

LiCl 沉淀法提取富含荚膜的细菌基因组 DNA^①

侯卫国, 连 宾*

(南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 南京 210097)

摘 要: 结合提取基因组 DNA 的 CTAB 法 (hexadecyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵) 和用于提取海藻基因组 DNA 的 LiCl 法, 设计了针对产生较多荚膜多糖细菌的 DNA 提取方法—LiCl 沉淀法。通过电泳、分光光度计及 16S rRNA 基因扩增检测, 证明 LiCl 沉淀法可以有效地提取产荚膜细菌基因组 DNA, 其片断大小约为 23 kb, 不需进一步纯化即可用于后续分子生物学实验。

关键词: 荚膜多糖; 细菌; 基因组 DNA 提取; LiCl 沉淀法

中图分类号: S154

有些细菌在一定条件下分泌粘液或胶态物质, 在细胞壁外面形成的一层较厚的稳定的致密保护层, 即荚膜。它通常是由多糖类、多肽类或多糖蛋白复合体组成。微生物荚膜多糖一直是工业微生物研究的热点之一^[1-2]。迄今已有多种由微生物产生的荚膜多糖包括葡聚糖 (Dextran) 及其衍生物、黄原胶 (Xanthan)、结凝胶 (Gellan)、凝乳胶 (Curdlan)、茁霉多糖 (Pullulan)、鼠李胶 (Rhamsan)、沃仑胶 (Welan) 及透明质酸 (Hyaluronic Acid) 等成功地投入工业化生产^[3-6]。荚膜物质有许多重要用途, 如肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 的荚膜可用来生产右旋糖酐, 在临床上作为代血浆使用, 而且还可维持血压, 在外伤出血和休克时可用于急救。有些产荚膜细菌可制成微生物肥料菌剂, 还可用于废水处理, 发酵细菌多糖等。放射型土壤杆菌 (*Agrobacterium radiobacter*) Q9415 所产胞外多糖 1% 水溶液经加热至 90℃ 左右、冷至常温即成弹性极好的热可逆透明凝胶, 并在 pH 3~10 范围内稳定^[7]。

在分子生物学实验中, 细菌的荚膜多糖粘、稠等性质在很大程度上影响 DNA 提取的质量和数量。荚膜多糖等物质与 DNA 会结合成粘稠的胶状物, 进而与 DNA 共沉淀。因此常规的 DNA 提取方法和处理过程 (如 SDS 法、酶法、超声波法等) 获得的 DNA 质量往往不能获得满意的效果。含有

杂质的 DNA 不能作为 PCR 模板供进一步分析使用, 且会影响试验结果的重复性。李海阔等^[8]借鉴真菌、植物基因组 DNA 提取方法, 用氯化苄法提取得了较高质量的产气荚膜梭菌基因组 DNA, 因为氯化苄在弱碱性的条件下, 可通过与各种多糖的羟基基团作用来去除多糖。Hong 和 Park 等人^[9-10]用 LiCl 法从富含多糖的海藻中提取核酸, 并得到高质量的 DNA 和 RNA, 可分别用于 RAPD 分析和随机引物扩增。CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵), 是一种阳离子去污剂, 可溶解细胞膜, 并与核酸形成复合物。该复合物在高盐溶液中 (>0.7 mol/L NaCl) 是可溶的, 通过有机溶剂抽提, 去除蛋白、多糖、酚类等杂质后加入乙醇沉淀即可使核酸分离出来。CTAB 法常被用于植物和真菌的基因组 DNA 提取实验中, 能够有效地去除杂质污染^[11-14]。本实验尝试用 CTAB 法和 LiCl 沉淀法相结合的方式从产荚膜细菌中提取 DNA, 并成功获得了纯度较高的 DNA, 证明该方法可以有效地去除富含荚膜的细菌基因组 DNA 提取过程中的干扰物。

1 材料与方法

1.1 材料

产荚膜细菌 P1、P2、P3、P4 由本实验室保存。其中 P1 为圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum* sp.),

①基金项目: 江苏省高校产业化项目 (JHB04-017) 和江苏省博士后科学基金 (0501011B) 资助。

* 通讯作者 (bin2368@vip.163.com)

作者简介: 侯卫国 (1981—), 男, 江苏泗阳人, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: haital@126.com

