

小菇一种 *Mycena sp.* 的 DNA 提取及测序

吴瑞娟, 金卫根, 饶军 (东华理工大学化学生物与材料科学学院, 江西抚州 344000)

摘要 [目的] 为新野生真菌小菇一种 *Mycena sp.* 的分类提供依据。[方法] 采集到一种新的野生真菌, 经形态学观察初步确定为小菇一种 *Mycena sp.*。对该真菌进行了 DNA 提取、18S rDNA 的 PCR 扩增与产物回收、琼脂糖凝胶电泳检测和测序等一系列分子生物学研究, 对其基因序列进行了 Blast 比对和同源性数据检索。[结果] 利用通用引物进行 18S rDNA 的 PCR 扩增, 可获得约 1.8 kb 的扩增片段。通过序列分析, 对回收后的产物进行鉴定, 确定其为 18S rDNA 基因序列。通过对小菇一种 *Mycena sp.* 的 18S rDNA 基因序列进行 Blast 比对和同源性数据检索, 发现其与白蘑属、毛伞属和脐伞属的亲缘关系最近。[结论] 可推测该野生真菌为担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、白蘑科一种, 并结合其形态特征, 暂时确定为小菇一种 *Mycena sp.*。

关键词 小菇属; DNA 提取; DNA 测序

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)03-00982-03

DNA Extraction and Sequencing of One Species of *Mycena sp.*

WU Rui-juan et al (Department of Biology, East China University of Science and Technology, Fuzhou, Jiangxi 344000)

Abstract [Objective] The aim of the research was to provide basis for the classification of a new kind of wild fungi—one species of *Mycena sp.* [Method] A new kind of wild fungi was collected and it was preliminarily confirmed as one species of *Mycena sp.* through morphological observation. A series of molecular biology researches such as DNA extraction, PCR amplification of 18S rDNA and products reclamation, agarose gel electrophoresis detection and sequencing were conducted on this epiphyte. And Blast analysis and homology data retrieval was made on the sequence of this gene. [Result] PCR amplification of 18S rDNA was conducted by using universal primers and about 1.8 kb amplification fragment was obtained. Through identifying the reclaimed products by sequence analysis, it was confirmed as 18S rDNA gene sequence. According to Blast analysis and homology data retrieval of 18 rDNA gene sequence of one species of *Mycena sp.*, it was found it had the closest genetic relationship with *Tricholoma mongolicum*, *Ginipellis sp.* and *Onphalia*. [Conclusion] It can be predicted that this wild fungi was Basidiomycota, Hymenomycetes, Agaricales, one species of *T. mongolicum* family. Combining with its morphological characteristics, it was confirmed as one species of *Mycena sp.* for the moment.

Key words Genus *mycena* (Pers. ex Fr.); DNA extraction; DNA sequencing

小菇一种 (*Mycena sp.*) 的子实体小; 菌盖直径 1~2 cm, 伞状, 表面平滑透明, 淡黄色; 具沟状纵纹, 开始色深, 后变稍浅, 光滑, 盖边缘裂成齿状, 顶部略有凸起; 菌柄细长, 同盖色, 长 4.3~6.2 cm, 直径 1 mm 左右; 菌肉薄, 同盖色; 孢子无色, 光滑, 椭圆形或圆形, 在高倍显微镜下观察为 7.2~14.4 μm , 孢子中部有 1 到多个油滴, 主要分布在潮湿、温度适宜的草地 (图 1)。



图 1 小菇一种 *Mycena sp.*

Fig. 1 One species of *Mycena sp.*

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源。东华理工大学校园草地。

1.1.2 培养基。液体种子培养基: 采用 PD 培养基 + 磷酸二氢钾 0.5 g; 发酵培养基: 采用 PD 培养基。

1.1.3 试剂。DNA 回收试剂盒 北京鼎国生物技术有限责任公司; 1 kb plus DNA Ladder (北京天为时代科技

有限公司); LA Taq 酶 (北京天为时代科技有限公司); 2 × GC Buffer (北京天为时代科技有限公司); 10 × loading buffer (TaKaRa 公司); Tris-base (Novon 公司) 等。其他常规试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器。基因分析仪 (美国应用生物系统公司), GL-21M 高速冷冻离心机 (湖南海达科技发展有限公司), DYY-5 型电泳仪 (北京六一仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取。在综合薛淑静等^[1-4]提取真菌 DNA 方法的基础上, 根据该小菇的特点设计了如下方法, 效果较好:

取 500 μl 接种标准菌液 (即 25 培养 7 d 的种子培养液) 接入 50 ml 发酵培养基, 培养 1 d 后取 30 ml 于 12 000 r/min 冷冻离心 40 min, 菌体用 TE 缓冲液洗 1~2 次, 重溶于 1 ml TE 缓冲液中。于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 微波炉反复冻融 4~7 次。12 000 r/min 离心 2 min, 沉淀物加入 567 μl TE 缓冲液, 用吸管反复吹打使之重悬。加入 20 μl 10% SDS 和 2 μl 蛋白酶 K, 混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。加入 100 μl 5 mol/L NaCl, 充分混匀, 再加入 80 μl CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 于 65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min。加入等体积酚: 氯仿, 摇匀, 稍加沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上层清液转入新管中, 重复 1 次。加等体积氯仿, 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上层清液转入新管中。加 0.6 倍体积的异丙醇, 轻轻混匀直到 DNA 沉淀下来, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加 500 μl 乙醇洗涤, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用冻干机稍加干燥重溶于 25 μl TE 缓冲液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保藏备用。

1.2.2 18S rDNA 的 PCR 扩增。使用通用引物 SPF1、SPR, 以总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。SPF1: AGTAGTCATATGCTTGCTC; SPR: TAATGATCCTTCCGCAGGTT。

反应体系总体积为 50.0 μl , 其中 ddH₂O 6.8 μl , 2 × GC Buffer 35.0 μl , dNIP (200 $\mu\text{mol/L}$) 6.0 μl , SPF1 (10 pmol/ μl) 0.4 μl , SPR (10 pmol/ μl) 0.4 μl , LA Taq (5 U/ μl) 0.4 μl , 模板 DNA (25 ng/ μl) 1.0 μl 。

PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 0.5 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 0.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min, 经 32 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 8 min。PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 18S rDNA PCR 产物回收。采用 DNA 回收试剂盒从琼脂糖凝胶中直接回收 DNA。回收过程中需注意以下几点:

基金项目 江西省教育厅科技项目 [赣教技字 (2006) 216 号]。

作者简介 吴瑞娟 (1964 -), 女, 广东蕉岭人, 副教授, 从事植物遗传学研究。

收稿日期 2007-09-16

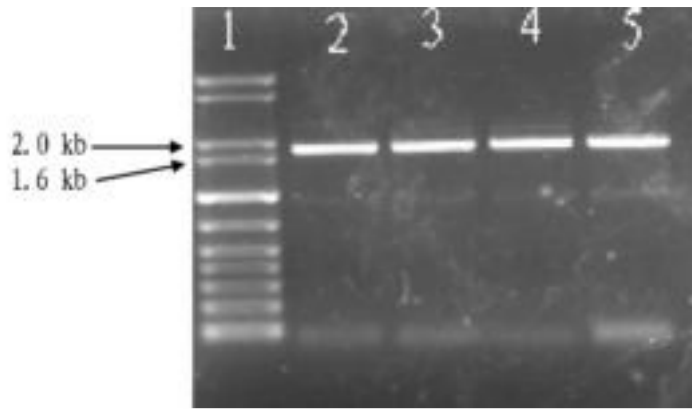


图2 小菇一种 *Mycena* sp. 的 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of DNA from one species of *Mycena* sp.

(1) 当回收的目的片段 < 150 bp 或琼脂糖凝胶浓度 > 2% 时, 最好使用 6 倍体积溶胶液 PN (如凝胶重为 0.1 g, 其体积可视为 100 μ), 依此类推。

(2) 一般将琼脂糖凝胶块于 50 $^{\circ}$ C 水浴放置 10 min, 期间不断温和地上下翻转离心管, 以确保胶块充分溶解。如果还有未溶的胶块, 可补加一些溶胶液或继续放置几分钟, 直至胶块完全溶解。若胶块体积过大, 可先将胶块切成碎块。

(3) 在吸附柱使用完后, 应将吸附柱中的漂洗液清除干净, 并置于室温或 50 $^{\circ}$ C 温箱数分钟, 彻底晾干, 以防止残留的漂洗液影响下一步实验。

(4) 如果回收的目的片段 > 4 kb, 洗脱缓冲液 EB 应先置于 65 ~ 70 $^{\circ}$ C 水浴预热后, 再向吸附膜中间位置悬空适量滴加。

(5) 为了提高 DNA 的回收量, 可将离心得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 再重复操作 1 次。

