

根癌农杆菌介导的反义 *VeFAD₂* 基因对少根根霉的遗传转化及其影响因子

刘明靖, 李纪元*, 范正琪, 田敏, 范妙华

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

关键词: AtMT; *VeFAD₂* 基因; 遗传转化; 少根根霉

中图分类号: Q786 S722.3⁺⁷

文献标识码: A

Genetic Transformation in *Rhizopus arrhizus* of Antisense *VeFAD₂* Gene via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation and Its Influencing Factors

LIU Ming-jing, LI Ji-yuan, FAN Zheng-qi, TIAN Min, FAN Miao-hua

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AtMT) method was used to study the genetic transformation in *Rhizopus arrhizus* of antisense expression vector pBI121-fad2 of *VeFAD₂* gene. We studied the key factors influencing transformation, such as *A. tumefaciens* strains, bacterial cell volume initially used, co-cultivation time, effective period and concentration of AS. The results shows that the ideal *A. tumefaciens* strain is AGL-1, the optimum bacterial cell volume initially used is 50 - 100 μL and co-culture 24 hours will get the most transformants. At co-culture period, AS induction is indispensable. It is beneficial to improve transformation ratio by adding to 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS at preincubate period and increasing AS concentration to 400 - 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ at co-culture period. It determined that antisense *VeFAD₂* gene has been integrated into the genome of *R. arrhizus* by PCR-Southern detection.

Key words: AtMT; *VeFAD₂* gene; genetic transformation; *Rhizopus arrhizus*

12 脂肪酸脱饱和酶(又称油酸脱氢酶,简称 *FAD₂*)是调节生物体内脂肪酸代谢的关键酶之一,它催化油酸 18:1(9)脱氢形成亚油酸 18:2(9,12),在碳链中引入第2个双键^[1]。本实验室已从木本油料树种千年桐(*Vernicia montana* Lour.)发育中的种子中克隆到 *VeFAD₂* 基因,为提高产油真菌少根根霉(*Rhizopus arrhizus* Fischer)的油酸含量,作者将 *VeFAD₂* 基因的反义表达载体 pBI121-fad2 导入少根

根霉中,期望通过分子生物学手段调控真菌的脂肪酸代谢,改良其脂肪酸组成,以满足生物柴油对植物油源油脂中单不饱和脂肪酸的要求^[2-4]。

根癌农杆菌介导法(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, AtMT)较之 PEG-CaCl₂ 法、醋酸锂法、电击法、基因枪法等传统的遗传转化方法,具有操作简便、遗传稳定、转化率高、重复性好等优点^[5-8]。自 1995 年 Bundock^[5] 等成功利用根癌农杆

菌转化酵母以来,已有包括丝状真菌泡盛曲霉(*Aspergillus awamori* Nakazawa)在内的60多种真菌通过该方法实现了遗传转化^[9]。虽然AtMT转化的过程基本相同,但针对不同的真菌,其转化条件却不尽相同。众多研究表明,影响转化的因素很多,如农杆菌菌株类型、真菌与农杆菌的细胞浓度、选择标记、乙酰丁香酮(Acetosyringone, AS)作用时期与作用浓度、共培养时间、共培养温度、培养基pH值等都能影响转化的成败及转化率^[7,10-11]。本文通过对影响转化效率的几个关键因子进行研究,优化转化条件,初步建立了一套经由根癌农杆菌介导的木本植物基因在丝状真菌少根根霉中实现遗传转化的体系,同时也为将该体系应用于其它产油真菌的遗传转化提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒 *VeFAD₂* 基因(全长1 152 bp)的反义表达载体 pBI121-fad2 由本实验室构建,该质粒携带标记基因 *NPT*,对卡那霉素具有抗性;根癌农杆菌菌株 EHA105、AGL-1(均含质粒 pBI121-fad2)为本实验室保存;少根根霉购自中国科学院微生物研究所。

