

THP 基因的重新克隆及草菇表达载体的构建*

郭丽琼 林俊芳** 陈守才 熊 盛

(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)

关键词: 草菇, THP 基因, 草菇表达载体

中图分类号: S66.13 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)03-0375-05

草菇(*Volvariella volvacea*)是一种高温型的食用菌,在4℃低温条件下,其菌丝自溶死亡,子实体发软、液化直至腐烂^[1-3]。草菇的这一特性严重地限制了草菇的生产、新鲜草菇的流通、低温冷冻保鲜和出口创汇以及草菇菌种的低温冷冻储藏。草菇是同宗结合的真菌,生活史复杂^[4],菌丝没有锁状联合,杂种选择缺乏标记,这给草菇的杂交育种带来极大的困难^[5,6]。基因工程的发展为解决草菇不耐低温冷藏这一难题提供了可能。THP(Thermal Hysteresis Protein)基因—热滞后蛋白基因,是加拿大科学家 Michael G. 等从北美云杉虫(*Choristoneura fumiferana*)中克隆分离得到的,其全长为411bp,其产物活性是目前已知的所有北极鱼抗冷冻蛋白 AFP 活性的10~30倍^[7],甚至100倍^[8,9]。我们已从国外引进了连接在未知载体上的 THP 基因,并通过 PCR 技术重新克隆获得了该基因,拟用于遗传转化草菇,以期获得抗冷冻的草菇新菌株。本文报道了 THP 基因的重新克隆以及草菇抗冷冻基因表达载体的构建。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌株

质粒 pUC19AP 国外引进,转化受体菌 *E. coli* DH5 α 质粒 pCAMBIA1301 本实验室保存, pGEM[®] T-Vector 购自 Promega 公司。

1.2 酶及试剂

限制性内切酶 *Nco* I、*Bst* Z I 购自 Promega 公司, *Bst* E II、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶购自 Biolabs 公司;质粒纯化 Kit、凝胶 DNA 提取 Kit 和 PCR 产物纯化 Kit 购自美国 Roche Diagnostics 公司;实验所用试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.3 PCR 引物

根据 THP 基因的已知序列设计了一对引物,即:AFP1(5'-TGCAGGAATCGGCACGAGGAA-3')和 AFP2(5'-GACTTTCATGCGCTTAATTAGC-3')。引物由 OPERON 公司合成。

1.4 接头

依据与限制性内切酶 *Bst* Z I 和 *Bst* E II 酶切后留下的粘性末端碱基相配并在接头中间增加酶切位点的实验要求设计合成两条 Oligo 核苷酸,即 5'-GGCCGCCATGGATGGTAACCAAGATCTAG-3'(29BP)和 5'-GTAACCTAGATCTTGGTTACCATCCATGCC-3'(3bp),退火后即为连接接头,其中包括了 *Nco* I、*Bst* E II、*Bgl* II 3 个酶切位点。接头由上海生物工程公司合成提供。

1.5 THP 基因的重新克隆

1.5.1 未知载体质粒的扩增与提取:DH5 α 感受态细胞的制备以及质粒的转化和扩增参照文献 [10],质

* 本文系国家自然科学基金资助项目(39960050)的一部分。

** 通讯作者

作者简介:郭丽琼(1963-),女,福建福州市人,中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室,副研究员,在职博士生,主要从事食用真菌的分子生物学和生物技术研究。

收稿日期:2001-08-31,修回日期:2001-12-26 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

粒的提取参考文献 [11]。

1.5.2 THP 基因的 PCR 扩增 PCR 的反应体系为: $10 \times$ PCR Buffer(含 25mmol/L MgCl_2) $5.0\mu\text{L}$, dNTPs(10mmol/L) $1.0\mu\text{L}$, Primer AFP1($10\mu\text{mol/L}$) 和 Primer AFP2($10\mu\text{mol/L}$) 各 $1.25\mu\text{L}$, Taq DNA 聚合酶($5\text{U}/\mu\text{L}$) $0.25\mu\text{L}$, 模板 $2.0\mu\text{L}$, 无菌 ddH_2O $39.25\mu\text{L}$, 总体积 $50\mu\text{L}$ 。反应条件: 预变性 94°C 5min ; 循环参数为 94°C 40s , 55°C 30s , 72°C 1min , 35 Cycles, 72°C 延伸 6min 。

