

## 土壤微生物总 DNA 提取方法的优化

赵裕栋, 周俊, 何璟\*

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要:** 【目的】土壤中未培养微生物约占总量的 99%, 这就意味着绝大多数微生物资源还未得到开发和利用。本研究通过优化土壤微生物总 DNA 的提取方法, 获得较高质量的 DNA, 为后期研究土壤微生物的多样性及构建大插入片段的宏基因组文库奠定基础。【方法】通过综合比较已报道的微生物 DNA 提取方法的优缺点, 我们设计出一种新的提取方案。对提取过程中的几个关键步骤进行了优化, 包括联合使用 SDS-CTAB 和溶菌酶一起来破细胞, 利用氯仿除蛋白, 使用 PVPP 柱纯化 DNA 等。比较分析了优化后的方法和 3 种已报道方法所获得的土壤总 DNA 的产量、纯度及片段大小。【结果】优化后的方法所获得的土壤 DNA 质量明显有所提高: 每克土壤最高能提取 95  $\mu\text{g}$  DNA, A260/A280 和 A260/A230 比值更接近理想水平, PCR 扩增能够得到明显的目标条带, DNA 片段最大能达到 100 kb 左右。【结论】通过比较分析, 最终确立了一种较理想的土壤微生物总 DNA 提取方法, 为更好地开发利用土壤未培养微生物资源提供了有力工具。

**关键词:** 土壤微生物, eDNA 抽提, DNA 的产量及质量, PCR 扩增, 大片段 DNA

**中图分类号:** Q93-3   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209(2012)09-1143-08

土壤是自然环境中最复杂的异质体系, 蕴含着丰富的微生物资源并表现出高度的多样性, 每克土壤中含有几千到上百万种不同的基因组信息, 近 10 亿的细菌细胞<sup>[1-2]</sup>。土壤微生物不仅在生态循环系统中扮演着重要的角色, 而且一直以来都是结构独特多样、生物活性丰富的天然产物的重要来源之一<sup>[3]</sup>。目前人们对土壤微生物的基因组、代谢和多样性了解的仍然很少。长期以来, 对土壤微生物的研究仅限于极少部分可培养的微生物。实际上, 绝大多数环境微生物都是不可或很难被培养的, 利用传统的培养方法研究土壤微生物多样性及基因资源信息, 具有很强的偏好性, 因为可培养的微生物只占自然界微生物总量的 0.01% - 10%<sup>[4-5]</sup>。随着宏

基因组学在该领域的应用, 利用分子生物学的研究方法绕过了传统培养方法的局限, 直接研究微生物的多样性及功能, 为土壤微生物更全面的研究开辟了新局面<sup>[6-7]</sup>。

土壤微生物的研究, 尤其是一些未培养微生物的基因资源信息以及分子生态学信息分析, 很大程度上依赖于有效的且无偏好性的 eDNA (environmental DNA) 提取方法。然而, 土壤样品含有非常复杂的成分<sup>[8]</sup>, 微生物细胞可能与土壤颗粒紧密结合, 而且土壤中富含腐殖酸等有机物质, 这些都会影响高产量、高纯度的大分子量土壤 DNA 的获得<sup>[9]</sup>。尤其是在提取过程中, 腐殖酸、酚类化合物、重金属离子、不明沉淀物等杂质很难除去, 直接影响

**基金项目:** 国家自然科学基金(30800020, 30970059); 教育部留学回国人员科研启动基金项目( [2009] 1590); 教育部新世纪人才支持计划项目(NCET-08-0779); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2009PY006)

