微生物学通报
Microbiology
tongbao@im.ac.cn
生物实验室

NOV 20, 2008, 35(11): 1840~1844
© 2008 by Institute of Microbiology, CAS

浙贝母根际土壤总 DNA 提取和纯化方法的比较

窦莹颖　林展民　朱英德　路　群　叶波平*

(中国药科大学生命科学与技术学院　南京　210009)

摘　要: 本研究通过对 6 种土壤总 DNA 提取方法(CTAB-SDS-冻融法、玻璃珠-SDS-酚氯仿抽提法、玻璃珠-聚乙烯聚吡咯烷酮-SDS 法、玻璃珠-聚乙烯聚吡咯烷酮-溶菌酶法、玻璃珠-聚乙烯聚吡咯烷酮-冻融法和 UltraClean 试剂盒法)和 4 种纯化方法(改进琼脂糖凝胶电泳法、2%聚乙烯吡咯烷酮-琼脂糖凝胶电泳法、PVPP 层析柱法和低熔点琼脂糖电泳法)的比较, 证明利用 20 mmol/L EDTA (pH 7.5)预处理土壤后, 利用 CTAB-SDS-冻融法提取土壤总 DNA 并经改进琼脂糖凝胶电泳法纯化获得的浙贝母根际土壤总 DNA 的得率和纯度相对较高, 达 44.00 μg/g±2.65 μg/g 土壤, 可用于后续基于 16S rDNA 分析基础上的土壤微生物分子生态学的分析工作。

关键词: 浙贝母, 根际土壤, 土壤 DNA, 提取和纯化, 方法优化

Comparison of Rhizospheric Soil DNA Isolation and Purification Methods from the Root of *Fritillaria thunbergii* Miq

DOU Ying-Ying　LIN Zhan-Min　ZHU Ying-De　LU Qun　YE Bo-Ping*

(*School of Life Science and Technology*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009)

Abstract: Six DNA extraction methods and four DNA purification methods were compared and analyzed in this study to get higher quality DNA from the rhizospheric soil of *Fritillaria thunbergii* Miq. Results showed that higher purity DNA were harvested by pretreating the soil with 20 mmol/L EDTA (pH 7.5), then isolating soil DNA with CTAB-SDS-frozen-thawing, and further purified by agarose method. The recovery rate of this soil DNA was about 44.00 μg/g ± 2.65 μg/g soil, and they were qualified for the microbial diversity analysis in the rhizospheric soil of *F. thunbergii* Miq based on the 16S rDNA sequence.

Keywords: *F. thunbergii*, Rhizospheric soil, Soil DNA, Extraction and purification, Method modification

植物根际土壤微生物在植物的生长发育[1]、分布[2]、次生代谢产物的产生[3]以及N、P、K的循环[4]过程中起着非常重要的作用。早期有关植物根际土壤微生物的研究一般采用常规的分离鉴定手段, 但是由于绝大多数微生物目前尚处于难培养或不可培养阶段[5], 通过常规方法获得的研究结果很难全面反映植物根际土壤微生物区系的状况。基于 16S rDNA 以及ITS序列在进化过程中的保守性以及在物种分类上的应用, 利用各种分子生物学手段开展植物根际土壤微生物的研究开始受到关注并取得了一些重要的成果[6]。然而, 目前的主要问题在于不同来源土壤中腐殖质成分以及土壤微生物类群的差异(如菌

基金项目：教育部高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(项目编号 No. 130105)
*通讯作者：Tel: 025-83271016, Fax: 025-83271249; ✉: yebp2001@yahoo.com.cn
收稿日期：2008-04-29; 接受日期：2008-05-23
©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

种的大小、多样性和丰度等)往往导致提取的土壤总DNA质量低下, 影响了后续的DNA分析工作[7], 需在研究中针对不同的土壤特点对DNA提取和纯化方法进行优化。

中药浙贝母为百合科植物浙贝母(*Fritillaria thunbergii* Miq)的鳞茎, 主要分布在浙江、江苏、江西和安徽等地, 在我国具有 2000 多年的应用历史。近 30 年来, 研究人员已先后开展了有关浙贝母形态、生理生化、活性产物以及病原菌等的研究工作, 但是, 尚未见有关于浙贝母根际土壤微生物区系的研究报道。鉴于鳞茎类药材的品质可能受到土壤环境中各种生物因子和非生物因子的影响[8], 有必要对其根际土壤微生物区系进行深入的研究。为此, 本研究通过比较不同的土壤总DNA提取和纯化方法对浙贝母根际土壤总DNA提取效率以及后续PCR扩增的影响, 确定了适合浙贝母根际土壤总DNA提取和纯化的方法, 为后续通过 16S rDNA分析方法研究其土壤根际微生物区系奠定一个良好的工作基础。

