

木质素降解条件下黄孢原毛平革菌 *lip* 基因转录调控序列的筛选与鉴定

江明锋, 张义正

(四川大学生命科学学院 四川省分子生物学及生物技术重点实验室, 成都 610064)

摘要:用 DNA-蛋白质体外结合实验和凝胶迁移率变动分析技术筛选黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 木质素过氧化物酶基因 *lipA*、*lipC*、*lipF* 的 5'-端调控区内能与该菌在木质素降解条件下形成的蛋白特异结合的顺式作用元件。结果表明,来自 *lipC*、*lipF* 基因的 5'-端片段 LG2P3(396 bp)和 LG6S1-2(738 bp)能特异结合培养于 Kirk 低氮培养基中的菌丝体蛋白;而来自于 *lipF* 基因的 5'-端的 LG6S2 (226 bp) DNA 片段能特异结合培养于天然冷杉木片中的菌丝体蛋白。对这些片段的 DNA 序列分析表明,它们均存在各种顺式作用元件,由此推测它们可能是被一些木质素过氧化物酶基因转录调控相关的蛋白质所结合的序列。

关键词:黄孢原毛平革菌;木质素过氧化物酶基因;凝胶迁移率变动分析;DNA 结合蛋白;顺式作用元件

中图分类号:Q933

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2005)03-0435-07

Identification of Regulatory Sequence of *lip* Genes of *Phanerochaete chrysosporium* under Lignin-degradation

JIANG Ming-Feng, ZHANG Yi-Zheng

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Eleven subcloned DNA fragments from the 5'-upstream region of *lipA*, *lipC* and *lipF* of *Phanerochaete chrysosporium* were assayed by using the gel mobility shift assay (GMSA). The total proteins extracted from *P. chrysosporium* mycelia grown in Kirk medium and natural fir wood chips were used to identify the segments in these 11 DNA fragments which are bound by some regulatory proteins. The results showed that two DNA segments LG2P3 (396 bp) and LG6S1-2 (738 bp) in the 5'-noncoding regions of *lipC* and *lipF* were able to specifically bind total mycelial proteins of *P. chrysosporium* incubated in Kirk medium, respectively. One DNA segment LG6S2 (226 bp) from the 5'-noncoding region of *lipF* was found to specifically bind total mycelial proteins of this fungus on natural fir wood chips. Analysis of the sequences showed that there were many cis-regulatory elements in these DNA segments, implying that these sequences may be bound by some transcriptional regulation protein factors.

Key words: *Phanerochaete chrysosporium*; lignin peroxidase gene; Gel Mobility Shift Assay; DNA-bound protein; Cis-regulatory element

收稿日期:2004-11-04;修回日期:2005-01-20

基金项目:教育部博士点基金资助项目(编号:20010610025)和国家自然科学基金资助项目(编号:30170513)[Doctoral Foundation of National Education Committee(No.20010610025) and National Foundation of Natural Science of China (No. 30170513)]

作者简介:江明锋(1971—),男,羌族,四川茂县人,在读博士,研究方向:生物质的生物转化。Tel:028-85410409;E-mail:mingfengjiang@vip.sina.com

通讯作者:张义正(1947—),男,四川永川人,教授,博士,研究方向:遗传学。Tel:028-85412738;E-mail:yizzhang@scu.edu.cn

黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 是研究木质素降解的模式生物, 它的基因组序列已由美国联合基因组研究所在 2004 年测定完成^[1]。 *P. chrysosporium* 在木质素降解条件下(次生代谢期间)能分泌一类依赖于 H_2O_2 的过氧化物酶-木质素过氧化物酶(LIP)。它能氧化降解木质素和环境中的芳香族污染物, 因而在生物制浆、纸浆生物漂白和环境保护方面有重要的用途^[2-3]。研究表明, LIP 由一个基因家族编码, 这些基因的表达在转录水平上受到氮、碳、分子氧、热激等因素的调控^[4~7]。目前, *lip* 基因家族的成员已全部克隆, 但它们的转录调控机制仍未得到阐明。因此, 研究 *lip* 基因表达的调控机理对进一步利用该基因资源具有十分重要的意义。

