

研究简报

康氏木霉中调控纤维素酶形成的两个调控因子的克隆及功能性分析

凌敏^{1,2}, 覃拥灵¹, 李楠¹, 梁智群¹

1 广西大学生命科学与技术学院 亚热带生物资源保护和利用重点实验室, 南宁 530004

2 广西医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 南宁 530021

摘要: 锌指蛋白 ACEI 和 Xyr1 是里氏木霉中调控纤维素酶和木聚糖酶形成的两个调控因子, 它们能竞争性结合木聚糖酶基因 *xyn1* 的启动子。为进一步研究 ACEI 和 Xyr1 调控纤维素酶基因表达的机制, 本研究利用 PCR 技术扩增康氏木霉 ACEI 和 Xyr1 DNA 结合区的基因序列, 并使其在大肠杆菌中得到表达。凝胶迁移率移动试验表明 ACEI 和 Xyr1 的 DNA 结合区均可与纤维素酶基因 *cbh1* 启动子的 287 bp 序列特异性结合。提示 ACEI 与 Xyr1 不仅能竞争性结合 *xyn1* 启动子, 也能竞争性结合 *cbh1* 启动子。

关键词: 调控因子, 纤维素酶, 凝胶迁移率移动试验

Cloning and Functional Analysis of Two Regulators Involved in Regulation of Cellulase Formation in *Trichoderma koningii*

Min Ling^{1,2}, Yongling Qin¹, Nan Li¹, and Zhiquan Liang¹

1 Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China

2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: ACEI and Xyr1 are two regulators that potentially involve in regulation of cellulases and xylanases formation in *Trichoderma reesei*, they compete for a binding site in the *xyn1* (Xylanase1-encoding) gene promoter. To further investigate the mechanism for the transcriptional regulation of cellulases, DNA-binding domains of both ACEI and Xyr1 in *T. Koningii* were expressed from *E. coli*. They both showed bindings to the *cbh1* promoter fragment (−304 bp to −18 bp) by electrophoresis mobility shift assays, suggesting ACEI and Xyr1 not only compete for binding to *xyn1* promoter but also to *cbh1* promoter.

Keywords: regulator, cellulase, electrophoresis mobility shift assay

木霉纤维素酶由三类酶组分构成^[1]: (1) 外切纤维二糖水解酶(Cellobiohydrolase, CBH); (2) 内切葡聚糖酶(Endoglucanase, EG); (3) β -葡萄糖苷酶

(β -glucosidase, BG)。其中, CBH 是降解天然纤维素主要的酶组分。纤维素酶属诱导型酶类, 纤维二糖、槐糖、山梨糖、龙胆二糖、甲基-葡萄糖苷、纤维二

Received: March 8, 2008; **Accepted:** September 2, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 20066001), the Open Fund of Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization (No. SB0709).

Corresponding author: Zhiquan Liang. Tel/Fax: +86-771-3270733; E-mail: zqliang@gxu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 20066001), 广西亚热带生物资源保护和利用重点实验室开放课题(No. SB0709)资助。

糖内酯和乳糖等对纤维素酶合成有诱导作用, 其中槐糖的诱导能力最为强烈^[2,3]。已经证明纤维素酶的诱导合成为转录水平调控, *cbh1*、*cbh2*、*eg1*、*eg2* 等纤维素酶基因的表达是通过 ACEI、ACEII 和 Xyr1 等调控因子进行调节的^[4]。但调节的机制尚不够清楚。鉴于此, 本研究应用大肠杆菌系统表达了康氏木霉纤维素酶的 2 个调控因子 ACEI 和 Xyr1 的 DNA 结合区, 并利用凝胶迁移率移动试验分析了它们与 *cbh1* 启动子的结合特性, 为阐明真菌纤维素酶基因的表达调控机制做了进一步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

康氏木霉 *Trichoderma koningii* G-39 和大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 为本实验室保存, 质粒 pGEX-4T-3 购自 Amersham Pharmacia 公司。

1.1.2 培养基和培养条件

从培养 5 d 的土豆汁斜面培养基刮取康氏木霉孢子, 制备孢子悬液。康氏木霉的基本培养基为 Mandels 营养盐^[5]并加 1% 山梨醇为碳源。接种 10^6 孢子于 50 mL 基本培养基, 摇瓶培养条件为 28°C, 160 r/min。

