**一种针对重金属污染土壤的高效DNA提取方法：去腐试剂前处理结合标准试剂盒提取**

**An efficient DNA extraction method for soil with heavy-metal contaminations: humus removal reagents for sample pre-treatment combined with DNA standard kit**

郭东毅1,#，陈泓羽1,#，李方如1，占迪1，董海良1

1生物地质与环境地质国家重点实验室，中国地质大学（北京），北京；

\*通讯作者邮箱: [dongh@cugb.edu.cn](mailto:dongh@cugb.edu.cn)

#共同第一作者/同等贡献

**摘要：**重金属污染矿区环境中的微生物生态研究内容包括鉴别与发现重金属耐受菌属、揭示潜在重金属氧化还原过程、研究重金属污染生物修复策略等，而高效提取污染土壤中的DNA是研究的基础和关键。然而，相比其他土壤生态环境，重金属污染矿区的土壤pH较为极端、重金属浓度高、腐殖质含量高、缺乏碳源氮源等营养物质，因此该类环境中生物量较低且含有大量DNA提取的抑制因子，从而导致直接使用商业 DNA 提取试剂盒的提取效率低且 DNA 质量较差。本方法对此进行了改进，利用去腐试剂（主要成分为EDTA、NaCl等）对污染矿区土壤样品进行前处理以去除腐殖质与重金属，并加入OptiprepTM细菌分离液通过密度梯度离心对土壤样品中的微生物进行分离，之后使用PowerSoil ® Pro提取试剂盒（试剂盒A）的标准方法进行DNA的提取。改进后的方法明显提高了DNA的质量，更利于后续的PCR扩增等实验。

**关键词：**重金属污染，矿区土壤，DNA提取

**材料与试剂**

1. DNA提取试剂盒A：品牌QIAGEN, PowerSoil ® Pro Kit, Catlog number: 47014-100，15-25℃保存（其中CD2保存于4℃）；试剂盒提供的溶液与材料包括：CD1、CD2、CD3、EA、CD5、CD6，BowerBead Pro离心管、2 mL 无菌离心管、1.5 mL 洗脱管、MB Spain过滤柱
2. DNA提取试剂盒B：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：PowerBead 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
3. 50 mL聚四氟乙烯无菌高速离心管（Nalgene，货号：3114-0050）
4. 1 mL、5 mL枪尖、10 mL移液管与配套移液枪

*（注：为减小剪切力对核酸的损伤，可将枪尖头部稍剪一下）*

1. 去离子水
2. 焦磷酸盐：MACKLIN，S817837-500g（见溶液配方）
3. 吐温20：CAS [9005-69-5]，密封保存（见溶液配方）
4. 细菌分离液（OptiPrepTM，LOT#00119，4-30℃避光保存）
5. 1M Tris-HCl缓冲液：Solarbio，Catlog number：T1150，pH 8.0，常温保存
6. 去腐蚀剂S0（见溶剂配方）
7. 0.22 µm滤膜（Millipore, GSW04700）
8. 磷酸二氢钠二水合物：阿拉丁，S102315-250g
9. 磷酸氢二钠，无水：阿拉丁，S118443-250g
10. 氯化钠：阿拉丁，C111535-500g
11. 50 mL无菌注射器
12. DL15000 DNA Marker：TaKaRa，LOT#AK90932A，-20℃保存
13. 3M乙酸钠（见溶剂配方）
14. 70% 乙醇（见溶剂配方）

**仪器设备**

1. 高速离心机（均可至4℃低温）:

1) 品牌：Eppendorf，model: Centrifuge 5810R

2) 品牌：Eppendorf，model: Centrifuge 5417R

1. 涡旋仪：品牌Scientific Industries，model: Vortex Genie-2
2. 涡旋仪水平50 mL离心管支架：model: SI-H506
3. 电子天平：梅特勒-托利多仪器上海公司，品牌HANGPING，model: JA2003N
4. 超净工作台：苏净安泰，model: YJ-1340
5. 纯水仪：美国Milli-Q型
6. 电热鼓风干燥箱：天津市泰斯特仪器有限公司，model: WGLL-230BE
7. 高压蒸汽灭菌器：品牌PHCBI，model: MLS-3781L-PC
8. 真空泵：（郑州恒岩仪器有限公司，SHB-IIIS循环水式多用真空泵）
9. 过滤器：Nalgene，货号：300-4050
10. 琼脂糖凝胶电泳仪：北京市六一仪器厂，DYY-6C型
11. 超微量紫外分光光度计：品牌Thermo Scientific，model：NANODROP 1000
12. 浓缩仪:品牌 Eppendorf，model: Concentrator plus 真空离心浓缩仪

