

## 丝状真菌表达分泌系统中受体菌的构建

刘 丽<sup>1</sup> 刘 谨<sup>2</sup> 仇润祥<sup>1</sup> 朱兴国<sup>1</sup> 唐国敏<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

<sup>2</sup>(山东大学,济南 250001)

**摘 要** 黑曲霉糖化酶高产菌株 T21 经紫外诱变后,通过酪蛋白平板和蛋白酶活性测定筛选出胞外酸性蛋白酶活力仅为原株 0.76% 的菌株 *A. niger* T21-201,其生长特性和产糖化酶活力与原株基本一致。利用原生质体-PEG 法将含有报告基因 *vhb* 的表达分泌质粒 pGT10-*vhb* 通过与选择标记质粒的共转化导入此蛋白酶部分缺陷株及其原株 T21 检测在蛋白酶缺陷株 *Aspergillus niger* T21-201 和原株 T21 中 Vhb 的分泌表达,结果表明在 *A. niger* T21-201 中 Vhb 表达水平显著高于原株,但 Northern blot 却显示在两菌株中 *vnb* 基因的转录水平近似,由此证明酸性蛋白酶缺陷对保护外源蛋白产生了显著效果。

**关键词** 黑曲霉 T21,蛋白酶缺陷株,Vhb,表达-分泌

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0667-04

黑曲霉作为外源基因表达系统比其它微生物表达系统(细菌,酵母)具有如下的独特优点:高分泌性能,高强度启动子,完善的翻译后加工及成熟的发酵工艺。但黑曲霉自身蛋白酶对外源蛋白的降解成了提高目的蛋白产量的主要障碍。实践证明,通过诱变或基因敲除来筛选蛋白酶缺陷株,是克服这一障碍的行之有效的办法<sup>[1,2]</sup>。黑曲霉糖化酶高产株 T21 除具有高强度能诱导的糖化酶启动子和内源蛋白高分泌能力外是已知的抗葡萄糖阻遏突变株,因此以黑曲霉 T21 作为基因工程受体菌的改造集中于筛选蛋白酶缺陷株。本文即报告蛋白酶缺陷株的筛选及其作为丝状真菌表达宿主的应用效果。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌种:*A. niger* T21 由本组保存。

1.1.2 质粒:p3SR2,含乙酰胺酶基因 *amdS*,Dr. Hynes 惠赠;pMW1,含潮霉素 B 磷酸转移酶基因 *hph*,Dr. kück 惠赠;pGT10 为丝状真菌表达分泌载体,pGT10-*vhb* 为插入报告基因 *vhb*(编码细菌血红蛋白)的表达分泌载体质粒,由本组构建(待发表)。

1.1.3 培养基:细菌培养用 LB 培养基。黑曲霉菌

种保存、活化,用查氏培养基。黑曲霉发酵培养基 6% 淀粉,2% 酵母粉,0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.5% 玉米粉。检测蛋白酶分泌活性的酪蛋白平板成分为 1% 酪蛋白(溶于 pH 4.0 的 0.1mol/L 乳酸缓冲液),1% 明胶和 1.2% 琼脂。检验淀粉水解酶分泌的淀粉平板成分为 1% 淀粉,1% 明胶和 1.2% 琼脂。糖化酶活性测定按常规,1 个单位定义为 37℃ 作用于可溶性淀粉每分钟产生 1 $\mu\text{g}$  葡萄糖的酶量。黑曲霉原生质体制备的前培养基成分为 1% 淀粉,2% 酵母粉,1% 葡萄糖,0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.25% 玉米粉,0.25% 豆粉。黑曲霉转化培养基是以 1mol/L 蔗糖为渗透压稳定剂的查氏培养基。其中以乙酰胺为选择标记的培养基去掉  $\text{NaNO}_3$  另含 0.01mol/L 乙酰胺和 0.02mol/L CsCl,以潮霉素 B 为选择标记的查氏培养基另含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B,转化用的上层软洋菜培养基成分除 0.6% 琼脂外,其它与下层培养基相同。

