

尖孢镰刀菌 *Six1d* 启动子的克隆及其在真菌分泌表达载体构建中的应用

彭存智¹, 常丽丽¹, 王丹¹, 黄超¹, 徐兵强^{2*}, 仝征^{1*}

1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 2. 中国热带农业科学院海口实验站(热带果树研究所), 海南海口 571101

摘要: 前期研究中构建的真菌分泌表达载体 p74HSP-EGFP 可在真菌中表达目标蛋白, 在真菌侵染并定殖植物的过程中分泌目标蛋白到植物中, 从而验证目的基因的功能, 但 p74HSP-EGFP 载体中驱动目的基因表达的毒素基因 (*ToxA*, *ToxA*) 启动子不是尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc) 自身的启动子。为能在 Foc 中更有效地表达其自身基因, 本研究从尖孢镰刀菌 1 号生理小种 (Foc1) 中克隆到高丰度表达的木质部分泌蛋白基因 (*secreted in xylem 1d*, *Six1d*) 的启动子, 来替换 p74HSP-EGFP 载体中的 *ToxA* 启动子, 并将新构建的真菌分泌表达载体命名为 pSix1d74HSPG。为比较 2 个分泌载体的表达效率, 本研究进一步将 p74HSP-EGFP 和 pSix1d74HSPG 载体转化尖孢镰刀菌热带 4 号生理小种 (Foc TR4), 获得的转化菌株分别在钾盐液体培养基 (KK) 中振荡培养 5 d 后, 检测分泌到胞外的 EGFP 荧光强度和 EGFP 蛋白的表达量。结果显示, pSix1d74HSPG 中 *Six1d* 启动子驱动的 EGFP 表达强度能够达到 p74HSP-EGFP 中 *ToxA* 启动子驱动的 1.6~1.7 倍, 说明 pSix1d74HSPG 载体可代替 p74HSP-EGFP 载体在 Foc 中更高效分泌表达目的蛋白, 为香蕉枯萎病抗感病分子机理研究提供重要的实验工具。

关键词: 香蕉枯萎病; 内源启动子; 分泌表达载体; *Six1d* 蛋白

中图分类号: S436.68 文献标识码: A

Cloning of *Six1d* Promoter of *Fusarium oxysporum* and Its Application in the Construction of Fungal Secretory Expression Vector

PENG Cunzhi¹, CHANG Lili¹, WANG Dan¹, HUANG Chao¹, XU Bingqiang^{2*}, TONG Zheng^{1*}

1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2 Haikou Experimental Station (Institute of Tropical Fruit Tree Research), Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: The fungal secretory expression vector p74HSP-EGFP constructed in a previous study can express the target gene in fungal pathogens and secrete the target protein into plants during fungal infection and colonization, thus verifying the function of the target gene. However, the promoter of toxin A gene (*ToxA*) driving the target gene in p74HSP-EGFP is not an endogenous promoter of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc). For more efficient expression of target genes in Foc, the promoter of secreted in xylem 1d (*Six1d*), which is highly expressed in Foc, was cloned using the genomic DNA of Foc race 1 (Foc1) as a template, replacing the *ToxA* promoter in p74HSP-EGFP, and the newly constructed fungal secretory vector was named pSix1d74HSPG. Foc tropical race 4 (Foc TR4) was transformed by p74HSP-EGFP and pSix1d74HSPG. The transformed strains were cultured in potassium salt liquid medium (KK) containing 100 µg/ml hygromycin for 5 days, respectively. The fluorescence intensity and the abundance of EGFP protein

收稿日期 2022-05-17; 修回日期 2022-08-09

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC707, No. 321RC635); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630052022010)。

作者简介 彭存智 (1972—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 香蕉枯萎病抗感病机理。*通信作者 (Corresponding author): 徐兵强 (XU Bingqiang), E-mail: xubingqiang@itbb.org.cn; 仝征 (TONG Zheng), E-mail: tongzheng@foxmail.com。

secreted outside the cell were detected. The results showed that the expression intensity of EGFP driven by *Six1d* promoter in p*Six1d*74HSPG was 1.6–1.7 times of that driven by *ToxA* promoter in p74HSP-EGFP, which could replace the p74HSP-EGFP vector for more efficient expression and secretion of target proteins in *Foc* for functional characterization. Our work provides an important experimental tool for the study of the molecular mechanism of resistance and susceptibility to *banana fusarium wilt*.

Keywords: banana fusarium wilt; endogenous promoter; secretory expression vector; *Six1d* protein

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.06.014

香蕉枯萎病是危害香蕉产业的重要病害，而尖孢镰刀菌古巴营养专化型 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Foc*) 是引起这种病害的病原真菌，可导致香蕉严重减产，甚至绝收。根据对不同香蕉品系的致病性 *Foc* 可细分为 4 个生理小种，包括 1 号小种 (race 1, *Foc1*)、2 号小种 (race 2, *Foc2*)、3 号小种 (race 3, *Foc3*) 和 4 号小种 (race 4, *Foc4*)，其中 *Foc4* 具有广泛的寄主范围，根据病害发生是否受冷害胁迫以及发生的地理区域可进一步区分为热带 4 号小种 (tropical race 4, *Foc TR4*) 和亚热带 4 号小种 (subtropical race 4, *Foc STR4*)^[1-3]。*Foc TR4* 在所有生理小种中致病性最强对我国南方香蕉主产区危害最大，尤其对 Cavendish 系列香蕉有致命的侵害作用^[3]。Cavendish 香蕉是国内目前栽培面积最大、产量最多的品种群，但市场欢迎度较高的一些品种 (如巴西蕉等)，对 *Foc TR4* 极度易感^[4]。通过引进和自选获得的一些抗枯萎病栽培品种 (如南天黄等) 虽然对 *Foc TR4* 具有一定的抗性，但这类抗病性易受环境影响，且植株的发病率会随着土壤中 *Foc TR4* 孢子含量的增加而显著上升^[5]。因此，加强对香蕉枯萎病抗感病机制研究将有助于培育香蕉枯萎病抗性新品种。病原菌在侵染寄主植物致病的过程中，会分泌一系列蛋白质、酶和毒素阻止植物的防御反应，从而有利于自身的生存和繁殖^[6-7]，而植物免疫系统可通过识别某些分泌蛋白来产生抗病性^[8]。在 *Foc* 的研究中，人们通过观察携带真菌表达载体 pCT74 的 *Foc1* 和 *Foc TR4* 侵染香蕉根部的过程，已经阐释了一些 *Foc* 的致病机制^[9]。

