

文章编号: 1004 - 7271(2006)03 - 0276 - 05

GUS 基因瞬时表达检测香菇顺式因子的调控功能

胡乐琴¹, 姚泉洪², 陈明杰³, 熊爱生², 潘迎捷⁴

- (1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;
2. 上海农业科学研究院生物中心, 上海 201106;
3. 上海农业科学研究院食用菌研究所, 上海 201106;
4. 上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘 要 设计了一个顺式元件功能检测载体 pYF3553, 该载体以 *GUS* 为报告基因, 其上游连接一段由待测香菇 (*Lentinula edodes*) 克隆片段与酵母 *Cyc1* 基本启动子组成的杂合启动子。将编号为 XG108 和 XG111 的香菇克隆序列构建的检测载体命名为 pXG108、pXG111。将 pXG108 转化到香菇原生质体中, 结果被测样的 *GUS* 瞬时活性比对照增加一倍, 表明 *GUS* 基因得到了表达, 其上游调控元件具有调控功能。对比 pXG108 和 pXG111 转化后的表达结果, 其 *GUS* 瞬时表达活性表现出差异, 这种差异与克隆片段在酵母中的表达差异相一致。分析了利用 *GUS* 瞬时表达验证未知香菇顺式元件的优缺点。

关键词 香菇; 顺式调控元件; 转化; *GUS* 基因; 瞬时表达

中图分类号: Q 939.96 文献标识码: A

Checking of cis-acting element of *Lentinula edodes* by transient expression of *GUS* gene

HU Le-qin¹, YAO Quan-hong², CHEN Ming-jie³, XIONG Ai-sheng², PAN Ying-jie⁴

- (1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
2. Biology Science Central Lab, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;
3. Edible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;
4. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract A function-checking vector pYF3553 was constructed, *GUS* gene as the reporter gene, whose upstream was the fusion-promoter consisted of cis-acting elements of *Lentinula edodes* and a yeast *Cyc1* gene mini-promoter. Two function-checking vector, whose cis-acting elements of *Lentinula edodes* were XG108 and XG111, were named pXG108 and pXG111. By transforming of the pXG108 into protoplasts of *Lentinula edodes*, transient expression of *GUS* activity was twice as high as the control. This phenomenon revealed the obvious expression of *GUS* gene and the modulation function of its upstream sequence. Transient *GUS* gene expression of the two vector, pXG108 and pXG111, was different. Difference existed in the transient *GUS* gene expression between the two cis-acting elements of *Lentinula edodes*, pXG108 and pXG111 resemble the expression effect in yeast of that. A detailed analysis of superiority and disadvantage for the method utilizing the transient *GUS* gene expression to detect the unknow

收稿日期 2006-3-29

基金项目 上海科技兴农重点攻关项目(农科工字 2001 D03 - 22)

作者简介 胡乐琴(1966 -),女,江西九江人,助理研究员,研究方向为生物技术。Tel: 021 - 65710526, E-mail: yqhu@shfu.edu.cn

通讯作者 潘迎捷, Tel: 021 - 65710298, E-mail: yjpan@shfu.edu.cn

function of cis-acting elements of edible fungi was also brought forward.

Key words : *Lentinula edodes* ; cis-acting element ; *GUS* gene ; transient expression

启动子是构建转化系统的重要元件。常用的克隆启动子的方法是 PCR 法^[1]和启动子探测载体法^[2]。PCR 法的局限性是只能克隆一端或两端序列已知的启动子,不能克隆未知基因的启动子。要克隆未知基因启动子,常用的方法是启动子探测载体法,其原理是构建一个带有报告基因的探测载体,将未知 DNA 片段插入在报告基因上游作为启动部分,检测报告基因的表达情况,如果报告基因获得表达,说明插入片段具有启动子功能,反之则不是启动子元件。这种克隆启动子的方法可以任意筛选未知启动子,易于获得大量的新启动子,给启动子结构分析和调控机理的研究提供了大量材料。胡乐琴等^[3]已经报道了利用酵母转化体系和启动子探测载体克隆香菇顺式因子,得到较多的阳性克隆子。本实验将对克隆到的顺式因子做进一步分析,探讨其在香菇中的启动表现。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种

香菇申 10 由上海农科院食用菌所提供,用于制备香菇原生质体。

1.1.2 培养基

用于培养香菇的培养基参见 Sato 等^[4]。

1.1.3 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒纯化试剂盒等为 Promega 公司生产,其它试剂皆采用 Sigma 公司和国产高纯度试剂。

