

猴头菌锰过氧化物酶 1 基因在构巢曲霉的 异源转化与表达

尹立伟^{1,2}, 池玉杰^{1*}

(1. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 安庆师范学院生命科学学院, 安徽 安庆 246011)

摘要:为提高猴头菌菌株 CB1 锰过氧化物酶(MnP)基因的表达产量,采用 PEG/CaCl₂ 介导的原生质体转化方法,将携带有 *He-mnp1* 的重组质粒 pLB01/*He-mnp1* 转入到构巢曲霉尿嘧啶尿苷营养缺陷菌株 TN02A7 的原生质体中,获得了转化子菌株 TN02A7-*He-mnp1*,并在乙醇脱氢酶启动子 *alcA(p)* 控制下实现了异源表达。将 TN02A7-*He-mnp1*、TN02A7、构巢曲霉野生型菌株 WJA01、猴头菌菌株 CB1 在相同的木质素环境下进行培养并检测 MnP 酶活性,结果表明:转化子菌株 TN02A7-*He-mnp1* 在 0.05 g·L⁻¹ 血红素的情况下,诱导 96 h 后酶活性最高为 38.31 U·L⁻¹,比不添加血红素的酶活力高 8.64 倍,但比猴头菌菌株 CB1 的酶活力低,而 TN02A7 与 WJA01 始终无 MnP 酶活性,说明基因 *He-mnp1* 已经成功地被转化到 TN02A7-*He-mnp1* 中,并在木质素环境下得到表达,血红素是重组 *MnP* 基因异源表达的限制性因素之一。本文为生产 MnP 和提高 MnP 产量提供了新的途径。

关键词:猴头菌;锰过氧化物酶;构巢曲霉;转化;表达

中图分类号:S718.8

文献标识码:A

Heterologous Transformation and Expression of *Hericium erinaceum* Manganese Peroxidase 1 Gene in *Aspergillus nidulans*

YIN Li-wei^{1,2}, CHI Yu-jie¹

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

2. School of Life Science, Anqing Teachers College, Anqing 246011, Anhui, China)

Abstract: The recombinant plasmid pLB01/*He-mnp1* which contains a gene encoding for manganese peroxidase (*He-mnp1*) from *Hericium erinaceum* CB1 was transformed into protoplasts of auxotrophic stain TN02A7 of *Aspergillus nidulans* by means of protoplast transformation method mediated by PEG/CaCl₂ so as to enhance MnP production. A transformant stain TN02A7-*He-mnp1* of *A. nidulans* was gained, the gene *He-mnp1* was expressed under the control of alcohol dehydrogenase *alcA(p)* promoter. The transformant stain TN02A7-*He-mnp1*, auxotrophic stain TN02A7, wild stain of *A. nidulans* WJA01, and *H. erinaceum* CB1 were cultured under the same lignin condition and detected the MnP activity. The results showed that TN02A7-*He-mnp1* could produce MnP activity in the absence and presence of heme, but the MnP activity was up to 38.31 U·L⁻¹ on 96h with 0.05 g·L⁻¹ heme which was 8.64 times higher than that without heme but less than that of *H. erinaceum* CB1, whereas TN02A7 and WJA01 could not produce MnP activity at any time, indicating that the gene *He-mnp1* had been successfully transformed into TN02A7-*He-mnp1* and expressed in lignin environment, and the heme was one of the restrictive factors for recombinant *mnp* gene to express in *A. nidulans*. The study provides a new method to produce MnP and enhance MnP

收稿日期:2013-01-16

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30671700)

作者简介:尹立伟(1981—),女,黑龙江双鸭山人,博士,主要研究方向真菌生物学. Email: kaixinliwei@163.com

* 通讯作者:博士生导师,教授,主要研究方向林木病理学、真菌生物学. Email: chiyujienefu@126.com

yield.

Key words: *Hericum erinaceum*; manganese peroxidase; *Aspergillus nidulans*; transformation; expression

锰过氧化物酶 (Manganese peroxidases (MnPs; EC 1.11.1.13)) 是真菌分泌的一种糖基化含 Fe^{3+} 和血红素的胞外过氧化物酶, 分子量为 38.0 ~ 62.5 kDa, 广泛存在于白腐菌中。大多数 MnPs 的活性依赖于 Mn^{2+} 和 H_2O_2 的存在, 因是含有血红素辅基的多种同工酶, 又称血红素过氧化物酶。MnPs 能氧化分解芳香环多聚体, 也可氧化木质素中的酚类和非酚类的结构单元, 是一种高效的木质素降解酶^[1]。目前, 国内对白腐菌 MnPs 的酶学性质、染料的脱色、纸浆的漂白、有机污染物的降解等都有研究, 但对 MnPs 的基因表达调控和构建优良工程菌株等研究相对较少。为了实现高效表达从而提高 MnPs 基因的表达产量, 可进行基因转化与表达研究。同源转化一般可以获得较高的表达量, 但 MnPs 的同源转化需首先要构建载体-受体系统。构建表达型载体质粒需考虑以下表达与转化元件: 适合于白腐菌本体菌株的强基因启动子、翻译起始区域、信号肽的编码序列、报告基因的插入、目的基因的插入、筛选标记、转录终止和聚腺苷酸作用的信号序列等^[2]。筛选标记保证筛选出阳性转化子和保持转化 DNA 在宿主中的遗传稳定性, 转化时通过转入的标记基因与受体细胞突变基因互补, 使受体菌表现出与野生型相同的生长表型。如使用营养缺陷型标记要求有特定营养缺陷型受体菌, 但大多数丝状真菌难以获得适宜的营养缺陷型菌株, 需要耗时进行培养与筛选, 因而限制了本体菌株的使用^[3]。Mayfield 等^[4] 和 Gelpke 等^[5] 研究了黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium* Burdsall) 的 MnP 基因和木质素过氧化物酶 LiP 基因的同源表达, 然而, 同源表达不利的因素是重组蛋白易受本体蛋白的交叉污染; 在饥饿条件下, 重组基因会出现与本体基因同样的表达水平^[6]。

