

一种快速高效获取丝状真菌 PCR 反应模板的方法

刘 柳¹, 张 琨^{2,3}, 邓百万^{1*}, 万 一^{2,3*}

(1. 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省微生物研究所 分子生物学研究中心, 陕西 西安 710043;

3. 陕西省科学院 秦岭天然产物工程中心, 陕西 西安 710043)

摘要 建立一种快速高效获取丝状真菌 PCR 反应模板的方法, 提高丝状真菌 PCR 鉴定效率。通过单因素法对机械破壁联合微波法进行条件优化, 利用优化后的方法获取 13 株不同种属丝状真菌的 PCR 反应模板, 同时与 Chelex-100 法、机械破壁法作对比, 以试剂盒抽提法作为阳性对照, 进行 ITS 序列扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。机械破壁联合微波法获取丝状真菌 PCR 反应模板的最佳条件为 40 Hz 机械破壁 1 min、微波 700 W 高温裂解 3 min, 采取该法与试剂盒抽提法获得的模板均成功扩增 13 株不同种属丝状真菌 ITS 序列, 且 PCR 鉴定结果一致; Chelex-100 法获得的模板成功扩增 6 株丝状真菌 ITS 序列; 机械破壁法获得的模板虽成功扩增 9 株丝状真菌 ITS 序列, 但扩增效果欠佳。机械破壁联合微波法能够有效获取丝状真菌 PCR 反应模板, 与试剂盒抽提法相比具有操作简便、快速高效的优点, 提高丝状真菌 PCR 鉴定效率。

关键词 丝状真菌; 细胞裂解; PCR; 快速鉴定

中图分类号 Q93-31

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2020)03-0098-06

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.03.016

A Rapid and Efficient Method for Obtaining PCR Reaction Template of Filamentous Fungi

LIU Liu¹, ZHANG Kun^{2,3}, DENG Bai-wan¹, WAN Yi^{2,3}

(1. Schl. of Biol. Sci. & Engin., Shaanxi Uni. of Technol., Hanzhong 723000; 2. Mol. Biol. Res. Ctr., Shaanxi Inst.

of Microbiol., Xi'an 710043; 3. Engin. Ctr of Mt. Qinling Nat. Prod., Shaanxi Acad. of Sci., Xi'an 710043)

Abstract A rapid and efficient method to obtain PCR template of filamentous fungi was established to improve PCR identification efficiency of filamentous fungi. Conditions of mechanical cell wall-breaking combined with microwave method were optimized by single factor method. The PCR reaction templates of 13 filamentous fungal of different genera were obtained by 4 methods such as mechanical cell wall-breaking, simultaneously compared with Chelex-100 method, and mechanical cell wall-breaking and kit as a positive control, the amplified results of different methods were detected through agarose gel electrophoresis. The results showed that PCR reaction template was obtained at optimum conditions: 40 Hz of breaking frequency, for 1 min of breaking time, 700 W of microwave power, for 3 min of microwave time. The results were consistent with mechanical cell wall-breaking combined with microwave method and kit extraction method. The amplified ITS sequences of 13 filamentous fungal genera were successfully. ITS sequence of six filamentous fungal strains was amplified successfully by Chelex-100 method. Nine filamentous fungal strains were amplified successfully by mechanical cell wall-breaking method yet with poor amplification results. Therefore, mechanical cell wall breaking combined with microwave method can effectively obtain PCR reaction template of filamen-

基金项目: 陕西省科学院一所一品专项(2018nk-01); 陕西省科技厅重点研发计划项目(2017NY-116); 陕西科技厅科技创新工程项目(2016HBGC-07)

作者简介: 刘柳 女, 硕士研究生。研究方向为微生物资源保育与应用开发。Tel: 029-82357035, E-mail: LLiu0302@163.com

* 通讯作者: 邓百万, 男, 教授, 硕士生导师。研究方向为微生物资源保育与应用开发。Tel: 029-82357035, E-mail: 2210309868@qq.com

万 一, 男, 研究员, 博士。研究方向为分子生物学及微生物学。Tel: 029-82357035, E-mail: wanyi6565@sina.com

收稿日期: 2019-09-24

tous fungi, having the advantages of simple operation, rapid and efficient as compared with kit extraction method.

