**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](http://www.scipu.com/goods-3408.html" \t "_blank); 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 μl溶菌酶 (起始浓度20 mg/ml)和20 μl蛋白酶K (起始浓度20 mg/ml)，缓慢上下颠倒几次来混匀，37 °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 μl 20% SDS混匀，缓慢上下颠倒几次来混匀，65 °C温育2 h，每隔30 min缓慢颠倒混匀数次；
5. 10,000 *× g*离心10 min，取上清液至新的2 mL Ep管中，一般转移900 μl，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 °C条件下16,000 *× g*离心25 min；
6. 小心吸取上层水相至新的2 mL离心管中，记~~下~~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 °C过夜，一般6~9小时；
7. 将沉淀过夜的离心管16,000 *× 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 °C条件下16,000 *× 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× TE溶液溶解DNA，保存在-80 °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 μl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 μl 20% SDS，20 μl蛋白酶K (20 mg/ml)，65 °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 °C。

**岩石样品** (Zhang*等*，2016)

1. 实验中要用的铁勺、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 (dI-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)
2. 1 M NaH2PO4

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

1. 1 M Na2HPO4

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

1. 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

1. 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

1. 5 M NaCl

146.1 g NaCl，用去离子水定容至500 ml

1. 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)

1. 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)

1. 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

1. 0.5 μg/μl Poly (dI-dC)

称取500 μg Poly (dI-dC)，加入到1 ml无菌去离子水中混合均匀，放置在紫外交联仪 (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**

1. 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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16305811) *J Microbiol Methods* 66(1): 21-31.
2. 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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27446026) *Front Microbiol* 7: 986.
3. 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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27047476) *Front Microbiol* 7: 363.
4. Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. (1996). [DNA recovery from soils of diverse composition.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8593035) *Appl Environ Microbiol* 62(2): 316-322.