

应用 *alc* 基因开关系统在糙皮侧耳中表达 绿色荧光蛋白

赵帅举, 张 宇, 王景冒, 左勇涛, 戚元成, 申进文, 邱立友*

(河南农业大学 生命科学院/农业部农业微生物酶工程重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 为探明担子菌糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)中是否存在与构巢曲霉相似的乙醇代谢调控机制, 及能否在糙皮侧耳中应用构巢曲霉 *alc* 基因开关系统调控表达外源基因, 从糙皮侧耳 PC15 v2.0 基因组数据库中电子克隆得到其假拟乙醇脱氢酶基因(*alcA*)及其上游序列, 该基因上游 1 317 bp 序列中含有 1 个正向和 2 个反向调控因子 AlcR 蛋白的特异性结合位点序列。将构建的含有 *alcA* 基因启动子控制绿色荧光蛋白基因表达的质粒 pEGFP-C1-*PalcA* 转入糙皮侧耳天达 300 中, 转化子在含有葡萄糖的培养基中没有绿色荧光蛋白表达, 在含有乙醇的培养基中则有绿色荧光蛋白表达。综合上述, 糙皮侧耳的乙醇代谢调控机制与构巢曲霉相似, 仅用构巢曲霉的 *alcA* 基因启动子替代目的基因的启动子即可在糙皮侧耳中有效调控目的基因的表达。

关键词: 糙皮侧耳; 基因开关; 诱导表达; 绿色荧光蛋白

中图分类号: S646.1⁺41 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)05-0118-06

Expression of Green Fluorescent Protein Controlled by *alc*-gene Switch in *Pleurotus ostreatus*

ZHAO Shuai-ju, ZHANG Yu, WANG Jing-mao, ZUO Yong-tao,

QI Yuan-cheng, SHEN Jin-wen, QIU Li-you*

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University/Key Laboratory of Enzyme Engineering of
Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To explore if there is a similar ethanol metabolic regulation mechanism to *Aspergillus nidulans* in *Pleurotus ostreatus*, the hypothetical alcohol dehydrogenase gene (*alcA*) and its upstream sequences was cloned by electronic cloning technology from *P. ostreatus* PC15 v2.0 genome database. There were one forward and two reverse AlcR specific binding sites in the upstream region (1 317 bp) of *alcA*. To explore if ethanol-inducible *alc*-gene switch from *A. nidulans* can be used in *P. ostreatus*, the promoter of *alcA* (*PalcA*) was inserted in plasmid pEGFP-C1 and fused with the green fluorescent protein gene (*GFP*), generating the plasmid pEGFP-C1-*PalcA*. The plasmid pEGFP-C1-*PalcA* was transformed into *P. ostreatus* TD300. The *GFP* genes in the transformants expressed when the transformants were cultured in medium containing alcohol, but did not express when the transformants were cultured in the medium containing glucose. Overall, the ethanol metabolic regulation mechanism in *P. ostreatus* is similar to *A. nidulans*, and replacing the promoter of target gene by *PalcA* can effectively regulate the target gene expression in *P. ostreatus*.

Key words: *Pleurotus ostreatus*; gene switch; inducible expression; green fluorescent protein

收稿日期: 2014-01-01

基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (082102150048)

