

粗柄鸡枞菌总 DNA 提取及 ITS 区克隆测序研究

邹立扣¹, 潘欣²

(1. 四川农业大学都江堰分校 生物科学系, 四川 都江堰 611830; 2. 成都理工大学 地球科学学院, 四川 成都 610059)

摘要: 利用 2 种 DNA 提取方法获得了粗柄鸡枞菌总 DNA, 并比较了 2 种方法之间的提取效果, 利用分子生物学方法扩增并克隆出粗柄鸡枞菌长 632 bp 的 ITS 区序列, 为以后的鸡枞菌培养及鉴定奠定了一定的基础。

关键词: 粗柄鸡枞菌; 总 DNA; 克隆测序
中图分类号: S 646.1⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)06-0217-03

鸡枞菌(*Termitomyces robustus*), 又叫伞把菇、鸡丝菇、白蚁菇等, 属于担子菌纲, 伞菌目, 侧耳科, 鸡枞菌属, 是珍贵的野生食用菌, 全世界约有 25 种, 我国有 15 种, 主要分布在云南、贵州、四川几省的山区。鸡枞菌含营养丰富, 长期以来, 人们都希望实现这种珍稀野生食用菌的人工驯化栽培, 但是由于鸡枞菌只能生长在白蚁巢上, 它与白蚁巢之间的关系复杂, 生理生化特性尚未真正彻底弄清楚, 所以, 至今不能完全人工栽培, 仍然处于半人工栽培的摸索阶段^[1-4]。

该研究在获得粗柄鸡枞菌子实体的基础之上, 对鸡枞菌总 DNA 的提取方法进行了比较, 并首次利用 ITS₄,

ITS₅通用引物首次克隆出粗柄鸡枞菌的 ITS 区, 目前国内外文献中对此类研究报道不多, 通过此研究希望能建立起鸡枞菌快速、准确的鉴定方法, 从而为以后的培养及鉴定奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

新鲜鸡枞菌子实体采自四川省西昌市; 分子量标准 DL2 000, 质粒 pMD-18T 载体, 连接试剂盒, Taq DNA 聚合酶及合成引物均购自大连 TaKaRa; X-gal, IPTG 购自上海生工; 转化宿主细胞大肠杆菌 JM 109(实验室保存); Ω^{TM} 质粒 DNA 小量提取试剂盒, Ω^{TM} 小量胶回收试剂盒购自公司。

1.2 鸡枞菌的形态学鉴定

根据其形态特征, 判断出鸡枞菌所属种^[5,6]。

1.3 鸡枞菌总 DNA 的提取

1.3.1 子实体的初步处理 采集的新鲜鸡枞菌子实体, 冰袋封存后保存, 速用灭菌蒸馏水洗净鸡枞菌子实体, 再用 75% 无水乙醇冲洗 2 次, 灭菌蒸馏水除去残余乙醇后备用, 剩余样品可保存于 -20℃。

第一作者简介: 邹立扣(1979-), 男, 博士, 讲师, 现主要从事微生物及生物工程研究工作。

通讯作者: 潘欣(1979-), 女, 在职博士, 讲师, 现主要从事森林病理及生态学的研究工作。

基金项目: 四川省教育厅青年基金资助项目(2006B014); 四川农业大学青年创新基金资助项目; 成都理工大学青年基金资助项目。

收稿日期: 2009-01-27

低温下出现的多; 单核菌丝在不同培养基中出现的几率为: 70%、47.5%、50%、47.5%、20%, 即 1>3>2=4>5。说明 5 号培养基对单核菌丝有较强的抑制作用。

2.2 双核菌丝的生长情况

表 3 双核菌丝生长情况比较

	1	2	3	4	5
28℃	++	+	+++	+++	+
25℃	+++	++	++++	++++	++
22℃	+++	+++	++++	+++++	+++
19℃	++	++	+++	++	+

