

一种快速提取三孢布拉霉基因组的方法

董雪田¹, 朱恺丽¹, 曲音波², 杨培龙³, 余晓斌¹, 罗玮^{*1}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237; 3. 农业农村部 饲料生物技术重点实验室/中国农业科学院 饲料研究所, 北京 100081)

摘要: 三孢布拉霉负菌是一种重要的 β -胡萝卜素和番茄红素工业生产菌株, 由于其基因组提取耗时费力, 转化子筛选困难, 基因编辑工作严重受阻。作者比较了煮沸法、添加 NaOH 煮沸法、复合酶液(2 g/dL 溶壁酶+3 g/dL 纤维素酶+3 g/dL 蜗牛酶)酶解法、复合酶液酶解后煮沸法等 4 种处理方法的效应, 发现 NaOH 为影响三孢布拉霉基因组释放的关键因素; 对 NaOH 浓度、煮沸时间及基因组源的选择(上清液或处理后的菌苔)进行了优化, 当 NaOH 浓度不低于 20 mmol/L 时, 所处理样品的上清液均可扩增出目的基因, 煮沸时间对基因组的释放无影响; 不同浓度 NaOH 处理条件下基因组的稳定性实验表明, 在所测时间(最长至 108 h)内, 基因组质量浓度(150~350 ng/ μ L)与纯度(OD_{260}/OD_{280} 1.8~2.0)均较高, 且随时间的延长无明显下降趋势; 以快速提取法与常规提取法获得的基因组为模板进行 PCR, 两种方法扩增结果无明显差异, 后续对 PCR 产物的测序与酶切实验证明了 NaOH 处理不会对后续实验产生影响; 最后, 从扩增同一菌株不同基因和不同丝状真菌 ITS 两个方面确定了基因组快速提取方法具有一定的普适性。

关键词: 基因组提取; 快速法; NaOH; 三孢布拉霉

中图分类号: Q 781 文章编号: 1673-1689(2021)10-0063-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.10.009

Rapid Method of Genome Extraction of *Blakeslea trispora*

DONG Xuétian¹, ZHU Kaili¹, QU Yinbo², YANG Peilong³, YU Xiaobin¹, LUO Wei^{*1}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China; 3. Key Laboratory of Feed Biotechnology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of People's Republic of China/Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: *Blakeslea trispora* (-) strain is a very important industrial strain producing β -carotene and lycopene. The genome extraction of *Blakeslea trispora* (-) is time-consuming and laborious, which brings difficulties to the transformants selection and genome edition. Four different lawn pretreatment methods were compared, boiling, boiling with NaOH, enzymolysis with mixed enzymes (2 g/dL lysozyme, 3 g/dL cellulose and 3 g/dL snailase), boiling after enzymolysis with mixed enzymes. The result showed that NaOH was the most prominent factor in the genome releasing process. The optimization was carried out including the NaOH concentration, the boiling time and

收稿日期: 2020-12-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(21878123); 微生物技术国家重点实验室开放课题(M2020-06); 农业农村部饲料生物技术重点实验室开放课题(KLFB-FRI-202001)。

* 通信作者: 罗玮(1981—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物代谢工程和发酵工程方面的研究。

E-mail: wluo@jiangnan.edu.cn

the genome source (the supernatant or the pretreated lawn). The results showed that if the concentration of NaOH was not lower than 20 mmol/L, the target gene could be well exemplified with the supernatant as the genome source, and the boiling time did not play an important role in the process of genome releasing. The stability test of genome under different NaOH concentration showed that the genome concentration (150~350 ng/ μ L) and the purity (OD_{260}/OD_{280} 1.8~2.0) were both high during the whole testing period (up to 108 h), and there was no obvious decline with the time. There was no prominent difference between the PCR results with the genome extracted by the rapid method and the traditional method as the template. The subsequent sequencing and restriction enzyme digestion of PCR products showed that NaOH treatment had no effect on the following experiments. Finally, it was confirmed that the rapid genomic extraction method had certain universality from two aspects of amplifying different genes and different filamentous fungi ITS of the same strain.

Keywords: genome extraction, the rapid method, NaOH, *Blakeslea trispora*

番茄红素和 β -胡萝卜素具有很强的抗氧化能力,具有提高免疫力、减少细胞或组织损伤、预防多种癌症及心血管疾病、降低血清胆固醇、预防白内障等功效,近年来被广泛应用于食品、药品、保健品和动物饲料等行业^[1]。三孢布拉霉属于异宗接合菌,高产类胡萝卜素,且不需要特殊的生长条件,是一种理想的 β -胡萝卜素和番茄红素工业生产菌株^[1-4],是工业上用于生产食品级 β -胡萝卜素和番茄红素的主要微生物^[4],具有重要的经济价值。由于传统诱变选育方法存在盲目性和低效性,利用系统代谢工程和合成生物学方法进行高产菌株的选育已经成为一个重要的研究方向。由于丝状真菌细胞壁厚,对其基因组提取存在诸多问题,如方法烦琐、耗时费力,阻碍了后续基因工程和代谢工程的操作。目前常用的丝状真菌基因组提取方法有CTAB法^[5]、氯化苜法^[6-8]、液氮研磨法^[9-11]等,这些方法普遍存在耗时长、过程烦琐、添加有毒试剂等问题,后来发展起来的一些改进的方法,如改进的CTAB法^[8,12-13],操作安全性较高、简便性较强、DNA纯度也进一步提高;除此以外也发展了一些新的方法,如微波法^[8,14]、冻融法^[15]、试剂盒法^[16]等,分别在经济性、安全性或简便性方面有所改进,但依然要经过抽提、沉淀、洗涤、溶解等4步的重复,耗费时间依然不少于2h,再加上种子液的培养,使得整个周期也很长,且操作过程中还会用到一些毒性较大的试剂。

