

沙吸附 DNA 的分布及转化活性

欧剑虹,倪丽娜,叶学成,黄永胜,谢志雄*,陈向东,沈 萍

(武汉大学生命科学学院,武汉 430072)

摘要: 尽管自然环境中存在着大量的 DNase,大分子体外 DNA 在土等生态环境中存在并保持转化活性。实验表明 DNA 被沙土吸附之后会被沙土保护而产生对 DNase 的抗性。然而对沙中 DNA 的检测多是通过 PCR 或者探针杂交的方法来进行,采用转化方法进行来检测的却鲜有报道。为了研究 DNA 释放进沙之后的分布及转化活性,建立了流式微型离心沙柱。将 20 μ L pUC18 置于 1.0g 直径介于 1.2~2.5mm 之间的沙中,1.5mL 0.1mol/L CaCl₂ 洗脱之后再用 200 μ L TEN 缓冲液提取。结果表明吸附于沙中的 DNA 经提取后仍然具有生物转化活性,并且与洗脱液、提取液具有不同的转化活性和对 DNase I 抗性,说明 DNA 与沙粒的结合不只是一种简单的附着,而是 3 种复杂的复合体结构。相对于没有沙保护而只能在室温下保留 7d 转化活性的 DNA,在被沙吸附保护之后的 DNA 可以保存转化活性达 35d 以上。研究结果还表明在存在感受态细胞的情况下,生物释放出来的 DNA 并非直接与沙粒结合,而是优先与感受态细胞结合。推测认为沙吸附 DNA 的转化活性同 DNA 的构象及同感受态细胞接触的机会相关,而与 DNA 的浓度不直接相关。这些结果为研究环境中存在的 DNA 库及其与混居的微生物间的相互作用,水平基因转移及其生态效应提供了有价值的信息。

关键词: 沙;DNA;转化;水平基因转移

文献标识码:A 文章编号:1000-0933(2005)08-2019-06 中图分类号:Q933 文献标识码:A

The distribution and transforming ability of sand-absorbed DNA

OU Jian-Hong, NI Li-Na, YE Xue-Cheng, HUANG Yong-Sheng, XIE Zhi-Xiong*, CHEN Xiang-Dong, SHEN Ping (College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(8): 2019~2024.

Abstract: In spite of the presence of ubiquitous DNase in the environment, high-molecular-weight extracellular DNA molecules can survive in natural habitats such as soil and maintain the transforming ability. It has been evidenced that DNA molecules, once being absorbed in sand, can be protected from DNase degradation. However, the mechanism of DNA-sand interaction and its effect on transforming ability remain unclear. In the present study, we developed a flow-through system of sand-filled micro Bio-Spin columns to determine the distribution of extracellular DNA in sand and employed *E. coli* transformation method to directly monitor its transforming ability. 20 μ L of free plasmid pUC18 DNA was introduced into 1.0 g sand (1.2mm < diameter < 2.5mm), eluted by 1.5 mL of 0.1 mol/L CaCl₂ and extracted by 200 μ L of TEN buffer. The transforming ability and stability of the plasmid DNA in the eluate, extract and sand were examined with three different transformation protocols. The results indicated that the DNA transforming ability and accessibility to DNase I in eluate, extract and sand were different, suggesting at least three types of DNA-sand complexes. Moreover, the transforming ability of adsorbed DNA in sand was detected over a period of 35 days, whereas the activity of free plasmid without protection of sand only maintained for 7 days. In the presence of competent cells, the DNA molecules, released from other organisms, were uptaken by the competent cells instead of being absorbed by sand. This result suggested that the transforming ability of sand adsorbed-DNA was affected by the conformation of DNA molecules and the accessibility to competent cells, but not the DNA concentration. Our data showed that there were at least three forms of DNA in the environment, which might make different contributions to the dynamic

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20207005, 30070408 和 30070010)

收稿日期:2004-03-12;修订日期:2004-06-28

作者简介:欧剑虹(1979~),男,广东人,硕士生,主要从事微生物遗传学研究。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: whubmg@whu.edu.cn or hsiech@263.net

Foundation item: The National Natural Science Foundation of China (No. 20207005, 30070408 & 30070010)

Received date: 2003-03-12; Accepted date: 2004-06-28

Biography: OU Jian-Hong, Master candidate, mainly engaged in microbial genetics.

change of extracellular DNA pool.

