

前 言

农作物病害的生物防治作为绿色农业的重要组成部分，以其环境友好、靶标专一和可持续性等特色，在现代植物保护体系中发挥着越来越重要的作用。与化学农药相比，生物防治最大的特色在于其利用自然界中已有的生物种间关系，通过“以菌治虫”“以菌治菌”等方式对病虫害进行生态调控，具有不污染环境、无化学残留、对非靶标生物安全且不易产生抗药性等显著优势。在众多生防微生物中，真菌是一类资源丰富、应用潜力巨大的生防微生物。

真菌在自然界中扮演着重要的害虫和病原物调控者角色，是重要的昆虫、线虫及其他植物病原真菌的天敌微生物。它们能够通过寄生、捕食、产生抗生素或竞争营养与空间等多种方式，对多种农业病害（如土传病害、叶部病害及线虫病害等）发挥控制作用。目前，在科研与应用中常见的真菌生防菌种类繁多，主要包括以下几大类。

昆虫病原真菌：如球孢白僵菌（*Beauveria bassiana*）和金龟子绿僵菌（*Metarhizium anisopliae*），广泛应用于蚜虫、飞虱、蛴螬等害虫的防治。

植物病原真菌拮抗菌：如木霉菌属中的哈茨木霉（*Trichoderma harzianum*）和绿色木霉（*Trichoderma viride*），对由镰刀菌（*Fusarium spp.*）、丝核菌（*Rhizoctonia spp.*）等引起的作物枯萎病、立枯病等有良好防效。

捕食或寄生线虫真菌：如德氏霉菌（*Drechslerella spp.*）能通过特化的捕食器官捕捉线虫，而淡紫拟青霉（*Purpureocillium lilacinum*）和厚垣孢普可尼亚菌（*Pochonia chlamydosporia*）则是著名的线虫内寄生真菌。

这些生防真菌之所以能有效侵染其宿主（如昆虫、线虫或其他真菌），是因为它们拥有一套复杂而精密的机制。其侵染过程通常是多种机制协同作用的结果，主要包括识别与附着（真菌孢子识别并附着于宿主表面）、侵入结构形成（产生侵染钉或形成捕食器官）、酶解与机械压力（分泌几丁质酶、蛋白酶等降解宿主主体壁）、体内定殖与营养获取（在宿主体内生长并吸收营养）及毒素抑制（产生特异性毒素削弱宿主免疫力）。然而，目前对这些机制的理解仍不够深入，许多关键过程尚处于“黑箱”状态。因此，系统而深入地研究真菌与寄主互作的分子机理与生态过程，是突破现有防效瓶颈、开发新一代高效生防制剂的科学基础。

尽管真菌生物防治技术前景广阔，但与之相关的系统性书籍与工具指南却相对匮乏，这在一定程度上限制了科研人员与技术推广人员对该技术的深入掌握与应用。正是为了填补这一领域的知识空白，我们总结并编写了本书。虽然本书主要以研究历史较长、机制颇具代表性的捕食线虫真菌为技术模型进行阐述，但其

核心研究方法——包括真菌的 DNA 和蛋白质操作、原生质体制备与转化等技术——普遍具有指导意义，能够被顺利地借鉴和应用到其他类别的生防真菌（如昆虫病原真菌、真菌拮抗菌等）的研究与开发工作中。我们期望本书能成为科研工作者和植保专业人士案头实用的工具书与参考指南，共同推动我国农作物病害生物防治事业的进步。

捕食线虫真菌（nematode-trapping fungi, NTF）的研究源于 19 世纪中叶的形态学观察，现已逐步发展到现代分子生物学方法。研究者通过创新的观察、培养和分子技术，推动了从描述性研究到机制解析的转变。德国科学家 Fresenius 首次在欧洲采集并描述了少孢节丛孢（*Arthrobotrys oligospora*），这是捕食线虫真菌的早期记录，为后续捕食机制研究奠定基础。Fresenius 采用野外采集和形态学描述方法，使用光学显微镜观察菌丝和分生孢子结构，这是早期真菌分类的标准技术，推动了从纯形态向功能观察的转变。俄国微生物学家 Woronin（1870）观察到 *A. oligospora* 形成菌丝环捕获线虫，证实其捕食习性，为捕食线虫真菌的概念确立提供了关键证据。他引入活体感染观察法，将线虫置于菌丝培养基中，实时记录捕食动态，这是早期实验生态学的创新，帮助揭示诱导捕食器官形成的触发机制。德国真菌学家 Zopf（1888）首次正式认识到真菌可捕食活体动物（如线虫），将 *Dactylella* 属等归为捕食型真菌，并描述感染过程。Zopf 开发了侵染实验方法，使用玻璃培养皿模拟土壤环境，结合显微镜记录捕食全过程（从诱导到消化），这是捕食机制研究的开创性技术。美国真菌学家 Drechsler（1937）描述了多个 *Dactylella* 属新种，建立了 11 个新种的分类体系，并详述收缩环（constricting ring）等捕器结构在捕食中的作用。其创新的培养方法将感染植物根碎块置于琼脂培养基上诱导生长，避免纯培养难题；结合详细形态学绘图和活体解剖，系统分类捕食器官类型（如黏性菌网、收缩环），奠定了现代捕食线虫真菌的分离和鉴定基础。加拿大真菌学家 Barron 将其扩展到内寄生型食线虫真菌研究，描述 *Dactylella* 属相关内寄生机制，并编写了 *The Nematode-Destroying Fungi* 一书，总结其生态作用。他提出将土壤或基质样本涂布于水琼脂平板上，诱导孢子萌发和捕食器官的形成，由此从自然环境中分离活菌株；同时强调生态量化方法，如计数捕食效率（Barron, 1977, 1979, 1981, 2003）。云南大学张克勤院士带领团队发现并描述多个捕食线虫真菌新种，首次测定捕食线虫真菌（少孢节丛孢）的全基因组，并结合转录组和蛋白质组分析提出三维菌网的形成机制（Yang et al., 2011）。团队解析捕食基因（如 *Mad1* 黏附基因）（Liang et al., 2015）和蛋白酶（如丝氨酸蛋白酶）在捕器形成和侵染线虫中的作用，推动生物防治应用（Liang et al., 2010, 2011）。整合分子生物学方法：克隆全长 cDNA、系统发育分析（ITS、TEF 基因序列）和蛋白质晶体结构解析，结合转录组学揭示诱导机制；开发高效感染模型，用于评估生物防治潜力，这是从描述向功能基因组学的关键转变。这些贡献从形态观察演变为分子机制解析，特别是 Drechsler 和张克勤院士的创新方法显著提升

