

根癌农杆菌介导的 *Cry I A(b)* 基因 在毛壳菌中的转化

高兴喜, 杨 谦

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘 要: 利用根癌农杆菌介导的遗传转化方法, 将 *Cry I A(b)* 基因转入生物防治真菌毛壳菌中, 转化率约为 $40 \sim 180$ 个转化子 $\cdot 10^{-7}$ 个孢子。通过对转化子的 RT-PCR 检测和 Southern 杂交分析表明, *Cry I A(b)* 基因已整合进毛壳菌基因组中, 而且在转录水平上得到表达, 转化子都能够稳定遗传。根癌农杆菌介导的遗传转化具有高转化率、低拷贝、遗传稳定、操作简便等优点, 因此有可能成为丝状真菌遗传转化和功能基因组研究的有力工具。

关键词: 根癌农杆菌; 毛壳菌; *Cry I A(b)* 基因; 遗传转化

中图分类号: X17 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2005)01-0022-04

Transformation of Gene *Cry I A(b)* Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens* in *Chaetomium Globosum*

GAO Xing-xi, YANG Qian

(Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

Abstract: *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation system is routinely used for genetic transformation in a wide range of plant species. Not restricted to plant species, *A. tumefaciens* is able to transfer T-DNA to yeasts, filamentous fungi and human cells. Using this transformation system, we successfully transferred *Cry I A(b)* gene to biological control fungus *C. globosum* with an efficiency of $40 \sim 180$ transformants per 10^7 spores, and constructed genetically engineered strains against plant pathogens and pest insects. Compared with the transformation mediated by PEG-CaCl₂, the transformation efficiency was increased 20-50 folds. Putative transformants were analysed for the presence of *Cry I A(b)* gene by PCR and southern analysis. The latter analysis proved that the gene was integrated into the genome, and most transformants contained a single copy. RT-PCR analysis showed that the *Cry I A(b)* gene was transcribed into *C. globosum* transformants. The *Cry I A(b)* gene used here was artificially modified from its wild gene according to plant codon bias without changing amino acid sequence, which maybe contributed to the expression of the gene in the fungus *C. globosum*. Genetic stability of the transformants through mitotic cell division were also observed. Good performance of the transformation system mediated by *A. tumefaciens* in *C. globosum* may further prove to be a powerful tool for the filamentous fungal transformation and functional genomic study with its high transformation frequency, simplicity of T-DNA integration, and genetic stability of transformants.

Keywords: *agrobacterium tumefaciens*; *Cry I A(b)*; *chaetomium globosum*; genetic transformation

毛壳菌 (*Chaetomium. spp*) 是植物病害生物防治中一种非常重要的拮抗菌, 在植物病害生物防治中有着广泛的应用。目前对毛壳菌的遗传转化报道还很少, 陈振明等^[1] 利用 PEG 介导的原生质体法以潮霉素抗性基因为选择标记, 率先在毛壳菌 (*C. globosum*)

建立起相应遗传转化系统, 但由于该转化系统的局限性, 其转化效率很低, 只有大约 1 个转化子 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ DNA。李梅等^[2] 利用同样的转化系统将多菌灵抗性基因转入毛壳菌中, 通过对转化条件的优化, 使转化效率提高了 3~5 倍。但相对于其他真菌的遗传转化, 这一转化效率仍然很低。根癌农杆菌 (*Agrobacterium. tumefaciens*) 介导的转化系统在丝状真菌遗传转化上的成功应用^[3-5], 为我们在毛壳菌中建立这一转化系

收稿日期: 2004-07-03

资助项目: 国家 863 项目 (2003AA241140)

作者简介: 高兴喜 (1972—), 男, 博士研究生, 研究方向为微生物基因工程。E-mail: gaopingxi@yahoo.com.cn

统提供了理论参考。

苏云金芽孢杆菌是一种分布广泛的革兰氏阳性细菌,在形成芽孢时形成由 *cry* 基因编码的多种杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins,简称 ICPs),由于 ICPs 对多种农、林害虫具有毒杀作用,Bt 制剂已作为最有效的微生物农药广泛应用于害虫的生物防治^[6]。由于 ICPs 极易受紫外线等自然因素的影响而分解,限制了其应用潜力的进一步发挥。将 *cry* 基因导入植物根际、叶面和内生细菌构建的新型工程菌可有效克服 Bt 制剂持效期短、对根部和茎蛀害虫难以有效发挥作用等不足。目前,已实现了 *cry* 基因对多种有益细菌的转化^[7~9],然而,将 *cry* 基因向生防真菌中转化还鲜有尝试。

