

文章编号:1000-582X(2006)04-0073-04

## 绿僵菌 *NTL* 基因上游调控序列的克隆及分析\*

胡宗利,陈国平,王中康,彭国雄,殷幼平,蔡绍哲,夏玉先

(重庆大学生物工程学院,重庆 400030)

**摘要:**实验室已经克隆了金龟子绿僵菌中性海藻糖酶基因(*NTL*)的编码序列(GenBank 登录号:AY557612),为了解该基因的上游调控信息,采用 Panhandle Polymerase Chain Reaction Amplification 方法获得了长为 982bp 的中性海藻糖酶基因上游序列。序列分析表明,该序列含有 5 个 CAAT 启动子元件和一个压力反应元件(CCCCT)。经 PCR 和 Southern 杂交验证表明,利用 panhandle PCR 法成功地获得了金龟子绿僵菌 CQMa102 中性海藻糖酶基因上游序列,并且该基因在金龟子绿僵菌基因组中以单拷贝形式存在。

**关键词:**panhandle PCR;金龟子绿僵菌;中性海藻糖酶基因(*NTL*)

**中图分类号:**Q78

**文献标识码:**A

海藻糖酶(EC 3.2.1.28)是海藻糖水解释酶,它将海藻糖水解成两分子葡萄糖。目前,已经从很多生物体中分离出海藻糖酶<sup>[1]</sup>。真菌海藻糖酶根据其最适 pH 和调节特性分为酸性(或非调节性)和中性(或调节性)海藻糖酶<sup>[2-3]</sup>。酵母中的酸性海藻糖酶在 pH 4.5 左右具有最大活性,定位于液泡<sup>[4]</sup>;丝状真菌中的酸性海藻糖酶则定位于细胞壁<sup>[5]</sup>。中性海藻糖酶在 pH 7.0 显示最大活力,经磷酸化作用而激活,定位于胞质<sup>[6]</sup>。研究在我们已经克隆昆虫病原真菌金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)中性海藻糖酶编码序列(GenBank 登录号:AY557612)的基础上,为了得到该基因的上游调控序列信息,采用了 panhandle PCR 方法克隆该基因 5'端的非编码序列。该方法可以高度特异地扩增与已知位点相邻的大于 3.0 kb 的人基因组 DNA<sup>[7]</sup>,可以应用于染色体步移<sup>[8]</sup>、利用 cDNA 信息进行的启动子及基因结构域的定位<sup>[9]</sup>、病毒及转座子整合位点的测定<sup>[10]</sup>、不能克隆的 DNA 的定位和测序<sup>[11]</sup>等。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

##### 1.1.1 菌种与质粒

金龟子绿僵菌菌株(*Metarhizium anisopliae*) CQ-Ma102 为本实验室从我国微生物资源中自行分离、选育出的高毒力、高产孢、强专化性的杀蝗新菌株;大肠杆菌 JM109 为本实验室保存;质粒 pGEM<sup>®</sup>-T Easy

Vector 购自 Promega 公司。

##### 1.1.2 主要试剂

限制性内切酶、RNA 酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、T4 多核苷酸激酶(T4 PNK), T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶为 Promega 公司产品;High Pure PCR Product Purification Kit 和 High Pure Plasmid Isolation Kit 为 Roche 公司产品;同位素  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP 购自北京福瑞生物工程公司,其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。

##### 1.1.3 培养基

1/4SDA (1/4 - Strength Sabourauds Dextrose Agar) 培养液:葡萄糖 10 g,蛋白胨 2.5 g,酵母膏 5 g,调 pH 6.0,定容到 1 L,121 °C 灭菌 20 min。培养基 LB 按《分子克隆实验指南》<sup>[12]</sup>推荐方法配制。

##### 1.1.4 引物和寡核苷酸链设计、合成以及 PCR 产物的序列测定

根据金龟子绿僵菌中性海藻糖酶 5'端已知序列设计引物 1,2,3,4 和寡核苷酸链 56,验证引物 Q539.4P 根据 panhandle PCR 产物设计,序列分别如下:

引物 1:5'-AAA CAC ATT GTA GTC ATC CGA GCC-3'

引物 2:5'-GCG TCG TCA AAC ACA TTG TAG TCA-3'

引物 3:5'-CGC AAA CAA GTG GAA CAA TAC CT-3'

引物 4:5'-TCA CCG TGG CTG CCT CTT CT-3'

\* 收稿日期:2005-12-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170630);重庆市自然科学基金重点项目(8564)

作者简介:胡宗利(1971-),女,重庆江津人,重庆大学博士,讲师,主要从事基因工程及分子生物学研究。

寡核苷酸链 56: 5'-CTA GTA TGC TTC TGA AGA  
CGC ACA TCA GAA CCG A-3'

Q539.4P: 5'-TTG TCC TCC CAT CTC TTC-3'

所有引物由上海生工生物工程公司合成, 序列测定委托上海生工生物工程公司完成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 金龟子绿僵菌 CQMa102 总 DNA 提取

将金龟子绿僵菌 CQMa102 孢子  $10^6$  接种于 20 mL 1/4SDA 培养液, 180 r/min, 26 ~ 28 °C 培养 60 h, 10 000 r/min 离心 5 min 沉淀菌丝, 无菌水冲洗 2 次, 按单志萍等<sup>[13]</sup>的方法提取金龟子绿僵菌 CQMa102 总 DNA。

### 1.2.2 基因组 DNA 的消化、脱磷酸化、磷酸化寡核苷酸的连接

用 100 U *Xba* I 消化 5  $\mu$ g 绿僵菌总 DNA, 产生 5' 突出末端, 反应总体积为 100  $\mu$ L, 反应时间为 2 h。然后加 0.05 U CIAP, 37 °C 温育 30 min, 使消化的基因组 DNA 脱磷酸化, 用 High Pure PCR Product Purification Kit 纯化 DNA, 50  $\mu$ L TE 溶解 DNA, -20 °C 保存。然后在 T4 DNA 连接酶缓冲液中, 用 3 U T4 DNA 连接酶, 25  $\mu$ L 消化去磷酸化的基因组 DNA (大约含 2.5  $\mu$ g DNA) 和 50 倍摩尔数过量的 5' 磷酸化寡核苷酸链 56, 于 4 ~ 8 °C 过夜, 用 High Pure PCR Product Purification Kit 纯化连接混合物, 50  $\mu$ L TE 溶解。寡核苷酸链的磷酸化可以在合成过程中加入磷酸化的亚磷酰胺, 生成 5' 末端磷酸化的寡核苷酸, 也可以用 T4 PNK 产生 5' 末端磷酸化。

### 1.2.3 Panhandle 的形成

在 50  $\mu$ L 反应体系中加入 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ L, 25 mmol/L  $Mg^{2+}$  3  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1.8  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L *Taq* 酶 0.5  $\mu$ L 和 33.2  $\mu$ L MilliQ 水, 用 50  $\mu$ L 矿物油覆盖, 预热至 80 °C, 加入 4  $\mu$ L (约 100 ng) 以上连接好的模板 DNA, 94 °C 反应 1 min, 72 °C 温育 1 min, 迅速转入 80 °C 水浴。

### 1.2.4 起始扩增和嵌套式扩增

在矿物油层下加入引物 2 和引物 4 各 1.25  $\mu$ L (各为 12.5 pmol), 同时反应管仍保留在 80 °C 水浴中, 然后作 30 个循环 (94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 4 min), 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。取出 1  $\mu$ L 未纯化的起始 PCR 产物, 置于含有嵌套式引物 (引物 1 和引物 3) 并预热至 80 °C 的 PCR 管中, 嵌套式扩增和起始扩增反应应用同样的酶、试剂和引物浓度, 嵌套式扩增作 35 个 PCR 热循环, 循环参数与起始扩增完全相同。

