

研究报告

南极莫氏黑粉菌热激蛋白 70 家族启动子鉴定及活性比较

张聪¹, 郭利桃¹, 董国云², 李毅³, 李新文³, 张政兵³, 林宇丰³, 侯春生^{*1}, 李智敏^{*1}

1 中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410205

2 张家界市农业科学技术研究所, 湖南 张家界 427000

3 湖南省农业农村厅植保植检站, 湖南 长沙 410005

张聪, 郭利桃, 董国云, 李毅, 李新文, 张政兵, 林宇丰, 侯春生, 李智敏. 南极莫氏黑粉菌热激蛋白 70 家族启动子鉴定及活性比较[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2934-2946.

ZHANG Cong, GUO Litao, DONG Guoyun, LI Yi, LI Xinwen, ZHANG Zhengbing, LIN Yufeng, HOU Chunsheng, LI Zhimin. Identification and activity comparison of promoters of the heat shock protein 70 family of *Moesziomyces antarcticus*[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2934-2946.

摘要:【背景】南极莫氏黑粉菌(*Moesziomyces antarcticus*)由于能够产生优良的生物表面活性剂和脂酶而被深入研究,但目前仍缺乏遗传操作相关的基因表达元件。【目的】检测南极莫氏黑粉菌热激蛋白 70 超家族全部 7 个基因的启动子表达活性,明确该菌中不同热激蛋白 70 家族成员的启动子活性差异,并筛选出可用于调控南极莫氏黑粉菌基因表达的强启动子。【方法】通过基因组数据库获得南极莫氏黑粉菌 JCM10317 菌株中 7 个热激蛋白 70 家族成员的基因信息,利用生物信息学方法进行热激蛋白 70 家族进化分析并预测热激蛋白 70 启动子(P_{Hsp70})序列中的关键顺式作用元件,然后构建 7 个热激蛋白 70 启动子连接增强型绿色荧光蛋白基因的重组表达载体,通过测定阳性转化子荧光值和荧光显微观察比较不同热激蛋白 70 家族成员启动子的活性差异。【结果】蛋白进化分析表明 7 个热激蛋白 70 家族成员分别属于不同亚家族,并且各成员启动子中的顺式作用元件种类和数量也具有明显差异。此外,以 P_{Hsp701} 、 P_{Hsp702} 、 P_{Hsp703} 、 P_{Hsp704} 、 P_{Hsp705} 、 P_{Hsp706} 和 P_{Hsp707} 构建的重组质粒转化菌株 BDH3-1 所获得的阳性转化子平均荧光值分别为对照的 12.8、1.6、2.9、5.8、4.6、5.0 和 1.5 倍,与荧光显微观察结果一致。【结论】根据生物信息学分析及绿色荧光蛋白表达结果发现,南极莫氏黑粉菌热激蛋白 70 家族不同成员间的启动子活性差异显著,其中 P_{Hsp701} 的活性最高,是南极莫氏黑粉菌中的强启动子, P_{Hsp704} 、 P_{Hsp705} 、 P_{Hsp706} 启动子活性次之,可作为备选

资助项目: 湖南省植保植检站植物防疫防控科研项目(HNZB202104); 中国农业科学院科技创新工程项目(ASTIP-IBFC)
This work was supported by the Plant Epidemic Prevention and Control Research Project of Plant Protection and Plant Inspection Station of Hunan Province (HNZB202104), and the Agricultural Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (ASTIP-IBFC).

*Corresponding authors. E-mail: LI Zhimin, lizhimin@caas.cn; HOU Chunsheng, houchunsheng@caas.cn

Received: 2023-10-18; Accepted: 2024-01-01; Published online: 2024-01-31

启动子用于后续研究。

关键词：南极莫氏黑粉菌；热激蛋白 70 家族；启动子活性；遗传转化；增强型绿色荧光蛋白

Identification and activity comparison of promoters of the heat shock protein 70 family of *Moesziomyces antarcticus*

ZHANG Cong¹, GUO Litao¹, DONG Guoyun², LI Yi³, LI Xinwen³, ZHANG Zhengbing³, LIN Yufeng³, HOU Chunsheng^{*1}, LI Zhimin^{*1}

1 Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, Hunan, China

2 Zhangjiajie Agricultural Science and Technology Research Institute, Zhangjiajie 427000, Hunan, China

3 Plant Protection and Plant Inspection Station, Department of Agriculture and Rural Affairs of Hunan Province, Changsha 410005, Hunan, China

Abstract: **[Background]** *Moesziomyces antarcticus* has been extensively studied for its ability to produce excellent biosurfactants and lipases, while little is known about its expression elements for genetic manipulation. **[Objective]** To measure and compare the promoter activities of all the seven genes of the heat shock protein 70 superfamily in *M. antarcticus*, and screen out the strong promoters that can be used for regulating gene expression in *M. antarcticus*. **[Methods]** The gene information on seven members of the heat shock protein 70 family was obtained from the genome database of *M. antarcticus* JCM10317. Bioinformatics tools were used for evolutionary analysis of the heat shock protein 70 family, and key *cis*-acting elements in the heat shock protein 70 promoter (P_{Hsp70}) sequences were predicted. The recombinant expression vectors were constructed by fusing the promoters of the seven heat shock protein 70 genes with the gene encoding the enhanced green fluorescent protein. The positive transformants were measured for the fluorescence intensity and observed under a fluorescence microscope, on the basis of which the promoter activities of different members of the heat shock protein 70 family were compared. **[Results]** The seven heat shock protein 70 family members belonged to different subfamilies, and their promoters had different categories and number of *cis*-acting elements. Moreover, the average fluorescence intensities of transformants with P_{Hsp701} , P_{Hsp702} , P_{Hsp703} , P_{Hsp704} , P_{Hsp705} , P_{Hsp706} , and P_{Hsp707} recombinant plasmids respectively were 12.8, 1.6, 2.9, 5.8, 4.6, 5.0, and 1.5 times of that in the control. The results are consistent with the fluorescence observation results under the microscope. **[Conclusion]** The results of bioinformatics analysis and enhanced green fluorescent protein expression revealed significant differences in the promoter activity among the heat shock protein 70 family members in *M. antarcticus*. P_{Hsp701} showed the highest expression activity, serving as a strong promoter in *M. antarcticus*. P_{Hsp704} , P_{Hsp705} , and P_{Hsp706} had lower activities than P_{Hsp701} but could be used as alternative promoters for further research.

