

# 平菇差异显示 PCR 产物特异条带的回收方法及再扩增效果

王年久, 马爱民\*

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

**摘 要:** 本实验采用一步法、直接法和沉淀法分别对平菇差异显示 PCR 银染产物中粗、细两种特异条带进行回收, 并进行再扩增效果比较。结果表明, 三种特异条带的回收方法中, 直接法操作简单、快速可行, 且再扩增效果优于一步法和沉淀法, 可有效应用于平菇 mRNA 差异显示实验。

**关键词:** 平菇; 差异显示; 一步法; 直接法; 沉淀法

Recovering Methods and Re-amplified Effects of Special Bands in Differential Display  
PCR Products in *Pleurotus ostreatus*

WANG Nian-jiu, MA Ai-min\*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Three methods including one-step method, direct method and deposited method were used to recover the thick and thin bands from the silver stained differential display PCR products in *Pleurotus ostreatus* and their re-amplification effects were evaluated. The results showed that the direct method is a rapid, simple and reliable method among the three different recovering methods. And its re-amplification effect is better than that of the one-step method and the deposited method. So it can be efficiently applied in mRNA differential display PCR experiment of *Pleurotus ostreatus*.

**Key words** *Pleurotus ostreatus*; differential display; one-step method; direct method; deposited method

中图分类号: Q943.2 S646.14

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0307-03

平菇, 又名糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*), 在分类学上隶属担子菌纲、伞菌目、白蘑科、侧耳属。平菇含有丰富的蛋白质、碳水化合物、维生素 B 族和钾、钠、钙、镁、锰、铜、锌、硫等 14 种微量元素及 8 种必需氨基酸。此外, 平菇还含有平菇素(蛋白糖)和酸性多糖等生理活性物质, 对健康、长寿、防治肝炎病等作用甚大, 对防治癌症也有一定的效果<sup>[1]</sup>。

近年来, 国内外在平菇的分子生物学方面已开展了一系列的研究, 如转化系统建立<sup>[2]</sup>、遗传图谱构建<sup>[3]</sup>、分子核型分析<sup>[4]</sup>等。本实验室曾利用 mRNA 差异显示技术(differential display, DD-PCR)<sup>[5]</sup>对平菇菌丝体及不同发育阶段子实体进行研究, 获得了与子实体发育相关的 3 个差异表达基因<sup>[6]</sup>。同时, 在实验中也发现采用不同的差异条带回收方法将直接影响再扩增的效率, 进而影响整个实验的结果。本实验对平菇差异显示 PCR 产

物特异条带的回收方法及再扩增效果进行比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

供试平菇 739 菌株为本实验室保藏。

#### 1.1.2 试剂与工具酶

TRI<sup>®</sup> Reagent 试剂 美国分子研究中心;  
Superscript<sup>™</sup> II 反转录试剂 GIBCO BRL 公司; Taq DNA  
聚合酶、RNase-free DNase II、PCR Marker Takara 公  
司; 引物 北京奥科生物公司; 丙烯酰胺、N,N'-亚甲  
双丙烯酰胺及硝酸银试剂 Canalab 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 平菇菌丝体总 RNA 的提取及逆转录反应

收稿日期: 2007-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(39770530; 30170658)

作者简介: 王年久(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物及生物技术。E-mail: lilowang@163.com

\* 通讯作者: 马爱民(1965-), 男, 教授, 研究方向为食品生物技术。E-mail: maaamin@yahoo.com

按照 TRI<sup>®</sup>Reagent 试剂盒的使用说明提取供试平菇菌丝体总 RNA, 以 RNase-free DNase I 除去 DNA。用微量紫外分光光度计检测所提 RNA 的纯度与含量, 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。

分别用三种锚定引物 5' TTTTTTTTTTTTA/G/C3' 进行逆转录反应, 反应体系如下: 锚定引物 2  $\mu$ l, 5  $\mu$ g 总 RNA, 1  $\mu$ l dNTPs (10mmol/L each), 加入 DEPC 水至 12  $\mu$ l, 65 $^{\circ}$ C 5min, 立即置于冰上, 然后加入如下试剂: 5  $\times$  First-Strand 缓冲液 4  $\mu$ l, 0.1mol/L DTT 2  $\mu$ l, dNTP 2  $\mu$ l, SuperScript<sup>™</sup> II 反转录酶 0.25  $\mu$ l, 42 $^{\circ}$ C 1h, 70 $^{\circ}$ C 15min。

