

巢式 PCR 检测植物组织痕量内生真菌的方法及其引物

Detection of Trace Endophytic Fungi in Plant Tissues

by Nested PCR and its primers.

张紫薇², 杨预展², 袁志林^{1, 2, *}

¹ 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院, 北京; ² 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州

*通讯作者邮箱: yuanzl@caf.ac.cn

摘要: 真菌的转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, ITS)能有效在种的水平上区分真菌类群, 是研究真菌多样性的理想条形码。巢式 PCR 以两对真菌特异性 ITS 转录间隔区引物进行两轮巢式 PCR 扩增, 最终高效扩增出植物根系和叶片组织内生真菌的 ITS1 和 ITS2 片段, 解决了目前植物内生真菌群落高通量测序建库过程中遇到的非特异性扩增 (植物源 ITS)这一技术瓶颈。

关键词: PCR, 内生真菌, ITS, 引物

材料与试剂

1. 用于扩增植物组织中内生真菌 ITS 的引物

引物包括巢式 PCR 第一轮扩增引物对和巢式 PCR 第二轮扩增引物对;
巢式 PCR 第一轮扩增引物对:

①、正向引物 NSA3: 5'-AAACTCTGTCGTGCTGGGGATA-3',

反向引物 NLC2: 5'-GAGCTGCATTCCCAAACAACTC-3';

②、正向引物 NSI1: 5'-GATTGAATGGCTTAGTGAGG-3',

反向引物 NLB4: 5'-GGATTCTCACCTCTATGAC-3';

巢式 PCR 第二轮扩增引物对为以下任一引物对:

①、正向引物 ITS1-F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3',

反向引物 ITS2: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3';

②、正向引物 ITS1-F_KYO2: 5'-TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA-3',

反向引物 ITS2_KYO2: 5'-TTYRCTRCGTTCTTCATC-3';

③、正向引物 fITS7: 5'-GTGARTCATCGAATCTTTG-3',

反向引物 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3';

④、正向引物 ITS3_KYO2: 5'-GATGAAGAACGYAGYRAA-3',

- 32 反向引物 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。
- 33 2. PCR 反应液 (见溶液配方)
- 34 3. DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒 (QIAGEN 公司, catalog number: 69104)
- 35 4. AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 试剂盒 (康宁生命科学有限公司, AxyPrep,
- 36 catalog number: AP-GX-50)
- 37 5. 碎冰
- 38 6. 各种型号枪头
- 39 7. 离心管 (2 ml、1.5 ml)
- 40 8. 异丙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 80109218)
- 41 9. 无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10009218)
- 42 10. 胰蛋白胨 (杭州微生物试剂有限公司, HANWEI, catalog number: Y0005)
- 43 11. NaCl (国药集团化学试剂有限公司, 沪试, catalog number: 10019318)
- 44 12. 酵母提取物 (yeast extract) (Oxoid 公司, Oxoid, catalog number: LP0021)
- 45 13. 琼脂 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, DING GOU, catalog number:
- 46 DH010-1.1)
- 47 14. 氨苄青霉素 (Ampicillin) (生工生物工程 (上海)有限公司, Amresco, catalog
- 48 number: 0339)
- 49 15. 3% X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷) (北京索莱宝科技有限公司,
- 50 Solarbio, catalog number: X8050-25)
- 51 16. 20% IPTG (异丙基硫代半乳糖苷) (北京百奥莱博科技有限公司, 百奥莱博,
- 52 catalog number: GL1590-PYO)
- 53 17. 含有 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板 (预先滴加 40 μ 13%X-gal 和 7 μ
- 54 120%IPTG) (见溶液配方)
- 55 18. 超纯水
- 56 19. pGEM-T Easy 载体 (Promega 公司, Promega, catalog number: A1360)
- 57 20. 感受态细胞 *Escherichia coli* JM109 (Promega 公司, Promega, catalog number:
- 58 L1001)
- 59 21. DNA Marker (康为世纪公司, cwbio, catalog number: CW2583)
- 60 22. 制冰机 (上海易汇生物科技有限公司, 易汇, catalog number: IMS-20)

