

# 用指纹图谱评价环境样本 DNA 的提取效果

田扬捷 杨虹\* 李道棠 虞茜

(上海交通大学生命科学与技术学院 上海 200240)

**摘要:** 研究了 DNA 指纹图谱技术在评价环境样本 DNA 提取效果方面的应用。采用 3 种 DNA 提取方法提取垃圾渗滤水和活性污泥中的微生物 DNA, 并用 ARDRA 和 RISA 图谱加以评价。实验结果表明, RISA 图谱分析法可以作为评估 DNA 提取效果的有效手段。

**关键词:** DNA 提取, 微生物多样性, 16S rDNA, ARDRA, RISA

**中图分类号:** Q938.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0032-04

## EVALUATION ON DNA EXTRACTION OF ENVIRONMENTAL SAMPLES BY DNA FINGERPRINTS

TIAN Yang-Jie YANG Hong LI Dao-Tang YU Qian

(School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

**Abstract:** In this paper the application of DNA fingerprints to evaluate the efficiency of DNA extraction was studied. DNA mixtures of landfill leachate and active sludge were extracted using three different methods and the DNA extraction was evaluated by ARDRA and RISA fingerprints. The results showed that RISA is a effective way to evaluate DNA extraction.

**Key words:** DNA extraction, Microbial diversity, 16S rDNA, ARDRA, RISA

长期生活在环境中的微生物与污染物直接接触, 可以反映多种污染因子的综合效应和所处的生境<sup>[1]</sup>, 但绝大多数环境微生物不能用传统技术进行培养和分离。

近 10 多年来发展的基于 rDNA 同源性分析的分子方法, 直接从复杂的环境样本中提取微生物总 DNA 进行分析, 可以比较客观地反映微生物多样性及种群动态变化。

rDNA 同源性分析主要基于环境 DNA 的扩增, 能否获得代表性的 DNA 影响着后继

国家自然科学基金资助项目 (No. 50278053)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 50278053)

\*联系人

收稿日期: 2002-07-31, 修回日期: 2002-09-25

分析的准确性。因此 DNA 的提取通常是最重要的一步,应尽可能多地将样本中不同种类的微生物 DNA 都提取出来。目前国内外发展的多种 DNA 提取方法还没有形成统一的标准,同样的环境样本用不同的方法所提取的 DNA 差异会对后继的各种基于 DNA 的分析结果产生影响<sup>[2]</sup>。因此,为环境样本确定最合适的 DNA 提取方法是十分重要的。

对提取出的 DNA 进行扩增核糖体 DNA 限制性酶切分析 (amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) 和核糖体基因间区序列分析 (ribosomal intergenic spacer analysis, RISA) 可形成一系列的条带组成的图谱。从环境样本提取的 DNA 中包含的微生物越多,则 ARDRA 或 RISA 图谱的电泳条带在一定程度上也应当越多。所以可以从条带的多少来推测微生物 DNA 提取的充分程度。

本文选用两种环境样本——垃圾渗滤水和活性污泥,用 3 种方法提取 DNA,并用 ARDRA 和 RISA 两种指纹图谱法分析评估了 DNA 提取的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样本:垃圾渗滤水和活性污泥,取自上海老港垃圾填埋场和上海闵行污水处理厂二沉池。

1.1.2 引物:16S rDNA 引物<sup>[2]</sup>: 27<sub>f</sub> (5' -AGA GTT TGA TCM TCG CTC AG-3') 和 1492<sub>r</sub> (5' -TAC CCH TAC CTT GTT ACG ACT T-3')。16S - 23S ITS 引物<sup>[3]</sup>: 1406<sub>f</sub>: 5' -TG (C/T) ACA CAC CGC CCG T-3' (位于 16S rDNA) 和 23S<sub>r</sub>: 5' -GGG TT (G/C/T) CCC CAT TC (A/G) G-3' (位于 23S rDNA)。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取方法:根据参考文献 [4~6],比较了 3 种 DNA 提取方法,依照其细胞裂解原理简称为酶溶法、化学法和 Bead-Beating 法 (使用 Mini Bead-beater, Biospec 公司, UK)。

