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

*通讯作者邮箱: fengpingw@sjtu.edu.cn

引用格式: 牛明杨, 隋维康, 王风平. (2021). 沉积物、岩石样品总 DNA 提取. **Bio-101 e2003375**. Doi: **10.21769/BioProtoc. 2003375**.

How to cite: Niu, M. Y., Sui, W. K. and Wang, F. P. (2021). Total DNA Extraction from Sediment and Rock Samples. **Bio-101 e2003375**. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003375. (in Chinese)

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

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. NaH₂PO₄ (Sigma, catalog number: S3139)
4. Na₂HPO₄ (Sigma, catalog number: S3264)
5. EDTA (pH = 8.0, Sigma, catalog number: 324506)
6. Tris-HCl (pH = 8.0, Solarbio, catalog number: T8230)
7. NaCl (Sigma, catalog number: S3014)
8. CTAB (Sigma, catalog number: 52365)
9. 蛋白酶 K (Sigma, catalog number: 70663)
10. 溶菌酶 (Sigma, catalog number: L6876)

11. SDS (Sigma, catalog number: L3771)
12. 苯酚-氯仿-异戊醇 25:24:1 (pH > 7.8, Sigma, catalog number: 77617)
13. Polydexoyinosinic-deoxycytidylic acid (poly dl-dC) (Sigma, catalog number: P4929)
14. 异丙醇 (Sigma, catalog number: I9516)
15. 1× TE 缓冲液 (pH =8.0) (生工, catalog number: B548106)
13. DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen, catalog number: 12888-100)
14. DNA 抽提缓冲液 (1L) (见溶液配方)
15. 20 % SDS (十二烷基磺酸钠) (见溶液配方)
16. 3 M 醋酸钠 (pH 5.2) (见溶液配方)
17. 0.5 ug/ul Poly (dl-dC) (见溶液配方)

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 24 × 1.5 ml 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

一、沉积物样品 (Zhou *et al*, 1996; Natarajan *et al*, 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 μ l 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，记录体积，加入 0.6 体积的异丙醇，再加入 0.2 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 (起始浓度 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 6-11 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。

二、岩石样品 (Zhang *et al*, 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 $^{\circ}$ 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 μ l C1 溶液后，向管中加入 5 μ g 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 $\times$ g 离心 1 min，小心将 500 μ l 上清转移至新的 2 ml 离心管中；
4. 加入 250 μ l C2 溶液，震荡 5 s，4 $^{\circ}$ C 孵育 5 min；
5. 在室温下，10,000 $\times$ g 离心 1 min，小心将 600 μ l 上清转移至新的 2 ml 离心管中；
6. 加入 200 μ l C3 溶液，震荡 5 s，4 $^{\circ}$ C 孵育 5 min；
7. 在室温下，10,000 $\times$ g 离心 1 min，小心将 750 μ l 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 μ l C4 溶液，震荡 5 s；
9. 吸取 675 μ l 混合液转移至 MB Spin Column 中，在室温条件下，10,000 $\times$ 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 μ l C5 溶液，室温下 10,000 $\times$ 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 $\times$ 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 的膜中心中加入 50-60 μ l C6 溶液，放置在室温 2~5 min，然后 10,000 $\times$ 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 $^{\circ}$ C。

注：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。

溶液配方

一、DNA 抽提缓冲液 (1 L)

1. 1 M NaH_2PO_4
12 g NaH_2PO_4 ，用去离子水定容至 100 ml，0.22 μm 滤膜过滤
2. 1 M Na_2HPO_4
14.2 g Na_2HPO_4 ，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
7. 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 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min，待溶液降至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右，加入 6.8 ml 1 M NaH_2PO_4 和 93.2 ml 1 M Na_2HPO_4 ，用无菌去离子水定容至 1 L。(各试剂的终浓度: 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.1 M Na_2HPO_4 , 0.1 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 1 % CTAB)

二、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)

三、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

四、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 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，放置在紫外交联仪 (Stratalinker 1800 UV；紫外光功率密度为 5000 $\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$)中处理 5-10 min，然后保存在-20 °C (Barton *et al*, 2006)

注意事项

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。

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](#). *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](#). *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](#). *Front Microbiol* 7: 363.
4. Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. (1996). [DNA recovery from soils of diverse composition](#). *Appl Environ Microbiol* 62(2): 316-322.