土壤微生物总 DNA 提取及其 PCR 优化

李　超[1,2],梁俊峰[1*]

(1.中国林业科学研究院热带林业研究所，广东 广州 510520；2.国家林业局桉树研究开发中心，广东 湛江 524022)

摘要：采用 3 种不同土壤微生物总 DNA 提取方法对广东省乐昌杨东山十二度水自然保护区的样地土壤进行比较研究，进一步通过 PCR 扩增，研究牛血清白蛋白(BSA)对整个 PCR 扩增过程的影响。结果表明：试剂盒提取法相对于其他两种提取方法更加方便有效，当土壤样品量比较大时，直接提取法是最经济有效的方法；而在土壤微生物的 PCR 扩增实验中，加入 2 μl 的 BSA，可以有效地抑制腐殖酸等对后续 PCR 扩增的影响。

关键词：土壤微生物；DNA 提取；牛血清白蛋白；PCR 扩增

中图分类号：S154.3　　**文献标识码**：A

Comparison of Extraction Methods For Soil Microbe DNA and Effectiveness of BSA for PCR Amplification

LI Chao[1, 2], LIANG Jun-feng[1]

(1. *Research Institute of Tropical Forestry*, *Chinese Academy of Forestry*, *Guangzhou* 510520, *Guangdong*, *China*; 2. *China Eucalypt Research Centre*, *Zhanjiang* 524022, *Guangdong*, *China*)

Abstract: The extracting efficiency of three methods for soil DNA extraction and isolating of microbial soil DNA from sites in Yangdongshan Shierdushui Nature Reserve was examined. Also, the effect of bovine serum albumin (BSA) on PCR amplification of the DNA obtained was studied. The results showed that the DNA Extraction Kit method was the most simple and effective method. However, for large numbers of soil samples, the most economical method proved to be ‘the direct method’. It was found that 2 μl BSA could inhibit the deleterious effects of humic acid on PCR amplification of soil microbe DNA.

Key words: soil microbes; DNA extraction; BSA; PCR amplification.

传统上，利用微生物形态、培养特性、生理生化特性及遗传特性作为依据对微生物进行分类和鉴定来研究微生物多样性制约因素很多，且 85% ~ 99%的环境微生物不能被分离识别[1]。近年，基于 PCR 技术的分子生物学方法应用于土壤微生物多样性研究已成为一种趋势，弥补了传统土壤微生物培养和鉴定方法不能真实反映待测环境的不足[2-3]。土壤理化性质十分复杂，粗提取的土壤 DNA 中均含有腐殖酸、酚类化合物和重金属离子等抑制性污染物，其中腐殖酸是土壤的主要成分，微量的腐殖酸即可抑制 PCR 扩增中的 TaqDNA 聚合酶以及酶切反应的限制型内切酶活性[4-6]，且腐殖酸在 DNA 的提取过程中出现与 DNA 共提取的现象，并和 DNA 紧密结合，导致其很难与 DNA 分离[7-8]。因此，如何减少腐殖酸的抑制作用，获得良好的 PCR 扩增结果成了土壤微生物多样性研究的关键。

Tebbe 等[5]研究发现 0.08 μg mL^{-1} 腐殖酸足以抑制 PCR 扩增中极为敏感的 Taq 聚合酶活性，因此 DNA 稀释后再进行 PCR 扩增可降低腐殖酸等抑制物的浓度，从而显著减少其抑制作用。Al-Soud 等[9]通过离子交换色谱成像系统和荧光定量 PCR 仪等来鉴定和纯化人体血细胞内的 PCR 扩增抑制物成分，结果表明血红蛋白和乳铁蛋白中的 9 种扩增促进剂中牛血清白蛋白(BSA)的效果最明显。Forbes 等[10]通过内部控制实验研究抑制用于直接检测临床样本的结核分枝杆菌 PCR 实验的干扰物质，数据结果表明 BSA 在直接检测呼吸道标本的结核分枝杆菌的 PCR 反应中至关重要。

