

# 一种用于构建红色红曲霉基因组 cosmid 文库的大片段 DNA 制备方法

安洋<sup>1,2</sup>, 杨晶<sup>1,2</sup>, 徐欣欣<sup>1,2</sup>, 刘钢<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所真菌地衣实验室, 北京 100101)

(<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要** 【目的】制备用于构建红色红曲霉 cosmid 文库的大片段基因组 DNA。【方法】采用优化的酚氯仿抽提法制备 DNA, 并利用 *Sau3AI* 切割至平均大小为 40 kb, 然后使用 Stratagene 包装蛋白构建 cosmid 文库。基于 PCR 法使用同源探针从该文库中进行了目的基因的筛选。【结果】制备了浓度为 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 平均片段大小大于 48 kb 的红色红曲霉大片段基因组 DNA。利用该 DNA 构建的 cosmid 文库基因组覆盖倍数为 10, 并筛选到了含有目的片段的 cosmid。【结论】通过该方法制备红色红曲霉大片段基因组 DNA 简便易行并且完全可以用于构建 cosmid 文库。

**关键词**: 红色红曲霉; 大片段基因组 DNA; cosmid 文库

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)10-1385-04

红曲霉在我国传统天然产物宝藏中有着独具东方特色的应用历史。在诸多传统药典辞书中可见其不同的应用, 如: 食品保藏, 染色, 调制风味, 酿酒及入药。现代科学研究进一步证实了红曲霉能够产生丰富的次生代谢产物<sup>[1-3]</sup>, 如: 能够抑制胆固醇合成的 Monacolin K; 具有降血压功效的  $\gamma$ -氨基丁酸; 包括红色素、橙色素、黄色素在内的天然色素等。从基因水平上了解这些重要天然化合物的生物合成途径, 有助于利用基因工程手段改造和优化这些次生代谢产物的组分。通过制备同源探针, 从大片段基因组文库中筛查未知生物合成基因是一种快速有效的方法<sup>[4]</sup>。红曲霉的细胞壁成分复杂, 较难温和而有效地破壁, 进而获取基因组 DNA。利用传统方法, 如低熔点琼脂糖包埋原生质体或者细胞核, 虽然可以获得大片段基因组 DNA, 但是制备周期较长, 步骤繁琐, DNA 得率较低, 所用试剂和仪器成本较

高<sup>[5-6]</sup>。为此, 我们经过反复实验论证, 摸索出一种简便易行的提取红色红曲霉大片段基因组 DNA 的方法, 并将之用于构建 cosmid 文库。通过筛选目的基因证明了该方法的有效性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒**: 红色红曲霉 (*Monascus ruber*) AS 3.549, 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心; SuperCos 1 Cosmid Vector Kit, 购自 Stratagene 公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器**: 十二烷基磺酸钠, 购自 Sigma 公司; Gigapack III XL Packaging Extract, 购自 Stratagene 公司; 限制性内切酶为大连宝生物公司产品; T4 DNA 连接酶及修饰酶购自 NEB 公司; 其他常规生化试剂均为国产分析纯; 冷冻台式离心机为

基金项目: 国家科技支撑计划(2007BAI26B01)

\* 通信作者。Tel: +86-10-64807892; E-mail: liug@sun.im.ac.cn

作者简介: 安洋(1982-), 男, 吉林长春人, 硕士研究生, 主要从事丝状真菌次生代谢产物分子调控相关的研究。E-mail: anyang@foxmail.com

收稿日期: 2009-03-23; 修回日期: 2009-04-15

Eppendorf 公司产品;凝胶电泳仪购自北京东方君意公司;凝胶成像系统为 Bio-Rad 公司产品。基因扩增仪购自 Bio-Metra 公司。

**1.1.3 培养基及缓冲液:**菌丝生长培养基(1% 葡萄糖、0.5% 牛肉膏、1% 蛋白胨、0.5% NaCl);抽提缓冲液(10 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA);包装蛋白缓冲液 SM(5.8% NaCl、2%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、50 mL 1 mol/L Tris-HCl pH7.5、5 mL 2% 明胶,加去离子水至 1 L)

