

实验七 丝状真菌少根根霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的分离

随着分子生物学研究的发展，目前丝状真菌的分子生物学技术也已建立起来，如：用DNA进行限制性内切酶分析、克隆特定的DNA分子或分离DNA做为杂交探针进行真菌的遗传学研究等。这些研究首先都必须进行分离、提取DNA，核酸在细胞中都是以与蛋白质结合的状态存在的。真核生物的染色体DNA为双链线性分子；原核生物的“染色体”，质粒及真核细胞器DNA为双链环状分子。95%的真核生物DNA主要存在于细胞核内，其它5%为细胞器DNA，如线粒体DNA、叶绿体DNA等。

本实验将介绍一种简化的制备丝状真菌总DNA的方法，由于制备量少且速度快，因此，该方法制备的DNA适合于作为PCR的模板。

一、实验目的

1. 学习和掌握丝状真菌DNA的提取方法
2. 学习聚合酶链式反应的操作技术。
3. 从真核微生物少根根霉的总DNA中扩增 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因，为 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因克隆提供实验材料。

二、实验原理

分离纯化核酸的总原则：之一是保证核酸一级结构的完整性。这是因为遗传信息全部贮存在一级结构之内，同时核酸的一级结构还决定其高级结构的形式及和其它生物大分子结合的方式；原则之二是排除其它分子的污染，如蛋白质、RNA等。

核酸的纯化应达到三点要求：1. 核酸样品中不存在对酶有抑制作用的有机溶剂和过高浓度的金属离子；2. 其它生物大分子如蛋白质、多糖和脂类分子的污染降低到最低程度；3. 排除其它核酸分子的污染，如RNA。

提取纯化应注意的问题：

1. 尽量简化操作步骤，缩短提取时间，减少有害因素对核酸的破坏；
2. 减少化学因素对核酸的降解，为避免过酸，过碱对磷酸二酯键的破坏，操作多在pH4~10条件下进行；
3. 减少物理因素对核酸的降解，主要是机械剪切力和高温。0~4℃的温度环境降低核酸酶的活性与反应速率，减少对核酸的生物降解；
4. 防止核酸的生物降解，主要是指细胞内、外的各种核酸酶。如DNA酶需要金属二价离子 Mg^{++} ， Ca^{++} 的激活，使用金属二价离子螯合剂EDTA柠檬酸盐，基本可以抑制DNA酶活动。

核酸的提取步骤：破碎细胞，去除与核酸结合的蛋白质及多糖、脂类等生物大分子，去除其它不需要的核酸分子，沉淀核酸，去除盐类、有机溶剂等杂质，纯化核酸等。

真核细胞的破碎方法有：包括物理、化学和酶解作用裂解细胞，使DNA释放出来。物理法：煮沸、冻融、微波、超声波、匀浆、液氮研磨， Al_2O_3 粉研磨法等，这些物理操作可导致DNA链的断裂。化学法：高盐、表面活性剂SDS、热酚法等。酶解法：裂解酶、溶菌酶、蛋白酶K等，此方法较为温和，可获得大分子量的DNA。

核酸去蛋白：一般程序是酚；酚/氯仿；氯仿抽提，其原理：交替使用酚、氯仿这两种不同的蛋白质变性剂，以增加去除蛋白质的效果。因为酚虽然可有效地变性蛋白质，但它不能完全抑制RNase的活性。氯仿能加速有机相与液相分层。在氯仿中加入少许异戊醇的目的在于减少蛋白质变性操作过程中产生气泡。最后用氯仿抽提是为了去除核酸溶液中的痕量酚。

沉淀核酸：是浓缩核酸最常用的方法。最大优点是通过核酸沉淀来改变核酸的溶解缓冲液及重新调节核酸在溶液中的浓度，可去除溶液中某些盐离子与杂质，在一定程度上纯化核酸。核酸是多聚阴离子的水溶液化合物，它与Na、K、Mg形成的盐在许多种有机溶剂中不溶解，但也不会被有机溶剂变性，常用的有机溶剂有乙醇、异丙醇、聚乙二醇等。

表 几种核酸提取方法比较

	传统法	螯合树脂法	玻璃粉法	磁珠法	免疫亲和法
DNA 提取	酚/ 氯仿等有机溶剂抽提	Chelex 100 树脂	玻璃粉吸附	磁珠吸附、磁场分离	抗原抗体反应、磁场分离
适用范围	大多数标本 DNA 提取、纯化	培养及各种临床标本	土壤标本	冰冻、陈旧组织	冰冻、陈旧组织, 样本含量很少的标本
方法评价	获得的DNA 纯度高,含量多,但比较费时,步骤烦琐,而且使用有机溶剂,有损操作者健康。	简单、快速、且成本不高,可用于培养标本和各种临床标本细菌及部分病毒核酸提取。	提取方法简便,可用于土壤中细菌芽孢DNA 的提取,不能彻底除去PCR 抑制剂。	简单、快速整个过程仅需不到2 h,利用磁场分离可以得到较纯的DNA ,但产量比传统方法获得的少	获得DNA 纯度高,含量多,尤其适合样本含量很少的标本。抗DNA单克隆抗体制备是关键的一步。

