

# 大型真菌分子生物学实验材料的保存方法介绍

张丽芳<sup>1,2</sup>, 杨祝良<sup>1\*</sup>

1. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

**摘要:**介绍了几种保存大型真菌分子生物学实验材料的方法,用这几种方法所保存的材料提取的基因组核糖体脱氧核糖核酸(DNA)质量适于系统生物学及其他分子生物学研究之用。

**关键词:**大型真菌;脱氧核糖核酸;分子生物学;材料保存

中图分类号: Q93-33

文献标识码: A

文章编号: 1672-3538(2004)02-0060-02

随着分子生物学在大型真菌中研究的深入,对制备高质量的基因组核糖体脱氧核糖核酸(DNA)的需求也日益增长。各种提取真菌 DNA 的方法见诸报道<sup>[1-3]</sup>,但是对分子生物学实验所用的大型真菌材料的保存方法却少有细究。而如果保存方法不当,很可能使实验材料中的 DNA 大量降解,不管用什么方法都无法获得高质量的 DNA,甚至根本得不到 DNA,同时浪费了大量人力物力。一些对系统学有意义的种类因为没有用恰当的方法保存可供分子生物学研究用的材料而失去基因信息,十分可惜。本文对大型真菌分子生物学实验材料的几种保存方法做了较为详细的介绍,按照这些方法保存的大型真菌所得的 DNA 质量完全适于系统生物学及其他分子生物学的需要。

供分子生物学研究用的大型真菌材料可以大致分为菌丝培养物、孢子粉和子实体 3 类,其中以菌丝培养物所能提供的 DNA 质量最好,但很多大型真菌不易分离或培养,且野外菌种分离污染率较高。常规菌种分离培养方法在此不再赘述。孢子粉的保存方法即获取孢子印的方法,要注意用高压灭菌的锡箔收集较为干净的孢子粉,及时标号并且保留相对应的凭证标本。该法保存的材料

量一般较少,有时难以满足实验需求。子实体材料的保存最为简便易行。下面介绍 4 种常用的方法:

## 1 全子实体烘干保存法

将整个子实体置于 35~45℃通风良好的恒温烘箱内干燥,注意选取较为干净且较年轻的,但同时要尽量保证是成熟的(以便日后对凭证标本种类进行鉴定)子实体。烘干应连续进行,中间不能中断。烘干后的子实体在野外可以用纸包裹或置于干净、干燥的塑料袋中保存,并及时送至标本馆储藏。该法保存的材料视当时干燥情况在 3~5 年之后仍然可以提取 DNA,但 DNA 质量随保存年限增加而降低。

## 2 子实体组织块硅胶干燥保存法

从单个子实体上选取无深色色素且较干净的组织,如菌盖菌肉,菌柄菌肉或菌褶,用干净的镊子(每次从子实体上取材料前,镊子应先灼烧灭菌,蘸入酒精中降温后再使用)将选取的组织块分次(每次 1 小块)取下放在干净的滤纸上,隔层包裹起来,尽量不要使同一叠层内有 3 个以上组织块。将滤纸包放入有变色硅胶的小塑料袋中。也

\* 基金项目:中国科学院知识创新重要方向资助项目(KSCX2-SW-101C);国家自然科学基金资助项目(30470010)

作者简介:张丽芳(1977-),女,博士研究生,主要从事大型真菌分子系统学研究。

收稿日期:2004-05-08

\*\* 通讯作者:杨祝良, E-mail: fungi@mail.kib.ac.cn

可以将组织块直接放入有变色硅胶的小袋中。总的待干燥材料的体积不宜超过袋内硅胶体积的五分之一,以免部分材料不能及时脱水。需要注意的是,从不同子实体上(即使凭证标本是同一编号)取的材料不能混在一个硅胶袋中干燥,以免交叉污染。视情况更换变色硅胶 1~3 次直至袋内硅胶保持原色不变。如果是组织块直接放入硅胶中,在硅胶更换仍保持原色不变后应及时将多余的硅胶倒出,只保留 10~20 粒硅胶维持干燥环境即可,否则在从野外到实验室的运输中会因硅胶磨擦,致使材料变碎,不利于后续工作。装有材料的小袋应妥善保管,不能受压。该法保存的材料提取的 DNA 质量远比恒温烘干保存的材料高,如在材料磨碎之后先用去多糖缓冲液(100 mmol/L Tris·HCl pH8.0, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl)清洗 1 次,然后再用常规的 CTAB 法<sup>[4]</sup>提取 DNA 则效果更好。

### 3 子实体组织块材料酒精保存法

从单个子实体上选取适合的组织(原则同“方法 2”),用干净的镊子将选取的部分(尽量分成小块)取下放入盛有 100% 酒精的干净小瓶(容积大约 3~5 mL)中,用封口胶将瓶口封住,以免酒精渗漏或挥发。每日更换瓶中的酒精 1~2 次,持续 1~2 d。用时将材料取出,在室温下使酒精自然挥发干净,然后再按照常规方法提取 DNA 即可。该法保存材料时需多次更换酒精,若要保存多份材料则在野外需携带大量酒精,较为不便。

### 4 子实体组织块缓冲液保存法

从单个子实体上选取适合的组织(原则同“方

法 2”),用干净的镊子将选取的部分(尽量分成小块)取下放入充有 EDTA 过量 10 倍的 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris·HCl pH8.0, 10 mmol/L EDTA)的小瓶(容积大约 3~5 mL,加入缓冲液前要仔细清洗)中,用封口胶将瓶口封住,置于室温下保存即可。用此法保存的材料,提取 DNA 前无须经过任何特殊处理。用该法保存的材料提取的 DNA 质量为上述几种方法中最高的,且材料保存时间可达 5 年或更长。

从用上述各方法保存的大型真菌材料中均可提取出质量满足分子生物学研究需要的 DNA。如果材料仅供短期内实验之用,可以采取全子实体烘干保存法或子实体组织块硅胶干燥保存法保存,较为经济;如果需要长期保存材料,则采用子实体组织块缓冲液保存法较为妥当。其余方法或不适用于所有大型真菌,或保存量较少,或保存液不易大量携带,故不特别推荐使用。

### 参考文献:

- [1] Hamer J E, Givan S. Genetic mapping with dispersed repeated sequences in the rice blast fungus: mapping the SMO locus[J]. *Mol Gen Genet*, 1985, 223: 287-495.
- [2] 时向阳,魏江春,姜玉梅,等.提取地衣真菌总 DNA 的简便方法[J]. *北京林业大学学报*, 1997, 19(4): 46-50.
- [3] 朱衡,瞿峰,朱立煌.利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. *真菌学报*, 1994, 13(1): 34-40.
- [4] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.

## Recommendation of Several Methods for Preserving the Materials of Macrofungi for Molecular Biological Research

ZHANG Li-fang, YANG Zhu-liang

1. *Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650204, China*

2. *Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*

**Abstract:** Several methods of preserving the materials of macrofungi for molecular biological research were recommended. The DNA extracted from the materials preserved by these methods are suitable for the studies of molecular phylogeny and other molecular biology.

**Key words:** macrofungi; DNA; molecular biology; material preservation