

多头绒泡菌微原质团瞬时表达系统的构建

刘士德^{1*}, 程彩霞^{1*}, 林子扬², 张建华¹, 李明华¹, 周卓龙¹, 田生礼¹, 邢苗¹

1 深圳大学生命科学学院 深圳市微生物基因工程重点实验室, 深圳 518060

2 深圳大学光电子研究所, 深圳 518060

摘要: 真核生物多头绒泡菌的原质团是研究细胞周期的好材料。但尚无合适的表达体系可供选择。本研究用多头绒泡菌 *ardC* actin 基因启动子和终止子分别替换哺乳动物细胞表达质粒 pDsRed1-N1 的 *CMV IE* 和 *SV40 polyA* 片段, 构建了多头绒泡菌红色荧光蛋白(RFP)表达质粒 pXM1; 用 *PardC-MCS-DsRed1-TardC* 替换 pTB38 表达盒 *PardC-hph-TardC*, 构建了多头绒泡菌 RFP 表达质粒 pXM2。将多头绒泡菌转录延伸因子类似蛋白(PELF1)基因与质粒 pXM2 重组, 构建了 PELF1 红色荧光融合蛋白(PELF1-RFP)表达质粒 pXM2-*pelf1*。通过荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察 RFP 表达发现, 电转参数为 4 kV/cm(电场)、1 A(电流)、70 μ s(电击时间)时, 质粒 pXM1 和 pXM2 电转多头绒泡菌微原质团($\leq 500 \mu$ m)后 24~48 h 内, RFP 荧光最显著; 而 PELF1-RFP 则主要聚集在多头绒泡菌细胞核, 说明本试验建立的表达系统可以用于研究特定蛋白在多头绒泡菌内的瞬时表达。

关键词: 多头绒泡菌, 微原质团, 瞬时表达

Transient expression in microplasmodia of *Physarum polycephalum*

Shide Liu^{1*}, Caixia Cheng^{1*}, Ziyang Lin², Jianhua Zhang¹, Minghua Li¹, Zhuolong Zhou¹, Shengli Tian¹, and Miao Xing¹

1 Shenzhen Key Laboratory of Microbial and Genetic Engineering, College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

2 Institute of Photoelectron, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

Abstract: The plasmodium of *Physarum polycephalum* is a suitable eukaryotic cell for cell cycle investigation, but there is no compatible transient expression system for the plasmodium. Using the promoter and terminator of *ardC* actin of *Physarum polycephalum* substituted the *CMV IE* and *SV40 polyA* of plasmid pDsRed1-N1, using cassette *PardC-MCS-DsRed1-TardC* substituted the cassette *PardC-hph-TardC* of plasmid pTB38, we constructed plasmids pXM1 and pXM2 for transient expression of red fluorescent protein (RFP) in *Physarum polycephalum* respectively. After reconstituting the transcription elongation factor homologous gene (*pelf1*) of *Physarum polycephalum* into the pXM2, we generated a plasmid pXM2-*pelf1*. After the plasmid pXM1, pXM2 and pXM2-*pelf1* were electroporated into the plasmodium of *Physarum polycephalum*, we observed optimum RFP and PELF1-RFP expression under fluoroscope and confocal microscope between 24–48 h after electroporation, and found that ELF1-RFP expression was accumulated in nucleus of microplasmodium, the optimum electroporation parameters were 40 V/cm electric field, 1

Received: January 14, 2009; **Accepted:** March 24, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30470113), Guangdong Natural Science Foundation (No. 04011314), Shenzhen Science & Technology Foundation (No. 200442).

Corresponding author: Miao Xing. Tel: +86-755-26557245; E-mail: xingmiao@szu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30470113), 广东省自然科学基金项目(No. 04011314), 深圳市科技基金项目(No. 200442)资助。

* These authors contributed equally to this study.

ampere current, and 70 μ s electric shock time. The results suggest that this expression system is qualified for transient expression of specific protein in plasmodium of *Physarum polycephalum*.

Keywords: *Physarum polycephalum*, microplasmodium, transient expression

多头绒泡菌(*Physarum polycephalum*)是一种黏菌,也是一种有线粒体的低等真核生物,其生命周期包括单细胞变形体(Amoeba)、多核原质团(Plasmodium)和孢子(Spore)形成等几个过程。其中,原质团是多头绒泡菌的主要生命形态,也是一种多核体细胞(非细胞结构,无胞壁,仅原生质膜)^[1]。多头绒泡菌的有丝分裂没有G1期,只有S期、G2期和M期,DNA合成始于有丝分裂末期结束^[2]。原质团内的基因复制与转录以及其他细胞生物学事件都是按同步化方式进行的^[3]。原质团在同步化培养20h后进入第一次同步有丝分裂中期;第一次至第二次有丝分裂中期的原质团生长最快、同步化效果最好^[4];是研究细胞周期变化的好材料。在前期研究中,先后从多头绒泡菌cDNA文库中分离出一个SR蛋白激酶(Physarum SRPK, PSRPK)基因和一个14-3-3蛋白(P14-3-3)基因,之后又以PSRPK和P14-3-3为诱饵蛋白,通过酵母双杂交分离出200余个cDNA片段及50余个完整的cDNA。生物信息学分析结果显示,上述基因编码的蛋白涉及多头绒泡菌的多个生命过程。由于缺少合适的多头绒泡菌表达系统,制约了上述蛋白的细胞生物学研究。因此,构建多头绒泡菌微原质团的表达质粒、建立质粒转化方法和表达产物的检测方法对多头绒泡菌基因表达及蛋白的生理功能研究具有重要意义。

多头绒泡菌ardC actin基因上游的1082 bp片段内含有ardC actin基因的启动子*PardC*和一个DNA复制子^[5,6]。本研究用*PardC*(GenBank Accession No. M73459)和ardC actin基因终止子*TardC*(GenBank Accession No. M73460)分别替换质粒pDsRed1-N1的CMV IE和SV40 polyA片段,构建了多头绒泡菌的RFP表达质粒pXM1;通过改造质粒pTB38,引入RFP基因序列,构建了多头绒泡菌RFP表达质粒pXM2;将多头绒泡菌转录延伸因子(Transcription elongation factor 1, ELF1)类似蛋白(*Physarum* ELF1, PELF1)基因与pXM2重组,构建了PELF1的红色荧光融合蛋白表达质粒pXM2-*pelf1*。通过荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察RFP的表达,确定了

