

海洋沉积物 DNA 提取前的简易脱腐方法研究^①

席峰^{②*} 傅莲英^{**} 王桂忠^{*} 郑天凌^{③*}

(* 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门大学海洋与环境学院 福建 361005)

(** 厦门大学生命科学学院 福建 361005)

(*** 集美大学水产生物技术研究所 福建 361021)

摘要 针对海洋沉积环境样品 DNA 提取中的腐殖酸去除难题, 采取先脱除腐殖酸再提取 DNA 的策略, 进行了海洋沉积物 DNA 提取前的简易脱腐方法研究。依据腐殖酸的理化性质, 遴选出由 Tris-HCl、EDTA、Na₄P₂O₇、NaCl、PVP、Triton X-100 及脱脂奶粉组成脱腐缓冲液, 有效地脱除了腐殖酸。之后采用温和的溶菌酶-蛋白酶 K-SDS 直接裂解法, 获取了大片段(分子量 21kb 以上)可进行 *rpob* 基因 PCR 扩增的海洋沉积物 DNA, 为海洋沉积环境分子生态学研究与海洋生物活性物质开发奠定了基础。

关键词 海洋, 沉积物, DNA, 腐殖酸, 脱除

0 引言

海洋沉积物 DNA 提取对海洋沉积环境的分子生态学研究与海洋生物活性物质开发有重要意义。在以往海洋沉积物 DNA 提取过程中, 对 DNA 提取影响最大的是结构复杂的结合态腐殖酸(humic acids, HAs), 它难以分离。原因在于腐殖酸拥有独特的苯环、稠环和各种杂环结构, 富含羟基、羧基、烯醇基、磺酸基、胺基等多种活性官能团, 表现出极性、氧化还原性、络合与吸附等多重理化性质^[1], 致使在经典的 DNA 提取过程中它不仅可与粘粒及金属离子等相互作用而将微生物裹挟其中, 阻止 SDS 等变性剂的渗透并抑制溶菌酶及蛋白酶 K 等的活性, 而且在相当程度上影响裂解缓冲液对微生物的裂解^[2], 同时经碱性裂解液处理后溶出的黄腐酸与棕腐酸既能氧化为醌, 又能还原为酚^[3], 这样可导致部分 DNA 随氧化的苯酚进入有机相而丧失^[4, 5], 即便在对 DNA 进行纯化与浓缩的乙醇或异丙醇溶液中, 腐殖酸仍与 DNA 表现出相似的沉淀行为^[6], 因此, 即使采用透析、离子交换、密度梯度离心、层析和电泳等不同方法对核酸粗提物进行进一步纯化^[7-9], 仍有一些理化性质与核酸相近的腐殖酸组分与之共存, 从而影响到核酸的定量^[10]及后续的 PCR 扩增、杂交、酶切乃至转化等技术过程^[11-15]。由于传统的海洋沉积物 DNA 提取方法存在除杂步骤多、过程繁杂、依赖贵重仪器、提取成本高、DNA 损失量大等

诸多缺陷, 难以客观揭示原位环境的分子生态状况。即便是某些商业公司开发的土壤 DNA 抽提试剂盒, 其效果仍难以满足宏基因组文库对 DNA 大片段的需求, 无法应用于生物活性物质的开发。因此, 建立简便有效的海洋沉积物 DNA 提取方法势在必行。

纵观传统的沉积物 DNA 提取过程可以发现, 在细胞裂解之前, 腐殖酸与 DNA 本是相隔离的, 若在此前有效地去除腐殖酸, 则可望解决腐殖酸问题。因此, 我们开展了这项建立一种细胞裂解前有效脱除海洋沉积物腐殖酸的简易方法, 实现采取温和裂解法获取高产、高纯度的大片段 DNA。

1 材料与方法

1.1 沉积物样品

沉积物样品采自近海滩涂半精养虾池、港口和红树林区。虾池沉积物表层为棕黄色, 港口与红树林沉积物样品均为棕黑色。

1.2 方法

1.2.1 脱腐缓冲液筛选

将沉积物(湿重)与不同的脱腐缓冲液按质量/体积比(w/v)1:10 混合, 旋涡 3 min 后作用 10 min, 再旋涡 3 min 后 3000g 离心 5min, 根据上清颜色深浅判定不同脱腐缓冲液的脱腐效果, 洗涤完毕后采用 DAPI 荧光计数检测微生物的裂解率, 筛选脱腐效果显著且无明显裂解现象的脱腐缓冲液。

1.2.2 脱腐参数优化

① 863 计划(2002AA603013)、国家自然科学基金(30370276)、“长江学者和创新团队发展计划”和福建省科技重点项目(20041023)资助。

② 男, 1972 年生, 博士生, 研究方向: 环境微生物学, E-mail: xifeng@jmu.edu.cn

③ 联系人, E-mail: microzh@jingxian.xmu.edu.cn, wshwzh@jingxian.xmu.edu.cn.

