

定量评估抑制因子去除技术对粗提DNA及环境样品腐植酸的去除效果

H. A. Callahan, S. J. Kennedy, M. N. Brolaski
MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA 92010

简介

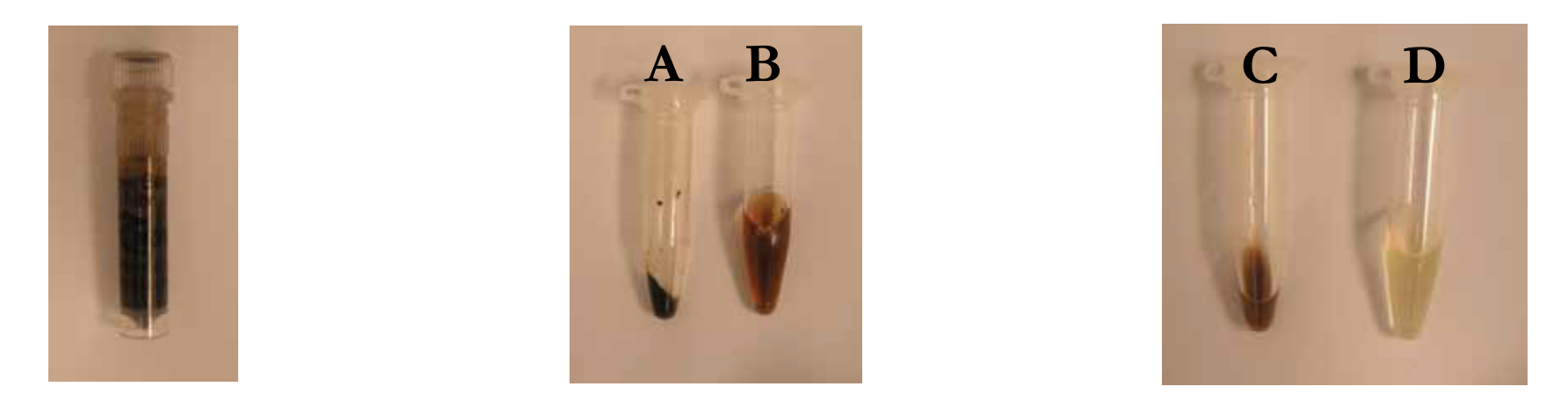
腐殖质 (HSs) 是植物、微生物残体分解转化而成的一类有机高分子化合物。HSs是土壤、沉积物和生物薄膜的主要组成成分。也是水样中主要的不可溶有机物。核酸提取过程若未能去除这些抑制因子将降低得率，抑制下游PCR等应用。抑制因子去除技术 (Inhibitor Removal Technology®) 是一项高效去除多酚、多糖、腐植酸等腐殖质成分的专利技术。在此，我们通过演示使用含/不含IRT技术的DNA、RNA提取试剂盒提取各种环境样品，对提取效果进行定量比较，证明IRT在核酸提取过程中的重要性。

材料及方法

抑制因子去除技术Inhibitor Removal Technology® (IRT) :

IRT由两个缓冲液组成。第一个缓冲液溶解DNA并沉淀蛋白，第二个缓冲液吸附沉淀大分子杂质 (如多糖、多酚)，并把他们与核酸分离 (图1)。

图1. 抑制因子去除技术 (IRT) 流程图: 1号缓冲液加入到经过研磨的样品中，孵育后离心，蛋白杂质 (A) 沉淀下来。2号缓冲液加入到上清液 (B) 中，孵育后离心，大分子杂质 (C) 沉淀下来，得到清亮的上清液 (D)。上清液已准备好进行核酸绑定吸附。



研磨后的样品 → 去除蛋白质 (1号缓冲液) → 去除腐植酸 (2号缓冲液)

评估抑制因子去除技术 (Inhibitor Removal Technology®) 效果:

1.2µg大肠杆菌DNA加入腐植酸 (Sigma-Aldrich)，用无菌水做系列倍比稀释。使用含IRT技术的PowerClean® DNA Clean-Up (MO BIO Laboratories) 按照说明书去除样品中的腐植酸。腐植酸的含量通过Nano-drop® (Thermo Scientific) 检测A320的值获得。所有样品 (1µl) 用Kapa2G Fast HotStart Readymix (MOBIO Laboratories) 和链霉菌属16S rRNA通用引物进行end-point PCR扩增。

竞争品牌比较: 分别使用PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) 和不含抑制因子去除技术的竞争品牌的试剂盒提取0.1g堆肥。如上文描述进行PCR。

抑制因子去除技术 (Inhibitor Removal Technology®) 的使用: Elliot Bay, Seattle, WA: 用0.45µm孔径混合纤维素滤膜过滤两份50ml水样。分别用PowerWater®和RapidWater® DNA提取试剂盒提取，后者没有使用IRT技术。用Kapa SYBR Fast qPCR Kit (MO BIO Laboratories)和16S rRNA通用引物对提取的DNA进行Q-PCR，评估DNA质量。另用纯粪球菌DNA及其系列倍比稀释液制作标准曲线。扩增反应及结果分析在StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)上进行。

Buena Vista Lagoon, Carlsbad, CA: 按照PowerBiofilm™ RNA Isolation Kit说明书操作提取两份0.15g岩石表面生物薄膜RNA。第一份使用标准量IRT 1号缓冲液和100µl IRT 2号缓冲液，第二份使用相同量1号缓冲液和200µl 2号缓冲液。最终RNA先反转录，再后如上文描述做end-point PCR。稍作修改PowerClean® DNA Clean-UP Kit的说明书，对RNA样品做进一步纯化。

结果

评估抑制因子去除技术 (Inhibitor Removal Technology®) 效果:

无论添加的腐植酸浓度多高，IRT技术都能将其降低至未添加腐植酸对照水平 (图2A)。已去除腐植酸的样品都能获得预期的扩增产物，而未处理的样品须把腐植酸抑制物稀释至7.5ng (0.75ng/µl)才能有结果 (图2B)。