1 材料和方法

1.1 土壤样品

2008 年 4 月采自于中国药科大学燕子矶药用植物园浙贝母根际。用一中空无菌钢管(2 cm×30 cm)沿浙贝母根垂直插入土层后, 取出带土的钢管, 擦除钢管表面的附着土壤, 用保鲜膜封闭两端的开口, 取回并在实验室无菌环境下取出管中土样混匀。经检测, 土壤为棕褐色沙壤土, pH 为 6.4, 自由水含量为 16.7%。

1.2 土壤预处理

将新鲜土壤样品与 20 mmol/L EDTA (pH 7.5)溶液按 1:2 (*W*/*V*)涡旋混合 30 s 制成土壤混悬液, 室温下 8000 r/min离心 5 min后弃上清, 重复操作 3 次, 制备的土壤预处理样品供后续分析[9]。

1.3 土壤 DNA 粗提取

取 3 g预处理后的土壤, 分别以(1)CTAB-SDS-冻融法[10](使用液氮代替文献中−20°C进行冷冻)、(2)玻璃珠-SDS-酚氯仿抽提法[11]、(3)玻璃珠-PVPP-SDS法[12]、(4)玻璃珠-PVPP-溶菌酶法[12]、(5)玻璃珠-PVPP-冻融法[12]和(6)试剂盒法(UltraClean Soil DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc., 由Michigan大学奚传武博士提供)提取土壤总DNA, 并将DNA沉淀溶于 100 μL无菌去离子水中。

1.4 粗提 DNA 的检测及含量测定

DNA样品经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。用 UV-1700 Pharma Spec (Shimadzu, 日本) 测定粗制DNA的吸光度值(OD_{260}、OD_{280}、OD_{230}), 分别计算OD_{260}/OD_{280}和OD_{260}/OD_{230}, 并根据OD_{260}计算出DNA含量。

1.5 土壤 DNA 粗提物的纯化

取 50 μL 经CTAB-SDS-冻融法制备的土壤DNA样品, 分别按照以下方法进行纯化, 最后溶解于 20 μL 无菌去离子水中。

1.5.1 改进的琼脂糖凝胶纯化法**(a)**: 将样品 DNA 于 1.0%的琼脂糖凝胶中以 5 V/cm 电泳 40 min, EB 染色后切下 DNA 所在胶带, 用 DNA 凝胶回收试剂盒(DNA Gel Extraction Kit, Axygen)回收胶块, 用 UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)中的过滤柱替换 DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen)中的过滤柱进行凝胶回收。

1.5.2 改进的**PVP**琼脂糖凝胶电泳纯化法**(b)**[13]: 试剂盒纯化步骤同方法 1.5.1, 但不更换DNA凝胶回收试剂盒中的过滤柱。

1.5.3 **PVPP** 层析柱纯化法**(c)**: 按文献[14]中的方法 2 加以改进, 取凝胶回收试剂盒中的过滤柱, 将上层套管中的滤膜去除, 将适当大小的灭菌脱脂棉推到过滤柱的底部, 然后向管中加入 1 mL TE 缓冲液浸透的 PVPP (0.1 g/mL), 制成简式离心纯化柱。其余纯化步骤同文献[14]。

1.5.4 低熔点琼脂糖电泳纯化法**(d)**: 将 DNA 样品于 1.0%的低熔点琼脂糖(BBI)凝胶中以 5 V/cm 电泳 40 min, EB 染色后切胶回收含 DNA 的胶块, 加入 100 μL TE 缓冲液 65°C 水浴溶解后直接用于 PCR 等操作。

1.5.5 纯化后 **DNA** 的检测及含量测定: 同 1.4, 回收率=纯化后 DNA 量/纯化前 DNA 量×100%。

1.6 16S rDNA 扩增

1.6.1 引物设计: 16S rDNA 上游引物序列为 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', 下游引物序列为 5'-ATTACTAGCGATTCCGTCTTC-3'。由上海生工公司合成并经 PAGE 纯化。

1.6.2 **PCR**扩增体系和程序: 建立总体积为 25 μL 的PCR 扩增体系, 其中含 2.5 μL 10×PCR buffer(上海生工)、2.5 mmol/L $MgCl_2$、2 mmol/L dNTP、0.4 μmol/L 上下游引物、1.0% DMSO, 100 ng模板DNA以及