质粒pXM1和pXM2的表达功能以及多头绒泡菌微原质团的电转条件。通过观察疑似核蛋白PELF1的核定位,印证了该瞬时表达系统的可信性。

1 材料与方法

1.1 多头绒泡菌ELF1类似蛋白cDNA

P14-3-3是从多头绒泡菌TU291菌株(由法国Reims大学细胞生物学实验室惠赠)分离的1个14-3-3蛋白,PELF1是以P14-3-3 C-端的181个氨基酸残基为诱饵蛋白,通过酵母双杂交从多头绒泡菌TU291菌株cDNA文库^[7]分离的1个ELF1类似蛋白,其完整cDNA的GenBank序列号为No. FJ422212。

1.2 多头绒泡菌表达质粒的构建

以质粒pTB38(由加拿大Wisconsin大学McArdle实验室Gerard Pierron惠赠)为模板,用引物F1/R1(表1)PCR *PardC1*片段。通过Ase I、Bgl II内切酶和T4 DNA连接酶(TaKaRa),用*PardC*替换质粒pDsRed1-N1(Clontech)的*pCMV IE*片段;转化*E. coli* DH5 α ,制备过渡质粒pXM。以质粒pTB38为模板,用引物F2/R2(表1)PCR *TardC1*片段;以*TardC1*片段为模板,用引物F3/R3(表1)PCR扩增C²⁵突变为G²⁵的*mTardC*片段。通过Not I和Afl II内切酶(TaKaRa),用*mTardC*替换pXM上的SV40 poly A片段;制备成红色荧光蛋白表达质粒pXM1(图1)。以pDsRed1-N1为模板,用引物F4/R4(表1)PCR *DsRed1*片段;以pTB38为模板,用引物F5/R5(表1)PCR扩增*PardC2*片段,用引物F6/R6(表1)PCR扩增*TardC2*片段;之后再引物F7/R7(表1)overlap-PCR扩增*DsRed1*和*TardC2*片段;通过Kpn I酶切*PardC2*和*DsRed1-TardC2*片段,并连接成含MCS(Kpn I、Sma I和Sal I)的表达盒*PardC-MCS-DsRed1-TardC*;通过Hind III和Sac I酶切酶,用*PardC-MCS-DsRed1-TardC*替换pTB38的*PardC-hph-TardC*片段;转化*E. coli* DH5 α ,制备成红色荧光表达质粒pXM-2(图2)。以质粒pGADT7-*pelf1*为模板,用引物F8/R8(表1)PCR扩增

PELF1 基因片段, 之后重组到 pXM2 对应位点上, 转化 *E. coli* DH5 α 后, 制备成 PELF1 红色荧光融合蛋白表达质粒 pXM2-*pe1f1*。通过酶切和测序确认质粒 pXM1、pXM2 和 pXM2-*pe1f1* 重组序列的正确。

1.3 质粒电转化多头绒泡菌微原质团

参照 Daniel 等^[8]的方法, 在 250 mL 三角烧瓶中, 加入 20 mL SDM 的 A 贮液(1000 mL 溶液含 Glucose 10 g, DifCo BactoSoytone 10 g, Citric Acid monohydrate 3.54 g, KH₂PO₄ 2 g, CaCl₂·2H₂O 1.026 g, MgSO₄·7H₂O 0.6 g, ZnSO₄·7H₂O 0.034 mg, Thiamine-

HCl 0.0424 mg, Biotin 0.0158 mg, 用 4 mol/L 的 KOH 调整 pH 至 4.6)、0.2 mL SDM 的 B 贮液(含 0.05% hematin 和 1% NaOH(W/V)和 1% 多头绒泡菌(*P. polycephalum* PpII(+/-) strain, ATCC 编号为 24467, 由德国雷根斯堡大学生物物理学所惠赠) 微原质团(W/V), 在 260 r/min、24~26°C 下暗培养, 每 3 d 传代 1 次。参考 Burland 等^[9-11]电转化 *Physarum amoebae* 的方法, 取悬浮培养 48~72 h、直径小于 500 μ m 的微原质团, 在 2000 r/min 下离心 2 min, 用等体积

表 1 DNA 片段扩增引物

Table 1 Primers used for cloning DNA fragments

| DNA fragments | Primers name | Forward and reward primers with cleaving sites | Cleaving sites |
|--------------------------------|--------------|--|--|
| <i>PardC1</i> | F1 | 5'-AGTTATTAATG GATCTCCACACTATTGCAC-3' | <i>Ase</i> I |
| | R1 | 5'-GGAAGATCTTGC GGTTTGTGTTTGTGTTG-3' | <i>Bgl</i> II |
| <i>TardC1</i> | F2 | 5'-ACGCACCCG TAGTCGCTCCCAATTG-3' | <i>Afl</i> II |
| | R2 | 5'-CGCTTAAGACATTCTCCCCACACAATATAGCCGCGAC-3' | |
| <i>mTardC</i> | F3 | 5'-ATTTGCGGCCGCACGCACCCGTAGTCGCTCCCAATTG-3' | <i>Not</i> I |
| | R3 | 5'-CGCTTAAGACATTCTCCCCACACAATATAGCCGCGAC-3' | <i>Afl</i> II |
| <i>DsRed1</i> | F4 | 5'-CGGGGTACCCCGGGGTCGACGTGCGCTCCTCCAAG-3' | <i>Hind</i> III |
| | R4 | 5'-CTACGGGTGCGTTTACAGGAACA GGTGGTGGC-3' | |
| <i>PardC2</i> | F5 | 5'-CCCAAGCTTGGATCTCCACACTATT GCAC-3' | <i>Kpn</i> I |
| | R5 | 5'-GGGGTACCTGC GGTGTTGTTGTTGTTGTTG-3' | |
| <i>TardC2</i> | F6 | 5'-CCTGTTCTGTAAACGCAC CCGTAGTCGCTCCC-3' | <i>Sac</i> I |
| | R6 | 5'-CGAGCTCGAATTCA CATTCTCCCCACAC-3' | |
| Overlap <i>DsRed1-TardC</i> | F7 | 5'-CGGGGTACCCCGGGGTC GACGTGCGCTCCTCCAAG-3' | <i>Kpn</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Sal</i> I |
| | R7 | 5'-CGAGCTCGAATTCACATTCTC CCCACAC-3' | |
| <i>pe1f1</i> | F8 | 5'-CGGGGTACCATGGGTAAGAAA GAAG-3' | <i>Kpn</i> I |
| | R8 | 5'-ACGCGTCGACTGTT GCATATTCCTCTC-3' | |

