

重金属污染土壤总 DNA 提取方法的研究 ——土壤预处理和硫酸铵铝在 DNA 提取中的应用

张琴¹ 荚荣^{1*} 豆长明² 谢贤政²

(1. 安徽大学 生命科学学院 安徽 合肥 230601)

(2. 安徽省环境科学研究院 安徽 合肥 230071)

摘要:【目的】从土壤中获得高纯度、高得率和完整性好的总 DNA，为重金属污染土壤微生物群落多样性的分析奠定基础。【方法】将一定浓度的硫酸铵铝增补入 DNA 提取液中，分别联合不同方式的土壤预处理，对所提取的土壤总 DNA 进行完整性、纯度和得率分析。【结果】TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法、ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法、Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法和试剂盒 4 种提取方法获得的 DNA 片段均在 23 kb 左右，总 DNA 完整；Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的 DNA 纯度较高， A_{260}/A_{230} 达到 2.00， A_{260}/A_{280} 达到 1.62；ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法的 DNA 得率最高，达到 1 010 $\mu\text{g/g}$ 土壤；这两种方法提取的 DNA 在纯度和浓度上均达到后续 PCR 等分子实验要求。通过扩增提取的土壤总 DNA 中 16S rRNA 基因，表明合适浓度的硫酸铵铝能有效去除土壤中的 PCR 干扰因子。【结论】本研究将土壤的预处理和一定浓度的硫酸铵铝联合使用，获得理想的重金属污染土壤的总 DNA。

关键词: 重金属污染土壤，总 DNA，预处理，硫酸铵铝

Application of soil pretreatments and $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ in DNA extraction from soils contaminated with heavy metals

ZHANG Qin¹ JIA Rong^{1*} DOU Chang-Ming² XIE Xian-Zheng²

(1. School of Life Science, Anhui University, Hefei, Anhui 230601, China)

(2. Anhui Research Academy of Environmental Sciences, Hefei, Anhui 230071, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to obtain DNA with high purity, high yield and good integrity from the soil, for the analysis of the microbial diversity of heavy metal contaminated soil. [Methods] Accompanied by different soil pretreatments, $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ was added in the DNA extraction buffer to analyze the yield, purity and integrity of the total DNA extracted from the soil. [Results] The DNA fragments extracted from the four different methods, TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$, ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$, Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ and Reagent Kit, were all intact, and the sizes of them were all about 23 kb. The Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ method gave the purest DNA with 2.13 at A_{260}/A_{230} and 1.62 at A_{260}/A_{280} , while the yield from ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ method was the highest with 1 010 μg DNA per

基金项目: 国家环保公益性行业科研专项项目(No. 201009041)

*通讯作者: ✉ ahdxxjiaorong@163.com

收稿日期: 2013-02-04; 接受日期: 2013-04-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

gram soil. Both methods could provide DNA with sufficient purity and concentration for the following molecular experiments such as PCR. Through the amplification of 16S rRNA gene from the extracted soil DNA, PCR inhibitors in the soil could be efficiently removed by $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ with appropriate concentrations. **[Conclusion]** By combining soil pretreatment and utilization of $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$, we obtained the desired total DNA from the soil contaminated with heavy metals.

Keywords: Soils contaminated with heavy metals, Total DNA, Soil pretreatments, $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$

土壤的重金属污染已成为一个严峻的环境问题,不仅使农田土壤肥力退化、农产品质量和产量降低,还导致水环境恶化,最终通过食物链危及人类的生命健康。土壤微生物对重金属污染的反应比较敏感,微生物的群落多样性可以作为衡量重金属污染程度的指标。目前,通过微生物传统的分离培养所认识的种类十分有限^[1],多数是不可培养的微生物,因此,利用传统的培养技术无法准确反映重金属土壤样品中的微生物群落多样性。随着分子生物学技术的发展,使研究者能够在基因水平上对土壤微生物群落多样性进行研究,更加全面、真实地评价微生物的群落结构与种类。从土壤中获得高纯度、高得率和完整性好的总 DNA 是在基因水平上研究土壤微生物群落多样性的基础,因此,从土壤中提取 DNA 的方法尤为重要。

重金属污染土壤本身的复杂性、非均质性,土壤中腐殖酸、粘土矿物、重金属离子等都会不同程度地影响 DNA 的提取及其质量^[2]。已报道的从土壤样品中提取 DNA 的方法有很多种^[3-5],主要可分为直接法和间接法两类。间接法是从土壤样品中回收细胞再提取 DNA,虽然该法获得的 DNA 纯度高,但得率低,往往不能包括真菌和细菌总 DNA。而直接法是直接裂解土壤样品中的微生物,通过土壤清洗、粗提取和纯化三步骤获得土样中的总 DNA。由于该法是直接从土样中获得 DNA,更能