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

1.5 U Taq DNA 聚合酶(上海生工)。PCR 反应液于 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 45 s, 52°C 退火 45 s, 72°C 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min 结束反应。取 10 μL PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 不同方法对浙贝母根际土壤总 DNA 提取得率和纯度的影响

在本研究的 6 种方法中, 利用 CTAB-SDS-冻融法、玻璃珠-SDS-酚氯仿抽提法和试剂盒法可从浙贝母根际土壤中有效提取出总 DNA, 其它 3 种方法均未检测到浙贝母根际土壤总 DNA (图 1)。

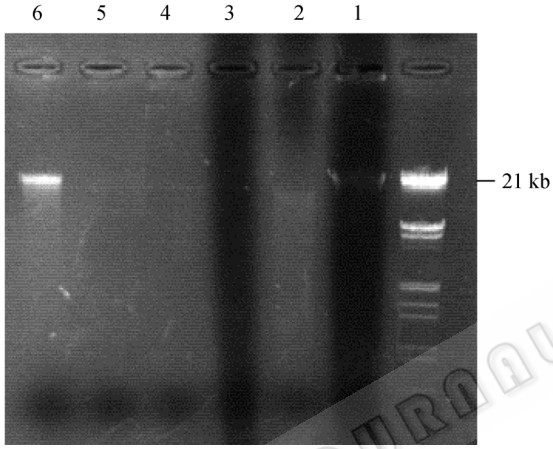

图 1 6 种不同提取方法获得的土壤 DNA 琼脂糖电泳分析图

Fig. 1 Agarose gel electrophoretic analysis of unpurified soil DNA by six DNA extraction methods

1: CTAB-SDS-冻融法(方法 **1**); 2: 玻璃珠-SDS-酚氯仿抽提法(方法 **2**); 3: 玻璃珠-PVPP-SDS 法(方法 **3**); 4: 玻璃珠-PVPP-溶菌酶法(方法 **4**); 5: 玻璃珠-PVPP-冻融法(方法 **5**); 6: UltraClean Soil DNA Isolation Kit 试剂盒法(方法 **6**)

1: DNA extracted by CTAB-SDS-frozen-thawing (Method **1**); 2: SDS-phenol-Chloroform (Method **2**); 3: Beads-PVPP-SDS (Method **3**); 4: Beads-PVPP-lysozyme (Method **4**); 5: Beads-PVPP-frozen-thawing (Method **5**); 6: UltraClean Soil DNA Isolation Kit (Method **6**)

比较了通过不同提取方法获得的土壤总DNA量, 结果表明由CTAB-SDS-冻融法提取到的DNA量最多, 得率比其它 5 种方法高约 3~50 倍(表 1)。但通过该提取方法获得的DNA溶液为棕黑色, 表明其中的腐殖酸等杂质含量很高, 可通过 OD_{260}/OD_{280}(高质量的DNA中一般为 1.7~1.8)和 OD_{260}/OD_{230} (高质量的DNA一般为 1.7~2.0) 比值反映出来(表 1)。因此, 通过上述 6 种方法获得的土壤总DNA有待进一步纯化。

表 1 6 种不同提取方法获得的 DNA 纯度及其得率
Table 1 Purity and recovery rate of the crude DNA extracted by six DNA extraction methods

方法 Method	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	DNA 得率(μg/g soil) DNA recovery rate
1	1.17 ±0.05	0.81 ±0.03	250.00 ±10.60
2	1.11 ±0.02	0.85 ±0.01	84.60 ±9.91
3	1.02 ±0.07	0.94 ±0.04	22.47 ±1.89
4	1.09 ±0.02	0.93 ±0.10	9.33 ±1.00
5	1.03 ±0.03	0.76 ±0.12	4.80 ±0.87
6	1.84 ±0.30	1.24 ±0.05	60.00 ±5.00

Note: Method 1-6 are the same as indicated in figure 1

2.2 不同纯化方法对 DNA 质量的影响

采用 4 种方法对通过CTAB-SDS-冻融法提取的浙贝母根部土壤总DNA进行了进一步的纯化, 结果表明:除改进的PVP琼脂糖凝胶电泳纯化法外, 其它 3 种方法可纯化DNA样品(图 2), 并降低了样品中的腐殖酸等杂质含量, OD_{260}/OD_{230}有一定的改善(表 2)。但这 3 种方法的回收率并不高, 分别为 20.75%±1.25%、8.23%±2.10%和 10.75%± 0.99%。