研究发现，丝状真菌在表达某些内源基因时的产量特别高，表明丝状真菌基因组中存在强启动子，能够驱动内源基因的高效表达^[10-11]。使用内源强启动子有利于在体内高效、稳定、特异地表达外源目标基因^[12]。已报道的丝状真菌启动子有瑞氏木霉纤维二糖水解酶基因 (cellobiohydro-

lase, *cbh1*) 启动子，构巢曲霉的甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *gpdA*) 启动子，曲霉葡糖淀粉酶基因 (glucoamylase, *glaA*) 启动子^[13]，橡胶树白粉菌 (HO-73) 启动子^[14]等。本研究团队前期已将 *Foc1* 高丰度分泌表达蛋白 secreted in xylem 1d (*Six1d*)^[15] 的 N 端分泌信号肽连接至常用真菌表达载体 pCT74 中，构建了新型真菌分泌载体 p74HSP-EGFP，该载体可将绿色荧光蛋白 EGFP 分泌至 *Foc TR4* 菌体外，并在 *Foc TR4* 菌株侵染香蕉过程中将 EGFP 蛋白分泌到香蕉根部^[16]。为了能在 *Foc* 菌株中更高效表达内源基因，本研究在已有的 p74HSP-EGFP 载体基础上，克隆到 *Foc1 Six1d* 基因的启动子，并替换 p74HSP-EGFP 载体中的 *ToxA* 启动子，将 p74HSP-EGFP 进一步改造为由 *Foc* 内源启动子驱动的分泌表达载体。通过比较 *ToxA* 启动子和 *Six1d* 启动子驱动绿色荧光蛋白的荧光强度以及表达丰度，证明 *Six1d* 启动子在 *Foc* 中的表达活性比 *ToxA* 启动子高，为后续研究 *Foc* 致病相关蛋白或抗病相关外源蛋白在香蕉枯萎病中的作用机理提供重要的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 *Foc1* 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所曾会才博士提供，*Foc TR4* 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所周登博博士提供，非分泌型真菌表达转化菌株 *Foc TR4*-HPG 由本实验室保存。用于载体构建的大肠杆菌菌株 DH5 α 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.1.2 质粒 真菌表达载体 p74HSP-EGFP 由本实验室构建和保存^[9]，该载体含有潮霉素 B 磷酸转移酶基因 (*hygR*)，增强型绿色荧光基因 (*EGFP*)，来源于小麦黄斑病菌 (*Pyrenophora tritici-repentis*) 的 *ToxA* 启动子^[17]，以及来源于

Foc1 的 *Six1d* 蛋白分泌信号肽。

1.1.3 培养基及试剂 LB 培养基: 10 g/L NaCl, 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物; 土豆液体培养基 (PDB): 200 g 土豆切丝, 加水煮沸 15~20 min, 纱布过滤, 加入 20 g 蔗糖, 定容到 1 L, 高温灭菌; 土豆琼脂培养基 (PDA): PDB 中添加 9 g/L 琼脂粉; 液体再生培养基: PDB 中添加 274 g/L 蔗糖; 固体再生培养基: 液体再生培养基中添加 9 g/L 琼脂粉; 钾盐液体培养基 (KK): 1.0 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L KCl, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g/L Fe-Na EDTA, 2.0 g/L 天门冬酰胺和 10.0 g/L D-半乳糖, pH 5.0; 溶酶液: 0.1 mol/L NaH_2PO_4 , 0.8 mol/L NaCl, pH 5.8; 酶解液: 10 mg/mL 崩溃酶 (Driselase, Sigma), 10 mg/mL 溶壁酶 (Lysing Enzyme, Sigma), 加入溶酶液, 80 r/min 摇床振荡溶解 30 min, 过滤除菌。原生质体转化相关试剂: 0.8 mol/L NaCl 溶液; STC 溶液: 1.2 mol/L Sorbitol, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5),

50 mmol/L $CaCl_2$, 过滤除菌; 60% PTC 溶液: STC 溶解 PEG4000 配制成 60% 溶液, 过滤除菌。

1.2 方法

1.2.1 真菌基因组 DNA 的提取 取直径约 5 mm 的真菌菌盘接种到 20 mL 的 PDB 液体培养基中, 28 °C, 200 r/min 震荡培养 3 d, 过滤收集菌丝。分别称取 100 mg 菌丝到 2 mL 离心管中, 置于液氮中冷冻 2 min, 用高速组织研磨仪破碎菌丝 (Servicebio, China), 最后用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen, China) 进行真菌基因组 DNA 的提取。

1.2.2 *Six1d* 启动子的扩增 根据 Foc1 基因组测序序列 (GenBank No. KB730415.1) 中 *Six1d* 基因上游序列设计特异引物对 (表 1), 以 Foc1 基因组 DNA 为模版, 通过 PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara, Japan) 扩增 *Six1d* 启动子, 反应条件为: 94 °C 10 s, 58 °C 15 s, 72 °C 20 s, 共 32 个循环。扩增产物纯化后保存备用。

表 1 引物信息
Tab. 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	注释 Annotation
Six1dPro-F	AAA <u>AATCGAT</u> ATCATCTGTA ACTCGC	<i>Six1d</i> 启动子克隆引物
Six1dPro-R	CTTGTCGAAAGCTCAAAATCCGG	
EGFP-F	CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG	EGFP 检测引物
EGFP-R	CACGAACTCCAGCAGGACCATG	

注: 引物中带下划线序列为限制性内切酶 *Cla* I 的酶切识别位点。

Note: The underlined sequence in the primer is the recognition site of restriction endonuclease *Cla* I.

