

东北山葡萄酵母菌基因组 DNA 提取方法的比较研究

王晓娥, 陈长武

(吉林工程技术师范学院食品工程学院, 长春 130052)

摘要: 利用液氮研磨法、蜗牛酶法和玻璃珠法提取东北山葡萄分离的酵母菌株 S60 基因组 DNA, 采用琼脂糖凝胶电泳、微量核酸蛋白测定仪和 PCR 方法检测基因组 DNA 的纯度和浓度。结果显示, 蜗牛酶法提取的酵母菌基因组 DNA 纯度最好、浓度最高; 液氮研磨法提取的基因组 DNA 浓度虽然较高, 但含有较多的蛋白等杂质; 玻璃珠法提取的酵母菌基因组 DNA 纯度和浓度均最低。

关键词: 东北山葡萄; 液氮研磨法; 蜗牛酶法; 玻璃珠法; DNA 提取

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)06-1017-03

Methods of genomic DNA extraction from the yeast isolated from *Vitis amrensis* Rupr in Northeast China

WANG Xiao'e, CHEN Changwu

(College of Food Engineering, Jilin Teacher's Institute of Engineering and Technology, Changchun 130052)

Abstract: Liquid nitrogen, snailase, and glass beads were used to extract genomic DNA from the yeast S60 isolated from *Vitis amrensis* in Northeast China. The DNA quality was examined using agarose gel electrophoresis, spectrophotometer ND-2000, and PCR. The result showed that the quality of the genomic DNA extracted using snailase method was best. Liquid nitrogen method resulted in high protein content and the glass beads method obtained the lowest DNA yield.

Key words: *Vitis. Amrensis*; liquid nitrogen grinding; snailase; glass beads; DNA extraction

酵母菌是葡萄酒酿造的关键因素之一, 其遗传多样性分析和分类鉴定是选育优良酿酒酵母菌种的重要基础^[1-2]。随着葡萄酒产业的快速发展, 在全世界范围内出现了“同质化”现象, 不仅为生产者带来极大风险, 同时削弱了消费者对葡萄酒的兴趣, 因此具有独特香气和口感的葡萄酒研发势在必行^[3-5]。东北地区山葡萄风味独特, 营养丰富, 单宁多酚物质含量高, 具有显著的地域特色, 是生产“非同质化”葡萄酒的重要来源, 但山葡萄含糖量低, 酸度高, 容易导致商业活性干酵母出现发酵终止现象, 因此选育适合低温及高酸葡萄汁环境发酵的地方酵母菌刻不容缓。

随着分子生物学技术的发展, DNA 水平上的分子标记在酵母菌遗传育种过程中发挥着重要作用, 不仅为传统育种方法提供更清楚的遗传背景, 还可

高效而精准地选择目标基因, 因此, 提取高质量酵母菌基因组 DNA 成为遗传育种最基础的工作。作者采用 3 种方法对东北山葡萄分离的天然酵母菌株进行基因组 DNA 提取条件的摸索研究, 旨在为选育优良的东北山葡萄酵母菌种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 S60 酵母菌株分离自山葡萄“双红”。

1.1.2 主要试剂 DNA 缓冲液: 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH8.0, 10 mmol·L⁻¹ EDTA; 酚-氯仿-异戊醇: 体积比 25:24:1; PBS 缓冲液: 0.01 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 和 NaH₂PO₄, pH7.0, 0.15 mol·L⁻¹ NaCl; 裂解液: 2% Triton X-100, 1% SDS, 0.1 mol·L⁻¹ NaCl, 10 mmol·L⁻¹

TrisHCl pH8.0, 1 mmol·L⁻¹ EDTA; STES 缓冲液: 0.2 mol·L⁻¹ TrisHCl, 0.5 mol·L⁻¹ NaCl, 0.1% SDS, 0.01 mol·L⁻¹ EDTA; *Taq* 酶、引物、DNA Marker 购自大连宝生物公司, 蜗牛酶和玻璃珠购自 Sigma 公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 PCR 扩增仪 EDC-810: 东胜创新生物科技有限公司; 高速冷冻离心机 FRESKO21: 美国 Thermo fisher 公司; 微量蛋白核酸检测仪 Nano2000: 美国 Thermo fisher 公司。

1.2 酵母菌基因组 DNA 的提取方法

1.2.1 液氮研磨法 收集过夜培养酵母菌 1.5 mL, 12000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 将沉淀置于预冷的无菌研钵中加入液氮进行研磨。移入 1.5 mL 离心管中, 加 200 μL DNA 缓冲液混匀, 65℃ 保温 1 h。12000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 上清用酚-氯仿异戊醇抽提 2 次, 每次 5000 r·min⁻¹ 离心 5 min。上清用 2 倍无水乙醇沉淀 30 min, 12000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 75%乙醇洗 2 次, 自然干燥溶于 50 μL 无菌双蒸水, 加入 1 μL 10 mg·mL⁻¹ 的 RNaseA, 37℃ 温浴 30 min, 自然冷却后保存^[6]。

