

研究报告

从土壤中提取 DNA 用于 PCR 扩增*

杜涛¹ 黄小毛^{1,2} 侯明生² 林木兰¹ 周宁一^{1*}(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)¹ (华中农业大学植物科技学院 武汉 430070)²

摘要: 设计、比较了5种直接从土壤中提取DNA的方法。实验结果表明这5种方法都可以从土壤中提取到长度大于15kb的DNA片段,但在不同方法间DNA的产量存在很大差异;初提的土壤DNA经进一步提纯后均可用于PCR反应,利用细菌16S rRNA基因和抗菌肽Shiva-1基因的引物都得到了相应的目的产物。其中方法5提取DNA产量最高,无明显降解,且重复性好,是一种从小量土壤样品中直接提取DNA的理想方法。

关键词: 土壤, DNA, 提取方法, PCR

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0001-05

EXTRACTION OF DNA FROM SOIL FOR PCR AMPLIFICATION

DU Tao¹ HUANG Xiao-Mao^{1,2} HOU Ming-Sheng² LIN Mu-Lan¹ ZHOU Ning-Yi^{1*}(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430071)¹(College of Plant Sciences and Technology, Huazhong University of Agriculture, Wuahn 430070)²

Abstract: In this paper, five different methods were carried out for DNA extraction directly from soil. The result shows that all five methods could generate DNA with more than 15 kb in size. They were subsequently used as templates for PCR amplification with success, using primers of the bacterial 16S rRNA gene and Shiva-1 gene encoding an antibacterial peptide. However, method 5 is more suitable for DNA extraction directly from a small amount of soil sample as it produced a good yield of DNA in high integrity with reliable reproducibility.

Key words: Soil, DNA, Extraction, PCR

土壤是生态系统中进行物质循环和能量转化的重要场所,土壤微生物则是这两个功能的主要完成者。由于土壤微生物中仅0.2%左右的种类能够培养,若以培养技术为基础来研究土壤微生物生态就会丧失较多信息^[1]。分子生物学技术的引入,使研究土壤微生物生态降低了对培养技术的依赖性,而提取土壤DNA则成为开展土壤微生物分子生态学工作的前提。土壤成分复杂,含有大量的无机及有机化合物,存在着对某些酶反应的抑制剂,如腐殖酸、重金属离子等都会干扰提取反应的进行。且各种土壤类型组成不一,这些都为从土壤中有效提取高质量的DNA带来了困难。

Cecropins 是一类具有广谱抗菌活性的小分子多肽^[2],它的杀菌机理为在细菌细胞膜上形成小孔使膜破坏,改变细菌渗透压导致其死亡^[3]。Cecropins 及其衍生物如 Shiva-1 等由于良好的抗菌活性而被广泛应用于植物抗细菌基因工程,迄今已有烟草、水稻、

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 3017074)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30170746)

* 联系人 E-mail: zhouningyi2002@yahoo.com

收稿日期: 2003-01-07, 修回日期: 2003-04-23

樱桃、葡萄、辣椒、番茄、马铃薯、大白菜、泡桐等多种作物获得了转 *Cecropins* 家族基因的植株^[4]。由于 *Cecropins* 的广谱抗菌能力, 评估转 *Cecropins* 家族基因植物的外源基因在土壤中的扩散和分布以及基因产物对土壤微生物生态的影响非常必要。

我们在前人工作的基础上, 设计了5种不同的从小量土壤中直接提取DNA的方法, 通过比较实验, 以期建立一种高效、简便的土壤DNA提取方法, 为在分子生物学水平上研究转 *Cecropins* 基因植物中的外源基因在土壤中的扩散及对土壤微生物生态的影响提供基础, 同时为从事土壤微生物分子生态学的同行作一参考和借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤标本 1: 取自温室苗圃, 组成按壤土: 植源性有机肥: 细沙 = 17:2:1 的比例混合而成, pH 5.8; 实验前将样本用研钵磨碎, 备用。

1.1.2 土壤标本 2: 为含 *Shiva-1* 基因 (质粒 p438PRSI) 农杆菌的温室土壤: 取 16mL 含 *Shiva-1* 基因的农杆菌 LBA4404 于含卡那霉素 100mg/L、硫酸链霉素 50mg/L LB 培养过夜离心收集菌体, 蒸馏水重悬后, 与取自温室苗圃的 960g 土壤拌匀, 自然风干, 实验前将样本用研钵磨碎, 备用。

