

# 黑曲霉糖化酶基因启动子区的克隆及其功能测定

唐国敏 汤文剑 钟丽婵 杨开宇

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要** 利用 PCR 技术,以黑曲霉糖化酶高产株 T21 的基因组 DNA 为模板合成了糖化酶基因 5' 端上游 850bp 的非编码区,并作了序列测定。将该合成片段与细菌潮霉素磷酸转移酶结构基因融合建成表达质粒,转化黑曲霉,获得了高潮霉素抗性转化子,证实该合成片段具有丝状真菌启动子功能。抗性转化子的 Southern 分析表明,潮霉素磷酸转移酶基因已整合到受体黑曲霉的基因组 DNA 中。

**关键词** PCR, 糖化酶, 启动子

丝状真菌是低等真核生物,在工农业生产中起重要作用,因此丝状真菌基因表达调控研究无论从理论上或实践上都具有重要意义。丝状真菌启动子的分离则为研究基因表达调控提供了基础。在遗传工程研究中,丝状真菌由于有很强的蛋白质外泌功能和对哺乳动物基因的翻译后加工能力,已成为新的基因工程受体菌。已有实践证明,曲霉糖化酶启动子是诱导型的强启动子之一,常用于构建表达载体<sup>[1~4]</sup>。本文即报告黑曲霉糖化酶高产株 T21 糖化酶基因 5' 端上游非编码区的克隆及其启动子功能测定。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

黑曲霉 *Aspergillus niger* T21 为本所经连续诱变获得的糖化酶高产株; *E. coli* DH5 和 *E. coli* SK383 为本组保存。质粒 p DH33R 为 p DH33 (Dr. Cullen D 惠赠) 的衍生质粒,用作启动子功能检测载体,其结构见图 1。该质粒含有细菌复制起点和 Amp<sup>r</sup>,可在 *E. coli* 中增殖和选择,同时含有 *E. coli* 潮霉素抗性基因 (hph, 潮霉素磷酸转移酶基因) 和丝状真菌基因终止子 T<sub>trc</sub>,在 Cla I 切点插入一足够强度的丝状真菌启动子时,潮霉素抗性便可在丝状真菌中表达。

### 1.2 黑曲霉基因组 DNA 的提取

参照文献 [5] 的方法进行,但增加 RNase 的处理和酚抽提步骤以进一步纯化。

### 1.3 聚合酶链式反应

按文献 [6] 报道的曲霉糖化酶基因 5' 端非编码区序列设计引物,由本所技术室合成,用这对引物预计合成糖化酶基因 5' 上游 850bp 的非编码区片段。PCR 反应总体积 50 $\mu$ l, dNTP 终浓度为 200 $\mu$ mol/L,引物 100pmol,模板 DNA 200ng, 94 $^{\circ}$ C 5min 变性后加 Taq DNA 聚合酶 2.5u,进行 30 个循环,每个循环条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 58 $^{\circ}$ C 退火 50s, 72 $^{\circ}$ C