待试管中菌丝长满管后, 比较不同温度以及在同一温度下的不同培养基上菌丝的浓密度, 由表 3 可知, 滑

菇菌丝在不同培养基中的浓密度是 4>3>1>2>5; 同一培养基在不同温度下菌丝的浓密度是 22℃>25℃>28℃>19℃。

3 结论

5 号培养基(PDA 培养基中加 5% 的玉米粉)在 28℃下, 能有效抑制单核菌丝的产生; 培养基配方 3 和 4(PDA 培养基中分别加 5% 麸皮, 5% 豆饼粉)能有效促进双核菌丝的生长, 与 1 号培养相比也能抑制单核菌丝产生; 在 22℃和 25℃下培养菌丝浓密。综合考虑, 在滑菇生产中, 加 5% 的麸皮或 5% 的豆饼粉, 并在 25℃下培养较好。

1.3.2 采用改良氯化苄法 DNA 的提取^[7,8] 离心收集菌丝体,尽量吸干水分,1 g 菌丝体加入 5 mL 提取液(100 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, pH 8.0),振荡使之与菌丝体充分混匀,再加入 1 mL 10% SDS、3 mL 氯化苄,剧烈振荡,使管内混合物呈乳状。在 50℃水浴保温 1 h,每隔 10 min 振荡混合 1 次。然后加入 3 mL 3M NaOAc (pH 5.2)混匀,冰水浴 15 min, 6 000 rpm 离心 15 min,取上清液,加入等体积的异丙醇室温沉淀 20 min。10 000 rpm 室温离心 15 min,沉淀用 70%乙醇洗 1 次,自然干燥或吹干后溶于 TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0),加 1 μ L RNAase 消化后,保存于 -20℃冰箱备用。提取的 DNA 可在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.3.3 改良二次沉淀法 DNA 的提取^[9] 离心收集菌丝体,用灭菌双蒸水冲洗 2~3 次,尽量吸干水分。将菌丝体转移到已冷冻过的研钵里,加入 2~3 次液氮,把冷冻的菌丝体研磨成细粉末,应随时补充液氮以保证低温。将菌丝体粉末迅速转移到 20 mL 的离心管中,加入 10 mL 缓冲液 A (SDS-EB, pH 8.0),密封后在涡旋振荡器上混合均匀,静置至室温。将混合液置 65~68℃水浴 20 min,室温下 10 000 rpm 离心 15 min。取上清液移至另一离心管,加入 0.5 mL 缓冲液 B (8 M KOAc, pH 4.2),混匀后冰浴 45 min,然后 4℃下 10 000 rpm 离心 20 min。取上清液至另一离心管,加入等体积异丙醇,小心颠倒混合均匀,可以看到沉淀出现。将离心管静置 5 min,轻轻倒掉上清液,用长针将沉淀转移到 1.5 mL 的离心管中,用 70%乙醇清洗 1 次,无水乙醇清洗 2 次,然后让沉淀自然干燥。将沉淀溶解于 750 μ L 超纯水,混匀后可于 -20℃冰柜过夜。将上述溶液用等体积的酚-氯仿抽提 2~3 次,氯仿抽提 1 次,再用异丙醇沉淀,自然干燥,溶于 50 μ L 超纯水中,加 1 μ L RNAase 消化后,保存于 -20℃冰箱备用,提取的 DNA 可在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.3.4 总 DNA 的检测 利用分光光度法分别测定 2 种方法提取出的总 DNA 的 A_{260} 与 A_{280} 值,算出其含量及纯度^[10]。

1.4 鸡枞菌的分子生物学鉴定

1.4.1 ITS 区 PCR 扩增引物 采用真菌通用引物 ITS₄ 和 ITS₅, 其序列如下: ITS₄ (5'-3'): TCCTCCGCTTATT GATATGC, ITS₅ (5'-3'): GGAAGTAAAGTCGTAACA AG。PCR 扩增体系 50 μ L, 包括超纯水 40.5 μ L, 10 \times Buffer 5.0 μ L, 4 \times dNTP 1.0 μ L, ITS₄ 和 ITS₅ 各 1.0 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 反应混合物加 30.0 μ L 矿物油覆盖。每个反应为 30 个循环,每个循环包括 95℃变性 1 min, 52℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 首次循环先在 95℃预变性 3 min, 最后 1 次循环后在 72℃延伸 5 min, 根据扩增结果调整模板量, 扩增产物经 1%琼脂