了研究的精确性和应用性。

捕食线虫真菌 *Drechslerella* 产生的收缩环是一种高度特化的机械性捕食器官，由 3 个弯曲细胞组成，环内径 20~30 μm 。当线虫钻入环内触碰内壁时，环细胞在 0.1s 内快速膨胀 3 倍体积，关闭开口并固定猎物。随后，真菌通过感染结构（如侵染钉）穿透线虫表皮消化其内容物。这一机制的研究已从形态描述演进到分子信号解析，虽取得一定进展，但尚未彻底阐明。

收缩环的形成是真菌从腐生型向寄生型的可塑性转变，受环境信号诱导。早期研究聚焦形态和诱导因素，后期转向分子调控。形态学基础与分类描述：Drechsler（1937）首次分离并描述了形成收缩环的真菌（如 *Drechslerella stenobrocha*），观察到环由 3 个细胞组成，从菌丝分化而来。他通过土壤样本纯培养方法，记录了环在有机质丰富的土壤中高密度出现，奠定了分类基础（*Drechslerella* 属专指环形成者）。这一发现确立了收缩环作为主动捕食装置的地位，与黏性网等被动捕食器官区分。诱导因素与纯培养实验：Lawton 在纯培养中证明，收缩环形成无需活线虫，可由动物提取物（如马血清）或有机物质（如肽、氨基酸）诱导。*Arthrobotrys dactyloides*（现名：*Drechslerella dactyloides*）可在无刺激下自发形成环，但接触固体表面（如盖玻片）可触发初始分支分化，而非由饥饿引起。她通过生长实验发现，环从菌丝侧枝发育，进而强调物理接触和营养信号的作用（Lawton, 1957, 1967）。瑞典真菌学家 Nordbring-Hertz 扩展了诱导条件，证明低营养环境（如土壤提取物）可以诱导分生孢子产捕器，线虫体液中的小分子（如氨基酸）可以提高诱导活性（Persmark and Nordbring-Hertz, 1997）。她在 *A. oligospora* 中观察到类似捕食器官，通过显微镜和染色（如刚果红）追踪细胞分化，揭示“致密体”（dense body）在捕食器官细胞中的积累，促进分生孢子向捕食器官转化（Nordbring-Hertz et al., 1984）。信号转导与分子调控：Kuo 等（2024）研究了 *Arthrobotrys oligospora* 中的异三聚体 G 蛋白信号通路，线虫接触激活 G 蛋白偶联受体（GPCR），触发下游 cAMP 和 MAPK 通路，继而引发黏性菌网的产生。Hu 等（2024）在 *Arthrobotrys flagrans* 中同样研究了 GPCR 响应线虫的蛔苷信号调控产生黏性菌网的机制，类似机制在产收缩环真菌中尚未研究。中国科学院微生物研究所刘杏忠研究员课题组 Liu 等（2014）通过 *D. stenobrocha* 基因组测序和转录组分析，揭示 PKC 信号通路核心作用：线虫蛋白信号上调 PKC 和 Ga , Zn(II)2Cys6 转录因子调控下游细胞分裂和细胞周期蛋白。比较基因组显示，产收缩环真菌 *lectin* 基因少，捕捉线虫依赖机械而非黏附。细胞膨胀机制：膨胀是收缩环闭合的核心，涉及快速离子/水流动和细胞骨架重组。过程 0.1~1s，细胞体积增至原来的 3 倍。动态观察与触发因素：Muller（1958）通过蔗糖溶液减缓法，在普通显微镜下观察了两种捕食线虫真菌（*Arthrobotrys dactyloides* 和 *Dactylella doedycoides*）的收缩环膨胀过程。膨胀可由触觉刺激（显微针触碰）或温度升高（热水）诱导；电刺激则未能成功触发。Muller 首次量化了环细胞膨胀

的体积变化（约 3.3 倍），并提出了渗透吸水驱动膨胀的假说，为后续生理学研究奠定了基础。钙信号与水通道激活：Chen 等（2001）通过压力、温水并结合化合物刺激，推测如下模型：触碰→G 蛋白激活→胞质 Ca^{2+} 升高→钙调蛋白激活→水通道蛋白（aquaporin）开放，导致渗透压变化和细胞膨胀。压力实验（如注射器加压）或温水模拟证实了 Ca^{2+} 依赖性。刘杏忠课题组提出栅栏组织是膨胀过程中的细胞膜库，为膨大的细胞提供细胞膜来源（Chen et al., 2023）。

