

研究报告

敲除组蛋白去乙酰化酶基因 *hdac* 对里氏木霉纤维素酶表达的调控作用张珂珂^Δ 周娇娇^Δ 余炜怡 高云雨 邓嘉雯 谢宁 田生礼*

深圳大学生命与海洋科学学院 深圳市微生物基因工程重点实验室 广东 深圳 518052

摘要:【背景】里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是木霉属中产纤维素酶最具代表性的真菌之一,表观遗传调控是不涉及 DNA 序列变化的可遗传变化,组蛋白去乙酰化是其中一种。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)负责脱乙酰化,敲除去乙酰化酶基因可引起菌株孢子、菌丝及纤维素酶活性等的一系列改变。【目的】通过敲除里氏木霉组蛋白去乙酰化酶基因(histone deacetylase, *hdac*)建立了里氏木霉 *hdac* 缺失突变株(*T. reesei* Δ *hdac*),以研究对纤维素酶基因表达的调控作用。【方法】利用 Split-Maker 技术构建了组蛋白去乙酰化酶基因敲除表达盒,并转化了里氏木霉 *T. reesei* QM9414。经 PCR 及 Southern blotting 验证正确后,对突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 连续 7 d 检测滤纸酶活(filter paper activity, AFP)、羧甲基纤维素钠酶活(carboxymethyl cellulase activity, CMCA),利用 RT-qPCR 检测纤维素酶及其相关基因 *cbh1*、*egl1* 和 *xyr1* 的表达。【结果】突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 两种酶活力均显著高于出发菌株,分别高出 8.00、30.00 IU/mL。突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 纤维素酶及其相关基因 *cbh1*、*egl1* 和 *xyr1* 的转录水平分别为出发菌株 *T. reesei* QM9414 的 6.50、6.01 和 4.51 倍。【结论】里氏木霉中纤维素酶的基因表达明显受到组蛋白去乙酰化酶基因(*hdac*)的调控,这为研究里氏木霉表观遗传调控对纤维素酶的影响提供了新的证据。

关键词: 里氏木霉, 组蛋白去乙酰化酶, 基因敲除, 突变体

Effects of knocking-out histone deacetylase gene *hdac* on cellulase expression in *Trichoderma reesei*ZHANG Ke-Ke^Δ ZHOU Jiao-Jiao^Δ SHE Wei-Yi GAO Yun-Yu DENG Jia-Wen
XIE Ning TIAN Sheng-Li*

College of Life and Marine Sciences, Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518052, China

Abstract: [Background] *Trichoderma reesei* is the most representative fungus to produce cellulase. Epigenetic regulation is a heritable change that does not involve changing DNA sequence. Histone

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31070044); Shenzhen Science and Technology Basic Research Development Plan (ZYC201105130092A)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: sltian@szu.edu.cn

Received: 29-03-2019; Accepted: 27-05-2019; Published online: 19-06-2019

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

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: sltian@szu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-29; 接受日期: 2019-05-27; 网络首发日期: 2019-06-19

deacetylation is one of epigenetic regulation, and histone deacetylase (HDAC) is responsible for deacetylation. Knocking out the acetylase gene can cause a series of changes in spores, hyphae and cellulase activities. **[Objective]** A mutant of *T. reesei* $\Delta hdac$ was developed by knocking out the histone deacetylase (*hdac*) gene to investigate the effects of *hdac* on regulation of cellulase expression. **[Methods]** The *hdac* knocking-out expression boxes were constructed by the Split-Maker technique, and were transformed into *Trichodermium reesei* QM9414. After being verified by PCR and Southern blotting, filter paper enzyme activity and carboxymethyl cellulose natriuretic enzyme activity of the mutant were continuously detected for 7 days, and the related gene expressions were detected by RT-qPCR. **[Results]** The two enzyme activities in mutant strains were 8.00 IU/mL and 30.00 IU/mL higher than those of the start strain *Trichodermium reesei* QM9414 respectively. The transcription level of *cbh1*, *egl1* and *xyr1* in the *T. reesei* $\Delta hdac$ were 6.50 times, 6.01 times and 4.51 times higher than those of the start strain, respectively. **[Conclusion]** The cellulase gene expression in *Trichoderma reesei* QM9414 was significantly regulated by the histone deacetylase, this provides a new way to study the effects of epigenetic regulation of *Trichoderma reesei* on cellulase.

Keywords: *Trichoderma reesei*, Histone deacetylase, Gene knocking-out, Mutant

里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是木霉属中产纤维素酶最具代表性的真菌之一,其基因组相较于其他丝状真菌小得多^[1],该菌安全无害且繁殖速度快,具有强大的合成和分泌蛋白的能力,主要生产的酶类有纤维素酶和纤维二糖水解酶I(CBH1),纤维素酶总量每升最高可达克级以上^[2],因此,里氏木霉是重组蛋白表达和生产的优良宿主。表观遗传调控是不涉及DNA序列变化的可遗传变化,具体的表现形式有DNA甲基化、组蛋白修饰(甲基化、乙酰化、去乙酰化等)、miRNA调控等。在乙酰化/脱乙酰化过程中,最为突出的是N-末端残基修饰H2A、H2B、H3和H4的高度保守赖氨酸^[3-4],所以乙酰化在转录调控中可能发挥重要作用。负责脱乙酰化的是组蛋白去乙酰化酶(HDAC),研究发现人HDAC1与转录调节因子RPD3的基因序列具有较高的一致性^[5]。HDAC被分为三类,第一类和第二类分别是和酵母蛋白RPD3、HDA1同源的酶类,第三类是和玉米HD2相关的蛋白,此类被证实还与小鼠体内具有ADP核糖基转移酶活性的SIR2属于同源物^[6]。研究发现,*C. carbonum*菌株经基因工程敲除*hdc1*基因会导致分生孢子突变,在*hdc1*突变株粗提物中组蛋白去乙酰化酶活性下降约50%,与野生型菌株相比蔗糖产量稍微下降,阿拉伯糖、木糖等其他碳水化合物下降了30%–73%^[7]。在*C. carbonum* *hdac*基因敲除菌株