\* 通信作者。Tel: +86-27-87280163; E-mail: hejingj@mail.hzau.edu.cn

**作者简介:** 赵裕栋(1986-), 男, 江西省九江人, 2009 级硕士研究生, 研究方向为土壤微生物宏基因组学。E-mail: zyd3894816@yahoo.cn

**收稿日期:** 2012-03-31; **修回日期:** 2012-05-11

后续的 PCR 扩增、DNA 杂交、内切酶消化等<sup>[10]</sup>。研究者尝试过多种多样的提取 eDNA 方法,根据微生物细胞壁裂解方法的不同,主要可分为三大类:(1)物理方法(研磨、高温、超声波等), (2)化学方法(高盐浓度 SDS 法等), (3)酶裂解法(蛋白酶 K、溶菌酶等)<sup>[11]</sup>。根据实验目的不一样,各种方法均有优缺点。利用物理方法得到的 DNA 片段往往偏小,只有 5–10 kb 左右,且 DNA 的产率较低<sup>[8]</sup>,不适合推广。化学方法和酶裂解法目前应用的比较普遍,但是缺点是很难获得大片段 eDNA (< 70 kb)。这在一定程度上限制了宏基因组学的推广应用,使得绝大多数情况下只能构建插入片段在 40 kb 以下的 cosmid 宏基因组文库来进行研究工作。截至目前,一般用 BAC 载体构建出来的土壤宏基因组文库插入片段也只有 44 kb 左右<sup>[12]</sup>。当然,除了 eDNA 片段大小以外,提取的 eDNA 纯度也尤为关键,尽管商业化的 eDNA 提取试剂盒能够获得较纯的 DNA,不过 eDNA

产率很低,而且片段大小往往小于 20 kb<sup>[13–14]</sup>,不适合于大型基因簇、调控网络及基因组相关性的研究。因此,确立高效且无偏好性的土壤微生物总 DNA 的提取方法,对土壤微生物的宏基因组学具有重要的意义。

本研究在比较现有提取方法优缺点的基础上,建立了一种优化土壤微生物总 DNA 提取的方案。并对不同提取方法所获得的土壤总 DNA 的产量、纯度及片段大小进行了详细的分析比较。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土壤样品:**供试的土壤样品采集于不同的地区,选择天然土样,取样深度为 5–20 cm 左右,除去明显颗粒杂物,装入无菌袋中,–80℃ 冰箱保存。供试的 3 种土壤部分理化性质见表 1。

表 1 所用土壤的理化性质

Table 1 The properties of soil samples tested in the study

Samples	Location	Sampling Time	Soil Type	H <sub>2</sub> O (%)	pH number
1	Guangxi Province, Beihai City (广西省北海市)	2011.7	Light black, spongy	32.1	4.88
2	Shanxi Province, Luliang county (山西省吕梁县)	2011.8	Black	22.5	5.20
3	Hubei Province, Yingchen City (湖北省应城市)	2011.7	Khahi, humid	30.2	6.35

**1.1.2 主要试剂和仪器:**本实验所用引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,溶菌酶为 Fermentas 公司产品,DNA marker 及 rTaq DNA 聚合酶购自东盛生物科技有限公司。其余试剂均购自国药集团。PCR 仪和冷冻离心机均来自德国 Eppendorf 公司。

### 1.2 土壤微生物总 DNA 的提取方法

**1.2.1 土壤样品的预处理:**取出适量的土壤样品经 1 mm 筛子过滤,除去明显的石头颗粒杂质,将样品放入 50 mL 无菌离心管中备用。

**1.2.2 土壤 DNA 提取方法 1:**高温裂解法。参照文献 [15] 报道的方法。

**1.2.3 土壤 DNA 提取方法 2:**SDS-CTAB 原位裂解法。参照文献 [16] 报道的方法。

**1.2.4 土壤 DNA 提取方法 3:**酶裂解法。参照文献 [17] 报道的方法。

**1.2.5 土壤 DNA 提取方法 4:**优化后的方法。称取 10 g 经筛子过滤后的土壤样品加入 50 mL 无菌离心管中,加入 10 mL 裂解缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L Na EDTA, 100 mmol/L 磷酸

