

皱边石杉内生真菌DNA快速有效提取的研究

史云峰^{1,2}, 禹利君², 胥锦桦², 朱楠楠², 禹勇军¹, 刘仲华²

(¹湖南农业大学东方科技学院, 长沙 410128;

²湖南农业大学园艺园林学院/国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 长沙 410128)

摘要:为了选择一种省时省力、简单有效的皱边石杉内生真菌菌丝体总DNA提取方法,采用氯化苜法提取其总DNA,对比研究石英砂研磨与超声波振荡2种破壁方式对其DNA的提取效能。结果表明,采用石英砂研磨法提取的DNA,其点样孔附近残余杂质较多、拖尾现象严重;超声波破壁法提取的DNA质量总体较好,DNA条带在23.1 kb处集中,多糖、蛋白质等杂质污染少,拖尾现象轻微。比较而言,超声波破壁法可快捷、高效提取皱边石杉内生真菌菌丝体DNA,适于植物内生真菌DNA大规模快速提取,尤其对质地坚硬的菌落较石英砂研磨更有效。提取的DNA经琼脂糖凝胶电泳、ITS序列扩增,表明超声波破壁法提取的DNA与石英砂研磨法一样,均可获得良好的PCR扩增结果。

关键词:菌丝体破壁处理;DNA;皱边石杉;内生真菌

中图分类号:S188

文献标志码:A

论文编号:2011-2162

A Rapid and Effective Method for Isolating Total DNA from *Huperzia crispata*'s Endophyte Fungi Mycelia

Shi Yunfeng^{1,2}, Yu Lijun², Xu Jinhua², Zhu Nannan², Yu Yongjun¹, Liu Zhonghua²

(¹Orient Science & Technology College of Hunan Agricultural University, Changsha 410128;

²Horticulture and Landscape College of Hunan Agricultural University/

National Research Center of Engineering & Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128)

Abstract: In order to select a time-saving, simple and efficient total DNA extraction method for *Huperzia crispata*'s endophyte fungi mycelia which were isolated from *Huperzia crispata*. In this study, using benzyl chloride method to isolate total DNA of endophyte fungi and comparing quartz sand grind method with ultrasonic break method two break treatments for endophyte fungi mycelia DNA extraction efficiency. Results showed that, the DNA extraction efficiency and quality obtained by ultrasonic break method was superior to quartz sand grind method. Using quartz sand grind this method, the extracted DNA had more impurity and appeared serious tailing. But using ultrasonic break this method, the extracted DNA were concentrated in v 23.1 kb band, little polysaccharides and proteins were polluted near loading well. Ultrasonic break treatment was a fast, efficient and time-saving method for endophyte fungi mycelia DNA extraction, especially suitable for large scale DNA extraction. The genomic DNA extracted by this two different break treatments were digested by RNase A and amplified with ITS primers, agarose gel electrophoresis checking results showed that this two different break treatments could obtain good quality PCR effects. But, the ultrasonic break method was

0 引言

石杉碱甲(Huperzine A, HupA)是当今治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD, 俗称老年性痴呆)的有效临床用药^[1-2], 药物来源极其匮乏。发掘新的药物资源, 是解决老年性痴呆用药紧缺的有效措施^[3-4]。Yu^[5]、杨培迪^[6]等发现, 皱边石杉内生真菌具有生产Hup A的潜能, 为阐明皱边石杉内生真菌与其宿主植物的遗传进化关系, 拟建立皱边石杉内生真菌菌丝体的有效提取方法, 为后期分子遗传进化研究提供高质量的DNA模板。

