

瑞氏木霉木糖代谢关键酶基因在不同碳源条件下的表达 *

汪天虹¹ Merja Penttilä² 高培基¹

(¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(² VTT 生物技术与食品研究所 芬兰 FIN-02044)

摘 要 用 20 种不同的碳源(包括单一碳源和混合碳源)分别培养瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414。通过一系列 Northern 杂交分析检测瑞氏木霉木糖还原酶(XR)、木糖醇脱氢酶(XDH)以及转醛醇酶(TAL)mRNA 的表达情况。实验结果证实,槐糖和木二糖是 *xr* 和 *xdh* 表达的强诱导物,阿拉伯糖和乳糖也有较强的诱导作用。葡萄糖在培养基中的存在阻遏该二基因的表达。当葡萄糖耗尽以后,培养基中不存在任何诱导物的情况下,*xr* 和 *xdh* 以一定的基础水平进行转录。相比较, *tal* 基因在每种碳源上都是强表达。

关键词 瑞氏木霉,木糖还原酶基因,木糖醇脱氢酶基因, Northern 杂交,基因表达

分类号 Q533 **文献标识码** A **文章编号** 0001-620X(1999)06-0503-09

D-木糖是一类木质纤维素中大量存在的五碳糖,是自然界最丰富的糖类之一。对它的生物转化具有重要的经济意义。木糖相对于葡萄糖、甘油和果糖等能被微生物优先利用的碳源而言为迟效碳源。某些细菌、酵母和丝状真菌能发酵木糖为乙醇^[1],但原核与真核生物利用 D-木糖起始代谢步骤不同。通常细菌是利用木糖异构酶经一步异构化反应将 D-木糖转变为 D-木酮糖^[2],而酵母和真菌则是利用木糖还原酶(XR)和木糖醇脱氢酶(XDH)进行两步氧化还原反应来进行同样的生物转化过程^[3],即:



生成的木酮糖进一步磷酸化为 5-磷酸木酮糖,然后进入磷酸戊糖(PP)途径代谢。在酵母和真菌对木糖的利用中,由 D-木糖到 D-木酮糖的生物转换是一个重要的调节或限速步骤。

瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)是自然界中广泛分布的腐生性丝状真菌,传统地被应用于生产各种酶制剂,如纤维素酶、淀粉酶、果胶酶、蛋白酶、脂肪酶等,其工业规模的生产工艺已比较成熟。在基因工程研究中,现已被作为宿主菌生产多种外源蛋白^[4]。瑞氏木霉具有降解纤维素与半纤维素的完全酶系^[5]。由于其具有木糖还原酶和木糖醇脱氢酶(XDH),所以能继续利用降解半纤维素所产生的木糖作为碳源与能源生长。对丝状真菌木糖代谢酶基因的表达,尚未在分子水平上进行过研究。对瑞氏木霉木糖还原酶和木糖醇脱氢酶基因的克隆成功,为在分子水平上研究该二基因的表达创造了条件。我们以瑞氏木霉进行木糖代谢的关键酶——木糖还原酶和木糖醇脱氢酶以及磷酸戊糖代谢途径的代表酶——转醛醇酶的基因片段为探针,通过一系列 Northern 印迹杂交,分析比较了瑞氏

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39770012)

收稿日期:1998-02-09,修回日期:1998-05-04

木霉在 20 种不同碳源(包括单一碳源和混合碳源)条件下 3 个基因的表达情况。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

用于基因表达研究的瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)QM9414(ATCC 26921)是由美国菌种保藏中心得到,质粒 pAJ401-xdh1 是在酵母/大肠杆菌穿梭质粒 pAJ401 上插入瑞氏木霉的木糖醇脱氢酶 cDNA 基因构建得到的重组质粒,由汪天虹等人分离得到^[6]。质粒 pAJ401-xr 和 pAJ401-tal 分别是在 pAJ401 上插入瑞氏木霉的木糖还原酶基因和转醛醇酶基因构建得到的重组质粒,该 2 基因由芬兰 VTT 生物技术与食品研究所分离提供。利用 pAJ401 构建瑞氏木霉 cDNA 文库时外源基因插入位点两端设计有 *Eco*RI 和 *Xho*I 位点。

