

土壤微生物总 DNA 的提取和纯化*

张瑞福¹ 曹 慧^{1,2} 崔中利^{1**} 李顺鹏¹ 樊 奔¹

(¹ 南京农业大学农业部农业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 本文建立了从土壤中提取总 DNA 的方法,并通过改进使适合于对革兰氏阳性菌的提取。用 9 种性质不同的土壤进行验证,均提取到了 DNA,每克干土的 DNA 提取量从 3.30 μ g ~ 13.41 μ g,通过透析袋回收进行纯化,纯化回收率达到 65.34%,纯化后的土壤 DNA 可以直接扩增出 16S rDNA。9 种土壤的提取率从 60.51% ~ 93.45%,可以从每 g 干土添加 362 个菌体的土壤中扩增到目的条带。

关键词 土壤 DNA 提取 纯化 提取量 提取率 PCR 扩增

中图分类号 S154.4 文献标识码 A 文章编号 1006-6179(2003)02-0276-07

从自然环境中提取细菌 DNA 是非常有用的方法,可用于检测不可培养的细菌^[1,2],跟踪某些目标菌株或重组基因在自然环境中的行为^[3,4]。也可以用来揭示土壤微生物生态系统中的基因的多样性及其随环境的变化^[5]。从环境样品中抽提和纯化 DNA 是最关键的技术问题之一。来自环境中的样品含有非常复杂的成分^[6],尤其是土壤中的腐质酸类物质在提取过程中不能去除掉,直接影响后续的 PCR 扩增、杂交、内切酶消化等。本文建立了适合从不同土壤提取总 DNA 并进行纯化的方法,可应用于环境中微生物的研究。

1 材料和方法

1.1 土壤样品的采集与性质测定

从各地采集了不同性质的土壤,基本性质如表 1。

1.2 菌株

大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 霉状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*), 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)都是本实验室保存;邻单胞菌(*Plesiomonas* sp.) M6 为本实验室分离的甲基对硫磷农药降解菌(带有甲基对硫磷水解酶基因 *mpd*)。

1.3 土壤 DNA 的提取方法^[7]

1.3.1 自然土壤 DNA 的提取 称取 5g 土壤样品,与 13.5mL DNA 提取液(100mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L EDTA, 100mmol/L 磷酸钠, 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB, pH8.0)混合,再加入 100 μ L 蛋白酶 K (10mg/mL),于 225r/min 摇床上 37 $^{\circ}$ C 摇动 30min,接着加入 1.5mL 20% SDS, 65 $^{\circ}$ C 水浴 2h,每隔 15 ~ 20min 轻轻颠倒几下,室温 6 000 \times g 离心 10min,收集上清,转移到

* 中国科学院南京土壤研究所物质循环开放实验室开放课题(2025102)和红壤站开放课题(2001-K-01)资助项目

** 通讯作者

作者简介 张瑞福(1974 -)男,山东人,在读博士生,主要从事环境与土壤微生物研究。E-mail: zhangruifu@263.net

收稿日期 2002-06-27,修回日期 2002-09-29

50mL 离心管中,土壤沉淀再加入 4.5mL 提取液和 0.5mL 20% 的 SDS,涡旋 10s,65℃ 水浴 10min,室温 $6\ 000 \times g$ 离心 10min,收集上清合并于上次上清。重复上述操作,收集上清与前两次上清合并。上清与等体积的氯仿-异戊醇(24:1 体积比)混合,离心,吸取水相转移至另一 50mL 离心管中,以 0.6 倍体积的异丙醇室温沉淀 1h,室温 $16\ 000 \times g$ 离心 20min,收集核酸沉淀,用冷的 70% 乙醇洗涤沉淀,重悬于灭菌的无离子水中,最终体积为 500 μ L。

