

电击法介导的紫孢侧耳原生质体转化

燕克勤 朱宝成 赵会良* 李庆余 王 谦**

(河北大学生物系 保定 071002)

(河北大学静电研究所 保定 071002)*

(河北省微生物研究所 保定 071051)**

摘 要 使用基因脉冲导入仪成功地将糙皮侧耳 DNA 导入紫孢侧耳单核原生质体内,获得了具有“锁状联合”特征的双核转化菌株 T_1 和 T_2 。转化率为 8.2×10^{-5} , 转化比为 3.6%。酯酶同 I 酶分析结果表明,转化菌株除具有受体菌的酶带外,还存在供体菌的酶带,由此证明转化菌株确为紫孢侧耳和糙皮侧耳 DNA 重组的产物。转化菌孢子实体形态也发生了变化。两菌孢子实体均不释放孢子; T_1 菌柄中生; T_2 成熟子实体菌盖中部易长出菌丝。

关键词 侧耳, 原生质体, 电击法, 转化

利用原生质体进行遗传操作受到越来越多的研究者和育种工作者的重视,在食用菌方面,已有许多原生质体融合成功的报道^[1,2],但是对食用菌进行遗传转化的研究很少。近年来发展起来的电击法被认为是外源遗传物质导入的最有效的方法之一,它具有操作简单,转化效率高、毒性小等优点,在微生物学等领域已得到广泛应用^[3]。本文以紫孢侧耳单核原生质体为受体,用电击法导入了糙皮侧耳 DNA,获得了稳定的转化菌株。

1 材料与方法

1.1 菌种

紫孢侧耳 (*Pleurotus sapidus*), 受体菌株;糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*), DNA 供体菌株。

1.2 培养基及原生质体制备所用试剂

1.2.1 菌丝生长培养基(%) : 土豆浸汁 20, 蔗糖 2, 磷酸二氢钾 0.2, 酵母膏 0.5, 蛋白胨 1, pH6.0; 固体培养基加 2% 琼脂。

1.2.2 原生质体再生培养基(%) : 葡萄糖 2, 蛋白胨 0.2, 土豆浸汁 20, 蔗糖 0.6mol/L, 琼脂 2, pH6.0, 0.1MPa 灭菌 25min。

1.2.3 转化菌株出菇培养料: 棉籽皮加 5% 麦麸。干料和水的比例为 1:1.3, 自然 pH。

1.2.4 酶液: 溶壁酶 1% (广东微生物研究所生产), 蜗牛酶 0.5% (中国科学院生物物理研究所生产, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6mol/L, pH6.0。G6 漏斗抽滤除菌。

1.3 提取 DNA 所用试剂

Tris-HCl-EDTA 溶液 0.01mol/L (pH9.0), SDS 10%, 苯酚, 氯仿-异戊醇 (24:

* 现为清华大学电机系博士生。
本文于 1994 年 9 月 21 日收到。

1), 无水乙醇, 20×SSC 贮存液。

1.4 DNA 提取

收集培养 3~4 d 的糙皮侧耳双核菌丝体, 用无菌水洗涤两次, 以每克菌体加入 4ml Tris-HCl-EDTA 溶液及 1/50 体积的 β -巯基乙醇, 冰冻 1h 后研磨呈粘液状。加入 2% SDS。再加入一倍体积的饱和苯酚与 1/2 体积的氯仿-异戊醇, 振荡, 冰冻离心 (15 000r/min, 30min), 取上层水相。重复上述苯酚与氯仿-异戊醇的处理。然后再加入一倍体积氯仿抽提两次。最后将水相收集于烧杯内, 沿杯壁轻轻加入两倍体积无水乙醇, 离心收集 DNA 溶于 1×SSC 溶液中, 测定浓度及纯度后备用。

1.5 紫孢侧耳原生质体制备与纯化

用液体生长培养基培养紫孢侧耳的单核菌丝, 3~4d 后于 28℃ 下酶解 1.5h, 原生质体形成量在 10^7 /ml 以上。用无菌脱脂棉过滤酶解液, 滤去未酶解的菌丝, 离心洗涤两次 (2 000r/min, 8min), 最后用葡萄糖溶液 0.6mol/L 悬浮原生质体。

1.6 电击条件及转化方法

用 LN-101 型基因脉冲导入仪 (天津理工学院研制) 进行电击转化处理。电极间距 35mm, 电容 20 μ F, 电压 500~2 500V。取浓度为 4.5×10^5 /ml 原生质体悬浮液按 4:1 的比例与 DNA 溶液 (24 μ g/ml) 混合, 取 1.0ml 注入电击池内。电击后常温下静置 10min, 然后涂于原生质体再生培养基平板上, 25℃ 培养 7~10d。

