

Advances in Marine Sediments of the Total DNA Extraction Method

Xinqiang Zhao, Xiaopeng Yu, Mingai Zhang, Cuifang Yu, Fansheng Cheng*

College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao Shandong
Email: 1760029992@qq.com, fscheng@qau.edu.cn

Received: May 25th, 2015; accepted: Jun. 16th, 2015; published: Jun. 19th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Microorganisms inhabited in marine sediments server as an important role in the marine ecosystem as well as the biosphere substances' circulation. The gradually deepening understanding of the biodiversity and the continuous improvement of research methods in marine sediments still face some basic obstacles, such as the cultivation of microorganisms and DNA extraction. This paper aims to summarize the current research progress in environmental DNA extraction method in marine sediment, which corresponds to Metagenomics and other modern molecular ecology research methods. Key steps in the sampling, transportation, storage, samples pretreatment, cell disruption, total DNA enrichment, storage and quality evaluation were discussed in detail.

Keywords

Marine Sediments, Microbial Diversity, DNA Extraction, Research Progress

海洋沉积物总DNA提取方法研究进展

赵新强, 于晓朋, 张名爱, 于翠芳, 程凡升*

青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东 青岛
Email: 1760029992@qq.com, fscheng@qau.edu.cn

收稿日期: 2015年5月25日; 录用日期: 2015年6月16日; 发布日期: 2015年6月19日

*通讯作者。

摘要

海洋沉积物中微生物是海洋生态系统的重要组成部分,在维持生态平衡方面发挥着重要作用。随着人们对生物多样性重要性认识的不断深入及研究方法的不断改进,对海洋沉积物中微生物的研究取得了新的进展,但仍存在一些问题,如微生物难培养、DNA难提取等。本论对海洋沉积物微生物多样性研究中的关键步骤进行分析探讨,主要包括样品取样及预处理、细胞的裂解、总DNA的提取、纯化和保存方法及质量评价等方面。阐述国内外对海洋沉积物微生物多样性研究中DNA提取方法取得的成果,以及存在的局限性。

关键词

海洋沉积物, 生物多样性, DNA提取, 研究进展

1. 引言

海洋沉积物中的微生物是自然界生态系统中的重要组成成员,在维持环境与海洋生态平衡方面发挥着至关重要的作用。海洋的面积约占地球总表面积的3/4,在海洋高盐、高压、低温、低营养或无光照等特殊的生态环境下,造就了海洋沉积物中微生物的多样性,是海洋

环境下生物多样性的主要来源之一。沉积物是集化学物质和微生物于一体的特殊生态环境[1],海洋沉积物中的微生物往往因适应其特殊环境而引起功能、遗传、系统发育的多样性,是海洋沉积物微生物分子生态学研究中的重要的一部分。目前自然环境中可培养的微生物可能不及所有微生物总数的1% [2],可知约占99%的微生物至今难以培养,甚至一些微生物处于“存活却无法培养”的状态,可见海洋微生物及其沉淀物中的微生物拥有巨大的开发利用价值。

宏基因组学(或元基因组学, Metagenomics)是一种以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象,不依赖于有机体培养的技术手段。研究流程一般包括从环境样品中提取基因组DNA,再进行高通量测序分析或克隆DNA到合适的载体中,再载导入宿主菌体,筛选出目的转化子等现代分子生物学工作。与传统纯培养方法相比较而言,传统方法是对微生物先进行纯培养,再进行重复筛选的过程,因此筛选出的新活性物质的几率是不断降低的[3]。而基于宏基因组学的现代分子生物学研究中不需要先对微生物进行人工培养,可以直接从特定的环境中提取出微生物的总DNA,再进行基因的测序等操作,从而开发微生物和基因资源。宏基因组学的出现使人们打破了物种界的界限,突破了传统方法的局限,为微生物新资源的开发利用提供了更好的技术平台[4]。随着现代分子生物学研究技术的不断发展,宏基因组学在微生物学的研究中得到广泛的应用。在农业微生物研究方面,可以用于改造土壤、提供有机肥料和改进粮食品种等领域;在医学研究领域,可以用来研究人或动物体内的微生物群体,如Breitbart等[5]利用宏基因组方法获得了人类粪便中的1200个病毒基因型,在对抗病毒基因研究表达等方面获得了突破性的进展[6];尤其是在水体环境中新型酶及新型功能的已知酶的宏基因组学研究中具有广泛的应用[7]。

