

土壤 DNA 提取的解决专家

简介

土壤样品含有大量的微生物，其中绝大部分的微生物都是无法直接培养进行繁殖和研究。从土壤样品中提取 DNA 是研究土壤微生物最为有效的方法。目前从土壤样品中提取微生物 DNA 的方法主要有直接法和间接法。直接法是指把土壤样品放在裂解液中，经过有效的破壁方法使微生物的 DNA 全部释放到裂解液中，然后再进行分离提取，如 Zhou 的方法。间接法是指将土壤放在一种缓冲液中，如 Buffer PBS 等，把微生物从土壤中分离出来，然后再进行 DNA 的提取。间接法可大大降低土壤中腐殖酸，重金属盐对 DNA 提取带来的影响，但是这种方法会丢失许多微生物，得到的 DNA 并非土壤样品中的全基因组(宏基因组)，目前已经很少研究者会采用这种方法。从土壤样品中直接提取 DNA 可最大可能性地获得全基因组，但是这种方法却面临以下几个问题：

1. 腐殖酸的污染。土壤中，特别是森林，草地土壤含有非常丰富的腐殖酸。腐殖酸是一系列的有机物分子，部分腐殖酸同核酸分子非常类似，在纯化过程中非常难于去除。微量的腐殖酸污染都会导致下游应用，如 PCR，酶切的失败。
2. 裂解方法。土壤样品中含有各种微生物，如细菌和真菌等。革兰氏阳性细菌和真菌都含有非常厚的细菌壁，让这些微生物的细胞壁有效破裂是提取高产量宏基因组 DNA 的关键。由于土壤样品的复杂性，使用酶法(如溶菌酶，破壁酶，蜗牛酶)或液氮研磨都不可行，因为土壤中含有各种金属离子或抑制因子导致消化酶的活性失活，或土壤中的沙粒等会导致液氮研磨很难进行。
3. DNA 得率难于控制。土壤样品或因肥沃，或因贫瘠，或因含水量丰富，或因干枯，或因取样的深浅度，都会造成微生物数量和品种发生剧烈改变。在一个小范围的土壤样品 DNA 含量往往会差别成千上百倍。此外，某些土壤中含有的化学成分，如重金属盐，粘土物质都会造成 DNA 得率降低。

Magen 公司的 HiPure Soil DNA Kits 是目前土壤 DNA 提取最为优化的试剂盒。该试剂盒采用玻璃珠研磨法和热激化学破壁法，可不需特殊的珠磨机，在点动涡旋仪就可进行，适合于广大的研究室。试剂盒中 HTR Reagent 是 Magen 公司独家开发的腐殖酸吸附剂，能高效去除各种腐殖酸的污染。此外还采用无醇的硅胶柱纯化方式，可高效去除土壤中各种可溶性金属盐，以及其它可溶性的抑制因子。该试剂盒已经成功地提取如下土壤(部分是客户反馈)：自然保护区森林的土壤(长达 30-40 年森林土壤，表层有 30-50cm 落叶层)，红树林土壤，草地，耕地，海底泥，污泥，矿石区泥土，有机物污染的泥土，池塘泥，垃圾泥，空调管道堆积物等。

名称	组织用量	结合力	柱子大小
Soil DNA Mini Kit	500mg	50µg	1.5ml 柱
Soil DNA Midi Kit	10 g	100µg	15ml 柱

实验方法

为表明该试剂盒的优势性，我们选择以下不同组织样品进行 DNA 提取实验，每个样品重复 3 次。

- 森林类样品：自然保护区森林土壤(广东黑石顶自然保护区)和海南岛红树林保护区
- 矿石区样品：矿石区水底土壤(湿)和矿石区地表土壤(干)
- 耕地样品：稻田土壤，菜地土壤
- 有机物污染地表样品：污水沟衍泥和生活垃圾堆放区土壤

