

重金属复合污染农田土壤 DNA 的快速提取 及其 PCR-DGGE 分析*

滕 应 骆永明[†] 赵祥伟 李振高 宋 静 吴龙华

(土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

(中国科学院南京土壤研究所土壤与环境生物修复研究中心, 南京 210008)

摘 要 国内首次运用 FastPrep[®]核酸快速提取系统提取了重金属复合污染农田土壤的 DNA, 并对其进行了聚合酶链反应—变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)分析。结果表明, FastPrep[®]核酸提取仪与相应的 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒联用时, 能有效地分离到纯度较高的重金属污染农田土壤的 DNA。PCR-DGGE 电泳图谱表明, PCR 产物经 DGGE 检测后得到的电泳条带清晰且分离效果好, 可以明显反映出重金属复合污染导致了农田土壤微生物在基因上的损伤, 影响到农田土壤生态系统的细菌丰富度, 改变了土壤环境的优势菌群, 从而使农田土壤微生物群落结构多样性发生变化。可见, FastPrep[®]核酸提取系统同样适用于重金属污染农田土壤环境中微生物基因组 DNA 的快速分离和纯化, 得到的 DNA 可直接用于 PCR-DGGE 分析。

关键词 重金属复合污染; 农田土壤 DNA; FastPrep[®]核酸提取系统; PCR-DGGE 分析

中图分类号 S154.36

文献标识码 A

随着微生物分子生态学研究的深入, 一些先进的分子生物学分析方法, 如聚合酶链反应—变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)、限制性酶切片段多态性分析(RFLP)和末端限制性酶切片段多态性分析(T-RFLP)等相继用来评价土壤环境微生物群落多样性变化^[1~4]。但这些方法都离不开土壤 DNA 的提取和纯化, 这是应用分子生物学来研究土壤微生物多样性的重要步骤。目前土壤 DNA 的提取方法主要包括直接原位裂解和裂解前的细胞提取^[5~11]。由于土壤本身的复杂性、非均质性, 土壤中腐殖酸、黏土矿物以及其它离子等都会不同程度地影响土壤 DNA 的提取和纯度。因而, 以上两种提取方法常常会涉及到繁多的化学试剂和复杂的操作步骤, 大大限制了快速、大量样品的分析。针对这些实际问题, BIO101[®]Systems 公司最新推出一种特殊的、高速的、高效率的、多试管的 FastPrep[®]核酸快速提取系统。当 FastPrep[®]核酸提取仪与相应的 FastPrep 试剂盒联用时, 能快速释放和纯化土壤中的 DNA。这套系统近年来在国外许多分子生物学研究领域中得

到了较为广泛的使用^[12~15], 而在国内应用未见报道, 尤其是更没有针对土壤环境科学研究。鉴此, 本文拟选择重金属复合污染农田土壤作为研究样本, 运用 FastPrep[®]核酸快速提取系统提取污染土壤 DNA, 并应用聚合酶链反应—变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术分析重金属污染农田土壤细菌群落的多样性, 探讨该方法对污染土壤 DNA 的提取效果和重现性, 以期在分子水平上揭示土壤微生物与重金属污染环境之间的生态学意义, 为污染土壤的生物学风险评价及拓展 FastPrep[®]核酸提取系统的应用空间提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 土壤采集及样品处理

供试土壤采自浙江省富阳市环山乡某金属冶炼厂附近, 海拔为 30~150 m, 北纬 29°56'20", 东经 119°55'11", 土壤类型为砂页岩发育的黄红壤。以冶炼厂高炉为中心, 向西远离冶炼厂 20 m、40 m、100 m、200 m 处设置 4 个土壤样块, 每样块随机取 8 个土样

* 国家杰出青年基金项目(40125005)、国家重点基础研究发展规划项目(2002CB410810、2002CB410809)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX3-SW-429)资助

