

影响农杆菌介导草菇遗传转化的因素研究

王 杰, 林俊芳, 郭丽琼

(华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642)

摘要:以草菇 *Volvariella volvacea* 菌株 V51 为受体材料, 用农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法转入抗冷冻蛋白基因(*afp*), 探索不同的转化受体、农杆菌种类、乙酰丁香酮(AS)的浓度、共培养的温度、时间等因素对转化效率的影响, 并采用 PCR 及 Southern 杂交检测 *afp* 基因是否整合到草菇的基因组中. 结果表明: 以 $D_{660\text{nm}}$ 为 0.15 的 EHA105 为侵染的农杆菌菌株, 加入 200 $\mu\text{mol/L}$ AS 进行预培养, 侵染菌丝球后转入含有 AS 为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 IMA 培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$, 共培养 60 h 为最佳转化条件. PCR 与 Southern 杂交结果证明 *afp* 基因已整合到草菇的基因组中.

关键词:草菇; 农杆菌; 遗传转化; 转化效率

中图分类号: S646.13

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)01-0038-04

Assessment of Factors Affecting the Transformation Efficiency of *Volvariella volvacea* Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

WANG Jie, LIN Jun-fang, GUO Li-qiong

(College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *afp* gene was transformed into *Volvariella volvacea* via *Agrobacterium tumefaciens*. We evaluated some critical factors influenced transfer efficiency, including explant, *Agrobacterium* strain, concentration of acetosyringone(AS), temperature and time of co-culture. The integration of *afp* gene into *V. volvacea* genome was determined by PCR and Southern blot. The results showed that effective transformation was acquired when mycelium pellets inoculated with *A. tumefaciens* strain EHA105 with a optical density at $D_{660\text{nm}}$ of 0.15, pre-culture with 200 $\mu\text{mol/L}$ AS, co-cultivation for 60 h at 28 $^{\circ}\text{C}$ on IMA medium containing 200 $\mu\text{mol/L}$ AS. *afp* gene had been introduced into *V. volvacea* with *Agrobacterium*-mediated transformation successfully.

Key words: *Volvariella volvacea*; *Agrobacterium tumefaciens*; transformation; transfer efficiency

草菇 *Volvariella volvacea* 是一种重要的食用菌, 营养丰富, 药食兼用. 但草菇存在着不耐低温、易退化等问题, 严重限制了其生产与流通^[1-2]. 由于常规的杂交育种方法进行草菇品种改良十分困难, 因此, 利用基因工程手段培育品质优良的草菇新菌株就显得尤为重要. 农杆菌介导的遗传转化系统是一种天然有效的遗传工程系统, 近年来已逐渐应用到真菌的遗传转化研究中. 本课题组将农杆菌 *Agrobacterium*

tumefaciens 介导法应用于草菇的遗传转化, 将从云杉蚜虫中克隆的抗冷冻蛋白基因(*afp*)转入草菇中^[3]. 本文利用 *afp* 基因提高生物对低温抵抗力的生物学特性, 以 *afp* 为筛选基因和目的基因, 就影响农杆菌介导的转化参数及条件进行研究, 以建立高效稳定的农杆菌介导的草菇遗传转化体系, 为草菇的基因工程改良奠定基础.

收稿日期: 2009-05-05

作者简介: 王 杰 (1978—), 女, 讲师, 博士, E-mail: wjcasey@scau.edu.cn; 通讯作者: 郭丽琼 (1963—), 女, 教授, 博士, E-mail: guolq@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2008A020100024, 2009B020201012); “十一五”国家科技支撑计划重点项目 (2008BADA1B02); 国家自然科学基金 (30871768); 华南农业大学校长基金 (5100-K08197)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 草菇 V51 菌株购于上海市农科院食用菌研究所; *E. coli* DH5 α 、根癌农杆菌 EHA105 (Rif^r、Strep^r)、LBA4404 (无抗性)、A281 (Rif^r、Nal^r) 由华南农业大学食品学院生物炼制研究室保存;带有双孢蘑菇 *gpd* 启动子和 *afp* 基因的双元表达载体 pAg-afp₂₃₅ 为本华南农业大学食品学院生物炼制研究室所构建。

