

张丽君,王英,张燕,等. 小分子海洋抗菌肽鲨素 I 里氏木霉表达系统构建[J]. 江苏农业科学,2018,46(14):41-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.14.011

小分子海洋抗菌肽鲨素 I 里氏木霉表达系统构建

张丽君¹, 王英², 张燕¹, 简琛¹, 金刚¹, 代建国¹

(1. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东深圳 518055; 2. 广州城市职业学院食品系, 广东广州 510405)

摘要:为实现鲨素 I 基因的高效表达,以对鲨素 I 敏感度较低的里氏木霉为宿主,构建鲨素 I 里氏木霉表达系统。根据里氏木霉偏爱密码子优化合成鲨素 I 基因,构建鲨素 I - 里氏木霉组成型表达载体 pAN - PSGT - *Tac*,经 PEG 介导转化至里氏木霉原生质体,PCR 法鉴定重组子基因型。基因型鉴定和基因测序检测显示,鲨素 I 基因成功重组到里氏木霉基因组 DNA 上,因此本研究成功构建了鲨素 I 里氏木霉表达系统。

关键词:抗菌肽;鲨素 I;重组载体;里氏木霉;表达系统

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)14-0041-04

阳离子抗菌肽 (antimicrobial peptide, AMP) 鲨素 I (tachypleusin I) 由 Nakamuro 等首次从中国鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 血细胞分离纯化制得^[1],分子量为 2 263 u,一级结构由 17 个氨基酸残基构成,含有 2 个二硫键;二级结构呈典型的反平行 β -折叠结构,疏水的氨基酸残基定位于平面一侧,分子中 6 个阳离子氨基酸残基主要分布在分子的尾部。鲨素 I 具有抗菌^[2]、抗真菌^[3]、抗病毒^[4]、抑制肿瘤细胞增殖和诱导癌细胞分化^[5]以及显著调控动物肠道微生物菌群^[6]的功能,极具潜在广泛的应用价值。然而,天然鲨素 I 来源非常受限,人工合成价格非常昂贵,因此基因重组制备成为规模化获取鲨素 I 的重要途径。

鲨素 I 对常见基因工程宿主的广泛和强烈的抑杀活性^[7-8]使其高效表达异常艰难,融合表达虽可降低鲨素 I 对工程宿主的抑杀活性,但因特异性蛋白酶价格昂贵和后续切割精度难以保证而无法得到有效应用。因此,从天然微生物筛选得到耐受鲨素 I 抑杀的宿主以提高鲨素 I 的表达效率值得期待。本课题组比较了鲨素 I 对大肠杆菌 (BL21)、枯草芽

孢杆菌 (WB800、BS168)、酵母菌 (GS115)、小球藻和丝状真菌里氏木霉 (QM9414) 等常见工程宿主的抑杀活性,发现丝状真菌里氏木霉对鲨素 I 的耐受能力最强^[7-8]。迄今为止,抗菌肽能否在里氏木霉中获得有效表达尚未见相关报道。本研究拟构建鲨素 I - 里氏木霉表达系统,探索鲨素 I 在此表达系统中的表达效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 里氏木霉表达载体 pAN - PSGT 和里氏木霉 (QM9414),均由深圳大学刘刚教授惠赠;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Competent Cell JM109,购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.2 试剂 质粒快速提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒、DNA 连接试剂盒、Trizol 试剂盒和两步法 RT-PCR 试剂盒以及蛋白质 Marker,均购自 TaKaRa 公司;溶壁酶、氨苄青霉素和潮霉素,均购自 Sigma 公司;Not I、Sfi I 酶和 X-gal,均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 天然鲨素基因 (*Tac*) 序列的人工合成 从 GenBank 中获得鲨素 I 的碱基序列,根据丝状真菌里氏木霉偏爱密码子优化其序列;在其 5'端和 3'端分别加上 Not I 和 Sfi I 酶酶切位点,并补齐宿主中信号肽的部分序列,设计目的基因序列如下:

5' - GGCCTTCTTGCCACAGCTCGTGCTAAGTGGTGCTT-CCGCGTCTGCTACCGCGCATCTGCTACAGGCGATGTCGCTA-AGCGGCCGC - 3',该序列全长 87 bp,委托大连宝生物公司人工合成。

1.2.2 鲨素 - 里氏木霉表达载体构建 pAN - PSGT 全序列 9 710 bp,包括 PgpD 启动子序列 (2 129 bp)、潮霉素抗性基因 *php* 序列 (1 023 bp)、终止子序列 TtrpC (770 bp)、PUC18 中从 SALI 到 ECORI 之间的序列 AP (2 648 bp)、gpd 启动子序列 (1

收稿日期:2017-02-03

基金项目:国家自然科学基金 (编号:30800793、31272474);广东省自然科学基金 (编号:S2011020005160、S2011020004453);广东省高职院校珠江学者计划 (2012);广东省高校高层次人才项目 (2012、2013);广东省广州市属高校科研计划 (编号:2012A141);广东省深圳市基础研究重点项目 (编号:JC200903180711A、JC201105201191A);深圳职业技术学院青年创新项目 (编号:2210K3070024)。

作者简介:张丽君 (1975-),女,河北石家庄人,博士,副教授,主要研究方向为抗菌肽表达。Tel: (0755)26019165;E-mail: c7zlj@szpt.edu.cn。

通信作者:代建国,博士,教授,主要研究方向抗菌肽耐药性。Tel: (0755)26019165;E-mail: jgdai@263.net。

Pathology,2007,89(2):305.

[10] Dong J H, Cheng X F, Yin Y Y, et al. Characterization of tomato zozonate spot virus, a new tospovirus in China [J]. Archives of Virology,2008,153(5):855-864.

[11] Liu Y T, Lu X P, Zhi L, et al. Calla lily chlorotic spot virus from spider lily (*Hymenocallis litteralis*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) in the South - West of China [J]. Journal of Phytopathology,2012,160(4):201-205.

347 bp)、信号肽序列 CBH I sig (50 bp)、*Lac Z* 序列 (1 132 bp)、*Tcbh* 终止子 (340 bp)。采用常规分子重组技术将蚤素 I 基因 *Tac* 连接到 *gpd-sig* 和 *Tcbh* 中间,构建一个新的表达载体 pAN-PSGT-*Tac*,转化大肠杆菌 JM109,采用 α 互补法(蓝/白斑筛选法)进行阳性克隆筛选。菌落 PCR 法鉴定转化子,用通用引物 M13-47/RV-M 进行 PCR 扩增。反应体系总体积 50 μ L,PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 1 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 产物进一步经大连宝生物有限公司测定序列。