[†] 通讯作者: ymluo@issas.ac.cn

作者简介: 滕 应(1975~), 男, 贵州江口人, 博士, 主要从事环境生物与生物化学方面研究, 发表论文 12 篇

收稿日期: 2003-12-23; 收到修改稿日期: 2004-01-24

组成混合代表样,编号为1、2、3、4。土样装入无菌封口塑料袋内,带回实验室。将一部分新鲜土样置于 -86°C 冰箱内保存,以供土壤DNA分析用。另一部分土样于室内自然风干,研磨、过筛,供土样基本理化性质和重金属含量分析。供试土样基本理化性质和重金属含量测定结果见表1。

1.2 FastPrep®核酸提取仪的工作原理

FastPrep®核酸快速提取仪是BIO 101®Systems公司的最新样本裂解仪器,它采用快速、垂直的振荡方式(其运动轨迹类似于“8”字)配合研磨粉,可以高效、快速裂解分析样品。提取时,只要将样品与适量缓冲液加入预先装了研磨粉的抗冲撞2 ml管中,一次可以处理1~12个样品,将各个管放入仪器夹好,选择好振荡速度与振荡时间后启动,在很短时间内样品细胞裂解处理完毕。再与相应的FastPrep试剂盒(如FastDNA SPIN Kit for Soil试剂盒)联用,能快速提取和纯化土壤样品的原始DNA。与传统的手工研磨过程相比,FastPrep®系统避免了研磨、匀浆、超声波处理等方法的费力耗时低效等诸多缺点,可以快速稳定地裂解并纯化样品的核酸。

1.3 土壤DNA的快速提取及纯化

称取0.42g土样加入到裂解基体E管(Bio 101, catalog no. 6914-050)中,分别加978 μl 磷酸盐缓冲液(pH8.0)(Bio 101, catalog no. 6560-205)和122 μl MT缓冲液(Bio 101, catalog no. 6511-202),置于FastPrep FP220核酸提取仪(Bio 101, Vista, Calif, USA)中,设置振荡速度 5.5 m s^{-1} ,细胞裂解30 s;之后,裂解基体E管14 000 g离心30 s,转移上清液到FastDNA试管中,加入250 μl PPS试剂(Bio 101, catalog no. 6540-403),用手上下摇晃10 min混匀;随后14 000 g离心5 min,转移上清液至新的2 ml FastDNA试管中并加入1 ml结合基体混合液(Bio 101, catalog no. 6540-408),涡旋振荡2 min以使基体充分结合DNA;静置3 min后弃去500 μl 上清液,将剩余的上清液和结合基体充分混匀后取600 μl 到过滤管(Bio 101, catalog no. 6511-210, 211)中,14000 g离心1 min;倒空FastDNA试管,将剩余的混合液加入到过滤管中继续离心;加500 μl SEMS-M(Bio 101, catalog no. 6540-405)至过滤管中,14000 g离心1 min;弃掉过滤液,过滤管重新放入收集管中,14 000 g离心2 min以离去除剩余的SEMS-M洗涤液;把过滤管放入FastDNA试管中,25 $^{\circ}\text{C}$ 干燥5 min;干燥后加50 μl DES(Bio 101, catalog no. 6540-406),用移液枪头在

滤膜上轻轻混匀,14 000 g离心1 min后,将DNA洗脱至FastDNA试管中, -20°C 保存备用。

1.4 土壤DNA的PCR扩增

将纯化后的土壤DNA作为聚合酶链反应(PCR)的模板,在Hybaid OmniGene Temperature Cycler热循环仪(Hybaid, Teddington, United Kingdom)上PCR扩增,采用对大多数细菌和古细菌的16S rRNA基因V3区具有特异性的引物对:F338GC和R518,它们的序列分别为:F338GC:(5'-CGCCC GCCGC GCGCG GCGGG CGGGG CGGGG GCACG GGGGG ACTCC TACGG GAGGC AGCAG-3'),R518:(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'),扩增产物片段长约180bp。扩增反应体系(50 μl),10 \times 缓冲液5 μl (含 $25\text{ mmol L}^{-1}\text{Mg}^{2+}$),dNTP(25 mmol L^{-1})1.5 μl ,引物(25 pmol L^{-1})各1.5 μl ,模板1 μl ,Taq DNA聚合酶2.5 U,ddH₂O 39 μl 。反应参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s,35个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。PCR反应的产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 PCR反应产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

