

# 培养于天然冷杉木片的黄孢原毛平革菌木质素 过氧化物酶基因表达的 RT-PCR 分析\*

江明锋 张义正\*\*

(四川大学生命科学学院 四川省分子生物学及生物技术重点实验室 成都 610064)

**摘要** 利用 RT-PCR 方法分析了生长于冷杉木片上的黄孢原毛平革菌木质素过氧化物酶基因 (*lipA* (GLG3) \ *lipC* (GLG2) \ *lipC* (GLG5) \ *lipD* (GLG1) \ *lipE* (LP0811)) 的表达。结果发现在不同的培养时间里仅有特定的基因表达, 在第 2 周时仅有 *lipA* (GLG3) 基因表达, 在第 4 周时未检测到任何基因的表达, 在第 6 周时 *lipD* (GLG1) 和 *lipC* (GLG2) 基因表达, 在第 8 周时仅有 *lipA* (GLG3) 基因表达。这些结果说明, 在冷杉木片上培养的黄孢原毛平革菌的 *lip* 基因表达具有明显的时间特异性, 并且与限定培养基中得到的结果明显不同。

**关键词**: 黄孢原毛平革菌 木质素过氧化物酶基因 基因表达 反转录 聚合酶链式反应  
中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2003) 01-0065-08

在植物光合作用固定的碳中, 木质素是仅次于纤维素的第二大有机碳形式。它的矿化是生物圈碳循环的关键步骤之一<sup>[1,2]</sup>。木质素包裹纤维素、半纤维素等多糖类物质形成的木质纤维素被大量应用于造纸工业。由于木质素结构复杂、难以降解, 从而影响了纤维素的利用, 目前木质素的生物降解已成为天然生物资源利用的研究热点<sup>[1,3]</sup>。

木质素降解菌——黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 能分泌多种胞外酶, 木质素过氧化物酶 (LiP) 是降解木质素的关键酶。木质素过氧化物酶 (LiP) 由 10 个结构上相关联的基因编码, 它们分别被命名为 *lipA* ~ *lipJ*, 并已被定位于 4 个连锁群中<sup>[4,5]</sup>。

大量研究表明, 不同的 *lip* 基因对不同的培养条件有不同转录应答, 碳、氮、分子氧等不同的营养因子显著地影响 *lip* 基因的转录。Northern 杂交表明, *lipD* 是碳受限或在培养基中加入球磨麦草粉时的一个主要产物<sup>[6,7]</sup>, Broda 等发现在几乎所有限定培养基中 *lipD* 基因转录物都可以被检测到<sup>[7-9]</sup>。定量 RT-PCR 分析结合 Northern 杂交表明, *lipC* 和 *lipJ* 在氮受限的培养基中显著表达<sup>[10]</sup>。在受到葱污染的土地中只有 *lipF* 的转录能被检测到<sup>[11]</sup>。在杨树木片上培养时, 则发现基因的表达与限定培养基中的表达情况显著不同<sup>[12]</sup>。

在比较不同研究者的研究结果时发现, 相同培养条件得到不同的结果, 甚至是相反的结果。其原因可能是由于不同的方法学所致, 同时也从另一角度表明 *lip* 基因对不同营养因子应答反应的复杂性。目前, *lip* 基因在天然条件下的基因表达研究较少, 至今只见

\* 自然科学基金资助项目(30170513)和教育部博士基金资助项目(20010610025)

\*\* 通讯作者, Tel: 028-85412738, Fax: 028-85416477; E-mail: jmic3602@scu.edu.cn

作者简介: 江明锋 (1971 - ), 男, 四川省茂县人, 四川大学生命科学院 2000 级博士研究生, 主要从事黄孢原毛平革菌木质素过氧化物酶调控基因克隆。E-mail: jmfmb1@sina.com

