

电泳核型分析在丝状真菌研究中的应用

邢来君 李明春

(南开大学微生物学系, 天津 300071)

DNA 分子的分离技术是分子生物学研究中的关键技术之一。目前最通用的分离技术是琼脂糖凝胶电泳^[1],但分离的 DNA 分子大于 50kb 时,该方法已不能获得令人满意的结果。近年来出现的脉冲电场凝胶电泳(PFGE)技术则有重大的进步,分离能力达到 10Mb。

核型分析就是应用脉冲电泳方法发展起来的一种新的实验技术,把整个染色体包埋在琼脂糖凝胶中,依赖染色体的大小和立体结构,通过在凝胶中迁移的速度把基因组分离成染色体带,这就是所谓的电泳核型(electrophoretic karyotype)。PFGE 的出现使得染色体数目及大小的测定获得了巨大进展,已被广泛地用于动物、植物、真菌,尤其是人类基因组的测定。

到目前为止的 10 年间,在真菌中已对近 30 属的丝状真菌进行了研究,研究的内容主要是染色体的数目及基因组的测定、基因的杂交定位及基因作图等方面。本文将在介绍 PFGE 工作原理的基础上,对丝状真菌的电泳核型分析作简要综述。

1 PFGE 的原理及改进

PFGE 与普通的凝胶电泳不同,并非使用单一的连续电场,而是使 DNA 分子在凝胶中处于有规律地变化方向的电场中,电场方向的改变可以使大分子 DNA 得以分离,图 1(a)中表示了 PFGE 的电泳模式^[2]。如图所示,有 A、B 两个电极,当 A 工作时,由于 DNA 分子中有磷酸集团而带负电,因而 DNA 分子将向右下方移动,当 A 停止而 B 工作时,DNA 向左下方移动。如果在整个泳动过程中始终有规律地变化电场方向,则 DNA 的跑向呈“之”字形。基于上述的概念,DNA 分子像“蛇”一样穿过一个又一个凝胶孔隙。当电场方向变化

时,DNA 分子就要在电场中重新定向,然后才能穿过孔隙,如果电场方向不断改变。DNA 分子也将不断地变换方向,那小分子 DNA 可较快地重新定向、转身,而大分子 DNA 则需更多的时间来改向,从而在艰难的迁移中把 DNA 分离开来^[3]。

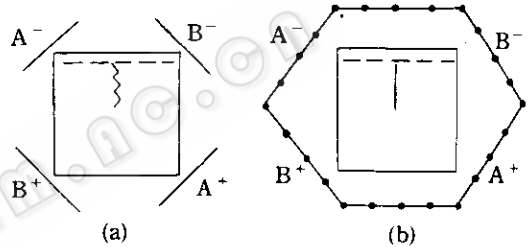


图 1 脉冲电场凝胶电泳工作原理示意图

(a) PFGE 工作原理, (b) CHEF 系统原理图示

Sahwartz 等人^[4]在 1984 年成功地分离了啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的染色体,并介绍了 PFGE 电场转换的方法。但是,由于电极的几何排列产生的不均一电场,使得 DNA 片段的迁移和轨迹每行各不相同,电泳泳道和泳道之间的对比以及测算大小变得十分困难。于是有人设计了不同的脉冲电泳装置,以期产生均一的电场。Carle & Olson^[5]提出了 OFAGE 系统,并在啤酒酵母^[5]、假丝酵母(*Candida* spp.)^[6]和玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)^[7]中应用 OFAGE 建立了电泳核型。Carle 等人^[8]发展了这一技术而建立了 FIGE 系统,他们成功地用 FIGE 技术使啤酒酵母染色体分离出 14 条清晰的带。Magee 等人^[9]应用类似的方法从白假丝酵母(*C. albicans*)中分

