

堆肥宏基因组柯斯质粒文库的构建和 DNA 提取技术的改进

庞浩^{1,2} 封毅¹ 唐纪良¹ 冯家勋^{1,2*}

(1. 广西大学生命科学与技术学院 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 广西 南宁 530005)

(2. 广西生物产业新技术重点实验室 广西 南宁 530004)

摘要: 堆肥环境中高浓度腐殖酸的存在阻碍了对这个环境中的未培养微生物的宏基因组研究。我们提出了一个确实可行的提取堆肥环境 DNA 的方法, 这个方法通过使用 Sephadex G200 + 酸洗 PVPP 层析柱与电洗脱两步纯化的方法成功地纯化堆肥环境来源的 DNA, 用提取的 DNA 成功构建了一个包含约 10 万个克隆的柯斯质粒文库。从这个文库中筛选到一个新的 β -葡萄糖苷酶基因。针对文库低的阳性筛选率问题, 利用分子技术研究了不同的分离速度对提取到的总 DNA 中真核生物 DNA 量的影响, 以减少文库中真核生物 DNA 的污染。

关键词: 堆肥, 宏基因组, DNA 提取纯化, 柯斯质粒文库

Construction of Cosmid Library of Metagenome Derived from Compost Sample and the Improvement of DNA Isolation Techniques

PANG Hao^{1,2} FENG Yi¹ TANG Ji-Liang¹ FENG Jia-Xun^{1,2*}

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresources Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China)

(2. Guangxi Key Laboratory of BioIndustry Technology, Nanning, Guangxi 530004, China)

Abstract: Abundant humic acid present in compost hinders the metagenomic study of uncultured microorganisms in compost environment. We developed an effective method for isolating metagenomic DNA from compost samples. By combinations of Sephadex G200 + acid washed PVPP column and electroelution techniques, this method was effective in purifying metagenomic DNA from compost samples. With the purified DNA, we succeeded in constructing a cosmid library containing about one hundred thousand clones. And a novel β -glucosidase gene was cloned and sequenced from this library. Targeting the problem of low frequency of positive clones in the library, we also studied the effects of different centrifugal speeds on the content of contaminated eukaryotic DNA in the isolated metagenomic DNA, in order to preclude the presence of eukaryotic DNA in metagenomic library.

Keywords: Compost, Metagenome, DNA isolation and purification, Cosmid library

自然界中 99%以上的微生物是未培养的,这些未培养的微生物蕴含了大量的基因资源^[1]。近年来兴起的宏基因组(Metagenome)技术利用分子生物学手段绕过微生物的培养而直接克隆环境中各种微生物的基因,为人类了解和利用环境中的大量微生物基因资源提供了平台^[2]。

宏基因组技术通过提取环境如土壤中所有微生物的DNA,并用于构建基因组文库来直接克隆和研究环境中各种微生物的基因。但是这个技术在应用上的一个巨大的障碍是土壤等环境中的其它化合物如腐殖酸会随DNA一起被提取出来,影响后续的各项DNA分子生物学的操作^[3,4],在宏基因组研究中视为污染物。因而寻求高效的去除DNA中污染物的方法是宏基因组研究的一个关键环节。堆肥是各种微生物共存的环境,蕴含丰富的微生物资源。但是堆肥环境的宏基因组研究远远滞后于土壤环境的研究。造成这个问题的主要原因是堆肥的腐殖酸含量比土壤高10~100倍^[5]。因此从堆肥中提取获得高纯度的宏基因组DNA成为目前研究的一个难点^[5-9]。此外,由于目前DNA文库的构建中所通用的克隆系统是大肠杆菌系统,真核生物的基因在这个系统中往往无法表达,因而在提取到的宏基因组中存在的真核生物DNA会影响到DNA文库的筛选效率。

本文提出了一个切实可行的提取堆肥环境DNA并构建DNA文库的方法。这个方法不但可以成功构建大片段的宏基因组文库,而且可以大大减少文库中真核生物DNA的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品:好氧堆肥的堆制是在一个自制的1 m×1 m×1.2 m的水泥槽中进行。在堆肥堆制的第4天,堆肥浅层(10 cm深度)温度达到57℃时取样。

