

# 扩展青霉基因组 DNA 五种提取方法比较

李亚菲, 何鸿举, 吕 茜, 樊明涛

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**为寻找一种适合于扩展青霉基因组 DNA 的提取方法, 比较了固体培养、液体静置培养和液体振荡培养 3 种培养方式的提取效果, 分别采用氯化苄法、蜗牛酶法、CTAB 法、SDS 法及异硫氰酸胍法提取扩展青霉菌基因组 DNA, 经 DNA 质量浓度测定及电泳分析, 比较 5 种方法的差异, 并利用扩展青霉的多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase)基因内一段保守序列, 设计 PCR 引物, 扩增大小为 288 bp 的特异目的基因, 检测其灵敏性。结果表明: 固体培养的方式较适合扩展青霉基因组 DNA 的提取, 另外 5 种提取方法均能提取出扩展青霉菌基因组 DNA, 扩增出目的条带, 其中氯化苄法和蜗牛酶法所提 DNA 的纯度均较好, 但蜗牛酶法所提 DNA 量较少。因此, 氯化苄法是 5 种提取方法中最可靠的 DNA 提取方法, 所提 DNA 浓度高、纯度好、结果稳定, 可作为 PCR 反应的模板进行特异性扩增, 且该方法的最低检测限大约为  $1.01 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$ 。

**关键词:**扩展青霉菌; DNA 提取; 氯化苄法; 蜗牛酶法; SDS 法; CTAB 法; 异硫氰酸胍法

**中图分类号:**Q 939.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)20-0128-04

扩展青霉是一种多细胞的丝状真菌, 属真核微生物, 细胞内富含多糖、脂类等物质, 细胞壁结构紧密、坚固, 其主要成分以几丁质为主, 而几丁质是由 N-乙酰葡萄糖胺分子以  $\beta$ -1,4 葡萄糖苷键连接而成的多聚糖。扩展青霉是引起苹果腐烂的主要真菌, 也是苹果及未发酵苹果汁中棒曲霉素(Patulin)的主要产生菌<sup>[1]</sup>。棒曲霉素是一种能够致畸、致癌、致突变的真菌毒素<sup>[2]</sup>。苹果汁生产上减少棒曲霉素最有效的方法就是剔除含有扩展青霉的苹果以及后续果汁的吸附去除, 要剔除污染扩展青霉菌的苹果, 早期的检测是重要手段之一, 而要实现这种检测, 传统的方法是培养法, 费时、费力, 达不到在线的目的, 而 PCR 方法却具有明显的优势, 但 PCR 方法需要有高质量的扩展青霉 DNA, 由于扩展青霉菌细胞结构的特殊性, 其基因组 DNA 的提取比较困难。尽管目前有很多提取真菌 DNA 方法的报道<sup>[3-5]</sup>, 但却没有对这些方法的优缺点进行比较, 课题组在进行扩展青霉 PCR 的过程中, 发现利用不同的方法, 扩增效果差异较大, 因此有必要对现有方法的优缺点进行比较, 以期找到一种高质高效的适合扩展青霉基因组 DNA 的提取方法, 为扩展青霉菌分子生物学水平的研究提供理论依据和技术支持。

**第一作者简介:**李亚菲(1986-), 女, 在读硕士, 现主要从事食品生物技术方面的研究工作。E-mail: liyafei1058@sina.com。

**责任作者:**樊明涛(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 现主要从事食品微生物及食品安全方面的研究工作。E-mail: fanmt@nwsuaf.edu.cn。

**基金项目:**教育部博士点基金资助项目(200807120017); 陕西省科技攻关资助项目(2007K01-12)。

**收稿日期:**2011-07-26

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 菌株来源** 扩展青霉菌(*Penicillium expansum*)由加拿大国家食品安全研究所提供。

