

天山 1 号冰川冻土微生物总 DNA 提取方法的比较和优化

李 梦, 胡有贞, 唐 洁, 王丽军, 郑晓吉, 顾艳玲, 关 波*, 倪永清

(石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832002)

摘要: 建立一种满足天山冰川冻土微生物宏基因组文库构建要求的 DNA 提取方法, 为低温乳糖酶基因的筛选奠定基础。通过对 DNA 纯度与得率进行比较, 从 4 种 DNA 提取方法中选择提取 DNA 得率和纯度最高的 TEN 法, 进一步通过增加预处理、反复提取等步骤进行了改良和优化。SDS-CTAB 法、TENP 预处理法、TEN 法和 Zhou 法 4 种提取方法中, TEN 法的 DNA 得率为 (392 ± 44) ng/g 冻土, A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 分别为 (1.82 ± 0.40) 和 (0.97 ± 0.38) , 最接近理想指标。对 TEN 法进行优化改良发现, DNA 得率最高达到 (449 ± 61) ng/g 冻土, 且 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 值分别为 (1.92 ± 0.15) 和 (2.03 ± 0.31) 。以 16S rDNA 和 26S rDNA 为引物的 PCR 扩增和酶切实验验证了所提取冻土宏基因组 DNA 的质量满足后续分子生物学的要求。改良优化过的 TEN 法是适合天山 1 号冰川冻土的一种经济有效的 DNA 提取方法, 为构建冻土低温微生物宏基因组文库奠定了基础。

关键词: 宏基因组 DNA; DNA 提取; 冻土; 天山 1 号冰川

中图分类号: Q 939.9 文章编号: 1673-1689(2019)12-0017-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.003

Comparison and Optimization of Methods for Metagenomic DNA Extraction from the Frozen Soil of the Glacier No.1 in the Tianshan Mountains

LI Meng, HU Youzhen, TANG Jie, WANG Lijun, ZHENG Xiaoji, GU Yanling, GUAN Bo*, NI Yongqing

(The Food College of SHIHEZI University, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: This study is aiming to establish a method for total DNA extraction from the frozen soil of the Glacier No.1 in the Tianshan Mountains. Four DNA extraction methods (SDS-CTAB, TENP, TEN and Zhou method) were used for DNA extraction from the frozen soil, and the yield, purity and

收稿日期: 2016-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560432); 石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZX201432); 石河子大学科学技术研究发展计划-应用基础研究青年项目(2014ZRKXYQ13)。

* 通信作者: 关波(1984—), 男, 新疆焉耆人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品酶生物技术研究。

E-mail: boguan3519@163.com

第一作者: 李 梦, 胡有贞, 唐 洁, 等. 天山 1 号冰川冻土微生物总 DNA 提取方法的比较和优化[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(12): 17-24.

integrity of the total DNA produced were compared. Among the four extraction methods tested, TEN method produced the highest purity with a A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratio of (1.82 ± 0.40) and (0.97 ± 0.38) , respectively, and the yield of TEN method was (392 ± 44) ng/g frozen soil. We further modified the TEN method by adding a pretreatment step. The A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratio of the extracted DNA reached (1.92 ± 0.15) and (2.03 ± 0.31) , respectively, and the DNA yield of TEN4 method reached (449 ± 61) ng/g frozen soil. 16S rDNA, 26S rDNA PCR analysis, and restriction digestion analysis of the DNA extracted by TEN method further proved that the DNA was qualified for the construction of a meta-genomic DNA library. In summary, a modified TEN method suitable for DNA extraction from the frozen soil of the Glacier No.1 in the Tianshan Mountains was established, which could be used for meta-genomic DNA library construction.

Keywords: metagenomic DNA, DNA extraction, frozen soil, Glacier No.1 in the Tianshan mountains

天山 1 号冰川冻土属于我国高海拔高山多年冻土类型,分布于乌鲁木齐河源天山冰川站及空冰斗地区,海拔 3 250 m 以上,年平均地温为 $-4.95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[1]。冻土环境中的微生物需要通过各种生理机制适应低温、寡营养、强辐射、冻融等一系列极端环境。冻土微生物的这些极端生理特性为研究和开发利用参与代谢过程的低温酶提供了丰富的材料。已有研究对天山 1 号冰川冻土中产低温 β -半乳糖苷酶的微生物进行筛选,本课题组从天山 1 号冰川冻土中分离获得产低温 β -半乳糖苷酶、低温脂肪酶、低温蛋白酶和低温淀粉酶的菌株。然而,由于冰川冻土有机质营养十分贫瘠,从中分离的寡营养型微生物在现有培养技术条件下普遍生长速率较慢,产酶水平较低(仅约 $1\sim5\text{ U/mL}$),严重限制了低温酶的高效筛选和制备。因此,利用宏基因组学等分子生物学技术,构建冰川冻土的宏基因组文库进行功能筛选,有助于更高效地从低温环境中筛选 β -半乳糖苷酶。

