

银耳芽孢基因组 DNA 五种提取方法的比较

刘娟¹, 马爱民^{1,*}, 杨江涛², 李大方¹

(1.华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070; 2.贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 采用酚仿法、CTAB 法、蛋白酶 K 法、氯化苄法和盐析法五种方法分别提取银耳芽孢基因组 DNA, 用吸光度估计 DNA 的纯度和得率、RAPD(随机扩增多态 DNA)技术和限制性内切酶酶切反应评价 DNA 的质量。结果表明: 五种方法所提的 DNA 纯度及产率有差别, 氯化苄法和蛋白酶 K 法的产率要高于另外三种方法, 但 CTAB 法所提 DNA 纯度最高。综合而言, CTAB 法是五种方法中最为适合银耳芽孢基因组 DNA 提取的方法。

关键词: 银耳; 芽孢; DNA 提取; RAPD; 限制性内切酶酶切

Comparison of Five Methods for Genomic DNA Extraction from Spores of *Tremella fuciformis*

LIU Juan¹, MA Ai-min^{1,*}, YANG Jiang-tao², LI Da-fang¹

(1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract : DNA was extracted from spores of *Tremella fuciformis* by phenol-chloroform method, CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) method, proteinase K method, benzyl chloride method and salting out method respectively. The purity and yield of the DNA were determined by A_{260}/A_{280} respectively. The quality of the DNA were evaluated with RAPD (random amplified polymorphic DNA technology) and restriction endonuclease digestion. Results showed that there are some differences in purity and yield among those 5 methods. Both benzyl chloride method and proteinase K method have better yield, but the purity of the DNA by CTAB method is better than that of others. In a word, the CTAB method is most suitable for extracting genomic DNA from spores of *Tremella fuciformis*.

Key words: *Tremella fuciformis*; spores; DNA extraction; RAPD; restriction endonuclease digestion

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0248-04

银耳(*Tremella fuciformis* Berk.)又称白木耳, 是一种高等担子菌, 其子实体含有丰富的蛋白质、多糖、不饱和脂肪酸及维生素等营养物质, 可治疗气管炎、心血管病、糖尿病等多种疾病, 素有“菌中之王”的美称^[1]。已经研究开发出银耳糖浆、银耳口服液等产品, 并取得了良好的经济效益^[2]。目前我国对银耳的研究集中在分类、生活史和生活条件等上, 对银耳遗传学的研究则较少, 以分子生物学的技术手段进行遗传育种也一直未有实质性进展^[3]。

银耳是一种二型态真菌, 其二型态现象表现为担孢子能反复芽殖, 产生大量酵母状细胞, 具有不同极性的可亲和酵母状细胞配对, 融合并形成双核菌丝, 纯菌丝在培养过程中因外界环境因素的刺激在其边缘处能形成酵母状节孢子^[4]。担孢子和节孢子统称“芽孢”。

由于银耳芽孢以出芽生殖的方式进行繁殖, 相对于菌丝和子实体而言, 能在较短时间内达到较大的生物量, 因而在 DNA 提取时可选用芽孢作为材料。但是银耳芽孢细胞壁结构比较致密, 多糖和蛋白等次生代谢产物的含量较高, 在基因组 DNA 的提取过程中存在一定难度。尽管目前已有许多其它提取真菌 DNA 方法的报道, 基本程序大同小异, 但针对不同的生物材料, 细微差别会影响所提 DNA 的质量和产量。本研究比较真菌 DNA 几种常见的提取方法, 以期筛选出一种较为适合银耳芽孢基因组 DNA 的提取方法, 为银耳分子生物学水平上的研究提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 菌种

收稿日期: 2007-05-10

基金项目: 中国科学院微生物研究所资源中心资助项目

作者简介: 刘娟(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物学。E-mail: liujuan0407@webmail.hzau.edu.cn

* 通讯作者: 马爱民(1965-), 男, 教授, 研究方向为食品生物技术。E-mail: maaimin@yahoo.com.cn

银耳(*Tremella fuciformis* Berk.)芽孢为华中农业大学食品安全与微生物系保存。

1.2 试剂

酚仿法提取液 I: 100mmol/L NaCl、pH8.050mmol/L Tris-HCl、pH8.0EDTA 50mmol/L、10mmol/L β -巯基乙醇; 酚仿法提取液 II: 100mmol/L NaCl、pH8.0 Tris-HCl、pH8.0 50mmol/L EDTA、1%SDS。

