

臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*) 启动子 H8 片段克隆及其序列

刘宏迪 曹旭* 吴晓军 金奇* 阮力* 梁平彦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

使用原核及真核菌通用的挑选启动子克隆载体 pJGI, 从臭曲霉菌体总 DNA 中分离到具有较好活性的启动子 H8 片段。根据 Southern blot 证明该启动子来自臭曲霉菌; H8 全片段 DNA 序列分析结果表明其含有 750bp, 内含典型真核启动子功能序列 (TA TA box) 及增强子 GTGG^{TTT}_{AAA}G 的相似序列, 分析证实是一个新的臭曲霉启动子。初步实验表明该启动子不但在臭曲霉菌内有启动功能, 并第一次证明来自臭曲霉菌的启动子在原核细胞中也具有启动子活性, 能够表达完整的 Lac Z 基因。

关键词 臭曲霉 H8 启动子; 序列

丝状真菌作为基因表达系统, 具有高效、糖基化、外泌的特点, 加之长期以来就是广泛应用于发酵工业的大规模生产所用菌, 因而受到了基因工程研究者的很大重视。然而, 作为一种较高等的生物, 对其分子生物学特点尚知之不多, 这给开发利用这一新系统进行基因工程研究带来了较大障碍。近年来, 曲霉属 (*Aspergillus*) 中黑曲霉 (*A. niger*)、构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和泡盛曲霉 (*A. awamori*) 的 3 个种基因文库的建立, 黑曲霉和泡盛曲霉葡萄糖淀粉酶基因的分离和克隆, 以及外源基因导入丝状真菌技术的建立, 这些都是利用这一系统进行外源基因表达研究的良好开端。

本文报道使用原核及真核菌选择启动子所通用的克隆载体 pJGI, 从臭曲霉菌总 DNA 中分离到具有较好活性的启动基因 H8。Southern blot 证明该启动基因来自臭曲霉; 序列分析表明 H8 全片段有 750bp, 内含典型真核启动子序列 (TATA box) 及增强子相似序列 GTGG^{TTT}_{AAA}G。并

且证实是一个新的启动子。

我们利用选择启动子克隆载体 pJGI, 从臭曲霉菌中分离到一个新的启动子, 并第一次证明来自臭曲霉菌的启动子在原核细胞中亦具有启动子活性, 这不但在臭曲霉菌分子生物学的研究工作中具有一定意义, 而且为利用臭曲霉系统进行外源基因表达研究奠定了良好基础。

材料和方法

(一) 菌种及重要试剂

臭曲霉 (*Aspergillus foetidus* [Nak-az]), 由本所齐祖同先生鉴定。

所用限制性内切酶, T₄ DNA 连接酶均来自华美生物工程公司, 医学科技公司, 及自 New England biolabs 购得, ³²P- α -dATP, ³²P- α -dCTP 均购自 Amersham Sequence。

(二) 质粒构建

本文于 1988 年 11 月 11 日收到。

* 中国预防医学科学院病毒研究所, 北京。

1. 臭曲霉 DNA 的分离: 制备臭曲霉原生质体^[1], 将离心收集的原生质体悬浮于 0.15mol/L NaCl-0.1mol/L EDTA (pH 8.0) 缓冲液中, 加入 SDS 最终浓度 1%, 60℃ 加热 10min, 加酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 抽提 3 次, 水相用 2 倍体积 95% 乙醇沉淀。TE 缓冲液溶解后经 Sepharose 2B 柱, 收集第一峰, 乙醇沉淀后溶于 TE 中, 约 1mg/ml 左右。

2. pJGI 质粒 DNA 的分离纯化: 按文献[2]。

3. 重组及转化和质粒导入臭曲霉菌: 取 2μg 臭曲霉总 DNA, 经 Hae III 作用, 取 0.2μg pJGI 质粒 (曹旭, 病毒学报待发) DNA, 经 StuI 作用, 酚抽提后, 无水乙醇沉淀, 抽干溶于 TE 混合后在 T₄-DNA 连接酶 8℃ 作用下连接过夜。第二天转化大肠杆菌 MCl061 经过 Mg²⁺、Ca²⁺ 处理过的感受态细胞, 涂布于含有 Amp 和 X-gal (40μg/ml) 的平皿上, 筛选启动子重组体, 蓝色克隆为含有启动子功能的外源 DNA 片段的重组体。挑选出重组体。常规方法从含有 X-gal 的培养皿中挑出蓝色细菌斑, 培养后提取质粒, 将纯化后的质粒转化臭曲霉原生质体 (方法另文发表), 把带有不同片段具有启动活性的质粒 DNA 导入臭曲霉中, 从含有 X-gal 的培养基中挑选蓝色菌落 (图版 1-B) 选出最蓝的重组体 pAFH8。

