

## 研究报告



## 黑曲霉菌株柠檬酸合成酶基因的敲除及功能分析

秦卿<sup>1,2</sup> 周翔宇<sup>2</sup> 王丽娟<sup>1,2</sup> 高紫君<sup>1,2</sup> 刘博雅<sup>1,2</sup> 王德培<sup>\*1,2</sup>

1 工业发酵微生物教育部重点实验室 天津 300457

2 天津科技大学生物工程学院 天津 300457

**摘要:**【背景】柠檬酸合成酶是碳代谢途径的中心酶,其在三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)、氨基酸合成和乙醛酸循环中发挥着重要作用,是柠檬酸合成的关键酶。本论文所选用的是一株高产柠檬酸的黑曲霉菌株 CGMCC10142。【目的】克隆柠檬酸合成酶关键基因,构建柠檬酸合成酶的敲除菌株并鉴定其在黑曲霉菌株高产柠檬酸过程中的功能及影响。【方法】采用根瘤农杆菌转化方法并利用同源重组原理,采用抗性筛选和致死型反向筛选的双重筛选方法获得正确敲除株。对转化子在不同碳源下的生长情况进行观察并对柠檬酸发酵过程中菌丝球变化和产酸量进行分析,最后通过荧光定量 PCR 分析柠檬酸合成酶基因对黑曲霉积累柠檬酸的影响,及其对主要代谢途径中重要酶相关基因和其他的表达量的影响。【结果】以柠檬酸高产菌株黑曲霉 CGMCC10142 为出发菌,构建一株遗传稳定的柠檬酸合成酶敲除的菌株 T1-2。结果发现该菌株在以葡萄糖为碳源的培养基上生长缓慢并且产生孢子量减少。通过摇瓶发酵产酸实验,结果表明敲除菌在 84 h 产酸量为 64.3 g/L,相对于出发菌的 98.7 g/L 降低了 34.85%。通过荧光定量 PCR 发现柠檬酸合成酶的表达量是下降的,同时重要酶的表达量都下降。【结论】该菌株的柠檬酸合成酶基因对柠檬酸积累具有重要作用,但存在其他同工酶基因,该基因敲除仅使产酸合成降低 34.85%,同时发现该柠檬酸合成酶的顺畅表达有助于主代谢途径中各关键酶的高效表达,本研究可为研究黑曲霉高产柠檬酸机理奠定基础。

关键词: 黑曲霉 CGMCC10142, 柠檬酸合成酶, 基因敲除, 柠檬酸, 实时荧光定量 PCR

Knock-out and functional analysis of citrate synthase gene from *Aspergillus niger*QIN Li<sup>1,2</sup> ZHOU Xiang-Yu<sup>2</sup> WANG Li-Juan<sup>1,2</sup> GAO Zi-Jun<sup>1,2</sup> LIU Bo-Ya<sup>1,2</sup>  
WANG De-Pei<sup>\*1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China

2 College of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract:** [Background] Citric acid synthase is the central enzyme of carbon metabolism. It is important in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, amino acid synthesis and glyoxylate cycle, and is a key enzyme in the synthesis of citric acid. In this paper, a citric acid-producing *Aspergillus niger* strain CGMCC10142

**Foundation items:** Key Research and Development Project of Shandong Province (Fostering Talent Project) (2016GRC3201); National Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (201910057208)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-22-60602715; E-mail: wangdp@tust.edu.cn

**Received:** 09-09-2019; **Accepted:** 08-12-2019; **Published online:** 06-01-2020

**基金项目:** 山东省重点研发计划(领军人才培养项目) (2016GRC3201); 国家级大学生创新创业训练计划资助项目 (201910057208)

**\*通信作者:** Tel: 022-60602715; E-mail: wangdp@tust.edu.cn

**收稿日期:** 2019-09-09; **接受日期:** 2019-12-08; **网络首发日期:** 2020-01-06

was selected. **[Objective]** Cloning of key gene citrate synthase, constructing the knockout strain of citrate synthase and identifying its function and influence in the process of high yield of citric acid by *Aspergillus niger* strain. **[Methods]** In this experiment, the *Agrobacterium tumefaciens* transformation method and the principle of homologous recombination were used, and the correct knockout strain was obtained by the dual screening method of resistance screening and lethal type and reverse screening. Observation of growth of different carbon sources by transformants and the changes of mycelial spheres and acid production during citric acid fermentation were analyzed. Finally, the effect of citrate synthase gene on the accumulation of citric acid in *Aspergillus niger* and its effect on the expression of important enzyme-related genes and other expressions in the main metabolic pathways were analyzed by real-time PCR. **[Results]** A strain T1-2 with a genetically stable knockout citrate synthase was constructed based on the high-yield citric acid strain *Aspergillus niger* CGMCC10142. The results showed that the strain grew slowly on the medium with glucose as carbon source and produced fewer spores. The results of shaking flask fermentation showed that the acid yield of knockout bacteria was 64.3 g/L at 84 h, which was 34.85% lower than that of the original bacteria at 98.7 g/L. Real-time quantitative PCR results showed that the expression level of citrate synthase was decreased, and the expression levels of other important enzymes were decreased. **[Conclusion]** The citrate synthase gene of this strain plays an important role in the accumulation of citric acid, but there are other isozyme genes. When this gene knockout, only the acid production synthesis is reduced by 34.85%. At the same time, it was found that the smooth expression of the citrate synthase facilitated the high-efficiency expression of each key enzyme in the main metabolic pathway, which laid a foundation for studying the mechanism of high-yield citric acid in *Aspergillus niger*.

**Keywords:** *Aspergillus niger* CGMCC10142, Citrate synthase, Gene knockout, Citric acid, Quantitative Real-time qPCR

我国最早从 20 世纪 60 年代初开始进行大规模的柠檬酸工业化生产, 其中 70%–80% 用于生产饮料、食品, 其余用于医药、化工、环保、化妆品、纺织、建筑等领域<sup>[1]</sup>。2018 年, 我国发酵生产柠檬酸及其盐达到 152 万 t, 柠檬酸发酵生产技术和产量均已经处于世界先进水平。克雷伯斯于 1940 年提出三羧酸循环学说以来, 柠檬酸的积累途径已被人们所认知。葡萄糖经过糖酵解(embden-meyerhof pathway, EMP)途径后生成丙酮酸, 丙酮酸进一步氧化脱羧生成乙酰辅酶 A, 同时在细胞质中羧化生成草酰乙酸, 然后由柠檬酸合酶催化乙酰辅酶 A 和草酰乙酸缩合而成柠檬酸<sup>[2]</sup>。

柠檬酸合成酶(citrate synthase, CS), 又称柠檬酸缩合酶, 在三羧酸循环第一步反应中催化乙酰辅酶 A 的乙酰基与草酰乙酸的酮基结合生成柠檬酰辅酶 A, 以便后续高能磷酸键水解释放出辅酶 A 得到柠檬酸。柠檬酸合成酶是一个调控酶, 此酶的底物乙酰辅酶 A 和草酰乙酸是其激活剂, NADH、琥珀酰辅酶 A 是抑制剂, 其是三羧酸循环(tricarboxylic

acid cycle, TCA)和乙醛酸循环中的关键酶, 因此, 对于所有生物体来说柠檬酸合成酶都是代谢过程中重要的酶, 在黑曲霉高产柠檬酸发酵过程中起到至关重要的核心作用。由于柠檬酸合成酶的重要性, 对其基因的克隆表达和功能分析已在多种生物体中完成。在植物油菜中进行了 *cs* 基因克隆及逆境表达研究, 为进一步研究 CS 在植物的发育调控以及抗逆作用中的机制提供了基础<sup>[3]</sup>。胡利华等则采用根癌农杆菌介导法将 *cs* 基因导入粳稻和籼稻中通过筛选获得转基因阳性植株, 使 CS 在水稻植株内过表达, 以加速根系大量合成和分泌柠檬酸<sup>[4]</sup>。在植物拟南芥中有 5 个柠檬酸合成酶同工酶, 其中 2 种是过氧化物酶体(CSY2 和 CSY3), 是脂肪酸呼吸和种子萌发所必需的<sup>[5]</sup>。在酿酒酵母中有 3 个基因编码柠檬酸合成酶同工酶, 线粒体 *cit1* 是 TCA 循环的主要柠檬酸合成酶。另外一种酶 *cit2* 通过 C 末端过氧化物酶体靶向序列 PST1 定位于过氧化物酶体<sup>[6]</sup>。此外, 第 3 个基因 *cit3* 编码具有柠檬酸合成酶活性的线粒体酶<sup>[7]</sup>。在丝状子囊菌构巢曲霉中