1.2.2 PCR 扩增方法:在 Gene Amp PCR System 2400 型扩增仪 (Applied Biosystems 公司, USA) 上特异性扩增 DNA 片段。采用 50 $\mu$ L PCR 体系,含 2mmol/L Mg<sup>2+</sup>、200 $\mu$ mol/L dNTPs (each)、0.2 $\mu$ mol/L 引物 (each)、2 $\mu$ L 模板 DNA、2.5U Taq 酶。酶的投加采用热启动方式即 94 $^{\circ}$ C 变性 3min 后于 80 $^{\circ}$ C 加 Taq 酶。循环采用 TD PCR 方式,具体循环条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 63 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min; 此后每循环退火温度降低 0.5 $^{\circ}$ C; 第 12 个循环退火温度为 57 $^{\circ}$ C, 从第 13 个循环至第 35 个循环退火温度保持 57 $^{\circ}$ C; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

1.2.3 胶回收和纯化:用试剂盒 (3S DNA Gel Purification Kit, 上海博彩生物公司) 进行 DNA 条带回收和纯化,方法根据说明书。

1.2.4 酶切反应:酶切体系为 25 $\mu$ L, 含纯化 DNA 20 $\mu$ L, 10U 限制性内切酶。反应 2h 后每个体系加 0.5 $\mu$ L 0.5mol/L EDTA 终止反应。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 提取

每种方法每次实验均有两个平行样,从相同湿重的环境样本中提取出的 DNA 溶于

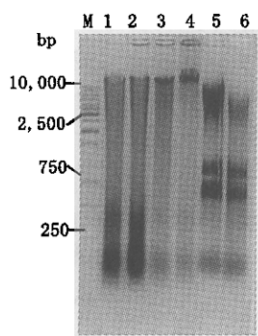


图1 从垃圾渗滤水提取的 DNA 电泳图

M GeneRuler™1kb DNA Ladder, 1, 2 酶溶法, 3, 4 化学法, 5, 6 Bead-Beating 法

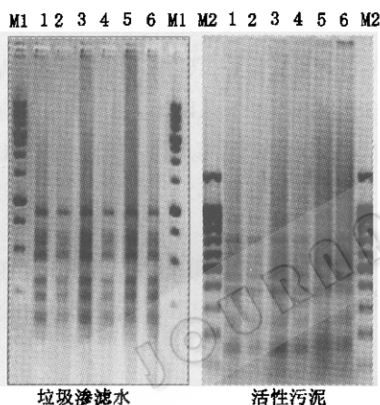


图2 *Msp* I 酶 ARDRA 分析电泳图

M1 GeneRuler™1kb DNA Ladder, M2 SE perfect 100bp + 1.5kb DNA ladder, 1, 2 酶溶法, 3, 4 化学法, 5, 6 Bead-Beating 法, 1, 3, 5 稀释 10 倍模板 DNA 的 PCR 产物酶切结果, 2, 4, 6 稀释 100 倍模板 DNA 的 PCR 产物酶切结果

灭菌超纯水 (ddH<sub>2</sub>O) 中, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳 (使用 SUB-Cell GT 电泳仪, BIO-RAD 公司, USA), 8V/cm, 60min。溴化乙锭 (EtBr) 染色, 紫外成像得到电泳图 (见图 1, 活性污泥图略)。

## 2.2 16S rDNA 的 PCR 扩增和 ARDRA 分析

对 3 种方法所提取的 DNA 进行 16S rDNA PCR 扩增, PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳 (8V/cm) 分离, 溴化乙锭 (EtBr) 染色, 对 16S rDNA 条带进行胶回收和纯化, 然后分别用限制性内切酶 *Hha* I 和 *Msp* I 进行酶切反应。在 1.7% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 8V/cm, 时间 1h, 结果如图 2 所示 (*Hha* I 酶切结果略)。

可以看出对于同种环境样品, 不同方法产生的 ARDRA 指纹图很类似, 具有相同的条带分布, 主要区别在于整体泳道的强弱, 但条带分布完全相同。

相同样品一致的指纹图结果表明对本文研究的两种样品,

ARDRA 分析结果不能说明 3 种不同方法的优劣。

## 2.3 RISA 分析与讨论

为了进一步评估 DNA 提取方法可能存在的差异, 对提取的 DNA 进行了 RISA 分析。PCR 扩增产物在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳 5 ~ 6h, 8mA, 结果如图 3, 图 4。

