



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109055420 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201810698030.2

(22)申请日 2018.06.29

(71)申请人 上海市农业科学院

地址 201106 上海市闵行区北翟路2901号

(72)发明人 尚俊军 鲍大鹏 李燕 李焱

杨瑞恒 汪滢 茅文俊 唐利华

(74)专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务

所 31233

代理人 黄志达 魏峯

(51) Int. Cl.

C12N 15/80(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12R 1/645(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

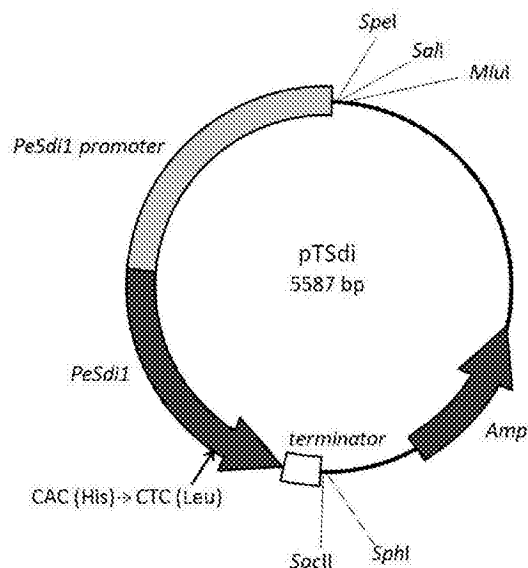
序列表4页 附图1页

(54)发明名称

一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体及其构建方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体及其构建方法和应用,将带有点突变的琥珀酸脱氢酶铁硫亚基的DNA片段连入质粒载体,记为pTSdi。本发明的转化载体可以用于转化杏鲍菇,使其获得对真菌杀菌剂萎锈灵的抗性;另外由于在构建的转化载体中留有插入外源基因片段的酶切位点,可以方便地插入感兴趣的外源基因,转化到杏鲍菇中进行遗传学研究,具有良好的应用前景。



1. 一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体,其特征在於:将带有点突变的琥珀酸脱氢酶铁硫亚基的DNA片段连入质粒载体,记为pTSdi。

2. 一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体的构建方法,包括:

(1) 提取杏鲍菇单核菌丝全基因组DNA,检测DNA质量和浓度;

(2) 在需要进行点突变的位置引入一对互补引物sdi2F和sdi1R;以提取的基因组DNA为模板,利用正向引物sdi1F和反向引物sdi1R扩增第一部分的DNA片段;以提取的基因组DNA为模板,利用正向引物sdi2F和反向引物sdi2R扩增第二部分的DNA片段;利用限制性内切酶MfeI消化两部分DNA片段,再采用T4连接酶将消化后的两部分DNA片段连接成完整DNA片段;

(3) 将完整DNA片段通过TA载体连接,导入pGEM-Teasy质粒载体中,获得转化载体pTSdi。

3. 根据权利要求2所述的一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体的构建方法,其特征在於:所述步骤(2)中的sdi1F的序列为:TCACGTCCTCAATAAGCGCTC;

sdi1R的序列为:ACAATTGAAAATGGTGAGGC;

sdi2F的序列为:GCCTCACCATTTTCAATTGT;

sdi2R的序列为:AGCACCGCAAGTGAGACCAA。

4. 一种如权利要求1所述的杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体的应用,其特征在於:应用于携带外源基因进行杏鲍菇的遗传转化。

一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体及其构建方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,特别涉及一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体及其构建方法和应用。

背景技术

[0002] 近年来我国杏鲍菇的工厂化栽培发展迅速,成为继金针菇之后发展最快的设施栽培食用菌品种。利用现代分子生物学技术改良杏鲍菇品种,获得产量高、生长周期短、抗杂菌能力强的菌株,是杏鲍菇遗传研究的重要课题。构建杏鲍菇的遗传转化系统首先要建立分子生物学工具,如抗性筛选标记和驱动外源基因表达的启动子等。

