

高温环境样品总 DNA 直接和间接提取方法的比较

刘宏伟¹ 彭 谦¹ 李沁元² 肖 炜¹ 崔晓龙^{1*}

(¹ 云南大学 云南省微生物研究所 云南省生物资源保护与利用重点实验室 昆明 650091)

(² 云南大学生命科学教学实验中心 昆明 650091)

(³ 昆明理工大学生物与化学工程学院 昆明 650224)

摘 要 :分别采用两种环境总 DNA 直接提取法和一种间接提取法从 6 种温泉菌席样品中提取总 DNA,以 DNA 粗产物的纯度、能否用于后续 PCR 扩增及 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)所反映的微生物多样性为评价指标对两类方法进行比较和评价。研究发现,虽然间接提取法效率低下,但对于高温极端环境中生物量较小的样品,间接法能得到有研究价值的、纯度较高的环境样品总 DNA,而直接法得到的 DNA 量小且不适于 PCR 扩增操作。在使用这 2 类方法都能得到可用于研究操作的 DNA 的情况下,间接提取法能更好的体现环境样品中微生物的多样性。

关键词 :菌席;环境 DNA;间接 DNA 提取法;PCR-DGGE

中图分类号:Q938 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)06-1018-05

在自然环境中,超过 90% 的微生物不能通过传统的分离培养方法进行研究^[1]。随着上个世纪 80 年代初分子生物学技术被运用到微生物生态学的研究中,获得环境样品中微生物的群落指纹以揭示其多样性^[2-4],获取环境样品中各种微生物的特征性核苷酸序列以确定其分类地位并据此设计探针原位探测环境样品中的微生物^[5,6],设计基因芯片(microarrays)调查环境样品中的微生物群落结构^[7],克隆新基因进行表达和应用^[8,9]等研究手段使我们更深入的了解和利用了丰富的未培养微生物资源^[10]。在这些研究中,环境样品微生物的总 DNA 提取成为研究起始最重要的步骤。

以往对环境样品总 DNA 提取方法的研究多集中于土壤样品^[4,11-14],以这些方法为基础经改进后的 DNA 提取方法被广泛应用于其它环境样品总 DNA 的提取^[9,15-19]。这些 DNA 的提取方法分为两大类:通过离心等手段先收集细胞再对细胞进行裂解操作的间接法和不经细胞收集在样品中裂解细胞直接法。在这两类方法中,不同的物理裂解、化学裂解和酶裂解手段以及这 3 种手段中 1 种或多种手段的使用,组合出多种环境样品总 DNA 提取方法。在 DNA 提取产率高即表示其所代表的微生物多样性高的前提下,DNA 直接提取法被认为是较好的方法并被广泛应用^[5,6,12]。但近年来有研究表明 DNA 提取的产率高不等同于微生物的多样性高^[3],间接提取法又再次被提出并用于相关研究^[14]。由于高温热泉的自然环境与早期的地球环境比较接近,其中的微生物生态系统相对比较简单、稳定,对其生态学的研究有助于认识微

生物生态学的基本理论和相关研究方法的建立^[20],我们选取滇西腾冲热海一高温热泉喷水口周围不同温度样点的 6 个菌席样品,分别采用两种 DNA 直接提取法和一种间接提取法对样品进行总 DNA 提取,并应用 PCR-DGGE 等技术对这 3 种方法所得到的微生物多样性进行比较分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 :实验中所用菌席(mat)样品均采自云南腾冲热海高温热泉蛤蟆嘴的喷水口周围,喷水口温度为 97℃,样品具体描述见表 1。

1.1.2 主要仪器 :高速冷冻离心机为 Beckman 公司产品,DGGE 电泳设备(The Dcode Universal Mutation Detection System)为 BIO-RAD 公司产品,凝胶成像系统及成像软件 GeneSnap、凝胶分析软件 GeneTools 为 SynGene 公司产品,核酸定量设备 Biophotometer 为 Eppendorf 公司产品。

1.1.3 主要试剂 :玻璃珠(Golden Beads)通用 DNA 纯化试剂盒及玻璃珠(Silver Beads)DNA 胶回收试剂盒为上海生工生物工程有限公司产品,Marker(λ -EcoT14 I)和 PCR 所用试剂(ExTaq,dNTP 等)为大连宝生物工程有限公司产品。

