

# 微生物超高分子量 DNA 提取方法

## Super-high Molecular Weight DNA Isolation

赵圣国<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 动物营养学国家重点实验，中国农业科学院北京畜牧兽医研究所院，北京

\*通讯作者邮箱: [zhaoshengguo@caas.cn](mailto:zhaoshengguo@caas.cn)

**摘要:** 随着三代测序的快速发展，对微生物超高分子量 DNA (SHMW-DNA) 的需求越来越多，三代测序有助于大大提高微生物基因组或宏基因组组装效率。目前，常用的商业试剂盒或液体试剂提取 DNA 的方法，受纯化膜或液体剪切力的影响，提取的 DNA 片段约 10-30 kb，无法满足 SHMW-DNA 的质量要求。本方法采用琼脂糖包埋法，通过胶内裂解和电泳洗脱回收方式，获得 SHMW-DNA，分子量达到 300 kb 以上，将为三代测序尤其是 nanopore 测序提供重要支撑<sup>[1]</sup>。

**关键词:** 微生物，超高分子量 DNA，提取，三代测序

### 材料与试剂

1. 透析袋 (MD34 (8000~14000 Da)，扁平宽度 10 mm)
2. 0.25  $\mu$ m 滤膜
3. 溶菌酶
4. 蛋白酶 K (冻干粉， $\geq 40$  units/mg protein)
5. MidRange PFG Marker I
6. Tris
7. EDTA
8. 苯甲基磺酰氟
9. N-月桂酰肌氨酸钠
10. 脱氧胆酸钠
11. 硼酸
12. 冰乙酸
13. 聚乙二醇 8000

## 14. 低熔点琼脂糖

### 仪器设备

1. 模具 (长 × 宽 × 高约为 1 cm × 0.5 cm × 1 cm)
2. 脉冲场电泳仪
3. 照胶仪
4. 恒温烘箱

### 实验步骤

1. 取新鲜采集微生物样品，根据样品特点离心获得微生物细胞，用 TE 缓冲液重悬细胞，利用平板计数法使得细胞的浓度约为每毫升  $10^7$ - $10^8$  个。
2. 取 3 ml 加热溶解的 1.6% 低熔点琼脂糖，温度降至 45 °C 左右，加入等体积微生物细胞，混匀后立即加入可制成胶块的模具中，4 °C 凝固 30 min。
3. 取出胶块，置于 5 倍体积的 DNA 裂解液中，37 °C 静置孵育裂解 1 h。
4. 把胶块转到与裂解液等体积的 ESP 缓冲液中，于恒温烘箱 50 °C 裂解 48 h，其间更换一次 ESP 缓冲液。
5. 取 10-20 倍胶块体积的冰冷 TE 缓冲液，加入 PMSF 贮备液至终浓度 0.1 mM，置于冰上洗涤胶块 3 次，每次静置 1 h。(PMSF 苯甲基磺酰氟是一种高强度毒性的胆碱酯酶抑制剂。操作时需佩戴合适的手套和安全眼镜，始终在化学通风橱里使用。)
6. 将胶块保存于 0.05 M EDTA 溶液 (pH 8.0) 中，4 °C 保存 (可放置 1 年)。
7. 在照胶仪下观察，用刀片切下含 DNA 条带的胶块，小心塞进透析袋中，加入 20-100  $\mu$ L 0.5× TBE 缓冲液，赶出气泡后两端夹紧透析袋夹。
8. 将透析袋放入含 4 °C 预冷 0.5× TBE 缓冲液的脉冲场电泳槽中，设置槽温 14 °C、电压 6 V/cm、脉冲转换时间 25 s、转换角度 120°、电泳时间 5 h，将胶块中的 DNA 电泳至透析袋溶液中。
9. 电泳结束后，将透析袋在电泳槽中水平调转 180°，再次电泳 1.5 min，将透析膜上的 DNA 电泳至透析袋溶液中。
10. 取出透析袋，打开一侧的透析袋夹，用剪去尖的枪头，小心缓慢的吸出 DNA 溶液，置于一个 1.5 ml 的离心管中。

