

徐 岩, 吴友根, 张军锋, 等. 广藿香根际土壤微生物总 DNA 提取方法的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 45–47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.013

广藿香根际土壤微生物总 DNA 提取方法的优化

徐 岩, 吴友根, 张军锋, 杨东梅, 胡新文

(热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学园艺园林学院, 海南海口 570228)

摘要:提取高质量的土壤微生物 DNA 是进行后续分子生物学试验的前提。在 3 种常用土壤微生物 DNA 提取方法的基础上, 提出了 1 种新的优化方案, 包括使用添加聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的磷酸缓冲液对土壤进行预洗、联合使用 SDS-CTAB 和蛋白酶 K 来破碎细胞、用酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)除蛋白质和淀粉等杂质、使用 PEG8000 沉淀 DNA、用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化 DNA 等。比较分析了优化的方法与其他 3 种常用方法所获得的总 DNA 产率和纯度的差别, 结果表明, 优化的方法所提取 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值均高于其他 3 种方法, 且 PCR 扩增条带清晰、DNA 产率高, 土壤中 DNA 得率达 88.76 $\mu\text{g/g}$, 表明该方法适宜提取土壤中的微生物 DNA, 从而为研究广藿香根际土壤微生物种类及其多样性奠定了基础。

关键词:广藿香; 总 DNA; 根际土壤; 微生物; 提取方法

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0045-03

广藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 为唇形科刺蕊草属植物, 原产于东南亚地区, 如马来西亚、菲律宾、印度尼西亚等国, 在我国引种可追溯到梁代或以前^[1], 我国的主要栽培地为海南、广东两省。广藿香以其干燥地上部分入药, 是我国常用的芳香化湿类中药之一, 常用于治疗湿浊中阻、脘痞

呕吐、暑湿倦怠、胸闷不舒、寒湿闭暑、腹痛吐泻、鼻渊头痛等^[2]。广藿香不仅是 30 多种中成药的主要原料, 而且从其中提取的广藿香油还是医药和轻化工业的重要原料^[3]。然而, 广藿香在种植过程中连作障碍十分明显, 通常认为根系分泌物会破坏土壤微环境、改变土壤微生物群落结构及多样性, 从而影响植物自身生长^[4-5]。因此, 研究广藿香土壤微生物的区系状况和变化是解决广藿香连作障碍的重要环节。传统的分离鉴定法可培养土壤微生物的数量仅占总微生物数量的 0.1%~1.0%^[6], 不能全面地反映根际土壤微生物的区系状况, 局限性十分明显。目前, 通过基于土壤微生物群落总 DNA 的现代微生物分子生态学方法研究土壤中微生物, 能较全面获得土壤微生物种类与多样性的信息。此方法作为微生

收稿日期: 2014-04-08

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31360210); 海南省中药现代化专项资金(编号: 2012ZY015)。

作者简介: 徐 岩(1988—), 女, 吉林白山人, 硕士研究生, 研究方向为南药种质资源与活性成分。E-mail: 490329151@qq.com。

通信作者: 张军锋, 硕士, 副教授, 研究方向为南药种质资源与活性成分。E-mail: zhangjunfengvip@qq.com。

[8] 徐 丽. 马铃薯 Y 病毒复制酶基因介导的病毒抗性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010: 46–62.

[9] Golemboski D B, Lomonosoff G P, Zaitlin M. Plants transformed with a tobacco Mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(16): 6311–6315.

[10] 饶雪琴, 李华平. 番木瓜美中红品种体胚转化体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(3): 293–296.

[11] 饶雪琴, 李华平. 番木瓜环斑病毒融合基因植物表达载体的构建[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 325–329.

[12] 鲁瑞芳, 吕鹏飞, 彭学贤. 马铃薯 Y 病毒 N1b 复制酶基因在转录水平介导的相对广谱抗病性[J]. 病毒学报, 2000, 16(2): 162–166.

[13] Hellwald K H, Palukaitis P. Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicase-mediated resistance against cucumber Mosaic virus[J]. Cell, 1995, 83(6): 937–946.

[14] 王美林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.

[15] Hanson P, Bemacchi D, Green S, et al. Mapping of a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line[J]. Journal of the American Society of

Horticultural Science, 2000, 125: 15–20.

[16] Hanson P, Green S K, Kuo G. Ty-2 a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato [J]. Tomato Genetic Cooperative Report, 2006, 56: 17–18.