1.2 总 DNA 的提取

1.2.1 直接提取:酶裂解法(方法 1) :据文献[12]中所述方法并做适当改进。于 0.2g 样品中加入 500 μ L TE(pH8.0),研磨至匀浆,加入 10 μ L 溶菌酶(25mg/mL),37℃ 处理 1h。再加

基金项目:国家自然科学基金(30660004,30460004,30360004,30260004)2005 年云南省中青年学术带头人后备人才基金(2005PY01-1)2005 年教育留学回国人员科研启动基金,云南省自然科学基金重点项目(2004C0002Z),云南省教育厅基金项目(5Y0199B)

* 通讯作者。Tel/Fax:86-871-5034621 E-mail:xlou@ynu.edu.cn

作者简介:刘宏伟(1980-)男,湖南人,现为中南大学博士研究生。E-mail:cliff.liu@163.com

其他作者:林连兵³,刘志坚¹,姜成林¹,徐丽华¹,陈义光¹,王治刚¹,任 祺¹,邓 岚¹,文孟良¹

收稿日期:2005-12-21 接受日期:2006-02-09 修回日期:2006-04-25

入 50 μ L 浓度为 20% 的 SDS, 20 μ L 浓度为 5% 的 CTAB(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, 十六烷基三甲基溴化胺) 和 5 μ L 蛋白酶 K(10mg/mL), 55 $^{\circ}$ C 处理 1h, 7000 \times g 离心 10min, 上清

用等体积的酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1) 抽提两次, 所得水相用 0.6 倍体积的异丙醇 - 20 $^{\circ}$ C 沉淀 1h 以上, 70% 乙醇洗涤沉淀两次, 风干后加入 20 μ L TE(pH8.0) 溶解沉淀。

表 1 实验所用菌席样品

Table 1 Description of mat samples

Mat Sample	Distance from the vent/m	Colour	pH	Temperature/ $^{\circ}$ C	H ₂ O/%
C	\approx 2	dark green	8.5	65	66.48
D	2~3	bright green	8.0	65	33.51
Eb	<1	white	8.5	76	61.18
Eh	\approx 1	gray	8.5	76	58.13
F	2~3	light pink	8.5	60	50.49
S	\approx 15	filemot	7.0	50	60.06

高盐缓冲液提取法(方法 2)据文献 [14] 中所述方法并做适当改进。于 0.2g 样品中加入 500 μ L 裂解缓冲液(0.1mol/L Tris-HCl, 0.1mol/L EDTA, 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB, pH8.0) 研磨至匀浆, 加入 5 μ L 蛋白酶 K(10mg/mL) 和 20 μ L 溶菌酶(25mg/mL), 于 37 $^{\circ}$ C 处理 30min。再加入 100 μ L SDS(20%) 65 $^{\circ}$ C 处理 2h, 7000 \times g 离心 10min, 收集上清。在沉淀中加入 250 μ L 裂解缓冲液, Vortex 处理 3min(每震荡 1min 停 1min) 使沉淀重悬, 65 $^{\circ}$ C 保温 10min 后, 7000 \times g 离心 10min, 所得上清与前次收集的上清合并, 再如 1.1.1 中所述, 用酚/氯仿/异戊醇抽提、异丙醇沉淀等操作得到 20 μ L DNA 粗产物。

1.2.2 间接提取(差速离心除杂法(方法 3)) 据文献 [14] 的方法并做适当改动。10g 样品和 20mL 缓冲液 A(0.1mol/L Tris-HCl, 0.1mol/L EDTA, 1% CTAB, 0.1% SDS, pH8.0) 研磨至匀浆, 转入 50mL 离心管中, 用 Vortex 处理 3 分钟(每震荡 1min 停 1min), 1000 \times g 离心 10min, 收集上清。重复在沉淀中加入 15mL 缓冲液 A, Vortex 处理、离心和收集上清的操作两次, 将所得 3 份上清液合并, 于 4 $^{\circ}$ C 10000 \times g 离心 30min。弃上清, 用 30mL 0.1% 焦磷酸钠重悬沉淀, 于 4 $^{\circ}$ C 10000 \times g 离心 20min。30mL 缓冲液 B(0.33mol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA; pH8.0) 洗涤沉淀 1 次, 离心后所得沉淀用 1mL 前述的裂解缓冲液重悬, 每管 500 μ L 分装于两个 Eppendorf 管中。在每个 Eppendorf 中加入 30 μ L 溶菌酶(25mg/mL), 4 μ L 蛋白酶 K(10mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 处理 30min。然后加入 100 μ L SDS(20%), 65 $^{\circ}$ C 处理 2h, 再如 2.1.1 中所述, 用酚/氯仿/异戊醇抽提、异丙醇沉淀等操作得到 DNA 沉淀, 最后用 200 μ L TE(pH8.0) 溶解沉淀。

