

# 针对热泉原位培养矿物的低质量 DNA 提取方法

## Low-quality DNA Extraction Method for Cultivated Minerals in Hot Springs

李方如<sup>1, #</sup>, 郭东毅<sup>2, #</sup>, 陈泓羽<sup>2</sup>, 侯卫国<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> 科学研究院, 中国地质大学(北京), 北京; <sup>2</sup> 地球科学与资源学院, 中国地质大学(北京), 北京;

\*通讯作者邮箱: 侯卫国: weiguohou@cugb.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

**摘要:** 在陆地土壤和水生环境中, 矿物—微生物的相互作用广泛地受到研究者的关注。然而, 陆地热泉作为极端生态环境之一, 其中的微生物群落与沉积物中矿物的相互作用与相关性的研究较少。热泉沉积物中的矿物颗粒可以为微生物提供附着生态位, 或作为电子供体或受体利于微生物的定殖与生存, 而微生物群落的差异可能导致矿物组分产生差异。本研究以云南腾冲热泉作为研究对象, 进行原位矿物的微生物培养实验, 结合生物分子学手段探究不同类型的矿物对热泉微生物群落结构及多样性的影响。相比于其他陆地生态环境, 由于热泉极端的温度和 pH 等环境条件, 导致直接使用 DNA 提取试剂盒得到的 DNA 其质量较差且浓度偏低, 因而本方法在使用传统 DNA 提取试剂盒的基础上对其改进, 采用对微生物循环冻融、加入苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 等方式优化 DNA 的提取步骤, 提高 DNA 的质量与产量, 对极端生态系统低生物量生态环境的 DNA 提取具有一定的借鉴意义。

**关键词:** 热泉, 微生物, 培养矿物, 低质量 DNA

### 材料与试剂

1. DNA 提取试剂盒: 品牌 QIAGEN, PowerSoil® DNA Isolation Kit 强力土壤 DNA 提取试剂盒, catalog number: 12988-10; 试剂盒提供的溶液与材料包括: BowerBead Solution, C1, C2, C3, C4, C5, 50 ml 无菌离心管, DeNase Purmax 过滤柱, 2 ml 无菌离心管
2. 1 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0): 品牌 Solarbio, catalog number: T1150, 常温保存
3. DNA 提取液: 苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) (pH > 7.8), catalog number: P1012, 4 °C 避光保存

4. 无水乙醇：北京东方博远科技发展有限公司
5. 50 ml 无菌离心管：Corning, catalog number: 430828
6. 200  $\mu$ l、1 ml、5 ml 枪尖与移液枪 (枪头适量扩大口径以减小剪切力对核酸的损伤，可用剪刀稍剪一下)
7. 2 ml 离心管：需提前高温蒸汽灭菌 (121  $^{\circ}$ C, 30 min)
8. 去离子水
9. 三水合乙酸钠：西陇化工股份有限公司, catalog number: 6131-90-4 (见溶液配方)
10. 70%乙醇 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 离心机：
  - 1) 品牌 eppendorf, model: Centrifuge 5810R 冷冻高速离心机
  - 2) 品牌 eppendorf, model: Centrifuge 5417R 冷冻高速离心机
2. 涡旋仪：品牌 Scientific Industries, model: Vortex Genie-2; 水平 50 ml 离心管支架, catalog number: SI-H506
3. 浓缩仪：品牌 eppendorf, model: Concentrator plus 真空离心浓缩仪
4. 水浴锅：上海一恒科技有限公司, HWS12 型电热恒温水浴锅
5. 电子天平：梅特勒-托利多仪器上海公司, 品牌 HANGPING, model: JA2003N
6. 超净工作台：品牌苏净安泰, model: YJ-1340 型
7. 通风橱：北京鸣远实验家具公司, model: MYLAB
8. 纯水仪：美国 Milli-Q 型号纯水仪

## 实验步骤

1. 使用电子天平称取 10 g 热泉原位培养矿物，加入 10 ml PowerBead Solution 和 1 ml 溶液 C1;  
*注：原位培养前，已将矿物研磨至粒径大小 $\leq 2\text{cm} \times 2\text{cm} \times 2\text{cm}$ ，以保证 DNA 提取的便捷；如若矿物粒径太大，可考虑使用液氮研磨*
2. 于通风橱内加入 5 ml 的 DNA 提取液；

