

农杆菌介导的蛹虫草营养缺陷型菌株和遗传转化体系的构建

王立^{1,2}, 黄慧^{1,2}, 刘新平¹, 王兴明⁴, 曾斌^{*1,2,3}, 胡志宏^{*1,2}

1 江西科技师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330013

2 江西省生物加工过程重点实验室, 江西 南昌 330013

3 深圳技术大学药学院, 广东 深圳 518118

4 江西省九江市农业科学院, 江西 九江 332101

王立, 黄慧, 刘新平, 王兴明, 曾斌, 胡志宏. 农杆菌介导的蛹虫草营养缺陷型菌株和遗传转化体系的构建[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3373-3386

Wang Li, Huang Hui, Liu Xinping, Wang Xingming, Zeng Bin, Hu Zhihong. Construction of *Agrobacterium*-mediated auxotrophic strain and genetic transformation system of *Cordyceps militaris*[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3373-3386

摘要:【背景】天然蛹虫草是蛹虫草菌侵染昆虫蛹或虫形成的子实体, 具有非常重要的生物药理学活性。目前蛹虫草基因组测序已经完成, 但是其分子生物学研究较少。【目的】在蛹虫草中构建一种以尿苷/尿嘧啶营养缺陷型为筛选标记的农杆菌介导的转基因体系。【方法】乳清酸核苷-5'-磷酸(orotidine-5'-monophosphate, OMP)脱羧酶为尿嘧啶合成必需酶, 利用根癌农杆菌介导的转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)方法, 通过同源重组对蛹虫草野生型菌株中该酶的编码基因 *pyrG* 进行敲除, 构建尿苷/尿嘧啶营养缺陷型突变体。然后, 利用本实验室已有的米曲霉 *pyrG* 为筛选标记的二元转化载体, 通过农杆菌转化法对该营养缺陷型菌株进行遗传转化。【结果】通过同源重组法, 成功敲除 *pyrG* 构建了尿嘧啶营养缺陷型蛹虫草, 以此为背景, 在 22 °C 共培养 66 h, 成功对蛹虫草实现转基因, 转化效率为 $(75\pm35)/10^6$ 孢子。另外, 本研究还发现丝状真菌常用的构巢曲霉 3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子 *PgpdA* 及 α 淀粉酶启动子 *PamyB* 不能在蛹虫草中驱动 *GFP* 或 *DsRed* 报告基因表达, 而蛹虫草自身延伸因子的启动子 *IF* 则能很好地表达 *GFP* 荧光报告基因。【结论】本研究构建了一种以尿嘧啶营养缺陷型为筛选标记的农杆菌介导的转基因体系, 为研究蛹虫草重组表达和基因功能提供了一个有前景的基因操作工具。

基金项目: 江西省科技厅项目(20192ACBL20012, 20202BDH80007, 20212BA205001); 江西科技师范大学青年拔尖人才项目(2019QNBjRC004)

Supported by: Science and Technology Department of Jiangxi Province (20192ACBL20012, 20202BDH80007, 20212BA205001); Jiangxi Science and Technology Normal University Young Top Talents Project (2019QNBjRC004)

*Corresponding authors: E-mail: ZENG Bin: Zengtx001@aliyun.com; HU Zhihong: huzhihong426@163.com

Received: 2021-12-09; Accepted: 2022-01-19; Published online: 2022-04-01

关键词：蛹虫草；根癌农杆菌介导的转化；尿嘧啶营养缺陷型

Construction of *Agrobacterium*-mediated auxotrophic strain and genetic transformation system of *Cordyceps militaris*

WANG Li^{1,2}, HUANG Hui^{1,2}, LIU Xinping¹, WANG Xingming⁴, ZENG Bin^{*1,2,3}, HU Zhihong^{*1,2}

1 College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

2 Jiangxi Key Laboratory of Bioprocess Engineering, Nanchang 330013, Jiangxi, China

3 College of Pharmacy, Shenzhen Technology University, Shenzhen 518118, Guangdong, China

4 Jiujiang Academy of Agricultural Sciences, Jiujiang 332101, Jiangxi, China

Abstract: [Background] Natural *Cordyceps militaris* is the fruiting body formed by *Cordyceps militaris* infects insect pupae or insects and has crucial biological and pharmacological activities. At the moment, the genome of *C. militaris* has been sequenced, but the research in molecular biology is limited. [Objective] To construct the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) system in *C. militaris* with uridine/uracil auxotrophic gene as the selection marker. [Methods] Orotidine-5'-monophosphate (OMP) decarboxylase is an essential enzyme for uracil synthesis. By using ATMT, We first knocked out the gene encoding *pyrG* of OMP decarboxylase in wild *C. militaris* by homologous recombination, and then constructed the uridine/uracil auxotrophic mutant. Afterward, the *pyrG*-carrying binary vector of *Aspergillus oryzae* was used to construct the complementary strain by ATMT. [Results] The *pyrG* was successfully knocked by homologous recombination and the uridine/uracil auxotrophic mutant was constructed. Under this background, the transformation efficiency reached $(75\pm35)/10^6$ conidia after co-culture for 66 h at 22 °C. In addition, the *Aspergillus nidulans* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter *PgpdA* and α -amylase promoter *PamyB*, which are commonly used by filamentous fungi, failed to drive the expression of *GFP* or *DsRed* reporter gene in *C. militaris*, but the promoter *IF* of *C. militaris* extension factor could well express *GFP*. [Conclusion] We constructed an ATMT system with uracil auxotrophic as a selection marker, providing a promising genetic tool for research on recombinant expression and gene function of *C. militaris*.

Keywords: *Cordyceps militaris*; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation; uracil auxotrophic

蛹虫草(*Cordyceps militaris*), 又称北冬虫夏草, 根据最新的分类系统, 蛹虫草属于子囊菌门肉座菌目虫草菌科麦角菌科虫草属^[1-3]。天然蛹虫草是蛹虫草菌侵染鳞翅目、鞘翅目及双翅目等昆虫蛹或虫形成的子实体, 具有和冬虫夏草相似的生物活性成分和药理作用, 并且人工培养技术成熟, 已逐渐成为冬虫夏草的理想替代品^[4-5]。由于蛹虫草中多种生物活性成分(包括虫

草多糖、腺苷、虫草素)具有保肺益肾、延缓衰老、提高免疫力、抗炎、抗癌、抗病毒、抗惊厥和镇静作用, 以及对细胞内信号转导有着广泛影响^[6-9], 具有较大的研究价值、开发价值与市场潜力, 已成为著名的功能性和药用真菌之一^[10]。

近些年, 随着蛹虫草全基因组测序的完成^[11], 对其分子生物学和遗传学研究也更加地

深入^[12]。然而, 相对植物或其他真菌而言, 蛹虫草相关的分子生物学方面的研究进展仍非常缓慢, 对蛹虫草遗传背景及相关产物表达调控机制的探讨还处于起步阶段, 以至于蛹虫草转基因方面的研究较少^[13]。分子生物学的研究离不开有效的遗传转化体系, 目前针对蛹虫草还未形成一种较稳定且高效的遗传转化体系, 所以构建简单高效的蛹虫草转基因体系很有必要。