CTAB 法提取液: 1mol/L NaCl、pH8.0 100mmol/L Tris-HCl、pH8.0 20mmol/L EDTA、1% CTAB; CTAB 沉淀液: 40mmol/L NaCl、pH8.0 50mmol/L Tris-HCl、pH8.0 10mmol/L EDTA、1% CTAB。

蛋白酶 K 法提取液: pH8.0 10mmol/L Tris-HCl、pH8.0 100mmol/L EDTA、0.5% SDS、0.1mg/ml 蛋白酶 K。

氯化苄法提取液: pH9.0 100mmol/L Tris-HCl、pH9.0 40mmol/L EDTA。

盐析法提取液: 2% Triton X-100; 1%SDS; pH8.0 10mmol/L Tris-HCl、pH8.0 0.1mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl。

PCA: 苯酚:氯仿:异戊醇=25:24:1。

1.3 仪器

5415R 冷冻离心机 Eppendorf 公司; Gellogic 200 凝胶成像系统 Eastman Kodak 公司; DYY-8C 型电泳仪北京六一仪器厂; Lamda35 型紫外可见光双光束分光光度计 Perkin-Elmer 公司; Fgradient PCR 仪 Biometry 公司。

1.4 方法

1.4.1 菌体收集

银耳芽孢接种于 PDA(Difco)培养基, 25℃培养 4~5d, 菌体用细胞刮刮下后以无菌生理盐水浸洗 2 次, 然后用无菌吸水纸吸干备用。

1.4.2 芽孢基因组 DNA 提取方法(略有改动)

1.4.2.1 酚仿法^[5]

液氮研磨, 取 100mg 左右菌体置于离心管, 加入 0.8ml 提取液 I 悬浮后去上清液得沉淀, 加入 0.7ml 提取液 II, 65℃水浴 1h, 不时颠倒混匀, 上清液加入等体积预冷 PCA, 10000r/min 离心 10min, 上清液转管加入等体积 CA, 13000r/min 离心 5min, 取上清液加 1/10 体积 3mol/L NaAc 与 2 倍体积无水乙醇, -20℃放置 30min 离心得沉淀。以 70% 乙醇洗涤沉淀两次, 室温自然风干后溶解于适量 TE 缓冲液, 加入 1 μ l 10mg/ml RNaseA, 37℃保温 1h。

1.4.2.2 CTAB 法^[6]

液氮研磨, 取 100mg 左右菌体置于 1.5ml 离心管, 加入 0.5ml 提取液, 70℃水浴 0.5h, 不时颠倒混匀, 上

清液加 2 倍体积 CTAB 沉淀液, 10000r/min 离心 10min, 转上清液加 0.35ml 1.2mol/L NaCl 和 2 倍体积无水乙醇, -20℃放置 30min 离心得沉淀。后续同酚仿法。

1.4.2.3 蛋白酶 K 法^[7]

液氮研磨, 取 100mg 左右菌体置于 1.5ml 离心管, 加入 0.6ml 提取液, 50℃水浴 1h, 不时颠倒混匀, 上清液加等体积预冷 PCA, 10000r/min 离心 10min, 上清液转管加入等体积 CA, 离心取上清液加 1/10 体积 3mol/L NaAc 溶液与 2 倍体积无水乙醇, -20℃放置 30min 离心得沉淀。后续同酚仿法。

1.4.2.4 氯化苄法^[8]

液氮研磨, 取 100mg 左右菌体置于 1.5ml 离心管, 加入 0.1ml 10%SDS、0.3ml 氯化苄和 0.5ml 提取液, 50℃水浴 1h, 不时颠倒混匀, 上清液加入等体积 NaAc(0.3mol/L) 混匀, 冰水浴 15min, 10000r/min 离心 10min, 收集上清液加入 2 倍体积无水乙醇, -20℃放置 30min 离心得沉淀。后续同酚仿法。

1.4.2.5 盐析法^[9]