获取高质量的宏基因组 DNA 是构建宏基因组文库的先决条件。目前对于各类土壤微生物总 DNA 的提取方法已有较多的报道^[2-7],但在已经报道的提取方法中还没有一种方法能够适用于所有环境样品微生物总 DNA 的提取。由于冰川微生物生物量相对较低,而且主要以革兰氏阳性菌为主^[8],本课题组前期尝试使用商业化提取试剂盒 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil(MP Biomedicals)和 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit(MO BIO)提取的天山 1 号冰川冻土 DNA 的得率和纯度均无法满足构建宏基因组文库的要求。因此,建立一种适用于天山 1 号冰川冻土的 DNA 提取方法,对构建冰川冻土的宏基因组文库及低温 β -

半乳糖苷酶的高效筛选具有重要意义。本文对目前报道的几种土壤 DNA 提取方法进行了比较,并对最适合天山 1 号冰川冻土 DNA 提取的 TEN 法进行了优化和改良。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

天山一号冰川属于天格尔山北坡乌鲁木齐河的河源区,海拔 3 833 m($43^{\circ}07.125\text{ N}$, $86^{\circ}48.707\text{ E}$)。冻土土壤样品取自从乌鲁木齐天山一号冰川尾部的底部沉积层,用提前灭菌的工具沿冰川边缘收集土样。采集的样品迅速装入已灭菌的 50 mL 离心管,置于车载冰箱中 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。采集的冻土样品于当天运回实验室并在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 主要试剂

PCR Taq 酶, λ DNA/Hind III marker 购自大连宝(Takara)生物工程有限公司, FastDigest 快速限制性内切酶 Bam HI 购自赛默飞世尔(Thermo Scientific)公司,引物由上海生工生物工程有限公司合成,蛋白酶 K 和溶菌酶购自北京康为世纪有限公司,相关生化试剂购自上海生工生物工程有限公司,实验用到的主要缓冲液及成分如下:

裂解缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L Na EDTA, 100 mmol/L Na_2PO_4 , 1.5 mol/L NaCl, 10 mg/mL CTAB, pH 8.0;

TENP 溶液:50 mmol/L Tris, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 10 mg/mL PVPP, pH 10.0;

PBS buffer:8.0 g NaCl, 2.0 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , 0.24 g KH_2PO_4 , 溶于 1 L 去离子水, pH

7.4;

TEN 溶液:100 mmol/L EDTA,100 mmol/L Tris (pH 8.0), 1.5 mol/L NaCl,100 mmol/L NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 ;

TE buffer:10 mmol/L Tris-HCl buffer(pH 8.0), 1 mmol/L EDTA。

1.3 冻土微生物总DNA的提取方法

1.3.1 SDS-CTAB 裂解法 参考赵裕栋等的方法^[9],略有调整。称取5.0 g土壤样品于50 mL离心管中,加10 mL裂解缓冲液,振荡混匀。向样品中加100 μL 溶菌酶(质量浓度为250 mg/mL),混合均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴1 h,每15 min温和振荡混匀1次;加50 μL 蛋白酶K(10 mg/mL),恒温水浴1 h;加100 g/L十二烷基磺酸钠(SDS,终质量浓度为40 g/L),65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴2 h,每20 min温和颠倒混匀1次;离心,取上清液,上清液中加1/5倍体积的氯仿(提前预冷),轻微振荡混匀,25 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 r/min离心15 min,取上清液;向水相中加入0.6倍体积的异丙醇和0.1倍体积的醋酸钠,4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h沉淀DNA;4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min离心20 min,弃去上清液,保留DNA沉淀。体积分数70%冰乙醇洗涤沉淀3次,自然晾干,加100 μL TE溶解DNA,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 TENP 法 参考赵勇等方法^[10],略有改动。预处理:取5.0 g土壤,于50 mL离心管中,加10 mL的TENP buffer,振荡混匀,离心10 min(10 000 r/min, 25 $^{\circ}\text{C}$),去上清液。沉淀中再加10 mL的TENP buffer,振荡混匀,离心10 min(10 000 r/min, 25 $^{\circ}\text{C}$),弃上清液。重复上述步骤直至上清透明,加入5 mL的PBS buffer按上述操作洗涤,保留沉淀。DNA提取:将收集的沉淀悬浮于10 mL裂解缓冲液(同SDS-CTAB裂解法),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴45 min;加50 μL 蛋白酶K(10 mg/mL),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min;加100 μL 溶菌酶(250 mg/mL),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min;加2 mL 100 g/L SDS,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴2 h。8 000 r/min,25 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,将上层液相转入另一洁净的50 mL离心管,加等体积氯仿-异戊醇(24:1,体积比),10 000 r/min、25 $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min。取上层清液,向水相中加入0.6倍体积的异丙醇和0.1倍体积的醋酸钠,4 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀2 h;10 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 min,体积分数70%冰乙醇洗涤沉淀3次,洗涤后自然风干2 h,待乙醇风干后,加100 μL TE,得到DNA溶液-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.3 TEN 法 参考Fang等方法^[11],略有改动。称取

