

简便易行的食用菌菌丝体基因组 DNA 提取法

臧金平, 连 宾*, 袁 生

(南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 江苏 南京 210097)

摘 要: 用 CTAB 法直接从食用菌菌丝体培养物中提取 DNA, 并将所提取 DNA 进行 PCR, 得到了较清晰的扩增图谱, 用该法提取的食用菌菌丝体 DNA 可用于分子生物学研究, 具有简便易行的优点。

关键词: DNA 提取; 食用菌; PCR

A Simplified Method for Extracting DNA from the Mycelium of Edible Fungi

ZANG Jin-ping, LIAN Bin*, YUAN Sheng

(Key Laboratory of Microbial Engineering, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The DNA of edible fungi was directly extracted from fresh mycelium growing on the solid medium. PCR was performed with total DNA as a template at an annealing temperature of 56°C. Positive amplification was obtained from the mycelium of edible fungi. The result indicated that the method was simple, easy and reliable for DNA extraction from the mycelium of edible fungi cultured on solid medium.

Key words: DNA extraction; edible fungi; PCR

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)03-0066-03

基因组 DNA 的提取分离, 对于在分子水平上研究基因的组成、基因的表达以及用重组 DNA 技术进行遗传工程的研究是十分重要的。近年来分子生物学方法, 如限制性片段长度多态性(RFLPs)分析, 用 PCR 技术进行的随机引物多态序列的扩增(RAPDs)或未知基因组序列的扩增等, 已经成为真菌分类学、分子进化及种群遗传研究的一个重要工具。而进行这些研究的前提是要能迅速分离出纯度高、分子量大的基因组 DNA。随着现代生物技术的快速发展, 食用菌分子生物学研究也进入

了一个崭新的阶段。很多研究集中在对 DNA 的分析上, 因此也就增加了对高质量 DNA 的需求。要获得所需的 DNA, 选择一个合适的提取方法是十分重要的。本文旨在探寻一种适合于在固体培养基中生长的食用菌菌丝体 DNA 的有效提取方法, 以便为相关分子生物学研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 菌种及其来源

红芝(*Ganoderma lucidum*)、黑芝(*Ganoderma sinsense*)均由南京师范大学生命科学学院微生物工程实验室提供, 金针菇(*Flammulina velutipes*)由镇江食用菌研究所提供。

收稿日期: 2004-05-10

* 通讯作者

基金项目: 中国博士后基金(2003033496)

作者简介: 臧金平(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物。

- [6] Diatchenko L, Lau Y F C, Campbel A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6025-6030.
- [7] 黄薇, 方孝东, 赵文明, 等. 分离差异表达基因的方法[J].

生物工程学报, 2002, 18(4): 521-524.

- [8] Hajjaj H, Klæbe A, Loret M O, et al. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus monascus rubber as revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(1): 311-315.

1.2 菌丝的收集和处理

菌丝体的获得: 母种菌丝体接入综合马铃薯斜面培养基于 26℃ 培养, 待长满斜面后, 从斜面上小心刮下菌丝体, 置于研钵中待用。

1.3 抽提液

抽提缓冲液: 取 8.1816g NaCl, 2g SDS, pH8.0 的 500mmol/L EDTA 10ml, pH8.0 的 1mol/L Tris-HCl 5ml, 并用双蒸馏水补足至 100ml。

5 × CTAB: 取 5g CTAB, 5.844g NaCl, pH8.0 的 500mmol/L EDTA 10ml, pH8.0 的 1mol/L Tris-HCl 25ml, 并用双蒸馏水补足至 100ml。

1.4 改进 CTAB 法提取真菌基因组 DNA^[1~5]

(1) 适量菌丝体加 0.5ml 预热到 65℃ 的抽提缓冲液, 室温下研磨, 菌液转移至 1.5ml 灭菌 eppendorf 管中, 并加抽提缓冲液补足至 1.5ml, 混匀, 65℃ 恒温 1h, 每隔 10min 左右轻摇 1 次。

(2) 10000r/min 离心 5min 去沉淀, 移取上清, 加等体积的 5 × CTAB, 混匀。65℃ 继续恒温 10min。冷却后吸取上清液至另一灭菌 eppendorf 管中, 并加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 10000r/min 离心 10min, 移出上清液。重复用氯仿/异戊醇(24:1)抽提并离心, 直到界面清晰为止。

