

转录调控因子 BglR 缺失对东方肉座菌纤维素酶表达的影响

刘富川, 薛勇, 刘健, 甘礼惠, 龙敏南*

(厦门大学能源学院 福建 厦门 361102)

摘要: 东方肉座菌 (*Trichoderma orientalis*) EU7-22 是一株高效分泌纤维素酶的丝状真菌, 对生物质转化重要价值。本文采用 TAIL-PCR 方法克隆得到纤维素酶转录调控因子 *bglr* 基因及其上下游序列, 并经同源交换获得 *bglr* 基因敲除的菌株 *T. orientalis* EU7-22 Δ *bglr*, 其产滤纸酶、外切酶、木聚糖酶活力和分泌蛋白最高值较对照菌株分别增加了 39%、22%、16% 和 20%, 而 β -葡萄糖苷酶活力下降 47%, 其编码基因 *bglI* 表达量显著降低, 同时发酵液 pH 值也发生明显变化。研究结果表明 BglR 的缺失抑制了菌株 EU7-22 在以特定多糖/寡糖为碳源的培养基上的生长, 且 BglR 在 β -葡萄糖苷酶的调控过程中起正调控作用, 为构建高效降解纤维素的工程菌株提供依据。

关键词: 东方肉座菌; *bglr* 基因; 转录调控因子; β -葡萄糖苷酶

中图分类号: Q 939.97 **文献标志码:** A

天然纤维素是自然界储能最多、最古老、最丰富的天然可再生生物质, 是生物质能源的主要原料。纤维素的多种加工利用过程依赖于微生物, 尤其是丝状真菌, 因为其在降解生物质过程中形成了一种高效、复杂的机制用来分泌一组水解和氧化酶, 并对降解起主要作用^[1]。然而, 目前能高效分泌纤维素酶和半纤维素酶的丝状真菌, 仅有少数如里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 等被开发应用^[2]。因此, 对于具有工业化潜力的丝状真菌, 研究其纤维素酶基因的表达调控机理势在必行, 以期更有效地构建和改造纤维素酶高产菌株。

转录调控因子在丝状真菌的纤维素酶表达调控过程中起关键作用。木聚糖基因调控因子 *xlnR* 是第一个被鉴定的转录因子^[3], 也是纤维素利用过程中的重要调控因子, 其多数同源序列存在于丝状真菌中。在里氏木霉 (*T. reesei*) 中, Xyr1 可调控纤维素酶基因和半纤维素酶基因的转录^[4]。对黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 中的 CREA/1

收稿日期: 2018-03-07

收稿日期: 2018-04-09

基金项目: 福建省海洋高新技术产业发展专项项目 (闽海洋高新[2015]27 号); 厦门大学能源发展基金 (2017NYFZ02)

*通信作者: longmn@xmu.edu.cn

进行敲除^[5],可有效抑制碳源代谢阻遏,提高其纤维素酶和半纤维素酶基因在非诱导表达条件下的表达。另一个纤维素酶基因表达调控因子 ACE1 在里氏木霉 (*T. reesei*) 和康氏木霉 (*Trichoderma koningii*) 中作为负调控因子进行调节,有研究表明,在槐糖和纤维素的诱导下,里氏木霉 (*T. reesei*) ACE1 敲除菌的主要纤维素酶基因和半纤维素酶基因表达量均较出发菌提高^[6]。

东方肉座菌 (*Trichoderma orientalis*) EU7-22 是由本实验室诱变、筛选获得的木霉属 (*Trichoderma*) 真菌,其不仅具有完整的纤维素酶系,且与其他丝状真菌相比具有较高的产纤维素酶能力,是一株具有工业化潜力的菌株,对其转录调控因子进行研究具有重要意义。锌指蛋白 BglR 是利用单核苷酸多态性检测技术发现的特异性调控 β -葡萄糖苷酶基因表达的转录因子^[7]。*bglr* 基因在里氏木霉 (*T. reesei*) 中的缺失可使其纤维素酶活力在碳源纤维二糖诱导下提高^[7],且其同源蛋白 COL-26 在粗糙脉孢菌 (*N. crassa*) 的生物碳氮平衡中起调节作用^[8]。因此,本研究拟获得东方肉座菌的 BglR 缺失菌株,并对其产纤维素酶活力、蛋白分泌量和编码产酶基因的表达量进行分析,探究 *bglI* 基因在东方肉座菌中的功能,以期为进一步构建高效降解纤维素的工业菌株提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本试验所用东方肉座菌 (*T. orientalis*) EU7-22 菌株为本实验室分离筛选获得,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株也为本实验室保存。pMD19-T 载体质粒购自宝生物工程(大连)有限公司。PUR5750 质粒(本实验室保存)带有真菌筛选标记潮霉素抗性基因 *hph*。

