

丝状真菌分子细胞生物学 与实验技术

编著 林福呈 王洪凯



科学出版社

www.sciencep.com

丝状真菌分子细胞生物学 与实验技术

编 著 林福呈 王洪凯

编写人员 (按姓氏笔画排序)

王洪凯 卢建平 刘小红 刘同宝
武治印 林福呈 胡东淮 徐 飞
章初龙 阎章才

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

真菌是真核生物的重要研究模式,广泛应用于真核细胞生命活动机制的基础研究中。真菌也是生态系统中的重要组成部分,还是重要的生物资源,在医药、轻工、环保、食品、农业等领域应用广泛,开发前景广阔。本书在总结近年来真菌分子细胞生物学的最新成果基础上,着重介绍真菌分子细胞生物学研究中的常用技术,有针对性地提出了真菌分子细胞生物学研究的技术原理和方案。全书分为14章,主要内容包括:真菌基因型的鉴定与特征分析、核酸的分析、真菌遗传转化、功能基因组学、生化与免疫方法、分子系统学及生物信息学常用软件等。本书可以作为高等院校真菌学相关课程的教材,也可以作为高等院校和科研院所真菌研究者在分子细胞生物学研究方面的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

丝状真菌分子细胞生物学与实验技术 / 林福呈,王洪凯编著. —北京:科学出版社,2010.10

ISBN 978-7-03-029010-6

I. 丝… II. ①林… ②王… III. 丝状真菌;真菌-分子生物学;细胞生物学-研究 IV. Q949.32

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第182022号

策划编辑:吴茵杰 / 责任编辑:邱波 / 责任校对:张怡君
责任印制:刘士平 / 封面设计:黄超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年10月第一版 开本:787×1092 1/16

2010年10月第一次印刷 印张:16 1/4

印数:1—2 000 字数:381 000

定价:49.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

作为生态系统中的重要组成部分,真菌在物质循环和能量循环过程中都有重要的作用。虽然人类对真菌的应用历史悠久,但直到最近人们才认识到真菌是重要的生物资源,在医药、轻工、环保、食品、农业等领域应用广泛,开发前景非常广阔。真菌是真核生物,具有结构简单、生活史短、易于培养的特点,使真菌成为研究真核生物的重要研究模式。近年来,以真菌为研究对象,以克隆和分析基因功能为目的的研究进展非常迅速,极大地促进了真菌分子细胞生物学的发展,在阐明细胞周期的调控、顶端生长机制、细胞分化调节及真菌致病机制等生物学基本机制方面提供了很有意义的信息。

虽然许多真菌分子生物学的技术和原理与其他生物学的分子生物学原理基本相同,但是,许多在动物和植物等其他真核生物上应用的方法技术,需要经过一定的调整才能在真菌生物学研究中顺利应用。因此,真菌细胞分子生物学研究技术还是面临许多挑战。于是编者在几年前便有了对应用于真菌分子细胞生物学技术与原理进行汇集整理的想法,为高校开展真菌学的教学和科研提供教材,同时也为从事真菌细胞分子生物学研究的科研工作者提供技术参考。

在国家自然科学基金委杰出青年基金、水稻生物学国家重点实验室的支持、资助下,本书得以顺利完成。编者在此表示感谢!同时,对关心、帮助过此书编写的专家、学者表示衷心感谢!

本书将丝状真菌研究领域中的分子细胞学研究技术进行了总结,根据不同研究目的提供了可能的研究方案。本书可以作为高等院校和科研机构的教材,也可以为环境、医药、生物资源、植物病理、微生物等领域的本科生、硕士和博士研究生及相关研究人员提供理论和实验技术指导。由于编者水平和条件的限制,不足之处在所难免,望多提宝贵建议。

