

低温胁迫下香菇基因表达差异研究*

冯志勇^{1,2} 米朔甫³ 陈明杰² 赵明文¹ 李军辉¹ 潘迎捷^{1**}

(¹南京农业大学生命科学院/农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

(²上海市农业科学院食用菌研究所/上海市农业遗传重点实验室 上海 201106)

(³上海丰科生物科技股份有限公司 上海 201401)

摘要 香菇为变温结实型担子菌,为探讨低温胁迫诱导香菇子实体形成的分子机理,应用 mRNA 差异显示技术对低温胁迫下香菇菌丝体基因表达差异进行了比较.电泳差异显示结果表明,低温胁迫前后基因表达在数量水平和质量水平上都存在显著差异,数量水平的差异表现为低温胁迫过程中表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)增强表达或减弱表达;质量水平上的差异表现为低温胁迫使部分 ESTs 特异诱导表达或沉默表达.差异 ESTs 的类型比较和多态性分析发现,低温胁迫处理 6~12 h 可能是诱发香菇原基发生的关键时段.本文还对显著差异表达的基因片段进行序列分析和 Northern 杂交验证,初步讨论了低温胁迫时间在调控香菇子实体发生中的作用.图 4 表 2 参 13

关键词 香菇;低温胁迫;mRNA 差异显示;基因表达序列标签(ESTs)

CLC S646.120.1 : Q786

Differences of Gene Expression in Mycelia of *Lentinula edodes* under Cold Stress*

FENG Zhiyong^{1,2}, MI Shuofu³, CHEN Mingjie², ZHAO Mingwen¹, LI Junhui¹ & PAN Yingjie^{1**}

(¹Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(²Edible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

(³Shanghai Finc Bio-tech Inc., Shanghai 201401, China)

Abstract *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler is a kind of important edible fungus, its fruiting body development depends on temperature alterations, and cold stress is a key environmental factor for its fruiting body inducement. The identification of gene expression differences under cold stress makes a better understanding of shiitake morphogenesis. Analysis of the differences in gene expression during cold stress by means of mRNA-differential display indicated that gene expression of the control was obviously altered both in quantity and quality. Quantitatively, there were enhanced or depressed expressions of genes during cold stress with genetic expression trend forwards the control. Qualitatively, the mycelia could have specific gene expression or silent expression induced by cold stress. The comparison of expression type and polymorphisms of differential display ESTs showed that a cold stress of 6~12 h was a key treatment in primordial initiation. And the relationship between the differential display ESTs under cold stress and fruiting body development was also illustrated. Fig 4, Tab 2, Ref 13

Keywords *Lentinula edodes*; cold stress; mRNA differential display; expressed sequence tags (ESTs)

CLC S646.120.1 : Q786

香菇[*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]是一种重要的食用真菌,具有丰富的营养价值,其产量在世界人工栽培食用菌中占第二位^[1],是我国栽培量最大的食用菌.香菇子实体发生是一个复杂的过程,除固有的遗传因素外,还需要特定的环境条件,如温度、光线、通风、湿度、pH 值、营养等都会影响这个过程,其中温度对其影响最大^[2,3].香菇菌丝达到生理成熟后,只有接受适宜的低温胁迫处理,原基才能迅速整齐地发生,子实体的产量才能明显提高^[4].

低温胁迫处理可改变香菇菌丝体中酚氧化酶、蛋白酶等很多酶的活性^[5,6],但由低温胁迫引起的这种生化反应变化的分子机理尚未开展研究.因此,比较低温胁迫前后基因表达差异,寻找低温胁迫应答反应的基因或基因群,探索低温胁迫与基因

表达调控的关系,可揭示生产上许多食用菌需要低温刺激才能形成子实体及提高子实体整齐度等一系列有意义现象的原因.

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 香菇(*L. edodes*)苏香,菌种保藏号 0818(中国农业微生物菌种保藏中心上海食用菌分中心).

1.1.2 培养基 PDB 培养基购自 DIFCO 公司; Agar A 购自 BBI 公司, $w = 0.2\%$.