[17] Carr J P, Marsh L E, Lomonosoff G P, et al. Resistance to tobacco Mosaic virus induced by the 54-kDa gene sequence requires expression of the 54-kDa protein[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1993, 5(5): 397–404.

[18] Guo H S, Garcia J A. Delayed resistance to plum pox potyvirus mediated by a mutated RNA replicase gene; involvement of a gene-silencing mechanism [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1997, 10(2): 160–170.

[19] Carr J P, Gal-On G A, Palukaitis P, et al. Replicase-mediated resistance to cucumber Mosaic virus in transgenic plants involves suppression of both virus replication in the inoculated leaves and long-distance movement original research article [J]. Virology, 1994, 199(2): 439–447.

[20] Baulcombe D. Replicase-mediated resistance: a novel type of virus resistance in transgenic plants? [J]. Trends in Microbiology, 1994, 2(2): 60–63.

物群落分子分析方法的基础,最重要的一步就是从土壤样品中尽量毫无偏差地提取出高质量的微生物总基因组 DNA。迄今尚未见关于广藿香根际土壤微生物总 DNA 提取的报道,本研究采用 4 种方法对广藿香根际土壤微生物总 DNA 进行提取和优化,旨在为克服广藿香种植中连作障碍及其根际土壤微生物区系的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土壤样品于 2013 年 9 月取于海南省万宁市广藿香种植园内,取样面积为 100 m² (10 m × 10 m),采用 5 点混合采样法,根际土壤采集按慕东艳等的方法^[7]进行。将取好的土壤混匀,除去明显杂质后装入无菌袋中,过 80 目筛后于 -80 ℃ 冰箱保存待用,供试土壤的部分理化性质:土壤为沙壤土,pH 值 5.93%,全氮含量 (0.998 ± 0.001) g/kg,全钾含量 (2.172 ± 0.025) g/kg,全磷含量 (0.623 ± 0.009) g/kg,含水量 30.2%。

1.2 广藿香根际土壤微生物总 DNA 的提取方法

1.2.1 方法 1 改良 CTAB 法:在 Ellingsøe 等方法^[8]的基础上,将 CTAB 浓度提高到 3%,并增加“SDS 裂解前,37 ℃ 水浴及涡旋振荡”的步骤。

1.2.2 方法 2 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpolypyrrolidone, PVP) 法:参照 Jia 等的方法^[9]进行。

1.2.3 方法 3 超声细胞破碎法:称取 0.5 g 根际土壤,加入 1.5 mL DNA 提取缓冲液 [100 mmol/L Tris - HCl (pH 值 8.0),100 mmol/L EDTA (pH 值 8.0),100 mmol/L 磷酸钠 (pH 值 8.0),1.5 mol/L NaCl,1% CTAB],置于超声细胞破碎仪内,超声振荡 30 min 后,于室温、8 000 r/min 离心 10 min,收集上清并转移到 2 mL 离心管中,用 0.6 倍体积的异丙醇沉淀 DNA;于 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,收集核酸沉淀,用 4 ℃ 70% 乙醇洗涤沉淀后重悬于灭菌的去离子水中,最终体积为 100 μL。

1.2.4 方法 4 采用笔者优化的方法:在张瑞福等方法^[10]的基础上优化,即(1)土壤预洗:取 0.5 g 土壤样品,加入 10 mL 2% 磷酸缓冲液 [pH 值 8.0,含 2% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)],磁力搅拌 15 min,于 10 000 r/min 离心 5 min,取沉淀,重复上述步骤洗涤 2 次,将沉淀转移至 1.5 mL 离心管中,于 -20 ℃ 冰箱保存备用;(2)DNA 提取:称取 0.5 g 根际土壤,加入 1.5 mL DNA 提取缓冲液 (100 mmol/L Tris - HCl,100 mmol/L EDTA,100 mmol/L 磷酸钠,1.5 mol/L NaCl,2% CTAB),再加入 10 μL 蛋白酶 K,37 ℃ 水浴 30 min,其间每 10 min 用涡旋仪振荡 1 次,接着加入 150 μL 20% SDS,65 ℃ 水浴 3 h,每隔 15 ~ 20 min 摇晃 1 次,于室温、8 000 r/min 离心 10 min,收集上清并转移到 2 mL 离心管中。用等体积的酚 - 氯仿 - 异戊醇 (25 : 24 : 1) 抽提。离心后将水相转移至已灭菌的 2 mL 离心管中,用 1/3 体积的 PEG8000 于 -20 ℃ 沉淀 2 h,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,收集核酸沉淀,用 4 ℃ 70% 乙醇洗涤沉淀,重悬于灭菌的去离子水中,最终体积为 100 μL。

