

# CTAB 法提取野野村菌基因组 DNA

王凡<sup>1</sup> 洪葵<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学生命科学技术学院 湖北 武汉 430070)

(2. 中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所 农业部热带作物生物技术重点开放实验室 海南 海口 571101)

**摘要:** 针对用常规方法难以提取野野村菌基因组 DNA 的问题, 通过选用添加甘氨酸的不同培养基和不同培养时间获得的菌丝体, 采用液氮研磨结合 CTAB 法提取野野村菌 DNA, 电泳检测及计算  $OD_{260}/OD_{280}$  值。结果表明, 在添加 0.3% 甘氨酸的麦芽汁-酵母膏(YE)培养基中振荡培养培养 3 d 的菌丝体适合于 DNA 提取, 用 CTAB 法获得的基因组 DNA, 长度约为 20 kb, 且  $OD_{260}/OD_{280}$  在 1.8 左右, 达到基因组 DNA-DNA 杂交的要求。

**关键词:** 野野村菌属, DNA 提取, CTAB 法

## CTAB Method for Genomic DNA Extraction from *Nonomuraea*

WANG Fan<sup>1</sup> HONG Kui<sup>1,2\*</sup>

(1. Huazhong Agricultural University of Life Science and Technology, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou, Hainan 571101, China)

**Abstract:** In order to obtain genomic DNA which meets the requirements of DNA-DNA hybridization, CTAB method combined with liquid nitrogen grinding was investigated. Cultures from different media added with glycine were harvested in different time. Quality of extracted genomic DNA was assessed by electrophoresis and  $OD_{260}/OD_{280}$  value. Mycelia of shaking culture in yeast extract & malt extract (YE) medium containing 0.3% glycine for 3 days were subjected for DNA extraction. The genomic DNA obtained was about 20 kb, with the  $OD_{260}/OD_{280}$  value around 1.8.

**Keywords:** *Nonomuraea*, Genomic DNA extraction, CTAB method

野野村菌属(*Nonomuraea*)是由 Zhang 等在 1998 年命名<sup>[1]</sup>, 属于链孢囊菌科。到目前为止, 该属包含 23 个种与 2 个亚种。DNA-DNA 杂交率是判断细菌新种的重要指征, 尤其是对像野野村菌属这样虽然 16S rRNA 基因序列相似性在 99% 以上, 但杂交率却只有 4.5%–48% 的一些种属<sup>[2–3]</sup>。高纯度大片段基

因组 DNA 的获得是进行杂交的重要前提, 放线菌基因组 DNA 的提取可分为物理破壁及化学或酶法破壁<sup>[4]</sup>, 常选用溶菌酶与表面活性剂 SDS 共同处理来获得。文献报道的野野村菌株一般选用丝状真菌的基因组 DNA 提取方法<sup>[5–6]</sup>。CTAB (十六烷基三乙基溴化铵)法常用于植物基因组 DNA 的提取<sup>[7]</sup>。在本

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA09Z415); 国家自然科学基金广东联合基金重点项目(No. U0633008)

\* 通讯作者: Tel: 86-898-66984969; ✉ k1022@163.net

收稿日期: 2010-02-08; 接受日期: 2010-04-12

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

研究中,我们对培养条件加以改进,选用液氮研磨结合 CTAB 法,提取到了长度及纯度都能达到杂交要求的基因组 DNA。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 菌株 *Nonomuraea* sp. 210417 分离自海南文昌头苑红树林根际土壤,参考模式菌株为 *Nonomuraea bangladeshensis* JCM 13930<sup>T</sup>。

**1.1.2 试剂:** TE25S 缓冲液: 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8), 25 mmol/L EDTA (pH 8), 0.3 mol/L sucrose。菌体悬浮用 SET 缓冲液: 75 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA (pH 8), 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)。TE 缓冲液: 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8), 25 mmol/L EDTA (pH 8)。20 × SSC 洗涤缓冲液(L<sup>-1</sup>): NaCl 175.3 g, sodium citrate 88.2 g, pH 7。CTAB/NaCl: 10% CTAB (十六烷基三乙基溴化铵), 0.7 mol/L NaCl。

