

酵母基因组的提取

邢福国^{1,2}, 张培军¹, 谭训刚¹, 徐永立¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要: 酵母是低等真核生物, 被广泛应用于食品生产和基因工程。提取酵母基因组对于应用酵母进行实验研究非常重要, 本文摸索出了一套简单、经济、高效的酵母基因组的提取方法, 为进行酵母研究提供方便。

关键词: 酵母; 基因组; 提取

Study on Total DNA Isolation from Yeast

XING Fu-guo^{1,2}, ZHANG Pei-jun¹, TAN Xun-gang¹, XU Yong-li¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China

2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Yeast is *Archaic Eukaryotes*. It is comprehensively used in food processing and gene engineering. Isolation total DNA from yeast is very important in the yeast application. A set of procedures were found that is simple economical and highly effective in isolating total DNA from yeast. This method facilitates on yeast DNA isolation.

收稿日期: 2006-01-30

作者简介: 邢福国(1979-), 男, 博士研究生, 主要从事分子发育生物方面的研究。

株菌鉴定到了菌株的水平。如果选择足够多的代谢酶为靶标, 据此设计足够多的PCR引物, 并尽可能降低引物的长度, 也可能将细菌鉴定到菌株的水平。如果在此研究的基础上, 进一步采用多重巢氏PCR等技术, 可能建立乳酸球菌菌株水平的快速鉴定技术。同时, 这对其他乳酸菌的分类鉴定也有一定的借鉴意义。

参考文献:

- WARD L J, BROWN J C, DAVEY G P. Two methods for the genetic differentiation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *cremoris* based on differences in the 16S rRNA gene sequence[J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 166(1): 15-20.
- MASARU N, KOBAYASHI M, OKAMOTO T. Rapid PCR-based method which can determine both phenotype and genotype of *Lactococcus lactis* Subspecies[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 2209-2213.
- CHAVES A C S D, FERNANDEZ M, LERAYER A L S. Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 5656-5662.
- DUBOC P, MOLLET B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry[J]. Milk Dairy, 2001(11): 759-768.
- MCCARTNEY A L. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora[J]. Br J Nutr, 2002, 88: 29-37.
- BASARAN P, BASARAN N, CAKIR I. Molecular differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris* strains by ribotyping and site specific-PCR[J]. Curr Microbiol, 2001, 42: 45-48.
- BRIGIDI P, SWENNEN E, VITALI B. PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption[J]. Int J Food Microbiol, 2003, 81: 203-209.
- GARDE S, BABIN M, GAYA P. PCR amplification of the gene *acm4* differentiates *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* [J]. Appl Environ Microbiol, 1999(5): 5151-5153.
- BLAIOTTA G, PEPE O, MAURIELLO G. 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis[J]. Syst Appl Microbiol, 2002, 25: 520-527.
- PRODEALOVA J, SPANOVA A, RITTICH B. Application of PCR, rep-PCR and RAPD techniques for typing of *Lactococcus lactis* strains [J]. Folia Microbiol, 2005, 50: 150-154.
- ROSSETTI L, GIRAFFA G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases[J]. Microbiol Methods, 2005, 63: 135-144.
- SAMARZIJA D, SIKORA S, REDZEPOVIC S. Application of RAPD analysis for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains isolated from artisanal cultures[J]. Microbiol Res, 2002, 157: 13-17.
- QUENEE P, LEPAGE E, KIM W S. Minisatellite polymorphism as a tool to distinguish closely related *Lactococcus lactis* strains[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 248: 101-109.
- 丛玉婷, 高学军, 刘衍芬, 等. EZAL-MY96乳酸菌种菌株分离鉴定[J]. 生物技术, 2004, 14(6): 38-40.
- HOLT J, KRIEG N, SNEATH P. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. Ninth Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

Key words: yeast; total DNA; isolation

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0210-03

酵母是低等真核生物, 具有细胞生长快、易于培养, 遗传操作简单等原核生物的特点, 被广泛应用于食品生产和基因工程^[1-2], 例如酿酒和利用酵母作为工程菌来表达外源蛋白质^[3]。因此, 酵母受到越来越多的重视和利用^[4]。而提取酵母基因组是研究酵母必需的方法之一。一般提取酵母基因组是用Lyticase来破碎酵母, 但Lyticase价格非常昂贵, 并且不容易买到, 所以对研究酵母造成一定的麻烦。本文摸索出了一套简单实用的提取酵母基因组的方法。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