本研究采用根癌农杆菌介导的遗传转化方法,将来自苏云金芽孢杆菌的 *Cry I A(b)* 基因成功导入毛壳菌中,拟构建兼具杀虫防病双重功效的工程菌株,为研究和开发新型微生物农药奠定理论基础,同时也为根癌农杆菌介导的转化系统在其他丝状真菌遗传转化上的应用提供重要参考。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

根癌农杆菌 AGL-1 由中国科学院遗传与发育研究所储成才教授惠赠,毛壳菌(*C. globosum*)为本实验室分离保存,质粒 pFWZ10 由中国农科院范云六院士提供,农杆菌质粒 pPK2 来自 S. F. Covert 教授(University of Georgia, USA),质粒 pES200、pCB1003 来自美国 FGSC(Fungal Genetic Store Center)。

1.2 引物与试剂

检测 *Cry I A(b)* 基因的引物为: BtR: 5' - CAATCAGCCTAGTAAGGTCG - 3'; BtF: 5' - GAAG-GATTGAGCAATCTCTA - 3'。引物由北京赛百盛公司合成。DNA 限制酶、去磷酸化酶(CIAP)、Taq 聚合酶等购自 TaKaRa 公司, T₄DNA 聚合酶、T₄DNA 连接酶购自 MBI 公司, DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II、潮霉素 B 购自 Roche 公司,植物总 RNA 小量提取纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。

1.3 农杆菌的培养

质粒 pPBH 采用冻融法直接转化到农杆菌 AGL-1。从 LB 平板(含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素)上挑取一农杆菌单菌落接种于 7 mL LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素, 50

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素), 250 r $\cdot \text{min}^{-1}$, 29 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。第二天用含 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮(AS)MM^[10]液体培养基稀释至 OD₆₆₀ 大约 0.15, 继续培养大约 4 h 至 OD₆₆₀ 为 0.6 ~ 0.8。

1.4 毛壳菌孢子的准备

用 5 mL 灭菌蒸馏水从培养大约 7 d 的 PDA 平板上洗下毛壳菌的孢子, 血球计数板计数, 然后用 MM 液体培养基稀释至孢子浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.5 毛壳菌的转化

取 100 μL 已活化的农杆菌 AGL-1(pPBH) 菌液和 100 μL 稀释好的毛壳菌孢子悬液混合后涂布在 MM(200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS)平板上, 27 $^{\circ}\text{C}$ 共培养两天后, 在平皿中倒入 10 mL M-100 固体培养基^[11](含 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素和 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 头孢霉素), 27 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养, 大约 5 ~ 7 d 可见菌落出现。

1.6 转化子的 Southern blot 分析

毛壳菌总 DNA 的提取按文献[12]方法进行, 用于标记探针的模板为质粒 pFWZ10 上 *Cry I A(b)* 基因的 Nco I 和 Hind III 酶切片段, 探针的标记及杂交按试剂盒上提供的方法进行。

1.7 转化子 RT-PCR 检测

毛壳菌及转化子总 RNA 提取采用小量植物叶总 RNA 提取试剂盒(上海华舜生物工程公司)上的方法进行, 为防止 DNA 污染, 对提取到的 RNA 用 DNase I 进行处理, 然后再用 RNA 吸附柱纯化一次。RT-PCR 采用 TaKaRa 公司的 One Step RNA PCR Kit(AMV) 上的方法进行, 反应条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 96 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 96 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。

2 结果和分析

2.1 含有 *Cry I A(b)* 基因的二元表达载体构建

用限制性内切酶 Nco I 和 Hind III 双酶切质粒 pFWZ10, 胶回收含有目的基因 *Cry I A(b)* 的片断(该目的基因带有 Nos 终止子), 将所回收的片断用 T₄DNA 聚合酶补平; 用限制性内切酶 Cla I 和 BamH I 双酶切质粒 pES200, 回收载体大片断, T₄DNA 聚合酶补平, 并用碱性磷酸酶(CIAP)去磷酸化, 将去磷酸化的载体与已经补平的 *Cry I A(b)* 基因进行平端连接, 得到质粒 pEB(目的基因连接上启动子 P_{trpC}, 图 1a); 用限制性内切酶 EcoR I 和 Xba I 双酶切质粒 pPK2, 回收载体大片段, 与用 EcoR I 酶切质粒 pCB1003 所得到的含有潮霉素(hph)基因的小片段连接, 再胶回收

Cry I A(b) 基因在转录水平上得到表达。

2.6 转化子的遗传稳定性

将毛壳菌转化子接种到不含潮霉素的 PDA 培养基上培养,连续转接 10 代,然后再接种到含有不同浓

度潮霉素的培养基上,27 ℃ 培养 3 d。结果表明,毛壳菌转化子无论在非选择培养基还是在选择培养基上都能正常生长(表 2),从而表明毛壳菌转化子能稳定遗传。

表 2 毛壳菌转化子转接 10 代后在不同浓度潮霉素处理下菌落生长半径(cm)