中,成熟孢子增殖被阻断^[8]。蓝华辉等^[9]构建了组蛋白去乙酰化酶基因 $\Delta hosA$ 突变体,其黄曲霉孢子的形成减少,黄曲霉的侵染能力降低。李依民等^[10]获得HDACs的敲除突变体 $\Delta hda1$ 、 $\Delta hda2$ 、 $\Delta hda3$ 后研究了禾谷镰刀菌突变菌株生长与致病的分子生物学机制,结果发现*hda1*影响糖代谢,*hda2*与分生孢子产孢及病原菌扩散有关。

Split-Maker技术是一种运用于丝状真菌中基因敲除的高效方法,经两轮PCR可直接将选择性抗性基因与目的基因上下游融合,利用序列同源重组从而置换目的基因。基于该技术,Fairhead等^[11]研发了一种使染色体缺失和直接基因克隆的新型转化策略,并应用于XI染色体上几个开放阅读框的分析。Trushina等^[12]敲除了玉米叶枯病菌和小麦赤霉病菌的致病基因。Fu等^[13]与Kim等^[14]改良了该技术,使得基因异位整合减少,更易于目的基因的靶向敲除。本研究利用Split-Maker技术敲除了*hdac*基因,筛选得到了里氏木霉敲除组蛋白去乙酰化酶的突变体*T. reesei* $\Delta hdac$,并探索了对纤维素酶酶活及其相关基因转录水平的影响,为里氏木霉表观遗传调控和影响纤维素酶基因表达提供了新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

里氏木霉QM9414购自美国模式菌种收藏中心

(ATCC), 含有遗传霉素抗性基因的表达式载体 pBC-Geneticin^R 由法国巴黎第七大学 Philippe Silar 惠赠。其质粒图见图 1。

1.1.2 培养基

土豆 PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0。

里氏木霉液体基本培养基(g/L): 参考高云雨等^[15]的培养基配方。

里氏木霉产酶培养基: 参考周娇娇等^[16]的培养基配方。

1.1.3 主要试剂和仪器

各种 DNA 工具酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、RNase Free H₂O, TaKaRa 公司; DNA 胶回收纯化试剂盒、PCR 产物回收纯化试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 真菌总 RNA 提取试剂盒, Omega 公司; 反转录试剂盒(EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix), 北京全式金生物技术有限公司; qPCR

试剂盒(Bestar[®] SybrGreen qPCR mastermix), DBI Bioscience 公司; 溶壁酶(lysing enzyme from *Trichoderma harzianum*), Sigma 公司; 潮霉素和氨苄青霉素, Invitrogen 公司。

荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystem 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 冷冻离心机, Sigma 公司; 正置荧光显微镜, Olympus 公司; 凝胶成像系统, Siemens 公司。

1.2 方法

1.2.1 组蛋白去乙酰化酶基因(*hdac*)干扰片段的设计与合成

根据 GenBank 公布的 *hdac* 的基因序列(登录号为 18489230)寻找上、下游 1 000 bp 片段分别命名为 *hdac-1* 和 *hdac-2*, 并设计带有筛选抗性基因同源臂的引物, 分别命名为 *hdacF1*、*hdacR2*、*hdacF3* 和 *hdacR4*。以 pBC 质粒上遗传霉素序列(pBC-Geneticin^R)设计上、下游引物命名为 *hdac-MkF* 和 *hdac-MkR*, 引物序列见表 1。

1.2.2 敲除表达盒的构建

以基因组为模板, 分别以 *hdacF1*、*hdacR2* 和 *hdacF3*、*hdacR4* 为引物, 单独扩增 *hdac* 基因上、下游 1 000 bp 片段, 并命名为 *hdac-1*、*hdac-2*。以质粒 pBC-Geneticin^R 为模板, 以 *hdac-MkF* 和 *hdac-MkR* 为引物扩增 G^R 片段。PCR 反应体系(25 μL): ddH₂O 13.75 μL, 模板 DNA 1 μL, 上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μL, dNTPs(10 mmol/L) 1 μL, Mg²⁺(25 mmol/L) 2 μL, 5×Buffer 5 μL, *GoTaq[®]* DNA Polymerase(5 U/μL) 0.25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 2 min, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共

