

15 种常见食(药)用菌的 3 种总 DNA 提取方法比较研究

江树勋¹, 邵碧英¹, 陈文炳^{1*}, 李寿崧¹, 王泽生², 朱晓南¹, 廖剑华²

(1. 福建出入境检验检疫局技术中心, 福建 福州 350001;

2. 福建省轻工业研究所双孢蘑菇菌种研究推广站, 福建 福州 350005)

摘 要: 本文研究了 15 种主要食(药)用菌共 16 个样品的 3 种总 DNA 提取方法之比较, 它们分别是 CTAB 法、食品 DNA 提取试剂盒法和 QIAGEN 试剂盒法。提取结果分别经过核酸蛋白分析仪、电泳以及 RAPD 检测。紫外检测结果表明 3 种方法提取到的总 DNA 质量均不理想, 电泳结果表明 3 种方法均能提取出小平菇、红菇、香菇、双孢蘑菇、竹荪、黑木耳、姬松茸等 7 种食(药)用菌总 DNA, RAPD 检测结果表明 CTAB 法适用于所有 15 种食(药)用菌提取用于 PCR 的总 DNA。根据以上结果, 我们认为可以选用 CTAB 法作为在检测这些食(药)用菌的转基因成分时的总 DNA 提取方法。

关键词: 食(药)用菌; 基因组 DNA 提取

Study on the Comparison of three Genomic DNA Extraction Methods

for 15 Familiar Edulis and Medicinal Fungi

JIANG Shu-xun¹, SHAO Bi-ying¹, CHEN Wen-bing^{1*}, LI Shou-song¹, WANG Zhe-sheng²,

ZHU Xiao-nian¹, LIAO Jian-hua²

(1. The Technical Centre of Fujian Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China;

2. Fujian Research Institute of Light Industry, Fuzhou 350005, China)

Abstract: Edulis and medicinal fungus were sort of traditional healthy foods of China. Not only Chinese people liked them, but also many people in other countries liked them too. With the increasing of its output and export China, we found more and more countries asked for the detection of genetically modified ingredients in the fungus. This required the study of transgenic material detection techniques in fungus. The first problem to be resolved was the genomic DNA extraction method and the ways to analyze the quality of the extracted DNA. A high quality extracted genomic DNA was the basis of the following exact results of transgenic material detection. So this article set out a study on the genomic DNA extraction method appropriate for most of the common edulis and medicinal fungus by analyzing the quality of the extracted genomic DNA.

Following 15 species of the common edulis and medicinal fungi(16 samples) were studied here, namely: *Pleurotus comucopiae*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sajor-caju*, *Agrocybe cylindracea* maire, *Ganoderma lucidum*, *Russula vinosa* Lindbe, *Pleurotus eryngii*, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Dictyophora indusiata*, spore of *Ganoderma lucidum*, *Tremella fuciformis* Berk, *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus geesteyanus*. Singer and *Agaricus blazei*. Three commonly used DNA extraction methods were selected, including CTAB method, Food DNA Extraction Kit and Qiagen DNA Extraction Kit. Of them the CTAB method refered for plant introduced in <Short Protocols in Molecular Biology> with a few improvings was adopted. The Food DNA Extraction Kit and Qiagen DNA Extraction Kit refered to their method were provided with the kit. All extracted DNAs were assayed by UV spectrophotometer, agarose electrophoresis and RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) respectively. UV spectrophotometer detection results showed the quality of all

收稿日期: 2003-09-16

* 通讯联系人

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研项目(2002IK084); 福建省科技重大项目资助(2001H011)

