

脉冲场凝胶电泳技术及其在真菌学研究中的应用*

付晓燕 胡克兴 范黎**

(首都师范大学生命科学学院 北京 100037)

摘要: 脉冲电泳是用于分离大分子量 DNA 的一种电泳技术, 已广泛用于真菌的核型分析, 种群特异性鉴定, 基因定位及遗传分析的研究。介绍了脉冲电泳的原理, 发展和基本操作程序, 并阐述了脉冲电泳技术在真菌分子生物学研究领域的应用。

关键词: 脉冲电泳, 真菌, 种群特异性鉴定, 遗传分析

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0144-05

Pulsed Field Gel Electrophoresis and Its Application in Fungi*

FU Xiao-Yan HU Ke-Xing FAN Li**

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037)

Abstract: Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) is a new type technique of gel electrophoresis which can be used to separate large DNA molecules. It has been widely applied to the karyotype analysis, identification of species groups, genetic orientation and genetic analysis for fungi. This article describes the principle, development and general manipulative procedure of PFGE, and elaborates the application in the molecular research of fungi.

Key words: Pulsed field gel electrophoresis (PFGE), Fungi, Identification of species groups, Genetic analysis

脉冲场凝胶电泳 (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) 技术是 80 年代初期发展起来的^[1], 该技术依靠有规律地改变电场的方向而使大分子 DNA 得以分离。目前, 已能分辨出高达 6,000kb 乃至 10,000kb 以上的 DNA 片段。这一独具的高分辨力使脉冲场电泳技术的应用范围已涉及几乎所有生物的基因组的研究, 如酵母染色体 DNA 分离^[1] 及酵母和多种真菌的电泳核型分析、哺乳动物或人染色体 DNA 物理图谱分析及 DNA 双链断裂的检测、制备植物大分子 DNA^[2] 甚至可以介导动物卵、植物细胞的转基因^[3], 为包括真菌在内的真核生物的细胞学和遗传学的深入研究和创造了新的条件, 特别是脉冲场电泳技术与分子杂交、RAPD 分析、RFLP 分析等分子生物学研究技术的有机结合, 将极大地提高真菌分子生物学的研究水平。

1 脉冲电泳技术的原理

脉冲电泳是在琼脂糖凝胶上外加正交的交变脉冲电场, 其方向、时间与电流大小交替改变, 每当电场方向发生改变, 大分子的 DNA 便滞留在爬行管内, 直至沿新的电场轴重新定向后, 才能继续向前移动, DNA 分子越大, 这种重排所需时间就越长。当

*北京市自然科学基金 (No. 6032005)

北京市教育委员会基金资助 (No. 00KJ-096)

**通讯作者 Tel: 010-68902964, E-mail: clifan@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2005-04-29, 修回日期: 2005-06-07

DNA 分子变换方向的时间小于脉冲周期时, DNA 就可以按其分子量大小分离开了^[4]。

2 脉冲电泳技术的种类及其特点

2.1 脉冲场梯度凝胶电泳^[1,5] (Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis, PFGE)

这种电泳技术装置产生的电场不均一, 故分离的 DNA 条带向一侧歪曲, 难以比较各片段的迁移率, 从而导致分辨率的降低。

2.2 正向交变电场凝胶电泳^[6] (Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis, OFAGE)

该技术使位于凝胶中间的 DNA 条带有所改良, 但由于电场并非处处相同, 位于边缘的条带仍然歪曲, 而且 DNA 分子迁移速度随在凝胶中的位置而变化, 难于进行带与带之间的比较和分子量的估测。

2.3 横向交变凝胶电泳^[7] (Transverse Alternating Field GEL Electrophoresis, TAFE)

该技术消除了特性弯曲, 但凝胶分子不能以恒定速度通过凝胶。

2.4 电场倒转凝胶电泳^[7,8] (Field Inversion Gel Electrophoresis, FIGE)

该技术能使 DNA 带更直, 但只能分辨 750kb 以下的片段, 有时还会导致带型反转, 即大片段位于小片段之前。

2.5 转动凝胶电泳^[6] (Rotating Gel Electrophoresis, RGE)

琼脂糖浓度必须高于 1.5% 以防止胶在转动过程中破裂。

2.6 转动电场电泳^[6] (Rotating Field Electrophoresis, RFE)

克服了 RGE 凝胶易破裂的缺点, 但实际操作中电场方向难以调节和控制, 不能分辨小于 50kbDNA。

2.7 双重脉冲场凝胶电泳^[9] (Secondary Pulsed Field Gel Electrophoresis, SPFG)

