

三孢布拉霉 *crgA* 启动子的克隆和活性分析

桂仁跃, 洪宇, 余晓斌, 罗玮*

江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

桂仁跃, 洪宇, 余晓斌, 罗玮. 三孢布拉霉 *crgA* 启动子的克隆和活性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5275-5285.

GUI Renyue, HONG Yu, YU Xiaobin, LUO Wei. Cloning and activity of the *crgA* promoter from *Blakeslea trispora*[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5275-5285.

摘要: 【背景】CrgA 是三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*, Bt)中调控类胡萝卜素合成的关键负调控因子, 其表达水平会影响类胡萝卜素的合成。【目的】克隆三孢布拉霉 *crgA* 启动子并分析其活性, 为进一步解析 CrgA 表达调控机制奠定基础。【方法】通过综合微生物基因组(integrated microbial genomes, IMG)数据库提供的基因组序列, 克隆 *crgA* 翻译起始位点上游 2 000 bp 序列, 分析其顺式调控元件和转录起始区域预测, 通过 RT-qPCR 分析不同光照时间对三孢布拉霉 *crgA* 相对转录水平的影响; 构建 4 个不同长度的 *crgA* 启动子截短序列驱动的 GUS-mGFP5 重组表达载体 p1303-procrgAF、F1、F2 和 F3, 利用农杆菌侵染整合到三孢布拉霉基因组中, 在黑暗和光照条件下测定 β -D-葡萄糖苷酸酶(β -D-glucuronidase, GUS)酶活性并观察荧光信号。【结果】*crgA* 启动子不仅包含基础的 TATA-box 和 CAAT-box 元件, 还包括多个与光响应相关的元件。观察荧光结果显示 CaMV35S 和构建的 4 个突变启动子均能在三孢布拉霉体内驱动下游基因表达, 检测 GUS 酶活性发现 procrgAF3 活性最强, 且截短的启动子活性均强于 CaMV35S, *btcrgA* 启动子序列在 1 499–989 bp 范围内有激活下游基因表达的光响应元件。【结论】三孢布拉霉的 *crgA* 表达具有“光激活”和“光适应”现象, *crgA* 启动子核心区位于 procrgAF3 序列, *btcrgA* 启动子上具有响应光调控的顺式作用元件位于 1 499–989 bp。

关键词: 三孢布拉霉; *crgA*; 启动子活性; 农杆菌; β -D-葡萄糖苷酸酶; 光调控

资助项目: 国家自然科学基金(21878123); 微生物技术国家重点实验室开放课题(M2020-06)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21878123) and the Open Project of the State Key Laboratory of Microbial Technology (M2020-06).

*Corresponding author. E-mail: wluo@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-05-11; Accepted: 2023-06-10; Published online: 2023-07-25

Cloning and activity of the *crgA* promoter from *Blakeslea trispora*

GUI Renyue, HONG Yu, YU Xiaobin, LUO Wei*

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] CrgA is a key negative regulator of carotenoid synthesis in *Blakeslea trispora* (Bt). [Objective] To clone and determine the activity of the *crgA* promoter from *B. trispora*, laying a foundation for deciphering the regulatory mechanism of CrgA expression. [Methods] According to the genome sequence in the integrated microbial genomes (IMG), we cloned a sequence of 2 000 bp upstream of the translation initiation site of *crgA*, identified the *cis*-regulatory elements, predicted the transcription initiation region, and then Analysis of *crgA* transcription level of *B. trispora* under different light time by RT-qPCR. Furthermore, we constructed four recombinant expression vectors p1303-procrgAF, F1, F2, and F3 driven by truncated sequences of *crgA* promoters with different lengths, and integrated them into the genome of *B. trispora* via *Agrobacterium tumefaciens*. Under dark and light conditions, the fluorescence signals were observed and the β -D-glucuronidase (GUS) activity was determined. [Results] The *crgA* promoter contained not only the basic elements TATA-box and CAAT-box but also multiple elements related to light response. Both CaMV35S and the constructed four mutant promoters could drive the expression of downstream genes in *B. trispora*. The GUS activity indicated that procrgAF3 had the strongest activity, and the truncated promoter had stronger activity than CaMV35S. The *btcrgA* promoter sequence has a light-responsive element at 1 499–989 bp that activates downstream gene expression. [Conclusion] The transcription of *crgA* in *B. trispora* presented the phenomena of light activation and light adaptation. The core region of the *crgA* promoter was identified as procrgAF3, and the *cis*-acting elements on the *btcrgA* promoter that responded to light regulation were located in the region of 1 499–989 bp. **Keywords:** *Blakeslea trispora*; *crgA*; promoter activity; *Agrobacterium*; GUS; photoregulation

三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*, Bt)是目前工业化生产 β -胡萝卜素的主要微生物之一。三孢布拉霉不仅生长速度快, β -胡萝卜素的产量也很高, 其合成 β -胡萝卜素受到负调控因子 CrgA 的调控^[1]。CrgA 被发现于卷枝毛霉中, 作为关键负调控因子发挥作用^[2-4], 同时在藤仓镰孢、尖孢镰刀菌^[5]、三孢布拉霉和布拉克须霉^[6]等丝状真菌中也都存在 *crgA* 直系同源基因。*crgA* 缺陷型的卷枝毛霉在整合三孢布拉霉来源的 *crgA* 后, 表现出和野生型卷枝毛霉类似