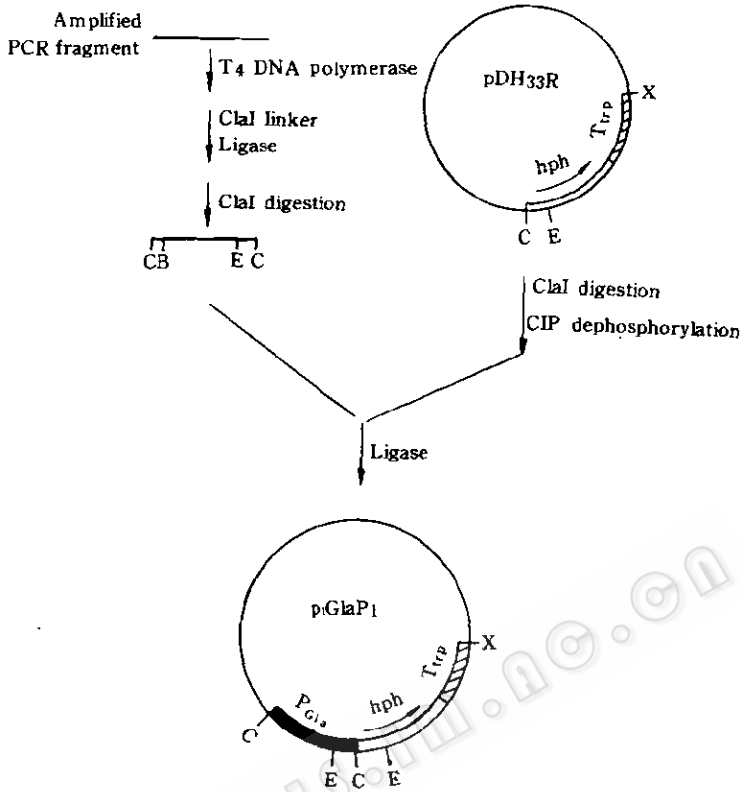


图1 启动子功能检测质粒的构建

Fig. 1 Construction of promoter function detective plasmid

X: Xba I, C: Cla I, E: EcoR I, B: BamH I

延伸 1.5min。PCR 反应产物用琼脂糖凝胶电泳分离，DE81 纸回收目的片段。

#### 1.4 PCR 合成片段的序列测定

将合成的片段克隆到 PUC19 上，对从 ATG 上游到 BamH I 切点间的 814bp 片段作了序列分析。使用 ABI DNA 序列分析仪 Model 370A 进行测定，部分序列用 Pharmacia 公司 T7 Sequencing kit 按产品说明书推荐的方法手工测定。

#### 1.5 PCR 合成片段的启动子功能测定

**1.5.1 功能检测质粒的构建：**将纯化的 PCR 合成片段用 T4DNA 聚合酶齐平，与磷酸化的 Cla I 接头连接，克隆到 pDH33R 的 Cla I 位点上，转化 *E. coli* SK383。随机选择几个转化子抽提质粒 DNA，用 EcoR I 限制酶切、电泳检查，选择插入方向与 hph 结构基因方向一致的转化子。从上述转化子制备质粒 DNA，供转化黑曲霉用。

**1.5.2 黑曲霉潮霉素抗性水平测定：**把黑曲霉孢子划线接种到含潮霉素浓度分别为 100、200、500 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的查氏斜面上，30 $^{\circ}\text{C}$  培养一周，观察生长情况。

**1.5.3 黑曲霉转化：**按 Gomi 等的方法进行<sup>[7]</sup>。制备黑曲霉原生质球所用的酶 Novo 234 系 Dr. Kinghorn 所赠送。实验以 pDH33R 质粒同时转化作为对照。

#### 1.6 Southern 印迹分析

取黑曲霉基因组 DNA 6 $\mu\text{g}$  经适当限制酶完全酶切后，按“Molecular Cloning”一书

中所述方法进行。从 pDH33R 酶切回收 EcoR I -BamH I 的潮霉素抗性基因片段,  $^{32}\text{P}$  标记后用作探针。

## 2 结果和讨论

### 2.1 糖化酶基因 5' 端非编码区的 PCR 合成

根据已发表的图谱<sup>(6)</sup>, 拟合成的 5' 端非编码区位于基因组 DNA 的 3.3kb 的 Sal I 片段上, Southern 分析证实了这一点(图略)。实验分别以基因组 DNA 经 Sal I 完全酶切后回收的 2.9~3.6kb 片段和以全基因组 DNA 为模板进行 PCR 合成, 都获得了较好的结果, 合成的主带大小与预期的一致。图 2 是以 Sal I 片段为模板时扩增产物的电泳图, 图 3 的结果表明 PCR 扩增主带用 BamH I 和 EcoR I 双酶切产生的片段大小也与预期的一致(根据 Fowler 的序列, 应产生 588, 244 和 38bp 三个片段)。以上扩增产物的长度及其双酶切结果说明 PCR 合成的主带很可能就是糖化酶基因 5' 端非编码区片段。



