

灰树花总 DNA 的制备及基因组文库的构建

徐志祥,程 度,李宝健

(中山大学生命科学院 基因工程国家教育部重点实验室,广州 510275)

摘要:灰树花是一种珍贵的药用真菌,因为多糖含量较高,较难获得高质量的总 DNA,本文提出了一种制备高质量灰树花总 DNA 及构建灰树花基因组文库的方法。该方法制备的灰树花总 DNA,经 *Sau3A I* 酶切后,用于构建基因组文库,可得到 2×10^5 个转化子/50mg,平均插入片段为 14kb。为下一步克隆灰树花中的基因以及进行其他分子生物学研究奠定了基础。

关键词:灰树花;DNA 提取;基因组文库

中图分类号:Q939.96

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2004)05-0711-03

A Method for Preparation of Genomic DNA from *Grifola frondosa* and Construction of A Genomic Library

XU Zhi-Xiang, CHENG Du, LI Bao-Jian

(Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: *Grifola frondosa*, is a valuable medicinal fungus. High quality total genomic DNA is difficult to prepare due to its high polysaccharide content. A method for the preparation of *Grifola frondosa* total genomic DNA and construction of *Grifola frondosa*, genomic library is described. Genomic DNA prepared by this method is digested by *Sau3A I* restriction enzyme. Constructed genomic library give a titer of 2×10^5 transformants/50mg, with a average insert size of 14kb. This has paved way for the cloning of other *Grifola frondosa* genes and molecular biology studies.

Key words: *Grifola frondosa*; DNA preparation; genomic library

灰树花 (*Grifola frondosa*) 是一种珍贵的药用真菌,在日本俗称舞茸。它隶属于真菌门 (Eumycota)、担子菌亚门 (Basidiomycotina)、非褶菌目 (Aphylllophorales)、多孔菌科 (Polyporaceae)、多孔菌属 (Polyporus)。

目前对灰树花的研究逐渐深入到分子水平。基因组 DNA 的提取是分子生物学研究的基本技术之一。目前适用于灰树花等担子菌纲大型药用真菌 DNA 提取的方法报道较少。按照曲霉等丝状真菌 DNA 的提取方法提取灰树花的基因组 DNA 时,不但

未能有效除去混在 DNA 中的多糖,而且所得 DNA 片段小,构建文库时的转化率低。

为此我们建立了一种快速提取高质量基因组总 DNA 的技术,并在此基础上探索出了一种构建高质量基因组文库的方法,为以后进行有关的灰树花分子生物学研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

(1)限制性内切酶、ExTaq 酶、分子质量标准购

收稿日期:2003-06-30;修回日期:2003-10-30

基金项目:广州市科委重大科技攻关资助项目(2001-Z-006-01) [Supported by Key Science and Technology Fund of the Science Commission of Guangzhou City(2001-Z-006-01)]

作者简介:徐志祥(1975-),男,博士,研究方向:药用真菌的发酵工程和分子生物学。Tel:020-84110296;E-mail:xuzhixiang123@163.net

通讯作者:李宝健(1933-),男,教授,博导,研究方向:植物遗传学。Tel:020-84034519;E-mail:lsslbj@zsu.edu.cn

自 TaKaRa 公司。

(2) T4DNA 核酸连接酶、Agarase 购自 New England Biolab。

(3) 低熔点琼脂糖购自 Sigma 公司。

(4) 包装蛋白购自 Stratagen 公司。

(5) BamH I -消化的 λ 载体购自 Promega 公司。

(6) 灰树花 (*Grifola frondosa*) GR1 为本室保存的菌种。

1.2 菌丝培养与收集

(1) 母种培养基均为 PDA 固体培养基: 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 1.5g, 加水至 1000 mL, 自然 pH 值。

(2) 摇瓶培养基采用 MYG 培养基: 麦芽糖 10g, 葡萄糖 4g, 酵母粉 4g, pH 自然, 加水至总体积为 1000mL。

(3) 收集菌丝。取菌丝生长旺盛的摇瓶, 菌丝用 8 层纱布过滤, 并用无菌蒸馏水洗涤三次, 略挤水分, 置于无菌滤纸上, 滤纸下铺硅胶, 风干菌丝。

1.3 DNA 提取方法

(1) 收集的菌丝迅速在液氮中研成细粉。

(2) 将冷冻的粉末及时转入 50 mL 的离心管中, 加入 15 mL 提取缓冲液 (500 mmol/L NaCl; 100 mmol/L tris-HCl, pH8; 50 mmol/L EDTA, pH8; 10 mmol/L β -巯基乙醇), 轻轻旋转混匀。