(三) Southern blot

带有 H8 启动子的质粒 pAFH8 经 XhoI 和 EcoRI 酶解产物同臭曲霉总 DNA 一起进行琼脂糖凝胶电泳, 再吸印到硝酸纤维素膜上, 以 H8 片段为探针进行 Southern blot^[3], 结果见图 3。

(四) H8 启动子片段 DNA 序列分析

将重组体质粒 pAFH8 DNA 用 XhoI-EcoRI 酶切后, 电泳进行分离得到 H8 片

段, 与 M13 mp⁺、M13mp¹⁹ 中的 SalI-EcoRI 位点, 用 T₄ DNA 连接酶连接过夜, 转化大肠杆菌 JM103 感受态细胞, 涂布于含有 IPTG 及 X-gal 的 LB 培养基上, 6—12h 从蓝色噬菌斑中挑选因 H8 片段插入 M13mp¹⁹ 而破坏了 LacZ 基因表达的白色空斑。将空斑转接到 LB 培养液中, 培养 6h 后离心, 从上清中用聚乙二醇沉淀含有 H8 片段的单链噬菌体。经纯化后用于进行序列分析, 方法见 [3]。我们将 H8 片段测序的结果用计算机作了酶切图谱分析。

结 果

(一) 质粒构建

质粒 pGJI 中的 β-半乳糖苷酶基因是含有包括 S.D 序列及起始密码子的完整 LacZ 基因, 这是一个已删除启动子没有外源启动子存在时不能表达 LacZ 基因的质粒。在 LacZ 基因起始密码子上游存在着 BglII、XhoI、SutI 及 EcoRI 4 个单一的内切酶位点, Bg III 位点可以和 BamHI 和 Sau 3A 位点粘合, XhoI 位点可以和 SalI 位点粘合, StuI 位点可以和 AluI、HaeIII、RsaI 等任何平端内切酶位点接合, 因而这些内切酶位点为克隆任何平端内切酶位点消化后的臭曲霉 DNA 片段提供了方便的插入位点。通过在 X-gal 琼脂培养基上选择蓝色细菌克隆 (图版 1-A), 即可初步分离到具有启动子功能的外源 DNA 片段以便进一步进行鉴定。经 XhoI 和 EcoRI 酶切检查重组体的插入片段 (图 1 和 2)。

为了避免 pJGI 中大肠杆菌染色体 DNA 污染的可能性, 我们又作了臭曲霉 DNA 和带有 H8 的 pJGI 酶切片段的 Southern blot。臭曲霉 DNA 和带有 H8 的 pJGI 质粒都能和 XhoI-EcoRI 片段的 H8 片段探针杂交, 而 pJGI 质粒则无 (图