海底沉积物中达50%~80%的物质为腐殖质,腐殖质与DNA在分子大小和理化性质方面比较相近,其化学结构复杂,能够阻碍DNA的提取、分离以及抑制某些活性物质。因此在进行海洋沉积物中微生物多样性研究中需去除腐殖质对DNA提取质量的影响。同时能否获得高质量、高纯度的DNA对后面的微生物学分析和下游生物学实验起着决定性的作用。从程凡升等[7]在水体宏基因组学研究进展及应用中可知以水中微生物为研究对象的宏基因组构建比较容易,而对于海洋沉积物环境下的以底泥及附着微生物为研究对象的宏基因组的构建却困难很多,存在泥微粒对于DNA的附着及其酚类物质对DNA及后续操作污染等问题。可见DNA的提取存在一些难题,从另一方面证明提取出高质量的DNA对于海洋沉积物

微生物的研究起着关键性影响。Lesack 等[8]在 16S rDNA 基因克隆的研究中发现, DNA 提取的基因片段及质量效果不好时可能会导致 2 种不同的 16S rDNA 类型的结果出现。即验证了 DNA 的提取过程是宏基因组学研究的关键与前提。刘璞等[1]在海洋沉积物微生物多样性研究中进行了存在问题的总结概述, 结果如表 1。

在海洋沉积物微生物研究中 DNA 的提取是研究现代分子生物学的基础, 获得完整性好、纯度高和品质好的 DNA 是宏基因组学的必需条件。而在 DNA 提取的过程中由于材料来源、微生物多样性及环境组成成分是不同的, 因此提取方法往往存在一定的差异。张宁等[9]在对动物、植物、微生物以及海洋生物 DNA 提取进展的比较中发现: 不同来源实验材料由于其组织和细胞结构特点不同往往采用不同的 DNA 提取方法。其中对于海洋沉积物微生物的研究虽然方法较多, 但技术方法尚不完善, 仍然存在微生物 DNA 流失等一些问题, 可见对于海洋沉积物微生物总 DNA 的提取方法探究方面仍然有很大的发展空间, 因此本研究对海洋沉积物微生物总 DNA 提取方法方面进行系统的分类概述, 并针对其中存在的一些问题优化出最佳方案。

2. 样品取样、运输、保存

海洋沉积物是一种特殊的生态环境, 其来源复杂多样。通常采取表层样品, 并且要求重金属类样品装在聚乙烯塑料袋中, 油类样品放在广口磨砂玻璃瓶中。因此一般借助采样器进行采样。表层样品可用咬合采泥器直接取样, 如果底质为基岩或砾石时, 可使用拖网采样法进行采样[10]。参照《海洋生态环境监测技术规程》, 采集后立即 4℃ 下冷藏运输到实验室, 在无菌室中的超净台上取出柱状样品, 去除样品外表层以防陆地空气等其他污染, 按 2 cm 进行分层, 再分别放入无菌塑料盒中于-40℃ 保存备用[11]。

3. 样品的预处理

样品的预处理主要包括直接法和间接法。直接法用来去除样品中腐殖酸、蛋白质等杂质的干扰; 间接法主要提取样品中的细胞悬液。目前普遍使用的是间接法[12], 即通过梯度离心、离心洗涤等操作方式来去除样品中的腐殖酸、蛋白质等杂质的影响, 这样收集和裂解的细胞就可以减少或者避免杂质对实验的影响, 其不足是容易造成微生物种类和数量的丢失[13]。在对海洋沉积物中微生物总 DNA 提取过程中, 可能还会受到胞外游离的 DNA、无机物和有机物的干扰。Nathalie 等[14]建议在裂解细胞前, 采用磷酸缓冲液进行样品的处理; 张娇等[15]在研究 DNA 提取方法对菌的多样性中采用了此法, 获得了较好的纯化结果。

在 DNA 提取的杂质去除过程中, 王琦等[16]在海水多营养层次生态养殖池塘细菌群落分析及与环境因子中比较了三种 DNA 提取方法, 采用 CTAB 和蛋白酶 K, 与蛋白质和多聚糖形成复合物, 再通过有机溶剂抽提, 去除蛋白、多糖、酚类等杂质, 提取结果表明提取的 DNA 产量最高并无明显拖尾, 说明杂质去除效果明显; 而王宇等[17]通过改进的 Tiedje [18]法采用同样方法去除杂质的影响。提取结果发现:

Table 1. Problems are classified study microbial diversity in marine sediments [1]

表 1. 海洋沉积物微生物多样性研究中存在问题归类[1]

