

文章编号: 1000-0240(2012)02-0478-07

冰川表层雪样中微生物总 DNA 几种提取方法的比较研究

闫沛迎¹, 侯书贵^{1, 2}, 陈拓¹, 张淑红³, 孙维君¹

(1. 中国科学院 寒区旱区环境与工程研究所 冰冻圈科学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 2. 南京大学 地理与海洋科学学院, 江苏 南京 210093; 3. 商丘师范学院 生命科学系, 河南 商丘 476000)

摘 要: 通过对 4 种具有不同裂解方式的微生物总 DNA 提取方法的比较, 筛选出较佳的方法进行滤膜处理、DNA 抽提及沉淀的优化, 再将优化出的传统 DNA 提取方法与商业化试剂盒提取方法比较. 结果表明: 商业化试剂盒提取总 DNA 的方法适用于冰川表层雪微生物总 DNA 的提取; 其次, 将滤膜剪碎, 用溶菌酶 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) + 蛋白酶 K ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) + CTAB (1%) + SDS (1%) 的裂解方式, 氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提一次, 乙醇沉淀 DNA 的提取方法是一种效果较佳且廉价的冰川表层雪微生物总 DNA 提取方法.

关键词: 冰川表层雪; 微生物总 DNA; 方法优化

中图分类号: Q93-33 **文献标识码:** A

0 引言

微生物随着大气环流和降水沉积于冰川中^[1-3], 成为极端低温环境中的主要生命形式. 冰川微生物影响冰川的表面反照率和水文化学, 而且扮演冰川的初级生产者, 在其物质循环和能量流动中起着重要作用^[4-8]. 起初, 冰川微生物的研究主要是依靠传统培养方法对不同区域冰芯和雪坑中可培养微生物群落结构和多样性的研究^[9-15]. 但是, 自然环境中可培养微生物可能不及所有微生物总数的 1%^[16-17], 成为环境微生物研究的限制性因素. 因此, 自 20 世纪 80 年代中期以来, 一些微生物学家开始通过免培养法 (culture-independent), 直接利用分子杂交、DGGE (TGGE) 和高通量测序等分子生物学方法对环境微生物的数量、群落结构和功能等特征进行研究^[16]. 然而, 这些技术的基础以提取环境样品中微生物总 DNA 为前提.

所有环境微生物总 DNA 的提取都分为样品的预处理、细胞裂解 (物理裂解、化学裂解、酶裂解以及裂解方式的结合) 及 DNA 的抽提、沉淀和纯化.

目前, 多家生物公司已生产出各种环境样品微生物总 DNA 提取的试剂盒, 与传统提取方法相比较, 使用试剂盒比较省时省力, 适合于大批样品 DNA 的提取, 但其成本较高, 应用受到一定的局限性. 由于环境样品本身各自的特性, 在已经提出的提取方法中还没有一种方法适合于所有样品微生物总 DNA 的提取. 冰川微生物生物量低^[18], 而且主要以革兰氏阳性菌为主^[19], 因此, 建立可靠的高质量微生物总 DNA 提取方法, 对研究冰川微生物的分子多态性及其在地球生物化学循环中的作用具有重要意义. 本研究首先对 4 种裂解方式不同的微生物总 DNA 提取方法进行筛选, 再从冰雪微生物的过滤到 DNA 沉淀进行优化, 将优化出的 DNA 提取方法与试剂盒提取方法作比较, 从而筛选出较佳的 DNA 提取方法用于冰川微生物多样性的研究.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

将本实验室保存的分离自冰雪样品中的 4 种不同种属的革兰氏阳性菌 *Mycobacterium* sp., *Clavi-*

收稿日期: 2011-09-24; 修订日期: 2012-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40825017; 40576001; 31100369) 资助

作者简介: 闫沛迎 (1980-), 女, 甘肃景泰人, 2004 年在甘肃农业大学获硕士学位, 现为中国科学院寒区旱区环境与工程研究所所在读博士研究生, 主要从事冰雪微生物研究. E-mail: peiyin@163.com

bacter sp, *Pseudonocardia* sp 和 *Nocardioides* sp 分别接入 LB 液体培养基, 以 180 rpm, 在 25 °C 培养后用于总 DNA 提取。

