

斜卧青霉去泛素化蛋白酶 CREB 的缺失提高纤维素酶的生产

周广麒¹, 吕晶¹, 李忠海^{2,3}, 李晶晶¹, 王明钰², 曲音波², 肖林^{4,5}, 覃树林^{4,5},
赵海涛^{4,5}, 夏蕊蕊^{4,5}, 方诒²

1 大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034

2 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100

3 山东大学药学院, 山东 济南 250012

4 山东龙力生物科技股份有限公司, 山东 德州 251200

5 山东省秸秆生物炼制技术企业重点实验室, 山东 德州 251200

周广麒, 吕晶, 李忠海, 等. 斜卧青霉去泛素化蛋白酶 CREB 的缺失提高纤维素酶的生产. 生物工程学报, 2012, 28(8): 959-972.

Zhou GQ, Lü J, Li ZH, et al. Enhanced cellulase production of *Penicillium decumbens* by knocking out *CreB* encoding a deubiquitination enzyme. Chin J Biotech, 2012, 28(8): 959-972.

摘 要: 斜卧青霉 *Penicillium decumbens* T. 是 1 种重要的产纤维素酶丝状真菌, 能有效地降解利用木质纤维素生产第 2 代生物燃料。为了提高斜卧青霉纤维素酶的产量, 构建了去泛素化酶基因 *creB* 的敲除盒, 并通过同源双交换重组的方法, 获得了 *creB* 基因缺失突变株 $\Delta creB$ 。该突变株呈现明显的纤维素酶表达分泌抗葡萄糖代谢阻遏效应, $\Delta creB$ 菌株的滤纸酶活、内切纤维素酶活、木聚糖酶活以及外切纤维素酶活分别提高 1.8 倍、1.71 倍、2.06 倍以及 2.04 倍, 其胞外蛋白质含量提高了 2.68 倍。确定了 *creB* 基因缺失突变株具有抗碳源代谢物阻遏的生理现象, CREB 对斜卧青霉生产纤维素酶的能力具有显著影响, 为系统改造丝状真菌高产纤维素酶菌株提供了理论指导。

关键词: 斜卧青霉, 去泛素化, CREB, 纤维素酶

Received: January 7, 2012; **Accepted:** February 29, 2012

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB707403), National Key Technology R&D Program of China (No. 2011BAD22B02), International Science and Technology Cooperation Program of China (No. 2010DFA32560), Program for New Century Excellent Talents in University (NCET).

Corresponding author: Xu Fang. Tel: +86-531-88364004; E-mail: fangxu@sdu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划(973 计划) (No. 2011CB707403), 国家科技支撑计划(No. 2011BAD22B02), 科技部国际科技合作计划(No. 2010DFA32560), 新世纪优秀人才支持计划(NECT)资助。

Enhanced cellulase production of *Penicillium decumbens* by knocking out *CreB* encoding a deubiquitination enzyme

Guangqi Zhou¹, Jing Lü¹, Zhonghai Li^{2,3}, Jingjing Li¹, Mingyu Wang², Yinbo Qu², Lin Xiao^{4,5}, Shulin Qin^{4,5}, Haitao Zhao^{4,5}, Ruirui Xia^{4,5}, and Xu Fang²

¹ School of Bioengineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

² State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, Shandong, China

³ School of Pharmaceutical Science, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China

⁴ Longlive Bio-Technology Co., Ltd., Dezhou 251200, Shandong, China

⁵ Shandong Key Laboratory of Straw and Stover Biorefinement Technologies, Dezhou 251200, Shandong, China

Abstract: *Penicillium decumbens* T. is an important filamentous fungus for the production of cellulases to effectively degrade lignocellulose for second generation biofuel production. In order to enhance the capability of *Penicillium decumbens* to produce cellulases, we constructed a *creB* (a deubiquitinating enzyme encoding gene) deletion cassette, and generated a *creB* knockout strain with homologous double crossover recombination. This mutation resulted in a detectable decrease of carbon catabolite repression (CCR) effect. The filter paper activity, endoglucanase activity, xylanase activity and exoglucanase activity of the $\Delta creB$ strain increased by 1.8, 1.71, 2.06 and 2.04 fold, respectively, when comparing with the parent strain Ku-39. A 2.68 fold increase of extracellular protein concentration was also observed. These results suggest that the deletion of *creB* results in CCR derepression. These data also suggest that CREB influences cellulase production of *Penicillium decumbens*. In generation, this study provides information that can be helpful for constructing cellulase hyper-producing strain.

Keywords: *Penicillium decumbens*, deubiquitination, CREB, cellulase

木质纤维素是自然界中分布最为广泛的可再生资源。利用木质纤维素生产洁净的生物能源是将来解决石化产品污染的重要举措。丝状真菌能产生多种纤维素酶和半纤维素酶并有效降解木质纤维素生成多用途糖类。斜卧青霉 *Penicillium decumbens* T.^[1-3] 作为重要的高产纤维素酶丝状真菌之一,已应用于纤维素酶及半纤维素酶的工业生产,但对于高效低成本地降解利用木质纤维素,还需要对该菌株的多种代谢途径进行系统的菌株改造。

微生物细胞中,碳源代谢阻遏作为重要的生理代谢控制机制使细胞在较容易利用的碳源存

在时,相比其他较难代谢的碳源具有优先利用的特点。丝状真菌中参与碳源代谢阻遏的蛋白主要有 CREA (CRE1)^[4]、CREB^[5]、CREC^[6]及 CRED^[7]。CREA 与酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* H. 中的 Mig1/Mig2/Mig3 蛋白同源^[8],为重要的转录调控因子,介导葡萄糖在碳源代谢阻遏中的作用^[9],同时,CREA 蛋白可与泛素结合,形成泛素化蛋白^[7]。泛素化的 CREA 相对不稳定,容易受到蛋白酶的降解。CREB 和 CREC 分别编码 1 个去泛素化蛋白酶^[5],在多核真核细胞中较为普遍,但在单核细胞酿酒酵母中未发现同源蛋白的存在。在构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* W.中,*creB*

