

里氏木霉绿色荧光蛋白表达载体的构建 及功能鉴定

高云雨, 余炜怡, 董冠园, 钟路遥, 刘雯莉, 田生礼*

(深圳大学 生命与海洋科学学院 深圳市微生物基因工程重点实验室, 中国广东 深圳 518060)

摘要: 为了后续研究里氏木霉(*Trichoderma reesei*)纤维素酶基因的表达与调控, 利用 overlap PCR 及分子克隆技术构建了含有 ColE1 原核复制起始位点、氨苄青霉素抗性、里氏木霉的丙酮酸脱羧酶启动子、丙酮酸脱羧酶终止子、潮霉素 B 抗性的筛选标记并能表达增强型绿色荧光蛋白(ZsGreen)的表达载体 pLXT-ZsGreen。将该载体转化里氏木霉 QM9414 原生质细胞, 使用潮霉素 B 筛选平板得到阳性转化子, 随后使用荧光显微镜在 488 nm 激发光下观察菌丝, 并随机挑取 4 个转化菌株进行 Western-blot 验证。结果显示, 里氏木霉菌丝体可发出明亮的绿色荧光, 而且 Western-blot 验证了该载体能够在里氏木霉中有效地表达增强型绿色荧光蛋白。上述研究表明, 载体 pLXT-ZsGreen 在里氏木霉中能够稳定高效地表达外源基因, 为研究里氏木霉的基因表达调控奠定了实验基础。

关键词: 里氏木霉; 增强型绿色荧光蛋白; 组成型表达; 载体构建; 重叠 PCR

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2017)04-0306-06

Construction of ZsGreen Expression Vector and Verification of Its Function in *Trichoderma reesei*

GAO Yun-yu, SHE Wei-yi, DONG Guan-yuan, ZHONG Lu-yao, LIU Wen-li,
TIAN Sheng-li*

(Shenzhen Key Laboratory of Microbial and Gene Engineering, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China)

Abstract: In order to study the expression and regulation of cellulase gene in *Trichoderma reesei*, overlap PCR amplification and molecular cloning techniques were employed to construct a vector pLXT-ZsGreen expressing bright green fluorescence protein in *T. reesei*. The vector contains prokaryotic replication origin ColE1, the ampicillin resistance gene, promoter of pyruvate decarboxylase (PDC), terminator of PDC, *ZsGreen* gene, and the hygromycin B resistance gene. The vectors were transformed into the protoplasts of *T. reesei* QM9414. The hyphae of the transformants were observed using a fluorescence microscope with 488 nm excitation light, and four colonies were randomly selected for Western-blot. The results showed that the transformants were able to express bright green fluorescence under fluorescence microscope. The Western-blot analysis further verified that the constructed plasmid could express ZsGreen protein effectively in *T. reesei*. The vector pLXT-ZsGreen is capable of stable and efficient expression of exogenous genes in *T. reesei*, and this lays a foundation for the study of gene expression regulation of *T. reesei*.

Key words: *Trichoderma reesei*; enhanced green fluorescence protein; constitutive expression; vector construction; overlap PCR

(*Life Science Research*, 2017, 21(4): 306~311)

收稿日期: 2016-09-07; 修回日期: 2016-10-10

基金项目: 国家自然科学基金(31070044); 深圳市科技基础研究发展计划(ZYC201105130092A)

作者简介: 高云雨(1992-), 女, 广东深圳人, 硕士研究生, 主要从事里氏木霉基因表达与调控研究, E-mail: smallkokoko@hotmail.com; * 通讯作者: 田生礼(1960-), 男, 辽宁东港人, 博士, 深圳大学教授, 硕士生导师, 主要从事里氏木霉基因表达与调控研究, Tel: 0755-26534149, E-mail: sltian@szu.edu.cn.

