

香菇反转录转座子间扩增多态性 (IRAP)PCR反应体系的研究

肖扬,李黎,刘伟,边银丙
(华中农业大学应用真菌研究所,武汉 430070)

摘要:为了开发香菇反转录转座子间扩增多态性标记(IRAP),建立稳定的IRAP-PCR反应体系,对影响IRAP-PCR的主要因素进行了优化筛选。确定了最佳反应体系为:20 μl反应体系中,包含30 ng模板DNA,0.30 μmol/L引物,0.3 mmol/L dNTPs,2.0 mmol/L Mg²⁺及0.75 U Taq酶。梯度PCR试验筛选得到的最佳退火温度为56.1℃。采用上述最佳反应体系和引物LTR1L-MarY1L对香菇18个菌株进行了IRAP-PCR扩增,验证了该体系的可靠性。

关键词:香菇;反转录转座子;IRAP-PCR;体系优化

中图分类号:S646.1+2 **文献标识码:**A

Study on PCR Reaction System of Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) in *Lentinula edodes*

Xiao Yang, Li Li, Liu Wei, Bian Yinbing

(The Institute of Applied Mycology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: The main factors affecting IRAP-PCR amplification were optimized in order to develop inter-retrotransposon amplified polymorphism marker and to establish stable IRAP reaction system in *Lentinula edodes*. The optimal IRAP-PCR system was as follows, within 20 μl reaction system, there were 30 ng template DNA, 0.3 μmol/L primer, 0.3 mmol/L dNTPs, 2.0 mmol/L Mg²⁺ and 0.75 U Taq DNA polymerase. The optimal annealing temperature was determined as 56.1℃ by gradient PCR. Based on the optimal IRAP-PCR system, primer combination LTR1L and MarY1L was used to amplify genomic DNA of eighteen strains. Results indicated that the optimal IRAP-PCR system is reliable.

Key words: *Lentinula edodes*, retrotransposon, IRAP-PCR, system optimization

反转录转座子是一种可移动的遗传元件,通过RNA中间体进行反转录转座,普遍存在于真核生物基因组中^[1]。反转录转座子在基因组中广泛存在且丰度高,可用于分子标记的开发,Kalendar et al(1999)开发出基于反转录转座子插入位点间多态性的分子标记(Inter-retrotransposon amplified polymorphism,IRAP)^[2]。目前,该标记方法已经成功应用于分子指纹图谱构建、亲缘关系分析、遗传连锁图谱构建及基因定位等诸多

领域的研究中^[3-5],但该标记技术在真菌中应用极少,仅在腊蘑属菌根菌 *Laccaria bicolor* 及松茸(*Tricholoma matsutake*)中有相关报道^[3,6-7]。笔者通过筛选香菇IRAP-PCR反应体系中各因素的最佳组合,旨在建立理想的IRAP-PCR反应体系,为进一步利用该标记技术开展香菇遗传多样性分析、种质资源评价、系统发育分析等研究奠定基础。

基金项目:农业部公益性行业(农业)科研专项项目“食用菌菌种质量评价与菌种信息系统研究与建立”(nyhyzx07-008);农业部948项目“食用菌优异种质与优质安全生产技术引进与创新”(2006-G11(3)-7)。

第一作者简介:肖扬,男,1979年出生,讲师,在职博士研究生,主要从事应用真菌生物技术研究。通信地址:430070 湖北武汉市洪山区狮子山1号华中农业大学应用真菌研究所, Tel: 027-87282221, E-mail: xiaoyang@mail.hzau.edu.cn。

通讯作者:边银丙,男,1963年出生,教授,博士生导师,主要从事蕈菌遗传育种研究。通信地址:430070 湖北武汉市洪山区狮子山1号华中农业大学应用真菌研究所, Tel: 027-87282221, E-mail: bianyinbing@mail.hzau.edu.cn。