## 1.2 菌丝体制备

将红曲孢子悬液接种于 200 mL 生长培养基,置于 500 mL 三角瓶中 28℃ 下 180 r/min 培养 48 h,过滤收集菌体,滤纸吸干培养基后冻存待用。

## 1.3 基因组 DNA 的提取

将冻干菌体置于洁净研钵中,加入液氮研磨至均匀颗粒。每 1 g 粉末加入 15 mL 抽提缓冲液混匀,加入 SDS 至终浓度 1%。50℃ 水浴 15 min。待冷却至室温后加入等体积中性酚-氯仿-异戊醇(V/V/V = 25/24/1),将混合物置于洁净的 50 mL 三角瓶中温和混匀 10 min,11℃ 下 4000 × g 离心 20 min,吸取上清,再次用酚抽提一次。取上清,加入等体积氯仿-异戊醇(V/V = 24/1),温和混匀 10 min,11℃ 下 4000 × g 离心 20 min,吸取上清,置于冰上。加入醋酸钠至终浓度 0.3 mol/L,缓慢加入两倍体积的预冷无水乙醇,用玻璃棒将白色絮状 DNA 挑出至 1.5 mL 离心管,用 70% 乙醇漂洗后晾干。加入 1 × TE 缓冲液,放置 4℃ 过夜,使 DNA 自然溶解。

## 1.4 酶切基因组 DNA

每 150 μL 酶切体系包括 30 μL(150 μg)基因组 DNA,1 μL(0.005 U) *Sau3A* I,37℃ 反应 10 min。通过酚氯仿抽提终止反应,吸取上清用乙醇沉淀。沉淀干燥后溶于 1 × TE 缓冲液待用。

## 1.5 切割片段与载体的连接及包装

SuperCos 1 Cosmid Vector 的处理按照使用说明书进行。20 μL 连接反应体系含有 6 μg DNA 片段,6 μg 载体片段,2 μL 的 T4 DNA 连接酶(400 U/μL),16℃ 下反应过夜。加入 4 μL 连接产物至刚刚融化的包装蛋白,快速混匀。22℃ 水浴 2 h。加入 500 μL SM 缓冲液混匀。最后加入 20 μL 氯仿,混匀后可见无色透明沉淀块。置于 4℃ 保存。

## 1.6 文库滴度及丰度测定

分别稀释包装原液至 1/10 和 1/50 两种浓度,转化至 XL1-Blue MR 感受态细胞,涂布 LB/Amp 琼脂平板,37℃ 生长过夜。对平板计数,计算每 μL 包装原

液的转化效率。随机选取 10 个单菌落使用碱裂解法抽提 cosmid DNA,分别使用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行单酶切,通过比较酶切图谱的差异,判断文库的丰度。

## 1.7 文库的制备与保存

根据 Clarke-Carbon 公式计算完全基因组文库应有的克隆数,选取每平板 200 至 300 个转化子的包装液稀释度,转化至 XL1-Blue MR 感受态细胞,涂布 LB/Amp 琼脂平板,37℃ 生长过夜。每平板用 2 mL 50% 甘油洗下所有菌落,-70℃ 保存于冻存管中。

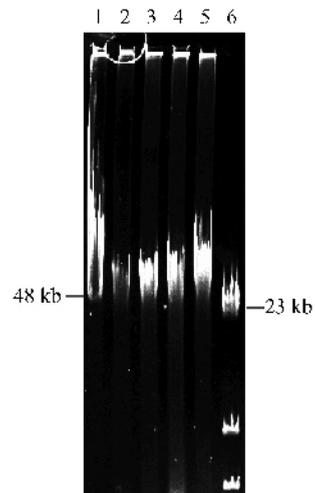
## 1.8 PCR 法筛选 cosmid 文库

对每板的混菌进行 PCR 验证,选取给出阳性信号的平板,将其转化子接种到 96 孔细胞培养板中,37℃ 静置培养过夜。每孔取 50 μL 菌液,按照行列式混合,进行菌液 PCR。

