

土壤可培养细菌 DNA 的提取及 RAPD 条件的优化*

李钧敏

(台州学院生物系 临海 317000)

摘要: 以改进的 CTAB-溶菌酶-蛋白酶 K 裂解法抽提土壤可培养细菌总 DNA, 直接进行随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析。分别测试了不同浓度镁离子、dNTP、模板 DNA、引物、DNA 聚合酶及牛血清白蛋白对反应结果的影响, 通过各因子的组合研究, 确定了土壤可培养细菌遗传多样性分析的稳定的 RAPD 反应体系。

关键词: 土壤可培养细菌, RAPD, 成分

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0005-05

EFFECT ON THE EXPERIMENTAL RESULTS OF THE CONTENT OF COMPOSITIONS IN RAPD EXPERIMENT OF SOIL CULTURED BACTERIA

LI Jun-Min

(Department of Biology, Taizhou University, Linhai 317000)

Abstract: The total soil cultured bacterial DNA was extracted by improved CTAB-lysosome-protease K method and was analyzed by random amplified polymorphic DNA markers. The effect of concentration of Mg^{2+} , dNTP, DNA templates, primers, DNA polymerase and bovine serum albumin on experimental results were tested and the optimal reaction system of RAPD for soil cultured bacteria was determined.

Key words: Soil cultured bacteria, RAPD, Composition

土壤中含有许多微生物, 包括细菌、真菌、放线菌与原生动植物等, 其中细菌是土壤生物的主要类群, 个体小, 数量多, 繁殖快, 在物质循环中起着关键作用。随机扩增多态 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 分析是建立在 PCR 反应基础上的一种新的分子生物学技术, 由于 RAPD 技术费用低廉, 不需预知目标生物基因组相关分子生物学资料等优点, 使得 RAPD 技术在生物多样性研究中具有极大的应用潜力^[1]。目前 RAPD 广泛应用于动、植物遗传多样性的研究^[2,3]。研究微生物多样性的传统方法是将微生物从环境中分离、实验室培养和鉴定, 但此法较繁琐, 受微生物分类的限定且具有较大的误差。RAPD 技术应用于微生物遗传多样性研究起步较晚, 最早在 1995 年, Xia 等^[4]利用 RAPD 标记分析了 3 种分解 2,4-D 的土壤微生物居群的遗传多样性。由于受微生物核酸抽提方法的限制, 分子生物学技术在土壤微生物遗传多样性的研究中开展缓慢^[5]。在 RAPD 分析中, dNTP 浓度, 镁离子浓度, Taq 酶用量, 模板 DNA 浓度, 引物浓度等因素均对扩增结果有明显的影响, 本文目的在于通过对土壤可培养细菌 RAPD 扩增反应中各影响因素的分析, 建立重复性强, 稳定的 RAPD 反应参数, 为进一步分析土壤细菌遗传多样性打下了基础。

* 台州学院校立项目资助 (No. 2001-14)

收稿日期: 2002-09-16, 修回日期: 2002-12-03

1 材料与方法

1.1 材料

土壤采自浙江省天台山石梁国家森林公园灌丛植被下 10cm ~ 15cm 土层, 野外采集后, 保鲜袋封装, 立即带回实验室, 采集的土壤样品放置时间不宜超过 24h。

1.2 方法

1.2.1 土壤细菌的培养与收集: 实验用培养基为牛肉膏蛋白胨液体培养基^[6]。土壤用无菌水稀释至 10^3 , 取 1mL 接入 9mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基, 37℃, 105r/min 振荡培养 48h, 12,000r/min 离心 5min 收集菌体于 Eppendorf 管中, 贮存于 -20℃, 备用。

1.2.2 土壤可培养细菌 DNA 的抽提^[7]与定量: 土壤细菌 DNA 的抽提按如下方法进行: 细菌沉淀, 重悬浮于 2mL 提取缓冲液 (100mmol/L Tris·HCl (pH8.0), 100mmol/L EDTA·2Na (pH8.0), 100mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH8.0), 1.5mol/L NaCl, 1% CTAB), 搅拌均匀, 加入溶菌酶 (50mg/mL) 至 1mg/mL, 37℃ 水浴 1h, 加入蛋白酶 K (10 mg/mL) 至 100 (g/mL, 65℃ 水浴 1h)。取裂解液 12,000 r/min 离心 10min, 取上清, 置 5mL 离心管中, 用等体积的氯仿/异戊醇抽提, 加入 0.6v/v 异丙醇, -20℃ 放置 30min, 12,000 r/min 离心 10min, 沉淀用 70% 乙醇洗涤, 8,000 r/min 离心 5min, 沉淀室温晾干, 溶于 50μL TE (pH8.0), 备用。

