

一种土壤微生物总 DNA 的高效提取方法

黄婷婷¹ 曹慧¹ 王兴祥² 崔中利^{1, 2*}

(1 南京农业大学农业部环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095;

2 中国科学院南京土壤研究所 南京 210008)

摘要 获得高浓度、大片段、多样性程度高的土壤微生物总 DNA 是研究土壤微生物群落结构的分子生态学基础。本文采用间接法(菌体细胞回收法)提取红壤地区两种土壤类型的土壤微生物总 DNA, 定量计算其回收率, 并与直接法(细胞原位裂解法)比较了提取效率和纯度。结果表明:红壤地区 2 种土壤每克干土的总 DNA 提取量, 间接法约为 0.34 和 0.53 $\mu\text{g/g}$ 干土, 直接法约为 13.62 和 24.32 $\mu\text{g/g}$ 干土; 间接法的提取效率低于直接法, 但所得 DNA 片段较大, 且 *Sau* 3A 酶切和 16S rDNA 通用引物 PCR 扩增结果显示, 间接法比直接法更能有效地去除土壤中的某些抑制剂, 所得总 DNA 的纯度更高, 有利于后续操作。

关键词 土壤微生物; 总 DNA 提取; 细胞回收; 粗 DNA 纯化

中图分类号 S154

土壤微生物生态系统极为复杂, 在很大程度上还是未知的。土壤微生物不仅是土壤中物质循环的驱动力, 其代谢物也是植物的营养成分, 其活动能直接影响到土壤的物理、化学性质^[1, 2]。可以说, 土壤微生物生态系统是一个巨大的、潜在的科研和经济价值远未得到开发的微生物资源库。目前可在实验室培养的微生物还不到自然界中微生物总数的 1%, 还有相当多的菌种因为无法人工培养而未被人所认识^[3]。随着分子生物学技术的发展, PCR 的指纹技术、DNA 文库、FISH、Microarray 等技术被广泛应用于土壤微生物群落结构以及基因资源的开发利用, 丰富拓展了人们对土壤中不可培养微生物的认识^[4, 5]。

分子生物学技术研究土壤微生物群落结构的实质是用土壤微生物 DNA 的不均一性来反映土壤微生物的种群结构特征。因此, 获得高浓度、大片段、多样性程度高、具有代表性的土壤微生物总 DNA 是研究土壤微生物群落结构的分子生态学基础。由于土壤样品中含有较多的腐质酸和粘粒等抑制物质, 这些物质可对内切酶消化、PCR 扩增、杂交等后续操作产生强烈的影响^[6, 7], 因而提取与纯化土壤微生物总 DNA 在研究中尤为重要^[8, 9]。

已报道的从土壤样品中提取 DNA 的方法有很多种, 主要可分为直接法和间接法两类。直接法是

直接对样品进行裂解, 然后从裂解物中获得 DNA; 而间接法则是先从土壤中回收细胞再提取 DNA。和直接法相比, 间接法获得的 DNA 分子量更大, 纯度更高, 但不可避免的, 该法得到的 DNA 产率有所降低。由于人们普遍认为较高的 DNA 得率更能代表大部分的土著微生物种群和遗传多样性^[10], 目前进行基因文库构建时大多仍采用直接法提取土壤总 DNA。但最近研究显示, 直接法包含的高 DNA 得率并不一定代表了种群的丰富度, 并且序列的代表性也受到所采取的不同提取方法的影响, 且有研究发现由直接法建立的基因文库中还包含了大量真核生物的基因片段。由于真核生物基因增加基因文库的大小但其遗传信息并不能在原核宿主载体中表达, 因此间接法为构建更高质量的基因文库提供了条件^[11]。本文采用间接提取法对两种植被条件下红壤的总 DNA 进行提取, 并与直接提取法比较了提取和纯化的效率, 为红壤地区微生物群落结构多样性分析以及功能性基因的获得奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况与土壤样品采集

研究区域位于江西省鹰潭市余江县。该区域具有中亚热带温暖湿润的季风气候, 年均温为 17.8 $^{\circ}\text{C}$, 年均降雨量为 1785 mm, 且主要集中在 4~6 月; 地

国家自然科学基金项目 (40371069), 中国博士后科学基金项目 (2003033495) 和中国科学院创新项目 (KZCX3-SW-417) 资助。

*通讯作者(czl@njau.edu.cn)

