

农业生物技术

根癌农杆菌介导的增强型绿色荧光蛋白基因在淡紫拟青霉中的转化

王阶平, 汪家旭, 刘凡, 潘沧桑

厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

摘要: 为了实现增强型绿色荧光蛋白基因 (*egfp*) 在生防真菌淡紫拟青霉 9410 菌株中的转化, 借助中间质粒 pcDNA3.1(-) 构建 *nptII-egfp* 融合基因的表达载体 pUPNGT, 然后采用根癌农杆菌介导的转化法将 *egfp* 基因转化到淡紫拟青霉 9410 菌株中。PCR 检测和 Southern blotting 分析结果表明, *egfp* 基因以单拷贝形式整合到淡紫拟青霉 9410 的基因组中。荧光显微镜观察结果显示, 转化子在 488 nm 光源的激发下能产生绿色荧光。这些结果说明 *egfp* 基因已成功转化至淡紫拟青霉 9410 菌株并获得表达。这些工作可为淡紫拟青霉在不同条件下的防效评价、环境安全评价等提供新的途径和方法。

关键词: 淡紫拟青霉, 增强型绿色荧光蛋白, 根癌农杆菌, 遗传转化

Transformation of enhanced green fluorescent protein gene in *Paecilomyces lilacinus* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Jieping Wang, Jiayu Wang, Fan Liu, and Cangsang Pan

School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: The main aim of this study was to transform the enhanced green fluorescent protein gene (*egfp*) into biocontrol fungus *Paecilomyces lilacinus* strain 9410. We constructed the expression vector pUPNGT of the fusion gene *nptII-egfp* using pcDNA3.1(-) as a helper plasmid. The *egfp* gene was then transformed into *P. lilacinus* strain 9410 via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. PCR and Southern blotting analysis showed that the *egfp* gene was integrated into the genomes of the tested transformants and the integration manner was single-copy. The transformants could generate green fluorescence when they were excited by 488 nm blue laser. These results indicated that the *egfp* gene had been successfully transformed into *P. lilacinus* 9410 and expressed in the tested transformants. Our work may provide a new approach to assess environmental safety and practical biocontrol efficacy of *P. lilacinus* under different conditions.

Keywords: *Paecilomyces lilacinus*, enhanced green fluorescent protein, *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation

Received: October 26, 2009; **Accepted:** March 16, 2010

Supported by: Key Program of Fujian Province (No. 2008N01050731).

Corresponding author: Cangsang Pan. Tel: +86-592-2186812; Fax: +86-592-6889168; E-mail: cspan@xmu.edu.cn

福建省重点项目 (No. 2008N01050731) 资助。

淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson 1974 是一种土壤及多种植物根际的习居菌, 在全球广泛分布。现已认为它是最有前途的植物病原线虫的生防真菌之一, 全球已有 60 多个国家开展了应用淡紫拟青霉防治根结线虫 *Meloidogyne* spp.、胞囊线虫 *Heterodera* spp. 等植物病原线虫的研究, 并已开始付诸实践^[1-3]。同时, 淡紫拟青霉对有害昆虫^[4]、动物寄生虫^[5]、植物病原菌^[6]等也有一定的防控效果。但在淡紫拟青霉的遗传背景及其控害的作用机制等方面, 至今仍了解甚少。丝状真菌遗传转化系统的建立, 为人们从分子水平了解丝状真菌的遗传背景和进一步的菌株改造提供了强有力的工具。

根癌农杆菌介导的转化法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 具有易操作、转化受体多样化、转化效率高、转化子稳定、T-DNA 在真菌基因组中以单拷贝插入为主等优点。自 1998 年 de Groot 等^[7]首次将 ATMT 法应用于丝状真菌的遗传转化以来, 已有大量的丝状真菌通过 ATMT 法成功实现了遗传转化^[8-10]。本研究以 G418 抗性基因为筛选标记, 采用 ATMT 法将增强型绿色荧光蛋白基因 (Enhanced green fluorescent protein, *egfp*)^[11]整合到生防真菌淡紫拟青霉 9410 菌株的基因组中, 实现淡紫拟青霉 9410 的 *egfp* 标记, 为其在防效评价、生态学跟踪研究和环境安全评价等方面的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