收稿日期: 2002-04-15, 修回日期: 2002-08-26

到一篇在杨树木片上 *lip* 基因表达的文章,在其它的树种中未见报道。鉴于木质素过氧化物酶在生物制浆中的重大应用前景,研究黄孢原毛平革菌在不同的木材上 *lip* 基因的转录调控是非常必要的。

研究 *lip* 基因的表达较为有效的方法是 RT-PCR 分析。有作者对 RT-PCR 和 Northern 杂交应用于 *lip* 基因转录调控研究时的精确性进行了比较,结果发现 RT-PCR 的灵敏度比 Northern 杂交法高 1 000 ~ 10 000 倍<sup>[5]</sup>。基于以上几个方面的原因,本研究中采用了 RT-PCR 方法分析生长于冷杉木片上的黄孢原毛平革菌 *lip* 基因的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

*Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767 是一个木质素降解研究的常用菌株,为本实验室保存。

### 1.2 培养基

1.2.1 完全培养基(CM):主要用于 *P. chrysosporium* 的常规培养和形成分生孢子<sup>[13]</sup>。

1.2.2 天然培养基:采用岷江上游的冷杉木,加工为 5.0cm × 1.0cm × 0.2cm 的薄木片,经蒸馏水浸泡 24h,高压灭菌后作为黄孢原毛平革菌的天然培养基。

1.2.3 *P. chrysosporium* 的培养:*P. chrysosporium* 的常规培养采用 CM 平板或斜面,37℃ 培养约 5d 左右,在平板或斜面上形成大量的分生孢子后,用 0.1% 的 Tween20 溶液将孢子从平板上洗下,涡旋分散,玻璃纤维丝过滤,4 000 r/min 离心 5min,再用无菌水洗涤 1 ~ 2 次,重新将孢子悬浮,将浓度调节到  $A_{600} \approx 1.5$ ,每次均配制新鲜孢子悬液<sup>[13]</sup>。

在 2 × 100 mL 的 CM 培养液中,分别接种上述孢子悬液 5 mL,37℃ 下 150 r/min 振荡培养约 36h,灭菌纱布过滤收集菌丝体用于提取总 DNA。*P. chrysosporium* 在冷杉木片上的培养采用如下的方法:将木片按每 5 片串成栅栏状,干燥好后用无菌的蒸馏水浸泡 24h,121℃ 灭菌 25 min,将木片浸入  $A_{600} \approx 1.5$  的新鲜孢子悬液中,最后将其放入到已灭菌的 500 mL 的三角瓶中 28℃ 培养 2 ~ 8 周。取样时,用无菌的乙酸钠缓冲液(50 mmol/L pH5.2)将生长于冷杉木片的菌体洗下,4 000 r/min 离心分离菌体用于总 RNA 的提取。

### 1.3 *P. chrysosporium* 菌体总 DNA 提取

参照 Raeder 介绍的方法提取总 DNA<sup>[14]</sup>,总 DNA 样品溶于适量的 TE 缓冲液中(Tris-HCl, 10 mmol/L pH8.0; EDTA 1 mmol/L pH8.0)。取适量的 DNA 样品稀释后,测定  $A_{260}$  和  $A_{280}$  光密度值,检测总 DNA 纯度并计算含量;0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检查总 DNA 的大小分布。DNA 样品分装后于 -20℃ 保存。

### 1.4 *P. chrysosporium* 总 RNA 的提取

提取 RNA 时所用的塑料制品用浓度为 0.1% DEPC 溶液 37℃ 浸泡 24h 后,121℃ 蒸气灭菌至少 30 min,烘箱干燥后置于干净处备用。玻璃和金属物品 250℃ 烘烤 3h 以上。样品总 RNA 的提取按上海生物工程公司的 UNIQ-10 Trizol RNA 抽提试剂盒的操作指南进行。提取出的 RNA 样品立即测定样品在 260 nm 和 280 nm 的光密度值,以确定 RNA 的浓度和质量。通过琼脂糖凝胶电泳,确定 RNA 的完整性和 DNA 的污染情况。RNA 样品可立即使用或 -70℃ 保存。