**实验步骤**

1. DNA提取准备工作：

1）配置DNA提取所需的去腐试剂S0、1%焦磷酸盐（S1）、5%吐温20（S2）与PBS缓冲液；

2）将50 mL Nalgene聚四氟乙烯离心管（为防止高压灭菌后管体变形，管盖与管体分别灭菌）、5 mL枪尖、抽滤装置、去腐试剂S0、5%吐温20与PBS缓冲液置于灭菌器内进行高压蒸汽灭菌；

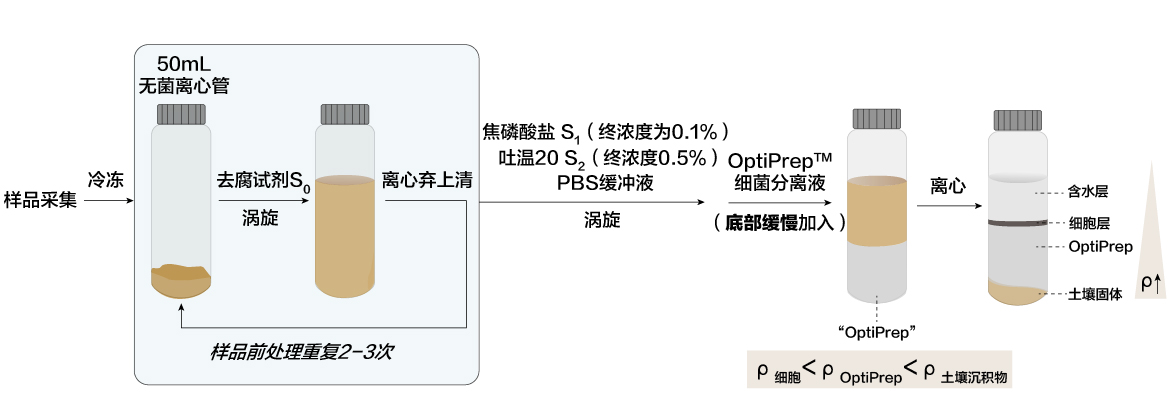
3）1%焦磷酸盐使用0.22 µm无菌滤膜进行过滤灭菌；

1. 样品前处理：
2. 使用电子天平称取约10 g土壤样品，装入50 mL Nalgene聚四氟乙烯无菌离心管内，加入40 mL的去腐试剂S0，使用涡旋仪用最大转速（Speed=10）涡旋10 min，充分震荡，使样品与去腐试剂充分混合；

*（注：称取土壤样品的离心管必须使用可承受超速离心的无菌离心管）*

1. 在转速5000 g下离心5 min，丢弃上清液，重复2次上述步骤，直至上清液无色透明；*（注：如上清液仍然有色，可适当增加重复次数）*
2. 细胞分离与富集（见视频操作）：
3. 向处理后的土壤样品内加入2 mL S1（终浓度为0.1%）、2 mL S2（终浓度为0.5%）以及16 mL的PBS缓冲液，混合，将其放置于涡旋仪上，使用Speed=7，涡旋30 min；
4. 向上一步得到的混合液底部缓慢加入15mL的OptiPrepTM细菌分离液；

*（注：分3次、每次5 mL，将枪尖伸入到离心管的****底部****缓慢加入，切记加入后不要倒转，摇晃离心管，防止分离液与上部水体混合，导致分层失败。）*

1. 提前预冷离心机至4℃，将样品混合液在4℃，转速8000 g下离心30 min；离心后样品混合液因密度差异共分为四层，由上到下依次为上层含水层、细胞层、细菌分离液层与底部土壤固体层（图1 & 2），倘若30分钟后细菌分离液层没有澄清，则延长离心时间至细菌分离液层澄清。