为了深入研究捕食线虫真菌，尤其是指状德氏霉及相关微生物的功能，我们组织本实验室师生根据捕食线虫真菌研究涉及的实验进行了实验技术方法的归纳总结，以科学研究的经典路径——“从基因到功能”为纲，将系列实验整合为六大模块，旨在构建一个层次分明、逻辑清晰的学习体系。

核心分子克隆与载体构建模块奠定了分子生物学的基石，涵盖了从基因组 DNA 与质粒的提取，到基因敲除、回补及过表达等不同功能载体的构建策略，并延伸至 RNA 操作与基因表达的 RT-PCR 分析技术，为遗传操作提供了核酸层面全面的技术支持。

蛋白质研究技术模块则聚焦于基因功能的执行者，呈现了一个完整的蛋白质研究流程。内容包括从多种来源的蛋白质样品制备、基于不同标签与系统的蛋白质纯化方法，到核心的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）与蛋白质印迹（Western blot）检测技术，最终拓展至蛋白质相互作用研究的前沿技术，形成了从制备、纯化、检测到互作分析的技术闭环。

在细胞操作与转化技术模块中，我们关注如何将构建好的遗传工具导入生命体的基本单元。此部分介绍了针对丝状真菌原生质体及培养动物细胞等不同宿主体系的遗传转化技术，是实现基因功能在细胞水平上进行探索的关键桥梁。

随后的表型与功能分析模块，是连接基因变异与生物学表型的关键环节。本部分通过体内外的多种实验方法，包括突变株表型测试、微生物互作研究、高通量筛选及利用秀丽隐杆线虫等模式生物，系统地验证基因在复杂生命系统中的具体功能。

生物防治应用与模型生物模块将前述基础研究成果导向实际应用场景，具体展示了从生防菌剂的制备到防治根结线虫的盆栽生测等完整应用链条，体现了科学研究从理论走向实践的最终目标。

最后，通用技术与方法模块作为支撑上述所有研究的公共技术平台，汇总了包括样品染色、显微成像及数据分析在内的多种通用实验技能与软件使用方法，是确保各项实验顺利进行的必备工具集。

我们相信，这种模块化的编排不仅能帮助学习者掌握独立的实验技能，更能引导他们理解技术之间的内在联系与科学逻辑，从而构建起系统性的科研思维能力。感谢云南大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室张克勤院士团队的支持，感谢编委会每一位作者！由于作者水平有限，书中难免存在疏漏与错误，敬请读者批评指正。

参 考 文 献

- Barron G L. 1977. The Nematode-destroying Fungi. Guelph, Ontario, Canada: Canadian Biological Publications.
- Barron G L. 1979. Observations on predatory fungi. Canadian Journal of Botany, 57(2): 187-193.
- Barron G L. 1981. 20-Predators and parasites of microscopic animals. In: Cole G T, Kendrick B. Biology of Conidial Fungi. New York: Academic Press: 167-200.
- Barron G L. 2003. Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. Biodiversity, 4(1): 3-9.
- Chen T H, Hsu C S, Tsai P J, et al. 2001. Heterotrimeric G-protein and signal transduction in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. Planta, 212(5-6): 858-863.
- Chen Y, Liu J, Kang S, et al. 2023. A palisade-shaped membrane reservoir is required for rapid ring cell inflation in *Drechslerella dactyloides*. Nature Communications, 14(1): 7376.
- Drechsler C. 1937. Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. Mycologia, 29(4): 447-552.
- Hu X, Hoffmann D S, Wang M, et al. 2024. GprC of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys flagrans* activates mitochondria and reprograms fungal cells for nematode hunting. Nature Microbiology, 9: 1752-1763.
- Kuo chih-yen, Tay Rebeaaj, Lin Hang-che, et al. 2024. The nenatodo-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* detects prey pheromones via G protein-coupled receptors. Nature Microbiology, 9(7): 1738-1751.
- Lawton J R. 1957. The formation of constricting rings in nematode-catching hyphomycetes grown in pure culture. Journal of Experimental Botany, 8(1): 50-54.
- Lawton J R. 1967. The formation and closure of the constricting rings in two nematode-catching hyphomycetes. Transactions of the British Mycological Society, 50(2): 195-205.
- Liang L, Liu S, Yang J, et al. 2011. Comparison of homology models and crystal structures of cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi: structural basis of nematocidal activity. The FASEB Journal, 25(6): 1894-1902.
- Liang L, Meng Z, Ye F, et al. 2010. The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes. The FASEB Journal, 24(5): 1391-1400.
- Liang L, Shen R, Mo Y, et al. 2015. A proposed adhesin AoMad1 helps nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* recognizing host signals for life-style switching. Fungal Genetics and Biology, 81: 172-181.
- Liu K, Zhang W, Lai Y, et al. 2014. *Drechslerella stenobrocha* genome illustrates the mechanism of constricting rings and the origin of nematode predation in fungi. BMC Genomics, 15: 114-114.
- Muller H G. 1958. The constricting ring mechanism of two predacious hyphomycetes. Transactions

- of the British Mycological Society, 41(3): 341-364.
- Nordbring-Hertz B, Veenhuis M, Harder W. 1984. Dialysis membrane technique for ultrastructural studies of microbial interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1): 195-197.
- Persmark L, Nordbring-Hertz B. 1997. Conidial trap formation of nematode-trapping fungi in soil and soil extracts. *FEMS Microbiology Ecology*, 22: 313-323.
- Woronin K. 1870. *Sphaeria lemaneae*, *Sordaria coprophila*, *S. fimiseda*, *Arthrobotrys oligospora*. In: de Bary A, Woronin M. Beitr, Morph, Physiol, Pilze, III, Abhandl, Senckenberg Naturforsch. Ges., 7: 325-360.
- Yang J, Wang L, Ji X, et al. 2011. Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *PLoS Pathogens*, 7(9): e1002179.
- Zopf W. 1888. Zur Kenntnis der Infektions-Krankheiten neiderer Thiere . *Nova Acta Leop Acad Naturf Halle*, 52: 7.

