

海洋底泥环境 DNA 提取与纯化方法比较研究

王晓辉^{*1,2,3,4}, 黄李淑馨^{2,4}, 白凤武¹, 杜昱光⁵

(1. 大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024;

2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023;

3. 大连大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622;

4. 中国科学院大学, 北京 100049;

5. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190)

摘要: 为了探索有效的海洋底泥宏基因组 DNA 提取与纯化方法, 分别采用 CTAB 结合 SDS 法、CTAB 结合玻璃珠法、SDS 结合蛋白酶 K 法和 SoilMaster™ 试剂盒法提取海洋底泥宏基因组 DNA, 用柱式腐殖酸清除试剂盒法与电洗脱法纯化宏基因组 DNA, 并对宏基因组 DNA 的产量与纯度进行评价. 结果表明: SDS 结合蛋白酶 K 法提取率最高, DNA 片段完整; SoilMaster™ 试剂盒法与 CTAB 结合 SDS 法次之; CTAB 结合玻璃珠法有严重降解; 电洗脱法可以得到高纯度、大于 42 kb 宏基因组 DNA 片段. 因此, SDS 结合蛋白酶 K 法和电洗脱法提取纯化海洋近海底泥宏基因组 DNA 优于其他方法.

关键词: 宏基因组 DNA; 提取; 纯化; 海洋底泥

中图分类号: Q781

文献标识码: A

doi: 10.7511/dllgxb201403002

0 引言

海洋约占地球表面积的 70%, 具有高盐(3.5%)、高压(>100 MPa)、低温、低光照、寡营养等特点, 以及无光照和局部高温(400 ℃)等极端环境. 据估计海洋微生物接近 3.67×10^{30} 种^[1], 而可培养微生物仅占 0.001%~0.1%^[2], 人们对于绝大多数不可培养微生物几乎一无所知. 宏基因组学(metagenomics)技术为人类从海洋天然宝库中寻找新型功能生物活性物质和工业酶制剂提供了新的方法, 为海洋微生物资源的开发和利用开辟了一个新领域.

目前海洋底泥宏基因组 DNA 提取主要有两种方法: 一种是对环境样品进行微生物宏基因组 DNA 的提取, 称直接裂解法(direct lysis extraction method), 也称原位裂解法; 另一种是间接裂解法, 即微生物细胞抽提法(bacterial

extraction method), 先分离黏附在土壤、沉积物等样品中的微生物细胞, 然后提取宏基因组 DNA. 间接裂解法所制备的宏基因组 DNA 较直接裂解法纯度高、片段大, 然而 DNA 的产量及基因组信息的广泛性不如直接裂解法^[3]. 直接裂解法常采用高温(>60 ℃)裂解, 并加入去污剂及螯合剂, 如十二烷基硫酸钠(SDS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、乙二胺四乙酸(EDTA)等, 特定环境样品也加入蛋白酶 K、溶菌酶, 并结合研磨、冻融等物理措施. 虽然这些裂解策略得到的宏基因组 DNA 质量相对较低, 但是可获取多样化的不可培养微生物的基因信息, 便于后续宏基因组文库构建及功能基因筛选.

本研究中海洋底泥样品含有腐殖酸、重金属离子等杂质, 水分、盐分含量高, 黏稠度高并含有少量的贝壳碎片, 严重影响宏基因组文库构建的后续操作, 如 PCR 反应、酶切、连接等, 因此对宏

基因组 DNA 的纯化显得尤为重要。目前常用的纯化方法包括氯化铯密度梯度超速离心、脉冲电泳法、透析和过滤法^[4]等,然而以上任何一种方法都不可能完全适用于所有的环境 DNA 除杂,在实际操作中应结合样品情况选择一种或多种纯化方法进行组合纯化。鉴于此,作者分别采用 CTAB 结合 SDS 法、CTAB 结合玻璃珠法、SDS 结合蛋白酶 K 法、SoilMaster™ 试剂盒及柱式腐殖酸清除试剂盒法和电洗脱法提取纯化海洋底泥宏基因组 DNA,并比较其提取与纯化效果,以期获得有效提取纯化海洋底泥宏基因组 DNA 的方法,为后续构建宏基因组文库,筛选新型工业生物催化剂奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

