微生物群落胞内/胞外吸附/胞外游离水环境 DNA 的分离提取

Isolation and Extraction of Intracellular, Absorbed-extracellular and Free-extracellular Environmental DNA from Aquatic Microbial Community

赵泽[1,2]，鞠峰[1,2,*]

[1]浙江省海岸带环境与资源研究重点实验室，工学院，西湖大学，杭州，浙江；[2]前沿技术研究所，浙江西湖高等研究院，杭州，浙江

*通讯作者邮箱：jufeng@westlake.edu.cn

引用格式：赵泽，鞠峰. (2020). 微生物群落胞内/胞外吸附/胞外游离水环境 DNA 的分离提取. *Bio-101* e2003587. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003587.

How to cite: Zhao, Z. and Ju, F. (2020). Isolation and Extraction of Intracellular, Absorbed-extracellular and Free-extracellular Environmental DNA from Aquatic Microbial Community. *Bio-101* e2003587. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003587. (in Chinese)

摘要：胞外 DNA 是位于微生物细胞膜外的 DNA 片段，来自于微生物的主动/被动排放或细胞裂解，作为微菌落的结构成分发挥着重要的作用。本实验流程通过过滤、洗脱再过滤的二级处理将环境水体中微生物组的胞内/胞外吸附/胞外游离 DNA 分离，并且在十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 提取 DNA 的方法上进行优化，实现大体积水样中微量胞外游离/胞外吸附 DNA 的分离提取，并且适用于不同类型环境样品。该方案得到的胞内/胞外吸附/胞外游离 DNA 可用于下游的 PCR、qPCR、标记基因扩增子测序、宏基因组测序等相关分析。胞内 DNA 适用于探究微生物群落结构与功能；胞外吸附/胞外游离环境 DNA (eDNA) 适用于水环境生物多样性评估、生物入侵预警与防治以及濒危物种保护。

关键词：胞外游离 DNA，胞外吸附 DNA，胞内 DNA, CTAB

材料与试剂

材料：

1. 15 ml 离心管 (CORNING, CentriStar, catalog number: 430790)
2. 50 ml 离心管 (CORNING, CentriStar, catalog number: 430828)

Copyright © 2020 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

3. 1.5 ml 离心管 (AXYGEN, catalog number: MCT-200-C)
4. 2 ml 离心管 (AXYGEN, catalog number: MCT-150-C)
5. 0.2 μm 聚碳酸酯微孔滤膜 (Millipore, Isopore, PC Membrane, 47 mm, catalog number: GTTP04700)
6. 移液吸头 (QSP, 10 μl, 20 μl, 100 μl, 200 μl, 1,000 μl, 5 ml)
7. 冰盒

试剂：

1. CTAB (Solarbio, catalog number: C8440)
2. Tris (Solarbio, Ultra Pure Grade, catalog number: T8060)
3. Tris-HCl (Sigma, BioUltra, for molecular biology, catalog number: 93363)
4. EDTA (Solaibio, Biotechnolongy Grade, catalog number: E8030)
5. 苯酚-氯仿-异戊醇 (Solarbio, catalog number: P1012-100)
6. 氯仿-异戊醇 (Solarbio, catalog number: P1014-100)
7. 异丙醇 (Acros, catalog number: 447080010)
8. 氯化钠 (Sigma, for molecular biology, catalog number: S3014)
9. 氢氧化钠 (Sigma, catalog number: 71687)
10. 琼脂糖 (Solarbio, catalog number: A8201)
11. PBS 缓冲液 (Thermo Fisher, catalog number: C10010500BT)
12. 无水乙醇 (Sigma, BioUltra, for molecular biology, catalog number: 51976)
13. FastDNA Spin Kit for Soil (Qiagen)
14. UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo, catalog number: 10977023)
15. Qubit 检测试剂 (Thermo)
16. CTAB 提取液 (pH 8.0) (见溶液配方)
17. 高盐 TE buffer (pH 8.0) (见溶液配方)
18. TE buffer (pH 8.0) (见溶液配方)
19. Tris-HCl-EDTA 提取液 (pH 8.0) (见溶液配方)
20. 苯酚-氯仿-异戊醇 (可自配，见溶液配方)
21. 氯仿-异戊醇 (可自配，见溶液配方)

Copyright © 2020 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

DOI:10.21769/BioProtoc.2003587

仪器设备

1. 剪刀
2. 镊子
3. 真空过滤器（台湾洛科六联过滤器，MultiVac610-MS)
4. 真空泵（GAST, DOA-P504-BN)
5. 移液枪（Eppendorf, 0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1,000 µl, 0.5-5 ml)
6. 台式大容量冷冻离心机（Eppendorf, Centrifuge 5810R)
7. 台式冷冻离心机（Eppendorf, Centrifuge 5427R)
8. 涡旋仪（IKA, VORTEX2)
9. 低温冷藏箱（海尔，HYCD-290)
10. 水浴锅
11. NanoDrop™ One/OneC (Thermo)
12. Qubit 4 (Thermo)
13. 核酸电泳仪（上海天能，HE120+HE90+EPS300+VE-180)
14. 全自动凝胶成像系统（上海天能，TON-250)