凝胶迁移率变动分析法 (gel mobility shift assay) 是检测 DNA 结合蛋白的一种简单、快速而又灵敏的方法, 它可以鉴定目的基因的调控序列中是否存在特定的 DNA 结合蛋白位点, 也可以鉴定特定的细胞核蛋白中是否存在与已知的顺式调控元件结合的蛋白, 因此可用于基因转录调控因子的初步筛选, 是研究序列特异性 DNA 结合蛋白的常用方法之一^[8~12]; 冯红等曾用凝胶迁移率变动分析及 DNaseI 足迹分析技术在 *lipC* 基因启动子 5'-端鉴定出 2 个蛋白质结合区域^[13]。本研究将进一步分析 *lip* 基因 5'-端非编码区内能与不同培养条件下获得的菌丝体蛋白结合的调控序列, 以期在 *lip* 基因 5'-端鉴定出更多的蛋白质结合区域, 为分离与 *lip* 基因的转录调控有关的蛋白编码基因打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 真菌和大肠杆菌菌株

P. chrysosporium BKM-F-1767 和 *Escherichia coli* DH5 α 为本室保存。

1.1.2 *lip* 基因 5'-端亚克隆 DNA 片段

lipA、*lipC*、*lipF* 基因启动子及 5'-端上游序列的 11 个亚克隆片段 LG2P1、LG2P2、LG2P3、LG2S Δ X、LG2Xh、LG2X Δ X、LG3SC、LG3SS、LG6S2、LG6S3、LG6S1-1、LG6S1-2, 由本室冯红制备^[13]。

1.1.3 试剂和工具酶

限制性内切酶、Klenow 大片段购自 Gibco BRL 公司; dNTP 购自 Sigma 公司; [α -³²P]dATP/dCTP

购自北京亚辉生物工程公司。丙烯酰胺, 双丙烯酰胺, HEPES 等生化试剂购自 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黄孢原毛平革菌培养基及培养方法

用于黄孢原毛平革菌培养的完全培养基(CM)按冯红所述的方法配制^[13]; 木质素降解系统形成的低氮培养基参照 Kirk 低氮培养基的配方^[14,15]; 黄孢原毛平革菌的天然冷杉木培养基按江明锋等的方法制备^[16]。

1.2.2 *P. chrysosporium* 菌丝体蛋白的提取

分别收集低氮充氧条件下培养 3、4、5 d 菌丝体和天然冷杉木条件下培养 2、4、6、8 周的菌丝体, 分别将相同培养条件下不同时间收集的菌丝体合并, 按 Ausubel(1997)和 Mizote(1996)^[8,10]的方法提取总蛋白。蛋白质含量的测定采用 Bradford(1976)所述方法^[10]。蛋白质样品的 SDS-PAGE 电泳, 按照 Sambrook(1989)和 Ausubel(1997)^[8,12]介绍的方法。最后将提取蛋白的浓度调整为 2 mg/mL, 液氮速冻后 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 DNA 探针的放射性标记

用产生 5'-端突起的限制性内切酶将待分析的 DNA 片段从亚克隆质粒中酶切回收, 取 250 ng DNA, 在反应系统中加入 10 μ L [α -³²P]dATP 和 dCTP 混合物, 用 Klenow 大片段补平反应标记片段, 然后以此为探针进行凝胶迁移率变动分析^[14]。

1.2.4 DNA 探针与菌丝体蛋白体外结合试验及凝胶迁移率变动分析

按文献^[8,10,14]提供的方法, 在 0.5 mL Eppendorf 离心管中依次加入以下组分: 1 μ L 标记 DNA 探针片段 (>500 cpm), 2 μ L (2 μ g) *sau3A* I 完全酶切的 pUC18 DNA 片段, 1 μ L 100 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH7.9, 2 μ L 牛血清白蛋白(300 μ g), 40 μ L 菌丝体蛋白质(20 μ g), 2 μ L 50% 甘油, 2 μ L 重蒸水。混匀后在冰水浴中静置 30 min, 使蛋白质与 DNA 结合。反应结束后, 立即上样进行 PAGE 电泳^[14]。PAGE 凝胶的浓度为 4% 的低离子强度聚丙烯酰胺凝胶, 用低离子强度电泳缓冲液在 100 V、22 mA 的条件下预电泳 1 h, 再将 20 μ L 蛋白质-DNA 结合反应物直接加入加样孔中。在 120 V 和 30 mA 条件下电泳, 其间用恒流泵循环上下电极槽中的缓冲液, 同时在电泳板侧面挂上冰盒保持低温, 当染料离凝胶底部约 2~4 cm 处时, 停止电泳。小心取出凝胶块, 用 2 张凝胶大小的滤纸覆盖胶的两面, 然后用保鲜膜将