- 59 3. 将得到的样品溶液放置于涡旋仪上，使用最大转速涡旋 30 min；
- 60 4. 进行 3 次循环冻融：将样品置于液氮内 3 min，取出后立即 65 °C 水浴加热 5 mi  
61 n；或者将样品放置于-80 °C 冰箱内冷冻 10 min，取出后立即 65 °C 水浴加热 5  
62 min；
- 63 5. 将样品溶液在转速 5000 x g 下离心 8 min，将上清液转移至新的 50 ml 离心管  
64 内。
- 65 *注：对于较低转速的离心机可适当增加离心时间，例如 2500 x g，15 min。*
- 66 6. 加入 1.5 ml 溶液 C2，涡旋 5 s 使其混合均匀。再加入 1 ml 溶液 C3，涡旋 5 s  
67 使其混合均匀。放置于 4 °C 冰箱内孵育 10 min；
- 68 *注：C2、C3 提前保存在 4 °C 冰箱中。*
- 69 7. 取出样品，在转速 5000 x g 下离心 5 min，将上清液小心地转移到新的 50 ml  
70 离心管内；
- 71 *注：转移体积大约 13-14 ml，视实际情况而定。*
- 72 8. 依次加入与步骤 7 等体积的溶液 C4 和无水乙醇，使用涡旋仪使溶液充分混合；
- 73 9. 从上述混合溶液内取出 15 ml，加载到过滤柱上；转速 5000 x g 下离心 3 min，  
74 丢弃下部滤液；
- 75 10. 重复步骤 11，直到混合液全部被加载到过滤柱上；
- 76 11. 向过滤柱加入改良的 C4 溶液 15 ml 后，直接 5000 x g，离心 3 min，丢弃滤  
77 液；
- 78 *注：具体改良方法见溶液配方。*
- 79 12. 向过滤柱中加入 10 ml 溶液 C5 后，直接 5000 x g，离心 3 min，丢弃下部滤  
80 液。重复一次该步骤；
- 81 13. 向过滤柱中加入 10 ml 无水乙醇后，直接 5000 x g，离心 3 min，丢弃下部滤  
82 液。重复一次该步骤；
- 83 14. 将过滤柱在 5000 x g 空离心 10 min 以除去多余的无水乙醇；
- 84 15. 将过滤柱放置于新的 50 ml 无菌离心管中，转移至超净工作台内，开盖使其在空  
85 气中干燥 10 min；
- 86 16. 向过滤柱中加入 2 ml Tris-HCl 反应静置 3 min，5000 x g 离心 5 min；
- 87 *注：Tris-HCl 需提前放入 65 °C 烘箱内预热。*

- 88 17. 收集下部离心管内的 DNA 溶液，小心地将其转移至新的 2 ml 无菌离心管中；  
89 注：可以一个样品分装 2 管，每管 1 ml。
- 90 18. 将得到的 DNA 溶液放入浓缩仪内，将液体体积浓缩至 0.5 ml 左右；浓缩仪设  
91 置：温度 25 °C，V-AQ 模式，45-55 min 左右；
- 92 19. 向浓缩后的 DNA 溶液中加入 0.1 倍体积 (约 50 µl) 的乙酸钠(3 mol/L，PH = 5.  
93 2)，并简单涡旋混合均匀，此时获得约 0.55mL 的 DNA 混合液；
- 94 20. 再加入 2 倍 DNA 混合液体积的 (约 1.1 ml) 冰冻无水乙醇 (需提前放入 4 °C 冰  
95 箱内)，简单涡旋混合均匀，放置于-20 °C 的冰箱中大于 1 h；
- 96 21. 从冰箱取出第 20 步中的混合液在 16,000 x g 下离心 10 min，小心地移除上清  
97 液；
- 98 22. 加入 1 ml 的冰冻 70%乙醇 (需提前放入 4 °C 冰箱内)，简单涡旋后，16, 000 x  
99 g 下离心 2 min，小心地移除上清液，重复一次该步骤；
- 100 23. 于室温下将离心管开盖置于超净台中，以使残留的乙醇完全挥发；或者将离心管  
101 置于浓缩仪中，45 °C，V-AL 模式，浓缩 10 min 左右；
- 102 24. 向离心管内加入 50 µl 的 Tris-HCl 溶液，简单涡旋振荡 DNA 保存在溶液中；并将  
103 其放置在-80°C冰箱，以备后续 PCR 扩增  
104 注：Tris-HCl 溶液需提前放 65 °C 烘箱中预热。