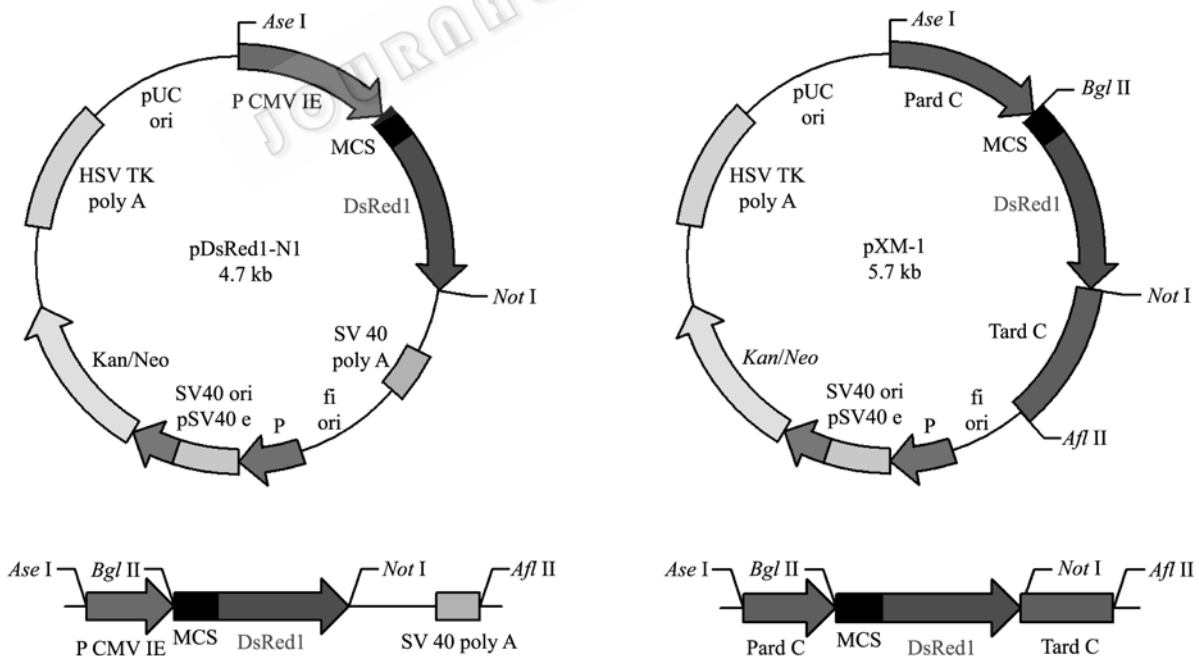


图 1 基于质粒 pDsRed1-N1 构建的多头绒泡菌红色荧光蛋白表达质粒 pXM1

Fig. 1 Schematic diagrams of *Physarum polycephalum* vector pXM1 constructed basing on plasmid pDsRed1-N1. After fragment *pCMV IE* of pDsRed1-N1 was replaced by *PardC* with endonucleases *Ase*I and *Bgl* II, and fragment *SV40 poly A* of pDsRed1-N1 was replaced by mutant *TardC* (*C*²⁵ mutated to *G*²⁵) with endonucleases *Not* I and *Afl* II, plasmid pXM1 was constructed.

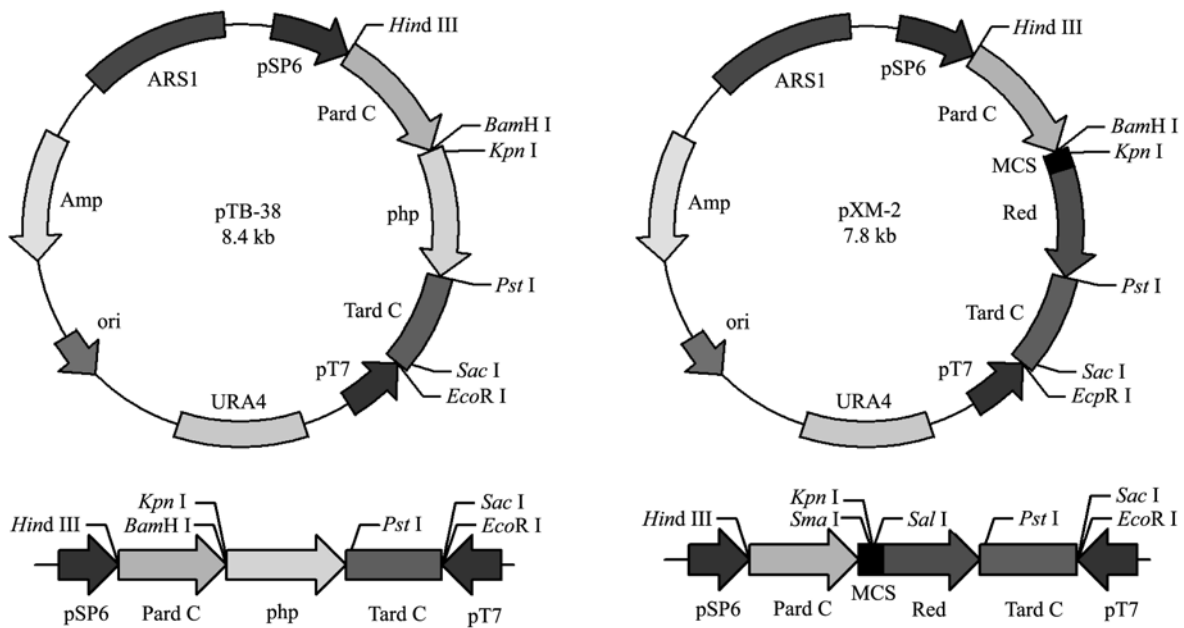


图 2 基于质粒 pTB38 构建的多头绒泡菌红色荧光蛋白表达质粒 pXM2

Fig. 2 Schematic diagrams of *Physarum polycephalum* vector pXM2 constructed basing on plasmid pTB38. After fragment *PardC-hph-TardC* of plasmid pTB38 was replaced by fragment *PardC-MCS-DsRed1-TardC* with endonucleases *Hind* III and *Sac* I, plamid pXM2 was constructed.