1.2.2 蜗牛酶法 收集过夜培养酵母菌 1.5 mL, 12000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取沉淀加入 500 μL PBS 缓冲液重悬菌体, 重复离心、重悬过程 1 次。向沉淀中加入 20 mg·mL⁻¹ 蜗牛酶溶液 100 μL, 500 μL 裂解液, 45℃ 作用 4 h。向悬浮液中加入等体积的酚-氯仿-异戊醇, 轻柔颠倒混匀, 12000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液加入等体积的酚-氯仿-异戊醇再抽提一次。取上清加入 2 倍体积的无水乙醇, 轻轻混匀, 室温放置 30 min, 12000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 沉淀用 75%乙醇洗 2 次, 自然干燥溶于 50 μL 无菌双蒸水, 加入 1 μL 10 mg·mL⁻¹ 的 RNaseA, 37℃ 温浴 30 min, 自然冷却后保存^[7]。

1.2.3 玻璃珠法 收集过夜培养的酵母菌 1.5 mL, 12000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 吸去液体培养基, 收集沉淀, 将沉淀重悬于 50 μL STES 缓冲液中。向悬浮液中加入 50 μL 酸洗过的玻璃珠, 20 μL TE (pH7.6), 加入 60 μL 酚-氯仿-异戊醇, 震荡 1 min 充分混合。12000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清到一个新的离心管中, 2 倍体积无水乙醇沉淀 10 min, 12000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集沉淀, 挥发乙醇。用 100 μL 75%乙醇洗涤沉淀, 12000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 干燥沉淀溶于 50 μL 无菌双蒸水中, 加入 1 μL 10 mg·mL⁻¹ 的 RNaseA, 37℃ 温浴 30 min, 自然冷却后保存^[8]。

1.3 基因组 DNA 的质量检测

1.3.1 电泳检测 取 5 μL DNA 溶液在 1.0%的琼脂

糖凝胶电泳检测其完整性, 电压调至 50 V, 稳压电泳约 1 h。

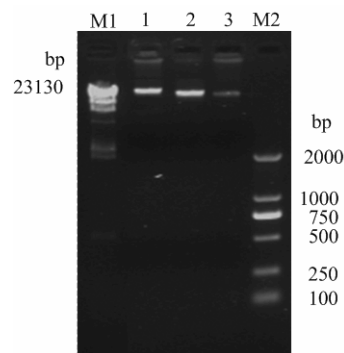
1.3.2 微量核酸蛋白测定仪检测 无菌双蒸水清洗微量核酸检测仪的点样孔 3 次, 并校正对照数值为零。取 1 μL DNA 样品检测, 重复 3 次读取 A_{260}/A_{280} 的 OD 值, 计算平均值。

1.3.3 PCR 扩增检测 采用一对引物 ITS1 和 ITS4 扩增提取的酵母菌基因组 DNA, 引物序列 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' PCR 反应体系: 总体积 25 μL, DNA 模板: 1 μL, ITS1 (10 μmol·L⁻¹): 1 μL, ITS2 (10 μmol·L⁻¹): 1 μL, 10×PCR buffer (Mg²⁺ plus): 2.5 μL, dNTP (10 mmol·L⁻¹): 3 μL, *Taq*: 0.3 μL, H₂O: 16.2 μL。PCR 反应条件: 95℃ 7 min; 95℃ 1 min, 55℃ 90 s, 72℃ 3 min, 35 个循环, 72℃ 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物于 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 纯水为模板作为阴性对照, Marker 为 DL2000。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的完整性

由图 1 可以看出, 3 种方法均能获得完整的酵母菌基因组 DNA, 其中蜗牛酶法获得的酵母菌 DNA 完整性最好, 亮度最高。液氮研磨法获得 DNA 完整性较好, 但梳孔处有蛋白等杂质残留。玻璃珠法获得的 DNA 电泳条带较暗, 且梳孔处有蛋白等杂质残留。



M1: λ -Hind III digest DNA marker; 1: 液氮研磨法; 2: 蜗牛酶法; 3: 玻璃珠法; M2: DL2000

M1: λ -Hind III digest DNA marker; 1: liquid nitrogen; 2: snailase; 3: glass beads; M2: DL2000

图 1 不同方法提取酵母菌总 DNA 的电泳图

Figure 1 Total genome DNA extracted from yeast by different methods

2.2 基因组 DNA 的纯度与浓度

A_{260}/A_{280} 比值是检测核酸纯度的重要指标, 纯

度较高的 DNA A_{260}/A_{280} 应在 1.8 左右, 低于 1.6 表明有蛋白质、酚等杂质, 高于 1.9 表明样品中含有 RNA 污染。本文采用不同方法提取酵母菌总 DNA 的纯度和浓度见表 1, 蜗牛酶法提取的基因组 DNA A_{260}/A_{280} 为 1.85, 几乎无蛋白等杂质的污染, 且浓度最高为 $426 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 与电泳检测结果吻合。液氮研磨法提取总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 为 1.59, 浓度为 $397 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 玻璃珠法提取总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 为 1.68, 浓度较低为 $247 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