1.3 广藿香根际土壤微生物总 DNA 的纯化方法

参照 UNIQ - 10 柱式 DNA 凝胶回收纯化试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 的步骤进行回收纯化。

1.4 广藿香根际土壤微生物总 DNA 粗提物及纯化物的产率及纯度检测

用分光光度法分别测定 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{230\text{ nm}}$ 值,计算其比值 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 。

1.5 广藿香根际土壤细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增条件

采用细菌通用引物 27F:5' - AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG - 3',907R:5' - CCGTCAATTCCTTTTTRAGTTT - 3'扩增 16S rDNA 片段。其中正向引物的 5'端用带羟基荧光素 (FAM) 的荧光标记。扩增采用 4 管平行,20 μL 反应体系为:10 μL 2 × PCR Mix,各 2 μL 引物 (1 μmol/L),1.5 μL *Taq* DNA 聚合酶 (5 U),2 μL 牛血清蛋白 (BSA) (2 μg/μL),1 μL 模板,3.5 μL 无菌水。反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,53 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物 DNA 提取方法的分析

2.1.1 DNA 纯度 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 主要用来检测蛋白质和酚类物质的污染情况,而 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 主要用来检测糖类、盐类或有机物等杂质的污染情况。从表 1 可见,方法 3 所得 DNA 样品的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 均低于其他 3 种方法,而方法 4 所得的 DNA 纯度最高, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 分别为 1.75、1.83。

2.1.2 DNA 产率 由表 1 可见,方法 4 提取的 DNA 产率最高,达 88.76 μg/g,可能是因为增加了土壤预洗过程,使得杂质减少,且使用了 1/3 体积的 PEG8000 沉淀 DNA,沉淀效果好,从而增加了 DNA 的产率。方法 3 所得的 DNA 产率最少,仅为 1.67 μg/g。结果表明,在不添加化学裂解液的情况下,物理方法可能使细胞破壁不完全,导致 DNA 产率降低。

表 1 4 种方法提取广藿香根际土壤样品的 DNA 纯度与产率分析

方法编号	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	DNA 产率 (μg/g)
1	1.01 ± 0.06A	1.35 ± 0.02A	3.36 ± 0.14A
2	1.54 ± 0.01B	1.54 ± 0.09B	58.13 ± 0.85B
3	0.86 ± 0.06C	1.16 ± 0.02C	1.67 ± 0.09C
4	1.83 ± 0.01D	1.75 ± 0.04D	88.76 ± 1.32D

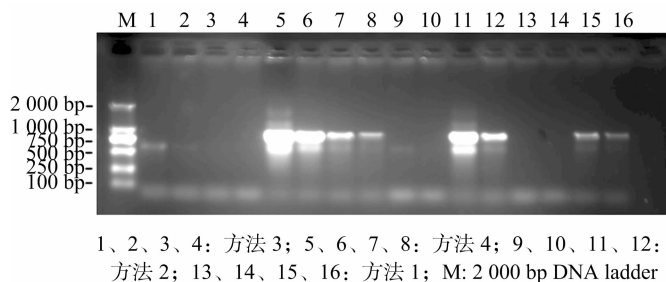
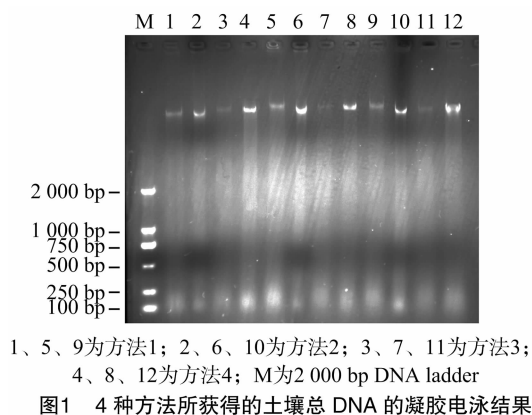
注: $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值在 1.8 ~ 2.0 之间表明较纯; $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}} > 2.0$ 较好。

2.2 广藿香根际土壤微生物总 DNA 的提取和检测

将 4 种方法所提取的 DNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测,从图 1 可以看出,4 种方法均可提取广藿香根际土壤微生物总 DNA,其中方法 2、方法 4 所得的 DNA 浓度远高于方法 1、方法 3。试验中还发现,除方法 4 外,其他方法提取出的 DNA 均呈现不同程度的棕褐色,说明土壤预洗可有效地去除土壤中的杂质。

