

文章编号: 1004-7271(2006)01-0012-05

含绿色荧光蛋白及 $trp3^{iar}$ 基因的 草菇表达载体的构建

孙晓红^{1,2}, 姚泉洪³, 陈明杰², 潘迎捷⁴

(1. 南京农业大学生命科学院, 南京 210095; 2. 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201106;
3. 上海市农业科学院生物中心, 上海 201106; 4. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要: 分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切质粒 pBGgHg, 将切下的含双孢蘑菇 *gpd* 启动子、EGFP 基因和 35S 终止子的碱基序列连接到含 Ap 抗性的 pBSK II 上, 再将这一段序列切下连接到含 kan 抗性的 pCAMBIA1300 载体上, 形成中间质粒载体 YH2873。用限制性内切酶 *Hind* III 分别酶切质粒 YH2873 和质粒 pDB06, 将从 pDB06 切下的 $trp3^{iar}$ 基因连接到中间质粒载体 YH2873 上, 得到表达载体 pSAGF。中间载体 pYH2873 经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切, 电泳后显示 1.3 kb 的目的片段和 9 kb 的载体片段, 表达载体 pSAGF 经限制性内切酶 *Hind* III 酶切, 电泳后显示 4 kb 的 $trp3^{iar}$ 基因的目的片段和 10 kb 的载体片段, 进一步测序证明重组质粒连接正确, 成功构建了草菇的表达载体 pSAGF。

关键词: 草菇; EGFP 基因; $trp3^{iar}$ 基因; 表达载体

中图分类号: S 188 文献标识码: A

Construction of expression vector of *Volvariella volvacea* with EGFP and $trp3^{iar}$ genes

SUN Xiao-hong^{1,2}, YAO Quan-hong³, CHEN Ming-jie², PAN Ying-jie⁴

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;

3. Agro-Biotech Research Center, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;

4. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Plasmid pYH2555 was generated by exciting pBSK II with *EcoR* I and *Hind* III and inserting the promoter of *gpd*, EGFP gene and CaMV 35S terminator sequence from plasmid pBGgHg. Intermediate plasmid pYH2873 was made by digesting pCAMBIA1300 with *EcoR* I and *Hind* III and inserting the promoter of *gpd*, EGFP gene and CaMV 35S terminator sequence from pYH2555. Then pYH2873 was digested by *Hind* III and ligated to the $trp3^{iar}$ gene which was excited from plasmid pDB06. The plasmid pYH2873 was digested by *EcoR* I and *Hind* III, and electrophoresis of the digested products showed two fragments: 1.3 bp fragment and 9 kb fragment. The expression vector pSAGF was digested by *Hind* III, and electrophoresis of the digested products showed two fragments: 4 kb fragment and 10 kb fragment. Sequencing analysis showed that the recombinant plasmid was

收稿日期: 2005-07-08

基金项目: 上海市科学技术发展基金资助(003912076)

作者简介: 孙晓红(1978-), 女, 江苏射阳人, 在读博士, 专业方向为真菌遗传育种。E-mail: xhsun15@163.com

通讯作者: 陈明杰(1965-), 男, 研究员。Tel: 021-52630034, E-mail: mjchen@mail.china.com

correct. Thus the pSAGF, a binary expression vector of *V. volvacea*, was constructed successfully.

Key words: *Volvariella volvacea*; EGFP gene; $\text{trp}^{3^{\text{iar}}}$ gene; expression vector

草菇是一种原产于热带及亚热带高温多雨地区的腐生性真菌,富含多种人体必需的氨基酸,是一类营养价值及经济价值较高、拥有广阔发展前景的食用菌^[1]。然而由于草菇是初级同宗结合真菌,生活史复杂,且菌丝间无锁状联合,杂种选择缺乏遗传标记,给草菇的杂交育种带来了很大的困难。基因工程技术的发展使得这一难题的解决有了新的途径。绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)基因是新近发现的一种报告基因,从维多利亚生物发光水母中分离出来,受蓝色光的激发可产生绿色荧光^[2]。增强型绿色荧光蛋白(EGFP)是在 GFP 的基础上,第 64 位氨基 Phe 被替换成 Leu,第 65 位氨基 Ser 被替换成 Thr,在保留 GFP 原有特点的基础上,其荧光强度为 GFP 的 4~35 倍^[3]。 $\text{trp}^{3^{\text{iar}}}$ 基因是第一个分离自担子菌的阳性标记基因。由于这个基因来自于担子菌本身,对食用菌来说属于近同源基因转化,不易甲基化,更易于表达,因此在食用菌的转化上很有应用前景^[4,5]。本文报道了以 EGFP 基因为报告基因, $\text{trp}^{3^{\text{iar}}}$ 为筛选基因的草菇双元表达载体的构建,成功构建的载体可用来进行草菇转化试验。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌株

