

抗冷冻蛋白基因遗传转化草菇的研究

郭丽琼^{1,2} 林俊芳^{1,2*} 熊 盛² 陈守才²

(¹ 华南农业大学食品学院 生物工程系 广州 510640)

(² 中国热带农业科学院 热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

摘 要 采用 RT-PCR 技术从瑞典的北极云杉卷叶蛾幼虫中扩增出抗冷冻蛋白基因,利用基因枪法遗传转化草菇。PCR 检测和 Southern 杂交结果证明,抗冷冻蛋白基因已整合进草菇基因组。低温胁迫试验结果表明,转基因草菇具有较强的耐低温能力。转基因草菇生物学特性观测结果显示,大多数草菇转化子的生长速率明显地慢于对照的宿主菌株,多数转化子的菌丝也明显地比宿主菌丝细弱。转化子筛选结果表明,采用三轮的转化子筛选程序,即第一轮在固体培养基上筛选、第二轮和第三轮在液体培养基中筛选,有利于获得真实转化子和淘汰假转化子。转基因草菇一代低温胁迫结果证明,转基因草菇后代仍然具有较强的低温耐受能力,这说明转基因草菇的耐低温性能在世代之间是稳定的。

关键词 草菇 抗冷冻蛋白基因 转化 基因枪法

中图分类号 S66.13, Q939.96 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2005)01-0039-05

草菇是几种最重要的大规模栽培的食用菌之一,特别是在热带和南亚热带地区。草菇是典型的高温型食用菌,它可在 43℃ 高温环境中生长良好,但不耐 10℃ 以下的低温。在 4℃ 低温下,草菇菌丝会发生自溶而死亡,子实体会发软、液化和腐烂^[1]。草菇的这一特性严重地限制了草菇的生产季节和生产区域、新鲜草菇的流通和出口、低温冷藏保鲜和草菇菌种的低温冷冻贮藏。因此,选育耐冷冻的草菇新菌株就显得非常必要。然而,草菇为同宗结合真菌,菌丝没有锁状联合,杂种选择缺乏标记^[1],这给草菇常规育种带来很大困难^[2]。基因工程的发展为解决草菇不耐低温冷藏这个难题提供了可能。

抗冷冻蛋白具有降低水的冰点而不改变水的溶点的独特性能,在低温生物的生存方面起着重要的作用^[3]。本研究采用 RT-PCR 技术从瑞典的北极云杉卷叶蛾幼虫中扩增了抗冷冻蛋白基因,利用基因枪法遗传转化草菇,获得了耐低温能力较强的转基因草菇菌株。

1 材料和方法

1.1 草菇菌株和培养基

供试草菇菌株 V34 是商业化草菇栽培品种之一,原购自华中农业大学菌种实验中心,本课题组保

存。PDA 培养基:去皮马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 20g,水定容至 1L。PDSA 培养基:去皮马铃薯 200g,葡萄糖 20g,磷酸二氢钾 3g,硫酸镁 1.5g,维生素 B1 5mg~10mg,琼脂 20g,水定容至 1L。PDSB 培养基:去皮马铃薯 200g,葡萄糖 20g,磷酸二氢钾 3g,硫酸镁 1.5g,维生素 B1 5mg~10mg,水定容至 1L。DTB 培养基:Dextrose 20g,Tryptone 2g,KH₂PO₄ 0.6g,MgSO₄ 0.5g,维生素 B1 0.5g,水定容至 1L。

1.2 抗冷冻蛋白基因及其草菇表达载体

抗冷冻蛋白基因是本课题组采用 RT-PCR 方法从瑞典的北极云杉卷叶蛾幼虫中扩增得到的。PCR 引物为 AFP1(5'-TGCAGGAATCGGCACGAGGAA-3')和 AFP2(5'-GACTTTCATGGCTTAATTAGC-3'),由 OPERON 公司合成。抗冷冻蛋白基因的草菇表达载体 pCTH823 详见图 1,抗冷冻蛋白目的基因和潮霉素抗性筛选标记基因均由 35S 启动子驱动。