在这种系统中, 除了原来的主脉冲场外, 又在 DNA 分子的净迁移方向增加了一对由另一电源控制的电极, 产生了一个短的附加脉冲场, 能使 PFGE 的分辨范围的上限从 5,000kb 达到 10,000kb 以上, 并大大缩短了电泳时间。但是需要选择合适的附加脉冲场的宽度、脉冲周期和电场强度, 附加电场使凝胶中 DNA 分子迁移的主要原因以及对其动力学的影响因素还不清楚, 使得我们没有足够的信息利用 SPFG 的这些参数。

2.8 等高锁状均质电场电泳或钳位均匀电场电泳^[8] (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field, CHEF)

在水平凝胶周围沿正六边形排列电极, 从而在六边形中央形成脉冲式匀强电场, 使凝胶处处场强相同, 它吸取了 FIGE 和 OFAGE 的长处, 从而具有分离 DNA 带直, 分辨率高, 凝胶板可用于分子杂交等特点, 在真菌 DNA 电泳核型分析中被广泛应用, 如啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、李氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、白假丝酵母 (*Candida albicans*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、大雄疫霉 (*Phytophthora megasperma*)、盘长孢状刺盘孢 (*Colletotrichum gloeosporoides*)、大麦坚黑粉菌 (*Ustilago hordei*)、玉米黑粉菌 (*U. maydis*) 等。

CHEF 系统是目前广泛应用的装置, 因为它改进了其它电泳装置使 DNA 泳道发生弯曲的缺陷, 并可分离高达 10Mb 的 DNA 片段, 脉冲时间的延长可分离大片段 DNA, 缩短则适应小片段 DNA 的分离。

3 脉冲电泳在真菌中的应用

基因组又称染色体组,指一个生物体、细胞器或病毒的整套基因。基因组分析旨在弄清基因组 DNA 的全部核苷酸顺序结构,识别所有基因的编码,测定基因的位置及它们的功能,这是分子生物学及至整个生命科学领域一项十分重要的基础性工作。而明确基因组染色体数目和大小,则是这一工作的前提。由于真菌染色体较小以及可能获得的遗传标记较少,因此难于用传统的染色体技术和光学显微镜观察或是通过基因间建立遗传学连锁关系的方法对其进行测定。脉冲电泳技术可分离大分子量的 DNA 的极限为 10Mb,为真菌染色体的研究提供了技术平台,并在真菌的染色体分离、菌株鉴定、核型分析、核型多态性等研究领域得到广泛的应用。

3.1 核型分析 脉冲电泳广泛用于真菌的核型分析,通过它可以直接得到其染色体的数目,每条染色体分子量以及染色体总量。

利用 OFAGE 技术对双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 染色体 DNA 进行核型分析,结合 DNA 探针杂交,估计双孢蘑菇基因组共有 13 条染色体,总长约 34Mb^[10];采用 CHEF 对双孢蘑菇进行核型分析,亦分离到 13 条染色体^[11],说明脉冲电泳结果具有重复性及可靠性。经统计,目前真菌学家至少对近 30 种丝状真菌进行了电泳核型分析,明确其染色体数目和基因组大小,并在食用真菌、病原真菌的染色体基因组的分离和鉴定上得到应用。

3.2 种群特异性鉴定 脉冲电泳能应用于各种真菌的核型分析,明确其染色体 DNA 的数目及分子量,这将促进真菌种群在细胞学水平上的特异性鉴定。不同种真菌间染色体数目、DNA 分子量及基因组大小都有较大不同,分子核型差异较大。不同来源的同种真菌内菌株间分子核型亦有明显差异。在近缘种属形态鉴定较困难的情况下,电泳核型图谱将为真菌分类提供细胞学水平上的依据。Sagawa 等对侧耳属 (*Pleurotus*) 4 个种 (*P. pulmonarius* 肺形侧耳, *P. salmoneostramineus*, *P. ostreatus* 糙皮侧耳, *P. cornucopiae* 白黄侧耳) 的电泳核型分析表明, *P. pulmonarius* 有 6 条分子大小从 4.9Mb 到 1.6Mb 的 DNA 条带, *P. salmoneostramineus* 有 8 条分子大小在 6.2 ~ 2.7Mb 的 DNA 条带, *P. ostreatus* 有 6 条分子大小从 5.2Mb 到 2.1Mb 的 DNA 条带, *P. cornucopiae* 有 7 条分子大小在 4.6 ~ 1.8Mb 的 DNA 条带,具有明显的种的特异性^[12]。