作者简介: 江树勋(1969-), 男, 工程师, 硕士, 从事基因工程产品的分子生物学检测与研究工作。

extracted genomic DNA was poor as expected. Agarose electrophoresis results showed that all three methods could extract the DNA from the following 7 fungi, *Pleurotu comucopiae*, *Russula vinosa* Lindbe, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Dictyophora indusiata*, *Auricularia auricula* and *Agaricus blazei*, while CTAB method could extract the DNA of *P.geesteyanus*.Singer. The Food DNA Extraction Kit could extract the DNA of *V. volvacea* and Qiagen DNA Extraction Kit could extract the DNA of *T. fuciformis* Berk additionally. The RAPD results showed that CTAB method could be used to extract all 15 fungi's DNA for PCR, while the other two methods could be used to extract most of the 15 fungi's DNA for PCR. According to the above results, we suggested the choice of the CTAB method for DNA extraction when testing the transgenic ingredients for these edulis and medicinal fungi. All experiment results were confirmed by another researcher in our programme.

Due to all the values of UV spectrophotometer detection in this study were always abnormal, a comparison with the same CTAB method on *E. coli* was made. The results showed that the values of DNA from *E. coli* were all good. While agarose electrophoresis could not be applied to all of the fungi, we had to select RAPD to analyze the DNA for PCR. How to improve the extraction method to gain high quality DNA from edulis and medicinal fungus if there would be any better method specially for analyzing them would be still needed for further studies.

Key words: Edulis and medicinal fungus; genomic DNA

中图分类号: Q93; Q7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)05-0036-05

食(药)用菌作为健康食品极受人们的欢迎, 尤其近年来, 随着人们生活水平的提高, 更是受到消费者的青睐。食(药)用菌是我国传统的特色农产品, 我国是食(药)用菌生产和消费大国, 同时又是食(药)用菌出口大国。随着市场需求的增加以及我国政府的重视, 食(药)用菌的生产量和出口量都在不断扩大。

一段时间以来, 我们发现一些国家, 尤其是阿拉伯国家, 对我国的食(药)用菌出口提出了转基因成分检测的要求, 他们只接受非转基因食(药)用菌, 这个现象给我们提出了新的课题。首先, 食(药)用菌属于大型真菌, 外形上象高等植物, 结构上却不同于高等植物, 它的基因组 DNA 提取比较困难。关于食(药)用菌 DNA 提取方面已经有了一些报道, 包括草菇^[1], 金杂和草菇^[2], 香菇、蘑菇、平菇、红芝^[3]等少数几种食用菌 DNA 的提取方面的研究, 但对多数常见食(药)用菌的基因组提取进行专门的 DNA 提取方法进行的研究比较以及对提取到的 DNA 进行分析比较, 还未见报道。为了比较全面探讨出口食(药)用菌的转基因成分检测方法, 结合我们检测工作的实际情况, 本研究选用了常见的 15 种食(药)用菌进行 DNA 提取 3 种方法的研究比较。

1 材料与方法

1.1 食(药)用菌

包括小平菇 *Pleurotu comucopiae*、草菇 *Volvariella volvacea*、凤尾菇 *Pleurotus sajur-caju*、茶树菇 *Agrocybe cylindracea mair*、灵芝 *Ganoderma lucidum*、红菇 *Russula vinosa* Lindbe、杏鲍菇 *Pleurotus eryngii*、

香菇 *Lentinus edodes*、双孢蘑菇 *Agaricus bisporus*、竹荪 *Dictyophora indusiata*、灵芝孢子 *spore of Ganoderma lucidum*、白木耳 *Tremella fuciformis* Berk、黑木耳 *Auricularia auricula*、金针菇 *Flammulina velutipes*、秀珍菇 *Pleurotus geesteyanus*.Singer、姬松茸 *Agaricus blazei* 等 15 种(以下只用中文名称), 原料来自三个途径: 包括福州各大超市, 如好又多、麦德龙等; 食(药)用菌商家, 如灵芝和灵芝孢子由圣灵公司提供以及出口企业送检样品。

1.2 试剂药品

分子生物学试剂主要购自上海生工生物工程公司, 试剂盒 Dneasy Mini kit(50)(cat. No. 69104/69103)为德国 Qiagen 公司开发, 食品 DNA 提取试剂盒为北京陆桥技术有限公司开发。其它常用试剂均为国产分析纯。