的表型^[7]。在三孢布拉霉 *crgA* 缺陷菌株中, 参与 β -胡萝卜素合成途径上的相关结构基因转录水平明显增加, β -胡萝卜素的合成量较野生型也提高了 31.2%, 表明其对 β -胡萝卜素的合成起到负调控作用; 同时, 在光照条件下, *crgA* 的转录也体现出“光适应”和“光激活”现象^[8-9], 但其表达水平与 β -胡萝卜素合成水平之间的相互关系尚未得到充分解析。为研究 CrgA 在三孢布拉霉体内受到光刺激时的表达状态, 本研究以 *crgA* 启动子结构和活性研究为切入点, 为 CrgA

调控 β -胡萝卜素合成提供一些理论依据。

启动子一般是位于结构基因 5'端上游的一段 DNA 序列, RNA 聚合酶可通过序列的特异性来识别和结合启动序列, 可调控下游基因的表达, 通过调控转录水平进而影响下游基因的表达部位、水平以及方式^[10]。在反式作用调控的研究中, 对启动子功能区进行缺失突变分析是常用的方法, 为之后研究相关转录因子的 DNA 和蛋白质相互作用试验奠定基础^[11]。

目前对三孢布拉霉 *CrgA* 调控 β -胡萝卜素合成过程及机制解析的研究非常有限, 本研究旨在分析该基因启动子中光响应元件功能及其调控 *crgA* 的表达模式。首先以 *btcrgA* 上游 2 000 bp 序列为研究对象^[12], 克隆并对其序列中的顺式作用元件进行预测, 逐渐截短其 5'端序列构建突变载体, 通过测定 β -D-葡萄糖苷酸酶(β -D-glucuronidase, GUS)的活性, 确定各个截短启动子驱动外源表达基因的能力, 并设置不同光照模式探究 *btcrgA* 的转录是否受到光照调控及其调控模式, 以及 *btcrgA* 启动子受光调控顺式作用元件所在的区域, 了解 *btcrgA* 上游启动子的核心序列位置^[13-15]。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*) NRRL2896 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保藏; 农杆菌 LBA4404, 酷来博科技有限公司; pCAMBIA1303 由本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器

RNA pure Plant Kit 和 5'-RACE 试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白浓度测定试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; GUS 报告基因定量检测试剂盒, 酷来博科技有限公

司; Clone[®] Plus Multi One Step Cloning Kit, Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus)和 Heff[®] qPCR SYBR Green Master Mix, 翊圣生物科技公司; 蜗牛酶、纤维素酶、溶壁酶和溶菌酶, 索莱宝生物科技有限公司; 引物合成与测序等, 苏州金唯智生物科技有限公司。荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 植物基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; 2 \times Rapid *Taq* Master Mix PC, 南京诺维赞生物科技股份有限公司; Prime STAR[®] Max DNA Polymerase, 宝日医生物技术有限公司; 多功能酶标仪, 伯腾仪器有限公司。

1.1.3 培养基

麦汁固体培养基: 5 $^\circ$ 的麦汁加入 20 g/L 琼脂粉; 种子培养基(g/L): 玉米粉 30.0, 黄豆粉 50.0, KH₂PO₄ 1.5, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L; LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0; 酵母浸粉蛋白胨培养基(yeast extract peptone medium, YEP) (g/L): 牛肉浸膏 10.0, 酵母提取物 10.0, NaCl 5.0; 土豆葡萄糖培养基(potato dextrose medium, PD)培养基(g/L): 土豆 200.0, 葡萄糖 20.0, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.1。

1.2 光照处理三孢布拉霉

三孢布拉霉 NRRL2896 在添加有 200 μ g/mL 头孢菌素的麦汁固体培养基上 25 $^\circ$ C 黑暗培养 5 d, 随后在 25 $^\circ$ C 环境下光照培养, 从黑暗培养挪到光照培养时间点为 0 min, 设置持续光照 (15 W/m² 白光), 并在 2、5、10、30、60、180 和 360 min 取各自平板上的三孢布拉霉菌丝体用液氮快速冷冻, 保存于-80 $^\circ$ C 冰箱用于后续试验。

分别将含有 pCAMBIA1303、pCAMBIA1303-*procrgAF*、F1、F2 和 F3 质粒的农杆菌用于侵染三孢布拉霉, 试验得到的三孢布拉霉转化子转接到含 200 μ g/mL 头孢菌素、75 μ g/mL 潮霉

素的麦汁培养基上, 设置两组试验样本, 一组为 15 W/m² 的白光照射条件; 另一组为黑暗条件, 温度均为 25 °C, 分别继续培养 3 d, 挑取菌丝-80 °C 冰箱保存。

1.3 相对转录水平的分析

取适量三孢布拉霉菌丝, 放在研钵中用液氮充分研磨, 后续按照 RNA pure Plant Kit 说明书提取纯化 RNA, 并使用琼脂糖凝胶电泳对提取的 RNA 质量进行检测。对质量良好的 RNA 进行反转录试验, 根据 Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) 试剂盒步骤, 反转录得到相应的 cDNA, 按照试剂盒 Heff[®] qPCR SYBR Green Master Mix 说明书步骤加入所需 cDNA 和其他成分。实