**A picture containing indoor, blue, drinking water

Description automatically generated图1 使用细菌分离液获取样品中细胞流程图**

**图2使用细菌分离液离心后混合液分层示意图**

1. 使用5 mL移液枪将细胞层与上层含水层吸出，吸取时枪头应紧贴着细胞层；为了充分提取细胞，建议将细胞层与上层含水层一并吸出；切勿吸取到下部分离液层，否则会影响核酸的提取。
2. 安装抽滤装置，并使用该装置将3.4步骤中得到的混合液过滤到滤膜上，具体步骤为：1）提前30 min从烘箱内拿出灭菌好的滤器；2）对操作台进行消毒，并点燃酒精灯放在合适的位置；3）将滤器下半部分和可灭菌的滤膜支撑器拿出，放上滤膜，注意将滤膜放置在支撑器的正中；4）将滤器上半部分于下半部分组装，组装完成后轻轻转动上半部分滤器，若不能被转动则上下部分已经扣紧；5）转开过滤器上盖，倒入混合液，盖紧上盖并将上部气孔打开维持气压平衡；6）连接真空泵，并开始抽滤，适当延长抽滤时间确保滤膜较为干燥；7）将连接真空泵的管子缓慢拔出，防止气压迅速改变，冲破滤膜；8）将滤膜放置在冻存管内，保存在-20~-80℃冰箱等待下一步实验操作。
3. ，在超净台内，将滤膜用无菌剪刀剪成小片，放入试剂盒提供的PowerBead Pro离心管内，由于47 mm滤膜较大，可将滤膜分装到两个离心管内；
4. 使用DNA提取试剂盒A提取DNA：
5. 向上一步的离心管内加入800 µL的CD1溶液，将其置于涡旋仪上使用最大转速涡旋10 min；
6. 在转速15000 g下离心1 min，将约500-600 µL的上清液转移到另外的无菌2 mL离心管内，加入200 µL的CD2，置于涡旋仪上使用最大转速涡旋5 s；

*（注：CD2置于4℃内保存）*

1. 在15000 g转速下离心1 min，将上清液（500-600 µL）转移至另外的无菌2 mL离心管内，加入600 µL的CD3，置于涡旋仪上使用最大转速涡旋5 s；
2. 取约650 µL上步得到的溶液加载至MB Spin过滤柱上，在转速15000 g下离心1 min，丢弃离心管下部的滤液；
3. 重复4.4的操作，直至所有溶液加载并通过MB Spin过滤柱；
4. 小心地将过滤柱转移至另外的2 mL无菌离心管内；

*（注：避免将下部滤液洒入过滤柱内）*

1. 向过滤柱上加入500 µL的EA溶液，转速15000 g下离心1 min；
2. 丢弃下部滤液，将过滤柱放回步骤4.7中使用的离心管内，向过滤柱上加入500 µL的CD5溶液，在15000 g转速下离心1 min；
3. 丢弃下部滤液，小心地将过滤柱转移至另外的2 mL无菌离心管内；

4.10在转速16000 g下空离心2 min，小心地将过滤柱转移至另外的1.5 mL洗脱管内，向过滤柱上加入50 µL的CD6溶液*（注：尽量将液体加到过滤柱中心位置，可根据下游实验需要调整CD6溶液的用量，通常50-100 µL；可将CD6溶液更换为无菌水）*

4.11在转速15000 g下离心1 min，丢弃过滤柱，提取得到的DNA存在于洗脱管内，放置于-20℃冰箱内保存。

1. 使用DNA提取试剂盒B提取DNA（对照组）：

按照PowerSoil® DNA Isolation Kit强力土壤DNA提取试剂盒的标准方法进行DNA的提取，提取方法在本文中不做详细叙述。提取得到的DNA样品按下列步骤进行浓缩：

5.1 将按照试剂盒提取得到的 DNA 溶液小心地分装至2mL无菌离心管中，并置于浓缩仪内（浓缩仪设置: 温度 25℃，V-AQ 模式，45-55 min），将液体体积浓缩至 0.5 ml 左右；

5.2 向浓缩后的DNA溶液中加入约50 µL的乙酸钠，涡旋使其混合均匀；再加入约2 倍混合液体积的（约 1.1 mL）冰冻无水乙醇，涡旋使其混合均匀，放置于-20℃冰箱内大于1 h；

5.3 从冰箱中取出DNA混合液，转速16000 g下离心10 min，小心地移除上清液；而后加入 1 mL的冰冻70%乙醇，涡旋使其混合均匀后，转速16000 g下离心 2 min，小心地移除上清液，并重复一次该步骤；

5.4 将上一步得到的含DNA的离心管置于浓缩仪内（浓缩仪设置: 温度 25℃，V-AL 模式，10 min），去除混合液中残留的乙醇；

5.5 向离心管内加入 50 µL的 Tris-HCl 溶液，此时得到的DNA溶液作为与上述1-4步骤提取的DNA样品的对照。

**结果与分析**

**A picture containing text

Description automatically generated图3 两种方法提取得到的DNA电泳结果对比图**

**Chart, line chart

Description automatically generatedA：使用本文叙述方法；B：使用试剂盒B方法；E：大肠杆菌*E. coli* DNA对照；N；A方法阴性对照（样品放入500℃马弗炉烘烤4h）**