用上述 3 种方法提取 6 个菌席样品的总 DNA, 每个样品用每种方法提取 4 次。所得到的 DNA 产物及其后的实验均在样品名称前加上编号 1、2 和 3 分别表示所用的提取方法为方法 1、方法 2 和方法 3。

1.3 DNA 产率和纯度的检测

测定 DNA 粗提物浓度并换算成每克样品所提取的 DNA 质量以确定产率。

混合同种提取方法所得到的 DNA 粗提物, 取 2 μ L 溶于 50 μ L TE 中测量 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值, 结合能否直接用于后续 PCR 扩增来评价 DNA 粗提物的纯度。

1.4 DNA 粗提物的纯化

使用 DNA 纯化试剂盒纯化不能直接用于 PCR 扩增的 DNA 粗提物。

1.5 各 DNA 提取方法所代表的微生物多样性比较

采用 PCR-DGGE 的方法获取微生物多样性信息, 用香农指数 H'(Shannon-wiener index) 评价 3 种 DNA 提取方法的微生物多样性。

1.5.1 PCR 扩增: 用热启动降落 PCR(TD-PCR) 扩增 DNA 产物中的细菌 16S rDNA V9 片段, 使用文献 [2] 中引物: 1055f 和 1406r-GC, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 80 $^{\circ}$ C 保温加酶, 95 $^{\circ}$ C 60s, 63 $^{\circ}$ C 60s (每个循环降低 1 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 90s, 10 个循环, 95 $^{\circ}$ C 60s, 53 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 90s, 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。

1.5.2 变性梯度电泳(DGGE): PCR 产物经胶回收后用 DGGE 分离, 条件为 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 30% ~ 60% 的变性剂梯度(7mol/L 的尿素, 40% 的甲酰胺为 100% 的变性剂浓度), 120V 恒定电压, 60 $^{\circ}$ C 下电泳 8h。

凝胶经成像后用凝胶分析软件进行分析, 以软件分析所得条带的数量和亮度信息为依据, 使用统计软件 SPSS 计算香农指数 H'(Shannon-wiener index)。

2 结果

2.1 DNA 粗产物的片段大小和产率

3 种环境总 DNA 提取方法所得粗产物的产率和电泳结果见表 2 和图 1(DNA 粗产物不经稀释直接用 1% 琼脂糖凝胶电泳)。

表 2 3 种方法所得 DNA 的产率

Table 2 Comparison of different methods with crude DNA yielded from six mat samples

Samples	Crude DNA yield(μ g \cdot g ⁻¹ wet sample)		
	Method 1	Method 2	Method 3
C	13.03 \pm 0.10	77.95 \pm 0.15	7.20 \pm 0.04
D	33.57 \pm 0.11	11.02 \pm 0.09	8.21 \pm 0.07
Eb	9.21 \pm 0.02	5.68 \pm 0.02	1.53 \pm 0.01
Eh	10.24 \pm 0.05	6.13 \pm 0.03	0.84 \pm 0.02
F	14.69 \pm 0.11	63.87 \pm 0.18	1.61 \pm 0.08
S	27.80 \pm 0.20	89.08 \pm 0.24	12.51 \pm 0.10
Average	18.09	42.29	5.32

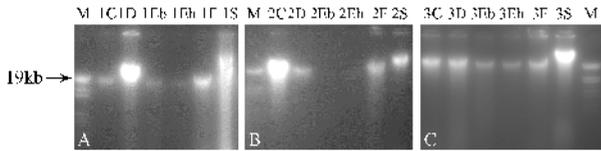


图1 DNA粗产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Agarose electrophoresis of crude DNA extraction using extraction method 1, 2 and 3. A: Method 1; B: Method 2; C: Method 3. M: Marker (λ -EcoT14 I), the number 1, 2 and 3 before each sample name corresponding to DNA extraction method 1, 2 and 3, respectively.

