

活性污泥宏基因组 DNA 提取方法优化

苟 敏, 曲媛媛*, 周集体, 曹湘禹, 许炳雯, 王 腾

(大连理工大学 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 辽宁 大连 116024)

摘要: 宏基因组 DNA 的成功获取是宏基因组学技术顺利开展的关键. 利用溶菌酶-SDS-蛋白酶 K 法 (LSK 法) 提取活性污泥宏基因组 DNA, 结合单因素法与表面响应法对提取过程的 4 个关键步骤进行条件优化, 即预处理、细胞裂解、蛋白去除及 DNA 沉淀过程. 确定影响 DNA 产量的重要因素: 预处理缓冲溶液与 DNA 沉淀剂类型、CTAB 质量分数、溶菌酶浓度、37 °C 水浴时间及 SDS 质量分数. 确定 LSK 法提取宏基因组 DNA 的最佳条件: TENC 预处理活性污泥; 1.5% CTAB; 0.5 mg/mL 溶菌酶; 37 °C 水浴 1.4 h; 2% SDS; 200 μg/mL 蛋白酶, 55 °C 水浴 2.5 h; 异丙醇沉淀 DNA 40 min. 在最佳条件下, 活性污泥宏基因组 DNA 的最大产量为每 g 污泥 170 μg. 本研究可为环境样品中高质量宏基因组 DNA 的提取提供有价值的参考.

关键词: 宏基因组 DNA; 活性污泥; 单因素法; 表面响应法

中图分类号: Q93-33 **文献标志码:** A

0 引 言

研究表明, 利用纯培养技术可培养的微生物不到总数的 1%, 仅为巨大微生物资源的冰山一角^[1]. 近年来, 各种宏基因组学技术飞速发展, 它们避开微生物的分离培养过程, 直接以宏基因组 DNA 为研究对象, 开启了获取未培养微生物信息的大门^[2-4]. 目前, 宏基因组学技术已被证实是开发真实微生物多样性及新型生物活性物质的有效途径^[5-7].

获取高纯度、高质量的宏基因组 DNA 是宏基因组学技术顺利开展的有力保证. 土壤、水体与海洋沉积物宏基因组 DNA 的提取方法报道较多, 然而, 活性污泥宏基因组 DNA 的提取研究相对较少^[8-10]. 同时, 对这些方法的优化多采用传统的“单次单因子法 (one-factor-at-a-time (OFAT) method)”, 存在耗时长、费时费力等局限, 且无法评估多因素间的相互作用^[11,12]. 表面响应法 (response surface methodology, RSM) 是一种基于统计学的过程优化方法, 其基本思想即通过近似构造一个多项式函数来表征受多个因素 (自变量) 影响的目标值 (因变量) 的状况, 从而实现目标

值的优化. 在有限的实验次数下, RSM 不仅能够描述每个因子的影响, 同时还能反映多种因素间的交互作用^[13]. RSM 已广泛应用于生物学、食品学、工程学以及环境学等领域的条件优化^[14,15], 但国内外还未有利用 RSM 优化宏基因组 DNA 提取的报道.

为此, 本研究以溶菌酶-SDS-蛋白酶 K 法 (LSK 法) 为例, 结合单因素法及 RSM, 对影响活性污泥宏基因组 DNA 提取效果的主要因素进行考察, 并对这些因素进行条件优化, 以期为后续的微生物群落分析及文库构建等分子生物学操作提供高质量的宏基因组 DNA.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基 本实验所用培养基为无机盐培养基, 具体组成 (g/L) 为 (NH₄)₂SO₄ 2.0, KH₂PO₄ 2.0, Na₂HPO₄ 1.3, pH 自然.

1.1.2 活性污泥 活性污泥样品采自大连春柳污水处理厂污泥外运车间. 污泥经无机盐培养基于 30 °C 培养 48 h 后, 新鲜培养液立即进行宏基因组 DNA 的提取.

