

文章编号: 1673-1689(2011)02-0245-05

棘孢木霉木聚糖酶 II 结构基因和上游调控区的克隆及分析

庞漫宇¹, 郭丽琼^{1,2}, 林俊芳*^{1,2}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510640; 2. 华南农业大学生物质能研究所, 广东广州 510640)

摘要: 作者克隆及分析了棘孢木霉木聚糖酶 II 结构基因和上游调控区, 并获得了内源启动子。根据木霉属木聚糖酶 II 结构基因及上游调控区的保守性, 以棘孢木霉基因组 DNA 为模板, 进行简并 PCR 扩增, 产物纯化并克隆至 T 载体, 经酶切鉴定后进行序列分析。扩增获得片段长 1 875 bp, 由 795 bp 的木聚糖酶 II 结构基因和 1 080 bp 的上游调控区组成。结构基因编码 223 个氨基酸, 具有糖基水解酶第 11 家族的典型保守区域。上游调控区具备核心启动子和转录起始点, 有 CAAT-Box, TATA-Box 等启动子特征元件, 分析其还有 CreI, AreA, XlnR, Ace1, AlcR 等转录因子结合位点。综上所述, 克隆的 1 080 bp 上游调控区是典型的丝状真菌基因启动子, 可作为内源启动子用于构建棘孢木霉高效外源基因表达系统。

关键词: 棘孢木霉; 木聚糖酶 II; 基因克隆; 启动子

中图分类号: S 188

文献标识码: A

Cloning and Sequence Analysis of Xylanase II Structural Gene and Its 5' Flanking Region of *Trichoderma asperellum*

PANG M arryu¹, GUO L i qiong^{1,2}, LIN J uirfang*^{1,2}

(1. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou, 510640, China; 2. Institute of Biomass Energy, South China Agriculture University, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To study the native promoter of xylanase II of *Trichoderma asperellum*, cloning and sequence analysis of xylanase II structural gene and its 5' flanking region was performed. On the basis of the genomic conserved sequence of *Trichoderma spp.*, degenerate PCR was designed to amplify the xylanase II structural gene and its 5' flanking region of *Trichoderma asperellum*. The product was cloned into T vector and confirmed by EcoR I digestion. Sequence analysis showed that cloned fragment was 1 875 bp long, comprising the 795 bp xylanase II structure gene and its 1 080 bp 5 flanking region. The structure gene encoded a polypeptide of 223 amino acids, where the Glycohydro 11 superfamily domains were detected. In the 5' flanking region, core promoter region, transcriptional start site, CAAT-Box and TATA-Box were detected. Several typical transcriptional factor binding domain, such as CreI, AreA, XlnR, Ace1, AlcR were also found.

收稿日期: 2010-08-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071837); 广东省科技计划项目(2008B011000005)。

* 通信作者: 林俊芳(1962-), 男, 福建莆田人, 工学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事合成生物学工程与生物炼制方面的研究与开发。Email: junfanglin2003@yahoo.com.cn

The 1080 bp 5' flanking region was a typical promoter. The isolation of this native promoter can benefit the development of an efficient *Trichoderma asperellum* host system for gene expression.

Key words: *Trichoderma asperellum*, xylanase II, gene cloning, promoter

木聚糖酶(Xylanase)在造纸业、纺织业、食品及饲料行业被广泛应用,该酶以内切方式作用于木聚糖主链内部的 β 1,4木糖苷键,是降解木聚糖的最主要酶。近20年来,不少人对来自真菌的木聚糖酶的生化性质、三维结构以及其基因调控等进行了研究^[1-2]。其中,对来自瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)的木聚糖酶的研究发现,瑞氏木霉有两种性质各异的内切 β 1,4木聚糖酶,简称木聚糖酶I和木聚糖酶II,其相对分子质量分别为19 000和21 000,等电点分别为pI 5.2和pI 9.0,分别属于酸性蛋白质和碱性蛋白质^[3-4]。瑞氏木霉的木聚糖酶II,因其等电点(pI 9.0)和最适pH 6.0较高,在高pH值及高温条件下耐受性强,在工业生产中相对木聚糖酶I被更为广泛应用,实际应用价值更大。另外,对木聚糖酶II进行蛋白质改造也相对更容易^[5]。

棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)在国外被报道用作生防菌种,可有效抑制植物病害^[6],而在我国则属于新记录的木霉种^[7],目前国内对该菌种的开发利用尚处于起步阶段。棘孢木霉作为一种小型丝状真菌,在用作外源基因表达宿主上有着巨大的开发潜力。与细菌宿主相比,其具有表达量大、胞外分泌率高、蛋白质分子折叠和修饰系统接近高等真核细胞、生产的外源蛋白质具有天然活性等优点^[8]。

在对棘孢木霉LaTr01菌株的木聚糖酶I结构基因及上游调控区进行克隆分析的基础上,作者利用简并PCR方法,克隆其木聚糖酶II结构基因及上游调控区,并进行序列分析以及启动子特征分析,为进一步构建棘孢木霉的高效外源基因表达系统提供元件。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株 棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)LaTr01菌株及大肠杆菌(*E. coli*)Top10F'菌株:由华南农业大学食品学院生物炼制实验室保存。

1.1.2 试剂 克隆载体pGEM-T Easy:Promega公司产品;Taq DNA聚合酶、dNTP、EcoR I:均购

自广州东盛生物技术有限公司;琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒及质粒小样快速提取试剂盒:购自天根生化科技有限公司;常规试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR引物的设计与合成 从GenBank基因组数据库中获取了深绿木霉(*Trichoderma atroviride*),瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*),绿木霉(*Trichoderma virens*)的全基因组序列,同源比对分析了这3种木霉的木聚糖酶II结构基因及上游调控区的序列保守性,据此设计了1对简并引物,可用于扩增棘孢木霉的木聚糖酶II结构基因及其上游调控区。简并引物如下,WXF:5'-CNYYNC-CAGCTGAYTTTAGGC-3',WXR:5'-NMRYCANYCMYYTAGCTGAC-3'(简并碱基表示方法按国际惯用规则)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 棘孢木霉基因组DNA的提取 将棘孢木霉菌种接种于PDA固体培养基上,30℃培养3d后,收集菌丝提取基因组DNA。提取方法参照刘世强等^[9]的方法。

1.2.3 简并PCR 以棘孢木霉基因组DNA为模板,WXF/WXR为上下游引物,进行简并PCR。扩增的反应条件为:在50 μ L反应体系中,含5 μ L 10 \times Buffer、1 μ L dNTP(10 mmol/L)、0.5 μ L Taq DNA聚合酶(5 U/ μ L)、1.5 μ L WXf(50 μ mol/L)、1.5 μ L WXR(50 μ mol/L)、1 μ L基因组DNA、39.5 μ L无菌去离子水。反应参数为:94℃预变性5 min,94℃变性40 s,50℃退火30 s,72℃延伸2 min,35个循环后在72℃继续延伸7 min。PCR产物用1 g/dL琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 PCR产物的回收、克隆及阳性克隆的鉴定

PCR产物经1 g/dL琼脂糖凝胶电泳后,参照琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒的使用说明进行目标片段回收,采用Nano Drop分光光度计ND-1000检测浓度,并按Promega公司提供的方法,将目标片段与pGEM-T Easy载体连接。连接产物转化大肠杆菌*E. coli* Top10F'感受态细胞,菌液涂布于含氨苄青霉素的LB平板上(含X-gal和IPTG)。倒置平板于37℃培养16 h后,挑出白色单菌落,提取质粒,并进行EcoR I酶切鉴定,以获得阳性重组子。

