

专论与综述

PFGE 技术及其在昆虫病原真菌研究中的应用*

时连根

(浙江大学蚕学系 杭州 310029)

关键词: 昆虫病原真菌, 脉冲场凝胶电泳, 染色体 DNA, 基因连锁群, 遗传特性

中图分类号: Q965.8-33 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)03-0212-04

染色体是真核生物遗传物质的载体, 控制着生物体的遗传、变异和发育, 研究染色体的组型和行为对于更好地改造、利用真核生物是至关重要的。昆虫病原真菌在自然界广为分布, 作为害虫生物防治剂、中药材、经济昆虫病原真菌等被利用和研究^[1-3]。然而, 绝大部分昆虫病原真菌属于半知菌类, 缺乏有性生殖世代, 核分裂时观察不到染色体凝缩, 同时由于其染色体很小, 又不具有足够数目的基因标记, 所以难以用核染色和杂交等方法进行核型分析和遗传育种的研究, 也难以用遗传学方法和细胞学方法测定其染色体数目和大小。另一方面, 昆虫病原真菌 DNA 片段范围相对较大, 不能用普通的凝胶电泳、连锁分析、克隆技术等方法完整地分析。以上这些都妨碍了昆虫病原真菌的分子遗传学研究进展。80 年代初期发展起来的脉冲场凝胶电泳(Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)技术是在交变脉冲电场中分离 DNA, 能分离的 DNA 分子量范围较大, 近来被广泛地应用于分离各种真菌染色体 DNA 以进行核型分析和核型多态性研究中, 特别该技术与分子杂交、RAPD 分析、RFLP 分析等分子生物学技术有机地结合, 极大地提高了真菌分子生物学研究的水平, 为昆虫病原真菌的发展开辟了广阔前景, 被推荐为分析研究昆虫病原真菌遗传特性的首选方法^[4,5]。本文就脉冲场凝胶电泳技术的原理、操作及在昆虫病原真菌研究中应用作一简述。

1 脉冲场凝胶电泳的原理

普通凝胶电泳是利用凝胶网孔所起的分子筛效果来达到分离不同长度 DNA 的目的, 其电流仅朝一个方向流动, 当 DNA 片段的大小超出其分子筛网孔大小时就不能分离, 脉冲场凝胶电泳采用 2 个或多个相互不

同方向(直交或 120° 或 180°)交替的电场, 当第一个电场作用于凝胶时, DNA 分子沿着电场方向伸展和迁移, 当第二个电场以不同角度方向替代第一个电场时, DNA 分子改变构型和迁移方向, 沿着第二个电场方向迁移, DNA 分子在凝胶中似蛇行式弯曲蜿蜒地寻找孔隙而移动(图 1a)。DNA 分子用于改变构型和调整泳动方向所需要的时间和能在新电场电流方向泳动的时间与 DNA 分子量大小密切相关, 片段长分子量大的 DNA, 其改变构型和调整泳动方向所需要的时间较长, 从而在新电场方向泳动的时间就较短, 则在凝胶中迁移距离就较近; 相反, 片段短分子量小的 DNA, 其改变构型和调整泳动方向所需要的时间较短, 从而在新电场方向泳动的时间就较长, 则在凝胶中迁移距离就较远, 这样使不同分子量大小的 DNA 片段在脉冲场凝胶电泳中能有效地分离开来。脉冲场凝胶电泳技术的开创者是美国学者 Schwartz 和 Cantor, 他们于 1984 年采用多个互相交替的脉冲式定向电场, 成功地分离了酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)染色体 DNA^[6]。至目前脉冲场凝胶电泳已开发出 5 种类型: (1)脉冲场梯度凝胶电泳(Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis, PFGE), 它采用交变脉冲梯度电场, 先用较短的交变脉冲时间, 使较小的 DNA 分子分离, 然后用较长的交变脉冲时间分离较大的 DNA 分子, 但分离的 DNA 条带向一侧歪曲, 难以比较各片段的迁移率。(2)正交交变场凝胶电泳(Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis, OFAGE), 两个交变电场电流方向相互