1.3 DNA 提取方法

CTAB 法: 样品烘干后, 研磨成粉, 称取 0.05g, 加 600 μ l CTAB 缓冲液[20g/L CTAB, 0.1mol/L Tris-HCl (pH8.0), 20mmol/L EDTA(pH8.0), 3 μ l 蛋白酶 K(20mg/ml), 3 μ l RNaseA(10mg/ml)], 振荡混匀, 65 $^{\circ}$ C 温浴 2h 以上或过夜, 期间定期晃动。加 500 μ l 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 振荡混匀, 12000r/min 离心 10min。取上清, 加等体积氯仿:异戊醇(24:1), 振荡混匀, 12000r/min 离心 10min。取上清, 加 0.8 倍体积异丙醇, 混匀, 12000r/min 离心 10min。取沉淀, 加 350 μ l NaCl(1mol/L)溶解, 加 350 μ l 氯仿:异戊醇(24:1), 振荡, 12000r/min 离心 10min。取上清, 加 0.8 倍体积异丙醇, 12000r/min 离心 10min。取沉淀, 70% 乙醇清洗 2 次, 干燥, 加 100 μ l TE(pH8.0)溶解。

Qiagen 试剂盒法、食品 DNA 试剂盒法：参照试剂盒说明书进行。

1.4 DNA 吸光值测定

DNA 经 100 倍稀释后，于紫外可见分光光度计(安玛西亚公司，ultrospec 1100 pro 型号)上测定其浓度和纯度。

1.5 DNA 电泳检测

取 4 μ l DNA 溶液，经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，凝胶电泳图象分析系统分析电泳结果及摄取图象。

1.6 DNA RAPD 分析

以上述 DNA 为模板，25 μ l 反应体积，经过筛选选定随机引物序列为 CCGAATTCCC，反应程序如下：94℃ 2min 后，按 94℃ 变性 1min，38℃ 退火 2min，72℃ 延伸 1min，进行 42 个循环，最后 72℃ 延伸 15min。RAPD 产物用琼脂糖凝胶水平电泳法进行检测。

2 结果与分析

2.1 DNA 紫外分析

15 种食(药)用菌经过 3 种方法提取 DNA 后，分别进行紫外分光光度计测定，结果见图 1~图 3 所示。从图中可以知道 15 种食(药)用菌 DNA 的紫外检测结果总体看来数值较不正常，主要表现在如下几个方面：(1) $OD_{260/280}$ 一般不在 1.8~2.0 之间，甚至出现乱值，如灵芝孢子在 QIAGEN 试剂盒法和食品 DNA 试剂盒法中为负值、草菇在 QIAGEN 试剂盒法中为大于 20 等；(2) $OD_{260/230}$ 值虽然没有象 $OD_{260/280}$ 一样出现乱值的情况，但数值普遍偏小，本研究中除了 QIAGEN 试剂盒法的值较高，大部分在 1 左右，均值为 1.116，食品 DNA 试剂盒法的 16 种食(药)用菌样品中有 15 种小于 1，均值为 0.578，CTAB 法的值也大部分小于 1，均值为 0.639；(3) DNA 浓度很低，很少有 100 μ g/ml 以上。