近年来, 几个研究小组探索了 MnPs 在不同宿主菌中的异源表达, 几种 MnPs 基因异源转化与表达的宿主细胞主要有大肠杆菌 (*Escherichia coli* (Migula))^[7]、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris* (Guillerm.) Phaff)^[8]、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans* (Eidam) G Winter)^[9]、米曲霉 (*A. oryzae* (Ahlburg) E. Cohn)^[10]、黑曲霉 (*A. niger* V. Tiegh.)^[11] 等。1991 年, Johnson 等^[12] 首先进行了黄孢原毛平革菌 MnP 基因在杆状病毒中的异源表达; 随后 1995

年, Whitwam 等^[13] 和 Doyle 等^[14] 发现黄孢原毛平革菌的 *mnpH4* 基因在大肠杆菌中的重组表达比在杆状病毒中的表达酶活产量高, 得到了低成本高产出的表达效果。2003 年, Gu 等^[15] 研究小组将黄孢原毛平革菌的 *mnp1* cDNA 基因在巴斯德毕赤酵母中实现了表达, 转化子菌株分泌了有活性的重组 MnP (rMnP), 表明巴斯德毕赤酵母能有效地完成必需的蛋白翻译后加工修饰机制, 包括血红素的插入、蛋白糖基化、空间折叠和分泌; 然而, 血红素是表达系统最主要的限制因素^[10,16]。1996 年, Stewart 等^[10] 研究小组首次实现了黄孢原毛平革菌的 MnP1 基因在米曲霉中的过表达。1999 年, Ruiz-dueñas 等^[17] 研究了杏鲍菇 (*Pleurotus eryngii* (DC. : Fr.) Quél.) *MnPL2* 基因在构巢曲霉的 *alcA* 启动子控制下成功表达并分泌酶活性, 但重组菌的 MnP 酶活比在杏鲍菇培养液中的 MnP 酶活低。2001 年, Larrondo 等^[9] 研究小组发现, 虫拟蜡菌 (*Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilb. & Ryvarden) 的 *MnP1* 基因未受到交叉污染, 能在构巢曲霉中得到适合的表达, 并与黄孢原毛平革菌的 *rMnPs H4* 基因在米曲霉中的表达作比较, 发现构巢曲霉适合外源基因有效的表达和分泌, 是一个理想的宿主表达菌株。

目前, 国内对白腐菌 MnP 基因在丝状真菌中表达的研究还不多。本文根据笔者已克隆到的猴头菌 (*Hericum erinaceum* (Bull. : Fr.) Pers.) 菌株 CB1 锰过氧化物酶 1 (MnP1) 基因的基础上, 为实现高效表达提高猴头菌 MnP1 基因的表达产量, 从而在构巢曲霉中实现了异源转化与表达研究, 对构建优良工程菌株及商业化生产具有重要意义和理论价值。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

菌株: 转化用构巢曲霉菌株 TN02A7 为带有 *pyrG89* 突变标记的尿嘧啶尿苷营养缺陷体, 该菌株去除了非同源重组基因 *nku* (*pyrG89; pyrA4, nkuA::argB2; riboB2*), 只有在加有尿苷和尿嘧啶的丰富培养基中才能正常生长。构巢曲霉野生型菌株 WJA01 (*pyrA4, riboB2*) 为对照菌株。猴头菌 (*H. erinaceum*) 菌株 CB1 由东北林业大学森林保护学科森林病虫害病理实验室提供。TN02A7、WJA01 与猴头菌 CB1 的菌种试验前分别在 YUU、YAG、PDA 试管斜面上

保存在4℃冰箱中。

质粒:pLB01为本试验采用的整合型表达载体质粒,该质粒长6.0 Kb,以pBluescript SK(-)为骨架,启动子 $alcA(p)$ 下插入报告基因 GFP 基因,含有多克隆MCS酶切位点,加入了粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa* Shear & B. O. Dodge)的乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶的靶基因 $pyr4$ 和AMP抗性筛选标记,可以有效地弥补TN02A7菌株尿苷尿嘧啶的缺陷^[18],试验前质粒保存在-80℃冰箱中。菌株TN02A7、WJA01和质粒pLB01由南京师范大学生命科学学院微生物所陆玲教授惠赠(2010年11月)。

1.2 培养基

YAG培养基:酵母粉5g,葡萄糖20g,微量元素溶液1mL,固体培养基加入2%琼脂粉($w \cdot v^{-1}$),加蒸馏水定容至1000mL。

YUU培养基:在YAG培养基的基础上加入1.3g尿嘧啶和1.2g尿苷。

YAGK和YUUK培养基:分别在YAG和YUU培养基的基础上加入 $44.7 g \cdot L^{-1}$ KCl^[19-20],加蒸馏水定容至1000mL。

