

以质粒载体构建土壤宏基因组文库的研究*

樊 奔 崔中利 邱珊莲 曹 慧 李顺鹏[†]

(南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

CONSTRUCTION OF SOIL METEGENOMIC LIBRARY WITH PLASMID VECTOR

Fan Ben Cui Zhongli Qiu Shanlian Cao Hui Li Shunpeng

(Key Laboratory of Microbial Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture,

Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

关键词 土壤总 DNA; 宏基因组; DNA 文库

中图分类号 S154 文献标识码 A

从土壤中提取土壤总 DNA, 切割成一定长度的 DNA 片段并连接到载体上, 然后转化宿主菌, 形成一个重组 DNA 文库即宏基因组 (metagenome) 文库。目前对宏基因组的研究在国际上是土壤微生物学研究的前沿领域和热点。文库构建后可以根据宿主细菌获得的功能筛选相应的克隆; 也可以用已知的探针分离目的基因片段, 加上表达调控元件后获取活性产物, 所以通过宏基因组文库可以规避微生物培养的限制而寻找新的功能基因或者直接筛选活性物质^[1,2]; 在早期宏基因组还被用来研究土壤微生物的遗传多样性^[3,4]。因此构建宏基因组文库是研究微生物分子生态学和开发微生物资源的强有力工具。本研究从土壤中直接分离 DNA, 部分酶切后分别回收 2~ 6 kb 和 6~ 9 kb 片段, 然后分别与 pUC19

质粒载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5A 构建了土壤宏基因组文库, 实验中比较了不同 DNA 片段长度和不同的转化方法对文库构建的影响。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

土壤样品取自河南洛阳与山东泰安小麦田 (分别编号为样品 N 和样品 O), 均属潮土。用灭菌的小铲取 5~ 10 cm 深度的土壤样品, 装入灭菌的牛皮纸袋后带回实验室。样品取回后一周内提取总 DNA, 另取一部分风干后分析理化性质^[5] (结果见表 1), 其余部分置 -80℃ 冰箱保存备用。

表 1 土壤样品的部分理化性质

样品 编号	含水量 (g kg ⁻¹)	pH	有机质 (g kg ⁻¹)	总氮 (g kg ⁻¹)	总磷 (g kg ⁻¹)	总钾 (g kg ⁻¹)	碱解氮 (mg kg ⁻¹)	速效磷 (mg kg ⁻¹)	速效钾 (mg kg ⁻¹)
样品 N	18012	71.40	16194	0185	0136	20117	78161	13115	88180
样品 O	17410	71.20	20174	1130	1103	16139	88101	57146	67150

1.2 菌株和质粒

E. coli 5A\$lac U169 (<80lacZ \$M15); 质粒 pUC19, 具有氨苄青霉素抗性。

1.3 试剂与培养基

限制性内切酶、脱磷酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; IPTG、X2 gal、DMSO、DNA 片段纯化

* 国家自然科学基金项目(40471073, 40371069)资助

- 通讯作者, E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介: 樊 奔(1977~), 理学硕士, 主要从事环境微生物学研究

收稿日期: 2004- 10- 15; 收到修改稿日期: 2005- 06- 08

试剂盒为 Promega 公司产品, 质粒纯化试剂盒购自上海华舜生物技术公司。实验中 LB、SOC、SOC 等培养基的配制均参照文献[6]。

114 PCR 扩增 16S rDNA 的通用引物序列

正向引物: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG₃, 反向引物: 5'TACCTGTITACGACTT₃。

115 土壤 DNA 的提取与纯化

土壤总 DNA 的提取, 纯化与定量参考文献[7], 纯化后以其为模板 PCR 扩增 16S rDNA, 确定纯化效果。扩增条件参见文献[7]。

116 土壤总 DNA 酶切与酶切片段的回收纯化

把从样品 N 中所提取的土壤总 DNA 用限制性内切酶 Sau3AL (作用碱基 GATC) 随机切割, 建立 100 L 的反应体系, DNA 含量为 5 Lg 100 L⁻¹, 控制添加的限制性内切酶的含量和酶切时间, 使切割获得的 DNA 片段大小集中在 2~ 9 kb 之间, 酶切后用 75 e 水浴 10 min 终止反应, 酶切产物电泳后用半透膜透析法分别回收 2~ 6 kb 和 6~ 9 kb 的 DNA 片段, 然后用基因组试剂盒进一步纯化。

117 载体制备

提取适量的 pUC19 质粒以限制性内切酶 BamHI 完全酶切后试剂盒回收, 然后用牛小肠碱性磷酸酶 (CIP) 进行脱磷酸化处理。以最大程度地抑制其自我环化。脱磷酸化之后用假单胞菌 DLL21 的 2~ 6 kb DNA 酶切片段进行预酶连来检测脱磷酸化的效果。

118 酶连

建立如下反应体系: 加入 0.1 Lg 经过脱磷处理的 pUC19 载体以及 2 倍摩尔量的酶切 DNA 片段, 加水至 815 L, 于 45 e 热激 5 min, 使重新退火的粘端解链, 将混合物冷却到 0 e, 加入 1 L T4 连接酶缓冲液和 0.5 L T4 连接酶, 16 e 酶连 4 h 以上, 再 4 e 酶连过夜。

119 氯化钙法转化

高效感受态细胞制备: - 70 e 划出保存菌株, 于 LB 平板上 37 e 培养过夜; 用玻璃环挑取 2~ 4 个直径 2 mm 左右的菌落, 接种至 50 ml SOB 培养基中, 18 e 剧烈震荡培养 (200~ 250 r min⁻¹), 到 OD₆₀₀ 为 0.16 左右; 三角瓶放置冰上 10 min, 预冷后, 将菌液转移到同样预冷的离心管中, 4 e, 2500 g 离心 10 min 回收细胞; 每 50 ml 细胞沉淀用 20 ml TB 缓冲液重悬, 放置冰上 10 min; 同上条件离心回收细胞, 每 50 ml 培养液重悬于 4 ml TB 缓冲液中, 加入 DMSO 至

终浓度为 7%, 冰上放置 10 min; 分装菌液于 115 ml eppendorf 管中, 于液氮中放置 48 h 以上, 即为高效感受态细胞。

取 2 L 酶连产物以氯化钙法^[6]将酶连产物转化 200 L 该高效感受态细胞。转化产物涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板, 培养后挑取 100 个氨苄抗性菌落, 用碱裂解法小量提取质粒, 然后 EcoRI 酶切过夜, 电泳检测质粒大小。

1110 电转化

首先制备电转化所需的感受态细胞⁽¹⁾。

取 40 L 感受态细胞加入适量的质粒 (1~ 5 L), 混匀后转入电转化杯, 进行电转化 (BioRad 公司电脉冲基因转移仪), 反应条件^[10]: 2 000 hms, 25 LF, 215 kV, 0.12 cm 电转化杯。电击完毕后, 转化产物立即用 1 ml SOB 培养基洗出转入试管中, 180 r min⁻¹ 30 e 复苏 1 h, 然后涂布于含 X2gal 和 IPTG 的氨苄青霉抗平板, 37 e 培养。

培养 12~ 16 h 至出现菌落, 随机挑取 100 个白斑, 碱裂解法小量提取质粒, EcoRI 酶切, 电泳检测外源片段插入的几率和插入片段大小分布。

2 结果与分析

211 土壤总 DNA 的提取与纯化

用前述方法从 2 种土壤中都提取到了总 DNA (如图 1 所示), 其片段略大于 2311 kb, 2 个土壤样品的 DNA 提取量分别为 14132 Lg g⁻¹ 干土与 10106 Lg g⁻¹ 干土。

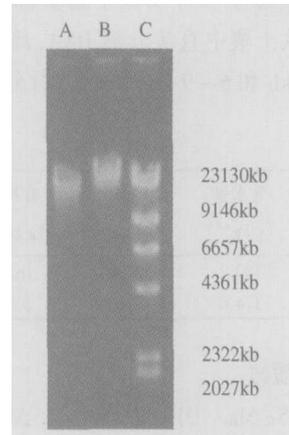


图 1 从两个土壤样品中提取的总 DNA (A: 从土壤样品 N 中提取的 DNA; B: 从土壤样品 O 中提取的 DNA; C: KDNA/ Hind III 分子量标准)

(1) <http://informa.bio.caltech.edu/idx/www/tree.html>

由于粗提的土壤 DNA 通常含有杂质,这些杂质会严重抑制分子生物学操作中工具酶的活性^[8,9,11],因此粗提的 DNA 需要纯化并进行检测其纯度。本研究中对纯化后的土壤 DNA 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增,可以方便稳定地扩增出特定条带(如图 2 所示),说明该方法纯化的土壤 DNA 具有较高的纯度。用标准量的大肠杆菌总 DNA 进行相同步骤的纯化,确定纯化回收的效率约为 70%。

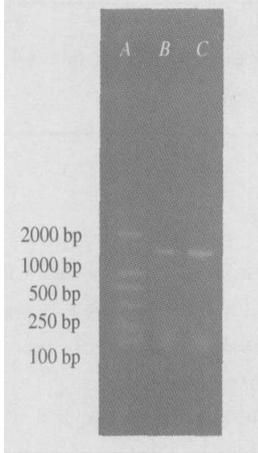


图 2 从 2 个土壤总 DNA 扩增得到的 16S rDNA
(A: DL2000 DNA 分子量标准;
B: 从土壤样品 N DNA 扩增得到的 16S rDNA;
C: 从土壤样品 O DNA 扩增得到的 16S rDNA)

2.1.2 酶切与酶连

所提取的土壤总 DNA 用四碱基识别位点限制性内切酶 *Sau3AI* 随机切割,由于理论上每 256 bp 长度就有一个酶切位点,因此可以近似认为切割是随机和均匀的。酶切时 DNA 浓度不可过高,否则酶切可能会遇到困难。酶切后分别回收 2~6 kb 和 6~9 kb 的 DNA 片段并与 pUC19 质粒载体相连接,获得的酶连产物准备转化。

2.1.3 氯化钙法转化构建宏基因组文库

转化结果表明大小范围不同的外源片段其转化和插入载体的效率是不同的。2~6 kb 片段的酶连产物转化效率约为 10^7 个转化子 Lg^{-1} 重组 DNA,电泳检查确定片段插入载体的效率在 50% 左右;而 6~9 kb 片段的酶连产物转化效率约为 10^6 个转化子 Lg^{-1} 重组 DNA,片段插入载体效率约为 30%。图 3 和图 4 分别为转化后氨苄青霉素抗性菌落质粒快速检测结果的代表性电泳图谱。

2.1.4 电转化构建宏基因组文库

在本实验中对所得的酶连产物进行电转化,结果表明对于 2~6 kb 的片段在适当的电击时间下可

产生约 10^8 转化子 Lg^{-1} 重组 DNA (致死率约为 80%),比氯化钙转化法效率高 10~20 倍;然而对于 6~9 kb 的片段而言,两种方法的转化效率差不多,而且转化后白斑数量较少,仅占总抗性菌落的 30%,这与氯化钙转化法的结果基本一致。

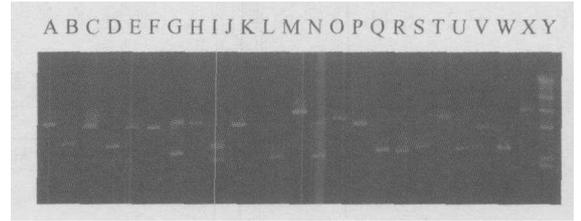


图 3 2~6 kb 片段基因文库质粒快速检测结果的电泳图谱举例
(A~X: 不同大小的质粒;
Y: KDNA/ *Hind* III 分子量标准,参见图 1)

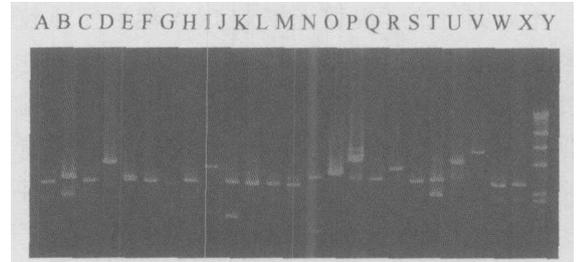


图 4 6~9 kb 片段基因文库质粒快速检测结果的电泳图谱举例
(A~X: 不同大小的质粒;
Y: KDNA/ *Hind* III 分子量标准,参见图 1)

鉴于以上情况,实验中只检测了 2~6 kb DNA 片段电转化插入载体的大小与分布频率,结果如图 5 所示。外源片段的平均插入大小为 217 kb,其中 44% 的插入片段大于 3 kb,约 83% 的插入片段大小在 2~4 kb 之间。根据估算,依上述建库方法,每克土壤样品可得到 5 000~10 000 个转化子,由于微生物中非编码区较少,因此这些阳性克隆中将包含大

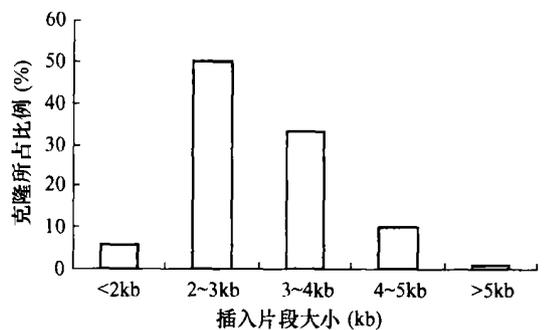


图 5 不同插入片段的阳性克隆的比例

于 20 Mb 的插入片段, 多于 20 000 个的基因。

215 不同因素对宏基因组文库构建的影响

表 2 中比较了不同长度酶切片段, 不同转化方法对文库构建的影响, 总的来看, 不论哪一种转化方法, 2~ 6 kb 片段转化效率均比 6~ 9 kb 片段高, 电转化法对于 2~ 6 kb 片段而言比氯化钙法效率高,

但对于 6~ 9 kb 片段 2 种方法的转化效率差不多。从图 3、图 4 和图 5 可知, 转化子中有不少空斑, 而且插入到载体中的多为长度偏小的片段。这一方面可能跟载体性质有关, 即小片段更易插入到载体中, 另一方面可能跟转化过程也有关, 即较小的重组质粒更易转化到宿主菌中。

表 2 不同因素对文库构建的影响

	氯化钙转化法		电转化法	
	2~ 6 kb 片段	6~ 9 kb 片段	2~ 6 kb 片段	6~ 9 kb 片段
转化效率	10 ⁷ 个转化子 Lg ⁻¹ 酶连产物	10 ⁶ 个转化子 Lg ⁻¹ 酶连产物	10 ⁸ 个转化子 Lg ⁻¹ 酶连产物	10 ⁶ 个转化子 Lg ⁻¹ 酶连产物
外源片段插入效率	50%	30%	70%	30%

3 讨论

本研究讨论了提取土壤总 DNA 然后用质粒载体构建土壤宏基因组文库的实验过程以及影响建库效率和文库质量的各种因素。总的来说, 与纯菌的 DNA 相比, 对土壤 DNA 进行分子生物学操作是有很多困难的, 这一方面可能与土壤 DNA 自身的特性有关, 比如从土壤中提取的 DNA 可能含有更多的甲基化位点, 从而影响了限制性内切酶的作用; 另一方面, 目前更多报道认为, 土壤 DNA 提取过程中携入的杂质(例如腐殖酸)的干扰可能是造成这一问题的主要原因^[8,9,12]。

例如在本实验中, 用 Sau3AI 酶切土壤总 DNA 时, 先建立 10 U 的检测体系摸索了酶切反应的合适浓度和时间, 但是在大量制备时, 可能由于 DNA 浓度较高, 杂质浓度也较高的原因, 在 48 h 内 DNA 几乎完全没有被切开(后采取稀释反应体系保持单位体积酶浓度的措施加以解决)。

这种影响在酶连, 转化过程中也显现出来。例如在实验中用氯化钙转化法, 2~ 6 kb 片段的酶连产物转化效率约为 10⁷个转化子 Lg⁻¹重组 DNA, 外源片段插入载体的效率在 50% 左右; 而同样条件下用假单胞菌 DLU21 总 DNA 的 2~ 6 kb 酶切片段进行酶连和转化作为对照, 结果酶连产物转化效率约为 10⁹个转化子 Lg⁻¹重组 DNA, 外源片段的插入效率达 85% 以上。

所以, 对于构建土壤宏基因组文库而言, 如何高效率地从土壤中提取 DNA 并进行纯化是一个影响全局的关键性问题。除此之外, 选择更高效的载体, 更合适的宿主菌, 以及开发更高效的转化方式, 也都会对宏基因组文库的构建工作有很大的帮助。

参考文献

- [1] Rondon M R, August P R, Bettenmann A D, et al. Cloning the metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(6): 541~ 547
- [2] Henne A, Daniel R, Schmitz R A, et al. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 2-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(9): 3 901~ 3 907
- [3] Torsvik V, Sorheim R, Goksoyr J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities: A review. *J. Ind. Microbiol.*, 1998, 17: 170~ 178
- [4] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry and Biology*, 1998, 5(10): R245~ R249
- [5] 佩奇, 米勒, 等著. 土壤分析法. 北京: 中国农业出版社, 1991
- [6] 萨母布鲁克 J, 拉塞尔 D W, 等著. 见: 黄培堂译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002
- [7] 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, 42(2): 276~ 281
- [8] Tsai Y, Betty H O. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substance in sediments for Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58: 2 292~ 2 295
- [9] Richard A H, Qiu X Y, Wu L Y, et al. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 4 495~ 4 503
- [10] Dower W J, Miller J F, Ragsdale C W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16: 6 127~ 6 145
- [11] Robert I G, Andrew S W, Anthon G O. Rapid method for co-extraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and RNA based microbial composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66: 5 488~ 5 491
- [12] Lovell C R, Piceno Y. Purification of DNA from estuarine sediments. *J. Microbiol. Methods*, 1994(20): 161~ 170