1.1.3 实验仪器 所用实验仪器如下:V-560 型紫外-可见分光光度计(日本 JASCO),Biofuge® primoR 台式冷冻离心机(德国 Heraeus),GDS-8000 凝胶图像分析系统(美国 UVP),SK-1 型快速混匀器(常州国华),Avanti™ J-30 型高速低温冷冻离心机(美国 Beckman)。

1.1.4 实验试剂 溶菌酶及蛋白酶 K 购自大连宝生物公司,聚乙烯吡咯烷酮(PVP)与十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)购于北京索莱宝科技有限公司,SDS 购自上海华美生物工程公司。

本研究使用的缓冲溶液如下:TEN 缓冲溶液,即含 0.1 mol/L NaCl 的 TE 缓冲溶液;TENP 缓冲溶液,即含 1% PVP 的 TEN 缓冲溶液;TENC 缓冲溶液,即含 1% CTAB 的 TEN 缓冲溶液。

1.1.5 软件 利用 Statease 公司的软件 Design Expert 7.1.3 进行表面响应实验的设计及数据分析。

1.2 实验方法

1.2.1 宏基因组 DNA 的提取 利用溶菌酶-SDS-蛋白酶 K 法(LSK 法)进行宏基因组 DNA 的提取^[16]。方法略有改动,即活性污泥先经缓冲溶液洗涤 2 次后(预处理步骤),再进行细胞的裂解。

1.2.2 溶菌酶-SDS-蛋白酶 K 法提取宏基因组 DNA 的条件优化 对 LSK 法的 4 个重要步骤进行优化,即预处理过程、细胞裂解过程、蛋白去除过程及 DNA 沉淀过程,图 1 为每个步骤所考察的因素及水平。

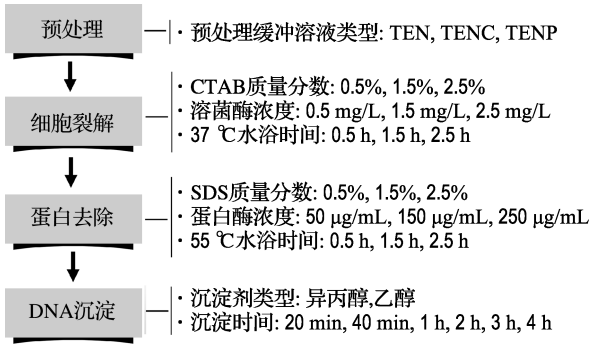


图 1 宏基因组 DNA 提取方法的优化因素及水平
Fig. 1 Factors and level optimization for extraction of metagenomic DNA

(1) 预处理及 DNA 沉淀过程的优化

利用单因素法优化预处理及 DNA 沉淀过程。平行称取 12 份活性污泥(每份 1 g, 湿重), 按表 1 的实验条件提取 DNA, 以确定缓冲溶液类

型、DNA 沉淀剂类型及沉淀时间。

表 1 预处理及 DNA 沉淀过程的实验设计

Tab. 1 Experimental design for the process of pretreatment and DNA precipitation

序号	缓冲溶液	沉淀剂	沉淀时间
1	TEN	异丙醇	40 min
2	TEN	乙醇	40 min
3	TENC	异丙醇	40 min
4	TENC	乙醇	40 min
5	TENP	异丙醇	40 min
6	TENP	乙醇	40 min
7	TENC	异丙醇	20 min
8	TENC	异丙醇	40 min
9	TENC	异丙醇	1 h
10	TENC	异丙醇	2 h
11	TENC	异丙醇	3 h
12	TENC	异丙醇	4 h

(2) 细胞裂解及蛋白去除过程的优化

利用表面响应法优化细胞裂解及蛋白去除过程。以 DNA 产量为响应值, 采用 Design Expert 软件中心组合设计法(central composite design, CCD)设计实验。根据方差分析确定模型的可行性, 得出细胞裂解及蛋白去除过程的显著影响因素及最佳条件。

1.2.3 宏基因组 DNA 的分析方法

(1) DNA 定量分析

利用紫外-可见分光光度计测定宏基因组 DNA 的光密度值 OD_{260} , DNA 产量(μg)计算公式如下:

$$\text{DNA 产量} = \frac{OD_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \gamma \times V}{1\ 000}$$

