

# 根癌农杆菌介导的球毛壳菌遗传转化及 T-DNA 插入突变体的获得

高兴喜 杨 谦\*

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001)

**摘 要** 根癌农杆菌介导的遗传转化系统是植物基因工程常用方法,目前已将这一转化系统应用到酵母、丝状真菌以及人类细胞的转化。利用这一转化系统,成功地实现了丝状真菌球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)的遗传转化,转化率约为 60~180 个转化子/ $10^7$  个孢子。通过对转化子的 PCR 检测和 Southern 杂交分析表明,T-DNA 已整合进毛壳菌基因组中,而且在所检测的转化子中都是以单拷贝的形式整合,转化子都能够稳定遗传。根癌农杆菌介导的遗传转化具有转化率高、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,遗传转化,潮霉素抗性

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)01-0129-03

毛壳菌(*Chaetomium* spp.)是自然界中广泛存在的腐生子囊菌。其中的球毛壳菌(*C. globosum*)作为一种潜在的生防真菌正在受到越来越多的关注。研究表明,球毛壳菌能有效防治苹果黑星病、西红柿的灰葡萄孢感染以及洋葱白腐病等<sup>[1,2]</sup>。为进一步提高毛壳菌的生防效果,必须对其抑菌、促生的分子机理进行深入研究,而这一工作的前提就是建立起有效的毛壳菌遗传转化系统。

陈振明<sup>[3]</sup>、李 梅<sup>[4]</sup>等采用传统的 PEG- $\text{CaCl}_2$  介导的原生质体法先后在球毛壳菌中建立起相应的遗传转化系统。但由于这些转化系统都是以原生质体为受体,除了原生质体制备过程复杂、重复性差、耗时费力,还普遍存在转化效率低、转化子不稳定等问题。针对这一问题,本文在国外有关研究的基础上,将用于植物遗传转化的根癌农杆菌转化系统成功地用于球毛壳菌的遗传转化,并获得了相应的 T-DNA 插入突变体。根癌农杆菌介导的丝状真菌遗传转化系统不但效率高,操作方便,而且具有遗传稳定,拷贝数低,重复性好等优点<sup>[5-7]</sup>,从根本上解决了传统的丝状真菌遗传转化方法所面临的问题。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) AGL-1 由中国科学院遗传与发育研究所储成才教授惠赠;球毛壳菌(*C. globosum*)为本实验室分离保存,含有潮霉素抗性基因的质粒 pPKH 由质粒 pPK2 上 *Eco*R I/*Xba*I 酶切大片段与质粒 pCB1003 上 *Eco*R I 酶切小片段连接获得<sup>[8]</sup>。

**1.1.2 引物和试剂** 检测潮霉素抗性基因的引物为:hphR:5'-TTCGATGTAGGA GGGCGTGGAT-3', hphF:5'-CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3' 检测卡那霉素抗性基因的引物为:KanR:5'-TCAGTGAACGAAACTC-3', KanF:5'-GAAACACGGATGATGTC-3',引物由北京赛百盛公司合成。*Taq* 聚合酶购自 TaKaRa 公司,潮霉素购自 Roche 公司。

### 1.2 农杆菌的转化和培养

质粒 pPKH 采用冻融法直接转化到农杆菌 AGL-1。从 LB 平板(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素)上挑取一农杆菌单菌落接种于 7mL LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素),250r/min 29 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。第 2 天用含 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$  乙酰丁香酮(AS)MM 液体培养基稀释至  $OD_{660}$  大约 0.15,继续培养大约 4h 至  $OD_{660}$  为 0.6~0.8。

### 1.3 球毛壳菌的转化

用 5mL 灭菌蒸馏水从培养大约 7d 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  $10^5 \sim 10^7$  个/mL。取 100 $\mu\text{L}$  已活化的农杆菌 AGL-1(pPKH)菌液和 100 $\mu\text{L}$  稀释好的毛壳菌孢子悬液混合后涂布在 MM(200 $\mu\text{mol}/\text{L}$  AS)平板上,27 $^{\circ}\text{C}$  共培养 2d 后,在平皿中倒入 10mL M-100 固体培养基<sup>[9]</sup>(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素和 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$  头孢霉素),27 $^{\circ}\text{C}$  继续培养,约 5~7d 见菌落出现。

