

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[#], 陈泓羽[#], 李方如, 占迪, 董海良^{*}

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

[#]共同第一作者/同等贡献

引用格式: 郭东毅, 陈泓羽, 李方如, 占迪, 董海良. (2021). 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. Bio-101 e2003707. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2003707.
How to cite: Guo, D. Y., Chen, H. Y., Li, F. R., Zhang, D. and Dong, H. L. (2021). An Efficient DNA Extraction Method for Soil with Heavy-metal Contaminations: Humus Removal Reagents for Sample Pre-treatment Combined with DNA Standard Kit. Bio-101 e2003707. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2003707. (in Chinese)

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影响 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 Optiprep™ 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. 1 ml、5 ml 枪尖, 10 ml 移液管
注: 为减小剪切力对核酸的损伤, 可将枪尖头部稍剪一下
2. 50 ml 聚四氟乙烯无菌高速离心管 (Nalgene, catalog number: 3114-0050)
3. 50 ml 无菌注射器
4. 细菌分离液 (OptiPrep™, LOT#00119, 4-30 °C 避光保存)
5. DNA 提取试剂盒 A: 品牌 QIAGEN, PowerSoil® Pro Kit, catalog number: 47014-100, 15-25 °C 保存 (其中 CD2 保存于 4 °C); 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
6. 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, 2ml、50 ml 无菌离心管, DeNase Purmax 过滤柱
7. 去离子水
8. 1 M Tris-HCl 缓冲液: Solarbio, catalog number: T1150, pH 8.0, 常温保存
9. 0.22 µm 滤膜 (Millipore, GSW04700)
10. 磷酸二氢钠二水合物: 阿拉丁, S102315-250g
11. 磷酸氢二钠, 无水: 阿拉丁, S118443-250g
12. 氯化钠: 阿拉丁, C111535-500g
13. DL15000 DNA Marker: TaKaRa, LOT#AK90932A, -20 °C 保存
14. 焦磷酸盐: MACKLIN, S817837-500g (见溶液配方)
15. 吐温 20: CAS [9005-69-5], 密封保存 (见溶液配方)
16. 去腐蚀剂 S₀ (见溶剂配方)
17. 3 M 乙酸钠 (见溶剂配方)
18. 70% 乙醇 (见溶剂配方)

仪器设备

1. 1 ml、5 ml、10 ml 移液枪
2. 高速离心机 (均可至 4 °C 低温) :
 - 1) 品牌: Eppendorf, model: Centrifuge 5810R
 - 2) 品牌: Eppendorf, model: Centrifuge 5417R
3. 涡旋仪: 品牌 Scientific Industries, model: Vortex Genie-2
4. 涡旋仪水平 50 ml 离心管支架: model: SI-H506
5. 电子天平: 品牌 HANGPING, model: JA2003N
6. 超净工作台: 苏净安泰, model: YJ-1340
7. 纯水仪: 美国 Milli-Q 型
8. 电热鼓风干燥箱: 天津市泰斯特仪器有限公司, model: WGLL-230BE
9. 高压蒸汽灭菌器: 品牌 PHCBI, model: MLS-3781L-PC
10. 循环水式多用真空泵: 郑州恒岩仪器有限公司, model: SHB-IIIIS
11. 过滤器: 品牌 Nalgene, catalog number: 300-4050
12. 琼脂糖凝胶电泳仪: 北京市六一仪器厂, model: DYY-6C
13. 超微量紫外分光光度计: 品牌 Thermo Scientific, model: NANODROP 1000
14. 真空离心浓缩仪: 品牌 Eppendorf, model: Concentrator plus

实验步骤

1. DNA 提取准备工作 (Fang *et al*, 2015):
 - 1.1 配置 DNA 提取所需的去腐试剂 S₀、浓度为 1% 的焦磷酸盐 (试剂 S₁)、浓度为 5% 的吐温 20 (试剂 S₂) 与 PBS 缓冲液。
 - 1.2 将 50 ml Nalgene 聚四氟乙烯高速离心管、5 ml 枪尖、过滤器、去腐试剂 S₀、试剂 S₂ 与 PBS 缓冲液置于灭菌器内进行高压蒸汽灭菌。
 注: 为防止高压灭菌后聚四氟乙烯高速离心管管体变形, 管盖与管体分别灭菌
 - 1.3 试剂 S₁ 使用 0.22 μm 无菌滤膜进行过滤灭菌。
2. 样品前处理:

- 2.1 使用电子天平称取约 10 g 的土壤样品，装入聚四氟乙烯无菌离心管内，加入 40 ml 的去腐试剂 S_0 ，使用涡旋仪用最大转速 (Speed = 10) 涡旋 10 min，使样品与去腐试剂 S_0 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

- 2.2 在转速 $5000 \times g$ 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

3. 细胞分离与富集 (见视频操作) (Pascaud et al, 2012; Neveu et al, 2014):

- 3.1 向经过前处理后的样品内加入 2 ml 试剂 S_1 (使其终浓度为 0.1%)、2 ml 试剂 S_2 (使其终浓度为 0.5%) 以及 16 ml 的 PBS 缓冲液，使用涡旋仪 (Speed = 7) 涡旋 30 min。

- 3.2 由底部缓慢加入 15 ml 的 OptiPrep™ 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，切记加入后不可倒转或摇晃离心管，以防分离液与上部水体混合而导致分层失败。

- 3.3 提前预冷离心机至 4°C ，将样品混合液在 4°C ，转速 $8000 \times g$ 下离心 30 min；离心后的混合溶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 和图 2)，倘若 30 min 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。

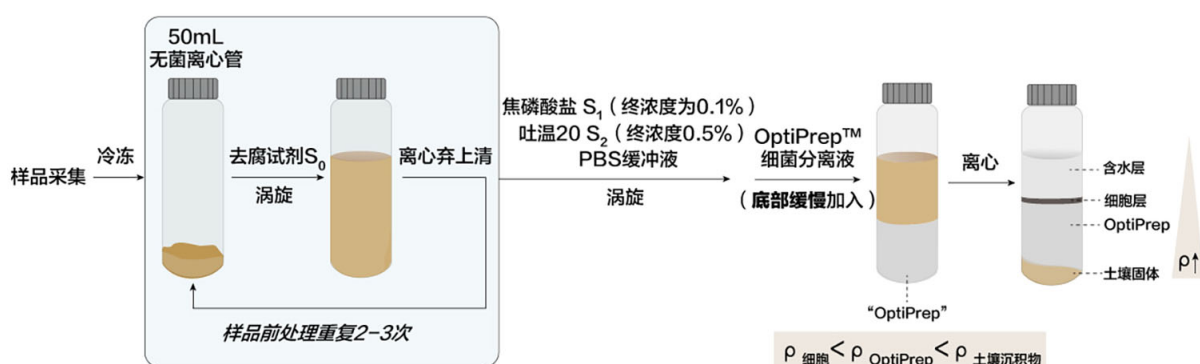


图 1. 使用细菌分离液获取样品中细胞流程图



图 2. 使用细菌分离液离心后混合液分层示意图

3.4 使用 5 ml 移液枪将细胞层与上层含水层吸出，吸取时枪尖应紧贴着细胞层。

注：切勿吸取到混合液下部的分离液层

3.5 安装抽滤装置，并使用该装置过滤 3.4 步骤中得到的混合液，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) 将滤器上半部分与下半部分组装，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，以防止气压迅速改变而冲破滤膜；8) 将滤膜放置在冻存管内，保存在-20 ~ -80 °C 冰箱中等待下一步实验操作。

3.6 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。



视频 1. 样品中细菌的分离与富集

4. 使用 DNA 提取试剂盒 A 提取 DNA:

4.1 向 3.5 步骤中的离心管内加入 800 μ l 的 CD1 溶液，将其置于涡旋仪上使用最大转速 (Speed = 10) 涡旋 10 min。

4.2 在转速 15,000 $\times g$ 下离心 1 min，将约 500 ~ 600 μ l 的上清液转移到另外的无菌 2 ml 离心管内，加入 200 μ l 的 CD2，使用涡旋仪最大转速 (Speed = 10) 涡旋 5 s。

注：CD2 置于 4 °C 内保存

4.3 在 15,000 $\times g$ 转速下离心 1 min，将上清液 (500 ~ 600 μ l) 转移至新的无菌 2 ml 离心管内，加入 600 μ l 的 CD3，使用涡旋仪最大转速 (Speed = 10) 涡旋 5 s。

4.4 取约 650 μ l 上步得到的溶液加载至 MB Spin 过滤柱上，在转速 15,000 $\times g$ 下离心 1 min，丢弃离心管下部的滤液。

