

郑道君, 张冬明, 吉清妹, 等. 1 种简单有效的根际土壤微生物 DNA 提取方法[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(4): 39–40, 69.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.011

# 1 种简单有效的根际土壤微生物 DNA 提取方法

郑道君<sup>1,2</sup>, 张冬明<sup>1</sup>, 吉清妹<sup>1</sup>, 史珍萍<sup>2</sup>, 符传良<sup>1</sup>

(1. 海南省农业科学院农业环境与土壤研究所, 海南海口 571100; 2. 海南省农业科学院热带园艺研究所, 海南海口 571100)

**摘要:**研究了 1 种快速简便地提取高质量根际土壤 DNA 的改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法, 应用该方法能简便快速地去除腐殖酸等干扰物质, 从而获得高质量的根际土壤 DNA。所得 DNA 的  $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值为  $1.477 \pm 0.121$ , 以此 DNA 为模板, 可以获得带条清晰、重复性高的相关序列扩增多态性 PCR(SRAP-PCR)扩增结果。

**关键词:**根际土壤; DNA 提取; 改良 CTAB 法; 相关序列扩增多态性 PCR(SRAP-PCR)

**中图分类号:** S154.34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0039-02

通过传统分离方法获得并进行过研究的微生物种群数量只占自然界微生物总数的 1%<sup>[1-2]</sup>, 因此, 采用培养的方法很难真实地反映土壤微生物的变化。近年来, 不依赖于培养, 直接从土壤中提取微生物总 DNA 进行分析的一系列分子生态学研究技术因其研究结果具有快速、准确、全面等特点, 被广泛应用于土壤微生物群落结构、功能及动态监测等方面的研究<sup>[3]</sup>。通过这些分子生态学技术, 土壤不再是黑箱, 而是可以看得见、摸得着的系统, 使得许多年以来土壤微生物学家所面临的诸多问题可以得到解决。DNA 的分离提取是分子生物学研究中重要的基本技术, 从不同土壤中提取分离获得纯度较高的土壤 DNA 是进行土壤微生物分子生态学研究的的前提。本研究探索了 1 种简单高效提取根际土壤 DNA 的改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

土壤为取自海南省农业科学院农业环境与土壤研究所大棚的西瓜连作根际土壤, 共连作 3 茬。每茬取样 1 次, 作为 1 份样品。

### 1.2 试剂与仪器

**1.2.1 主要试剂** 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、三氯甲基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸(EDTA), 均为国产分析纯。100 bp DNA ladder、Taq DNA 聚合酶、4 × dNTPs mix, 中科瑞泰(北京)生物科技有限公司产品。相关序列扩增多态性(SRAP)引物序列为正向引物 Me1(5′-TGAGTCCAAACCG-GATA-3′)、反向引物 Em4(5′-GACTGCGTACGAATTGA-3′), 生工生物工程(上海)股份有限公司产品。

**1.2.2 主要仪器** 台式高速冷冻离心机; 温水浴锅; 制冰机; 移液枪; 紫外分光光度计; T100 Thermal Cycler 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad); 水平电泳仪; 凝胶成像系统等。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 取样及样品前处理** (1)带土挖出整株植物的根系, 挖出时尽可能多带些土; (2)轻轻抖去根系上大块土壤, 剪取约 15 g 的带土根系, 置于装有灭菌的 0.86% NaCl 溶液的 25 mL 离心管中, 并快速带回实验室; (3)将上述离心管放在冰中 30 min, 每隔 5 min 取出摇匀 1 次; (4)去掉植株根系, 4 000 g、4 ℃低温离心 30 min, 然后去除上清液。将所得土壤沉淀物保存于 -20 ℃备用。