凝胶包好。在 -20°C 下放射自显影。用 GDS-8000 凝胶图像分析系统照像,记录^[8,14]。

1.2.5 DNA 测序

双脱氧核苷酸链终止法用于亚克隆片段的序列测定。

2 结果

2.1 探针 DNA 片段的制备和放射性标记

对来自不同木质素过氧化物酶基因的 11 个片段亚克隆质粒分别用产生 5'-端突起的限制酶进行双酶切,回收相应的 DNA 片段,紫外分光光度法测定每个样品的 DNA 浓度。每个 DNA 片段各取 250 ng,用 Klenow 大片段通过补平反应使待测 DNA 片段的两端都带上 ^{32}P 放射性标记。盖革计数器测定表明,11 个 DNA 片段的放射强度均大于 500 cpm,可用于下一步 DNA 与菌丝体蛋白的体外结合实验。此外,pUC18 质粒用 *sau3A*I 完全酶切,产生的 7 个 DNA 片段作为凝胶迁移率变动分析实验中的 Carrier DNA。

2.2 菌丝体蛋白的提取

从 600 mL 低氮培养基中过滤收集黄孢原毛平革菌菌丝体,可获得 2.1 g 湿菌丝体用于提取总蛋白(LOP);用灭菌蒸馏水将培养于天然冷杉木片上的菌丝体洗下,离心收集可得 3.7 g 湿菌丝体用于提取蛋白(TP)。收集到的菌丝体用液氮冷冻研磨成粉,每克菌丝体加入 5 mL 蛋白抽提缓冲液,冰浴 30 min 浸提菌丝体蛋白。经检测,分别得到 14 mg LOP 蛋白和 29 mg TP 蛋白。经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,总蛋白质的分子量分布在 7~210 kD 之间(结果未显示)。

2.3 凝胶迁移率变动分析

用 DNA 蛋白质体外结合实验和凝胶迁移率变动分析技术,分析了 11 个 DNA 片段与菌丝体蛋白 LOP 和 TP 的相互作用,筛选能与 *P. chrysosporium* 在木质素降解条件下的菌丝体蛋白特异结合的片段。结果表明,在 *lipC*、*lipF* 基因的 5'-端非编码区内各有一个大小为 396 bp(LG2P3)(图 1)和 738 bp(LG6S1-2)(图 2)的 DNA 片段,能特异地与 LOP 菌丝体蛋白结合。*lipF* 基因的 5'-端序列中有一个长为 226 bp(LG6S2)的 DNA 片段能特异结合菌丝体蛋白 TP(图 3)。不同总蛋白质加量对于结合效果的影响见图 4。其余的 DNA 片段未出现延迟反应结果(未显示)。

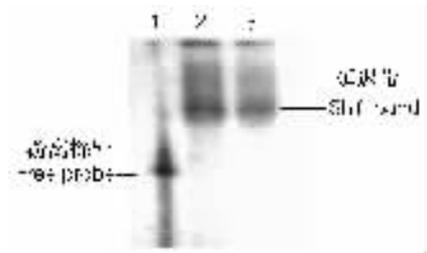


图 1 *lipC* 基因 LG2P3 DNA 片段与 LOP 蛋白的凝胶迁移率变动分析

1:游离的 LG2P3 标记探针;2:加 15 μg LOP 的结合反应;3:加 15 μg LOP 和 2 μg *Sau3A* I 酶切 pUC18 DNA 片段以及 40 \times 的冷探针的结合反应。

Fig.1 Gel Mobility Shift Assay of LG2P3 DNA fragment of *lipC* with LOP proteins

1: Free ^{32}P - labeled LG2P3 probe;
2: 15 μg LOP + ^{32}P - labeled LG2P3 probe;
3: 15 μg LOP, 2 μg pUC18 *Sau3A* I - cut DNA and 40 \times cold probe.

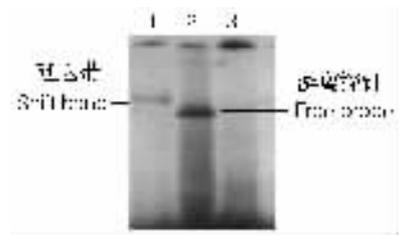


图 2 *lipF* 基因 LG6S1-2 DNA 片段与 LOP 蛋白的凝胶迁移率变动分析

1:加 15 μg LOP 和 2 μg *Sau3A* I 酶切 pUC18 DNA 片段的结合反应;2:游离的标记 LG6S1-2 探针;3:加 15 μg LOP, 2 μg *Sau3A* I 酶切 pUC18 DNA 片段和 40 \times 的冷探针的结合反应。

Fig.2 Gel mobility shift assay of LG6S1-2 DNA fragment of *lipF* Gene with LOP protein

1: 15 μg LOP and 2 μg pUC18 *Sau3A* I - cut DNA;
2: ^{32}P - labeled LG6S1-2 probe; 3: 15 μg LOP, 2 μg pUC18 *Sau3A* I - cut DNA and 40 \times cold probe.