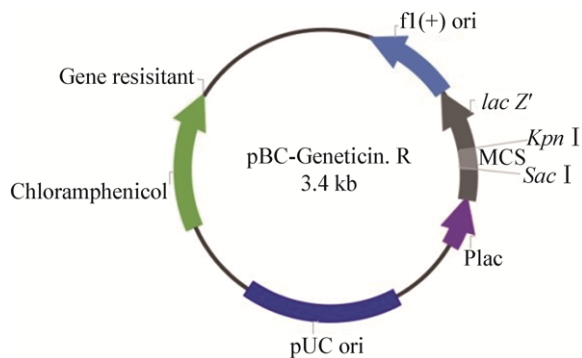


图 1 质粒 pBC-Geneticin^R 图谱

Figure 1 pBC-Geneticin^R plasmid map

表 1 *hdac* 基因上、下游 1 000 bp 引物及遗传霉素基因引物序列

Table 1 Oligo nucleotide sequences of *hdac* gene and geneticin gene primers

引物名称	序列	目的片段
Primers name	Sequences (5'→3')	Target segment
<i>hdacF1</i>	GGGCGTTGAGTGCTTGTTTG	<i>hdac-1</i>
<i>hdacR2</i>	CTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGGGCTTCATTTCCAGCCATTGTG	
<i>hdacF3</i>	CTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGGTTCCTAACGGGGGCTGTTTTG	<i>hdac-2</i>
<i>hdacR4</i>	GGGCAACAAACGGACATTC	
<i>hdac-MkF</i>	CACAATGGCTGGAATGAAGCCCGTTTCAGGGCAGGGTCGTTAAATAG	Geneticin ^R (G ^R)
<i>hdac-MkR</i>	CAAACAGCCCCGTTAGGAACCATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG	

35 个循环; 72 °C 5 min。分别以 *hdac-1* 和 G^R 为模板, 以 *hdacF1* 和 *hdac-MkR* 为引物扩增 *hdac-1-G^R* 融合片段; 分别以 *hdac-2* 和 G^R 为模板, 以 *hdac-MkF* 和 *hdacR4* 为引物扩增 *hdac-2-G^R* 融合片段。PCR 反应体系(20 μ L): ddH₂O 8 μ L, 2 个模板 DNA 各 0.5 μ L, 上、下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μ L, 2 \times Prime STAR[®] Max DNA Polymerase 10 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 58 °C 5 s, 72 °C 20 s, 共 35 个循环; 72 °C 7 min。将融合片段送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。

1.2.3 *T. reesei* QM9414 原生质体的转化

参考 Wang 等^[17]的方法, 用聚乙二醇进行里氏木霉原生质体的转化。转化时, 用 *hdac-1-G^R*、*hdac-2-G^R* 各 10 μ g, PEG Buffer 200 μ L (60% PEG4000, 50 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 涂布到含 100 μ g/mL 遗传霉素的 PDA 固体平板用于筛选转化子, 28 °C 培养 2 d。用牙签挑取转化子接种到新的筛选培养基上, 并连续筛选培养观察 6 代。

1.2.4 基因组 DNA 提取及突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 转化子的 PCR 验证

将转化子接种于 PDA 平板上, 28 °C 培养 5 d 后, 制备孢子悬液接种于液体基本培养基中, 28 °C、250 r/min 培养 2 d。抽滤菌液, 将菌丝体液氮研磨成粉后使用 E.Z.N.A[®] Fungal DNA Kit 提取基因组 DNA。用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的浓度和质量。

用基因组 DNA 为模板, 以 Ver-1F 和 Ver-1R 及 Ver-2F 和 Ver-2R 为引物对分别扩增阳性转化子 *hdac-1*、*hdac-2* 片段上、下游约 1 000 bp 的验证序列 Ver-1 和 Ver-2。PCR 反应体系(25 μ L): ddH₂O 13.75 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 上、下游引物(10 mmol/L) 各 1 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, Mg²⁺ (25 mmol/L) 2 μ L, 5 \times Buffer 5 μ L, *GoTaq*[®] DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.25 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 2 min, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环;

72 °C 5 min。原理示意图见图 2, 引物序列列表 2。

1.2.5 Southern blotting 验证突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 转化子

以突变体 Δ *hdac* 转化子 DNA 为模板, Ver-1F 和 Ver-1R 及 Ver-2F 和 Ver-2R 为引物, 实验组与对照组体系见表 3。PCR 完成后在 1% 的琼脂糖凝胶

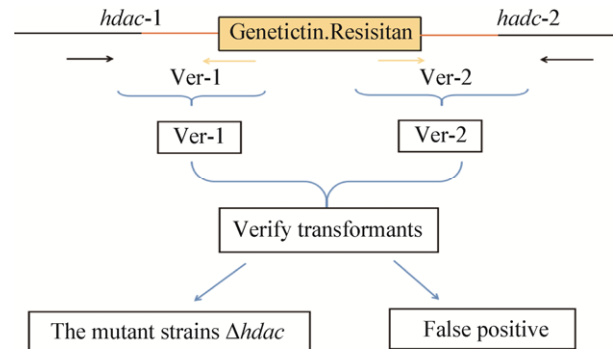


图 2 阳性转化子的 PCR 鉴定原理示意图

Figure 2 Schematic diagram for verifying positive transformant by PCR

表 2 验证阳性转化子引物

Table 2 Oligo nucleotide primers for verifying positive transformants

引物名称	序列	目的片段
Primers name	Sequences (5'→3')	Target segment
hdac-Ver-1F	GGGCGTTGAGTGCTTGTTTG	Ver-1
hdac-Ver-1R	TGAGAAGCACACGGTCAC	
hdac-Ver-2F	TCGGGGCGAAAACCTCTC	Ver-2
hdac-Ver-2R	CGGACTTGCCTATTTGGCG	

