

沉积物、岩石样品总 DNA 提取

Total DNA Extraction from Sediment and Rock Samples

牛明杨¹, 隋维康², 王风平^{2,*}

¹生命科学技术学院, 上海交通大学, 上海; ²海洋学院, 上海交通大学, 上海

摘要: 本实验流程在土壤总 DNA 提取方法上, 通过对破碎、DNA 分离和纯化步骤的优化, 能够有效提高从环境样品中获得总 DNA 的浓度和质量。此方法适用于不同环境样品中总 DNA 的提取, 包括淡水、潮间带沉积物和海洋沉积物, 以及岩石等低生物量的环境样品。所获得的 DNA 可以用于扩增 16S rRNA 基因和功能基因, 功能基因定量以及宏基因组测序。

关键词: 酚氯仿法, DNA 提取, 沉积物, 岩石

材料与试剂

实验试剂:

1. NaH₂PO₄ (Sigma, catalog number: S3139)
2. Na₂HPO₄ (Sigma, catalog number: S3264)
3. EDTA (pH = 8.0, Sigma, catalog number: 324506)
4. Tris-HCl (pH = 8.0, Solarbio, catalog number: T8230)
5. NaCl (Sigma, catalog number: S3014)
6. CTAB (Sigma, catalog number: 52365)
7. 蛋白酶 K (Sigma, catalog number: 70663)
8. 溶菌酶 (Sigma, catalog number: L6876)
9. SDS (Sigma, catalog number: L3771)
10. 苯酚-氯仿-异戊醇 25:24:1 (pH > 7.8, Sigma, catalog number: 77617)
11. Polydexoyinosinic-deoxycytidylic acid (poly dI-dC) (Sigma, catalog number: P4929)
12. 异丙醇 (Sigma, catalog number: I9516)

实验器材

1. 2 ml、15 ml 和 50 ml 离心管 (Axygen, catalog number: MCT-200-C; SCT-15ML-25-S; SCT-50ML-25-S)
2. 药匙 (无菌)
3. DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen, catalog number: 12888-100)

仪器设备

1. 组织研磨机 (Tissuelyser-48, 上海净信公司, 中国)
2. 离心机 (5810R, Eppendorf 公司, 德国)
3. 涡旋仪 (Vortex Genie® 2 Vortex, MO BIO 公司, 美国)
4. 水平 24x1.5ml 离心管支架 (SI-H524, MO BIO 公司, 美国)
5. 移液枪 (10 µl, 200 µl, 1 ml, Eppendorf 公司, 美国)
6. 紫外交联仪(Stratalinker 1800 UV, Stratagene 公司, 美国)
7. 高压蒸汽灭菌锅 (G154DWS, 致微 (厦门) 仪器有限公司, 中国)
8. 鼓风干燥箱 (DHG-9091A, 上海一恒科学仪器有限公司, 中国)
9. 马弗炉 (MFLX544-12, 上海马弗炉科技仪器有限公司, 中国)
10. 0.22 µm 滤膜 (SLGP033RB, Merck Millipore 公司, 爱尔兰)
11. 酒精喷壶
12. 冰箱 (MDF-U74V, Panasonic 公司, 日本)
13. Nanodrop (Nano-300, 杭州奥盛仪器有限公司, 中国)
14. 电磁加热搅拌器 (TH-500, 上海沪西分析仪器厂, 中国)
15. 耐高温磁性搅拌子

实验步骤

沉积物样品 (Zhou 等, 1996; Natarajan 等, 2016)

1. 在 2 mL Ep 管中加入 0.3 g 粒径为 0.1 mm 的玻璃砂, 之后加入适量沉积物 (一般 0.3 g~0.5 g 湿重);
2. 加入 650 µl 的 DNA 抽提缓冲液, 在打碎前需要将沉积物和缓冲液混匀, 此步骤需在涡旋仪上安装水平离心管支架, 将离心管放在离心管架上, 一般选择 5 档, 振荡 3~5 min;

