

氯化苄法提取植物内生放线菌基因组 DNA

刘建利

(北方民族大学 生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以植物内生放线菌菌株 GL0806123 为试材, 用氯化苄快速提取植物内生放线菌菌株 GL0806123 基因组 DNA。建立用氯化苄提取植物内生放线菌基因组 DNA 的方法。结果表明: 用氯化苄法能够成功提取植物内生放线菌菌株 GL0806123 基因组 DNA, 以此为模板 PCR 扩增出 16S rDNA 区段, 测序后可用于菌种鉴定。氯化苄法是一种快速提取植物内生放线菌基因组 DNA 的方法。

关键词:氯化苄; 植物内生放线菌; 基因组 DNA

中图分类号: Q 94-334 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)13-0124-03

“植物内生菌(Endophyte)”是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官的细胞间隙或细胞内部的微生物, 被感染的宿主植物(至少是暂时)不表现出外在病症, 可通过组织学方法或从严格表面消毒的植物组织中分离或从植物组织内直接扩增出微生物 DNA 的方法来证明其内生。它不仅包括互惠共利的和中性的内共生微生物, 也包括那些潜伏在宿主体内的病原微生物, 这些微生物有细菌、真菌、放线菌等^[1-2]。植物内生菌存在植物组织细胞间隙, 在几千万年的进化历程中, 与宿主植物协同进化, 可能产生与宿主相关的活性成分。自从 1993 年美国蒙大拿州立大学的 Strobel^[34] 从短果实红豆杉(*Taxus brevifolia* Nutt.) 的韧皮部分离出一株能产紫杉醇的内生真菌安德列亚菌(*Taxomyces andreanae*), 为紫杉醇的来源提供了很好的研究方向。此后, 从内生真菌的代谢产物中, 寻找抗肿瘤、抗病毒、降血糖、抗菌、杀虫、免疫抑制、酶抑制剂或激活剂等活性的分子代谢产物, 已成为人们关注的热点, 内生真菌已经成为寻找新药源的宝贵资源。最近有报道指出, 从内生真菌中分离出来的具生物活性的物质, 有 51% 是新物质, 而从土壤中分离出来的仅有 38% 是新物质, 因此, 从植物中分离的内生菌是获得新的天然产物及开发新药的潜在资源^[56]。

从分子生物学方面着手植物内生菌研究工作, 首先

涉及的问题就是高分子量的染色体 DNA 的提取制备。氯化苄法是提取基因组 DNA 的方法之一, 具有快速、简便、经济的优点, 得到的 DNA 蛋白质污染少、质量好、产量高, 可以直接满足后续的基因操作, 整个方法具有较好的重复性。利用氯化苄法提取植物内生放线菌基因组 DNA 的报道不多, 该研究利用氯化苄提取植物内生放线菌的基因组 DNA, 旨在寻找一种操作方便、快速、满足分子生物学研究要求的 DNA 提取方法, 为进一步开展植物内生菌的分子生物学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物内生放线菌菌株 GL0806123 课题组实验室保存。分子量标准 λ DNA/HindIII Marker 和 DNA Marker D(Biobasic 公司)、Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 等分子生物学试剂, 购自北京全式金生物公司, 氯化苄购自北京化学试剂厂产分析纯原液, 其它生化试剂为国产分析纯。所用试剂、塑料耗材和玻璃器皿等物品, 均经高压灭菌处理。高氏 1 号培养基: 可溶性淀粉 20 g; KNO₃ 1 g; NaCl 0.5 g; K₂HPO₄ 0.5 g; MgSO₄ 0.5 g; FeSO₄ 0.01 g; 琼脂 20 g; 水补足 1 000 mL; pH 7.2~7.4。配制时, 先用少量冷水, 将淀粉调成糊状, 倒入煮沸的水中, 在火上加热, 边搅拌边加入其它成分, 溶化后, 补足水分 1 000 mL, 121℃灭菌 20 min。可溶性淀粉要先加热再进行配制。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的培养 在高氏 1 号固体培养基上 28℃活化 48 h, 然后接入含 200 mL 高氏 1 号液体培养基 500 mL 三角瓶中, 28℃、135 r/min 摇床培养 24 h。

1.2.2 菌体的收集 将液体培养好的菌体用 2 层无菌

作者简介: 刘建利(1973-), 男, 硕士, 讲师, 现主要从事微生物分子生物学研究工作。E-mail: lj17523@126.com。

基金项目: 宁夏回族自治区高等学校科学研究资助项目(2009JY011)。

收稿日期: 2010-03-22

纱布过滤, 然后用无菌生理盐水冲洗 2 ~ 3 次, 无菌滤纸尽量挤干水分。

1.2.3 基因组 DNA 提取 收集培养菌体细胞 1 mL 提取液(100 mmol/L Tris-HCl、40 mmol/L EDTA), 振荡混匀, 加入 0.1 mL 100 mg/mL SDS、0.3 mL 氯化苄(30%), 剧烈振荡, 使管内混合物呈乳状, 50℃温浴 1 h, 每隔 10 min 振荡混匀 1 次, 冷却至室温, 加入 0.3 mL 预冷的 3 mol/L NaAc(pH 5.2)溶液, 混匀, 冰浴 15 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 加入等体积异丙醇, -20℃放置 1 h, 12 000r/min 离心 15 min, 弃上清液, 以 70% 乙醇洗涤沉淀物 1 次, 待乙醇挥发完全后, 用适量 TE 溶液溶解沉淀物, -20℃保存备用。