1.1.3 主要试剂及试剂盒

总 RNA 提取试剂盒、一步法 RT-PCR 试剂盒购自杭州博日科技有限公司。DIG Gel Shift 试剂盒购自 Roche 公司。*Pfu* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶购自大连宝生物公司, 其它试剂均购自上海生工生物工程公司。DNA 测序委托大连宝生物公司进行。寡核苷酸引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 真菌 DNA 和 RNA 提取及鉴定

康氏木霉孢子于摇瓶培养 48 h, 过滤收集菌丝体, 用 0.9% NaCl 洗涤 2 次, 液氮中研磨成细粉状, 然后参照 Raeder^[6]和 Chomczynski^[7]的方法分别进行 DNA 及 RNA 的提取与鉴定。

1.2.2 DNA 片段的克隆

根据 *T. koningii cbh1* 序列^[8], 设计 Pcbh1 引物对, PCR 扩增 *cbh1* 启动子 287 bp 片段(-304 bp 到 -18 bp)。根据 *T. reesei* 的纤维素酶调控因子 *ace1* 基因序列^[9], 设计 *ace1* 引物对(引物 5'端分别添加 *Bam*H I 和 *Eco*R I), PCR 扩增 ACEI 的 DNA 结合区(382~528aa)的 DNA 序列(约 459 bp)。上述 PCR 以康氏木霉基因组 DNA 为模板, 扩增条件为: 95°C 预变性 2 min, 94°C 变性 50 s, 59°C 退火 30 s, 72°C 延伸 50 s, 30 个循环, 72°C 再延伸 5 min。根据 *T. reesei* 的木聚糖酶调控因子 *xyr1* 基因序列^[10], 设计 *xyr1* 引物对(引物 5'端分别添加 *Bam*H I 和 *Eco*R I), 以康氏木霉 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 一步法扩增 Xyr1 的 DNA 结合区(55~159 aa)的 cDNA 序列(约 423 bp)。RT-PCR 一步法反应的条件为: 45°C 温育 30 min, 95°C 灭活 3 min, 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 50 s, 30 个循环, 72°C 再延伸 5 min。RT-PCR 一步法反应液按说明书配制(各引物对序列见表 1)。

1.2.3 融合蛋白表达质粒的构建

将 PCR 扩增得到 ACEI 的 DNA 结合区编码序列和 Xyr1 的 DNA 结合区编码序列用 *Bam*H I, *Eco*R I 双酶切后分别与用相同限制酶处理的 pGEX-4T-3 质粒连接, 构建融合表达质粒 pGEX-A1 和 pGEX-X1。

1.2.4 GST-融合蛋白的表达和纯化

将表达质粒 pGEX-A1 和 pGEX-X1 分别转化入

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列
Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Name	Sequence (5'-3')	Position
Pcbh1.f	GGTAGGATCGAACACACTGC	-304 to -284 (<i>cbh1</i> promoter)
Pcbh1.r	GACTATTGGGTTTCTGTGCC	-38 to -18 (<i>cbh1</i> promoter)
ace1.f	CGCGGATCCATGCGGTCCATGGCCCGCCG	1144 to 1163 (<i>ace1</i> gene)
ace1.r	CCGGAATTCGTAGCTGGGCGTGGAGGAAG	1584 to 1565 (<i>ace1</i> gene)
xyr1.f	CGAGGATCCGAGCTTTCGAGTTCACGCATG	163 to 183 (<i>xyr1</i> gene)
xyr1.r	TTTGAATTCCTCAATGTGGCCATGAG	651 to 635 (<i>xyr1</i> gene)

大肠杆菌 BL21(DE3), 挑单克隆接种于含 100 mmol/L Amp、50 mmol/L 葡萄糖的 LB 培养液中, 30°C、90 r/min 摇床培养至 OD_{600} 约为 0.5 后, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 再于 37°C、160 r/min 摇床诱导培养 2 h。离心收集菌体, 超声破菌后离心。取上清做 SDS-PAGE。用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱 (Amersham Pharmacia Biotech) 对 GST-融合蛋白进行分离纯化。SDS-PAGE 验证分离得到的蛋白质。蛋白质定量采用考马斯亮蓝染色法。

1.2.5 凝胶迁移率移动试验(EMSA)