实验步骤

1. 环境水样采集

   环境水样采集后应尽快低温（冰袋，保温箱）运输至实验室并储存在 4 °C 低温冷藏箱中。

   注：建议在水样采集后 24 小时内完成后续水样预处理和 DNA 分离提取。

2. 环境水样预处理

   2.1. 环境水样经 0.2 µm 滤膜过滤，滤膜置于 4 °C 储存，用于后续胞内 DNA 和胞外吸附 DNA 的分离，滤液用于后续胞外游离 DNA 的提取。

   注：不同环境水体中胞外 DNA 的含量不同。河流、湖泊、近岸海水等环境水体建议过滤水样 1 L 及以上，远海海水等较为洁净的环境水体需增加过滤水样体积。不同环境水体样品建议通过预实验确定合适的过滤体积，以保证提取得到的 DNA 满足下游实验要求。

Copyright © 2020 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

2.2. 准备洁净的 50 ml 离心管，用灭菌剪刀将步骤 2.1 中所得滤膜剪碎并转移到 50 ml 离心管中，加入 10 ml PBS 缓冲液，室温涡旋 20 min，溶液经新的 0.2 µm 滤膜过滤。所得滤膜用于胞内 DNA 的提取，所得滤液用于胞外吸附 DNA 的提取。

注：环境水样预处理后用于胞内 DNA 提取的滤膜可放置于-20 °C 保存直至提取。用于胞外吸附/游离 DNA 提取的滤液建议 12 小时内完成提取，不宜长时间放置。

3. 水样胞外游离 DNA 的提取

可参考文献 Zhao 等 (2020), Mao 等 (2014), Zhang 等 (2018)。

注：DNA 提取实验开始前将异丙醇和乙醇放置在 4 °C 冰箱中预冷。

3.1. 准备 15 个洁净的 50 ml 离心管，在每个离心管中加入步骤 2.1 中所得滤液 20 ml，加入等体积的 CTAB 提取液，充分颠倒混匀，65 °C 水浴 30 min，然后于 4 °C、10,000 × *g* 下离心 10 min，弃掉上清液。

注：不同环境水体中胞外游离 DNA 的含量不同，甚至同一环境水体部分采样点之间含量差别也较大。建议通过预实验确定不同环境水体需要处理滤液的合适体积，以保证所得 DNA 满足下游实验需求。我们的实验结果表明，300 ml 湖泊水体滤液提取得到约 100-200 ng 胞外游离 DNA。

3.2. 将 3.1 所有离心管中所得沉淀分别用 300 µl 高盐 TE buffer 重悬，所有离心管中的悬浊液全部转移至 1 个 15 ml 离心管中。

3.3. 向 15 ml 离心管中加入 0.6 体积的冷异丙醇，离心管于冰上放置 1 h，然后在 10,000 × *g*、4 °C 下离心 15 min，弃掉上清液。

3.4. 所得沉淀用 450 µl Tris-HCl-EDTA 提取液重悬。

3.5. 向重悬液中加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇，上下颠倒混匀，于 13,000 × *g*、4 °C 离心 10 min。

3.6. 取上清液置于新的 2 ml 无菌离心管中，重复 3.5 操作一次。

3.7. 用移液枪尽可能吸取上清液，加入等体积的氯仿-异戊醇混合，相同条件下离心。

3.8. 取上清液置于新的 2 ml 无菌离心管中，加入氯化钠 (终浓度为 0.2 M) 和冷无水乙醇 (终体积为 70%) 沉降 DNA, -20 °C 下放置 1 h。然后于 13,000 × *g*、4 °C 离心 15 min，弃掉上清液。

Copyright © 2020 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

3.9. 所得沉淀加入 0.5 ml、70%冷乙醇，颠倒混匀，于 13,000 × *g*、4 °C 离心 5 min，弃掉上清液。

3.10. 重复 3.9 操作一次。

3.11. 将离心管于室温放置 5~10 min 风干沉淀，用 50 µl、65 °C 预热的 TE buffer 溶解沉淀。

4. 水样胞外吸附 DNA 的分离提取

按照水样胞外游离 DNA 的提取实验步骤，从 2.2 所得滤液中提取胞外吸附 DNA。

5. 水样胞内 DNA 的分离提取

取步骤 2.2 中过滤所得滤膜，按照 DNA 提取试剂盒 (FastDNA Spin Kit for Soil) 的说明书提取胞内 DNA。

6. DNA 的浓度检测

用 NanoDrop™ One/OneC 超微量核酸蛋白定量仪检测胞内/胞外吸附/胞外游离 DNA 的浓度和纯度，进一步采用 Qubit 4 荧光剂精准检测 DNA 浓度。

7. DNA 的质量检测

用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量，在全自动凝胶成像系统上需观察到清晰的目标 DNA 条带。

8. DNA 样品的储存与下游分析

通过上述步骤获取的 DNA 样品可储存于-20 °C，或直接用于后续的 PCR、qPCR、扩增子测序、宏基因组测序等相关分析。

失败经验

1. 选用洁净的材料和试剂，严格无菌操作

胞外 DNA (特别是胞外游离 DNA) 在环境水体中含量较低，在提取过程中要严格无菌操作，选用无菌、无核酸酶的高纯试剂和材料，从而避免提取过程造成的胞外 DNA 的污染和降解。