1.1.3 试剂 总 RNA 提取试剂盒 RNAex Reagent System IV(上海华舜生物工程有限公司);反转录试剂(Promega);PCR 相关试剂(上海申能博彩生物科技有限公司);引物合成(上海生工生物工程技术有限公司);电泳琼脂糖(Spanish);克隆载体及相关试剂(Promega);DIG-dUTP 及地高辛检测试剂(Roche);其它均采用国产分析纯试剂.

收稿日期:2005-05-23 接受日期:2005-07-25

*国家自然科学基金资助(No. 30270932) Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30270932)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: yjpan@shfu.edu.cn)

1.1.4 引物 随机引物和锚定引物均购自上海生工生物工程技术有限公司. 其中反转录锚定引物为: Oligo - p(dT)₁₁A, Oligo - p(dT)₁₁G, Oligo - p(dT)₁₁C. 随机引物为常用差异显示分析基因引物, 产品编号为 B0301 ~ B0326 (表 1).

表 1 mRNA 差异显示所用的随机引物

Table 1 Random primers used in mRNA differential display			
引物编号 Primer	序列 Sequence	引物编号 Primer	序列 Sequence
B0301	5'd (TACAACGAGG)3'	B0314	5'd (GATCAAGTCC)3'
B0302	5'd (TGGATTGGTC)3'	B0315	5'd (GATCCAGTAC)3'
B0303	5'd (CTTTCTACCC)3'	B0316	5'd (GATCACGTAC)3'
B0304	5'd (TTTTGGCTCC)3'	B0317	5'd (GATCTGACAC)3'
B0305	5'd (GGAACCAATC)3'	B0318	5'd (GATCTCAGAC)3'
B0306	5'd (AAACTCCGTC)3'	B0319	5'd (GATCATAGCC)3'
B0307	5'd (TCGATACAGG)3'	B0320	5'd (GATCAATCGC)3'
B0308	5'd (TGGTAAAGGG)3'	B0321	5'd (GATCTAACCG)3'
B0309	5'd (TCGGTCATAG)3'	B0322	5'd (GATCGCATTG)3'
B0310	5'd (GGTACATTGG)3'	B0323	5'd (GATCTGACTG)3'
B0311	5'd (TACCTAAGCG)3'	B0324	5'd (GATCATGGTC)3'
B0312	5'd (CTGCTTGATG)3'	B0325	5'd (GATCATAGCG)3'
B0313	5'd (GTTTTCGCAG)3'	B0326	5'd (GATCTAAGCC)3'

1.2 试验方法

1.2.1 香菇菌丝的培养与低温处理 将 0.2% Agar 的 PDB 培养基以每瓶 40 mL 分装于 250 mL 三角瓶中, 摇床培养的香菇菌种用 Blender 均质后每瓶接种 1 mL, 于 25 °C 恒温静止培养. 35 d 后, 将菌丝放入 10 °C 环境中进行低温处理, 处理时间分别为 0 (CK)、0.5、1、2、3、6、12 和 24 h, 洗涤、离心, 去除培养基后, 用冻干机 (EDWARDS) 冻干备用.

1.2.2 香菇菌丝总 RNA 的提取 各取 0.5 g 的冻干菌丝体, 采用适合于真菌菌丝的总 RNA 提取试剂盒, 方法参照说明书步骤, 所得 RNA 再用 RNase free - Dnase (Promega) 处理, 酚: 氯仿 (3 : 1) 抽提, 然后甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 质量.

1.2.3 反转录与 PCR 差异显示 以 Oligo (dT)₁₁G、Oligo (dT)₁₁A、Oligo (dT)₁₁C 为锚定引物, M - MLV Reverse Tran-

scriptase RNase H Minus (Promega) 反转录 mRNA 方法参见 Promega 公司说明. 差异显示引物分别与各锚定引物配对, PCR 扩增 cDNA. PCR 扩增仪为 PCR Express Thermal Cycler (Thermo Hybaid), 20 μL 反应体系为: 10 mmol/L KCl, 8 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 10 mmol/L Tris - HCl (pH 9.0), 0.05% NP-40, 1.75 mmol/L MgCl, 125 μmol/L dNTP, 锚定引物 20 pmol, 差异显示引物 16 pmol, Taq DNA 聚合酶 (上海申能博彩生物科技有限公司) 1 Unit. 反应程序为: 94 °C 5 min → [94 °C 30 s → 40 °C 120 s → 72 °C 60 s]₄₀ → 72 °C 10 min.