1.2.3 p*Six1d74HSPG* 载体的构建, 测序和启动子元件分析 p74HSP-EGFP 载体的 *ToxA* 启动子区域通过 *Hind* III 酶切后补平, 再用 *Cla* I 酶切, 切除 *ToxA* 启动子。将扩增获得的 *Six1d* 启动子序列片段同样用 *Cla* I 酶切, 连接进 p74HSP-EGFP 载体片段中, 构建得到完整的载体 p*Six1d74HSPG*。载体转化大肠杆菌 DH5 α , 寄送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。测序结果提交到 <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>, 进行启动子元件在线分析。

1.2.4 原生质体制备及转化 主要参考黄东杰等^[18]的方法, 并进行适当的改良。接种 Foc TR4 菌株到 20 mL PDB 液体培养基中, 28 °C, 200 r/min 摇床培养 3~4 d。3 层无菌擦镜纸过滤菌液, 滤液转移到 100 mL PDB 中扩大培养 10~12 h。3 层无菌擦镜纸过滤菌液收集菌丝, 无菌水冲洗 2 遍,

0.8 mol NaCl 溶液冲洗 2 遍。菌丝转移到 250 mL 无菌三角瓶中, 称重, 按照每 0.2 g 菌丝加入 10 mL 酶解液的比例进行酶解, 28 °C, 80 r/min 摇床避光酶解 3.5 h。酶解的菌液用 5 层无菌擦镜纸过滤, 预冷 0.8 mol NaCl 溶液冲洗并收集到 50 mL 离心管中, 4 °C, 5000 r/min 离心 15 min。弃上清, 加入 5 mL 预冷的 STC 溶液重悬, 4 °C, 5000 r/min 离心 15 min。弃上清, 加入适量的 STC 溶液重悬, 使原生质体浓度至约 1×10^8 CFU/mL。按照 200 μ L 原生质体、50 μ L 质粒或 DNA (5~10 μ g)、50 μ L PTC 的顺序加入 15 mL 离心管中, 混匀后冰浴 30 min。加入 2 mL PTC, 混匀后室温放置 20 min。加入 3 mL 液体再生培养基, 混匀后 28 °C, 光照静置培养 12~14 h。5000 r/min 离心 15 min, 弃上清 4 mL, 剩余菌液重悬后转入 40 mL 融化的固体再生培养基 (45~55 °C) 中, 混匀后倒入 9 mm 培

养皿，凝固后再倒入含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 的 PDA 培养基。3~5 d 后长出转化子，将转化子转至新的含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 的 PDA 培养基上进行再次筛选。重复转接 3~4 次，以获得性状稳定的转化菌株。

1.2.5 真菌表达载体转化菌株的鉴定 转化菌株接种到 20 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 的 PDB 中，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min 震荡培养 3 d，按照前面所述方法收集菌丝并提取真菌基因组 DNA。根据 *EGFP* 基因序列设计特异引物对（表 1），通过 PCR 反应检测携带 *EGFP* 基因的真菌表达载体是否成功导入 Foc TR4。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s，共 32 个循环，扩增产物为 646 bp DNA 片段。

1.2.6 菌液的显微镜荧光观察以及荧光强度和 EGFP 蛋白含量变化的检测 将转化菌株分别接种到 200 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 的 KK 液体培养基中，在 28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 r/min 条件下摇床振荡培养，每 24 h 分别吸取 20 μL 菌液进行荧光显微镜（Olympus, USA）观察。培养到第 5 天，通过紫外可见分光光度计（Techcomp, China）测定菌液浓度，用 KK 液体培养基统一稀释到 $OD_{600}=1.5$ 的浓度，各取 50 mL 菌液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。分别吸取 200 μL 过滤后的溶液，通过全波长多功能酶标仪（Bio-Tek, USA）检测溶液的荧光强度值（激发波长为 488 nm，发射波长为 528 nm）。以上数据检测重复 3 次。同时采用本实验室改进的蛋白提取方法^[19]提取上述过滤后液体培养基中的总蛋白，用 BRADFORD^[20]的方法测定蛋白浓度。分别取 20 μg 总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，Image scanner III 图像扫描系统

（GE, USA）扫描凝胶获取图片，并利用 ImageJ 软件计算蛋白质条带的灰度值^[21]，获得 EGFP 蛋白表达量的相对变化。Western blot 检测采用 TONG 等^[22]描述的方法进行，利用 GFP 兔单克隆抗体（Beyotime, China）检测 EGFP 蛋白的表达量。以上荧光强度和 EGFP 蛋白含量变化的检测实验均重复 3 次。

1.3 数据处理

以 Excel 2010 软件的统计工具对数据进行均值和标准偏差分析。

2 结果与分析

2.1 *Six1d* 启动子的克隆，p*Six1d74HSPG* 载体的构建及顺式作用元件分析

以 Foc1 的基因组 DNA 为模版，通过特异引物 SixPro-F 和 SixPro-R 进行 PCR 扩增，获得 *Six1d* 启动子目的条带，纯化回收备用。同时利用 *Hind* III 限制性内切酶对分泌表达载体 p74HSP-EGFP 的 *ToxA* 启动子下游末端进行酶切，补平粘性末端。再用 *Cla* I 限制性内切酶酶切，切除 *ToxA* 启动子，获得载体片段。随后将克隆的 *Six1d* 启动子片段通过 *Cla* I 酶切后，连接进 p74HSP-EGFP 载体片段中，构建的新载体命名为 p*Six1d74HSPG*（图 1）。

将携带 p*Six1d74HSPG* 载体的 DH5 α 菌株寄送至生物工程（上海）股份有限公司测序，测序结果表明，克隆的 *Six1d* 启动子片段序列长度为 1999 bp，与公布的 Foc1 基因组（Accession No. KB730415）中的序列一致。将序列提交到启动子元件预测分析网站 Plant CARE^[23]进行分析。结果表明，启动子中除了 CAAT-box、TATA-box 等核心元

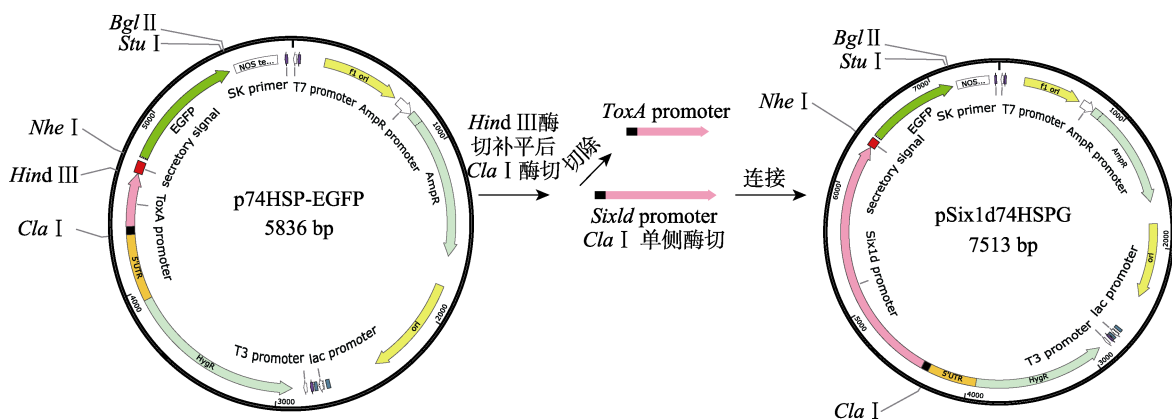
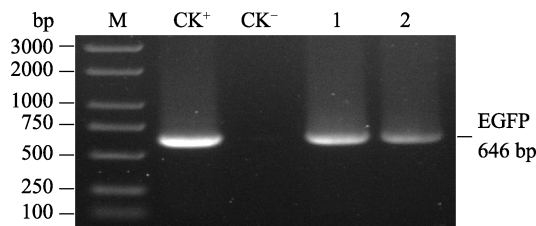


