银耳芽孢的诱导培养及其差异基因片段的克隆

聂燕华[1]，王杰[2]，林俊芳[2,3]，郭丽琼[2,3]
（1.广东农工商职业技术学院热作系，广东广州 510507）
（2.华南农业大学食品学院生物工程系，广东广州 510640）（3.华南农业大学生物质能研究所，广东广州 510640）

摘要：为了探讨银耳芽孢内源诱导型启动子克隆的有效方法，克隆银耳芽孢诱导型差异基因片段，本研究采用乙醇和纤维二糖两种碳源对银耳芽孢进行诱导培养，对其生长情况进行了比较分析，并用 cDNA-AFLP 技术对差异培养的细胞进行差异表达基因克隆及分析。结果表明乙醇、纤维二糖诱导碳源培养银耳芽孢与葡萄糖相比具有很大差异，其中乙醇培养细胞脱氢酶类活性提高 168%，纤维二糖培养细胞最大生长量减小 32.2%。从两种差异培养的细胞中克隆得到 14 条特异性的差异表达基因片段，其中 5 条在乙醇、纤维二糖样品中各有表达的差异序列，与编码细胞色素 C 氧化酶、细胞色素 b 蛋白的基因序列同源，该基因的表达与乙醇代谢途径及胁迫诱导相关。银耳芽孢诱导培养及其诱导差异基因片段的克隆是建立食用菌诱导型表达系统一次有益尝试，为构建高效银耳生物反应器提供一定的理论参考。

关键词：银耳；芽孢；诱导剂；差异表达；cDNA-AFLP
文章篇号：1673-9078(2012)7-737-742

Induction Culture and Isolation Inductive Differentially Expressed Gene Fragments from Yeast-like Conidia of *Tremella fuciformis*

NIE Yan-hua[1], WANG Jie[2], LIN Jun-fang[2,3], GUO Li-qiong[2,3]
(1.Department of Tropical Crop, Guangdong AIB Polytechnic University, Guangzhou 510507, China)
(2.College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)
(3.Institute of Biomass Research, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to probe an effective way of cloning the endogenous inductive promoter and isolating inductive differentially-expressed gene fragments from Yeast-like conidia of *Tremella fuciformis*, conidia was cultured by two carbon source inducers(ethanol and cellobiose). The inductive differentially-expressed gene fragments were isolated by cDNA-AFLP from the two kinds of differential cells after the growth status analysis. Result showed that, the dehydrogenase activity of the cells cultured with ethanol was 168% higher than that with glucose. The maximum growth rate of the cells cultured with cellobiose reduced by 32.2%. 14 differentially-expressed gene fragments were isolated from the tow differential cells 5 of these gene fragments expressed separately in the cells cultivated with ethanol and cellobiose, which were homologous with the sequence Codes of cytochrome C oxidase and cytochrome b. The gene expression was related to ethanol metabolic and stress induction. This research mayb be of benefit to construction of edible fungus inducible expression system and highly effective bioreactor of *Tremella fuciformis*.

Key word: *Tremella fuciformis*; yeast-like conidia; inducer; differentially expressed; cDNA-AFLP

银耳(*Tremella fuciformis*)俗称白木耳，一种著名的食药用真菌，可食安全，属于高等担子菌，其担孢子芽殖产生酵母状分生孢子称为银耳芽孢。银耳芽孢单核，能像酵母那样快速生长且容易培养，已有较完善的液体深层发酵培养技术[1]，具备优良外源基因表达宿主的特点。启动子是外源基因表达重要的顺式调控元件，目前，食用菌遗传转化所采用均为组成型启动子，不能从时间和空间上有效地调控目的基因的表达，持续的表达过度消耗细胞内的物质和能量，大量表达的外源基因积累可能会对宿主造成毒害[2,3]。而诱导型启动子能通过诱导剂控制基因在特定时期、特定部位表达，避免了目的基因在寄主细胞内高表达对寄主细胞生长的影响[4]，使表达系统变得有效、可控，但是，目前为止食用菌尚未见诱导型启动子的报道。

收稿日期：2012-04-10
基金项目：国家高技术研究发展计划项目(2006AA10Z301)、国家自然科学基金(30371000，30671457)
作者简介：聂燕华（1984-），男，助理实验师，从事食品营养及成分分析研究
通讯作者：郭丽琼