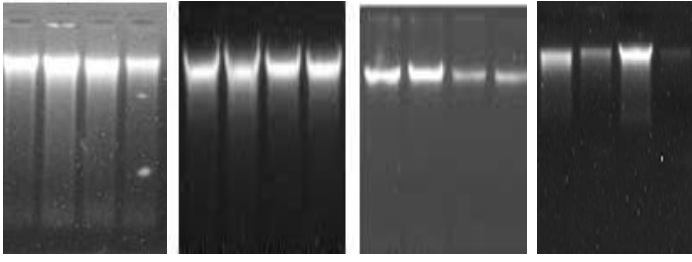
操作方法(按 Soil DNA Kit 试剂盒进行)简单描述以下：

1. 取▲ 0.5g 森林土壤/耕地土壤，或 ◆ 4g 矿石区土壤和有机物污染土壤至 15ml 离心管中；
2. 加入▲ 0.5g 酸洗玻璃珠，或 ◆ 4g 酸洗玻璃珠；
3. 加入▲ 1ml Buffer SXL Minus，或 ◆ 8 ml Buffer SXL Minus；
4. 立即在涡旋仪上最高速涡旋 3 分钟；
5. 转移至预热至 70°C 水浴锅中，水浴 10 分钟；
6. 加入▲ 0.34ml Buffer SP2，或 ◆ 2.6 ml Buffer SP2，涡旋混匀；
7. ▲ 10,000 x g 离心 5 分钟，或 ◆ 5,000 x g 离心 10 分钟；
8. 把上清液转称至新的 2ml/15ml 离心管中，加入 0.7 倍的异丙醇。(在处理矿石区样品时和有机物污染的样品中，还加入 133ul 糖原溶液)，涡旋混匀；
9. ▲ 10,000 x g 离心 5 分钟，或 ◆ 5,000 x g 离心 10 分钟沉淀收集 DNA；
10. 倒弃上清液，并反扣于吸水纸上 5 分钟；
11. 加入 200 ul Elution Buffer，涡旋 5 秒。65 度水浴 20-60 分钟，让 DNA 充分溶液；
12. 加入 50ul HTR,反应 2min 后，离心，取上清；
13. 上清加入 200ul Binding Buffer，均匀后上柱；
14. 加入 300ul Binding Buffer，洗涤一次；
15. 加入 700ul SPW Wash Buffer，洗涤两次；
16. 空甩后，加入适当量的 Elution Buffer 洗脱即可。

实验结果

1. DNA 电泳结果

取 10 ul 纯化的基因组 DNA 上样于 0.8%琼脂糖凝胶, 80V 电泳 30 分钟, 结果如下。

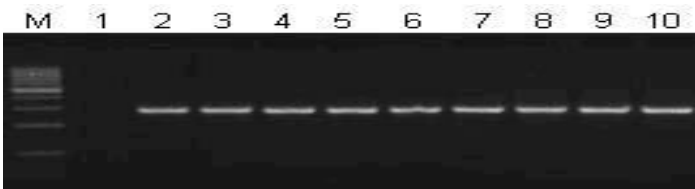


2. DNA 纯度和产量分析

土壤类型	A260	A280	A230	A320	A260/A280	产量 ug
6	0.1792	0.1041	0.1075	0.0207	1.7	9
7	0.2107	0.1195	0.1257	0.0178	1.8	11
4	0.1244	0.0730	0.0759	0.0159	1.7	6
5	0.1477	0.0855	0.0900	0.0236	1.7	7
2	0.2640	0.1739	0.2149	0.0685	1.5	11
3	0.2584	0.1521	0.1579	0.0354	1.7	12
8	0.0595	0.0390	0.0414	0.0121	1.5	3
1	0.0190	0.0121	0.0623	0.065	1.6	1

1. 红树林土壤, 2. 自然保护区森林土壤 3. 玉米土壤, 4. 水稻田土壤 5. 矿业区地表土壤(干), 6. 污水沟底泥, 7. 生活垃圾堆放地, 8. 矿业区水底土壤(湿), 9. 矿业区水底土壤(干)

3. PCR 结果分析



各种样品 DNA 作模板, 扩增细菌 16s 基因的电泳图

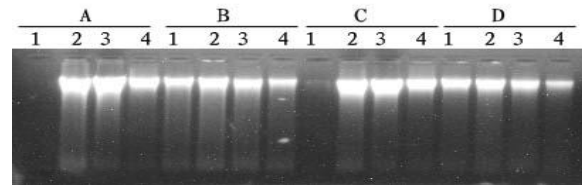
M. 100bp DNA Ladder, 1. 阴性对照 2. 红树林土壤, 3. 自然保护区森林土壤 4. 玉米土壤, 5. 水稻田土壤 6. 矿业区地表土壤(干), 7. 污水沟底泥, 8. 矿业区水底土壤(湿), 9. 矿业区水底土壤(干) 10. 阳性对照, 大肠杆菌 DH5a 基因组。

常见问题分析

1. 试剂盒是如何进行破壁的?