Keywords: *Moesziomyces antarcticus*; heat shock protein 70 family; promoter activity; genetic transformation; enhanced green fluorescent protein

南极莫氏黑粉菌(*Moesziomyces antarcticus*)属于黑粉菌科(*Ustilaginaceae*)莫氏黑粉菌属(*Moesziomyces*)黑粉菌^[1],该真菌最初在南极洲万达湖的沉积物中被发现^[2],当前研究表明南极莫氏黑粉菌分布范围十分广泛,该菌不仅可以在土壤、湖泊中进行无性繁殖,还能寄生在甘蔗、水稻、稗草等多种禾本科植物组织内^[3-5]。此外,由于南极莫氏黑粉菌能够合成一些活性物质和酶类,因而被广泛应用于工业领域,其中一种重要应用是该菌合成的一种天然生物表面活性剂甘露糖赤藓糖醇酯(mannosylerythritol lipid, MEL)^[6],相较于人工合成的表面活性剂, MEL更易降解并且对环境无污染,因此被用于化妆品和护肤品行业^[7]。南极莫氏黑粉菌还能够合成一种塑料降解酶^[8-9],其中菌株 JCM10317产生的塑料降解酶被报道对聚丁二酸丁二醇酯(polybutylene succinate, PBS)和聚丁二酸-己二酸丁二酯(polybutylene succinate adipate, PBSA)组成的农用地膜等可生物降解塑料(biodegradable plastic, BP)具有较强的降解活性^[10]。另外,该菌产生的脂肪酶 A 和脂肪酶 B 还被应用于生物催化领域^[11]。作为一种新的微生物资源,南极莫氏黑粉菌在工业上有着广阔的应用前景,然而由于目前在该菌中已知可用的基因表达调控元件较少、遗传操作较难等原因,导致对其基因功能和遗传改造等研究进展缓慢。

热激蛋白是普遍存在于各类原核和真核生物中的一种分子伴侣蛋白,在调节细胞活性、维持细胞功能方面具有重要作用^[12],其中热激蛋白 70 (heat shock protein 70, Hsp70)是结构最保守且最受关注的热激蛋白^[13],其启动子被证明具有较强的热激活性,因而在真核基因表达研究中被广泛使用^[14]。对从菰黑粉菌(*Ustilago esculenta*)中筛选的 P_{hsp} 、 P_{ef} 、 P_{actin} 等 10 个高强度启动子活性进行比较后发现, $Hsp70$ 启动子

(P_{hsp})是表达能力最强的内源启动子^[15]。基于 $Hsp70$ 启动子驱动基因表达能力强、表达相对稳定的特点,研究人员常将其作为基因高效表达的调控元件进行基因超表达研究。在菰黑粉菌^[16]和黑粉病致病菌 *Thecaphora thlaspeos*^[17]中分别使用内源 $Hsp70$ 启动子构建了 β -1,4-内切葡聚糖酶基因 *UeEgl1* 过表达载体和质粒介导的 CRISPR/Cas9 系统。此外,有研究证实 $Hsp70$ 启动子具有相对保守的调控机制,甘紫菜(*Porphyra tenera*) $Hsp70$ 启动子可调控合成的 *GUS* 基因在甘紫菜和条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)中进行有效表达,而条斑紫菜的 *GAPDH* 启动子在甘紫菜中却丧失了启动子活性^[18],在球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)中也曾使用玉米瘤黑粉菌(*Ustilago maydis*) $Hsp70$ 启动子建立遗传转化体系^[13]。这表明 $Hsp70$ 启动子不仅是内源强启动子,还可以作为通用启动子在其他物种中构建异源表达系统。因此,鉴定 $Hsp70$ 启动子对建立南极莫氏黑粉菌及其他各类真核生物遗传转化体系和基因功能研究具有重要意义。

尽管 $Hsp70$ 启动子被证明是高效和保守的启动子元件,然而随着基因组学的发展,发现 $Hsp70$ 是一个基因家族,即在同一个生物体基因组中有多个 $Hsp70$ 编码基因^[19]。在禾本科植物玉米中的 $Hsp70$ 家族成员多达 41 个^[20],而在真菌玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)^[21]和土曲霉(*Aspergillus terreus*)^[22]中分别鉴定出 11 个和 9 个 $Hsp70$ 家族成员,它们在蛋白质家族分析与建模数据库(protein family analysis and modeling, PFAM)中均被归为 $Hsp70$ (PF00012),但迄今为止在高表达 $Hsp70$ 启动子的应用报道中均未指明使用了该家族中哪一个基因的启动子。由此引出的问题是:在一个物种中,不同 $Hsp70$ 基因家族成员的启动子序列各异,而这些启动子是否都具有高表达活性? 为解答

这一问题, 本文对南极莫氏黑粉菌 *Hsp70* 基因家族的全部启动子进行了表达活性研究。首先, 对南极莫氏黑粉菌与其他近缘黑粉菌 *Hsp70* 家族成员的氨基酸序列进行比对, 用于分析不同 *Hsp70* 家族成员之间的蛋白进化关系。随后, 通过生物信息学方法分析南极莫氏黑粉菌不同 *Hsp70* 家族成员启动子中的关键顺式作用元件, 初步预测其启动子活性。在此基础上, 从南极莫氏黑粉菌菌株 BDH3-1 中分别克隆相应的 *Hsp70* 启动子片段并构建增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP)表达载体, 通过比较重组质粒表达 *eGFP* 的荧光强度来分析不同 *Hsp70* 家族成员启动子的表达活性差异。

1 材料与方法

1.1 样品

南极莫氏黑粉菌菌株 BDH3-1 和质粒 pMF-Sr*Hsp70-eGFP* 均保存于中国农业科学院麻类研究所。其中 pMF-Sr*Hsp70-eGFP* 质粒包含氨基青霉素和潮霉素抗性基因以及 *eGFP* 基因, 载体构建所用的大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞购自北京博迈德基因技术有限公司。

1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 固体培养基另加琼脂粉 17.0。YEPSL 培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 4.0, 蔗糖 4.0。氨基青霉素抗性培养基: 将氨基青霉素母液加入 LB 培养基中, 终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。潮霉素抗性培养基: 将潮霉素母液加入 YEPSL 培养基中, 终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 主要试剂和仪器

无缝克隆试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 核糖核酸酶 A 及限制性内切酶 *Afl* II, 宝日生物技术有限公司(北京)有限公司; 限制

性内切酶 *Cla* I, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; MonAmpTM 2 \times MonHI-FI HS Mix 试剂盒, 莫纳生物科技有限公司; T3 Super PCR Mix 试剂盒, 北京擎科生物科技股份有限公司。荧光酶标仪, TECAN 公司; 荧光显微镜, Leica 公司。