Table 2 C Growth of globosum transformants under different concentrations of hygromycin after 10 generations

浓度/μg · mL ⁻¹	0	50	100	150	200	250	300
毛壳菌原菌	3. 20 ^a	2. 20 ^b	0. 22 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
转化子 C1	3. 22 ^a	3. 22 ^a	3. 26 ^a	3. 10 ^a	3. 18 ^a	3. 16 ^a	3. 12 ^a
转化子 C2	3. 10 ^a	3. 60 ^a	2. 96 ^a	3. 26 ^a	3. 22 ^a	3. 10 ^a	3. 25 ^a

注:表中数据均为 3 个测量数据的平均值;小写字母相同的数据表示差异不显著(P≥0. 05),反之亦然。

3 讨论

通过根癌农杆菌介导的遗传转化方法将 Bt 杀虫基因 *Cry I A(b)* 导入生防真菌毛壳菌中,构建了具有杀虫防病双重作用的工程菌株。该 Bt 基因为人工合成基因,已经在多种植物中获得高效表达,在进行人工合成时,根据植物密码子偏爱性在不改变原有氨基酸序列的情况下对原有密码子进行了调整,并消除了可能引起 mRNA 不稳定的因素。本试验结果表明,该基因在毛壳菌中同样得到表达,这就为 Bt 基因的应用提供了一个新的途径。兼有杀虫防病双重作用的基因工程毛壳菌的构建显示了生物技术在生防真菌遗传改良中的应用潜力,为进一步研究和开发新型微生物农药奠定了理论基础。

根癌农杆菌介导的转化系统因其简便、高效以及外源基因易于整合等优点,在植物基因转化中得到广泛的应用。我们利用这一转化系统成功地实现了对生防真菌毛壳菌的遗传转化,转化率约为 40~180 个转化子·10⁻⁷ 个孢子,相对于李梅等^[2] 用 PEG 介导的原生质体法对毛壳菌的转化,转化效率提高了约 20~50 倍。这在一定程度上解决了用传统方法对毛壳菌的转化效率低的问题,对充分发挥这一优秀菌株在生物防治中的作用具有重要意义。

利用根癌农杆菌介导的转化系统对毛壳菌的转化成功不但进一步验证了这一转化系统对丝状真菌遗传转化的可行性,而且找到了一种对毛壳菌以及其他丝状真菌进行遗传改良的新方法。根癌农杆菌介导的丝状真菌转化,克服了用常规转化方法转化率低、操作繁杂等缺点,也正由于该转化系统具有转化率高、位点整合精确、可转移大片段 DNA 等优点,使该系统有可能成为丝状真菌功能基因研究的有力工具。

参考文献:

[1] 陈振明,郭泽建,林福呈,等. 以潮霉素抗性为选择标记的毛壳霉原生质体转化[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2001, 27(1): 19-22.

[2] 李梅,杨谦. 多菌灵抗性基因在球毛壳菌中的转化[J]. 高技术通讯, 2002, 12(2): 43-45.

[3] de Groot M J A, Bundock P, Hooykaas P J J, et al. Agrobacterium tumefaciens - mediated transformation of filamentous fungi[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 839-842.

[4] Covert S F, Kapoor P, Lee M, et al. Agrobacterium tumefaciens - mediated transformation of *Fusarium circinatum*[J]. *Mycology Research*, 2001, 105: 259-264.

[5] Hanif M, Pardo G A, Gorfer M, et al. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker[J]. *Current Genetics*, 2002, 41: 183-188.

[6] 范玲. 微生物农药研究进展及产业发展对策[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(5): 83-86.

[7] Obukowicz M G. Integration of δ - endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root colonizing strains of *Pseudomonas* using Tn5[J]. *Gene*, 1986, 45: 327-331.

[8] Lampel J S, Canter G L, Dimock M B, et al. Integrative cloning expression and stability of the *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp *cynodontis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60: 501-508.

[9] 陈中义,张杰,曹景萍,等. 杀虫防病基因工程枯草芽孢杆菌的构建[J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 215-220.

[10] Hooykaas P J J, Roobol C, Schilperoort R A. Regulation of the transfer of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1979, 110: 99-109.

[11] Stevens R. *Mycology Guidebook*[M]. University of Washington Press, 1974, 376.

[12] Russo P, Juuti J T, Raudaskoski M. Cloning, sequence and expression of a β - tublin - encoding gene in the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*[J]. *Gene*, 1992, 119: 175-182.