DNA 采用凝胶电泳与岛津 UV2401-PC 型紫外分光光度法双重定量。DNA 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳后, 置上海天能 GIS 凝胶成像分析系统 (上海天能科技服务有限公司) 中拍照保存, 与标准 DNA 分子量参照比较进行定量。

1.2.3 RAPD 反应程序: 本实验所用的 PCR 仪为上海高机公司生产的 SRX-481 PCR 仪, 适合土壤细菌 RAPD 分析的 PCR 反应程序 (用 6℃ 循环水冷却): 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 1min, 40℃ 退火 1min, 72℃ 延升 1.5min, 40 个循环; 72℃ 最后延伸 5min。

1.2.4 土壤细菌 RAPD 实验中各影响因素: 考虑到 RAPD 扩增系统中, Mg^{2+} 与 dNTP、

表 1 Mg^{2+} 与 dNTP 浓度对 RAPD 扩增的影响

管号	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	4 × dNTP 浓度 (mmol/L)
1	2.5	
2	3.0	
3	3.5	0.1
4	4.0	
5	2.5	
6	3.0	0.2
7	3.5	
8	4.0	
9	2.5	
10	3.0	0.3
11	3.5	
12	4.0	

模板 DNA 与牛血清白蛋白、引物与 Taq 之间的相互作用, 对两两因素设立了正交实验。(1) Mg^{2+} 浓度与 dNTP 浓度对 RAPD 扩增的影响: 15μL PCR 反应液中含 1 × Taq 酶缓冲液, 2U Taq 酶 (上海华美公司), 10ng 模板 DNA, 20pmol 引物 (上海 Sangon 公司), 2mg/mL 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA); Mg^{2+} 与 4 × dNTP 浓度见表 1, 加水补足体积至 15μL, 覆盖石蜡油按方法 1.2.3 进行 PCR 扩增。(2) 模板 DNA 用量与牛血清白蛋白浓度对 RAPD 扩增的影响: 15μL PCR 反应液中

含 1 × Taq 酶缓冲液, 2U Taq 酶 (上海华美公司), 3mmol/L $MgCl_2$, 0.2mmol/L 4 × dNTP, 20pmol 引物 (上海 Sangon 公司), 模板 DNA 用量与 BSA 浓度见表 2, 加水补足体积至 15μL, 覆盖石蜡油按方法 1.2.3 进行 PCR 扩增。(3) 引物用量与 Taq 酶用量对 RAPD 扩

增的影响: 15 μ L PCR 反应液中含 1 \times Taq 酶缓冲液, 3mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L 4 \times dNTP, 20pmol 引物(上海 Sangon 公司), 10ng 模板 DNA, 2mg/mL BSA; 引物用量与 Taq 酶量见表 3, 加水补足体积至 15 μ L, 覆盖石蜡油按方法 1.2.3 进行 PCR 扩增。

1.2.5 PCR 产物的鉴定: 扩增产物取 15 μ L 在 2% 琼脂糖凝胶 (0.5 \times TBE, 含 5mg/mL 溴化乙锭) 上进行电泳分析, 于上海天能 GIS 凝胶成像分析系统 (上海天能科技服务有限公司) 中拍照保存。

2 结果与分析

2.1 土壤可培养细菌 DNA 的抽提

10cm~15cm 土层土壤的细菌经培养后, 收集菌体, 进行细菌 DNA 的抽提, 结果如图 1 所示。所抽提的 DNA 具有较高的质量, A₂₆₀/A₂₈₀ 大于 1.8。从图 1 可看出加样孔中较亮, 可能是抽提过程中残留的部分多糖类物质, 但这并不影响其 PCR 扩增。