里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是多细胞的丝状真核微生物,是红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)的无性型,隶属于丛梗孢目(Moniliales)木霉属(*Trichoderma*),是重要的纤维素酶生产菌,可将再生木质纤维素生物质转化为生物燃料^[1]。在公布出来的里氏木霉的基因组序列中,植物细胞壁降解酶的基因组只有 33.9 Mb,比其他丝状真菌的要小得多^[2],但其降解纤维素的能力远远大于其他真菌,在发酵生产过程中无致病性,不产生真菌毒素和抗生素^[3]。且丝状真菌里氏木霉表达系统和原核表达系统相比,其对蛋白质的折叠、修饰和糖基化更全面和准确,具有很强的分泌蛋白质的能力^[4]。据报道,优良的里氏木霉突变株在最优化的培养条件下可以分泌出 100 g/L 的蛋白质,其中主要成分是纤维素酶^[5]。因此里氏木霉在纤维素酶生产上具有重大的工业意义。

里氏木霉的主要产物纤维素酶和纤维二糖水解酶 I (cellobiohydrolase I, CBHI)约 64%~80% 能分泌到胞外^[6]。其中, CBHI 的含量最高,占到胞外分泌总蛋白质的 50%以上^[7],因此常使用 CBHI 的启动子来构建里氏木霉基因调控载体^[8]。CBHI 启动子是诱导型启动子,在构建里氏木霉诱导型表达系统时,经常需要添加纤维素或乳糖等诱导物,才能开启基因的转录表达,但是这个过程容易受到葡萄糖分解物的阻遏作用^[9];同时,在诱导物存在的条件下,诱导型表达系统会产生大量的内源性纤维素酶系蛋白,使表达产物分离纯化困难^[10-12]。而组成型启动子调控基因表达不需要诱导物,不受葡萄糖分解物阻遏作用的影响,可以快速利用葡萄糖作为碳源,表达产生高纯度的目的蛋白。目前,用组成型启动子构建的里氏木霉组成型表达系统已经成功地生产了同源和异源重组蛋白。例如:编码磷酸甘油酸激酶的 *pgk* 启动子和编码丙酮酸激酶的 *pyk* 启动子,在葡萄糖培养基中能够调控基因的转录表达,但是效率不高^[13];而编码 3-磷酸甘油醛脱氢酶的 *gpd* 基因的启动子(*Pgpd*)是一个强的组成型启动子,已经被广泛用于构建真菌的组成型表达系统^[14]。本文使用的 pAN7-1 载体中的 *Hph* 表达盒中正是使用了 *gpd* 启动子。此外, Wang 等^[15]从里氏木霉糖代谢基因中筛选出的丙酮酸脱羧酶基因(*pyruvate decarboxylase, pdc*)的组成型启动子 *Ppdc* 是较新发现的一个具有较强作用的启动子,本文将选用 *Ppdc* 启动子来构建里氏木霉组成型表达载体。

大多数的里氏木霉基因工程改造方法是利用 pUC 系列载体在多克隆位点处插入一个表达盒来构建质粒,将这个质粒与含有潮霉素 B 基因(*Hph*)的 pAN7-1 质粒共转化里氏木霉原生质体,才能获得潮霉素 B 抗性基因,从而通过抗性筛选获得转化菌株^[16-18]。该方法繁琐、费时、转化率低,而且还存在假阳性的问题。为了对里氏木霉纤维素酶的表达和调控机制有更清晰的了解,需要构建一个更加便捷高效的里氏木霉表达载体。本文将 *Hph* 基因表达盒及组成型强启动子 *Ppdc* 和终止子 *Tpdc* 表达盒构建在同一个载体中,利用绿色荧光蛋白基因(*ZsGreen*)作为报告基因,可更直接、客观地证明该载体的高效表达。这不仅可以提高基因克隆的效率,也大大减少了传统方法中需要与 pAN7-1 共转化的工作量、工作难度和复杂性,为研究里氏木霉的基因表达与调控提供了强有力的技术工具和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 JM107 由本实验室保存。里氏木霉 QM9414 购自美国模式菌种收藏中心(ATCC)。质粒 pAN7-1 带有真菌筛选标记潮霉素 B 抗性基因(*Hph*),由山东大学汪天虹教授惠赠。pMD19-T 带有氨苄青霉素抗性基因(*Amp*),购自宝生物工程(大连)有限公司。pLVX-ZsGreen1-N1 (Clontech 公司,美国)。溶壁酶(Sigma-Aldrich 公司,丹麦),ECL 化学发光底物(Thermo Scientific 公司,美国),Anti-His-Tag Mouse IgG1、Goat Anti-Mouse IgG-HRP (Abcam 公司,英国)。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L,用于平板培养时加入 15 g/L 琼脂(均购于生工生物工程(上海)股份有限公司),用于 *E. coli* 转化时加入 100 μg/mL 氨苄青霉素(Invitrogen 公司,美国)。