1.2.3 重组载体 pAN-PSGT-*Tac* 转化里氏木霉原生质体

里氏木霉原生质体的制备和转化在参考 Penttila 等人的方法^[9]基础上改造如下:里氏木霉孢子接种于 PDA 固体培养基,28 $^{\circ}$ C 培养 7 d;无菌水制备孢子悬液,取 $0.8 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^8$ 个孢子,接种到 40 mL 液体培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 11 ~ 15 h;待孢子萌发,取 25 mL 菌液置于 25 mL 离心管,6 000 r/min 离心 5 min;去上清,菌丝用 1 mol/L $MgSO_4$ 洗 2 遍,8 000 r/min 离心 5 min;用 10 mL 酶解液(100 mg 溶壁酶溶于 10 mL 1 mol/L $MgSO_4$ 后过滤除菌)重悬菌丝并置于 100 mL 三角瓶中,28 $^{\circ}$ C、70 r/min 培养 2.0 ~ 2.5 h,镜检原生质体的情况。在酶解液中加入 1 ~ 2 倍体积的 STC[1.2 mol/L 山梨醇,10 mmol/L Tris·Cl (pH 值为 7.5),50 mmol/L $CaCl_2$]8 000 r/min 离心 15 min,沉淀原生质体。去上清,用 STC 溶液洗涤原生质体 2 次,8 000 r/min 离心 10 ~ 15 min,最后将原生质体悬浮于 1 mL STC 溶液中。调整原生质体的浓度为 10^8 个/mL,取 200 μ L,加入 20 μ g pAN-PSGT-*Tac*(总体积不超过 20 μ L),轻轻混匀;48 $^{\circ}$ C 热激 2 min;加入 50 μ L 60% 的 PEG-4000(用 pH 值为 7.5 含 50 mmol/L $CaCl_2$ 和 10 mmol/L Tris·Cl 的缓冲液配制),于室温静置 20 min。溶液先转移到 25 mL 离心管中,再加入 2 mL 60% 的 PEG-4000,混匀后于室温静置 5 min;加入 20 mL STC,11 000 r/min,离心 15 min;用 1 mL STC 溶液重悬原生质体沉淀后加入到 10 mL 原生质体液体再生培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、70 r/min 条件下培养 20 ~ 24 h(原生质体长成微小菌丝即可,若菌丝较大,则涂板后不易区分单菌落);8 000 r/min 离心 10 min 后用 0.5 ~ 1.0 mL STC 溶液悬浮沉淀,将悬浮液涂布于 5 个含 100 μ g/mL 潮霉素 B 的 PDA 固体平板(不含 STC)上,28 $^{\circ}$ C 培养 2 d 左右;待平板上长出菌丝(平板底部变黄),将菌丝连同其下方的一层薄薄的琼脂块一同挖下,菌丝朝下接到新的 PDA 固体小平板上(含 80 μ g/mL 潮霉素 B),28 $^{\circ}$ C 培养 7 d 左右。

1.2.4 里氏木霉转化子鉴定

1.2.4.1 转化子潮霉素基因鉴定 将筛选平板上长出的潮霉素抗性转化子分别转接到 PDA 平板上进行扩大培养,1 周后首先将各转化子分别接种于液体基本培养基中,提取各转化子的基因组 DNA 作为模板,用引物 HPH1 和 HPH2 进行 PCR 扩增,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测^[10]。

1.2.4.2 转化子的基因型鉴定 提取转化子基因组 DNA 作为模板,由于 *Tac* 基因太小,PCR 扩增存在极大难度,本试验设计的鉴定方式为扩增 *Tac* 基因上下游的片段,分别为 *gpd-sig-tac-Tcbh*、*gpd-sig-gpd-sig-tac*、*tac-Tcbh* 和 *Tcbh*,如

果能扩增出这 5 种片段,则可确定蚤素 I 基因 *Tac* 已成功同源替换到里氏木霉基因组 DNA 上了,并且插入方向正确。扩增片段、所需引物和预计扩增片段大小见表 1。并将用引物 GPD1 和 TRD3 扩增所得的 PCR 产物进行核苷酸序列测定。

1.2.5 引物设计与合成 本研究过程所采用的引物序列见表 2,各引物均由大连宝生物公司合成。

表 1 扩增片段、所需引物和预计扩增片段大小

扩增片段	引物名称	扩增片段长度(bp)
<i>gpd-sig-tac-Tcbh</i>	GPD1、TRD3	1 824
<i>gpd-sig</i>	GPD1、TRU2	1 387
<i>gpd-sig-tac</i>	GPD1、TAC2	1 474
<i>tac-Tcbh</i>	TAC1、TRD3	427
<i>Tcbh</i>	TRD1、TRD3	340