由图可知,除使用方法1提取S样品所得到的DNA粗产物明显弥散(shear)外,其它所有DNA粗产物片段大小均超过19kb,表明各方法对DNA片段的剪切作用均不明显。由于采样点Eb和Eh温度远高于采样点F和S,并且在用同一种提取方法所得到的DNA粗产物中样品Eb和Eh的DNA产率明显小于样品F和S,表明菌席样品Eb和Eh中的生物量远小于样品F和S。从样品C和样品D用直接提取法(方法1和方法2)所提取的DNA粗产物产率和电泳结果(表2,图1-A和图1-B)来看,不同的直接提取法对不同样品总DNA提取的产率影响明显。样品C使用方法2提取DNA产率较高,而样品D和S使用方法1提取DNA产率较高。

2.2 DNA粗产物的纯度

3种环境总DNA提取方法所得粗产物 OD_{260}/OD_{280} 的比值见表3。由于方法3在酶处理之前先去除了大量的杂质, DNA粗提物的纯度比其他两种直接提取法高,均能直接用于后续PCR扩增操作。两种直接提取所提取的DNA粗产物由于杂质较多,部分不能直接用于PCR扩增,经纯化后大部分DNA样品可以较好的扩增出目的条带。有5个DNA样品(样1Eb, 1Eh, 2Eb, 2Eh和1S)即使经试剂盒纯化也不能扩增出目的条带。

表3 3种方法所得DNA粗产物的纯度

Table 3 The purity of crude DNA yielded from six mat samples

Samples	OD_{260}/OD_{280}		
	Method 1	Method 2	Method 3
C	1.43	1.59	1.79
D	1.57	1.65	1.86
Eb	1.15	1.27	1.80
Eh	1.41	1.54	1.92
F	1.75	1.75	1.74
S	1.65	1.60	1.85
Average	1.49	1.57	1.83

2.3 各提取方法DGGE多样性分析

由于有5个DNA样品未能PCR扩增出目的条带,用扩增出的13种PCR产物作为DGGE实验对象。DGGE结果见图2,由DGGE凝胶图像分析所得香农指数见表4。

从图2可以看出同一样品用不同DNA提取方法所得到的条带在位置上相似度较大,但大部分相同位置的条带在量上有明显的不同,表明不同DNA提取方法对某一特定微生物类群丰富程度的反映存在偏差。样品D、F和S用方法3

得到的DGGE条带数均多于其他两种方法(具体比较结果未给出)所得到的微生物多样性香农指数也高于另外两种方法,表明间接提取法获得了直接提取法未能获得的某些微生物总DNA,在体现样品微生物群落多样性方面有优势。样品Eb和Eh用方法3也得到了有研究价值的DGGE条带,并能用香农指数衡量样品中微生物的多样性。

1C 2C 3C 1D 2D 3D 1F 2F 3F 1Eb 2Eb 3Eb 2S 3S

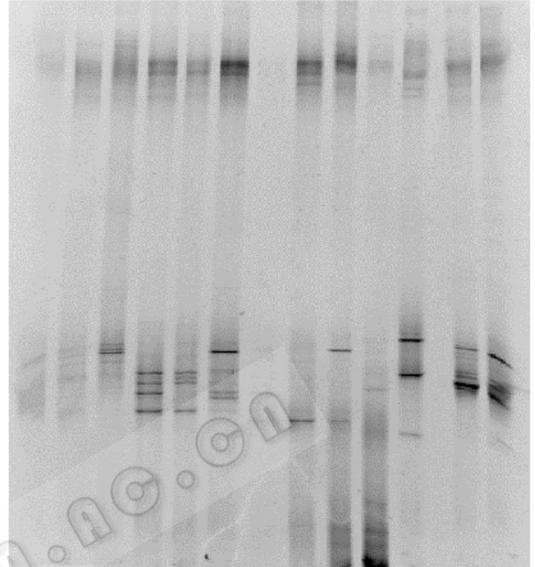


图2 DGGE凝胶成像结果

Fig.2 DGGE profiles. The number 1, 2 and 3 before each sample name corresponding to DNA extraction method 1, 2 and 3, respectively.