编 者

2010年8月

目 录

前言

第一章 丝状真菌基因型特征的鉴定	(1)
1 概述	(1)
2 基因组变异的主要特征	(1)
3 确定研究目的	(2)
4 用于基因组分析的技术	(3)
5 假设	(8)
6 选择最佳策略	(9)
方案 1 链格孢真菌的 RAPD 分析	(11)
7 AFLP 技术的原理及其应用	(13)
方案 2 丝状真菌的 AFLP 分析	(16)
方案 3 丝状真菌的 cDNA-AFLP	(19)
8 变性梯度凝胶电泳(DGGE)	(21)
方案 4 土壤中真菌的 DGGE 分析	(22)
9 重要的数据库和互联网资源	(24)
第二章 丝状真菌核酸的提取与分析	(26)
1 概述	(26)
2 基因组 DNA 的分离	(26)
方案 1 CTAB 法提取真菌基因组 DNA	(27)
方案 2 氯化苄(benzyl chloride)法提取真菌基因组 DNA	(28)
方案 3 丝状真菌总 DNA 的分离	(29)
方案 4 固体平板上菌小量 DNA 的块速提取(以稻瘟病菌为例)	(31)
方案 5 真菌小量 DNA 的快速提取	(31)
3 丝状真菌 RNA 的提取	(32)
4 RNA 的操作	(32)
方案 6 Trizol 法提取丝状真菌总 RNA	(33)
方案 7 丝状真菌总 RNA 的提取	(33)
方案 8 真菌总 RNA 的小量提取(Trizol 法)	(34)
第三章 丝状真菌的 DNA 转化	(35)
1 概述	(35)
2 选择性标记和转化载体	(35)
3 待转化 DNA 的质量	(37)
4 DNA 的进入	(37)
5 REMI 转化	(38)

方案 1 稻瘟病菌(<i>Magna porthe grisea</i>)原生质体的制备及转化	(38)
方案 2 毛壳菌原生质体的制备	(39)
6 真菌 ATMT 转化	(40)
方案 3 感受态农杆菌细胞的制备与转化	(40)
方案 4 利用农杆菌转化真菌	(41)
7 电击转化	(42)
方案 5 <i>Tapesia yallundae</i> 的电击转化	(42)
8 转化 DNA 的命运	(42)
方案 6 丝状真菌中的质粒拯救	(43)
方案 7 农杆菌电击转化感受态的制备与转化	(45)
第四章 丝状真菌的遗传分析	(48)
1 子囊菌遗传分析	(48)
方案 1 对真菌孢子进行化学诱变	(49)
方案 2 对真菌的孢子进行紫外诱变	(50)
方案 3 营养缺陷型突变体的筛选与鉴定	(51)
方案 4 温度敏感型突变群体的制备	(51)
方案 5 单孢分离	(52)
方案 6 构巢曲霉的八分体分析	(53)
方案 7 通过准性重配确定里连锁群	(54)
方案 8 稻瘟病菌温度敏感型突变体的筛选	(55)
2 担子菌遗传分析	(56)
方案 9 鬼伞菌在人工培养条件子实体和担孢子的产生	(58)
方案 10 通过 CHEF 凝胶电泳分离 <i>C. cinereus</i> 的染色体	(62)
方案 11 <i>C. cinereus</i> 的四分体分离	(64)
方案 12 <i>C. cinereus</i> 孢子的紫外诱变	(65)
方案 13 利用 NTG(MNNG)/EMS 对担子菌进行诱变	(66)
方案 14 平板印迹	(68)
附:担子菌研究中的标准培养基	(69)
第五章 丝状真菌的基因组分析	(70)
1 概述	(70)
2 遗传图谱	(70)
方案 1 克隆固定大小的基因组 DNA 作为 RFLP 探针	(71)
方案 2 RAPD 操作要点	(71)
3 电泳核型分析	(73)
方案 3 琼脂糖栓中制备完整染色体 DNA	(73)
方案 4 琼脂糖栓电泳	(73)
方案 5 钳位均匀电场电泳	(74)
4 物理图谱	(75)
方案 6 染色体 DNA 的 RecA-AC	(75)