答: 该试剂盒采用高浓度 SDS 裂解液和珠磨法进行破壁。土壤中含有细菌和真菌, 以及其它微生物。大部分革兰氏阴性细菌在 SDS 裂解液中可快速发生裂解, 革兰氏阳性细菌和真菌是 SDS 裂解液中是不会裂解的。采用玻璃珠高速涡旋或使用珠磨仪可有效裂解细菌和真菌。此外, 试剂盒还进行热激(70°C 或 90-95°C)步骤, 以确保这些微生物的有效裂解。为了比较不同的破壁方法, 我们选择四种森林土壤(1,2,3,4), 然后采用不同的方法(A,B,C,D)进行破壁。结果如下。结果表明, 使用珠磨仪(A,C)匀浆能得到最高的产

量, 但 1 号样品因没有加热而得不到 DNA。使用手工涡旋和液氮研磨, 辅助加热都可以获得较高产量的 DNA。

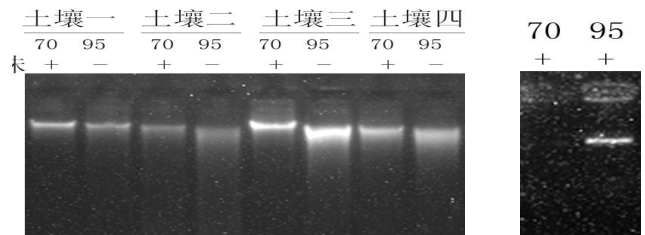


A: Fastprep-24 珠磨仪 C: 2000 Geno/Grinder 珠磨仪 (A,C 珠磨仪结束后, 没有加热步骤)

B: 用玻璃珠, 在点动涡旋仪上涡旋 3 分钟, 再 70°C 加热处理; D: 用液氮研磨, 再 70°C 加热处理。(1,2: 红树林土壤, 3,4: 森林土壤)

2. 加热过程对产量提高有多大? 是选择 70°C 还是 95°C 加热?

答: 加热过程对某些土壤是相当关键的。我们的实验表明, 某些土壤经高效珠磨仪 Fastprep-24 处理后, 70°C 处理 10 分钟可提高 3-4 倍的 DNA 产量。某些土壤对加热并不敏感。90-95°C 处理 10 分钟可提高 10-30% DNA 的产量, 对一些特别难裂解的细菌(如金黄色葡萄球菌), 95°C 热激非常重要。但是 95°C 处理会引起 DNA 的降解。我们建议需要检测难裂解细菌或真菌才进行 95°C 处理。



左图结果表明: 高温处理(95°C)可以提高产量, 但是会引起 DNA 的降解。右图表明, 在灭菌的土壤样品中接种金色葡萄球菌后, 只有 95°C 处理可能获得其 DNA。

3. 如何提高土壤 DNA 的产量?

答: 土壤样品中所含的微生物种类, 微生物的数量, 以及土壤样品中的有机, 无机盐都会直接影响到 DNA 的产量。如下几种方法可显著提高土壤中 DNA 提取的产量。

- 土壤中微生物含量低: 提高土壤用量至 1-2g。提高土壤用量时, 必须相应地提高 Buffer SLX Minus, Buffer DS 和 Buffer SP2 的用量, 第八步以后的用量就不需要增加。
- 土壤中存在 DNA 吸附物质: 加入脱脂奶粉。土壤样品因含有粘土, 硅胶盐等有机物, 这些有机物会吸附核酸而造成 DNA 产量过低。可以在 Buffer SLX Minus 中, 加入脱脂奶粉至 8-40mg/ml, 以减少对核酸的吸附。
- 土壤中含有重金属盐: 提高土壤用量至 2-5g。土壤中的某些可溶性的二价或三价金属盐会絮凝 DNA 而导致 DNA 的损失。举例来说, 在 DNA 溶液中, 加入 Al³⁺ 或 Zn²⁺ 等离子时, DNA 就会立即同这些金属离子结合形成不溶解的物质。处理该类型样品时, 可以在 Buffer SLX Minus 中加入特殊金属络合剂, 如 EGTA 等。(Buffer SLX Minus 中已含有高浓度的 EDTA)。或提高土壤用量。