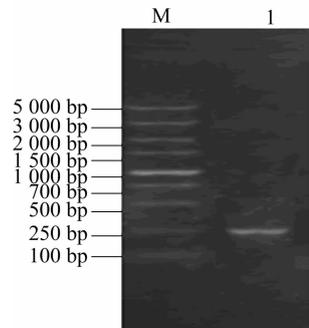
表 2 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
M13-47	CGCCAGGTTTCCAGTCACGAC
RV-M	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG
GPD 1	GACGCAGAAGAAGGAAATCGCC
TRD3	TGCTACTGGGATACACGAAGAG
TRU2	AGCACCAGCTGTGGCCAAGAAG
<i>Tac2</i>	TTAGCGACATGCCCTGTAGCAG
<i>Tac1</i>	AAGTGGTGCCTCCGCTCTGCT
TRD1	AGTCCGTGCGAAAGCCTGA
HPH1	ATGCCTGAACCTACCGCGAC
HPH2	ACTCTATTCTTTGCCCTCGG
<i>Tac</i> (F)	CCTTCTTGCCACAGCTC
<i>Tac</i> (R)	GGTGCCTCAGGCTTTCCG

2 结果与分析

2.1 pAN-PSGT-*Tac* 重组载体构建

以重组载体为模板,采用 PAN-PSGT 通用引物 M13-47/RV-M 进行 PCR 扩增。通用引物扩增产物大小约 150 bp,加上蚤素 I 基因 87 bp,预计目的条带大小约为 240 bp,电泳结果见图 1,在 250 bp 附近发现 1 条清晰的条带,初步确认其为目的条带。PCR 产物测序结果与已知序列同源性达到 100%,确认蚤素 I 基因 *Tac* 已经正确连接至表达载体 PAN-PSGT 之中。



M—DNA 分子量标准;1—PCR 产物

图 1 菌落 PCR 鉴定结果

2.2 载体 pAN-PSGT-*Tac* 对里氏木霉原生质体转化后的鉴定

2.2.1 潮霉素基因的 PCR 扩增结果 提取筛选平板上长出的潮霉素抗性转化子的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增潮霉素

抗性基因,引物为 HPH 1 和 HPH 2。由图 2 可知,潮霉素抗性基因 *hph* 基因大小为 1 023 bp,在 1 000 bp 处发现条带,可以证明潮霉素基因成功扩增,初步确定潮霉素基因已经成功转化。

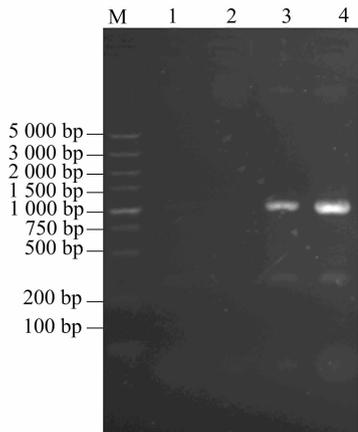
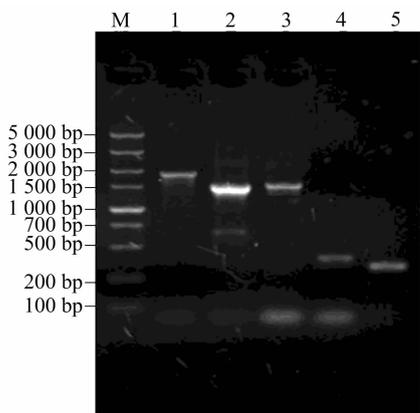


图2 潮霉素抗性转化子中 *hph* 基因的 PCR 扩增结果

2.2.2 转化子基因型鉴定 取潮霉素基因鉴定为阳性的菌株,提取其基因组 DNA 按“1.5.2”节进行基因型鉴定,由图 3 可知,以基因组 DNA 为模板,1 泳道为扩增出的 *gpd-sig-tac-Tcbh* 片段,扩增条带在 1 500 ~ 2 000 bp 之间,符合预期大小 1 824 bp;2 泳道为扩增出的 *gpd-sig* 片段,大小在 1 000 ~ 1 500 bp 之间,符合预期大小 1 387 bp;3 泳道为扩增出的 *gpd-sig-tac* 片段,大小在 1 500 bp 附近,符合预期大小 1 474 bp;4 泳道为扩增出的 *tac-Tcbh* 片段,大小靠近 500 bp,符合预计大小 427 bp;5 泳道为扩增出的 *Tcbh* 片段,大小在 250 ~ 500 bp 之间,符合预计大小 340 bp。5 种扩增都验证为正确,即可初步确定 *Tac* 基因已正确同源整合到基因组 DNA 上。针对 *gpd-sig-tac-Tcbh* 的扩增产物测序结果与已知序列的同源性达 100%,可以证明 *Tac* 基因已经重组到基因组 DNA 上。