2.4 序列分析

为了确定实验中筛选出的亚克隆片段在木质素过氧化物酶基因的 5'-端的准确位置,我们测定了这些片段的核苷酸序列,并利用 Blast 软件将序列在 *P. chrysosporium* 的基因组序列上进行了定位,确定了每个序列在相应 *lip* 基因 5'-端的精确位置。结果表明, LG2P3 片段位于 *lipC* 基因 ATG 上游 -759 至 -362 bp 的区域, LG6S1-2 片段定位于 *lipF* 基因的启动子序列 -205 至 -942 bp 的区域,

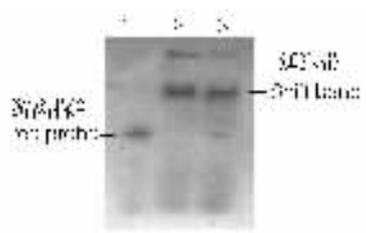


图3 *lipF* 基因 LG6S2 DNA 片段与 Tp 蛋白的凝胶迁移率变动分析

1: 游离的 LG6S2 探针; 2: 加 15 µg TP 和 2 µg *Sau3A I* 酶切 pUC18 DNA 片段的结合反应; 3: 加 15 µg TP, 2 µg *Sau3A I* 酶切 pUC18 DNA 片段和 40×冷探针的结合反应。

Fig.3 Gel mobility shift Assay of LG6S2 DNA fragment of *lipF* Gene with Tp protein

1: Free ^{32}P - labeled LG6S2 probe; 2: 15 µg TP and 2 µg pUC18 *sau3A I* - cut DNA; 3: 15 µg TP, 2 µg pUC18 *sau3A I* - cut DNA and 40× cold probe.

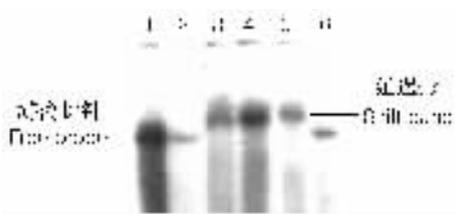


图4 LG2P3 DNA 片段与不同量的 LOP 蛋白的凝胶迁移率变动分析

1: 游离的冷探针; 2: 加 10 µg LOP 的结合反应; 3: 加 20 µg LOP 结合反应; 4: 加 20 µg LOP 和 2 µg *sau3A I* 酶切 pUC18 DNA 片段的结合反应; 5: 加 40 µg LOP, 2 µg *sau3A I* 酶切 pUC18 DNA 片段的结合反应; 6: 加 40 µg LOP 蛋白, 2 µg *sau3A I* 酶切 pUC18 DNA 片段和 40×冷探针的结合反应。

Fig.4 Gel Mobility Shift Assay of LG2P3 fragment with different amount of LOP protein

1: Free ^{32}P - labeled LG2P3 probe; 2: 10 µg LOP; 3: 20 µg LOP; 4: 20 µg LOP and 2 µg pUC18 *sau3A I* -cut DNA; 5: 40 µg LOP and 2 µg pUC18 *sau3A I* - cut DNA; 6: 40 µg LOP, 2 µg pUC18 *sau3A I* - cut DNA and 40× cold probe.