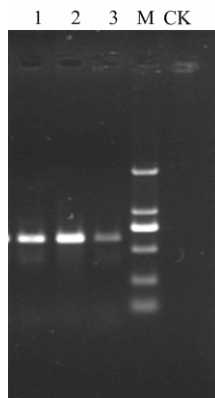
2.3 基因组 DNA 的 PCR 检测

由图 2 可以看出, 3 种方法提取的酵母菌基因组 DNA 经 PCR 扩增均能获得较清晰的条带, 片段大小在 700 bp 左右, 玻璃珠法扩增结果较差, 可能是 DNA 模板的浓度较低导致。

表 1 不同提取方法获得 DNA 的纯度与浓度

Table 1 Purity and concentration of extracted genome DNA by different methods

提取方法 Extraction method	A_{260}/A_{280}	DNA 浓度/ $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ DNA concentration
液氮研磨法 Liquid nitrogen	1.59	397
蜗牛酶 Snailase	1.85	426
玻璃珠法 Glass beads	1.68	247



1: 液氮研磨法; 2: 蜗牛酶法; 3: 玻璃珠法; M: DL2000; ck: 阴性对照

1: liquid nitrogen; 2: snailase; 3: glass beads; M2: DL2000; ck: negative control

图 2 不同方法提取酵母菌总 DNA 的 PCR 电泳图

Figure 2 PCR products of genome DNA by different extraction methods

3 讨论

本试验通过比较 3 种不同方法提取东北山葡萄自然分离的酵母菌株 S60 基因组 DNA 的效果表明, 3 种提取方法均能获得完整的基因组 DNA, 但以蜗牛酶法获得的基因组 DNA 纯度和浓度最高, 液氮研磨法和玻璃珠法次之。

蜗牛酶是一类混合酶, 能够有效水解酵母菌细胞壁的主要成分, 从而达到释放基因组 DNA 的目的^[9-10]。本试验利用蜗牛酶 45°C 条件下 4 h, 在裂解液的作用下提取酵母菌基因组 DNA, 相比液氮研磨法和玻璃珠法花费的时间最长, 但获得的 DNA 纯度和浓度最高, 是一种更适合东北山葡萄酵母菌基因组 DNA 提取的有效方法, 在后续的研究中可进一步改良以缩短提取时间。

液氮研磨法获得基因组 DNA 浓度较高, 但纯度最低, 去除蛋白等杂质的能力最差, 可能在液氮研磨过程中将蛋白等物质破碎释放导致。玻璃珠法提取效果并不理想, 获得的 DNA 含有较多的蛋白等杂质且浓度最低, 可能该方法不能有效破除本研究使用酵母菌株的细胞壁从而使 DNA 释放出来。

东北山葡萄发酵出的葡萄酒风味独特, 具有显著的地域特色, 但经常出现发酵终止现象。针对这种现状, 利用分子生物学手段对东北山葡萄相关酵母进行遗传多样性分析, 分离出耐低 pH 和耐低温的优势菌株。本研究使用的蜗牛酶法提取东北山葡萄酵母菌株基因组 DNA 效果最好, 在后续的研究中还需进一步分离出更多山葡萄酵母菌株, 对其进行基因组 DNA 提取条件的摸索, 为选育优良山葡萄酵母菌株提供理论依据。

参考文献:

- [1] 李梓. 山葡萄自然发酵过程中酵母菌的分离鉴定[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [2] 苏龙. 东北产区山葡萄酒酵母 5.8S-ITS 区 RFLP 分析和优良酿酒酵母菌株选育[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [3] 朱力, Siczkowski N, Belancic A, 等. 更完美地展现葡萄品种的个性—“品种酵母”的筛选和应用[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2007(1): 58-61.
- [4] 徐艳文. 甘肃地区葡萄酒相关酵母菌的分离及其分类鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [5] Di Maro E, Ercolini D, Coppola S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(2): 201-210.
- [6] 唐天乐, 高炳森, 长孙东亭, 等. 高质量毕赤酵母基因组 DNA 提取方法比较[J]. 生物技术通报, 2010(1): 196-199.
- [7] 赵宏宇, 李珺, 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.
- [8] 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 485.
- [9] 王志博, 潘军, 张永根, 等. 用酶法对啤酒酵母细胞破壁优化条件的研究[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(3): 76-79.
- [10] 贾艳萍, 魏群, 赵军. 对酵母细胞酶法破壁的研究[J]. 中国酿造, 2005(9): 11-13.