表 3 探针制备 PCR 体系

Table 3 Probe preparation PCR system

反应试剂	实验组	对照组
Reaction reagent	Test group (μ L)	Control group (μ L)
<i>GoTaq</i> DNA Polymerase (5 U/ μ L)	0.5	0.5
5 \times Green <i>GoTaq</i> Reaction Buffer	10	10
MgCl ₂ (25 mmol/L)	4	4
Ipmo5' Test or Ipmo3' Test	2	2
5' Test or 3' Test	2	2
PCR DIG Mix (labeled)	2	0
dNTPs (unlabeled)	0	2
Template DNA	1	2
ddH ₂ O	28.5	28.5
Total volume	50	50

电泳后切胶回收。取基因组 DNA 用适当的酶进行单酶切, 37 °C 酶切 4 h。1%琼脂糖凝胶电泳, 在 366 nm 的长波紫外线下观察电泳结果。参考 Dubeau 等^[18]的实验方法进行 Southern blotting 验证, 并将结果采用图像仪扫描拍照留存。

1.2.6 RNA 提取

为分析 *hdac* 基因对纤维素酶活力的影响, 将重组菌 *T. reesei* Δ *hdac* 和出发菌株 *T. reesei* QM9414 分别接种于 30 mL 基本培养基中, 每个菌株做 3 个平行样品, 28 °C、250 r/min 培养 48 h 后, 每种菌液取 1.5 mL 接种到 30 mL 含有 0.1%微晶纤维素(质量分数)的产酶培养基中, 28 °C、250 r/min 培养 5 d, 按照 E.Z.N.A[®] Fungal RNA Kit 说明书将菌丝使用液氮研磨成粉后提取总 RNA。用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品浓度和质量。

1.2.7 RNA 反转录和荧光定量 PCR

使用反转录试剂盒, 以 Random primer 为引物, 将约 100 ng RNA 反转录成 cDNA。使用荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR。PCR 反应体系 (20 μ L): 模板 4 μ L, ROX Reference Dye 0.4 μ L, Bestar[®] SybrGreen qPCR Mastermix 10 μ L, 上、下游引物(20 μ mol/L) (表 4)各 0.5 μ L, RNase Free H₂O 4.6 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 10 s, 55 °C 31 s, 40 个循环。运行结束后得到融解曲线, 用以核对 PCR 产物的特异性。所有 PCR 反应样品做 3 个复孔。目的基因表达量通过内参基因 *sar1* 校正。以对照菌株表达量为 1, 其他转化子的表达量与对照样品的比值作为数据分析。

1.2.8 酶活测定

为分析 *hdac* 基因对纤维素酶活力的影响, 将重组菌 *T. reesei* Δ *hdac* 和出发菌株 *T. reesei* QM9414 分别接种于 30 mL 基本培养基中, 每个菌株做 3 个平行样品, 28 °C、250 r/min 培养 48 h 后, 每种菌液取 1.5 mL 接种到 30 mL 含有 0.1%微晶纤维素(质量分数)的产酶培养基中, 28 °C、250 r/min 培养 7 d, 从第 2 天开始每天固定时间取发酵液 1 mL,

表 4 用于定量 PCR 分析 *hdac* 基因表达水平的引物序列表
Table 4 Primer sequences used in RT-qPCR for analysis of *hdac* expression level

引物名称	序列	目的片段
Primers name	Sequences (5'→3')	Target segment
<i>hdac</i> -F	ACTTTCTGGCTGCTGTTC	<i>hdac</i> qPCR
<i>hdac</i> -R	ATCTCCTGTTCGTTGAATCG	

于 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行酶活测定。滤纸酶活力(filter paper activity, FPA) 和羧甲基纤维素酶活力(carboxymethyl cellulase activity, CMCA)的测定参照 Ghose^[19]的方法。以 CMC 和 Whatman No.1 滤纸为底物, 分别加酶液 0.5 mL, 50 °C 孵育 30 min 和 1 h, 加入 DNS 沸水浴 5 min, 测定 *OD*₅₄₀ 值, 每个样品做 3 个重复, 结果取平均值。以 1 h 内水解 50 mg 滤纸释放出 2.0 mg 葡萄糖或 30 min 内水解 2%羧甲基纤维素放出 0.5 mg 葡萄糖的酶液稀释倍数来计算 FPU 和 CMCase 活性单位, 单位为 IU/mL。

2 结果与分析

2.1 组蛋白去乙酰化酶基因敲除盒的构建

以 *T. reesei* QM9414 基因组为模板, PCR 扩增得到组蛋白去乙酰化酶基因上游 1 000 bp 左右的片段 *hdac*-1 (1 006 bp)和下游 1 000 bp 左右的片段 *hdac*-2 (1 023 bp), 将 PCR 得到的目的片段进行 1%的琼脂糖凝胶电泳, 片段大小与预期相同, 见图 3 泳道 1、3。同时, 以 pBC-Geneticin^R 质粒为模板, PCR 扩增得到选择性标记抗性基因-遗传霉素抗性基因 G^R, 大小为 2 342 bp, 见图 3 泳道 2。将 3 个片段送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将得到的序列与测序结果经 DNA assist 软件比对, 发现 *hdac*-1 和 *hdac*-2 与里氏木霉组蛋白去乙酰化酶基因上、下游各 1 000 bp 片段一致性达到 100%, G^R 片段序列与原质粒上的序列一致性也达到 100%。分别以 *hdac*-1、G^R 片段和 *hdac*-2、G^R 片段为模板, Overlap PCR 扩增得到的融合片段 *hdac*-1-G^R 和 *hdac*-2-G^R 大小分别为 3 348 bp 和 3 363 bp。将得到的融合片段进行 1%凝胶电泳, 片段大小与预期相同, 其结果见图 3 泳道 4、5。

