

基于 DGGE 分析的大鼠粪便及肠道细菌 DNA 提取方法研究

郑 刚¹, 陈己任², 胡博文², 陈彦斌², 赵国华^{1,3,*}

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128;

3.重庆市农产品加工技术重点实验室, 重庆 400715)

摘 要: 为获得高质量肠道细菌总 DNA 用于研究膳食纤维对大鼠肠道菌群的影响, 本实验以 SD 大鼠为实验动物, 灌胃番茄皮膳食纤维, 收集大鼠粪便及盲肠, -70℃冰箱保存。分别采用 Tiangen 细菌基因组试剂盒法、蛋白酶 K-十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)法和溶菌酶法提取粪便和肠道中的细菌总 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳、细菌通用引物 PCR 扩增和变性梯度凝胶电泳(DGGE)对提取效果进行观察比较, 发现将溶菌酶法进行改进后, 可以获得满意效果。改进后的溶菌酶法与另外两种方法比较, 具有成本低、时间短、DNA 得率高和多样性好等特点; 该方法获得的 DNA 样品适合于用 DGGE 技术分析大鼠粪便及肠道菌群。

关键词: DNA 提取; 大鼠; 粪便; 肠道菌群; DGGE 电泳

Genomic DNA Extraction from Rat Faecal and Intestinal Microflora Based on DGGE Analysis

ZHENG Gang¹, CHEN Ji-ren², HU Bo-wen², CHEN Yan-bin², ZHAO Guo-hua^{1,3,*}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. College of Horticulture and Gardening, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3. Chongqing Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Chongqing 400715, China)

Abstract: In this study, SD rats were fed dietary fiber from tomato skin for understanding the effect of dietary fiber on intestinal flora. The feces and cecum of rats were collected and stored at -70 °C. Bacterial genomic DNA was extracted from feces and cecum using TIANamp bacterial DNA kit, proteinase K-CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) and muramidase protocol, respectively. The extracted DNA was assayed by agarose gel electrophoresis, bacterial universal primer PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Results showed that more and better DNA was extracted by using modified muramidase method with lower cost and shorter extraction time when compared with other methods. Therefore, the modified muramidase protocol is the best for DNA extraction from feces and cecum of rats.

Key words: DNA extraction; rat; faecal; intestinal microflora; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

中图分类号: Q523

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0215-04

近年来, 肠道微生物菌群对动物机体的健康和疾病的影响越来越受到人们的关注^[1], 由于肠道中绝大多数微生物是严格厌氧或兼性厌氧菌, 体外培养困难, 加上大量微生物不可培养, 传统培养技术很难对肠道微生物进行全面深入的研究^[2]。随着现代生物技术的快速发展, 各种分子生物学技术如聚合酶链式反应-变性梯度-

温度凝胶电泳(PCR-DGGE-TGGE)、16S rRNA基因的克隆文库构建及序列分析、实时定量 PCR、点杂交、限制性片段长度多态性(RFLP)等被用于肠道微生态学研究^[3-4]。应用这些技术的前提是要获得高浓度、大片段、多样性程度高、具有代表性的微生物 DNA^[5]。由于动物粪便中含有大量肠道菌群信息, 且便于非损伤型取样, 是

收稿日期: 2010-12-12

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA100805); 新疆生产建设兵团博士基金项目(2009JC12);

国家自然科学基金项目(31071826)

作者简介: 郑刚(1970—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为农产品加工与贮藏工程。E-mail: shothawk@sohu.com

* 通信作者: 赵国华(1971—), 男, 教授, 博士, 研究方向为非消化性碳水化合物化学与营养。

E-mail: zhaoguohua1971@163.com

较好的分子生物学研究材料,许多研究人员开展了从不同粪便样品中提取DNA的研究^[6-13]。但由于粪便成分复杂,且伴有各种Taq酶抑制剂和胆红素、胆盐等DNA降解物,从不同动物粪便样品中提取DNA、保存DNA以及进行PCR扩增还存在诸多问题^[13-14]。

本实验对前人采用过的粪便和肠道细菌DNA提取方法进行研究,对DNA提取效果进行比较,经过改进,摸索适合于提取大鼠粪便及肠道微生物菌群DNA的快速、经济、有效的方法,旨在为后续基于16S rRNA技术的肠道菌群DGGE分析提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

SPF级SD大鼠,雌雄各半,体质量(190±20)g,由重庆第三军医大学动物中心提供。

Tiagen 细菌基因组DNA提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR扩增全套试剂 北京天根生化科技有限公司;Goldview I型核酸染色剂 北京Solarbio公司;琼脂糖(分析纯) 西班牙Biowest公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、去离子甲酰胺(超级纯)美国Amresco公司;引物由上海Invitrogen公司合成。

1.2 仪器与设备

Veriti 96-well Thermal Cycler PCR扩增仪 美国Applied Biosystems公司;Kodak Gel Logic 212 凝胶成像系统 美国Carestream Health公司;Z323K 高速冷冻离心机 德国Hermle公司;DYY-12 电泳仪、立式电泳仪 北京六一仪器厂;UV-2450 紫外分光光度计 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 样品预处理

将大鼠随机分为8组,每组10只。灌胃经过超微改性处理的番茄皮膳食纤维(平均粒度大于360目),连续3周,每3d收集各组大鼠粪便一次,−70℃冻存。3周后处死大鼠,截取大鼠盲肠约2cm,挤出粪便,将盲肠用锡纸包裹,−70℃冻存。

称取100mg盲肠及粪便样品各3份分别置于2mL离心管,加入1mL磷酸盐缓冲液(0.12mol/L, pH8.8),剧烈振荡2~3min,5000r/min离心5min,弃上清液,重复洗涤样品至上清液基本清澈;用1mL磷酸盐缓冲液悬浮沉淀物表面的菌体,小心转移菌液至另一2mL离心管中;5000r/min再次离心5min,弃上清液,沉淀主要是分离出的细菌菌体,做标记后−20℃保存备用。

1.3.2 3种DNA提取方法

蛋白酶K-十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法:参考张瑞福等^[15]方法。

试剂盒法:采用Tiagen 细菌基因组DNA提取试剂盒(TIA Namp Bacteria DNA Kit,离心柱型),取经预处理的盲肠及粪便样品各一份,按照试剂盒的使用说明

提取细菌DNA,用100μL TE缓冲液洗脱。

改进溶菌酶法:参考LaMontagne等^[16]方法,稍作修改。取经预处理的盲肠及粪便样品各一份,加入0.8mL溶菌酶溶液(0.15mol/L NaCl、0.2mol/L EDTA-2Na、10mg/mL溶菌酶, pH8.0),5μL蛋白酶K。混合物在37℃条件下200r/min振荡1h,然后加入经65℃预热过的0.3mL裂解缓冲液(10%十二烷基磺酸钠(SDS)、0.1mol/L NaCl、0.5mol/L Tris-HCl, pH8.0),0.3mL磷酸盐缓冲液,0.6mL氯仿-异戊醇(体积比24:1),65℃水浴10min,每隔2~3min置漩涡振荡仪上振荡30s。5000r/min离心3min后小心吸取上清液转入另一2mL离心管,并加入0.6倍体积异丙醇冰浴沉淀30min,然后15000r/min离心10min,弃去液相。沉淀以1mL 75%冷乙醇轻微振荡洗涤,4℃条件下13000r/min离心2min。待乙醇彻底挥发后,加入200μL TE缓冲液溶解DNA,用Tiagen公司CB2柱进行纯化后即得到所需DNA样品。

1.3.3 DNA提取效果及质量检测

各取5μL由以上3种方法提取到的细菌DNA,用1.5%琼脂糖凝胶进行电泳,Goldview染色,凝胶成像仪观察分析。紫外分光光度计分别在波长260nm和280nm处检测样品总DNA质量浓度和纯度,计算DNA得率^[3]。

1.3.4 细菌16S rDNA通用引物PCR扩增

参考肖勇^[17]方法,PCR反应体系稍作修改。选择细菌16S rDNA的通用引物对GC341F(5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3',下划线部分为GC clamp)和907R(5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3')对3种方法提取的细菌DNA进行PCR扩增。

PCR反应体系(20μL):10×PCR Buffer(含Mg²⁺)2μL、0.2mmol/L dNTPs、0.5μmol/L双引物、0.5μL模板DNA和0.025U/μL Taq酶。

扩增程序为:预变性94℃ 5min;94℃变性50s,54℃退火40s,72℃延伸90s,35个循环;72℃延伸7min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳,Goldview染色后用凝胶成像仪观察分析。

1.3.5 DGGE电泳分析

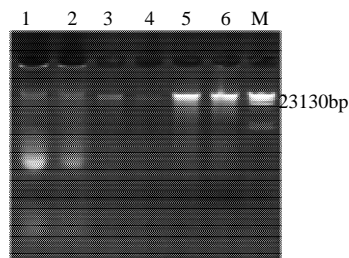
将改进溶菌酶法和试剂盒法提取的DNA进行PCR扩增,再用CB2柱纯化PCR产物,用变性梯度为35%~70%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳缓冲液为1×TAE,电泳温度55℃,电压120V,时间10h;银染后拍照^[17]。

2 结果与分析

2.1 3种DNA提取方法琼脂糖凝胶电泳结果

用3种方法分别对相同的粪便和肠道样品进行DNA提取,用琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图1。3种方法均能提取出DNA。1、2泳道主条带亮度相对较弱且有一定程度弥散,说明DNA提取得率不高且存在一定程

度降解；而泳道中段的亮物质表明 RNA 去除不彻底；泳道点样孔发亮，说明蛋白酶 K-CTAB 法提取的 DNA 样品可能有少量蛋白质污染。3、4 泳道条带清晰但亮度相对较弱，表明试剂盒法提取的样品 DNA 纯度较高但得率不高；5、6 泳道主条带清晰且亮度较高，说明改进后的溶菌酶法 DNA 提取效果最好。



1、2.蛋白酶 K-CTAB 法；3、4.试剂盒法；5、6.改进溶菌酶法；1、3、5.粪便样品，2、4、6.肠道样品，M. λ /Hind III DNA Marker。

图1 3种不同方法提取细菌总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of bacterial total DNA extracted by three methods

2.2 3种方法获得的总 DNA 质量比较

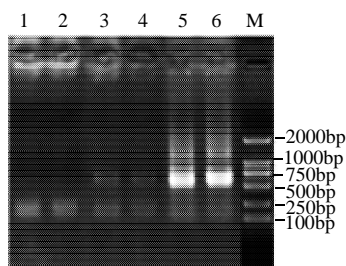
OD_{260nm}/OD_{280nm} 反映 DNA 的纯度，正常 OD_{260nm}/OD_{280nm} 值约为 1.7~2.0，若 OD_{260nm}/OD_{280nm} 值小于 1.7 或大于 2.0，说明可能有蛋白污染或 RNA 污染^[5]。由表 1 可知，3 种提取方法得到的 DNA 纯度均能达到要求。但蛋白酶 K-CTAB 法的 DNA 质量浓度较低，OD 值却较高，可能是由于蛋白质少量残留和 RNA 抽提不完全造成的。就 DNA 质量浓度和得率而言，改进溶菌酶法在 3 种方法中最优，该结果与图1结果基本一致。

表1 3种提取方法的 DNA 质量比较

Table 1 Quality comparison of DNA extracted by three methods

方法	OD_{260nm}/OD_{280nm}	质量浓度/(μ g/mL)	DNA 得率/(μ g/g)
蛋白酶 K-CTAB 法	1.917 ± 0.037	177	354
试剂盒法	1.811 ± 0.027	166	332
改进溶菌酶法	1.846 ± 0.018	474	948

2.3 提取 DNA 的 16S rDNA 通用引物 PCR 扩增检测



M. λ /HindIII DNA Marker；1、2.蛋白酶 K-CTAB 法；3、4.试剂盒法；5、6.改进溶菌酶法；1、3、5.

粪便样品；2、4、6. 肠道样品；每孔上样 6 μ L。

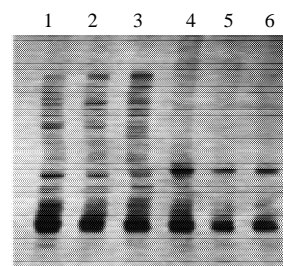
图2 3种不同提取方法的细菌 16S rDNA 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of amplified bacterial 16S rDNA extracted by three methods

由于粪便中存在较多的 PCR 抑制物，为了检验本实验中 3 种方法提取的细菌总 DNA 质量，利用细菌 16S rDNA 的通用引物扩增其部分片段加以验证。由图 2 可以看出，蛋白酶 K-CTAB 法提取的 DNA 样品 PCR 扩增目的条带几乎不可见；试剂盒法提取的 DNA 样品 PCR 扩增目的条带较弱；而经改进溶菌酶法提取获得的样品 DNA 通过 PCR 扩增，获得了高亮度、清晰的目的条带。

2.4 菌群多样性 DGGE 分析结果

实验目标是从粪便及肠道样品中获得的 DNA 能够尽量比较全面的反映出菌群的多样性，但 DNA 提取过程的失误，很可能会造成那些数量较少细菌种类的 DNA 难以检测到。由于 DGGE 图谱能够比较直观地反应所获得的细菌总 DNA 的多样性，因此采用 DGGE 图谱可以从细菌多样性的角度评价 DNA 提取方法的优劣。由于蛋白酶 K-CTAB 法没有扩增出目的条带，所以不进行 DGGE 讨论比较，从图 3 可以看出，左边 3 条泳道所显现出的条带明显多于右边 3 条，说明本实验中，改进溶菌酶法提取的 DNA 样品的菌群丰度优于试剂盒法。



1~3.改进溶菌酶法；4~6.试剂盒法；1、3、4、6.粪便样品，2、5.肠道样品。

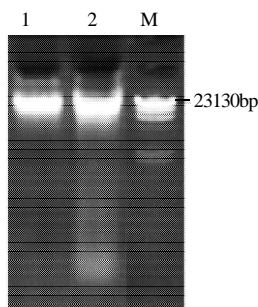
图3 改进溶菌酶法及试剂盒法的 DGGE 图谱

Fig.3 Denaturing gradient gel electrophoresis of DNA extracted modified muramidase method and TIANamp bacterial DNA kit

3 讨论与结论

由于粪便成分复杂，存在着如多糖、脲、腐殖酸和血红素等多种 PCR 抑制因子，从不同动物粪便样品中提取 DNA 还存在 *Taq* 酶抑制剂去除不干净影响后续实验，或腐殖酸、胆红素等引起 DNA 降解等诸多问题^[4]。在前期实验中，采用包括蛋白酶 K-CTAB 法^[15]、溶菌酶法^[16]在内的 6 种方法进行粪便菌落 DNA 提取，效果均不理想。原溶菌酶方法中处理的样品是堆肥，而本方法中处理的样品是粪便，显然会导致处理效果的差异。本实验根据所用试剂在提取过程中的作用对溶菌酶法作了如下改进：1)样品预处理的 pH 值由原来的 8.0 调至 8.8。因为堆肥是由植物残渣和动物粪便等多种物质混合发酵而成，发酵会产生一系列碱性物质，如氨气，pH 值处于 8.0~10.0，DNA 在碱性条件下容易析出；而粪便 pH 值一般在 7.0~7.5，DNA 在 pH 值在 7.8 以下会溶解，不容易被析出抽提，pH 值低于 8.0 会抑制溶菌酶的活性，也会导致 DNA 抽提效果变差。经过实验，