作者简介: 赵帅举 (1989-), 男, 河南宝丰人, 在读硕士研究生, 研究方向: 食用菌分子生物学。

* 通讯作者: 邱立友 (1963-), 男, 河南信阳人, 教授, 博士, 主要从事分子生物学研究。E-mail: qliyou@henau.edu.cn

alc 基因开关系统是从构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 中发现的一种通过乙醇诱导基因表达的调控系统。构巢曲霉利用乙醇需要 2 种酶, 分别是乙醇脱氢酶基因 *alcA* 编码的乙醇脱氢酶 (ADH I) 和乙醛脱氢酶基因 *aldA* 编码的乙醛脱氢酶 (ALDH)。*alcA* 是典型的诱导表达基因, 其表达受正调控顺式作用因子 AlcR (编码基因是 *alcR*) 和负调控反式作用因子 CreA (编码基因是 *creA*) 的控制^[1-2]。*alcR* 与 *alcA* 位于同一条染色体上, 紧密连锁。*alcR* 的表达受乙醇、乙醛和苏氨酸的诱导, 而 *creA* 的表达则受葡萄糖的诱导^[2-4]。当有乙醇存在时, 乙醇调节 *alcR* 的表达并参与 AlcR 结合诱导其构像发生改变, 构像发生改变的 AlcR 与 *alcA* 启动子结合并激活基因的表达^[5]。当有葡萄糖存在时, CreA 可完全抑制 *alcR*、*alcA* 和 *aldA* 的表达^[6]。另外, 当有不易利用的碳源如乳糖、甘油或果糖存在时, *alcA* 的转录可被抑制^[2,7]。由于 *alcR* 基因和 *alcA* 基因启动子组成的乙醇诱导系统 (*alc* 基因开关系统) 能够在乙醇存在的情况下灵敏、精确和安全地控制基因的表达, 因而被越来越广泛地用于丝状真菌^[8-10] 和植物^[11-12] 基因表达的调节, 成为调控基因表达的有效工具。

子囊菌中的烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 和榆树枯萎病菌 (*Ophiostoma novo-ulmi*) 利用乙醇的代谢调控机制与构巢曲霉相似^[9,13], 也存在着 *alc* 基因开关系统, 因此, 在调控其他基因表达时, 仅需用 *alcA* 基因的启动子 (*PalcA*) 代替其原有启动子即可^[9]。在担子菌中应用 *alc* 基因开关系统调控基因表达未见报道。糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 是我国和东亚广泛栽培的食用和药用菌, 其生长周期短、适应性强、产量高, 并且是重要的白腐真菌, 用于工业生产木质素降解酶和纤维乙醇燃料, 因此, 已成为担子菌遗传和基因组研究的模式生物。为探索在担子菌中是否存在与构巢曲霉相似的利用乙醇的代谢调控机制, 以及能否仅用构巢曲霉 *alcA* 基因的启动子调控外源基因在担子菌中表达, 对糙皮侧耳基因组中相关基因序列进行了分析, 并将用构巢曲霉的 *alcA* 启动子和绿色荧光蛋白基因 *GFP* 及终止子构建的表达载体转化糙皮侧耳天达 300, 以期在担子菌和糙皮侧耳中应用构巢曲霉 *alc* 基因开关提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 菌株、DNA 和质粒

糙皮侧耳天达 300, 购自河南省农业科学院食

用菌技术中心。构巢曲霉 *alcA* 启动子 *PalcA*, 根据构巢曲霉 *alcA* 基因启动子序列 (GenBank 登录号: M16196.1) 化学合成得到。质粒 pAN7-1, 由荷兰 TNO 生物医学实验室 Punt 博士赠送。质粒 pEGFP-C1, 购自美国 Clontech 公司, 含有绿色荧光蛋白基因 *GFP*, 控制其表达的启动子是巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 启动子。

1.2 培养基

PD 培养基 (葡萄糖含量为 3%): 马铃薯 200 g (去皮切块加水煮沸 20 min, 用 4 层纱布过滤取滤液), 葡萄糖 30 g, 琼脂 20 g, 补水至 1 000 mL。PE 培养基 (乙醇浓度为 0.1 mol/L): 马铃薯 200 g (去皮切块加水煮沸 20 min, 用 4 层纱布过滤取滤液), 乙醇 5.8 mL, 琼脂 20 g, 补水至 1 000 mL。

1.3 电子克隆

利用 GenBank 中构巢曲霉的 ADH I 序列 (登录号: M16196.1)、AlcR 序列 (登录号: XM_677155.1) 和 CreA 序列 (XM_658707.1) 在糙皮侧耳 PC15 v2.0 基因组数据库中进行 BLAST 比对, 根据氨基酸序列的同源性电子克隆相应基因及其启动子序列。应用软件 DNASTar 进行氨基酸序列的同源性比较。

