

灵芝转化体系的建立

孙墨可¹, 李晓薇², 孙晓文³, 张曼¹, 田娟¹, 董玉迪¹, 李海燕^{2*} (1. 吉林省白城市农业科学院生物技术实验室, 吉林白城 137000; 2. 吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林长春 130118; 3. 吉林省镇赉县芦苇湿地管理站, 吉林镇赉 137300)

摘要 利用 TPS 法提取平菇基因组, 克隆甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GPD), 用 GPD 启动子替换原表达载体 pCAMBIA1302 中的 35s 启动子, 构建 pCAMBIA1302 表达载体, 利用 PEG 法转化灵芝原生质体。通过酶切验证与测序结果表明 GPD 启动子已成功构建到表达载体 pCAMBIA1302 中, 通过灵芝转化子的 PCR 检测和荧光显微镜观察证明绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 已转入到灵芝中。该研究成功构建了灵芝转化体系, 对今后开展灵芝的分子生物学研究具有重要意义。

关键词 灵芝; 表达载体; PEG; 转化; GFP

中图分类号 S567.3⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)26-0091-03

The Construction of Transformation System for *Ganoderma lucidum*

SUN Mo-ke¹, LI Xiao-wei², SUN Xiao-wen³ et al (1. Biological Technology Laboratory, Baicheng Academy of Agricultural Sciences, Baicheng, Jilin 137000; 2. Bioreactor and Drug Development Research Center of Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 3. Reed Wetland Management Station, Zhenlai, Jilin 137300)

Abstract The *Pleurotus ostreatus* genome was extracted by TPS, cloning glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter, pCAMBIA1302 expression vector was built with GDP promoter to replace the original expression vector of pCAMBIA1302 35 s promoter, and *Ganoderma lucidum* protoplast was transformed by using the method of PEG. Verification by enzyme digestion and sequencing showed that GDP promoter has successfully built into the expression vector pCAMBIA1302. It proved that green fluorescent proteins have gone to the *G. lucidum* by PCR detection and fluorescence microscopy. The transformation system of *G. lucidum* had been successfully constructed, which was of great significance to the molecular biology research of *G. lucidum*.

Key words *Ganoderma lucidum*; Expression vector; PEG; Transformation; GFP

灵芝是我国的传统药用真菌, 在我国和东南亚国家有着悠久的历史^[1]。灵芝含有多糖、萜类化合物、核苷、生物碱、氨基酸多肽、微量元素等多种活性成分。现代药理研究表明, 灵芝具有保肝、抗肿瘤、抗 HIV-1 及 HIV-1 蛋白酶活性、抗组织胺释放、抑制血管紧张素、抗氧化、调节免疫及延缓衰老的作用^[2-7]。自 Mishra 等^[8]首次实现粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*) 的 DNA 转化以来, 已经成功建立了许多丝状真菌外源基因的遗传转化体系。近年来, 研究人员对灵芝转化方法进行了广泛和深入的研究。Sun 等^[9]将电击转化方法引入灵芝的分子遗传学研究中, 获得 15 个转化子。Kim 等^[10]在灵芝中成功应用限制性内切酶介导的转化方法, 获得 4~17 个转化子。郭淑等^[11]从灵芝中克隆了合成三萜的关键元件 GLCYP450 及其还原酶 GLNADPH 的基因, 并在酵母中获得了表达; 方星等^[12]利用农杆菌介导法将灵芝甾醇 14 α -脱甲基酶基因在灵芝中进行表达。逢春梅等^[13]通过电击法将双元细菌人工染色体 (BIBAC) 载体上的 100 kb 人参大片段 DNA 转化到灵芝原生质体内。笔者利用 PEG 转化法将带有 GPD 启动子及 GFP 绿色荧光蛋白的表达载体 pCAMBIA1302 转入灵芝原生质体中, 以期利用灵芝作为生物反应器表达蛋白及其中间产物提供理论基础。

