

# 利用 RNAi 抑制 *cre1* 基因转录 提高里氏木霉表达纤维素酶

王榕<sup>1,2</sup>, 宫莉<sup>2</sup>, 姚斌<sup>2</sup>, 薛鲜丽<sup>2</sup>, 罗会颖<sup>2</sup>, 张永杰<sup>1,\*</sup>, 苏小运<sup>2,\*</sup>  
(1. 山西大学生命科学学院, 山西太原 030006;  
2. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

**摘要:**本研究采用 RNA 干扰技术 (RNAi) 对里氏木霉主要的转录抑制因子 *cre1* 基因的表达进行抑制, 以期提高里氏木霉生产纤维素酶的能力。通过 PCR, 从里氏木霉的基因组中扩增得到 *cbh1* 启动子、反向的 *cre1* 基因片段 (568~963 bp)、正向的 *cre1* 基因片段 (655~961 bp) 和 *cbh2* 终止子, 利用 DNA assembler 方法将这些基因连接到 pRS424 质粒上, 构建成 pCre1-i 质粒。再将 RNAi 盒分作两个片段扩增, 同时转化里氏木霉并通过 PCR 鉴定阳性转化子。摇瓶发酵显示其中一株转化子在纤维素诱导培养基中培养 4.5 d 后, 其纤维素酶的滤纸酶活、内切葡聚糖酶活和 CBHI 酶活为 0.67、3.70 和 0.46 U/mL, 较出发菌株分别提高了 1.3、1.8 和 5.6 倍。通过实时荧光 RT-PCR 检测, 发现该转化子中 *cre1* 基因的转录水平比出发菌株降低了 43%。

**关键词:** *cre1*, RNAi, 纤维素酶, DNA assembler

## Improving cellulase expression of *Trichoderma reesei* by RNAi-mediated repression of *cre1* transcription

WANG Rong<sup>1,2</sup>, GONG Li<sup>2</sup>, YAO Bin<sup>2</sup>, XUE Xian-li<sup>2</sup>, LUO Hui-ying<sup>2</sup>, ZHANG Yong-jie<sup>1,\*</sup>, SU Xiao-yun<sup>2,\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Key Laboratory for Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture,  
Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The RNA interference (RNAi) technique was used to repress the expression of the main transcriptional repressor *cre1* in order to improve the cellulase production of *Trichoderma reesei*. The *cbh1* promoter, a reversed *cre1* gene fragment (568~963 bp), an ordinary *cre1* gene fragment (655~961 bp), and *cbh2* terminator were all amplified from the genomic DNA of *T. reesei* by polymerase chain reaction (PCR). The DNA assembler method was used to assemble all these gene fragments in pRS424 to obtain the pCre1-i plasmid. Two fragments encompassing the RNAi cassette were amplified from the plasmid and transformed simultaneously into *T. reesei*. PCR was used to verify the positive colonies. In the flask batch culture, one of the transformants displayed 0.67, 3.70 and 0.46 U/mL for the filter paper cellulase, endoglucanase, and CBHI activity, which were 1.3, 1.8, and 5.6 folds of the parent strain. By using RT-qPCR, the transcript level of *cre1* in this transformant was determined to be lowered to 43% of that of the parent strain.

**Key words:** *cre1*; RNAi; cellulase; DNA assembler

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)11-0189-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.11.031

纤维素酶作为自然界中数量最大的可再生资源, 在制酒、酱油酿造、饮料加工等食品行业有广泛的应用价值<sup>[1]</sup>。目前, 报道的主要产纤维素酶的菌株多为真菌<sup>[2]</sup>。其中, 里氏木霉因其表达能力强 (工业上, 经改造后的里氏木霉, 其产纤维素酶的产量可达

到 100 g/L 以上<sup>[3]</sup>)、易于培养和符合“一般公认安全”等优点, 在工业表达酶基因、尤其是纤维素酶上得到了极大的应用。里氏木霉的纤维素酶系包括两个外切纤维素酶、五个内切纤维素酶、一个  $\beta$ -葡萄糖苷酶和六个裂解性多糖单加氧酶<sup>[4-5]</sup>。

收稿日期: 2015-12-02

作者简介: 王榕 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: wangrong109@163.com。

\* 通讯作者: 苏小运 (1979-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 丝状真菌基因工程, E-mail: suxiaoyun@caas.cn。

张永杰 (1979-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物进化生物学与分子生态学, E-mail: zhangyj2008@sxu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31400067); 中国农业科学院青年英才计划。