1.5.3 PCR 产物的回收 PCR 产物的回收按 PCR 产物纯化 Kit 上的说明进行。

1.5.4 PCR 产物的连接与转化 回收的 PCR 产物直接与 pGEM[®] T-Vector 相连, 连接产物转化感受态受体菌 DH5 α , 37°C 培养过夜, 挑取有插入片段的白色菌落进行扩增。

1.5.5 PCR 产物的序列测定 提取白色菌落的转化子质粒(方法同上), 以 QIAGEN 质粒纯化 Kit 进行纯化。DNA 序列测定用 ABI377A 型 DNA 自动测序仪进行。得到 THP 基因正向插入的转化子 pGTHP4。

1.6 草菇表达载体的构建

1.6.1 pCAMBIA 1301 的双酶切反应 质粒 pCAMBIA 1301 的扩增、提取方法同 1.5.1。先以 *Bst*E II 酶解质粒 pCAMBIA1301, 反应体系为: pCAMBIA 1301 $15\mu\text{L}$ ($1.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $10 \times$ NE Buffer3 $3.0\mu\text{L}$, *Bst*E II($5\text{U}/\mu\text{L}$) $3.0\mu\text{L}$, 无菌 ddH_2O $9.0\mu\text{L}$, 总体积 $30\mu\text{L}$, 60°C 水浴酶解 2h 。加入 $3.0\mu\text{L}$ 3mol/L NaAc ($\text{pH}5.2$) 和 $60\mu\text{L}$ 的无水乙醇沉淀已酶解的质粒 DNA, $12\ 000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min , 小心弃尽上清液后, 加入 $100\mu\text{L}$ 75% 的乙醇洗涤沉淀, $12\ 000\text{r}/\text{min}$ 离心 2min , 弃尽上清, 室温下干燥至沉淀物呈透明色。之后进行第二个酶解反应, 反应体系为: 先加入无菌 ddH_2O $25.2\mu\text{L}$ 以溶解 DNA, 再加入 $10 \times$ Buffer D $3.0\mu\text{L}$, *Nco* I($10\text{U}/\mu\text{L}$) $1.5\mu\text{L}$, BSA($10\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $0.3\mu\text{L}$, 37°C 水浴酶解 2h 。以 1% 琼脂糖凝胶电泳分离酶解产物, 目的大片段采用凝胶 DNA 提取 Kit 回收, 步骤按说明书进行。回收产物保存于 -20°C , 备用。

1.6.2 pGTHP4 的双酶切反应 质粒 pGTHP4 的扩增、提取方法同 1.5.1。以内切酶 *Bst*Z I 和 *Nco* I 进行双酶切反应。先以 *Nco* I 进行酶解, 反应体系为: pGTHP4($3.3\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $5.0\mu\text{L}$, $10 \times$ Buffer D $3.0\mu\text{L}$, *Nco* I($10\text{U}/\mu\text{L}$) $2.0\mu\text{L}$, BSA($10\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $0.3\mu\text{L}$, 37°C 水浴酶解 2h 。之后加入 *Bst*Z I($10\text{U}/\mu\text{L}$) $2.0\mu\text{L}$, 50°C 水浴酶解 2h , 以 1.6.1 相同的方法回收含有 THP 目的基因的小片段, 保存于 -20°C , 备用。

1.6.3 接头的退火 在 OD 值为 $2(66\mu\text{g})$ 的 29bp 和 30bp 的 Oligo 核苷酸中分别加入 $50\mu\text{L}$ 的无菌 ddH_2O , 把离心管上下振荡 10min 以充分溶解沾在离心管壁上的 Oligo DNA, $13\ 000\text{r}/\text{min}$ 离心 30s 后各取出 $25\mu\text{L}$ 于一新管里混匀, 95°C 变性 5min , 然后在 10min 内逐渐冷却至室温, $5\ 000\text{r}/\text{min}$ 离心 10s 。储存于 -20°C 。备用。

1.6.4 目的片段的连接与环化 把回收的大片段与小片段在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接。反应体系为: 大片段和小片段各 $30\mu\text{L}$, $10 \times$ T4 DNA 连接酶 Buffer $7.0\mu\text{L}$, T4 DNA 连接酶($5\text{U}/\mu\text{L}$) $3.0\mu\text{L}$, 在 PCR 仪上 16°C 连接反应 16h 。连接产物用 1% 凝胶电泳分离并按 1.6.1 的方法回收, -20°C 下保存备用。

连接产物进一步连接环化的反应体系为: 连接产物($0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $8.0\mu\text{L}$, $10 \times$ T4 DNA 连接酶 Buffer $2.0\mu\text{L}$, T4 DNA 连接酶($5\text{U}/\mu\text{L}$) $2.0\mu\text{L}$, 接头($14.6\mu\text{mol}$) $2.0\mu\text{L}$, 无菌 ddH_2O $6.0\mu\text{L}$, 总体积 $20.0\mu\text{L}$, 在 PCR 仪上 16°C 连接反应 16h 。连接环化后的质粒为 pCTH823。

