

## 技术与方法

## 微波法快速提取放线菌基因组 DNA \*

徐 平<sup>1,2</sup> 李文均<sup>1</sup> 徐丽华<sup>1</sup> 姜成林<sup>1</sup>(云南大学省微生物研究所 教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)<sup>1</sup>(华北制药集团新药研究开发中心 石家庄 050015)<sup>2</sup>

**摘要:**原有的放线菌基因组 DNA 提取方法费时、费力、费用高,且对极端环境放线菌成功率较低。利用微波热振惊提取固体培养基表面放线菌菌落基因组 DNA,具有快速、简便、费用低廉等优点。所得的基因组 DNA 可作为 PCR 反应的模板进行 16S rRNA 基因有效扩增。这为大量放线菌菌株的快速鉴别和系统分类创造了条件。

**关键词:**微波,基因组 DNA 提取,PCR,16S DNA

**中图分类号:**Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2003)04-0082-03

A MICROWAVE-BASED METHOD FOR GENOMIC DNA EXTRACTION  
FROM ACTINOMYCETES

XU Ping LI Wen-Jun XU Li-Hua JIANG Cheng-Lin

(The Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology,  
Yunnan University, Kunming 650091)<sup>1</sup>(New Drug Research and Development Center of North China Pharmaceutical  
Corporation, Shijiazhuang, 050015)<sup>2</sup>

**Abstract:** The original methods on DNA extraction are not only complex and expensive, but although invalid with actinomycetes under extreme environments. Genomic DNA can be extracted directly from biomass picked up from solid medium by microwave thermal shock. The extracted DNA is suitable for PCR. The method is effective, easy and fast, and can be used in actinomycete systematics and identification rapidly.

**Key words:** Microwave, Genomic DNA extraction, PCR, 16S rDNA

放线菌基因组 DNA 提取方法很多,可归纳为以物理方法破细胞壁再提取基因组 DNA 和酶或化学法破壁提取 DNA 两种。前者如液氮研磨法、石英沙振荡研磨法等<sup>[1]</sup>,后者如改良 Marmur 法<sup>[2]</sup>等。但这些方法不仅步骤多、费时、菌体需要量大,而且对嗜极端环境微生物难于奏效。因此有必要探索一种快速、高效的基因组 DNA 提取方法,以满足大量菌种快速筛选和分类鉴定的需要。

Orsini 等<sup>[3]</sup>利用微波热振惊法直接提取土壤等环境样品的细菌基因组 DNA。该方法可迅速破细胞壁,然后以高浓度的聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP) 可有效提取基因组 DNA。所得的 DNA 可作为 PCR 模板进行 16S rRNA 基因的有效扩增。

\* 国家科技部基础研究重大资助项目 (No.2001CC000600)  
云南省自然科学基金资助项目 (No.2001C0001Q)  
云南省教育厅基金资助项目 (No.01111134, No.02QJ077)  
教育部微生物资源开放研究重点实验室开放基金资助项目  
收稿日期:2002-07-24, 修回日期:2002-09-09

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种：见表 1。

1.1.2 试剂：洗涤液：

50mmol/L Tris, pH7.7,

25mmol/L EDTA, 0.1%

PVP; 裂解液：50mmol/L

Tris, pH8, 25mmol/L EDTA,

3% SDS, 1.2% PVP; 抽提

液：10mmol/L Tris, pH8,

1mmol/L EDTA, 0.3mol/L

NaAc, 1.2% PVP.

PVP 40,000 为 AMRES-  
CO 公司产品, Taq 酶购自

TaKaRa 公司。16S rDNA 扩增用 PCR 引物 (引物 A, 8-27f: 5' -AGAGTTTGATCC TGGCT-  
CAG-3'; 引物 B, 1523-1504r: 5' -AAGG AGGTGATCCAGCCGCA-3') 由 TaKaRa 公司合  
成。微生物培养用 ISP2 固体培养基。

