用脉冲电场凝胶电泳分析棉病囊霉及其突变体的染色体 DNA

杨素红　葛忠良

（北京放射医学研究所，北京　100850）

提　要

采用交变脉冲电场凝胶电泳和碱变性交变脉冲电场凝胶电泳方法，分析了棉病囊霉酵母菌及其 2 个不同的突变菌株的核型，得知此菌株含有 5 条染色体 DNA，而 2 株突变体的染色体 DNA 都没有大片段的缺失或双链断裂，但其稳定性不如野生型菌株的 DNA，而且存在单链断裂等碱不稳定性位点.

关键词　棉病囊霉，交变脉冲电场凝胶电泳，碱变性交变脉冲电场电泳，染色体 DNA

棉病囊霉（*Ashbya gossypii*，AG）是子囊菌纲酵母菌属的一个种，目前在核黄素的微生物发酵生产中起着重要作用[1,2]. 如果能够对 AG 的遗传背景有一清楚的认识，那么就能定向地改造这个工业生产用菌种，但是文献中有关这方面的内容尚未见报道.

脉冲电场凝胶电泳（pulsed field gel electrophoresis，PFGE）是近年来出现的一种分离大分子 DNA 的新方法，自从 Schwartz 和 Cantor 于 1984 年首次报道用此方法成功地分离酵母细胞完整染色体 DNA 以来[3]，这一技术得到了迅速发展和广泛应用[4—6]. 本实验采用六角形电极电场 PFGE 并结合碱变性电泳法分析了 AG 及两株本实验室分别用电离辐射和激光辐照获得的突变体 CMG 和 JMG 的染色体 DNA，首次报道 AG 的核型.

1　材料与方法

1.1　菌种　AG：购自中科院微生物研究所，不产核黄素，在固体培养基上长成乳白色菌落；CMG 和 JMG：由本实验室分别用电离辐射和氦氖激光辐照获得的 AG 突变体，产核黄素，在固体培养基上长成黄色菌落；啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*，SC）：Y332，由北京生物工程研究所陈添弥教授惠赠.

1.2　实验方法

1.2.1　细胞培养：AG，CMG 和 JMG 菌种接种到 10 波林的麦芽汁固体培养基（含 1.3%的琼脂）上，28—30℃培养 4—5d. SC 接种到 YPD 液体培养基（1%酵母提取物，2%蛋白胨，2%葡萄糖）上，28—30℃摇床培养 14h.

1.2.2　原生质体制备：取培养的 AG，CMG 和 JMG 菌落称重，按 0.5g/ml 的比例加入 0.5%蜗牛酶-0.5%纤维素酶溶液，28℃酶解 100min，再用脱脂棉过滤并用高渗磷酸盐缓冲液（0.2mol/L，0.6mol/L KCl，pH 6.0）洗涤数次. SC 细胞经离心收集，用 1.0%蜗牛酶溶液作用 100min，所得原生质体用高渗磷酸缓冲液洗涤数次.

1.2.3　细胞 DNA 准备：MG，CMG，JMG 原生质体制成 10^9 个/ml 的悬液，SC 原生质体配成 10^8 个/ml 的悬液，再按文献 [5] 处理样品：原生质体悬液与等体积的 1%低熔点琼脂糖（Sigma）混合后加到制胶模孔中，凝固后取出小胶块，放入含 2mg/ml 蛋白酶 E（Merck），1%SDS，0.5mol/L EDTA，10mmol/L Tris-HCl（pH8.0）的反应液中，50℃，48h 溶胞、去蛋白，然后用 TE（10mmol/L Tris-HCl，1mmol/L EDTA）小心清洗胶块，将制备好的样品 DNA 胶块于 0.5mol/L EDTA（pH8.0）溶液中 4℃保存待电泳.

1.2.4　电泳：采用 DY-4A 型交变脉冲电

收稿日期：1992-04-15　　修回日期：1992-05-22

泳仪（江苏兴化分析仪器厂产品），在六边形电泳槽的每条边对称排列多个铂电极，由此产生六角形电极电场，其2个脉冲电场方向相交120度，DNA在脉冲电场作用下呈"Z"形向前移动[7].

a. 交变脉冲电场凝胶电泳：用0.5×TBE（45mmol/L Tris，45mmol/L 硼酸，1.25 mmol/L EDTA，pH8.0）配制1%的琼脂糖凝胶，再将样品DNA胶块切割成适当大小，小心加入凝胶加样孔中，用1%凝胶封固，放入电泳槽中，加入1 000ml 0.5×TBE的电泳缓冲液，16℃左右电泳. 电泳方式为：先选择100V电压，在120s和195s的脉冲时间下先后各电泳12h，然后将电压和脉冲时间分别调为50V和420s，继续电泳24h. 电泳完毕，取出凝胶，用0.5mmol/L溴化乙啶溶液染色1h，在紫外灯下照相，显示细胞DNA在凝胶中的分布.

b. 碱变性交变脉冲电场凝胶电泳：用碱性凝胶缓冲液（50mmol/L NaCl，4mmol/L EDTA）配制1%的琼脂糖凝胶，将DNA小胶块加入样品凝胶胶孔，用凝胶封固，放入电泳槽中，加入1 000ml 碱性电极缓冲液（30mmol/L NaOH，2mmol/L EDTA），16℃左右电泳. 电泳方式为：电压选择40V，在120s、195s、420s的脉冲时间下各电泳10h. 电泳完毕，取出凝胶，用凝胶中和液（0.1mol/L Tris，pH7.8—9.0）中和半小时，再进行染色、照相.