方案 7 准备 BAC 载体 DNA	(78)
方案 8 准备 BAC 插入 DNA	(78)
方案 9 BAC 插入 DNA 大小的选择,恢复和克隆	(79)
方案 10 将文库克隆排列到杂交膜上	(80)
方案 11 收集克隆文库	(80)
5 筛选文库	(81)
方案 12 Southern 杂交分析混合文库和克隆阵列文库	(81)
6 染色体步移(chromosome walking)	(82)
方案 13 BAC 或者黏粒末端 RNA 探针的合成	(82)
方案 14 根据插入片段末端序列制备的探针	(83)
7 真菌基因组分析相关数字资源	(85)
第六章 真菌发育过程的细胞学分析	(86)
1 概述	(86)
2 丝状真菌生长的测定	(86)
方案 1 菌丝顶端生长的测定	(86)
方案 2 菌落生长速度的测定	(87)
方案 3 直线生长速率的测定	(87)
3 丝状真菌孢子的萌发	(87)
方案 4 真菌孢子的萌发测定	(87)
4 稻瘟病菌细胞生物学分析	(87)
方案 5 稻瘟病菌产孢培养、孢子收集和附着胞诱导培养	(88)
方案 6 稻瘟病菌侵染过程的组织病理学观察	(88)
方案 7 稻瘟病菌孢子、附着胞内脂质体、糖原的观察	(88)
方案 8 细胞自噬现象的观察	(89)
方案 9 酒精氧化酶活性测定	(89)
方案 10 冷冻替代用于电子显微镜观察	(90)
方案 11 细胞核,细胞壁和隔膜的染色	(90)
第七章 丝状真菌的信号传导	(92)
1 概述	(92)
2 蛋白抽提	(93)
方案 1 构巢曲霉(<i>Aspergillus nidulans</i>)蛋白激酶的抽提	(93)
3 蛋白免疫沉淀反应	(94)
方案 2 NIMA 在大肠埃希菌(<i>E. coli</i>)中的表达和 His-tag 亲和纯化	(94)
方案 3 蛋白质免疫沉淀(IP)	(95)
4 凝胶阻滞试验(gel-shift assay)检测蛋白的磷酸化状态	(95)
方案 4 NIMA 磷酸化状态的凝胶阻滞试验	(96)

5 蛋白激酶的底物特异性分析	(96)
方案 5 NIMA 激酶分析	(97)
第八章 丝状真菌的细胞生物学技术	(98)
1 电子显微镜工作原理及其应用	(98)
2 扫描电子显微镜样品制备的原理与方法	(99)
3 透射电子显微镜样品制备的原理与方法	(101)
4 电镜细胞化学技术	(104)
5 免疫组化技术	(117)
第九章 丝状真菌的生化研究方法	(120)
1 概述	(120)
2 抽提物的准备	(120)
方案 1 菌丝的摇瓶培养	(120)
方案 2 疏水蛋白的分离	(120)
3 细胞组分的准备	(121)
方案 3 细胞膜的分离	(121)
方案 4 脉孢霉的液泡分离	(122)
方案 5 线粒体的分离	(123)
方案 6 细胞核的分离	(123)
方案 7 细胞核的抽提	(124)
方案 8 微体的分离	(125)
4 蛋白分析	(125)
方案 9 孢子和菌丝的小量的蛋白质抽提	(125)
方案 10 从固体培养物中分离胞外酶(<i>N. crassa</i> 的脂肪酶)	(126)
方案 11 从新鲜菌丝分离细胞内蛋白,适用于蛋白水解敏感蛋白的方法	(126)
方案 12 从新鲜菌丝分离细胞内蛋白	(127)
方案 13 从冻干菌丝分离胞内蛋白	(128)
方案 14 酶学分析的代谢物抽提	(128)
第十章 真菌研究中的免疫学方法	(129)
1 概述	(129)
2 免疫原分子的特性	(129)
方案 1 免疫抗原的准备	(131)
3 制备多克隆抗血清	(132)
方案 2 用辛酸和硫酸铵沉淀法纯化抗体	(133)
方案 3 用 ELISA 测定 pAb 的滴度和检验上清液中的 mAb	(134)
4 制备单克隆抗体	(135)
方案 4 通过 B 细胞-骨髓瘤细胞融合制取鼠科杂种瘤细胞	(136)
方案 5 荧光免疫检测	(138)
方案 6 限制性稀释法亚克隆	(139)
方案 7 冷冻法长期储存的杂交瘤细胞	(140)