Key words: sand; DNA; transformation; horizontal gene transfer (HGT)

许多细菌具有从环境中摄取 DNA 改变自身遗传结构的能力^[1~4]。这种遗传物质在不同的生物个体之间交流的现象被称为水平基因转移(Horizontal Gene Transfer, HGT)^[5]。细菌的水平基因转移机制主要有转化、接合和转导 3 种方式^[6]。转化一般是指某一基因型的细菌从周围介质中摄取来自另一基因型细菌的游离(free)DNA 而使受体的基因型和表型发生相应变化的现象^[7]。转化的发生有两个必要条件:一是遗传物质的存在,二是感受态细胞的形成^[8]。自 1928 年在 *Streptococcus pneumoniae* 中首次发现自然遗传转化现象以来,发现越来越多的细菌可以建立自然感受态^[7,9]。尽管环境中存在大量的 DNase,但越来越多的实验证明环境中存在大量的来自于死亡细胞释放或特定生理状态下细胞分泌的遗传物质^[10]。环境中大量存在的遗传物质的命运逐步引起人们的关注。Lorenz 等以化学纯净的海沙为研究对象,研究 DNA 在沙土中的命运,结果表明这些遗传物质由于受到沙土的保护作用而大量存留在沙土中可达 60d 以上^[10]。然而,这些研究多采用先提取再用 PCR 或探针检测,却少见采用转化方法研究沙环境中 DNA 的转化活性的报道,而且沙环境中遗传物质的检测工作多集中在 DNA 提取液上,却忽视了经提取之后沙土中残留的遗传物质转移能力的研究。

本研究以沙为研究对象,对 DNA 在进入沙之后,沙对 DNA 的吸附机制及 DNA 转化活性进行研究,为研究环境中存在的 DNA 库及与其混居的微生物间的相互作用、水平基因转移及其生态效应提供有价值的信息。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和培养基

菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*)TG-1 和携带质粒 pUC18 的 *E. coli* TG-1,本室保存。

质粒 pUC18,依照《分子克隆》SDS 碱裂解法大量制备^[11]。

培养基 Luria broth(LB)培养基(% ,wt/vol) 蛋白胨 1,酵母抽提物 0.5, NaCl 0.5, pH7.2~7.4。

选择平板(g/100mL) LB 培养基中加入琼脂粉 1.5,灭菌后加入氨苄青霉素至终浓度 100 μ g/mL。

半固体 LB 培养基(g/100mL) LB 培养基中加入琼脂粉 0.6,灭菌后加入氨苄青霉素至终浓度 100 μ g/mL。

1.2 实验器材及溶液

1.2.1 器材 1.2mL 微型离心柱,海门市三和建华玻塑仪器厂。

1.2.2 DNA 提取缓冲液 TENP 缓冲液^[12]: 50mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 200mmol/L EDTA (pH 8.0), 100mmol NaCl, 1g/100mL polyvinylpolypyrrolidone (PVPP);

PTENCS 缓冲液^[13]: 100mmol/L sodium phosphate (pH 7.0), 100mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 100mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.5mol/L NaCl, 1g/100mL hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), 2g/100mL SDS;

TEN 缓冲液: 100mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1mmol/L EDTA (pH 8.0), 100mmol/L NaCl;

Crombach 缓冲液 (Cr. b)^[14]: 33mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH 8.0;

NNEP 缓冲液^[15]: 100mmol/L NaAc (pH 5.5), 500mmol/L NaCl, 50mmol/L EDTA (pH 8.0), 2g/100mL PVPP;