*cre1* 是里氏木霉的一个广域的转录抑制因子,能调节大部分纤维素酶甚至半纤维素酶基因的表达<sup>[6]</sup>。在里氏木霉主要的纤维素酶和木聚糖酶基因上,都或多或少的存在着 *cre1* 转录因子的结合位点<sup>[7]</sup>。虽然 *cre1* 的主要作用是转录抑制因子,但完全敲除 *cre1* 基因,在以微晶纤维素做唯一碳源进行诱导时,产酶水平低于野生型菌株的最大产酶水平,意味着 *cre1* 还具有一定的转录激活作用<sup>[8]</sup>。因此,对 *cre1* 基因的调控,不能简单的采取基因敲除的策略,而应该采取抑制其表达的策略。RNA 干扰(RNAi)技术提供了一种快速、有效抑制目的基因表达的方法<sup>[9]</sup>。受到 RNAi 的受体菌株,其被调控基因呈现从高到低的一系列表达水平,与基因敲除在性状上呈现有或无不同,其具有连续性。

本研究采取 RNAi 技术对 *cre1* 基因进行干扰调节,期望能提高受体菌株产纤维素酶的水平,为利用 RNAi 技术对里氏木霉进行遗传改造构建高效表达的菌株提供新的思路,同时为纤维素酶在食品领域的广泛应用提供可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

里氏木霉 QM9414 (ATCC 26921) 和 Tu6Δ*tku70* (ATCC MYA-256, 尿嘧啶缺陷菌株)<sup>[10]</sup> 均由中国科学院微生物研究所董志扬教授馈赠。pEASY-T3 质粒购于全式金;质粒 pRS424 为本实验室保存,用作质粒骨架构建。pCre1-i 重组质粒(pRS424-armL-cbh1p-cre1f-cre1r-cbh1t-pyrG-armR,图1)由本实验室构建。

里氏木霉生长培养基:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.6 g/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0037 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0014 g/L, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.0016 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 自然 pH。

里氏木霉纤维素诱导培养基:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.6 g/L, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0037 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0014 g/L, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.0016 g/L, 微晶纤维素 Avicel (购自 Sigma 公司) 20 g/L, 自然 pH。

色氨酸(Trp)缺陷型培养基:YNB 6.7 g/L, 葡萄糖 20 g/L, Trp Do supplement (购自 Clontech) 0.64 g/L, 琼脂粉 20 g/L。

T100™ 普通 PCR 仪、CFX-96 实时荧光定量 PCR 仪和 212PRO 凝胶成像仪 购自美国 Bio-Rad 公司; CR22GIII 立式高速冷冻离心机 购自日本 HITACHI 公司;移液枪 购自德国 Eppendorf 公司;CT6E 台式高速冷冻离心机 购自日本 HITACHI 公司;SPECORD200PLUS 紫外分光光度计 购自德国耶拿分析仪器公司;H1MFDG 酶标仪 购自美国 BioTek 仪器有限公司;SPX-250 生化培养箱 购自北京利康达圣科技发展有限公司;ZHWHY-211C 恒温培养振荡器 购自上海智诚分析仪器制造有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 pCre1-i 质粒的构建 以里氏木霉 QM9414 基因组为模板,利用引物 ParmL (SR) F1/R1、PpyrG (SR) F1/R1、ParmR (SR) F1/R1 (表 1) 扩增获得 armL、pyrG (乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶) 和 armR。armL 和 armR 片段分别作为在里氏木霉里进行同源重组的左臂和右臂,pyrG 基因作为尿嘧啶营养缺陷型的筛选标记基因。并同时引进 *Not* I 和 *Eco*R I 酶切位点。利用引物 Pcbh1P (SR) F1/R1、Pcre1 (SR) F1/R1、Pcre1 (SR) F2/R2、Pcbh2t (SR) F1/R1, 扩增获得 *cbh1* 启动子、反向的 *cre1* 基因 (*cre1r*) 568~963 bp 片段、正向的 *cre1* 基因 (*cre1f*) 655~961bp 片段以及 *cbh2* 终止子并同时引入 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶切位点。将 pRS424 质粒用 *Eco*R I 酶切,电泳、回收线性化质粒载体。将其与 armL、pyrG、armR 按 1:3:3:3 的摩尔比用氯化锂法共同转化酿酒酵母 AH109 的感受态细胞,采用 DNA assembler 方法进行拼接<sup>[11]</sup>。DNA assembler 利用酿酒酵母的高效同源重组机制,能快速的将多个具有相同核苷酸末端(重叠区长度需要大于 30 bp)的 DNA 片段在体内一次性和线性化的质粒拼接起来。同样的方法将 *Eco*RI 酶切的 pRS424 质粒与 *cbh1* 启动子、反向的 *cre1* 基因、*cbh2* 终止子 DNA 片段,共转化酿酒酵母 AH109 的感受态细胞,涂布在色氨酸(Trp)缺陷型培养基上,30 °C 静置培养 48 h。对酵母菌落做菌落 PCR,以鉴定是否已经成功构建 pRS424-armL-pyrG-armR 和 pRS424-cbh1p-cre1f-cbh2t 重组质粒。将 PCR 鉴定为阳性的酵母菌落挑取并接种于 3 mL YPD 培养基上,30 °C、180 r/min 振荡培养过夜,提取质粒。将重组质粒转化大肠杆菌 Trans1 感受态细胞(全式金,北京),涂布于含 100 μg/mL 氨苄的 LB 琼脂平板上,37 °C 静置培养 16 h。挑取单克隆菌落,接种于 3 mL LB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄)中,37 °C、180 r/min 振荡培养过夜,提取质粒。

