

北方黑土土壤细菌 16S rDNA 扩增体系的优化*

李秋红 吴凤芝[†]

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要 采用降落 PCR 方法扩增目的基因, 设计两次正交试验对 PCR 反应体系中的各组分浓度进行筛选, 同时对退火时间、延伸时间及循环次数进行摸索。结果表明, 适合北方黑钙土土壤细菌 16S rDNA 扩增体系为: 在 25 μ l 体系中, 10 \times buffer 2.5 μ l, DNA 模板 20 ng, Mg²⁺ 2.5 mmol L⁻¹, dNTPs 0.25 mmol L⁻¹, 引物 0.3 μ mol L⁻¹, TaqDNA 聚合酶 1.5 U。降落 PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 95 $^{\circ}$ C, 45 s; 65~56 $^{\circ}$ C, 60 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s; 每两个循环降低 1 $^{\circ}$ C。95 $^{\circ}$ C, 45 s; 55 $^{\circ}$ C, 60 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s; 10 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C, 10 min。

关键词 土壤细菌 16S rDNA; 降落 PCR; 优化

中图分类号 S154.3

文献标识码 A

目前对于土壤微生物多样性的研究已引起国内外学者的极大重视, 利用分子生物学方法研究土壤微生物多样性已经成为最主要的手段。rDNA 由保守区和可变区组成, 在细菌中高度保守, 素有“细菌化石”之称, 是细菌系统分类学研究中最有用和最常用的分子钟。其中 16S rRNA 序列分析已经成为细菌种属鉴定和分类的标准方法^[1]。现在人们对 16S rDNA 序列有了清晰的认识, 日前已经明确细菌的 16S rDNA 全长约 1 540 bp, 片段长度适中, 信息量大且易于分析。在细菌的 16S rDNA 中有多个区段高度保守, 根据这些保守区人们可以设计出细菌的通用引物, 用它们可以扩增出所有细菌的 16S rDNA 片段, 扩增得到的细菌的 16S rDNA 片段根据扩增产物分析方法的不同, 发展了多个分支, 如 16S rDNA 的限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析

(ARDRA)^[1~11]、末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 分析^[1,12~17]、单链构象多态性 (SSCP)^[18]、DGGE 的巢式 PCR 扩增^[19]。

本文使用有机质含量丰富的北方黑土土壤 DNA 作为扩增细菌 16S rDNA 的模板, 目的是找到适合北方黑土土壤 DNA 的最佳扩增体系, 为相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料与仪器

1.1.1 土壤 本试验土壤 (黑钙土) 采自位于北纬 45 $^{\circ}$ 的黑龙江省哈尔滨市东北农业大学试验实习基地, 土样过 80 目筛, 存于 -70 $^{\circ}$ C 备用。土壤的基本理化性状见表 1。

表 1 供试土壤理化性状

Table 1 Physicochemical properties of the soils studied

土壤类型 Soil type	全氮 Total N (g kg ⁻¹)	碱解氮 Alkaline hydrolysis N (mg kg ⁻¹)	全磷 Total P (g kg ⁻¹)	有效磷 Availabe P (mg kg ⁻¹)	缓效钾 Slow-release K (mg kg ⁻¹)	速效钾 Available K (mg kg ⁻¹)	有机质 Organic matter (g kg ⁻¹)	电导率 Electric conductivity (μ S cm ⁻¹)	pH
黑土 Black soil	3.62	326	3.61	399	761	473	68.96	294	5.73

* 国家自然科学基金项目 (NO: 30571264, 30230250) 资助

[†] 通讯作者, E-mail: fzvu2006@yahoo.com.cn

作者简介: 李秋红 (1981~), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 主要研究方向为设施土壤微生物生态学。E-mail: nongdr_liqiu hong@163.com 或 cindylqh@sina.com.cn

收稿日期: 2006-12-25; 收到修改稿日期: 2007-04-17

1.1.2 药品及仪器 TaqDNA 聚合酶为美国 MBI 产品; 引物序:

5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3' (N₈ N₂₇), 5'-ACG-GTTACCTTGTTACGACTT-3' (N₁₄₈₇ N₁₅₀₇)^[20], 由上海生工生物公司合成; PCR 仪为美国 MJ Research Thermal Cycler DNA Engine(PTC-150)。

1.2 方法

1.2.1 土壤微生物 DNA 的提取 参照 SANNON 和夏北成的方法^[21-26], 稍做修改。称取 10 g 土壤样品于灭菌的研钵中, 加液氮迅速研磨, 直至土样成为粉末为止, 并迅速将粉末转至 50 ml 的离心管中, 加土壤缓冲液(0.4 mol L⁻¹ 磷酸盐缓冲液; 0.5 mol L⁻¹ EDTA; 1 mol L⁻¹ Tris; 5 mol L⁻¹ NaCl, 1% CTAB, pH6.5) 13.5 ml 及 100 μl 蛋白酶 K(10 mg ml⁻¹) 于离心管中, 混匀, 并在 37 °C 下在摇床上以 220 r min⁻¹ 转速震荡 30 min, 加 1.5 ml 20% 的 SDS(十二烷基磺酸钠), 在 65 °C 下水浴 2 h, 每隔 20 min 轻轻摇匀一次。6 000 r min⁻¹ 下离心 10 min, 收集上清液于另一离心管中, 再取 4.5 ml 提取缓冲液及 0.5 ml 20% SDS 加入原离心管中, 放回水浴 15 min, 用上述同样的速度离心 10 min, 将上清液转出并与原上清液合并, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1) 混匀, 6 000 r min⁻¹ 离心并收集上清液至新的 50 ml 离心管中, 于上清液中加入 0.6 倍体积的异丙醇, 室温静置过夜后以 10 000 r min⁻¹ 速度离心 30 min, 倒出上清液,

用 75% 的乙醇清洗 2~3 次, 转移至 1.5 ml 离心管中, 在无菌室将乙醇吹干, 最后加入 500 μl 左右的去离子水, 溶解粘附于管壁的 DNA 及杂质。

1.2.2 DNA 纯化 利用 Promega Wizard 纯化试剂盒纯化。纯化后的 DNA 适当稀释后, 在紫外分光光度计测定 230 nm、260 nm 及 280 nm 波长下的吸光度 OD 值。

1.2.3 PCR 循环条件 本试验采用降落 PCR 扩增, 基本程序为:

95 °C, 5 min	}	每两个循环降 1 °C, 共 20 个循环
95 °C, 45 s		
65~56 °C, 60 s		
72 °C, 90 s		
95 °C, 45 s	}	10 个循环
55 °C, 60 s		
72 °C, 90 s		

最后 72 °C, 10 min。

1.2.4 正交设计 (1) 搜索性正交试验。在体系组成未知的情况下, 首先选用大的正交表, 对各因素和水平进行搜索性正交摸索试验。反应体系 25 μl, Buffer 2.5 μl, 补足去离子水至 25 μl, 在此基础上对反应混合物中各组分的浓度做了调整, 选用 L₁₆(4⁵) 正交表^[28], 所考虑的因素水平如表 2, 按照表 3 设计了 16 组 PCR 扩增试验。

表 2 搜索性正交试验 PCR 水平—因素表

Table 2 Factors of the scanning orthogonal design

水平 Level	因素 Factor				
	引物 Primer(μmol L ⁻¹)	dNTPs(mmol L ⁻¹)	Mg ²⁺ (mmol L ⁻¹)	Taq 酶 Taq enzyme(U)	模板 Template(ng)
1	0.2	0.15	1.5	0.5	10
2	0.3	0.20	2.0	1.0	20
3	0.4	0.25	2.5	1.5	30
4	0.5	0.30	3.0	2.0	40

