

# 从环境样本中提取高质量 DNA—研磨加 DNeasy 试剂盒方法

## DNA Extraction from Environment Samples – Grind Plus Kit Method

王朱珺<sup>1,2</sup>, 邓晔<sup>1,2</sup>, 王尚<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国科学院生态环境研究中心, 中国科学院环境生物技术重点实验室, 北京, 100085; <sup>2</sup> 中国科学院大学资源与环境学院, 北京, 100049

\*通讯作者邮箱: [shangwang@rcees.ac.cn](mailto:shangwang@rcees.ac.cn)

**摘要:** 从各类环境样本中提取高质量的 DNA 是宏基因组测序、基因芯片杂交以及其它各类宏基因组技术应用的前提, 但各大型试剂公司的环境 DNA 提取试剂盒 (如 DNeasy PowerClean、MP FastDNA、Invitrogen PureLink 等) 提取 DNA 的效率和质量大相径庭 (Zhou. *et al.*, 1996)。本文中使用的经典细胞破碎方法 (冷冻研磨以及在经典提取缓冲液中使用 SDS 裂解细胞) 可以从各种环境样本中获得高质量的 DNA, 且获取的基因组 DNA 完整度较高。配合 DNeasy 试剂盒提纯 DNA, 该方法比凝胶纯化更简单、快速, 在去除 PCR 抑制剂方面具有优异的性能, 可以达到较高的 DNA 纯度, 相比单独使用试剂盒的方法, 得到的土壤 DNA 浓度也相对更高 (Costea. *et al.*, 2017)。

**关键词:** DNA 提取, 冷冻研磨, Mobio

### 材料与试剂

#### 1. DNA 提取缓冲液 Extraction buffer

6.8 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (一价 monobasic)

93.2 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (二价 dibasic)

注: 在磷酸盐溶液中加入 NaOH 溶液直至 pH 为 8, 再加入剩余溶液

200 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0

100 ml 1 M Tris-HCl, pH 8.0

300 ml 5 M NaCl

100 ml 10% CTAB (对于过滤样本, 不要使用 CTAB)

加入去离子水至 1 L；如果不加 CTAB，加入去离子水至 900 ml

(终浓度：0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 1% CTAB)

## 2. 其它需要的化学物质

10 mg/ml 蛋白酶 K (Proteinase K) (储藏在-20 °C)

20% SDS (预制)

冷的 70%乙醇 (储藏在-20 °C)

2-异丙醇

0.5 M EDTA, pH 8.0

1 M Tris-HCl

\*100x TE (Sigma, catalog number: T9285-100ML)

\* (可选) 氯仿：异戊醇 (24:1)

将氯仿和异戊醇混合后储存在深色的或包裹锡箔纸的瓶子里，并放在通风橱的防火柜里

## 3. 试剂盒 Kit

MO BIO PowerClean® Pro DNA Clean-Up Kit (MO BIO, catalog number: 12997-50)

或者 MO BIO PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO, catalog number: 12888-100 or 12888-50)

现在是 DNeasy® PowerClean® Pro Cleanup Kit (50) (QIAGEN, catalog number: 12997-50)

或者 DNeasy® PowerSoil® Kit (QIAGEN, catalog number: 12888-100) (图 1)



图 1. DNA 提取试剂盒 DNeasy® PowerSoil® Kit (QIAGEN, catalog number: 12888-100)

## 4. 其它说明

本方法中使用的 Oak Ridge tubes（图 2）不要高压蒸汽灭菌。因为 DNA 分子在经过高温蒸汽灭菌的 Oak Ridge tubes 中难以聚集成紧密的颗粒，以至于肉眼不可见。使用后去离子水冲洗，并在去离子水中煮沸 20 min。冷却后，用 70% EtOH 冲洗试管并干燥。



图 2. Oak Ridge tube

## 仪器设备

1. 移液枪
2. 离心机（图 3，图 4）

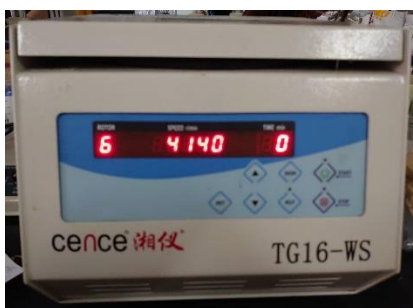


图 3. 2mL 离心管离心机      图 4. 15mL 离心管离心机

3. Nanodrop
4. 涡旋仪（图 5）

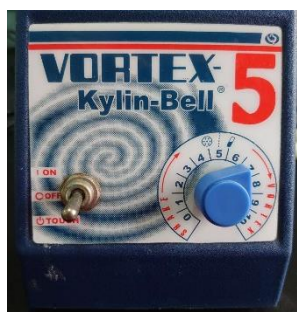


图 5. 涡旋仪

## 5. 水浴锅

### 实验步骤

1. 称出 1 g 样品到无菌研钵中 (使用 6-10 cm 直径的研钵。每次只取出一个样品，以尽量减少 DNA 在室温下的降解)，再加入 0.5 g 无菌石英砂到研钵中。石英砂可酌情增加用量。在研钵中加入足够液氮快速冷却石英砂和研钵。