目 录

模块一：核心分子克隆与载体构建	1
实验一 真菌基因组 DNA 的提取与检测	1
实验二 经典方法少量/中量提取质粒	7
实验三 基因敲除质粒/片段构建的方法和策略	13
实验四 指状德氏霉基因的回补方法	23
实验五 指状德氏霉基因的过表达方法	28
实验六 真菌基因表达水平检测	37
模块二：蛋白质研究技术	46
实验七 丝状真菌蛋白质的提取	46
实验八 真菌蛋白纯化方法 (His 标签)	49
实验九 蛋白质纯化 (细胞膜蛋白)	52
实验十 蛋白质原核表达、纯化及 GST pull-down 实验	60
实验十一 真菌蛋白质检测	65
实验十二 邻近蛋白标记技术	88
模块三：细胞操作与转化技术	96
实验十三 原生质体的制备、转化及阳性转化子的鉴定	96
实验十四 杆状病毒介导真菌膜蛋白的瞬时表达	102
模块四：表型与功能分析	116
实验十五 突变菌株表型的测试	116
实验十六 高通量筛选诱导指状德氏霉分生孢子产捕器的细菌或化合物	122
实验十七 细菌生测	127
实验十八 细菌与真菌互作实验	130
实验十九 秀丽隐杆线虫的培养与同步化	134
模块五：生物防治应用与模型生物	140
实验二十 根结线虫的扩繁及指状德氏霉防治根结线虫的生测盆栽实验	140
实验二十一 生防菌剂的初步制备	146

模块六：通用技术与方法 150

 实验二十二 染色技术 150

 实验二十三 拍照设备使用指南 174

 实验二十四 实验室常用软件的使用方法 188

附录 1 公共配方 228

附录 2 抗生素及配制方法 229

模块一：核心分子克隆与载体构建

此部分是分子生物学研究的基础，专注于核酸操作和不同用途载体的构建。

实验一 真菌基因组 DNA 的提取与检测

一、实验目的

掌握高质量真菌基因组 DNA 的提取方法及琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 技术；掌握核酸浓度检测方法，便于后续 PCR 等实验的准确用量。

二、实验原理

1. 尿素提取 DNA 法

丝状真菌的分子生物学研究比其他生物起步要晚，其基因组 DNA 提取常借鉴植物组织的提取方法。尿素提取 DNA 方法最早在拟南芥等高等植物中报道，该方法操作过程比较温和，不需要剧烈的振荡及高温处理，不容易造成 DNA 降解。拟南芥是高等绿色植物，具有分化的根、茎、叶、花等器官，细胞壁以纤维素为主，通过叶绿体进行光合作用，基因组为二倍体，约 135Mb；而丝状真菌属于异养型真核微生物，由无隔或有隔菌丝构成，细胞壁含几丁质，通过分泌胞外酶吸收有机养分，多数为单倍体且基因组大小差异大（10~100Mb），两者在形态结构、营养方式和细胞组成上截然不同，因此还需进行一定的改良。

刘少华等（2005）将原先用于拟南芥的尿素提取法，首次推广应用于 5 种植物丝状病原真菌（草莓疫霉病菌、西瓜蔓枯病菌、草莓炭疽病菌、西瓜枯萎病菌和水稻纹枯病菌），并与十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）法、十二烷基硫酸钠-十六烷基三甲基溴化铵（SDS-CTAB）法、氯化苄方法进行了系统比较。结果发现，尿素法非常简便，常温混匀后马上可以离心，而其余 3 种方法均需要 50℃ 以上的温度处理及长时间的振荡，其中 SDS-CTAB 法最为复杂，需要 37℃ 和 65℃ 两种不同的温度处理。在 4 种方法中，尿素法用时最短、DNA 质量最高且适用的真菌种类最多。因此，尿素提取法可以应用于捕食线虫真菌等生防真菌的基因组 DNA 提取。

简要说，尿素提取法的步骤为：先加入尿素提取液，再用机械的方法使

组织和细胞破碎。尿素通过破坏蛋白质分子内的氢键，使其二级结构（如 α 螺旋、 β 折叠）解体，导致蛋白质变性。这种变性作用使与 DNA 结合的组蛋白和非组蛋白失去结合能力，从而释放出游离的 DNA；十二烷基硫酸钠（SDS）等离子型活性剂溶解细胞膜和核膜蛋白。随后加入酚-氯仿使蛋白质变性。离心，除去组织和变性蛋白，上清液中加入冰冻的无水乙醇使 DNA 沉淀，离心，弃上清，用 70%乙醇漂洗 DNA，倒掉上清，风干，溶于灭菌的双蒸水中。

2. 植物组织基因组 DNA 核酸提取试剂盒（备选方法）

核酸提取过程中，利用磁珠吸附原理，通过特制的磁棒吸附、转移和释放磁珠，实现磁珠/核酸的转移，自动完成核酸的提取。

3. 电泳检测

如何对所提取的基因组 DNA 进行质量检验？电泳检测则是一个高效、简便的方式。琼脂糖凝胶电泳技术使用琼脂糖凝胶作为固体介质，从海藻提取出的琼脂中可以分离出一种胶状多糖，称为琼脂糖。在加热条件下，琼脂糖溶于水，形成溶液。当该溶液的温度降至 45℃左右时，琼脂糖凝胶三维网络结构中存在大量微孔，这些微孔就是 DNA 分子在凝胶中移动的通道。