P2 为根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*), P3 为中华根瘤菌 (*Sinorhizobium* sp.), P4 为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus mucilaginosus*)。该 4 株细菌在无氮培养基上均能产生粘稠的荚膜多糖。

16S rDNA 通用引物 F1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG TCA GAA C-3') 和引物 F2 (5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 购于博亚生物技术有限公司。

所用的 PCR 试剂均购于上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 LiCl 沉淀法提取细菌基因组 DNA

产荚膜细菌 P1、P2、P3、P4 在 28℃ 条件下培养 2 天, 从平板上轻轻刮取菌落加入盛有 700 μ l 抽提缓冲液 (1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 20 g/kg CTAB) 的 1.5 ml 离心管中, 振荡混匀, 在恒温摇床 (Ependorff HD-930) 上 65℃, 225 r/min 温育 50 min; 然后加入等体积 (700 μ l) 的酚/氯仿/异戊醇 (体积比: 25/24/1) 混合液, 颠倒混匀, 室温, 10000 r/min 离心 5 min; 而后将上清液转入一个新管, 加等体积的氯仿/异戊醇 (体积比: 24/1) 混合液, 颠倒混匀, 10000 r/min 离心 5 min, 将上清液再转入另一只新管中; 然后加入 1/4 体积 10 mol/L LiCl 溶液, 轻轻混合, 4℃ 过夜沉淀 RNA 及残留的多糖, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液; 最后在上清液中加入等体积的纯异丙醇, 室温 30 min 后, 14000 r/min 离心沉淀 DNA, 加入 1 ml 70%乙醇洗涤沉淀 2 次, 无水乙醇洗涤 2 次, 风干, 将沉淀的 DNA 溶于 50 μ l 的 TE 缓冲液中, -20℃ 保存备用。

1.3 DNA 检测

1.3.1 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 将所得 DNA 分别进行 7 g/kg 琼脂糖凝胶电泳, 以 Marker λ -hindIII 做标准分子量 DNA, EB 染色后, 于紫外凝胶成像系统 (Bio-Rad) 中观察, 拍照。

1.3.2 紫外可见分光光度计检测 DNA 纯度及浓度

取少量的 DNA 稀释 50 倍, 用紫外可见分光光度计 (WFZUV-2000) 测定波长 260、280 和 230 nm 下 DNA 样品的光吸收值, 以确定 DNA 的纯度。DNA 浓度的确定采用如下计算公式:

$$\text{浓度 } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$$

式中 A_{260} 是指 260 nm 下的光吸收值。

1.3.3 16S rRNA 基因扩增 用改进的方法提取 DNA 不经纯化, 直接用于 16S rRNA 基因扩增, 以

进一步检测提取的 DNA 是否满足后续操作的要求。PCR 反应体系: 10 $\times$ PCR buffer 5 μ l, MgCl_2 2.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, DNA 模板 2 μ l, TaqDNA 聚合酶 0.5 μ l, 引物 F1 0.2 μ mol/L, 引物 F2 0.2 μ mol/L, 加双蒸水定容至 50 μ l。

PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 1 min, 59℃ 退火 2 min 和 72℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环; 最后 72℃ 补齐 10 min。同时设置不含模板 DNA 的阴性对照和以大肠杆菌基因组为模板的阳性对照。

扩增产物检测: 用 10 g/kg 琼脂糖凝胶, MarkerDL2000 作标准, EB 染色后, 于紫外凝胶成像系统内观察。

2 结果与讨论

2.1 琼脂糖凝胶电泳

如图 1 所示, LiCl 沉淀法能够有效地提取产荚膜细菌基因组 DNA, 所得 DNA 与标准谱带中相对分子质量为 23 kb DNA 接近, RNA 含量较低或者没有, 满足后续操作需要。

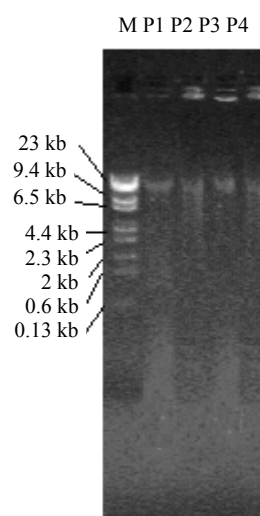


图 1 LiCl 沉淀法提取 4 株细菌基因组 DNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA by LiCl precipitating method