## 1.5 核酸的电泳检测

总 DNA 和 RT-PCR 产物采用常规琼脂糖凝胶电泳检测<sup>[15]</sup>。

总 RNA 的电泳的检测采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳<sup>[15]</sup>,电泳缓冲液为 TBE Buffer,电泳槽用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 24h 后用 DEPC 处理过的 ddH<sub>2</sub>O 冲洗 3 次,最后用无水乙醇干燥。操作过程中所用的玻璃器皿均应于 180℃ 干烤 8h 以保证无 RNase 的污染,电泳结果用 GDS-800 凝胶图像系统照相,记录。

## 1.6 总 RNA 的反转录

用大连宝生物公司的 DNase I 对总 RNA 样品进行预处理,防止 RNA 样品中污染的 DNA 可能作为模板干扰实验结果。处理完后 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 是否发生降解。取 400ng 总 RNA,参照 RTase 供应商指南进行反转录后直接置于 -20℃ 保存备用。

## 1.7 PCR 扩增

首先用 *P. chrysosporium* 的总 DNA 作为模板,分别用 5 对引物进行 PCR 扩增,以检测 5 对 *lip* 基因引物的特异性。在 20 $\mu$ L 的反应体系中依次加入模板 DNA 约 10 ng, 5 $\times$  Taq 缓冲液 4 $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 $\mu$ L, 10 mmol/L 上下游引物各 1 $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 1U,最后在反应混合物上加盖一层 20 $\mu$ L 的轻质矿物油。在 MJ Research 公司生产的 PTC-100 型扩增仪上进行 PCR 扩增。反应条件为 94℃ 预变性 4 min,每次循环 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 31 次循环,最后 72℃ 再延伸 5 min。

RT-PCR 反应方法如下:取 2 $\mu$ L 的反转录产物,用 18 $\mu$ L 无菌超纯水稀释,从中取 1 $\mu$ L 作为 RT-PCR 反应的模板,在 20 $\mu$ L 的反应体系中分别依次加入 5 $\times$  Taq 缓冲液 4 $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 $\mu$ L, 10 mmol/L 的上下游引物各 1 $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 1U,其上覆盖 20 $\mu$ L 无菌轻质矿物油。在 PTC-100 型热循环仪上进行 PCR 反应,反应的条件与总 DNA 扩增时一致。PCR 均设置了相应的正负对照,即以总 DNA 为模板作为 PCR 正对照,以不加模板作为负对照。整个反转录系统则以 *P. chrysosporium* 的三磷酸甘油醛脱氢酶基因(*gpd*)引物能否扩增出预期大小的条带作为正对照。RT-PCR 产物与总 DNA 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测,并用 GDS-8000 凝胶图像分析系统照像记录。

# 2 结果

## 2.1 总 RNA 的提取

提取的总 RNA 质量的高低直接影响 RT-PCR 的结果。经测定本实验中获得的 RNA 样品的  $OD_{260}/OD_{280} \approx 2.0$ ,总 RNA 的质量较好。每 80mg 菌体中可提取到约 30 $\mu$ g 的总 RNA,经电泳检查,可观察到 18S 和 25S 两条带,说明在提取过程中 RNA 未降解(见图 1)。

## 2.2 RT-PCR 引物的设计及验证

*P. chrysosporium* 的 *LiP* 分别由木质素过氧化物酶基因家族编码,由于这些基因序列高度同源,设计引物时需充分考虑序列上的微小差异。为验证 RT-PCR 反应体系是否正常,设计了 *P. chrysosporium* 的 *gpd* 基因引物作为整个 RT-PCR 反应的正对照。本研究中的 *lipA*<sub>2</sub>(GLG3) $\lambda$  *lipC*<sub>1</sub>(GLG2) $\lambda$  *lipC*<sub>2</sub>(GLG5) $\lambda$  *lipD*(GLG1)引物由冯红设计<sup>[13]</sup>,*lipE* 及 *gpd* 基因引物序列由本实验的研究者设计。6 对引物序列及预测长度见表 1。为检测 *lipA* 等基因 PCR 引物的特异性,提高 RT-PCR 分析的准确性,用 5 对 *lin* 基因引物扩增 *P. chrysos-*