ZAPP 液(40 mmol/L Sucrose, 10 mmol/L HEPES, pH 8.2)洗涤, 用 ZAPP 液重悬, 之后在 4°C 下过夜。取 800 μ L 直径小于 500 μ m 的多头绒泡菌微原质团液悬液(约 $0.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$ 个)和 5 μ g 质粒溶液, 在直径为 4 mm 的 Bio Rad 电转杯中混匀, 冰浴后按表 2 的参数, 在 Multiporator[®]电转仪(Eppendorf AG)上进行电转化。将多头绒泡菌微原质团转移到 EP 管中, 在 30°C 水浴中复苏 20 min。取 800 μ L 复苏的电转化微原质团滴加到 10 mL SDM 培养基中, 24°C~26°C 下暗培养 8 h 后, 每隔 8 h 取 1 mL 菌液, 2000 r/min 离心 4 min 后, 用无菌蒸馏水清洗 2 次并压片, 通过荧光显微镜观察荧光蛋白的表达情况。

1.4 多头绒泡菌细胞核的常规染色

取少量液体培养的多头绒泡菌于载玻片上, 加一滴卡宝品红染液[45 mL 品红母液(0.3 g 碱性品红, 10 mL 70%乙醇, 90 mL 5%苯酚(W/V)), 6 mL 冰醋酸和 6 mL 37%甲醛的混合液]于菌体上, 之后在 Olympus BX51 显微镜下(可见光)观察、拍照。

1.5 荧光蛋白的表达观测

在荧光显微镜(Olympus BX51)下观察质粒电转化多头绒泡菌微原质团后红色荧光蛋白(RFP)及 PELF1-RFP 的表达情况, 之后通过激光扫描共聚焦

显微镜(TCS SP2, Leica), 在 558 nm 激发波长下, 560~600 nm 范围内观察 RFP 或 PELF1-RFP 的表达或分布。

2 结果

2.1 质粒的构建和酶切鉴定

通过酶切和琼脂糖凝胶电泳检测质粒 pXM1、pXM2 和 pXM2-*pelf1* 的重组序列。图 3 显示, 用 *Ase* I 和 *Bgl* II 酶切 pXM1, 产生一个与 *PardC* 大小一致的 DNA 片段; 用 *Not* I 和 *Afl* II 酶切质粒 pXM1, 产生一个与 *TardC* 大小一致的 DNA 片段; 说明 *PardC* 和 *TardC* 片段存在于质粒 pXM1 上。用 *Hind* III 和 *Sac* I 酶切质粒 pXM2, 产生一个与 *PardC-MCS-DsRed1-TardC* 大小一致的 DNA 片段, 说明 *PardC-MCS-DsRed1-TardC* 存在于质粒 pXM2 上。用 *Kpn* I 和 *Sac* I 酶切质粒 pXM2-*pelf1*, 产生一个与 PELF1 基因大小一致的 DNA 片段, 说明 PELF1 基因存在于质粒 pXM2-*pelf1* 上。质粒 pXM1、pXM2 和 pXM2-*pelf1* 的测序结果进一步证实, *PardC* 和 *TardC* 分别替换了质粒 pDsRed1-N1 的 *CMV IE* 和 *SV40 polyA*, *PardC-MCS-DsRed1-TardC* 替换了质粒 pTB38 的 *PardC-hph-TardC*, PELF1 基因正确插入到

pXM2 的 *Kpn* I 和 *Sac* I 的酶切位点间, 说明上述 3 个质粒的构建是成功的。

2.2 红色荧光蛋白在多头绒泡菌微原质团内表达
分别取 5 μ g 测序确认的质粒 pXM1 和 pXM2 电转化(电转参数为 4 kV/cm、1 A、70 μ s)多头绒泡菌微原质团(500 μ m), 36 h 后用荧光显微镜(Olympus BX51)和激光扫描共聚焦显微镜(Leica TCS SP2)观察红色荧光蛋白在多头绒泡菌微原质团内的表达, 发现 2 个转化菌内均有红色荧光出现(图 4); 说明由 *PardC* 启动、*TardC* 终止的红色荧光蛋白表达质粒 pXM1 和 pXM2 均能在多头绒泡菌微原质团中表达外源基因。

2.3 质粒电转多头绒泡菌微原质团的最佳条件
按表 2 的电转参数, 分别将 5 μ g 质粒 pXM2 电

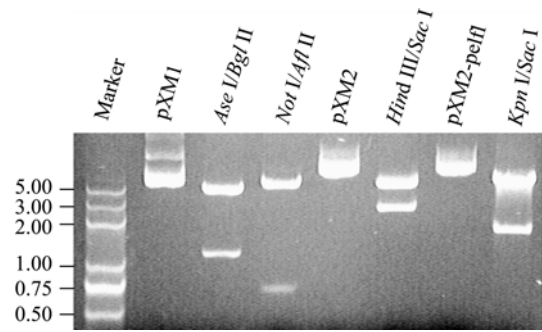


图 3 质粒 pXM1、pXM2 和 pXM2-*pelf1* 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis pattern of plasmids pXM1, pXM2, pXM2-*pelf1*, and their digested products. *Ase* I/*Bgl* II: pXM1 digested by *Ase* I and *Bgl* II; *Not* I/*Afl* II: pXM1 digested by *Not* I and *Afl* II; *Hind* III/*Sac* I: pXM2 digested by *Hind* III and *Sac* I; *Kpn* I/*Sac* I: pXM2-*pelf1* digested by *Kpn* I and *Sac* I.