钠, 1.5 mol/L NaCl, 1% [w/v] CTAB, pH8.0), 振荡混匀, 放置在恒温摇床(37℃, 200 r/min) 45 min。向样品中加入溶菌酶(终浓度为 10 mg/mL), 混合均匀, 37℃ 恒温水浴 3 h, 每 30 min 温和颠倒混匀 1 次。在样品中加入 SDS(终浓度为 4%), 65℃ 水浴 2 h, 每 30 min 温和颠倒混匀 1 次(可以使用玻璃棒等将沉淀的土壤搅匀)。直接加入 1/5 体积的氯仿(提前预冷), 轻微振荡混匀, 4℃, 3500 × g 离心 15 min。取上清, 加入 1/3 体积的 20% PEG, 2.5 mol/L NaCl 来沉淀 DNA。放置于 4℃ 冰箱过夜。4℃, 3000 × g 离心 20 min 来沉淀 DNA。弃去上清, 保留 DNA 沉淀, 用 70% 冰乙醇洗涤 DNA 3–4 次, 每次静置 20–30 min, 自然风干 DNA, 加入 200 μL TE。待 DNA 样品溶解后, 将 DNA 粗品过 PVPP 柱(先用 3 mol/L HCl 处理 PVPP 过夜, 再用 200 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 漂洗至 pH 为 7.0, 121℃, 灭菌备用, 吸取 700 μL 灭菌的 PVPP 悬液加入垫有少许棉絮的 1 mL 无菌注射器中, 短暂离心即可), 4℃, 2200 × g 离心 15 min, 得到的 DNA 样品放在 –20℃

冰箱保存。

### 1.3 土壤 DNA 的定量和纯度检测

采用 Thermo SCIENTIFIC 公司的 Spectrophotometer NaNoDrop 2000 测定 DNA 含量以及  $A_{260}/A_{280}$ 、 $A_{260}/A_{230}$  的比值。

### 1.4 土壤 DNA 的 PCR 扩增条件

以提取的土壤 DNA 为模板, 扩增 16S rDNA 片段。上游引物序列为: 5'-ACTTTCATCCTCGCTCAG-3', 下游引物序列为: 5'-TACCTTCTTACCACTT-3', 扩增片段为 1.5 kb 左右。PCR 扩增反应体系: 10 × 缓冲液 2 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物 (10 pmol/L) 各 1 μL, DMSO 1 μL, 模板 (土壤 DNA) 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 U, 加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 20 μL。反应参数: 95℃ 变性 5 min; 95℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

### 1.5 脉冲场电泳检测土壤 DNA

采用 Bio-RAD 公司的脉冲场电泳仪检测提取的土壤 DNA 大小及浓度, 脉冲电泳条件: 0.5% 的 TBE 琼脂糖凝胶, 6 v/cm, 20 h, (注: 使用前将电泳槽用无菌去离子水清洗 2 次, 避免杂质污染样品)。

## 2 结果和分析

### 2.1 土壤微生物 DNA 提取方法的优化

目前已报道的土壤 eDNA 提取方法, 主要可分为三大类, 即物理方法、化学方法、酶裂解法。为了确定合适的土壤 eDNA 提取方法, 我们首先选择现在实验室最常用的三种方法 (高温裂解法 (方法 1)、SDS-CTAB 原位裂解法 (方法 2) 和酶裂解法 (方法 3)) 对不同的土壤样品进行了 DNA 提取和分析, 结果发现所获得的 DNA 均不能达到我们的要求。比较这三种提取方法的优缺点, 同时参考提取纯培养微生物基因组 DNA 的方法, 我们对以下几方面进行了改进, 得到优化后的土壤微生物总 DNA 提取方案 (方法 4):

(1) 从 DNA 得率方面考虑, 方法 1 和 2 提取的 DNA 得率明显低于方法 3 (见表 2), 说明方法 3 裂解微生物细胞壁的效果较好。因此, 选择方法 3 中的破壁方法来进行细胞裂解。

(2) 从 DNA 片段大小方面考虑, 方法 1、2 和 3 所得到的 DNA 片段大小均不够理想, 有的甚至在 23 kb 以下 (如图 1)。在 DNA 提取过程中, 影响

DNA 片段大小的主要因素是操作过程的人为剪切力、大片段 DNA 的释放效率以及高浓度细胞壁裂解酶对 DNA 片段的降解作用。因此, 借鉴常规 DNA 操作经验, 首先减小高浓度溶菌酶对 DNA 大片段的降解作用, 考虑降低溶菌酶的浓度 (选择终浓度为 10 mg/mL)。同时为了保证细胞壁裂解效率, 采用 SDS-溶菌酶法裂解细胞壁。为了减小人为操作对 DNA 片段的剪切力以及土壤颗粒对大片段 DNA 的吸附作用, 在完成微生物细胞裂解后, 直接加入 1/5 体积的氯仿<sup>[6]</sup>。