*porium* DNA 的结果见图 2。结果表明,每对引物扩增总 DNA 所获得的 DNA 片段与预期大小一致(表 1)。

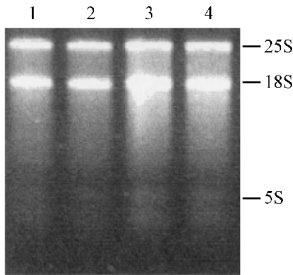


图 1 *P. chrysosporium* 总 RNA 电泳

Fig.1 Electrophoresis of *P. chrysosporium* total RNA

1~4. *P. chrysosporium* total RNA samples after incubation of 2, 4, 6, 8 weeks, respectively.

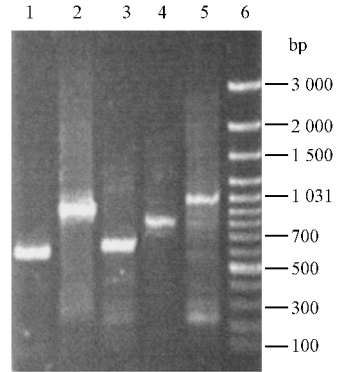


图 2 5 对 *lip* 基因特异性引物扩增总 DNA

Fig.2 PCR products of *P. chrysosporium* total DNA

1~5. *lipD2*, *lipC1*, *lipA2*, *lipC2*, *lipE*, PCR products; 6. DNA marker.

表 1 用于 RT-PCR 的基因特异引物序列

Table 1 Gene-specific primers used in RT-PCR

Gene	Primer	Primer sequence(5' - 3')							Predicted size/bp	
									CDNA	Genomic DNA
<i>lipD</i> (GLG1)	PLG1F	GCA	GAT	GCA	GTT	CTT	C	419	646	
	PLG1R	TCC	TCC	TGC	AGC	TTC	G			
<i>lipC</i> (GLC2)	PLG2F	CGG	TCT	CGA	CGA	GAT	C	730	980	
	LG2R	GAG	TCG	AGA	GAG	TCG	G			
<i>lipA</i> (GLC3)	PLG3F	CAC	TGT	CGA	CCA	AAT	C	541	645	
	PLG3R	CCG	GGA	AGA	TGG	TGA	G			
<i>lipC1</i> (GLG5)	PLG5F	CAC	TGG	TCG	TGC	TCC	G	482	680	
	PLG5R	GGG	ATG	ACA	GCA	GAG	C			
<i>lipE1</i> (LP0811)	PLIPEF	TCG	CCG	CGA	TCA	CCG	TGG	685	1006	
	PLIPER	CTC	GAC	GAA	GAA	CTG	CGA			
<i>gpd</i>	PGPDF	CGT	ATC	GTC	CTC	CGT	AAT	907	1106	
	PGPDR	ACT	CGT	TGT	CGT	ACC	AGG			

## 2.3 培养于冷杉木片上的 *P. chrysosporium* 木质素过氧化物酶基因转录的 RT-PCR 分析

**2.3.1 *gpd* 基因转录的 RT-PCR 分析:** 用 P<sub>gpd</sub> 引物分别扩增总 DNA 和 2, 4, 6, 8 周的 4 个 RNA 样品, 均产生预期大小的 DNA 带, 说明培养于冷杉木上的 *P. chrysosporium* *gpd* 基因在不同的时间均表达, 也表明本研究中的反转录和 PCR 系统是正常的。结果见图 3。

**2.3.2 *lipC1*, *lipE1* 基因转录的 RT-PCR 分析:** 用 PLG5 和 PLIPE 引物分别扩增 2, 4, 6, 8 周的 4 个 RNA 样品, 均无预期的 DNA 带产生(结果未显示), 而以总 DNA 为模版却能扩增出

