

露天矿排土场土壤微生物总 DNA 提取方法的研究

闫 晗, 吴祥云, 张志平

(辽宁工程技术大学 理学院, 辽宁 阜新 123000)

摘要:对露天矿排土场土壤微生物总 DNA 的提取方法进行了研究,将化学法(SDS 高盐法和 PBS 缓冲液法)、酶法(溶菌酶和蛋白酶 K)和机械法(循环冻融)组合为 12 种细胞裂解方案。琼脂糖凝胶电泳和 UV 检测的结果表明,SDS 高盐法与酶法和机械法组合的 6 种方案所获得的 DNA 均具有较好的完整性和较大的浓度。为缩短试验时间,减小 DNA 在循环冻融过程中造成机械断裂的可能性,故 SDS 高盐裂解液不经循环冻融、并加入蛋白酶 K 和溶菌酶的方案组合为最佳,该结果为从分子水平上研究露天矿排土场土壤微生物的多样性及以 PCR 为基础的研究提供了可行的方法。

关键词:露天矿; 土壤微生物; 总 DNA; 提取方法

中图分类号:S154.3

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)10-0008-03

土壤是微生物栖居的主要场所,微生物在土壤中的分布及生命活动与土壤肥力、植物营养、植物病害和植被状况等密切相关^[1]。自然环境中的微生物仅 0.01%~1.00%是可以培养的,大部分处于不可培养状态。传统的分离培养、鉴定菌落研究土壤微生物的方法难以使人们全面了解和深入研究土壤微生物的多样性,运用传统的微生物分离培养方法研究土壤微生物种群构成会导致严重的微生物多态性信息的丢失^[2]。随着现代分子生物学技术的发展,不通过培养微生物而对土壤微生物进行研究已成为可能。PCR 技术能在遗传本质的层面上对微生物群落进行客观的分析,精确地揭示微生物种类和遗传的多样性^[3]。露天矿排土场由于矿物渗出物、污染物、废弃沉积物以及其它干扰物的存在,其土壤环境不利于土壤微生物的生存,因此对露天矿排土场土壤微生物总 DNA 的提取方法进行研究,对于获得高质量的 DNA、PCR 的顺利进行至关重要。现从细胞裂解的方法入手,对化学法、酶法和机械法及其组合进行研究,以筛选出能提高 DNA 的产量、质量和纯度的最佳组合方案。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

研究区为辽宁省阜新市海州露天矿排土场,于 2008 年 5 月 7 日采集土壤样品。采样前双手

及采样工具用 75%酒精消毒,按“之”型分别取 5 点距离地表 0~10 cm 处土样,5 点土样混匀后作为该取样小区的样品。将新鲜土样打碎、混匀,去除杂质、石砾、粗根等,装入无菌塑料袋内,于 -20℃ 冰箱中贮存。

1.2 DNA 提取方法

分别采用 SDS 高盐法和 PBS 缓冲液法并配合不同的酶以及机械法来裂解细胞,在细胞裂解时所采用的酶分别为蛋白酶 K、溶菌酶以及蛋白酶和溶菌酶两者组合。具体操作参照 Zhou^[4]的方法并略有改动。

1.2.1 SDS 高盐法 ①取 1 g 土壤放入研钵中,倒入适量的液氮研磨直至土壤颗粒研成粉末。将土壤粉末倒入 10 mL 离心管中并加入 2.7 mL DNA 提取液〔0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0); 0.1 mol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0); 0.1 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄; 1.5 mol·L⁻¹ NaCl; 1% CTAB〕和 10 μL 蛋白酶 K (20 mg·mL⁻¹) 或 80 μL 溶菌酶 (50 mg·mL⁻¹),或者两种酶均加入,混合摇匀置于 37℃ 摇床 225 r·min⁻¹ 振荡 30 min。②加入 0.3 mL 20% SDS,轻轻混匀于 65℃ 水浴 2 h,每隔 15~20 min 轻轻颠倒几下。③ 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液转入新的 10 mL 离心管中。④再取 900 μL DNA 提取液和 100 μL 20% SDS,颠倒混匀后 65℃ 水浴 10 min。⑤ 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液与原上清液合并。重复操作 1 次,合并上清液。⑥ 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,用阔口 Tip 头吸上清液于一新离心管中,加等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提 10 min。⑦ 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,用阔口 Tip 头吸上清液于一新离心管中,加等体积的氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提 10 min。⑧ 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,用阔口 Tip 头吸上清液于一新离心