质粒 pBGgHg 由美国宾夕法尼亚州州立大学 Peter 教授馈赠,质粒 pDB06 由英国牛津大学 Casselton 教授馈赠,转化受体菌 *E. coli* DH5 α ,质粒 pBSK II,质粒 pCAMBIA1300 由上海农科院生物中心保存。

1.2 酶及试剂

限制性内切酶 *Cla* I, *Eco* R I, *Hind* III 购自 Biolabs 公司, T_4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司,凝胶 DNA 提取 kit 购自杭州维洁特公司,实验室所用试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.3 EGFP 基因的重新克隆

质粒 pBGgHg 用限制性内切酶 *Eco* R I, *Hind* III 进行双酶切反应。反应体系为: pBGgHg (1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 15 μL , $10\times$ Buffer M 5.0 μL , *Eco* R I 0.5 μL , *Hind* III 0.5 μL , 无菌 ddH₂O 29 μL , 总体积 50 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 水浴酶解 4 h。以 1% 琼脂糖凝胶电泳分离酶解产物,目的片断采用凝胶 DNA 提取 kit 回收,步骤按说明书进行。酶切回收产物与 pBSK II 载体在 T_4 DNA 连接酶的作用下进行连接。反应体系为:片断 9.0 μL (55 ng/ μL), $10\times$ T_4 DNA 连接酶 Buffer 3.0 μL , T_4 DNA 连接酶 1.0 μL , pBSK II 载体 1.0 μL , 无菌 ddH₂O 16 μL , 总体积 30.0 μL , 在 PCR 仪上 (MJ Research PTC - 100) 16 $^\circ\text{C}$ 连接反应过夜,连接环化后的质粒为 pYH2555。

质粒 pYH2555 转化受体菌感受态 DH5 α , 随机挑取转化菌落,接种于含氨苄青霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基中, 37 $^\circ\text{C}$ 摇菌过夜,提取质粒,用 *Eco* R I, *Hind* III 酶切鉴定。

1.4 中间质粒载体 pYH2873 的构建

质粒 pCAMBIA1300 的扩增、提取方法同质粒 pYH2555。以 *Eco* R I, *Hind* III 进行双酶切反应, 37 $^\circ\text{C}$ 水浴酶解 4h, 加入 6.0 μL 3 mol/L NaAc (pH5.2) 和 100 μL 的无水乙醇沉淀已酶解的质粒 DNA, 12 800 g 离心 20 min, 小心弃上清后用 75% 的乙醇洗涤沉淀, 12 800 g 离心 20 min, 弃尽上清, 自然烘干, 加 30 μL 无菌 ddH₂O 溶解, -20 $^\circ\text{C}$ 备用。质粒 YH2555 双酶切反应同上, 以相同的方法回收 EGFP 基因片断, 保存于 -20 $^\circ\text{C}$ 。将含有 EGFP 基因的片断连接到质粒 pCAMBIA1300 双酶切下的大片断, 转化受体菌感受态 DH5 α 。挑取白斑接种于含有 Kan (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中, 37 $^\circ\text{C}$ 摇菌过夜, 提取质粒。用 *Eco* R I, *Hind* III 进行双酶切鉴定。挑取含有插入片断的 DNA 进行序列测定, 正确的质粒命名为 pYH2873。