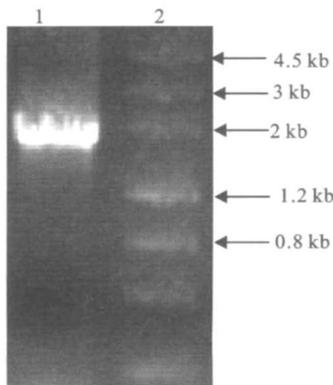
将酶切鉴定正确的阳性重组质粒送往华大基因有限公司进行 DNA 序列测定。

1.2.5 序列的生物信息学分析 采用美国国立生物信息中心 (NCBI) 在线核酸序列比对程序 (BLASTn) 进行目的片段同源分析, 利用 DNAMAN 软件进行核苷酸及氨基酸序列分析, Promoter Prediction 进行核心启动子及转录起始位点预测, GENSCAN 进行内含子分析, SignalP 3.0 进行信号肽预测。

2 结果与分析

2.1 基因的 PCR 扩增

以 WXF/WXR 为引物, 棘孢木霉基因组 DNA 为模板, 进行简并 PCR 扩增, PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析, 见图 1。可扩增出约 1.9 kb 的片段, 与预测的木聚糖酶 II 结构基因及上游调控区序列总长一致。



1. PCR 产物; 2. DNA Marker III

图 1 目的片段的 PCR 扩增

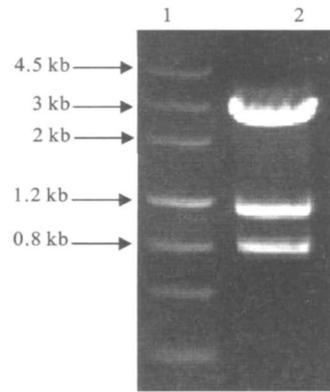
Fig. 1 Amplification of target fragment by PCR

2.2 重组质粒酶切鉴定

将扩增片段克隆至 pGEM-T Easy 载体上, 通过蓝白斑筛选, 选取拟重组子进行 *EcoR* I 酶切鉴定, 见图 2。可以看出, 重组质粒经 *EcoR* I 酶切可切出一条约 3 000 bp 的 T 载体片段。另外, 插入片段中预期有一 *EcoR* I 酶切位点, 会使 1 900 bp 的插入片段被切成两段, 分别为 1 100 bp 及 800 bp, 电泳检测结果显示与预期一致。表明 1 900 bp 的目的片段已经成功克隆至 pGEM-T Easy 载体中。

2.3 序列测定及分析

对 1 900 bp 的目的片段进行测序, 得到包含上游调控区和结构基因在内的棘孢木霉木聚糖酶 II 基因序列, 并推导其编码的氨基酸序列, 见图 3。分析表明该基因长 1 875 bp, 由 795 bp 的木聚糖酶 II 结构基因和 1 080 bp 的上游调控区组成。GEN-



1. DNA Marker III; 2. *EcoR* I 酶切后的重组子

图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmids by *EcoR* I digestion

SCAN 分析显示, 结构基因由两个外显子及一个 112 bp 的内含子组成 (图 3 波浪线表示)。外显子总长 672 bp, 从起始密码子 ATG 到终止子 TAA (图 3 双下划线表示) 共编码 223 个氨基酸, 氨基酸序列分析表明, 编码蛋白相对分子质量为 24 200, 等电点 pI 8.59, 属于碱性蛋白质, 其中 43~222 AA 含有糖基水解酶第 11 家族的典型保守区域, 表明该编码蛋白质具有水解木聚糖的结构区域。BLASTn 分析发现该编码蛋白与绿木霉木聚糖酶 (GenBank AAP83925) 相似性高达 99%, 与瑞氏木霉木聚糖酶 II (Swiss-Prot P36217.1) 有 81% 相似。

氨基酸序列的跨膜分析显示, 蛋白质的 N 端含有明显的跨膜区, 范围介于 4~22 AA 之间, 表明该区域可能存在信号肽剪切位点。进一步用 SignalP 3.0 对信号肽进行预测, 发现 19 AA 与 20 AA 之间有明显的信号肽剪切位点信号, 这与跨膜区分析结果吻合, 据此判断 1~19 AA 为信号肽 (图 3 粗下划线表示), 20~223 AA 为成熟肽。