收稿日期：2015-04-27
基金项目：中国林业科学研究院基本科研业务费专项(CAFYBB2014MA003)和广东省林业科技创新重点项目(2014KJCX019-01)
作者简介：李超(1987—　)，女，硕士，助理工程师，主要从事土壤微生物及遗传多样性研究
*梁俊峰为通讯作者

国内外关于土壤微生物总 DNA 提取方法的研究很多，而土壤质地和成分的差异也会影响土壤微生物 DNA 的提取效果[11]，提取的方法也有一定的差异。本研究对广东省乐昌杨东山十二度水自然保护区样地的土壤微生物进行了比较，以期找到一种快速、简便、高效的 DNA 提取方法用于后续土壤微生物多样性和种群变化的研究。

1 试验地概况

杨东山十二度水省级自然保护区位于广东省韶关市乐昌东北部，该保护区正北面与湖南省接壤，自北向南跨越九峰、五山、北乡、廊田四镇和龙山林场。地理位置为 113°23′09″ ~ 113°29′32″ E，25°22′47″ ~ 25°11′06″ N，总面积 11 651 hm^2，光照充足、温暖湿润、雨量充沛，属于中亚热带季风气候[12]。土壤类型主要有山地红壤、山地黄壤、山地灌丛草甸土、石灰土和水稻土。地貌特征属于南岭山地，最高海拔 1 726.6 m。该区年均气温 18.1 ~ 19.9℃，年降水量超过 1 700 ~ 1 800 mm。

2 材料与方法

2.1 样品采集

2008年9月在广东省乐昌杨东山十二度水自然保护区的样地进行土壤样品采集，样地面积 50 m × 30 m，并细分为 10 m × 10 m 的样方，采样时尽量在相对平坦、地表植被覆盖较好的地方采集土壤样品，采用五点采样法取地表下 0 ~ 15 cm 土样混合均匀后装入无菌自封袋，贴上标签，带回实验室放入−20℃冰箱保存用于后续实验。样品保存时间不超过 1 周。

2.2 研究方法

2.2.1 土壤微生物总 DNA 的提取及纯化

2.2.1.1 直接提取法

参照芦晓飞等[8]的 DNA 提取方法稍改进。

2.2.1.2 真菌提取法

(1) 将采集的土壤样品用孔径25目的分样筛混匀筛除沙石并分装，称取样品 1 ~ 3 g，置于 10 mL 灭菌离心管；(2) 加 5 mL TENP (pH=10.0) ，混匀 3 min (在摇床上摇 5 min，37℃ 250 rpm)，再 12 000 rpm 离心 3 min，去上清。(3) 重复 3 ~ 4 次或更多，直至上清液较清；(4) 加入 PBS 5 mL，混匀 3 ~ 5 min，12 000 rpm 离心 3 min，弃上清；(5) 加入 65℃预热好的 4 ×CTAB 提取液 5 ml，混匀，置于 65℃水浴 2 ~ 3 h，其间摇匀 4 ~ 5 次(4 ×CTAB：1 L 溶液中，1 M Tris-HCl 100 mL (pH 8.0)，NaCl 82 g，0.5 M EDTA 40 mL (pH 8.0)，CTAB 40 g，PVP 2 g)；(6) 加入等体积氯仿：异戊醇(24:1)，颠倒混匀，12 000 rpm 离心 15 min，取上清；(7) 加入等体积的异丙醇沉淀，放入 4℃冰箱保存过夜；(8) 离心 10 min，去上清，用 70%酒精和无水乙醇 3 mL 各洗 1 次，晾干后加入 30 µl ddH_2O 或 TE。