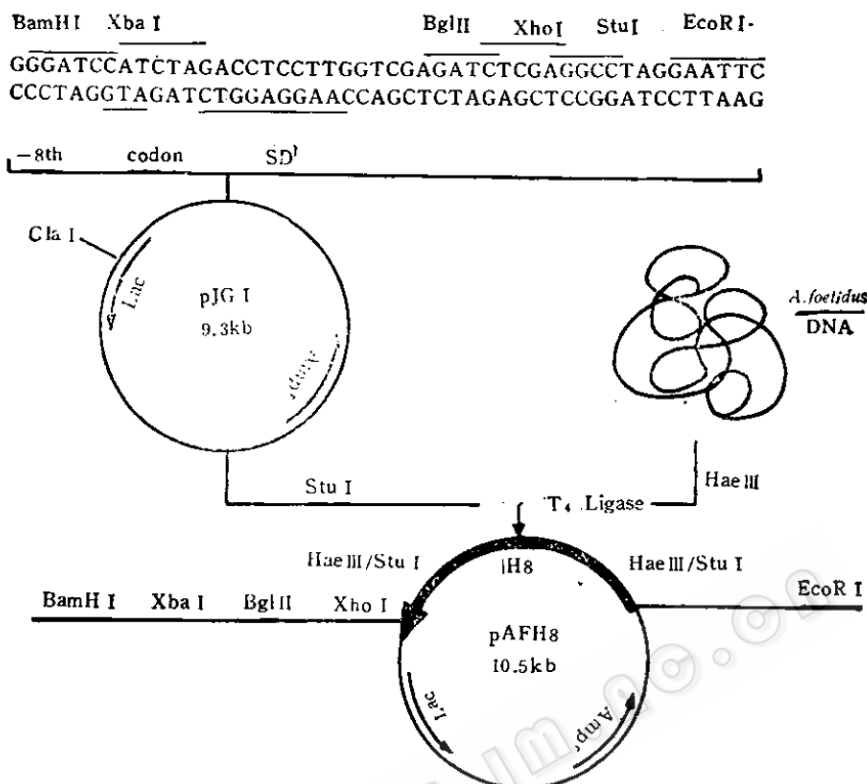


图1 用质粒 pJG1 为载体克隆臭曲霉启动基因片段

Fig. 1 Cloning of pJG1 *A. foetidus* promoter using the plasmid pJG1 as vehicle

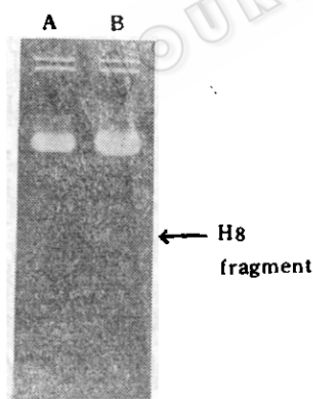


图2 pJG1 重组质粒的电泳分析

- A. pJG1 质粒用 XhoI-EcoRI 酶解;
B. pJG1 重组质粒 (pAFH8) 用 XhoI-EcoRI 酶解

Fig. 2 The electrophoresis analysis of recombinant plasmid pJG1

- A. XhoI and EcoRI digested pJG1;
B. XhoI and EcoRI digested recombinant pJG1(pAFH8)

3)。这就直接证明了带有 H8 片段的 pAFH8 质粒上的片段,确实是来自臭曲霉 DNA,而不是其它 DNA 的污染。pAFH8 质粒导入臭曲霉中也能产生蓝色菌斑(图版 I-B)。

(二) 启动子 H8 片段 DNA 序列分析

我们对启动子 H8 片段进行了序列分析, DNA 序列结果和战略分别如图 4、5。

H8 片段 DNA 全部序列为 750bp,有 9 个限制性内切酶位点,在 79、336、545 的位置存在典型真核启动子序列 (TATA box),在 533 的位置存在着一段与典型的真核细胞增强子核心序列 GTGG^{TTT}_{AAA}G 相似的序列,即有着一段 GTGGTTTAG 序列。