1 材料与方

1.1 材料 灵芝 (*Goanoderma lucidum*) 由吉林农业大学菌物研究所保存。大肠杆菌 DH5a 由吉林农业大学生物反应器保存。质粒 pCAMBIA1302 及 *Taq* DNA 聚合酶购自大连

TaKaRa 公司。

1.2 菌株培养 将灵芝菌丝接入 PDA 液体培养基中, 培养条件为摇床 120 r/min, 28 °C 培养 6 d。将大肠杆菌 DH5a 在 LB 培养基中 37 °C 培养, 在含有 15% 甘油的 LB 培养基中, -80 °C 保存。

1.3 引物序列 PCR 引物均由金唯智公司合成, GPD 启动子引物为 GPD - F: 5' - GCTCTAGACGTTTCGTGACTCGCAATATC - 3'; GPD - R: 5' - CGGGATCCTGCGGGT-GAAAGAGGAGG-3'。

检测灵芝转化子 GFP 引物为 GFP - F: 5' - GTTGTATA-ATAGCACCCGGTTT - 3'; GFP - R: 5' - GGCTCGGTACG-GAAGTTG - 3'。

1.4 平菇基因组 DNA 的提取 将平菇菌种接种于液体 PDA 培养基中, 27 °C 培养 6 d 后, 收集菌丝, 采用 TPS 法提取平菇基因组。

1.5 构建 pCAMBIA1302 重组表达载体

1.5.1 PCR 扩增 GPD 启动子。 根据已报道的平菇 GPD 启动子序列设计 2 对引物, 由金唯智公司合成, 以平菇基因组 DNA 为模板进行 GPD 启动子片段的扩增。扩增程序为预变性 94 °C 7 min; 变性 94 °C 45 s, 退火 65 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 延伸 72 °C 7 min 反应终止, 于 4 °C 保存。取 2 μ L 扩增 PCR 产物进行 1% 的琼脂电泳, 检测 PCR 扩增结果。电泳结果后连接 T 载体测序。

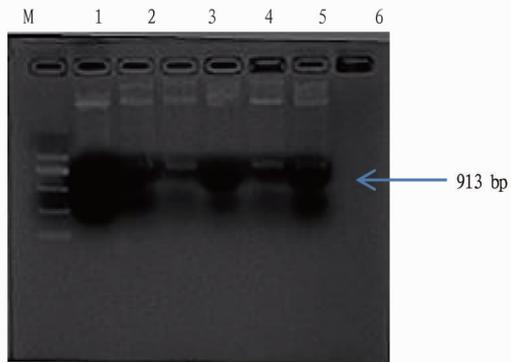
1.5.2 双酶切。 将 pCAMBIA1302 质粒用 *Nco* I 和 *Bam*HI 于 37 °C 进行过夜酶切, 切胶回收大片段, 用 *Nco* I 和 *Bam*HI 限制性内切酶处理 pSB1302 质粒。酶切后置于 65 °C 水浴锅中反应 12 min 使限制性内切酶失活。

1.5.3 GPD 启动子连接 pCAMBIA1302。 用 Solution I 连接载

基金项目 吉林省重点科技攻关项目 (20150204027NY)。

作者简介 孙墨可 (1988—), 女, 吉林镇赉人, 研究实习员, 硕士, 从事生物技术研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事基因工程及分子生物学研究。