方案 8 应用抗原介导 ELISA 鉴定 Ig 类别/亚类	(141)
5 蛋白质和糖类抗原决定簇的特性	(142)
方案 9 通过化学和酶学修饰确定的抗原决定簇的特性	(143)
6 其他经常使用的免疫学分析方法	(144)
方案 10 间接 DAS-ELISA	(144)
7 抗体的提供及其商业发展	(145)
第十一章 丝状真菌的功能基因组分析	(146)
1 构建稻瘟病菌突变子库	(146)
2 目标突变技术	(146)
3 cDNA 文库构建及测序分析	(147)
方案 1 构建附着胞 cDNA 文库的 cDNA 的合成	(147)
4 cDNA 文库构建及筛选	(152)
方案 2 cDNA 文库构建	(152)
方案 3 质粒 pTriplEx2 的插入片段的验证	(155)
5 抑制差减杂交技术	(156)
方案 4 稻瘟病菌附着胞 SSH 差减文库的构建	(158)
6 丝状真菌细胞自噬及其研究方法	(165)
方案 5 稻瘟病菌中细胞自噬研究方法	(171)
方案 6 稻瘟病菌细胞自噬研究中的其他相关显微观察	(172)
方案 7 双分子荧光互补技术	(174)
方案 8 蛋白质电泳(Tricine-SDS-PAGE)及蛋白质印迹杂交	(176)
方案 9 酵母双杂交系统研究蛋白互作	(180)
方案 10 细胞表达目的蛋白	(184)
7 真菌中结合 PCR(Double-Joint PCR)基因融合片段操作	(186)
8 真菌 RNAi 技术的应用	(190)
第十二章 丝状真菌分子进化与系统发育分析	(205)
1 概述	(205)
2 系统发育分析方法	(206)
方案 1 木霉菌的 ITS rDNA 的 PCR 扩增	(206)
方案 2 木霉菌的 <i>tef 1-α</i> 基因的 PCR 扩增	(207)
方案 3 木霉菌进行 RAPD 研究	(208)
方案 4 AFLP 技术	(209)
3 构建系统发育树	(209)
第十三章 丝状真菌群体遗传分析	(211)
1 纯培养条件下真菌群体遗传分析	(211)
方案 1 Pot2-rep-PCR	(211)
方案 2 MGR586-RFLP	(212)
2 免培养技术用于环境中真菌群体的遗传结构分析	(212)
方案 3 土壤真菌 DNA 的直接提取	(215)

方案 4 土壤样品中真菌总 DNA 的提取	(215)
第十四章 真菌分子生物信息学常用软件的使用	(217)
1 概述	(217)
2 文件格式	(217)
3 FASTA 格式	(219)
4 Tab(或其他分隔符)分隔的行文件	(219)
5 BLAST	(222)
6 Primer Premier 5	(226)
7 e-PCR	(231)
8 Clustal	(235)
9 BioEdit	(237)
10 Staden Package	(239)
参考文献	(249)

第一章 丝状真菌基因型特征的鉴定

1 概述

随着近 30 年生物技术的发展,建立了许多包括真菌在内的生物体基因型鉴定的方法。本章所介绍的方法只是其中常用的一些技术,而本章的重点是希望给科研人员提供理解基因型鉴定技术的原理和策略,从而帮助读者根据研究对象的不同,选择合适的技术回答生物学问题;同时指出信息的来源,帮助读者进一步加深对操作步骤的理解。

2 基因组变异的主要特征

尽管 DNA 的复制具有很高的保真性,真菌基因组变异还是持续发生:如核苷酸置换、插入、缺失事件,染色体某些基因区域及整条染色体重排、转座事件,基因从细胞质转入细胞核,甚至从其他生物体中获得遗传元件等,都可能发生。这类事件的发生虽然非常少见,但可以通过合适的遗传进化分析方法检测到特定时间的某一变异的存在,因此,真菌基因组中存在的众多 DNA 区域和特征就可以进行分析。任何种类真菌的基因组都可能存在这样或那样变异的区域,在相当程度上,就是我们所面临的问题所在。我们可以根据我们要检测变异的特点,选择合适的解决方法。

真菌基因组中的编码区和非编码区是能够进行区分的,编码区包括编码蛋白质的 DNA 序列和结构 RNA 的序列,非编码区包括基因间的间隔区,内元和功能未知的序列。非编码区可能被转录为 RNA,也可能不转录。一般来说,编码区比非编码区具有更高的保守性。但是,即使非编码区也可能具有生物学功能,例如调节区,或者能够被转录的间隔区在转录后可以形成二级结构,有助于剪切形成正确的 RNA。一般保守性高的编码区可以设计引物对内元序列进行 PCR 扩增,从而研究不同单元之间内元的变异特点。