## 2 结果

### 2.1 红色红曲霉大片段基因组 DNA 的质量及得率

在分离细菌基因组 DNA 常规方法的基础上,优化了各种相关参数,建立了一种简便易行的分离红色红曲霉大片段基因组 DNA 的方法。图 1 表明,该方法分离到的 DNA 片段集中在 48 kb 以上。同时经  $OD_{260}$  测定浓度为 5 μg/μL,每 1 g 菌体粉末可制备 10 mg DNA。



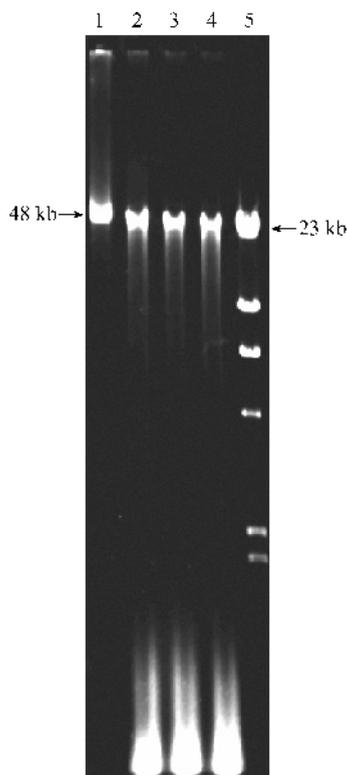
**0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA**

Fig.1 0.5% agarose gel electrophoresis of genomic DNA. Lane1:  $\lambda$ DNA; Lane2-5: genomic DNA 1# - 4#; Lane6:  $\lambda$ DNA *Hind* III fragments.

### 2.2 cosmid 文库的评价

由于 XL1-Blue MR 感受态细胞优先包装 40 kb 片段,所以经过酶量和反应时间的调整,可以控制切割产生的 DNA 片段大小,使其集中在 40 kb 左右(图 2)。

随机挑选 10 个转化子提取 cosmid, 酶切分析表明全部有插入片段 (图 3)。参考台湾食品工业发展研究所公布的红曲霉基因组大小为 26 Mb, 根据 Clarke-Carbon 公式, 在期望为 99% 的概率下, 平均插入片段大小为 40 kb, 所需转化子克隆数为 3000 个左右, 基因组覆盖倍数为 4.5。实际得到转化子数量为 6809 个, 其覆盖基因组的倍数为 10。所以理论上该文库包含有红色红曲霉基因组上的所有基因。

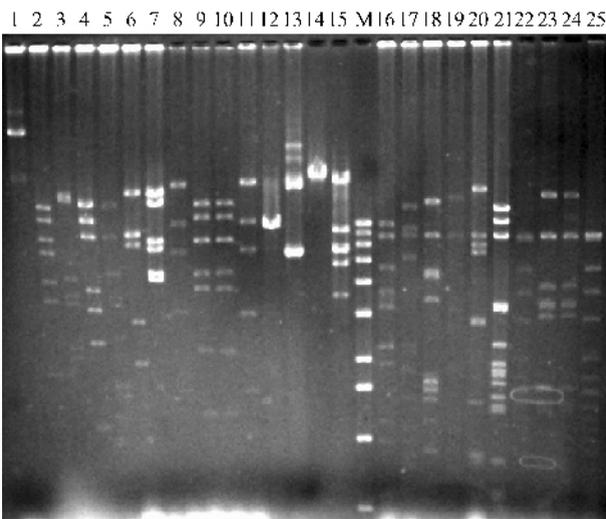


2 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 *Sau3AI* 酶切片段

Fig.2 0.5% agarose gel electrophoresis of *Sau3AI* DNA fragments. Lane1:  $\lambda$ DNA; Lane2: DNA fragments digested for 10 min; Lane3: DNA fragments digested for 15 min; Lane4: DNA fragments digested for 20 min; Lane5:  $\lambda$ DNA *Hind*III fragments.