1995-02-17 收稿

离出 11 条染色体带。

对 PFGE 改进的结果是有成效的,然而电场交互的非均一性仍然使得泳道和泳道之间难于比较。Chu 等人^[10]提出了 CHEF(contour-clamped homogeneous electric field)凝胶电泳系统,较好地解决了这一问题。CHEF 系统是 24 个电极呈六边形排列在凝胶周围,产生一个等强度的均一电场,两电极间呈 120° 夹角(见图 1(b)),在 CHEF 系统中 DNA 迁移的动力学是一个很复杂的问题,这里不予讨论。Vollrath & Davis^[11]对 CHEF 电泳凝胶划分了四个分离段,第一个区段是最小的 DNA 分子分离区域,而且迁移率呈现线性函数;第二区段接近胶的中间,很少出现分离带;第三区段是又一个很好的分离区域,此段的迁移率和 DNA 大小再次呈现线性关系;第四区段是最大 DNA 分子的分离区段。其中第三区段是一个关键区段,在这个区段中能够通过改变电场强度、脉冲间隔,以及琼脂糖的浓度而使 DNA 迁移率发生变化。Chu 等人^[10]应用这一系统从啤酒酵母中获得了 15 条染色体带。Vollrath & Davis^[11]从粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中分离出 3 条染色体,这一结果目前已被真菌学家们作为丝状真菌电泳核型的 marker,来测算被分离 DNA 分子的大小。CHEF 系统已广泛用于真菌,如构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)^[12]、李氏木霉(*Trichoderma reesei*)^[13]、白假丝酵母(*C. albicans*)^[9]、粗糙脉孢菌(*N. crassa*)^[14]、大雄疫霉(*Phytophthora megasperma*)^[15,16]、盘长孢状刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporoides*)^[17]、*Magnaporthe grisea*^[18,19]、大麦坚黑粉菌(*U. hordei*)^[20]、玉米黑粉菌^[21]等。

CHEF 系统是目前广泛应用的装置,因为它改进了其它电泳装置使 DNA 泳道发生弯曲的缺陷,并可分离高达 10Mb 的 DNA 片段,脉冲时间的延长可分离大片段 DNA,缩短则适应小片段 DNA 的分离。

2 样品的制备方法

分离染色体 DNA 必须解决染色体标本的

制备,亦在制备电泳分离标本时,必须保持染色体的完整性。文献资料中大都应用如下的方法,首先用酶法破壁获得原生质体。然后把原生质体悬浮于液体琼脂糖中,加入蛋白酶 K,在 50℃ 下处理琼脂糖中的原生质体,细胞的消化产物及裂解物通过透析作用而析出,完整的染色体由于在凝固的凝胶基质中而未遭到任何破坏。这就是所说的原生质体凝胶包埋技术^[4,29]。原生质体包埋所用的琼脂糖凝胶是包埋技术中的关键,凝胶浓度一般在 0.5%~1%,使用的凝胶为低熔点琼脂糖。另一个关键就是制作的标本中 DNA 的浓度,这可以由初始的原生质体浓度来控制。在脉冲电泳中对 DNA 浓度的敏感性比在普通电泳更强烈,一般普通凝胶电泳中总 DNA 为 3~20μg,而在脉冲电泳中为避免电泳速度过慢, DNA 量一般限定在 1~2μg 内^[3]。

近期有些报道提出不需制备原生质体,而且用蛋白酶 K 水解原生质体也并非必需^[20]。因此,电泳核型分析技术可能随着越来越广泛的应用而被简化,朝着快速和常规的方向发展。