相应的 DNA 带,说明 PCR 反应是正常的。表明培养于冷杉木上的 *P. chrysosporium* 的 *lipC1*(GLG5)和 *lipE*(LP0811)基因不表达。

**2.3.3 *lipD2* 基因转录的 RT-PCR 分析**:*lipD2* 基因的引物 PLG1 在培养 6 周的样品中扩增出了与预期大小(419 bp)一致的 cDNA 带(见图 4)。

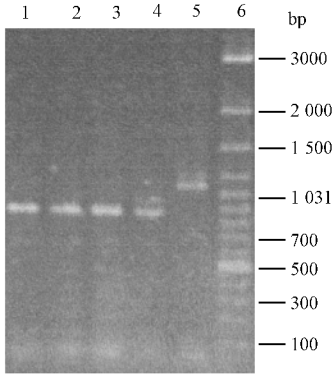


图 3 *P. chrysosporium gpd* 基因的 RT-PCR 分析

Fig.3 RT-PCR analysis of *P. chrysosporium gpd* gene  
1~4. 2 4 6 8 week samples ; 5. Positive control ; 6. DNA marker.

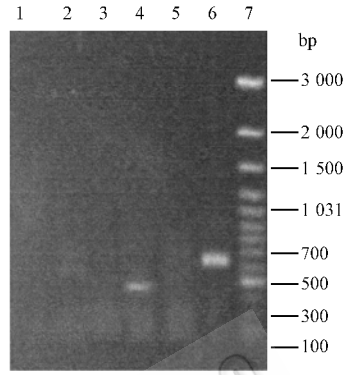


图 4 *P. chrysosporium lipD2* 基因的 RT-PCR

Fig.4 RT-PCR analysis of *P. chrysosporium lipD2* gene  
1. Negative control ; 2~5. 2 4 6 8 week samples 6. Positive control ; 7. DNA marker.

**2.3.4 *lipA2* 基因的 RT-PCR 分析**:*lipA2* 基因引物 PLG3 在冷杉木上培养 *P. chrysosporium* 的第 2 周和第 8 周样品中均扩增出预期大小的 *lipA2* cDNA(541bp)带。说明 *P. chrysosporium* 在冷杉木上培养的第 2 周和第 8 周 *lipA2* 基因是一个主要转录产物(图 5)。

**2.3.5 *lipC2* 基因的 RT-PCR 分析**:*lipC2* 基因的引物 PLG2 在培养 6 周的 *P. chrysosporium* 样品中扩增出与预期大小一致的 cDNA 的带,说明该基因在培养的第 6 周时是一个主要的转录产物(见图 6)。

将 *lipA2*(GLG3) *lipC1*(GLG2) *lipC2*(GLG5) *lipD2*(GLG1) *lipE*(LP0811) 5 个木质素过氧化物酶基因在冷杉木上培养不同时间的转录应答的情况归纳如表 2。

表 2 在冷杉木片上培养 2~8 周后 *P. chrysosporium* 的 *lip* 基因的 RT-PCR 分析结果

Table 2 The RT-PCR results of *P. chrysosporium lip* genes in fir wood chip after incubation for 2~8 weeks

Gene	Incubation time/week			
	2	4	6	8
<i>lipD2</i> (GLG1)	-	-	+	-
<i>lipC2</i> (GLG2)	-	-	+	-
<i>lipA2</i> (GLG3)	+	-	-	+
<i>lipC1</i> (GLG5)	-	-	-	-
<i>lipE</i> (LP0811)	-	-	-	-

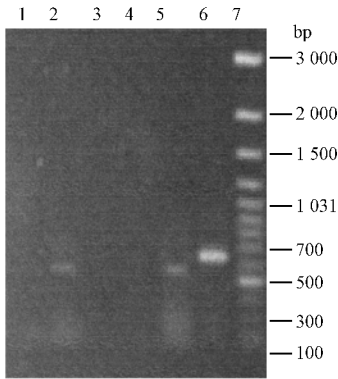


图5 *P. chrysosporium lipA2* 基因的 RT-PCR 分析

Fig.5 RT-PCR analysis of *P. chrysosporium lipA2* gene  
1. Negative control; 2~5. 2 A 6 8 week samples; 6. Positive control; 7. DNA marker.