1.1.2 试剂与培养基 壮观霉素 (Spec)、硫酸链霉素 (Stre)、利福平 (Rif)、萘啶酮酸 (Nal)、头孢霉素 (Cefotaxime)、羧苄青霉素 (Carbenicillin)、二甲基亚砷 (DMSO)、乙酰丁香酮 (AS)、2-(N-吗啡啉)乙磺酸 (MES) 等购于 Sigma 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

诱导培养基 (Induced medium, IM): 20 × AB salts 50 mL, Na₂HPO₄ 0.356 g, 1 mol/L MES 40 mL, 葡萄糖 5 g, 加去离子水定容至 1 000 mL; 固体诱导培养基 (IMA): 20 × AB salts 50 mL, Na₂HPO₄ 0.356 g, 葡萄糖 5 g, 琼脂粉 15 g, 加去离子水定容至 960 mL, 高压灭菌, 待冷却至 50 ℃ 时加入 1 mol/L MES 40 mL; 液体培养基 (PDSB): 新鲜土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, 磷酸二氢钾 3 g, 硫酸镁 1.5 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL; 选择培养基 (Selective medium, SM): 含 cef 和 Car 各 200 μg/mL、琼脂 8 g/L 的 PDSA 培养基。

1.2 方法

1.2.1 拟转化子低温筛选条件的建立 将准备好的 V51 转化受体转入预培养好农杆菌菌液中进行侵染, 侵染结束后, 将转化受体转入放有 1 层无菌滤纸的 IMA 培养基上, 进行共培养, 然后在共培养平板上覆盖 1 层选择培养基, 34 ℃ 培养至菌丝长出, 取小菌块于 PDA 板上, 经 10、15、20、25、30、35、40 和 45 h 处理后取出, 置于 34 ℃ 培养。

1.2.2 草菇转化受体的制备 菌丝碎片的制备: 取培养好的 V51 平板, 挑取菌丝接入 PDSB 中, 于 34 ℃ 静止培养 3~4 d, 收集培养好的菌丝, 剔除培养基块后, ddH₂O 冲洗 2 次, 吸去多余的水分, 用无菌的研磨器将菌丝研磨成碎片, 用于农杆菌介导的遗传转化。

草菇菌丝球的制备: 取培养好的 V51 平板, 用接种刀将菌丝切割成细小的小块, 接入 PDSB 中, 于 34 ℃、170 r/min 培养 3~4 d。将培养好的菌丝球过滤收集, 剔除带有培养基的大菌丝球, 用 ddH₂O 冲洗 2 次, 过滤收集小菌丝球, 用于农杆菌介导的遗传转化。

1.2.3 农杆菌菌株及菌液浓度对草菇遗传转化的影响 制备农杆菌电激感受态细胞, 采用电激法将载体 pAg-afp₂₃₅ 导入 EHA105、LBA4404、A281 这 3 种农杆菌菌株中。活化 3 种农杆菌工程菌株, 离心收集菌体后, 加入 IM 培养基, 调整菌液浓度使其 $D_{600\text{nm}}$ 分别为 0.05、0.10、0.15、0.20 和 0.25, 侵染等量的草菇转化受体, 侵染后转化受体转入含有 100 μmol/L AS 的 IMA 培养基上, 300 ℃, 共培养 72 h, 0 ℃ 筛选拟转化子, 比较农杆菌菌株及菌液浓度对转化效率的影响。上述试验平行进行 3 次。

1.2.4 预培养与共培养时 AS 含量对草菇遗传转化的影响 以 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.15 的 EHA105 为侵染农杆菌菌株, 预培养时加入 AS 使其终浓度分别为 0、100、200、300 和 400 μmol/L, 侵染等量的草菇转化受体, 在其他条件相同的情况下, 观察预培养时 AS 的量对转化效率的影响。

在其他条件相同的情况下, 侵染后转化受体转入 AS 浓度分别为 0、100、200、300 和 400 μmol/L 的 IMA 培养基上, 研究共培养时 AS 的量对转化效率的影响。上述试验平行进行 3 次。

1.2.5 共培养温度与时间对草菇遗传转化的影响 以 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.15 的 EHA105 为侵染的农杆菌菌株, 加入 200 μmol/L 的 AS 进行预培养, 侵染后转化受体转入 AS 浓度为 200 μmol/L 的 IMA 培养基上, 分别在 26、28、30、32 和 34 ℃ 共培养 72 h, 研究共培养温度对转化效率的影响。