图 2 PCR 扩增产物的电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of PCR amplified products

1. In buffer with 20mmol/L  $[\text{Mg}^{2+}]$
2. In buffer with 30mmol/L  $[\text{Mg}^{2+}]$
3. Marker (pBR322/pst I -Hind III)

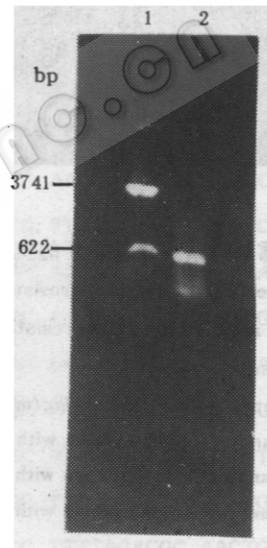


图 3 PCR 扩增产物的限制酶分析

Fig. 3 Restriction analysis of PCR amplified product

1. Marker (pBR322/Hind III -Sal I)
2. Digested by BamH I -EcoR I

### 2.2 启动子功能检测质粒的构建(图 1)

PCR 扩增片段加上 Cal I 接头后插入 pDH33R 的 Cla I 位点, 转化 *E. coli* SK383。经选择, 转化子质粒 pGlaP1 的 Cal I 酶切产生~850bp 片段, 显示扩增片段的插入, 同时 EcoR I 酶切产生~470bp 片段, 表明扩增片段的插入方法与 hph 结构基因的方向是一致的(图略)。

### 2.3 PCR 扩增片段具有丝状真菌启动子功能

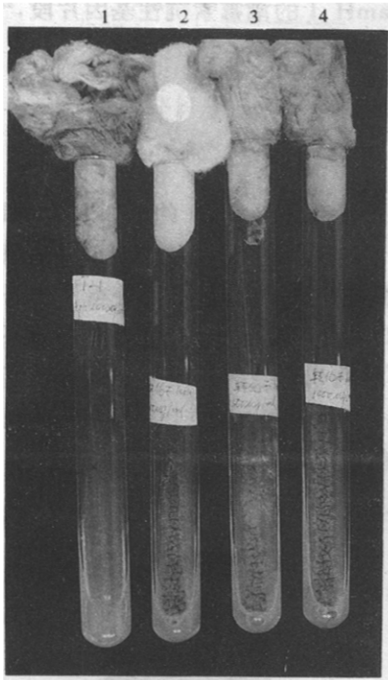


图 4 黑曲霉潮霉素抗性转化子的抗性水平检测  
Fig. 4 The determination of resistance level of *A. niger* hygromycin resistant transformant

1. T21 on Czapek medium with 200 $\mu$ g/ml Hyg.
2. Transformant on Czapek medium with 200 $\mu$ g/ml Hyg.
3. Transformant on Czapek medium with 500 $\mu$ g/ml Hyg.
4. Transformant on Czapek medium with 1000 $\mu$ g/ml Hyg.

上挑取的菌落是稳定的潮霉素抗性转化子，其抗性水平比受体株提高约 12 倍。

#### 2.4 黑曲霉潮霉素抗性转化子中，潮霉素抗性基因已整合到基因组 DNA 中

从黑曲霉潮霉素抗性转化子和 *A. niger* T21 提取基因组 DNA，分别用 Xba I、Hind III、EcoR I 作完全酶切后进行 Southern 印迹分析，以 hph 结构基因片段为探针。由图 5 给出的结果表明，hph 基因已整入黑曲霉基因组 DNA，并且整入的拷贝数至少为 2。因 hph 基因来源于细菌，整入黑曲霉染色体后，必需有一定强度的丝状真菌启动子带动才能在黑曲霉中表达。因此以上结果表明 PCR 合成的黑曲霉糖化酶基因 5' 端上游 850bp 的非编码区具有丝状真菌启动子功能。

