

用于 PCR 扩增的细菌 DNA 提取方法比较

冯广达, 陈美标, 羊宋贞, 朱红惠

(广东省微生物研究所/广东省华南应用微生物重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地/
广东省菌种保藏与应用重点实验室/广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070)

摘要:以 14 个属的革兰阴性菌和阳性菌为研究对象,采用 16S rRNA 基因 PCR 扩增对 4 种细菌 DNA 提取法进行了比较. 结果表明,对细菌 DNA 的提取效果排序,依次为冻融法、煮沸法、碱解法、ROSE 法. 冻融法效果最好,具有成本低、省时省力、无污染等优点,但仍存在少数革兰阳性菌 DNA 提取失败的现象. 因此,在菌株较多的情况下可先采用冻融法提取细菌 DNA,对少数提取失败的菌株,弃冻融法得到的上清液,再以 SDS 法、CTAB 法或 DNA 试剂盒的提取进行补充. 采用该操作流程既能节省成本和时间,又减少了提取过程中有机废弃物的产生.

关键词:DNA 提取; 冻融法; 16S rRNA 基因; PCR
中图分类号:Q93-3 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)03-0439-04

A Comparative Study on Bacteria DNA Extraction Methods
Used for PCR Amplification

FENG Guangda, CHEN Meibiao, YANG Songzhen, ZHU Honghui

(Guangdong Institute of Microbiology/State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry—Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China/Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application/
Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract:The 16S rRNA genes amplification effects of the four simple total DNA extraction methods (freeze-thaw, boiling, alkaline lysis, and ROSE) were compared by extracting DNA from the Gram-negative and gram-positive bacterial strains of 14 genera. The results showed that the extraction effects of the methods from superior to inferior were in the following order: freeze-thaw, boiling, alkaline lysis and ROSE. The freeze-thaw method had advantages of cost-effective, time-and labor-saving and non-pollution. However, it was not always effective for minority gram-positive bacteria. When the DNA extraction of a large number of bacterial strains was required, the freeze-thaw method to extract total DNA of most bacteria may be first used. For the minority of DNA extraction samples which failed, it was advisable to discard the suspension from the freeze-thaw method, then use the chemical methods such as CTAB, SDS or DNA extraction kit for supplement. The freeze-thaw method to extract total DNA could not only save time and reduce cost, but also decrease the production of organic waste during DNA extrction.

Key words:DNA extraction; the freeze-thaw method; 16S rRNA gene; PCR

随着分子生物学技术的不断进步,许多非培养 法在微生物学领域的研究中得到广泛应用^[1-4]. 尽管

收稿日期:2012-09-03 网络出版时间:2013-06-13
网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130613.1420.013.html>
作者简介:冯广达(1983—),男,助理研究员,硕士;通信作者:朱红惠(1970—),女,研究员,博士,E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn
基金项目:国家自然科学基金(31070103,31200006);广东省自然科学基金重点项目(10251007002000001);广东省科技计划项目(2009B030802013)

如此,传统的平板分离及鉴定工作仍然是获取微生物资源最直接的方式,发挥着不可替代的作用.菌株遗传信息的获取对于明确其分类地位必不可少,因此需要提取DNA进行基因扩增和测序.采用CTAB法^[5]、SDS法^[6]或基因组提取试剂盒提取DNA均具有较好的效果,但在菌株数量较多的情况下,这些方法仍存在耗时长或费用高等问题.此外,CTAB法和SDS法提取DNA的过程中还会产生酚、氯仿等有机污染物.针对该问题,本研究以不同属的革兰阴性菌和阳性菌为研究对象,比较了4种简单提取细菌DNA方法的效果,为其在细菌资源发掘和鉴定中的应用提供参考.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

革兰阴性菌7株,包括:*Escherichia coli* ATCC 8739、*Acinetobacter* sp. 1PNM-1、*Massilia* sp. 1PNM-3、*Sphingomonas* sp. 1PNM-9、*Herbaspirillum* sp. 9PNM-13、*Ralstonia* sp. 6HR-14和*Moraxella* sp. 1NM-7.革兰阳性菌8株,包括:*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Staphylococcus aureus* ATCC 6538、*Deinococcus* sp. 1PNM-7、*Arthrobacter* sp. 9PNM-1、*Curtobacterium* sp. 6PNM-17、*Staphylococcus* sp. 1NM-17、*Streptomyces* sp. 6PNM-9和*Kocuria* sp. 1PNM-16.其中,*Escherichia coli* ATCC 8739、*Bacillus subtilis* ATCC 6633和*Staphylococcus aureus* ATCC 6538由广东省微生物菌种保藏中心提供,其余菌株均分离自矿区.

