

一种用于 PCR 扩增的丝状真菌 DNA 快速提取方法

潘力* 崔翠 王斌

(华南理工大学生物科学与工程学院 广东 广州 510006)

摘要: 丝状真菌在工业、农业、医药以及基础生物学研究中具有重要作用。利用遗传转化技术对丝状真菌进行菌株改良和基因功能分析,也越来越受到重视。然而,丝状真菌 DNA 提取方法繁琐、费时,难以满足利用 PCR 技术高通量筛选转化子的需要。本文以曲霉菌为例建立了一种快速提取丝状真菌 DNA 的实验方法,微波处理置于 $10 \times$ TE buffer 中的菌丝即可得到 DNA。RAPD 试验和 PCR 扩增证明,该方法提取的 DNA 能够达到 PCR 扩增的要求。研究结果为高通量快速筛选丝状真菌转化子奠定了基础。

关键词: 丝状真菌, DNA 提取, 筛选鉴定, 转化子, RAPD

Rapid Extraction of Filamentous Fungal DNA for PCR Amplification

PAN Li* CUI Cui WANG Bin

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: Filamentous fungi play an important role in industry, agriculture, medicine and biological fundamental research. More and more attention has been paid to fungal breeding and gene functional analysis via genetic transformation technology. However, the extraction of fungal DNA was labor intensive and time-consuming, which makes it difficult to perform high-throughput screening of transformants through PCR technology. In this paper, a rapid DNA extraction method was established for filamentous fungi (take *Aspergillus* for example). DNA was easily obtained by exposing the fungal mycelia in $10 \times$ TE buffer to microwave. RAPD and PCR experiments demonstrated that the extracted DNA satisfied the requirements of PCR amplification. These results provided a foundation for the high-throughput screening of filamentous fungal transformants.

Keywords: Filamentous fungi, DNA extraction, Screening and identification, Transformant, RAPD

丝状真菌广泛存在于自然界中,在工业、农业、医药以及基础生物学研究中具有重要作用,多年来

一直被广泛地研究。随着分子技术的发展,丝状真菌的遗传转化在理论上和应用上均取得了较大的进

基金项目: 广东省科技攻关项目(No. 2008A010900002)

*通讯作者: Tel: 86-20-39380616; 信箱: bilipan@scut.edu.cn

收稿日期: 2009-09-29; 接受日期: 2009-12-02

展^[1]。当前, 丝状真菌转化体系遇到的主要问题是如高通量筛选遗传转化子。普通的菌落 PCR 不能适用于细胞壁结构复杂的丝状真菌, 需要先提取基因组 DNA (如 CTAB 法^[2]), 再进行 PCR 扩增才能鉴定转化子。CTAB 法虽能获得质量极高的丝状真菌 DNA, 但是操作步骤繁琐, 不能满足高通量的要求; 后续有很多改良的方法^[3-10], 一定程度上简化了操作步骤, 但仍达不到高通量筛选的要求。

本文介绍了一种适用于丝状真菌 DNA 的快速提取方法, 利用实验室常用设备——微波炉, 对丝状真菌的菌丝进行简单处理, 一步即可得到适用于 PCR 筛选的 DNA 模板, 方法快速、简便, 为丝状真菌转化子的高通量筛选奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种: 米曲霉 RIB40, 米曲霉 IFO4177, 米曲霉 AS3.951, 黑曲霉 ATCC9142, 黑曲霉 CICC2377 (本实验室保藏)。

1.1.2 试剂: 10 × TE buffer (100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0)。

1.1.3 培养基: DPY 培养基(1 L): 糊精 20 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, K₂HPO₄·3H₂O 1.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 琼脂 15 g, pH 5.5, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.2 方 法

1.2.1 菌体培养: 将 10⁷–10⁸ 个孢子涂布于 DPY 培养基上, 30°C 培养 2–3 d 到长出较多菌丝。

1.2.2 DNA 提取: 用无菌牙签挑取少量菌丝, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μL 10 × TE buffer, 振荡使菌丝分散, 盖紧离心管盖并用封口膜(Parafilm)密封, 置微波炉中 700 W 加热 2 min, 立即将离心管转入冰浴 2 min, 12000 r/min 离心 1 min, 吸取 10 μL 上清液作为 PCR 模板。

1.2.3 CTAB 法提取 DNA: 在 DPY 液体培养基中接种孢子(浓度为 10⁵ 个/mL), 200 r/min、30°C 培养 2 d, 收集菌丝体, 洗涤、抽滤除去其中的大部分水分, 冷冻干燥 12 h 左右彻底干燥菌丝体。取 1 g 左右干燥菌丝体于研钵中, 加入液氮, 研磨至粉末状并迅速转移至 1.5 mL 离心管中, 每管 20–60 mg, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[11]。