(2) 细调性正交试验。在搜索性正交试验的基础上, 选取扩增效果相对较好的条件, 以此作为中心基点继续设计细调性正交试验。本试验选用搜索性正交试验的第 10 组条件为基点, 选用 L₉(3³) 正交表^[28], 按照表 4 和表 5 设计试验。其他条件为引物 0.3 μmol L⁻¹, Taq 酶 1.5 U, Buffer 2.5 μl。

1.2.5 PCR 扩增反应程序的优化 根据细调性试验所得的结果, 筛选出第 8 组作为反应体系中的最佳浓度, 在此基础上对退火时间、延伸时间和循环次数进行单因子试验, 以期找到最佳的 PCR 扩增程序。

1.2.6 产物鉴定 PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶中检测, 于凝胶成像系统下观察并照相。

表3 搜索性正交试验设计表[$L_{16}(4^5)$]

Table 3 The scanning orthogonal anays

组号 Group number	因素 Factor				
	引物 Primer	dNTPs	Mg ²⁺	Taq 酶 Taq enzyme	模板 Template
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

表4 细调性正交试验水平一因素表[$L_9(3^3)$]

Table 4 Factors of the inching orthogonal design

水平 Level	因素 Factor		
	Mg ²⁺	dNTPs	模板
	(mmol L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)	Template (ng)
1	2.0	0.15	10
2	2.5	0.20	20
3	3.0	0.25	30

表5 细调性正交试验设计表

Table 5 Inching orthogonal arrays

组号 Group number	因素 Factor		
	Mg ²⁺	dNTPs	模板 Template
1	1	1	3
2	2	1	1
3	3	1	2
4	1	2	2
5	2	2	3
6	3	2	1
7	1	3	1
8	2	3	2
9	3	3	3

表6 PCR 扩增程序中各参数梯度

Table 6 Gradients of parameters in PCR amplification procedure

参数 Parameter	梯度 Gradients			
	1	2	3	4
退火时间 Anneal time (s)	40	50	60	70
延伸时间 Extension time (s)	75	90	105	120
循环次数 Cycle time	25	30	35	40

2 结果与分析

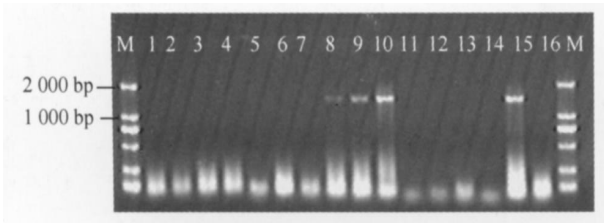
2.1 搜索性正交试验结果

搜索性正交试验用于新的 PCR 体系的建立之中, 对于新的 PCR 体系而言, 所有条件均是未知的, 因此搜索性正交试验的结果大都不理想, 本次结果见图 1。

图 1 中 8, 9 泳道条带较暗说明扩增效率较低, 10 和 15 泳道条带清晰且无非特异带, 但 15 泳道的二聚体较多, 因此选用第 10 组条件为基点进行细调性正交试验, 以获得进一步的优化。

2.2 细调性正交试验结果

细调性正交试验主要用来调节偏离中心不远的试验条件, 本试验中细调性正交试验结果如图 2 所



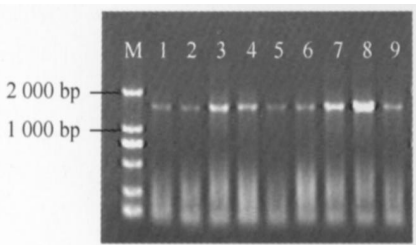
注: 1~ 16 泳道分别对应于表 3 的 1~ 16 组

Note: Paths 1~ 16 correspond respectively to Groups 1~ 16 in Table 3

图 1 搜索性正交试验结果

Fig. 1 Results of the scanning orthogonal arrays

示, 出现了多组整齐清晰、扩增效率高、泳道干净、特异性好的条带。从产物产量的角度出发, 选取产量最高的第 8 组, 进行单因子优化试验。



注: 1~ 8 泳道分别对应于表 5 的 1~ 8 组

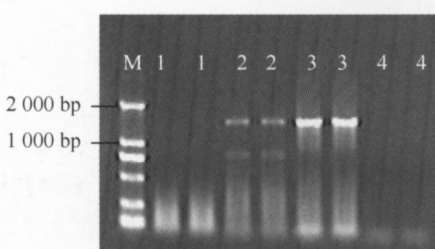
Note: Paths 1~ 8 correspond respectively to Groups 1~ 8 in Table 5