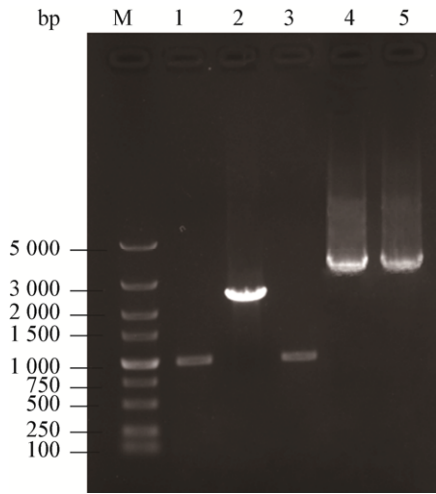


图3 *hdac* 基因敲除片段的琼脂糖凝胶电泳
Figure 3 Electrophoresis of fragments for knock-out of *hdac* gene

注: M: 5 000 bp DNA 分子标记; 1: *hdac*-1 片段 (1 006 bp); 2: G^R 片段(2 342 bp); 3: *hdac*-2 片段(1 023 bp); 4: *hdac*-1- G^R 片段(3 348 bp); 5: G^R -*hdac*-2 片段(3 363 bp).
Note: M: 5 000 bp DNA ladder marker; 1: *hdac*-1 fragment (1 006 bp); 2: G^R fragment (2 342 bp); 3: *hdac*-2 fragment (1 023 bp); 4: *hdac*-1- G^R fragment (3 348 bp); 5: G^R -*hdac*-2 fragment (3 363 bp).

2.2 突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 的 PCR 鉴定

实验组平板上有大量凸起伴辐射状黄绿色菌落, 对照组平板上无菌落, 经筛选后共得到 10 株转化子, 随机挑取 3 株转接到里氏木霉液体基本培养基中, 28 °C、250 r/min 培养 2 d, 以转化子基因组为模板, 以出发株基因为阴性对照, 进行 PCR 验证。1%琼脂糖凝胶电泳结果见图 4。从突变株基因中扩增得到验证序列 Ver-1 (1 005 bp)和 Ver-2

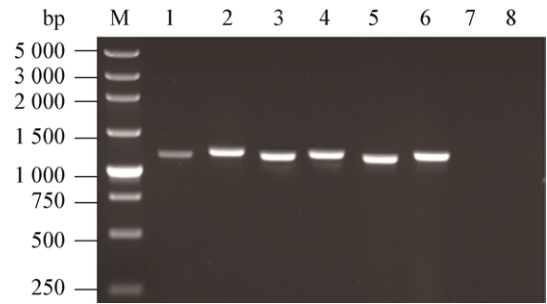


图4 3株突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 转化子的 Ver-1 和 Ver-2 片段琼脂糖凝胶电泳
Figure 4 Electrophoresis of amplified Ver-1 and Ver-2 fragments from 3 mutant *T. reesei* Δ *hdac* transformants

注: M: 5 000 bp DNA 分子标记; 1-2, 3-4, 5-6: 第 1、2、3 株 *T. reesei* Δ *hdac* Ver-1 和 Ver-2 片段; 7-8: *T. reesei* QM9414 Ver-1 和 Ver-2 片段。
Note: M: 5 000 bp DNA ladder marker; 1-2, 3-4, 5-6: The first, second, and third strain of *T. reesei* Δ *hdac* Ver-1 and Ver-2 fragments; 7-8: *T. reesei* QM9414 Ver-1 and Ver-2 fragments.

(1 021 bp), 说明目的基因整合到突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 的基因组中。

2.3 突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 转化子的 Southern blotting 验证

在遗传霉素基因内部、*hdac* 基因内部及上下游 3 000 bp 和 5 000 bp 位置找到一个共同的酶切位点 *Nar* I, 酶切图谱见图 5A, *T. reesei* QM9414 基因组和 *T. reesei* Δ *hdac* 转化子敲除盒均被切成长度互不相同的两部分。*T. reesei* QM9414 基因组两条条带大小分别为 1 864 bp 和 6 456 bp, 突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 转化子敲除盒中两条条带大小分别为 2 293 bp 和 5 926 bp。Southern blotting 条带图见图 5B。

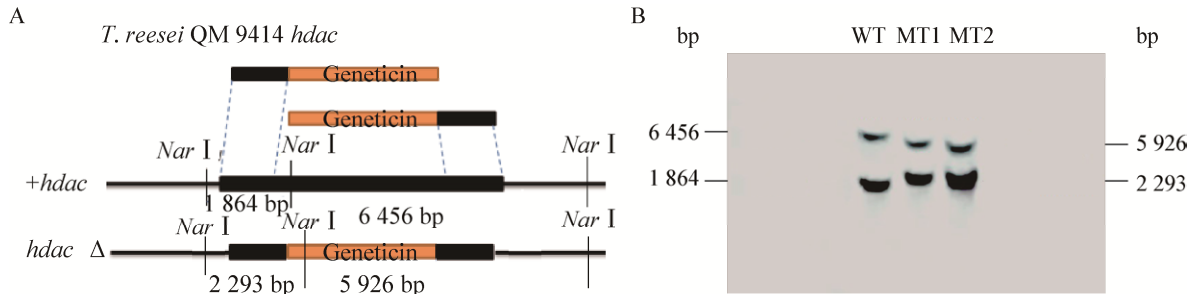


图5 酶切位点示意图及敲除基因后 Southern blotting 的验证结果
Figure 5 Schematic site and southern blotting results after knocking out the gene

注: A: 酶切位点示意图; B: 敲除基因后 Southern blotting 结果。
Note: A: Schematic site; B: Southern blotting results after knocking out the gene.