目前发现了柠檬酸合成酶和甲基柠檬酸合成酶编码基因<sup>[8]</sup>, 分别为 *citA* 和 *mcs*, 而且在构巢曲霉和烟曲霉中 *mcs* 仅位于线粒体, 同时具有甲基柠檬酸盐和柠檬酸合成酶活性, 为丙酰辅酶 A 代谢所必需<sup>[9]</sup>。根据报道, 在黑曲霉 WU-2223L 中也只发现了一个柠檬酸合成酶和一个甲基柠檬酸合成酶, 并且其同时表现出 Methylcitrate synthetase (MCS) 活性和 CS 活性, 其中 MCS 是丙酰辅酶 A 代谢的关键酶, 但不是黑曲霉利用葡萄糖生产柠檬酸的关键酶<sup>[10]</sup>。Ruijter 等在真菌黑曲霉中过表达柠檬酸合成酶 CS, 在表达水平和酶活变高的情况下对黑曲霉产柠檬酸无明显影响<sup>[11]</sup>。

在 NCBI 的丝状真菌黑曲霉 CBS 513.88 所公布的基因序列中发现有 4 个柠檬酸合成酶。本实验所用菌株的基因组测序结果发现, 在黑曲霉 CGMCC10142 存在 4 个柠檬酸合成酶的同工酶序列。根据已有柠檬酸合成酶的相关报道, 本次的实验选择柠檬酸合成中起到最主要作用的柠檬酸合成酶, 对其进行克隆并构建柠檬酸合成酶缺失菌株, 以期对该基因在柠檬酸高产菌株中的功能进行初步分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株及培养条件

实验使用的柠檬酸高产菌株黑曲霉 CGMCC 10142、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和农杆菌 AGL-1 均来自天津工业发酵微生物学重点实验室。

#### 1.1.2 培养基

产孢培养基为 PDA 培养基。发酵培养基为玉米液化液(RZBC 有限公司, 山东日照)。玉米液化液是按玉米粉:水=1:4 的比例混合, 加热至 70 °C, 加入耐高温  $\alpha$ -淀粉酶, 保温 10 min, 然后加热至 90 °C 保温 4–5 h, 碘液不变色, 2 层纱布过滤, 至滤液冷却后加水调至合适的总糖浓度, 1 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

霉菌基因组 DNA 提取试剂, 北京索莱宝科技有限公司; 潮霉素 HYG、5-氟脱氧尿苷, 索莱宝公司; pMD18-T Easy Vector, 宝生物工程有限公司; PCR 产物胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、10 $\times$ PCR Buffer、2.5 $\times$ dNTP Mixture、MarKIII DNA Marker, 天根生化科技有限公司; PrimeScript<sup>TM</sup> II 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit、rTaq DNA Polymerase, 5 $\times$ RT Reaction Buffer、RNase Inhibitor、M-MLV RTase、dNTPs, TaKaRa 公司。PCR 扩增仪, Eppendorf 公司; Fast 荧光定量 PCR 仪, TaKaRa 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 黑曲霉基因组的提取

将黑曲霉的孢子接种于液体 PDA 培养基中, 在 36 °C 静置培养 48 h, 待液体培养基长出菌丝后, 纱布过滤并用无菌水冲洗收集菌丝体, 具体方法参考文献[12]。

### 1.2.2 *cs* 基因的克隆

依据 NCBI 已经公布的 CS (XM-001393946) 的基因信息, 设计 *cs* 基因序列引物如表 1 所示, 以

表 1 柠檬酸合酶基因克隆和敲除质粒构建所使用的引物

Table 1 Primers used for cloning and knockout plasmid construction of citrate synthase gene

Primers name	Sequences (5'→3')	Amplification product	Length (bp)
CS-F	ATGGCTTCCACCTTGAGACTG	<i>cs</i> gene	2 121
CS-R	ATTACAGCTTAGCACCAACAAG		
HSVtk-F	<u>GAATTC</u> CGGAATTCAATTCGAATTGGGTACTCAAATTGG	HSV-TK gene	1 855
HSVtk-R	CAATCTTCTCCGGGCTCTCCAGCTTATCATCATG		
L-F	GTACTTGATTTGTTGTTATGGCTG	P10-C left arm	1 110
L-R	CTCCCTACACACATTGATTGGGTACC		
H-F	<u>GTCGAC</u> GTCGACGTTAACTGATATTGAAGGAG	HYG	1 396
H-R	CTATTTCTTTGCCCTCGGACG		
R-F	CCATTGGCAACGACCTCAGC	P10-C right arm	704
R-R	GATTGACTTGGAATTTCTCAAGTGCCTCGAC		

Note: The *Eco*R I, *Kpn* I, *Sal* I sites are underlined.

黑曲霉 CGMCC10142 菌株的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 技术扩增编码柠檬酸合成酶基因 *cs*。以提取的黑曲霉菌基因组为模板, CS-F、CS-R 为上、下游引物。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): *rTaq* DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, DNA 2  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, 2.5 $\times$ dNTP Mixture 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 15.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。将扩增的目的片段分别连接到 pMD18-T 载体上并测序。

### 1.2.3 *cs* 基因敲除质粒的构建

敲除质粒构建过程所用的引物如表 1 所示。质粒 p44 来源于天津市工业发酵重点实验室。用于敲除黑曲霉 CGMCC10142 菌株中 *cs* 基因质粒 p10-C 的构建方法为: 基因组 DNA 被用作模板来扩增位于 *cs* 基因上游和下游的同源左臂和右臂; 以实验室保存的质粒 pBHt2-tk 为模板, 用 HSVtk-F、HSVtk-R 作为上、下游引物, PCR 扩增 HSVtk 基因序列。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): *rTaq* DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, 2.5 $\times$ dNTP Mixture 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。然后利用重叠 PCR 技术将 HSVtk 和左臂融合起来, 经过 *EcoR* I 和 *Kpn* I 将质粒 p44 和融合片段同时双酶切回收后使用 T4 连接酶连接构成 p44-HSVtk-L 质粒。再利用重叠 PCR 技术将 *cs* 基因右臂和潮霉素融合起来, 然后再用 *Sal* I 单酶切该片段和 p44-HSVtk-L 质粒连接, 最终构成柠檬酸合成酶的敲除质粒 p10-C 质粒。

### 1.2.4 质粒转化大肠杆菌及验证

首先是制作 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 之后将带有目的片段的质粒转化入感受态细胞中。具体方法参考文献[13]。

### 1.2.5 质粒电转农杆菌

将大肠杆菌质粒与农杆菌感受态混合均匀, 用移液枪吸入间距 0.2 cm 电转杯中, 2.5 kV 电击

5 ms; 加入 LB 液体培养基于电转杯混匀后, 注入无菌 EP 管中, 28  $^{\circ}$ C、180 r/min 孵育 6 h; 吸取部分菌液涂布到含有 100  $\mu$ g/mL Kan 抗性的 LB 平板上, 28  $^{\circ}$ C 培养 1–2 d。然后挑取较大单菌落转接到含有相同抗性的 LB 液体培养基, 28  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜后进行菌液 PCR 验证。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): *rTaq* DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, L-F、R-R 引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板菌液 1  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, 2.5 $\times$ dNTP Mixture 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.2.6 根癌农杆菌侵染黑曲霉及阳性转化子的筛选

根癌农杆菌转化法具体步骤参考文献[14]。在实验过程中, 除了使用 HYG 抗性标记进行初步筛选, 还采用一种反向筛选方法来提高黑曲霉基因敲除效率<sup>[15]</sup>。

### 1.2.7 CS 缺失菌株在不同碳源下的生长表型

生长实验是在 CM 培养基平板上进行的, 其中将 1%葡萄糖替换为果糖、木糖、阿拉伯糖、甘露醇、蔗糖、麦芽糖、半乳糖、乳糖、山梨醇、乙酸钠和丙酸钠为唯一碳源<sup>[16]</sup>。将黑曲霉菌株 CGMCC10142 和 T1-2 的分生孢子在蒸馏水中悬浮, 然后涂布于正常 CM 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h, 然后将其单菌落分别点种在不同碳源板上, 37  $^{\circ}$ C 下接着培养 3 d。对各个菌株的生长情况和产孢量进行分析。

### 1.2.8 摇瓶实验和总酸的测定

将  $1 \times 10^5$  孢子/mL 的孢悬液接种至 50 mL/500 mL 三角瓶的发酵培养基中, 37  $^{\circ}$ C、300 r/min 振荡培养, 分别发酵 24、48、84 h 取样, 观察发酵液中菌丝球形态并采用氢氧化钠滴定法, 重复 3 次, 取平均值测定产酸。