淡紫拟青霉 *P. Lilacinus* 9410 菌株, 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 菌株, pcDNA3.1(-) 和 pcDNA3.1-*egfp* 质粒由厦门大学生命科学学院寄生动物研究室保存; 根癌农杆菌 *A. tumefaciens* EHA105 菌株由厦门大学生命科学学院陈亮教授提供; 真菌表达载体 pUR5750 由 RE Cardoza 博士 (University of León, Spain) 提供。

1.2 含有 *egfp* 基因的二元载体的构建

首先按图 1 的流程, 经过 PCR 扩增、酶切、连接和序列分析等步骤分别将来自构巢曲霉 *Aspergillus*

nidulans 的甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子 *PgpdA*、G418 抗性基因 *nptII*+弹性连接肽 (Linker)、*egfp* 基因和来自构巢曲霉 *A. nidulans* 的色氨酸合成酶 C 基因的转录终止子 *TtrpC* 4 个片段插入到中间质粒 pcDNA3.1(-) 中, 构建成 *nptII-egfp* 融合基因的表达 DNA 序列组件 *PgpdA*-NPTL-*egfp*-*TtrpC*; 然后, 经酶切、连接步骤将该表达 DNA 序列组件插入到真菌表达载体 pUR5750 中, 构建成二元载体 pUR5750-*PgpdA*-NPTL-*egfp*-*TtrpC*, 命名为 pUPNGT。

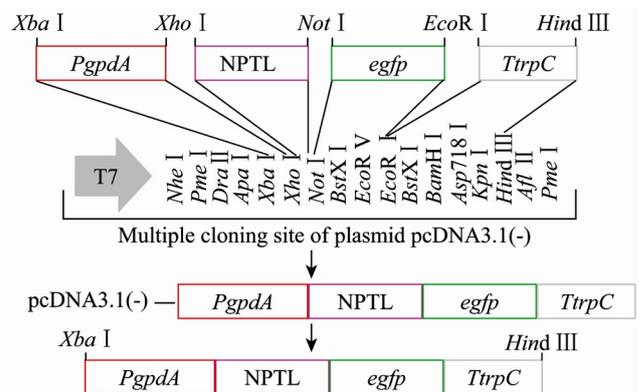


图 1 构建 *nptII-egfp* 融合基因的表达 DNA 序列组件的流程

Fig. 1 Construction flow chart of the expression DNA cassette of the fusion gene *nptII-egfp*.

1.3 淡紫拟青霉分生孢子的准备

用无菌蒸馏水从培养 7~10 d 的 PDA 平板上洗下淡紫拟青霉的分生孢子, 离心后用 MM 液体培养基重悬, 血球计数板计数, 然后用 MM 液体培养基将孢子浓度调整为 10^8 个/mL。

1.4 根癌农杆菌的活化培养

表达载体 pUPNGT 采用液氮冻融法直接转化到根癌农杆菌 EHA105 菌株中。从含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上挑取农杆菌单菌落, 接种于 3 mL LB 液体培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素), 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养过夜。第 2 天用诱导培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素、40 mmol/L MES (pH 5.3)、0.5% 甘油 (W/V)、200 μ mol/L 乙酰丁香酮的 MM 液体培养基) 稀释至 OD_{600} 大约 0.15, 继续培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8。

1.5 淡紫拟青霉的转化

取已活化好的根癌农杆菌 EHA105 菌液和制备好的淡紫拟青霉分生孢子悬液各 100 μ L, 加入到

1.5 mL EP 管中,离心后用 200 μ L 诱导培养基重悬,采用液相静置方式置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中进行共培养,48 h 后将共培养物涂布在含 300 μ g/mL G418 和 300 μ g/mL 头孢霉素的 PDA 平板上进行转化子筛选。

1.6 淡紫拟青霉转化子的 PCR 检测

淡紫拟青霉原始菌株和转化子的基因组 DNA 的提取按文献[12]的方法和步骤进行。以基因组 DNA 为模板,用扩增 *egfp* 基因的引物 eGFPF: 5'-AT AAGAATGCGGCCGCATGGTGAGCAAGGGCGAG -3'和 eGFPR: 5'-CCGGAATTCTTACTTGTACAGCT CGTC-3'对 eGFP 转化子进行 PCR 检测。