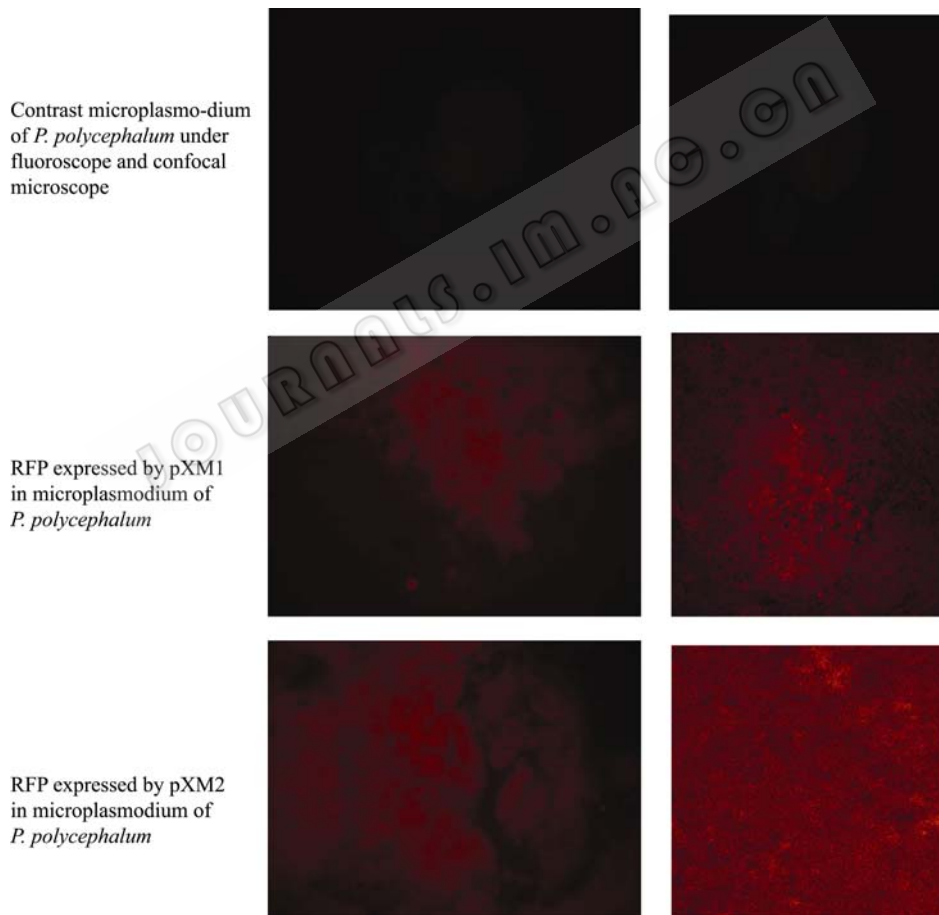


图 4 质粒 pXM1 和 pXM2 电转多头绒泡菌微原质团 36 h 后观察的红色荧光蛋白表达

Fig. 4 RFP expression in microplasmidium of *Physarum polycephalum* after vectors pXM1 and pXM2 were electroporated for 36 h. Figures on left lane: RFP expression observed under fluoroscope (Olympus BX51, 1000 \times , 500 ms exposure); figures on right lane: RFP expression observed under confocal microscope (Leica TCS SP2, 1000 \times); electroporation parameters: 4.0 kV/cm, 1.00 A, 70 μ s.

转到 800 μL 多头绒泡菌微原质团中, 8 h 后观察多头绒泡菌的生长变化, 发现电转参数为 4.0 kV/cm、1.00 A、60 μs 、4.0 kV/cm、1.00 A、70 μs 和 5.0 kV/cm、1.25 A、60 μs 时, 菌体生长基本正常, 形态没有明显改变(见表 2), 培养 36 h 后, 可以在荧光显微镜下观察到 RFP 的表达(图 5); 其中, 电转参数为 4.0 kV/cm、1.00 A、70 μs 时, 荧光最显著。而电转参数为 4.0 kV/cm、1.00 A、75 μs 和 5.5 kV/cm、1.38 A、60 μs 时, 菌体培养 30 h 后出现死亡(表 2); 说明多头绒泡菌微原质团的最佳电转参数为 4.0 kV/cm、1.00 A、70 μs 。通过跟踪观察转基因微原质团的荧光强度变化, 发现质粒 pXM2 转化多头绒泡菌的 24 h 内, 只有微量 RFP 表达, 48 h 后荧光强度明显降低, 72 h 后基本观察不到荧光, 说明质粒在多头绒泡菌表达的最佳观察时间为电转化后的 24~48 h。此外, 还将线性质粒 pXM2 及表达盒 *PardC-red-TardC* 电转化到多头绒泡菌微原质团中(电转参数为 4.0 kV/cm、1.00 A、70 μs), 36 h 后分别在荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜下观察红色荧光蛋白在多头绒泡菌微原质团的表达情况。与环型质粒 pXM2 不同, 线性质粒 pXM2 及表达盒 *PardC-red-TardC* 均不能在多头绒泡菌中看到红色荧光蛋白表达, 说明只有环型质粒能在多头绒泡菌中表达外源基因。

表 2 电转参数对多头绒泡菌微原质团的生长和 RFP 表达的影响

Table 2 Electrofusion parameters effect on the growth and RFP expression of microplasmidium of *P. polycephalum*

| Electric field | Current | Charge time | Effect on growth | Effect on expression |
|----------------|---------|------------------|------------------|----------------------|
| 4.0 kV/cm | 1.00 A | 60 μs | + | + |
| 4.0 kV/cm | 1.00 A | 70 μs | + | ++ |
| 5.0 kV/cm | 1.25 A | 60 μs | + | + |
| 4.0 kV/cm | 1.00 A | 75 μs | - | - |
| 5.5 kV/cm | 1.38 A | 60 μs | - | - |

Notes: +: normal; ++: positive; -: negative.