*注：如果 1 g 土壤样品不够用，可在以下步骤中增加土壤样品用量和按比例增加试剂量 (如 DNA 提取缓冲液、蛋白酶 K、SDS 和异丙醇等)。本方案也适用于其他类型的环境样品 (污泥、水、木材等)，但样品量要视情况而定。*

2. 开始研磨样本，如果加入的液氮太少已经消耗完，立即加入新的液氮。研磨样品时尽量控制在研钵里的一个小区域。一直研磨直到样品开始融化。研磨时尽可能保持样品处于冷冻状态。

*注：如果样品冷冻后结块难以研磨，可以放置稍微解冻，但一定要加入 0.2~0.4 ml 的 DNA 提取缓冲液，记录准确的使用量 V1。当温度升高时，缓冲液可以抑制 DNA 降解。*

3. 重复步骤 (2) 冷冻研磨 2 次 (共三次)。
4. 当样品仍处于冷冻状态时，用刮刀把样品集中到研钵的中心 (如有必要，加入更多的液氮让保持样品冷冻)。转移样本到新的 15 ml 离心管中。  
*注：此时如果不能立即进行 DNA 提取，样品要保存在 -80°C，直到准备好进行下一步的 DNA 提取。*

5. 在上述准备好的样品中加入 3.3 ml DNA 提取缓冲液 (含有 CTAB)。缓冲液的总容量应该是 3.3 ml，如果在冷冻研磨过程中添加过该缓冲液，并且使用量为 V1 ml，

- 101 这一步添加的缓冲液体积为 3.3-V1。
- 102 注：如果土壤杂质太多，但含有足够的 DNA，可以增加缓冲液总体积至 5 ml。
- 103 6. 加入 12.2 ml 蛋白酶 K (10 mg/ml) ，轻轻地混合。
- 104 注：如果在第 (5) 步中加入 5 ml 缓冲液，则加入 18.5  $\mu$ l 蛋白酶 K。
- 105 7. 37 °C 水浴 30 min，期间 5-10 min 倒转混合一次。
- 106 8. 加入 0.37 ml 20% 的 SDS，轻轻地混合。
- 107 注：如果在第 (5) 步中加入 5 ml 缓冲液，则加入 0.56 ml 20% 的 SDS。
- 108 9. 65 °C 水浴 2 h，每 15-30 min 轻柔地倒转混合一次。
- 109 10. 25 °C 离心 20 min，6,000  $\times g$  。
- 110 11. 转移上清液到 Oak Ridge tubes 中 (使用半透明的 Oak Ridge tubes) ，尽量不要
- 111 碰到白色的表层。
- 112 注：如果样品中有太多的有机杂质 (如蛋白质) ，可以转移上清液到 15 ml 锥形离心
- 113 管中用于氯仿提取。
- 114 12. 加入 1.2 ml DNA 提取缓冲液 (含有 CTAB) 到剩余的沉淀中涡旋混匀。
- 115 注：如果在第 (5) 步中加入 5 ml 缓冲液，则加入 1.8 ml 含有 CTAB 的 DNA 提取缓
- 116 冲液。
- 117 13. 加入 0.13 ml 20% 的 SDS，轻柔地混合。
- 118 注：如果在第 (5) 步中加入 5 ml 缓冲液，则加入 0.2 ml 20% 的 SDS。
- 119 14. 65 °C 水浴静置 15 min.
- 120 15. 25 °C 离心 20 min，6,000  $\times g$  。
- 121 16. 转移上清液与 (11) 所得上清液混合，转移过程中避免碰到白色表层。
- 122 注：如果样品中有太多的有机杂质 (如蛋白质) ，在下一步之前，加入与上清液等体
- 123 积的 1:24 氯仿：异戊醇混合液，在通风橱中用圆盘旋转混匀仪连续倒转混合 5-10
- 124 min。3,700  $\times g$  离心 20 min。转移上清液到一个新的锥形离心管中。加入新的等体
- 125 积氯仿：异戊醇再萃取一次。然后转移上清液到 Oak Ridge tubes 中。
- 126 17. 加入 0.6 个体积的 2-异丙醇 (使用量要精准控制在 0.6 个体积) 。
- 127 18. 在 -20 或 -80 °C 冰箱中静置过夜。低温有助于 DNA 沉淀。
- 128 19. 从冰箱取出样品，37 °C 水浴加热。在进行下一步之前，确保样品是完全加热的并
- 129 且所有的沉淀都溶解了。在离心前加热样本可以溶解静置一整夜产生的所有矿物沉