### 1.2.9 敲除菌株的实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 的相关基因的参考序列在 GenBank 登录号为: 己糖激酶 XM\_001400532, 磷酸果糖激酶 XM\_001398589, 丙酮酸激酶 XM\_026768580.1, 柠檬酸合成酶 XM\_001393946。参考其序列所设计的引物如表 2 所示。将上述发酵得到过滤的菌体进行黑曲霉总 RNA 的提取, 然后

根据 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ II 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit 的操作方法进行反转录,实验操作按照产品说明书进行。PCR 反应体系(25 μL): 5×RT Reaction Buffer 5 μL, dNTPs (25 mmol/L) 1 μL, RNase Inhibitor (25 U/μL) 1 μL, M-MLV RTase (200 U/μL) 1 μL, RNA 2 μL, Random Primer (250 mmol/L) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 14 μL。PCR 反应条件: 37 °C 60 min; 85 °C 5 min; 4 °C 保存。用 Fast 荧光定量 PCR 仪, 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法进行相对定量分析。

2 结果与分析

2.1 柠檬酸合成酶基因的克隆与序列分析

基于对 CGMCC10142 基因组的分析, 该菌株

表 2 实时荧光定量 PCR 所使用引物

Table 2 Primers used for real-time qPCR

Primers Sequences (5'→3')		Amplification product	Length (bp)
F	CTCCAAGCTCAAGCAGATT	<i>hk</i>	98
R	GAACCCAGGTGACGTTTCATA		
F	GCCAAGAACATGGTCCTC	<i>pfk</i>	115
R	CCAATTCCTTCAACAGACCG		
F	CATACAACCCTCGTCCTACT	<i>pk</i>	91
R	GTCTCTCCCGACAGCATGA		
F	TCAGATTGAAGTGCTTTCGCTA	<i>cs</i>	83
R	CATCTTGGTGAGCCAGTT		
F	CTGAATGACCCTCATGT	<i>cexA</i>	84
R	CGGTGGTTGTAATCCATAAGG		

具有 4 个编码柠檬酸合成酶的基因。4 个柠檬酸合成酶的氨基酸序列比对如图 1 所示, 差异较大, 但

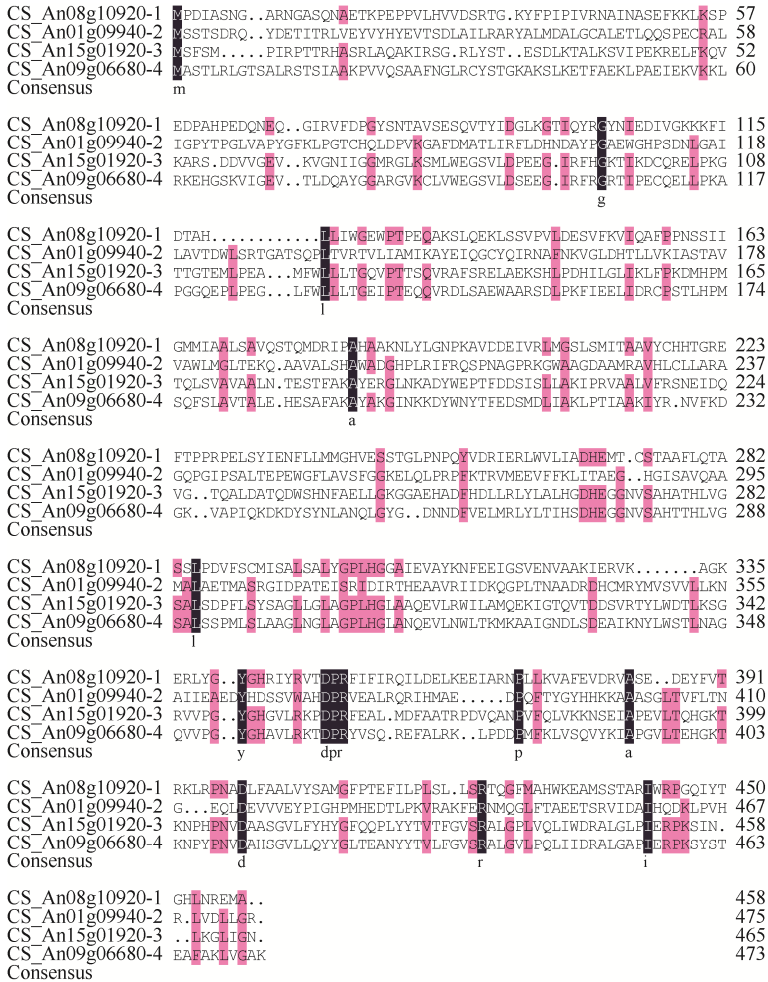


图 1 4 个柠檬酸合成酶的氨基酸序列比对

Figure 1 Amino acid sequence alignment of four citrate synthases

注: An08g10920: 柠檬酸合成酶 1; An01g09940: 柠檬酸合成酶 2; An15g01920: 柠檬酸合成酶 3; An09g06680: 柠檬酸合成酶 4.  
Note: An08g10920: Citrate synthase 1, An01g09940: Citrate synthase 2, An15g01920: Citrate synthase 3, An09g06680: Citrate synthase 4.

依然具有活性位点和乙酰辅酶 A 的结合位点。分别将黑曲霉 4 个柠檬酸合成酶的氨基酸序列与不同物种的柠檬酸合成酶比较发现,第 4 个柠檬酸合成酶(An09g06680)在不同物种的相似性较高,并且位于线粒体,是柠檬酸合成中起主要功能的酶,因此选择对该基因进行研究。从黑曲霉 CGMCC10142 菌株基因组中克隆 *cs* 基因 DNA 片段,如图 2 所示,测序结果表明获得了长度为 2 121 bp 的序列,与 NCBI 所公布的 *cs* 基因大小相近。将核苷酸测序结果与 GenBank 上公布的黑曲霉 CBS 513.88 (XM\_001393946)的 *cs* 基因序列进行比对,结果相似性为 98%。该柠檬酸合成酶共有 474 个氨基酸,分子量为 52 kD,其氨基酸序列与报道的曲霉属、酿酒酵母、大肠杆菌和人类的柠檬酸合成酶的氨基酸序列在 DNAMAN 中进行比对的结果如图 3 所示,具有多段氨基酸残基序列保守区,其中 VVPGYGHAVLRKTD RRY 都分布在柠檬酸合成酶的活性中心。通过 MEGA 5.0 软件构建系统发育树,如图 4 所示。菌株黑曲霉 CGMCC10142 与烟曲霉的相似性最高为 96%,同时与构巢曲霉、黄曲霉和米曲霉的相似性均在 90%以上。与酿酒酵母和人类的柠檬酸合成酶的氨基酸序列相似性都达到了 60%以上,可见该柠檬酸合成酶的保守性较强。

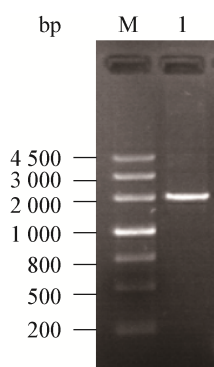


图 2 柠檬酸合成酶 *cs* 基因的克隆

Figure 2 Cloning of citrate synthase *cs* gene

注: M: MarKIII DNA Marker; 1: 柠檬酸合成酶基因 PCR 产物。

Note: M: MarKIII DNA Marker; 1: PCR products of citrate synthase gene.

## 2.2 *cs* 基因缺失菌株的构建

柠檬酸合成酶的敲除质粒 p10-c 的构建过程如图 5A 所示。将构建好的质粒转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 验证正确的质粒即具有整个 *cs* 基因敲除表达框,全长为 5 065 bp,如图 5B 所示,电转到农杆菌 AGL-1,获得带有 p10-c 质粒的农杆菌对黑曲霉 CGMCC 10142 进行侵染实验。农杆菌与黑曲霉孢子悬液共培养 2–3 d 后用无菌水洗下,并涂布于加有 200  $\mu$ g/mL 潮霉素(hygromycin, HYG)的 PDA 培养基进行一次筛选,35  $^{\circ}$ C 培养 3 d 后,将一次抗性筛选平板上长出的单个转化子点接到含有 0.5  $\mu$ mol/L 5-氟脱氧尿苷的 PDA 培养基进行二次筛选,将二次筛选板上生长的转化子点接正常 PDA 平板上,35  $^{\circ}$ C 培养 2–3 d 后转接孢子于液体培养基,提取基因组验证从左臂到右臂敲除组件,如图 5C 所示,当以潮霉素作为抗性筛选标记,以筛选到的转化子基因组为模板扩增得到一条 3 210 bp 的单一一条带;而完全没有插入基因组的菌株只能得到 2 900 bp 左右的条带;若非同源重组,仅仅随机插入,就会得到上述两条带。在此基础上,依照黑曲霉 CBS 513.88 的柠檬酸合酶左臂的上游序列设计复证引物 *csA*-F (5'-CAATCACCCCATTCCTTCACGG-3'),以左臂更左上游引物 *csA*-F 和潮霉素下游引物 H-R 成对进行 PCR 验证,获得条带大小为 2 610 bp 左右的片段,复证阳性转化子确为潮霉素原位重组,结果如图 5D 所示,筛选到同源重组敲除株,命名为 T1-2。