基因编码 1 个由 767 个氨基酸, 包括 6 个去泛素化结构域组成的去泛素化酶, 属于泛素特异性加工酶 (Ubiquitin-specific processing enzymes, UBP) 家族中的一员, 其中的卷曲螺旋结构域起到底物识别的作用^[9]。CreB 是第 1 个被发现参与碳代谢阻遏作用的去泛素化酶, CreB 在第 240 位、385 位、473 位和 538 位的氨基酸有 4 个重要的 PEST 序列, PEST 序列是一段富含脯氨酸 (P)、谷氨酰胺 (E)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T), 约由 10 个氨基酸组成的结构序列, 被认为是泛素化识别序列之一^[10]。CreB 的同源序列大部分存在比较高等的生物中, 比如人类的 UBH1, 拟南芥的 UBP3, 毕赤酵母 *Pichia pastoris* Yeast C. 中的 UBP1 以及黑腹果蝇的 AAF56066。在构巢曲霉中 CREB 的缺失可以引起多种纤维素酶的产量提高^[5], Denton 等在里氏木霉 *Trichoderma reesei* 中敲除 *creB* 的同源序列 *cre2*, 同样可以达到提高纤维素酶产量的作用^[11]。CREB 和 CREC 可形成去泛素化复合体, 共同作用于泛素化的蛋白质并使其去泛素化, 从而使去泛素化的蛋白质更为稳定^[6]。CRED 包含 1 个抑制蛋白结构域和 1 个 PY 模块与酿酒酵母中的 Rod1p 和 Rog3p 蛋白具有高度的相似性, *creD* 参与 1 个与 CREB-CREC 复合物的去泛素化作用完全相反的过程, 可以对靶蛋白进行泛素化标记^[7]。由于蛋白质 (如 CREA) 泛素化水平的增高会造成该蛋白在细胞中受降解程度的变化, 进而影响到细胞利用碳源的代谢途径, 因此, CREB 的缺失对真菌利用纤维素作为碳源分泌纤维素酶的影响值得深入研究。

通过敲除与构巢曲霉 *creB* 基因同源的基因,

获得了该基因的突变株, 研究 CREB 在斜卧青霉利用纤维素时对产纤维素酶的影响, 对该突变株的表型, 产纤维素酶及产胞外蛋白的能力进行了测定和分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

斜卧青霉 Ku-39 ($\Delta pku70::hph$)、菌株 Kup-1 ($\Delta pku70::hph$; $\Delta pyrG::ptrA$) 以及质粒 pEKU 由山东大学微生物技术国家重点实验室保存, pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司, 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自 TransGen Biotech 公司。

1.1.2 培养基

麸皮培养基: 100 g 麸皮加 1 L 水, 煮沸 30 min, 过滤后定容至 1 L。固体麸皮培养基加 2% 琼脂粉。LB 培养基和测生物量液体培养基分别参照文献[12]和[13]。表型分析培养基: Mandel's 营养盐液 (1 倍), 1% Triton-100, 2% 琼脂粉, 碳源分别为 2% 葡萄糖, 1% 微晶纤维素, 1% 葡萄糖+1% 微晶纤维素, 2% 可溶性淀粉, pH 5.5。测酶活培养基: Mandel's 营养盐液 (1 倍), 1% 微晶纤维素, pH 5.5。

1.1.3 主要试剂

Taq、*FastPfu* DNA 聚合酶购自 TransGen Biotech 公司、限制性内切酶购自 Fermentas 公司, 琼脂糖凝胶/PCR 产物纯化试剂盒购自 Biomiga 公司, 细胞壁裂解酶 (L1412-25G) 购自 Sigma 公司, 改良型 Bradford 法蛋白质浓度测定试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司, Southern 杂交试剂盒购自罗氏诊断产品 (上海) 有限公司, pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 斜卧青霉分子生物学操作方法

质粒提取：碱裂解法^[12]，将带有质粒的大肠杆菌培养 14 h，离心，倒掉上清液，加入溶液 I (GET) 充分悬浮菌体，再加入溶液 II (变性液)，加盖颠倒 6~7 次充分混匀，加入溶液 III 颠倒混合均匀后冰上放置 5 min，离心将上清液转移到 1.5 mL 离心管中，利用醇沉的方法得到沉淀，用适量双蒸水溶解。

真菌转化：斜卧青霉 Kup-1 的转化通过细胞壁裂解酶消化细胞壁得到原生质体，再利用 PEG-CaCl₂ 法转化目的 DNA 片段^[13]。

染色体 DNA 提取：真菌染色体 DNA 的提取采用液氮研磨法^[13]。接种浓度为 1×10^7 个/mL 新鲜的分生孢子于液体培养基中，30 °C、200 r/min 培养 48 h，将菌体过滤收集，放入研钵中加入液氮进行研磨破碎，收集破碎后的菌体于 15 mL 离心管中加入适量抽提缓冲液，65 °C 水浴，然后加入苯酚/氯仿振荡充分混合均匀后，离心收集上清液，加入 NaAc 和异丙醇，-20 °C 放置 20 min 后离心收集沉淀物，用 70% 乙醇，洗涤 1 次，待乙醇完全挥发后加入双蒸水溶解。

1.2.2 转化子表型分析

分别吸取 1 μ L 浓度为 1×10^5 个/mL 的孢子悬液，点接于表型分析培养基平板，30 °C 静置培养 9 d。

1.2.3 蛋白质含量测定

参考改良型 Bradford 法蛋白质浓度测定试剂盒说明。

1.2.4 生物量测定

接 1×10^7 个/mL 分生孢子悬液 100 μ L 至 50 mL 液体基本培养基中，30 °C、200 r/min 培

养，分别在 24、33、42、51、60、69 h 时取样，真空过滤抽干，80 °C 烘干 24 h，称重。

1.2.5 滤纸酶活、木聚糖酶活、内切葡聚糖酶活、外切葡聚糖酶活力的测定

滤纸酶活：1 cm×6 cm 定量滤纸条，1 mL 醋酸缓冲液 (pH 4.8) 和 0.5 mL 稀释后的粗酶液，50 °C 酶解 1 h。

木聚糖酶活：1 mL 1% 的燕麦木聚糖悬浮液，0.5 mL 稀释后的酶液，50 °C 酶解 30 min。

内切葡聚糖酶活：1 mL 1% 的 CMC-Na 溶液，0.5 mL 稀释后的酶液，50 °C 酶解 30 min。

以上 3 种酶活测定中，均以 DNS 法测定酶解液中的还原糖量。

外切葡聚糖酶活：0.5 mL 稀释后的粗酶液，加入 50 μ L pNPC (g/L)，50 °C 保温 30 min；加入 150 μ L 10% NaCO₃ 终止反应^[14]。