1.7 转化子的检出

将再生单个菌落转接在固体生长培养基平板上, 25℃ 培养 6~7d, 分别对单菌落进行镜检, 有“锁状联合”特征的菌株视为转化菌株。计算转化率和转化比。

$$\text{转化率} = \frac{\text{转化子数}}{\text{原生质体数}}, \quad \text{转化比} = \frac{\text{转化子数}}{\text{再生菌落数}} \times 100\%$$

1.8 转化菌株的分析鉴定

1.8.1 酯酶同工酶分析: 采用 Bio-Rad 垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳系统, 分离胶 7.5%, pH8.9, 浓缩胶 2.5%, pH6.7, 点样量 50 μ l, 电流为每板 30mA。染色、固定后的凝胶, 在 Bio-Rad 干胶仪中干燥。

1.8.2 菌丝生长速度的测定: 将转化菌株和供受体菌株分别接到固体生长培养基平板上培养, 以测定其生长速度。

1.8.3 出菇试验: 采用袋装栽培法。

2 结果与讨论

2.1 电击处理对原生质体再生的影响

脉冲强度及脉冲次数对原生质体再生率和转化率有一定的影响 (见表 1), 当固定电容为 20 μ F, 改变脉冲电压, 对原生质体进行电击处理。

从表 1 可以看出, 电容一定时, 在低电压情况下, 原生质体再生率较高, 高电压时再生率明显降低, 1 500V 时达到最低。当电压高于 1500V 时, 再生率略有升高。而且在同一电压条件下, 电击两次比电击一次的再生率相对要低。

表 1 脉冲电压对原生质体再生的影响

Table 1 Effect of pluse voltage on the protoplast regeneration

| Pluse times | Pluse voltage/V | 500 | 1000 | 1500 | 2000 | 2500 |
|-------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| 1 | Number of regeneration clones | 2626 | 1417 | 754 | 1482 | 1430 |
| | Regenerative frequency/% | 0.58 | 0.31 | 0.17 | 0.33 | 0.32 |
| 2 | Number of regeneration clones | 2496 | 728 | 143 | 429 | 351 |
| | Regenerative frequency/% | 0.55 | 0.16 | 0.03 | 0.10 | 0.08 |

2.2 外源 DNA 导入及转化子检出

在电压 1000V，电容 20μF 条件下，对紫孢侧耳单核原生质体进行了两次电击处理。电击后的原生质体经培养后，根据“锁状联合”形态特征挑选转化子。由于受体菌是单核，其菌丝无“锁状联合”，而经转化后，供体 DNA 进入到受体菌并与受体菌 DNA 重组，从而使转化菌株形成“锁状联合”，根据这一特征在再生菌落中挑出了转化菌株，转化率为 8.2×10^{-5} ，转化比为 3.6%。对照处理的原生质体再生后没出现具“锁状联合”的双核转化菌株。

2.3 转化菌株的鉴定

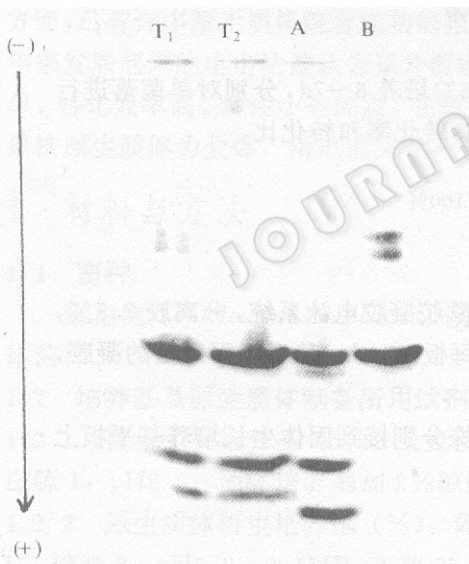


图 1 转化菌株酯酶同工酶谱

Fig. 1 The esterase isozyme patterns of transformants

A. *P. ostreatus*, B. *P. sapidus*

2.3.1 转化菌株的稳定性:转化菌株经多次传代后，其菌丝形态、菌丝生长速度都未发生变化，转化菌株具有很好的稳定性。

2.3.2 酯酶同工酶分析:同工酶是基因的产物，酶谱的不同可反映出基因组的变化。本实验对紫孢侧耳 (*P. sapidus*)、糙皮侧耳 (*P. ostreatus*) 及两株转化菌株 T₁、T₂ 的酯酶同工酶进行了电泳分析，结果见图 1。

由图中可以看出，转化菌株 T₁、T₂ 与受体菌紫孢侧耳的酶带具有明显差异。在两株转化菌株中除具有受体紫孢侧耳的酶带 (d) 外，均存在供体菌糙皮侧耳的酶带 (c)，同时还出现了新酶带 (b)，显然为基因重组之结果。从而证实筛选出的具“锁状联合”特征的菌株是糙皮侧耳 DNA 导入受体紫孢侧耳单核原生质体的产物。