1.4 PCR

以质粒 pEGFP-C1 为骨架, 构建 *alcA* 启动子控制 *GFP* 表达的重组表达质粒 pEGFP-C1-*PalcA*, 过程如图 1 所示。首先 PCR 克隆得到 2 个 DNA 片段。片段 *PalcA*-EN, 采用引物 S1 (5'-CCGGAATTCCA-TGCGGAACCGCACGAG-3') 和 A1 (5'-CTAGCTA-GCTTTGAGGCGAGGTGATAGGA-3'), 引物下划线序列分别为 *EcoR* I 和 *Nhe* I 限制性酶切位点, 以构巢曲霉 *PalcA* 为模板经 PCR 扩增得到, PCR 扩

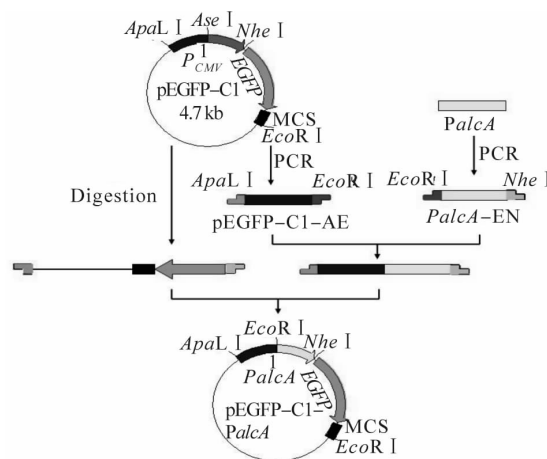


图1 *alcA* 启动子控制 *GFP* 表达的重组表达质粒 pEGFP-C1-*PalcA* 的构建


```

-1317      GGAAGACTACCCCAAGCTGACAAAAGTGACTGCGGCGTTCTACGAGTCGCTCCGAAT -1240
-1200      TCGCGCTTGTGCGGATGTCCGTGGTGAATACAGCGGCTGGCCACTTGATGATCCGCGAGG -1140
-960       TCGCTTCTCCATATTGACGTAGCCACCCCGCACTCGTGCTTCTTTTCAGAATACAACCCT -900
-540       ATGACTTCACCGGTAACCTTCCACTTATATCCGACCAATTTAGATCGGCTTCGGGCCTTCGC -480

```

以相对于 *alcA* 基因起始密码子的第 1 个碱基开始编号。TATA 盒用长方形框指示, *AlcR* 特异性结合位点序列 5'-CCGCA-3' 及其反向序列用水平箭头指示

图 3 糙皮侧耳中假拟 *alcA* 基因上游的部分序列

2.2 *alcA* 启动子控制 *GFP* 表达的重组表达质粒构建

以构巢曲霉 *PalcA* 为模板, 用引物 S1 和 A1 PCR 扩增得到片段 *PalcA*-EN。以 pEGFP-C1 为模板, 用引物 S2 和 A2 PCR 扩增得到片段 pEGFP-C1-AE, 2 个片段经 *EcoR* I 酶切后连接(图 4), 再与 pEGFP-C1 经 *Apa* I 和 *Nhe* I 双酶切后得到的大片段进行连接, 即构建得到 *alcA* 启动子控制 *GFP* 表达的重组表达质粒 pEGFP-C1-*PalcA*, 该质粒用 *EcoR* I 单酶切或 *Nhe* I、*EcoR* I 双酶切, 分别得到 2 个或 3 个片段(图 5)。