其他条件相同的情况下, 培养时间分别设为 24、48、60、72 和 84 h, 共培养后 0 ℃ 筛选拟转化子, 确定共培养时间对转化效率的影响。上述试验平行进行 3 次。

1.2.6 拟转化子的 PCR 鉴定 挑取经过冷冻处理后恢复生长的拟转化子进行静止培养并收集菌丝, 提取草菇基因组 DNA。PCR 引物根据 *afp* 基因的序列设计, 即上游引物 F1: 5'-TATACCATGGACTG-CAGGAATCGGCACGA-3'; 下游引物 F2: 5'-CGAG-GTCGACATGGCTTAATTAGCACTG-3'。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 扩增片断长度为 421 bp。反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 50 s, 55 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环后在 72 ℃ 继续延伸 10 min。

1.2.7 转化子的 Southern blot 分析 分别取 PCR 阳性的草菇转化子和 V23 非转基因对照的基因组 DNA 15 μg 用 *Hind* III 限制性内切酶进行酶切, 37 ℃ 温浴过夜, 50 pg 质粒 DNA 用 *Hind* III 酶切作为阳性对照。酶切后的 DNA 在 8 g/L 的琼脂糖凝胶上进行电泳。

分离、DNA 印迹转膜、洗涤、预杂交和杂交、洗膜、显影以及探针标记等参照 Dig 试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 拟转化子低温筛选条件的确定

V51 草菇菌丝的耐低温试验结果表明, V51 菌丝在 0 °C 下的低温致死时间为 35 h。根据此结果, 确定拟转化子的筛选条件为: 从选择培养基上取小块转化的菌丝于 PDA 板上, 于 0 °C 放置 35 h, 取出放入 34 °C 培养 4~7 d 后, 有菌丝长出的视为拟转化子。

2.2 草菇转化受体

农杆菌介导的转化中, 转化受体的选择很重要。采用振荡培养的小菌丝球作为农杆菌侵染的转化受体, 虽然菌丝球中心的菌丝不容易被农杆菌侵染, 但其侵染后再生能力强, 且用于农杆菌侵染过程中操作方便。采取磨碎菌丝的方式制备转化受体, 虽然有利于农杆菌的侵染, 但其操作繁琐, 侵染后再生率很低。因此选择菌丝球作为农杆菌介导转化的转化受体。

2.3 农杆菌菌株及菌液浓度对转化效率的影响

在其他条件相同的情况下, 分别以不同 $D_{600\text{nm}}$ 的 EHA105、LBA4404、A281 为试验菌株, 侵染等量的转化受体, 分析农杆菌菌株及菌液浓度对转化效率的影响。结果表明, 菌液 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 和 0.30 的 EHA105 菌株分别得到 0、5、17、16、9 和 11 个转化子, 而 LBA4404 和 A2810 没有得到转化子。可见, EHA105 有着较高的转化效率。

农杆菌菌株的选择决定着农杆菌转化的成败。增加农杆菌转化时的细胞数目可以提高转化效率, 但细胞数目过高反而降低转化效率。 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.15 与 0.20 时, EHA105 菌株的转化效率相差不大, 但菌液浓度增高, 后续操作中农杆菌的生长不易控制, 故选择 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.15 的 EHA105 进行侵染。

