

一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法

周小玲 沈 微 饶志明 王正祥 诸葛健

(江南大学工业微生物研究中心江南大学教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要: 介绍了一种适用于多种真菌染色体 DNA 的快速提取方法。该方法用石英砂振荡破壁, 快速便捷地提取真菌染色体 DNA, 提取时间仅用 1~2 h。作者应用该方法成功地提取了粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、羊肚菌 (*Morchella esculenta*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等 4 种不同真菌的染色体 DNA, 所提 DNA 片段均大于 20 kb, 可直接用于限制性内切酶酶切、PCR 扩增等分子生物学研究。

关键词: 真菌, 染色体 DNA, 提取

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0089-04

A Rapid Method for Preparation of Fungal Chromosome DNA

ZHOU Xiao-Ling SHEN Wei RAO Zhi-Ming WANG Zheng-Xiang ZHUGE Jian

(The Research Center of Industrial Microbiology, the Key Laboratory of Industrial Biotechnology, the Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: The article introduce a rapid method for preparation of fungal chromosome DNA. In this method the quartz sand is used to break the fungal cell wall and the chromosome DNA is harvested rapidly in 1~2 h. The method is applied successfully by the author to four kinds of fungi-*Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae*, *Morchella esculenta*, *Saccharomyces cerevisiae*. All the chromosome DNA extracted has the fragment size larger than 20 kb and can be used directly for either digestion with restriction endoenzyme or PCR.

Key words: Fungi, Chromosome DNA, Extract

随着真菌分子生物学研究的进展, 简便快捷地提取真菌染色体 DNA 的方法对真菌分子生物学的研究日显其重要的意义。真菌的细胞壁结构坚固, 次生代谢产物丰富等特点对其染色体的提取造成一定困难。目前, 提取真菌染色体 DNA 的方法主要有: 机械研磨法、酶解制备原生质体法、氯化苄法等^[1]。其中机械研磨法常采用液氮研磨, 主要是借助超低温的液氮使真菌的细胞壁变脆, 再通过研磨破坏细胞壁使染色体释放出来。此法需要收集较大量的菌体, 在提取时为保证研磨充分常常导致染色体 DNA 受机械剪切力过度而形成碎片, 操作过程不太容易掌握。酶解制备原生质体法则受到酶的质量的影响, 成本也较高, 而且需摸索形成原生质体的适宜条件。氯化苄法在提取某些食用真菌时, 几乎没有破壁的作用^[2]。本文提供的方法与以上所述方法相比, 具有操作步骤简单, 操作时间短, 不需特殊的仪器和药品等特点。本法所提的染色体 DNA 均大于 20 kb, 可直接用于限制性酶切, PCR 等分子生物学研究。

1 材料与方法

1.1 菌株及其培养

粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*), 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*), 羊肚菌 (*Morchella*

收稿日期: 2003-10-17, 修回日期: 2003-12-13

esculenta), 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为本实验室保存菌种。

粗糙脉孢菌、米曲霉用改良的 Vogel 培养基^[3]: 柠檬酸三钠 3.0 g, KH_2PO_4 5.0 g, NH_4NO_3 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 葡萄糖 10.0 g, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg, 加水至 1 L。接种适量孢子于 50 mL 液体 Vogel 培养基中, 置于 30℃ 生化培养箱中培养 36~48 h 至孢子萌发为菌丝。羊肚菌用 PGY 液体培养基: 20 g 马铃薯汁, 5 g 葡萄糖, 0.1 g 酵母膏, 定容至 1 L, pH 6.3。接种适量新鲜菌丝于 50 mL PGY 液体培养基中, 置 25℃ 生化培养箱培养 2~3 d, 时间不宜过长。酿酒酵母用 YEPD 液体培养基: 10 g 酵母膏, 20 g 蛋白胨, 20 g 葡萄糖, 定容至 1 L。接种一环新鲜的酿酒酵母于 20 mL YEPD 液体培养基中, 30℃, 180 r/min 振荡培养 18~22 h。

1.2 菌丝的收集和预处理

粗糙脉孢菌、米曲霉、羊肚菌等采用过滤的方法收集菌丝, 并用生理盐水充分洗涤 1~2 次。置于 5 mL 离心管中, 最大转速离心, 去除残余的生理盐水。酿酒酵母则离心收集菌体, 用生理盐水重悬, 离心弃上清。