1.2 供试雪样

2011 年 4 月末和 6 月初在祁连山老虎沟 12 冰川(39°26' N, 96°33' E) 海拔 4 600 m 处, 采样者身穿洁净服, 佩戴口罩和 PE 手套采集表面雪样, 装入预先无菌处理的塑料瓶中, 低温运回实验室置于冷库中(≤ -15 °C)备用。

1.3 冰雪微生物总 DNA 提取方法

将液体培养的每种供试菌株 1.5 mL 依次加入同一个 2 mL 离心管以 8 000 rpm 离心 15 min, 弃上层液相, 收集细胞, 参照以下 4 种不同方法提取其总 DNA, 每种方法设 3 个重复。

1.3.1 Bosshard-Bano 提取方法

参照 Bosshard-Bano 等^[20-21]的方法稍加改动。将收集的细胞悬浮于 200 μ L 裂解缓冲液(50 mM 蔗糖; 25 mM Tris; 10 mM EDTA, pH 8.0)中, 加入 50 μ L 溶菌酶(20 mg \cdot mL⁻¹), 37 °C 水浴 1.5 h, 加入 10 μ L 蛋白酶 K(20 mg \cdot mL⁻¹)与 15 μ L SDS(wt/vol, 20%), 37 °C 水浴 30 min, 55 °C 水浴 2 h 后, 加入预热的 CTAB/NaCl 溶液(10% CTAB; 0.7 M NaCl), 65 °C 水浴 30 min, 8 000 rpm 离心 15 min, 将上层液相转入另一洁净的 2 mL 离心管后, 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1), 充分混匀, 12 000 rpm 离心 10 min, 收集上层液相, 加入 2/3 体积预冷的异丙醇, 颠倒混匀, -20 °C 过夜, 12 000 rpm 离心 20 min, 弃液相, 加入 250 μ L 冰乙醇(70%)清洗沉淀 2 次, 室温晾干, 加入 20 μ L TE 溶解, -20 °C 保存备用。

1.3.2 Liu 提取方法^[22]

将收集的细胞悬浮于 1 mL GTE 缓冲液(50 mM 葡萄糖; 25 mM Tris; 10 mM EDTA, pH 8.0)中, 37 °C 水浴 2 h, 加入 10 μ L 蛋白酶 K(20 mg \cdot mL⁻¹)、140 μ L NaCl(5M)和 55 μ L SDS(20%), 65 °C 水浴 1.5 h, 8 000 rpm 离心 15 min, 将上层液相转入另一洁净的 2 mL 离心管中, 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1), 充分混匀, 10 000 rpm 离心 15 min, 再一次将上层液相转入另一洁净的 2 mL 离心管中, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1), 充分混匀, 10 000 rpm 离心 15 min, 收集上层液相, 加入等体积预冷的异丙醇, -20 °C 过夜, 12 000 rpm 离心 20 min, 弃液相, 加入 500 μ L 乙醇(75%)吹洗沉淀 2 次, 室温晾干,

加入 50 μ L TE 溶解, -20 °C 保存备用。

1.3.3 Zhou 提取方法^[23]

将收集的细胞悬浮于 650 μ L DNA 提取缓冲液(100 mM Tris-HCl(pH 8.0); 100 mM sodium EDTA(pH 8.0); 100 mM sodium phosphate(pH 8.0); 1.5 M NaCl; 1% CTAB)中, 加入 5 μ L 溶菌酶(10 mg \cdot mL⁻¹), 在 225 rpm, 37 °C 下振荡 20 min, 加 5 μ L 蛋白酶 K(10 mg \cdot mL⁻¹), 继续振荡 20 min, 加入 75 μ L SDS(20%), 65 °C 水浴 2 h, 在此过程中每 15~20 min 轻轻翻转离心管一次, 8 000 rpm 离心 15 min, 收集上清液转入另一洁净的 2 mL 离心管, 加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1), 充分混匀, 10 000 rpm 离心 15 min, 吸取上层液相转入另一洁净的 2 mL 离心管, 加入 2/3 倍体积预冷的异丙醇, 充分混匀, 室温过夜, 12 000 rpm 离心 30 min, 弃液相, 75%乙醇漂洗沉淀 2 次, 室温晾干, 加入 50 μ L 超纯水溶解, -20 °C 保存备用。

1.3.4 冻融法

将收集的细胞悬浮在 650 μ L DNA 提取缓冲液中进行 3 次反复冻融过程(液氮中 2 min; 65 °C 水浴中 10 min)^[24], 以下步骤同 Zhou 提取方法^[23]。