银耳能利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、半乳糖、甘露糖、木糖、纤维二糖、乙醇及醋酸钠等碳源，以常见碳源作为诱导剂开发的诱导型启动子具有诱导剂价格低廉、诱导控制简便有效等优点。目前已在其他真菌中开发出的诱导表达系统有：以甲醇为诱导碳源的毕赤酵母的醇氧化酶（AOX）表达系统，以纤维素为诱导源的木霉的纤维二糖水解酶表达系统。纤维二糖、乙醇两种银耳能利用的碳源在代谢过程中也应涉及相关的水解、氧化酶系，有待开发的潜力。cDNA-AFLP（cDNA-amplification fragment length polymorphism）技术，又叫cDNA-扩增片断长度多态性，是研究基因表达的一种快速有效的方法，是分离组织特异性、发育阶段特异性和生长条件特异性基因的快速、可靠的方法[5]。在克隆诱导型启动子的研究中，可以通过cDNA-AFLP 技术有效分离诱导的差异表达基因片段，再通过一系列方法克隆其上游的启动子序列，最终获得诱导型的启动子。

本研究以乙醇、纤维二糖两种碳源诱导剂对银耳芽孢进行诱导培养，旨在通过生长差异及基因表达差异的分析，分离相关的差异表达基因片段，为其上游诱导型启动子的克隆提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株：银耳菌株Tr01 购自福建古田食用菌研究所。

培养基：PDSB 培养基（1 L）：去皮马铃薯 200 g，KH_2PO_4 3 g，$MgSO_4·7H_2O$ 3 g，葡萄糖 20 g，pH 自然；PDSA 培养基（1 L）：PDSB 培养基另加入 20 g 琼脂。

CM 培养基（1L）：蛋白胨 2.0 g，酵母膏 2.0 g，K_2HPO_4 1.0 g，KH_2P0_4 0.46 g，$MgS0_4$ 1.0 g，pH 自然；CMD 培养基：含 2%葡萄糖的 CM 培养基；CME 培养基为含 3%乙醇的 CM 培养基；CMC 培养基为含 2%纤维二糖的 CM 培养基。

1.2 方法

1.2.1 乙醇、纤维二糖碳源诱导剂对银耳芽孢的诱导培养

使用 PBSA 平板对银耳芽孢 Tr01 菌株于 25 ℃培养活化 5 d，挑取单菌落制 PBSB 培养基 25 ℃摇瓶培养 3 d 制成接种液。

按 1%的接种量分别接种至添加添加 2%纤维二糖、3%无水乙醇的 CM 培养基中，以同样接种量的 CM 培养基、CMD 培养基（葡萄糖添加量为 2%）为对照，25 ℃150 r/min 摇床培养至稳定期；每隔 12 h 从培养液中取出 0.5 mL 菌液，蒸馏水稀释 20 倍后 540 nm 下测定各个样的吸光值，用各自未接种的培养基为空白调零，连续测 9~10 d。

1.2.2 银耳芽孢脱氢酶类的活性测定

1.2.2.1 粗酶液的制备

取上述培养至 3 d 的细胞培养液 50 mL，以 6000 r/min 速度冷冻离心 5 min 收集细胞沉淀，往沉淀中加入 1.15%的 KCl 溶液 3 mL 混匀，静置 5 min 后用超声波粉碎细胞，工作参数为：工作时间 4 s，间歇 8 s，全程 5 min，保温 30 ℃，工作功率 260 W。细胞破碎液于 10000 r/min 4 ℃离心 10 min 后分离上清液为粗酶液。

1.2.2.2 酶活测定

测定管与对照管分别加入 0.25 mL 酶液，NAD^+ 基质液 2.1 mL (pH 9.0)，测定管中加入 800 mmol/L 乙醇液 0.07 mL，再分别用蒸馏水补至最后反应总量为 2.8 mL，一组在波长 340 nm 测定光密度，另一组在 37 ℃水浴加热 30 min 后在波长 340 nm 下测定光密度。

$$\text{ADH活性(U/L)}=\Delta A/\min\times\frac{1}{6.3\times10^2}\times\frac{1.07}{0.05}\times10^6=\Delta A/\min\times34000$$