1.3 真菌染色体 DNA 的简易提取方法

将收集好的菌体置于 5 mL 离心管中, 按照每 0.5 g 菌体加入 1 mL 裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 180 mmol/L EDTA pH 8.0, 1% SDS, 现配), 少量菌体可采用 1.5 mL 离心管, 加适量裂解缓冲液, 保证能振荡开为宜。同时加入 3/10 总体积的石英砂, 盖紧离心管盖, 在漩涡振荡器上振荡 5~8 min, 每隔 1 min 用力上下晃动离心管 30 s, 使内容物混合均匀。65℃ 放置 10 min, 加入 600 μL 7.5 mol/L 乙酸铵溶液, 冰浴 8 min。以最大转速离心 5 min, 转移上清至另一无菌的 5 mL 离心管中, 加入 0.1 倍体积的 3 mol/L 的 NaAc 以及 0.6 倍体积的异丙醇, 颠倒混匀, 冰浴 8 min。室温下以最大转速离心收集沉淀, 弃上清, 用 200 μL TE 溶解沉淀, 加入适量 RNase, 65℃ 温浴 10 min。取出, 加入 200 μL 氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提一次, 将上清转入另一无菌的 1.5 mL 离心管中, 加入 0.1 倍体积的 3 mol/L 的 NaAc 以及 2.5 倍体积的无水乙醇, 以最大转速离心 8 min 收集染色体 DNA, 70% 乙醇洗涤一次, 待乙醇挥发完全, 用适量 TE 溶液溶解沉淀^[4-6]。

1.4 用提取的真菌染色体 DNA 进行酶切消化及 PCR 扩增

采用 *Eco*RI (Takara 公司) 37℃, 1 h 对提取的 4 种真菌染色体 DNA 分别进行酶切消化。设计引物: P1: 5'-ACCGGAATTCGCCTGAGAAACGGCTACCAC-3', P2: 5'-ACCGGAATTCGGCAGGAGCGTAATCAACGC-3' 作扩增真菌 18S rDNA 保守序列用。PCR 反应条件为: 94℃ 变性 4 min; 50 μL 反应体系中加入 Pyrobest™ DNA 聚合酶 1.5 u, 混合后加入矿物油 30 μL 进行 PCR 反应: 94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 3 min, 经过 30 个循环后, 72℃ 再延伸 8 min。

2 结果与讨论

2.1 真菌染色体 DNA 的提取

本方法操作简易, 提取 DNA 所需时间仅为 1~2 h, 所提真菌染色体 DNA 长度均大于 20 kb, 如图 1 所示。 OD_{260}/OD_{280} 比值均在 1.8 左右。本实验用到的 4 种真菌种属差异很大, 由此可见该方法具有较广的适用性。

2.2 提取的真菌染色体 DNA 的质量分析

2.2.1 限制性酶切提取的真菌染色体 DNA: 限制性酶切验证所提染色体 DNA 的质量, 用 *EcoR* I 对所提染色体 DNA 进行酶切, 结果显示所提 4 种真菌的染色体 DNA 均能被消化完全, 而且片段大小分布均匀, 如图 2 所示。

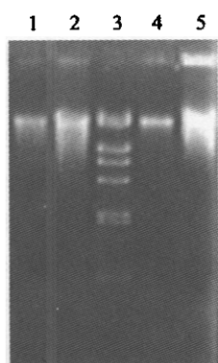


图 1 本方法提取的 4 种不同种属的真菌染色体 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

1 粗糙脉孢菌染色体 DNA, 2 羊肚菌染色体 DNA, 3 λ DNA/*Hind* III 分子量标准, 4 酿酒酵母染色体 DNA, 5 米曲霉染色体 DNA

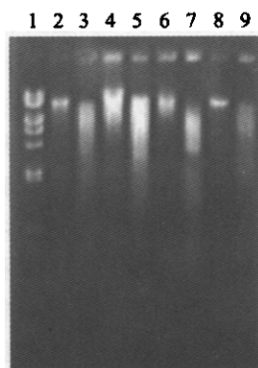


图 2 所提 4 种真菌染色体 DNA *EcoR* I 酶解产物琼脂糖凝胶电泳图

1 λ DNA/*Hind* III 分子量标准, 2, 4, 6, 8 分别为提取的粗糙脉孢菌、羊肚菌、酿酒酵母、米曲霉染色体 DNA, 3, 5, 7, 9 分别为粗糙脉孢菌、羊肚菌、酿酒酵母、米曲霉染色体 DNA *EcoR* I 酶解结果

