

毛霉目真菌 DNA 的提取及其 GC 含量的测定*

周志伟 黄河

(中国科学院微生物研究所, 北京)

摘要 试验证明, 通过液氮冷冻、手工研磨破碎后用稍加改进的常规 DNA 提取方法, 可以成功地提取聚合度高, 符合于热变性测 T_m 值的毛霉目真菌 DNA。对 60 株菌的测定结果表明, 毛霉目各属真菌中 G + C mol% 高低有一定顺序, 基本与文献报道相符。对提取时应注意的细节、 T_m 值的测定、GC 含量计算公式的选定和结果分析进行了讨论。

关键词 毛霉目; DNA 提取; GC 含量; T_m 值

核酸作为生物的遗传物质, 不仅决定了生物的形态特征, 而且也包含了生物进化的信息。由于核酸在生物进化中的特殊地位, 分离与测定生物核酸组成成份即 DNA GC mol% 并加以比较, 日益为生物分类工作者所重视。特别是对于那些用形态分类方法难以区分的类群,

分子生物学的分类手段更显示出它们的优越性。DNA GC mol% 在分类上的作用首先在

* 国家自然科学基金及真菌地衣系统学开放研究实验室资助项目。

我所四室李文忠副研究员提供 Beckman DU-7 分光光度计并指导使用, 特此致谢。

细菌中得到证实。目前 DNA GC mol% 已广泛地应用于描述细菌的种。在真菌中 GC mol% 虽然没有如此普遍的应用,但也发现各纲中 GC 含量可以作为反映进化的一种指标^[1-2]。GC 含量用于丝状真菌的分类研究在国内几乎还是空白。近年来我们在毛霉目真菌 DNA 的提取与 GC 含量的测定方面做了一些工作,现将我们的经验与结果作一介绍。

材料与方 法

(一) 菌种和培养

所有测定 DNA 碱基组分用的菌种都是由我所一室毛霉组郑儒永研究员和陈桂清副研究员鉴定和提供的。它们是 *Blakeslea sinensis* 1 株, *Choanephora cucurbitarum* 1 株, *Cunninghamella blakesleeana* 1 株, *C. echinulata* 1 株, *C. elegans* 1 株, *Haplosporangium attenuatissima* 2 株, *Mortierella alpina* 1 株, *M. isabellina* 1 株, *M. parvispora* 1 株, *M. ramanniana* var. *ramanniana* 1 株, *M. zychae* 1 株, *Absidia corymbifera* 1 株, *A. cylindrospora* 1 株, *A. spinosa* 1 株, *Actinomyces elegans* 1 株, *Circinella aspera* 1 株, *C. muscae* 1 株, *C. umbellata* 1 株, *Gongronella butleri* 2 株, *Mucor circinelloides* 1 株, *M. hiemalis* 1 株, *M. racemosus* 1 株, *Phycomyces nitens* 2 株, *Rhizopus arrhizus* 6 株, *R. chinensis* 2 株, *R. circinans* 2 株, *R. delemar* 2 株, *R. microsporus* 1 株, *R. niveus* 1 株, *R. oligosporus* 2 株, *R. rhizopodiformis* 1 株, *R. stolonifer* 1 株, *Zygorhynchus heterogamus* 1 株, *Z. moelleri* 1 株, *Syncephalastrum monosporum* var. *crisatum* 2 株, *S. monosporum* var. *monosporum* 3 株, *S. monosporum* var. *pluriproliferum* 1 株, *S. racemosum* 7 株, *Chaetocladium brefeldii* 1 株, *Helicostylum fresenii* 1 株, 共 6 科 14 属 60 株菌, 保存在 PDA 斜面上。收集菌体用蛋白胨酵母膏培养液。

(二) 仪器和试剂

GC 含量测定时用 Beckman DU-7 型分光光度计, 其他主要仪器还有 Hitachi 20PR-52D 冷冻高速离心机, New Brunswick 可调速摇床, 恒温水浴锅。