随后,用 *Kpn*I 和 *Eco*RI 双酶切 pRS424-cbh1p-cre1r-cbh2t, 同时将用 PCR 扩增所得到的正向的 *cre1* 基因用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切,将回收质粒和正向的 *cre1* 基因用 T4 连接酶(TaKaRa 公司)连接、转化大肠杆菌 Trans1 感受态细胞,筛选重组质粒 pRS424-cbh1p-cre1r-cre1f-cbh2t (图 1)。利用引物 Pcbh1P (SR) F3/Pcbh2t (SR) R3 从重组质粒 pRS424-cbh1p-cre1 反-cre1 正-cbh2t 上扩增获得 cbh1p-cre1r-cre1f-cbh2t 片段。

最后,将 pRS424-armL-pyrG-armR 重组质粒用 *Eco*R I 酶切,与上一步获得的 cbh1p-cre1r-cre1f-cbh2t 片段用 DNA assembler 法进行重组质粒的构建。经验证正确后,最终将重组质粒转化大肠杆菌 Trans1 感受态细胞,提取重组质粒 pCre1-i (图 1)。

1.2.2 里氏木霉的转化 用 ParmLF2/PpyrGR2 和 Pcbh2tF2/ParmRR2 (表 1) 引物对分别从重组质粒 pCre1-i 上扩增 armL-cbh1p-cre1r-cre1f-cbh2t-pyrG 和 cbh2t-pyrG-armR 片段。在 1% 琼脂糖胶上电泳,切下 PCR 产物中的目的条带,纯化 DNA 备用。

将里氏木霉 TU6Δ*tku70* 接种于土豆培养基(PDA)平板上,30 °C 静置培养 7 d 待其产孢,将孢子

表1 本研究所用引物  
Table 1 Primers used in this study

引物	序列 5'-3'
ParmL(SR) F1	AGGTCGACGCTATCGATAAGCTTGATATCGGCGCCCGCGTCAATGGGTTGGCGTAGCG
ParmL(SR) R1	CCAACCGGGGGGTCAGTCTAGTCAATTCTATGTCTGATTTGGGTTTCAGC
PpyrG(SR) F1	CTGAAACCCAAATCAGACATAGAATTCGACTAGACTGACCCCGCGTTGG
PpyrG(SR) R1	GTACAACATCAGAACCCGTCATCCAATGCATCCAAACCATCCTACC
ParmR(SR) F1	GGTAGGATGGTTTGGATGCAGTTGGATGACGGGTTCTGATGTTGTAC
ParmR(SR) R1	TCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGCGGCGCCGCCCATGCGCGCCGTCG
Pcbh1P(SR) F1	TGAGCGCGGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGATATCTAGAGTTGTGAAGTCGG
Pcbh1P(SR) R1	GCACAATACGACTCCGGCGCTGGCCGATGCGCAGTCCGCGTTGACTATT
Pere1(SR) F1	AATAGTCAACCGCGACTGCGCATCGGCCAGCGCGGAGTCGTATTGTGC
Pere1(SR) R1	TTGAAGCCCGTACGAAAGCCGAATTTCTTAGGTACCATGCTTGCCAAGCGGCAAATC
Pere1(SR) F2	TTAA GGTACC GGCCAGGGTGTTCGGGTTCTCG
Pere1(SR) R2	TATA GAATTC CCAGCGCCGAGTCGTATTGTGC
Pcbh2t(SR) F1	GATTTGCCGCTTGGCAAGCAT GGTACCTAAGAATTCGGCTTTCGTGACCGGGCTTCAA
Pcbh2t(SR) R1	CGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAG TGGGTATGGTTTCCACGTGCAC
Pcbh1P(SR) F3	CTGAAACCCAAATCAGACATAATATCTAGAGTTGTGAAGTCGG
Pcbh2t(SR) R3	CGGGACGAGGGGCCCAACCGGGGGGCTCAGTCTAGTCTGGGTATGGTTTCCACGTGCAC
ParmLF2	GGTCAATGGGTTGGCGTAGCGAAAGGCC
PpyrGR2	GCCAGATAATACCTACCCAGTCAGACC
Pcbh2tF2	GGCTTTCGTGACCGGGCTTCAAACAATG
ParmR R2	CCCCATGCGCGCCCGTCGACGGCGCTCCCGGCCCATGCGCGCCCGTCG
YZ-pyrGR	GCAGAAATAGGGTGAATGATACACAC
q-actinF	TGAGAGCGGTGGTATCCACG
q-actinR	GGTACCACCAGACATGACAATGTTG
q-cre1F	GACAAGGCTTTCACCGCCTGGAGC
q-cre1R	GTGTATCCTCGAGTGCCTCGTCAGC

