

黑曲霉 T21 *glaA* 5' 上游调控区的两个蛋白结合因子及其靶序列*

仇润祥 刘丽 朱兴国 唐国敏**

中国科学院微生物研究所, 北京 100080

摘要 采用凝胶阻滞法从糖化酶高产株黑曲霉(*Aspergillus niger*) T21 部分纯化的蛋白提取液中检测到与糖化酶基因(*glaA*) 5' *cis* 调控区特异结合的两个蛋白因子, 其一的靶 DNA 定位在 *glaA* 翻译起始点(ATG)上游 -580~-509 及 -318~-254bp 两个区域, 另一蛋白因子的靶 DNA 定位在 -809~-580 区域. -580~-509 序列含有“TATA”的重复结构, -318~-254 序列富含“GC”以及 -809~-580 序列含有 CCAAT 的特点暗示此 3 片段及其所结合的蛋白因子在 *A. niger* T21 *glaA* 的表达调控中可能有重要作用.

关键词 黑曲霉 糖化酶 凝胶阻滞 蛋白结合因子 靶 DNA

在以构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)等模式菌株为对象所进行的丝状真菌基因表达调控的研究中, 已经鉴定和分离了不少调控蛋白. 但工业丝状真菌遗传背景不清, 基因表达调控的研究进展缓慢, 且主要集中在对高表达基因 *cis* 调控区的鉴定及其功能分析上. 迄今有关转录调控基因或调控蛋白的分离只有 5 例, 即 1993 年首次从 *Aspergillus niger* 中克隆到分解代谢阻遏蛋白的编码基因 *creA*^[1], 1998 年报道了 *A. niger* 木聚糖水解途径的调节基因 *xlnR*^[2], Petersen 和 Gomi 又先后分离到米曲霉(*Aspergillus oryzae*)淀粉酶基因的转录因子 *amyR*^[3,4]. 最近又报道了瑞氏木霉(*Trichoderma reesei*)纤维素酶基因 *cbhI* 的调节基因 *aceI*^[5]和米曲霉中参与 TaKa 淀粉酶 A 基因高表达的结合蛋白 A_oCP^[6]. 可是, 丝状真菌高表达基因 *A. niger glaA* 的表达调控研究虽起步较早, 但在报道了 *glaA* 5' *cis* 调控区的功能分析后^[7,8], 至今未见有进一步的研究报告. 我们曾对 *A. niger* 糖化酶高产诱变株 T21 及其出发株 AS3.795 的 *glaA* 基因在分子水平上作了较广泛的比较研究^[9~11], 确定了反式调控的改变是导致 T21 糖化酶

产量大幅度提高的主要原因. 为从反式调控角度阐明 T21 高产的分子机制, 我们进行了 *glaA* 调控蛋白的鉴定和分离. 本文报告了我们在 40%~50% 硫酸铵饱和度的蛋白组分中检测到的两个在 *glaA* 5' *cis* 调控区上的蛋白结合因子及其靶序列的分析.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

黑曲霉 *A. niger* T21 为本组保存. 质粒 pUX-H_{ΔB800} 含有 T21 *glaA* 5' 上游 -809~-205bp 序列, 由本组构建^[11].

1.2 *A. niger* T21 总蛋白的提取

参照文献 [12] 进行. 材料来自淀粉培养的菌丝体. 提取缓冲液为: 20 mmol/L HEPES-KOH (pH 7.9), 100 mmol/L KCl, 5 mmol/L DTT, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, PepstatinA, Aprotinin, Leupeptin 各 10 mg/L. 蛋白提取液用硫酸铵和 KCl 沉淀作初步的分级分离. 从硫酸铵饱和度为 40%, 40%~50%, 50%~60%, 60%~70%, 70%~80%, 80%~100% 的沉淀所获得的蛋白质组

2001-04-18 收稿, 2001-06-08 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39870015)

** 联系人, E-mail: tgmwaq@yahoo.com.cn

分分别称为组分 I-VI. 蛋白含量用 Folin-酚法测定.

