

# 基于流式细胞分析技术的茯苓基因组大小测定\*

□王亚之\*\* 李秋实 陈士林 孙超 宋经元\*\*

(中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)  
(北京协和医学院)

**摘要:**目的:茯苓是担子菌多孔菌科的著名传统中药。本研究的目的在于测定茯苓的基因组大小并考察了其倍性与基因组的关系。方法:真菌材料的前处理参考文献报道<sup>[1]</sup>,并用 DNA 特异性染料碘化丙啶进行染色,通过调节离心转速、染色时间等条件对样品进行核分离的优化。DNA 含量用流式细胞仪进行分析,通过比较茯苓与内参黑曲霉  $G_0/G_1$  期峰比值计算得出。结果:茯苓的基因组大小测定为  $55.79 \pm 3.03 \text{ Mb}$ ,或相对 DNA 含量为  $0.12 \pm 0.01 \text{ pg}$  ( $1 \text{ pg DNA} = 0.965 \times 10^9 \text{ bp}$ )。在结果中可以检测出黑曲霉和茯苓的  $G_2/M$  期峰。结论:本研究探索了用流式细胞仪分析茯苓基因组大小的方法,所得数据可为基因组学研究提供了参考。

**关键词:**茯苓 基因组大小 流式细胞术 黑曲霉

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.03.029

茯苓为我国传统常用菌类药材,别名松腴、松薯,《中华人民共和国药典》2010 版收录的茯苓来源于多孔菌科(Polyporaceae)、卧孔菌属(*Poria*)真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核。野生茯苓多分布于北纬  $18^\circ \sim 37^\circ$ 、东经  $98^\circ \sim 121^\circ$  之间的亚热带、热带<sup>[2]</sup>,其作为经济型真菌在我国已有 2000 多年的栽培历史<sup>[3]</sup>。茯苓作为传统中药应用已久,具有利水渗湿、健脾宁心等功效,《神农本草经》将其列为上品。现代药理研究表明<sup>[4]</sup>,茯苓具有抑制肿瘤、抗炎、调节免疫等作用,具有广阔的开发前景。

自 1996 年第一个真菌酿酒酵母基因组测序完成后,70 余种真菌基因组测序工作已经组装完成或正在组装<sup>[5]</sup>。真菌的全基因组信息可推动其分子水平研

究的深入开展,有助于人们了解真菌的生理特性、进化和代谢多样性。目前,已测序真菌大部分集中于重要的人类病原菌、植物病原菌、腐生菌或者模式生物,药用真菌范围尚属空白。药用真菌在我国资源丰富,有临床药用基础的真菌近 300 种<sup>[6]</sup>,近年来建立的 DNA 条形码鉴定系统,对药用植物和药用真菌的正确鉴定提供了强有力的工具<sup>[7-9]</sup>。本研究以茯苓作为药用真菌基因组学研究的开端,对其基因组大小测定方法进行探索。

测定基因组大小可估测物种的 DNA 含量,对于待测物种的选择及测序工作前期预算的评估具有指导意义,为基因组测序提供了不可或缺的基础数据。流式细胞仪可在高速液流中对 DNA 含量进行测定分析<sup>[10]</sup>,检测器捕捉单细胞悬浮液中经 DNA 特异性染料染色的细胞核被激发后所发射的荧光信号,并

收稿日期:2010-06-02

修回日期:2010-06-12

\* 国家自然科学基金面上项目(30772735):濒危药用植物川贝母 EST 文库的建立和 *hmgr* 基因克隆的研究,负责人:陈士林。

\*\* 联系人:王亚之,助理研究员,主要研究方向:植物分子生物学,E-mail: tinkywinkysoda@163.com;宋经元,副研究员,主要研究方向:药用植物的分子生物学研究,E-mail: jysong@implad.ac.cn。

用直方图进行量化分析,通过与内参比较相对荧光强度从而计算出 DNA 含量<sup>[1]</sup>。流式分析技术已经被广泛地应用于植物、真菌的基因组大小测定,制样方法简便易行,检测结果较为稳定可靠。

本研究利用茯苓为待测对象,选取黑曲霉作内标,用流式细胞仪对 6 组样品进行重复实验,通过比较计算测定了茯苓基因组的大小,为其基因组学研究提供了基础数据。本研究还对药用真菌基因组大小测定进行了方法学上的探索,建立了流式细胞仪测定药用真菌基因组大小的平台,以期更为准确、快速地测定其它药用真菌。