对上游调控区的 BLASTn 分析未发现高度相似序列。Promoter Prediction 预测发现, 上游调控区的两个核心启动子区, 分别在 437~487 bp 及 879~929 bp 区间内 (图 3 虚下划线表示), 两个转录起始点分别在 477 bp 及 919 bp (图 3 实心三角部位)。启动子特征元件方面, 在 163 bp 及 352 bp 处发现了 CAAT-Box, 在 154、526、964 bp 处发现 TATA-Box (图 3 阴影方框表示)。TATA-Box 决定着 RNA 聚合酶 II 的位置, 在很多情况下会影响到基因的转录水平, 与具有控制转录起始频率的 CAAT-Box 作为真核基因启动子的上游元件, 可以极大地提高基本启动子的低水平转录活性^[10]。

此外, 上游调控区内还发现了某些转录因子的

结合位点,其中 CreI 结合位点 3 个,AreA 结合位点 2 个, XlnR、Acel、AlcR 位点各 1 个(图 3 方框表示)。CreI 为碳源抑制蛋白,参与抑制基因转录,其识别序列为 SYGGRG^[11]; AreA 介导氮代谢抑制,是 GATA 家族的转录激活因子^[12]; XlnR 是木糖依赖转录激活因子的结合位点,通过与相应转录因子的结合,能够激活纤维素酶基因以及半纤维素酶基因的表达,结合序列为 GGCTRA^[13]; Acel 是一种转录调控蛋白,结合序列为 AGGCA,对 Acel 基因缺失、在不同诱导条件下对主要的纤维素酶与半纤

维素酶基因表达的研究发现, Acel 具有抑制转录的作用^[14]; AlcR 是构巢曲霉乙醇利用途径中的一种特异反式作用因子,具有激活转录作用,其结合序列为 CCGCA^[15]。

从分析结果可以看出,上游调控区具备了核心启动子区、转录起始点和启动子特征元件。此外,还具有多个典型的丝状真菌蛋白结合位点,受多种转录激活因子、阻遏蛋白、增强子的调控。表明所克隆到的 1 080 bp 的上游调控区是典型的丝状真菌基因启动子。