1.2.4 PCR 扩增及测序 16S rDNA 引物, 由上海生工合成。F8: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG (20 mer); R1507: GGT TAC CTT GTT ACG ACT T (19 mer)。PCR 反应体系组成: 10×PCR 反应缓冲液(含 Mg^{2+})2.5 μ L, dNTP 溶液(各为 10 mM)0.5 μ L, 正反引物(10 μ M)各 0.5 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L)0.5 μ L, 模板 10 μ L, 水补足反应体系, 使总体积为 25 μ L。循环参数为 94℃预变性 5 min, 再按 94℃变性 30 s、55℃复性 45 s、72℃延伸 60 s, 30 个循环, 最后 72℃延伸 5 min。扩增产物于加入 EB 的 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 以 DNA Marker D 分子量标准, 紫外灯下观察。序列测定: 割胶回收纯化 PCR 产物, 序列测定由上海生工完成。

1.2.5 系统发育分析 将所得序列提交到 NCBI 核酸数据库, 通过 Blast 程序与 GenBank 中的核酸序列进行对照, 确定菌株类别。将测序 16S rDNA 序列及其近缘种序列 Clustal X2.0 和 Bioedit7.09 比对排序, 辅之以手工调整 Mega 4.0 中 Maximum Parsimony 方法构建系统进化树, 应用自展法(bootstrap)检验系统树, 自展数据集为 1 000 次, 去掉支持率<50%分支。

2 结果与分析

2.1 氯化苄法提取植物内生放线菌菌株 GL0806123 基因组 DNA 结果

采用氯化苄法提取植物内生放线菌菌株 GL0806123 基因组 DNA, 如图 1, 大小大约 25 kb, 呈带状。根据亮度判断, 浓度约为 200 ~ 300 ng/ μ L, 可满足 PCR 要求。

2.2 植物内生放线菌菌株 GL0806123 PCR 扩增结果

采用氯化苄法提取植物内生放线菌菌株 GL0806123 基因组 DNA 0.5 μ L 约 50 ~ 100 ng 作为模板, 用放线菌 16S rDNA 引物扩增, 如图 2, 得到扩增条

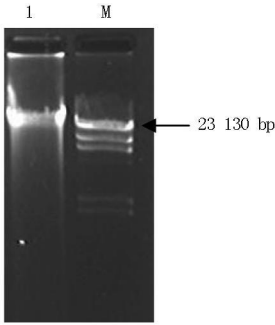


图1 氯化苄法提取植物内生放线菌株 GL0806123 基因组 DNA 电泳结果
注: M. λ DNA/ HindIII Marker 2; 1. 基因组 DNA

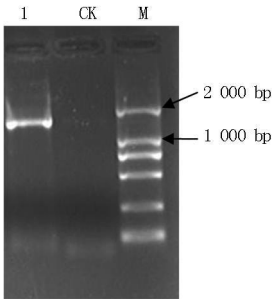


图2 植物内生放线菌株 GL0806123 16S rDNA PCR 扩增结果
注: M; DNA Marker D; CK; 对照; 1: 16S rDNA PCR 产物

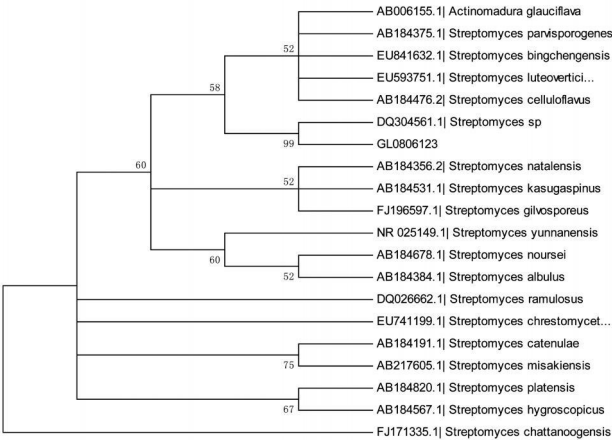


图3 植物内生放线菌株 GL0806123 16S rDNA 序列构建的系统树

带, 大小约 1 500 bp, 与理论长度吻合。

2.3 植物内生放线菌菌株 GL0806123 16S rDNA 分析

采用 PCR 技术, 植物内生放线菌菌株 GL0806123 的 16S rDNA 基因, 测序的序列长度为 1 530 bp。将该序列结果输入 GenBank 以 Blast 进行序列同源性比较结果表明, 与菌株 GL0806123 16S rDNA 同源性在 97% 以