淀。

注：尽可能彻底地溶解所有矿物沉淀，大概需要 30~45 min。

20. 25 °C 室温 15,000 x g (RCF) 离心 20 min (确保离心机处于室温状态，如果太冷，样品中的矿物沉淀就会析出)。离心后立即将上清液转移到新的离心管中 (保留上清液直到通过后续步骤确认得到 DNA，否则需要重复这一步)。

21. 在 Oak Ridge tubes 的 DNA 沉淀中加入 1 ml 冰的 70%乙醇清洗 DNA 沉淀。15,000 x g 离心 5 min，去掉乙醇。

注：如果 DNA 沉淀杂质太多，可以清洗两次。可以使用移液枪尽可能彻底地去除乙醇。一些纯净的 DNA 可能是不可见的。如果去除乙醇之前不离心或者下一步中不充分溶解 DNA 就转移，就有可能损失一部分 DNA。

如果使用的是 Mobio PowerClean Pro kit 或者 DNeasy® PowerClean® Pro Cleanup Kit。

a. 加入 100 µl 1x TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.Na<sub>2</sub>, pH=8, sterile, DNase free) 用于溶解 DNA。充分混合确保所有的 DNA 都溶解了。转移 DNA 溶液到 1.5 ml 离心管。

注：充分溶解 DNA 是非常重要的。移液枪吹打比涡旋更能有效地溶解 DNA 如果 DNA 难以溶解，可以 50 °C 水浴 2-5 min。在一些情况下，可以将粗 DNA 稀释到 1/2-1/10，这样下一步中使用 100 µl 稀释的 DNA，腐殖质的浓度也不会超出试剂盒的去除范围。

b. 接下来就是按照 PowerClean Pro kit 的标准流程来纯化 DNA。此外，在这个试剂盒中，我们会使用 1x TE (pH=8.0) 或者去离子水 (DNase free) 代替 DC5 溶液。

注：PowerClean Pro kit 的 DNA 纯化流程: <http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12997-50.pdf>。DC5 试剂不含有 EDTA，如果下一步使用的 DNA 对 EDTA 是敏感的，可以使用 DC5。而 1x TE 更适合长期保存。但是，如果想从 Nanodrop 中得到准确的 260/230 值，还是使用去离子水 (DNase free) 洗脱 DNA 更好。Nanodrop 检测后，可加入 1/100 (v/v) 100x TE，得到 1x TE 的 DNA 样本，供长期保存。



159 c. 用 Nanodrop 检测 DNA 纯度。

160 260/280 ~ 1.8, 260/230 ≥ 1.7.

161 注: 如果 260/230 数值不好, 可以参考 <http://ieq.ou.edu/protocol.htm> (page 10,  
162 *Desalting protocol*) 中的“Community DNA Preparation through hybridization”进行  
163 脱盐。如果 DNA 浓度过低, 则很难通过酸化和冷乙醇沉淀 DNA。可以将 DNA 浓缩  
164 到 100 ng/μl 左右, 沉淀 DNA, 用 10~20 倍体积 70% 冷乙醇洗涤 DNA 颗粒。如果  
165 260/230 或 260/280 数值都不够好, 尝试重复使用 PowerClean Pro kit 再纯化一次。

166 d. 用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整程度 (0.8% agarose, 105 V, 30 min) 。

167

168 如果使用的是 PowerSoil kit 或者 DNeasy® PowerSoil® Kit:

169

170 a. 在离心后的 DNA 沉淀中加入 430 μl bead solution (DNeasy PowerSoil kit, 在 bead  
171 tube) 用于溶解 DNA。充分混合以确保 DNA 完全溶解。

172 注: 充分溶解 DNA 是非常重要的。移液枪吹打比涡旋更能有效地溶解 DNA。如果  
173 DNA 难以溶解, 可以 50 °C 水浴 2-5 min。在一些情况下, 可以将粗 DNA 稀释到  
174 1/2-1/10, 这样下一步中使用 100 μl 稀释的 DNA, 腐殖质的浓度也不会超出试剂盒  
175 的去除范围。之后步骤中的试剂来自于 DNeasy PowerSoil kit。