1.2.4 获得 18S rDNA 基因序列。 利用通用引物进行 18S PCR 扩增, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测分析, PCR 所得片段大小约为 1.8 kb; 使用 DNA 片段回收试剂盒回收, 回收后的产物经基因分析仪分析研究, 获得 18S rDNA 基因序列。

```

AGGGGTTTCCCTCTTTTTCCTTGGCTCCCAAGCCAAATCCGAAGACCTCACIAAG
CCATTCATTCGGIAGIAGCCACGGCGGTGTGACAAAGCCAGGGACGTAAITCAACG
CAAGCTGATGACTTCCCTTACTIAGGTAATCCITCGTGAAGACCAATATGCAATGCT
CTATCCCAACACACAGAGTTTACAAGATTACCAGACCTTCCCGCCAAGGIGAGA
ACTCCCTGGCTCTGTGACGTGACCCCGGTGGCCCCAGAACAATCAAGGGCATTACA
GACCTGTATGCTCAAACITCCGTCAGCTIAGACGCTACAGTCCCTCTAAGAAGAC
GCGCGCAACCAAAGTCCCGGCTATTTACAGGTTAAGGTCITCGTGTATCGG
AATTAACCAGACAAATCATTCCACCAACIAAGAAGCGCCATGCACCACCACCAATAAA
ATCATGAAAGAGCTAACAATCTGICAAATCCIAGTATGTCTGGACCTGGTGAATTCCT
GTGTGAGTCAAATTAAGCCGACGCTCCACACTGGTGGTCCCTTCCGICAAITCCT
TTAAGTTTACCCCTTGGACCAATACITCCCCCAGAACCACAAAGACTTGTATTCCTGTA
AGGIGCTGAAGCAGCATAAAAATGAGGTCGTCATCCCTIAGTCGGCAIATTTIAC
GTTAAGACTIACAACGGTATCTGATCGTTTTCGATCCCTAACCTTGTCTGTATTAATG
AAAACATCTTGGCAAATGCTTTGCGAGIAGTGGICTTGAGTCAATCCAAGAATTTCA
CCCTAGCGACTCAATACCAATGCCCCAACIATCCCTAATAATCAIACGGCGACTIAG
AAACCAACAAATAAACCGCAGCTIATTTATTAATCCATCTAATGIAITCAGCCAIAG
CCTTGCCTTGAACACTIATTTCT

```

图3 小菇一种 *Mycena* sp. 的 18S rDNA 基因序列

Fig. 3 18S rDNA sequence of one species of *Mycena* sp.

2 结果与分析

2.1 DNA 琼脂糖凝胶电泳及 18S rDNA 基因序列测定结果 见图 2、3。

2.2 Blast 软件比对 将以上基因序列用 Blast 软件比对分析, 获得与其同源性最高的 50 种真菌(担子菌纲)(表 1)。

2.3 GenBank 同源性数据检索 通过 GenBank 进行同源性数据检索, 结果如下:

Eukaryota [eukaryotes]
 .Agaricomycetes [basidiomycetes]
 ..Agaricomycetidae [basidiomycetes]
 ...Agaricales [basidiomycetes]
Tichlonataceae [basidiomycetes]
Giripellis [basidiomycetes]
Giripellis sp. VFI40211657 1 hit [basidiomycetes] Giripellis sp. VFI4021 18S small subunit ribosomal RNA gene
Giripellis zonata1 652 1 hit [basidiomycetes] Giripellis zonata strain OKM25450 18S small subunit ribosomal RNA
Moriophthora roreri (Moriophthora pod rot of cocoa) - 1 640 1 hit [basidiomycetes] Moriophthora roreri strain C21 18S small subunit ribosomal RNA
Chaetocalathus liliputianus1 640 1 hit [basidiomycetes] Chaetocalathus liliputianus 18S small subunit ribosomal RNA
Marasmius sp. MCA17081635 1 hit [basidiomycetes] Marasmius sp. MCA1708 18S small subunit ribosomal RNA gene,
Chaetocalathus cf. columellifer MCA25381635 1 hit [basidiomycetes] Chaetocalathus cf. columellifer MCA2538 18S small subunit ribosomal RNA
Marasmius rotula1631 1 hit [basidiomycetes] Marasmius rotula isolate AFTOL-ID 1505 18S ribosomal RNA gene
Marasmius oreades (fairy-ring mushroom)1 629 1 hit [basidiomycetes] Marasmius oreades isolate AFTOL-ID 1559 18S small subunit ribosomal RNA
Moriophthora sp. MCA25001 629 1 hit [basidiomycetes] Moriophthora sp. MCA2500 18S small subunit ribosomal RNA
Marasmius sp. MCA15061 629 1 hit [basidiomycetes] Marasmius sp. MCA1506 18S small subunit ribosomal RNA gene,
Marasmius sp. MCA15771624 1 hit [basidiomycetes] Marasmius sp. MCA1577 18S small subunit ribosomal RNA gene,
Arthrocorymbium archeri1 6181 hit [basidiomycetes] Arthrocorymbium archeri isolate AFTOL-ID 973 18S ribosomal RNA
Moriophthora perniciosa1 6181 hit [basidiomycetes] Moriophthora perniciosa strain DIS71 18S small subunit ribosomal RNA
Marasmius sp. MCA16111 6181 hit [basidiomycetes] Marasmius sp. MCA1611 18S small subunit ribosomal RNA gene,
Campanella sp. MCA16891 613 1 hit [basidiomycetes] Campanella sp. MCA1689 18S small subunit ribosomal RNA gene
Tichlonataceae sp. ATCC 283441611 1 hit [ba