采用Bio-Rad公司DcodTM的基因突变检测系统(DCode Universal Detection System Instrument)对PCR反应产物进行分离。其步骤简述为:使用梯度胶制备装置,制备变性剂浓度从35%~60%的10%的聚丙烯酰胺凝胶,其变性剂的浓度从胶上方向下方依次递增。待胶完全凝固后,将胶板移至已加热至60 $^{\circ}\text{C}$ 缓冲液电泳槽内,每个加样孔中加入40 μl PCR产物。在150 V电压下,60 $^{\circ}\text{C}$ 电泳6.5 h。电泳完毕后,置凝胶于银染法染色后的凝胶用凝胶影像分析系统(Gel Doc EQ Gel Documentation System)分析,观察样品的电泳条带并拍照。

1.6 土壤重金属含量及理化性质分析

土壤Cu、Zn、Pb、Cd全量:用王水-高氯酸消化,火焰原子吸收分光光度计测定(Variant-AAS220, USA);有效态Cu、Zn、Pb、Cd:用 $0.01\text{ mol L}^{-1}\text{CaCl}_2$ 提取^[16],石墨炉原子吸收分光光度计测定(V-220 Zeem, USA)。土壤基本理化性质按常规分析方法测定^[17],结果见表1。

1.7 数据统计

土壤微生物群落DNA的PCR-DGGE图谱采用Bio-Rad公司的Quantity One软件分析;实验数据用Microsoft®Excel 2000及SPSS10.0统计软件处理。

表 1 供试土壤的基本理化性质和重金属含量

Table 1 Some physical-chemical properties and heavy metal contents of soil samples used

土样编号 Soil No.	pH (H ₂ O)	有机碳 Organic C (g kg ⁻¹)	重金属全量 Total contents of heavy metal (mg kg ⁻¹)				CaCl ₂ 提取态重金属含量 Content of heavy metal extracted by CaCl ₂ (mg kg ⁻¹)			
			Cu	Zn	Pb	Cd	Cu	Zn	Pb	Cd
			1	7.1	31.6	6 187	7 278	2 335	12.5	2.32
2	5.9	20.3	1 346	1 813	685	3.9	1.33	85	0.12	0.32
3	5.8	21.7	257	1257	481	3.7	0.89	84	0.07	0.17
4	5.6	18.3	153	594	264	0.4	0.73	39	0.05	0.05

注: 表 1 中数据均为 3 次重复的平均值 Note: Average values of three replications data in the table

2 结果与分析

2.1 污染土壤的重金属含量及 DNA 产量

从表 1 可知, 供试土壤重金属含量随着离冶炼厂越近而逐渐升高, 其 Cu、Zn、Pb、Cd 的变化范围分别为 153~6 187 mg kg⁻¹、594~7 278 mg kg⁻¹、264~2 335 mg kg⁻¹、0.4~12.5 mg kg⁻¹, 其平均值分别高于该地区相应重金属元素背景值的 101.8 倍、28.3 倍、36.5 倍、9.2 倍^[18]。CaCl₂ 提取态 Cu、Zn、Pb、Cd 含量范围分别为 0.73~2.32 mg kg⁻¹、39.5~52.2 mg kg⁻¹、0.05~0.50 mg kg⁻¹、0.05~0.37 mg kg⁻¹, 变化趋势同重金属全量。这表明冶炼厂附近土壤环境不同程度地受到重金属复合污染。表 1 数据方差分析后经 LSD_{0.05} 测验表明, 供试土壤间 Cu、Zn、Pb、Cd 的全量存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