## 2.3 黑曲霉突变株的生长形态

由于自身基因的缺失和外源基因的随机插入都会导致黑曲霉的生长形态发生改变(图 6)。从菌落形态可以看出,两株菌以葡萄糖、果糖、木糖、蔗糖、麦芽糖为单一碳源时菌落较大,以阿拉伯糖、乳糖、乙酸钠、丙酸钠为唯一碳源时的菌落较小。从产孢情况来看,黑曲霉 CGMCC10142 在葡萄糖



<i>Aspergillus niger</i> .seq	PAEIEKVKKLRKEHGSKVIGEVTLTQAYGGARGVKCLVWEGSVLDSEEGIRFRGRITPEEC
<i>Aspergillus nidulans</i> .seq	PGELEKVKKLRKEHGNKVIQELTLDQAYGGARGVKCLVWEGSVLDSEEGIRFRGLTIPEEC
<i>Aspergillus flavus</i> .seq	PGEIEKVKKLRKDYGNKVIQEVTLTQAYGGARGVKCLVWEGSVLDSEEGIRFRGYTIPEEC
<i>Aspergillus oryzae</i> .seq	PGEIEKVKKLRKEHGSKVIGEVTLTQAYGGARGVKCLVWEGSVLDSEEGIRFRGYTIPEEC
<i>Aspergillus fumigatus</i> .seq	PAKAEIEKKFKKEHGKTVIGEVLLTQAYGGMRGKGLVWEGSVLDPEEGIRFRGRITPEEI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .seq	PEKQAEIKKFRAEHGQDVIGEVTLINQYGGARGVRSLLWEGSVLDPEEGIRFRGYTIPEEC
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> .seq	GQDVIDIRTLGSK.....GVFTFDPGFTSTASCES...KITFDGDEGILLH.....
<i>Escherichia coli</i> .seq	PKKQARIKTFKQHGKTVVGGITVDMYGGMRGKGLVYETSVLDPDEGIRFRGFSTPEEC
<i>Homo sapiens</i> .seq	g d egi
Consensus	
<i>Aspergillus niger</i> .seq	QELLPKAPGGQEPLEGLFWLLLTGEIPTEQVRLSAEWAARSDDLKPFIEELIDRCPEST
<i>Aspergillus nidulans</i> .seq	QKLLPKAPGGEEPLPEGLFWLLLTGEVPSEQQVRDLSEWAARSDDLKPFIEELIDRVPEST
<i>Aspergillus flavus</i> .seq	QKLLPKAPGGEEPLPEGLFWLLLTGEIPSEQQVRDLSEWAARSDDLKPFIEELIDRCPEST
<i>Aspergillus oryzae</i> .seq	QKLLPKAPGGEEPLPEGLFWLLLTGEIPSEQQVRDLSEWAARSDDLKPFIEELIDRCPEST
<i>Aspergillus fumigatus</i> .seq	QKLLPKAPGGEEPLPEGLFWLLLTGEIPTEQVRLSAEWAARSDDLKPFIEELIDRCPEST
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .seq	QRELPAEGSTEPLPEALFWLLLTGEIPTDAQVKSADLAARSEIPEHVQLDLSLPKD
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> .seq	QKLLPSSPNKGQPLPESLFWLLLTGEIPTLSQVQALSADWAARSQPLKFVEELIDRCPEST
<i>Escherichia coli</i> .seq	.RGFPIDQLATDSNYLEVCIYLLNGEKPTQEQYDEFKTTVTRHTMHPQITRLPHAFRRD
<i>Homo sapiens</i> .seq	QKLLPKAPGGEEPLPEGLFWLLLTGHTPEEQVSWLSKEWAKRAALPSHVVTMLDNFETN
Consensus	p l g p q
<i>Aspergillus niger</i> .seq	LHPMSQFSLAVTALEHESAFAKAYAGINKKDYWNNTFEDSMDLIAKLETTAAKIYRNVF
<i>Aspergillus nidulans</i> .seq	LHPMAQFSLAVTALEHESAFAKAYAGINKKEYWHYTFEDSMDLIAKLETTAAKIYRNVF
<i>Aspergillus flavus</i> .seq	LHPMAQFSLAVTALEHESAFAKAYAGINKKDYWNNTFEDSMDLIAKLETTAAKIYRNVF
<i>Aspergillus oryzae</i> .seq	LHPMAQFSLAVTALEHESAFAKAYAGINKKDYWNNTFEDSMDLIAKLETTAAKIYRNVF
<i>Aspergillus fumigatus</i> .seq	LHPMAQFSLAVTALEHESAFAKAYAGINKKDYWNNTFEDSMDLIAKLETTAAKIYRNVF
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .seq	LHPMAQFSLAVTALEHESAFAKAYAGINKKDYWNNTFEDSMDLIAKLETTAAKIYRNVF
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> .seq	LHPMAQFSLAVTALEHESAFAKAYAGINKKDYWNNTFEDSMDLIAKLETTAAKIYRNVF
<i>Escherichia coli</i> .seq	SHFMAVMCGITGAL.....AAYVHDSLDVNNFRHREIAA.FRLLSKMFMAAMCYK..Y
<i>Homo sapiens</i> .seq	LHPMSQFSLAVTALEHESAFAKAYAGINKKDYWNNTFEDSMDLIAKLETTAAKIYRNVF
Consensus	hpm al a l k a y
<i>Aspergillus niger</i> .seq	KDGG.VAPIQKDKDYSYNLANQL.....GYGNNDFFVELMRLYLTIHSDHEGGNVSAAHT
<i>Aspergillus nidulans</i> .seq	KDGG.VAPIQKDKDYSYNLANQL.....GFADNKDFVELMRLYLTIHSDHEGGNVSAAHT
<i>Aspergillus flavus</i> .seq	KDGG.VAPIQKDKDYSYNLANQL.....GFGNNDFFVELMRLYLTIHSDHEGGNVSAAHT
<i>Aspergillus oryzae</i> .seq	KDGG.VAPIQKDKDYSYNLANQL.....GFGNNDFFVELMRLYLTIHSDHEGGNVSAAHT
<i>Aspergillus fumigatus</i> .seq	KDGG.VAPIQKDKDYSYNLANQL.....GYGNNDFFVELMRLYLTIHSDHEGGNVSAAHT
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .seq	KDGG.ITSTDPNADYGNLANQL.....GYE.NKDFIDLMRLYLTIHSDHEGGNVSAAHT
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> .seq	RDGV.VAPIQMDKDHYNFANVL.....GFANNEFFVELMRLYLTIHSDHEGGNVSAAHT
<i>Escherichia coli</i> .seq	SIQGFPIVPRNDLSYAGNFINMNFSTPCPEYVNPILERAMDRILLHADHEQN.ASTST
<i>Homo sapiens</i> .seq	REGSGIGATDSNLDWSHNFNML.....GYT.DHQFTETRLYLTIHSDHEGGNVSAAHT
Consensus	g n l h dhe s t
<i>Aspergillus niger</i> .seq	THLVGSALSSPMLSLAAGLNLGAPLHGLANQEVINWLTMKMAAIGNDLSDEATKNYLWS
<i>Aspergillus nidulans</i> .seq	THLVGSALSSPMLSLAAGLNLGAPLHGLANQEVINWLTMKMAAIGNDLSDEATKNYLWS
<i>Aspergillus flavus</i> .seq	THLVGSALSSPMLSLAAGLNLGAPLHGLANQEVINWLTMKMAAIGNDLSDEATKNYLWS
<i>Aspergillus oryzae</i> .seq	THLVGSALSSPMLSLAAGLNLGAPLHGLANQEVINWLTMKMAAIGNDLSDEATKNYLWS
<i>Aspergillus fumigatus</i> .seq	THLVGSALSSPMLSLAAGLNLGAPLHGLANQEVINWLTMKMAAIGNDLSDEATKNYLWS
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .seq	THLVGSALSSPMLSLAAGLNLGAPLHGLANQEVINWLTMKMAAIGNDLSDEATKNYLWS
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> .seq	THLVGSALSSPMLSLAAGLNLGAPLHGLANQEVINWLTMKMAAIGNDLSDEATKNYLWS
<i>Escherichia coli</i> .seq	HLVGSALSSPMLSLAAGLNLGAPLHGLANQEVINWLTMKMAAIGNDLSDEATKNYLWS
<i>Homo sapiens</i> .seq	SHLVGSALSSPMLSLAAGLNLGAPLHGLANQEVINWLTMKMAAIGNDLSDEATKNYLWS
Consensus	gs p a l gp hg an l l
<i>Aspergillus niger</i> .seq	TLNAGQVVPVGYGHAVLRKTDPRYVSQREFALRKLPDD.PMEKLVSVQYKTIAPGVLT.HG
<i>Aspergillus nidulans</i> .seq	TLNAGRVVPVGYGHAVLRKTDPRYVSQREFALRKLPDD.PMEKLVSVQYKTIAPGVLT.HG
<i>Aspergillus flavus</i> .seq	TLNAGQVVPVGYGHAVLRKTDPRYVSQREFALRKLPDD.QMENLVSQYKTIAPGVLT.HG
<i>Aspergillus oryzae</i> .seq	TLNAGQVVPVGYGHAVLRKTDPRYVSQREFALRKLPDD.QMENLVSQYKTIAPGVLT.HG
<i>Aspergillus fumigatus</i> .seq	TLNAGQVVPVGYGHAVLRKTDPRYVSQREFALRKLPDD.PMEKLVSVQYKTIAPGVLT.HG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .seq	TLNAGRVVPVGYGHAVLRKTDPRYVSQREFALRKLPDD.PMEKLVSVQYKTIAPGVLT.HG
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> .seq	TLNAGRVVPVGYGHAVLRKTDPRYVSQREFALRKLPDD.PMEKLVSVQYKTIAPGVLT.HG
<i>Escherichia coli</i> .seq	.KNDSEFLMGPGHRYKNYDPRATVMRETCHEVLKELGTKDDLLLEVAMELENIALNDPYF
<i>Homo sapiens</i> .seq	TLNAGRVVPVGYGHAVLRKTDPRYVSQREFALRKLPDD.PMEKLVSVQYKTIAPGVLT.HG
Consensus	n g gh v dpr re l l
<i>Aspergillus niger</i> .seq	KTKNPYPNVDAHSGVLLQYYGLTEANYTTLVFGVSRALGVLPQLIIDRALGAPIERPKSF
<i>Aspergillus nidulans</i> .seq	KTKNPYPNVDAHSGVLLQYYGLTEANYTTLVFGVSRALGVLPQLIIDRALGAPIERPKSF
<i>Aspergillus flavus</i> .seq	KTKNPYPNVDAHSGVLLQYYGLTEANYTTLVFGVSRALGVLPQLIIDRALGAPIERPKSF
<i>Aspergillus oryzae</i> .seq	KTKNPYPNVDAHSGVLLQYYGLTEANYTTLVFGVSRALGVLPQLIIDRALGAPIERPKSF
<i>Aspergillus fumigatus</i> .seq	KTKNPYPNVDAHSGVLLQYYGLTEANYTTLVFGVSRALGVLPQLIIDRALGAPIERPKSF
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .seq	KTKNPYPNVDAHSGVLLQYYGLTEANYTTLVFGVSRALGVLPQLIIDRALGAPIERPKSF
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> .seq	KTKNPYPNVDAHSGVLLQYYGLTEANYTTLVFGVSRALGVLPQLIIDRALGAPIERPKSF
<i>Escherichia coli</i> .seq	IEKKLYPNVDFYSGIILKAMGIP.SSMFTVIFAMARTVGVIAHWSMHSDEGMKIPARQGL
<i>Homo sapiens</i> .seq	KAKNEWPNVDAHSGVLLQYYGLTEANYTTLVFGVSRALGVLPQLIIDRALGAPIERPKSF
Consensus	k pnv d sg l g tv f r g g rp
<i>Aspergillus niger</i> .seq	STEAFAKLVGAKL..
<i>Aspergillus nidulans</i> .seq	STEAFAKLVGAKL..
<i>Aspergillus flavus</i> .seq	STEAFAKLVGAKL..
<i>Aspergillus oryzae</i> .seq	STEAFAKLVGAKL..
<i>Aspergillus fumigatus</i> .seq	STEAFAKLVGAKL..
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .seq	STEAKLVGAKL..
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> .seq	STEAKLVGAKL..
<i>Escherichia coli</i> .seq	YTGYEKRDFKSDIKR
<i>Homo sapiens</i> .seq	STEGLMKLVDSKSG.
Consensus	t