表 1 试验所用土壤样品

Table 1 The soil samples tested in this study

Sample No.	Location	Soil type	Organic matter content /%	Sampling time	Landuse/fertilization
Y1	Nanjing, Jiangsu	Yellow brown soil	2.55	2001.12	Vegetable
Y2	Weifang, Shandong	Fluvo-aquic soil	1.91	2001.12	Flower
Y3	Wuxian, Jiangsu	Paddy soil	1.62	2001.9	Rice
Y4	Dafeng, Jiangsu	Yellow sandy soil	1.42	2001.12	Barren land
Y5	Yingtian, Jiangxi	Red soil	1.31	2001.11	Straw in place returned
Y6	Yingtian, Jiangxi	Red soil	1.35	2001.11	Rice straw and shoot
Y7	Yingtian, Jiangxi	Red soil	1.28	2001.11	Green manure
Y8	Yingtian, Jiangxi	Red soil	2.32	2001.11	Animal manure
Y9	Yingtian, Jiangxi	Red soil	0.99	2001.11	No fertilizer

Note: The samples were stored at 4℃ and cultured for one week at 30℃ with water content of 20% before experiment.

1.3.2 土壤中 G^+ 细菌 DNA 的提取 霉状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌过夜培养,离心收集菌体,无菌水洗涤,再悬浮于等体积无菌水中。各吸取 1mL 上述 3 种悬浮液,分别加入 5g 灭菌土壤 Y1 中,摇床振荡吸附 30min 后提取 DNA。在此提取方法的基础上,水浴结束后,于 -70℃ 冷冻,然后于 65℃ 融化,反复 3 次,比较两种提取方法的效果。

1.3.3 提取 DNA 的定量 以 λ DNA(0.569 μ g/ μ L)作为标准,与提取 DNA 同时电泳后,经溴化乙锭染色后,用 TANON 凝胶分析软件进行分析定量。

1.4 土壤 DNA 的纯化

1.4.1 纯化方法 透析袋电洗脱纯化回收法,具体操作参见文献^[8]

1.4.2 纯化回收效率 吸取 20 μ L 的标准 λ DNA(0.0569 μ g/ μ L),按上述回收方法回收 DNA,回收 DNA 与标准 λ DNA 同时电泳后用 TANON 软件进行定量,计算纯化回收效率。

1.5 土壤 DNA 的提取效率及质量检查

1.5.1 土壤 DNA 提取效率 9 个土样都于 121℃ 湿热灭菌 1h,提取灭菌土壤的 DNA 检查灭菌情况。*E. coli* DH5 α 隔夜培养后,离心收集菌体,无菌水洗涤 3 次,然后悬浮于等体积无菌水中,以无菌操作取 1mL 分别接种 5g 的 9 种灭菌土壤,摇床振荡吸附 0.5h 后提取。同时设置纯菌作为对照。所有处理与对照均有 3 个重复。提取后定量对照与各处理的 DNA 提取量,计算提取效率。提取效率 = 各处理的提取量/对照的提取量 $\times 100\%$ 。

1.5.2 纯化后的土壤总 DNA 中 PCR 扩增 16S rDNA 从土壤 DNA 扩增 16S rDNA 的引物 1 序列为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* bases 8 to 27),引物 2 序列为 5'-TACCT-TGTTACGACTT-3' (*E. coli* bases 1507 to 1492)。PCR 扩增反应体系:10 \times 缓冲液 5 μ L, dNTP

(25mmol/L) 4 μ L, 引物 1(25pmol/ μ L) 2 μ L, 引物 2(25pmol/ μ L) 2 μ L, Mg²⁺(25mmol/L) 4 μ L, 模板(土壤 DNA)10 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 2.5U, dd H₂O 22.5 μ L, 总体积 50 μ L。反应参数: 95 $^{\circ}$ C 变性 10min, 95 $^{\circ}$ C 2min, 42 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 4min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20min。