(3) 从 DNA 纯度方面考虑, 方法 1、2 和 3 提取得到的 DNA 纯度均不够好, 尤其是方法 1 效果最差 (见表 3), 不利于后续分子生物学操作。土壤中的腐殖酸等杂质和有效的 DNA 沉淀方法是影响 DNA 纯度的主要因素。首先参考方法 2, 在对土壤微生物细胞裂解前, 加入 DNA 提取液后, 将样品放置在 37℃ 摇床 (180 r/min) 处理 30 - 45 min, 让 CTAB 充分吸收土壤中的腐殖酸等杂质。其次, 参照常规 DNA 操作经验, 选择 20% PEG, 2.5 mol/L NaCl 来专一性地沉淀 DNA。最后, 增加了一个纯化步骤, 利用 PVPP 柱纯化 DNA 粗品。

### 2.2 土壤微生物总 DNA 的提取和检测

为了验证优化后的方法是否对土壤微生物总 DNA 的提取有促进作用, 将方法 4 与方法 1、2 和 3 进行了比较分析。利用 4 种方法分别处理 3 种不同来源的土壤样品, 将所获得的 eDNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1。

从图 1 中可以看出 4 种方法均可以提出土壤微生物总 DNA, 其中方法 3 和方法 4 提取出来的土壤 DNA 浓度远远高于方法 1 和方法 2。4 种方法提取出来的土壤 DNA 都有拖尾现象, 说明: (1) 土壤中含有已降解的 DNA 片段; (2) 在提取过程中基因组 DNA 可能因物理机械剪切或酶降解作用而变为不同大小程度的片段。方法 4 提取出来的 DNA 浓度最高, 且包含较多的大片段 DNA, 从三种土壤样品中提取的总 DNA 均大于 20 kb, 最大可达到 100 kb 左右 (见图 3)。除方法 4 以外, 其它方法提取出来的土壤 DNA 均呈现不同程度的棕褐色, 这可能与其提取过程中缺少有效的纯化步骤有关。

### 2.3 土壤总 DNA 的得率和纯度

土壤 DNA 的得率和纯度是评价 DNA 质量的两个重要指标。从表 2 中可以看出, 方法 1 和方法 2

提取的 DNA 得率较低,每克土壤提取的 DNA 浓度均在 10  $\mu\text{g}$  以下,而方法 3 和方法 4 提取的 DNA 得

率大幅提升,尤其是方法 4 每克土壤最高能得到 95  $\mu\text{g}$  DNA,比方法 1 的 DNA 得率高出 40 倍左右。

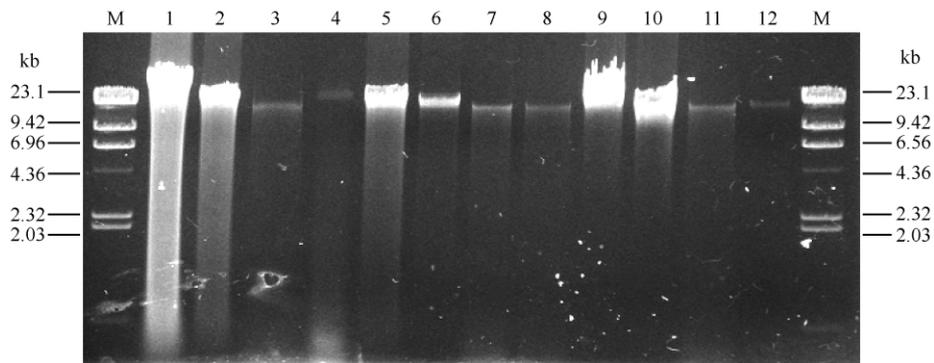


图 1 4 种方法所获得的土壤总 DNA 的凝胶电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of total DNA isolated from three different soil samples using Method 1 (lane 4, 8 and 12), 2 (lane 3, 7 and 11), 3 (lane 2, 6 and 10) and 4 (lane 1, 5 and 9), respectively. DNA obtained from 10 g soil sample was dissolved into 200  $\mu\text{L}$  TE buffer and detected by electrophoresis with the loading volume of 2  $\mu\text{L}$  in each experiment. Lane 1–4: soil sample 1; lane 5–8: soil sample 2; lane 9–12: soil sample 3; M:  $\lambda$  DNA/*Hind*III.