核酸分子在 pH 高于其等电点的溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。由于核酸的戊糖-磷酸骨架在结构上具有重复性，长度相同的核酸链几乎具有等量的净电荷，因此它们能以同样的速率向正极方向移动。

此外，含有琼脂糖的凝胶具有网状结构，物质通过时会受到阻力，大分子物质在泳动时受到的阻力更大，因此在琼脂糖凝胶电泳中，带电颗粒的分离不仅取决于净电荷的性质和数量，而且还取决于分子大小，这就大大提高了分辨能力。在同样电场的强度下，核酸分子的迁移速度取决于核酸分子本身的大小和构型及琼脂糖凝胶的浓度，简而言之，分子量较大的核酸迁移速度较慢，分子量较小的核酸迁移速度较快。

4. 核酸浓度测定

紫外分光光度法基于 DNA 链上碱基的苯环结构在紫外线区具有较强吸收。DNA/RNA 在 260nm 处有最大吸收峰，蛋白质在 280nm 处有最大吸收峰，盐和小分子则集中在 230nm 处。因此，可以用 260nm 波长进行分光测定核酸浓度。OD 值为 1 分别相当于：双链 DNA 约为 50 μ g/mL，单链 DNA 浓度约为 33 μ g/mL，RNA 约为 40 μ g/mL，寡核苷酸约为 35 μ g/mL。如用 1cm 光径，用 H₂O 稀释 DNA/RNA 样品 n 倍并以 H₂O 为空白对照，根据此时读出的 OD₂₆₀ 值即可计算出样品稀释前的浓度。

三、实验材料

1. 菌株

指状德氏霉 (*Drechslerella dactyloides*)。

2. 培养基与试剂

(1) PDA、PDB (见附录 1.公共配方)。

(2) 尿素提取液 (500mL)：

尿素	210.21g
Tris	3.058g
氯化钠	1.826 25g
SDS	5g

(3) DNA 抽提液 (苯酚：氯仿：异戊醇=25：24：1)。

(4) 异丙醇。

(5) 3 mol/L NaCOOH (1L)

NaCOOH	246.1g
--------	--------

(6) 70%乙醇。

(7) 6×上样缓冲液 (Vazyme)。

(8) DNA marker (2000bp 等) (Vazyme)。

(9) 植物组织基因组 DNA 核酸提取试剂盒 (西安天隆科技有限公司, 简称天隆科技)。

3. 主要仪器

组织研磨仪 (上海净信实业发展有限公司, 简称上海净信)、核酸自动提取仪 (天隆科技)、琼脂糖凝胶电泳仪 (北京六一生物科技有限公司; DYY-6C 型)、超微量核酸蛋白测定仪 (MIULAB)。

四、实验步骤

(一) 尿素提取 DNA 法

(1) 收集菌丝：PDA 上的菌丝，使用细胞刮铲刮取；PDB 中的菌丝，用真空泵超滤，抽干培养基，用滤纸吸干水分。

(2) 破碎：取从 6cm 培养皿上刮下的菌丝放入 1.5 mL 离心管中，加入 700~800μL 尿素提取液 (pH8.0)，加入 1 个大钢珠和 2 个小石英砂珠子，随后放入组织研磨仪中，切记对称放置，参数为 60Hz，400s。

(3) 离心：破碎完毕后取出，放于离心机中 12 000r/min 离心 5min。

(4) 吸取上清：吸取上清加到一个干净的 1.5mL 离心管中，若未完全沉淀即可重复离心一次。加入等体积的 DNA 抽提液（苯酚：氯仿：异戊醇=25：24：1），用力混匀，随后 12 000r/min 离心 5min。

(5) 沉淀：取上清，加等体积的异丙醇和 1/10 体积的 3mol/L NaCOOH。

(6) 冰冻：-20℃放置 20~30min 后，12 000r/min 离心 5min，弃上清。

(7) 洗涤：倒置离心管，使余留的上清液流尽，随后用 70%乙醇洗涤沉淀，12 000r/min 离心 1~2min，弃上清，此步骤重复 2 次。

(8) 干燥：室温放置干燥 5~10min，也可用金属浴 55℃，随后加入 10μL ddH₂O，-20℃保存。若收集的菌丝多也可适当提高 ddH₂O 的量。

(二) 植物组织基因组 DNA 核酸提取试剂盒

(1) 收集菌丝：PDA 上的菌丝，使用细胞刮铲刮取；PDB 中的菌丝，用真空泵超滤，抽干培养基，用滤纸吸干水分。

(2) 破碎：取从 6cm 培养皿上刮下的菌丝放入离心管中，加入 400μL 前处理液和 60μL 核酸释放剂，加入 1 个大钢珠和两个小石英砂珠子，随后放入组织研磨仪中，切记对称放置，参数为 60Hz，400s。

(3) 离心：破碎完毕后取出，放于离心机中 12 000r/min 离心 5min。

(4) 预封装试剂准备：从试剂盒中取出预封装试剂，颠倒混匀数次使磁珠重悬，也可使用振荡仪涡旋处理，随后小心撕去铝箔封口膜，避免振动、液体流出。

(5) 加样：取(3)步离心后的上清液，依次加入预封装深孔板的第 1 列和第 7 列，也就是磁珠所在位置的前一列，注意不可加错位置。

(6) 核酸自动提取仪提取：将机器开关键打开，进入主界面，将预封装深孔板放入机器，在上方插入搅拌棒，一个预封装深孔板配 2 个搅拌棒。点击主界面的核酸提取程序，并用扫码枪扫描配置的二维码（小），一次一个，扫描完二维码即作废，可将其撕下。等待机器自动将码填充完毕后，即可点击确定，进行自动提取核酸。