1.1.4 酶及其它试剂:Lysing enzyme 和 cellulase 购自 Sigma 公司。酪蛋白购自 Sigma 公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 T21 紫外诱变:参照文献[3]进行。取培养好的斜面,加入无菌水约 2~3mL,将孢子刮下,玻

收稿日期 2002-05-14,修回日期 2002-08-30。

基金项目 本工作为国家自然科学基金资助项目(No. 30170014)。

\* 通讯作者。 Tel 86-10-62629398; E-mail: lgnwqa@yahoo.com.cn

璃珠打碎,4层纱布过滤,获得单孢子悬液,调整孢子浓度至约  $10^3$  个/mL,涂布查氏培养基平板,  $100\mu\text{L}/\text{皿}$ ,置紫外箱中,灯管距平板 17.5cm,功率 40W,照射 45s,然后置  $30^\circ\text{C}$  培养箱中培养 6~7d。从致死率约为 70%的平板挑取菌落接种保存。

**1.2.2 部分蛋白酶缺陷株蛋白酶活力的测定及其发酵特性试验:**将上述各诱变菌株斜面培养物接种到黑曲霉发酵培养基中,  $30^\circ\text{C}$ , 210r/min 培养 3d, 过滤收集上清,取  $50\mu\text{L}$ ,注入已打孔的酪蛋白平板的孔穴内,  $30^\circ\text{C}$  培养,第 2 天观察蛋白透明圈。以 T21 为对照,选取蛋白透明圈明显减小菌株的发酵上清液进行蛋白酶活力测定,参照《酶制剂工业手册》所述方法<sup>[4]</sup>进行。将筛选出的部分蛋白酶缺陷株进行菌丝重量,发酵液 pH 值,淀粉水解能力,糖化酶活性的测定以及在 2-脱氧葡萄糖培养基上的生长试验。

**1.2.3 黑曲霉蛋白酶部分缺陷株原生质体的制备及转化:**黑曲霉原生质体制备基本参照 Wernars (1986) 等人<sup>[5]</sup>的方法。质粒的整合采用共转化。取  $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$  原生质体与  $5\mu\text{g}$  选择标记质粒 DNA 和  $5\mu\text{g}$  转化质粒 DNA 混合,加入  $50\mu\text{L}$  PEG 缓冲液 (25% PEG6000,  $0.05\text{mol/L}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.01\text{mol/L}$  Tris. Cl, pH 7.5) 冰上孵育 20min 后加入 1mL 上述 PEG 缓冲液 5min 后再加入 1mL  $1\text{mol/L}$  sorbitol 溶液并与融化的软洋菜选择培养基混匀,立即铺于同一培养基平板上  $30^\circ\text{C}$  培养 10~12d。

**1.2.4 转化子 Vhb 的功能检测:**参见文献[6],接种转化子的孢子悬液至 50mL 黑曲霉发酵培养基中,  $30^\circ\text{C}$  220r/min 培养 4d,过滤,取 8mL 滤液,均分至两个大试管,各加入 20mg/mL 亚硫酸钠,溶解后,一份通入  $\text{CO}$  30min,立即在分光光度计上作 380~480nm 扫描测定,以室温静置的另一份作比色对照,依据 420nm 处 Vhb-CO 特征吸收峰的出现来鉴定,峰高则粗略表示 Vhb 的浓度。

**1.2.5 Northern blot 分析:**采用标准 DNA 重组技术。总 RNA 的提取根据 Verwoerd 等人方法<sup>[7]</sup>。DNA 探针为 *vhb* 结构基因的 ClaI-MluI 片段。

## 2 结 果

### 2.1 T21 部分蛋白酶缺陷株的筛选

从紫外诱变后的 576 株菌的发酵上清各取  $50\mu\text{L}$  加入酪蛋白平板的孔内,结果选到了蛋白圈明显减小的 4 株菌 No. 80, 93, 96, 201(图 1),于 pH 4.0 测定蛋白酶活力,结果示于表 1, No. 201 的胞外