基因组中序列的重复数变化很大。一些基因存在相当少的重复数,而有些序列的重复数很大。大多数编码蛋白的基因重复数很少,但这种现象与基因的功能有关。蛋白质或结构 RNA 需要高效率的代谢功能,结构元件需要能迅速执行生命活动,这样的基因区段在基因组中倾向于高拷贝数,使转录频率最大化。但是,重复数还受到遗传元件调节过程的影响。遗传元件对复制过程很敏感,例如在复制和转录过程中从转座子衍生出的序列可能在基因组中发生迁移。

单拷贝基因不多,这类基因往往以基因家族成员的形式出现。一个基因家族一般包含多个一致或几乎一致的基因,也经常检测到发生歧化的基因家族含有相似但不一致的基因。在许多情况下,基因家族的基因可以产生功能不同的基因产物,也有些基因是没有功能的基因或称为假基因。

许多拷贝的基因排列成串联重复形式,即同一基因的多个拷贝首尾相接。串联重复基因序列常彼此非常相似,在单个拷贝中不易出现随机突变。这种首尾重复的串联趋向同一

性,被称为一致进化(concerted evolution)。一致进化的机制虽有假说但并不清楚,这些串联重复序列的一致性对物种的研究非常有用,因为当遗传交换发生时,一致进化的许多随后机制非常有效。

一个关于高拷贝数的串联重复序列的例子是组成核糖体的编码结构 RNA 的基因(rDNA),rDNA 是一个遗传分析的常用靶点。任何一个真菌核糖体 rDNA 重复序列至少包含 3 种基因:核糖体小亚基基因(也称为 16-18S rDNA 或 SSU),5.8S 基因和大亚基基因(也称为 26-28SrDNA 或 LSU)。在 SSU 和 5.8S 基因之间的区段,称为内部转录间区 1,即 ITS1。在 5.8S 基因和大亚基之间的非编码区,称为内部转录间区 2,即 ITS2。这个 rDNA 可以转录形成单一的单位,然后剪切除去间区。在转录本之间还有基因间隔区,在一些担子菌中还有第四个基因:单独转录的 5S 基因。在不同的非编码区,其进化速率不同,因此,可以用来检测分类单元不同组群之间的进化历史。编码区基因虽被称为歧化区段的中度变异区域,但一般进化高度保守。ITS 区段中度变异,而基因间隔区高度变异。

在基因组中,卫星 DNA 是指在整个基因组中含有很高拷贝的相似核苷酸序列的片段。小卫星 DNA 是指 15~30bp 为核心单位的多次串联重复序列,然后形成高拷贝数的重复序列,小卫星 DNA 存在于端粒结构区。微卫星 DNA 是指 2~10bp 长度片段多次串联重复形成的高拷贝重复序列。这些序列分散分布于整个基因组中,在复制滑动、滚动环扩增、非等位基因交换过程中起作用。还有许多高拷贝重复序列不是串联重复的,但也是分散于整个基因组中,许多这样的重复序列是由转座元件通过转座衍生而来,在长期的进化过程中,拷贝数发生突变并失去转座功能,最后经过染色体重排分散于基因组中。

线粒体 DNA 也可以编码一些蛋白质和自身的 RNA。真菌的线粒体 DNA 的变异速率远高于核基因组,这样也使得线粒体基因组可以用来研究基因型。一些证据表明真菌线粒体是双亲遗传,也有重组特点。

以上这些序列片段和遗传元件都具有基因型的分子分析能力。以下我们将具体分析哪些序列区段用于哪些方面的分析,采用的分子生物学的方法有哪些。

3 确定研究目的

分子研究至少要有一至两个最初的目标:建立同一性或确定相互关系。身份(同一性)建立是要明确代表不同遗传样品的个体之间是否一致,如果样品不同,那么假设是错误的,却可经常导致复杂的问题,如这些不一致的观察值是否可以达到确定这些样品是属于不同遗传单位的显著性。确定关系假设则不同,是要试图说明由个体样品之间变异的模式引申出其系统发育关系。

在通常情况下,有三种方法来解决研究目的是同一性还是关系研究。第一个方法你可以选择一个确定位点的 DNA 区段来分析,例如 rDNA 或蛋白编码基因。选择的原因是已经知道这个区段在一个分类单元中的变异大小,或用这个引物是否可以对该基因进行有效地扩增。在这个方法中,研究人员可以在需要解决的合适变异水平上,应用预先已知的关于这个基因的遗传变异特点的知识。第二个方法,研究者可以选择 DNA 扫描方法,即任意分布在基因组始终的多个靶基因的 DNA 区段。这种方法由于靶区段是任意的,因此产生的标记可以从无变异到高变异,这样使研究者可以选择合适的特征来解决所要研究的问