(3) 加入 1mL 20% SDS (pH7.2), 混匀, 65°C 水浴保温 20~30min, 并轻轻混匀。

(4) 加入 5mL 5mol/L KAC, 混匀后冰浴 20min。10 000r/min, 4°C 离心 10min。

(5) 上清加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 10 000r/min, 4°C 离心 10min。

(6) 取水相, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 轻轻混匀, 冰上放置 10min, 7000r/min, 4°C 离心 10min, 沉淀用 70% 乙醇洗涤, 离心后溶于无菌双蒸水中。

(7) 加入 30mL DNase-free RNase (10mg/mL), 37°C 温育 30min。

(8) 加入等体积的酚和氯仿, 混匀, 10 000r/min, 4°C 离心 10min。

(9) 取水相, 加入 0.6 倍体积异丙醇沉淀 DNA。

(10) 将沉淀重悬于 30% 乙醇中, 4°C 放置过夜。10 000r/min, 4°C 离心 1min。

(11) 上清加乙醇至浓度为 80%, 10 000r/min,

4°C 离心 10min。沉淀用 TE 溶解。

1.4 基因组文库的构建

采用上述方法所提的 50mg DNA 溶解在 500mL 的 *Sau3A* I 的酶切缓冲液中, 加入 0.25 U *Sau3A* I, 在 30°C 下酶切 30min。0.4% 低熔点琼脂糖 (1×TAE 缓冲液) 电泳分离 DNA 片段, 回收 9~23kb 片段, 按照 New England BioLab 所述方法, 用 Agarase 消化低熔点琼脂糖。基因组 DNA 片段 (3mg) 与 BamH I -消化的 λ 载体 (5mg) 用 T4DNA 连接酶在 25°C 连接 4h。取连接产物与包装蛋白混和, 22°C 反应 4h。按分子克隆所述方法测定文库滴度。

1.5 文库质量的鉴定

参照萨姆布鲁克等的方法, 从噬菌体平板上挑 5 个分隔良好的噬菌斑, 放入盛有 1mL SM 液 (50mmol/L Tris-HCl pH7.5, 100mmol/L NaCl, 8mmol/L MgSO₄, 0.01% 明胶) 和 3mL 氯仿的灭菌管中, 混匀后放于 4°C 过夜。取 50~100 μ L 噬菌体悬液和 100 μ L 培养好的大肠杆菌 KW251, 于 37°C 吸附 20min, 加入 3mL 融化的 (45°C) 顶层琼脂, 迅速铺于预热 LB 平板, 37°C 倒置培养 6~8h。平板上加入 5mL SM 溶液。室温下轻摇 2h, 放于 4°C 过夜。次日, 收集平板中的 SM 溶液, 用 1mL SM 清洗平板, 合并收集液, 加入氯仿 (至 0.3%), 轻轻振荡以裂解细胞, 贮于 4°C。提取噬菌体 DNA, 用 *Sal* I 酶切, 电泳。

2 结果与讨论

(1) 在研究中发现, 在高浓度钾离子存在下, SDS 与多糖或蛋白质结合生成复合物, 能有效除去多糖, 所得 DNA 易溶解。DNA 提取过程中只使用 SDS, 而不使用 CTAB, 减少了对 DNA 的损害。另外我们用 30% 乙醇溶解 DNA 后, 于 4°C 放置过夜, 能进一步去除多糖和其他杂质, 提高所提取的 DNA 纯度。本方法操作步骤少, 不含 4°C 放置过夜的时间, 所有操作在 3h 内完成。

(2) 采用上述实验方法, 每 100mg 灰树花湿菌丝体能制备 10mg DNA, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.83, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 为 2.18。所提 DNA 能被限制酶有效识别和切割, 总 DNA 被 *Sau3A* I、*EcoR* I 及 *BamH* I 酶切前后的电泳结果如图 1 所示。实验结果显示, 基因组 DNA 在几小时内能被 *Sau3A* I 完全酶切, 而被