糖凝胶电泳后用凝胶成相系统(BIO-RAD)观察并保存。

1.4.2 PCR 产物的回收、连接与转化 用上海华舜生物工程有限公司的小量胶回收试剂盒,按说明书提供的方法即可完成回收,用成都天泰生命科技有限公司提供的连接试剂盒连接 PCR 片段与 pMD-T 载体。用氯化钙法制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞(按《分子克隆实验指南》第 3 版)。将重组质粒 DNA 转入感受态细胞 JM109,取适量菌液涂布于 Amp 抗性平板(含 X-gal, IPTG)上, 37℃培养 16~24 h, 放于 4℃使显色完全。

1.4.3 阳性重组质粒的筛选和鉴定 经蓝白筛选,进行菌落 PCR 鉴定,反应体系与反应条件同前。将 PCR 初步筛选阳性的重组质粒 DNA 用限制性内切酶 Sal I 和 BamH I 进行酶切证实。酶切体系如下: 10 \times T Buffer 1.5 μ L, BSA 1.0 μ L, 质粒 DNA 6.5 μ L, Sal I 0.5 μ L, BamH I 0.5 μ L, 总体积 10 μ L, 混匀后 37℃水浴 3 h, 电泳检测。

1.4.4 DNA 测序 利用 UltraPure™ 质粒 DNA 小量提取试剂盒(购自赛百胜)提取高纯度的质粒 DNA,用于测定插入片段的碱基序列。样品送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 鸡枞菌的种类

鸡枞菌菌盖褐色,宽 3~19 cm,盖中央乳头状,中央尖突不明显,柄纺锤状,粗 2~7 cm,根据形态学特征,鉴定为粗柄鸡枞菌(*T. robustus*(Beeli) Heim)。

2.2 总 DNA 提取效果比较

第 1 种方法即改良氯化苄法提取获得总 DNA 其 $A_{260}/A_{280}=1.33$, 含量约为 66.5 μ g/mL, 而采用改良二次沉淀法获得总 DNA 其 $A_{260}/A_{280}=1.85$, 含量约为 92.5 μ g/mL, 比较 2 组数据后发现后一种方法获得总 DNA 纯度及含量要远比第一种要高。由此可见,改良二次沉淀法为提取鸡枞菌总 DNA 的优选方法,凝胶电泳结果见图 1。

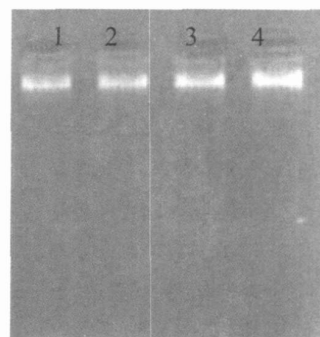


图 1 粗柄鸡枞菌总 DNA 凝胶电泳
注: 1、2-改良氯化苄法 3、4-改良二次沉淀法。

2.3 粗柄鸡枞菌 ITS 区的系统发育分析

2.3.1 粗柄鸡枞菌 ITS 区序列见图 2。

TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAAATGGTCAAG
AGTGAATGAAAATCGGTTAGAAGCAGAGTAAGCTGACTGCACACGGTGTTGATAAAGGTTTATCACA
CCAGGAAACAAGGTCAACAAATCGTTCCACTAATGCGTTTAAGGGGAGCTGACTTCTGAGGGGTTGA
AGCCAGCAAAAGCCCCACAATCCAAGCCTATCCAAAAGTTGGTTAGGTTGAGAAITTAATGACACTC
AAACAGGCATGCTCCTCAGATCACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGAITCGATGATTCACGTGTC
TGCAATTACATTACTTATCGCGTTTCGCTGCGTCCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCT
GAAAGTTGTATAATATTTGATTAAAGGCACTGAGGCCAATCAATAACATTCTGATTACACGGGAGTAAA
TGATTGATAGACAAAACAAAGTCTGTCTACAAAAGGTGCACAGGTGGGTTTGAATAAGGCGTGCACAT
GCCGAGAAAAAGGCCAGCAACAACCAGACTTCAATAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGAAAG
CTTGTTACGACTTTTACTTCC