收稿日期:2008-12-09, **修回日期:**2009-01-12。

1 材料和方法

1.1 试验时间和地点

试验于2008年在华中农业大学应用真菌研究所进行。

1.2 试验材料

香菇供试野生菌株 HW049 为该研究所保藏菌株。Taq 酶及 dNTPs 及分子量 marker(DL2000)均购自大连 Takara 生物技术公司。该研究所开发设计的 IRAP 引物 LTR1L (5'-aaagtacgcagcccctatca-3') 及 MarY1L (5'-gtgccctgtgtgttttct-3'), 由上海生工生物技术公司合成。

1.3 基因组 DNA 提取及检测

采用 SDS 法提取基因组 DNA, DNA 浓度与纯度用 SHIMADZU UV-1700 紫外分光光度计测定, 并将 DNA 浓度稀释为 50 ng/ μ l。

1.4 PCR 反应体系

参照前人研究及预备试验结果, 设定 PCR 基本反应体系为: 20 μ l 体系中含有 1 U Taq 酶, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 25 ng 模板 DNA, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.30 μ mol/L 引物, 1 \times PCR Buffer。PCR 反应各因素浓度优化条件见表 1。按照模板 DNA、引物、dNTPs、 Mg^{2+} 、Taq 酶的顺序依次进行单因素筛选, 每次都将在上一次筛选到的某个因素的最佳值, 作为固定值使用到下一个因素的筛选中, 每个处理设 2 次重复。

表1 IRAP-PCR 反应各因素的浓度水平

因素	浓度水平							
Template DNA/ng	10	20	30	40	50	60	70	80
Primer/(μ mol/L)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
dNTPs/(mmol/L)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
Mg^{2+} /(mmol/L)	0.50	1.00	1.50	2.00	2.25	2.50	2.75	3.00
Taq DNA polymerase/U	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00

PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶以 3.5 V/cm 电压电泳分离, EB 染色后于 GL200 凝胶成像系统下拍照(Kodak 公司)。

1.5 退火温度优化

以试验确定的最佳反应体系为基础, 在 MyCycler 梯度 PCR 仪(Bio-Rad 公司)上进行最佳退火温度筛选, 以 55 $^{\circ}$ C 为中段, 设置温度最小为 50 $^{\circ}$ C, 最大为 60 $^{\circ}$ C, 自动形成 8 个梯度: 60.0 $^{\circ}$ C, 59.2 $^{\circ}$ C, 58.0 $^{\circ}$ C, 56.1 $^{\circ}$ C, 53.7 $^{\circ}$ C, 51.9 $^{\circ}$ C, 50.7 $^{\circ}$ C, 50.0 $^{\circ}$ C。每个梯度设 2 个重复, 其它反应程序均与 PCR 单因素筛选试验相同。

1.6 优化体系的应用

根据上述试验确定的最佳反应体系和条件, 使用引物 LTR1L-MarY1L 扩增 18 个香菇菌株, 以检测所筛选得到体系的稳定性和可靠性。

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 浓度对 IRAP-PCR 反应结果的影响

从图 1 可以看出, 当模板 DNA 浓度为 10~80 ng 时均得到扩增产物。在 10~20 ng 时, 扩增量少, 部分条带模糊或者缺失。30 ng 和 40 ng 时, 扩增结果趋于稳定, 谱带清晰, 特异性较强。模板 DNA 浓度达 50 ng 以上时, 非特异性扩增明显增多, 谱带逐渐模糊。在 20 μ l 反应体系选用 30 ng 较合适。