表4 6个样品用3种DNA提取方法的PCR-DGGE多样性香农指数

Table 4 Shannon-wiener index of PCR-DGGE of DNA recovered from six mat samples by three methods

Sample	Shannon-wiener index		
	Method 1	Method 2	Method 3
C	1.751	2.192	2.205
D	2.354	2.319	2.476
Eb	N.A	N.A	1.883
Eh	N.A	N.A	2.459
F	1.196	1.752	2.201
S	N.A	2.217	2.519

N.A: Not amplified by PCR.

综合上述结果, DNA直接提取对某些特定样品用特定的操作方法能获得较高的提取效率,但是对有些生物量不高的样品则很难得到足够的环境总DNA用于后续操作,适合在样品生物量较大但采样量不大的情况下采用。

间接提取在提取效率上远小于直接提取,但用间接提取法所得到的环境总DNA纯度较高,所有样品能直接用于PCR扩增,并且能更好的体现样品中微生物的多样性,适合于有大量样品可以使用的前提下采用。

3 讨论

能用于后续分子生物学实验操作的,并且能代表样品中尽可能多的微生物类群的总 DNA。在提取过程中还需要兼顾实验操作是否简便,方法是否经济以及样品量是否充足(有些样品因考虑到保护环境的目的采集量不大)。

以往研究^[21, 22]表明环境样品总 DNA 粗提物中有机物质(主要是腐殖酸和多糖)对后续分子生物学操作有很大影响,而 DNA 间接提取法能更好的减轻这种影响^[14],本研究的实验结果也验证了这一点。

有研究发现使用 CTAB 比使用 PVPP(Poly Vinyl Poly Pyrrolidone, 交联聚乙烯基吡咯烷酮)在腐殖酸去除过程中 DNA 的损失更少^[12],本实验中将以以往用 PVPP 的情况改为使用 CTAB 以减少 DNA 的损失。虽然在 DNA 提取最后阶段两次用酚/氯仿抽提并用 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀,增加了实验操作的复杂程度,并且 DNA 会有一些的损失,但这样操作提高了 DNA 粗产物的纯度,并且大部分能直接用于 PCR 扩增,减少了一些样品的纯化操作。

研究中有 5 个 DNA 样品未能扩增出目的条带用于后续 DGGE 操作,后来曾用所有 DNA 样品作为模版 PCR 扩增细菌 16S rDNA 序列,这 5 个 DNA 样品仍未能得到目的条带(结果未给出)。这个结果的出现可能是由于样品 Eb 和 Eh 生物量较小,间接提取法使用大量样品操作,在收集细胞的同时去除了许多杂质,减少了对提取过程和后续研究操作的干扰,能够得到较好的结果,而直接提取法在样品量小的情况下所得到的 DNA 粗产物量太少,腐殖酸等物质的浓度又相对较高,所以不适于后续 PCR 扩增,需要进行得率更高、纯化效果更好的纯化操作。如果改为大样品量直接提取,则所需要的试剂量和酶量都很大(一个样品一次提取过程仅溶菌酶就需要 10mg 以上),所得到的 DNA 粗产物中腐殖酸等污染物质的浓度更高,仍将严重影响后续 PCR 扩增。

土壤样品总 DNA 的提取方法中被关注较多的操作是如何高效裂解样品基质中的微生物细胞^[12]和在提取过程中除去大部分腐殖酸样品^[22]。高盐环境样品 DNA 提取操作被关注的除了上述两点以外,则是找到一个合适于 DNA 提取的等渗缓冲液体系^[18]。对于高温环境中的菌席样品,由于其中的生物以及这些生物附着的基质大多顺着水流的方向形成丝状物,所以在实验操作时大多用研磨而非珠磨(bead-beating)的方法从样品中裂解微生物细胞^[4, 49];对于高温环境中的沉积物样品,则多是用土壤样品的裂解操作手段(珠磨法、冻融法和微波炉法等)。在本实验中,样品 S 在用方法 1 和方法 2 提取 DNA 得到了明显不同的结果(DNA 样品 1S 弥散,产率较低且不能用于后续操作)。这些事实都说明,在环境样品 DNA 提取过程中,不同的细胞裂解手段、细胞裂解操作时不同的处理时间、温度、缓冲体系适合不同环境样品中不同的微生物群落总 DNA 的提取。这就要求我们在选择提取方法时不仅要试用直接提取和间接提取这两类方法,在每类方法中也要试用不同的处理组合方式,使后续操作能顺利进行,并得到准确可信的研究结果。

致谢 感谢云南腾冲热海景区谷华先生在样品采集过程中的帮助和支持;感谢实验员段丽霞在实验操作过程中的协助!