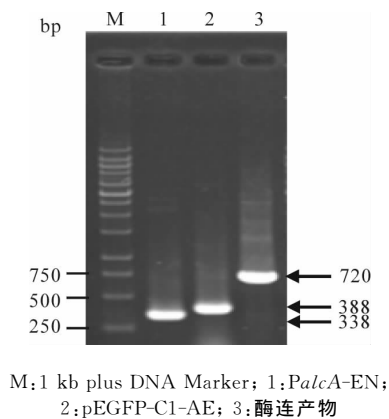


图 4 PCR 产物 *PalcA*-EN 和 pEGFP-C1-AE 及其酶连产物凝胶电泳分析

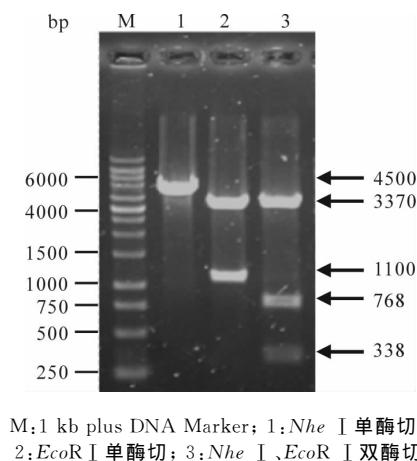


图 5 *alcA* 启动子控制 *GFP* 表达的重组表达质粒 pEGFP-C1-*PalcA* 酶切检测

2.3 质粒 pEGFP-C1-*PalcA* 转化子的 PCR 鉴定

将质粒 pEGFP-C1-*PalcA* 和 pAN7-1 通过 PEG 介导的原生质体转化法导入入天达 300 中, 拟转化子采用含有潮霉素的抗性平板初筛, 再经在不含潮霉素的平板中传代 3 次后回接到含潮霉素的抗性平板中仍能生长的菌落, 即可初步认定为转化子。随机挑选 7 个转化子, 采用 PCR 扩增和绿色荧光检测进一步鉴定。以转化子的总 DNA 为模板, 利用引物 S3 和 A3 及 P1 和 P2, 在 7 个转化子中扩增得到目的条带(图 6—7)。表明在转化子中均含有启动子 *PalcA* 及 *GFP* 和 *hpt* 基因。