2.4 预培养与共培养时 AS 浓度对转化效率的影响

在其他条件相同的情况下, 预培养与共培养时分别加入不同终浓度的 AS, 分析 AS 对转化效率的影响, 结果见图 1。

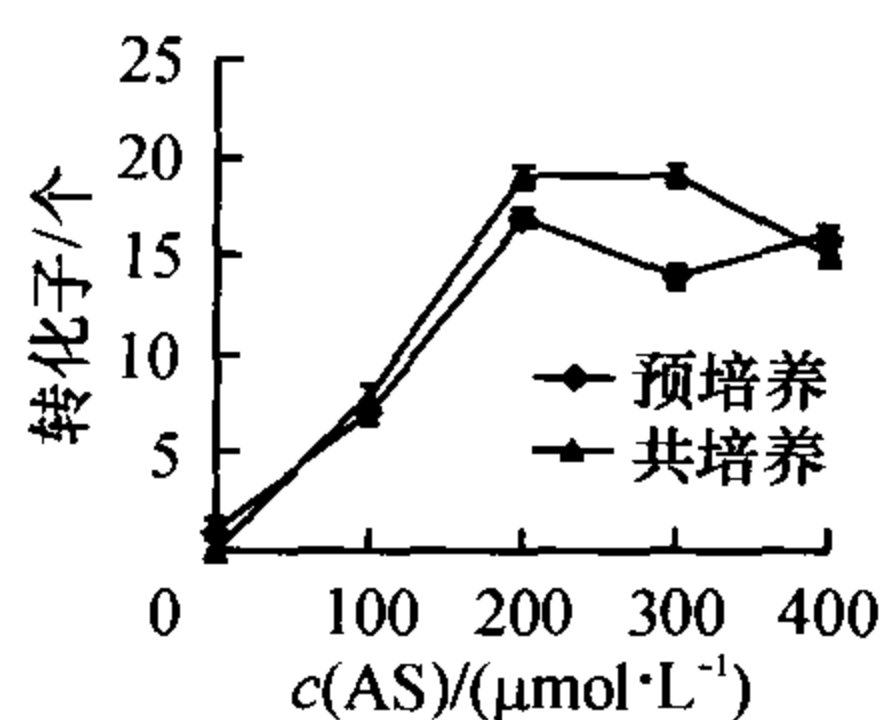


图1 预培养与共培养时 AS 浓度对转化效率的影响

Fig.1 Effects of the concentration of AS on the transformation efficiency in pre-culture and co-culture

从图 1 可以看出, 预培养过程中 AS 对转化效率有一定的影响。没有 AS 诱导, 转化效率很低。随着 AS 浓度的增加, 拟转化子的数目增多, 但当 AS 的浓度超过 300 μmol/L 时, 转化效率并没有增加。共培养过程中没有 AS 诱导的均没有转化子。随着 AS 浓度的增加, 转化效率也相应提高。但 AS 浓度增加到 400 μmol/L 时, 转化效率反而降低。因此, 在预培养过程中, 加入终浓度为 200 μmol/L 的 AS 最合适。在共培养过程中, 将 AS 的终浓度设为 200 μmol/L。