反映大部分的土壤微生物群落多样性;但是,直接法在提取 DNA 的同时会将土壤中有有机成分如腐殖酸等溶出^[6],影响了 DNA 的纯度和后续的 PCR 等分子分析。

近年来有报道,通过表面活性剂和螯合剂的清洗可以改善有机物含量高的土壤总 DNA 的得率^[7-8], Braid 等报道使用多价阳离子如 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 能够消除土壤中影响 DNA 扩增的酶抑制剂^[9]。为了从重金属污染土壤中,获得完整性和纯度、得率高的土壤总 DNA,本实验将一定浓度的硫酸铵铝增加入 DNA 提取液中,并分别与不同的预处理方式联合使用,旨在快速去除土壤中的有机化合物和 PCR 干扰因子等物质,构建有效的重金属污染土壤 DNA 提取的方法,为重金属污染土壤微生物群落多样性的分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

土样采自我国典型矿业城市铜陵重金属污染严重的新桥区, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,土样的基本理化性质及各重金属含量如表 1 所示。

1.2 主要试剂

TENP buffer: 50 mmol/L Tris、20 mmol/L EDTA-2Na、100 mmol/L NaCl、10 g/L PVPP, pH 10;

表 1 供试土壤的基本理化性质和重金属含量

Table 1 Some physical-chemical properties and heavy metal contents of soil samples used

土样 Soil sample	pH	含水量 Water (%)	有机质 Organic matter (g/kg)	重金属含量 Total contents of heavy metal (mg/kg)				
				As	Cd	Zn	Pb	Cu
30	7.39	15.77	31.04	36.95	3.46	428.01	170.90	130.83

PBS buffer : 8 g NaCl , 0.2 g KCl , 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 , 溶于 1 L 水 , pH 7.4 ;

DNA extraction buffer : 100 mmol/L Tris , 200 mmol/L EDTA-2Na , 2% PVPP , pH 9.0 ;

SDS buffer : 100 mmol/L Tris , 200 mmol/L NaCl , 3% SDS , pH 9.0 .

ABG : 土壤腐殖酸清除剂(上海生工) ;

Wash1 : 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3) , 200 mmol/L NaCl , 5 mmol/L EDTA-2Na , 0.05% Tritonx-100 ;

Wash2 : 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3) , 200 mmol/L NaCl , 5 mmol/L EDTA-2Na ;

Wash3 : 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3) , 0.1 mmol/L EDTA-2Na .

酚液 : 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1 , 体积比) ; 50 g/L 蜗牛酶 ; 100 g/L 溶菌酶 ; 1 g/L 蛋白酶 K ; 3 mol/L NaAc (pH 5.2) ; PCR 反应混合酶液(含染料) : 上海生工 .

1.3 土壤总 DNA 的提取方法

1.3.1 TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法: (1) 土壤的预处理 : 称取 0.2 g 土壤样品 , 置于 10 mL 灭菌离心管中 , 加 2 mL TENP buffer 旋涡振荡 5 min , 10 000 r/min 室温离心 5 min , 弃上清 , 在土壤颗粒沉淀中再加 2 mL TENP buffer , 重复上述洗涤步骤 , 直至上清液澄清 , 最后加 2 mL PBS buffer 洗涤 1 次 .

(2) 土壤总 DNA 的粗提 : 在预处理好的土壤中 , 加入 2 mL 的 DNA extraction buffer , 再分别加入不同浓度的 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$, 高强度旋涡振荡 10 min , 加入 100 μL 溶菌酶和 100 μL 蜗牛酶 , 高强度旋涡振荡 5 min . 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min (水浴过程中每隔 10 min 用手上下颠倒离心管 3 次) , 水浴结束后温和旋涡振荡 5 min , 加入 100 μL 蛋白酶 K , 再加入 2 mL SDS buffer , 上下颠倒混匀 , 60 $^\circ\text{C}$ 水浴 1 h (水浴过程中每隔 10 min 上下颠倒离心管 3 次) , 水浴后 8 000 r/min 离心 15 min , 取上清液 .

