



基于密度梯度离心技术分离稳定同位素 DNA 的方法研究

何秋香

(福建农林大学 资源与环境学院, 福州 350002)

摘要: 有别于传统的通过富集分离纯化技术获得一些纯培养污染物降解功能微生物, 稳定同位素技术(SIP-DNA)可以更加便捷地鉴定出功能基因。该文研究针对 SIP-DNA 中密度梯度离心这一核心技术, 获得了该技术的条件及相关参数。浮力密度和 DNA 浓度结果表明该方法可以有效地把同位素标记和非同位素标记的 DNA 分离, 为 SIP-DNA 后续高通量测序奠定基础。同时也为离心机管理人员和实验人员正确使用该方法提供技术手段。

关键词: 稳定同位素; 密度梯度离心; 功能微生物; 浮力密度

中图分类号: N33

文献标志码: A

DOI: [10.12179/1672-4550.20190058](https://doi.org/10.12179/1672-4550.20190058)

Study on the Method of Separating Stable Isotope DNA Based on Density Gradient Centrifugation Technology

HE Qiuxiang

(College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Unlike the traditional enrichment, separation and purification technology to obtain some purely cultured pollutant-degrading functional microorganisms, stable isotope technology (SIP-DNA) can more easily identify functional genes. In this study, the core technology of density gradient centrifugation in SIP-DNA was used to obtain the conditions and related parameters of the technology. The buoyancy density and DNA concentration results show that this method can effectively isolate isotope-labeled and non-isotope-labeled DNA and lay the foundation for subsequent high-throughput sequencing of SIP-DNA. It also provides technical means for centrifuge managers and experimenters to use the method correctly.

Key words: stable isotope technique; density gradient centrifugation; functional microorganism; buoyant density

超速离心机是分子生物实验室最常用的科研仪器之一, 能将具有不同沉降系数、质量和密度的混合物在离心机高速旋转产生的离心力场作用下进行快速分离、浓缩和纯化^[1]。密度梯度区带离心法(简称区带离心法), 是超速离心机常用的一种离心方法, 在一定的离心力下将加入惰性梯度介质的样品进行离心沉降, 把所需的颗粒分配到梯度中某些特定位置, 形成不同区带的分离方法。该法能够在保持颗粒活性条件下很好地将不同颗粒的物质进行分离^[2]。

为探究环境中降解某种污染物功能微生物, 传统的方法是通过加大富集培养和分离的方式获得。然而, 并非所有微生物都可以获得纯培养,

而且实验室条件下获得可培养的土壤微生物受到很多因素的限制。所以通过传统方式获得的某种污染物的功能降解菌可能无法准确反映污染环境微生物分布的真实情况, 也不能预测功能微生物对底物的同化代谢水平^[3]。稳定同位素探针(stable isotope probing, SIP)技术规避了传统方式的缺点, 利用非纯培养的方法, 用于鉴别稳定同位素示踪自然环境中的功能微生物。微生物通过代谢被标记的底物, 追踪被稳定同位素标记的 DNA 来达到识别功能微生物的目的^[4]。根据生物标记样品的浮力密度可以对目标的功能微生物 DNA 进行分离和表征, 从而确定环境样品中的功能微生物^[5]。

收稿日期: 2019-02-21; 修回日期: 2019-10-15

作者简介: 何秋香(1986-), 女, 硕士, 实验师, 主要从事水污染环境微生物修复方向的工作。

2000年英国科学家首次利用DNA-SIP技术成功获得森林土壤 ^{13}C -DNA^[6]; 2017年文献^[7]运用这一技术, 通过添加同位素标记的PAH样品到污染的水体系统中, 经过一段时间的处理后, 成功提取了具有该同位素标记的DNA, 并通过密度梯度离心技术将同位素标记和非同位素标记的DNA进行分离, 成功鉴定出降解PAH的功能微生物, 并将它分离纯化。

DNA-SIP技术的一个难点是如何有效的分离稳定同位素标记DNA样品。密度梯度离心技术是分离同位素样品的技术核心^[8-9]。该技术不仅需要制备惰性梯度介质溶液, 而且离心时间长, 操作严格不易掌握^[8]。但是少有文章详细报道了该技术的详细信息, 本研究就从这些问题出发, 采用密度梯度离心法中的等密度区带离心法, 以贝克曼公司的Optima XPN-100超速离心机, VTI-90垂直转头为例, 用氯化铯为介质, 构建了超速离心机分离SIP-DNA样品的条件、相关参数, 以及如何根据离心后样品的指标判定样品是否有效分离。目前该技术在国内只有少数几个团队使用, 掌握该技术, 可以为高校科研和教学提供强有力的技术手段, 而且大大提高昂贵的超速离心机的使用价值。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

Fast DNA快速提取试剂盒(MoBio Laboratories, Solana Beach, CA), CsCl(AR99%, 成都西亚试剂), Tris-EDTA(TE, pH8.0)。

Optima XPN-100超速离心机, 贝克曼垂直转子VTI-90(最高转速(rpm) 90 000, 最大相对离心力(g)645 000, 最大容量(mL)8 × 5.1), ND-1 000 UV-vis紫外可见分光光度计(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), AR200数显手持式折光仪(Leica Microsystems Inc.)。

1.2 Optima XPN-100超速离心机的基本操作

1) 电源开启: 打开电源, 待显示器显示操作界面;

2) 装入样品: 将装有样品的离心管对称放入VTI-90转头中的, 上层盖子涂上胶后用卡尺锁紧最外层盖子;

3) 放置转子: 双手握紧转子边缘将转子提

起, 对准离心机转轴轻轻放置, 确认放好后, 旋转几圈听到“滴”的一声表示转头放至准确位置, 关上仓门;

4) 设置参数: 在显示器操作界面上选择所用转子的型号, 离心转速, 离心时间及离心温度, 按“Download”键确认并回到主界面;

5) 开始抽真空: 参数设置完毕点击“Vacuum”仓体开始抽真空, 抽到200 Pa以下表明真空度正常;

6) 开始离心: 在主界面上按“Precool”键预冷, 当界面显示的温度达到设定温度后, 按“Enter”键和“Start”键开始离心;

7) 离心结束: 当离心机蜂鸣器提示离心结束时, 按“Vacuum”键使离心仓从真空状态恢复到正常气压;

8) 收集样品: 打开仓门, 平稳取出转子放置于桌面固定的位置;

9) 关闭离心机: 用干净的布擦拭转子和离心仓, 关上仓门, 最后关闭电源;

10) 登记信息: 在大型仪器使用记录本上记录本次离心机使用的相关信息。

Optima XPN-100超速离心机如图1所示。



图1 贝克曼 XPN-100 超速离心机

2 SIP-DNA 样品制备的流程

2.1 DNA 样品制备

用DNA快速提取试剂盒提取土壤样品中同位素标记和非同位素标记的样品DNA, 获得以 ^{12}C 和 ^{13}C 标记物为底物两个处理组的总DNA, 即 ^{12}C -DNA和 ^{13}C -DNA。

2.2 离心样品的制备

在10 mL无菌离心管中加入5 mL折光率约为1.402 0的Tris-EDTA(TE, pH 8.0)/CsCl溶液,

2.5~5 μg DNA 样品, 用数显手持折光仪测定溶液折光率, 通过加入少量 Tris-EDTA(TE, pH 8.0)或者折光率约为 1.41 Tris-EDTA(TE, pH 8.0)/CsCl 溶液调节, 使得最终折光率为 $1.402\ 0 \pm 0.000\ 2\ \text{g}^{[10]}$ 。两个处理的 DNA 样品按上述方法调节好后将溶液用注射器转移到 Quick-seal 离心管中(13 mm $\times$ 51 mm, 5.1 mL, Beckman Coulter), 使得对称的两个离心管称量误差在 $\pm 0.000\ 2\ \text{g}$, 之后热封^[7]。将装满样品的封口离心管装入 Beckman 超速离心机中 (Optima XPN-100, Beckman Corporation), 在 20 $^{\circ}\text{C}$, 45 000 g 离心 48 h。

2.3 分液分层

利用 Frantion Recovery System(如图 2(a)所示)用穿刺取代法分离样品: 把装满无菌水的注射器连上引流管和恒流泵(图 2(b))及穿刺分层器连接好, 缓慢取出离心管, 剪开离心管上面管口后轻置于分层器上, 刺破底部离心管, 调节恒流泵流速先排出引流管中的气泡后, 启动恒流泵, 后从底部引流管缓慢把每一层样品分接到无菌的 1.5 mL 离心管中, 总共将 5.1 mL 的离心液平均分为 14~15 个等体积不同浮力密度的氯化铯梯度区带 DNA 分层样品, 每层样品体积大约为 360 μL , 并做好每一层标记。用折光仪测定每一层的折光率, 并根据公式计算转换为浮力密度值(Buoyant Density, BD)。



(a) 贝克曼 Frantion Recovery System (b) 雷弗微流量泵

图 2 密度梯度离心技术分层分液仪器

2.4 纯化分层后 DNA 样品

分层后的样品加 70% 的冰乙醇, 加 pH=5.2 的乙酸钠, -80 $^{\circ}\text{C}$ 放 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心, 去上清, 用 70% 冰乙醇洗涤两次后, 风干, 将 DNA 溶于无菌 ddH₂O。即为分离纯化后的 DNA, 并测定纯化后每一层样品 DNA 的浓度。

3 实验结果分析

密度梯度离心分离步骤如图 3 所示, 经过 2.2 节

条件下设置的参数经密度梯度离心后样品出现明显的分层现象(本实验分为 14 层)^[8]。测定分层后每层的折光率, 由折光率和浮力密度转换公式计算出相应的浮力密度 BD^[5], 样品经 DNA 纯化后根据不同层 DNA 浓度值, 判断较高可能出现富集重碳, 把其他数值较小富集概率小的相邻层数合并, 使原来 14 层用相同的方式合并为 7 层进行后续高通量测序。

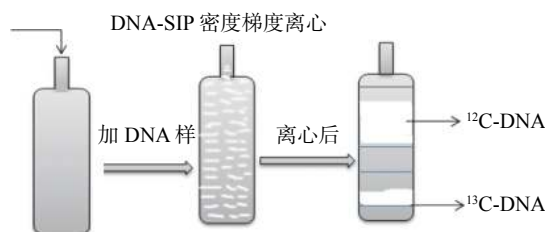


图 3 密度梯度离心分离步骤示意图

合并后层数和对应的浮力密度 BD 关系图如图 4(a)所示, 从上往下合并后 1~7 层分别为 ¹²C-DNA (1.671 4 > 1.694 3 > 1.714 3 > 1.727 4 > 1.737 2 > 1.750 7 > 1.776 2) 和 ¹³C-DNA (1.692 1 > 1.710 0 > 1.726 8 > 1.744 2 > 1.762 1 > 1.778 4 > 1.778 9), 按相同方式合并后从上往下浮力密度呈直线上升趋势, 且相对应层 ¹³C-DNA 样品 BD 均比 ¹²C-DNA 样品大。说明分层后浮力密度是由轻到重不断增加, 且标记处理 ¹³C-DNA 因添加了重碳的缘故浮力密度相对于未标记的大。由浮力密度和 DNA 浓度指标可初步判断该条件下离心获得的样品是否已经成功地将 DNA 样品分离^[11], 浮力密度与各层 DNA 浓度的关系曲线如图 4(b)所示, 重碳 DNA 浓度在中下的位置出现一个明显的浓度峰值 (6.5 ng/ μL)。这一结果表明被标记 ¹³C-DNA 主要在离心管下部重浮力密度梯度区富集, 而未被标记 DNA 在上层^[12]。密度梯度离心可以将不同微生物片段的 DNA 密度的不同分别收集在不同的层, 同一平行样品添加不同的同位素标记物处理后, 相同片段的 ¹³C-DNA 样品比 ¹²C-DNA 样品出现的位置更靠后, 在较高浮力密度区域属于同位素样品标记的重碳层。由 ¹²C-DNA 和 ¹³C-DNA 相对应层的高通量数据对比可知丰度含量较高的微生物为主要功能微生物, 为分离纯化该功能微生物提供更多生理生化信息^[13-14]。该方法可以很好地运用于实际水体或者土壤污染物中功能微生物的鉴定^[7, 15]。

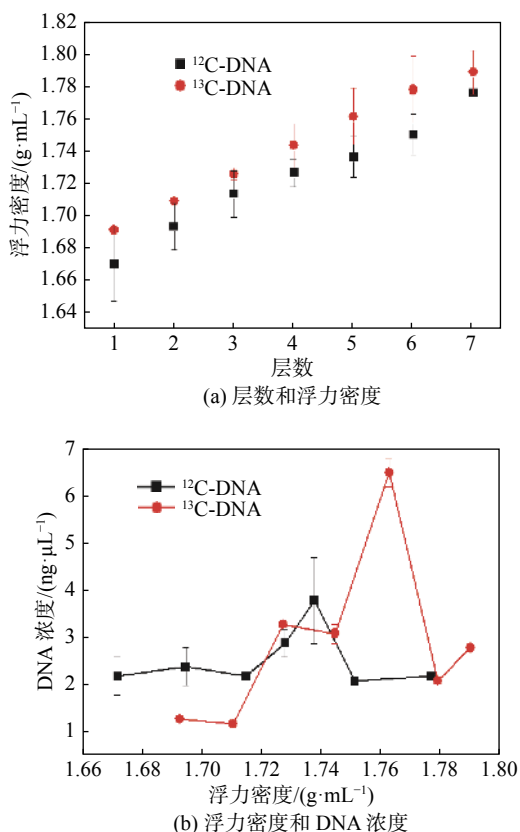


图4 ¹²C和¹³C处理的DNA样品离心后

4 结束语

密度梯度离心技术是实现 SIP-DNA 样品分离的关键技术, 本研究通过实验获得了超速离心机分离 SIP-DNA 样品的最佳条件(以 CsCl 为惰性介质, 在 20℃, 45 000 g 离心 48 h, 离心后分为 14 层)。根据每层的浮力密度和 DNA 浓度这两个参数可以判定分离是否成功, 成功分离后的重的同位素样品与正常样品相比不仅相同层数浮力密度大, 在相同浮力密度层 DNA 浓度最大位置也会比较靠后。该技术可为后续 16Sr RNA 高通量测序提供前提和保障。根据高通量数据结果可以从整体水平上反应环境样品微生物群落水平, 也可以更准确地认识自然条件下微生物的作用与具体的功能微生物。

参考文献

[1] 王媛, 雷迎峰, 丁天兵, 等. 超速离心机的操作及超速离心技术的应用[J]. 综述与进展, 2013, 26(16): 2144-2146.
[2] 黄素梅, 殷明, 张春芳, 等. 超速离心机在公共实验平台发挥的作用[J]. 实验室研究与探索, 2008, 27(3): 29-31.

[3] CHEN Y, DUMONT M G, NEUFELD J D, et al. Revealing the uncultivated majority: combining DNA stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated methylocystis in acidic peatlands[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(10): 2609-2622.
[4] DUMONT M G, MURRELL J C. Stable isotope probing-linking microbial identity to function[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 499-504.
[5] LUEDERS T, MANEFIELD M, FRIEDRICH M W. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA- based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis isopycnic centrifugation gradients[J]. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(1): 73-78.
[6] RADAJEWSKI S, INESON P, PAREKH N R, et al. Stable isotope probing as a tool in microbial ecology[J]. *Nature*, 2000, 403(6770): 646-649.
[7] LI J B, LUO C L, SONG M K, et al. Biodegradation of phenanthrene in polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated wastewater revealed by coupling cultivation dependent and independent approaches[J]. *Environment Science Technology*, 2017(51): 3391-3401.
[8] 贾仲君. 稳定性同位素核酸探针技术DNA-SIP原理与应用[J]. 微生物学报, 2011, 51(12): 1585-1594.
[9] 贾仲君. 稳定性同位素技术的应用. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2010, 294-321.
[10] 宋孟珂. 土壤POPs的生物降解及功能微生物研究[D]. 广州: 中国科学院大学, 2014.
[11] 郑燕, 贾仲君. 新一代高通量测序与稳定性同位素示踪DNA/RNA 技术研究稻田红壤甲烷氧化的微生物过程[J]. 微生物学报, 2013, 53(2): 173-184.
[12] 郑燕, 贾仲君. 基于核酸DNA/RNA同位素示踪技术的水稻土甲烷氧化微生物研究[J]. 土壤学报, 2016, 53(2): 490-501.
[13] DAVID R S, MARK H, SABRINA N P, et al. Stable-isotope probing with multiple growth substrates to determine substrate specificity of uncultivated bacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007(69): 180-187.
[14] TONY G, DAVID R S, DAVID B, et al. Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the deepwater horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP[J]. *International Society for Microbial Ecology*, 2013(7): 2091-2104.
[15] HE Q X, YU L P, LI J B, et al. Electron shuttles enhance anaerobic oxidation of methane coupled to iron(III) reduction[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 688: 664-672.