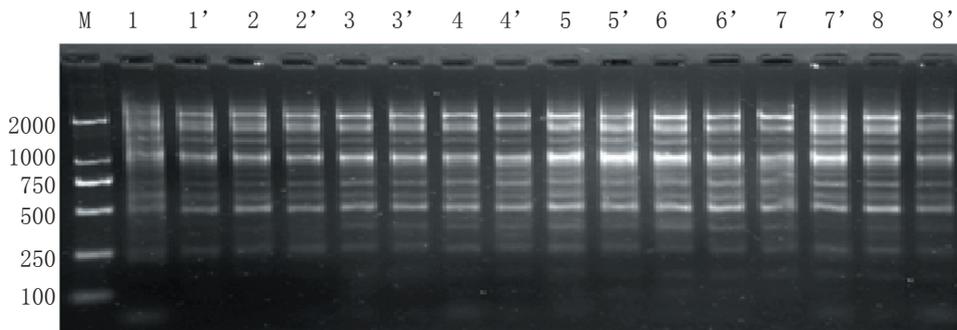


图1 模板 DNA 浓度梯度筛选试验结果

注: 1~8 泳道对应的模板 DNA 浓度依次为 10~80 ng, 1'~8' 泳道为相应处理的重复。

2.2 引物浓度对IRAP-PCR反应结果的影响

设计8个引物浓度梯度,结果表明(图2)不同引物浓度对IRAP反应的影响较大,引物浓度在0.3 $\mu\text{mol/L}$ 和0.4 $\mu\text{mol/L}$ 条带清晰稳定,引物浓度偏低或偏高时都会出现条带模糊或缺失的现象。该试验确定引物浓度0.3 $\mu\text{mol/L}$ 为最佳水平。

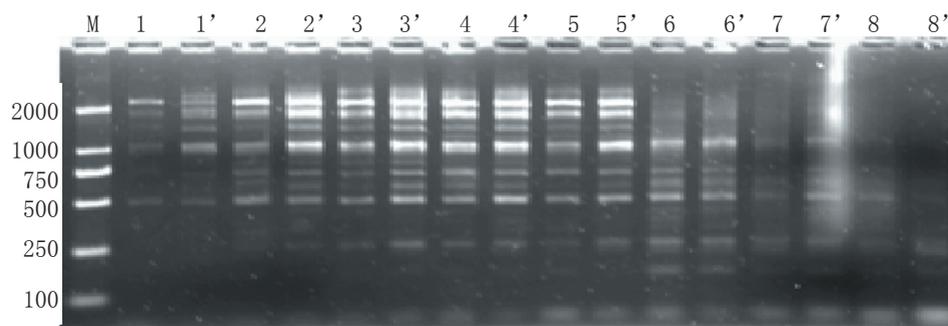


图2 引物浓度梯度筛选试验结果

注:1~8泳道对应的引物浓度依次为0.1~0.8 $\mu\text{mol/L}$, 1'~8'泳道为相应处理的重复。

2.3 dNTPs浓度对IRAP-PCR反应结果的影响

如图3所示,当dNTPs浓度在0.1 mmol/L和0.2 mmol/L时,扩增信号较弱,谱带模糊缺失。当dNTPs浓度大于0.3 mmol/L时,浓度对PCR反应体系影响较小,谱带基本趋于稳定。该试验确定0.3 mmol/L为dNTPs最佳水平。

