

用识别四个 GC 对的限制酶研究高等担子菌 线粒体 DNA *

曾凡亚 汤海妹 张义正

(四川大学生物工程系 成都 610064)

摘 要 本文报道了用识别四个 GC 对的限制性内切酶 *Hae*III、*Cfo*I、*Msp*I 酶切高等担子菌伞菌目 (*Agaricales*)、非褶菌目 (*Aphyllorphorales*) 12 个菌株的总 DNA, 在琼脂糖凝胶上显现线粒体 DNA 带谱的结果。通过对带型、累加分子量、酶切片段数和同源性的分析表明, 不同种类高等担子菌的线粒体 DNA 变化较大。研究还显示, 以多种识别四个 GC 对的限制酶分析高等担子菌的线粒体 DNA 及其它们的 RFLP, 比只用 *Hae*III 更灵敏有效。

关键词 高等担子菌, 线粒体 DNA, RFLP 分析

分类号 Q 939.5

在近十多年里, 对真菌线粒体基因组的分子生物学研究结果显示, 真菌线粒体 DNA 分子的进化速度介于动物和植物之间^[1], 它的变异丰富, 在真菌的分子进化、类群划分和遗传多样性等研究中具有重要意义^[2]。另外, 真菌线粒体 DNA 的重组、突变与真菌的老化 (senescence) 也有密切的关系^[3]。

利用真菌核 DNA 与线粒体 DNA 碱基组成上的差异, 以识别 GGCC 的限制酶 *Hae*III 酶切真菌总 DNA, 可在琼脂糖凝胶上显示出它们的线粒体 DNA 带谱。这一现象已在藻状菌^[4], 子囊菌^[5]和几种致病的半知真菌^[6~9]中有报道。我们还将这些特征性的线粒体 DNA 带谱用来研究真菌线粒体 DNA 多态性和作为分子标记区分菌株。为进一步探讨识别四个不同序列 GC 对的限制酶在真菌总 DNA 中显现线粒体 DNA 带的普遍性意义和应用这一方法分析高等担子菌线粒体 DNA 多态性, 本文报道了分别用限制酶 *Hae*III、*Cfo*I (GCGC) 和 *Msp*I (CCGG) 酶切伞菌目 (*Agaricales*)、非褶菌目 (*Aphyllorphorales*) 12 个菌株总 DNA, 显现它们线粒体 DNA 带谱的结果。

1 材料和方法

1.1 菌株

担子菌栽培菌株凤尾侧耳 (*Pleurotus sajor-caju*)、香菇 (*Lentinula edodes*) Cr02、草菇 (*Volvariella volvacea*) V4、双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 浙农 1 号、金针菇 (*Flammulina velutipes*) F10、真姬菇 (*Hypsizygus marmoreus*)、柱状田头菇 (*Agrocybe aegerita*)、滑菇

*国家教委留学回国人员基金资助。

收稿日期: 1997-04-28

(*Pholiota nameko*)、灵芝(*Ganoderma lucidum*)川芝6号、猴头(*Hericium erinaceus*)H6均购自农业部四川食用菌种场。白腐担子菌黄孢原毛平革霉(*Phanerochaete chrysosporium*) BKM-F-1767 (ATCC 24725)和 ME-446 (ATCC 34541)为本实验室保存菌种。

1.2 DNA 制备

1.2.1 总 DNA 按文献 [10] 的方法制备。

1.2.2 凤尾侧耳线粒体 DNA 采用 bisbenzimidazole 氯化铯密度梯度离心纯化制备^[11]。

1.3 DNA 的酶切和电泳

本实验所用限制酶购自美国的 BRL 和德国的宝灵曼公司,采用厂商提供的酶切缓冲液和推荐的方法进行酶切。酶切样品用 0.8% 的琼脂糖凝胶, $1 \times$ TAE 缓冲液电泳和按 Sambrook 等^[12]的方法进行溴乙锭染色。

1.4 Southern 杂交

参照 Sambrook 等^[12]的方法将电泳后的 DNA 样品进行 Southern 转移,固定和杂交。洗膜采用室温下洗二次后,在 65℃ 下用 $1 \times$ SSC, 0.1% SDS 洗两次,每次 15min。克隆的凤尾侧耳线粒体 DNA 探针 H4 与 H2 的分离和标记以及凤尾侧耳线粒体 DNA 探针的标记均按以前的方法进行^[13]。

1.5 相似性分析

DNA 的相似分析 (DNA relatedness) 采用 Nei 等人^[14]的方法,用公式 $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 计算,其中 N_x 和 N_y 分别代表进行比较的两菌株酶切后可见 DNA 带的数目, N_{xy} 代表两菌株中相同 DNA 带的数目。