2.5 共培养温度与时间对转化效率的影响

在其他条件相同的情况下, 分别采用不同的共培养温度与时间, 研究共培养温度与时间对转化效率的影响, 结果见图 2。

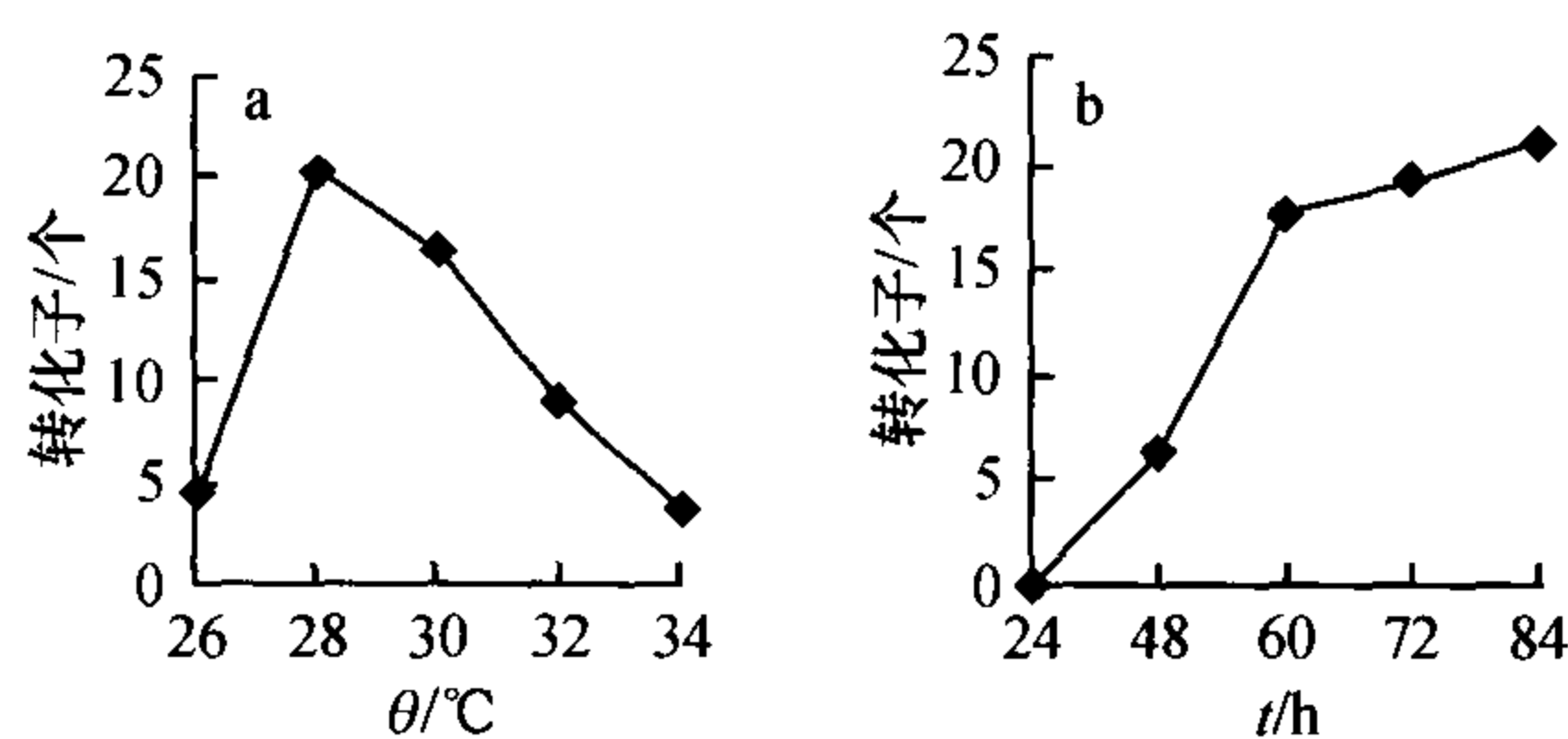


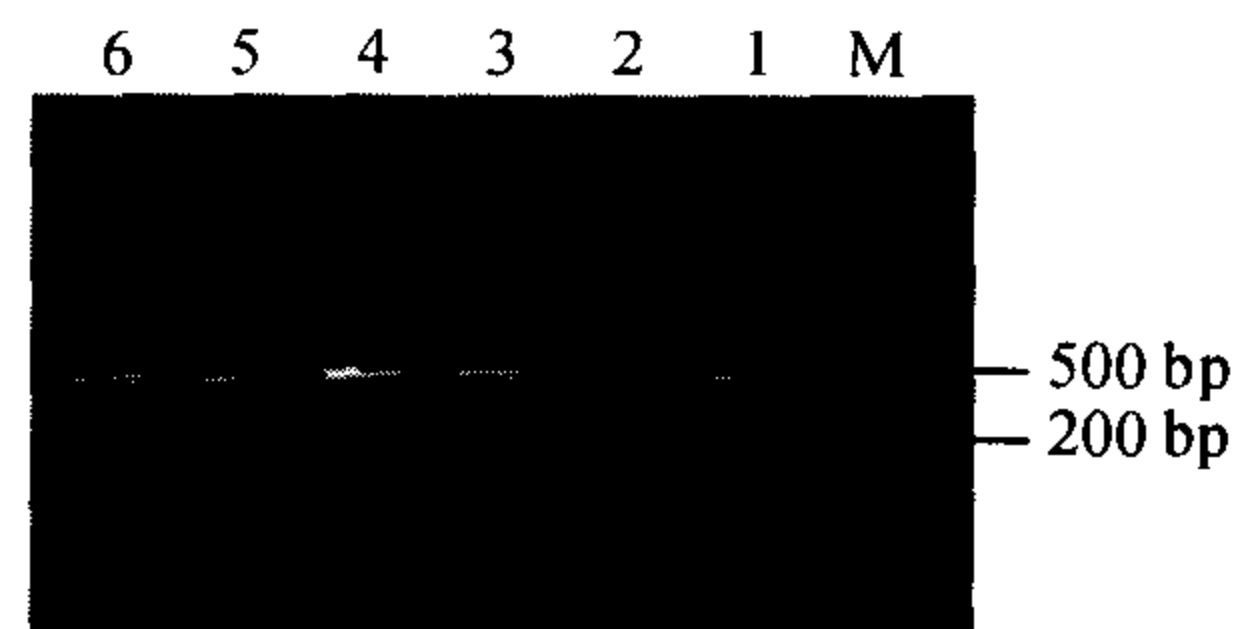
图2 共培养温度和时间对转化效率的影响

Fig.2 Effects of temperature and time on the transformation efficiency in co-culture