2.2 DNA 电泳分析

3 种方法提取的 DNA 分别加入适量进行电泳分析，凝胶成像摄取照片，结果见图 4。从电泳结果可看出，3 种方法提取的 DNA 均能用电泳(同样加样的情况下)检

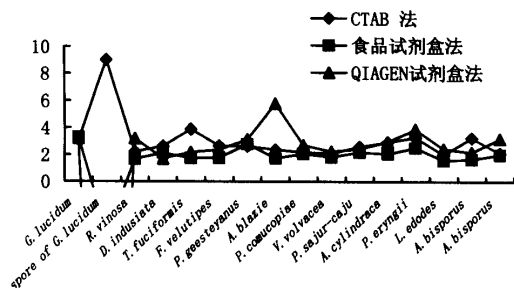


图1 $OD_{260/280}$ 值

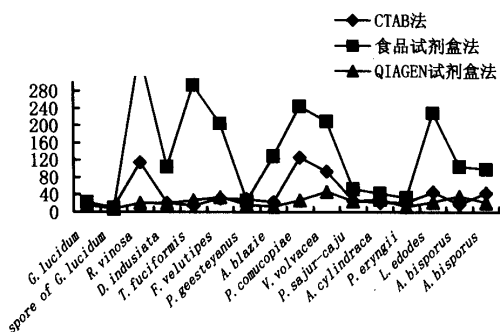


图2 DNA 的量(μ g/ml)

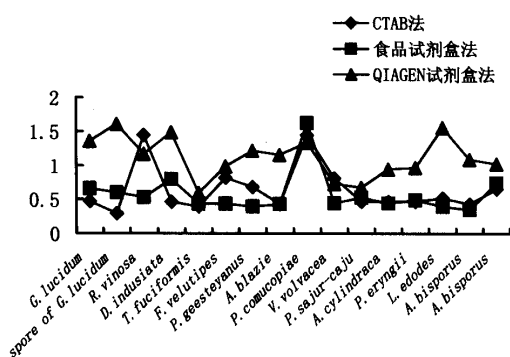
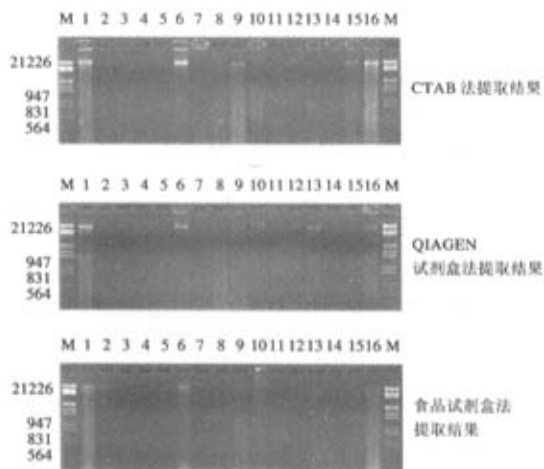


图3 $OD_{260/230}$ 值



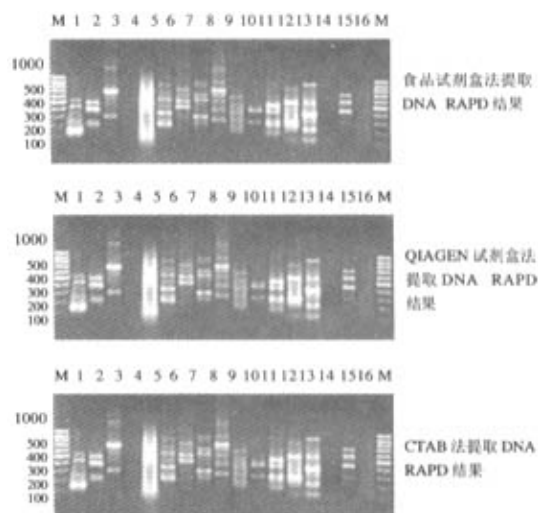
注：M λ DNA/EcoR I +Hind III marker；1 *P.comucopiae* 2 *V. volvacea*；3 *P.sajur-caju*；4 *A.cylindrica* 5 *G.lucidum*；6 *R. vinosa* Lindbe；7 *P.eryngii*；8 *L. edodes*；9 *A.bisporus*；10 *D. indusiata*；11 spore of *G.lucidum*；12 *T.fuciformis* Berk；13 *A.auricula*；14 *F. a velutipes*；15 *P.geosteyanus*.Singer；16 *A.blazie*。

图4 15种食(药)用菌3种方法提取到的DNA的电泳检测结果

测到的有以下7种:小平菇、红菇、香菇、双孢蘑菇、竹荪、黑木耳、姬松茸。另外,CTAB法可以明显检测到白木耳和秀珍菇,食品DNA试剂盒法能检测到白木耳,QIAGEN试剂盒法能明显检测到草菇。其它的6种食(药)用菌的提取物均未能通过电泳检测出来。