遗传转化体系主要由转化方法和筛选标记构成。由于真菌细胞壁成分的复杂性使其成为遗传转化的难点, 目前蛹虫草研究中常用的遗传转化的方法有聚乙二醇介导的原生质体转化(protoplast-mediated transformation, PMT)、根癌农杆菌介导的转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)、基因枪介导转化技术(particle bombardment, PB)等^[14-17], 原生质体制备费时费力, 操作复杂^[18-19]; 基因枪转化法对设备要求高, 成本昂贵, 遗传不稳定, 嵌合体不易排除, 不易选择转化子, 转化率低^[20-22]; 农杆菌介导的转化是目前最经济、高效和简单的方法, 只需要将农杆菌菌液与真菌孢子液混合后直接用筛选培养基进行筛选^[23-24]。筛选标记是筛选转化子必不可少的条件, 合适的筛选标记可以大大减少工作量, 提高转化效率。目前丝状真菌中使用较多的筛选标记有营养缺陷型标记、抗生素抗性标记和代谢产物抗性标记等, 营养缺陷型标记不需要外源添加药物, 所以使用较为广泛。以潮霉素(hygromycin)作为抗性筛选标记, 利用 PMT 和 ATMT 转化法得到遗传稳定的蛹虫草转化子, 为研究功能基因组学提供有效技术^[14-15]; 以草铵膦(Bar)抗性为筛选标记, 基因枪转化技术在蛹虫草转化中成功应用, 丰富了蛹虫草的遗传转化手段^[16]。

在真菌中, *pyrG* 编码真菌生存所需尿苷/尿

嘧啶生物合成关键酶的乳清酸-5'-单磷酸(orotidine-5'-monophosphate, OMP)脱羧酶^[25-26]。如果该基因发生突变或缺失, 相应的 *pyrG* 突变体不能将鸟苷转化为尿嘧啶核苷(尿嘧啶前体), 因此需要补充尿苷/尿嘧啶才能生长。野生型菌株中 OMP 脱羧酶能够将无毒的 5-氟乳清酸(5-fluoroorotic acid, 5-FOA)转化为有毒产物 5-氟尿嘧啶, 因而不能在含 5-FOA 的培养基中生长^[27]。然而, 5-FOA 在缺失 *pyrG* 的突变株中不能被转化, 因此这些突变体可以在含有 5-FOA 的培养基上正常生长, 这一特性有利于真菌转化的筛选, 因此 *pyrG* 被广泛用作真菌转化的营养缺陷型筛选标记^[28-30]。研究者在鲁氏酵母中构建了一种无抗性标记 URA 营养缺陷型菌株^[31]; 在黑曲霉中构建了 *pyrG* 为标记基因的同源转化系统^[32]; 在米曲霉中构建了尿苷/尿嘧啶营养缺陷型突变体并以 *pyrG* 作为选择营养缺陷标记^[33-34]; 在食用菌香菇中构建了尿嘧啶营养缺陷型突变体^[35]。然而目前在蛹虫草菌中 *pyrG* 被用作营养缺陷型筛选标记的报道很少。

本实验在蛹虫草中构建一种以尿苷/尿嘧啶营养缺陷型为筛选标记的农杆菌介导的转基因体系。利用根癌农杆菌介导的转化技术, 通过同源重组对蛹虫草野生型菌株中尿苷/尿嘧啶合成的关键酶基因 *pyrG* 进行敲除, 构建遗传稳定的营养缺陷型突变体。然后构建以 *pyrG* 为筛选标记的双元载体, 通过 ATMT 法对该营养缺陷型菌株进行转化。该 ATMT 遗传转化体系为研究蛹虫草重组表达和基因功能提供了一个有前景的基因操作工具。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

尿苷、尿嘧啶和头孢噻肟钠, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 5-氟乳清酸(5-FOA)、

卡那霉素和利福平,北京市索莱宝科技有限公司; DNA Marker、高保真 DNA 聚合酶和 *rTaq/Ex Taq* 及限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Spe* I、*Xho* I, 大连宝生物工程有限公司; KOD DNA 聚合酶, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; 重组酶, 北京全式金生物技术有限公司。PCR 仪、凝胶电泳系统和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 荧光显微镜, Leica 公司。

1.2 菌种和质粒

Escherichia coli DH5 α 、*Agrobacterium tumefaciens* AGL1、蛹虫草菌株 *C. militaris* 及表达质粒 Cm Δ pyrG、IF-pEX1 均由本实验室保存提供(表 1)。pEX1、pEX2B 表达载体由越南河内国家大学 Van-Tuan Tran 教授惠赠。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基配方详见参考文献[15]; LB 培养基、诱导 IM 培养基(pH 5.8)、Czapek-Dox (CD)筛选培养基(碳源改为麦芽糖)、Yeast Extract Peptone Dextrose (DPY)培养基配方详见参考文献[33]。以上固体培养基使用时添加 1.5%琼脂粉。

1.4 引物

本研究所用引物如表 2 所示。

1.5 蛹虫草基因组中 *pyrG* 的鉴定

以米曲霉菌株 *pyrG* 编码的 OMP 脱羧酶蛋白序列为参考序列, 通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)同源序列比对来查询蛹虫草 *pyrG* 编码的 OMP 脱羧酶蛋白序列, 以及其他曲霉属及真菌基因组包括黄曲霉、黑曲霉、烟曲霉、构巢曲霉、酵母等。不同真菌的 OMP 脱羧酶蛋白序列采用 MEGA X 软件进行系统发育分析, 并使用 DNAMAN 软件把不同真菌的 OMP 脱羧酶蛋白序列加载到不同通道中, 对导入的目的序列进行多序列比对。

1.6 载体的构建

1.6.1 构建敲除载体 Cm Δ pyrG

构建 Cm Δ pyrG 敲除载体用于删除 *pyrG*。先用 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 pEX1 (图 1A)质粒双酶切; 再以蛹虫草 DNA 为模板, 分别 PCR 扩增出蛹虫草基因组中 *pyrG* 的 5'侧翼区(1 302 bp)和 3'侧翼区(1 442 bp)目的片段, 引物为 *pyrG* 上游 F1/R1 或 *pyrG* 下游 F2/R2 (表 2); 最后, 采用

表 1 本研究使用的菌种和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌种和质粒 Strains and plasmids	描述 Description
<i>E. coli</i> DH5 α	The host of plasmid reproduction
<i>A. tumefaciens</i> AGL1	As a tool to transfer genes into <i>C. militaris</i> cells
<i>C. militaris</i>	Stored by our laboratory
pEX1	The binary vector carries <i>pyrG</i> cassette of <i>A. oryzae</i> and <i>GFP</i> gene controlled by <i>PgpdA</i> promoter of <i>A. nidulans</i> . The pEX1 vector was kindly provide by professor Van-Tuan Tran (VNU University of Science, Hanoi, Vietnam) ^[33]
Cm Δ pyrG	The <i>pyrG</i> flanking regions (5' <i>pyrG</i> and 3' <i>pyrG</i>) of the <i>C. militaris</i> genome were amplified by PCR. The obtained DNA fragments were recombined into binary vector pEX1 by one-step method (linearized with <i>EcoR</i> I and <i>Hind</i> III sites), and used to delete the <i>pyrG</i> gene
pEX2B	The binary vector carries <i>pyrG</i> cassette, <i>DsRed</i> gene controlled by amylase <i>PamyB</i> promoter. The pEX2B vector was kindly provide by professor Van-Tuan Tran (VNU University of Science, Hanoi, Vietnam) ^[33]
IF-pEX1	The binary vector carries <i>pyrG</i> cassette, <i>GFP</i> gene controlled by <i>IF</i> elongation factor of <i>C. militaris</i> , and is used to express green fluorescent protein

表 2 质粒构建及鉴定所用引物信息

Table 2 Primers used for plasmid construction and identification in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	产物大小 Sizes (bp)	描述 Description
pyrG upstream F1	TATGACATGATTACGAATTCGGCGCACGAGCTGCTGGGGG	1 302	Construct <i>pyrG</i> knockout vector
pyrG upstream R1	ATGAAGACGAAGTGGTGCCAAGCTGAGTCCAGTTCGCTTC		
pyrG downstream F2	GAAGCGAACTGGACTCAGCTTGGCACCACTTCGTCTTCA	1 442	
pyrG downstream R2	CGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCAGCTGCCGCACCAGGCCC		
CmpyrG F	GACCCATCACGACATGGTGT	800	Verify deletion of <i>pyrG</i> gene
CmpyrG R	AGCCAGCAACGCCAATGATG		
IF-F	TCAGAGCCTAGCCAAGTTCGGCAAGAATAGGAACAG	1 500	Construct
IF-R	ATGGTACCTACGTACTCGAGTTTGAAGGTGTTTGTATTG		IF-pEX1 vector
GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGG	400	Verify <i>GFP</i>
GFP-R	GTGGCTGTTGTAGTTGTACT		
DsRed-F	ATGGCCTCCTCCGAGGACG	750	Verify <i>DsRed</i>
DsRed-R	CAGGAACAGGTGGTGGCGG		