规定以每分钟 ADH 催化产生的 NADH 微克分子的量为一个 ADH 活力单位[6,7]。

1.2.3 银耳芽孢诱导差异表达基因片段的克隆

1.2.3.1 差异诱导细胞的培养收集

按1%接种量分别将接种液接种CMD、CMC、CME诱导培养基中，25 ℃，150 r/min摇床培养3 d，6000 r/min离心5 min，收集细胞备用。

1.2.3.2 诱导差异片段的克隆

(1) RNA的提取

采用STE法[8]提取以上三种培养基诱导培养的银耳芽孢细胞总RNA。紫外分光光度法检测RNA的浓度和纯度，1.2%甲醛变性胶电泳检测RNA的完整性。

(2) cDNA 双链的合成及纯化

按照 Universal RiboClone® cDNA 合成试剂盒提供的方法先后合成 cDNA 第一链、第二链，按照 QIAquick PCR Purification Kit 的说明书进行 cDNA 双链的纯化。

(3) 接头和引物的设计与合成

根据 *Ase* Ⅰ酶切位点设计接头、预扩增引物和选择性引物，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，序列如表 1 所示。

(4) cDNA 双链 *Ase* Ⅰ酶切及接头连接

按照 NEB 公司 *Ase* Ⅰ限制性内切酶使用说明分别对 1、2、3 号 Tr01 样品的 cDNA 双链进行 *Ase* Ⅰ酶切，酶切产物放于-20 ℃保存。

将上下接头退火后与酶切产物连接，连接体系为：10×T4 ligase Buffer 6.0 μL ，Ase Ⅰ-Adapter 4.0 μL，T4 ligase(6 U/μL) 1.0 μL，酶切产物 51.5 μL，于 16 ℃下过夜连接。

表 1 引物序列表

Table 1 The sequence of the primers

引物类别	引物名称	序列
接头	Adapter-top	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	Adapter-bottom	5'-TAGGTACGCAGTC-3'
预扩增引物	PrePrimer	5'-CTCGTAGACTGCGTACCTAAT-3'
选择性引物	Sel1	5'-GACTGCGTACCTAATA-3'
	Sel2	5'-GACTGCGTACCTAATG-3'
	Sel3	5'-GACTGCGTACCTAATC-3'
	Sel4	5'-GACTGCGTACCTAATAG-3'
	Sel5	5'-GACTGCGTACCTAATAC-3'
	Sel6	5'- GACTGCGTACCTAATGA-3'
	Sel7	5'- GACTGCGTACCTAATGC-3'
	Sel8	5'-GACTGCGTACCTAATCA-3'
	Sel9	5'-GACTGCGTACCTAATCG-3'
	Sel10	5'-GACTGCGTACCTAATGT-3'
	Sel11	5'-GACTGCGTACCTAATAT-3'
	Sel12	5'-GACTGCGTACCTAATCT-3'
	Sel13	5'-GACTGCGTACCTAATTG-3'
	Sel14	5'-GACTGCGTACCTAATTA-3'
	Sel15	5'-GACTGCGTACCTAATTC-3'

(5) cDNA-AFLP 预扩增

将连接产物稀释分别稀释 10 倍进行预扩增，扩增体系为：10×Amp buffer (Mg^{2+} free) 5.0 μL，$Mgcl_2$ (25 mM) 5.0 μL，dNTPs (10 mM) 1.0 μL，Taq Ⅰ-standard primer (10 μM) 5.0 μL，连接稀释产物 2.0 μL，Taq 酶 (5 U/μL) 0.6 μL，ddH_2O 32.4 μL。预扩增反应程序为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，52 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 1 min，20 个循环；72 ℃延伸 6 min。以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测预扩增结果。

(6) cDNA-AFLP 扩增差异带的回收和纯化

由 *Ase* Ⅰ-selective primer1-15 条引物两两结合，将预扩增产物稀释 20 倍进行选择性扩增，其标准体系和程序为：10×Amp buffer (Mg^{2+} free) 5.0 μL，$Mgcl_2$ (25 mM) 5.0 μL，dNTPs (10 mM) 1.0 μL，*Ase* Ⅰ-selective primer (10 μM) 各 1.0 μL，ddH_2O 31.4 μL，次级模板 5.0 μL，Taq 酶(5 U/μL) 1.0 μL。反应程序采用 Touch Down PCR：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，65 ℃退火 35 s，72 ℃延伸 1 min，每个循环退火温度降低 0.7 ℃，13 个循环；94 ℃变性 30 s，56 ℃退火 35 s，72 ℃延伸 1 min，23 个循环；72 ℃延伸 6 min。回收样品中出现的特异条带，TA 克隆后送上海生工生物技术服务有限公司测序。测序结果在 NCBI 上进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 乙醇、纤维二糖碳源诱导剂对银耳芽孢生长的影响