1.6 土壤中目标菌株 DNA 的提取灵敏度

1.6.1 土壤接种目标菌株 菌株 M6(带有 *mpd* 基因)是甲基对硫磷降解菌,其甲基对硫磷水解酶基因已被克隆^[9]。菌株 M6 活化后,隔夜培养,离心收集菌体,无菌水洗涤 3 次,以 10⁻²-10⁻⁸ 系列稀释,各稀释度分别取 1mL 加入到 5g 土壤 Y1 中,摇床振荡 30min,然后提取 DNA 进行纯化。提取前用含有甲基对硫磷的肉汤平板计数添加到土壤中的 M6 菌。

1.6.2 目的基因(*mpd*)的 PCR 扩增:引物 1 为:5'-GAATTCATATGCCCTGAAGAAC-3',引物 2 为:5'-GAATTCGAGCTTGGGGTTGACGACCG-3'。扩增反应体系:10 \times 缓冲液 2.5 μ L, dNTP(25mmol/L) 2 μ L,引物 1(25pmol/ μ L) 0.5 μ L,引物 2(25pmol/ μ L) 0.5 μ L, Mg²⁺(25mmol/L) 1.5 μ L, 模板(土壤 DNA) 3 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 2.5U, dd H₂O 14.5 μ L 总体积 25 μ L。反应参数:95 $^{\circ}$ C 变性 2min, 95 $^{\circ}$ C 1min, 45 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

2 结果和分析

2.1 不同土壤中 DNA 的提取

用 SDS 高盐抽提法从 9 种不同土壤中都提取出了 DNA,而灭菌后的土壤,由于在高温灭菌过程中核酸被分解,都不能提取到(图 1)。并且用该方法提出的总 DNA,其片段均大于 23.1kb,有利于对其进行后续操作。每 g 干土中提取的 DNA 从 3.30 μ g - 13.41 μ g,提取量最大的是土壤 Y1,最低的是土壤 Y9。土壤中总 DNA 的提取量与土壤的有机质含量呈正相关($r = 0.91$)。在同一种土壤中,例如红壤,由于耕作措施的不同,使土壤有机质含量也变化很大,土壤 Y9 由于不用有机肥料,土壤有机质含量非常低,仅为 0.99%,而增施秸秆和有机肥的土壤土壤有机质明显升高,土壤中可培养的细菌数和总 DNA 提取量均相应地发生变化(表 2)。由此也说明,SDS 高盐抽提法适合于从不同的土壤中抽提 DNA。

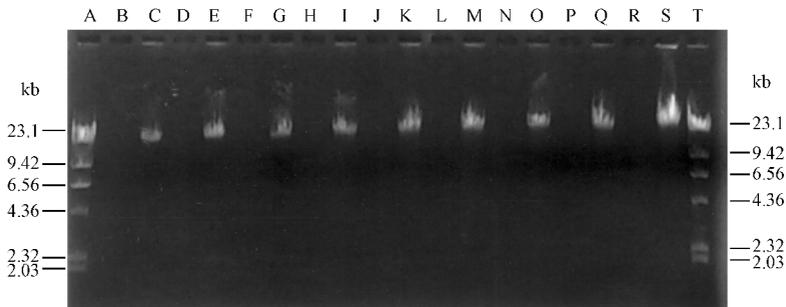


图 1 不同土壤提取的总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from different soil

A. T. λ DNA/*Hind*III marker; B. Autoclaved soil Y9; C. Soil Y9; D. Autoclaved soil Y8; E. Soil Y8; F. Autoclaved soil Y7; G. Soil Y7; H. Autoclaved soil Y6; I. Soil Y6; J. Autoclaved soil Y5; K. Soil Y5; L. Autoclaved soil Y4; M. Soil Y4; N. Autoclaved soil Y3; O. Soil Y3; P. Autoclaved soil Y2; Q. Soil Y2; R. Autoclaved soil Y1; S. Soil Y1.