其中 V 为宏基因组 DNA 的总体积, μL ; γ 为 DNA 的稀释倍数。

(2) DNA 定性分析

对宏基因组 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶图像分析系统对胶块进行分析检测。

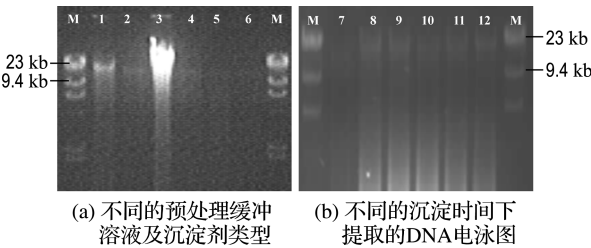
2 结果与讨论

2.1 预处理及 DNA 沉淀过程的优化

细胞裂解前利用合适的缓冲溶液洗涤环境样品(预处理步骤), 可有效地去除溶解态抑制剂(如腐殖酸、褐色素、重金属离子等)及胞外 DNA, 以减小这些杂质对后续 DNA 分子操作的影响^[17,18]。因此, 本研究利用单因素法考察了含有 CTAB 及 PVP 的缓冲溶液对 DNA 产量的影响。由电泳图(图 2(a))可知: 与 TEN 及 TENP 相比, 经 TENC 洗涤后的活性污泥可获得最大的 DNA

产量,是本研究最佳的预处理缓冲溶液. Zhou 等^[19]也证实,虽然 CTAB 和 PVP 均可有效地去除腐殖酸,但 PVP 易引起 DNA 损失.

考察了沉淀剂类型及沉淀时间对 DNA 提取效果的影响. 图 2(a)表明异丙醇对 DNA 的沉淀效果要优于乙醇,这与 Cullen 等的研究结果一致^[20]. 图 2(b)显示大于 40 min 的沉淀时间对 DNA 产量影响不大,但长时间沉淀会引起蛋白质的共沉,从而降低 DNA 纯度. 综合考虑,后续实验采用 TENC 缓冲溶液预处理活性污泥,异丙醇沉淀 DNA 的时间为 40 min.



(a) 不同的预处理缓冲溶液及沉淀剂类型 (b) 不同的沉淀时间下提取的DNA电泳图

M λ -Hind III digested DNA marker;
1~12 组实验提取的宏基因组 DNA(如表 1)

图 2 预处理及 DNA 沉淀过程电泳图

Fig.2 Electrophoretogram for the process of pretreatment and DNA precipitation

2.2 细胞裂解过程的优化

利用表面响应法优化细胞裂解过程. 以 CTAB 质量分数(A)、溶菌酶浓度(B)、37 ℃水浴时间(C)作为优化因子,以 DNA 产量为响应值,实验设计及结果见表 2.

利用软件 Design Expert 7. 1. 3 对实验数据进行二次多元回归拟合,得到 DNA 产量 Y 对自变量 A、B、C 的二次多项式回归方程:

$$\log_{10} Y = 1.79 - 0.21A - 0.28B - 0.11C - 0.21AB + 0.056AC - 0.091BC - 0.21A^2 + 0.016B^2 - 0.14C^2 \quad (1)$$

根据上式进行计算,得到 DNA 产量的预测值列于表 2.

利用 ANOVA 方差分析检验了回归模型的显著性,结果见表 3. 其中,F 值越大越好; $p < 0.05$ 时说明考察的因子有统计学意义^[14]. 本模型的 F 值为 102.23,对应的 $p < 0.0001$,表明该模型具有显著性. 模型 R^2 (复相关系数的平方)为 0.9892,显示该模型有 98.92%的可信度,最多只有 1.08%的变化不能用此模型来解释. 校正相关系数的平方(Adjusted R^2)为 0.9796,说明模

型的预测值与实验值拟合的程度较好.

表 2 细胞裂解过程的实验设计

Tab.2 Experimental design for the process of cell lysis

序号	A/%	B/(mg · mL ⁻¹)	C/h	DNA 产量/ μ g	
				实验值	预测值
1	0.50	0.50	0.50	71.04	66.07
2	2.50	0.50	0.50	49.94	52.48
3	0.50	2.50	0.50	67.14	72.44
4	2.50	2.50	0.50	8.14	8.12
5	0.50	0.50	2.50	44.94	46.77
6	2.50	0.50	2.50	63.30	61.66
7	0.50	2.50	2.50	21.93	21.88
8	2.50	2.50	2.50	3.72	4.17
9	0.30	1.50	1.50	56.04	54.95
10	2.70	1.50	1.50	19.28	17.78
11	1.50	0.30	1.50	139.98	144.54
12	1.50	2.70	1.50	34.13	30.20
13	1.50	1.50	0.30	55.92	53.70
14	1.50	1.50	2.70	30.88	28.84
15	1.50	1.50	1.50	53.49	61.66
16	1.50	1.50	1.50	51.78	61.66
17	1.50	1.50	1.50	64.71	61.66
18	1.50	1.50	1.50	58.35	61.66
19	1.50	1.50	1.50	71.07	61.66
20	1.50	1.50	1.50	65.43	61.60