2.2.1.3 试剂盒提取法

按照生工生物有限公司提供的 Ezup 柱式土壤基因组 DNA 抽提试剂盒操作步骤提取土壤总 DNA。

2.2.2 PCR 扩增及电泳检测

在 rDNA 基因中，16S rDNA 和 28S rDNA 基因间隔序列称为(ITS)，它的长度和序列变化较大，将其扩增物进行序列分析，可用于对真菌的不同生物型、菌株、种、属进行分类鉴定。采用通用引物 ITS1 和 ITS4 来扩增核糖体基因内转录间隔区(rDNA-ITS)。引物：ITS 1 (5’—TCCGTAGGTGAACCTGCGG—3’)和 ITS 4 (5’—TCCTCCGCTTATTGATATGC—3’)。PCR 体系(50 µl)：ITS 12 µl，ITS 42 µl，10 ×Buffer 5 µl，dNTP 5 µl，Taq 酶 0.8 µl，超纯水 31.2 µl，模板 2 µl，BSA(牛血清白蛋白) 2 µl (2.0 mg ml^{-1})。土壤真菌 PCR 扩增程序：35 cycles，95℃ 5 min；94℃ 30 s；55℃ 30 s；72℃ 2 min；72℃ 7 min。检测：1.0％琼脂糖电泳进行检测，并拍照记录。

2.2.3 扩增片段的纯化回收

选用北京百泰克生物技术有限公司的多功能 DNA 纯化回收试剂盒，得到的 DNA 溶液置于−20℃保存或者直接用于后续实验。检测：1.0％琼脂糖电泳进行检测，并拍照记录。

3 结果与分析

3.1 DNA 颜色及量的比较

直接法提取的土壤总 DNA 量最多，颜色呈深褐色，其次为真菌提取法，颜色最淡的为试剂盒提取的 DNA，结果表明直接法提取的 DNA 含有腐殖酸等杂质较多，但提取的 DNA 总量也多，试剂盒属于微量提取法，获得的 DNA 纯度较高，试剂盒提取更方便快捷，但费用相对较高。

3.2 电泳检测结果

用 1% 琼脂糖在 1 ×TAE 缓冲液中进行电泳检测，每条电泳道加 5 μl DNA 原样。由图 1 可知，直接法提取的 A1、B1、C1、D1 四个土壤样品的总 DNA 电泳图，条带较清晰，亮度最大，质量较好；A2、B2、C2、D2 为真菌法提取样品的 DNA，条带最模糊，亮度最低，但对大型真菌的总 DNA 的提取效果却很好；A3、B3、C3、D3 为试剂盒法提取的 4 个土壤样品的总 DNA，条带很清晰，含杂质量最少，但亮度稍微比直接法低，说明直接提取法的总 DNA 量最大，由于试剂盒成本昂贵，少量提取是可行的，如果土壤样品量需求比较大，最经济有效的方法为直接提取法。