**1.1.2 培养基** 察氏培养基: 先取 200 mL 蒸馏水, 依次添加  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g、 $\text{NaNO}_3$  3.0 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、KCl 0.5 g 使其充分溶解, 加水定容到 1 000 mL, 分装于三角瓶中, 将蔗糖 30 g、琼脂粉 15 g(固体培养基)按三角瓶中溶液体积(mL): 1 000 mL 的比例分装到各瓶中, 加盖硅胶塞, 0.1 MPa(121℃)灭菌 30 min。

**1.1.3 试剂(均为实验室配制)** 氯化苄提取液: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0; 40 mmol/L EDTA, pH 8.0。蜗牛酶法缓冲液①: 0.9 mol/L Sorbitol + 0.1 mol/L EDTA; 缓冲液②: 50 mmol/L Tris-HCl + 20 mmol/L EDTA; 缓冲液③: 10 mmol/L Tris-HCl + 1 mmol/L EDTA。CTAB 法提取液: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 20 mmol/L EDTA, 20 g/L CTAB, 0.7 mol/L NaCl, 10 g/L PVP。SDS 法提取液: 4% SDS, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol/L EDTA, pH 8.0。异硫氰酸胍法提取液(GTP 试剂): 6 mol/L 异硫氰酸胍 + 50 mmol/L Tris(pH 8.3) + 等体积 Tris 饱和酚(pH 8.0)。

**1.1.4 仪器与设备** UV-3802H 紫外可见分光光度仪(尤尼科(上海)仪器有限公司)、PTC-200 PCR 仪(美国 MJ RESEARCH 公司)、Bio Doc 凝胶成像系统(美国伯乐公司)、HC-3018R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)、DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 菌体培养及收集 在无菌操作条件下,将扩展青霉菌转接到灭菌察氏固体培养基和液体培养基上,置于真菌培养箱中 25℃ 培养 5~6 d,另将部分置于 25℃ 摇床振荡培养 5~6 d。用接种环从固体培养的平板上刮取菌体,从液体培养的三角瓶内挑取菌体,均以无菌生理盐水浸洗 2 次然后用无菌滤纸吸干备用。

1.2.2 氯化苄法 DNA 提取 称取 100 mg 菌体置于 1.5 mL 离心管中,加入 500  $\mu$ L 提取液,充分振荡使之混合,加入 100  $\mu$ L 10% SDS,300  $\mu$ L 氯化苄,剧烈振荡使之成乳状。50℃ 保温 1 h,每隔 10 min 振荡混匀 1 次。再加入 300  $\mu$ L NaAc(3 mol/L)混匀,冰浴 15 min,10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,加入等体积异丙醇,−20℃ 放置 1 h,10 000 r/min 离心 15 min。弃上清液,沉淀加 500  $\mu$ L 70% 乙醇洗涤,乙醇挥发完全后加入 200  $\mu$ L 灭菌超纯水重悬 DNA,−20℃ 保存备用<sup>[6-7]</sup>。

1.2.3 蜗牛酶法 DNA 提取 称取 100 mg 菌体加入 600  $\mu$ L 缓冲液①,600  $\mu$ L 蜗牛酶(50 mg/mL),37℃ 保温 1 h,3 000 r/min 离心 10 min,去上清液,加 800  $\mu$ L 缓冲液②,100  $\mu$ L 10% SDS,混匀,65℃ 水浴 30 min,再加 300 mL 5 mol/L NaAc,混匀,冰浴 1 h,10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液并加入 2~3 倍体积无水乙醇,混匀后静置 10 min,6 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,600  $\mu$ L 缓冲液③溶解沉淀,12 000 r/min 离心 15 min,转移上清液至一新管,加 2  $\mu$ L 50  $\mu$ g/ $\mu$ L RNase 溶液,37℃ 保温 30 min,再加入等体积 4℃ 预冷的异丙醇,混匀后−20℃ 沉淀 1 h,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀加 500  $\mu$ L 70% 乙醇洗涤<sup>[8]</sup>,以下步骤同 1.2.2 所述。