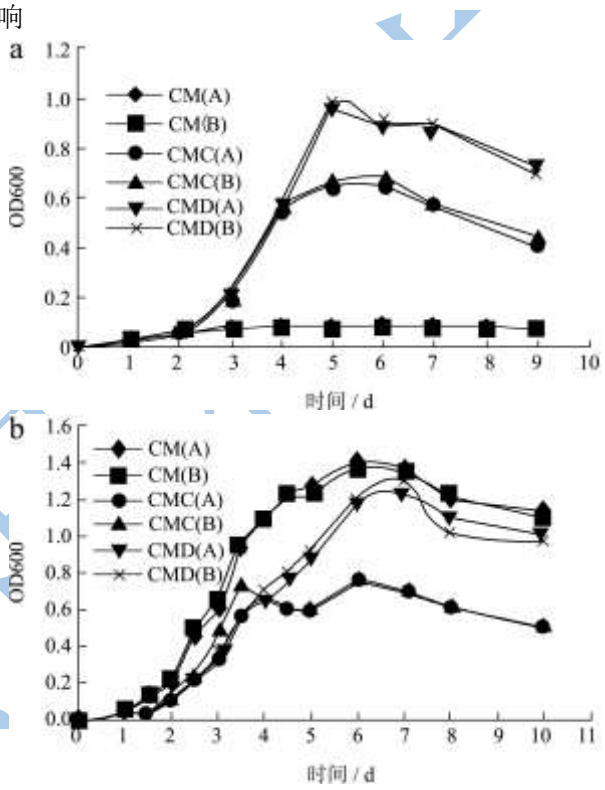


图 1 碳源诱导剂对银耳芽孢生长的影响

Fig.1 Effect of Carbon sources on Growth of theconidia

注：图中系列 A、B 为两个平行，a 为纤维二糖碳源下银耳的生长比较图，b 为乙醇碳源下银耳生长的比较图。

银耳芽孢生长曲线图 1a 可见，银耳芽孢在纤维二糖为唯一碳源的 CMC 培养基生长速度与葡萄糖为碳源的 CMD 培养基相近，生长至稳定期均为 6 d 左右，细胞生最大生长量为葡萄糖碳源的 67.8%，由此说明是银耳芽孢较好纤维二糖碳源，但纤维二糖比葡萄糖供能少。银耳具有纤维二糖酶，能代谢纤维二糖，但不具有纤维二糖水解酶，不能直接利用纤维素。而纤维二糖代谢途径与葡萄糖代谢途径涉及的酶系必然不尽相同，因此推测以纤维二糖为唯一碳源培养银耳芽孢能诱导相关代谢酶系的表达，可以作为一种诱导条件进行诱导型基因的克隆。

银耳芽孢生长曲线图 1b 可见，银耳芽孢在乙醇为唯一碳源的 CME 培养基中缓慢生长 10 d 至稳定期，细胞最大生长量出现在第 7 d，与葡萄糖碳源培养基

CMD 第 5 d 的生长量相近，由此说明银耳能利用乙醇碳源，但为劣势碳源。两种碳源培养下生长具有明显差异，其中乙醇代谢最为相关的酶类为脱氢酶类，拟对其活性的变化进行检测。

2.2 脱氢酶的活性测定

表 2 脱氢酶活性的测定

Table 1 Determination of dehydrogenase activitoes of the cells

细胞培养基类型	保温前吸光度	保温后(稀释5倍)吸光度	每分钟吸光度变化值 ΔA/min	ADH 活性/(U/L)
CM	0.167	0.095	0.0102	346.8
CME	0.218	0.301	0.0429	1458.6
CMD	0.034	0.103	0.0160	544.0

分别对 CME、CMD、CM 培养基培养的细胞破碎液进行脱氢酶酶活检测，表 2 结果可见，添加乙醇碳源的 CME 培养基脱氢酶活分别为 1458.6 U/L，比 CMD 培养基（544.0 U/L）、CM 培养基（346.8 U/L）脱氢酶活分别提高了 168%、320%。