图 1 *Six1d* 启动子驱动的真菌分泌表达载体 p*Six1d74HSPG* 的构建

Fig. 1 Construction of fungal secretory expression vector p*Six1d74HSPG* driven by *Six1d* promoter

2.2 p74HSP-EGFP 和 pSix1d74HSPG 载体对 Foc TR4 菌株的转化及 PCR 鉴定

真菌分泌表达载体 p74HSP-EGFP 和 pSix1d74HSPG 转化 Foc TR4 的原生质体后,将长出的转化菌株转至新的含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 的 PDA 培养基上进行再次筛选。培养 5 d 后,挑选并接种正常生长的转化菌株到 PDB 中继续培养,然后收集菌丝提取基因组 DNA,通过 *EGFP* 基因特异引物对(表 1)进行 PCR 鉴定。对鉴定成功的阳性转化菌株进行转接培养,重复 2~3 次,获得性状稳定的阳性转化菌株,分别命名为 Foc TR4-HSPG 和 Foc TR4-Six1dHSPG。PCR 鉴定结果显示,从 Foc TR4-HSPG 和 Foc TR4-Six1dHSPG 菌株 DNA 中均能扩增出 646 bp 的 *EGFP* 基因片段,表明真菌表达载体 p74HSP-EGFP 和 pSix1d74HSPG 已成功转入 Foc TR4 菌株中(图 3)。



M: DL2000 plus DNA marker; CK⁺: pSix1d74HSPG; CK⁻: Foc TR4; 1: Foc TR4-HSPG; 2: Foc TR4-Six1dHSPG.

图 3 真菌分泌表达载体转化 Foc TR4 菌株的 PCR 鉴定
Fig. 3 PCR identification of Foc TR4 strain transformed by fungal secretory expression vector

2.3 转化菌株的荧光显微镜观察

分别将 Foc TR4 野生型菌株, Foc TR4-HPG、Foc TR4-HSPG 和 Foc TR4-Six1dHSPG 转化菌株接种到 KK 液体培养基中振荡培养,培养期间每隔 24 h 吸取菌液通过荧光显微镜进行观察(图 4)。结果显示,在明场的可见光下,不同时期菌丝生长形态均表现正常,没有明显区别(图中仅显示培养 120 h 的明场图片)。在 488 nm 激发光下, Foc TR4 野生型菌落不发绿色荧光; Foc TR4-HPG 携带的是非分泌型真菌表达载体,菌丝能发出明亮的绿色荧光,但没有明显的荧光背景,只是在培养后期可能由于 EGFP 蛋白的逸出,才出现微弱的荧光背景; Foc TR4-HSPG 和 Foc TR4-Six1dHSPG 携带的是分泌型真菌表达载体,在培养早期就由于表达并分泌 EGFP 蛋白而出现绿色荧光背景,随着培养时间的增加,荧光背景逐渐增强,其中 Foc TR4-Six1dHSPG 的荧光背景更加

明亮。结果表明 Foc TR4-HSPG 和 Foc TR4-Six1dHSPG 菌株在液体培养过程中表达的 EGFP 绿色荧光蛋白不断分泌到培养基中,导致液体培养基中出现明显的绿色荧光背景。Foc TR4-Six1dHSPG 的绿色荧光背景比 Foc TR4-HSPG 的更加明亮,表明 Foc TR4-Six1dHSPG 中的 EGFP 表达量更高,分泌到液体培养基中的 EGFP 蛋白相应更多。

2.4 液体培养基荧光强度的测定和分析

转化菌株在培养过程中不断分泌 EGFP 蛋白到液体培养基中,影响培养基的荧光强度。因此,测定液体培养基的荧光强度可间接反映 EGFP 表达量的差异,从而比较 *Six1d* 启动子与 *ToxA* 启动子驱动 EGFP 表达的活性强度差异。为此,进一步检测了培养 120 h 的不同菌株液体培养基荧光强度。结果显示, Foc TR4 的液体培养基滤液荧光强度值为 3059.25 ± 49.04 ; Foc TR4-HSPG 的荧光强度值为 $84\ 560.25 \pm 1161.16$, 是 Foc TR4 野生型菌株的 27.6 倍; Foc TR4-Six1dHSPG 的荧光强度值为 $138\ 572.5 \pm 1987.32$, 是 Foc TR4-HSPG 菌株的 1.6 倍(图 5)。以上研究结果说明 pSix1d74HSPG 载体中的 *Six1d* 启动子活性高于 p74HSP-EGFP 载体中的 *ToxA* 启动子活性。

2.5 EGFP 蛋白表达检测和分析

采用本实验室改进的蛋白提取方法^[19],提取上述菌液过滤后液体培养基中的总蛋白。利用 Bradford 方法测定蛋白浓度后,取 15 μg 总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 6)。在 p74HSP-EGFP 和 pSix1d74HSPG 载体中,EGFP 的 N 端均加入了分泌信号肽序列,全长 271 个氨基酸,分子量约为 30.3 kDa。电泳结果显示, Foc TR4-HSPG 和 Foc TR4-Six1dHSPG 均有 EGFP 蛋白的表达,分子量大小和预估的 30.3 kDa 基本一致,而作为对照的 Foc TR4 野生型菌株中没有 EGFP 蛋白的表达条带(图 6A)。通过 ImageJ 软件计算 EGFP 蛋白条带的灰度值,结果显示, Foc TR4-HSPG 的 EGFP 蛋白条带灰度值为 $12\ 508.33 \pm 1063.94$, Foc TR4-Six1dHSPG 的 EGFP 蛋白条带灰度值为 $21\ 281.42 \pm 1868.97$, 是 Foc TR4-HSPG 的 1.7 倍,与之相对应的 Foc TR4-Six1dHSPG 的 EGFP 蛋白表达量也是 Foc TR4-HSPG 的 1.7 倍(图 6B),该结果和菌液中荧光强度值的倍数差异相似。