题。第三个方法是更加功能性的方法,涉及用 mRNA 检测基因表达。由于这个方法是根据基因的功能,可能用来检测环境的或系统发育的不同更有价值。

4 用于基因组分析的技术

4.1 PCR 技术

虽然在 PCR 过程中有很多因素对扩增结果有影响,但引物是最有决定作用的因素。

在一定条件下,引物可以扩增出一至多条产物。为了提高产物的特异性,用于真菌基因组扩增的引物的核苷酸数目一般要 17 个以上。作为真菌,其基因组不是很大,PCR 的变性一般在温度 94℃ 时,几秒即可完成。但由于基因组 DNA 的提取过程也不同,其纯度也不同,因此进行一定的优化是必要的。退火温度是影响产物特异性的另一个重要因素,在实践过程中,退火温度一般采用以下的公式进行估算:

$T = T_m - 5^\circ\text{C}$, 其中 T 是退火温度

T_m 用以下公式估算:

$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$, 其中 A 、 T 、 C 、 G 分别指引物中每种碱基的数目。

一般在 50 μl 的 PCR 体系中,包含:

模板	1~100ng
引物 1	0.5~1 $\mu\text{mol/L}$ (0.5)
引物 2	0.5~1 $\mu\text{mol/L}$ (0.5)
四种核苷酸	100~400 $\mu\text{mol/L}$ (200)
Taq 酶(5U/ μl)	0.5~3 U
PCR 缓冲液(10 \times)	5 μl
Mg ²⁺	1.5~3 mmol/L(1.5)
总体积:50 μl	

4.1.1 引物设计

现在已经有许多通用引物的序列发表,用于对基因组中一些特定区段和特定基因进行 PCR 扩增。在这些引物中,其中一些通用引物是根据高度保守的基因区段来设计的,因此,可以从多种多样的生物中进行扩增。还有一些引物专一性高,根据一个基因或一个物种的基因区段来设计,甚至根据物种的一个变种来设计。如果一个引物设计成特异性引物,则只能从特定的群体中扩增出特异性片段。如果一个引物是通用设计,则可以从相关的不同物种中扩增出目的片段。在许多情况下,通用引物已经用于扩增不同分类单元含有变异的同源 DNA 序列片段。

与特异引物的设计相比,设计通用引物有特殊的策略,但引物设计的基本原理是相同的。用于非特异性扩增的引物一般很短(例如用于 RAPD 的引物是 10nt),但用于特异扩增的引物一般在 18~24 个核苷酸长度。引物可以更长,但长度增加意味着如果引物序列稍有错误,则难以进行 PCR,而引物合成是有一定的错误几率的,因此扩增失败的风险增大。在这种情况下,对引物进行纯化以确保高特异性是十分必要的。

引物可以是模板序列的任何匹配序列,但是成功扩增的引物还是有一定的特征。首先,引物序列的内部重复区在扩增时可以导致形成引物二聚体。由于引物二聚体很短,它们的扩增非常有效,这将大大降低目的片段的产量。其次,引物中互补的内部重复序列可以使引物形成二级结构,叫做发夹环(hairpin loops),也可以严重影响引物的效率。最后,如果引物的主要区域是 A/T 或 G/C,将产生极端退火最适温度,这样使一对引物联合退火温度的优化变得非常困难。因此,如果组成引物的 4 种碱基在引物中平衡分布、没有内部重复序列或互补序列区域,这样的引物会更有效。

4.1.2 特异引物与通用引物

引物与模板分子的匹配程度决定着 PCR 的特异性。通用引物 3'-端的碱基对正确扩增至关重要,因为这个区域必须在 DNA 聚合酶起始复制之前与模板紧密结合。为了增加引物的通用性,在通用引物设计时,引物的某些碱基是具有简并性的,即引物的某个位置上的碱基可能不是一种,这样增加其通用性的同时,也存在一定的风险。3'端 5 个核苷酸以内的错配显著影响引物的退火,以致常使 PCR 失败。3'端上游的不匹配对扩增的影响随扩增过程的进行而逐渐减少,特别是如果它们被匹配序列包围。但是一定程度的错配可以导致一些其他的特点。A : G 和 C : C 错配可以导致产量下降最大(约 100 倍),A : A 错配使产量下降较少(约 20 倍),而 T : G、T : T 和 T : C 错配导致的退火影响最小。因此,在引物设计时,对不同位点的核苷酸的选择意味着引物是特异的还是通用引物。