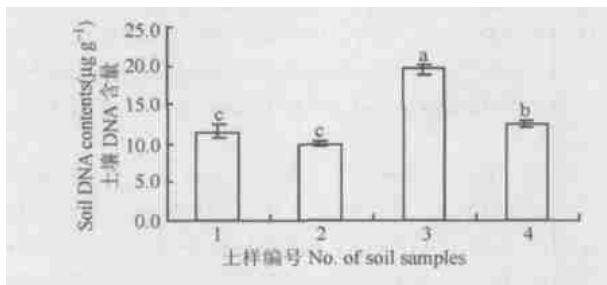


图 1 供试土壤 DNA 含量

Fig. 1 Soil DNA contents of soil samples used

供试土壤的 DNA 含量分析结果如图 1 所示。由图 1 可知, FastPrep © 系统提取的供试土壤 DNA 含量存在一定的差异, DNA 含量范围为 DNA 10.0~19.7 µg g⁻¹ 干土, 其中重金属复合污染较为严重的 1 号和 2 号土样 DNA 含量较低 (分别是 DNA 11.5 µg g⁻¹ 干土、DNA 10.0 µg g⁻¹ 干土), 而 3 号土样 DNA 含量最高 (高达 DNA 19.7 µg g⁻¹ 干土), 4 号

土样次之。这一结果表明一定程度的重金属污染有利于土壤 DNA 含量升高, 这可能与重金属轻度污染刺激了土壤微生物群落的繁殖和生长活动有关。为了进一步检验 FastPrep © 系统提取土壤 DNA 的纯度, 测定了各土样的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值, 结果得出 1~4 号土样的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值范围为 1.83~1.94。通常情况下, 样本 DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值在 1.75~2.1 之间时 DNA 的纯度较好, 受土壤中蛋白质和腐殖酸的污染很少^[8~10]。可见, 采用 FastPrep © 系统提取的土壤 DNA 纯度较高, 可以用来扩增土壤微生物 16S rRNA 基因, 进一步作变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 检测。

2.2 重金属污染土壤微生物群落 DNA 的 PCR-DGGE 分析

采用对大多数细菌和古细菌的 16S rRNA 基因片段具有特异性的引物对 (F₃₃₈GC 和 R₅₁₈) 进行了供试土壤微生物的基因组 DNA 特异性扩增, 其 PCR 扩增产物的变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 图谱如图 2 所示。经凝胶成像系统分析可知, 1、2、3、4 号土样的 DGGE 电泳条带数目、各个条带的强度和迁移率均存在一定程度的差异, 表明重金属复合污染影响了农田土壤生态系统的细菌丰富度, 从而使土壤微生物群落结构多样性发生变化。由图 2 还可看出, 供试土壤间具有许多共同的条带, 说明这些供试土壤之间可能存在一些共有的细菌类型, 而且这些公共条带的强度也不相同, 表明污染土壤微生物在 DNA 水平上有明显改变, 这与前人的研究结果相一致^[19~20]。为了进一步揭示供试土壤间 DNA 片段的差异, 采用非加权成对算术平均法 (UPGMA) 对土样 DGGE 指纹图谱作相似性聚类分析, 其结果见图 3。结果表明, 所有供试土壤的遗传相似性为 45%, 在 65% 的相似性水平处可将 4 个供试土壤区分开来, 表明土样间存在遗传多态性, PCR-DGGE 指纹图谱

分析技术能较好地反映出重金属污染土壤样品之间存在的遗传差异。另一方面也说明了 FastPrep[®]核酸提取系统同样适用于重金属污染土壤环境中微生物基因组 DNA 的分离、纯化,得到的 DNA 可直接用于 PCR-DGGE 分析。

