

不同提取缓冲液对红树林土壤 DNA 提取品质的影响*

蒋云霞¹, 郑天凌^{2,3}

1. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院环境卫生学系, 广东 广州 510515; 2. 厦门大学生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005

摘要: 针对 1 种典型的酸性、高有机质含量类型土壤——红树林土壤, 从 DNA 产量、DNA 纯度、土壤腐殖酸类物质的提取量以及 DNA 提取物 PCR(polymerase chain reaction)扩增反应的敏感度等方面比较了不同提取缓冲液对土壤 DNA 品质的影响。结果表明, 酸性 SDS (sodium dodecyl sulfate)提取缓冲液所获得的土壤 DNA 产量及纯度均较低; PVP (polyvinylpyrrolidone)提取缓冲液所获得的土壤 DNA 产量较高, 但土壤腐殖酸类物质的提取量亦远高于其他提取缓冲液; 酸性 SDS 提取缓冲液及 PVP 提取缓冲液所获得的土壤 DNA 提取物即使稀释到 10^{-3} 量级亦不能获得目的基因 PCR 扩增条带。PVPP (polyvinylpolypyrrolidone)提取缓冲液及 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)+PVPP 提取缓冲液所获得的土壤 DNA 产量较 PVP 提取缓冲液低, 但其纯度较高, 并且其纯度随提取缓冲液中 PVPP 浓度的升高而提高; 当 2% PVPP 提取缓冲液及 CTAB+PVPP 提取缓冲液所获得的土壤 DNA 提取物分别稀释到 10^{-2} 及 10^{-1} 量级时, 均能获得 PCR 扩增条带。综上所述, 酸性提取缓冲液及 PVP 提取缓冲液不适用于酸性、高有机质含量类型土壤 DNA 的提取, 而 2% PVPP 提取缓冲液及 CTAB+PVPP 提取缓冲液均能提高此类土壤 DNA 的提取品质。

关键词: 红树林土壤; DNA 提取; DNA 产量; 腐殖酸; 提取缓冲液

中图分类号: P714.4 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2011)02-0087-07

Evaluation of different extraction buffers on the quality of mangrove soil DNA

JIANG Yun-xia¹, ZHENG Tian-ling^{2,3}

1. Department of Environmental Health, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Ministry of Education of Key Laboratory for Coast and Wetland Ecosystem, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. State Key Laboratory for Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: The authors compared the influence of six different extraction buffers on DNA yields, DNA purity, co-extracted humic compound yields, and their PCR (polymerase chain reaction) sensitivity from a typical acidic and high organic content soil type, mangrove soil. Results showed that the quality of the soil DNA obtained using the acidic SDS (sodium dodecyl sulfate) buffer was poor. The DNA yields obtained using the PVP (polyvinylpyrrolidone) buffer were higher than the other buffers, whereas the co-extracted humic compound yields were significantly higher. PCR results showed that no expected bands were obtained even in 1:1000 dilutions of the DNA extracts obtained using the acidic SDS buffer or PVP buffer. On the other hand, although the PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) buffer and the CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) and PVPP buffer resulted in a lower DNA yield, the purity of the soil DNA was improved. In addition, the purity was improved as the concentration of PVPP in the buffer increased. Moreover, PCR amplification was successfully conducted in the 1:10 dilutions of the DNA extracts obtained using the CTAB and PVPP buffer and in the 1:100 dilutions of DNA extracts obtained using the 2% PVPP buffer, respectively. In conclusion, acidic SDS buffer and PVP buffer were not suitable for extracting DNA from the

收稿日期: 2010-03-25; 修订日期: 2010-05-19. 蔡卓平编辑

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2008AA09Z408); 国家自然科学基金项目(40930847、30930017、30940002); 深港创新圈项目(08Lh-04); 南方医科大学公共卫生与热带医学学院院长基金项目(GW200801-039)

作者简介: 蒋云霞(1973—), 女, 湖北省武汉市人, 讲师, 博士, 主要从事环境微生物研究。E-mail: jiangyuxia@yahoo.com.cn

通信作者: 郑天凌(1955—), 男, 福建省厦门市人, 教授, 博士生导师, 主要从事环境微生物研究。E-mail: wshwzh@xmu.edu.cn

*感谢厦门大学生命科学学院王文卿老师在红树林土壤样品采集方面给予的帮助。

acidic and high organic content soil type; however, 2% PVPP buffer and CTAB and PVPP buffer improved the DNA quality.