(收稿日期: 2005-09-08)

表 2 复合组分脱腐缓冲液的脱腐与裂解效应

试剂组合	脱腐与裂解效应
100mmol/L Tris , 100mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 100mmol/L Na_2EDTA , 1.0% PVP(以 NaOH 分别调 pH 至 8.0 , 9.0 , 10.0 , 11.0 , 12.0 , 13.0)	pH 8.0 与 9.0 呈浅棕黄色和棕黄色 , pH 10.0 以上呈棕黑色 , pH 10.0 无明显的细胞裂解现象 , pH 11.0 时微生物细胞裂解率 6% ~ 15%
100mmol/L Tris , 100mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 100mmol/L Na_2EDTA , 1.0% PVP , 100 mmol/L NaCl (pH 10.0)	上清棕黑色 , 微生物无明显裂解
100mmol/L Tris , 100mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 100mmol/L Na_2EDTA , 1.0% PVP , 100 mmol/L NaCl 0.05% Triton X-100 (pH 10.0)	上清棕黑色 , 微生物无明显裂解 , 体系更为均一稳定
100mmol/L Tris , 100mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 100mmol/L Na_2EDTA , 1.0% PVP , 100 mmol/L NaCl 0.05% Triton X-100 4.0% 脱脂奶粉 (pH 10.0)	上清棕黑色 , 微生物无明显裂解 , 洗涤次数减少至 2 次即可充分脱腐
50 mmol/L Tris , 20 mmol/L EDTA , 100 mmol/L NaCl , 1.0% (w/v) PVPP (pH 10.0) ^[16]	上清澄清 , 无明显脱腐效应
50 mmol/L Tris-HCl , 200 mmol/L NaCl , 5 mmol/L Na_2EDTA , 0.05% Triton X-100 (pH 8.3) ^[17]	上清澄清 , 无明显脱腐效应

由此,最后遴选出的脱腐缓冲液为:100mmol/L Tris, pH 10.0, 100mmol/L $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 100mmol/L Na_2EDTA , 1.0% PVP, 100 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100 4.0% 脱脂奶粉。将此缓冲液与 Picard 等^[16] (1992)提出,后相继为许多研究者作为 DNA 提取缓冲液的 TENP (50 mM Tris, pH 10.0, 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% (w/v) PVPP) 以及 Fortin 等^[17] (2004) 的研究 (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 200 mM NaCl, 5 mM Na_2EDTA , 0.05% Triton X-100) 相比,其脱腐性能更为优越。

2.2 脱腐方案

以遴选出的脱腐缓冲液为基础,比较沉积物(湿重)与脱腐缓冲液的质量/体积比 (w/v) 在 1:3, 1:5, 1:8, 1:10, 1:15 条件下的洗脱时间与速度,发现其比例至少应在 1:5 以上,不同样品间以 1:10 较为稳定。同时,温度对脱腐速率的影响表明:随着水浴温度提高,脱腐速率提高,适当提高洗涤温度至 DNA 抽提过程中的反应温度 55 ~ 65℃,未使样品微生物发生明显裂解,而脱腐时间大为缩短。至此,优化的脱腐方案为:沉积物(湿重)与脱腐缓冲液的质量/体积比 (w/v) 为 1:10,旋涡混合 3min, 60℃ 水浴 5min,再旋涡 1 min 后 3000g 离心 5 min,根据上清颜色再重复洗涤与离心 1 或 2 次,至上清颜色与洗涤缓冲液颜色无明显差异止。

2.3 脱腐前后沉积物 DNA 的产量与质量

对脱腐与未脱腐样品 DNA 粗提物加以比较发现,前者颜色为白色或略带黄色(红树林样品),而后者为棕黄色。

琼脂糖凝胶电泳表明,脱腐前后 DNA 产量无明

显差异, DNA 片段大小均在 21 kb 以上。对粗提模板经 *rpoB* 基因 PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳显示:未脱腐样品模板的扩增无法进行,而脱腐样品均有效扩增。

