

茶薪菇基因组 DNA 的 RAPD 反应体系优化

王守现, 刘宇, 耿小丽, 王兰青, 孟莉莉 (北京市农林科学院植保环保研究所, 北京 100097)

摘要 [目的] 旨在筛选出茶薪菇 RAPD 反应体系的最佳条件。[方法] 采用单因素试验, 对 RAPD 反应体系所需的 Mg^{2+} 浓度、模板 DNA 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、Taq 酶浓度以及退火温度进行初步筛选。[结果] 茶薪菇 RAPD 扩增的最佳反应体系为: 2.5 μ l Buffer, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 75 ng DNA, 0.5 μ mol/L Primer, 150 μ mol/L dNTPs, 2.0 U Taq 酶。反应程序为: 92 预变性 5 min, (92 1 min, 35.5 1 min, 72 延伸 2 min) 35 个循环, 72 10 min。[结论] 为茶薪菇 RAPD 分析及其亲缘关系、遗传多样性研究提供了参考依据。

关键词 茶薪菇; RAPD; 扩增条带; 优化

中图分类号 S646.1⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)27-11674-03

Optimization of RAPD Reaction System on Genomic DNA of *Agrocybe chaxingu* Huang

WANG Shou-xian et al (Institute of Plant Protection and Environmental Protection, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract [Objective] The experiment was aimed to select optimum RAPD reaction system on genomic DNA of *Agrocybe chaxingu* Huang. [Method] The single factor experiment was adopted to select the required Mg^{2+} concentration, template DNA concentration, primer concentration, dNTPs concentration, Taq enzyme concentration and anneal temperature initially. [Result] The optimum reaction system for RAPD amplification of *Agrocybe chaxingu* Huang was listed as follow: 2.5 μ l Buffer, 2.0 mmol/L Mg^{2+} , 75 ng DNA, 0.5 μ mol/L primer, 150 μ mol/L dNTPs and 2.0 Taq enzyme. The reaction procedure was also listed as follow: denaturation for 5 min at 92, 35 circulations (1 min at 92, 1 min for 35.5 and elongation for 2 min at 72), 10 min at 72. [Conclusion] The experiment provided reference for conducting RAPD analysis of and studying on genetic relationship and genetic diversity of *Agrocybe chaxingu* Huang.

Key words *Agrocybe chaxingu* Huang; RAPD; Amplified band; Optimization

茶薪菇 (*Agrocybe chaxingu* Huang) 是一种味道鲜美、盖肥柄脆、气味清香的食用菌, 为我国发现的新种, 首次记载于《真菌试验》, 然而关于茶薪菇的分类地位, 还有待研究认定。

RAPD (Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增 DNA 多态性) 技术是 1990 年 William^[1] 等人建立的物种鉴定方法, 该技术以 RCR 为基础, 采用随机引物对特定的 DNA 片段进行扩增。RAPD 标记技术因具有快速、准确、多态性好、灵敏度高特点而在动植物及微生物的生态、遗传研究中广泛应用。但 RAPD 标记对试验程序和条件变化较敏感, 使得不同物种的 RAPD 最优体系所需条件不同。为此, 笔者以茶薪菇基因组 DNA 为试材, 对加入反应体系的模板 DNA 浓度、Taq 酶浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度及不同退火温度进行初步优化, 旨在为今后进行茶薪菇的遗传多样性分析与明确茶薪菇分类地位奠定理论基础。

1 材料与试验方法

1.1 材料 供试菌种为茶薪菇菌株, 由北京市农林科学院植保环保所保存; 供试试剂为随机引物 (Primer)、 Mg^{2+} 、dNTPs (各 10 mmol/L)、Taq DNA 聚合酶 (5 U μ l)、10 \times PCR buffer、100 bp DNA Ladder, 均购自上海生工生物工程公司, 其余试剂均为国产或进口分析纯; 供试仪器为 Eppendorf 5331 型 PCR 扩增仪、WFZ UV-2802 型紫外可见分光光度计 (尤尼柯上海仪器有限公司)、DYY-10C 型电脑三恒多用电泳仪 (北京六一仪器厂)、BIO RAD 型凝胶成像系统、GL-20G 型冷冻离心机 (上海安亭)、SD 110VAC 型掌型离心机 (江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备与检测。 采用 CTAB 法^[2] 提取 DNA 样品。取 5 μ l 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (5 V/cm), EB 染色