图3 不同物种的柠檬酸合成酶的氨基酸序列比对

Figure 3 Amino acid sequence alignment of citrate synthase from different species

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

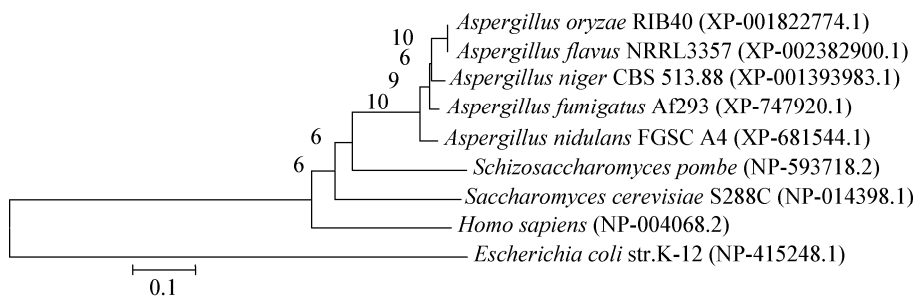


图 4 对不同物种柠檬酸合成酶构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree constructed from citrate synthase of different species

注：系统发育树采用邻接法构建；括号中的序号为代表菌株的氨基酸 GenBank 登录号；分支上的数值表示经 1 000 次计算后的置信度值；比例尺表示遗传距离。  
Note: Phylogenetic tree is constructed by adjacency method; the sequence number in parentheses is the amino acid GenBank login number representing the strain; the number on the branch represents the confidence value calculated 1 000 times; and the scale represents the genetic distance.

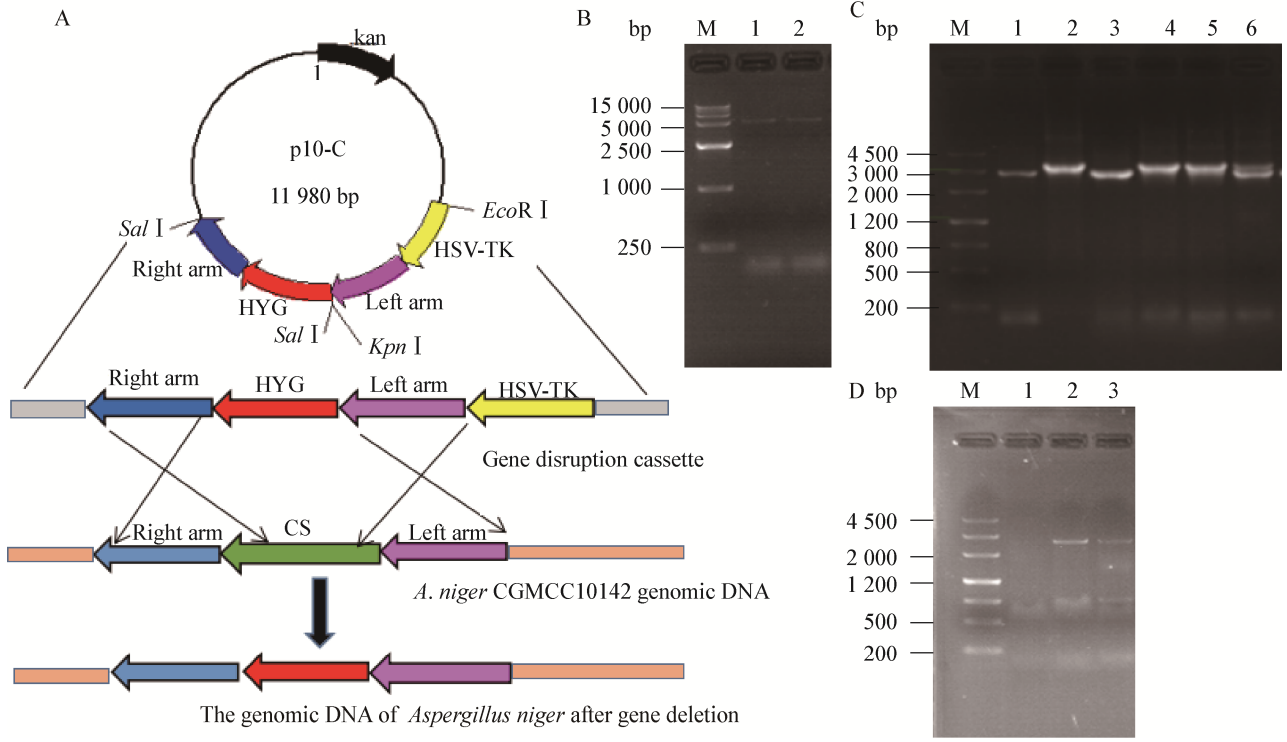


图 5 敲除株质粒构建过程和阳性转化子的验证

Figure 5 Plasmid construction of knockout strains and verification of positive transformers