共培养时温度的设定能明显地影响转化效率。由图 2a 可以看出, 共培养温度为 28 °C 时, 得到最多的拟转化子。低于或高于 28 °C 都降低了拟转化子的数目。随着共培养时间的增加, 拟转化子的数目也随之增加(图 2b)。共培养时间超过 60 h 时, 转化效率没有显著提高。超过 72 h, 假阳性克隆的产生增多。所以, 共培养时间设定为 60 h。

2.6 拟转化子的筛选与 PCR 鉴定

随机挑选 4 个拟转化子, 提取菌丝基因组 DNA, 进行 *afp* 基因扩增, 结果见图 3。图 3 显示, PCR 产物经凝胶电泳检测后可看到 4 个样品均出现了明显的 *afp* 基因扩增条带, 大小约 424 bp, 与期望扩增的 *afp* 基因片段的大小一致, 因此初步判定这 4 个拟转化子的基因组中含有 *afp* 基因。



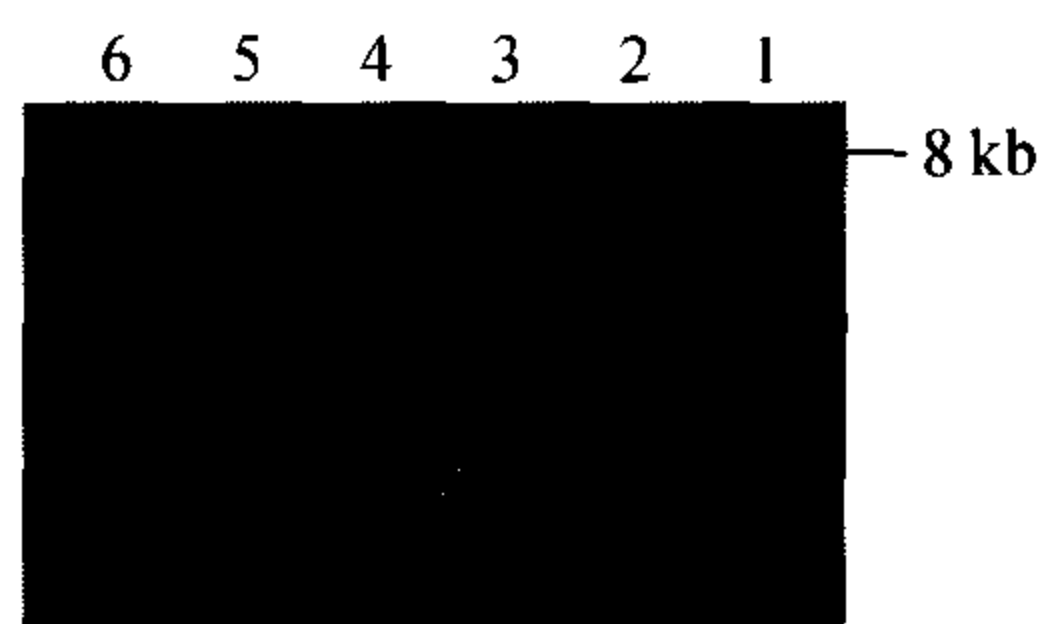
M: DNA Maker III; 1: 质粒 pAg-afp₂₃₅; 2: 阴性对照; 3~6: 拟转化子

图3 拟转化子的 PCR 鉴定

Fig.3 The *afp* gene PCR amplification from genomic DNA of the transformants

2.7 转化子的 Southern blotting 分析

提取 PCR 阳性的拟转化子的基因组,进行 Southern 杂交分析, Southern 杂交的结果见图 4。图 4 的结果显示,4 个拟转化子中有 3 个能与 *hph* 探针杂交显出特异的条带,说明这 3 个拟转化子的染色体基因组中整合了 *afp* 基因。第 4 泳道的拟转化子与非转化子对照菌株没有杂交信号。