NNESP 缓冲液^[15]: 100mmol/L NaAc (pH 5.5), 1mol/L NaCl, 50mmol/L EDTA (pH 8.0), 1g/100mL SDS, 2g/100mL PVPP。

1.3 实验方法

1.3.1 沙粒的处理方法 沙来自于湖北省武汉市长江江滩。沙经过 80℃ 烘干 2h,除去水份后过筛,保留小于 20 目大于 70 目的沙,按如下步骤净化除杂:加入适量洗衣粉沸水浴 10min,双蒸水洗 3~5 次直至洗液清澈,0.5mol NaOH-NaCl 盐溶液浸泡 30min,双蒸水洗 3~5 次直至 pH 值达到 7.0 后,用 0.5mol HCl 浸泡 30min,双蒸水洗 3~5 次直至 pH 值达到 7.0^[16]。沙经 121℃ 湿热灭菌 20min, -20℃ 保藏备用。使用前沙需在室温下用 10mmol Tris-HCl (pH 7.0)平衡 20min。

1.3.2 沙柱离心系统的建立及 DNA 的吸附 所有的实验都是在无菌环境下通过沙微型离心柱系统完成。1.2mL 微生物离心柱内装入 1.0g 处理过的沙土,1mL 0.1mol CaCl₂ 溶液洗涤两次,滴加含有 20 μ L pUC18 DNA (100ng/ μ L)的 0.1mol CaCl₂ 溶液 200 μ L,室温静置 10min。

1.3.3 吸附 DNA 的洗脱 以每 3 min 滴加 500 μ L 0.1mol/L CaCl₂溶液的速度进行洗涤,每 500 μ L 收集洗液于 1.5mL 无菌离心管内备用。

1.3.4 吸附 DNA 的提取 无菌环境下,滴加 200 μ L 提取液于洗涤过的、吸附有 DNA 的流过式沙土柱系统中,60℃ 水浴 10min。室温下 13,200 r/min 离心 1min,收集离心液。反复提取两次并合并提取液备用^[17]。

1.3.5 洗脱液及提取液中 DNA 的纯化 洗脱液或提取液中加入十分之一倍体积乙酸钠,两倍体积乙醇沉淀 10min,12 000

r/min离心 10min,沉淀干燥后溶于 20 μ L ddH₂O 中,1 μ L 10U RNase 37℃消化 10min,备用^[11]。

1.3.6 感受态细胞的建立及转化

(1)转化所用 DNA 的定义

洗脱液中 DNA 沙柱中吸附的 DNA 经洗脱后,对所洗脱的 DNA 进行纯化所得样品。

提取液中 DNA 沙柱中吸附的 DNA 经提取后,对所提取的 DNA 进行纯化所得样品。

沙中 DNA 沙柱中吸附有 DNA 的沙样品。

(2)感受态的建立及转化方法 洗脱液及提取液中 DNA 转化按《分子克隆》描述的方法用氯化钙法制备和转化感受态 *E. coli* TG1;沙柱中转化,如无特殊描述,*E. coli* TG1 感受态细胞按《分子克隆》描述的氯化钙法制备^[11]。

沙柱转化方法 1 沙中 DNA 经过提取液提取之后,向沙柱系统中加入 200 μ L 感受态细胞,冰浴 30min,42℃静置 3min,迅速冰浴 3min,加入 200 μ L 2 倍 LB 培养基,37℃培育 60~90min,将微型离心柱中所有的沙粒加入 3mL 半固体培养基中,混合均匀,倒入选择平板,37℃过夜培养检测转化子。