注：A：质粒 p10-C 的构建示意图。B：以 p10-C 质粒为模板扩增敲除组件全长；M：DL15000 DNA Marker；1-2：以 p10-C 质粒为模板扩增敲除组件全长。C：黑曲霉转化子的验证；M：DL5000 DNA Marker；1：以黑曲霉 CGMCC10142 基因组为模板，左臂到右臂敲除组件扩增；2：以含 p10-C 质粒为模板 PCR 扩增敲除组件片段；3-6：以提取黑曲霉转化子基因组 DNA 为模板，扩增验证。D：cs 基因敲除转化子菌的复证；M：DL5000 DNA Marker；1：以黑曲霉 CGMCC10142 基因组为模板，扩增左臂更左到潮霉素；2-3：以前期扩增的左臂到右臂为单带且为同源插入的黑曲霉 cs 基因敲除转化子基因组 DNA 为模板。

Note: A: Construction of plasmid p10-C. B: Full-length amplification knockout module using p10-C plasmid as template; M: DL15000 DNA Marker; 1-2: Full-length amplification knockout module using p10-C plasmid as template. C: Validation of *Aspergillus niger* transformants; M: DL5000 DNA Marker; 1: CGMCC10142 genome as template, left arm to right arm Knockout component amplification; 2: Knockout component fragments amplified by PCR using p10-C plasmid as template; 3-6: Amplification by extracting *Aspergillus niger* transformant genomic DNA as template. D: Re-identification of transformants with cs gene knockout; M: DL5000 DNA Marker; 1: Using *Aspergillus niger* CGMCC10142 genome as Re-identification of transformants with cs gene knockout template, Left arm is more left arm was amplified to hygromycin; 2-3: The genomic DNA of the cs gene knockout transformant of *Aspergillus niger*, which was homologously inserted from the left arm to the right arm, was used as a template.



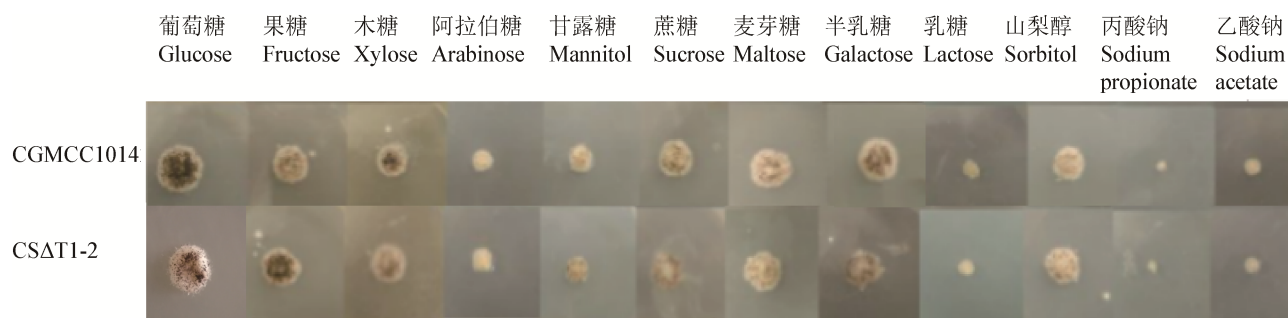


图6 在不同碳源中出发菌黑曲霉 CGMCC10142 和敲除株 T1-2 的菌落形态

Figure 6 Colony morphology of *Aspergillus niger* CGMCC10142 and knockout strain T1-2 from different carbon sources

和半乳糖为唯一碳源时最多, T1-2 在果糖和半乳糖为唯一碳源时较多, 在乙酸钠和丙酸钠为唯一碳源时都没有产孢。总体来看, 在相同的培养时间中黑曲霉 CGMCC10142 生长快且孢子量比 T1-2 多, 但 T1-2 的孢子囊比出发菌株大, 气生菌丝高且向外生长, 中央部分孢子极少分散。

#### 2.4 *cs* 基因敲除菌 T1-2 发酵过程产酸的测定

为了确定柠檬酸合成酶对黑曲霉产柠檬酸积累的作用, 进行了柠檬酸摇瓶发酵试验。实验中黑曲霉菌株的产酸量 90% 为柠檬酸。如图 7A 所示, 在 24–84 h 的整个发酵过程中敲除菌株 T1-2 产酸一直显著低于出发菌株 CGMCC10142, 最终在 84 h 的产酸量为 64.3 g/L, 相对于出发菌的 98.7 g/L 降低了 34.85%。从图 7B 分析可知发酵开始初糖含量均为 18%, 但在发酵过程可以看到 T1-2 的糖利用率比较低, 在 84 h 时 T1-2 的剩余残糖为出发菌株

的 2 倍多。

#### 2.5 突变菌株实时荧光相对定量 PCR 检测 *cs* 基因及其相关基因的表达量

为了进一步研究 *cs* 基因敲除后如何影响黑曲霉代谢产柠檬酸, 图 8 为柠檬酸代谢路线图, 在柠檬酸发酵摇瓶实验的同时还检测了与柠檬酸合成相关的关键限速酶编码基因的表达量, 其余 3 个同工酶编码的基因和对柠檬酸运输的相关酶编码基因的表达量。如图 9A、D 己糖激酶(hexokinase, HK)与柠檬酸合成酶(citrate synthase, CS)在柠檬酸发酵过程的 3 个时间点转录水平平均下降, 24 d 是进入产柠檬酸的高峰时间点, 这 2 个基因在敲除株的表达量较出发菌株均下降达 60%。柠檬酸是糖酵解途径关键酶 PFK 的抑制剂<sup>[17]</sup>, 如图 9B 可见, 敲除株中由于柠檬酸浓度低, 磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)表达量没有明显下降,

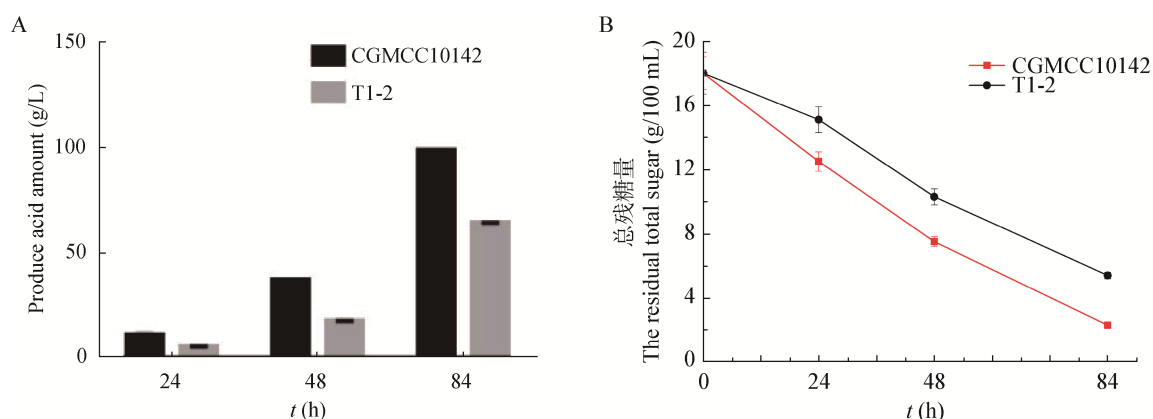


图7 两株菌的产酸量(A)和在发酵液中的残糖量(B)

Figure 7 Acid production (A) and residual sugar content (B) of two strains in fermentation broth

而且在 24 h 表达量有所增加, PFK 受到柠檬酸反馈抑制, 因此对柠檬酸浓度更为敏感, 而敲除菌株 24 h 时柠檬酸产量仅为出发菌株的 50%, 柠檬酸浓度比较低, 所以表达不受抑制。丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)是柠檬酸合成相关代谢的关键限速酶, 柠檬酸合成酶敲除菌株可能导致主代谢途径的整体代谢流下调, 造成丙酮酸激酶在 24 h 和 48 h 表达量显著下降, 如图 9C 所示。由于柠檬酸合酶是 TCA 循环的关键酶, 同时也影响 EMP 代谢流, 因此导致柠檬酸合成和糖利用率下降。从图 9A、B、C 可以看到敲除菌株的这 3 个关键激酶从 0–84 h 整体比出发菌株的表达量低, 也导致葡萄糖的利用率降低, 这是柠檬酸产量降低的主要原因。同时, 由