### 1.2.2 差异显示 PCR 扩增及产物分离

每种锚定引物分别与随机引物组合, 以反转录产物为模板进行 PCR 反应, 反应体系如下: 20  $\mu$ l 体系中加入 10  $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l, dNTP 2  $\mu$ l, 锚定引物 2  $\mu$ l, 随机引物 2  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l, Taq 酶 5U, 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 15s, 42 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 15s, 共 30 个循环, 然后 94 $^{\circ}$ C 15s, 42 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 7min。PCR 产物经 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 硝酸银染色。

### 1.2.3 差异显示 PCR 产物特异条带的回收及再扩增

银染结束后, 在凝胶的 3 个泳道上分别选取位置相同的一组粗条带和一组细条带, 按照下面三种方法进行回收。

#### 1.2.3.1 一步法

将切下的条带放入一只 0.5ml 的离心管中, 加入 50  $\mu$ l 无菌双蒸水, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜, 然后用小的针穿刺离心管的底部, 把穿刺管放入一只 1.5ml 离心管中, 离心 20s 后将洗脱液转移至新的 1.5ml 离心管中, 取 4  $\mu$ l 作为再扩增模板。

#### 1.2.3.2 直接法

将切下的条带用 1ml pH8.0 的 TE 缓冲液快速冲洗一遍, 然后用 1ml 无菌水洗一遍, 用枪头将胶带划成小块, 然后直接挑取一小块作为再扩增模板。

#### 1.2.3.3 沉淀法

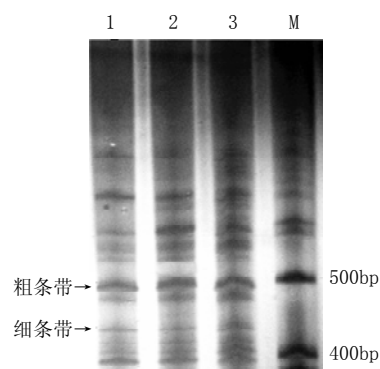
将切下的条带放入 1.5ml 的离心管中, 加入 1ml pH8.0 TE 缓冲液快速冲洗一遍, 然后加入 100  $\mu$ l TE 缓冲液, 用枪头碾碎胶条, 室温放置 15min 后, 100 $^{\circ}$ C 水浴 15min; 4 $^{\circ}$ C, 12000r/min 离心 2min, 上清转移到另一 1.5ml 离心管中; 加入 10  $\mu$ l 3mol/L 的 NaAc (pH5.2), 5  $\mu$ l 糖原 (10mg/ml), 450  $\mu$ l 无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜; 4 $^{\circ}$ C, 12000r/min 离心 15min 离心; 弃上清, 沉淀加入预冷的 70% 乙醇 200  $\mu$ l; 4 $^{\circ}$ C, 7500r/min 离心 5min 后弃上清, 空气干燥 3min; 沉淀加入 10  $\mu$ l 灭菌水, 溶解, 取 2  $\mu$ l 作为再扩增模板。

回收产物的再扩增程序同 1.2.2 中的 DD-PCR 程序, 再扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色。

## 2 结果与分析

### 2.1 差异显示 PCR 反应产物的变性聚丙烯酰胺电泳结果

为了保证不同回收方法挖取条带的一致性, 将同一种 PCR 产物分别点样后进行电泳和硝酸银染色, 结果见图 1。由图 1 可以看出, 电泳图谱清晰, 条带分布均匀 (图中箭头所示的粗条带和细条带均为单一条带, 分别代表高丰度和低丰度两类特异条带)。



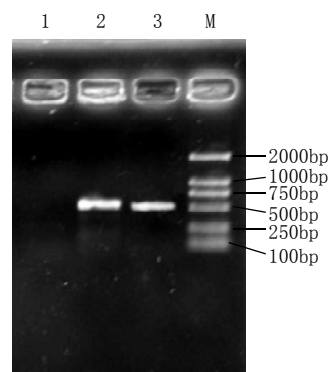
1、2、3. 相同 DD-PCR 产物; M. 500bp Marker。

图 1 DD-PCR 产物 8% 变性 PAGE 电泳图谱  
Fig.1 Electrophoresis diagram of DD-PCR products by 8% denatured PAGE