表 2 4 种方法提取 3 种土壤样品的 DNA 得率

Table 2 DNA quantity analyses isolated from three soil samples using four methods

Soil samples	DNA quantity / ( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) <sup>*</sup>			
	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4
1	1.53 $\pm$ 0.08	3.22 $\pm$ 0.11	62.14 $\pm$ 0.55	82.09 $\pm$ 0.95
2	2.32 $\pm$ 0.12	4.72 $\pm$ 0.18	30.51 $\pm$ 1.30	59.05 $\pm$ 2.05
3	2.07 $\pm$ 0.11	6.38 $\pm$ 0.09	58.12 $\pm$ 0.81	95.67 $\pm$ 1.56
Average	1.973	4.773	50.257	78.937

\* Values are presented as the average DNA quantity per gram soil and the standard deviation (shown in brackets) from three independent experiments.

在土壤样品提取过程中, DNA 很容易受到杂蛋白、腐殖酸、酚类物质等的污染而影响后期的实验操作。通常检测 DNA 样品纯度的指标有 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 和 A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> 比值,其中 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值主要用来检测蛋白质和酚类物质的污染情况,理想比值在 1.8–2.0 之间; A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> 比值主要用来检测糖类、盐类或有机物等杂质污染情况,理想比值在

2.0–2.5 之间。从表 3 中可以看出,方法 1 所得 DNA 样品的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 和 A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> 比值均小于 1.0,说明其中蛋白质、腐殖酸等杂质成分较多,方法 2 和方法 3 所得 DNA 的纯度略有提高,方法 4 所得的 DNA 纯度最高, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 和 A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> 比值均最接近理想水平。

表 3 4 种方法提取 3 种土壤样品的 DNA 纯度分析

Table 3 DNA quality analyses isolated from three soil samples using four methods

Method	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> <sup>*</sup>			A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> <sup>*</sup>		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Method 1	0.97 $\pm$ 0.03	1.17 $\pm$ 3.08	0.85 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.01	0.72 $\pm$ 0.15	0.77 $\pm$ 0.06
Method 2	1.65 $\pm$ 0.11	1.53 $\pm$ 0.10	1.62 $\pm$ 0.06	1.55 $\pm$ 0.07	1.46 $\pm$ 0.03	1.63 $\pm$ 0.19
Method 3	1.65 $\pm$ 0.15	1.55 $\pm$ 0.08	1.59 $\pm$ 0.06	1.12 $\pm$ 0.07	1.32 $\pm$ 0.04	1.50 $\pm$ 0.20
Method 4	1.77 $\pm$ 0.17	1.73 $\pm$ 0.09	1.64 $\pm$ 0.04	1.68 $\pm$ 0.08	1.70 $\pm$ 0.18	1.82 $\pm$ 0.07

\* Values are presented as the average OD A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> and A<sub>250</sub>/A<sub>230</sub> ratio and the standard deviation (shown in brackets) from three independent experiments.

## 2.4 PCR 扩增结果

从土壤中提取到的 eDNA 难免会受到腐殖酸等物质的污染, 而造成 PCR 扩增或酶处理反应的失败。因此我们用所获得的土壤 DNA 作为模板进行了 PCR 扩增检测。将土壤 DNA 稀释至  $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$  后, 利用细菌的 16S rDNA 通用引物进行扩增, 结果见图 2。方法 1 提取的 DNA 样品中 PCR 扩增效果最差, 甚至扩增不出条带, 说明该方法提取出的 DNA 受污染情况最严重, 这个结果恰好与前面 DNA 的纯度分析的结果一致。而方法 2、3 和 4 提取出的 DNA 均能扩增出目标条带, 其中方法 4 的扩增效果最好。说明方法 4 提取的 DNA 样品纯度比其它三种方法的要高, 可以直接用于后续分子生物学实验。