(3) 上清液转入另一离心管, 加入等体积的异丙醇, 混匀后置 -20℃ 冰箱中沉淀 DNA 12h。

(4) 10000r/min 离心 10min 后去上清液。

(5) 沉淀用 70% 乙醇和无水乙醇吹洗后彻底干燥, 溶于适量的无菌双蒸水中备用。

1.5 PCR 扩增 18S-28SrDNA 的 ITS 区段

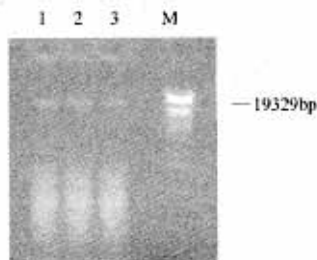
PCR 引物为通用引物^[6,7]: 上游引物 ITS5(5' -GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') 和下游引物 ITS4(5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。该对引物可用于扩增 ITS1、5.8S 和 ITS2 的完全序列以及 18S、28S 的部分片段。PCR 反应的混合液总体积为 50μl, 包括: 无菌双蒸水 33.75μl, 10 × PCR buffer 5μl, 25mmol/L MgCl₂ 4μl, dNTP Mix(各 10μmol/L)1μl, 上游引物(20μmol/L)1μl, 下游引物(20μmol/L)1μl, 5U/μl Taq 酶 0.25μl, DNA 模板 4μl。反应在 PTC-100 型 PCR 仪上进行。反应程序如下: 94℃ 预变性 5min, 然后进入循环, 94℃ 变性 1min, 56℃ 复性 1min, 72℃ 延伸 1min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。反应结束后, 取 9μl 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外检测。同时设置不含模板 DNA 的阴性对照。

2 结果与讨论

2.1 食用菌菌丝体基因组 DNA 的提取

按上述方法提取食用菌菌丝体基因组 DNA, 在 1%

的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 结果见图 1。



(1. 金针菇, 2. 红芝, 3. 黑芝, M. 分子标记)

(1. *Flammulina velutipes*, 2. *Ganoderma lucidum*, 3. *Ganoderma sinsense*, M. DNA marker)

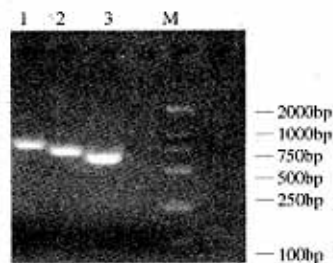
图 1 改进 CTAB 法提取的 DNA

Fig.1 Electrophoresis of different fungi genome DNAs prepared by the improved CTAB method

图 1 显示用改进 CTAB 法提取的 DNA 大约为 20kb, 且有少量降解的小碎片。本实验采用非离子型去污剂 CTAB 能够较好地裂解细胞壁及细胞膜, 释放 DNA, 同时在一定的盐浓度下, 它可以沉淀色素和多糖; 以 50mmol/L EDTA 洗涤菌丝, 浸出菌丝中的色素, 可有效去除 DNA 中影响后续分子操作的多糖、色素及其它大分子胞壁物质。反复实验表明, 研磨好的菌丝放入预热的抽提缓冲液中充分混匀, 是获得高 DNA 收率的关键步骤。整个提取时间短, 不需特殊仪器, 简便易行。

2.2 PCR 扩增 18S-28SrDNA 的 ITS 区段

为验证所提真菌 DNA 是否适用于分子生物学研究, 我们选取两个通用引物对所提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增出的 DNA 片段条带单一, 大小为 550bp 至 800bp 不等(图 2)。



(1. 金针菇, 2. 红芝, 3. 黑芝, M. 分子标记)

(1. *Flammulina velutipes*, 2. *Ganoderma lucidum*, 3. *Ganoderma sinsense*, M. DNA marker)

图 2 3 个菌株 ITS 区段 PCR 扩增琼脂糖电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of ITS gene region from samples DNA templates

基因组 DNA 包含着一些非编码基因, 如信号序列、间隔序列(内含子基因)、无功能序列(假基因)。真菌的这些基因在结构、功能和变异程度上差别很大, 是

真菌在分子各级水平上研究的良好区段,其中 rDNA ITS 序列是目前研究的热点。本实验结果表明 ITS 区段通用引物适用于扩增红芝、黑芝、金针菇等的核糖体基因转录间隔区,PCR 扩增出的 DNA 片段应为它们 ITS 区段的基因序列。