**图4 使用Nanodrop对两种方法提取得到的DNA样品质量测试结果**

**Sample A：使用本文叙述方法；Sample B：使用试剂盒B方法**

**表1 使用Nanodrop对两种方法提取得到的DNA样品浓度与质量测试结果**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Sample ID | ng/µL | 260/280 | 260/230 |
| A | 215.97 | 1.81 | 1.90 |
| B | 83.68 | 1.75 | 1.55 |

A：使用本文叙述方法提取的DNA；B：使用试剂盒B方法提取的DNA

**注意事项**

1. 所有操作步骤均推荐在超净工作台内进行，实验所用剪刀均需提前浸泡于75%的酒精内，所用离心管与枪尖均需提前进行高温蒸汽灭菌（121℃，30 min），避免对样本微生物造成污染。
2. 当同时使用涡旋仪震荡的离心管数目过多时，可增长5-10 min的涡旋时间，以保证所有离心管能够充分震荡混合。
3. 加入细菌分离液时应将枪尖小心地伸入离心管的底部，且在加入时缓慢上移枪尖，防止样品撒出；加入细菌分离液之后应避免震荡离心管。
4. 使用转速14000 g进行离心前离心管应严格配平（离心管之间质量差<0.01g），需使用50 mL聚四氟乙烯离心管或可承受超速离心的无菌离心管，降低超速离心对离心机的损害，且避免离心管的破裂。

**溶液配方**

1. PBS缓冲液

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂名称 | 称取质量（g） | 试剂终浓度（mM） |
| NaCl | 7.5972 | 130 |
| NaH2PO4·2H2O | 1.0921 | 7 |
| Na2HPO4 | 0.4259 | 3 |

按上表称取试剂，加入200 mL的去离子水，搅拌溶解，加入NaOH或者HCl调节pH到7.4，然后定容至1 L，高压蒸汽灭菌灭菌，常温保存。

1. 1%（wt/v）焦磷酸盐（S1）

称取1g焦磷酸盐固体用PBS定容至100 mL使用0.22 µm滤膜过滤灭菌，常温保存。

1. 5%（v/v）吐温20（S2）

量取5 mL吐温20溶液用PBS定容至100 mL，高压蒸汽灭菌，常温密封保存。

1. 去腐试剂S0
2. 配置1M NaH2PO4：称取1.56 g NaH2PO4·2H2O固体加入10 mL去离子水内，搅拌溶解；
3. 配置1M Na2HPO4：称取23.20 g Na2HPO4·5H2O固体加入100 mL去离子水内，搅拌溶解；
4. 混合6.8 mL NaH2PO4与93.2 mL Na2HPO4，使用NaOH调节pH至8.0；
5. 配置0.5 M EDTA：称取37.44 g EDTA固体加入200 mL去离子水内，调节pH至8.0使其溶解；
6. 配置5 M NaCl：称取87.66 g NaCl固体加入300 mL去离子水内，搅拌溶解；
7. 混合3）、4）、5）与100 mL Tris-HCl，加入去离子水定容至1 L；
8. 所得混合溶液即为去腐试剂S0，将S0高温蒸汽灭菌，常温保存。
9. 3 mol/L乙酸钠

称取 40.8 g 的三水合乙酸钠颗粒，用去离子水定容至100 mL，搅拌使其完全溶解， 加入HCl 将pH调整至5.2，高压蒸汽灭菌，置于阴凉处室温保存。

1. 70%乙醇

将无水乙醇与去离子水按7:3 (v/v) 混合，置于4°C冰箱内保存。

**致谢**

感谢国家自然科学基金项目“微生物—粘土矿物—重金属铀与铬相互作用过程”与教育部—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**

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](https://link.springer.com/article/10.1007/s11783-014-0679-4). *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 9: 444-452.

窦敏娜.[重金属污染环境土壤细菌总DNA提取方法探索](https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFDLAST2018&filename=SNKX201805012&v=ZkXarCexXEVhdHbQJGzzTm0Gp6iru5kDAuzOx%25mmd2BODgGpDNTOdzYhpGVKrFlqPvmGE). (2018) 陕西农业科学, 64(05):37-38+52.

Alice Pascaud, Marie-Louise Soulas, Samira Amellal and Guy Soulas. (2012) [An integrated analytical approach for assessing the biological status of the soil microbial community](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S116455631200009X). *European Journal of Soil Biology* 49: 98-106.

Marc Neveu, Amisha T. Poret-Peterson, Zarraz M.P. Lee, Ariel D. Anbar, and James J. Elser. (2014) [Prokaryotic cells separated from sediments are suitable for elemental composition analysis](https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.4319/lom.2014.12.519). *Limnology and Oceanography: methods* 519-529.