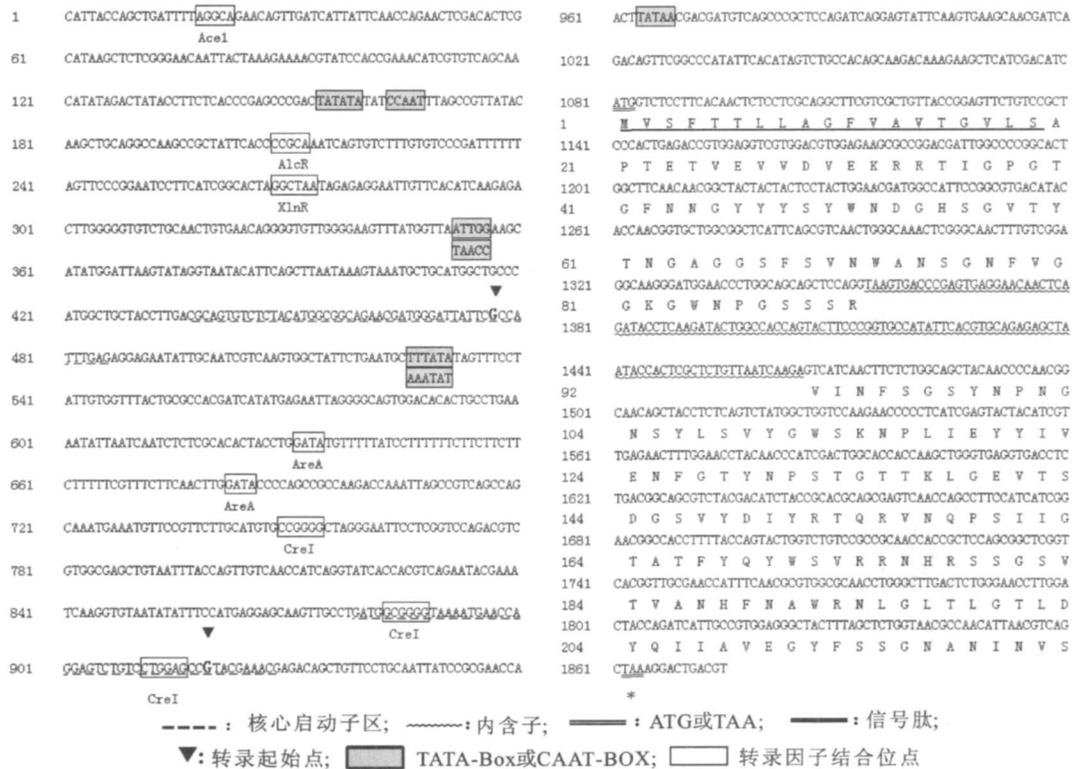


图 3 棘孢木霉木聚糖酶 II 结构基因及上游调控区的序列分析

Fig. 3 Sequence analysis of xylanase II structural gene and its 5' flanking region from *Trichoderma asperellum*

3 结 语

高效表达的基因,其启动子必定具有较高的转录起始效率。选择强启动子构建外源基因表达系统,是提高外源蛋白质表达量的一种重要策略。另外,启动子与受体细胞之间的合理匹配是外源基因在宿主细胞中表达的关键。同源启动子有利于受体细胞调控因子的识别,减少甲基化,促进外源基因整合到染色体上,从而提高转化效率和外源基因的表达效率^[16]。瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)的纤维二糖水解酶 I 启动子(cbh1),是瑞氏木霉的内源强启动子。Margolles-Clark 等人利用 cbh1 启动

子高效介导了内切几丁质酶的表达,其总酶活力比原来提升了 10 倍^[17]。

已经发现棘孢木霉 LaTr01 是一株产木聚糖酶活力较高的菌株,并克隆获得了其木聚糖酶 I 的启动子^[18]。对棘孢木霉木聚糖酶 I 和 II 的启动子进行比较发现,其都具有相似的 CAAT-Box 和 TATA-Box 等特征元件以及相同的 CreI, XlnR, Acel, AreA 等转录因子结合位点。然而,Zeilinger 等人在转录水平上的研究指出,瑞氏木霉的木聚糖酶 I 和木聚糖酶 II 表达调控机制存在差异,会受不同的诱导剂调控^[19]。葡萄糖对两者的诱导存在差异,当葡萄糖作惟一碳源时,木聚糖酶 II 表现出基

础水平的表达, 而木聚糖酶 I 表达被完全抑制。当使用木聚糖、木二糖或槐糖作碳源时, 木聚糖酶 II 的表达提高, 然而葡萄糖的添加会抑制其表达^[20]。相反, 木聚糖酶 I 受木糖诱导, 葡萄糖的添加不影响其表达^[21]。另有研究指出, 两种酶的表达受各自的

降解产物诱导, 木聚糖酶 I 受其降解产物木糖所诱导, 而木聚糖酶 II 受木二糖诱导^[22]。综上所述, 木聚糖酶 II 与木聚糖酶 I 的表达调控存在异同, 作者克隆的棘孢木霉木聚糖酶 II 启动子, 可为进一步构建棘孢木霉的高效外源基因表达系统提供表达元件。

参考文献(References):