一步连接法将 *pyrG* 上游、下游和双酶切线性化片段重组连接, 构建 *pyrG* 缺失载体 CmΔ*pyrG* (图 1B)。

1.6.2 构建二元互补表达载体 IF-pEX1

构建二元互补表达载体 IF-pEX1 用于转基因互补 *pyrG* 营养缺陷型菌株。用 *Spe* I 和 *Xho* I 对 pEX1 质粒(图 1A)双酶切, 去掉 *PgpdA* 启动子; 以蛹虫草 DNA 为模板, 使用引物 IF-F/R (表 2)扩增延伸因子-1α 基因(CCM_00809)的启动子 *IF* (1 602 bp)^[36]; 然后用一步连接法将片段 *IF* 与双酶切线性化片段重组连接构建回补载体 IF-pEX1 (图 1C)。

1.7 农杆菌介导转化蛹虫草

采用 ATMT 法转化 CmΔ*pyrG* 等载体。将含有目的载体的农杆菌在相应抗性 LB 培养基中培养至 *OD*₆₀₀ 为 1.0–1.5 (28 °C、200 r/min); 预诱导: 1 mL 菌液与 9 mL 液体 IM 培养基(含 40 mmol/L 的 MES 和 200 μmol/L 的 AS)混合, 28 °C、200 r/min 培养 6 h 至 *OD*₆₀₀ 为 0.6–0.8; 共培养: 取 100 μL 预诱导液与 100 μL 的孢子液(浓度约为 1×10⁷ 个/mL)混合涂到 IM (含 40 mmol/L 的 MES 和 200 μmol/L 的 AS)固体培养基上, 22 °C 暗培养 48–60 h。在蛹虫草长出

菌丝之前加入对应的筛选培养基筛选转化子(含孢噻脲钠 300 μg/mL), 22 °C 培养 7–10 d。挑取少量的转化子菌丝置于含 50 μL 无菌水的离心管中, 微波炉高火加热 7–8 min, 快速提取 DNA^[37], 通过 PCR 扩增, 检测阳性克隆。

2 结果与分析

2.1 蛹虫草基因组中 *pyrG* 基因的鉴定结果

通过 BLAST 比对发现蛹虫草基因组中包含单拷贝 *pyrG* (XP_006670464.1)。将其他真菌包括黄曲霉、黑曲霉、烟曲霉、构巢曲霉和酵母等与蛹虫草 OMP 脱羧酶蛋白序列进行进化分析, 发现蛹虫草 OMP 脱羧酶蛋白与所比对的真菌在进化距离上相差较远(图 2A), 而所比对的的不同真菌中氨基酸序列一致性较高, 为 58.23% (图 2B)。因此, 蛹虫草基因组中存在单个保守的 *pyrG*。

2.2 5-FOA 对蛹虫草生长的抑制作用

5-FOA 常用于筛选真菌的尿苷尿嘧啶营养缺陷型, 当 *pyrG* 存在时, 其编码的乳清酸核苷-5'-磷酸(OMP)脱羧酶(尿苷/尿嘧啶生物合成关键酶)能够将无毒的 5-FOA 转化为有毒产物 5-氟尿嘧啶, 从而抑制真菌生长。因

此, 为了验证 5-FOA 是否能用于筛选蛹虫草尿苷尿嘧啶营养缺陷型菌株, 我们检测了蛹虫草野生型菌株对 5-FOA (2 mg/mL) 的敏感性。如图 3 所示, 野生型蛹虫草孢子在 CD 培

养基正常生长, 而在 CD+5-FOA 培养基培养 12 d 后仍然不能萌发。因此, 5-FOA 抑制蛹虫草的生长, 表明其可用于尿苷/尿嘧啶突变体的筛选。

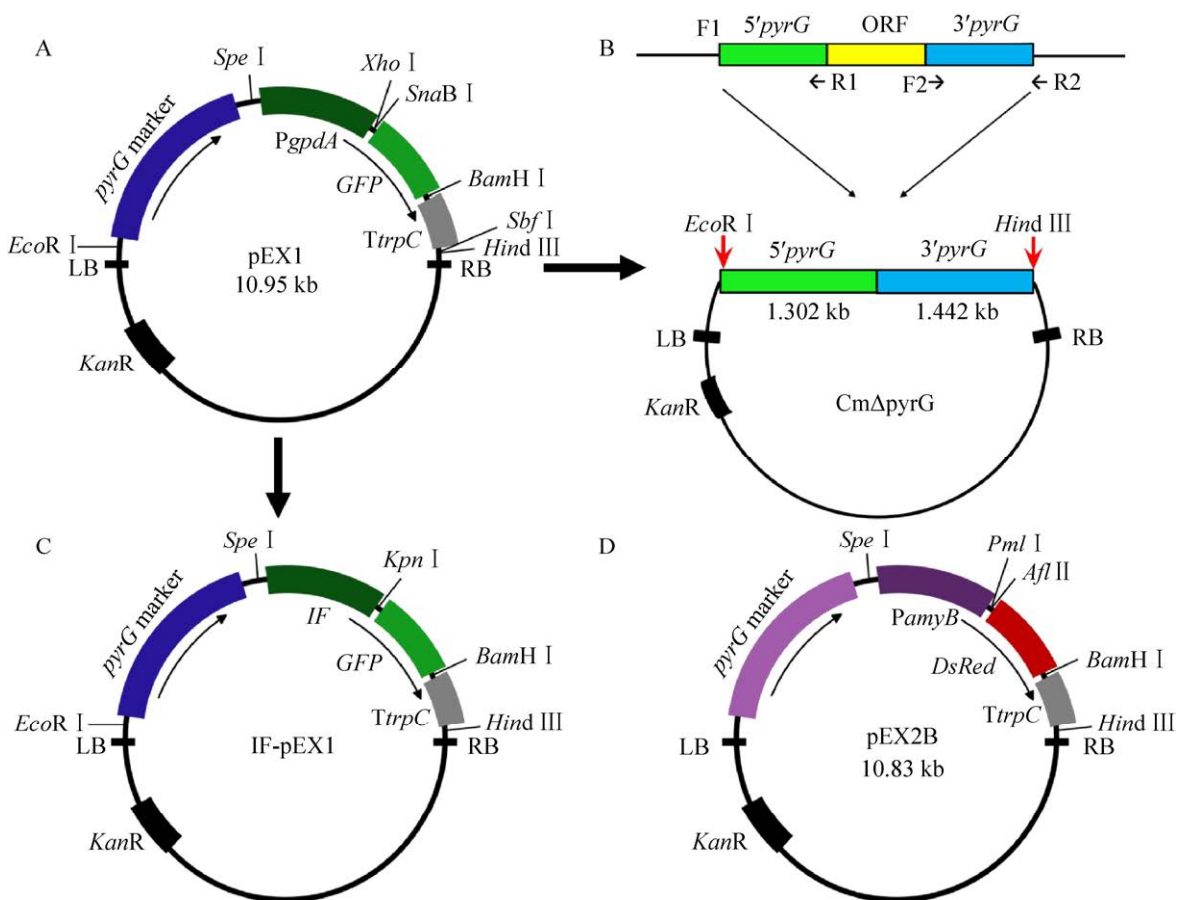


图 1 ATMT 载体的构建 A: pEX1 载体图谱, 该二元载体携带米曲霉 *pyrG* 表达盒和由构巢曲霉甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子 *PgpdA* 控制的 *GFP*; B: *CmΔpyrG* 敲除载体, PCR 扩增蛹虫草基因组的 *pyrG* 侧翼区域(5' *pyrG* 和 3' *pyrG*), 通过一步法将获得的 DNA 片段重组连接到二元载体 pEX1 (用 *EcoR* I 和 *Hind* III 线性化), 构建 *CmΔpyrG* 敲除载体; C: IF-pEX1, 该二元载体携带标记基因 *pyrG*, 是在 pEX1 基础上改造的由蛹虫草自身延伸因子启动子 *IF* 控制的 *GFP*; D: pEX2B 该二元载体携带 *pyrG* 表达盒, 由淀粉酶启动子 *PamyB* 控制的 *DsRed*

