

文章编号:1003-8701(2010)03-0027-03

球孢白僵菌硝酸还原酶基因同源重组载体的构建

赵曦^{1,2}, 张正坤², 孙召朋^{2,3}, 徐文静², 杜茜², 隋丽², 李启云^{2*}

(1. 吉林农业大学农学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院, 长春 130033;
3. 吉林大学农学部植物科学学院, 长春 130000)

摘要: 根据已报道球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)硝酸还原酶基因(nitrate reductase, NR)序列设计引物, 从球孢白僵菌 D1-5 菌株基因组 DNA 中扩增并克隆该基因上下游片段 NR1 和 NR2, 成功构建了球孢白僵菌 NR 基因同源重组敲除载体, 以期敲除球孢白僵菌的 NR 基因, 建立白僵菌同源重组基因敲除体系。

关键词: 球孢白僵菌; 硝酸还原酶; 同源重组; 载体构建

中图分类号: S476+.12

文献标识码: A

Construction of Homologus Recombination Vector for *Beauveria bassiana* Nitrate Reductase

ZHAO Xi^{1,2}, ZHANG Zheng-kun², SUN Zhao-peng^{2,3},
XU Wen-jing², DU Qian², SUI Li², LI Qi-yun^{2*}

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

2. Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100;

3. College of Plant Science, Department of Agriculture, Jilin University, Changchun 130000, China)

Abstract: The 5' and 3' regions of nitrate reductase (NR) gene came from *Beauveria bassiana* D1-5 strain, NR1 and NR2 were amplified and cloned from the fungal genomic DNA, by designed primers according to the sequence published on NCBI. Homologus recombination vector was constructed successfully in order to knock out *B. bassiana* NR gene, verify the biological function, and build the technical system for gene knockout by homologus recombination.

Keywords: *Beauveria bassiana*; Nitrate reductase; Homologus recombination; Vector construction

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)是目前国内应用最广泛的昆虫病原真菌^[1]。在自然界的分布极为广泛, 寄主范围也非常宽广, 杀虫范围达 15 个目 149 个科的 700 多种昆虫^[2-4]。因此, 白僵菌受到世界各国的广泛重视, 但同时也存在击倒害虫时间长等缺点, 通过现代基因工程技术, 获得高效白僵菌基因工程菌株, 是目前新菌株开发的主要手段之一, 而相关功能基因的发掘及其功能验证是其前提。同源重组法敲除基因是基因功能研究的重要方法之一, 是进行昆虫病原真菌分子生

物学研究的一类有力工具。硝酸还原酶是真菌利用氮源的关键酶, 也是谷氨酰胺系统酶中铵盐一个抑制子^[5-6]。本文通过构建球孢白僵菌硝酸还原酶基因的同源重组基因敲除载体, 建立了球孢白僵菌基因敲除技术体系, 为进一步发掘和验证白僵菌功能基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

实验菌种 D1-5 从天然感染球孢白僵菌的玉米螟僵虫分离获得, 本实验室沙土管保存。

1.2 质粒、菌株

PF 质粒(图谱如图 1)和 *E.coli* DH5 α 均由本实验室保存。

收稿日期: 2010-02-03

基金项目: 吉林省科技厅科技支撑计划重点项目(20080249)

作者简介: 赵曦(1983-), 女, 硕士研究生, 从事生物农药研究。

通讯作者: 李启云, 男, 研究员, E-mail: qyli@cjaas.com

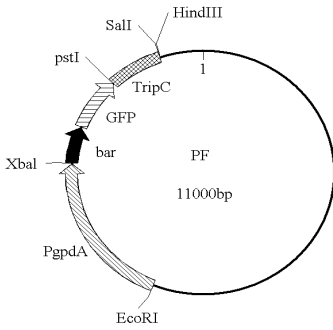


图1 PF质粒图谱

1.3 工具酶、试剂盒及其它试剂

PCR masterMIX 为 TIANGEN 公司产品, 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为 GENE 公司产品, pMD18-T 载体、限制性内切酶和 T4DNA 聚合酶为大连宝生物(TaKaRa)公司产品, 碱性磷酸酶(CIP)为 NEB 公司产品, 其他试剂均购自北京鼎国, 有机试剂均为分析纯。