2. 重复提取积累经验

由于胞外 DNA 的含量较低，使用该方法提取的过程中经常不能直接观察到 DNA 沉淀的存在，需要明确离心沉淀后沉淀附着的位置，通过反复提取熟练提取流程，优化提取操作程序，才可以得到较为理想的提取效果。

Copyright © 2020 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

DOI:10.21769/BioProtoc.2003587

注：对于 50 ml 和 15 ml 离心管，建议将离心管标签区域背向轴心放置 (图 1. A)，对于 1.5 ml 离心管，建议将管盖连接处背向轴心放置 (图 1. C)，离心管沉淀附着位置见沉淀模拟示意图 (图 1. B)。

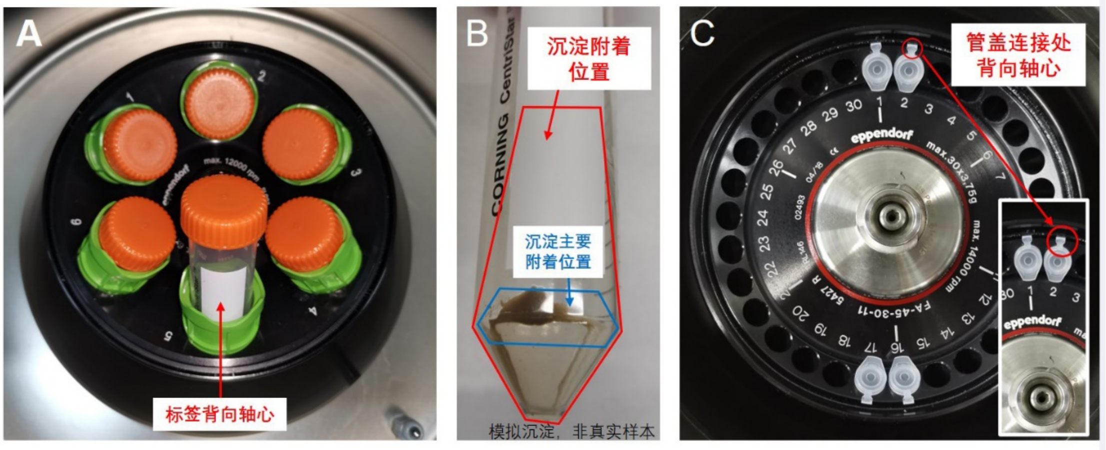

图 1：A. 50 ml 离心管放置示意图；B. 50 ml 离心管沉淀模拟示意图；C. 1.5 ml 离心管放置示意图

3. 合理规划实验时间

此方法提取胞外 DNA 所需时间较长 (8 h 以上的时间)，实验开始前请做好相关准备工作，合理规划实验时间，避免由于时间问题中断实验。

4. 空白对照设置

由于胞外 DNA (特别是胞外游离 DNA) 在环境水样中含量较低，在 DNA 分离提取过程中存在的微量微生物污染也会对实验结果产生影响，所以建议在 DNA 分离提取过程中设置空白对照以检测是否存在污染问题。可以用 UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water 替代环境水样作为空白对照组，进行 DNA 分离提取全流程操作。空白对照组提取 DNA 后，进行 DNA 浓度检测，DNA 浓度应为零，进行琼脂糖凝胶电泳检测应无条带出现，以排除分离提取操作中污染的发生。

溶液配方

1. CTAB 提取液 (pH 8.0)

50 mM Tris

10 mM EDTA

Copyright © 2020 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

1% CTAB

2. 高盐 TE buffer (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl

0.1 mM EDTA

1 M NaCl

3. TE buffer (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl

0.1 mM EDTA

4. Tris-HCl-EDTA 提取液 (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

5. 苯酚-氯仿-异戊醇

25:24:1, vol/vol/vol (可购买成品试剂，见试剂部分)

6. 氯仿-异戊醇

24:1, vol/vol/vol (可购买成品试剂，见试剂部分)

致谢

本实验得到国家自然科学基金青年基金 (51908467) 的资助。感谢西湖大学环境微生物组和生物技术实验室全体成员的建议和帮助。感谢天津大学近海环境安全实验室全体成员的建议和帮助。

参考文献

1. Mao, D., Luo, Y., Mathieu, J., Wang, Q., Feng, L., Mu, Q., Feng, C. and Alvarez, P. J. (2014). Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation. *Environ Sci Technol* 48(1): 71-78.
2. Zhang, Y., Niu, Z., Zhang, Y. and Zhang, K. (2018). Occurrence of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in coastal areas of Bohai Bay (China) and the factors affecting them. *Environ Pollut* 236: 126-136.
3. Zhao, Z., Zhang, K., Wu, N., Li, W., Xu, W., Zhang, Y. and Niu, Z. (2020). Estuarine sediments are key hotspots of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes: A high-throughput analysis in Haihe Estuary in China. *Environ Int* 135: 105385.

Copyright © 2020 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.