1.2 土壤 DNA 提取方法

1.2.1 初提纯方法步骤: 方法 I 参照 Kuske 等报道的方法上修订而成^[5]。将 1g 土壤样品加入 2 mL TENS (50mmol/L Tris [pH8.0]; 20mmol/L disodium EDTA; 100mmol/L NaCl; 1% SDS) 混合 70℃水浴 1h (间或摇动), 台式离心机 4,000g 离心 10min, 保留上清, 沉淀用 TEN (50mmol/L Tris [pH8.0]; 20 mmol/L disodium EDTA; 100mmol/L NaCl) 洗 1 次, 10,000g 离心 10min, 沉淀溶于 1.5mL TEN, 混合物分别置于 -20℃冰浴、65℃水浴, 循环 3 次, 10,000g 离心 10min 取上清, 并合并保留的上清, 用等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇 = 25:24:1 混合物提两次, 取水相加等体积异丙醇沉淀, 10,000g 离心 10min, 保留沉淀, 用双蒸水溶解。方法 II 在 Edgcomb 等报道的方法^[6]上进行了改进, 将 1g 土壤样品加入 2 mL PBS (0.12mol/L 磷酸钠缓冲液 pH 8.0), 置于 30℃摇床 150r/min 振荡 15 min, 4,000g 离心 10 min, 沉淀重复上述过程 1 次, 取沉淀加入溶液 1 (0.15mol/L NaCl, 0.1mol/L EDTA) 1.5 mL、50mg/mL 的溶菌酶溶液 0.5 mL, 37℃水浴 1.5h 后分别加入 5 mol/L NaCl 270 μ L、溶于 0.7mol/L NaCl 的 5 mol/L CTAB (溴化十六烷基三甲基铵) 270 μ L, 水浴后加入溶液 2 (0.1mol/L NaCl, 0.5mol/L Tris, 10% SDS) 2 mL 于 65℃水浴 10 min, 将样品转移至 -20℃冰浴、65℃水浴循环 3 次, 10,000g 离心 10 min, 取上清, 用等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇 = 25:24:1 混合物提两次, 水相加等体积异丙醇沉淀, 10,000g 离心 10min, 获得的沉淀用双蒸水溶解。方法 III 按照 Eichner 等报道的方法^[7]进行如下调整。将 1g 土壤加 PBS (0.12 mol/L 磷酸钠缓冲液 [pH8.0]) 1 mL、溶菌酶 0.5 mL、蛋白酶 K 20 μ L, 37℃水浴 2h, 加溶液 1 (5 mol/L NaCl, 10% CTAB) 100 μ L, 65℃水浴 10 min, 10,000g 离心 15 min 去沉淀, 用等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1 混合物提两次, 水相加等体积异丙醇沉淀, 10,000g 离心 10 min, 获得的沉淀双蒸水溶解。方法 IV 参照 Lee 等报道的方法^[8]进行。将 1g 土壤样品加入 2 mL PBS (0.12 mol/L 磷酸钠缓冲液 [pH8.0]), 置于 30℃摇床 150r/min 振荡 15 min, 40,000g 离心 10 min, 沉淀重复上述过程 1 次后, 加入溶液 1 (0.15 mol/L NaCl, 0.1 mol/L EDTA) 1.5 mL、50mg/mL 溶菌

酶 0.5 mL, 37 °C 水浴 2h (间或摇动), 加入溶液 2 (0.1 mol/L NaCl, 0.5 mol/L EDTA, 10% SDS) 2 mL, -20 °C 冰浴、65 °C 水浴循环 3 次, 10,000g 离心 15 min, 保留上清, 加入 5 mol/L NaCl 270 μ L, 10% CTAB 270 μ L, 65 °C 水浴 10 min, 用等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1 混合物提取, 10,000g 离心 10 min; 保留水相, 加等体积溶于 5 mol/L NaCl 的 13% PEG8000, 置冰上 2h, 用等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1 混合物提取两次, 水相加等体积异丙醇沉淀, 10,000g 离心 10min, 获得的沉淀用双蒸水溶解。方法 V 参照 Tsai 等报道的方法^[9]进行, 将 1g 土壤加 2 mL PBS (0.12 mol/L 磷酸钠缓冲液 pH 8.0), 置于 30 °C 摇床 150r/min 振荡 15 min, 10,000g 离心 15 min, 重复 1 次, 取沉淀加溶解液 1 (0.15 mol/L NaCl, 0.1 mol/L EDTA) 1.5 mL、50mg/ mL 溶菌酶 0.5mL, 37 °C 水浴 2h 后, 加溶解液 2 (0.1 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Tris, 10% SDS) 2 mL, -20 °C 冰浴、65 °C 水浴循环 3 次, 10,000g 离心 15 min, 取上清与等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1 混合物抽提两次, 异丙醇沉淀, 双蒸水溶解。