收稿日期:2010-06-02

基金项目:辽宁省教育厅科研基金资助项目(20060391)

第一作者简介:闫晗(1980-),女,辽宁省阜新市人,博士,讲师,从事土壤生态治理方面研究。E-mail: yanh112@163.com。

通讯作者:吴祥云(1962-),男,辽宁省辽阳市人,博士,教授,从事水土保持与恢复生态学领域的研究。E-mail: wuxyun2003@yahoo.com.cn。

管中,加入 2 倍体积的冷无水乙醇于-20℃沉淀 DNA 0.5~1.0 h。用预冷的 75%乙醇洗涤 DNA 3 次,室温干燥,TE 溶解。置于 4℃待用。

所采用的机械法为循环冻融法,具体操作为 65℃水浴 2 h,每隔 15~20 min 轻轻颠倒几下后将样品轻轻移至-180℃液氮中 10 min,后移至 65℃水浴 1 h,循环 3 次。其余步骤同上。

1.2.2 PBS 缓冲液法 ①取 1 g 土壤,研碎,加入 2 mL PBS 缓冲液(0.12 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄, pH 8.0),置于 37℃摇床 225 r·min⁻¹ 振荡 30 min。②加入 1.5 mL 溶液 I (0.15 mol·L⁻¹ NaCl,

0.1 mol·L⁻¹ EDTA), 10 μL 蛋白酶 K 或 80 μL 溶菌酶(50 mg l·mL⁻¹),或者两种酶均加入,37℃水浴 2 h,每隔 15~20 min 轻轻颠倒几下。③ 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液转入新的 10 mL 离心管中。④再加入 2 mL 溶液 II(0.15 mol·L⁻¹ NaCl, 0.5 mol·L⁻¹ EDTA, 10% SDS),颠倒混匀后 65℃水浴 10 min。10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液与原上清液合并。⑤重复第④步操作 1 次,合并上清液。⑥其余步骤同 1.2.1 中的⑥~⑧。机械法同前。

两种缓冲液与 3 种酶、机械法的组合方案见表 1。

表 1 处理及其编号

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
酶	蛋白酶 K	溶菌酶	蛋白酶 K 溶菌酶	蛋白酶 K	溶菌酶	蛋白酶 K 溶菌酶	蛋白酶 K	溶菌酶	蛋白酶 K 溶菌酶	蛋白酶 K	溶菌酶	蛋白酶 K 溶菌酶
裂解液	PBS	PBS	PBS	SDS	SDS	SDS	PBS	PBS	PBS	SDS	SDS	SDS
机械法	否	否	否	否	否	否	冻融	冻融	冻融	冻融	冻融	冻融

1.3 凝胶电泳检测 DNA 完整性

将 5 μL DNA 和 1 μL 的 Loading Buffer 混匀点样在 1%琼脂糖凝胶(含 0.5 μg·mL⁻¹ EB)上,80V 电压电泳,用凝胶成像系统观察并用数码相机拍照,初步检测提取的 DNA 完整性。

1.4 紫外分光光度计检测 DNA 纯度

以 4 mL TE 作空白对照,另于装有 3.6 mL TE 的石英比色皿中加入 400 μL DNA,充分混合,使其稀释 100 倍。在波长为 260、280 nm 处调节紫外分光光度计读数至零(用对照的 TE)。于 260、280 nm 波长处读数,分别测定其 OD 值,根据公式(1)计算所提取 DNA 的浓度,根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值确定 DNA 的纯度测定^[5]。