1.1.2 试剂和引物 质粒提取试剂盒购自 AXYG-GEN 公司;Southern 杂交试剂盒 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 购自 Roche 公司;卡那霉素、利福平、头孢呋辛钠和乙酰丁香酮(AS)购自上海生工公司;限制性内切酶 BamH 和 XbaI 购自宝生物(大连)有限公司;PCR 试剂购自 TAKARA 公司,其它化学试剂均为国产分析纯。

VeFAD₂ 基因上游引物: gAgCTggTggCCgAATgTCT,下游引物: CTCgTAACAaggTCAAACCTC,由上海生工公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌的活化及预培养 从 LB 平板上挑取根癌农杆菌单克隆菌落接种于 LB 液体培养基中(含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素, $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 利福平), $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 28 °C 培养过夜,离心收集菌体,用等体积的 IM 诱导培养液重悬菌体,继续摇瓶预培养 4 转 5 h 至 OD_{600} 为 0.6 左右。

1.2.2 真菌孢子悬液的制备 用无菌蒸馏水从培养 5 转 7 d 的 PDA 斜面培养基上洗下少根根霉的孢子,3 层擦镜纸过滤,用适量蒸馏水稀释至 OD_{600} 为

0.45 左右(血球计数板计数,孢子浓度约为 1.0×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.2.3 共培养 分别吸取 50、100、150、200、300 μL 的根癌农杆菌菌液与 200 μL 少根根霉孢子悬液混合,再取 10 μL 混合液与 100 μL IM 培养液混合均匀后,涂布在铺有微孔滤膜的 IM 固体培养基(含一定浓度的 AS)上,28 °C 暗培养一段时间。

1.2.4 转化子的筛选 将滤膜转移至选择培养基 SM 平板上(含 $350 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素筛选剂, $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 头孢呋辛钠抑菌剂),28 °C 暗培养 24 h 后,随机挑取抗性菌丝转接到含更高浓度筛选剂的选择培养基 SM 上(含 $450 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素, $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 头孢呋辛钠),还能继续生长的视为阳性转化子。每处理随机挑取 10 处抗性菌丝,设 5 次重复,统计转化子数目,计算转化率。

1.2.5 转化子的 PCR-Southern 杂交鉴定 采用氯化苜法^[12]提取阳性转化子基因组 DNA。*VeFAD₂* 基因 PCR 反应条件为:94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1.5 min,30 个循环,72 °C 再延伸 10 min。

随机选取 5 个经 PCR 初步鉴定为阳性的转化子,提取基因组 DNA 做进一步的 PCR-Southern 杂交检测。用于标记探针的模板为质粒 pBI121-fad2 上 *VeFAD₂* 基因的 BamH 和 XbaI 双酶切片段,探针的标记和杂交按试剂盒上提供的方法进行。

1.2.6 各影响因子的试验设计 选用 EHA105 和 AGL-1 2 种农杆菌菌株;农杆菌初始菌液量分别为 50、100、150、200、300 μL ;不同的共培养时间(12、24、36、48 h);在农杆菌预培养时期设置未加入和加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 2 个处理;共培养时期加入不同浓度的 AS(0、200、400、600、800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2 结果与分析