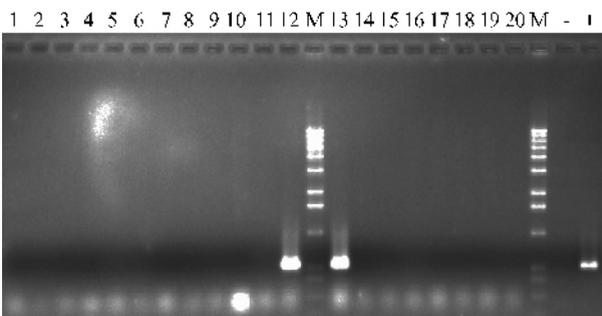
### 2.3 PCR 法筛选 cosmid 文库

在本实验室的前期工作中, 我们利用 Bingle *et al*<sup>[7]</sup> 在 1999 年所发表的文献中所使用的 LC1 和 LC2c 简并引物对, 克隆到了与色素合成相关的聚酮合酶编码基因的部分片段。以该序列为模板, 我们合成了如下引物对, PLC1: 5'-TGGCTTTGATTACGGCTTAT-3', PLC2c: 5'-GCTTGGGCATCGGTTAGT-3'。并使用该引物对, 通过菌液 PCR 法筛选含有目的片段的 cosmid。如图 4 所示, 预计扩增产物大小为 700 bp, 所对应的转化子位于该 96 孔板的 A 列 12 行。证明该文库可以筛选到所需基因。



3 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 cosmid 酶切产物

Fig.3 0.8% agarose gel electrophoresis of *Bam*H I & *Eco*R I fragments. Lane1: undigested cosmid control; Lane2 - 11: cos1 - 10 *Bam*H I fragments; Lane12: supercos vector *Bam*H I fragments; Lane13: undigested supercos vector control; Lane14:  $\lambda$ DNA; Lane15:  $\lambda$ DNA *Hind*III fragments; M: 1kb DNA Ladder; Lane16 - 25: cos1 - 10 *Eco*R I fragments.



4 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测菌液 PCR 产物

Fig.4 0.8% agarose gel electrophoresis of PCR products. Lane1 - 12: PCR products of row1 - 12; M: 1kb DNA Ladder; Lane13 - 20: PCR products of lineA - H; Lane -: negative control; Lane +: positive control.

## 3 讨论

大片段基因组 DNA 的制备对于构建 cosmid 文库来说至关重要。与包埋法比较, 本方法的优势在于: 制备周期短, 从研磨菌丝体开始计算只需 2 h; 制备步骤简单, 无需繁琐的酶消化破壁以及制备凝胶块, 从而避免了大片段 DNA 的自然降解和过多的外力剪切; 所需试剂和仪器成本较低, 并且容易获得, 常规分子生物学实验室都可以开展类似工作; 制备所得 DNA 纯度较高, 在 4℃ 保存 3 个月无明显降解, 可以直接用于酶切、连接等下游实验。同时基因组 DNA 的得率较高, 可以一次制备足量的 DNA 用于构建文库。

利用本方法制备的基因组 DNA 完全可以用于

构建 cosmid 文库。通过精确控制酶切的反应条件,经过多次重复实验,我们都能得到同样平均大小的酶切片段,这就消除了本方法制备得到的 DNA 平均片段小于包埋法制备的 DNA 的不足之处。本文所构建的 cosmid 文库覆盖倍数为 10,可以为以后的基因筛选工作提供足够的库容。

