

黑曲霉糖化酶基因表达调控的研究

II. *A. niger* T21 和 3.795 *glaA* 基因 5' 调控区功能的体内分析

乔殷华 钟丽婵 唐国敏 杨开宇

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 对糖化酶高产菌株 *A. niger* T21 和原始菌株 *A. niger* 3.795 的 *glaA* 5' 上游区的序列分析证明, 两者在 1.5kb 的区域内有 9 个部位的碱基不同。为考察这些碱基差异是否是引起 T21 *glaA* 基因转录水平提高的原因, 构建了以 T21 和 3.795 *glaA* 基因转录调控区及 *A. nidulans trpC* 基因终止子为表达元件的 *E. coli hph* 基因表达载体(pXH2 和 pGH1), 用 pXH2 和 pGH1 分别转化 *A. niger* T21, 对两种转化子的 HmB 抗性水平测定和 Southern 杂交分析显示, 在转化子 XH2 C 和 GH1C 中, pXH2 和 pGH1 以相同拷贝数(2 拷贝串联)整合到染色体 DNA 的相同位置上, XH2 C 的 HmB 抗性水平(3 000 $\mu\text{g} / \text{ml}$)为 GH1C(1 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$)的 2 倍。这一结果表明, 诱变引起的调控区序列改变使 T21 *glaA* 基因转录调控区的功能水平比 3.795 提高 1 倍。

关键词 黑曲霉, 糖化酶基因, 转录调控区功能水平

分类号 Q933

黑曲霉(*Aspergillus niger*) T21 是通过诱变获得的糖化酶高产菌株, 其产量比原始菌株 *A. niger* 3.795 提高 10 倍以上。前文曾报道 T21 菌体内糖化酶 mRNA 的含量为 3.795 的 4.3~4.4 倍, 并证明这一差别与糖化酶基因(*glaA*)的转录效率不同有关^[1]。通过对两菌株 *glaA* 上游序列测定发现, 在 -340~-1505 的范围内有 9 个部位的碱基不同^[2]。为了进一步考察这些碱基的差异与转录效率之间是否有对应关系, 对两者的功能进行了体内分析。

在丝状真菌基因转录调控区功能分析中, 通常是将待分析的序列与报告基因(如大肠杆菌 *uidA*^[3]、*lacZ*^[4]、*hph*^[5]等)重组, 构建表达载体, 转入适当的丝状真菌, 通过分析报告基因在宿主中的表达水平和调控特点以阐明该序列的功能。本文以 *E. coli* 潮霉素 B 磷酸转移酶(Hygromycin B phosphotransferase)基因(*hph*)为报告基因, 以 *A. niger* T21 为宿主, 其表型为潮霉素 B 抗性, 转化子抗性强弱与 *hph* 基因表达水平有关, 可以籍此判断不同序列在调控基因表达中的作用。

1 材料和方法

1.1 菌株、培养基、质粒、试剂和酶

1.1.1 菌株: *A. niger* T21 为中国科学院微生物研究所糖化酶研究组经多次诱变选育的糖

*国家自然科学基金和联合国教科文组织资助项目。

收稿日期: 1996-08-03

化酶高产菌株,3.795 为其诱变出发菌株。大肠杆菌 DH5 和 SK383 为质粒转化受体菌株。

1.1.2 培养基:查氏斜面培养基(0.3%NaNO₃, 0.1%K₂HPO₄, 0.05%KCl, 0.05%MgSO₄·7H₂O, 0.001%FeSO₄·7H₂O, 3% 蔗糖, 1.5% 琼脂粉, 自然 pH)用于 *A. niger* 的菌种保存和活化培养。*A. niger* 液体培养基为:0.5%KH₂PO₄, 2% 聚脲, 6% 可溶性淀粉, 1% 黄豆饼粉, 自然 pH。

1.1.3 质粒:pUXE 与 pUGPI 分别为本实验室克隆的 *A. niger* T21 和 3.795 *glaA* 基因 5' 调控区片段与 pUC19 的重组质粒。pDH33 为 Dr. Cullen 惠赠。