ITS为真菌rDNA中18S rDNA、5.8S rDNA和28S rDNA基因间隔序列,其长度和序列变化较大,常用于真菌菌种鉴定^[17-19]; *wc-1a*和*wc-1b*^[20]为三孢

布拉霉中的两个光受体基因;*crgA*^[21]为三孢布拉霉中的一种与类胡萝卜素合成调控相关的负调控因子编码基因;*carB*^[22]为八氢番茄红素脱氢酶编码基因。首先筛选出了影响三孢布拉霉基因组释放的主要因素NaOH,然后对NaOH浓度、煮沸时间及基因组来源(上清液或处理后的菌苔)进行了优化,而后又对所提取基因组的稳定性以及对后续测序、酶切等实验的影响进行了验证,最后,从三孢布拉霉的其他基因和其他丝状真菌ITS序列两个方面进行了基因组快速提取法普适性的分析,确定了一种对多种丝状真菌具有较好适用性的基因组快速提取方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 接合菌纲的三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)负菌NRRL2896、卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)MU 244,丝孢纲的产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)和土曲霉(*Aspergillus terreus*)、半知菌纲的塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensi*)及散囊菌纲的亮白曲霉(*Aspergillus candidus*):作者所在实验室保藏。

1.1.2 引物 本研究所用引物见表1。

1.1.3 培养基

1) PDA:去皮土豆200 g/L,葡萄糖20 g/L,琼脂粉20 g/L;pH自然。

2) 种子液:玉米粉30 g/L,黄豆粉50 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L;pH 6.5。

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')	大小/bp
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	500~750*
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>wc-1a-F</i>	ATGTCTCAGCAATATCAGCAAC	2 286
<i>wc-1a-R</i>	TTACTACTGTGACAGAGCAATTTTC	
<i>wc-1b-F</i>	ATGGATCCCTTCAATCGTTC	2 456
<i>wc-1b-R</i>	TTATGATTGTTGAGTGGCTAAAAGT	
<i>crgA-F</i>	GTGCAAAGCATACAACAACATAAAC	1 836
<i>crgA-R</i>	TTAAGAAATGCAACAAGTAAACAGGT	
<i>carB-F</i>	ATGTCTGATCAAAAGAAGCATATTG	1 958
<i>carB-R</i>	TTAAATGCCAATATCGTTGCTG	

注:*不同物种的ITS大小不完全相同。

1.1.4 试剂及试剂盒 NaCl、NaOH、葡萄糖、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 购于国药集团化学试剂有限公司; 2×Rapid Taq Master Mix: 购于南京诺唯赞生物科技有限公司; QuickCut *KpnI*: 购于宝日医生物技术(北京)有限公司; 溶菌酶、蜗牛酶和纤维素酶: 购于北京索莱宝生物科技有限公司; 液氮: 购于无锡市太湖气体有限公司; 快速DNA产物纯化试剂盒、植物基因组DNA提取试剂盒、50×Tris-乙酸缓冲液: 购于康为世纪生物科技有限公司; 琼脂糖: 购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 琼脂粉: 购于大连美仑生物技术有限公司; 土豆、玉米粉、黄豆粉: 购于本地超市。

1.2 方法

1.2.1 影响三孢布拉霉基因组提取效果关键因素的筛选 选择煮沸30 min、加20 mmol/L NaOH煮沸30 min、稳渗液(0.6 mol/L NaCl)配制的复合酶液(2 g/dL 溶壁酶+3 g/dL 纤维素酶+3 g/dL 蜗牛酶)^[21]酶解30 min、复合酶液酶解30 min后煮沸30 min等4种方法处理 *B.trispora* NRRL2896 菌苔,以处理后的菌苔为基因组源,对 *crgA* 进行PCR扩增,扩增引物(*crgA-F*和*crgA-R*)序列见表1。PCR反应体系和程序见表2~3。

表 2 2×Rapid Taq Master Mix PCR 体系

Table 2 PCR components of 2×Rapid Taq Master Mix

组分	添加量
2×Rapid Taq Master Mix	10 μL
引物(10 μmol/L)	0.8 μL
模板	40~400 ng
ddH ₂ O	补充至 20 μL

表 3 2×Rapid Taq Master Mix PCR 程序

Table 3 PCR protocol of 2×Rapid Taq Master Mix

温度/℃	时间
95	3 min
95	15 s
52	15 s
72	15 s
72	5 min

注:本表中退火温度与延伸时间以ITS为例。其他基因的退火温度为 T_m-5 , T_m 为引物解链温度,延伸时间根据基因长度而定,延伸速度为15 s/kb,步骤2~4重复35个循环。

1.2.2 NaOH 浓度、煮沸时间及基因组源对基因组提取效果的影响 选择不同的NaOH浓度、不同的煮沸时间和不同的基因组源(处理后的菌苔或上清液)对btITS进行PCR扩增,扩增引物(ITS1和ITS4)序列见表1,PCR体系和程序见1.2.1,PCR结束后进行琼脂糖凝胶电泳验证。

