

# 堆肥中微生物总 DNA 的高效提取

何丽鸿<sup>1,2</sup>, 赵 勇<sup>1,2</sup>, 陈明杰<sup>2\*</sup>, 潘迎捷<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup> 南京农业大学生命科学院微生物学系 南京 210095)

(<sup>2</sup> 上海市农业遗传育种重点开放实验室 上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201106)

(<sup>3</sup> 上海水产大学 上海 200090)

**摘 要** :采用化学裂解和酶解相结合的方法,选择加入 PVPP 的高盐缓冲液作为细胞裂解的反应体系,并以 PEG-8000 进行 DNA 沉淀,从高有机含量的堆肥样品中进行微生物总 DNA 的提取。结果表明,从 4 种性质不同的堆肥中均获得了高质量的微生物总 DNA,所得的 DNA 分子片段在 23kb 左右,每克干重堆肥的总 DNA 提取量为  $63.54 \pm 12.08 \mu\text{g} \sim 106.50 \pm 28.36 \mu\text{g}$ ,  $A_{260}/A_{280}$  大于 1.6,  $A_{260}/A_{230}$  大于 1.8,不用经过纯化可以直接进行 PCR 扩增和限制性酶切,以该 DNA 为模板进行微生物区系的 DGGE 分析,显示了丰富的微生物多样性。该方法减少了通常环境样品 DNA 提取过程中的纯化步骤,减少了 DNA 的损失,为从事微生物分子生态学,尤其是那些针对高有机含量以及获取极为不易的环境样品的研究而言是十分有益的。

**关键词** 堆肥;DNA 的高效提取;高有机含量;DGGE

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)01-0162-04

堆肥是回收利用有机残余物质的重要方法之一,近年来其在土壤修复方面的潜力也逐渐引起了人们的关注,对堆肥过程中微生物的衍替情况进行研究,有助于我们更深入地了解堆肥发生的机理,从而更好地实现对其技术的控制和优化。基于 DNA 分析的分子生态学技术为该研究提供了强有力的工具,而该技术的应用必须以能获得真实反映原环境样品中微生物实际组成状况的总 DNA 为基础<sup>[1]</sup>。堆肥中含有高达 30%~70% 的有机质<sup>[2]</sup>,远远高于一般的环境样品,堆制过程中会产生大量的腐殖酸,而腐殖酸在 DNA 的提取和纯化过程中不易去除,会影响后续的 PCR 扩增、限制性酶切以及杂交等反应<sup>[3]</sup>。因此,尽管近年来土壤等环境样品中的 DNA 提取、纯化工作已经有了很大的突破,但高有机含量的堆肥样品 DNA 的获得仍存在着纯化回收效率低,纯化产物 PCR 扩增不稳定等问题<sup>[2,4]</sup>。本文介绍了从高有机含量的堆肥样品中高效提取微生物总 DNA 的方法,可用于堆肥中的

微生物分子生态学研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 堆肥样品的采集** :从各地采集了 4 份不同来源的堆肥样品,其性质见表 1,以两份土壤样品做比较。

**1.1.2 试剂和仪器** :PVPP(Polyvinylpyrrolidone, Sigma), PEG-8000(Polyethylene glycol, Sigma),腐殖酸标准品(Humic acid mixture, Aldrich),蛋白酶 K(Proteinase K, Merck),Taq 酶(Promega),溶菌酶(Genview),溶壁酶(广东微生物研究所),各种限制性内切酶(MBI),DNA 胶纯化回收试剂盒(V-gene),其他试剂均为国产分析纯或分子生物学等级。Waring blender(EBERBACH),PCR 扩增仪(MJ Research PTC-200),核酸蛋白分析仪(BECKMAN),DGGE 电泳仪(Bio-Rad Dcode),凝胶成像系统(Pharmacia VDS)。

表 1 试验所用堆肥样品

Table 1 The compost samples tested in this study

Sample No.	Location	Sample type	Function	Organic matter content/%
C1	Yantai, Shandong	Waste cotton, Rice straw, Water	Substrate for mushroom cultivation	56
C2	Minhang, Shanghai	Wheat straw, Chicken manure, Water	Substrate for mushroom cultivation	60
C3	Minhang, Shanghai	Defoliation, Sawdust	Organic fertilizer	44
C4	Nanjing, Jiangsu	Cattle manure	Organic fertilizer	63
S1	Jinzai, Anhui	Sandy soil		1.42
S2	Minhang, Shanghai	Paddy soil		1.62