4. 为什么 DNA 电泳拖尾严重？

答：这是由于 DNA 降解形成的。造成 DNA 降解的原因有如下几点：

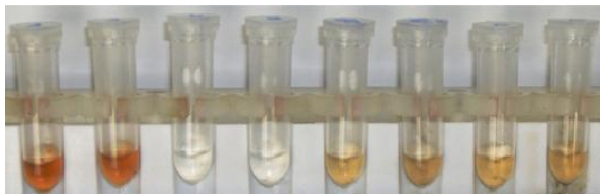
- 1) 土壤中含有丰富小型生物和易裂解的细菌。这些易裂解的小型生物和细菌在玻璃珠长时间涡旋中就会造成 DNA 降解。解决方案就是减少涡旋时间，或用高能量的珠磨仪代替手工涡旋。（高能量的珠磨仪能提供非常高的能量，在短时间就可以达到破壁效果，因而能减少 DNA 的降解）
- 2) 样品中存在某些化学物质，或样品在贮藏过程中发生降解。

5. 加入异丙醇沉淀时，为什么会形成一大堆沉淀？

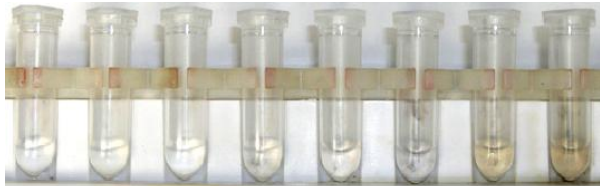
答：土壤样品含有各种无机或有机分子，其它大部分的无机分子，如金属盐都是水溶性的。加入异丙醇沉淀时，水溶性金属盐的溶解度下降就会析出形成沉淀物。处理矿石区的样品时常常会碰到这种现象。使用该试剂盒时可去除这些水溶性金属盐的污染。

6. HTR Reagent 去除腐殖酸的原理和效果？

答：HTR Reagent 是 pH 依赖性的腐殖酸吸附剂。该吸附剂在 pH8.0 的缓冲液中能高效特异性地吸附腐殖酸。HTR Reagent 吸附剂在 pH7.0 以下，也会吸附核酸 DNA。因此，DNA 必须采用 Elution Buffer 或 Buffer TE(pH8.0)来溶解。



(处理前)



(HTR Reagent 处理后)

由图可知，在 HTR Reagent 处理，粗制的土壤 DNA 中含有大量的腐殖酸的污染，颜色很深；HTR Reagent 处理后，DNA 的颜色消失了，表明腐殖酸已经被去除。

7. 该试剂盒还可以通过何种方法进行优化？

答：由于土壤样品百差万别，不同的土壤样品对预处理的方式都有不同的效果。试剂盒采用 SDS 裂解液和玻璃珠研磨对土壤样品进行裂解和预处理，这种方案可能对某些样品是没有效果。此时，用户可按自己的方案或其它方案对土壤的 DNA 进行粗提取，然后再按试剂盒的第 9 步，加入 HTR Reagent 吸附去除腐殖酸，过柱进一步纯化。

8. HTR Reagent 处理后，DNA 样品颜色还是很深？或使用该试剂盒得到的 DNA 还是有颜色的，怎么办？

答：这种样品往往是森林土壤，特别落叶层很厚的土壤。这种土壤因落叶的分解而积累丰富的腐殖酸。HTR Reagent 吸附腐殖酸有一定的饱和度，土壤样品用量过大或腐殖酸过多会有残留。可重复一次 HTR Reagent 的吸附步骤。

9. 该方法可以获得所有微生物的 DNA 吗？

答：不一定。土壤样品中含有大量的微生物，有细菌和真菌，以及其它植物根系，小型生物。某些真菌类，特别孢子类真菌，因带有非常厚的细胞壁，无法破壁而导致其 DNA 的丢失。若需要提取这些难提取微生物的 DNA 时，我们建议加强破壁的时间和强度。