1.1.4 质粒

质粒 pYF 带有来自细菌的报告基因 *GUS*,上游有 pL 启动子。由上海农业科学院生物中心提供。G221X 质粒由本实验构建^[3],该质粒带有 *LacZ* 标记基因,其上游带有由酿酒酵母 *Cyc1* 基因的基本启动子和插入的香菇顺式调控序列构成的杂合启动子,该杂合启动子将插入 pYF 质粒 *GUS* 基因上游,取代 *GUS* 基因的 pL 启动子,构建香菇顺式元件功能检测载体。

1.2 方法

1.2.1 香菇顺式元件功能检测载体的构建

pYF3553 是本试验用来检测香菇顺式元件功能载体的总称,该载体带有报告基因 *GUS*,其上游插入一个杂合启动子,该杂合启动子由需要验证的香菇片段和酵母 *Cyc1* 基本启动子构成。酵母 *Cyc1* 基本启动子单独作用时不能启动 *GUS* 基因表达,只有在其上游插入的香菇序列是顺式因子时才构成有功能的启动子,据此可以检测插入的香菇片段在香菇中是否具有顺式调控功能。本试验将编号为 XG108 和 XG111 的香菇克隆序列构建的 pYF3553 检测载体命名为 pXG108、pXG111。香菇克隆序列 XG108 和 XG111 由本实验室前期工作所克隆^[3],它们在酵母中的表达显色状况如图 1 所示。

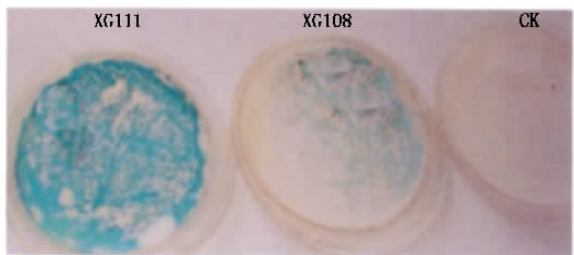


图 1 XG111 和 XG108 在酿酒酵母中的显色反应

Fig.1 Colour of XG111 & XG108 in *S. cerevisiae*

pYF3553 构建过程如图 2 所示。先用 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切质粒 pYF,切除 *GUS* 基因的启动子 pL,回收 4.3 kb 大片段。再用 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切阳性克隆质粒 G221X,回收 *LacZ* 基因前的杂合启动子(400 ~ 600 bp),该杂合启动子由克隆的香菇顺式调控元件片段和 *Cyc1* 基本启动子组成。用 T4 DNA 连

接酶连接上面回收的两个样品,连接产物电击转化大肠杆菌 DH5 α ,抽提质粒,质粒经 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切鉴定,有一条 4.3 kb 大片段和一条 500 bp 左右小片段。本实验每个需要检测的克隆子均做 5 个重复样,所作载体酶切结果正确,5 个重复样酶切片段一致。

