

一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法

张颖慧 魏东盛 邢来君 李明春*

(南开大学微生物学系 分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

摘要: 以丝状真菌雅致枝霉(*Thamnidium elegans*)和深黄伞形霉(*Umbelopsis isabellina*)为材料, 使用优化的 CTAB 法提取基因组 DNA。改进后的方法使用液氮冻融以及玻璃珠振荡的方法代替了传统的液氮研磨, 所需菌体量少, 而得到的基因组 DNA 比用传统的 CTAB 法得到的基因组 DNA 产率高、纯度好、且步骤简单, 适用于一次微量提取多个样品的基因组 DNA。这种方法得到的基因组 DNA 可用于大部分分子生物学基本实验如 PCR 和 DNA 的酶切等。

关键词: DNA 提取, CTAB, 玻璃珠, 液氮冻融

A Modified Method for Isolating DNA from Fungus

ZHANG Ying-Hui WEI Dong-Sheng XING Lai-Jun LI Ming-Chun*

(Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education,
Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: Genomic DNA of two fungi *Thamnidium elegans* and *Umbelopsis isabellina* were extracted with an amended Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) method. This modified method uses repeated freezing in liquid nitrogen and thawing with combination of shocking with glass beads to replace of the traditional method. Quality and concentration of DNA extracted by the modified method were tested. Compared with the traditional method, higher yield and purity of genomic DNA were obtained with less amount of mycelium. The result indicated that this is a simple and highly efficient method, which is suitable to treat many samples at one time and for basic molecular experiments, such as restriction endonuclease reaction and PCR.

Keywords: Extraction, CTAB, Glass beads, Thawing and freezing test of liquid nitrogen

在丝状真菌基因工程研究中, 基因组的提取是常规实验, 目前所采用的CTAB法^[1]来自于改进的提取植物基因组的方法, 可以有效地去除真菌组织中的多糖类物质。但是传统的CTAB法需要液氮研磨真菌菌丝, 研磨的充分与否会严重影响最后得到的DNA质量。本方法使用了液氮冻融和玻璃珠振荡^[2]结合的方法破壁, 不需液氮研磨, 且所需菌体量少, 操作简单, 所获得的基因组DNA完整性好,

可直接用于PCR和限制性酶切等分子生物学实验操作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: 雅致枝霉(*Thamnidium elegans*)As3.2806 购自中国微生物研究所; 深黄伞形霉(*Umbelopsis isabellina*)M₆₋₂₂ 为本室保存。

1.1.2 酶、试剂: 限制性内切酶 *EcoRI* 购自 TaKaRa 公司; 玻璃珠、DNA Taq 酶和 DNA Marker 购自北京鼎国公司, β -巯基乙醇、Tris 饱和酚购自上海生工。其他生化试剂和常规试剂均为超纯或分析纯。

1.1.3 主要仪器: DU-7 紫外分光光度计、ependorf 高速离心机、UV 自动凝胶成像系统、Biorad PCR 仪、漩涡振荡器。

1.1.4 培养基: 土豆培养基(1L): 土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, 琼脂 12 g, pH 自然。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取: (1) 50 mL 三角瓶中装 7 mL–8 mL 土豆液体培养基, 从生长 2 d–3 d 的斜面上刮少量孢子接种于该液体培养基中, 28 °C 培养 24 h–36 h;

(2) 取 1.5 mL 菌液(菌体呈均匀小球状)或是 1/4 炮弹管体积菌体(菌体呈较大团状), 12000 r/min 离心, 用 dd H_2O 洗 2 次;

(3) 每管加入 500 μL 5 \times CTAB(含 1% β -巯基乙醇), 液氮中速冷 30 s, 立即 65 °C 30 s, 反复 3 次;

(4) 加入 1/3 体积的玻璃珠, 漩涡振荡器上高速振荡 4 min–5 min。65 °C 保温 20 min, 每隔 10 min 摇匀 1 次。

(5) 加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, V/V/V), 12000 r/min 离心 10 min。将上清液移入到新的离心管中, 加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1, V/V), 12000 r/min 离心 10 min。

(6) 在上清中加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, –20 °C 静置 20 min–30 min, 12000 r/min 离心 10 min。

(7) 倒掉上清, 加 70% 的酒精 200 μL 洗沉淀, 室温干燥。

(8) 加入 100 μL TE 使 DNA 完全溶解。

(9) 加入 RNase A (10 mg/mL), 65 °C 保温 30 min 以上。

(10) 重复步骤 6–8。最后 DNA 溶于 30 μL dd H_2O 中。

1.2.2 DNA 紫外分光光度计检测: 取 5 μL 溶解的 DNA 加入 995 μL 的 dd H_2O 后充分混匀, 装在 1.5 mL 的离心管中待测。分别读出 260 nm 和 280 nm 的光密度值及其比值, 根据 $OD_{260/280}$ 的值比较所提取的总 DNA 的纯度。DNA 浓度计算公式: DNA 浓度 = $OD_{260} \times \text{核酸稀释倍数} \times 50/1000$ 。