**1.1.3 培养基:** 选用野野村菌属 DNA 提取常用的菌体培养基胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)<sup>[5]</sup>和麦芽汁-酵母膏培养基(YE)。TSB 的配方为(g): 胰蛋白胨 17, 大豆蛋白胨 3, 氯化钠 5, 磷酸氢二钾 2.5, 葡萄糖 2.5, pH 7.3 ± 0.2。YE 的配方为(g): 酵母粉 4, 麦芽浸提粉 10, 葡萄糖 4, 蒸馏水 1 L, pH 7.2–7.4。

**1.1.4 培养条件:** 供试菌株在 TSB 或 YE 液体培养基中 28°C 生长 3 d 作为种子液,以 10%的接种量转到含有甘氨酸的对应相同的培养基中,28°C、250 r/min 振荡培养 36、48 和 72 h。

### 1.2 方法

**1.2.1 甘氨酸浓度的确定:** 在 TSB 和 YE 液体培养基中添加甘氨酸<sup>[8]</sup>,浓度分别为: 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%、0.35%、0.40%、0.45% 和 0.50%,每个浓度设置 3 个重复。28°C、250 r/min 培养 72 h 后,用无菌水洗涤,3000 r/min 离心收集菌丝体,60°C 烘干至恒重后称量。

**1.2.2 预处理:** 将采用 1.1.4 培养方式收获的菌体用蒸馏水洗涤 2 次,在 TE25S 缓冲液中浸泡洗涤 30 min,3000 r/min 离心收集。−40°C 真空冷冻干燥机冻干后在研钵(已高压灭菌)中加入液氮研磨成粉末,备用。

**1.2.3 基因组 DNA 的提取方法:** 选用了 CTAB 法<sup>[7]</sup>,略有改进。将液氮研磨过的干菌体约 50 mg 重悬于

5 mL SET 缓冲液中,加入 100 μL 溶菌酶(50 g/L)溶液,37°C 放置 30–60 min 加入 50 μL 蛋白酶 K (20 g/L),颠倒混匀后加入 300 μL 10% SDS,55°C 水浴 1 h,并不时晃动;加入 1 mL 5 mol/L NaCl,颠倒混匀(NaCl 终浓度为 0.8 mol/L);加入 0.65 mL CTAB/NaCl,混匀后置于 55°C 10 min;冷却至 37°C,加入 5 mL 氯仿/异戊醇,颠倒混匀 30 min;20°C、1000 r/min 离心 15 min (加入 CTAB/NaCl 以及氯仿/异戊醇抽提这两个步骤可重复进行;取上清,加入 1/10 体积的 CTAB/NaCl 置于 55°C,30 min 后用氯仿异戊醇抽提);取上清,加入 0.6 倍体积的异丙醇沉淀,3 min 后挑出 DNA,用 70%乙醇漂洗,风干后用 200 μL 的 TE 溶解。

**1.2.4 基因组 DNA 的电泳检测:** 取 5 μL DNA 溶液于 1%琼脂糖凝胶 100 V 电泳 1 h,260 nm 紫外灯下观察,检测基因组 DNA 的长度。

**1.2.5 基因组 DNA 纯度的检测:** 用紫外分光光度计分别在 260 nm 和 280 nm 下测定 DNA 溶液的 OD 值,并计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值。