Key words: microbial diversity; DNA extraction; DNA yield; humic compound; extraction buffer

近年来, 基于 DNA 分析的各种分子生物学技术, 如变性梯度凝胶电泳技术(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、末端限制性片段长度多态性技术(terminal-restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、rRNA 基因间隔区序列分析技术(automated rRNA intergenic spacer analysis, ARISA)等已经被广泛应用于土壤环境微生物多样性研究中^[1-4]。运用该类方法进行微生物多样性研究的前提是获得高品质环境 DNA, 否则 DNA 提取过程中所存在的偏差将直接导致微生物多样性研究结果出现偏差^[5]。迄今为止, 大量文献报道了各种土壤 DNA 提取方法的有效性^[6]; 然而, 土壤 DNA 提取时却仍然存在腐殖酸、腐殖酸类等大量高分子量抑制物的共提取问题^[7]。

土壤 DNA 提取过程中所选用的缓冲液对 DNA 产量、DNA 纯度以及基于该 DNA 所产生的土壤微生物群落结构的分析结果均有一定影响^[8]。因此, 了解不同 DNA 提取缓冲液对土壤 DNA 品质的影响, 对于进行土壤环境中微生物的多样性分析具有重要意义。现阶段, 酸性、高有机质含量类型土壤被认为是较难获得高品质 DNA 的土壤类型^[9]。为此, 本研究拟以 1 种典型的酸性、高有机质含量土壤——红树林土壤为样品, 从 DNA 产量、DNA 纯度、土壤腐殖酸类物质的提取量以及 PCR 扩增反应的有效性等方面比较不同提取缓冲液对土壤 DNA 品质的影响, 以期对环境基因组学相关研究中理想 DNA 提取方案的制订提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 土壤样品

红树林土壤样品采集于福建省云霄县东厦镇境内的国家级红树林湿地自然保护区白骨壤林内, 采样时间为 2005 年 10 月 19 日。退潮后, 在采样点(23°58'N, 117°27'E)设置 1m×1m 的样方, 除去表面约 1cm 厚的薄层, 用专用采泥器钻取 1—20cm 层次的土壤样品, 拣去根系后装入做好标记的灭菌塑料袋中, 随冰块带回实验室分析。剩余样品于-80℃保存。所有采样器具均事先经灭菌处理。土壤样品的理化参数: pH 值为 6.33±0.02, 盐度为(18.63±0.27)‰, 有机质含量为(5.47±0.06)%。

1.2 土壤 DNA 提取缓冲液

6 种土壤 DNA 提取缓冲液如下。1)酸性 SDS 缓冲液^[10]: 140mmol·L⁻¹ NaCl, 50mmol·L⁻¹ NaAc, SDS (SDS 终浓度为 0.5%、1%、2%), pH 5.1; 2)1% PVP 缓冲液: 100mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 100mmol·L⁻¹ EDTA·Na₂, 100mmol·L⁻¹ Na₃PO₄, 200mmol·L⁻¹ NaCl, PVP (物质的量与溶液体积比 1%), SDS (SDS 终浓度为 0.5%、1%、2%), pH 8.0; 3)2% PVP 缓冲液: 100mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 100mmol·L⁻¹ EDTA·Na₂, 100mmol·L⁻¹ Na₃PO₄, 200mmol·L⁻¹ NaCl, PVP (物质的量与溶液体积比 2%), SDS (SDS 终浓度为 0.5%、1%、2%), pH 8.0; 4)1% PVPP 缓冲液: 100mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 100mmol·L⁻¹ EDTA·Na₂, 100mmol·L⁻¹ Na₃PO₄, 200mmol·L⁻¹ NaCl, PVPP (物质的量与溶液体积比 1%), SDS (SDS 终浓度为 0.5%、1%、2%), pH 8.0; 5)2% PVPP 缓冲液: 100mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 100mmol·L⁻¹ EDTA·Na₂, 100mmol·L⁻¹ Na₃PO₄, 200mmol·L⁻¹ NaCl, PVPP (物质的量与溶液体积比 2%), SDS (SDS 终浓度为 0.5%、1%、2%), pH 8.0; 6) CTAB+PVPP 缓冲液: 100mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 100mmol·L⁻¹ EDTA·Na₂, 100mmol·L⁻¹ Na₃PO₄, 1500mmol·L⁻¹ NaCl, 1%CTAB, 2%PVPP, SDS (SDS 终浓度为 0.5%、1%、2%), pH 8.0。