1.7 淡紫拟青霉转化子的 Southern blotting 分析

选择质粒 pUPNGT 上无酶切位点的内切酶对基因组 DNA 进行酶切,以质粒 pUPNGT 的 *Not* I 和 *Eco*R I 的酶切片段 (*egfp*) 为模板制备探针。标记、杂交及检测的方法和步骤参照试剂盒上 (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, 购自上海华舜公司) 提供的方法进行。

1.8 淡紫拟青霉转化子的荧光显微镜观察

在洁净的载玻片中央滴加无菌水,分别从 PDA 平板上挑取转化子菌丝体于水滴中,用解剖针分散菌丝体,盖上盖玻片。于荧光显微镜下观察转化子的 *egfp* 基因的表达情况,并拍照记录。

2 结果

2.1 *egfp* 基因表达载体 pUPNGT 的构建

按图 1 的流程,分别将启动子 *P_{gpdA}*、筛选标记基因 *nptII*+Linker (即 NPTL)、*egfp* 基因和转录终止子 *T_{trpC}* 这 4 个片段,依次插入到中间质粒中,构建成重组质粒 pcDNA3.1(-)-*P_{gpdA}*-NPTL-*egfp*-*T_{trpC}*。然后,用 *Xba* I 和 *Hind* III 将 *P_{gpdA}*-NPTL-*egfp*-*T_{trpC}* 片段切下,插入到真菌表达载体 pUR5750 的相应位点,得到了表达载体 pUR5750-*P_{gpdA}*-NPTL-*egfp*-*T_{trpC}*,命名为 pUPNGT。

2.2 淡紫拟青霉转化子的获得与初步鉴定

含载体 pUPNGT 的农杆菌和淡紫拟青霉的分生孢子在诱导培养基中液相静置共培养 48 h,经适当稀释后涂布在含 300 μ g/mL G418 和 300 μ g/mL 头孢霉素的 PDA 平板上,培养 5 d 左右即有 G418 抗性菌落出现,随机挑取 G418 抗性菌落转接至含有

400 μ g/mL G418 的 PDA 平板,这些菌落都可以正常生长。据此初步认定这些抗性菌落为转化子。结合几次转化结果,本研究对淡紫拟青霉 9410 的转化率为 140~156 个转化子/ 10^6 个孢子。

2.3 转化子的 PCR 和 Southern blotting 分析

从抗性平板 (含 400 μ g/mL G418) 上随机挑取 10 个转化子,提取基因组 DNA 后,用扩增 *egfp* 基因的引物 eGFPF 和 eGFPR 对转化子进行 PCR 检测。结果表明,10 个转化子在约 750 bp 处均有一条特异的扩增条带,PCR 反应均为阳性,而原始菌株的 PCR 反应则为阴性 (数据未显示)。这些结果提示,*egfp* 基因已成功整合到各转化子的基因组中。

淡紫拟青霉 1、4、18、19 号转化子和原始菌株 (阴性对照) 的基因组 DNA 分别用 *Spe* I 进行单酶切,该酶切位点位于 T-DNA 外侧,质粒 pUPNGT (阳性对照) 用 *Hind* III 进行单酶切,按照试剂盒的方法进行 *egfp* 基因的 Southern 杂交和检测。结果表明 *egfp* 基因已经整合到淡紫拟青霉基因组中,而且都是以单拷贝的方式整合 (图 2)。

2.4 淡紫拟青霉转化子的荧光显微镜观察

为了检测淡紫拟青霉转化子的 *egfp* 基因的表达情况,利用荧光显微镜观察各转化子的菌丝体在 488 nm 蓝色激光光源的激发下能否产生绿色荧光。图 3 所示的是 1、4 和 18 号 3 个转化子的菌丝体在蓝色激光激发下的形态,转化子 eGFP1、4 和 18 在 488 nm 蓝色激光的激发下均发出了绿色荧光。结果表明,*egfp* 基因在转化子中得到了表达。