时荧光定量 PCR 反应体系(50 μL): 模板 cDNA (0.1 g/L) 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 2×qPCR buffer 25 μL, ddH₂O 21 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 60 °C 30 s, 4 个循环; 溶解曲线为仪器默认, 试验中所用到的引物序列见表 1。通过实时荧光定量 PCR 仪 Step One Plus 上机检测得到相应数据, 采用相对定量 2^{-ΔΔC_t} 法计算各个目的基因和内参基因 *tef1* 的相对转录水平, 分析数据并用 Origin 作图。

1.4 三孢布拉霉 *crGA* 启动子序列克隆和分析

取适量三孢布拉霉菌丝于研钵中, 倒入液氮充分研磨, 使用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取三孢布拉霉菌基因组用于 *btcrgA* 上游启动子的

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Products size (bp)
<i>pcrgA</i> -R	TAGTCAGATCTACCATTGTTGATAATTCTCAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AGAATTGAAGC	2 186
<i>pcrgA</i> -F3	AGCCAATACGCAAACCGGGGTTGATTTGTCGATCACAAG	
<i>pcrgA</i> -R	TAGTCAGATCTACCATTGTTGATAATTCTCAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AGAATTGAAGC	1 499
<i>pcrgA</i> -F2	AGCCAATACGCAAACCCCTTTGATAGGTAATGTATGTCGGTGTGG	
<i>pcrgA</i> -R	TAGTCAGATCTACCATTGTTGATAATTCTCAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AGAATTGAAGC	989
<i>pcrgA</i> -F1	AGCCAATACGCAAACCCGACTGGATTGGGCACTTAC	
<i>pcrgA</i> -R	TAGTCAGATCTACCATTGTTGATAATTCTCAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA AGAATTGAAGC	632
<i>pcrgA</i> -F	AGCCAATACGCAAACCTTGCCAACAAGTTAGAGCAAT	
1303-F	CTGCTCTAGCCAATACGCAAACCG	2 166
1303-R	GCTTTCCACCAACGCTGATC	
GUS-F	ATGGTAGATCTGACTAGTTTACGTCCTG	11 336
GUS-R	GGTTTGCGTATTGGCTAGAGCAG	
At-16s-F	GATCCTGGCTCAGAACGAACG	236
At-16s-R	CCCTACGGCTACCTTGTTACGAC	
q- <i>crGA</i> -F	GTCCTCCACCAGCCAAAATCT	152
q- <i>crGA</i> -R	CCAATCAACAAGGGAACACGG	
<i>tef1</i> -F	AACTCGGTAAGGGTTCCTTCAAG	129
<i>tef1</i> -R	CGGGAGCATCAATAACGGTAAC	

扩增。根据 JGI 数据库已有的 *Blakeslea trispora* NRRL2456 V1.0 基因组, 设计引物扩增 *btcrgA* 翻译起始位点上游 2 000 bp 左右作为启动子序列, 同源重组整合进 pUC57 载体中, 转化到感受态 *E. coli* DH5 α 中, 37 °C 培养过夜, 挑取菌落通过 PCR 和琼脂糖凝胶电泳验证并测序, 得到的 *btcrgA* 启动子序列用 Plant CARE 分析该序列的顺式调控元件和 BDGP 预测可能的转录起始位点^[16]。

1.5 *btcrgA* 启动子截短载体构建和转化

以三孢布拉霉基因组为模板设计相应引物, 根据预测的启动子转录起始位点, 且不破坏序列上的顺式调控元件基础上, 从 5'端逐渐截短 *crgA* 上游启动子序列, 分别扩增不同长度的 *btcrgA* 启动子序列, 取代原有的 CaMV35S 启动子, 构建 pCAMBIA1303-*procrgA*F、F1、F2 和 F3。使用重组酶 Clone[®] Plus Multi One Step Cloning Kit 连接到 pCAMBIA-1303 载体上, 并转化到大肠杆菌感受态 DH5 α 中, 用 2 \times Rapid Taq Master Mix PCR 验证并提取质粒, 测序结果正确后, 通过电转化试验将构建好的质粒转化到农杆菌 LBA4404 中, 并涂布在 YEP 固体培养基上, 30 °C 培养 48 h, 挑取单菌落溶于 ddH₂O, 并用高保真酶对特异片段进行 PCR 扩增, PCR 反应体系(50 μ L): 溶于 ddH₂O 的农杆菌 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 2 \times PrimeSTAR Max Premix 25 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用于测序, 以确定构建的正确序列的质粒转入到了农杆菌中。

1.6 三孢布拉霉原生质体制作

吸取适量三孢布拉霉孢子溶液涂布于麦汁固体培养基上, 25 °C 培养 5 d, 刮取 5 cm² 的菌苔接种于种子液中, 25 °C、180 r/min 摇床培养

60 h 后, 取上述培养的野生型三孢布拉氏酶种子液于 8 000 r/min 离心 10 min; 用无菌水洗涤菌丝体和培养基混合物两次(8 000 r/min, 10 min), 加入之前配制好的酶解液(2%溶菌酶、0.5%溶壁酶、0.25%蜗牛酶和 0.25%纤维素酶溶解于 0.6 mol/L NaCl 溶液中)混匀, 28 °C、75 r/min 避光孵育 4 h^[17]。待酶解完成, 将三孢布拉霉菌丝用三层擦镜纸过滤, 用 0.6 mol/L NaCl 溶液洗涤原生质体, 4 000 r/min 离心 10 min, 在光学显微镜下观察并用血球计数板计数, 稀释原生质体到 1 \times 10⁶ 个/mL 备用。

