

## 黄孢原毛平革菌基因启动子的分离与鉴定

李 维\* 张义正\*\*

(四川大学生命科学学院 成都 610064)

**摘 要** 利用启动子探针型载体 pSUPV8 直接在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中分离黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)基因启动子片段,获得 6 个潮霉素抗性(Hyg<sup>r</sup>)重组子。对重组子 CH2、CH6 进行序列分析,结果发现它们都存在真核生物基因启动子的保守序列;用原生质体转化法将其转化黄孢原毛平革菌,仅 pCH6 获得了潮霉素抗性转化子;PCR 和斑点杂交分析表明 pCH6 已成功导入黄孢原毛平革菌,并启动潮霉素抗性基因的表达。

**关键词** 大肠杆菌,黄孢原毛平革菌,基因启动子,序列分析,启动子探针型载体

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0599-04

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)能有效降解木质素及多种难降解的有机物,现已成为用于研究植物生物物质利用和自然界有机污染物生物治理的模式生物之一<sup>[1]</sup>。到目前为止,该菌中两类主要的木质素降解酶——木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶已经分离纯化,相应的 cDNA 及基因也被克隆和定序<sup>[2,3]</sup>。迄今为止,利用已知同源或异源基因的启动子构建了该菌的转化和表达质粒<sup>[4,5]</sup>,但其研究进展与其他真菌相比,还存在着很大的差距。因此,进一步建立黄孢原毛平革菌的转化系统是十分必要的。

启动子是基因表达的一个重要元件。要建立某种生物的转化系统或相应的表达载体,首先要有相应的基因启动子用于标记基因或表达单元的建立。分离真核生物基因启动子的方法有多种,常用的一种是用启动子探针型载体在 *E. coli* 中建立基因组文库,然后文库 DNA 转化相应的供体菌,从获得的转化子中回收含启动子的 DNA 片段。对于转化频率低的真核生物,该方法难度较大。已知来自原核和真核生物基因启动子具有一些十分保守的序列,如 TATA 盒,我们假定来自真菌的某些基因启动子能够在大肠杆菌中被识别并启动基因表达。实际上,已有的研究结果显示某些真核生物基因启动子在大肠杆菌中能启动基因表达<sup>[6,7]</sup>。因此,我们利用启动子探针型载体在 *E. coli* 中直接筛选来自

高等担子真菌——黄孢原毛平革菌的能启动潮霉素抗性基因表达的 DNA 片段,然后再将其转化黄孢原毛平革菌,进一步鉴定其基因表达的启动功能。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 黄孢原毛平革菌 *P. chrysosporium* BKM-F1767、大肠杆菌 *E. coli* XL1-blue 为本实验室保存。启动子探针型载体 pSUPV8 由本室构建<sup>[8]</sup>,含有氨苄青霉素抗性基因和来自 *E. coli* 的潮霉素磷酸转移酶基因(*hph*),该基因的启动子和翻译起始区已被除去(图 1)。

**1.1.2 试剂** 分子克隆工具酶和试剂购自 Boehringer Mannheim、BRL、华美生物工程公司;Novozyme 234 为 Novo 公司产品,溶壁酶购自广东微生物研究所( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dCTP、( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dATP 购自北京亚辉生物工程公司。

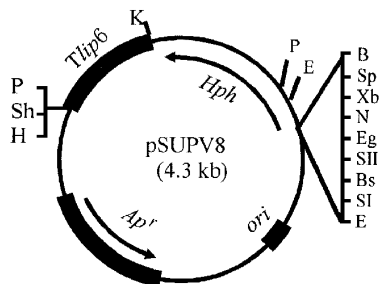


图 1 启动子探针型载体 pSUPV8 的物理图谱

Fig. 1 Physical map of promoter-probe vector pSUPV8

B. BamHI; Bs. BstXI; E. EcoRI; Eg. EagI; H. Hind III; K. KpnI; SI. SacI; SacII; Sh. SphI; Sp. SpeI; N. NotI; Xb. XbaI.

收稿日期:1999-11-02 修回日期:2000-06-16。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39430020)。

\* 工作单位:四川师范大学生物系。 \*\* 通讯联系人。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌的转化 采用高频转化法<sup>[9]</sup>。