### 1.4 转化子的 PCR 分析

毛壳菌总 DNA 的提取按文献方法<sup>[10]</sup>进行,潮霉素抗性基因 PCR 反应体系(25 $\mu\text{L}$ ):基因组 DNA 约 100ng,每种引物 10pmol,每种 dNTP 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ,1 $\times$  PCR 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl,50mmol/L KCl,1.5mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ),0.25U *Taq* 酶。反

基金项目:国家 863 计划(2003AA241140)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-451-86412952 E-mail: yangq@hit.edu.cn

作者简介:高兴喜(1972-)男,黑龙江省集贤县人,博士研究生,研究方向为微生物基因工程。E-mail: gaoxingxi@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-06-02,修回日期:2004-11-15

应条件 94℃ 4min ,94℃ 45s ,60℃ 1min ,72℃ 1.5min ,35 个循环 ,72℃ 10min。卡那霉素抗性基因 PCR 反应体系( 25 $\mu$ L ):基因组 DNA 约 100ng ,每种引物 10pmol ,每种 dNTP 200 $\mu$ mol/L ,1 $\times$  PCR 缓冲液( 10mmol/L Tris-HCl ,50mmol/L KCl ,1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub> ) ,0.25U Taq 酶。反应条件 :94℃ 5min ;94℃ 45s ,50℃ 1min ,72℃ 1.5min 30 个循环 ,72℃ 10min。

1.5 转化子的 Southern blot 分析

用于标记探针的模板为质粒 pPKH 上潮霉素抗性基因的 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切片段 ,探针的标记及杂交按试剂盒 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II( 购于 Roche 公司 )上提供的方法进行。

2 结果

2.1 转化前球毛壳菌对潮霉素的敏感性

将球毛壳菌接种于含不同浓度潮霉素的 M-100 固体培养基上 ,27℃ 培养 6d 后 ,毛壳菌生长情况如表 1 所示。结果表明 ,潮霉素浓度在 100 $\mu$ g/mL 时便能抑制毛壳菌的生长 ,潮霉素对球毛壳菌的有效中浓度 *EC*<sub>50</sub> 约为 35.68 $\mu$ g/mL。

表 1 不同浓度潮霉素对球毛壳菌的生长抑制率						
Table 1 Inhibition efficiency of Hygromycin on <i>C. globosum</i> growth						
( Hygromycin ) ( $\mu$ g/mL )	0	25	50	75	100	125
1	0	48.57	88.57	94.28	97.14	100
2	0	41.18	82.35	91.18	94.12	100
3	0	44.12	88.24	97.05	100	100
mean	0	44.62	86.38	94.17	97.08	100
<i>S</i> <sub>n-1</sub>	0	3.72	3.50	2.94	2.94	0

2.2 球毛壳菌转化子的获得及初步鉴定

根癌农杆菌和球毛壳菌孢子在诱导培养基上共培养 2d 后 ,覆盖选择培养基继续培养 5~7d 便可看到大量菌落出现 ,随机挑取这些潮霉素抗性球毛壳菌菌落转接至新的含有 100 $\mu$ g/mL 潮霉素的选择培养基上时 ,都可正常生长 ,把潮霉素浓度增大到 200 $\mu$ g/mL 时 ,仍可正常生长。因此可初步认定这些抗性菌落为转化子。结合几次转化结果 ,本方案对球毛壳菌的转化率约为 60~180 个转化子/10<sup>7</sup> 个孢子。

2.3 转化子的 PCR 检测

随机挑取 6 个转化子菌落 ,以野生型球毛壳菌株为对照 ,在 PD 液体培养基培养 3 d 后 ,提取基因组 DNA 进行 PCR 检测 ,6 个样品均扩增出潮霉素抗性基因的特异片段( 图 1-A )而对位于 T-DNA 之外的卡那霉素抗性基因均未扩增出特异片段( 图 1-B ) ,这表明 Covert 等所报道的 T-DNA 之外的基因转移<sup>[7]</sup>在对球毛壳菌的转化中并未出现。

