

## 斜卧青霉 114-2 *cbh1* 基因的 TAIL-PCR 克隆及与 抗阻遏突变株 JU-A10 的比较

刘自勇, 孙宪昀, 曲音波\*

(山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

**摘要:**【目的】研究斜卧青霉 (*Penicillium decumbens*) 114-2 与其抗阻遏突变株 JU-A10 外切酶基因序列的差异。【方法】用热不对称交错 PCR(TAIL-PCR)和 RT-PCR 扩增得到斜卧青霉 114-2 外切葡聚糖酶 (*cbh1*)基因全长和 cDNA 全长。【结果】*cbh1* 基因全长为 1500 bp, 含有两个内含子, 编码 453 个氨基酸(GenBank,EF397602)。克隆并分析了 1.9 kb 的 *cbh1* 基因上游序列, 分别发现了葡萄糖代谢抑制因子 CRE 与纤维素酶转录调控蛋白 ACE I 的两个潜在结合位点。【结论】在相同的培养条件下, 其抗阻遏突变株 JU-A10 的外切酶活明显高于野生株 114-2。两菌株的 *cbh1* 基因序列完全一致, 说明外切酶活明显提高不是由于 *cbh1* 基因发生突变引起的。

**关键词:** 斜卧青霉; TAIL-PCR; *cbh1*; 抗阻遏突变株

中图分类号: \*\*\* 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0667-05

自然界中纤维素的降解主要是由微生物分泌的纤维素酶完成的, 产纤维素酶的微生物非常广泛, 其中的丝状真菌以其产酶量大、可以分泌到胞外便于分离等优点, 成为研究热点。丝状真菌所产的纤维素酶是一个包括多种水解酶的复合酶系, 主要包括 3 个组分: 外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[1]</sup>。在该酶系中, 外切葡聚糖酶在降解纤维素的结晶区有重要的作用<sup>[2]</sup>。是水解天然纤维素必不可少的一类重要酶。

关于丝状真菌的外切葡聚糖酶 I 的克隆表达大多集中于木霉和曲霉属, 关于青霉属的很少。本实验室筛选的斜卧青霉 (*Penicillium decumbens*) 114-2 菌株不仅能分泌比较全的降解天然木质纤维材料的纤维素酶系, 而且与木霉属产纤维素酶的高产菌株相比能分泌较多  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[3]</sup>。通过多轮理化诱变得到其抗降解物阻遏突变株 JU-A10, 在含葡萄糖、甘油的培养基上也能产生纤维素酶, 在产酶培养基上酶活相对于出发株明显提高, 滤纸酶活达到国际先进水

平<sup>[4]</sup>, 已经成功应用于工业生产纤维素酶制剂, 并开始用于纤维素酒精生产中试及示范厂的建设<sup>[5]</sup>。但对斜卧青霉纤维素酶及其编码基因的分子特性、调控机制与菌株 JU-A10 突变机理并不了解。深入开展相关研究, 不仅有助于对这些特性的认识, 而且对于理性构建基因工程菌株亦有重大意义。本研究通过 TAIL-PCR 克隆得到斜卧青霉第一个基因 *cbh1* 基因及其上游调控序列。并比较了野生菌株 114-2 及其突变株 JU-A10 *cbh1* 基因及上游调控序列, 初步探讨了菌株 JU-A10 的突变机理。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 斜卧青霉 114-2 及其突变株 JU-A10 为实验室保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH 5 $\alpha$ 、质粒 pUC19 为本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** Trizol 购自东胜科技公司;

基金项目: 国家自然科学基金(30570049); 国家“973 项目”(2003CB716006)

\*通讯作者。Tel: +86-531-88364429; Fax: +86-531-8856-5234; E-mail: quyinbo@sdu.edu.cn

作者简介: 刘自勇(1983-), 男, 河北清河人, 硕士研究生, 研究方向为资源与环境微生物学。E-mail: liuziyong1010@126.com

收稿日期: 2007-10-17; 修回日期: 2007-12-28

普通 *Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司；DEPC、高保真 *Pfu* DNA 聚合酶购自上海生工公司；RT-PCR 试剂盒、各种限制型内切酶是 MBI 公司产品；PCR 引物合成及序列测定在上海英骏公司完成。PTC-200 型 PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品。

