



敲除 *Spt7* 对黑曲霉生长及菌落形态的影响

王一川¹, 张香香¹, 王静然¹, 王德培^{1,3}, 薛鲜丽^{1,2*}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300450

2 天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300450

3 天津科技大学 天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心, 天津 300457

王一川, 张香香, 王静然, 王德培, 薛鲜丽. 敲除 *Spt7* 对黑曲霉生长及菌落形态的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 855-867.

WANG Yichuan, ZHANG Xiangxiang, WANG Jingran, WANG Depei, XUE Xianli. Effects of *Spt7* knockout on growth and morphology of *Aspergillus niger*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 855-867.

摘要: 在酵母中 *Spt7* 作为一种多功能蛋白复合物 Spt-Ada-Gcn5-乙酰转移酶(Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase, SAGA)复合体的核心蛋白, 其不仅负责维持 SAGA 复合物的稳定, 还负责细胞内 10% 以上的基因转录。除此之外, 丝状真菌中关于 *Spt7* 功能的研究很少。【目的】探究 *Spt7* 在黑曲霉 *Aspergillus niger* CGMCC 1062 中的功能。【方法】以黑曲霉 *A. niger* CGMCC 1062 为出发菌株, 通过农杆菌转化法将敲除 *spt7* 基因的质粒转入黑曲霉中; 并分别将 $\Delta spt7$ 菌株与对照组点种在 CM 培养基、不同碳源及含 H_2O_2 培养基上进行生长观察; 通过实时定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 分析糖酵解关键基因、产孢相关基因的相对转录水平。【结果】成功获得 *spt7* 基因敲除菌株 $\Delta spt7$; 通过实验发现 $\Delta spt7$ 菌株较对照菌株生长缓慢、菌落变白且产孢延迟; *spt7* 基因的敲除显著影响菌株对不同碳源的利用; 但 $\Delta spt7$ 菌株同对照组均能在 20 mmol/L H_2O_2 的平板上正常生长。 $\Delta spt7$ 菌株中糖酵解关键酶 *fbp*、*pfk*、*trk*、*pks*、*fda* 和 *gsdA* 基因的转录水平较对照组分别下调了 2.65、4.46、6.05、4.90、3.20 和 3.20 倍; 产孢相关基因 *wetA*、*abaA* 和 *brlA* 的转录水平相较于对照组分别下调了 529.93、172.40 倍和 9.61 倍。【结论】*spt7* 基因的缺失影响菌株的正常生长、菌落形态及分生孢子产生。

关键词: 黑曲霉; 基因敲除; $\Delta spt7$ 菌株; 菌落形态; 抗氧化胁迫

资助项目: 国家自然科学基金(31902193)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31902193).

*Corresponding author. E-mail: xuexianli@tust.edu.cn

Received: 2022-07-03; Accepted: 2022-10-21; Published online: 2022-11-01

Effects of *Spt7* knockout on growth and morphology of *Aspergillus niger*

WANG Yichuan¹, ZHANG Xiangxiang¹, WANG Jingran¹, WANG Depei^{1,3}, XUE Xianli^{1,2*}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300450, China

2 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology (Ministry of Education), Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300450, China

