

葡萄溃疡病菌限制性内切酶介导整合方法的建立 及转化子库的构建

张鑫^{1△} 刘爱芬^{1,2△} 张玮¹ 严红¹ 乔广行¹ 燕继晔^{1*} 李兴红^{1*}

(1. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所 北京 100097)

(2. 青岛农业大学 农学与植物保护学院 山东 青岛 266109)

摘要: 【目的】摸索葡萄溃疡病菌(*Lasiodiplodia theobromae*)限制性内切酶介导整合(Restriction enzyme mediated integration, REMI)的转化方法,并构建 CSS-01s (*L. theobromae*)的 REMI 转化子库。【方法】利用 REMI 转化方法,将线性化的含有潮霉素抗性基因(Hygromycin phosphotransferase gene, *Hyg*)的 pUCATPH 质粒转化 CSS-01s 菌株的原生质体;测定其对潮霉素 B 的敏感浓度,摸索不同酶解液和酶解时间对原生质体制备的影响,统计不同限制性内切酶酶量对转化效率的影响,以摸索出的最优条件构建 CSS-01s 菌株的 REMI 转化子库,采用 Southern blot 的方法验证转化子。【结果】首次建立了一套 *L. theobromae* 的 REMI 转化方法,经转化得到包含 6 000 余个转化子的 *L. theobromae* CSS-01s 转化子库,随机挑选的 5 个转化子经 Southern blot 分析,质粒均插入到了 *Hind* III 相应的酶切位点处。【结论】浓度为 2% 崩溃酶+2% 蜗牛酶酶混合液、酶解 4 h 为原生质体获得的最优条件,每管转化体系中加入 30 U *Hind* III 时转化效率最高,该方法可以用来获得大量不同表型的 REMI 转化子。

关键词: 葡萄溃疡病菌,原生质体制备,REMI

基金项目: 国家葡萄产业技术体系专项资金资助项目(No. CARS-30); 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所
创新基金项目

*通讯作者: Tel: 86-10-51503434

✉: 燕继晔: jiyeyan@gmail.com; 李兴红: lxx1962@yahoo.com.cn

△共同第一作者

收稿日期: 2012-08-23; 接受日期: 2012-11-02

Establishment of restriction enzyme mediated integration and construction of transformants library in *Lasiodiplodia theobromae*

ZHANG Xin^{1△} LIU Ai-Fen^{1,2△} ZHANG Wei¹ YAN Hong¹
QIAO Guang-Hang¹ YAN Ji-Ye^{1*} LI Xing-Hong^{1*}

(1. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China)

(2. College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: [Objective] To establish the Restriction enzyme mediated integration (REMI) transformation system and a REMI transformants library of *Lasiodiplodia theobromae*. [Methods] REMI method was used to obtain transformants of *L. theobromae*. Linearized DNA of plasmid pUCATPH containing the hygromycin phosphotransferase gene (*Hyg*) was integrated into chromosomes of wild strain CSS-01s. Sensitive concentration of *L. theobromae* to hygromycin B was determined. Different enzymolysis systems and digest time on preparation of protoplasts were performed and effect of restriction enzyme quantity on percent conversion was also carried out. The REMI transformants library of CSS-01s was constructed with the optimal condition, and the transformants was confirmed by Southern blot. [Results] This study established REMI method of *L. theobromae* for the first time and constructed REMI transformants library containing about 6 000 transformants. Southern blot analysis revealed that the plasmid inserted into the corresponding restriction endonuclease sites located on the genomic DNA of five random transformants. [Conclusion] The results suggested that the optimal condition of protoplasts preparation was adding 2% Drislase+2% Snailase enzyme mixture and digested for 4 hours. The transformation efficiency reached to the highest when 30 U *Hind* III was added into per transformation reaction. Transformants with different phenotype can be obtained using the above optimal conditions.