图2A- 未经处理的大肠杆菌DNA (红色)、经IRT处理的大肠杆菌DNA (绿色)，腐植酸系列倍比稀释水溶液 (蓝色) 各自在320nm处的吸光值。

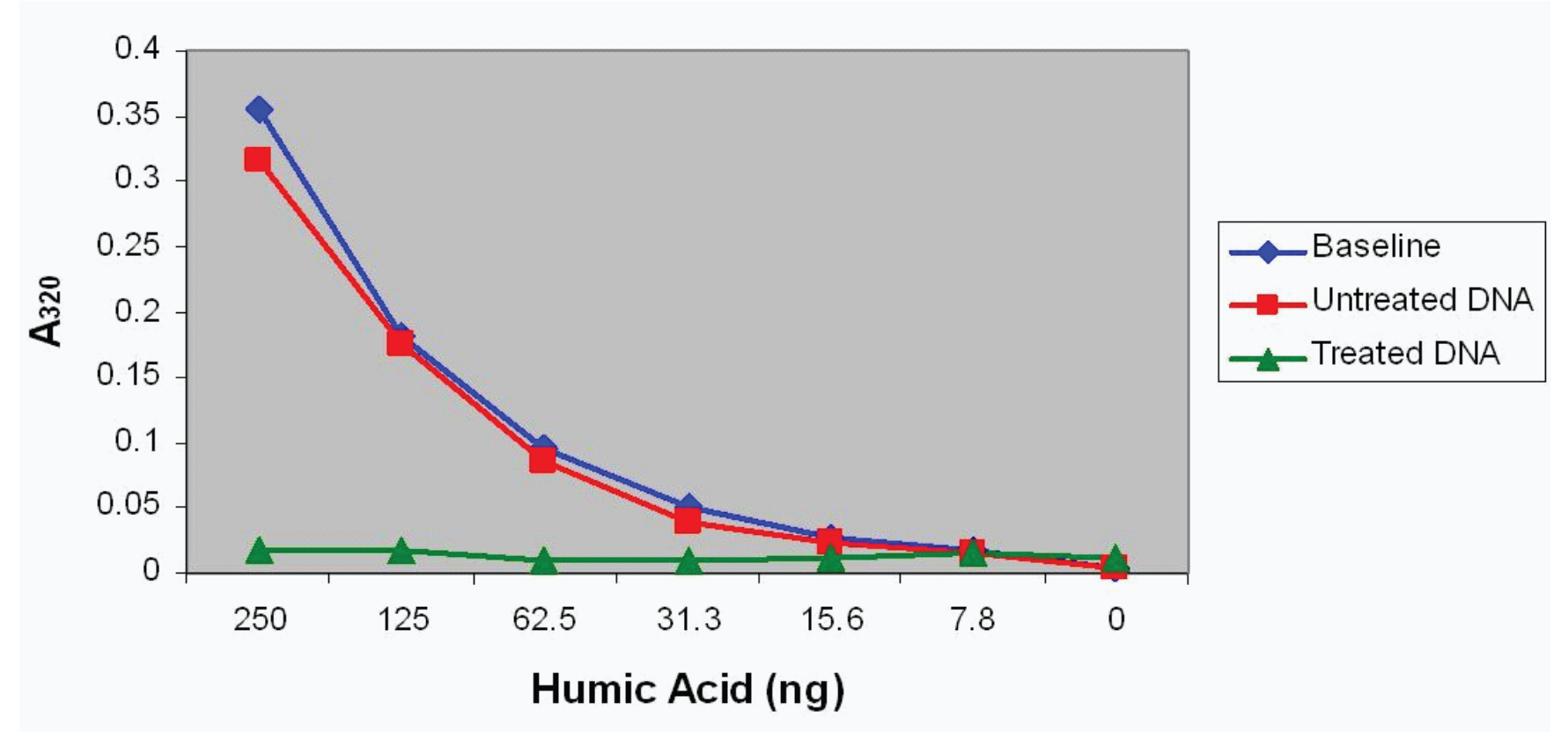
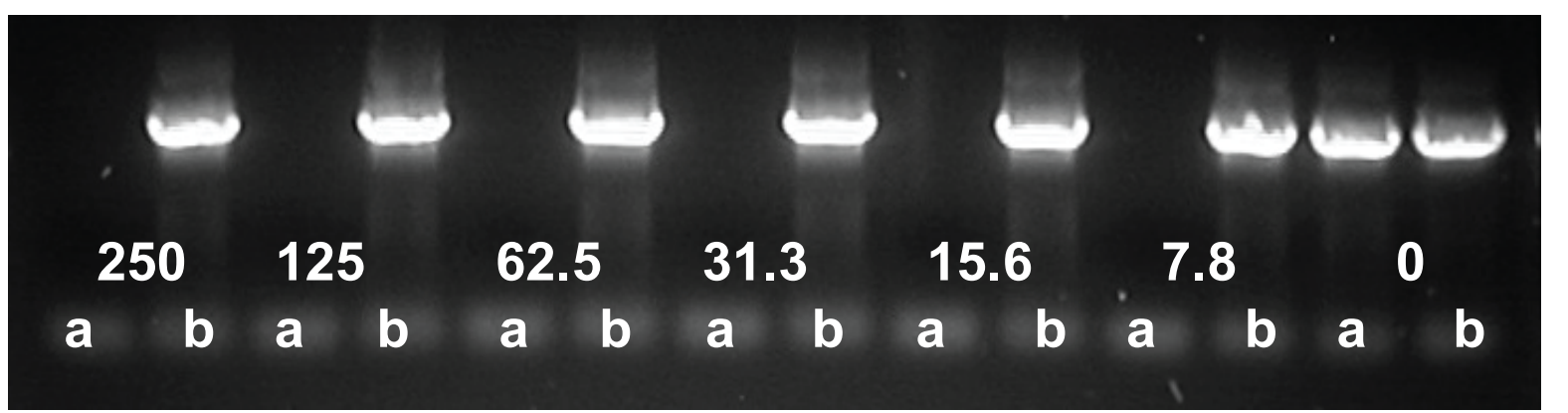