Keywords filamentous fungi; cell lysis; PCR; rapid identification

丝状真菌种类繁多,广泛存在于地球生物圈中,是整个生态系统的重要组成部分^[1]。作为重要的生物资源,丝状真菌在工业^[2]、医药^[3]、食品^[4]、生物防治^[5]、生态环境^[6]等方面具有重要的应用价值。对丝状真菌的开发利用首先需要对菌种进行分类鉴定,高效获取丝状真菌 PCR 反应模板是对其进行分类鉴定的必要条件^[7]。由于丝状真菌细胞壁成分复杂,结构特殊,尤其是较高的几丁质含量增加了细胞壁的抗逆性,难以释放出菌体 DNA,因此,获取 PCR 反应模板的过程较为复杂^[8]。目前,最常用的方法是利用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[9-10]、十二烷基磺酸钠(SDS)法^[11]、氯化苄法^[12]、尿素法^[13]、蜗牛酶法^[14]等获取丝状真菌基因组 DNA 作为 PCR 反应模板。上述方法虽然适用于绝大部分丝状真菌,但操作耗时费力,并且不同方法适用的丝状真菌类群存在差异^[15],不适合丝状真菌的批量、快速鉴定。为了提高丝状真菌 PCR 鉴定效率,快速高效获取丝状真菌 PCR 反应模板显得尤为重要。研究表明,玻璃珠法可以借助玻璃珠之间相互振动挤压及剪切力快速破碎细胞壁^[16];加热裂解法可以利用产生的高温达到裂解细胞壁的目的^[17]。

另有研究报道,Chelex-100 作为阳离子螯合树脂在高温、低离子强度下可以络合金属离子,避免模板 DNA 降解,快速获取用于 PCR 反应模板的 DNA^[18-21]。本文结合相关研究经验,通过多次实验摸索,利用机械破壁仪联合微波炉共同作用对丝状真菌细胞壁进行裂解,快速获得 PCR 反应模板,提高丝状真菌 PCR 鉴定效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 本实验室分离自秦岭昆虫体内 13 株不同种属的丝状真菌:绳状篮状菌(*Talaromyces funiculosus*)、澳大利亚腔孢菌(*Cochliobolus australiensis*)、层生镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)、易脆毛霉(*Mucor fragilis*)、鲁本斯青霉(*Penicillium rubens*)、皱折裸胞壳(*Emericella dentata*)、链格孢菌(*Alternaria alternata*)、平脐蠕孢属(*Bipolaris tetramera*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*)、歧皱青霉(*Penicillium steckii*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、拟康宁木霉(*Trichoderma koningiopsis*),如图 1 所示。

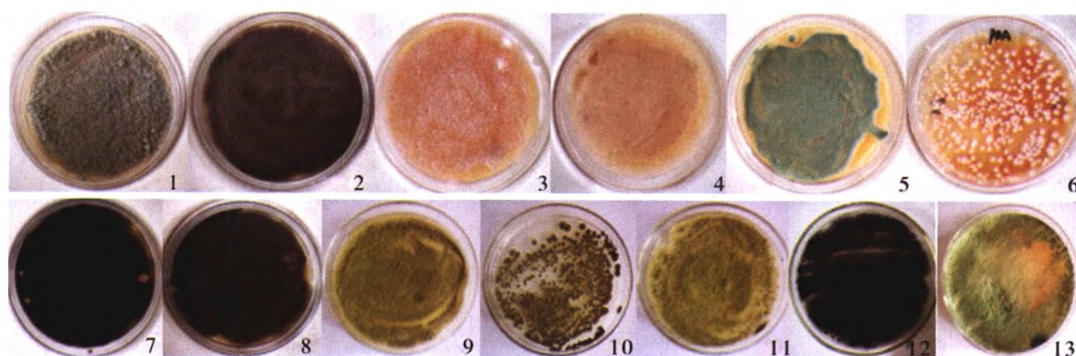


图 1 实验菌株图片

Fig. 1 The pictures of experimental strain

1:绳状篮状菌;2:澳大利亚腔孢菌;3:层生镰刀菌;4:易脆毛霉;5:鲁本斯青霉;6:皱折裸胞壳;7:链格孢菌;8:平脐蠕孢属;9:黄曲霉;10:枝状枝孢菌;11:歧皱青霉;12:黑曲霉;13:拟康宁木霉