3. 将离心管放入组织研磨机中, 30 Hz, 打碎 30 s, 打碎三次, 每次间歇 120 s, 然后加入 70 μ l 溶菌酶 (起始浓度 20 mg/ml)和 20 μ l 蛋白酶 K (起始浓度 20 mg/ml), 缓慢上下颠倒几次来混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 每隔 10 min 混匀, 缓慢颠倒混匀即可, 不要过度振荡;
4. 加入 70 μ l 20% SDS 混匀, 缓慢上下颠倒几次来混匀, 65 $^{\circ}$ C 温育 2 h, 每隔 30 min 缓慢颠倒混匀数次;
5. 10,000 \times g 离心 10 min, 取上清液至新的 2 mL Ep 管中, 一般转移 900 μ l, 再加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1)溶液, 小心混匀至乳浊状, 即一般振荡管子混匀 3 min 左右, 4 $^{\circ}$ C 条件下 16,000 \times g 离心 25 min;
6. 小心吸取上层水相至新的 2 mL 离心管中, 记干录体积, 加入 0.6 体积的异丙醇, 再加入 0.1 体积的 3 M pH = 5.2 醋酸钠 (终浓度为 0.3 M), 颠倒混匀, 放入 4 $^{\circ}$ C 过夜, 一般 6~9 小时;
7. 将沉淀过夜的离心管 16,000 \times g 离心 30 min, 小心吸掉上清液, 注意不要碰到沉淀;
8. 小心加入 70%的冰乙醇, 缓慢加入, 小心晃动离心管洗涤沉淀, 4 $^{\circ}$ C 条件下 16,000 \times g 离心 30 min, 小心吸取并弃掉上清液, 不要碰到沉淀;
9. 重复步骤 8 一次或者两次 (可选步骤);
10. 在超净台中打开离心管盖, 室温下干燥 20~30 min, 注意不要干燥太久, 致使 DNA 很难洗脱和溶解;
11. 用适量的去离子水或者 1 \times TE 溶液溶解 DNA, 保存在-80 $^{\circ}$ C。
12. 如果第一次提取的 DNA 浓度达不到后续实验要求, 可以进行二次提取, 再将装有沉积物的小管加入 600-700 μ l 提取缓冲液, 用力将离心后的沉积物弹起, 并且混匀, 这一步可以参照步骤 2, 沉积物和缓冲液混合均匀后, 放在破碎仪上 40 Hz, 打碎 30 s, 打碎三次, 每次间歇 120 s, 加入 70 μ l 20% SDS, 20 μ l 蛋白酶 K (20 mg/ml), 65 $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 每 30 min 混匀一次;
13. 重复步骤 5-11, 将两次提取的 DNA 混合;
14. 按照步骤 6-10 重新沉淀和纯化 DNA;
15. 将浓缩纯化后的 DNA 分装, 并保存在-80 $^{\circ}$ C。

岩石样品 (Zhang 等, 2016)

1. 实验中所用的铁勺、研钵和玻璃器皿需要用去离子水冲洗 2-3 次，用铝箔纸包好，在烘箱中烘干，然后放入马弗炉 160 °C 高温灭菌 6 小时，待温度降至室温后使用；
2. 主要使用 DNeasy® PowerSoil® Kit 提取 DNA，对其中有些步骤进行优化。在加入 60 µl C1 溶液后，向管中加入 5 µg 用 UV 照射处理过的 Poly (dl-dC) (Sigma-Aldrich, USA)，取 0.5 g 研磨粉碎的岩石样品，在组织研磨机中破碎 30 s，频率为 70 Hz，打碎三次，每次间歇 120 s；
3. 在室温下，10,000 × g 离心 1 min，小心将 500 µL 上清转移至新的 2 ml 离心管中；
4. 加入 250 µl C2 溶液，震荡 5 s，放入 4 °C 反应 5 min；
5. 在室温下，10,000 × g 离心 1 min，小心将 600 µL 上清转移至新的 2 ml 离心管中；
6. 加入 200 µl C3 溶液，震荡 5 s，放入 4 °C 反应 5 min；
7. 在室温下，10,000 × g 离心 1 min，小心将 750 µL 上清转移至新的 2 ml 离心管中；
8. 使用前将 C4 溶液混合均匀，加入大约 1,200 µl C4 溶液，震荡 5 s；
9. 吸取 675 µl 混合液转移至 MB Spin Column 中，在室温条件下，10,000 × g 离心 1 min；将过滤后的液体丢弃。重复此步骤，直至混合液体全部过滤完；
10. 加入 500 µl C5 溶液，室温下 10,000 × g 离心 1 min，将过滤后的液体丢弃；
11. 继续在室温条件下，10,000 × g 离心 1 min；
12. 将 spin filter 转移至新的 2 ml 离心管中，转移过程中要小心，不要沾到 C5 溶液；
13. 向 spin filter 中加入 50-60 µl C6 溶液，放置在室温 2~5 min，然后 10,000 × g 离心 1 min；
14. 丢弃 spin filter，将 2 ml 离心管中的 DNA 溶液分装，并保存在 -80 °C。