项目	存在问题
核酸回收	无法回收全部的 DNA 或 RNA; 菌体细胞无法完全裂解并且重复性差; 伴有腐殖质等杂质的干扰。
PCR	DNA 混合物中扩增特定基因时可能面临不同物种间的基因序列互相集结形成 DNA 聚合物的问题以及 PCR 技术中的 DNA 污染问题。
克隆	不同有机体的 rDNA 基因片段的克隆效率存在差异; 根据 rDNA 克隆的相对丰度来估算其相应种群的相对丰度时一般会产生偏差; DNA 提取可能会受到其他微生物基因片段的污染。

获得的 DNA 纯化提取液的 OD_{260 nm}/OD_{230 nm} 值仅为 0.89, OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 值为 1.31, 说明此方法去除腐殖酸效果较差, 却具有较强的去除蛋白质能力。Tiedje 等[18]人就结合使用了 PVP 和 CTAB 的方法来去除杂质, 经测定发现 OD_{260 nm}/OD_{230 nm} 值仅为 1.12, OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 值为 1.27, 可以看出去测定的评价效果数值均大于 1, 所以对于腐殖酸、蛋白质等杂质的去除效果还是比较理想的。

除了采用上述试剂, 还可以通过加入脱腐缓冲液使其在细胞的裂解前去除一部分的腐殖酸, 同时增加样品洗脱步骤, 可以去除可溶性的抑制物和胞外 DNA [19]。李靖宇等[20]在 DNA 的提取及其脱腐处理中, 加入了脱腐缓冲液[21]进行腐殖酸的去除处理, 在加入 DNA 提取缓冲液前加入氯化钙进行腐殖酸沉淀反应, 注意的是如果 DNA 提取缓冲液中加入 EDTA 螯合剂, 由于 EDTA 可以螯合 Mg²⁺或 Mn²⁺离子, 抑制 DNase 活性, 因此可以将氯化钙形成的沉淀溶解, 重新释放出腐殖酸, 影响 DNA 的提取纯度。

上述都是去除腐殖酸等杂质的处理方法, 样品的预处理还可以进行菌体细胞的回收, 黄婷婷等[22]通过改进 Esther M. Gabor 的 Blending method 采用匀浆缓冲液进行匀浆, 再进行低速室温离心等操作进行菌体细胞的回收。经研究发现此处理获得的 DNA 受土壤中腐殖酸等的杂质影响很小。

4. 细胞裂解技术

在样品的预处理之后, 需要对菌体细胞进行裂解处理, 菌体细胞的裂解主要是对细胞进行破壁等处理, 作用主要是用来释放细胞内核酸、蛋白质和核酸分离。细胞裂解一般采用研磨、超声波、机械破碎等物理方法, 或采用添加化学试剂 SDS、溶菌酶等化学方法裂解细胞。

在化学方法中通常加入溶菌酶, 其是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶, 可以破坏菌体细胞的细胞壁; 还可以加入 SDS 等除垢剂, 其中 SDS 是分离 DNA 时常用的一种阴离子除垢剂, 不仅可以溶解膜蛋白及脂肪, 从而使细胞膜破裂, 还可以溶解核膜和核小体, 使其解聚, 将核酸释放出来, 并对 RNase、Dnase 有一定的抑制作用。陈双喜等[23]采用 SDS-蛋白酶 K 处理, 以提取的混合液总 DNA 为模板, 进行 PCR、电泳等处理分析了印度洋与大西洋中脊深海沉积物菌落的分布情况以及砷抗性菌的多样性, 可见 SDS 对于细胞的裂解效果是比较理想的。袁志辉等[24]在对水样进行 DNA 提取中同样采用了此法, 经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳显示: 所有样品均在 23 kb 左右出现条带, 表明已经获得了水样微生物的宏基因组 DNA 的较长基因片段。

CTAB 是常用的一种阳离子去污剂, 能够与核酸形成复合物然后在低盐溶液沉淀出来。在该法中使用的 PVP(聚维酮)与多酚结合形成复合物, 能够有效避免多酚类化合物介导的 DNA 降解[25]。但存在实验操作步骤繁多、试剂组成复杂及实验试剂有一定毒性等问题。

由于 CTAB 法试验步骤繁多复杂, 经过近几年 DNA 提取方法的不断发展, 利用 SDS-Tris-EDTA 等试剂结合的方法来直接裂解细胞使其释放出 DNA 的方法逐渐被广泛应用于 DNA 提取[26]。该法提取所用试剂较少, 步骤简单。但不能有效地去除多糖和多酚类物质, 因此在 DNA 提取的后续实验研究中一般需要进行改良优化处理。吴发红等[27]采用了 CTAB 法、SDS 法及改良的 CTAB 法对真菌进行 DNA 提取, 经电泳结果显示: 三种方法都能够获得 DNA 片段, 并且得率较高。改良的 CTAB 法提取的 DNA 电泳带很亮而且将提取和纯化实现同步, 简化了操作步骤, 但所需的费用较高。因此还有待开发一种新型简单易提取、纯度高的方法。