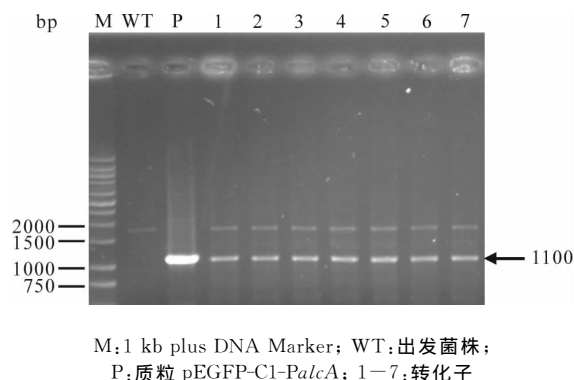


图 6 转化子中启动子 *PalcA* 及 *GFP* 基因的 PCR 鉴定

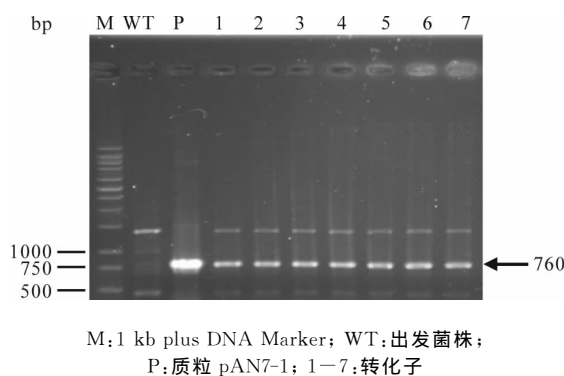


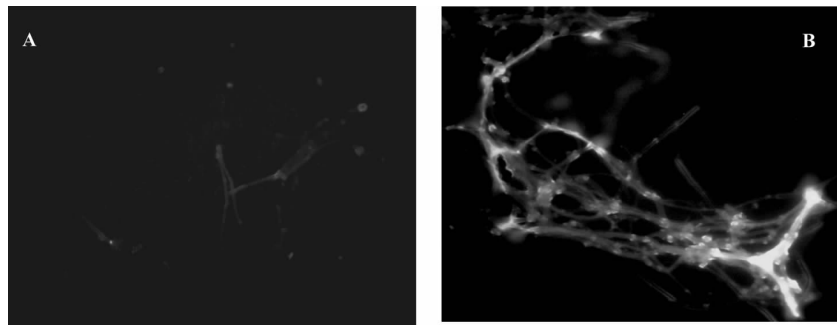
图 7 转化子中 *hpt* 基因的 PCR 鉴定

2.4 质粒 pEGFP-C1-*PalcA* 转化子的荧光鉴定

将 PCR 扩增验证正确的 7 个转化子分别接种在 PD 培养基(葡萄糖含量为 3%)和 PE 培养基(乙醇浓度为 0.1 mol/L)中培养 5 d, 取菌丝在

荧光显微镜下观察,生长在 PD 培养基上的菌丝无荧光,生长在 PE 培养基上的菌丝有荧光(图

8)。表明转化子中 *GFP* 基因的表达受到葡萄糖的抑制和乙醇的诱导。



A:PD 培养基(葡萄糖含量为 3%)培养; B:PE 培养基(乙醇浓度为 0.1 mol/L)培养

图 8 转化子荧光显微观察结果(200×)

3 讨论

alc 基因开关系统至少需要 *alcR* 基因表达盒和 *PalcA*。由于植物体内既没有 *alcR* 基因表达盒,也没有 *PalcA*,所以,在植物中应用 *alc* 基因开关系统时,采用的策略是将 *alcR* 由组成型表达启动子 *CaMV 35S* 控制,目的基因由 *alcA-35S* 微启动子组成的嵌合启动子控制。*alcR* 在 *35S* 控制下为组成型表达,当诱导物乙醇与 *AlcR* 结合后,与 *alcA-35S* 微启动子组成的嵌合启动子内特定顺式元件结合,从而激活目的基因的表达^[17]。在丝状真菌中,如果存在与构巢曲霉相似的利用乙醇的代谢调控机制,则在调控其他基因表达时,仅需用 *PalcA* 代替其原有启动子即可。为检测在丝状真菌中是否存在该机制,在培养基中添加葡萄糖、乙醇、甘油、苏氨酸等抑制或诱导剂,检测丝状真菌乙醇脱氢酶活力,若这些抑制剂或诱导剂能够降低或提高乙醇脱氢酶的活力,即表明在该菌中可能存在着与构巢曲霉相似的利用乙醇的代谢调控机制,否则不存在这种机制。应用这种方法已发现烟曲霉利用乙醇的代谢调控机制可能与构巢曲霉相似,经进一步利用 *PalcA* 替代 *nudC* 基因启动子,证实在烟曲霉中的确存在与构巢曲霉相似的利用乙醇的代谢调控机制^[9]。然而,在黑曲霉中利用乙醇的代谢调控机制则与构巢曲霉不同^[8]。从榆树枯萎病菌基因组数据库中发现有假拟 *alcA* 和 *creA* 基因,以及相应的启动子,应用其内源的 *PalcA* 能够在抑制或诱导条件下调控 *YFP* 基因的表达。说明榆树枯萎病菌存在着与构巢曲霉相似的利用乙醇的代谢调控机制^[13]。

本研究中从糙皮侧耳 PC15 v2.0 基因组数据库中电子克隆得到其假拟 *alcA* 基因及其上游序列,在

其上游序列中存在着 1 个正向和 2 个反向的与 *AlcR* 蛋白特异性结合的位点,表明在糙皮侧耳中可能存在着与构巢曲霉相似的利用乙醇的代谢调控机制。将构巢曲霉 *PalcA* 控制表达 *GFP* 的质粒转入糙皮侧耳天达 300 中,转化子 *GFP* 的表达严格受到葡萄糖的抑制和乙醇的诱导。证实糙皮侧耳利用乙醇的代谢调控机制的确与构巢曲霉相似。另外,从黑曲霉 ATCC 1015 v3.0 基因组数据库(<http://genome.jgi-psf.org/Aspni5/Aspni5.home.html>)中电子克隆得到其假拟 *ADH I* (Protein ID: 194416),在其基因上游的 2 000 bp 序列中仅发现一个与 *AlcR* 蛋白特异性结合的位点(数据未给出)。这可能是黑曲霉利用乙醇的代谢调控机制与构巢曲霉不同的原因。