1.3 基因枪法转化草菇

本研究使用的 PDS-1000/He 基因枪和微粒子弹(直径 1.0μm 的金粉)均购于 BIO-RAD 公司。微粒子子弹的制备按照说明书进行。基因枪轰击参数为:氦气压力 1100Pa,真空压力 26 英寸汞柱,靶距离(靶组织与阻挡网之间的距离)设置为 6cm、9cm 和 12cm,轰击次数设置为一次或两次。靶组织为在

基金项目 国家自然科学基金(39960050,30060054,30371000),广东省自然科学基金(032239),华南农业大学校长基金(5100-K03003)

* 通讯作者。Tel 86-20-38902762 Fax 86-20-85280270 E-mail jinjf@scau.edu.cn

作者简介 郭丽琼(1963-)女,福州市人,副研究员,博士,主要从事大型真菌分子生物学和生物技术研究。E-mail guolq@scau.edu.cn

收稿日期 2004-06-07,修回日期 2004-11-02

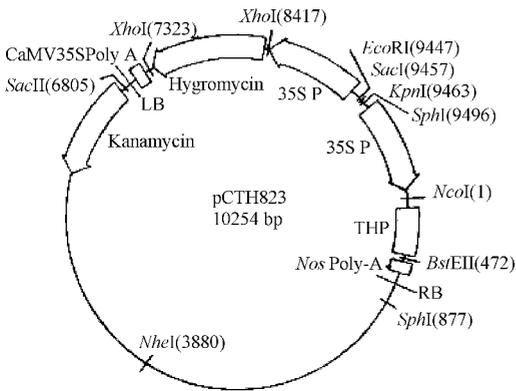


图1 抗冷冻蛋白基因的草菇表达载体 pCTH823

Fig. 1 *Volvariella volvacea* expression vector pCTH823 of thermal hysteresis protein gene.

PDSA 平板上和在 PDSB 液体培养基中于 28℃ 下生长 5d 的草菇菌丝块和菌丝球。轰击时草菇菌丝体平铺在垫有两层吸足 PDSB 培养基的无菌滤纸的培养皿中间,形成直径 6cm 的菌丝圈。以没有包被抗冷冻蛋白基因的金粉为微粒子弹进行轰击的菌丝体作为阴性对照。

1.4 转化子的筛选

在 PDSA 培养基上和 PDSB 培养基中分别进行草菇菌丝体的潮霉素最小抑制浓度的测定,根据测定结果进行草菇菌丝体转化子的筛选。基因枪轰击后的菌丝体在 28℃ 培养箱中进行恢复培养 2d 后转移至含有 60 μ g/mL 潮霉素的 PDSA 固体筛选培养基上于 28℃ 下进行 1 周的第一轮筛选。第一轮筛选后生长良好的菌丝体分割成 0.1cm \times 0.5cm 的小块,转移至含有 40 μ g/mL 潮霉素的 PDSB 液体筛选培养基中于 28℃ 下进行为期 3 周的第二轮筛选。第二轮筛选后生长良好的菌丝球进一步分割成 0.1cm \times 0.1cm 的小菌块,转移至含有 40 μ g/mL 潮霉素的 DTB 液体筛选培养基中于 28℃ 下进行为期三周的第三轮筛选。3 轮筛选后生长良好的草菇菌丝体即为假定转化子。

1.5 假定转化子对潮霉素抗性的稳定性测定

经过 3 轮筛选后在 PDSA 筛选培养基上能够生长的假定转化子转接到不含潮霉素的 PDSA 培养基上连续继代培养 3 代,每代 10d,然后再转接到含有 60 μ g/mL 潮霉素的 PDSA 固体筛选培养基上培养,观察假定转化子的生长情况。

1.6 转化子的 PCR 检测

草菇假定转化子菌丝体和阴性对照菌丝体的基因组 DNA 提取参照文献 [4] 进行。PCR 的反应体系 (50 μ L): ddH₂O 27.0 μ L, 10 \times PCR Buffer 5.0 μ L, MgCl₂