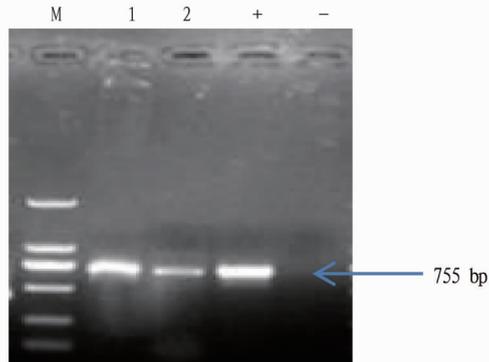
收稿日期 2018-05-04



注: M.DL2000 Marker; 1~6.GPD 启动子
 Note: M.DL2000 Marker; 1~6.GPD promoter

图 4 质粒 pCAMBIA1302 上 *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切验证

Fig.4 The digestion verification of plasmid pCAMBIA1302 by *Nco* I and *Bam*H I



注: M.DL2000 Marker; 1~2.灵芝转化子

Note: M.DL2000 Marker; 1~2.*G. lucidum* transformants

图 6 灵芝转化子中 GFP 的 PCR 验证

Fig.6 PCR detection of GFP in *G.lucidum* transformants

化子,用 GFP 片段进行 PCR 检测(图 6)。

2.4 荧光倒置显微镜观察转化的灵芝菌丝 在荧光倒置显微镜下观察转化后 GFP 绿色荧光蛋白的灵芝转化子,可以看出部分灵芝菌丝在倒置荧光显微镜下呈现荧光色,由此表明,GFP 绿色荧光蛋白在灵芝菌丝中有表达(图 7)。

3 结论

利用 TPS 法提取平菇基因组,此方法简单易行,适用于少量提取基因组。该研究建立了由 PEG 介导的灵芝转化体系,首先将 GPD 启动子构建到带有 GFP 绿色荧光蛋白的 pCAMBIA1302 表达载体中,通过 PEG 介导的转化法转化灵芝原生质体,以及潮霉素的抗性筛选,获得了一批具有潮霉素抗性的灵芝转化子菌株,并通过 PCR 扩增 GFP 基因片段和荧光倒置显微镜试验证实外源基因片段 GFP 已成功转化进灵芝转化子的基因组中。食用菌等大型丝状真菌的转化效率较低,远远低于丝细菌和酵母的转化率,转化效率高也许与物种本身有关。该研究建立了灵芝转化体系,使灵芝作为一种新的生物反应器,为今后分子生物学研究打下基础。

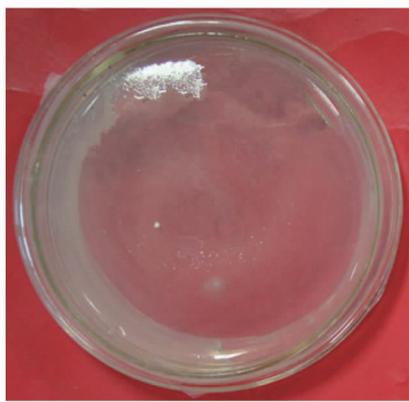
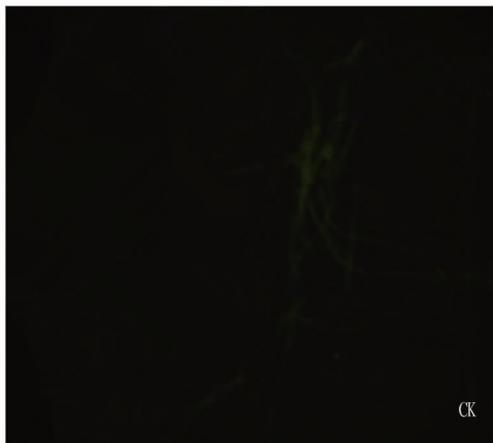
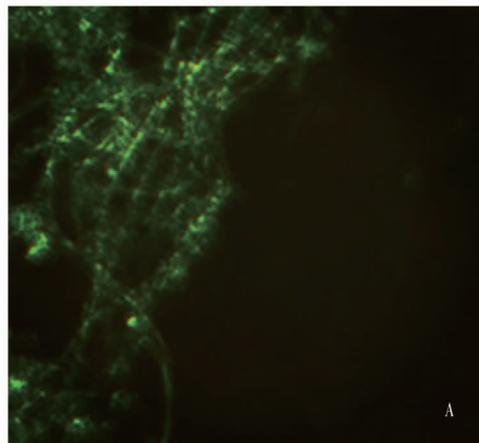


图 5 灵芝原生质体在带有潮霉素抗性培养基中的生长情况

Fig.5 The growth of protoplast of *G.lucidum* in culture medium with hygromycin resistance