1.2.3 提取的基因组稳定性测定 撕取约25 mm²的三孢布拉霉NRRL2896菌苔于50 μL浓度为20、30、40、50 mmol/L NaOH中,6℃或25℃静置,分别于不同时间点取样,测dsDNA质量浓度及纯度,并用Origin8.0绘制质量浓度变化曲线;取25℃静置60 h的样品上清液,扩增btITS,并通过琼脂糖凝胶电泳验证;分别以NaOH处理菌苔所提取基因组与试剂盒提取的基因组为模板进行PCR扩增,并通过琼脂糖凝胶电泳验证。

1.2.4 NaOH 处理对后续测序、酶切等实验的影响 取约25 mm²菌苔于50 μL浓度为40 mmol/L NaOH中,静置10 min,取上清液为基因组源,PCR扩增btITS,用快速DNA产物纯化试剂盒纯化,取少量送金唯智测序,根据测序结果进行酶切位点分析,选具有单酶切位点的限制性内切酶进行酶切,琼脂糖凝胶电泳验证,酶切体系见表4。

表 4 酶切体系

Table 4 Components of QuickCut *KpnI* digestion

组分	添加量
10×QuickCut (Green) Buffer	1~3 μL
DNA	≤0.2 μg
QuickCut <i>KpnI</i>	1 μL
ddH ₂ O	补充至 10~30 μL

1.2.5 基因组快速提取法普适性分析 从扩增同一菌株的不同基因和不同菌株的ITS两个方面进行基因组快速提取法普适性分析。

1) 同一菌株不同基因 取约 25 mm² 三孢布拉霉菌苔于 50 μL 浓度为 40 mmol/L NaOH 中, 静置 10 min, 取上清液为基因组源扩增光受体基因 *wc-1a*、*wc-1b*、类胡萝卜素合成负调控因子编码基因 *crgA* 和八氢番茄红素脱氢酶编码基因 *carB*, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳验证。

2) 不同菌株 ITS 取少量卷枝毛霉、产黄青霉、烟曲霉、塔宾曲霉、亮白曲霉和土曲霉菌苔或菌丝体, 浸于 50 μL 浓度为 40 mmol/L NaOH 中, 静置 10 min, 取上清液为基因组源, 扩增 ITS, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳验证。

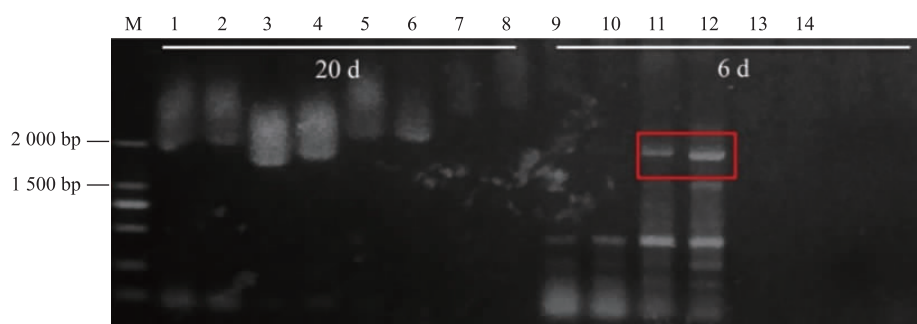
1.2.6 数理统计 所有实验均重复 3 次, 采用 SPSS 20.0 进行数理统计分析, 结果以平均值±标准偏差表示。

2 结果与讨论

2.1 影响三孢布拉霉基因组提取的关键因素

选择不同方法对三孢布拉霉菌苔进行处理, 以处理后的菌苔为基因组源直接添加到 PCR 反应体系中去扩增 *crgA*, 利用琼脂糖凝胶电泳进行分析, 结果见图 1。采用添加 20 mmol/L NaOH 煮沸 30 min 的方法处理菌苔, 可扩增出条带清晰的 *crgA*, 但扩增产物中存在杂带, 仍需对处理条件进行进一步优

化。以直接煮沸处理后的菌苔为基因组源进行 PCR, 未扩增出目的条带, 可能是由于真菌细胞壁厚, 单纯的热裂解无法暴露基因组 DNA^[23]。酶解法也是常用的菌丝或菌苔处理方法之一, 以酶解处理后的菌苔为模板进行 PCR, 未扩增出目的条带, 可能是由于酶解时间较短, 酶解效果不够好, 未释放出足够的基因组。考虑到先酶解制备原生质体再提取基因组所需时间较长^[6], 且酶较昂贵, 不同真菌对酶的种类和菌龄要求均较高^[12,14], 因此不再对酶解法进行进一步研究。三孢布拉霉菌龄对基因提取效果也存在一定影响, 平板培养 5~6 d 的菌苔释放效果较好, 培养时间过长(20 d)释放效果明显变差。张晓利等^[23]报道真菌细胞壁组分在不同生长阶段有明显不同, 在生长早期, 只有几丁质层和蛋白质层两层, 而成熟期则由几丁质层、蛋白质层、葡聚糖蛋白层和质层葡聚糖层 4 层构成, 因此用成熟菌丝体扩增出基因的难度较大。但本研究获得的菌龄较长的菌苔经各种条件处理后, 作为基因组源进行 PCR 扩增, 均得到了弥散的条带, 可能是由于培养时间过长导致大量菌体老化甚至死亡, 细胞壁结构不完整, 基因组易于释放至外界环境, 且基因组也发生了部分降解, 因而各种处理条件下均可获得 PCR 产物, 但均存在严重的弥散现象。