后在凝胶成像系统下观察 DNA 的电泳条带, 同时用紫外分光光度计测定 DNA 浓度。

1.2.2 RAPD 反应体系与扩增条件。 RAPD 反应体系组成为^[3]: 10 \times Buffer (Mg^{2+}) 2.5 μ l, dNTPs 150 μ mol/L, 引物 0.4 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1.5 U, 模板 DNA 50 ng, 补 ddH₂O 使总体积为 25 μ l。扩增条件为: 92 预变性 5 min, (92 1 min, 35.5 1 min, 72 延伸 2 min) 35 个循环, 72 10 min。

1.2.3 单因素设计方案。 在上述反应体系及扩增条件的基础上设置单因素优化试验, 筛选最佳反应条件。具体设计见表 1。

表 1 各因素的单因素设计

Table 1 Design of single factor test

序号 Serial number	DNA ng	Taq 酶 U Taq enzyme	Mg^{2+} mmol/L	引物 μ mol/L Primer	dNTPs μ mol/L
1	0	0	0	0	0
2	10	0.5	0.5	0.1	50
3	25	1.0	1.0	0.2	100
4	50	1.5	1.5	0.3	150
5	75	2.0	2.0	0.4	200
6	100	2.5	2.5	0.5	250
7	150	3.0	3.0	0.6	300
8	200	3.5	3.5	0.7	350

注: 1~8 表示各因素浓度序号。

Note: 1-8 represent corresponding concentration of every factor.

对上述因素进行优化时, 退火温度先设为 35, 待扩增反应组成成分确定后再筛选退火温度。退火温度设为 27.0、27.1、28.0、29.3、31.2、33.2、35.5、37.7、39.7、41.5、42.8、43.6。每次仅改变 1 个因素, 其他因素均保持不变, 每个因素水平 3 次重复。

1.2.4 PCR 产物检测。 PCR 结束后, 在 PCR 管中加入 5 μ l 6 \times 溴酚蓝上样缓冲液, 混匀, 取 6 μ l 混合液上样于 1.2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/ml EB), 电泳 1.5 h 后于紫外凝胶成像系统上拍照。优化结果以背景低、谱带清晰、数目适中、稳定可重

基金项目 北京市科委重点项目 (D0705007040291)。

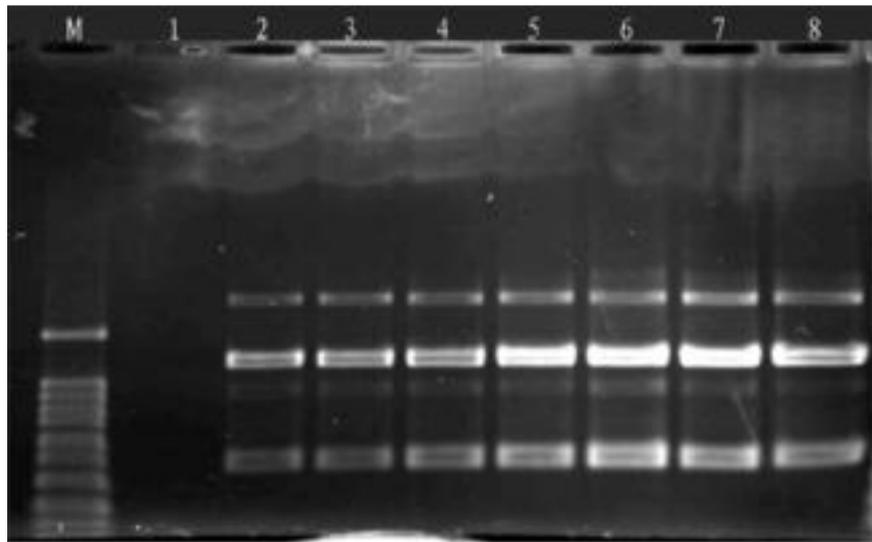
作者简介 王守现 (1980-), 男, 山东莒县人, 硕士, 助理研究员, 从事食用菌遗传育种和分子生物学研究。