C1-C6 溶液为 DNeasy® PowerSoil® Kit 中试剂。C1 溶液有助于细胞裂解的试剂组分；

C2 和 C3 溶液的作用是去除样本中的有机物（腐殖质、细胞碎片、蛋白等）；C4 溶液是高浓度盐溶液，调整 DNA 溶液中盐离子浓度，使得 DNA 可以和 MB Spin Column 的硅胶柱紧密结合；C5 溶液中主要成分为乙醇，可以将盐离子和腐殖酸等物质从 MB Spin Column 的硅胶柱上洗脱掉；C6 溶液为无 DNA、低浓度 TE 缓冲溶液，主要作用是将 DNA 从 MB Spin Column 的硅胶柱上洗脱下来，溶解 DNA。

失败经验

1. 用 70%乙醇洗 DNA 时，要小心加入或者吸取乙醇溶液，切勿使 DNA 沉淀脱离离心管壁造成 DNA 损失。
2. 运用 DNeasy® PowerSoil® Kit 提取 DNA 时，MB Spin Column 离心后不要接触到 C5 溶液，C5 溶液中含有乙醇。如果最后的 DNA 洗脱液中含有 C5 溶液，会影响 DNA 的后续实验操作。

溶液配方

1. DNA 抽提缓冲液 (1 L)

1) 1 M NaH₂PO₄

12 g NaH₂PO₄，用去离子水定容至 100 ml，0.22 μm 滤膜过滤

2) 1 M Na₂HPO₄

14.2 g Na₂HPO₄，用去离子水定容至 100 ml，0.22 μm 滤膜过滤

3) 0.5 M EDTA (pH 8.0)

9.3 g EDTA(二水合乙二胺四乙酸二钠)加 50 ml 去离子水 (加热和少量 NaOH 溶解)，之后使用 NaOH 调节溶液 pH 至 8.0

4) 1 M Tris-HCl (pH 8.0)

6.1 g Tris-base，加入 50 ml 水，加入 HCl 调节 pH 至 8.0

5) 5 M NaCl

146.1 g NaCl，用去离子水定容至 500 ml

6) 10% CTAB

10 g CTAB 用去离子水定容至 100 ml

DNA 提取缓冲液成分：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，用 0.22 μm 过滤，然后 121 °C 高压灭菌

20 min, 待溶液降至 50 °C 左右, 加入 6.8 ml 1 M NaH₂PO₄ 和 93.2 ml 1 M Na₂HPO₄, 用无菌去离子水定容至 1 L。(各试剂的终浓度: 0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.1 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 1% CTAB)

2. 20% SDS (十二烷基磺酸钠)

20 g SDS (十二烷基硫酸钠) 用去离子水定容至 100 ml (可能需要加热促进溶解)

3. 3 M 醋酸钠 (pH 5.2)

12.3 g 醋酸钠加入 40 ml 去离子水, 加入醋酸 (大约 10 ml) 调节 pH 至 5.2, 用 0.22 µm 滤膜过滤, 保存在 4 °C

4. 0.5 µg/µl Poly (dl-dC)

称取 500 µg Poly (dl-dC), 加入到 1 ml 无菌去离子水中混合均匀, 放置在紫外交叉联仪 (Stratalinker 1800 UV; 紫外光功率密度为 5000 µJ·cm⁻²) 中处理 5-10 min, 然后保存在 -20 °C (Barton 等, 2006)

致谢

沉积物样品中 DNA 提取实验方案改编自 Natarajan Vengadesh Perumal 博士发表的论文《A Modified SDS-Based DNA Extraction Method for High Quality Environmental DNA from Seafloor Environments》, 岩石样品中 DNA 的提取方法改编自张新旭博士发表的论文《Diversity and Metabolic Potentials of Subsurface Crustal Microorganisms from the Western Flank of the Mid-Atlantic Ridge》, 在此致谢 Natarajan Vengadesh Perumal 博士和张新旭博士。

参考文献

- Barton, H. A., Taylor, N. M., Lubbers, B. R. and Pemberton, A. C. (2006). [DNA extraction from low-biomass carbonate rock: an improved method with reduced contamination and the low-biomass contaminant database](#). *J Microbiol Methods* 66(1): 21-31.
- Natarajan, V. P., Zhang, X., Morono, Y., Inagaki, F. and Wang, F. (2016). [A Modified SDS-Based DNA Extraction Method for High Quality Environmental DNA from Seafloor Environments](#). *Front Microbiol* 7: 986.
- Zhang, X., Feng, X. and Wang, F. (2016). [Diversity and Metabolic Potentials of Subsurface Crustal Microorganisms from the Western Flank of the Mid-Atlantic Ridge](#). *Front Microbiol* 7: 363.
- Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. (1996). [DNA recovery from soils of diverse composition](#). *Appl Environ Microbiol* 62(2): 316-322.