1.1.2 主要试剂:文库构建试剂盒pWEB::TNC Cosmid Cloning Kit购自Epicentre公司;限制性内切酶等分子生物学酶试剂购自Promega公司;酸洗聚乙烯吡咯烷酮(PVPP, Polyvinyl Polypyrrolidone)按文献的方法自制^[10]。其它试剂购自上海生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 宏基因组DNA的提取与纯化:样品中微生物

的分级分离方法改进自Patrick的方法^[11]。取50 g样品加入100 mL磷酸钾缓冲液(100 mmol/L)(pH 7.2),用涡悬振荡器振荡1 min,置冰中冷却1 min,重复3次。混合液在600 g的转速中离心10 min。取上清入另一个离心管中,加入40 mL酸洗PVPP溶液(100 mg PVPP/mL磷酸钾缓冲液),涡悬30 s。加入200 μL 3 mol/L CaCl₂ 涡悬30 s,在600 g的转速中离心5 min。取上清液转入另一个离心管,在8000 g离心15 min。得到细胞沉淀块。沉淀块加入1 mL TE缓冲液悬浮,加入100 μL(50 mg/mL)溶菌酶在37℃作用30 min,然后按照细菌总DNA的提取方法提取总DNA^[12]。获得DNA粗提取物。

将DNA粗提物加到含有Sephadex G200和2%酸洗PVPP的层析柱(200 mm×10 mm)上,用TE缓冲液洗脱,按每组分1 mL分部收集洗脱液,每一组分加入100 μL的3 mol/L醋酸钠溶液(pH 6.8)及0.6 mL异丙醇沉淀DNA,沉淀块用70%乙醇清洗后,放置于室温晾干,把沉淀物溶于TE缓冲液,合并各个组份的DNA。经过PVPP柱分离的DNA经过进一步的电洗脱方法进行洗脱纯化^[12]。

1.2.2 总DNA的16S rRNA基因序列的扩增检测:使用文献报道的引物序列合成16S rRNA基因引物^[13],这个引物是原核生物16S rRNA基因的保守序列。引物序列为27F:5'-AGAGTTTGATCATGG CTCAG-3'和1492R:5'-TCAGGTTACCTTGTTACG ACTT-3'。扩增程序为:第一阶段96℃ 2 min 预变性;第二阶段94℃ 40 s, 69℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s, 共30个循环;第三阶段72℃ 10 min。

1.2.3 总DNA的ITS序列的扩增检测:使用文献报道的引物序列合成ITS序列引物^[14],这个引物是真核生物ITS序列上保守序列。引物序列为ITS1-F:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'和ITS4-R:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。扩增程序为:第一阶段96℃ 2 min 预变性;第二阶段94℃ 40 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共30个循环;第三阶段72℃ 10 min。

1.2.4 DNA文库构建:文库构建使用Epicentre公司pWEB::TNC Cosmid Cloning Kit试剂盒(方法参照其说明书)。取0.5 μg纯化的总DNA,补平DNA末端,然后在低熔点琼脂糖上进行电泳并回收大约40 kb大小的DNA。补平并回收的DNA与试剂盒中

的载体 pWEB::TNC 连接, 连接产物经包装蛋白包装后侵染宿主菌 EPI100 并涂布在含有氨苄青霉素的 LA 平板上。

1.2.5 文库筛选与基因克隆: 用平板影印法将文库影印到含 0.1% 七叶苷和 0.25% 柠檬酸高铁铵的 LA 平板(含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素)上, 将平板倒置于 37°C 培养 12 h~16 h 后, 菌落周围显黑色即为 β -葡萄糖苷酶阳性克隆^[15]。对显示阳性的克隆提取质粒, 质粒重新转化 EPI100 菌株, 再把转化产物转接种到上述的筛选平板上进行 β -葡萄糖苷酶活性的再验证。

对于验证的阳性克隆, 提取质粒进行基因亚克隆操作。用 *Bam*HI 酶切阳性质粒并与 pGEM-3zf(+) 载体连接, 从转化菌落中挑取表达 β -葡萄糖苷酶活性的克隆, 从中选取外源片段小于 3 kb 的质粒送交大连宝生物公司进行测序。