176 b. 加入 250 μl 试剂 C2, 涡旋 5 s 混合均匀, 4 °C 冰箱中静置 5 min。

177 c. 10,000 x g 离心 1 min。转移 650 μl 到一个新的离心管中。

178 d. 加入 200 μl 试剂 C3, 涡旋 5 s 混合均匀, 4 °C 冰箱中静置 5 min。

179 e. 10,000 x g 离心 1 min。转移 700~750 μl 到一个新的 2 ml 离心管中。

180 注: 如果在试剂 C3 处理之后溶液不是无色的 (比如棕色), 可以重复步骤 (25) 和  
181 (26), 加入另外的 200 μl 试剂 C3 以提高 DNA 纯度。然而, 在某些情况下如果重  
182 复使用 C3, DNA 会大量丢失。

183 f. 加入 1.2 ml 试剂 C4, 涡旋 5 s 混合均匀。

184 注: 使用试剂 C4 之前要记得摇匀。

185 g. 在 Spin filter 的柱子中加入 675 μl 的样本 10,000 x g 离心 1 min, 去除过滤掉的液  
186 体。使用相同的 Spin filter 重复本步骤两次 (共三次) 。

187 h. 加入 500 μl 试剂 C5 到 Spin filter 的柱子中, 在 10,000 x g 离心 30 s。去除过滤

掉的液体。重复这一步，如果你的样品不是无色的。

*注：一般而言，试剂 C5 的洗涤次数不超过两次。不然 260/230 数值可能不会太好。*

- i. 再一次在 10,000 x g 离心 Spin filter 1 min。小心地将 Spin filter 的柱子转移到一个新的 2 ml 离心管中。

*注：如果有试剂 C5 残留在柱子壁上，可以用干净的 kimwipes 纸巾吸干。*

- j. 加入 100  $\mu$ l 去离子水 (DNase free) 到 Spin filter 的柱子里 10,000 x g 离心 30 s。去掉 Spin filter。

*注：C6 试剂不含有 EDTA，如果下一步使用的 DNA 对 EDTA 是敏感的，可以使用 C6。而 1x TE 更适合长期保存。但是，如果想从 Nanodrop 中得到准确的 260/230 值，还是使用去离子水 (DNase free) 洗脱 DNA 更好。Nanodrop 检测后，可加入 1/100 (v/v) 100x TE，得到 1x TE 的 DNA 样本，供长期保存。*

- k. 使用 Nanodrop 确认 DNA 纯度

260/280 ~ 1.8, 260/230 $\geq$ 1.7.

*注：如果 260/230 数值不好，可以参考 <http://ieg.ou.edu/protocol.htm> (page 10, Desalting protocol) 中的“Community DNA Preparation through hybridization”进行脱盐。如果 DNA 浓度过低，则很难通过酸化和冷乙醇沉淀 DNA。你可以将 DNA 浓缩到 100 ng/ $\mu$ l 左右，沉淀 DNA，用 10~20 体积 70%冷乙醇洗涤 DNA 颗粒。如果 260/230 或 260/280 数值都不够好可以重复步骤 (22) 到 (32) 在 (22) 中使用 330  $\mu$ l bead solution。*

22. 用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整程度 (0.8% agrose, 105 V, 30 min) 。

## 结果与分析

最后得到的 DNA 260/280 的值在 1.8-2.0 之间，260/230 $\geq$ 1.7。一般只要严格按照本方案的每一个细节进行操作，不会出现杂质过多的问题。

## 致谢

感谢国家自然科学基金 (U1906223) ，中国科学院前沿科学重点研究项目 (QYZDB-SSW-DQC026) 的资助。感谢已使用过本实验方案的文章“Zhujun Wang, et al.,



[Elevated temperature overrides the effects of N amendment in Tibetan grassland on soil microbiome.](#) *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 136: 107532”。

## 参考文献

1. Costea, P., Zeller, G., Sunagawa, S. Pelletier, E., Alberti, A, Levenez, F., Tramontano, M., Driessen, M., Hercog, R. and Jung, F.E. (2017) [Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies.](#) *Nature Biotechnology*, 35, pages1069-1076.
2. Zhou, J.Z., Bruns, M.A. and Tiedje, J.M. (1996) [DNA recovery from soils of diverse composition.](#) *Applied and Environmental Microbiology* 62, 316.