

文章编号: 0529-6579 (2000) S2-0056-03

一种简单高效提取食用菌总 DNA 的方法*

李 刚, 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要: 报导了一种简单、高效提取食用菌总 DNA 的方法。该法在 Yelton 的提取方法基础上做了一些改良和简化处理, 使本方法具有获得的总 DNA 相对分子质量大、得率高、质量好、操作简单迅速等一系列优点, 为以后进一步开展食用菌的分子生物学研究提供了一种有力的研究手段。

关键词: 食用菌; 总 DNA; 简单; 高效; 提取

中图分类号: Q 94-336 **文献标识码:** A

提取总 DNA 是进行食用菌分子生物学方面研究的一项基本技术。由于关于食用菌的分子生物学研究目前才刚刚起步, 所以关于提取食用菌总 DNA 的方法很少见。而关于丝状真菌分子生物学的研究已有 20 多年的历史, 故有多种提取丝状真菌 (例如黑曲霉) 总 DNA 的方案已被提出。其中 Yelton 的方法^[1]是在丝状真菌总 DNA 的提取中使用得很普遍的一种方法, 我们以该方法为基础, 参照了《分子克隆》中提取生物材料总 DNA 的方法^[2], 加上我们自己在实验中的一些心得和体会, 并考虑到食用菌与低等丝状真菌在材料本身方面的不同之处, 对 Yelton 的提取方法做了一些改良和简化处理, 从而建立了一种简单快速、高效的食用菌总 DNA 的提取方法。本研究为以后进一步开展食用菌的分子生物学研究提供了一种有力的研究手段。

1 材料和方法

1.1 材 料

提取液为 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA; ρ 为 10% SDS; 5 mmol/L NaCl; 苯酚/氯仿 (体积比为 1:1); 异丙醇; φ = 70% 乙醇; TE 缓冲液 (pH 8.0, 含 20 μ g/mL 无 DNA 酶的 RNA 酶)。

1.2 方 法

① 用无菌纱布过滤经液体摇瓶培养的食用菌菌丝体, 所得菌丝体用无菌蒸馏水洗涤几次, 以除去菌丝表面所粘附的培养液。用干燥的无菌纱布包裹湿菌丝并充分挤出其中的

* 基金项目: 广州市重点科技攻关项目基金资助项目 (99-Z-021-01)

收稿日期: 1999-11-12; 作者简介: 李 刚 (1971 ~), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 李宝健。

水分。

② 取挤出水分的菌丝 1~2 g, 放在研钵中并加入液氮研磨成粉末后, 迅速悬浮于盛有 10 mL 提取液的 50 mL 离心管中, 轻微振荡至溶液中无团块存在。

③ 加入 0.5 mL ρ 为 10% SDS, 充分混匀后, 在 65 °C 水浴中保温 15 min, 并间歇振荡一下。

④ 加入等体积的苯酚/氯仿 (体积比为 1:1), 混匀后, 于 4 °C 下 5 000 r/min 离心 10 min。

⑤ 取上清液, 重复步骤 4 至无肉眼可见的蛋白质界面。

⑥ 取上清液, 加入 0.5 mL 5 mol/L 的 NaCl, 然后加入 0.6 倍体积放于 -20 °C 预冷的异丙醇, 混匀后于冰浴中静置 30 min。

⑦ 4 °C 下, 5 000 r/min 离心 10 min, 小心除去上清液。

⑧ 用 70% 的乙醇洗涤沉淀, 然后于 5 000 r/min 离心 10 min, 小心除去上清液。

⑨ 沉淀的 DNA 在超净台中风吹干燥 15 min, 然后用 100 μ L 含 20 μ g/mL 无 DNA 酶的 RNA 酶的 TE 缓冲液溶解并混匀 DNA, 贮存于 -20 °C 备用。

2 结果和讨论

实验表明, 应用本方法可以在 2~3 h 内从 1 g 挤干水分的食用菌材料中得到 200~600 μ g 总 DNA。与同类的丝状真菌提取总 DNA 的方法相比, 达到了快速高效的要求。

本方法所提 DNA 质量很好, 完全可以满足分子生物学实验的要求。另外本方法由于操作步骤较少, 所用试剂也较少, 故所提 DNA 在进行 PCR、Southern 等分子生物学方面的分子鉴定实验时不易引起交叉感染, 完全能够满足这些操作的需要。

本方法的改良之处主要有:

(1) 改良了 Yelton 方法中 DNA 提取液的成份。Yelton 方法中提取液的成份为: 50 mmol/L EDTA (pH 8.5), 0.2% NaDodSO₄ (含微量氧二甲酸二乙酯), 我们所用提取液成分为: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 根据比较, 我们所用提取液抽提 DNA 的效果要强于 Yelton 方法中的 DNA 提取液。

(2) 增加了苯酚/氯仿 (体积比为 1:1) 处理的步骤, 减少了 DNA 中蛋白质的含量, 提高了所提 DNA 的纯度和质量。

(3) 将 Yelton 方法中所用的 DNA 助沉剂 KAC 改为 NaCl。因为本方法中使用了 SDS, 而据《分子克隆》记载, 含有 SDS 的 DNA 样品应使用 NaCl 沉淀, 这样 SDS 可溶于 70% 的乙醇而除去^[3]。

(4) 降低了 Yelton 方法中 DNA 的离心速率。在 Yelton 方法中 DNA 的离心速率常常在 12 000 g 以上, 而我们在实验中发现, 高速离心不仅会使 DNA 易于断裂, 以至得不到高分子量的 DNA, 而且有时会使 DNA 沉淀缠绕过紧而难以溶于 TE 中, 故本方法中我们采用了 5 000 r/min 的转速。

(5) 此外, 本方法只采用去污剂 SDS 来去除菌体中的蛋白质和多糖, 而未使用在真菌和植物材料总 DNA 提取中常用的去污剂 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵), 是因为用 SDS 处理较 CTAB 处理更为温和, 避免了对核酸的过度切割, 因而可提取出高分子量的总 DNA 用于基因组文库构建等实验。

参考文献:

- [1] YELTON M M. Proc Natl Acad Sci. USA, 1984 (81): 1470 ~ 1474.
- [2] 萨姆布鲁克. 分子克隆 (第 2 版). 北京: 科学出版社, 1992. 463 ~ 469.
- [3] 萨姆布鲁克. 分子克隆 (第 2 版). 北京: 科学出版社, 1992. 959.

A Simple and Highly Efficient Method for Extracting Total DNA of Edible Fungus

Li Gang^{}, Li Bao-jian*

Abstract: This paper reports a simple and highly efficient method for extracting total DNA of edible fungus. The method has made some improvements and simplifications on the basis of Yelton' s extraction method so that it has a number of advantages such as obtaining high molecular weight total DNA, high yield, good quality, simple operation. This research has provided a strong means for the further development of edible fungus' s molecular biology research in the future.

Keywords: edible fungus; total DNA; simple; highly efficient; extract

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China