于敲除株柠檬酸浓度的下降, 如图 9E 所示, 柠檬酸转运蛋白(citrate exporter protein, CexA)转录水平在 3 个时间点全部比出发菌株明显下降。由于敲除柠檬酸合酶编码的基因使柠檬酸的产量有了大幅度的下降, 但可以看出还是有一定柠檬酸的生成, 很大原因是由于其 3 个同工酶的存在导致。从图 9F、G 可以看出, 在敲除株 T1-2 的同工酶柠檬酸合成酶 1 和柠檬酸合成酶 2 的表达量分别是出发菌株的表达量的 2.3 倍和 2.5 倍左右。从图 9H 可以看到相比较同工酶 1 和 2 来说, 敲除株的柠檬酸合成酶 3 的表达量与出发菌株相比表达量相差不大。综上所述, 柠檬酸合成酶的敲除导致在一定的时间内关键基因的表达量受到影响, 也会使整个产酸量下降。

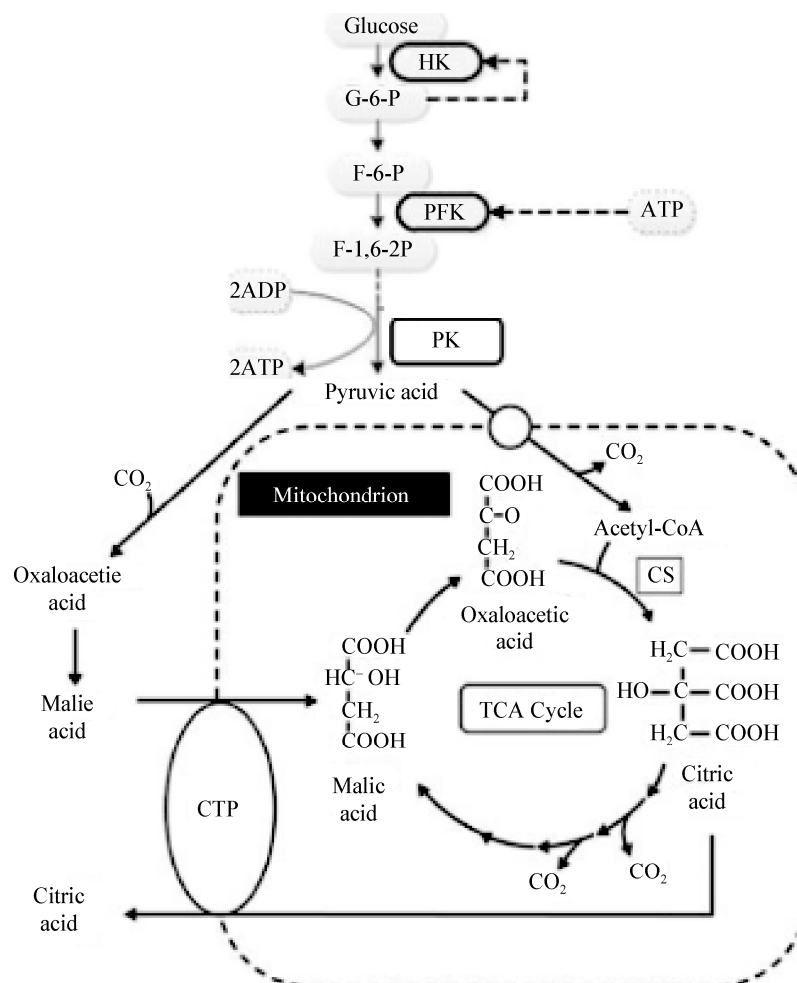


图 8 柠檬酸代谢途径

Figure 8 Citric acid metabolism pathway

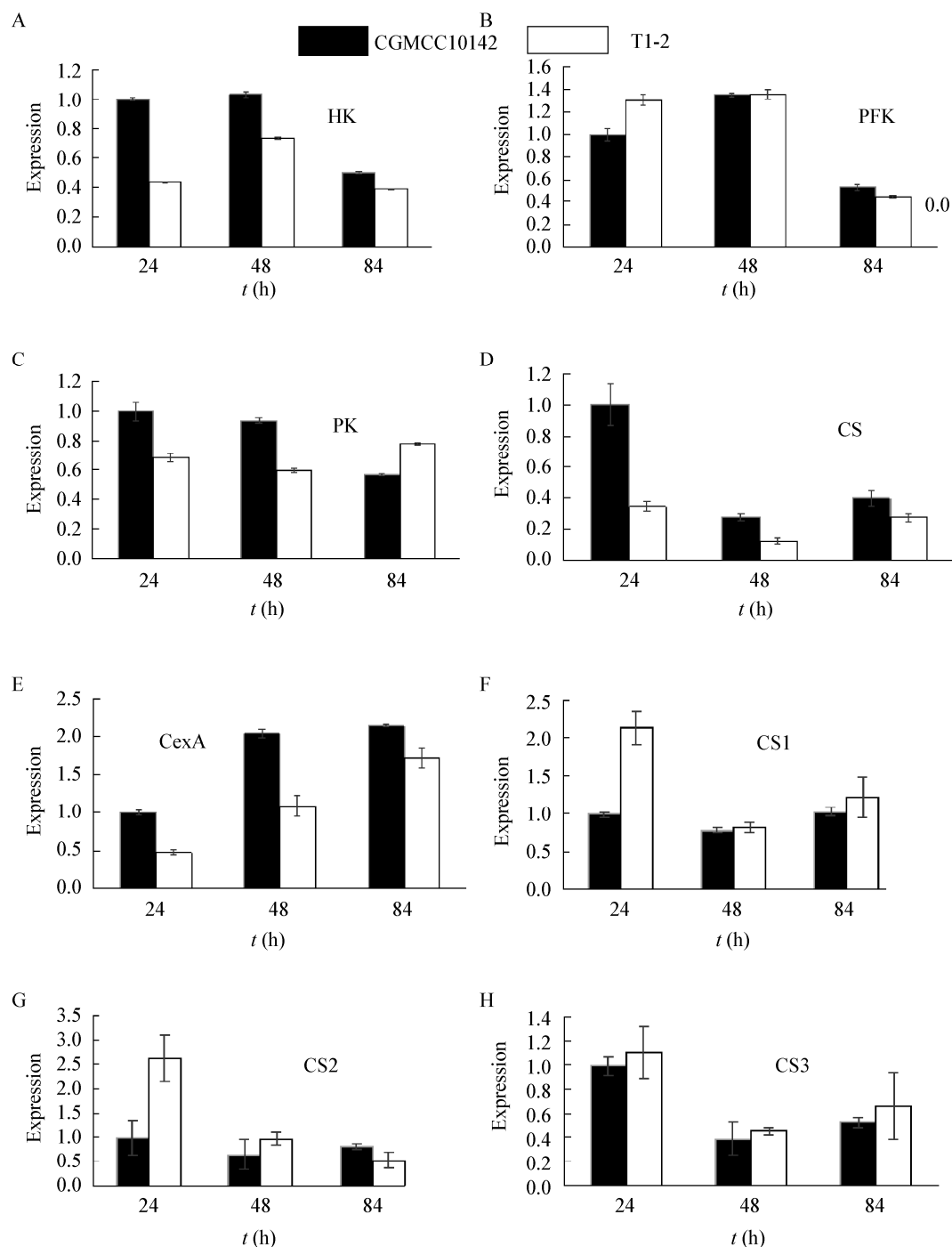


图9 不同时间点的 *hk*、*pfk*、*pk*、*cs*、*cs1*、*cs2*、*cs3*、*cexA* 基因相对表达量

Figure 9 Relative expression of *hk*, *pfk*, *pk*, *cs*, *cs1*, *cs2*, *cs3*, *cexA* genes at different time points

注：根据实时荧光定量 qPCR 的结果(以  $\beta$ -actin 基因为内参基因，黑曲霉 CGMCC10142 为对照)计算不同时间点(24、48、84 h) *hk*、*pfk*、*pk*、*cs*、*cs1*、*cs2*、*cs3*、*cexA* (图 A-H) 的相对表达水平；将  $1 \times 10^5$  孢子/mL 的量在 35 °C 的发酵培养基中培养 84 h，并在 500 mL 摇瓶中以 300 r/min 的速度振荡；误差线表示标准偏差，n=3。

Note: Relative expression levels of *hk*, *pfk*, *pk*, *cs*, *cs1*, *cs2*, *cs3*, *cexA* (A-H) at different time points (24, 48, 84 h) were calculated based on the quantified real-time qPCR results (with the  $\beta$ -actin gene as housekeeping genes, the value of *A. niger* CGMCC 10142 sets as the control). The amount of  $1 \times 10^5$  spores/mL was cultured in liquefied corn starch medium at 35 °C for 84 h with shaking at 300 r/min in 500 mL shake flasks. Error bars denote standard deviations and n=3.