1.1.4 试剂和酶:氯化苄为北京化学试剂一厂产品, [α-²³P]dCTP 为 Dupont 公司产品, Hygromycin B 和牛肠碱性磷酸酯酶(CIP)为 Boehringer 公司产品, 限制性内切酶为中国医科院基础所友谊生物制品公司及 Promega 公司产品, T4 DNA 连接酶为友谊生物制品公司产品, T7 DNA 聚合酶测序 Kit 为 Pharmacia 公司产品, Taq DNA 聚合酶为中国科学院遗传研究所产品, 切刻平移 Kit 和 T4 DNA 聚合酶及 Cla I Linker 为 Promega 公司产品, Novozyme 234 为 Biospecific 公司产品, Cellulase R-10 为 Yakuit Pharmaceutical Industry 公司产品。

1.2 *A. niger* 的 DNA 转化

参考 Gomi^[6] 和 Unkles^[7,8] 等方法制备原生质体。取 0.2 ml 原生质体 ($0.5 \sim 5.0 \times 10^8$ / ml), 加入 1~2 μg DNA (≤20 μl), 转化后与 3ml 55℃ 保温的上层培养基 (0.3% NaNO₃, 0.1%K₂HPO₄, 0.05%KCl, 0.05%MgSO₄·7H₂O, 1% 麦芽糖, 0.8 mol / L 蔗糖, 0.7% 琼脂, 200 μg / ml HmB) 混和, 铺于选择培养基平板 (除 1% 琼脂外, 同上层培养基) 上, 30℃ 培养 10~12d。

1.3 *A. niger* 染色体 DNA 提取

参照朱衡等的方法^[9]进行。

1.4 Southern 杂交分析

参照文献 [10] 的方法。

1.5 PCR 扩增 *A. niger* T21 和 3.795 *glaA* 基因 5' 调控区近上游区

根据 *A. niger* T21 与 3.795 *glaA* 基因 5' 调控区序列^[2], 设计和合成如下引物:

Primer 1: (-848)5' GAGCGAGTTCCAGCCACACGTA 3' (-827)

Primer 2: (-25) 3' AGGGGTCGTAGTAATGTGGA 5' (-6)

PCR 反应 (50 μl): 10 × Buffer 5 μl, 25 mmol / L MgCl₂ 5 μl, *A. niger* T21 或 3.795 染色体 DNA 2 μl (200 - 250ng), Primer 1 (5 μmol / L) 5 μl, Primer 2 (5 μmol / L) 5 μl, dNTPs (2 mmol / L / each) 5 μl, 去离子水 23 μl。94℃, 5 min 预变性后, 加 2u Taq DNA 聚合酶, 随后进行 30 个循环的扩增反应: 变性, 94℃ 40s; 退火, 58℃ 50s; 延伸, 72℃ 60s。最后增加延伸 72℃ 10 min。