1.2.2 DNA 纯化: 采用新芝胶回收试剂盒, 操作步骤与说明书略有差异: 将待纯化的粗提 DNA 溶液用 50 × TAE 调整到 1 × TAE, 加入两倍体积的溶液 1, 70 °C 温浴, 加入纯化柱内, 离心, 0.5 mL 75% 酒精离心清洗两次, 加入 50 μ L 双蒸水, 7,500g 离心 30s, 10,000g 离心 2min, 加入 50 μ L 双蒸水重复上述离心过程。以得到的 DNA 溶液为出发物, 按上述步骤重复 1 次。

1.3 土壤 DNA 纯度检测及有关基因的 PCR 检测

为了检测提取的土壤 DNA 纯度, 以各方法提取土壤样本 1 的纯化 DNA 为模板, 细菌 16S rRNA 基因的通用引物进行扩增, 5' 端引物为: 5'—AGAGTTTGA TCMTGGCT CAG—3', 3' 端: 5'—TACGGYTACCTTGTTACGACTT—3', 循环条件为 94 °C 1min, 52 °C 1min, 72 °C 1.5min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5min。为检测各种方法提取的 DNA 能否扩增出 shiv-1 基因, 根据编码信号肽的 DNA 片段与抗菌肽 shiva-1 基因的序列, 设计一对 PCR 引物: 5' 端: 5'—CCGGGG ATCCTCTAGA—3'; 3' 端: 5'—GCTAGC GAATTCT-CAACC—3', PCR 反应体系为 50 μ L, 模板 1 μ L; PCR 循环条件: 94 °C 5min, 52 °C 2min, 72 °C 1min, 1 个循环; 94 °C 1min, 52 °C 1min, 72 °C 1min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5min。

PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统记录电泳结果。

2 结果与分析

2.1 土壤 DNA 的提取及纯化

上述 5 种提取方法均能获得土壤微生物的 DNA, 且所得到的 DNA 片段都在 15kb 以上, 无明显的降解。但 5 种提取方法所获得的 DNA 产量差别大。方法 5 提取量最大, 方法 1、2 次之, 方法 3、4 产量非常低。在粗提取产物中, DNA 含量与提取物黄褐色的程度成正比关系: 黄褐色越深, DNA 含量越高。同时, 在 DNA 提取产量高的 1、5 两种方法中, 均不含化学裂解剂 CTAB。土壤样本 1 不同提取方法产物 0.7% 琼脂糖电泳结果见图 1 (纯化后)。DNA 片段越大, 对纯化柱的结合能力越强。本文中各方法所获得的 DNA 片段都在 15kb 以上, 纯化过程中的损失并不明显 (纯化前电泳图未显示)。

2.2 土壤 DNA 中 16S rRNA 基因和 Shiva-1 基因的 PCR 检测

提取土壤 DNA 的一个很重要的目的就能够用于 PCR。土壤中存在大量的 PCR 反应抑制剂如腐殖酸、腐殖酸类似物, 重金属离子等等, 以本实验中所使用的 5 种方法的

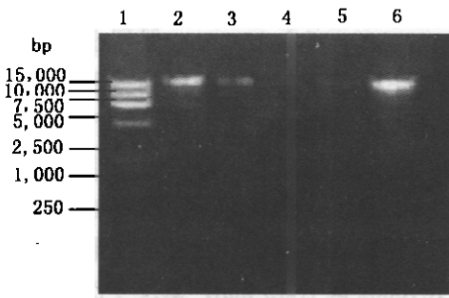


图1 5种方法提取的DNA电泳结果

1 分子量标记, 2~6 方法1~5所提取的DNA

DNA粗提物为模板的PCR反应均未能扩增出产物。而经一次过柱纯化的DNA仅有部分能够进行PCR反应,但结果不够稳定;5种方法的DNA粗提物通过两次过柱纯化后却都能够进行PCR扩增。采用细菌16S rRNA基因的通用引物进行扩增目的带为1.5 kb,结果见图2。Shiva-1基因引物在250bp处扩增出目的带(见图3)。表明采用该种纯化方法提取出来的DNA能够用于监测细菌的种类及其变化,也能用作研究shiva-1基因在土壤中的分布情况。