根据非蛋白编码区进行引物设计(例如核糖体 RNA 基因)则相对直接。不同分类单元之间的序列进行对齐排列(align),核苷酸相同的区域(通用引物)或不同区域(特异引物)可以用来设计通用或特异引物。但是对蛋白编码区设计引物则不同。根据蛋白编码基因的氨基酸顺序设计引物相当多的依赖密码子的位置。第 1 个和第 2 个核苷酸相对保守,而第 3 个核苷酸位置核苷酸种类变化很大。当要对一个编码蛋白质的基因进行通用引物设计时,选择最小冗余 7~9 个氨基酸长度的密码子区最有用。如果选择的引物 3'端不是最小冗余的氨基酸密码子(即编码氨基酸的密码子有 2 个甚至 3 个),很可能在这个关键区域会有不匹配的情况,这就要求 3'端 5 个核苷酸不匹配的情况必须减低到最小。

一对典型的通用引物,对来自不同单元的模板都可以应用,即所谓的“退化引物”。退化引物一般包括在多数序列中相同的核苷酸,但并不是每个待扩增的序列都完全匹配,有少数位点存在区别。在退化区域,可能存在任何 2 个、3 个甚至 4 个不同碱基,形成混合物。这样可以使引物中的一部分序列与实际的模板匹配,从而顺利完成 PCR 过程。但是依据退化的程度,匹配引物的实际浓度可能很低,势必减少产物的合成量。大多数引物合成设备能合成退化位点(degenerate position)。

4.2 单位点变异分析

在一个确定的 DNA 区域内,可以根据 DNA 片段在电泳场中的迁移速率的变化,检测不同基因型的真菌中相互联系片段内的核苷酸取代,或通过测定整个片段的碱基组成来检测其变异。片段变异的大小可以通过琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳来检测。例如,琼脂糖凝胶电泳可以实现检测 DNA 长度 5% 的变异,而聚丙烯酰胺凝胶电泳可以检测 1% 的差异。而 DNA 测序可以揭示一个片段最多的信息。由于自动测序仪的应用,DNA

测序已经成为劳动量和花费都在减少的检测手段。

4.2.1 RFLP 及其相关技术

限制性片段长度多态性(RFLP)分析是根据限制性内切酶的特性,限制性内切酶可以在双链 DNA 片段的特定序列(通常是 4~6 个核苷酸长度)裂解 DNA。限制性内切酶多是从原核生物体内提取的酶,这些酶在外源 DNA 进入原核细胞时可以起保护细胞的作用。

传统的 RFLP 的操作,是先将基因组 DNA 用相应的限制性内切酶裂解,酶切片段用琼脂糖凝胶分离,再转移到醋酸纤维素膜或尼龙膜上,然后与 DNA 探针杂交,过程与 Southern 印迹杂交一致,只不过 Southern 印迹杂交是一个样品用不同的限制性内切酶处理,每个泳道上一个酶切产物,不同的泳道是不同的酶切产物。而 RFLP 是不同的样品用相同的限制性内切酶处理,每个泳道上一个样品,不同的泳道是不同样品的酶切产物。RFLP 所用的探针可以是要研究的分类单元的克隆片段,也可以是相关的分类单元的克隆片段,甚至是重复元件(如微卫星片段),例如那些用于 DNA 指纹图谱(DNA fingerprinting)检测的探针。杂交探针不一定来源于已知的 DNA 片段,未知克隆和 PCR 片段都可以用作探针来检测变异。

还有一种方法,叫做 PCR-RFLP,先用 PCR 引物扩增出 DNA 片段,接着进行限制性内切酶消化,然后电泳分离酶切片段,电泳结果用溴化乙锭染色来检测酶切位点的变异。这种方法比 Southern 印迹杂交容易操作,快速且简便。