1.6 DNA 序列分析

采用 Sanger 双脱氧链终止法, 以双链质粒 DNA 为测序模板。

2 结果

2.1 *A. niger* T21 和 3.795 *glaA* 基因 5' 调控区引导转录的 hph 基因表达载体的构建

按图 1 所示分别构建了 *A. niger* T21 和 3.795 *glaA* 基因 5' 调控区 (1.5kb) 引导转录的

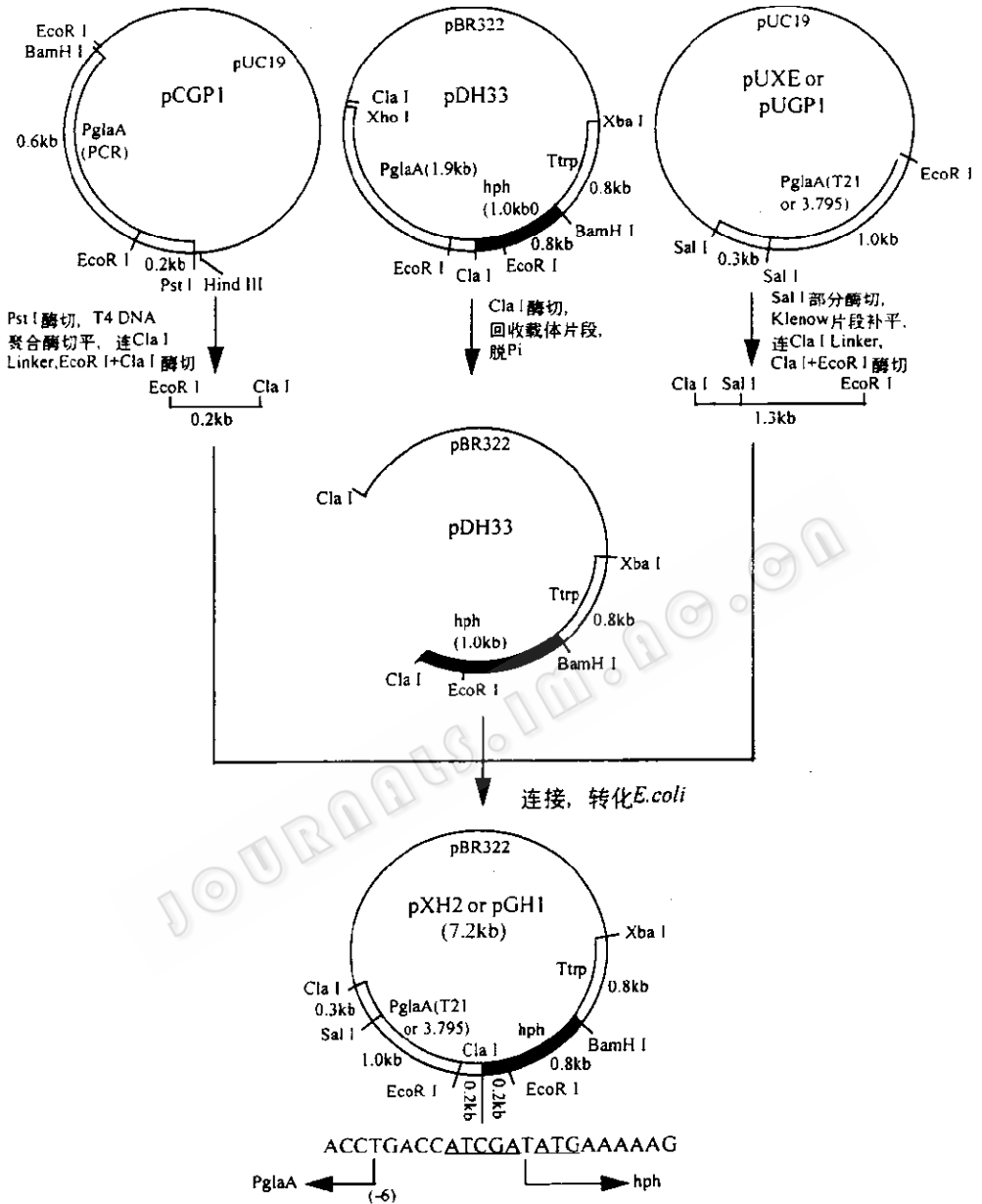


图1 大肠杆菌 hph 基因丝状真菌表达质粒pXH2和pGH1的构建

Fig.1 The construction of plasmids pXH2 and pGH1 for the expression of *E. coli hph* gene in *A. niger*

hph 基因表达载体——pXH2 和 pGH1, 表达载体中的终止子部分均使用 *A. nidulans trpC* 基因终止子。由于在 *glaA* 基因起始密码子附近没有可资利用的限制酶位点, 为了获得游离的 *glaA* 基因 5' 调控区片段, 采用 PCR 扩增办法合成了 *glaA* 基因 5' 调控区中与起始密码子毗邻的区域 (-848—-6), 因在 -801 处有一 *BamH* I 位点, 故用 *BamH* I 酶切 PCR

产物, 然后与 pUC19 / BamH I + Hinc II 载体片断连接, 转化 *E. coli* 感受态细胞, 获得重组质粒 pCGP1, 对其插入片断的 DNA 序列分析表明, PCR 扩增未引入任何碱基错误。

2.2 pXH2 和 pGH1 对 *A. niger* T21 的转化

预备实验表明, *A. niger* T21 对 HmB 敏感, 最多只能耐受 100 μg / ml HmB, 因此可以作为转化重组质粒的受体菌。 *A. niger* T21 在培养 17 h 左右后, 收集菌丝体制备原生质体。实验表明, 菌丝体的分散好坏和菌龄长短是影响原生质体数量和质量的主要因素, 提高菌丝体分散程度和尽量缩短培养时间, 可以显著增加胞壁酶解速度和胞壁破除完全程度, 并因此提高原生质体的数量和质量。本实验中原生质体数量约为每 0.5g 菌丝体(湿重)10⁸个。

用 2 μg 左右的 pXH2 和 pGH1 分别转化 *A. niger* T21 原生质体(0.2ml, 约 10⁸ / ml), 在含 200μg / ml HmB 的选择培养基上培养 5d 以上, 最高转化频率为 4 个转化子 / μg DNA, 而未经转化的原生质体在同样的选择培养基上未见任何生长。