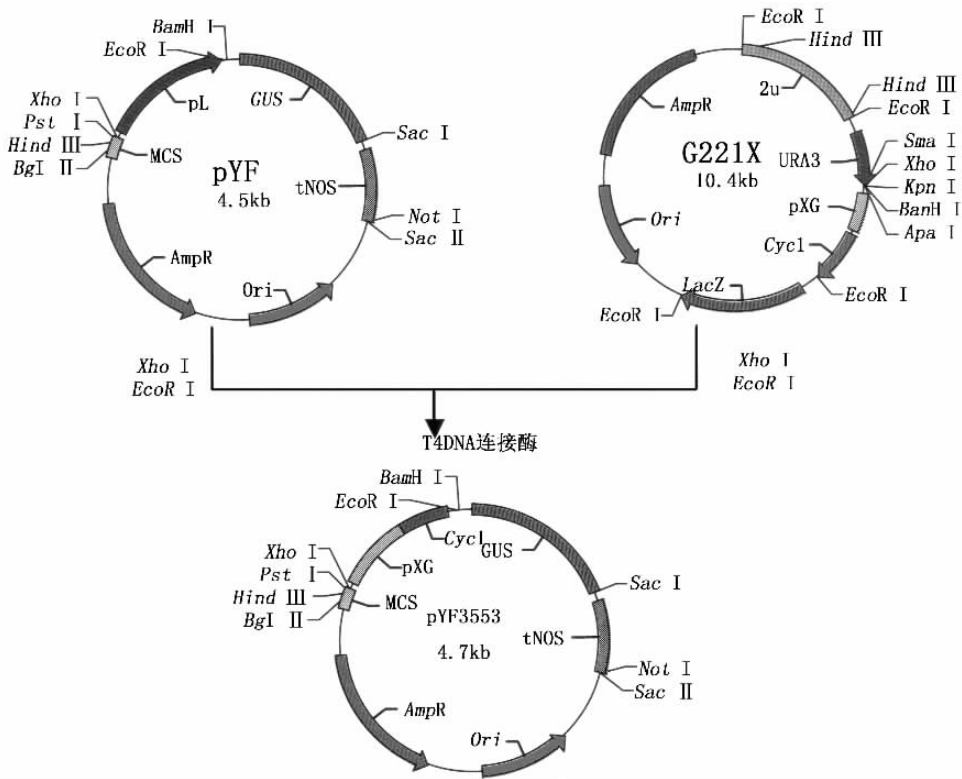


图2 顺式因子功能鉴定载体 pYF3553 的构建程序
pXG 为需要验证的香菇调控序列

Fig.2 Construction of function-checking vector pYF3553

为了制备转化时的对照质粒,将一部分回收的 4.3 kb 大片段用 T4 DNA 连接酶直接连接成完整质粒 pYF3553-C。

1.2.2 香菇原生质体的制备

原生体制备方法参见 Sato 等^[4]方法,最后悬浮于 STE 缓冲液和甘油中,浓度为每毫升 1×10^8 个原生质体,用于转化。

1.2.3 电击转化法

在无菌操作下取上述甘油悬浮的原生质体 100 μ L,与 7 μ g 质粒 DNA,放入预冷的 1 mm 无菌电击杯中,冰置 20 min 后电击,电击参数 0.45 kV,200 Ω ,25 μ F (Bio-rad gene Pulser),时间为 4.3 ~ 4.6 s。电击后立即加入 PDMS 培养基,25 $^{\circ}$ C 培养。分别于培养后 2 h、10 h、20 h 取样测定蛋白质和 GUS 活性。每个样品做 3 个重复。

1.2.4 PEG 介导法转化

在无菌操作下取 100 μ L 上述 STE 悬浮原生质体,加入 10 μ g 质粒 DNA,参照 Sato 等^[4]方法做 PEG 转化。最后用 1 mL PDMS 悬浮,放置 25 $^{\circ}$ C 培养。至 10 h 取出,离心,收集原生质体,用 0.6 mol/L 甘露醇溶液洗涤一次。用于 GUS 活性及蛋白含量检测。每个样品做 3 个重复样。

1.2.5 GUS 瞬间表达检测

12 000 g 离心收集转化好的原生质体,加 100 μ L 抽提液,超声波破碎细胞,离心。分别取上清液 50

μL 测定 *GUS* 活性和蛋白质,其具体测定方法参考 Jefferson 等^[5]的方法。

2 结果与分析

2.1 *GUS* 活性检测

2.2.1 载体 pXG108 *GUS* 瞬时表达检测

为了确定检测载体在香菇中是否有表达,用电击转化法将载体 pXG108 转化到香菇原生质体中。对照转化质粒为构建的 pYF3553-C。检测 *GUS* 活性和总蛋白质含量,根据结果计算出酶活(表 1)。

由表 1 可知,检测样 *GUS* 活性在 2 h、10 h、20 h 时有所不同,在 2 h 和 20 h 与对照无明显区别,而在 10 h 左右比对照高一倍,表明 *GUS* 基因在香菇中得到了瞬间表达。虽然和对照相比,检测样 *GUS* 活性增加量不是很多,但由于 *GUS* 活性荧光检测法极为灵敏,检测结果是可靠的。此结果表明,由克隆的香菇片段和 *Cyc1* 基本启动子构成的杂合启动子在香菇中转录了 *GUS* 基因瞬时表达,克隆的香菇 DNA 片段在香菇中具有启动转录活性。在香菇中,*GUS* 表达活性随着时间而变化,在转化后 10 h 出现最高表达,然后逐渐下降。

2.2.2 PEG 介导转化

为了比较不同的克隆片段启动功能的差别,采用 PEG 介导法,将载体 pXG108 和 pXG111 同时进行了转化。结果如表 2。

和对照相比,两个检测样的 *GUS* 酶活力(units/mg)各增加 87% 和 125%,有比较明显的增加。两个检测样品之间也表现出一定差异,pXG111 的 *GUS* 酶活力比 pXG108 提高 20%。香菇克隆片段 XG111 和 XG108 转化到酵母中时在酵母中的表达情况,如图 1,质粒 XG111 转化后产生的兰色比 XG108 深,说明前者在酵母中的表达量比后者多,这与二者的 *GUS* 瞬时表达检测结果是相符合的。