表 2 不同土壤中总 DNA 的提取量和计数的细菌数量

Table 2 The yield of total DNA extracted from different soils and the counts of their bacteria cells

Items	Soil samples No.								
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9
Yield of crude DNA ($\mu\text{g/g}$ dry soil)	13.41 ± 2.70	9.58 ± 3.26	9.06 ± 3.46	8.21 ± 1.91	6.19 ± 3.41	6.46 ± 2.32	5.10 ± 1.36	10.04 ± 2.10	3.30 ± 1.19
Number of soil bacteria ^a ($\times 10^6/\text{g}$ dry soil)	25.8	21.3	20.2	7.25	5.48	6.58	5.32	10.2	3.64

Note : A plate counting

2.2 土壤中 G⁺ 细菌 DNA 的提取

由于基于 SDS 的高盐提取法会对一些革兰氏阳性细菌效果不好,本文增加物理性的处理方法,由图 2 可以看出,经过冻融处理后,3 种芽孢杆菌均提取到了 DNA,未经冻融处理的霉状芽孢杆菌未提取到 DNA,并且冻融处理也未对 DNA 造成大的剪切,提取的 DNA 片段还大于 23.1kb。

2.3 土壤 DNA 的提取效率

各种土壤由于性质不同,特别是土壤中粘粒的比例不同,土壤总 DNA 的提取效率也会有很大的差异,9 种土壤总 DNA 的提取效率从 93.45% ~ 60.51% 最高的为 Y4,提取效率达到 93.45%,最小的为 Y6,提取效率为 60.51% (表 3)土壤 Y4 为黄沙壤,粘粒所占比例最小。从表 3 中还可以看出,同一类型的土壤,提取效率差别不大。土壤中的粘粒由于会造成微生物紧紧吸附于其上而无法分离,或由于其周围的空间小而造成无法与菌体裂解液发生作用。所以 DNA 提取效率与土壤中粘粒的比例是呈负相关的。

表 3 不同土壤中总 DNA 的提取效率

Table 3 The percentage of total DNA extracted from different soil samples

Items	Soil samples No.									
	Pure culture	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9
DNA yield/ μg	14.51 ± 0.62	13.16 ± 0.29	13.35 ± 1.13	11.99 ± 1.10	13.56 ± 0.59	9.78 ± 0.90	8.78 ± 0.59	9.49 ± 1.12	8.96 ± 1.28	9.61 ± 0.73
Extracting efficiency/%		90.70	92.01	82.63	93.45	67.40	60.51	65.40	61.75	66.23

2.4 粗提 DNA 的纯化

2.4.1 纯化回收率: $20\mu\text{L}$ 的标准 λDNA ($0.0569\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 经透析袋回收后,得到 $0.7436 \pm 0.0702\mu\text{g}$ DNA,则纯化回收效率为: $0.7436(20 \times 0.0569) \times 100\% = 65.34\%$ 。透析袋回收法虽然操作复杂,但对于大片段 DNA 却非常有效。

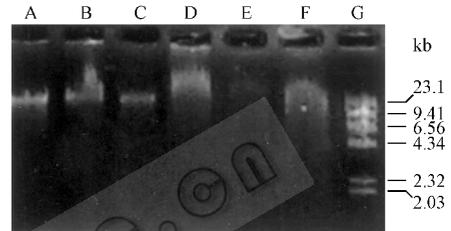


图 2 土壤中芽孢杆菌 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from soil with bacillus

A. *Bacillus subtilis* SDS + freezing-thawing ; B. *Bacillus mycoides* SDS + freezing-thawing ; C. *Bacillus thuringiensis* SDS + freezing-thawing ; D. *Bacillus subtilis* SDS ; E. *Bacillus mycoides* SDS ; F. *Bacillus thuringiensis* SDS ; G. $\lambda\text{DNA}/\text{HindIII}$ marker.