1.7 农杆菌侵染三孢布拉霉

将含有 pCAMBIA1303-*procrgA*-F、F1、F2 和 F3 载体菌株(LBA4404)分别接种于 50 mL 的 YEP 液体培养基中, 在 28 °C、75 r/min 条件下培养, 使 OD₆₀₀ 约为 0.4–0.6 之间^[18–20]; 吸取 400 mL 上述活化的农杆菌培养液与 200 mL 的三孢布拉霉原生质体混匀, 并且加入终浓度为 200 μ mol/L 的乙酰丁香酮, 28 °C、180 r/min 避光诱导培养 48 h, 再加入 800 μ L PD 液体培养基, 继续在 28 °C、180 r/min 条件下复苏 24 h, 8 000 r/min 离心 10 min, 吸取剩余 200 μ L 左右的培养液混匀涂布于含有 200 μ g/mL 头孢菌素、75 μ g/mL 潮霉素的麦汁培养基上, 25 °C 培养 5 d, 挑取菌落保存于–80 °C 冰箱, 用于提取基因组和蛋白。

1.8 mGFP5 蛋白荧光观察和 GUS 活性检测

mGFP5 是将野生型绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的 Ser₆₅ 替换为 Thr, 荧光强度较野生型的 GFP 提高 4–6 倍, 且较 GFP 对生物毒害性减弱。挑取适量麦汁培养基上农杆菌侵染的三孢布拉霉转化子于 PBS 溶液中洗涤并 8 000 r/min 离心 10 min, 重复 2 次, 取少量菌丝体到载玻片上置于倒置荧光显微镜上观察。取适量的新鲜三孢布拉霉菌丝体在研钵中充分研磨, 按照 GUS 报告基因定量检测试剂盒

提取植物总蛋白, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒制作蛋白浓度标准曲线, 并测定提取的三孢布拉霉菌丝总蛋白浓度。GUS 蛋白可以将 4-甲基-7-乙酰氧基香豆素- β -D-葡萄糖醛酸苷 (4-methyl-2-oxo-2H-1-benzopyran-7-yl- β -D-glucopyranosiduronic acid, 4-MUG) 催化为 4-甲基伞形酮 (4-methylumbelliferon, 4-MU), 用反应终止液配制 4-MU 的 1–10 nmol/L 稀释液作为标准液绘制标准曲线。4-MU 的激发波长为 356 nm, 使用多功能酶标仪测定样品在 456 nm 处的吸光值。根据标准曲线公式计算各个反应样品 4-MU 生成浓度, GUS 的活性用反应结果生成的 4-MU 量与总蛋白量和时间的比值 [$\mu\text{mol 4-MU}/(\mu\text{g}\cdot\text{min})$] 表示。

2 结果与讨论

2.1 光照对三孢布拉霉 *crgA* 转录的影响

对不同光照时间培养条件下的三孢布拉霉 *btcrgA* 相对转录水平的分析(图 1)表明, 光照显著影响了 *btcrgA* 在体内的转录水平, 在 10 min 时达到较高的相对转录水平, 是对照组黑暗处理条件下(0 min)的 30 多倍, 二者间差异达到显著水平 ($P < 0.05$); 随着光照处理时间的增加, 相对转录水平也逐渐降低, 6 h 后的 *btcrgA* 相对转录水平约为对照组的 2 倍, 说明随着光照处理时间的延长, *btcrgA* 的转录会受到光照的抑制作用。因此, 在光照条件下, *btcrgA* 的表达存在“光激活”和“光适应”现象^[21]。

2.2 *btcrgA* 启动子中顺式作用元件分析

启动子是转录水平上的一个重要调控元件, 决定着基因的表达模式和表达强度, 在对 *btcrgA* 翻译起始位点上游 2 000 bp 序列进行分析后, 发现序列中靠近 *btcrgA* 起始密码子部分包含多个 TATA-box 元件, 整个序列上分布着很多启动子和增强区域相关的顺式作用元件

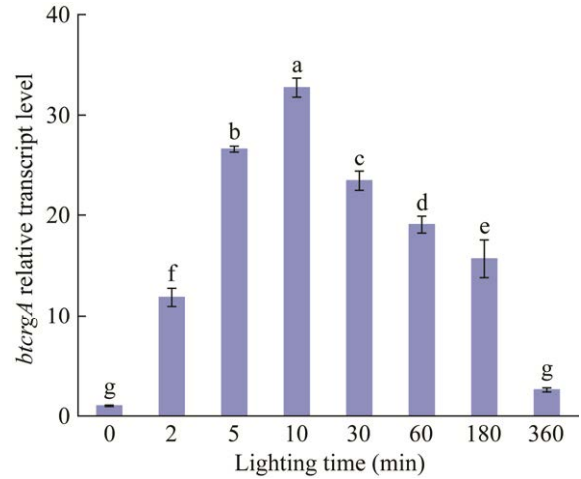


图 1 *btcrgA* 持续光处理条件下各个时间点的相对转录水平 不同小写字母表示差异显著

Figure 1 Relative transcription levels of *btcrgA* gene at various time points under continuous light treatment. Different lowercase letters indicate significant difference.