11. 用 NanoDrop 或 Qubit 对 DNA 进行定量。

12. 利用脉冲场电泳仪进行 DNA 片段大小分布和降解情况分析，设置电泳条件：1%琼脂糖凝胶，0.5x TBE 缓冲液，温度 14 °C，泵速 80，电场夹角 120°，起始脉冲时间 0.1 s，终止脉冲时间 40 s，电场强度 6 V/cm，电泳时间为 16 h。。

## 结果与分析

该方法提取的 DNA 整体主条带大于 300 kb (见图 1)<sup>[2,3]</sup>。

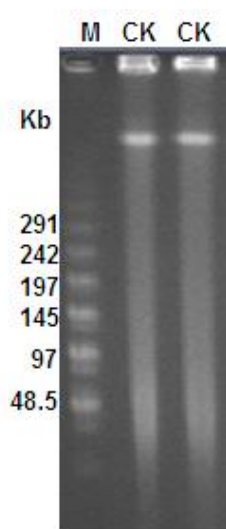


图 1. 奶牛瘤胃微生物 SHWM-DNA 脉冲场电泳图

## 溶液配方

- 0.5 M EDTA 溶液 (pH 8.0): 186.1 g EDTA, 20 g NaOH, 加水定容至 1 L, 浓盐酸调 pH 至 8.0。
- 0.05 M EDTA 溶液 (pH 8.0): 取 1 ml 0.5 M EDTA 溶液，加入 9 ml 超纯水。
- 1 M Tris-HCl: 121.1 g Tris 碱，42 ml 浓盐酸定容至 1 L，调 pH 至 8.0。
- TE 缓冲液 (pH 8.0): 10 ml 1 M Tris-HCl (pH 8.0), 2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), 加入超纯水定容至 1 L。
- PMSF (苯甲基磺酰氟) 贮备液: 用异丙醇溶解配制 100 mM 的贮存液，4 °C 保存。使用前 37 °C 加热 15 min 溶解。
- 溶菌酶: 用 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) 溶解溶菌酶，配制成 10 mg/mL 浓度的储存液。

7. DNA 裂解液: 10 mM Tris (pH 8.0), 50 mM NaCl, 0.1 M EDTA, 1% N-月桂酰肌氨酸钠, 0.2%脱氧胆酸钠, 1 mg/ml 溶菌酶。
8. ESP 缓冲液: 1% N-月桂酰肌氨酸钠, 1 mg/ml 蛋白酶 K, 0.5 M EDTA。
9. 5× TBE 储备液: 54 g Tris, 27.5 g 硼酸, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) 加水至 1 L。
10. 0.5× TBE 工作液: 将 5× TBE 储备液稀释 10 倍。
11. 50× TAE 储备液: 242 g Tris, 57.1 ml 冰乙酸, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), 加水定容至 1 L。
12. 1× TAE 工作液: 将 50× TAE 储备液稀释 50 倍。
13. 30%聚乙二醇 8000: 称取 20 g 聚乙二醇 8000, 溶于超纯水中, 最后定容到 100 ml, 0.25 μm 滤膜过滤除菌后于 4 °C 保存。
14. 1.6%低熔点琼脂糖: 1.6 g 低熔点琼脂糖, 加入 100 ml 超纯水中。

## 致谢

感谢中国农业科学院创新工程 (ASTIP-IAS12) 支持, 感谢中国农业科学院北京畜牧兽医研究所金迪、刘思佳、李旦、朱雅新等研究生的帮助。

朱雅新, 东秀珠, 黄力, 董志扬. (2007). 瘤胃元基因组 BAC 文库研究. 中国农业科技导报 009(005): 53-57.

李旦, 王加启, 卜登攀, 刘开朗, 李发弟. (2009). 荷斯坦奶牛瘤胃微生物元基因组 Fosmid 文库的构建与分析. 微生物学杂志 29(06): 1-4.

## 参考文献

1. Farrar, K. and Donnison, I. S. (2007). [Construction and screening of BAC libraries made from \*Brachypodium\* genomic DNA](#). *Nat Protoc* 2: 1661-74.
2. 朱雅新, 东秀珠, 黄力, 董志扬. (2007). [瘤胃元基因组 BAC 文库研究](#). *中国农业科技导报* 009(005): 53-57.
3. 李旦, 王加启, 卜登攀, 刘开朗, 李发弟. (2009). [荷斯坦奶牛瘤胃微生物元基因组 Fosmid 文库的构建与分析](#). *微生物学杂志* 29(06): 1-4.