Keywords: *L. theobromae*, Protoplasts preparation, REMI

近年来,葡萄溃疡病在世界各地广泛发生,在美国、法国等 13 个国家均造成了严重危害^[1-3],给全球葡萄产业造成巨大经济损失。我国李兴红研究组于 2010 年首次报道了可可毛色二孢 *Lasiodiplodia theobromae* 能侵染葡萄引起葡萄溃疡病^[4]。该病会导致葡萄掉粒、穗腐、枝干溃疡,甚至死树,使许多果园损失严重。

L. theobromae 的有性态为 *Botryosphaeria rhodina*, 广泛存在于热带和亚热带地区,能够导致大约 500 种寄主发生溃疡、顶梢枯死、果腐、根腐等症状^[5],目前生产上对 *L. theobromae* 仍无有效的防治措施,因此开展其致病机理的研究极为必要。当前对病原菌致病机理的研究普遍采用 ATMT 和 REMI 技术获得表型突变体。鉴于

CSS-01s 菌株具有产孢周期长、生长速度快的特点,因此 REMI 方法更适合。REMI 是利用限制性内切酶将线性化质粒经 PEG 介导转入真菌原生质体,进而破坏基因,获得表型突变体的技术。自 1991 年该技术首次应用到酵母真菌上以来^[6], *Trichoderma* 等多种真菌应用此技术实现成功转化^[7-8], 魏世平博士在 2002 年构建了模式真菌稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 的 REMI 转化子库并克隆到无毒基因 AVR-Pia^[9]。但是 REMI 技术在 *L. theobromae* 的应用还未见相关报道。本研究较为系统的对 *L. theobromae* 的 REMI 转化方法进行探索和优化,建立了理想的 REMI 转化体系,构建了含有大量不同表型转化子的 REMI 转化子库,为该病菌致病机理的研究奠定基础,为最终有效地防治该病菌提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株: 葡萄溃疡病菌 CSS-01s (*L. theobromae*), 由北京市农林科学院植病综防实验室分离并保存; pUCATPH 载体, 由中国农业大学彭友良教授惠赠, 美国 Cornell University 构建。

1.1.2 主要培养基和试剂: PDA 培养基、CM 液体培养基、LR 再生液体培养基、SR 再生固体培养基; STC、PTC、0.7 mol/L NaCl、崩溃酶(Driselase)、蜗牛酶(Snailase)均参照魏世平^[9]的 REMI 转化子库构建中的培养基配制方法。

崩溃酶、蜗牛酶、酶水解干酪素、酸水解干酪素、聚乙二醇 3350 购自 Sigma 公司; 限制性内切酶 *Hind* III 以及琼脂粉购自 TaKaRa 公司; 潮霉素 B 购自 Roche 公司; 其他常规试剂为国产分析纯, 购自北京强欣博瑞生物技术有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 载体制备: 将载体质粒 pUCATPH 用限制性内切酶 *Hind* III 消化后定量, 线性质粒-20 °C

保存备用。

1.2.2 潮霉素敏感性测定: 将野生型菌株 CSS-01s 接种到 PDA 培养基上培养 36 h, 用 4 mm 的打孔器打孔, 分别接种到含有 20、30、40、50、60、70、80、90、100 mg/L 潮霉素的 PDA 培养基上, 28 °C 静置培养 36 h 后测量菌落直径, 每个处理重复 3 次。

1.2.3 原生质体制备: 将 CSS-01s 菌株接种到 PDA 培养基上培养 36 h, 将培养好的菌丝转入液体 CM 培养基中, 28 °C、120 r/min 培养 24 h。收集菌丝于 50 mL 离心管中, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 0.7 mol/L NaCl 洗涤菌丝, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。将菌丝称重, 按照 2 mL/g 的酶量加入细胞壁降解酶液, 28 °C、120 r/min 酶解 4 h, 四层擦镜纸过滤酶液, 0.7 mol/L NaCl 洗脱原生质体, 4 °C、2 000×g 离心 15 min, 弃上清。用 5 mL STC 重悬沉淀, 4 °C、2 000×g 离心 15 min, 弃上清。沉淀重悬于 1 mL STC 中, 用 STC 稀释至终浓度为 1×10^7 个/mL 左右备用。

(1) 不同酶系统对原生质体制备的影响。

向每克菌丝中分别加入 4% (W/W) 崩溃酶, 4% 蜗牛酶, 2% 崩溃酶+2% 蜗牛酶, 28 °C、120 r/min 酶解 4 h, 统计不同酶系统对原生质体制备的影响。每个处理重复 3 次。

(2) 不同酶解时间对原生质体制备的影响。

将酶解液置于 28 °C、120 r/min 分别酶解 2、3、4、5、6 h, 统计不同酶解时间对葡萄溃疡病菌原生质体产量的影响。每个处理重复 3 次。

1.2.4 原生质体转化: 参照魏世平的 REMI 转化方法^[9]。

1.2.5 转化子筛选: 将培养皿于 28 °C 静置培养 4-7 d 至水琼脂表面长出小菌落为止, 用灭菌牙签将长出的小菌落接种至 PDA 培养基(含 70 mg/L 潮霉素 B)上再次筛选, 将能生长的菌株保存。