参 考 文 献

- [1] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 - 169.
- [2] Casamayor EO, Schäfer H, Bañeras L, *et al.* Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 499 - 508.
- [3] Stach JEM, Bathe S, Clapp JP, *et al.* PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **36**: 139 - 151.
- [4] 李沁元, 崔晓龙, 张东华, 等. 云南腾冲热海两热泉菌席细菌多样性的研究. *微生物学报*, 2004, **44**(4): 431 - 435.
- [5] Huber JA, Butterfield DA, Baross JA. Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, **43**: 393 - 409.
- [6] Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3094 - 3101.
- [7] Cho, JC, Tiedje, JM. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 3677 - 3682.
- [8] Henne A, Schmitz RA, Bömeke M, *et al.* Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3113 - 3116.
- [9] Cottrell MT, Moore JA, Kirchman DL. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 2553 - 2557.
- [10] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, **276**: 734 - 740.
- [11] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 316 - 322.
- [12] Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, *et al.* Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 4715 - 4724.
- [13] Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, *et al.* DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 2354 - 2359.
- [14] Gabor EM, de Vries EJ, Janssen DB. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, **44**: 153 - 163.
- [15] Yu Z, Mohn W. Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass. *Can J Microbiol*, 1999, **45**: 269 - 272.

- [16] Liu XD, Bagwell CE, Wu LY, *et al.* Molecular diversity of sulfate-reducing bacteria from two different continental margin habitats. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 6073 – 6081.
- [17] 王 涛, 柴丽红, 崔晓龙, 等. 免培养法对一热泉细菌多样性的初步研究. *微生物学报*, 2003, **43**(5): 541 – 546.
- [18] 柴丽红, 崔晓龙, 彭 谦, 等. 青海两盐湖细菌多样性研究. *微生物学报*, 2004, **44**(3): 271 – 275.
- [19] 张东华, 李沁元, 刘 杨, 等. 腾冲热海眼镜泉粉红色菌藻席的细菌组成分析. *微生物学报*, 2004, **44**(6): 820 – 823.
- [20] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 腾冲地热. 北京: 科学出版社, 1989, 181.
- [21] 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**: 5072 – 5078.
- [22] Tsai YL, Olson BH. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 754 – 757.

Comparison of direct and indirect environmental DNA extraction methods for samples from a high-temperature environment

LIU Hong-wei¹, PENG Qian¹, LI Qin-yuan², XIAO Wei¹, CUI Xiao-long^{1*}

(¹ Yunnan Institute of Microbiology and Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China)

(² Experiment Center of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

(³ Faculty of Biologic and Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract : Two different direct DNA extraction methods and one indirect DNA extraction method were applied to recover environmental DNA from six mat samples, which were sampled closely around a high-temperature spring vent in Tengchong Rehai of the western Yunnan province. As the criteria, quantity and purity of the extracted crude DNA, the result of PCR amplification for denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) before and after crude DNA purification, and the Shannon-wiener index of DGGE profiles were used to evaluate the direct and indirect DNA extraction methods. For the samples of less biomass, the indirect method yielded available crude DNA with high purity, and the DNA was amplified without purification by PCR for DGGE. The two direct methods extracted less DNA than indirect method from the samples of less biomass, and the crude DNA extraction could not be amplified by PCR. Despite the lower quantity of DNA yield, the indirect DNA extraction method for the other mat samples presented more diverse bacterial community than that of the direct DNA extraction methods according to the Shannon-wiener index of the PCR-DGGE profiles.

Keywords : Microbial mat ; Environmental DNA ; Indirect DNA extraction method ; PCR-DGGE

Foundation item : Chinese Natural Science Foundation (30660004, 30460004, 30360004, 30260004); Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars of the State Education Ministry ; Yunnan Provincial Sciences and Technology Department (2005PY01-1, 2004C0002Z)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-871-5034621 ; E-mail : xlcui@ynu.edu.cn

Other authors : LIN Lian-bing³, LIU Zhi-jian¹, JIANG Cheng-lin¹, XU Li-hua¹, CHEN Yi-guang¹, WANG Zhi-gang¹, REN Zhen¹, DENG Lan¹, WEN Meng-liang¹

Received : 21 December 2005 / Accepted : 9 February 2006 / Revised : 25 April 2006