(7) 取样：40min 后操作完毕，取出预封装深孔板，即可依次从预封装深孔板的第 6 列和第 12 列取出已提取好的核酸于干净的离心管中。

(8) 关机：点击关机，待屏幕黑屏，关闭机器的总开关。

(三) 琼脂糖凝胶电泳仪

实验流程如图 1-1 所示。

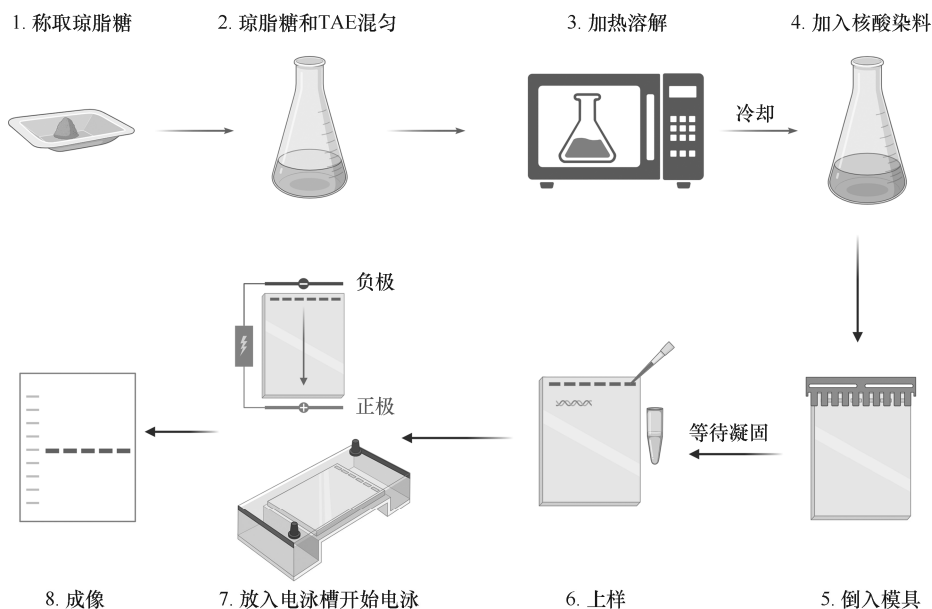


图 1-1 琼脂糖凝胶电泳流程图

（1）琼脂糖凝胶配制（1%凝胶为例，琼脂糖、TAE、核酸染料用量比 1：100：10）。

1）小胶（11 个孔）：0.4g 琼脂糖和 40/50mL TAE 电泳缓冲液（三羟甲基氨基甲烷醋酸-乙二胺四乙酸缓冲液，简称 TAE）混匀后加热，冷却后加入 4 μ L 核酸染料。

2）中胶（25 个孔）：0.8g 琼脂糖和 80/90mL TAE 混匀后加热，冷却后加入 8 μ L 核酸染料。

3）大胶（50 个孔）：1.6g 琼脂糖和 160mL TAE 混匀后加热，冷却后加入 16 μ L 核酸染料。

（注意：需加热至液体中无絮凝状物质，用流水稍微冷却后再加入核酸染料；倒入模具后，需注意梳子周围有无气泡，若有气泡需将其去掉。）

（2）选取合适的模具：根据自己的实验目的选取合适的梳子和塑料托盘，拼装完成后，将配制好的琼脂糖凝胶倒入模具中，尽量将气泡去除，待其冷却定型，35~40min 后拔掉梳子可点样。

（3）上样：若在 PCR 体系中使用的 PCR 酶本身带有颜色，如 2 $\times$ *Taq* 预混液（含染料），在紫外线下可显示条带，即可取 10 μ L 加到孔中；若为无色 PCR 产物，则根据 1：5 的比例，取 1 μ L 的 6 $\times$ 上样缓冲液和 5 μ L 的 PCR 产物混匀后，加入孔中；若为胶回收，则可等比例扩大体系进行混匀后点样。根据自己的需求选取合适大小的标志物（marker）6 μ L 左右，加入相应孔中。

（4）电泳：将上完样的凝胶连同胶板一同放在电泳槽中，上样处应置于电泳

槽的负极，切记凝胶的正负极不可有阻挡物，加入适量 TAE 直至没过凝胶，盖上电泳槽盖子，正负极相互配对；设置电压和时间，一般为 100V/35min 或 80V/40min，若需切胶回收，电压则可适当加大。

（5）成像：先打开照胶仪的主开关，随后打开屏幕开关，点开成像软件，选取核酸成像系统，波长为 302nm UV，点击自动拍照即可（注：照胶仪使用完毕后需清洁干净）。

（四）浓度测定（以检测核酸浓度为例）

（1）打开超微量核酸蛋白测定仪侧边的开机键。

（2）输入密码进入界面，点击核酸模块，注意右上角选取的类型，若样品为 dsDNA，则选择 dsDNA。

（3）取 1 μ L ddH₂O 到读孔处，样品由什么试剂溶解即用什么试剂作为空白对照，若用 TE 缓冲液溶解则用 TE 缓冲液作为空白，点击空白进行对照；读取完毕后，用纯水清洗读孔处，再次取 1 μ L 样本如 DNA 片段于读孔处，点击测试，即可读出样品浓度（ng/ μ L）。