## 1.2 堆肥中微生物总 DNA 的提取

**1.2.1 样品的前处理** :称取 25g 堆肥与 100mL 无菌水混合,

经匀浆器(Waring blender)12000r/min,30s,3 次匀浆后,混合液于室温 15000 × g 离心 10min,收集沉淀为处理过的样品,

\* 通讯作者。Tel :86-21-52630034 ; Fax :86-21-62207544 ; E-mail :mjchen@saas.sh.cn

作者简介:何丽鸿(1979-),女,福建福州人,硕士研究生,主要从事堆肥中的分子生态学研究。E-mail :artsing1980@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-05-11 接受日期:2005-06-13 修回日期:2005-11-18

于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.2 样品的洗涤** :取 0.6g 处理过的样品用 4mL 的磷酸缓冲液洗涤 3 次<sup>[2]</sup>, 用于去除胞外 DNA 和可溶性的有机物质。

**1.2.3 DNA 的提取** :具体操作步骤参见文献[24]。为减少机械损伤, 采用酶解法(细胞裂解液中含 2.5mg/mL 溶菌酶, 25mg/mL 溶壁酶)取代 bead-mill 法。酶解结束后, 加入 150 $\mu\text{L}$  20% 的 SDS (0.15g PVPP 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴 1.5h)。采用 PEG-8000(终浓度为 10% 的 PEG 1.1mol/L 的 NaCl)进行 DNA 的沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$  静置 2h 以上, 16000 $\times g$  离心 15min, 即可获得核酸沉淀。

### 1.3 DNA 的提取效率及质量检测

表 2 PCR 试验所用的引物及反应条件

Table 2 Primers and protocols used for PCR experiments

Primer No.	Target sequences	Primer sequences(5' ~ 3')	References
F27, R1498	16S rDNA of Bacteria	AGAGTTGATCCTGGCTCAG TACCTTGTTACGACTT	5
P2, P3-GC	V3 Region of 16S rDNA of Bacteria	ATTACCGCGGCTGCTGG GC-clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG	6
F243, R513-GC	16S rDNA Fragment of Actinomycetes	GGATGAGCCCGCGGCTA GC-clamp-CGGCCGGGCTGCTGGCCAGTA	7
ITS1, ITS4	ITS Sequence of Fungi	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA TCCTCCGCTTATTGATATGC	8
GC-clamp		CGCCCGCCGCGCGGGCGGGGGGGGG GGGCACGGGGGG	

F, Forward primer; R, Reverse primer; GC-clamp, Short sequences riched in G and C used for DGGE analysis; V3, Hypervariable region; ITS, Internal transcribed spacer region.

**1.3.4 DGGE 分析微生物区系及多样性** :对 3 份不同堆肥来源的总 DNA 扩增细菌的 V3 可变区, 引物序列及扩增条件见表 2, PCR 产物用 DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)分析。PAGE 胶浓度为 8%, 变性梯度为 35% ~ 65%, 电泳条件为 150V 4.5h, 电泳结束后进行银染。DNA 模板的纯度会影响微生物区系的分析结果<sup>[9]</sup>, 为进一步检测该方法提取的 DNA 的纯度, 将此 3 份样品分别用透析带电洗脱法<sup>[10]</sup>和 DNA 胶纯化试剂盒(DNA Gel Extraction Kit)进行纯化, 以纯化后的 DNA 样品为对照同时进行 DGGE 分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同堆肥中 DNA 的提取

加入 PVPP 的高盐裂解液结合 PEG-8000 沉淀的方法, 从 4 份堆肥样品和两份土壤样品中均提取到了总 DNA, 该提取方法采用 SDS 和生物酶(溶菌酶、溶壁酶以及蛋白酶 K)解法

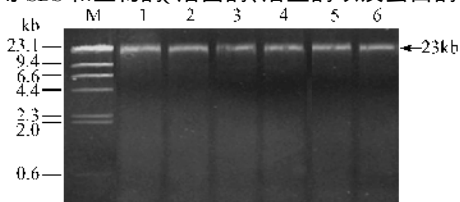


图 1 不同堆肥中提取的总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from different compost  
M.  $\lambda$ DNA/*Hind*III marker; 1. Compost C1; 2. Compost C2; 3. Compost C3; 4. Compost C4; 5. Soil S1; 6. Soil S2.