4.2.2 DGGE、TGGE 和 SSCP

还有一些技术,如变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)、单链一致性多态性分析(single-strain conformation polymorphism, SSCP)等也用于区分 DNA 片段。这些方法的优点是它们不仅可以区分不同长度的 DNA 片段,还可以区分片段长度相同但有一至几个不同的碱基替换差异的片段。DGGE 和 TGGE 是根据 DNA 片段在具有梯度变性的电场中移动时,不同 DNA 片段的变性特点有差异来区分 DNA 片段的不同长度与组成(在 DGGE 中有化学变性剂,在 TGGE 中存在温度梯度)。当双链 DNA 片段通过变性梯度时,在开始变性的位置, DNA 片段在电场中的移动发生改变。由于不同序列的 DNA 片段在变性梯度电场中的变性位置不同,从而它们相互区分开。SSCP 是根据二级结构的不同来检测电泳移动过程中的差异的。

4.2.3 外元引发的内元穿越(exon primed intron-crossing, EPIC)

许多真核生物的内元附近有高度保守的位点,可以根据内元两侧的外元保守区设计 PCR 引物。这些引物可以用来扩增具有高变异区域的内元序列,这些变异可以通过 RFLP 或 DNA 测序来检测。这种方法广泛应用于动物的遗传多样性检测,也应用在真菌基因型研究中。

4.2.4 DNA 序列分析

检测 DNA 最多多态性的方法是对 DNA 目的区段进行序列分析,从而鉴定每个位置的

4.3.2 DAF

DNA 扩增指纹图谱(DNA amplification fingerprinting, DAF)采用更短的 5~6nt 的序列片断作为引物,PCR 结果在琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶上可以产生重复性的谱带。DAF 结果的产生并不依赖以上所述的基因组的差异,而是一种简便、快速、敏感的方法,可以广泛应用到各种生物,例如,虽然豌豆的分子多样性很低,DAF 可以检测到从一个母本而来的高同质性的不同品种之间的多态性。DAF 能够产生比其他基因组扫描技术更复杂的指纹图谱,因此,往往需要在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分析,采用银染的方法检测。简单的 DAF 可以用来构建遗传图谱,而复杂的 DAF 带型可以用来进行个体基因型的鉴别。

4.3.3 AFLP

扩增片断长度多态性(amplification fragment length polymorphism, AFLP)是限制性酶切和 PCR 扩增相结合产生多态性片断的技术。样品 DNA 首先用限制性内切酶消化,然后用一个寡核苷酸接头将消化的片断连接起来,连接完成后,接头序列和 3'-端随机序列为引物序列,采取 PCR 方法扩增获得一系列产物片断,然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物进行分离。这种技术可以获得大量的多态性片断,但是这些标记可能集中在一个基因组的小范围内。

4.3.4 VNTR 位点

传统的 DNA 指纹方法许多是根据串联重复序列的不同数目(variable number tandem repeat, VNTR)位点的特性,通过与小卫星中心序列的酶切产物进行 Southern 杂交来进行的。这是一个检测多位点变异的有效工具。用微卫星序列进行 DNA 指纹分析的操作程序也很成熟。VNTR 位点也可以通过合并 PCR 引物来进行随机检测。小卫星和微卫星中心序列都可以合并到 PCR 引物序列中,从而丰富了对 VNTR 位点的扩增产物。

虽然 VNTR 位点分散于整个基因组中,根据 VNTR 位点两侧保守序列设计引物进行 PCR 扩增,也可以检测单个包含微卫星 SSR 序列的 VNTR 位点。但是,如果引物不能从相关的生物中扩增出片断,则需要对围绕 VNTR 位点的序列进行相当的研究,以得到足够的可供引物设计的信息。一旦引物获得了,只需要对少数位点进行取样分析就可以揭示相当多的遗传变异。部分原因是 SSR 序列的重复数有相当大的突变率,产生的标记也是共显性的。

上述许多技术可以相互结合,从而增加了标记谱带的复杂性,即对于同一组样品,采用不同的方法,对结果进行综合分析,可以对研究的问题得出比较科学的答案。

4.4 环境样品的分析

从环境样品中如土壤、植物组织、泥土、水体等进行 PCR 扩增,通用引物的选择是关键。为了避免对非真菌材料进行扩增,采用对真菌有选择性的引物是必要的。对于核糖体基因,已经有针对真菌设计的通用引物如 ITS1F 和针对担子菌的 ITS4B。还有如 NL6Amum 针对于 Pezizales, NL6Bmum 针对担子菌。

为了分析环境样品中真菌的群体,在 PCR 过程中,要采用避免从单个个体中扩增出多