注: A.灵芝转化子;CK.未转化的灵芝菌丝

Note: A.*G.lucidum* transformants;CK.Untransformed *G.lucidum* mycelia

图 7 在荧光倒置显微镜下观察灵芝菌丝

Fig.7 The mycelium of *G. lucidum* was observed under a fluorescence inverted microscope

参考文献

[1] 卯晓岚.中国经济真菌[M].北京:科学出版社,1998.
 [2] LIU Y W,GAO J L,GUAN J,et al.Evaluation of antiproliferative activities

and action mechanisms of extracts from two species of *Ganoderma* on tumor cell lines[J].J Agric Food Chem,2009,57(8):3087-3093.

2.4.7 病虫害防治。病虫害是影响山核桃产量的重要因素,病虫害防治不可使用剧毒、高残留的农药,避免造成山核桃农药残留超标。山核桃常见病害有腐烂病、枝枯病^[7]和白粉病等;常见虫害主要为山核桃小吉丁虫、尺蠖、象甲虫、刺蛾

等,具体防治措施见表 1。病虫害防治应以预防为主,坚持因地制宜、适地适树的原则,切忌盲目扩大面积,合理水肥,提高林木自身长势,发挥其自身的抗逆性。

表 1 山核桃常见病虫害防治方法

Table 1 The common pest and disease control methods of *C.cathayensis*

类型 Type	种类 Variety	防治方法 Control method
病害 Disease	腐烂病	及时彻底刮除治病斑,之后用 50% 的甲基托布津可湿性粉剂 50 倍液,或 50% 退菌特可湿性粉剂 50 倍液进行涂抹消毒,最后涂波尔多液保护伤口
	枝枯病	选用 70% 的甲基托布津可湿性粉剂 800~1 000 倍液,或 400~500 倍液的代森锰锌可湿性粉剂喷雾防治,每隔 10 d 喷洒 1 次,连续 3~4 次
	白粉病	发病初期,可用三唑酮 3 000 倍液喷施
虫害 Pest	核桃小吉丁虫	成虫发生期喷洒 25% 西维因可湿性粉剂 500 倍液,或 2.5% 溴氰菊酯乳剂 4 000 倍液防治
	尺蠖	树体喷 25% 可湿性西维因可湿性粉剂 300~500 倍液
	核桃果象甲	及时捡拾落果或摘除被害果,虫害发生时,喷洒 2.5% 溴氰菊酯乳油 2 000~3 000 倍液防治
	刺蛾类	盛蛾期设诱虫灯诱杀成虫,幼虫期及时喷洒 50% 杀螟松乳油、10% 天王星乳油 5 000 倍液、2.5% 鱼藤酮 300~400 倍液等

2.4.8 产品深加工。金寨县的山核桃产业目前还存在山核桃种植投入资金少、种植规模偏小、种植技术不规范、科技含量不高、深加工企业偏少等问题,只有为数不多的小作坊从事山核桃油加工,出油率低、品质不高、原料浪费大、难以形成规模效应、经济效益差。为保证金寨县山核桃产业的健康发展,将金寨山核桃的附加值留在金寨本地,最好的办法就是结合市场需要,对山核桃进行产业化综合加工,提高产品的附加值,将巨大的资源优势转化为经济优势。通过建立综合加工厂,形成山核桃加工业的龙头企业,以加工带动种植,以加工促进发展,为山核桃种植者带来可观的经济效益,为金寨县的经济做出应有的贡献。

3 结语

金寨县山核桃产业发展应严格遵循市场经济规律,实行政府引导、市场为主的原则发展山核桃产业。县级林业主管部门要努力做好政策宣传、工作指导、信息和技术服务、种苗监管和市场监管,促进山核桃产业健康发展;要大力宣传山核桃及其相关产品,扩大社会认知度,提升加工企业市场竞争力,增加消费群体和山核桃种植户数量;要研究市场变化