1.2 培养基和生长条件

在 250ml 三角瓶中装入 50mL 含各种不同碳源的生长培养基,接种瑞氏木霉孢子 10^7 个,200r/min,28℃ 振荡培养,根据生长状况,72~87h(均在对数生长期)收获菌丝体提取 RNA。瑞氏木霉生长培养基为基本培养基(TMM 培养基),每升含 KH_2PO_4 15g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.4mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.7mg, MgSO_4 0.6g, CaCl_2 0.6g, pH4.8。所用的碳源包括:4 种单糖:葡萄糖、木糖、甘露糖、阿拉伯糖;4 种双糖:槐糖(2-O- β -glucopyranosyl),甘露二糖、木二糖和纤维二糖;几种糖醇:山梨糖醇、木糖醇、阿拉伯糖醇和甘油以及几种多聚物:1 种纤维素(solca flock cellulose)和 1 种木聚糖(lenzin xylan)。甘露二糖和木二糖分别由相应的多聚糖经酶水解得到,并经高压液相柱层析(HPLC)纯化。由于槐糖、甘露二糖、木二糖等双糖价格昂贵,这些化合物分别在 62 和 72h 分两次,每次按原初体积计算加入终浓度为 1mmol/L 的双糖加到以葡萄糖、甘油或山梨糖醇为碳源的培养基中。为避免碳源耗尽所引起的基因表达对实验结果分析的干扰,在培养 72h 后取样检测以确证所实验碳源在培养基中仍过量存在。其它碳源:甘露糖、木糖、木糖醇、阿拉伯糖、阿拉伯糖醇和葡萄糖分别为 60g/L,甘油、山梨糖醇和纤维二糖添加量分别为 50g/L、40g/L 和 30g/L。纤维素(Solca flock cellulose)及木聚糖(lenzin Xylan)的添加量为 30g/L。在葡萄糖/槐糖、葡萄糖/甘露二糖、葡萄糖/纤维二糖等这些混合碳源培养基中,经 72h 培养后,补加 4mL 25% 葡萄糖使其终浓度达 2%。在混合碳源培养基上生长的培养物至 75h 获取菌体。培养结束时用 HPLC 检测各种碳源以确证其在培养基中仍过量存在。从起始葡萄糖含量为 2%,培养 72h 后经 HPLC 测定葡萄糖含量已在 0.1% 以下的培养物中所提取的总 RNA 为葡萄糖解阻遏条件下的总 RNA。用 GF/B 玻璃纤维滤器(Whatman)过滤培养物收获菌体,灭菌蒸馏水洗涤,-70℃ 储藏备用。

1.3 杂交探针的制备

各基因探针的制备是用 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切含有相应 cDNA 基因的重组质粒 pAJ401-xr、pAJ401-xdh1 和 pAJ401-tal,在低熔点琼脂糖上进行凝胶电泳,分离所要的基因片段。用 Gel Extraction Kit(QIAGEN 公司产品)试剂盒纯化 DNA 片段,用³²P 和随机引物标记试剂盒(Bichringer Mannheim Biochemica 产品)对各基因探针进行放射性标记。

1.4 瑞氏木霉总 RNA 的提取及 Northern 印迹杂交分析

按照 Chirgwin 等的方法^[7]提取在各种不同碳源上生长的 *T. reesei* QM9414 总 RNA。测定各样品 RNA 含量 根据浓度的不同调整上样体积 使总 RNA 上样量为 5 μ g 左右。按照 Maniatis^[8]等人的方法将总 RNA 乙酰化后 以 10mmol/L 磷酸钠为缓冲液 (PH7.0) 在 1% 琼脂糖上进行电泳。以 BRL 公司生产的带有已知分子量的 RNA 为分子量标准。由于 RNA 样品较多 电泳是在两块凝胶板上进行 (1[#] ~ 19[#] 在一块板 20[#] 在另一块板)。为避免杂交膜因使用次数太多而影响杂交效果 每块凝胶电泳板都用同样的样品及上样量制备了双份。电泳结束后 用丫啶橙 (15mg/ml) 在 10mmol/L 磷酸缓冲液中染色 15min 然后用 10mmol/L 磷酸缓冲液洗涤背景。紫外光下拍照 作为最终判断杂交结果的一个参照物。通过毛细管印迹转移法在 20 倍 SSC 中将 RNA 转到 Hybond N 尼龙膜 (Amersham 公司产品) 上。杂交是在 50% 甲酰胺-1% 硫酸葡萄糖-1% SDS-1mol/L NaCl-125 μ g 变性鲑精 DNA/ml 溶液中进行。10⁶cpm 探针/ml 杂交液。由于 XR 和 XDH 的 mRNA 大小接近 无法同时同一溶液中进行杂交 因此 3 个基因的杂交分别进行。在实验过程中注意使操作条件尽可能保持一致 以使实验结果有可比性 并通过 RNA 凝胶电泳后的丫啶橙染色照相 根据上样量的差异调整对杂交结果的分析判断。*xr* 和 *tal* 的杂交是用同一张膜先后进行 (先进行与 *xr* 基因片段的杂交 膜洗涤后再与 *tal* 基片段杂交)。*xdh* 的杂交用另一张膜进行。杂交是在 42 $^{\circ}$ C 过夜进行 42 $^{\circ}$ C 5 \times SSPE 洗膜 15min 然后在 1 \times SSPE-0.1% SDS 中洗涤 2 \times 15min 0.1 倍 SSPE-0.1% SDS 中洗涤 2 \times 15min。柯达 XAR-5X 胶片置 -70 $^{\circ}$ C 曝光。