氯化苜法因其提取步骤相对简易, 仅需3~4 h即可获得DNA, 已成为植物内生真菌菌丝体DNA的首选提取方法^[7-8], 但对菌丝体的破壁处理主要采取石英砂、液氮冷冻研磨等逐一研磨的方式进行。超声波振荡常用于皱边石杉等药用植物功能成分提取, 具有高效、快速等特点^[9]; 在螺旋藻基因组DNA制备、原位杂交中鲑鱼精子DNA处理中有初步研究^[9-10]; 但在植物内生真菌菌丝体DNA提取中未见相关文献报道。因此, 本研究采用石英砂研磨法与超声波振荡法2种不同破壁方式, 对皱边石杉中15株代表性内生真菌其菌丝体进行DNA提取比较研究, 琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量, 并对消化、纯化后的DNA以真菌通用引物ITS1、ITS4扩增其核糖体内转录基因间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列, 检测其是否可以作为后续分子生物学鉴定的模板, 旨在寻求一种适宜、快速、简便的总DNA提取方法, 以应对皱边石杉内生真菌样本多、菌落质地各异等特点, 以便开展皱边石杉内生真菌各菌株的遗传背景研究。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

于2011年6—7月在湖南农业大学国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 进行皱边石杉内生真菌的分离纯化、发酵培养、菌丝体DNA提取等系列分子生物学试验。

1.2 试验材料

从皱边石杉植物体中分离、纯化得到的15株内生真菌; 真菌核糖体内转录基因间隔区通用引物: ITS1 (5'-TCCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 由上海生工生物工程公司生工合成; 200 bp Ladder、λDNA/Hind为BBI公司产品; RNase A购于北京天根公司; EDTA、氯仿、异戊醇、氯化苜为国药集团化学试剂公司产品; Tris-HCl、琼脂糖为长沙欧迈生物科技公司产品; SDS为上海生工生物工程公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 菌丝体获取 从皱边石杉植物体中分离纯化的内生真菌, 马铃薯液体培养基发酵培养2~3天, 抽滤获取菌丝体, 无菌水冲洗2~3次, -20℃贮存备用。

1.3.2 石英砂研磨法提取皱边石杉内生真菌DNA 参考文献[11]进行, 并加以改进, 称取2.0 g左右的冰冻菌丝, 置于预冷的无菌研钵中, 加入少许石英砂、3 mL氯化苜提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 40 mmol/L EDTA, pH 9.0), 冰上快速研磨成匀浆; 吸取3 mL于10 mL无菌离心管中, 加入800 μL 10% SDS, 2.4 mL氯化苜原液, 充分振荡混匀, 50℃水浴1 h, 每隔10 min轻摇混匀1次, 直到溶液变粘稠, 细胞完全裂解; 加入2.4 mL乙酸钠(pH 5.2), 冰浴15 min; 4500 r/min离心15 min, 吸取4 mL上清液转入于另一新离心管中; 加入等体积的异丙醇小心混匀, 室温沉淀20 min, 4500 r/min离心10 min, 弃上清液; 沉淀用80%的乙醇洗涤2次, 于超净工作台上吹干乙醇(DNA仍保持湿润, 鼻闻无乙醇味); 加入300 μL TE缓冲液溶解DNA, 用于琼脂糖凝胶电泳检测及RNase A消化。

1.3.3 超声波振荡法提取皱边石杉内生真菌DNA 称取2.0 g左右的冰冻菌丝, 置于10 mL无菌离心管, 加无菌水5 mL, 混匀后放入水浴式超声波振荡仪(KQ3200B)中超声振荡10 min, 4500 r/min离心10 min, 弃上清; 加入3 mL氯化苜提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 40 mmol/L EDTA, pH 9.0)、800 μL 10% SDS、2.4 mL氯化苜原液, 充分振荡混匀, 50℃水浴1 h, 后续步骤同1.3.2。

1.3.4 RNase A消化 吸取200 μL粗提DNA样品, 加入RNase A(终浓度为10 μg/mL), 37℃水浴30 min; 加等体积的氯仿: 异戊醇(V/V=24:1), 轻摇萃取5 min, 12000 r/min离心10 min(18℃); 上清液转入新的离心管, 加入1/10倍体积的NaAc(pH 6.8)及2.5~3倍体积的无水乙醇沉淀DNA, 7500 r/min离心5 min; 吸弃上清, 管底沉淀用80%的乙醇洗涤2次, 于超净工作台上吹干残留乙醇(DNA仍保持湿润, 鼻闻无乙醇气味); 溶于100 μL TE缓冲溶液中, 分成2管, 一管用于检测DNA的浓度和质量, 另一管于-20℃保存备用。

