

重金属污染环境土壤细菌总DNA提取方法探索

窦敏娜

(咸阳职业技术学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要:通过对重金属污染环境土壤细菌总DNA提取方法探索,并对提取总DNA做PCR-DGGE分析,找到一种较适合提取重金属污染环境土壤细菌总DNA的方法。

关键词:重金属污染;土壤细菌群落;DNA提取;PCR-DGGE

中图分类号: S154.3

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2018)02-048-03

近年来,从土壤环境中提取总DNA的方法主要是直接提取法和间接提取法^[1-3]。间接提取法是通过先提取细胞,再进行细胞破壁溶解,获得环境样品的总DNA,虽然纯度高,但是提取量较少,且不能真实反映被调查环境中整个细菌群落结构,而且费时耗力;直接提取法是通过物理方法、化学方法或者生物酶分解的方法,让环境样品中的细胞直接破裂溶解,获取环境样品的总DNA,此法提取的总DNA更接近于样品的真实环境,能较好反映被调查环境的细菌群落结构。

本研究采集的重金属污染土壤来自于北京郊区东三岔铅锌尾矿区,由于采集的土壤属于重金属铅镉铬复合污染,加之土壤环境复杂,对后期应用PCR-DGGE方法研究重金属污染环境土壤细菌群落造成影响,对比应用不同方法从重金属铅镉铬复合污染土壤样品中获取细菌群落的总DNA量差异,并用变性梯度凝胶电泳(DGGE)检验不同方法提取总DNA的土壤细菌群落结构差异,试图找到一种较适合的细菌群落总DNA提取方法。

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

含重金属铅镉铬复合污染的土壤样品采于北京东三岔铅锌尾矿区,此矿已废弃多年,其附近的土壤受到金属铅镉铬的严重污染^[4,5]。本次采样深度为10-20厘米,采样位置分别是:距矿60米果园土壤,距矿40米的溪泥,距矿20米矿渣,洞口土壤和

矿洞内土壤。重金属铅镉铬复合污染的土壤样品采集后进行除渣、过筛、等量混合,冰箱4℃冷藏,并于24小时内进行细菌群落总DNA提取。

1.2 土壤样品的DNA提取方法

1.2.1 直接提取法^[6-9] 首先,取0.2g重金属污染的土壤样品,装入2ml无菌离心管,加入540μL预配制好的DNA提取液,加入4μL的蛋白酶K(10g/L),放入37℃恒温水浴30min(每隔两分钟上下振荡几下)。再加入60μL20%的SDS,65℃恒温水浴两小时(每隔15分钟振荡几下)。然后,6000转离心10分钟,将上清液转移到新的无菌离心管中,将离心沉淀再加入180μL的DNA提取液和20μL20%的SDS,高速涡旋振荡10秒,再次65℃恒温水浴10分钟,并6000转离心10分钟,取上清。此操作共重复三次,将所有上清液混合。

其次,将上清液和氯仿-异戊醇(体积比24:1)1:1混合振荡均匀,15000转高速离心10分钟后吸取水相,并移到干净无菌的离心管中(根据杂质多少可选择再次抽提)。

再次,将水相用异丙醇(0.6倍体积)室温沉淀1小时。再次离心20分钟(15000转,室温),弃上清,将沉淀用70%的乙醇(4℃预冷)洗涤2次,自然风干。最后,将风干的核酸产物重悬于20μL无菌的去离子水中,待用。

1.2.2 直接PCR法 将5种矿土样品等量混合后,取0.2g加入无菌水中,30℃恒温振荡30min,低速离心取上清1μL,尝试用预处理的土壤样品作为聚合酶

收稿日期:2018-05-19

作者简介:窦敏娜(1982—),女,陕西礼泉人,硕士,讲师。主要从事环境微生物研究工作。

链反应 (PCR) 的模板, 直接进行PCR扩增, 希望得到基因产物(见1.3)。

1.2.3 试剂盒法 应用细菌基因组DNA提取试剂盒提取土壤样品总DNA (上海生工)。

1.3 PCR扩增产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)检测

对土壤样品总DNA提取特液进行纯化采用的是上海生工的玻璃珠DNA胶回收试剂盒 (SK111), 检测纯化效果用的是1.0%的琼脂糖电泳。

将纯化后的土壤样品总DNA作为聚合酶链反应 (PCR) 的模板, 在Gene Amp PCR System 2700型基因扩增仪 (Applied Biosystems??) 上进行基因扩增, 采用16S rRNA基因的V3区引物对: F357GC (基因序列为: 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3',) 和R518 (基因序列为: 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'), 用这对引物来扩增对大多数细菌和古细菌都具有特异性的片段长度约为230bp基因产物。PCR反应体系 (50 μ L) 如下表1:

表1 PCR反应体系

试剂	体积 (μ L)
10 \times Buffer	5
MgCl ₂ (25mM)	5
dNTP (25mM)	1.5
F ₃₅₇ GC 引物 (10 μ M)	1.5
R ₅₁₈ 引物 (10 μ M)	1.5
Taq 酶 (1U/ μ L)	2.5
ddH ₂ O	33

聚合酶链反应 (PCR) 参数为: 94 $^{\circ}$ C预变性5min, 94 $^{\circ}$ C变性1min, 65 $^{\circ}$ C-55 $^{\circ}$ C退火1min (其中每个循环后温度下降0.5 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C延伸3min, 共20个循环, 然后为 94 $^{\circ}$ C变性1min, 55 $^{\circ}$ C退火1min, 72 $^{\circ}$ C变性3min, 共10个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸10min。最后, PCR反应产物的检测用1.7%琼脂糖凝胶电泳。