MMPDR培养基:20×Salts 50mL,微量元素1mL,葡萄糖10g,pyrodoxine 0.5mg,riboflavin 2.5mg,加蒸馏水定容至1000mL,固体培养基需加入2%琼脂粉($w \cdot v^{-1}$),调pH值至6.5。

MMPGR培养基:将MMPDR培养基中的 $10 g \cdot L^{-1}$ 的葡萄糖替换成100%甘油10mL。

MMPGRT培养基:在MMPGR培养基的基础上加入 $11.9 g \cdot L^{-1}$ 的苏氨酸^[21]。

1.3 重组质粒的构建与双酶切验证

根据笔者已克隆到的猴头菌CB1的 $MnP1$ 完整cDNA基因 $He-mnp1$ 设计表达用双酶切引物,上游引物:5'-GCTCTAGAATGGCGTTCAAAACTTTTCG-3',下游引物:5'-CGGGATCCTTAAGACGGGGG-GACGGG-3',下划线分别为 Xba I和 Bam H I的酶切位点,酶切位点前面设置2个保护碱基,引物由上海生工合成。利用真菌RNA提取试剂盒提取猴头菌总RNA,利用Oligo dT引物和两步法RT-PCR试剂盒进行反转录获得cDNA第1条链,用上述双酶切引物扩增得到 $He-mnp1$ 全长CDS序列。用凝胶回收试剂盒回收目的基因,将目的基因与pMD18-T(Simple)载体连接,构建目的基因的载体质粒pMD18-T/ $He-mnp1$ 。将pMD18-T/ $He-mnp1$ 与pLB01分别 Xba I和 Bam H I双酶切,然后用T4连接酶进

行连接,构建重组质粒pLB01/ $He-mnp1$ 。用Pcircle软件绘制表达载体pLB01/ $He-mnp1$ 的质粒图谱。将重组质粒pLB01/ $He-mnp1$ 转化到大肠杆菌ToP10感受态细胞中,培养后用质粒DNA小提试剂盒及相关方法从过夜培养的菌液中提取重组质粒,对其浓度进行检测;然后对提取的重组质粒进行 Xba I、 Bam H I双酶切验证及用双酶切引物进行PCR扩增验证,对PCR验证阳性产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳检测并测序。

1.4 原生质体的制备与PEG/CaCl₂方法的转化

原生质体制备时转化用的溶液1、2、3、4、5按照参考文献[22]中的方法进行配制和贮存。构巢曲霉菌株TN02A7待30%~50%的分生孢子萌发且芽管在1个孢子长度以内时,收集孢子,用溶壁酶、纤维素酶和蜗牛酶以1:1:1的比例在30℃、 $150 r \cdot min^{-1}$ 下酶解处理3h,以获得原生质体。在制备TN02A7原生质体的同时制备WJA01原生质体做对照。采用PEG/CaCl₂介导的转化方法,向100μL的原生质体中加入10~20μL重组质粒pLB01/ $He-mnp1$ (其中,测定DNA浓度使其至少达到 $500 ng \cdot \mu L^{-1}$ 以上),然后加入50μL转化用溶液4进行转化。向转化后的原生质体悬液中加入25mL45℃液化的YAGK(2%低熔点的琼脂粉),立刻混匀倒入无菌平板,置于30℃下过夜,第2天放置37℃下继续培养2~3d后,对每个生长出来的菌落,分别用牙签挑出后,点接或划线于YAG培养基上继续培养2~3d,筛选能在YAG培养基上生长良好的转化子并计数。之后,将生长出的转化子继续在YAG培养基上划线培养1~2次,确定其生长性状稳定,具体操作步骤参照参考文献[23]中方法进行。将原营养缺陷体菌株TN02A7、野生型菌株WJA01分别接种在YUU和YAG培养基上,置于37℃培养箱内2~3d,二者的生长表型用作对照。用牙签挑取9个生长性状稳定的转化子单菌落分别点接于MMPDR、MMPGR和MMPGRT平板培养基的一侧,而将野生型菌株WJA01用牙签点接于同一平板培养基的另一侧,观察转化子单菌落在3种培养基上的生长情况,进行高效表达用培养基的筛选。

1.5 转化子的PCR鉴定

收集3个在MMPGRT培养基上生长性状稳定的转化子菌丝,提取基因组DNA,分别利用1.3中的双酶切引物和重组质粒的乙醇脱氢酶启动子($alcA$)部分作为上游引物^[24]、双酶切的下游引物作为下游

引物,进行目的基因的PCR扩增验证。乙醇脱氢酶启动子上游引物为:5'-GAGAGCCA-CAAACGAGCG-3'。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后,用凝胶回收试剂盒回收目的片段,将目的片段连接到PMD18-T载体并转化至大肠杆菌ToP10感受态细胞中,所得菌液交给上海英俊生物技术有限公司进行双向测序。如双酶切引物扩增出MnP基因片段,表明基因*He-mnp1*已转入到TN02A7中;如乙醇脱氢酶启动子上游引物和双酶切下游引物扩增得到构巢曲霉*alcA::GFP::He-mnp1*基因片段,表明基因*He-mnp1*已以正确的方式连接到了GFP基因上;两对引物均能扩增出目的产物,表明重组菌株TN02A7-*He-mnp1*已转化成功。分别提取营养缺陷体菌株TN02A7、野生型菌株WJA01的基因组DNA,用上述两对引物进行PCR扩增作为对照。

