

# 农田土壤中病原真菌 DNA 提取方法的研究

王楠<sup>1,2</sup>, 王伟<sup>2</sup>

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

**摘要:**通过比较不同的研磨、洗涤、裂解和沉淀方法,成功获得一种适于土壤真菌 DNA 提取的方法。结果表明,采用石英砂研磨、TENP 和 PBS 联合洗涤、SDS 高盐裂解、异丙醇沉淀等一系列步骤,所获取的土壤微生物 DNA 质量最佳。该试验方法可以直接从土壤中提取微生物基因组,尤其适用于土壤病原真菌的提取,所得 DNA 完全可以直接用于酶切和 PCR 扩增。该方法高效、价廉、操作简单,对改进土壤病原菌生态的研究方法具有重要价值。

**关键词:**农田土壤;病原真菌;DNA 提取;PCR 扩增

**中图分类号:**S154.3 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2013.02.013

## Study on an extraction method of pathogenic fungal DNA from farmland soil

WANG Nan<sup>1,2</sup>, WANG Wei<sup>2</sup>

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** By comparing grinding method, washing method, cleavage and precipitation method, a method was gotten suitable for farmland fungi DNA extraction. The results showed that the quality of soil microorganism DNA is of the best which is obtained by grinding with quartz sand, washing with TENP and PBS, lysing with SDS in high-salt buffer and precipitating with isopropanol and so on. The pathogenic fungal DNA can be directly extracted from soil by using the method, which is particularly suitable for the soil pathogenic fungal extraction. The DNA obtained can be directly used for restriction enzyme digestion and PCR amplification. The method is efficient, inexpensive, easy to operate, which is of important value for the soil pathogens ecological research.

**Key words:** farmland soil; pathogenic fungi; DNA extraction; PCR amplification

## 0 引言

土壤生态系统极其复杂,土壤中微生物种类丰富多样,其中可在试验室培养的微生物仅占其中的1%,而那些不可培养的微生物对田间作物的影响十

分巨大<sup>[1]</sup>. 采用分子生物学技术,通过研究土壤微生物 DNA 的差异和特征来检测土壤病害,已成为现代农业发展的一个重要推动力,而快速、高效地获得土壤微生物 DNA,成为研究的一个重要瓶颈<sup>[2-3]</sup>.

收稿日期:2013-03-05

基金项目:国家863计划项目(2012AA101401);国家公益性行业(农业)专项(201003029)

作者简介:王楠(1983—),女,江苏省徐州市人,郑州轻工业学院助教,主要研究方向为植物病害生物防治。

通信作者:王伟(1963—),男,黑龙江省双城市人,华东理工大学教授,博士,主要研究方向为植物病害生物防治及微生物农药创制。

国内外对土壤微生物总 DNA 提取的工作已开展了 20 多年<sup>[4-6]</sup>。目前提取土壤微生物 DNA 的方法分为 2 类:一类是直接法,即不去除土壤及其所包含的其他杂质,直接在裂解缓冲液中裂解土壤微生物细胞,再提取和纯化裂解液中的 DNA;另一类是间接法,即通过良好地分离缓冲液将微生物菌体与土壤颗粒分开,再通过差速离心法去除土壤等杂质,最后将回收到的细胞裂解,进行 DNA 提取<sup>[7]</sup>。2 种方法都要通过细胞裂解、抽提核酸和纯化核酸 3 个步骤。土壤总微生物 DNA 提取液中主要的污染物是腐植酸,可以螯合  $Mg^{2+}$ , 引物, dNTP, Taq 酶或是与 DNA 或蛋白质发生共价结合,从而抑制酶的活性<sup>[8]</sup>。很多研究使用树脂柱、氯化铯梯度离心、色谱法、电泳回收等方法,既费时费力又丢失了很多核酸信息<sup>[9-10]</sup>。

目前,针对土壤微生物总 DNA 和细菌 DNA 的提取有很多报道,而对于土壤真菌 DNA 的提取则极为少见<sup>[11-12]</sup>。本文旨在研究针对土壤植物病原真菌 DNA 的快速、简捷、高效的提取方法,并用真菌通用引物和特异性真菌引物进行 PCR 反应,以检测提取方法的优劣。

## 1 实验

### 1.1 材料

土样:于 2010 年 9 月采土壤自上海南汇区(经度 121.76 纬度 31.05)英雄村蔬菜大棚,该大棚多年连续种植甜瓜,枯萎病、蔓枯病等病害发生较严重。先去除土壤表面杂物,采集距甜瓜根 2 cm,深 5~10 cm 的土壤,除去根系、石块等杂物,过 2 mm 筛。立即分析或置于 4 °C 冰箱保藏。

试剂:所用试剂均为 AR 级,上海生工生物工程公司生产。

### 1.2 土壤样品预处理

**1.2.1 石英砂研磨** 称取 500 mg 土壤样品,等重石英砂(20~40 目,下同),置研钵中研磨至粉末状,转移至离心管中,添加 500 mg 石英砂振荡。同时对不添加石英砂而直接进行研磨的处理方法比较效果。

**1.2.2 液氮研磨** 称取 500 mg 土壤样品,放入预冷研钵中,加入液氮快速研磨至粉末状,转移至离心管中,添加石英砂振荡。

### 1.3 土壤微生物的洗涤

**1.3.1 磷酸洗涤法** 向经过 1.2 预处理的离心管中加 3 mL 磷酸洗涤液(0.12 mol/L  $Na_3PO_4$ ,

0.5 mol/L EDTA, pH = 8.0), 旋涡振荡 5 min, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 室温离心 5 min, 弃上清。重复 2 次。

**1.3.2 TENP 洗涤法** 向经过 1.2 预处理的离心管中加 3 mL TENP 洗涤缓冲液(50 mmol/L Tris, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.01 g/mL PVPP, pH = 8.5), 同 1.3.1 方法洗涤 3 次。

**1.3.3 TENP 及 PBS 联合洗涤法** 向经过 1.2 预处理的离心管中加 3 mL TENP 洗涤缓冲液, 洗涤 2 次。加 3 mL PBS 缓冲液(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L  $Na_2HPO_4$ , 1.4 mmol/L  $KH_2PO_4$ , pH = 7.4), 洗涤 1 次。

### 1.4 土壤微生物 DNA 的裂解

**1.4.1 SDS 高盐裂解法** 向经过 1.3 洗涤处理的离心管中加入 3 mL SDS 高盐提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, 100 mmol/L  $Na_3PO_4$ , 1.5 mol/L NaCl, 5% PVP, 1% CTAB, pH = 8.0), 500 μL 溶菌酶(20 mg · mL<sup>-1</sup>), 15 μL 蛋白酶 K(20 mg · mL<sup>-1</sup>), 振荡 10 min, 37 °C 水浴 0.5 h, 间隔 5 min 上下颠倒数次。再加入 125 μL 20% SDS 和 0.15 g PVPP(固体), 65 °C 水浴 2 h, 其间每隔 5 min 颠倒离心管数次。8 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 将上清液转入新的 5 mL 离心管中。

**1.4.2 CTAB 裂解法** 向经过 1.3 洗涤处理的离心管中加入 3 mL CTAB 提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 5% PVP, 3% CTAB, pH = 8.0), 同 1.4.1 方法进行裂解。

**1.4.3 Reddy 提取液法<sup>[13]</sup>** 向经过 1.3 洗涤处理的离心管中加入 3 mL Reddy 提取缓冲液(150 mmol/L Tris-HCl, 3 mmol/L EDTA, 1.1 mol/L NaCl, 1.5% CTAB, pH = 8.0), 同 1.4.1 方法进行裂解。

**1.4.4 脱脂牛奶法** 向经过 1.3 洗涤处理的离心管中再加入 1 mL 0.4% 脱脂牛奶溶液, 剧烈振荡 15 min, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 室温离心 10 min, 取上清, 加入 2 mL SDS 高盐提取缓冲液。同 1.4.1 方法裂解。

### 1.5 土壤微生物 DNA 的抽提

在粗 DNA 溶液中加入等体积苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1) 颠倒混匀, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 室温离心 10 min, 收集上清, 加入等体积氯仿/异戊醇(24:1), 颠倒混匀, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 室温离心 10 min, 收集上清。

### 1.6 土壤微生物 DNA 的沉淀

**1.6.1 PEG 沉淀法** 抽提后加入 0.5 倍体积 25% (V:V) PEG 8 000, 4 °C 过夜, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心

10 min, 70% 乙醇洗涤, 离心晾干, 溶于 100  $\mu\text{L}$  pH = 8.0 TE 缓冲液, 备用。

**1.6.2 异丙醇沉淀** 抽提后加入 0.1 倍体积  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaAC (pH = 5.2), 0.6 倍体积异丙醇 4  $^{\circ}\text{C}$  沉淀 1 h,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 70% 乙醇洗涤, 离心晾干, 溶于 100  $\mu\text{L}$  TE, 备用。

### 1.7 DNA 质量的检测与定量

DNA 质量的检测与定量采用紫外分光光度计与琼脂糖凝胶电泳双重分析, 紫外分光光度法以  $\lambda\text{DNA}$  为标准品, 以  $A_{260}$  对 DNA 进行定量, 同时测  $A_{230}$  和  $A_{280}$ , 以测定其纯度. 电泳图谱经 GIS 凝胶成像分析系统与标准 DNA 分子量参照物比较定量而得。

### 1.8 DNA 稀释度的考察

将提取得到的 DNA 溶液稀释至不同浓度:  $5 \times 10^{-1}$  倍,  $1 \times 10^{-2}$  倍,  $5 \times 10^{-2}$  倍,  $1 \times 10^{-3}$  倍,  $2 \times 10^{-3}$  倍,  $5 \times 10^{-3}$  倍,  $1 \times 10^{-4}$  倍, 进行 PCR 扩增, 以找到最佳的稀释浓度。

### 1.9 PCR 扩增

**1.9.1 真菌通用引物 ITS 扩增** 提取所得 DNA 用真菌核糖体基因转录间隔区 (ITS) 通用引物 ITS<sub>1</sub> (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS<sub>4</sub> (5'-TCCTCCGCTTAGATA TGC-3'). PCR 反应体系: 2.5  $\mu\text{L}$   $10 \times$  PCR 反应缓冲液, 2  $\mu\text{L}$  2.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 20  $\mu\text{M}$  引物各 0.25  $\mu\text{L}$ , 2.5 mM dNTP 各 1  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  BSA, 1.25 U Taq 酶, 模板若干. 反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共 32 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min. 反应结束后, 取 5  $\mu\text{L}$  样品进行琼脂糖凝胶电泳, Bio-rad 凝胶成像系统照相。

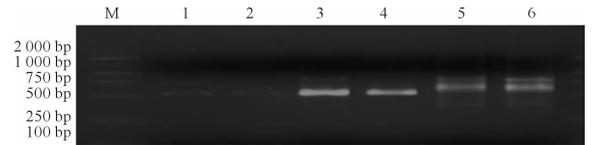
**1.9.2 特异引物扩增** 采用瓜类枯萎病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*)、瓜类蔓枯病 (*Didymella bryoniae*, 有性 *Mycosphaerella meloni*) 2 种主要瓜类病原菌的特异引物进行检测, 瓜枯萎病引物 Fn-1 (5'-TACCACTTGTTCCTCGGC-3') / Fn-2 (5'-TTGAGGAA CGCGAATTAAC-3'), 瓜蔓枯病引物 Mn-1 (5'-GGATCATTACCTAGAGTTG-3') / Mn-2 (5'-ACG TCG TCG TTG TGA GTG-3')<sup>[14]</sup>.

## 2 结果与讨论

从田间作物病害的病原菌数量看, 病原真菌数量较多. 为考察本实验所采用方法提取 DNA 对后续试验的影响, 用真菌通用引物 ITS 扩增的方法来判断是否存在足以抑制 Taq 酶活性的抑制剂。

### 2.1 研磨方法的比较

图 1 中所有处理 ITS<sub>1</sub>/ITS<sub>4</sub> 扩增后在 500 bp 附近有明显条带出现, 符合真菌 ITS 片段大小. 不添加石英砂研磨法所得模板也能实现扩增, 但条带非常弱, 可能是提取的 DNA 杂质较多, 影响了后期 PCR 反应, 而加石英砂研磨和液氮研磨的处理均实现了扩增, 且条带很明显. 可见研磨充分实现了土壤颗粒的分散, 使其充分与裂解液接触, 进而裂解微生物. 加石英砂研磨和液氮研磨可以达到相同效果, 而从实验室条件和实验操作来看, 显然石英砂研磨既经济又安全。

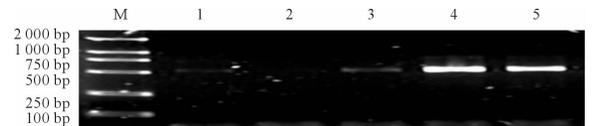


M: DNA Marker DL2000; 泳道 1—2: 不添加石英砂研磨法的 PCR 结果; 泳道 3—4: 石英砂研磨法的 PCR 结果; 泳道 5—6: 液氮研磨法的 PCR 结果。

图 1 不同研磨方法所得土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图

### 2.2 洗涤方法的比较

因农田土壤有机质含量高, 若提取过程中不能有效去除腐植酸等杂质的干扰, 则不能进行下一步的操作, 如 PCR 扩增、杂交等. 在裂解前对土壤进行预洗, 可以去除一些可溶性抑制剂和细胞外 DNA, 因而对洗涤方法进行比较很有必要. 图 2 为不同洗涤研磨方法所得土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图, 图 3 为不同洗涤方法所得土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图。

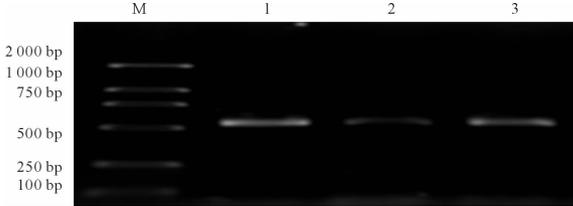


M: DNA Marker DL2000; 泳道 1: 研磨且不洗涤法的 PCR 结果; 泳道 2: 不研磨且不洗涤法的 PCR 结果; 泳道 3: 不研磨且 TENP 和 PBS 联合洗涤法的 PCR 结果; 泳道 4—5: 研磨且 TENP 和 PBS 联合洗涤法的 PCR 结果。

图 2 不同洗涤研磨方法所得土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图

图 2 中, 所有不洗涤的处理所得 PCR 扩增条带都非常淡, 而 TENP 和 PBS 联合洗涤后的处理条带清晰可见, 洗涤离心后上清呈淡黄色或黄褐色, 此为附着土壤表面的腐植酸, 这样便大大减少了影响后续操作的障碍. 一般土壤的洗涤采用磷酸缓冲液

或偏磷酸缓冲液洗涤,可以去除土壤中的杂质离子,胞外 DNA 和部分有机质. 而 TENP 和 PBS 洗涤方法一般用于洗涤淤泥,由于淤泥中的有机质更为丰富,微生物生态复杂, TENP 和 PBS 联合洗涤可以在洗涤杂质的同时进行一定程度的裂解,更大程度地将土壤有机质去除. 鉴于农田土壤中有有机物含量丰富,腐植酸也较多,故这里借鉴过来进行农田土壤的洗涤处理. 由图 3 也可以看出,这种方法对于农田土壤微生物 DNA 的提取很有效.

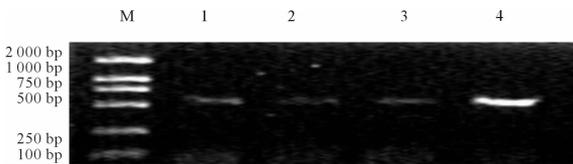


M: DNA Marker DL2000;泳道 1: TENP 和 PBS 联合洗涤法的 PCR 结果;泳道 2:磷酸缓冲液洗涤法的 PCR 结果;泳道 3: TENP 洗涤法的 PCR 结果.

图 3 不同洗涤方法所得土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图

### 2.3 裂解方法的比较

本文所选用的几种裂解方法均为文献广泛报道的 DNA 提取方法. CTAB 由于对多糖去除效果显著,广泛应用于植物 DNA 的提取. 脱脂牛奶洗涤能够使土壤中大部分细胞悬浮于试剂中,但对于菌丝体较大的真菌效果不明显. 图 4 为不同裂解方法所得土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图,从图 4 可以看出,用脱脂牛奶法所扩增条带非常淡. SDS 高盐和热处理使微生物细胞变性裂解, SDS 有助于蛋白质与 DNA 的分离,同时 PVPP 的添加有助于腐植酸的去除,利于核酸纯化. 图 4 中 SDS 高盐法处理的扩增条带最亮,明显优于其他 3 种方法.



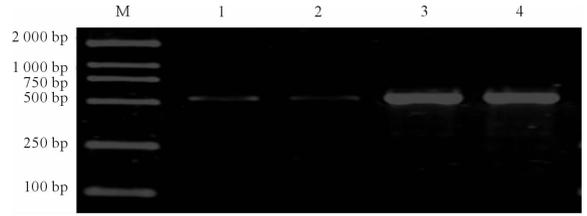
M: DNA Marker DL2000;泳道 1: Reddy 提取液裂解法的 PCR 结果;泳道 2: CTAB 裂解法的 PCR 结果;泳道 3: 脱脂牛奶裂解法的 PCR 结果;泳道 4: SDS 高盐裂解法的 PCR 结果.

图 4 不同裂解方法所得土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图

### 2.4 沉淀方法的影响

图 5 为不同沉淀方法所得土壤 DNA 模板的 PCR

产物电泳图. PEG 沉淀所需时间较长,且易导致腐植酸沉淀,影响后续 PCR 反应,由图 5 可见,其扩增条带很淡,异丙醇沉淀较适中,扩增条带清晰可见.



M: DNA Marker DL2000;泳道 1—2: PEG 沉淀法的 PCR 结果;泳道 3—4: 异丙醇沉淀法的 PCR 结果.

图 5 不同沉淀方法所得土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图

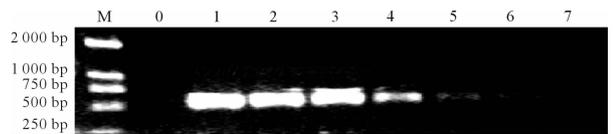
### 2.5 DNA 模板不同稀释度的扩增

紫外分光光度法测定 DNA 溶液的  $A_{230}$ ,  $A_{260}$  及  $A_{280}$ . 以  $A_{260}/A_{280}$  代表 DNA 的纯度与质量,以  $A_{260}/A_{230}$  代表 DNA 中污染腐植酸的程 度. 检测结果见表 1,不同稀释度的土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图见图 6.

表 1 土壤微生物 DNA 分光度检测结果

波长	$A_{230}$	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	产量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
吸光值	0.091	0.102	0.084	1.122	1.214	68

DNA 初产量为  $68 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,图 6 中 DNA 稀释度依次为  $5 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ . DNA 稀释度达到  $2 \times 10^{-3}$  时仍可以检测到,但扩增条带很淡. 本实验所得 DNA 产量较高,为减少后续分子实验中的干扰因素,尽量提高模板的稀释度,降低腐植酸等杂质对 PCR 反应的影响,故后续的实验均采用  $1 \times 10^{-3}$  的稀释度. 本实验优化的提取方法获得的 DNA 量比较大,所含微生物遗传信息多,有利于对植物病原菌的监测,每克干土所获取的 DNA 量远大于张瑞福<sup>[15]</sup>和 J. Zhou 等<sup>[16]</sup>的研究报道.



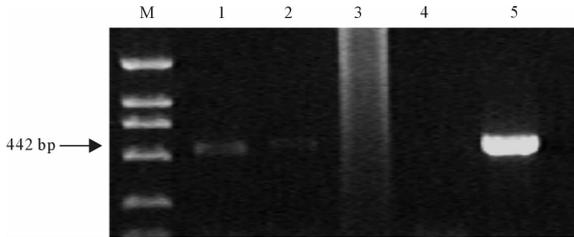
M: DNA Marker DL2000;泳道 0: 空白对照;泳道 1—7 依次为不同稀释度 DNA 样品的 PCR 扩增结果.

图 6 不同稀释度的土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图

### 2.6 特异引物检测植株根围土壤样品

图 7 为特异引物扩增优化前后所得土壤 DNA

模板的 PCR 产物电泳图. 对于瓜蔓枯病, 按照引物 Mn - 1/ Mn - 2, 能够扩增出 442 bp 的特异引物条带. 选取蔓枯病发病植株根围土壤, 分别用优化前和优化后的提取方法进行提取, 获得土壤微生物 DNA, 用 Mn - 1/ Mn - 2 进行 PCR 扩增. 从图 7 可以看出, 优化前的虽然部分样品有条带出现, 但都或淡或弥散, 而优化后的结果非常清晰, 扩增结果也符合瓜蔓枯病特异条带大小.

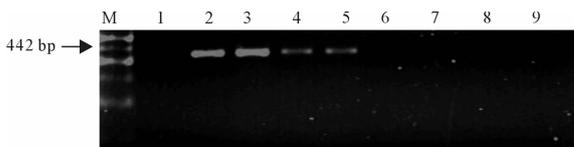


M: DL600 bp 的 Marker, 泳道 1—4: 优化前; 泳道 5: 本试验优化后.

图 7 特异引物扩增优化前后所得土壤 DNA 模板的 PCR 产物电泳图

用引物 Mn - 1/ Mn - 2, 扩增大棚甜瓜根围土壤样品中提取的基因组, 若扩增出该特异条带即表示该样品土壤中含有瓜蔓枯病病原菌. 同样, 对于瓜枯萎病按照引物 Fn - 1/ Fn - 2, 能够扩增出 327 bp 的特异引物条带, 因此如果土壤中提取的基因组也扩增出该特异条带, 即表示该样品土壤中含有瓜枯萎病病原菌.

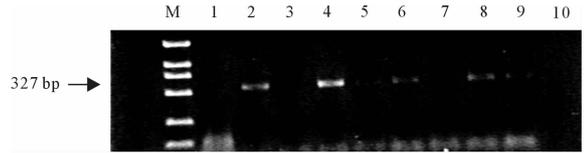
图 8 为蔓枯病特异引物扩增甜瓜根围土壤微生物 DNA 的 PCR 产物电泳图. 从图 8 可以看出, 瓜蔓枯病在 442 bp 有清晰条带出现, 也证明了 PCR 扩增过程成功. 对于从甜瓜植株根部取土壤样品, 用本试验方法提取获得土壤微生物 DNA, 用 Mn - 1/ Mn - 2 扩增, 泳道 4, 5 有较清晰的条带出现, 说明该 2 个样品检测到瓜蔓枯病病原菌, 有可能致使作物发病. 而其余泳道即没有检测到该瓜蔓枯病原菌.



M: DL600 bp Marker, 泳道 1: 阴性对照, 泳道 2—3: 西瓜蔓枯萎病菌 PCR 扩增阳性对照; 泳道 4—9: 不同甜瓜根围土壤样品 DNA 的 PCR 扩增结果.

图 8 蔓枯病特异引物扩增甜瓜根围土壤微生物 DNA 的 PCR 产物电泳图

图 9 为枯萎病特异引物扩增甜瓜根围土壤微生物 DNA 的 PCR 产物电泳图. 从图 9 可以看出, 瓜枯萎病在 327 bp 有清晰条带出现, 也证明了 PCR 扩增过程成功. 对于土壤微生物 DNA 的扩增, 泳道 4 - 6, 8 - 9 有不同亮度的条带出现, 说明该编号样品检测到瓜蔓枯病病原菌, 有可能致使作物发病, 而其余泳道则没有检测到该瓜蔓枯病原菌.



M: DL600 bp Marker, 泳道 1: 阴性对照, 泳道 2: 西瓜枯萎病菌 PCR 扩增阳性对照, 泳道 3—10: 不同甜瓜根围土壤样品 DNA 的 PCR 扩增结果.

图 9 枯萎病特异引物扩增甜瓜根围土壤微生物 DNA 的 PCR 产物电泳图

### 3 结论

本实验在对传统土壤微生物 DNA 提取方法优化的基础上重点比较了几种裂解和洗涤方法, 单个样品操作一般可在 5 h 内完成, 可以不经进一步的纯化步骤即可直接进行后续分子实验, 尤其利于土壤中丝状真菌 DNA 的提取. 优化后的提取方法为: 称取 500 mg 土壤样品, 等重石英砂研磨后添加石英砂振荡, 加 3 mL TENP 洗涤 2 次. 加 3 mL PBS 洗涤 1 次. 加入 3 mL SDS 高盐提取液, 500  $\mu$ L 溶菌酶, 500  $\mu$ L 纤维素酶溶液, 15  $\mu$ L 蛋白酶 K, 振荡 10 min, 37  $^{\circ}$ C 水浴 0.5 h. 加入 125  $\mu$ L 20% SDS 和 0.15 g PVPP, 65  $^{\circ}$ C 水浴 2 h. 离心后上清液加入等体积酚/氯仿/异戊醇抽提 1 次, 等体积氯仿/异戊醇, 抽提 1 次. 上清加入 0.1 倍体积 NaAC, 0.6 倍体积异丙醇沉淀, 乙醇洗涤, 离心晾干, 溶于 100  $\mu$ L TE 缓冲液.

本研究最终建立了优化的微生物 DNA 提取方法, 为开发土壤微生物资源提供了有力工具和借鉴.

#### 参考文献:

[1] Vigdis T, Lise O. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems [J]. Ecology and Industrial Microbiology, 2002 (5) :240.

### 3 结论

通过对改良 CTAB 法的 CTAB 沉淀缓冲液使用量、裂解时间、Tris 平衡酚的处理次数和 RNase 处理时间 4 个主要影响因素进行单因素优化. 实验结果表明: CTAB 沉淀缓冲液使用 DNA 溶液体积的 1.5 倍、裂解时间 40 min、Tris 平衡酚的抽提 1 次和 RNase (10 mg/mL, 1  $\mu$ L) 处理 10 min, 能得到主带清晰、纯度良好并适合用于 PCR 分析的烤后烟叶基因组 DNA.

### 参考文献:

- [1] 张英, 柏干荣, 黄明辉, 等. 植物基因组 DNA 提取方法的评析与验证[J]. 药品评价, 2004, 1(4): 292.
  - [2] 魏志刚, 王艳敏, 杨传平. 松科植物基因组总 DNA 提取方法的比较[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 263.
  - [3] 邓力超, 邱道寿, 屠乃美, 等. PVP 对烟草基因组 DNA 提取的影响[J]. 广东农业科学, 2009(5): 37.
  - [4] 梁景霞, 祁建民, 吴为人, 等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(4): 33.
  - [5] 郭兆奎, 万秀清, 魏继承, 等. 适于 PCR 分析的烤后烟叶 DNA 提取方法的研究[J]. 中国烟草科学, 1999(4): 5.
  - [6] Sarala K, Rao R V S. Genetic diversity in Indian FCV and burley tobacco cultivars [J]. J of Genetics, 2008, 87(2): 159.
  - [7] Gadani F, Ward M, Guo Z K, et al. Report of the COREST task force genetically modified tobacco: detection methods [J]. Coresta Bulletin, 1999(4): 77.
  - [8] 马林, 毛华, 李元实, 等. 烤后烟叶 RAPD 反应体系优化研究[J]. 郑州轻工业学院学报: 自然科学版, 2010, 25(1): 1.
  - [9] 王齐红, 黄骥, 张红生. 一种快速微量提取植物叶片 DNA 的方法[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(5): 479.
  - [10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 742-744.
  - [11] 黄莹, 高丽美, 张永彦, 等. 一种优化的植物总 DNA 提取方法[J]. 西北作物学报, 2004, 24(6): 1103.
  - [12] GB/T 24310—2009, 烟草及烟草制品转基因检测方法[S].
- 
- (上接第 58 页)
- [2] Bertrand H, Poly F, Van V T, et al. High molecular weight DNA recovery from soils prerequisite for biotechnological metagenomic library construction[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005(62): 1.
  - [3] Thakuria D, Schmidt O, Siurtaim M M. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008(40): 1390.
  - [4] 吴敏娜, 张惠文, 李新宇, 等. 提取北方土壤真菌 DNA 的一种方法[J]. 生态学杂志, 2007, 26(4): 611.
  - [5] Kirk J L, Beaudette L A, Hart M, et al. Methods of studying soil microbial diversity [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004(58): 169.
  - [6] Sessitsch, Hackl E, Wenzl P, et al. Diagnostic microbial microarrays in soil ecology [J]. New Phytologist, 2006(171): 719.
  - [7] Cao C, Yang M, Xu X J, et al. Technologies of extraction and purification of microbial total DNA from a meadow soil [C]//Remote Sensing Environment and Transportation Engineering (RSETE), Nanjing: IEEE, 2011: 7215-7218.
  - [8] Smalla K, Cresswell N, Mendonca Hagler L C, et al. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction mediated amplification [J]. J Appl Microbiol, 1993, 74(1): 78.
  - [9] 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 [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(47): 15.
  - [10] Volossiorik T, Jane Robb E, Nazar Ross N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(11): 3972.
  - [11] Agnelli A, Ascher J, Corti G, et al. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2004, 36: 859.
  - [12] Hawksworth D L, Rossman A Y. Where are all the undescribed fungi? [J]. Phytopathology, 1997(87): 888.
  - [13] Lamontagne M G, Michel Jr F C. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis [J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 49: 255.
  - [14] Zhang Z, Zhang J, Wang Y, et al. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249: 39.
  - [15] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 等. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化 [J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 276.
  - [16] Zhou J, Bruns M A, Tiedie J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(4): 326.