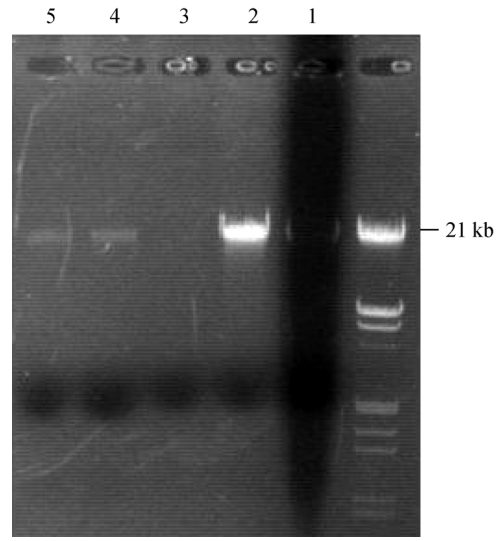

图 2 4 种不同纯化方法获得的 DNA 的凝胶电泳分析图

Fig. 2 Agarose gel analysis of the purified DNA by the four DNA purification methods

1: DNA before purification; 2: DNA purified by modified agarose (Method **a**); 3: DNA purified by agarose-PVP (Method **b**); 4: DNA purified by PVPP-gel filtration chromatography (Method **c**); 5: DNA purified by low-melting-point agarose (Method **d**)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 2 4 种不同纯化方法获得的 DNA 的纯度及回收率
Table 2 Purity and recovery rate of soil DNA purified by the four DNA purification methods

方法 Method	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}/OD_{230}	DNA 含量(μg/g soil) DNA concentration	DNA 回收率(%) DNA recovery rate
a	1.09±0.02	1.04±0.02	44.00±2.65	20.75±1.25
b	1.27±0.26	0.67±0.15	4.00±1.00	1.89±0.47
c	1.18±0.04	0.82±0.03	17.47±4.46	8.23±2.10
d	1.04±0.03	0.89±0.03	22.80±2.11	10.75±0.99

Note: Method a-d are the same as indicated in figure 2

2.3 16S rDNA 扩增分析

由于土壤中的腐殖酸等物质可显著抑制PCR扩增反应, 在本研究中将PCR扩增效率作为检测DNA纯度的一个指标。研究结果显示：4 种方法纯化后的DNA样品均能作为模板得到有效扩增, 但效率有所不同, 其中通过方法 **a** 和方法 **b** 获得的 DNA 模板扩增效率明显优于方法 **c** 和 **d**, 与通过试剂盒方法获得的 DNA 质量相当(图 3)。

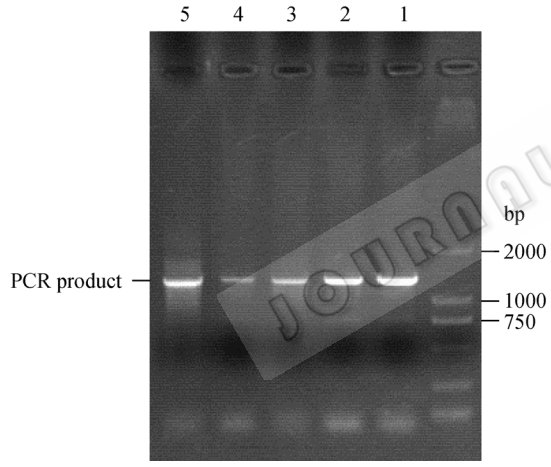

图 3 以纯化后 **DNA** 为模板通过 **PCR** 扩增获得的 **16S rDNA** 琼脂糖凝胶电泳分析图

Fig. 3 Agarose gel electrophoretic analysis of 16S rDNA amplified with the purified DNA

1: Agarose Method; 2: Agarose-PVP Method; 3: PVPP-gel Filtration Chromatography Method; 4: Low-melting-point Agarose Method; 5: DNA extracted by UltraClean Soil DNA Isolation Kit

3 讨论

本研究通过比较不同的 DNA 提取和纯化方法对浙贝母根际土壤总 DNA 的质量以及 PCR 扩增效率的影响, 证明 CTAB-SDS-冻融法提取后的土壤总DNA经改进琼脂糖凝胶电泳法纯化后, DNA 质量较高, 适宜后续的 PCR 分析。

土壤总DNA的提取方法一般分为两大类[15]：一类是直接提取法, 该方法直接利用各种化学或物理方法裂解土壤样品中的微生物再提取总DNA, 其主要优点是避免了一些微生物与土壤颗粒共沉淀, 从而提高DNA产量, 能更好地反映土壤微生物群落多样性, 缺点在于提取的同时将土壤中有机成分(如腐殖酸和褐菌酸等)溶出, 影响了后续分析[16]。另一类是间接提取法, 先采用差速离心等物理方法将微生物从样品中分离出来, 再用较温和的方法提取总DNA。但一些微生物因与土壤微颗粒共沉淀而导致它们在后续分析过程中被“漏检”, 因而一般不建议用于土壤微生物区系分析[17]。本研究比较的 6 种总DNA提取方法均为直接提取法。为降低提取后DNA溶液中的腐殖酸含量[9], 在提取前利用 20 mmol/L EDTA (pH 7.5)缓冲液对土壤样品进行了预处理。

