

从土壤样本中提取DNA

日本基因株式会社 津田顺

前言

大部分 (99.5~99.9%) 存在于土壤中的微生物都不能够在实验室中进行培养, 因此被称为“难培养型微生物”¹⁾。

采用以前的离析、培养方法, 只可以分析其中少于1%的微生物。使用从土壤中直接提取的DNA (以下简称土壤DNA) 是分析难培养型微生物的有效方法。这种方法不仅可用于分析难培养型微生物, 而且还可以用于特定微生物、重组体等的检测、系统学多样性及微生物生态分析等领域。²⁾

土壤DNA的提取及精制

土壤的成份包括矿物质、粘土等无机物、植物及植物的遗体、腐



图1: 土壤DNA溶液的染色比较 左: 使用ISOIL for Beads Beating的提取物 (透明) 右: 使用其它公司生产的DNA提取试剂的提取物 (有色) 土壤样本: 褐色森林土 (兵库)

殖物质等土壤有机物以及在土壤中生存的微生物。

因此, 从土壤中直接提取DNA时, 会将这些腐殖物质一起提取。

这些腐殖物质会阻碍聚合酶链式反应 (PCR) 及限制酶处理等酶反应, 从而会影响转录效率, 降低DNA杂交的特异性。²⁾

因而进行土壤DNA的分子生物学分析, 需要极高纯度的精制DNA。然而, 去除腐殖物质非常困难。如果采用以前的方法, 则需要对提取的土壤DNA进行凝胶过滤琼脂糖凝胶电泳等极为复杂的操作。

日本基因公司生产的土壤DNA提取试剂ISOIL以及ISOIL for Beads Beating (以下统称ISOIL系列) 根据东京大学的赖泰树博士等开发出来的新DNA提取法及精制法研制而成。使用这些试剂在特殊条件下进行DNA沉淀基本上可以完全除去腐殖物质采用这种方法得到的土壤DNA具有腐殖物质污染少 (图1)、高纯度 (图2) 的特点, 因此可以直接用于PCR等酶反应。

日本的土壤DNA提取现状

当前, 关于土壤DNA的提取, 研究者们提出了各种不同的方法, 而

一些国外的公司也开始在日本市场出售土壤DNA提取试剂。

但是, 由于日本的土壤包括较多的火山灰土壤, 因此使用这些方法或试剂往往不能够从土壤中提取DNA。³⁾

火山灰土壤中所包含的粘土矿物质水铝英石对DNA有极强的吸附作用。黑土 (约占日本耕地面积的一半) 即是一种含有水铝英石的火山灰土壤。为了从此类土壤中提取DNA, 必须采取某种方法来减少土壤对DNA的吸附作用。

ISOIL系列产品利用特殊成份的提取液, 可防止土壤对DNA的吸附作用。

因此, 这些产品对非火山灰土壤的DNA提取效果自然无须赘言, 即使是对火山灰土壤, 也可以得到很好的DNA提取效果 (图3)。

土壤提取DNA可以反映土壤微生物的生态

为了进行基于PCR-DGGE (变性剂浓度梯度凝胶电泳) 的土壤微生物群落结构分析以及微生物生态研究, 必须得到可以反映实际微生物生态的土壤DNA。

但是, 由于土壤中生存着大量的革兰阳性菌 (如链霉菌)、丝状菌 (霉菌) 等具有坚固细胞壁的微生物因此使用一般的方法难以有效地提取这些微生物中的DNA。

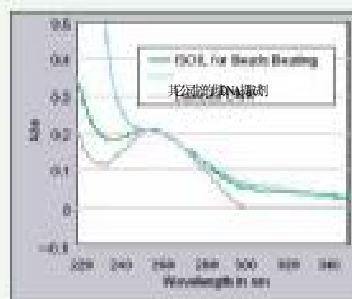
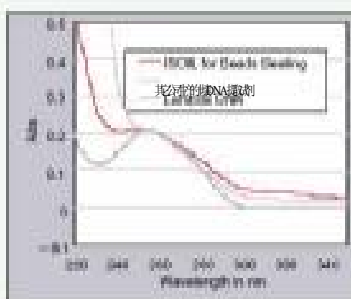
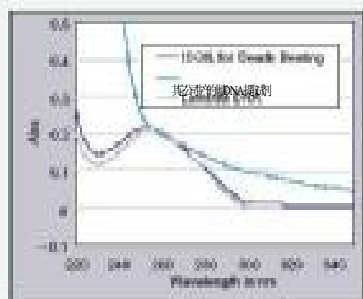