1.4 滤膜处理、DNA 抽提及沉淀的优化

采集的冰川表层雪在 4 °C 下溶化后, 如表 1 所示: 1) 将约 800 mL 融水平均过滤到 4 张 0.22 μ m 的膜上, 将滤膜分剪碎(J)和完整(W) 2 种处理方式转入装有 200 μ L 裂解液的 2 mL 离心管中, 以下步骤同 Bosshard-Bano 法提取总 DNA; 2) 将约 1 100 mL 融水平均过滤在 6 张 0.22 μ m 的膜上, 然后将膜完整的转入装有 200 μ L 裂解液的离心管中, 设 3 种 DNA 抽提方式, 即 FL(第一次用等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1)抽提; 第二次用等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)抽提)、L II(用等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)抽提 2 次)和 L I(用等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)抽提 1 次), 其他步骤同 Bosshard-Bano 法提取总 DNA; 3) 将约 600 mL 融水平均过滤在 4 张 0.22 μ m 的膜上, 然后将膜完整的转入装有 200 μ L 裂解液的离心管中, 设 3 倍体积的纯乙醇沉淀(Y)和用 2/3 体积的异丙醇沉淀(B) 2 种 DNA 沉淀方式, 其它步骤同 Bosshard-Bano 法提取总 DNA。以上所有处理设 2 个重复, 并计算每个重复第一次水浴及第二次与第三次水浴混合的平均 DNA 产率。

表 1 DNA 提取中滤膜处理、抽提和沉淀的优化

Table 1 Optimization of the treating filter membrane, DNA extraction and precipitation

处理	过滤体积/mL	滤膜处理	抽提	沉淀
J	200	剪碎膜	同 L II	同 B
W	200	膜完整	同 L II	同 B
FL	180	同 W	第一次用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提;第二次用等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提	同 B
L II	180	同 W	等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提 2 次	同 B
L I	180	同 W	等体积的氯仿:异戊醇(24:1)抽提 1 次	同 B
Y	150	同 W	同 L II	3 倍体积的纯乙醇沉淀
B	150	同 W	同 L II	2/3 体积的异丙醇沉淀

1.5 优化后的提取方法与试剂盒提取方法的比较

将 Bosshard-Bano 法和 Zhou 法的滤膜处理、DNA 抽提及沉淀步骤优化后命名为 ZE 和 ZH. 然后将约 1 800 mL 表层雪融水平均过滤在 9 张 0.22 μm 的膜上, 用 MOBIO 试剂盒(PowerWater DNA Isolation Kit, 型号: 14900-50-NF)、ZE 和 ZH 提取方法提取其总 DNA, 筛选最佳的冰川微生物总 DNA 提取方法.

1.6 微生物 DNA 质量检测

DNA 的浓度和 230, 260, 280 nm 处的光密度值采用美国 Nanodrop 公司的 ND-1000 紫外分光光度计测定. 并以 A260/A230 (DNA/腐植酸) 和 A260/A280 (DNA/蛋白质) 的比值来评价 DNA 纯度.

1.7 PCR 扩增

采用细菌 16S rDNA 基因的通用引物对 1.5 所提取的 DNA 进行扩增, 引物为 8-27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1507-1492r (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3')[25]. 扩增体系: 1 \times PCR 缓冲液 (MBI), 2.5 mM MgCl₂ (MBI), 正反向引物各 0.2 μM , 0.2 mM dNTP, 1U Taq DNA 聚合酶 (MBI), 4 μL 上述提取液用作 DNA 模板, 总反应体系 25 μL . 同

时用无菌去离子水代替 DNA 模板用作 PCR 反应的阴性对照. 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 复性温度 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. PCR 产物用 1.0% (wt/vol) 琼脂糖凝胶电泳检测.

2 结果与讨论

2.1 不同 DNA 提取方法的比较

表 2 中 4 种提取方法的 A260/A280 值都在 1.8~2.0, 表明酚和氯仿对蛋白质的去除效果很好. A260/A230 的值都大于 2.0, 表明基本没有试剂杂质残留^[26-27]. 由于本试验是对液体培养的菌体总 DNA 的提取, 相对环境样品无腐殖酸等杂质的污染, 因此提取 DNA 产率的差异主要源于裂解方式的不同. 冰雪细菌以革兰氏阳性菌为主要类群, 以复杂的细胞壁结构适应极端的低温环境^[19]. 所以, 此试验采用 4 种具有不同裂解方式的提取方法对革兰氏阳性混合菌体提取总 DNA. 裂解方式中不同浓度的溶菌酶和蛋白酶 K 分别溶解细胞壁和蛋白质, CTAB 和 SDS 破坏脂质双分子层, 破裂细胞, 反复冻融可以破解细胞结构. 试验结果表明, Bosshard-Bano 法所提取 DNA 产率高于其它 3 种方法的, 但与冻融法和 Zhou 法的无显著性差