3 在丝状真菌研究中的应用

3.1 丝状真菌的脉冲电泳条件: 真菌染色体可依据其大小概括地分为酵母类和非酵母类。酵母类真菌染色体 DNA 一般 < 2Mb。用强的电流、高的琼脂糖浓度和相应短的脉冲间隔,大约 24h 左右可以分开。例如,黑粉菌的 CHEF 电泳条件是 1%LE 琼脂糖,电压 140V,脉冲间隔 60S 泳动 17h, 140S 泳动 8h,缓冲液温度控制在 14℃,即能很好的分离^[19]。非酵母类真菌染色体 DNA 一般大于 2Mb,需要低电流,低琼脂糖浓度,较长的脉冲间隔,而且泳动周期明显延长。例如颖枯壳针孢(*Septoria nodorum*)的 CHEF 电泳,琼脂糖浓度为 0.8%,电压 50V,脉冲间隔 60min 泳动 166h,温度控制在 12℃ 下^[22]。又如李氏木霉(*T. reesei*)在比较低的电压下,脉冲间隔 53min 泳动 46h,改为 50min 泳动 72h,再改为 45min 30h,最后 36min 90h^[23]。

电泳的温度是一个重要的条件,常规电泳一般在室温下(25℃)进行,脉冲电泳要在1~15℃下,温度高DNA迁移快,但会引起较小DNA分子DNA的缠绕,并导致电泳带的明显加宽。控制温度不仅可以解决这些问题,还可进一步控制染色体分离的可重复性,所以电

泳过程中冷却循环系统是必不可少的^[3]。

3.2 丝状真菌染色体的分离和测定:在丝状真菌中脉冲电泳的直接应用是测定染色体的数目及大小。如粟酒裂殖酵母(*S. pombe*)遗传分析认为它有三条染色体,脉冲电泳的结果证实了这一点,而且简单精确地测量出染色体的

表1 丝状真菌的染色体和基因组

菌名	染色体		基因组大小 (Mb)	资料来源
	数目	大小范围(Mb)		
<i>Aspergillus nidulans</i>	8	2.9~5.0	31.2	[12]
<i>A. niger</i>	8	3.5~6.6	35.5~38.5	[25]
<i>Acremonium chrysogenum</i>	8	0.3~6.3	25.6	[26]
<i>Agaricus bisporus</i>	13		26.78	[27]
<i>Beauveria bassiana</i>	8	2.9~8.1	40.6	[28]
<i>Cephalosporium acremonium</i>	8	1.7~4.0	22.5	[29]
<i>Curvularia lunata</i>	12	1.4~4.0	29.7	[30]
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>				
type A	5	2.0~6.0		[17]
type B	3	4.7~6.0		[17]
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	15	0.4~2.0	12.2	[31]
<i>Fusarium oxysporum</i>				
f. sp. <i>conglutinans</i>	8	2.2~6.2		[32]
f. sp. <i>raphani</i>	11	0.6~6.4		[32]
<i>Lentinus edodes</i>	8	2.2~7.0		[33]
<i>Histoplasma capsulaeum</i>	7	2.0~5.7		[32]
<i>Magnaporthe grisea</i>	6	3.4~9.5		[19]
<i>Neurospora crassa</i>	7	4.0~12.6	47.7	[14]
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	6	3.1~7.8	30.1	[34]
<i>Penicillium janthinellum</i>	10	2.0~7.5	42.9	[35]
<i>Phenacochateae chrysosporium</i>	7	2.0~4.8		[10]
<i>Phytophthora megasperma</i>	13~14	1.4~?		[15]
<i>Podospora anserina</i>	7	3.9~6.3	33.4	[36]
<i>Schizophyllum commune</i>	11		35.2	[37]
<i>Septoria nodorum</i>	14~19	0.5~3.5		[22]
<i>Tilletia caries</i>	12~14	0.88~4.0		[32]
<i>T. controversa</i>	12~16	0.88~3.9		[32]
<i>Trichoderma reesei</i>	6	3.3~11.9	37.9	[13]
<i>Ustilago hordei</i>	15~19	0.17~3.15		[20]
<i>U. maydis</i>	20	0.3~2.0		[7]