样品采自中国辽宁大连渤海海域近海底泥 6~100 m(123°371'E,39°697'N),样品采集后迅速装入无菌保鲜袋冻存于-20℃冰柜,运回实验室后转至-80℃。

1.2 方法

1.2.1 宏基因组 DNA 提取

(1)CTAB 结合 SDS 法

参照 Brady 法^[5],称取 1.0 g 近海底泥样品,加入 70℃预热的 1.5 mL 裂解缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L Na₂EDTA,1.5 mol/L NaCl,1% CTAB,2% SDS,pH 8.0),振荡器上充分混匀;70℃水浴 2 h,每隔 30 min 混匀一次;2 h 后冷却至室温,12 000g,4℃离心 10 min,重复一次;上清液加入 0.7 体积的异丙醇,室温放置 30 min 后,12 000g,4℃离心 30 min;沉淀加入 1.0 mL 预冷的 70%乙醇,12 000g,4℃离心 10 min;风干,溶于 50 μL 无菌水,4℃保存备用。

(2)SDS 结合蛋白酶 K 法

参照 Zhou 等法^[6],称取近海底泥 1.0 g,加入 1.35 mL DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L EDTA,100 mmol/L Na₃PO₄,1.5 mol/L NaCl,1% CTAB,pH 8.0)与 10 μL 蛋白酶 K(10 mg/mL),37℃,225 r/min 振荡

30 min;加入 0.15 mL 10% SDS,65℃水浴 2 h,每隔 15~20 min 上下颠倒混匀;12 000g,4℃离心 10 min;取上清液,用等体积氯仿-异戊醇(24:1)抽提 2 次,12 000g,4℃离心 20 min;沉淀加入 1.0 mL 预冷的 70%乙醇,12 000g,4℃离心 10 min;风干,溶于 50 μL 无菌水,4℃保存备用。

(3)SoilMaster™ 试剂盒法

具体见 Epicentre 公司 SoilMaster™ DNA Extraction Kit,按照操作说明进行。

(4)CTAB 结合玻璃珠法

参照 Huang 等法^[7],称取 1.0 g 近海底泥于 1.5 mL 无菌离心管,加入 0.5 mL 磷酸盐提取缓冲液,40 μL 20% SDS,加入与近海底泥等重玻璃珠。用涡旋振荡器混匀 2 min,68℃水浴 2 h,每隔 15 min 上下颠倒混匀。12 000g,4℃离心 15 min,将上清液转移至另一无菌离心管,加入 50 μL 5 mol/L KAc 和 0.2 mL PEG8000,-20℃放置 15 min,12 000g,4℃离心 15 min。沉淀用 50 μL 2×CTAB 重悬,68℃水浴 1 h。加入等体积氯仿-异戊醇(24:1),轻柔混匀,静置 5 min,12 000g,4℃离心 15 min。将上清液转移至另一新无菌离心管,加入等体积异丙醇,混匀,室温放置 15 min,12 000g,4℃离心 10 min。70%乙醇洗涤 2 次,风干,溶于 50 μL 无菌水,4℃保存备用。