表 2 4 种不同提取方法的 DNA 产率及纯度

Table 2 Yield and purity of DNA extracted by the four methods

方法	DNA 产率/ (ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)	A260/A280	A260/A230
Zhou 法	155.230 \pm 82.792	1.953 \pm 0.021	2.110 \pm 0.120
冻融法	162.570 \pm 94.330	1.920 \pm 0.044	2.037 \pm 0.122
Bosshard-Bano 法	202.070 \pm 38.511	1.950 \pm 0.010	2.090 \pm 0.017
Liu 法	49.650 \pm 12.092	1.935 \pm 0.021	2.225 \pm 0.035

注: 表中数值为平均值 \pm 标准差 ($n=3$).

异($p > 0.05$), 说明反复冻融不能显著提高 DNA 产率; Leff 等同样发现冻融法对沉积物中 DNA 的提取质量没影响^[28-29]; Liu 法提取的 DNA 浓度低于其它 3 种方法的, 且显著低于 Bosshard-Bano 法的($p < 0.05$), 其裂解方式中无 CTAB, 可能是降低了裂解作用, 从而减少了 DNA 的产率. CTAB 不但有去除腐殖酸的作用, 还有类似 SDS 的裂解作用^[30-31]. 因此, Bosshard-Bano 法和 Zhou 法提取方法中的裂解方式比较有效, 即溶菌酶+蛋白酶 K+CTAB+SDS.

2.2 DNA 提取中滤膜处理、抽提和沉淀的优化

第二次和第三次水浴收集的 DNA 量占到总量的 25%~37%(表 3), 因此, 有必要将第一次水浴离心的沉淀进行重复的水浴步骤以提高 DNA 的总产率. 重复提取在土壤微生物总 DNA 的提取过程中也是有效的^[23]. 在对膜的处理中, 将膜剪碎可以明显提高 DNA 产率($p < 0.01$), 处理 J 的 DNA 产率是 W 的 2.6 倍, 但处理 J 的 A260/A280 值小于 W 的, 可能在 65 °C 水浴过程中, 碎膜很少一部分溶于提取液中, 干扰了 DNA 的蛋白质抽提效果. 在蛋白质抽提处理中, 处理 L I 的 DNA 产率明显高于处理 L II 和 FL, 而处理 L II 和 FL 的 DNA 产率相近, 说明抽提次数增加会损失 DNA 量. 处理

FL 的 A260/A280 值大于 L II 和 L I 的, 接近 2.0, 而 L II 和 L I 的 A260/A280 值相近, 因此处理 FL 和 L I 是各有优势的 2 种抽提方法, 处理 FL 适合于复杂的环境样品, 而处理 L I 适合于生物量低的冰雪样品. 在 DNA 的沉淀处理中, 处理 Y 的总产率明显高于处理 B 的, 且它的 A260/A230 值大于处理 B 的 ($p < 0.05$), 即在冰雪微生物 DNA 提取中, 乙醇沉淀比异丙醇有效.

2.3 优化后的提取方法与试剂盒提取方法的比较

3 种方法提取 DNA 产率的比较结果是方法 ZE > 试剂盒法 > ZH(表 4), 但三者无显著差异($p > 0.05$). 这三种方法提取老虎沟 12 冰川表层雪的 DNA 产率远大于尚天翠用高盐法提取其它冰川雪样品的^[32], 一方面可能由于这三种方法比高盐法有效; 另一方面也可能由于不同冰川冰雪微生物的数量和群落结构不同^[33-34]. ZH、ZE 和试剂盒法的 A260/A280 值在 1.8~2.0 的范围, 即优化后的方法 ZE 和 ZH 及试剂盒法对冰川表面雪样 DNA 提取中的蛋白质去除彻底; 三者的 A260/A230 值都小于 2.0, 即这三种方法提取的 DNA 有腐殖酸等杂质的污染, 但试剂盒法的 A260/A230 大于其它 2 种方法的; 对三种方法提取的 DNA 16S rDNA 扩增结果是(图 1), 方法 ZH 提取的 DNA 的 3 个重