## 一、材 料

### 1. 试剂与耗材

碘化丙啶 (Sigma-Aldrich, cat. no. P4170); RNase (Sigma-Aldrich, cat. no. R5000); 柠檬酸 (Sigma-Aldrich, cat. no. C2404-100G); Tween-20 (Sigma-Aldrich, cat. no. P2287); 磷酸氢二钠 (Sigma-Aldrich, cat. no. S7907, 99.0%); 300 目尼龙筛网 (北京利文商贸有限公司)

### 2. 仪 器

流式细胞仪 BD FACSCalibur (BD Bioscience Corporation), Thermo Scientific Sorvall Legend Micro 17R 微量台式离心机 (Thermo Scientific), SHP-80 生化培养箱 (北京利康达圣科技发展有限公司), THZ-C-1 台式冷冻恒温振荡器 (太仓市实验设备厂)。

### 3. 供试菌株

实验所用茯苓和黑曲霉菌株均由中国科学院微生物研究所菌种保藏中心提供。

### 4. 培养基配置

PDA 培养基: 马铃薯 200g (煮沸后过滤取滤液)、琼脂 20.0g、葡萄糖 20.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0g、维生素 B<sub>2</sub> 2.0mg, 加水定容至 1000mL, 自然 pH 值。

## 二、方 法

### 1. 菌种培养

茯苓和黑曲霉菌种活化后接种在 PDA 平面培养基上, 28℃ 下培养至茯苓菌丝覆盖整个平皿 4/5 时或黑曲霉产生肉眼可见的黑色分生孢子层, 在 40mL 新 PDA 液体培养基上接种 0.5cm<sup>2</sup> 左右大小的带有菌丝的琼脂块, 以温度为 28℃、转速为 150rpm 的条件对茯苓进行培养 4d、黑曲霉培养 2d。

### 2. 细胞核悬液制备

本研究细胞核悬液的制备方法参考 Jaroslav 等<sup>[14]</sup>。称取洗净培养基的茯苓菌丝团 150mg 置冰浴培养皿中, 移取 2mL Otto I 溶液 (0.1 M 柠檬酸, 0.5% (v/v) Tween 20, 0.22μm 水系微孔过滤膜过滤, 4℃ 保存备用), 使培养皿倾斜放置以避免溶液挥发, 用锋利刀片迅速将菌丝团切碎; 用 1mL 移液枪反复搅拌已切好的茯苓菌丝团混合液使其混合均匀, 吸取样品并经 300 目尼龙筛网过滤, 滤液置入 1.5mL 离心管中; 所得滤液在 4℃ 离心机中以 8000×g 离心 5min; 用 1mL 移液枪移去上清, 将离心管倒置在纸上使剩余液体自然流干, 加入 100μL 冰浴 Otto I 溶液, 轻摇离心管使样品混合均匀, 放置冰上待用; 进行流式细胞术分析前, 向样品中加入 800μL Otto II 溶液 (0.4 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.22μm 水系微孔过滤膜过滤, 室温 (18~25℃) 保存备用)。

### 3. DNA 特异性染色

向细胞核悬液中加入 50μL PI 染料 (1mg·mL<sup>-1</sup> 碘化丙啶, 0.22μm 水系微孔过滤膜过滤, -20℃ 保存备用) 和 RNase 50μL (1mg·mL<sup>-1</sup> RNase, 90℃ 加热 15min 使 DNase 失活, 0.22μm 水系微孔过滤膜过滤, 20℃ 保存备用) 轻摇, 避光染色 10min, 用移液枪吸取染色后的样品过 300 目的尼龙筛网, 进入流式细胞仪分析。

### 4. 流式细胞仪分析

样品检测前, 开启流式细胞仪预热 30min, 采用 488nm 的氩离子激光, 样品流速设定为 low (12μL·min<sup>-1</sup>)。为保证分析过程中样品每秒检测数被控制在 300 个细胞以下<sup>[12]</sup>, 细胞核悬液会用 Otto II 稀释以调节样品浓度。根据预实验中仪器检测参数优化的条件, 设定 FSC-Height, SSC-Height, FL2-A, 以黑曲霉为内标, 重复检测样品 6 次, 每次样品至少被获取 10000 个细胞。