图2: 土壤DNA的吸收光谱 从左至右分别为黑土 (东京)、灰色低地土 (埼玉) 及褐色森林土 (兵库) 中提取出来的土壤DNA的吸收光谱。使用ISOIL提取的土壤DNA光谱有一个260nm的峰值, 形成较理想的形状。而使用其它公司生产的土壤DNA提取试剂提取出来的样本由于不纯物较多, 因此光谱中未见260nm的峰值。作为理想DNA吸收光谱的比较样本, 我们使用了Lambda DNA。

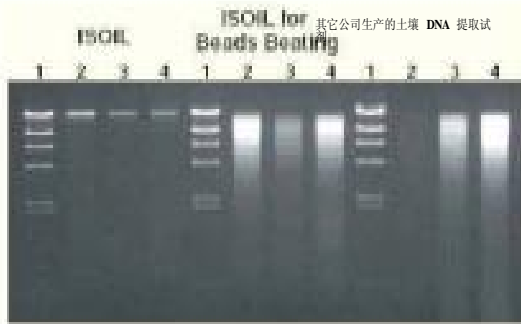


图3. 从各种土壤中提取 DNA

- 1: OneSTEP Marker1 (λ HindIII)
- 2: 黑土 (东京)
- 3: 灰色低地土 (埼玉)
- 4: 褐色森林土 (兵库) 1% 琼脂糖 S

为了从上述微生物中提取 DNA, 比较有效的做法是联合采用化学溶菌方法及物理法 (如 ISOIL for Beads Beating)。使用这样方法提取的土壤 DNA 由于物理作用会被部分切断, 变成较低分子的 DNA (~23kb)。由于 PCR-DGGE 的 PCR 模板因此上述低分子 DNA 完全可以用于 PCR-DGGE 分析 (图 4)。

在基因资源方面的应用

从环境中的微生物整体提取出来的 DNA 被称为“宏基因组”。由宏基因组构成的宏基因组库被是微生物基因的信息来源

作为基因资源的土壤 DNA 必须是高分子 DNA。

结束语

在本公司进行的使用 ISOIL 系列产品的土壤 DNA 提取实验中, 我们采用了从日本东北部到九州的各种土壤, 甚至于有明海的潮浸区及活性淤泥结果都得到相应的 DNA 提取物。但是, 考虑到土壤样本的多样性, 土壤的种类及状态有时可能会出现提取量不足或纯度不高的现象在这种情况下, 则需要考虑土壤的特殊性质。

然而, 我们始终认为 ISOIL 系列是日本的土壤微生物学研究的基础技术, 在将来也会得到进一步的开发。



图4. 土壤微生物群落结构分析 采用 ISOIL for Beads Beating 提取的土壤 DNA 的 PCR-DGGE 分析 (数据提供: 东京大学研究生院农学生命科学研究所 赖泰树博士)



图5. 土壤 DNA 的分子量 从左至右分为使用 Marker 7GT (166, 50, 42, 33, 21, 18, 10kb) ISOIL 提取的土壤 DNA (平均分子量 50kb 以上) 0.5% 琼脂糖 H

(参考文献)

- 1) Torsvik, V., Goksoyr, J. and Daae, F. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 782-787 (1990).
- 2) Zhou, J.-Z., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 316-322 (1996).
- 3) Takada-Hoshino, Y. and Matsumoto, N.: *Microbes Environ.*, **19**, 13-19 (2004).
- 4) Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J. and Goodman, R. M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2541-2547 (2000).

Products

土壤 DNA 提取试剂盒

编号	品名	容量
316-06211	ISOIL	50次用
319-06201	ISOIL for Beads Beating	50次用
313-06221	Lysis Solution BB SP1	50毫升

日本基因



Lysis Solution BB SP1 是 ISOIL for Beads Beating 专用的可选产品, 可用于富含水铝英石的土壤的 DNA 提取。

※ 东京大学 TLO 已经申请了使用 ISOIL 及 ISOIL for Beads Beating 的土壤 DNA 提取法的专利。日本基因公司从东京大学 TLO 得到了关于使用土壤 DNA 提取方法的许可。