1: *Talaromyces funiculosus*; 2: *Cochliobolus australiensis*; 3: *Fusarium proliferatum*; 4: *Mucor fragilis*; 5: *Penicillium rubens*; 6: *Emericella dentata*; 7: *Alternaria alternata*; 8: *Bipolaris tetramera*; 9: *Aspergillus flavus*; 10: *Cladosporium cladosporioides*; 11: *Penicillium steckii*; 12: *Aspergillus niger*; 13: *Trichoderma koningiopsis*

1.1.2 主要试剂及仪器 引物 ITS1、ITS4 由上海捷瑞生物有限公司合成, ITS1: 5'-TCCGTAGTT-GAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', 10 × Buffer TE 由实验室自配, 2 × Taq Master Mix(上海捷瑞生物有限公司), 5 × Loading Buffer(上海捷瑞生物有限公司), 250 bp Maker(上海捷瑞生物有限公司), 真菌基因组试剂盒(北京天根生化科技有限公司), Chelex-100(Sigma 公司), 钢珠($d = 5\text{ mm}$, QIAGEN Hilden)机械破壁仪(TissueLyser LT, QIAGEN Hilden), 微波炉(WD700TL23-K5, 格兰仕微波炉电器有限公司), 离心机(XI, 基因公司), 酶标仪(EPOCH2, BioTek), PCR 扩增仪(Ti100™, BIO-RAD), 凝胶电泳仪(DYY-100, 北京市六一仪器厂), 凝胶成像系统(ChemDoc XRS + , BIO-RAD)。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 将菌株接种于 PDA 培养基中, 28 °C 恒温培养 3 ~ 4 d。

1.2.2 PCR 反应模板制备 在无菌操作台, 取 100 μL 10 × Buffer TE (100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 于 2 mL 离心管中, 用无菌接种环挑取少半环菌丝体, 迅速震荡混匀, 加一颗无菌钢珠, 先采用机械破壁仪进行机械破壁, 随后对其进行微波处理, 待其温度降至室温, 离心获取上清液作为 PCR 反应模板。

1.2.3 机械破壁联合微波法条件优化 选取常见丝状真菌黑曲霉 *Aspergillus niger* 为实验菌株, 以 PCR 产物量为指标, 以 30 Hz 机械破壁 2 min, 微波 560 W 裂解 5 min 为基础条件^[22], 采取单因素法对机械破壁频率(20、30、40、45、50 Hz)、机械破壁时间(0.5、1、2、3、4 min)、微波裂解功率(140、420、560、700 W)、微波裂解时间(1、3、5、8、10 min)进行优化, 筛选出机械破壁联合微波法获取 PCR 反应模板的最佳条件。

1.2.4 ITS 序列扩增及 PCR 产物量分析 分别将上述不同条件下得到的 PCR 反应模板进行 ITS 序列扩增。反应体系为 30 μL : 2 × Taq Master Mix 15 μL , 引物 ITS1 0.5 μL , 引物 ITS4 0.5 μL , DNA 模板 3 μL , ddH₂O 11 μL 。反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 54.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 °C 终延伸 10 min。PCR 反应结束后, 取 3 μL PCR 产物用于 1% 琼脂糖凝胶

电泳检测扩增结果, 并以 Maker 条带浓度为对照(标准带浓度为 10 ng/ μL 、加亮带浓度为 25 ng/ μL), 通过 Image Lab 进行 PCR 产量分析。