5.0 g土壤样品,加入10 mL TEN溶液,将样品完全悬浮到TEN溶液中,反复冻融(-80 $^{\circ}\text{C}$,10 min;65 $^{\circ}\text{C}$, 5 min)3次后;再加入100 μL 溶菌酶(250 mg/mL),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min;加入10 μL 蛋白酶K(10 mg/mL),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min。酶解后在试样中加入2 mL预热的100 g/L SDS,65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴2 h,期间每15 min轻轻上下颠倒一次。10 000 r/min,25 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min后,将上清液转移到新的离心管中,土壤颗粒裂解后沉淀于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。向上清液中加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1,体积比),混匀后,10 000 r/min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,收集水相。向水相中加入0.6倍体积的异丙醇和0.1倍体积的醋酸钠,4 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀2 h, 10 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 min,弃上清液,体积分数70%冰乙醇洗涤沉淀3次,室温晾干,加100 μL 无菌TE溶解DNA。

1.3.4 Zhou 法^[12] 称取5.0 g土壤样品,研碎,于50 mL离心管中,加135 mL裂解缓冲液,振荡混匀;加100 μL 蛋白酶K(10 mg/mL),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min;加1.5 mL 200 g/L SDS,混匀,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴2 h,间或混匀;8 000 r/min、25 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 min,将上层液相转入另一洁净的50 mL离心管于4 $^{\circ}\text{C}$ 备用;土样沉淀再加4.5 mL裂解缓冲液和0.5 mL 200 g/L SDS混匀,于65 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min后,离心;上清液与前一次上清液二为一,加等体积氯仿异戊醇抽提,8 000 r/min、离心10 min;取上层清液,加入0.6倍体积异丙醇,室温沉淀1 h;10 000 r/min、25 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 min,体积分数70%乙醇洗涤沉淀3次,自然风干,加100 μL TE。

1.3.5 TEN 法的改良和优化 1)反复多次提取对提取效率和质量的影响。以TEN法首次裂解后的含细胞裂解物沉淀作为第2次DNA提取样品,按TEN法反复提取1次(在提取样品中加入2 mL预热的100 g/L SDS,65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴30 min,其余不变),记为TEN1法。以第2次裂解后的含细胞裂解物沉淀作为第3次DNA提取样品,再用TEN方法重复提取1次,记为TEN2法。2)向TEN法首次裂解后的土壤颗粒沉淀中加入4 mL TEN溶液,并反复冻融(-80 $^{\circ}\text{C}$,10 min;65 $^{\circ}\text{C}$,5 min)3次后,再加入1 mL预热的100 g/L SDS,65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴30 min,8 000 r/min离心15 min后的上清液与第1次离心获得的上清液合并后,进行核酸沉淀,后续操作方法与TEN法相同,记为TEN3法。3)预处理对提取效率和质量的影响。取2组冻土样品分别不进行预

处理和进行预处理(将土壤颗粒重悬于 10 mL TEN 溶液中,25 ℃、150 r/min、10 h 后,将混合物离心,收集沉淀。再重复用 TEN 溶液洗沉淀 2~3 次,直到悬浮液无色澄清)后按 TEN3 法提取(预处理记为 TEN4)每个处理至少做 3 个平行实验。

1.4 冻土微生物总 DNA 完整性及纯度和得率的检测

提取的冻土微生物核酸样品用 NanoDrop2000 微量分光光度计测定 230、260、280 nm 处的光吸收和核酸浓度。以 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 的比值来评价 DNA 的纯度。此外,取 10 μ L 提取的冻土微生物核酸样品,1 g/mL 琼脂糖凝胶电泳(1 $\times$ TAE 缓冲溶液,8 V/cm,45 min)检测 DNA 片段的完整性和含量。