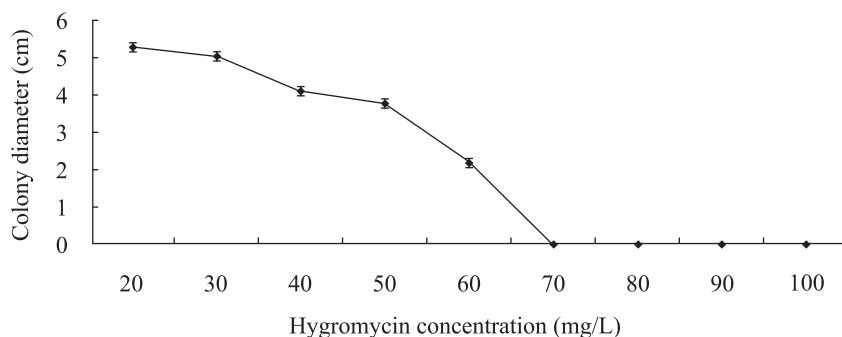


图 1 不同潮霉素 B 浓度对 *L. theobromae* 菌株生长速度的影响

Fig. 1 Impact of different hygromycin B concentration on growth speed of *L. theobromae*

1.2.6 转化子库的构建: 利用摸索的最优条件将线性化的 pUCATPH 载体转化 CSS-01s 的原生质体, 用含有 70 mg/L 潮霉素 B 的 PDA 筛选, 滤纸片法将能够生长的转化子保存在 -20°C 。

1.2.7 转化子的 Southern blot 验证: 取随机挑选的 5 个转化子的基因组 DNA 各 15 μg , 用 REMI 转化所用的限制性内切酶 *Hind* III 酶切基因组 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 毛细管虹吸法转膜, 杂交及洗膜方法参照萨姆布鲁克等^[10]。杂交探针为潮霉素基因片段, 采用随机引物标记法 (Random-primer labeling kit, TaKaRa) 标记。

2 结果与分析

2.1 潮霉素敏感性测定

通过测量 CSS-01s 菌株在含有不同潮霉素浓度 PDA 培养基上的菌落直径, 发现随着潮霉素浓度的加大生长速度逐渐减慢, 当浓度增加至 70 mg/L 时菌株生长完全受到抑制(图 1), 所以本研究采用 70 mg/L 潮霉素作为该菌株 REMI 转化子的筛选浓度。

2.2 不同酶系统对原生质体制备的影响

向每克菌丝中加入不同酶系统酶解 4 h 后, 统计原生质体的数量, 结果如图 2 所示, 单独加入蜗牛酶几乎没有得到原生质体, 而单独加入崩

溃酶和加入混合酶液的效果相似, 两者均可作为葡萄溃疡病菌制备原生质体的细胞壁降解酶酶解体系。

2.3 不同酶解时间对原生质体制备的影响

将 2% 崩溃酶和 2% 蜗牛酶的混合酶液加入到菌丝中, 28°C 、120 r/min 振荡培养不同时间发现, 随着培养时间的延长原生质体数量不断增加, 而 4 h 以后, 数量又有所下降(图 3)。由此确定葡萄溃疡病菌原生质体制备的最佳酶解时间为 4 h。

2.4 不同 *Hind* III 酶量对转化效率的影响

本研究是在 *Hind* III 介导下将线性化的 pUCATPH 质粒转化 CSS-01s 的原生质体, 在转化过程中, 加入不同酶量的限制性内切酶 *Hind* III, 经潮霉素 B 筛选后, 统计得到的转化子数目, 结果发现每管转化所用 *Hind* III 为 45 U 时,