2.3 RAPD 分析

3种方法提取到的DNA分别用同一种随机引物在同等条件下进行RAPD反应,结果见图5所示。从图中可看出除了食品DNA试剂盒法提取的杏鲍菇和黑木耳以及QIAGEN试剂盒法提取的白木耳外,均得到了较为丰富的条带,同时发现同一个菌,虽然经过不同的提取方法,但是RAPD结果却表现出了一致性,重复性强。



注: M 100bp ladder marker 1 *F.avelutipes*; 2 *P.geesteyanus.Singer*; 3 *P.comucopiae*; 4 *P.eryngii*; 5 *A.cylindraca maire*; 6 *A.bisporus*; 7 *A.blazie*; 8 *P.sajur-caju*; 9 *R.vinosa Lindbe*; 10 *V.volvacea*; 11 *L.edodes*; 12 *D.indusiata*; 13 *G.lucidum*; 14 spore of *G.lucidum*; 15 *A.auricula*; 16 *T.fuciformis Berk C. Control(DD water)*.

图5 15种食(药)用菌3种方法提取到的DNA的RAPD结果

3 讨论

3.1 紫外检测的结果与DNA的质量的关系

对于食(药)用菌DNA紫外检测的不正常结果,我们同时用CTAB法做了大肠杆菌的6个菌株的DNA提取作为比较,结果如表1所示,6个菌株的 $OD_{260/280}$ 均在1.9~2.0之间, $OD_{260/230}$ 均在2.3~2.5之间,浓度也相当的高。可见,本文提取到的食(药)用菌DNA质量均较差,纯度不高,杂质多,量少。从草菇的提取情况来看,DNA质量的数值也差于草菇的研究^[1]中CTAB法得出的结果。在提取过程中我们发现黑木耳、白木

耳特别粘稠,即使加入了酚:氯仿:异戊醇以后,也难以得到清液,灵芝孢子、香菇、双孢蘑菇、杏鲍菇、红菇、秀珍菇、小平菇、姬松茸、竹荪、金针菇、凤尾菇和草菇均有不同程度的白色粘性沉淀,这是因为食(药)用菌中含有大量的多糖造成的,减少样品量,如较方法中的减半甚至更少,裂解时间延长甚至过夜,效果会好些。

表1 CTAB法提取大肠杆菌6个菌株的基因组DNA的紫外检测结果

序号	$OD_{260/280}$ 值	$OD_{260/230}$ 值	得率($\mu\text{g/ml}$)
1	1.944	2.436	1944
2	1.931	2.313	1533
3	1.904	2.349	1551
4	1.920	2.278	1824
5	1.994	2.301	1015
6	1.942	2.376	3327

本文所使用的QIAGEN试剂盒说明书中有提到可专门用于真菌DNA的提取,在本研究中发现应用该试剂盒提取到的DNA在 $OD_{260/230}$ 上优于其它2种方法,说明蛋白及小分子物质污染会小些。

3.2 电泳检测的结果与DNA的质量的关系

根据电泳检测的原理,它可以检测到小至10ng的量^[14],这说明本研究提取到的DNA的浓度很低。同时我们注意到,电泳结果与紫外检测结果并没有一致性,所以我们推测电泳检测到的条带未必完全是DNA,因为其它物质如多糖也能与EB结合并发出荧光。

为了进一步了解所提取到的DNA质量,我们对3种方法提取到的DNA又进行了RAPD比较,从图5中可看出大多数食(药)用菌,尽管由不同的方法提取得到DNA,RAPD结果却基本上表现较一致,一些特征条带重复性好,只是在条带丰富性上有一些差别。当然,也有个别例外,如白木耳在QIAGEN试剂盒法中没有得到象其它两种方法中得到的结果,食品DNA试剂盒法中的黑木耳和杏鲍菇没有得到其它两种方法中得到的结果。RAPD结果是否可以说明DNA质量,目前没有相关的报道,尤其RAPD敏感度太高,实验室间重复性差。不过,本研究中同一种食(药)用菌的不同DNA提取途径得到的DNA的RAPD结果表现较一致,应该可以从一个侧面说明提取到的DNA质量。