2.4 Southern blot 分析

从 PCR 阳性样品中选 3 个菌株的基因组 DNA 各取 10 $\mu$ g ,以野生菌株为对照 ,用限制性内切酶 *EcoR* V 单酶切( 图 2-A ) ,T-DNA 内部不包含该酶切位点。按照试剂盒上的方法进行潮霉素抗性基因的 Southern 杂交和检测( 图 2-B ) ,结果表

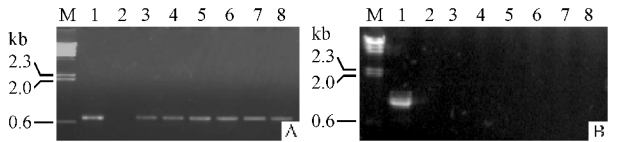


图 1 转化子潮霉素抗性基因 (A) 和卡那霉素抗性基因 (B) PCR 结果

Fig. 1 PCR analysis of putative transformants for hygromycin resistance gene (A) and kanamycin resistance gene (B)  
M. Marker  $\lambda$ -Hind III digest ; 1. Plasmid pPKH ; 2. Wild strain ; 3~8. Transformants .

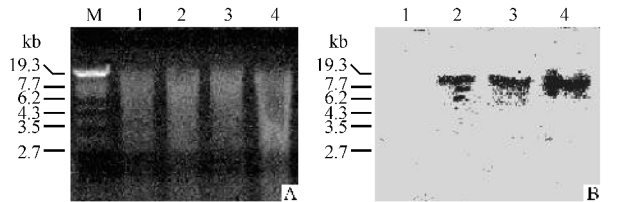


图 2 转化子总 DNA *EcoR* V 酶切 (A) 及潮霉素抗性基因 Southern blotting (B)

Fig. 2 Total DNA digestion by *EcoR* V (A) and Southern blotting of the putative transformants for hygromycin resistance gene (B)  
M. Marker  $\lambda$ -*Eco*T14 I digest ; 1. Wild strain ; 2~4. Transformants .

明潮霉素抗性基因在所检测的转化子中都是以单拷贝的方式整合到基因组 DNA 上的。

2.5 转化子的有丝分裂稳定性

将球毛壳菌转化子接种到不含潮霉素的 PDA 平板上 ,27℃ 培养 2d 后 ,挑取菌落边缘菌丝接种到另一 PDA 平板上培养 ,如此连续转接 10 代 ,然后再接种到含有 100 $\mu$ g/mL 潮霉素的 PDA 平板上培养。结果表明这些转化子仍可生长 ,说明转化子的潮霉素抗性在有丝分裂过程中是稳定的。

3 讨论

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 ,目前已将这一转化系统应用到酵母<sup>[11]</sup>、丝状真菌<sup>[5]</sup>以及人类细胞<sup>[12]</sup>的转化。我们利用这一转化系统成功地实现了对生防真菌球毛壳菌的遗传转化 ,转化率约为 60~180 个转化子/10<sup>7</sup> 个孢子 ,相对于陈振明、李梅等用 PEG-CaCl<sub>2</sub> 介导的原生质体法对球毛壳菌的转化 ,转化效率提高了约 30~50 倍。这在一定程度上解决了用传统方法对球毛壳菌的转化效率低的问题。

通过对球毛壳菌转化子 PCR 分析发现 ,随机挑取的 6 个转化子都扩增出潮霉素抗性基因的特异片段 ,表明潮霉素抗性基因已整合到基因组中。根癌农杆菌介导的转化 ,一般只向宿主转移载体上 T-DNA 部分 ,而不转移除 T-DNA 之外的部分 ,但最近的研究发现 T-DNA 整合也具有超界现象 ,甚至有整个 Ti 质粒整合的报道 ,T-DNA 超界转移现象的机理尚不完全清楚 ,可能与其左边界周边序列有关<sup>[13]</sup>。鉴于此 ,我们