## 106 注意事项

- 107 1. 对微生物进行反复冻融的过程中推荐使用液氮冷冻与水浴的方法，冷冻时间短，且  
108 冷冻彻底。如置于-80 °C 冰箱内可以适当增加冷冻时间，避免因冷冻不彻底而  
109 导致微生物细胞的裂解不充分。
- 110 2. 所有操作步骤均推荐在超净工作台内进行，且所用枪尖均需要进行高温蒸汽灭菌  
111 (121 °C，30 min)，避免对样本微生物造成污染。
- 112 3. 实验最后一步加入 Tris-HCl 溶液的体积为 50-100 µl，实验中可根据生物量适当减  
113 少加入的 Tris-HCl 体积，例如减少至 25 µl。如 DNA 含量过低，可使用浓缩仪对  
114 溶液进行适当的浓缩。
- 115 4. 实验中的无水乙醇与 70%乙醇需提前放入 4 °C 冰箱内冷却；Tris-HCl 溶液需提前  
116 放入 65 °C 烘箱内加热。

5. 干燥 DNA 的时间不宜过长，且浓缩仪对 DNA 溶液进行浓缩时应控制浓缩时间(浓缩仪对水的浓缩速度通常为 0.1 ml/15 min)，避免溶液的完全挥发，对 DNA 造成损伤。

6. 试剂盒中的 C5 用量较大，可能需要单独购买 (catalog number: 160023921)。

## 溶液配方

### 1. 乙酸钠 (终浓度 3 M, pH 5.2)

称取 40.8 g 的三水合乙酸钠颗粒，加入 100 ml 的去离子水，搅拌使其完全溶解，加入约 200  $\mu$ l 的 1 N HCl 调整 pH 至 5.2, 高温蒸汽 (121  $^{\circ}$ C, 30 min)进行灭菌，置于阴凉处室温保存

### 2. 70%乙醇

将无水乙醇与去离子水以 7:3 (v/v)混合，置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱内冷冻保存。

### 3. 改良的 C4 溶液

向 50ml 无菌离心管中加入 9:11 (v/v)的溶液 C4:无水乙醇

## 结果与分析

直接用试剂盒提取的 DNA 浓度：

样品名	浓度 ng/ul	260/280	260/230
0-1	2.46	1.34	0.16
0-2	0.31	-0.64	0.09
0-3	0.55	-3.16	0.10
0-4	0.11	-0.15	0.03
0-5	1.32	2.44	0.17
0-6	0.79	1.26	0.06

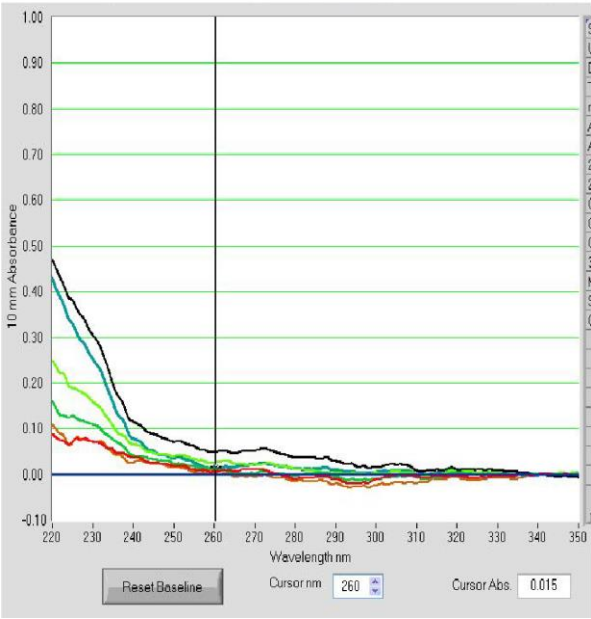
使用本方法试提取的 DNA 浓度：

样品名	浓度 ng/ul	260/280	260/230
1	4.09	1.87	0.44
2	39.22	1.98	1.71
3	28.13	1.76	1.28

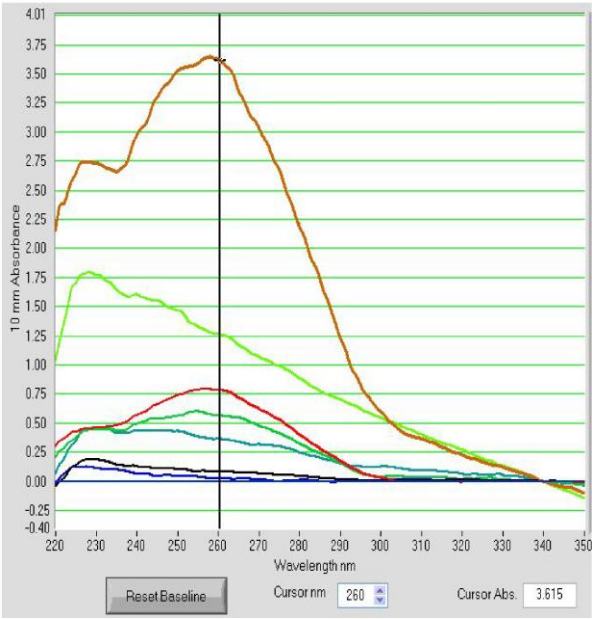
4	181.23	1.66	1.33
5	63.10	1.43	0.71
6	18.15	1.48	0.80