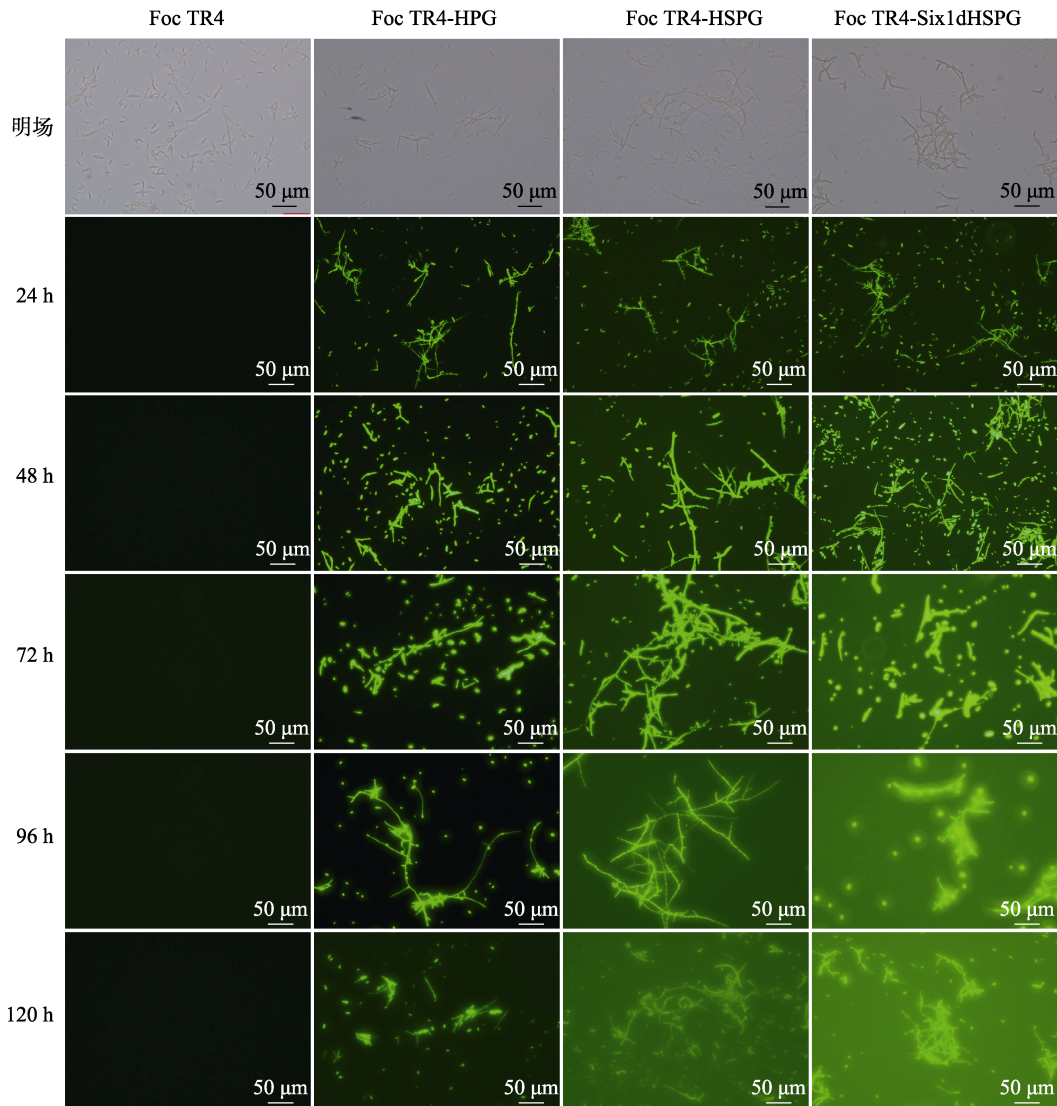
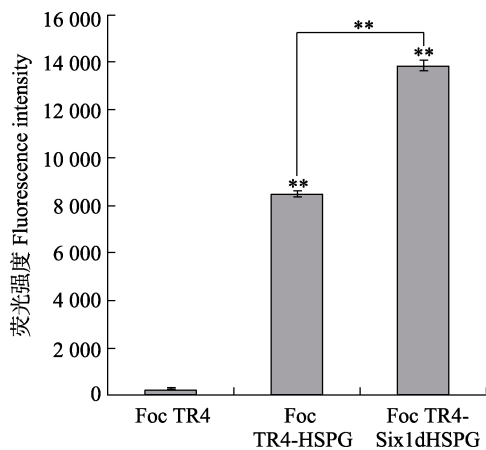


图 4 液体培养基中转化菌株的荧光显微镜观察

Fig. 4 Fluorescence microscopic observation of transformed strains in liquid medium