* 浙江省自然科学基金资助项目

收稿日期: 1999-02-01, 修回日期: 1999-05-12

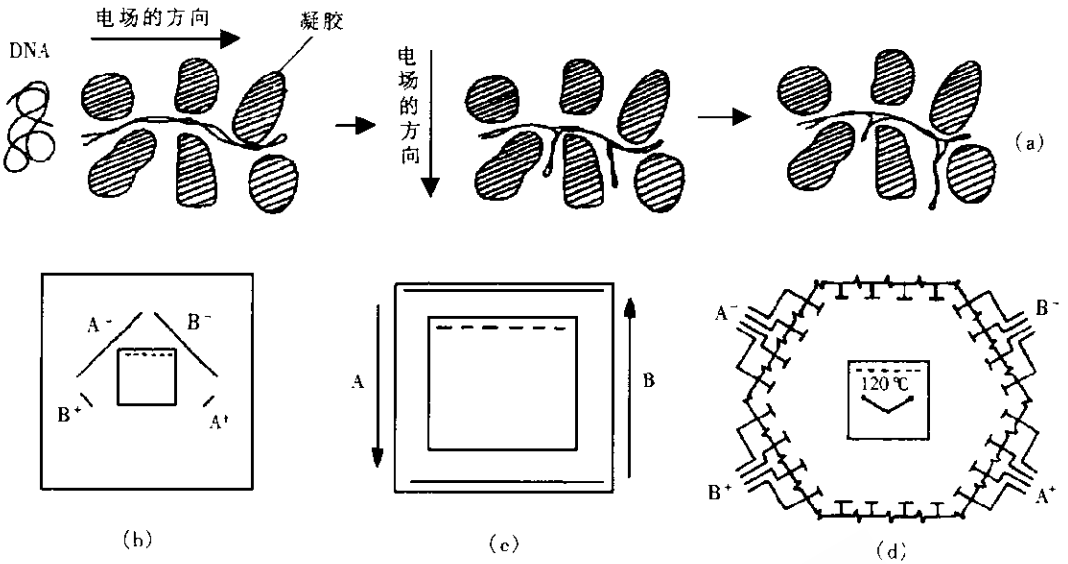


图1 脉冲场凝胶电泳的DNA泳动和电泳槽示意图

垂直(图1b),克服了PFGGE的缺点,但凝胶边缘的DNA条带仍然歪曲。(3)倒转电场凝胶电泳(Field Inversion Gel Electrophoresis, FIGE),两个交变电场电流方向呈 180° (图1c),能使DNA条带更直,但能分离的DNA片段较小(800kb以下),且分辨率也不太理想。(4)垂直脉冲场梯度凝胶电泳(Vertical Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis, VPFGE),是将PFGGE与OFAGE有机地结合而成,提高了分辨率。(5)钳位均匀电场电泳(Counter-clamped Homogeneous Electric Field, CHEF),是根据静电学原理,将24个电极均匀排列在等六边形周边,从而在六边形中央形成脉冲式匀强电场(图1d),它吸取了FIGE和OFAGE的长处,具有DNA带直、分辨率高、凝胶板可用于分子杂交等优点,在真菌DNA电泳分析中被广泛应用。

2 脉冲场凝胶电泳分析昆虫病原真菌 DNA 的基本操作步骤

2.1 电泳样品的制备

将真菌分生孢子接种于液体培养基中,振荡培养以获取对数增殖前期的幼嫩菌丝。菌丝离心洗净后悬浮于含有裂解酶的渗透压稳定液中,酶解菌丝细胞壁以释放出原生质体。分离并精制原生质体,调原生质体液浓度至 $10^8 \sim 10^9$ 个/mL,以保证原生质体包埋块中含有足够浓度的完整染色体DNA。将原生质体悬浮液与一定比例的低熔点琼脂糖凝胶液混

匀后,迅速倒入样品制备用模槽内,4℃冰箱内凝固,制备出原生质体包埋块。原生质体包埋块浸入蛋白酶K液(0.01mol/L, pH7.5~9.5 Tris-HCl, 1%SDS, 0.5mol/L, pH8.0 EDTA, 1~2mg/mL蛋白酶K)中,50℃下处理24h,以除去包埋块中的蛋白质和脂类等成分,使完整染色体DNA裸露地存在于包埋块中。酶解后的原生质体包埋块在0.05mol/L EDTA(pH8.0)液中洗涤数次(50℃,每次16h),以除去蛋白酶K及其残留的蛋白质、脂类。最后用0.05mol/L EDTA (pH8.0)浸渍保存,在4℃冰箱内可保存数月。