利用脉冲电泳技术真菌学家发现真菌中存在着染色体 DNA 的多态性,在酵母菌及丝状真菌中普遍存在染色体长度多态性。如对家蚕病原白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 的 3 种菌株核型分析发现,被分离出的 6 条染色体的大小在供试的 3 种菌株间存在差异,最小的 6 号染色体的估算大小分别为 215Mb (菌株 F1)、218Mb (菌株 F2) 和 219Mb (菌株 F3),最大的 1 号染色体的估算大小分别为 616Mb (菌株 F1)、617Mb (菌株 F2) 和 712Mb (菌株 F3),在 2、3、4、5 号染色体中也存在着这种差异。结果表明,家蚕病原白僵菌 3 种菌株的染色体大小在 2.5 ~ 7.2Mb 之间,核型大小在 26.5 ~ 29.0Mb 之间,并且其核型在各菌株间存在多型性^[13],因此可以根据不同菌株染色体 DNA 长度的多态性,应用于真菌的菌株鉴定。随着脉冲电泳技术的进一步改进,以及更多的同源 DNA 探针用于与染色体 DNA 进行分子杂交,核型多态性的研究将得到更加

广泛深入的发展,可能成为鉴别真菌菌株的重要指标之一。

3.3 基因定位 动植物基因连锁分析往往先研究若干个基因的连锁关系,再通过染色体突变等研究将不同的连锁群定位到具体的染色体上。大多数真菌难以通过其表型分析及染色体突变研究来确定其连锁群,但可以先用脉冲电泳分离染色体DNA,再通过DNA探针杂交,就能将真菌基因定位到染色体上,并从其杂交图谱上分析出其基因连锁群。

Lodder^[11]等利用双孢蘑菇(*A. bisporus*)纤维素酶和漆酶的cDNA探针与脉冲电泳分离的核型进行杂交,将纤维素酶和漆酶的基因分别定位到第10条和第13条染色体DNA上。Brody^[14]等利用CHEF获得构巢曲霉的核型,并同时对其8个连锁群中的4个进行了染色体定位,分子大小为5.0Mb, 4.5Mb, 3.8Mb, 3.5Mb的染色体分别对应于连锁群Ⅷ、Ⅶ、Ⅰ、Ⅲ。Debets^[15]等对7株携带构巢曲霉(*A. nidulans*)异源*amdS*基因的黑曲霉(*A. niger*)的核型研究表明,通过杂交的方法将非诱变rRNA基因定位于染色体Ⅱ或Ⅵ上。这一技术还专门用于缺乏有性世代的真菌中,例如白假丝酵母(*C. albicans*)染色体14个基因的测定,以及在顶头孢霉(*Cephalosporium acremonium*)的两条不同染色体上,头孢霉素C合成途径的两个关键基因结构的测定。因此,对于遗传学上难以操作的真菌,电泳核型为证明其连锁相关性提供了有力的工具。

3.4 遗传分析 由于真菌的电泳核型图谱具有种的特异性及种内核型多态性,在一些真菌的杂交或原生质体融合形成的异核体的核型图谱中,能区分来自不同亲本的染色体DNA。在其减数分裂产物中,亦可对某些特异的染色体DNA片段进行追踪,从而进行遗传分析。通过对球孢白僵菌28和*Beauveria sulfurescens*2(白僵菌的一种)原生质体融合而得到的新菌株的基因组结构的研究,发现新菌株同时拥有两个亲本的特异性条带,表明其新菌株是集中了双亲本性状的杂合菌株,并且其性状和分子结构稳定^[8]。对双孢蘑菇的核型分析亦发现同样现象,两个同核体的电泳核型存在显著的多态性,其异核体的核型图谱是两个同核体电泳图谱的组合^[10]。随着对染色体结构与功能研究的深入,脉冲电泳技术可能广泛应用于真菌遗传变异的研究。

4 脉冲电泳技术中现存的问题

脉冲电泳应用于真菌核型分析的历史并不长,其本身还存在一些问题:(1),分子量相近的染色体DNA难以有效地分离开来,只能借助溴化乙锭的荧光强度和DNA探针杂交结果来判断。(2),电泳条件的选择比较复杂,分子量大于3.5Mb的DNA分子极难分离成带,常严重拖尾。(3),从真菌中克隆的基因还很少,能找到的各种分子标记不多,因而,缺少足够的DNA探针与染色体DNA进行杂交,影响了核型分析结果的准确性。(4),在脉冲电泳中分离的每一条染色体带并不纯,故从目的染色体上获得的DNA片段易被从其他染色体来源的片段所污染。第五,在凝胶分离过程中大的染色体分离是不完全的。

参考文献

- [1] Schwartz D C, Cantor C R. Cell, 1984, 37: 67~75.
- [2] 邱芳,伏建民,王斌. 植物学报, 1999, 41(11): 1204~1207.
- [3] 董琼珠,程备久,朱苏文. 激光生物学报, 2003, 12(4): 241~248.