### 1.2.5 Panhandle PCR 产物的克隆和测序

Panhandle PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化, 然后连接到 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector 上, 42 °C 热击转化到大肠杆菌 JM109 中, 用 Ampicillin 抗生素和  $\alpha$ -互补初筛转化子, 然后用 High Pure Plasmid Isolation Kit 提取纯化质粒 DNA, 再用引物 1 和 3 作 PCR 验证, 同时用 *Eco* R I 酶切质粒 DNA, 验证为阳性克隆子后测序。

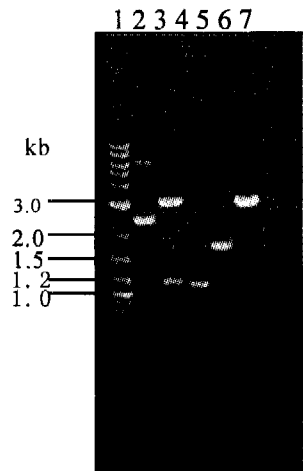
### 1.2.6 金龟子绿僵菌中性海藻糖酶基因上游序列的 PCR 和 Southern 杂交验证

根据 panhandle PCR 产物的测序结果, 设计一个新引物 Q539.4P, 用该引物和引物 4, 以金龟子绿僵菌基因组 DNA 为模板 PCR 扩增, 按上述方法将该 PCR 产物克隆和测序, 并进行序列分析。以该片段 A 为模板, 利用同位素  $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP 制备探针, 以此探针与经限制性内切酶 *Xho*I, *Bam*H I, *Apa*LI 完全酶切的金龟子绿僵菌 CQMa102 总 DNA 做 Southern 杂交, 其操作过程按《分子克隆实验指南》<sup>[12]</sup>描述进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 Panhandle PCR 的扩增、克隆及序列分析

根据金龟子绿僵菌中性海藻糖酶基因 5' 端已知序列, 设计 2 对引物 (引物 1, 3 与引物 2, 4) 和一条与已知序列互补的寡核苷酸链 56, 经互补连接、起始扩增和嵌套式扩增得到一条 1 121 bp 大小的扩增带, 该 PCR 产物克隆到 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector 上, 经 PCR 和酶切验证为阳性克隆子后测序, PCR 和酶切验证如图 1 所示。该序列分析表明, 序列中含 5 个 CAAT 启动子元件, 还含有一个压力反应元件 STREs (stress responsive element CCCCT), 它可能具有调控金龟子绿僵菌中性海藻糖酶基因在各种胁迫条件下转录活性的作用<sup>[14]</sup>。该序列在 GenBank 的登录号为 AY557613。



1. 2 - Log DNA Ladder; 2. 未经酶切的重组质粒; 3. 经 *Eco*R I 酶切的重组质粒; 4. 利用引物 1 和 3 扩增重组质粒的 PCR 产物; 5. 未经酶切的 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector; 6. 经 *Eco*R I 酶切的 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector; 7. 利用引物 1 和 3 扩增 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector 质粒。

图 1 Panhandle PCR 产物克隆质粒的 PCR 和酶切验证

### 2.2 PCR 和 Southern 验证

根据 panhandle PCR 产物的测序结果, 设计一个新引物 Q539.4P, 用引物 Q539.4P 和引物 4, 以金龟子绿僵菌基因组 DNA 为模板扩增出与理论值相同的片段 A。该片段经克隆、测序后, 其核苷酸序列如图 2 所示, Southern 杂交结果如图 3 所示。由此可见, 利用 panhandle PCR 法成功地获得了金龟子绿僵菌 CQ-