**1.1.3 培养基**：斜卧青霉培养基为加浓的 Mandles' 营养盐液<sup>[3]</sup>，大肠杆菌的培养基为 LB 培养基，筛选转化子的平板为麦康凯培养基。

**1.1.4 引物**：所有 TAIL-PCR 过程中用到的引物如表 1 所示。

表 1 用于 TAIL-PCR 的引物  
Table 1 Primers used in the process of TAIL-PCR

AD and reactions	Primer names	Sequences (5'→3')
Arbitrary degenerate primer (AD)	AD1	TG(A/T)GNAG(A/T)ANCA(G/C)AGA
	AD2	AG(A/T)GNAG(A/T)ANCA(A/T)AGG
	AD3	(G/C)TTGNTA(G/C)TNCNTGTC
	AD4	NTCGA(G/C)T(A/T)T(G/C)G(A/T)GTT
	AD5	NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA
	AD6	(A/T)GTGNAG(A/T)ANCANAGA
	AD7	(A/T)TCTGNCT(A/T)ANTANCT
The first upstream TAIL-PCR	1SPD1	TACTTGGCACCCGCTTGT
	1SPD2	CCCGCTTGTGGTCTCATC
	1SPD3	GGGAAGAGTGGAAACATCAACG
The second upstream TAIL-PCR	2SPD1	GCAGGTAGCATCGTCAGGGCACAG
	2SPD2	GTCCCACTGTTGGCGAAAAAGAAAT
	2SPD3	ACTTCGTTACCAGTGTAGCAGTTCAT
The downstream TAIL-PCR	3SPD1	CCTACTCTACCACCAGATACGCCG
	3SPD2	ATGGCTGCGACTTCAACCCCTT
	3SPD3	TGACCCAGTTCATCACCAACGA
The first regulation sequence TAIL-PCR	4SPD1	CCACGGAACCATCTTTGCTG
	4SPD2	CGAGTGGTGGGTGGGTTTCA
	4SPD3	AGGGAGGGAAGCGTAGTAGGA
The second regulation sequence TAIL-PCR	5SPD1	TACTATTCACTTGCCAGACTTCTT
	5SPD2	GGTGAAAGACCCCTACGACAGC
	5SPD3	CCACATACGGTCGGTAAAGC

## 1.2 外切纤维二糖水解酶的基因 *cbh1* 的克隆

**1.2.1 简并引物扩增 *cbh1* 基因保守片段**：根据 GenBank 中已发表的丝状真菌特别是青霉的 *cbh1* 基因，设计简并引物 PC1F：5'-AACCAGGAGTTCACC-TTCG-3'；PC1R：5'-AGTGGAGGTGCCGTCGTT-3'。以斜卧青霉基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

**1.2.2 TAIL-PCR 扩增 *cbh1* 基因全长及其上游调控序列**：参照文献[6]，用 TAIL-PCR 扩增全基因序列，根据文献报道的试验程序，适当改动，使 3 条特异性嵌套引物分别与 7 条随机引物进行三轮反应。将确定的目的片段切胶回收，克隆测序，进行序列拼接。

**1.2.3 高保真 *Pfu* DNA 聚合酶扩增全长基因及上游序列**：为得到准确无误的基因，根据拼接得到的全长序列设计引物，分别以出发株 114-2 和突变株 JU-A10 的基因组为模板，*Pfu* DNA 聚合酶扩增 *cbh1* 全长并进行比较，引物为：P1：5'-GCCAGTGAGACAATCCT-ACTA-3'；P2：5'-TCAGGCGAAATCTACGAAA-3' 同样的方法扩增基因上游调控序列，引物为引物为 P4：5'-ACAATGCCAAAGGTCTAACATGAG-3'；P5：

5'-AGGGAGGGAAGCGTAGTAGGAT-3'。切胶回收扩增出的目的片段后，与质粒 pUC-19 连接、克隆，送上海英骏公司测序。

**1.2.4 RT-PCR**：总 RNA 的提取，按照 Sternberg 等<sup>[7]</sup>报道方法进行，cDNA 第一链合成按照逆转录试剂盒说明进行。由于存在内含子，终止子很难确定，所以在下游引物设计时除了扩增全基因时用的 P2：5'-AGACCCTAGTCCACGCTTT-3'，另外在其上游 200 bp 处设计引物 P3：5'-TCAGGCGAAATCTACGAAA-3'，分别扩增出发株 114-2 和突变株 JU-A10 的 *cbh1* 基因的 cDNA 全长，目的序列与 pUC 19 质粒连接克隆，送上海英骏公司测序。序列通过 ORF 软件分析，并和扩增出的 *cbh1* 基因比对，得出内含子和起始、终止密码子。

## 2 结果和分析

### 2.1 斜卧青霉 *cbh1* 基因片段的克隆

利用简并引物 PC1F/PC1R，以菌株 114-2 和突变株 JU-A10 的基因组为模板，扩增出 3 条主要片段，

大小分别约是 800 bp, 550 bp 和 500 bp。其中 550 bp 片段与预计片段大小相近, 将其切胶回收后测序, 通过对 BLAST 分析, 确定 564 bp 大小的片段为目的片段。