M—DNA 分子量标准; 1—*gpd-sig-tac-Tcbh* 扩增结果;
2—*gpd-sig* 扩增结果; 3—*gpd-sig-tac* 扩增结果;
4—*tac-Tcbh* 扩增结果; 5—*Tcbh* 扩增结果

图3 里氏木霉转化子基因型的鉴定

3 讨论

基因重组表达 *Tac* 的研究开始于 20 世纪 90 年代,但重组 *Tac* 商品至今尚未问世。总体而言,国内外对 *Tac* 基因工

程表达主要集中在以细菌、真菌和藻类为宿主的表达体系上。

张春义等首次在大肠杆菌中以包涵体形式表达了 *Tac* I,但因需变性和复性,产品下游处理难度较大^[11-12];Dai 等在枯草杆菌 WB800 中分泌表达了 *Tac* I,但表达量最高仅达到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与酵母菌是否可分泌性表达 *Tac* I 报道结果^[6] 相差较大。张春义等报道 *Tac* 基因可克隆至毕赤酵母表达载体,其诱导分泌产物有抑菌效果,但具体蛋白表达量均未提及^[13-14];Xu 等将 *Tac* II 克隆至毕赤酵母 SMD1168,*Tac* II 表达量经过甲醇诱导 6 d 可达 150 mg/L ^[15];Dorrington 未能在毕赤酵母发酵液中检测到 *Tac* I^[16];Gao 等实现了 *Tac* I 基因和人溶菌酶基因在毕赤酵母的融合表达,虽然避免了 *Tac* I 对基因工程宿主的抑杀作用,但用特异性蛋白酶切割 *Tac* I 与融合蛋白时,容易造成氨基端出现多余的氨基酸,或切割效率低下,甚至不能切割等^[17];吴顺章等^[18]、邓祥元等^[19] 分别成功地将 *Tac* I 基因整合到坛紫菜(红藻门,多细胞真核藻)和海带配子体(褐藻门,单细胞真核藻)内,但前一研究仅在 DNA 和 mRNA 层面检测到 *Tac* I 基因整合到坛紫菜基因组中,未报告是否表达了 *Tac* I,后一研究虽表达了具有活性的 *Tac* I,但其表达量要低于大肠杆菌表达体系^[11] 和枯草杆菌表达体系^[6,10,18-19]。

综上所述,本课题组观察了 *Tac* I 对大肠杆菌、枯草杆菌、酵母菌、小球藻和丝状真菌里氏木霉的抑杀活性,发现除丝状真菌里氏木霉外,*Tac* I 对其余工程宿主的最小抑杀浓度均不超过 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[7-8]。因此,本课题组猜想,*Tac* I 可强烈抑杀工程宿主极有可能是其一直难以获得高效表达的主要原因。因此,找到比较耐受 *Tac* I 抑杀的工程宿主,如丝状真菌里氏木霉,可能是解决 *Tac* I 如何获得高效表达的关键。

丝状真菌里氏木霉生产纤维素酶、半纤维素酶和淀粉酶等已有多年的历史,该菌株在产酶条件下不产生毒素。实践还表明,经基因工程手段改造的里氏木霉表达系统能够实现异源蛋白过量表达。Emilio 等将 *Trichoderma harzianum* P1 的几丁质酶编码基因置于里氏木霉 CBH I 启动子之后,摇瓶产量可达 130 mg/L (达到原产菌株的 20 倍)^[20]。几丁质酶能抑制多种真菌的生长,但里氏木霉却能高效生产几丁质酶。可在里氏木霉中获得高效表达的异源蛋白还有肌醇六磷酸酶(2 g/L)、哺乳动物的牛凝乳蛋白酶(40 mg/L)、抗体片段(150 mg/L) 和人 N-乙酰葡萄糖苷转移酶等^[21]。但迄今为止,抗菌肽能否在丝状真菌里氏木霉系统中得到高效表达尚不清楚。