3 Tianjin Engineering Center for Microbial Metabolism and Fermentation Process Control Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: As the core protein of a multifunctional protein complex Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) in yeast, Spt7 is not only responsible for maintaining the stability of the SAGA complex, but also responsible for the transcription of more than 10% of genes. However, there were few studies on the functions of Spt7 in filamentous fungi. **[Objective]** To investigate the effects of Spt7 on *Aspergillus niger* CGMCC 1062. **[Methods]** In this study, the plasmid with *spt7* gene knockout was transferred into *Aspergillus niger* CGMCC 1062 by *Agrobacterium tumefaciens* transformation method. The colony morphology of $\Delta spt7$ strain and control group was observed, which grew on CM medium, different carbon sources, and H₂O₂-containing mediums. The relative transcription levels of glycolysis key genes and sporin-producing related genes were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). **[Results]** The $\Delta spt7$ strain was successfully obtained. It was found that the growth of $\Delta spt7$ strain was slow, the colony became white, and the sporulation was delayed. The knockout of the *spt7* gene significantly affected the use of different carbon sources by the strain. However, $\Delta spt7$ strain and the control group grew normally on the plate with 20 mmol/L H₂O₂. The transcriptional levels of *fbp*, *pfk*, *trk*, *pks*, *fda*, and *gsdA* genes in the $\Delta spt7$ strain were 2.65 times, 4.46 times, 6.05 times, 4.90 times, 3.20 times, and 3.20 times lower than those in the control group, respectively. The transcriptional levels of *wetA*, *abaA*, and *brlA* were down-regulated by 529.93 times, 172.40 times, and 9.61 times, respectively, as compared with the control group. **[Conclusion]** The deletion of *spt7* gene affects the normal growth, colony morphology, and conidial production of the strain.

Keywords: *Aspergillus niger*; gene knockout; $\Delta spt7$ strain; colony morphology; anti-oxidative stress

黑曲霉是一种自然界中广泛存在的腐生真菌，多见于植物、粮食和土壤中；其是工业化生产中常用的微生物之一，在工业酶制剂、有机酸生产等方面具有广泛应用。在 2007 年前后，

3 株黑曲霉菌株基因组的公布，将黑曲霉的研究推入后基因组时代^[1]。对黑曲霉某些基因的敲除与过表达是现在验证黑曲霉基因功能比较常用的方法。

Spt-Ada-Gcn5-乙酰转移酶(Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase, SAGA)复合体是一种多蛋白复合物,是一个多亚基保守的转录辅助因子,主要负责体内 10%以上的基因转录^[2]。目前发现 SAGA 复合体由至少 20 个蛋白组成^[3],以酵母 SAGA 复合物为例:它是由 20 个亚基组成,在结构上可分为 4 个不同的模块:双歧化(double disproportionated, DUB)模块;由 Gcn5、Ada2、Ada3 和 Sgf29 组成组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)模块;TATA 结合蛋白(TATA binding protein, TBP)相关因子(TATA binding protein associated factors, TAF)模块;以及由 Spt3、Spt8、Tra1、Spt20、Spt7 和 Ada1 组成 Ty(SPT)模块。其中 Spt7 是构成 SAGA 复合体的核心结构之一,它在维持 SAGA 复合体结构的稳定方面发挥重要作用。Spt7 参与调节 Spt20 和 Adal 的水平,并且含有 Spt7 的部分 SAGA 复合物可以在 Spt20 和 Adal 都不存在的情况下组装^[4]。SAGA 作为一类多功能蛋白复合物,通过对组蛋白进行乙酰化^[5]和去泛素化^[6]修饰,实现染色质结构在沉默与活跃状态之间的转换,为基因转录起始创造了合适的遗传条件。缺失 *spt7* 基因的细胞可以存活,但生长缓慢,并呈现多种表型如肌醇营养不良、细胞形态发生改变、产孢缺陷以及 Ty 元素的转录改变^[7]。

目前有关 Spt7 的报道仅集中于真菌酵母中,缺失 *spt7* 会对生长发育有影响。本课题组在研究转录调控因子相关工作中发现真菌黑曲霉(*Aspergillus niger* CGMCC 1062)中 *veA* 及 *laeA* 基因也对其生长发育有很大影响,而且对毒素合成也具有调控作用。缺失 *VeA* 或 *LaeA* 的菌株与野生型相比其菌落直径与产孢量都显著降低,且真菌毒素 OTA、OT α 及 OT β 的含量极大减少^[8]。除此之外,本课题组构建了一株过表达 Spt7 的菌株,并发现 OEspt7 转化子较原始菌株菌丝生