## 2.2 TAIL-PCR 扩增 *cbh1* 全长基因

根据 564 bp 的已知序列, 在 5 端和 3 端分别设计特异性嵌套引物, 按照 TAIL-PCR 反应条件进行三轮反应。把三轮反应产物一块电泳, 直观的挑选扩增正确的目的条带引物组合。通过向上两次 TAIL-PCR, 向下游进行一次 TAIL-PCR, 拼接后得到一个 1811 bp 大小的序列。通过基因软件分析, 可以确定得到全长 *cbh1* 基因全长和起始密码子。

## 2.3 *cbh1* 基因全长的高保真扩增及 RT-PCR

在 TAIL-PCR 扩增的基础上, 利用引物 P1、P2。在高保真 *Pfu* DNA 聚合酶的作用下, 以 114-2 和突变株 JU-A10 基因组 DNA 为模板, 进行全长 *cbh1* 基因的扩增。目的片段切胶回收, 测序。结果对比, 发现出发株 114-2 和突变株 JU-A10 的 *cbh1* 基因序列完全一致。

以斜卧青霉 114-2 及其突变株 JU-A10 总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 RT-PCR, 由电泳结果 (图 1) 可知, 以 114-2 基因组为模板, 引物 P1、P2 和 P1、P3 (泳道 1 和 4) 克隆得到的条带的大小差距与引物设计的间隔相一致。而以 114-2 和突变株 JU-A10 的 cDNA 为模板, 引物 P1、P2 没有克隆出条带 (泳道 2 和 3)。而 P1、P3 克隆得到的条带比以基因组为模板克隆出的条带大小有明显差别 (泳道 5 和 6)。说明 *cbh1* 基因含有内含子, 而且转录在引物 P2 和 P3 之间的区域终止。将以斜卧青霉 114-2 及其突变株 JU-A10 总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 以引物 P1 和 P3 扩增出的产物回收测序, 得到 1649 bp 大小的序列。通过 ORF 软件分析, 发现含有一个 1362 bp 大小的开放阅读框。同源性分析表明该 *cbh1* 基因编码的蛋白质属于糖基化水解酶第 7 家族。该酶同 *Neosartorya fischeri* 的 CBH 的同源性最高, 但其蛋白质序列相似度只有 75%, 显示该青霉的 CBH 有自己独特的结构。用 DNAMAN 软件分析比较其基因组序列和 cDNA 序列, 最后确定克隆到的 *cbh1* 基因大小为 1500 bp, GenBank 的登录号为 EF397602。其中含有两个内含子, 大小分别是 75 bp 和 63 bp。基因编码 453 个氨基酸。利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP>) 对信号肽进行分析, 其中前

17 个为推测的信号肽序列。

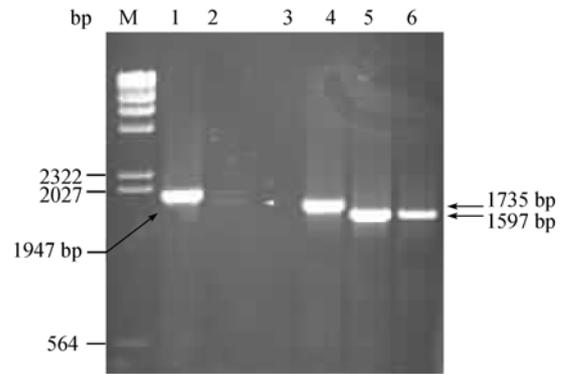


图 1 内含子验证电泳图谱

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of intron verification. M.  $\lambda$ -*Hind* marker; 1. Amplification product of P1 and P2 with genome template of 114-2; 2. Amplification product of P1 and P2 with cDNA template of 114-2; 3. Amplification product of P1 and P2 with cDNA template of JU-A10; 4. Amplification product of P1 and P3 with genome template of 114-2; 5. Amplification product of P1 and P3 with cDNA template of 114-2; 6. Amplification product of P1 and P3 with cDNA template of JU-A10.