CAAT-box; 此外还包括光响应元件、昼夜节律响应元件、创伤诱导元件、厌氧感应元件、低温诱导元件、脱落酸响应元件、干旱响应元件和茉莉酸甲酯响应元件等(表 2)。这表明 *btcrgA* 的表达可能受到光照、低温、脱落酸和干旱等外在因素的影响^[22]。*btcrgA* 启动子上存在多个光响应元件, 如 Sp1、LAMP-element、TCT-motif、G-box、Box 4 和 AE-box 等, 说明在光照条件下, *btcrgA* 表达可能受到上游启动子光响应元件的调控。

2.3 *btcrgA* 启动子截短突变表达载体构建

btcrgA 上游启动子序列经过 BDGP 预测, 得到一个位于启动子下游且分值为 0.98 的启动子转录起始区序列(5'-TTCTCTCTCAAAAAAAAAA GGGCTTTTTTAACGCTTGATCGATTCTTTTT-3')。经过 5' cDNA 末端快速扩增(rapid-amplification of cDNA ends, 5' RACE)试验表明, *btcrgA* 的起始转录位点为 GTG 上游的 278 bp 处。根据转录因子结合位点和启动子转录起始区在启动子序列上的分布位置, 在不切断转录因子结合位

表 2 三孢布拉霉 *btrcgA* 启动子部分预测的顺式作用元件Table 2 Part of putative *cis*-acting elements and their positions in the *btrcgA* promoter

Name of <i>cis</i> -acting element	Sequence (5'→3')	Function	Location	Number
TGACG-motif	TGACG/CGTCA	Involved in the MeJA-responsiveness	484 (+), 1 450 (+)	2
WUN-motif	AAATTCCT	Wound-responsive element	1 822 (+)	1
ABRE	TACGGTC/ACGTG	Involved in the abscisic acid responsiveness	678 (+), 957 (+)	2
AE-box	AGAAACAA	Part of a module for light response	595 (+)	1
MBS	CAACTG	Involved in drought-inducibility	731 (-)	1
ARE	AAACCA	Essential for the anaerobic induction	10 (-), 90 (+), 893 (+), 1 050 (-), 1 141 (+), 1 435 (+)	6
Box4	ATTAAT	Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	1 459 (+)	1
G-box	CACGTC	Involved in light responsiveness	956 (+)	1
LAMP-element	CTTTATCA	Part of a light responsive element	158 (+)	1
TCA-element	CCATCTTTT	Involved in salicylic acid responsiveness	1 828 (+)	1
LTR	CCGAAA	Involved in low-temperature responsiveness	152 (+), 753 (+), 1 015 (+)	3
TCT-motif	TCTTAC	Part of a light responsive element	627 (-)	1
Circadian	CAAAGATATC	Involved in circadian control	360 (-)	1
Sp1	GGGCGG	Light responsive element	870 (+), 1 370 (+)	2
TGA-element	AACGAC	Auxin-responsive element	505 (+), 601 (+)	2
O2-site	GATGATGTGG	Involved in zein metabolism regulation	93 (-)	1

(+): 该顺式作用元件位于正链; (-): 该顺式作用元件位于互补链

(+): The *cis*-acting regulatory elements locate on the positive chain; (-): The *cis*-acting regulatory elements locate on the complementary chain.

点的原则下, 以 *btrcgA* 翻译起始位点至上游 632 bp 处为最小的启动子截短序列, 将这 2 000 bp 设计了 4 个缺失突变片段(图 2A), 分别为 *procrGAF* (2 186 bp)、*procrGAF1* (1 499 bp)、*procrGAF2* (989 bp) 和 *procrGAF3* (632 bp), 通过后续试验来确定 *btrcgA* 启动子的核心区域和起主要光调控作用的光响应元件所在区域^[23]。

通过设计不同的引物(表 1), 以三孢布拉霉基因组 DNA 为模板, 经过 PCR 特异性扩增得到图 2A 中不同大小的序列。以 pCAMBIA1303 质粒为出发载体(图 2B), 构建 pCAMBIA1303-*procrGAF*、pCAMBIA1303-*procrGAF1*、pCAMBIA1303-*procrGAF2* 和 pCAMBIA1303-*procrGAF3* (以

pCAMBIA1303 载体作为阳性对照)。经过大肠杆菌 DH5 α 扩增得到所需的质粒, 电转进入农杆菌 LBA4404, 使用引物 1303-F/R 扩增特定序列经琼脂糖凝胶电泳(图 3)检测后送金唯智公司测序, 并和 JGI 基因组序列对比, 序列相似度为 98%, 说明获得了含有各个启动子序列缺失载体的 LBA4404 菌株。

2.4 基于 mGFP5 荧光信号的截短启动子序列活性分析

构建的 pCAMBIA1303、pCAMBIA1303-*procrGAF*、pCAMBIA1303-*procrGAF1*、pCAMBIA1303-*procrGAF2* 和 pCAMBIA1303-*procrGAF3* 等 5 个载体分别转入农杆菌, 并以