2 结果

2.1 三种限制酶酶切总 DNA 的结果

用三种识别四个 GC 对的限制性内切酶 HaeIII、CfoI、MspI 分别酶切上述 12 个菌株总 DNA,经琼脂糖凝胶电泳,所有样品道上都在被切成弥散状的小分子核 DNA 后面显示出分子量较大的线粒体 DNA 带,并且同种酶在不同的菌株和不同的酶在相同的菌株中出现的带型完全不一样(图 1)。经多次制备总 DNA 和重复酶切,这些带谱能稳定地重复。

2.2 Southern 杂交

为证实上述三种限制酶酶切总 DNA 所产生的分子量较大的可见带都来自线粒体 DNA,以氯化铯梯度离心纯化的凤尾侧耳线粒体 DNA 为探针,与凤尾侧耳总 DNA 酶切后显现的 DNA 带进行 Southern 杂交。结果显示:凤尾侧耳线粒体 DNA 探针能与琼脂糖凝胶上显现的所有分子量较大的 DNA 带杂交(图 2H, I, J),说明这些带来源于线粒体 DNA。

以两个克隆的凤尾侧耳线粒体 DNA 片段 H4 和 H2^[13]为探针,与图 1 中 8 个菌株(图 1I, II)的酶切总 DNA 杂交,结果表明,所有样品中都有 1~3 条 DNA 带能与探针 H4 杂交。显然, H4 的序列在不同担子菌线粒体 DNA 中具有广泛的同源性(图 3);而探针 H2 除与三种酶切的凤尾侧耳总 DNA 中的可见线粒体 DNA 带杂交外(图 2E, F, G),仅能同草菇 DNA 带产生弱杂交带,与其它菌株的 DNA 则不杂交,表现出较强的特异性。

2.3 不同酶切样品中 DNA 带的分子量计算

三种识别四个 GC 对的限制酶作用 12 株高等担子菌总 DNA,在琼脂糖凝胶上显现的

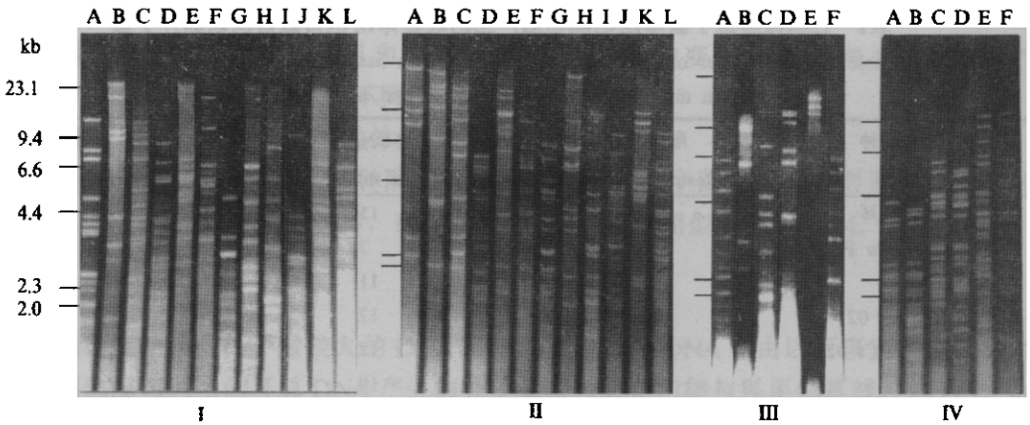


图1 HaeIII、CfoI、MspI 酶切 12 个菌株总 DNA 显现的线粒体 DNA 图谱

Fig.1 mtDNA band patterns of 12 basidiomycetous strains by digesting their genomic DNA with four-GC-cutter restriction enzymes, HaeIII, CfoI and MspI, respectively

(I) *P. sajor-caju* FWG (A, B, C), *L. edodes* Cr02 (D, E, F), *V. volvacea* V4 (G, H, I), *A. bisporus* ZN1 (J, K, L); (II) *F. velutipes* F10 (A, B, C), *A. aegirita* ZZITG (D, E, F), *P. nameko* HG (G, H, I), *H. marmoreus* ZIG (J, K, L); (III) *G. lucidum* CZ6 (A, B, C), *H. erinaceus* H6 (D, E, F); (IV) *P. chrysosporium* BKM-F-1767 (A, C, E), ME-446 (B, D, F).