1.2 试剂及仪器

酵母提取物和蛋白胨(Oxoid, UK),酸水解干酪素、琼脂糖和十二烷基肌氨酸钠(Sigma, USA),丙酮酸钠(国药集团,上海),*EasyTaq*TM DNA聚合酶(全式金,北京),dNTP和Maker DL5000(东盛生物,广州),引物合成(英骏,上海);PCR仪(Biometra Tprofessional, Germany),离心机(Sigma, USA),电泳仪(六一,北京).

1.3 DNA提取

将供试菌株分别接种于R2A^[7]液体培养基中,30℃、150 r/min振荡培养至对数期后期或稳定期,菌液浑浊.每个菌株分别取2 mL菌液于4个离心管中,12 000 r/min离心2 min,弃上清液.收集的菌体分别按下述4种方法进行处理.

1.3.1 冻融法 向离心管中加入500 μL的无菌双蒸水,采用液氮将离心管冷冻后,置于99℃水浴5 min,取出后涡旋30 s,重复上述操作1次.12 000 r/min离心,以上清液作为模板.

1.3.2 煮沸法^[8] 向离心管中加入500 μL无菌双蒸水,涡旋30 s,置95℃水浴5 min,12 000 r/min离心2 min.以上清液作为模板.

1.3.3 碱解法^[9] 加入50 μL 0.5 mol/L NaOH溶液于离心管中,涡旋30 s.取5 μL液体用无菌的0.1 mol/L Tris (pH 8.0)溶液稀释100倍,以稀释液作为模板.

1.3.4 ROSE法^[10] 向离心管中加入200 μL ROSE Buffer[10 mmol/L Tris (pH8.0),312.5 mmol/L EDTA (pH 8.0),10 g/L 十二烷基肌氨酸钠,10 g/L 聚乙烯聚吡咯烷酮],涡旋30 s,置90℃水浴20 min后,冰浴5 min,取10 μL液体用无菌双蒸水稀释100倍,以稀释液作为模板.

1.4 PCR扩增

采用细菌16S rRNA基因引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TAC-GACTTAACCCCAATCGC-3')^[11]对15株细菌分别进行PCR扩增.25 μL反应体系包括:10×Buffer 2.5 μL,10 mmol/L dNTP 0.5 μL,10 μmol/L引物各0.5 μL,*Taq*酶1.25 U,模板2 μL,ddH₂O定容至25 μL.PCR扩增程序:95℃预变性3 min;进入PCR循环,94℃30 s,56℃30 s,72℃1.5 min,30个循环;72℃延伸20 min.PCR产物采用添加了Goldview的10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测,根据电泳图谱来判断4种细菌DNA提取方法的效果.对其中提取效果较好的方法,增加DNA提取及PCR扩增的重复试验2次,以验证方法的稳定性.

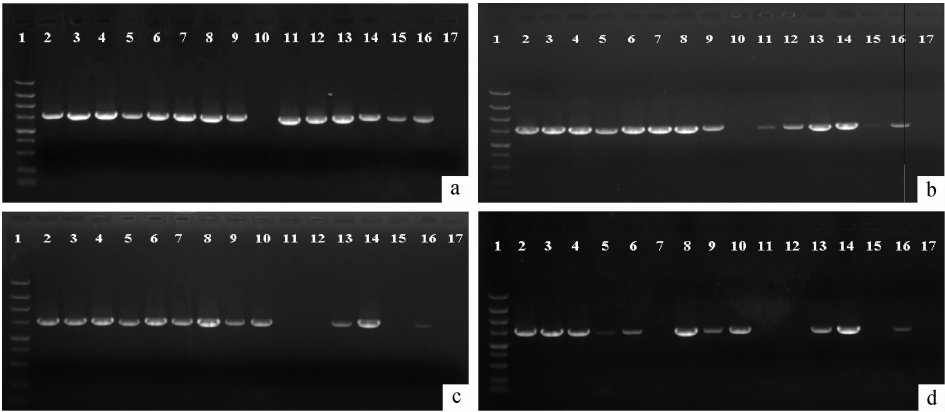
2 结果与分析

2.1 细菌DNA提取效果比较

分别采用4种方法提取了15株细菌的总DNA,以之为模板进行了16S rRNA基因的PCR扩增.电泳结果如图1所示,以冻融法、煮沸法和碱解法提取的不同属的革兰阴性菌的总DNA为模板,均能够成功用于16S rRNA基因的PCR扩增,目的片段大小约为1.5 kb,而采用ROSE法提取的7株革兰阴性菌的总DNA中,仅*Escherichia*、*Acinetobacter*、*Massilia*和*Moraxella*4个属的菌株得到了较好的PCR扩增效果,而其他3个属的菌株PCR扩增效果较差或失败.4种方法对革兰阳性菌总DNA的提取效果也存在较大的差异,采用冻融法成功提取了7株不同属的革兰阳性菌菌株的总DNA,仅*Staphylococcus aureus* ATCC 6538的总DNA未能成功提取.采用煮沸法则成功提取了5株革兰阳性菌的总DNA,但提取的*Staphylococcus aureus* ATCC 6538、*Deinococcus* sp.