ADH 类脱氢酶是 NAD^+依赖型酶，微生物体内，ADH 是主要的短链醇代谢的关键酶，可逆的催化氧化短链醇、芳香醇等为相应的梭基化合物，在不同的微生物中，其生理作用有所不同[9~11]。在酵母代谢中，控制乙醇含量的两个酶是乙醇脱氢酶 I (ADH I)与乙醇脱氢酶 II (ADH II)。ADH I 的作用是将乙醛变成乙醇，ADH II 的作用是将乙醇转变为乙醛，进入代谢链，消耗乙醇[12]。银耳具有乙醇的代谢能力，以乙醇为碳源的培养基明显检测到脱氢酶酶活的提高，推测其具有与酵母类似的乙醇代谢能力，以乙醇作为诱导碳源能诱导相关的代谢基因。

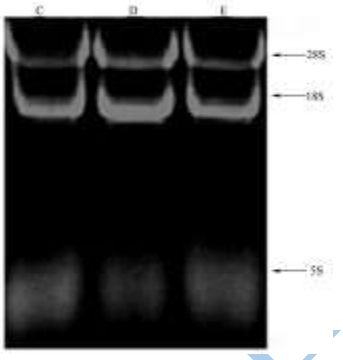
2.3 银耳芽孢诱导差异表达基因片段的克隆

2.3.1 银耳芽孢总 RNA 的提取

银耳芽孢三个诱导培养样品总 RNA 的提取结果经 1.2%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测（图 2a）和吸光值检测（图 2b），结果可知，三个样品的 RNA 完整性很好，28S 和 18S 的比值均介于 2~1 之间，质量高；OD260/OD280 分别是 2.01、2.10、2.10，纯度较高，蛋白污染少，浓度高，能满足 cDNA 双链合成的要求。

2.3.2 连接产物预扩增

cDNA-AFLP 预扩增结果见图 3，稀释 5×的连接产物预扩增产物大小分布在 400~2000 bp 之间，条带弥散清晰，分布范围宽，说明 cDNA 双链酶切完全、连接效果好，预扩增产物可以进行下一步的选择性扩增实验。



a

Sample ID	ng/μL	A260	A280	260/280	260/230
C	3743.04	74.861	37.225	2.01	1.92
D	3047.79	60.956	29.083	2.10	2.09
E	2724.60	54.492	25.895	2.10	2.20

b

图 2 样品总 RNA 变性电泳及分光光度分析图

Fig.2 Denaturinggel electrophoresis and spectrophotometric analysis of the total RNA

注：C、D、E 分别对应 CMC、CMD、CME 三种培养基培养的细胞样。

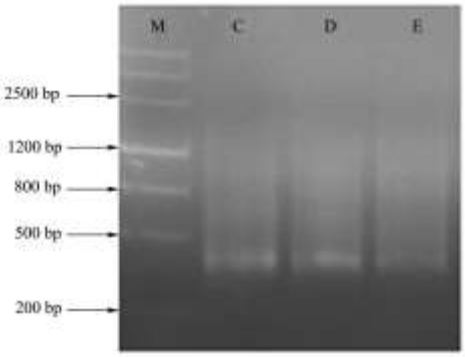


图 3 连接产物预扩增图

Fig.3 Pre-amplification of connective product

注：M 为 DNA 分子量标准，C、D、E 分别对应 CMC、CMD、CME 三个差异样品。

2.3.3 cDNA-AFLP 的选择性扩增

利用 15 对 *Ase* I 引物，共进行 120 次选择性扩增，扩增产物通过 1.2%琼脂糖凝胶电泳，比较 C、D、E 三个样品结果显示出 14 条清晰的大于 200 bp 的特异条带(图 4 未附全图)。

2.3.4 差异表达基因片段回收及序列分析

回收上述差异条带，经测序后，将测序获得的DNA序列在NCBI上的核酸序列数据库和多肽序列数据库中分别进行BLASTn和BLASTx比对，其中5条有相关同源性（序列详见附录）。