**1.2.6 基因组 DNA-DNA 杂交:** 选用尼龙膜杂交法<sup>[9]</sup>,略有改进。从菌株 *Nonomuraea* sp. 210417 与模式菌株 *N. bangladeshensis* JCM 13930<sup>T</sup> 中分别提取 DNA,用 *Sau*3A I 酶切,形成长度为 0.2–2 kb 含有粘性末端的 DNA 片段<sup>[10]</sup>,再分别用 T4 连接酶与含有粘性末端的 linker 连接后作为模板进行 PCR 扩增。参照菌株 *N. bangladeshensis* JCM 13930<sup>T</sup> 的 DNA 用地高辛修饰的 dUTP 标记扩增,非标记扩增的 *Nonomuraea* sp. 210417 的 DNA 经紫外交联仪照射 1 min 后固定于尼龙膜上。将膜放入含 10 mL 杂交液的杂交管中,预杂交 1 h 后,加入地高辛标记的探针,杂交 20 h 后,将膜取出,放入 10 mL 2 × SSC,0.1% SDS 洗涤液中室温洗涤 2 次,每次 5 min;20 mL 0.1 × SSC,0.1% SDS 洗涤液中 65°C 洗涤 2 次,每次 15 min;经 NBT/BCIP 碱性磷酸酯酶显色剂显色后,对杂交膜拍照,用天能科技有限公司 DOTS Ver 3.00 分析软件对图片进行分析,计算杂交值。

## 2 结果与分析

### 2.1 甘氨酸浓度的确定

在 YE 和 TSB 培养基中加入不同浓度的甘氨酸培养菌体,烘干至恒重后称量,结果见图 1。

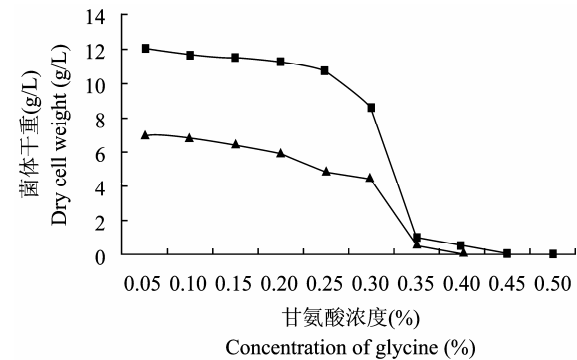


图 1 不同甘氨酸浓度对 *Nonomuraea* sp. 210417 生物量的影响

Fig. 1 Effects of glycine concentration on the biomass of strain *Nonomuraea* sp. 210417

注: ■: YE 培养基; ▲: TSB 培养基.

Note: ■: YE culture medium; ▲: TSB culture medium.

由图 1 可知, 在 0.05%–0.30% 的甘氨酸浓度范围内, 菌株 *Nonomuraea* sp. 210417 在 YE 和 TSB 培养基中的生物量范围分别为 12–8.6 g/L 和 7–4.5 g/L。当甘氨酸浓度为 0.35% 时, 在 YE 和 TSB 培养基中的生物量分别迅速降至 1 g/L 和 0.6 g/L, 可以看出, 高于 0.30% 浓度的甘氨酸对 *Nonomuraea* sp. 210417 的生长有抑制作用, 故应控制甘氨酸的浓度为 0.30%。

2.2 基因组 DNA 的电泳检测

分别收集在 100 mL TSB 和 YE 培养基中培养 36、48 和 72 h 的菌丝体, 提取基因组 DNA, 电泳检测。结果显示, 所提取的 DNA 在 20 kb 左右有清晰的 DNA 条带, 未发现降解现象(图 2)。

2.3 基因组 DNA 的纯度检测

在 72 h 以内, 从 TSB 培养基培养的 *Nonomuraea* sp. 210417 菌丝体中提取的 DNA 浓度范围为 0.269–1.315 g/L,  $OD_{260}/OD_{280}$  范围为 1.6536–1.8033, 从 YE 培养的菌丝体中提取的 DNA

的浓度范围为 1.723–3.428 g/L,  $OD_{260}/OD_{280}$  范围为 1.7379–1.8216 (表 1)。用 CTAB 法提取的基因组 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  可以达到 1.8 左右, 从 YE 培养基培养的菌丝中提取的 DNA 浓度更高, 故菌株 *Nonomuraea* sp. 210417 在 YE 培养基中培养 3 d 左右的菌丝体适合于基因组 DNA 的提取。

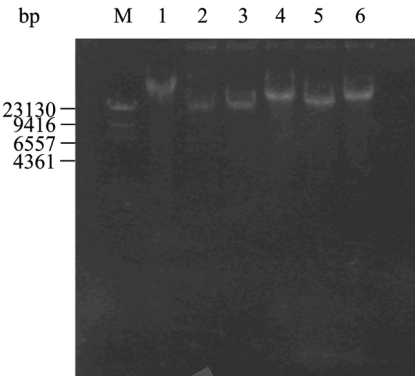


图 2 CTAB 法提取的 *Nonomuraea* 基因组 DNA 电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram of genomic DNA extracted by CTAB method

注: M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III; 1, 2, 3: TSB 培养基培养 36、48 以及 72 h 提取的 DNA; 4, 5, 6: YE 培养基培养 36、48 和 72 h 提取的 DNA.