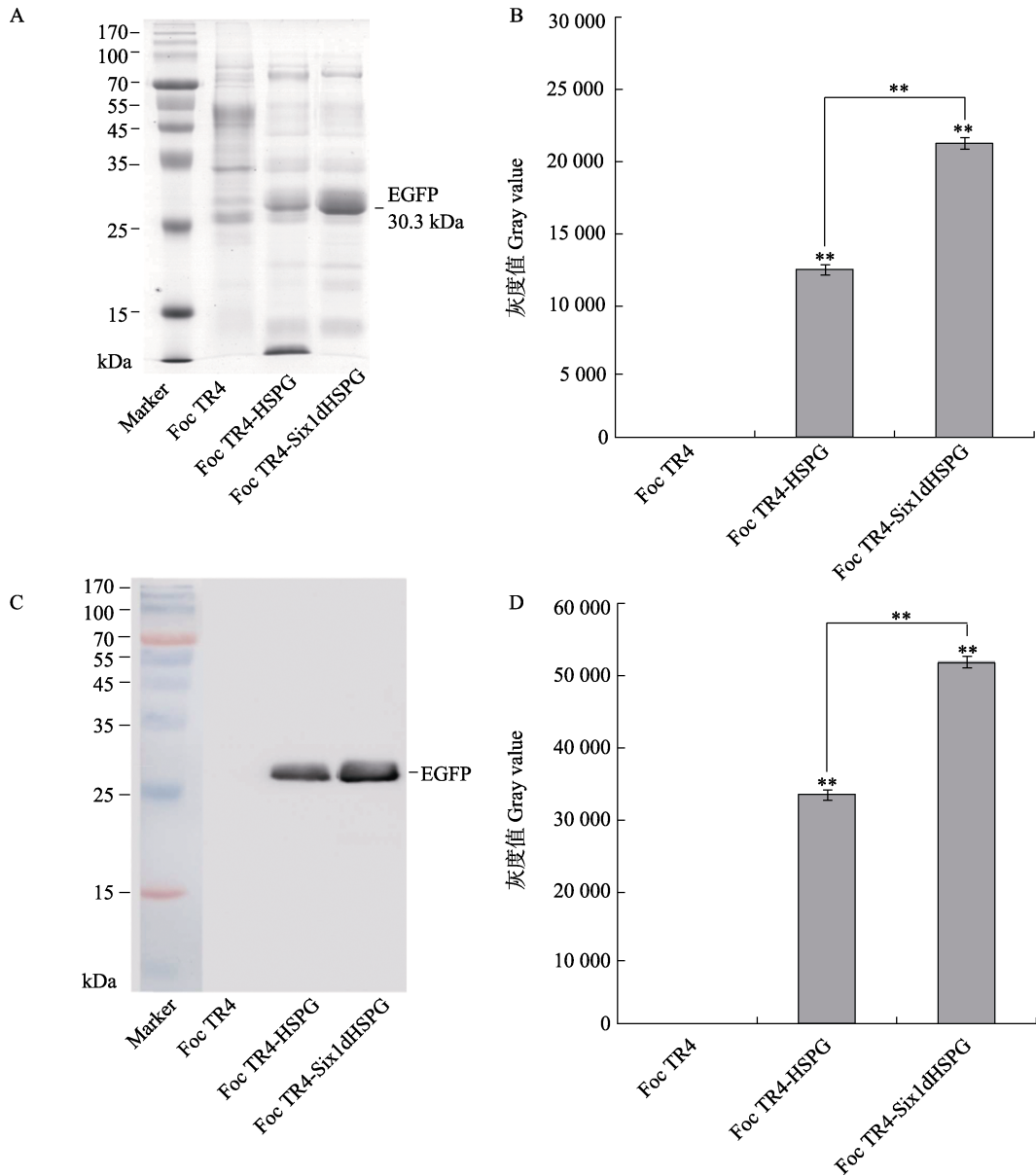
**表示处理间差异极显著 ($P < 0.01$)。

** indicates extremely significant difference among treatments ($P < 0.01$).

图 5 液体培养基中 EGFP 荧光强度测定

Fig. 5 Determination of EGFP fluorescence intensity in liquid medium

随后,通过 Western blot 来直接检测转化菌株分泌蛋白中 EGFP 蛋白的表达量,结果显示, Foc TR4-HSPG 和 Foc TR4-Six1dHSPG 均检测到 EGFP 蛋白的表达,而作为对照的 Foc TR4 野生型菌株中没有 EGFP 蛋白的表达条带(图 6C),这一结果与聚丙烯酰胺凝胶电泳的实验结果相同。进一步通过 ImageJ 软件计算 Western blot 膜上 EGFP 蛋白表达条带的灰度值,数据显示 Foc TR4-HSPG 的 EGFP 蛋白条带灰度值为 $29\ 164.39 \pm 429.73$, Foc TR4-Six1dHSPG 的 EGFP 蛋白条带灰度值为 $46\ 915.92 \pm 559.16$,是 Foc TR4-HSPG 的 1.61 倍(图 6D),这一数据结果和菌液中荧光强度值的倍数差异也比较一致。上述 EGFP 蛋白表达检测和分析结果表明,pSix1d74HSPG 载体中的 *Six1d* 启动子与 p74HSP-EGFP 载体中的 *ToxA* 启动



A: 菌液中总分泌表达蛋白的 PAGE 电泳; B: PAGE 电泳中 EGFP 蛋白条带的灰度值; C: 菌液中总分泌表达蛋白的 Western blot 检测; D: Western blot 检测中 EGFP 蛋白条带的灰度值。**表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

A: PAGE electrophoresis of total protein in liquid medium; B: Gray value of EGFP protein band in PAGE electrophoresis; C: Western blot detection of total protein in liquid medium; D: Gray value of EGFP protein band in Western blot detection. ** indicates extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

图 6 EGFP 蛋白表达检测

Fig. 6 EGFP protein expression detection

子相比有更高的表达活性。

3 讨论

香蕉枯萎病是危害香蕉产业的重要病害,通过对尖孢镰刀菌致病机理以及香蕉的抗病机制等方面的研究,已分离鉴定出一批相关基因。利用植物病毒表达载体^[24],农杆菌介导的表达载体^[25]和酵母表达载体系统^[26]等可以鉴定基因的功能,但存在许多局限性,同时这些鉴定方法操作程序

复杂,鉴定途径为非直接方式,鉴定结果容易出错等问题。

pCT74 是一种常用的真菌表达载体,携带潮霉素 Hyg 抗性筛选标记,利用 *ToxA* 启动子可在多种丝状真菌中高效表达绿色荧光蛋白,达到蛋白定位的目的,但只能在胞内表达,无法真实反映一些特异目标蛋白的功能^[17, 27]。因此,本研究团队已在 pCT74 载体的基础上,构建了携带分泌信号肽的真菌分泌表达载体 p74HSP-EGFP,该载

体可在真菌病原菌中表达携带的目的基因, 并在侵染植物的过程中将目的蛋白分泌到植物体内, 实现蛋白功能的验证^[16]。相对于利用香蕉遗传转化体系验证目标蛋白功能的传统方法, 利用真菌分泌表达载体的验证方法具有用时短、可操作性强、直观高效等优点。