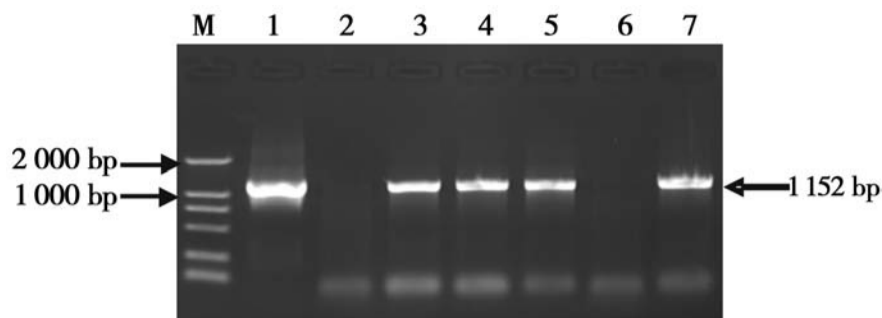
2.1 少根根霉转化子的获得及鉴定

将少根根霉分生孢子和根癌农杆菌的混合液涂布到 IM 诱导培养基上共培养 24 h 后,滤膜上即有些许细弱菌丝生成,将其转移到 SM 选择培养基继续培养 24 h,便可看到大量絮状或绒毛状的白色菌丝出现,这些菌丝呈丛生状或片状分布于平板上,并未形成独立的单一菌落。随机挑取这些抗性菌丝转接至含更高浓度卡那霉素的 SM 选择培养基上时,仍能继续正常生长的,可初步认定为转化子。

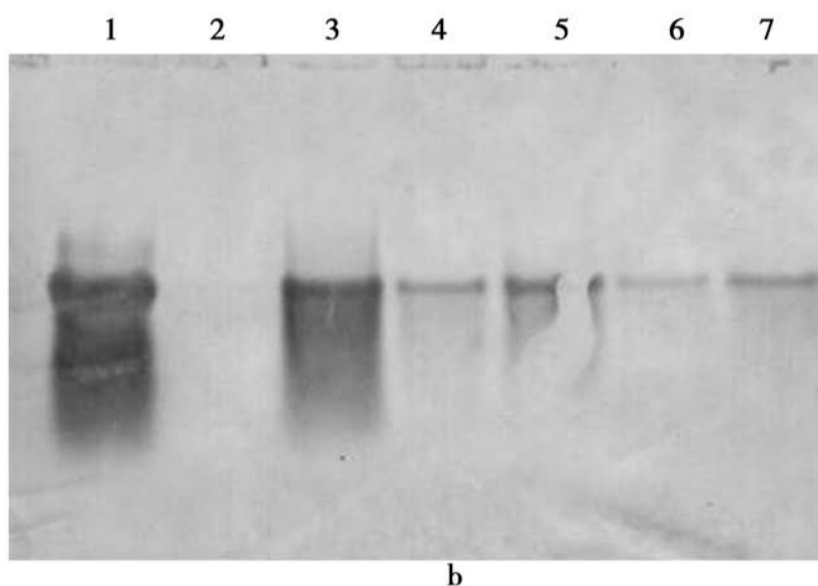
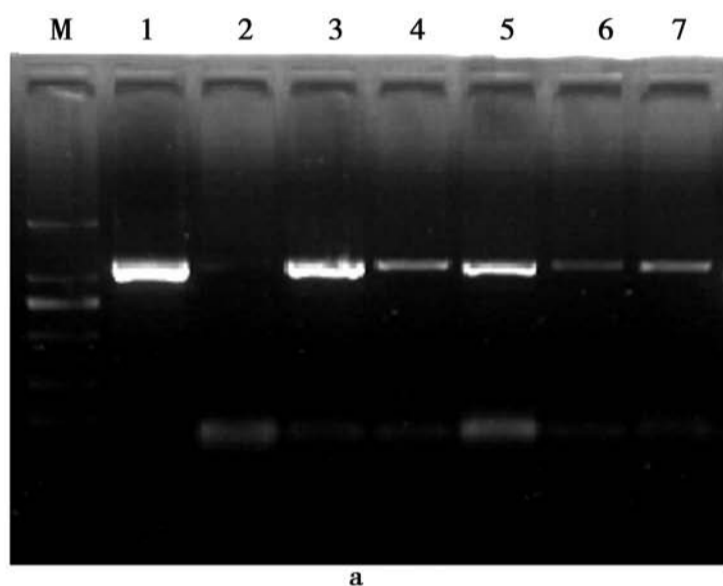
随机选取5个转化子,以质粒 pBI121-fad2 为阳性对照,以野生型少根根霉菌株为阴性对照,分别提取基因组 DNA 进行 PCR 扩增,检测结果见图 1。由图 1 可见:有 4 个样品扩增出 *VeFAD₂* 基因的特异性片段,初步表明转化成功;而未扩增出条带的样品则有可能是存在于抗性菌落中的假阳性转化子。