表 1 载体 pXG108 在香菇中 *GUS* 瞬时表达活力

时间(h)	对照	检测样
2	0.130	0.143
10	0.134	0.270
20	0.128	0.130

表 2 pXG108 和 pXG111 转化后 *GUS* 酶活力

质粒编号	蛋白含量(mg/mL)	<i>GUS</i> 酶活力(units/mg)
对照	0.210	0.142
pXG108	0.229	0.266
pXG111	0.250	0.320

3 讨论

因易于检测和在许多物种中能够表达,*GUS* 已经成为分子研究的良好标记,在研究启动子结构与功能的关系以及优化转化参数等方面应用广泛^[6-10]。本实验以 *GUS* 为报告基因检测在酵母中克隆的香菇顺式因子在香菇中的功能,实验结果显示检测样比对照的 *GUS* 有比较明显的提高,证明 *GUS* 基因在香菇中获得了表达。实验结果表明,用 *GUS* 基因瞬间表达方法验证香菇克隆序列在香菇中是否具有调控功能是可行的,也证明用酵母表达体系克隆的香菇调控元件在香菇中也具有转录活性,克隆得到的片段是真正的香菇调控序列。而载体 pXG108 和 pXG111 转化后 *GUS* 瞬间表达量有差异,这种差异与两个片段在酵母中的表达差异一致,说明用 *GUS* 瞬间表达法可以有效地鉴别不同顺式因子的功能大小。使用 *GUS* 瞬间表达方法不仅可以作为克隆香菇启动子的快速鉴定方法,也可以作为快速筛选优良启动子的有效途径。

但实验中也存在一些问题,与对照相比,检测样 *GUS* 瞬间表达量提高不多,可能的原因有:酵母 *Cyc1* 基本启动子不适合在香菇中起始转录;*GUS* 基因在香菇中不易获得表达,几例 *GUS* 基因在食用菌的应用中,效果都不是很好^[11];克隆的顺式因子启动功能不强。此外,由于香菇原生质体比较难制备,

也给该方法增加了难度。而实验过程中容易出现细菌污染,也会影响实验的稳定性。

参考文献:

- [1] 曹清玉,曲志才,万由衷,等. 短小芽孢杆菌启动子活性片段的克隆、表达及序列特征分析[J]. 科学通报, 2001, 46(2):141-145.
- [2] 罗新梅, Schoenherr R, 陈宏. 黑曲霉(*Aspergillus niger*)启动子的克隆及其序列特征[J]. 遗传学报, 1999, 26(4):428-436.
- [3] 胡乐琴, 姚泉洪, 陈明杰, 等. 香菇顺式调控元件的克隆及其序列分析[J]. 菌物系统, 2002, 21(3):406-611.
- [4] Sato T, Yaegashi K, Ishii S, et al. Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated DNA integration of plasmid DNA[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62(12):2346-2358.
- [5] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. *GUS* fusions β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. The EMBO, 1987, 6(13):3901-3907.
- [6] Enrico Monke, Wilhelm Schafer. Transient and stable gene expression in the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* after transformation with the β -glucuronidase (*GUS*) gene[J]. Gene, 1990, 93:101-109.
- [7] Bunkers G J. Expression of the *Escherichia coli* β -glucuronidase gene in *Pseudocercospora herpotrichoides*[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57:2896-2900.
- [8] Gould J H, Smith R H. A non-destructive assay for *GUS* in the media of plant tissue culture[R]. Plant Mol Biol Rep, 1989, 7:209-216.
- [9] Martin T, Wohnr R V, Hummel S, et al. The *GUS* reporter system as a tool to study plant gene expression[A]. Using the *GUS* gene as a reporter of gene expression[C]. Academic Press, Orlando Florida, 1992:23-43.
- [10] Toyoda H, Yamaga T, Matsuda Y, et al. Transient expression of the β -glucuronidase gene introduced into barley coleoptile cells by microinjection[R]. Plant Cell Rep, 1990, 9:299-302.
- [11] Yanai K. The integrative transformation of *Pleurotus ostreatus* using biolaphos resistance as a dominant selectable marker[J]. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(3):472-475.