形为低丘岗地，海拔 35.0~54.6 m，坡度为 5°~8°；土壤为第四纪红粘土发育的红壤^[12]。

选择旱地和水田两种红壤粘土类型。土壤样品为 5 点混合样品，采样深度为 0~20cm，每个土壤样

品重 1 kg。土壤采集后，用布袋封装，以增加样品的通气性。样品带回室内，除去根系、石块等杂物，再过 4mm 筛，保存在 4℃ 冰箱，1 周内完成土壤总 DNA 的提取。供试土壤理化性质见表 1。

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of soils tested

土壤类型	pH (KCl)	含水量 (g/kg)	全 N (g/kg)	全 P (g/kg)	全 K (g/kg)	有机质 (g/kg)
水田红粘土	3.98	304.8	1.30	0.52	11.85	24.57
旱地红粘土	4.41	214.9	1.32	0.67	11.43	20.99

1.2 主要试剂

DNA 提取液：100 mmol Tris·HCl (pH8.0)，100 mol EDTA·Na (pH8.0)，100 mmol 磷酸钠 (pH8.0)，1.5 mol NaCl，10 g/L CTAB。

1×匀浆缓冲液：100 mmol Tris·HCl (pH8.0)，100 mmol EDTA·Na (pH8.0)，200 g/L SDS，10 g/L CTAB。

洗涤缓冲液：0.33 mol Tris·HCl (pH8.0)，1 mmol EDTA·Na (pH8.0)。

裂解缓冲液：100 mmol Tris·HCl (pH8.0)，100 mmol EDTA·Na (pH8.0)，1.5 mol NaCl，10 g/L CTAB；1 g/L 焦磷酸钠；200 g/L SDS；蛋白酶 K (20 mg/ml)；溶菌酶 (50 mg/ml)；氯仿：异戊醇 (v:v=24:1)；异丙醇；3 mol 醋酸钠 (pH5.2)。

核酸电泳缓冲液：1×TAE 缓冲液。

1.3 土壤 DNA 的提取方法

1.3.1 间接法提取自然土壤总 DNA 参考 Esther M. Gabor 的 Blending method^[11]并进行了适当修正。具体步骤如下：称取 50 g 左右土壤样品，加入 50ml 预冷的无菌水混匀后匀浆机匀浆，匀浆过程中要有时间间隔以防温度过高，然后补加 2×blending buffer，充分振荡混匀；低速 (200~300g) 室温离心 10 min，收集上清液转移至另一离心瓶中。沉淀再用 100ml 1×blending buffer 洗涤重悬，离心取上清液，与前次合并；所得上清液室温下高速 (10000g) 离心 30min 以回收菌体细胞；所得细胞依次用 150 ml 1 g/L 焦磷酸钠和 100 ml chrombath buffer 洗涤，离心取沉淀；8 ml lysis buffer 重悬沉淀，加 160 μl 溶菌酶 (50 mg/ml) 和 20 μl 蛋白酶 K (20 mg/ml)，37℃ 水浴 30 min；加 1 ml 200 g/L SDS，65℃ 水浴 2h，其间每隔 15~20 min 轻轻颠倒混匀；反应完成后氯仿-异戊醇抽提，异丙醇沉淀；回收沉淀洗涤，

吹干后溶解于 200 μl 灭菌的超纯水。

1.3.2 直接法提取自然土壤总 DNA^[13, 14] 称取 5 克土壤样品，与 13.5 ml DNA extraction buffer 混合，迅速置于-70℃ 冰冻 30 min，取出后于 65℃ 水浴融化，如此反复 2~3 次裂解细胞；加入 100 μl 蛋白酶 K (10 mg/ml)，于 37℃ 摇床上振荡 30min (225 r/min)；加入 1.5ml 200 g/L SDS，65℃ 水浴 2h，其间每隔 15~20 min 轻轻颠倒混匀；室温离心 (6000 g) 10 min，收集上清液，转移到 50 ml 离心管中，土壤沉淀再加入 4.5 ml 提取液和 0.5 ml 200 g/L 的 SDS，涡旋 10s，65℃ 水浴 10min，室温离心 (6000 g) 10 min，收集上清液并与前次上清液合并。上清液用等体积的氯仿-异戊醇 (v:v=24:1) 抽提，离心后吸取水相转移至另一 50ml 离心管中，以 0.6V 异丙醇室温沉淀 1h，室温离心 (6000 g) 20 min，收集核酸沉淀，用冷的 700 ml/L 乙醇洗涤沉淀，吹干，溶解于灭菌的超纯水中，最终体积为 300 μl。