表 3 滤膜处理、抽提和沉淀对 DNA 产率的影响

Table 3 The effects of filter membrane, extraction and precipitation on the yield of DNA

处理	第 1 次水浴 DNA 产率 /(ng · μL ⁻¹)	第 2 和 3 次水浴 DNA 产率之和/(ng · μL ⁻¹)	DNA 总产率 /(ng · μL ⁻¹)	第 2 和 3 次水浴 DNA 产率之和所占比例/%	A260/A280	A260/A230
J	0.130±0.075	0.043±0.018	0.173±0.093	25	1.610±0.077	0.713±0.265
W	0.052±0.004	0.024±0.001	0.076±0.005	32	1.745±0.045	0.603±0.176
FL	0.046±0.006	0.026±0.001	0.072±0.007	36	1.915±0.233	0.528±0.178
L II	0.051±0.000	0.030 ±0.004	0.081±0.004	37	1.733±0.188	0.540±0.143
L I	0.076±0.023	0.030±0.003	0.106±0.026	28	1.748±0.0.225	0.595±0.174
B	0.006±0.004	0.002±0.001	0.008±0.005	29	1.737±0.083	0.505±0.368
Y	0.031±0.014	0.015±0.001	0.046±0.015	33	1.710±0.629	0.978±0.312

注: 表中数值为平均值±标准差($n=2$).

表 4 优化后提取方法与试剂盒提取方法的 DNA 产率和纯度

Table 4 Yield and purity of DNA extracted by the two methods

方法	DNA 产率 /(ng · μL ⁻¹)	CV/%	A260/A280	CV/%	A260/A230	CV/%
ZH	0.015±0.010	67	2.005±0.530	26	0.820±0.184	22
ZE	0.034±0.014	41	1.930±0.311	16	0.840±0.010	12
试剂盒法	0.020±0.008	40	1.815±0.091	5	1.145±0.011	10

注: 表中数值为平均值±标准差($n=3$).

复不能都扩增出条带,方法 ZE 提取的 DNA 的 3 个重复中,1 个扩出的条带亮度强,另外的 2 个扩出的条带亮度弱,试剂盒法提取的 DNA 的扩增效果最好,3 个重复都能扩增出清晰的条带,这可能是由于试剂盒法提取的 DNA 相对较纯。重复间的变异系数(CV)可以比较不同提取方法所得 DNA 各参数的变异度大小,进而比较 DNA 提取方法重复性的好坏^[35]。试剂盒法的 3 个重复的 DNA 产率, A260/A280 和 A260/A230 值的变异系数都小于其它 2 种提取方法各参数的变异系数,说明试剂盒法的重复性最好,其次是 ZE 的 DNA 各参数的变异系数,除 A260/A280 值的以外,其它的接近试剂盒法的,因而方法 ZE 也是一种可取的冰川微生物总 DNA 提取方法。



图 1 3 种方法提取的 DNA 的 16S rDNA 扩增产物电泳图谱

M. DL2000 DNA maker; 1~3. ZH 提取方法;
4~6. ZE 提取方法; 7~9. 试剂盒提取法

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA gene of bacteria from glacier surface snow by the three methods

3 结论

首先选用 4 种以不同裂解方式为主的 DNA 提取方法对实验室混合培养的革兰氏阳性冰雪细菌提取总 DNA,并对 4 种方法提取的 DNA 产率进行比较评价,筛选出 Zhou 法和 Bosshard-Bano 法的裂解方式较好,即溶菌酶+蛋白酶 K+CTAB+SDS;在冰川表层雪 DNA 提取步骤中,优化出 1) 较佳的膜处理方式,即将膜剪碎有利于 DNA 的提取; 2) 适合于冰雪微生物 DNA 的抽提方法,即氯仿抽提一次; 3) 高效的核酸量沉降法,即用乙醇沉淀 DNA。最后,将优化后的 DNA 提取方法与试剂盒法作比较, DNA 参数和 PCR 扩增结果显示试剂盒法适于冰川表面层雪微生物多样性的研究。其次,

方法 ZE 也是一种效果较好且廉价的冰川微生物总 DNA 提取方法。

参考文献 (References):