LG6S2 片段长 227 bp, 位于 *lipF* 基因的 +51 至 +277 的区域(图 5)。

3 讨论

3.1 丝状真菌基因 5'-端序列特异性结合元件及其相应的转录因子的研究策略

目前已经发展了多种实验技术用于直接或间接

地确定顺式作用元件的存在及相应的核苷酸序列的位置,并且已在丝状真菌的结构基因中鉴定了多个顺式作用元件^[7,9,10,17~22]。确定顺式作用元件最基本的方法就是采用凝胶迁移率变动分析(GMSA)技术,直接筛选能够与转录因子特异结合的核苷酸序列。即使在调控蛋白因子还未分离纯化的情况下,GMSA 技术仍然可以利用粗蛋白制备物与特定基因启动子的 DNA 片段进行分析。这对于遗传背景不太清楚,特别是调控蛋白还未鉴定的结构基因转录调控机理的研究提供了有力的工具^[9,11,23,24]。冯红等(1999)用此方法,分析了 *P. chrysosporium* 的 3 个木质素过氧化物酶基因启动子 DNA 片段,发现了 2 个 DNA 片段在凝胶上形成延迟带,即被蛋白组分特异结合^[13]。此外,通过 GMSA 筛选到的蛋白特异结合的顺式作用元件可作为探针,用于筛选 cDNA 文库中与 DNA 结合的蛋白质 cDNA 克隆。该方法已成功地应用于高等真核生物转录调控因子的克隆,但在丝状真菌中还未见报道^[25]。本实验室已对培养于不充氧的 Kirk 培养基中提取的 *P. chrysosporium* 菌丝体蛋白与 *lip* 基因 5'-端调控区的次克隆 DNA 片段进行了凝胶迁移率变动分析,结果在 LG2P3 片段中鉴定出 2 个蛋白结合元件 PBE1 和 PBE2^[13]。本研究利用充氧条件的 Kirk 培养基和天然木片培养所得的菌丝体蛋白进行分析,在更大的范围内寻找木质素过氧化物酶基因 5'-端调控区域的顺式作用元件。

3.2 木质素过氧化物酶基因 5'-端顺式作用元件的鉴定

从 *lipC* 基因的 5'-端得到的 6 个亚克隆片段 (LG2XΔX、LG2Xh、LG2P1、LG2P2、LG2P3、LG2SΔX),基本能够覆盖该基因的 5'-端调控序列。这些 DNA 片段的凝胶迁移率变动分析结果表明, LG2P3 (396 bp) DNA 片段,能特异的结合培养于低氮培养基的 LOP 菌丝体蛋白(图 1)。在体外结合实验中,分别加入 20 µg、40 µg 的菌丝体蛋白和过量的 *sau3A I* 酶切 pUC18 DNA 片段时,放射性标记的 LG2P3 片段在凝胶中的电泳迁移率发生改变,加入 10 µg 菌丝体蛋白质,电泳迁移率未发生改变,加入 40 倍过量的同源冷探针后延迟带消失,同时释放出游离探针(图 2)。上述结果表明, LG2P3 能与 LOP 蛋白质特异结合,而且这种结合与加入的蛋白质量有一定的关系,加入的菌丝体蛋白质含量达到 20 µg