在上清液中加入等体积的酚液 , 颠倒混匀 , 静置 10 min , 然后 12 000 r/min 离心 5 min , 收集上

清液 , 在上清液中再加入氯仿/异戊醇抽提一次 , 颠倒混匀 , 12 000 r/min 离心 5 min , 收集上清液 , 在上清液中加入 0.1 倍体积的 NaAc 上下颠倒混匀 , 再加入 0.6 倍体积的异丙醇室温沉淀 DNA 1 h , 之后 12 000 r/min 离心 5 min , 弃上清液 , 用 70% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀 , 10 000 r/min 离心 5 min , 弃上清 , 于室温蒸发痕量乙醇 , 加入 200 μL 的 ddH₂O 溶解 .

(3) 粗 DNA 的纯化 : 在粗 DNA 50 μL 溶液中加入等体积酚液 , 12 000 r/min 离心 15 min , 收集上清 , 在上清中加入 0.1 倍体积的 NaAc , 颠倒混匀 , 再加入 0.6 倍体积的异丙醇 , -20 $^\circ\text{C}$ 沉淀 1 h , 10 000 r/min 离心 15 min , 弃上清 , 于室温蒸发痕量乙醇 , 加入 200 μL 的无菌水溶解 DNA , -20 $^\circ\text{C}$ 保存^[10] .

1.3.2 ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法: 称取 0.2 g 土壤样品 , 置于 10 mL 灭菌离心管中 , 加 2 mL 腐殖酸去除剂 . 旋涡振荡 3 min , 8 000 r/min 室温离心 5 min , 弃上清 , 在土壤颗粒沉淀中再加 2 mL 腐殖酸去除剂 , 按上述 1.3.1 方法再洗涤 1-2 次 , 直至上清液澄清 . DNA 的粗提和纯化同 TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法 .

1.3.3 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法: 称取 0.2 g 土壤样品 , 置于 10 mL 灭菌离心管中 , 加 2 mL Wash1 , 旋涡振荡 3 min , 6 000 r/min 室温离心 3 min , 弃上清 , 在土壤颗粒沉淀中再加 2 mL Wash2 , 6 000 r/min 室温离心 3 min , 弃上清 , 在土壤颗粒沉淀中再加 2 mL Wash3 , 6 000 r/min 室温离心 3 min , 弃上清 , 重复 Wash3 洗涤步骤 , 直至上清液澄清 . DNA 的粗提和纯化同 TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法 .

1.3.4 试剂盒法: 采用上海生工 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒(土壤)提取 DNA , 参照试剂盒说明书 .

1.4 土壤总 DNA 完整性及纯度和得率的检测

取总 DNA 6 μL 在 1% 的 Agrose 中电泳 , EB 染色并拍照 . 取 6 μL DNA 液稀释至 300 μL , 用紫外可见分光光度计测定 DNA 的 A_{260} 、 A_{280} 、 A_{230} , 并计算 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 的比值、DNA 浓度及

DNA 得率。DNA 浓度(g/L)= $A_{260} \times 50 \times$ 稀释倍数/1 000 , DNA 得率($\mu\text{g/g}$)=DNA 浓度 \times 原液体积/土壤重量(g)。

1.5 土壤总 DNA 的 PCR 扩增

1.5.1 PCR 扩增所用引物: 如表 2 所示。

1.5.2 PCR 扩增反应条件: 扩增反应体系(25 μL): PCR 反应混合酶液 13 μL , 土壤 DNA 模板 2 μL , 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , 用灭菌 ddH₂O 补足至 25 μL 。Touch-down PCR 反应参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min ; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s , 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (退火温度从 60 $^{\circ}\text{C}$ 降到 44 $^{\circ}\text{C}$, 每 2 个循环降低 2 $^{\circ}\text{C}$) , 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min , 共 20 个循环 ; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

2 结果与分析

2.1 TENP-AlNH₄(SO₄)₂ 法提取的土壤总 DNA

2.1.1 总 DNA 的完整性: 将 TENP-AlNH₄(SO₄)₂ 法提取的总 DNA 进行电泳检测, 观察 DNA 是否被降解, 结果如图 1 所示, 表明 TENP-AlNH₄(SO₄)₂ 法提取的总 DNA 在 23 kb 左右, 条带单一, 基本无弥散, 完整性较好。

进一步检测 DNA 的完整性及硫酸铵铝对土壤

DNA 的 PCR 影响, 以 TENP-AlNH₄(SO₄)₂ 法提取的 DNA 经纯化后为模板, 应用表 2 中所列细菌及真菌特异引物对其进行 PCR 扩增, 结果如图 2 所示, 均能获得目的片段, 表明该法能从土壤中同时有效提取细菌和真菌总基因组 DNA , DNA 片段完整。硫酸铵铝能够去除 PCR 干扰因子, 提高 PCR 的质量, 每克土壤加入 100 mmol 硫酸铵铝最适。