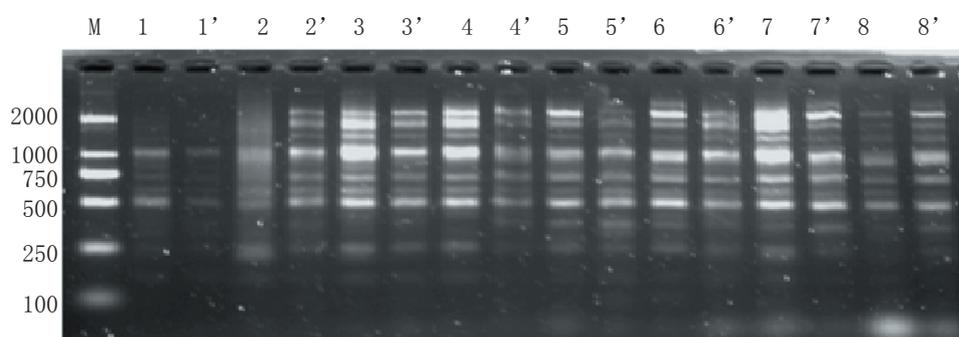


图3 dNTPs浓度梯度筛选试验结果

注:1~8泳道对应的dNTPs浓度依次为0.1~0.8 mmol/L, 1'~8'泳道为相应处理的重复。

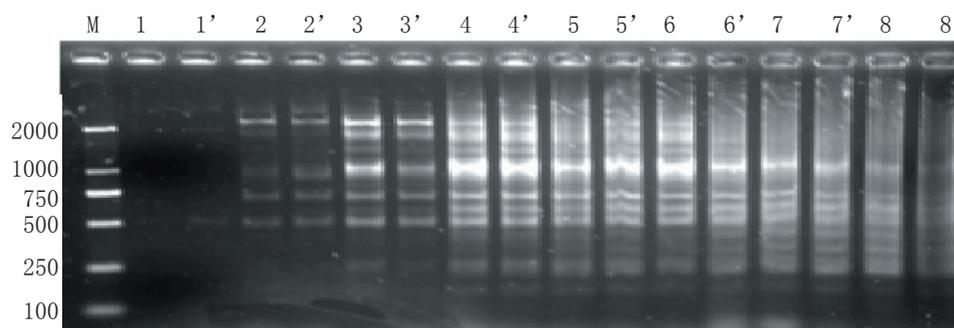


图4 Mg^{2+} 浓度梯度筛选试验结果

注:1~8泳道对应的 Mg^{2+} 浓度依次为0.5、1.0、1.5、2.0、2.25、2.5、2.75、3.0 mmol/L, 1'~8'泳道为相应处理的重复。

2.4 Mg^{2+} 浓度对IRAP-PCR反应结果的影响

试验表明, Mg^{2+} 对IRAP反应结果影响很大(图4)。 Mg^{2+} 为0.5 mmol/L时,没有扩增出特异性条带,在1.0 mmol/L时条带少且模糊,在1.5 mmol/L和2.0 mmol/L时,条带数量多且清晰,但在2.0 mmol/L时扩增产物更多,条带更清晰,当 Mg^{2+} 浓度大于2.0 mmol/L时,谱带模糊,非特异性扩增产物增加。因此, Mg^{2+} 浓

度选用2.0 mmol/L较理想。

2.5 Taq酶浓度对IRAP-PCR反应结果的影响

由图5可知,当Taq酶用量为0.25 U时,几乎无扩增产物,当用量为0.5 U和0.75 U时谱带较清晰稳定,但在0.75 U时,谱带更清晰、条带更多。用量大于0.75 U时,非特异性扩增升高,谱带模糊。因此,Taq酶用量以0.75 U为宜。

