

超高速密度梯度离心获得不同浮力密度 DNA

简要流程

一、制备离心液：

1. 提取通过 DNA-SIP 培养中各个处理的土壤总 DNA；
2. 测定土壤总 DNA 含量：NanoDrop 测定样品的 DNA 浓度，每个样品测 3 次取平均值；
3. 采用 GB 缓冲液将 3.0-5.0 μg 的土壤总 DNA 定容到 100 μl （总 DNA+GB=100 μl ）；
4. 在 50 ml 的离心管中，依次加入：
4.9 ml CsCl（1.85 g/ml），0.9 ml GB，100 μl GB（含土壤 DNA）；
5. 涡旋振荡将离心液混合均匀；
6. 采用折光仪测定折光率，超高速离心溶液理想的折光率 nD-TC 是 1.4029 ± 0.0002 ，这一折光率对应的浮力密度为 1.725 g/ml，如 nD-TC 偏大，添加 GB（20 μl 约为一个添加单位）；如 nD-TC 偏小，添加 CsCl（20 μl 约为一个添加单位）；（此步骤需要缓慢调节）

二、热封离心管

1. 检查离心管身有否裂纹，采用 10 ml 注射器将 5.3 ml 的超高速离心混合液转移到离心管中，加至离心管的颈口处（肩部上 1mm/管颈中间横线下 2mm），赶走管壁上的气泡，保证颈部以上处干燥无液滴；
2. 将离心试管称重配平，对称管要精确至 ± 0.01 g，如有必要，可加入对应 50ml 离心管中剩余的离心液配平；
3. 在离心管口上套上热封管帽，使用封管器，将加热头垂直放在热封管帽上，轻轻用力，垂直下压，等待热封管帽下沿下降至热封管肩部，迅速移开封管器并套上降温棒给管帽降温；
4. 降温散热 10 秒后，即可取下热封管帽，轻捏离心管，检测并确认没有漏液；

三、超高速离心

1. 确认离心机转子内部干燥和离心管外壁干燥；
2. 将配平后的离心管放入转子离心管腔，自由下落并确认到达底部；
3. 先后放入内盖和拧上外盖，用板钳旋紧外盖至扭力达到 120，再将转子置于离心机内；
4. 用 Beckman 垂直离心转子 Vti65.2。基本参数是：44 小时，20°C，速度 45 krpm（190000 \times g），Accel: 9；Decel: no break；

四、分层收集样品

手动收集：

1. 缓慢取出转子，用板钳旋松外盖，先后取下外盖和内盖，缓慢取出离心管，放置于稳固的离心管架上（管架上的孔位直径应刚好放下离心管，以避免离心管晃动）；
2. 注射器（50ml 或 100ml）吸取置换液（无菌超纯水），将注射器安置于恒流泵上，通过一软管连接注射器和针头，启动恒流泵将置换液推至针头，待用；
3. 离心管上打孔。按住离心管，在离心管上部（肩部两条线交汇点）插入针头（针头斜面朝上）；
4. 离心管下打孔。将离心放置于一较高位置，用针头在离心底部扎一小孔；
5. 收集离心液。启动恒流泵，向离心管上部注入置换液，从底部收集 15 个等体积的分层样品；

[通常设定 0.340ml min⁻¹，每层接 1min。正式收集之前，首先要用热封好的含有氯化铯溶液（ 1.4029 ± 0.0002 nD-TC）的离心管验证实际流速与设定的能否匹配]。

6. 测定折光率。启动折光仪，测定 15 管收集液的折光率，通过密度公式计算各管收集液的浮力密度。（浮力密度 = $-75.9318 + 99.2031x - 31.2551x^2$ ，表示浮力密度，x 表示折光值）
自动收集：（取代上述收到收集的 3-5 步）

1. 缓慢将离心管放在打孔器上，启动转头，完成离心管底部打孔；
2. 缓慢将打完下孔的离心管放入自动收集器上，启动运行，完成离心液的分层收集。
(设置每管收集时间 46 秒，每个样品收集 15 管，每管收集体积 320-360 μ l)

注意事项：

1. 离心结束之后，从取出转子开始，所有动作均需缓慢匀速，以保证离心管无振动、无倾斜，直至离心液逐层取出。
2. 通常情况下，同一实验室内，该公式每半年需重新校正浮力密度计算公式。基本思路是：设置不同浮力密度的氯化铯溶液并测定其折光率，得出经验公式，具体方法参考《土壤微生物研究原理与应用》(林先贵研究员主编，高等教育社 2010 年出版)。
3. 不能使用乙醇进行洗擦折光仪。
4. 参考：19 号和 23 号针头；10 ml 和 20 ml 注射器；硅胶管 3 mm 直径，1.5 mm 壁厚。

五、纯化 DNA

1. 每管收集液中加入 550 μ l 的 PEG6000 溶液，上下倒置若干次混匀溶液，室温静置 2h 或者 37 $^{\circ}$ C 温浴 1h，沉淀 DNA；
2. 在 15-20 $^{\circ}$ C 下 13000 \times g 高速离心 30 min，除去上清液；
3. 加入 500 μ l 70%乙醇清洗 DNA 沉淀，离心 10 min，除去上清液；
4. 重复步骤 3 (进一步去除氯化铯，同时去除 PEG)；
5. 于室温干燥沉淀 DNA 大约 30 min；
6. 确保 DNA 沉淀中无液体存在后，将其溶于 30 μ l TE 缓冲液，零下 20 摄氏度保存。