图 2 细调性正交试验结果

Fig. 2 Results of the iniding orthogonal arrays

2.3 PCR 扩增反应程序的优化结果

2.3.1 退火时间对 PCR 扩增的影响 4 种退火时间下的结果显示: 当采用 60 s 时扩增效率较高, 产物条带最亮; 当采用 50 s 时有明显的非特异性条带, 且产物条带很弱; 当退火时间为 40 s 和 70 s 时均未得到产物, 如图 3。



注: 1~ 4 两重复依次为 40 s、50 s、60 s、70 s

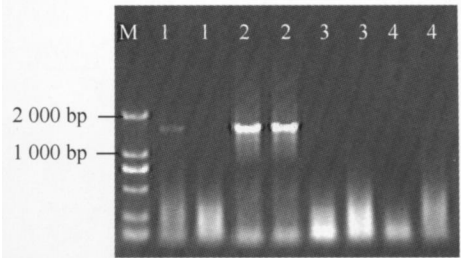
Note: 1~ 4 duplications following 40 s, 50 s, 60 s and 70 s, respectively

图 3 不同退火时间对 PCR 扩增的影响

Fig. 3 Effects of annealing time on PCR amplification

2.3.2 延伸时间对 PCR 扩增的影响 4 种延伸时间下的结果显示: 只有在 90 s 时可以扩增出清晰的条带; 75 s 时扩增效率低只能看到微弱的条带且

重复性差; 当延伸时间超过 90 s 时, 均未得到目的条带, 如图 4。



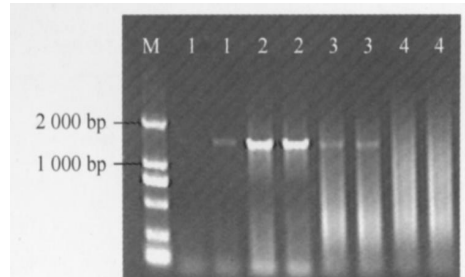
注: 1~ 4 两重复依次为 75 s、90 s、105 s、120 s

Note: 1~ 4 duplications following 75 s, 90 s, 105 s and 120 s, respectively

图 4 不同延伸时间对 PCR 扩增的影响

Fig. 4 Effects of extending time on PCR amplification

2.3.3 循环次数对 PCR 扩增的影响 本试验循环次数的确定是: 降落部分的 20 个循环不变, 只有最后 55 °C 恒定温度时的循环次数变化。4 种循环条件下的结果显示: 当循环次数为 30 时, 扩增效果较好, 条带很亮且重复性好; 当循环次数为 25 时, 扩增效率较低, 条带很弱重复性差; 当循环次数高于 30 时, 产生成片拖带的现象, 且随着循环次数的增加这种现象越明显, 如图 5。



注: 1~ 4 两重复依次为 25、30、35、40 循环

Note: 1~ 4 duplications following 25, 30, 35 and 40 cycles, respectively

图 5 不同循环次数对 PCR 扩增的影响

Fig. 5 Effects of number of cycles on PCR

3 结论与讨论

本试验采用降落 PCR 方法扩增目的基因, 这种方法对于特异性扩增尤其适合, 是一种潜在的一步找到最佳退火温度的方法^[29], 省去了找最佳退火温度的步骤, 大大提高了工作效率^[30]。通过设计搜索性 $L_{16}(4^5)$ 和细调性 $L_9(3^3)$ 两次正交试验对 PCR 扩增体系中各组分浓度进行了筛选, 同时对退火时间、延伸时间及循环次数进行优化。结果表明, 16S rDNA 扩增体系在 25 μ l 体积中进行, 包括 20 ng DNA