2.4 重组表达的 PELF1 红色荧光融合蛋白主要定位在细胞核

本课题组从多头绒泡菌分离的 ELF1 类似蛋白 cDNA 含有 565 个核苷酸, 编码 100 个氨基酸。编码序列与人 (*Homo sapiens*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 ELF1 蛋白 (GenBank Accession Nos. 分别为 NP_115753、NP_568654 和 NP_012762) 序列高度同

源(图 6), 本研究将其命名为 PELF1(*Physarum* ELF1)。SWISS-MODEL 软件^[12-14]模拟的三级结构图谱显示, PELF1 与其他物种 ELF1 一样, 也是一个锌指蛋白, 锌指结构域内也存在 4 个保守的半胱氨酸(图 6 内*标记的氨基酸)。PSORT II 软件^[15]分析结果显示, PELF1 N-端还存在一个经典的核定位信号序列(序列比对图谱中下划线标记的肽段), 说明 PELF1 可能是一个核蛋白, 可以用于观察红色荧光融合蛋白在多头绒泡菌内的表达分布。将质粒 pXM2-*pelf1* 电转化到多头绒泡菌微原质团(电转参数为 4.0 kV/cm、1.00 A、70 μs), 培养 36 h 后, 在荧光显微镜下初步观察 PELF1-RFP 在多头绒泡菌内的表达情况, 再通过激光扫描共聚焦显微镜观察 PELF1-RFP 在多头绒泡菌细胞内的分布, 结果见图 7。参考多头绒泡菌细胞核在原质团内的分布(图 7C)可以看出, pXM2-*pelf1* 在多头绒泡菌表达的 PELF1-RFP 在核内外均有分布(图 7B), 但核内的分布密度更高, 说明 PELF1 是一个核蛋白。上述结果也说明, 质粒 pXM1、pXM2 和 pXM2-*pelf1* 电转化多头绒泡菌微原质团后, 通过荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察到的红色荧光是由 RFP 或 PELF1-RFP 发射光产生的。

3 讨论

多头绒泡菌有 4 个 actin 基因, 其中, *ardC* actin 基因的复制发生在有丝分裂早 S 期^[16]。Burland 等^[5,6]发现, *ardC* actin 基因上游的 1082 bp 片段(*PardC*)内不仅含有 *ardC* actin 基因的启动子还含有一个复制子。Burland 等将 *PardC* 片段重组在酵母表达质粒 pGEM-7Zf(+)*pSP6* 启动子下游, 并在 *PardC* 和 *pT7* 之间分别插入了氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因、潮霉素磷酸转移酶(HPH)基因和萤火虫荧光素酶(LUC)基因, 构建了 CAT、HPH 和 LUC 表达质粒; 将上述质粒电转化到多头绒泡菌变形体后, 能检测到 CAT、HPH 和 LUC 的瞬时表达^[9-11]; 说明以质粒 pGEM-7Zf(+)*pSP6* 为基础构建的, *PardC* 启动的质粒能在多头绒泡菌变形体内表达外源基因。Burland 等^[10]还在 pGEM-7Zf(+)*pSP6* 的基础上构建了 *PardC* 启动的、*ardC* actin 基因终止子 *TardC* 终止的 HPH 表达质粒 pTB38, 并发现环型和线型 pTB38 都能在多头绒泡菌变形体内瞬时表达 PHP。本研究构建的多头

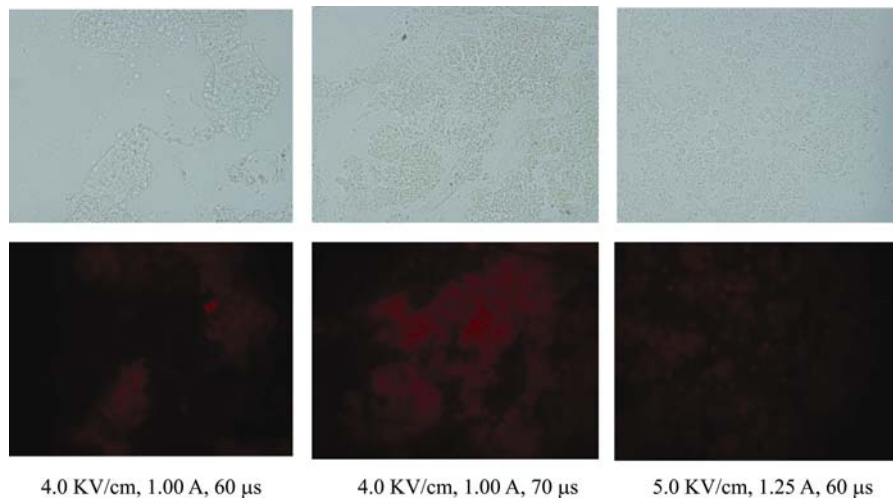


图 5 电转参数对质粒 pXM2 转化多头绒泡菌微原质团的影响

Fig. 5 Electroporation parameters effect on plasmid pXM2 transformed into microplasmodium of *Physarum polycephalum*. (A) Microplasmodium of *Physarum polycephalum* observed under optical microscope. (B) RFP expression in *Physarum polycephalum* observed under fluoroscope (Olympus BX51, 1000×, 500 ms exposure) after pXM2 were electroporated into microplasmodium (parameter are 4.0 kV/cm, 1.00 A, 60 μs; 4.0 kV/cm, 1.00 A, 70 μs; and 5.0 kV/cm, 1.25 A, 60 μs respectively) for 36 h.