PDA 培养基:将土豆去皮切碎,每 20 g 土豆加水 100 mL,煮沸 30 min,用 3 层纱布过滤,加入 2%葡萄糖。筛选里氏木霉转化子时加入终浓度为 100 μg/mL 的潮霉素 B (Invitrogen 公司,美国)。

里氏木霉液体基本培养基: KH_2PO_4 2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g/L, 尿素 0.3 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001 6 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 7 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.003 7 g/L, 蛋白胨 2 g/L, 吐温 80 1 g/L, 葡萄糖 20 g/L (均购

于生工生物工程(上海)股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 表达载体 pLXT-ZsGreen 构建

通过限制性内切酶 *Ahd I* (识别位点是 5'...GACNNN↓NNGTC...3') 酶切载体 pLXT-ZsGreen 后, 载体 DNA 双链的 3' 端各悬挂一个胸腺嘧啶残基 dT, 可直接连接 PCR 产物。通过 PCR 扩增 pMD19-T 质粒的 pUC ori 及 *Amp* 片段, 并将该基因片段命名为 PMD 片段, 由于 PMD 片段中的 *Amp* 编码序列第 789 位含有 *Ahd I* 酶切位点, 与 pLXT-ZsGreen 载体酶切盒中的两个 *Ahd I* 酶切位点相冲突, 因此需要将 PMD 片段中的 *Ahd I* 位点突变除去, 同时不改变所对应编码的氨基酸。本文采用 overlap PCR 的方法对目的位点进行突变, 将需要突变的位点引入引物(引物序列见表 1) 中。第一轮 PCR 反应: 首先使用引物 pmd6 F 和 pmd6 R 扩增, 获得 PMD 片段的前部分突变片段 (Δ PMD1), 约 1 035 bp。然后使用引物 pmd5 F 和 pmd5 R 扩增, 获得 PMD 片段的后部分突变片段 (Δ PMD2), 长度约 945 bp。第二轮 PCR 反应: 将上一轮 PCR 的反应产物 Δ PMD1、 Δ PMD2 纯化后作为模板, 使用引物 pmd5 F 和 pmd6 R 扩增出含有突变位点的完整 Δ PMD, 长度约为 1 901 bp。通过两轮 PCR 反应后, 得到完成点突变的 Δ PMD 片段。再通过 PCR 获得其他载体片段(引物序列见表 1): 以质粒 pAN7-1 为模板扩增 *Hph* 片段; 以里氏木霉 QM9414 基因组 DNA 为模板, 扩增丙酮酸脱羧酶基因(*pdc*)组成型启动子 *Ppdc* 和终止子 *Tpdc*; 以 pLVX-ZsGreen1-N1 质粒为模板扩增

绿色荧光蛋白编码基因 *ZsGreen*。每个片段间首尾有 40~80 bp 不等的重叠部分, 这样通过一次 overlap PCR 将各个片段连接, 构建成了重组质粒 pLXT-ZsGreen。

将重组质粒 pLXT-ZsGreen 转化大肠杆菌 JM107 感受态细胞, 挑选在氨苄选择培养基上生长的菌落进行扩增培养后, 提取质粒 DNA 进行酶切鉴定和 DNA 测序鉴定。然后将阳性质粒转化至里氏木霉 QM9414 中, 并将转化后的菌体涂于含有 100 μ g/mL 的潮霉素 B 抗性平板上, 通过 PCR 对里氏木霉重组菌进行鉴定, 挑选阳性重组菌在荧光显微镜下使用 488 nm 激发光激发菌体中的绿色荧光蛋白并观察拍照。

1.2.2 原生质体转化

将里氏木霉 QM9414 接种于 PDA 平板上, 于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 7 d 后, 用无菌水制备孢子悬液, 取 1.0×10^8 个孢子接种到 30 mL 液体基本培养基, 28 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 11 h, 镜检孢子萌发情况, 若大部分孢子萌发后即可进行后续步骤。参考 Penttilä 等^[9]的实验方法, 用 PEG 进行原生质体的制备与里氏木霉转化。哈茨木霉的溶壁酶(10 mg/mL) 溶于 1 mol/L $MgSO_4$ 用于制备原生质体。转化时, 使用 20 μ g 质粒 DNA 和 200 μ L PEG buffer (60% PEG4000, 50 mmol/L $CaCl_2$, 10 mmol/L Tris HCl, pH 7.5)。将转化后的里氏木霉在包含 100 μ g/mL 潮霉素 B 的平板上 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 2~3 d。将平板置于蓝光仪上, 挑取有绿色荧光的阳性转化子, 并进行菌丝 PCR 鉴定, 以确认 *ZsGreen* 表达盒插入到转化子的基因组中。随后使用荧光显微镜在