1:阴性对照;2:*Hind* III 酶切的质粒 pAg-afp₂₃₅; 3~6:拟转化子

图 4 拟转化子的 Southern 杂交分析

Fig. 4 Southern blotting analysis of transformants

3 讨论

在农杆菌介导的遗传转化中,转化受体的选择很重要。目前,在食用菌遗传转化过程中,受体材料主要为子实体、菌丝体和孢子。参考 Thomas 等^[4]的方法,本文采取将菌丝打碎的方式制备外植体。结果发现,菌丝破碎后,其碎片虽然有利于农杆菌的侵染,但其侵染后再生率很低,且操作繁琐。而采用振荡培养的小菌丝球作为农杆菌侵染的转化受体,虽然菌丝球中心的菌丝不容易被农杆菌侵染,但菌丝球外周有很多新生菌丝可供侵染,所以其转化效率高。菌丝球的制备过程简单,侵染后再生能力强,且用于农杆菌侵染过程中操作方便。故本试验采用振荡培养的小菌丝球作为农杆菌侵染的转化受体。

农杆菌菌株的选择决定着农杆菌转化的成败。本试验结果表明,EHA105 农杆菌侵染草菇菌丝具有很高的转化效率,而 LBA4404、A281 没有得到转化子。且增加农杆菌转化时的细胞数目可以提高转化效率,但细胞数目过高反而降低转化效率。这与文献^[5-6]的研究结果一致。

AS 是农杆菌介导真菌转化的关键。在共培养过程中,没有 AS 诱导的均没有获得转化子,随着 AS 浓度的增加,转化效率也相应提高^[7-8]。对于农杆菌在预培养时是否需要 AS 的诱导,则有不同的看法。Combiere 等^[9]认为 AS 在预培养时加入,虽然可增加单拷贝插入的几率,但却降低了转化效率。而 Leclercque 等^[8]则认为预培养时加入 AS 会提高转化的效率。本研究的试验结果表明,在预培养和共培养过程中加入 AS,均能提高转化效率,但随着 AS 浓度的增加,转化效率没有显著提高,共培养反而降低。

共培养的温度和时间也是影响转化效率的关键因素。Campoy 等^[5]的研究表明,当共培养温度和受体最适生长温度一致时,得到最多的转化子。而本研究结果证明,采用 28 ℃ 共培养时得到最多的转化子,可能因为在此温度下农杆菌最适合生长,从而有利于农杆菌的侵染。此外,还可以降低菌丝的生长速度,以便 T-DNA 区的整合。共培养时间的研究结果同 Takahara 等^[10]的一致,时间过长会导致假阳性克隆的产生。

参考文献:

- [1] 陈明杰,汪昭月,贺冬梅,等. 低温影响草菇蛋白质组分变化的研究[J]. 食用菌学报,1995,2(4):28-31.
- [2] 段学武,庞学群,张昭其. 草菇低温贮藏及有关生理变化研究[J]. 热带作物学报,2000,21(4):75-79.
- [3] WANG Jie, GUO Li-qiong, ZHANG Kai, et al. Highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Volvariella volvacea*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(17):8524-8527.
- [4] THOMAS S P M, BRIGITTE L, ANTON S M S, et al. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Curr Genet, 2001, 39(1):35-39.
- [5] CAMPOY S, PEREZ F, MARTIN J F, et al. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Curr Genet, 2003, 43(6):447-452.
- [6] TSUJI G, FUJII S, FUJIHARA N, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*[J]. J Gen Plant Pathol, 2003, 69(4):230-239.
- [7] HANIF M, PARDO A G, GORFER M, et al. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker[J]. Curr Genet, 2002, 41(3):183-188.
- [8] LECLERQUE A, WAN H, ABSCHUTZ A, et al. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Curr Genet, 2004, 45(2):111-119.
- [9] COMBIER J P, MELAYAH D, RAFFIER C, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 220(1):141-148.
- [10] TAKAHARA H, TSUJI G, KUBO Y, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum lagenarium*[J]. J Gen Plant Pathol, 2004, 70(2):93-96.

【责任编辑 李晓卉】