PCR 扩增得到的 *cbh1* 启动子 287 bp 片段用胶回收试剂盒纯化。经紫外分光光度测定含量后, 用 TEN 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0)稀释为 3~4 pmol/ μ L。然后按 DIG Gel Shift 试剂盒说明书提供的方法制备探针, -20°C 保存备用。在结合缓冲液(20 mmol/L Hepes (pH 7.6), 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 1 mmol/L DTT, 30 mmol/L KCl, 1% Tween 20, 1 μ g poly(dI-dC), 0.1 μ g polyL-lysine)中加入 1 ng 标记好的 DNA 探针和 1 μ g GST-融合蛋白。室温反应 15 min 后, 将样品按照 DIG Gel Shift 试剂盒操作手册进行非变性 PAGE 凝胶电泳, 电转移至尼龙膜以及化学发光检测。

2 结果

2.1 PCR 产物的鉴定

PCR 扩增的产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、紫外检测后, 可见 3 条分子量约为 287 bp、459 bp 和 423 bp 的区带出现(图 1), 与预期的大小基本一致。表明这些 PCR 产物分别是 *cbh1* 启动子片段(-304 bp~-18 bp)、ACEI 的 DNA 结合区的 DNA 片段和 Xyr1 的 DNA 结合区的 cDNA 片段。各 PCR 产物经 DNA 测序, 与里氏木霉(*T. reesei*)完全一致。

2.2 ACEI 和 Xyr1 的 DNA 结合区在大肠杆菌中的表达

将 ACEI 的 DNA 结合区的 DNA 片段和 Xyr1 的 DNA 结合区的 cDNA 片段用 *Bam*H I, *Eco*R I 双酶切后, 分别插入到 pGEX-4T-3 进行表达质粒构建。表达质粒经大小、酶切鉴定, 得到正确克隆 pGEX-A1 和 pGEX-X1。表达质粒 pGEX-A1 和 pGEX-X1 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)进行蛋白表

达, 结果发现: 在超声破菌上清中出现大小约为 43 kD 和 42 kD 的目的条带(图 2 箭头所指), 说明 ACEI 的 DNA 结合区(GST-ACEI)和 Xyr1 的 DNA 结合区(GST-Xyr1)得到了可溶性表达。利用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱对上清中的 GST-融合蛋白进行分离纯化, 获得 GST-ACEI 和 GST-Xyr1 融合蛋白(图 2 中泳道 4 和 5)。

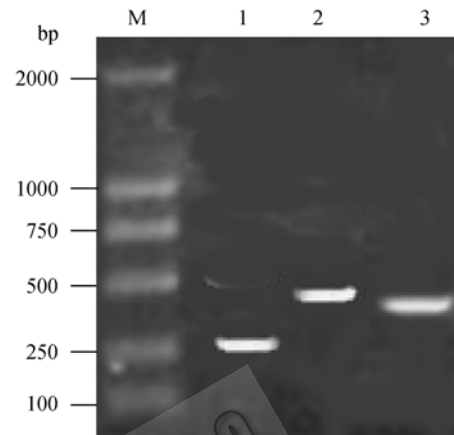


图 1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 PCR products analysis by agarose gel electrophoresis

M: DL2000 DNA marker; 1: *cbh1* promoter DNA fragment; 2: DNA fragment coding for the DNA-binding domain of ACEI; 3: cDNA fragment coding for the DNA-binding domain of Xyr1

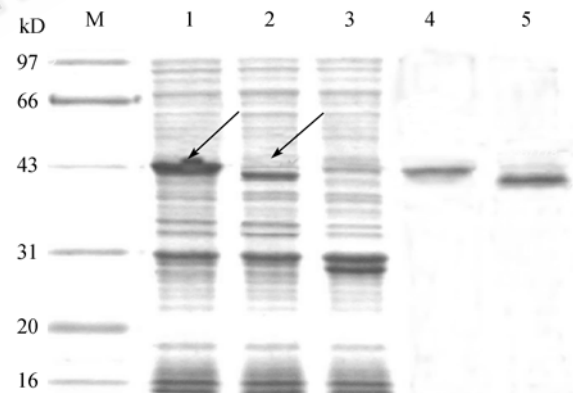


图 2 蛋白纯化产物的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant GST-fusion proteins

M: protein molecular weight markers; 1~3: the supernatants of *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with pGEX-A1, pGEX-X1 and pGEX-4T-3 (control), respectively; 4, 5: purified recombinant GST-ACEI and GST-Xyr1