(50mmol/L) 1.5 μ L, dNTPs (2mmol/L) 5.0 μ L, Primer AFP1 (2.5 μ mol/L) 4.0 μ L, Primer AFP2 (2.5 μ mol/L) 4.0 μ L, DMSO 1.5 μ L, Taq DNA Polymerase (3U/ μ L) 1.0 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L。PCR 的反应条件: 94℃ 5min, 94℃ 45s, 55℃ 40s, 72℃ 1min, 35 个循环, 72℃ 6min。阳性对照的 PCR 模板 DNA 为质粒 pCTH823。

1.7 转化子的 Southern 杂交分析

草菇各假定转化子和阴性对照取 15 μ g 基因组 DNA 进行 *Hind*III 酶切, 50pg 质粒 DNA 用 *Sal*I 酶切作为阳性对照。酶切后的 DNA 在 0.8% 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、放射自显影等参照文献 [5] 进行。探针标记使用 Prime-It Random Primer Labeling Kit (购自 Stratagene 公司) 及其推荐的方法进行。

1.8 转化子的耐低温能力检测

9 个草菇转化子和阴性对照在 PDSA 培养基上于 28℃ 培养箱中生长 5d 后切割成 3mm \times 4mm 的小菌块, 转接于新鲜的 PDSA 培养基上, 在 4℃ 低温培养箱中进行耐低温能力的测试。测试的头 3d 每隔 12h 各转化子和阴性对照分别取出一个培养皿, 3d 后每隔 24h 分别取出一个培养皿, 转至 28℃ 培养箱中进行恢复生长, 观察菌丝存活与否及生长情况。

1.9 转化子的形态和生长速度观测

把草菇转化子和阴性对照接种在 PDSA 培养基上, 置于 28℃ 培养箱中培养。每天观测菌丝的生长速度及其形态特征。

1.10 转基因草菇一代耐低温能力测定

把 9 个草菇转化子分别命名为 V34 I -1、V34 I -2、V34 I -3、V34 I -4、V34 II -1、V34 II -2、V34 II -3、V34 II -4 和 V34 II -5。这 9 个草菇转化子经过栽培, V34 I -3、V34 I -4、V34 II -1、V34 II -2 和 V34 II -4 未能正常形成草菇子实体, 因而本研究未能得到这 5 个草菇转化子的后代。V34 I -1、V34 I -2、V34 II -3 和 V34 II -5 经过栽培能够正常形成草菇子实体。它们经过子实体组织分离, 所形成的转基因草菇一代菌丝命名为 VF1-1、VF1-2、VF1-3 和 VF1-4。这 4 个转基因草菇一代菌丝的耐低温能力按照上述 1.8 相同的方法进行测定。

2 结果

2.1 草菇的基因枪法转化和转化子筛选

草菇基因枪法转化结果显示, 所有稳定的转化子都来自于在 PDSA 固体平板上生长的小菌块为靶组织进行的转化, 而在 PDSB 液体培养基中生长

的小菌球为靶组织进行的转化没有筛选到稳定转化子。这似乎说明草菇基因枪转化的靶组织应以来自于固体平板上的小菌块为好。靶距离为 6cm 的转化效率明显地高于靶距离为 9cm 和 12cm 的转化效率。基因枪轰击一次与轰击两次的转化效率没有明显差异。

转化子筛选结果表明,草菇对潮霉素是敏感的,潮霉素对草菇菌丝的最小抑制浓度分别是 60 μ g/mL 的 PDSA 固体培养基和 40 μ g/mL 的 PDSB 液体培养基。转化子筛选结果也揭示,采用 3 轮的转化子筛选程序,即第一轮在固体培养基上筛选、第二轮和第三轮在液体培养基中筛选,有利于获得真实转化子和淘汰假转化子。如果转化子筛选都在固体培养基上进行,由于固体培养基容易形成较多的气生菌丝,因而这种筛选程序容易产生假转化子。而如果转化子筛选都在液体培养基中进行,则转化效率太低。

2.2 转化子对潮霉素抗性的稳定性

研究获得的假定转化子在不含潮霉素的 PDSA 培养基上连续继代培养 3 代后,在含有 60 μ g/mL 潮霉素的 PDSA 筛选培养基上仍能生长良好。这说明转化子对潮霉素的抗性在无性世代之间是稳定的。