1.2.4 差异显示 cDNA 片段的克隆测序 PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 比较不同低温胁迫时间的电泳结果, 挖取并回收纯化差异片段, 采用 Promega 公司的 pGEM-T 载体系统克隆片段, 宿主菌为 DH5α. 结果递交上海联合基因科技有限公司测序.

1.2.5 DIG 标记探针 Northern 杂交 以克隆片段为模板, 掺入 DIG - dUTP, PCR 制备探针. RNA 电泳、RNA 毛细管法转膜及 Northern 杂交依照分子克隆试验指南^[7], DIG 标记的检测方法参照 Roche 公司提供的方案.

2 结果和分析

2.1 基因表达差异分析

利用 3 个锚定引物和 26 个随机引物组成的 78 对引物组合, 对 8 个反转录的 cDNA 样品及阴性对照分别进行 PCR 扩增, 除随机引物 B0311 和 B0324 与 3 个锚定引物组合的 DDRT - PCR 反应无扩增产物, 其余均得到电泳展示结果 (图 1), 为总反应的 92.3%, 表明锚定引物和随机引物的组合可以扩增出特定的 mRNA 亚群. 随机引物相同时, 使用锚定引物 Oligo (dT)₁₁G 和 Oligo (dT)₁₁C 扩增出的 ESTs 数目要高于 Oligo (dT)₁₁A, 差异显示的 ESTs 比例也高. 琼脂糖凝胶电泳分离的可见条带平均约 10 条左右, 分子量分布大都在 250 bp ~ 1 kb.

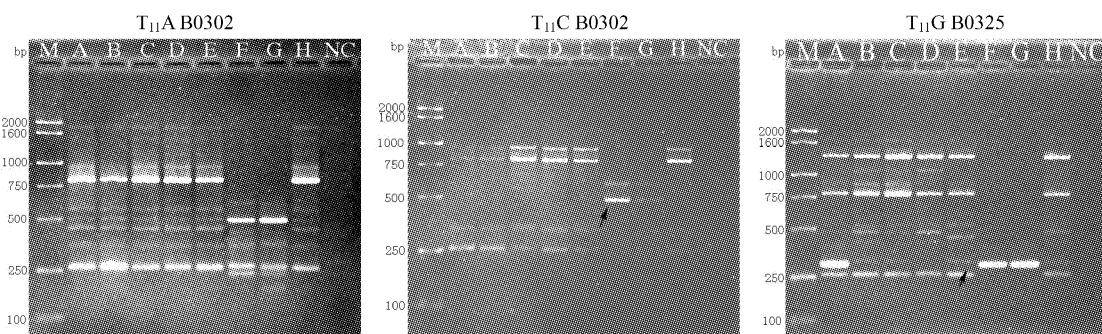


图 1 DDRT - PCR 部分扩增结果

Fig. 1 Partial amplification results of differential display RT - PCR

A: 低温胁迫前; B、C、D、E、F、G、H: 低温胁迫 0.5、1、2、3、6、12、24 h. 下同. T₁₁A B0302、T₁₁C B0302 和 T₁₁G B0325 表示锚定引物为 T₁₁A、T₁₁C 和 T₁₁G, 随机引物分别为 B0302、B0302 和 B0325. M: 分子量标记 (100 bp Ladder, 大连 Takara 公司); NC: 阴性对照; →: 信号被增强或被诱导的 DNA 片段. A; B, C, D, E, F, G, H: Cold stress for 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, respectively. The same below. T₁₁A B0302, T₁₁C B0302 and T₁₁G B0325 mean that the anchored primers are T₁₁A, T₁₁C and T₁₁G, and the random primers are B0302, B0302 and B0325. M: 100 - bp DNA marker from Takara Corp. NC: Negative control. →: Enhanced or induced ESTs

分析 72 个电泳展示图谱可以发现, 低温胁迫 0.5 h 就可以产生差异显示片段, 但只有少数基因在表达上产生了差异, 大部分基因的表达并没有很大的改变, 随后 1、2、3 h 持续的

低温胁迫只新产生少量的差异显示片段. 低温胁迫处理和对照在转录水平上的明显差异主要发生在低温胁迫 6、12、24 h. 从表 2 可以看出, 低温胁迫 6 h 或更长的时间, 对照中的 ESTs 至

少有 61.3% 沉默表达,但随着低温胁迫时间延长,又逐渐恢复表达.由此可见,低温胁迫一段时间后诱导某些基因沉默表达

是低温处理后香菇基因差异表达的主要特征.