长更旺盛,菌丝分支增多且分支变短,菌体产孢延迟但产孢增多。于原始菌株相比, OEspt7 转化子的过氧化氢耐受性、高温耐受性及高渗耐受性均明显增强^[2]。

针对 Spt7 的研究源于本实验室在实验过程中发现一株黑曲霉突变株与原始菌株(*A. niger* CGMCC 10142)的菌落形态呈现极大的差异性,突变菌株菌落聚缩,生长迟缓,且不形成黑色分生孢子,经基因组重测序发现其 *spt7* 基因被破坏。为探索 Spt7 功能,本研究以黑曲霉 *A. niger* CGMCC 1062 为出发菌株,利用同源重组敲除 *spt7* 基因,通过观察其在不同培养基上的表型与野生型的差异,并分析糖酵解及菌株形态调控关键基因的转录水平,推测 Spt7 在黑曲霉 *A. niger* CGMCC 1062 中的功能。

1 材料与方法

1.1 菌种

黑曲霉(*A. niger* CGMCC 1062)由江苏国信协联能源有限公司天津分公司保藏。大肠杆菌 DH5 α 和根癌农杆菌 AGL1: 采购于中国普通微生物菌株保藏管理中心,由天津科技大学生物工程学院生化过程与技术研究室保藏。

1.2 试剂

试剂:无水葡萄糖、酵母粉、胰蛋白胨,天津市北方天医试剂公司;磷酸二氢钾、磷酸氢二甲、硫酸镁、硫酸铵、氯化钙、氯化钾、五水合硫酸铜、七水合硫酸亚铁、氢氧化钠、硫酸锰、硼酸、六水合氯化钴、苯酚、氯仿、七水合硫酸锌、冰乙酸、甲醇、氯化钠、氢氧化钾、无水乙醇、甘油、乙酰丁香酮、潮霉素、氨基青霉素、卡那霉素(均为分析纯),北京市索莱宝科技有限公司;限制性内切酶 *Bam*HI (15 U/ μ L),宝日生物技术有限公司;真菌 RNA 提取试剂盒 (50 T),北京酷来博科技有限公司;DL5000 DNA

Marker、快速 DNA 聚合酶(5 U/μL)、RNA 反转录试剂盒 HiScript III RT Super Mix for qPCR (+Gdna wiper) (100 rxn)和 qRT-PCR 试剂盒 ChamQ UniversalSYBR qPCR Master Mix (500 rxns), 南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.3 培养基

LB 培养基: 1% NaCl, 0.5%酵母粉, 1%胰蛋白胨; 电转根癌农杆菌筛选培养基: LB 培养基添加 0.012%卡那霉素; CM 培养基: ASP+N-母液 2%、葡萄糖 1%、1 mol/L MgSO₄母液 0.2%、酪蛋白水解物 0.1%、酵母浸出物 0.5%; 根癌农杆菌介导的转化初步筛选培养基: CM 培养基添加 0.025%潮霉素。

1.4 仪器和设备

LRH-250A 生化培养箱购自韶关市泰宏医疗器械有限公司; WXL-A30002 电子天平购自北京赛多利斯仪器系统有限公司; ChampGel5000 全自动凝胶成像仪购自北京赛智创业科技有限公司; Eppendorf PCR 仪购自上海恒久医疗器械有限公司; CX23 型光学显微镜购自 OLYMPUS 公司; 实时荧光定量 PCR 仪(SteponePlus)购自 ABI 公司, 由天津科技大学生物工程学院分析测试中心保存。

1.5 *Spt7* 敲除质粒的构建

以 *A. niger* CGMCC 1062 基因组为模板,

PCR 扩增 *spt7* 上游同源臂 *spt7F*、*hyg* 和 *spt7* 下游同源臂 *spt7R*。p44 质粒用 *Bam*HI, *Pst*I 双酶切后与片段 *spt7F*、*hyg* 和 *spt7R* 在连接酶的作用下得到重组质粒 p44-Δ*spt7*。将质粒 p44-Δ*spt7* 热激转化至大肠杆菌, 以大肠杆菌菌液为模板, 以 1'YZ-*spt7*-F 和 1'YZ-*hyg*-R 为上下游引物验证质粒敲除框全长并测序验证。构建质粒所用引物见表 1。