表 3 同时显示:A、B、C 的 p 均小于 0.05,可见 CTAB 质量分数、溶菌酶浓度及 37 ℃水浴时间对 DNA 产量均为显著影响因素. AB、AC 与 BC 的 p 均小于 0.05,说明这 3 个因素间存在显著交互作用,因此采用单变量考察会产生误差.

表 3 模型(1)的 ANOVA 方差分析结果

Tab.3 ANOVA variance analysis results of model (1)

因子	自由度	总偏差平方和	平均偏差平方和	F 值	$p(\text{prob}>F)$
模型	9	2.410	0.270	102.23	<0.0001
A	1	0.460	0.460	177.28	<0.0001
B	1	0.880	0.880	335.29	<0.0001
C	1	0.140	0.140	53.26	<0.0001
AB	1	0.350	0.350	135.15	<0.0001
AC	1	0.025	0.025	9.56	0.0114
BC	1	0.067	0.067	25.47	0.0005
A ²	1	0.220	0.220	85.45	<0.0001
B ²	1	1.409×10 ⁻³	1.409×10 ⁻³	0.54	0.4800
C ²	1	0.097	0.097	37.15	0.0001

利用软件 Design Expert 7. 1. 3 得到上述 3 个因素间相互作用的 3D 图(图 3). 经模型预测得出细胞裂解过程的最优条件为 CTAB 质量分数 1.5%,溶菌酶浓度 0.5 mg/mL,37 ℃水浴时间 1.4 h. 在此条件下,DNA 的最大产量为每 g 污泥 124.16 μ g.

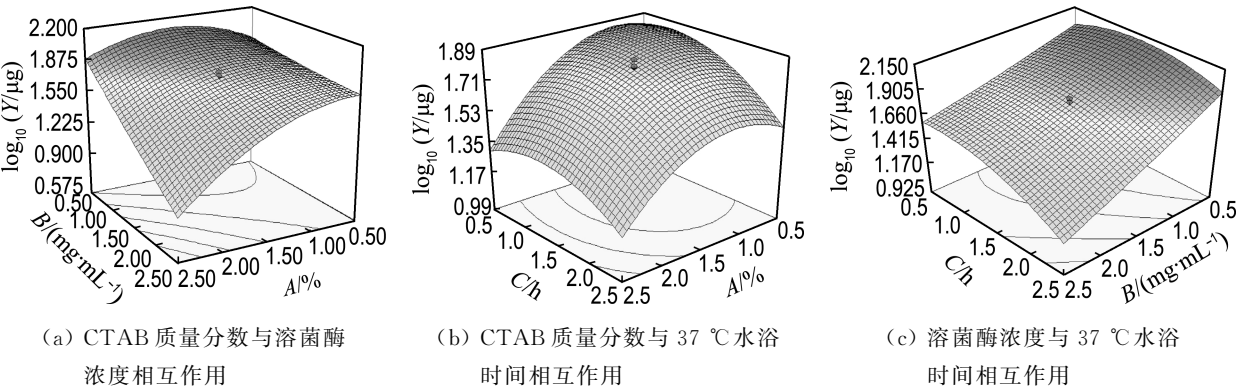


图 3 细胞裂解过程中 3 个因素相互作用的响应面 3D 图

Fig. 3 3D response surface plot of interaction among the three factors of cell lysis

2.3 蛋白去除过程的优化

利用表面响应法优化蛋白去除过程. 以 SDS 质量分数(A)、蛋白酶浓度(B)、55 °C 水浴时间(C)作为优化因子, 以 DNA 产量为响应值, 实验设计及结果见表 4.