1.4 培养基

PDA 培养基, LB 培养基。

1.5 引物设计与合成

根据已发表在 NCBI 中的白僵菌硝酸还原酶基因(Genbank access No.X84950)序列分别设计上下游引物, 5'端片段 NR1(1024bp-1380bp)引物分别为 P1024F: 5'-GGAATTCGGATCCCAGGCTAATACG-3'和 P1380R:5'-GGAATTC AAGAGCA CCAATCG-3' ;3'端片段 NR2(2640 bp-3246 bp)引物分别为 P2640F: 5'-TGCGTTCGACATCACAT TGGCACTC-3'和 P3246R :5'-CAAGCTTGC ACT GCAGAGAATGTC-3'。并分别在引物 P1024F 和 P1380R 中引入 *EcoRI* 酶切位点(划线部分), P2640F 和 P3246R 中引入 *SalI* 和 *HindIII* 酶切位点(划线部分)。引物合成由上海生工完成。

1.6 各元件 PCR 产物的获得

球孢白僵菌 D1~5 菌株基因组 DNA 提取参照方卫国等[7]的方法。利用 PCR 方法分别从基因组 DNA 中扩增 NR1 和 NR2 片段。反应体系为: master MIX 25 μ L、DAN 模板 2 μ L、上下游引物各 20 pmol, 最后加 ddH₂O, 定容到 50 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 再进行如下: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环程序 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 载体构建方案

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收纯化, pMD18-T 载体连接过夜。用热击法转

化到 *E.coli*DH5 α 感受态细胞, 氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)筛选, 37 $^{\circ}$ C 培养 12h 后挑取单菌落到 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C, 180 转/min 过夜培养, 分别用相应的引物做 PCR 鉴定, 反应程序同上。参照质粒提取试剂盒说明书进行质粒提取, 并用相应的限制性内切酶做酶切鉴定。

将酶切得到的片段回收纯化, 同时利用相同限制性内切酶酶切 PF 质粒。由于 NR1 上游与下游是相同的酶切位点, 在对 PF 质粒进行单酶切后用碱性磷酸酶(CIP)去磷酸化, 去磷酸化过程根据试剂盒的说明书进行。将回收的 NR1 片段与酶切后的 PF 质粒 T4DNA 连接酶连接过夜。将连接产物用热击法转入 *E.coli*DH5 α 感受态细胞, 得到阳性克隆后提取质粒 NR1::PF, 并进行酶切验证。同时, 用 NR1 上游引物与 PF 质粒中来源于构巢曲霉的真菌特异性启动子 *pgpdA* (约 2.2kb) 的下游引物 5'-GGGAAAAGAAAAGAGAAAAGAAAAGAGC-3'进行 PCR 验证 NR1 插入顺序, 扩增产物为 2.6kb 的克隆为正向插入, 未能克隆出条带的克隆为反向插入。

将 NR2 片段从 pMD18-T 载体上用相应的限制性酶切酶酶切, 回收片段并 T4 连接酶过夜连接到相同酶切的正向插入的 NR1::PF 质粒上, 转化 *E.coli*DH5 α 后挑取阳性克隆, 获得 NR1::PF::R2 质粒, 并分别进行 PCR 及酶切鉴定。

2 结果与分析

2.1 NR1 和 NR2 基因的克隆

根据设计好的引物分别从球孢白僵菌基因组 DNA 中克隆出两段基因片段 NR1 (约 400bp) 和 NR2 (约 600bp)(图 2), 经克隆测序发现与 GenBank 中公布的序列同源性为 100%, 确定为所需基因。