收稿日期 2008-06-13

复的组合为最佳反应条件。

2 结果与分析

2.1 模板DNA浓度对RAPD扩增的影响 模板DNA浓度是制约RAPD扩增产量和特异性的主要因素。相关文献表明^[4-5],RAPD反应对模板DNA用量的适宜范围较大。由图1可知,随着DNA浓度的增大,扩增条带的清晰度随之增强,但浓度过高,条带清晰度反而减弱。当DNA浓度为75 ng(泳道5)和100 ng(泳道6)时,扩增条带较清晰。本着遵循条带清晰、经济的原则,确定最佳模板DNA浓度为75 ng(泳道5)。



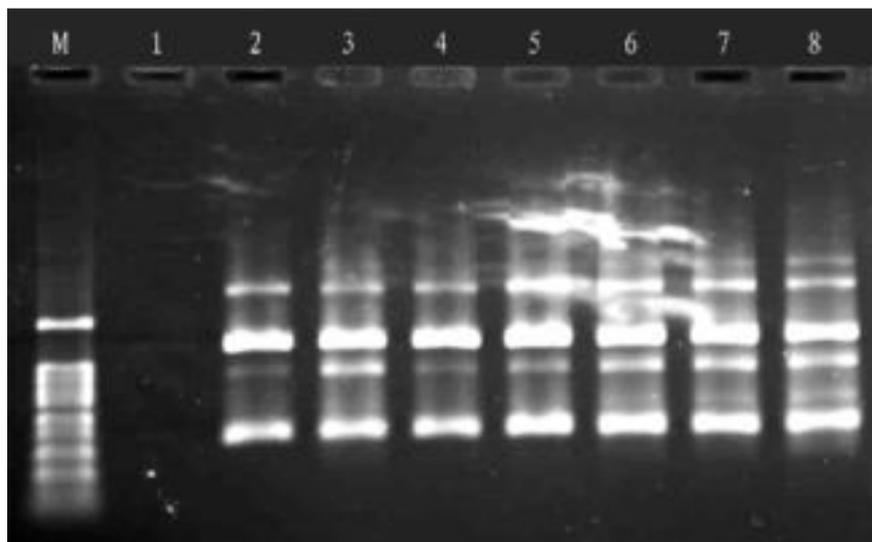
注:M:100 bp DNA Ladder ,1 ~8 :8 个DNA 浓度。

Note : M,100 bp DNA Ladder ,1 - 8 ,8 different DNA concentrations .

图1 不同浓度的DNA 扩增结果

Fig.1 The amplification result of DNA at different concentrations

2.2 Taq 酶浓度对RAPD扩增的影响 Taq 酶是PCR反应中最重要的因素之一。如果Taq 酶浓度过大,不仅造成浪费,且容易产生非特异性带;Taq 酶浓度过小,则得不到扩增产物。由图2可见,随着Taq 酶浓度的增大,扩增条带的清晰度随之增强。当浓度为1.0 U(泳道3)时,产生的扩增条带比浓度为0.5 U(泳道2)和1.5 U(泳道4)产生的条带清晰,原因可能是在加样时存在一定的误差,弃除;当Taq 酶浓度为2.0 U(泳道5)时,扩增条带清晰,当Taq 酶浓度大于2.0 U(泳道6~8)时,虽然条带较清晰,但试剂用量大。因此,将Taq 酶的最佳扩增浓度确定为2.0 U(泳道5)。