1.3 凝胶阻滞的探针制备

质粒 pUXH Δ B800 用适当的限制酶酶切、回收

T21 *glaA*5' 上游 -805 ~ -205bp 间的各特定片段 (见图 1), 分别用 Klenow 酶和 [α - 32 P]-dCTP 或 [α - 32 P]-dATP 标记, 纯化后用作探针.

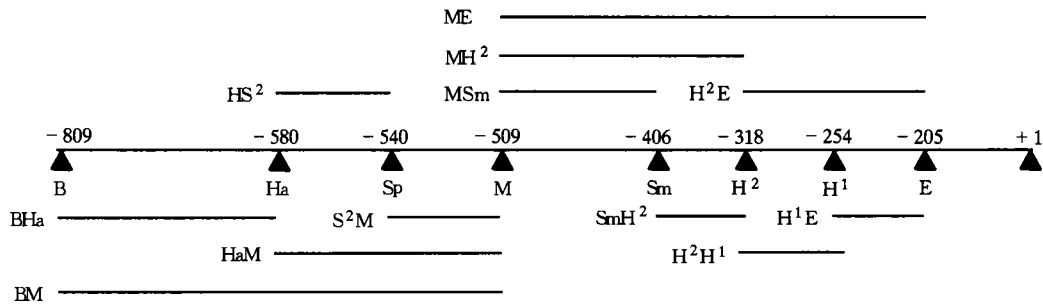


图 1 探针的物理图

E: *EcoRI*; H¹, H²: *HinfI*; Sm: *SmaI*; M: *MluI*; Sp: *SpeI*; Ha: *HaeIII*; B: *BamHI*

1.4 凝胶阻滞分析

参照文献 [13] 所述进行. 在 20 μ L 结合缓冲液 (25 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.9, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 20% 甘油, 1 mmol/L PMSF) 中, 含有 1 μ g 载体 DNA poly(dI-dC)-(dI-dC), 1 ng 标记探针 (2000 cpm), 适量蛋白提取液, 于 0 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后经 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 干胶, 放射自显影. 在竞争性凝胶迁移率变动分析中, 除先加入总量 100 倍于标记 DNA 的非标记 DNA, 于 0 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后再加入标记 DNA 外, 其他操作与上相同.

2 结果

已知黑曲霉 T21 *glaA* 翻译起始位点上游 0.2~0.8kb 的区域与 *glaA* 基因的表达调控有关^[5], 利用该区域中已知的限制性酶切位点, 取 ME 和 BM 片段为探针, 通过凝胶阻滞分析对蛋白结合因子进行初探. 结果表明组分 II 中可能存在特异性的蛋白结合因子, 本文即报告对组分 II 的研究结果.

2.1 蛋白组分 II 中存在与 ME 和 BM 片段特异结合的蛋白因子

以 ME 和 BM 片段为探针与组分 II 蛋白进行的凝胶阻滞实验结果见图 2(a) 和 (b). 组分 II 蛋白导致部分 ME 带迁移明显滞后 (图 2(a), 泳道 4), 且此结合能被同源非标记片段的竞争完全消除 (图 2(a), 泳道 5), 表明该组分中有与 ME 片段特异结合的蛋白因子. 组分 II 蛋白与 BM 片段结合时出现了两条滞后带 C₁ 和 C₂ (图 2(b), 泳道 5), 都可

被同源非标记片段完全竞争消除 (图 2(b), 泳道 6), 表明两滞后带都是特异性结合所致. 同时, 观察到等量的 ME 片段只完全竞争滞后带 C₁, (图 2(b), 泳道 7).

综合以上实验结果可以看出, 蛋白组分 II 中存在与 ME 片段和 BM 片段特异结合的蛋白因子, 同时以 BM 为探针的交叉竞争实验 (图 2(b), 泳道 5~7) 表明产生滞后带 C₁ 的蛋白因子可能既与 ME 又与 BM 片段结合, 同时产生滞后带 C₂ 的蛋白因子可能只与 BM 结合, 而不与 ME 结合.