在土壤微生物的裂解方法中, 冻融处理和玻璃珠振荡法是较常用的物理方法, 而化学裂解法(SDS、CTAB 法等)和酶法(溶菌酶和蛋白酶 K 等)则是一类相对温和的微生物裂解方法。在本研究中, 为保证DNA的完整性, 我们对振荡处理的速度和时间进行了适当的降低, 使最终获得的土壤总DNA保持相对完整, 降低了 DNA 电泳时“拖尾”现象。研究中还发现：尽管利用 PVPP 可去除土壤溶液中大多数腐殖酸等杂质, 但获得的土壤DNA产率也随之大大下降, 其原因可能与 PVPP 与 DNA 共沉淀所致。

就土壤总 DNA 的纯化而言, 改进琼脂糖凝胶纯化法和低熔点琼脂糖法可相对有效地从土壤总DNA 粗提液中回收到高纯度 DNA, 回收效率分别为 20.75%±1.25%和 10.75%±0.99%。鉴于上述两种

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

纯化方法的操作相对比较简单，建议在其它土壤来源的总 DNA 纯化中参考。

土壤总 DNA 提取和纯化的目的是尽可能多地反映土壤微生物区系的多样性，但由于不同来源的土壤类型以及微生物种类具有多样性的特点，目前还未有一种通用的方法获得各种来源土壤的高质量总 DNA。因此，需在研究中针对目标土壤特点优化总 DNA 提取和纯化的过程。

参 考 文 献

[1] 许光辉，李振高. 微生物生态学. 南京：东南大学出版社, 1991, pp.127−128.

[2] Li M, Shinano T, Tadano T. Distribution of exudates of lupin roots in the rhizosphere under phosphorus deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1997, **43**: 237−245.

[3] 钟建江，王 威，岳才军. 植物次级代谢产物的多样性及其在细胞培养中的调控研究进展. 化学世界, 2005, **8**: 498−503.

[4] 顾宗濂，李振高. 土壤微生物学与生物化学. 北京：科学技术文献出版社, 1993, pp.102−273.

[5] Rondon MR, August PR, Bettermann PD, *et al*. Cloning of the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 2541−2547.

[6] Brambilla E, Hippe H, Hagelstein A, *et al*. 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Extremophiles*, 2001, **5**: 23−33.

[7] Krsek M, Wellington EMH. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J Microbiol Methods*, 1999, **39**(1): 1−16.

[8] 陈锡林，蒋歆歆，普锦宝，等. 浙江贝母生药学评价及种群保护研究. 见：李维林，冯煦. 药用植物研究与中药现代化. 南京：东南大学出版社, 2004, pp.112-122.

[9] Heb JZ, Xua ZH, Hughes J. Pre-lysis washing improves DNA extraction from a forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, **37**: 2337−2341.

[10] 方光伟，洪雪梅，蔡丽希，等. 土壤宏基因组的提取及基于免培养技术分析细菌 16S rDNA. 江西农业大学学报, 2005, **27**(4): 505−507.

[11] 徐晓宇，闵 航，刘 和，等. 土壤微生物总 DNA 提取方法的比较. 农业生物技术学报, 2005, **13**(3): 377−381.

[12] 赵 勇，周志华，李 武，等. 土壤微生物分子生态学研究中总 DNA 的提取. 农业环境科学学报, 2005, **24**(5): 854−860.

[13] Young CC, Burghoff RL, Keim LG, *et al*. Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction amplifiable DNA from soil. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(6): 1972−1974.

[14] 栗若兰，郑智慧，张 华，等. 从土壤中快速提取纯化 DNA 方法的建立. 河北师范大学学报(自然科学版), 2008, **32**(1): 98−102.

[15] Rose P, Harkin JM, Hickey WJ. Competitive touchdown PCR for estimation of *Escherichia coli* DNA recovery in soil DNA extraction. *J Microbiol Methods*, 2003, **52**(1): 29−38.

[16] Tebbe CC, Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(2): 657−665.

[17] Van Elsas JD, Mantynen V, Wolters AC. Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenolicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biology and Fertility of Soils*, 1997, **24**: 188−195.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn