碱煮法：一种制备海洋浮游生物 PCR 模板 DNA 的实用方法

刘　泳，杨官品

（中国海洋大学 海洋生命学院，山东 青岛 266003）

摘要：介绍了一种制备海洋浮游生物 PCR 模板 DNA 的方法——碱煮法。取少量海水样品（40μL），直接经 0.25mol/L NaOH 和 99℃温育处理裂解细胞，从而得到环境样品总 DNA。实验证明，该方法制备的模板 DNA 可用于细菌核糖体 RNA、浮游植物叶绿体 *rbcL* 和浮游动物线粒体 *COI* 等基因的 PCR 扩增。但是，在使用通用引物扩增细菌基因时，假阳性很难避免。该法制备的模板 DNA 适用于扩增非细菌基因或者特异引物界定的细菌基因。该方法较传统制备方法快速、简便，样品需要量减少，适用于浮游生物分子遗传多样性研究。

关键词：碱煮法；浮游生物；聚合酶链式反应

中图分类号：Q781　　文献标识码：A　　文章编号：1000－3096(2004)07－0001－03

用聚合酶链式反应（PCR）技术扩增环境指示基因，再电泳分析不同环境样品间的差异，或建立这些基因变异类型文库、测定其序列，根据序列变异揭示环境生物多样性是目前在生态学研究中广泛使用的分子生物学技术。指示基因的 PCR 扩增，必须以待测样品 DNA 为模板。但是，常规的模板 DNA 制备方法需要较大的生物量，需要使用蛋白酶、酚、氯仿等生化试剂[1-2]，并需要冷冻离心等复杂步骤[3-4]。另外，海洋浮游生物生物量较小，往往需要采集大量的海水样本，过滤收集特定粒径的浮游生物。因此，在海洋浮游生物分子生态学研究中，迫切需要一种简单、快速、实用的符合环境指示基因 PCR 扩增需要的浮游生物模板 DNA 制备方法。作者介绍一种海洋浮游生物 PCR 模板 DNA 的制备方法——碱煮法。

1　材料和方法

1.1　材料

海水样品于 2003年 4月取自胶州湾潮间带表层海水。样品立即带回实验室，于取样当日制备总体浮游生物 PCR 模板 DNA，或保存于 4℃在 24h 之内使用。

1.2　PCR 模板的制备

取 40μL 水样，与等体积 0.25mol/L NaOH 混合，并于 25℃温育过夜（≥8h）；99℃加热 10min（可在干浴或 PCR 仪上进行），冷却至室温，简单离心收集溶液，依次加入 8μL 1mol/L HCl，20μL 0.5mol/L Tris－HCl（pH 8.0）和 10μL 2%（体积分数）TritonX－100 混合并离心。将混合液再次在 99℃加热 10min。制备的模板 DNA 溶液 pH 值在 8到 9之间，可直接用于 PCR 扩增反应，不需要其它纯化处理，作者称其为碱煮法。

1.3　PCR 扩增反应

为验证碱煮法的有效性，我们对实验室正在使用的各种浮游生物基因扩增引物进行了分析。所用引物及扩增的基因列于表 1，用细菌 16S rRNA 基因特异引物 F968和 R1401扩增出长约 417bp 的海洋细菌 16S rRNA 基因片段。PCR 反应体系总体积 25μL，其中含有模板 2μL，Mg^{2+}浓度 1mmol/L，dNTP 200μmol/L，引物各 0.2μmol/L，Taq DNA 聚合酶 1U 和 1倍缓冲液。扩增条件为 95℃预扩增 4min；94℃ 1min，50℃ 2min，72℃ 1min 30个循环；72℃延伸 20min。扩增

收稿日期：2003－06－09；修回日期：2003－11－30

基金项目：国家自然科学基金资助项目（40176028）

作者简介：刘泳（1977－），男，山东青岛人，硕士研究生，研究方向：海洋生物分子生态学，E－mail：hawk199@hotmail.com；杨官品，通讯作者，E－mail：yguanpin@mail.ouc.edu.cn

表 1 分析碱煮法制备 PCR 模板 DNA 可行性中使用的引物

Tab.1 Primer pairs used for analysing the feasibility of alkaline－boiling method to prepare PCR template

引物	扩增基因	引物序列(5'→3')
F968	细菌 16S rRNA 基因	AACGCGAAGAACCTTAC
R1401		CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG
rbcL 1	浮游植物 *rbcL* 基因	AA(AG)CC(TA)AA(AG)(TC)TAGG(TG)(CT)T(AT)TC
rbcL 2		CC(TC)TC(TC)A(AG)(TC)TTACC(AT)AC(GAT)AC
LCO－1490	线粒体 *COI* 基因	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
HCO－2198		TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATC

产物经 2.0%琼脂糖凝胶电泳，以 100bp DNA Ladder 为分子质量标准，拍照记录。用Ⅰ型 *rbcL* 特异引物扩增约 500bp 的浮游植物 *rbcL* 基因片段；用后生动物线粒体 *COI* 基因特异引物扩增约 700bp 的浮游生物线粒体 *COI* 基因片段。PCR 反应体系及扩增条件同细菌 16S rRNA 基因。

2 结果与分析

对细菌 16S rRNA 基因片段而言，当 PCR 反应体系中的模板量为 0.5μL(碱煮混合液)、Mg^{2+}浓度在 0.5～1mmol/L 范围内时，PCR 产量较高（图 1）；当 Mg^{2+}浓度在 0.4mmol/L 以下时，得不到扩增产物；当模板量为 2μL 时，即使 PCR 体系中不另外加入 Mg^{2+}，有时也可以得到扩增带。因此，尽管 Mg^{2+}浓度对 PCR 反应影响较大，海水中存在的 Mg^{2+}也可能影响 PCR 扩增反应。针对不同的基因扩增，Mg^{2+}浓度需要优化，但是，实验证明 Mg^{2+}适宜浓度范围很广。实验中，1mmol/L Mg^{2+}浓度是细菌 16S rRNA 基因片段扩增的最适浓度，在此浓度下，叶绿体 *rbcL* 基因和线粒体 *COI* 基因片段都能被扩增出来(图 2)。

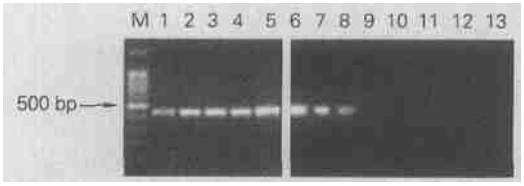

图 1 不同 Mg^{2+}浓度下细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 The effect of Mg^{2+} on the amplification of bacterial 16S rRNA gene fragments

M 表示 100bp 梯度 DNA 分子质量标记；泳道 1、4、5 mmol/L Mg^{2+}；泳道 2 到 5 与 1 相比逐步降低 1mmol/L；泳道 6、1mmol/L；泳道 7、0.5mmol/L；泳道 8 到 11 与 7 相比逐步降低 0.1mmol/L；泳道 12 和 13 不加 Mg^{2+} 对照

M：100bp DNA ladder marker；Lane 1：4.5mmol/L Mg^{2+}，Lane 2 to 5 different Mg^{2+} concentrations with a constant decrement of 1mmol/L from lane 1；Lane 6：1mmol/L；Lane 7：0.5mmol/L；Lane 8 to 11 different Mg^{2+} concentrations with a constant decrement of 0.1mmol/L from Lane 7；Lane 12 and 13 without addition of Mg^{2+}

图 2 用碱煮法制备的模板 DNA 扩增不同的基因片段

Fig.2 PCR amplification products based on DNA template prepared by alkaline－boiling method

M 表示分子质量标记；泳道 1、2、3 依次为线粒体 *COI* 基因片段、叶绿体 *rbcL* 基因片段和细菌 16S rRNA 基因片段；泳道 4、5、6 分别为 1、2、3 不加模板对照

M：DNA length marker；Lane 1、2 and 3 show mitochondrial *COI* gene fragment, chloroplast *rbcL* gene fragment and bacterial rRNA gene fragment in turn；Lane 4、5 and 6 are the free template controls of 1、2 and 3 respectively

在扩增细菌 16S rRNA 基因片段时，作者发现 PCR 反应体系中不加入模板 DNA，有时也能扩增出明显的带(图 2，泳道 6)。可能的原因是反应体系有细菌或细菌 DNA 污染。任何实测样品中，待分析细菌的丰度都应该高于污染细菌。因此需要进一步测序或结合别的检测方法，而不能仅依据带的出现与否来分析细菌多样性。作者还发现线粒体 *COI* 基因的扩增也存在这一现象(图 2，泳道 4)，可能的原因是线粒体起源于细菌。不仅是本方法，其它任何扩增细菌基因的 PCR 过程，只要被扩增的基因具有较高的保守性，都可能存在这一问题，即可能的细菌或细菌 DNA 污染会导致细菌相关基因扩增时空白对照出现扩增带。在

扩增叶绿体 *rbcL* 基因时，空白对照中没有任何带出现(图 2,泳道 5),这是因为 PCR 体系中几乎不存在污染的可能性。因此,用制备的模板 DNA 扩增非细菌基因或者用特异引物界定的细菌基因是恰当的。

所采胶州湾潮间带水样为近岸水样,为覆盖不同差异的海水样品,我们尽可能多地采集具不同表观特征的海水。作者发现近岸各种海水样品均适合用本方法制备 PCR 模板 DNA，直接用于 PCR 扩增反应（图 3)。本方法制备的 DNA 量小,且为单链 DNA,无法用常规电泳方法检测。作者通过 PCR 反应证明制备的 DNA 符合 PCR 反应要求。

图 3 经碱煮法制备的不同水样 DNA 直接用于叶绿体 *rbcL* 基因的 PCR 扩增

Fig. 3 DNAs prepared from different seawaters can serve as the template for amplification of chloroplast *rbcL* gene

M 表示 DNA 分子质量标记；泳道 1至 5 不同样品的 PCR 扩增产物

M: DNA length marker; Lane 1 to 5 PCR products from different marine plankton DNAs

用碱煮法制备的浮游生物模板 DNA 可直接用于 PCR 反应。但本研究所使用的都是拷贝数较高、多种生物共有的基因。本方法制备的 DNA 可能不适用扩增低拷贝数或者单拷贝基因。作者用 10对 RAPD 引物对不同水样 DNA 进行了扩增，没有获得明显的扩增带。因此，碱煮法制备的海水 DNA 可能不适合 RAPD 分析和单拷贝基因的扩增,至少在 30个循环内是这样。实际上，浮游生物组成复杂，它们的混合 DNA 复杂度非常高，可能超过任何单种生物。因此，该方法制备的模板 DNA 不适合单拷贝基因扩增是预料之中的。但是，如果增加循环数，或者进行第二次扩增，仍可能扩增出特异基因。另外，较长的基因片段也有可能扩增不出来，因为碱煮过程有可能使制备的 DNA 分子质量较小。不过,在分子生态学研究中，一般不需要长片段扩增，本方法制备的 DNA 应能满足常规需要。

与传统的 DNA 提取方法相比，碱煮法简单、快速，省掉了许多繁琐的步骤，其实用性还体现在小取样体积上。小取样体积使得能低温保存大量样品，适合长时间大规模取样需要。酒精等试剂可保存生物样品，同时对 PCR 过程影响也不大，如果能结合适当的样品保存措施，本方法将更具优越性。另外,本方法更具保真性,因为操作中不可能产生人为偏差。当然，本方法也可以与其它取样方法结合，如可以先过滤收集样品，再用该方法制备模板 DNA，既能大大减少过滤体积，又能兼顾对不同粒径浮游生物的选择。类似的方法已用在真菌孢子、酵母、细菌[illegible]、线虫、甚至小麦和水稻叶片[illegible]的模板 DNA 制备上。作者相信，碱煮法制备浮游生物 PCR 模板 DNA 适用于海洋浮游生物分子生态学、分子遗传多样性等研究，也应该适用于纯培养浮游生物样品。

参考文献:

[illegible] Michael S R, Kevin V, Stephen J G. Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems[illegible] **FEMS Microbiology Ecology**, 2000, 33: 219—232.

[illegible] Giovannoni S J, DeLong E F, Schmidt T M, *et al*. Tangential flow filtration and preliminary phylogenetic analysis of marine picoplankton[illegible] **Applied and Environmental Microbiology**, 1990, 56: 2 572—2 575.

[illegible] 杨官品,朱艳红,李志岗. 土壤细菌基因资源的直接分离—16S 核糖体 RNA 基因模式[illegible] 湖北大学学报(自然科学版), 1998, 20(4): 383—385.

[illegible] 李志岗,杨官品,朱艳红. 水环境细菌限制性片段长度多型性及群落结构分析[illegible] 水生生物学报, 2001, 25(2): 111—115.

[illegible] 汪秀峰,杨剑波,吴丽芳,等. 小麦叶片直接用于 PCR 和 RAPD 反应的方法[illegible] 遗传, 2002, 24(3): 332—334.

[illegible] 赫然,黄小乐,刘秋云. 快速制备水稻基因组 DNA PCR 模板的煮沸法[illegible] 植物生理学通讯, 2003, 39(1): 41—42.

(下转第 53页)

（上接第 3页）

Alkaline—heating method：an effective approach for preparing PCR template DNA from marine plankton

LIU Yong, YANG Guan—pin
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Jun. 9, 2003
Key words: alkaline—heating method; plankton; polymerase chain reaction (PCR)

Abstract: In this study alkaline—heating, an efficient method for preparing PCR template DNA from marine plankton, was developed. A small volume of surface seawater (40μL) was sampled and total DNA was extracted directly by lysing cells using 0.25mol/L NaOH and incubating at 99℃. The experiment shows that the DNA prepared can serve as PCR template directly for the amplification of genes like ribosomal RNA gene of bacterioplankton, chloroplast *rbcL* gene of phytoplankton and mitochondrial cytochrome oxidase gene of zooplankton. However, false—positives can not be avoided when bacterial ribosomal RNA gene was amplified with universal primers. Therefore, template DNA prepared using alkaline—heating is practicable to amplify genes of non—bacterial or bacterial gene confined by specific primers. Alkaline—heating is a simple and rapid method where only very small sample volume was needed compared with traditional DNA extracting method. It is suitable for the study of planktonic molecular diversities.

（本文编辑：张培新）