

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

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

²*Horticulture 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 a faster and more efficient method for DNA extraction from *Huperzia crispata*'s endophyte fungi mycelia than quartz sand grind method, especially for large scale samples and firm texture fungi colony.

Key words: mycelia break treatments; DNA; *Huperzia crispata*; endophyte fungi

基金项目:湖南省重大科技专项“特色植物资源高值化利用关键技术研究及产业化开发”(2007FJ1005);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目“皱边石杉中可产杉碱甲目标菌种属的深入鉴定”(DFCXS201003)。

第一作者简介:史云峰,男,1970年出生,湖南长沙人,副教授,硕士生导师,硕士,主要从事茶树生理栽培及药用植物资源分子生物学研究。通信地址:410128 湖南省长沙市湖南农业大学东方科技学院办公室, Tel: 0731-84638206, E-mail: shiyunfenghn@yahoo.com.cn。

通讯作者:禹利君,女,1971年出生,湖南长沙人,教授,硕士生导师,博士,主要从事茶及药用植物资源生物化学及分子生物学的研究。通信地址:410128 湖南省长沙市湖南农业大学园艺园林学院, Tel: 0731-84611249, E-mail: yulijunhn@yahoo.cn。

收稿日期:2011-07-27, **修回日期:**2011-10-13。

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。

氯化苄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、氯化苄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氯化苄提取缓冲液(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氯化苄原液, 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氯化苄提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 40 mmol/L EDTA, pH 9.0)、800 μL 10% SDS、2.4 mL氯化苄原液, 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

1 μL , *Taq*酶(2.5 U/ μL) 1 μL , 模板DNA 2 μL (30 ng), 用无菌双蒸水补足至 25 μL ; 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物检测: 同 1.3.5, Marker 更换为 200 bp Ladder。

1.3.7 试验仪器 Hettich MIKRO 22R 台式高速冷冻离心机(德国); Syngene Gene Genius 凝胶成像系统(英国); DYY-III-5 型电泳仪、水平电泳槽(中国北京); Biometra PCR 仪(德国); KQ 3200B 型超声波振荡仪(中国江苏); SW-CJ-1B(U)超净工作台(中国江苏)等。

1.3.8 统计分析 以 λ DNA/HindIII Marke 作参照, 采用 GeneTools from SynGene 软件对所提取的 DNA 进行 Molecular Weight Calibration, 获知各 DNA 样本的相对提取率及 PCR 反应其 DNA 模板用量。

2 结果与分析

2.1 不同破壁处理方式对皱边石杉内生菌 DNA 粗提效果比较

选取皱边石杉中分离纯化得到的 15 个形态各异的代表性菌株(见表 1), 以石英砂研磨和超声波振荡 2 种破壁方式, 参考文献[11]进行其基因组 DNA 提取。

表 1 皱边石杉内生真菌菌落形态特征

菌株编号	菌落形态特征
1	表面灰绿色, 边缘白色, 背面黄色, 同心环纹饰, 质地疏松
2	表面淡绿色, 边缘纯白色, 全缘; 背面黄色至淡黄色, 同心环纹饰, 质地致密
3	初期白色, 成熟后为青绿色, 菌落凸起, 粉粒状, 背面淡黄色, 质地疏松
4	表面黑灰色, 均匀覆盖一层白色棉毛状绒毛, 背面黑灰色, 质地致密
5	表面黄褐色, 中心呈同心环, 四周放射状, 粉粒状, 背面暗黄色, 质地疏松
6	表面为青绿色, 粉粒状, 同心环纹饰, 质地疏松
7	表面墨绿色, 中心同心环, 周围辐射状褶皱, 菌核颜色略深, 边缘为乳白色, 质地疏松
8	表面白色, 蔓延生长, 周围有白色气生菌丝, 气生菌丝较为发达, 长绒毛状, 质地疏松
9	表面草绿色, 粉粒状, 边缘为白色气生菌丝, 背面中心凹陷, 颜色略深, 周围淡黄色, 边缘白色不透明, 质地疏松
10	表面青绿色, 边缘白色, 背面中心同心环, 周围辐射状, 淡绿, 质地疏松
11	表面青色, 边缘白色, 粉粒状, 背面中心淡黄色, 边缘白色, 质地疏松
12	呈青灰色, 周围为白色气生菌丝, 粉粒状, 质地疏松
13	表面白色细绒状, 蔓延生长, 背面乳白色, 中心同心环, 周围辐射状
14	表面黑色, 蔓延生长, 菌丝顶端有粗颗粒状黑色孢子, 背面淡黄色, 质地疏松
15	表面青色, 边缘白色绒毛状, 背面乳白色, 同心环纹饰, 质地疏松