1.5 冻土微生物总 DNA 的 PCR 扩增

以提取的冻土微生物总 DNA 为模板,分别扩增 16s rDNA 和 26s rDNA 片段,分析冻土微生物总 DNA 的提取质量。扩增体系(20 μ L):10 $\times$ Taq PCR Buffer 2 μ L,dNTPs 2 μ L,正反向引物(表 1)各 1 μ L,Taq DNA 聚合酶 1 μ L,冻土微生物总 DNA 溶液 1 μ L,其余用灭菌双蒸水补齐。PCR 反应的阴性对照用无菌双蒸水代替 DNA 模板。扩增条件:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s;56 ℃退火 30 s;72 ℃延伸 1 min;30 个循环;72 ℃延伸 10 min。反应在 PCR 仪(TC512 型,英国 Techne 公司)上进行。PCR 产物用 1.0 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 引物序列及 PCR 产物
Table 1 Primers sequences and PCR product

基因	引物名称	引物序列	预期扩增片段大小/bp
16s rDNA	27f	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	1 500
	1492r	5'-TACGGYTACCTTGTACGACT T-3'	
26s rDNA	NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	520
	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	

1.6 冻土微生物总 DNA 的限制性酶切

冻土微生物总 DNA 的酶切按照 FastDigest 快速限制性内切酶 *Bam* HI 的推荐酶切体系进行酶切,在 37 ℃水浴酶切指定时间后,80℃,5 min 灭活后进行琼脂糖凝胶电泳。

法的 2 个重要指标。4 种方法所提 DNA 的含量和纯度的测定结果见表 2。从表 2 中可以看出,3 次平行实验中 TEN 法提取 DNA 的得率最高,为(392 $\pm$ 44) ng/g 冻土。SDS-CTAB 法和 TENP 法的得率最低。与一般土壤中 DNA 得率(95.67 $\pm$ 1.56) μ g /g 土壤相比^[10],冻土中 DNA 的得率明显偏低,这可能由于冰川冻土中微生物生物量较低或冻土微生物细胞的裂解效率较低。从表 2 中可以看出,4 种提取方法所得 DNA 的 A_{260}/A_{230} 比值均小于 1.0,说明提取 DNA 中

2 结果与分析

2.1 不同冻土微生物总 DNA 提取方法的比较

土壤 DNA 的得率和纯度是评价 DNA 提取方

表 2 不同提取方法获得的 DNA 得率和纯度比较

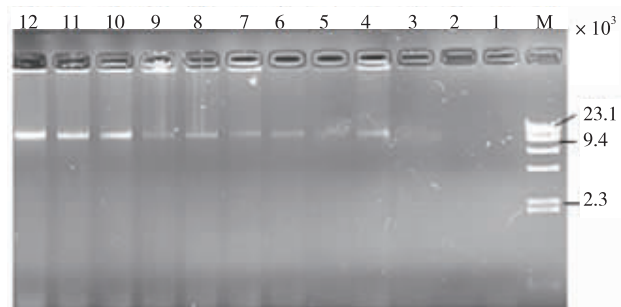
Table 2 Comparison of yield and purity of DNA obtained by different extraction methods

方法	DNA 得率/ (ng/g 冻土)	变异系数/%	A_{260}/A_{280}	变异系数/%	A_{260}/A_{230}	变异系数/%
SDS-CTAB	296 $\pm$ 48	16	1.67 $\pm$ 0.58	3	0.96 $\pm$ 0.23	24
TEN	392 $\pm$ 44	11	1.82 $\pm$ 0.40	22	0.97 $\pm$ 0.38	39
TENP	175 $\pm$ 77	44	1.61 $\pm$ 0.06	4	0.72 $\pm$ 0.05	7
Zhou	351 $\pm$ 194	55	1.7 $\pm$ 0.07	4	0.83 $\pm$ 0.26	32

杂质成分仍较多。从 A_{260}/A_{280} 上看,TEN 法提取 DNA 的 A_{260}/A_{280} 的比值最接近理想指标。

利用琼脂糖凝胶电泳对4种提取方法所提DNA进行了完整性检测,结果如图1所示。除了TENP法外,其余的3种方法提取的DNA电泳后均得到明显的主条带,主条带相对分子质量在 $10 \times 10^3 \sim 23 \times 10^3$ 之间。

4种提取方法都有不同程度的降解现象,但



M: λ DNA/Hind III; 1-3: TENP 法; 4-6: SDS-CTAB 法; 7-9: Zhou 法; 10-12: TEN 法

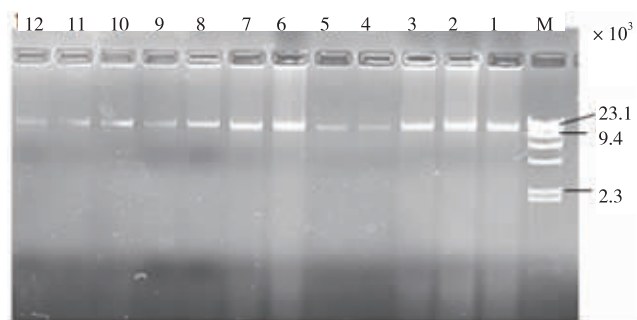
图1 不同方法提取的冻土基因组DNA凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoresis result of genomic DNA extracted from frozen soil samples by different methods