本论文所讲的几种细胞裂解方法有些方法对于湖水中底泥的 DNA 提取, 其与活性污泥、海洋沉积物的物理化学性质有一些相近的地方, 因此对于海洋沉积物的 DNA 提取还是具有一定的参考价值。朱艳霞等[28]在研究太湖入水口底泥微生物宏基因组及聚磷菌多样性研究中采用冻融-溶菌酶-SDS 法裂解细胞提取总 DNA, 进行了 3 次反复冻融, 结果发现提取出的 DNA 得率较低, 而溶菌酶-SDS-二次沉淀法提取的效果最好, 得到的 DNA 颜色洁白透明, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.86~1.95, OD₂₆₀/OD₂₃ 比值在 1.67~1.78,

平均得率为 12.365 $\mu\text{g/g}$ 。并得出溶菌酶-SDS-二次沉淀法是适合太湖底泥基因组 DNA 提取的最优方法的结论。熊开容等[29]通过进行了一些改进,采用冻融+玻璃珠+溶菌酶+SDS 方法提取了活性污泥的 DNA,结果表明获得的 DNA 适合于酶解和符合 PCR 扩增要求。

在细胞裂解的过程中,还可以采用一些物理方法进行菌体裂解。在 DNA 提取中可以采用液氮研磨处理。液氮不仅有助于研磨充分,还可以让细胞冷冻起来,变得很脆,这样容易破细胞壁,同时,液氮的超低温可以大大降低酶活性,防止 DNA 的降解和组织的破坏。许守英等[30]在热泉微生物研究中,就采用了液氮研磨处理,再利用 MPbio 土壤基因组 DNA 提取试剂盒(MP Bio Laboratories, Inc.)提取海水样品、菌苔、沉积物的总 DNA,经电泳、PCR 确定获取的是目的基因及目的扩增片段,证明获得了总 DNA 片段。除了液氮研磨还可以超声波、玻璃珠粉碎法进行细胞裂解,赵吉等[31]发明一种快速提取沉积物环境样品总 DNA 的方法,其中采用玻璃珠破碎-SDS 法,不仅能高效去除腐殖酸等杂质,还提高了沉积物中 DNA 提取的纯度。同时不用添加一些有一定毒性的化学试剂,操作比较简单。李鹏等[32]采用一种超声波法(Miller 等[33])处理代替珠磨匀化法,得到结果发现:提取到的活性污泥微生物的总 DNA 片段分子量约为 23 kb,条带较亮,纯度大于 1.70,可以用来 PCR 等后续处理。包慧等[34]为建立一种快速、高效的藻类 DNA 提取方法,分别采用了纤维素酶法、改良的 CTAB 法、超声波粉碎及试剂盒法对自然界中的藻类进行 DNA 的提取及比较。结果证明,三种方法提取的 DNA 片段完整。但纤维素酶法提取的 DNA 沉淀显黄褐色,可能存在蛋白质的污染,改良的 CTAB 法和超声波粉碎法提取效果差别不大,而后者耗费较大,因此得出改良的 CTAB 法是比较适合藻类的 DNA 提取方法。吕新等[35]在探究不同土壤微生物 DNA 提取方法对 DGGE 分析微生物群落的影响时采用了高盐法、玻璃珠破碎法、冻融法和试剂盒法对土壤进行微生物 DNA 提取。通过电泳结果发现:玻璃珠破碎法和试剂盒法提取的 DNA 均能满足后续土壤微生物多样性分析实验的要求;其中试剂盒法操作简单且提取的 DNA 质量好,但 DNA 产率较低且耗费成本较高;而玻璃珠破碎法虽然具有提取耗时较长,步骤复杂的缺点,但 DNA 产量较高,提取的 DNA 对于后续 PCR 分析等下游实验并没有明显影响。得出玻璃珠破碎法是一种比较适合土壤微生物总 DNA 提取方法的结论。

细胞裂解不仅仅局限于单纯的物理或者化学方法,也可以两者进行适当的组合,王宇等[17]在 DNA 不同提取方法对养殖池塘底泥细菌多样性 PCR-DGGE 检测的影响的研究中,通过改进的 Tiedje[18]法中使用 20% SDS, 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热和改进的 Martin-Laurent 法[36]中酸洗石英砂对底泥细菌进行细胞裂解。结果发现,改进的 Tiedje [18]法获得 DNA 纯度较高、产量一般、耗时长;而后者获得 DNA 纯度较低;并提出对于提取养殖池塘中的细菌用改进的 Martin-Laurent 法获取 DNA 纯度及含量是可以直接用于 PCR 的。Bourrain 等[37]人采用该方法从活性污泥中提取了 DNA; Reddy 等[38]人同样成功的从堆肥中提取出了 DNA。