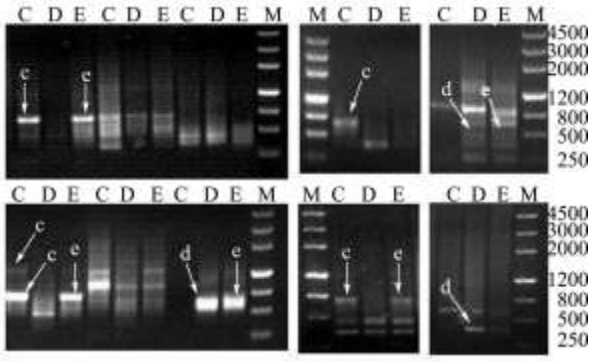


图 4 差异表达基因片段部分电泳图

Fig.4 Electrophoresis of differentially-expressed gene fragments

注：M 为 DNA 分子量标准，C、D、E 分别为三个差异样品，箭头 c、d、e 分别为对应样品中出现的差异带。

其中2条序列只在乙醇碳源下表达，与编码细胞色素C氧化酶亚基Ⅰ的基因序列具有较高的同源性；1条只在只在纤维二糖下碳源表达，与磷脂酶相关蛋白基因序列具有较高的同源性；2条在乙醇、纤维二糖均表达的与编码细胞色素b基因序列具有较高的同源性（表3所示）。

细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase，COX)是线粒体内呼吸链电子传递的终末复合物，是线粒体氧化能力的关键调节物质。细胞色素 C 氧化酶亚基I(COXⅠ)是细胞色素C氧化酶具有酶催化活性的3个亚基之一。细胞色素 b 与细胞色素氧化酶是细胞无氧代谢诱导表达的相关蛋白，在乙醇碳源的代谢情况下无氧呼吸加强，从而诱导了两种相关基因的表达[13]；而纤维二糖作为非优势碳源无氧呼吸也有所增强，也有诱导表达。

表 3 差异表达基因片段比对结果

Table 3 Blast results of differentially-expressed gene fragments

cDNA-AFLP Fragments	BLASTn	BLASTx	Identities	score	Expect
E70(649bp)	无	cytochrome c oxidase subunit I [Pleurotus ostreatus] (细胞色素 C 氧化酶亚基 I)	70/103 (67%)	150	$3e^{-34}$
C83(607bp)	无	phosphoesterase PA-phosphatase related [Methylovorus sp. SIP3-4]（磷脂酶相关蛋白）	18/40 (45%)	34.7	6.8
E88(955bp)	无	cytochrome c oxidase subunit Ⅰ [Gibberella zeae] (细胞色素 C 氧化酶亚基 I)	47/181 (25%)	53.9	$3e^{-05}$
C91(808bp)	无	cytochrome b [Cryptococcus neoformans var. grubii] (细胞色素 b)	196/229 (85%)	389	$2e^{-106}$
E91(775bp)	无	cytochrome b [Cryptococcus neoformans var. grubii] (细胞色素 b)	198/243 (81%)	385	$3e^{-105}$

3 结论

本研究初步探讨了纤维二糖、乙醇碳源诱导剂对银耳芽孢生长情况的影响，并从两种碳源诱导培养的细胞中分离出了诱导型差异表达的基因片段。两种碳源诱导剂下的生长情况都有异于葡萄糖碳源，具有明显的诱导效果，分离的基因片段均与相关代谢蛋白的编码序列具有同源性，可作为后续上游诱导型启动子克隆的主要依据。下一步一方面可以对已获得的相关基因片段的表达机理及其诱导表达量进行进一步的探究；另一方面可以选着其他酶切组合进行差异表达基因的克隆，获得更多相关的诱导表达基因片段；最终筛选出具有高表达量的诱导基因片段，克隆其上游的诱导型启动子。本研究是建立食用菌诱导型表达系统一次初探，对高效银耳生物反应器的构建具有一定的理论参考意义。

附录

1.C83：

GACTGCGTACCTAATCATTCTCTACCGGCTATGTCCAGACAATGAAAC
ACTATCCTTCAACCATGCCGGATGCTCCATTACCCAATCCAGTTCCTTT
TGAGGGGATCCCGGACGGCATAGTATCGGTGAGTGATCTAAGACCCG
TTAATCTTCGGCGCCACGACTCATTAGACTACTAAGTTGTTACACTATT
ATTAAAGAGTAGCTACTTCCAAGCTCATCTTATAGCTGTATGCGAGTCA
CGACTTCCTTACTTTCACTTAATCACTACTTTGGGACCTTCATCTATGC
TTACGGCTGTTTCCGTCTTGACTATCCACCTTATCATGAATAGTCTGCC
TCCTCTAAAACAATTTACGTTATTCCGAGGTTAACTACCAATGGTAGAA
TCTCTCAATCCCCCAATTGAATCCAAGAGTGTAATCACAATCAGACAT
GGTAATCAGTGCTATACCCGCGTAAATCTTTTAAAGAGGGCAGTACCT
AAATACTTTTAATGGAGTACCAGCTATCTCACGGTCAGATTGGCCTTTC
ACCTACAACCCTCAACTCATCGGACAATACTGCAACATTGATCCGTTC
GATCTATTTAATTAGGTACGCAGTC