3.3 结论与问题

根据以上分析,我们认为可以得出如下二点结论:一、电泳方法证明3种方法均能提取到小平菇、红菇、香菇、双孢蘑菇、竹荪、黑木耳、姬松茸等7种食(药)用菌的DNA,另外CTAB法还可以用于提取白木耳和秀珍菇DNA,QIAGEN试剂盒法能用于提取草菇DNA;二、除了白木耳不能用QIAGEN法以及黑木耳

表2 15种食(药)用菌适合于PCR用的基因组DNA的3种提取方法的效果比较

方法	食(药)用菌															
	<i>A.auricula</i>	<i>T.fujiformis Berk</i>	<i>spore of G.lucidum</i>	<i>G.lucidum</i>	<i>D.indusiata</i>	<i>L.edodes</i>	<i>V.volvacea</i>	<i>R.vinosa Lindbe</i>	<i>P.sajor-caju</i>	<i>A.blazie</i>	<i>A.bisporus</i>	<i>A.cylindracea maire</i>	<i>P.eryngii</i>	<i>P.comucopiae</i>	<i>P.gesseyanus.Singer</i>	<i>F.a.velutipes</i>
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

注：“+”表示这种方法适合于该食(药)用菌DNA提取，“-”表示不适合。

和杏鲍菇不能用食品DNA试剂盒法外,3种方法均能对所有其它食(药)用菌提取到适合于RAPD的DNA(见表2)。综合以上结论,结合已有的食用菌DNA提取的研究结果,我们认为可以选用CTAB法作为检测这些食(药)用菌转基因成分时的基因组提取方法,直至有更好的方法被研究出来。最后我们的问题是一由于食(药)用菌DNA的紫外吸收值不正常,电泳又不适用于所有食(药)用菌种类,如何鉴定食(药)用菌DNA质量以及如何减少DNA提取过程中其它物质如多糖等的污染还有待进一步

的研究。

参考文献:

- [1] 江玉姬,谢宝贵,陈文校.草菇DNA提取方法初探[J].福建农业学报,2000,15(2):61-64.
- [2] 王春晖,刘文彬,邓洁娇.一种提取食用菌DNA的有效方法[J].食用菌,1999,21(1):9-10.
- [3] 杨华,李联泰.食用菌DNA提取方法研究[J].中国食用菌,2002,22(1):19-23.

山茱萸果肉抑菌物质的提取及抑菌作用研究

黄钰铃¹, 王斌²

(1.三峡大学,湖北宜昌 443002; 2.西北农林科技大学,陕西杨凌 712100)

摘 要:以自来水作溶剂,对山茱萸果肉抑菌物质的提取条件进行了研究,得到了最佳提取条件为A₃B₂C₁。将该物质对几种常见的食品微生物进行抑菌活性试验,发现其对细菌的抑制效果明显,但对霉菌和酵母效果一般;最低抑菌浓度(Mic)试验表明,该物质Mic为50%;此外,该物质抑菌pH范围为3~5、且热稳定性好。

关键词:山茱萸果肉;提取;抑菌

Study on Extraction and Antimicrobial Effect of the Fruit of Common Macrocarpium

HUANG Yu-ling¹, WANG Bin²

(1. Three Gorge University, Yichang 443002, China;

2. Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: This test adopted the tap water as the solvent. The conditions for extracting antimicrobial substance from the fruit

收稿日期:2003-09-01

基金项目:陕西省攻关项目(2002K02-G13-1)

作者简介:黄钰铃(1978-),女,在职博士,主要从事资源综合利用的研究。