1.6 转化子MnP酶活测定

在YAG培养基上生长的转化子菌株TN02A7-*He-mnp1*和野生型菌株WJA01、在YUU固体培养基上生长的营养缺陷体菌株TN02A7培养2~3d,然后用无菌水分别收集孢子并计数。根据高效表达用培养基的选择结果,在MMPGRT液体培养基上进行以上各菌株的酶活表达培养。在250 mL三角瓶中加入50 mL MMPGRT培养基,加入2 g青杨(*Populus ussuriensis* Kom.)木屑为产酶底物,不添加血红素和添加0.05 g·L⁻¹血红素,调pH值为6.5,各取2×10⁸个孢子接种于培养基中,于37℃、220 r·min⁻¹下摇瓶培养。另外,用营养缺陷体菌株TN02A7添加尿苷、尿嘧啶进行培养作对照;同时,用打孔器在培养基中接种猴头菌5块8 mm²的菌饼,在不添加血红素的情况下进行培养也作为对照。分别在培养后0、24、48、72、96、120、144 h取1 mL的培养液作为胞外酶液,在6 000 r·min⁻¹下离心5 min,收集上清液进行MnP活性测定。酶活测定方法见参考文献[25]。每项试验设3组重复,取平均值。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的鉴定

重组质粒pLB01/*He-mnp1*的质粒图谱见图1。利用RT-PCR方法和使用双酶切引物进行反转录PCR扩增,产物经测序后获得与猴头菌MnP完整cDNA基因完全一致的1 080 bp CDS序列。由于质粒pLB01长6 000 bp,而*He-mnp1*长1 080 bp,重组质粒

pLB01/*He-mnp1*长7 080 bp。载体质粒pMD18-T/*He-mnp1*双酶切后的电泳结果(图2a中1~2泳道);重组质粒pLB01/*He-mnp1*进行*Xba*I、*Bam*H I双酶切后,产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测结果(图2b中1~2泳道),从图2b可看出:重组质粒的酶切产物得到了2个片段,1个为6 000 bp,1个超1 000 bp,与预期相符,说明基因*He-mnp1*已连接到pLB01质粒载体上。将重组质粒用双酶切引物进行PCR验证的电泳产物(图2c中2~7泳道),同样得到了超过1 000 bp的片段,该产物经测序后与目的基因的完整cDNA序列比对完全一致,进一步说明基因*He-mnp1*已连接到pLB01质粒载体上。

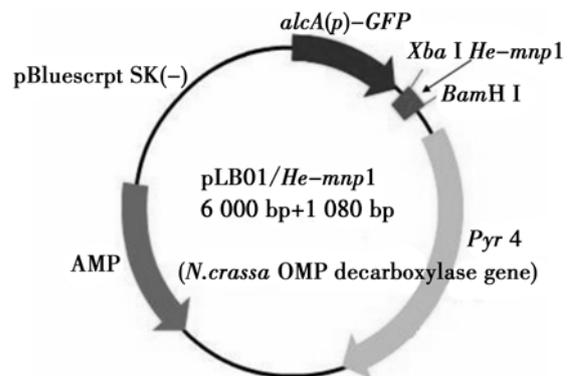
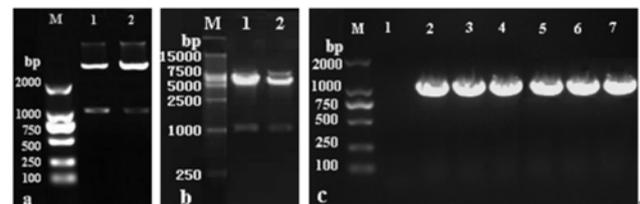


图1 猴头菌MnP1重组表达载体pLB01/*He-mnp1*的结构图

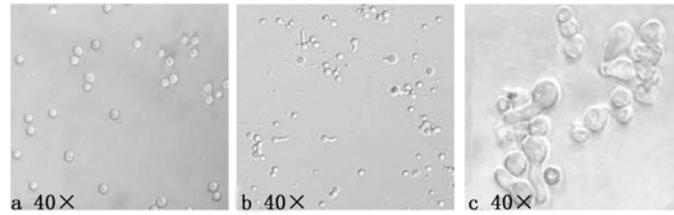


M: DNA Marker 2 000 bp 和 15 000 bp; a 中 1~2 泳道: 载体质粒 pMDTM18-T/*He-mnp1* 双酶切产物; b 中 1~2 泳道: 重组质粒 pLB01/*He-mnp1* 双酶切产物; c 中 1 泳道为对照, 2~7 泳道: pLB01/*He-mnp1* PCR 验证。

图2 重组质粒的验证

2.2 原生质体的制备

用含有0.2% Tween 80的无菌水收集菌株TN02A7在YUU固体培养基上生长3d的新鲜分生孢子(图3a),当新鲜的TN02A7分生孢子YUUK液体培养基中30%~50%的孢子萌发且芽管在1个孢子长度以内时(图3b),37℃下摇瓶培养7~10h,当萌发的孢子细胞内出现空泡时表明原生质体已经形成(图3c)。与菌株TN02A7相比,野生型菌株WJA01产孢量多,孢子萌发时间早、数量多。