Figure 1 Construction of ATMT vector. A: pEX1 plasmid profile, which carries the *pyrG* cassette of *A. oryzae* and the *GFP* gene controlled by the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter *PgpdA* of *A. nidulans*. B: *CmΔpyrG* knockout vector, amplification of the *pyrG* flanking regions (5' *pyrG* and 3' *pyrG*) of the *C. militaris* genome by PCR. The obtained DNA fragments were recombined into binary vector pEX1 by one-step method (linearized with *EcoR* I and *Hind* III sites) to generate the constructed *CmΔpyrG* knockout vector; C: IF-PEX1, a binary vector carrying *pyrG* cassette, modified promoter based on pEX1, is a *GFP* gene controlled by the promoter of the *IF* extension factor of *C. militaris*; D: A binary vector carrying *pyrG* cassette *DsRed* gene controlled by amylase *PamyB* promoter.

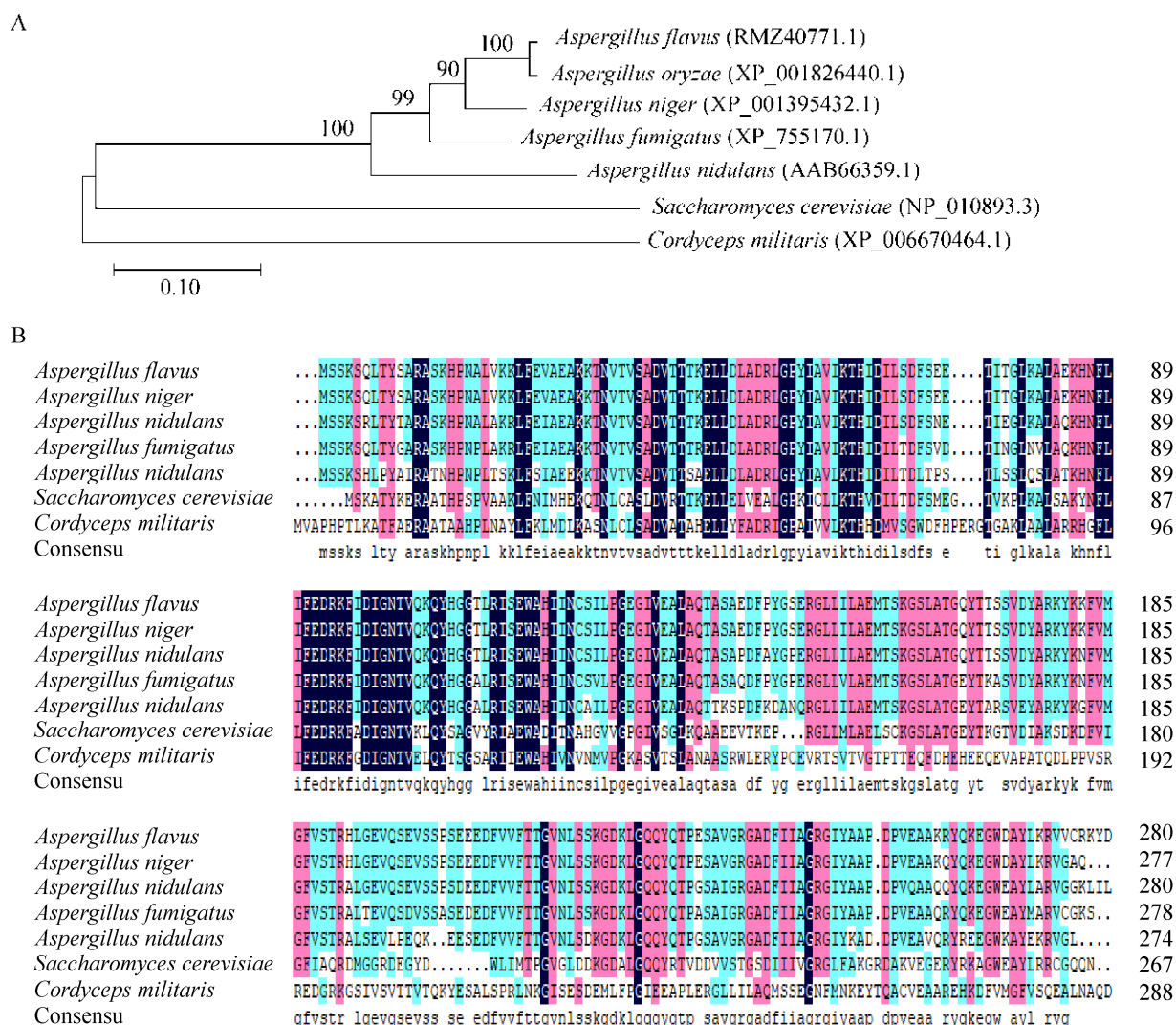


图 2 不同真菌 *pyrG* 的系统发育树(A)与蛋白序列比对(B) A: 采用 MEGA X 软件, 通过 1 000 个 bootstrap 重复构建不同真菌 *pyrG* 编码的 OMP 脱羧酶蛋白系统发育树。黄曲霉(RMZ40771.1)、米曲霉(XP_001826440.1)、黑曲霉(XP_001395432.1)、烟曲霉(XP_755170.1)、构巢曲霉(AAB66359.1)、酿酒酵母(NP_010893.3)和蛹虫草(XP_006670464.1), 进化树分支长度之和为 1.298 921 18, 并标明了分支节点(数字代表二者在进化上的亲缘关系)、距离标尺(0.10 为进化树的比例尺)。B: 不同真菌中 OMP 脱羧酶蛋白氨基酸序列一致性较高, 为 58.23%

Figure 2 Phylogenetic tree (A) and protein sequence comparison (B) of *pyrG* of different fungi. A: Phylogenetic trees of orotidine-5'-monophosphate protein of different fungi were constructed by using MEGA-X software with 1 000 bootstrap repeats. *Aspergillus flavus* (RMZ40771.1), *Aspergillus oryzae* (XP_001826440.1), *Aspergillus niger* (XP_001395432.1), *Aspergillus fumigatus* (XP_755170.1), *Aspergillus nidulans* (AAB66359.1), *Saccharomyces cerevisiae* (NP_010893.3) and *Cordyceps militaris* (XP_006670464.1). The sum of branch lengths of the evolutionary tree is 1.298 921 18, and marked the branch nodes (number represents the evolutionary relationship between the two) and the distance scale (0.10 is the scale of the evolutionary tree). B: The amino acid sequence of orotidine-5'-monophosphate protein in different fungi has a high consistency of 58.23%.