2 结果和讨论

2.1 在 20 种不同碳源上生长的瑞氏木霉培养物的制备

在基本培养基中补加 20 种不同碳源的瑞氏木霉培养物 其碳源的起始浓度和最终浓度见表 1。

2.2 木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和转醛醇酶 mRNA 的大小

提取在 20 种不同碳源上生长的瑞氏木霉 QM9414 的总 RNA 分别以 1.25、1.3 和 1.2kb 的全长 *xr*、*xdh* 和 *tal* 基因片段为探针 进行一系列的 Northern 杂交。在进行 RNA 凝胶电泳时 加入 RNA 标准分子量。由杂交结果显示 瑞氏木霉木糖还原酶、木糖醇脱氢酶和转醛醇酶 mRNA 的大小分别为 1.3、1.35 和 1.25kb。

2.3 瑞氏木霉 *xr* 基因在不同碳源条件下的表达

对在 20 种不同碳源上生长的瑞氏木霉 mRNA 进行一系列 Northern 杂交的结果汇总于图 1。

由图 1 可见 在所采用的 20 种碳源 (包括单一碳源和混合碳源) 中 瑞氏木霉木糖还原酶基因在单一碳源 纤维素 (Sigma 产品)、木聚糖 (Sigma 产品)、木二糖、阿拉伯糖、阿拉伯糖醇、甘露糖以及混合碳源 山梨糖醇/槐糖、甘油/木二糖上都得到强表达。葡萄糖阻遏瑞氏木霉 *xr* 的表达。但在葡萄糖/槐糖培养基上 *xr* 基因有一定程度表达。木糖是木糖还是原酶的底物 对木糖还原酶的合成有一定的诱导作用 但并非最强的诱导物。

表 1 在添加不同碳源的基本培养基上生长的瑞氏木霉 QM9414 培养物碳源起始浓度和终浓度

Table 1 The beginning and ultimate concentrations of carbon source in minimal mediums supplemented with different carbon source on which *T. reesei* QM9414 cultivations were grown

碳源 Carbon Sources	起始浓度/L Beginning concentration	终浓度/L Ultimate concentration
纤维素 Solka flock cellulose	30g	12g
葡萄糖阻遏 Glu repress	60g	21~27g
葡萄糖解阻遏 Glu derepress	20g	<0.1g
葡萄糖/槐糖 Glu/Sophorose	60g/0.685g	21~27g/1.06g
葡萄糖/甘露二糖 Glu/Mannobiose	60g/0.685g	21~27g/1.12g
葡萄糖/木二糖 Glu/Xylobiose	60g/0.565g	21~27g/0.95g
山梨糖醇 Sorbitol	40g	14~16g
山梨糖醇/槐糖 Sorb/Sophrose	40g/0.685g	14~16g/0.78g
山梨糖醇/甘露二糖 Sorb/Mannobiose	40g/0.685g	14~16g/1.12g
山梨糖醇/木二糖 Sorb/xylobiose	40g/0.565g	14~16g/0.338g
山梨糖醇/纤维二糖 Sorb/Cellubiose	40g/0.685g	14~16g/1.09g
纤维二糖 Cellubiose	30g	3.8g
甘油/甘露二糖 Gly/Mannobiose	50g/0.685g	28~29g/1.09g
甘油/木二糖 Gly/Xylobiose	50g/0.565g	28~29g/0.169g
甘露糖 Mannose	60g	33g
木糖 Xylose	60g	45g
木糖醇 Xylitol	60g	42g
阿拉伯糖 Arobinose	60g	47g
阿拉伯糖醇 Arabitol	60g	45g
木聚糖 Lenzin xylan	30g	12g