液氮研磨, 取 100mg 左右菌体置于 1.5ml 离心管, 加入 0.3ml 提取液, 高速振荡 10min。加入 0.2ml 预冷饱和 6mol/L NaCl, 充份混匀, 2500r/min 离心 15min, 收集上清液加入 2 倍体积无水乙醇, -20℃放置 30min 离心得沉淀。后续同酚仿法。

1.4.3 DNA 浓度测定及电泳检测

紫外分光光度计测定各方法提取的 DNA 在 260、280nm 波长下的吸光度, 计算出 A_{260}/A_{280} 值及 DNA 浓度。

每组三个平行, 取平均值。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。DNA 浓度(μ g/ μ l)= $A_{260} \times$ 稀释倍数 \times 50/1000。

1.4.4 RAPD 反应

在 Biometry PCR 仪上进行 RAPD 反应, 反应体系 50 μ l, DNA 样品 0.1 μ g, 随机引物: S₁(5'CAAGCGAGGA3'), 反应参数: 94℃ 5min; 94℃ 1min, 34℃ 1min, 72℃ 1min, 35 个循环; 72℃ 10min。RAPD 反应产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.5 限制性内切酶酶切反应

采用限制性内切酶 *EcoR* I 进行酶切, 反应参数参照 Al-Samarrai 和 Schmid 的方法^[10]。

2 结果与分析

2.1 DNA 浓度测定及电泳检测结果

由图 1 可以看出, 除氯化苄法外的另四种方法所提基因组 DNA 电泳检测均得到比较单一的条带, 无严重

拖尾现象, 没有明显的 RNA 带, 电泳条带明亮。氯化苄法有轻微拖尾。表 1 也显示五种方法所提 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值均在 1.6~2.0 之间, 能够用于基因组 PCR 扩增。CTAB 法和酚仿法的 A_{260}/A_{280} 值最为接近 1.8, 所提 DNA 纯度最高。但酚仿法的得率最低, 氯化苄法和蛋白酶 K 法的得率要明显高于另外三种方法。

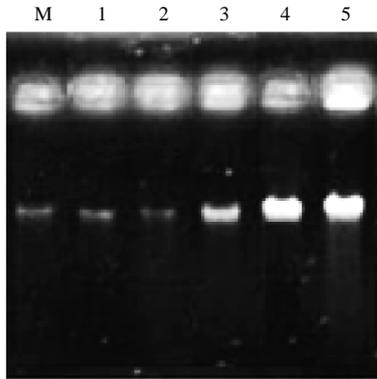


图 1 五种方法提取银耳芽孢 DNA 的电泳图谱
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from spores of *Tremella fuciformis* by 5 methods respectively

表 1 五种方法提取银耳芽孢 DNA 产率及纯度

Table 1 Yield and purity of genomic DNA extracted from spores of *Tremella fuciformis* by 5 methods respectively

提取方法	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260}/A_{280}	DNA 浓度($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
酚仿法	0.077	0.042	1.833	0.770
盐析法	0.088	0.047	1.872	0.880
氯化苄法	0.609	0.378	1.611	6.090
CTAB 法	0.411	0.226	1.819	4.110
蛋白酶 K 法	0.694	0.357	1.944	6.940

2.2 RAPD 反应电泳检测结果

实验表明(图 2): 五种提取方法得到的基因组 DNA 经随机引物扩增后均得到了较为清晰的扩增带, 且重复性较好, 扩增片段集中在 180~650bp 之间。氯化苄法和蛋白酶 K 法扩增得到 5 条条带, 酚仿法、盐析法和 CTAB 法在 300bp 和 600bp 附近还各扩增出 1 条比较明显的带, 此外, CTAB 法在 350bp 附近还有一条弱带出现。

2.3 限制性内切酶酶切反应电泳检测结果

从图 3 的酶切产物电泳图谱可以看出, 五种方法所提 DNA 均能被 *EcoR* I 酶切, CTAB 法和酚仿法所提 DNA 酶切后的片断从大到小分布均匀, 说明 DNA 能被限制酶有效的切开。氯化苄法和蛋白酶 K 法所提 DNA 则不能完全酶切。