蛋白酶活力仅为原株的 0.76%,进一步对 No. 201 进行了发酵培养和在添加了 1% 的 2-脱氧葡萄糖的培养基上的生长试验,以观察其培养特性和测定糖化酶产量,结果均与原株基本一致(表 2),因此可以认为 No. 201 的生长能力,糖化酶的转录机器,蛋白分泌能力和蛋白加工形成成熟蛋白所需的内肽酶 KEXII 和抗葡萄糖阻遏特性都基本未变,没有受诱变作用的影响,适于用作基因工程的受体菌,命名为 *A. niger* T21-201。

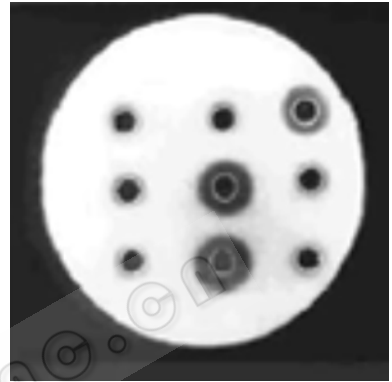


图 1 分泌蛋白酶活性的酪蛋白平板检测

Fig. 1 Casein plate testing of secreted protease activity  
Right hole of the first line and middle holes of the second and third line are T21, the other holes are No. 201

表 1 胞外蛋白酶活性测定

Table 1 Testing of extracellular protease activity

Strains	T21	80	93	96	201
$OD_{215}$ before reaction	0.152	0.222	0.097	0.124	0.162
$OD_{215}$ after reaction	0.283	0.259	0.140	0.152	0.163
Difference value	0.131	0.037	0.043	0.028	0.001
protease activity( u/mL )	30	8.46	9.84	6.42	0.23

The results are the average values of eight experiments.

表 2 部分蛋白酶缺陷株与 T21 的培养特性比较

Table 2 The comparison of cultural properties of protease-deficient strain and starting strain T21

Strains	Mycelia dry weight( g/50mL )	pH value	Starch halo diameter	Glucoamylase activity	Growth in 2-deoxyglucose
T21	$0.634 \pm 0.02$	$4.8 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.1$	$2798.6 \pm 6.2$	+
80	$0.571 \pm 0.01$	$4.7 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.1$	$2645.2 \pm 7.1$	+
93	$0.59 \pm 0.01$	$4. \pm 0.17$	$1.5 \pm 0.1$	$2814.8 \pm 8.6$	+
96	$0.62 \pm 0.01$	$4.6 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.1$	$2740.3 \pm 9.3$	+
201	$0.60 \pm 0.02$	$4.6 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.1$	$2785.4 \pm 4.8$	+

The results are average values of the three experiments.

## 2.2 以 *A. niger*T21-201 和 *A. niger*T21 为受体的表达水平的比较

分别用 p3SR2/pGT10-vhb 和 pMW1/pGT10-vhb 对 *A. niger*T21-201 和 *A. niger*T21 进行共转化。由于采用共转化,用选择标记筛选出的转化子中只有一定比例是同时整合入表达质粒的,从以上 4 种转化中各随机挑出 10 个转化子,检测 Vhb 功能表达,结果分别检出 2~3 个阳性转化子。图 2 出示了 *A. niger*T21-201 和 *A. niger*T21 各一株阳性转化子培养上清的 CO 结合吸收峰。比较二菌株的 CO-Vhb 平均吸收,结果示于表 3。由表 3 知,以 *A. niger*T21-201 为受体菌的转化子的 Vhb-CO 结合吸收明显比 *A. niger*T21 为受体的高。推测这是以 *A. niger*T21-201 为受体时,由于部分蛋白酶的缺陷使 Vhb 的降解明显减少的缘故,但是否是两菌株 *vhb* 基因转录水平的差异所致呢,为此进行了如下的 Northern 实验。

表 3 *A. niger*T21 和 *A. niger*T21-201 为受体株的 Vhb 表达水平比较

Table 3 Comparison of expression levels of Vhb with *A. niger*T21 and *A. niger*T21-201 as recipient strains

Selective marker	<i>amds</i>		<i>hph</i>	
recipient strains	<i>A. niger</i> T21	<i>A. niger</i> T21-201	<i>A. niger</i> T21	<i>A. niger</i> T21-201
No. of screening	10	10	10	10
No. of expression	2	2	2	3
* $OD_{420}$	0.02	0.12	0.03	0.20

\*  $OD_{420}$  is the average absorbance value determined by three independent experiments.