酶活力单位：1 分钟内水解底物产生 1 μ mol 还原糖或对硝基苯酚所需的酶量定义为 1 个酶活力单位 (IU)。

1.2.6 pH 测定

取 1 mL 产酶发酵液，12 000 r/min 离心 3 min，吸取上清液，测 pH 值。

1.2.7 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒的构建

$\Delta creB::pyrG$ 敲除盒的构建 (图 1)。 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒上、下游同源臂 (5'-flanking, 3'-flanking) 以及上游同源臂部分重复序列 (5'-flanking RE) 的扩增均以 Ku-39 染色体 DNA 为模板，分别以引物对 CreB-uF+CreB-uR；CreB-dF+CreB-dR1 和 CreB-reF+CreB-reR 为引物 (表 1)。 $pyrG$ 筛选标记表达盒的扩增以质粒 pEKU (山东大学微生物技术国家重点实验室保存) 为模板，PyrG-F1 和 PyrG-F2 为引物。 $\Delta creB::pyrG$

敲除盒下游 3 个片段的连接采用 Double-joint PCR^[15] 方法, 融合 *pyrG* 筛选标记表达盒、 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒上游同源臂部分重复序列以及下游同源臂 3 个片段, 再以 PyrG-F2 和 CreB-dR2 为嵌套引物, PCR 扩增获得融合产物, 并将该融合产物经琼脂糖凝胶纯化回收后经 T/A 连接插入到克隆载体 pMD18-T 上, 获得重组质粒 pCreB-DT, 转化 DH5 α 感受态细胞。将质粒 pCreB-DT 和 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒上游同源臂分别进行 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切, 然后通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 获得重组质粒 pCreBqch, 带有上游部分同源臂序列的 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒构建成功。将重组质粒 pCreBqch 转化 DH5 α 感受态细胞。以质粒 pCreBqch 为模板, CreB-uF 和 CreB-dR2 为引物 PCR 大量扩增 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒, 转化斜卧青霉 Kup-1 原生质体。

Double-joint PCR 反应体系: 第 1 轮 PCR,

50 μ L 反应体系为: 40 μ L 双蒸水, 上下游引物各 1 μ L, dNTPs (10 mmol) 1 μ L, 模板 1 μ L, 10 \times

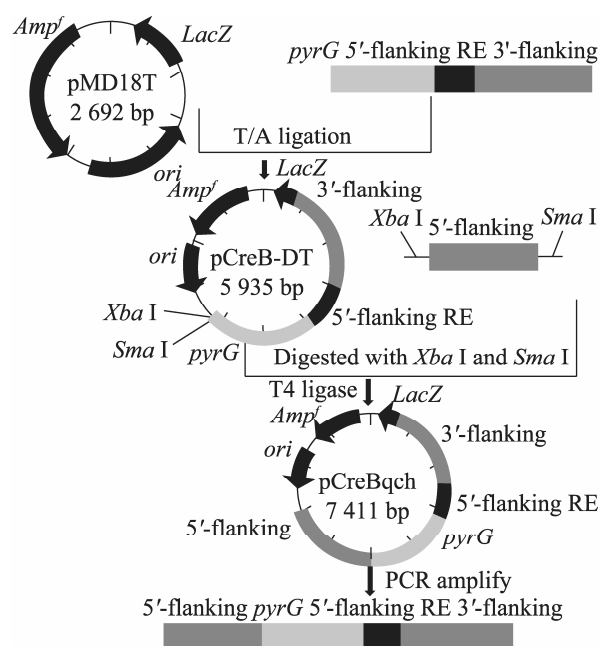


图 1 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒构建流程图

Fig. 1 Flow diagram of $\Delta creB::pyrG$.

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
CreB-uF	GCCTTCCATTCTTGCTGCTT
CreB-uR	TATCTCTAGAGATGGACGTGTGTCGAGGGT
CreB-dF	GCAGCCATCGGTGGGTTTGT
CreB-dR1	ACAGGCTCAAACACCCACCC
CreB-dR2	GCCCTACATCTACACGCTCT
CreB-reF	TGTGTAACGGTATTGACTAAAAGGGTCCACGCTTCTATCGCTTCT
CreB-reR	GATGAACAAACCCACCGATGGCTGCGATGGACGTGTGTCGAGGGT
PyrG-F1	GATGTGCTGCAAGGCGATTA
PyrG-F2	GCAACTTCCTCGAGAACGCG
PyrG-R	CCCTTTTAGTCAATACCGTT
CreB-YZF1	CGTCGGCTCTTCTACCTCAT
CreB-YZR1	CCCAACTGTATAGAGCCAAG

缓冲液 5 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1 μL 。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 58 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min 30 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。分别切胶回收 3 个第 1 轮 PCR 产物: 上游同源臂、下游同源臂以及上游同源臂部分重复序列, 来进行第 2 轮 PCR, 本轮 PCR 不需要添加引物, 反应体系为: 40 μL 双蒸水, dNTPs (10 mmol) 1 μL , 3 个 DNA 片段各 1 μL , 10 \times 缓冲液 5 μL , HIFI 酶 1 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 72 $^{\circ}\text{C}$, 4 min, 12 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。将第 2 轮 PCR 产物适当稀释作为第 3 轮 PCR 的模板; 40 μL 双蒸水, dNTPs (10 mmol) 1 μL , 10 \times 缓冲液 5 μL , HIFI 酶 1 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

斜卧青霉 *creB* 基因序列已提交 GenBank, 登录号为 JN977580。

1.2.8 系统进化树分析

根据斜卧青霉中 CreB 氨基酸序列, 自 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库比对筛选出该蛋白在丝状真菌中的同源序列。CreB 同源序列分别来自产黄青霉 *Penicillium chrysogenum* T.、构巢曲霉 *A. nidulan*、烟曲霉 *Aspergillus fumigates*、黑曲霉 *Aspergillus niger*、米曲霉 *Aspergillus oryzae*、*Talaromyces stipitatus*、马尔尼菲青霉菌 *Penicillium marneffei*、里氏木霉 *T. reesei*、粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa*。邻接系统发育树 (Neighbor Joining tree) 采用软件包 ClustalX 2.0 和 MEGA4.1 分析构建, 标尺为每位点氨基酸替代值。