沙柱转化方法 2 沙中 DNA 经过洗脱之后未经提取之前,向沙柱系统中加入 200 μ L 感受态细胞,其余同方法 1。

沙柱转化方法 3 (包含沙中感受态细胞的制备方法):以 1%接种量转接过夜活化的大肠杆菌培养物于 50mL LB 培养基中,37℃振荡(250r/min)培养至 OD₆₀₀ 0.4~0.6;取 5mL 菌液,12,000r/min 离心 20~30s 收集菌体,0.1mol/L CaCl₂ 溶液洗涤 1~2 次。在沙柱体系中未加入质粒之前,将 CaCl₂ 洗涤好的细胞用 200 μ L 0.1mol/L CaCl₂ 重悬之后加入到微型离心柱中,冰浴 2~7h。加入 20 μ L 100ng/ μ L 的 pUC18 静置 10min,冰浴 30min,42℃静置 3min,迅速冰浴 3min,加入 200 μ L 2 倍 LB 培养基,37℃温育 60~90min,将微型离心柱中所有的沙粒加入 3mL 半固体培养基中,混合均匀,倒入选择平板,37℃过夜培养检测转化子。

1.3.7 沙粒对 DNA 吸附作用的检测方法 在含有 1.0g 沙粒的微型离心柱中加入 500 μ L pUC18 (100ng/ μ L),按前文所述方法对沙中的 DNA 进行 10 次洗脱后,再经 Cr. b 提取液进行提取,洗脱液和提取液经过纯化后,用电泳检测洗脱液和提取液中 DNA 含量情况,以确定沙粒对 DNA 是否有吸附作用。

1.3.8 沙柱系统中 DNA 分布情况的检测方法 将含有 1.0g 沙粒的微型离心柱中加入 200 μ L 100ng/ μ L 的 pUC18 静置 10min 后只经过洗脱或者经过洗脱及提取。对洗脱液,提取液及沙中 DNA 采用转化方法进行检测。

2 结果

2.1 沙粒对 DNA 的吸附作用

实验结果表明,当沙粒大于 20 目时,表面积比过小,同时由于实验体系较小,不利于实验操作;当沙粒小于 70 目时,电泳结果表明不利于 DNA 的吸附或提取(数据未给出)。因此本实验均采用介于 20 目与 70 目之间的沙粒。

经电泳检测洗脱液及提取液中 DNA,如图 1 所示,前 3 次洗脱液中(洗脱液总体积 1.5mL)可以检测到递次减少的 DNA 信号,从第四次洗脱开始无法检测到有效的 DNA 信号(图 1,1~10 泳道)。

提取液中出现一定量的 DNA(图 1,11 泳道)。

结果表明沙粒对 DNA 具有吸附作用。

2.2 提取液的选择

为了便于实验分析,对已报道的各种不同的 DNA 提取液进行了筛选。微型离心柱中沙所吸附的 DNA 经过洗脱后使用不同提取液对微型离心柱中沙吸附的 DNA 进行提取,将洗脱液及提取液中 DNA 纯化后经电泳(图 2)及转化方法 1(图 3)检测,结果表明 TENP, TEN 及 Cr. b 提取液效果好于其它提取液。以后的实验未加特殊说明提取液均为 TEN 提取液。

2.3 沙柱系统中 DNA 的分布情况

沙柱系统中 DNA 分布情况分析结果表明,洗脱液中有活性的 DNA 含量少于提取液中的,沙中经过洗脱、提取之后仍然残留有一部分具有活性的 DNA;只经过洗脱的沙中会残留有较多量的具有活性的 DNA(图 4a,b)。

2.4 沙中感受态细胞的制备及转化能力

为了模拟沙中存在着感受态细胞的情况下,DNA 从生物中释放出来进入沙中的转化情况,按转化方法 3 在沙中完成细胞感受态的诱导及转化(图 4c),表明感受态制备与转化过程均可在沙中原位完成。同时表明,当沙中存在感受态细胞时,生物释