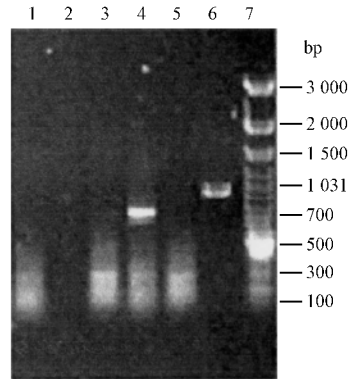


图6 *P. chrysosporium lipC2* 基因的 RT-PCR 分析

Fig.6 RT-PCR analysis of *P. chrysosporium lipC2* gene  
1. Negative control; 2~5. 2 A 6 8 week samples; 6. Positive control; 7. DNA marker.

### 3 讨论

#### 3.1 木质素降解菌 *P. chrysosporium lip* 基因在天然底物条件下的转录

近年来,一些研究者检测了生长于杨树木片和有机物污染的土地中 *lip* 基因的转录情况,培养底物的复杂性制约了对单个木质素过氧化物基因对不同营养因子转录应答的精确研究,但在研究中,他们发现 *lip* 基因的转录与限定培养基中的研究结果存在明显的差异<sup>[11,12,16]</sup>。Bagon(1996)发现受到葱污染的土地中只有 *lipF* 的转录能被检测到<sup>[11]</sup>。Bernard 等发现在限定培养基中通常易于检测到的 *lipD* 和 *lipE* 基因在杨树木片上生长的样品只以极低的水平表达,在培养 2 周时主要转录的是 *lipA*、*lipC*、*lipJ* 基因<sup>[12]</sup>,并且在第 8 周后所有的木质素过氧化物酶基因的表达水平均出现了剧烈的下降,呈现出明显的时间依赖性。本研究中发现, *lipA2* 基因在冷杉木上培养到第 2 周时是唯一被检测到的转录基因,在此后的 4 周内未能再检测到该基因的表达,在培养到第 8 周该基因又是唯一被检测到转录的基因。本研究在培养的第 8 周时还检测到 *lipD2* 和 *lipC2* 基因的表达,而 Bernard 认为 *lipD* 和 *lipE* 基因难以在杨树木片上生长的样品中检测到。令人费解的是本研究在培养 4 周的样品中未检测到任何基因的表达。其原因可能是由于本研究只分析 5 个 *lip* 基因的表达情况,而在这段时间内可能由其它的 *lip* 基因起主要作用(例如 *lipJ* 基因),但从中仍可以看出, *P. chrysosporium lip* 基因在降解天然木材时,其基因的表达的确具有时间的依赖性,其转录的总体模式也与在限定培养基中时有较大的差异。

#### 3.2 *lip* 基因家族的组成形式与基因调控间的关系

木质素过氧化物酶基因家族由 10 个基因组成<sup>[5]</sup>。按基因的内含子和外显子的结构可以将 *lip* 基因分为 5 个明显的亚家族<sup>[5,11]</sup>。基于 LIP 的氨基酸序列可将 *lip* 基因家族分为两个大类<sup>[5]</sup>;Philip Stewart(1999)等人建立了关于木质素过氧化物酶基因在染色体上组成的详细的物理图谱,4 个基因 *lipA*、*lipB*、*lipC*、*linE* 定位在一个 35kb 的区域, *linG*、*linH*、