1.2.4 PCR 扩增: 利用上述微波处理得到的 DNA 作模板扩增曲霉菌的单拷贝基因 *nucS*, 以检测提取

的 DNA 的质量。扩增引物为 Sense primer (5'-GGCAGATAAGATAGCGGAAG-3'), Anti-sense primer (5'-CCGACAGACTGTAGCCACC-3'), 由美国 Invitrogen 公司合成。25 μL PCR 体系包括 1 μL 模板 DNA, 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa) 0.2 μL, 10 × PCR buffer (TaKaRa) 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ (TaKaRa) 2.0 μL, 20 μmol/L 引物各 0.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs (TaKaRa) 1.5 μL, 双蒸水 16.8 μL。扩增程序为: 95°C 5 min; 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 RAPD-PCR: RAPD 引物见表 1, 由美国 Invitrogen 公司合成。扩增体系如下(总体积为 25 μL): 10 × PCR buffer (TaKaRa) 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ (TaKaRa) 1.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs (TaKaRa) 1.0 μL, 25 μmol/L 引物 0.2 μL, 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa) 0.2 μL, 微波处理得到的 DNA 1.0 μL, 双蒸水 18.6 μL。扩增程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 33°C 1 min, 72°C 2 min, 45 个循环; 72°C 5 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 照相保存。

表 1 RAPD-PCR 反应所使用的引物序列
Table 1 Primers of RAPD-PCR

编号 Number	序列 Sequence (5'→3')
Primer1	AATCGGGCTG
Primer2	CTGCTGGGAC
Primer3	CGGCC[A/C]CTG[T/A]

1.2.6 丝状真菌转化子鉴定: 依照上述方法微波处理米曲霉 RIB40 野生型、转化子(转入潮霉素抗性基因 *Hyg^r*)的菌丝, 利用得到的 DNA 进行 PCR 扩增。潮霉素抗性基因扩增引物为 Sense primer (5'-CTTG TTCGGTCGGCATCTAC-3'), Anti-sense primer (5'-GT CGCCTAAGGTC ACTATCAGC-3')。此外扩增 *nucS* 基因作为检测 DNA 质量的指标, 反应体系与程序同 1.2.3。

2 结果与分析

2.1 PCR 检测 DNA 的质量

分别以微波处理得到的 DNA 和 CTAB 法得到的 DNA 为模板, PCR 扩增曲霉菌的单拷贝基因 *nucS*, 均能获得清晰的产物条带(图 1), 说明微波处理丝状真菌得到的 DNA 可以作为 PCR 扩增的模板。

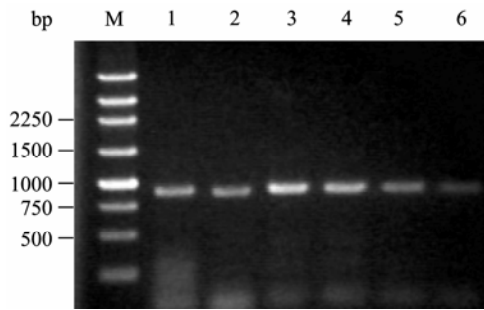


图 1 PCR 扩增 *nucS* 基因

Fig. 1 PCR amplification of *nucS* gene

注: 1: CTAB 法提取 DNA 扩增到的 *nucS* 基因; 2-6: 微波处理提取 DNA 扩增到的 *nucS* 基因; M: 250 bp marker (TaKaRa).

Note: 1: *nucS* gene amplified from DNA extracted by CTAB method; 2-6: *nucS* gene amplified from DNA extracted by our method using microwave. DNA extracted via two methods could both satisfied PCR amplification. M: 250 bp marker (TaKaRa).