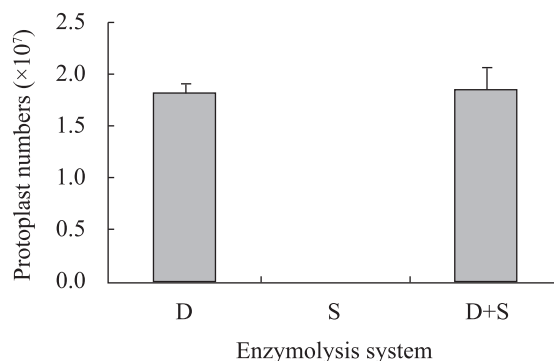


图 2 酶系统对原生质体制备的影响

Fig. 2 Effect of enzymolysis system on preparation of protoplasts

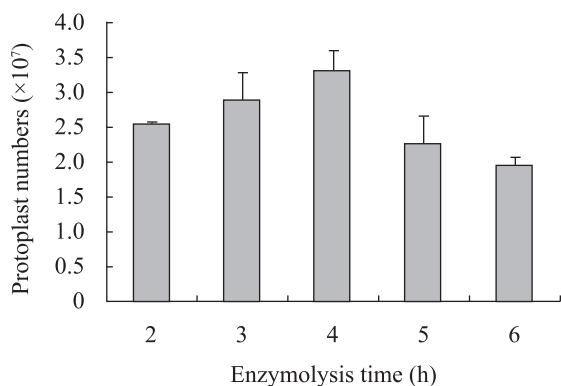


图3 酶解时间对原生质体制备的影响

Fig. 3 Effect of enzymolysis time on preparation of protoplasts

表1 不同 <i>Hind</i> III 酶量对转化率的影响 Table 1 Effect of restriction enzyme quantity on percent conversion	
每管转化所用酶量 Quantities of enzymes added into transformation mixture per tube (U)	转化率(个/ μ g) Average of transformants (per μ g DNA)
30	6.25
45	4.70
60	1.43

转化率为 4.7 个/ μ g 质粒 DNA, 当每管转化体系中加入 30 U 酶量时, 转化效率大约为 6.25 个/ μ g 质粒 DNA, 高于另外两种条件下的转化效率(表 1)。

2.5 转化子库的构建及 Southern blot 分析

根据摸索出的最优条件对 CSS-01s 进行 REMI 转化, 获得了包括 6 000 余个转化子的 REMI 转化子库, 许多转化子的生长速度及致病性发生了明显变化, 从中随机挑选 5 个 REMI 转化子进行 Southern blot 验证, 菌落形态如图 4 所示。以潮霉素基因片段做探针, 以转化所用的限制性内切酶 *Hind* III 酶切基因组 DNA, 结果显示 CSS-01s 菌株未杂交出条带, 而 5 个转化子均出现了 5.08 kb 的杂交条带(图 5), 该结果表明线性化的 pUCATPH 载体插入到了基因组中相应的 *Hind* III 酶切位点处, 本试验所检测的 5 个转化子均为 REMI 转化子。

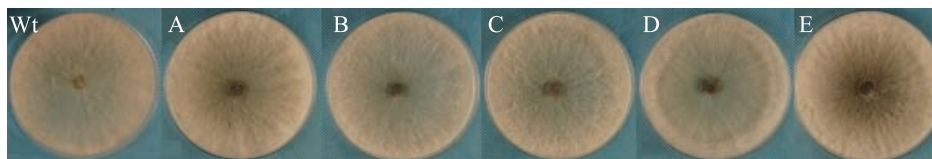


图4 REMI 转化子的菌落形态

Fig. 4 Colony characters of REMI transformants

Note: Wt: Wild type CSS-01s; A-E: 1-5 REMI transformants.

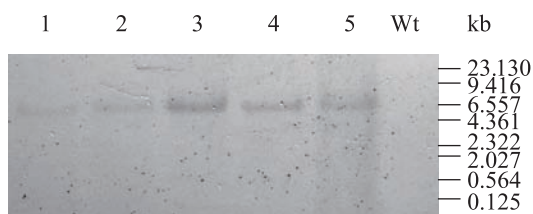


图5 REMI 转化子的 Southern blot 验证

Fig. 5 Southern blot of transformants

Note: Wt: Wild type CSS-01s; 1-5: REMI transformants.

3 讨论

REMI 转化的前提是得到足够数量的原生质体, 因此, 确定合适的酶解体系及酶解时间至关重要。本研究发现应用蜗牛酶和崩溃酶的混合液获得的原生质体的数量最多, 单独使用崩溃酶也可以获得原生质体, 但是单独使用蜗牛酶却没有

获得原生质体,这可能是由于蜗牛酶不能单独酶解菌丝的细胞壁。蜗牛酶中纤维素酶的浓度低而崩溃酶中纤维素酶浓度很高,但蜗牛酶果胶酶浓度高,进而混合使用两种酶效果最好。随着酶解时间的延长,原生质体的释放量增加,4 h时达到最大,随后数量又有所下降,这可能是由于原生质体长时间处于细胞壁降解酶环境下细胞膜会受到损害,使原本已释放的原生质体破损,导致数量下降,因此为了得到数量多、质量高的原生质体,到达最适酶解时间后要及时将酶解液去除,以减少其对原生质体的损伤。