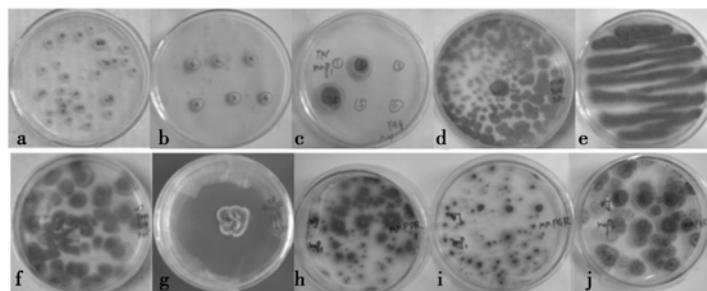
a: TN02A7 新鲜分生孢子; b: TN02A7 分生孢子萌发; c: TN02A7 原生质体形成
图3 菌株 TN02A7 原生质体的制备

2.3 转化子的筛选

构巢曲霉菌株 TN02A7 转化后的原生质体悬液混入到 YAGK 平板培养基中,置于 30 °C 下过夜,之后在 37 °C 下培养 2 ~ 3 d 后生长出的菌落形态见图 4a。对图 4a 中每个生长出的菌落,分别用牙签挑出后,点接于 YAG 培养基上继续培养 2 ~ 3 d,此时发现一些菌落能在 YAG 培养基上生长良好,长出包括菌丝(图 4b)和孢子的绿色菌体(图 4c 中的 2 个绿色圆菌落②与④),与野生型菌株 WJA01 在 YAG 和 YUU 培养基上的生长形态一致(图 4e、f),也与原营养缺陷体菌株 TN02A7 在 YUU 培养基上生长的形态一致(图 4d),说明这样的菌落其基因组中含重组质粒,即为成功的转化子 TN02A7-*He-mnp1*;而另一些菌落用牙签挑出后点接在 YAG 培养基上生长受到明显的抑制,不能在缺乏尿苷和尿嘧啶的培养基上生长,这些即为携带有目的基因的重组质粒没有被转化到原生质体中去的非转化子(图 4c 中的其他

4 个点接点①、③、⑤、⑥已停止生长,没有菌落生长出来)。统计 3 次重复的转化子数目,在 2×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 孢子浓度、10 ~ 20 μg 质粒 DNA 条件下可得到 30 ~ 60 个转化子,对这些转化子连续传 3 代培养,它们的生长特性均十分稳定。原营养缺陷体菌株 TN02A7 在 YAG 培养基上生长受抑制的情况见图 4g。

当转化子分别与野生型菌株 WJA01 对接于同一平皿内的 MMPDR、MMPGR 和 MMPGRT 3 种培养基上培养时(图 4h ~ j, 3 个平板的上部为 WJA01,下部为转化子),观察到 3 个转化子在 MMPGRT 培养基上生长最快、产孢量最多、菌落散发的最大(图 4j);其次为 MMPGR(图 4i 中 WJA01 菌落有生长,而转化子菌株只生长 1 株);而在 MMPDR 上生长最慢、产孢量最少、菌落散发的最小或不长(图 4h)。表明 MMPGRT 培养基是转化子菌株最适生长的培养基。



a: 转化后的原生质体在 YAGK 上生长出的菌落; b: 转化子筛选 1; c: 转化子筛选 2; d: TN02A7 在 YUU 上; e: 野生型 WJA01 在 YAG 上; f: 野生型 WJA01 在 YUU 上; g: TN02A7 在 YAG 平皿上生长受抑制; h: WJA01 与转化子在 MMPDR 上; i: WJA01 与转化子在 MMPGR 上; j: WJA01 与转化子在 MMPGRT 上。

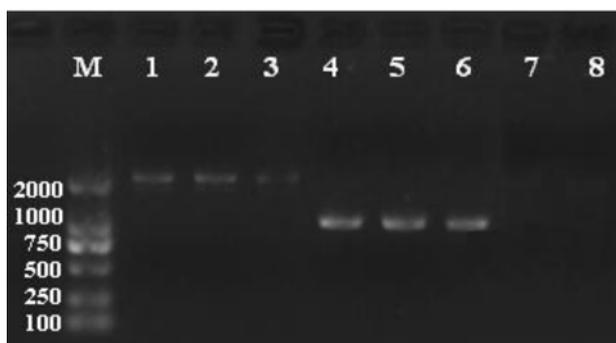
图4 转化子菌株的筛选

2.4 转化子的 PCR 鉴定

对转化子的基因组 DNA 用扩增猴头菌 MnP1 完整编码序列的双酶切引物和重组质粒的乙醇脱氢酶启动子(*alcA*)部分作上游引物、双酶切的下游引物作下游引物进行 PCR 反应,其中,双酶切引物扩

增的产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后获得大于 1 000 bp 的 DNA 片段(图 5 中 4 ~ 6 泳道),该产物经测序得到 1 096 bp 的核苷酸序列,序列比对结果表明该序列与猴头菌 MnP1 完整编码序列完全一致;乙醇脱氢酶启动子(*alcA*)部分作上游引物、双酶