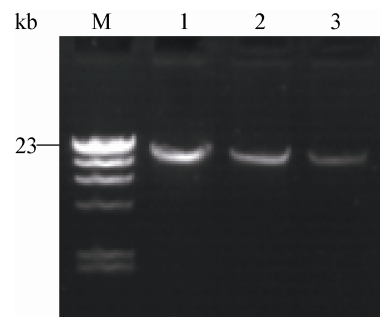


图 1 TENP-AlNH₄(SO₄)₂ 法提取的土壤总 DNA 凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted by TENP-AlNH₄(SO₄)₂ method

注: 1、2、3: 硫酸铵铝浓度分别为 0、100、200 mmol/g 土壤。
Note: 1, 2, 3: The concentration of AlNH₄(SO₄)₂ is 0, 100, 200 mmol pergram soil.

表 2 实验所用引物系列 Table 2 Primers used in the experiment				
生物体 Organisms	Amplified position	Primers	Sequence (5'→3')	Resources
细菌 Bacterium	16S rDNA	16ss	AGAGTTTGATCCTGGCTCA	龙良鲲等 ^[11]
		16ssl	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	
	16S rDNA V3 region	V3	ATTACCGCGGCTGCTGG	滕应等 ^[2]
		V31	(GC)-CCTACGGGAGGCAGCAG	
真菌 Fungi	18S rDNA	18ss	CCAGTAGTCATATGCTTGTCTC	张海燕等 ^[12]
		18ssl	ACCTTGTTACGACTTTTACTTCC	
	28S rDNA fragment	ns	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	张海燕等 ^[12]
		ns1	(GC)-CACCGGCCAGTAGTCATATGCTTGTC	

注: (GC) clamp: CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGG.
Note: (GC) clamp: CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGG.

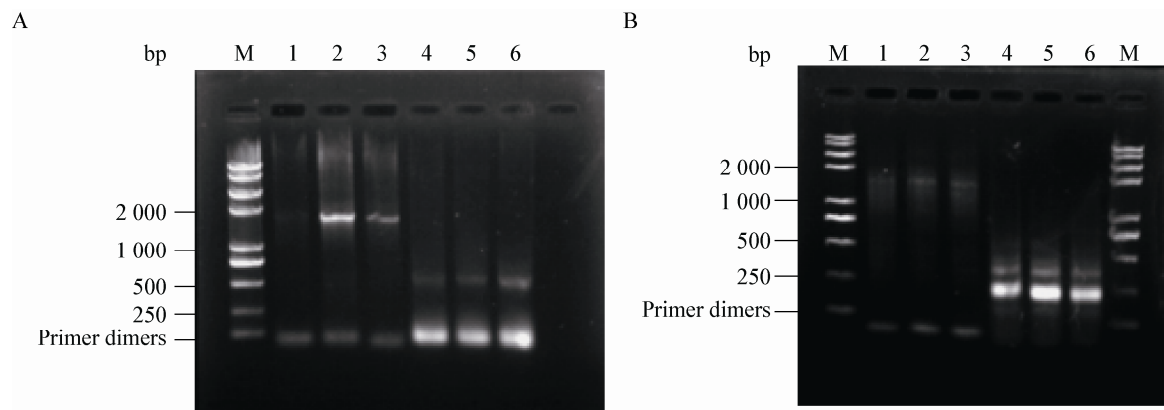


图 2 硫酸铵铝对土壤总 DNA PCR 效果影响

Figure 2 The influence of $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ on soil total DNA PCR

注：A：1、2、3：土壤 DNA 真菌 18ss 引物 PCR 产物；4、5、6：土壤 DNA 真菌 ns 引物 PCR 产物。B：1、2、3：土壤 DNA 细菌 16ss 引物 PCR 产物，4、5、6：土壤 DNA 细菌 V3 引物 PCR 产物。

Note: A: 1, 2, 3: The products of primer 18ss; 4, 5, 6: The products of primer ns. B: 1, 2, 3: The products of primer 16ss; 4, 5, 6: The products of primer V3.