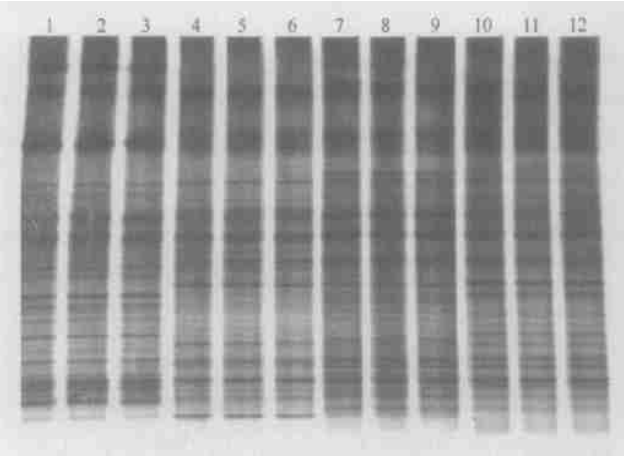


图2 供试土壤微生物 16S rDNA 片段的 DGGE 图谱(每个土样各设 3 次重复(即 3 条泳道),泳道 1~3 代表 1 号土样;泳道 4~6 代表 2 号土样;泳道 7~9 代表 3 号土样;泳道 10~12 代表 4 号土样)

Fig. 2 DGGE patterns of 16S rDNA fragments from four soils polluted with heavy metals(Each soil has three replicates(three lanes). Lanes 1~3 are of the first soil sample; Lanes 4~6 of the second soil sample; Lanes 7~9 of the third soil sample; and Lanes 10~12 of the fourth soil sample)

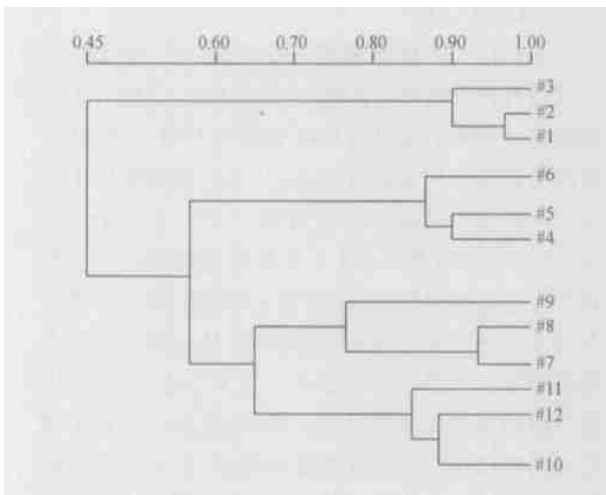


图3 供试土壤微生物群落 PCR-DGGE 剖面的遗传相似性分析(每个土样各设 3 次重复, #1~#3 代表 1 号土样; #4~#6 代表 2 号土样; #7~#9 代表 3 号土样; #10~#12 代表 4 号土样)

Fig. 3 Genetic similarity of microbial community profiles obtained with PCR-DGGE in the soils polluted with heavy metals(Each soil has three replicates(three lanes). #1~#3 are of the first soil sample; #4~#6 of the second soil sample; #7~#9 of the third soil sample; and #10~#12 of the fourth soil sample)

3 结论

1) FastPrep[®]核酸提取仪配合 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒能在约 30 min 内快速提取和纯化重金属污染土壤的总 DNA,且分离获得的土壤 DNA 纯度较高。FastPrep[®]核酸快速提取系统同样适用于重金属污染农田土壤环境中微生物基因组 DNA 的分离和纯化,得到的 DNA 可直接用于 PCR-DGGE 分析,据此深入探讨污染土壤微生物群落演变的分子机理。

2) 该冶炼厂附近农田土壤环境受到不同程度的 Cu、Zn、Pb、Cd 的复合污染。总体而言,重金属复合污染严重的农田土壤中 DNA 含量较低,从而使土壤微生物群落结构多样性发生变化。