1.6 根癌农杆菌 AGL1 介导转化 *A. niger* CGMCC 1062

将 p44-Δ*spt7* 质粒电转至农杆菌 AGL1 感受态细胞, 根据文献所述方法[9]孵育农杆菌。将农杆菌与 *A. niger* CGMCC 1062 新鲜孢子置于 IM 固体培养基硝酸纤维膜上, 25 °C 避光共培养 48 h。之后用无菌生理盐水将黑曲霉孢子从膜上洗到初筛培养基上 28 °C 培养 2 d, 直到转化子出现。再将初筛板上的菌落挑到复筛培养基上 28 °C 培养 2 d, 将正常生长的转化子提基因组及 PCR 验证。

1.7 敲除 *spt7* 阳性转化子的筛选

将共培养的 *A. niger* CGMCC 1062 孢子用无菌生理盐水洗到初筛培养基上 28 °C 培养 3 d, 再挑转化子到复筛培养基上 28 °C 培养 2 d, 最后挑取转化子进行提基因组验证。用 ll-yz-*spt7*-F 和 rr-yz-*spt7*-R 验证敲除框(*spt7F*-*hyg*-*spt7R*)全

表 1 p44-Δ*spt7* 质粒构建所用引物

Table 1 Primers for plasmid construction of p44-Δ*spt7*

Primer names	Sequences (5'→3')	Description
CZ-HYG-F	AAGAGCGCCGACTGGATCCTCCAGGCGGATCA	Amplification fragment <i>hyg</i>
CZ-HYG-R	GCAGACCTTTCGCGTTTCTATTTCTTTGCCCTCGGACG	Amplification <i>spt7</i> left arm sequence
CZ- <i>spt7</i> F-F	TATGACCATGATTACGAATTCCTCCATGATGCGCGGTCT	Amplification <i>spt7</i> right arm
CZ- <i>spt7</i> F-R	AGGATCCAGTCGCGCTCTTCTGCC	sequence
CZ- <i>spt7</i> R-F	TAGAAACGCGAAAGGTCTGCTCG	Validation of 1062-Δ <i>spt7</i> strain
CZ- <i>spt7</i> R-R	GCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGTGGTTGGGATTCTGGTC	Validation of p44-Δ <i>spt7</i>
ll-yz- <i>spt7</i> -F	AAAAGGCTCCCTTGATACCCTA	
rr-yz- <i>spt7</i> -R	GGAAATAGCGATCATGGCATT	
1'YZ- <i>spt7</i> -F	CAGGTGGAAG CGGAAATGTC	
1'YZ- <i>hyg</i> -R	CAATAGGTCA GGCTCTCGCTG	

长,并用巢式 PCR 进一步验证 *spt7F-hyg* 长度,同时阳性转化子进行 Southern blotting 分析,以 Hyg-F-P 和 Hyg-R-P 为引物, p44 质粒为模板进行扩增,获得 *hyg* 探针模板, *A. niger* CGMCC 1062 和 $\Delta spt7$ 转化子基因组用 *Hind* III 进行酶切线性化,依次进行低压电泳 3–5 h,转膜,杂交,自显影。

1.8 转化子形态观察

将稀释到 1×10^6 个/mL 的野生型黑曲霉孢子悬液与转化子孢子悬液各取 10 μ L 分别点种到 CM 培养基上;点种在含不同碳源(葡萄糖、木糖、果糖、蔗糖、半乳糖、阿拉伯糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇和乙酸钠)的 CM 培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养 7 d,观察菌株在不同培养基上的生长形态。

1.9 转化子过氧化氢抗性分析

将转化子及野生型孢子制成浓度为 1×10^6 个/mL 的孢子悬液,各取 10 μ L 点种于含有 6、10、15、20 mmol/L H_2O_2 的 CM 培养基平板中央,28 $^{\circ}$ C 静置培养 3 d,观察菌落生长情况。