表 2 不同低温胁迫时间 DDRT-PCR 扩增出的 ESTs 量
Table 2 Number of displayed bands by DDRT-PCR amplification during cold stress

低温胁迫时间 Duration under cold stress (t/h)	0 (CK)	0.5	1	2	3	6	12	24
实际扩增 ESTs 量 No. of displayed bands	568	557	545	534	560	220	302	394

2.2 基因差异表达类型比较

香菇菌丝在 10 °C 低温胁迫下基因差异表达表现为量和质的差异,量的差异表现为低温胁迫后 mRNA 的丰度增强或减弱,即增强表达型 (enhanced expression, EE, 图 2-a) 和减弱表达型 (partially depressed expression, DE, 图 2-b). 质的差异表现为低温胁迫后,对照 (或前面的处理) 的电泳展示中未出现的 ESTs 在随后的处理中被诱导出,归纳为特异诱导表达型 (specially induced expression, IE, 图 2-c); 另一种表现为对照 (或前面的处理) 中表达的 mRNA, 经过一定时间的低温胁迫处理后不再表达,称为沉默表达型 (silent expression, SE, 图 2-

d).

从实际扩增的 ESTs 数量来看 (表 2), SE 型为基因差异表达的最多类型,与对照相比,该类型主要出现在低温胁迫 0.5 h 和 6 h, 低温胁迫 0.5、1、2、3 h 等 4 个处理之间在所有的展示结果中未出现 SE 型的差异表达. 另一个基因差异表达主要类型是 IE 型,在 72 个电泳图谱中,只有一个图谱在低温胁迫 3 h 出现 IE 型的差异表达,其他所有 IE 型差异显示均出现在低温胁迫 6、12、24 h 的处理中. 在低温胁迫处理 0.5、1、2、3 h, 以 EE 型和 DE 型差异表达为主. 总体上看, SE 型和 IE 型差异表达的 ESTs 数量要远远多于 EE 型和 DE 型.

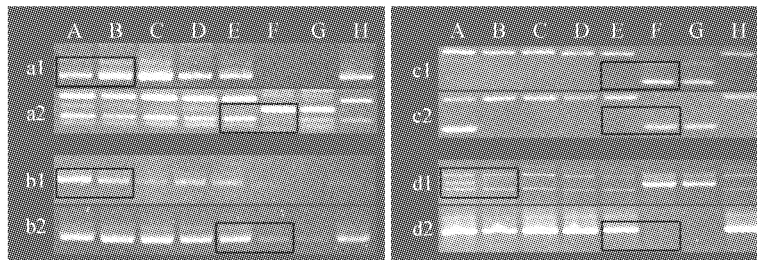


图 2 低温胁迫下香菇基因差异表达类型

Fig. 2 Expression type of differential display ESTs from *L. edodes* under cold stress

a: 增强表达型 Enhanced expression; b: 抑制表达型 Partially depressed expression; c: 特异诱导表达型 Specially induced expression; d: 沉默表达型 Silent expression. 矩形框标示差异显示的 ESTs The differential display ESTs are indicated in rectangle frame

2.3 差异表达序列标签的多态性分析

低温胁迫时间不同使差异 ESTs 呈现多态性,这种多态性反应了差异基因表达的时间顺序. 具体特征表现为:

(1) 低温胁迫 0.5、1、2、3 h, mRNA 的丰度逐渐降低,表现为典型的 DE 型特征;低温胁迫 6 h, 呈 SE 型特征,条带消失;低温胁迫 12、24 h 时,信号恢复,分别表现为 IE 型和 EE 型 (图 3-a). 电泳展示结果表明,对照中绝大多数表达信号在低温胁迫 3 h 期间没有发生变化,而是在低温胁迫 6 h 时,表达信号才开始减弱 (图 3-b) 或消失 (图 3-c),然后在低温胁迫 24 h 时减弱或沉默的信号又被重新激活. 一个 EST 呈现 DE (或 SE)、EE (或

IE) 两种差异表达类型. 但对照中极少量的 ESTs 在低温胁迫 0.5 h 就开始沉默表达,在低温处理 3 h 又恢复表达 (图 3-d).