M: DL2000 DNA marker; 1~2, 9~10: 煮沸 30 min; 3~4, 11~12: 在 20 mmol/L NaOH 中煮沸 30 min; 5~6, 13~14: 稳渗液配制的混合酶液(2 g/dL 溶壁酶+3 g/dL 纤维素酶+3 g/dL 蜗牛酶)酶解 30 min; 7~8, 15~16: 混合酶液酶解 30 min 后煮沸 30 min; 1~8 和 9~16 的差异为菌龄不同, 1~8 的菌苔培养时间约 20 d, 而 9~16 的培养时间为 6 d。

图 1 影响三孢布拉霉基因组提取关键因素的筛选

Fig. 1 Screening of key factors affecting the release of *Blakeslea trispora* genome

2.2 基因组提取所需的最适 NaOH 浓度、煮沸时间及基因组源的确定

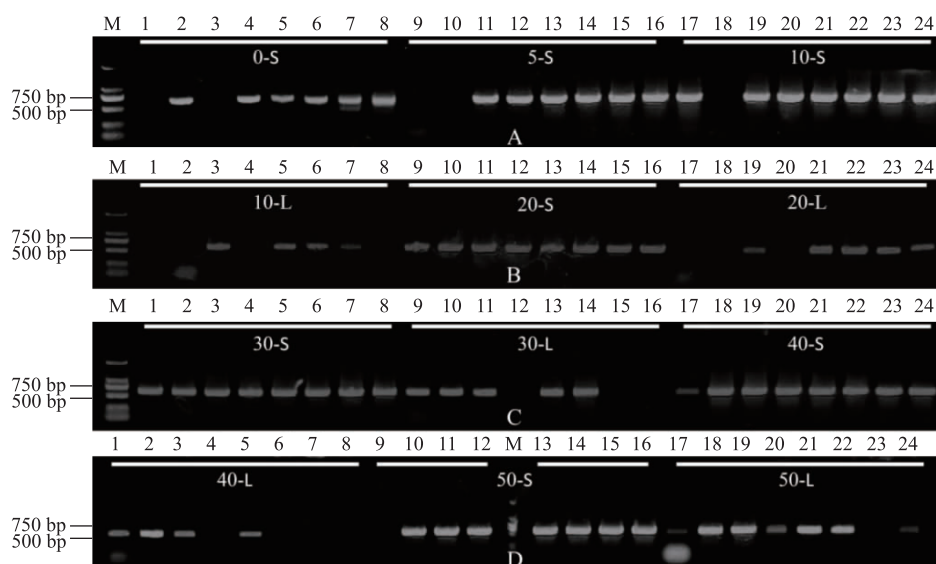
一般进行细菌菌落 PCR 时, 直接挑取菌落作为基因组源, 部分革兰氏阳性菌无法直接进行菌落 PCR, 需要通过煮沸或冻融法进行破壁处理后, 离心取上清液后进行 PCR 扩增。丝状真菌基因组提取大

多将基因组提取纯化^[12-14], 无须考虑基因组源的选择。张晓利等^[23]通过冻融法对 19 种丝状真菌进行破壁处理后, 离心取上清液作为基因组源进行 PCR。杜克久等^[24]取孢子制成孢子悬液, 以孢子悬液为基因组源进行 PCR。作者用 20 mmol/L NaOH 煮沸处理菌苔后, 菌苔仍为固态, 并未溶于 NaOH 溶液, 此

时,菌苔中的基因组是否释放到上清液中,基因组源该如何选择,也需要进一步确定。

以 20 mmol/L NaOH 处理菌苔 10 min,以处理后的菌苔为基因组源扩增 *crgA* 后虽有目的条带,但杂带明显,菌苔处理条件需进行优化。作者对煮沸时间、NaOH 浓度及基因组源的选择(上清液或处理后的菌苔)进行了优化。向不同离心管中分别加入 50 μ L 不同浓度的 NaOH 溶液,取约 25 mm² 菌苔于离心管,煮沸不同的时间后,分别取上清液和处理后的菌苔为基因组源,扩增 *btITS*,结果见图 2。当 NaOH 浓度为 0、5、10 mmol/L 时,并非所有条件均可扩增出 *btITS*,可能是由于 NaOH 浓度较低(低于 20 mmol/L)时,对菌丝体的裂解不充分。此外,是否扩增出目的条带与煮沸时间无正相关;当 NaOH 浓度达到 20 mmol/L 后,以上清液为基因组源,均可扩

增出 *btITS*。而以处理后的菌苔为基因组源,仅部分样品能扩增出 *btITS*,可能是由于 20 mmol/L 以上的 NaOH 溶液处理菌苔后,均可释放一定量的基因组到体系中,因而在 PCR 过程中,取体系中的上清液为基因组源,均可扩增出目的条带;而以处理过的菌苔为基因组源时,菌苔中剩余未释放的基因组由于暴露于 PCR 体系中导致不稳定,使得 PCR 体系中其他组分与菌苔中基因组的接触受阻,因而有时无法扩增出目的条带。此外,当 NaOH 浓度到达 20 mmol/L 时,以各种煮沸条件处理菌苔后的上清液为基因组源,均可扩增出目的条带,即扩增效果与煮沸时间同样无正相关。添加 20~40 mmol/L NaOH 煮沸 0 min 时也可扩增出目的条带,可能是由于将菌苔浸入 NaOH 后到吸取上清液的片刻,部分细胞壁裂解,释放出基因组。



M: DL2000 DNA Marker; 0、5、10、20、30、40、50: 不同浓度的 NaOH (mmol/L); S 或 L: 以上清液或菌苔为基因组源; 每一组泳道上的数字 (1~8, 9~16 和 17~24 各代表一组): 依次代表不同煮沸时间 (依次为 0、10、20、30、40、50、60、90 min)。