1.4 南极莫氏黑粉菌 *Hsp70* 家族成员蛋白进化分析

从 JGI 数据库(<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>)中获取南极莫氏黑粉菌 JCM10317 菌株参考基因组中 7 个 *Hsp70* 家族成员的蛋白质序列信息, 在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中进行 BLAST 检索以获得相应蛋白质序列登录号; 用同样的方法查找近缘物种玉米瘤黑粉菌(*Ustilago maydis*)、玉米丝轴黑粉菌(*Sporisorium reilianum*)、蚜虫莫氏黑粉菌(*Moesziomyces aphidis*)、黑麦草腥黑粉菌(*Tilletia walkeri*)和湖北拟酵母(*Pseudozyma hubeiensis*)的 *Hsp70* 家族成员蛋白质序列, 将南极莫氏黑粉菌及近缘物种的 *Hsp70* 家族成员进行重命名(表 1)。使用 MEGA 7.0 软件对南极莫氏黑粉菌及近缘物种的 *Hsp70* 家族成员的氨基酸序列进行 neighbor-joining 法聚类分析并构建系统发育树(Bootstrap 值为 1 000)。

1.5 南极莫氏黑粉菌 *Hsp70* 启动子调控元件分析

根据 JGI 数据库中南极莫氏黑粉菌 JCM10317 菌株的 7 个 *Hsp70* 基因序列选取上游相应长度序列作为其启动子, 将各启动子序列分别与菌株 BDH3-1 基因组进行比对, 从而得到菌株 BDH3-1 的 7 个 *Hsp70* 启动子序列。为分析启动子序列特征与表达活性之间的关系, 将获得的 7 个 *Hsp70* 的启动子分别命名为 P_{Hsp701} 、 P_{Hsp702} 、 P_{Hsp703} 、 P_{Hsp704} 、 P_{Hsp705} 、 P_{Hsp706} 、 P_{Hsp707} , 用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)启动子在线分

表 1 南极莫氏黑粉菌及近缘物种 Hsp70 家族成员信息

Table 1 The Hsp70 family information of *Moesziomyces antarcticus* and related species

物种名称 Species name	氨基酸序列重命名 Amino acid sequence renaming	氨基酸数量 Amino acid number (aa)	NCBI 登录号 NCBI accession number
<i>Moesziomyces antarcticus</i>	MaHsp70-1	644	XP_014655775.1
	MaHsp70-2	1 084	XP_014658722.1
	MaHsp70-3	574	XP_014654537.1
	MaHsp70-4	619	XP_014655565.1
	MaHsp70-5	942	XP_014657791.1
	MaHsp70-6	673	XP_014658973.1
	MaHsp70-7	1 312	XP_014658668.1
<i>Ustilago maydis</i>	UmHsp70-1	645	XP_011390235.1
	UmHsp70-2	619	XP_011391166.1
	UmHsp70-3	672	XP_011387146.1
	UmHsp70-4	919	XP_011386916.1
	UmHsp70-5	573	XP_011392059.1
	UmHsp70-6	660	XP_011387505.1
<i>Moesziomyces aphidis</i>	MapHsp70-1	556	ETS64348.1
	MapHsp70-2	396	ETS62365.1
	MapHsp70-3	917	ETS61203.1
	MapHsp70-4	915	ETS60751.1
	MapHsp70-5	1 070	ETS61164.1
<i>Tilletia walkeri</i>	TwHsp70-1	648	KAE8206153.1
	TwHsp70-2	629	KAE8268258.1
	TwHsp70-3	620	KAE8211441.1
	TwHsp70-4	790	KAE8266144.1
	TwHsp70-5	921	KAE8266414.1
	TwHsp70-6	694	KAE8211740.1
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	PhHsp70-1	619	XP_012189617.1
	PhHsp70-2	645	XP_012186068.1
	PhHsp70-3	572	XP_012191474.1
	PhHsp70-4	634	XP_012190629.1
	PhHsp70-5	690	XP_012190900.1
	PhHsp70-6	917	XP_012192422.1
	PhHsp70-7	896	XP_012192629.1
<i>Sporisorium reilianum</i>	SrHsp70-1	648	CBQ68406.1
	SrHsp70-2	619	CBQ69252.1
	SrHsp70-3	573	CBQ70135.1
	SrHsp70-4	916	CBQ70325.1
	SrHsp70-5	689	CBQ70371.1
	SrHsp70-6	671	CBQ70616.1
	SrHsp70-7	790	CBQ70961.1

析网站对南极莫氏黑粉菌 7 个 *Hsp70* 启动子序列中的关键顺式作用元件 TATA-box 和 CAAT-box 进行预测分析。

1.6 *eGFP* 重组表达载体的构建

根据 7 个 *Hsp70* 启动子序列分别设计特异性引物用于扩增启动子片段(表 2), 在引物两端添加 20 bp 重叠片段用于构建重组质粒。参照文献[23]的方法制备南极莫氏黑粉菌 BDH3-1 的基因组 DNA 作为 PCR 反应模板, 用相应引物扩增 7 个 *Hsp70* 启动子片段, PCR 反应条件和体系按照 MonAmp™ 2×MonHI-FI HS Mix 试剂盒说明书操作。使用限制性内切酶 *Cla* I 和 *Afl* II 对原质粒 pMF-Sr*Hsp70-eGFP* 进行双酶切, 从而获得去除原有启动子的线性化 pMF-Sr*Hsp70-eGFP* 质粒。

按照无缝克隆试剂盒说明书分别将 7 个 *Hsp70* 启动子片段与双酶切后的 pMF-Sr*Hsp70-eGFP*

质粒片段进行连接, 用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含氨苄青霉素的 LB 固体培养基中 37 °C 过夜培养筛选阳性转化子, 第 2 天挑选转化子单菌落于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 扩大培养, 用特异性引物 Hsp70-YZF/Hsp70-YZR 对转化子进行 PCR 检测并测序, PCR 反应条件和体系按照 T3 Super PCR Mix 试剂盒说明书操作。将构建成功的重组质粒分别命名为 pMF-*Hsp701-eGFP*、pMF-*Hsp702-eGFP*、pMF-*Hsp703-eGFP*、pMF-*Hsp704-eGFP*、pMF-*Hsp705-eGFP*、pMF-*Hsp706-eGFP* 和 pMF-*Hsp707-eGFP*。