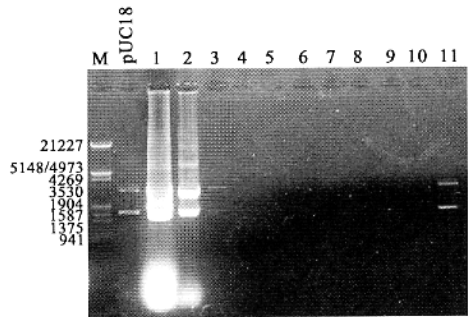


图 1 洗脱液及提取液中 DNA 的凝胶电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of DNA eluted and extracted from sand
M: DNA/*Hind* III/*EcoR* I Markers;1~10;泳道:顺序洗脱液中 DNA;11 泳道:提取液中 DNA
lanes 1~10: DNA in serial eluate; lane 11: extracted DNA

放出来的具有转化活性的 DNA 物质将迅速为感受态细胞摄取并完成转化。

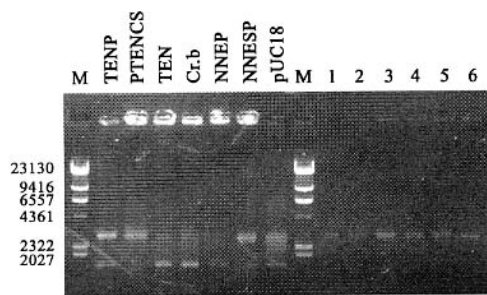


图2 各种提取液提取的 DNA 电泳检测结果

Fig. 2 Effects of different buffers on DNA extraction

M: DNA/*Hind* III Markers; 1~6: 与左对应的各提取液提取前洗脱液中所含 DNA 检测结果,洗脱液中 DNA 含量基本一致,说明各微型离心柱中的初始状态较为一致 relevant DNA series in eluate

2.5 有 DNase I 存在情况下的沙中不同分布的 DNA 转化能力

将含有 1.0g 沙粒的微型离心柱中加入 200 μ L 100ng/ μ L 的 pUC18 静置 10min 后,加入不同浓度存在于 5mmol/L MgCl₂ 10mmol/L Tris-HCl, pH 7.0 反应缓冲液中的 DNase I 溶液, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30min, 60 $^{\circ}$ C 水浴 30min 终止反应。进行洗脱提取,对洗脱液、提取液及经过洗脱提取之后的沙以转化方法 1 进行检测,观察有 DNase I 存在的情况下不同分布 DNA 的转化能力。结果表明,当 DNase I 浓度达到 5ng/ μ L 时,洗脱液中的 DNA 就无法得到转化子;对于提取液中的 DNA,当 DNase I 浓度达到 50ng/ μ L 时无法得到转化子;而在对于残留于沙中的 DNA 而言, DNase I 浓度达到 500ng/ μ L 时仍可以得到少量转化子(图 5)。即沙中的 DNA 对 DNase I 呈现出 3 种不同层次的抗性。

2.6 经提取后沙中 DNA 活性存留时间

吸附于沙中的 DNA 经过洗脱提取之后,在室温下放置不同时间,按转化方法 1 进行转化,检测吸附于沙粒中的 DNA 活性存留时间。结果表明经过洗脱提取之后残留于沙中的 DNA 可以在室温下保持转化活性 35d 以上,而洗脱液中 DNA 活性保留不到 7d(图 6)。

3 讨论

本文对引入沙中的 DNA 分布及转化活性进行了研究,发现经过提取后沙中仍然残留有具生物转化活性的 DNA,这表明 DNA 与沙粒的结合不只是一种简单的附着,而是一个复杂的结合体,这为研究环境中存在的 DNA 库及与其混居的微生物间的相互作用、水平基因转移、生态效应提供了新的信息。

3.1 沙中 DNA 存在形式有 3 种

许多研究表明,“裸露”的 DNA 分子可以吸附结合于沙土上,并受到沙土的保护而产生对 DNase I 降解的抗性,可以在沙土中存留达 60d 之久^[10]。但对 DNA 在沙中的结合状况及分布未见详细报道,只有 Lorenz 等依据沙对 DNA 吸附保护的能力在加入不同浓度离子时会不同,认为沙与 DNA 之间至少会存在两种不同的复合体结构^[10]。