刮下并接种于 100 mL MM-glucose 培养基中, 30 ℃、180 r/min 振荡培养过夜。在 12 层纱布上过滤收集萌发的菌丝, 加入 10 mg/mL 的 Lysing enzymes (购自 Sigma 公司), 在 30 ℃ 消化 1~2 h。收集原生质体, 将 armL-cbh1p-cre1r-cre1f-cbh2t-pyrG 和 cbh2t-pyrG-armR 片段混合, 以 PEG 介导的原生质体转化法将两种 DNA 同时转入里氏木霉 TU6ΔtKU70 菌株。每微克 DNA 可获得约 10 个转化子, 转化子中同时含有两种 DNA 的转化子的转化效率为 80%。

1.2.3 重组转化子的筛选 转化子在含 1 mol/L 山梨醇的 MM-glucose 琼脂培养基上生长和选择。7 d 后, 挑取单个克隆, 接种于 MM-glucose 培养基上进行再次生长、选择。挑取单克隆接种于 PDA 平板上, 30 ℃ 培养 5~6 d。取部分菌丝, 用 UniversAll-tissue extraction PCR kit (YEASTERN, Taipei, Taiwan) 提取基因组 DNA, 通过 PCR 验证 cre1 基因是否转入以及两片段是否发生重组并成功整合到里氏木霉基因组。PCR 所用引物为 Pcbh1P(SR) F1/YZ-pyrGR (表 1)。

1.2.4 转化子的诱导培养 将出发菌株 TU6ΔtKU70 的孢子和各转化子的孢子, 接种 2.0 mL  $1 \times 10^7$ /mL 的孢子于 100 mL MM-glucose 培养基中。30 ℃、180 r/min 振荡培养 1 d。将菌丝用 12 层纱布过滤, 收集菌丝并用大量无菌水冲洗, 以去除残余的葡萄糖。

称取等量 (900 mg) 的菌丝, 接种于 100 mL MM-Avicel 液体培养基中, 出发菌株和每个转化子均做 3 个平行。30 ℃、180 r/min 振荡培养 7 d 以诱导纤维素酶的生产。从第 3 d 开始, 每 12 h 收集发酵液, 储存于 4 ℃ 冰箱备用。

1.2.5 纤维素酶活测定 纤维素酶滤纸酶活的测定: 纤维素酶的滤纸酶活 (FPase activity) 采用 Whatman 一号滤纸, 参照 IUPAC 标准方法进行测定。滤纸酶活的单位定义为: 1 mL 液体酶, 在 50 ℃、pH4.8 的条件下, 每小时水解滤纸底物, 产生 1 mg 还原糖 (以葡萄糖计) 所需要的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

外切纤维素酶活的测定: 用 4-methylumbelliferyl-β-D-cellobioside (MUC, Sigma) 作底物, 称取 45 mg MUC, 溶于 3 mL DMSO (Sigma), 再将其转移到 42 mL 柠檬酸缓冲液 (pH5.2, 20 mmol/L) 中。将 25 μL 适当稀释的酶液和 250 μL MUC、25 μL 葡萄糖 (1 mol/L) 混合, 此为不加纤维二糖实验组。在混合溶液中, 葡萄糖会抑制 BG 降解 MUC, 因此, 测得的活性实际为 CBH1 和 EG 的活性。同时设加纤维二糖实验组: 25 μL 酶液和 200 μL MUC、25 μL (50 mmol/L) 纤维二糖和葡萄糖于 50 ℃ 反应 10 min。加入纤维二糖会抑制 CBH 的活性, 因此测得的是 EG 的活性, 于 50 ℃ 反应 10 min。加入 250 μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mmol/L), 于