本研究根据里氏木霉偏爱密码子优化了 *Tac* I 的基因序列,人工合成了该序列,采用酶切、连接等方法将 *Tac* I 基因成功连接至里氏木霉表达载体 pAN-PSGT 之上,构建了 pAN-PSGT-*Tac* 重组表达载体。pAN-PSGT 表达载体无需“共转法”,可“单转法”即直接用质粒转化里氏木霉原生质体;pAN-PSGT 采用里氏木霉 QM9414 CBH I 的信号肽来引导目的蛋白的分泌。Kuo 等发现许多真菌的 *gpd* 启动子可用于重组蛋白的调控和转录过程中,提高目的产物的表达水平^[22]。同时,信号肽可引导目的蛋白分泌到胞外,产物分离时不必破碎宿主细胞,同时分泌到胞外的蛋白往往都具有正确的空间折叠构象,利于下游的分离纯化;pAN-PSGT 中带有 *Lac Z* 基因,可通过蓝白斑筛选阳性克隆。

采用 PEG 介导法将重组表达载体 pAN-PSGT-*Tac* 转

化至里氏木霉 QM9414 原生质体,潮霉素筛选得到了重组子,基因型鉴定结果表明,鲎素 I 基因已经重组到基因组 DNA 上,说明本研究成功构建了鲎素 I 里氏木霉表达系统。利用本系统表达鲎素 I 蛋白的研究需要进一步研究。

4 结论

本试验成功构建了鲎素 I - 里氏木霉表达载体,并成功转化至里氏木霉 QM9414 细胞中。这一结果为进一步改进鲎素 I 在里氏木霉表达系统中表达研究奠定了基础,对于其他小分子肽类蛋白在丝状真菌表达系统中的表达也具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(32): 16709 - 16713.
- [2] Iwanaga S. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab [J]. Current Opinion in Immunology, 2002, 14(1): 87 - 95.
- [3] Miyata T, Tokunaga F, Yoneya T, et al. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity [J]. Journal of Biochemistry, 1989, 106(4): 663 - 668.
- [4] Morimoto M, Mori H, Otake T, et al. Inhibitory effect of tachyplesin I on the proliferation of human immunodeficiency virus *in vitro* [J]. Chemotherapy, 1991, 37(3): 206 - 211.
- [5] 李祺福, 欧阳高亮, 鲍仕登, 等. 中国鲎鲎素对人肝癌 SMMC - 7721 细胞增殖的抑制作用 [J]. 中国海洋药物, 2002, 21(2): 22 - 25.
- [6] Dai J G, Xie H W, Jin G, et al. Preliminary study on high - level expression of tandem - arranged tachyplesin - encoding gene in *Bacillus subtilis* Wb800 and its antibacterial activity [J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(1): 109 - 117.
- [7] 简琛, 张燕, 代建国, 等. 鲎素对几种常见基因工程菌的抑杀研究 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8): 54 - 55, 57.
- [8] 黄莉莉, 代建国, 金刚, 等. 鲎素和硫酸多黏菌素 B 对小球藻的

抑制效应及机理 [J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 537 - 540.