61 仪器设备

- 62 1. 超净工作台

- 63 2. 研钵
- 64 3. 移液枪 (2.5 μ l、10 μ l、20 μ l、100 μ l、200 μ l、1000 μ l)
- 65 4. 离心机 (杭州卡培恩生物技术公司, SIGMA, catalog number: 3K1S)
- 66 5. 超微量核酸蛋白测定仪 (Quawell 公司, Quawell, catalog number: Q5000)
- 67 6. -20 °C冰箱
- 68 7. MyCycler PCR 扩增仪 (Bio-Rad 公司, Bio-Rad, catalog number: MyCycler)
- 69 8. 手术刀
- 70 9. 电子精密天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司, MINQIAO, catalog number:
- 71 JA1103 FA/JA 系列)

72

73 软件 and 数据库

- 74 1. VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)
- 75 2. BLASTN2.2.28+程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

76

77 实验步骤

78 一、植物组织 (含真菌)基因组的提取的方法:

79 使用 DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒并做一些微调。具体步骤如下:

- 80 1. 此案例中以盐生植物-盐地碱蓬 (*Suaeda salsa*)为例, 将其叶片 (样品编号: L3)
- 81 20 mg 或根系 (样品编号: R3)20 mg 放入研钵中进行液氮冷却研磨至粉末状
- 82 。
- 83 2. 加入 400 μ l Buffer AP1 和 4 μ l RNaseA。混合均匀后放入 65 °C 水浴 40 mi
- 84 n, 期间轻微颠倒混匀 3 次。(在用之前不要将 BufferAP1 和 RNaseA 混合。)
- 85 3. 加入 130 μ l BufferP3, 混匀后冰上放置 5 min; 得裂解液。
- 86 4. 将裂解液在 20000 $\times g$ 下离心 5 min。
- 87 5. 吸取上清液至 QIAshredder 离心柱, 置入新的 2 ml 离心管中, 20,000 $\times g$ 离
- 88 心 2 min 后过滤。
- 89 6. 将滤液转移至新的离心管中, 加入 1.5 倍的 Buffer AW1, 立即吹打混匀。
- 90 7. 吸取 650 μ l 混合液至 DNeasy 微离心柱, 置入新的 2 ml 离心管中, $\geq 6000 \times$
- 91 g 离心 1 min, 弃滤液。

8. 把 DNeasy 微离心柱放到一个新的 2 ml 离心管中, 加 500 μ l Buffer AW2,
 $\geq 6000 \times g$ 离心 1 min, 弃滤液。
9. 再加 500 μ l Buffer AW2, 20000 $\times g$ 离心 2 min。
10. 小心从离心管中取出离心吸附柱 (不要让离心吸附柱底端接触到下面的滤液) 转移至一个新的 1.5 ml 或者 2 ml 的离心管中。
11. 加 50-100 μ l Buffer AE 或灭菌去离子水, 室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 下放置 5 min,
 $\geq 6000 \times g$ 离心 1 min。
12. 将得到的溶液 (即步骤 11 离心所得的滤液) 重新加入 DNeasy 微离心柱中, 室温放置 2 min, $\geq 6000 \times g$ 离心 1 min。
13. DNA 样品 (即, 步骤 12 离心所得的滤液) 浓度测定: 使用 Quawell Q5000 超微量核酸蛋白测定仪。
14. DNA 样品保存在 -20 $^{\circ}$ C 备用。

备注说明: 以下实验中, 以根际土壤 DNA (RS, 浓度为 30.2 ng/ μ l) 和非根际土壤 DNA (SS, 浓度为 7.8 ng/ μ l) 为阳性对照。

二、PCR 体系及反应条件

巢式 PCR 以第一轮 PCR 扩增产物为模板, 即第二轮以第一轮扩增产物为模板。

PCR 扩增反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 (其中 NSA3 和 NLC2 引物对的退火温度为 58 $^{\circ}$ C) 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 30 次循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。在 MyCycler PCR 扩增仪上进行。