1.2.5 快速获取丝状真菌 PCR 反应模板方法的比较 采取上述实验得到的机械破壁联合微波法的最佳条件获取 13 株不同种属丝状真菌的 PCR 反应模板, 同时与机械破壁法、Chelex-100 法得到的模板作对比, 以试剂盒抽提法得到的基因组 DNA 为模板作阳性对照, 进行 ITS 序列扩增及目的条带浓度分析, 目的条带清晰并在 500 ~ 750 bp 之间可认为扩增成功。将扩增产物送至上海生工进行测序, 并对结果进行 BLAST 比对分析。

机械破壁法: 参照文献[21], 取少半环菌丝体于装有 200 μL 10 × Buffer TE 的 2 mL 离心管中, 加入一颗钢珠, 涡旋震荡 5 min 后置于机械破壁仪中破壁 2 min, 12 000 r/min 离心 2 min 取上清液作为 PCR 反应模板。

Chelex-100 法: 参照文献[19], 取少半环菌丝体于装有 200 μL 10% Chelex-100 溶液的 2 mL 离心管中, 涡旋震荡 10 s, 沸水浴 10 min, 冷却至室温后 12 000 r/min 离心 2 min 取上清液作为 PCR 反应模板。

2 结果与分析

2.1 机械破壁联合微波法条件优化结果

机械破壁联合微波法在不同条件下得到的结果如下: 机械破壁频率在 40 Hz 时, 目的条带最亮且 PCR 产物量最高为 100.334 ng(图 2A、表 1); 机械破壁时间在 2 min 时, 目的条带最亮且 PCR 产物量最高为 82.868 ng, 但 1 min 时, 目的条带清亮, PCR 产物量为 81.726 ng, 与 2 min 时相差不大, 从快速的角度考虑选取 1 min 为最佳机械破壁时间(图 2B、表 2); 微波裂解功率在 700 W 时目的条带最亮且 PCR 产物量最高为 76.872 ng(图 2C、表 3); 微波裂解时间在 3 min 时目的条带最亮且 PCR 产物量最高为 128.516 ng(图 2D、表 4)。综上所述, 机械破壁联合微波法的最佳条件为 40 Hz 机械破壁 1 min, 微波 700 W 高温裂解 3 min。

2.2 快速获取丝状真菌 PCR 反应模板方法的比较

2.2.1 ITS 序列扩增结果 对 4 种方法得到的

PCR 反应模板进行 ITS 序列扩增后,经琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 3 所示。采用 Chelex-100 法获取的 PCR 反应模板可成功扩增 6 株丝状真菌的 ITS 序列,扩增率虽然较低,但目的条带明亮、清晰(图 3A1、A2);采取机械破壁法获取的 PCR 反应模板,虽成功扩增 9 株丝状真菌的 ITS 序列,但目的条带明亮度和清晰度明显低于其他

3 种方法(图 3B1、B2);试剂盒抽提法获取的 PCR 反应模板可成功扩增 13 株丝状真菌的 ITS 序列,且目的条带明亮、清晰(图 3C1、C2);机械破壁联合微波法获取的 PCR 反应模板成功扩增 13 株丝状真菌的 ITS 序列,且目的条带明亮、清晰(图 3D1、D2)。因此,机械破壁联合微波法可快速、高效获取丝状真菌 PCR 反应模板。