1.10 实时荧光定量 PCR

将转化子接种于提 RNA 的固体培养基中,在 28 $^{\circ}$ C 静置培养 4 d。用无菌水洗涤 3 遍后用滤纸将菌丝体上的水分吸干,之后将其用液氮冷冻并研磨至粉末状。按照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,参考百迈客生物技术公司 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA,用于相关基因转录水平的测定, *actin* 基因作为内参基因,荧光定量 PCR 试剂选用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(Q311-03Vazyme),在 LightCycler $^{\circ}$ 480 II 型荧光定量 PCR 仪(Roche)上进行测定,数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[10]进行相对定量分析,利用 SPSS 16.0 中 One-way ANOVA 中 DUNCAN's test 方法分析不同组间的差异性, $0.05 < P \leq 0.1$ 、 $0.01 < P \leq 0.05$ 及

$P \leq 0.01$ 分别用“*”、“**”及“***”表示,分别代表组别间存在差异、差异显著及差异极显著。实时荧光定量 PCR 所用引物见表 2。

2 结果与分析

2.1 *spt7* 敲除质粒的构建及转化子筛选

以 *A. niger* CGMCC 1062 基因组 DNA 为模板,分别获得 *spt7* 基因上下游序列 *spt7F* (1 330 bp)、*spt7R* (1 430 bp),以 p44 质粒为模板获得 *hyg* (1 313 bp),通过相应的酶切连接方法构建 p44- $\Delta spt7$ 质粒(图 1A),所构建的重组质粒及 *spt7* 基因敲除的阳性转化子通过巢式 PCR 进行验证(图 1B)。其中 p44- $\Delta spt7$ 质粒上 *spt7* 左臂和 *spt7* 右臂之间的 *HYG* 可以替换 *A. niger* CGMCC 1062 基因组上 *spt7* 基因 935 bp 的片段。

查阅文献[7,11]发现在真菌酵母中 *spt7* 缺失后导致菌落形态发生很大变化,于是作者从 400 多个转化子中筛选到与原始菌株菌落形态存在较大差异的转化子 T-9、T-2、T-1、T-7、T-13、T-10 和 T-8 (图 1C)。通过 PCR 从中筛选到 *spt7* 敲除的菌株 T-7 和 T-10,若转化子为非同源重组即随机插入则会扩增出长度分别为 3 908 bp 和 4 286 bp 的两条带;若为同源重组则只有 4 286 bp,为进一步证明 T-7 和 T-10 为阳性转化子,则以前一步的 PCR 产物为模板,以 1'YZ-*spt7*-F/ 1'YZ-*spt7*-R 引物通过巢式 PCR 扩增出 1 395 bp 的条带(图 1D),选取其中的 T-7 (编号 $\Delta spt7$)进行 Southern blotting 分析^[12]及后续实验。如图 1E 所示,1 泳道和 2 泳道分别为 $\Delta spt7$ 菌株基因组和 *A. niger* CGMCC 1062 基因组被 *Sac* I 线性化后进行的 Southern blotting 分析,3 泳道为 PCR 扩增的 *hyg* 片段,可以杂交出 1 313 bp 的单一一条带, *A. niger* CGMCC 1062 无条带, $\Delta spt7$ 菌株杂交出 2 271 bp 单一的目的条带,说明敲除质粒为单拷贝插入,结合巢式 PCR 验证结果,证明 *spt7* 基因被敲除。