1.2.6 GenBank 索引号: *umbgl3A*(ABB51613)。

2 结果

2.1 堆肥宏基因组 DNA 的提取与纯化

通过琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行定量。使用 1.2.1 的分离提取方法, 1 g 堆肥样品获得约 0.6 μg 左右的粗提 DNA。再使用含 2% 酸洗 PVPP 的 Sephadex G200 凝胶柱纯化后, DNA 损失量不到 20%(1 g 堆肥样品得到纯化的 DNA 为约 0.5 μg)。并且从琼脂糖凝胶电泳检测发现, 这个方法很好地除去了 DNA 中的杂质, DNA 没有降解的现象。纯化后的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳后回收 30 kb~50 kb 的片段, 回收得率约为 50%。经过分级分离以及纯化的步骤, 获得了纯化的总 DNA, DNA 的纯度和大小可以满足柯斯文库构建的需要。

2.2 总 DNA 中 ITS 序列的检测

取上述纯化的宏基因组总 DNA 作模板, 进行 16S rRNA 基因和 ITS 序列的 PCR 扩增。从该总 DNA 中不但扩增出了 16S rRNA 基因序列, 也扩增出了大量的 ITS 序列。

2.3 不同分级分离速度对 DNA 中 16S rRNA 基因序列和 ITS 序列量的影响

在堆肥总 DNA 提取中, 我们使用 600 g 的离心力进行样品的微生物分级分离时, DNA 样品中有大量的真核生物的 DNA。为了研究不同的离心速度对总 DNA 中的真菌 DNA 多少的影响, 我们分别做了

用 800 g、1200 g、1600 g 重力离心力离心后的 DNA 的分离提取(图 1)。使用 800 g、1200 g、1600 g 这三个转速提取到的 DNA 的量有明显的差异, 800 g 和 1200 g 离心力提取的 DNA 的量基本差不多, 而离心速度达到 1600 g 时 DNA 的量显著减少, 这个转速下提取到的 DNA 的量只为 800 g 和 1200 g 离心力下的 1/10。

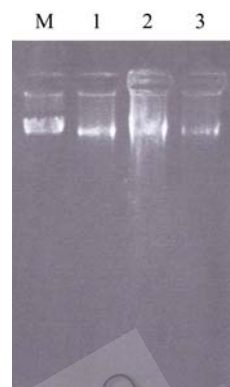


图 1 不同转速条件下提取得到的宏基因组 DNA

Fig. 1 The metagenomic DNA isolated when different centrifugal speed was used

M: λ DNA; 1-3: 分别是在 800 g、1200 g、1600 g 离心力下提取的 DNA。

M: λ DNA; 1-3: The metagenomic DNA isolated at 800 g, 1200 g and 1600 g condition.

用 800 g、1200 g、1600 g 不同转速的方法提取的总 DNA, 使用同样的模板量进行 ITS 序列的 PCR 扩增(图 2A)。在同样的模板用量和 PCR 条件下, 使用不同离心力提取得到的 DNA 扩增得到的 ITS 序列的 DNA 量是不同的。1600 g 这个转速条件下得到的 ITS 序列的 DNA 量最少。而在同样的模板量下, 16S rRNA 基因序列的条带是一样的(图 2B), 说明 ITS 序列扩增的差异是由于宏基因组中真核生物的 DNA 量的减少造成的, 而不是抑制物等其它条件造成的差异。

2.4 DNA 文库构建与文库质量检测

使用 600 g 离心力分离和提取堆肥宏基因组 DNA, 经过纯化的 DNA 进行柯斯质粒文库的构建, 一次连接的包装产物中产生了将近 10 万个克隆。从文库中随机挑 14 个克隆, 提取质粒 DNA, 并用 *Bam*HI 酶切, 14 个质粒均释放了一条大小为 5.8 kb 的条带, 这个条带的大小和文库质粒载体的大小吻合(图 3)。14 个质粒经过酶切后所释放的外源片段大小各不相同, 说明这 14 个质粒都是不同的, 这个

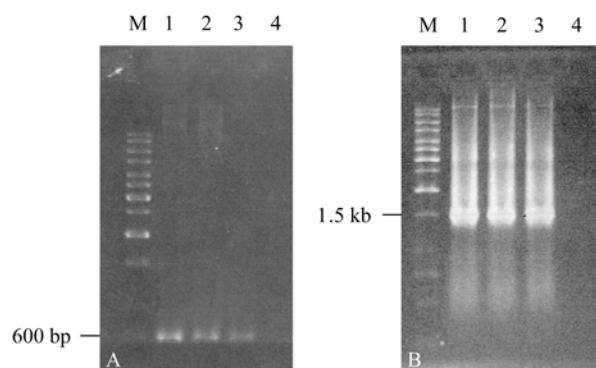


图2 不同离心力提取的DNA中的ITS序列和16S rRNA基因序列扩增产物

Fig. 2 16S rRNA gene sequence and ITS sequence amplified from DNA isolated at different centrifugal speed