2.3 假定转化子的抗冷冻蛋白基因的分子验证和分析

PCR 扩增结果表明,9 个转化子的基因组中都有抗冷冻蛋白基因存在(图 2)。结果证实,Southern 杂交抗冷冻蛋白基因已整合进转化子的基因组中

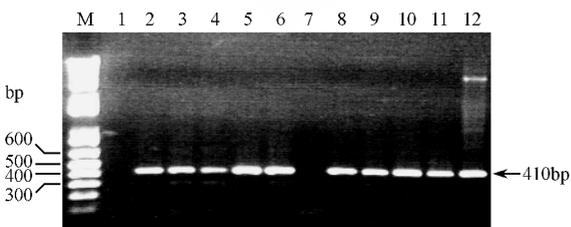


图 2 假定转化子的 PCR 检测

Fig.2 PCR detection of putative transformants

M :DNA ladder ; 1 : PCR product from non-transformed host strain ; 2 ~ 6 : PCR product from putative transformant V34 II -1, V34 II -2, V34 II -3, V34 II -4, V34 II -5, respectively ; 7 : PCR product from negative control water ; 8 ~ 11 : PCR product from putative transformant V34 I -1 and V34 I -2, V34 I -3, V34 I -4 respectively ; 12 : PCR product from plasmid pCITH823.

(图 3)。杂交带型显示,抗冷冻蛋白基因是以多拷贝的方式整合在草菇基因组的不同染色体位点上,而杂交信号较弱说明了抗冷冻蛋白基因是以低拷贝数整合的^[6]。一些杂交带的信号很弱,这可能是这些杂交带所代表的序列是由抗冷冻蛋白基因的部分片段与相邻草菇基因组片段组成的边界序列^[6]。所有转化子都出现多条杂交带,这似乎显示抗冷冻蛋白基因是各自独立插入在转化子基因组中或基因发生了重排。

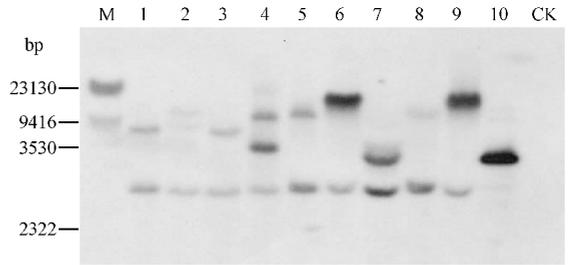


图 3 转化子的 Southern 杂交分析

Fig.3 Southern blotting analysis of transformants.

M : DNA ladder ; 1 ~ 9 : Genomic DNA from transformant V34 II -1, V34 II -2, V34 II -3, V34 II -4, V34 II -5, and V34 I -1, V34 I -2, V34 I -3 and V34 I -4 respectively ; 10 : plasmid pCITH823 ; CK : Genomic DNA from non-transformed host strain (negative control).

2.4 转化子的低温耐受能力

转化子耐低温能力检测结果表明,所有 9 个转化子都在不同程度上比对照表现出较强的低温耐受能力(表 1)。V34 I -3、V34 I -4、V34 II -4 和 V34 II -5 等 4 个转化子在 4 $^{\circ}$ C 低温胁迫 16d 后仍能恢复生长,而对照在 4 $^{\circ}$ C 低温胁迫下仅能存活 2d。就是低温耐受能力较差的转化子 V34 I -1,也能够耐受 9d 的 4 $^{\circ}$ C 低温胁迫。

2.5 转化子生长速度和形态特征

不同转化子的生长速度不同。方差分析结果表明,V34 I -2、V34 I -4、V34 II -1、V34 II -3、V34 II -4 和 V34 II -5 等 6 个转化子的生长速度明显地慢于对照,而转化子 V34 I -1、V34 I -3 和 V34 II -2 的生长速度与对照相当。

与对照相比,所有 9 个转化子的形态都有所变化。转化子 V34 I -1、V34 I -3 和 V34 II -2 的菌丝明

表 1 不同转化子和对照在 4 $^{\circ}$ C 低温胁迫下的存活天数

Table 1 Survival days of different transformants and non-transformed control at 4 $^{\circ}$ C