模板、 Mg^{2+} 2.5 mmol L⁻¹, dNTP 0.25 mmol L⁻¹, 引物 0.3 μmol L⁻¹, Taq DNA 聚合酶 1.5 U, Buffer 2.5 μL。PCR 扩增程序为: 95℃, 5 min; 95℃, 45 s; 65~56℃, 60 s; 72℃, 90 s。每降 1℃两个循环, 共 20 个循环。95℃, 45 s; 55℃, 60 s; 72℃, 90 s; 10 个循环。最后 72℃, 10 min。

当扩增较大片段时, 如果退火时间过短, 引物与靶序列不能牢固结合或结合不完全, 从而导致无扩增产物或产生非特异条带; 但时间过长可能会导致非特异性扩增。由本试验结果来看, 退火时间为 40 s 时扩增失败, 50 s 时扩增效率很低且得到非特异性条带, 只有在 60 s 时扩增结果最好, 当升至 70 s 时没有得到产物, 这与赵晓勤等^[31] 研究结果有相似之处。由此可见对于一个成功的 PCR 反应来说, 不仅退火温度很重要, 退火时间的选择也很重要。本试验选择的 4 个延伸时间, 只有 90 s 时能扩增出理想的产物, 延长或缩短时间扩增效率较低甚至无产物。循环次数主要取决于 DNA 浓度, 一般而言 25~30 轮循环已经足够。循环次数过多, 会使 PCR 产物中非特异性产物大量增加。由本试验来看, 循环次数由 25 增至 30 后产物量明显增多, 但继续增加循环次数后产生了非特异带和成片拖带现象。PCR 扩增有时出现涂抹带或片状带或地毯样带, 其原因往往由于酶量过多或酶的质量差, dNTP 浓度过高, Mg^{2+} 浓度过高, 退火温度过低, 循环次数过多引起。由本试验结果来看, 随着循环次数的增加, 这种成片拖带的程度有所增加。

PCR 反应失败的原因有很多: 模板核酸的制备, 引物的质量与特异性, 酶的质量及活性, PCR 循环条件及反应体积的改变等。本试验尝试使用不同来源的 Taq DNA 聚合酶扩增目的基因, 结果扩增失败, 这是因为不同的酶活性有很大差别, 如果使用不同厂家的试剂, 则扩增体系也应有所改变。另外, 本试验所用的 Taq DNA 聚合酶配套的缓冲液为 K^+ , 换用 NH_4^+ 的缓冲液时扩增也失败。在保证模板质量的前提下, 如果模板变性不彻底也会导致 PCR 反应的失败, PCR 反应的变性温度及时间与模板的大小和性质有关。本试验提取的北方黑钙土土壤总 DNA 片段大小在 15 000 bp 左右, 所采用的变性温度及时间可以成功地扩增出目标产物。模板的性质和片段大小与土壤类型和提取总 DNA 的方法有关。一般情况下, 退火温度在许可范围内即可扩增出产物, 本试验采用的退火温度由高到低, 适合大部分土壤类型的 16S rDNA 扩增, 只是针对不同的模板类型