笔者发现磷酸盐缓冲液的 pH 值在 8.8 时效果较好。因此,笔者调高了磷酸盐缓冲液的 pH 值。2)在溶菌酶溶液中加入蛋白酶 K。DNA 提取的量与菌体细胞的裂解效率密切相关,溶菌酶和 SDS 能够破坏细菌的细胞壁和细胞膜,蛋白酶 K 能够降解与 DNA 结合的蛋白。在改进的溶菌酶法中,通过添加蛋白酶 K 这一步骤来水解蛋白质,并用物理振荡和水浴结合方法加速细胞裂解,然后用 SDS 和氯仿-异戊醇去除蛋白质和脂类杂质,以达到有机溶剂高效抽提去除蛋白质、提高抽提 DNA 的浓度和纯度的目的。3)裂解缓冲液使用前先在 65℃ 预热。因为实验发现裂解缓冲液在配制后会产生少量沉淀,加热后缓冲液的沉淀即溶解并充分混匀了。另外,10min 65℃ 水浴这一步骤,不仅能在 SDS 和氯仿的作用下加速蛋白质变性,还能同步完成灭活 DNA 酶、减弱 DNA 的降解。4)沉淀风干后加入 TE 缓冲液,37℃、100r/min 振荡溶解 10min 后,短时离心取上清液留用。原方法在风干后加入双蒸水(ddH₂O)用于后续实验,发现加入双蒸水后还有沉淀不能溶解或溶解缓慢,这些沉淀会干扰后续实验,通过溶解、离心、取上清液,可以有效去除杂质,获得高纯度的 DNA。另外,溶解 DNA 用 TE 缓冲液(pH8.0)而不是双蒸水是因为在碱性条件下 DNA 脱氨作用受到抑制,TE 缓冲液所含的 Tris 能与盐酸形成强的缓冲对,EDTA 能螯合二价金属阳离子,抑制 DNase 的活性,可以减少 DNA 降解。双蒸水的正常 pH 值为 7.0,可作为 DNA 的储存液,但长时间保存,双蒸水的 pH 值会下降,导致 DNA 发生降解。因此 TE 缓冲液作为 DNA 的长期储存液更为合适。在实验过程中,提取的 DNA 在 -20℃ 保存 3 个月后,在 1% 的琼脂糖电泳凝胶中条带清晰,基本无逸散(图 4)。



1.改良溶菌酶法提取的 DNA 琼脂糖电泳; 2.-20℃ 保存 3 个月后 DNA 琼脂糖电泳; M. λ /HindIII DNA Marker; 每孔上样 6 μ L。

图 4 改良溶菌酶法提取大鼠粪便 DNA 保存 3 个月前后对比效果

Fig.4 Comparison of DNA extracted from rat feces with and without storage at -20 °C for three months by modified muramidase method

蛋白酶 K-CTAB 法利用 CTAB 裂解液进行的提取可以有效去除粪便中的色素和多糖成分,但 CTAB 的少量残留会对酶活性有很大影响,且操作要求较高,难以标准化,使得该方法不适合大量提取 DNA 使用。此外,蛋白酶 K-CTAB 法虽然能提取一定量的 DNA(图 1),但用于 PCR 却只能见到微弱条带(图 2),可能原因是提取的 DNA 纯度不够,提取出的 DNA 可能是粪便中植物