2.2 Mg²⁺ 浓度与 dNTP 浓度对 RAPD 带的影响

Mg²⁺ 浓度与 dNTP 浓度的变化对 RAPD 带的数量和强弱影响较大, 见图 2。当 dNTP 浓度为 0.1mmol/L 时, Mg²⁺ 浓度从 2.5mmol/L 至 4mmol/L 时对 dNTP 浓度影响不大, 均可扩增出清晰的条带, 但当 Mg²⁺ 浓度为 4mmol/L 扩增出的条带最多, 且最清晰; 当 dNTP 浓度升高至 0.2mmol/L 时, Mg²⁺ 浓度的变化对 dNTP 浓度影响较大, 当 Mg²⁺ 浓度为 2.5mmol/L 时, 只可扩增出两条弱带; 而 Mg²⁺ 浓度增加至 3.0mmol/L 以上时, 才可扩增出明显的条带, 并且条带数比 dNTP 浓度为 0.1mmol/L 时扩增的条带数明显减少; 当 dNTP 浓度升高至 0.3mmol/L 时, 只有当 Mg²⁺ 浓度增加至 4.0mmol/L 以上时, 才可扩增出条带, 并且条带数也明显减少。以上结果显示了 dNTP 浓度的升高可以降低 RAPD 扩增的条带, 而 Mg²⁺ 浓度的增加略微可抵消 dNTP 浓度升高带来的影响。Mg²⁺ 浓度的增加会降低 RAPD 扩增的特异性, 从图 2 可知, 最适合的 Mg²⁺ 浓度与 dNTP 浓度的组合是 4 mmol/L Mg²⁺, 0.1mmol/L dNTP。土壤微生物的 PCR 反应经常需要较高的 Mg²⁺ 浓度, 本文中最适合的 Mg²⁺ 浓度为 4 mmol/L, 比一般植物或动物的 RAPD 扩增所需的 Mg²⁺ 浓度高, 这与文献报道相吻合^[8]。

表 2 模板 DNA 浓度与牛血清白蛋白浓度对 RAPD 扩增的影响

管号	模板 DNA 量 (ng)	BSA 浓度 (mg/mL)
13	40	
14	20	1
15	2	
16	40	
17	20	2
18	2	
19	40	
20	20	3
21	2	

表 3 引物用量与 Taq 酶量对 RAPD 扩增的影响

管号	Taq 酶量 (U)	引物用量 (pmol)
22	1	
23	2	10
24	3	
25	1	
26	2	20
27	3	
28	1	
29	2	30
30	3	

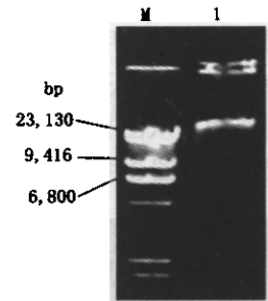


图 1 土壤可培养细菌 DNA
M λ DNA/Hind III 标准分子量参照物,
1 土壤可培养细菌 DNA

2.3 模板 DNA 量及 BSA 浓度对 RAPD 带的影响

模板 DNA 量的变化对 RAPD 带的数量和强弱有一定的影响, 40ng 至 2ng 模板 DNA 均可获得满意的扩增交果。当模板 DNA 为 40ng, BSA 浓度为 1mg/mL 及 2mg/mL 时, 扩增出的 RAPD 条带较亮, 但条带有些变形; 当 BSA 浓度增加 3mg/mL 时, 可扩增出正确清晰的条带; 当模板 DNA 为 20ng, 均可扩增出明显的条带, 但随着 BSA 浓度的升高, 有些条带变模糊; 当模板 DNA 为 20ng, BSA 浓度升高至 3mg/mL 时会导致一些条带的丢失。BSA 广泛应用于酶反应系统及 PCR 反应系统中, 可以封闭扩增系统中对 Taq 酶的

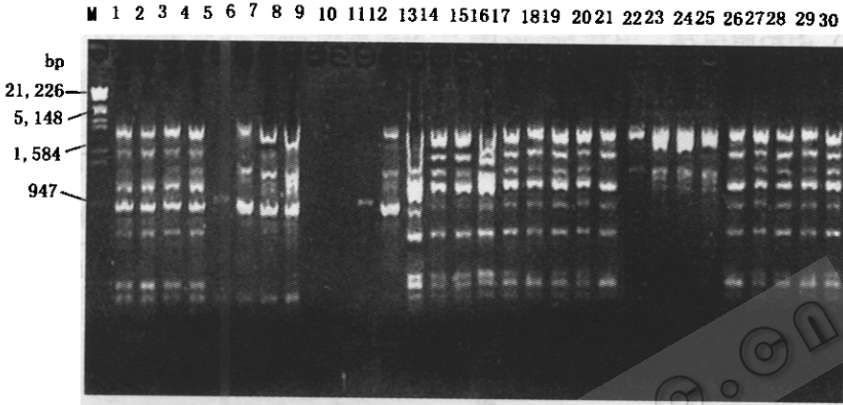


图2 几种因素对土壤可培养细菌 RAPD 扩增的影响 (引物 S307)