TES: Tris 50mmol/L + 0.15 mol/L

NaCl + 0.1mol/L EDTA, pH7.8。

SSC: 0.15mol/L NaCl + 0.015mol/L 柠檬酸三钠 pH7.0—7.2。

YPG 培养基: 酵母膏 3g, 蛋白胨 10g, 葡萄糖 10g, 加水 1000ml。

10% SDS: 10g SDS 加水到 100ml。

NaCl-Na₂EDTA: 3mol/L NaAc + 0.001 mol/L Na₂EDTA。

NaClO₄, 乙醇, 异丙醇等均为分析纯试剂。

(三) 方法

1. T_m 值测定: 虽然细菌 DNA 的提取步骤已较成熟, 但丝状真菌 DNA 的提取还没有一套完整规范的程序。经多次摸索, 我们认为 Storck 与 Alexopoulos^[3] 在 Marmur^[3] 法基础上改进的方法比较适用。经过一些小的改进即成为提取毛霉目真菌 DNA 的常规方法。只是我们采用 15000r/min 高速离心去多糖及摇床代替手工操作进行去蛋白。

在 T_m 值测定时将 DNA 浓度稀释至 OD₂₆₀ = 0.4 左右 (在 260nm 处 1 OD₂₆₀ 相当于 50 μg/ml DNA)。在 230nm、260nm、280nm 处测定光吸收 OD₂₃₀、OD₂₆₀、OD₂₈₀, 当它们达到标准后 (OD₂₃₀: OD₂₆₀ = 0.450, OD₂₈₀: OD₂₆₀ = 0.515), 继续 T_m 值测定步骤。在开始测定时, 温度上升的幅度可以适当大一些, 当 OD₂₆₀ 随温度而增加时说明 DNA 已开始变性, 这时每升高 1°C 必须稳定 5 分钟。在变性结束时可以加快温度上升幅度, 直至 OD₂₆₀ 随温度升高无明显增加为止。

2. 变性曲线的绘制和 T_m 值的确定: 以 DNA 溶液的温度为横坐标; 相对吸光率为纵坐标作图即得变性曲线。相对吸光率的计算可参考有关文献 [4]、[6]。与最大相对吸光率一半相对应的温度即为 T_m。由于用 T_m 值来计算 GC 含量, 因此 T_m 值的准确性至关重要, 故必

须对仪器的温度进行校正。但分光光度计的样品室较小,无法直接用标准温度计校正,只能先用标准温度计校点温计,再用点温计校分光光度计,而且在25—95℃范围内都要校正,因为偏差值在不同温度时不是固定不变的。

3. GC含量的计算:用 T_m 值测GC含量,习惯上沿用 $1 \times SSC$ 溶液时Marmur和Doty所推荐的经验公式^[7]。但在DNA中G+C mol%含量比较高时, T_m 值往往在90℃以上,完全变性时的温度会超过100℃。这时会带来很多不便,所以常改用 $0.1 \times SSC$ 代替 $1 \times SSC$ 作溶剂以降低 T_m 值。这时计算GC含量的公式多用Mandel和Marmur推荐的 $GC\% = (T_m - 53.9) \times 2.44$ ^[6]。林万明等稍加改变为 $GC\% = (T_m - 53.5) \times 2.44$ ^[4]。我们使用后,发现GC含量低的DNA所得计算值和文献报道的G+C mol%,差别较大。实际上1970年Mandel等已把1968年所推荐的 $0.1 \times SSC$ 溶液中 T_m 计算GC含量的公式改为 $GC = (T_m/50.2) - 0.990$ ^[8]。我们用这一公式计算我们所有的DNA,发现GC含量的测定值与文献报道的更为接近,所以采用了这一公式。大肠杆菌的GC含量以Gillis等^[9]1970年计算的51.7%计。所测毛霉目真菌DNA的GC含量都用大肠杆菌(*E. coli* HB101)的GC含量作校正。大肠杆菌DNA制备见文献[8]。