2.4 *T. reesei* QM9414 和 *T. reesei* Δ hdac 菌株表型差异分析

取在固体培养基上的生长菌丝制成玻片在显微镜下观察, *T. reesei* Δ hdac 菌株菌丝较长, 分枝较多, 形态较好。表型图见图 6。

2.5 *T. reesei* Δ hdac 菌株 FPA 和 CMCA 酶活的测定

滤纸酶活(FPA)代表的是纤维素酶的 3 种酶组分, 即内切型葡聚糖酶、外切型葡聚糖酶、 β -葡聚糖苷酶协同作用下的综合性酶活, 是菌株整个纤维素酶系统活力水平的综合体现。*T. reesei* QM9414 和 *T. reesei* Δ hdac 的 FPA 和 CMCA 从

第 2-7 天都呈先升后降的趋势, 在第 5 天达到峰值。其中 *T. reesei* Δ hdac 的两种酶活均高于出发菌株。*T. reesei* QM9414 和 *T. reesei* Δ hdac 的 FPA 和 CMCA 变化曲线见图 7。其中 *T. reesei* Δ hdac 各个时段 FPA 和 CMCA 酶活力相比于 *T. reesei* QM9414 显著升高($P < 0.001$), 分别平均高出 6.50、25.50 IU/mL, 即突变菌株酶活平均分别增长了 1.35、2.13 倍, 在峰值第 5 天时分别高出 8.00、30.00 IU/mL, 即突变菌株酶活分别增长了 1.45、2.31 倍。结果表明, 敲除组蛋白去乙酰化酶基因可以显著提高纤维素酶的表达。

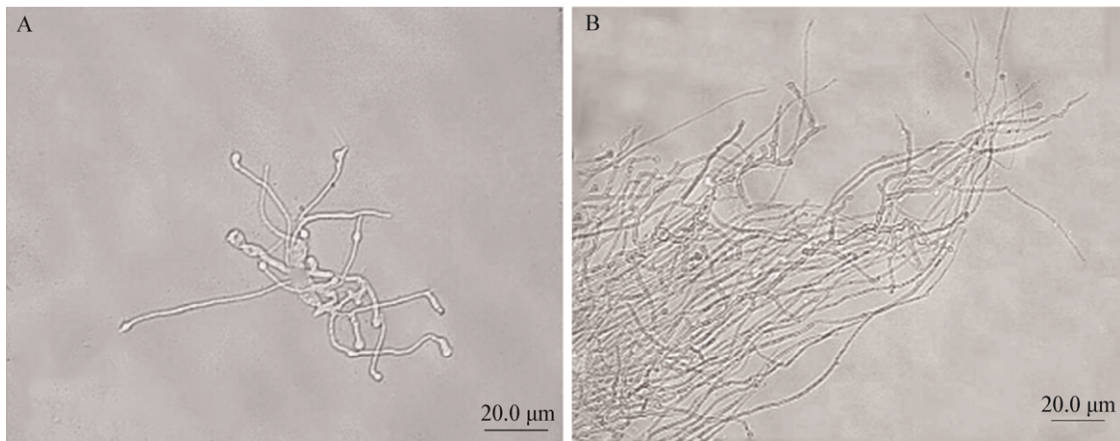


图 6 *T. reesei* QM9414 及 *T. reesei* Δ hdac 菌丝表型变化

Figure 6 Phenotypic changes in *T. reesei* QM9414 and *T. reesei* Δ hdac

注: A: *T. reesei* QM9414 菌丝表型变化; B: *T. reesei* Δ hdac 菌丝表型变化。

Note: A: Phenotypic changes in *T. reesei* QM9414; B: Phenotypic changes in *T. reesei* Δ hdac.

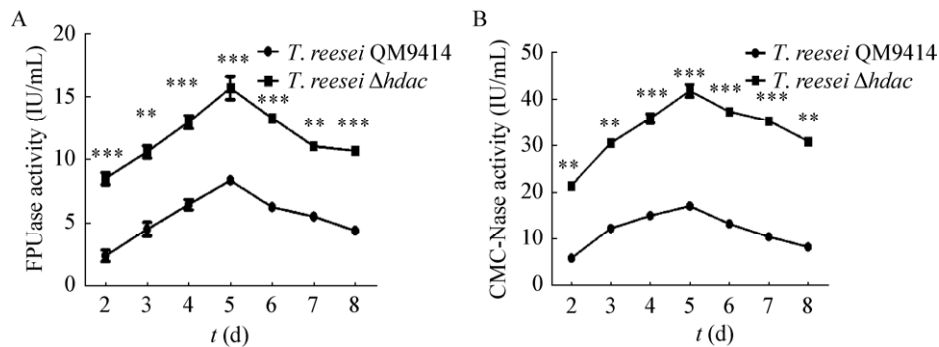


图 7 *T. reesei* Δ hdac 突变体 FPA 及 CMCA 酶活变化曲线

Figure 7 *T. reesei* Δ hdac mutant FPA and CMCA enzyme activity curve

注: A: *T. reesei* Δ hdac 突变体 FPA 酶活变化曲线; B: *T. reesei* Δ hdac 突变体 CMCA 酶活变化曲线。

Note: *T. reesei* Δ hdac mutant FPA enzyme activity curve; B: *T. reesei* Δ hdac mutant CMCA enzyme activity curve. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$, $\bar{x} \pm SD$, $n=3$.