1.7 *eGFP* 重组质粒转化南极莫氏黑粉菌

成功构建 7 个 *eGFP* 重组质粒后在冰上解冻南极莫氏黑粉菌感受态细胞, 分别加入 1 μ L 浓度为 15 mg/mL 的肝素和 1 μ g 重组质粒,

表 2 本研究中所使用的引物

Table 2 The primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
Hsp701-F	<u>ACCATGATTACGCCCTTAAG</u> GTTGGAAGTTGAACCGAGCG	701
Hsp701-R	CCCTTGCTCACCATATCGATGATGGCGATGCTAGATCTTTTG	
Hsp702-F	<u>ACCATGATTACGCCCTTAAG</u> CTTGCAAGAAGTGGGCGAG	509
Hsp702-R	CCCTTGCTCACCATATCGATGGTGGGCAATGTGCAAGC	
Hsp703-F	<u>ACCATGATTACGCCCTTAAG</u> CAAGGTCAGCACCGAAAGG	516
Hsp703-R	CCCTTGCTCACCATATCGATGATTGTATATGTGTGATATGGGGGT	
Hsp704-F	<u>ACCATGATTACGCCCTTAAG</u> CGTGAATGCTCGATGTATACGG	738
Hsp704-R	CCCTTGCTCACCATATCGATGATGACGAAGTTTGTGTTTGTGATG	
Hsp705-F	<u>ACCATGATTACGCCCTTAAG</u> ATGACGGCAATGACGAGGG	1 376
Hsp705-R	CCCTTGCTCACCATATCGATGTTTTTCGTTTTGGGGAAGAGTC	
Hsp706-F	<u>ACCATGATTACGCCCTTAAG</u> GCTTTTTGCATTATTAAGCCCC	1 401
Hsp706-R	CCCTTGCTCACCATATCGATGGCTGTGTATGAGATGCGGAG	
Hsp707-F	<u>ACCATGATTACGCCCTTAAG</u> CTCACCAGAGTAAGTACGCCG	1 099
Hsp707-R	CCCTTGCTCACCATATCGATCCAAGTTGGGCGCGC	
Hsp70-YZF	CGGCTCGTATGTTGTGTGGA	
Hsp70-YZR	GCTGAACTTGTGGCCGTTT	

重叠片段用下划线标出

Overlapping fragments are underlined.

通过聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体转化法^[24]对南极莫氏黑粉菌 BDH3-1 感受态细胞进行转化, 在含潮霉素的固体 YEPSL 培养基中 30 °C 培养 3–4 d 筛选阳性转化子, 为避免挑取假阳性菌落, 再次挑取固体培养基上的阳性菌落并在含潮霉素的液体 YEPSL 培养基中 30 °C、180 r/min 振荡培养 12–16 h 进行二次筛选。

1.8 *eGFP* 荧光强度分析

用移液枪吸取二次筛选后的阳性转化子菌液并转移至含潮霉素的液体 YEPSL 培养基中 30 °C、180 r/min 重新扩大培养, 直至菌液 OD_{600} 达到 0.6, 取 200 μ L 菌液转移至 96 孔板, 在荧光酶标仪激发光 488 nm 和发射光 520 nm 下分别测定 pMF-*Hsp701-eGFP*-pMF-*Hsp707-eGFP* 共 7 个重组质粒转化子菌液的荧光值(菌株 BDH3-1 作为对照), 每个样品设置 6 个重复, 并用 SAS 和 GraphPad Prism 8 软件进行单因素方差分析和作图。

另外, 分别在荧光显微镜下拍摄各转化子(菌株 BDH3-1 作对照)的原始图像及绿色荧光图像(保持曝光时间、对比度以及其他参数条件一致), 以比较不同 *Hsp70* 启动子驱动 *eGFP* 荧光表达强弱^[15]。

2 结果与分析

2.1 南极莫氏黑粉菌 *Hsp70* 家族蛋白进化分析结果

从 JGI 数据库中获取南极莫氏黑粉菌 7 个 *Hsp70* 家族成员的氨基酸序列后, 用 MEGA 7.0 软件对该菌和玉米瘤黑粉菌等 5 个近缘物种的 *Hsp70* 家族成员共同进行 ClustalW 多序列比对并构建系统发育树(图 1)。蛋白进化分析结果显示: 南极莫氏黑粉菌与近缘物种的 38 个 *Hsp70*

家族成员共形成了 7 个 group (亚家族), 且南极莫氏黑粉菌的 7 个 *Hsp70* 家族成员分别在 7 个 group 中, 其中 MaHsp70-2、MaHsp70-3、MaHsp70-5、MaHsp70-7 最终均与同属的蚜虫莫氏黑粉菌的 *Hsp70* 家族成员聚在同一分支, 说明相较于其他 4 种黑粉菌来说, 这两个物种亲缘关系最近。*Hsp70* 家族蛋白进化分析结果表明同一物种的 *Hsp70* 家族包含不同的亚家族成员, 尽管这些家族成员之间蛋白序列具有明显差异, 但却与近缘物种中的某些 *Hsp70* 家族成员高度同源。

2.2 南极莫氏黑粉菌 *Hsp70* 启动子调控元件分析结果

启动子元件是启动子的核心组成部分, 具有调控转录过程的功能, 对启动子活性有着关键的作用^[25]。不同启动子元件具有各自的特异序列结构特征和功能, 其中 TATA-box 和 CAAT-box 是真核生物中普遍存在和关键的启动子元件^[26]。TATA-box 可以被 RNA 聚合酶识别, 具有控制转录起始的作用; 而 CAAT-box 负责控制转录的频率, 与 TATA-box 共同影响编码基因的转录效率。对南极莫氏黑粉菌 7 个 *Hsp70* 启动子调控元件预测结果显示: P_{Hsp701} 中有 4 个 CAAT-box, P_{Hsp702} 、 P_{Hsp703} 中分别含有 1 个 CAAT-box 和 1 个 TATA-box, P_{Hsp704} 中有 2 个 TATA-box 和 1 个 CAAT-box, P_{Hsp705} 和 P_{Hsp706} 均含有 6 个 CAAT-box, P_{Hsp707} 中有 2 个 CAAT-box。对比 7 个 *Hsp70* 启动子内的关键顺式作用元件后发现, P_{Hsp702} 、 P_{Hsp703} 和 P_{Hsp707} 中所含顺式作用元件数量较少, 而其余 4 个 *Hsp70* 启动子中都含有 3 个及 3 个以上顺式作用元件, 其中 P_{Hsp705} 和 P_{Hsp706} 中所含元件最多, 推测其驱动基因表达能力也比较强。各启动子序列内 TATA-box 和 CAAT-box 元件的分布如图 2 所示。