4.5 重复 4.4 的操作，直至所有溶液加载并通过 MB Spin 过滤柱。

4.6 小心地将过滤柱转移至新的 2 ml 无菌离心管内。

注：应避免将原本离心管下部的滤液洒入过滤柱内

4.7 向过滤柱上加入 500 μ l 的 EA 溶液，在转速 15,000 $\times g$ 下离心 1 min。

4.8 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 μ l 的 CD5 溶液，在 15,000 $\times g$ 转速下离心 1 min。

4.9 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 16,000 $\times g$ 下离心 2 min，小心地将过滤柱转移至新的 1.5 ml 洗脱管内，向过滤柱上加入 50 μ l 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，通常为 50 ~ 100 μ l；可将 CD6 溶液更换为无菌水。

4.11 在转速 15,000 $\times g$ 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 $^{\circ}$ C 冰箱内保存。

5. 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 提取，提取方法本文不做详细叙述。提取得到的 DNA 样品按下列步骤进行浓缩：

5.1 将提取得到的 DNA 溶液小心地分装至 2 ml 无菌离心管中，并置于浓缩仪内 (浓缩仪设置：温度 25 $^{\circ}$ C，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 μ l 的乙酸钠，简单涡旋使其混合均匀；再加入约 2 倍混合液体积的 (约 1.1 ml) 冰冻无水乙醇，简单涡旋使其混合均匀，放置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱内大于 1 h。

5.3 从冰箱中取出 DNA 混合液，在转速 16,000 $\times g$ 下离心 10 min，小心地移除上清液；而后加入 1 ml 提前预冷的 70%乙醇，涡旋使其混合均匀，在转速 16,000 $\times g$ 下离心 2 min，小心地移除上清液，并重复一次该步骤 (窦敏娜 等, 2018)。

5.4 将步骤 5.3 得到的含 DNA 的离心管置于浓缩仪内 (浓缩仪设置：温度 25 $^{\circ}$ C，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 μ l 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

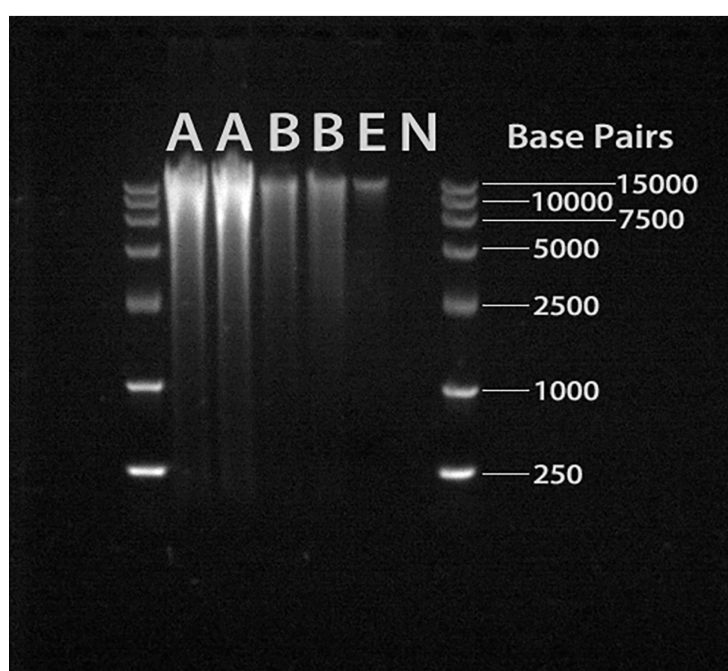


图 3. 两种方法提取得到的 DNA 电泳结果对比图 A: 使用本文叙述方法; B: 使用试剂盒 B 方法; E: 大肠杆菌 *E. coli* DNA 对照; N: A 方法的阴性对照 (将样品放入 500 °C 马弗炉内烘烤 4 h)