备注说明: 除了 NSA3 和 NLC2 引物对外, 其余引物对均为 53 $^{\circ}$ C。

引物名称及其扩增片段如表 1 (具体位点信息见图 1)。

其中 NSA3 和 NLC2 引物对和 NSI1 和 NLB4 引物对的扩增产物包括了 18S 小亚基 (SSU 部分片段)+ITS1+5.8S+ITS2+28S 大亚基 (LSU 部分片段); ITS1_F 和 ITS2 引物对和 ITS1-F_KY02 和 ITS2_KY02 引物对的扩增产物为 ITS1 区域; ITS7 和 ITS4 引物对和 ITS3_KY02 和 ITS4 引物对的扩增产物为 ITS2 区域 (详见图 1)。

两轮巢式 PCR 扩增:

第一轮巢式 PCR 引物组合 (共 2 组): NSA3 和 NLC2 引物对; NSI1 和 NLB4

122 引物对。

123 第二轮巢式 PCR 引物组合: ITS1 片段扩增引物组合 (共 2 组): ITS1-F 和 ITS2

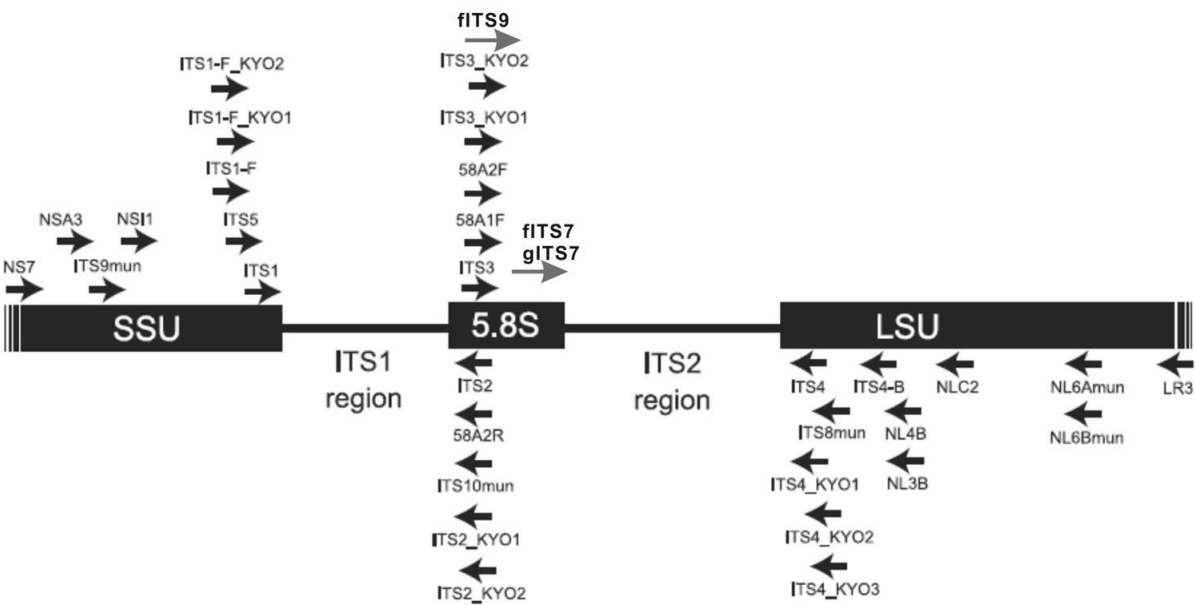
124 引物对; ITS1-F_KYO2 和 ITS2_KYO2 引物对。ITS2 片段扩增引物组合 (共 2 组):

125 fITS7 和 ITS4 引物对; ITS3_KYO2 和 ITS4 引物对。

表 1. PCR 扩增引物

| 引物名称 | 扩增片段 |
|------------------|--------------------------------|
| ITS1-F (正向) | ITS1 片段 |
| ITS2 (反向) | |
| NSA3 (正向) | 18S 小亚基部分片段+完整 ITS+28S 大亚基部分片段 |
| NLC2 (反向) | |
| fITS7 (正向) | ITS2 片段 |
| ITS4 (反向) | |
| NSI1 (正向) | 18S 小亚基部分片段+完整 ITS+28S 大亚基部分片段 |
| NLB4 (反向) | |
| ITS1-F_KYO2 (正向) | ITS1 片段 |
| ITS2_KYO2 (反向) | |
| ITS3_KYO2 (正向) | ITS2 片段 |
| ITS4 (反向) | |