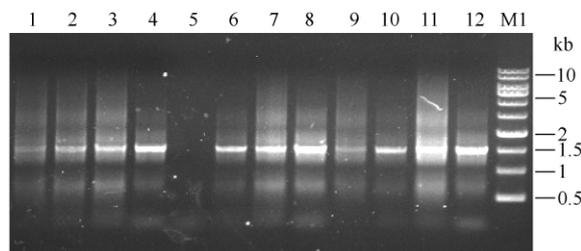


图 2 4 种方法提取的土壤 DNA 进行 16S rDNA 扩增的结果分析

Fig. 2 Electrophoresis analysis of 16S rDNA amplification from soil eDNA isolated from three different soil samples by using Method 1 (lane 1, 5 and 9), 2 (lane 2, 6 and 10), 3 (lane 3, 7 and 11) and 4 (lane 4, 8 and 12), respectively. Lane 1-4: soil sample 1; lane 5-8: soil sample 2; lane 9-12: soil sample 3; M1: 1 kb DNA ladder.

## 2.5 脉冲电泳检测土壤 DNA 片段大小

对 4 种方法所得到的土壤 eDNA 进行脉冲电泳分析 DNA 片段的大小。图 3-A 中展示出利用不同提取方法从 2 号土样中得到的土壤总 DNA 片段大小分析的结果, 可以明显看出方法 2 所得的 DNA 片段最小, 方法 1 和 3 得到的土壤 DNA 片段主带均在 20 kb 左右, 而方法 4 得到的 DNA 片段大部分超过 23 kb, 说明所含的大片段 DNA 的比例高于其它三种方法。图 3-B 显示使用方法 4 从 3 号土壤中提取的 DNA 最大可达到 100 kb 左右。

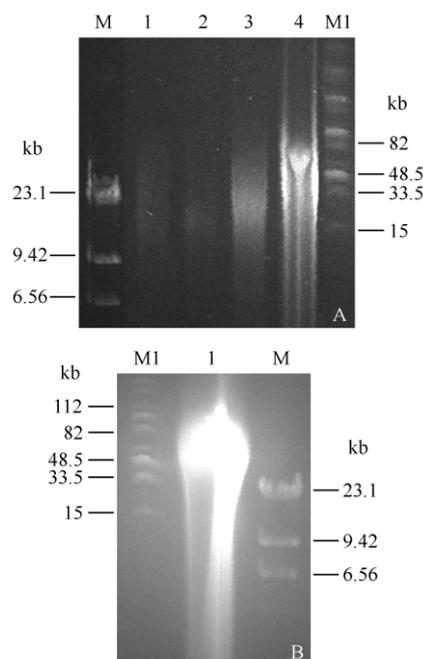


图 3 PFGE 检测 DNA 片段大小

Fig. 3 PFGE results for analyzing sizes of DNA fragments. A: DNA isolated from soil sample 2 using Method 1 (lane 1), 2 (lane 2), 3 (lane 3) and 4 (lane 4), respectively. B: DNA isolated from soil sample 3 using Method 4. M:  $\lambda$  DNA/*Hind*III; M1: NEB MidRange PFG Marker I.

## 3 讨论

随着宏基因组学和分子生物学技术的快速发展, 基于群体基因组的方法来研究土壤微生物多样性及挖掘基因资源信息的策略得到了广泛的应用<sup>[1]</sup>。其中最关键的步骤之一就是提取高质量的土壤微生物的总 DNA。研究的目的不同, 对提取得到的土壤 eDNA 的要求也有较大的差别。对于研究微生物多样性及分子生态学等, 要求 DNA 的产率高且无偏好性, 对 DNA 片段大小要求不高。而在微生物天然产物合成基因簇及复杂代谢途径的研究中, 则需要的 DNA 片段越大越好。据报道, 目前获得的土壤 eDNA 片段大小一般在 70 kb 以下, 经过纯化回收后得到的 DNA 片段大多在 40 kb 以下, 只适用于构建 cosmid 宏基因组文库, 而本研究能够得到更大的 DNA 片段, 这使得构建大插入片段的土壤宏基因组文库成为可能。

表 4 4 种提取土壤微生物 DNA 的方法

Table 4 Four methods for soil microbial DNA isolation in the study

Method	Mainstrategy	Merits	Demerits	Field of application
1	Thermal lysis	Easy operation and low cost	Low diversity, bad DNA purity and quantity	Construction of libraries with small inserts
2	<i>In situ</i> SDS-CTAB lysis	Better DNA purity	Low DNA quantity	Construction of cosmid libraries
3	Enzyme lysis	Better DNA quantity	Small DNA size	Construction of libraries with < 40 kb inserts and biodiversity analysis
4	SDS-enzyme lysis	Highest DNA quantity and quality, largest DNA size	Complicated operation and time consuming	Construction of libraries with larger inserts and biodiversity analysis