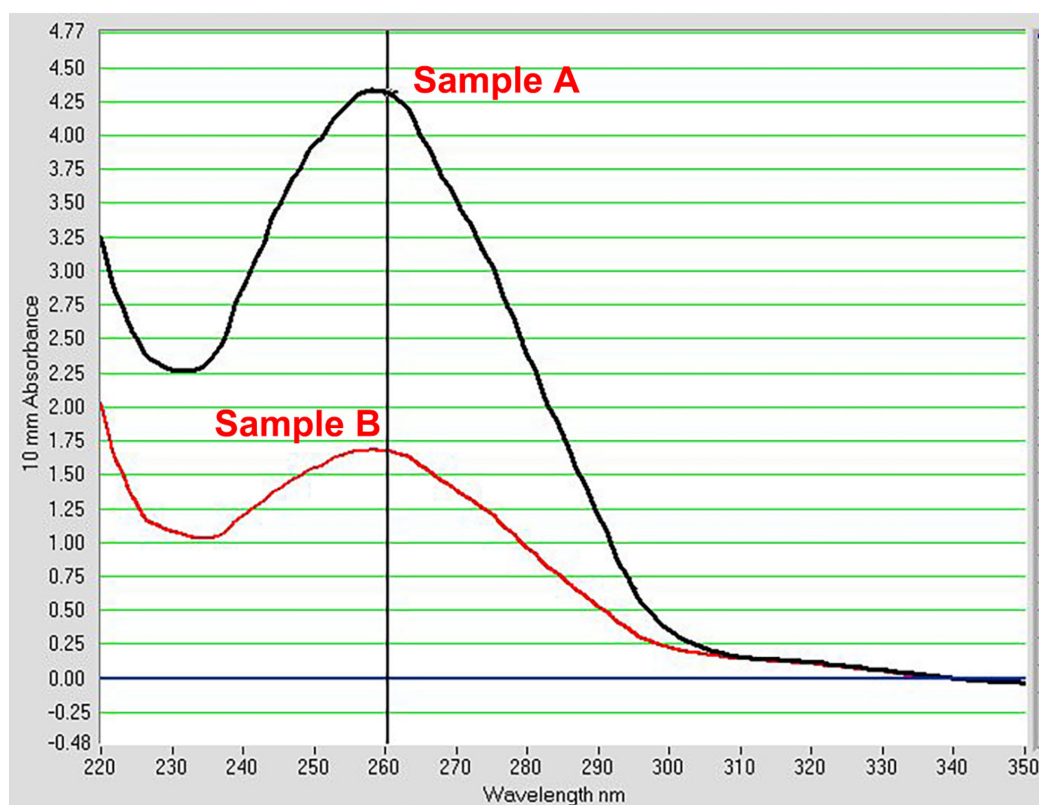


图 4. 使用 Nanodrop 对两种方法提取得到的 DNA 样品质量测试结果 **Sample A:** 使

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 °C, 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，可增加 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 14,000 × g 进行离心前离心管应严格配平 (离心管之间质量差 < 0.01 g)，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
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.0921	7
Na ₂ HPO ₄	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。

2. 1% (wt/v) 的焦磷酸盐 (试剂 S₁)

称取 1 g 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。

3. 5% (v/v) 的吐温 20 (试剂 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。

4. 去腐试剂 S₀

- 1) 配置 1 M NaH₂PO₄: 称取 1.56 g NaH₂PO₄·2H₂O 固体加入 10 ml 去离子水内，搅拌溶解。
- 2) 配置 1 M Na₂HPO₄: 称取 23.20 g Na₂HPO₄·5H₂O 固体加入 100 ml 去离子水内，搅拌溶解。
- 3) 混合 6.8 ml NaH₂PO₄ 与 93.2 ml Na₂HPO₄，使用 NaOH 调节 pH 至 8.0。
- 4) 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。
- 5) 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。
- 6) 混合 3)、4)、5) 与 100 ml Tris-HCl，加入去离子水定容至 1 L。
- 7) 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。

5. 3 M 乙酸钠

称取 40.8 g 的三水合乙酸钠，用去离子水定容至 100 ml，搅拌待其完全溶解后，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。

6. 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

1. 窦敏娜. (2018). [重金属污染环境土壤细菌总DNA提取方法探索](#). 陕西农业科学

- 64(05): 37-38, 52.
2. 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](#). *Front Env Sci Eng* 9: 444-452.
3. Pascaud, A., Soulas, M. L., Amellal, S. and Soulas, G. (2012). [An integrated analytical approach for assessing the biological status of the soil microbial community](#). *Eur J Soil Biol* 49: 98-106.
4. Neveu, M., Poret-Peterson, A. T., Lee, Z. M. P., Anbar, A. D. and Elser, J. J. (2014). [Prokaryotic cells separated from sediments are suitable for elemental composition analysis](#). *Limnol Oceanogr: methods* 12(7): 519-529.