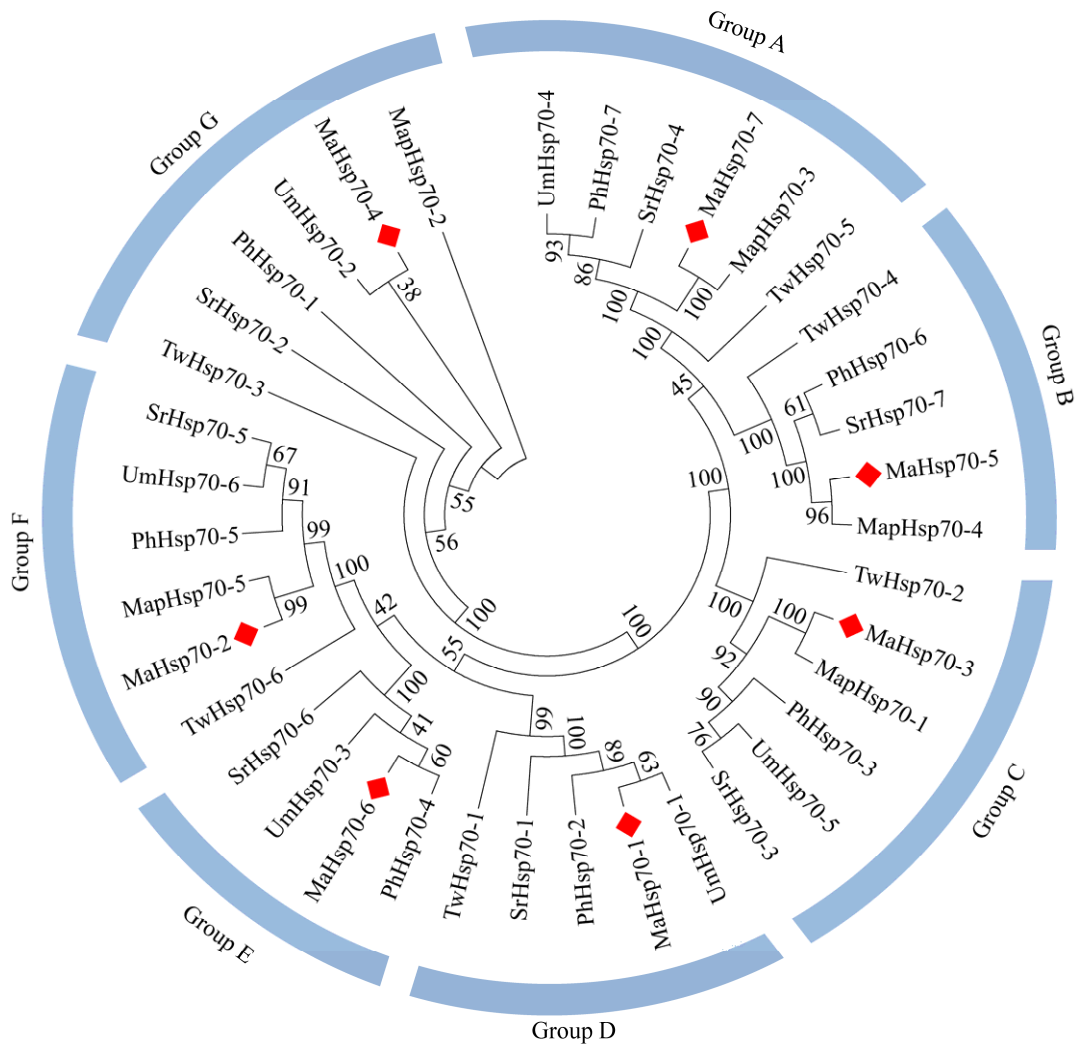


图 1 南极莫氏黑粉菌 Hsp70 家族系统发育树

Figure 1 Hsp70 family phylogenetic tree of *Moesziomyces antarcticus*.

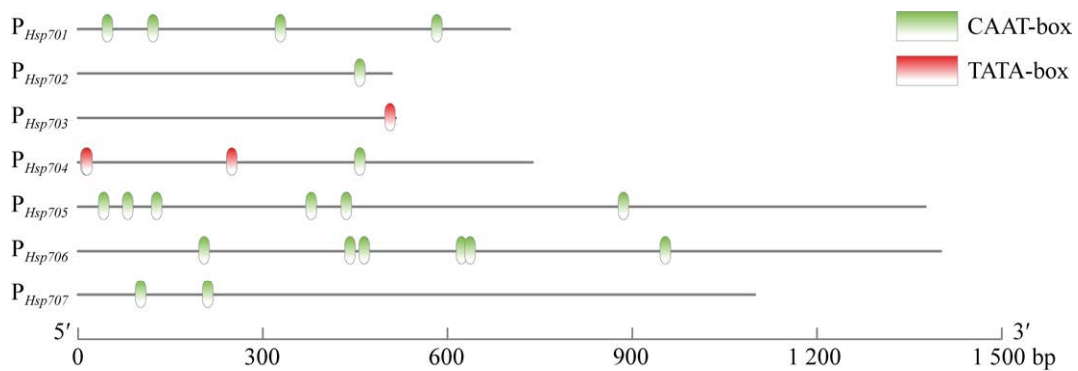


图 2 南极莫氏黑粉菌 Hsp70 启动子内的 TATA-box 和 CAAT-box 分布情况

Figure 2 Distribution of TATA-box and CAAT-box within *Moesziomyces antarcticus* Hsp70 promoters.

2.3 *eGFP* 重组质粒转化及转化子筛选

通过表 2 设计的特异性引物分别扩增 7 个 *Hsp70* 启动子片段, 片段大小与预期相符(图 3)。按照无缝克隆试剂盒操作要求, 将纯化后的 7 个 *Hsp70* 启动子片段(P_{Hsp701} - P_{Hsp707})分别与线性化的 pMF-Sr*Hsp70-eGFP* 质粒连接并转化大肠杆菌 DH5 α , 对转化子进行 PCR 检测, 测序结果无误, 证明已经成功构建出 pMF-*Hsp701-eGFP*-pMF-*Hsp707-eGFP* 共 7 个重组质粒。

七个 *eGFP* 重组质粒构建完成后, 提取 7 个重组质粒并分别转化南极莫氏黑粉菌感受态细胞, 从转化皿中随机挑取 24 个转化子菌落进行二次筛选, 经过二次筛选后大部分转化子菌液均变浑浊(即为二次筛选的阳性菌落), 只有少数阳性菌落在二次筛选时未浑浊(即为假阳性)。二次筛选的阳性转化子结果如表 3 所示, 不同重组质粒的转化阳性率为 70.8%–100.0%。推测不同启动子序列可能对阳性筛选稍有影响。24 个随机菌落在二次筛选后多数仍为阳性菌落, 说明重组质粒已经成功转入这些细胞中。

2.4 重组质粒转化子荧光值检测和分析

分别测定二次筛选后的阳性转化子菌液(含重组质粒 pMF-*Hsp701-eGFP*-pMF-*Hsp707-eGFP*)的荧光值(菌株 BDH3-1 作为对照), 每个

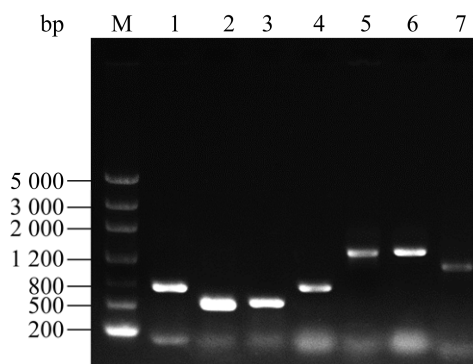


图 3 南极莫氏黑粉菌 *Hsp70* 启动子 PCR 扩增片段

Figure 3 PCR amplified fragments of *Hsp70* promoters in *Moesziomyces antarcticus*. M: DNA Marker III. 1–7: P_{Hsp701} - P_{Hsp707} .