## 三、结 果

### 1. 茯苓、黑曲霉染色分析

本研究对茯苓和黑曲霉分别在 Otto I 溶液进行了充分的机械破碎以分离完整的细胞核, Otto I 溶液中的 0.5% (v/v) Tween 20 可以使样品获得足够量的细胞核<sup>[13]</sup>。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种常见的荧光染料, 可被最大吸收在 488nm 的可见光激发, 作用机制为 PI 可插入双链 DNA 的碱基对中,

与另一常见染料 DAPI 相比,其流式结果更为稳定、可靠<sup>[14]</sup>。黑曲霉已于 2007 年完成全基因组测序,其基因组大小为 33.98Mb<sup>[15]</sup>。在预实验中,黑曲霉培养简便生长迅速,流式分析中出峰稳定,被选择作为内参以测定茯苓基因组大小。本研究对于流式分析 FL2-A 参数进行了优化筛选,优化后的检测参数可使黑曲霉和茯苓的粒子团同时被检测到,粒子清晰集中,并且可观察到茯苓 4C DNA 粒子团,其散点图如图 1 所示。

## 2. 茯苓、黑曲霉基因组大小分析

样品通过核酸染料 PI 标记 DNA,在高速液流下逐个通过激光照射区时,受到激光照射会以细胞核为中心向空间 360°立体角的整个空间散射光线,发射产生荧光信号,散射光的强度及其空间分布与细胞的大小、形态、质膜和细胞内部结构密切相关,荧光强弱与 DNA 含量成正比,荧光信号经光电倍增管接受转换为电信号和可被计算机识别的数字信号被接收,故可用于估测生物的基因组大小<sup>[16]</sup>。通过流式细胞仪分析可以得到细胞各个时期的分布状态,整个复制周期可以描述为 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>,S 及 G<sub>2</sub>/M。通常检测分辨率或精确度由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 峰的变异系数 CV 来反映,  $\%CV = (SD/mean) \times 100$ ,研究中 CV 值均控制在 5%以内,实验结果可靠。流式细胞仪测定茯苓、黑曲霉基因组大小如图 2 所示。通过比较 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的峰值进行比较,二倍体茯苓基因组大小略大于黑曲霉,是黑曲霉的 1.64 倍(表 1),由此可估测茯苓基因组大小为  $55.79 \pm 3.03\text{Mb}$ ,或相对 DNA 含量为  $0.12 \pm 0.01\text{pg}$  ( $1\text{pgDNA} = 0.965 \times 10^9\text{bp}$ )。在流式分析中,茯苓 6 次流式细胞仪检测结果均出现了双峰现象,且双峰出峰位置比例保持稳定。通过计算,发现第二个峰的出峰位置为第一个峰的 2 倍。由此可知,第一个峰为 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的 DNA 含量,第二峰为 G<sub>2</sub>/M 期 DNA 含量。在图 2(c)中,黑曲霉的 G<sub>2</sub>/M 期与茯苓的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期相对 DNA 含量相近,黑曲霉的 G<sub>2</sub>/M 期峰被茯苓的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期峰掩盖,故未能观察到黑曲霉的 G<sub>2</sub>/M 期峰。

## 四、讨 论

本研究的主旨在于获得茯苓的基因组大小,为基因组学研究提供基础数据。茯苓是一味被广泛应用于临床的中药,在我国资源丰富。目前,关于茯苓的研究多集中于其成分分析、药理活性等领域,其基因组学研究尚属空白。本研究以茯苓为研究对象,测定其基因组大小,并进行方法学探索,以期建立一个流式分析技术测定药用真菌基因组大小的平台。