1.3 土壤 DNA 的提取

在超净工作台中, 精确称取红树林土壤样品 24 份, 每份 5g, 分别置于 24 个 50mL 无菌离心管中(其中 12 管土壤样品经湿热蒸汽灭菌 50min); 每管加入 13.5mL 上述提取缓冲液, 剧烈旋转 5min 后, 于摇床中继续水平振荡(37℃, 225r·min⁻¹)45min; 每管加入适量 20%(物质的量与溶液体积比)SDS, 使其终浓度分别为 0.5%、1%、2%。相同 SDS 浓度设置 4 管, 置于 65℃ 水浴裂解, 于裂解后的 1h、2h、3h 和 4h 分别对土壤样品进行后续处理。室温下, 将裂解后土壤样品离心(8216r·min⁻¹, 15min), 吸出上层水相置新的离心管, 加入预冷的氯仿和异戊醇体积比为 24:1 的溶液, 抽提、离心(室温, 8216r·min⁻¹, 15min), 吸出上层水相置新的离心管, 加入 0.6 倍体积预冷的异丙醇, 于室温下静置沉淀 1h 后, 离心(10000r·min⁻¹, 20min), 收集沉淀; 沉淀用预冷 70%(体积比)乙醇清洗 2 次, 溶解于 TE 缓冲液(10mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1mmol·L⁻¹ EDTA·Na₂, pH 8.0)。

1.4 土壤 DNA 品质检测

利用 UN-SCAN IT Software (Silk Scientific, Orem, UT, USA) 软件分析 DNA 粗提物的琼脂糖凝胶电泳图谱以获得不同提取缓冲液的土壤 DNA 产量。土壤 DNA 提取物的纯度以吸光度比值表示, 测定提取物在 230、260、280nm 处的 OD 值(UV310, Thermo Fisher Scientific, America), 并计算 OD_{260} 与 OD_{280} 的比值以及 OD_{260} 与 OD_{230} 的比值。由于腐殖酸类物质在 260nm 也呈现紫外吸收性质^[11], 以灭菌土壤所得提取物的 OD_{260} 值对各提取缓冲液中土壤腐殖酸类物质进行定量分析。

1.5 PCR 反应

采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCC-TGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTAC-GACTT-3')^[12] 对未经稀释和稀释后的土壤 DNA 提取物(以 SDS 浓度为 2% 时 6 种提取缓冲液所获得的土壤 DNA 为样本)进行细菌 16S rDNA 基因片段的 PCR 扩增反应, 以检测土壤 DNA 提取物 PCR 反应的敏感性。反应体系为 10 μ L 模板 DNA, 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液 (TaKaRa), 1 μ L dNTP (10mmol) 混合物 (TaKaRa), 1 μ L 引物 (10pmol, Invitrogen), 2 单位 Taq 酶 (TaKaRa), 2 μ L $MgCl_2$ (50mmol), 5 μ L 牛血清白蛋白 (BSA, 1mg \cdot mL⁻¹, Promega), 用经灭菌的去离子水将最终反应体系补足至 50 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 预变性 5min, 然后进行 30 个循环反应(变性 94 $^{\circ}$ C, 1min、退火 55 $^{\circ}$ C, 1min 及延伸 72 $^{\circ}$ C, 1min), 以最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min 结束反应。PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 统计学分析

所有实验至少重复 3 次以验证实验结果的可靠性。采用 SAS 软件对实验结果进行统计学分析, 实验结果表示为平均数 \pm 标准差, 采用最小显著差数

检验方法(the least significant difference, LSD)进行不同缓冲液组间比较, 以 $P \leq 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 提取缓冲液对红树林土壤 DNA 产量的影响

6 种提取缓冲液均能获得红树林土壤 DNA, 不同提取缓冲液所获得的土壤 DNA 产量各异。同种缓冲液, 土壤 DNA 产量随提取缓冲液中 SDS 浓度的升高而增加, 并随 65 $^{\circ}$ C 条件下水浴裂解时间的延长而逐渐增加(在此仅显示 1%PVPP 提取缓冲液所获得的土壤 DNA 的产量结果, 见图 1)。当缓冲液中 SDS 浓度及 65 $^{\circ}$ C 水浴裂解时间相同时, 各提取缓冲液所获得土壤 DNA 产量的高低依次为 2%PVP 提取缓冲液>1%PVP 提取缓冲液>1%PVPP 提取缓冲液>2%PVPP 提取缓冲液>1%CTAB+2%PVPP 提取缓冲液>酸性提取缓冲液(在此仅显示 SDS 浓度为 1%、裂解时间为 4h 时 6 种提取缓冲液所获得的土壤 DNA 产量, 见图 2)。2% PVP 提取缓冲液所得