规律、消费趋势、市场竞争等状况,有针对性地制定山核桃产业发展策略和措施^[8];要向林农提供生产资料、技术应用、加工储藏、运输销售等方面的信息服务,使其真正从山核桃生产种植中得到实惠;要加大种苗管理和加工、贸易监管力度,实行严格的生产经营市场准入制度,切实保证山核桃种苗和加工产品质量;同时,鼓励企业和农户开展山核桃低产林改造,组织农技人员实地指导林农开展林地管理、病虫害防治等,促进金寨县山核桃产业快速健康发展。

参考文献

- [1] 傅松玲,丁之恩,周根土,等.安徽山核桃适生条件及丰产栽培研究[J].经济林研究,2003,21(2):1-4.
- [2] 朱兰娟,李绍进.气候变化对山核桃产量的影响[J].浙江农业科学,2018,59(5):808-810.
- [3] 范紧跟.薄壳山核桃栽培管理技术[J].乡村科技,2018(9):79-80.
- [4] 刘胜清.山核桃栽培技术初探[J].浙江林业科技,2001,21(2):57-61.
- [5] 钱安光.山核桃高产栽培技术[J].现代农业科技,2011(7):121-122.
- [6] 彭丽.山核桃优质丰产栽培管理技术[J].园林园艺,2017,34(2):122,119.
- [7] 黄雅俊,宋会鸣,丁佩,等.75% 苯醚甲环唑·咪鲜胺锰盐 WP 防治山核桃枝枯病的田间药效评价[J].农业灾害研究,2018,8(2):1-2,36.
- [8] 龚巧枝,吴志辉,胡云飞,等.2011 年宁国市山核桃减产原因分析及产业发展建议[J].安徽林业科技,2012,38(4):28-30.

(上接第 93 页)

- [3] STANLEY G, HARVEY K, SLIVOVA V, et al. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF- β 1 from prostate cancer cells[J]. Biochemical & biophysical research communications, 2005, 330(1):46-52.
- [4] SLIVA D. *Ganoderma lucidum* in cancer research[J]. Leukemia research, 2006, 30(7):767-768.
- [5] MÜLLER C I, KUMAGAI T, O' KELLY J, et al. *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells[J]. Leukemia research, 2006, 30(7):841-848.
- [6] 孙墨可,张曼,田娟,等.真菌免疫调节蛋白基因 LZ-8 过表达载体的构建及转化灵芝原生质体的研究[J].菌物学报,2017,36(12):1625-1631.
- [7] SHIEH Y H, LIU C F, HUANG Y K, et al. Evaluation of the hepatic and renal-protective effects of *Ganoderma lucidum* in mice[J]. American journal of Chinese medicine, 2008, 29(3/4):501-507.
- [8] MISHRA N C, TATUM E L. Non-Mendelian inheritance of DNA-induced

- inositol independence in *Neurospora*[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 1973, 70(12):3875-3879.
- [9] SUN L, CAI H Q, XU W H, et al. Efficient transformation of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Plant molecular biology reporter, 2001, 19(4):383-384.
- [10] KIM S, SONG J, CHO H T. Genetic transformation and mutant isolation in *Ganoderma lucidum* by restriction enzyme-mediated integration[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 233(2):201-204.
- [11] 郭淑,孙超,宋经元,等.灵芝三萜合成关键元件 GLCYP450 及其还原酶 GLNADPH 的基因克隆及共表达载体构建[J].药学学报,2013(2):206-210.
- [12] 方星,师亮,徐颖,等.灵芝甾醇 14 α -脱甲基酶基因的克隆及超量表达对三萜合成的影响[J].菌物学报,2011,30(2):242-248.
- [13] 逢春梅,张亮,孙春玉,等.人参大片段 DNA (100kb) 转化灵芝的研究[J].菌物学报,2013,32(1):96-102.
- [14] 孙墨可,陈欢,李晰亮,等.赤芝原生质体分离与再生研究[J].菌物研究,2015,13(1):52-54.