切的下游引物作下游引物扩增的产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后获得大于 2 000 bp 的 DNA 片段(图 5 中 1~3 泳道),该产物经测序得到 2 019 bp 的核苷酸序列,序列比对的结果表明该序列包括了构巢曲霉 *alcA* 启动子区 151 bp、绿色荧光蛋白 *GFP* 基因 772 bp 及加有保护性碱基的目的基因完整编码序列 1 096 bp,表明已扩增得到构巢曲霉 *alcA::GFP::He-mnp1* 基因片段,其中,基因 *He-mnp1* 已以正确的方式连接到 *GFP* 基因之后,进一步证明重组质粒已成功地转化到构巢曲霉的转化子菌株 TN02A7-*He-mnp1* 中。对营养缺陷体菌株 TN02A7、野生型菌株 WJA01 的基因组 DNA 用双酶切引物进行 PCR,没有扩增出任何 DNA 片段,表明 2 个菌株基因组中不含有编码 *MnP* 的基因(图 5 中 7~8 泳道)。



M: DNA Marker 2 000 bp;1~3 泳道:*alcA* 部分作上游引物的 PCR 结果;4~6 泳道:双酶切引物的 PCR 结果;7 泳道:TN02A7 双酶切引物的 PCR 结果;8: WJA01 双酶切引物的 PCR 结果

图 5 转化子的 PCR 验证结果

2.5 转化子 *MnP* 酶活性测定

在 144 h 的培养过程中,构巢曲霉野生型菌株 WJA01 与营养缺陷体菌株 TN02A7 在各种培养条件下,提取的胞外上清液始终未检测到 *MnP* 酶活性,表明菌株 WJA01 与 TN02A7 没有 *MnP* 基因的转录与表达。转化子菌株 TN02A7-*He-mnp1* 在不添加血红素和添加血红素的 MMPGRT 液体培养基中,培养 72 h 后提取的胞外酶液都检测到 *MnP* 酶活性,其中,培养 96 h 时,无血红素和添加血红素的酶活性均达最高,分别为 4.44、38.31 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$,后者比前者的酶活力高 8.64 倍,但比猴头菌菌株 CB1 的酶活力低;培养 96 h 后,2 种培养方式的酶活性都开始下降,表明基因 *He-mnp1* 已经被转化到 TN02A7-*He-mnp1* 中,并在木质素环境下得到表达。对比 2 种培

养方式的检测结果表明:血红素是重组 *MnP* 基因异源表达的限制性因素之一,在重组 *MnP* 表达的过程中起关键性的调节作用。在培养 144 h 时,猴头菌菌株 CB1 的 *MnP* 酶活性已达 78.6 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$,仍继续上升(图 6)。

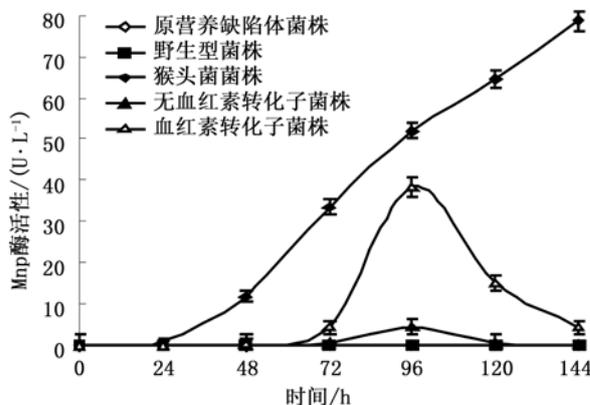


图 6 *MnP* 酶活性随时间的变化

3 结论与讨论

白腐菌木质素降解酶基因在丝状真菌中的表达研究旨在揭示其内在表达调控机制和提高酶的表达产量。本研究采用 PEG/ CaCl_2 介导的原生质体转化方法,首次将猴头菌菌株 CB1 的 *MnP1* 基因 *He-mnp1* 转入到构巢曲霉尿嘧啶尿苷营养缺陷体菌株 TN02A7 的原生质体中,获得转化子菌株 TN02A7-*He-mnp1*,并使该基因在构巢曲霉的乙醇脱氢酶启动子 *alcA(p)* 控制下实现了异源表达。本研究利用 3 种细胞壁裂解酶,即溶壁酶、纤维素酶和蜗牛酶以 1:1:1 的比例混合,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下,对构巢曲霉菌株 TN02A7 的新鲜分生孢子进行酶解脱壁处理 3 h,在试验手法准确得当时,获得高达 90.78% 的原生质化率,较高的原生质化率为后续的高原生质体转化率奠定了基础。在原生质体转化过程中,PEG 是促融剂也是渗透压稳定剂,PEG 与 H_2O 分子之间以 H 键结合,使原生质体脱水,PEG 也作为多聚物和 Ca^{2+} 等二价阳离子及外源 DNA 在原生质体表面形成沉淀颗粒,协助外源基因转移,促使原生质体通过内吸作用使外源基因进入到细胞体内。本试验在多次重复进行原生质转化的过程中,也证明 25% 的质量分数是 PEG6000 较适宜的浓度。孟祥锋等^[26]将瑞氏木霉的纤维二糖水解酶(CBH I)转化到黑曲霉中时,使用 60% PEG4000 也获得了较高的原生质体转化率。质粒 DNA 的浓度也会影响原生

质体的转化效率,10 μg 以上的质粒 DNA 浓度可保证获得较高的转化效率。本试验在 2×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 孢子浓度、10 μg 质粒 DNA 条件下得到 30 个以上的转化子,从而建立了构巢曲霉高效转化体系。