Ma102 中性海藻糖酶基因上游序列, Southern 杂交结果表明金龟子绿僵菌 CQMa102 中性海藻糖酶基因在染色体上是以单拷贝的形式存在。

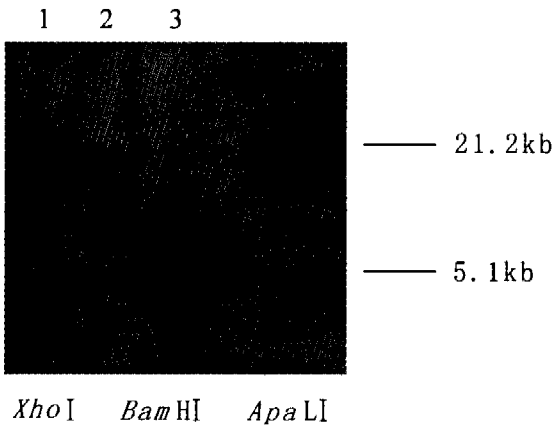
→ primerQ539.4P

```

1 TTGTCCTCCC ATCTCTTCCA TCCTGGTCCC CGGTCAACGG TAGGCCACAT
51 TCAATGTTCC GTTGTGACCA CTCACACACC AGATCAACGT GACATTTGAA
101 TTGGTGGGTC GGGCCAGCCT ATGCACGGTA TCGTCACCBC CTTCTCTTC
151 ACTGGAACCA CTTGTGAGTC TTCCGATAAG AACAAAGCCC TCCGCGTGCC
201 TCGTGCCTCT CCAAACTATC CATCTGACAT CTCTTGTGAT CAATTGAAAC
251 TCTCCCGGGA ACATACCCCA CAACTTGGGA TTGAGTACTC CGCAGTACGA
301 ATCTGACACT AGACATGAAT CAGCTACCCG CAAGCCCGCT CTAACATCTC
351 CACTCTTAAC TAGACCACCT CGGTGTCGGC GACACTTTTT TTTTATGTA
401 CGACGGAGCT CAATCTTAGC TCATCTCGCT ATCGTCCCGG TGACGCAGAC
451 GCCATTCCCT CGAGCCTGCC ATACTTTATC TTTGGATTTT GTTGATTGG
501 ATACCCATCA CCCATCTGCC ACTGTCGCTA CAAGCCTCCT TTCATAACTG
551 CACGGCAGTC TTCTGTGCCC ACCTCCAGCT TCGTCAGTCT GCGCCCTCGT
601 CATAACCATG GCGGGAACGA CAAACGCCA AGCGCATGGC TCGGATGACT
651 ACAATGTGTT TGACAGCGCA AAGACATACT ATGCTTCTGA AGAGCGACAT
701 CAGAACCAGT TTGGTCCCGG GACACGTACA TACTCTCAGG TATTGTTCCA
751 CTTGTTTGCG ACGTCTGGA TACAATTTT GACTGTACAT AGAACAGCTT
801 GATGAAGCAG TTTGAACGAA ACGGCTGCG TGAACCCAC AGAAGAGGCA
851 GCCACGGTGA
    
```

注:箭头所示为引物 Q539.4P 的序列;长方形盒内为金龟子绿僵菌中性海藻糖酶基因的已知序列;黑体碱基为引物 4 的互补序列,有下划线的黑体碱基为压力反应元件 STREs(5'-CCCCT-3');倾斜黑体碱基为启动子元件(5'-CAAT-3')。

图 2 PCR 产物 A 的核苷酸序列



1. 龟子绿僵菌基因组 DNA 经限制性内切酶 *xho* I 酶切后的杂交结果;2. 子绿僵菌基因组 DNA 经限制性内切酶 *Bam*H I 酶切后的杂交结果;3. 龟子绿僵菌基因组 DNA 经限制性内切酶 *Apa*L I 酶切后的杂交结果。

图 3 金龟子绿僵菌 CQMa102 *NTL* 基因组 DNA Southern 杂交分析

### 3 讨论

目前,有很多种以 PCR 方法为基础的染色体步移法可以获得已知序列旁的未知序列,这些方法大致分为 3 类:反向 PCR (inverse PCR)<sup>[15]</sup>,连接介导的 PCR (ligation-mediated PCR, LM-PCR)<sup>[16-17]</sup> 和随机引物 PCR (randomly primed PCR, RP-PCR)<sup>[18-19]</sup>。反向 PCR 是最早发展起来的一种染色体步移法,但由于限制性内切酶位点分布不均,模板自身环化率极低,经