五、问题与讨论

- （1）在尿素提取法中，如何优化破碎和离心条件以提高 DNA 提取效率？
- （2）仪器提取法中，磁珠的选择和洗脱条件对提取效果有何影响？
- （3）电泳检测时，如何避免条带扩散和拖尾现象？
- （4）紫外分光光度法测定 DNA 浓度时，如何减少蛋白质等杂质的干扰？

编写：夏艺萌

参 考 文 献

- 曹文波, 郑璐璐, 谢文海. 2008. 一种提取植物基因组 DNA 的方法——改良尿素法. 华中师范大学学报(自然科学版), 42(3): 448-451.
- 何忠效, 张树政. 1999. 电泳（第二版）. 北京：科学出版社.
- 李景梅, 金丽虹, 翁占坤, 等. 2008. 鸟嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶的紫外吸收谱研究. 长春理工大学学报(自然科学版), 31(2): 74-76.
- 刘少华, 陆金萍, 朱瑞良, 等. 2005. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法. 植物病理学报, (4): 362-365.
- 卢圣栋. 1999. 现代分子生物学实验技术（第二版）. 北京：中国协和医科大学出版社.
- 张婀娜, 魏政立, 刘佳, 等. 2017. 不同方法提取基因组 DNA 的比较. 解剖学研究, 39(6): 479-482.
- Aras S, Duran A, Yenilmez G. 2003. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of

- some *Hesperis* L. Specimens. Plant Molecular Biology Reporter, 21(4): 461-462.
- Bhattacharjee R, Kolesnikova-Allen M, Aikpokpodion P, et al. 2004. An improved semiautomated rapid method of extracting genomic DNA for molecular marker analysis in Cocoa, *Theobroma cacao* L. Plant Molecular Biology Reporter, 22(4): 435.
- Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. 1983. A plant DNA mini preparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1(4): 19-21.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19(1): 11-15.

实验二 经典方法少量/中量提取质粒

一、实验目的

从大肠杆菌中分离并纯化目标质粒 DNA，用于后续基因克隆、测序或转化等分子生物学实验。

二、实验原理

质粒 (plasmid) 通常是一种小型、双链环状的 DNA 分子，存在于细胞质中，但不属于细菌的染色体 DNA。

质粒上的基因不是宿主细胞生存必需的基因，但可以赋予宿主某些优势，如抗药性、代谢某些物质等。质粒广泛存在于细菌中，在某些真菌、酵母，甚至植物细胞中也有发现。质粒能提供青霉素、氯霉素等抗生素的抗性，帮助宿主分解某些特殊物质，某些质粒还携带毒素相关基因，使细菌具有致病性。在分子生物学中，人工构建的质粒被广泛用作载体 (vector)，用于基因克隆、蛋白质表达等实验。质粒通常含有复制起点 (ori)，允许质粒在宿主中自主复制，决定复制效率和拷贝数；筛选标记，通常是抗生素抗性基因，用于筛选成功转入质粒的宿主细胞，如 Amp (ampicillin, 氨苄青霉素)、Kan (kanamycin, 卡那霉素)；多克隆位点 (MCS)，含有多个不同的限制性内切酶识别位点，便于外源 DNA 的插入；启动子 (promoter)，控制目标基因的转录表达，常用的如 T7、lac、CMV 等，取决于宿主系统 (原核或真核)；目标基因序列，被插入用于表达的外源 DNA，如 GFP、某个蛋白质编码序列；终止子，能终止转录，保护下游序列不被转录干扰；标签序列，如 His 标签、Flag 标签、GST 标签，用于纯化或检测蛋白质。

20 世纪 50 年代初期，日本科学家 Tsutomu Watanabe 在研究细菌对抗生素的抗性传播时，发现某些细菌之间可以传递抗药性，且这种能力不受染色体上的基因控制，后经研究发现，这种抗药性是由一种非基因组 DNA 携带，后经 Joshua

Lederberg 在 1952 年正式命名为质粒。

1962 年，Falkow 和 Baron 首次系统地从细菌中提取并表征质粒 DNA。他们利用超速离心和染色法分离出携带抗性基因的 R 质粒 (resistance plasmid)，并分析其大小和功能。Cohen 等 (1973) 首次将外源 DNA 插入到质粒 (pSC101) 中，并在大肠杆菌中成功表达，实现了第一个功能性基因克隆实验。Bolivar 等 (1977) 在实验室开发出 pBR322 质粒，是第一个广泛应用的多功能克隆载体，具备 AmpR 和 TetR 抗性基因、多个限制位点和 pMB1 复制起点等结构。在 20 世纪 70 年代，随着限制性内切酶和琼脂糖凝胶电泳的出现，质粒提取技术得到了迅速发展，标准化方法逐步建立，Birnboim 和 Doly (1979) 使用的碱裂解法 (alkaline lysis) 成为分子生物学中最经典的质粒提取方法。在 1973 年 Cohen 首次用提取的质粒进行重组 DNA 实验。目前常用的质粒提取方法总结见表 2-1。