从图 1 的电泳结果可知, 采用石英砂研磨法提取 15 株形态各异菌株菌丝体 DNA, 在 23.1 kb 处可观察到相对集中的 DNA 条带, 但点样孔附近有较多多糖杂质残余、DNA 降解严重、DNA 条带拖尾现象明显, DNA 的产量不能做出比较准确的估计。这主要是由

于石英砂研磨用力较大, 使得 DNA 出现不同程度降解。

从图 2 电泳结果可知, 2.0 g 冰冻菌丝分别经历 2、3、4、5、6、7、8、9 min 超声振荡提取, 从其电泳结果可知, 随着超声处理时间的延长, DNA 产量依次增加、条

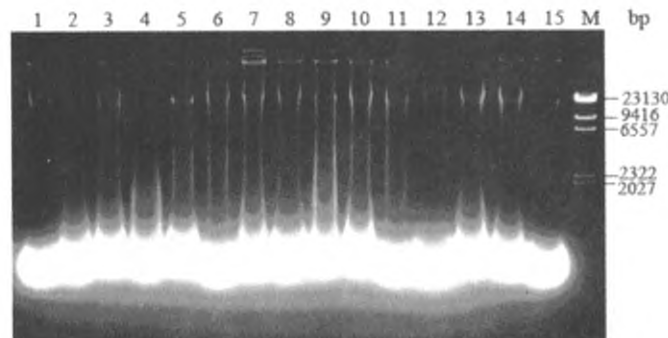
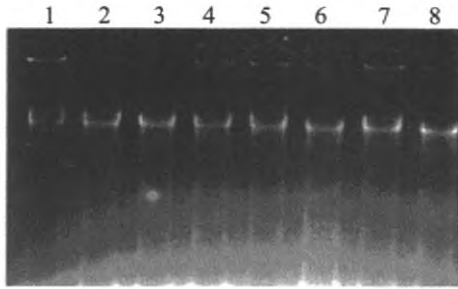


图 1 石英砂研磨法提取 1~15 号内生真菌菌丝体 DNA 电泳结果



1~8号点样孔为2.0 g菌丝体分别经历2、3、4、5、6、7、8、9 min 超声破壁处理

图2 不同超声振荡提取时间对4号菌丝体DNA提取效果

带依次增量,说明4号菌丝体的破损率依次增高。综合考虑各菌丝体的质地特征,选定超声振荡10 min为各菌丝体的适宜超声处理时间。

从图3电泳结果可知,超声波振荡法提取15株内生真菌菌丝体DNA,除4号(菌落质地致密)的产量略低,其余各样本均在23.1 kb左右有清晰、完整的条带,且无明显的DNA降解、拖尾现象。对比图1、图3的电泳结果可知,以超声波破壁提取15株形态各异内生真菌菌丝体DNA,获取23.1 kb处DNA的完整度比石英砂研磨法高,条带更清晰。且可一次处理15个样品,省时、省力。

2.2 RNase A消化粗提DNA的效能比较

从图4电泳结果可知,以石英砂研磨法获得的1~15号粗提DNA经RNase A消化纯化后,与图1比较,在23.1 kb处出现了相对集中的DNA条带,集中程度

比图1有明显改善,但在点样孔附近仍可观察到较多多糖杂质残留,拖尾现象仍很明显,小分子量的RNA也不能有效去除。由此可知,以常规研磨法粗提获取DNA, RNase A消化用量及纯化步骤还有待进一步优化。