1.2.2 黄孢原毛平革菌的转化 黄孢原毛平革菌原生质体转化按文献 [4],有所修改,即用 Novozyme 234 与溶壁酶各 10 mg/mL 制备原生质体。另外,将转化后的原生质体混合物重悬于 MYV<sup>[4]</sup> + 1 mol/L Sorbitol 中,36℃ 恢复培养 9~12 h,收集原生质体,与 10 mL 上层培养基 (Gold's 培养基<sup>[4]</sup> + 1 mol/L Sorbitol + 70 μg/mL 潮霉素)混匀倒入含有下层培养基 (Gold's 培养基 + 1 mol/L Sorbitol + 2% 琼脂粉 + 70 μg/mL 潮霉素)的平板中。于 37℃ 培养 32 h 后可见不加潮霉素的对照开始有菌落生长,转化子则 5~6 d 开始出现。挑出转化子,以供进一步的鉴定。

1.2.3 黄孢原毛平革菌总 DNA 提取和转化子 PCR 快速分子鉴定 总 DNA 的提取参照文献 [4] 的方法。PCR 操作按以下步骤进行,于 0.5 mL EP 管中依次加入以下成分:1×PCR 缓冲液,dNTP(每种各 70 μmol/L),50 ng 转化子总 DNA,Taq DNA 聚合酶 1 u,上下游引物各 1 μmol/L,总反应体积为 50 μL。循环反应条件:95℃ 预变性 5 min 后,以 95℃ 2 min、50℃ 1 min、72℃ 2 min 循环 30 次,最后于 72℃ 延伸 10 min。

1.2.4 斑点杂交 参照文献 [10] 的方法。

1.2.5 DNA 序列分析 DNA 序列测定采用 ABI 公司 373A 型荧光自动测序仪进行。

2 结果与讨论

2.1 黄孢原毛平革菌基因启动子的克隆策略

本实验室所构建的启动子探针型载体 pSUPV8 的物理图谱如图 1 所示。潮霉素抗性基因与多克隆位点融合处的核苷酸序列是:

5'GAA TTC GAG CTC CAC CGC GGT GGC GGC CGC TCT AGA ACT AGT G GAT CCT GAA CTC ACC GCG ACG TCT GTC GAG AAG TTT CTG 3'

其中,有下划线部分为多克隆位点区;其余部分为潮霉素抗性基因编码区。一段外源 DNA 片段插入 pSUPV8 多克隆位点区的任意一个克隆位点时,只有当其同时满足以下条件才能形成有功能的潮霉素抗性融合基因 (1) 具有基因启动子序列 (2) 具有翻译起始区 (3) 具有起始密码子 (4) 插入方向正确 (5) 插入片段 3'端编码区序列与潮霉素抗性基因编码区读码框一致。

将 *P. chrysosporium* BKM-F1767 总 DNA 用

*Sau*3AI 部分酶切,使酶切片段主要集中于 0.5~5kb 之间。探针型载体 pSUPV8 用 *Bam*HI 完全酶切并脱磷酸化处理,与上述总 DNA 部分酶切片段以适当的比例连接,转化大肠杆菌 XL1-blue,分别用氨苄青霉素 (50 μg/mL) 平板和氨苄青霉素 (50 μg/mL) 与潮霉素 (150 μg/mL) 双抗平板筛选转化子和重组子。将在氨苄青霉素平板上出现的转化子,点种到氨苄青霉素与潮霉素双抗平板上进一步筛选重组子,称间接筛选法;用双抗平板直接筛选重组子,则称直接筛选法。

2.2 黄孢原毛平革菌基因启动子的分离

在氨苄青霉素平板上共得到约 10000 个左右转化子,将这些菌落转移到含有氨苄青霉素与潮霉素的双抗平板上 (即间接法),筛选得到 6 个氨苄青霉素和潮霉素双抗重组子,分别命名为 pCH1~pCH6。而在氨苄青霉素、潮霉素双抗平板上未见任何菌落生长 (直接法)。我们曾用卡那霉素抗性基因为报告基因的启动子探针型载体,分离几种不同微生物的基因启动子,当抗生素用量为 10 μg/mL 时,两种方法筛选的效率相差 2.5 倍,当抗生素用量为 50 μg/mL 时,筛选效率相差 30 倍,本实验中潮霉素浓度高达 150 μg/mL,过高浓度的抗生素可能是直接筛选法未获得任何抗性菌落的原因之一;另一个可能的原因是与大肠杆菌、供体菌亲缘关系有关,亲缘关系越近,两种方法筛选的效率相差越小。