2.1.2 总 DNA 的纯度和得率：从土壤中提取的微生物总 DNA 常含有一定量的腐殖酸。腐殖酸的存在，往往会影响 DNA 聚合酶的活性，使得 PCR 扩增无法进行。因此，提取土壤总 DNA 时不仅要避免蛋白质、RNA 的污染，还要尽可能的去除腐殖酸。腐殖酸在 230 nm 处有吸收峰，计算 A_{260}/A_{230} 的比值可以确定 DNA 中的腐殖酸污染程度，一般情况下 A_{260}/A_{230} 比值在 2.0 左右，DNA 较纯， A_{260}/A_{230} 比值越低，腐殖酸污染越严重。蛋白质在 280 nm 处有吸收峰，因此 A_{260}/A_{280} 一般在 1.8 左右时，DNA 较纯，低于 1.8 时，则有蛋白质污染^[13]。

用紫外分光光度计检测 DNA 纯度，测得 DNA

的紫外吸光值，每个波长重复测定 3 次取平均值，见表 3，由表 3 中数据可以看出，纯化后的 TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的总 DNA， A_{260}/A_{280} 在 1.2 左右， A_{260}/A_{230} 在 1.0 左右，表明 DNA 纯度不高，但 DNA 得率达到 340 $\mu\text{g/g}$ 土壤。从表 3 中也看出，随着硫酸铵铝的增加，DNA 得率总体下降。

2.2 ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的总 DNA

2.2.1 总 DNA 的完整性：将 ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的总 DNA 电泳检测，观察 DNA 是否被降解，结果如图 3 所示，从图 3 中可以看出 DNA 大小在 23 kb 左右，条带清楚、明亮、单一，没有拖尾现象，DNA 完整。

表 3 TENP-AlNH ₄ (SO ₄) ₂ 法提取的总 DNA 纯度和得率				
Table 3 DNA purity and yield of total DNA by TENP-AlNH ₄ (SO ₄) ₂ method				
AlNH ₄ (SO ₄) ₂ concentration (mmol/g)	吸光度比值		DNA concentration (g/L)	DNA yield (μg/g)
	Absorbance ratio			
	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀		
0	1.26	1.01	0.24	240.0
100	1.24	1.01	0.34	340.0
200	1.25	1.00	0.16	162.5

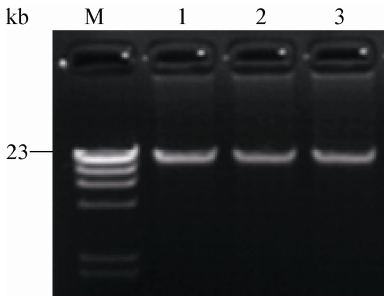


图3 ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的土壤总DNA凝胶电泳图

Figure 3 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted by ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ method

注：1、2、3：硫酸铵铝浓度分别为0、100、200 mmol/g 土壤。

Note: 1, 2, 3: The concentration of $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ is 0, 100, 200 mmol per gram soil.

2.2.2 总DNA的纯度和得率：用紫外分光光度计检测DNA纯度，测得DNA的紫外吸光值，每个波长重复测定3次取平均值，见表4。由表4看出，纯化后的ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的总DNA， A_{260}/A_{280} 最高达到1.5左右， A_{260}/A_{230} 最高在1.6左右，DNA得率达到1 010 $\mu\text{g/g}$ 土壤，表明该法提取的DNA纯度及得率都比ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法高。从表4也可以看出，随着硫酸铵铝浓度的增加，DNA得率下降。

2.3 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的总DNA

2.3.1 总DNA的完整性：将Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的总DNA电泳检测，观察DNA是否被降解，结果如图4所示，从图4中可以看出DNA大小也在23 kb左右，条带清楚、明亮、单一，没有拖尾现象，DNA完整。

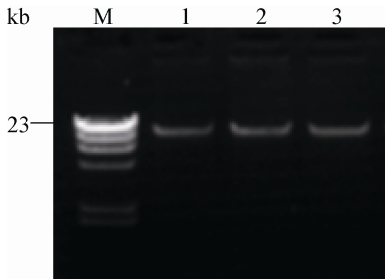


图4 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的土壤总DNA凝胶电泳图

Figure 4 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted by Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ method

注：1、2、3：硫酸铵铝浓度分别为0、100、200 mmol/g 土壤。

Note: 1, 2, 3: The concentration of $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ is 0, 100, 200 mmol per gram soil.