1.4 土壤 DNA 的纯化

采用透析袋电洗脱纯化回收法对土壤中提取的微生物总 DNA 进行纯化。具体回收步骤参照参考文献[15]。

1.5 土壤微生物总 DNA 的定量及提取和纯化效率的计算

采用紫外分光光度法测波长 260nm 的吸光度值对土壤总 DNA 进行定量，参见参考文献[5]。

吸取 20μl 的标准 \ddot{e} DNA (0.0569μg/μl)，按上述回收方法回收，回收后，核酸沉淀再溶于 20μl 无菌水中，然后回收 DNA 与标准 \ddot{e} DNA (0.0569μg/μl) 同时电泳后经溴化乙锭染色，用 TANON 软件进行定量，计算纯化回收效率。

提取效率=(粗提 DNA 总量×稀释倍数)/干土% ×100%

回收效率=纯化后 DNA 总量/粗提 DNA 总量×100%

1.6 提取 DNA 的酶切和 PCR 扩增

用 *Sau3A* I 对总 DNA 进行酶切;用细菌的 16S rDNA 通用引物对纯化后的土壤总 DNA 进行扩增。扩增 16S rDNA 的引物 1 序列为: 5'-agagtttgatc-ctggctcag-3' (*E. coli* bases 8 to 27); 引物 2 序列为: 5'-tacctgttacgactt-3' (*E. coli* bases 1507 to 1492)。

PCR 扩增反应体系: 10 ×缓冲液2.5 μ l, dNTP (25 mmol/L) 2 μ l, 引物1 (25pmol/ μ l) 1 μ l, 引物2 (25 pmol/ μ l) 1 μ l, Mg²⁺ (25 mmol/l) 2.5 μ l, 模板(适当稀释的土壤DNA)2 μ l, *Taq* DNA聚合酶2.5U, dd H₂O 13.5 μ l, 总体积25 μ l。

反应参数: 95 变性5 min; 94 30 s, 50 30 s, 72 10 min, 30个循环; 72 延伸10 min。

2 结果和分析

2.1 两种土壤 DNA 提取方法的效率

用直接和间接两种方法从不同土壤类型的红粘土(旱地和水稻田)中都提取到了 DNA(图 1)。从电泳图谱上可以看出所得到总 DNA 片段均 > 23 kb, 且间接法得到的片段更大, 这有利于对其进行构建基因文库、筛选功能基因等后续操作。间接法的关键是要将菌体和土壤颗粒分开, 所采用的方法很多, 有机械分散、超声破碎、表面活性剂分散等。不同的方法对分散效果有显著影响, 因为这直接决定了所能得到的 DNA 量。本文对土壤匀浆, 使紧密吸附在颗粒和团聚体上的菌体得以分离, 然后通过差速离心去除较大的土壤颗粒, 获得菌体细胞。显然, 这种方法获得的 DNA 受土壤中腐殖质等的影响要小很多。

每克干土中提取 DNA 的量见表 2。从表 2 中可以明显看到, 直接法得到的 DNA 量要明显高于间接法。由于耕作措施、外界环境、人为因素等的影响, 不同类型的土壤获得的 DNA 量也有差异。直接法中, 水稻田土壤总 DNA 量要高于旱地土壤; 而间接法从旱地中得到的 DNA 量要高于水稻田土壤, DNA 的提取量与土壤的活菌计数呈正相关。分析原因可能是直接法仅通过研磨、振荡、涡旋的方法分散土壤颗粒, 与土壤颗粒吸附紧密的微生物分散不彻底; 而间接法较彻底地分散了细胞与土壤颗

粒, 所以这两组数据存在相关性。不同植被下的红壤其理化性质差异显著, 表 2 数据同时说明两种提取方法适合于从不同的土壤中抽提 DNA, 但在获得的 DNA 的浓度和质量上, 两者还是存在差异。

表 2 两种方法的 DNA 提取量和计数的细菌数量

Table 2 DNA yields by the two methods and the counts of bacteria

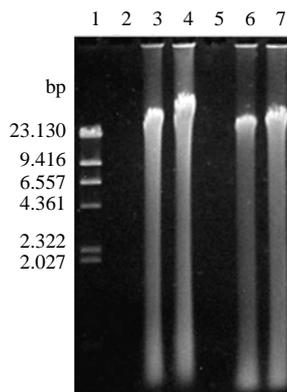
土壤类型	直接法 (μ g/g 干土)	间接法 (μ g/g 干土)	平板计数 (cfu/g 干土)
水田红粘土	24.32±0.15	0.34±0.01	3.84×10 ⁶
旱地红粘土	13.62±1.0	0.53±0.03	6.96×10 ⁶

2.2 粗提 DNA 的纯化及回收效率

土壤总 DNA 的纯化是顺利进行后续实验的前提, 因此回收效率的高低就显得很重要。透析袋回收法虽然操作复杂, 但对于大片段 DNA 却非常有效。使用这种方法回收的两种土壤总 DNA 的回收效率在 50%~60% 之间, 其回收效率基本可以满足实验要求。