1.2.2 宏基因组 DNA 纯化

(1)柱式腐殖酸清除试剂盒法

采用柱式腐殖酸清除试剂盒(北京天恩泽)进行纯化,具体操作参见试剂盒说明书。

(2)电洗脱法

参照 Brady 法^[5],DNA 粗提液 1%低熔点琼脂糖凝胶电泳,20 V,16 h。将凝胶两侧含 DNA Marker 及相邻部分目的胶条切下,于溴化乙锭中染色约 2 h,而后与未切除部分拼接,用刀片将目的 DNA 胶条切下,将凝胶转移至预先处理好的透析袋(MWCO 10 000)中,加入 1×TAE 溶液直至有充足的缓冲液与凝胶接触。用透析袋夹将袋夹紧,避免存留气泡。把透析袋泡在盛有 1×TAE 的水平电泳槽中,7.5 V/cm 的电压电洗脱 4 h,电极反转同样电压电洗脱 1 min,将透析袋中的溶液转移至 1.5 mL 的无菌离心管中,加入 0.1

体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2)和 2.5 体积无水乙醇,室温放置 30 min,在 13 000*g*、4 ℃下离心 15 min,70%乙醇洗涤 2 次,风干,溶于适量无菌水,4 ℃保存备用.

1.2.3 宏基因组 DNA 电泳检测 采用常规 1%琼脂糖凝胶电泳检测.提取宏基因组 DNA 的电泳条件:普通琼脂糖(生工生物工程(上海)股份有限公司,简称生工,上海),100 V,1 h;16S rDNA 扩增的电泳条件:普通琼脂糖(生工,上海),120 V,30 min;电洗脱纯化 DNA 的电泳条件:20 cm 长低熔点琼脂糖凝胶(生工,上海),20 V,16 h.

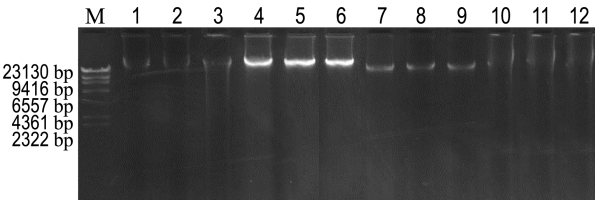
1.2.4 宏基因组 DNA 定量和纯度检测 采用 HD-21C-B 型核酸蛋白检测仪检测不同方法提取的宏基因组 DNA 的吸光度(A_{260}/A_{280} 与 A_{260}/A_{230})及提取量.

1.2.5 PCR 扩增 16S rDNA PCR 引物分别为 F27 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 R1492 (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[8],由生工合成. PCR 反应条件:95 ℃预变性 2 min,95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1.5 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min.

2 结果与分析

2.1 海洋底泥宏基因组 DNA 提取

对于同一样品而言,环境 DNA 提取方法的好坏,取决于宏基因组 DNA 总量以及 DNA 片段的完整性.本文采用 CTAB 结合 SDS 法、CTAB 结合玻璃珠法、SDS 结合蛋白酶 K 法、SoilMasterTM试剂盒法 4 种方法提取海洋近海底泥宏基因组 DNA 样品,每种方法做了 3 次重复.结果如图 1 所示:4 种方法所得土壤 DNA 电泳后均呈现单一的带,相对分子质量均在 23 kb 以上.其中 SDS 结合蛋白酶 K 法提取的 DNA 效果最显著,既保持了宏基因组 DNA 片段的完整性,又得到浓度高的环境 DNA. CTAB 结合 SDS 法提取所得 DNA 量相对于 SDS 结合蛋白酶 K 法低很多,同时有拖尾现象,说明其完整性遭到破坏. SoilMas-terTM试剂盒法提取的 DNA 片段较完整,但浓度较低,片段长度小. CTAB 结合玻璃珠法提取的海洋底泥宏基因组 DNA 严重降解.



M 核酸相对分子质量标准;1~3 CTAB 结合 SDS 法;4~6 SDS 结合蛋白酶 K 法;7~9 SoilMasterTM试剂盒法;10~12 CTAB 结合玻璃珠法

图 1 不同方法提取的海洋底泥宏基因组 DNA
Fig. 1 The marine sediment metagenomic DNA extracted by different methods

综上所述,SDS 结合蛋白酶 K 法为提取海洋底泥宏基因组 DNA 最佳方法.