表 4 蛋白去除过程的实验设计

Tab.4 Experimental design for the process of protein removal

序号	A/%	B/(mg · mL ⁻¹)	C/h	DNA 产量/μg	
				实验值	预测值
1	0.50	50.00	0.50	6.77	7.41
2	2.50	50.00	0.50	39.88	31.62
3	0.50	250.00	0.50	9.00	7.08
4	2.50	250.00	0.50	31.08	31.62
5	0.50	50.00	2.50	7.66	7.94
6	2.50	50.00	2.50	28.82	38.90
7	0.50	250.00	2.50	7.70	10.23
8	2.50	250.00	2.50	56.24	53.70
9	0.30	150.00	1.50	6.64	5.89
10	2.70	150.00	1.50	37.40	38.02
11	1.50	30.00	1.50	41.40	36.31
12	1.50	270.00	1.50	41.00	41.69
13	1.50	150.00	0.30	30.06	41.69
14	1.50	150.00	2.70	91.36	58.88
15	1.50	150.00	1.50	68.04	51.29
16	1.50	150.00	1.50	40.58	51.29
17	1.50	150.00	1.50	32.04	51.29
18	1.50	150.00	1.50	54.76	51.29
19	1.50	150.00	1.50	65.84	51.29
20	1.50	150.00	1.50	49.48	51.29

利用软件 Design Expert 7.1.3 对实验数据进行二次多元回归拟合, 得到 DNA 产量 Y 对自变量 A、B、C 的二次多项式回归方程:

log₁₀Y = 1.71 + 0.34A + 0.028B + 0.063C + 7.068 × 10⁻³AB + 0.016AC + 0.035BC - 0.37A² - 0.085B² - 0.012C²

(2)

根据上式进行计算, 得到 DNA 产量的预测值列于表 4.

ANOVA 方差分析结果如表 5 所示. 模型的 F 值为 13.19, $p < 0.05$, 表明该模型具有显著性. 模型 R^2 (复相关系数的平方) 为 0.922 3, 表明该模型有 92.23% 的可信度. 校正相关系数的平方为 0.852 4, 说明模型的预测值与实验值拟合的程度较好. 同时, 从表 5 可以看出, 仅因素 A 的 p 小于 0.05, 证明 SDS 质量分数、蛋白酶浓度以及 55 °C 水浴时间这 3 个因素中, 只有 SDS 质量分数对 DNA 产量为显著影响因素. AB、AC 与 BC 的 p 均大于 0.05, 表明上述 3 个因素间不存在显著的相互作用.

表 5 模型(2)的 ANOVA 方差分析结果

Tab.5 ANOVA variance analysis results of model (2)

因子	自由度	总偏差平方和	平均偏差平方和	F 值	$p(\text{prob} > F)$
模型	9	2.360	0.260	13.190	0.000 2
A	1	1.220	1.220	61.520	< 0.000 1
B	1	8.413×10^{-3}	8.413×10^{-3}	0.420	0.530 0
C	1	0.043	0.043	2.150	0.173 7
AB	1	3.997×10^{-4}	3.997×10^{-4}	0.020	0.890 1
AC	1	2.145×10^{-3}	2.145×10^{-3}	0.110	0.749 3
BC	1	9.634×10^{-3}	9.634×10^{-3}	0.480	0.502 2
A ²	1	0.730	0.730	36.580	0.000 1
B ²	1	0.037	0.037	1.870	0.201 5
C ²	1	7.584×10^{-4}	7.584×10^{-4}	0.038	0.849 1

利用软件 Design Expert 7.1.3 得到上述 3 个因素间相互作用的 3D 图(图 4). 经模型预测得出蛋白去除过程的最优条件为 SDS 质量分数 2%, 蛋白酶浓度 200 μg/mL, 55 °C 水浴时间 2.5 h. 在此条件下, 最大 DNA 产量为每 g 污泥 71.94 μg.