*lipI*、*lipJ* 定位于一个 15kb 的区域, *lipD* 和 *lipF* 不与其余的基因相连; 其中 6 个基因以相反的转录方向成对出现于染色体上( *lipA* 和 *lipB*、*lipG* 和 *lipI*、*lipH* 和 *lipJ* )<sup>[5]</sup>。

在大多数研究中, *lip* 基因的表达与基因的内含子和外显子结构以及 *lip* 的氨基酸序列之间均没有找到明显关系的证据<sup>[5,11~13]</sup>。研究 *lip* 基因在染色体上的组成与基因表达的关系时, 一些研究者用定量 RT-PCR 的方法进行了分析, 结果发现 *lipA* 和 *lipB* 基因在低氮和低碳的培养条件下出现相似的转录模式<sup>[5]</sup>, 在其余的 *lip* 基因间没有找到明显相关的证据。如同在限定培养基中一样 Bernard 等在杨树木片上进行的研究也证实了这一观点, 但他发现两个与其它 *lip* 基因不相连的基因 *lipD* 和 *lipF* 的转录模式与其余基因的确非常不同<sup>[12]</sup>。本研究也未发现在 *lip* 基因的转录和 *lip* 基因的组成有明显的关系, 如定位于染色体上同一区域的 *lipA*( GLG3 )、*lipC*( GLG2 )、*lipC*( GLG5 )、*lipE*( LP0811 ) 基因并没有表现出协同表达的特性, 而在基因的内含子和外显子结构以及氨基酸序列间差异较大同时在基因组成上也没有联系 *lipC*( GLG5 ) 和 *lipD*( GLG1 ) 却在培养的第 6 周同时检测到基因的表达。这说明在天然木材上的培养如同在限定培养基中一样, 木质素过氧化物酶基因的转录模式与按内含子划分的亚家族, 与基因在染色体上的排列形式, 或按氨基酸序列的相似性划分的亚家族之间没有明显的相关。这也从另一角度支持了独立的木质素过氧化物酶基因在木质素的降解中完成独特的功能。

### 3.3 木质素过氧化物酶基因转录调控机制的研究方法

目前 *lip* 基因在染色体上的组成方式已经阐明, *lip* 基因在染色体上的组成方式暗示, *lip* 基因家族也许起源于一系列的加倍事件<sup>[5]</sup>。已有的研究表明, 无论在限定培养基上还是天然底物中, 单独的木质素过氧化物酶基因在不同的营养因子影响下其转录应答是不同的, 这支持了一种假设: 每个木质素过氧化物酶扮演着独特生物学角色。当然, 也不能排除其中的一些基因是进化的过程中积累突变而形成假基因的可能性。要阐明这些问题, 仅仅进行 RT-PCR 分析是远远不够的, 当前应集中于木质素过氧化物酶基因调控机理的研究, 如通过凝胶延迟的方法和 DNaseI 足迹实验鉴定出与 *lip* 基因中对特定营养因子发生转录应答的顺式作用元件, 再通过序列特异的 DNA 亲和层析法分离纯化调控蛋白进而克隆调控蛋白基因<sup>[13]</sup>; 也可用 *lip* 基因表达前后的 mRNA 来构建消减文库, 以寻找与 *lip* 基因家族调控有关的基因。在进行这些研究前首先用 RT-PCR 分析的方法确定在天然底物中主要表达的基因是十分必要的。显然, 在天然底物中主要表达 *lip* 基因将是构建基因工程菌株, 提高其表达水平, 应用于生物制浆和污染治理时的首选基因。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Eiksson K E L. Concluding remarks, where do we stand and where do we going? Lignin biodegradation and practical utilization. *J Biotechnol*, 1993, **30** :149 ~ 158.
- [ 2 ] Higuchi T. Biochemistry and Molecular Biology of wood. New York: Springer, 1997. 36 ~ 40.
- [ 3 ] Kirk T K, Farrel R L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Ann Rev Microbiol*, 1987, **41** : 456 ~ 505.
- [ 4 ] Gaskell J, Stewart P, Kersten P, et al. Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bio/Technology*, 1994, **12** :1372 ~ 1375.
- [ 5 ] Stewart P, Cullen D. Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Molecular Biology*, 1991, **211** : 101 ~ 111.