[0003] 通常对基因进行点突变需要购买商业试剂盒,价格不菲而且操作繁琐。因此,引入突变位点的DNA序列可以为构建萎锈灵抗性遗传转化载体提供基础。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体及其构建方法和应用,解决了实现对基因进行点突变成本过高的问题。

[0005] 本发明提供了一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体,将带有点突变的琥珀酸脱氢酶铁硫亚基的DNA片段连入质粒载体,记为pTSdi。

[0006] 本发明还提供了一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体的构建方法,包括:

[0007] (1) 提取杏鲍菇单核菌丝全基因组DNA,检测DNA质量和浓度;

[0008] (2) 在需要进行点突变的位置引入一对互补引物sdi2F和sdi1R;以提取的基因组DNA为模板,利用正向引物sdi1F和反向引物sdi1R扩增第一部分的DNA片段;以提取的基因组DNA为模板,利用正向引物sdi2F和反向引物sdi2R扩增第二部分的DNA片段;利用限制性内切酶MfeI消化两部分DNA片段,再采用T4连接酶将消化后的两部分DNA片段连接成完整DNA片段;

[0009] (3) 将完整DNA片段通过TA载体连接,导入pGEM-Teasy质粒载体中,获得转化载体pTSdi。

[0010] 所述步骤(2)中的sdi1F的序列为:TCACGTCCTCAATAAGCGCTC;

[0011] sdi1R的序列为:ACAATTGAAAATGGTGAGGC;

[0012] sdi2F的序列为:GCCTCACCATTTTCAATTGT;

[0013] sdi2R的序列为:AGCACCGCAAGTGAGACCAA。

[0014] 上述引物为PCR扩增琥珀酸脱氢酶复合物的铁硫蛋白亚基的引物。

[0015] 本发明还提供了一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体的应用,应用于携带外源基因进行杏鲍菇的遗传转化。

[0016] 有益效果

[0017] 本发明的转化载体可以用于转化杏鲍菇,使其获得对真菌杀菌剂萎锈灵的抗性;另外由于在构建的转化载体中留有插入外源基因片段的酶切位点,可以方便地插入感兴趣

的外源基因,转化到杏鲍菇中进行遗传学研究,具有良好的应用前景。

附图说明

[0018] 图1为用于构建转化载体pTSdi的引物位置;

[0019] 图2为本发明转化载体pTSdi的示意图;

[0020] 图3为利用PCR结合酶切鉴定杏鲍菇转化子的示意图。

具体实施方式

[0021] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0022] 实施例1

[0023] 一、杏鲍菇萎锈灵抗性转化载体的构建:

[0024] (1) 提取杏鲍菇单核菌丝全基因组DNA,检测DNA质量和浓度;

[0025] (2) 在需要进行点突变的位置引入一对互补引物sdi2F和sdi1R(图1);以提取的基因组DNA为模板,利用正向引物sdi1F和反向引物sdi1R扩增第一部分的DNA片段(2251bp,如SEQ NO.7所示);以提取的基因组DNA为模板,利用正向引物sdi2F和反向引物sdi2R扩增第二部分的DNA片段(339bp,如SEQ NO.8所示);利用限制性内切酶MfeI消化两部分DNA片段,再采用T4连接酶将消化后的两部分DNA片段连接成完整DNA片段(2570bp,如SEQ NO.9所示);

[0026] (3) 将完整DNA片段通过TA载体连接,导入pGEM-Teasy质粒载体中,获得转化载体pTSdi。

[0027] sdi1F的序列为:TCACGTCCTCAATAAGCGCTC;

[0028] sdi1R的序列为:ACAATTGAAAATGGTGAGGC;

[0029] sdi2F的序列为:GCCTCACCATTTTCAATTGT;