REMI 技术之所以能使 *Gibberella zeae*、*Trichoderma atroviride*、*Colletotrichum lagenarium* 等多种病原真菌的转化效率显著提高^[11-13],这可能归因于限制性内切酶对原生质体基因组的有效切割。张文荟等^[14]对 *Magnaporthe grisea* 131 菌株应用此技术,结果发现,转化效率在限制性内切酶 *Hind* III, *Kpn* I 和 *Sac* I 介导下分别提高 6.5、10.0、3.7 倍。理论上,随着限制性内切酶酶量的增加,转化效率会逐渐提高,但本研究发现,当每管转化体系中的线性化质粒浓度均为 2 μ g 时,随着限制性内切酶酶量的增加转化效率逐渐降低,这与魏士平等构建 *M. grisea* 的 REMI 转化子库时得到的结果一致^[9],可能是由于限制性内切酶浓度的增加使病原真菌的基因组被过度酶切,插入质粒的拷贝数增加,严重破坏的基因组 DNA 的原有框架,造成致死突变,使转化子成活率降低。本研究 Southern blot 分析结果虽然证实了 5 株转化子均为 REMI 转化子,但尚未明确插入位点数及拷贝数,因此还需进一步设计实验进行分析。

4 结论

近几年, *L. theobromae* 作为一种新报道的葡萄病害的致病菌,研究其致病机理是至关重要

的。本文通过摸索葡萄溃疡病菌原生质体的获得体系及酶解时间,限制性内切酶的酶量,及该菌对潮霉素的耐受性等条件,确立了葡萄溃疡病菌的 REMI 转化体系的最适条件。应用该体系本实验室成功构建了一个含有 6 000 余株转化子的 REMI 库,初步筛选发现库中含有不同表型的转化子,这为后期筛选致病相关基因的突变体提供了可能,继而为该菌致病机理的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Taylor A, Hardy GESJ, Wood P, et al. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia[J]. Australasian Plant Pathology, 2005, 34(2): 187-195.
- [2] Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Voegel TM, et al. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California[J]. Plant Disease, 2006, 90: 1490-1503.
- [3] Úrbez-Torres JR, Gubler WD. First report of *Botryosphaeria iberica* and *B. viticola* associated with grapevine decline in California[J]. Plant Disease, 2007, 91(6): 772.
- [4] Jy Y, Li XH, Kong FF, et al. Occurrence of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria rhodina* in China[J]. Plant Disease, 2011, 95(2): 219.
- [5] Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Guerrero JC, et al. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico[J]. Plant Disease, 2008, 92(4): 519-529.
- [6] Schiestl RH, Petes TD. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(17): 7585-7589.
- [7] Wang B, Liu L, Gao Y, et al. Improved phytoremediation of oilseed rape (*Brassica napus*) by *Trichoderma* mutant constructed by restriction

- enzyme-mediated integration (REMI) in Cadmium polluted soil[J]. *Chemosphere*, 2009, 74(10): 1400-1403.
- [8] Wang Y, Guo B, Miao Z, et al. Transformation of taxol-producing endophytic fungi by restriction enzyme-mediated integration (REMI)[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 273(2): 253-259.
- [9] 魏士平. 稻瘟菌 REMI 突变体库的构建及 AVR-Pia 的克隆[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2002.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW 著, 黄培堂译. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2001: 492-505.
- [11] Han YK, Kim MD, Lee SH, et al. A novel F-box protein involved in sexual development and pathogenesis in *Gibberella zeae*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(3): 768-779.
- [12] Takano Y, Takayanagi N, Hori H, et al. A gene involved in modifying transfer RNA is required for fungal pathogenicity and stress tolerance of *Colletotrichum lagenarium*[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 60(1): 81-92.
- [13] Tang J, Liu L, Hu S, et al. Improved degradation of organophosphate dichlorvos by *Trichoderma atroviride* transformants generated by restriction enzyme-mediated integration (REMI)[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1): 480-483.
- [14] 张文荟, 周益军, 范永坚, 等. 稻瘟病菌限制酶介导整合(REMI)转化的致病性诱变[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2002, 25(2): 17-21.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/swsxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsP14* 基因的克隆和表达[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2013-00-00; 接受日期: 2013-00-00

(下转 p.1313)