表 2-1 常见质粒提取方法

方法名称	原理	后续实验适用范围	优点	缺点
碱裂解法	利用 SDS + NaOH 破坏细胞壁并变性 DNA，然后中和（如加乙酸钾）让染色体 DNA 和蛋白质沉淀，质粒因环状结构复性得更快保留下来	克隆验证/电泳/PCR	材料便宜、简单、产量较高	杂质多，需后续纯化
硅胶柱纯化法	结合碱裂解，上清中的质粒 DNA 通过 pH 调整后与硅胶柱结合，再经洗脱提纯	质粒用于克隆、酶切、电泳、测序、细胞转染等	纯度高、流程快、适配自动化	价格相对较高
CsCl/EtBr 密度梯度超速离心法	将质粒与溴化乙锭 (EtBr) 混合后，在 CsCl 梯度中超速离心分离纯质粒	质粒疫苗制备、腺相关病毒 (AAV) 包装	提取的质粒极纯，适用于动物细胞转染、疫苗研究	设备昂贵、时间长、EtBr 有毒
磁珠法	裂解后质粒 DNA 与磁珠结合，再用磁力分离、洗脱	克隆验证/电泳/PCR	适合自动化系统	成本高、需专用设备
热裂解法/酶裂解法	热裂解法：高温处理裂解细胞，回收质粒； 酶裂解法：如使用溶菌酶裂解细胞，低速操作	克隆验证/电泳/PCR	适合处理难以裂解的菌	稳定性差、提取效率低、杂质多

三、实验材料

1. 菌株

含有目的质粒的大肠杆菌。

2. 培养基

培养基：LB（见附录 1.公共配方）

3. 主要仪器

高速离心机（Dynamica）、摇床（上海知楚仪器有限公司，简称知楚仪器）、超净工作台（ESCO Laminar Flow Cabinet）。

4. 试剂盒

Omega 质粒小提试剂盒

SPARKeasy 高纯度质粒小量极速提取试剂盒

SPARKeasy 高纯质粒小提中量快速提取试剂盒

四、实验步骤

（一）少量提取质粒步骤（Omega 试剂盒）

（1）取含目的质粒的大肠杆菌 20 μ L 接种于 5mL LB 培养基，37 $^{\circ}$ C，180r/min 培养 16~20h。

（2）将培养的细菌分装于 1.5mL 离心管，12 000r/min，1min 离心，弃上清。

（3）加入 250 μ L 溶液 I（含 RNaseA）充分悬浮大肠杆菌沉淀。

溶液 I 在使用前确保加入 RNaseA，使用完毕后立即放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

（4）加入 250 μ L 溶液 II，温和翻转离心管 5~6 次（作用时间小于 5min）。一定要轻柔操作，避免质粒断裂。

（5）加入 350 μ L 溶液 III 轻翻 5~6 次，静置 2min。

（6）室温 12 000r/min 离心 10min，取上清。

（7）将上清置于干净 1.5mL 离心管，12 000r/min，离心 1min，取上清。

（8）将上清上柱，12 000r/min 离心 1min，弃滤液。

（9）用 500 μ L 的缓冲液 WA（HBC）洗柱子，12 000r/min，离心 1min。

（10）用 700 μ L 的缓冲液 WA 洗柱子，12 000r/min，离心 1min。

（11）重复步骤（10）。

（12）12 000r/min，离心 2min，静置 20~30min（液体挥发）。

（13）将离心柱置于 1.5mL 离心管中，加入 30~50 μ L 洗脱缓冲液（elution buffer），静置 5min 后 12 000r/min 离心 1min。

（14）浓度测定（具体测定方法参照“实验一”）。

（二）少量提取质粒步骤（SPARKeasy 试剂盒）

（1）取 1~5mL 过夜培养的菌液，12 000r/min 离心 1min，去上清，收集菌体。菌液超过 1.5mL 时，可多次离心将菌体沉淀收集在同一个离心管中。

（2）加 250 μ L 溶液 P1（请先检查是否已加入 RNaseA）重悬菌体沉淀，吹打或涡旋振荡至彻底悬浮至溶液为浑浊的红色。

如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。

（3）加 250 μ L 的溶液 P2，温和地上下翻转 6~8 次使菌体充分裂解至清亮的紫色。

温和地混合，不要剧烈振荡，以免质粒断裂！如果菌体少，溶液很快变成清亮紫色，略微黏稠拉丝后就可以进行下一步。菌体量较多时，可稍微静置至稍清亮，所用时间不应超过 5min。

（4）加 350 μ L 溶液 P3，立即温和地上下翻转 10~15 次，充分混匀时会出现黄色絮状沉淀。12 000r/min 离心 10 min，小心取上清。

加入溶液 P3 后应该立即温和混匀，以免产生 SDS 的局部沉淀；充分混匀时，溶液应为黄色，如果黄色中混有紫色，需要继续温和翻转混匀；离心机未达到设定转速就开始计时，可以适当增加离心时间。

（5）将上一步所得上清加入吸附柱 AC 中（吸附柱放入收集管中），12 000r/min 离心 1min，弃滤液。

（6）加入 750 μ L 漂洗液 WB（请先检查是否已加入无水乙醇！），12 000r/min 离心 1min，弃滤液。

如下游实验要求较高，可重复本步骤一次。

（7）将吸附柱 AC 放回空收集管中，12 000r/min 离心 1min。

尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

（8）取出吸附柱 AC，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50~100 μ L 洗脱缓冲液 EB（洗脱缓冲液事先在 65~70℃ 水浴中加热效果更好），12 000r/min 离心 1min。

如果需要较多量质粒，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，离心 1min；吸附柱 AC 放入一个干净的离心管中后，可开盖晾干 1~2min，有利于增加纯度；洗脱液体积越大，洗脱效率越高。如果需要质粒浓度较高，可以适当减小洗脱体积，但是最小体积不应小于 30 μ L，体积过小会降低质粒洗脱效率，减少质粒产量。

（三）中量提取质粒步骤（Spark Jade 试剂盒）

（1）取过夜培养菌 40~60mL（最大不超过 90mL）菌液，装入 50mL 离心管中，4500~6000g 于 4℃ 离心 5min 沉淀菌体（也可 12 000g 离心 2min），完全弃