六、标记 DNA 鉴定

方法一、DNA 浓度分析。

NanoDrop 测定不同浮力密度 DNA 的浓度。与 12C-CH₄ 对照处理的重浮力密度 DNA 相比，13C-CH₄ 标记处理样品的重浮力密度 DNA 数量通常较高，然而，这一指标通常很难作为 DNA-SIP 成功的主要标准。

方法二、常规 PCR 和实时荧光定量 PCR 分析。

13C-CH₄ 标记处理土壤中甲烷氧化微生物 DNA 为 13C 所标记，超高速离心后 13C-DNA 将在试管下部重浮力密度梯度区带中相对富集，利用甲烷氧化细菌特异的 pmoA 功能基因引物，定性 (常规 PCR) 或者定量 (实时荧光 PCR) 分析 pmoA 基因在不同浮力密度 DNA 中的数量变化规律，并与 12C-CH₄ 对照处理相比，根据 pmoA 功能基因在不同浮力密度梯度区带中的位移，即可准确判定 13C-DNA 在不同浮力密度区带中的位置及其富集程度。

方法三、高通量测序分析 (目前最准确的方法)。

通过 454 高通量测序技术，检测各层中微生物 16S rRNA 基因组成，分析目标标记微生物占该层总微生物的比列。如果标记成功，目标微生物占每层总微生物的比值会随着浮力密度的增加而显著增加。

前期准备工作

一、试剂配制

1. **Tris-HCl** (1.0M, pH=8.0) (可购买成品)
制备方法: 溶解 121.1 g Tris base 于 800 mL 去离子水, 盐酸调节 pH 至 8.0, 去离子水定容为 1000 mL;
2. **EDTA** (0.5M)(可购买成品液体)
3. **TE 缓冲液** (Tris-EDTA) (可购买成品液体)
[10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA (pH8.0)]
制备方法: 5 ml Tris-HCl (1 M), 1.0ml EDTA (0.5M) 加入 400 ml 去离子水中, 定容至 500 ml, 并灭菌, 使用时需用 0.2 μ m filter 过滤;
4. **GB 缓冲液** (Gradient Buffer), [0.1M Tris-HCl(pH=8.0), 0.1M KCl, 1.0 mM EDTA]
制备方法: 50 ml Tris-HCl (1 M), 3.75 g KCl 和 1.0ml EDTA (0.5M) 加入 400 ml 去离子水中, 定容至 500 ml, 并灭菌, 使用时需用 0.2 μ m filter 过滤;
5. **氯化铯溶液** (室温 20°C下, 密度 1.85 g•ml⁻¹, 折光率 1.4153±0.0002 nD-T)
制备方法: 溶解 50 g CsCl 于 30 ml GB 缓冲液。
(该方法配置的最终体积大于 30ml, 30°C可促进氯化铯溶解),
6. **PEG6000 溶液** (Polyethylene Glycol 6000) (30%)
制备方法: 去离子水溶解 150 g PEG 6000 和 46.8 g NaCl, 并定容于 500 ml, 并灭菌, 使用时需用 0.2 μ m filter 过滤; (PEG 较难溶解, 配时可超声或水浴加热, 不超过 50°C)
7. **70%乙醇** 制备方法: 加入 370 ml 95%乙醇于 130 ml 去离子水;

二、分层收集用的无菌材料:

1. 无菌 50ml 离心管, 数量=样品数+3 (氯化铯、GB、TE); (混合离心液用)
2. 无菌 5ml 注射器, 数量=样品数, 取完样品应留在 50ml 离心管中 (配平是可能用到) ;
3. 无菌 1.5ml 离心管 3 个饭盒约 400 只; (收集分层液用)
4. 无菌枪头 5ml-1 盒, 1ml-1 盒, 200ul-4 盒; (测定折光率用)
5. 无菌 200ml 烧杯 1 个+玻璃棒 1 个 (配置氯化铯用);
6. 无菌 200ml 试剂瓶 1 个 (分装无菌 PEG 用);
7. 无菌无尘吸水纸 (蘸取无菌水洗擦折光仪样品井用);
8. 无菌去离子水 100ml。

三、仪器与设备:

1. 超高速离心机 (贝克曼 L-100XP, 型号 CP80WX)
2. 超高速离心机垂直转子 (贝克曼垂直转子 VTi 65.2)
3. 5.1-ml polyallomer 超高速离心试管 (贝克曼, 5.1ml 快封管 REF. 342412)
4. 超高速离心试管热封器 (7720) (可用国产替代)
5. 注射泵, (美国 NE-1000) (可用国产替代)
6. 折射仪,(ATAGO PR-RI)
7. 台式高速离心机,
8. 微量分光光度计,

(沈阳应用生态研究所分子生物学实验室)