表3 TEN法反复多次提取DNA和TEN3法的得率和纯度

Table 3 DNA yield and purity extracted by the TEN method repeatedly and TEN3 method

方法	DNA 得率/ (ng/g 冻土)	变异系数/%	A_{260}/A_{280}	变异系数/%	A_{260}/A_{230}	变异系数/%
TEN	383 ± 57	15	1.60 ± 0.17	11	0.96 ± 0.2	21
TEN1	410 ± 72	18	1.97 ± 0.13	6.5	1.65 ± 0.13	8
TEN2	61 ± 15	25	2.57 ± 1.32	21	0.42 ± 0.12	4
TEN3	413 ± 91	24	1.76 ± 0.04	3	1.08 ± 0.24	41



M: λ DNA/Hind III; 1-4: TEN3 法; 5-8: TEN 法; 9-10: TEN1 法; 11-12: TEN2

图2 TEN3法和TEN法反复多次提取冻土的基因组DNA凝胶电泳

Fig. 2 Electrophoresis result of genomic DNA repeatedly extracted from frozen soil samples by different TEN method

TEN 法的主条带最亮。综合考虑不同提取方法获得DNA的得率、完整性和纯度,本研究选择TEN法做了进一步优化。

2.2 TEN法反复多次提取DNA和改良TEN法的得率和纯度分析

为了进一步提高TEN法的DNA提取得率,用TEN法对同一份天山冰川冻土样品进行了反复提取,同时采用改良后的TEN3法提取。TEN3法和反复提取3次后的DNA得率及纯度汇总在表3。同一样品反复通过TEN法进行提取3次获得的DNA(对应TEN、TEN1、TEN2)得率依次为 (383 ± 57) 、 (410 ± 72) ng/g 和 (61 ± 15) ng/g 冻土,而 A_{260}/A_{280} 逐渐升高,这表明单次提取无法完全获得冻土样品中的所有DNA,反复多次提取同一样品后DNA中的杂质成分逐渐减少。TEN3法参考Zhou法将2次细胞裂解产物合并进行DNA抽提,得率达到 (413 ± 91) ng/g 冻土, A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 分别为 (1.76 ± 0.04) 和 (1.08 ± 0.24) 。对所提基因组DNA进行琼脂糖电泳检测结果如图2所示,提取的DNA电泳后均得到

较清晰的主条带,相对分子质量接近 23×10^3 。但由于冻土土壤中微生物的分布存在着不均一性,而在提取过程中可能又因物理机械剪切的作用而使基因组DNA有不同程度的降解。因此,后续实验选择对TEN3法进行了优化。

2.3 样品预处理对DNA提取得率和纯度的影响

为分析预处理步骤是否能够提高TEN法提取DNA的得率和纯度,分别取3份冻土样品进行预处理,3份冻土样品不进行预处理提取总DNA。从表4可以看出,相比未经预处理样品,经预处理的样品提取DNA的得率从 (424 ± 76) ng/g 冻土增加到 (449 ± 61) ng/g。未经预处理提取的DNA和预处理提取DNA的 A_{260}/A_{280} 均在1.8~2.0之间,但预处理提取的DNA其 A_{260}/A_{230} 值达到了 2.03 ± 0.31 。

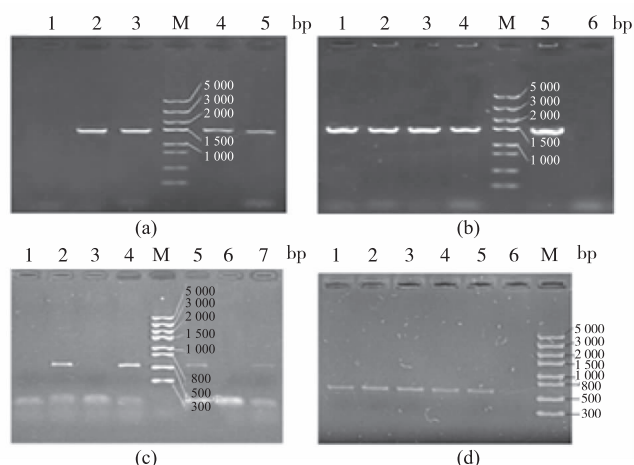
表 4 TEN3 法预处理对 DNA 得率与纯度的影响

Table 4 Effects of pretreatment with TEN buffer on the DNA yield and purity

方法	DNA 得率/ (ng/g 冻土)	变异系数/%	A_{260}/A_{280}	变异系数/%	A_{260}/A_{230}	变异系数/%
TEN3	424±76	18	1.83±0.34	18	1.21±0.24	20
TEN4	449±61	12	1.92±0.15	8	2.03±0.31	16