1.3.5 DNA电泳检测 配制0.8%的琼脂糖凝胶(内含0.5 μg/mL溴化乙锭), 取3 μL DNA样品与1 μL上样缓冲液充分混合上样, 以λDNA/Hind III为Marker, 100 V电泳45 min, 于凝胶自动成像系统观察照相。

1.3.6 ITS序列的PCR扩增 ITS序列的扩增反应体系为: 2.5 μL 10×PCR buffer(含Mg²⁺), dNTPs(2.5 mmol/L) 3 μL, 引物ITS1(10 pmol/μL)、ITS4(10 pmol/μL)各

体年龄越大,越难破壁。综合考虑菌丝体的量及适宜的提取率,菌丝体培养以不超过3天为宜。若菌丝体产量不足,可平行培养2~3瓶,收集足量菌丝体作为DNA提取材料。菌株经马铃薯液体培养后,其菌丝体应以灭菌超纯水充分洗涤2~3次,抽干、分装,于-20℃冰箱中储藏备用。

(2)简化操作步骤。对比2种破壁处理方式,超声振荡处理在同一离心管中进行超声处理、离心、裂解,保证了各样品的平行均一性,避免了石英砂研磨法的转管步骤,不存在磨碎样的损失,确保DNA的较高提取得率。后续以等体积异丙醇沉淀DNA,80%乙醇洗涤2次去杂,不换管,试验进程简化,冰盒上低温操作,防止DNA降解,以得到足量的DNA用于后续试验。

(3)动作轻重适宜。进行皱边石杉内生真菌菌丝体DNA提取,整个操作过程动作轻重缓急应区别对待。进行破壁处理、涡旋混匀,应有足够的力量促其破壁;DNA一旦从菌丝体中释放出来,后续步骤应低温、快速、温和进行,包括去除DNA中残余乙醇,也应在超净工作台以微风徐徐吹干,尽量避免抽真空干燥,防止DNA过分干燥,影响其溶解性。

(4)分管保存、批量使用。为保证试验进程顺利继

[2] Wang R, Tang X C. Neuroprotective effects of huperzine A: a natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease[J].Neurosignal,2005,14(1/2):71-82.

[3] Szypula W, Pietrosiuk A, Suchocki P, et al. Somatic embryogenesis and in vitro culture of *Huperzia selago* shoots as a potential source of huperzine A[J].Plant Sci.,2005(168):1443-1452.

[4] Ma X, Gang D R. *In vitro* production of huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer's disease[J].Phytochemistry,2008(69):2022-2028.

[5] Yu L J, Shi Y F, Huang J A, et al. Modification and Validation of a High Performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Huperzine A in *Huperzia Crispata*[J].Journal of AOAC INTERNATIONAL,2010,93(5):1428-1435.

[6] 杨培迪.皱边石杉内生菌的分离、纯化及种属初步鉴定[D].长沙:湖南农业大学,2009:6.

[7] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J].Nucleic Acids Res.,1993,21(22):5279-5280.

[8] Watanabe M, Lee K, Goto K, et al. Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA[J].J Food Prot.,2010,73(6):1077-1084.

[9] 邵丽华,于涛,张晓嵘,等.螺旋藻基因组DNA制备方法的摸索与比较[J].科学工程与技术,2007,7(22):5755-5758.

[10] 赵婷婷,王俊刚,陈军,等.原位杂交中鲑鱼精DNA处理方法探究[J].生命科学仪器,2007,5(9):22-25.

[11] 禹利君,高思青,史云峰,等.皱边石杉内生真菌DNA提取有效方法