126



127

128

图 1. 扩增真菌核糖体转录间隔 (ITS)常用引物及位点

三、PCR 产物的纯化 (用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 试剂盒进行纯化):

1. 在紫灯下切下含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶,用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎。
计算凝胶重量 (提前记录 1.5 ml 离心管重量), 该重量作为一个凝胶体积 (如 100 mg=100 μ l 体积)。

2. 加入 3 个 (300 μ l)凝胶体积的 Buffer DE-A, 混合均匀后于 75 $^{\circ}$ C 加热, 间断混合 (每 2-3 min), 直至凝胶块完全熔化 (约 3-6 min)。注: Buffer DE-A 为红色液体。在熔化凝胶过程中, 可以帮助观察凝胶是否完全熔化。

3. 加 0.5 个 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B (即,加入 150 μ l 的 Buffer DE-B), 混合均匀。当分离的 DNA 片段小于 400 bp 时, 需再加入 1 个凝胶体积的异丙醇。注: 加 Buffer DE-B 后混合物颜色变为黄色, 充分混匀以保证形成均一的黄色溶液。

备注说明: 根据引物设计位点, NSA3 和 NLC2 引物对的扩增产物片段大小为 950 bp, NSI1 和 NLB4 引物对的扩增产物片段约 800 bp, 其他的引物的扩增产物为 200-250 bp。

4. 吸取步骤 3 中的混合液, 转移到 DNA 制备管 (原始状态时, 该 DNA 制备管被置于 2 ml (试剂盒内提供)离心管)中, 12000 \times g 离心 1 min。弃滤液。

5. 将制备管置回 2 ml 离心管, 加 500 μ l 的 Buffer W1, 12000 \times g 离心 30 s, 弃滤液。

6. 将制备管置回 2 ml 离心管, 加 700 μ l 的 Buffer W2, 12000 \times g 离心 30 s, 弃滤液。以同样的方法再加 700 μ l 的 Buffer W2 洗涤一次, 12000 \times g 离心 1 min。

注: (1)确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。(2)再次使用 Buffer W2 冲洗能确保盐分被完全清除, 消除对后续实验的影响。

7. 将制备管置回 2 ml 离心管中, 12000 \times g 离心 1 min。

8. 将 DNA 制备管置于洁净的 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供)中, 在 DNA 制备管的过滤膜中央加 25-30 μ l 的 Eluent 或去离子水, 室温静置 1 min。12000 \times g 离心 1 min (收集过滤液, 滤液中含的就是 PCR 的扩增产物)。洗脱 DNA。

9. 将纯化好的 PCR 产物连接到 pGEM-T Easy 载体, 然后将连接产物转化到感受

159 态细胞 *Escherichia coli* JM109，具体步骤根据操作手册进行。将感受态细胞
160 涂布在含有 50 µg/ml 氨苄青霉素的 (ampicillin)LB 平板上进行蓝白斑筛选获得
161 阳性克隆。菌落呈现白色的即为阳性克隆。

162 10. 阳性克隆再经“菌液 PCR”进行鉴定 (colony PCR): 挑取白色克隆，LB 液体培
163 养过夜 (培养温度为 37 °C，培养时间为 12 h)，吸取 1 µl 菌液作为 DNA 模板
164 进行验证，PCR 体系为 25 µl (如表 2)，所用引物如表 3，反应条件同上，设置
165 25 个循环。最后每个样品挑取 6-16 个 (视具体试验需求而定)阳性克隆 (菌液)
166 送测序公司 (本案例中为上海生工)测序，测序引物为 M13F (M13F: TGT AAA
167 ACG ACG GCC AGT)。

表 2. PCR 体系 (25 µl)

| | |
|--|---------|
| TaKaRa Ex Taq (5 U/µl) | 0.2 µl |
| 10xEx Taq Buffer (2.5 mM, Mg ²⁺ free) | 2.5 µl |
| MgCl ₂ (浓度为 2 mM) | 1.5 µl |
| dNTP Mixture (2.5 mM) | 2 µl |
| 正向引物 (50 µM) | 0.25 µl |
| 反向引物 | 0.25 µl |
| 灭菌超纯水 | 17.3 µl |
| 模板 DNA (巢式 PCR 以第一轮 PCR 扩增产物为模板) | 1 µl |