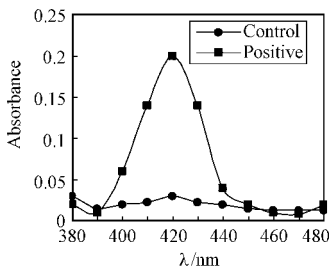


图 2 阳性转化子培养上清的 CO-Vhb 结合吸收光谱

Fig.2 CO-binding spectrum of culture supernatant from positive transformants.

## 2.3 *A. niger*T21-201 和 *A. niger*T21 转化子 Northern blot 分析

从以 *hph* 为选择标记的 *A. niger*T21-201 和 *A. niger*T21 转化子中,选出 Vhb 表达水平接近该类平均水平的转化子,接种于 6% 淀粉为唯一碳源的

50mL 培养基中,220r/min,30℃ 培养 84h,收集菌丝,提取总 RNA,以<sup>32</sup>p-dCTP 标记的 *vhb* 结构基因上 300bp 的 ClaI-MluI 片段作为探针进行杂交,以 pGT10 空载体的转化子 RNA 作为对照。图 4 表明糖化酶与 Vhb 基因的融合转录本存在于两类转化子中且二者显影强度基本无差别。此结果排除了以 *A. niger*T21-201 和 *A. niger*T21 作为受体菌时 *vhb* 基因转录水平的差异,从而证明了以紫外诱变筛选的部分蛋白酶缺陷株作为受体菌在提高外源基因表达中确实产生了显著效果。

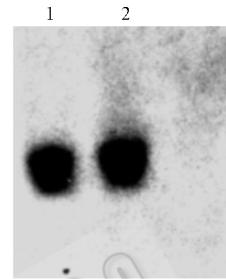


图 3 *A. niger*T21-201 和 *A. niger*T21 转化子的 Northern blot 分析

Fig.3 Northern blot analysis of transcriptional levels of *vhb* gene in transformants

## 2.4 *A. niger*T21-201 转化子不同培养时间的 Northern blot 分析

接种一株 Vhb 转化子至 50mL 黑曲霉发酵培养基,于 30℃ 220r/min 分别培养 72h、84h、90h、96h,进行 Northern blot 分析,由图 5 可见,在培养时间为 96h 以内,外源基因的特异 mRNA 含量是逐渐增加的,与内源糖化酶产量的进程一致。

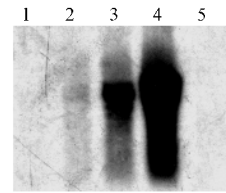


图 4 *A. niger*T21-201/pGT10-*vhb* 转化子不同培养时间的 Northern blot 分析

Fig.4 Northern blot analysis of different culture time of *A. niger*T21-201/pGT10-*vhb*  
Lane 1 : 72 ; Lane 2 : 84 ; Lane 3 : 90 ; Lane 4 : 96 ,  
total RNA 5 $\mu$ g , respectively.