1.5 草菇表达载体 pSAGF 的构建

1.5.1 Trp3^{iar} 基因的回收

质粒 pDB06 以 *Hind* III 内切酶进行单酶切反应,产物纯化后回收, -20 °C 备用。

1.5.2 质粒 YH2873 的单酶切反应

中间质粒载体 pYH2873 的单酶切反应同质粒 pDB06 的单酶切反应,酒精沉淀回收,300 μL 无菌 ddH₂O 溶解, -20 °C 备用。

1.5.3 Trp3^{iar} 基因的连接

质粒 pYH2873 的单酶切反应产物与 trp3^{iar} 基因在 T₄ DNA 连接酶的作用下进行连接。反应体系为: 片断 9.0 μL (1 μg/μL) 酶切载体 1 μL, 10 × T₄ DNA 连接酶 Buffer 3.0 μL, T₄ DNA 连接酶 1 μL, 无菌 ddH₂O 16 μL, 总体积 30 μL, 在 PCR 仪上 16 °C 连接反应过夜。连接后的质粒为 pSAGF。质粒 pSAGF 的转化、扩增与提取参照 J. 萨姆布鲁克的方法^[6]。

1.5.4 质粒 pSAGF 的酶切鉴定和 DNA 序列测定

分别用 *Hind* III 单酶切质粒 pDB06 和 pSAGF, 用 *Eco*R I, *Hind* III 双酶切 pCAMBIA1300 酶解产物用 1% 的凝胶进行电泳检查。挑取含有正确插入片断的质粒进行 DNA 正向和反向的序列测定。

2 结果

2.1 中间载体 pYH2873 的酶切鉴定

如图 1, 结果表明, 质粒 pBGgHg, pYH2555 及 pYH2873 在 1.3 kb 左右都出现一条明亮的带, 而且 pBGgHg 和 pYH2873 切下的载体大小约为 9 kb, pYH2555 切下的载体大小约为 3 kb 都与 pCAMBIA1300 pBSK II 的大小一致, 说明含 EGFP 基因的片断已连接到 pCAMBIA1300 载体上。将含有 EGFP 基因的片断从 pBGgHg 质粒上切下没有直接连接到载体 pCAMBIA1300 上, 而是连接到含有 Ap 抗性的 pBSK II 载体上, 是因为 pBGgHg 和 pCAMBIA1300 的都是 kan 抗性, 如果直接连接, 切下的 EGFP 基因中很可能夹杂着 pBGgHg 的载体, 从而增加假阳性。因此先连接到含有 Ap 抗性的 pBSK II 载体上, 再切下来连接到载体 pCAMBIA1300 上, 就可以大大减少后序试验中挑取阳性克隆的假阳性。

2.2 草菇表达载体 pSAGF 的构建

以 pCAMBIA1300 为基本框架, 酶切回收大片断。从 pYH2555 载体中酶切回收含 EGFP 基因的片断, 连接成中间载体 pYH2873。再用 *Hind* III 单酶切 pYH2873, 与用相同的酶从 pDB06 上切下的 trp3^{iar} 基因连接即为草菇的表达载体 pSAGF, 具体构建过程见图 2。

2.3 草菇表达载体 pSAGF 的酶切鉴定

以 *Eco*R I, *Hind* III 对质粒 pCAMBIA1300 进行双酶切作为对照, 以 *Hind* III 对质粒 pDB06 和表达载体 pSAGF 进行单酶切后电泳的结果如图 3, 质粒 pDB06 和 pSAGF 单酶切后在 4 kb 左右都出现一条明亮的带, 与 trp3^{iar} 基因的大小一致。pCAMBIA1300 双酶切的结果只有 9 kb 左右的一条带, 说明 trp3^{iar} 基因已