2.3 转化子的 HmB 抗性水平

随机选取 pXH2 和 pGH1 的 *A. niger* T21 转化子各 7 个(XH2 A-G, GH1 A-G), 对它们的 HmB 抗性水平进行了测定和比较。将各转化子的孢子用牙签接种于含不同浓度 HmB(100μg / ml~4000μg / ml) 的查氏培养基上, 在 30℃ 培养 5d, 以未转化的 *A. niger* T21 为对照, 结果列于表 1。各转化子的生长均随 HmB 浓度的增加而逐渐延缓, 当 HmB 达到一定浓度后, 生长即被完全抑制。除 GH1D 以外, pGH1 转化子的 HmB 抗性水平普遍低

表1 *A. niger* T21转化子的潮霉素B抗性水平测定
Table 1 The hygromycin B sensitivity of *A. niger* T21 transformants

转化子 Transformants	在不同浓度HmB(μg/ml)下的生长情况 The growth stations under different concentrations of HmB								
	100	200	500	1000	1500	2000	2500	3000	4000
<i>A. niger</i> T21	(+)	-	-	-	-	-	-		
GH1A	+	+	+	+	(+)	(+)	-		
GH1B	+	+	+	(+)	(+)	-	-		
GH1C	+	+	+	(+)	-	-	-		
GH1D	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	-
GH1E	+	+	+	(+)	-	-	-		
GH1F	+	+	+	+	(+)	(+)	-		
GH1G	+	-	-	-	-	-	-		
XH2A	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	-
XH2B	+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
XH2C	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-
XH2D	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-
XH2E	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)
XH2F	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
XH2G	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-

+, 正常生长 Normal growth; (+), 生长被明显抑制 Inhibited growth; -, 没有生长 No growth.

于 pXH2 转化子。未转化的 *A. niger* T21 只在 100 μ g / ml HmB 的培养基上微弱生长。

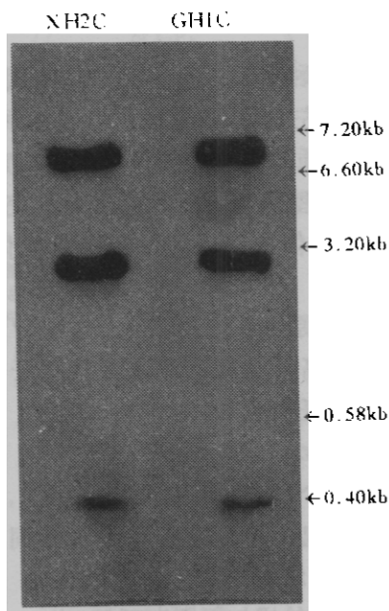


图2 *A. niger* 转化子GH1C和XH2C的 Southern杂交分析

Fig.2 The Southern hybridization analysis of *A. niger* transformants GH1C and XH2C, probed with *E. coli hph* gene

2.4 对转化子的 Southern 杂交分析

提取 *A. niger* T21 及各转化子的染色体 DNA, 用 *Eco*RI 酶切后, 以 *hph* 基因 (1.0kb) 为探针进行 Southern 杂交分析, 结果除未转化的 *A. niger* T21 外, 均产生了杂交带, 并且均有共同的 0.4kb 杂交带, 这表明转化 DNA 确实均整合到了各转化子的基因组中。由于 GH1C 和 XH2C 具有相同的杂交图谱, 因此取相同微克数 (5 μ g) 的 GH1C 和 XH2C 染色体 DNA 进一步进行定量的 Southern 杂交分析, 结果如图 2 所示。GH1C 和 XH2C 染色体 DNA 用 *Eco*RI 酶解后均形成 3 条杂交带: 0.4kb、3.0kb 和 6.8kb, 其中 0.4kb 条带对应于 pGH1 和 pXH2 中的 *Eco*RI 小片段, 6.8kb 相当于 pGH1 和 pXH2 中 *Eco*RI 大片段长度, 3.0kb 片段则是由整合的质粒 DNA 与受体染色体 DNA 组成的含部分 *hph* 基因的 *Eco*RI 片段。据此可以判断, 在 GH1C 和 XH2C 中, pGH1 和 pXH2 分别是以数拷贝串联的形式整合到染色体 DNA 的同一位置上。由于 GH1C 和 XH2C 各自的 6.8kb 与 3.0kb 杂交带的密度均相同, 因此推测 GH1C 和 XH2C 中