Transformant	V34-CK	V34 I -1	V34 I -2	V34 I -3	V34 I -4	V34 II -1	V34 II -2	V34 II -3	V34 II -4	V34 II -5
Survival time at 4 $^{\circ}$ C/d	2	9	13	16	16	15	13	11	16	16

显比对照细,转化子 V34 I -2、V34 I -4、V34 II -1 和 V34 II -3 的菌丝比对照细得多而且几乎没有气生菌丝。转化子 V34 II -4 的菌丝比较浓密且颜色较白但一周后呈淡黄色,V34 II -5 的菌丝粗壮浓密,菌落呈放射状。

2.6 转基因草菇后代耐低温性能的稳定性的稳定性

转基因草菇一代耐低温能力测定结果表明,转基因草菇后代仍然保持比较强的低温耐受能力(表 2)。4 个转基因草菇一代菌丝在 4℃低温胁迫下一般能够存活 10d 以上,而对照菌丝只能存活 2.5d。这说明转基因草菇的耐低温性能在世代之间也是稳定的。

表 2 转基因草菇一代菌丝在 4℃低温胁迫下的存活天数

Table 2 Survival days of transgenic <i>V. volvacea</i> F1 mycelia at 4℃					
Line or strain	VF1-1	VF1-2	VF1-3	VF1-4	V34-CK
Survival time at 4℃/d	10	14	11	15	2.5

3 讨论

Southern 杂交结果显示多种带型,这说明抗冷冻蛋白基因是以不同的拷贝数插入在转化子基因组的不同的位点上。这一结果与多数丝状真菌的转化结果相一致^[6-8],这可能是微同源介导的异常重组和异位整合的结果^[9,10]。

Southern 杂交结果中同一样品既有杂交信号微弱的带又有杂交信号强的带出现,如 V34 I -1、V34 I -4、V34 II -4,这反映了转基因草菇抗冷冻蛋白基因整合的复杂性。如结果中所述,微弱信号杂交带可能代表的是由抗冷冻蛋白基因的末端小片段与相邻草菇基因组片段组成的边界序列,而强信号杂交带可能代表的是抗冷冻蛋白基因的完整拷贝^[6,11]。

Southern 杂交结果中所有 9 个转化子样品都出现了一条大约 2.8kb 的杂交带,这似乎显示草菇基因组中存在一个外源基因整合的热点(hotspot)。这在裂殖酵母、拟南芥菜和水稻研究中也观察到了相似的整合热点的结果^[9,12,13]。

众多报道普遍认为,在冷冻条件下,抗冷冻蛋白是通过降低冰点、抑制冰晶形成和生长以及抑制重新结晶、降低细胞内可冻水的百分比来保护生物免遭冷冻伤害的。但是,在寒冷条件下、当处于低温胁迫而温度又在冰点以上的情况下,抗冷冻蛋白保护生物免遭寒冷伤害的机制目前仍然不明。有些报道认为,在寒冷条件下,抗冷冻蛋白可能是通过抑制生

物膜的膜相转变、通过阻断离子通道和防止生物膜离子渗漏而起到保护生物减轻寒冷伤害的^[14,15]。也有报道认为,抗冷冻蛋白可能通过结合和固化细胞内的活性水、增加束缚水含量、减少可冻水比例而起到保护生物的作用^[3]。无论机制怎样,本研究所获得的所有草菇转化子都表现出比对照具有较强的耐受低温胁迫的能力,这表明抗冷冻蛋白基因在草菇抗寒基因工程、保护草菇减轻低温寒冷灾害方面可以发挥作用。

致谢 华南农业大学食品学院硕士研究生杨飞芸、刘二鲜参加了本研究的转基因草菇栽培和出菇实验,特此表示感谢!