2.2 电泳

在CHEF操作系统中,一般选用0.5×TBE(0.089mol/L Tris碱,0.089mol/L 硼酸,0.02mol/L EDTA, pH8.0)缓冲液为电泳液。用电泳液配制100mL 0.6%~1%琼脂糖,加热溶化后注入水平放置的模槽(17cm×12.5cm×1cm)中,自然冷却后,将真菌染色体DNA样品胶块插入凝胶中并与凝胶块紧紧贴住,然后放入CHEF装置中进行电泳。电泳温度为14℃恒温,其他条件(例如:电泳电压、脉冲间隔时间、电泳时间等)应根据所分离的DNA片段大小来决定。一般分离较大片段DNA分子时,脉冲间隔时间和电泳时间需相应延长,琼脂糖凝胶浓度和电泳电压相应降低;反之,分离较小片段DNA分子时,脉冲时间和电泳时间可相应缩短,琼脂糖凝胶浓度和电泳电压可相应提高。在常规条件下,昆虫病原真菌染色体DNA一般需要走电

泳 7~10d。

2.3 观察 电泳完毕后,将凝胶块移入溴化乙锭(0.5μg / mL)溶液中,室温下染色,双蒸馏水脱色后,在短波长(310nm)紫外灯下观察并照相,并以酵母(*S. cerevisiae* 或 *Schizosaccharomyces pombe*) 的染色体 DNA 为标准,估算出真菌染色体大小和核型大小,或者进行其他的生物工程研究。

3 脉冲场凝胶电泳在昆虫病原真菌研究中的应用

3.1 用于昆虫病原真菌的核型分析 核型又叫染色体组型或基因组型,是指一个生物体、细胞器或病毒、真菌的整套基因,核型分析旨在弄清楚核型 DNA 的全部核苷酸顺序结构,识别所有基因,测定基因的位置及它们的功能,这是分子生物学乃至整个生命科学领域中一项十分重要的基础性工作,而明确核型染色体数目和大小,则是这一工作的前提。昆虫病原真菌染色体大小处于 PFGE 分离范围内,用脉冲场凝胶电泳能将其核型内

染色体分离并测定大小。用 CHEF 已成功地分析了玫瑰色拟青霉(*Paecilomyces fumosoroseus*)^[7]、粉拟青霉(*Paecilomyces farinosus*)^[8]、金龟子绿僵菌小孢变种(*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*)^[9]、金龟子绿僵菌大孢变种(*Metarhizium anisopliae* var. *majus*)^[10]、球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)^[11]等昆虫病原真菌的核型(表 1)。作者等(待发表)也用 CHEF 查明家蚕病原球孢白僵菌 3 分离株至少有 6 条染色体,估算其大小在 2.5~7.2Mbp 之间,核型大小为 27.6Mbp。同时研究发现,金龟子绿僵菌小孢变种、金龟子绿僵菌大孢变种、球孢白僵菌、家蚕病原球孢白僵菌等寄生范围广泛的昆虫病原真菌染色体 DNA 大小在菌株间具有明显的多态性^[9~11]。在近缘种属形态鉴定较困难的情况下,脉冲场凝胶电泳核型图谱将为昆虫病原真菌分类提供细胞学依据,并且随着脉冲场凝胶电泳技术的进一步改进以及该技术与其它技术的进一步结合,核型多态性将成为鉴别昆虫病原真菌菌株的重要方法。

表1 部分昆虫病原真菌的染色体DNA和核型

菌 名	染 色 体		核型大小 (Mbp)
	数 目	大小范围(Mbp)	
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> ^[7]	6	2.8~7.8	27.8
<i>Paecilomyces farinosus</i> ^[8]	6	2.6~7.8	28.9
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> ^[9]	7	1.6~7.4	31.2
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i> ^[10]	7	1.7~6.5	24.4
<i>Beauveria bassiana</i> ^[11]	6	2.4~7.9	28.4