从土壤中提取微生物总 DNA 主要可分为两个关键步骤: (1) 土壤微生物细胞的裂解和 DNA 粗品的提取; (2) DNA 粗品的纯化。尽管粗 DNA 的提取和纯化都有许多不同的方法, 但往往是纯化得到的样品较少, 尤其是大片段 DNA 回收率很低<sup>[18]</sup>。比较文献所报道的提取方法的优缺点, 本研究建立了一种优化土壤微生物总 DNA 提取的方案(方法 4), 最高能获得 95  $\mu\text{g}$  DNA/g 土壤, DNA 纯度较高, A260/A280 和 A260/A230 比值均接近理想水平, DNA 片段最大可达到 100 kb 左右, 能够直接用于 PCR、酶切等分子生物学实验。与现有方法相比, 方法 4 表现出一定优势, 综合比较分析结果见表 4。总体来说, 方法 4 在以下几个关键步骤进行了优化处理:

(1) 增加了预处理步骤。首先通过筛子过滤除掉了一些大的颗粒杂质, 其次在对土壤微生物细胞裂解前, 加入 DNA 提取液后, 将样品放置在 37 $^{\circ}\text{C}$  摇床(180 r/min) 处理 30 - 45 min。一方面使土壤均质化, 利于后续操作, 另一方面提取液中的 CTAB 能充分吸收土壤中的腐殖酸等杂质<sup>[16]</sup>, 减小了腐殖酸等杂质对 DNA 质量的影响。

(2) 采用 SDS-溶菌酶法裂解微生物细胞。前期实验结果表明单纯使用某一种细胞裂解方法, 很难达到理想的结果。SDS 和溶菌酶都能高效地裂解细胞, 不过浓度太高或处理时间过长都会造成 DNA 断裂, 影响 DNA 质量, 本文将两者适当结合, 确定了一种较好裂解细胞的方法。

(3) 完成微生物细胞裂解后, 直接加入 1/5 体积的氯仿。一般裂解完后, 都会直接离心, 然后再用苯酚抽提除去蛋白杂质, 研究中发现这样处理不利于大片段 DNA 的提取。如果在细胞裂解完后直接加入 1/5 体积的氯仿, 不仅能够除去部分蛋白杂质, 而且可以防止裂解释放出来的大片段 DNA 重新吸

附到土壤颗粒中<sup>[16]</sup>, 增加了获得大片段 DNA 的几率。

(4) 选择 20% PEG, 2.5 mol/L NaCl 来沉淀 DNA。大多数报道的方法都是用异丙醇、无水乙醇等来沉淀 DNA, 实验证明其沉淀效果并不是很好, 很多蛋白、腐殖酸、酚类物质、不明沉淀物等杂质都可以混夹在 DNA 中, 给后续的纯化工作带来不便。而利用 20% PEG, 2.5 mol/L NaCl 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 可专一性的沉淀 DNA, 获得的 DNA 样品杂质较少, 又不会影响 DNA 的得率。

(5) 利用 PVPP 柱纯化 DNA 粗品。大多数研究者纯化 DNA 粗品, 采用 CsCl 梯度离心、Sephadex 凝胶层析, 树脂吸附及解吸附等方法, 或者直接通过琼脂糖胶电泳, 切胶回收 DNA 片段。这些方法要么价格昂贵, 要么操作繁琐, 且对 DNA 都有一定程度的损伤。也有文献报道将 PVPP 直接加入裂解液中以除去土壤样品中的腐殖酸等杂质, 但效果不理想。本研究通过制备 PVPP 柱纯化 DNA, 效果明显。经初步纯化后基本能除去有色物质, 且对 DNA 的大小及产量影响不大, 操作简便。

本研究建立的新方法综合了酶裂解法和化学裂解法, 可将不同类型的微生物基因组 DNA 从土壤中抽提出来, 适用范围更加广泛, 可用于土壤微生物多样性及其相关基因功能研究, 为更好地开发利用土壤未培养微生物资源提供了有力工具。

**致谢** 感谢华中农业大学农业微生物国家重点实验室李华、朱梦奕、李祥同学提供土壤样品, 以及翟英、李佳丽同学对本工作的支持与帮助。

## 参考文献

- [1] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 240-245.