[0030] sdi2R的序列为:AGCACCGCAAGTGAGACCAA。

[0031] 二、外源基因的导入

[0032] (1) 转化载体pTSdi在Sdi基因的5'端和3'端都预留了限制性内切酶识别位点,可供导入外源基因使用。

[0033] (2) 在转化载体pTSdi中Sdi基因的5'端导入外源基因,可以选择三个酶切位点SpeI、SalI和MluI中的任意两个加在外源基因PCR片段两侧,通过双酶切连接到转化载体pTSdi中。

[0034] (3) 在转化载体pTSdi中Sdi基因的3'端导入外源基因,可以利用酶切位点SacII和SphI加在外源基因PCR片段两侧,通过双酶切连接到转化载体pTSdi中。

[0035] 三、转化子的鉴定:

[0036] 杏鲍菇转化子的检测可以用PCR结合酶切鉴定:

[0037] 1,CTAB法提取杏鲍菇转化子全基因组DNA。

[0038] 2,琼脂糖电泳检测DNA质量,Nanodrop检测浓度。

[0039] 3,以提取的基因组DNA为模板,利用PCR引物capsF (GTACGTTGTATCATCGTCGCT) 和 capsR (TGGACAAGTGCGAGAGCCTT) 扩增198bp片段。

[0040] 4,利用限制性内切酶Mn1I酶切PCR产物。

[0041] 5,琼脂糖电泳检测酶切产物,如果转化载体成功插入到了基因组中,可以检测到PCR产物被酶切成为121bp和77bp的两个片段(图3)。

[0042] 由此说明,将引物capsF和capsR的PCR扩增和限制性内切酶Mn1I的酶切鉴定结合起来,可以非常方便地鉴定杏鲍菇遗传转化后获得的阳性转化子。

SEQUENCE LISTING

<110> 上海市农业科学院

<120> 一种杏鲍菇萎锈灵抗性筛选转化载体及其构建方法和应用

<130> 1

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

tcacgtcctc aataageget c 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

acaattgaaa atggtgaggc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

gcctcaccat tttcaattgt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

agcaccgcaa gtgagaccaa 20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

gtacgttgta tcatcgtcgc t 21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

tggacaagtg cgagagcctt 20

<210> 7

<211> 2251

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

tcacgtcctc aataagcgtc cgcgacaacg cggattcaca tectgcccc acatcactct 60
ccaagaatct cttgttcaaa ggtatcccgt atttgtaagt caagccaacg tttattccat 120
gatacatggc tggccacatt catggtatc tctccgtaa tagccattta ccacctatga 180
cacgacatat tcggactcct gccgcttggtg aaccgttcaa ctatgcaaat gctaattgat 240
ggcttctgag actgccaacg ctgtttggag aaaccttctc aaaaacggct gctgaagacc 300
taagccagcg ctgcaccgac attttctcaa cactcaatag aagttgcaac taggtcaaca 360
aagttggcat tcgatcgctt gtgactacaa attgattcgg ggggttcgac gatggacacc 420
atgactgagc tttggggctc gttacgacga gaacatccga agtcccttcc tcaactttca 480
agggaatttc gaggcctcag agcgccgttg aactcaggtt tccgagtgat acctcaattg 540
ctttccccct tttctgatca gagtactcga ggtacagctt ggggtacgga catattctac 600
cttgataacc tcaactcataa cgttccgagg agagtggcat cacacagcgc gctggcctaa 660
aagtgggtgc aagttggaag ggaagcgagt cggggtcatt ggaactgggg ccagcgccga 720
gttcagatca tccaagaggc aggcaaattg gcacaagagc tcgtggtatt acagcgtaca 780
ccgaatctga cattccaccg gcgacaaccg acgcaagcca aagtgtcaga agttgtcgaa 840
atgcagtgga atcatgctca cgaagaggcc ccgagtagtg accctctcaa gtaaacaagc 900
atcgtcgatt tcttaacact tctagttgct ccgtccacgt gtatatatac cttcgactga 960
agagcatgat tggcgcaaag attacgttct atcgtcttc tctccttatt ttgataatcg 1020
aaagccgcac tactcagcgc agcagttcta catgttttc taaaaatcta ccgggtcacc 1080
gctgacgcgc tgacggccgg taagcttcaa gctaaattc aaaagttcca agtaacctgc 1140
agtcccaatc gggcaattcc gaagtgcgcc ggcatttacc gaagagtaac atgtgccctc 1200
tgattggttc ggatcgcggg ggctccttc ccgctccgaa ttcacgcgac gggatccccg 1260
cgcactctct ctcttcaccg tcgtcgttga cgtecccgaa acacagaaat caccgaatca 1320
tgcaggcgct cacctccagg tcgttggtc gctcctccg ctcgattcgt gctttctcca 1380
cctcatctgg aaggtggcag gctgagcccc tccagaagcc cgttctccag aaagaattca 1440
agatctatcg ttgggtgagc tgagacgett gtatatccag atgtgttct cacatcgag 1500
cccagaatcc ggatgaacca gccaaagaag ctcacttcca atcgtacacc attgacttga 1560
accagacggg ccccatggta cgtacaatc caagggcatt gtctctatgc tcacgggctc 1620
gtagattctg gacgctctta tcaagatcaa gaacgaaatc gatcctacgc tcacattccg 1680
tcgttcgtgt agagaaggga tttgcggctc gtgcgcgatg aatattgacg gacagaacac 1740
gttggcttgc ctgtgccgaa tcgaccgtaa cgctagcaag gacagcaaga tctacccttt 1800