从图5电泳结果可知,以超声波破壁法获得的1~15号粗提DNA经RNase A消化、纯化后,与图3比较,条带更清晰,小分子量的RNA去除较彻底。对比图4、图5的电泳结果,可知超声波破壁法提取的DNA经RNase A消化、纯化后(见图5),DNA的纯度、完整度均比石英砂研磨法(见图4)的要好。除4号、8号的小分子RNA未有效去除,其余样品均获得了相对高纯度的DNA,若进行后续分子生物学研究,以超声波破壁法提取、纯化的DNA为首选模板。

2.3 2种不同破壁方式所提DNA的PCR扩增结果比较

以石英砂研磨、超声波振荡2种不同破壁方式所提的DNA经RNase A消化、纯化后作为PCR反应模板,以真菌核糖体内转录基因间隔区通用引物ITS1、ITS4进行PCR扩增,200 bp Ladder作为Marker,产物经1%琼脂糖凝胶电泳,于凝胶自动成像系统观察拍照,PCR结果见图6、图7。从图6可知,除了4号不能获得有效扩增,其余样品均在500 bp左右获得了有效扩增。4号样品无明显的扩增条带,可能是由于DNA降解程度高,用于扩增反应的DNA模板量相对较少,致使扩增条带检测不出。而用超声波破壁法获取的