从经过 PCR 初步鉴定呈阳性且生长良好的转化子中随机挑选 5 个转化子菌落,以质粒 pBI121-fad2 为阳性对照,以野生型木霉菌株做阴性对照,1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 2 - a。接着再用此凝胶与标记好的探针杂交,图 2 - b 为杂交后所获

影像。图 2 显示:5 个转化子均有与阳性对照相同的杂交信号出现,而阴性对照未出现杂交信号,这说明目的基因已整合到少根根霉的基因组中。



M: DNA 2 000 分子量标准; 1: 质粒 pBI121-fad2(阳性对照);
2: 野生型少根根霉(阴性对照); 3 轉 7: 转化子
图 1 转化子 *VeFAD₂* 基因的 PCR 鉴定



M: DNA 2 000 分子量标准; 1: 质粒 pBI121-fad2; 2: 野生型少根根霉; 3 轉 7: 转化子
图 2 转化子 *VeFAD₂* 基因的 PCR 检测(a) 及 PCR 产物的 Southern 杂交鉴定(b)

2.2 农杆菌菌株对转化的影响

分别利用 2 种农杆菌菌株 EHA105 和 AGL-1 对丝状真菌少根根霉进行转化。转化条件: 农杆菌初始菌液量 50 μL , 预培养时加入 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AS, 共培养时 AS 浓度 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 共培养时间 24 h。2 种处理均筛选出了阳性转化子, 转化率达到 68% 轉 82% (图 3)。结果表明: 农杆菌菌株 EHA105 和 AGL-1 都适用于少根根霉的转化, 且 AGL-1 的转化率高于 EHA105。

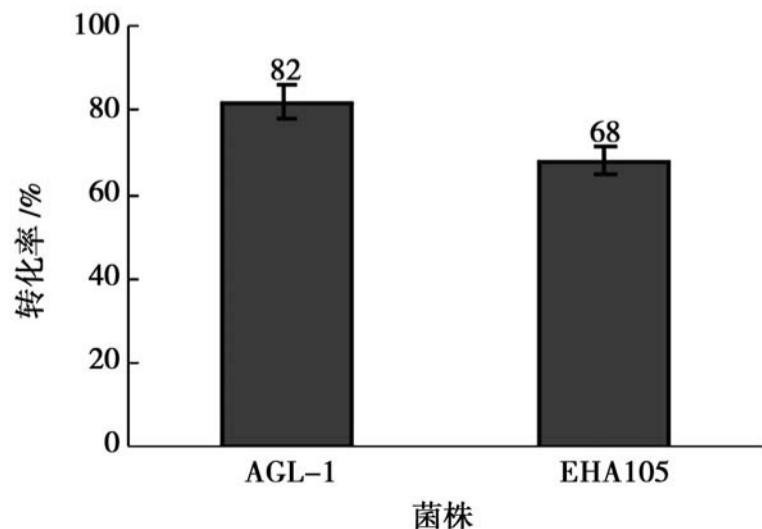


图 3 农杆菌菌株对转化的影响

2.3 农杆菌初始菌液量对转化的影响

农杆菌经活化培养到对数生长期 (OD_{600} 为 0.6 左右), 分别吸取 50、100、150、200、300 μL 的农杆菌初始菌液量与 200 μL 制备好的少根根霉孢子悬液 (10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$) 混合。转化条件: 农杆菌菌株 AGL-1, 预培养时加入 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AS, 共培养时 AS 浓度 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 共培养时间 24 h。

转化结果(图 4)表明: 当农杆菌初始菌液量在 50 μL 和 100 μL 时, 转化率在 80% 左右; 随着菌液量的增加, 转化率逐渐下降。作者在试验中发现, 以 200 μL 初始菌液量的处理, IM 平板上有农杆菌菌落形成, 极大抑制了真菌的生长; 而当菌液量增加到 300 μL 时, 农杆菌过度生长引起严重污染, 导致真菌几乎无法生长。因此, 本试验理想的农杆菌初始菌液量是 50 轉 100 μL 。