2.2 RAPD 技术检测 DNA 的质量

以微波处理的 DNA 作模板, 利用 RAPD 技术对 5 株曲霉属菌株进行系统发育分析。RAPD-PCR 获得了多态性良好的扩增产物谱带(图 2), 利用

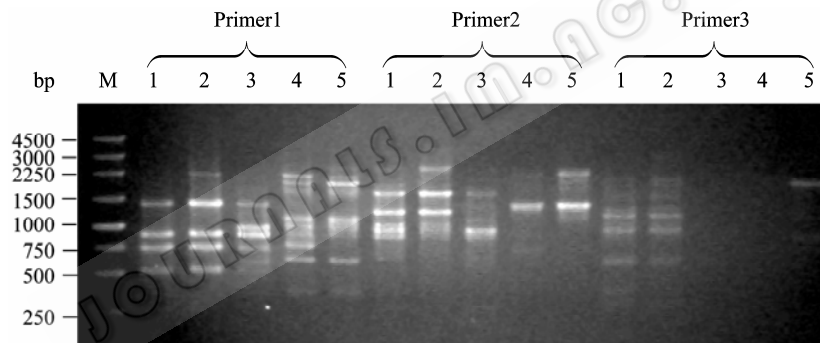


图 2 五株曲霉属菌株的 RAPD-PCR 扩增图谱

Fig. 2 RAPD-PCR amplification patterns of five isolates of *Aspergillus*

注: 1: 米曲霉 RIB40; 2: 米曲霉 IFO4177; 3: 米曲霉 AS3.951; 4: 黑曲霉 ATCC9142; 5: 黑曲霉 CICC2377; M: 250 bp marker (TaKaRa).

Note: 1: *Aspergillus oryzae* RIB40; 2: *Aspergillus oryzae* IFO4177; 3: *Aspergillus oryzae* AS3.951; 4: *Aspergillus niger* ATCC9142; 5: *Aspergillus niger* CICC2377; M: 250 bp marker (TaKaRa). Each isolate owns its characteristic PCR products, so RAPD-PCR could clearly differentiate these five isolates.

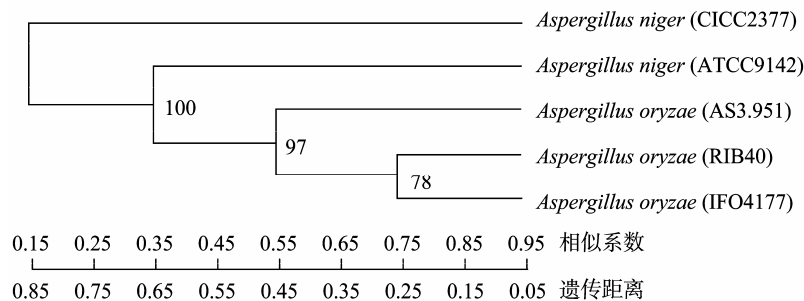


图 3 五株曲霉属菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenesis of five isolates of *Aspergillus*

Note: The serial number of these isolates are indicated in the parentheses. The number located in the branch represents the confidence, and similarity coefficient and genetic distance are denoted below the phylogenetic tree.

Phylip3.65 软件包采用邻位相连法构建了 5 株曲霉属菌株的系统发育树(图 3)。3 株米曲霉位于同一分支上, 而且米曲霉 RIB40 和米曲霉 IFO4177 亲缘关系更近; 米曲霉与黑曲霉分化明显; 相比黑曲霉 CICC2377, 黑曲霉 ATCC9142 与米曲霉亲缘关系更近。由此可见, 基于微波处理得到的 DNA, 所获得的系统发育分析结果与依赖生理生化和形态特征的传统分类方法相吻合, 说明微波处理得到的 DNA 质量较高, 可以满足 PCR 实验的要求。

2.3 米曲霉转化子的快速鉴定

利用微波处理获得米曲霉 RIB40 野生型和转化子的 DNA, 分别进行 PCR 扩增, 结果如图 4 所示。阳性对照基因 *nucS* 扩增结果表明, 野生型和转化子 DNA 均可以扩增到清晰的目标带, 而外源基因——潮霉素抗性基因只在转化子 DNA 中扩增出目标带(图 4 第 4 道), 以野生型菌株 DNA 为模板则没有扩增出相应条带(图 4 第 2 道)。由此表明, 微波提取的 DNA 适合转化菌株的 PCR 筛选。

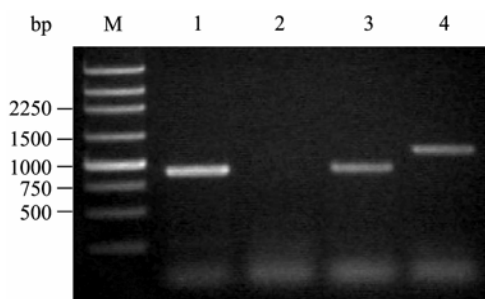


图 4 PCR 扩增鉴定米曲霉转化子

Fig. 4 Rapid identification of *Aspergillus oryzae* transformants using PCR

注: 1 和 2 分别为野生菌株扩增 *nucS* 基因和潮霉素抗性基因 (*Hyg^r*); 3 和 4 分别为转化子扩增 *nucS* 基因和潮霉素抗性基因 (*Hyg^r*); M: 250 bp marker (TaKaRa).