2.2.2 真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增: 采用根据真菌 18S rDNA 的保守序列设计的引物 P1, P2 对所提 4 种真菌染色体的质量进行 PCR 验证。结果表明以 4 种真菌的染色体为模版均能扩增出所需 18S rDNA 的保守序列间约 1.3 kb 左右的片段, 如图 3 所示, 非特异性扩增很少。这表明本方法所提取的真菌染色体 DNA 可用于一般的分子生物学研究。

2.2.3 特异性基因片段的 PCR 扩增: 应用所提的粗糙脉孢菌染色体 DNA 成功扩增出一特异性基因片段约 2.5 kb, 如图 4 所示。所提的酿酒酵母染色体 DNA 也成功地被用于扩增几丁质酶基因, 图略。

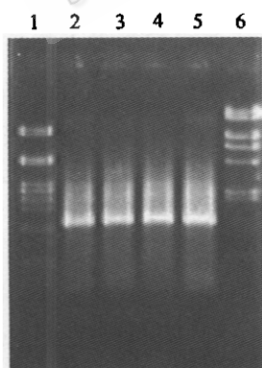


图 3 以提取的 DNA 为模版 PCR 扩增 4 种真菌的 18S rDNA

1 λ DNA/*Pst* I 分子量标准, 2, 3, 4, 5 分别为 PCR 扩增出来的粗糙脉孢菌、羊肚菌、酿酒酵母、米曲霉的 18S rDNA 的片段, 6 λ DNA/*Hind* III

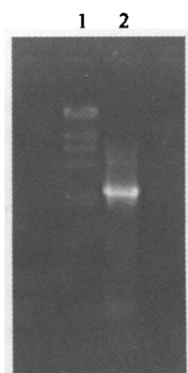


图 4 以提取的粗糙脉孢菌染色体 DNA 为模版 PCR 扩增特异性基因片段

1 λ DNA/*Hind* III 分子量标准, 2 PCR 扩增出来的粗糙脉孢菌特异性基因片段

本方法成功地快速提取了 4 种不同种属的真菌的染色体 DNA 关键在于考虑了以下几方面因素：(1) 大多真菌的细胞壁主要成分为几丁质，与细菌相比其结构要坚固的多。真菌细胞壁各成分的比例在细胞生活周期的过程中也存在差异，一般而言，当真菌细胞处于幼嫩时期时，破壁要相对容易些，故在真菌的培养方式上要注意，不要让收集的菌的菌龄过老。(2) 真菌的次级代谢产物很多，与次生代谢相关的酶类也很多，而且许多酶是直接分泌到胞外。为尽可能减少这些物质对提取染色体 DNA 的影响，可以通过充分洗涤收集的菌丝以除去胞外各种酶及杂质。提取过程中，采用较高浓度的 EDTA 可抑制破壁时释放的大量酶类对 DNA 可能的降解^[6]。此外，随着操作时间的延长，酶对 DNA 的降解的几率也在增加，故提取真菌 DNA 的操作时间也不宜过长。(3) 真核生物的染色体主要由核 DNA 和组蛋白组成，用高盐溶液可防止在 SDS 作用下解聚后的核 DNA 和组蛋白发生重聚，本方法采用了 7.5 mol/L 乙酸铵溶液。最后，为避免提取过程中机械力对染色体 DNA 的反复剪切，应尽可能简化操作步骤。

致谢 衷心感谢本实验室谌斌博士提供宝贵的建议和讨论。

参 考 文 献

- [1] 朱 衡, 瞿 峰, 朱立煌. 真菌学报, 1994, 13 (1): 34 ~ 40.
- [2] 曾凡亚, 张义正. 食用菌学报, 1996, 3 (3): 13 ~ 17.
- [3] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994. 493.
- [4] Wendland J A, Lengeler K B, Kothe E. Fungal Genetics Newsletter, 1996, 43: 54 ~ 55.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南 (第三版). 北京: 科学出版社, 2002. 485 ~ 486.
- [6] 王建荣, 张曼夫. 遗传, 1992, 14 (6): 29 ~ 30.