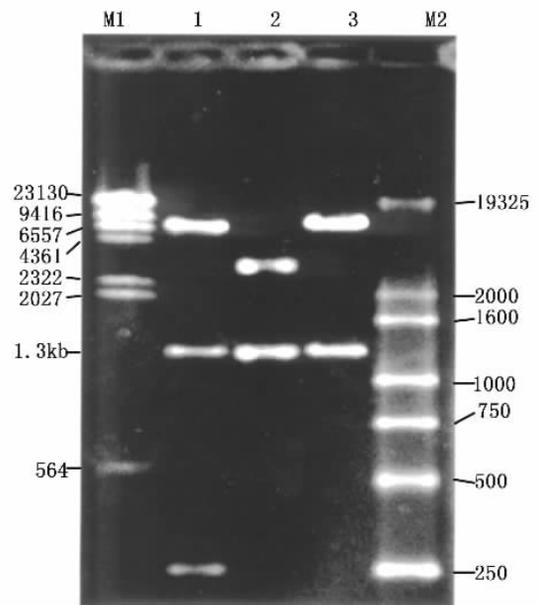


图 1 pYH2873 质粒酶切电泳

Fig. 1 Digestion of plasmid pYH2873

1-3 分别为 pBGgHg, pYH2555, YH2873 的酶切结果; M1 为 λ/*Hind* III 分子量标准; M2 为 DGL2000 分子量标准