2　结果与讨论

2.1　由本实验所得的结果表明，AG具有5条染色体DNA. 脉冲交变电场凝胶电泳的结果见图1，从中可以看出，G（SC染色体DNA）出现11个条带，这是迄今报道的分离SC染色体DNA的最好结果，由此可认为本实验所采用的电泳条件是可行的. A，B，C均显示5个带，而且各泳道的电泳条带位置相同，说明AG菌株有5个染色体DNA，突变体的染色体DNA没有大片段的缺失或双链断裂.

2.2　突变菌株的染色体DNA不如野生型菌株稳定. 图1中D道仍然出现5个条带，

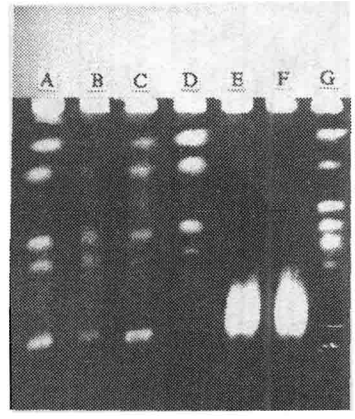

图1　不同样品的交变脉冲电场凝胶电泳结果

Fig. 1　PFGE of various DNA samples

A：AG　B：CMG　C：JMG　G：SC

D，E，F：存放3个月之后的AG，MG

A：AG　B：CMG　C：JMG　G：SC

D，E，F：AG，MG after storage of three monthes

而E，F道电泳条带改变，可见样品DNA经4℃于0.5mol/L EDTA溶液中贮存3个月之后，野生型菌株的核型未见变化，而突变菌株的染色体DNA都降解为小分子，电泳时迁移率变大，在离加样孔较远处形成一片，提示突变型菌株与野生型菌株相比，其遗传物质可能对外界因素更为敏感.

2.3　突变菌株DNA分子上有单链断裂或其他变性位点存在. 图2是碱变性脉冲电场凝胶电脉的结果，从中可以看出，A，D，F道的DNA未分开，集中分布在加样孔附近，说明这些样本的DNA以完整的双链形式存在；B，C，E道的DNA分子迁移率较大，说明其分子较小，结合图1可以推断，这些DNA分子上有单链断裂或其他变性位点存在，因为只有这样的分子在碱性条件下被解链为单链DNA，分子变小. 从图中还可看出，E道的分子比B，C道的分子还小，这与结论2一致.

由上可见，我们用脉冲交变电场凝胶电泳法初步确定棉病囊霉酵母菌的核型为5条染色体，结合碱变性脉冲电场凝胶电泳结果，可以认为，电离辐射和氦氖激光辐照诱发此菌种突变产生核黄素，没有引起其DNA发生双链断裂或大片段的缺失，但突变菌种的DNA分子

存在单链断裂或其他碱不稳定性位点.

图 2　不同样品 DNA 的碱变性脉冲电场凝胶电泳

Fig. 2　alkaline PFGE of various DNA samples

A：AG　B：CMG　C：JMG　F：SC

D，E：存放 3 个月之后的 AG，MG

A：AG　B：CMG　C：JMG　F：SC

D，E：AG，MG after storage of three monthes

参　考　文　献

1　Ward O P. Introduction：*Fermentation biotechnology，principles，processes and products*，Milton Keynes：Open University Press，1989：8

2　Rivlin R S. *Riboflavin*. N. Y：Plenum Pr，1975

3　Schwartz D C，Cantor C R. Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*，1984；**37**：67－75

4　Herrmann B G Barlow D P，Lehrach H. A large inverted duplication allows homologous recombination between chromosomes heterozygous for the proximal t complex inversion. *Cell*，1987；**48**：813－825

5　朱圣庚，黄仪秀. 交变脉冲电场凝胶电泳分离染色体 DNA 分子. 生物化学与生物物理进展，1987；**5**：67－69

6　周平坤，魏康. 用脉冲电场凝胶电泳检测电离辐射所致哺乳动物细胞 DNA 双链断裂. 生物化学杂志，1991；**7**(5)：1

7　Carle G F，Frank M，Olson M V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science*，1986；**232**：65－68

Analysis of Chromosome DNAs in *Ashbya gossypii* and Its Mutant Strains Using pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Yang Suhong　Ge Zhongliang

(*Beijing Institute of Radiation Medicine，Beijing*　100850)

ABSTRACT

Pulsed-field gel electrophoresis and alkaline pulsed-field gel electrophoresis were used to analyze the chromosome DNAs of *Ashbya gossypii* and two kinds of its mutant strains CMG and JMG，which were obtained by γ-ray and Helium-Neon laser irradiation，respectively. The experiments resulted in the conclusions that AG contains five chromosome DNAs；and that no double-stranded breaks or loss of large DNA fragments but alkaline labile sites existed in both the mutant strains.

Key words　*Ashbya gossypii*，pulsed-field gel electrophoresis，alkaline pulsed-field gel electrophoresis，chromosome DNA