1.2.3 酶切方法及 PCR 扩增方法: 见分子克隆^[3]。扩增片段分别为两种菌的 Δ^{-6} 脂肪酸脱氢酶基因^[4,5], 深黄伞形霉引物为:

上游: 5'-TAGGCTGAATTCATGGCTGCTGCTCCCAGTGTGAGGACG-3';

下游: 5'-AACTGCCTCGAGTTACTGCGCCTTACCCATCTTGGAGGC-3';

雅致枝霉引物为: 上游: 5'-CACGGTACC ATGAGTACATTAGATCGTCAA -3';

下游: 5'-GGCTGAATTCAAACGACTTTTTTGC TTAATTGC-3'。

2 结果与分析

2.1 琼脂糖凝胶电泳检测基因组的完整性

将上述方法提取的基因组 DNA 取 2 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 实验结果见图 1。琼脂糖电泳结果显示该方法提取的基因组完整性较好, 条带较窄, 说明降解很少; 使用改进后的方法得到的 DNA 明显亮度高于传统方法, 初步说明改进后提取的 DNA 浓度较高。

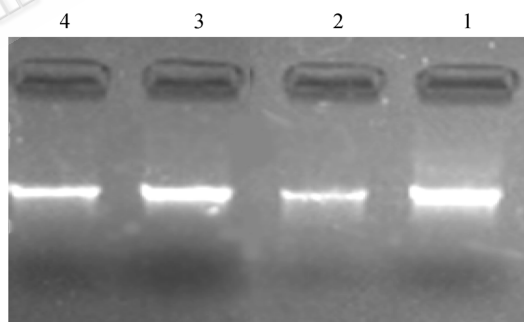


图 1 基因组 DNA

Fig. 1 Genomic DNA

1-2: 雅致枝霉基因组, 1 改进后方法, 2 传统 CTAB 法; 3-4: 深黄伞形霉基因组, 3 改进后方法, 4 传统 CTAB 法:

1-2: *Thamnidium elegans*, 1: Modified method, 2: Traditional CTAB method; 3-4: *Umbelopsis isabellina*, 1 Modified method, 2 Traditional CTAB method

2.2 分光光度法测定 DNA 的浓度和纯度

通过比色测定, 改进后的方法提取的 DNA 的量可达到 730 ng/ μL –840 ng/ μL , 而传统方法仅为 325 ng/ μL –390 ng/ μL ; 改进后获得的 DNA 比色测定 $OD_{260/280}$ 在 1.8–2.0 之间。说明该方法得到的基因组 DNA 比传统的 CTAB 法得到的基因组 DNA 得率高, 且所含杂质少, 纯度较好。

2.3 基因组 DNA 的酶切检测

将使用优化的 CTAB 法提取的基因组用 *EcoRI* 单酶切后, 进行电泳检测, 结果见图 2。可以看到, 基因组已经被较为充分的酶切, 形成了均匀的条带。说明改进方法所提取的 DNA 所含的杂质较少, 酶切效果良好。

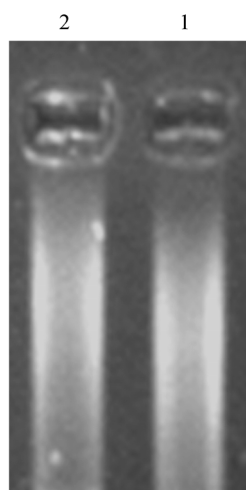


图 2 基因组 *EcoRI* 单酶切后电泳图

Fig. 2 Genomic DNA by *EcoRI*

1: 雅致枝霉; 2: 深黄伞形霉.

1: *Thamnidium elegans*; 2: *Umbelopsis isabellina*.

2.4 PCR 检测基因组 DNA

用本室已经有的两种菌的 Δ^{-6} 脂肪酸脱氢酶基因上下游引物对该方法提取的两种菌的基因组DNA进行PCR, 结果见图 3。可以看出, 雅致枝霉

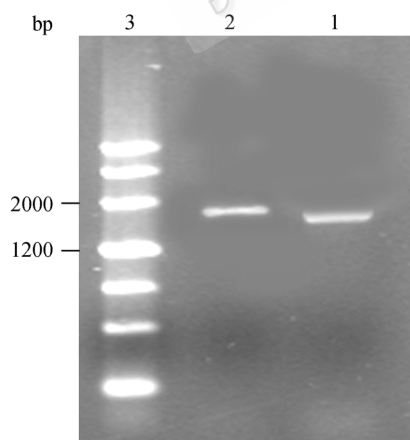


图 3 基因组 PCR 电泳图

Fig. 3 PCR amplification of the Δ^{-6} -fatty acid desaturase genomic gene

1: 雅致枝霉 Δ^{-6} -脂肪酸脱氢酶基因; 2: 深黄伞形霉 Δ^{-6} -脂肪酸脱氢酶基因; 3: DNA Marker.