3 讨论

3.1 脱腐缓冲液的筛选原则

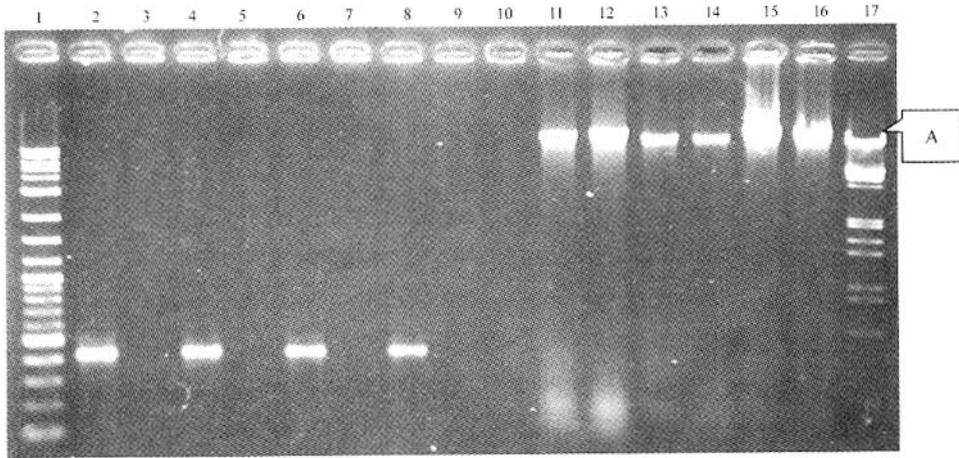
海洋沉积物中对 DNA 提取影响最大的是结构复杂的结合态腐殖酸,它一般与矿物质中的金属离子配位形成稳定的盐类。针对腐殖酸的理化性质及其赋存形态,腐殖酸脱除缓冲液应具备以下功能:(1)能有效地解除腐殖酸与金属离子、粘土颗粒之间的作用,使腐殖酸的由不溶解的二价或多价盐转变为可溶解的单价盐;(2)能促使释出的腐殖酸充分悬浮,增加未脱腐组分与缓冲液接触的表面积,避免洗脱的腐殖酸在离心过程中聚沉;(3)能填充并饱和粘粒等的吸附位点,减少其在后续过程中对腐殖酸和核酸的再吸附。

3.2 脱腐缓冲液不同组分的功能

就结合态腐殖酸的脱除能力而言,常用的配位体 Cl^- 作用很弱,但 NaCl 能提供电解质,加速其他配位剂与表面活性剂在沉积物颗粒固液界面的吸附与扩散速度,提高其吸附量; SO_4^{2-} 在浓度较高时易引发絮凝,也不利于脱腐反应的进行;而 OH^- 、 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 与 EDTA 则与金属离子生成不溶性配合物,破坏腐殖酸钙镁键与铁铝键复合体能力较强;PVP 因其分子链节中的酰胺基团具有吸电子性,导致 N 体现出微弱的阳离子性,因而容易吸附于带负电的沉积物

颗粒、微生物及腐殖酸的表面,它可使洗脱出的腐殖酸分散悬浮,而且,PVP及其聚合物PVPP中所含的酰胺基有很强的结合多酚化合物酚羟基的能力,可与腐殖酸形成稳定的复合物^[9],PVP与腐殖酸形成的复合物存在于离心后的上清中,而PVPP因其聚合度高,与腐殖酸形成的不溶性复合物离心后则与泥沙、粘粒等共存于离心管底部可继续对后续过程

中释出的核酸产生吸附与结合作用而降低其产率;Triton X-100可降低疏水界面表面张力,因而可增强脱腐缓冲液的渗透能力及对碳氢化合物等疏水性污染物的清除能力;脱脂奶粉与腐殖酸竞争并饱和粘粒的吸附位点,防止粘粒对后续裂解过程中释出的核酸产生吸附作用而降低产率^[18],同时也缓冲洗涤过程对微生物产生的剪切作用力。



左起:1为DNA Marker 2-Log DNA Ladder(Biolabs)2为阳性对照 *E. Coli* rpoB 基因 PCR 产物,3为不加模板的阴性对照;4、6、8分别为脱腐后的虾池、红树林、港口沉积物 DNA rpoB 基因 PCR 产物;5、7、9分别为未脱腐虾池、红树林、港口沉积物 DNA rpoB 基因 PCR 产物;11、13、15为虾池、港口、红树林沉积物脱腐样品的DNA提取物;12、14、16为虾池、港口、红树林沉积物未脱腐样品DNA提取物;17为lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III Marke(Sangon),其带A大小为21223bp。