备注 :混合碳源培养基中双糖的加入是在 62 和 72h 分两次按培养物原初体积计算加入终浓度为 1mmol/L 的双糖 , 75h 收获菌体。

Note :According to the original volume ,1mmol of corresponding disaccharificate was added at 62h and 72h , two times , into every medium in which the mixed carbon sources were used. The mycelium were harvested at 75h.

2.4 瑞氏木霉 *xdh* 基因在多种碳源上的表达

由杂交结果可见瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因在木聚糖、木糖、阿拉伯糖、阿拉伯糖醇以及混合碳源 :甘油/木二糖上得到强表达。在纤维素和山梨糖醇/槐糖上的表达较 *xr* 弱。木糖醇是木糖醇脱氢酶作用底物 ,但对木糖醇脱氢酶的表达并不是最强的诱导物。葡萄糖阻遏瑞氏木霉 *xdh* 的表达 ,即使在葡萄糖/槐糖培养基上 ,*xdh* 基因也基本不表达。

2.5 瑞氏木霉 *TAL* 基因在多种碳源上的表达

瑞氏木霉转醛醇酶基因在所有各种不同碳源上都得到强表达。证实瑞氏木霉在不同碳源上生长时 ,都需要磷酸戊碳糖途径的存在 ,以产生菌体代谢所需要的各种戊碳糖及其它中间代谢产物。

2.6 葡萄糖对木糖代谢的阻遏作用与解阻遏条件下 *xr* 和 *xdh* 的基础水平组成型合成表达

木糖为迟效碳源。本实验结果证实瑞氏木霉的木糖代谢关键酶基因的表达受代谢降解物阻遏机制控制。这与纤维素酶、半纤维素酶等与迟效碳源代谢有关的酶类受代谢降解物阻遏机制控制是一致的^[9,10] ,表明 *XR* 和 *XDH* 与纤维素酶、木聚糖酶等受同一普遍性调节机制的控制。在葡萄糖培养基上生长的瑞氏木霉 ,当葡萄糖耗尽以后 ,在没有加入任何诱导剂的情况下 ,检测到 *xr* 和 *xdh* 有一定量的表达。这说明在代谢降解物阻遏机

制解除的情况下,瑞氏木霉的木糖还原酶和木糖醇脱氢酶存在着一定量的基础水平的组成型合成表达。这与文献报道纤维素酶在葡萄糖解阻遏条件下存在一定量的基础水平组成型表达是一致的^[11]。山梨醇阻遏瑞氏木霉 *xr* 和 *xdh* 基因的表达,这与山梨醇对纤维素酶表达的作用也是一致的^[12]。

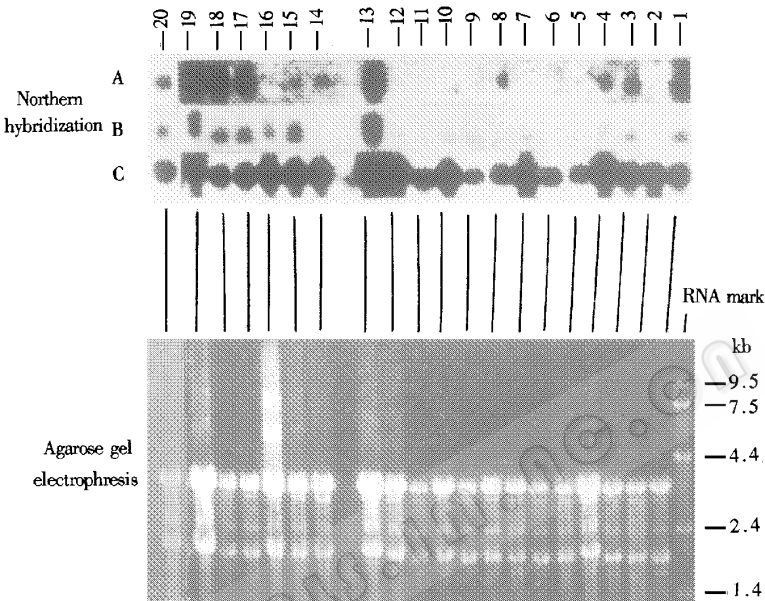


图1 Northern 系列杂交

A B C 分别是以 *xr* *xdh* 和 *tal* 为基因探针进行杂交的结果

Fig.1 The results of a series of northern hybridization analysis

Lanes A B C were Northern hybridization probing with *xr* , *xdh* and *tal* fragment separately