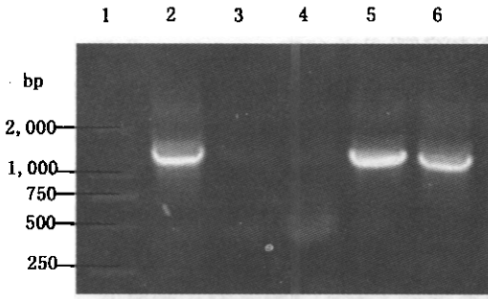


图2 5种方法提取土壤

16S rRNA基因PCR检测

1 分子量标记, 2~6 方法1~5所提取土壤DNA的16SrRNA基因PCR结果

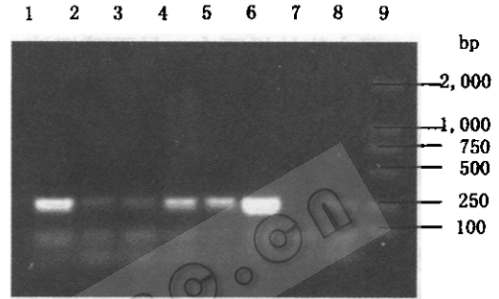


图3 5种方法提取土壤DNA

Shiva-1基因PCR检测

1~5 方法1~5提取土壤DNA的Shiva-1基因PCR结果, 6 质粒p439PRSI阳性对照, 7 阴性对照, 8 杆菌LBA4404阳性对照, 9 分子量标记

3 结论与讨论

本文所参考的5种土壤提取方法原文由于DNA提取目的有差异,对单位质量土壤样品DNA提取量,以及提取纯度要求都不一样。我们对5种方法进行了修改并验证以期能够从有机成分含量较高的土样中提取高质量的DNA。评价一种土壤DNA提取方法是否有效,一般考虑以下几个方面:DNA未发生降解且所提取的片段是比较完整;能够去除土壤中大量存在的影响后续实验的物质,如腐殖酸、腐殖酸似物,酚类化合物,重金属离子等等;能在单位样本量中比较彻底的提取出微生物DNA;提取方法应具广谱性,对土壤中绝大多数微生物能够有效,提取方法无很大的偏差^[4,10]。方法5提取的土壤DNA片段达到15kb以上,供试土壤1g样品能够提取20μg以上的DNA,纯化后的DNA可以用于PCR扩增,方法5综合利用了酶学、化学、物理这3种裂解方式,对微生物的提取应有很强的通用性,在后续实验中我们将用DGGE(变性梯度电泳)对其通用性进行验证,该方法具有很好的重复性。方法5可以满足大多数微生物分子生物学实验的工作需要,是一种比较好的少量土壤DNA提取方法。

在样品DNA的粗提阶段,DNA的释放程度与提取混合物颜色深度成正比关系:方法5粗提物的颜色最深,DNA量大;方法3、4提取液颜色浅,DNA量少。同时作为主要酶类抑制剂的腐殖酸含量与溶液颜色深浅成正比。方法3、4经过一次过柱纯化后可

以直接进行 PCR 扩增。CTAB 在土壤 DNA 提取中的作用需要加以讨论。本文列举的 5 种方法中, 使用 CTAB 裂解剂的 2、3、4 方法 DNA 产量低, 而方法 1、5 具有较高的 DNA 产量, 其溶液中不含 CTAB。方法 4、5 两者之间的产量差别非常大, 而方法 4 的 DNA 带在琼脂糖电泳上显得暗淡; 加入 CTAB 后, 溶液颜色也变浅方法 5 产量最高。这说明 CTAB 可能能够促进腐殖酸等有机物的沉淀, 在沉淀这些杂质的同时, 由于腐殖酸、酚类化合物等化合物与 DNA 在一些理化性质相似性, 在 CTAB 的作用下, 两者形成了非选择性共沉淀。

参 考 文 献

- [1] Torsvik V, Ovreaas L. *Curr Opin Microbiol*, 2002, **5** (3): 240 ~ 245.
- [2] Boman H G, Steiner H. *Curr Top Microbiol*, 1981, **94** (5): 75 ~ 91.
- [3] Christensen B, Fink J, Merrifield RB, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (14): 5072 ~ 5076.
- [4] 王关林, 方宏筠, 王火旭, 等. *植物学报*, 2002, **44** (8): 951 ~ 955
- [5] Kuske C R, Barns S M, Busch J D. *Diverse Appl Envir. Microbiol*, 1997, **63** (9): 3614 ~ 3621.
- [6] Edgcomb V-P, McDonald J H, Devereux R, *et al.* *Appl Envir Microbiol*, 1999, **65** (4): 1516 ~ 1523.
- [7] Eichner C A, Erb R W, Timmis K N, *et al.* *Appl Envir Microbiol*, 1999, **65** (1): 102 ~ 109.
- [8] Lee S Y, Bollinger J, Bezdicek D, *et al.* *Appl Envir Microbiol*, 1996, **62** (10): 3787 ~ 3793.
- [9] Tsai Y L, Olson B H. *Appl. Envir Microbiol*, 1992, **58** (7): 2292 ~ 2295.
- [10] Yeates C, Gillings M R, Davison A D, *et al.* *Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification.* (<http://www.biologicalprocedures.com>)