1.6.5 质粒 pCTH823 的转化、扩增与提取 质粒 pCTH823 转化受体菌 DH5 α 的方法参考文献 [10]。随机挑取转化菌落, 接种于含卡那霉素($50\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基中, 37°C 摇菌过夜, 按 1.6.1 方法提取质粒, 保存于 -20°C , 备用。

1.6.6 PCR 扩增鉴定质粒 pCTH823 以 Primer AFP1t 和 AFP2 为引物, 以已知质粒 pGTHP4 为对照进行 PCR 扩增。反应体系和反应条件同 1.5.2。PCR 反应完毕, 以 1% 的凝胶进行电泳检查。

1.6.7 质粒 pCTH823 的酶切鉴定 用限制性内切酶 *Bgl* II 对质粒 pCTH823 进行单酶解反应, 反应体系为: 质粒 pCTH823($3.12\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $6.0\mu\text{L}$, $10 \times$ NE Buffer3 $3.0\mu\text{L}$, *Bgl* II($5\text{U}/\mu\text{L}$) $4.0\mu\text{L}$, 无菌 ddH_2O $17.0\mu\text{L}$, 37°C 水浴酶解 2h , 同样以限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Eco*R I 对质粒 pCTH823 进行双酶解反应, 先以 *Bgl* II 酶进行酶解, 以 1.6.1 相同的方法沉淀已酶解的 DNA, 之后进行第二次酶解反应, 反应体系为: 无菌 ddH_2O $25.2\mu\text{L}$, $10 \times$ Buffer D $3.0\mu\text{L}$, *Eco*R I($10\text{U}/\mu\text{L}$) $1.5\mu\text{L}$, BSA($10\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $0.3\mu\text{L}$, 37°C 水浴酶解 2h 。以 1% 琼脂糖凝胶电泳分离酶解产物, 目的大片段采用凝胶 DNA 提取 Kit 回收, 步骤按说明书进行。回收产物保存于 -20°C , 备用。

0 μ L, 10 \times Buffer H 3.0L, *EcoR* I (12U/ μ L)1.7 μ L, BSA(10g/ μ L)0.3 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴酶解 2h。酶解产物同样以 1% 的凝胶进行电泳检查。

2 结果和分析

2.1 THP 基因的 PCR 扩增结果

未知载体质粒 PCR 扩增结果如图 1 所示,未知载体质粒的 PCR 各扩增出一条特异明亮的条带(2, 3),其大小与期望扩增得到的 THP 基因的大小一致,介于 400bp 到 500bp 之间。而以 H₂O 为模板没有得到扩增(图 1),这说明扩增的 DNA 条带是特异的。

2.2 PCR 产物的序列测定结果

回收的 PCR 产物(目的片段)经重新克隆,其 DNA 序列测定结果见图 2。该序列同已报道的 THP 基因序列完全相同,全长 411bp。说明 THP 基因已重新克隆成功。

2.3 草菇表达载体 pCTH823 的构建

以 pCAMBIA1301 为基本框架,酶切去除其 GUS 基因的编码片段,回收其大片段。从重新克隆的 pGTHP4 载体中酶切回收 THP 基因目的片段,与 pCAMBIA1301 基本框架的大片段先进行一端的连接,形成包括启动子、目的基因、终止子在内的具完整表达结构的线性载体,然后加衔接头进行连接