5. DNA 提取方法

在总 DNA 的提取过程中,常使用乙醇、异丙醇和聚乙二醇等有机溶剂来沉淀样品中的 DNA 分子,其对 DNA 分子具有一定优先选择性[39]。李新伟等[40]使用 Mobio 高效 DNA 提取试剂盒的提取方法,对胶州湾近岸沉积物中细菌群落组成、结构及功能方面进行了分析。还可以利用磁珠法进行 DNA 纯化提取,韩云霞[41]通过分析常见的 DNA 纯化提取方法发现,通过加入适量的磁珠悬液,可以提取出纯度高、完整性好的 DNA 片段。根据磁珠添加比例区别来回收大小不同的 DNA 片段,特别适用于微量样品的 DNA 纯化提取。

除以上方法, Chelex-100 煮沸法同样可以用于 DNA 的纯化提取。Chelex-100 是一种碱性多价金属离子螯合树脂,它可以和 DNase 维持活性的金属离子如镁、锰等所必需的离子相结合,以此可以有效地抑

制其活性,从而达到保护 DNA 的效果。还可以提供一个强碱性环境,在煮沸条件下可以裂解细胞并沉淀蛋白质,以分离 DNA。这种 DNA 提取方法简便易行,不需要多次转换离心管,因此降低了其它 DNA 污染的可能性。但该方法得到的 DNA 中含有 Taq 聚合酶抑制作用,仍需用硅质颗粒或玻璃珠进行 DNA 纯化。胡晓红等[39]比较了五种细菌 DNA 提取方法,结果证明通过进一步优化改进 Chelex-100 方法获得了一种特异性高、灵敏度高、高效,无需酚/氯仿抽提,大大减少了有毒试剂对人体和环境的危害。Coombs 等[42]则采用热循环方法,将标本上的蜡融入样品溶液,在酶的作用下进行裂解,然后用 Chelex-100 进行吸附,离心去蜡,这种方法安全、简便、有效、经济。蔡鹏[43]在 DNA 分离纯化中发现,苯酚-氯仿法提取 DNA 比 Sephadex 50 柱脱水效果好。在提取 DNA 中用氯仿-异戊醇进行 DNA 提取时,提取液中依然存在大量的腐殖酸等杂质,导致溶液呈现黑褐色。

目前免疫磁珠分离技术已成功应用于 DNA 研究领域,通过利用纳米磁性粒子的特异性吸附可以用于富集捕获目的菌及 DNA 的分离。Rudi 等[44]通过纳米磁性粒子对裂解菌体释放的 DNA 进行吸附处理,成功提取了 DNA 并能用于 PCR 的测定。裴杰萍[45]通过比较五种 DNA 提取方法发现,免疫磁珠法制备的 DNA 纯度高、含量多,尤其适合微量样品的 DNA 提取,但是以成功制备特定纳米磁珠为前提的。

6. 粗 DNA 纯化

在总 DNA 提取的过程中,虽然经过了样品的预处理去除杂质处理,但仍存在一些杂质会对后续的生物实验结果造成干扰,如电泳效果不明显、PCR 扩增困难等问题。因此往往需要对提取的粗 DNA 进行纯化处理。

王琦等[16]采用胶回收和稀释法对粗 DNA 进行了纯化效果比较,PCR 扩增得到目的条带,结果说明对粗提 DNA 的纯化方法能有效去除样品中的腐殖酸、蛋白质等抑制 PCR 反应过程中 Taq 酶活力的杂质且效果显著,并得出胶回收方法是更为理想的纯化方法的结论。还可以利用溶液的回收来进行 DNA 纯化,李鹏等[32]比较了两种回收纯化 DNA 方法发现,胶回收的 DNA 量虽然显著小于溶液的回收量,但均能获得理想的 PCR 产物条带,所以两种回收纯化方法对 DGGE 的结果没有明显的影响。

透析袋电洗脱法也是一种常用的 DNA 纯化方法,黄婷婷等[22]采用透析袋电洗脱法进行粗提 DNA 的纯化。结果显示:此法虽然操作复杂,但对于大片段 DNA 却非常有效。并且回收效率达 50% - 60%,基本可以满足后续 PCR 等实验操作的样品要求。