1.2.4 CTAB 法 DNA 提取 称取 100 mg 的菌体,加入 600  $\mu$ L 提取液和少许灭菌石英砂到无菌研钵,在无菌操作条件下研磨成糊状,转入到 1.5 mL 离心管中(尽可能转移完全),65℃ 水浴 30 min,再加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1)充分振荡混匀,4℃ 8 000 r/min 离心 5 min,收集上清液然后加入 10% 体积 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积的异丙醇,4℃ 10 000 r/min 离心 5 min,70% 乙醇洗涤沉淀<sup>[9]</sup>,以下步骤同 1.2.2。

1.2.5 SDS 法 DNA 提取 称取 100 mg 菌体加入 600  $\mu$ L 提取液和少许灭菌的石英砂,如上述方法步骤研磨,65℃ 水浴 30 min,迅速冰浴 5 min,加入 300  $\mu$ L Tris 饱和酚和 300  $\mu$ L 氯仿,于室温下放置 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液并加入等体积的氯仿 12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液然后加入 1/5 体积的 NaAc 和 3/5 体积的异丙醇,室温放置 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,70% 乙醇洗涤沉淀<sup>[10]</sup>,以下步骤同 1.2.2。

1.2.6 异硫氰酸胍法 DNA 提取 称取 100 mg 菌体,加入 500  $\mu$ L GTP 试剂,振荡混匀,65℃ 保温 30 min,轻微离心后加入 250  $\mu$ L 氯仿/异戊醇(24:1),室温放置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液然后加

入 500  $\mu$ L 异丙醇,−20℃ 放置 1 h,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 70% 乙醇洗涤<sup>[11]</sup>,以下步骤同 1.2.2。

1.2.7 DNA 纯度及浓度检测 UV-3802 型紫外分光光度计测定各种方法提取的 DNA 样品在 260、280、320 nm 波光下的吸光度,计算出  $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$  的值以及 DNA 浓度。每种方法做 3 个平行,取其平均值。总 DNA 用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.8 PCR 扩增及凝胶电泳检测 根据 GenBank (Accession Number, AF 047713) 中扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 的 polygalacturonase (POL) 基因序列<sup>[12]</sup>,该实验室利用 Primer 5.0 软件按照引物设计的一般原则设计 1 对特异性引物,正向引物 5'-CGCCAAGAA TACACCAACT-3',反向引物为 5'-TCCAAAGATAACGGACGAA-3',引物扩增片段大小为 288 bp。引物由 Takara 公司合成。PCR 反应体系(25  $\mu$ L)为:2.5  $\mu$ L 10×PCR 缓冲液,正反引物(10  $\mu$ mol/L)上下游各 0.4  $\mu$ L,3.5  $\mu$ L DNA 模板,2.0  $\mu$ L 底物 dNTPs(2.5 mmol/L),16  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,最后加入 0.2  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶。PCR 循环条件:94℃ 预热 5 min,94℃ 解链 1 min,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环,72℃ 延伸 10 min,4℃ 保温 10 min。凝胶电泳检测:将 PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳,并在凝胶成像仪上拍照进行比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养方式的选择

用氯化苄法分别提取固体培养,液体静置培养和液体振荡培养菌体的基因组 DNA,提取结果见表 1。 $A_{320}$  表示检测浑浊度,一般应比较小,有些接近于 0。纯 DNA  $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$  的值应该在 1.8~2.0,若太高(>2.0)表明可能有 RNA 存在,而低于 1.8 可能有酚或蛋白质的污染。在扩展青霉菌基因组 DNA 提取方面,无论是在静置还是振荡的液体培养方式下,所提 DNA 的质量均不如固体培养,因此,该试验选择固体培养的方式。

表 1 3 种培养方式下扩展青霉 DNA 的提取结果

培养方式	检测指标			
	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{320}$	$(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$
液体静置培养	2.795	2.666	0.050	1.048
液体振荡培养	2.833	2.223	0.009	1.274
固体培养	2.630	1.333	0.016	1.914

