

食用真菌线粒体 DNA 的直接分析

曾凡亚 张义正

(四川大学生物工程系 成都 610064)

摘要 该文报道了以限制酶 HaeIII 酶切 13 个食用菌栽培品种的总 DNA, 在琼脂糖凝胶上直接显现线粒体 DNA 带的结果, 结合另外两种限制酶 CfoI 和 MspI 的酶切结果和 HaeIII 在其它真菌中的研究报道, 提出了利用识别四个 GC 对的限制酶酶切真菌总 DNA, 直接分析线粒体 DNA 的方法。

关键词 食用真菌, 线粒体 DNA, HaeIII 酶切

分类号 Q344

近年来, 线粒体基因组限制酶片段长度多态性 (RFLP) 的研究已在多种真菌中开展起来。其主要的原因可能是真菌线粒体 DNA 变异丰富, 能为真菌的系统演化提供大量稳定的信息, 可部分克服因真菌的营养、生殖结构相对简单, 传统的系统研究方法难于应用^[1]; 以及同工酶谱、感染宿主差异等性状易受环境与基因表达的影响^[2]等问题。另外, 真菌线粒体 DNA 拷贝数较高, 操作方便, 不需杂交就可显示 RFLP 带谱。

在已有的研究中, 绝大多数研究者采用先分离真菌的线粒体 DNA, 再分析 RFLP。Marriot 在 1984 年报道了应用限制酶 HaeIII 酶切真菌 *Fusarium* 的总 DNA, 直接在琼脂糖凝胶上显示线粒体 DNA 的 RFLP^[3]。随后, 这种在总 DNA 中分析线粒体 DNA 多态性的方法被运用到其它几种真菌中^[4~8]。本文报道了应用限制酶 HaeIII 和其它两种识别四个 GC 对的限制酶作用几种食用菌的总 DNA, 显示它们 RFLP 的结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

侧耳属 (*Pleurotus*) 栽培品种凤尾菇、姬菇、佛罗里达侧耳、上平侧耳、义平侧耳、佳平侧耳、滩平侧耳、侧五侧耳, 金针菇 (*Flammulina velutipes*)、香菇 (*Lentinula edodes*)、双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 栽培品种 F10、香 Cr02 和浙农一号均购自农业部四川食用菌菌种场。鸡枞

(*Termitomyces albuminosus*) 04 菌株由华西医科大学基础医学部赵呈裕教授馈赠。

1.2 DNA 提取

总 DNA 提取采用以前的方法^[9]。杂交用的凤尾菇线粒体 DNA 按照 Garder 和 Yoder^[10]的方法, 以 bisbenzimidazole 为介质, 经两次氯化铯超速离心分离纯化。

1.3 DNA 酶切及电泳

总 DNA 酶切采用生产厂家提供的缓冲液和方法, 本实验所采用的限制酶均购自 BRL 和宝灵曼公司。酶切后的 DNA, 在 0.5 × TAE 缓冲液中电泳, 琼脂糖凝胶浓度 0.8%。溴乙锭染色的凝胶, 在紫外检测仪上观察和拍照。

1.4 Southern 杂交

按 Sambrook 等^[11]描述的方法将电泳后的 DNA 转移到尼龙膜上, 干燥固定。依次进行预杂交、杂交、洗膜和放射自显影。洗膜采用室温下洗二次后, 在 65℃ 中用 1 × SSC, 0.1% SDS 洗两次, 每次 15min。杂交所用探针采用随机引物加 (α -³²P) - (dATP + dCTP) 混合物 (0.05mCi, 比活性 3000Ci / mmol / L), 按文献 [11] 描述的方法标记。

2 结果

2.1 不同限制性内切酶对凤尾菇、义平侧耳总

DNA 的作用

凤尾菇、义平侧耳的总 DNA 分别用限制酶 EcoRI、HindIII、EcoR V、XhoI、BamHI、PstI、HaeIII、HinfI 酶切。发现经 HaeIII 酶切后，基因组总 DNA 在琼脂糖凝胶上显示出清晰的特异性 DNA 带谱，它们的分子量范围在 1.9~11.2kb 之间。其它限制性内切酶则将总 DNA 切成长短不等的片段，电泳后在琼脂糖凝胶上呈散状分布。图 1 显示了其中四种限制酶的酶切结果。