对位于 T-DNA 之外靠近左边界的卡那霉素抗性基因进行了 PCR 检测,但没有相应的特异片段扩增,这与 Covert 等所报道的情况有所不同,Covert 在利用农杆菌系统对 *Fusarium circinatum* 的转化中,有大约 50% 的转化子检测到卡那霉素抗性基因的转移<sup>[7]</sup>,这一结果预示在农杆菌介导球毛壳菌的转化中,可能只有 T-DNA 整合到了基因组中。这一特性对于保证转基因安全具有重要意义,因为如果通过用宿主营养缺陷型等性状作为选择标记,就可以实现除 T-DNA 上的目的基因和同源序列外,农杆菌质粒上其它部分,特别是细菌抗生素选择标记都不整合到基因组上。

根癌农杆菌介导的球毛壳菌转化和植物转化一样,在共培养阶段也需要 AS 的诱导,在培养基中不加 AS 的情况下没有阳性菌落出现,说明 vir 基因的诱导对 T-DNA 向球毛壳菌转移同样是必要的。对球毛壳菌转化子 Southern blot 分析表明,在所测 3 个阳性菌株中,T-DNA 都是以单拷贝方式整合进基因组的,这些特性与农杆菌系统对植物以及其它真菌的转化特点是一致的。

根癌农杆菌介导的球毛壳菌遗传转化体系的建立及 T-DNA 插入突变体的获得,对采用分子生物学手段探讨其生防机制,深入研究其在生物防治中的作用具有重要意义。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Elad Y, Kohl J, Fokkema J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 1994, **100**: 315 - 336.
- [ 2 ] Mclean K L, Stewart A. Application strategies for control of onion

- white rot by fungal antagonists. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 2000, **28**: 115 - 122.
- [ 3 ] 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. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2001, **27**(1): 19 - 22.
- [ 4 ] 李梅,杨谦. 多菌灵抗性基因在球毛壳中的转化. *高技术通讯*, 2002, **12**: 43 - 45.
- [ 5 ] Groot M J A, de Bundock P, Hooykaas P J J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 839 - 842.
- [ 6 ] Gou R J, Gerk C, Hooykaas P J J, et al. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nat Biotechnology*, 1999, **17**: 598 - 601.
- [ 7 ] Covert S F, Kapoor P, Lee M, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol Res*, 2001, **105**(3): 259.
- [ 8 ] 高兴喜,杨谦. 根癌农杆菌介导的 *CryIA(b)* 基因在哈茨木霉菌中的转化. *科学通报*, 2004, **49**(21): 2193 - 2197.
- [ 9 ] Stevens R. *Mycology Guidebook*. Washington: University of Washington Press, 1974, 376.
- [ 10 ] Russo P, Juuti J T, Raudaskoski M. Cloning, sequence and expression of a  $\beta$ -tubulin-encoding gene in the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Gene*, 1992, **119**: 175 - 182.
- [ 11 ] Bundock P, Dulk-Ras A den, Beijersbergen A, et al. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 1995, **14**: 3206 - 3214.
- [ 12 ] Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, et al. Genetic transformation of Hela cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, **98**: 1871 - 1876.
- [ 13 ] 李卫,郭光沁,郑国昌,等. 根癌农杆菌介导遗传转化研究的若干新进展. *科学通报*, 2000, **45**(8): 798 - 807.

## *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Chaetomium globosum* and its T-DNA insertional mutagenesis

GAO Xing-xi YANG Qian\*

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

**Abstract:** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation is a routine method in the genetic transformation of a wide range of plant species, and so far, its application has been extended to the transformation of yeasts, fungi and even human cells. By using this transformation system, filamentous fungus *Chaetomium globosum* was successfully transformed with an efficiency of 60 ~ 180 transformants per  $10^7$  spores. PCR and Southern analysis showed that the T-DNA was integrated into the genome. Among of the examined transformants contained a single copy, and was stable through mitotic cell division. The transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* may prove to be a powerful tool for the filamentous fungi transformation and functional genomic study with its high transformation frequency, simplicity of T-DNA integration, and genetic stability of transformants.

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Chaetomium globosum*, Genetic transformation, Hygromycin resistance