Note: M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III; 1, 2, 3: DNA extracted from culture in TSB medium after 36, 48 and 72 h respectively; 4, 5, 6: DNA extracted from culture in YE medium after 36, 48 and 72 h.

2.4 杂交结果

按照上述确定的方法提取了菌株 *Nonomuraea* sp. 210417 和参考模式菌株 *Nonomuraea* JCM 13930<sup>T</sup> 的基因组 DNA (表 2), 并对两株菌做了 DNA-DNA 杂交。结果显示, 这两株野野村菌的 DNA 同源性比较低为 36.9%。参照国际细菌学特别命名委员会提出的原则: DNA 相关性  $\geq 70\%$  或杂交分子的热解链温度差  $\leq 5^{\circ}\text{C}$  为细菌种的界限<sup>[11]</sup>, 这两株菌应归属于不同的种。*Nonomuraea* sp. 210417 和 *Nonomuraea* JCM 13930<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因相似

表 1 不同培养条件下获得的 <i>Nonomuraea</i> sp. 210417 的基因组 DNA 测定结果				
Table 1 Assessment of DNA of strain <i>Nonomuraea</i> sp. 210417 obtained under different culture condition				
培养基 Culture medium	培养时间 Culture time (h)	$OD_{260}$	$OD_{260}/OD_{280}$	DNA 浓度 Concentration of DNA (g/L)
TSB	36	0.0335	1.6536	0.335
	48	0.0269	1.8033	0.269
	72	0.1315	1.7985	1.315
YE	36	0.1723	1.7379	1.723
	48	0.3428	1.8216	3.428
	72	0.3376	1.8041	3.376

率很高(99.4%), 而基因组 DNA 同源性比较低, 这种现象在野野村菌属中普遍存在, *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup> 与 *Nonomuraea turkmeniaca* NRRL B-16246<sup>T</sup> 16S rRNA 基因序列相似性为 99%, DNA 同源性仅为  $4.5\% \pm 3.8\%$ <sup>[2]</sup>; *Nonomuraea africana*, *Nonomuraea dietziae* 和 *Nonomuraea recticatena* 菌株之间的 16S rRNA 基因序列相似性为 98.9%–99.8%, 而 DNA-DNA 同源性最高仅为 45%–48%<sup>[3]</sup>。

表 2 基因组 DNA 的浓度及纯度  
Table 2 Concentration and purity of genomic DNA

菌株 Strain	OD <sub>260</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	DNA 浓度 Concentration of DNA (g/L)
<i>Nonomuraea</i> sp. 210417	0.3376	1.8041	3.376
<i>Nonomuraea</i> JCM 13930 <sup>T</sup>	0.2964	1.7983	2.964