经插入到中间载体中。

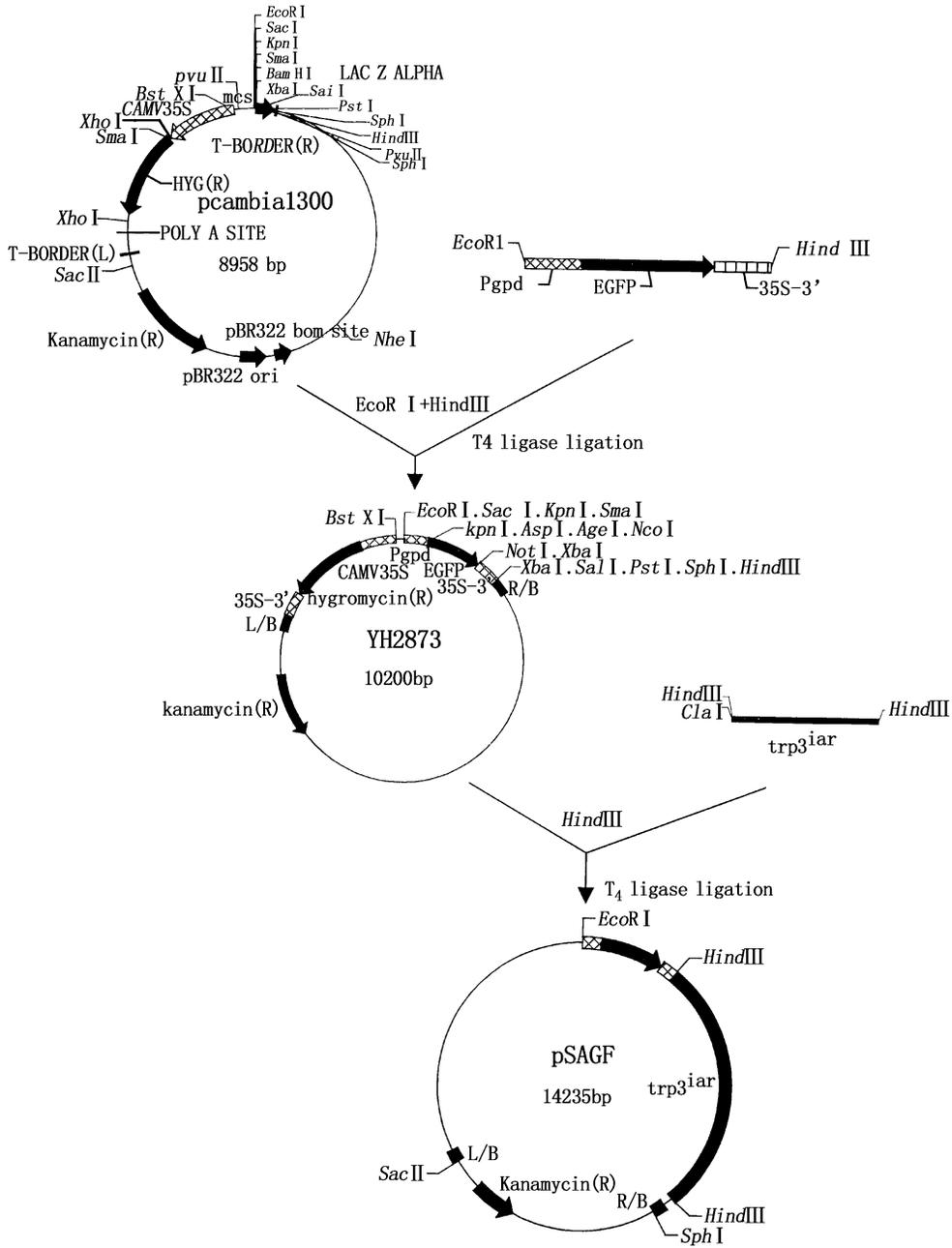


图 2 草菇表达载体 pSAGF 的构建

Fig.2 Construction of expression vector pSAGF of *V. voluacea*

2.4 草菇表达载体 pSAGF 的双向测序鉴定

质粒 pSAGF 用测序仪 3730 进行正反双向测序,得到的序列通过比对证明 EGFP 基因和 *trp3^{iar}* 基因已经连接到载体上,说明草菇双元表达载体构建成功。

3 讨论

过去在遗传转化中几乎无一例外的使用 *gus* 基因作为报告基因,同时 *gus* 基因的表达也可以由细胞的组织化学的方式进行检测^[7]。然而 GUS 作为标记的一个主要的局限在于检测时对材料的破坏性,这对于需要进一步进行基因表达的材料来说就显得不方便。绿色荧光蛋白基因在组织中表达的检测不需要任何底物或协助因子的存在即可自发产生荧光,能简便、灵活地动态检测,是较为理想的报告基因。本实验所用的 EGFP 基因是在 *gfp* 基因的基础上改造得来的,其荧光活性大大增强。因此用 EGFP 基因构建的载体转化草菇菌丝,在无需裂解草菇细胞的情况下,就能检测出活体菌丝或子实体的基因表达,而且安全无害。此载体为进一步建立草菇转基因系统提供了很好的基因材料。

参考文献:

- [1] Chang S T. The biology and cultivation of edible fungi[M]. New York: Academic Press, 1978. 573 - 605.
- [2] Prasher D C, Eckenrode B K, Ward W W, et al. Primary structure of Aequorea Victoria green fluorescent protein[J]. Gene, 1992, 111(2): 229.
- [3] Cormack B P, Valdivia R, Fallow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein[J]. Gene, 1996, 173: 33 - 38.
- [4] Bhattiprolu G R, Challen M P, Elliott T J. Transformation of the homobasidiomycete *Coprinus bilanatus* to 5-fluorouracil resistance using a mutant *trp3* gene from *Coprinus cinereus*[J]. Mycol Res, 1993, 97(11): 1281 - 1286.
- [5] Jia J H, Buswell J A, Peberdy J F. Transformation of the edible fungi *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*[J]. Mycol Res, 1998, 102(7): 876 - 880.
- [6] 黄培堂译. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] Jefferson R A, Burgess S M, Hirsch D. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker[J]. Proc Natl Acad Sci, 1986, 83: 8447 - 8451.

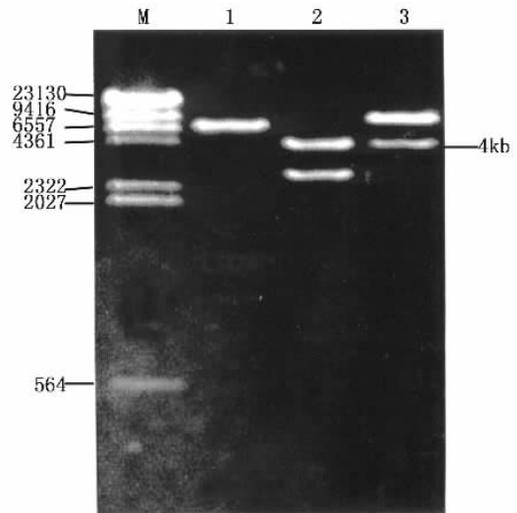


图3 表达载体 pSAGF 的酶切

Fig. 3 Digestion of plasmid pSAGF

1 - 3 分别为 pCAMIA1300, pDB06, pSAGF 的酶切结果;

M 为 λ /Hind III 分子量标准