**1.3.2 土壤总 DNA 的提取** (1)取上述土壤样品约 1.0 g 于 2.0 mL 离心管中, 置于液氮中 3 min, 再放入 65 ℃水浴锅中解冻 2 min, 反复进行 3 次; 然后在高通量组织研磨仪上用液氮研磨 1 min, 至粉末状。(2)立即将上述粉末转入 65 ℃预热的 800 μL 3 × CTAB 提取液[100 mmol/L Tris-HCl(pH 值 8.0), 25 mmol/L EDTA, 2.0 mol/L NaCl, 2% 巯基乙醇, 3% CTAB]中, 迅速混匀, 置于 65 ℃水浴约 25 min, 其间每隔 10 min 摇 1 次。(3)加入约等体积的三氯甲烷: 异戊醇(24:1), 90 ℃连续翻动至浑浊而无 2 相, 15 000 r/min 离心 5 min, 取上清。重复此操作 2 次。(4)取上清液加入 5 μL 10 mg/mL RNase 溶液, 摇匀, 室温下静置 10 min。(5)加入无水乙醇至离心管满, 此时马上看到白色絮状沉淀漂浮于上层乙醇中, 切勿摇动。用灭菌牙签轻轻挑出白色絮状 DNA 沉淀。然后吸出下层提取液于另 1 支离心管中, 吸至 2 相混合面颜色较淡的液体时, 将此液体连同上层乙醇丢弃。(6)重复第(5)步 3 次, 并将最后 3 次所得 DNA 沉淀转入同一离心管中, 用 70% 乙醇清洗 2 次, 晾干至 DNA 沉淀呈透明状, 再溶于 120 μL 无菌 ddH<sub>2</sub>O 中, 于 4 ℃保存备用或长期保存于 -20 ℃。

**1.3.2 DNA 的质量检测** 用 1.0% 琼脂糖凝胶检测所提 DNA 的完整性; 直接取 100 μL 用紫外分光光度计测定 230、260、280 nm 处的吸光度  $D_{230\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{280\text{ nm}}$ , 计算 DNA 的浓度, 并估测 DNA 的纯度。

**1.3.3 SRAP 扩增** 以上述提取的土壤总 DNA 为模板, 进行 SRAP-PCR 扩增反应, 以进一步检测所提 DNA 的质量, 反应

收稿日期: 2016-01-28

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31360071); 海南省自然科学基金(编号: 312082); 海南省农业科学院农业科技创新专项(编号: 琼农院[2013]32 号)。

作者简介: 郑道君(1979—), 男, 海南海口人, 硕士, 副研究员, 主要从事土壤微生物分子生态学研究。E-mail: daojunzh@163.com。

通信作者: 符传良, 高级农艺师, 主要从事土壤微生物分子生态学研究。E-mail: fuc119@163.com。

在 iCycler™ Thermal 的 Cycler 型 PCR 仪上进行。采用李春楠等优化后的反应体系和扩增程序<sup>[4]</sup>。25 μL 反应体系组成: 2.5 μL 10 × PCR buffer, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200 μmol/L dNTPs, 1.0 U Taq 酶, 0.4 μmol/L 引物, 30 ng DNA 模板, 用无菌超纯水补足至 25 μL。PCR 扩增程序: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 45 s, 35 ℃ 1 min, 72 ℃ 120 s, 5 个循环; 94 ℃ 45 s, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 120 s, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。反应重复 1 次。

PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶检测, 以 100 bp DNA ladder 作为对照分子量标准 (marker), 在 0.5 × TBE 缓冲液中, 于 5 V/cm 的条件下电泳, 在 Gel Doc XR 型凝胶成像分析系统下照相并记录结果。

2 结果与分析

2.1 提取根际土壤 DNA 质量

由图 1 可见, 琼脂糖凝胶电泳结果无拖尾现象, 表明所提 DNA 基本上无断裂, 完整性好。能够有效去除腐殖酸是土壤 DNA 提取的关键。腐殖酸在 230 nm 处有 1 个吸收峰, 可通过估算  $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值来确定所提取的 DNA 中腐殖酸的污