168

表 3. 引物名称

| | |
|------|------------------------------------|
| 正向引物 | ITS1-F、ITS1-F_KY02、fITS7、ITS3_KY02 |
| 反向引物 | ITS2、ITS2_KY02、ITS4 |

169

170 PCR 扩增反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 40 s,
171 72 °C 延伸 50 s, 25 次循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。在 MyCycler
172 PCR 扩增仪上进行。

173 备注说明: 此 PCR 反应是为了验证感受态细胞 *Escherichia coli* JM109 中的
174 pGEM-T Easy 载体上是否已经连接有纯化好的 PCR 产物, 防止白色的假阳性菌落
175 影响结果。

176 11. 原始序列用 VecScreen 程序去除克隆序列中的部分 T 载体序列, 利用

BLASTN2.2.28+程序分析与每个克隆序列匹配的记录。

结果与分析

利用两组引物对 (NSA3 和 NLC2 引物对; NSI1 和 NLB4 引物对)进行巢式 PCR 的第一轮扩增, 基因片段能覆盖整个真菌 ITS 转录间隔区; 随后以该基因片段为模板进行第二轮 PCR 扩增, 引物仍然使用 ITS1-F 和 ITS2 引物对、ITS1-F_KY02 和 ITS2_KY02 引物对、fITS7 和 ITS4 引物对、ITS3_KY02 和 ITS4 引物对。结果显示 NSA3 和 NLC2 引物对能有效扩增出目的产物 (片段长度越 950 bp), 而 NSI1 和 NLB4 引物对扩增的效果较差, 无明显条带 (见图 2)。将 NSA3 和 NLC2 引物对扩增所得条带割胶后纯化, 作为第二轮 PCR 的模板 DNA。结果表明使用 ITS1-F 和 ITS2 引物对、ITS1-F_KY02 和 ITS2_KY02 引物对、fITS7 和 ITS4 引物对、ITS3_KY02 和 ITS4 引物对等 4 组引物组合都能扩增出单一的亮条带 (图 3)。同上, 对目的产物进行验证。BALST 搜索的结果显示随机挑取的共 28 个克隆序列 (每种扩增产物至少 6 个克隆)在 GenBank 数据库中匹配的记录全部是真菌 ITS1 或 ITS2 片段 (图 4)。

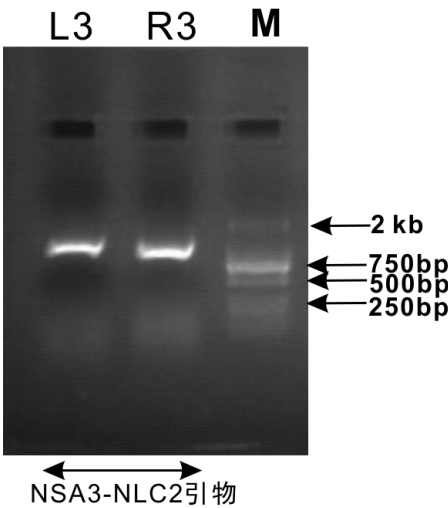


图 2. 利用 NSA3 和 NLC2 引物对进行巢式 PCR 的第一轮扩增的结果图
M:DNA Marker (核酸分子标记) (康为世纪公司, cwbio, catalog number: CW25