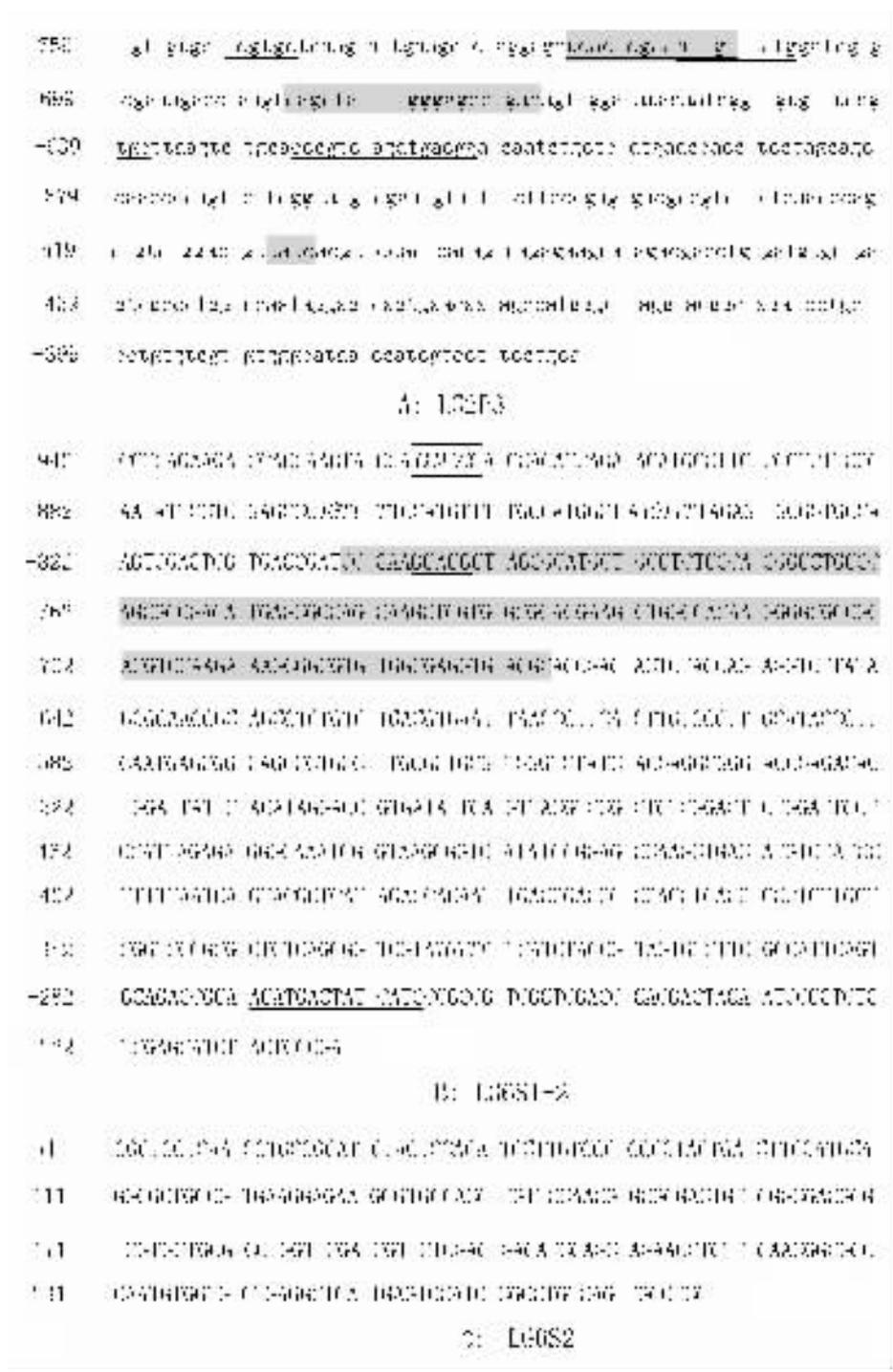


图 5 *lip* 基因的顺式作用位点

A: Lg2p3; B: Lg6s1-2; C: Lg6s2;

ACR1: 下划线; AFLR: 斜体粗体; AP2: 斜体; GC 富集区: 阴影; NIT2: 粗体;

PBE1 and PBE2: 粗体阴影; ROX1: 加框; XRE: 粗体下划线; 回文序列: 加框及斜体; 重复序列: 斜体粗体。

Fig. 5 Cis-regulatory elements of *lip* genes

A: Lg2p3; B: Lg6s1-2; C: Lg6s2;

ACR1, underlined; AFLR, italic and bold letter; AP2, italic letter; GC-rich region, shadow; NIT2, bold letter; palindrome sequence, boxed and italic; PBE1 and PBE2, bold and shadow; Repeat sequences, italic and bold; ROX1, boxed; XRE, bold and underlined.

时, DNA-蛋白质的特异结合带最明显。本研究结果与冯红用 GNSA 技术分析 LG2P3 片段与结合反应不充氧的低氮培养基中提取的菌丝体蛋白的结果相类似^[13], 表明 LG2P3 在低氮的条件下无论充氧与否均会发生迁移率的改变。已有的 RT-PCR 分析结果表明, *lipC* 基因是限碳条件下的主要转录成分, 该基因的表达主要与培养基中的碳源有关。江明锋等发现在碳源充足的情况下仅有 *lipC* 等位基因中的 *lipC2* 在高氮高碳充氧的条件下才得到表达^[4, 26]。本研究中的 KirK 培养基属于高碳低氮培养基, *lipC* 应不表达, 因此研究中发现的 LG2P3 片段中是否含有负调控的顺式作用元件, 还有待于进一步研究。值得注意的是, 本研究中未能检测到 LG2P3 片段与培养于天然冷杉木片上的 TP 蛋白的结合(结果未显示)。在用 RT-PCR 方法分析 *lipC* 基因在天然冷杉木片上的表达的时候, 我们发现 *lipC* 在培养到第 6 周时可以得到表达, 因此单独用培养 6 周的菌丝体蛋白质进行凝胶迁移率变动分析, 有可能得到更理想的结果^[16]。

从 *lipF* 基因的 5'-端共得到 4 个亚克隆 DNA 片段 LG6S1-1(120 bp)、LG6S1-2(738 bp)、LG6S2、LG6S3(300 bp), 它们的凝胶迁移率变动分析结果发现, LG6S1-2(738 bp) 能与培养于 Kirk 低氮培养基的菌丝体蛋白 LOP 发生特异的结合, LG6S2 片段能与培养于天然冷杉木片的菌丝体蛋白 TP 发生特异结合。在与菌丝体蛋白的同样结合实验中, 加入 *sau3A* 酶切 pUC18 DNA 片段后, LG6S2 和 LG6S1-2 片段在凝胶电泳中的迁移率发生改变, 加入 40 倍过量的同源冷探针后延迟带减弱, 同时出现游离探针。其余 3 个来自于 *lipF* 基因的启动子区域的亚克隆 DNA 片段无论与 LOP 还是 TP 菌丝体蛋白质, 均不能发生特异的结合。由于 *lipF* 基因表达的研究较少, 所以难以比较不同的研究结果^[16]。