染程度,  $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值越高, 表明 DNA 纯度越高; 反之, 表明腐殖酸污染越严重<sup>[5]</sup>。诸多学者报道土壤 DNA 提取法所获得的 DNA  $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值在 1.3 左右<sup>[6-8]</sup>。本研究所获得的 DNA  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值在 1.560 ~ 1.935 之间,  $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$  值在 1.356 ~ 1.552 之间, 可见纯度较高 (表 1)。

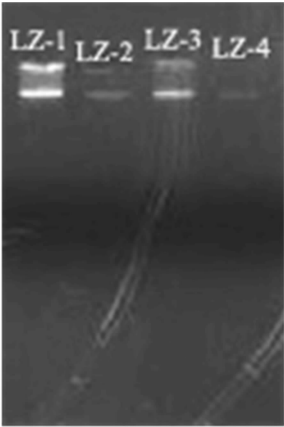


图1 改良 CTAB 方法所提 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

表 1 改良 CTAB 方法所制备的土壤 DNA 纯度及产量

材料	$D_{230\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}$	$D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 值	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值	DNA 浓度 (μg/μL)	DNA 产量 (μg/g)
LZ-1	1.522 2	2.064 1	1.323 1	1.356	1.560	0.103 2	12.384
LZ-2	0.733 1	1.137 7	0.648 6	1.552	1.754	0.056 9	6.828
LZ-3	0.865 1	1.256 1	0.769 7	1.452	1.632	0.062 8	7.536
LZ-4	0.639 0	0.989 2	0.511 2	1.548	1.935	0.049 5	5.940

提取 DNA 的质量会影响 PCR 是否能扩增或扩增的效果。在提取土壤 DNA 时, 影响 DNA 质量的主要是腐殖酸类物质, 这类物质可以螯合 Mg 离子或与 DNA 或蛋白质发生共价结合, 从而抑制酶的活性<sup>[9]</sup>。为了验证本方法所提取的 DNA 中是否含有杂质, 采用 SRAP 扩增的方法来判断是否存在足以抑制 Taq 酶活性的抑制剂。由 SRAP 的扩增结果 (图 2) 可见, 本研究的 DNA 提取方法所提取的 DNA 完全可以用于 SRAP-PCR 反应, 扩增条带清晰, 结果重复性高。综上所述, 本研究中所采用的 DNA 提取法是 1 种可以有效减少腐殖酸类物质的方法, 用该法所提 DNA 几乎不含有酶抑制物等影响 PCR 反应的杂质。

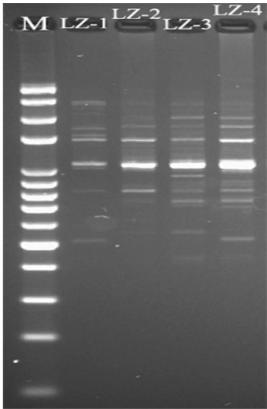


图2 引物 ME1/EM4 的扩增结果

2.2 根际土壤 DNA 提取效率

经紫外-可见分光光度计检测, 4 份样品所提取的 DNA

浓度分别为 0.062 8、0.103 2、0.056 9、0.049 5 μg/μL。经计算, 用本方法所提取根际土壤 DNA 的产量为 5.94 ~ 12.384 μg/g, 这与张海燕等建立的方法获得的 DNA 产量<sup>[10]</sup>相当, 较陈旭玉等建立的方法获得 DNA 产量<sup>[8]</sup>高。此外, 本研究所建立的方法步骤简单, 仅需 6 个步骤即可完成, 需时 1.0 ~ 1.5 h。可见本方法为操作简单、效率较高的土壤 DNA 提取方法。