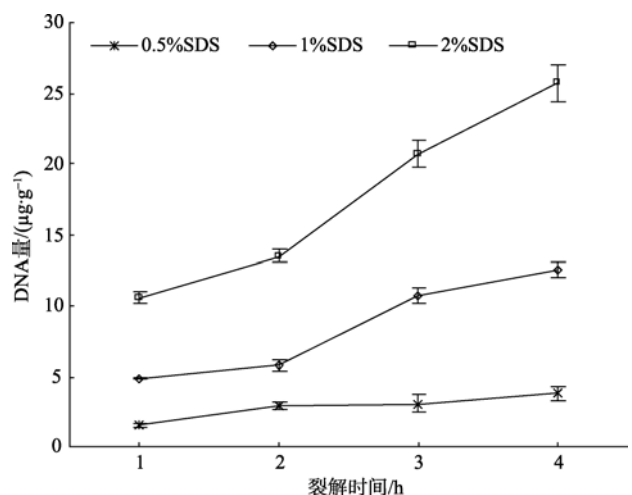


图 1 1%PVPP 提取缓冲液所获得的土壤 DNA 产量
Fig. 1 Soil DNA yields obtained from 1% PVPP buffer

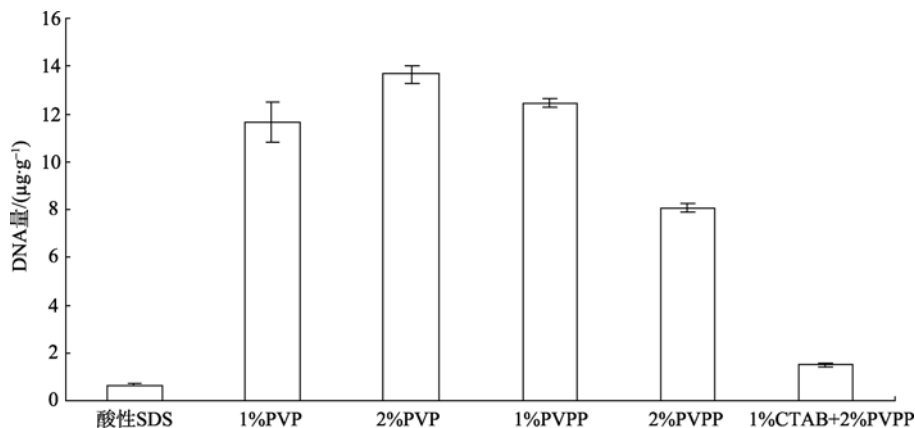


图 2 6 种提取缓冲液所获得的土壤 DNA 产量

Fig. 2 Soil DNA yields obtained from six DNA extraction buffers

DNA 产量显著高于 1%CTAB+2%PVPP 提取缓冲液及酸性提取缓冲液所得 DNA 产量($P<0.05$); 并且高于 1%PVP 提取缓冲液所得 DNA 产量, 但差异不显著($P>0.05$)。

2.2 提取缓冲液对土壤腐殖酸类物质提取量的影响

6 种提取缓冲液所得土壤腐殖酸类物质的量各不相同, 每种提取缓冲液对抑制性物质的提取量均随提取缓冲液中 SDS 浓度的升高而增加(图 3)。提取缓冲液中 SDS 浓度相同时, 2%PVP 提取缓冲