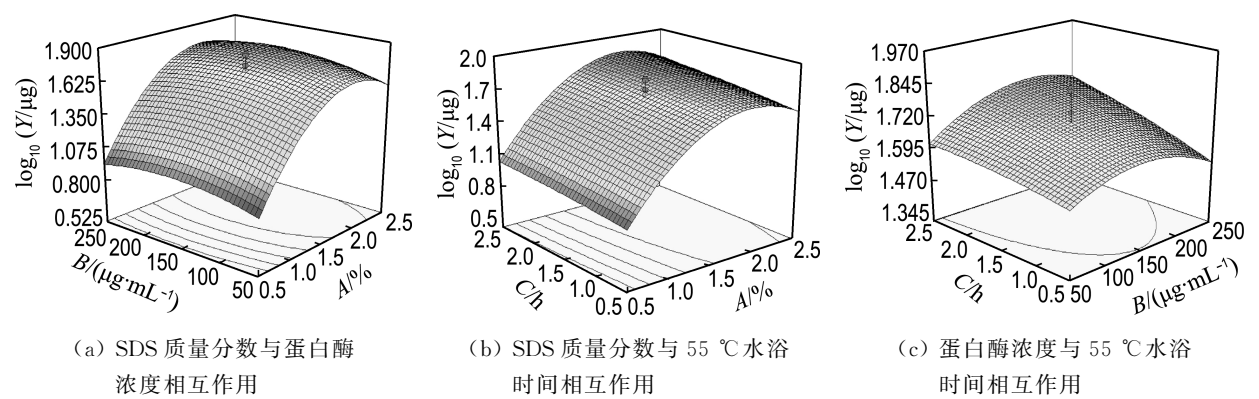


图 4 蛋白去除过程中 3 个因素相互作用的响应面 3D 图

Fig. 4 3D response surface plot of interaction among the three factors of protein removal

由此确定了 LSK 法提取活性污泥宏基因组 DNA 的最佳条件: TENC 作为预处理缓冲溶液, 1.5% CTAB, 0.5 mg/mL 溶菌酶, 37 °C 水浴 1.4 h; 2% SDS, 200 μg/mL 蛋白酶, 55 °C 水浴 2.5 h, 异丙醇沉淀 40 min. 在此条件下, DNA 最大产量为每 g 污泥 170 μg.

以上结果证实, 表面响应法能够用于宏基因组 DNA 提取过程的优化, 并了解各因素间的相互作用关系, 但产生交互作用的原因还有待于进一步研究. 同时, 研究过程中也发现 LSK 法存在的不足. 首先, 该法获得的宏基因组 DNA 片段大小基本在 23 kb 左右, 难以满足大文库构建的需求(插入的 DNA 片段需大于 20 kb), 而宏基因组大文库对开发新基因簇及新代谢途径具有更大的优势. 其次, 虽然对活性污泥增加了预处理洗涤步骤, 但 LSK 法获得的 DNA 仍含有深棕色的杂质. 在进行下一步的 DNA 精制时, 不仅容易降低 DNA 产量, 而且有可能导致低丰度基因信息的丢失. 因此, LSK 法需要进一步改进以获得高质量 DNA, 为宏基因组学技术的开展奠定基础.

3 结 论

(1) 利用溶菌酶-SDS-蛋白酶 K 法 (LSK 法) 提取活性污泥宏基因组 DNA, 结合单因素法与表面响应法对该过程进行了条件优化, 确定了影响 DNA 产量的显著因素: 预处理缓冲溶液类型、DNA 沉淀剂类型、CTAB 质量分数、溶菌酶浓度、37 °C 水浴时间及 SDS 质量分数.

(2) 确定 LSK 法提取宏基因组 DNA 的最佳条件: TENC 预处理活性污泥; 1.5% CTAB; 0.5 mg/mL 溶菌酶, 37 °C 水浴 1.4 h; 2% SDS, 200 μg/mL 蛋白酶, 55 °C 水浴 2.5 h; 异丙醇沉淀 DNA 40 min. 在最佳条件下, 活性污泥宏基因组

DNA 的最大产量为每 g 污泥 170 μg.

参考文献:

[1] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiology Review*, 1995, **59**(1):143-169.

[2] Handelsman J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, **68**(4):669-685.

[3] Cowan D, Meyer Q, Stafford W, *et al.* Metagenomic gene discovery: past, present and future [J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, **23**(6):321-329.

[4] Schloss P D, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, **14**(3):303-310.

[5] Schmeisser C, Steele H, Streit W R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **75**(5):955-962.

[6] Riesenfeld C S, Goodman R M, Handelsman J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes [J]. *Environmental Microbiology*, 2004, **6**(9):981-989.

[7] Streit W R, Daniel R, Jaeger K E. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, **15**(4):285-290.