常得不到 PCR 产物,即使得到了 PCR 产物,其大小往往小于 2kb,目前应用较少。LM-PCR 和 RP-PCR 是普遍采用的染色体步移法,后者是最简单、最常用的方法,但其 PCR 扩增产物较小 (< 1 kb),为了得到较大的未知片段 (> 1 kb),人们通常采用 LM-PCR,但是 LM-PCR 经常会得到非特异扩增产物,为了解决这一问题,人们不断地对此方法进行着改进,相继有很多改进的 LM-PCR 报道<sup>[20-22]</sup>,panhandle PCR 法就是其中之一。1992 年, Jones DH 和 Winistorfer SC 首次提出了 panhandle PCR<sup>[20]</sup>, 随后又发展出 reverse-panhandle PCR<sup>[10]</sup>。很多实验证明 panhandle PCR 可以扩增位于已知位点侧翼的大于 3.0 kb 的基因组 DNA,由于能完成全部嵌套式扩增,因此有非常高的特异性,使得 panhandle PCR 扩增能接近用 T4 DNA 聚合酶和原始缓冲液条件扩增的极限<sup>[23]</sup>。采用 panhandle PCR 技术试图克隆出绿僵菌中性海藻糖酶基因 5' 端的非编码序列,获得该基因更多的调控信息。在本实验中,选用了 6 碱基的限制性内切酶 *Xba* I 来酶切基因组 DNA,理论上,在已知序列旁侧大约 4 000 bp 的位置分布有一个 *Xba* I 酶切位点,由于限制性内切酶位点分布不均,正好在已知序列附近 1 kb 的位置有一个 *Xba* I 酶切位点,所以得到了一个 1 121 bp 的 PCR 产物。本实验证明该方法操作简单,步骤少,容易形成锅柄状,便于 PCR 扩增。同时,由于采用了嵌套式扩增,其特异性较高,是一种较好的克隆已知序列旁侧未知序列的方法。

试验获得的中性海藻糖酶基因上游序列包含一个压力反应元件,该元件也存在于一些与抗逆有关的酵母基因的调控序列中。该元件在压力胁迫如热击、高渗透压、有毒以及营养饥饿等条件下,介导酵母相关基因的转录激活,推测该元件在金龟子绿僵菌中也可能具有类似功能,实验室正在分析其调控作用。

### 参考文献:

- [1] RICHARDS A B, KRAKOWKA S, DEXTER L B, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies[J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40(7): 871-898.
- [2] THEVELEIN J M. Regulation of trehalose mobilization in fungi[J]. Microbiol Rev, 1984, 48:42-59.
- [3] THEVELEIN J M. Regulation of trehalase activity by phosphorylation-dephosphorylation during developmental transitions in fungi[J]. Exp Mycol, 1988, 12:1-12.
- [4] MITTENBUHLER K, HOLZER H. Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant[J]. J Biol Chem, 1988, 263:8 537-8 543.
- [5] DENFERT C, FINTAINE T. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose[J]. Mol Microbiol, 1997, 24:203-216.
- [6] APP H, HOLZER H. Purification and characterization of neutral trehalase from the *ABYS1* mutant[J]. J Biol Chem, 1989, 264:17 583-17 588.