1: PCR amplification of the *Thamnidium elegans* genomic sequence; 2: PCR amplification of the *Umbelopsis isabellina* genomic sequence; 3: DNA Marker

得到了约 1.39 kb 的目的条带, 深黄伞形霉得到了约 1.5 kb 的目的条带, 两条条带都很清晰整齐, 而且没有杂带, PCR 结果良好。说明该方法提取的基因组 DNA 适合用于 PCR 检测。

3 讨论

丝状真菌基因组 DNA 的提取是丝状真菌基因工程研究中一项常规实验操作, 基因组的产率和纯度对后续实验如酶切、PCR、杂交等有重要影响。目前广泛采用的 CTAB 法是针对丝状真菌细胞结构成分与植物细胞的相似性借鉴提取植物基因组的方法改进而来的。但是传统的 CTAB 法有 3 个主要缺点: (1) 液氮研磨所需菌体量多, 需发酵大量发酵液, 而微量提取仅需少量菌体, 造成菌体的浪费。(2) 研磨的充分与否严重影响提取基因组的质量, 研磨不充分或研磨后没有及时加入裂解液, 就可能造成提取 DNA 量太少或基因组降解。(3) 目前在丝状真菌基因工程遗传转化中, 转化丝状真菌常常会得到很多转化子, 由于传统方法研磨费时费力, 大批量提取多个样品的基因组 DNA 极为困难。而本实验改进后的方法, 克服了以上 3 个缺点, (1) 提取时所需菌体非常少, 如果是均一的形成球状菌体发酵液中, 只需 1.5 mL 菌体, 大大地降低了浪费。(2) 使用液氮冻融和玻璃珠振荡的方法破壁, 可以较好地控制破壁的程度, 重复性好, 更易于操作。(3) 非常适用于大批量提取多个样品的基因组 DNA, 所需时间少, 操作简单, 2 h 即可获得基因组 DNA, 可以一次提取 12–24 个样品的基因组 DNA。除了上述 3 个优点外, 改进后的 CTAB 法获得的基因组完整性好、纯度高、得率也较传统方法高, 在 -20°C 可以长期保存, 稳定性好。

此外, 该方法还用来提取了两种高等真菌日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)和产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)的基因组, 也取得了很好的效果(结果略)。

实验中需要注意: (1) 添加菌体量的多少很关键, 菌体加的过多, 破壁易不充分, 可适当增加震荡时间, 菌体加的太少, 则得到的基因组 DNA 较少。(2) 对于发酵后成为均匀小球状的真菌, 直接取 1.5 mL 菌液离心即可; 而形成团状的真菌, 则需要用玻璃棒挑取少量菌体。(3) 基因组 DNA 在用 RNase A 处理时, 为了避免在 37°C 下 RNase A 中混有的 DNase 降解 DNA, 推荐选用 65°C , 因为在该

温度下, DNase 活性几乎丧失, 而 RNase A 活性依然很高, 处理效果很好。对改进后的 CTAB 法提取的基因组 DNA 进行内切酶消化、PCR、以及后续的 Southern 杂交等实验, 其结果和重复性都令人满意。

参 考 文 献

- [1] Walker WH, Fitzpatrick SL, Barrera - Saldana HA, *et al.* *Endocrine Reviews*, 1991, **12**: 316-318.
- [2] 戈海泽, 郭 刚, 张 瑞, 等. 天津医科大学学报, 2006, **12**(2): 313-314.
- [3] Brook J, Frisch EF, Maniatis T 著(黄培堂等译), 分子克隆实验指南, 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] 李明春, 刘 莉, 胡国武, 等. 菌物系统, 2001, **20**(1): 44-50.
- [5] 王德培, 李明春, 魏东盛, 等. 微生物学报, 2006, **46**(1): 74-79.

(上接 p.461)

征 稿 简 则

3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句(毕竟不是我们的母语), 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登陆号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。凡被录用的稿件将及时发出录用通知, 对不录用的稿件, 一般在收稿 1 个月之内通过 E-mail 说明原因, 打印稿不退。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网址上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区大屯路中国科学院微生物研究所 B401 《微生物学通报》编辑部 (100101)

Tel: 010-64807511 E-mail: tongbao@im.ac.cn 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>