图2 粗柄鸡枞菌的 ITS 区序列

2.3.2 鸡枞菌 ITS 区同源性分析 将此序列分别与 GenBank 中鸡枞菌 ITS 区(AB051890, AB217791, AB073532)利用分子生物学软件进行同源性分析, 见图 3。由图 3 可知, 4 种鸡枞菌 ITS 区有着很高的同源性, 克隆鸡枞菌 ITS 区并对其测序比较完全可以作为鸡枞菌菌丝培养后鉴定的良好方法。自今已有很多关于分离、培养及纯化鸡枞菌的报道, 但其单孢子萌发时间长, 分离时易受污染而难以成功, 如何确定培养出的菌丝是否为鸡枞菌菌丝及确定是否污染等一直是个难题^[2,4]。试验在国内首次对鸡枞菌 ITS 区基因片段进行了成功的 PCR 扩增、克隆及测序, 并根据其 ITS 区序列分析了各种间的同源性, 其种间亲缘关系在 91% ~ 100% 之间, 此方法可以作为鸡枞菌快速、准确的鉴定方法^[11-12], 根

据形态特征和分子系统学特征结合界定鸡枞菌的种是比较科学的, 也符合当今真菌分类的发展趋势。

参考文献

[1] 胡尚勤 刘天贵, 李贤柏. 鸡枞菌最佳碳源与生长条件的研究[J]. 食用菌 2006(3): 11-12.
[2] 姚晓红 许尧兴, 许少春, 等. 鸡枞菌的生物学特性及深层发酵研究进展[J]. 食用菌学报, 2001, 8(1): 59-62.
[3] 曾大兴 谢和, 吴龙英. 几种分离鸡枞菌的方法研究[J]. 山地农业生物学报, 1999, 18(2): 87-89.
[4] 龙正海 曾大兴. 鸡枞菌培养特性的初步研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 90-94.
[5] 贺新生. 中国鸡枞菌的种类与分布[J]. 食用菌, 1995(6): 4-5.
[6] 贺新生. 鸡枞菌与白蚁的相互关系[J]. 中国食用菌, 1995, 14(5): 20-21.
[7] 朱衡 瞿峰 朱立煌. 利用氯化苄提取适用于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. 真菌学报 1994 13(1): 34-40.
[8] 潘欣 邹立扣 彭培好, 等. 杜鹃褐斑病原菌的分离与鉴定[J]. 北方园艺 2008(6): 198-200.
[9] 潘欣. 四川省松树散斑壳菌的种类及其 rRNA 基因 ITS 区的 PCR 克隆和序列分析[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2004.
[10] 王镜岩 朱圣庚 徐长法. 生物化学[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
[11] 骆志成 王端礼 李若瑜, 等. 烟曲霉 rRNA 基因 ITS 区的克隆测序分析[J]. 菌物系统 2000 19(3): 336-341.
[12] 陈永青 姜子德 戚佩坤. RAPD 分析与 ITS 序列分析在拟茎点霉分类鉴定上的应用[J]. 菌物系统 2002 21(1): 39-46.

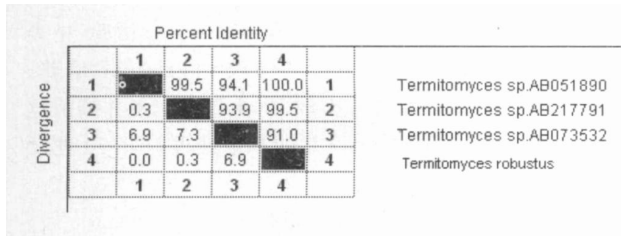


图3 鸡枞菌属内不同种的 ITS 序列同源性

Total DNA Isolation of *Termitomyces robustus* and Cloning of its ITS Region

ZO U Li-kou¹, PAN Xin²

(1. Lab of Microbiology of Dujiangyan Campus, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan, Sichuan 611830 China; 2. College of Earth Science of Chengdu University of Technology, Chengdu, Sichuan 610059 China)

Abstract: The total DNA of *Termitomyces robustus* was isolated by two different methods, and its extraction yield was also compared. The internal transcribed spacer(ITS) region in rRNA gene was cloned and sequenced, and the sequence was compared with others species. The results showed that the cloning and sequencing of ITS region was a good method to identify the species of *Termitomyces*.

Key words: *Termitomyces robustus*; Total DNA; ITS Region