我们对利用同源探针筛选到的 cosmid 进行了核酸序列的测序,并在 NCBI 核酸/蛋白数据库中进行了比对。BLAST 结果表明,该 cosmid 所包含的基因组 DNA 片段与 *Glarea lozoyensis* 中黑色素合成相关的 *pkS1* 基因<sup>[8]</sup>具有很高的相似性,这与所使用的引物对的设计初衷是吻合的。同时,我们还利用其它不同的同源探针筛选到了含有相应目的基因片段的 cosmid。这进一步说明,利用该方法制备大片段基因组 DNA 并用于构建 cosmid 文库来分离未知基因是可行的。

随着对红色红曲霉活性化合物分子结构了解的进一步加深,我们可以根据氨基酸序列的保守区设计不同的简并引物来制备同源探针,进而筛选相关的合成基因来完整地认识不同活性化合物的生物合成途径。本文所述方法为这些后期工作提供了一个简便有效的选择。

## 参考文献

- [ 1 ] Endo A. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1979, 32(8): 852 - 854.
- [ 2 ] Su YC, Wang JJ, Lin TT, et al. Production of the secondary metabolites: gamma-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003, 30(1): 41 - 46.
- [ 3 ] Jůzlová P, Martínková L, Kren V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 16: 163 - 170.
- [ 4 ] Nicholson TP, Rudd BAM, Dawson M, et al, Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chemistry & Biology*, 2001, 8: 157 - 178.
- [ 5 ] 李燕萍, 许杨, 阮琼芳, 等. 红曲菌 Fosmid 文库的构建与分析. 北京师范大学学报(自然科学版) [ *Journal of Beijing Normal University( natural science)* ], 2008, 44(2): 188 - 192.
- [ 6 ] 周礼红, 王正祥, 诸葛健. 红曲霉 HMW-DNA 的制备. 食品与发酵工业( *Food and Fermentation Industries* ), 2005, 31(9): 35 - 38.
- [ 7 ] Bingle LEH, Simpson TJ, Lazarus. Ketosynthase Domain Probes Identify Two Subclasses of Fungal Polyketide Synthase Genes. *Fungal Genetics and Biology*, 1999, 26: 209 - 223.
- [ 8 ] Zhang A, Lu P, Dahl-Roshak A M, et al, Efficient disruption of a polyketide synthase gene( *pkS1* ) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2003, 268: 645 - 655.

## Construct cosmid libraries by isolating large genomic DNA fragments from *Monascus ruber*

Yang An<sup>1,2</sup>, Jing Yang<sup>1,2</sup>, Xinxin Xu<sup>1,2</sup>, Gang Liu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(<sup>2</sup> Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract [ Objective ]** To isolate large genomic DNA fragments from *Monascus ruber* for the construction of cosmid libraries.

**[ Methods ]** Modified phenol-chloroform method was used to isolate genomic DNA. The isolated genomic DNA was digested by *Sau3AI* to 40kb fragments on average. Then, the fragments were packaged by Stratagene's Gigapack III XL packaging extract. A pair of degenerate primers were used to amplify a fragment of PKS (polyketide synthase) gene from this cosmid library.

**[ Results ]** The average size of genomic DNA isolated by this method was larger than 48 kb, with a concentration of 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . The constructed cosmid libraries had 10 fold coverage of the *Monascus* spp. genome. A cosmid containing the homologue of PKS gene was obtained by PCR screening. **[ Conclusion ]** This modified method of isolating large fragments genomic DNA of *Monascus ruber* was efficient and feasible.

**Keywords:** *Monascus ruber*; large fragments genomic DNA; cosmid library

( 本文责编:王晋芳 )

Supported by the Key Project of National Science & Technology Pillar Programe ( 2007BAI26B01 )

\* Corresponding author. Tel: + 86-10-64807892; E-mail: liug@sun.im.ac.cn

Received: 23 March 2009/Revised: 15 April 2009