2.4.2 土壤 DNA 的 PCR 扩增 :由于从土壤中提取的 DNA 含有腐质酸类物质在提取过程中无法去除掉,若不经纯化,则由于所含的腐质酸等杂质的干扰,使其不能用于下一步的操作,如 PCR 扩增、杂交等。本文从纯化后的土壤 DNA 中通过 PCR 直接扩增出土壤细菌的 16S rDNA(图 3),证明经过该方法纯化后的土壤 DNA 适合进行后续的操作。

2.5 土壤中目标菌株 DNA 的提取灵敏度

使用一对特异引物扩增 M6 菌株的 *mpd* 基因片段,大小为 1.0kb 左右。取 3 μ L 纯化后的 DNA 做模板,可以从每 g 添加 362 个菌体的 Y1 土样中扩增出目的条带(图 4)。而不添加 M6 菌株的土样则不能扩增出目的条带。说明所建立的提取与纯化方法对提取土壤中的目标菌株是非常灵敏的。应用该方法来分离土壤中含量少的微生物或基因资源,或者用来监测自然环境中的特定菌株或重组基因也是行之有效的。

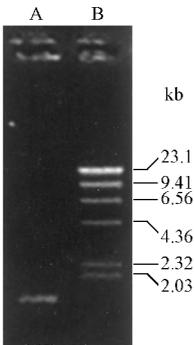


图 3 以土壤 DNA 为模板扩增的 16S rDNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplified from soil DNA

A. 16S rDNA B. λ DNA/*Hind*III marker.

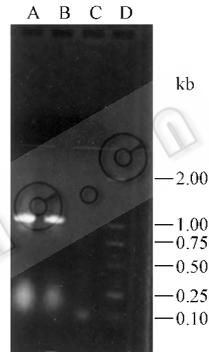


图 4 从土壤中扩增的菌株 M6 的 *mpd* 基因琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of *mpd* gene amplified from M6 DNA in soil A. M6 pure culture ;B. Soil + 352 cells/g soil ;

C. Nature soil ;D. DL2000 marker.

3 讨论

由于土壤本身及其中微生物的复杂性,常规分析微生物的方法如平板计数、生物量测定等方法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,并已在海外受到广泛的关注^[10]。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^[11],一是在土壤中直接裂解微生物体,再提取 DNA^[12]。另一类是先将微生物菌体与土壤颗粒分开,再提取 DNA^[13]。一般第一类方法提取效率比较高。从土壤中提取 DNA 有两个关键步骤:①土壤中菌体细胞的裂解和粗 DNA 的提取;②粗 DNA 的纯化。粗 DNA 的提取和纯化均有不同的方法,有些工作者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^[16]。也有用微型柱进行粗提 DNA 的纯化,但每次能纯化的样品少,对于大片段的 DNA 回收率低^[12]。选用哪种方法的组合,要根据实验的要求选择。本实验选择基于 SDS 的高盐提取法和透析袋回收法,既保证了一定的提取与回收效率,又兼顾了 DNA 的质量,使在提取和纯化过程中, DNA 不会受到机械损伤。

提取方法的效率及其灵敏度对于后续研究是十分重要的,高效提取才能具有代表性。基于 SDS 的高盐提取法对 9 种土壤总 DNA 的提取效率从 93.45% ~ 60.51%,但这种从灭菌土壤中提取外源添加菌株的 DNA 所计算的提取效率可能会高于土壤中土著微生物的提取效率。因为土著微生物可能会比接种的菌株更难裂解。

根据 Bakken 等^[14]的研究,土壤中土著性细菌平均 DNA 含量为 1.6fg ~ 2.4fg/细胞,若据此计算,则在本研究中用活菌平板计数法得到的细菌数还不到根据提取的 DNA 量得到的数量的 1%,这也跟许多研究者的观点相符。由此也可以看出群体基因组学的方法研究土壤微生物具有独特的优势,可以使研究对象的范围更加扩大。