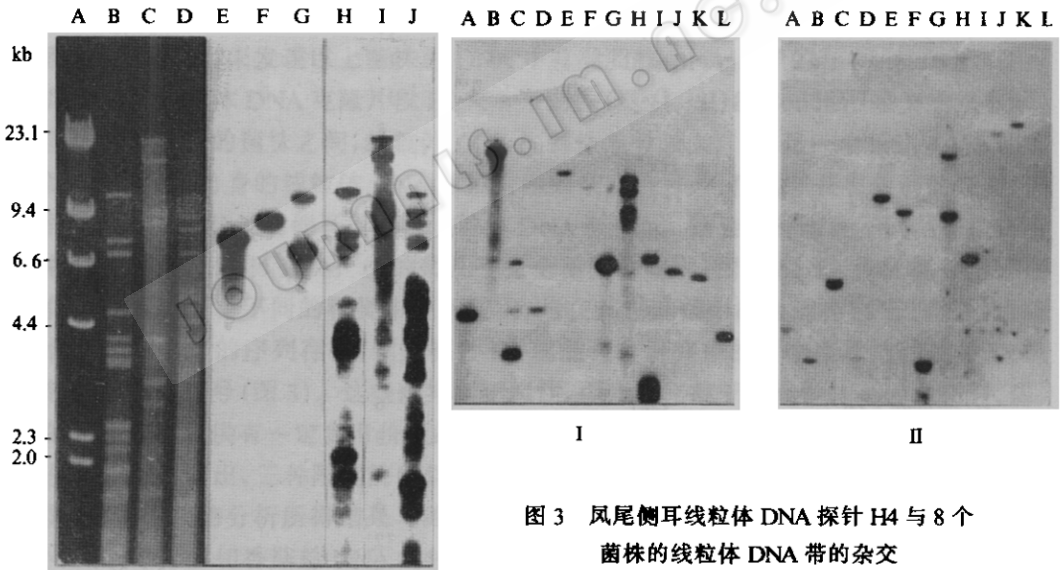


图2 三种识别四 GC 对限制酶酶切凤尾侧耳总 DNA 及杂交结果

HaeIII(B, E, H), GfoI(C, F, I), MspI(D, G, J) 酶切凤尾侧耳总 DNA 与 H2 探针的杂交(E—G)和与凤尾侧耳线粒体 DNA 探针的杂交(H—J), A 为 HindIII 酶切 λ DNA 标准分子量。

Fig.2 Restriction and hybridization analysis of total DNA of *P. sajor-caju* FWG

HaeIII(lane B, E, H), CfoI(C, F, I) and MspI(D, G, J); probing with mtDNA(H, I, J) and cloned mitochondrial fragment H2(E, F, G), respectively.

图3 凤尾侧耳线粒体 DNA 探针 H4 与 8 个菌株的线粒体 DNA 带的杂交
各道样品的排列顺序同图 1(I), (II)。

Fig.3 Hybridization of mtDNA fragments of 8 strains with cloned mtDNA fragment H4
The content of each lane is same as that of (I) and (II) in Fig.1.

表1 12株高等担子菌总DNA酶切后产生的线粒体DNA带数目及累加分子量

Table 1 The number of mtDNA bands emerged from basidiomycetous genomic DNA digested with three four-GC-cutter enzymes and their summated sizes