2.E91：

GACTGCGTACCTAATGTTGGAACAGTGTTAGAGCCAGTAGAATTGTT
ACTAGATCTTTGAAGATGAAGTATGGGTGCATCGGTAGTTTGTCTGA
GTTAGAACTAATACCGAGTGGGTTACTACTTCCGTGTGTGTGTAGTG
TCATAAGGTGCATAATAGCTAGAGCTGCTAGTAAGAATGGAAGAAG
ATAGTGTAGTGAGAAGAACCGGTTAAGTGTCGCATTGTTCACAGAG
AATCCACCCCGCACGAATTGTACGAAATCTTGACCAATCCATGGAAC
AGCTGAAAGCATGTTAGTAATTACAGTAGCCCCCCATAGTGACATTT

GTCCATAAGGTAGAACGTATCCAAGGAAAGCTGTACCCATCATAAG
AACTAGAATAATTACCCCAATAGACCAAGGTAGAACTCGAGGTGAT
TTGTATGACCCGTAGTATAGTCCTCGACCAATGTGTAGGTATACGAA
GATGAAGAAGAATGAAGCTGTGTTAGCGTGCATGTATCGAATCATTC
ATCCGTAGTTTACATCTCGCATGATGCGTTCAACACTTACATATGCTA
GATCTACGTTAGGTGTATAGTGCATTGCTAGGATAATACCTGTAACA
ATTTGAATACCTAGACATAGAGCTTGAAGAGATCCAAAGTTCCATGC
GTAGCTAAGGTTAGCTGGTTGTGGGCTATCCACAATATAACTGTTTG
CAAGACCCAGTAATGGGTGTGATTTTAGTAGTCGCATGATATTATAT
AGTTTGTTGACATTAGGTACGCAGTC

3.C91：

GACTGCGTACCTAATGTCAACAAACTATATAATATCATGCGACTACT
AAAATCACACCCATTACTGGGTCCTGTAAACAGTTATATTGTGGATA
GCCCACAACCAGCTAACCTTAGCTACGCATGGAACTTTGGATCTCTT
CTAGCTCTATGTCTAGGTATTCAAATTGTTACAGGTATTATCCTAGCA
ATGCACTATACACCTAACGTAGATCTAGCATTTGTAAGTGTTGAACA
CATCATGCGAGATGTAAACTACGGATGGATGATTCGATACATGCACG
CTAACACAGCTTCATTCTTCATCATCTTCGTATACCTACACATTGGTC
GAGGACTATACTACGGGTCATACAAATCACCTCGAGTTCTACCTTGG
TCTATTGGGGTAATTATTCTAGTTCTTATGATGGGTACAGCTTTCCTT
GGATACGTCCTACCTTATGGACAAATGTCACTATGGGGAGCTACTGT
AATTACTAACATGCTTTCAGCTGTTCCATGGATTGGTCAAGATTTCGT
ACAATTCGTGTGGGGTGGATTCTCAGTGAACAATGCGACACTTAACC
GGTTCTTCTCACTACACTATCTTCTTCCATTCTTACTAGCAGCTCTAG
CTATTATGCACCTTATGACACTACACACACACGGAAGTAGTAACCCA
CTCGGTATTAGTTCTAACTCAGACAAACTACCAATGCACCCATACTT
CATCTTCAAAGATCTAGTAACAATTCTTCTATTCTTCTTAGCACTAGC
AATCATCGTGTTCTATCTACCTAACGTAATGGGACACAGTGATAACT
ACA