处理设置 6 次重复。荧光值测定结果如图 4 所示。转入 pMF-*Hsp701-eGFP* 重组质粒的转化子荧光值最高, 平均荧光值达到 CK 的 12.8 倍, 转入 pMF-*Hsp704-eGFP*、pMF-*Hsp705-eGFP* 和 pMF-*Hsp706-eGFP* 重组质粒的转化子荧光值较高, 平均荧光值分别为 CK 的 5.8、4.6 和 5.0 倍, 转入 pMF-*Hsp703-eGFP* 重组质粒转化子的平均荧光值较低, 为 CK 的 2.9 倍, 转入 pMF-*Hsp702-eGFP* 和 pMF-*Hsp707-eGFP* 重组质粒转化子的平均荧光值最低, 仅为 CK 的 1.6 倍和 1.5 倍。使用 SAS 软件对转入不同 *eGFP* 重

表 3 *eGFP* 重组质粒转化南极莫氏黑粉菌产生的阳性转化子筛选结果

Table 3 Screening results of positive transformants produced by transforming *Moesziomyces antarcticus* with *eGFP* recombinant plasmids

质粒名称 Plasmid name	转化皿中的阳性转化子数量 Number of positive colonies in the screening plate	挑选的阳性转化子数量 Number of picked positive colonies	二次筛选后的阳性转化子数量 Number of positive colonies for the second screening	阳性率 Positive rate (%)
pMF- <i>Hsp701-eGFP</i>	85	24	23	95.8
pMF- <i>Hsp702-eGFP</i>	47	24	21	87.5
pMF- <i>Hsp703-eGFP</i>	54	24	18	75.0
pMF- <i>Hsp704-eGFP</i>	68	24	24	100.0
pMF- <i>Hsp705-eGFP</i>	61	24	22	91.7
pMF- <i>Hsp706-eGFP</i>	49	24	21	87.5
pMF- <i>Hsp707-eGFP</i>	53	24	17	70.8

组质粒转化子(菌株 BDH3-1 作为对照)的荧光值进行单因素方差分析发现:不同 *Hsp70* 启动子驱动 *eGFP* 基因的表达存在显著性差异 ($P < 0.05$), 其中菌株 BDH3-1 的平均荧光值显著小于其他 7 个转入 *eGFP* 重组质粒转化子的荧光值, 而转入 pMF-*Hsp701-eGFP* 重组质粒的转化子荧光值最高且显著高于所有处理。方差分析结果证明了 7 个 *Hsp70* 启动子均具有转录活性, 且 P_{Hsp701} 的活性最高。

为可视化 7 个 *Hsp70* 启动子驱动 *eGFP* 基因表达的效果, 进一步判定 7 个 *Hsp70* 启动子间的活性差异, 在荧光显微镜下直接观察各转化子荧光强度(图 5)。荧光显微观察结果显示: P_{Hsp701} 驱动 *eGFP* 基因表达的荧光强度最强, P_{Hsp704} 、 P_{Hsp705} 、 P_{Hsp706} 驱动 *eGFP* 基因表达的

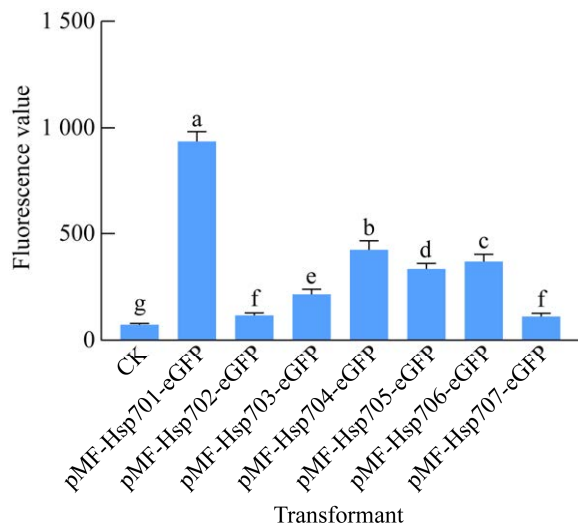


图 4 不同 *eGFP* 表达载体阳性转化子的平均荧光值 图中误差线表示标准误差;不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 每个处理 6 个生物学重复
Figure 4 Mean fluorescence values of positive transformants in different *eGFP* expression vectors. Error lines in the graphs indicate standard errors; Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$); Six biological replicates per treatment.

荧光强度较强, P_{Hsp703} 驱动 *eGFP* 基因表达的荧光强度很弱, P_{Hsp702} 、 P_{Hsp707} 和 CK 组未观察到荧光。荧光显微观察结果与酶标仪测定的荧光值结果基本相符, 证明 *Hsp70* 基因家族各个启动子的表达活性有明显差异, 其中 P_{Hsp701} 是表达活性最高的启动子。

3 讨论与结论

挖掘高表达活性启动子是进行真菌基因功能研究和遗传操作的基础, *Hsp70* 启动子不仅是表达活性较强的内源启动子, 还因其保守的调控机制被用于构建异源表达系统, 早在 1985 年, 研究人员就曾发现果蝇 *Hsp70* 启动子在烟草中仍然具有活性^[27], 此后 *Hsp70* 启动子便作为调控各类真核生物基因表达的启动子元件被广泛使用。在球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)中, 使用玉米瘤黑粉菌 *Hsp70* 启动子建立的遗传转化体系相较于常用的 P_{gpdA} 启动子转化效率提高了近 60%^[13]; 在罗伯茨绿僵菌(*Metarhizium robertsii*)中则利用 *Hsp70* 启动子成功调控 *GFP* 基因表达^[28]。此外, 近些年来 *Hsp70* 启动子还被用于构建高效的 CRISPR/Cas9 质粒表达系统^[29], 在稗黑粉菌(*Ustilago trichophora*)^[30]和大麦坚黑粉菌(*Ustilago hordei*)^[31]中均是在 *Hsp70* 启动子控制下高效表达了 Cas9 蛋白, 而在黑粉病致病菌 *Thecaphora thlaspeos* 中则是通过使用自身的 *Hsp70* 启动子成功驱动潮霉素抗性基因表达^[17]。然而这些研究中均笼统地写某一物种的“*Hsp70* 启动子”却并未指明使用了 *Hsp70* 家族中哪一个基因的启动子。本研究通过分析和比较南极莫氏黑粉菌 *Hsp70* 家族全部基因启动子的表达活性发现, 虽然这些基因在数据库均被命名为 *Hsp70*, 但它们的启动子却并非都具有高转录活性。