2 结果与分析

2.1 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒的构建

为得到 *creB* 基因缺失突变株, 首先构建了 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒。首先, 分别扩增得到了 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒上游同源臂序列 1 476 bp、*pyrG* 筛选标记表达盒 1 538 bp、 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒上游同源臂部分重复序列 531 bp 以及 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒下游同源臂序列 1 733 bp (图 2 泳道 1–4)。采用 Double-joint PCR^[15]的方法将 *pyrG* 筛选标记表达盒、 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒上游同源臂部分重复序列以及 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒下游同源臂, 3 个片段融合, 嵌套引物 PyrG-F2+CreB-dR2 扩增得到 3 片段融合产物 (图 2 泳道 5), 然后将该融合片段连接到 pMD18-T 载体上, 得到重组质粒 pCreB-DT (图 2 泳道 6)。将质粒 pCreB-DT 和 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒上游同源臂 (图 2 泳道 6, 1) 分别进行 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切, 酶切产物经切胶回收后通过 T4 DNA 连接酶连接, 得到重组质粒 pCreBqch (图 2 泳道 9)。以 pCreBqch 为模板, CreB-uF 和 CreB-dR2 为引物扩增 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒 (图 2 泳道 13)。*Hind* III 和 *Kpn* I 分别单酶切验证 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒, 经 *Hind* III 酶切后电泳结果显示得到 3 条带大小分别为 725 bp、1 185 bp 以及 2 819 bp (图 2 泳道 14), *Kpn* I 酶切后电泳结果显示得到 3 条带大小分别为 482 bp、1 927 bp 以及 2 320 bp (图 2 泳道 15), 2 个酶切结果均与预期目的条带大小一致, 表明 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒构建成功。

重组质粒 pCreB-DT 由华大基因进行测序验证。

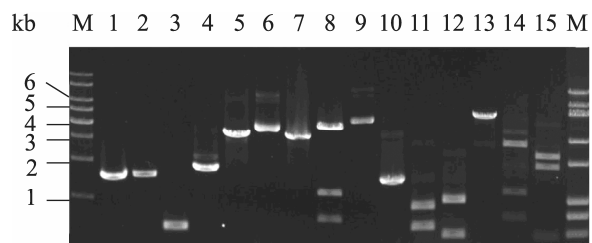


图2 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒的构建以及酶切验证

Fig. 2 Construction of *creB* gene deletion cassette and the confirmation of the cassette structure by restriction enzyme digestion. 1: 5'-flanking region of *creB* gene in the deletion cassette; 2: *pyrG*; 3: Partial repeating sequence of the 5'-flanking region of *creB* gene in the deletion cassette; 4: 3'-flanking region of *creB* gene in the deletion cassette; 5: the fused cassette of 2,3,4 using nest PCR; 6: pCreB-DT vector; 7: amplification of the fused cassette of 2,3,4 using nest PCR from 6; 8: pCreB-DT vector digested with *Hind* III; 9: pCreBqch; 10: colony PCR confirmation of pCreBqch; 11: 10 digested by *Eco*R I; 12: 10 digested by *Kpn* I; 13: the *creB* gene deletion cassette; 14: 13 digested by *Hind* III; 15: 13 digested by *Kpn* I.

2.2 $\Delta creB$ 突变株的构建

将构建成功的 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒转入 Kup-1 菌株中。在转化平板上获取转化子 10~15 个/ μ g DNA。为排除转化子中的异核体,挑取转化子在平板上经过 2 轮划线分单孢复筛培养。将纯化后的转化子接入到基本培养基中,30 °C、200 r/min 摇床培养 48 h。提取转化子基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板,Pyrg-F2 和 Pyrg-R 为引物扩增 *pyrG* 表达盒部分序列, (图 3,泳道 1-2),扩增出大小为 1 345 bp 的目的条带,表明 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒已成功转入到出发菌株中。CreB-YZF1 和 CreB-YZR1 (序列见表 1) 为引物,其中引物 CreB-YZF1 和 CreB-YZR1 结合位点分别位于 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒上游同源臂和下游同源臂,分别以出发菌株及

转化子基因组 DNA 为模板,出发菌株扩增获得 3 573 bp 大小目的条带 (图 3,泳道 3),而转化子扩增出片段大小为 2 652 bp 大小目的条带 (图 3,泳道 4-5),表明 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒在 *creB* 基因位点发生同源双交换, *creB* 基因编码区已被置换;为进一步验证 *creB* 基因已被同源敲除,以 Pyrg-YF 和 CreB-dR1 为引物,分别以出发菌株及 2 株不同转化子基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。其中引物 Pyrg-YF 和 CreB-dR1 的结合位点分别位于 *pyrG* 基因编码区和 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒下游同源臂外侧的染色体上。由于出发菌株不能扩增出相应大小的目的条带 (图 3,泳道 6),而以 2 株转化子 DNA 为模板,上下游引物可配对扩增出大小为 2 515 bp 的目的条带 (图 3,泳道 7-8) 说明 2 株转化子发生同源双交换。以上结果表明, $\Delta creB$ 突变株已构建成功。

2.3 $\Delta creB$ 突变株的 Southern blotting 分析

为分析 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒在转化子染色体中的整合类型,对得到的转化子进行 Southern

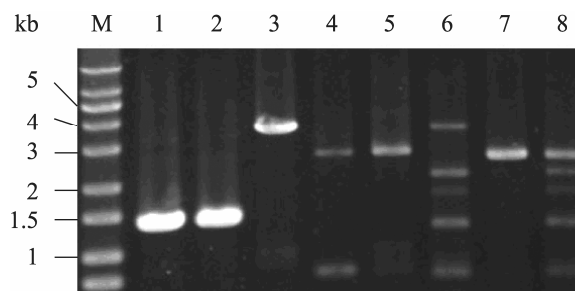


图3 $\Delta creB$ 转化子的 PCR 验证

Fig. 3 Verification of transformants by PCR analysis. 1-2: amplification of *pyrG* gene with genomic DNA of the transformants; 4-5, 7-8: amplification was performed with genomic DNA of the primary transformants; 3, 6: amplification was performed with genomic DNA of $\Delta pyrG::ptrA$.

blotting (图 4A) 检测, 首先分别提取出发菌株 Kup-1 及 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒转化子基因组 DNA, 然后经限制性内切酶 *Bam*H I 酶切, $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒下游同源臂 DNA 片段为探针进行 Southern 杂交 (图 4B)。杂交结果显示 $\Delta creB$ 突变株出现单 1 条带 (图 4A, 泳道 1), 该条带大小符合 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒在 *creB* 位点以同源双交换整合方式所产生杂交片段的大小, 并未出现出发菌株杂交所示条带 (图 4A WT)。由于 $\Delta creB$ 突变株未出现因敲除盒的随机插入而产生的条带, 因此, 杂交结果表明 $\Delta creB::pyrG$ 敲除盒是以单拷贝的形式整合到转化子染色体上。

2.4 $\Delta creB$ 突变株的表型分析

为分析 *creB* 基因缺失对该菌株表型的影响, 吸取 $\Delta creB$ 突变株及菌株 Ku-39 分生孢子悬液, 分别点接于葡萄糖、微晶纤维素、葡萄糖+微晶纤维素以及可溶性淀粉为碳源的平板。在以葡萄糖为唯一碳源的基本培养基上, $\Delta creB$ 突变株的