近年来许多研究表明, 利用内源启动子表达外源基因往往具有更强的目的性, 更高的表达效率。卢姗等^[28]通过用马尔尼菲青霉菌微管蛋白 β 亚基基因启动子替换粗脉孢菌苯菌灵抗性基因启动子, 构建了苯菌灵抗性基因表达盒, 成功地运用于马尔尼菲青霉菌的遗传转化研究中。聂燕华等^[29]克隆了银耳芽孢内源甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *gpd*) 启动子, 与多功能纤维素基因 (multi-functional cellulose, *mfc*) 连接并构建表达载体, 转化银耳芽孢后, 酶活发酵试验表明多功能纤维素酶的表达量提高了 34.3%。真菌分泌表达载体 p74HSP-EGFP 中的 *ToxA* 启动子来源于小麦黄斑病真菌 (*Pyrenophora tritici-repentis*)^[17], 虽然在大部分真菌, 包括 *Foc* 中都可以启动基因的表达, 但为了在 *Foc* 中更高效地表达外源基因, *Foc* 自身的启动子可能会更加适合。本研究团队在前期对 *Foc1* 的分泌蛋白质组研究结果中发现, *Foc1* 在单独培养或与香蕉根共培养的过程中, *Six1d* 蛋白都能高效分泌表达^[15], 因此本研究先克隆到 *Six1d* 基因的启动子, 并替换 p74HSP-EGFP 中的 *ToxA* 启动子, 构建能够在尖孢镰刀菌中更好表达目的基因的真菌分泌表达载体 p*Six1d74HSPG*。

在基因工程中, 启动子的强度是决定外源蛋白表达的关键因素。启动子的强度可以通过研究转录因子对其序列的结合亲和力或评估启动子驱动的基因的表达水平来确定^[12]。本课题组研究的 2 种转化菌株携带的是真菌分泌表达载体, 转化菌株在培养过程中会在不断表达外源基因的同时, 将已合成的目的蛋白同步向细胞外分泌, 不会造成细胞内目的蛋白的过量积累, 只会增加培养基中目的蛋白的总量。因此在一定的培养时间范围内, 培养基中目的蛋白的总量和启动子的活性呈现一定的线性相关。在本研究中, 真菌分泌表达载体表达的 EGFP 绿色荧光蛋白在培养过程中不断分泌到液体培养基中, 随着培养基中 EGFP 荧光蛋白总量的提高, 逐步提高培养基的荧光背景, 从而可以通过检测培养基中 EGFP 荧光强度

的变化来判断启动子表达强度的差异。研究发现, 真菌分泌表达载体 p74HSP-EGFP 和 p*Six1d74HSPG* 的 *Foc TR4* 转化菌株 *Foc TR4-HSPG* 和 *Foc TR4-Six1dHSPG* 分别在 KK 液体培养基 (含潮霉素 B 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 中振荡培养 24 h 后, 就能观察到少量的荧光背景, 表明均有 EGFP 蛋白的表达并分泌到培养基中。随着培养时间的增加, 观察到的荧光背景也在逐步增强, 并且 *Foc TR4-Six1dHSPG* 产生的荧光背景高于 *Foc TR4-HSPG*。结合菌液过滤后上清液中的荧光强度以及 EGFP 蛋白表达量的检测数据, 进一步证实 *Foc TR4-Six1dHSPG* 菌液中的 EGFP 蛋白表达量是 *Foc TR4-HSPG* 的 1.6~1.7 倍。

以上研究结果表明, 新构建的真菌分泌表达载体 p*Six1d74HSPG* 中的 *Six1d* 内源启动子拥有完整的启动子功能, 表达强度显著高于 p74HSP-EGFP 载体中的 *ToxA* 启动子, 具有明显的内源表达优势, 达到 *ToxA* 启动子的 1.6~1.7 倍。p*Six1d74HSPG* 载体完全能够代替原来的 p74HSP-EGFP 载体, 可以在 *Foc* 中更高效表达并分泌目的蛋白, 从而为香蕉枯萎病抗感病分子机理研究提供重要的实验工具。

参考文献

- [1] PLOETZ R C. Panama disease: an old nemesis rears its ugly head: Part 1. the beginnings of the banana export trades[J]. *Plant Health Prog*, 2005, 6(1): 18.
- [2] ORDONEZ N, SEIDL M F, WAALWIJK C, DRENTH A, KILIAN A, THOMMA B P H J, PLOETZ R C, KEMA G H J. Worse comes to worst: bananas and Panama disease-when plant and pathogen clones meet[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(11): e1005197.
- [3] PLOETZ R C. *Fusarium* wilt of banana[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(12): 1512-1521.
- [4] 王芳, 夏玲, 胡贝, 吕顺, 曾莉莎, 刘文清, 韩秀香. 香香蕉与枯萎病 4 号小种抗性相关的 SCAR 分子标记开发[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(15): 4991-5000.
WANG F, XIA L, HU B, LYU S, ZENG L S, LIU W Q, HAN X X. Development of SCAR molecular marker related with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 in banana (*Musa* AAA Cavendish)[J]. *Molecular Plant breeding*, 2018, 16(15): 4991-5000. (in Chinese)
- [5] 剧虹伶, 张曼, 阮云泽, 赵艳, 邓燕, 尹黎燕, 何朝族, 王蓓蓓. 不同品种香蕉抗枯萎病效果及抗性生理研究[J]. *植物保护*, 2017, 43(2): 82-87.
JU H L, ZHANG M, RUAN Y Z, ZHAO Y, DENG Y, YIN