用 *Eco*RI 酶切电泳检测显示其插入片段大小分别为 2.0,0.115,1.0,2.05,1.2,1.2 kb 左右 (图 2),将其分别点种在不同浓度 (150、200、250、300 μg/mL)

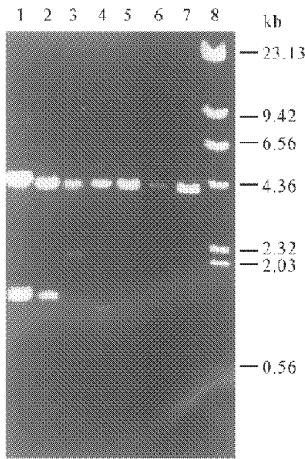


图 2 重组子 *Eco*RI 酶切的电泳检测  
Fig.2 Analysis of the recombinants through agarose gel electrophoresis

的潮霉素平板上 37℃ 培养过夜 6 个重组子均能在 150 μg/mL 潮霉素平板上正常生长 ,而 100 μg/mL 潮霉素即可完全抑制对照菌的生长。

2.3 序列分析

对 CH2 和 CH6 DNA 片段进行了序列测定 ,结果如图 3 所示。CH2 片段较小 ,仅有 115 bp。由上述结果可知 ,虽然它在 *E. coli* 中仍具有启动子活性 ,但活性不高 ,潮霉素浓度超过 200 μg/mL 就不能生长。该启动子活性片段与潮霉素磷酸转移酶基因融合处的核苷酸序列为 :

5′ GGAACATCGTACGGAGATCATACGCAGC ATGTCAGATC-CTGAACTCACCGCGACGTCTGTCTCGAGAAGTTTCTG3′

其中 ,下划线部分为潮霉素抗性基因编码区核苷酸序列 ,其余部分为启动子片段 CH2 的核苷酸序列。在该片段 3′ 端有一个翻译起始密码子 ATG ,ATG 上游 46 bp 处有一个 TATA 盒及与 CAAT 盒相似的 CAAAT 序列 ,ATG 下游还多出一个密码子 CTA 与潮霉素抗性基因编码区融合 ,后者阅读框不变。

CH6 插入片段大小为 1093 bp( 图 3 ) ,该片段在 *E. coli* 中启动子活性较高 ,其潮霉素抗性为 300 μg/mL。该启动子活性片段与潮霉素磷酸转移酶基因融合处的核苷酸序列为 :

5′ AGTGCATGCGACTCTCTGAGACTGACAATGCCCCAGTAC-CTTAAAGATCCTGAACTCACCGCGACGTCGTCTCGTCTCGAGA AGTTTCTG3′

其中 ,下划线部分为潮霉素抗性基因编码区核苷酸序列 ,其余部分为 CH6 启动子片段核苷酸序列 ,其 3′ 末端有一个翻译起始密码 ATG ,ATG 附近的-3 位点是碱基 A ,4 位点是碱基 G ,即为 ACAATGG ,这种高度保守的特点与 *P. chrysosporium* lip1、lip5、lip6 及其它真核生物翻译起始位点保守序列 A/GNNATGG 十分相符<sup>[2,11]</sup>。在 ATG 上游具有典型的真核生物 RNA 聚合酶 II 所识别的启动子保守序列 TATAA、CAAT 盒、GC 盒。ATG 后恰好增加 5 个密码子与潮霉素抗性基因编码区融合 ,潮霉素抗性基因读码框未发生变化。以上研究结果说明潮霉素抗性基因编码区的 5′-端能作较大的改变而不影响其生物活性 ,另外它在从细菌等原核生物到高等植物、哺乳动物中作为选择标记而被广泛运用 ,具有较宽的宿主范围 ,因此 ,具备作为启动子探针型载体报告基因的基本条件 ,是理想的报告基因。

2.4 CH6 片段在黄孢原毛平革菌中的功能分析

2.4.1 黄孢原毛平革菌的转化及转化子抗性水平测定 :为了证明用大肠杆菌为宿主菌分离的黄孢原

CH2 插入片段序列:  
1 GATCCGAACA AATGGCCGTA TCATTACAAG ATAGACCTAG GGTGCTTAG CAGAAAGTGG  
61 TATACAGCGC CAGAAGCGCA ACGGAACATC GTACGGAGAT CATACGCAGC ATGTCA