菌落形态以及生长速率相比菌株 Ku-39 均未发生明显变化 (图 5A), 表明 *creB* 基因的缺失对菌株的营养生长未产生明显的影响。在以可溶性淀粉为唯一碳源的平板上, $\Delta creB$ 突变株的菌落生长表型相比 Ku-39 菌株也无明显变化, 但平板经碘化钾染色后 (图 5D), 突变株所形成的淀粉水解圈变大, 表明 $\Delta creB$ 突变株分泌淀粉酶的活性增强。在以微晶纤维素为唯一碳源的培养基上 (图 5B), $\Delta creB$ 突变株生长正常, 与对照菌株相比无明显差异, 但在菌株 $\Delta creB$ 菌落周围出现明显的因纤维素降解所形成的透明圈, 而菌株 Ku-39 菌落周围未出现纤维素水解透明圈, 表明 *creB* 基因的缺失可提高突变株产纤维素酶的活性, 特别在葡萄糖存在的培养条件下, 以微晶纤维素+葡萄糖为复合碳源的培养基上 (图 5C), $\Delta creB$ 突变株仍能形成较为明显的纤维素水解透明圈, 表明 *creB* 基因的缺失不仅能提高产纤维素酶的能力, 而且还呈现出一定的抗葡萄糖代谢阻遏效应。

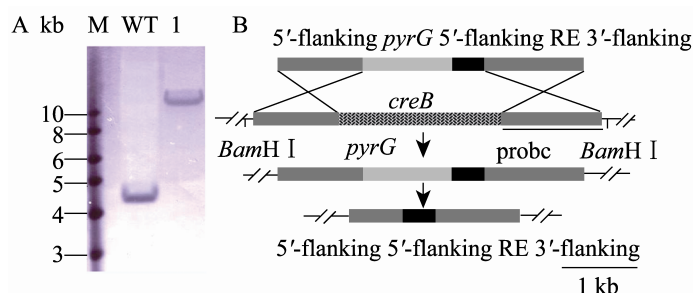


图 4 斜卧青霉 Kup-1 *creB* 敲除 Southern blotting 分析

Fig. 4 Southern blotting analysis of the *P. decumbens* Kup-1 $\Delta creB$ knockout strain. (A) Southern blotting analysis of the knockout strain. M: 1 kb ladder. WT: Southern blotting of genomic DNA extracted from wild-type. 1: Southern blotting of genomic DNA extracted from the knockout strain. (B) Diagram of *creB* deletion by homologous recombination.

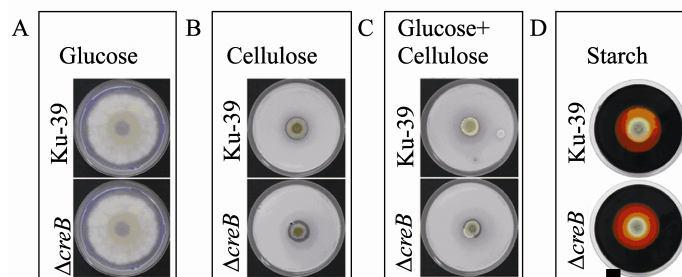


图5 $\Delta creB$ 突变株的平板检测分析

Fig. 5 Comparing the morphologies of $\Delta creB$ and the Ku-39 strain cultivated for 9 days. (A) Glucose. (B) Cellulose. (C) Glucose + Cellulose. (D) Starch.

2.5 pH 值的变化

为测定 CREB 的缺失对菌株在液体培养条件下发酵的影响,对菌株 Ku-39 和 $\Delta creB$ 突变株不同培养时间段发酵液的 pH 值进行了测定(图 6)。 $\Delta creB$ 突变株和 Ku-39 菌株发酵液的 pH 值在 48 h 内均明显处于下降的状态,在 24 h 处, $\Delta creB$ 突变株发酵液的 pH 值下降速度明显慢于出发菌株。Ku-39 菌株和 $\Delta creB$ 突变株发酵液的 pH 值 48 h 前后分别达到最低点 3.6 和 3.5,并在 48 h 与 120 h 之间发酵液 pH 值稳步上升达到 5.2 左右,随后 pH 值趋于稳定,结果表明,CREB 的缺失对突变株在以微晶纤维素为唯一碳源的发酵液 pH 值没有明显变化。

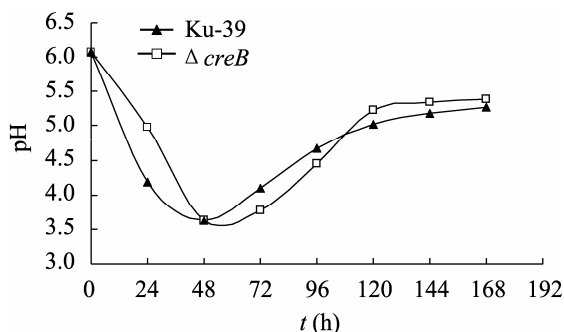


图6 菌株 Ku-39 和 $\Delta creB$ 突变株发酵过程的 pH 值

Fig. 6 pH value of *P. decumbens* Ku-39 and $\Delta creB$.

2.6 酶活力的变化

在液体培养产酶条件下,对菌株 Ku-39 和 $\Delta creB$ 突变株不同培养时间段发酵液的滤纸酶活、内切葡聚糖酶活、木聚糖酶活、外切葡聚糖酶活进行了测定(图 7)。 $\Delta creB$ 突变株发酵液的滤纸酶活、内切葡聚糖酶活、木聚糖酶活、外切葡聚糖酶活均比出发菌株的相应酶活显著提高,其中, $\Delta creB$ 突变株发酵液的滤纸酶活在第 144 h 时,比 Ku-39 菌株发酵液提高了 1.8 倍(图 7A),内切葡聚糖酶活在 96 h 比出发菌株提高 1.71 倍(图 7B),木聚糖酶活在 120 h 时提高 2.06 倍(图 7C),外切葡聚糖酶活在 96 h 时提高 2.04 倍(图 7D)。 $\Delta creB$ 突变株纤维素酶活的提高与在固体纤维素平板上该突变株的表型一致,均表现出纤维素酶分泌活性的显著增加,由此表明,CREB 的缺失可显著增强突变株产纤维素酶的能力,进而提高菌株降解利用纤维素的效能。

2.7 分泌蛋白质总量变化

在液体培养产酶条件下,对菌株 Ku-39 和 $\Delta creB$ 突变株不同培养时间段发酵上清液蛋白质含量进行了测定(图 8)。在培养至 24 h 时, $\Delta creB$ 突变株与菌株 Ku-39 发酵液的蛋白质含量均比