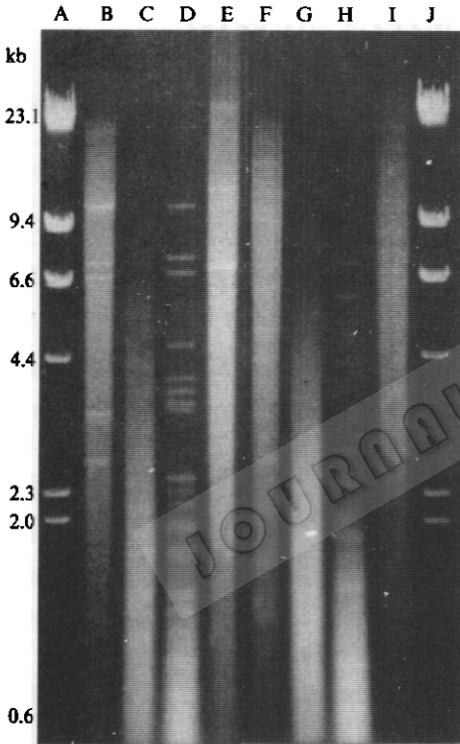


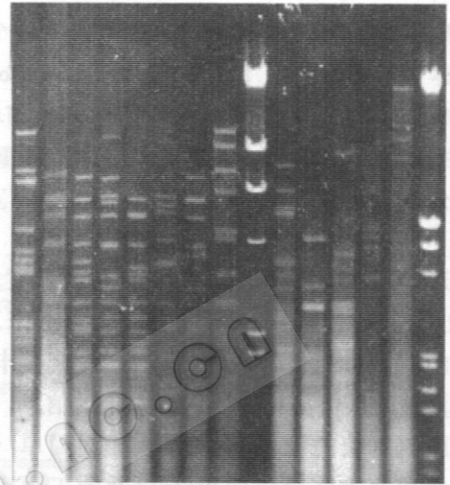
图 1 不同限制酶酶切凤尾菇(B-E道)、义平侧耳(F-I道)总 DNA
BamHI (B,F道), HinfI (C,G道), HaeIII (D,H道), PstI (E, I道), λ / HindIII (A, J道)

2.2 HaeIII 对侧耳属及其它食用菌总 DNA 的作用

为了证实 HaeIII 酶切基因组总 DNA 后出现 DNA 带谱的普遍性，选择侧耳属食用菌栽培品种八个，香菇、草菇、双孢蘑菇和金针菇栽培品种及鸡纵菌株各一个，制备总 DNA 再用 HaeIII 完全酶切。结果显示所有的 DNA 样品均

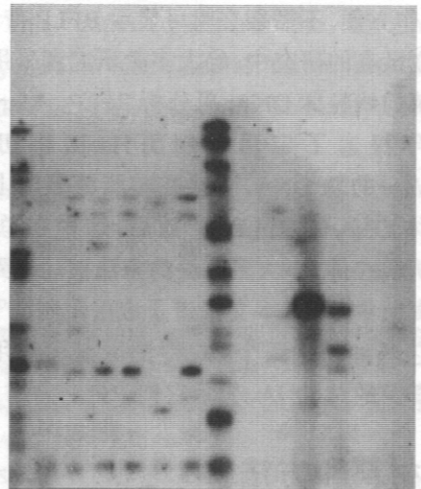
切出大小不等的 DNA 带(图 2-I)，其中分子量最大的 DNA 带达 21kb。经多次制备总 DNA 和重复酶切，各菌株显现的带型相同。根据对图 2 各菌株的 HaeIII 带计算，表 1 列出了部分品种的 HaeIII 片段数及累加分子量。

A B C D E F G H I J K L M N O



I

A B C D E F G H I J K L M N



II

图 2 13 个菌种总 DNA 的 HaeIII 酶切(I)和与凤尾菇线粒体 DNA 探针的杂交(II)图谱
第 A-O 道依次为: 凤尾菇, 濠平侧耳, 义平侧耳, 桂平侧耳, 上平侧耳, 佛罗里达侧耳, 姬菇侧耳, 侧五侧耳, λ /HindIII, 香菇 C02, 草菇 V4, 双孢蘑菇浙农一号, 鸡纵菌 04, 金针菇 F10, λ /HindIII-EcoRI.

表1 几种食用菌DNA的HaeIII片段数和分子量累加值

菌种	HaeIII片段数	分子量累加值(kb)
凤尾菇	15	59.4
义平侧耳	13	46.3
佳平侧耳	14	52.4
上平侧耳	14	46.2
佛罗里达侧耳	11	40.4
姬菇	14	50.7
侧五侧耳	11	56.8
香菇	14	56.2
金针菇	4	52.2

个别很亮的带在计算时被认为至少包含两个长度相似
的HaeIII片段。

2.3 凤尾菇线粒体DNA与HaeIII带的杂交

以超速离心分离的凤尾菇线粒体DNA为探针,与这些HaeIII片段进行Southern杂交。结果显示,凤尾菇线粒体DNA探针能与所有来自凤尾菇和侧五侧耳的HaeIII片段杂交,并能与侧耳属菌株的部分HaeIII带产生不同程度的杂交。但是,它与香菇、双孢蘑菇、金针菇的HaeIII带只各有2~3条弱杂交带,与鸡枞菌的