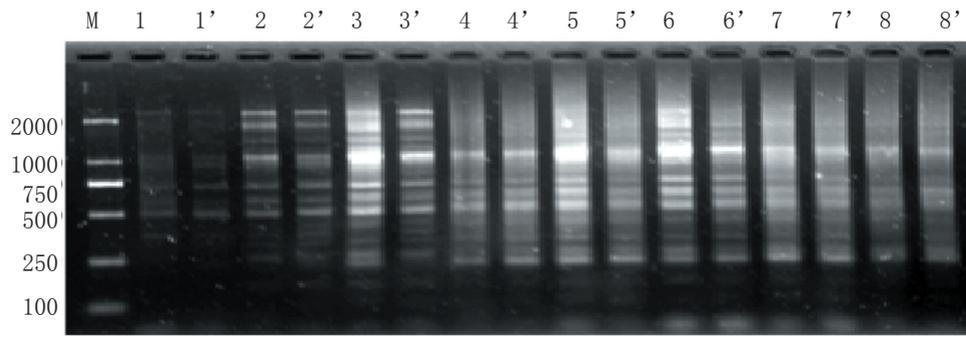


图5 Taq酶浓度梯度筛选试验结果

注:1~8泳道对应的Taq酶浓度依次为0.25,0.5,0.75,1.0,1.25,1.5,1.75,2.0 U, 1'~8'泳道为相应处理的重复

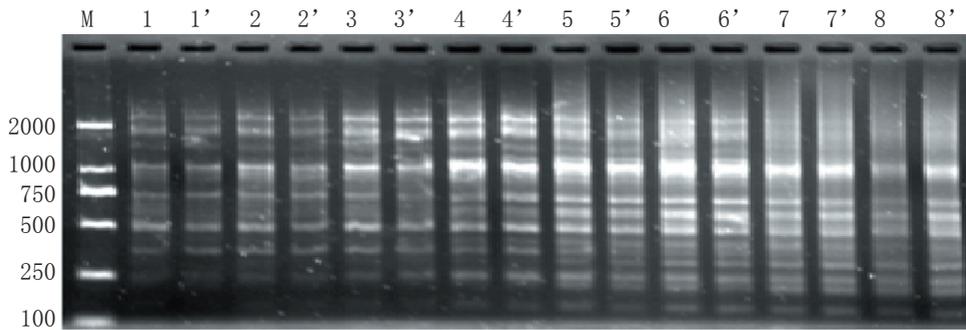


图6 不同退火温度下PCR扩增结果

注:1~8泳道对应的退火温度依次为60,59.2,58.0,56.1,53.7,51.9,50.7,50℃, 1'~8'泳道为相应处理的重复。

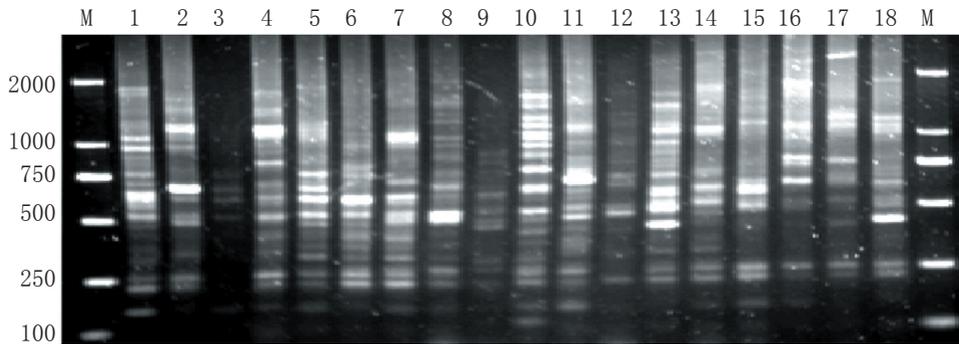


图7 应用最佳IRAP反应体系对18个菌株的SSR扩增结果

注:1~18泳道对应的菌株依次为武6, H55, SHL29, HN001, G059, HW028, HW049, YUN106, YUN039, YUN109, G062, SHX020, HW016, HW084, HW037, G057, DL1, HN002。

2.6 退火温度优化

结果如图6所示,在设定的8个退火温度下,随着温度的降低,非特异性扩增显著增加。当退火温度在60℃,59.2℃,58.0℃,56.1℃时,扩增条带较少,在2000 bp附近有两条特异性条带。当温度低于53.1℃以下时,随着温度的降低,此两条带逐渐消失,同时250 bp附近的非特异性条带逐渐增多。综合考虑谱带的信息量和条带的特异性,退火温度选择56.1℃为宜。

2.7 最佳反应体系的应用

采用香菇18个栽培及野生菌株来验证上述最佳IRAP-PCR反应体系的可靠性。从图7中可以看出,引

物LTR1L和MarY1L在18个菌株中均能有效扩增,谱带清晰、多态性高,扩增产物大小集中在250~2000 bp左右。该引物组合在18个菌株中共扩增出205条带,菌株中扩增出的条带数介于3~20条之间,平均每个菌株11.4条。除250 bp左右的两条带为大多数菌株共有外,每个菌株的扩增结果间均存在较大差异。

3 结论和讨论

该研究首次对影响香菇IRAP-PCR反应体系的各个因素进行了优化,建立了最佳反应体系。20 μl体系包括30 ng模板DNA,0.30 μmol/L引物,0.3 mmol/L dNTPs,2.0 mmol/L Mg²⁺及0.75 U Taq酶。PCR反应程

序为:94℃预变性4 min;94℃变性40 s,56.1℃退火40 s,72℃延伸2 min,32个循环;72℃延伸7 min。

作为一种基于PCR的分子标记方法,IRAP反应体系易受多种因素的影响,同时各因素间又存在相互作用。以往的单因素优化设计试验通常是分别进行各因素最佳水平的筛选,然后将其组合,并未考虑多因素间的相互作用。该研究中,笔者采用单因素循环筛选的方法^[8-9],每次都将在上一次筛选到的某个因素的最佳水平,作为固定值使用到下一个因素的筛选中,依次确定各因素最佳水平,然后进行组合,结果更理想。