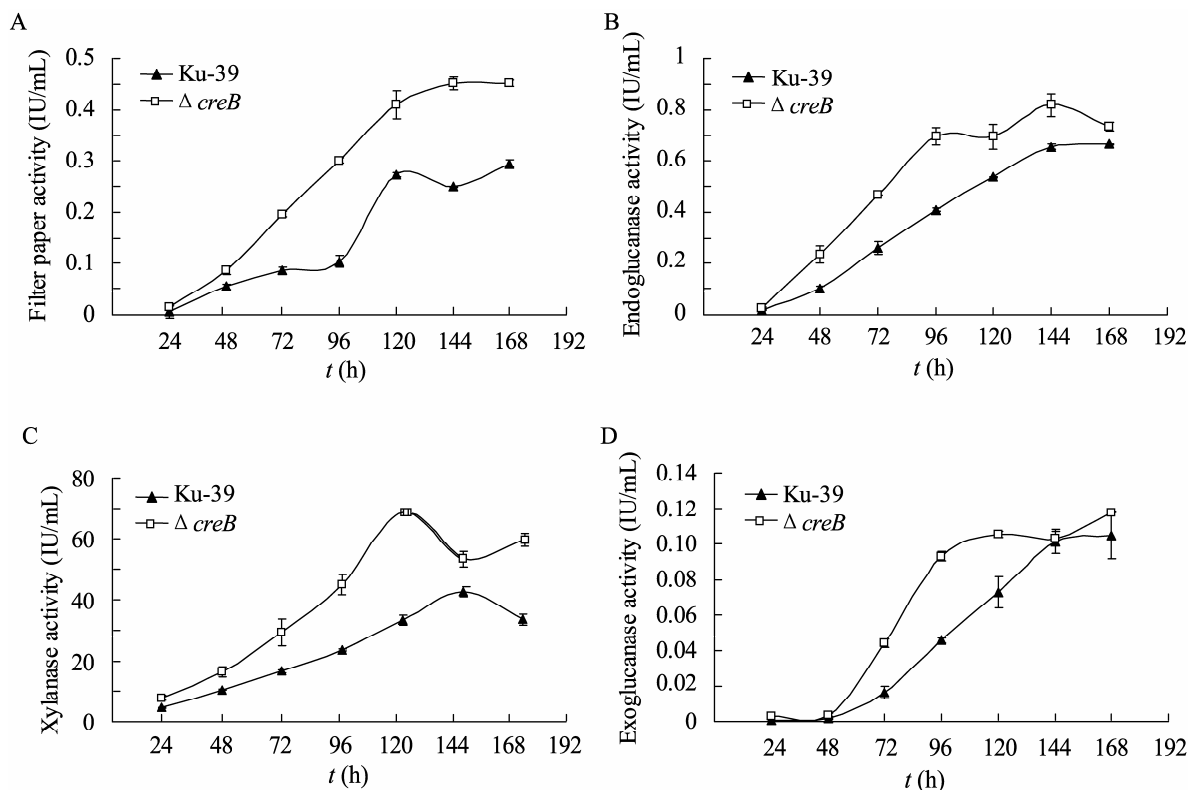


图7 菌株 Ku-39 和 $\Delta creB$ 突变株的滤纸酶活、内切葡聚糖酶活、木聚糖酶活、外切葡聚糖酶活

Fig. 7 Filter paper activity, endoglucanase activity, xylanase activity and exoglucanase activity by *P. decumbens* Ku-39 and $\Delta creB$. (A) Production of filter paper activity by *P. decumbens* Ku-39 and $\Delta creB$. (B) Production of endoglucanase activity by *P. decumbens* Ku-39 and $\Delta creB$. (C) Production of xylanase activity by *P. decumbens* Ku-39 and $\Delta creB$. (D) Production of exoglucanase activity by *P. decumbens* Ku-39 and $\Delta creB$.

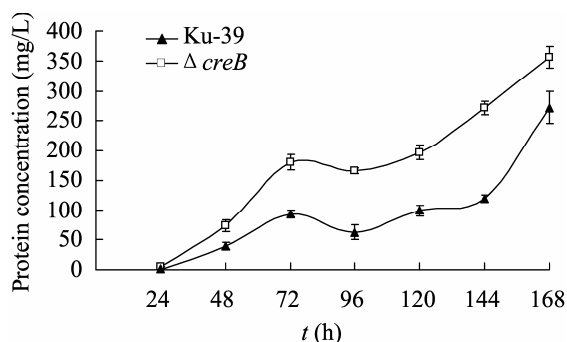


图8 菌株 Ku-39 和 $\Delta creB$ 突变株的分泌蛋白质含量

Fig. 8 Concentration of secreted protein of *P. decumbens* Ku-39 and $\Delta creB$ during the fermentation.

较低,自培养 24 h 开始, $\Delta creB$ 突变株发酵上清液中的蛋白质含量相比对照菌株明显提高,其中

在 72 h、96 h、120 h、144 h 以及 168 h 时,其蛋白质含量分别达到菌株 Ku-39 的 1.93 倍、2.68 倍、2.00 倍、2.30 倍以及 1.31 倍,胞外蛋白质浓度总体呈明显的上升趋势。因此, *creB* 基因的缺失可导致细胞外蛋白质含量的显著增加。

2.8 生物量变化

为测定 *creB* 基因的缺失是否影响菌株的营养生长,接浓度为 1×10^7 个/mL 的分生孢子到液体基本培养基中。 $\Delta creB$ 突变株和菌株 Ku-39 在培养 24 h 后,进入了对数生长期,并且在 48 h 左右达到菌体的最大量。在培养 48 h 后, $\Delta creB$

突变株生物量进入生长稳定的平台期,生物量相比菌株 Ku-39 略低。在液体培养条件下, *creB* 基因的缺失可轻度影响突变株的营养生长 (图 9)。

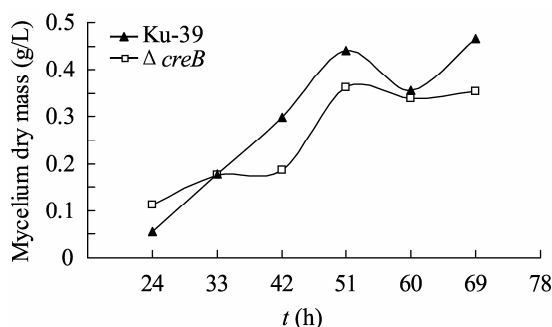


图 9 菌株 Ku-39 和 $\Delta creB$ 突变株的生长量

Fig. 9 Growth of *P. decumbens* Ku-39 and $\Delta creB$ in glucose-based medium.