溶菌酶(分析纯) 美国Sigma公司; Tris饱和酚 北京鼎国公司; 乙醇(分析纯) 青岛化工公司; 异丙醇(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 氯仿(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; SDS(分析纯) 美国Sigma公司。

Eppendorf 5804R 台式离心机 德国Eppendorf公司; vortex v1 plus 振荡器 BioSan公司; 恒温摇床 ZHWY-100B 上海智诚公司; 凝胶成像仪 美国Bio-Rad公司。

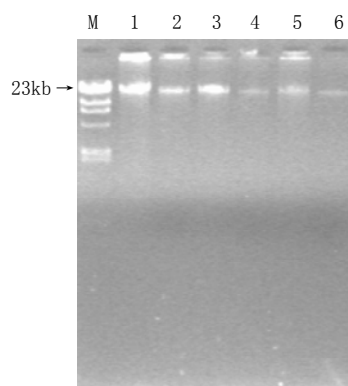
1.2 酵母基因组的提取方法

接种酵母到2.5ml酵母试管培养基中(YPD培养基), 30℃, 培养16~18h; 取1.5ml酵母培养液, 室温下, 1500×g离心5~10min收集菌体; 菌体用灭菌水洗1次, 1500×g离心5min; 菌体用200μl SCED(1mol/L山梨醇、10mmol/L柠檬酸钠、10mmol/L EDTA、10mmol/L DTT二硫苏糖醇)溶液重悬, 加入30μl 10mg/ml溶菌酶(Lysozyme)37℃温浴1h; 加入100μl 2%SDS混匀, -20℃冰冻, 然后室温震荡溶解, 反复3次; 向悬浮液中加入150μl 5mol/L KAc(pH 8.9)轻轻混匀, 然后10000r/min离心5min; 将上清转移到一新的1.5ml离心管中, 加入2倍体积的乙醇, 轻轻混匀, 室温放置5min后12000r/min离心10min; 除去上清, 将沉淀溶解在300μl TE(10mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 1mmol/L EDTA, pH8.0)中, 加入6μl RNase (10mg/ml), 37℃温浴30min; 加入饱和酚和氯仿各150μl充分混匀, 然后10000r/min离心5min; 转移上清到新的1.5ml离心管中, 加入1/2体积的7.5mol/L NH₄Ac(pH7.5)和等体积的异丙醇, -20℃放置20min后12000r/min离心10min; 除去上清, 加入300μl 70%乙醇漂洗沉淀一次, 10000r/min离心5min; 风干除去乙醇, 用20μl TE溶解酵母DNA。

1.3 与试剂盒提取酵母基因组的提取效果比较

分别用本文所提供的方法和酵母基因组提取试剂盒所提供的方法从相同体积的酵母培养液提取酵母基因组, 每种方法提取的样品数都是三个, 然后用琼脂糖电泳来检测所提取基因组的质量。电泳条件如下: 0.8%琼脂糖凝胶, 每加样孔上样量都是2μl, 100V恒压电泳40min, 然后用Bio-Rad凝胶成像系统拍照。

2 结果与分析



M为λDNA/Hind III DNA分子量标准; 1、2、3泳道的样品为用本文提供的方法所提取的酵母基因组(2μl); 4、5、6泳道的样品为用试剂盒所提取的酵母基因组(2μl)。

图1 与试剂盒提取酵母基因组的提取效果对比

Fig.1 Comparison with the effect of extraction total DNA from yeast using yeast genomic DNA extraction kit

从图1可以看出, 用本文所提供的方法所提取的酵母基因组与用试剂盒所提取的酵母基因组分子大小是一样的, 而用本文所提供的方法提取的酵母基因组的条带比用试剂盒所提取的酵母基因组的条带要亮很多, 说明用本文的方法提取的酵母基因组的量比用试剂盒提取的量要大。