结果与讨论

(一) DNA的提取

经过对Storck和Alexopoulos的方法作了一些改进后,DNA提取的成功率大大提高,所得的DNA片段长,蛋白质与多糖含量少,纯度符合用熔点法测GC含量的要求。在热变性时转化温度范围窄,增色效应明显,一般可达30—40%(图1)。

(二) 毛霉目真菌DNA GC含量

对毛霉目16个属60株菌的测定后发现,它们的GC含量可分为明显的三组。*Gongronella*、*Haplosporangium*、*Syncephalastrum*及*Mortierella*各属为一组,GC含量最高,为

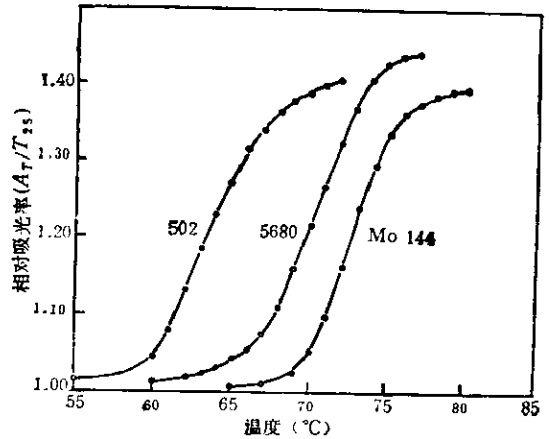


图1 毛霉目不同属DNA的热变性曲线

表明 T_m 值有明显的差异。502为*Cunninghamella elegans*, 5680为*Mucor circinelloides*, Mo 144为*Mortierella rammaniana* var. *rammaniana*

46.0—49.8%; *Cunninghamella* 单独成一组, GC含量只有28.8%;其它各属如*Absidia*, *Rhizopus*, *Mucor*等的GC含量分布在34.9—41.9%之间。按各属GC含量的多少排列整理,结果见表一。图1为这三组的代表属实测的变性曲线。由图1可以看出各属 T_m 的差别。表1的排列次序基本上和Storck与Alexopoulos^[5]用浮力密度法测得结果相吻合。看来这两种方法是可以相互参比的,而且GC含

表1 毛霉目若干属DNA GC含量的分布

属名	测定种数	测定株数	GC平均值	范围
<i>Gongronella</i>	1	2	48.8	47.8—49.7
<i>Syncephalastrum</i>	4	13	47.5	45.6—49.8
<i>Haplosporangium</i>	1	2	47.0	46.0—48.0
<i>Mortierella</i>	5	5	46.0	42.3—50.6
<i>Absidia</i>	3	3	41.9	37.3—44.0
<i>Zygorhynchus</i>	2	2	41.5	41.1—41.9
<i>Phycomyces</i>	1	2	40.3	40.1—40.5
<i>Actinomucor</i>	1	1	38.7	
<i>Mucor</i>	3	3	38.4	34.5—41.5
<i>Rhizopus</i>	9	17	38.4	36.9—41.7
<i>Blakeslea</i>	1	1	38.3	
<i>Choanephora</i>	1	1	38.1	
<i>Helicostylum</i>	1	1	36.9	
<i>Circinella</i>	3	3	35.4	35.3—35.5
<i>Chaetocladium</i>	1	1	34.9	
<i>Cunninghamella</i>	3	3	28.8	27.8—29.5