图1

3.3 脱腐 pH 值对微生物裂解的影响

腐殖酸具有类似生物膜的双分子层结构,这种胶体结构依靠弱键维系,一旦 pH 或某些多价离子浓度发生微弱变化,将引发腐殖酸结构的强烈变化——解聚并与大量的自由基、金属离子及其他杂质相互作用^[19]。在高 pH 条件下,腐殖酸聚合体的长链结构趋于舒展,而低 pH 条件下则趋向紧缩,故腐殖酸的脱除应在碱性环境下进行。对脱腐影响最大的是腐殖酸组分的酸解离常数 pK_a 值达 9.0^[20],因此,缓冲液的 pH 应为 9.0 以上可使其解离。鉴于沉积物颗粒结构的复杂性,而绝大多数微生物能在 pH 5.0 ~ pH 9.0 范围内生长,以及微生物坚韧的细胞壁和疏水的细胞膜对短时间洗涤的耐受力,为增强缓冲液渗透强度与速度,pH 宜适当提高。本研究通过 Tris-HCl 将 pH 提高至 10.0,兼顾了脱腐与防裂解双重效益。

3.4 沉积物与脱腐缓冲液的质量/体积比对脱腐反应的影响

腐殖酸具有巨大的表面积与表面能,它对各种离子的吸附能力很强,在较低的质量/体积比条件下,脱腐缓冲液中的水分子几乎为腐殖酸及各种离子所束缚,使体系处于凝胶状态,加之腐殖酸本身亦为多元酸,具有较强的缓冲能力,因而脱腐难以进行。随着质量/体积比的提高,富余的脱腐缓冲液对业已膨胀、松散的腐殖质凝胶团的渗透与瓦解能力逐渐增强,致使平衡朝着有利于脱腐的方向进行。因此,腐殖酸含量越高的沉积物,其质量/体积比宜越大。

3.5 脱腐反应的温度影响

腐殖酸体系为非平衡体系,它与其他物质的反应是受扩散控制的慢反应过程^[21,22]。因此,温度升高可促进腐殖酸的脱除。在避免微生物发生裂解的前提下,采用 55 ~ 65℃ 水浴可使脱腐反应速率较常

温下大大加快,减少了脱腐时间与次数。

3.6 方法的可靠性与适用性

脱腐前后沉积物样品 DNA 粗提物颜色、产量、大小与进化中保守的单拷贝看家基因 *rpoB*^[23] 的 PCR 效果表明:先脱腐后提 DNA 的策略与上述脱腐方法切实可行。腐殖酸脱除缓冲液可针对中国南方土质以黄色或红色的铁铝键复合体为主和北方以黑色或棕黑色的钙镁键复合体为主的特点进行设计,不同生境的研究可根据沉积物性质衍生出特定的脱腐方法。此外,该方法摆脱了以往对特殊器材的需求,仅需普通离心机 and 恒温水浴锅及相关的试剂与耗材即可获取满足分子技术要求的大片段 DNA,是一类经济、简易且普遍适用的方法。

4 结论

本研究采取先除腐殖酸再提 DNA 的策略,依据腐殖酸理化性质与赋存形态制定脱腐缓冲液组分的遴选原则,优化出 Tris-HCl、EDTA、 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、NaCl、PVP、Triton X-100 及脱脂奶粉组成的脱腐缓冲系及其脱腐方案,在 DNA 提取前有效地脱除了海洋沉积物样品的腐殖酸,建立了服务于海洋分子生态研究的海洋沉积物腐殖酸简易脱除方法。