3.2 用于昆虫病原真菌的基因连锁群分析 动植物基因连锁分析往往先研究若干个基因的连锁关系,再通过染色体突变等研究将不同的连锁群落实到具体的染色体上。然而,大多数昆虫病原真菌难以通过其表型分析及染色体突变研究来确定其连锁群。为此,先用脉冲场凝胶电泳分离染色体 DNA,再通过 DNA 探针杂交,就能将昆虫病原真菌基因定位到染色体上,并从其杂交图谱上分析出其基因连锁群。Shimizu 等用同位素标记的 cDNA 探针与脉冲场凝胶电泳分离的核型进行杂交,分别将粗糙链孢霉菌(*Neurospora crassa*)的β-微管蛋白基因和 rRNA 基因定位在玫瑰色拟青霉和粉拟青霉的染色体上,发现β-微管蛋白基因在玫瑰色拟青霉染色体上至少有 2 拷贝以上,在粉拟青霉染色体上至少有 3 拷贝以上,并且在不同的菌株中位于不同分子量的染色体上。然而,rRNA 基因在玫瑰色拟青霉的不同菌

株中均位于 5.3Mbp 大小的染色体上,在粉拟青霉的不同菌株中均位于 5.0Mbp 大小的染色体上,表现出较好的同一性^[7,8]。为此,脉冲场凝胶电泳能为遗传学上难以操作的昆虫病原真菌基因连锁相关性的证明提供有力的工具,也能用于难以用突变体表型鉴定等的昆虫病原真菌基因的定位。

3.3 用于昆虫病原真菌的遗传分析 昆虫病原真菌作为害虫生物防治的生物农药及珍贵中药材的资源微生物而受到广泛重视并发挥着重要作用,要进一步提高和扩大其防治害虫和药用的水平与范围,改良和培育性状优良的菌株是必需的。在昆虫病原真菌的选育种中,原生质体融合技术引人瞩目并获得了理想的成果^[12~14]。脉冲场凝胶电泳核型图谱具有种的特异性及种内核型多态性,利用该技术就能区分原生质体融合体中来自不同亲本的染色体 DNA,同时对某些特异

染色体 DNA 片段也能进行跟踪研究。Couteaudier 等 (1996)^[15] 用 CHEF 和 Southern 印迹杂交法研究了球孢白僵菌 28 和 *Beauveria sulfurescens* 2 (白僵菌的一种) 通过原生质体融合而得到的新菌株的基因组结构等, 查明了其新菌株为集中了双亲本性状的杂合菌株, 并且其性状和分子结构稳定。为此, 脉冲凝胶电泳技术在昆虫病原真菌的遗传、良种选育等研究中具有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 时连根. 蚕桑通报, 1991, 22(3): 37~42.
- [2] 华南农业大学主编. 蚕病学. 北京: 农业出版社, 1993, 54~69.
- [3] 福原敏彦著. 昆虫病理学. 日本东京: 学会出版センター, 1979, 161~177.
- [4] Macdonald B A, Martinez J P. Curr Genet, 1991, 19: 265~271.
- [5] Shimizu S, Nishida Y, Yoshioka H *et al.* J.

Invertebr. Pathol., 1991, 58(2): 461~463.

- [6] Schwartz D C, Cantor C R. Cell, 1984, 37: 67~75.
- [7] Shimizu S, Yoshioka H, Matsumoto T. Letters in Applied Microbiology, 1993a, 16: 183~186.
- [8] Shimizu S, Yoshioka H, Matsumoto T. Trans. Mycol. Soc. Japan, 1993b, 34: 239~244.
- [9] Shimizu S, Aral Y, Matsumoto T. J. invertebr. pathol., 1992, 60: 185~187.
- [10] 时连根, 卢春松, 王象礼等. 科技通报, 1998, 14(5): 348~351.
- [11] Shimizu S, Higashiyama R, Matsumoto T. J. seric. sci. Jpn., 1993, 62(1): 45~49.
- [12] 清水进, 加藤正人, 松本继男等. 日本应用动物昆虫学杂志, 1989, 33(2): 92~94.
- [13] Kawamoto H, Aizawa K. Appl. Ent. Zool., 1986, 21: 624~626.
- [14] Riba G. Entomophaga, 1978, 23(4): 417~421.
- [15] Couteaudier Y, Viaud M, Riba G. Microbial Ecology, 1996, 32(1): 1~10.