2.4 共培养时间对转化的影响

本研究设计不同的共培养时间(12、24、36、48 h), 通过考察少根根霉在 IM 诱导培养基上的生长情况及其在 SM 筛选平板上生成抗性菌落的情况,

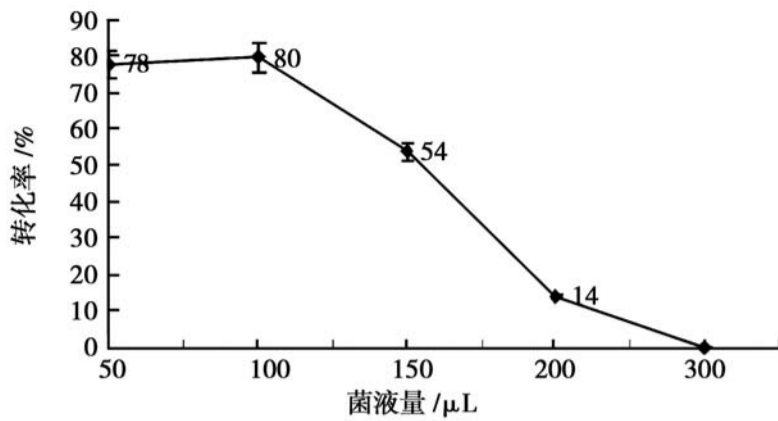


图4 农杆菌初始菌液量对转化的影响

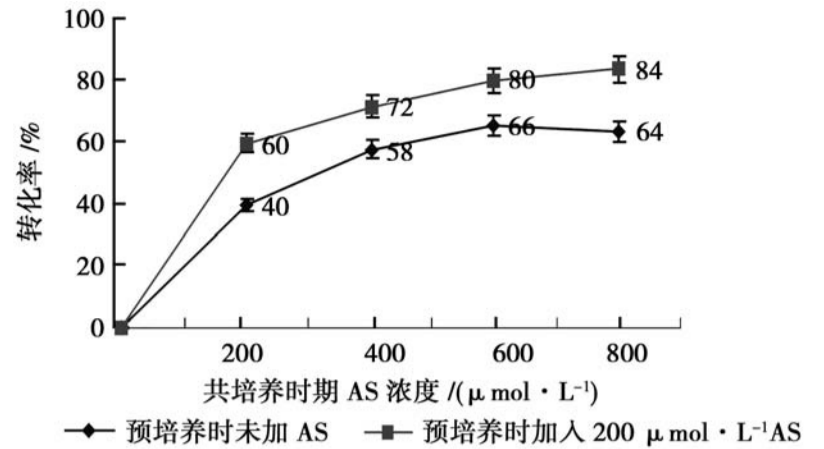


图5 AS加入与否与作用浓度对转化的影响

并随机挑取抗性菌落进行 PCR 扩增, 检测假阳性率, 探讨共培养的最佳时间。试验的转化条件: 农杆菌菌株 AGL-1, 农杆菌初始菌液量 $50 \mu\text{L}$, 预培养时加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AS, 共培养时 AS 浓度 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

由表 1 可以看出: 共培养时间越长, 少根根霉在 IM 诱导培养基上生长越旺盛, 将其转移到 SM 筛选平板上后生成的抗性菌落也越多; 然而 PCR 扩增表明: 在这些抗性菌落中, 出现假阳性的概率也大幅升高, 特别是共培养 48 h 的处理, 产生的大量抗性菌落中, 假阳性率高达 86.6%。比较而言, 共培养时间为 24 h 较为适宜, 既能获得抗性菌落, 又降低了假阳性率。

表 1 不同共培养时间对转化的影响

共培养时间 / h	真菌生长情况	抗性菌落	假阳性率 / %
12	未见生长	无	-
24	肉眼可辨少量细弱菌丝	有	6.6
36	白色菌丝较密较长	较多	60.0
48	菌丝浓密纤长, 有黑色孢子生成	多	86.6

2.5 乙酰丁香酮(AS)加入与否与作用浓度对转化的影响

研究在农杆菌预培养时期加入 AS ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与否以及共培养阶段不同的 AS 浓度对转化的影响。转化条件: 农杆菌菌株 EHA105, 农杆菌初始菌液量 $50 \mu\text{L}$, 共培养时间 24 h, 结果见图 5。分析表明: 对于农杆菌菌株 EHA105, 在预培养时期加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AS, 有利于提高转化效率; 在共培养阶段不能缺少 AS 的诱导; 共培养时期适宜的 AS 浓度为 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上。

3 小结与讨论

本文采用根癌农杆菌介导法, 实现了目的基因 *VeFAD₂* 对产油真菌少根根霉的遗传转化, 获得了阳

性转化子。对影响遗传转化的几个关键因子的研究表明: 采用农杆菌菌株 AGL-1, 农杆菌初始菌液量 $50 \mu\text{L}$, 共培养时间 24 h, 在预培养时期加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS, 共培养时期的 AS 浓度增加至 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可获得较高的转化率。

农杆菌的侵染、T-DNA 的转移和整合需要一定的时间, 因此控制适宜的共培养时间是转化成功的关键。时间过短, 农杆菌尚未完成侵染过程; 时间过长, 真菌过度生长会减弱筛选剂的筛选效果, 产生假阳性抗性菌落的概率升高, 不利于转化子的获得。少根根霉属于丝状真菌, 有粗而长的分枝状菌丝, 菌落呈絮状或绒毛状, 相互重叠或连成一片。因此, 在抗性克隆中, 可能存在一定比例的假阳性转化子, 这也是图 1 中有一个样品未扩增出目的条带的原因; 然而, 本研究发现, 通过控制转化条件, 如缩短共培养时间至 24 h 以及使用含更高浓度抗生素的平板复筛, 可将假阳性率降到一个较低的水平。

根癌农杆菌将 T-DNA 转移进真菌细胞主要是依赖于 Ti 质粒上一系列 *Vir* 基因的表达。一方面, 不同菌系的根癌农杆菌菌株毒力差异很大; 另一方面, 某些酚类物质, 如乙酰丁香酮 (AS) 可以诱导 *Vir* 毒蛋白的产生^[13]。本研究发现, 在其它转化条件相同的情况下, 农杆菌菌株 AGL-1 对少根根霉的转化只需在共培养时期加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AS 即可达到 82% 的转化率, 而 EHA105 菌株要想达到此水平, 需要增加 AS 浓度至前者的 3 到 4 倍。这可能是由于菌株 AGL-1 本身的侵染能力 (毒力) 强于 EHA105, 较低的 AS 浓度即可激活 *Vir* 基因的表达。Campoy 等^[14] 利用农杆菌菌株 AGL-1 转化紫红曲霉 (*Monascus purpureus* Went.), 其转化效率比用 LBA1100 高出 2 到 4 倍, 高兴喜等^[15] 进行了农杆菌菌株 AGL-1 和 LBA4404 对木霉菌 (*Trichoderma* spp.) 的遗传转化实验, 其中菌株 AGL-1 能够转化木霉, 而 LBA4404 转化失败。综合 AtMT 法转化丝

状真菌的相关报道, AGL-1 是较常用的一种农杆菌菌株, 且在转化中普遍取得了较好的效果, 本研究也印证了这一点。对于在农杆菌预培养时期加入 AS 的作用效果文献说法不一。龙朝钦等^[16] 在研究烟曲霉(*A. fumigatus* Fres.) 转化条件时发现, 预培养时加入 AS 与否对烟曲霉的转化效率影响不大; 而在尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schl.) 和稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea* Sacc.) 的转化中, 研究者认为增加 AS 预处理, 可以提高转化效率^[17]。本研究结果显示, 在对农杆菌菌株 EHA105 进行预培养时加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AS 可获得较多的转化子, 而在共培养时不能缺少 AS 的诱导, 并且随着 AS 浓度加大, 转化子增多。