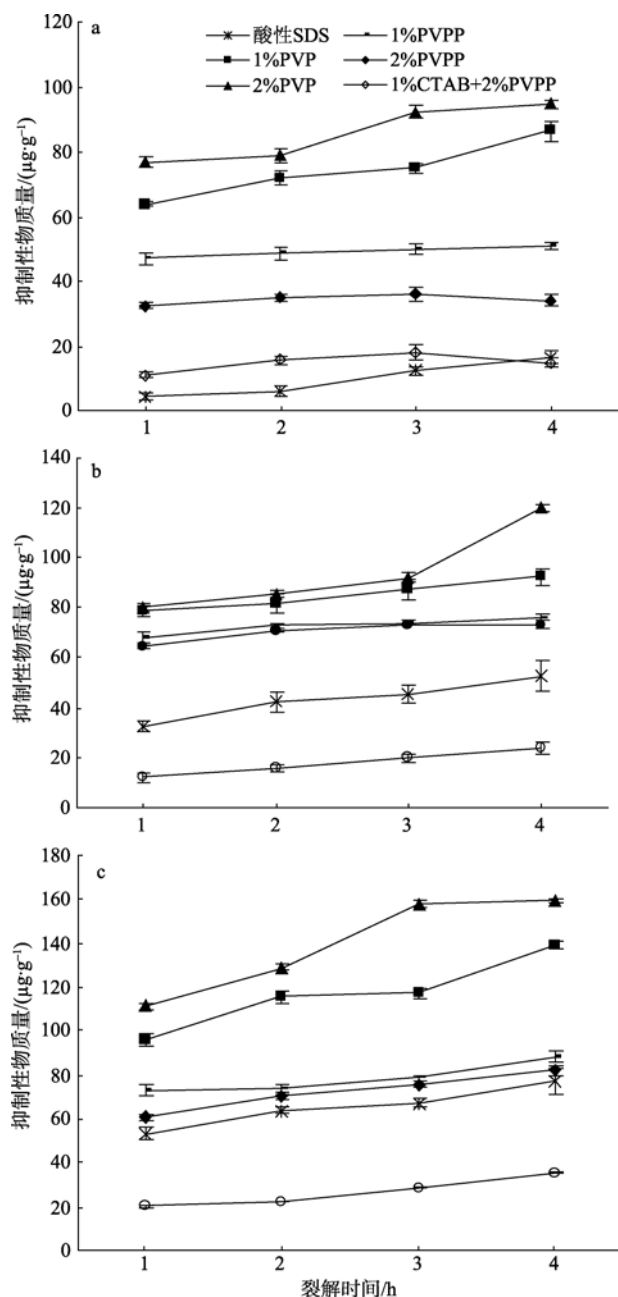


图 3 6 种提取缓冲液所得土壤抑制性提取物的产量

a. 缓冲液中 SDS 的最终浓度为 0.5%; b. 缓冲液中 SDS 的最终浓度为 1%; c. 缓冲液中 SDS 的最终浓度为 2%

Fig. 3 Humic compound yields obtained from six DNA extraction buffers

液所得到的抑制性物质的提取量均为最高。65℃水浴裂解时间的长短对抑制性物质的提取量也有一定的影响。SDS 浓度为 0.5% 时, 2%PVPP 提取缓冲液和 1%CTAB+2%PVPP 提取缓冲液所得抑制性物质的提取量随裂解时间的延长表现为先增加后减少的规律, 前 3h 内, 抑制性物质的提取量分别从 $(32.57\pm0.89)\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $(11.11\pm0.77)\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加至 $(36.10\pm2.24)\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $(17.94\pm2.17)\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 裂解时间延长至 4h 时, 抑制性物质的提取量分别下降为 $(34.15\pm1.82)\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $(14.94\pm1.49)\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 而其他 4 种提取缓冲液所得抑制性物质的提取量均随裂解时间的延长而增加。在裂解时间为 1h、2h 和 3h 时, 酸性 SDS 提取缓冲液所得抑制性提取物的量最低, 分别为 (4.49 ± 0.94) 、 (6.11 ± 1.54) 、 $(12.35\pm1.12)\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 当裂解时间为 4h 时, 1%CTAB+2%PVPP 提取缓冲液所得抑制性物质的提取量最低, 为 $(14.94\pm1.49)\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。当 SDS 浓度为 1% 及 2% 时, 6 种提取缓冲液所得抑制性物质的提取量均随裂解时间的延长而增加。从图 3 可看出, 抑制性物质的提取量随提取缓冲液中 PVP 浓度的升高而增加, 随 PVPP 浓度的升高逐渐减少。

2.3 提取缓冲液对红树林土壤 DNA 纯度的影响

对于同种提取缓冲液, 溶液中 SDS 浓度及 65℃水浴裂解时间的长短对 DNA 粗提物 OD 比值几乎没影响。SDS 浓度为 2%、裂解时间为 4h 时, 6 种提取缓冲液中所得到 DNA 粗提物的 OD 比值见图 4。由图 4 可知, 1%CTAB+2%PVPP 提取缓冲液所得土壤 DNA 粗提物的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 及 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 均为

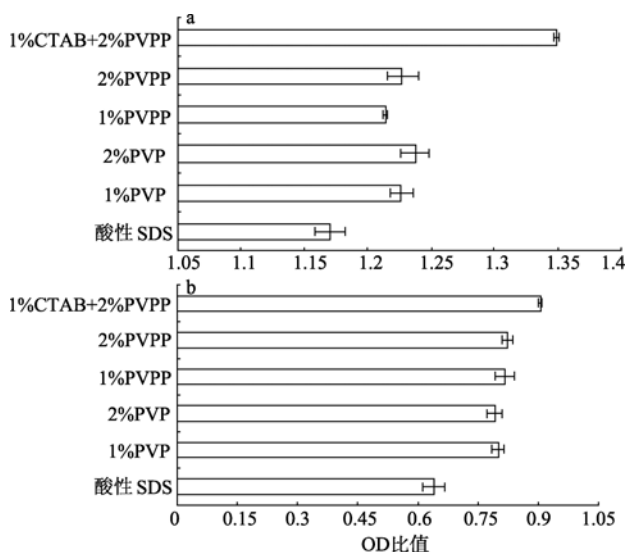


图 4 不同提取缓冲液所得土壤 DNA 粗提物的 OD 比值

a. $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$; b. $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$

Fig. 4 OD ratios of soil DNA extracts obtained from six DNA extraction buffers

最高;相反,酸性 SDS 提取缓冲液所得土壤 DNA 粗提物的 OD 比值最低。PVP 提取缓冲液所得 DNA 粗提物的 OD_{260}/OD_{280} 值较 PVPP 提取缓冲液的高,然而, OD_{260}/OD_{230} 值较 PVPP 提取缓冲液的低。