- L Y, HE C Z, WANG B B. The effects and mechanisms of different banana varieties to *Fusarium* wilt disease[J]. Plant Protection, 2017, 43(2): 82-87. (in Chinese)
- [6] COOK D E, MESARICH C H, THOMMA B P. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion[J]. Annual Review of Phytopathology, 2015, 53: 541-563.
- [7] LO P L, LANVER D, SCHWEIZER G, TANAKA S, LIANG L, TOLLOT M, ZUCCARO A, REISSMANN S, KAHMANN R. Fungal effectors and plant susceptibility[J]. Annual Review of Plant Biology, 2015, 66: 513-545.
- [8] DE SAIN M, REP M. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(10): 23970-23993.
- [9] LI C Q, YANG J H, LI W B, SUN J B, PENG M. Direct root penetration and rhizome vascular colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are the key steps in the successful infection of Brazil Cavendish[J]. Plant Disease, 2017, 101(12): 2073-2078.
- [10] 林涛, 黄建忠. 丝状真菌启动子研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(7): 2862-2863, 2865.
LIN T, HUANG J Z. Research advance on promoters for heterologous gene expression in filamentous fungi[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(7): 2862-2863, 2865. (in Chinese)
- [11] 孙先花, 苏小运. 丝状真菌启动子的基因工程改造进展[J]. 广西科学, 2017, 24(1): 73-76.
SUN X H, SU X Y. Research progress towards promoters genetic engineering in filamentous fungi[J]. Guangxi Sciences, 2017, 24(1): 73-76. (in Chinese)
- [12] MCKELVIE N D, STRATFORD R, WU T, BELLABY T, ALDRED E, HUGHES N J, CHATFIELD S N, PICKARD D, HALE C, DOUGAN G, KHAN S A. Expression of heterologous antigens in *Salmonella typhimurium* vaccine vectors using the *in vivo*-inducible, SPI-2 promoter, *ssaG*[J]. Vaccine, 2004, 22: 3243-3255.
- [13] 孟祥锋. 瑞氏木霉纤维二糖水解酶(CBH I)丝状真菌表达体系的构建[D]. 济南: 山东大学, 2010.
MENF X F. Heterologous expression of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in filamentous fungi[D]. Jinan: Shandong University, 2010. (in Chinese)
- [14] 殷金瑶, 王义, 徐良向, 朱利, 王晨, 刘文波, 缪卫国. 橡胶树白粉菌(HO-73)启动子 WY172 不同长度片段的克隆及表达活性分析[J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 29-36.
YIN J Y, WANG Y, XU L X, ZHU L, WANG C, LIU W B, MIAO W G. Cloning and expression analysis of different-length fragments of *Oidium heveae* (HO-73) promoter WY172[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(1): 29-36. (in Chinese)
- [15] WANG D, PENG C Z, ZHENG X M, CHANG L L, XU B Q, TONG Z. Secretome analysis of the banana *Fusarium* wilt fungi *Foc RI* and *Foc TR4* reveals a new effector OASTL required for full pathogenicity of *Foc TR4* in banana[J]. Biomolecules, 2020, 10(10): 1430-1446.
- [16] 王丹, 彭存智, 常丽丽, 郑杏梅, 徐兵强, 仝征. 一种可用于外源基因功能鉴定的真菌分泌表达载体 74HSP-EGFP 的构建及验证[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(1): 230-236.
WANG D, PENG C Z, CHANG L L, ZHENG X M, XU B Q, TONG Z. Construction and verification of a fungal secretory expression vector 74HSP-EGFP for functional identification of exogenous genes[J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40(1): 230-6. (in Chinese)
- [17] ANDRIE R M, MARTINEZ J P, CIUFFETTI L M. Development of *ToxA* and *ToxB* promoter-driven fluorescent protein expression vectors for use in filamentous ascomycetes[J]. Mycologia, 2005, 97(5): 1152-1161.
- [18] 黄东杰, 彭明, 李春强. 几株尖孢镰刀菌的绿色荧光蛋白基因转化[J]. 热带农业科学, 2014, 34(1): 59-62.
HUANG D J, PENG M, LI C Q. Transformation of GFP gene of several *Fusarium oxysporum* strains[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2014, 34(1): 59-62. (in Chinese)
- [19] WANG D, SUN Y, TONG Z, YANG Q, CHANG L L, MENG X R, WANG L M, TIAN W M, WANG X C. A protein extraction method for low protein concentration solutions compatible with the proteomic analysis of rubber particles[J]. Electrophoresis, 2016, 37(22): 2930-2939.
- [20] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [21] ARENA E T, RUEDEN C T, HINER M C, WANG S L, YUAN M, ELICEIRI K W. Quantitating the cell: turning images into numbers with ImageJ[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology, 2017, 6(2): e260.
- [22] TONG Z, SUN Y, WANG D, WANG L M, CHANG L L, MENG X R, FENG W Q, WURTELE E S, WANG X C. Identification and functional characterization of *HbOsmotin* from *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 109: 171-180.
- [23] LESCOT M, DEHAIS P, THIJS G, MARCHAL K, MOREAU Y, VAN DE PEER Y, ROUZE P, ROMBAUTS S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327.

- [24] 吴乐乐, 徐丽, 丁向真, 李志英, 王盛. 内含子介导的 TBSV 病毒表达载体的构建和功能分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(4): 719-728.
- WU L L, XU L, DING X Z, LI Z Y, WANG S. Construction and function analysis of an intron-containing TBSV-based vector system[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(4): 719-728. (in Chinese)
- [25] WEI Y X, LIU W, HU W, LIU G Y, WU C J, LIU W, ZENG H Q, HE C Z, SHI H T. Genome-wide analysis of autophagy-related genes in banana highlights *MaATG8s* in cell death and autophagy in immune response to *Fusarium wilt*[J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(8): 1237-1250.
- [26] LI S W, DONG Y J, LI L, ZANG Y, YANG X F, ZENG H M, SHI M W, PEI X W, QIU D W, YUAN Q H. The novel cerato-platanin-like protein FocCP1 from *Fusarium oxysporum* triggers an immune response in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(11): 2849-2867.
- [27] LORANG J M, TUORI R P, MARTINEZ J P, SAWYER T L, REDMAN R S, ROLLINS J A, WOLPERT T J, JOHNSON K B, RODRIGUEZ R J, DICKMAN M B, CIUFFETTI L M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 1987-1994.
- [28] 卢姗, 毛从政, 陶玉婷, 黄勇奇, 贺菽嘉, 梁莹, 梁晓乐, 吴谦, 何志义, 蓝秀万. 马尔尼菲青霉菌内源启动子驱动的苯菌灵抗性基因盒构建及其应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(2): 253-259.
- LU S, MAO C Z, TAO Y T, HUANG Y Q, HE S J, LIANG Y, LIANG X L, WU Q, HE Z Y, LAN X W. Construction of the benomyl resistance gene cassette driven by the endogenous promoter and its use in *Penicillium marneffeii*[J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(2): 253-259. (in Chinese)
- [29] 聂燕华, 林俊芳, 王杰, 尤琳烽, 郭丽琼. 银耳芽孢内源 *gpd* 启动子的克隆与功能鉴定[J]. 食用菌学报, 2012, 19(2): 1-7.
- NIE Y H, LIN J F, WANG J, YOU L F, GUO L Q. Isolation and functional analysis of a *gpd*-Tf promoter from yeast-like conidia of *Tremella fuciformis*[J]. ACTA Edulis Fungi, 2012, 19(2): 1-7. (in Chinese)