注:M:100 bp DNA Ladder ,1 ~8 :8 个Taq 酶浓度。

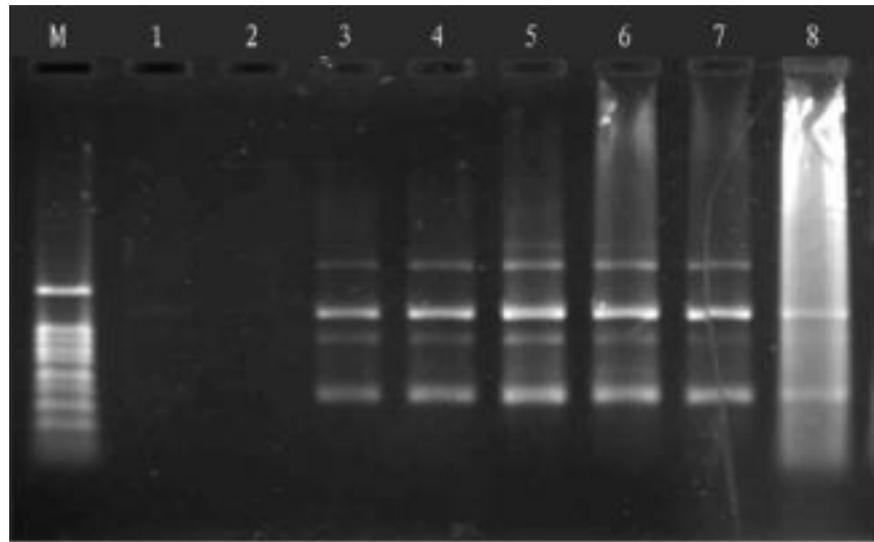
Note : M,100 bp DNA Ladder ,1 - 8 ,8 different DNA concentrations .

图2 不同Taq 酶浓度的扩增结果

Fig.2 The amplification result of Taq enzyme at different concentrations

2.3 Mg^{2+} 浓度对RAPD扩增的影响 由图3可见,当 Mg^{2+} 浓度小于1.0 mmol/L(泳道1~2)时,无扩增条带出现;随着

Mg^{2+} 浓度的增大,扩增出的条带随之增多(泳道3~5),且清晰度也逐渐增强;当浓度大于2.5 mmol/L(泳道6~8)时,扩增条带的清晰度反而减弱。可见, Mg^{2+} 最适浓度为2.0 mmol/L(泳道5)。



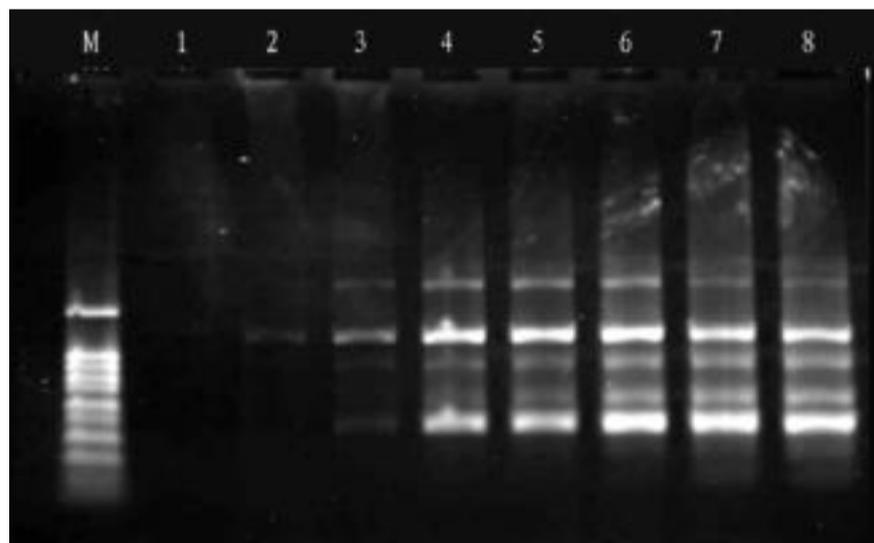
注:M:100 bp DNA Ladder ,1 ~8 :8 个 Mg^{2+} 浓度。

Note : M,100 bp DNA Ladder ,1 - 8 ,8 different DNA concentrations .