表 1 Overlap PCR 所需引物
Table 1 Primers for overlap PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Underline for the restriction site or box for the mutation site
pmd5 F	GCCTGTGTAGAGATACAAGGGAATTCGCGACGAAAGGGCCTCGTACGCC	<i>Nru I</i>
pmd5 R	CTCCCCATCGTAGTTATCTACACACACGCGGAGTACGGCAACTATCG	Mutation site
pmd6 F	CCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCCATACTTCGCTGACTCCCCGTGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC	Mutation site
pmd6 R	ATAAGCGCGCCCGCAGGAAAGAATCATGTGAGC	<i>Asc I</i>
H-PPDC F	TATTGGCGCCCTCGCGACCAAGCAGGTGACCAAGAAAGACGCCCGCGCCG	<i>Asc I</i> ; <i>Nru I</i>
H-ZSG F	GCACAATCTTAAGACATTTGGTCATGGCCCAAGCAGCGCC	<i>Afl II</i>
H-TPDC F	CATTAGATCGATCCGCTGAGCAATAAGCTACGGCCCGCCGATGAAGTCTGACCGGG	<i>Cla I</i> ; <i>Not I</i>
H-PAN F	CGAGGCGTCCATCCCGATGCGCATGCTGCAGGTGCGAGTGG	<i>Bst XI</i>
H-PMD F	TCCCGAGCGCCAAAGGCCTTGGCGAAAGGGCCTCGTACGCC	<i>Nru I</i> ; <i>Bst XI</i> ; <i>Nar I</i>
H-PPDC R	GCCATGACCAAATGCTCTTAAGATTTGTGCTGCTAGCTGCGCTGC	<i>Afl II</i>
H-ZSG R	CAGCGCATCGATCTAATGATGATGATGATGACTAGTGACCTTTAGTCGGGCAA GGCGGAGCCGAGGCCG	<i>Cla I</i> ; <i>Spe I</i>
H-TPDC R	GCAGGCATGCCATCGGGATGGACGCCCTCGATGCTCTCC	<i>Bst XI</i>
H-PAN R	GGCCCTTCGCGCAAGGCCTTGGCGCCTCGCAATTCCTTGTATCTCTACACACAGCG	<i>Bst XI</i> ; <i>Nru I</i> ; <i>Nar I</i>

488 nm 激发光的条件下观察菌丝绿色荧光蛋白的表达情况并拍照。与此同时,对阳性转化子进行基因组 DNA 的提取及测序,做进一步确定。

1.2.3 基因组 DNA 的提取

将适量孢子悬液接种于液体基本培养基中,于 28 °C、250 r/min 条件下培养 2 d。抽滤菌液,得到菌丝体,用液氮研磨成粉后根据 E.Z.N.A.® Fungal DNA Kit (Omega 公司,美国)提取基因组 DNA。

1.2.4 Western-blot 检测

在里氏木霉转化培养板上挑选 4 株经观察含 *ZsGreen* 基因的里氏木霉转化株(分别编号为 *T. reesei*-pLXT-*ZsGreen*-1; *T. reesei*-pLXT-*ZsGreen*-2; *T. reesei*-pLXT-*ZsGreen*-3; *T. reesei*-pLXT-*ZsGreen*-4), 分别接种于液体基本培养基中,以里氏木霉 QM9414 空白菌为对照,28 °C 恒温培养 2 d。抽滤菌液,得到菌丝体,用液氮研磨成粉后加入裂解液裂解,离心后取上清,使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)检测蛋白质浓度。将样品稀释至相同蛋白质浓度后,同时加样至两块聚丙烯酰胺凝胶上,两块胶同时进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(10% 的分离胶及 5% 的浓缩胶)。电泳结束后,其中一块使用考马斯亮蓝染色液染色,然后使用核酸成像系统(GEL DOX XR+, Bio-Rad 公司,美国)拍摄凝胶;另一块使用迷你转印电泳仪(DYCZ-40D, 北京六一仪器厂)将蛋白质转到 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后再使用 Anti-His-Tag Mouse IgG1 作为一抗(1 : 2 000 稀释),4 °C 孵育过夜,随后使用 Goat Anti-Mouse IgG-HRP 作为二抗(1 : 5 000 稀释),室温下孵育 1 h,洗净后加入 ECL 显色液,用凝胶成像分析系统(Image Station 4000MM, Kodak 公司,美国)进行 Western-blot 显影分析。