2.2 组分 II 中蛋白因子结合的靶 DNA 定位

为进一步鉴定组分 II 中蛋白因子在 ME 和 BM 片段上的结合部位, 首先以 ME 为探针, 分别以非标记的等量的 H²E, SmH², MSm, HaM 和 BHa 片段 (图 1) 做竞争性凝胶阻滞实验, 结果见图 2(c). 由图可见, 在 ME 上只有 H²E 竞争性最强 (泳道 2), 而 SmH² 和 MSm 竞争性很弱 (泳道 3, 5), 在 ME 上 HaM 有竞争性 (泳道 4), 而 BHa 却没有竞争性 (泳道 6), 暗示蛋白因子的结合位点在 H²E 和 HaM 片段上. 在此基础上, 又以 BM 为探针, 以非标记的等量的 H²E, HaM 和 BM 片段做竞争性凝胶阻滞实验 (图 2(d)), 结果 H²E 和 HaM 把组分 II 蛋白与 BM 片段结合所产生的滞后带 C₁ 完全竞争消除, 但未能竞争消除滞后带 C₂ (泳道 2, 3), 而 BM 能把两条滞后带全部竞争消除 (泳道 4). 证实产生滞后带 C₁ 的蛋白因子的靶序列在 ME 的 H²E 上和 BM 的 HaM 上, 产生滞后带 C₂ 的蛋白因子其结合部位可能在 BHa 上.