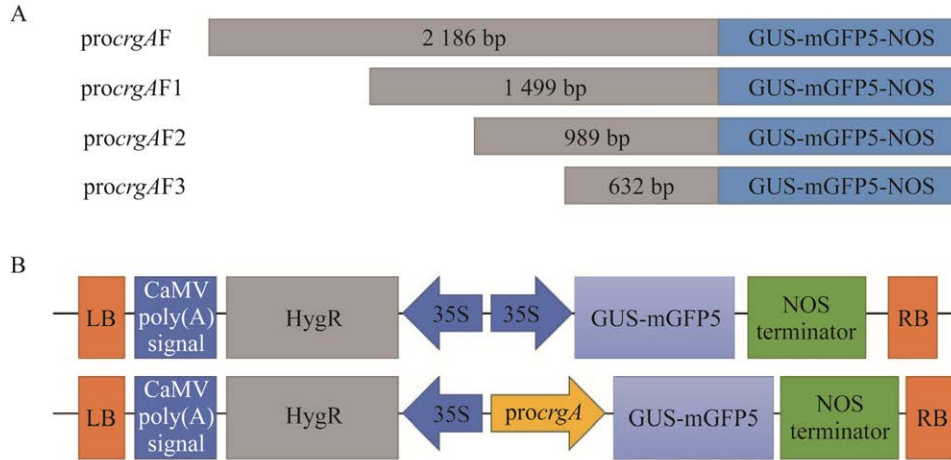


图2 截短突变的 *btcrGA* 启动子片段及载体构建图 A: 不同截短长度的 *procrGAs*. B: *btcrGA* 启动子取代 CaMV35S 启动子位置结构图

Figure 2 The different length of *btcrGA* promoters and vectors build legend. A: *procrGAs* with different truncated lengths. B: *btcrGA* promoter replaces CaMV35S promoter position structure legend.

它们侵染三孢布拉霉原生质体, 得到的三孢布拉霉转化子和阴性对照(不携带质粒的农杆菌 LBA4404 侵染的三孢布拉霉)一同分别在倒置荧光显微镜下观察, 每个视野都对明场(bright field, BF)和 mGFP5 [异硫氰酸荧光素场(fluorescein isothiocyanate isomer, FITC) field]进行了观察, 并设置了 BF 和 FITC 的融合视野(图 4), 结果表明 mGFP5 在三孢布拉霉中基本不存在本底水平表

达, 其他均观察到了荧光信号, CaMV35S 可以驱动 GUS-mGFP5 融合蛋白在三孢布拉霉中表达, 且构建的 4 个截短的 *btcrGA* 启动子均可使外源基因在三孢布拉霉中表达。

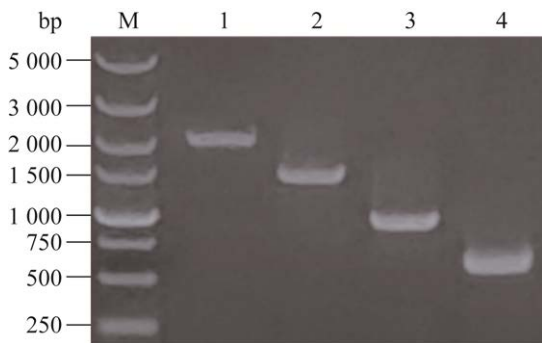


图3 重组载体菌落 PCR 验证

Figure 3 PCR products of recombinant vector colonies. M: DL5000 Marker; 1: pCAMBIA1303-*procrGA*; 2: pCAMBIA1303-*procrGA1*; 3: pCAMBIA1303-*procrGA2*; 4: pCAMBIA1303-*procrGA3*.

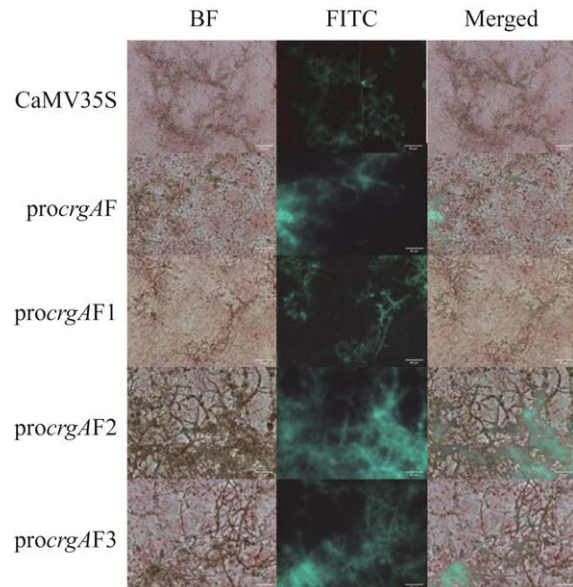


图4 三孢布拉霉 mGFP5 荧光观察结果

Figure 4 Fluorescence observation of mGFP5 in *Blakeslea trispora* (40 \times).