2.2 海洋底泥宏基因组 DNA 纯度检测

DNA 纯度可通过 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 来评价. A_{260}/A_{280} 在 1.8~1.9 时,DNA 纯度较高,小于这个范围则可能含有蛋白质、腐殖酸等有机物,而大于这个范围则可能含有 RNA.与此同时,干净的 DNA 其 A_{260}/A_{230} 应不小于 2.0,小于这个范围则可能含有无机盐离子.表 1 中 4 种提取方法获得环境 DNA 纯度均未达到要求,需进一步纯化,但 SDS 结合蛋白酶 K 法提取 DNA 产量最大,确定 SDS 结合蛋白酶 K 法为提取海洋底泥样品最佳方法.

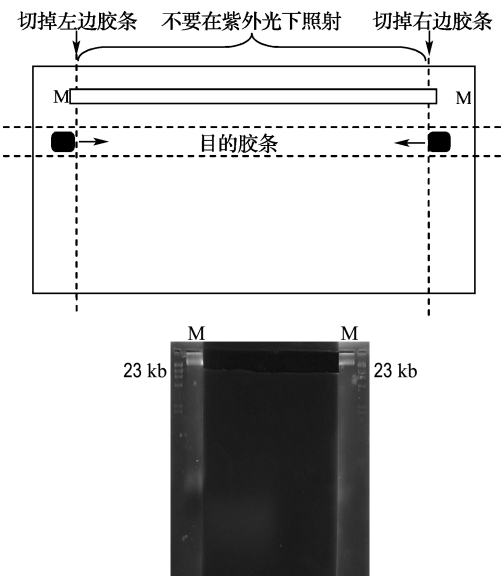
表 1 海洋底泥宏基因组 DNA 产量与纯度比较
Tab. 1 Amount and purity of metagenomic DNA from marine sediment samples

方法	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}	DNA 产量/ (ng · μL^{-1})
SoilMaster TM 试剂盒法	0.87	1.39	412.6
CTAB 结合 SDS 法	0.78	1.38	365.2
CTAB 结合玻璃珠法	0.74	1.09	375.4
SDS 结合蛋白酶 K 法	0.85	1.62	545.8

2.3 海洋底泥宏基因组 DNA 电洗脱纯化

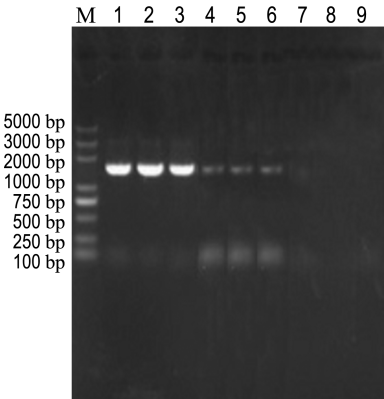
在粗提物中,DNA 含量与提取物颜色成正比关系:黑褐色越深,DNA 含量越高.电洗脱纯化中,因紫外照射的 DNA 对后期建库阳性克隆效率有影响,因此纯化过程中只将 DNA Marker 和部分目的胶条进行溴化乙锭染色观察,而后与目的胶条拼接来获取所需宏基因组 DNA 进行后续

实验(见图 2)。



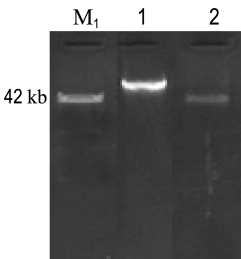
M 核酸相对分子质量标准；粗提宏基因组 DNA
图 2 电洗脱法纯化海洋底泥宏基因组 DNA
Fig. 2 The purified marine sediment metagenomic DNA by electroelution

分别以粗提宏基因组 DNA 及电洗脱法与柱式腐殖酸清除试剂盒法纯化后的 DNA 为模板，进行 16S rDNA 扩增，纯化后 DNA 长度与理论值一致，而以粗提宏基因组 DNA 为模板无法得到扩增产物，说明纯化效果较好(见图 3)。与试剂