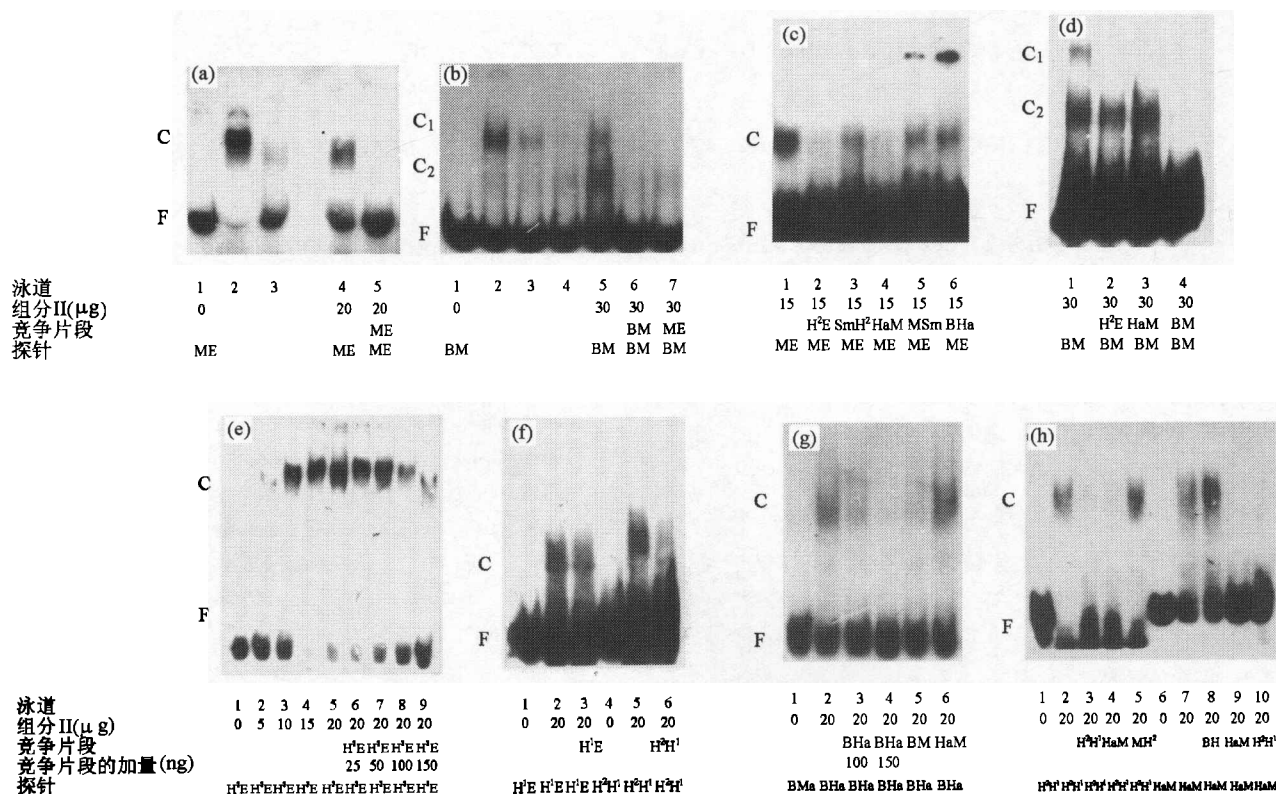


图2 C蛋白质-DNA复合物所形成的滞后带

F 游离探针带, 各图所用竞争性片段的量(除注明外)都为 100 ng

图2(e)以 H²E 为探针的蛋白梯度和竞争梯度凝胶阻滞实验, 随着蛋白加样量的增加, 滞后带渐强, 游离带渐弱(泳道 2~5), 而随着同源竞争片段量的增加, 滞后带渐弱, 游离带却渐强(泳道 6~9), 验证了 H²E 是蛋白因子的特异结合部位. 为进一步确定蛋白因子在 H²E 上的结合部位, 以 H²H¹ 和 H¹E 分别作为探针与组分 II 进行凝胶阻滞实验(图 2(f)), 证实 H¹E 与组分 II 蛋白的结合不能被自身竞争, 属于非特异性结合(泳道 1~3), 而 H²H¹ 能被自身竞争(泳道 4~6), 表明组分 II 蛋白因子在 H²E 上的特异结合部位在 H²H¹ 上.

图2(h)中, H²H¹ 与组分 II 蛋白的结合可被自身及 HaM 竞争(泳道 3, 4), 但不被 MH² 竞争(泳道 5). 同样, HaM 与组分 II 蛋白的结合可被自身及 H²H¹ 竞争(泳道 9, 10), 但不被 BH 竞争(泳道 8). 此结果除进一步证实 H²H¹ 和 HaM 是蛋白因子的特

异结合部位外, 还显示 H²H¹ 和 HaM 与组分 II 蛋白的结合呈现交叉竞争. 这一现象, 结合图 2(d)中 H²E(含 H²H¹) 和 HaM 都能竞争消去组分 II 蛋白与 BM(含 HaM)所产生的滞后带 C₁ 的实验结果证明, 与 H²H¹ 和 HaM 相结合的是同一个蛋白因子, 但与另文¹⁾报道的蛋白因子不同, 因两者的结合部位不同(图 3), 且不呈现交叉竞争现象.

图 2(b)结果表明, 组分 II 蛋白与 BM 结合产生了两个滞后带 C₁ 和 C₂. 由图 2(d)得知, H²E 和 HaM 都能竞争消去滞后带 C₁, 但不能竞争消去滞后带 C₂. 而图 2(g)以 BHa 为探针的凝胶阻滞实验只产生一条滞后带, 且此带可被自身和 BM 竞争(图 2(g)泳道 3~5)但不被 HaM 竞争(泳道 6). 综合以上 3 个实验结果分析, 以 BM 为探针时产生的两个滞后带是组分 II 中两种蛋白因子分别与 BH 上的 HaM 和 BHa 两片段结合所产生的.