实验表明在经过洗脱及提取之后,沙中仍大量残留有转化活性的 DNA(图 4),并且洗脱液、提取液及沙中残留 3 种不同状态下的 DNA 对 DNase I 抗性能力的不同,因此认为 DNA 与沙土之间至少还存在着一种复合体结构,即沙中 DNA 依据其与沙的相互作用强弱表型分为 3 种类型:容易洗脱的 DNA、可以提取的 DNA 及沙吸附的 DNA。这 3 种不同存在类型的 DNA 具有

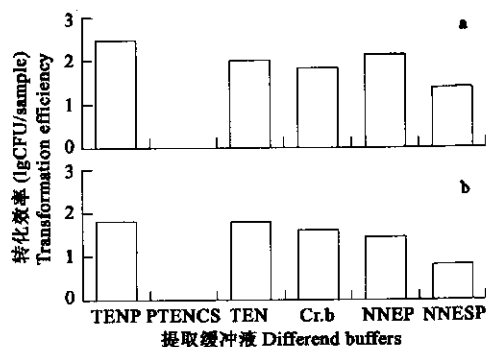


图3 不同提取液提取的 DNA 转化结果

Fig. 3 Transformation of DNA extracted with different buffers (a) DNA extracted directly; (b) 沙柱系统经洗脱后提取液中的 DNA 转化结果 DNA extracted after eluting

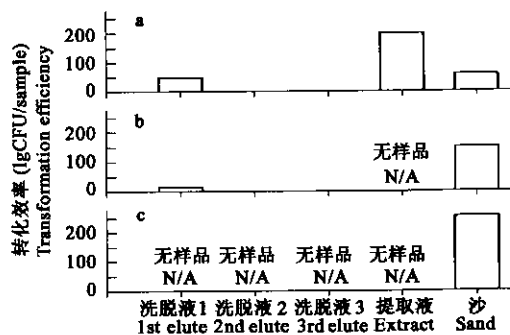


图4 洗脱液、提取液及经洗脱提取后沙土中 DNA 分布转化检测结果

Fig. 4 Transformation of DNA in eluate and extracted from sand 1st, 2nd and 3rd elute; 先后 3 次洗脱液中 DNA 转化结果 DNA in eluate 1st, 2nd and 3rd; Extract; 提取液中 DNA 转化结果 Extract; extracted DNA; Sand; 沙土中 DNA 转化结果 DNA remained in sand; a: 采用转化方法 1 Transformation method 1; b: 采用转化方法 2 Transformation method 2; c: 采用转化方法 3 Transformation method 3

不同的转化活性。由图 4a 中可以看出,可以提取的 DNA 中具转化活性的量最高,容易洗脱的 DNA 及沙吸附的 DNA 具转化活性的量都较少。

由于转化过程对 DNase 是敏感的,所以转化能力的变化可以反应 DNA 受 DNase 的损害程度。有 DNase I 存在情况下的沙土中 DNA 的转化能力试验中,提取液中的 DNA 转化能力较沙土中余留的 DNA 转化能力随 DNase I 浓度的增加下降速率稍快,推测认为 3 种复合体结构有 3 种不同的保护 DNA 免受降解的能力。

