

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 712000)

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

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。

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 cm,采样位置分别是:距矿 60 m 果园土壤,距矿 40 m 的溪泥,距矿 20 m 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 h 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] 主要有:

首先,取 0.2 g 重金属污染的土壤样品,装入 2 mL 无菌离心管,加入 540 uL 预配制好的的 DNA 提取液,加入 4 uL 的蛋白酶 K($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),放入 37℃ 恒温水浴 30 min(每隔 2 min 上下振荡几下)。再加入 60 uL 20% 的 SDS, 65℃ 恒温水浴 2 h(每隔 15 min 振荡几下)。然后,6 000 转离心 10 min,将上清液转移到新的无菌离心管中,将离心沉淀再加入 180 uL 的 DNA 提取液和 20 uL 20% 的 SDS,高速涡旋振荡 10 s,再次 65℃ 恒温水浴 10 min,并 6 000 转离心 10 min,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)混合振荡均匀,15 000 转高速离心 10 min 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 h。再次离心 20 min(15 000 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 20 uL 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 0.2 g 加入无菌水中,30℃ 恒温振荡 30 min,低速离心取上清 1 uL,尝试用预处理的土壤样品作为聚合酶链反应(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

收稿日期:2017-12-01 修回日期:2017-12-15

作者简介:窦敏娜(1982-),女,陕西礼泉人,2007 年毕业于北京林业大学微生物学专业。咸阳职业技术学院,讲师,长期从事环境微生物研究工作。

(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 230 bp 基因产物。PCR 反应体系(50 μL)如表 1。

表 1 PCR 反应体系

试剂	体积/μL
10×Buffer	5
MgCl ₂ (25 mM)	5
dNTP(25 mM)	1.5
F357GC 引物(10 μM)	1.5
R518 引物(10 μM)	1.5
Taq 酶(1 U·μL ⁻¹)	2.5
ddH ₂ O	33

聚合酶链反应(PCR)参数为:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,65~55℃退火 1 min(其中每个循环后温度下降 0.5℃),72℃延伸 3 min,共 20 个循环,然后为 94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃变性 3 min,共 10 个循环,72℃延伸 10 min。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℃预热),每个加样孔加入 PCR 样品 30 μL(含有 10%加样缓冲液)。在 120V 的电压下,60℃电泳 5~6 h,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。

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。

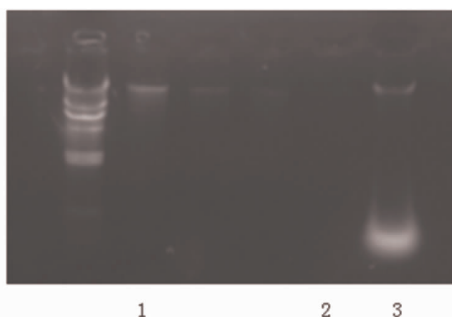


图 1 不同方法总 DNA 提取结果

注:1.直接提取法 2.直接 PCR 法 3.试剂盒法

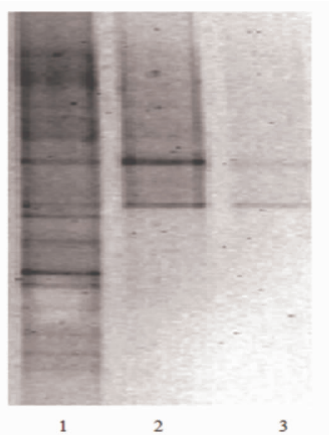


图 2 不同方法的 DGGE 图谱

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

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,便能较好的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。

(下转第 52 页)