**1.3.1 DNA 及腐殖酸的定量** :用核酸蛋白分析仪测定 DNA 样品的  $A_{260}$  和  $A_{230}$  分别用于 DNA 及腐殖酸的定量, 腐殖酸的测定以腐殖酸标准品的梯度溶液(0.1 ~ 100ng/ $\mu\text{L}$ )为参照。

**1.3.2 限制性酶切** :为检测提取的总 DNA 样品中杂质对于限制性酶切的影响, 选用 *Bam*H I 对总 DNA 进行限制性完全酶切, 并以 pET28b 质粒作为对照, 选用 *Hinc* II 和 *Nde* I 进行酶切, 考察 DNA 样品中杂质对酶切作用位点的影响<sup>[4]</sup>。

**1.3.3 PCR 扩增** :为检测提取的总 DNA 样品中杂质对于 PCR 扩增的影响, 分别采用细菌、放线菌以及真菌的特异性引物对其进行 PCR 扩增, 引物序列及反应条件见表 2。

进行细胞破壁, 减少了 Bead mill 等方法在提取过程中对 DNA 的机械损伤; 电泳结果(图 1)显示条带整齐一致, 且 DNA 的分子量在 23kb 左右, 不会对后续操作产生影响。

### 2.2 DNA 及腐殖酸含量的测定

不同堆肥中提取的总 DNA 量差异较大, 从  $63.54 \pm 12.08\mu\text{g DNA/g}$  干重堆肥到  $106.50 \pm 28.36\mu\text{g DNA/g}$  干重堆肥(表 3), 该差异可能是由于不同堆肥中存在的微生物数量差异引起的。该提取量同 LaMontagne<sup>[2]</sup>报道的  $59\mu\text{g}$  粗 DNA/g 干重堆肥到  $90\mu\text{g}$  粗 DNA/g 干重堆肥相近。  $A_{260}/A_{230}$  的比值, 是检测环境样品 DNA 质量的重要指标<sup>[3]</sup>。本试验从堆肥中提取的总 DNA 其  $A_{260}/A_{230}$  值均大于 1.8, 该值已接近环境样品纯化后的水平<sup>[11]</sup>; 而从土壤中提取的总 DNA 虽然腐殖酸的绝对浓度显著低于从堆肥中提取的 DNA, 但从  $A_{260}/A_{230}$  的比值判断其纯度不如后者, 这可能与不同环境样品中腐殖酸

表 3 不同堆肥中提取的总 DNA 的比较

Table 3 Comparison of DNA obtained from different compost

Sample No.	DNA yield ( $\mu\text{g DNA/g}$ sample)	DNA quality ( $\mu\text{g Humic acid/L}$ )		
		$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{230}$
C1	$67.92 \pm 12.23$	$1.72 \pm 0.03$	$174.23 \pm 26.12$	$1.92 \pm 0.09$
C2	$106.50 \pm 28.36$	$1.67 \pm 0.03$	$224.52 \pm 35.84$	$2.10 \pm 0.16$
C3	$63.54 \pm 12.08$	$1.65 \pm 0.01$	$168.16 \pm 22.58$	$1.80 \pm 0.12$
C4	$74.02 \pm 17.02$	$1.67 \pm 0.03$	$187.41 \pm 29.92$	$2.38 \pm 0.17$
S1	$6.10 \pm 1.17$	$1.66 \pm 0.01$	$83.72 \pm 15.77$	$1.13 \pm 0.08$
S2	$5.49 \pm 1.08$	$1.66 \pm 0.02$	$71.34 \pm 17.01$	$1.21 \pm 0.11$

$\pm$ , Mean ( $\pm$  SD) yield or concentration in triplicate DNA

的具体组成和存在形式的差异有关。

### 2.3 酶切验证和 PCR 扩增

酶切结果说明:提取的 DNA 样品腐殖酸等杂质的含量较低,对酶切反应不存在明显干扰;与 pET28b 载体混合,也未影响酶切作用位点,图略。

本试验以提取的 6 份 DNA 样品为模板分别对细菌、放线菌以及真菌等的多个特异片段进行了 PCR 扩增,均扩增出了目的条带(图 2),证实了该方法提取的 DNA 纯度较高,可直接用于 PCR 扩增。另一方面也说明本试验采用的化学裂解和生物酶解相结合的方法具有较高的破壁效率,可以从堆肥中同时提取到细菌、放线菌以及真菌的总 DNA。