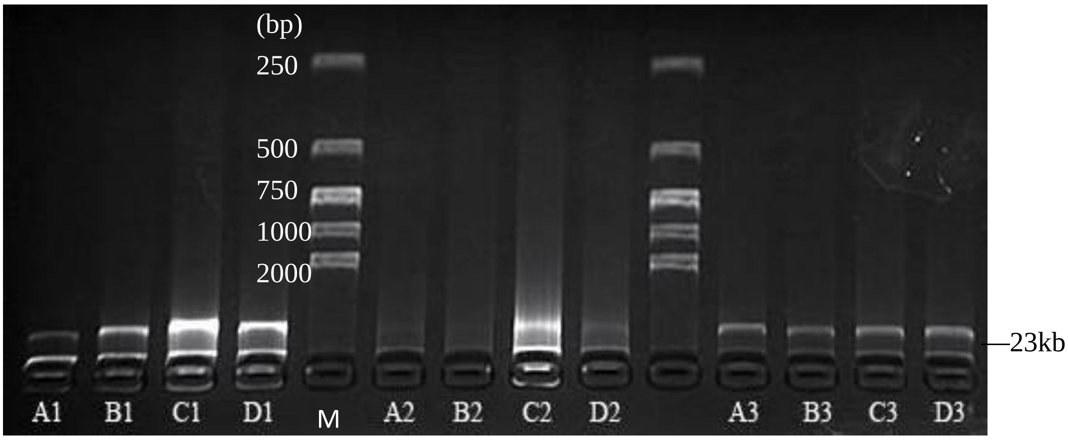

图 1　3 种不同土壤 DNA 提取方法的电泳结果图

3.3 PCR 扩增结果

由于试剂盒提取的 DNA 溶液仍会含有少量的腐殖酸等物质，而微量的腐殖酸即可抑制 PCR 扩增中 Taq 聚合酶及限制性内切酶的活性，通过查阅相关文献发现牛血清白蛋白(BSA)广泛应用于酶反应及 PCR 反应系统中，用来减少内源抑制物的干扰作用[13]，BSA 的加入，能够减小活性污泥微生物样品中残留腐殖酸和棕黄酸等杂质在 PCR 扩增中的抑制作用[14]。不同研究采用的 BSA 最适浓度不同，本研究采用的 BSA 浓度为 2.0 mg ml^{-1}。通过实验还发现，对于本研究的土壤及腐殖质层样品进行 PCR 的过程中，设计从 50 ~ 60℃的退火温度，扩增结果的变化不是太大，而以 55℃效果最佳。本实验模板 DNA 为采用试剂盒提取法提取的总 DNA 稀释 5 倍后取 2 μl 作为扩增模板。

由图 2 可知，左边 4 个条带 A1、B1、C1、D1 为 PCR 反应体系中未加 BSA 的 4 个样品 PCR 扩增结果，条带若隐若现，很难看到；中间 4 个条带 A2、B2、C2、D2 为 50 μl 体系中加入 2 μl BSA 的扩增结果，条带清晰；右边 4 个条带 A3、B3、C3、D3 为 50 μl 体系中加入 5 μl BSA 的扩增结果，有条带，但不如 2 μl BSA 的扩增结果清晰。因此，在土壤微生物的 PCR 扩增实验，加入适量的 BSA，可有效地抑制腐殖酸等的污染，对实验结果产生很好的优化作用，且本次实验加入 BSA 的量为 2 μl 效果最好，因此添加 BSA 是一种既经济又有效的辅助措施。

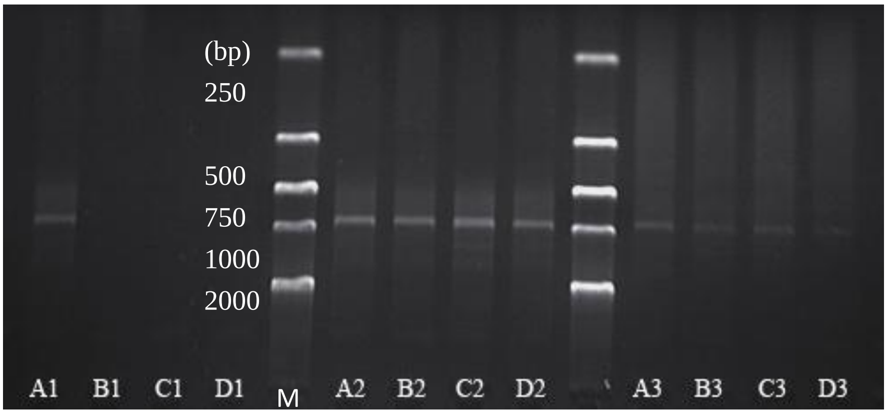

图 2 不同浓度 BSA 对土壤微生物 PCR 扩增效果的影响

4 结论与讨论

研究结果表明，3 种 DNA 提取方法均可提取本研究样地土壤基因组总 DNA，但每种方法获得的结果存在一定的差异，试剂盒提取法快速便捷，但实验成本相对较高，适用于在较短时间内获得直接用于 PCR 扩增的较高纯度的 DNA，不适合进行样品量需求较大的研究。因此针对不同土壤类型，应该选择合适简便有效的 DNA 提取方法。