图2B- 未经处理 (a) 和经过IRT处理 (b) 的大肠杆菌DNA PCR结果。PCR产物大小为1.2kb。



与竞争品牌试剂盒对比: 竞争品牌试剂盒 (C) 因DNA/RNA降解 (图3A)，表面看来获得比PowerSoil® Kit (P) 高一倍得率。但其A260/230值偏低，A340值偏高表明含有抑制因子 (图3B)。PCR扩增进一步验证存在抑制 (图3C)。

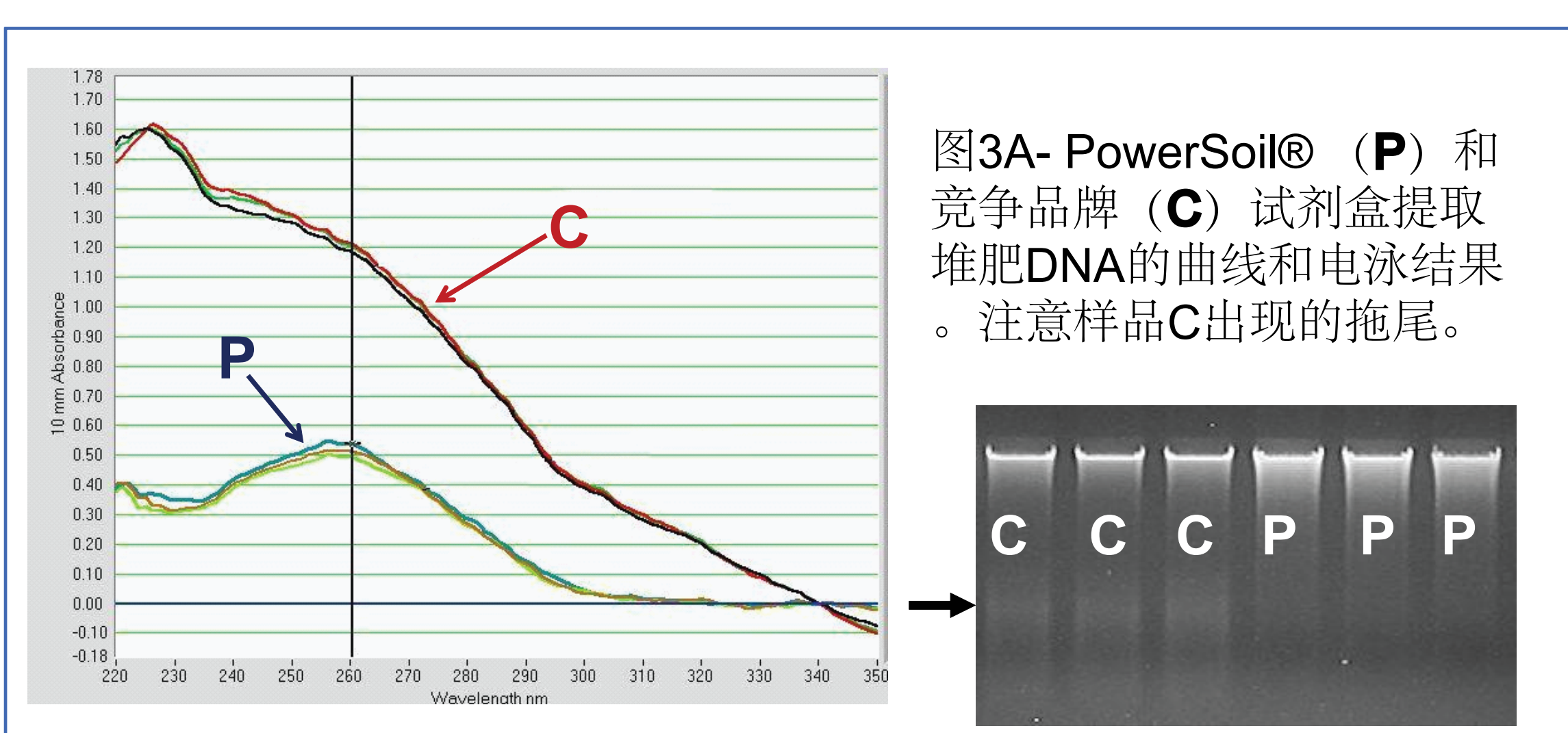
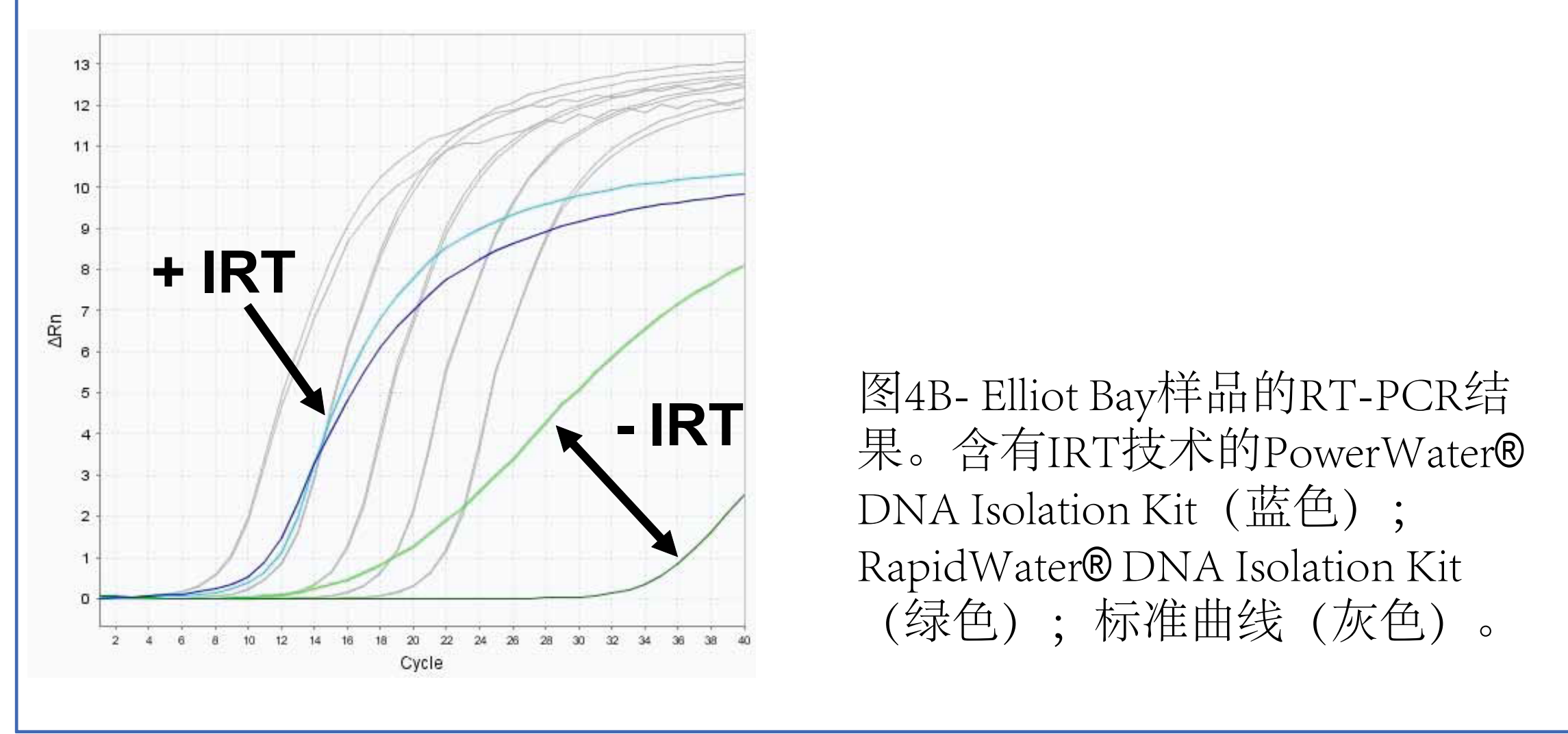
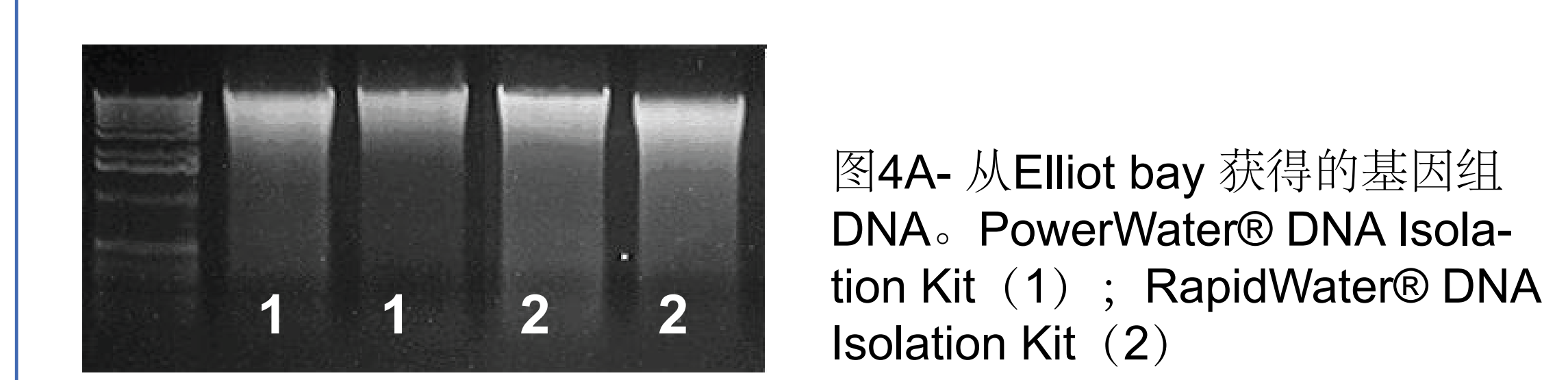