- [1] Sattler B, Puxbaum H, Psenner R. Bacterial growth in super-cooled cloud droplets [J]. *Geophysical Research Letters*, 2001, **28**(2): 239-242.
- [2] Zhao Shuhui, Li Zhongqin, Zhou Ping, *et al.* Morphological and element composition characteristics of the aerosol particles collected from the Gacier No. 1 at the Headwaters of Ürümqi River, Tianshan Mountains [J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2010, **32**(4): 714-22. [赵淑慧, 李忠勤, 周平, 等. 天山乌鲁木齐河源 1 号冰川大气气溶胶的微观形貌及元素组成分析 [J]. *冰川冻土*, 2010, **32**(4): 714-722.]
- [3] Priscu J C, Christner B C, Foreman C M, *et al.* Biological material in ice cores [J]. *Encyclopedia of Quaternary Sciences*, 2006, **2**: 1156-1166.
- [4] Thomas W H, Duval B. Sierra Nevada, California, U. S. A., snow algae: snow albedo changes, algal-bacterial interrelationships, and ultraviolet radiation effects [J]. *Arctic and Alpine Research*, 1995, **27**(4): 389-399.
- [5] Jiang Xi, Wang Ninglian, He Jianqiao, *et al.* A study of parameterization of albedo on the Qiyi Glacier in Qilian Mountains, China [J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2011, **33**(1): 30-37. [蒋熹, 王宁练, 贺建桥, 等. 祁连山七一冰川反照率的参数化研究 [J]. *冰川冻土*, 2011, **33**(1): 30-37.]
- [6] Sharp M, Parkes J, Cragg B, *et al.* Widespread bacterial populations at glacier beds and their relationship to rock weathering and carbon cycling [J]. *Geology*, 1999, **27**(2): 107-110.
- [7] Skidmore M L, Foght J M, Sharp M J. Microbial life beneath a high Arctic glacier [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(8): 3214-3220.
- [8] Skidmore M, Anderson S P, Sharp M, *et al.* Comparison of microbial community compositions of two subglacial environments reveals a possible role for microbes in chemical weathering processes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(11): 6986-6997.
- [9] Ma Xiaojun, Liu Wei, Hou Shugui, *et al.* Culturable bacteria in snow pits of different type glaciers: diversity and relationship with environment [J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2009, **31**(3): 483-489. [马晓军, 刘炜, 侯书贵, 等. 不同类型冰川雪中可培养细菌多样性变化及其与环境因子关系研究 [J]. *冰川冻土*, 2009, **31**(3): 483-489.]
- [10] Xiang S R, Yao T D, An L Z, *et al.* 16S rRNA sequences and differences in bacteria isolated from the Muztag Ata Glacier at increasing depths [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(8): 4619-4627.
- [11] Zhang X J, Ma X J, Yao T D, *et al.* Diversity of 16S rDNA and environmental factor affecting microorganisms in Malan ice core [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2003, **48**(11): 947-957.
- [12] Zhang X F, Yao T D, Tian L D, *et al.* Phylogenetic and Physiological Diversity of Bacteria Isolated from Puruogangri Ice Core [J]. *Microbial Ecology*, 2007, **55**(3): 476-488.
- [13] Zhang S H, Hou S G, Ma X J, *et al.* Culturable bacteria in Himalayan glacial ice in response to atmospheric circulation