2.5 截短启动子序列驱动 GUS 报告基因的表达分析

为测定 CaMV35S 和不同截短长度的 *btcrgA* 启动子驱动 GUS 表达的能力, 在 OD_{595} 和 OD_{456} 条件下, 绘制了牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和 4-MU 标准曲线, 它们分别为 $y=0.929\ 61x+0.523\ 82$ ($R^2=0.990\ 53$)和 $y=5\ 700.509\ 09x+1\ 503.727\ 27$ ($R^2=0.998\ 0$), 符合测定要求。经过对 GUS 酶活性的数据统计, 结果表明野生型三孢布拉霉基本无催化 4-MUG 的活性, 而 CaMV35S 和不同截短的 *btcrgA* 启动子对应菌株都具有一定的催化 4-MUG 的能力(图 5), 这间接表明了不同启动子相应驱动 GUS 表达的能力。在光照条件下, 不同启动子驱动 GUS 表达的能力由强到弱依次为: *procrGAF3*>*procrGAF2*>*procrGAF1*>CaMV35S。另外, 启动子 *procrGAF1* 和 *procrGAF* 在驱动 GUS 表达的能力上无显著差异, *procrGAF3* 则在驱动 GUS 表达能力上约为 *procrGAF2* 的 2 倍, 两者之间差异显著($P<0.05$)。不同种类、数量的顺式作用元件和转录因子结合位点的不同, 最后都会影响启动子驱动基因的表达结果, 启动子片段 *procrGAF3* 比 *procrGAF2* 强, 在启动子序列的 989–632 bp 区间内可能有较强的转录抑制元件。同样地, 在 1 499–989 bp 区间也含有转录抑制元件, 而 *procrGAF1* 和 *procrGAF* 启动子片段驱动 GUS 表达的能力相近。但通过启动子序列的分析结果表明, 在这一区间内有多和增强子相关的 CAAT-box 元件, 说明在 2 186–1 499 bp 之间可能存在能够抵消 CAAT-box 带来的增强转录水平的抑制元件。通过对黑暗条件和光照条件下各个启动子活性的对比发现, 光照条件下 *procrGAF* 和 *procrGAF1* 的启动子活性与黑暗条件下 *procrGAF* 和 *procrGAF1* 的启动子活性之间差异显著, 即在启动子的 1 499–989 bp 之间存在依

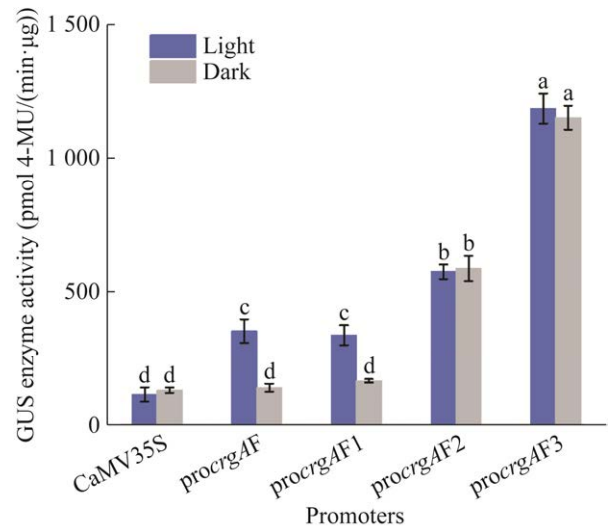


图 5 CaMV35S 启动子和截短突变的 *btcrgA* 启动子片段三孢布拉霉表达 GUS 酶活性 不同小写字母表示差异显著

Figure 5 GUS enzyme activity expressed by *Blakeslea trispora* with different length promoter fragments. Different lowercase letters indicate significant difference.

赖光激活的响应元件发挥作用。对启动子该处区域进行分析, 发现该区域包含了 AE Box、G Box 和 SP1 等光响应元件。*procrGAF2* 和 *procrGAF3* 启动子分别在黑暗和光照条件下的活性都无明显变化, 但在 *procrGAF3* 的 632 bp 序列内有一个 Box 4 顺式作用元件(参与光响应的保守 DNA 模块的部分元件), Box 4 未发挥光调控可能是由于其需要和其他的元件共同作用^[24]。另外, *procrGAF3* 驱动 GUS 的表达能力为在三孢布拉霉体内表达外源基因提供了内源性的强启动子, 对激活元件和抑制元件在 *btcrgA* 启动子上的具体定位提供了研究基础。

3 结论

本研究克隆并分析了 *btcrgA* 上游启动子 2 000 bp 序列的顺式作用元件, 其中 Sp1、LAMP-element、TCT-motif、G-box、Box4 和

AE-box 等顺式作用元件均和光照有关。本研究根据预测的启动子中元件组成, 构建了 4 个不同长度的启动子截短突变片段, 驱动下游 GUS-mGFP5 融合蛋白的三孢布拉霉体内表达载体; 通过荧光信号观察和 GUS 酶活检测, 对构建的截短启动子活性进行了定性和定量分析, 结果表明 *crgAF3* 启动子驱动的 GUS 表达的酶活性最高, *btcrgA* 启动子的核心区位于 *crgAF3* 截短序列中, 且 4 个截短启动子在三孢布拉霉体内驱动外源基因表达的能力都高于 CaMV35S 启动子的活性; 黑暗和光照条件下 GUS 酶活结果表明, *btcrgA* 启动子的 1 499–989 bp 序列之间存在依赖光激活的顺式作用元件, 对下游基因的表达具有显著的调控作用。