图3B- PowerSoil® (P) 和竞争品牌 (C) 试剂盒提取的堆肥DNA吸光值。

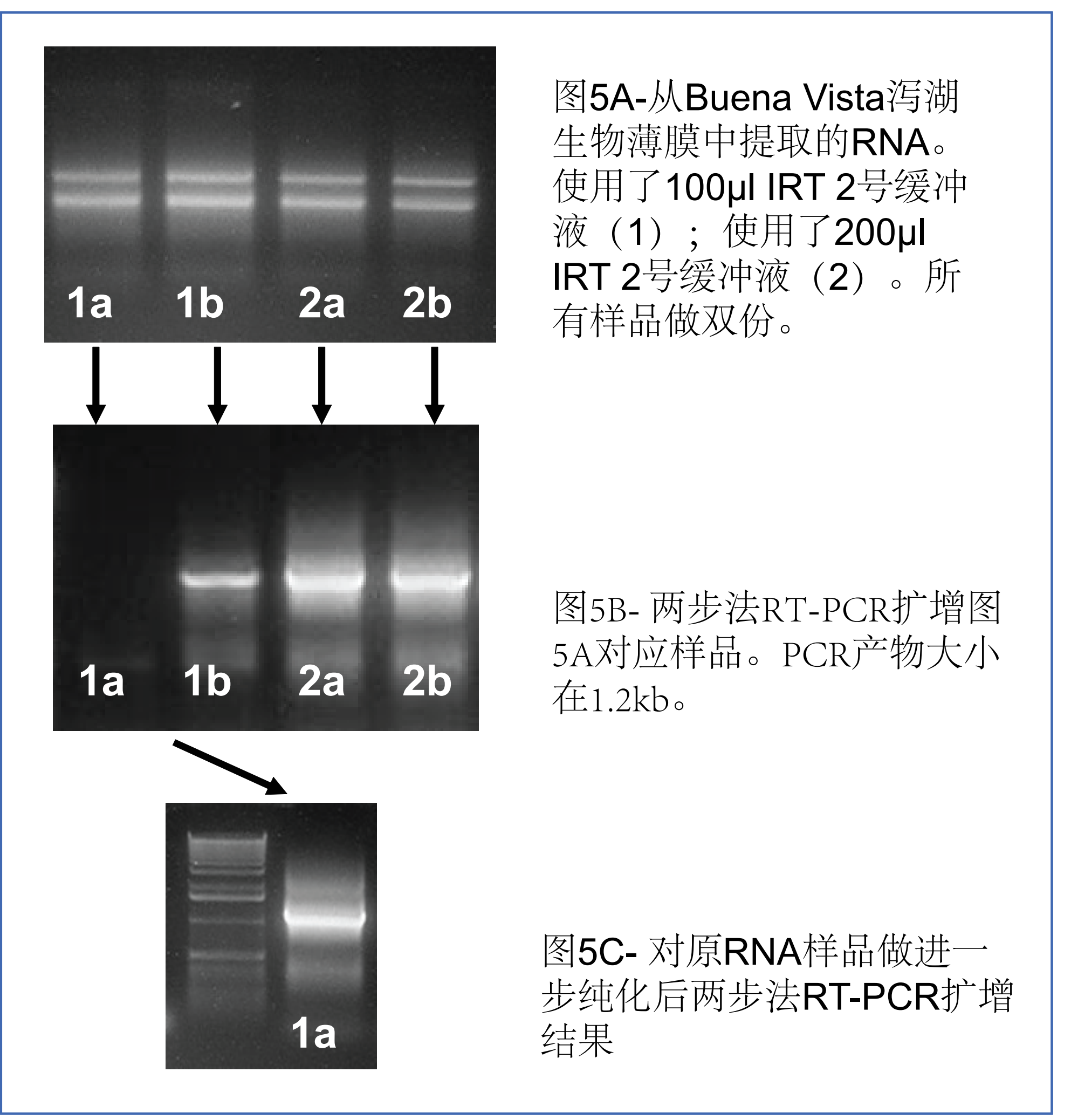
	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
C	59.38	1.188	0.807	1.47	0.78	50.00	230	1.527	0.696
C	60.71	1.214	0.818	1.48	0.78	50.00	230	1.565	0.652
C	60.30	1.206	0.828	1.46	0.78	50.00	230	1.539	0.768
P	25.58	0.512	0.268	1.91	1.63	50.00	230	0.314	0.056
P	24.60	0.492	0.262	1.88	1.60	50.00	230	0.308	0.043
P	26.97	0.539	0.287	1.88	1.55	50.00	230	0.349	0.052



Buena Bay水样: 分别PowerWater® 与RapidWater® 提取DNA (图4A)，当使用了IRT时，Cq值更低更稳定 (图4B)。



Buena Vista Lagoon生物薄膜: 与使用100µl 2号IRT缓冲液相比，使用200µl 2号IRT缓冲液的RNA得率略少 (图5A)，但PCR扩增结果的稳定性确较高 (图5B)。对PowerClean® DNA Clean-up kit protocol说明书稍作修改，用于样品1a，抑制因子得以去除，最终获得PCR扩增产物 (图5C)。



结论

环境样品中大量的HSs对DNA/RNA的提取和分析都造成极大影响。无论何种样品类型，双溶液组成的IRT都能轻松结合到核酸提取的操作步骤中。

IRT能完全去除腐植酸 (无论含量有多高)，恢复聚合酶对DNA的扩增能力。提取堆肥样品必须使用IRT去除抑制因子。经过IRT处理的DNA qPCR扩增结果更稳定，灵敏度更高。生物薄膜之类富含抑制因子的样品需要更多的IRT来保证PCR扩增的成功率。

鸣谢

特别感谢V.Moroney (MO BIO Laboratories) 提供堆肥方面相关数据。