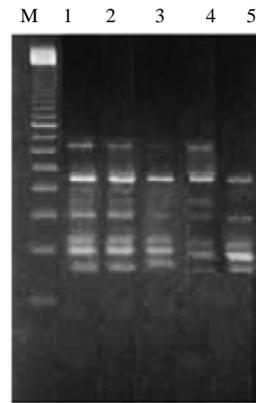


图 2 五种方法提取银耳芽孢 DNA 的 RAPD 产物电泳图
M.1000bpDNA Marker; 1~5.酚仿法、盐析法、氯化苄法、CTAB 法、蛋白酶 K 法所提 DNA 的 RAPD 产物。

图 2 五种方法提取银耳芽孢 DNA 的 RAPD 产物电泳图

Fig.2 RAPD analysis of DNA extracted by 5 methods respectively

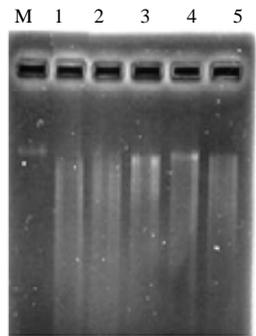


图 3 *EcoR* I 酶切产物电泳图谱
1.酚仿法提 DNA; 2~6.CTAB 法、酚仿法、盐析法、氯化苄法、蛋白酶 K 法所提取 DNA 的酶切产物。

图 3 *EcoR* I 酶切产物电泳图谱

Fig.3 DNA digested with *EcoR* I

3 讨论

3.1 本实验根据所选材料的特点选取五种方法并进行比较。综合 DNA 提取纯度、得率、RAPD 扩增和酶切效果而言, CTAB 法是五种方法中最为适合银耳芽孢基因组 DNA 提取的方法。实验过程中也发现经 CTAB 法提取的基因组 DNA 干燥时呈较透明的白色, 易溶于 TE 缓冲液。

3.2 在银耳芽孢基因组 DNA 提取过程中应尽量采用新鲜材料, 一般而言培养 4~5d 为宜, 培养时间过长则次生代谢产物会相应增多, 不利于 DNA 的提取。此外转移上清时应尽量避免界面活动, 将两相间的杂质带入下一步操作。DNA 洗涤的次数也不宜过少, 否则样品中的小分子杂质不易除干净, 会影响 PCR 扩增时 Taq 酶的活性。

3.3 本研究所选取的五种方法基本步骤大致相同, 但 CTAB 法耗时稍短, 转管次数较少, 且避免了苯酚、氯

仿等有机试剂。此外, CTAB 法同样适合银耳菌丝及子实体基因组 DNA 的提取, 在平菇、黑木耳、灵芝等其它食用真菌基因组 DNA 提取过程中采用 CTAB 法也得到了较好结果。因而 CTAB 法可广泛应用于食用真菌基因组 DNA 的提取。

参考文献:

- [1] 杨新美. 食用菌栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] 刘振江, 王红育. 食用菌功能食品的研究与开发[J]. 食品科技, 2007 (1): 29-31.
- [3] 彭卫红, 王勇, 黄忠乾, 等. 我国银耳研究现状与存在问题[J]. 食用菌学报, 2005, 12(1): 51-56.
- [4] 刘娟, 马爱民, 盛桂华, 等. 银耳二型态细胞差异性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 880-884.
- [5] RAEDER U, BRODA P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi[J]. Letters in Applied Microbiology, 1985(1): 17-20.
- [6] CUBERO O F, CRESPO A, FATESI J, et al. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi[J]. Plant Systematics and Evolution, 1999, 216: 243-249.
- [7] BYRD A D, SCHARDL C L, SONGLIN P J, et al. The tubulin gene of *Epichloe typhina* from perennial ryegrass (*Lolium perenne*)[J]. Current Genetics, 1990, 18: 347-354.
- [8] 张莉莉, 张苓花, 史剑斐. 利用氯化苳提取真菌基因组 DNA 及其分子生物学分析[J]. 大连轻工业学院学报, 2000, 19(1): 36-39.
- [9] 秦振宇, 吴绍熙, ROY L H, 等. 玻璃珠-盐析法提取常见致病真菌 DNA 的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2000, 33(5): 330-332.
- [10] AL-SAMARRAI T H, SCHMID J. A simple method for extraction of fungal genomic DNA[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 30: 53-56.