#### 2.5 PCR 合成的启动子功能片段的序列

合成片段的序列测定结果如图 6。在 -171bp 和 -109bp 处分别有高等真核生物基因启动子的共有序列 CAAT 框和 TATA 框，但在丝状真菌基因中 CAAT 框和 TATA 框在转录中的功能目前仍不能肯定，有待进一步研究。关于黑曲霉糖化酶基因 5' 端非编码区

*A. niger* T21 的潮霉素抗性水平测定结果表明该菌株在含 100 $\mu$ g/ml 潮霉素的查氏斜面上显示微弱生长，浓度提高到 120 $\mu$ g/ml 时则完全不生长，因此转化用的再生培养基平板中的潮霉素浓度定为 200 $\mu$ g/ml。

在质粒 pGlaP1 中，hph 结构基因的起始密码 ATG 紧接 Cla I 识别序列，在 Cla I 位点以正确方向插入的 PCR 合成片段若具有一定强度的启动子功能，便能引导细菌潮霉素抗性基因在黑曲霉中表达。实验取 2 $\mu$ g pGlaP1 质粒 DNA，对  $3.5 \times 10^7$  个 *A. niger* T21 原生质球进行转化，在含 200 $\mu$ g/ml 潮霉素的转化平板上于 30 $^{\circ}$ C 培养 8 d，结果共长出 13 个黑曲霉菌落。用 2 $\mu$ g pDH33R 质粒 DNA 同样操作作为对照，但在对照转化平板上没有菌落生成。

为了证明转化平板上生长的 *A. niger* 菌落是稳定的潮霉素抗性转化子而非流产转化子，我们选择部分抗性菌落转接到分别含 200、500 和 1 000 $\mu$ g/ml 潮霉素的查氏斜面上，并同时接种受体株 T21 作为对照，于 30 $^{\circ}$ C 培养 7d，结果见图 4。继续提高潮霉素浓度至 1 200 $\mu$ g/ml 和 1 500 $\mu$ g/ml，30 $^{\circ}$ C 培养 7d 观察，转化子在 1 200 $\mu$ g/ml 潮霉素的查氏斜面上生长正常，在 1 500 $\mu$ g/ml 潮霉素的查氏斜面上仅微弱生长。以上表明转化平板