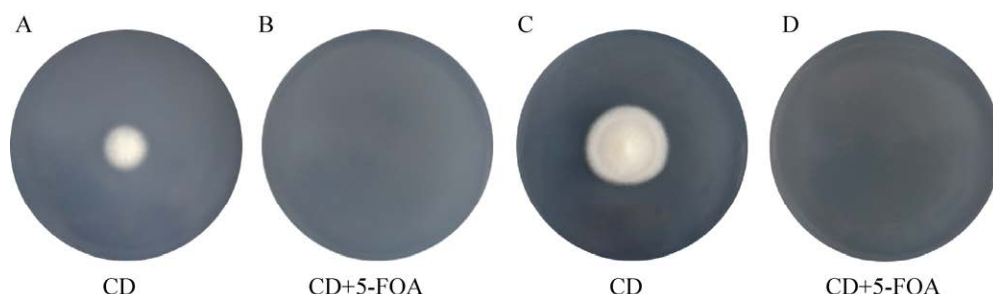


图3 蛹虫草野生型孢子对5-FOA的抗性 将蛹虫草野生型孢子分别接种于CD和CD+5-FOA培养基,在22℃培养;A、B培养了7d,C、D培养了12d

Figure 3 Resistance of wild type spores of *C. militaris* to 5-FOA. Wild type spores of *C. militaris* were inoculated on CD and CD+5-FOA medium respectively, and cultured at 22 °C. A and B was cultured for 7 days, C and D was cultured for 12 days.

2.3 构建蛹虫草 *pyrG* 敲除载体

采用同源重组法敲除蛹虫草 *pyrG*。首先用 *EcoR* I 和 *Hind* III 对 pEX1 质粒进行双酶切(图4A),回收线性化片段;再以蛹虫草 DNA 为模板,PCR 扩增其 *pyrG* 上、下游片段(图4B),然后采用一步连接法将上、下游和 pEX1 线性化片段连接构建 *pyrG* 缺失载体 CmΔ*pyrG*。通过菌落 PCR,选取 8 号 CmΔ*pyrG* 阳性单克隆提质粒(图4C),测序验证正确后转化农杆菌用于敲除蛹虫草 *pyrG*。

2.4 利用 ATMT 法敲除 *pyrG*

将构建好的 CmΔ*pyrG* 载体通过 ATMT 方法对蛹虫草野生型孢子进行转化,在 CD+U+5-FOA 培养基上进行筛选。如图5A所示,在筛选培养基中成功筛选到具有 5-FOA 抗性的菌株,通过 PCR 验证发现,转化子的产物长度均比对照小(图5B)。随机选取 2 个转化子在不同培养基上培养发现,野生型菌落不能在含有 5-FOA 的培养基上生长,转化子在无尿苷/尿嘧啶的培养基上不能生长,但在含有 5-FOA 和尿苷/尿嘧啶的培养

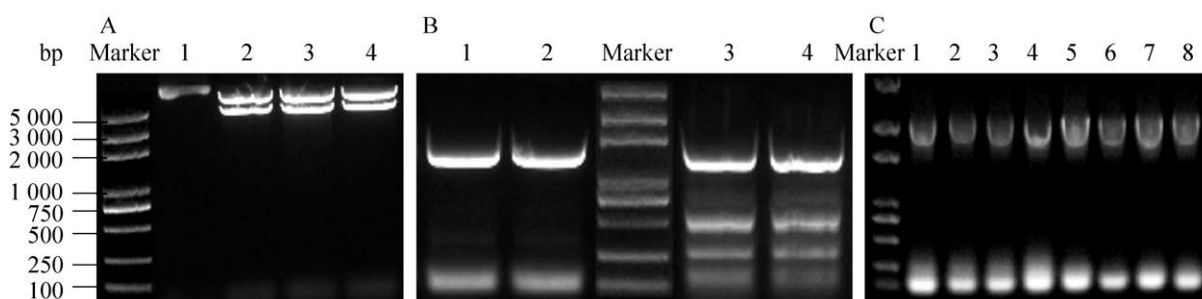


图4 蛹虫草 *pyrG* 敲除载体的构建 A: 泳道1为pEX1质粒对照,泳道2、3、4为 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切 pEX1; B: 泳道1和泳道2为蛹虫草基因组 *pyrG* 的5'侧翼区(1302 bp),泳道3和泳道4为3'侧翼区(1442 bp); C: 阳性单克隆验证,选择8号阳性单克隆

Figure 4 Construction of *pyrG* knockout vector in *C. militaris*. A: lane 1 was pEX1 plasmid control; lane 2, 3 and 4 were *EcoR* I and *Hind* III double enzyme digestion of pEX1. B: lane 1 and lane 2 were 5' flanking region (1302 bp) of *C. militaris* genome *pyrG*, and lane 3 and lane 4 were 3' flanking region (1442 bp). C: Positive monoclonal verification, select No. 8 positive monoclonal.