1.2 方法

1.2.1 菌体准备：用无菌竹签从固体培养基上挑取单菌落或少些菌苔于无菌安瓿管，  
备用。

1.2.2 DNA 提取：在装有菌体的安瓿管中加入洗涤液 1mL，在旋涡混合器上振荡 5s；  
5,700r/min 离心 1min；弃上清；加入 35μL 裂解液，振荡悬浮，并于功率为 600W 微波炉  
中处理 60s；加入 400μL 65℃ 预热的抽提液，振荡 5s；加入等体积  
的 Tris 饱和酚/氯仿溶液抽提，  
10,000r/min 离心 5min；上清以等  
体积的异丙醇沉淀，70% 乙醇洗  
涤，干燥后溶于 20μL TE 溶液中。

1.2.3 基因组 DNA 检测：取 10μL  
DNA 溶液于 0.8% 琼脂糖凝胶 50V  
电泳 1.5h, 260nm 紫外灯下观察并  
照相。

1.2.4 16S rDNA PCR 扩增：将提  
取的基因组 DNA 作为模板进行  
PCR 扩增。25μL 反应体系包括  
2μL DNA, 2μL 200mmol/L dNTP, 1  
X Taq DNA 聚合酶 buffer, 1μL Taq  
酶, 100pmol 引物。反应在 Thermo-  
Hybaid PCR 仪上进行，程序为

表 1 实验菌种\*

菌 种	菌 号
云南双孢放线菌 ( <i>Actinobispora yunnanensis</i> )	CCTCC M90959
马杜拉马杜拉放线菌 ( <i>Actinomaruda madurae</i> )	CGMCC 4.1178
产色小双孢菌 ( <i>Microbispora chromogenes</i> )	JCM 3022
青铜小单孢菌 ( <i>Micromonospora chalcone</i> )	CGMCC 4.1050
白色类诺卡氏菌 ( <i>Nocardioideus albus</i> )	CGMCC 4.1183
星状诺卡氏菌 ( <i>Nocardia asteroides</i> )	CGMCC 4.1165
自养假诺卡氏菌 ( <i>Pseudonocardia autotrophica</i> )	CCRC 12444
绿色糖单孢菌 ( <i>Saccharomonospora viridis</i> )	CGMCC 4.1089
披发糖多孢菌 ( <i>Saccharopolyspora hirsuta</i> )	CGMCC 4.1317
灰色链霉菌 ( <i>Streptomyces griseus</i> )	ATCC 23345
吸水链霉菌 ( <i>Streptomyces hygroscopicus</i> )	CGMCC 4.940
弯曲高温单孢菌 ( <i>Thermomonospora curvata</i> )	NRRL B-1983

\* 缩写：ATCC = 美国典型菌种保藏中心, JCM = 日本微生物保藏中心,  
NRRL = 美国农业研究菌种保藏中心, CCRC = 中国台湾菌种保藏及研究  
中心, CGMCC = 中国普通微生物菌种保藏管理中心, CCTCC = 中国典型  
菌种保藏中心

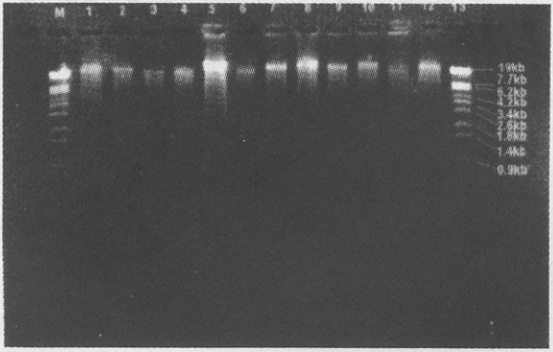


图 1 微波法提取的放线菌基因组 DNA 电泳图谱

1 云南双孢放线菌 CCTCC M90959, 2 自养假诺卡氏菌 CCRC  
12444, 3 绿色糖单孢菌 CGMCC 4.1089, 4 披发糖多孢菌 CGMCC  
4.1317, 5 星状诺卡氏菌 CGMCC 4.1165, 6 青铜小单孢菌 CGM-  
CC 4.1050, 7 白色类诺卡氏菌 CGMCC 4.1183, 8 产色小双孢菌  
JCM 3022, 9 马杜拉马杜拉放线菌 CGMCC 4.1178, 10 弯曲高温  
单孢菌 NRRL B-1983, 11 灰色链霉菌 ATCC 23345, 12 弯曲高温  
单孢菌 CGMCC 4.940, 13 λDNA/Eco T141