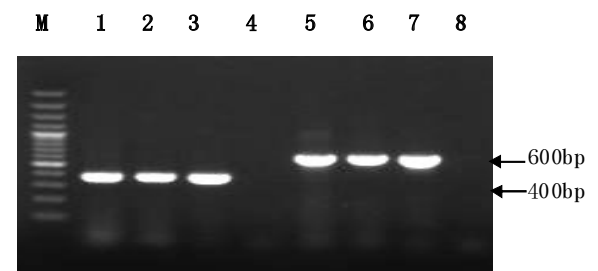


图2 NR1 和 NR2 的 PCR 产物

M 为 1kb molecular weight marker (北京鼎国 B031-1), 1-3 为 NR1 目的条带, 4 为 NR1 清水对照, 5-7 为 NR2 目的条带, 8 为 NR2 清水对照

2.2 NR1 与载体的连接

酶切后 NR1 片段与经过去磷酸化的质粒过夜连接后转入到 *E.coli* DH5 α 得到阳性克隆, 挑取单菌落到 LB 培养基(约 5 mL)过夜培养后, 利用 NR1 基因的 5' 端引物和其连接的 pgpdA 基因 3' 端引物进行 PCR 扩增, 验证片段插入方向, 结果如图 3。菌液 PCR 电泳图中显示挑取的 8 个单菌落中有 2 个阳性克隆是正向插入并与预期片段大小一致。

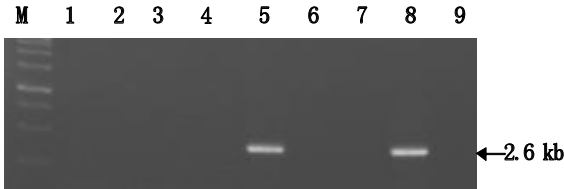


图 3 NR1 插入顺序验证 PCR 电泳图

M 为 1 kb molecular weight marker (北京鼎国 B032-1), 1-4 和 6-7 反向插入, 5 和 8 为正向插入, 9 为清水对照

2.3 NR1::PF 质粒酶切鉴定

利用质粒提取试剂盒提取 NR1::PF 质粒, 并进行 *Eco*RI 单酶切, 进行了 3 个重复, 结果如图 4。从图中可以看出, 酶切所得到的片段大小与预期的 NR1 的片段大小一致, 约为 400 bp。

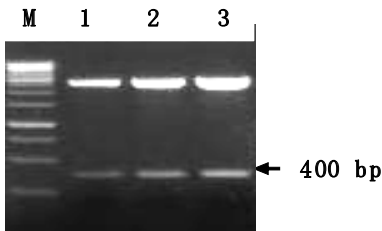


图 4 NR1::PF 质粒酶切电泳图

M 为 1 kb molecular weight marker (北京鼎国 B032-1), 1-3 为 *Eco*RI 单酶切结果

2.4 NR2 与载体的连接

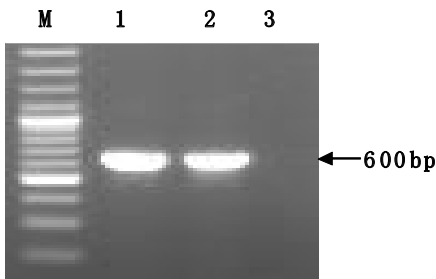


图 5 NR2 插入结果的 PCR 验证

M 为 1 kb molecular weight marker (北京鼎国 B031-1), 1-2 为 NR2 的 PCR 产物, 3 为清水对照

将 NR2 经双酶切并连接到已验证的正向插入的 NR1::PF 载体中, 连接产物过夜培养后, 转化 *E.coli* DH5 α , 并挑取转化子到 LB 液体培养基

中过夜培养后进行菌液 PCR, 结果如图 5。结果显示所得到的片段大小约为 600 bp, 与预期的 NR2 的片段大小一致。两个单菌落均为阳性克隆, NR2 已连接到 NR1::PF 载体上。