A: ITS 序列的扩增产物. M: DNA 分子量标记; 1-3:分别是在 800 g、1200 g、1600 g 离心力下提取的 DNA 所扩增的 ITS 序列; 4: 水作模板的 PCR 对照. B: 16S rRNA 基因序列的扩增产物. M: DNA 分子量标记; 1-3:分别是在 800 g、1200 g、1600 g 离心力下提取的 DNA 所扩增的 16S rRNA 基因序列; 4: 水作模板的 PCR 对照.

A: PCR products of ITS sequence. M: DNA marker; 1-3: ITS sequence amplified from DNA isolated in 800 g, 1200 g, 1600 g centrifugal speed; 4: PCR control with water as template. B: PCR products of 16S rRNA gene sequence. M: DNA marker; 1-3: 16S rRNA gene sequence amplified from DNA isolated at 800 g, 1200 g, 1600 g centrifugal speed; 4: PCR control with water as template.



图3 宏基因组柯斯质粒文库克隆的质粒DNA的酶切分析

Fig. 3 Restriction analysis of plasmid DNA isolated from clones of metagenomic cosmid library

M1: 1 kb ladder DNA 分子量标记; M2: λ EcoRI 分子量标记; 1-14: BamH I 酶切的重组质粒.

M1: 1 kb ladder DNA marker; M2: λ EcoRI marker; 1-14: Recombinant plasmids digested with BamH I.

宏基因组文库具有很好的随机性。

2.5 文库中一个新的β-葡萄糖苷酶基因的克隆

我们通过筛选文库表达β-葡萄糖苷酶活性的克隆来检测文库是否能用来有效克隆基因。结果从文库中筛选得到一个表达β-葡萄糖苷酶活性的克隆,提取质粒并对其中的基因作了亚克隆。最后发现在一个2.8 kb的DNA片段上有一个2559 bp的ORF。

我们把这个ORF命名为*umbgl3A*,序列已上传到GenBank(登录号:ABB51613)。*umbgl3A*的核苷酸序列在GenBank数据库中和来自*Caulobacter crescentus* CB15的一段DNA序列(AE005673)有74%的同源性(gap为9%)。而*umbgl3A*编码的蛋白质和来自*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain 306的β-葡萄糖苷酶(CAP51849)具有最高的相似性(一致性为57%,相似性为74%)。

3 讨论

从土壤和堆肥等环境提取的总DNA溶液富含腐殖酸,DNA由于腐殖酸的破坏作用而发生降解。我们实验室的经验证明,粗提得到的含有腐殖酸的总DNA,一般在极短时间内(几个小时)就会发生降解。而且腐殖酸抑制Taq DNA聚合酶的活性,10 ng的腐殖酸就可以完全抑制PCR反应^[16]。腐殖酸还抑制溶菌酶和限制性内切酶的活性、DNA杂交及感受态的转化等^[17-19]。

我们提出的堆肥DNA提取方法是使用Sephadex G200+酸洗PVPP层析柱与电洗脱两步纯化的方法。采用Sephadex G200层析柱可以快速的分离DNA和腐殖酸,而加入层析柱的酸洗PVPP可大量吸附腐殖酸,从而避免腐殖酸对DNA的破坏作用。粗提DNA经过层析柱的分离,得到的洗脱DNA中的腐殖酸含量很少,DNA可以被限制性内切酶部分酶切。粗提DNA经过层析柱分离纯化后,再使用电洗脱法进行二次纯化,得到的纯化DNA纯度很高,纯化DNA可以被限制性内切酶完全酶切,可以进行连接和随后的转化反应。相对于已报道的堆肥宏基因组DNA提取方法^[7-9],这个方法更重要的是得到的DNA在操作过程中被物理打断的几率相对较少,得到的DNA分子量很大,适合于柯斯质粒文库等大插入片段文库的构建。构建的大片段插入文库是宏基因组文库筛选基因的关键,只有获得尽可能大的文库容量,才能保证基因筛选的效率和可靠性^[3]。