370 nm 测定吸光度。将不加纤维二糖实验组 OD 值减去加纤维二糖实验组,即为外切纤维素酶较为特异的活性。一单位的外切纤维素酶酶活定义为每秒催化 1 nmol/L MUC 水解所需要的酶量。

内切纤维素酶酶活测定:采用 1% 羧甲基纤维素钠(CMC)作为底物进行测定。取酶液 62.5  $\mu$ L,加入到 175  $\mu$ L 磷酸-柠檬酸钠缓冲液(0.05 mol/L、pH4.8)配制的 CMC 中,加水定容到 250  $\mu$ L。50  $^{\circ}$ C,反应 1 h,测定酶活力。CMC 酶活的单位定义为:1 mL 液体酶,在 50  $^{\circ}$ C、pH4.8 的条件下,每小时水解羧甲基纤维素钠,产生 1 mg 还原糖(以葡萄糖计)所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

$\beta$ -葡萄糖苷酶酶活的测定:用 pNP-Glucose (pNPG)为底物,取 0.24 g pNPG 用蒸馏水定容到 50 mL,得到 16 mmol/L 的 pNPG 为底物。使用前 -20  $^{\circ}$ C 避光保存。取 50  $\mu$ L 已稀释的酶液,加入 15.625  $\mu$ L pNPG 和 125.5  $\mu$ L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH5.0)用水定容到 250  $\mu$ L,pNPG 终浓度为 1 mmol/L,振荡混匀。50  $^{\circ}$ C 水浴保温 1 h,迅速冷却向各试管中加入 750  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  试剂,再向空白中补加 50  $\mu$ L 酶液,混合均匀。以 0 号管为参比,测定 540 nm 的吸光度。 $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活的单位定义为:1 mL 液体酶,在 50  $^{\circ}$ C、pH5.0 的条件下,每小时水解 pNPG,产生 1 mg 还原糖(以葡萄糖计)所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

对出发菌株 TU6 $\Delta$ tKU70 和转化子,经预实验测定酶活,发现在 4.5 d 时纤维素酶的酶活最高。因此,选取 4.5 d 的发酵液,分别测定总体纤维素酶酶活(滤纸酶酶活)及各分解酶酶活包括内切纤维素酶酶活(CMC 酶活)、外切纤维素酶 CBHI 的酶活以及  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活(BG 酶活)。

1.2.6 cre1 的转录丰度测定 出发菌株与重组菌株先接种 2.0 mL  $1 \times 10^7$ /mL 的孢子于 100 mL MM-glucose 培养基中。30  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 1 d。称取等量湿重(900 mg)的菌丝,接种于 100 mL MM-纤维素液体培养基中,30  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 2 d 以诱导纤维素酶的生产。收集诱导后第 2 d 的菌丝,在滤纸上压干菌丝,进行研磨并提取总 RNA。将所提取总 RNA 用 ReverTra Ace- $\alpha$ -试剂盒(TOYOBO,日本)处理,将其中的 mRNA 反转录为 cDNA。设计引物,以 actin 基因作为内参,q-cre1F/q-cre1R 为引物(表 1),1  $\mu$ g cDNA 为模板,按 TransStart Tip Green qPCR SuperMix(全式金.北京)试剂盒进行操作,比较转化子和对照株中 cre1 转录物的相对丰度。

### 1.3 数据处理方法

所有结果均采用 Excel 和 SPSS16.0 版统计软件中 One-Way ANOVA 过程进行方差及其显著性分析, $p < 0.05$  表示差异显著, $p < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 pCre1-i 质粒构建及重组子的鉴定

按 1.2.1 的方法,构建了 pCre1-i 质粒(图 1),并通过 Not I 酶切验证重组质粒是否构建成功(图 3A)。通过 ParmLF2/PpyrGR2 和 Pcbh2tF2/ParmR2