参 考 文 献

- [1] Liesack W, Stackebrandt E. Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol*, 1992, **174** (4) 5072 ~ 5078.
- [2] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* (London), 1990, **345** 63 ~ 65.
- [3] Holben W E, Jansson J K, Chelm B K, et al. DNA probe method for the detection of specific microorganism in the soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54** 703 ~ 711.
- [4] Steffan R J, Atlas R M. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54** 2185 ~ 2191.
- [5] Torsvik V, Goksoyr J, Daae F L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56** 782 ~ 787.
- [6] Ogram A, Sayler G S, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods*, 1987, **7** 57 ~ 66.
- [7] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** 316 ~ 322.
- [8] J 萨姆布鲁克, E F 弗里齐, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [9] Cui Zhongli, Li Shunpeng, Fu Guoping. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (10) 4922 ~ 4925.
- [10] Vigdis T, Lise O. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Ecology and industrial microbiology*, 2002, **5** 240 ~ 245.
- [11] Laurag G L, James R, Dana J, et al. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **59** 1141 ~ 1143.
- [12] Tsai Y L, Olson B H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57** 1070 ~ 1074.
- [13] Jacobsen C S, Rasmussen O F. Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation - exchange resin. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58** 2458 ~ 2462.
- [14] Bakken L R, Olsen R A. DNA content of soil bacteria of different cell size. *Soil Biol Biochem*, 1989, **21** (6) 789 ~ 793.

Extraction and Purification of Soil Microbial Total DNA *

Zhang Ruifu¹ Cao Hui^{1,2} Cui Zhongli^{1**} Li Shunpeng¹ Fan Ben¹

(¹ Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

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

Abstract: A method of extracting soil total DNA was developed, and it can extract DNA from G⁺ bacteria. The soil total DNA was extracted from 9 different soils, the DNA yield was from 3.30ng to

13.41 μ g. The crude soil DNA was purified by dialysis bag, the recovery rate is 65.34%. The extracted rate in the 9 soils was 60.51% ~ 93.45%. The target gene could be amplified from the soil which was added 362 target cell/g, dry soil.

Key words : Soil DNA extraction, Purification, Extraction yeild, Extraction rate, PCR amplification

* This work was supported by the Laboratory of Material Cycling in Pedosphere(2025102), the Ecological Experiment Station of Red Soil(2001-K-01), the Chinese Academy of Sciences.

** Corresponding author

2003 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

会议名称	筹办单位	时间	人数	地点	联系人
2003 年中国微生物学会学术年会暨第八届三次全体理事会	中国微生物学会	11 - 12 月	250	待定	尹 畅 010 - 62554677
第六届全国真菌学学术研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	4 月 1 - 3 日	50 - 80	南京	刘维达 liumyco@hotmail.com
第三届全国微生物与免疫学学术会议	中国微生物学会医学微生物与免疫学专业委员会	4 月	100	杭州	关显智 0431 - 5645911 - 6574
全国调味品学术研讨会	中国微生物学会酿造学会	5 月	100	待定	张 林 顾甘泉 010 - 69504653
第五届四体病和弓形虫病学术研讨会	中国微生物学会《人兽共患病杂志》编辑部	5 月上旬	70	厦门	于恩庶 0591 - 7552018
第二届全国微生物肥料技术研讨和产品展示会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	5 月 28 - 30 日	80	无锡	李 俊 010 - 68918702
第四届全国酶工程学术讨论会	中国微生物学会酶工程专业委员会	7 月	70	无锡	黎高翔 010 - 62643074
中德环境微生物及多样性研讨会	中国微生物学会协办	8 月 5 日—12 日	90	北京	肖昌松 010 - 62554677
第八届全国微生物学教学研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会协办	8 月	80	湖南	夏立秋 0731 - 8872298
环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	8 - 9 月	80	成都	李顺鹏 025 - 4396314
生物催化前沿基础研究学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	8 月/10 月	70	济南/威海	曲音波 陈冠军 0531 - 8564429