图3 不同 Mg^{2+} 浓度的扩增结果

Fig.3 The amplification result of Mg^{2+} at different concentrations

2.4 引物浓度对RAPD扩增的影响 引物浓度对RAPD影响较大。当引物浓度增大时,引物与模板的结合机会增多,扩增产物也随之增多;但若引物浓度过大,容易形成二聚体,并且有非特异性条带产生。由图4可见,随着引物浓度的增大,扩增条带逐渐出现,并且清晰度也随之增强,当引物浓度为0.5 μ mol/L(泳道6)时,条带最清晰;当浓度大于0.5 μ mol/L(泳道7~8)时,扩增条带的清晰度反而降低。因此,引物最佳扩增浓度为0.5 μ mol/L(泳道6)。



注:M:100 bp DNA Ladder ,1 ~8 :8 个引物浓度。

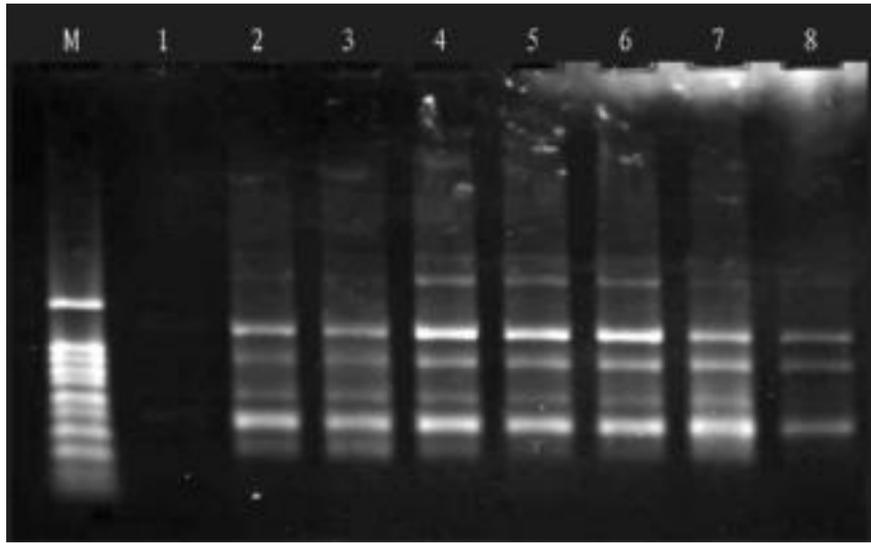
Note : M,100 bp DNA Ladder ,1 - 8 ,8 different DNA concentrations .

图4 不同引物浓度的扩增结果

Fig.4 The amplification result of primer at different concentrations

2.5 dNTPs 浓度对RAPD扩增的影响 dNTPs 是PCR的原料,浓度过高或过低均影响扩增条带效果^[6]。由图5可以看出,当dNTPs 浓度小于100 μ mol/L(泳道1~3)时,扩增条带不明显;当dNTPs 浓度大于300 μ mol/L(泳道7~8)时,条带清晰度降低;当浓度为150 μ mol/L(泳道4)时,扩增产物较多,条带清晰。因此,dNTPs 的最佳扩增浓度为150 μ mol/L(泳道4)。

2.6 退火温度对RAPD扩增的影响 RAPD扩增中,将退火温度通常控制在35~37 之间。由图6可知,在12个温度梯度下,扩增条带的清晰度逐渐增强,当温度为35.5 (泳道7)时,条带最清晰;当温度大于35.5 (泳道8~12)时,扩