2.3 广藿香根际土壤微生物的 PCR 扩增结果

以所提土壤 DNA 为模板,利用细菌 16S rDNA 通用引物进行扩增。由图 2 可见,方法 3 提取的 DNA 样品扩增条带均不清晰;方法 1、方法 2 提取的 DNA 有 50% 的扩增条带不清晰;方法 4 所得的 DNA 均能扩增出目标条带且效果最好,可



广藿香根际土壤微生物总DNA的提取方法。方法1仅用CTAB作为裂解液,微生物细胞裂解不完全,DNA产率及纯度低,杂质多,后续的PCR扩增效果不理想;方法2尽管有SDS和PVP 2种裂解液,其提取的DNA浓度、纯度和产率均略高于方法1,但也不是最佳的方法;方法3采用超声细胞破碎法,未添加化学裂解液,不能完全破碎细胞壁,DNA不能全部从细胞中释放出来,导致产率低,且不能去除土壤样品中的杂质;方法4采用CTAB和SDS 2种裂解液,提取效果较好,加上与蛋白酶K及PVP的共同作用,可更好地结合土壤中的腐殖酸,防止大片的DNA降解,从而得到更纯的土壤微生物DNA。试验中还发现,方法4中的聚乙二醇(PEG)沉淀DNA的效果较好,使所得DNA纯度较高,且不影响其产率。当前,土壤微生物DNA有时采用专一试剂盒来提取,虽然操作简便,但是价格昂贵^[14]。方法4所提取的DNA纯度和产率高,PCR扩增的条带清晰,提取的DNA可用于根际土壤微生物群落和多样性分析,表明方法4适宜提取土壤中微生物总DNA,此方法为广藿香种植中克服连作障碍及其根际土壤微生物区系的研究提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 吴友根,郭巧生,郑焕强. 广藿香本草及引种历史考证的研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(20):2114-2117,2181.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:42.
- [3] Wu Y G, Guo Q S, He J C, et al. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(1):63-72.

直接用于后续分析。

3 结论与讨论

一般认为,药用植物在栽培中产生的连作障碍,与根际土壤中的微生物群落变化密切相关,根际土壤中的微生物可以促进植物的生长发育,同时对植物体其他生命活动进行调控^[11-13]。基于土壤微生物群落总DNA的现代微生物分子生态学方法研究土壤中微生物,能较全面获得土壤微生物种类与多样性的信息。然而,此方法最重要的一步就是提取高质量的微生物总基因组DNA。由于广藿香根际土壤成分复杂,如腐殖酸、重金属离子、大分子杂质等,因此需要筛选和优化土壤微生物总DNA的提取方法。本研究筛选和优化了4种

- [4] Marschner P, Timonen S. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere[J]. Applied Soil Ecology, 2005, 28(1):23-36.
- [5] Inderjit. Experimental complexities in evaluating the allelopathic activities in laboratory bioassays: A case study[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(2):256-262.
- [6] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等. PCR-DGGE技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 生态学报, 2003, 23(8):1570-1575.
- [7] 慕东艳,吕国忠,孙晓东,等. 黑龙江省药用植物根际土壤真菌多样性[J]. 生态学报, 2013, 33(1):229-237.
- [8] Ellingsøe P, Johnsen K. Influence of soil sample sizes on the assessment of bacterial community structure[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(11):1701-1707.
- [9] Jia X, Han S J, Zhao Y H, et al. Comparisons of extraction and purification methods of soil microorganism DNA from rhizosphere soil[J]. Journal of Forestry Research, 2006, 17(1):31-34.
- [10] 张瑞福,曹慧,崔中利,等. 土壤微生物总DNA的提取和纯化[J]. 微生物学报, 2003, 43(2):276-282.
- [11] Islam M R, Sultana T, Melvin J M, et al. Comparisons of direct extraction methods of microbial DNA from different paddy soils[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2012, 19(3):337-342.
- [12] 陈慧,郝慧荣,熊君,等. 地黄连作对根际微生物区系及土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2007, 18(12):2755-2759.
- [13] 张新慧,郎多勇,张恩和. 当归根际土壤水浸液的自毒作用研究及化感物质的鉴定[J]. 中草药, 2010, 41(12):2063-2066.
- [14] 陈旭玉,周亚奎,余贤美,等. 一种直接用于PCR的土壤微生物DNA提取方法[J]. 中国农学通报, 2008, 24(4):33-36.