3 结论

从电泳图谱可以看出, 应用本文提供的提取方法提取的酵母基因组与试剂盒提取的酵母基因组分子大小基本一样, 而所提取的量明显多于用试剂盒提取的酵母基因组。并且, 本文提供的方法提取的酵母基因组应用于PCR扩增, 获得了非常好的扩增条带。说明本文所提供的方法提取的酵母基因组能够充分满足PCR以及其他一些分子生物学实验的要求。

本文提供的酵母基因组的提取方法中, 用Lysozyme消化和SDS冻融的方法来代替Lyticase进行酵

壳聚糖固定化超氧化物歧化酶的研究

张春艳, 孟宪军, 宣景宏

(沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 目的: 研究壳聚糖固定化超氧化物歧化酶的酶学性质。方法: 分别以不同方法对超氧化物歧化酶进行固定并比较其活力, 对固定化方法进行相应的优化, 对固定化超氧化物歧化酶进行酶学性质测定。结果: 以壳聚糖为载体, 戊二醛交联法制备固定化超氧化物歧化酶, 优化条件下制备的固定化酶, 所得固定化酶活力为 330U/g, 酶活回收率为 58.33%, 热稳定性和酸稳定性较游离酶有很大的提高, 且具有良好的贮存稳定性, 固定化酶可实现反复使用, 提高了利用率。结论: 壳聚糖-戊二醛交联法可用于制备性能较优的固定化超氧化物歧化酶。

关键词: 超氧化物歧化酶; 壳聚糖; 固定化酶

Study on Superoxide Dismutase Immobilized with Chitosan

ZHANG Chun-yan, MENG Xian-jun, XUAN Jing-hong

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Objective: To study the enzyme properties of superoxide dismutase immobilized with chitosan. Methods: Immobilized superoxide dismutase were prepared by different processes. The methods were optimized by comparing their activities. Results: Superoxide dismutase on chitosan with glutaraldehyde as crosslinking agent showed the highest activities and recovery rates. The activity of superoxide dismutase powder immobilized under optimum conditions is 330 U/g, with the recovery rate above 58.33%. The temperature stability and the pH stability of the immobilized enzyme are much better than the free enzyme. And the immobilized enzyme also shows a good storage stability. The immobilized enzyme may be applied repeatedly. It can improve utilization rate. Conclusion: The immobilized superoxide dismutase can be prepared by crosslinking glutaraldehyde on chitosan, and it possesses good properties.

Key words superoxide dismutase; chitosan; immobilized enzyme

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0212-04

超氧化物歧化酶是广泛存在于生物体内的金属酶, 可专一清除细胞外液中存在的与一些疾病和发展密切相关的超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$), 具有抗炎、抗肿瘤、抗

病毒、防辐射和延缓衰老等作用, 在化妆品、食品和医药等领域有着广泛的应用前景。将其固定化, 不但能保持原有酶活性, 而且稳定性也有所提高, 还兼有

收稿日期: 2006-01-17

作者简介: 张春艳(1979-), 女, 硕士研究生, 主要从事果蔬中生物活性物质的研究。

母细胞的破碎, 在起到同样破碎效果的情况下大大节省了提取酵母基因组的成本; 用酚-氯仿抽提的方法来代替蛋白酶 K 除去溶液中的蛋白, 同样达到好的除蛋白效果并节省提取酵母基因组的成本。

因此, 可以认为本文提供的方法是一种简单、经济、高效的提取酵母基因组的方法, 能够为酵母研究提供很大的方便。

参考文献:

- [1] HITZEMAN R A, HAGIE F E, LEVINE, et al. Expression of a human gene for interferon in yeast[J]. *Nature*, 1981, 293: 717-722.
- [2] VALENZUELA P, MEDINA A, RUTTER W J, et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast[J]. *Nature*, 1982, 298: 347-350.
- [3] INNIS M A, HOLLAND M J, MACCABE P C, et al. Expression glycosylation and secretion of an *Aspergillus glucoamylase* by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Science*, 1985, 228: 21-26.
- [4] 李晶, 赵晓祥, 沙场清, 等. 甲醇酵母基因表达系统的研究进展[J]. *生物工程进展*, 1999, 19(2): 17-20.