(表 1)引物对从重组质粒 pCre1-i 扩增获 armL-cbh1p-cre1r-cre1f-cbh2t-pyrG 和 cbh1t-pyrG-armR 片段,将两个片段共转化里氏木霉 TU6 $\Delta$ tKU70(图 2)。所采用的宿主菌为 ku70 基因敲除株,并且用于转化的两个片段间设计了 1 kb 的重叠片段,因此,预期两个片段可以重组在一起,并在左、右重组臂(armL 和 armR)的介导下,整合到里氏木霉基因组的 ku70 座位上。cbh1 启动子驱动含反、正 cre1 基因片段的转录,mRNA 在细胞内形成发夹状 RNA 并在 Dicer 的作用下形成小分子 RNA 并最终使降解目的基因 cre1 的 mRNA 降解(图 2)。设计一对引物 Pcbh1P(SR)F1 和 YZ-pyrGR(表 1),PCR 验证是否 armL-cbh1p-cre1 反-cre1 正-cbh2t-pyrG 和 cbh2t-pyrG-armR 片段已成功整合(图 3B)。从图 3B 可以看出,六个转化子均有 3 kb 左右的特异扩增条带,与预期条带大小一致,而以出发菌株做模板则没有此条带,说明两个 DNA 片段已经成功转入里氏木霉 TU6 $\Delta$ tKU70 并整合在一起。

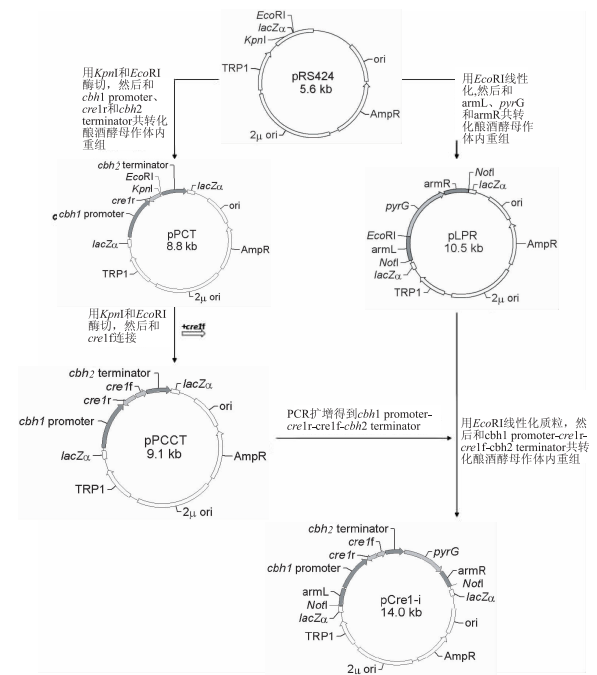


图 1 pCre1-i 质粒构建示意图

Fig.1 The diagram for pCre1-i plasmid construction

### 2.2 纤维素酶活测定

经预实验,从 6 个转化子中选择一株酶活最高的 2 号转化子进行详细的纤维素酶酶活测定。分别以滤纸、CMC、MUC 和 pNPG 为底物测定出发菌株和 2 号转化子的总体纤维素酶酶活、内切纤维素酶酶活、外切纤维素酶 CBHI 酶活以及  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活。从图 4 可看出,2 号转化子的总体纤维素酶酶活是 TU6 $\Delta$ tKU70 的 1.3 倍,说明转化子较出发菌株,其纤维素酶酶活有显著提高。与出发菌株相比,该转化子的内切纤维素酶活性提高极为显著,为出发菌株的 1.8 倍(图 4)。外切纤维素酶 CBHI 活性也有一定程度的提高,2 号转化子的 CBHI 酶活是出发菌株的 5.6 倍(图 4)。但对  $\beta$ -葡萄糖苷酶而言,转化子的酶活与 TU6 $\Delta$ tKU70 相比下降了 65%(图 4)。

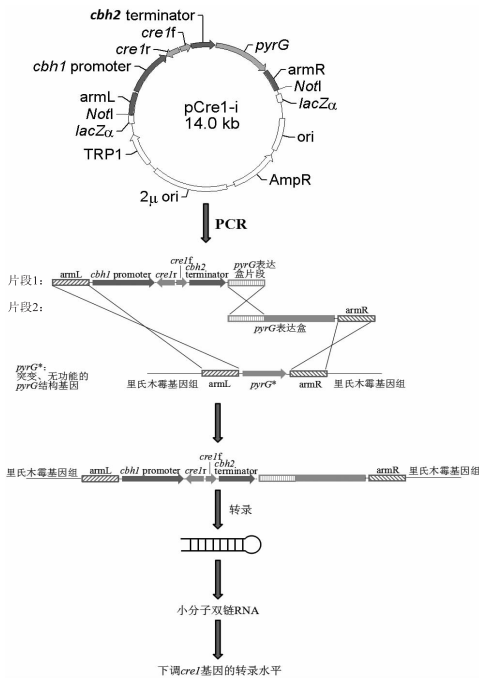


图2 通过 RNAi 抑制里氏木霉 *cre1* 的表达示意图  
Fig.2 The schematic diagram of inhibiting *cre1* expression by RNAi