2.2 紫外可见分光光度计检测 DNA 纯度及浓度

由于核酸在 260 nm 处有一最大光吸收值, 蛋白质在 280 nm 处有一最大光吸收值, 酚类及色素等杂质在 230 nm 处有一最大光吸收值, 所以通过比较 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 的比值可以了解所提 DNA 是否达到纯度要求。通常当 $1.8 \leq A_{260}/A_{280} < 2$,

$A_{260}/A_{230} \geq 2$ 时, 表明 DNA 较纯, 此时 DNA 中蛋白质、RNA、酚类及色素等杂质的含量不会影响后续有关分子生物学试验结果^[15]。采用 LiCl 沉淀法提取 DNA 的纯度、浓度及提取量见表 1。

表 1 LiCl 沉淀法提取 DNA 的纯度、浓度及提取量
Table 1 Purity, concentration and distill amount of DNA extracted from bacteria rich in capsule by LiCl precipitating method

菌株号	P1	P2	P3	P4
A_{260}/A_{280}	1.95	1.8	1.73	1.86
A_{260}/A_{230}	3.15	2.0	2.60	19.5
DNA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	102.5	135	112.5	97.5
DNA 总量 (μg)	10.25	13.5	11.25	9.75

由表 1 可知, 采用 LiCl 沉淀法提取的 DNA 基本满足 $1.8 \leq A_{260}/A_{280} < 2$, $A_{260}/A_{230} \geq 2$ (表 1), 说明所 DNA 较纯, DNA 中蛋白质、酚类及色素、RNA 等杂质含量合乎要求。DNA 浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 左右, 满足分子生物学实验要求。

2.3 PCR 扩增产物检测结果

经 LiCl 沉淀法提取得到的 DNA 纯度较高, 不经纯化即可进行 PCR 扩增, 如图 1 所示, 4 株产荚膜细菌和阳性对照均能成功扩增出 16S rRNA 基因, 约 1500 bp 左右, 而阴性对照无扩增条带。证明用

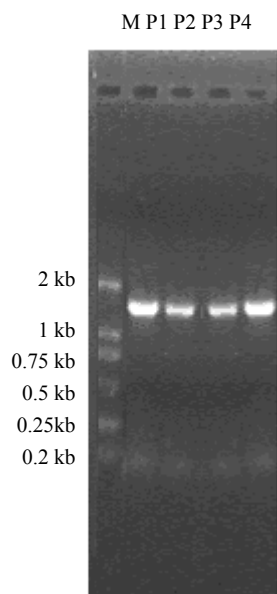


图 2 LiCl 沉淀法提取 4 株细菌 16S rDNA 扩增图谱

Fig. 2 Agarose gel eletrophoresis of 16S rDNA amplification of DNA samples by LiCl precipitating method

LiCl 沉淀法提取的产荚膜细菌基因组 DNA 能够用于分子生物实验。

3 结语

提取细菌基因组 DNA 方法较多, 常用方法有物理法如液氮冻融, 化学法如 SDS、CTAB, 酶解法如裂解酶, 蛋白酶 K 等。其中 SDS 与 CTAB 都是破坏细胞膜, 使细胞内容物释放出来, 不同的是 CTAB 可与核酸结合形成复合物, 有利于 DNA 与变性蛋白及多糖分开, SDS 可与蛋白质形成复合物, 经离心与 DNA 分开^[16]。

笔者发现对于某些产荚膜细菌基因组 DNA 的提取, 这些方法不易去除荚膜物质对 DNA 的提取影响, 如当菌体加入裂解液, 经过加热后, 裂解液形成粘稠的液体, 即使加入去除多糖的试剂情况也不能改善, 或者得到的 DNA 沉淀呈果冻状, 说明较多的荚膜物质未能去除。多糖类物质对核酸限制性内切酶和 PCR 都有抑制作用^[17], 因此从产荚膜细菌中提取 DNA 最关键的步骤就是去除荚膜多糖。施苏华等^[18]在抽提缓冲液中加入 LiCl 分别提取龙眼基因组 DNA, 去除了植物多糖的干扰并得到较高的基因组 DNA 产量。Hong 等^[9]同样在抽提缓冲液中加入 LiCl 来提取富含多糖的海藻基因组 DNA, 并证明 LiCl 可以去除粘稠的多糖干扰。在本实验中采用高浓度的 LiCl 沉淀 RNA, 同时降低了 DNA 抽提液的粘稠度, 从而可去除荚膜多糖对 DNA 纯度的影响。本方法对类似研究具有参考价值。