2 结果

2.1 里氏木霉干扰载体 pLXT-*ZsGreen* 的构建及鉴定

根据载体构建的需要,将 *Amp* 编码序列第 789 位的 G 突变为 A,去除片段中的 *Ahd* I 酶切位点,而原来编码的苏氨酸 T (ACG-ACA)保持不变,扩增出含有突变位点的 Δ PMD 片段。PMD 片段的前部分突变片段 Δ PMD1 的长度约 1 035 bp,后部分突变片段 Δ PMD2 的长度约 945 bp,完成定点突变后 Δ PMD 为 1 901 bp。电泳结果显示获得符合预期大小的目的片段(图 1),经测序鉴定成

功定点突变。

通过 overlap PCR 构建载体 pLXT-*ZsGreen*。载体包括 *Ppdc* 启动子(1 811 bp)和 *Tpdc* 终止子(1 100 bp)、潮霉素 B 抗性基因 *Hph* (4 100 bp)、绿色荧光蛋白编码基因 *ZsGreen* (708 bp)、pUC ori 与氨苄抗性基因 *Amp* (2 000 bp),长度为 9 719 bp,电泳结果见图 2。为了进一步验证所构建质粒的正确性,提取重组子基因组 DNA 进行 PCR 鉴定和 DNA 测序,以上实验结果均表明序列正确,质粒 pLXT-*ZsGreen* 构建成功。质粒 pLXT-*ZsGreen* 图谱如图 3 所示。

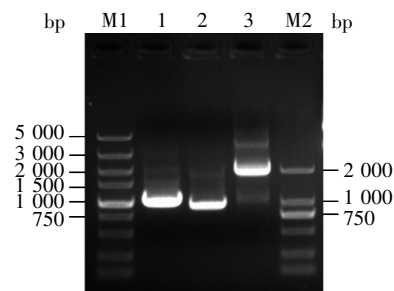


图 1 Δ PMD 片段定点突变的结果

1: PMD 片段前部分突变片段 Δ PMD1; 2: PMD 片段后部分突变片段 Δ PMD2; 3: 完成定点突变的完整片段 Δ PMD; M1: 5 000 bp DNA marker; M2: 2 000 bp DNA marker。

Fig.1 Site-directed mutation of Δ PMD fragment

1: The Δ PMD1 fragment after mutation of PMD; 2: The Δ PMD2 fragment after mutation of PMD; 3: The complete fragment Δ PMD with the spot mutation; M1: 5 000 bp DNA marker; M2: 2 000 bp DNA marker。

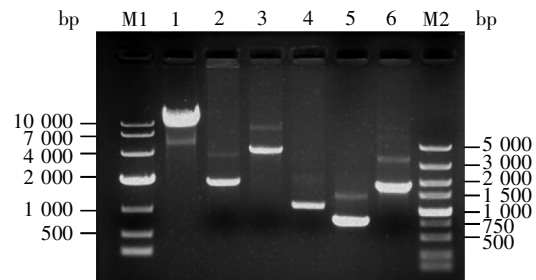


图 2 重组质粒 pLXT-*ZsGreen* 的电泳鉴定结果

M1: 10 000 bp DNA marker; 1: 质粒 pLXT-*ZsGreen* (9 719 bp); 2: pUC ori 与氨苄抗性基因 *Amp* (2 000 bp); 3: 潮霉素 B 抗性基因 *Hph* (4 100 bp); 4: *T. reesei* *Tpdc* 终止子(1 100 bp); 5: 绿色荧光蛋白基因 *ZsGreen* (708 bp); 6: *T. reesei* *Ppdc* 启动子(1 811 bp); M2: 5 000 bp DNA marker。

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pLXT-*ZsGreen* by electrophoresis

M1: 10 000 bp DNA marker; 1: Plasmid pLXT-*ZsGreen* (9 719 bp); 2: pUC ori and Ampicillin resistance gene *Amp* (2 000 bp); 3: Hygromycin B resistance gene *Hph* (4 100 bp); 4: *T. reesei* *Tpdc* terminator (1 100 bp); 5: Green fluorescent protein gene *ZsGreen* (708 bp); 6: *T. reesei* *Ppdc* promoter (1 811 bp); M2: 5 000 bp DNA marker。