2.5 敲除载体的酶切验证

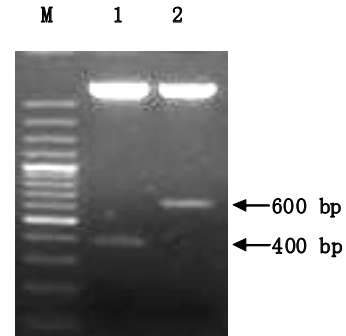


图 6 同源重组载体 NR1::PF::NR2 酶切验证

M 为 1 kb molecular weight marker, 1 为 *Eco*RI 单酶切, 2 为 *Sal*I 和 *Hind*III 双酶切

将 NR1, NR2 各片段分别正向连接到 PF 表达载体上, 转化 *E.coli* DH5 α , 通过蓝白斑筛选得到了阳性克隆, 纯化质粒, 分别利用 *Eco*R I、*Sal*I 和 *Hind*III 进行酶切鉴定, 结果如图 6。电泳结果显示酶切所得片段与预期的 NR1, NR2 片段大小一致, 成功构建了在片段 NR1, NR2 之间连有 pgpdA 启动子基因, bar 基因、绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 和终止子 tripC 基因的重组载体 NR1::PF::NR2, 载体结构如图 7。

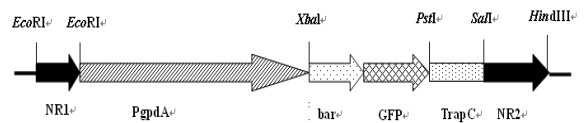


图 7 NR1::PF::NR2 同源重组载体图

3 讨 论

随着分子生物技术被广泛的应用, 转基因生物释放田间以后, 转基因的筛选标记基因是否会漂移到环境中使生态环境受到破坏越来越受到人们的重视。营养缺陷型互补标记是目前用于昆虫病原真菌遗传转化中的主要选择标记, 通过转入的标记基因与受体细胞突变基因互补, 使受体细胞在基本培养基上筛选原野生型生长菌落而得到转化子^[8]。它的优点是能引导载体质粒整合到染色体的同源部位, 且转化成本很低, 易于选择。硝酸还原酶就可作为很好的转基因筛选标记基因。

为了验证某些基因的功能, 经常使用的方法是将该基因敲除, 影响其表达, 从而(下转第 44 页)

3 结 论

东北地区以种植春玉米为主,春季多风干旱,土壤封闭除草剂的效果表现并不稳定,但广大农户常认为这是由于药量不够导致,因此在施药时常增加药剂的施用量,这不仅大大增加了生产成本,而且施用不当会对玉米产生药害作用,同时还会对下一茬大豆的种植造成影响。本文分别进行了地膜封闭处理和茎叶处理两部分试验,大田试验结果表明,春玉米出苗前施用由 1.6 L/hm² 乙草胺、2.4 L/hm² 莠去津、0.4 L/hm² 2,4-D 复配而成的乳油乙草胺·莠去津·2,4-D 的乳油或在杂草 3~4 片叶时喷施 0.6 L/hm² 玉农乐 +0.96 L/hm² 莠去津的悬浮药剂,可有效控制田间杂草危害,且对玉米安全性较好。

参考文献:

[1] 陈国海. 除草剂的残留、残效与残毒 [J]. 林业实用技术, 2003(5): 41.