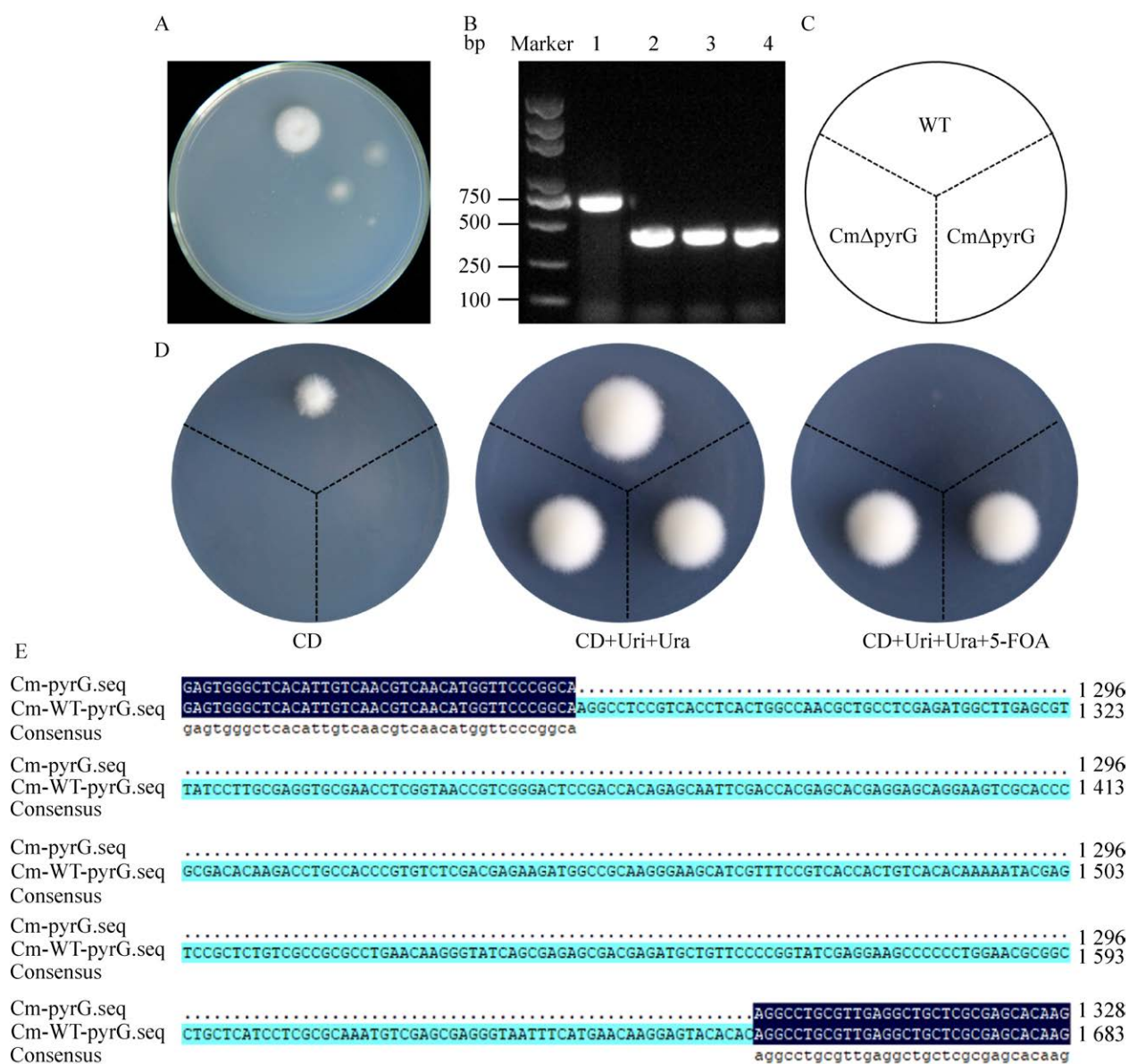


图 5 蛹虫草中 *pyrG* 的敲除 A: 由 CmΔpyrG 敲除载体在筛选培养基上培养 15 d 后转化的平板;
B: 用引物对 CmpyrG F/R 进行 PCR 分析证实 *pyrG* 缺失的阳性菌株, 泳道 1 为野生型对照, 泳道 2–4 为转化子; C: D 图菌株的示意图; D: 将蛹虫草的野生型孢子和突变体接种于 CD、CD+尿苷/尿嘧啶和 CD+尿苷/尿嘧啶+5-FOA 培养基上, 22 °C 培养 7–10 d, 确认 *pyrG* 突变体缺失; E: 蛹虫草野生型与 Δ*pyrG* 突变体序列比较

Figure 5 *pyrG* gene knockout in *C. militaris*. A: CmΔpyrG knockout vector transformation after cultivation for 15 days on the screening medium; B: PCR analysis with primers (CmpyrG F/R) confirmed positive strains with *pyrG* gene deletion; lane 1 was control; lane 2–4 were transformants. C: D diagram of the strain. D: The wild type and the mutant spores of *C. militaris* were inoculated on CD, CD+uridine/uracil and CD+uridine/uracil+5-FOA medium and cultured at 22 °C for 7–10 days to confirm the deletion of *pyrG* mutants. E: Sequence comparison between wild-type and Δ*pyrG* mutant of *C. militaris*.

基上可以生长(图 5C 和 5D)。通过进一步测序验证发现,转化子 *pyrG* 基因与野生型相比缺失了 378 bp 碱基。因此,利用农杆菌介导的转化法,在蛹虫草中成功实现了 Cm Δ *pyrG* 同源重组敲除,构建了蛹虫草尿嘧啶营养缺陷型突变体。

2.5 以尿嘧啶营养缺陷型为筛选标记进行遗传转化

利用 ATMT 法将本实验室已有的米曲霉

pyrG 转化载体 pEX1、pEX2B 及改造的 IF-pEX1 载体,分别转化蛹虫草 Δ *pyrG* 突变体菌株,在不添加尿苷/尿嘧啶的 CD 培养基上进行筛选,均能筛选到尿嘧啶营养缺陷型互补的菌株(图 6A),转化效率为(75 \pm 35)个转化子/10⁶个孢子。通过 PCR 对转化背景、报告基因进行验证,结果发现转化背景和报告基因都正确(图 6B),说明筛选基因和报告基因均转化进入了蛹虫草。

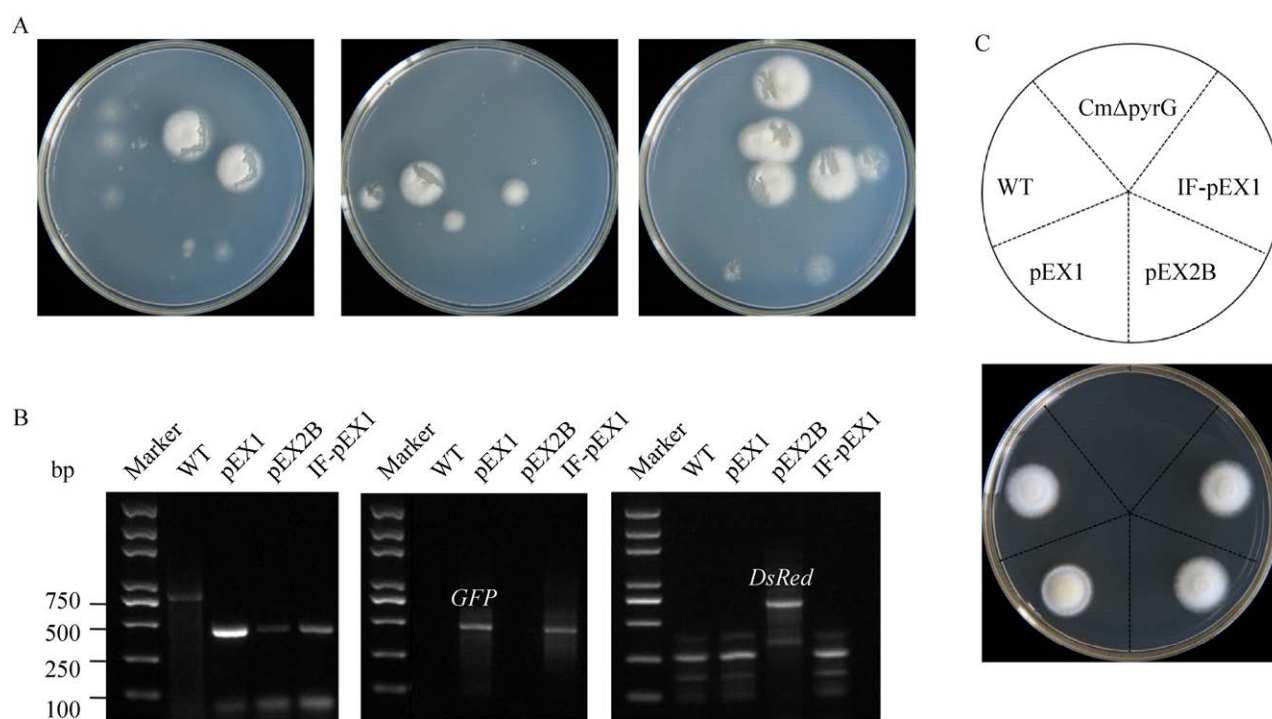


图 6 蛹虫草野生型和 *pyrG* 突变体互补菌株表型及 PCR 验证 A: 从左到右分别为由 pEX1、pEX2B 和 IF-pEX1 转化的 *pyrG* 突变体互补株; B: 不同菌株蛹虫草的分子验证, 从左到右分别为 Cm Δ *pyrG* F/R 引物验证证实 pEX1、pEX2B 和 IF-pEX1 转化子的背景是蛹虫草 *pyrG* 突变体; 引物对 GFP-F/R 验证 pEX1 和 IF-pEX1 转化子 *GFP* 基因; 引物对 DsRed-F/R PCR 验证 pEX2B 转化子 *DsRed* 基因; C: 转化子在 CD 培养基上的培养表型; WT、pEX1、pEX2B、IF-pEX1 生长良好, 但 Δ *pyrG* 突变体不生长

Figure 6 Comparison of wild type and complementary *pyrG* mutant strains of *C. militaris* and their PCR analysis. A: From left to right were complementary strains of *pyrG* mutants transformed by pEX1, pEX2B and IF-pEX1, respectively. B: Molecular validation of different strains of *C. militaris*. From left to right: PCR analysis of the background four strains with Cm Δ *pyrG* F/R primers of the *C. militaris* *pyrG* mutant; Confirm of pEX1 and IF-pEX1 transformants by PCR with GFP-F/R primers; Confirm of pEX2B transformant PCR analysis with DsRed-F/R primer. C: Phenotypes of the strain; WT, pEX1, pEX2B, IF-pEX1 grew well, but Δ *pyrG* mutant did not grow.