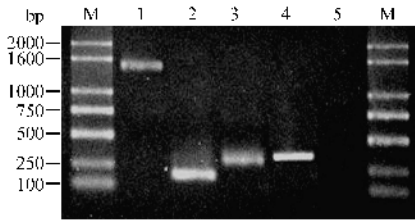


图 2 以堆肥 DNA 为模板进行 PCR 扩增结果

Fig.2 Results of PCR amplification of compost DNA

1. DGL2000 Marker; 2. Compost DNA amplified using primers F27 and R149 (about 1.5kb); 3. Compost DNA amplified using primers P2 and P3 (about 0.23kb); 4. Compost DNA amplified using primers F243 and R513 (about 0.27kb); 5. Compost DNA amplified using primers ITS1 and ITS4 (about 0.3kb); 6. Control, no template DNA; 7. DGL2000 Marker.

### 2.4 DGGE 分析

用 DGGE 分析了不同来源的 3 份堆肥样品中细菌的结构组成和多样性(图 3),证实以该方法提取的未经纯化的 DNA 可以直接用于微生物群落结构的 DGGE 分析,在主要条带的分布上纯化前后的样品不存在明显的差异,但以纯化前的 DNA 直接为模板, DGGE 分析得到的条带要多于纯化后的 DNA 样品,这显示了更加丰富的微生物多样性,纯化的 DNA 样品多态性降低可能与纯化过程中 DNA 严重损失有关<sup>[2]</sup>。

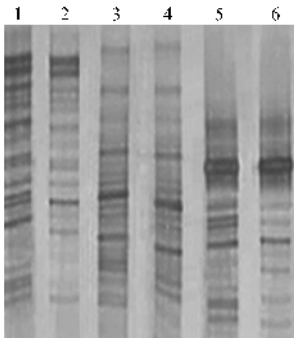


图 3 堆肥中 V3 扩增产物的 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE of amplified V3 fragments

1. V3 amplified from the crude DNA C1; 2. V3 amplified from the purified DNA C1; 3. V3 amplified from the crude DNA C2; 4. V3 amplified from the purified DNA C2; 5. V3 amplified from the crude DNA C3; 6. V3 amplified from the purified DNA C3.

## 3 讨论

堆肥中腐殖酸的含量是土壤样品的 10~100 倍<sup>[12]</sup>,腐殖酸的存在会影响 PCR 扩增等一系列分子生物学操作。在微生物细胞裂解之前对环境样品进行洗涤是腐殖酸去除的重要步骤,在去除腐殖酸等可溶有机物的同时,还可去除样品中尚未降解的胞外 DNA,使得制备的模板更为真实地反映环境中微生物的实际状况。

在 DNA 的抽提过程中针对腐殖酸的结构和理化性质选择合适的抽提缓冲体系也是极为重要的,对于土壤等环境样品,提高抽提缓冲液的盐浓度和 pH 值有助于 DNA 产量的增加,但也会带来大量的腐殖酸<sup>[13,14]</sup>。然而,针对高有机含量的堆肥样品,高盐浓度的抽提液却可大大降低腐殖酸的干扰<sup>[2]</sup>。本试验采用 1.1mol/L 的高盐缓冲体系,同时加入 PVPP,它能有效地吸收腐殖酸及其它酚类化合物,避免以上杂质对 Taq DNA 聚合酶的抑制作用;另一方面采用 PEG-8000 进行 DNA 的沉淀,同传统的氯仿/异戊醇沉淀法相比,PEG 沉淀法具有相近的得率,却能大大减少腐殖酸等杂质的污染。

DNA 模板的纯度不仅会影响各类 DNA 修饰酶的活性,而且同 DNA 模板量一样会引起微生物区系分析的偏差<sup>[9,14]</sup>。因此,各种纯化方法在环境样品 DNA 的获取过程中被广泛采用。但对于高有机含量的堆肥样品,纯化过程中 63% 的 DNA 会损失掉,而有些方法即使能获得  $A_{260}/A_{230}$  高于 1.8 的高纯度 DNA,但在 PCR 扩增中仍不稳定<sup>[2]</sup>。本试验亦采用了透析带电洗脱法和纯化试剂盒对总 DNA 进行纯化,虽能去除 15%~25% 的腐殖酸,但 DNA 的回收效率不足 30% (结果未列出),这也可能是导致本试验中回收后的 DNA 用于 DGGE 分析,微生物的多样性下降的原因。虽然 DGGE 只是评价微生物区系组成和多样性的诸多方法之一,而各方法间的结果是否存在差异还有待进一步验证,但充分说明了根据试验材料及目的合理地选择 DNA 的提取方案是极为重要的。