DNA/μg·mL⁻¹ = OD₂₆₀ × 50 μg·mL⁻¹ ×
稀释倍数

(1)

2 结果与分析

2.1 DNA 完整性

各处理组合琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。可以看出,4~6 号样品的谱带和 10~12 号样品的谱带(均为 SDS 高盐法)在 λ-Hind III 即 Marker 23 kb 的附近均有条带出现,说明 SDS 高盐法所提取的 DNA 均有较好的完整性。1~3 号样品的谱带(PBS 缓冲液未经循环冻融)中无明显条带,而 7~9 号样品的谱带中条带亮度较弱。从条带的亮度来看,SDS 高盐法加入 2 种酶且不经循环冻融的 6 号样品的谱带亮度强于其它条带,说明该法所提取的 DNA 得率为最高。因此可以推断,蛋白酶 K 和溶菌酶共同作用可以提高 DNA 的提取率,反复的循环冻融可能会造成基因组 DNA 的机械断裂而不利于提取土壤微生物的总 DNA。

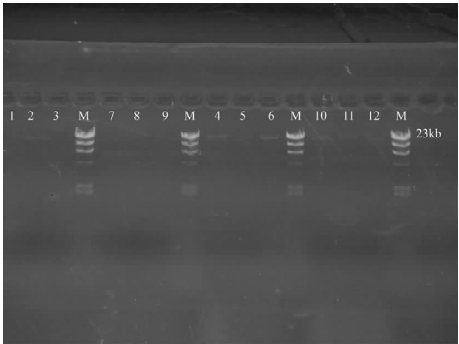


图 1 不同组合方案提取的 DNA 电泳图
(M:λ-Hind III)

2.2 DNA 纯度

用紫外分光光度计法测得的 DNA 浓度及纯度见表 2。可知,6 号样品的 DNA 浓度最大,与凝胶电泳初步检测的结果相符。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值大一些的模板,说明其中的杂质较少,DNA 的纯度相对较高。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值小于 1.8,说明模板中有蛋白质、酚等杂质的污染;OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值大于 2.0,说明模板中有少量的 RNA;OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~1.9 的范围内最好。表 2 中的值均不在此范围内,说明模板中有许多的杂质,需要进一步的纯化处理。

综合凝胶电泳的 DNA 完整性检测结果和 UV 检测 DNA 的纯度和浓度的结果来看,在多种细胞裂解的方法组合中,不经循环冻融、且同时加入蛋白酶 K 和溶菌酶的方案组合为最佳。但是所提取的 DNA 含有较多的杂质,如抽提过程中残留的酚等有机试剂或土壤中含有的腐殖酸,因此需要进一步的纯化才可以进行 PCR 扩增,否则会影响 PCR 扩增的顺利进行。

表 2 DNA 浓度和纯度分析

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DNA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	230	161	188	668	565	687	243	263	208	573	553	595
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.08	1.04	1.06	1.15	1.08	1.07	1.08	1.10	1.08	1.12	1.11	1.15

3 结论与讨论

用直接法提取土壤微生物 DNA,主要考虑的是细胞裂解方法对 DNA 得率的影响。常用的细胞裂解方法有机械法、化学法和酶法。单纯使用一种方法很难得到高质量的 DNA,适当进行各种方法的组合,可以得到不错的结果。

常用的机械方法是冻融和加玻璃珠搅拌,它们可以破坏土壤结构,最大限度地触及整个细菌群落,但也存在一定的弊端。Bürgmann H 等^[6]对加玻璃珠搅拌的方法进行了研究,发现在提取缓冲液体较小的情况下,搅拌时间越长、速度越大则 DNA 产量越高,但 DNA 损伤也增加。该试验也得到了相似的结论,即反复冻融会降低 DNA 的得率。