M BM5000 DNA Marker; 1~3 电洗脱法纯化 16S rDNA 扩增结果; 4~6 试剂盒法纯化 16S rDNA 扩增结果; 7~9 粗提宏基因组 DNA 16S rDNA 扩增结果
图 3 以纯化后的 DNA 为模板扩增的 16S rDNA 琼脂糖电泳结果
Fig. 3 Agarose electrophoresis of amplified 16S rDNA with purified DNA as template

盒法相比(见图 4)，电洗脱法纯化获取 DNA 收率和纯度高、浓度较大，其 A_{260}/A_{280} 为 1.890 8， A_{260}/A_{230} 为 2.201 4(见表 2)，可满足后续建库筛选工业酶制剂要求。因此，针对海洋底泥样品，应选用电洗脱法对其进行纯化。



M₁ Fosmid 对照 DNA, 42 kb; 1 电洗脱法纯化 DNA; 2 试剂盒法纯化 DNA
图 4 试剂盒法与电洗脱法纯化宏基因组 DNA 电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis of purified metagenomic DNA purified by kit and electroelution

表 2 海洋底泥宏基因组 DNA 不同纯化方法的比较

Tab. 2 Comparison of different purification methods of metagenomic DNA from marine sediment		
样品	A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{280}
纯化前	0.850 0	1.620 0
试剂盒法纯化	1.160 2	1.823 5
电洗脱法纯化	2.201 4	1.890 8

3 结 语

环境 DNA 的提取和纯化是构建宏基因组文库、获取环境微生物资源的关键所在。宏基因组 DNA 提取方法主要有直接裂解法和间接裂解法。据报道^[9-11]，间接裂解法至少需要 10~100 g 样品量才能满足后期建库需求。本研究海洋底泥样品采集困难，确定 1.0 g 海洋底泥提取环境宏基因组 DNA。基于海洋底泥微生物多样性的特性，海洋底泥样品中含有大量腐殖酸与重金属离子，水分、盐分含量高，黏稠度高并含有少量的贝壳碎片等杂质，运用现有 DNA 提取技术到底能回收环境中多少类型微生物的核酸信息仍不清楚^[12]。选用温和的提取方法，环境中大部分革兰氏阴性细菌能被裂解，而革兰氏阳性细菌几乎不能被裂解；

采用剧烈的提取方法,有可能获得环境中革兰氏阳性细菌的信息,但所得的环境 DNA 又将被严重剪切,无法满足构建大片段环境宏基因组文库的要求^[13]. 不可避免地,在构建环境宏基因组文库过程中环境 DNA 的损失将直接导致“基因遗漏”现象发生,因此,本研究将物理法、化学法与酶法相结合,比较 4 种直接裂解环境 DNA 提取方法. 其中化学与物理结合法即 CTAB 结合玻璃珠法提取 DNA 样品严重降解,可能由于玻璃珠等对样品完整性有一定破坏. SoilMaster™ 试剂盒法虽然裂解效果明显,然而其样品浓度较低,离心柱式的收集方式影响 DNA 片段收率. 化学法即采用 CTAB 结合 SDS 法能获取一定收率 DNA,但 DNA 片段降解严重. 因此,化学与酶法相结合即 SDS 结合蛋白酶 K 法提取海洋底泥 DNA 效果最佳.