四、实验内容 （一）少根根霉总DNA的提取及检测

1. 菌体的制备：将生长6d的斜面菌种用无菌水洗下，并稀释至 10^7 孢子/ml。250ml三角瓶装50mlPDA液体培养基，灭菌后接入上述孢子悬液1ml，于28℃振荡培养24h后，四层纱布过滤收集菌体，并用无菌水冲洗，挤干水分。
2. 取一支1.5mL微量离心管，加入冻干磨碎的菌丝（干重20~60mg）或在液氮中研磨磨碎的新鲜菌丝（湿重约0.2 g）。
3. 加入600 μ l 2 $\times$ CTAB提取液。
4. 65℃温育至少30 min，每隔10 min轻微颠倒离心管数次。
5. 冷却至室温后，加入等体积酚:氯仿:异戊醇（25:24:1），缓慢颠倒离心管5min。
6. 12000r/min，4℃离心15min。
7. 吸取上清层约400 μ l（含有DNA），转入新的1.5ml离心管中（须小心操作，勿带入界面的细胞碎片）。
8. 加入1/10体积 3mol/L NaAc混匀后，再加入2倍体积的无水乙醇，小心颠倒离心管，混匀，可见DNA沉淀，此操作动作要快。
9. 置于-20℃沉淀15-30min。
10. 同步骤6，离心后，弃去上清，用70%乙醇洗涤沉淀2次。
11. 室温干燥20min，挥发除去乙醇。
12. 用20 μ l含RNase (终浓度50ug/ml)的TE溶液回溶，-20℃保存备用。

该方法的优点在于：

1. 用多层纱布过滤，挤压，使菌丝中的水分充分吸干，不需要低温离心或低温真空干燥设备；
2. 由于减少CTAB法的一些步骤，操作过程简单，一次可以处理大量样品，节约时间；
3. 提取DNA时仅需转管一次，可以有效的减少交叉污染；
4. 提取的DNA样品在-20℃下保存仍可使用。

实验中应注意的问题：

1. 掌握好真菌的培养时间。培养时间过长，菌丝体的多糖和酚类物质含量比较高，提取的DNA杂质含量比较高，而且容易氧化和褐变，质量比较差，所以短时间培养的菌丝体更利于得到高质量的DNA。
2. 在提取缓冲液中加入 β -巯基乙醇可以防止酚氧化和褐变。
3. 在粉碎后的菌体组织中加入65℃ 2 × CTAB 缓冲液并于65℃水浴，这是非常关键的一步，把握正确的粘稠度是成功提取出DNA的关键。
4. 采用机械研磨进行细胞破碎，必须十分充分。

(二) PCR扩增少根根霉 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因

1. 根据 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因序列设计引物为:

本实验所用引物(由OLIGO®软件辅助设计, 上海Sangon公司合成, PAGE纯化)

上游引物(upper primer, P9), 下游引物(lower primer, P10)

P9 5'-CACGGTACCATGAGTACATCAGATCGTC AATCAG-3' (*Kpn*I位点)

P10 5'-CTCGCATGCTTAAAATGACTTTTTGCTAATTGC-3' (*Sph*I位点)

2. PCR反应体系(25 μ l), 于0.2mL薄壁管内进行:

成分	体积(μ l)
H ₂ O	15
<i>Taq</i> DNA聚合酶10 $\times$ Buffer (含MgCl ₂ 20mmol/L)	2.5
dNTP混合物 (2.5mmol/L)	2
P9(10 μ mol/L)	2
P10(10 μ mol/L)	2
DNA模板	1
<i>Taq</i> DNA聚合酶(5U/ μ l)	0.5

3. 混匀并离心PCR混合物后，加入25 μ l 石蜡油以防蒸发。

4. 按如下PCR反应程序进行扩增：

程序1 (cycle 1) 94°C 3min

程序2 (cycle 2~31) 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 1.5 min

程序3 (cycle 32) 72°C 10min

程序4 (cycle 33) 4°C ∞

5. 待反应结束后，取5 μ l产物直接在1 %琼脂糖凝胶上进行电泳，检查扩增效果。扩增产物长度约1.5kb。

五、实验报告

1. 根据OD260nm计算出所提DNA含量。
2. 计算OD260nm 与OD280nm的比值，对所提取的DNA纯度进行说明，并加以分析。
3. 绘制出PCR后电泳检测示意图，标出标准DNA与目的基因的大小。

六、思考题

1. 影响DNA提取效率的关键操作是什么？
2. 简述PCR反应原理。
3. 最后循环为什么要延伸10min？
4. 需在体外扩增已在某一质粒上的一基因，如何设计这个实验？