参考文献

- [1] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 190~197
- [2] Lukow T, Dunfield P F, Leisack W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbial Ecology*, 2000, 32: 241~247
- [3] Muyzer G, Ellen C W, Andre G U. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695~700
- [4] 张惠文,张倩茹,周启星,等. 分子微生物生态学及其研究进展. *应用生态学报*, 2003, 14(2): 286~292. Zhang H W, Zhang Q R, Zhou Q X, *et al.* Introduction and progress of molecular microbial ecology(In Chinese). *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2003, 14(2): 286~292
- [5] 张瑞福,曹慧,崔中利,等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化. *微生物学报*, 2003, 43(2): 276~282. Zhang R F, Cao H, Cui Z L, *et al.* Extraction and purification of soil microbial total DNA (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(2): 276~282
- [6] Robe P, Nalin R, Capellano C, *et al.* Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 2003, 39: 183~190
- [7] Alm D W, Zheng D, Raskin L. The presence of humic substances and DNA in RNA extracts affects hybridization results. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 4547~4557
- [8] Kresk M, Wellington E M. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 39: 1~16
- [9] Robert I G, Andrew S W, Anthony G O. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA- based microbial community composition. *Ap-*

- plied and Environmental Microbiology, 2000, 66(12): 5488~5491
- [10] Gelsomine A, Keijzer-Wolters A C, Cacco G, *et al.* Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 38(1): 1~15
- [11] Zhou J, Brouns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316~322
- [12] Bomeman J, Skrotch P W, Patis J A, *et al.* Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(6): 1935~1943
- [13] Bomeman J, Triplett E W. Rapid and direct method for extraction of RNA from soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 1997, (11/12): 1621~1624
- [14] Orphan V J, Hinrichs K U, Ussler III, *et al.* Comparative analysis of methane oxidizing archaea and sulfate reducing bacteria in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 1922~1934
- [15] Zambino, Paul J. Dry grinding at neat ambient temperatures for extracting DNA from rust and other fungal spores. *Biological Techniques*, 2002, 33: 48~51
- [16] McGrath S P, Cunliffe C H. A simplified method for the extraction of metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludge. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1985, 36: 794~798
- [17] 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析法. 北京: 北京农业科技出版社. 1999. 107~240. Lu R K. ed. *Analytical Methods of Soil and Agricultural Chemistry (In Chinese)*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999. 107~240
- [18] 中国环境监测总站编著. 中国土壤元素背景值. 北京: 中国环境科学出版社. 1990. 336~392. Environment Monitoring Station in China. ed. *Background Values of Soil in China (In Chinese)*. Beijing: China Environmental Science Press, 1990. 336~392
- [19] Kozdroj J, Elsas J D. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialized area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. *Applied Soil Ecology*, 2001, 17: 31~42
- [20] Smit E, Leeftang P, Wernars K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 23: 249~261

RAPID EXTRACTION AND PURIFICATION OF DNA IN FARMLAND SOILS CONTAMINATED WITH MIXED HEAVY METALS FOR PCR-DGGE ANALYSIS

Teng Ying Luo Yongming[†] Zhao Xiangwei Li Zhengao Song Jing Wu Longhua

(State Key Laboratory of Soil and Agricultural Sustainable Development (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China)

(Soil and Environment Bioremediation Research Centre, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Total community DNA was extracted and purified from soils contaminated with different levels of mixed heavy metals by FastPrep[®] system, and then amplified by using eubacterial 16S rDNAs primers. Their PCR products were analysed by DGGE to obtain bacterial community patterns. The results showed that the FastPrep[®]120 instrument with the FastDNA SPIN Kit for soil can be used to rapidly, effectively extract and purify DNA from polluted soils. The electrophoresis lanes obtained by PCR-DGGE were legible and distinguishable. The profiles of PCR-DGGE indicated that heavy metals accumulation at different levels markedly caused damage to farmland soils DNA, affecting the soil microbial richness and structure of dominating bacterial populations in the farmland ecological systems, and changing the structural diversity of microbial community. The FastPrep[®] system is also suitable for rapid efficient extraction and purification of soil total community DNA from farmland soils polluted with mixed heavy metals and in turn the DNA can be used directly for PCR-DGGE analysis.

Key words Mixed heavy metal pollution; Farmland soils; The FastPrep[®] system; PCR-DGGE analysis