通过观察转化子表型, 结果发现在未添加尿苷/尿嘧啶的培养基上, 互补的菌株生长良好, 与野生型无明显差别(图 6C)。因此, 该结果表明米曲霉 *pyrG* 能成功用于互补蛹虫草 *pyrG* 营养缺陷型, 并且 ATMT 法对蛹虫草遗传转化十分有效。

2.6 蛹虫草延伸因子的启动子 *IF* 可以驱动报告基因表达

由于 pEX1、pEX2B 和 IF-pEX1 载体都带有报告基因 *GFP* 或 *DsRed*, 为了检测报告基因是否成功表达, 将转化子进一步培养爬片, 在荧光显微镜下观察。结果表明, *PgpdA* 和 *PamyB* 启动子在蛹虫草中不表达 *GFP* 或 *DsRed* 荧光蛋白, 而自身延伸因子-1 α 基因(CCM_00809)的启动子 *IF* 控制 *GFP* 报告基因的表达(图 7)。因此, 丝状真菌转化过程中常用的 3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子 *PgpdA* 和 α 淀粉酶启动子 *PamyB* 不能

用于蛹虫草转基因, 而其自身延伸因子启动子可以很好地用于驱动目的基因在蛹虫草中表达。

3 讨论与结论

丝状真菌中的 *pyrG* 及其在酵母中的 *URA3* 同源物已被广泛用作真菌转化的营养缺陷标记。前期研究中, 我们在丝状真菌米曲霉中建立了尿嘧啶营养缺陷型菌株及 *ptrA* 为标记的农杆菌介导的转化体系(30 个转化子/ 10^5 个孢子)^[38]。本研究运用 ATMT 法通过同源重组敲除了蛹虫草的 *pyrG*, 获得性状稳定的尿苷/尿嘧啶营养缺陷型 *Cm Δ *pyrG** 菌株。基于该营养缺陷型突变株, 利用本实验室已有的米曲霉 *pyrG* 为筛选标记的二元载体进行转化, 发现米曲霉 *pyrG* 可以成功互补蛹虫草 *pyrG* 营养缺陷型, 并且表型与野生型无明显差别, 说明 *pyrG* 基因在功能上比较保守。

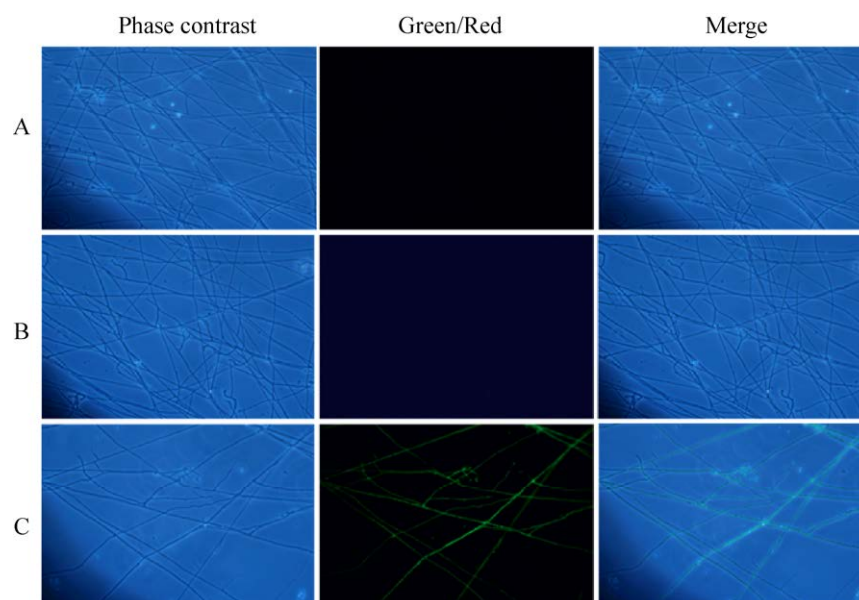


图 7 蛹虫草转化子报告基因表达情况 A–C 分别是 pEX1、pEX2B 和 IF-pEX1 回补菌株菌丝体爬片后荧光观察; 从左到右依次为相差视野、荧光视野和荧光相差叠加

Figure 7 Observation of the reporter gene expression of *C. militaris* transformants. A–C are the fluorescence images of pEX1, pEX2B and IF-pEX1 complement strains, respectively. From left to right: phase contrast field, fluorescence field and merge of phase contrast and fluorescence field.

ATMT 法与其他常用的转化方法相比, 既不需要制备原生质体, 也无需基因枪转化法设备, 只需要孢子液与农杆菌菌液共培养, 实验操作相对经济简便。因此, 本研究利用 ATMT 法敲除了蛹虫草 *pyrG* 基因, 获得了 *CmΔpyrG* 营养缺陷型菌株, 建立了 ATMT 遗传转化和外源基因表达体系。相较于 PEG 转化效率 (100–200 个/μg)^[14], 在蛹虫草 JM4 菌株中 ATMT 法转化效率为 30–600 个转化子/10⁵ 个孢子^[15], 本研究 *pyrG* 为选择标记的转化效率为 (75±35) 个转化子/10⁶ 个孢子, 敲除效率约为 (15±7) 个转化子/10⁶ 个孢子, 相对较低。蛹虫草转化效率可能与菌种、生长周期及转化载体相关, 利用筛选培养基覆盖更易筛选, 每个培养皿可以获得 5–10 个单克隆转化子, 可以方便地挑取单克隆转化子, 而且转化子的阳性率可达到 100%, 大大减少了工作量。此外, 本研究还发现构巢曲霉 *Pgpda* 启动子控制的 *GFP* 不能在尿苷/尿嘧啶营养缺陷的蛹虫草中异源表达 *GFP* 蛋白; 淀粉酶 *PamyB* 启动子控制的 *DsRed* 不能在尿苷/尿嘧啶营养缺陷的蛹虫草中异源表达 *DsRed* 荧光蛋白; 而由蛹虫草 *IF* 启动子控制的 *GFP* 能很好地在尿苷/尿嘧啶营养缺陷的蛹虫草中异源表达 *GFP* 荧光。本研究提供了一个有效、简便的遗传转化方法, 丰富了蛹虫草的遗传转化手段, 使得蛹虫草可以利用无抗性标记来实现遗传改造, 为之后蛹虫草分子改造提供了一个有前景的基因操作工具。

REFERENCES

- [1] 李虎臣, 孙平, 冯成强. 蛹虫草中活性成分虫草素的研究进展[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2010, 31(2): 93-96
Li HC, Sun P, Feng CQ. The research of cordycepin as an active component in *Cordyceps*[J]. Journal of Jinggangshan University: Natural Science, 2010, 31(2): 93-96 (in Chinese)
- [2] 李挺, 宋斌, 林敏. 药用真菌蛹虫草遗传多样性的 ScoT 分析[J]. 中药材, 2016, 39(7): 1488-1492
Li T, Song B, Lin M. ScoT analysis on genetic diversity of medicinal fungus *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2016, 39(7): 1488-1492 (in Chinese)
- [3] Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi[J]. Studies in Mycology, 2007, 57: 5-59
- [4] Kim HO, Yun JW. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(4): 728-738
- [5] Li SP, Yang FQ, Tsim KWK. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41(5): 1571-1584
- [6] Rose KM, Bell LE, Jacob ST. Specific inhibition of chromatin-associated poly(A) synthesis *in vitro* by cordycepin 5'-triphosphate[J]. Nature, 1977, 267(5607): 178-180
- [7] Tuli HS, Sharma AK, Sandhu SS, Kashyap D. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential[J]. Life Sciences, 2013, 93(23): 863-869
- [8] Wong YY, Moon A, Duffin R, Barthet-Barateig A, Meijer HA, Clemens MJ, De Moor CH. Cordycepin inhibits protein synthesis and cell adhesion through effects on signal transduction[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(4): 2610-2621
- [9] Yue K, Ye M, Zhou ZJ, Sun W, Lin X. The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2013, 65(4): 474-493
- [10] Paterson RRM. *Cordyceps*: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory?[J]. Phytochemistry, 2008, 69(7): 1469-1495
- [11] Zheng P, Xia YL, Xiao GH, Xiong CH, Hu X, Zhang SW, Zheng HJ, Huang Y, Zhou Y, Wang SY, et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine[J]. Genome Biology, 2011, 12(11): R116
- [12] 郑鹏, 王成树. 蛹虫草 *cvn* 基因的功能研究[C]. 中国菌物学会第五届会员代表大会暨 2011 年学术年会, 2011
Zheng P, Wang CS. Study on the function of *cvn* gene in *Cordyceps militaris*[C]. The Fifth Member Congress of Chinese Fungi Society and 2011 Academic Annual