gccgcacagt atgacatgtc tttcggtccc taatagcatt ggctgacggc cggttacagt 1860
 gtacatcgtg aaagacctcg taccgacct cacgcttttc tacaagcagt acaagtccat 1920
 caagccatac ctgcagaacg acaatattcc cgagagggag cacctccagt cgccagagga 1980
 ccgcaagaag ttggacggga tgtatgaatg catcctgtgc gcgtgctgca gcacatcgtg 2040
 ccccagctat tgggtgaacc aagatgagta tttgggaccg gctgctttga tggccgcgta 2100
 taggtggatt gcggattcac gactacgttg taccctcgtc gctccattcg ctgaataagt 2160
 tgacgtttcg taggatacat atggcgaca acgcaaggag cacttcaga atgagatgag 2220
 tttgttccgc tgcctcacca tttcaattg t 2251

<210> 8

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

gcctcacat tttcaattgt acgtcgttt cgccttgata tggattcgt attaacata 60
 tcccttctca aggtctctgc acttgctcaa agggctcaa cctgcgaaa gccatcgcag 120
 agatcaagct cgcgcttget actgagtaaa ccctagtcaa cagtcacgga tcaaaagcat 180
 caagtcagag gcagatatct ttctgtagc agttcgcagt tctttccact tcatcgtatg 240
 gtgtccattg caaacatcta atcatattca ttctatcaca tccacttggt cctgagccac 300
 tcttaaggta ggcatatcct tggctcact tgcggtgct 339

<210> 9

<211> 2570

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

tcacgtcctc aataagcgt cgcgacaacg cggattcaca tctgceccc acatcactct 60
 ccaagaatct cttgttcaaa ggtatcccgt atttgtaagt caagccaacg tttattccat 120
 gatacatggc tggccacatt catggtattc tctccgtaaa tagccattta ccacccatga 180
 cacgacatat tcgactcct gccgcttgtg aaccgttcaa ctatgcaaat gctaatgcat 240
 ggcttctgag actgccaacg ctgtttggag aaaccttctc aaaaacggct gctgaagacc 300
 taagccagcg ctgcaccgac attttctcaa cactcaatag aagttgcaac taggtcaaca 360
 aagttggcat tcgacgcct gtgactaaa attgattcgg ggggttcgac gatggacacc 420
 atgactgagc tttgggttcc gttacgacga gaacatccga agtcccttc tcaactttca 480
 agggaatttc gaggcctcag agcgcggtt aactcaggtt tccgagtgat acctcaattg 540
 ctttccccct tttctgatca gagtaactcga ggtacagctt gggtacgga catattctac 600
 cttgtatacc tcaactcataa cgttccgagg agagtggcat cacacagcgc gctggcctaa 660
 aagtgggtgc aagttggaag ggaagcgagt cggggctcatt ggaactgggg ccagcgcga 720
 gttcagatca tccaagagge aggcaaattg gcacaagagc tcgtgttatt acagcgtaca 780
 ccgaatctga cattccacc gcgacaacc acgcaagcca aagtgtcaga agttgtcga 840
 atgcagtgga atcatgctca cgaagaggcc ccgagtagtg acctctcaa gtaacaagc 900