本研究以黑曲霉为内参测定茯苓基因组大小为  $55.79 \pm 3.03\text{Mb}$ ,6 次测定结果均可重复。在选定内参时,本研究曾经

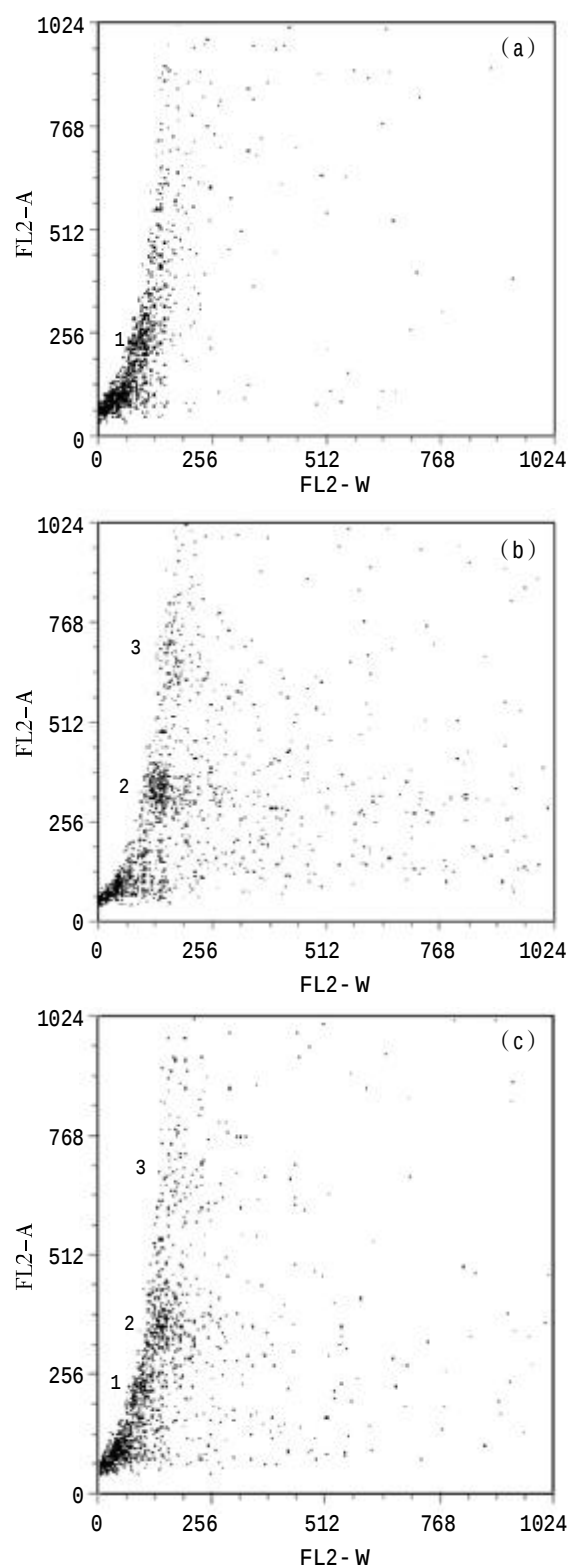


图 1 黑曲霉、茯苓流式细胞仪亚细胞团分型散点图  
注:(a)为黑曲霉单独测定结果(b)为茯苓单独测定结果,(c)为黑曲霉、茯苓混合上样测定结果;FL2-W:荧光脉冲宽度;FL2-A:荧光脉冲面积;1:黑曲霉 2C DNA 粒子团;2:茯苓 2C DNA 粒子团;3:茯苓 4C DNA 粒子团。

尝试选用基因组学研究中的模式植物-酿酒酵母。早期流式细胞仪分析技术中,通常采用鸡血红细胞作为内参,但研究表明,由于鸡和植物的细胞核的水解速率不同,在进行植物基因组大小分析时,应采用植物作为内参<sup>[14]</sup>,所以本研究选用与茯苓属同一门的酿酒酵母和黑曲霉。酿酒酵母已完成全基因组测序,其基因组大小为 11.60Mb。但在预实验中发现,酿酒酵母的出峰位置虽然可以与茯苓的峰分开,但与直方图中的杂质峰距离太近,设定不同的 FL2 参数也无法使二者分开,故放弃了酿酒酵母这一内参。黑曲霉基因组大小为 33.98Mb,可以与茯苓的峰分开,数据较易获取,故本实验最终选定黑曲霉作为内参。

在流式细胞仪分析中,样品前期处理是影响分析结果的重要因素之一。本研究从培养方法、取材、机械破碎、离心转速、染色时间等多方面对样品前期处理的条件进行了摸索。在培养中,本研究考察了在 PDA 液体培养基中不同培养时间(24h、48h、72h、96h、120h)对黑曲霉、茯苓出峰峰形的影响。实验结果表明,48h 和 96h 分别为黑曲霉和茯苓的最佳培养时间,出峰位置稳定、峰形较好易于获取数据。在取材过程中,考察冷冻对于茯苓基因组大小结果的影响,在与新鲜组织比较后发现,冷冻组结果无峰图出现。这表明,进行基因组大小分析时,应取用新鲜组织,取材后应立即制样,以保证样品的活性。前期文献报道,对流式细胞仪混合上样时,前期处理可加入 70%~95%的酒精进行固定<sup>[14]</sup>。酒精固定可以帮助组织或细胞核悬液的贮存。本研究曾经尝试分别用 70%和 95%的酒精对茯苓和黑曲霉样品进行固定,但出峰效果不好。原因为酒精固定会修饰染色质结构,在进行 DNA 含量测定时,不推荐酒精固定方法。用刀片对组织进行机械破碎是目前植物基因大小测定中最为普遍的方法,本研究发现,不同强度的机械破碎可影响核分离程度,机械破碎不够充分会导致细胞核数目少,峰形不明显,故适当增强机械破碎的强度和ación,可以使峰形更好,从而得到更好的分析结果。本研究考察了离心转速和染色时间对于实验结果的影响,通过不同条件设定优化后,确定离心转速 8000×g,染色时间 10min 为最佳条件。