## 2.4 TAIL-PCR 扩增 *cbh1* 基因上游序列

用 TAIL-PCR 继续扩增 *cbh1* 基因的上游调控序列, 通过 TAIL-PCR 反应, 得到正确的条带, 都是特异性引物与 AD2 扩增得到的。分别为 868 bp 和 2215 bp。通过拼接得到启动子上游 2938 bp 序列。设计引物, 以出发株 114-2 和突变株 JU-A10 基因组为模板, 高保真 *Pfu* DNA 聚合酶扩增 *cbh1* 基因上游序列 1.9 kb, 并进行比对, 发现突变株 JU-A10 的上游序列与出发株 114-2 相比, 在 1.9 kb 的范围内存在 4 处单碱基突变, 而且这四个突变位点集中在起始密码子上游 600 bp 的范围内。

对出发株 114-2 上游序列进行分析, 推测的转录起始位点在 ATG 上游 91 bp 处, 将此设为 +1。推测的 TATA 框在 -36 处。在 -654、-747 处存在两个代谢抑制因子 Cre I 的结合序列 5'-SYGGRG-3<sup>[8]</sup>。瑞氏木霉纤维素酶转录调控因子 ACE I<sup>[9]</sup> 包含 3 个 Cys2His2 型的锌指结构, 在体外与 5'-AGGCA-3 的序列结合。该转录因子被认为是丝状真菌纤维素酶基因的表达抑制因子, 在 -1028、-1740 处发现两个与其结合位点符合的序列。

## 3 讨论

基于目前资源丰富的序列数据库, 通过简并 PCR 很容易得到要克隆基因的保守序列。TAIL-PCR 的优

点在于简单、省钱、特异性高、快速和重复性好<sup>[6]</sup>。TAIL-PCR 另一个关键因素是随机引物的选择,在本研究中的几次 TAIL-PCR 中,随机引物 AD2 和 AD5 适合斜卧青霉基因及上游序列扩增,所有的克隆均为阳性。另外,根据 TAIL-PCR 的扩增结果,可以直接确认第二轮的产物为目的条带,但需要做对照验证。TAIL-PCR 克隆的假阳性很低,所以可以用来扩增已知基因的调控序列(启动子序列)。

纤维素酶作为一种诱导酶,其合成受到诱导物诱导和降解物阻遏两方面调节。弄清诱导与阻遏机制,对于纤维素酶高产菌株的选育和工程改造、解决人类面临的能源和环境问题具有战略意义。前人的研究表明丝状真菌的诱导和阻遏调节发生在转录水平调控上。丝状真菌的葡萄糖阻遏蛋白 CRE A/CRE<sup>[10]</sup>以及在瑞氏木霉发现的两个转录调控因子 ACE<sup>[9]</sup>和 ACE<sup>[11]</sup>对纤维素酶基因的转录水平调控有重要影响。瑞氏木霉 *cbh1* 基因的启动子序列与调控因子的作用位点研究得比较全面。通过与斜卧青霉 *cbh1* 基因的启动子序列比较可以看出,在-700 bp 左右都有 CRE 的结合序列。实验表明这个位置的序列与 CRE 结合最为敏感<sup>[12]</sup>,而且为单一的序列<sup>[10]</sup> 5'-GTGGGG-3'。斜卧青霉 *cbh1* 基因的启动子序列虽然都存在潜在的 ACE 结合序列,但并没有发现 ACE 的结合序列,说明青霉的纤维素酶的调控系统与瑞氏木霉也存在差异。

本研究室通过诱变得得到一株纤维素酶高产菌株 JU-A10,而且具有抗降解物阻遏的特性,在葡萄糖存在条件下仍可分泌大量纤维素酶。该菌株已经在工业化实际生产发挥作用,但对其分子生物学方面的了解甚少。通过对其第一个基因和上游调控序列的克隆表明,该菌的出发株和突变株的纤维素酶基因 *cbh1* 基因序列并没有发生改变,虽然上游序列中出现 4 个单碱基突变,但这些突变是否影响 *cbh1* 基因的转录调控还需进一步证明。研究表明纤维素酶基因的表达受到协同调控<sup>[13,14]</sup>。通过对 JU-A10 胞外纤维素酶各组分的酶活测定表明,内切酶和木聚糖酶酶活也有很大提高<sup>[4]</sup>。关键的突变很可能发生在更大范围的基因水平的调节机制(如产能代谢的宏观调节)上。以出发株和抗阻遏突变株为材料,通过分子生物学研究纤维素酶基因的表达调控,阐明抗阻遏机制,具有重大的理论和实际生产意义。相关研究正在进行中。