2.3 对纯化后 DNA 的酶切及 PCR 扩增

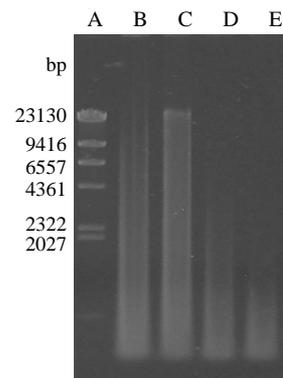
由于土壤中的腐殖质等物质对酶切、PCR 扩增等有显著的抑制作用, 因此可将其用以检测所得 DNA 的纯度。*Sau3A* 对纯化后的 DNA 进行完全消化, 酶切图谱显示(图 2): DNA 进行了酶切反应, 但直接法提取的 DNA 纯化后可能仍然存在某些抑制物质, 所以酶切不完全, 在 23 kb 附近仍有亮带; 而间接法所得 DNA 酶切较为完全。采用细菌的 16S rDNA 通用引物对纯化后两种土壤的 DNA 进行扩增, 并与其他地区土壤微生物 DNA 进行比较, 扩增后的电泳图谱见图 3、4。从图 3、4 中可以看出, 红壤地区旱地和水田的土壤 DNA 经扩增后没有产生对照土壤中所具有的特异性条带, 这可能与红壤地区土壤粘粒物质中含有较多的 Al³⁺ 有关。由于这些离子的吸附作用, 减少了 DNA 表面所带的负电荷量, 因而扩增后的 DNA 在电场中移动距离较小, 呈现出大片段 DNA 所具有的特征。而对用间接法回收得到的 DNA 进行 16S rDNA 扩增时, 可在 1.5kb 大小处得到特异性的条带(图 4)。同时实验还发现, 即使对没有回收纯化的间接法得到的 DNA, 同样可以扩增得到相应的特异性条带。由此可说明, 虽然在产率上间接法不具优势, 但它获得的 DNA 纯度是相当高的。



2~4 为间接法提取, 5~7 为直接法提取。1: Hind marker; 2、5: 灭菌的对照土壤; 3、6: 旱地红粘土; 4、7: 水田红粘土

图 1 间接法和直接法总 DNA 提取

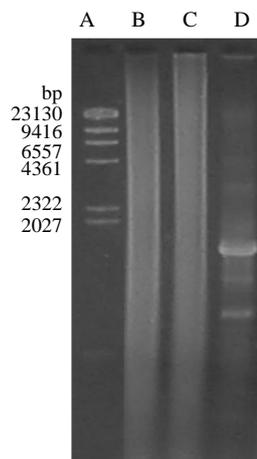
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from different soils by the two methods



B, C 为直接法提取; D, E 为间接法提取。A: Hind Marker, B、D: 旱地红粘土; C、E: 水田红粘土

图 2 间接法和直接法总 DNA 酶切

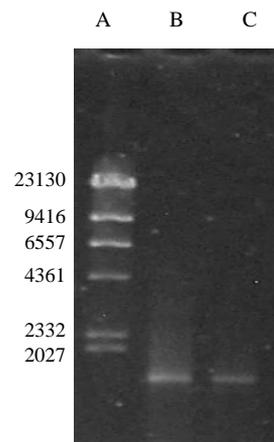
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of total DNA *Sau3A*I digestion from different soils by the two methods



A: Hind marker; B: 旱地土壤 DNA 16 S rDNA 扩增; C: 水田 16 S rDNA 扩增; D: 其他地区土壤 DNA 的 16 S rDNA 扩增

图 3 直接法提取 DNA 的 16 S rDNA 扩增图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of 16 S rDNA amplification of DNA samples by the direct method



A: Hind marker; B: 旱地土壤 DNA 16 S rDNA 扩增; C: 水田 DNA 16 S rDNA 扩增

图 4 间接法提取 DNA 的 16 S rDNA 扩增图谱

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of 16 S rDNA amplification of DNA samples by indirect methods

3 讨论

由于土壤本身及其中微生物的复杂性, 传统的微生物学方法如平板计数、生物量测定等的准确性受到了极大的限制。从土壤微生物群体基因组的角度研究其多样性及功能是一种可行的方法, 并已在国外受到广泛的关注^[3]。从 DNA 的角度分析土壤微生物, 关键是 DNA 的提取。从土壤或沉积物中提取 DNA 的方法可以分为两类, 一是在土壤中直接裂解微生物菌体, 再提取 DNA^[14]。另一是先将微生物菌体与土壤颗粒分开, 再提取 DNA^[11, 16]。一般前者的提取效率比较高, 而后的纯度相对较高。