### 2.2 5 种 DNA 提取方法比较

对 5 种方法的操作特点做了比较,各方法主要优缺点见表 2。试验中发现,蜗牛酶法 DNA 提取成本高,操作时间长,倒管次数多,操作步骤繁琐,但整个 DNA 提取过程没有涉及到有害化学试剂的参与,试验相对较安全,且所用仪器设备相对简单,一般实验室可满足试验要求。相比之下,氯化苄法、CTAB 法和 SDS 法试验成本较低,操作时间和倒管次数较蜗牛酶法明显减少,但是氯化苄是一种有毒、易燃、致癌并具腐蚀性的有机溶剂,CTAB 和 SDS 均为有机去污剂,且操作

过程中还用到氯仿等危险有机溶剂,这对试验操作者和环境均构成了危害及潜在的污染。异硫氰酸胍是一种强烈的变性剂,该法成本相对偏高,操作复杂,不宜

选用。另外,CTAB 和 SDS 法用研磨的方法来破除细胞壁,在往离心管转移时会损失一部分菌体,而且可能会造成部分 DNA 条带的断裂。

表 2 5 种方法的比较

提取方法	方法优缺点比较					
	成本	操作时间/h	试剂危害性	仪器使用	操作步骤	倒管次数
氯化苄法	低	3.0	有毒可燃	相对复杂	繁琐	2
蜗牛酶法	高	5.5	无毒	简单	繁琐	5
CTAB 法	低	2.0	有毒	简易	简易	3
SDS 法	低	2.0	有毒	简易	简易	4
异硫氰酸胍法	较高	2.5	有毒	相对复杂	简易	2

## 2.3 5 种方法提取 DNA 纯度及浓度比较

使用氯化苄法、蜗牛酶法、CTAB 法、SDS 法、异硫氰酸胍法提取 100 mg 干菌体的总 DNA,紫外吸收光谱检测结果见表 3。氯化苄法所提 DNA 纯度以及浓度均为最高,能满足 DNA 提取的要求;蜗牛酶法所提 DNA 纯度较好但是浓度偏低,可能对 PCR 快速检测时有一定的影响;CTAB、SDS 法和异硫氰酸胍法所提扩展青霉 DNA 的量比氯化苄法的量要少的多,比蜗牛酶法所提 DNA 量大,但 DNA 纯度较低,有可能对 PCR 扩增时的结果造成较大影响。按照该试验所用紫外分光光度计使用手册给出计算公式:DNA 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) =  $(A_{260} - A_{320}) \times f_1 - (A_{280} - A_{320}) \times f_2$ ,其中计算因子  $f_1 = 62.9$ ,  $f_2 = 36.0$ 。

表 3 5 种方法提取扩展青霉 DNA 的结果

提取方法	检测指标				质量浓度 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{320}$	$(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$	
氯化苄法	2.311	1.215	0.016	1.914	101.180
蜗牛酶法	0.754	0.509	0.201	1.794	23.714
CTAB 法	2.883	2.792	1.218	1.058	48.065
SDS 法	3.732	3.538	0.977	1.075	81.052
异硫氰酸胍法	3.099	2.741	0.355	1.150	86.711

## 2.4 电泳检测所提 DNA 结果

由图 1 可知,5 种方法所提扩展青霉菌基因组 DNA 均在 23 kb 左右有明显条带,条带亮度除了异硫氰酸胍法稍弱以外,其它 4 种方法所提总 DNA 的电泳条带均明亮,这和表 2 中 DNA 浓度的测定结果一致,说明这 5 种方法均能提取出扩展青霉菌基因组 DNA, DNA 片段分子量大约在 23 kb。

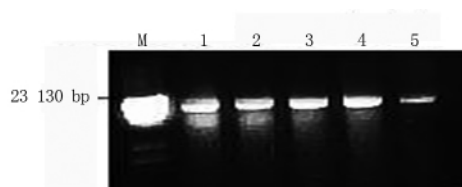


图 1 扩展青霉总 DNA 电泳

注: M: 标准 DNA Marker  $\lambda$ -Hind III digest; 1: 氯化苄法; 2: 蜗牛酶法; 3: CTAB 法; 4: SDS 法; 5: 异硫氰酸胍法。