7. DNA 保存技术

DNA 分子经纯化之后有可能需要进行一段时间的贮藏,DNA 在贮存过程中容易降解,因为 DNA 会随着时间降解(或称退化),暴露于一定的影响因素下 DNA 的降解可能会变快,如阳光、水、温度等。经研究发现在理想条件下,DNA 的“可读”时间约占其存活时间的 1/5,可见 DNA 的保存同样在海洋沉积物的微生物多样性、资源的利用等方面是至关重要的。

常用的贮藏方法有 -20°C TE (无菌水)溶液、 -20°C 70%酒精、液氮超低温、DNA 冻干粉等。这类方法具有操作简单、耗时短等特点,但 DNA 保存的安全性、质量的完整性不能保证。李娜等[46]通过不同保存方法对基因组 DNA 提取效果的影响中,比较了直接低温(保温瓶中加入生物冰袋)保存、 60°C 干燥后低温保存、100%乙醇保存及 75%乙醇保存样品所提取的 DNA 对 DNA 纯度和完整性进行了方法检测比较发现,乙醇保存样品室具有多优点是能够获得较高质量 DNA 的保存方法,而且操作简单。

8. 质量检测和评价进展

在对提取的 DNA 片段进行基因的测序、克隆、转化等分子生物学操作过程中,DNA 的纯度、品质

对实验结果起着决定性作用。因此需要对提取的 DNA 样品进行质量检测及评价,需达到无污染、无降解(脉冲场电泳主带大于 40 Kb)、无颜色、不粘稠的要求,以确保后续实验结果的准确性。质量检测和评价主要包括:基因组 DNA 的片段大小确定、基因组 DNA 浓度的测定、基因组 DNA 纯度的测定三个方面进行评价。常用的检测方法有以下几种:

8.1. 紫外吸收与琼脂糖凝胶电泳检测

紫外吸收检测 DNA 的纯度:核酸的最大吸收波长为 260 nm,蛋白质为 280 nm。在波长 260 nm 时,OD 值为 1 时相当于双链 DNA 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$,单链寡核苷酸的含量为 30 $\mu\text{g/mL}$ 。因此通过计算可以得知核酸样品的浓度。其中纯净 DNA 的比值为 1.8, RNA 为 2.0,可以通过测定在 260 nm 和 280 nm 的 OD 值的比值($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$)可以估计核酸的纯度。如果比值高于 1.8,则说明提取的 DNA 样品中有 RNA 残留。如果存在酚和蛋白质将会导致比值降低,其中 270 nm 存在高吸收表明有酚的干扰。紫外分光光度法只能测定浓度大于 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 的核酸溶液,对浓度更小的样品,可采用荧光分光光度法(琼脂糖凝胶电泳法)。

琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性:琼脂糖凝胶电泳是利用琼脂糖溶化再凝固后能形成带有一定孔隙的固体基质的特性。DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时有电荷效应和分子筛效应,琼脂糖凝胶电泳是最常用的鉴定 DNA 的方法。其原理是利用 DNA 分子电泳时的电荷效应和分子筛效应及溴化乙锭在紫外光照射下能发射荧光。当提取的 DNA 片段在琼脂糖凝胶中从负极向正极泳动时,溴化乙锭会从正极向负极移动,致使溴化乙锭分子嵌入到 DNA 分子中形成荧光络合物,使 DNA 在紫外光下的能够发射出很强的荧光,而荧光的强度正比于 DNA 的含量,同时将已知浓度的标准样品作为电泳的对照,进行对比就可以对 DNA 进行样品的浓度评估。

8.2. DNA 扩增片段的测序

对 PCR 产物进行 1.0%的琼脂糖凝胶电泳,扩增效果较好的样品进行回收试剂盒处理,获得的纯化 DNA 进行测序,从而进行 DNA 样品的质量检测[46]。以上为常用的几种质量检测和评价的方法,当然还有很多别的不同的方法,需要我们在实验时根据实验目的基因的要求及所需的 DNA 质量标准进行方法的选择。对 DNA 进行质量检测 and 评价可以反映 DNA 提取方法的不足与优势,从而更好地改进获得新的 DNA 提取技术,为宏基因组的研究奠定基础。

9. 总结展望

目前微生物多样性研究正处于概念和方法体系构建阶段,单一的研究方法已经基本完善[47]。但在方法的针对性选择和优化组合方面仍存在很大发展空间。与传统培养法相比,PCR 技术研究方法的优点是无需分离培养纯种微生物,通过提取 DNA 即可获得有关微生物群落总体活性与代谢功能的信息,最大限度地保留微生物群落原来的代谢特征[48]。但基于 PCR 技术的研究方法存在局限性,在 DNA 提取中每次提取的 DNA 效率不同即重复性比较差,无法获得完全相同的 DNA 片段;同时细胞的裂解程度不同导致提取的 DNA 效果不同,也存在在微生物研究中偏漏的可能:提取 DNA 所采集的样品只是在某些方面具有代表性,而不能包括所有环境的特征,同时在样品的保存过程中可能导致微生物组分的变化[49]。因此提取的总 DNA 不能定义为全部的微生物基因,要得到非培养微生物的微生物信息。