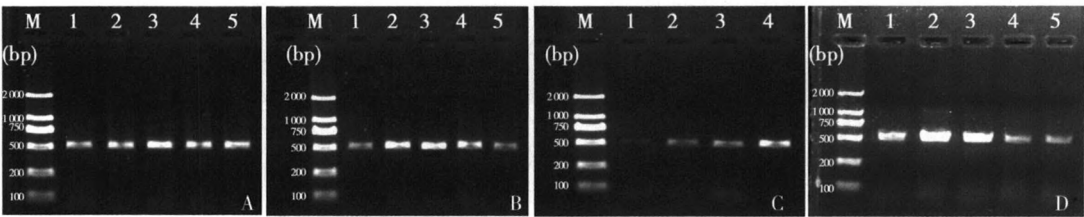


图 2 ITS 序列扩增结果

Fig. 2 The results of ITS sequence amplification

M:250 bp Maker; A:不同机械破壁频率(泳道 1~5:20、30、40、45、50 Hz); B:不同机械破壁时间(泳道 1~5:0.5、1、2、3、4 min); C:不同微波裂解功率(泳道 1~5:140、420、560、700 W); D:不同微波裂解时间(泳道 1~5:1、3、5、8、10 min)
M: 250 bp Maker; A: Different mechanical wall-breaking frequency (lane1-5: 20,30,40,45,50 Hz); B: Different mechanical wall-breaking time (lane1-5: 0.5,1,2,3,4 min); C: Different microwave power (lane1-5: 140,420,560,700 W); D: Different microwave time (lane1-5: 1,3,5,8,10 min)

表 1 不同机械破壁频率对 PCR 产物量的影响

Table 1 Effect of different mechanical breaking frequency on PCR yield

机械破壁频率/Hz	PCR 产物量/ng
20	73.329
30	73.947
40	100.334
45	66.754
50	72.767

表 2 不同机械破壁时间对 PCR 产物量的影响

Table 2 Effect of different mechanical breaking time on PCR yield

机械破壁时间/min	PCR 产物量/ng
0.5	58.204
1	81.726
2	82.868
3	78.045
4	56.330

2.2.2 PCR 扩增量及产物测序结果分析 结果如表 5 所示,机械破壁联合微波法获取的 PCR 反

应模板扩增后的目的条带质量浓度菌株 1、2、8、10、11、12 与试剂盒抽提法相当,菌株 3、4、5、6、7、9、13 虽低于试剂盒抽提法,但条带质量浓度均大于 20 ng/μL。

表 3 不同微波裂解功率对 PCR 产物量的影响

Table 3 Effect of different microwave cracking power on PCR yield

微波裂解功率/W	PCR 产物量/ng
140	32.481
420	49.856
560	70.708
700	76.872

表 4 不同微波裂解时间对 PCR 产物量的影响

Table 4 Effect of different microwave cracking time on PCR yield

微波裂解时间/min	PCR 产物量/ng
1	65.061
3	128.516
5	92.513
8	46.907
10	42.069

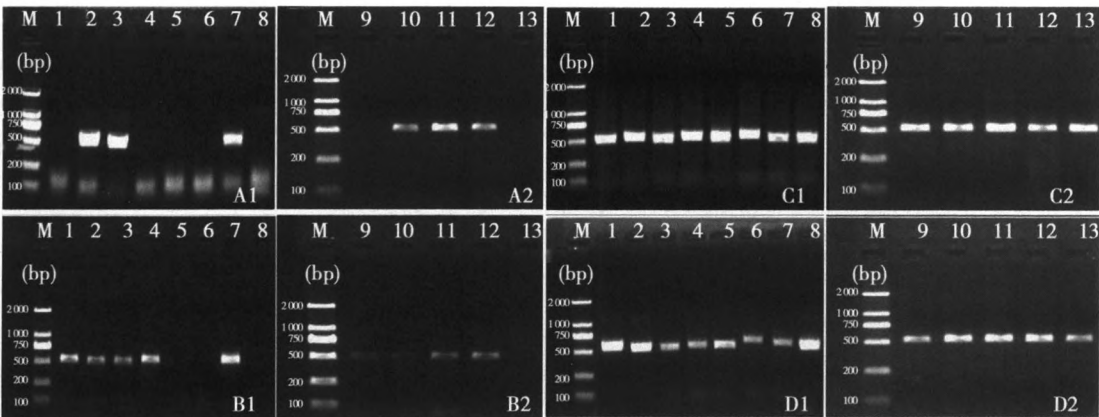


图 3 ITS 序列扩增结果

Fig.3 The results of ITS sequence amplification

M:250 bp Maker; 1 ~13:13 株实验菌株; A1、A2:Chelex-100 法; B1、B2:机械破壁法; C1、C2:试剂盒抽提法; D1、D2:机械破壁联合微波法