### 3 讨论与结论

基于对黑曲霉 CGMCC10142 基因组进行的 BLAST 分析,证实了该菌株具有编码 4 个柠檬酸合酶的基因,本文仅对其中最主要的一个 *cs* 基因进行研究,将该基因的氨基酸序列与不同物种来源的 *cs* 基因进行同源性分析,发现氨基酸序列完全相同的部分有 8 处之多,相似性最高的氨基酸序列有 17 个氨基酸为 VVPGYGHAVLRKTDRRY,可以看出柠檬酸合酶的保守性。其中, VVPGYGHA 为活性位点,也是乙酰辅酶 A 的结合位点,还有多肽结合位点为 GARVKCLVWE 和 PIERPKSYS<sup>[18]</sup>。充分说明来源于不同生物体的 *cs* 基因具有相同的生理功能,因此其氨基酸序列高度保守。

本研究通过敲除主要柠檬酸合成酶来研究其对黑曲霉柠檬酸积累的影响,发现柠檬酸合成酶敲除后黑曲霉 CGMCC 10142 的菌落生长表型有明显变化<sup>[19]</sup>,导致其在葡萄糖培养基的上生长比出发菌滞后 12 h,分生孢子的数量下降 60%左右,而在以果糖为碳源培养基中该现象不明显。单一葡萄糖和果糖对敲除菌株生长的影响与随后的 qRT-PCR 实验结果具有一定相关性,即柠檬酸合成酶表达量下降导致己糖激酶显著下调,而对磷酸果糖激酶表达量没有明显的影响。因此,以葡萄糖为唯一碳源的柠檬酸合成酶敲除菌株生长延迟,而果糖没有影响。

通过本研究对柠檬酸合成酶敲除菌株和出发菌株在相同时间的柠檬酸积累和糖消耗实验结果可以表明,由于柠檬酸合成酶合成下降,在各时间点糖消耗量和柠檬酸积累量都显著下降。如图 8 所示的柠檬酸代谢途径中,柠檬酸合成酶的改变会影响整个代谢途径以及所涉及的重要酶的表达。进行的 qRT-PCR 实验结果进一步证明了上述结果,柠檬酸合酶敲除株主代谢途径中关键酶如己糖激酶、丙酮酸激酶、柠檬酸合成酶表达量显著下降,因此导致糖分解代谢速度下降,进而柠檬酸合成降低,表明柠檬酸大量合成需要主代谢途径的整体代谢流

的增加。据报道在柠檬酸黑曲霉中单一过表达己糖激酶、丙酮酸激酶或果糖激酶都不能增加柠檬酸的积累,只有同时过表达上述 3 个酶才会使柠檬酸积累量提高<sup>[20]</sup>。由于本研究仅敲除了柠檬酸合成酶同工酶中的一个关键柠檬酸合成酶基因,通过对该突变株进行发酵发现柠檬酸积累量显著降低,但依然具有柠檬酸积累,可以看出该柠檬酸合成酶被敲除后其余 3 个柠檬酸合成酶的表达量在 24 h 时比出发菌株有明显的提高,说明柠檬酸合成对生物体至关重要,其他柠檬酸合酶还是发挥一定作用,以维持黑曲霉正常的物质和能量代谢,保持黑曲霉生长。由于黑曲霉 CGMCC10142 基因组中还存在 3 个同工酶,当其中主要柠檬酸合成酶受到破坏,其余 3 个同工酶可能发挥作用使乙酰辅酶 A 和草酰乙酸继续合成柠檬酸,继续深入研究其余 3 个同工酶的活性和表达量,对于完善柠檬酸合成酶功能具有重要意义,可为探索黑曲霉高产柠檬酸机制提供依据。

### REFERENCES

- [1] Wang BY, Jin QR. Handbook on Production and Application of Fermented Organic Acids[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2000: 12-221 (in Chinese)  
王博彦, 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000: 12-221
- [2] Ge YD, Pan W, Wang J, et al. Advances in molecular biology of citrate synthase[J]. Journal of Biology, 2010, 27(3): 59-62 (in Chinese)  
葛亚东, 潘蔚, 汪劫, 等. 柠檬酸合酶的分子生物学研究进展[J]. 生物学杂志, 2010, 27(3): 59-62
- [3] Tong J, Zhan GM, Wang XF, et al. Cloning of citrate synthase gene in rapeseed (*Brassica napus* L.) and its expression under stresses[J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(1): 33-40 (in Chinese)  
童晋, 詹高森, 王新发, 等. 油菜柠檬酸合酶基因的克隆及在逆境下的表达[J]. 作物学报, 2009, 35(1): 33-40
- [4] Hu LH, Wu HM, Zhou ZM, et al. Introduction of citrate synthase gene (CS) into an elite indica rice restorer line Minghui 86 by agrobacterium -mediated method[J]. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(2): 160-166 (in Chinese)  
胡利华, 吴慧敏, 周泽民, 等. 利用农杆菌介导法将柠檬酸合成酶基因(CS)导入籼稻品种明恢 86[J]. 分子植物育

- 种, 2006, 4(2): 160-166
- [5] Pracharoenwattana I, Cornah JE, Smith SM. Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(7): 2037-2048
- [6] Lewin AS, Hines V, Small GM. Citrate synthase encoded by the *CIT2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is peroxisomal[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1990, 10(4): 1399-1405
- [7] Jia YK, Bécam AM, Herbert CJ. The *CIT3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a second mitochondrial isoform of citrate synthase[J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 24(1): 53-59
- [8] Brock M, Fischer R, Linder D, et al. Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 35(5): 961-973
- [9] Park BW, Han KH, Lee CY, et al. Cloning and characterization of the *citA* gene encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus nidulans*[J]. *Molecules and Cells*, 1997, 7(2): 290-295
- [10] Kobayashi K, Hattori T, Honda Y, et al. Gene identification and functional analysis of methylcitrate synthase in citric acid-producing *Aspergillus niger* WU-2223L[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(7): 1492-1498
- [11] Ruijter GJG, Panneman H, Xu DB, et al. Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of *citA* overexpression on citric acid production[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 184(1): 35-40
- [12] Hou L. Cloning and functional analysis of *aox1* gene from *Aspergillus niger*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2017 (in Chinese)  
侯莉. 黑曲霉 *aox1* 基因的克隆及其功能分析[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2017
- [13] Chen HD, Dong WB, Li HM. Doohickey for the standard transformation protocol of plasmids DNA transfer into competent *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009(S1): 297-299 (in Chinese)
- 陈洪栋, 董文博, 李红民. 一种用质粒 DNA 转化大肠杆菌感受态细胞的实用操作技巧[J]. *生物技术通报*, 2009(S1): 297-299
- [14] Cao ZL, Wang DP, Zhang L. Improvement of transformation efficiency of *Aspergillus niger* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2016, 31(2): 20-25 (in Chinese)  
曹张磊, 王德培, 张岚. 提高根癌农杆菌介导黑曲霉转化效率的研究[J]. *天津科技大学学报*, 2016, 31(2): 20-25
- [15] Liu L, Zhang HF, Zhang L, et al. Construction of high efficient gene knockout system in *Aspergillus niger* and knockout of trehalose-6-phosphate synthase[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(22): 124-130 (in Chinese)  
刘玲, 张鸿飞, 张岚, 等. 黑曲霉高效敲除体系构建及 *tpsA* 基因的敲除[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(22): 124-130
- [16] El-Enshasy H, Hellmuth K, Rinas U. *GpdA*-promoter-controlled production of glucose oxidase by recombinant *aspergillus niger* using nonglucose carbon sources[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, 90(1): 57-66
- [17] Legiša M, Benčina M. Evidence for the activation of 6-phosphofructo-1-kinase by cAMP-dependent protein kinase in *Aspergillus niger*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 118(3): 327-333
- [18] Mustafa G, Arif R, Bukhari SA, et al. Structural and functional annotation of citrate synthase from *Aspergillus niger* ANJ-120[J]. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 31(2 Suppl): 709-717
- [19] Murray SL, Hynes MJ. Metabolic and developmental effects resulting from deletion of the *citA* gene encoding citrate synthase in *Aspergillus nidulans*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9(4): 656-666
- [20] Ruijter GJG, Panneman H, Visser J. Overexpression of phosphofructokinase and pyruvate kinase in citric acid-producing *Aspergillus niger*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1997, 1334(2/3): 317-326