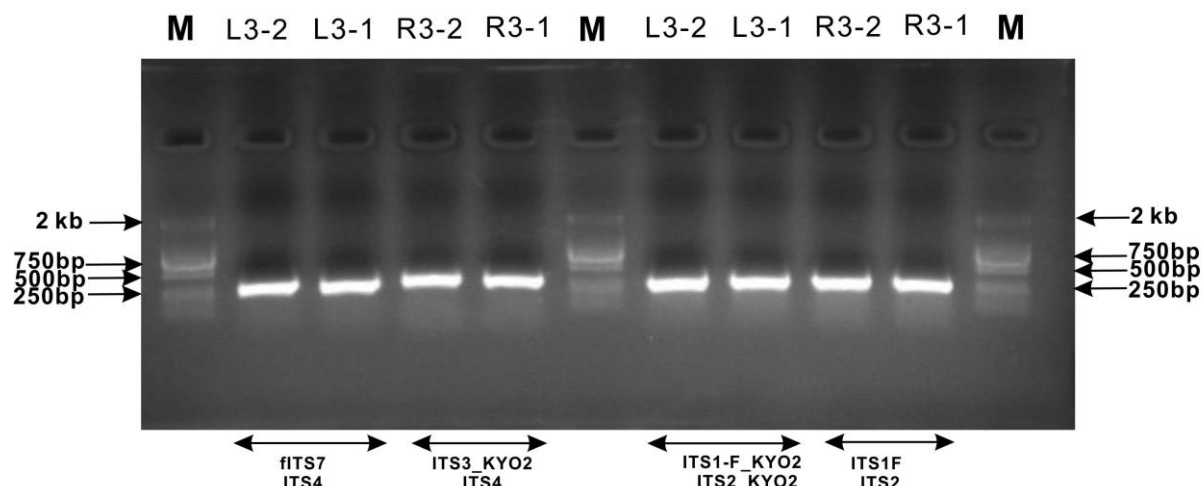


图 3. 以第一轮扩增的 PCR 产物为模板，利用 ITS1-F 和 ITS2、ITS1-F_KYO2 和 ITS2_KYO2、ITS3_KYO2 和 ITS4、fITS7 和 ITS4 等四组引物对进行巢式 PCR 的第二轮扩增的结果图。

L3-2: 叶片基因组 DNA 的第二次重复扩增;
L3-1: 叶片基因组 DNA 样品的第一次扩增;
R3-2: 根系基因组 DNA 的第二次重复扩增;
R3-1: 根系基因组 DNA 样品的第一次扩增;

M:DNA Marker (核酸分子标记) (康为世纪公司, cwbio, catalog number: CW25 83)

图 3 备注说明: 右侧代表 ITS1 片段, 左侧代表 ITS2 片段。由于 ITS1-F 和 ITS2; ITS1-F_KYO2 和 ITS2_KYO2 两组引物对的结合位点 (位置) 非常接近, 因此扩增出的片段大小也差不多; 而 fITS7 的引物结合位点与 ITS3_KYO2 位置相差 50 bp 左右, 因此片段长度略有差异。

以上结果可以看出, 经过两轮巢式 PCR, 能特异性地高效扩增真菌 ITS; NSA 3 和 NLC2 引物对能有效区分真菌源和植物源的 ITS, 说明该引物具有极高的真菌特异性。研究结果充分说明利用巢式 PCR 技术及以上的引物组合, 可以特异性地高效扩增植物组织中痕量内生真菌 ITS, 为今后高通量测序技术成功应用于植物内生真菌生物多样性及生态学研究奠定基础。