M: 250 bp Maker; 1-13:13 experimental strains; A1 ,A2 : Chelex-100 method; B1 ,B2 : Mechanical wall-breaking method; C1 , C2 : Kit method; D1 ,D2 : Mechanical wall-breaking united microwave method

表 5 目的条带质量浓度测定结果

Table 5 The results of determination of target band concentration

菌株	方法	目的条带质量浓度/(ng·μL ⁻¹)
1	机械破壁联合微波法	42.963
	试剂盒抽提法	41.696
2	机械破壁联合微波法	41.584
	试剂盒抽提法	40.826
3	机械破壁联合微波法	20.301
	试剂盒抽提法	40.665
4	机械破壁联合微波法	20.521
	试剂盒抽提法	41.342
5	机械破壁联合微波法	25.092
	试剂盒抽提法	42.482
6	机械破壁联合微波法	20.132
	试剂盒抽提法	41.313
7	机械破壁联合微波法	20.167
	试剂盒抽提法	36.342
8	机械破壁联合微波法	41.403
	试剂盒抽提法	38.872
9	机械破壁联合微波法	21.011
	试剂盒抽提法	30.483
10	机械破壁联合微波法	32.584
	试剂盒抽提法	31.635
11	机械破壁联合微波法	33.013
	试剂盒抽提法	40.492
12	机械破壁联合微波法	30.046
	试剂盒抽提法	27.584
13	机械破壁联合微波法	20.006
	试剂盒抽提法	26.047

机械破壁联合微波法、试剂盒抽提法获得模板的 PCR 扩增产物送上海生工测序,测序结果进行 BLAST 比对分析,机械破壁联合微波法同试剂盒抽提法得到的鉴定结果一致。因此,机械破壁联合微波法可快速、高效获取用于丝状真菌 PCR 反应的正确模板。

3 讨论

要提高丝状真菌 PCR 鉴定效率,首先需要快速高效获取 PCR 反应模板。我们通过大量实验建立了机械破壁联合微波法获取丝状真菌 PCR 反应模板的方法,以 PCR 产物量为指标,以常见丝状真菌黑曲霉为实验菌株,对机械破壁联合微波法的机械破壁频率、机械破壁时间、微波裂解功率、微波裂解时间进行条件优化,得到了机械破壁联合微波法获取丝状真菌 PCR 反应模板的最佳条件:40 Hz 机械破壁 1 min,微波 700 W 高温裂解 3 min。

采取优化的机械破壁联合微波法获取 13 株不同种属丝状真菌的 PCR 反应模板,与已报道的多个快速获取方法作比较,同时以试剂盒抽提法作为阳性对照,进行 ITS 序列扩增及结果分析。结果显示,Chelex-100 法获取的模板进行扩增后虽然目的条带明亮、清晰,但扩增成功率较低(46.2%),与李焕宇等^[15]研究结果一致;机械破

壁法扩增成功率(69.2%)虽然高于 Chelex-100 法,但扩增结果不理想;机械破壁联合微波法获取的模板效果良好,13 株不同属的丝状真菌 ITS 序列均成功扩增(扩增成功率 100%),且条带清晰明亮,PCR 鉴定结果与试剂盒抽提法完全一致。

试剂盒抽提法是目前获取丝状真菌 PCR 反应模板最常用方法,但首先需对大量菌体进行液氮研磨,提取过程约需 1 h,提取费时且成本高,不适合丝状真菌的批量、快速鉴定。本研究建立的机械破壁联合微波法仅需 10 min 即可获得丝状真菌用于 PCR 反应的扩增模板,效果与试剂盒抽提法相同,具备高效、低成本的优点。因此,机械破壁联合微波法可快速高效获取丝状真菌 PCR 反应模板,提高丝状真菌 PCR 鉴定效率。

参考文献:

- [1] 林艳云,陈忆婷,黄晓明,等.真菌菌体直接 PCR 扩增的方法研究[J].生物化工,2018,4(6):7-10.
- [2] 邓大杰,孟亚南,邓二杰,等.丝状真菌遗传筛选系统的研究及其应用[J].微生物学通报,2019,46(5):1165-1178.
- [3] 潘园园,刘钢.中国丝状真菌次级代谢分子调控研究进展[J].遗传,2018,40(10):874-887.
- [4] 李林笑,夏炎,吴文锦,等.米曲霉发酵鲫鱼基料酿造鱼鲜酱油的工艺研究[J].食品科技,2017,42(7):265-272.
- [5] 王娟,胡军华,龙艳玲,等.交枝顶孢霉杀柑橘全爪螨活性及其生物学特性研究[J].植物保护,2017,43(2):95-101.
- [6] 华涛,李胜男,邸志琰,等.微生物降解石油污染物机制研究进展[J].生物技术通报,2018,34(10):26-34.
- [7] 孙广宇,彭友良,李振歧,等.核苷酸序列分析在真菌系统学研究中的应用[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,(6):187-192.
- [8] Andrew M Borman, Mark Fraser, Christopher J. Linton, et al. An improved protocol for the preparation of total genomic DNA from isolates of yeast and mould using whatman FTA filter papers[J]. Mycopathologia, 2010, 169(6):445-449.
- [9] AlShahni MM, Makimura K, Yamada T, et al. Direct colony PCR of several medically important fungi using ampdirect plus [J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2009, 62(2): 164-167.
- [10] Yi RH, Zhu XR, Zhou EX, et al. Simplified CTAB method for rapid extracting DNA from filamentous fungi[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2003, 23(6): 72-73.
- [11] 赵杏利,邓晖,牛永春.一种狗尾草病原真菌的鉴定及菌株致病性研究[J].菌物学报,2010,29(2):172-177.
- [12] 薛淑静,岳田利,关键,等.一种真菌 DNA 提取方法的改进[J].食品研究与开发,2006,(4):39-40.
- [13] Sun Y, Zhang W, Li FL. Identification and genetic mapping of four novel genes that regulate leaf development in Arabidopsis [J]. Cell Research, 2000, 10(4): 325-335.
- [14] 赵宏宇,李璐,赵玥,等.4 种酵母基因组提取方法的比较[J].食品科学,2011,32(9):170-173.
- [15] 李焕宇,付婷婷,张云,等.5 种方法提取真菌基因组 DNA 作为 PCR 模板效果的比较[J].中国农学通报,2017,33(16):28-35.
- [16] Faggi E, Pini G, Campisi E. Use of magnetic beads to extract fungal DNA[J]. Mycoses, 2005, 48(1): 3-7.
- [17] 余道军,童文娟,陈岳明,等.临床标本细菌基因组 DNA 提取方法探讨[J].中国微生态学杂志,2007,(6):519-520, 523.
- [18] 代海涛,仵楠,黎昌学.改良 Chelex-100 快速提取白色念珠菌 DNA 作为 PCR 扩增模板方法[J].农垦医学,2015,37(6):486-489.
- [19] 陈吉良,黄小龙,吴安迪,等.一种快速高效提取病原真菌 DNA 作为 PCR 模板的方法[J].菌物学报,2011,30(1): 147-149.
- [20] Idris B, Goodwin W. Comparison of Chelex-100 with two solid phase DNA extraction techniques[J]. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2015, 33(2): 168-170.
- [21] 何鸿举,焦凌霞,樊明涛,等.用于 PCR 检测的扩展青霉基因组 DNA 提取方法比较[J].西北农业学报,2011,20(2): 198-201.
- [22] 潘力,崔翠,王斌.一种用于 PCR 扩增的丝状真菌 DNA 快速提取方法[J].微生物学通报,2010,37(3):450-453.
- [23] 卢群,刘晓艳,丘泰球,等.超声对酵母细胞膜通透性的影响[J].食品与发酵工业,2005,(9):18-21.