2.4 不同提取缓冲液所得土壤 DNA 粗提物的 PCR 反应
未经稀释的 6 种提取缓冲液所得土壤 DNA 粗提物均不能获得细菌 16S rDNA 基因片段 PCR 产物(图 5a—f, 泳道 1)。酸性提取缓冲液及 PVP 提取缓

冲液所获得的红树林土壤 DNA 即使稀释到 10^{-3} 量级,亦无扩增信号(图 5a—c, 泳道 2—4); 1% PVPP 提取缓冲液所得土壤 DNA 提取物稀释到 10^{-2} 和 10^{-3} 量级,有微弱 PCR 反应信号(图 5d, 泳道 3—4);而 2%PVPP 提取缓冲液以及 CTAB+PVPP 提取缓冲液所得土壤 DNA 的稀释物获得了较强的细菌 16S rDNA 基因片段 PCR 扩增条带(图 5e, 泳道 3—4; 图 5f, 泳道 2)。

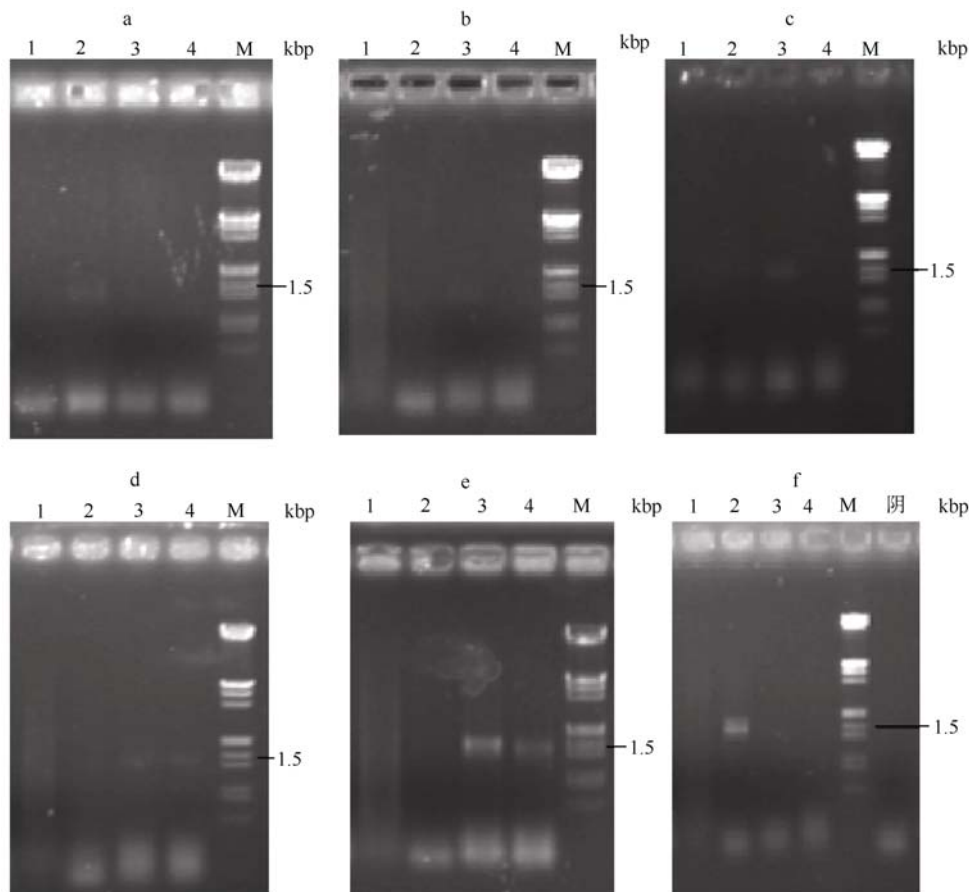


图 5 不同提取缓冲液所得土壤 DNA 粗提物的 PCR 结果

a. 酸性 SDS 提取缓冲液; b. 1%PVP 提取缓冲液; c. 2%PVP 提取缓冲液; d. 1%PVPP 提取缓冲液; e. 2%PVPP 提取缓冲液; f. 1%CTAB & 2%PVPP 提取缓冲液。阴: 阴性对照; M: λ -EcoRI + λ -HindIII marker

Fig. 5 Results of PCR amplification of bacterial 16S rDNA regions of DNA extracts obtained from different DNA extraction buffers