无杂交(图2-II)。

2.4 CfoI, MspI酶切总DNA的结果

用识别四个GC对的另外两种限制酶CfoI, MspI酶切凤尾菇、香菇、草菇的总DNA,所有酶切后的DNA都在琼脂糖凝胶上呈现不同的DNA带(图3)。其中凤尾菇的带经用放射性同位素标记的凤尾菇线粒体DNA杂交,证明它们都来自线粒体DNA(结果未显示)。经计算,这些线粒体DNA片段分子量累加值中,最大的三种是:CfoI酶切的凤尾菇总DNA,69kb;MspI酶切的香菇总DNA,62kb;CfoI酶切的草菇总DNA,44kb。

3 讨论

食用菌多数属于高等担子菌,其细胞核DNA与线粒体DNA的碱基组成有明显差异。核DNA的GC含量一般在50~60%,存在大量识别四个GC对的限制酶酶切位点;而线粒体DNA的GC含量仅占30%左右^[12],因此,识别四个GC对的限制酶在它们中的位点相对较少。当用HaeIII(识别GGCC)完全酶切总DNA后,绝大部分核DNA被切成1.5kb以下的小片段,但线粒体DNA片段却能保持较大的分子量。另外两种识别四个GC对的限制酶CfoI(识别GCGC序列)和MspI(识别CCGG序列)的酶切结果也与HaeIII的相似(图3)。用识别GATC四个核苷酸顺序的限制酶Sau3AI酶切以上总DNA,只能见到呈弥散状的小片段。一种可能的解释是: Sau3AI酶切位点中有两个AT对,增加了它在AT丰富的线粒体DNA中的酶切位点,以致两种DNA都被酶切成小片段(结果未显示)。这种由HaeIII酶切总DNA直接显现线粒体DNA带的现象,已在真菌*Fusarium*^[3], *Histoplasma*^[4], *Phytophthora*^[5], *Verticillium*^[6], *Podospora anserina*^[7], *Pyrenophora*^[8]中有报道。

利用凤尾菇线粒体DNA探针与这些由HaeIII酶切产生的带进行分子杂交表明:由HaeIII酶切凤尾菇与侧五侧耳总DNA显现的带均来自线粒体DNA(图2-II),但其它侧耳

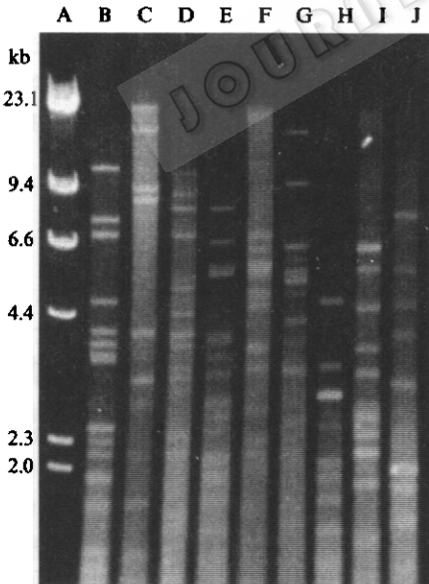


图3 三种识别四个GC对的限制酶酶切三种食用菌总DNA
凤尾菇(B-D道)、香菇 Cr02(E-G道)、草菇 V4(H-J道)
总DNA依次用HaeIII, CfoI, MspI酶切。

属菌株仅有部分带能与凤尾菇线粒体 DNA 探针杂交。可能的原因是真菌线粒体 DNA 在不同的种、属中变异较大,某些片段间的同源性较差,类似的结果在双孢蘑菇的不同菌株中已有报道^[13]。使用克隆的凤尾菇线粒体 DNA 片段为探针的分子杂交也表明,部分线粒体 DNA 片段的同源性在这些侧耳属菌株间确有较大的差异^[14]。对于香菇、草菇、双孢蘑菇和金针菇,产生的杂交带更少,说明它们的线粒体 DNA 的碱基组成和排列变化更大。

从表 1 看出,凤尾菇各条 HaeIII 带的累加长度约 59.4kb,与 Byan 等^[15]用超速离心分离纯化的凤尾菇线粒体 DNA 所报道的 60~65kb 相比,HaeIII 带总长度代表了约 90% 的线粒体 DNA。香菇的 HaeIII 带累加长度与 Fukuda 等^[16]用纯化线粒体 DNA 测得的平均长度 79.4kb 相比,约占 70%,但由 MspI 显现的线粒体 DNA 带却达到了 78%。其它品种线粒体 DNA 片段的累加长度也达到了真菌线粒体 DNA 典型长度的范围^[1]。从图 3 还可以看出,不同的限制酶作用同种 DNA,可将线粒体 DNA 的不同区段在凝胶上显示出来。因此,选一种代表性强或几种识别四个 GC 对的限制酶作用总 DNA,产生的带可基本代表线粒体基因组,这对快速、简便研究线粒体基因组和对线粒体基因定位非常有用。