| 菌 种 | 限制酶种类 | 线粒体DNA片段数 | 累加分子量 (kb) |
|------------------------------------|--------------------|-----------------------|---------------|
| Strain | Restriction enzyme | Number of mt DNA band | Summated size |
| 凤尾侧耳 | HaeIII | 15 | 61 |
| <i>P. sajor-caju</i> FWG | CofI | 7 | 73 |
| | MspI | 11 | 63 |
| | HaeIII | 12 | 50 |
| 香菇 Cr 02 | CofI | 12 | 50 |
| <i>L. edodes</i> Cr 02 | MspI | 10 | 69 |
| | HaeIII | 8 | 23 |
| | CofI | 11 | 45 |
| 草菇 V4 | MspI | 8 | 34 |
| <i>V. volvacea</i> V4 | HaeIII | 8 | 40 |
| | CofI | 14 | 53 |
| | MspI | 9 | 51 |
| 双孢蘑菇浙农1号 | HaeIII | 6 | 51 |
| <i>A. bisporus</i> ZN1 | CofI | 10 | 87 |
| | MspI | 11 | 73 |
| | HaeIII | 15 | 60 |
| 金针菇 | CofI | 11 | 77 |
| <i>F. velutipes</i> F10 | MspI | 8 | 43 |
| | HaeIII | 10 | 41 |
| | CofI | 10 | 59 |
| 柱状田头菇 | MspI | 16 | 60 |
| <i>A. aegirita</i> ZZTIG | HaeIII | 9 | 40 |
| | CofI | 13 | 66 |
| | MspI | 12 | 53 |
| 滑 菇 | HaeIII | 11 | 38 |
| <i>P. nameko</i> HG | CofI | 6 | 39 |
| | MspI | 9 | 41 |
| | HaeIII | 9 | 60 |
| 真姬菇 | CofI | 6 | 60 |
| <i>H. mamoreus</i> ZJG | MspI | 12 | 59 |
| | HaeIII | 8 | 25 |
| | CofI | 12 | 49 |
| 灵芝 川芝6号 | MspI | 17 | 87 |
| <i>G. lucidum</i> CZ6 | HaeIII | 8 | 25 |
| | CofI | 13 | 56 |
| | MspI | 15 | 81 |
| 猴 头 H6 | HaeIII | 9 | 60 |
| <i>H. erinaceus</i> H6 | CofI | 6 | 60 |
| | MspI | 12 | 59 |
| 黄孢平革霉BKM-F-1767 | HaeIII | 8 | 25 |
| <i>P. chrysosporium</i> BKM-F-1767 | CofI | 12 | 49 |
| | MspI | 17 | 87 |
| 黄孢平革霉ME-446 | HaeIII | 8 | 25 |
| <i>P. chrysosporium</i> ME-446 | CofI | 13 | 56 |
| | MspI | 15 | 81 |

注：凡是在 EB 染色的琼脂糖凝胶道上出现很亮的带，被认为包含了至少两个分子量相近的片段，在计算片段数和总分子量时被加了两次。

Note: Some brighter bands on the same lane of agarose gel were supposed to contain at least two fragments with similar size and their molecular weight was doubled in the size summation.

线粒体 DNA 带数目及其累加分子量见表 1。从表 1 和图 1 可以看出: 相同菌株用不同限制酶酶切后, 线粒体 DNA 带的数目和累加分子量都有较大的变化; 同种酶在不同菌株中产生的线粒体 DNA 带也几乎完全不同。

2.4 黄孢原毛平革霉两菌株线粒体的种内多态性

根据相似系数的公式, 将三种酶切黄孢原毛平革霉两个菌株产生的明显可区分的线粒体 DNA 带分别相加, 得 $N_x=37$, $N_y=36$, $N_{xy}=27$, 算得相似系数 $F=0.74$ 。

3 讨论

本研究结果中分子量较大的 DNA 带来源于线粒体 DNA 可由以下事实来支持: (1) 三种限制酶酶切凤尾侧耳总 DNA 产生的分子量较大的带均能与凤尾侧耳线粒体 DNA 杂交(图 2); (2) 克隆的凤尾侧耳线粒体 DNA 探针 H4 能与测试过的酶切 DNA 中的 1~3 条 DNA 带杂交(图 3); (3) 高等担子菌总 DNA 经酶切后能在琼脂糖凝胶上直接显带的有线粒体 DNA、核 DNA 重复序列以及类质粒 DNA。Raeder 曾报道高等担子菌核 DNA 中的重复序列约占总 DNA 的 5%, GC 含量 53%, 与核 DNA 的 59%GC 含量极为相似^[15], 识别四个 GC 对的限制酶可将它切成很小的片段(理论长度约 200bp)。但是, 高等担子菌线粒体 DNA 的 GC 含量一般只有 30~40%^[16], 经上述限制酶完全酶切后应产生分子量较大的片段, 能与小片段的核 DNA 分开并显带。另外, 通过脉冲场凝胶电泳 (CHEF) 和 0.5% 的常规琼脂糖凝胶电泳, 未发现以上菌株总 DNA 中有类质粒 DNA 分子的存在。

凤尾侧耳线粒体 DNA 克隆片段 H2 与 8 个菌株(图 1I, II)的 Southern 杂交结果显示, 在这些同为伞菌目的菌株之间, 线粒体 DNA 同源性差异较大。H2 是一个长达 4.1kb 的片段, 除与凤尾侧耳自身的线粒体 DNA 片段有强的杂交信号外, 仅与草菇有较弱的杂交, 但该片段能与 8 个试验过的侧耳属菌株线粒体 DNA 杂交^[13]。结合同种酶在不同菌株中产生的线粒体 DNA 带和 H4 杂交产生的带几乎完全不同的结果(图 1, 图 3), 推测高等担子菌线粒体基因组序列在不同的种类中差异较大, 与在其它真菌中的报道相似^[12]。但是, 也确实有进化上比较保守的序列存在, 例如探针 H4 就能与本研究中的 8 个菌株的线粒体 DNA 产生较强的杂交信号(图 3)。这些差异和相似性, 可为研究担子菌线粒体基因组在科、属、种级的系统演化提供有一定参考价值的信息。