2.9 CREB 在丝状真菌中的系统进化

从 CreB 系统进化树 (图 10) 可以发现, CreB 存在于许多产纤维素酶丝状真菌中, 并且其氨基酸序列与产黄青霉以及曲霉属来源的 CreB 同源序列有较高的相似度。因此可以推测 CreB 在丝状真菌纤维素酶合成过程中具有重要的作用。

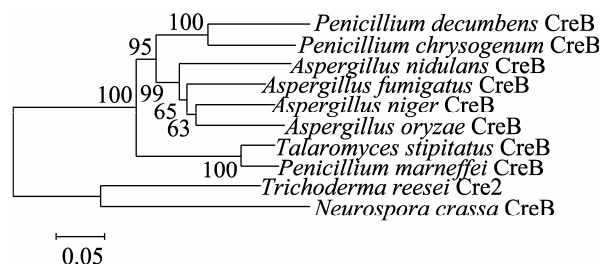


图 10 CreB 系统进化树

Fig. 10 The neighbor joining tree of CreB. Deubiquitinating enzyme CreB are highly conserved across most sequenced filamentous fungi. The neighbor joining tree above shows the phylogenetic relationship of some of the fungal CreB in the NCBI protein database and their relationship to *P. decumbens* CreB. The bootstrap values are shown and the The bar=0.05 represents genetic distance in substitutions per amino acid.

3 讨论

通过同源双交换整合的方式在斜卧青霉中敲除 *creB* 基因, 获得了产纤维素酶和胞外蛋白质含量均提高的突变株 $\Delta creB$ 。 *creB* 基因编码 1 种去蛋白质泛素化酶^[5], 因此, 开展微生物蛋白质的泛素化与去泛素化的研究对于菌株的改造具有重要的意义。

真菌遗传转化系统中可利用的筛选标记比较有限。现在较为常用的筛选标记主要有 *ptrA*^[16]、*hph*^[17]、*Hyg*^[18]、*pyrG*^[19]和 *amdS*^[20]等, 但工业菌株的系统改造需要在同一株菌中进行多次的遗传操作, 因此, 需要在斜卧青霉中通过构建可重复利用的筛选标记操作系统, 用于该菌累积式的系统改造。在斜卧青霉中已经构建了高效的遗传基因打靶系统菌株 Ku-39^[21], 并在此基础上获取了 *pyrG* 缺失突变株 Kup-1 (数据未发表)。在构建 *creB* 敲除盒的过程中, 在该敲除盒的 *pyrG* 表达盒两侧加入同源臂部分重复序列。由于该菌株具有高效的同源重组效率, 因此在含有 5'-氟乳清酸 (5'-FOA) 的平板上可高效筛选 *pyrG* 筛选标记自我剪切的菌株。筛选标记重复利用系统的建立为该菌株代谢途径的优化重组, 进而为构建高产纤维素酶菌株提供了良好的基因操作基础。

蛋白质的泛素化可导致蛋白质的降解和影响蛋白质的活性。 $\Delta creB$ 突变株也可在含有葡萄糖的纤维素平板上形成透明圈, 表明该突变株在葡萄糖存在的情况下仍有较强的纤维素酶活性。在丝状真菌降解利用纤维素等过程中, 如存在较容易利用的碳源, 则可抑制纤维素酶的产生, 从而产生碳源代谢阻遏效应。负责碳源代谢阻遏的

蛋白主要有 CREA^[4]、CREB^[5]、CREC^[6]及 CRED^[7]。CREA 作为 1 种重要的转录调控因子, 可通过影响其他调控因子如 XlnR^[22-23], 间接调控木聚糖的利用, 并且, CREA 的缺失可造成明显的抗代谢物阻遏作用。CREB 和 CREC 分别编码 1 种去蛋白质泛素化的蛋白, 这 2 种蛋白的结合可形成具有去蛋白质泛素化功能的复合物^[6], 该复合物可与泛素化后的 CREA 相结合并使其去泛素化, 进而增强 CREA 的稳定性, 而 CREB 的缺失则造成 CREC 和 CREB 不能形成有效的去泛素化复合物, 从而导致泛素化后的 CREA 蛋白不稳定, 容易受到蛋白酶的降解, 进而减少葡萄糖代谢的阻遏效应, 同样, 在缺失 CREC 蛋白的情况下, 也可产生与 CREB 缺失相类似的现象(数据未发表)。因此, 开展对蛋白质的降解机理的研究对于提高菌株蛋白质的产量, 特别是针对菌株高产工业用酶的研究具有较强的指导作用。

碳源代谢阻遏调控机制的存在, 使细胞能优先利用营养价值较高的碳源作为细胞的能源, 特别是在葡萄糖等较易利用碳源存在条件下, 可显著降低纤维素酶的产量。丝状真菌中纤维素酶的表达转录明显受转录因子 CREA/CRE1^[24-26]、XLNR/XYR1^[27-29]、ACE1、ACE2^[24]等的调控, 其中 CREA/CRE1 是细胞产生碳源代谢阻遏过程中特别重要的调控中间体。在里氏木霉^[25]、斜卧青霉^[13]等丝状真菌中, CREA/CRE1 的缺失造成纤维素酶表达过程中碳源代谢阻遏现象的降低或消除, 并使相应突变株中纤维素酶表达量明显提高。里氏木霉中, XYR1 和 ACE1 分别作为纤维素酶表达重要的正向和负向转录调控因子, CRE1 的完全缺失明显降低 XYR1 的转录活性,

并且导致 ACE1 的表达显著提高, 表明 ACE1 也受到了明显的碳源代谢阻遏效应^[25]。里氏木霉中 ACE2 可正向调控纤维素酶的表达。CRE1 蛋白的完全缺失可导致 ACE2 表达量显著降低^[25], 然而在构巢曲霉、斜卧青霉和黑曲霉中, 未发现与 ACE2 同源的调控蛋白, 表明丝状真菌纤维素酶系的表达调控存在较大区别。由于 CREA/CRE1 的稳定性受细胞蛋白质泛素化/去泛素化机制的明显影响, 因此, 深入研究丝状真菌重要蛋白质泛素化的机制对于消除或降低纤维素酶表达的碳源代谢阻遏效应应有重要的作用。