atcgtcgatt tcttaacact tctagttgct ccgtccacgt gtatatatac cttegactga 960
agagcatgat tggcgcaaag attacgttct atcgetette tctccttatt ttgataatcg 1020
aaagccgcac tactcagcgc agcagttcta catgtttttc taaaaatcta ccgggtcacc 1080
gctgacgcgc tgacggccgg taagcttcaa gctaaatttc aaaagttcca agtaacctgc 1140
agtcccaatc gggcaattcc gaagtgcgcc ggcatttacc gaagagtaac atgtgccctc 1200
tgattggttc ggatcgcggg ggctccttc ccgctccgaa ttcacgcgac gggatcccgc 1260
cgcatctctc ctcttcaccg tcgtcgttga cgtccccgaa acacagaaat caccgaatca 1320
tgcaggcgct cacctccagg tcgttggetc gtcatecccc ctcgattegt gctttctcca 1380
cctcatctgg aagggtggcag gctgagcccc tccagaagcc cgttctccag aaagaattca 1440
agatctatcg ttgggtgagc tgagacgctt gtatatccag atgtgttget cacatcgag 1500
cccagaatcc ggatgaacca gccaaagaagc ctcatctcca ategtacacc attgacttga 1560
accagacggg ccccatggta cgtacaatte caaggecatt gtctctatgc tcacgggctc 1620
gtagattctg gacgtctta tcaagatcaa gaacgaaatc gatcctacgc tcacattccg 1680
tcgttcgtgt agagaaggga tttgcggctc gtgcgcgatg aatattgacg gacagaacac 1740
gttggttgc ctgtgccgaa tcgaccgtaa cgtagcaag gacagcaaga tctacccttt 1800
gccgcacagt atgacatgtc tttcggetcc taatagcatt ggctgacggt cggttacagt 1860
gtacatcgtg aaagacctcg taccgacct cacgcttttc tacaagcagt acaagtccat 1920
caagccatac ctgcagaacg acaatattcc cgagaggag cacctccagt cgccagagga 1980
ccgcaagaag ttggacggga tgtatgaatg catcctgtgc gcgtgctgca gcacatcgtg 2040
cccagctat tgggtgaacc aagatgagta tttgggaccg gctgctttga tggccgcgta 2100
taggtggatt gcgattcac gagtacgtt gatcctcgtc getccattcg ctgaataagt 2160
tgacgtttcg taggatacat atggcgaca acgcaaggag cacttcaga atgagatgag 2220
tttgttccgc tgcctacca tttcaattg tacgtegett tcgcttgat atggattcgc 2280
tattaaacat atcccttctc aaggctctcg cacttgtcca aaggcctca accctgcgaa 2340
agccatcgca gagatcaagc tcgcgcttgc tactgagtaa accctagtca acagtcacgg 2400
atcaaaagca tcaagtcaga ggcagatatac tttctgtag cagttcgcag ttctttccac 2460
ttcatcgtat ggtgtccatt gcaaacatct aatcatatc attctatcac atccacttgt 2520
tcctgagcca ctcttaaggt aggcataatc ttggtctcac ttgcggtgct 2570