REFERENCES

- [1] NAVARRO E, RUIZ-PÉREZ VL, TORRES-MARTÍNEZ S. Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*[J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(3): 800-807.
- [2] LORCA-PASCUAL JM, MURCIA-FLORES L, GARRE V, TORRES-MARTÍNEZ S, RUIZ-VÁZQUEZ RM. The RING-finger domain of the fungal repressor *crgA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(5): 1463-1474.
- [3] MURCIA-FLORES L, LORCA-PASCUAL JM, GARRE V, TORRES-MARTÍNEZ S, RUIZ-VÁZQUEZ RM. Non-AUG translation initiation of a fungal RING finger repressor involved in photocarotenogenesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(21): 15394-15403.
- [4] NICOLÁS-MOLINA FE, NAVARRO E, RUIZ-VÁZQUEZ RM. Lycopene over-accumulation by disruption of the negative regulator gene *crgA* in *Mucor circinelloides*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(1): 131-137.
- [5] RODRÍGUEZ-ORTIZ R, MICHELSE C, REP M, LIMÓN MC, AVALOS J. Genetic basis of carotenoid overproduction in *Fusarium oxysporum*[J]. Fungal Genetics and Biology: FG & B, 2012, 49(9): 684-696.
- [6] TAGUA VG, NAVARRO E, GUTIÉRREZ G, GARRE V, CORROCHANO LM. Light regulates a *Phycomyces blakesleeanus* gene family similar to the carotenogenic repressor gene of *Mucor circinelloides*[J]. Fungal Biology, 2020, 124(5): 338-351.
- [7] 巩尊洋, 罗玮, 杜瑶, 余晓斌. *crgA* 调控三孢布拉霉合成类胡萝卜素[J]. 微生物学报, 2017, 57(10): 1527-1535.
- [8] GONG ZY, LUO W, DU Y, YU XB. Regulation effect of *crgA* on carotenoid production in *Blakeslea trispora*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(10): 1527-1535 (in Chinese).
- [9] QUILES-ROSILLO MD, RUIZ-VÁZQUEZ RM, TORRES-MARTÍNEZ S, GARRE V. Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blakeslea trispora*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(2): 141-153.
- [10] LUO W, GONG ZY, LI N, ZHAO YZ, ZHANG HL, YANG X, LIU YT, RAO ZM, YU XB. A negative regulator of carotenogenesis in *Blakeslea trispora*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(6): e02462-19.
- [11] 胡益波, 皮畅钰, 张哲, 向柏宇, 夏立秋. 丝状真菌蛋白表达系统研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2020, 40(5): 94-104.
- [12] HU YB, PI CY, ZHANG Z, XIANG BY, XIA LQ. Recent advances in protein expression system of filamentous fungi[J]. China Biotechnology, 2020, 40(5): 94-104 (in Chinese).
- [13] 殷金瑶, 王义, 徐良向, 朱利, 王晨, 刘文波, 缪卫国. 橡胶树白粉菌(HO-73)启动子WY172不同长度片段的克隆及表达活性分析[J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 29-36.
- [14] YIN JY, WANG Y, XU LX, ZHU L, WANG C, LIU WB, MIAO WG. Cloning and expression analysis of different-length fragments of *Oidium heveae* (HO-73) promoter WY172[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(1): 29-36 (in Chinese).
- [15] GOLDBERG H, HELAAKOSKI T, GARRETT LA, KARSENTY G, PELLEGRINO A, LOZANO G, MAITY S, de CROMBRUGGHE B. Tissue-specific expression of the mouse alpha 2(I) collagen promoter. Studies in transgenic mice and in tissue culture cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(27): 19622-19630.
- [16] HUANG XN, LU XF, LI JJ. Cloning, characterization and application of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter from *Aspergillus*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014,

- 41(3): 585-592.
- [14] 岑由飞, 朱牧孜, 叶伟, 李赛妮, 钟国华, 章卫民. *Paramyothecium roridum* 中单端孢霉烯毒素生物合成基因启动子的克隆和功能鉴定[J]. 生物技术通报, 2021, 37(8): 85-94.
CEN YF, ZHU MZ, YE W, LI SN, ZHONG GH, ZHANG WM. Cloning and functional identification of trichothecene mycotoxin biosynthesis gene promoter from *Paramyothecium roridum*[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(8): 85-94 (in Chinese).
- [15] BHURIA M, GOEL P, KUMAR S, SINGH AK. The promoter of AtUSP is co-regulated by phytohormones and abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1957.
- [16] WANG Y, WANG C, RAJAOFERA MJN, ZHU L, LIU WB, ZHENG FC, MIAO WG. WY7 is a newly identified promoter from the rubber powdery mildew pathogen that regulates exogenous gene expression in both monocots and dicots[J]. PLoS One, 2020, 15(6): e0233911.
- [17] WANG YL, WANG YC, CHEN X, GAO N, WU Y, ZHANG HF. Protoplast fusion between *Blakeslea trispora* 14 271 (+) and 14 272 (-) enhanced the yield of lycopene and β -carotene[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 37(4): 58.
- [18] FRANDBSEN RJN. A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 87(3): 247-262.
- [19] LI DD, TANG Y, LIN J, CAI WW. Methods for genetic transformation of filamentous fungi[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 168.
- [20] MICHIELSE CB, HOOYKAAS PJJ, van den HONDEL CAMJJ, RAM AFJ. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. Current Genetics, 2005, 48(1): 1-17.
- [21] SCHMOLL M. Assessing the relevance of light for fungi: Implications and insights into the network of signal transmission[J]. Advances in applied microbiology, 2011, 76: 27-78.
- [22] GAO Y, ZAN XL, WU XF, YAO L, CHEN YL, JIA SW, ZHAO KJ. Identification of fungus-responsive cis-acting element in the promoter of *Brassica juncea* chitinase gene, *BjCH11*[J]. Plant Science, 2014, 215/216: 190-198.
- [23] KWON BR, KIM MJ, PARK JA, CHUNG HJ, KIM JM, PARK SM, YUN SH, YANG MS, KIM DH. Assessment of the core cryparin promoter from *Cryphonectria parasitica* for heterologous expression in filamentous fungi[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(2): 339-348.
- [24] 李濯雪, 陈信波. 植物诱导型启动子及相关顺式作用元件研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(10): 8-15.
LI ZX, CHEN XB. Research advances on plant inducible promoters and related cis-acting elements[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(10): 8-15 (in chinese).