**微生物超高分子量DNA提取方法**

**Super-high Molecular Weight DNA Isolation**

赵圣国1, \*

1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

**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[1]。

**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 μm滤膜
3. 溶菌酶
4. 蛋白酶K (冻干粉，≥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**

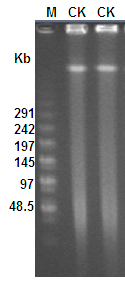
1. 模具 (长 *×* 宽 *×* 高约为1 cm *×* 0.5 cm *×* 1 cm)
2. 脉冲场电泳仪
3. 照胶仪
4. 恒温烘箱

**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107-108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 μL 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120º，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)[2,3]。

****

**图1. 奶牛瘤胃微生物SHWM-DNA脉冲场电泳图**

**溶液配方**

1. 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。
2. 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。
3. 1 M Tris-HCl: 121.1 g Tris碱，42 ml浓盐酸定容至1 L，调pH至8.0。
4. 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。
5. 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。
6. 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.](https://www.nature.com/articles/nprot.2007.204.pdf?origin=ppub) *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](http://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotal-NKDB200705010.htm).*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.](http://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotal-WSWX200906003.htm) *微生物学杂志* 29(06): 1-4.