2.3 ACEI, Xyr1 与 *cbh1* 启动子的结合

将 GST-ACEI、GST-Xyr1 融合蛋白分别与克隆得到的 *cbh1* 启动子片段(-304 bp~-18 bp)做凝胶迁移率移动试验(EMSA)。图 3 表明 GST-ACEI 和 GST-Xyr1 均能与 *cbh1* 启动子结合(有阻滞带)。另外, 在竞争性移动试验中, 当加入 100 倍过量的未标记

的 DNA 片段时,发现阻滞带消失或大大减弱,这说明 GST-ACEI 和 GST-Xyr1 与相应 DNA 片段的结合是特异性的。

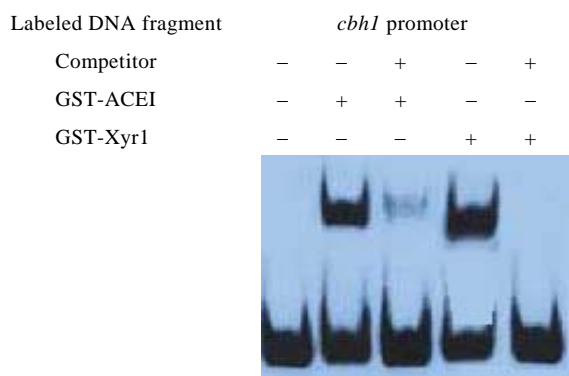


图 3 纯化蛋白的凝胶迁移率移动试验

Fig. 3 Binding of GST-ACEI and GST-Xyr1 to the *cbh1* promoter
A chemiluminescence image showing mobility shifts of labeled *cbh1* promoter fragment (-304 bp to -18 bp) in the EMSA analysis with purified GST-ACEI or GST-Xyr1 fusion proteins. In the competition experiments, a 100-fold excess amount of unlabeled *cbh1* promoter fragment was added as competitor

3 讨论

早期的研究表明^[11,12],木霉纤维素酶的生物合成受诱导和阻遏 2 种机制的调控。在葡萄糖培养条件下,存在阻遏蛋白 CREI 介导的阻遏机制;在纤维素或它的派生物诱导下,纤维素酶基因的表达显著增加。2000 年和 2001 年,Saloheimo 和 Aro 先后从里氏木霉分离得到 2 种调控纤维素酶 *cbh1* 基因转录的蛋白因子 ACEI^[9] and ACEII^[13]。随后,ACEI 被证实为调控纤维素酶和木聚糖酶表达的抑制因子^[14],*cbh1* 启动子上的 287 bp 序列(-304 bp~-18 bp)被证实为调控基因转录的区域^[4]。最近,在里氏木霉又发现了能调控木聚糖酶 *xyn1* 的转录激活因子 Xyr1^[10],Xyr1 能与抑制因子 ACEI 竞争 *xyn1* 启动子上的一个结合位点 GGCTAA。

为了验证 ACEI 和 Xyr1 是否也与 *cbh1* 启动子竞争性的结合,本研究扩增了康氏木霉 ACEI 和 Xyr1 DNA 结合区的基因序列,并使其在大肠杆菌表达出融合蛋白 GST-ACEI 及 GST-Xyr1。克隆的 ACEI 和 Xyr1 DNA 结合区的基因序列经测序分析与里氏木霉完全一致,进一步证实了以往报告的 *T. koningii* G-39 是源自 *T. reesei* QM9414 的说法^[15]。从氨基酸序列来看,ACEI 的 DNA 结合区含有 3 个

Cys₂-His₂ 型锌指结构域,Xyr1 DNA 结合区含有 GAL4-Zn(II)₂Cys₆ 双核簇结构域,这提示了 ACEI 和 Xyr1 很可能是丝状真菌中特异的调控蛋白。将融合蛋白 GST-ACEI 和 GST-Xyr1 分别与 *cbh1* 启动子的 287 bp 序列做 EMSA 试验可看出 GST-ACEI 和 GST-Xyr1 均可以与 *cbh1* 启动子的 287 bp 序列结合。由于 *cbh1* 启动子 287 bp 序列中也存在 GGCTAA 位点,故我们推断,ACEI 和 Xyr1 除了能与 *xyn1* 启动子竞争结合之外,也能竞争结合 *cbh1* 启动子 287 bp 序列中的 GGCTAA 位点。在葡萄糖阻遏条件下,抑制因子 ACEI 结合于 GGCTAA 位点,阻止了激活因子 Xyr1 与之结合,关闭 *cbh1* 基因的转录;在纤维素,槐糖等诱导下,Xyr1 能与 GGCTAA 位点结合,启动基因转录。