及不同类型的酶, 所采用的退火时间、延伸时间及变性时间应做相应的调整。

参考文献

- [1] 张瑞福, 崔中利, 李顺鹏. 土壤微生物群落结构研究方法进展. 土壤, 2004, 36 (5): 476~480. Zhang R F, Cui Z L, Li S P. Advance in methods for research on soil microbial community structure (In Chinese). Soils, 2004, 36 (5): 476~480
- [2] 李慧, 陈冠雄, 张颖, 等. 分子生物学方法在污染土壤微生物多样性研究中的应用. 土壤学报, 2004, 41(4): 612~617. Li H, Chen G X, Zhang Y, et al. Application of molecular bio techniques in the study on microbial diversity in polluted soils (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(4): 612~617
- [3] 胡江, 代先祝, 李顺鹏. 阿特拉津及其降解菌的使用对土壤微生物群落的影响. 应用生态学报, 2005, 16(8): 1518~1522. Hu J, Dai X Z, Li S P. Effects of atrazine and its degrader *exiguobacterium* sp. BTAH1 on soil microbial community (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2005, 16(8): 1518~1522
- [4] 滕齐辉, 曹慧, 崔中利, 等. 太湖地区典型菜地土壤微生物 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析. 生物多样性, 2006, 14(4): 345~351. Teng Q H, Cao H, Cui Z L, et al. PCR-RFLP analysis of bacterial 16S rDNA from a typical garden soil in Taihu region (In Chinese). Biodiversity Science, 2006, 14(4): 345~351
- [5] 杨官品, 朱艳红, 陈亮, 等. 土壤细菌 16S rRNA 基因变异型及其与植被的相关研究. 应用生态学报, 2001, 12(5): 757~760. Yang G P, Zhu Y H, Chen L, et al. Molecular genetic variation of soil bacteria as determined by polymorphism of restrictive fragment length of 16S rRNA genes and its relation with vegetation shift (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2001, 12(5): 757~760
- [6] Dunbat J, Takala S, Bams S M. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65(4): 1662~1669
- [7] Fantroussi S E L, Verschuere L, Verstraete W. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community level physiological profiles. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65(3): 982~988
- [8] Tiedje J M, Asuming Brempong S, Nusslein K, et al. Opening the black box of soil microbial diversity. Appl. Soil Ecol., 1999, 13: 109~122
- [9] Smit E, Leeftang P, Wemars K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. FEMS Microbiol. Ecol., 1997, 23: 249~261
- [10] Brim H, Heyndrickx M, de Vos P, et al. Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. System. Appl. Microbiol., 1999, 22: 258~268
- [11] 张丽娜, 曹慧, 崔中利, 等. 红壤荒草地氨氧化细菌富集液 16S rDNA 文库的 RFLP 分析. 土壤学报, 2006, 43(4): 635~641. Zhang L N, Cao H, Cui Z L, et al. RFLP analysis of ABO-specific 16S rDNA library from red soil enrichment culture (In Chinese). Ac