94℃ 变性 5min, 94℃ 变性 1min, 56℃ 复性 1min, 72℃ 延伸 2min 进行 30 个循环, 72℃ 延伸 5min。取 5 $\mu$ L PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶 50V 电泳 1.5h, 260nm 紫外灯下观察并照相。

## 2 结果与讨论

为了验证微波法抽提 DNA 的有效性, 我们选用 11 个属的 12 种放线菌进行试验(表 1)。单个菌落的菌体量既足够用于基因组 DNA 的提取。所得的基因组 DNA 电泳后在 19kb 以上的位置可见一明显的 DNA 带。泳道上没有发现 DNA 降解现象(图 1)。

以此 DNA 为模板进行 PCR 反应, 可有效扩增 16S rRNA 基因。扩增产物经电泳检测目的条带特异, 且产物量大, 表明所提取的 DNA 中没有酶反应的抑制物存在(图 2)。

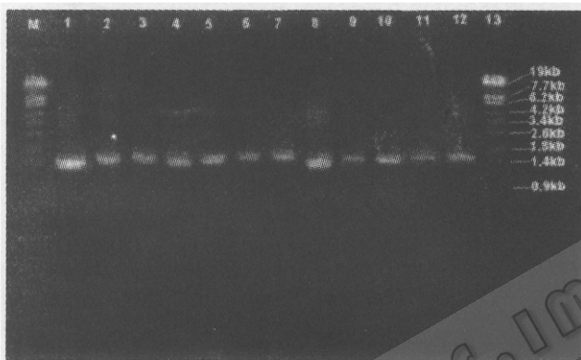


图 2 微波法提取的放线菌基因组 DNA 为模板的 16S DNA PCR 产物电泳图谱

- 1 云南双孢放线菌 CCTCC M90959, 2 自养假诺卡氏菌 CCRC 12444, 3 绿色糖单孢菌 CGMCC 4.1089, 4 披发糖多孢菌 CGMCC 4.1317, 5 星状诺卡氏菌 CGMCC 4.1165, 6 青铜小单孢菌 CGMCC 4.1050, 7 白色类诺卡氏菌 CGMCC 4.1183, 8 产色小双孢菌 JCM 3022, 9 马杜拉马杜拉放线菌 CGMCC 4.1178, 10 弯曲高温单孢菌 NRRL B-1983, 11 灰色链霉菌 ATCC 23345, 12 弯曲高温单孢菌 CGMCC 4.940, 13  $\lambda$ DNA/Eco T14I。

和价廉等特点。微波 DNA 提取法的建立为大量菌株的快速鉴别和活性物质产生菌的快速基因筛选奠定了基础。

微波法提取 DNA 时所需菌体量极微, 固体琼脂平板上的单菌落即可用于基因组 DNA 的提取, 避免了菌体繁殖所需的时间。从固体琼脂平板上挑取菌落时即使混有一些琼脂也不影响 DNA 的提取及所提 DNA 的质量。在微波法提取 DNA 过程中, 由于只需洗涤、微波振惊破壁和酚/氯仿抽提等 3 步反应, 有效避免了物理破壁的费时、费力或酶法破壁中的长时间消化处理过程。同时微波法提取 DNA 过程中所用的试剂都是常用、价廉的生化试剂, 微波炉和台式离心机也是实验室常备仪器。因此微波法与常规的 DNA 提取方法相比, 具有简便、高效、快速

## 参考文献

- [1] Hopwood D H, Bibb M J, Chater K F, *et al.* Genetic Manipulation of Streptomyces A Laboratory manual. In Preparation of chromosomal, plasmid and phage DNA. Norwich: F. Crowe & Sons Ltd. 1985, 79~80.
- [2] 放线菌の分类と同定. 日本放线菌学会编. 2001.83~88.
- [3] Orsini M, Romano-Spica V. Lett Appl Microbiol, 2001, 33: 17~20.