sidionycetes] Tichdonataceae sp. ATCC 28344 small subunit ribosomal RNA

.....Gymnopus contrarius1 607 1 hit [basidionycetes]

表1 Blast 软件对小菇一种 *Mycena* sp. 的 18S rDNA 基因序列比对分析

Table 1 Contrast analysis on 18S rDNA sequence from one species of *Mycena* sp. by Blast software

登记入册	描述	最大分值	总分值	查询范围	%	E 值	最大同源性	%
Accession	Description	Max score	Total score	Query scope		E value	Max homology	
AY916697.1	<i>Giropellis</i> sp. VH4021	1 657	1 657	97		0	98	
AY916691.1	<i>Giropellis zonata</i> strain OKM25450	1 652	1 652	97		0	98	
AY916745.1	<i>Monilophthora rorai</i> strain C21	1 640	1 640	97		0	97	
AY916681.1	<i>Chaetocalathus liliputianus</i>	1 640	1 640	97		0	97	
AY916719.1	<i>Marasmius</i> sp. MCA1708	1 635	1 635	97		0	97	
AY916685.1	<i>Chaetocalathus cf. edunellifer</i> MCA2538	1 635	1 635	97		0	97	
DQ113912.2	<i>Marasmius rotula</i> isolate AFTOL-ID 1505	1 631	1 631	97		0	97	
DQ457644.1	<i>Marasmius oreades</i> isolate AFTOL-ID 1559	1 629	1 629	97		0	97	
AY916753.1	<i>Monilophthora</i> sp. MCA2500	1 629	1 629	97		0	97	
AY916732.1	<i>Marasmius</i> sp. MCA1506	1 629	1 629	97		0	97	
AY916710.1	<i>Marasmius</i> sp. MCA1577	1 624	1 624	97		0	97	
DQ092915.1	<i>Anthracophyllum archei</i> isolate AFTOL-ID 973	1 618	1 618	97		0	97	
AY916739.1	<i>Monilophthora perniciosa</i> strain DIS71	1 618	1 618	97		0	97	
AY916724.1	<i>Marasmius</i> sp. MCA1611	1 618	1 618	97		0	97	
DQ851577.1	<i>Onphalotus olivascens</i> strain VI645.7	1 613	1 613	97		0	97	
AY445116.1	<i>Agaricales</i> sp. 3034	1 613	1 613	97		0	97	
AY916669.1	<i>Campanella</i> sp. MCA1689	1 613	1 613	97		0	97	
AY445117.1	Tichdonataceae sp. ATCC 28344	1 611	1 611	97		0	97	
DQ440643.1	<i>Gymnopus contrarius</i> isolate AFTOL-ID 1758	1 607	1 607	97		0	97	
DQ459374.1	<i>Onphalotus clearius</i> isolate AFTOL-ID 1718	1 596	1 596	97		0	97	
AY916675.1	<i>Campanella</i> sp. MCA2235	1 592	1 592	97		0	97	
AY787214.1	<i>Marasmius alliaceus</i> isolate AFTOL-ID 556	1 591	1 591	97		0	97	
AY445118.1	<i>Campanella subdendrophora</i> ATCC 42449	1 581	1 581	97		0	96	
M55638.1	<i>Athelia bombacina</i>	1 581	1 581	97		0	96	
DQ851 580.1	<i>Pleuroctopsis longinqua</i> strain RV95/ 473	1 580	1 580	97		0	96	
AY752970.1	<i>Phaeomarasmius proximus</i> isolate AFTOL-ID 979	1 580	1 580	97		0	96	
AF082850.1	<i>Cystostereum murai</i>	1 578	1 578	96		0	97	