2.4 改良 TEN 法提取 DNA 质量的 PCR 检测和限制性酶切检测

为验证提取的 DNA 质量是否满足后续分子生物学实验的要求,采用 16S rDNA 和 26S rDNA 引物 PCR 扩增进一步验证了提取的冻土宏基因组 DNA 质量(图 3)。结果显示 4 种方法提取的 DNA 样品均可成功扩增出 16S rDNA 产物,但 SDS-CTAB 法、Zhou 法和 TENP 法提取的部分 DNA 样品没有成功扩增出 26S rDNA 产物。采用 TEN 方法反复多次提取的 DNA 样品均能成功扩增出 16S rDNA 和 26S rDNA 产物,扩增产物的琼脂糖电泳条带单一,分别约为 1 400 bp 和 500 bp,与预期大小一致。



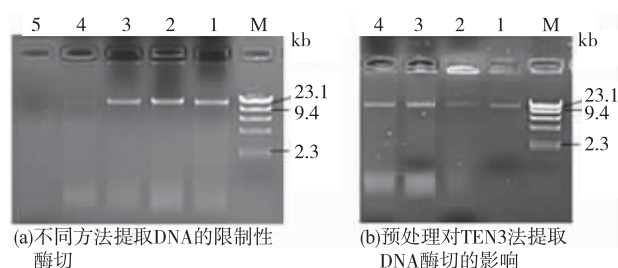
M 为 Trans 5K DNA Marker; (a): 不同提取方法的 16S rDNA 的扩增结果 (1: 阴性对照; 2: Zhou 法; 3: TEN 法; 4: TENP 预处理法; 5: SDS-CTAB 法); (b): 优化 TEN 法提取后 16S rDNA 的扩增结果 (1: TEN 法; 2: TEN1 法; 3: TEN2 法; 4: TEN3 法; 5: TEN4 法; 6: 阴性对照); (c): 为不同提取方法的 26S rDNA 的扩增结果 (1: 阴性对照; 2~3: Zhou 法; 4~5: TEN 法; 6: TENP; 7: SDS-CTAB 法); (d): 不同优化 TEN 法提取后 26S rDNA 的扩增结果 (1: TEN 法; 2: TEN1 法; 3: TEN2 法; 4: TEN3 法; 5: TEN4 法; 6: 阴性对照)

图 3 16S rDNA 和 26S rDNA 引物 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification using 16S rDNA and 26S rDNA primers

分别对 TEN3 法、TEN4 法和 TEN1 法获得的

DNA 样品进行限制性酶切,实验结果(图 4)显示经 *Bam* HI 部分酶切后 TEN3 法基因组 DNA 的主条带降解不明显,而 TEN1 法提取基因组 DNA 和 TEN4 法的主条带降解明显,表明 TEN1 法和 TEN4 法获得的 DNA 满足限制性酶切的要求。进一步验证了,增加预处理的方法可以提高核酸的得率和纯度。但由于通过综合考虑到 TEN4 法核酸的得率相对较高,损失较少,更能展示生物的多样性,所以采用 TEN4 法从天山 1 号冰川冻土中提取的总基因组 DNA 质量满足后续分子生物学实验的要求。



(a) 不同方法提取 DNA 的限制性酶切

(b) 预处理对 TEN3 法提取 DNA 酶切的影响

M: λ DNA/Hind III; (a) 1: TEN3 法酶切前 DNA, 2: TEN3 法酶切后 DNA, 3: TEN1 法酶切前 DNA, 4~5: TEN1 法酶切后 DNA; (b) 1: TEN4 法酶切前 DNA, 2: TEN4 法酶切后 DNA, 3: TEN3 法酶切前 DNA, 4: TEN3 法酶切后 DNA

图 4 提取冻土基因组 DNA 的限制性酶切分析

Fig. 4 Restriction digestion analysis of genomic DNA extracted from frozen soil samples

3 讨论

天山 1 号冰川冻土环境中的微生物通过产生低温酶等多种机制适应低温环境,这为挖掘各类低温酶提供了极好的研究材料。课题组已从天山 1 号冰川冻土中分离获得产低温 β -半乳糖苷酶、低温脂肪酶、低温蛋白酶和低温淀粉酶的菌株^[13-16]。据估计,环境样品中可分离培养微生物仅占总微生物的 1%,通过现有标准培养方法无法进行培养微生物的种类更占到环境中所有微生物种类的 99% 以上^[8]。近年来,极端微生物的研究已经成为热点,特别是它们所具有的独特基因^[17-19]。冰川冻土由于有机质