(2) 对照的 ESTs 表达信号在低温胁迫后加强,随着低温胁迫时间的延长,信号又消失,低温胁迫 24 h 信号又被诱导表达 (图 3-e). 对照中沉默表达而在处理中被特异诱导的 ESTs 全部出现在低温胁迫 3 h 以上的处理中 (图 3-f, g),在低温胁迫 0.5、1、2 h 的处理中未发现差异显示的 IE 型 ESTs.

(3) 低温处理 24 h 所展示的 IE (或 EE 型) 差异 ESTs, 全部在对照或低温处理 0.5~3 h 的 ESTs 中出现过 (图 3-a, b, c, d, e, g), 在 76 个电泳图谱中未发现例外.

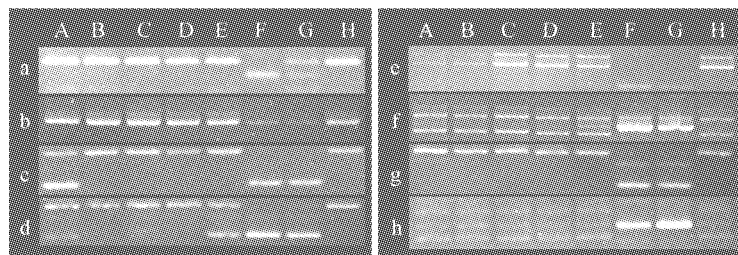


图 3 低温胁迫下差异显示的 ESTs 多态性

Fig. 3 Polymorphism of differential display ESTs under cold stress

a~h 表示差异的 ESTs 不同表达特征 a~h indicate the characteristics of differential display ESTs under cold stress

2.4 差异 cDNA 片段的序列分析与 Northern 杂交

为了避免 mRNA 差异显示条带中可能含有一条以上分子量相似的片段,并减少可能的假阳性,本实验先将差异显示片段进行 TA 克隆并测序,然后再将其进行 Northern 杂交检验,此方法可节省对差异显示片段进行检验和序列分析的时间^[8]。

选择 15 个具有代表性的 ESTs 经由 pGEM-T 载体系统克隆测序,有两个来自于不同引物组合的扩增产物序列相同,共获得 14 个有明确序列的 ESTs。利用 BLAST 与 NCBI 数据库序列进行同源性比较,14 个 ESTs 仅有 4 个与 NCBI 数据库中的基因或基因片段序列具有较高的同源性($E < 1 \times 10^{-5}$),占 28.57%;而 71.43% 具有较低的同源性或不具有同源性,这些 ESTs 可能是新发现于香菇中的表达序列标签。

用低温胁迫处理 6 h 获得的差异 EST (引物组合为 T₁₁C-B0302) 制备探针与低温胁迫不同时间的菌丝 RNA 做 Northern 杂交,与对照相比呈阳性反应(图 4),且杂交信号强弱变化与图 1 差异显示条带的变化一致。以该 EST 序列为基础,可以获得一个与香菇低温胁迫应答反应相关的全长 cDNA。

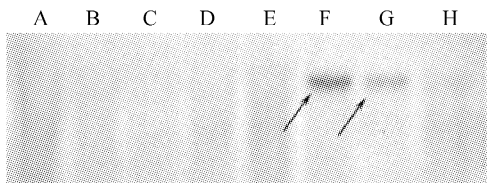


图 4 采用 IE 型差异 EST 为探针进行 Northern 杂交结果

Fig. 4 Northern blotting using specially induced EST as probe “→”所示为探针与 RNA 杂交印迹 → Indicating Northern blotting of special primer and total RNA