1 Solka flock cellulose ; 2 Glucose repression ; 3 Glucose derepression ; 4 Glu/Sophorose ;
5 Glu/Mannobiose ; 6 Glu/Xylobiose ; 7 Sorbitol ; 8 Sorb/Mannobiose ;
9 Sorb/Xylobiose ; 10 Sorb/Cellubiose ; 11 Cellubiose ; 12 Gly/Mannobiose ;
13 Gly/Xylobiose ; 14 Mannose ; 15 Xylose ; 16 Xylitol ;
17 Arabinose ; 18 Arabitol ; 19 Lenzin xylan ; 20 Sorb/Sorphrose.

2.7 槐糖的普遍性诱导作用

本实验结果证明,葡萄糖、山梨糖醇单独存在时均阻遏瑞氏木霉 *xr* 和 *xdh* 基因的表达。但在葡萄糖/槐糖及山梨糖醇/槐糖培养基上,尽管只含有 2mmol/L 槐糖, *xr* 在葡萄糖/槐糖和山梨糖醇/槐糖培养基上, *xdh* 在葡萄糖/槐糖培养基上都有一定程度的表达。甘油对迟效糖源没有诱导作用。但在甘油/木二糖培养基上, *xr* 和 *xdh* 均为强表达。这说明木二糖对该 2 基因的表达具有诱导作用。但在葡萄糖/木二糖和山梨糖醇/木二糖上, *xr* 和 *xdh* 不表达。这提示我们,对瑞氏木霉木糖代谢关键酶而言,槐糖是比木二糖更强的诱导剂。

槐糖是纤维素酶、半纤维素酶合成的一个普遍性强诱导物。槐糖能诱导瑞氏木霉的大多数纤维素酶,尤其是外切葡聚糖纤维二糖水解酶 I (CBHI) 的合成^[12],并诱导细菌^[13]和真菌的木聚糖酶的表达^[14]。本实验的结果证实了槐糖对瑞氏木霉木糖代谢酶的

诱导作用,进一步证实了槐糖作为一个普遍性诱导剂对于多种代谢迟效碳源的酶类起作用。

2.8 瑞氏木霉 *xr* 和 *xdh* 表达情况的比较

在各种培养基上, *xr* 和 *xdh* 的表达基本上是协调一致的,但并不完全相同。如在葡萄糖解阻遏条件下,在葡萄糖/槐糖、山梨糖醇/槐糖和甘露糖培养基上, *xr* 的表达程度比 *xdh* 要强。是否因木糖醇脱氢酶所催化的反应是处于木糖还原酶的下游,而需要进一步的级联反应物,以激活 *xdh* 的表达,或其它原因,有待于进一步探讨。

2.9 用 Northern 系列杂交法鉴定基因表达方法的探讨

应用 Northern 系列杂交法对同一个酶系的若干个基因同时从转录水平上进行基因表达的研究,即研究基因在不同生长条件或生理状态下的表达情况,具有直接、简捷、一目了然的优点。但其前提是各种样品的实验条件需严格保持一致,方有可比性。这种方法是在定性水平上比较基因表达的相对强弱,很难做到定量。但对许多实验目的而言,能够在定性水平上检测系列酶系中各基因的表达情况,已能够满足其实验要求。本文用 Northern 系列杂交法鉴定了瑞氏木霉木糖代谢关键酶基因在 20 种不同碳源上的表达情况,检测结果与用酶学方法检测的结果是一致的。芬兰 VTTMerja Penttilä 等人用此方法研究了半纤维素酶系的多个基因在不同碳源上的表达情况^[18],证明了该方法的可行性。当然,影响基因表达的因素,从复制、转录、转录后加工到翻译水平都存在,而本方法只是在转录水平上进行基因表达的研究,但该研究结果能提供一些有益的信息。进一步将转录水平上的研究结果与其它水平上的研究结果相结合,相互佐证,有利于作出最后的判断。