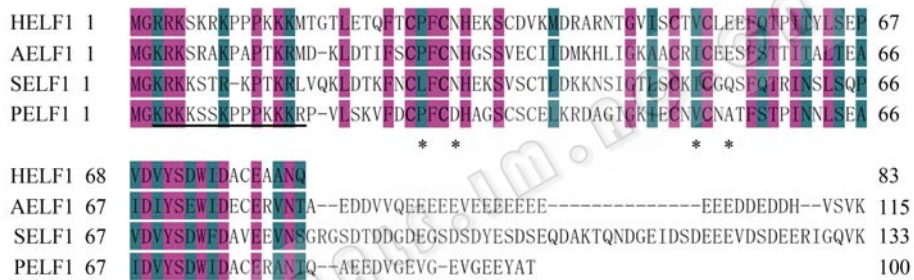


图 6 多头绒泡菌 ELFI 类似蛋白(PELFI)与人、拟南芥和酵母同源蛋白(HELFI、AELFI 和 SELFI)的序列比对结果

Fig. 6 Homologues of PELFI were identified by standard protein BLAST analysis. Full-length homologous protein sequences from several eukaryotic organisms were then aligned using DNAssist 2.0. Conserved and semiconservative substitutions are grayed in different color. The four conserved cysteines of the zinc finger domain are noted by asterisk below the alignment. HELFI, AELFI and SELFI are the homologous of PELFI from *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae*, respectively. A NLS (nuclear localization sequence) like motif is underlined below PELFI sequence.

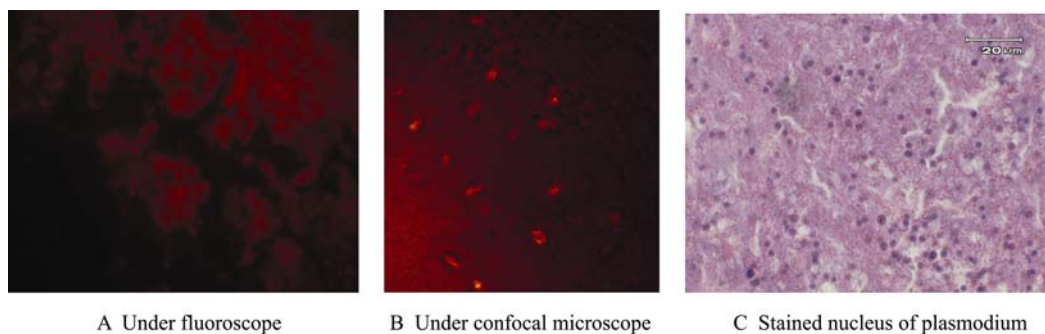


图 7 转录延伸因子 PELFI 在多头绒泡菌细胞内的表达分布

Fig. 7 Distribution of PELFI fusion RFP expression in *Physarum polycephalum*. Fig. A and B: PELFI-RFP observed under fluoroscope (Olympus BX51, 1000×, 500 ms exposure) and confocal microscope (Leica TCS SP2, 5,000×) after plasmid pXM2-*pelfi* had been electroporated into microplasmodium (4.0 kV/cm, 1.00 A, 70 μs) for 36 h. Fig. C: carbolfuchsin stained nucleus of plasmidium observed under Olympus BX51 microscope (400×).

绒泡菌红色荧光蛋白表达质粒 pXM2(图 2)去掉了质粒 pTB38 的 HPH 基因, 增加了红色荧光蛋白(RFP)基因和多个多克隆位点, 主要用于多头绒泡菌瞬时表达红色荧光融合蛋白。pDsRed1-N1 是哺乳动物细胞的红色荧光融合蛋白瞬时表达质粒。在构建多头绒泡菌瞬时表达质粒 pXM1 时, 用 *PardC* 和 *TardC* 分别替换了质粒 pDsRed1-N1 的 *CMV IE* 序列和 *SV40 polyA* 序列, 保留了 MCS 序列和 *DsRed1* 序列(图 1), 以便质粒 pXM1 能在多头绒泡菌中表达红色荧光蛋白或红色荧光融合蛋白; 保留了 *pUC ori* 序列和 *Kan/Neo* 序列, 以便质粒 pXM1 在大肠杆菌中克隆; 保留了 *f1* 噬菌体的复制起始序列 *f1 ori*, 以便制备质粒 pXM1 的单链 DNA, 使得 pXM1 具备了表达质粒的基本功能。

多头绒泡菌变形体是由孢子萌发产生的单倍体细胞, 没有细胞壁, 没有固定形状, 但能伸出假足捕食细菌或其他颗粒状食物, 因此被 Burland 等选作质粒转化的感受态细胞^[9,10]。单倍体变形体需要结合成双倍体合子后才能聚集成原质团, 以变形体作为质粒的宿主细胞, 适合观察多头绒泡菌的发育及分化, 不适合研究多头绒泡菌的细胞周期变化。多头绒泡菌原质团是观察细胞周期变化和蛋白分布的最佳生命形态, 因此本研究选择小于 500 μm 的微原质团作为质粒转化的宿主细胞, 研究了质粒 pXM2 电转化多头绒泡菌微原质团的条件。通过荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察红色荧光蛋白在原质团内的表达发现, 在电转参数为 4.0 kV/cm、1.00 A、60 μs 、4.0 kV/cm、1.00 A、70 μs 和 5.0 kV/cm、1.25 A、60 μs 的多头绒泡菌原质团中, 能观察到质粒 pXM2 表达的 RFP(图 5); 其中, 电转参数为 4.0 kV/cm、1.00 A、70 μs 的多头绒泡菌原质团中 RFP 的荧光强度最大; 说明在合适的条件下, 可以将质粒电转化到多头绒泡菌微原质团内表达。在电转参数为 4 kV/cm、1.00 A、70 μs 时, 将质粒 pXM1 转化到多头绒泡菌微原质团内, 也能观察到 RFP 的表达(图 4), 说明质粒 pXM1 与质粒 pXM2 一样, 都能在多头绒泡菌原质团内表达外源基因。除了上述研究外, 还观察了线性 pXM2 在多头绒泡菌原质团的表达, 没有在荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜下观察到 RFP 的表达, 说明线性质粒不能像在变形体细胞一样在原质团内表达外源基因。在实验中

还发现, 质粒 pXM2 转化多头绒泡菌的前 24 h, 只能观察到微弱的 RFP 荧光; 之后, RFP 荧光逐渐增强; 36 h 左右, RFP 荧光强度达到最大; 48 h 后, 荧光强度明显降低; 72 h 后, 基本观察不到荧光; 说明观测外源基因在多头绒泡菌原质团表达的最佳时间为质粒电转化后的 24~48 h。