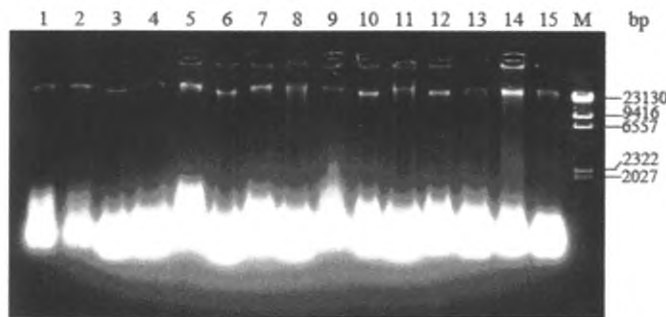


图3 超声波振荡法提取1~15号内生真菌菌丝体DNA电泳结果

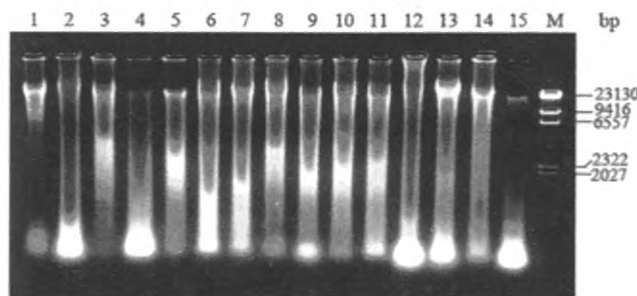


图4 RNase A消化石英砂研磨法粗提DNA(1~15号)电泳结果

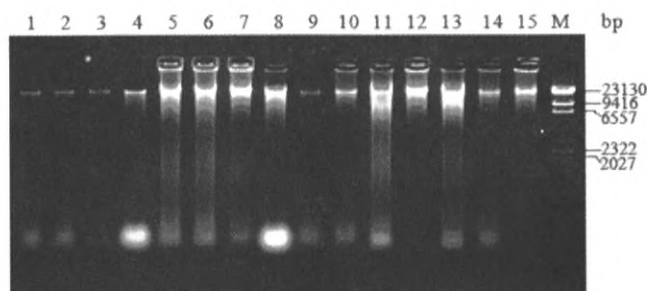


图5 RNase A 消化超声波破壁法粗提DNA(1~15号)的电泳结果

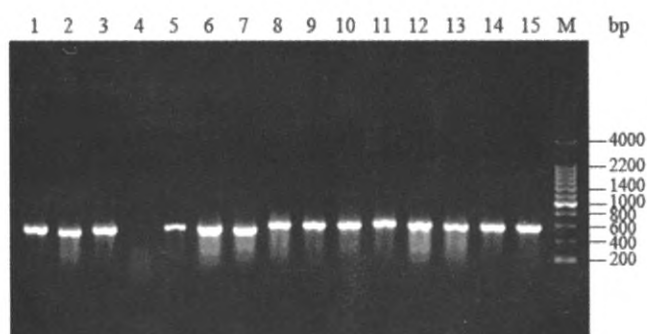


图6 石英砂研磨法所提DNA的PCR扩增结果

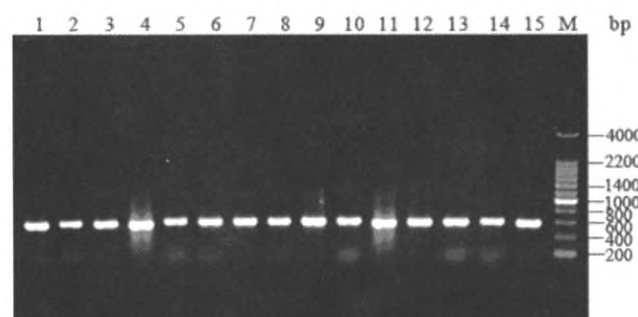


图7 超声波破壁法所提DNA的PCR扩增结果

DNA,均获得了理想的PCR扩增产物。可见2种方法所提取的DNA样本均可用于后续分子生物学研究。

3 结论

本研究采用石英砂研磨与超声波振荡2种不同破壁方式均可提取皱边石杉内生真菌菌丝体DNA。综合比较2种方式获得的粗提DNA琼脂糖凝胶电泳、RNase消化、ITS序列PCR扩增等结果,不同破壁方式提取的DNA质量存在较大差异。其中,超声波振荡提取的DNA纯度较高,效果理想,并可一次进行大批量样品处理,简便、快捷、省力,尤其对质地坚硬的菌落较石英砂研磨更有效,可作为皱边石杉内生真菌菌丝体DNA提取并开展后续分子生物学研究的首选方法。

4 讨论

有关植物内生真菌DNA的提取一般都采用石

英砂研磨、液氮冷冻低温研磨进行破壁处理^[7-8,11-13],单个样品逐一研磨,耗时费力,不利于样品大批量处理。超声振荡常见于植物功能成分提取、水体残余物的提取,快速制备样品用于高效液相色谱、气象色谱分析^[5,14]。本试验对比研究传统机械研磨与超声振荡2种破壁方式,对皱边石杉中15株代表性内生真菌菌丝体DNA的提取效果。综合比较可知,超声振荡破壁方式提取效能明显优于石英砂机械研磨破壁处理,每批可处理24~36个菌丝体样本,1天可轻松提取3批高质量DNA,操作简便易行。因此,对于植物内生真菌这类样本量大,难以用常规方式破壁的菌株材料,超声振荡为首选破壁方式。在进行皱边石杉内生真菌DNA提取时,需要注意以下几个方面:

(1)材料选择。真菌几丁质层厚实,难以破壁,提取的DNA一般得率较低。随着培养时间的延长,菌丝

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续,节省时间,避免返回再次抽提DNA。一次抽提得到的多个DNA样品,应分批、分管保存,批量使用。尽管DNA是溶于TE缓冲溶液于-20℃保存,但反复冻融也会使DNA降解。

(5)RNase A消化适宜用量。以超声波破壁处理提取的DNA,因其纯度较高,DNA产量可通过GenneTools的Molecular Weight Calibration进行准确估计,消化小分子量RNA能准确估算RNase A的使用量。但以石英砂研磨破壁处理提取的DNA杂质较多、纯度不高,DNA产量不能准确估算,RNase A消化粗提DNA,未能取得对所有样品均一、良好的消化效果,有待在后续试验中进一步探索。

参考文献

[1] Tang X C, De Sarno P, Sugaya K, et al. Effect of huperzine A, a new cholinesterase inhibitor, on the central cholinergic system of the rat[J]. *J. Neurosci. Res.*,1989(24):276-285.

- [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] Szygula 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提取有效方法比较[J]. *生物技术*,2010,20(1):39-42.
- [12] Li R, Mock R, Huang Q, et al. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens[J]. *J Virol Methods*,2008,154(1/2):48-55.
- [13] González-Mendoza D, Argumedo-Delira R, Morales-Trejo A, et al. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi[J]. *Genet Mol Res.*,2010,9(1):162-166.
- [14] Ariel R. Fontana, Rodolfo G. Wuilloud, Luis D. Martínez, et al. Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*,2009(1216):147-153.