- ta Pedologica Sinica, 2006, 43(4): 635~ 641
- [12] Brodie E, Edwards S, Clipson N. Bacterial community dynamics across a floristic gradient in a temperate upland grassland ecosystem. *Microbiol. Ecology*, 2002, 44: 260~ 270
- [13] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Assessment of microbial diversity in four southwestem United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 2 943~ 2 950
- [14] Gavin N. Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length polymorphisms: Application of multivariate statistics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, 86: 339~ 347
- [15] John J. DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples. *Water Research*, 2005, 39: 3 229~ 3 238
- [16] Liu WT, Marsh T L. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(11): 4 516~ 4 522
- [17] Rousseaux S, Hartmann A, Rouard N. A simplified procedure for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the soil bacterial community to study the effects of pesticides on the soil microflora using 4, 6-dinitroorthocresol as a test case. *Biol. Fertil. Soils*, 2003, 37: 250~ 254
- [18] Liu B R, Jia G M, Chen J. A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*, 2006, 16(1): 18~ 24
- [19] Frank S, Christoph C T. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizosphere of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) linking of 16S rRNA gene based single strand-conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(8): 3 556~ 3 565
- [20] 雷娟利, 周艳虹, 丁桔, 等. 不同蔬菜连作对土壤细菌 DNA 分子水平多态性影响的研究. *中国农业科学*, 2005, 38(10): 2 076~ 2 083. Lei J L, Zhou Y H, Ding J, *et al.* Effect of continuous cropping of different vegetables on DNA polymorphism of soil bacterial (In Chinese). *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(10): 2 076~ 2 083
- [21] Long S. Gene and signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiol.*, 2001, 125: 69~ 72
- [22] 夏北成, Zhou J, Tiedje Z. 分子生物学方法在微生物生态学中的应用. *中山大学学报(自然科学版)*, 1998, 37(2): 97~ 101. Xia B C, Zhou J, Tiedje Z. Molecular techniques applied in the studies of microbial biometrics (In Chinese). *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyaaatseni*, 1998, 37(2): 97~ 101
- [23] Margreti J, Herrick B. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60(5): 1 572~ 1 580
- [24] Miller D N, Bryant J E, Madsen E L, *et al.* Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 4 715~ 4 724
- [25] Porteous A, John L, Armstrong L. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small scale extraction method. *Current Microbiol.*, 1991, 22: 345~ 348
- [26] Voloskiouk T, Jane R E, Nazar R N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61: 3 972~ 3 976
- [27] Yuli T I, Betty H O. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57: 1 070~ 1 074
- [28] 杨水云, 李续娥, 吴明宇, 等. 正交实验法在 PCR 反应条件优化中的应用. *生物数学学报*, 2005, 20(2): 202~ 206. Yang S Y, Li X E, Wu M Y, *et al.* Application of orthogonal design to optimize PCR conditions (In Chinese). *Journal of Biomathematics*, 2005, 20(2): 202~ 206
- [29] 万兵, 闫杰, 季明春, 等. 一种优化的 PCR 方法—降落 PCR 扩增目的基因. *江苏临床医学杂志*, 2002, 6(2): 127~ 129. Wan B, Yan J, Ji M C, *et al.* TD PCR An ameliorative PCR for amplification of target genes (In Chinese). *Journal of Jiangsu Clinical Medicine*, 2002, 6(2): 127~ 129
- [30] Komura J, Ikehata H, Hosoi Y, *et al.* Mapping psoralen cross links at the nucleotide level in mammalian cells: Suppression of cross-linking transcription factor or nucleosome binding sites. *Biochemistry*, 2001, 40(13): 4 096~ 4 105
- [31] 赵晓勤, 倪娟, 陈立侨, 等. 日本沼虾基因片段 PCR 扩增的条件优化. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2006(2): 68~ 74. Zhao X Q, Ni J, Chen L Q, *et al.* Optimization of PCR conditions for macrobrachium nipponensis gene fragments (In Chinese). *Journal of East China Normal University (Natural Science Edition)*, 2006(2): 68~ 74

OPTIMIZATION OF 16S rDNA AMPLIFICATION SYSTEM OF BACTERIA IN BLACK SOIL IN NORTH CHINA

Li Qiuhong Wu Fengzhi[†]

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Target genes were amplified with the TD PCR method, two orthogonal experiments were designed to screen out optimal concentrations of various components of the PRC reaction system, while to explore annealing time, extending time and cycling frequency. Results show that soil bacteria 16S rDNA amplification system fit for black soil in North China was in 25 μ l volume, which was composed of 10 \times buffer 2.5 μ l, 20 ng soil microbial DNA template, Mg^{2+} 2.5 mmol L⁻¹, dNTPs 0.25 mmol L⁻¹, 0.3 μ mol L⁻¹ primer, and 1.5 Utaq enzyme. The TD PCR reaction procedure went like first keeping 95 $^{\circ}$ C for 5 min to make soil microbial DNA denaturalized, 95 $^{\circ}$ C for 45 s more, 65~56 $^{\circ}$ C for 60 s, and then 72 $^{\circ}$ C for 90 s, and lowering the temperature by 1 $^{\circ}$ C every two cycles; and starting another 10 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 45 s, 55 $^{\circ}$ C for 60 s, and 72 $^{\circ}$ C for 90 s, and finally staying at 72 $^{\circ}$ C for 10 min for extending.

Key words Soil bacteria 16S rDNA; TD PCR; Optimization