AF518576.1	<i>Cylindrobasidium laeve</i> strain HHB 8633-T	1 576	1 576	96		0	97	
AF426953.1	<i>Physalacia naipoensis</i>	1 576	1 576	96		0	97	
DQ851579.1	<i>Phylloctopsis ridulans</i> strain RV96/ 1	1 574	1 574	97		0	96	
DQ465344.1	<i>Xeromphalina campanella</i> isolate AFTOL-ID 1524	1 574	1 574	97		0	96	
DQ440631.1	<i>Agrocybe erebia</i> isolate AFTOL-ID 1807	1 574	1 574	97		0	96	
AY752966.1	<i>Rhodocollybia maculata</i> isolate AFTOL-ID 540	1 574	1 574	97		0	96	
AY707090.1	<i>Phylloctopsis</i> sp. MB35 isolate AFTOL-ID 773	1 574	1 574	97		0	96	
AY665772.1	<i>Coprinus conatus</i> isolate AFTOL-ID 626	1 574	1 574	97		0	96	
DQ440644.1	<i>Hemimycena gracilis</i> isolate AFTOL-ID 1732	1 570	1 570	97		0	96	
DQ435812.1	<i>Cheimophyllum candidissimum</i> isolate AFTOL-ID 1765	1 570	1 570	97		0	96	
DQ536416.1	<i>Naucoria viricolor</i> isolate AFTOL-ID 499	1 568	1 568	97		0	96	
DQ437683.1	<i>Conocybe lactea</i> isolate AFTOL-ID 1675	1 568	1 568	97		0	96	
AY705955.1	<i>Bolitius vitellinus</i> isolate AFTOL-ID 730	1 568	1 568	97		0	96	
AY705948.1	<i>Lepista irina</i> isolate AFTOL-ID 815	1 568	1 568	97		0	96	
DQ092911.1	<i>Pterula echo</i> isolate AFTOL-ID 711	1 568	1 568	97		0	96	
DQ867422.1	<i>Tichdona nyonyces</i> strain KM589	1 568	1 568	97		0	96	
AY923093.1	Uncultured eukaryote clone DRV-E112	1 568	1 568	97		0	96	
AB051891.1	<i>Termitomyces</i> sp. Type A gere	1 568	1 568	97		0	96	
DQ435811.1	<i>Catathelasma verticosum</i> isolate AFTOL-ID 1488	1 567	1 567	97		0	96	
AY771602.1	<i>Marasmius dolichula</i> isolate AFTOL-ID 481	1 567	1 567	97		0	96	
AY665779.1	<i>Gymnopus dryophilus</i> isolate AFTOL-ID 559	1 567	1 567	96		0	96	
AF026596.1	<i>Lentinula lateritia</i>	1 567	1 567	97		0	96	
DQ459375.1	<i>Panaedus splintinus</i> isolate AFTOL-ID 1499	1 565	1 565	97		0	96	

3 结论

通过对小菇一种 *Mycena* sp. 的 18S rDNA 基因序列进行 Blast 软件比对和 GenBank 同源性数据检索,发现其与白蘑属、毛伞属和脐伞属的亲缘关系最近,故推论其为担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、白蘑科一种,并结合其形态特征,暂时确定为小菇一种 *Mycena* sp.。

参考文献

- [1] 薛淑静,岳田利,关键,等.一种真菌 DNA 提取方法的改进[J].食品研究与开发,2006,127(4):39-40.
- [2] 周小玲,沈微,饶志明,等.一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J].微生物学通报,2004,31(1):89-92.
- [3] 李岩,蒋继志,梁宁.一种快速提取丝状真菌染色体 DNA 的方法[J].生物学杂志,2006,23(6):52-53.
- [4] 王家季,齐志广,牛丽芳,等.平菇不同菌株核 DNA 的提取及 RAPD 分析[J].食用菌,2007(1):13-14.