分离PCR反应产物采用DcodeTM的基因突变检测系统 (Bio-Rad公司) 完成。具体步骤是: 使用梯度胶制备装置, 制备变性剂浓度为30%到60%的10%聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度的递增方向是从上向下。等变性胶完全凝固, 将变性胶板移入装有电泳缓冲液的电泳槽中 (60 $^{\circ}$ C预热), 每个加样孔加入PCR样品30 μ l (含有10%加样缓冲液)。在120V的电压下, 60 $^{\circ}$ C电泳5-6小时, 注意观察条带迁移速度, 电泳完毕, 将EB染色后的凝胶用凝胶影像

分析系统分析, 观察分析每个样品的电泳条带并完成拍照。

2 实验结果

2.1 DNA提取结果

用0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取结果见图1。可以看出直接提取法提取总DNA, 条带不是最亮, 但是基本无杂质; 直接PCR法没有扩增到条带; 试剂盒法提取总DNA条带较亮, 但杂质太多。

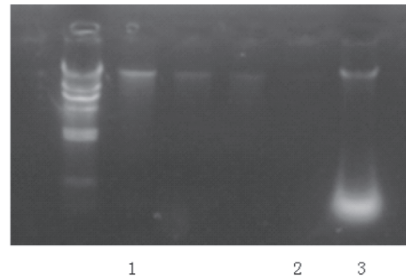


图1 不同方法总DNA提取结果
注:1.直接提取法 2.直接PCR法 3.试剂盒法

2.2 不同方法提取的DNA样品的PCR - DGGE图谱检验

不同方法提取的DNA粗提液, 经试剂盒纯化, 降落式PCR后, 其DGGE图谱见图2。

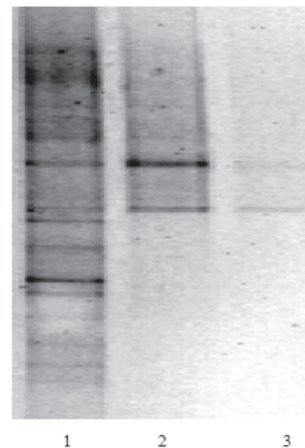


图2不同方法的DGGE图谱
注:1.直接提取法 2.试剂盒法 3.直接PCR法

从图2可看出, 直接提取法DGGE条带数目最多, 说明这种方法提取的重金属污染土壤样品中细菌群落的多样性最为丰富, 即能更好反映土壤真实情况; 试剂盒法条带少, 直接PCR法又少颜色又淡。

3 小结

通过本研究发现: 由于重金属铅镉铬复合污染的土壤环境复杂, 选用经实验室多次尝试改进的

直接裂解法提取总DNA,并做好适合的预处理工作,便能较好提取到重金属铅镉铬复合污染土壤细菌群落总DNA,能较好地反映被重金属铅镉铬复合污染土壤的细菌群落状况;试剂盒法虽提取总DNA快速,但杂质多、价格高,且不能较好反映重金属铅镉铬复合污染土壤细菌群落真实状况;直接PCR法不能应用于重金属铅镉铬复合污染土壤细菌群落研究。

参考文献

- [1]阳静,张静,邹伟,赵兴秀,赵长春.环境微生物DNA提取方法研究进展[J].食品与机械,2017,(33)3:207-210.
- [2]张静文,罗明,徐文修.用于微生物多样性分析的棉田土壤总DNA的提取[J].生物技术,2009,(5):34-37.
- [3]张瑞福,曹慧,崔中利.土壤微生物总DNA的提取和纯化[J].微生物学报,2003,(2):276-282.
- [4]刘辉等.矿区土壤镉污染研究[J].有色金属(矿山部分)2004,(56)4:47-48.
- [5]窦敏娜,王宁堂,王晓霞.一株强抗镉成团肠杆菌的分离鉴定[J].甘肃科学学报,2014,(2):9-11.
- [6]赵勇,周志华,李武等.土壤微生物分子生态学研究总DNA的提取[J].农业环境科学学报,2005,24(5):854-860.
- [7]徐晓宇,闵航,刘和,王远鹏.土壤微生物总DNA提取方法的比较[J].农业生物技术学报,2005,(13)3:377-381.
- [8]滕应,骆永明,赵祥伟等.重金属复合污染农田土壤DNA的快速提取及其PCR-DGGE分析[J].土壤学报,2004,(41)3:343-347.
- [9]魏斐,杨丽荣,吴坤,薛保国.不同方法提取土壤、活性污泥中总DNA的比较研究[J].河南农业科学,2012,(41)5:74-77.

[责任编辑:王军利]

Exploration of DNA Extraction Method for PCR-DGGE Analysis in Soil with Mixed Heavy Metals

DOU Min-na

(Xianyang Vocational & Technical College, Xianyang, Shaanxi 712000)

Abstract: there exist diverse methods in total DNA extraction from soils. A suitable method for DNA Extraction in Soil with Mixed Heavy Metals was detected in the paper, through the investigation in purity and the impact on the subsequent by polymerase chain reaction-denatured gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) analysis.

Key words: heavy metal pollution, soil microbial communities, DNA extraction, PCR-DGGE