## 2.5 PCR 扩增结果

用设计的 PCR 引物扩增 5 种方法所提扩展青霉 DNA,氯化苄法、蜗牛酶法、异硫氰酸胍法所提 DNA 都

得到了很好扩增,目的条带亮度很好,说明这 3 种提取方法都能很好满足 PCR 扩增的要求,但 CTAB 法和 SDS 法扩增条带明显要差,特别是 SDS 法,几乎看不到扩增条带,和表 2 相比较,这 2 种方法所提 DNA 的浓度还比较高,但  $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$  值只有 1,远低于 1.8,说明这 2 种方法所提 DNA 的质量较差,含有较多的杂质,进行 PCR 扩增时会对扩增有较大影响。

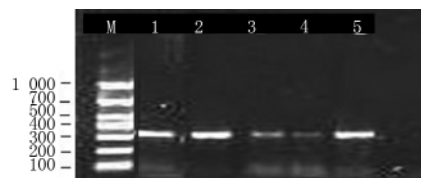


图 2 5 种方法提 DNA 的 PCR 产物电泳图

注: M: Marker DL-1 000; 1: 氯化苄法; 2: 蜗牛酶法; 3: CTAB 法; 4: SDS 法; 5: 异硫氰酸胍法。

## 2.6 灵敏性检测结果

对氯化苄法所提 DNA 进行梯度稀释后再进行 PCR 扩增,由图 3 可看出,在  $10^{-3}$  倍稀释时扩增条带明显变暗,  $10^{-4}$  倍稀释时已看不到目的条带的存在,说明菌液稀释的检测限大约为  $10^{-3}$ 。经测定得知,原始菌液提取的 DNA 质量浓度约为  $101.18 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,故在该试验条件下, DNA 质量浓度的检测限约为  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

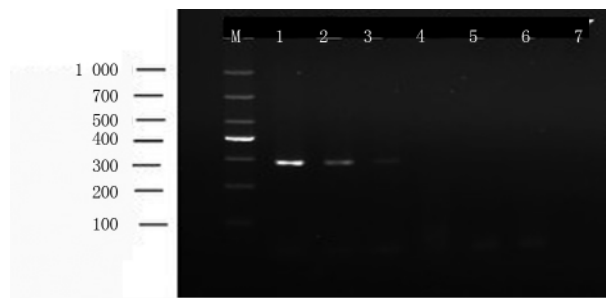


图 3 DNA 梯度稀释进行 PCR 扩增的结果

注: M: Marker DL-1 000; 1~7 分别是:  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  稀释液,空白对照。

## 3 讨论与结论

随着分子生物学的发展,近年来关于真菌 DNA 提取方法的研究也有不少报道,但是基于真菌细胞结

构的多样性和复杂性,同一种方法对不同的种属的菌体或者不同的方法对同一种属的菌体,所提 DNA 的浓度和纯度都会存在很大差别,在该研究中,用不同的方法提取扩展青霉 DNA,结果的重复性较差。

氯化苄法的原理是利用细胞壁的 N-乙酰基葡萄糖胺的糖链上含有大量的羟基这一特点<sup>[13]</sup>,在碱性条件下氯化苄可以与细胞壁多糖包括纤维素和半纤维素的羟基作用,反应式为:  $\text{ROH} + \text{PhCH}_2\text{Cl} + \text{NaOH} \rightarrow \text{PhCH}_2\text{OR} + \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$ ,从而破坏细胞壁而使得细胞内 DNA 释放出来,条件较温和,对其产生很小的机械撕裂作用<sup>[14]</sup>。因为氯化苄与苯酚极性相近,因此有抽提蛋白的作用,并能抽提水相中其它细胞残存物<sup>[15]</sup>,破壁抽提合二为一,简化了步骤而且所提 DNA 浓度及质量均较高,亦满足 PCR 扩增。