本论文比较了目前常见的几种 DNA 提取方法和试剂盒对 DNA 提取效果。经过对样品的预处理、细胞的裂解、DNA 的提取及纯化方面和提取的 DNA 质量、得率和 PCR 扩增效果方面进行分析比较。结果表明,每种 DNA 提取方法各有利弊,没有一种 DNA 提取方法或试剂盒可以对所有样品 DNA 的提取产

生最好的提取效果。所以总 DNA 提取方法研究中只有将各种方法有机结合,才能从不同角度揭示微生物多样性,提供更加全面的微生物信息。

微生物功能性研究以基因组 DNA 序列为基础并依赖其信息的完整性,必须提取出完整的高品质的全部 DNA,并使其纯度及片段大小等满足后面的研究需要。因此在现代分子生物学研究中需要原创性地、系统地研究和开发一种新型、高效快速、简单易行、低成本、低毒性或无毒性、高纯度的总 DNA 提取方法。

基金项目

国家自然科学基金(No.31301438); 山东省优秀中青年科学家奖励基金(No. BS2013SW034).

参考文献 (References)

- [1] 刘璞, 王红梅 (2009) 海洋沉积物微生物多样性研究. *安徽农业科学*, **37**, 4569-4571.
- [2] Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **59**, 143-169.
- [3] 印蕾, 高向东, 顾觉奋 (2012) 宏基因组技术研究进展. *中国医药生物技术*, **7**, 216-220.
- [4] Schloss, P.D. and Handelsman, J. (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion Biotechnology*, **14**, 303-310.
- [5] Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., et al. (2003) Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Journal of Bacteriology*, **85**, 6220-6223.
- [6] 楚雍烈, 杨娥 (2008) 宏基因组学及其技术的研究进展. *西安交通大学学报: 医学版*, **29**, 601-608.
- [7] 程凡升, 蔡婷, 金剑, 等 (2010) 水体宏基因组学研究进展及应用. *北京农学院学报*, **25**, 78-80.
- [8] Liesack, W., Weyland, H. and Stackebrandt, E. (1991) Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology*, **21**, 191-198.
- [9] 张宁, 王凤山 (2004) DNA 提取方法进展. *中国海洋药物*, **23**, 40-46.
- [10] 崔高嵩, 陈跃 (2003) 海洋底质沉积物的采样方法. 2003 年东北测绘学术与信息交流会论文集, 83-84.
- [11] 朱广超 (2009) 连云港近海岸海洋沉积物中微生物群落结构与功能的初步研究. 硕士论文, 江南大学, 无锡.
- [12] Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T.M. and Simonet, P. (2003) Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, **4**, 183-190.
- [13] 于洁, 冯妍, 解玉红, 刘淑琼 (2010) PCR-DGGE 技术及其在环境微生物领域中的应用. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, **6**, 227-234.
- [14] Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K. and Greer, C.W. (2004) Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **56**, 181-191.
- [15] 张娇, 夏占峰, 贺江舟, 孙红专, 张利莉 (2013) DNA 提取方法对盐环境放线菌多样性分析的影响. *微生物学报*, **7**, 746-757.
- [16] 王琦 (2013) 海水多营养层次生态养殖池塘细菌群落分析及与环境因子相关性研究. 硕士论文, 中国海洋大学, 青岛.
- [17] 王宇, 林文辉, 王亚军, 毕晔, 石存斌, 吴淑勤 (2009) DNA 不同提取方法对养殖池塘底泥细菌多样性 PCR-DGGE 检测的影响. *吉林农业大学学报*, **6**, 771-776.
- [18] Zhou, J.Z., Bruns, M.A. and Tiedie, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 316-322.
- [19] Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M.T., Guerri, G. and Nannipieri, P. (2009) Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, **45**, 219-235.
- [20] 李靖宇, 赵吉, 边玉, 武琳慧, 于景丽 (2010) 湿地土壤微生物 DNA 提取及其脱腐技术. *微生物学通报*, **8**, 1130-1137.
- [21] 席峰, 傅莲英, 王桂忠, 郑天凌 (2006) 海洋沉积物 DNA 提取前的简易脱腐方法研究. *高技术通讯*, **5**, 539-544.
- [22] 黄婷婷, 曹慧, 王兴祥, 崔中利 (2004) 一种土壤微生物总 DNA 的高效提取方法. *土壤*, **6**, 662-666.