- porium. *J Bacteriol* ,1999 ,3427 ~ 3432.
- [ 6 ] Holzbaur E , Tien M. Structure and regulation of a lignin peroxidase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* ,1988 ,**155** 626 ~ 633.
- [ 7 ] James C. M , Felipe M S S , Simes P F G , et al. Expression of a single lignin peroxidase-encoding gene in *Phanerochaete chrysosporium* strain ME446. *Gene* ,1992 ,**114** 217 ~ 222.
- [ 8 ] Broda P , Birch P , Brooks P , et al. PCR-mediated analysis of lignocellulolytic gene transcription by *Phanerochaete chrysosporium* substrate - dependent differential expression within gene families. *Appl Environ Microbiol* ,1995 ,**61** 2358 ~ 2364.
- [ 9 ] Brooks P , Sims P , Broda P. Is some specific polymerase chain reaction an alysis of differential gene expression : a general method applied to lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bio/Technology* ,1993 **11** : 830 ~ 834.
- [ 10 ] Stewart P , Kersten P , Wymelenberg A V et al. The lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium* : complex regulation by carbon and nitrogen limitation and the identification of a second dimorphic chromosome. *J Bacteriol* ,1992 ,**174** : 5036 ~ 5042.
- [ 11 ] Bogan B , Schoenike B , Lamar R , et al. Expression of *lip* genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* ,1996 ,**62** 3697 - 3703.
- [ 12 ] Bernard J , Janse H , Gaskell J , et al. Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases , manganese peroxidases and glyoxal oxidase in wood. *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64** 3536 ~ 3538.
- [ 13 ] 冯红 张义正.黄孢原毛平革菌木质素过氧化物酶基因对营养的转录应答.四川大学学报(自然科学版) ,2000 ,**37** :153 ~ 160.
- [ 14 ] Raeder U , Broda P. Preparation and characteration of DNA from lignin-degrading fungi. *Methods Enzymol* ,1987 ,**161** 211 ~ 220.
- [ 15 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular Cloning : a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ,New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.304 ~ 316.
- [ 16 ] Lamar R T , Schoenike B , Vanden A , et al. Quantitation of fungal mRNAs in complex substrate by reverse transcription PCR and its application to *Phanerochaete chrysosporium*-colonized soil. *Appl Environ Microbiol* ,1995 ,**61** 2122 ~ 2126.
- [ 17 ] Ritch T G , Gold M H. Quantitation of fungal mRNAs in complex substrate by reverse transcription PCR and its application to *Phanerochaete chrysosporium*-colonized soil. *Gene* ,1992 ,**118** 73 ~ 80.

## RT - PCR Analysis of *Phanerochaete chrysosporium lip* Genes in Colonized Fir Wood

Jiang Mingfeng Zhang Yizheng

( The College of Life Science ,Sichuan University ,Chengdu 610064 ,China )

**Abstract** : Expression of *Phanerochaete chrysosporium lipA2*( GLG3 ) *lipC1*( GLG2 ) *lipC2*( GLG5 ) *lipD*( GLG1 ) *lipE*( LP0811 ) genes were analyzed by RT-PCR method. It was showed that some genes were expressed in special colonized period. Only *lipA2*( GLG3 )transcription occurred in the 2nd week and the 8th week , both *lipC1*( GLG2 ) and *lipD*( GLG1 )gene transcription was checked out in the period of 6 weeks. However , no lip genes were expressed in the time of 4 weeks. These results indicated that lip gene expression is relied on the colonized period and transcript patterns are re dramatically different from those in previous studies with defined media.

**Key words** : *Phanerochaete chrysosporium* , Lignin peroxidase genes , Gene expression , Reverse transcription , PCR