3 讨论

土壤微生物的种群和数量极易随着环境条件的变化而变化, 因此为了确保所获得的研究结果能真实反映土壤微生物信息, 在取样过程中既要迅速, 又要彻底。可见取样过程是极为重要的, 但也是常被研究者忽略的。为了正确与迅速取样, 在本研究中, 抖去根系大块土壤后直接将土壤置于装有灭菌的 0.86% NaCl 溶液的 25 mL 离心管中, 并快速带回实验室进行样品预处理。根际土壤微生物在盐溶液中置于冰上 30 min, 每隔 5 min 取出摇匀 1 次, 这样既降低了土壤微生物的种群、数量的变化, 减少在样品取样过程中的污染, 同时也可使部分腐殖酸等杂质溶于 0.86% NaCl 溶液而得以去除。为了达到去除腐殖酸的目的, 诸多学者对土壤样品进行了预处理, 王澍等采用 CaCO<sub>3</sub> 溶液和聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 磷酸溶液对样品进行预处理<sup>[11]</sup>; 赵勇等在微生物细胞裂解前采用 TENP 缓冲液、磷酸盐缓冲液 (PBS) 对土壤样品进行了 2 次洗涤处理<sup>[7]</sup>; 徐岩等采用 2% 磷酸缓冲液 (pH 值 8.0, 含 2% PVP) 对土壤样品洗涤处理<sup>[6]</sup>, 均取得了一定的效果。本研究

果与之相似。本研究中 33 ℃ 时有 75% 的菌株仍能缓慢生长,并产生少量孢子,这与张莉等的研究结果<sup>[8]</sup>不一致,表明北疆早熟棉区黄萎病菌的耐高温能力可能有所增强,这也可能是造成当前新疆棉花黄萎病在高温期仍然发病较重的原因之一。30 ℃ 条件下发现有个别菌株由菌核型转为菌丝型,这与朱荷琴等研究的高温胁迫下温度对病原菌的培养特性有影响<sup>[9]</sup>一致。pH 值在 4~9 范围内菌株均可生长,pH 值在 5~7 范围内菌株生长速度较快,表明 pH 值是影响棉花黄萎病菌生长的因素之一。6.25% 菌株致死温度、时间为 65 ℃、10 min,37.50% 菌株致死温度、时间为 60 ℃、10 min,56.25% 的菌株致死温度、时间为 55 ℃、10 min,表明北疆早熟棉区黄萎病菌对高温具有一定的耐受性,籍秀琴等认为高温可明显控制黄萎病的发生<sup>[10]</sup>,棉田遭遇连续高温容易产生隐症,但是一旦环境条件适宜即可暴发成灾。

本研究仅从北疆早熟棉区中的第五师、第七师和第八师采集了 15 个重病田的病株,只能代表北疆早熟棉区局部黄萎病菌的类型。下一阶段的任务是广泛采集病样,进行 PCR 分子鉴定及致病力分化研究,以便为新疆棉花黄萎病的防控提供理论依据。

#### 参考文献:

[1] 新华网. 新疆棉花产量首次超过全国一半[EB/OL]. (2012 -

(上接第 40 页)

用盐溶液低温振荡悬浮处理也有效去除了部分腐殖酸类物质。

在细胞裂解释放 DNA 时,不同的学者采用了 2 × CTAB 提取液、溶菌酶、蛋白酶 K、十二烷基磺酸钠(SDS)裂解液对土壤样品进行处理。本研究则采用反复冻溶和 3 × CTAB 提取液以使细胞壁充分裂解,并适当提高 NaCl 浓度(2.0 mol/L)以使 DNA 充分溶解,从而达到提高 DNA 产量的目的。在土壤 DNA 提取时,影响 DNA 质量的主要是腐殖酸类物质。这类物质主要通过影响 PCR 酶的活性致使 PCR 扩增失败。本法在沉淀 DNA 时,白色絮状 DNA 沉淀漂浮于上层无水乙醇中,快速挑出 DNA 沉淀,使之未与下层液体接触,因而能避免由于腐殖酸类物质等原因给 DNA 质量造成的影响。