参考文献:

- [1] Crescenzi V. Microbial polysaccharides of applied interest: Ongoing research activities in Europe. *Biotechnology Progress*, 1995, 11: 251-259
- [2] 俞南雄, 王先极, 史志敬, 腰锐锋, 常理文. 放射型土壤杆菌生物变型 IS-1231 产丁二酸型多糖的研究. *生物工程学报*, 1994, 10 (2): 157-161
- [3] Sutherland IW. *Biotechnology of microbial polysaccharides*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990
- [4] Pszczola DE. Gellan gum wins IFTs food technology industrial achievement award. *Food Technology*, 1993, 47 (9): 94-96
- [5] 里景伟. 微生物多聚糖黄原胶的生产与应用. 北京: 中国农业科技出版社, 1995

- [6] 彭志英, 赵谋明, 刘通讯. 食品生物技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [7] 钟颜麟, 彭志英, 赵谋明. 放射形土壤杆菌 Q 9415 胞外多糖的发酵工艺. 华南理工大学学报 (自然科学版), 2000, 28 (8): 16-21
- [8] 李海阔, 王琛, 周碧君. 提取产气荚膜梭菌染色体 DNA 的新方法—氯化苄法. 贵州大学学报 (农业与生物科学版), 2002, 21 (1): 57-61
- [9] Hong YK, Sohn CH, Lee KW, Kim HG. Nucleic acid extraction from seaweed tissues for polymerase chain reaction. *Journal of Marine Biotechnology*, 1997, 5: 95-99
- [10] Park JW, Cho YC, Nam BH, Sohn CH, Hong YK. RAPD identification of genetic variation in seaweed *Hizikia fusiformis* (Fucales, Phaeophyta). *Journal of Marine Biotechnology*, 1998, 6: 62-64
- [11] 宋国立, 崔荣霞, 王坤波, 郭立平, 黎绍惠, 王春英, 张香娣. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA. 棉花学报, 1998, 10 (5): 273-275
- [12] 王传堂, 黄粤, 杨新道, 姜勇, 张建成, 陈殿绪, 闵平, 禹山林. 改良 CTAB 法和高盐低 pH 值法提取花生 DNA 的效果. 花生学报, 2002, 31 (3): 20-23
- [13] 安鑫龙, 董金皋, 韩建民. 玉米大斑病菌的 RAPD 分析 I. 应用 CTAB 法提取玉米大斑病菌 DNA. 河北农业大学学报, 2001, 24 (1): 39-41
- [14] 李晓红, 陈世义, 钟淑霞, 付爱华, 赵翠杨. 研磨-CTAB 法与碱性异硫氰酸胍煮沸法提取真菌 DNA 的比较分析. 中国实验诊断学, 2005, 9 (3): 364-365
- [15] 吴旭东, 张奇, 侯玉霞, 张文吉. 黄河鲶基因组提取与纯化方法的研究. 淡水渔业, 2006, 36 (1): 19-21
- [16] 吴坤, 陈红歌, 刘娜. 小麦表面微生物总 DNA 提取方法的比较与改进. 中国粮油学报, 2003, 18 (2): 34-38
- [17] Do N, Adams RP. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *BioTechniques*, 1991, 10: 162-166
- [18] 施苏华, 章群, 陈月琴. 一种简的植物核酸提取方法—从干叶和鲜叶中快速提取 RNA 和 DNA. 中山大学学报 (自然科学版), 1996, 35 (2): 103-105

Genomic DNA Extraction from Bacteria Rich in Capsular Polysaccharides by LiCl Precipitating Method

HOU Wei-guo, LIAN Bin

(Key Laboratory of Microbial Engineering, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Bacteria rich in capsule are widely applied in many fields and it is important to investigate their gene resources. But capsules, especially capsule polysaccharides, will disturb DNA extracting largely, thus, LiCl precipitating method was introduced in this paper as a novel method and was examined by electrophoresis, spectrophotometer and amplification of 16S rRNA gene. Results showed that it could extract genomic DNA about 23 kb effectively in molecular weight from bacteria rich in capsule polysaccharides, and doesn't need purification for following serial molecular biological experiments.

Key words: Capsular polysaccharides, Bacteria, Genomic DNA, LiCl precipitating method