从表 1 可以看出, 三种限制酶酶切相同总 DNA 所获得的线粒体 DNA 分子量有明显的差异, 有的限制酶分析所得结果与纯化的线粒体 DNA 大小相近, 如 *CoFI* 酶切凤尾侧耳总 DNA 和 *MspI* 酶切香菇总 DNA 的线粒体 DNA 带与已报道的结果比较接近^[17,18]。但有的限制酶酶切结果则与纯化的线粒体 DNA 大小差异较大, 如三种酶酶切双孢蘑菇总 DNA 产生的线粒体 DNA 带的累加分子量都与已报道的结果有较大差异^[19], 这可能是该属不同种或菌株间线粒体 DNA 的分子量变化较大所致。类似结果在大肥菇 (*A. bitorquis*) 与亲缘关系极近的褐变菇 (*A. brunnescens*) 中已有报道, 它们的线粒体 DNA 分子量相差达一倍之多^[2]。因此, 利用识别四个 GC 对的限制酶在总 DNA 中研究线粒体 DNA 时, 尤其是用来估计线粒体 DNA 分子量和进行基因定位时, 选用几种酶比只使用一种酶更具有代表性, 在进行线粒体 DNA 的 RFLP 分析时, 也具有更高的灵敏度。

参 考 文 献

- [1] Kurland C G. *Bioessays*, 1992, 14(10): 709~714.
- [2] Taylor J W. *Exp Mycol*, 1986, 10: 259~269.
- [3] 孙 狄. 真菌学报, 1990, 9: 81~92.
- [4] Mills S D, Forster H, Coffey M D. *Mycol Res*, 1991, 95: 31~48.
- [5] Lecellier G, Silar P. *Curr Genet*, 1994, 25: 122~123.
- [6] Marriot A C, Archer S A, Buck K W. *J Gen Microbiol*, 1984, 130: 3001~3008.
- [7] Spitzer E D, Lasker B A, Travis S J *et al.* *Infect Immun*, 1989, 57: 1409~1412.
- [8] Typas M A, Griffen A M, Bainbridge B W *et al.* *FEMS Microbiol let*, 1992, 95: 157~162.
- [9] Crous P W, Janse B J H, Tnubridge J *et al.* *Mycol Res*, 1995, 99: 1098~1102.
- [10] 曾凡亚, 张义正. 食用菌学报, 1996, 3(3): 13~17.
- [11] Garber R C, Yoder O C. *Anal Biochem*, 1983, 135: 416~422.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY: 1989.
- [13] 曾凡亚, 汤海妹, 张义正. 四川大学学报, 1996, 33: 438~442.
- [14] Nei M, Li W H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 5269~5273.
- [15] Raeder U, Broda P. *Methods In Enzymology*, 1988, 161: 211~220.
- [16] Kurtzman C P. *Molecular taxonomy of the fungi*. In: *Gene manipulations in fungi*. Academic Press, Orlando, Fla. 1985.
- [17] Byun M O, Kim K S, You C H *et al.* *Korean J Mycol*, 1994, 22(2): 117~121.
- [18] Matsumoto T, Fukkumasa-nakai Y. *Mycol Res*, 1995, 99: 562~566.
- [19] Hintz W E, Anderson J B, Horgen P A. *Curr Genet*, 1988, 14: 43~49.

ANALYSIS OF HIGHER BASIDIOMYCETOUS MITOCHONDRIAL
DNA WITH FOUR-GC-CUTTER RESTRICTION ENZYMES

Zeng Fanya Tang Haimei Zhang Yizheng

(Biotechnology Department, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract The mitochondrial DNA band patterns emerged from basidiomycetous genomic DNA digested with four-GC-cutter restriction enzymes, HaeIII, CfoI and MspI, were reported in this paper. It was demonstrated that mtDNAs of higher basidiomycetes had abundant diversity after comparison of their band patterns, summated sizes, the number of fragments and homology among 12 strains of *Agaricales*, *Aphyllphorales*. The results also showed that the technique, displaying fungal mtDNA bands directly from their total DNA, would be more efficient and sensitive for analyses of fungal mtDNA RFLP if several four-GC-cutter restriction enzymes, instead of one, were used.

Key words Higher basidiomycetes, Mitochondrial DNA, RFLP analysis