综上所述,本文介绍的方法可以从高有机含量的堆肥样品中获得高质量的微生物总 DNA,直接用于 PCR 扩增、限制性酶切以及 DGGE 分析微生物的多样性。该方法减少了通常的纯化步骤,在很大程度上避免了总 DNA 量的损失,这对于一些不易获得的材料的研究是极为有益的。

## 参 考 文 献

- [1] Gerard M, Komelia S. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 127-141.
- [2] LaMontagne MG, Michel Jr. FC, Holden PA, et al. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *J Micro Methods*, 2002, 49: 255-264.

- [ 3 ] Tebbe CC , Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Appl Environ Microbiol* , 1993 , **59** :2657 – 2665.
- [ 4 ] Michel H , William CG , Larry PW. A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost. *J Micro Methods* , 2003 , **54** :37 – 45.
- [ 5 ] Weissburg WG , Barns SM , Pelletier DA , *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* , 1991 , **173** :697 – 703.
- [ 6 ] Tannock GW , Munro K , Harmsen HJM , *et al.* Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** :2578 – 2588.
- [ 7 ] Heuer H , Krsek M , Baker P , *et al.* Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** :3233 – 3241.
- [ 8 ] White TJ , Bruns T , Lee S , *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. New York :Academic Press , 1990.
- [ 9 ] Frostegard A , Courtois S , Ramisse V , *et al.* Quantification of bacteria related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl Environ Microbiol* , 1999 , **65** :5409 – 5420.
- [ 10 ] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁 , 黎孟枫等译. 第二版. 北京 :科学出版社, 1998.
- [ 11 ] Zhou J , Bruns MA , Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** :1316 – 1322.
- [ 12 ] Pfaller SL , Vesper SJ , Moreno H. The use of PCR to detect a pathogen in compost. *Compost Sci Util* , 1994 , **2** :48 – 54.
- [ 13 ] 赵 晶 , 张 锐 , 曾润颖. 深海沉积物中微量 DNA 的提取及应用. *海洋与湖沼* , 2003 , **34** :313 – 321.
- [ 14 ] Krsek M , Wellington EMH. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J Micro Methods* , 1999 , **39** :1 – 16.

## An efficient method for DNA extraction from compost

HE Li-hong<sup>1,2</sup> , ZHAO Yong<sup>1,2</sup> , CHEN Ming-jie<sup>2\*</sup> , PAN Ying-jie<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup> Department of Microbiology , College of Life Science , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China )

(<sup>2</sup> Edible Fungi Institute , Shanghai Academy of Agricultural Sciences , Shanghai 201106 , China )

(<sup>3</sup> Shanghai Fishery University , Shanghai 200090 , China )

**Abstract:** An efficient method for obtaining DNA from compost which contained high levels of organic matter was developed. The protocol consisted of washing with phosphate-EDTA before extraction , cell lysis with hot-SDS and enzymes( lysozyme , lywzyme , proteinase K ) , removing humic acid and other inhibitors with PVPP and precipitation with PEG-8000. The compost total DNA was extracted from four different composts , the DNA yield was  $63.54 \pm 12.08 \sim 106.50 \pm 28.36 \mu\text{g/g}$  of dry compost. Molecular size of DNA obtained using this protocol was about 23kb and contained low protein and humic acid contamination with the  $A_{260}/A_{280}$  ratios exceeding 1.6 and  $A_{260}/A_{230}$  ratios reaching 1.8. Usually , additional purification steps such as agarose gel electrophoresis , gel permeation chromatography , or affinity chromatography were needed to get PCR-amplifiable DNA , but the DNA obtained using this protocol could directly be used to PCR-amplification and restriction enzyme digestion. Just like purity of DNA template , lower DNA yield also appears to introduce a bias towards lower community diversity. In this study compared the purified DNA the direct DNA reveals higher microbial community diversity assessed by denaturing gradient gel electrophoresis( DGGE ) of amplified V3 region of 16S rDNA.

**Keywords:** Compost ; An efficient DNA extraction method ; High levels of organic matter ; DGGE

\* Corresponding author. Tel : 86-21-52630034 ; Fax : 86-21-52207544 ; E-mail : mjchen@saas.sh.cn

Received : 11 May 2005/Accepted : 13 June 2005/Revised : 18 November 2005