大小^[24]。在啤酒酵母中也得到了同样的结果^[10]。根据资料检索的结果,目前脉冲电泳技术用于丝状真菌完整染色体分离的报告列于表1中。

3.3 基因定位和染色体特殊文库的构建:借助脉冲电泳制备分子核型可以指导基因作图,借助 Southern 杂交可以将任一被克隆的 DNA 片段定位于染色体上。应用这一技术已经把 *M. grisea* 的限制性片段长度多态性 (REL P) 标记的连锁群定位于它们原始的染色体上^[19]。这一技术还专门用于缺乏有性世代的真菌中,例如白假丝酵母染色体 14 个基因的测定^[9],以及在顶头孢霉 (*C. acremonium*) 的两条不同染色体上,头孢霉素 C 合成途径的两个关键基因结构的测定^[29]。因而电泳核型为遗传学上难以操作的真菌证明连锁相关性提供了有力的工具。同样,电泳核型可用于那些难以用突变体表型鉴定的基因的定位。Debets 等人^[25]关于黑曲霉 (*A. niger*) 分离的 DNA 核型中八个连锁群的识别得到了较好的验证,同时也通过杂交的方法在电泳核型中对非突变型基因在染色体上的定位研究中,发现了 rRNA 基因位于染色体 II 或 VI 上,并进一步通过电泳带置换确认在高拷贝数 *amdS* 转化体中被整合的质粒数。

用脉冲电泳技术确定 *Nectria haematococca*^[35] 的致病性基因——豌豆素脱甲基酶 (Pda) 位于一条 1.6Mb 染色体上,在两个有 Pda⁺ 的分离株之间杂交时,意外地得到了 Pda⁻ 的子代, Southern 分析显示出 Pda⁻ 的子代不携带 Pda 基因的同源序列,用 CHEF 凝胶核型分析,显示出不再携带完整的 1.6Mb 染色体, Pda⁺ 核型的 Southern 分析证实 Pda⁺ 基因是位于 1.6Mb 染色体上。该菌株失去了 1.6Mb 染色体后便失去了致病性,但菌丝生长仍充满活力。因此,1.6Mb 染色体尽管携带致病性基因,但不影响其生存,所以 1.6Mb 染色体是一条非必需的染色体。这是利用核型分析在超数染色体上发现功能基因的典型事例。

在凝胶上分离完整的染色体 DNA,使得

构建染色体特殊文库成为可能。如果只限于单一染色体文库的分析,那么对于染色体上特殊基因或者 REL P marker 的研究将大大简化。Skinner 等人^[32]应用这一技术构建了 *M. grisea* 染色体 DNA 的质粒文库,他们把 CHEF 凝胶上被分离的染色体切下,同时在胶柱上用 Hind III 消化 DNA,并用“Gene-clean”回收片段,这些片段再在 0.7% 低熔点琼脂糖中进行分离,大于 2Kb 的片段再一次用“Gene-clean”回收,这些片段连接到 pUC18 上,转化到大肠杆菌 DH5a 菌株。构建粘性质粒文库也可用类似的方法。

通过上述方法获得的质粒文库,虽然能从目的染色体上获得 DNA 片段,但是容易被从其它染色体来源的片段所污染,因为在脉冲电场凝胶中所分离的每一条染色体带并不纯。另外,在凝胶分离过程中大的染色体分离是不完全的,做为构建质粒文库的材料和技术来讲需要进一步的改进。但是凝胶分离中小的染色体可以产生足够纯的 DNA 片段用于做为染色体的探针。这已在玉米黑粉菌中得到应用^[7]。

电泳核型分析技术至今不过 10 年的发展历史,然而它却很快的成为分子生物学领域的重要研究工具。因为它具有分离和分析 Mb 级 DNA 的能力,使得在染色体基因组基础上的研究开创了新的局面。除了它在动植物和人类基因组作图方面的重要贡献外,它对真菌遗传学的研究展示了广阔的前景,尤其对分子真菌学的研究显示出越来越重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Takahashi M, Ogino T, Bab K. *Biochem Biophys Acta*, 1969, 174: 183~187.
- [2] Schwartz D C, Saffran W, Welsh J, *et al.* *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 1983, 47: 189~195.
- [3] Gardiner K. *Analytical Chemistry*, 1991, 63: 658~665.
- [4] Schwartz D C, Cantor C R. *Cell*, 1984, 37: 67~75.
- [5] Carle G F, Olson M V. *Nucleic Acids Res*. 1984, 12: 5647~5664.
- [6] Magee B B, Magee P T. *J General Microbiology*, 1987, 133: 425~430.
- [7] Kinscherf T G, Leong S A. *Chromosoma (Berl.)*, 1988,