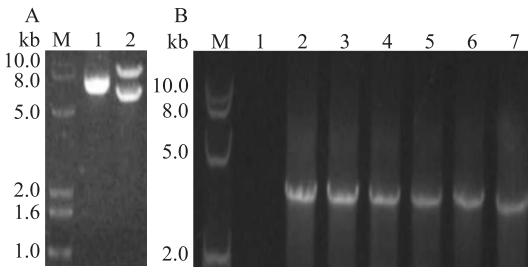


图3 PCR 鉴定目的片段是否插入里氏木霉基因组  
Fig.3 Identification of positive *Trichoderma reesei* transformants with the target fragment by PCR

注:A:pCre1-i 质粒酶切验证。M:DNA 分子量标准;1:未酶切 pCre1-i 质粒;2:Not I 酶切后的 pCre1-i 质粒。B:PCR 验证 RNAi 片段重组入里氏木霉基因组。M:DNA 分子量标准;1:出发菌株 TU6ΔtKU70;2-7:各转化子。

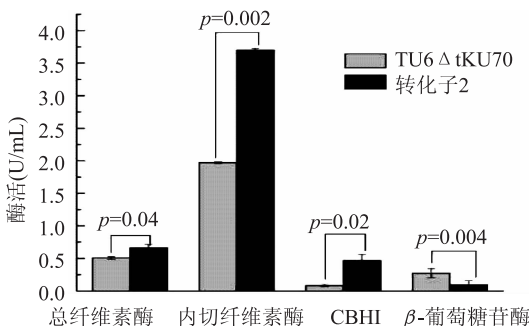


图4 转化子 2 与出发菌株 TU6ΔtKU70 酶活比较  
Fig.4 Comparison of enzyme activities of Transformant No.2 with those of the parent strain TU6ΔtKU70

### 2.3 *cre1* 的表达差异研究

将出发菌株和转化子取等量湿重菌丝,用

MM-纤维素培养基 30 °C 诱导表达。提取 48 h 的 RNA 并反转获得 cDNA,通过荧光定量 PCR (q-PCR),以 *actin* 基因为内参,对 *cre1* 转录水平进行监测。荧光定量 PCR 结束后,通过 IQ5 软件自动分析得出目的基因和内参基因的 Ct 值,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法,比较转化子和对照株中 *cre1* 基因的相对转录丰度。结果显示,与 TU6ΔtKU70 相比,转化子 *cre1* 表达量下降了 43% (图 5)。这说明正如预期的一样,*cre1* 的表达得到了一定程度的抑制,从而提高了里氏木霉生产纤维素酶的能力。

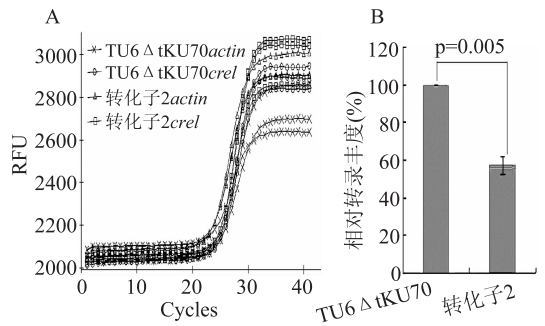


图5 出发菌株 TU6ΔtKU70 与转化子 2 中 *cre1* 的转录丰度比较

Fig.5 Comparison of the transcript abundance of *cre1* between the parent strain TU6ΔtKU70 and Transformant No.2

注:A:*cre1* 和看家基因 *actin* 的扩增曲线。B:*cre1* 的转录丰度比较。

### 3 结论与讨论

据报道,目前已经有 30 多种丝状真菌中可以应用 RNA 干扰技术<sup>[12]</sup>,这种技术对于某些重要的管家基因的功能研究来讲是一种很理想的工具,在里氏木霉里也曾经得到过成功应用。例如,将 *cbh1* 基因的表达进行 RNAi 的抑制,可以提高外源基因黑曲霉脂酶在里氏木霉里的分泌表达<sup>[13]</sup>。通过 RNAi,成功将 *cre1* 基因的表达进行下调,证明 RNAi 可用于对转录因子的调控。相应的,与出发菌株相比,2 号转化子的总体纤维素、内切纤维素酶和外切纤维素酶的酶活均有明显的提高,将有利于纤维素酶在食品工业更为广泛和深入的应用。其中,CBHI 的活性提高了 5.6 倍。有意思的是, $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性下降了。里氏木霉的  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性来自于 *bgl1* 基因,和 *cbh1* 启动子有 4 个功能性的 *cre1* 结合位点不同,虽然 *bgl1* 启动子上也有 1 个可能的 *cre1* 结合位点,但看起来 *bgl1* 的表达并不受 *cre1* 基因的调节抑制,这也许可以解释在 2 号转化子中, $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性的原因。