量可以作为毛霉目真菌的一种性状加以描述。

(三) 讨论

1. 提取过程

a. 细胞壁的破碎：一般都强调用温和的方法，尽量避免用机械法。经过我们多次试验证明，用液氮冷冻、手工研磨是最省事又不致影响大片段核酸提取的有效方法，所得核酸可用玻棒搅出。Storck 与 Alexopoulos 已用于破碎多种真菌，是丝状真菌破壁的有效手段。

b. 最适菌龄的选择：细菌的生长有明显的对数期，但丝状真菌生长对数期不好确定，文献上介绍的菌体培养时间各不相同。经摸索发现，以摇床培养 2—3 天的菌体作 DNA 提取材料为宜。对生长速度慢的真菌可以加大接种量或稍稍增加培养天数。

c. 防止提取过程中 DNA 链的断裂：除了防止核酸酶的降解作用外，还应避免振荡及转移时剪切力的作用。我们选用 Brunswick 可调变速摇床代替手工操作去蛋白，转速由快到慢可任意调节，比手工操作平稳，这样就大大减少了手工操作过程中因用力不均而造成的 DNA 断裂。采用大口径滴管转移溶液，慢吸慢放则与一般提取 DNA 相同。

d. 高速离心去多糖：真菌细胞中含有大量的多糖，在 DNA 提取时这些多糖随 DNA 一起释放到提取液中。它们在提取液中溶解度低，但低速离心又沉淀不下来，因而形成乳白色半透明溶液，在用乙醇沉淀核酸时这些多糖随 DNA 一起沉淀。我们采用 15000r/min 离心 30 分钟使多糖沉淀而除去，这时提取液变得清澈透明。

2. 用 T_m 值计算 GC 含量公式的选定：自 1962 年 Marmur 与 Doty 发表 GC 含量与 T_m 值成直线关系，而不同离子强度对 T_m 值的影响只改变该直线的截距而不影响斜率以来，不少工作者进行了研究。Mandel 和 Marmur 在《酶学方法》^[6]一书中把 $0.1 \times SSC$ 下所得 T_m 值与在 $1 \times SSC$ 下得到的 T_m 之间的差别确定为 $15.4^\circ C$ ，这一数值似乎已被普遍接受。实际上许多作者在研究离子强度和 T_m 值之间关

系时发现不同作者所得结果往往不太一致。Schildraut 与 Lifson 的公式中将 T_m 在 $1 \times SSC$ 和 $0.1 \times SSC$ 之间的差值确定为 $16.6^{[10]}$ ，Dover 与 Davison 认为是 $18.5^\circ C^{[11]}$ ，Mandel 等又推测为 $16.3 \pm 0.5^\circ C$ ，林万明等则推荐用 $15.8^\circ C^{[4]}$ ，Jahnke 与 Bahnweg 则用 $18.2^\circ C^{[12]}$ 。大多数作者认为直线的斜率不随离子强度而改变。Owen 等人提出不同意见^[13]，Jahnke 与 Bahnweg 简化 Owen 等的公式后斜率为 2.08 而不是习惯用的 2.44。实际上 Mandel 等在 1970 年的直线关系式中斜率也不是 2.44，而是接近 2.00。而且许多作者都说明这些公式为经验式，要用已知 GC 含量的 DNA 来验证。我们根据实测的 T_m 值与 Storck 和 Alexopoulos 用密度梯度测定的种名相同菌的 GC 含量作图，发现 Mandel 等 1970 年的关系式更符合我们的结果(图 2)，因而采用了此公式。Szécsi 和 Dobrovolsky 在计算镰刀菌 GC 含量时也用了这一公式^[14]。