- [9] Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, et al. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei* [J]. Gene, 1987, 61(2): 155 - 164.
- [10] 刘刚, 李云, 张燕. 红色荧光蛋白在丝状真菌里氏木霉中的表达 [J]. 生物技术, 2006, 16(6): 11 - 14.
- [11] 张春义, 范云六. 抗真菌鲎素基因在大肠杆菌中的表达 [J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(3): 7 - 12.
- [12] 张春义, 范云六. 在大肠杆菌中表达具有抗黄曲霉活性的鲎素 [J]. 高技术通讯, 1999, 9(1): 46 - 49.
- [13] 张春义, 赵军, 武长剑, 等. 利用毕赤酵母表达抗真菌鲎素基因 [J]. 科学通报, 1998, 43(19): 2085 - 2089.
- [14] 郑伟. 中国鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 基因工程抗菌肽的制备及其生物活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2005.
- [15] Xu F, Meng K, Wang Y R, et al. Eukaryotic expression and antimicrobial spectrum determination of the peptide tachyplesin II [J]. Protein Expression and Purification, 2008, 58(2): 175 - 183.
- [16] 谢海伟, 代建国, 金刚, 等. 鲎源抗菌肽的研究及其潜在应用价值 [J]. 生物技术通讯, 2007, 18(3): 530 - 533.
- [17] Gao, Y, Zhao H L, Feng X, et al. Expression of recombinant human lysozyme - tachyplesin I (hLYZ - TP I) in *pichia pastoris* and analysis of antibacterial activity [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2013, 26(4): 319 - 322.
- [18] 吴顺章, 李博文, 赵扬, 等. 坛紫菜转鲎素基因的初步研究 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2008, 47(4): 567 - 570.
- [19] 邓祥元. 转基因海带配子体的制备与高效增殖 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009.
- [20] Margolles - Clark E, Hayes C K, Harman G E, et al. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(6): 2145 - 2151.
- [21] 钟耀华, 王晓利, 汪天虹. 丝状真菌高效表达异源蛋白研究进展 [J]. 生物工程学报, 2008, 24(4): 531 - 540.
- [22] Kuo C Y, Chou S Y, Huang C T. Cloning of glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase gene and use of the *gpd* promoter for transformation in *Flammulina velutipes* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(5): 593 - 599.

(上接第 37 页)

物激素和其他营养物质,因此,合理利用活性炭对于提高杂交兰根的生长有重要作用^[12]。试验表明,在添加活性炭的培养基中杂交兰幼苗不仅生长良好,生根效果也最好。

参考文献:

- [1] 卢思聪. 中国兰与洋兰 [M]. 北京: 金盾出版社, 1994.
- [2] Morel G. Producing virus free *Cymbidium* [J]. Am Orchid Soc Bull, 1960, 29(1): 495 - 497.
- [3] 孔凡龙, 贾玉芳, 柴明良, 等. 春兰离体根状茎生长和分化的研究 [J]. 核农学报, 2009, 23(2): 253 - 256, 273.
- [4] 孙玉芬, 宁惠娟, 张韶伊, 等. 春兰与大花蕙兰杂交后代根状茎增殖与分化条件 [J]. 浙江农林大学学报, 2014, 31(1): 156 - 161.
- [5] 王丰妍, 李承秀, 王长宪, 等. 大花蕙兰与春剑杂交原球茎增殖及

分化研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 327 - 330.

- [6] 陈兰芬, 王晶, 田亦平, 等. 墨兰组织培养根状茎分化技术研究 [J]. 河北林果研究, 2011, 26(1): 22 - 24.
- [7] 李玉萍, 罗凤霞, 史慧梅. 春兰与大花蕙兰杂交种原球茎增殖研究 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 53 - 55.
- [8] 石乐娟, 张放, 张士良, 等. 植物生长调节剂对线艺春兰根状茎的增殖分化的影响 [J]. 园艺学报, 2006, 33(4): 887 - 890.
- [9] 潘银萍, 李承秀, 王长宪, 等. 春荷鼎杂交根状茎的组培快繁的研究 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(5): 209 - 212.
- [10] 左利娟, 李志强, 郑志勇, 等. 杂交兰根状茎的增殖与分化成苗技术 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 54 - 55, 56.
- [11] 李承秀, 黄艳艳, 赵进红, 等. 建兰变种组培快繁试验研究 [J]. 农业科技与信息 (现代园林), 2007, 9(9): 44 - 48.
- [12] 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的作用 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214 - 217.