2.3.2 总DNA的纯度和得率：用紫外分光光度计检测DNA纯度，测得DNA的紫外吸光值，每个波长重复测定3次取平均值，见表5。由表5看出，纯化后的Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的总DNA， A_{260}/A_{280} 在1.6左右， A_{260}/A_{230} 在2.0左右，表明DNA纯度比上述两种方法都高，但DNA得率只有145.0 $\mu\text{g/g}$ 土壤，比TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法和ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法都低。从表5中也可以看出，随着硫酸铵铝浓度的增加，DNA得率下降。

2.4 试剂盒法提取的总DNA

2.4.1 总DNA的完整性：将试剂盒法提取的总DNA电泳检测，观察DNA是否被降解，结果如图5所示，从图5中可以看出DNA大小在23 kb左右，条带清楚、单一，没有拖尾现象，DNA完整。

表 4 ABG-AINH ₄ (SO ₄) ₂ 法提取的总 DNA 纯度和得率				
Table 4 DNA purity and yield of total DNA by ABG-AINH ₄ (SO ₄) ₂ method				
AINH ₄ (SO ₄) ₂ concentration (mmol/g)	吸光度比值		DNA concentration (g/L)	DNA yield (μg/g)
	Absorbance ratio			
	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀		
0	1.52	1.61	1.01	1 010.0
100	1.27	1.10	0.77	772.5
200	1.17	0.91	0.76	755.0

表 5 Wash-AINH ₄ (SO ₄) ₂ 法及试剂盒法提取的总 DNA 纯度和得率				
Table 5 DNA purity and yield of total DNA by Wash-AINH ₄ (SO ₄) ₂ method				
AlNH ₄ (SO ₄) ₂ concentration (mmol/g)	吸光度比值		DNA concentration (g/L)	DNA yield (μg/g)
	Absorbance ratio			
	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀		
0	1.35	1.18	0.15	145.0
100	1.60	2.13	0.12	122.5
200	1.62	2.00	0.11	112.5

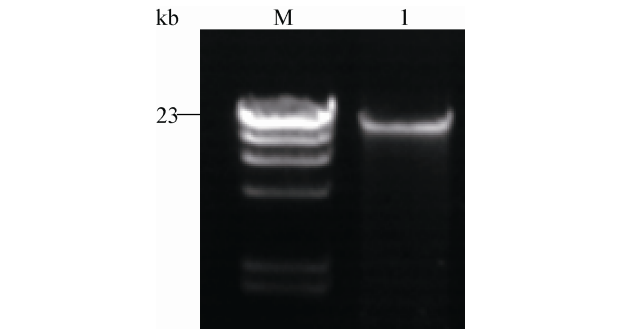


图 5 试剂盒法提取的土壤总 DNA 凝胶电泳图
Figure 5 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted by DNA extraction kit

2.4.2 总 DNA 的纯度和得率: 用紫外分光光度计检测 DNA 纯度, 测得 DNA 的紫外吸光值, 每个波长重复测定 3 次取平均值, 见表 6。

由表 6 看出, 试剂盒提取的土壤总 DNA 纯度及得率都比其他 3 种方法低。

2.5 土壤总 DNA 的 16S rRNA 基因的 PCR 扩增
为了检测提取的 DNA 的 PCR 效果, 分别以 ABG-AINH₄(SO₄)₂ 法和 Wash-AINH₄(SO₄)₂ 法提取的 DNA 为模板, 采用表 2 中 V3 为引物, 做 TD-PCR, 结果如图 6 所示。图 6A 中 1、2、3 泳

表 6 试剂盒法提取的总 DNA 纯度和得率			
Table 6 DNA purity and yield of total DNA by DNA extraction kit			
吸光度比值		DNA concentration (g/L)	DNA yield (μg/g)
Absorbance ratio			
A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}		
1.30	1.10	0.05	25.0