在构建 RNAi 载体时,我们选用了 DNA assembler 的方法<sup>[11]</sup>,在酿酒酵母 AH109 中,进行体内重组以将各目的片段拼接起来。与常规依赖于限制性酶切和连接酶连接不同,它是利用同源重组的方法使具有同源末端的片段连接起来,能够实现同时对多个片段的连接,大大提高了构建复杂、含多个基因片段载体的效率。另外,我们在构建好质粒载体 pCre1-i 后,通过 PCR 将 *cre1* 基因的 RNAi 盒以及

两侧的同源重组臂分作两个片段 PCR 扩增出来,并同时转化里氏木霉,获得了在里氏木霉细胞内两个片段重组在一起的菌株。因此,这还为以后将多个基因片段(如合成生物学研究中的代谢途径中的多个基因)转化入里氏木霉里并在其中进行同源重组打下了良好的基础。

### 参考文献

- [1] 赵国萍,李迎秋.纤维素酶的研究进展及其在食品工业的应用[J].山东食品发酵,2015,(2):37-40.
- [2] 张加春,王权飞,余尊祥.里氏木霉的纤维素酶产生条件研究[J].食品与发酵工业,2003,(03):21-23.
- [3] Su X, Schmitz G, Zhang M, et al. Heterologous gene expression in filamentous fungi[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2012, 81(1):1-61.
- [4] 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.
- [5] Hakkinen M, Arvas M, Oja M, et al. Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates [J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11:134.
- [6] Strauss J, Mach RL, Zeilinger S, et al. The carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei* [J]. *FEBS Letters*,

1995, 376(1-2):103-107.

- [7] 苏小运.嵌合体转录激活因子增强里氏木霉的纤维素酶、半纤维素酶和其它基因转录的研究.[D]北京:中国科学院博士论文,2009.
- [8] 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 [J]. *Eukaryotic Cell*, 2011, 10(2):262-271.
- [9] Su X, Qin L, and Dong Z. Chapter 15-RNAi-Mediated Gene Silencing in *Trichoderma*: Principles and Applications// *Biotechnology and Biology of Trichoderma* [M]. Waltham, USA: Elsevier, 2014:215-226.
- [10] Guangtao Z, 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.
- [11] Shao Z, Zhao H. DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(2):e16.
- [12] Kuck U, Hoff B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(1):51-62.
- [13] Qin L, Cai F, Dong X, et al. Improved production of heterologous lipase in *Trichoderma reesei* by RNAi mediated gene silencing of an endogenous highly expressed gene [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 109:116-122.

(上接第 178 页)

- [25] Fregapane G, Rubio-Fernandez H, Salvador M D. Influence of fermentation temperature on semi-continuous acetification for wine vinegar production [J]. *European Food Research and Technology*, 2001, 213(1):62-66.

(上接第 184 页)

- Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus* [J]. *Food Microbiol*, 2012, 30(2):355-361.
- [43] Wang J, Guo Z, Zhang Q, et al. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage [J]. *Journal of Dairy*

- [26] Xu W, Huang Z, Zhang X, et al. Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28:1175-1181.

*Science*, 2009, 92(6):2468-2476.

- [44] 侯保朝,葛红娟,赵建云,等.乳酸菌发酵剂制备发酵乳的特性研究[J].中国乳品工业,2014,42(11):18-21.
- [45] 刘晓恒.大豆蛋白替代牛乳蛋白对酸奶性质的影响[D].无锡:江南大学,2013.

(上接第 188 页)

- [8] 吴大成,孙洋,袁洁,等.双抗夹心 ELISA 检测肠出血性大肠杆菌 O157 方法的建立[J].中国兽医学报,2011,12(31):1745-1748.
- [9] 刘红亮,李克生,陈学忠,等.大肠杆菌 O157 LPS 单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2011,41(12):1260-1265.
- [10] 黄海燕,陈萍,陈亮,等.出血性大肠杆菌 O157 主要毒力因子单克隆抗体的制备[J].中国人兽共患病学报,2009,25

(2):122-126.

- [11] Nyquist-Battle C, Freeman L, Soberano J P, et al. Effects of chlorine injury, starvation, and Colitag (TM) enrichment on sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sELISA) detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2007, 28(4):371-383.
- [12] 刘运保.操作因素对 ELISA 检测结果的影响[J].公共卫生与预防医学,2005,16(4):56-57.