参 考 文 献

- [1] Chang S T. The Biology and Cultivation of Edible Fungi. New York: Academic Press, 1978, 573-605.
- [2] 谢宝贵, 黄志龙, 江玉姬. 草菇杂交研究初报. 食用菌学报, 1997, 2(2): 5-10.
- [3] Barrett J. Thermal hysteresis proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2001, 33: 105-117.
- [4] Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letter of Applied Microbiology*, 1985, 1: 17-20.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [6] Jia J H, Buswell J A, Peberdy J F. Transformation of the edible fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Volvarella volvacea*. *Mycological Research*, 1998, 102(7): 876-880.
- [7] Rhee M D V D, Graca P M A, Huizing H J, et al. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. *Molecular and General Genetics*, 1996, 250: 252-258.
- [8] Sato T, Yaegashi K, Ishii S, et al. Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998, 62(12): 2346-2350.
- [9] Virgin J B, Bailey J P. The M26 hotspot of *Schizosaccharomyces pombe* stimulates meiotic ectopic recombination and chromosomal rearrangements. *Genetics*, 1998, 149(3): 1191-1204.
- [10] Cormack B P, Falkow S. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics*, 1999, 151(3): 979-987.
- [11] Prudhomme M, Libante V, Claverys J P. Homologous recombination at the border: Insertion-deletions and the trapping of foreign DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2002, 99(4): 2100-2105.
- [12] Urawa H, Hidaka M, Ishiguro S, et al. Enhanced homologous recombination caused by the non-transcribed spacer of the rDNA in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 266(4): 546-555.
- [13] Kohli A, Leech M, Vain P, et al. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1998, 95: 7703-7708.

[14] Holmberg N, Lilius G, Bulow L. Artificial antifreeze proteins can improve Naes tolerance when expressed in *E. coli*. *FEBS Letters*, 1994, **349**(3) 354 - 358.

[15] Rubinsky B, Mattioli M, Arav A, *et al.* Inhibition of Ca^{2+} and K^{+} currents by antifreeze proteins. *The American Journal of Physiology*, 1992, **262** 542 - 545.

Transformation of *Volvariella volvacea* with a thermal hysteresis protein gene by particle bombardment

GUO Li-qiong^{1 2} LIN Jun-fang^{1 2*} XIONG Sheng² CHEN Shou-cai²

(¹ Department of Biotechnology, College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

(² State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract : A cDNA encoding a thermal hysteresis protein was isolated from the Swedish Arctic insect spruce budworm by RT-PCR amplification. *Volvariella volvacea* strain V34 was transformed with this cDNA through particle bombardment. PCR detection and Southern blotting analysis show that the thermal hysteresis protein gene is integrated into *Volvariella volvacea* genome. Cold stress assay reveals that transgenic *Volvariella volvacea* lines exhibit stronger cold tolerance than host strain. The morphological observation of transgenic *Volvariella volvacea* lines shows that growth rates of most *Volvariella volvacea* transformants are significantly slower than that of negative control strain. And hypha of most *Volvariella volvacea* transformants is thinner than host strain's hypha. Transformant screening result indicates that three-round of selection procedure with first selection on PDSA solid selective medium followed by second and third selection in PDSB liquid selective medium is favorable to get genuine transformants and to eliminate false transformants. Cold tolerance assay of transgenic *Volvariella volvacea* F1 generation demonstrates that the progeny of transgenic *Volvariella volvacea* still possesses stronger cold tolerance than non-transformed host strain. This suggests that the cold tolerant characteristic of transgenic *Volvariella volvacea* is meiotically stable between generations.

Key words : *Volvariella volvacea*, Thermal hysteresis protein gene, Transformation, Particle bombardment

Foundation item :National Natural Science Foundation of China (39960050, 30060054, 30371000)

* Corresponding author. Tel 86-20-38902762 Fax 86-20-85280270 E-mail jinjf@scau.edu.cn

Received date : 06-07-2004

《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(双月刊)创刊于1953年,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和自然科学核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、病毒学、免疫学以及生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊可以为您定期发布与微生物学相关的试剂、药品、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,可为您开拓在微生物学领域新的发展空间。另外,与生命科学有关的各类服务信息也在本刊发布之列。

本刊态度严谨,信守协议,由中国科学院科学出版社广告部代理广告业务(广告经营许可证:京东工商广字第0034号),编辑部备有最新的期刊简介和报价单,欢迎与我们联系。

电 话 (010) 62630422 传 真 (010) 62554303 电子信箱 actamicro@sun.im.ac.cn