除上述因素外,不同公司生产的Taq酶及Taq酶与PCR Buffer的相互作用对试验结果影响也很大。在研究过程中,曾使用其它两种品牌的Taq酶,但谱带模糊且信号微弱,将Takara Taq酶配合其它品牌的PCR Buffer使用,扩增结果也不理想。不同公司生产的酶的性能和质量有所不同,PCR Buffer的组分及pH值也不尽相同,需根据具体情况选用。

反转录转座子在基因组中广泛分布,根据其两端的长末端重复序列(LTR)设计引物,通过PCR扩增来检测反转录转座子插入位点间DNA序列长度的多态性,这就是IRAP的基本原理。与常规标记相比,基于反转录转座子的标记具有灵敏度高、基因组覆盖度广和多态性丰富等特点,尤其适用于种质鉴定、遗传多样性及系统发育分析^[10]。使用IRAP和REMAP技术研究克里迈丁桔(*Citrus clementina*)时,可将用常规标记技术(RAPD、RFLP及AFLP)不能区分的芽变品种区分开来^[11]。Chadha和Gopalakrishna运用REMAP技术研究水稻条斑病菌(*Magnaporthe grisea*)时发现该技术产生的扩增条带多态性高,可以克服常规技术的局限性^[12]。Diez et al在研究*Laccaria bicolor*时,也认为IRAP技术完全可以用于区分菌根担子菌的菌丝和子实体^[5]。Murata et al使用IRAP技术研究松茸时发现亚洲菌株和美洲菌株都存在丰富的多态性^[6]。反转录转座子广泛分布于生物基因组中,具有丰富的多态性,在基因组进化中起着重要作用,因此,基于反转录转座子的IRAP标记技术在真菌遗传多样性分析、系统发育分析等研究领域将具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Kempken F, Kück U. Transposons in filamentous fungi—facts and perspectives. *BioEssays*,1998,20: 652-659.
- [2] Kalendar R, Grob T, Regina M, et al. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*,1999,98: 704-711.
- [3] Díez J, Béguiristain T, Tacon FL, et al. Identification of Ty1-copia retrotransposons in three ectomycorrhizal basidiomycetes: evolutionary relationships and use as molecular markers. *Current Genetics*,2003,43: 34-44.
- [4] Guo D, Zhang H, Luo Z. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. *Plant Science*,2006,170: 528 - 533.
- [5] Manninen O, Kalendar R, Robison J, et al. Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of major resistance gene for net blotch in barley. *Molecular and General Genetics*,2000,264: 325-334.
- [6] Murata H, Babasaki K, Yamada A. Highly polymorphic DNA markers to specify strains of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* based on σ marY1, the long terminal repeat of gypsy-type retroelement marY1. *Mycorrhiza*,2005,15: 179-186.
- [7] Sha T, Zhang H, Ding H, et al. Genetic diversity of *Tricholoma matsutake* in Yunnan province. *Chinese Science Bulletin*,2007,52 (9): 1212-1216.
- [8] 杜晓云,罗正荣.部分柿属植物IRAP反应体系的建立和指纹图谱构建. *农业生物技术学报*,2006,14(6):931-936.
- [9] 赵海艳,王秋锦,孙清鹏,等.茄子IRAP分子标记体系的建立与优化. *中国农学通报*,2008,24(2):75-80.
- [10] Miller WJ, Cappy P. Mobile genetic elements: Protocols and genomic applications. *Methods in Molecular Biology*, 2004,260: 146-171.
- [11] Bréto MP, Ruiz C, Pina JA, et al. The diversification of *Citrus clementina* Hort. Es Tan., a vegetatiely propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*,2001,21(2): 285-293.
- [12] Chadha S, Gopalakrishna. Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) markers for genetic diversity assessment of the rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*). *Genome*,2005,48: 943-945.