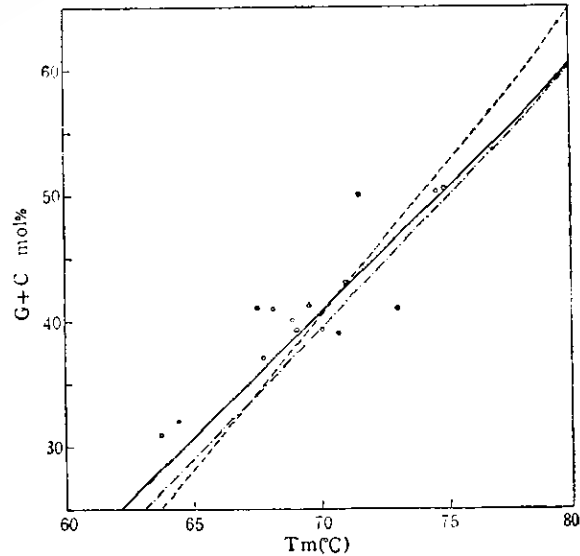


图 2 DNA G + C mol% 与 T_m 值之间三种公式的比较
—— $GC = (T_m/50.2) - 0.990$; --- $GC\% = (T_m - 53.5) \times 2.44$; - · - · - $GC\% = (T_m - 51) \times 2.08$ 。图中圆点是实测 T_m 值为横坐标对文献报道 G + C mol% 为纵坐标所确定的位置

3. 与文献报道值的比较：我们得出的 GC 含量基本上与文献报道的相符。有的偏低，并

有个别差异较大。估计有以下几种原因。a. 方法上允许的误差。用 T_m 测 GC mol% 允许的标准差为 $\pm 0.4^\circ\text{C}$, 相当于 $\pm 1\%$ GC^[6]。用浮力密度法测 GC 含量也有 0.5—0.9% 的标准差^[9]。这些是在完全一致的试验条件下重复的结果。不同试验室条件不可能做到完全一致, 结果差别超过 2% GC 也是可以理解的。b. 生物的变异。以 Storck 和 Alexopoulos 的试验可以说明生物个体间的差别, 即使在同一试验室, 而且是公认的最可靠的浮力密度法, 同一种的不同株的差别, 标准差一般在 2% 以内, 实测变动幅度在 6—8%。同一试验室都有这样的差别, 不同试验室因菌株不同, 加上有些只测一、二株, 结果不完全一致的可能性就更大。c. 方法不同造成的差异。不同工作者用不同方法做出的结果不一定完全吻合。DeLey 1970 年^[15]用 97 株细菌及其它一些生物 DNA 比较了浮力密度与 T_m 的关系。虽然两者呈直线相关, 但也是在统计学的观点上如此。即便如此, 尚有 7% 的细菌及 19% 的其它生物在置信区间以外。Jahnke 与 Bahnweg^[12]比较了裸盖菇用浮力密度与 T_m 测 GC 含量的结果, 表明前法比后法高 2—3% GC。d. 公式不同。有时

方法虽同但公式不同, 结果也就不一。以上列出种种分歧的原因, 并不是完全不能比较, 如我们的结果与 Storck 和 Alexopoulos 的结果就有相当的一致性。相信在经过更多工作的积累后将会得出公认的结果。

参 考 文 献

1. Vanyushin BF et al.: *Dokl Akad Nauk SSSR*, 134: 1222—1225, 1960.
2. Storck R: *J. Bacteriol.*, 91: 227—230, 1966.
3. Marmur J: *J. Mol. Biol.*, 3: 268—218, 1961.
4. 林万明等: *微生物学通报*, 8: 245—247, 1981.
5. Storck R and CJ Alexopoulos: *Bacteriol Rev.*, 34: 126—154, 1970.
6. Mandel M and J Marmur: In *Methods in Enzymology* ed. Grossman L. Moldave K. XII B, 196—206, 1968.
7. Marmur J and P Doty: *J. Mol. Biol.*, 5: 109—118, 1962.
8. Mandel M et al.: *J. Bacteriol.*, 101: 333—338, 1970.
9. Gillis M et al.: *Eur. J. Biochem.*, 12: 143—153, 1970.
10. Schildkraut C and S Lifson: *Biopolymers*, 3: 195—208, 1965.
11. Dover WF and N Davidson: *J. Mol. Biol.*, 5: 467—478, 1962.
12. Jahnke KD and C Bahnweg: *Trans Br. Mycol. Soc.*, 87: 175—191, 1986.
13. Owen RJ: et al.: *Biopolymers*, 7: 503—516, 1969.
14. Szecsi A and A Dobrovolszky: *Mycopathologia*, 89: 95—100, 1985.
15. DeLey J: *Enzymol.*, 101: 328—351, 1970.