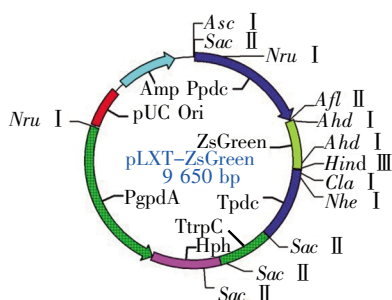


图3 质粒 pLXT-ZsGreen 图谱

Fig.3 The map of plasmid pLXT-ZsGreen

2.2 里氏木霉重组菌表达绿色荧光蛋白的功能鉴定及分析

为了观察里氏木霉重组菌株绿色荧光蛋白的表达情况,使用荧光显微镜在 488 nm 蓝光激发下对重组菌菌丝体进行观察,可看到发出明亮荧光的菌丝体(图 4C、D),而出发菌株在相同条件下无法观察到荧光(图 4A、B)。图 4E 和图 4F 分别显示出发菌株(左)和重组菌(右)菌体在日光和紫外灯下的肉眼观察结果,重组菌在日光灯下显亮黄色(图 4E 右),在 488 nm 蓝光下发出明亮绿色荧光(图 4F 右)。以上结果证明质粒 pLXT-ZsGreen 在里氏木霉重组菌株中可成功表达绿色荧光蛋白。

为进一步确定绿色荧光蛋白在里氏木霉重组菌中的表达情况,随机挑选 4 个重组菌提取菌体蛋白质,使用 BCA 法进行蛋白质定量,然后对重组菌进行 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 分析,结果见图 5。绿色荧光蛋白 ZsGreen 的大小是 30 kD, SDS-PAGE 电泳结果显示 4 个样品在 30 kD 处均有明显的蛋白质条带,而对照空白出发菌没有该条带,证明 4 个样品均能稳定表达 ZsGreen。进一步的 Western-blot 分析显示,4 个重组菌样品也出现了明显的特异性蛋白质条带,证明本文构建的里氏木霉表达质粒 pLXT-ZsGreen 可以稳定表达所克隆的外源绿色荧光蛋白基因 ZsGreen。

3 讨论

里氏木霉是工业产纤维素酶的重要菌种。然而,真菌中普遍存在“碳抑制效应”,在碳源丰富的条件下,里氏木霉中纤维素酶的合成受到分解代谢阻遏物的抑制^[20, 21]。为提高里氏木霉中纤维素酶的产量,我们需要进一步了解里氏木霉纤维素酶表达调控系统的调控机制。本文采用基因重组技术构建新型的里氏木霉表达载体,目的是为了探讨该表达载体组成基因的各个元件是否可以在丝状真菌里氏木霉中正常行使功能,以期为进

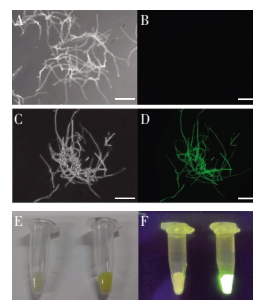


图4 质粒 pLXT-ZsGreen 转化里氏木霉 QM9414 后绿色荧光蛋白的表达结果

A: 空白出发菌普通光源下的拍摄结果; B: 空白出发菌荧光光源下的拍摄结果; C: 含有 pLXT-ZsGreen 的里氏木霉重组菌在普通光源下的拍摄结果; D: 含有 pLXT-ZsGreen 的里氏木霉重组菌在 488 nm 激发光条件下的拍摄结果(放大倍数为 100×; 普通光源曝光时间为 2 ms; 荧光光源曝光时间为 50 ms; 标尺长度为 200 μm); E: 出发菌(左)和含有 pLXT-ZsGreen 的里氏木霉重组菌(右)在日光灯下的观察结果; F: 出发菌(左)和含有 pLXT-ZsGreen 的里氏木霉重组菌(右)在 488 nm 蓝光条件下的拍摄结果。

Fig.4 GFP expression after transformation of QM9414 with pLXT-ZsGreen

A: The control strain under the ordinary light source; B: The control strain under the fluorescent light source; C: The *T. reesei* recombinant strain with pLXT-ZsGreen under the ordinary light source; D: The *T. reesei* recombinant strain with pLXT-ZsGreen under the 488 nm excitation fluorescent light source (magnification: 100×; ordinary light source exposure time: 2 ms; fluorescent light source exposure time: 50 ms; scale length: 200 μm); E: The control strain (left) and the recombinant strain (right) under the ordinary light source; F: The control strain (left) and the recombinant strain (right) under the blue light source.