在所构建的堆肥宏基因组文库中,只筛选到了一个葡萄糖苷酶基因,这样的阳性克隆比率是很低的。通过对构建文库所用的宏基因组DNA进行真核生物ITS序列PCR扩增,我们发现在这个提取的DNA中有很多的真核生物的DNA。混杂在提取的宏基因组总DNA中的真核生物的DNA在DNA文库中不能被转录、翻译成活性蛋白质,而且这个冗

余的 DNA 和原核生物 DNA 混杂在文库中还会造成文库筛选的困难。使用差速离心的方法可以把样品中真核生物分离下来,而保留原核生物。这样提取得到的宏基因组 DNA 中真核生物的 DNA 大大减少。而 Courtois 等人的实验证明,差速离心法把真核生物的 DNA 从宏基因组 DNA 中分离出去,但它不造成宏基因组中细菌的区系组成的改变^[20]。在我们的实验中发现,使用不同的转速来分离细胞会得到不同的真核 DNA:原核 DNA 的比例。使用 600 g 离心力,宏基因组 DNA 中残留大量的真核生物的 DNA。转速提高, DNA 中的真核生物 DNA 量减少,说明转速的提高可以大大改善宏基因组 DNA 中的真核 DNA 污染的问题。但是如果转速提高到 1600 g,宏基因组 DNA 的得率就大大下降,总 DNA 量的减少会增加文库构建的难度。综合考虑 DNA 得率和消除真核生物 DNA 的影响两方面,我们建议使用 1200 g 的离心力对堆肥样品进行差速离心后提取 DNA,可以进一步提高文库构建和筛选的效率。

在本文中,我们提供了一个有效的提取和纯化堆肥宏基因组 DNA 的方法,利用这个方法提取纯化的 DNA 可以构建成功堆肥环境的宏基因组文库。我们还利用分子技术研究了不同的分离速度对提取到的总 DNA 中含真核生物 DNA 量的影响。

参 考 文 献

- [1] Rappe MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol*, 2003, **57**: 369–394.
- [2] Daniel R. The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, **15**(3): 199–204.
- [3] Berry AE, Chiochini C, Selby T, *et al.* Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **223**(1): 15–20.
- [4] Rondon MR, August PR, Bettermann AD, *et al.* Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (6): 2541–2547.
- [5] Dees PM, Ghiorse WC. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **35**(2): 207–216.
- [6] LaMontagne MG, Michel FC, Jr. Holden PA, *et al.* Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *J Microbiol Methods*, 2002, **49**(3): 255–264.
- [7] Howeler M, Ghiorse WC, Walker LP. A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost. *J Microbiol Methods*, 2003, **54**(1): 37–45.
- [8] Yang Z, Xiao Y, Zeng G, *et al.* Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost. *Applied Microbiol and Biotech*, 2007, **74**(4): 918–925.
- [9] 何丽鸿, 赵 勇, 陈明杰, 等. 堆肥中微生物总 DNA 的高效提取. *微生物学报*, 2006, **46**(1): 162–165.
- [10] Holben WE, Jansson JK, Chelm BK, *et al.* DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(3): 703–711.
- [11] Patrick W, Joey W, Alison R, *et al.* A rapid, cost-effective procedure for the extraction of microbial DNA from soil. *World J Microbiol Biotech*, 2003, **19**: 85–81.
- [12] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, *et al.* The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 1988, **71**(2): 491–499.
- [14] Leclerc MC, Barriel V, Lecointre G, *et al.* Low divergence in rDNA ITS sequences among five species of *Fucus* (*Phaeophyceae*) suggests a very recent radiation. *Journal of Mol Evolution*, 1998, **46**(1): 115–120.
- [15] Kwon KS, Lee J, Kang HG, *et al.* Detection of beta-glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(12): 4584–4586.
- [16] Young CC, Burghoff RL, Keim LG, *et al.* Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(6): 1972–1974.
- [17] Henne A, Daniel R, Schmitz RA, *et al.* Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(9): 3901–3907.
- [18] Picard C, Ponsonnet C, Paget E, *et al.* Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(9): 2717–2722.
- [19] Henne A, Schmitz RA, Bomeke M, *et al.* Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(7): 3113–3116.
- [20] Courtois S, Frostegard A, Goransson P, *et al.* Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ Microbiol*, 2001, **3**(7): 431–439.