3 讨论

3.1 土壤 DNA 提取缓冲液组分及酸碱度的设置

土壤 DNA 提取缓冲液组分的设置基于以下几个方面综合考虑: 1)尽可能驱散土壤颗粒于溶液中, 提高微生物被裂解的可能性; 2)为已经裂解释放的 DNA 片段提供缓冲体系, 防止裸露 DNA 被微生物细胞所释放的核酸酶降解; 3)阻止已裂解的裸露 DNA 重新吸附于土壤颗粒^[13]。Tris-HCl 能提供缓冲体系, 防止 DNA 变性和水解; EDTA 能络合二价金

属离子, 避免 DNA 的降解。Krssek 等^[14]证实, 提取缓冲液中高浓度的 Tris 及 EDTA 有利于提高 DNA 的产量。本研究未探讨 Tris 及 EDTA 的浓度, 而是将它们的浓度均设定为 $100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Volossiuk 等^[10]认为, 碱性条件下腐殖酸等杂质更容易被共提取, 为此建议提取土壤 DNA 时, 宜采用酸性 SDS 提取缓冲液, 以简化土壤 DNA 粗提物的纯化过程。然而, 本研究中将 Volossiuk 等提出的酸性 SDS 提取缓冲液应用于酸性的红树林土壤时, 并没显示其优势性。酸性 SDS 提取缓冲液所获

得土壤 DNA 产量低, 且 DNA 提取物的 OD_{260}/OD_{280} 及 OD_{260}/OD_{230} 最低。从提取物的 PCR 扩增结果分析, 相同条件下, 酸性提取缓冲液所获得的红树林土壤 DNA 粗提物不存在目的基因的扩增信号。现有研究表明, 提取红树林土壤 DNA 时, 酸性提取缓冲液并不能提高 DNA 的品质, 这与 Volossiuk 等的研究结果相反, 这有可能是土壤样本的性质不同所致。

3.2 土壤 DNA 提取缓冲液中 PVP、PVPP、CTAB 对 DNA 品质的影响

土壤 DNA 的提取过程中, PVP、PVPP 及 CTAB 常被用于去除腐殖酸、酚类物质、蛋白质、多糖等杂质^[1,15-17]。本研究结果表明, PVPP 提取缓冲液所获得的土壤 DNA 产量随 PVPP 浓度的增加有所减少; 同时, 所得的抑制性提取物产量也降低, 但 DNA 纯度却随 PVPP 浓度的增加而提高。此结果与 Zhou 等^[16]的研究结果一致, 他们的研究表明, 提取缓冲液中含 PVPP 时, 土壤 DNA 产量会轻微下降, 但 DNA 提取物的 OD_{260}/OD_{280} 及 OD_{260}/OD_{230} 比值升高。Steffan 等^[18]报道, 应用 PVPP 纯化土壤 DNA 并不造成 DNA 产量的损失, 同时 DNA 提取物的 OD_{260}/OD_{280} 及 OD_{260}/OD_{230} 比值升高。Steffan 等是将 PVPP 直接与土壤裂解液作用, 并不是将之应用于提取缓冲液中, 而本研究是将 PVPP 加入到提取缓冲液中, 因此, 现有研究结果与 Steffan 等^[18]的研究结果并不矛盾。1%CTAB+2%PVPP 提取缓冲液所获得的土壤 DNA 产量低于 2%PVPP 缓冲液, 其原因是可能是缓冲液中 NaCl 浓度不同。由于 CTAB 的使用往往需要高盐环境, 1%CTAB+2%PVPP 提取缓冲液中 NaCl 浓度设置为 $1500\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而 PVPP 的使用并不需要高盐环境, 因此, 2%PVPP 提取缓冲液中 NaCl 浓度设置为 $200\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

PVP 和 PVPP 所含的酰胺基具有较强的结合多酚化合物酚羟基的能力, 均可与腐殖酸类物质形成稳定的复合物^[19-20]。本研究结果表明, 提取缓冲液中 PVPP 用量增加能降低抑制性物质的共提取量。然而, PVP 用量增加却导致抑制性物质的共提取量增加, 其原因是在土壤与提取缓冲液的复杂体系中,

PVPP 与腐殖酸类杂质形成的复合物是非水溶性的, 经匀质化过程后, 这些复合物将在随后的离心过程中随裂解后的红树林土壤一起沉淀, 从而使得含 DNA 的上清液中腐殖酸类物质含量减少, 最终降低了抑制性物质的共提取量。相反, PVP 与腐殖酸等杂质形成的复合物是水溶性的, 离心后, 将分配于上清液中, 并与上清液中的 DNA 共沉淀而导致 DNA 粗提物中抑制性物质共提取量增加。