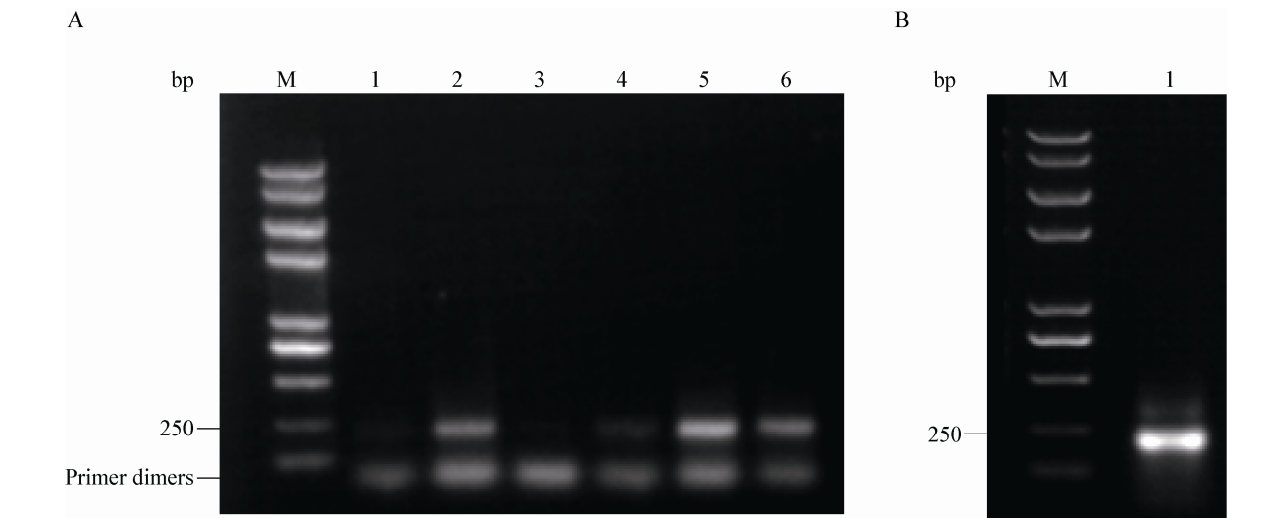


图 6 细菌 16S V3 可变区 PCR 结果
Figure 6 Products of DNA with V3 primers
注: A: ABG/Wash-AINH₄(SO₄)₂ 获得 DNA PCR; B: 试剂盒法获得 DNA PCR.
Note: A: The PCR products of DNA extracted by ABG/Wash-AINH₄(SO₄)₂; B: The PCR products of DNA extracted by DNA extraction kit.

道为 ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的 DNA PCR 目的条带, 硫酸铵铝的浓度分别为 0、100、200 mmol/g 土壤, 当硫酸铵铝浓度为 100 mmol/g 土壤时, 在 250 bp 处出现目的条带, 条带最亮, 且单一。4、5、6 泳道为 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的 DNA PCR 目的条带, 硫酸铵铝的浓度分别为 0、100、200 mmol/g 土壤, 当硫酸铵铝浓度为 100 mmol/g 土壤时, PCR 条带也最亮, 且单一。

从图 6B 图中可以看到, 采用试剂盒法提取到的 DNA PCR 扩增得到的目的条带明亮、单一。

3 结论与讨论

本研究将土壤的预处理和一定浓度的硫酸铵铝联合使用, 获得理想的重金属污染土壤的总 DNA。本研究建立的 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的 DNA 纯度最高, ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的 DNA 得率最高, 两种方法在 DNA 纯度和浓度上均达到后续 PCR 等分子实验要求。同时, 实验结果显示, 在提取 DNA 过程中, 每克土壤加入 100 mmol 硫酸铵铝为最适。

评价一种土壤 DNA 提取方法是否有效, 不仅要求提取的 DNA 片段未降解、完整, 还需能够有效地去除土壤中大量存在的影响后续实验的有机物质如腐殖酸等; 提取方法应具广谱性, 对土壤中大多数微生物的 DNA 尽可能地有效提取^[14]。

TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法、ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法、Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法和试剂盒法提取获得的 DNA 片段均在 23 kb 左右, 这与国内其他研究文献一致^[15-17]。应用细菌及真菌特异引物对 TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的 DNA 经纯化后进行 PCR 扩增, 均能获得目的片段, 表明该法能从土壤中同时有效提取细菌和真菌总基因组 DNA, DNA 片段完整。

TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法、ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法和 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法在粗提 DNA 之前, 分别采用 TENP、腐殖酸去除剂(ABG)和梯度 EDTA (Wash 系列)对土壤进行预处理, 去除土壤中的腐殖酸等

污染物。TENP 中的 PVPP 可以有效结合土壤中的腐殖酸物质, EDTA 能去除土壤中的金属离子, 有效地抑制核酸酶的活性, 防止 DNA 在提取过程中被降解。在粗提 DNA 过程中, 通过添加硫酸铵铝去除土壤总 DNA 的 PCR 扩增干扰因子, 这可能与铝离子优先和 PCR 干扰因子如腐殖酸相互作用有关, 另外, 硫酸铵铝还能够降低 DNA 与土壤中硅藻土等含硅成分的结合。

粗提获得的 DNA 大多都是淡棕色, 通过酚氯仿抽提纯化后, DNA 溶液颜色接近透明, 略带淡黄色, ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法和 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取纯化的 DNA, A_{260}/A_{230} 分别达到 1.6、2.0, 接近 2.0, A_{260}/A_{280} 分别达到 1.52、1.62, 接近 1.8, 表明 DNA 中杂质很少, 腐殖酸污染少, 两种方法都能有效地去除腐殖酸等物质, 后续的 PCR 扩增结果也表明了该两种方法提取的 DNA 纯度达到后续分子实验要求。