- [J]. *Biogeosciences*, 2007, **4**(1): 1–9.
- [14] Zhang Wei, Zhang Gaosen, Liu Guangxiu, *et al.* Diversity and its temporal-spatial characteristics of eukaryotic microorganisms Glacier No. 1 at the ürümqi River Head, Tianshan Mountains[J]. 2010, **32**(5): 906–913. [张威, 章高森, 刘光琇, 等. 天山乌鲁木齐河源 1 号冰川中真核微生物多样性分布及时空变化研究[J]. *冰川冻土*, 2010, **32**(5): 906–913.]
- [15] Miteva V I, Sheridan P P, Brenchley J E. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(1): 202–213.
- [16] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1995, **59**(1): 143–169.
- [17] Schloss P D, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics[J]. *Current Opinion Biotechnology*, 2003, **14**(3): 303–310.
- [18] Xiang Shurong, Yao Tandong, Wu Guangjian, *et al.* Deposition properties of bacterial populations[J]. *Quaternary Sciences*, 2006, **26**(2): 185–191. [向述荣, 姚檀栋, 邬光剑, 等. 慕士塔格冰芯记录的细菌菌群的沉积特征[J]. *第四纪研究*, 2006, **26**(2): 185–191.]
- [19] Miteva V I. Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology [M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2008: 31–35.
- [20] Bano N, Hollibaugh J T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(2): 505–518.
- [21] Bosshard P P, Santini Y, Grütter D *et al.* Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rRNA gene analysis [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **31**(2): 173–182.
- [22] Liu Y Q, Yao T D, Jiao N Z, *et al.* Bacterial diversity in the snow over Tibetan Plateau Glaciers [J]. *Extremophile*, 2009, **13**(3): 411–423.
- [23] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(2): 316–322.
- [24] Benjamin S B, Erin B F, Gargi D, *et al.* Extraction of high molecular weight DNA from microbial mats [J]. *Biotechniques*, 2010, **49**: 631–640.
- [25] Whitaker R J, Grogan D W, Taylor J W. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic Archaea[J]. *Science*, 2003, **301**(5635): 976–978.
- [26] Manchester K L. Value of A260A280 ratios for measurement of purity of nucleicacids[J]. *Biotechniques*, 1995, **19**(2): 208–210.
- [27] Small D S, Klusaritz B, Muller P. Evaluation of Bacillus Anthracis Contamination inside the Bretwood Mail Processing and Distribution Center—District of Columbia, October 2001[R]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2001, **50**(50): 1129–1133.
- [28] Moré M I, Herrick J B, Silva M C, *et al.* Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**(5): 1572–1580.
- [29] Leff L G, Dana J R, McArthur J V, *et al.* Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(3): 141–143.
- [30] Nathalie F, Danielle B, Kenneth L, *et al.* Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic sediments [J]. *Microbiological Methods*, 2004, **56**(2): 181–183.
- [31] Lee S Y, Bollinger J, Bezdicek D, *et al.* Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(10): 3787–3793.
- [32] Shang Tiancui. Extraction method of glacier microorganism total DNA [J]. *Journal of Yili Normal University (Natural Science Edition)*, 2009(1): 38–41. [尚天翠. 一种冰川微生物总 DNA 的提取方法[J]. *伊犁师范学院学报(自然科学版)*, 2009(1): 38–41.]
- [33] Zhang Shuhong, Hou Shugui, Qin Xiang, *et al.* Relation between bacteria in glacial snow with climate and environment in the Tibetan Plateau [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2007, **20**(5): 39–44. [张淑红, 侯书贵, 秦翔, 等. 青藏高原冰川雪细菌与气候环境的关系[J]. *环境科学研究*, 2007, **20**(5): 39–44.]
- [34] Xie Jun, Wang Ninglian, Pu Jianchen, *et al.* Study of the bacterial diversity recovered from glacial snow of the northern Tibetan Plateau [J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2009, **31**(2): 342–349. [谢君, 王宁练, 蒲健辰, 等. 青藏高原北部冰川雪中细菌多样性的研究[J]. *冰川冻土*, 2009, **31**(2): 342–349.]
- [35] Ge Junyi. *The Statistical Methods for Experiments*[M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2000: 46. [盖钧镒. *试验统计方法*[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 46.]

Comparison of Methods for Total DNA Extraction of Microorganisms in Glacier Surface Snow

YAN Pei-ying¹, HOU Shu-gui^{1, 2}, CHEN Tuo¹, ZHANG Shu-hong³, SUN Wei-jun¹

(1. *State Key Laboratory of Cryospheric Sciences, Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou Gansu 730000, China*; 2. *School of Geographic and Oceanographic Sciences, Nanjing University, Nanjing Jiangsu 210093, China*; 3. *Department of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu Henan 476000, China*)

Abstract: A better method was screened out through comparison of the four methods for total DNA extraction of microorganisms with different lysis. The method screened out was used to optimize the experiments of treating filter membrane, DNA extraction and precipitation. Finally, the optimized method was compared with commercial kit for total DNA extraction of microorganisms. The results showed that the commercial kit was fit for

total DNA extraction of microorganisms in surface snow on glacier, and another method with cutting the filter membrane into pieces, lysis (lysozyme ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) + proteaseK ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) + CTAB (1%) + SDS (1%)), extraction once by chloroform-isoamylalcohol (24 : 1) and DNA precipitation by ethanol, was an effective and low-cost method for total DNA extraction of microorganisms in surface snow on glacier.

Key words: glacier surface snow; total DNA extraction of microorganisms; optimizing method