4.D70：

GACTGCGTACCTAATGCGGTCCACGACATTAGCGATGAGCTGCTCTT
TGCCTAAGTCGGAATCTTCGTCAACGCTTGCTACTGTCAAAATGATC
GCCGCTACCGCAAGAGCGATCGTCTCAATGGCGGCTGCCGCGTTTAA
AAACACCCAAACTGCCGTTGCGCATTGGCCGATGGCCGTTGATTTTC
CTTTGTCCATGCTTTTTTTGTCAAATTCTTCTTTCAGCACTTTCGCCAT
AAACTGCGAACCTTGATCAATGACGCTGTTCACTTTCTCATAATCGC
CGCTGTAGACAGCCGTTTTTAACTTTTTAAAATAATCCGGCGATGAC
TTTTTAATATCAGCGATCACCTGATCGGAAACTTGCTTTAATTCGTCC
TGATTAGGTACGCAGTC

5.E70：

GACTGCGTACCTAATGCCTCAACATTTCCTTGGACTTGCAGGTATGC
CACGTCGAATTCCTGATTACCCTGACGCATTTGAAGGATGGAACTAC
ATCAGTTCAATGGGTTCACTTATCTCAGTAATCGCTACACTTGTGTTC
CTATACACAATTTACGATATGCTAGCTAACCAACCTGCAGCATCATC
AAATCCATGGGCCCTAGCACCGTACTTCACTAGTCGTCAAGTATTTG
AAGTTCACTCTCAAGTACCAACTACCCTAGAGTGGACATTACCTAGT
CCTACACCATTCCACGCATACAATATGATGCCAGTACAATCTTAGAC
AATGATGAAATTCCCATTCTTTACATCTAGTCGTTCTTACTATGATCT
AATAAAGATCAGAGCATTACAAGCAGAGTTCTTTACAAAGATTGTTG
CAGCCATCGAATTAGCACGAAGTTTAACTAAAGGAGGGAAATACAG
TGCAGTAGTGTCTAGTTATCCAGAGGGTACTCCTGTACAAGTTACAG
AACCTAGTAAGGATACTGACACAGTTGCTCCAGCTAACATGGGTACA
TTAGATAAAGCTAATACCACTTTATTTAGTCGATTCAATGGAACCTC
TGGAGTCTACCTACTTTACCGCATTAGGTACGCAGTC

参考文献

[1] Cho E J, Oh J Y, Chang H Y, et al. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis* [J]. Journal of Biotechnology, 2006, 127: 129-140

[2] Kumpatla S P, Chandrasekharan M B, Iyer L M, et al. Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing [J]. Trends Plant Sci, 1998, 3: 97-104

[3] Padidam M. Chemically regulated gene expression in plants [J]. Curr Plant Biol, 2003, 6: 169-177

[4] Zhang C, Odon V, Kim HK, et al. Mushrooms for molecular pharming. In C.P. Romaine, C.B. Keil, D.L. Rinker & D.J. Royse (eds), Science and Cultivation of Edible Fungi and Medicinal Fungi [J]. University Park: The Pennsylvania State University, 2004:611-618

[5] Simoes J L, Rodrigues R L, Gerhardt L B, *et al*. Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique during heat stress in cowpea nodules [J]. FEBS Letters, 2002, 515: 44-50

[6] 王丽娜,李夏兰.从废弃啤酒酵母细胞提取 ADH 的研究-其细胞破碎的研究[J].福建化工,1999,2:9-11

[7] 施特尔马赫,钱嘉渊译.酶的测定方法[M].上海科学技术出版社,1983

[8] 税丕容,郑晓冰,林俊芳,等.简便高质量的食用菌总RNA提取方法[J].食用菌学报,2008,1:32-41

[9] Ryoko I, Humie K, Tomoko H. Complete Amino Acid Sequence and Characterization of the Reaction Mechanism of a Glucosamine-Induced Novel Alcohol Dehydrogenase from *Agrobacterium radiobacter* (tumefaciens) [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,2002,398(2):203-212

[10] Todd King M. Thermodynamics of the reduction of NADP with 2-propanol catalyzed by an NADP-dependent alcohol dehydrogenase[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 410: 280-286

[11] Madyastha K M, Gururaja T L. Purification and some of the

properties of a novel secondary alcohol dehydrogenase from *Alcaigenes eutrophus* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, 211: 540-546

[12] 赵丽娟,王德良,程玉来,等.利用基因敲除技术破坏酿酒酵母乙醇脱氢酶II基因的初步研究[J].食品与发酵工业,2005, 31(11):30-33

[13] 金武丕,权修权,孟繁平,等.大鼠酒精性肝病细胞凋亡与细胞色素P4502E1 和氧化应激的关系[J].世界华人消化杂志, 2007,5(20):20-25

现代食品科技