评价一种 DNA 提取方法是否有效,一般需从以下几个方面考虑:DNA 是否发生降解且所提取的片段是否完整;能否去除样品中大量存在的影响后续实验的物质,如腐殖酸、腐殖酸类似物、酚类化合物和重金属离子等^[11]. 其中又以腐殖酸和腐殖酸类似物的抑制作用最明显,它们主要通过干扰裂解、使核酸降解或非特异性吸附和抑制酶活性方式起作用. 基于海洋底泥样品的特点,环境 DNA 纯化主要是去除腐殖酸与无机盐成分. 根据后续实验建库筛选酶制剂要求,纯化后的 DNA 需要满足 DNA 纯度和收率高与完整性好等要求. 试剂盒法简单,然而纯化效果不明显,离心柱收集影响了 DNA 的收率,同时破坏了 DNA 的完整性. 电洗脱法步骤相对烦琐,但低压、长时间(10 h 以上)的电泳利于 DNA 与杂质充分分离. 电洗脱纯化中将 Marker 和部分目的条带切除染色观察,避免紫外照射对目的 DNA 影响. 整个过程操作温和,极大地保护了宏基因组 DNA 片段的完整性. 根据建库需求,选择电洗脱法对环境 DNA 进行纯化效果最佳,纯化后的环境 DNA 其 A_{260}/A_{280} 为 1.890 8, A_{260}/A_{230} 为 2.201 4,片段均大于 42 kb,为后期构建海洋底泥宏基因组文库筛选具有潜在工业生产与应用价值新型生物催化剂奠定基础.

参考文献:

- [1] Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: the unseen majority [J]. **Proceedings of the National Academy of Science**, 1998, **95** (12): 6578-6583.
- [2] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. **Microbiological Reviews**, 1995, **59**(1):143-169.
- [3] Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, *et al.* DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2001, **67** (5): 2354-2359.
- [4] Roh C, Villatte F, Kim B G, *et al.* Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples [J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2006, **134**(2):97-112.
- [5] Brady S F. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules [J]. **Nature Protocols**, 2007, **2**(5):1297-1305.
- [6] ZHOU Ji-zhong, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996, **62**(2):316-322.
- [7] HUANG Ya-li, LAI Xin-tian, HE Xiao-cui, *et al.* Characterization of a deep-sea sediment metagenomic clone that produces water-soluble melanin in *Escherichia coli* [J]. **Marine Biotechnology**, 2009, **11**(1):124-131.
- [8] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. **Journal of Bacteriology**, 1991, **173** (2): 697-703.
- [9] Bertrand H, Poly F, Van V T, *et al.* High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction [J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2005, **62**(1):1-11.

[10] Rhee J K, Ahn D G, Kim Y G, *et al.* New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, **71**(2):817-825.

[11] Ginolhac A, Jarrin C, Gillet B, *et al.* Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2004, **70**(9):5522-5527.

[12] Kuske C R, Banton K L, Adorada D L, *et al.* Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1998, **64**(7):2463-2472.

[13] Simon C, Daniel R. Metagenomic analyses;past and future trends [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011, **77**(4):1153-1161.

Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from marine sediment samples

WANG Xiao-hui*^{1,2,3,4}, HUANG-LI Shu-xin^{2,4}, BAI Feng-wu¹, DU Yu-guang⁵

(1. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;
2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;
3. Bioengineering College, Dalian University, Dalian 116622, China;
4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
5. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: In order to seek an effective extraction and purification method of metagenomic DNA from marine sediment samples, the metagenomic DNA was extracted by CTAB plus SDS method, CTAB plus glass beads method, SDS plus proteinase K method and SoilMaster™ DNA Extraction Kit method, respectively. The metagenomic DNA was purified by column humic clear kit method and electroelution. The quality and quantity of the extracted metagenomic DNA are compared. The highest extracted rate and integrity are obtained by SDS plus proteinase K method, next are SoilMaster™ DNA Extraction Kit method and CTAB plus SDS method; CTAB plus glass beads method has severe degradation; and electroelution produces the purest metagenomic DNA and large fragments with more than 42 kb. The research results show that SDS plus proteinase K method and electroelution are the optimum extraction and purification methods of metagenomic DNA from marine sediment samples compared with other methods.

Key words: metagenomic DNA; extraction; purification; marine sediment samples