残渣的 DNA,也可能是 CTAB 的少量残留抑制了 PCR 过程中 Taq 酶的活性。试剂盒法获得的 DNA 纯度较高,但对样品的预处理纯度要求也很高,在提取过程中往往会出现预处理杂质去除不完全和蛋白质水解不彻底导致柱子阻塞,从而影响样品 DNA 的吸附和洗脱。另外,试剂盒法的成本也高于常规方法。

实验还发现,要获得质量较好的 DNA,粪便与肠道样品的保存非常重要。本实验中样品收集后采取 -70℃ 条件下冷冻保存,数月后仍然能够提取出高质量的 DNA,说明低温冻藏是较好的样品保藏方法,但须注意避免反复冻融,造成对样品 DNA 的伤害。

改进后的溶菌酶法对操作要求低,相对耗时短,提取全过程可控制在 2h 左右。在 DNA 提取得率上优于蛋白酶 K-CTAB 法和试剂盒法,在试剂成本上低于试剂盒法。琼脂糖凝胶电泳、细菌通用引物 PCR 扩增和 DGGE 分析结果显示,该方法用于提取大鼠粪便及肠道微生物基因组 DNA,快速、经济、有效,适用于处理大批量样品和后续基于 16S rRNA 技术的肠道菌群 DGGE 分析。

参考文献:

- [1] NICHOLSON J K, HOLMES E, WILSON I D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(5): 431-438.
- [2] 卢龙娣,江胜滔,林跃鑫.鸡肠道菌群总 DNA 三种提取方法的比较[J]. *中国微生物学杂志*, 2009, 21(7): 588-590.
- [3] 申剑,张宝让,魏华,等.三种粪便总 DNA 提取方法的比较[J]. *中国微生物学杂志*, 2008, 20(1): 28-30.
- [4] 李丽婷,许文涛,郭星,等.提取鼠肠道内微生物基因组 DNA 的方法研究[J]. *中国粮油学报*, 2010, 25(1): 122-127.
- [5] 吴银宝,史金才,莫测辉,等.猪粪和土壤样品中微生物 DNA 提取方法的比较[J]. *农业工程学报*, 2006, 22(增刊 2): 10-13.
- [6] 程宏毅,鲍毅新,郑荣泉,等.黑鹿粪便 DNA 提取及其 PCR 检测[J]. *生态科学*, 2006, 25(4): 158-161.
- [7] 洪艳云,李迪强,易图永,等.普氏原羚粪便 DNA 提取方法的改进与比较[J]. *中国草食动物*, 2009, 29(1): 3-5.
- [8] 陶新,徐子伟,邓波,等.少量动物粪便细菌总 DNA 提取方法的研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2009, 45(23): 68-70.
- [9] 刘宇庆,吕慎金,殷宝法,等.狗粪粪便 DNA 提取方法的初步探讨[J]. *生态科学*, 2008, 27(6): 468-473.
- [10] 张保卫,魏辅文,李明,等.大熊猫和小熊猫粪便细菌 DNA 提取的简易方法[J]. *动物学报*, 2004, 50(3): 452-458.
- [11] 张雪雁,李琳琳.一种提取肠道细菌总基因组 DNA 的方法[J]. *新疆医科大学学报*, 2007, 30(7): 722-724.
- [12] 杨德君,吴襟,刘毅,等.一种快速提取肠道微生物总 DNA 的方法[J]. *中国微生物学杂志*, 2006, 18(2): 91-93.
- [13] 陈蓓,黄瑞.粪便标本中细菌 DNA 提取方法的比较[J]. *中国血液流变学杂志*, 2007, 17(2): 210-212.
- [14] DEUTER R, PIETSCH S, HERTEL S, et al. A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(18): 3800-3801.
- [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): 276-282.
- [16] LaMONTAGNE M G, MICHEL F C, Jr, HOLDEN P A, et al. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis[J]. *Journal of Microbiology Methods*, 2002, 49(3): 255-264.
- [17] 肖勇. 16S rRNA/rDNA 序列分析技术应用于环境微生物群落的初步研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2007.