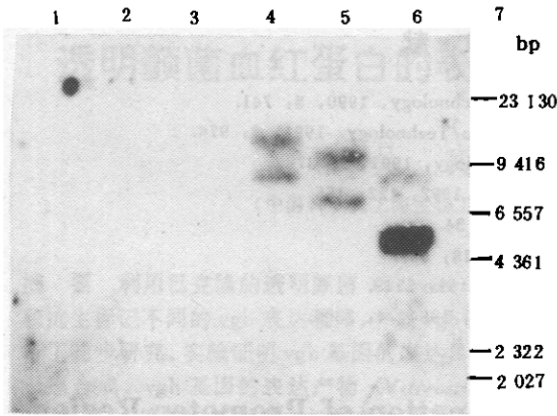


图 5 黑曲霉潮霉素抗性转化子的 Southern 印迹分析

Fig. 5 Southern blot analysis of *A. niger* hygromycin resistant transformant

1. T21/Xba I
2. T21/Hind III
3. T21/EcoR I
4. Transformant/Xba I
5. Transformant/Hind III
6. Transformant/EcoR I
7. Marker ( $\lambda$ /Hind III)

```

      BamHI
      ↓
GGATCCGAAC TCCAACCGGG GGGAGTACAT TGAGTGGCCG CAGTGAAGG AATCGCGCA
GTTGATGAAT TTCGGAGCGA ACGACGCCAG TCTCCTTACG GATGATTTCC GCAACGGGAC
ATATGAGTTC ATCCTGCAGA ATACCGCGGC GTTCCACATC TGATGCCATT GGC GGAGGGG
TCCGGACGGT CAGGAACCTTA GCCTTATGAG ATGAATGATG GACGTGTCTG GCCTCGGAAA
AGGATATATG GGGATCATGA TAGTACTAGC CATATTAATG AAGCGCATAT ACCACGCGTG
GGACCTGCGT TATAGTTTCC CGTTAGTTAT AGTACCATCG TTATACCAGC CAATCAAGTC
ACCACGCACG ACCGGGGACG GCGAATCCCC GGAATTGAA AGAAATTGCA ACCCAGGCCA
GTGAGGCCAG CGATTGTCCA CCTCTCCAAG GCACAGGGCC ATTCTGCTGC ACTGGTGAT
TCATCGCAAT TTCCCCCGGC CCGGCCCGAC ACCGCTATAG GCTGTTTCTC CCACACCATC
GGAGATTCGT CGCCTAATGT CTCGTCCGTC CACAAGCTGA AGAGCTTGAA GTGGCGAGAT
      EcoRI
      ↓
GTCTCTGCAG GAATCAAGC TAGATGCTAA GCGATATTGC ATGGCAATAT GTGTTGATGC
ATGTGCTTCT TCCTTCAGCT TCCCCTCGTG CATATGAAGG TTTGGCIATA AATTGAAGTG
GTTGGTCCGGG GTTCCGTGAG GGGCTGAAGT GCTTCTCCC TTTTAGACGC AACTGAGAGC
CTGAGCTTCA TCCCCAGCAT CATTACACCT CAGCA(ATG.....)
  
```

图 6 PCR 合成的启动子的功能片段的序列

Fig. 6 Sequence of the 5'upstream region of the glucoamylase gene synthesized by PCR from *A. niger* T21

序列, Fowler 报道了 1966bp 长的序列测定结果<sup>(6)</sup>, Nunberg 报道了 204bp 的测定结果<sup>(8)</sup>, 我们所测得的 5' 端上游 204bp 序列与 Nunberg 的完全一致, 但与 Fowler 的比较有较大差异。菌株的差异和菌株已经历多轮诱变可能是造成差异的主要原因, 至于这些碱基或序列的改变对菌株糖化酶产量提高有什么意义是值得探讨的问题。为进一步深入研究糖化酶基因 5' 端的 Cis 调控序列, 我们正从基因组 DNA 直接分离 2kb 长的 5' 端非编码区, 有关分离和序列分析工作将在下一篇中报告。

## 参 考 文 献

- [1] Archer D B, Jeenes D J, Mackenzie D A *et al.* *Bio/Technology*, 1990, 8: 741.  
[2] Dunn-Coleman N S, Bloebaum P, Berka B M *et al.* *Bio/Technology*, 1991, 9: 976.  
[3] Contreras R Carrez D, Kinghorn J R *et al.* *Bio/Technology*, 1991, 9: 378.  
[4] Roberts I N, Jeenes D J, Mackenzie D A *et al.* *Gene*, 1992, 122: 155.  
[5] 朱 衡, 瞿 峰, 朱立煌. *真菌学报*, 1994, 13 (1): 34.  
[6] Fowler T, Berka R M, Ward M. *Curr Genet*, 1990, 18: 537.  
[7] Comi K, Limura Y, Hara S. *Agric Biol Chem*, 1987, 51: 2549.  
[8] Nunberg J H, Meade J H, Cole G *et al.* *Mol Cell Biol*, 1984, 4: 2306.

## Cloning and Function Determination of Promoter Region of Glucoamylase Gene form *Aspergillus niger* T21

Tang Guomin Tang Wenjian Zhong Lichan Yang Kaiyu

(*Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing 100080*)

**Abstract** A 850bp fragment of the 5' flanking region of the glucoamylase gene was synthesized from *A. niger* T21 genome using PCR. The function detection vector was constructed by fusing this fragment to *E. coli* hygromycinB phosphotransferase gene (hph) and was used to transform *A. niger*. The high hygromycin resistance transformants thus obtained verified that the synthesized fragment functioned as a promoter in filamentous fungi. Southern blot analysis showed the hph gene has been integrated into genomic DNA of *A. niger* transformant.

**Key words** PCR, glucoamylase, promoter