[8] Robe P, Nalin R, Capellano C, *et al.* Extraction of DNA from soil [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2003, **39**(4):183-190.

[9] Leff L G, Dana J R, McArthur J V, *et al.* Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1995, **61**(3):1141-1143.

- [10] 苏俊峰,马 放,侯 宁,等. 活性污泥总 DNA 不同提取方法的比较[J]. 生态环境, 2007, **16**(1):47-49. SU Jun-feng, MA Fang, HOU Ning, *et al.* Comparison of different DNA extraction methods for activated sludge [J]. **Ecology and Environment**, 2007, **16**(1):47-49. (in Chinese)
- [11] QU Yuan-yuan, ZHANG Qiang, LI Wei, *et al.* Optimization of metagenomic DNA extraction from activated sludge samples [J]. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, 2009, **4**(5):780-786.
- [12] Bourrai M, Achouak W, Urbain V, *et al.* DNA extraction from activated sludges [J]. **Current Microbiology**, 1999, **38**(6):315-319.
- [13] 李 啸,陈长华,李友元. 红霉素 A 发酵条件的优化 [J]. 中国医药工业杂志, 2006, **37**(6):381-383. LI Xiao, CHEN Chang-hua, LI You-yuan. Optimization of fermentation conditions for Erythromycin A [J]. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**, 2006, **37** (6): 381-383. (in Chinese)
- [14] PAN Hai-feng, XIE Zhi-peng, BAO Wen-na, *et al.* Optimization of culture conditions to enhance *cis*-epoxysuccinate hydrolase production in *Escherichia coli* by response surface methodology [J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2008, **42**(2):133-138.
- [15] Mohana S, Shrivastava S, Divecha J, *et al.* Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium [J]. **Bioresource Technology**, 2008, **99**(3):562-569.
- [16] 曲媛媛,周集体,王 竞,等. 活性污泥基因组 DNA 快速提取的新方法及其指纹分析[J]. 大连理工大学学报, 2006, **46**(3):335-339. QU Yuan-yuan, ZHOU Ji-ti, WANG Jing, *et al.* Novel approach for rapid extraction of genomic DNA from activated sludge and its fingerprinting analysis [J]. **Journal of Dalian University of Technology**, 2006, **46**(3):335-339. (in Chinese)
- [17] XIA Xue-qing, Bollinger J, Ogram A. Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D [J]. **Molecular Ecology**, 1995, **4**(1):17-28.
- [18] Harry M, Jusseaume N, Gambier B, *et al.* Use of RAPD markers for the study of microbial community similarity from termite mounds and tropical soils [J]. **Soil Biology and Biochemistry**, 2001, **33**(4-5):417-427.
- [19] ZHOU Ji-zhong, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. **Applied and Environment Microbiology**, 1996, **62**(2):316-322.
- [20] Cullen D W, Hirsch P R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR [J]. **Soil Biology and Biochemistry**, 1998, **30**(8-9):983-993.

Optimization of metagenomic DNA extraction from activated sludge

GOU Min, QU Yuan-yuan*, ZHOU Ji-ti, CAO Xiang-yu, XU Bing-wen, WANG Teng

(Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, Ministry of Education, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The extraction of metagenomic DNA is the key step for metagenomic technology. Lysozyme-SDS-proteinase K method (LSK method) is used to extract metagenomic DNA from activated sludge. Four steps of LSK method, such as pretreatment, cell lysis, protein removal and DNA precipitation, are optimized using single-factor method and response surface methodology (RSM). And several key factors for DNA extraction are identified, including the type of buffer for pretreatment and reagent for DNA precipitation, CTAB mass fraction, lysozyme concentration, SDS mass fraction and the time of water bath at 37 °C. The optimal conditions for DNA extraction using LSK method are as follows: TENC as pretreatment buffer, 1.5% of CTAB, 0.5 mg/mL of lysozyme, water bath at 37 °C for 1.4 h, 2% of SDS, 200 μg/mL of proteinase, water bath at 55 °C for 2.5 h, DNA precipitation for 40 min with isopropanol. The highest DNA yield is obtained with 170 μg per gram sludge under the optimal conditions. This study will provide valuable reference for extraction of high-quality metagenomic DNA from environmental samples.

Key words: metagenomic DNA; activated sludge; single-factor method; response surface methodology