### 3 讨论

革兰氏阳性菌的细胞壁主要由肽聚糖组成, 借助短肽交联而成网状结构, 它是难溶性的聚糖链。破碎细菌细胞壁的主要阻力来自于肽聚糖的网状结构, 其网结构的致密程度和强度取决于聚糖链上所有存在的肽键的数量和其交联的程度。Simonet 等人利用消色肽酶(Achromopetidase)较完美地解决了 Frankia 菌总 DNA 提取困难的问题<sup>[12]</sup>, 该酶对除棒状杆菌及分支杆菌之外的大部分革兰氏阳性菌有效, 但由于价格昂贵, 人们常改用溶菌酶与表面活性剂如 SDS 共同处理以使胞内 DNA 释放<sup>[13]</sup>。在本研究中, 这些 DNA 提取方法对 *Nonomuraea* sp. 210417 并不凑效, 这和该菌特殊的细胞壁及氨基酸类型有关(菌株 *Nonomuraea* sp. 210417 的细胞壁含 meso-DAP, 全细胞水解物含马杜拉糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖和核糖), 特殊的胞壁成分使得其供溶菌酶作用的位点较少。我们也尝试了文献报道的用液氮研磨这种常用于真菌基因组 DNA 提取的物理破碎法<sup>[4-5]</sup>, 但没有获得可用于杂交的 DNA。改用液氮研磨结合 CTAB 法获得了很好的提取效果, 提取的总 DNA 约 20 kb, 带型清晰, 未发现降解现象。对于 *Nonomuraea bangladeshensis* JCM 13930<sup>T</sup>, 用 CTAB 法进行总 DNA 的提取, 也获得了较好的结果

(电泳图未列出), 这表明, CTAB 法对于这一类特殊的稀有放线菌属是有效的。

由于甘氨酸能使 G<sup>+</sup>细菌的菌体细胞壁发育不健全, 便于细胞壁的破碎, 常应用于原生质体的制备, 甘氨酸的作用可能是在细胞壁的合成过程中代替结构类似的丙氨酸, 进而干扰细胞壁网状结构的合成, 有助于细胞壁的瓦解。因而对于难以破壁的 *Nonomuraea*, 可以在培养基中加入一定量的甘氨酸进行前处理, 但由于菌株间的个体差异, 所适用的甘氨酸浓度不一样。应根据具体情况加以调整, 以确定最佳的甘氨酸添加比例。

DNA 的提取效果与收获的菌丝体生长状况有关, 一般选择培养 36 h 左右收获的较嫩的菌体进行 DNA 提取, 便于破壁。但由于某些稀有放线菌属生长速度较慢, 培养时间可以根据菌株的生长情况加以调整。本研究对不同的培养时间从不同培养基中收获的菌体进行了基因组 DNA 提取效果的比较, 结果显示, *Nonomuraea* sp. 210417 在 YE 培养基中培养 3 d 可以得到足够的生物量, 提取的 DNA 浓度更高。所以, 在提取基因组 DNA 时, 应选择最适于菌株生长的培养基和培养时间。

### 参 考 文 献

- [1] Zhang ZH, Wang Y, Ruan JS. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, **48**(2): 411–422.
- [2] Marilize LR, Paul RM. *Nonomuraea candida* sp. nov., a new species from South African soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2008, **93**(1/2): 133–139.
- [3] Stachebrandt E, Wink J, Steiner U, et al. *Nonomuraea dietzii* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**(4): 1437–1441.
- [4] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, **30**(4): 82–84.
- [5] Ismet A, Takuji K, Atsuko M, et al. *Nonomuraea bangladeshensis* sp. nov. and *Nonomuraea coxensis* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**(7): 1504–1509.
- [6] Ismet A, Takuji K, Atsuko M, et al. *Nonomuraea maheshkhaliensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from mangrove rhizosphere mud. *J Gen Appl Microbiol*, 2007, **53**(3): 159–166.
- [7] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acid Res*, 1980, **8**(19): 4321–4326.
- [8] 姜成林, 徐丽华. 放线菌 DNA 制备过程中胞壁破碎方

法的改进. 微生物学通报, 1990, 17(3): 182.

- [9] Cardinali G, Liti G, Martini A. Non-radioactive dot-blot DNA reassociation for unequivocal yeast identification. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(2): 931–936.
- [10] Wassill L, Ludwig W, Schleifer KH. Development of a modified subtraction hybridization technique and its application for the design of strain specific PCR systems for lactococci. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 166(1): 63–70.
- [11] Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al. International

committee on systematic bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. *Int J Syst Bacteriol*, 1987, 37(4): 463–464.

- [12] Simonet P. An improved method for lysis of *Frankia* with achromopetidase allows detection of new plasmids. *Can J Microbiol*, 1984, 30(10): 1292–1295.
- [13] Dobritsa SV. Restriction analysis of the *Frankia* spp. Genome. *FEMS Microbiol Lett*. 1985, 29(1/2):123–128.