在丝状真菌的转化中, 对转化受体的细胞浓度和农杆菌的浓度都有一定的要求, 而且两者之间的比例关系也影响着转化效率。高兴喜等^[15]、Zeilinger^[18]、de Groot 等^[19] 的研究均表明, 当木霉孢子浓度为 10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 能获得较高的转化率。因此, 本研究也将受体真菌的细胞浓度控制在这个数值左右。高兴喜等^[15] 分别取不同体积处于对数生长期 (OD_{660} 约为 0.62) 的农杆菌菌液与 $100 \mu\text{L}$ 木霉菌分生孢子 (10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$) 混合培养, 结果表明, 适宜的农杆菌初始菌液量是 $100 \mu\text{L}$ 或 $200 \mu\text{L}$ 。本研究认为适宜的农杆菌初始菌液量为 $50 \mu\text{L}$ 或 $100 \mu\text{L}$, 农杆菌浓度过高会抑制真菌的生长, 引起严重污染, 不利于转化子的获得。本研究下一步工作是对获得的少根根霉阳性转化子进行脂肪酸组分分析以及优良转基因菌株的筛选和中试。

参考文献:

- [1] 范妙华, 李纪元, 范正琪. 植物脂肪酸脱饱和酶特性及转基因研究进展 [J]. 生物技术通报, 2007(6): 16 - 20
- [2] Harrington K J. Chemical and physical properties of vegetable oil esters and their effect on diesel fuel performance [J]. Biomass, 1986, 9(1): 1 - 17
- [3] Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, et al. Effect of methanol and water contents on productions on production of biodiesel fule from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system [J]. Biosci, 2001, 91(1): 12 - 15
- [4] Gerpen J V. Business management for biodiesel producers [R]. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2004
- [5] Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* [J]. The EMBO Journal, 1995, 14(3): 3206 - 3214
- [6] Gouka R J, Gerk C, Hooykaas P J J, et al. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 598 - 601
- [7] 迟彦, 周东坡, 平文祥, 等. 根癌农杆菌介导的真菌遗传转化及其应用 [J]. 菌物学报, 2005, 24(4): 612 - 619
- [8] 李娟, 杨金奎, 梁连铭, 等. 丝状真菌遗传转化系统研究进展 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(4): 516 - 520
- [9] Michielse C B, Salim K, Ragas P, et al. Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. Mol Gen Genomics, 2004, 271: 499 - 510
- [10] 黄亚丽, 潘玮, 蒋细良, 等. 根癌农杆菌介导丝状真菌遗传转化的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2007(3): 111 - 114
- [11] 杨长得, 刘刚, 郑易之, 等. 根癌农杆菌在丝状真菌转化中的应用 [J]. 生物技术通讯, 2006, 17(5): 784 - 787
- [12] 张莉莉, 张苓花, 史剑斐, 等. 利用氯化苜蓿提取真菌基因组 DNA 及其分子生物学分析 [J]. 大连轻工业学院学报, 2000, 19(1): 36 - 39
- [13] 李国田, 杨合同, 周红资, 等. 根癌农杆菌介导的木霉插入转化及其应用 [J]. 山东科学, 2006, 19(6): 24 - 30
- [14] Campoy S, Perez F, Martin J F, et al. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. Current Genet, 2003, 43(6): 447 - 452
- [15] 高兴喜, 杨谦, 郭兆奎, 等. 影响根癌农杆菌介导的木霉菌遗传转化因素分析 [J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 74 - 78
- [16] 龙朝钦, 邓军, 郝飞, 等. 根癌农杆菌介导的烟曲霉转化条件的优化 [J]. 西部医学, 2008, 20(2): 261 - 264
- [17] Mullins E D, Chen X, Romaine P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertion mutagenesis and gene transfer [J]. Phytopathology, 2001, 91: 173 - 180
- [18] Zeilinger S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. Current Genet, 2004, 45(1): 54 - 60
- [19] de Groot M J, Bundock P, Hooykaas P J J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi [J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(9): 839 - 842