蜗牛酶法是一种温和无害的生物方法,但所提 DNA 浓度偏低,可能是原生质体形成的过程中细胞释放了 DNA 酶降解所提 DNA。异硫氰酸胍能够破坏植物和真菌的细胞壁,已广泛的被应用于许多微生物的 DNA 和 RNA 的提取,但是在试验中发现虽能够提取 DNA 并得到清晰的扩增条带,但在试验过程中其重复性很低。通过该研究综合比较 5 种方法,氯化苄是最适合于扩展青霉菌基因组 DNA 的提取方法,所提 DNA 浓度高、纯度好、结果稳定,是理想的扩展青霉菌基因组 DNA 的提取方法,用于 PCR 扩增可以获得良好的结果。通过灵敏性试验得到该方法的最低检测限大约为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 参考文献

[1] Niessen L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin

producing fungi [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119: 38-46.

[2] 蒋雄图,虞左向. 棒曲霉素[J]. 无锡轻工业学院学报, 1989, 8(2): 73-84.

[3] 张宁,王凤山. DNA 提取方法进展[J]. 中国海洋药物, 2004(2): 40-46.

[4] Zhang Y J, Zhang S, Liu X Z, et al. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungi strains [J]. Applied Microbiology, 2010, 51: 114-118.

[5] Haugland R A, Heckman J L, Wymer L J. Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 37: 165-176.

[6] 张莉莉,张琴花,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): 36-39.

[7] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(22): 5279-5280.

[8] 昂莎莎,英荣,卢伟. 白腐真菌总 DNA 提取方法的研究[J]. 生物学杂志, 2009, 9(4): 82-85.

[9] 陈锋菊,李百元,杨冰,等. 一种经济快速提取丝状真菌基因组 DNA 的方法[J]. 生命科学研究, 2010, 4(2): 122-125.

[10] 唐良华,苏敏,郑丹华,等. 食用菌总 DNA 提取方法的研究[J]. 福建轻纺, 2006(1): 1-4.

[11] 李晓红,陈世义,钟淑霞,等. 研磨-CTAB 法与碱性异硫氰酸胍沸騰法提取真菌 DNA 的比较分析[J]. 中国实验诊断学, 2005, 9(3): 364-365.

[12] Mark P, Annamalai T, Kumar V. Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 89: 39-144.

[13] 邹先彪,廖万清,温海,等. 新生隐球菌基因组 DNA 不同抽提方法的比较[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(2): 109-112.

[14] 刘建利. 氯化苄法提取植物内生放线菌基因组 DNA [J]. 北方园艺, 2010(13): 124-126.

[15] 钟玲,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.

## Comparison of Five Different Methods for Extracting Genomic DNA from *Penicillium expansum*

LI Ya-fei, HE Hong-ju, LV Qian, FAN Ming-tao

(College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** The aim was to compare DNA extraction methods and find one that was suitable for genomic DNA extraction from *Penicillium expansum*. The effect of extraction in the three culture ways including the solid, liquid stalling and liquid oscillation was compared. Genomic DNA were extracted using five methods including benzyl chloride, snail enzyme, SDS, CTAB, guanidinium isothiocyanate. The effects of the different extraction methods were evaluated through the quality determination and PCR analysis which was based on conservative sequence of the polygalacturonase gene of the *Penicillium expansum* to amplify a length of 288 bp, testing its sensitivity. The results showed that solid cultivation approach was suitable for the extraction of genomic DNA from *Penicillium expansum*, all five extraction methods could extract the genomic DNA to amplify the target DNA, of which benzyl chloride and snail enzyme methods were good with snail enzyme being a little less DNA. Therefore, the benzyl chloride method was the best choice to extract DNA from *Penicillium expansum* with high concentration and purity to carry out specific PCR, and the limit of detecting DNA was 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Key words:** *Penicillium expansum*; DNA extraction; benzyl chloride method; snail enzyme method; SDS method; CTAB method; guanidinium isothiocyanate method