上的菌株都属于链霉菌属(*Streptomyces* sp.), 最高的是 *Streptomyces gilvosporeus* (Genebank 登录号 FJ196597.1), *Streptomyces natalensis* (Genebank 登录号 AB184356.2), *Streptomyces kasugaspinus* (Genebank 登录号 AB184531.1) 相似性 99%。以 *Streptomyces chatta-noogensis* (FJ171335.1) 为外群, 构建系统发育树如图 3 所示, 菌株 S0806082 的 16S rDNA 也于 *Delftia* 属的菌株聚为一类。因此, 将植物内生放线菌菌株 GL0806123 初步鉴定为 *Streptomyces* sp.

3 结论与讨论

该研究利用氯化苄法成功提取纯度好、分子量适宜的植物内生放线菌基因组 DNA, 并且以此 DNA 为模板扩增 16S rDNA, 序列测定后可用于菌种鉴定。

氯化苄(PhCH_2Cl) 在弱碱性条件下可以与细胞壁多糖(包括纤维素、半纤维素等)的羟基(ROH)作用生成醚, $\text{ROH} + \text{PhCH}_2\text{Cl} + \text{NaOH} \rightarrow \text{PhCH}_2\text{OR} + \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$, 通过该反应破坏细胞壁糖链, 在 SDS 作用下, 胞内 DNA 得以释放。条件较温和, 不会对 DNA 产生较大损伤。由于氯化苄的极性与苯酚相近, 因此也具有抽提蛋白质的作用利用氯化苄提取的 DNA 样品可省略蛋白质抽提过程, 破壁抽提合二为一。该法不需要添加蛋白酶消解蛋白质, 也不需要苯酚、氯仿抽提蛋白质, 并且破膜与沉降 2 个过程可同时进行。为了保证氯化苄与菌体充分接触, 加入 SDS 和氯化苄后, 剧烈振荡使管内混合物成乳状, 保温过程中每隔 10 min 温和振荡混合一次。

氯化苄法与一般常规的方法相比, 具有经济、实用、高效、重复性好的优点, 值得推广。

参考文献

- [1] 孙剑秋, 郭良栋, 臧威, 等. 药用植物内生真菌及活性物质多样性研究进展[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1505-1519.
- [2] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.
- [3] Strobel G A. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes Infect, 2003, 5(6): 535-544.
- [4] Strobel G A. Rainforest endophytes and bioactive products[J]. Crit Rev Biotechnol, 2002, 22(4): 315-333.
- [5] Poulev A, O' Neal J M, Logendra S. Elcitation, a new window into plant chemo diversity and photochemical drug discovery[J]. J Med Chem, 2003, 46(12): 2542-2547.
- [6] 贾栗, 陈疏影, 翟永功, 等. 近年国内外植物内生菌产生物活性物质的研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(11): 1570-1571.
- [7] 孙小丁, 郑彦杰, 张苓花, 等. 微生物基因组 DNA 氯化苄提取方法优化的研究[J]. 中国酿造, 2006, 160(7): 9-12.
- [8] 张莉莉, 张苓花, 史剑斐, 等. 利用氯化苄提取真菌基因组 DNA 及其分子生物学分析[J]. 大连轻工业学院学报, 2000, 19(1): 37-38.
- [9] 李海阔, 王琛, 周碧君. 提取产气荚膜梭菌染色体 DNA 的新方法—氯化苄法[J]. 贵州大学学报, 2002, 21(1): 57-61.
- [10] 单志萍, 孟好, 姜文侯. 丝状真菌三孢布拉霉 DNA 的提取研究[J]. 生物技术, 2001, 11(3): 5-7.
- [11] 钟铃, 汪天虹. 氯化苄法提取染色体 DNA[J]. 微生物学杂志, 1997, 17(3): 62-63.
- [12] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 372.

Extraction Genomic DNA from Endophytic Actinomyces Using Benzyl Chloride

LIU Jian-li

(College of Biological Sciences and Engineering, North University for Ethnicity Yinchuan Ningxia 750021)

Abstract: Taking endophytic actinomyces GL0806123 as materials, the extraction genomic DNA using benzyl chloride were investigated in this paper. The study aimed to establish a novel method to extract the genomic DNA from endophytic actinomyces using benzyl chloride. The results showed that the genomic DNA extraction was had extracted successfully from endophytic actinomyces using benzyl chloride. And 16S rDNA was amplification with this DNA as PCR templates, then GL0806123 was identified based on this 16S rDNA sequence. Benzyl chloride method was a rapid method to extract the genomic DNA from endophytic actinomyces.

Key words: benzyl chloride; endophytic actinomyces; genomic DNA