化学方法提取土壤微生物 DNA 最常用的是阴离子去污剂 SDS,它能够溶解构成细胞膜的疏水性物质,通过破坏细胞膜结构的方式破碎细胞,从而使 DNA 能够从细胞中提取出来。在实际操作中,往往是将 SDS 与其它试剂结合使用以达到最佳的效果,如 EDTA 螯合剂、CTAB 或磷酸钠缓冲液,曾经有报道指出,在土壤中加入 SDS-磷酸钠缓冲液获得的 DNA 片段平均长度约为 25 kb^[7]。利用化学法提取 DNA 时必须与酶法相结合才能达到事半功倍的效果。在提取土壤微生物 DNA 时常用到的酶有溶菌酶和蛋白酶 K。溶菌酶水解糖苷键和腐殖酸,以此来提高 DNA 的纯度。蛋白酶 K 可以用来消化细胞中的蛋白质,有助于细胞的裂解。2 种酶的作用不同,因此

将这 2 种酶同时用于土壤微生物的细胞裂解,所获得的 DNA 得率最高。

由于露天矿排土场土壤中含有多种土壤酶、大量的腐殖质以及煤矸石和重金属,而导致土壤微生物 DNA 的提取成为了难点。该研究建立了利用直接法提取露天矿排土场土壤微生物总 DNA 的方法组合,该方法具有简便、快速、造价低的特点,更重要的是能够从土壤微生物中获得完整性好、浓度大的 DNA。用该法所获得的 DNA 经过纯化后可以进行下一步研究,为从分子水平上研究土壤微生物的群落结构以及多样性等提供了可行的方法。

参考文献:

- [1] 魏志琴,曾秀敏,宋培勇. 土壤微生物 DNA 提取方法研究进展[J]. 遵义师范学院学报,2006,8(4):53-56.
- [2] 邵继海,何绍江,冯新梅. 4 种土壤微生物总 DNA 的纯化方法的比较[J]. 生物学杂志,2005,25(3):1-4.
- [3] 朱建林,詹鹏,吕文洲. 聚合酶链反应—变性梯度凝胶电泳技术研究梯田式人工湿地微生物群落动态变化[J]. 环境污染与防治,2010,32(2):46-50.
- [4] Zhou J Z, Mary A B, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diversity composition[J]. Appl Environ Microbiol,1996,62(2):316-322.
- [5] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南(精编版)[M]. 黄培堂,译. 北京:化学工业出版社,2008:645-649.
- [6] Bürgmann H, Pesaro M, Widmer F, et al. A strategy for optimizing. Quality and quantity of DNA extracted from soil[J]. J. Microbiol Methods,2001,45(1):7-20.
- [7] Selenska S, Klingmüller W. DNA recovery and detection of Tn5 sequences from soil[J]. Lett. Appl Microbiol,1991,13(1):21-24.

Study of Extraction Methods for Soil Microbial Total DNA in the Opencast Coal Mine Dump

YAN Han, WU Xiang-yun, ZHANG Zhi-ping

(Science College of Liaoning Technical University, Fuxin, Liaoning 123000)

Abstract: Extraction methods for soil microbial total DNA were studied in opencast coal mine dump. The chemical methods(SDS hyperhaline buffer and PBS buffer), the enzyme methods(lysozyme and proteinase K) and the mechanical method(freeze-thaw cycles) were grouped into twelve kinds of schemes. Agarose gel electrophoresis and UV tests showed that six kinds of methods could extract DNA having better integrity and greater consistency. These methods were made up of SDS hyperhaline buffer, the enzyme methods and the mechanical method. In order to shorten test time and reduce feasibility of DNA fracture, the scheme that was SDS hyperhaline buffer joining proteinase K and lysozyme without mechanical method was the best. The results provided a feasible method for studying soil microbial diversity of opencast coal mine dump in the molecular level.

Key words: opencast coalmine; soil microorganism; total DNA; extraction method