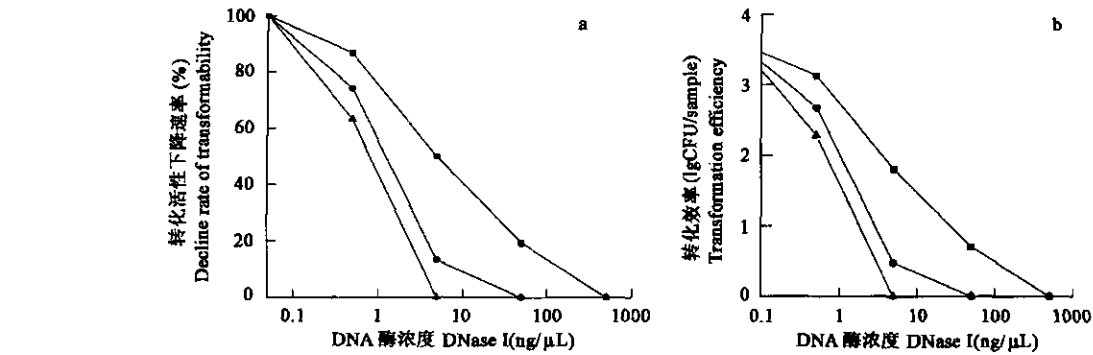


图 5 不同 DNA 对 DNase I 抗性的转化结果

Fig. 5 Effect of DNase I on the transformation of sand-adsorbed DNA

■:经过提取后沙中 DNA DNA remained in sand after eluting;●:提取液中 DNA Extracted DNA;▲:洗脱液中 DNA DNA in eluate

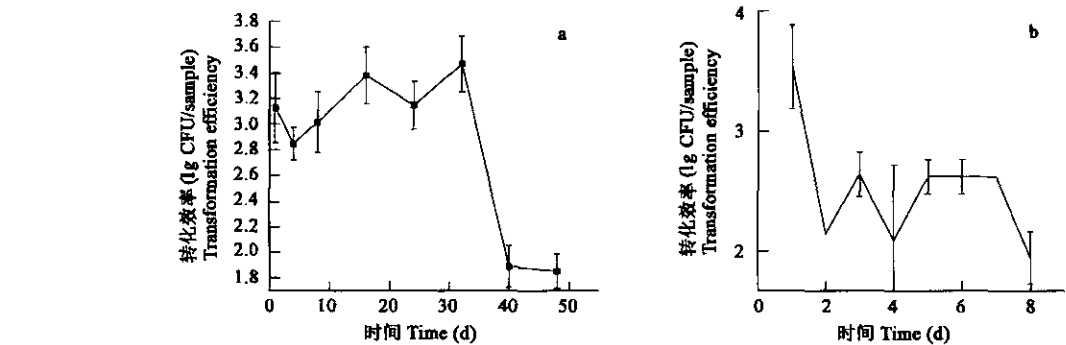


图 6 沙土吸附 DNA 的转化活性存留时间

Fig. 6 Transforming ability change of sand-adsorbed DNA when exposed to RT

a:混合后室温静置的洗脱提取液中 DNA DNA in eluate;b:沙土的 DNA Sand-adsorbed DNA

3. 2 当沙中存在感受态细胞时,生物释放出来的具有转化活性的 DNA 物质将优先与感受态细胞结合

当 DNA 从生物中释放出来进入沙中之后 DNA 是先被沙吸附保护还是先为感受态细胞接受在本实验中得到探讨。经过吸附于沙中的 DNA 不能为提取液提取出来却能为转化实验检测到的事实证明感受态细胞对 DNA 的结合能力强于沙粒,同时也为感受态细胞摄取环境中 DNA 的过程可能是受生理调控的主动过程提供了佐证。按转化方法 3 在沙中完成感受态细胞的制备并转化,模拟了沙中存在着感受态细胞的情况下, DNA 被生物释放后的可能走向(图 4)。结果表明当沙中先存在感受态细胞后加入 DNA 时转化频率与先让 DNA 同沙相结合后再进行转化时各分布的 DNA 的转化频率总和相当,高于任何单一分布 DNA 的转化能力。证明当沙中存在感受态细胞时,生物释放出来的具有转化活性的 DNA 物质将优先与感受态细胞结合。