图 2 最适 NaOH 浓度、煮沸时间及基因组源的确定

Fig. 2 Determination of the optimal concentration of NaOH and the time of boiling and the source of genome

2.3 提取的基因组稳定性分析

将菌苔静置于 NaOH 溶液中片刻,即可成功提取出基因组,但高质量浓度 NaOH 会使 DNA 降解,无法确定 20~50 mmol/L NaOH 较长时间存在时是否会对基因组稳定性产生影响。作者通过测定不同时间 DNA 质量浓度与纯度以及 PCR 扩增目的基因,并通过琼脂糖凝胶电泳观察其条带的完整性来

确定基因组的稳定性。

分别取约 25 mm² 菌苔于 20~50 mmol/L NaOH 中,6 $^{\circ}$ C 静置,并于不同时间点取样测 DNA 质量浓度与纯度,绘制质量浓度变化曲线,见图 3(a)。当静置 108 h 后, DNA 质量浓度依旧没有明显的下降趋势,纯度也较高 (OD_{260}/OD_{280} 1.8~2.0),可能与温度较低有关。取约 25 mm² 菌苔于 20~50 mmol/L NaOH

中, 25 °C 静置 60 h 取样, 绘制质量浓度变化曲线, 见图 3(b)。60 h 时, 质量浓度依然没有下降趋势。根据 DNA 质量浓度变化曲线, 将菌苔浸入 20~50 mmol/L NaOH 后, DNA 质量浓度迅速上升, 并在约 5 min 后上升速度减慢, 10~15 min 后 DNA 质量浓度达到最高值。曲线中 DNA 质量浓度高低与所用 NaOH 浓度并非正相关, 可能是撕取的菌苔面积大小不同, 但 DNA 质量浓度均在 150~350 ng/μL, 完全满足 PCR 扩增的要求。

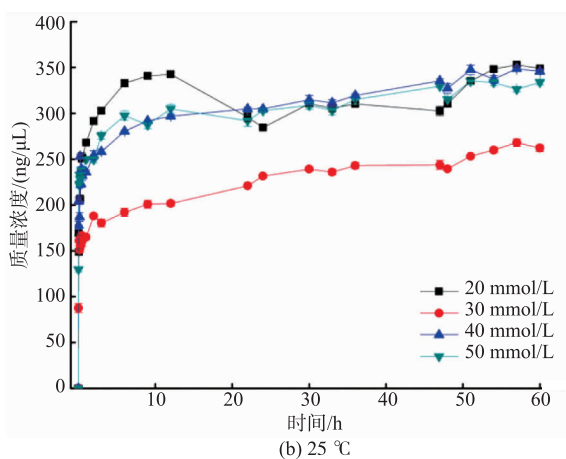
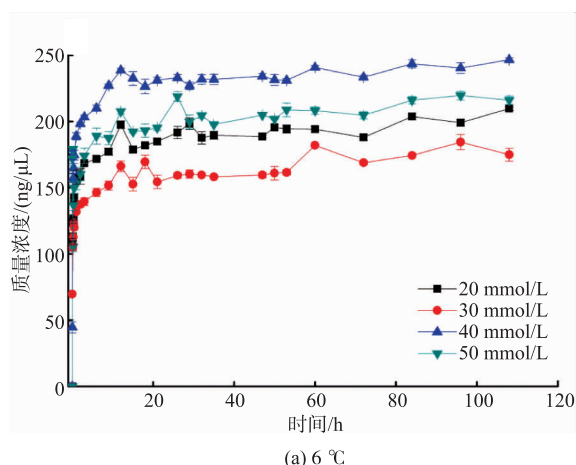


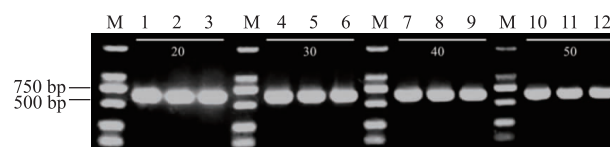
图 3 不同温度下 DNA 质量浓度变化

Fig. 3 Changing of DNA concentration at different temperature

取 25 °C 静置 60 h 的上清液为基因组源, PCR 扩增 btITS, 琼脂糖凝胶电泳验证, 见图 4。结果表明, 全部都能扩增出目的条带, 条带清晰, 无杂带。因此, 至少在 25 °C 静置 60 h 或 6 °C 静置 108 h 后, 基因组仍可以稳定存在。

大多数丝状真菌基因组提取方法都将基因组

分离纯化, 因而稳定性较好, 有的甚至可在 4 °C 存放 6 个月^[12], 但 these 方法操作烦琐, 耗时长, 有的还需要进行一些特殊处理或使用昂贵试剂, 甚至存在一定的危险性。因此, 根据实验的需求, 可对基因组稳定性与操作简便性、安全性和经济性等进行一定的取舍。当进行大批量转化子筛选或进行菌种鉴定时, 所提取基因组的长期稳定性对实验并无太大影响, 而简便性、安全性和经济性相对更为重要。因此, 本研究仅进行了较短时期的基因稳定性研究, 未进行更长时间的稳定性测定。



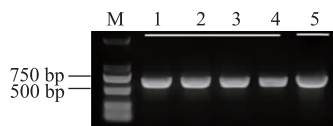
M; DL2000 DNA Marker; 1~3: 20 mmol/L NaOH; 4~6: 30 mmol/L NaOH; 7~9: 40 mmol/L NaOH; 10~12: 50 mmol/L NaOH。