3.3 木质素过氧化物酶基因 5'-端亚克隆序列顺式调控元件分析

真核基因的转录调控通常是上游序列中的顺式调控元件与反式作用因子相互作用的结果。因此, 分析发生凝胶迁移率改变的 DNA 片段中的已知顺式作用元件, 将有利于进一步了解该片段发生迁移率改变的原因。由于黄孢原毛平革菌的基因组序列已经公布, 根据发生结合反应片段的 DNA 序列, 因此很容易将所得片段进行定位。LG2P3 片段是位

于 *lipC* 基因 ATG 上游 -759 至 -362 bp 的区域内, 这段序列中发现了一些可能的顺式作用元件, 如 -421 bp 处存在一个真核生物激活蛋白 2(AP2) 因子的结合序列 GCCATGGG^[17]; 在 -504 bp 处的 NIT2 结合位点^[27], NIT2 是利用硝酸盐作为氮源的催化阻遏作用的全局性转录调控因子; -557 bp 处发现与 *Aspergillus parasiticus* 的 AFLR 调控蛋白结合的同源序列 TGCCTCA^[18]; -707 bp 处与酵母 ROX1 因子识别位点同源的序列 ATTGTTATG^[27], ROX1 是一个负调控因子, 它与分子氧和血红素介导的转录调控有关。冯红等用 DNaseI 足迹法在 LG2P3 鉴定出了 PBE1 和 PBE2 2 个蛋白结合序列^[13]。如图 5A 所示, PBE2 的 3'-端的 5nt 正好与酵母的 ROX1 结合位点的序列^[13](ATTGTTATG)的 5'-端重叠, ROX1 因子在酵母体内的表达受分子氧的调控, 并且参与血红素合成有关基因的调控。由于 *P. chrysosporium* 木质素降解系统基因的表达也受分子氧的调控, LIP 酶本身也是含血红素的基因, 因此这 2 个因子在序列上的重叠似乎暗示 PBE2 位点可能与分子氧或血红素的调控有关。

在 LG6S1-2 的序列中找到 4 个 NIT2 结合的序列, 2 个 XRE 结合位点; 在 -289 至 -291 bp 区域发现与酵母 ACR1 因子结合位点类似的核酸序列 ACATGACTGTCA^[28], 在 -803 至 -669 bp 间有一段长约 109 bp 的 GC 富集区, GC 碱基比例达 87.2%^[9, 21, 29, 25]。

LG6S2 片段在基因组序列上的定位结果表明, 该片段位于 *lipF* 基因的 +51 至 +277 的区域, 其序列中含有 2 个 XRE 结合位点。LG6S2 片段与提取于木片上的菌丝体蛋白能在体外结合并发生延迟反应, 因此, 该结果是否是由于反式因子结合于这些位点所引起的还有待进一步研究。

以上结果表明, 来自于木质素过氧化物酶基因 *lipC*、*lipF* 的 LG2P3、LG6S1-2、LG6S2 DNA 片段的确能与木质素降解条件下的菌丝体蛋白特异的结合。根据这些片段在该基因启动子中的位置, 及该片段中已发现的顺式作用元件, 有理由推测这些特异结合的菌丝体蛋白可能是与木质素过氧化物酶基因转录调控有关的蛋白因子。

参考文献(References):