- 96: 427~433.
- [8] Carle G F, Frank M Olson M V. *Science*, 1986, **232**: 65~68.
- [9] Magee B B, Koltin Y, Gorman J A, *et al.* *Mol cell Biol*, 1988, **8**: 4721~4726.
- [10] Chu G, Vollrath D, Davis R W. *Science*, 1986, **234**: 1582~1585.
- [11] Vollrath D, Davis R W. *Nucleic acids Res*, 1987, **15**: 7865~7876.
- [12] Brody H, Garbon J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 6260~6263.
- [13] Gilly J A, Sands J. *Biotechnology Letters*, 1991, **13**: 477~482.
- [14] Orbach M J, Vollrath D, Davis R W, *et al.* *Mol cell Biol*, 1988, **8**: 1469~1473.
- [15] Howlett B J. *Experimental Mycology*, 1989, **13**: 199~202.
- [16] Tooley P W, Carras M M. *Experimental Mycology*, 1992, **16**: 188~196.
- [17] Masel A, Braithwaite K, Irwin J, *et al.* *Curr Genet*, 1990, **18**: 81~86.
- [18] Talbot N J, Salch Y P, MA M, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 585~593.
- [19] Skinner D Z, Leung H, Leong S A. In: *Genetic maps*, S. J. O' Broen (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1990, 3.82~3.83.
- [20] McCluskey K, Mills D. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1990, **3**: 366~373.
- [21] Budde A D, Leong S A. In: *Genetic Maps Cold Spring Harbor Laboratory Press*, N. Y. 1990, 3.92~3.93.
- [22] Cooley N R, Caten C E. *Mol Gen Genet*, 1991, **228**: 17~23.
- [23] Carter G L, Allison D, Michael W, *et al.* *Molecular Microbiology*, 1992, **6**(15): 2167~2174.
- [24] Smith C L, Matsumoto T, Niwa O, *et al.* *Nucleic acids Res*, 1987, **15**: 4481~4489.
- [25] Debets A J M, Holub E F, Swart K, *et al.* *Mol Gen Genet*, 1990, **244**: 264~268.
- [26] Smith A W, Collis K, Ramsden M, *et al.* *Curr Genet*, 1991, **19**: 235~237.
- [27] Lodder S, Gull K, Wood D. *Curr Genet*, 1993, **24**: 496~499.
- [28] Peeifer T A, Khachatourians G G. *J of Invertebrate Pathology*, 1993, **61**: 231~235.
- [29] Skatrud P L, Queener S W. *Gene*, 1989, **78**: 331~338.
- [30] Osiewacz H D, Ridde R. *Curr Genet*, 1991, **20**: 151~155.
- [31] Takahashi H, Suzuk K, Ohta N, *et al.* *Cytologia (Tokyo)* 1993, **58**: 477~482.
- [32] Skinner D Z, Budde A D, Leong S A, *et al.* In: *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press. Inc. U S A. 1991, 87~102.
- [33] Arima T, Morinaga T. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 1993, **34**: 481~485.
- [34] Shimizu S, Nishida Y, Matsumoto T. *J Invert Pathol*, 1991, **58**: 461~463.
- [35] Kayser T, Schulz G. *Curr Genet*, 1991, **20**: 289~291.
- [36] Osiewacz H D, Clairmont A, Huth M. *Curr Genet*, 1990, **18**: 481~483.
- [37] Horton J S, Raper C A. *Curr Genet*, 1991, **19**: 77~80