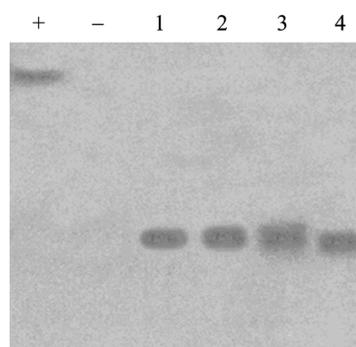


图 2 淡紫拟青霉转化子的 Southern blotting 分析

Fig. 2 Southern blotting analysis of transformants of *Paecilomyces lilacinus*. +: positive control (plasmid pUPNGT); -: negative control (genomic DNA of *P. lilacinus* 9410 original strain); 1-4: genomic DNA of transformant 1,4,18 and 19, respectively.

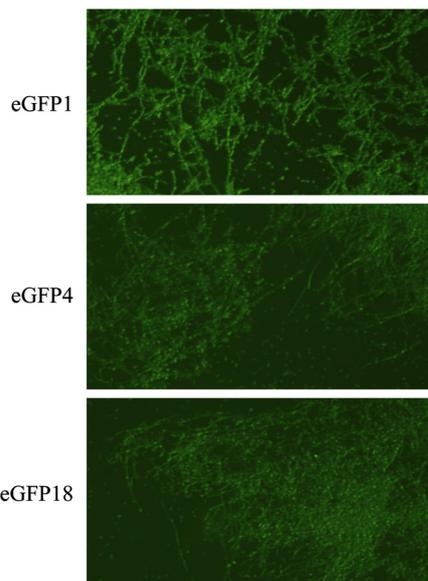


图3 淡紫拟青霉转化子的荧光显微镜观察 (200×)
Fig. 3 Observations of transformants of *Paecilomyces lilacinus* using fluorescent microscope (200×).

2.5 淡紫拟青霉转化子的遗传稳定性

将淡紫拟青霉转化子接种到不含抗生素 G418 的 PDA 平板上连续传代 5 次, 每代培养时间均为 5 d, 然后再接种到含有 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的 PDA 平板, 培养 7 d。结果表明, 淡紫拟青霉转化子在没有抗生素的压力下连续传代 5 次后, 仍保持了抗高浓度 G418 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的能力, 而且转化子仍能产生绿色荧光 (数据未显示), 提示淡紫拟青霉菌转化子的 G418 抗性和 *egfp* 基因能稳定遗传。

3 讨论

遗传转化通常是稀有事件, 因此, 从大量未转化细胞的背景中筛选转化子有赖于可供选择转化子的遗传标记。潮霉素 (HygB) 已广泛应用于丝状真菌的遗传转化。但淡紫拟青霉 9410 菌株对 HygB 具有高度的抗性, 因此 HygB 不能用来筛选该菌株的转化子。后来, 我们发现该菌株对新霉素类抗生素 G418 较为敏感, 可用于转化子的筛选。文献资料也表明, G418 及其抗性基因 *npt II* 已在酵母^[13]、须癣毛癣菌 *Trichophyton mentagrophytes*^[14] 等真菌的遗传转化中得到应用。本室以 G418 和 *npt II* 基因分别为筛选抗生素和筛选标记, 已成功建立了农杆菌介导的淡紫拟青霉 9410 的遗传转化体系。

绿色荧光蛋白 (GFP) 是一类存在于水母、水螅等腔肠动物体内的非常稳定的生物发光蛋白质。GFP 能在细菌、蓝细菌、酵母、植物、真菌、线虫、哺乳动物等多种异源细胞中表达, 这一特性使其成为广泛应用的荧光标记分子, 已在分子医学、细胞学、分子生物学、病毒学和微生物分子生态学等领域得到广泛应用。尽管 GFP 已对许多真菌成功实现了标记^[15], 但对植物病原线虫的生防真菌淡紫拟青霉的遗传标记国内外尚未见报道。本研究采用根癌农杆菌介导的转化法 (ATMT), 成功实现了增强型绿色荧光蛋白基因 *egfp* 对淡紫拟青霉 9410 的遗传转化。经实验证实 *egfp* 基因以单拷贝的方式整合到淡紫拟青霉 9410 基因组中, *egfp* 基因能稳定遗传, 且淡紫拟青霉转化子在 488 nm 蓝色激光的激发下均能发出绿色荧光。