1.1.2 培养基

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 10 g/L, pH 7.2。MM 培养基(种子培养基):葡萄糖 20 g/L,硫酸铵 5 g/L,磷酸二氢钾 15 g/L,硫酸镁 0.6 g/L,氯化钙 0.6 g/L。PDA 固体培养基:马铃薯(去皮,切块) 200 g 煮沸 30 min 后纱布过滤,将滤液定容至 1 L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L。产酶培养基(质量分数):微晶纤维素(PH101,深圳,优普惠) 1%,小麦麸皮(于福建漳州收集) 1%,蛋白胨 0.5%,氯化钙 0.05%,硫酸镁 0.05%,磷酸二氢钾 0.25%,吐温-80 0.4% (体积分数)。上述试剂均为国药分析纯(微晶纤维素与小麦麸皮除外)。

1.2 方法

1.2.1 东方肉座菌 DNA、RNA 的提取及 cDNA 的合成

将东方肉座菌接种至 MM 液体培养基中，置于温度为 30 °C、转速为 180 r/min 的摇床上培养 48 h，过滤，收集菌丝，液氮研磨，使用 CTAB 法^[9]提取 DNA。用 RNAiso Plus 试剂 (TaKaRa, 日本) 提取 RNA，置于 -80 °C 超低温冰箱中保存。使用 PrimeScript™ gDNA Eraser 试剂 (TaKaRa, 日本) 将 RNA 反转录为 cDNA，置于 -80 °C 下保存。

1.2.2 *bglr* 基因及其上下游序列的克隆

在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中将 *bglr* 基因与里氏木霉 QM6a (Sequence ID: XM_006969261.1)、绿色木霉 (*Trichoderma virens*) Gv29-8 (Sequence ID: XM_014098216.1) 和深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*) IMI 206040 (Sequence ID: XM_014092063.1) 进行序列比对，选择保守区序列设计引物 *bglr*-F 和 *bglr*-R，以东方肉座菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增，回收产物，连接到 pMD19-T 载体上，并转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。通过含有氨苄青霉素 (浓度为 100 μ g/ml) 的抗性平板筛选转化子。再利用通用引物 M13 对获得的阳性克隆子进行 PCR 检菌和测序，将所得序列在 NCBI 数据库中进行比对验证。

对 *bglr* 基因上游未知序列进行克隆，简并引物设计参照 Liu 和 Chen 的方法^[10]，设计 *bglr* 基因上游序列巢式引物 *ubglr*-1、*ubglr*-2、*ubglr*-3 (表 1)，经三次 PCR 反应，对上游序列进行扩增，将所得产物进行回收转化，对阳性克隆子筛选后进行测序。根据结果，继续设计上游巢式引物 *ubglr*-11、*ubglr*-22、*ubglr*-33 (表 1) 以得到足够长的上游同源臂，并进行第二轮序列扩增，方法与上述步骤相同。热不对称 PCR 简并引物 SP1~4 见表 1。

借助 *bglr* 基因下游序列在 NCBI 数据库中的比对结果，根据其下游序列保守位点，设计下游简并引物 *bglr*-DF1 与 *bglr*-DR1 (表 1)，以东方肉座菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增，采用同上游同源臂相同的方法进行测序，得到东方肉座菌下游同源臂序列。

表 1 本实验所用引物

Tab.1 Primers used in this study

引物名称	序列 (5'→3')	应用
<i>Ubglr</i> -1	TAAAGAACCTGCTGCTCGATGACGG	
<i>Ubglr</i> -2	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCGAACGTGAGGCACTCCTTGACCATG	<i>bglr</i> 基因及上下游
<i>Ubglr</i> -3	AATGCGGTTATGGACCTTTGCGGC	未知序列
<i>Ubglr</i> -11	TGGGTCAGTCAGCAAGCGGAAGAG	克隆