1PNM-7 和 *Streptomyces* sp. 6PNM-9 的 PCR 效果较差或失败. 采用碱解法和 ROSE 法仅能成功提取 4 株革兰阳性菌的总 DNA, 而对 *Deinococcus* sp. 1PNM-7、*Arthrobacter* sp. 9PNM-1、*Streptomyces* sp. 6PNM-9 和

Kocuria sp. 1PNM-16 的提取效果较差或失败. 增加冻融法和煮沸法的 2 次重复试验分别取得了与图 1a 和图 1b 相同的效果, 证明这 2 种方法均具有较好的稳定性.



泳道 1: DNA maker DL5000;泳道 2~8:革兰阴性菌株,依次为 *Escherichia coli* ATCC 8739、*Acinetobacter* sp. 1PNM-1、*Massilia* sp. 1PNM-3、*Sphingomonas* sp. 1PNM-9、*Herbaspirillum* sp. 9PNM-13、*Ralstonia* sp. 6HR-14、*Moraxella* sp. 1NM-7;泳道 9-16:革兰阳性菌株,依次为 *Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Staphylococcus aureus* ATCC 6538、*Deinococcus* sp. 1PNM-7、*Arthrobacter* sp. 9PNM-1、*Curtobacterium* sp. 6PNM-17、*Staphylococcus* sp. 1NM-17、*Streptomyces* sp. 6PNM-9、*Kocuria* sp. 1PNM-16;泳道 17:空白.

a: 冻融法;b: 煮沸法;c: 碱解法;d: ROSE 法.

图 1 不同 DNA 提取方法的 PCR 扩增效果

Fig. 1 PCR amplification of bacteria DNA extracted by different methods

冻融法和煮沸法提取 DNA 原理均为物理作用裂解细胞,两者对 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 的总 DNA 提取均未成功,但前者对 *Deinococcus* 和 *Streptomyces* 属菌株的总 DNA 提取效果均优于煮沸法. 碱解法和 ROSE 法均为化学作用裂解细胞,在革兰阴性菌的总 DNA 提取效果上碱解法优于 ROSE 法,与冻融法和煮沸法取得了相似的效果,但在革兰阳性菌的 DNA 提取上,两者效果均较冻融法和煮沸法差. 碱解法和 ROSE 法均能够成功提取 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 的总 DNA,而该菌株采用物理裂解的方法均未成功,这说明化学作用在裂解革兰阳性菌的细胞方面具有一定的优势,但它们对 *Deinococcus*、*Arthrobacter*、*Streptomyces* 和 *Kocuria* 属的菌株 DNA 提取均未成功. 总体而言,对细菌总 DNA 的提取效果排序依次为冻融法、煮沸法、碱解法、ROSE 法,冻融法效果最好.

2.2 细菌 DNA 提取操作规程

本研究表明了冻融法的 DNA 提取效果要优于煮沸法,但并不能成功提取所有菌株的总 DNA,尤其是革兰阳性菌. 针对该问题,我们提出了如图 2 所示的操作规程. 先对大量分离的菌株进行液体培养,待对数期取部分菌液用于甘油种制备. 剩余的菌液按照冻融法进行前处理,以获得的上清液为模板进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增. 对于少数扩增效果差或

失败的菌株,则弃上清液,采用 CTAB、SDS 法或试剂盒再次提取其总 DNA 进行补充,以确保获取菌株的遗传信息.

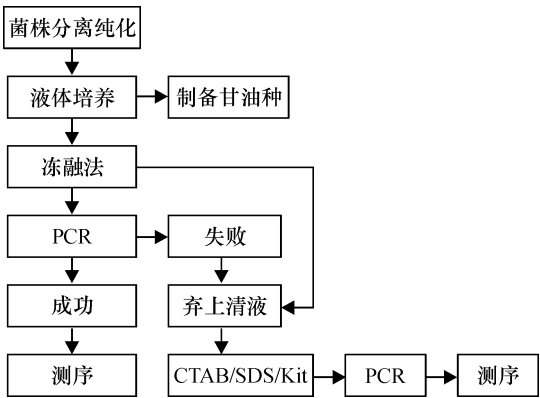


图 2 细菌 DNA 提取操作规程

Fig. 2 Operational procedure of bacteria DNA extraction

3 讨论与结论

微生物资源获取的过程中往往需要分离大量菌株,并通过 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及测序了解其分类地位. 因此, DNA 的提取成本和效率尤为重要. 目前许多学者仍采用化学裂解的方法(如 SDS、CTAB 等)提取细菌的总 DNA^[12-16],这些方法不仅耗时耗力,且会产生大量的酚和氯仿等有机污染物. 尽管市售的基因组 DNA 提取试剂盒具有省时和效率