从土壤中提取 DNA 有两个关键步骤: 土壤颗粒与菌体的分散; 粗 DNA 的纯化^[17]。粗 DNA 的提取和纯化均有不同的方法, 有些应用物理方法破碎菌体, 如超声波破碎等, 所得到的片段较小; 也有用微型柱进行粗提 DNA 的纯化, 但每次能纯化的样品少, 对于大片段 DNA 回收率低^[18]。

本实验采用间接法对不同植被类型下的红壤进行总 DNA 的提取和纯化, 并通过酶切和 PCR 扩增对所得 DNA 的纯度进行检测, 发现间接法能获得纯度很高的 DNA, 可以满足后续操作的要求, 是一种有效的 DNA 提取方法。

参考文献

- 1 白清云. 土壤微生物群落结构的化学估价方法. 农业环境保护, 1997, 16 (6): 252 ~ 256
- 2 Liao Min, Xie Xiaomei, Subhani A, Klose S. Combined effect of nutrient and pest managements on substrate utilization pattern of soil microbial population in hybrid rice cropping system. *Pedosphere*, 2002, 12 (3): 219 ~ 228
- 3 Vigdis T, Lisc O. Microbiol diversity and function in soil: from gene to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5: 240 ~ 245
- 4 马万里, Josquin Tibbits, Mark Adams. 土壤微生物多样性研究的新方法. 土壤学报, 2004, 41 (1): 103 ~ 108
- 5 徐德昌, 赵亚华, 杜天奎. 植物总 DNA 和核 DNA 提取及其纯度的研究. 宁夏农学院学报, 1997, 18 (3): 57 ~ 61
- 6 腾应, 骆永明, 赵祥伟, 李振高, 宋静, 吴龙华. 重金属复合污染农田土壤 DNA 的快速提取及其 PCR- DGGE 分析. 土壤学报, 2004, 41 (3): 343 ~ 348
- 7 Yeates C, Gillings MR, Davison AD, Altavilla N, Veal DA. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol. Proced. Online*, 1998, (1): 40 ~ 47
- 8 Burgmann H, Pesaro M, Widmer F, Zeyer J. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *J. Microbiol. Methods*, 2001, 45(1): 7 ~ 20
- 9 Rondon MR, August PR, et al. Cloning the soil meta-genome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66 (6): 2541 ~ 2547
- 10 张华勇, 李振高, 王振华, 潘映华. 红壤生态系统下芽孢杆菌的物种多样性. 土壤, 2003, 1: 45 ~ 48
- 11 Gabor EM, de Vries EJ, Janssen DB. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44 (2): 153 ~ 163
- 12 雷志栋, 杨诗秀, 谢森传. 土壤水动力学. 北京: 清华大学出版社, 1988, 231 ~ 236
- 13 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 李顺鹏, 樊奔. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. 微生物学报, 2003, 43 (2): 276 ~ 282
- 14 Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2): 316 ~ 322
- 15 萨姆布鲁克 J, 弗里齐 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998
- 16 Steffan RJ, Atlas RM. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54 (9): 2185 ~ 2191
- 17 Krsek M, Wellington EMH. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J. Microbiol. Methods*. 1999, 39: 1 ~ 16
- 18 Viggo Lindahl, Lars R. Bakken. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, (16): 135 ~ 142

AN EFFICIENT METHOD FOR DNA EXTRACTION FROM SOIL MICROORGANISM

HUANG Ting-ting¹ CAO Hui¹ WANG Xing-xiang² CUI Zhong-li^{1,2}

(1 Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, MOA, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

2 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008)

Abstract Isolation of DNA sufficient in purity, large in fragment and high in diversity from natural environments is the basis for molecular ecology study on community structure. In this study, the authors chose an indirect method, which is the cell recovery method, to extract DNA from two distinct red soils in South China, calculate its recovery efficiency and compare with the direct method in DNA yield and purity. The results show that the crude DNA yields from the two soils were about 0.34 and 0.53 $\mu\text{g/g}$ by the indirect method and 13.62 μg , and 24.32 $\mu\text{g/g}$ dried soil by the direct method respectively. Although the indirect DNA extraction method recovered smaller amounts of total DNA than the direct method, the DNA fragments are larger in size. Moreover, the results of *Sau3A* enzyme digestion and PCR amplification in evaluating DNA purity demonstrate that the indirect method can delete some inhibitor more efficiently, yielding DNA of superior quality more suitable for follow-up procedures.

Key words Soil microorganism, DNA extraction, Cell recovery method, Crude DNA purification