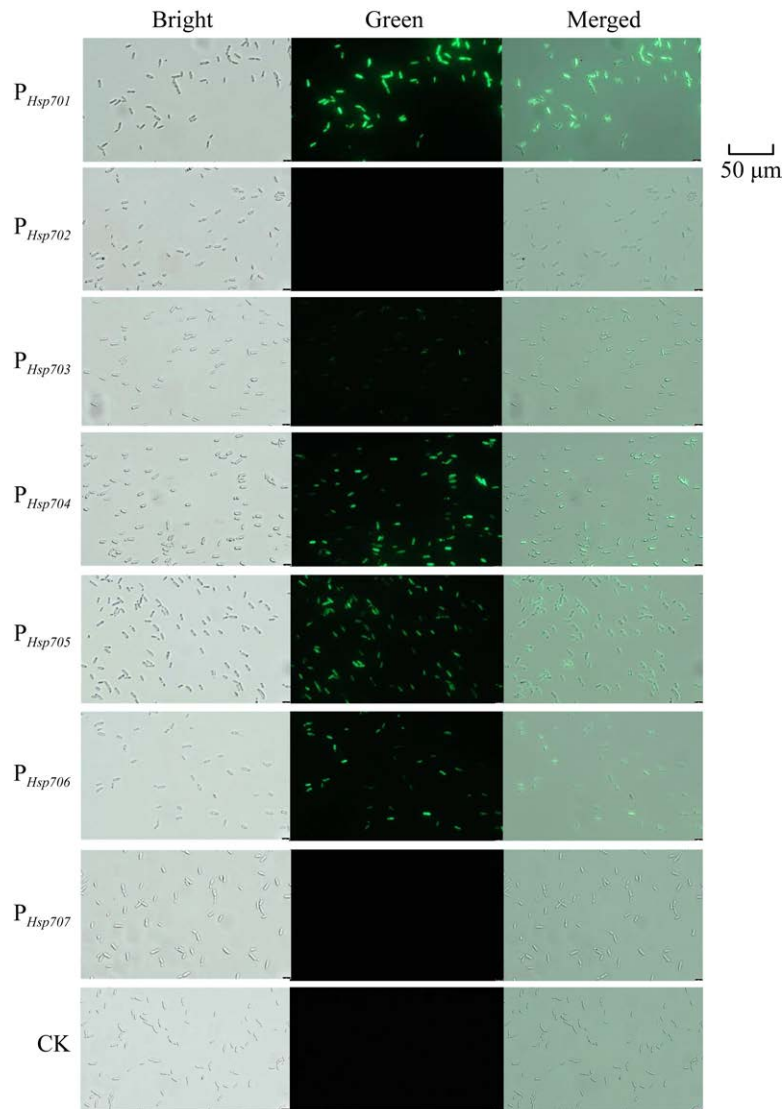


图 5 不同 *Hsp70* 启动子构建的 *eGFP* 表达载体阳性转化子的荧光观察结果 Bright: 白光通道下拍摄; Green: 绿色荧光通道下拍摄; Merged: 所有通道重叠

Figure 5 Fluorescence observation of positive transformants in *eGFP* expression vectors constructed with different *Hsp70* promoters. Bright: Shooting under white light channel; Green: Shooting under green fluorescent channel; Merged: Overlapping all channels.

在 *Hsp70* 家族成员的蛋白序列演化方面, 通过对南极莫氏黑粉菌与几个近缘黑粉菌 *Hsp70* 家族共同进行蛋白进化分析后发现同一物种内 *Hsp70* 家族各成员之间氨基酸序列差异较大, 可分为不同的亚家族, 且该家族各成员在近缘物种中具有高度保守性。这说明包括南

极莫氏黑粉菌在内的多种黑粉菌的 *Hsp70* 家族成员可能在演化地位更早的黑粉菌祖先中已演化出多个基因, 且这些基因可能具有不同功能、不同活性并且保留至今。而对南极莫氏黑粉菌 *Hsp70* 家族 7 个启动子中的关键顺式作用元件分析后发现各启动子内关键顺式作用元件种类

和数量同样具有明显差异, 通过进一步检测 *eGFP* 重组质粒转化子荧光值后发现 P_{Hsp701} 具有较高转录活性, P_{Hsp704} 、 P_{Hsp705} 、 P_{Hsp706} 转录活性适中, P_{Hsp703} 转录活性较低, P_{Hsp702} 和 P_{Hsp707} 转录活性极低。因此, 结合蛋白演化分析、启动子序列比对和 *eGFP* 表达结果可以推测, 可能只有与南极莫氏黑粉菌 MaHsp70-1 聚在同一分支的其他黑粉菌 *Hsp70* 启动子才具有高表达活性。因此, 在使用 *Hsp70* 启动子时需要谨慎, 不宜单纯根据基因名称搜索获得启动子序列, 而更应根据蛋白序列同源性来查找启动子。

本研究揭示了南极莫氏黑粉菌 *Hsp70* 家族各个启动子表达活性差异, 挖掘出几个有较高活性的启动子, 为南极莫氏黑粉菌的遗传操作增加了可用的基因表达调控元件。

REFERENCES

- [1] WANG QM, BEGEROW D, GROENEWALD M, LIU XZ, THEELEN B, BAI FY, BOEKHOUT T. Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the *Ustilaginomycotina*[J]. *Studies in Mycology*, 2015, 81: 55-83.
- [2] GOTO S, SUGIYAMA J, IIZUKA H. A taxonomic study of Antarctic yeasts[J]. *Mycologia*, 1969, 61(4): 748-774.
- [3] KRUSE J, DOEHLEMANN G, KEMEN E, THINES M. Asexual and sexual morphs of *Moesziomyces* revisited[J]. *IMA Fungus*, 2017, 8(1): 117-129.
- [4] LI YM, SHIVAS RG, LI BJ, CAI L. Diversity of *Moesziomyces* (*Ustilaginales*, *Ustilaginomycotina*) on *Echinochloa* and *Leersia* (*Poaceae*)[J]. *MycologyKeys*, 2019, 52: 1-16.
- [5] KHUNNAMWONG P, JINDAMORAKOT S, LIMTONG S. Endophytic yeast diversity in leaf tissue of rice, corn and sugarcane cultivated in Thailand assessed by a culture-dependent approach[J]. *Fungal Biology*, 2018, 122(8): 785-799.
- [6] SAIKA A, KOIKE H, YARIMIZU T, WATANABE T, KITAMOTO H, MORITA T. Deficiency of biodegradable plastic-degrading enzyme production in a gene-deletion mutant of phyllosphere yeast, *Pseudozyma antarctica* defective in mannosylerythritol lipid biosynthesis[J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 100.
- [7] YAMAMOTO S, MORITA T, FUKUOKA T, IMURA T, YANAGIDANI S, SOGABE A, KITAMOTO D, KITAGAWA M. The moisturizing effects of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, on human skin[J]. *Journal of Oleo Science*, 2012, 61(7): 407-412.
- [8] TANAKA E, KOITABASHI M, KITAMOTO H. A teleomorph of the ustilaginalean yeast *Moesziomyces antarcticus* on barnyardgrass in Japan provides bioresources that degrade biodegradable plastics[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2019, 112(4): 599-614.
- [9] WATANABE T, SHINOZAKI Y, YOSHIDA S, KOITABASHI M, SAMESHIMA-YAMASHITA Y, FUJII T, FUKUOKA T, KITAMOTO HK. Xylose induces the phyllosphere yeast *Pseudozyma antarctica* to produce a cutinase-like enzyme which efficiently degrades biodegradable plastics[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 117(3): 325-329.
- [10] SHINOZAKI Y, MORITA T, CAO XH, YOSHIDA S, KOITABASHI M, WATANABE T, SUZUKI K, SAMESHIMA-YAMASHITA Y, NAKAJIMA-KAMBE T, FUJII T, KITAMOTO HK. Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: cloning, sequencing, and characterization[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(7): 2951-2959.
- [11] DOMÍNGUEZ de MARÍA P, CARBONI-OERLEMANS C, TUIN B, BARGEMAN G, van der MEER A, van GEMERT R. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: state-of-the-art[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2005, 37(1/2/3/4/5/6): 36-46.
- [12] ALMALKI AFY, ARABDIN M, KHAN A. The role of heat shock proteins in cellular homeostasis and cell survival[J]. *Cureus*, 2021, 13(9): e18316.
- [13] 关兵兵. 玉米黑粉菌热激蛋白启动子介导的白僵菌转化效率评价[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学硕士学位论文, 2014.
GUAN BB. Evaluation of *Beauveria bassiana* transformation efficiency mediated by *Ustilago maydis* heat shock protein promoter[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Normal University, 2014 (in Chinese).
- [14] 王林玲, 林海静, 王钰, 李治, 周泽扬. 家蚕热休克蛋白 70 家族基因的染色体定位及表达特征[J]. *蚕业科学*, 2012, 38(4): 617-623.
WANG LL, LIN HJ, WANG Y, LI Z, ZHOU ZY. Chromosomal localization and expressional profile of heat shock protein 70 family genes in silkworm,