- [2] 张 惟,刘亦学,于金萍,等. 23%烟嘧·莠去津 SC 防除夏玉米田杂草的效果研究[J]. 现代农药, 2009, 8(4): 50-51.
- [3] 姚献华,刘文成,马瑞霞. 4%玉农乐悬浮剂试验效果[J]. 吉林农业科学, 2003, 28(1): 30-31.
- [4] 曲明海,李泉木. 玉农乐防除玉米田杂草试验 [J]. 农药, 2009(7): 41.
- [5] 王 英,王向荣. 42%丁草胺·异丙草胺·莠去津悬乳剂防除玉米田杂草田间药效试验[J]. 杂粮作物, 2008, 28(3): 196-197.
- [6] 张 惟,刘亦学,张丽华,等. 六种土壤除草剂对夏玉米田杂草防除效果比较[J]. 天津农业科学, 2005, 11(2): 49-51.
- [7] 孙 健,杨 娜,吴翠霞,等. 乙草胺和莠去津混配除草剂的室内活性测定[J]. 农药研究与应用, 2008, 12(4): 38-39.
- [8] 孔凡彬,徐瑞富,娄国强. 5 种除草剂对不同品种玉米的安全性研究[J]. 广东农业科学, 2008(6): 81-83.
- [9] 高宗军,李 美,高兴祥,等. 20%烟嘧磺隆·氟草津油悬浮剂的生物活性评价[J]. 玉米科学, 2009, 17(2): 140-144.
- [10] 赵桂东,李 茹,周玉梅,等. 玉农乐防治夏玉米田杂草技术初探[J]. 玉米科学, 2001, 9(增刊): 65-66.
- [11] 王仕稳,殷俐娜,段留生,等. 东北部分春玉米地乙莠合剂防效下降的原因和对策[J]. 玉米科学, 2007, 15(1): 135-138.
- [12] 张晓波,王晓丽,张柏香,等. 40%杀草特乳油防治玉米田杂草药效的研究[J]. 玉米科学, 1998(4): 57-61.

(上接第 29 页)通过表型的变化确定其生物学功能。同源重组是基因工程实验中常用的基因敲除技术手段,在基因打靶研究方面具有重要作用。在质粒构建过程中,两段同源重组片段相连处增加了可供同源重组筛选的标记基因,这样会大大降低筛选工作量,容易获得目的突变株。目前常用的选择标记有抗生素和除草剂抗性基因^[9]等。本研究在同源重组片段中插入抗除草剂基因(bar)和绿色荧光蛋白基因(GFP)作为选择性标记和示踪标记^[10]可以提高筛选效率。本实验成功构建了球孢白僵菌硝酸还原酶敲除载体,在进一步研究中,将该载体导入受体菌株,通过同源重组,通过抗性标记和示踪标记,筛选成功敲除 NR 基因的转化子,通过培养基筛选和硝酸还原酶活性等生物学功能鉴定,为建立球孢白僵菌同源重组基因敲除体系,研究功能基因奠定基础。

参考文献:

- [1] 林海萍,韩正敏,张 昕,等. 球孢白僵菌研究现状及提高其杀虫展望[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(5): 575-580.
- [2] STLEGER R. J, SCREEN S. Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds [M] //Fungal

as Biocontrol Agents. London: CABI Publish House, 2001: 219-237.

- [3] BLAKE R., BEXTUN E., HARLAN G, et al. Field applications of Bait-formulated Beauveria Bassiana alginate pellets for biological control of the red imported fire ant [J]. Biol Control, 2002, 31(4): 746-752.
- [4] FELIPE T, MARIO Z, RAQUEL A., et al. Pathogenicity of Beauveria Bassiana [J]. Florida Entomol, 2004, 87(4): 533-536.
- [5] Solomonson L, Barber M. Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. Annu[J]. Plant Physiol., 1990, 41: 225-253.
- [6] Guerrero M.G., J.M. Vega, M. Losada. The assimilation nitrate-reducing system and its regulation [J]. Plant Physiol., 1981, 32: 169-204.
- [7] 方卫国,杨星勇,裴 炎,等. 真菌核酸的一种快速提取方法 [J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(3): 305-307.
- [8] Challen M. P., Rao B.G., Elliot T.J. Transformation strategies for Agaricus bisporus [M]. Van Griensven L.J.L.D (ed) Genetics and breeding of Agsrics. Wageningen: 1991: 129-134.
- [9] Singh H.N., Sonie K. C. Isolation and characterization of chlorate resistant mutants of the blue green alga Nostoc muscorum[J]. Mutat. Res, 1977, 43: 205-212.
- [10] OLOFSSON A. C, ZITA A, HEMANSSON M F. floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge[J]. Microbiology, 1998, 144: 519-528.