## 书 讯

### 英汉双语对照版《〈自然〉百年科学经典》丛书

#### 汇聚《自然》百年经典 书写鲜活的近代科学史

英汉双语对照版《〈自然〉百年科学经典》(Nature: the Living Record of Science)是由外语教学与研究出版社联合麦克米伦出版集团和自然出版集团共同策划编辑的科学主题丛书。丛书共十卷, 收录并翻译了《自然》杂志自 1869 年创刊以来近 150 年间发表过的 840 余篇经典文献。这是目前为止全国乃至全世界唯一的一套最大规模的《自然》杂志论文选集。目前发布的是这套丛书的前两卷, 其余八卷预计于 2010 年陆续出版。

曾担任《自然》杂志编辑 20 余年的英国著名科学和科普作家菲利普·鲍尔(Philip Ball)说: “迄今为止还没有出版过如此大部头的《自然》杂志的科学论文精选集, 这套选集将很有可能成为相关的科学研究以及科学史研究甚而近现代社会发展研究的第一手资料。”

丛书由著名美籍华裔物理学家、诺贝尔物理学奖获得者李政道担任总顾问, 全国人大常委会副委员长、中国科学院院长路甬祥担任中方主编, 《自然》杂志前任主编约翰·马多克斯爵士(Sir John Maddox)和《自然》杂志现任主编菲利普·坎贝尔(Philip Campbell)担任英方主编。

该丛书所选文章涵盖物理、化学、天文、地理和生物等基础学科及众多交叉学科, 从狭义相对论的提出到量子理论的日趋成熟, 从同位素的发现到纳米管的诞生, 从进化论之争到人类基因组测序完成……再现了一个多世纪以来人类在自然科学领域艰辛跋涉、不断探索的历史足迹, 堪称一部鲜活的近代科学史诗。

#### 英汉对照 原汁原味 专业导读

外研社推出的这套《〈自然〉百年科学经典》是国内第一部以英汉双语对照形式出版的《自然》杂志经典论文选集, 荟萃了《自然》杂志自 1869 年创刊以来最具开创意义、最具影响力的经典科学文献, 并将这些重大科研成果的原始文献原汁原味地呈献给中国读者。双语对照的形式不仅可以使读者领略文章的原貌, 也更加便于中国读者阅读不同专业领域的文献, 扩大受众群体, 促进不同文化、不同专业领域之间的学术交流, 推动中国科学研究事业的发展。

这套丛书收录的科学文献大部分是原创性的科研论文, 另外也有少量综述、新闻快报和通讯评论等。通过纵览这些篇目, 读者既能从微观上欣赏优秀科学家在处理具体问题时的超凡智慧, 又能从宏观上了解各个学科领域在不同发展阶段的总体概貌。

此外, 该丛书还特意安排了几组系列文章, 以展示真理的探求者们围绕同一论题进行的学术争鸣。从这些严肃的科学争辩中, 读者将感受到碰撞迸发的思想火花和收获背后的艰辛探索。

丛书的编者每篇文章都精心撰写了简短导读, 这不仅可以帮助读者快速了解全文大意, 而且也可以为读者展现当时的研究背景, 引领读者以更加开阔的视野去感受这些非凡科学研究所蕴含的价值。

#### 云集知名专家 保证高质量出版

世界著名物理学家、演说家和作家, 曾两度担任《自然》杂志主编、时间长达二十多年的马多克斯爵士亲自参与该丛书文献的精选, 并带领《自然》杂志各个领域的资深编辑合力完成选篇工作。

外研社邀请一批长期工作在科研一线的专家学者, 以高度的责任感耗时三年完成全部文章的中文翻译工作, 并联系各领域的数十位知名专家对中文译文进行严格审订。为方便读者查找, 每卷中的文章按学科分类建立了索引。庞大的专家阵容, 专业的翻译、编辑队伍, 严格规范的出版流程, 保证了丛书的高质量。