## 参 考 文 献

- [1] Armentrout RW. Molecular cloning of genes for cellobiose utilization and their expression in *E. coli*. *Appl Envir Microbiol*, 1981, 41: 1355-1362.
- [2] Azevedo MO, Felipe MSS, Astolfi-Filho, et al. Cloning, sequencing and homologies of *cbh1* (exoglucanase) gene of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *J Gen Microbiol*, 1990, 136: 2569-2576.
- [3] Jørgensen H, Mørkeberg A, Krogh KBR, et al.. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: Effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme & Microbial Technol*, 2005, 36: 42-48.
- [4] 曲音波, 高培基, 王祖农. 青霉的纤维素酶抗降解物阻遏突变株的选育. *真菌学报(Mycosystema)*, 1984, 3 (4): 238-242.
- [5] Qu YB, Zhu MT, Liu K, et al. Studies on cellulosic ethanol production for sustainable supply of liquid fuel in China. *Biotechnol J*, 2006, 1: 1235-1240.
- [6] Liu Y, Robert F Whitter. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragment from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 1995, 25: 674-681.
- [7] Sternberg D, Mandels GR. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J Bacteriol*, 1979, 139: 761-769.
- [8] Takashima S, Iikura H, Nakamura A, et al. Analysis of CreI binding sites in the *Trichoderma reesei cbh1* upstream region. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 145: 361-366.
- [9] Saloheimo A, Aro N, Ilmén M, et al.. Isolation of the ace1 gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5817-5825.
- [10] Ilmén M, Onnela ML, Klemsdal S, et al.. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Mol Gen Genet*, 1996, 253: 303-314.
- [11] Aro N, Saloheimo A, Ilmén M, et al.. ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*, 2001, 276(26): 24309-24314.
- [12] Takashima S, Nakamura A, Iikura H, et al. Cloning of a gene encoding a putative carbon catabolite repressor from *Trichoderma reesei*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60(1): 173-176.
- [13] Fowler T, Brown RD Jr. The *bgl1* gene encoding extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Mol Microbiol*, 1992, 6(21): 3225-3235.
- [14] Ilmén M, Saloheimo A, Onnela ML, et al. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(4): 1298-1330.

## Cloning Cellobiohydrolase from *Penicillium decumbens* 114-2 with TAIL-PCR and comparing with its derepressed mutant JU-A10

Ziyong Liu, Xianyun Sun, Yinbo Qu\*

(State key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** [Objective] We studied the differences in gene sequence of cellobiohydrolase gene (*cbh1*) from *Penicillium decumbens* 114-2 and its derepressed mutant JU-A10. [Methods] We cloned *cbh1* and its full-length cDNA from *Penicillium decumbens* 114-2 by the modified thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction (TAIL-PCR) and RT-PCR. [Results] The total length of *cbh1* was 1500 bp. It contained 2 introns and encoded 453 amino acids (GenBank Accession No.EF397602). The upstream sequence (1.9 kb) of *cbh1* gene was also cloned and sequenced. It contained two putative binding sites for the carbon catabolite repressor CRE and two putative binding sites for cellulases transcriptional regulator ACE. [Conclusion] The derepressed strain JU-A10 was a multiple mutant of the wild strain 114-2. The mutant produced several times more cellobiohydrolase activity per ml of culture medium when compared with 114-2. The *cbh1* gene sequence of the mutant was the same with the wild strain. While four single base mutations were detected on the upstream sequences (1.9 kb) of *cbh1* gene. The result suggests that the evidently enhanced cellobiohydrolase activity of the mutant is not due to *cbh1* protein-coded sequence. The true reason maybe refer to single base mutations of the upstream sequence that effect the transcription regulation of mutant JU-A10. As a result, the secretion of CBH

**Keywords:** *Penicillium decumbens*; TAIL-PCR; *cbh1*; derepression mutant

Supported by the Chinese National Natural science Foundation (30570049) and the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB716006)

\*Corresponding author. Tel: +86-531-88364429 Fax: +86-531-88565610; E-mail: quyinbo@sdu.edu.cn

Received: 17 October 2007/ Revised: 28 December 2007

### 答 作 者 问

问: 在学术会议上发表过的论文能否在《微生物学报》上发表?

答: 这要分两种情况。(1)如果论文集属于正式出版物,有正式书号或刊号,则不能再在本刊发表;(2)如果不是正式出版物,属于交流材料,则论文可以投稿本刊。

问: 投稿时都需要哪些材料,是否还需要纸稿?

答: 从 2006 年起,本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供:(1)论文研究内容所属单位的介绍信(通常是第一单位),介绍信模板可从我刊主页“下载专区”或“远程投稿时”下载。(2)在接到本刊 E-mail 发出的“收稿通知”后,需要及时补寄纸样的 1 份稿件和介绍信,并缴纳 100 元稿件受理费。

问: 贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: (1)收到来稿后,首先将请 2 位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第 3 位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。

(2)完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出 e-mail 告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的),作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。