在 TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 、ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 和 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 三种方法中, ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的 DNA 得率最高, 达到 1 010 $\mu\text{g/g}$ 土壤, TENP- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法次之, Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法最低, 这可能与土壤总 DNA 提取过程中的预处理方式有关。实验发现, 采用 ABG 预处理土壤时, 只要洗涤 3 次上清液就可以澄清, 效率高, 造成的 DNA 损失少, DNA 的得率最高; 采用 TENP-PBS 预处理一般要洗涤土壤 4-5 次, 上清液才能完全澄清, 而采用 Wash 系列预处理土壤时要洗涤 7 次才能使上清液完全澄清, 造成 DNA 损失较多, 相应的 DNA 得率最低。文献调研表明, 本研究建立的 ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法和 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取的 DNA 得率(112.5-1 010.0 $\mu\text{g/g}$ 土壤)均高于国内其他文献的报道^[2,9,18]。

相比 ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法和 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法, 试剂盒法虽然方便快捷、PCR 条带明亮单一, 但费用昂贵, 且提取的 DNA 浓度及纯度都远远不及 ABG- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法和 Wash- $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 法提取得到的 DNA, 且这两种方法也能在 5 h 内完成,

所用的试剂普通, 价格便宜, 得到的土壤总 DNA 完整, 更适用于广大普通实验室进行土壤 DNA 的提取工作。

参 考 文 献

- [1] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [2] 滕应, 骆永明, 赵祥伟, 等. 重金属复合污染农田土壤 DNA 的快速提取及 PCR-DGGE 分析[J]. 土壤学报, 2004, 41(3): 343-347.
- [3] Suzanne D, Bryan SG, Roy N, et al. DNA extraction from soil nematodes for multi-sample community studies[J]. Applied Soil Ecology, 2008, 38(1): 20-26.
- [4] 胡元森, 李翠香, 周毅, 等. 两种从土壤中提取 DNA 方法的比较[J]. 生物技术, 2006, 16(5): 34-36.
- [5] Robe P, Nalin R, Capellano C, et al. Extraction of DNA from soil[J]. European Journal of Soil Biology, 2003, 39(4): 183-190.
- [6] 陈旭玉, 周亚奎, 余贤美, 等. 一种直接用于 PCR 的土壤微生物 DNA 提取方法[J]. 中国农学通报, 2008, 24(4): 33-36.
- [7] Nathalie F, Danielle B, Kneneth L, et al. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(2): 181-191.
- [8] Anat L, Yaron S, Asya V, et al. Can denaturing gradient gel electrophoresis analysis of amplified 16S rDNA of soil bacterial populations be used in forensic investigations?[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006(36): 1188-1192.
- [9] Michael DB, Laura MD, Christopher LK. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 52(3): 389-393.
- [10] 赵勇, 周志龙, 李武, 等. 土壤微生物分子生态学研究土壤中总 DNA 的提取[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5): 854-860.
- [11] 龙良鲲, 羊宋贞, 姚青, 等. AM 真菌 DNA 的提取与 PCR-DGGE 分析[J]. 菌物学报, 2005, 24(4): 564-569.
- [12] 张海燕, 王彩虹, 龚明福, 等. 一种简单有效且适于土壤微生物多样性分析的 DNA 提取方法[J]. 生物技术通报, 2009(8): 151-155.
- [13] Yeates C, Gillings MR, Davison AD, et al. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification[J]. Biological Procedures Online, 1998, 1(1): 40-47.
- [14] 葛芸英, 陈松, 胡兰, 等. 土壤细菌 DNA 提取及多样性分析的 T-RFLP 方法[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 131-136.
- [15] Dwipendar T, Olaf S, Mairtin MS, et al. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(6): 1390-1403.
- [16] 窦莹颖, 林展民, 朱英德, 等. 浙贝母根际土壤总 DNA 提取和纯化方法的比较[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1840-1844.
- [17] Han GM, Song FQ, Zhang ZJ, et al. An economic and efficient method for further purification of crude DNA extracted from forest soils[J]. Journal of Forestry Research, 2010, 21(2): 246-250.
- [18] 王啸波, 唐玉秋, 王金华, 等. 环境样品中 DNA 的分离纯化和文库构建[J]. 微生物学报, 2001, 41(2): 133-140.