未加 DNA 的原生质体经电击处理后的再生菌株的同工酶谱未发生变化。

2.3.3 菌丝生长的测定:结果见表 2。由表可知，转化菌株与受体菌株相比，生长速度提高 23%~29%，与供体菌株比，提高 30%~36%，具有明显的杂种优势。

表 2 转化菌株菌丝生长速度

Table 2 The mycelia growth rate of the transformants

| t/d | Strains and mycelia growth length/cm | | | |
|-------|--------------------------------------|-------|---------------------|-------------------|
| | T_1 | T_2 | <i>P. ostreatus</i> | <i>P. sapidus</i> |
| 4 | 2.7 | 2.5 | 1.9 | 2.0 |
| 6 | 4.5 | 4.3 | 3.3 | 3.5 |

2.3.4 出菇试验: T_1 、 T_2 菌株经多次传代后均能形成正常的子实体, 其子实体形态与紫孢侧耳相似, 两菌株子实体均不释放孢子。 T_1 菌柄中生, 此特点与紫孢侧耳原生质体诱变的结果相同^{〔4〕}, T_2 成熟子实体菌盖中部易长出菌丝, 为糙皮侧耳的特征。

我们利用紫外线灭活紫孢侧耳和糙皮侧耳双亲株原生质体后进行融合, 获得了成功^{〔1〕}。与传统的遗传标记方法相比, 灭活原生质体融合有很大的优越性, 大大简化了标记工作, 在一定程度上避免了遗传标记对亲株性状的不利影响, 但灭活过程对 DNA 损伤严重, 致使重组率低, 并且有可能破坏生产性状基因。本实验所采用的进行基因转移的电击法, 其外加电场主要作用在细胞膜上, 而对细胞质和 DNA 结构的影响很小, 这样在适当强度的外加电场作用下, 细胞膜被击穿, 原生质体吸收 DNA 而被转化。此法虽类似于单亲株原生质体灭活融合, 都简化了筛选

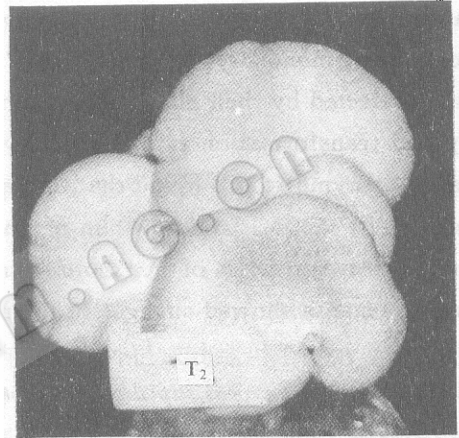


图 2 转化菌株子实体

Fig. 2 Fruit bodies of the transformants

过程, 但与后者相比, 电击法保证了 DNA 的完整性, 提高了重组率。电击法介导的基因转移所挑选的具“锁状联合”的双核菌株一定是转化菌株, 因为单核的受体菌的原生质体只有吸收 DNA 后, 生长出的菌丝体才有可能具有此特征。目前, 在食用菌方面可利用的目的基因和载体还很少, 尽管将供体所有 DNA 片段导入受体细胞内具有一定的盲目性, 但在现阶段不失为食用菌遗传育种的一种行之有效的方法。

参 考 文 献

- 〔1〕 朱宝成, 燕克勤, 王俊刚等. 生物工程论文集, 北京: 化学工业出版社, 1994, pp. 95~99.
- 〔2〕 韩新才, 杨新美. 真菌学报, 1991, 10 (3): 223~230.
- 〔3〕 王岳五, 江 波, 熊瑞身. 微生物学报, 1991, 31 (2): 94~99.
- 〔4〕 朱宝成, 王俊刚, 燕克勤等. 遗传, 1994, 16 (2): 32~34.

Transformation of *Pleurotus sapidus* Protoplasts by Electroporation

Yan Keqin Zhu Baocheng Zhao Huiliang* Li Qingyu Wang Qian**

(Department of Biology of Hebei University, Baoding 071002)*,

(Electrostatics Institute of Hebei University, Baoding 071002)

(Microbiology Institute of Hebei Province, Baoding 071051)**

Abstract The total DNA of *Pleurotus ostreatus* was successfully transferred into protoplasts of monokaryotic mycelia of *P. sapidus* by electroporation. The transformants were selected by their clamp connection of dikaryocyte, and the transformation frequency and transformation rate were 8.2×10^{-5} and 3.6% respectively. Analysing the esterase isozyme, it was found that the transformants had some isozyme bands of *P. ostreatus* and *P. sapidus*, and new non-parental bands. This proved that the recombination occurred between DNA of *P. sapidus* and DNA of *P. ostreatus*. The fruit bodies of the transformants showed changes in their morphological characters.

Key words *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus*, protoplast, electroporation, transformation