提高丝状真菌产纤维素酶的活性一直是重要的研究领域。通过缺失去蛋白质泛素化蛋白 CREB, 获得产纤维素酶活性提高的 $\Delta creB$ 突变株, 该突变株不仅能显著提高菌株的滤纸酶活, 而且对纤维素内切酶、外切酶、木聚糖酶活均有明显的提高作用, 表明 CREB 很可能也作用于其他(除 CREA 之外)与纤维素酶基因表达调控相关的转录调控因子, 并影响到其稳定性。而且, 通过图 10 的 CreB 系统进化树发现斜卧青霉 CreB 与产黄青霉以及曲霉属的较为相近。在产纤维素酶丝状真菌中, 纤维素酶的调控受到多种转录调控因子的作用, 如 ACE1^[30]、ACE2^[30]、CREA^[4]、XLNR^[22-23]以及其他新发现的转录调控因子(数据未发表), 因此, 对转录调控因子稳定性的改造作为 1 种重要的细胞调控机制对于产酶菌株生产改造具有重要的意义。

由于丝状真菌具有较强的蛋白分泌能力, 已成为重要的表达生产内、外源蛋白“细胞工厂”之一。然而由于丝状真菌较强的蛋白酶活性, 分泌到细胞外的外源蛋白产量仍处于较低水平。

CREB 的缺失可使突变株分泌胞外蛋白的含量提高 2.68 倍。细胞外蛋白质含量的增加,有可能由于 *creB* 基因的缺失造成蛋白酶的泛素化,进而造成泛素化的蛋白酶的快速降解,从而间接提高了蛋白分泌到细胞外的含量。因此,深入开展蛋白质的改造对于提高内、外源蛋白的高效表达并提高其稳定性具有重要的作用。

通过同源双交换整合的方式首次在青霉中敲除了编码去蛋白质泛素化的基因 *creB*, 该基因的敲除未对菌株的表型产生明显的影响,但可显著提高突变株的纤维素降解利用能力,并且明显增加胞外蛋白质的含量。斜卧青霉作为重要的产纤维素酶工业生产菌株,其基因组序列已测序完成,因此,利用基因工程手段并结合组学的研究方法对菌株的代谢途径进行系统改造已成为构建高效工业生产菌株重要的创造平台。

REFERENCES

- [1] Gao L, Wang FH, Gao F, et al. Purification and characterization of a novel cellobiohydrolase (PdCel6A) from *Penicillium decumbens* JU-A10 for bioethanol production. *Bioresour Technol*, 2011, 102(17): 8339–8342.
- [2] Chen S, Xing XH, Huang JJ, et al. Enzyme-assisted extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulase. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 48(1): 100–105.
- [3] Wei XM, Qin YQ, Qu YB. Molecular cloning and characterization of two major endoglucanases from *Penicillium decumbens*. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(2): 265–270.
- [4] Portnoy T, Margeot A, Linke R, et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 269.
- [5] Lockington RA, Kelly JM. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination. *Mol Microbiol*, 2001, 40(6): 1311–1321.
- [6] Lockington RA, Kelly JM. The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB *in vivo* in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 2002, 43(5): 1173–1182.
- [7] Boase NA, Kelly JM. A role for *creD*, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Mol Microbiol*, 2004, 53(3): 929–940.
- [8] Nehlin JQ, Carberg M, Ronne H. Control of yeast GAL genes by Mig1p repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J*, 1991, 10: 3373–3377.
- [9] Arst HN, Tollervey D, Dowzer CEA, et al. An inversion truncating the *creA* gene of *Aspergillus nidulans* results in carbon catabolite derepression. *Mol Microbiol*, 1990, 4(5): 851–854.
- [10] Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, 1986, 234(4774): 364–368.
- [11] Denton JA, Kelly JM. Disruption of *Trichoderma reesei cre2*, encoding an ubiquitin C-terminal hydrolase, results in increased cellulase activity. *BMC Biotechnol*, 2011, 11(1): 103.
- [12] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [13] Li ZH. Development of a highly efficient gene targeting system allowing rapid genetic manipulations and functional analysis of the transcriptional regulator CreA in *Penicillium decumbens*[D]. Jinan: Shandong University, 2010. 李忠海. 斜卧青霉高效基因打靶系统的构建与转录调控因子 CreA 功能的研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [14] Sun XY. Studies on the Synthesis Regulation of lignocellulose-degrading enzymes in *Penicillium*

- decumbens*[D]. Jinan: Shandong University, 2007.
孙宪昀. 斜卧青霉木质纤维素酶系的合成调控研究[D]. 济南: 山东大学, 2007.
- [15] Yu JH, Hamari Z, Han KH, et al. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, 2004, 41(11): 973–981.
- [16] Kubodera T, Yamashita N, Nishimura A. Pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(7): 1416–1421.
- [17] Honda S, Selker EU. Tools for fungal proteomics: multifunctional *Neurospora* vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics*, 2009, 182(1): 11–23.
- [18] Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, et al. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(33): 12248–12253.
- [19] Lara-Rojas F, Sánchez O, Kawasaki L, et al. *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol Microbiol*, 2011, 80(2): 436–454.
- [20] Carvalho NDSP, Arentshorst M, Kooistra R, et al. Effects of a defective ERAD pathway on growth and heterologous protein production in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(2): 357–373.
- [21] Li ZH, Du CM, Zhong YH, et al. Development of a highly efficient gene targeting system allowing rapid genetic manipulations in *Penicillium decumbens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(3): 1065–1076.
- [22] van Peij NNME, Brinkmann J, Vršanská M, et al. β -Xylosidase activity, encoded by *xlnD*, is essential for complete hydrolysis of xylan by *Aspergillus niger* but not for induction of the xylanolytic enzyme spectrum. *Eur J Biochem*, 1997, 245(1): 164–173.
- [23] van Peij NNME, Gielkens MMC, De Vries RP, et al. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(10): 3615–3619.
- [24] Sun J, Glass NL. Identification of the CRE-1 cellulolytic regulon in *Neurospora crassa*. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25654.
- [25] Portnoy T, Margeot A, Seidl-Seiboth V, et al. Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulase. *Eukaryot Cell*, 2011, 10(2): 262–271.
- [26] Andersen MR, Nielsen ML, Nielsen J. Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Mol Syst Biol*, 2008, 4(1): 178.
- [27] Furukawa T, Shida Y, Kitagami N, et al. Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol*, 2009, 46(8): 564–574.
- [28] Tamayo EN, Villanueva A, Hasper AA, et al. CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 2008, 45(6): 984–993.
- [29] Hasper AA, Trindade LM, van der Veen D, et al. Functional analysis of the transcriptional activator XlnR from *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 2004, 150(5): 1367–1375.
- [30] Saloheimo A, Aro N, Ilmén M, et al. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys₂-His₂ transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5817–5825.