- Meeting, 2011 (in Chinese)
- [13] Xie CY, Gu ZX, Fan GJ, Gu FR, Han YB, Chen ZG. Production of cordycepin and mycelia by submerged fermentation of *Cordyceps militaris* in mixture natural culture[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 158(2): 483-492
- [14] 孙丹, 张敏, 解长睿, 郭晓威, 徐赫韩, 高红桃, 李晓薇, 孙天旭, 李海燕. PEG法介导蛹虫草遗传转化体系的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(4): 76-82
Sun D, Zhang M, Xie CR, Guo XW, Xu HH, Gao HT, Li XW, Sun TX, Li HY. Establishment of genetic transformation system of *Cordyceps militaris* using PEG mediated method[J]. China Biotechnology, 2017, 37(4): 76-82 (in Chinese)
- [15] Zheng ZL, Huang CH, Cao L, Xie CH, Han RC. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris*[J]. Fungal Biology, 2011, 115(3): 265-274
- [16] 茅文俊, 鲍大鹏, 周陈力, 李燕, 谭琦, 汪滢. 运用基因枪法进行蛹虫草遗传转化的研究[J]. 园艺学报, 2015, 42(9): 1837-1842
Mao WJ, Bao DP, Zhou CL, Li Y, Tan Q, Wang Y. Effective transformation of *Cordyceps militaris* by particle bombardment[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(9): 1837-1842 (in Chinese)
- [17] Fitzgerald AM, Mudge AM, Gleave AP, Plummer KM. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*[J]. Mycological Research, 2003, 107(7): 803-810
- [18] Rachmawati R, Kinoshita H, Nihira T. Establishment of transformation system in *Cordyceps militaris* by using integration vector with benomyl resistance gene[J]. Procedia Environmental Sciences, 2013, 17: 142-149
- [19] Liu ZH, Friesen TL. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation in filamentous fungal pathogens[A]//Plant Fungal Pathogens[M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011: 365-375
- [20] 李欣龙, 张敏, 段霞瑜, 周益林. 丝状真菌遗传转化系统的研究进展[C]. 中国植物保护学会学术年会, 2011
Li XL, Zhang M, Duan XY, Zhou YL. Advances in genetic transformation system of filamentous fungi[C]. Annual Conference of Chinese Society for Plant Protection, 2011 (in Chinese)
- [21] 曹育博, 刘天翔, 周巍巍, 高玉千, 戚元成, 申进文, 邱立友. 基因枪法遗传转化双孢蘑菇菌褶[J]. 食用菌学报, 2011, 18(3): 9-11
Cao YB, Liu TX, Zhou WW, Gao YQ, Qi YC, Shen JW, Qiu LY. Transformation of *Agaricus bisporus* by particle bombardment of fruit body gill tissue[J]. Acta Edulis Fungi, 2011, 18(3): 9-11 (in Chinese)
- [22] Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix PJ, et al. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities[J]. Molecular Breeding, 2005, 15(3): 305-327
- [23] De Groot MJA, Bundock P, Hooykaas PJJ, Beijersbergen AGM. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(9): 839-842
- [24] Michielse CB, Hooykaas PJJ, Van Den Hondel CAMJJ, Ram AFJ. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. Current Genetics, 2005, 48(1): 1-17
- [25] Mattern IE, Unkles S, Kinghorn JR, Pouwels PH, Van Den Hondel CA. Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger pyrG* gene[J]. Molecular & General Genetics: MGG, 1987, 210(3): 460-461
- [26] Oakley BR, Rinehart JE, Mitchell BL, Oakley CE, Cannona C, Gray GL, May GS. Cloning, mapping and molecular analysis of the *pyrG* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) gene of *Aspergillus nidulans*[J]. Gene, 1987, 61(3): 385-399
- [27] Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR. 5-fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics[J]. Methods in Enzymology, 1987, 154: 164-175
- [28] D'Enfert C. Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker[J]. Current Genetics, 1996, 30(1): 76-82
- [29] Gouka RJ, Hessing JG, Stam H, Musters W, Van Den Hondel CA. A novel strategy for the isolation of defined *pyrG* mutants and the development of a site-specific integration system for *Aspergillus awamori*[J]. Current Genetics, 1995, 27(6): 536-540
- [30] Du Y, Xie GZ, Yang CF, Fang BS, Chen HW. Construction of brewing-wine *Aspergillus oryzae pyrG*⁻ mutant by *pyrG* gene deletion and its application in homology transformation[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2014, 46(6): 477-483
- [31] 曾斌, 陈飞, 胡志宏, 马龙, 胡建文. 一种无抗性标记营养缺陷型鲁式酵母的制备方法: CN108148854A[P]. 2018-06-12
Zeng B, Chen F, Hu ZH, Ma L, Hu JW. Preparation method of resistance marker-free auxotroph *Saccharomyces*

- rouxii*: CN108148854A[P]. 2018-06-12 (in Chinese)
- [32] 刘钟滨. 黑曲霉菌 *pyrG* 基因的克隆与黑曲霉菌同源转化系统的建立[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(2): 170
- Liu ZB. Cloning of *pyrG* gene of *Aspergillus niger* and establishment of homologous transformation system of *Aspergillus niger*[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2001, 21(2): 170 (in Chinese)
- [33] Nguyen KT, Ho QN, Pham TH, Phan TN, Tran VT. The construction and use of versatile binary vectors carrying *pyrG* auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 32(12): 204
- [34] Nguyen KT, Ho QN, Do LTBX, Mai LTD, Pham DN, Tran HTT, Le DH, Nguyen HQ, Tran VT. A new and efficient approach for construction of uridine/uracil auxotrophic mutants in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(6): 107
- [35] 王连会, 茅文俊, 鲍大鹏. 香菇尿嘧啶营养缺陷型菌株的筛选与分子验证[J]. 上海农业学报, 2014, 30(3): 6-9
- Wang LH, Mao WJ, Bao DP. Selected and molecular verification for uracil auxotrophic mutants of *Lentinula edodes*[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2014, 30(3): 6-9 (in Chinese)
- [36] Xia YL, Luo FF, Shang YF, Chen PL, Lu YZ, Wang CS. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin[J]. Cell Chemical Biology, 2017, 24(12): 1479-1489
- [37] 王琼, 唐俊妮, 汤承, 陈娟, 刘骥, 陈炼红. 一种采用微波炉加热快速提取细菌 DNA 用于 PCR 扩增的方法[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2015, 41(2): 150-155.
- Wang Q, Tang JN, Tang C, Chen J, Liu J, Chen LH. Method for rapidly extracting bacterial DNA for PCR amplification by heating in microwave oven[J]. Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition), 2015, 41(2): 150-155 (in Chinese).
- [38] Sun YL, Niu YL, He B, Ma L, Li GH, Tran VT, Zeng B, Hu ZH. A dual selection marker transformation system using *Agrobacterium tumefaciens* for the industrial *Aspergillus oryzae* 3.042[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(2): 230-234