

双孢蘑菇 mtDNA 粗提物的酶切分析

廖剑华 王泽生 陈美元 李洪荣 卢政辉

(福建省轻工业研究所, 福州, 350005)

摘要:发展了一种粗提双孢蘑菇 mtDNA (线粒体 DNA) 方法, 获得 As2796 亲代及子代系列菌株的 mtDNA 粗提物, 并用 HaeIII、CfoI、MspI、TaqI 等内切酶进行酶切, 对酶切结果进行了分析和讨论。

关键词:双孢蘑菇, mtDNA, 限制性酶切

一般食用菌 mtDNA 占总 DNA 的比例较高, 且 mtDNA GC 含量比核 DNA 低, 仅 30% 左右, 故用识别四个 GC 碱基对的内切酶对总 DNA 进行酶切时, mtDNA 因识别位点少而能保留较大片段, 电泳后可直接进行多态性分析^[1]。由于双孢蘑菇细胞多核, 故其 mtDNA 占总 DNA 的含量较低, 该方法难以显示 mtDNA 的清晰带型^[2]。而提取纯 mtDNA 或因操作麻烦, 或设备要求较高, 所需的菌丝量也较多, 不便进行多种菌株的大规模培养和纯 mtDNA 的提取。故我们发展了一种折衷的简便方法, 先粗提双孢蘑菇的 mtDNA, 然后用识别四个 GC 碱基对的限制酶进行酶切分析。

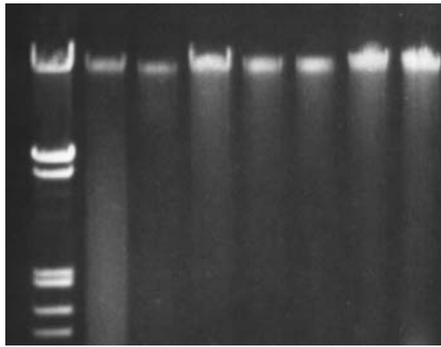
1 材料和方法

- 1.1 菌株: 双孢蘑菇亲代菌株 8213、02 及其杂交子一代菌株 W95-2, 子二代菌株 As2796, 子三代菌株 4607, 以及另一供试菌株 751-341 由福建省蘑菇菌种研究推广站提供。
- 1.2 试剂
 - 1.2.1 酶类: RNaseA 购自美国 Sigma 公司, 限制性内切酶 HaeIII、CfoI、MspI、TaqI 购自德国宝灵曼公司。
 - 1.2.2 化学试剂: Tris 碱、饱和酚购于上海生工公司, 其它试剂为国产分析纯。
- 1.3 菌丝培养: 各菌株接在 PDA 液体培养基上, 24℃ 静置培养 15-30 天。
- 1.4 粗 mtDNA 提取: 根据美国 Sylvan 公司提取纯 mtDNA 的方法 (私人通信), 并加以修改和简化。用两层纱布过滤菌丝体, 加蒸馏水洗一遍, 尽量挤干水分。称重后, 按 12ml 缓冲液/10g 菌丝体的比例加入预冷的 BufferA (1.0M 蔗糖, 0.01M KH_2PO_4 , 0.1% BSA, 2mM 半胱氨酸, 1mM EDTA, pH7.2), 在高速组织捣碎机中充分破碎, 1700g 4℃ 离心 20min, 上清用两层纱布过滤后, 15000g 4℃ 离心 20min, 用 20ml BufferB (0.6M 蔗糖, 10mM Tris-Cl, pH7.5, 2mM EDTA) 洗涤一遍, 15000g 4℃ 离心 20min, 沉淀加 2ml BufferC (10mM Tris-Cl, pH8.0, 10mM EDTA, 100mM NaCl, 2% N-十二烷基肌氨酸钠) 混匀, 加 RNaseA 至 0.5mg/ml, 30℃ 水浴 30min, 酚、氯仿/异戊醇各抽提一遍, 加 0.1V 3M NaAc (pH5.2), 2V 无水乙醇 -20℃ 沉淀 2hr, 台式离心机收集沉淀, 70% 乙醇洗后吹干, 溶于适量纯水中, -20℃ 保存备用。
- 1.5 酶切: 用厂家提供的缓冲液, 50ul 体系, 适量 DNA 和内切酶, 适宜温度下酶解 2.5hr, 加 EDTA 至 10mM 终止反应。
- 1.6 电泳: 按文献 [3] 的方法。检测提取的 DNA 样品用 0.8% 琼脂糖, 检测酶切产物用 1.0% 琼脂糖, 电压 5V/cm。结束后 EB 染色观察并照相。