2.6 组蛋白去乙酰化酶缺失突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 的 *cbh1*、*egl1* 和 *xyr1* 转录水平相对表达量分析

对所有样品进行实时荧光定量 PCR 反应, 使用 qPCR Software 3.2 软件对实验结果进行处理分析。实验数据经内参基因 *sar1* 定量值校正后, 分别以出发菌株 *T. reesei* QM9414 中 *cbh1*、*egl1* 和 *xyr1* 的表达量为 1, 计算出培养第 5 天的 *T. reesei* Δ *hdac* 中 *cbh1*、*egl1* 和 *xyr1* 相对表达量, 结果如图 8 所示, 在诱导培养第 5 天时, *T. reesei* Δ *hdac* 的 *cbh1*、*egl1* 和 *xyr1* 的表达量与出发菌株 *T. reesei* QM9414 相比, 分别约为出发菌株的 6.50、6.01 和 4.51 倍。

纤维素酶是起协同作用的多组分酶系, 不仅具有内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶活性, 还有很高活力的木聚糖酶。*cbh1* 是纤维二糖水解酶 CBH1 的编码基因, *egl1* 是内切 β -1,4-葡聚糖酶 EGL1 的编码基因。XYR1 是主要纤维素酶和半纤维素酶基因, 包括 *cbh1*、*cbh2*、*egl1*、*bgl1*、*xyn1* 和 *xyn2* 等转录所必需的激活因子。*T. reesei* Δ *hdac* 中 *cbh1*、*egl1* 和 *xyr1* 的表达量显著提高可能是由于组蛋白去乙酰化酶基因敲除后, 组蛋白的乙酰化水平提高导致基因转录水平提高, 激活因子 *xyr1* 转录水平提高, 同时促进纤维素酶基因 *cbh1* 和 *egl1* 表达量再次提高。

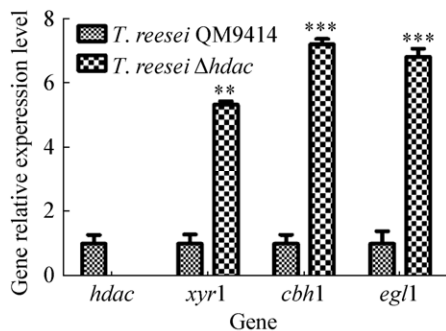


图 8 *T. reesei* QM9414 和 *T. reesei* Δ *hdac* 在第 5 天时纤维素酶基因表达量

Figure 8 Cellulase gene expression at the 5th day of *T. reesei* QM9414 and *T. reesei* Δ *hdac*

Note: **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$, $\bar{x} \pm SD$, $n=3$.

3 讨论与结论

里氏木霉是工业生产纤维素酶的重要菌种, 为提高里氏木霉中纤维素酶的产量, 需从纤维素酶表达调控系统入手进行研究。本研究就里氏木霉组蛋白去乙酰化酶基因缺失对菌体表型和纤维素酶的影响进行了探索, 实现了重构基因 *hdac-1-G^R* 和 *hdac-2-G^R* 在 *T. reesei* QM9414 中对蛋白去乙酰化酶基因的同源替换, 经酶活性测定发现突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 的 FPA 和 CMCA 酶活均高于出发菌株 *T. reesei* QM9414, 说明酶活性的提高与敲除组蛋白去乙酰化酶基因 *hdac* 有关, 进一步对纤维素酶基因 *cbh1*、*egl1* 和木聚糖酶激活因子 XYR1 的 mRNA 表达水平进行了荧光定量 PCR 检测。结果显示, 与出发菌相比, 突变体 *T. reesei* Δ *hdac* 中 *cbh1*、*egl1* 和 *xyr1* 的表达量均有显著提高, 说明敲除组蛋白去乙酰化酶基因 *hdac* 可能使得乙酰化作用维持长久。有研究表明, *cbh1* 基因上游的 800 bp 区域是转录激活因子 XYR1 的结合位点^[20]。同时 ChIP 实验结果也显示, TATA 盒的变化趋势与组蛋白乙酰化水平变化结果一致^[21]。另一方面, 激活因子 *xyr1* 转录水平提高后促进了纤维素酶基因 *cbh1*、*egl1* 转录。Shwab 等^[22]研究发现构巢曲霉的组蛋白去乙酰化酶基因主要控制青霉素和杂色曲霉素的合成, 敲除该基因后其代谢产物发生明显改变, 且基因簇的转录水平大大提高。另外, 江艳萍^[23]敲除了去乙酰化酶 Tr26 显著影响了菌株在逆境条件下的生长和发育状态, 影响了阻遏或诱导条件下(半)纤维素降解相关酶类的表达。我们通过敲除组蛋白去乙酰化酶基因 *hdac* 后发现, 表达纤维素酶及其相关基因转录水平明显提高, 这与 Schwab 等^[22]和江艳萍^[23]的结果相一致, 但本实验尚未检测相关代谢物产量的改变。本研究观察的 *T. reesei* QM9414 和 *T. reesei* Δ *hdac* 均为正常生长条件, 菌株的表型在去乙酰化酶基因缺失情况下生长表型未见明显变化, 而对纤维素酶及相关基因的表达影响明显。综上, 表观遗传修饰在激活沉默基因簇方面具有重要作用, 对里