土壤或沉积物 DNA 提取物中所存在的腐殖酸类杂质可抑制 Taq DNA 聚合酶的活性, 因此, 土壤 DNA 粗提物 PCR 扩增反应信号的强弱可指示其纯度的高低程度^[21-23]。PVP 提取缓冲液所获得的红树林土壤 DNA 即使稀释到 10^{-3} 量级, 亦无扩增信号, 进一步表明土壤 DNA 的提取缓冲液中不宜设置 PVP 组分; 而 2%PVPP 提取缓冲液以及 CTAB+PVPP 提取缓冲液所得土壤 DNA 的稀释物能产生较强的 PCR 扩增条带, 表明 PVPP 和 CTAB 在提取缓冲液中能提升土壤 DNA 的品质, 减轻其后期纯化负荷。

3.3 本研究结果对土壤洗脱缓冲液组分设置的启示

在不研究胞外 DNA 的前提下, 先洗涤土壤再提取 DNA 是提高土壤 DNA 品质的有效方法^[24]。依据 PVP 与腐殖酸等杂质的结合物归于水相的特征, 将 PVP 应用于洗脱缓冲液, 先洗涤土壤, 再进行 DNA 的提取应当具有提升 DNA 品质的作用。综合分析 DNA 产量、土壤腐殖酸类物质提取量以及 DNA 提取物 PCR 扩增反应结果可发现, 酸性提取缓冲液及 PVP 提取缓冲液不适用于酸性、高有机质含量类型土壤 DNA 的提取, 而 2% PVPP 提取缓冲液及 CTAB+PVPP 提取缓冲液能提高此类土壤 DNA 的提取品质。不同提取缓冲液对土壤微生物群落结构的影响有待进一步研究。

4 结论

酸性缓冲液及 PVP 缓冲液不适用于红树林土壤 DNA 的提取, 而 2%PVPP 提取缓冲液及 CTAB+PVPP 提取缓冲液均能提高红树林土壤 DNA 的提取品质。

参考文献

- [1] SHEU C, WU C Y, CHEN S C, et al. Extraction of DNA from soil for analysis of bacterial diversity in transgenic and nontransgenic papaya sites[J]. J Agr Food Chem, 2008, 56(24): 11969-11975.
- [2] CAMPBELL J H, CLARK J S, ZAK J C. PCR-DGGE comparison of bacterial community structure in fresh and archived soils sampled along a Chihuahuan Desert elevational gradient[J]. Microbial Ecology, 2009, 57(2): 261-266.

- [3] ROBINSON C H, SZARO T M, IZZO A D, et al. Spatial distribution of fungal communities in a coastal grassland soil [J]. *Soil Biol Biochem*, 2009, 41: 414-416.
- [4] THAKURIA D, SCHMIDT O, SIURTAİN M M, et al. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses[J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, 40(6): 1390-1403.
- [5] MILLER D N, BRYANT J E, MADSEN E L, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(11): 4715-4724.
- [6] ROBE P, NALIN R, CAPELLANO C, et al. Extraction of DNA from soil[J]. *Eur J Soil Biol*, 2003, 39(4): 183-190.
- [7] SAGOVA M, CERMAK M, NOVOTNA L. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(9): 2902-2907.
- [8] THAKURIA D, SCHMIDT O, MAC SIÚRTÁIN M, et al. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses[J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, 40(6): 1390-1403.
- [9] HE J, XUA Z, HUGHES J. Pre-lysis washing improves DNA extraction from a forest soil[J]. *Soil Biol Biochem*, 2005, 37(12): 2337-2341.
- [10] VOLOSSIOUK T, ROBB E J, NAZAR R N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(11): 3972-3976.
- [11] ZIPPER H, BUTA C, LAMMLE K. Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(7): 39.
- [12] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89(12): 5685-5689.
- [13] PICARD C, PONSONNET C, PAGET E, et al. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(9): 2717-2722.
- [14] KRSEK M, WELLINGTON E M H. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil[J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 39(1): 1-16.
- [15] ZHOU J, BRUNS M A, TIEDJE J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 316-322.
- [16] HOLBEN W E, JANSSON J K, CHELM B K. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(3): 703-711.
- [17] ORSINI M, ROMANO-SPICA V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 33(1): 17-20.
- [18] STEFFAN R J, GOKSOYR J, BEJ A K, et al. Recovery of DNA from soils and sediments[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(12): 2908-2915.
- [19] LOOMIS W D, BATTAILE J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes[J]. *Phytochemistry*, 1966, 5: 423-428.
- [20] MALIYAKAL J D. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(9): 2381.
- [21] TSAI Y L, OLSON B H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(2): 2292-2295.
- [22] 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 yeast[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(8): 2657-2665.
- [23] DONG DEXIAN, YAN AN, LIU HAIMING, et al. Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate[J]. *J Microbiol Methods*, 2006, 66(2): 217-222.
- [24] FORTIN N, BEAUMIER D, LEE K, et al. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments[J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 56(2): 181-191.