PELF1 是从多头绒泡菌中分离出的 1 个 ELF1 类似蛋白, 该蛋白与其他物种 ELF1 高度同源, 与酵母 ELF1 的高级结构类似, N-端存在一个经典核定位信号类似序列, 适合于观察蛋白在多头绒泡菌细胞内的表达。为了进一步验证本表达系统的可信性, 将 PELF1 基因重组到质粒 pXM2 的多克隆位点上, 将重组质粒 pXM2-*pelF1* 电转化到多头绒泡菌微原质团内, 观察了 PELF1-RFP 的表达分布, 发现核内外都有 PELF1-RFP 荧光, 但荧光主要聚集在核内(图 7), 说明通过荧光显微镜和激光扫描共聚焦显微镜观察到的荧光是重组质粒 pXM2 表达的红色荧光蛋白, 也证明本试验的研究结果是可信的。

进化保守的 ELF1 蛋白是一类与 DNA 结合的转录延伸因子。研究显示, 哺乳动物 ELF1 主要结合在基因转录区内以 GGAA 为核心的嘌呤富含区序列上^[17,18]; 酵母 ELF1 在基因转录延伸过程中主要结合在基因转录区^[19], 并通过 Paf1 复合物以及转录延伸因子 TFIIIS、Spt4、Spt5 和 Spt6 等调节基因的转录延伸^[20,21]。与 TFIIIS、Spt4 等转录延伸因子一样, ELF1 也含有具有 C4 锌指结构和 4 个保守的半胱氨酸; C4 锌指结构可能在保持基因活性转录区的染色质的合适结构上扮演着重要角色^[22]。结构分析^[12-15]结果显示, PELF1 不仅含有 C4 锌指结构, 其 N-端的 3~18 aa 肽段内还存在一个经典的核定位信号序列。图 7 还显示, 重组 PELF1-RFP 主要聚集在细胞核内, 印证了 PELF1 核定位的推测。

REFERENCES

- [1] Gawlitta W, Wolf kV, Hoffmann HU, *et al.* Studies on microplasmidia of *Physarum polycephalum*. I. classification and locomotion behavior. *Cell Tissue Res*, 1980, **209**: 71-86.
- [2] Kessler D. Nucleic acid synthesis during and after mitosis in the slime mold, *Physarum polycephalum*. *Exp Cell Res*, 1967, **45**(3): 676-680.
- [3] Bailey J. Plasmodium development in the myxomycete

- Physarum polycephalum*: Genetic control and cellular events. *Microbiology*, 1995, **141**: 2355–2365.
- [4] Burland TG, Solnica-Krezel L, Bailey J, *et al.* Patterns of inheritance, development and the mitotic cycle in the protist *Physarum polycephalum*. *Adv Microb Physiol*, 1993, **35**: 1–69.
- [5] Bénard M, Lagnel C, Pallotta D, *et al.* Mapping of a replication origin within the promoter region of two unlinked, abundantly transcribed actin genes of *Physarum polycephalum*. *Mol Cell Biol*, 1996, **16**: 968–976.
- [6] Pierron G, Pallotta D, Bénard M. The one-kilobase DNA fragment upstream of the *ardC* actin gene of *Physarum polycephalum* is both a replicator and a promoter. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(5): 3506–3514.
- [7] Ouyang QL, Liu SD, Zhang JH, *et al.* Screening of the psrpk-related protein genes with yeast two-hybrid method. *J Shenzhen Univ Sci Eng*, 2006, **23**(3): 38–45.
欧阳秋玲, 刘士德, 张建华, 等. 采用酵母双杂交法筛选 PSRPK 相关蛋白基因. 深圳大学学报(理工版), 2006, **23**(3): 38–45.
- [8] Daniel JW, Baldwin HH. Methods of culture of plasmodial myxomycetes. In: Prescott DM (Ed), *Methods in Cell Physiology*. New York: Academic Press, 1964: 9–41.
- [9] Burland TG, Bailey J, Adam L, *et al.* Transient expression in *Physarum* of a chloramphenicol acetyltransferase gene under the control of actin gene promoters. *Curr Genet*, 1992, **21**: 393–398.
- [10] Burland TG, Bailey J, Pallotta D, *et al.* Stable, selectable, integrative DNA transformation in *Physarum*. *Gene*, 1993, **132**: 207–212.
- [11] Bailey J, Benard M, Burland TG. A luciferase expression system for *Physarum* that facilitates analysis of regulatory elements. *Curr Genet*, 1994, **26**: 126–131.
- [12] Guex N. Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 2714–2723.
- [13] Schwede T, Kopp J, Guex N, *et al.* SWISS-MODEL: An automated protein homology- modeling server. *Nucl Acids Res*, 2003, **31**: 3381–3385.
- [14] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, *et al.* The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, **22**: 195–201.
- [15] Bairoch A, Bucher P, Hofmann K. The PROSITE database, its status in 1997. *Nucl Acids Res*, 1997, **25**(1): 217–221.
- [16] Pierron G, Durica DS, Sauer HW. Invariant temporal order of replication of the four actin gene loci during the naturally synchronous mitotic cycles of *Physarum polycephalum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 6393–6397.
- [17] Wang CY, Petryniak B, Ho IC, *et al.* Evolutionarily conserved Ets family members display distinct DNA binding specificities. *J Exp Med*, 1992, **175**(5): 1391–1399.
- [18] Bosselut R, Levin J, Adjadj E, *et al.* A single amino-acid substitution in the Ets domain alters core DNA binding specificity of Ets1 to that of the related transcription factors Elf1 and E74. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**(22): 5184–5191.
- [19] Prather D, Krogan NJ, Emili A, *et al.* Identification and characterization of Elf1, a conserved transcription elongation factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(22): 10122–10135.
- [20] Hartzog GA, Wada T, Handa H, *et al.* Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, 1998, **12**(3): 357–369.
- [21] Squazzo SL, Costa PJ, Lindstrom DL, *et al.* The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors *in vivo*. *EMBO J*, 2002, **21**(7): 1764–1774.
- [22] Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV. Structural classification of zinc fingers: Survey and summary. *Nucl Acids Res*, 2003, **31**(2): 532–550.