136

直接用试剂盒提取的DNA



采用本方法提取的DNA

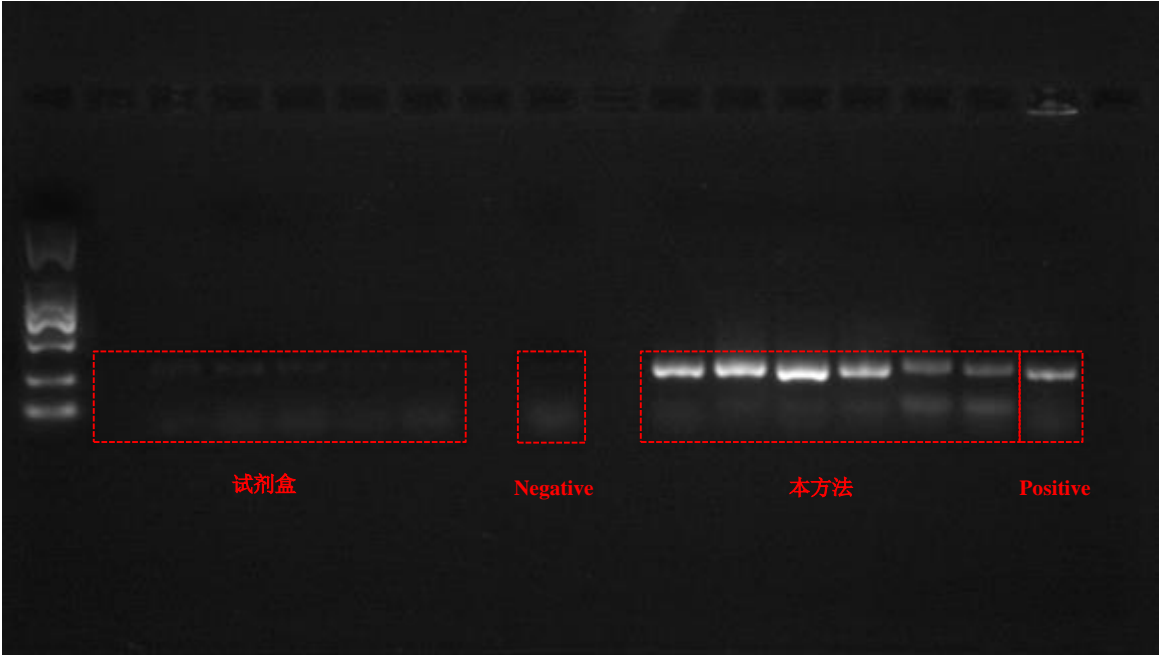


137

138

139

琼脂糖凝胶电泳照片对比：



140

141

142

致谢

143

感谢国家自然科学基金委重大计划培育项目“云南腾冲热泉化能自养微生物碳源和固碳

速率研究”（项目号：91851116）和教育部双一流建设经费-中国地质大学（北京）求真研究群体“极端环境生物地球化学群体”对本研究方法的资助

## 参考文献

1. 艾红霞, 束文圣, 叶脉, 徐卓菲, 张传伦, 李猛 (2017). [一种土壤微生物宏基因组DNA的提取方法及相应的试剂盒.](#)
2. Fang, Y., Xu, M.Y., Chen, X.J., Sun, G.P., Guo, J., Wu, W.M., and Liu, X.D. (2015) [Modified pretreatment method for total microbial DNA extraction from contaminated river sediment.](#) *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 9: 444-452.
3. More, M. I., Herrick, J. B., Silva, M. C., Ghiorse, W. C. and Madsen, E. L. (1994). [Quantitative Cell-Lysis of Indigenous Microorganisms and Rapid Extraction of Microbial DNA from Sediment.](#) *Applied and Environmental Microbiology* 60(5): 1572-1580
4. More, M. I., Herrick, J. B., Silva, M. C., Ghiorse, W. C. and Madsen, E. L. (1994). [Quantitative Cell-Lysis of Indigenous Microorganisms and Rapid Extraction of Microbial DNA from Sediment.](#) *Applied and Environmental Microbiology* 60(5): 1572-1580
5. Andreou, L. V. (2013). [Preparation of Genomic DNA from Bacteria.](#) *Laboratory Methods in Enzymology: DNA* 529: 143-151.