- [23] 陈双喜 (2008) 深海洋中脊沉积物砷抗性菌的多样性分析. 硕士论文, 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门.
- [24] 袁志辉 (2006) 宏基因组学方法在环境微生物生态及基因查找中的应用研究. 硕士论文, 西南大学, 重庆.
- [25] Kim, C.S., Lee, C.H., Shin, J.S., Chung, Y.S. and Hyung, N.I. (1997) Simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research*, **25**, 1085-1086.
- [26] 邱国华, 徐增富, 曹吉祥, 李宝健 (1997) 一种简单实用的提取植物 DNA 的方法. *植物生理学通讯*, **5**, 368-369.
- [27] 吴发红, 黄东益, 黄小龙, 周鑫, 程文杰 (2009) 几种真菌 DNA 提取方法的比较. *中国农学通报*, **8**, 62-64.
- [28] 朱艳霞 (2012) 太湖入水口底泥微生物宏基因组及聚磷菌多样性研究. 硕士论文, 苏州科技学院, 苏州.
- [29] 熊开容, 张智明, 张敏 (2005) 活性污泥总 DNA 提取方法的研究. *生物技术*, **4**, 43-45.
- [30] 许守英 (2013) 热泉微生物及其氢酶多样性研究. 硕士论文, 齐鲁工业大学, 济南.
- [31] 赵吉, 李清宇 (2013) 一种从湖泊沉积物样品中提取纯化总 DNA 的高效方法. 2013-10-30.
- [32] 李鹏, 毕学军, 汝少国 (2007) DNA 提取方法对活性污泥微生物多样性 PCR-DGGE 检测的影响. *安全与环境学报*, **2**, 53-57.
- [33] Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L. and Ghiorse, W.C. (1999) Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4715-4724.
- [34] 包慧, 杨忠委, 王华然, 刘颖, 尹静 (2012) 3 种真核藻类 DNA 提取方法比较. *环境与健康杂志*, **5**, 451-453.
- [35] 吕新, 陈丽华, 李明仁 (2012) 4 种不同土壤微生物 DNA 提取方法对 DGGE 分析微生物群落的影响. *福建农业学报*, **4**, 367-372.
- [36] Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallrt, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G. and Catroux, G. (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2354-2359.
- [37] Bourrain, M., Achouak, W., Urbain, V. and Heulin, T. (1999) DNA extraction from activated sludge. *Current Microbiology*, **38**, 315-319.
- [38] Lamontagne, M.G., Michel, F.C., Holden, P.A. and Reddy, C.A. (2002) Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **49**, 255-264.
- [39] 胡晓红, 彭惠民, 刘昕, 共正根, 袁科 (2008) PCR 及 Real-Time PCR 评价细菌 DNA 提取方法. *重庆医科大学学报*, **2**, 155-158.
- [40] 李新伟 (2012) 胶州湾近岸沉积物中细菌群落对石油和铜污染的响应特征. 硕士论文, 中国海洋大学, 青岛.
- [41] 韩云霞 (2014) DNA 常见纯化方法比较与分析综述. *生物技术世界*, **1**, 2-3.
- [42] Coombs, N.J., Gough, A.C., Primrose, J.N. and Primrose J.N. (1999) Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*, **27**, 15-37.
- [43] 蔡鹏 (2007) 土壤活性颗粒与 DNA 的相互作用及其对 DNA 稳定性、细胞转化和 PCR 扩增的影响. 博士论文, 华中农业大学, 武汉.
- [44] Rudi, K., Kroken, M., Dabblberg, O.J., Deggerdal, A., Jakobsen, K.S. and Larsen, F. (1997) Rapid, universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads. *Biotechniques*, **22**, 506-511.
- [45] 裴杰萍 (2005) 免疫胶体金法提取纯化环境标本中细菌 DNA 技术的建立. 硕士论文, 中国人民解放军军事医学科学院, 北京.
- [46] 李娜, 李迪强, 王秀磊, 刘毅 (2006) 粪便不同保存方法对动物基因组 DNA 提取效果的影响. *国际遗传学杂志*, **5**, 341-345.
- [47] Zhou, J. and Lei, T. (2007) Review and prospects on methodology and affecting factors of soil microbial diversity. *Biodiversity Science*, **15**, 306-311.
- [48] Chen, J. (2005) Review on methods for investigation of microbial diversity. *Biotechnology*, **15**, 85-87.
- [49] Falkowski, P.G. and de Vargas, C. (2004) Shotgun sequencing in the sea: A blast from the past? *Science*, **304**, 58-60.