一步研究基因的表达调控及沉默特异性基因(如代谢物阻遏蛋白编码基因)奠定良好的基础。

本文通过 PCR 获得了构建里氏木霉表达载体的特定基因片段,如大肠杆菌复制起点 Ori 和 Amp 片段, Ppdc 启动子、TpdC 终止子、Hph 片段和 ZsGreen 片段,载体图谱见图 3。同时,采用 overlap PCR 方法对 PMD 片段进行了点突变,突变后 Amp 编码序列第 789 位的 G 变为 A,去除了该片段中的 Ahd I 酶切位点,但使原来编码的苏氨酸 T (ACG-ACA)保持不变。最后,通过 overlap PCR 构建了含有绿色荧光蛋白基因 ZsGreen 的表达质粒 pLXT-ZsGreen,该载体包含潮霉素 B 抗性基因,因此在转化原生质体时,省去了载体 pAN7-1 的提取和共转化的过程,大大减少了工作量,并且提高了转化效率。绿色荧光蛋白基因 ZsGreen 受到紫外或蓝光激发时,能发射绿色荧光,且荧光性质稳定,无种属限制,为载体构建成功与否提供了直观的观察方法。绿色荧光蛋白 ZsGreen 的相对分子质量为 30 kD,可通过 SDS-PAGE 电泳

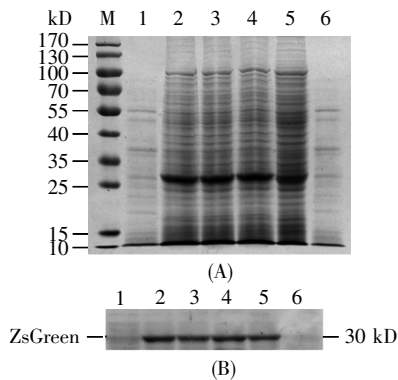


图5 转化子提取蛋白质的 SDS-PAGE 电泳(A)及 Western-blot 分析(B)

M: PageRuler 预染蛋白质 ladder; 1: 里氏木霉 QM9414 空白出发菌; 2~5: 分别为转化株 *T. reesei*-pLXT-ZsGreen-1、*T. reesei*-pLXT-ZsGreen-2、*T. reesei*-pLXT-ZsGreen-3 和 *T. reesei*-pLXT-ZsGreen-4; 6: 里氏木霉转化对照组。

Fig.5 The extracted protein from transformants analyzed by SDS-PAGE (A) and Western-blot (B)

M: PageRuler prestained protein ladder; 1: *T. reesei* QM9414 control strain; 2~5: *T. reesei* recombinant strains (*T. reesei*-pLXT-ZsGreen-1, *T. reesei*-pLXT-ZsGreen-2, *T. reesei*-pLXT-ZsGreen-3 and *T. reesei*-pLXT-ZsGreen-4); 6: *T. reesei* transformation control strain.

及 Western-blot 检测。实验结果显示,载体 pLXT-ZsGreen 已成功转化进入里氏木霉 QM9414 中,并能稳定表达出绿色荧光蛋白 ZsGreen (图 5)。理论上,外源基因在基因同源重组过程中会有同源重组和非同源重组发生,由于整合位点的不同,可能会对外源基因的表达量产生一定的影响,但是通过对 4 个随机挑选的不同转化子进行蛋白质表达检测和 Western-blot 分析,发现这 4 个转化子中,绿色荧光蛋白基因的表达量并无明显的不同。通过基因组测序进一步证明,载体有效地整合到了里氏木霉基因组中。上述结果说明,构建的表达载体是通过丙酮酸脱羧酶基因启动子 *Ppdc* 和终止子 *Tpdc* 介导同源重组的方式有效地整合到了里氏木霉基因组中,并通过启动子 *Ppdc* 起始了对外源基因 *ZsGreen* 的有效转录,从而在里氏木霉菌体中翻译出相应的蛋白质,证明该载体可用于丝状真菌里氏木霉中开展外源基因的表达研究。