实验过程中还发现 DNA 总浓度越高，PCR 扩增的效果越不理想，而把 DNA 浓度稀释后在电泳中已检测不到条带，也能有较理想的 PCR 扩增结果，说明对粗提取的 DNA 进行稀释也是减少杂质影响的有效途径。鲍立新等[14]以有机废水厌氧生物处理系统中的活性污泥为样本，研究了 BSA 对 PCR 扩增的影响。结果表明，通过条件优化，提高了图谱的分辨率和可读性，添加 BSA 前后形成的 SSCP 图谱条带的多样性基本不变，但加 BSA 后的条带更加清晰，可读性更强。本实验也证明了在森林土壤微生物群落多样性研究的样品 PCR 扩增时，添加适量 BSA 有助于降低样品中残留腐殖酸等的抑制作用，使 PCR 结果更加显著，是一种可尝试的优化手段。当然影响 PCR 扩增的因素还有很多，试剂的浓度、反应的条件及实验步骤的优化均有可能影响到实验的最终结果。

关于如何快速有效地提取土壤中的总 DNA，并适合后续的 PCR 扩增反应的研究很多[11,15-17]。而根据不同的土壤类型及森林类型，方法各异。近年，基于 PCR 技术的分子生物学方法已大量地应用于土壤微生物多样性研究，因此选择合适的 DNA 提取方法，把 PCR 反应体系中各因子优化到最佳浓度，并把 BSA 合理地运用到土壤微生物 PCR 反应体系中成为了整个土壤微生物实验的关键。

参考文献

[1] Yu Z,Morrison M.Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR- denaturing gradient gel electrophoresis[J].Applied and Environmental Microbiology, 2004,70(8):4800–4806.

[2] 李丹,王秋玉.变性梯度凝胶电泳及其在土壤微生物生态学中的应用[J].中国农学通报,2011,7(3):6–9.

[3] 刘国华,叶正芳,吴为中.土壤微生物群落多样性解析法:从培养到非培养[J].生态学报,2012,32(14):4421–4433.

[4] 徐晓宇,闵航,刘和,等.土壤微生物总 DNA 提取方法的比较[J].农业生物技术学报,2005,13(3):377–381.

[5] Tebbe C C,Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast[J].Applied and Environmental Microbiology,1993, 59(8):2657–2665.

[6] Steffan R J,Atlas R M.DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples[J].Applied and Environmental Microbiology,1988,54(9):2185–2191.

[7] 芦晓飞.西藏高寒草甸土壤微生物及功能基因多样性研究[D].北京:中国农业科学院,2009.

[8] 芦晓飞,赵志祥,谢丙炎,等.西藏米拉山高寒草甸土壤微生物 DNA 提取及宏基因组 Fosmid 文库构建[J].应用与环境生物学报,2009,15(6):824–829.

[9] Al-Soud W A,Radstrom P.Purification and characterization of PCR inhibitory components in blood cells[J]. Journal of clinical microbiology,2001,39(2):485–493.

[10] Forbes B A, Hicks K E. Substances interfering with direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by PCR: effects of bovine serum albumin[J]. Journal of clinical microbiology,1996,34(9):2125–2128.

[11] 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.

[12] 赵霞,沈孝清,黄世能,等.冰雪灾害对杨东山十二度水自然保护区木本植物机械损伤的初步调查[J].林业科学,2008,44(11):164–167.

[13] 边才苗,李钧敏,金则,等.牛血清白蛋白在植物 RAPD 分析中的作用[J].遗传,2002,24(3):279–282.

[14] 鲍立新,李建政,赵焱,等.厌氧活性污泥微生物群落的 SSCP 分析条件优化[J].科技导报,2008,26(2):28–32.

[15] 金海林,金东淳,李颖,等.土壤微生物 3 种 DNA 提取方法的比较[J].延边大学农学学报,2010,32(1): 59–61,68.

[16] 胡磊,杨广,尤民生,等.茶园土壤微生物总 DNA 不同提取方法的比较[J].基因组学与应用生物学,2010,29(2): 361–368.

[17] 孙海明,朱梅,郭宇南,等.不同土壤微生物 DNA 提取方法比较[J].北华大学学报:自然科学版,2011,12(5):550– 552.