3 讨论

由差异 ESTs 的类型及多态性变化规律可以看出,低温胁迫 6~12 h 可能为香菇菌丝应答低温胁迫反应的重要时段。由于低温胁迫可诱发香菇原基的发生^[9],因而低温胁迫 6~12 h 所获得的差异 ESTs 的数量和类型可作为反应香菇菌丝由营养生长向生殖生长过渡的一个重要的参考指标。日本菌物学者 Matsumoto^[10] 比较了不同水温处理对出菇的影响,发现少于 0.5 h 的低温处理不出菇,处理 1 h 后有 20% 出菇,处理 6 h 后全部出菇,处理 12~24 h 效果最佳、最可靠。香菇应答低温胁迫反应后,差异显示的 ESTs 多态性变化与 Matsumoto 等人的结实性试验结果一致,可初步判断所获得的差异 ESTs 与诱发子实体形成的某些内源因子有着必然的联系,这些未知的内源因子或是受差异表达基因的调控,或是这些基因的翻译产物。

香菇菌丝低温胁迫处理后差异 ESTs 类型以及类型变化的复杂性说明,低温胁迫对子实体形成的诱导作用可能是多层次的、交互的。在已测序的 14 个 ESTs 中,仅有 4 个 ESTs 在数据库中找到同源性序列,且 3 个具有较高同源性序列为未知功能的基因片段。而 14 个 ESTs 与已报道的与子实体形成密切相关的基因,如香菇漆酶基因^[11]、细胞色素 P450 基因^[12]、疏水蛋白基因^[13] 都没有同源性,这一方面因为是测定序列的 ESTs 数

量不够,另一方面是除低温诱导因素以外,还有大量的内外界因子影响子实体的发生。基因的表达在程序、时间与部位等不同层次上受不同的环境因素及不同的调控元件联合控制,既存在着差异表达,也存在着协同作用。香菇低温胁迫诱导原基形成是多个基因协同作用和差异表达的结果;一些基因在低温胁迫时受到诱导而表达,另一些基因因为低温胁迫表达受到抑制。要了解香菇低温胁迫应答过程中差异表达基因的功能及其调控子实体形成的机制,必须得到全长的基因序列并研究其功能。

References

- Ooi VEC, Liu F, Liu F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Inter J Med Mush*, 1999, **1** (3): 195~206
- Leatham GF, Stahamann MA. Effect of light and aeration on fruiting of *Lentinula edodes*. *Trans Br Mycol Soc*, 1987, **88** (1): 9~20
- Ishikawa H. Physiological and ecological studies on *Lentinus edodes* (Berk. Sing). *J Agri Lab (Abiko, Japan)*, 1967, **8**: 1~57
- Song CH, Cho KY. Growth stimulation and lipid synthesis in *Lentinula edodes*. *Mycologia*, 1989, **81** (4): 514~522
- Matsumoto T. Changes in activities of carbohyarases, phosphorylase, proteinases and phenol oxioases during fruiting of *Lentinus edodes* in sawdust culture. *Rept Tottori Mycol Inst*, 1988, **26**: 46~54
- Okeke BC, Paterson A, Smith JE, Watson-Craik IA. The relationship between phenol oxidase activity, soluble protein and ergosterol with growth of *Lentinus* species in oak sawdust logs. *Appl Microbiol & Biotechnol*, 1994, **41** (1): 28~31
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 31~51
- Hao CY (郝纯毅), Zhao M (赵敏), Li Yong (李勇), Xing BC (邢宝才), Lu YY (吕有勇), Huan XF (黄信孚). A technique to decrease the false positive rate of differential display PCR. *Chin J Biochem & Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2002, **18** (1): 110~114
- Huang NL (黄年来). *Shitake Cultivation in China*. Shanghai (上海): Shanghai Scientific and Technological Literature Publishing House (上海科技文献出版社), 1994. 58~60, 64~66
- Matsumoto T. Effect of immersion of sawdust substrate in water on formation of *Lentinus edodes*. *Trans Mycol Soc Japan*, 1988, **29**: 265~270
- Zhao J, Kwan HS. Characterization, molecular cloning and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Appl & Environ Microbiol*, 1999, **65** (11): 4908~4913
- Akiyama R, Sato Y, Kajiwara S, Shishido K. Cloning and expression of cytochrome P450 genes, belonging to a new P450 family, of the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66** (10): 2183~2188
- Nishizawa H, Miyazaki Y, Kaneko S, Shishido K. Distribution of hydrophobin 1 gene transcript in developing fruiting bodies of *Lentinula edodes*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66** (9): 1951~1954