高的优点,但在菌株较多和经费有限的情况下成本依然较高.为此,本研究以来自14个属的革兰阴性和阳性细菌菌株为研究对象,对4种简单提取细菌DNA方法的效果进行了比较.研究结果表明在细菌DNA的提取效果上进行排序,依次为冻融法、水煮法、碱解法、ROSE法,冻融法效果最好,理论上,碱解法和ROSE法采用化学作用的方式应更有助于细胞的裂解和DNA的释放,但在实际操作过程中,我们发现部分细菌的胞内物与化学裂解液反应后会形成大量的黏稠状物质,这种现象在革兰阳性菌中更为突出,而这2种方法又缺少了酚/氯仿/异戊醇的纯化步骤,使得DNA释放和溶解都较为困难,这些黏稠状物质可能也影响到了DNA聚合酶的活性,导致部分菌株的PCR扩增失败,尝试采用高速离心仍无法解决该问题.钱雪琴等^[17]对*E. coli* ATCC 25922和*Staphylococcus aureus* ATCC 25923利用碱解法提取DNA用于PCR扩增也均告失败.冻融法和煮沸法虽为物理作用裂解细胞,但在不同属的供试菌株DNA提取中均取得了较好的提取效果.与之相似,李森等^[18]采用煮沸法成功提取了冻土中144株细菌的总DNA.在大量菌株的分离鉴定过程中,采用本研究中的操作流程获取的PCR产物可直接用于测序和克隆,在实现菌种保藏的同时,又缩减了DNA提取的成本和时间,且减少了有机废弃物对环境的污染,提高了细菌菌株遗传信息的获取效率.

参考文献:

- [1] MUYZER G, DE WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700.
- [2] WAKELIN S A, ANAND R R, REITH F, et al. Bacterial communities associated with a mineral weathering profile at a sulphidic mine tailings dump in arid Western Australia[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2012, 79(2): 298-311.
- [3] CHANDLER D P, BROCKMAN F J, FREDRICKSON J K. Use of 16S rDNA clone libraries to study changes in a microbial community resulting from ex situ perturbation of a subsurface sediment[J]. FEMS Microbiol Rev, 1997, 20(3/4): 217-230.
- [4] HOLT K E, PARKHILL J, MAZZONI C J, et al. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi[J]. Nat Genet, 2008, 40(8): 987-993.
- [5] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [6] TSAI Y L, OLSON B H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(4): 1070-1074.
- [7] VAN DER LINDE K, LIM B T, RONDEE J M, et al. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: A comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media[J]. Nephrol Dial Transplant, 1999, 14(10): 2433-2437.
- [8] GÜSSOW D, CLACKSON T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(10): 4000.
- [9] WANG Hong, QI Meiqing, CUTLER A J. A simple method of preparing plant samples for PCR[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(17): 4153-4154.
- [10] STEINER J J, POKLEMB A C J, FJELLSTROM R G, et al. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(13): 2569-2570.
- [11] WEISBURG W G, BARNS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. J Bacteriol, 1991, 173(2): 697-703.
- [12] 张越己, 秦盛, 卞光凯, 等. 具有ACC脱氢酶活性的麻疯树根际促生菌(PGPR)的分离筛选及系统发育分析[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7): 901-911.
- [13] 包慧芳, 王伟, 王宁, 等. 塔克拉玛干沙漠腹地胡杨林土壤细菌多样性分析[J]. 微生物学报, 2011, 51(1): 122-126.
- [14] 姜怡, 曹艳茹, 王茜, 等. 波罗的海放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(11): 1461-1467.
- [15] JANSO J E, CARTER G T. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(13): 4377-4386.
- [16] SUN Leni, ZHANG Yanfeng, HE Linyan, et al. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland[J]. Bioresour Technol, 2010, 101(2): 501-509.
- [17] 钱雪琴, 张军, 沈芳. Chelex-100法和碱性裂解法提取细菌DNA的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(8): 1565-1566.
- [18] 李森, 冯海艳, 杨忠芳, 等. 中国典型冻土区土壤可培养细菌多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(12): 1595-1604.

【责任编辑 李晓卉】