图 4 以 NaOH 溶液中 25 °C 静置 60 h 处理的上清液为基因组源扩增的 btITS

Fig. 4 btITS exemplified by the genome source that stand in NaOH solutions at 25 °C for 60 h

2.4 NaOH 处理对基因组完整性的影响

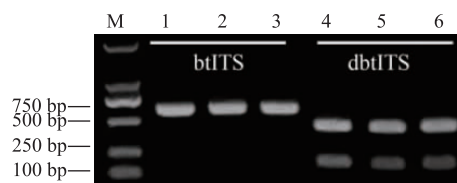
NaOH 处理菌苔后, 不影响 PCR 的扩增效果。为进一步确定 NaOH 对测序及酶切等实验的影响, 分别以 NaOH 裂解提取的基因组和传统液氮研磨后试剂盒提取的基因组为模板, 扩增 btITS 并测序, 两种方法无明显差异, 且不影响测序, 见图 5。周礼红^[12]对提取的基因组 DNA 进行酶解, 得到较为均一的完全酶解带, 证明该方法提取的基因组 DNA 不存在影响酶切的干扰因子, 但由于基因组上酶切位点数量很大, 该方法无法识别具体的序列变化, 因此对特定序列进行酶切更具说服力。根据测序结果对三孢布拉霉 btITS 进行限制性内切酶酶切位点分析, 选择具有单靶点的 *KpnI* 对纯化的 PCR 产物进行酶切, 酶切效果良好, 见图 6。说明 NaOH 处理未对后续实验产生影响, 可能是由于 NaOH 处理菌苔后, 体系 pH 较原 NaOH 溶液已有所降低 (已通过 pH 试纸检测验证), 而加入 PCR 体系中的模板量较少, NaOH 浓度再次稀释 50 倍, 且后续实验中又经过了纯化等步骤, NaOH 被去除或再次稀释, 因而未对基因完整性造成影响。



M:DL2000 DNA Marker; 1~4:以快速法提取的基因组为模板扩增的 btITS; 5: 以传统方法提取的基因组为模板扩增的 btITS。

图 5 以不同方法提取的基因组为模板扩增的btITS

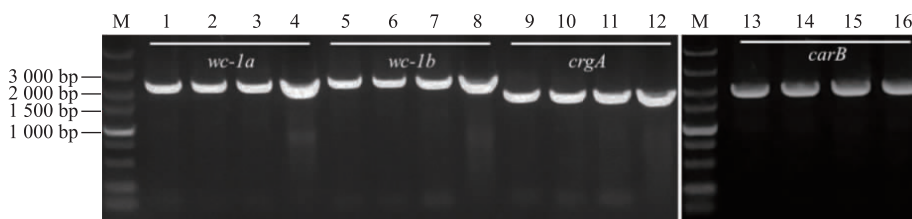
Fig. 5 Amplification of btITS with genome extracted by different methods



M:DL2000 DNA Marker;1~3:btITS PCR 产物 ;4~6:btITS 的 KpnI 酶切产物

图 6 btITSPCR 产物和酶切产物

Fig. 6 PCR product and the digestion product of btITS



M:DL5000 DNA Marker;1~4:wc-1a;5~8:wc-1b;9~12:crgA;13~16:carB。

图 7 以快速法提取的基因组为模板扩增的 wc-1a、wc-1b、crgA 和 carB

Fig. 7 Amplification of wc-1a,wc-1b,crgA and carB by template extracted by the rapid method

2.5.2 对不同菌株的普适性 传统的以及一些改进的丝状真菌基因组提取方法^[13-14,23]均存在着一定的普适性,为确定本研究方法对其他丝状真菌是否存在适用性,选取另外 6 种丝状真菌进一步研究。用 40 mmol/L NaOH 处理卷枝毛霉、产黄青霉、烟曲霉、塔宾曲霉、亮白曲霉和土曲霉 10 min,取上清液扩增 ITS,卷枝毛霉、产黄青霉、烟曲霉和土曲霉阳性率均为 100%,但塔宾曲霉和亮白曲霉扩增阳性率较低,见图 8。可能该 NaOH 浓度和处理时间并非其最适条件,从以上结果可知,NaOH 处理法具有一定的普适性,但具体处理条件(NaOH 浓度和静

2.5 方法普适性分析

该方法简便快速,具有其独特的优势,但能否在各种丝状真菌中广泛应用,还需进一步确定。后续实验中选择在 50 μL 浓度为 40 mmol/L NaOH 中静置 10 min 作为菌苔或菌丝体处理条件。

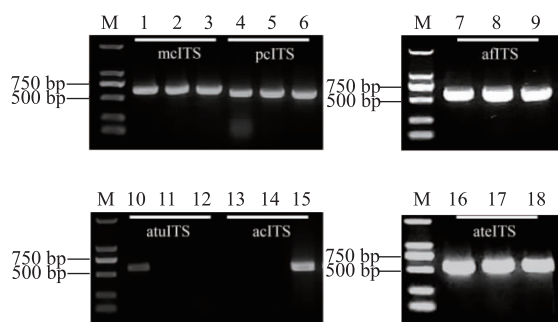
2.5.1 对同一菌株不同基因的普适性 ITS 区存在于各种真核生物中,为最常用的验证基因,大多研究仅通过这些序列进行验证分析,但 ITS 区较短,无法检测 DNA 模板的完整性^[23],因此,对方法的适用性的确定,还需要通过更多的基因进行进一步的验证。曾东方等^[19]利用随机引物进行 PCR,获得 DNA 指纹图谱,但由于缺少对照,无法判断图谱的完整性及重复性。本研究中,通过扩增三孢布拉霉中其他 4 种序列较长的基因来确定该菌苔处理方法对三孢布拉霉基因整体的适用性。