氏木霉纤维素酶及相关的基因表达和调控具有重要意义。

本研究通过对纤维素酶活和 mRNA 水平等的实验结果分析,进一步确定了敲除组蛋白去乙酰化酶基因 *hdac* 可提高纤维素酶的产量,利用 Split-Maker 技术构建的相关基因敲除表达盒可以成功在 *T. reesei* QM9414 基因组中同源重组,得到含有遗传霉素抗性基因的突变株,为进一步研究和探讨里氏木霉纤维素酶基因的调控提供新思路 and 实验参考。

REFERENCES

- [1] Martinez D, Berka RM, Henrissat B, et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*)[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(5): 553-560
- [2] Zhang GT, Hartl L, Schuster A, et al. Gene targeting in a nonhomologous end joining deficient *Hypocrea jecorina*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 139(2): 146-151
- [3] Felsenfeld G, Boyes J, Chung J, et al. Chromatin structure and gene expression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(18): 9384-9388
- [4] Bonnaud EM, Suberbielle E, Malnou CE. Histone acetylation in neuronal (dys) function[J]. *Biomolecular Concepts*, 2016, 7(2): 103-116
- [5] Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p[J]. *Science*, 1996, 272(5260): 408-411
- [6] Lusser A, Kölle D, Loidl P. Histone acetylation: lessons from the plant kingdom[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(2): 59-65
- [7] Baidyaroy D, Brosch G, Ahn JH, et al. A gene related to yeast *HOS2* histone deacetylase affects extracellular depolymerase expression and virulence in a plant pathogenic fungus[J]. *Plant Cell*, 2001, 13(7): 1609-1624
- [8] Brosch G, Dangel M, Graessle S, et al. An inhibitor-resistant histone deacetylase in the plant pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(43): 12855-12863
- [9] Lan HH, Ye LQ, Ren SL, et al. Study on the function of histone deacetylase *hosA* gene of *Aspergillus flavus*[A]//2015 Annual Meeting of Chinese Society of Fungi[C]. Shanghai: Mycological Society of China, 2015 (in Chinese) 蓝华辉, 叶柳青, 任思琳, 等. 黄曲霉菌组蛋白去乙酰化酶 *hosA* 基因功能研究[A]//中国菌物学会 2015 年学术年会论文摘要集[C]. 上海: 中国菌物学会, 2015
- [10] Li YM, Wang CF, Wang GH, et al. Functional verification of *Fusarium graminearum* histone deacetylase gene (HDACs)[A]//Academic Conference of Chinese Society of Plant Pathology[C]. Kunming: Chinese Society for Plant Pathology, 2009 (in Chinese) 李依民, 王晨芳, 王光辉, 等. 禾谷镰刀菌组蛋白去乙酰化酶基因(HDACs)功能验证[A]//中国植物病理学会 2009 年学术年会论文集[C]. 昆明: 中国植物病理学会, 2009
- [11] Fairhead C, Llorente B, Denis F, et al. New vectors for combinatorial deletions in yeast chromosomes and for gap-repair cloning using 'split-marker' recombination[J]. *Yeast*, 1996, 12(14): 1439-1457
- [12] Trushina N, Levin M, Mukherjee PK, et al. PacC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 138
- [13] Fu J, Hettler E, Wickes BL. Split marker transformation increases homologous integration frequency in *Cryptococcus neoformans*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2006, 43(3): 200-212
- [14] Kim MS, Kim SY, Yoon JK, et al. An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 390(3): 983-988
- [15] Gao YY, Zhong LY, Dong GY, et al. *Trichoderma reesei* constitutive type of expression vector siRNA interfering *cre1* gene on cellulases expression regulation[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(1): 12-19 (in Chinese) 高云雨, 钟路遥, 董冠园, 等. 里氏木霉组成型表达 siRNA 干扰 *cre1* 基因对纤维素酶表达的调控作用[J]. *微生物学杂志*, 2018, 38(1): 12-19
- [16] Zhou JJ, She WY, Wang HR, et al. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the expression of cellulases in *Trichoderma reesei*[J]. *Journal of Shenzhen University (Science and Engineering)*, 2017, 34(2): 122-131 (in Chinese) 周娇娇, 余炜怡, 王浩人, 等. 5-氮杂-2-脱氧胞苷对里氏木霉产纤维素酶的影响[J]. *深圳大学学报: 理工版*, 2017, 34(2): 122-131
- [17] Wang SW, Xing M, Liu G, et al. Improving cellulase production in *Trichoderma koningii* through RNA interference on *ace1* gene expression[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 22(8): 1133-1140
- [18] Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, et al. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens[J]. *Cancer Research*, 1986, 46(6): 2964-2969
- [19] Ghose TK. Measurement of cellulase activities[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59(2): 257-268
- [20] 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*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(8): 564-574
- [21] Seiboth B, Karimi RA, Phatale PA, et al. The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(6): 1150-1164
- [22] Shwab EK, Bok JW, Tribus M, et al. Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(9): 1656-1664
- [23] Jiang YP. Study on the mechanism of regulation proteins related to cellulase synthesis of *Trichoderma*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2015 (in Chinese) 江艳萍. 里氏木霉中纤维素酶合成相关调控蛋白的作用机制研究[D]. 北京: 中国科学院大学博士学位论文, 2015