致谢 研究中蒙艾春香、杨小茹、骆苑蓉、王晓颖、李可和蔡莹等支持与帮助,在此谨表谢忱。

参考文献

- [1] Elizabeth W A , Zheng D D , Lutgarde R . The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results . *Appl Environ Microbiol* 2000 66 : 4547-4554
- [2] More M I , Herrick J B , Silva M C , et al . Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment . *Appl Environ Microbiol* ,1994 , 60 :1572-1580
- [3] Lovley D R ,Blunt-Harris E L . Role of humic-bound iron as an electron transfer agent in dissimilatory Fe(III) reduction . *Appl Environ Microbiol* ,1999 65 :4252-4254
- [4] Paciolla M D , Davies G , Jansen S A . Generation of hydroxyl radicals from metal-loaded humic acids . *Environ Sci & Technol* ,1999 33(11) :1814-1818
- [5] Paciolla M D , Kolla S , Jansen S A . The reduction of dissolved iron species by humic acid and subsequent production of reactive oxygen species . *Adv in Environ Res* 2002 , 7(1) : 169-178
- [6] 卓苏能,文启孝. 胡敏酸的酒精分级沉淀法分级. 土壤学报,1994 31(3) 251-258
- [7] Frostegard A S , Courtois S , Ramiisse V , et al . Quantification bias related to the extraction of DNA directly from soils . *Appl Environ Microbiol* ,1999 65 :5409-5420
- [8] Jackson C R , Harper J P , Willoughby D , et al . A simple , efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples . *Appl Environ Microbiol* , 1997 63 :4993-4995
- [9] Young C C , Burghoff R L , Keim L G , et al . Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils . *Appl Environ Microbiol* ,1993 59 :1972-1974
- [10] Zipper H , Buta C , Lammle K , et al . Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments . *Nucleic Acids Res* 2003 31 39-39
- [11] Jacobsen C S , Rasmussen O F . Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin . *Appl Environ Microbiol* ,1992 58 :2458-2462
- [12] Tsai Y L , Olson B H . Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction . *Appl Environ Microbiol* ,1992 58 :2292-2295
- [13] Tebbe C C , Vahjen W . Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast . *Appl Environ Microbiol* ,1993 59 :2657-2665
- [14] Kreader C A . Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein . *Appl Environ Microbiol* ,1996 62 :1102-1106
- [15] Chandler D P , Schreckhise R W , Smith J L , et al . Electroelution to remove humic compounds from soil DNA and RNA extracts . *J Microbiol Methods* ,1997 28(1) :11-19
- [16] Picard C , Ponsonnet C , Nesme X , et al . Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction . *Appl Environ Microbiol* ,1992 ,58 : 2717-2722
- [17] Fortin N ,Beaumier D ,Lee K ,et al . Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments . *J Microbiol Methods* , 2004 56(2) : 181-191
- [18] Ogram A V , Mathot M L , Harsh J B , et al . Effects of DNA polymer length on its adsorption to soils . *Appl Environ Microbiol* ,1994 60 :393-396
- [19] Tombacz E ,Rice J A . Changes of Colloidal State in Aqueous Systems of Humic Acids . In :Ghabbour , E. A. and Davies , G. (eds .) , Understanding Humic Substances : Advanced Methods , Properties and Applications . Cambridge : Royal So-

ciety of Chemistry, 1999, 69-77

[20] 贺婧, 颜丽, 杨凯, 等. 不同来源腐殖酸的组成和性质的研究. 土壤通报, 2003, 34(4): 343-345

[21] 王红斌, 杨敏, 宁平等. 腐殖酸自水溶液中吸附亚甲基蓝的热力学与机理研究. 化学研究与应用, 2002, 14(4): 449-451

[22] 魏世强, 李光林, Osterberg R, 等. 腐殖酸-金属离子反应

动力学特征与稳态指标的探讨. 土壤学报, 2003, 40(4): 554-561

[23] Dahllof I, Baillie H, Kjelleberg S. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(8): 3376-3380

A simple method for removing humic acids from marine sediment samples prior to DNA extraction

Xi Feng^{* ***}, Fu Lianying^{**}, Wang Guizhong^{*}, Zheng Tianling^{* **}

(^{*} State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005)

(^{**} School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

(^{***} Aquaculture Biological Technique Institute, Jimei University, Xiamen 361021)

Abstract

A strategy of removing humic acids (HAs) prior to DNA extraction was conducted to resolve the problem of removing HAs from marine sediments in DNA extraction. According to the physical and chemical properties of HAs, the HAs' removing buffer composing of Tris-HCl, EDTA, Na₄P₂O₇, NaCl, PVP, Triton X-100 and skim milk was screened out, which washed HAs out from the marine sediment samples successfully. Then a mild lysozyme-proteinase K-SDS direct lysis method was applied and the large fragment DNA was recovered from the marine shrimp pond, seaport and mangrove sediments samples, the molecular mass of which is more than 21 kb. These DNA extractions contain the sediment DNA which could be PCR amplified for rpoB gene. These work laid a foundation for molecular ecology research and exploiting the bioactive substances from marine sediments.

Key works: marine, sediment, DNA, humic acids (HAs), remove