2 结果与分析

2.1 粗 mtDNA 提取结果

凝胶电泳分析表明提取的粗 mtDNA 产量约 200-600ng/g 湿菌体 (混有核 DNA), 质量尚可, 都在 20Kb 以上, 有一定拖尾 (图 1)。由于混有核 DNA, 用常规的内切酶酶切不能得到 mtDNA 的清晰带型, 因为核 DNA 酶解后产生的连续大小弥散状片段阻碍了 mtDNA 酶解片段的观察。但由于 mtDNA 在提取的混合 DNA 中的比例大大提高 (估计占 60% 以上), 使用识别四个 GC 碱基对的内切酶酶切时, 很容易得到清晰的条带。我们使用四种内切酶 HaeIII (识别 GG'CC)、CfoI (识别 GCG'C)、MspI (识别 C'CGG)、TaqI (识别 T'CGA) 对粗 mtDNA 进行酶切, 获得的片段数达 15-20 条 (图 2), 接近纯 mtDNA 酶切的效果。该提取方法简单, 操作方便, 一次可提取多个样品, 菌丝体用量介于直接分析法和纯 mtDNA 提取法之间, 20g 湿菌体提取的粗 mtDNA 可供 10 次酶切。

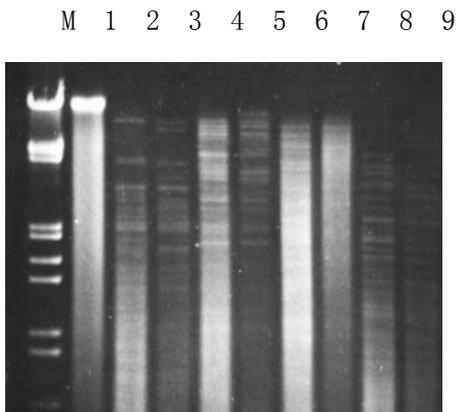


M 1 2 3 4 5 6 7
图1 双孢蘑菇粗mtDNA在0.8%琼脂糖凝胶上电泳分离结果

M: λ DNA/EcoRI+HindIII Markers, 下同。

Fig.1 Electrophoretic pattern of crude mtDNA of *A. bisporus* on 0.8% agarose gel

M: λ DNA/EcoRI+ HindIII Markers. Similarly here in after.



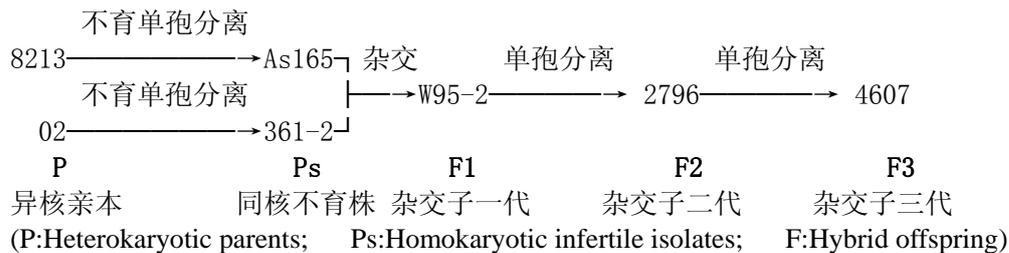
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
图2 双孢蘑菇粗 mtDNA 内切酶酶切图谱
1 道:无酶对照;2,3;4,5;6,7;8,9 道:分别为内切酶 HaeIII, CfoI, MspI, TaqI 酶切带型;2,4,6,8 道:2796 粗 mtDNA;3,5,7,9 道:751-341 粗 mtDNA。

Fig.2 Band patterns of crude mtDNA of *A. bisporus* by endonuclease digestion

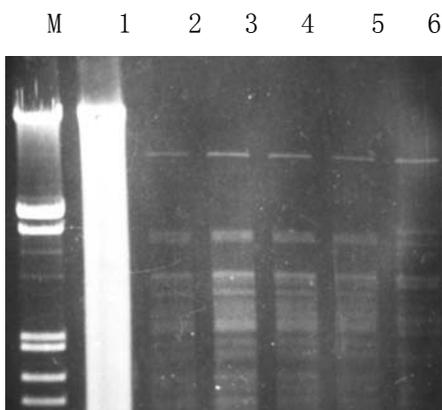
Lane 1:non-enzyme CK; Lane 2,3;4,5;6,7;8,9:bands of Hae III, CfoI, MspI, TaqI; Lane 2,4,6,8: 2796 crude mtDNA; Lane 3,5,7,9: 751-341 crude mtDNA.

2.2 As2796 亲子代系列菌株的 mtDNA 分析

As2796 是我站选育的高产优质杂交菌株之一，其亲子代关系如下^[4]：



优质菌株 8213 和高产菌株 02 的不育单孢杂交获得子一代W95-2，再通过连续的单孢分离获得子二代 2796 和子三代 4607。mtDNA酶切图谱(图 3, 4)显示，8213 和W95-2、2796、4607 具有相同的线粒体基因型，而 02 不同。这表明了双孢蘑菇线粒体是单亲本遗传的，杂交菌株W95-2、2796 和 4607 遗传了优质亲本 8213 的线粒体。对 2796 家系的mtDNA分析也直接验证了Sonnenberg关于双孢蘑菇线粒体单亲遗传的论断^[1]。



M 1 2 3 4 5 6
图3 双孢蘑菇粗 mtDNA 的 HaeIII酶切图谱
1 道:无酶对照;2-6 道: 2796, 4607, 8213, W95-2, 02 的粗 mtDNA 酶切带型