CH6 插入片段序列:  
1 GATCGTATTC TTCATAGCGA GACTTCTAGT CACTGCTCCT ACGTTAACTA AACACCCCC  
61 AATTGCATCA ACAGTGCAGT TACCCTGGAG ATGAGTTCAT AACCGTCAAC AGCTTCTTCA  
121 GGGGCTCTAA GACGCGCAAC ACGCACCGTA GCGCGAGGCG CGACCAACCGA CCTCCCTGC  
181 TGCAGCCGAC CGTGCCGAGC TCGCTTGACA TTGCAGACCC GAGAAGCAGC GTCCCGCTGG  
241 ACTGTACGCG AGTTGCCGAA CCCCTCAGCC GTCGCAAGTG ATGACAGACA CAGACCCGCG  
301 CTGTGCAAGT AACTTCAGCA GGAAGCAGTA CGATAAGCTG GCGCCGACAC CTGTGCGGGT  
361 TACAACCTTC TTATCGGCTG GGCACAACAG CACCAGGCTG GCCTTACGGA CCAGATACCG  
421 TTCTGCAGGA AGCCGGCTGT AATAAAGTTG CTGCAGTCAT GGTGAGGTG ACTAGTGCAG  
481 GGGCCTGACG AGAGCCGTGC TTTCCTCTAC ATTTGTTAGAC TTGTGAGTCA TAAACCTCG  
541 TAGCATAGAA CTGAATACAA GACGTACCCG TTGAAGTTGC GATGTTGGCC GTGAAAGAAC  
601 CATCGTATGT GGAATCGCT GCGGCCAGCA GCAGCTCTTC CACAATCTTC ACAACCCGT  
661 AAGCCGGCTT CGCGTGGTGT CTCTGTTACA TTACATCGCA CTGAATTTTC GGTTAGCTCT  
721 CGAATTGGCA CAATGATGAG CATGCGTTAG AGTTGAATA GCGCGGGGGT TAACCGGAAC  
781 CATAGCGTTG TTACAAATTT CTGGGTTTGA AATTAGAAGG CTGCCGCGCG CTTGGCCGAG  
841 TTTGCAGCGG GCAACAAGA ACCTACGATT CTCAGCTGCG ATTCGACACA ACTCCCGATG  
901 GTGCATTTCG CTGGCACCA TTACAAAAC TTGCTGCAA CAGCTGTGAG AGGTGAAGAT  
961 ATCTTGAAG TTTTATATG GGAACGGATA CGCACCCCGA GTCTTGGCA ACACAACCTA  
1021 GCACGGACTT TGTGCGCACC GTTGCCGAGT GCATGCGACT CTCTGAGACT GACAATGCGC  
1081 CAGTACCTTA AA

图 3 两个基因启动子片段的核苷酸序列

Fig.3 The nucleotide sequence of two promoter-active fragments  
The TATA and CAAT boxes are underlined

毛平革菌基因启动子片段在原供体菌中能启动基因表达 ,我们用原生质体转化法分别将 5~10 μg 线性化的重组子 DNA 转化 *P. chrysosporium* ,对获得的转化子进行复筛 ,仅在 pCH6 的转化平板上筛到 8 株能在 70 μg/mL HmB 的浓度下稳定生长的菌落。

将上述 8 个 *P. chrysosporium* 转化子分别接种在 80、100、120 μg/mL HmB 的 Gold 's 培养基上 ,37℃ 培养 ,所有的转化子均能在 80 μg/mL 潮霉素浓度下很好地生长 ,有 5 株可在 100 μg/mL 浓度下生长 ,其中有 3 株在 120 μg/mL 浓度下仍能生长。说明 CH6 片段在 *P. chrysosporium* 具有启动基因表达的功能。

2.4.2 Hgy<sup>+</sup> 转化子的 PCR 快速鉴定 :参照已知的潮霉素抗性基因编码区( 其长度为 1022 bp )的 5′、3′ 端核苷酸序列设计 PCR 引物 :

上游引物 5′GGC TGG ATC CTG AAC TCA CCG CGA C 3′  
下游引物 5′GCG GTA CCT ATT CCT TTG CCC TCG 3′

以转化子的总 DNA 为模板 ,进行 PCR 扩增 ,结果如图 4 所示 ,供试的 B2、B3 均特异性地扩增出约 1022 bp 的片段 ,未经转化的菌株 ,则仅有引物带 ,而未出现相应 1 kb 大小的扩增带。该结果从分子水平证明 pCH6 已导入 *P. chrysosporium* 中。将转化子 B2、B3 的总 DNA 用高频转化法转化大肠杆菌