1) 仇润祥, 等. 黑曲霉 T21 *glaA* 5' 上游调控区 DNA 与蛋白因子的相互作用分析. 待发表

```

_____ CCAAT _____ CCTCGGCAAAGGATATATAGGGTC
- 809          - 795                               - 580

ATAATAAGTAGTACTAGTTATATTAATGGAAGGGTATATACCACGCGT _____ TCAGTG
                                                - 509          - 318

CAATTTCCCCGGGCGCCGCGACACCGCGATAGGCTGGTTCTTCCACACCACCGGAG _____
                                                                    - 254

```

图3 组分II中特异的蛋白结合因子在 *A. niger* T21 *glaA* 5'上游调控区上的3段靶序列
即 - 809 ~ - 580, - 580 ~ - 509 和 - 318 ~ - 254

3 讨论

由于 *A. niger glaA* 和 *A. oryzae amy* 具有类似的调节特性, Verdoes 对这两个基因的 5'上游 *cis* 调控区作了比较, 找出了 5 对同源性相当高的序列, 并推测这些序列有可能是转录调控蛋白的结合部位^[8]. 但本文找到的 3 个结合部位没有一个与这 5 对序列相吻合. 分析这 3 个结合部位序列, BH_a(- 809 ~ - 580) 含有 CCAAT box, HaM(- 580 ~ - 509) 含有“TATA”的重复结构, 而 H²H¹(- 318 ~ - 254) 是富含 GC 的序列(图 3), 暗示了此 3 序列在 *A. niger* T21 *glaA* 的表达调控中可能具有重要作用.

我们还以 HaM 上的 HS² 和 S²M 作为探针与组分 II 进行凝胶阻滞实验, 但没有出现明显的结合(图略), 推测 HaM 上结合部位是在以 S² 位点为中心的区域.

我们在另文¹⁾中报道了 *A. niger* T21 蛋白组分 I 中存在一个蛋白结合因子, 其结合部位定位在 T21 *glaA* 5' *cis* 调控区 - 374 ~ - 344, - 480 ~ - 414 及 - 580 ~ - 540 三个区域. 本文所检测到的组分 II 中的两个蛋白结合因子, 除结合部位与上述不同外, 根据已述及的同源及异源片段的竞争性凝胶阻滞实验表明, 它们不同于组分 I 中所检测到的蛋白结合因子.

参 考 文 献

1 Drysdale M R, et al. The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. *Gene*, 1993, 130: 241

- 2 Peij N N M E, et al. Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Mol Microbiol*, 1998, 27(1): 131
- 3 Petersen K L, et al. A new transcriptional activator for amylase genes in *Aspergillus*. *Mol Gen Genet*, 1999, 262: 668
- 4 Gomi K, et al. Molecular cloning and characterization of a transcriptional activator gene, *amyR*, involved in the amylolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(4): 816
- 5 Saloheimo A, et al. Isolation of the *aceI* gene encoding a Cys₂-His₂ transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbhI* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*, 2000, 275: 5817
- 6 TanaKa A, et al. An *Aspergillus oryzae* CCAAT-binding protein, AoCP, is involved in the high-level expression of the TaKa-amylase A gene. *Curr Genet*, 2000, 37: 380
- 7 Fowler T, et al. Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*. *Curr Genet*, 1990, 18: 537
- 8 Verdoes J C, et al. The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the *Aspergillus niger* glucoamylase-encoding gene. *Gene*, 1994, 145: 179
- 9 乔殿华, 等. 黑曲霉糖化酶基因表达调控的研究 I. 高产及低产菌株糖化酶表达的总体分析和比较. *微生物学报*, 1997(5), 37: 349
- 10 钟丽婵, 等. 黑曲霉糖化酶高产和低产菌株糖化酶基因调控区的克隆及其分析比较. *微生物学报*, 1996, 36(3): 181
- 11 范晓春, 等. 黑曲霉诱变株 *Aspergillus niger* T21 糖化酶产量提高的分子基础. *中国科学*, 2001, 31(3): 202
- 12 Mizote T, et al. Gel mobility shift scanning of the acetate-inducible promoters from *Neurospora crassa* reveals a common co-inducible DNA-binding protein. *Mol Gen Genet*, 1996, 250: 421
- 13 rez-Esteban B, et al. Molecular characterization of a fungal secondary metabolism promoter: Transcription of the *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthetase gene is modulated by upstream negative elements. *Mol Microbiol*, 1993, 9(4): 881

1) 同上页