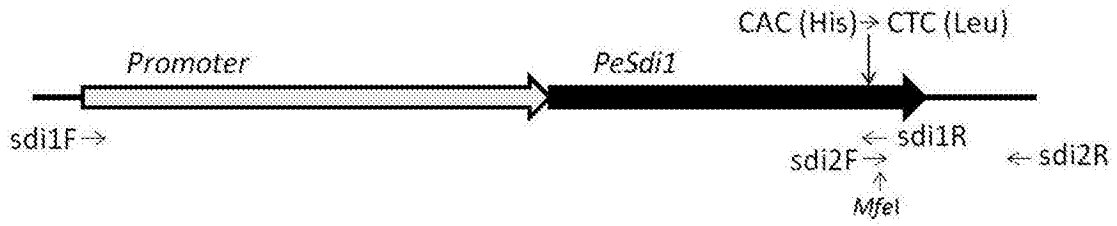


图1

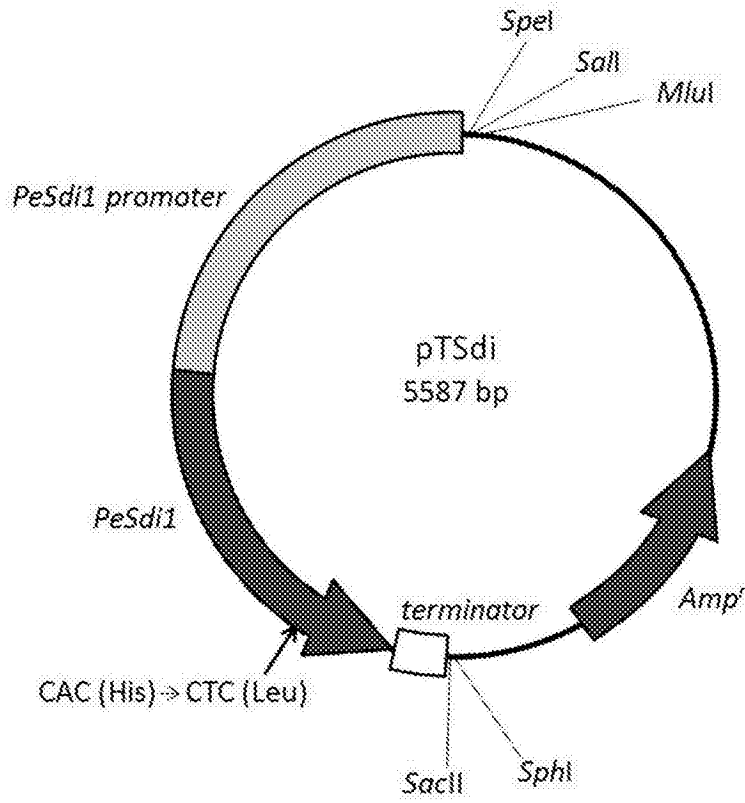


图2

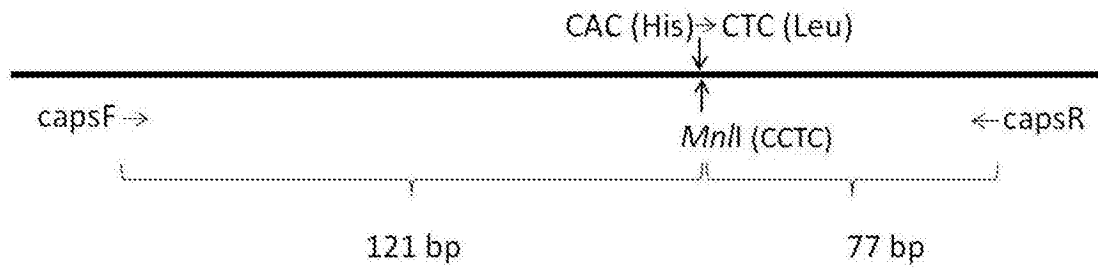


图3