4 结论

本文成功构建了里氏木霉表达载体 pLXT-ZsGreen,并转化了丝状真菌里氏木霉,其菌丝体在 488 nm 激发光下可观察到明亮的绿色荧光,免疫印迹结果进一步证明了绿色荧光蛋白表达成功。上述结果为进一步研究外源基因在里氏木霉中的表达提供了稳定的组成型表达载体,同时也

为 RNA 沉默里氏木霉中特定代谢阻遏物基因、研究纤维素酶表达的调控机制等奠定了实验基础。

参考文献(References):

- [1] Wilson D B. Cellulases and biofuels[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(3): 295-299.
- [2] Martinez D, Berka R M, Henrissat B, et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*)[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(5): 553-560.
- [3] Nevalainen H, Suominen P, Taimisto K. On the safety of *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Biotechnology, 1994, 37(3): 193-200.
- [4] Wang B, Xia L. High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(6): 4568-4572.
- [5] Schuster A, Schmol M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(3): 787-799.
- [6] Meyer V. Genetic engineering of filamentous fungi-progress, obstacles and future trends[J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(2): 177-185.
- [7] Gen Z, Shi S, Jiang Y, et al. Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 21.
- [8] 唐偲洋,魏东芝,杨忠,等.启动子 *cbh1* 的改造与里氏木霉通用质粒载体的构建[J].工业微生物(Tang Cai-yang, Wei Dong-zhi, Yang Zhong, et al. Improvement of promoter *cbh1* and construction of heterologous gene expression multi-purpose vector of *Trichoderma reesei*)[J]. Industrial Microbiology, 2014, 44(4): 33-38.
- [9] 林涛,黄建忠.丝状真菌启动子研究进展[J].安徽农业科学(Lin Tao, Huang Jian-zhong. Research advance on promoters for heterologous gene expression in filamentous fungi)[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(7): 2862-2863.
- [10] Xu J, Nogawa M, Okada H, et al. Regulation of *xyn3* gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(3): 370-375.
- [11] Mach R L, Zeilinger S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60(5): 515-522.
- [12] Seiboth B, Gamauf C, Pail M, et al. The D-xylose reductase of *Hypocrea jecorina* is the major aldose reductase in pentose and D-galactose catabolism and necessary for β -galactosidase and cellulase induction by lactose[J]. Molecular Microbiology, 2007, 66(4): 890-900.
- [13] Kurzatkowski W, Torronen A, Filipek J, et al. Glucose-induced secretion of *Trichoderma reesei* xylanases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(8): 2859-2865.
- [14] Eriksson T, Stals I, Collen A, et al. Heterogeneity of homologously expressed *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) *Cel7B* catalytic module[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(7): 1266-1276.
- [15] Wang S W, Liu G, Wang J, et al. Enhancing cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT C30 through combined manipulation of activating and repressing genes[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2013, 40(6): 633-641.
- [16] 梁智伟,王娟,田生礼,等.里氏木霉中小分子 RNA 对纤维素酶表达调控的作用[J].生物技术通讯(Liang Zhi-wei, Wang Juan, Tian Sheng-li, et al. Study on the regulation function of small RNAs on cellulase expression in *Trichoderma reesei*)[J]. Letters in Biontology, 2015, 26(4): 535-540.
- [17] 冯飞,王绍文,王娟,等.里氏木霉 GH61 家族糖苷酶的高效表达及酶学特性研究[J].微生物学通报(Feng Fei, Wang Shaowen, Wang Juan, et al. High-level expression and characterization of GH61 glycoside hydrolase from *Trichoderma reesei*)[J]. Microbiology China, 2014, 41(7): 1261-1269.
- [18] 曾敏,邓丽瑜,汤新,等. CBH II 和 EGIV 的重构基因在里氏木霉中的组成型表达[J].食品研究与开发(Zeng Min, Deng Li-yu, Tang Xin, et al. Construction of CBH II and EG IV for homologous protein expression with constitutive promoter in *Trichoderma reesei*)[J]. Food Research and Development, 2015, 36(13): 114-117.
- [19] Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Gene, 1987, 61(2): 155-164.
- [20] Kelly J M, Lockington R A. The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB *in vivo* in *Aspergillus nidulans*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(5): 1173-1182.
- [21] Margeot A, Portnoy T, Linke R, et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation[J]. BioMed Central Genomics, 2011, 12: 269.