用 40 mmol/L NaOH 处理三孢布拉霉菌 10 min,扩增 *wc-1a*(2 286 bp)、*wc-1b*(2 456 bp)、*crgA*(1 836 bp)和 *carB*(1 958 bp),条带大小均正确,且阳性率为 100%,适用于三孢布拉霉中其他基因的扩增,见图 7。

置时间)可能需随菌种不同进行适当调整。

2.6 三孢布拉霉基因组快速提取法与传统方法的比较

丝状真菌基因组提取方法较多,但常用的流程基本都是扩大培养、收集菌体、液氮冷冻、研磨破碎菌体、萃取、沉淀、洗涤、溶解基因组,并重复萃取、沉淀、洗涤和溶解这 4 个步骤数次,因而操作烦琐、耗时较长。表 5 将快速提取法与最传统方法进行比较,其他优化的提取方法未详细列出,但快速提取法的优点在与其他方法比较时依然适用。



M:DL2000 DNA Marker;1~3:卷枝毛霉 ITS(mcITS);4~6:产黄青霉 ITS(pcITS);7~9:烟曲霉 ITS(afITS);10~12:塔宾曲霉 ITS(atuITS);13~15:亮白曲霉 ITS(acITS);16~18:土曲霉 ITS(ateITS)

图8 以快速提取的卷枝毛霉、产黄青霉、烟曲霉、塔宾曲霉、亮白曲霉和土曲霉基因组为模板扩增的 ITS

Fig. 8 Amplification of ITS by genome of *M. circinelloides*, *P. chrysogenum*, *A. fumigatus*, *A. tubingensi*, *A. candidus* and *A. terreus* extracted by the rapid method

表5 基因组快速提取法与传统试剂盒提取法比较

Table 5 Comparison of traditional genome extraction method with the rapid method and the traditional kit extraction

项目	传统方法	快速提取法
实验步骤	配制三孢布拉霉种子液→挑取一定量的转化子菌丝体于种子液中→25℃摇瓶培养 2~4 d→液氮研磨提取基因组	挑取少量菌丝体于 40 mmol/L NaOH, 静置 10 min, 取上清液
所需材料	恒温摇床、种子液、液氮、植物基因组提取试剂盒	NaOH
所需时间	3~5 d	10 min
操作简便性	需要一定量的菌体, 否则种子液培养时间会延长; 操作烦琐, 提取质量浓度低; 无法大批量进行, 不利于转化子筛选	对菌体量要求低; 操作简单, 提取基因组质量浓度高, 快速简便; 可以大批量进行, 适于转化子验证、菌种鉴定等

3 结语

真菌具有复杂的、动态的细胞壁结构,在抵御外界刺激过程中发挥着重要作用^[25]。丝状真菌细胞壁主要由葡聚糖、几丁质、壳聚糖、甘露聚糖、糖蛋白等组成^[26-28],结构复杂,外界物质不易穿透,因而无法像原核生物那样不经过处理或经过简单处理后即可进行菌落 PCR。因此,当对丝状真菌进行基因组编辑操作后,筛选转化子的工作便非常耗时耗

力,且无法大批量进行。本研究中,先筛选出影响三孢布拉霉基因组释放的关键因素,确定了在添加 20 mmol/L NaOH 煮沸 30 min 后,取菌苔作为基因组源可扩增出目的条带;然后对 NaOH 浓度、煮沸时间及基因组源(上清液或处理后的菌苔)进行了优化。当 NaOH 浓度达到 20 mmol/L 后,以上清液为基因组源均可扩增出目的条带。对所提取基因组的稳定性及其对后续测序、酶切等实验的影响进行了验证,发现快速法提取的基因组至少在 25℃静置 60 h 或 6℃静置 108 h 后质量浓度(150~350 ng/μL)与纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀ 1.8~2.0)依然非常理想,用于 PCR 时与传统基因组提取法效果无明显差异,且不影响后续基因测序和对基因片段的酶切等研究;最后,从三孢布拉霉其他基因和其他丝状真菌 ITS 序列两个方面进行了基因组快速提取法普适性的分析,发现在 40 mmol/L NaOH 处理 10 min 的条件下,三孢布拉霉中 *wc-1a*、*wc-1b*、*crGA* 和 *carB* 的扩增的阳性率均为 100%,卷枝毛霉、产黄青霉、烟曲霉和土曲霉 ITS 的扩增阳性率也为 100%,但塔宾曲霉和亮白曲霉 ITS 的阳性率不高,只有 30%,可能是因为该条件对其而言非最佳提取条件,需要对 NaOH 浓度和处理时间重新进行优化。从以上结果可知,NaOH 处理法对多种丝状真菌基因组的快速提取具有较好的适用性,但最适处理条件需依照不同菌株进行适当的调整。由于过高的 NaOH 浓度会对基因组的稳定性产生影响,过长的 NaOH 处理时间违背了快速提取法的快速性,因此无法确定一个既相对温和又适用于各种丝状真菌的处理条件。针对不同的菌种,可通过控制 NaOH 处理时间并对 NaOH 浓度进行简单的优化来确定其最适处理条件。