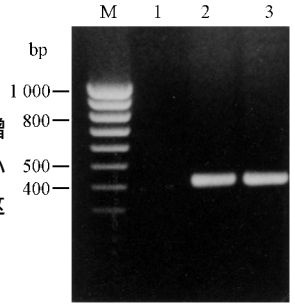


图 1 未知质粒载体 PCR 扩增产物电泳图

M. 100bp 的 DNA Marker ;
1. H₂O 为模板的 PCR 扩增结果 ;
2, 3 未知质粒载体为模板的 PCR 扩增结果 .

GGGCCCGACG	NCGCATGCTC	CCGGCCGCCA	TGGCCNTGGG	ATTTCAGGA	ATCGGCACGA	60
		<i>Nco</i> I		-> THP		
GGAAAGNGNT	ATTTTTTTTT	AGTTTCAAAA	GTTGTGTACA	TTTCTCTCAA	GTATCATGAA	120
GTGTTTAATG	CTGATCATGG	CTCTAGCCAT	TATCAACACT	GTATCTTCTG	ATGGCTCGTG	240
TACAAACACG	AACTCTCAGC	TCAGCGCAAA	CTCCAAGTGC	GAAAAATCGA	CGTTGACCAA	300
CTGCTACGTC	GATAAAAGCG	AGGTTTACGG	CACTACCTGT	ACAGGAAGCC	GATTTCGACG	360
AGTCACTATA	ACGACTTCAA	CATCTACCGG	TTCACGTATT	TCAGGCCCTG	GATGCAAGAT	420
TTCCACTTGC	ATTATCACCG	GGGGTGTACC	TGCTCCATCA	GCTGCTTGCA	AGATTTCTGG	480
ATGTACTTTC	AGTGCTAATT	AAGCCATGAA	AGTCAATCAC	TAGTGCGGCC	GCCTGCAGGT	540
			THP -	<i>Bst</i> Z I		

图 2 THP 基因的 DNA 序列

环化,即为环状的草菇表达载体 pCTH823。具体构建过程见图 3。

2.4 草菇表达载体 pCTH923 的 PCR 扩增鉴定

以 PrimerAFP1 和 PrimerAFP2 为引物对质粒 pCTH823、pCAMBIA1301 和 pGTHP4 进行 PCR 扩增,结果见图 4。从图 4 可知,待鉴定质粒 pCTH823 与 pGTHP4 目的片段的扩增结果相同,均在 500bp 前方同一位置出现一条明亮条带,而质粒 pCAMBIA1301 和 H₂O 没有得到目的片段的扩增。这说明只有待鉴定质粒 pCTH823 含有与已知质粒 pGTHP4 相同的片段。为了进一步鉴定该扩增片段即为 THP 基因片段,以凝胶 DNA Kit 回收该扩增片段并连接到 pGEM[®] T-Vector 上进行测序,测出的序列与图 2 完全一致,这说明该扩增片段正是 THP 基因。

2.5 草菇表达载体 pCTH823 的酶切鉴定

以限制性内切酶 *Bgl* II 进行单酶切及 *EcoR* I 和 *Bgl* II 进行双酶切后电泳的结果见图 5。图 5 的结果表明,质粒 pCTH823 的单酶切大小与期望的 10.25kb 相当。双酶切后在 1kb 和 1.5kb 之间出现一条带,