3 小 结

我们在参考前人工作基础上改进的这种食用菌菌丝体基因组 DNA 的提取方法,具有简便、易操作的特点,在提取过程中不需昂贵设备和费时程序,提取某一菌株的 DNA 时,在 DNA 提取的所有操作中,仅需要少量 eppendorf 管。由于整个操作中间过程少,时间短,减少了操作过程中 DNA 发生降解的机会。

大多数 DNA 提取过程中所用供试菌株均进行菌丝体液体培养,最后通过抽气过滤收集菌丝体。这可以得到较纯净的菌丝体,避免培养基对提取 DNA 产生不利的影响。在本实验中采用了对菌株进行固体培养的方法,这对一些难以进行液体培养的食用真菌分子生物学研究具有特别意义。实验中挑取菌丝体时应尽量避免挑到培养基,但即使挑取的菌丝体中含有少量培养基,对实验结果影响不大,仍可提取出 DNA。

以该方法提取的高分子量 DNA 可直接进行 PCR 和

Southern 印迹杂交等分子生物学研究,并可获得良好的实验结果。食用菌菌丝体基因组 DNA 提取方法的改进为顺利开展食用真菌分子生物学研究工作创造了条件。

参考文献:

- [1] 何月秋. 真菌菌丝培养和提取 DNA 方法的改进[J]. 菌物系统, 2000, 19(3): 434.
- [2] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34-40.
- [3] 陆悦健, 等. 由小麦赤霉菌菌丝快速提取 DNA 用于 PCR 扩增反应[J]. 菌物系统, 1997, 16(1): 36-39.
- [4] 刘小勇, 田素忠, 秦国夫, 等. 提取植物和微生物 DNA 的 SDS-CTAB 改进法[J]. 北京农业大学学报, 1997, 19(3): 100-103.
- [5] 曾凡亚, 张义正. 从多糖丰富的样品中制备食用真菌 DNA[J]. 食用菌学报, 1996, 3(3): 13-17.
- [6] 余仲东, 张星耀, 曹文敏. 真菌核糖体基因间隔区研究概况[J]. 西北林业大学学报, 2000, 15(2): 107-112.
- [7] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications[M]. California: Academic Press, 315-322.

信 息

美国葡萄柚浓缩汁价格飞涨

美国是葡萄柚浓缩汁(FCGJ)的最大生产国。在过去的 8、9 月份,这两个月里,在美国的佛罗里达州,这个葡萄柚的主要产地,连续遭遇了几次飓风的袭击,使价值 2.05 亿美元的柚子生产损失 2/3。因此,造成了葡萄柚的原料价格,大幅度上涨;这也就引起柚子浓缩汁的价格飞速上涨。佛州最大的柚子加工厂家中,其中有一家称,当前,柚子浓缩汁的价格为,每吨 2900 美元(58 白利糖度, FOB, 9+ratio, 佛罗里达州)。而在发生飓风前的产季,柚子浓缩汁的价格是,每吨只有 1000 美元。如果,这样的高价位继续维持下去,那么出口到欧洲的柚子浓缩汁价格,就会达到每吨 3000 美元以上,将会是历史上最高的水平。据佛州柑橘局估计,2003/04 产季,佛州葡萄柚汁的库存量,已经从 7430 万加仑(SSE)下降至 6680 万加仑。这样,消费量+出口量,就超过了 1.25 亿加仑(SSE)。到 2004/05 产季,如果葡萄柚汁,减少 7500 万加仑,这将肯定会给世界市场,留下一个大洞。

世卫生组织评出健康食品和垃圾食品

据日前来自中消协的消息,世界卫生组织经过 3 年的研究,评选并公布了六种最健康食品和十大垃圾食品。

健康食品包括:蔬菜—红薯、卷心菜、甜菜、芹菜、胡萝卜、芦笋、花椰菜、茄子、荠菜、苜蓿菜、金针菇、雪里红、大白菜;水果—木瓜、草莓、猕猴桃、芒果、杏、柿子、西瓜;荤菜—鹅肉、鸭肉、鸡肉;零食—核桃、花生、开心果、腰果、松子、杏仁、大豆等。

垃圾食品包括:油炸食品、腌制食品和加工类的肉食品加重身体负担;饼干、方便面、碳酸饮料等方便食品对人的肝脏影响很大;烧烤等同吸烟毒性;罐头、果脯和冰淇淋不宜常吃。