由于构巢曲霉的乙醇脱氢酶启动子系统 (*alcA* promoter) 已经建立^[27],该启动子克隆自构巢曲霉的乙醇脱氢酶基因起始密码子上游约 430 bp 的片段,能在曲霉属和一些高等植物体内行使正常功能,可以在含有不同碳源的培养基上控制其后面连接的外源基因的表达,如在含有葡萄糖的 MMPDR 培养基、含甘油的 MMPGR 培养基及含甘油和苏氨酸的 MMPGRT 培养基上外源基因分别表现为受抑制、不受抑制和强诱导,并且这种不同的表达调节与菌株的无性生长量相一致,可以直接通过菌株的生长表型表现出来。在本试验中,由于目的基因 *He-mnp1* 已被插入到重组质粒 pLB01/*He-mnp1* 中的 *GFP* 基因之后、乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶的靶基因 *pyr4* 和 AMP 抗性筛选标记的前面,上述 3 个基因都在 *alcA* 启动子之后,受其转录调控。由于转化子菌株携带有重组质粒,当转化子单菌落被分别点接于 MMPDR、MMPGR 和 MMPGRT 培养基上时,在 MMPDR 上 *alcA* 控制的基因表达与菌落生长都受到葡萄糖的抑制,只有野生型 WJA01 的菌体生长;在 MMPGR 上 *alcA* 控制的基因则能以接近于该基因正常情况下的表达水平进行表达,菌落生长也接近正常,与野生型菌株的生长表型相一致;在同时含有甘油和苏氨酸的 MMPGRT 上,*alcA* 控制的基因表现出受强诱导而过表达,无性生长最快,产孢量最多,菌落最大。作为检测转化子菌株的 MMPGRT 培养液,与 Gao 等^[28]研究的转化子菌株在构巢曲霉中实现的过表达培养基结果相一致。构巢曲霉的乙醇脱氢酶启动子后插入了绿色荧光蛋白 (*GFP*) 基因,为获得绿色荧光标记的构巢曲霉转化子奠定了基础,而插入的 *GFP* 基因作为标记基因不会影响转化子 TN02A7-*He-mnp1* 的酶活产量。

重组 MnP 在受体菌株中的酶活,受特异性强启动子、信号肽、基因拷贝数、血红素含量、诱导培养条件的优化等诸多因素的影响。本研究将构巢曲霉的转化子菌株 TN02A7-*He-mnp1*、尿嘧啶尿苷营养缺陷体菌株 TN02A7、野生型菌株 WJA01 及猴头菌菌株 CB1 在相同 MMPGRT 培养基的木质素环境下进行培养并检测 MnP 酶活性,结果 TN02A7-*He-mnp1* 在含有 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 血红素的情况下、诱导 96 h 后酶

活性最高为 $38.31 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,比不加血红素的酶活力高 8.64 倍,但比猴头菌菌株 CB1 的酶活力低,而营养缺陷体菌株 TN02A7 与野生型菌株 WJA01 始终无 MnP 酶活性,表明基因 *He-mnp1* 已被成功地转化到 TN02A7-*He-mnp1* 中,并在木质素环境下得到表达。与猴头菌菌株 CB1 相比,转化子的酶活低,推测原因之一是其 *MnP* 基因为单基因,而猴头菌菌株 CB1 笔者已经克隆到 2 个 *MnP* 基因,因此,猴头菌菌株的 *MnPs* 基因有 2 个拷贝数比转化子菌株中 *MnP1* 的基因拷贝数多。血红素是重组血红蛋白基因在不同表达体系中异源表达的限制性因素^[29],在重组 MnP 基因的表达过程中也起关键性的调节作用,虽然血红素在一定的浓度范围内可以促进重组 MnP 的酶活产量,但缺少或较低的血红素也可能是转化子菌株 MnP 酶活性较低的限制性因素之一。Ruiz-dueñas 等^[17]将杏鲍菇 *MnPL2* 基因转化到构巢曲霉中,在 *alcA* 启动子控制下,菌丝在由苏氨酸替代葡萄糖的诱导培养基中生长,在添加 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 血红素的情况下(是本试验中血红素含量的 10 倍),MnP 在 96 h 时酶活达到最高,为 $150 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究中的转化子菌株受不同浓度血红素调控的曲线还有待进一步测试搞清,通过对血红素浓度的优化,以期使 MnP 活性达到更高。培养环境也影响着酶的产量,Jiang 等^[29]将毕赤酵母 SMD1168H 作为宿主表达菌,将黄孢原毛平革菌的 *aMnP1-1* 转入,在不添加血红素的情况下酶活仅为 $6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,在添加 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 血红素时,重组 MnP 酶活增加到 $185 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,而在生物反应器中添加 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血红素时,MnP 的产量急剧增加到 $2490 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$;而有些异源表达的结果没有产生酶活或产量非常低,Conesa 等^[16]发现黄孢原毛平革菌的 MnP 在黑曲霉中表达时并不能提高该蛋白的产量。

丝状真菌表达系统作为一种生产重组蛋白质产品的工具,不仅具有很高的蛋白质分泌能力,还具备完善的蛋白翻译后加工修饰机制(包括肽链剪切、糖基化方式、空间折叠等都与高等真核生物类似),能得到大量胞外活性蛋白,其发酵及下游加工技术也很成熟。构巢曲霉与米曲霉等又是确认的安全生产菌株,因此,是很有潜能的异源基因表达系统,通过优化可以用来实现白腐菌锰过氧化物酶基因的异源表达,以获得重组 *MnP* 基因较高的转化效率。由于构巢曲霉的转化系统近年来已得到很大的发展^[30],并且其基因组测序工作已分别被 Cereon 和

