

4 种黑曲霉基因组 DNA 提取方法的比较

张晓利¹ 吕雪莲² 沈永年³ 吕桂霞³ 王淼淼⁴ 葛一平³ 刘维达³

(1. 暨南大学临床医学博士后流动站, 广州 510632; 2. 大连皮肤病医院, 大连 116011; 3. 中国医学科学院皮肤病研究所, 南京 210042; 4. 苏州大学第一附属医院, 苏州 215006)

【摘要】 目的 筛选适合提取曲霉 DNA 的方法。方法 比较 2 个菌落培养时间段 (3 d 内和 10 d 左右) 提取 DNA 质量的差异; 运用氯化苄法、石英砂 + CTAB 法、Biospin 法和微波法分别提取黑曲霉基因组 DNA, 然后用直接电泳、浓度测定、PCR 扩增等方法比较所提 DNA 的浓度和质量。结果 培养 3 d 内的菌落提取的 DNA 纯度较高, 无需纯化即可用于后续实验; 4 种方法制备的 DNA 均可用于 PCR 等后续实验, 其中以石英砂 + CTAB 法提取的 DNA 纯度好, 产率最高。结论 石英砂 + CTAB 法是一种适用于曲霉 DNA 提取的简便方法。

【关键词】 真菌; DNA 提取; 比较

【中图分类号】 R 379.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2011)03-0145-04

Four methods of DNA extraction for *Aspergillus niger*

ZHANG Xiao-li¹, LV Xue-lian², SHEN Yong-nian³, LV Gui-xia³, WANG Miao-miao⁴, GE Yi-ping³, LIU Wei-da³

(1. Clinical medicine postdoctoral mobile station of Jinan University, Guangzhou 510632; 2. Dalian Hospital for Diseases of the Skin, Dalian 116021; 3. Department of Mycology, Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Nanjing 210042; 4. First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 512006)

【Abstract】 Objective To find the best DNA extraction method for *Aspergillus niger*. **Methods** The purity and output of *Aspergillus niger* DNA extracted by benzyl chloride method, CTAB method, Biospin kit and microwave method were compared via agarose gel electrophoresis and PCR. **Results** The extracted DNA cultured for 3 ds was purer than that for 7-14 ds. All the DNA products were amplifiable for PCR, but the purity and output via CTAB method showed the best results. **Conclusions** CTAB is suitable for *Aspergillus niger* DNA extraction.

【Key word】 fungi; DNA extraction; comparison

[Chin J Mycol, 2011, 6(3): 145-148]

真菌 DNA 的提取是包括分子诊断在内的所有真菌分子生物学实验的基础^[1], 简便快捷地提取真菌 DNA, 且获得的 DNA 完整、纯度高, 对真菌分子生物学的后续实验操作有极其重要的意义。丝状真菌的细胞壁结构坚固, 且富含多糖, 破壁比较困难, 而 DNA 的提取效率, 尤其是 DNA 的纯度可严重影响实验结果^[2]。同一标本采用不同方法或不同标本采用相同方法提取 DNA 其纯度和提取率有

有很大差异。本实验以产黑色素最为丰富的黑曲霉为例, 通过检测 DNA 浓度、PCR 扩增等方法比较了几种 DNA 提取方法的优劣。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及菌株

引物合成购自上海生生物工程技术有限公司, 热启动 Taq 酶、dNTP 和核酸内切酶 *Hha* I、*Hinf* I、*Hae* III、*Taq* I、*Msp* I 购自大连宝生物工程技术有限公司。实验所用标准菌黑曲霉 [CMCCC (F). A3] 由中国微生物菌种保藏管理委员会医学真菌中心提供。

1.2 菌株的培养和收集

基金项目: 科技重大专项 (2008ZX10004-002); 临床重点学科建设项目 (2007-2009 年度卫生部部属 (管) 医院临床学科重点项目 (第 7 号)); 卫生部公益性行业科研专项经费项目 (200802032)

作者简介: 张晓利, 女 (汉族), 在站博士后. E-mail: zx1415@hotmail.com

通讯作者: 刘维达, E-mail: liumyco@gmail.com

将黑曲霉接种到 PDA 培养基上培养 7~14 d 至成熟,收集上层孢子至生理盐水中,振荡,制成孢子悬液,取菌悬液接种至 PDA 培养基上,28℃ 培养。两个时间段收集菌种:一为 3 d 菌龄(菌丝为白色,且该菌株未产生大量黑色的分生孢子);另一为 10 d 左右菌龄(该菌株产生大量黑色的分生孢子)。后续实验按照石英砂 + CTAB 法提取基因组 DNA。