营养十分贫瘠,分离获得的低温微生物在现有培养技术条件下普遍生长速率较慢,产酶水平较低(仅约 1~5 U/mL),严重限制了低温酶的高效筛选和制备。因此,需要采用基于宏基因组文库的分子生物学方法更高效的从天山冰川冻土中挖掘酶学特性优良的低温酶,并构建相应的基因工程菌以实现低温酶的高效制备。

构建宏基因组文库的重要前提是获取高质量的宏基因组 DNA。尽管目前针对多种土壤样品都有相应的 DNA 提取解决方案,但还尚未报道一种可适用于所有土壤的高效方法。课题组前期采用商业化提取试剂盒(MP Biomedicals 公司的 FastDNA SPIN Kit for Soil 和 MO BIO 公司的 PowerSoil DNA Isolation Kit)进行提取发现,试剂盒提取单次土壤样品处理量小(0.5 g 提取样),并且提取的天山 1 号冰川冻土 DNA 无法满足构建宏基因组文库的要求并且价格昂贵。因此,本文以天山 1 号冰川冻土为提取材料,对现有的几种土壤 DNA 提取方法进行了比较,并从中选择了 DNA 提取纯度和得率相对较高的 TEN 法进行了进一步的优化和改良。

土壤 DNA 的手提方法通常包括直接法和间接法两类,间接法通常从土壤样品中回收细胞后再提取 DNA,纯度高但得率低,往往不能包括真菌和细菌总 DNA^[7]。直接法是直接裂解土壤样品中的微生物,通常包括预处理、细胞裂解、蛋白质抽提和 DNA 沉淀几个基本环节。为了获得较高的 DNA 提取效率,通常采用预处理过滤除掉一些大的颗粒杂质,并利用预处理液中的 CTAB 或 PVPP 等成分充分吸收土壤中的腐殖酸等杂质^[12]。本研究中 TENP 法将 PVPP 加入预处理中,结果核酸的纯度和得率并不理想。推测可能是由于预处理液中残留的 PVPP 阻碍了后续的微生物细胞裂解,导致 DNA 提取得率最低。

为了获得最佳的细胞裂解效果,许多研究都采用物理、化学和水解酶类联用进行细胞裂解^[9]。本研究(SDS-CTAB 法)发现单纯采用 CTAB 对细胞进行裂解,效果并不好;Zhou 法 DNA 的得率和纯度也并不理想;而 TEN 法主要通过溶菌酶+蛋白酶 K+反复

冻融+SDS 破碎裂解细胞,把物理、生物和化学的方法结合起来,提高了细胞的裂解效率,在 4 种手提方法中 TEN 法提取的 DNA 得率最高,纯度也相对较高(表 2)。DNA 粗可体液通过吸附柱等方法进一步纯化,但通常对不同相对分子质量 DNA 的吸附具有一定的选择性,不利于宏基因组文库的构建^[5],因此本研究综合考虑 DNA 的纯度和完整性,选择 TEN 法进行了进一步的优化和改良。

已有文献表明同一土壤样品反复提取 3 次后能够较好地表征土壤微生物的数量和物种组成,现有的 DNA 提取方法似乎很难一次性将所有土壤微生物细胞裂解并获得 DNA^[20-21]。本研究的结果也表明反复提取 3 次均能从天山 1 号冰川冻土样品中提取出不同含量的 DNA,但以 TEN1 法的得率和纯度最高。TEN3 法则参考了 Zhou 法中一次提取过程将 2 次细胞裂解物成分合并后一并进行 DNA 抽提的策略,所提 DNA 的总体得率不如分 2 次提取(TEN+TEN1)的总得率高,但由于进行了多批次细胞裂解,所提 DNA 更能体现冻土中微生物的天然组成。因此,最终选择了 TEN3 法的样品进行后续实验。Fang 等提取河床沉积物 DNA 时发现 TEN 法预处理有助于提高 DNA 的纯度和得率^[12],本文的结果也表明预处理后 TEN 法提取的冻土 DNA 其 A_{260}/A_{230} 值达到了 (2.03 ± 0.31) ,提取 DNA 的纯度明显提高。

16S rDNA 和 26S rDNA 的 PCR 扩增结果显示预处理改良 TEN 法提取的 DNA 质量相对较高,表明该方法能从冻土中同时有效提取细菌和真菌总基因组 DNA。预处理改良 TEN 法提取 DNA 的限制性酶切效果明显,提取所获得 DNA 满足构建天山冰川冻土微生物宏基因组文库的要求。

4 结 语

本研究通过对现有几种土壤样品 DNA 提取方法的比较和优化,建立了一种适合天山 1 号冰川冻土样品微生物总 DNA 提取的有效方法——预处理改良 TEN 法,为后续天山 1 号冰川冻土宏基因组文库的构建和低温乳糖酶的筛选奠定了基础。

参考文献:

- [1] 白玉. 天山冻土微生物的系统多样性分析及生长特性的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [2] SAGOVA-MARECKOVA M, CERMAK L, NOVOTNA J, et al. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils

with widely differing characteristics[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008, 74(9):2902-2907.