目前所报道的土壤 DNA 提取方法中,为了获得更多的 DNA 沉淀,多数是用预冷的无水乙醇或异丙醇沉淀 DNA,并置于 -20 ℃、30 min 左右。这种方法虽然可以避免 DNA 断裂并可获得更多的 DNA 沉淀,但是低温可能会使 CTAB 溶液产生沉淀而影响后续工作。例如,导致 DNA 沉淀较难溶解和有 CTAB 残留,从而可能会对 PCR 产生影响。此外,长时间的沉淀会使更多的腐殖酸类物质随之沉淀而严重影响 DNA 质量。利用本方法所提取的 DNA 虽然浓度稍低,但可以有效去除腐殖酸等物质的干扰。同时本方法具有操作相对简单、整个过程所用时间短等优点,是 1 种简易快速获得高质量 DNA 的提取方法。

12 - 28) [2015 - 09 - 10] <http://news. Xinhuanet. com/fortune/2012 - 12/28/e - 114194610. htm>.

- [2] 刘海洋,王 伟,张仁福,等. 新疆棉花黄萎病发生调查及病原菌系统进化分析[J]. 新疆农业科学,2015,52(1):65 - 71.
- [3] 缪卫国,田逢秀. 新疆棉花枯、黄萎病发生趋势及研究现状[J]. 新疆农业科学,2000(增刊1):107 - 109.
- [4] 石磊岩,冯 洁,王莉梅,等. 北方植棉区棉花黄萎病菌生理分化类型研究[J]. 棉花学报,1997,9(5):273 - 280.
- [5] 李国英,张新全,宋玉萍,等. 北疆棉区棉花黄萎病发生趋势、抗性研究[J]. 新疆农业科学,2015,52(1):185 - 190.
- [6] 李国英,霍向东,田新莉,等. 新疆棉花黄萎病菌的培养特性及致病性分化的研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2000,4(1):9 - 15.
- [7] Pullman G S, Devay J E. Epidemiology of *Veticillium* wilt of cotton: effects of disease development on plant phenology and line yield[J]. Phytopathology, 1982, 72(5):554 - 559.
- [8] 张 莉,马慧宁,陈文霞,等. 石河子地区棉花黄萎病菌致病型监测研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(16):4879 - 4880,4882.
- [9] 朱荷琴,宋晓轩,简桂良. 温度胁迫对棉花黄萎病菌致病力的影响[J]. 棉花学报,2003,15(1):33 - 36.
- [10] 籍秀琴,马 存. 棉花黄萎病消长与温度关系的分析[J]. 农业科技通讯,1980(8):30 - 31.

#### 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]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1):143 - 169.
- [2] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature, 1990, 345(6270):63 - 65.
- [3] Pace N R. Amolecular view of microbial diversity in the biosphere[J]. Science, 1997, 276:734 - 740.
- [4] 李春楠,崔海瑞,王伟博. 用 SRAP 标记研究根际土壤微生物的遗传多样性[J]. 生物多样性,2011,19(4):485 - 493.
- [5] 顾华杰,李玉祥,赵明文,等. 几种水稻田土壤微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. 江苏大学学报(医学版),2005,15(4):300 - 305.
- [6] 徐 岩,吴友根,张军锋,等. 广藜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.
- [7] 赵 勇,周志华,李 武,等. 土壤微生物分子生态研究中总 DNA 的提取[J]. 农业环境科学学报,2005,24(5):854 - 860.
- [8] 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.
- [9] 李钧敏,金则新. 一种高效可直接用于 PCR 分析的土壤总微生物 DNA 抽提方法[J]. 应用生态学报,2006,17(11):2107 - 2111.
- [10] 张海燕,王彩虹,龚明福,等. 一种简单有效且适于土壤微生物多样性分析的 DNA 提取方法[J]. 生物技术通报,2009(8):151 - 155.
- [11] 王 澍,芮 蕊,蔡 婷,等. 不同无土栽培基质微生物 DNA 提取方法研究[J]. 西南林业大学学报,2012,32(4):36 - 40.