- [7] MEGONIGAL M D, RAPPAPORT E F, JONES D H, et al. Panhandle PCR strategy to amplify MLL genomic breakpoints in treatment - related leukemias [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94:11 583 - 11 588.
- [8] JONES D. H. WINISTORFER S. C. Genome walking with 2 - to 4 - kb steps using panhandle PCR[J]. PCR Methods Appl, 1993, (2):197 - 203.
- [9] MEGONIGAL M D, RAPPAPORT E F, WILSON, R B, et al. Panhandle PCR for cDNA: A rapid method for isolation of MLL fusion transcripts involving unknown partner genes [J]. PNAS, 2000, 97(17):9 597 - 9 602.
- [10] RAFFINI L J, SLATER D J, RAPPAPORT E F, et al. Panhandle and reverse - panhandle PCR enable cloning of der(11) and der(other) genomic breakpoint junctions of MLL translocations and identify complex translocation of MLL, AF - 4, and CDK6 [J]. PNAS, 2002, 99(7):4 568 - 4 573.
- [11] FELIX C A, JONES D H. Panhandle PCR: a technical advance to amplify MLL genomic translocation breakpoints [J]. Leukemia, 1998, 12(6): 976 - 981.
- [12] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南(第2版) [M]. 北京:科学出版社, 1992
- [13] 单志萍, 孟好, 姜文侯. 丝状真菌三孢布拉酶 DNA 的提取研究 [J]. 生物技术, 2001, 11(3): 5 - 6.
- [14] ZHRINGER H, THEVELEIN J M, NWAKA S. Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth [J]. Mol Microbiol, 2000, 35(2): 397 - 406.
- [15] TRIGLIA T, PETERSON M G, KEMP D J. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences [J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16: 8186.
- [16] ROSENTHAL A, JONES D S C. Genomic walking and sequencing by oligo - cassette mediated polymerase chain reaction [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 3095 - 3096.
- [17] PFEIFER G P, RIGGS A D. Genomic sequencing by ligation - mediated PCR [J]. Mol Biotechnol, 1996, 5: 281 - 288.
- [18] LOH E Y, ELLIOT J F, CWIRLA S, et al. Polymerase chain reaction with single - sided specificity: analysis of T cell receptored chain [J]. Science, 1989, 243: 217 - 220.
- [19] TERAUCHI R, KAHL G. Rapid isolation of promoter sequences by TAIL - PCR: the 5' - flanking regions of Pal and Pgi genes from yams (Dioscorea) [J]. Mol Gen Genet, 2000, 263: 554 - 560.
- [20] JONES D H, WINISTORFER S C. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(3): 595 - 600.
- [21] STERKY F, HOLMBERG A, ALEXANDERSSON G, et al. Direct sequencing of bacterial artificial chromosomes (BACs) and prokaryotic genomes by biotin - capture PCR [J]. J Biotechnol, 1998, 60: 119 - 129.
- [22] YAN YUAN - XIN, AN CHENG - CAI, LI LI, et al. T - linker - specific ligation PCR (T - linker PCR): an advanced PCR technique for chromosome walking or for isolation of tagged DNA ends [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(12): e68.
- [23] Felix C A, Kim C S, Megonigal M D, et al. Panhandle polymerase chain reaction amplifies MLL genomic translocation breakpoint involving unknown partner gene [J]. Blood, 1997, 90: 4679 - 4686.

## Cloning and Analyzing the Upstream Sequence of the Neutral Trehalase Gene (*NTL*) in *Metarhizium anisopliae*

HU Zong-li, CHEN Guo-ping, WANG Zhong-kang, PENG Guo-xiong,  
YING You-ping, CAI Shao-xi, XIA Yu-xian

(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** Based on the coding sequence of neutral trehalase gene (*NTL*) of *Metarhizium anisopliae* which has been cloned in the authors laboratory previously, Panhandle Polymerase Chain Reaction strategy was used to amplify the flanking sequences adjacent to the known sequence of the neutral trehalase gene. The genomic DNA was first digested with *Xba* I to create a 5' overhang and then treated with calf intestinal alkaline phosphatase. Next, a 34 - nucleotide single - stranded 5' phosphorylated oligonucleotide was ligated to the 3' ends of *Xba* I - digested DNA. After denaturation, intra - strand annealing and polymerase extension, a panhandle was formed and then nested PCR performed. A 1121 bp panhandle PCR product was subsequently subcloned and the sequence analysis shows that it contains one stress response element (STREs), which may mediate transcriptional activation of the neutral trehalase gene in response to various stress. Southern analysis indicated that the neutral trehalase gene was present as a single copy in *M. anisopliae*. The upstream sequence of neutral trehalase gene has been accessed by GenBank (Accession: AY557613).

**Key words:** panhandle PCR; *Metarhizium anisopliae*; neutral trehalase gene (*NTL*)

(编辑 陈移峰)