1.3 DNA 提取方法

包括氯化苜法、石英砂 + CTAB 法、微波法和 Biospin 试剂盒法 4 种方法的比较。

氯化苜法 将菌丝体加入 5 mL 研磨器中,加 500 μ L 的氯化苜提取液,研磨。将研磨液加入 1.5 mL 无菌 EP 管中,再加入 125 μ L 10% SDS 和 300 μ L 氯化苜原液。50℃ 水浴 60 min,然后加入 NaAc 300 μ L,冰浴,离心取上清液,加入等体积的异丙醇,室温沉淀 30 min,溶于 100 μ L TE 缓冲液。

石英砂 + CTAB 法 加石英砂及 400 μ L 10 \times TE Buffer 到无菌的 EP 管中,刮入菌丝体。加入 120 μ L 10% SDS,加入 10 μ L 蛋白酶 K,混匀,65℃ 水浴 30 min,加入 120 μ L 5 mol/L NaCl,加入约 65 μ L 的 10% CTAB,65℃ 水浴 60 min。加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),轻柔混匀。离心取上清液至无菌 EP 管中。加 225 μ L NH_4Ac ,取上清液至无菌 EP 管中,加入 510 μ L 异丙醇,-20℃ 放置 30 min,离心弃上清液,用 70% 乙醇清洗沉淀物,用 50 μ L TE Buffer 溶解沉淀。

微波法 将菌丝体加入 5 mL 研磨器中,加 300 μ L 缓冲液,研磨。将研磨液加入 1.5 mL 无菌 EP 管中,加少量石英砂,加 100 μ L 裂解液。将 EP 管置于微波炉中,600 W,共 100 s。加入 400 μ L 抽提液,倒置振荡 5 s,加入 600 μ L Tris 饱和酚氯仿抽提,混匀 5 s。离心取上清液加等体积异丙醇,离心,70% 乙醇洗两次室温下晾干,用 50 μ L TE Buffer 溶解。

Biospin 试剂盒 将菌丝体用 5 mL 研磨器研磨过后,放入 2 mL 微量离心管中。加 400 μ L TE Buffer,于 65℃ 环境中温浴 30 min。加入 130 μ L DA Buffer,于冰浴中放置 5 min。离心将上清液转移离心管,加 750 μ L 的 E Binding Buffer,将混合液体转移至 Spin column,加入 500 μ L 的 G Binding Buffer 离心,再加入 Wash Buffer。最后 Spin column 中加入 150 μ L Elution Buffer,离心并弃去 Spin column。

1.4 基因组 DNA 样品直接电泳检测

取几种方法提取的基因组 DNA 4 μ L,与适量 6 \times Loading Buffer 混合,采用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,电泳缓冲液为 1 \times TAE,恒压 80 V,电泳约 30 min。电泳结束后,取琼脂糖凝胶在凝胶成像仪上紫外线透射下观察结果并摄片。

1.5 基因组 DNA-ITS 的 PCR 扩增

真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAAC-CTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3'),反应总体积为 25 μ L,含 4 μ L 10 \times 缓冲液,1.5 μ L MgCl_2 (10 mmol/L),2 μ L dNTPmix (10 μ mol/L),引物 (10 μ mol/L)各 0.5 μ L,DNA 模板 2 μ L,Taq DNA 聚合酶 2U。反应条件为 95℃ 5 min 预变性后 95℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 1 min,共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,每个加样孔点样 4 μ L,电泳缓冲液为 1 \times TAE,恒压 80 V,电泳约 30 min。电泳结束后,取琼脂糖凝胶在凝胶成像仪上紫外线透射下观察结果并摄片。

1.6 基因组 DNA 浓度和产率测定

使用 Invitrogen Quant-iT™ 试剂盒测定样本的浓度,严格按照说明书操作;用所测的 DNA 浓度和测量的菌丝体的重量(湿重)之比计算产率。

2 结 果

2.1 菌株培养时间的确定

黑曲霉培养 3 d 内,菌落为白色时,未长出黑色孢子,收集的菌落主要为菌丝,用体视显微镜观察结构(见图 1);黑曲霉培养 10 d 左右,菌落产生大量的孢子和色素,收集的菌落大部分为孢子,并见部分菌丝(见图 2)。培养 3 d 内 DNA 溶液为透明无色,培养 10 d DNA 溶液为淡褐色(见图 3)。用相应的 DNA 做为模板进行 PCR 扩增,结果见图 4。培养 3 d 内 DNA 模板成功扩增出约 600 bp 的片段,培养 10 d 的 DNA 模板 PCR 反应为阴性。

2.2 4 种方法提取的黑曲霉基因组 DNA 直接电泳结果

4 种方法提取的 DNA 直接电泳都有阳性条带,以石英砂 + CTAB 法的条带最亮,且没有拖尾;微波法的亮度高,但有明显拖尾;Biospin 试剂盒法的条带最弱(见图 5)。