EcoR I 和 *Bam*H I 完全酶切则需要过夜甚至更长的时间。该方法制备的 DNA 可用于 PCR、RAPD、Southern 杂交等实验。

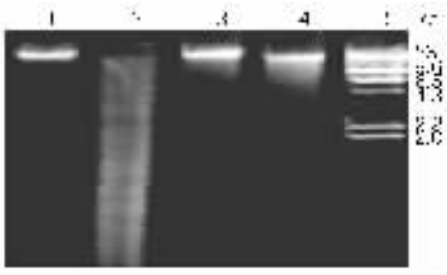


图 1 灰树花基因组 DNA 酶切前和酶切后的电泳结果

1: 未酶切的灰树花基因组 DNA; 2: *Sau*3A I 酶切后的灰树花基因组 DNA; 3: *Eco*R I 酶切后的灰树花基因组 DNA; 4: *Bam*H I 酶切后的灰树花基因组 DNA; 5: λ -*Hind* III 消化的标记。酶切条件: 酶量为 0.4 U/mg DNA, 37°C 反应 1h。

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of *Grifola frondosa* DNA sample before and after restriction digestion

Lane 1 is DNA sample from *Grifola frondosa* without digestion; Lane 2 is DNA sample from *Grifola frondosa* partially digested with *Sau*3A I; Lane3 is loaded with DNA sample from *Grifola frondosa* after partial digestion with *Eco*R I; Lane 4 is DNA sample from *Grifola frondosa* after partial digestion with *Bam*H I; Lane 5 is λ -*Hind* III marker; Digestion condition : 0.4Units enzyme/mg DNA, for 60min at 37°C.

(3) 高分子质量的 DNA 对构建基因组文库尤为重要。如果小片段多,会导致 DNA 转化噬菌体的效率低。本方法所提的灰树花大片段 DNA 经 *Sau*3A I 部分酶切,低熔点琼脂糖电泳回收 9~23kb 的片段,回收的 DNA 片段与 *Bam*H I -消化的 λ 载体连接,能获得 2×10^5 个转化子。丝状真菌的基因组为 $10^7 \sim 10^8$ bp, 当重组转化子为 $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 时,可保证 99% 的基因存在于基因组文库中。从文库中随机挑取重组克隆,提取 λ DNA,用 *Sal* I 酶切,可切出 20kb、14kb 和 9kb 3 个片段(如图 2 所示),其中 20kb 和 9kb 为 λ 载体的左右臂,插入片段为 14kb,与预期相符,说明文库的质量较高。

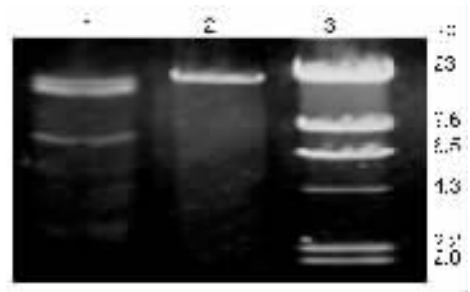


图 2 转化子 DNA 的 *Sal* I 酶切电泳结果

1: *Sal* I 酶切后的重组子 λ DNA; 2: 转化子 λ DNA; 3: λ -*Hind* III 消化的标记。

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of recombinant phage DNA sample before and after *Sal* I digestion.

Lane1 is DNA sample from recombinant phages digested with *Sal* I; Lane2 is DNA sample from recombinant phages without digestion; Lane3 is λ -*Hind* III marker.

运用本实验方法提取了高质量的灰树花基因组 DNA,利用其构建了灰树花基因组文库,为下一步克隆灰树花中的基因以及进行其他分子生物学研究奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] Xu Jing-tang. *Chinese Medicinal Mycology*. Beijing: Union Press of Beijing Medical University and Peking Union Medical College, 1997, 707~717.
徐锦堂. 中国药用真菌学. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997, 707~717.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. (Translated by JIN Dong-Yan, LI Meng-Feng et al.). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition). Beijing: Science Press, 1989.
J·萨姆布鲁克, E·F·弗里奇, T·曼尼阿蒂斯(金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1989.
- [3] He Yue-qiu, A improved fungal DNA extraction method. *Micosystema*, 2000, 19(3): 434.
何月秋, 一种改进的真菌 DNA 提取方法. 菌物系统, 2000, 19(3): 434.
- [4] Donglu Zhang et al. A method for the large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. *FEMS Microbiology Letter*, 1996, 145: 261~265.