M λDNA/EcoR I+ Hind III 标准分子量参照物,
1~30 方法 1.2.4 中各 Eppendorf 管的 RAPD 扩增结果

抑制物的抑制作用^[9], 从而改善扩增结果的特异性与酶的稳定性的。BSA 可以通过其上富含赖氨酸的阳离子与多酚化合物的阴离子相互作用^[10], 但阳离子同样可与带负电荷的 DNA 作用。从图 2 可以看出 BSA 可结合 DNA, BSA 浓度过高, 可使扩增条带减弱, 数目减少。由图 2 可知, 在土壤可培养细菌 RAPD 扩增中, 模板 DNA 的量以 20ng 为宜, 而 BSA 浓度以 2mg/mL 为宜。

2.4 引物量与 Taq 酶用量对 RAPD 带的影响

引物量及 Taq 酶用量对土壤可培养细菌 RAPD 反应的影响较大, 当 15μL 反应体积中, 引物量只有 10pmol 时, 只可扩增出少量的条带。当引物量增加至 20pmol 时, Taq 酶用量在 1U ~ 2U 时, 出现扩增条带的减少, 当 Taq 酶用量增加至 3U 时, 可扩增出清晰的条带。当引物量增加至 30pmol 时, 不同的浓度的 Taq 酶用量均可获得清晰的条带, 但以 3U 的 Taq 酶扩增出的条带亮度最大。当然土壤细菌 DNA 的扩增需要较多的 Taq 酶用量, 这可能与酶的活性有关, 不同厂家的酶其活性可能有所不同。由图 2 可知, 最适宜的引物量与 Taq 酶用量分别是 30pmol、3U。

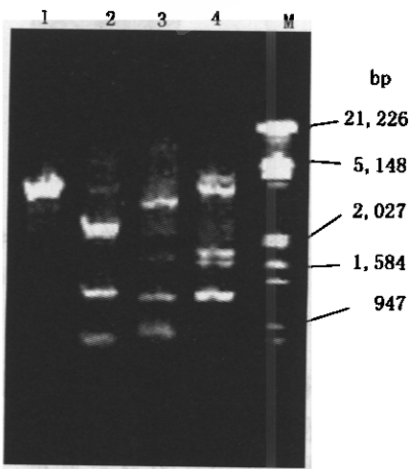


图3 土壤可培养细菌 RAPD 扩增的引物筛选
M λDNA/EcoR I+ Hind III 标准分子量参照物,
1~4 RAPD 扩增引物分别为 S344、S314、S312、S303

2.5 土壤可培养细菌 RAPD 扩增引物的筛选

经过上述分析可确定土壤可培养细菌的合适的 RAPD 扩增条件, 以此条件对土壤可培养细菌 DNA 进行 3 次 RAPD 分析, 结果可靠, 带型稳定。以此条件对 4 个引物进行筛选, 结果见图 3。

3 结论

由实验结果可知, 与动、植物的 RAPD 扩增类似, 扩增条件的变化会对 RAPD 图谱产生较大的影响, 从而影响 RAPD 分析的准确性。因此, 为了获得重复性和可靠性较高的 RAPD 结果, 在土壤可培养细菌 RAPD 分析前, 筛选优化 RAPD 条件是十分重要和必要的。本文结果显示: 土壤可培养细菌的 RAPD 分析较适宜的扩增条件如下: $15\mu\text{L}$ PCR 反应体积, $1\times$ Tag 酶缓冲液, 4mmol/L MgCl_2 , 3U Tag 酶 (上海华美公司), 20ng 模板 DNA, 20pmol 引物 (上海 Sangon 公司), 0.1mmol/L $4\times$ dNTP, 2mg/mL BSA。

参考文献

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Liavak K J, *et al.* Nucl Acid Res, 1990, 18 (22): 6531 ~ 6535.
- [2] Wachira F N, Wauth R, Hackett C A, *et al.* Genome, 1995, 38 (2): 201 ~ 210.
- [3] 张锡元, 杨建琪, 张德春, 等. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26 (5): 469 ~ 472.
- [4] Xia X, Bollinger J, Ogram A. Molecular Ecology, 1995, 4: 17 ~ 28.
- [5] Somerville C C, Knight J T, Straube W L, *et al.* Appl Environ Microbio, 1989, 55 (3): 548 ~ 554.
- [6] 沈萍, 范秀容, 李广武, 等主编. 微生物学实验手册. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [7] 边才苗, 李钧敏, 施时迪, 等. 浙江师范大学学报 (自然科学版), 2002, 25 (1): 56 ~ 61.
- [8] Dyer A R, Fowler J C S, Baker G H. Soil Biol Biochem, 1998, 20 (2): 159 ~ 165.
- [9] Al-Soud W A, Radström P. J Clin Microbio, 2001, 39 (2): 485 ~ 493.
- [10] Kreder C A. Appl Environ Microbio, 1996, 62 (3): 1102 ~ 1106.