3. 3 PCR 或探针检测的 DNA 结果不能表示沙中结合的 DNA 的转化活性

有文献报道认为,沙中被吸附的可交换类型的 DNA 才具有转化活性^[18]。沙中 DNA 的转化活性与 DNA 同沙的结合类型无关,除了 DNA 本身的构象对转化活性的影响之外,沙环境中 DNA 与细胞接触的能力也是一个重要的因素。图 2 中 1~6 各洗脱液中 DNA 构象都很一致,多表现为线形,这就揭示了图 4 中洗脱液中 DNA 含量很高转化活性却较低的原因。而提取液中 DNA 超螺旋构象含量较高(图 2 TEN 泳道),所以转化活性也较高。因为沙中的空间位阻效应,部分 DNA 失去了与细胞接触的

能力,也会表现出转化活性下降的现象。而 PCR 及探针等检测手段并不能体现质粒构象及沙表面空间位阻效应的区别,所以也就不能表现出沙中结合的 DNA 的转化活性的不同。

综上所述,自然环境中,生物释放到环境中的 DNA 可以为沙土以较强的作用所吸附而得到保护,抵抗 DNase I 的降解,长时间保持生物活性,并且可能在流水等自然作用下由沙土携带迁移,克服水平基因转移发生的时空障碍,从而影响某一基因在整个流域范围内的生态分布。

References:

[1] Stewart G J, Carlson C A. The biology of natural transformation. *Annu Rev Microbiol*, 1986, **40**:211~235.

[2] Gallori E, Franchi M, Rinaldi L, *et al.* Interspecific Transformation of *Bacillus subtilis* by Clay-Bound DNA in Non-Sterile Soil. *Symbiosis*, 1998, **25**(1-3):311~322.

[3] Nielsen KM, Van Weerelt MDM, Berg TN, *et al.* Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(5):1945~1952.

[4] Finkel S E, Kolter R. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J. Bacteriology*, 2001, **183**:6288~6293.

[5] Ou J H, Ni L N, Shen P, *et al.* Horizontal Gene Transfer. *Heredity*, 2003, **25**(5): 623~627.

[6] Eisen J A. Horizontal gene transfer among microbial genomes: new insights from complete genome analysis. *Curr Opin Genet Dev*, 2000, **10**:606~611.

[7] Shen P. *Microbiology*. Beijing: High Education Press,2000. 220~222.

[8] Lorenz M G, Wackernagel W. Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA. *Arch. Microbiol.*, 1990, **154**(4):380~385.

[9] Dubnau D. DNA uptake in bacteria. *Annu. Rew. Microbiol.*, 1999, **53**:217~244.

[10] Lorenz MG, Wackernagel W. Adsorption of DNA to Sand and Variable Degradation Rates of Adsorbed DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, **53**(12):2948~2952.

[11] Sambrook J,Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 26~99.

[12] Picard C, Ponsonnet C, Paget E, *et al.* Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**:2717~2722.

[13] Hurt RA, Qiu X, Wu L, *et al.* Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(10):4495~4503.

[14] Crombach W H J. DNA base composition of soil arthrobacters and other coryneforms from cheese and sea fish. *Antonie van Leewenhoek J. Microbiol.*, 1972, **38**:105~120.

[15] Liu Z, Chen Y. A rapid DNA isolation method for arid and desert plant materials. *J Desert Res*, 1997, **17**(3):274~279.

[16] Zhao Y. *Biochemistry techniques and applications*, 2nd ed. Wuhan:Wuhan Univ. Press, 2000. 40~112.

[17] Cullen D W, Hirsch P R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, **30**(8/9):983~993.

[18] Demaneche S, Jocteur-monrozier L, Quiquampoix H, *et al.* Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(1):293~299.

参考文献:

[5] 欧剑虹,倪丽娜,沈萍,等. 水平基因转移. *遗传*,2003, **25**(5): 623~627

[7] 沈萍主编,微生物学. 北京:高等教育出版社,2000. 220~222.

[15] 刘志学,陈妍珂,沙漠植物 DNA 快速提取方法. *中国沙漠*, 1997, **17**(3):274~279.

[16] 赵永芳. 生化技术原理(第 2 版). 武汉: 武汉大学出版社, 2000. 40~112.