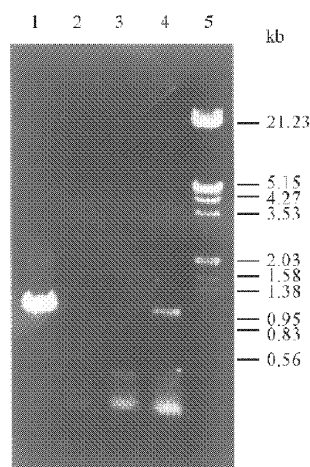


图4 Hgy<sup>r</sup> 转化子的 PCR 快速鉴定

Fig.4 Analysis of the transformants by PCR

Lane 1、2、3、4、5 were PCR amplified products from wild type strain and two of *P. chrysosporium* putative transformants' total DNA

*E. coli* XL1-blue 未获得任何生长的大肠杆菌菌株,说明转化质粒不是以自主复制的染色体外形式存在,而是整合在染色体上。

**2.4.3 转化子的斑点杂交分析:**转化子 B2、B3 总 DNA 经碱变性后,点到尼龙膜上,以 pSUPV8 *Kpn*I、*Bam*HI 双酶切的潮霉素抗性基因的 1kb 片

段为探针作斑点杂交(图5),结果表明它们的确引入了潮霉素抗性基因。由此证明 CH6 片段在黄孢原毛平革菌中具有启动功能。

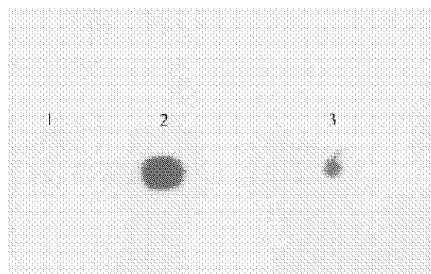


图5 斑点杂交分析

Fig.5 Dot hybridization analysis of transformants

Hph encoding region fragment was used as probe, total DNA was from nontransformed *P. chrysosporium* (lane 1) Transformants B3 (lane2) and B2 (lane3), respectively

本工作研究的结果说明原核生物的 RNA 聚合酶可以识别丝状真菌某些基因的启动子,利用启动子探针型载体,以大肠杆菌为宿主菌,分离真核生物的基因启动子是可行的,这为我们获得更多的真菌基因启动子用于基因的表达、遗传转化带来了极大的方便。另外,本研究还证明潮霉素抗性基因是理想的报告基因。

## 参 考 文 献

- [1] Gold M H. *Microbiol Rev* ,1993 **57** (3) :605~622
- [2] ZHANG Y Z,Reddy C A,Rasooly A. *Gene* ,1991 **97** :191~198
- [3] ZHANG Y Z,Zylstra G J,Olsen R H,Reddy C A. *Biochem Biophys Res Commun* ,1986 **137** :649~656
- [4] Alic M J,Kornegay R,Pribnow D,Gold M H. *Appl Environ Microbiol* ,1989 **55** (2) :406~411
- [5] Zapanta L S,Hattori T,Rzetskaya M,Tien M. *Appl Environ Microbiol* ,1998 **64** :2624~2629
- [6] Neve R L,West R W,Rodriguez R L. *Nature* ,1979 **277** :324~325
- [7] 王海燕,张义正. *植物学报* ,1999 **41** (5) :494~497
- [8] 李维,张义正. *四川大学学报(自然科学版)* ,1999 **36** (4) :736~740
- [9] Inoue H,Nojima H,Okayama H. *Gene* .1990 **96** :23~28
- [10] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [11] Balance D J. *Yeast* ,1986 **2** :229~236

## Isolation and Characterization of Promoters from *Phanerochaete chrysosporium*

LI Wei ZHANG Yi-Zheng

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

**Abstract** Promoter-probe vector pSUPV8 was used to clone promoters from *Phanerochaete chrysosporium* directly in *Escherichia coli*. Six hygromycin B-resistant recombinants were obtained and two inserted fragments of them were sequenced. The results indicated that they contain several sequences similar to eukaryotic cis regulatory elements. Only pCH6 could transform *P. chrysosporium* into hygromycin B resistance. PCR and dot hybridization analysis indicated that it was introduced into *P. chrysosporium* successfully and led to the HmB-resistance. The results demonstrated that HmB-resistant gene (*hph*) could be used as an ideal reporter gene for *P. chrysosporium* transformation.

**Key words** *E. coli*, *P. chrysosporium*, gene promoter, promoter-probe vector, sequencing