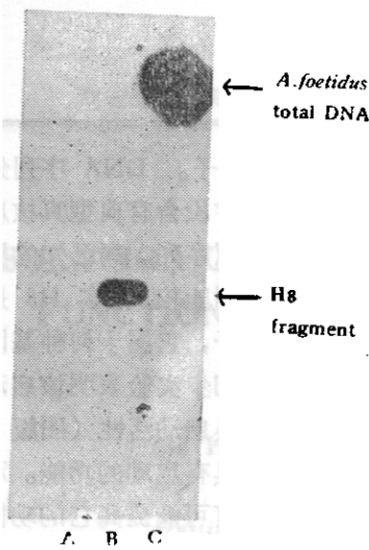


图3 臭曲霉总 DNA 与 H8 探针杂交图

A. pJGI 质粒用 XhoI-EcoRI 酶解

B. pJGI 重组质粒(pAFH8)用 XhoI-EcoRI 酶解

C. 臭曲霉总 DNA

Fig. 3 southern blot pattern of total *A. foetidis* DNA with H8 fragment probe

A. XhoI and EcoRI digested pJGI;

B. XhoI and EcoRI digested recombinant pJGI (pAFH8);

C. Total *A. foetidis* DNA

A. *foetidis* Promoter

GAATTCCTAG	GCCCCGTCTC	TCTCCAGTTG	AGAATCCAGG	GGAGCGCAGA	ACCCACATA	60
CTTAAGGATC	CGGGGCAGAG	AGAGGTCAAC	TCTTAGGTCC	CCTCGCGTCT	TGGGTGTAT	
TTACCAGATG	ATCACAGTAT	ATTTTTCCTC	AGCTGTGGGG	ACCACCTTAT	CCCGGGAGTT	120
AATGGTCTAC	TACTGTCATA	TAAAAAGGGG	TGCACACCCC	TGGTGAATA	GGGGCTCAA	
GCTGTCTGGG	GCCTGCGAGG	TGGGATATTG	AGGTTGAGGG	AACAGGAGGA	TTTCATAATC	180
CGACAGACCC	CGGACGCTCC	ACCCTATAAC	TCCAACCTCC	TTCTCCTCCT	AAAGTATTAG	
TGGATAGTGG	GATGGAGATT	GGGGAGGTGG	GTTTATCGGA	CGGGGCTTGG	GAATGGCACG	240
ACCTATCACC	CTACCTCTAA	CCCCTCCACC	CAAATAGCCT	GGCCCGAACC	CTTACCGTGC	
GTGTTTGATA	ATGGTGGTAG	TGGTGATAGT	GAGGGTGAGG	GTGAGGGTGG	GGACAGGGAC	300
CACAAACTAT	TACCACCATC	ACCACTATCA	CTCCCACTCC	CACCTCCACC	CCTGTCCCTG	
GGGGACGGGG	ACGCATTTGA	GGATGTTATC	AGGTGGAGGA	GGACAGGGTT	GTGGGAGTGG	360
CCGCTGCCGC	TGGGTAAACT	CCTACAATAG	TCCACCTCCT	CCTGTCCCAA	CAGCCTCACC	
CTGAAGGGTG	GGAAGGGGGT	GAGGGGTGTA	TTCCTGGATT	GATTGACCCA	GAAACATTGA	420
GACTTCCCAC	CCTTCCCCCA	TCCCCACAT	AAGGACCTAA	CTAACTGGGT	CTTTGTAAC	
TGTGAGTGCA	GGTTGTATAT	TTGTGAGAGG	GCAGGGTCTT	GTGCATATTG	GTCTAGGGGT	480
ACACTCACGT	CCAACATATA	AACACTCTCC	CGTCCCAGAA	CACGTATAAC	CAGATCCCCA	
ATTATTGAAA	TGTAATACTA	AATAGTAGAC	ACAGCTTTCA	ACAAATGGGG	CTGCTGTTTA	540
TAATAACTTT	ACATTATGAT	TTATCATCTG	TGTCGAAACT	TGTTTACCCC	GACACCAAAT	
GTGGTATAAT	ATTCCCTTAG	CATGGGAGAG	GTCCGGGGTT	CGATTCCCCG	CTGCAGCTCC	600
CACCATATTA	TAAGGGAATC	GTACCCTCTC	CAGGCCCCAA	GCTAAGGGGC	GACGTGAGG	
ATTTTTTGTG	CTTTTTTGTT	TCAGTCCCGG	ATAGATCAGA	CTGCTGCAGA	TTGGTGTAGA	660
TAAAAAACAC	GAAAAAACAA	AGTCAGGGCC	TATCTAGTCT	GACGACGTCT	AACCACATCT	
AGAGTCTATC	TTTTTCTTTT	CTTTTTTTTT	TTATCTGGAC	ATCTATGATA	ACCAGCCATA	720
TCTCAGATAG	AAAAAGAAAA	GAAAAAATAA	AATAGACCTG	TAGATACTAT	TGCTCGGTAT	
GTGTACAATT	CTGGATAACT	TCAGGCCTCG	AG			
CACATGTTAA	GACCTATTGA	AGTCCGGAGC	TC			