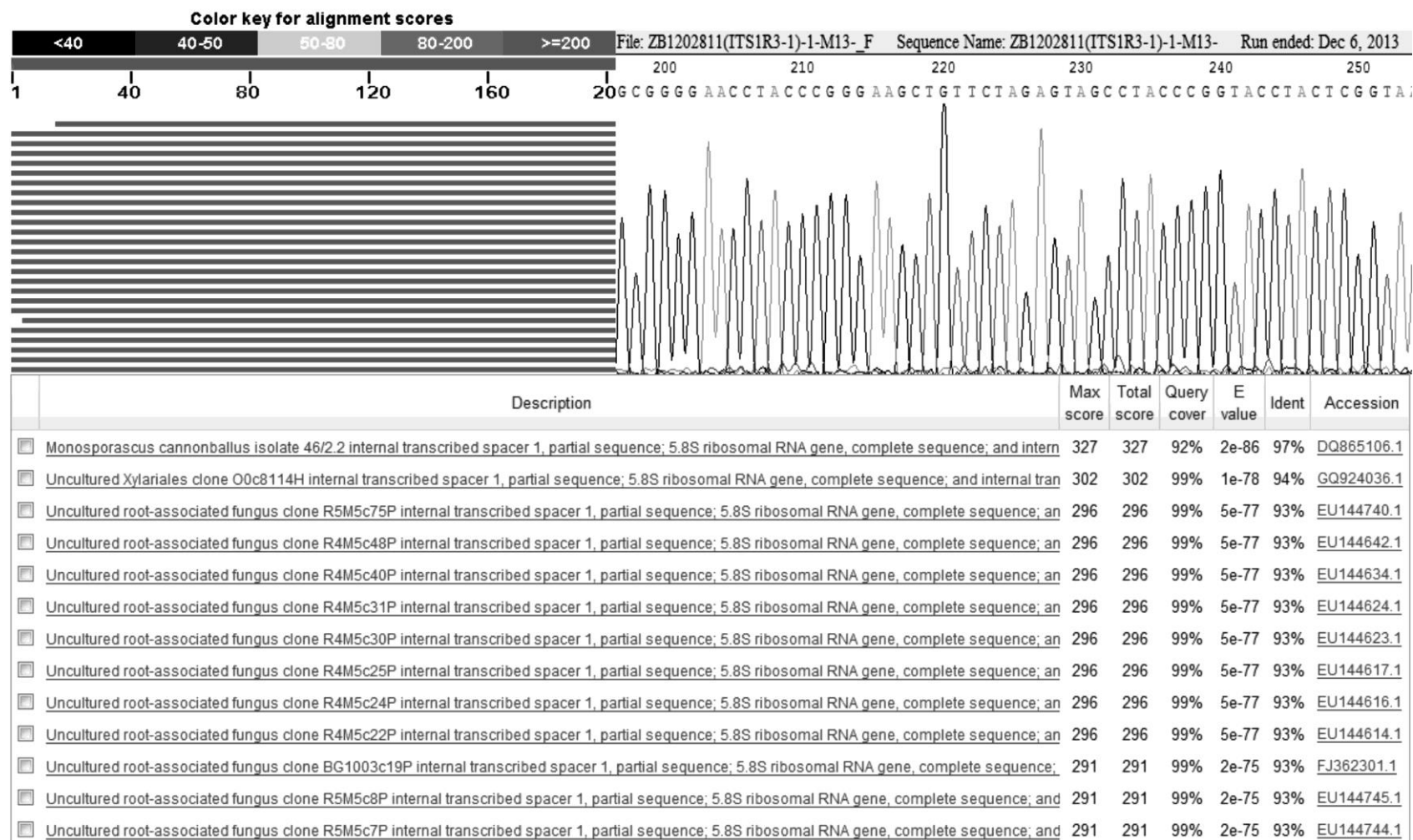


图 4. 经过两轮巢式 PCR 后，扩增产物克隆序列的 BLAST 结果

1. PCR 反应液 (50 μ l 体系): 按照下列组份配制 (表 4)

表 4. PCR 反应液 (50 μ l 体系)组分

| | |
|--|--------------|
| TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ l) | 0.3 μ l |
| 10xEx Taq Buffer (2.5 mM, Mg ²⁺ free) | 5 μ l |
| MgCl ₂ (浓度为 2 mM) | 3 μ l |
| dNTP Mixture (2.5 mM) | 4 μ l |
| 正向引物 (50 μ M) | 0.5 μ l |
| 反向引物 | 0.5 μ l |
| 灭菌超纯水 | 33.7 μ l |
| 模板 DNA (巢式 PCR 以第一轮 PCR 扩增产物为模板) | 3 μ l |

2. 含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 (ampicillin) LB 平板 (预先滴加 40 μ l 3%X-gal 和 7 μ l 20%IPTG) 的制备方法:

| | |
|-------|------|
| 胰蛋白胨 | 10 g |
| NaCl | 10 g |
| 酵母提取物 | 5 g |
| 琼脂 | 16 g |

超纯水定容至 1 L, 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 min, 待其冷却至 60 $^{\circ}$ C 左右时, 添加终浓度为 50 μ g/ml 氨苄青霉素, 制备 LB 平板。随后在平板上加入 40 μ l 质量浓度为 3%的 X-gal 溶液和 7 μ l 质量浓度为 20%的 IPTG 溶液。

致谢

感谢国家自然科学基金/面上项目 “盐生植物特异性招募"黑化"内生真菌的基础生物学研究” (编号: 31370704, 2014-2017)对本研究的大力支持。

参考文献

1. 袁志林,章初龙,陈益存. 扩增植物组织中内生真菌ITS基因的方法及所用引物. 浙江: CN103834728A, 2014-06-04.