Fig.3 Band patterns of crude mtDNA of *A. bisporus* by HaeIII digestion

Lane 1:non-enzyme CK; Lane 2-6:Digestion patterns of 2796, 4607, 8213, W95-2, 02

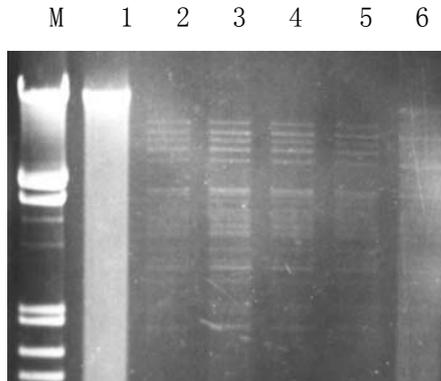


图4 双孢蘑菇粗 mtDNA 的 CfoI 酶切图谱
1 道:无酶对照;2-6 道: 2796, 4607, 8213, W95-2, 02 的粗 mtDNA 酶切带型
Fig.4 Band patterns of crude mtDNA of *A. bisporus* by CfoI digestion
Lane 1:non-enzyme CK;
Lane 2-6:Digestion patterns of 2796, 4607, 8213, W95-2, 02

3 讨论

常规的差速离心法提取纯mtDNA^[5],需用 DNaseI消化线粒体沉淀以去除核DNA的污染,再通过反复洗涤去除DNaseI,纯度要求较高的还要用蛋白酶K去蛋白,用超速离心去多糖。该mtDNA粗提法省略了这些步骤,使得操作大为简化,也减少了mtDNA的损失。与氯化铯密度梯度离心法提取纯mtDNA^[1]相比,该法不需超速离心机及相关操作。当然该法的缺点也是明显的。由于提取到的是mtDNA粗提物,其应用是有限的,只能用几种内切酶进行酶切和线粒体分型,而不便进行PCR及杂交等其它分子生物学操作。

按Sonnenberg对双孢蘑菇mtDNA的基因分型^[1],2796 线粒体基因型属 II 型,而 02 属 I 型,分别与世界上第一批育出的杂交菌株U3 和U1 属同一类型。根据HaeIII酶切结果,2796 与 02 的mtDNA分别切出 15 和 14 条带,其中共同带 11 条,两者相似值 $S=2 \times 11 / (15+14)=75.9\%$,相似值较高。而从总DNA获得的双孢蘑菇菌株间的遗传相似值也较高^[6]。这些说明了双孢蘑菇线粒体遗传的保守性及种质基因库(包括核DNA和mtDNA)的贫乏。在未来育种计划中为了改良商品菌株,含有更多基因变异性的野生菌株具有重要作用。

联系我们所做的这些菌株的同工酶谱^[7],2796、8213、02 分别属三种不同的同工酶类型HG4(杂合型)、G(优质型)、H(高产型),而线粒体基因型并不能把三种菌株完全分开,暗示了这些由核DNA编码的同工酶与mtDNA无关。当然这并不说明双孢蘑菇mtDNA与菌株类型无关,更深入的实验还有待继续。

参 考 文 献

- 1 Sonnenberg ASM., P. C. C. Van Loon & L. J. L. D. Van Griensven. Mitochondrial genotypes and their inheritance in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Genetics and breeding of *Agaricus* (ed by L. J. L. D. Van Griensven), Wageningen. 1991, 42-51.
- 2 曾凡亚,张义正.食用真菌线粒体DNA的直接分析.微生物学通报,1998,25(1):5-9.
- 3 J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著,金冬雁,黎孟枫等译,分子克隆实验指南(第二版).科学出版社.北京.1992,304-318.
- 4 Wang ZS, Liao JH, Chen MY et al., Molecular Genetic Study on the Family of Hybrid Strain As2796 of *Agaricus bisporus*, Proceedings of 3rd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Sydney, 1999. 66-74.
- 5 冯国宏,程文,陆师义.玉米黑粉菌 mtDNA 的研究.遗传学报,1991,18(4):378-384.
- 6 曾伟,宋思扬,王泽生等.双孢蘑菇及大肥菇的种内及种间多态性 RAPD 分析.菌物系统,1999,18(1):55-60.
- 7 Wang ZS and Wang HC. Isozyme patterns and characteristics of hybrid strains of *Agaricus bisporus*. Micol. Neotrop. Apl., 1990, 3:19-29.

Analysis of Crude mtDNA of *Agaricus bisporus* by Endonuclease

Digestion

Liao Jianhua Wang Zesheng Chen Meiyuan Li Hongrong Lu Zhenghui
(Fujian Research Institute of Light Industry, Fuzhou, 350005)

Abstract: An extraction method for the crude mtDNA of *Agaricus bisporus* was developed, and the crude mtDNAs of parent and offspring strains of As2796 were obtained and digested by endonuclease HaeIII, CfoI, MspI and TaqI, then the digestion results were analyzed and discussed.

Key words: *Agaricus bisporus*, mtDNA, Endonuclease digestion