- Bombyx mori*[J]. Science of Sericulture, 2012, 38(4): 617-623 (in Chinese).
- [15] 卞加慧, 胡映莉, 汤近天, 夏文强, 叶子弘, 张雅芬. 菽黑粉菌遗传转化体系启动子的筛选[J]. 中国计量大学学报, 2022, 33(1): 106-115.
- BIAN JH, HU YL, TANG JT, XIA WQ, YE ZH, ZHANG YF. Screening promoters for the genetic transformation of *Ustilago esculenta*[J]. Journal of China University of Metrology, 2022, 33(1): 106-115 (in Chinese).
- [16] ZHANG ZJ, BIAN JH, ZHANG YF, XIA WQ, LI SY, YE ZH. An endoglucanase secreted by *Ustilago esculenta* promotes fungal proliferation[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(10): 1050.
- [17] PLÜCKER L, BÖSCH K, GEIßL L, HOFFMANN P, GÖHRE V. Genetic manipulation of the *Brassicaceae* smut fungus *Thecaphora thlaspeos*[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(1): 38.
- [18] SON SH, AHN JW, UJI T, CHOI DW, PARK EJ, HWANG MS, LIU JR, CHOI D, MIKAMI K, JEONG WJ. Development of an expression system using the heat shock protein 70 promoter in the red macroalga, *Porphyra tenera*[J]. Journal of Applied Phycology, 2012, 24(1): 79-87.
- [19] BOORSTEIN WR, ZIEGELHOFFER T, CRAIG EA. Molecular evolution of the *HSP70* multigene family[J]. Journal of Molecular Evolution, 1994, 38(1): 1-17.
- [20] 祁茂冬. 玉米 *HSP70* 家族成员的鉴定及抗旱基因的筛选和功能分析[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2018.
- QI MD. Identification of maize *HSP70* family members and screening and functional analysis of drought resistance genes[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [21] 张淑红, 范永山. 玉米大斑病菌热激蛋白 *Hsp70* 的鉴定和结构分析[J]. 福建农业学报, 2022, 37(9): 1187-1193.
- ZHANG SH, FAN YS. Identification and characterization of Heat shock protein *Hsp70* in *Setosphaeria turcica*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(9): 1187-1193 (in Chinese).
- [22] BLATZER M, BLUM G, JUKIC E, POSCH W, GRUBER P, NAGL M, BINDER U, MAURER E, SARG B, LINDNER H, LASS-FLÖRL C, WILFLINGSEDER D. Blocking *Hsp70* enhances the efficiency of amphotericin B treatment against resistant *Aspergillus terreus* strains[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(7): 3778-3788.
- [23] LIU YY, CHEN J, CHENG Y, LI Y, LI XW, ZHANG ZB, XU XM, LIN YF, XU JP, LI ZM. A simple and rapid technique of template preparation for PCR[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1024827.
- [24] YU JJ, ZHANG YF, CUI HF, HU P, YU XP, YE ZH. An efficient genetic manipulation protocol for *Ustilago esculenta*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(12): fmv087.
- [25] ZHANG YM, ZHENG YM, XIAO N, WANG LN, ZHANG Y, FANG RX, CHEN XY. Functional analysis of the HS185 regulatory element in the rice *HSP70* promoter[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(2): 1649-1657.
- [26] 黎晨. 玉米黑粉菌 *cyp51* 基因上游启动子克隆及功能鉴定[D]. 武汉: 华中师范大学硕士学位论文, 2010.
- LI C. Cloning of upstream region of *cyp51* gene from *Ustilago maydis* and analysis by bioinformatics[D]. Wuhan: Master's Thesis of Central China Normal University, 2010 (in Chinese).
- [27] SPENA A, HAIN R, ZIERVOGEL U, SAEDLER H, SCHELL J. Construction of a heat-inducible gene for plants. Demonstration of heat-inducible activity of the *Drosophila hsp70* promoter in plants[J]. The EMBO Journal, 1985, 4(11): 2739-2743.
- [28] HUANG W, HONG S, TANG GR, LU YZ, WANG CS. Unveiling the function and regulation control of the DUF3129 family proteins in fungal infection of hosts[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2019, 374(1767): 20180321.
- [29] SCHUSTER M, SCHWEIZER G, KAHMANN R. Comparative analyses of secreted proteins in plant pathogenic smut fungi and related basidiomycetes[J]. Fungal Genetics and Biology, 2018, 112: 21-30.
- [30] HUCK S, BOCK J, GIRARDELLO J, GAUERT M, PUL Ü. Marker-free genome editing in *Ustilago trichophora* with the CRISPR-Cas9 technology[J]. RNA Biology, 2019, 16(4): 397-403.
- [31] ÖKMEN B, SCHWAMMBACH D, BAKKEREN G, NEUMANN U, DOEHLEMANN G. The *Ustilago hordei*-barley interaction is a versatile system for characterization of fungal effectors[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(2): 86.