本试验中,运用大肠杆菌系统表达出来的融合蛋白 GST-ACEI 和 GST-Xyr1 未经复性条件下,在体外即可以与 *cbh1* 启动子上的特定位点特异性结合,表明在大肠杆菌中可溶性表达的 ACEI 的 DNA 结合区和 Xyr1 的 DNA 结合区都保持了其特定的 DNA 识别和结合特性,具有特定的生物学活性,可为锌指蛋白与核酸相互作用的研究提供便利。本研究证明了调控因子 ACEI 和 Xyr1 可与 *cbh1* 启动子结合,对阐明真菌纤维素酶基因表达调控机制具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Beguin P. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu Rev Microbiol*, 1990, **44**: 219-248.
- [2] Kawamori M, Morikawa Y, Talasawa S. Inductive formation of cellulase by L-sorbose in *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, **22**: 235-236.
- [3] Morikawa Y, Ohashi T, Mantani O, et al. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-37. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **44**: 106-111.
- [4] Mach RL, Zeilinger S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **60**: 515-522.
- [5] Mandels M, Reese ET. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J Bacteriol*, 1960, **79**: 816-826.
- [6] Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol*, 1985, **1**: 17-20.
- [7] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**(1): 156-159.
- [8] Wey TT, Hseu TH, Huang L. Molecular cloning and

- sequence analysis of the cellobiohydrolase I gene from *Trichoderma koningii* G-39. *Curr Microbiol*, 1994, **28**: 31–39.
- [9] Saloheimo A, Aro N, Ilmen M, *et al.* Isolation of the *aceI* gene encoding a Cys2-His2 transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*, 2000, **275**(8): 5817–5825.
- [10] Rauscher R, Würleitner E, Aro N, *et al.* Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell*, 2006, **5**(3): 447–456.
- [11] Ilmén M, Thrane C, Penttilä M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol Gen Genet*, 1996, **251**(4): 451–460.
- [12] Ilmén M, Saloheimo A, Onnela M, *et al.* Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(4): 1298–1306.
- [13] Aro N, Saloheimo A, Ilmen 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.
- [14] Aro N, Ilmen M, Saloheimo A, *et al.* ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Appl Envir Microbiol*, 2003, **69**(1): 56–65.
- [15] Lee CF, Liu DY, Hseu TH. Reidentification of cellulolytic enzyme-producing *Trichoderma* strains W-10 and G-39. *Can J Microbiol*, 2006, **52**(6): 570–574.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

结构生物学与现代药学研究

杨铭 主编

978-7-03-022253-4 ¥75.00 2008年8月10日出版

结构生物学是以生物大分子三维结构及其运动性的研究为基础，定量阐明生命现象的学科，而现代药物的合理设计大多是以结构生物学的研究成果为基础。本书侧重于药学研究中的结构生物学问题，作为《结构生物学与药学研究》的新版，更力求反映这一领域的最新研究进展。除了第一章绪论外，全书分为两篇：上篇为专论篇，共十五章；下篇为方法与技术篇，共十二章。首先概述结构生物学的研究现状和发展趋势，再从分子水平上探讨主要生物大分子的三维结构与生物功能的关系及药学研究前沿领域中的一些重要科学问题，最后介绍结构生物学研究的主要方法与技术。

本书可供生命科学相关领域中从事药学基础研究的科学工作者及医药院校、科研单位的教师、科研人员及研究生等参考。



木材液化物碳纤维的制备、结构与性能的研究

马晓军 赵广杰 著

978-7-03-022509-2 ¥38.00 2008年8月30日出版

碳纤维是先进复合材料中最重要的增强材料，是进入21世纪的最具诱惑的纤维增强材料。随着化石资源的日益短缺和环境的不断恶化，研究碳纤维化石原料的可替代资源显得非常重要。木材液化物作为化石资源的新型替代品而备受关注。经过国内外研究者近几年的不懈努力，以木材液化物为原料的碳纤维材料取得了重大进展。本书在参阅大量国内外文献和专利的基础，结合作者几年来生物质碳纤维研究工作的成果，全面介绍和论述了木材液化物纺丝液、原丝及其碳纤维材料的制备工艺和方法、反应机理、微观结构和性能，有助于开拓木材等生物质资源的综合利用和深入开发研究。

本书适合从事木材科学、碳素纤维、林产化工、轻化工程、环境工程及生物质资源综合利用等科研人员、工程技术人员、高校师生以及管理人员阅读与参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>