### 2.2 差异显示 PCR 产物特异条带的回收及再扩增效果

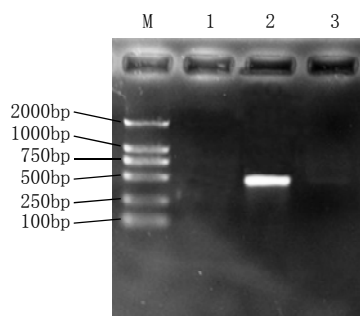
#### 2.2.1 PCR 产物中粗条带的回收及扩增效果

三种方法回收的粗条带其再扩增结果见图 2, 由图可知, 用沉淀法和直接法回收粗条带作为模板进行再扩增得到了特异性扩增产物, 而用一步法回收条带作为模板时未得到相应的扩增产物。



1. 一步法; 2. 直接法; 3. 沉淀法; M. 500bp Marker。

图 2 粗条带的再扩增电泳图谱  
Fig.2 Electrophoresis diagram of re-amplified thick bands



1. 一步法; 2. 直接法; 3. 沉淀法; M. DL2000 Marker。

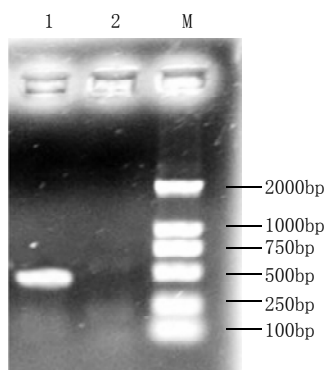
图3 细条带的再扩增电泳图谱

Fig.3 Electrophoresis diagram of re-amplified thin bands

### 2.2.2 PCR产物中细条带的回收及扩增效果

三种方法回收的细条带其再扩增结果见图3。由图3可知,直接法得到了特异性扩增产物,而一步法和沉淀法未得到相应的扩增产物。

取一步法和沉淀法的再扩增产物为模板进行再一次的扩增检验,结果如图4所示。沉淀法得到了相应的扩增产物,而一步法仍未得到特异扩增。这表明利用沉淀法回收差异条带的扩增效率较直接法低,而一步法进行回收扩增的效果不明显。



1. 沉淀法; 2. 一步法; M. DL2000 Marker。

图4 一步法和沉淀法再扩增产物的扩增图谱

Fig.4 Amplifying diagram of re-amplified products by one-step method, and deposited method

## 3 讨论

mRNA 差异显示技术为检测未知基因提供了一条新的途径,该技术在生物医学、动植物遗传育种、分化发育以及动物营养等领域倍受研究者的青睐<sup>[7]</sup>。从差异显示PCR产物PAGE胶中回收特异条带效率的高低,对后续的再扩增以及以再扩增为基础的纯化、克隆和测序具有至关重要的影响。

为了摸索出最佳的条带回收方法,提高差异显示技术的方便性和实用性,本实验在前人工作的基础上<sup>[8-9]</sup>,对平菇差异显示产物特异条带的回收方法和再扩增效果进行了探讨。多次重复实验的结果表明,三种特异条带回收方法中,直接法操作简便、快速,可当天出结果,扩增效果较明显。用沉淀法回收条带所得到的模板纯度较高,扩增效果也较好,但是其操作比较繁琐,模板的丢失量较大。而用一步法回收条带的扩增效果不明显。

### 参考文献:

- [1] 李月梅. 食用菌的功能成分与保健功效[J]. 食品科学, 2005, 25(8): 517-521.
- [2] HONDA Y, MATSUYAMA T, IRIE T, et al. Carboxin resistance transformation of the homobasidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. Curr Genet, 2000, 37: 209-212.
- [3] PARK S K, PENES M M, RAMIREZ L, et al. Genetic linkage map and expression analysis of genes expressed in the lamellae of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*[J]. Fungal Genet Biol, 2006, 43: 376-387.
- [4] LARRAYA L M, PEREZ G, PENAS M M, et al. Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(8): 3413-3417.
- [5] LIANG P, PARDEE A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257(5072): 967-971.
- [6] 马爱民, 关海山. 平菇子实体分化发育相关基因片段的克隆[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(4): 299-302.
- [7] 龙桂友, 饶力群. 基因差异表达分析技术进展[J]. 生命科学研究, 2004, 8(4): 48-52.
- [8] 李拥军, 敖红, 孙桂金. mRNA 差异显示技术中特异条带回收方法的比较[J]. 生物技术, 2005, 15(3): 43-44.
- [9] 王宏, 李春海, 陈高明, 等. mRNA差异显示技术中差异条带的回收与再扩增[J]. 中国肿瘤临床, 1999, 26(5): 350-351.