### 参考文献

- 1 Jaroslav Dolezel, Jan Bartos. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 2005,95:99~110.
- 2 么厉,程惠珍,杨智.中药材规范化种植(养殖)技术指南.北京:中国农业出版社,2006:1201.
- 3 水明,周导华.茯苓菌丝原生质体最佳条件研究.安徽农业科学, 2006, 34(18): 4651.
- 4 金惠,赵英博,江维,等.茯苓药理作用及临床应用研究进展.湖北中医杂志,

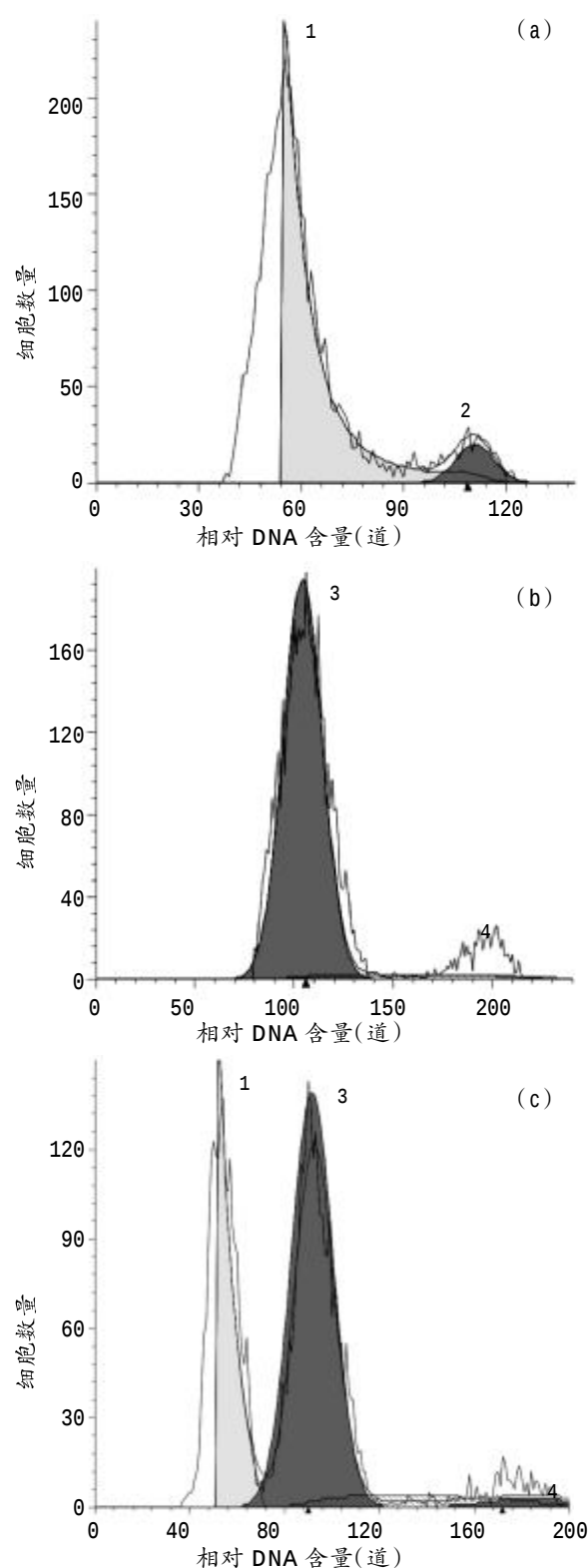


图2 茯苓与黑曲霉流式细胞仪测定结果

注:(a)为黑曲霉单独测定结果(b)为茯苓单独测定结果,(c)黑曲霉、茯苓混合上样测定结果;1:黑曲霉 2C DNA 含量峰;2:黑曲霉 2C DNA 含量峰;3:茯苓 2C DNA 含量峰;4:茯苓 4C DNA 含量峰。