- [1] Martinez D, Larrondo L F, Putnam N, Gelpke M D, Huang K,

- Chapman J, Helfenbein K G. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(6):695~700.
- [2] Breen A, Singleton F L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Curr Opin in Biotechnol*, 1999, 10(3):252~258.
- [3] Reddy C A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr opin Biotechnol*, 1995, 6(3):320~328.
- [4] Boominathan K, Reddy C A. cAMP-mediated different regulation of lignin peroxidase and manganese peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(12):5586~5590.
- [5] Fenn P, Kirk T K. Relationship of nitrogen to the onset and suppression of lignolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol*, 1981, 130(1):59~65.
- [6] Jeffries T W, Choi S, Kirk T K. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 42(2):290~296.
- [7] Marzluf G A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol. Rev*, 1997, 16(1):17~32.
- [8] Ausubel F M., Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. 1997. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- [9] Kulmburg P, Sequeval K, Lenouvel F, Mathieu M. Identification of the promoter region involved in the all to regulation of the transcriptional activator ACLR in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol*, 1992, 15(5):1932~1939.
- [10] Mizote T, Bibbins M, Sheffied P J, Connerton I F. 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(4):421~427.
- [11] Punt P J, Strauss J, Smit R, Kinghorn J R, van den Hondel C A M J J, Scazzocchio C. The intergenic region between the divergently transcribed *nitA* and *niaD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multipul Nir A binding sites which act bidirectionally. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(10):5688~5699.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning; a laboratory manual. The second edition, Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York, 1989.
- [13] FENG Hong, ZHANG Yi-Zheng. Analysis of 5' upstream regulatory sequences of lignin peroxidase(LIP) gene of *Phanerochaete chrysosporium*. *Acta Biochi Mica et Biophysica Sinica*, 1999, 31(6):669~674.
- 冯红,张义正.木质素过氧化物酶基因5'-端上游调控序列的分析.生物化学与生物物理学报, 1999, 31(6):669~674.
- [14] Zhang Y Z, Reddy C A, Rasody A. Cloning of several lignin peroxidase(*lip*) encoding genes: sequence analysis of the LIP6 gene from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene*, 1991, 97(2):191~198.
- [15] Zhang Y Z, Zylatia G J, Olsen R H, Reddy C A. Identification of cDNA clones for ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* using synthetic oligonucleotide probes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 137(2):649~656.
- [16] JIANG Ming-Feng, ZHANG Yi-Zheng. Rt-PCR analysis of *Phanerochaete chrysosporium lip* gene in colonized fir wood. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(1):65~72.
- 江明锋,张义正.培养于天然冷杉木片的黄孢原毛平革菌木质素过氧化物酶基因表达的RT-PCR分析.微生物学报, 2003, 43(1):65~72.
- [17] Dhawale S S, Lane A C. Complication of sequence-specific DNA binding proteins implicated in transcriptional control in fungi. *Nucl Acids Res*, 1993, 21(24):5537~5546.
- [18] Ehrlich K C, Montalbano B G, Cary J W. Binding of the c6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin of pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. *Gene*, 1999, 230(2):249~257.
- [19] Ebbode D L, Pahul J L, Plamann M, Sacha M, Yanofsky C. *Cpc1*, the general regulatory gene for genes of amino-acid biosynthesis in *Neurospora crassa* is differentially expression during the asexual life cycle. *Mol cell Biol*, 1991, 11(2):928~934.
- [20] Hass H, Angermayr K, Zadra I, Stoffler G. Overexpression of *nreB*, a new GATA factor-encoding gene of *Penicillium chrysogenum*, leads to repression of the nitrate assimilatory gene cluster. *J Biol Chem*, 1997, 272(36):22576~22582.
- [21] Mathieu M, Felenbok B. The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediated glucose repression of ethanol regulation at various levels through competition with ALCR-specific transactivator. *EMBOJ*, 1994, 13(17):4022~4027.
- [22] Jamse B J H, Gaskell J, Akhtar M, Cullen D. Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidase, manganese peroxidase, and glyoxal oxidase in wood. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(9):3536~3538.
- [23] Adhikary G, Crish J, Lass J, Eckert R L. Regulation of involucrin expression in normal human corneal epithelial cells: a role for activator protein one. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(4):1080~1087.
- [24] Futaki S, Kiwada T, Shiraishi Y, Sugiura Y. Total synthesis of artificial zinc-finger proteins; problems and perspectives. *Biopolymers*, 2004, 76(2):98~109.
- [25] Screen S, Bailey A, Charnley K, Cooper R, Clarkson J. Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREB protein. *Curr Genet*, 1997, 31(6):511~518.
- [26] Jiang M F, Zhang Y Z. The RT-PCR Analysis of lignocellulolytic biodegradation-related gene expression of *Phanerochaete chrysosporium*. *High Technol Lett*, 2004, 10(4):57~62.
- [27] Lowry C V, Cerdan M E, Zitomer R S. A hypoxic consensus operator and a constitutive activation region regulator the ANB1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(11):5921~5926.
- [28] Vincent A C, Struhl K. ACR1, a yeast ATF/CREB repressor. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(12):5394~5405.
- [29] Nagata T, Takashima T, Tomaka M, Tsukagoshi N. *Aspergillus nidulans* nuclear proteins bind to a CCAAT element and the adjacent upstream sequence in the promoter region of the starch-inducible Taka-amylase A gene. *Mol Gen Genet*, 1993, 237(1~2):251~260.