2.3 4 种方法提取的黑曲霉基因组 DNA-ITS 的 PCR 扩增结果

4 种方法均能扩增出阳性条带,以石英砂 + CTAB 法条带最亮 (见图 6)。

2.4 基因组 DNA 浓度和产率测定结果

4 种方法中以石英砂 + CTAB 法提取后的黑曲霉基因组 DNA 的浓度和产率最高,与基因组 DNA 直接电泳结果一致 (见表 1)。

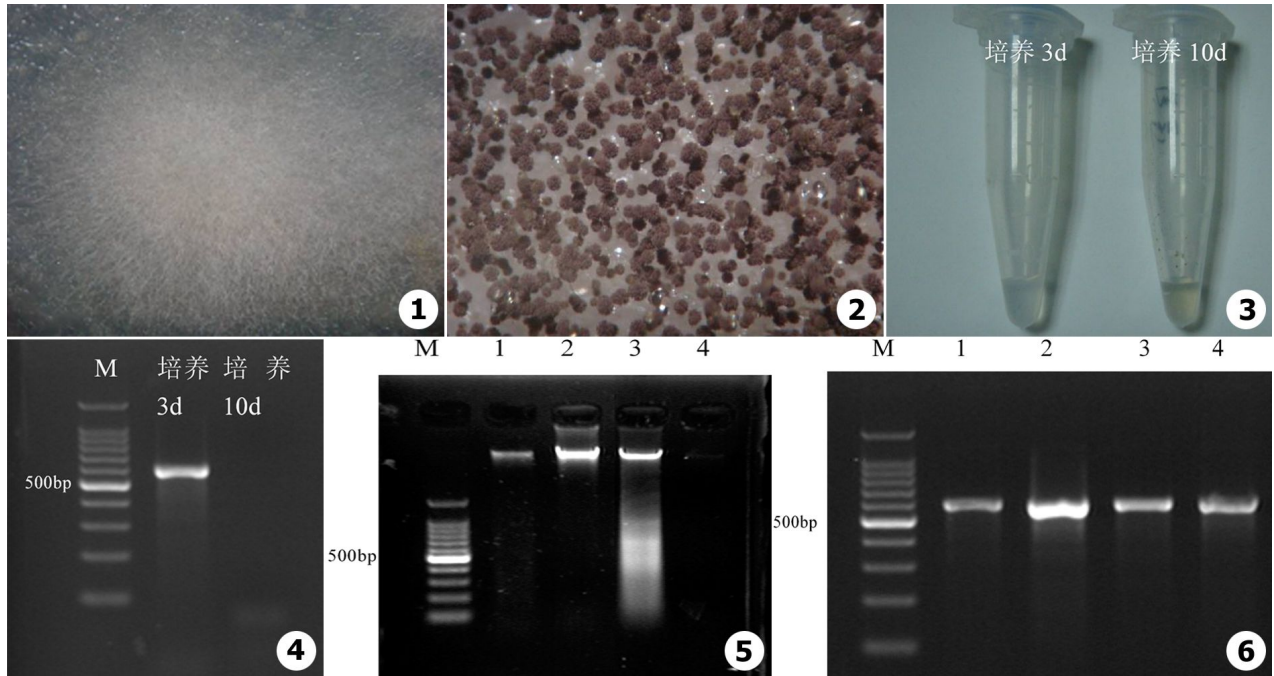


图 1 培养 3 d 左右菌落形态 图 2 培养 10 d 左右菌落形态 图 3 基因组 DNA 溶液 图 4 模板 DNA-ITS PCR 扩增电泳图 图 5 基因组 DNA 直接电泳图;M: 100 bp Ladder,1~4. 分别为氯化苄法、石英砂 + CTAB 法、微波法、Biospin 试剂盒法 图 6 基因组 DNA-ITS 的 PCR 扩增结果;M: 100 bp Ladder,1~4. 分别为氯化苄法、石英砂 + CTAB 法、微波法、Biospin 试剂盒法

Fig. 1 Colonies after 3 ds Fig. 2 Colonies after 10 ds Fig. 3 Template DNA solution Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products;M: 100 bp Ladder Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of template DNA;M: 100 bp Ladder;1~4. Benzyl Chloride method, quartz sand + CTAB, microwave method, Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of PCR products;M: 100 bp Ladder;1~4. Benzyl Chloride method, quartz sand + CTAB, microwave method, Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit

表 1 4 种方法提取的基因组 DNA 浓度和产率结果

Tab. 1 Concentration and yield results of template DNA by 4 methods

方法	基因组 DNA	
	浓度 (μg/mL)	产率 (μg/g)
氯化苄法	59.8	13.28
石英砂 + CTAB 法	139.0	34.75
微波法	83.7	16.73
Biospin 试剂盒法	13.5	2.25