淡紫拟青霉虽已在全球得到广泛的研究并已付诸实践^[1-2], 但淡紫拟青霉菌剂作为以活菌的形式发挥生防功能的生防制剂, 往往存在防效不稳定的问题, 可能随着土壤环境、施用方法、耕作方式、灌溉方式等的不同, 其防效可能出现较大差异^[16]。要解决这些问题, 就必须研究在不同土壤、温度 (季节)、不同作物栽培方式 (如聚乙烯薄膜覆盖与露土、滴灌施肥等) 等条件下, 淡紫拟青霉在植物根际的定殖能力、发生、发展等情况。由于植物根际有着复杂的微生态系统, 在研究目标菌株与植物及其他根际微生物相互作用的过程中, 如何将它们与根际其他土著微生物区分开来显得特别重要, GFP 分子标记及其荧光检测技术的应用为这项工作提供了一个简便、灵敏和可靠的方法。本研究所进行的工作可为淡紫拟青霉在不同条件下的防效评价、生态学跟踪研究和环境安全评价等提供新的途径和方法。

REFERENCES

- [1] Pan CS. R&D of *Paecilomyces lilacinus*. *Fine Spec Chem*, 2003, 6: 15-17.
潘沧桑. 淡紫拟青霉菌剂的研究开发. *精细与专用化学品*, 2003, 6: 15-17.
- [2] Kiewnick S, Sikora RA. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus*

- strain 251. *Biol Control*, 2006, **38**: 179–187.
- [3] Khan MR, Goswami BK. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* isolate 6 against *Meloidogyne incognita* infecting tomato. *Int J Nematol*, 2002, **12**(1): 111–114.
- [4] Xie QM, Liang GW, Lu YY. Field efficiency of *Paecilomyces lilacinus* against litchi stink bug *Tessarotoma papillosa* Drury. *Wuyi Sci J*, 2002, **18**: 143–145.
谢钦铭, 梁广文, 陆永跃. 淡紫拟青霉对荔枝蝽象的田间防治试验. *武夷科学*, 2002, **18**: 143–145.
- [5] Ciarmela ML, Thevenet PS, Alvarez HM, *et al.* Effect of *Paecilomyces lilacinus* on the viability of oncospheres of *Taenia hydatigena*. *Vet Parasitol*, 2005, **131**(1/2): 61–64.
- [6] Add-EL-Moity H, Riad FW, EL-Eraki S. Effect of single and mixture of antagonistic fungi on the control of root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Egypt J Agr Res*, 1993, **71**(1): 91–101.
- [7] de Groot MJ, Bundock P, Hooykaas PJJ, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(9): 839–842.
- [8] Weld RJ, Eady CC, Ridgway HJ. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Microbiol Methods*, 2006, **65**(1): 202–207.
- [9] Klimes A, Neumann MJ, Grant SJ, *et al.* Characterization of the glyoxalase I gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Can J Microbiol*, 2006, **52**(9): 816–822.
- [10] Maruthachalam K, Nair V, Rho HS, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(2): 234–241.
- [11] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996, **173**(1): 33–38.
- [12] Russo P, Juuti JT, Raudaskoski M. Cloning, sequence and expression of a β -tubulin-encoding gene in the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Gene*, 1992, **119**: 175–182.
- [13] Guerra OG, Rubio IG, da Silva Filho CG, *et al.* A novel system of genetic transformation allows multiple integrations of a desired gene in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes. *J Microbiol Methods*, 2006, **67**(3): 437–445.
- [14] Yamada T, Makimura K, Hisajima T, *et al.* Genetic transformation of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*, based on the use of G418 resistance as a dominant selectable marker. *J Dermatol Sci*, 2008, **49**(1): 53–61.
- [15] Spellig T, Bottin A, Kahmann R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, 1996, **252**(5): 503–509.
- [16] Kiewnick S, Sikora RA. Optimizing the efficacy of *Paecilomyces lilacinus* (strain 251) for the control of root-knot nematodes. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 2004, **69**(3): 373–380.