- [3] LU Xiaofei, ZHAO Zhixiang, XIE Bingyan, et al. DNA Extraction and construction of a metagenomic fosmid library of alpine meadow soil from the Mila mountains in Tibet, China[J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 2009, 15(6):824-829. (in Chinese)
- [4] FITZPATRICK K A, KERSH G J, MASSUNG R F. Practical method for extraction of PCR-quality DNA from environmental soil samples[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2010, 76(13):4571.
- [5] VERMA D, SATYANARAYANA T. An improved protocol for DNA extraction from Alkaline soil and sediment samples for constructing metagenomic libraries[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2011, 165(2):454-464.
- [6] YAN Peiying, HOU Shugui, CHEN Tuo, et al. Comparison of methods for total DNA extraction of microorganisms in Glacier surface snow[J]. **Journal of glaciology and geocryology**, 2012, 34(2):478-484. (in Chinese)
- [7] ZHANG Qin, JIA Rong, DOU Changming, et al. Application of soil pretreatments and $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ in DNA extraction from soils contaminated with heavy metals[J]. **Microbiology China**, 2014, 41(1):191-199. (in Chinese)
- [8] HUGENHOLTZ P, GOEBEL B M, et al. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic of bacterial diversity[J]. **Journal of Bacteriology**, 1998, 180(18):4765-4774.
- [9] ZHAO Yudong, ZHOU Jun, HE Jing. Optimization of soil microbial DNA isolation[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2012, 52(9):1143-1150. (in Chinese)
- [10] ZHAO Yong, ZHOU Zhihua, LI Wu, et al. DNA extraction from soil for molecular microbial community analysis[J]. **Journal of Agro-Environment Science**, 2005, 24(5):854-860. (in Chinese)
- [11] FANG YUN, XU MEIYING, CHEN XINGJUAN, et al. Modified pretreatment method for total microbial DNA extraction from contaminated river sediment[J]. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, 2015, 9(3):444-452.
- [12] ZHOU J Z, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996, 62(2):316-322.
- [13] NI Yongqing, GU Yanling, SHI Xuewei, et al. Phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted bacteria producing protease from sediments of the bottom layer of the Glacier No.1 in the Tianshan mountains[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2013, 53(02):164-172. (in Chinese)
- [14] QI Xinge, GU Yanling, HAN Liang, et al. Phylogeny and characterization of bacterial strains producing cold-active amylase from sediments of the bottom layer of the Glacier No.1 in the Tianshan mountains[J]. **Science and technology of food industry**, 2013, 34(23):172-176. (in Chinese)
- [15] DONG Juan, NI Yongqing, YANG Ruijin, et al. Isolation and identification of a cold-adapted lipase producing strains from the Glacier No. 1 in the Tianshan[J]. **Food and fermentation industry**, 2014, (05):43-47. (in Chinese)
- [16] ZHANG Ming, GU Yanglin, XU Yuli, et al. Phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted bacterial strains producing β -galactosidase from permafrost sediments of the bottom layer of the Glacier No.1 in the Tianshan mountains[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2011, 51(12):1605-1615. (in Chinese)
- [17] ZHANG Hao, XIA Yu, FU Xiaoyan, et al. Integration and expression of a thermostable β -galactosidase gene bgaB *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2003, 22(6):1-4. (in Chinese)
- [18] HE Song, GONG Fanghong, ZHANG Dechun, et al. Cloning of β -galactosidase gene from *Lactobacillus acidophilus* and study of its activity as a food-grade selection marker[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(5):777-781. (in Chinese)
- [19] ZHANG X, LI H, LI C J, et al. Metagenomic approach for the isolation of a thermostable β -galactosidase with high tolerance of galactose and glucose from soil samples of Turpan Basin[J]. **BMC Microbiology**, 2013, 13(1):1-10.
- [20] FEINSTEIN L M, SUL W J, BLACKWOOD C B. Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2009, 75(16):5428 - 5433.
- [21] GUO Yun, WU Yucheng, LIN Xiangui, et al. Three successive extractions reduce quantification bias of microbial communities associated with incomplete DNA recovery in soil[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2012, (07):894-901. (in Chinese)