构巢曲霉利用乙醇的代谢调控机制可存在于不同纲和门的真菌中,而在同属的真菌中却没有,暗示着该机制可能是进化过程中基因的横向转移。幸运的是,至少在担子菌糙皮侧耳中存在着该机制,为以后精准调控糙皮侧耳基因的表达提供了便利。

参考文献:

- [1] Bailey C R, Arst H N. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* [J]. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 1975, 51(2): 573-577.
- [2] Pateman J H, Doy C H, Olson J E, et al. Regulation of alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in *Aspergillus nidulans* [J]. *Proceedings of the Royal Society of London (Series B, Biological Sciences)*, 1983, 217: 243-264.
- [3] Doy C H, Pateman J A, Olsen J E, et al. Genomic clones of *Aspergillus nidulans* containing *alcA*, the structural gene for alcohol dehydrogenase and *alcR*, a

- regulatory gene for ethanol metabolism [J]. DNA, 1985, 4(2): 105-114.
- [4] Lockington R A, Sealy-Lewis H M, Scazzocchio C, *et al.* Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans* [J]. Gene, 1985, 33(2): 137-149.
- [5] Felenbok B. The ethanol utilization regulation of *Aspergillus nidulans*: The *alcA-alcR* system as a tool for the expression of recombinant proteins[J]. Journal of Biotechnology, 1991, 17(1): 11-18.
- [6] Mathieu M, Felenbok B. The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator[J]. The EMBO Journal, 1994, 13(17): 4022-4027.
- [7] Fillinger S, Panozzo C, Mathieu M, *et al.* The basal level of transcription of the *alc* genes in the ethanol regulon in *Aspergillus nidulans* is controlled both by the specific transactivator AlcR and the general carbon catabolite repressor CreA[J]. FEBS Letter, 1995, 368(3): 547-550.
- [8] Nikolaev I, Mathieu M, van de Vondervoort P, *et al.* Heterologous expression of the *Aspergillus nidulans alcR-alcA* system in *Aspergillus niger* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 37(1): 89-97.
- [9] Romero B, Turner G, Olivas I, *et al.* The *Aspergillus nidulans alcA* promoter drives tightly regulated conditional gene expression in *Aspergillus fumigatus* permitting validation of essential genes in this human pathogen[J]. Fungal Genetics and Biology, 2003, 40(2): 103-114.
- [10] Fleissner A, Dersch P. Expression and export: Recombinant protein production systems for *Aspergillus* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(4): 1255-1270.
- [11] Kinkema M, Geijskes R J, Shand K, *et al.* An improved chemically inducible gene switch that functions in the monocotyledonous plant sugar cane [J]. Plant Molecular Biology, 2014, 84(4/5): 443-454.
- [12] Padidam M. Chemically regulated gene expression in plants [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6(2): 169-177.
- [13] Carneiro J S, de la Bastide P Y, Hintz W E. Regulated gene silencing in the fungal [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2013, 82(1): 28-34.
- [14] Dong X, Zhang K, Gao Y, *et al.* Expression of hygromycin B resistance in oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) P. Kumm. using three gene expression systems [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2012, 14(1): 21-26.
- [15] Gwynne D I, Buxton F P, Sibley S, *et al.* Comparison of the cis-acting control regions of two coordinately controlled genes involved in ethanol utilization in *Aspergillus nidulans* [J]. Gene, 1987, 51(2/3): 205-216.
- [16] Kulmburg P, Judewicz N, Mathieu M, *et al.* Specific binding sites for the activator protein, ALCR, in the *alcA* promoter of the ethanol regulon of *Aspergillus nidulans* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(29): 21146-21153.
- [17] Caddick M X, Greenland A J, Jepson I, *et al.* An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism [J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(2): 177-180.