

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.007

煮沸裂解法和试剂盒法提取浸矿菌基因组 DNA 的比较 *

夏乐先¹ 孙文娟¹ 沈 振¹ 梁昱婷¹ 柳建设¹ 陈建华² 邱冠周¹

(1 中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083; 2 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院 湖南 长沙 410083)

摘要 目的:在生物浸出中,微生物群落结构分析有着重要意义,而群落分析的基础是提取纯度高、损失少的基因组 DNA。为了解决这一问题,本实验通过比较两种较常用的 DNA 提取方法,煮沸裂解法和试剂盒法,寻找一种灵敏、快速、经济实用的制备浸矿细菌基因组 DNA 的方法。**方法:**分别用煮沸裂解法和试剂盒法提取 6 种浸矿菌的基因组 DNA,从所提取的基因组 DNA 浓度、纯度、回收率和对 PCR 扩增反应的影响方面比较了两种方法的提取效果;用两种方法来处理不同浓度梯度的一种菌,通过实时定量 PCR 来比较两种方法的灵敏性。**结果:**相同处理量(108 个)的革兰氏阳性菌(1 株)、革兰氏阴性菌(4 株)、古菌(1 株)经两种方法提取的基因组 DNA 差异较大,煮沸裂解法所得的 6 组基因组 DNA 更纯,其 OD260/OD280 的值更接近 1.8-2.0(纯 DNA 的 OD260/OD280 在 1.8-2.0 之间),前者所提 DNA 回收率最大可达后者的 16.7 倍;煮沸裂解法只需较少菌(102 个)便能让实时定量 PCR 检测到所提 DNA 模板浓度,比试剂盒法灵敏。**结论:**两种方法提取的基因组 DNA 均可用于后续的 PCR 扩增,此外,前者提取的 DNA 浓度随细菌浓度增加而呈线性增大,而后者随菌浓度增大,所提 DNA 量增加有限,因此,在生物浸出中微生物基因组 DNA 的提取可直接采用简单快速的煮沸提取法,为实验节约成本和时间。

关键词:煮沸裂解法;试剂盒法;浸矿细菌;聚合酶链反应;实时荧光定量 PCR

中图分类号:Q93-3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)01-31-05

Comparison of Genomic DNA Extraction from Bioleaching Acidophiles by Two Methods: Boiling and Kit Methods*

XIA Le-xian¹, SUN Wen-juan¹, SHEN Zhen¹, LIANG Yu-ting¹, LIU Jian-she¹, CHEN Jian-hua², QIU Guan-zhou¹

(1 School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan, 410083, China;

2 The Affiliated Tumor Hospital of Xiangya Medical School of Central South University, Changsha, Hunan, 410083, China)

ABSTRACT Objective: In bioleaching process, the microbial community structure analysis, based on high purity, less loss of genomic DNA extraction, plays an important role. To solve this problem and find out a more sensitive, rapid, economical and practical way to extract genomic DNA from bioleaching acidophiles, two commonly used DNA extraction methods, boiling and Kit, were compared in the study. **Methods:** Boiling and Kit methods were used to extract genomic DNA from six different leaching bacteria. The extracting effects of the two methods were compared in terms of the concentration, purity and recovery of the extracted genomic DNA and the influence of extracted genomic DNA on PCR (Polymerase Chain Reaction). The sensitivity of the two methods were compared through Real-time PCR where the same mesophilic acidophile was treated with different decimal amounts of cells. **Results:** The results showed that the genomic DNA extracted from the equal amount of bacteria (108 cells) of gram positive bacteria (1 strain), gram negative bacteria (4 strains), archaea (1 strain) by the two methods are very different. The six kinds of genomic DNA extracted with the boiling method are much purer than those extracted with Kit method, and the values of OD260/OD280 of the former are closer to the value of 1.8 to 2.0 (the OD260/OD280 value of pure DNA falls between 1.8 to 2.0). Recovery of genomic DNA with the former method can be up to 16.7 times that of the latter. While compared to the kit method, the concentration of extracted DNA template could be detected through Real-time PCR with lower concentration of cells (102 cells) could be detected through Real-time PCR when DNA was extracted by boiling method. Thus, boiling method is higher sensitivity than kit method. **Conclusion:** The DNA extracted by the two methods could be used for subsequent PCR analysis. Additionally, the DNA concentrations with boiling method increase linearly with the increase of cell concentration, while, the increase of DNA concentration with kit method is limited when cell concentrations increase and arrive a high level. Therefore, the microbial genomic DNA extraction can directly use the boiling method to save cost and time in the bioleaching process.

Key words: Boiling methods; Kit method; Leaching bacteria; PCR; Real-time PCR

Chinese Library Classification (CLC): Q93-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)01-31-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(20803094);中国博士后特别资助(2012T50710);湖南省科技计划项目(2011RS4068)

作者简介:夏乐先(1973-),男,博士,副教授,从事生物冶金、选矿、微生物分子生态学等研究,

电话:0731-88836943, E-mail: xiale888@163.com

(收稿日期:2013-07-09 接受日期:2013-07-29)

前言

微生物冶金中涉及到的大多数浸矿微生物都是一些极端环境下生长的化能自养菌,包括细菌和古生菌^[1-3],相对于其他环境下的微生物具有生长速度慢,菌体浓度普遍较低的特点。在研究这些低丰度的微生物分子生物学特征时,需收集大量样品以满足 DNA 提取的需要,且在提取的过程中易受到浸出体系中的 pH、离子浓度、矿渣等干扰,使 DNA 提取也变得困难。尽管 DNA 提取方法有很多,但是没有哪一种方法是被定为科学界的标准,每种方法都有它的优缺点^[4]。目前,环境样品的 DNA 提取可分为直接提取法、间接提取法及他们的改进,直接提取法可得到高回收率的 DNA,但其纯度较低,会影响到后续的 PCR 扩增和使群落分析失真;间接提取法可得到较高纯度的 DNA 和保真 DNA 的多样性,但这种方法只适用于细菌^[5]。实验室常采用的细菌 DNA 提取方法有碱裂解法、SDS 裂解法、Chelex-100 法、CTAB 法、液氮研磨法等,但这些常规提取细菌 DNA 的方法往往只能针对革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌中的一类,缺乏通用性^[6],或者操作复杂、耗时长,易造成样品间的交叉污染且微生物基因组 DNA 的回收率和质量不太稳定。选取方法不当导致提取效率低,使一些特低丰度的微生物往往不能被检测到,从而导致所分析的群落结构与实际情况存在很大的偏差。因而,选取能从样品中尽量毫无偏差地提取出高质量的、具有代表性的微生物群落总基因组 DNA 的方法显

得尤为重要^[7]。在此,本文作者就煮沸裂解法与常用的试剂盒法对浸矿微生物的 DNA 提取进行研究,比较分析了两种方法提取冶金微生物基因组 DNA 的浓度、纯度、回收率及灵敏度,便于寻找一种更为快速、灵敏和经济实用的方法。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

本实验选取包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和古菌的 6 种不同常用浸矿菌作为代表:嗜酸氧化亚铁硫杆菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270(G⁻),嗜酸氧化硫硫杆菌 *Acithiobacillus thiooxidans* A01(G⁻),嗜铁钩端螺旋菌 *Leptospirillum ferriphilum* YSK(G⁻),喜温硫杆菌 *Acidithiobacillus caldus* S1(G⁻),嗜热硫氧化硫化杆菌 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* St(G⁺),嗜热嗜酸铁质菌 *Ferroplasma thermophilum* L1(古菌),均来自中南大学生物冶金重点实验室菌种保藏室。

1.2 菌体的培养与收集

9K 培养基: (NH₄)₂SO₄ 3 g/L, KCl 0.1 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, Ca(NO₃)₂ 0.01 g/L, 不同菌株培养时另外添加 FeSO₄·7H₂O、元素硫(S⁰)或酵母液(YE)到 9K 中。各菌的培养条件见表 1。

待各菌长到对数期时,收集菌液,于 12000 r/min 离心 3 min,收集菌体,用 pH 2.0 的无菌水洗涤两次,再用 pH 7.0 左右的无菌水洗涤两次,然后用无菌水悬浮各菌液,以血球计数板计数,

表 1 各种菌的培养条件

Table 1 Cultured conditions of all kinds of bacteria

Strains	Culture	pH	T(°C)
ATCC23270	9K+ FeSO ₄ ·7H ₂ O(44.71 g/L)	2.0	30
A01	9K+S ⁰ (10 g/L)	2.0	30
YSK	9K+ FeSO ₄ ·7H ₂ O(44.71 g/L)	1.6	40
Strains	Culture	pH	T(°C)
S1	9K+S ⁰ (10 g/L)	2.0	40
St	9K+FeSO ₄ ·7H ₂ O(20 g/L)+YE(0.2 g/L)	1.5	40
L1	9K+FeSO ₄ ·7H ₂ O(20 g/L)+YE(0.1 g/L)	1.0	40

最后每种菌液各取两份,每一份含菌量为 10⁸ 个。

1.3 方法

1.3.1 细菌 DNA 提取 (一)试剂盒提 DNA:所用试剂盒为上海申能博彩 3S Spin Genomic DNA Minipreps Kit。提取步骤:

1) 取含 10⁸ 个菌的菌悬液到 1.5 mL 的离心管中,12000 r/min,离心 3 min,然后吸净上清,加入 150 μL TE 将细胞悬浮起来,加入 10 μL 溶菌酶,混匀室温放置 10 min;2) 加入 500 μL Digestion Buffer 混匀后,加入 3 μL Protease K,混匀,55 °C 保温 20 min;3) 高速室温 12000 r/min 离心 5 min,将上清转移到 1.5 mL 无菌离心管中,加入 300 μL Solution B,混匀;4) 将样品全部转移到 3S 柱,柱子放入 2.0 mL Collection Tube,转移时用 1 mL Tip 头取样品;用台式离心机,12,000 r/min,室温离心 1 min;5) 取下 3S 柱,弃去离心管中的废液;将柱子放回同一根离心管中,加入 500 μL Wash Solution, 12,000 r/min,室温

离心 1 min;重复该步骤一次;6) 取下 3S 柱,弃去离心管中的全部废液。将柱子放回同一根离心管中,10000 r/min,室温离心 2 min,以除去残留的 Wash Solution;7) 在柱子中央加入 60 μL TE,将柱子放入新的干净 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管中,室温或 37-55 °C 放置 2 min;12000 r/min,室温离心 1 min;收集管中的液体即为基因组 DNA,将 DNA 转移到 200 μL EP 管中,-20 °C 保藏备用。

(二)煮沸法提 DNA:分别取上述 6 株菌液各两份,每份含 10⁸ 个菌体,加到 1.5 mL 的离心管中,12000 r/min,离心 3 min,然后吸净上清,加入 60 μL TE 将细胞悬浮起来,100 °C 水浴 2 min,13000 × g 高速离心 1 min,上清作为 DNA 模板,-20 °C 保存备用。

1.3.2 DNA 纯度、浓度和回收率的检测 取上述提取的 DNA 样品,以 TE 为空白对照,在 NanoDrop 微量分光光度计上测定

DNA 浓度, OD260/OD280, 每个样品测三次求平均值。计算回收率, 见公式(1-1):

$$\text{回收率} (\text{ng}/10^8 \text{ 个}) = \text{浓度} (\text{ng}/\mu\text{L}) \times 60 \mu\text{L} \quad (1-1)$$

1.3.3 PCR 扩增 这六对引物分别是针对六株菌的 *gyrB*、*arsB* 或 16 S rRNA 而设计的特异性 PCR 引物, 扩增体系和条件相同。PCR 体系: 上下游引物各 0.5 μL , 2 $\times$ PCR Master Mix 12.5

μL , 模板 1 μL , 用无菌 dd H₂O 补至 25 μL , 于微量离心管中在 PCR 仪上按下列参数扩增。PCR 条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预处理 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (32 个循环), 经 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 取 10 μL 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳, 以 250 bp- I DNA ladder 作为分子量标准, 空白对照为阴性对照, EB 染色, 凝胶成像系统下观察。

表 2 两种方法提取的 6 株菌基因组 DNA 浓度、纯度和回收率

Table 2 Concentration, purity and recovery of genomic DNA from six bacteria extracted by two methods

Strains	Kit			Boiling		
	Concentration (ng/ μL)	OD260/ OD280	Recovery(ng/ 10^8 cells)	Concentration (ng/ μL)	OD260/ OD280	Recovery(ng/ 10^8 cells)
ATCC23270	6.97	1.61	407.4	8.6	1.96	516
A01	5.07	1.67	304.2	11.6	1.92	696
YSK	4.17	1.55	250.2	5.4	2.05	324
S1	6	1.7	360	6.93	1.67	415.8
St	3.6	1.13	216	24.5	1.46	1470
L1	5.83	1.41	349.8	97.47	1.56	5848.2

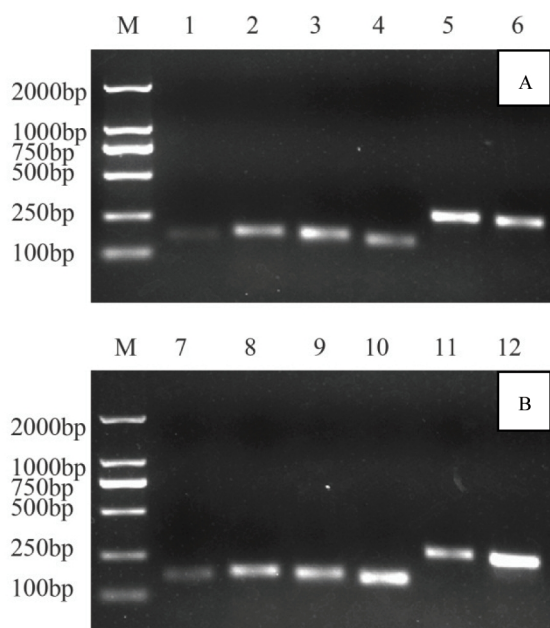


图 1 不同方法提取的基因组 DNA 做模板的 PCR 产物凝胶电泳分析 (A. 煮沸法; B. 试剂盒法)

注: 1, 7 所对应的菌株为氧化亚铁硫杆菌(产物长度 160 bp); 2, 8 所对应的菌株为氧化硫硫杆菌(产物长度 175 bp); 3, 9 所对应的菌株为嗜铁钩端螺旋菌(产物长度 168 bp); 4, 10 所对应的菌株为喜温硫杆菌(产物长度 150 bp); 5, 11 所对应的菌株为嗜热硫氧化硫化杆菌(产物长度 261 bp); 6, 12 所对应的菌株为嗜热嗜酸铁质菌(产物长度为 248 bp)

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR products generated from genomic DNA as templates by two extraction methods (A. kit method; B. boiling method)

Note: 1, 7 for the A. ferrooxidans (product length 160 bp); 2, 8 for A. thiooxidans (product length 175 bp); 3, 9 for L. ferrophilum (product length 168 bp); 4, 10 for A. caldus (product length 150 bp); 5, 11 for S. thermosulfidooxidans (product length 261 bp); 6, 12 for F. thermophilum (product length 248 bp)

1.3.4 灵敏度测定 两种方法的灵敏度测定选取浸矿过程中常用的嗜酸氧化亚铁硫杆菌, 将该菌液以 1:10 倍比稀释后, 取 6 组菌液作为样本, 菌量分别为 1、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 个。用上述两种方法分别提取这 6 组样本的基因组 DNA, 然后进行 Real-time PCR 扩增, 扩增条件与上步 PCR 扩增条件相同。以嗜酸氧化亚铁硫杆菌纯菌的全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将产物按 1:10 倍稀释(拷贝数为 10^{10} copy/mL)后作为 Real-time PCR 标准品, 以此作标准曲线。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 特异性退火温度退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 实时荧光检测, 共 40 个循环; 熔解曲线分析: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 每个循环后温度上升 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 时间 10 s, 产物特异性分析, 共 80 个循环。

2 结果

2.1 两种方法提取的 DNA 浓度和纯度

同一菌株经两种不同的方法提取得到的 DNA 纯度、浓度及回收率各不相同, 且同一菌株方法针对不同的菌提取的效果也不尽相同, 如表 2 所示。在起始菌量相同的情况下, 试剂盒法提取革兰氏阳性菌得到的 DNA 浓度要低于革兰氏阴性菌和古菌。煮沸裂解法提取后, 古菌所得 DNA 浓度高于细菌。整体上, 煮沸裂解法提取的基因组 DNA 浓度和回收率要明显高于试剂盒提取的, 这种差异在革兰氏阳性菌 *S. thermosulfidooxidans* 的提取上表现出的差别达 7 倍, 在古菌 *F. thermophilum* 的提取上差别达 16.7 倍, 由于革兰氏阴性菌细胞壁结构简单, 提取革兰氏阴性菌时这种差异稍小些。煮沸法并没有经过去蛋白和多糖的步骤, 但 OD260/OD280 仍比试剂盒法接近 1.8-2.0 (纯 DNA 的 OD260/OD280 阈值在 1.8-2.0 之间), 前者所得 DNA 纯度高干后者。

2.2 PCR 产物电泳结果

为了验证上述两种方法提取的基因组 DNA 中杂质是否影

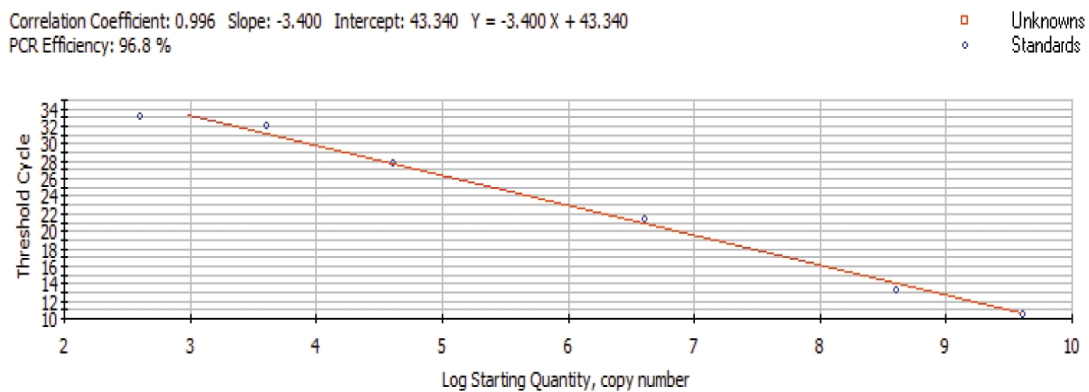


图2 Real-time PCR 标准曲线

Fig.2 Standard curve of Real-time PCR

响后续实验,以6对特异引物进行PCR扩增,电泳结果见图1。两种方法提取的6种基因组DNA均能作为模板扩增出各自的目的片段(150 bp-250 bp),没有出现杂带和拖带的现象。尽管操作上存在误差,煮沸法提取的6组基因组DNA扩增后的产物条带还是比试剂盒法的条带亮,与DNA的浓度测定结果相吻合。两组PCR产物电泳结果说明,煮沸法在既定煮沸破壁的时间内,导致的蛋白,多糖变性沉淀效果好,而DNA抗热变性能力较高,经高速离心能较好的分离出高纯度的,PCR扩增实验表明,即使DNA中存在少量蛋白质或多糖等杂质,也对PCR扩增影响不大,与实验室常用的试剂盒法相比能达到相同的效果。

2.3 灵敏度检验

用两种方法分别提取6种浓度(10^6 - 10 个)的嗜酸氧化亚

铁硫杆菌,以提取的基因组DNA为模板,经过Real-time PCR^[8]扩增后,标准曲线如图2所示。相关系数为99.6%,扩增效率为96.8%的情况下,两种方法提取得到的基因组DNA拷贝数如表3所示。从表3可以看出,煮沸裂解法能从较少(10^2 个)的菌体中提取得到DNA,且不同浓度的提取拷贝数与原始菌量以大致相同的倍数(10倍)增加,变化较一致。试剂盒法要从含 10^3 个菌体的样品中才能提取到DNA,但是提取的基因组DNA随着菌体的10倍增加而呈2倍递增的趋势,DNA拷贝数与初始菌量偏差较大,且在提取过程中,菌量越多,DNA损失越严重,这是由于提取的过程中细胞裂解不完全,要经过多次转管,导致DNA提取不出来或丢失。在处理相同菌量时,煮沸裂解法处理的效果是试剂盒的若干倍,验证了前面的煮沸法比试剂盒法提取的DNA浓度高。

表3 两种方法在不同浓度梯度的比较

Table 3 Comparison of recovery of DNA by two kinds of methods

Methods	Initial cells					
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10
Kit	5.37×10^2	2.75×10^2	1.46×10^2	7.16×10	0	0
Boiling	3.09×10^5	3.96×10^4	1.61×10^3	6.40×10^2	2.8×10	0

3 讨论

基于核酸技术能精确定量混合微生物中各种菌的数量及分析不同时期环境中的群落结构,所以从整个微生物菌群中提取出有代表性和高质量的核酸显得极为重要^[9]。DNA的浓度、纯度、产率及PCR产物电泳条带是反映所提DNA质量高低的重要参数,直接影响后续分子学实验操作。Real-time PCR可精确、灵敏、快速的检测出少量的微生物,而这种细胞计数主要依据的是DNA提取时获得的模板量,所以DNA的提取效率决定了检测结果的偏差大小^[4]。本文比较了煮沸裂解法和试剂盒法,结果显示两种方法提取的DNA各种参数都有较明显差异。

在处理量均为 10^8 个菌时,两种方法所提取的6株菌的DNA质量均不同。用试剂盒法处理,*S. thermosulfidooxidans*的DNA浓度低于其它五株菌所得DNA,说明革兰氏阳性菌细胞壁较厚,裂解液破壁不彻底。用煮沸裂解法处理,古菌所得

DNA浓度高于细菌,这是因为嗜热嗜酸古菌没有复杂的细胞壁,只有一层细胞膜,所以比细菌更容易裂解完全,同时,*S. thermosulfidooxidans*和*F. thermophilum*所得DNA浓度明显高于其它4株革兰氏阴性菌,说明了此种方法受细胞壁成分和其薄厚的影响不是主要因素,而各种细菌DNA浓度的差异可能是由于操作损失引起或它们的基因组大小不同导致的。对于4株革兰氏阴性菌,煮沸裂解法所得DNA浓度是试剂盒法的1-2倍,对于革兰氏阳性菌*S. thermosulfidooxidans*,煮沸裂解法所得DNA浓度是试剂盒法所得DNA浓度的7倍,对于古菌*F. thermophilum*,这种差别达到16.7倍,这两种提取效果的差异表明了加热破壁比试剂盒破壁效果普遍明显。不同的细胞,细胞壁结构各不相同,前者在破壁时受细胞壁成分的影响较小,高温可使所有的细胞壁成分及包裹在DNA外的蛋白降解,将DNA完全释放出来,后者破壁时会受到细胞壁成分、裂解液多少的影响,细胞破壁不充分。前者在提取的过程中操作步骤

少,损失的DNA量也少,后者要经过多次转管, DNA 损失较多。煮沸破壁时没有添加化学试剂,且后期没有经过去蛋白和多糖的步骤,但 OD260/OD280 仍比试剂盒法接近 1.8-2.0(纯 DNA 的 OD260/OD280 阈值在 1.8-2.0 之间),所得 DNA 纯度高于试剂盒法。PCR 产物跑胶均有较亮条带,表明煮沸法在较短的时间内能使蛋白、多糖变性降解,而 DNA 抗热变性能力高,仍能较完整的存在,试剂盒法所提 DNA 中可能含少量化学试剂,同样不影响后续分子实验。Real-time PCR 检测出,用煮沸裂解法处理 10^2 个 *A. ferrooxidans* 时即可得到模板,试剂盒法在处理量为 10^3 个时才能得到模板,结果表明,煮沸裂解法较试剂盒法更能从浓度较低的菌液中提取到 DNA,比较灵敏,这对于群落分析时混合菌基因组 DNA 的提取有较好的保真性,能较准确的分析出原来混合体系中各种菌的比例。同时,也验证了煮沸裂解法由于在煮沸法中的短暂高温使绝大部分蛋白与多糖发生了热变形而沉淀,而 DNA 的抗热变性的能力要强,通过离心收集上清能得到高纯度 DNA,对后续 PCR 分析无影响。

目前 DNA 提取方法的研究主要是针对土壤微生物, Parachin^[10] 和 Inceoğlu^[11] 等人比较研究了各种土壤微生物的 DNA 提取方法。这些方法在用于浸矿菌的提取时总是会遇到各种问题, DNA 抽提试剂盒与 Tris-EDTA 法不适合提取产生内生孢子或有厚荚膜的浸矿菌的基因组 DNA^[12], 冷冻研磨-SDS 抽提法对微量的浸矿菌不够灵敏^[13]。针对浸矿菌基因组 DNA 提取的研究较少, Lizama^[14] 和邹平^[15] 等直接用试剂盒法提取浸矿菌 DNA, 与本实验中煮沸法效果一样,但所需费用多。曾乐平^[16] 用沸水浴后再用酚氯仿乙醇混合物抽提浸矿菌 DNA, 与本实验中煮沸裂解法达到同样的目的,但步骤多,费时费力。张翠等^[17] 用直接裂解法快速制备出 CMV DNA 扩增模板,扩大了此种方法的应用范围,也验证了煮沸裂解法的简单、可靠,与本实验结果一致。胡晓红等^[18] 比较了煮沸裂解法和其它几种方法,同样证明了这种方法得到的 DNA 可用于后续分子实验,缺点是高温可能使模板损伤和丢失,但本实验缩短了煮沸的时间,减少了模板损失。

综合以上分析,煮沸裂解法步骤少,简单,快速,成本低;提取过程在一个管内完成,避免污染,减少操作上导致的失误;灵敏,保真,所需菌量少,在群落分析中,能确保低丰度的微生物被检测到;避免了残留化学试剂对后续实验的影响;此方法适用范围广:包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和古菌。煮沸裂解法提取的基因组 DNA 浓度、纯度、回收率均高于试剂盒法所提取 DNA,更能满足极端环境中低菌体密度的浸矿菌 PCR 及后续分子水平的生态群落分析。因而,用此方法可以解决在浸矿中 DNA 提取回收率和纯度低的问题,能够较好的还原菌群中各种菌的比例和数量,尤其对于群落结构分析中低丰度菌的 DNA 提取有很重要的应用价值。

致谢:

在论文的完成中,艾彬彬博士对论文审阅提供了重要修改意见,中南大学生物冶金重点实验室为实验提供了实验材料和仪器设备,国家自然科学基金(20803094)、中国博士后特别资助(2012T50710)、湖南省科技计划项目为实验提供了基金资助,在此表示感谢。

参考文献(References)

- [1] Zhou Hong-bo, Zeng Wei-min, Yang Zhi-feng, et al. Bioleaching of chalcocopyrite concentrate by a moderately thermophilic culture in a stirred tank reactor [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 515-520
- [2] Cárdenas J P, Valdés J, Quatrini R, et al. Lessons from the genomes of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 88(3): 605-620
- [3] Auernik K S, Kelly R M. Impact of molecular hydrogen on chalcocopyrite bioleaching by the extremely thermoacidophilic archaeon Metallosphaera sedula [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(8): 2668-2672
- [4] Islam M R, Sultana T, Melvin-Joe M, et al. Comparisons of direct extraction methods of microbial DNA from different paddy soils [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2012, 19: 337-342
- [5] Zhao Feng, Xu Kuo-dong. Efficiency of DNA extraction methods on the evaluation of soil microeukaryotic diversity [J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(4): 209-214
- [6] 郑维, 权春善, 朴永哲, 等. 一种从活性污泥中提取微生物总 DNA 的方法 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(7): 97-99
Zheng Wei, Quan Chun-shan, Pu Yong-zhe, et al. The extraction method of bacterial DNA from activated sludges [J]. China Biotechnology, 2008, 28(7): 97-99
- [7] 张于光, 李迪强, 王慧敏, 等. 用于分子生态研究的土壤微生物 DNA 提取方法 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(5): 956-960
Zhang Yu-guang, Li Di-qiang, Wang Hui-min, et al. Extraction method of soil microbial DNA for molecular ecology study [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2005, 16(5): 956-960
- [8] 胡晓红, 彭惠民, 刘昕, 等. PCR 及 Real-time PCR 评价细菌 DNA 提取方法 [J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(2): 155-158
Hu Xiao-hong, Peng Hui-min, Liu Xi, et al. Bacterial DNA extraction method used in PCR and Real-time fluorescent quantitative PCR [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2008, 33(2): 155-158
- [9] Nadkarni M A, Martin F E, Hunter N, et al. Methods for optimizing DNA extraction before quantifying oral bacterial numbers by real-time PCR [J]. FEMS microbiology letters, 2009, 296(1): 45-51
- [10] Parachin N S, Schelin J, Norling B, et al. Flotation as a tool for indirect DNA extraction from soil [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(5): 1927-1933
- [11] Inceoğlu Ö, Hoogwout E F, Hill P, et al. Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity of soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(10): 3378-3382
- [12] Bloem J, Bolhuis P, Veninga M, et al. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil [J]. Methods in applied soil microbiology and biochemistry, 1995: 162-173
- [13] Zhou Hong-bo, Liu Xi, Fu Bo, et al. Isolation and characterization of Acidithiobacillus caldus from several typical environments in China [J]. Journal-Central South University Of Technology (English Edition), 2007, 14(2): 163-163
- [14] Lizama H, Jensen S, Stradling A. Dynamic microbial populations in heap leaching of zinc sulphide ore [J]. Minerals Engineering, 2012, 25(1): 54-58

的 VEGF 促进了血管的形成从而增加血供,并且还能参与肝癌侵袭转移过程。我们结果发现 OPN 下降后,VEGF 的蛋白表达及活力也下降了,提示 OPN 参与肝癌侵袭的部分机制可能是通过调控 VEGF 来实现的。但是 OPN 是如何调控 MMP-2 和 VEGF 尚待进一步实验来研究。

综上所述,OPN 作为一种十分重要的肿瘤相关蛋白,目前受到人们的重视。既往研究和我们的实验结果发现在肝癌中 OPN 表达增加,并且抑制 OPN 的表达能够有效降低肝癌细胞的侵袭能力,就其机制可能是通过调控 MMP-2 和 VEGF 来实现的,所以针对 OPN 的研究可能最为肝癌转移治疗的靶点,但 OPN 具体参与肝癌侵袭的机制尚待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Hanazaki K, Kajikawa S, Shimozaawa N, et al. Survival and recurrence after hepatic resection of 386 consecutive patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Am Coll Surg, 2000, 191(4): 381-388
- [2] Masuzaki R, Karp SJ, Omata M. New serum markers of hepatocellular carcinoma[J]. Seminars in oncology, 2012,39(4): 434-439
- [3] Wai PY, Kuo PC. The role of osteopontin in tumor metastasis[J]. J Surg Res, 2004, 121(2): 228-241
- [4] Sun J, Xu HM, Zhou HJ, et al. The prognostic significance of preoperative plasma levels of osteopontin in patients with TNM stage-I of hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136: 1-7
- [5] Zhou L, Wang DS, Li QJ, et al. Downregulation of the Notch signaling pathway inhibits hepatocellular carcinoma cell invasion by inactivation of matrix metalloproteinase-2 and -9 and vascular endothelial growth factor[J]. Oncol Rep, 2012, 28(3): 874-882
- [6] Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins[J]. Cell, 1979, 16(4): 885-893
- [7] Ahmed M, Kundu GC. Osteopontin selectively regulates p70S6K/mTOR phosphorylation leading to NF-kappaB dependent AP-1-mediated ICAM-1 expression in breast cancer cells [J]. Molecular cancer, 2010, 9: 101
- [8] Beausoleil MS, Schulze EB, Goodale D, et al. Deletion of the thrombospondin cleavage domain of osteopontin mediates breast cancer cell adhesion, proteolytic activity, tumorigenicity, and metastasis[J]. BMC cancer, 2011, 11: 25
- [9] Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, et al. Role of the metastasis-promoting protein osteopontin in the tumour microenvironment [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2010, 14(8): 2037-2044
- [10] Coppola D, Szabo M, Boulware D, et al. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1): 184-190
- [11] Gotoh M, Sakamoto M, Kenetaka K, et al. Overexpression of osteopontin in hepatocellular carcinoma[J]. Pathol Int, 2002, 52(1): 19-24
- [12] Pan Hw, Ou YH, Peng SY, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis early recurrence and poorer prognosis of surgically resected[J]. Cancer, 2003, 98(1): 119-127
- [13] Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, et al. Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer[J]. Journal of cell communication and signaling, 2011, 5(2): 111-122
- [14] Abu El Makarem MA, Abdel-Aleem A, Ali A, et al. Diagnostic significance of plasma osteopontin in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Annals of hepatology, 2011, 10(3): 296-305
- [15] Bandiera E, Zanotti L, Fabricio AS, et al. Cancer antigen 125, human epididymis 4, kallikrein 6, osteopontin and soluble mesothelin-related peptide immunocomplexed with immunoglobulin M in epithelial ovarian cancer diagnosis[J]. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC, 2013, 51(9): 1815-1824
- [16] Giannelli G, Bergamini C, Marinossi FE, et al. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Cancer, 2002, 97(4): 425-431
- [17] Barak V, Kaiserman I, Frenkel S, et al. The dynamics of serum tumor markers in predicting metastatic uveal melanoma (part 1) [J]. Anticancer research, 2011, 31(1): 345-349
- [18] Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF[J]. Oncogene, 1999, 18 (38): 5356-5362

(上接第 35 页)

- [15] 邹平, 张文彬, 林连兵, 等. 以黄铜矿为主的低品位硫化铜矿生物浸出体系中的细菌优势菌群 [J]. 过程工程学报, 2008, 8(4): 761-767
- Zou Pin, Zhang Wen-bin, Lin Lian-bing, et al. Dominant bacteria in bioleaching system of low-grade copper sulphide ore consisting mainly of chalcopyrite the Chinese journal of process engineering [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2008, 8 (4): 761-767(In Chinese)
- [16] 曾乐平, 张燕飞, 黄菊芳. 一种有效的抽提浸矿细菌 DNA 的方法 [OL]. (2011-01-19) [2013-03-31]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201101-956>
- Zeng Le-Ping, Zhang Yan-fei, Huang Ju-fang. An effective method of DNA extraction for bioleaching bacteria [OL]. (2011-01-19) [2013-03-31]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201101-956>
- [17] 张翠, 韩金祥, 赵健, 等. 一种简单快速制备 CMV DNA 扩增模板的方法 [J]. 国外医学 (临床生物化学与检验学分册), 2002, 23(6): 371-371
- Zhang Zui, Han Jin-xiang, Zhao Jian, et al. A simple and rapid method for preparation of CMV DNA amplification template [J]. Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine, Foreign Medical Sciences, 2002, 23(6): 371-371