基因组常规提取法需要先对目的菌株进行种子培养,然后收集菌体,经液氮研磨后利用试剂盒或其他自备的试剂进行基因组的萃取、沉淀、洗涤、溶解,整个过程耗时很长,需要一些设备及试剂的支持,既耗时耗力,还存在一定的安全隐患。而快速提取法只经过 NaOH 静置处理一步,操作简便,耗时非常短,所需材料少,不需要特殊设备,既可少量提取,也可大量制备,且不影响后续分子操作,具有很高的经济性、简便性与高效性,为丝状真菌大规模基因组编辑提供了有利条件。

参考文献:

- [1] SEVGILI A, ERKMEN O. Improved lycopene production from different substrates by mated fermentation of *Blakeslea trispora*[J]. **Foods**, 2019, 8(4): 1-15.
- [2] SHARIATI S, ZARE D, MIRDAMADI S. Screening of carbon and nitrogen sources using mixture analysis designs for carotenoid production by *Blakeslea trispora*[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2019, 28(2): 469-479.
- [3] WANG Q, CHEN Y, FU J, et al. High-throughput screening of lycopene-overproducing mutants of *Blakeslea trispora* by combining ARTP mutation with microtiter plate cultivation and transcriptional changes revealed by RNA-seq[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2020, 161: 1-7.
- [4] WANG Y, WANG Y, CHEN X, et al. Protoplast fusion between *Blakeslea trispora* 14271(+) and 14272(-) enhanced the yield of lycopene and beta-carotene[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2021, 37(4): 58.
- [5] KROBANAN K, LIANG SW, CHIU HC, et al. Blue light photoreceptor *Sfvc -1* gene regulates phototropic response and fruiting-body development in the homothallic ascomycete *Sordaria fimicola*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2019, 85(12): e02206.
- [6] 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(2): 5-7.
- [7] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苜蓿提取适于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34-40.
- [8] 张晓利, 吕雪莲, 沈永年, 等. 菌落 PCR 技术快速鉴别丝状真菌的实验研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2011, 44(8): 556-559.
- [9] BRENNAN A, TALORA C. WC-1 and the proximal GATA sequence mediate a cis-/trans-acting repressive regulation of light-dependent gene transcription in the dark[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019, 20(12): 2854.
- [10] TISCH D, SCHMOLL M. Targets of light signalling in *Trichoderma reesei*[J]. **BMC Genomics**, 2013, 14: 657-674.
- [11] CANESSA P, SCHUMACHER J, HEVIA M A, et al. Assessing the effects of light on differentiation and virulence of the plant pathogen *Botrytis cinerea*: characterization of the white collar complex[J]. **PLoS One**, 2013, 8(12): e84223.
- [12] 周礼红. 一种制备富含多糖丝状真菌基因组 DNA 的方法[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(4): 379-381.
- [13] 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, 14(2): 122-124.
- [14] 田永强, 苏敏, 赵洪林, 等. 微波法快速提取丝状真菌基因组 DNA[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(11): 703-705.
- [15] 曾东方, 陈玢, 何一正, 等. 冻融法快速提取真菌微量培养物基因组 DNA[J]. 生物技术, 2010, 20(6): 49-51.
- [16] 潘力, 周斌, 何攀, 等. 一种提取丝状真菌基因组 DNA 的方法及试剂盒和遗传转化子的快速筛选方法; CN 201310326924.6 [P]. 2013-10-23.
- [17] 尚喜雨, 柯涛, 王玲玲, 等. 产脂肪酶酵母的筛选及菌种鉴定[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(20): 10512-10513.
- [18] 李颖, 徐英春. 评价 ITS、BenA 和 CaM 序列分析在曲霉菌种鉴定方面的应用[J]. 中国真菌学杂志, 2017, 12(2): 71-77.
- [19] 蔡海莺, 张婷, 沈灵智, 等. 甜米酒曲微生物分离和菌种鉴定[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(24): 204-210.
- [20] LUO W, XUE C, ZHAO Y, et al. *Blakeslea trispora* photoreceptors: identification and functional analysis[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2020, 86(8): e02962.
- [21] LUO W, GONG Z Y, LI N, et al. A negative regulator of carotenogenesis in *Blakeslea trispora*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2020, 86(6): e02462.
- [22] NICOLÁS-MOLINA F E, NAVARRO E, RUIZ-VÁZQUEZ R M. Lycopene over-accumulation by disruption of the negative regulator gene *crgA* in *Mucor circinelloides*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008, 78: 131-137.
- [23] 张晓利, 吕雪莲, 沈永年, 等. 菌落 PCR 技术快速鉴别丝状真菌的实验研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2011, 44(8): 556-559.
- [24] 杜克久, 宋歌, 崔菲, 等. 一种丝状真菌分生孢子 PCR 方法; CN201410053235.7[P]. 2014-05-14.
- [25] YOSHIMI A, MIYAZAWA K, ABE K. Function and biosynthesis of cell wall alpha-1, 3-glucan in fungi[J]. **Journal of Fungi**, 2017, 3(4): 63.
- [26] RUIZ-HERRERA J, ORTIZ-CASTELLANOS L. Cell wall glucans of fungi. A review[J]. **Cell Surface**, 2019, 5: 100022.
- [27] ARANDA-MARTINEZ A, LOPEZ-MOYA F, LOPEZ-LLORCA LV. Cell wall composition plays a key role on sensitivity of filamentous fungi to chitosan[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2016, 56(10): 1059-1070.
- [28] GARCIA-RUBIO R, DE OLIVEIRA HC, RIVERA J, et al. The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus species*[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2019, 10: 2993.