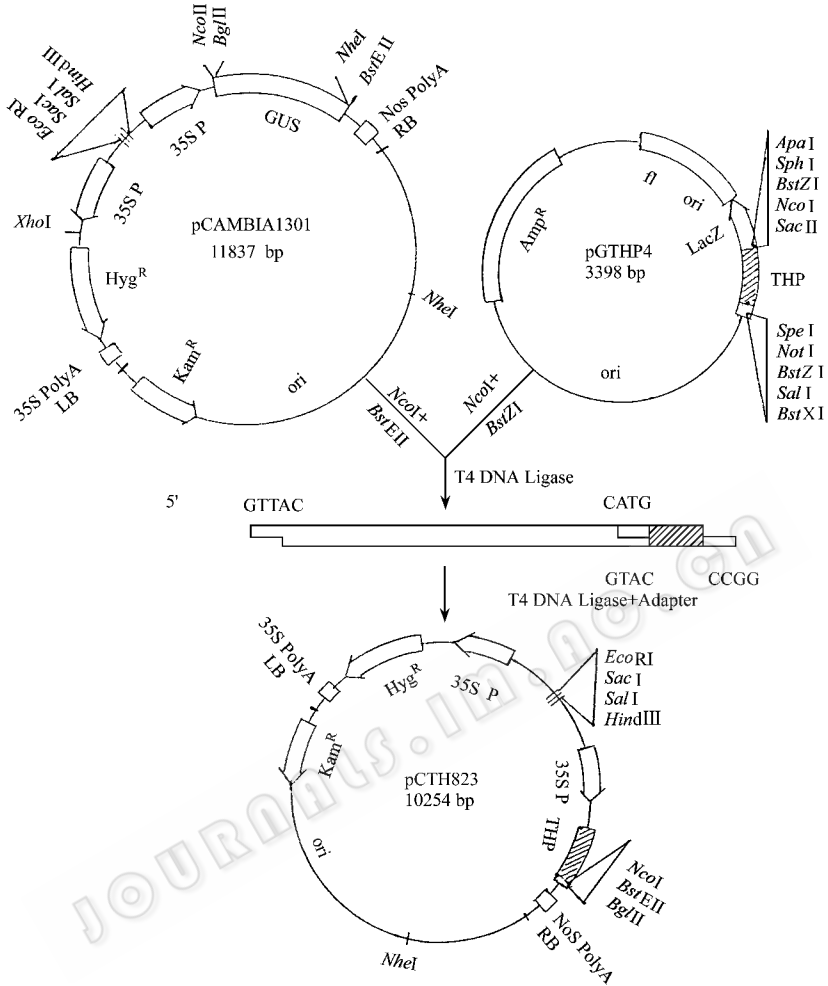


图 3 pCTH823 表达载体的构建

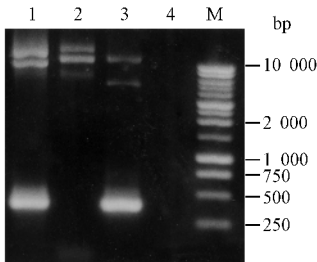


图 4 草菇表达载体 pCTH823 的 PCR 扩增结果

1. 质粒 pCTH823 PCR 扩增结果；
2. pCambia1301 PCR 扩增结果；
3. pGTHP4 PCR 扩增结果；
4. H₂O PCR 扩增结果；

M. 1000bp 的 DNA Marker.

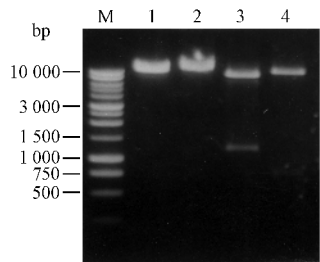


图 5 草菇表达载体 pCTH823 的酶切鉴定结果

1. 质粒 pCTH823 以 *Bgl* II 单酶切结果；
2. 质粒 pCambia1301 以 *Bgl* II 单酶切结果；
3. 质粒 pCTH823 *Eco* R I 和 *Bgl* II 双酶切结果；
4. 质粒 pCambia1301 *Eco* R I 和 *Bgl* II 双酶切结果；

M. 1000bp 的 DNA Marker.

这也与期望切下的大小约 1.23kb 相符。而对照质粒 pCAMBIA1301 的单酶切和双酶切的结果也与期望的相同,故说明草菇表达载体构建成功。

参 考 文 献

- [1] 张树庭.草菇.香港:香港中文出版社,1978.143~147.
- [2] Chang S T. The biology and cultivation of edible fungi. New York :Academic Press ,1978.573~605.
- [3] 段学武,庞学群,张昭其.热带作物学报,2000,21(4):75~79.
- [4] Chang S T, Yau C K. *American Journal of Botany* ,1971,58:552~562.
- [5] 陈明杰,赵绍惠,张树庭.食用菌学报,1995,2(1):1~6.
- [6] 谢宝贵,黄志龙,江玉姬.食用菌学报,1997,4(2):5~10.
- [7] Tyshenko M G, Doucet D, Davies P L, et al. *Nature Biotechnology* ,1997,15:887~890.
- [8] Graham L A, Liou Y C, Walker V K, et al. *Nature* ,1997,388:727~728.
- [9] Choy Hew. *Nature Biotechnology* ,1997,15(9):844.
- [10] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯著(金冬雁,黎孟枫等译).分子克隆实验指南.第二版.北京:科学出版社,1992.16~26,50~56.
- [11] 韩志勇,沈革志,潘建伟.生物技术通报,2000(4):45~46.

Re-cloning of THP Gene and Construction of High Efficient Expression Vector of *Volvariella volvacea**

Guo Liqiong Lin Junfang** Chen Shoucai Xiong Sheng

(National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, China Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract : PCR technique was used for amplifying THP gene in an unknown vector with primer AFP1 and AFP2. Then THP gene was ligated to pGEM T-Vector to be the plasmid pGTHP4. The plasmid pCAMBIA1301 was digested with restriction enzyme *Bst*E II and *Nco* I, and digestion product was separated with 1% of agarose gel, then big fragment containing promoter was isolated and purified with the Agarose Gel DNA Extraction Kit. At the same way, the plasmid pGTHP4 was digested with restriction enzyme *Bst*Z I and *Nco* I, and the small fragment containing THP gene was purified from 1% agarose gel with the Agarose Gel DNA Extraction Kit. The big fragment and the small fragment were ligated at *Nco* I digested cohesive-end. The ligation product was re-ligated to be cyclic plasmid by addition to a specific adapter, resulting in the pCTH823, a expression vector of *V. volvacea*.

Key words : *Volvariella volvacea*, THP gene, Straw mushroom expression vector

* Project Granted by National Natural foundation of China(39960050)

** Author for correspondence