3 讨 论

近些年以 PCR 技术为基础的分子生物学方法

不断发展并越来越多地被应用至临床^[3]。为保证真菌 PCR 技术及其相关分子生物学技术的顺利开展,简单快捷地获取 DNA,且获得完整、高纯度的 DNA,是所有病原真菌分子实验必须解决的前提。DNA 的提取效率,尤其是 DNA 的纯度可明显影响后续的实验结果。同一标本采用不同方法或不同标本采用相同方法提取的 DNA 其纯度和提取率有很大差异。

丝状真菌细胞壁坚韧厚实的构成需要较为繁琐的破壁手段,这样就使真菌 DNA 的提取较细菌或其他组织细胞的难度更大^[4]。真菌 DNA 提取方法颇多,主要区别在于破壁方法以及破壁后分离核酸、蛋白质方法的不同。常用的破壁方法有机械法、酶法和化学法等,其中液氮研磨是最常用的机

械破壁方法。但液氮研磨需要的菌体较多,研磨的容器为体积较大的研钵,在研磨过程中菌体丢失较多,同时因暴露在空气中也容易污染;在研磨过程中如果研磨时间和力度掌握不好,极易造成基因组 DNA 的断裂和不完整^[5]。很多学者在实验研究中发现,液氮研磨过的菌体所提取的 DNA 直接电泳拖尾现象严重,所以在本实验中,我们没有选择液氮研磨法作为比对。

本实验中,所用的方法能提取到 DNA 并能成功进行 PCR 扩增,最关键的就是确定了实验用菌的培养时间。因为丝状真菌的细胞壁主要成分为几丁质,与细菌或者是酵母菌相比其结构要坚固。但真菌细胞壁各成分的比例在细胞生活周期的过程中是存在差异的,一般而言,当真菌细胞处于幼嫩时期时,破壁相对容易些^[6]。在本实验开始时,我们参考各文献^[7],用生长 10 d 左右的成熟菌株进行实验,但所得 DNA 溶液均有不同程度的黑色素溶解其中。虽然后来也制订了相应的纯化方法,使之能够成功进行 PCR 扩增,但纯化过程包括离心,清洗等步骤,耗时在 1~2 h 之间;有时候一次纯化不成功,尚需要第二次、第三次纯化, DNA 的含量会随之逐次明显减少。所以我们选择了生长伊始的菌落,大部分为菌丝,只有少量孢子,不仅破壁较容易, DNA 获取率高,最终提取的 DNA 较纯,没有抑制 PCR 反应的色素存在,可以不用纯化直接用于 PCR 扩增。更重要的,我们认为,在菌落早期提取 DNA 不仅可以提前数天(5 d 以上)进行菌种鉴定,也意味着可以提前对接种了一定量标本的培养基上刚长出的菌落进行基因型鉴定,即可以大大缩短鉴定丝状真菌所需的时间,这对临床遇到的由丝状真菌引起的危重感染的救治十分重要和关键。

4 种提取方法均能获得一定量的 DNA,长度一致,但提取率和纯度因方法的不同有较大差异。石英砂 + CTAB 法所得的基因组 DNA 浓度最大,

明显要高于其他三种方法,后续的 PCR 反应得到的条带也最亮;微波法虽然得到的基因组 DNA 浓度较好,但纯度较差,有明显的拖尾;Biospin 试剂盒提取基因组 DNA 量较少,但纯度高,并且整个实验所耗时间较短,不需要另外配制试剂和高压灭菌,在实验较急且没有相应试剂的情况下可以试用。

参 考 文 献

- [1] Chen SC, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays[J]. *Med Mycol*, 2002, 40(4):333-357.
- [2] Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, et al. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(7): 3159-3163.
- [3] 张晓利,吕雪莲,沈永年,等. PCR-RFLP 和多重 PCR 技术检测常见病原性丝状真菌的实验研究[J]. *中国真菌学杂志*, 2010,4(5):105-108.
- [4] Haugland RA, Brinkman N, Vesper SJ. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis [J]. *J Microbiol Methods*, 2002, 50(3): 319-323.
- [5] Haugland RA, Heckman JL, Wymer LJ. Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis [J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 37(2):165-176.
- [6] Griffin DW, Kellogg CA, Peak KK, et al. A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2002, 34(3):210-214.
- [7] Clarkson AI, Lefevre P, Titchener-Hooker NJ. A study of process interactions between cell disruption and debris clarification stages in the recovery of yeast intracellular products [J]. *Biotechnol Prog*, 1993,9(5):462-467.

[收稿日期] 2011-02-18

[本文编辑] 施 慧