Note: 1 and 2 are *nucS* gene and hygromycin B resistant gene (*Hyg^r*) amplified from wild isolate respectively; 3 and 4 are *nucS* gene and *Hyg^r* gene amplified from transformant respectively. 1 and 3 are positive control, and PCR could accurately identify transformants. M: 250 bp marker (TaKaRa).

3 讨论

随着丝状真菌遗传转化体系的逐步完善, 转化子的高通量筛选方法是亟待解决的重要问题, 而其中 DNA 的提取是制约高通量筛选转化子的瓶颈。目前丝状真菌 DNA 的提取方法虽得到了一些改进和简化, 但仍达不到快速、简便的要求。利用微波处理提取 DNA 的方法已有文献报道^[2,7], 但这些方法都涉及酚/氯仿抽提和乙醇沉淀等步骤, 仍显繁琐。本文利用微波产生的瞬时高温可以有效地裂解丝状真菌的细胞壁, 而且其极短的作用时间避免了对 DNA 的破坏, 再利用 $10 \times$ TE buffer 除去细胞裂解液中的大多数蛋白组分, 加以离心, 只需 5 min 就能得到质量较好的 DNA, 可以满足 PCR 扩增要求, 用于 PCR 快速检测转化子。Ferreira 等曾报道利用微波处理提取丝状真菌的孢子 DNA^[12], 与本文有相似之处。但 Ferreira 等的方法所用的 TE buffer 浓度较低 ($1 \times$ TE buffer), 而且 TE buffer 是在干燥的孢子经过微波处理之后才加入的, TE buffer 的作用仅仅是浸提 DNA, 效果不够理想。而本文中, TE buffer 浓度高 ($10 \times$ TE buffer), 而且既参与菌丝组织的裂解, 也参与 DNA 的浸提, 因此提取的 DNA 质量较高。

微波处理提取 DNA 的过程中, 菌丝量和微波加热时间对提取的 DNA 的质量有影响, 需要根据实验条件进行调整。 $10 \times$ TE buffer 中的 EDTA 能络合 DNase 的激活剂——金属离子, 有效抑制了 DNase

的活性, 避免了在提取过程中其对 DNA 的降解, 对于提取的 DNA 具有保护作用。由于 $10 \times$ TE buffer 中 EDTA 含量较高, 所以 PCR 反应体系中 Mg^{2+} 的量需要相应提高以保持 *Taq* 酶的活性。另外, PCR 实验中可以适当地降低退火温度使引物与模板更好地结合。

综上所述, 本文提出的丝状真菌 DNA 提取方法快速、简便, 需要耗材少, 对于利用 PCR 技术快速高通量筛选丝状真菌转化子提供了一条可行的思路。

参考文献

- [1] 闫培生, 罗信昌, 周启. 丝状真菌基因工程研究进展. 生物工程进展, 1999(19): 36–41.
- [2] Walker WH, Fitzpatrick SL, Barrera-Saldana HA, *et al.* The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocrine Reviews*, 1991(12): 316–318.
- [3] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82–84.
- [4] 李绍兰, 周斌, 杨丽源, 等. 真菌 DNA 提取方法的改良. 云南大学学报(自然科学版), 2002, 24(6): 471–472.
- [5] 戈海洋, 郭刚, 张瑞, 等. 玻璃珠法提取基因组 DNA. 天津医科大学学报, 2006, 12(2): 313–314.
- [6] 韩立刚, 袁毅, 王罡. 丝状真菌组织 DNA 的提取. 生物技术, 1999, 9(6): 38–41.
- [7] 曾大兴. 适于 RAPD 分析的真菌 DNA 提取方法. 生物技术, 2003, 13(2): 20–21.
- [8] 田永强, 苏敏, 赵洪林, 等. 微波法快速提取丝状真菌基因组 DNA. 中国抗生素杂志, 2008, 33(11): 703–704.
- [9] CMJ van Zeijl, EHM van de Kamp, PJ Punt, *et al.* An improved colony-PCR method for filamentous fungi for amplification of PCR-fragments of several kilobases. *Journal of Biotechnology*, 1998(59): 221–224.
- [10] AlShahni MM, Makimura K, Yamada T, *et al.* Direct colony PCR of several medically important fungi using amp-direct plus. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2009, 62(2): 164–167.
- [11] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321–4326.
- [12] Ferreira, Adlane VB, Glass N. PCR from fungal spores after microwave treatment. *Fungal Genetics Newsletter*, 1996(43): 25–26.