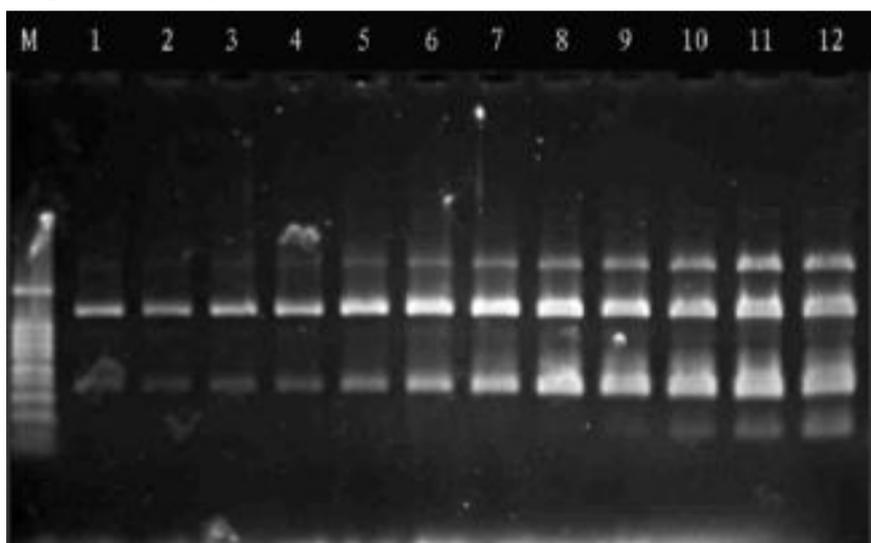


注: M:100 bp DNA Ladder, 1~8: 8 个 dNTPs 浓度。

Note: M, 100 bp DNA Ladder, 1-8, 8 different DNA concentrations.

图5 不同dNTPs浓度的扩增结果

Fig.5 The amplification result of dNTPs at different concentrations



注: M:100 bp DNA Ladder, 1~12: 12 个温度梯度。

Note: M, 100 bp DNA Ladder, 1-12, 12 different DNA concentrations.

图6 不同退火温度扩增结果

Fig.6 The amplification result at different anneal temperature

(上接第11673页)

导,并产生呼吸高峰,乙烯合成前期以SAM形式存在,而SAM正是PRMT的甲基供体,随着果实内乙烯释放量的增加,SAM逐渐减少;当乙烯释放达高峰时,RNA和蛋白质的合成也达高峰^[17]。由此推测,MaPRMT1在乙烯释放高峰前期,因甲基供体SAM的存在,表达量较高;随着SAM的减少,其表达量也逐渐下降;当乙烯释放达高峰时,MaPRMT1使RNA和蛋白质甲基化,从而增强了该基因的表达。MaPRMT1的表达差异,特别是在果实采后不同成熟期的表达差异,为深入研究香蕉果实成熟的分子机理奠定了基础,具有重要的分子生物学意义。

参考文献

- [1] 谢萍,田春艳,张令强,等.组蛋白甲基转移酶的研究进展[J].遗传,2007,29(9):1035-1041.
- [2] LEE D Y,TEYSSIER C,SIRAH B D,et al. Role of protein methylation in regulation of transcription[J].Environ Rev,2005,26(2):147-170.
- [3] 徐碧玉,苏伟,张健斌,等.香蕉果实SMART cDNA文库的构建及利用PCR方法筛选香蕉Actin2基因[J].热带亚热带植物学报,2005,13(5):375-380.
- [4] 李燕强.香蕉乙烯合成关键酶基因上游调控因子克隆[D].儋州:华南热带农业大学,2005.
- [5] 李燕强,金志强,徐碧玉.香蕉果实RNA提取方法的改进和比较[J].福建热作科技,2005,30(2):37-39.
- [6] DAME J K,DENT S Y. Transcriptional control: An activating role for arginine methylation[J].Cur Biol,2002,12(2):59-61.