通过用 HaeIII 酶切八个侧耳属食用菌栽培品种的总 DNA 发现,它们的线粒体 DNA 具有丰富的 RFLP,与 Matsumoto 等用 BamHI 和 HindIII 酶切糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 线粒体 DNA 的结果相似^[17]。如果同时采用几种这类限制酶酶切,例如:已经商品化的 HaeIII、CfoI、MspI 和 Thal (识别 CCGG),可在每一个菌株中产生约 40 个分子量较大的线粒体 DNA 片段(本实验中三种酶平均产生 34 个片段),大大地提高了 RFLP 检出的灵敏度。另外,这些特异性的带谱,还可以作为菌株的分子标记,用于研究线粒体 DNA 的遗传^[18]、系统进化和食用菌的遗传育种,它们将不受基因表达和环境变化的影响。

在基因组 DNA 中直接用适当种类的限制酶酶切分析线粒体 DNA 具有较大的优越性,它不需要 CsCl 密度梯度超速离心法^[10]中的多个线粒体 DNA 的分离纯化步骤,并可同时处理许多不同的样品。与传统的研究种间和种内线粒体 RFLP 相比较,直接分析法更具有实用性。此外,真菌线粒体 DNA 含量一般占总 DNA 的 10%~15%^[19],一次小规模制备(1 克湿菌体出发)能获得 20~60 μ g 总 DNA,可供 10~15 次电泳。还可用低熔点琼脂糖凝胶分离感兴趣的线粒体 DNA 片段,用于研究片段间的同源性或直接克隆。

参 考 文 献

- [1] Taylor J W. Exp. Mycol. 1986, 10:259~269.
- [2] Freeman S, Pham M, Rodriguez R J. Exp. Mycol. 1993, 17:309~322.
- [3] Marriot A C, Archer S A, Buck K W. J. Gen. Microbiol. 1984, 130:3001~3008.
- [4] Spitzer E D, Lasker B A, Travis S J, et al. Infect. Immun. 1989, 57:1409~1412.
- [5] Mills S D, Forster H, Coffey M. D. Mycol. Res. 1991, 95:31~48.
- [6] Typas M A, Griffen A M, Bainbridge B W, et al. FEMS Microbiol. Let. 1992, 95:157~162.
- [7] Lecellier G, Silar P. Curr. Genet. 1994, 25:122~123.
- [8] Crous P W, Janse B J H, Tunbridge J et al. Mycol. Res. 1995, 99:1098~1102.
- [9] 曾凡亚,张义正. 食用菌学报,1996, 3(3):13~17.
- [10] Garder R C, Yoder O C. Anal. Biochem. 1983. 135:416~422.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd. edn. Cold Spring Harbor Lab Press. Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- [12] Kurtzman C P. Molecular taxonomy of the fungi. In Gene manipulations in fungi. Academic Press. Inc., Orlando, Fla. 1985.
- [13] Sonnenberg A S M, Griensven Van LJLD. Cultivated mushroom research newsletter. 1994, 2:1~5.
- [14] 曾凡亚,汤海妹,张义正. 四川大学学报, 1996, 33(4):438~442.
- [15] Byun M O, Kim K S, You C H, et al. Korean J. Mycol. 1994, 22(2):117~121.

- [16] Fukuda M, Nakai Y F, Hibbett S, *et al.* Mycol. Res. 1994, **98**(2): 169~175.
- [17] Matsumoto T, Fukumasa-nakai Y. Mycol. Res. 1995, **99**: 562~566.
- [18] Fischer M, St. Seefelder. Botanica Acta. 1995, **108**(4): 277~402.
- [19] Rader U, Broda P. Methods Enzymol. 1988, **161**: 211~220.

ANALYSES OF MUSHROOM MITOCHONDRIAL DNA BY FOUR-GC-CUTTER RESTRICTION ENZYME

Zeng Fanya Zhang Yizheng

(Biotechnology Department, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract Genomic DNAs prepared from thirteen cultivated mushroom strains were digested with restriction enzyme HaeIII, and all of them showed their own distinguished DNA band patterns on EB-stained agarose gel. Southern hybridization proved that these DNA bands were mitochondrial DNA (mtDNA). Other two four-GC-cutter restriction enzymes, CofI, MspI, like HaeIII, also showed mtDNA bands after digestion. Combined these results with those reported from other fungi, we propose a method in which direct digestion of total fungal DNA with four-GC-cutter restriction enzymes can be used for analyses of fungal mtDNA.

Key words Mushroom fungi, Mitochondrial DNA, HaeIII digestion