TIGR 完成,这更有益于利用构巢曲霉进行任意基因功能的研究^[31]。选择构巢曲霉作为白腐菌 MnP 的宿主菌是提高该蛋白表达效率的重要手段之一,为生产 MnP 和提高 MnP 产量提供了新途径。

参考文献:

- [1] Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30(4): 454-466
- [2] 吴其威. 异源基因在丝状真菌系统中的克隆表达[J]. *生命科学*, 1993, 5(2): 19-21
- [3] 闫培生, 罗信昌, 周 启. 丝状真菌基因工程研究进展[J]. *生物工程进展*, 1999, 19(1): 36-41
- [4] Mayfield M B, Kishi K, Alic M, *et al.* Homologous expression of recombinant manganese peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(12): 4303-4309
- [5] Gelpke M D S, Gambill M M, Cereghino G P L, *et al.* Homologous expression of recombinant lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(4): 1670-1674
- [6] Singh D, Chen S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(3): 399-417
- [7] Whitwam R, Tien M. Heterologous expression and reconstitution of fungal Mn peroxidase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 333(2): 439-446
- [8] 路福平. 木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶基因的克隆及在甲醇毕赤酵母中的表达[D]. 天津:天津科技大学, 2004
- [9] Larondo L F, Lobos S, Stewart P J, *et al.* Isoenzyme Multiplicity and Characterization of Recombinant Manganese Peroxidases from *Ceriporiopsis subvermiformis* and *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2070-2075
- [10] Stewart P, Whitwam R E, Kersten P J, *et al.* Efficient Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase Gene in *Aspergillus oryzae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(3): 860-864
- [11] Cortés-Espinosa D V, Absalón Á E, Sanchez N, *et al.* Heterologous Expression of Manganese Peroxidase in *Aspergillus niger* and Its Effect on Phenanthrene Removal from Soil [J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2011, 21(3-4): 120-129
- [12] Johnson T M, Li J K. Heterologous expression and characterization of an active lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* using recombinant baculovirus [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 291(2): 371-378
- [13] Whitwam R E, Gazarian I, Tien M. Expression of fungal Mn peroxidase in *E. coli* and refolding to yield active enzyme [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 216(3): 1013-1017
- [14] Doyle W A, Smith A T. Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and haem [J]. *Biochem J*, 1996, 315: 15-19
- [15] Gu L, Lajoie C, Kelly C. Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase Gene in the Yeast *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(5): 1403-1409
- [16] Conesa A, Hondel C A M J J, Punt P J. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger* [J]. *Appl Environ Microbiol*. 2000, 66(7): 3016-3023
- [17] Ruiz-dueñas F J, Martínez M J, Martínez Á T. Heterologous expression of *Pleurotus eryngii* peroxidase confirms its ability to oxidize Mn^{2+} and different aromatic substrates [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(10): 4705-4707
- [18] Chen S, Song Y, Cao J, *et al.* Localization and function of calmodulin in live-cells of *Aspergillus nidulans* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(3): 268-278
- [19] Käfer E. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations [J]. *Adv Genet*, 1977, 19: 131-133
- [20] Wang J, Hu H, Wang S, *et al.* The important role of Actinin-like protein (AcaA) in cytokinesis and apical dominance of hyphal cells in *Aspergillus nidulans* [J]. *Microbiology*, 2009, 155(8): 2714-2725
- [21] Wang G, Lu L, Zhang CY, *et al.* Calmodulin concentrates at the apex of growing hyphae and localizes to the Spitzenkörper in *Aspergillus nidulans* [J]. *Protoplasma*, 2006, 228(4): 159-166
- [22] 曹进玲. 钙离子通道蛋白 MidA 在构巢曲霉中的功能特征研究 [D]. 南京:南京师范大学, 2011
- [23] 胡美美. 偏肿革菌 MnP 基因在构巢曲霉中的转化与表达 [D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2013
- [24] Romero B, Turner G, Olivas I, *et al.* The *Aspergillus nidulans alcA* promoter drives tightly regulated conditional gene expression in *Aspergillus fumigatus* permitting validation of essential genes in this human pathogen [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 40(2): 103-114
- [25] 池玉杰, 闫洪波. 红平菇木质素降解酶系统漆酶、锰过氧化物酶及木质素过氧化物酶的检测 [J]. *林业科学*, 2009, 45(12): 154-158
- [26] 孟祥锋. 瑞氏木霉纤维二糖水解酶 (CBH I) 丝状真菌表达体系的构建 [D]. 山东:山东大学, 2010
- [27] Waring R B, May G S, Morris N R. Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes [J]. *Gene*, 1989, 79(1): 119-130
- [28] Gao L, Song Y, Cao J, *et al.* Osmotic stabilizer-coupled suppression of NDR defects is dependent on the calcium-calcineurin signaling cascade in *Aspergillus nidulans* [J]. *Cellular Signalling*, 2011, 23(11): 1750-1757
- [29] Jiang F, Kongsaree P, Charron R, *et al.* Production and separation of manganese peroxidase from heme amended yeast [J]. *Cultures. Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99(3): 540-549
- [30] Nayak T, Szweczyk E, Oakley C E, *et al.* A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans* [J]. *Genetics*, 2006, 172(3): 1557-1566
- [31] Wollkow T D, Harris S D, Hamer J E. Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis [J]. *J Cell Sci*, 1996, 109(8): 2179-2188