增条带的清晰度反而降低。因此,35.5 (泳道7)为茶薪菇RAPD扩增反应的最佳退火温度。

3 结论与讨论

该研究在以往研究结果的基础上对影响扩增的主要因素(Mg²⁺浓度、引物浓度、DNA浓度、Taq酶浓度、dNTPs浓度以及退火温度)进行分析^[7-9]。经过对各因素条件的筛选,得出茶薪菇RAPD扩增反应的最佳反应体系为2.5 μ Buffer, 2.0 mmol/L Mg²⁺, 75 ng DNA, 0.5 μmol/L引物, 150 μmol/L dNTPs, 2.0 U Taq酶。反应程序为:92 预变性5 min(92 1 min, 35.5 1 min, 72 延伸2 min) 35个循环, 72 10 min。该研究为进一步进行茶薪菇RAPD分析及其亲缘关系、遗传多样性研究提供可靠的试验依据。

参考文献

- [1] WILLIAMS J G K. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [2] 曾凡亚, 张义正. 从多糖丰富的样品中制备食用真菌DNA[J]. 食用菌学报, 1996, 3(3): 13-17.
- [3] 黄晨阳. 同工酶和RAPD标记在金针菇鉴定和遗传多样性研究中的应用[D]. 福州: 福建农林大学, 2002.
- [4] 宿红艳, 王磊, 刘林德, 等. 白平菇不同菌株菌丝体的RAPD分析及系统进化关系的研究[J]. 食品科学, 2007(7): 283-285.
- [5] 张丹, 郑有良, 王波, 等. 毛木耳种质资源的RAPD分析[J]. 生物技术通报, 2007(1): 117-123.
- [6] 邹喻萍, 葛颂. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 40.
- [7] 刘维侠. 金针菇色泽基因的分子标记技术研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2004.
- [8] 叶明亮, 王全立. 铜绿假单胞菌随机扩增多态性DNA分析中反应条件优化方案的探讨[J]. 军事医学科学院院刊, 2001, 25(3): 186-194.
- [9] 陆开宏, 石志猛, 王扬才. 枝角类RAPD条件优化和遗传多样性分析[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(4): 303-307.
- [7] TREVILL R C. Structure and function of histone methyltransferases [J]. Git Rev Eukaryot Gene Expr, 2004, 14(3): 147-169.
- [8] WYSOCKA J, ALLIS C D, COCROD S. Histone arginine methylation and its dynamic regulation [J]. Front Biosci, 2006, 11: 344-355.
- [9] CHEN D, MA H, HONG H, et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase [J]. Science, 1999, 284: 2174-2177.
- [10] QI C, CHANG J, ZHU Y, et al. Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor [J]. J Biol Chem, 2002, 277(32): 28624-28630.
- [11] JIETANG J D G, GARY J D, SIEVEN CLARKE, et al. PRMT3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation [J]. J Biol Chem, 1998, 273(27): 16935-16945.
- [12] DAUJAT S, BAUER U M, SHAH V, et al. Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3 [J]. Cur Biol, 2002, 12(24): 2090-2097.
- [13] BRANSCOMBE T L, FRANKEL A, LEE J H, et al. PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins [J]. J Biol Chem, 2001, 276(35): 32971-32976.
- [14] RHO J, CHI S, SEONG Y R, et al. Prmt5, which forms distinct homodimers, is a member of the protein arginine methyltransferase family [J]. J Biol Chem, 2001, 276(14): 11393-11401.
- [15] MIRANDA T B, MIRANDA M, FRANKEL A, et al. PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity [J]. J Biol Chem, 2004, 279(22): 22902-22907.
- [16] COOK JEFFREY R, LEE JIN HYUNG, YANG Z H, et al. FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 342: 472-481.
- [17] 金志强. 香蕉果实生长发育的生理学与分子生物学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2006: 167-168.