表 1 流式细胞仪测定的样品(茯苓)和内参(黑曲霉)G0/G1 期峰值

| 测定重复 | 样品峰值   | 内参峰值   | 茯苓/黑曲霉    | 茯苓基因组大小(Mb) | 茯苓相对 DNA 含量 (pg) |
|------|--------|--------|-----------|-------------|------------------|
| 1    | 344.37 | 214.73 | 1.60      | 54.49       | 0.11             |
| 2    | 338.89 | 218.08 | 1.55      | 52.80       | 0.11             |
| 3    | 335.02 | 220.89 | 1.52      | 51.53       | 0.11             |
| 4    | 360.83 | 212.07 | 1.70      | 57.81       | 0.12             |
| 5    | 344.27 | 197.96 | 1.74      | 59.09       | 0.12             |
| 6    | 412.47 | 236.92 | 1.74      | 59.15       | 0.12             |
| 平均值  | 355.98 | 216.78 | 1.64±0.09 | 55.79±3.03  | 0.12±0.01        |

2008,30(4):59.

- 5 余知和, 高元钢, 曾昭清, 等. 真菌基因组学研究进展. 菌物学报, 2008,27(5): 778~787.
- 6 李顺祥, 张志光. 药用真菌研究进展. 湖南中医杂志, 2001,17(6):57~58.
- 7 Shilin Chen, Chang Liu, Jingyuan Song, et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. PLOS ONE, 2010,5(1):e8613.
- 8 Hui Yao, Jingyuan Song, Shilin Chen, et al. Identification of Dendrobium Species by a Candidate DNA Barcode Sequence: The Chloroplast psbA-trnH Intergenic Region. Phanta Med, 2008, 75:667~669.

- 9 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析. 中国天然药物, 2009, 7, 5:322~327.
- 10 Rafael Nunez. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. Curr. Issues Mol. Biol, 2001:3 (3):67~70.
- 11 Jaroslav Dolezel, Johann Greilhuber, Jan Suda. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nature protocols, 2007, 2(9):2233~2244.
- 12 J.R. Bradner, K.M.H. Nevalainen. Metabolic activity in filamentous fungi can be analysed by flowcytometry. Journal of microbiological methods, 2003, 54:193~201.
- 13 J. Dolezel, Pavla Binarova, S. Lucretti. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biologia Plantarum, 1989, 31(2):113~120.
- 14 J. Spencer Johnson, Michael D. Bennett, A. Lane Rayvurn, et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. American journal of botany, 1999, 86(5):609~613.
- 15 Herman J Pel, Johannes H de Winde, David B Archer, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory Aspergillus niger CBS 513.88. Nature biotechnology, 2007, 25:221~231.
- 16 桂毅杰, 金丽艳, 金亮, 等. 毛竹基因组大小和序列构成的比较分析. 中国科学, 2007(37):488~492.

Flow Cytometric Analysis of Nuclear DNA Content in *Poria cocos*

Wang Yazhi, Li Qiushi, Chen Shilin, Sun Chao, Song Jingyuan

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences&amp;Peking Union, Beijing 100193, China)

**Abstract:** *Poria cocos*, which belongs to Polyporaceae in basidiomycetes, is a well-known Traditional Chinese Medicine (TCM). The present study aims to estimate the DNA content as well as the relationship between ploidy and DNA content. The fungal material was prepared according to a protocol adopted from Jaroslav Dolezel et al. [1] and stained with propidium iodide (PI) which is a nucleic acid dye. For this study, a nuclei isolating method was optimized by adjusting centrifugal force and staining period. The DNA quantity was quantified by flow cytometry and calculated as the ratio of mean fluorescence of the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> peak between *Poria cocos* and *Aspergillus niger*. The *Aspergillus niger* was used as an internal reference. The estimated genome size of *Poria cocos* is 55.79±3.03 Mb, or 2C DNA about 0.12±0.01 pg (1pg DNA =0.965×10<sup>9</sup> bp). The peak of G<sub>2</sub>/M of *Poria cocos* and *Aspergillus niger* could be detected. In summary, the present study described a modified method of genome size analysis by using flow cytometry in *Poria cocos*. The data available of DNA content obtained in this study is helpful to the future genome sequencing research.

**Keywords:** *Poria cocos*, DNA content, flow cytometry, *Aspergillus niger*

(责任编辑:王 瑀, 责任译审:张立崑)