细胞对不同碳源的利用情况不同,因而在不同碳源中的生长速度显然是不一致的,结果必然影响 mRNA 在总 RNA 中的含量。本实验中我们掌握各培养物的收获时间均在对数期内,以及保证所利用的碳源在收获细胞时仍过量存在,并用同样量 RNA 进行 Southern 杂交,这样就避免了由于培养物进入生长平稳期或碳源耗尽所引起的错误判断,并如实地反映出各种所检测的 mRNA 在总 RNA 中的含量。

我们在混合碳源培养基中加入 2mmol/L 双糖,而最终测到的双糖浓度有的大于 2mmol/L。是否由于长时间振荡培养过程中体积减少而造成的浓缩效应,或由于其它原因,尚不清楚。

参 考 文 献

- [1] Skoog K, Hahn-Hagerdal B. *Enzyme Microb Technol*, 1988, **10**: 66~80.
- [2] Chen, W P. *Proc Biochem*, 1980, **15**: 30.
- [3] Chian C, Knight S. *Nature*, 1960, **188**: 79.
- [4] Keränen S, Penttilä M. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, **6**: 534~537.
- [5] Coughlan M. *Biotechnol Genet Eng Rew*, 1985, **3**: 39~109.
- [6] 汪天虹, Merja Penttilä, 高培基等. 瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因的分离和鉴定. *生物工程学报*, 1998, **14**(3): 320~325.
- [7] Chirgwin J M, Przybyla A E, MacDonald R J *et al.* *Biochemistry*, 1979, **18**: 5294~5299.
- [8] Maniatis T, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1982.

- [9] Begin P. *Ann Rev Microbial* ,1990 ,**44** :19~248.
- [10] Purkarthofer H , Steiner W. *Enzyme Microb Technol* ,1995 ,**17** (2) :114~118.
- [11] Merivuori H , Sieglri K M , Sands J A *et al* . *Biochem Soc Trans* ,1985 ,**13** :411.
- [12] EL-Gogary S , Leite A , Criiveallaro O *et al* . *Proc Natl Acad Sci USA* ,1989 ,**86** :6138~6141.
- [13] Kyu K L , Ratanahanokchai K , Uttapap D *et al* . *Bioresource Technol* ,1994 ,**48** (2) :163~167.
- [14] Pinaga F , Fernandez Espinar M T , Valles S *et al* . *FEMS Microbial Lett* ,1994 ,**115** (2~3) :319~324.
- [15] Merja P , Marja I , Saloheimmo A *et al* . Carbohydrases from *Trichoderma reesei* and other microorganisms. Tricel 97 , Ghent-Belgium august 28~30 ,1997.

EXPRESSION OF XYLOSE-METABOLIC KEY GENES OF *TRICHODERMA REESEI* ON VARIOUS CARBON SOURCES MEASURED BY A SERIES OF NORTHERN HYBRIDIZATIONS

Wang Tianhong¹ Merja Penttilä² Gao Peiji¹

(¹ The State Key Laboratory of Microbial Technology , Shandong University , Jinan , 250100)

(² VTT Biotechnology and Food Research , Finland FIN-02044)

Abstract The expression of xylose reductase (XR) , xylitol dehydrogenase (XDH) and transaldolase (TAL) genes from *Trichoderma reesei* , measured by Northern hybridization , were studied by adding different carbon sources (20 kinds , including single and mixed carbon sources) separately into the basal medium on which *T. reesei* QM9414 was grown. The experiment results indicated that the two disaccharides : sophrose and xylibiose act as a strong inducer for the expression of *xr* and *xdh*. The lactose and arabinose were identified as inducer also. The presence of glucose repressed the transcription of *xr* and *xdh*. When glucose depleted. *xr* and *xdh* were expressed at certain level , implying that expression of *xr* and *xdh* are controlled by the carbon catabolite repression mechanism and there existed a constitutive base level 's expression of *xr* and *xdh* when the catabolite repression mechanism was derepressed. On the other hand , transaldolase gene strongly expressed on all the carbon sources used.

Key words *Trichoderma reesei* , Xylose reductase gene , Xylitol dyhydrogenase gene , Northern hybridization , Gene expression