- [2] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95 (12) : 6578-6583.
- [3] Clardy J, Fischbach MA, Walsh CT. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, 2006, 24 (12) : 1541-1550.
- [4] Amann RL, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59 (1) : 143-169.
- [5] Torsvik V, Sørheim R, Goksøyr J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1996, 17 (3) : 170-178.
- [6] Blanc M, Marilley L, Beffa T, Aragno M. Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 28 (2) : 141-149.
- [7] Shan G, Jin W, Lam EKH, Xing X. Purification of total DNA extracted from activated sludge. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20 (1) : 80-87.
- [8] Ogram A, Sayler GS, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, 7 (2) : 57-66.
- [9] Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2) : 316-322.
- [10] Steffan RJ, Atlas RM. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54 (9) : 2185-2191.
- [11] Robe P, Nalin R, Capellano C, Vogel TM, Simonet P. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 2003, 39 (4) : 183-190.
- [12] Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (6) : 2541-2547.
- [13] Ferrer M, Golyshina OV, Chernikova TN, Khachane AN, Reyes-Duarte D, Santos VAP, Strompl C, Elborough K, Jarvis G, Neef A. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environmental Microbiology*, 2005, 7 (12) : 1996-2010.
- [14] Yun J, Kang S, Park S, Yoon H, Kim MJ, Heu S, Ryu S. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (12) : 7229-7235.
- [15] Brady SF. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. *Nature Protocols*, 2007, 2 (5) : 1297-1305.
- [16] 蒋云霞, 郑天凌. 天然红树林土壤微生物大片段宏基因组文库的构建. *环境科学 (Environmental Science)*, 2007, 28 (11) : 2609-2614.
- [17] Maarit Niemi R, Heiskanen I, Wallenius K, Lindström K. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45 (3) : 155-165.
- [18] Tsai YL, Olson BH. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (7) : 2292-2295.

## Optimization of soil microbial DNA isolation

Yudong Zhao, Jun Zhou, Jing He\*

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** [Objective] The vast majority of microbial resources has not been exploited and utilized because more than 99% of microorganisms in soil cannot be cultured by conventional means. The quantity and quality of environmental DNA (eDNA) are the most important issues in metagenomic study. Here we set up an optimized method for high quality soil microbial DNA isolation, which can be applied for microbial diversity study and metagenomic library construction containing large eDNA inserts. [Methods] After comprehensive comparison of strengths and weaknesses of the commonly used methods for microbial DNA isolation, we proposed a new method by optimizing several key procedures of isolation, including combination of sodium dodecyl sulfate (SDS)–hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) and lysozyme to lysis cells, usage of chloroform in stead of phenol to remove protein contamination, filtration with the polyvinylpolipyrrolidone (PVPP) column to purify DNA. Using three different soil samples, we compared the optimized method with three reported methods in the literature by analyzing soil eDNA yield, rate of purity, size and ability of PCR amplification. [Results] The quality of soil eDNA isolated by the optimized method was significantly improved. We obtained 95 µg DNA per gram of soil. OD A260/A280 and A260/A230 ratios of DNA were much closer to the ideal level. More desired PCR product was amplified and maximum size of eDNA reached 100 kb. [Conclusion] High quality and quantity of soil microbial DNA can be isolated by the optimized method we established, which provides a powerful tool for metagenomic research to exploit uncultured microbial resources in soil.

**Keywords:** soil microorganisms, eDNA isolation, quantity and quality of eDNA, PCR amplification, large DNA fragment

(本文责编:张晓丽)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30800020, 30970059), by the New Century Excellent Talents grant from the Ministry of Education of China (NECT-08-0779), by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars (SRF for ROCS, SEM) ([2009] 1590) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2009PY006)

\* Corresponding author. Tel: +86-27-87280163; E-mail: hejingj@mail.hzau.edu.cn

Received: 31 March 2012 / Revised: 11 May 2012