## 3 讨论

黑曲霉 T21 是糖化酶高产株,具备作为丝状真菌基因工程受体菌所需的蛋白高分泌能力,类似哺乳动物的翻译后加工能力以及抗葡萄糖阻遏等特

性,但它同时分泌大量蛋白酶到培养介质中,致使异源蛋白的蛋白酶降解成为了它作为表达宿主的主要问题,这也是丝状真菌受体系统普遍遇到的问题。Berka 等<sup>[8]</sup>用基因取代法破坏 *A. niger* 的 *pepA* 基因(编码一种门冬氨酸蛋白酶)后,该菌株的胞外蛋白酶活性下降为野生菌株的 20%。Mattern 等<sup>[3]</sup>则采用诱变处理获得部分蛋白酶缺陷株,使外源脂肪酶表达分泌量大幅度提高。黑曲霉中蛋白酶基因种类甚多,但已知黑曲霉 T21 在培养 36h 后 pH 便迅速下降至 4.0 以下,因此预计参与外源蛋白降解的主要是酸性蛋白酶,为此我们采用紫外诱变来筛选酸性蛋白酶活力下降菌株,结果表明传统诱变在获得黑曲霉蛋白酶缺陷株上,仍然是成本低廉,快速有效的方法之一。丝状真菌基因工程中的表达分泌载体常采用高强度、淀粉诱导的糖化酶启动子或其它淀粉酶类启动子,因此推测将黑曲霉受体株中内源糖化酶或其它淀粉酶类启动子通过基因取代法敲除,便可以在一定程度上降低因启动子拷贝数增加而导致的正调控蛋白的滴定效应和能量、营养的分流,从而有利于提高外源蛋白表达水平。我们正研究黑曲霉基因的靶位整合(Gene targeting)技术,以建成更理想的黑曲霉表达宿主。

## Construction of Recipient Strain of Expression-secretion System in Filamentous Fungi

LIU Li<sup>1</sup> LIU Jin<sup>2</sup> QIU Run-Xiang<sup>1</sup> ZHU Xing-Guo<sup>1</sup> TANG Guo-Min<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(Institute of Microbiology, China Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

<sup>2</sup>(Shandong University, Jinan 250001, China)

**Abstract** Glucoamylase overproducing *A. niger* T21 was mutated by UV mutagenesis. An extracellular acid protease-deficient mutant, *A. niger* T21-201, which produced only 0.76% extracellular acid protease activity of the parent strain, was screened by casein-degradating plate and determination of protease activity. Moreover, the growth properties and the ability to secrete glucoamylase of *A. niger* T21-201 are identical to these of starting strain T21. The comparison of expression-secretion levels of heterologous gene in *A. niger* T21-201 and T21 was carried out with bacterial *vhb* as reporter. The level of expression-secretion of *VHb* in *A. niger* T21-201 was 6~7 times higher than that in T21, but the transcriptional levels of *vhb* gene in both strains were similar revealed by Northern blot. Therefore, it was demonstrated that the deficiency of acid protease of recipient T21-201 has significant effect on the protection of heterologous protein.

**Key words** *Aspergillus niger* T21, protease-deficient strain, expression-secretion

Received: 05-14-2002

This work was supported by a grants from National Science Foundation of China( No.30170014 ).

\* Corresponding author. Tel 86-10-62550680; Fax 86-10-62550680; E-mail qgmwq@yahoo.com.cn

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Johannes P T W van den Hombergh, Peter J I van de Vondervoort, Laurence Fraissinet-Tachet *et al.* *Aspergillus* a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *TIBTECH*, 1997, **15**: 256 ~ 253
- [ 2 ] Broekhuijsen M P, Mattern I E, Contreras R *et al.* Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: Production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2 like processing of glucoamylase-hIL6 fusion protein. *Journal of Biotechnology*, 1993, **31**: 135 ~ 145
- [ 3 ] Mattern I E, Johannes M van Noort, Paul van den Berg *et al.* Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Mol Gen Genet*, 1992, **234**: 332 ~ 336
- [ 4 ] ZHANG S Z(张树政). Industrial handbook of enzyme preparation. Beijing: Science Press(科学出版社), 1984
- [ 5 ] Wernars K, Goosen T, Swart K *et al.* Genetic analysis of *Aspergillus nidulans* amdS<sup>+</sup> transformant. *Mol Gen Genet*, 1986, **205**: 312 ~ 317
- [ 6 ] Kanak L D, Webster D A. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene*, 1988, **70**: 377 ~ 386
- [ 7 ] Verwoerd, T C, Dekker, B M M, Hoekema. A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research*, 1989, **17**(6): 2362
- [ 8 ] Berka, R, Ward, M, Wilson, L J *et al.* Molecular cloning and deletion of the gene encoding aspergillopsin A from *Aspergillus awamori*. *Gene*, 1990, **86**: 153 ~ 162