3 种方法的 RISA 指纹图既有相似, 也有差别。对于垃圾渗滤水 (见图 3), 这种差别主要体现在非优势条带。优势条带分布在 1, 200bp、1, 000bp、690bp、630bp、520bp、500bp 和 420bp, 除 Bead-Beating 法的 420bp 较弱外, 其它条带基本相同。但它们之间的非优势条带却有差别。如 5 泳道的条带 1 在 1、2 泳道并不存在, 而条带 2、3、4 也只存在于 5 泳道, 条带 5 也仅存在于 2 泳道。

对于活性污泥 (见图 4), 指纹图的差别则更为明显, 在各方法的优势条带之间也存在明显差异, 如化学法和 Bead-Beating 法条带中都存在的条带 1 却不存在于酶溶法, 而 6 泳道的条带 2、3、4

也比其它泳道明显。每个泳道优势条带之间的相对强弱也有差别, 如条带 5、6 在酶法和化学法很强, 但 Bead-Beating 法却忽然弱了许多。

RISA 指纹图差异说明对于同种样品不同方法提取的 DNA 是有差别的, 而评价 DNA 提取优劣的标准在于: 得到的 DNA 所代表的微生物种类占样本中全部微生物种类的比例越高, 说明对样本中微生物多样性的反映越真实, 效果也就越好。

在垃圾渗滤水的 RISA 指纹图谱中, Bead-Beating 法得到了最多的条带, 反映了 Bead-Beating 法提取出的 DNA 包含最多的微生物种类, 最能够代表垃圾渗滤水中的微生物

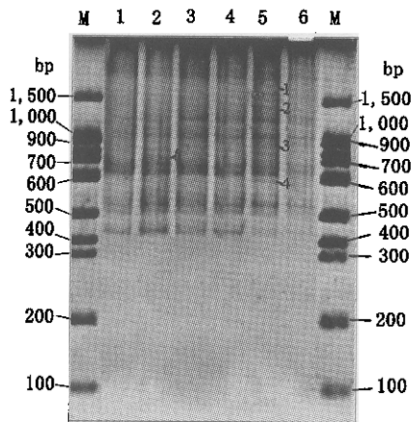


图 3 垃圾渗滤水 RISA 分析电泳图

M SE perfect 100bp + 1.5kb DNA ladder,

1, 2 酶溶法, 3, 4 化学法,

5, 6 Bead-Beating 法,

1, 3, 5 稀释 10 倍模板 DNA 的 PCR 产物,

2, 4, 6 稀释 100 倍模板 DNA 的 PCR 产物

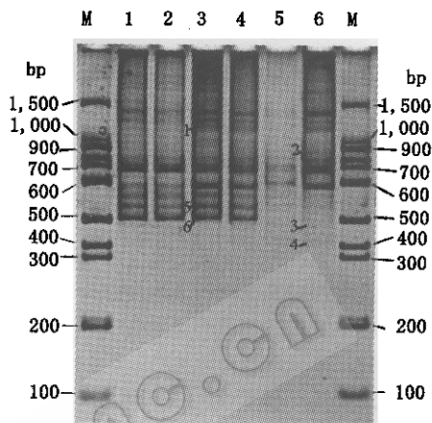


图 4 活性污泥 RISA 分析电泳图

M SE perfect 100bp + 1.5kb DNA ladder,

1, 2 酶溶法, 3, 4 化学法,

5, 6 Bead-Beating 法,

1, 3, 5 稀释 10 倍模板 DNA 的 PCR 产物,

2, 4, 6 稀释 100 倍模板 DNA 的 PCR 产物

物多样性, 说明 Bead-Beating 法是最适合垃圾渗滤水的 DNA 提取方法。同理, 对于活性污泥, 化学法得到了最多的条带, 因此化学法是最适合于活性污泥样本的方法。

本研究结果显示 RISA 图谱分析法可以用来快速地评估 DNA 提取方法的效果。同时也发现, 对于不同的环境样本, 最适合的 DNA 提取方法是不同的, 需要实验确定。

## 参考文献

- [1] 李江平, 李 雯. 云南环境科学, 2001, 20 (1): 51 ~ 54.
- [2] Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67 (5): 2354 ~ 2359.
- [3] Fisher M M, Triplett E W. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (10): 4630 ~ 4636.
- [4] Kowalchuk G A, Bodelier P L E, Heilig G H J, *et al.* FEMS Microbiology Ecology, 1998, 339 ~ 350.
- [5] Zhou J, Bruns M A, Tiedje M. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62 (2): 316 ~ 322.
- [6] 凯勒 G H, 马纳克 M M. DNA 探针技术. 北京: 科学出版 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>