- [1] Mach R L, Zeilinger S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2003, 60(5): 515- 522.
- [2] 刘亮伟, 杨海玉, 胡瑜, 等. F/10 木聚糖酶研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(6): 727- 732.
LIU Liang wei, YANG Hai yu, HU Yu, et al. A review of F/10 xylanase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(6): 727- 732. (in Chinese)
- [3] Tenkanen M, Puls J, Poutanen K. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*[J]. **Enzyme Microb Technol**, 1992, 14(2): 566- 574.
- [4] Törrönen A, Mach R L, Messner R. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes[J]. **Nat Biotechnol**, 1992, 10(1): 1461- 1467.
- [5] Liu J, Sun S Y, Wang T H. Construction of a yeast one hybrid system with the xylanase2 promoter from *Trichoderma reesei* to isolate transcriptional activators[J]. **Lett Appl Microbiol**, 2004, 38(4): 277- 282.
- [6] Cotxarrera L, Trillas Gay M I, Steinberg C, et al. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato[J]. **Soil Biol Biochem**, 2002, 34(4): 467- 476.
- [7] 章初龙, 徐同. 我国河北、浙江、云南及西藏木霉种记述[J]. 菌物学报, 2005, 24(2): 184- 192.
ZHANG Chu long, XU Tong. Records of *Trichoderma* species from Hebei, Zhejiang, Yunan and Tibet of China[J]. **Mycosystema**, 2005, 24(2): 184- 192. (in Chinese)
- [8] Archer D B, Pecherdy J F. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi[J]. **Crit Rev Biotechnol**, 1997, 17(4): 273- 306.
- [9] 刘世强, 杨丽卿, 郭丽琼, 等. 草菇 ras 启动子区域的克隆及其序列分析[J]. 食用菌学报, 2004, 11(1): 1- 6.
LIU Shi qiang, YANG Li qing, GUO Li qiong, et al. Cloning and sequence analysis of ras promoter region from *Volvariella volvacea*[J]. **Acta Edulis Fungi**, 2004, 11(1): 1- 6. (in Chinese)
- [10] 孙晓红, 陈明杰, 潘迎捷. 启动子克隆概述[J]. 食用菌学报, 2002, 9(3): 57- 62.
SUN Xiao hong, CHEN Ming jie, PAN Ying jie. A brief account of promoter cloning[J]. **Acta Edulis Fungi**, 2002, 9(3): 57- 62. (in Chinese)
- [11] Takashima S, Iikura H, Nakamura A, et al. Analysis of CreI binding sites in the *Trichoderma reesei* cbh1 upstream region[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 1996, 145(3): 361- 366.
- [12] Starich M R, Wikstrom M, Arst H N, et al. The solution structure of a fungal AreA protein-DNA complex: an alternative binding mode for the basic carboxyl tail of GATA factors[J]. **J Mol Biol**, 1998, 277(3): 605- 620.
- [13] Marui J, Tanaka A, Mimura S, et al. A transcriptional activator, AoXlnR, controls the expression of genes encoding xylanolytic enzymes in *Aspergillus oryzae*[J]. **Fungal Genetics Biol**, 2002, 35(2): 157- 169.
- [14] Nina A, Marja I, Anu S, et al. AceI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2003, 69(1): 56- 65.
- [15] Mathieu M, Fillinger S, Felenbok B. In vivo studies of upstream regulatory cis acting elements of the AlcR gene encoding the transactivator of the ethanol regulon in *Aspergillus nidulans*[J]. **Mol Microbiol**, 2000, 36(1): 123- 131.
- [16] Hirano T, Sato T, Okawa K, et al. Isolation and characterization of the glyceroldehydes 3 phosphate dehydrogenase gene of *Lentinus edodes*[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 1999, 63(7): 1223- 1227.
- [17] Margolles Clark E, Harman G E, Penttila M. Enhanced expression of endochitinase in *Trichoderma harzianum* with the cbh1 promoter of *Trichoderma reesei*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1996, 62(6): 2152- 2155.
- [18] Margolles Clark E, Ilmen M, Penttil M. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources[J]. **J Biotechnol**, 1997, 57(1): 167- 179.
- [19] Zeilinger S, Mach R L, Schindler M, et al. Different inducibility of expression of the two xylanase genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei*[J]. **J Biol Chem**, 1996, 271(41): 25624- 25629.
- [20] Würleitner E, Pera L, Wacenovský C, et al. Transcriptional regulation of *xyn2* in *Hypocrea jecorina*[J]. **Eukaryotic Cell**, 2003, 2(1): 150- 158.
- [21] Mach R L, Strauss J, Zeilinger S, et al. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xyn1*) gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. **Mol Microbiol**, 1996, 21(6): 1273- 1281.