图 4-1 H8 片段 DNA 序列分析 Fig. 4-1 Sequence of H8 DNA fragment

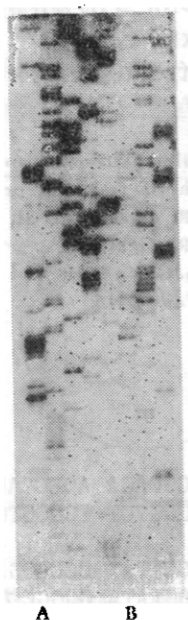


图 4-2 H8 DNA 序列分析

A. M13mp¹⁸ EcoRI-SalI 第 36 碱基开始的序列;B. M13mp¹⁹ SalI-EcoRI 第 124 碱基开始的序列

Fig. 4-2 sequence of H8 DNA fragment

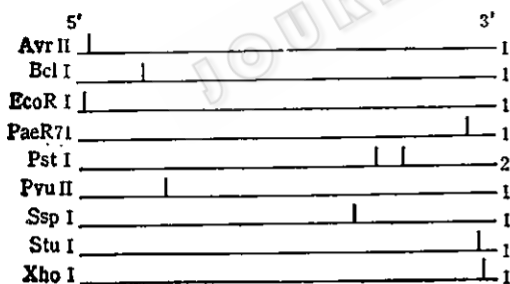
A. M13mp¹⁸ EcoRI-SalI start from the sequence of 36 base pairs;B. M13mp¹⁹ SalI-EcoRI start from the sequence of 124 base pairs

图 5 H8 DNA 酶切图谱

Fig. 5 Res map of H8 DNA fragment

讨 论

本文介绍了使用原核及真核菌通用的挑选启动子克隆载体 pJGI, 利用 β -半乳糖苷酶基因的表达为选择标记, 从臭曲霉 DNA 中在大肠杆菌系统内快速分离到启动子的基因片段, 并从中挑选到具有较好

活性的 H8 启动子。DNA 序列分析结果表明该 DNA 片段含有典型真核启动子序列及增强子相似序列。同已知的黑曲霉糖化酶启动子序列比较, 证实 H8 是一个新的臭曲霉启动子, 它属于何种基因还需作进一步鉴定。初步实验表明该启动子不但在原核细胞中具启动活性 (图版 1-C), 在臭曲霉菌中也具有启动的功能。对其片段作适当的加工有可能提高它的功能作用。

H8 驱动下的 Lac Z 基因能够在含有 X-gal 的琼脂培养基上产生蓝色细菌克隆, 为利用细菌质粒在大肠杆菌系统中, 快速分离丝状真菌启动子提供了选择标记。但由于大肠杆菌 RNA 聚合酶对真核生物不能够完全识别其中某些基因的转录调控信号及显示其功能。故在筛选丝状真的菌启动子时, 在细菌中的表达强度是否在丝状真菌中的表达强度相平行, 这就需要通过丝状真菌系统进一步验证。用 β -半乳糖基因作为标记筛选来自丝状真菌的启动子 (未见有同类工作报告), 可广泛地用于其它丝状真菌快速简便的分离启动子的研究中。

本文报道从臭曲霉菌中分离到一个新的启动子 H8, 并第一次证实了来自丝状真菌臭曲霉的启动子在原核细胞中亦具有启动子活性。这不仅在臭曲霉分子生物学的研究中具有一定意义, 而且为利用臭曲霉系统进行外源基因表达研究也奠定了良好基础。

参 考 文 献

- [1] 梁平彦等: 植物生理, 7(1): 1-10, 1981.
- [2] Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning, A laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [3] Sanger, F. et al.: PNAS, 74: 5463, 1977.

ISOLATION OF A DNA FRAGMENT H8 PROMOTER FUNCTION CONTAINED FROM *ASPERGILLUS* *FOETIDUS*

Liu Hongdi Cao Xu* Wu Xiaojun Jin Qi*

Ruan Li* Liang Pingyan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A DNA fragment H8 promoter function contained H8 was isolated from genomic DNA of *Aspergillus foetidus* by using a promoter cloning plasmid pJGI which generally functions in both procar-yotic and eucaryotic cells. Southern blot demonstrated that the H8 fragment was from *Aspergillus foetidus*. DNA sequence data showed the H8 fragment has 750bp, containing typical "TATA box" and enhancer like sequence GTGGTTT^C_A.

Primary experiments have shown that H8 fragment is not only functional in *Aspergillus foetidus* but also in *E. coli*.

Key words

Aspergillus foetidus H8 promoter;
Sequence

图 版 说 明

Explanation of plate

- A. 可见蓝色 pJGI 重组体。
B. pJGI 重组体质粒导入臭曲霉菌可见蓝色菌落。
C. pAFH8 转化大肠杆菌均为蓝色细菌斑。
A. Blue recombinant pJGI appeared.
B. Recombinant pJGI was induced into *Aspergillus foetidus* and blue colony appeared.
C. Conlony of transformed pAFH8 *E. coli* was blue.

* Institute of Virology, Chinese Academy of Proventive Medicine, Beijing