pGH1 与 pXH2 的串联拷贝数均为 2 拷贝。

3 讨论

根据 pXH2 转化子的 HmB 抗性水平普遍高于 pGH1 转化子, 可以认为, T21 *glaA* 上游序列能增强 *hph* 的表达。而同一系列的不同转化子之间的抗性又有明显的区别, 则说明 *hph* 的表达水平又受质粒在染色体上的整合位置和拷贝数的影响。Southern 杂交分析表明, 在转化子 GH1C 和 XH2C 中, pGH1 和 pXH2 以相同拷贝数 (2 拷贝串联) 整合到染色体 DNA 的相同位置上, 因此这两个转化子 *hph* 表达水平的差异只能与 T21 和 3.795 *glaA* 转录调控区功能水平的差异有关。由表 1 可见, GH1C 最高可耐受 1500 μ g / ml HmB, 而 XH2C 可以耐受 3000 μ g / ml HmB, 即 XH2C 中 *hph* 的表达水平为 GH1C 的 2 倍, 换句话说, T21 *glaA* 5' 调控区的转录活性为 3.795 的 2 倍。

T21 和 3.795 的 5' 转录调控区共有 9 个部位 (共计 10 个碱基) 的碱基差异, 其中哪些碱基在调节转录活性中起决定性作用尚有待研究。T21 菌体内的 mRNA 含量为 3.795 的 4.3~4.4 倍, 而上述结果表明, 在同一细胞环境内, T21 *glaA* 转录调控区的活性约为 3.795 的 2 倍, 两者的不一致性提示诱变除引起顺式调控元件发生改变外, 还有可能影响转录因子的质和量, 进一步的阐明将会深化对黑曲霉糖化酶基因表达调控规律的认识。

参 考 文 献

- [1] 乔殿华, 唐国敏, 钟丽婵, 等. 微生物学报, 1997, 37(5): 349~354.
- [2] 钟丽婵, 乔殿华, 唐国敏, 等. 微生物学报, 1996, 36(3): 181~186.
- [3] Roberts I N, Oliver R P, Punt P J *et al.* *Curr Genet*, 1989, 15: 177~180.
- [4] Van Gorcom R F M, Pouwels P H, Goosen T *et al.* *Gene*, 1985, 40: 99~106.
- [5] Davies J, Gritz L. *Gene*, 1983, 25: 179~188.
- [6] Gomi K, Iimura Y, Haya S *et al.* *Agric Biol Chem*, 1987, 51: 2549~2555.
- [7] Unkles S E, Campbell E I, Kinghorn J R *et al.* *MGG*, 1989, 218: 99~104.
- [8] Unkles S E, Campbell E I, Carrez D *et al.* *Gene*, 1989, 78: 157~166.
- [9] 朱 衡, 瞿 峰, 朱立煌, 等. 真菌学报, 1994, 13: (1): 34~40.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著(金冬雁等译). 分子克隆. 北京: 科学出版社, 1992, 474~491.

RESEARCH ON THE REGULATION OF GLUCOAMYLASE GENE(*glaA*) EXPRESSION IN *A. NIGER* II. ANALYSIS OF THE FUNCTION OF 5'-REGULATORY REGION OF *A. NIGER* T21 AND 3.795 *glaA* GENE

Qiao Dianhua Zhong Lichan Tang Guomin Yang Kaiyu

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Two plasmid vectors pXH2 and pGH1 were constructed through the fusion of *E. coli hph* gene, the report gene and the 5' upstream regions of *A. niger* T21 and 3.795 respectively, as well as the terminator of *A. nidulans trpC* gene. The plasmid vectors were then used to transform *A. niger* T21 to functionally identify those different basic groups between the two 5' upstream regions responsible for high-level expression of the *glaA* gene. Southern analysis of two transformants XH2C and GH1C revealed that pXH2 and pGH1 were integrated respectively into the chromosome at same site with two copies in tandem array. The level resistant to HmB(3000 µg / ml) of XH2C was twice as high as that (1500 µg / ml) of GH1C, indicating that the changes of basic groups through mutation result in twice increase of functional level of region responsible for transcription and regulation of *A. niger* T21 *glaA* gene compared with that of 3.795.

Key words *Aspergillus niger*, Glucoamylase gene, Function of upstream region