表 2 Southern blotting 及 qRT-PCR 引物
Table 2 Southern blotting and qRT-PCR primers

Target genes	Sequences (5'→3')	Description
<i>hyg</i>	GTGATTTTCATATGCGCGATTG CTATTTCTTTGCCCTCGGAC	Partial fragment of <i>hyg</i> probe was amplified
<i>actin</i>	ACCACCGACTCCCTACTA AGTCAAGAGAGAGATGGGAT	Partial fragment of <i>actin</i> was amplified
<i>pks</i>	AACGGCCAAACTATACCGAT GACGTATAAGAGACCCGGAC	Partial fragment of <i>pks</i> was amplified
<i>pfk</i>	GCCAAGAACATGGTCCTC CCAATTCCTTCAACAGACCG	Partial fragment of <i>pfk</i> was amplified
<i>fda</i>	CCTACGTCAAGGAGAAGACC TTGACCTTGACAACACCGTA	Partial fragment of <i>fda</i> was amplified
<i>fbp</i>	TTGGAGGAACCGTCAATAGG TTTATCTCCGCCATGAAGGG	Partial fragment of <i>fbp</i> was amplified
<i>gsd</i>	GTGAGGGTTGGTGGTGAGTC CCAAACATTCCTGCGAGGC	Partial fragment of <i>gsd</i> was amplified
<i>trk</i>	ACACATACTGCTTCTTCGGT ATTCCGTTGTCGTCGTAGAT	Partial fragment of <i>trk</i> was amplified
<i>pib</i>	GCTTCGGATCGGCAGACATAG CAAGTCACATTCCTCTCCACTT	Partial fragment of <i>pib</i> was amplified
<i>ras</i>	TCGATATACACCGTCTCATCA TTTCCCATCGGAAGCGCCTCCA	Partial fragment of <i>ras</i> was amplified
<i>pepA</i>	GCTTCACCATCAACCAGATT CGGCACTACCCTTGCTG	Partial fragment of <i>pepA</i> was amplified
<i>wetA</i>	TGCAGAACACCTCTGGGAA TGAAGGGTGGTGGGAACAG	Partial fragment of <i>wetA</i> was amplified
<i>abaA</i>	TTGAAACTCGCCCTCGTACT GTGGTGGTGGTAGTAGTAG	Partial fragment of <i>abaA</i> was amplified
<i>brlA</i>	GCTTCGGATCGGCAGACATAG CAAGTCACATTCCTCTCCACTT	Partial fragment of <i>brlA</i> was amplified
<i>spt7</i>	CGGGATCTGTACAAACGCAG ATCCTCAGCGTCATCTTCGT	Partial fragment of <i>spt7</i> was amplified
<i>htmA</i>	CCCATGCCATTGATAACTG AGTTCGTAAACCTGACCCGGT	Partial fragment of <i>htmA</i> was amplified
<i>gpx</i>	CGCCTTCTCAATCTCCTTCA AGCGCATCAAGTGGAACCTT	Partial fragment of <i>gpx</i> was amplified
<i>sod</i>	TTATCGCTCACAATGGCTGCTT GACAGGTCAGGGAGAGTAGC	Partial fragment of <i>sod</i> was amplified
<i>catR</i>	CTTGTACCCGAGTGCCCGTTT GTAATCCGGACCCCTCCTGTTGGG	Partial fragment of <i>catR</i> was amplified
<i>gcn5</i>	AAGCGGCATAAAGCGAACC CGTGTACTCATCGTGATATGG	Partial fragment of <i>gcn5</i> was amplified
<i>ada2</i>	AATTTGACGTGAACCCTCAA GAAGATGGTGGTCCGGAGAA	Partial fragment of <i>ada2</i> was amplified
<i>sch9</i>	ATTGTCGTTGGTCTGGCTTT CCGACAGCCATTTCCCTATC	Partial fragment of <i>sch9</i> was amplified
<i>fluG</i>	AGCGTGAATGATGGCTTG GCCAAGTGAAAGGCTCGATA	Partial fragment of <i>fluG</i> was amplified
<i>flbC</i>	GACGGCATCTTGAGCTAAA AATCTTACGAGAACGGCCAC	Partial fragment of <i>flbC</i> was amplified
<i>flbD</i>	GTTGACCCCGATCTACACAC AAGAAACGGAGTTGTGGTCC	Partial fragment of <i>flbD</i> was amplified
<i>flbE</i>	GAGATGACTTTCCACCCGAC TCTCTCGTCTACCCAACCTC	Partial fragment of <i>flbE</i> was amplified

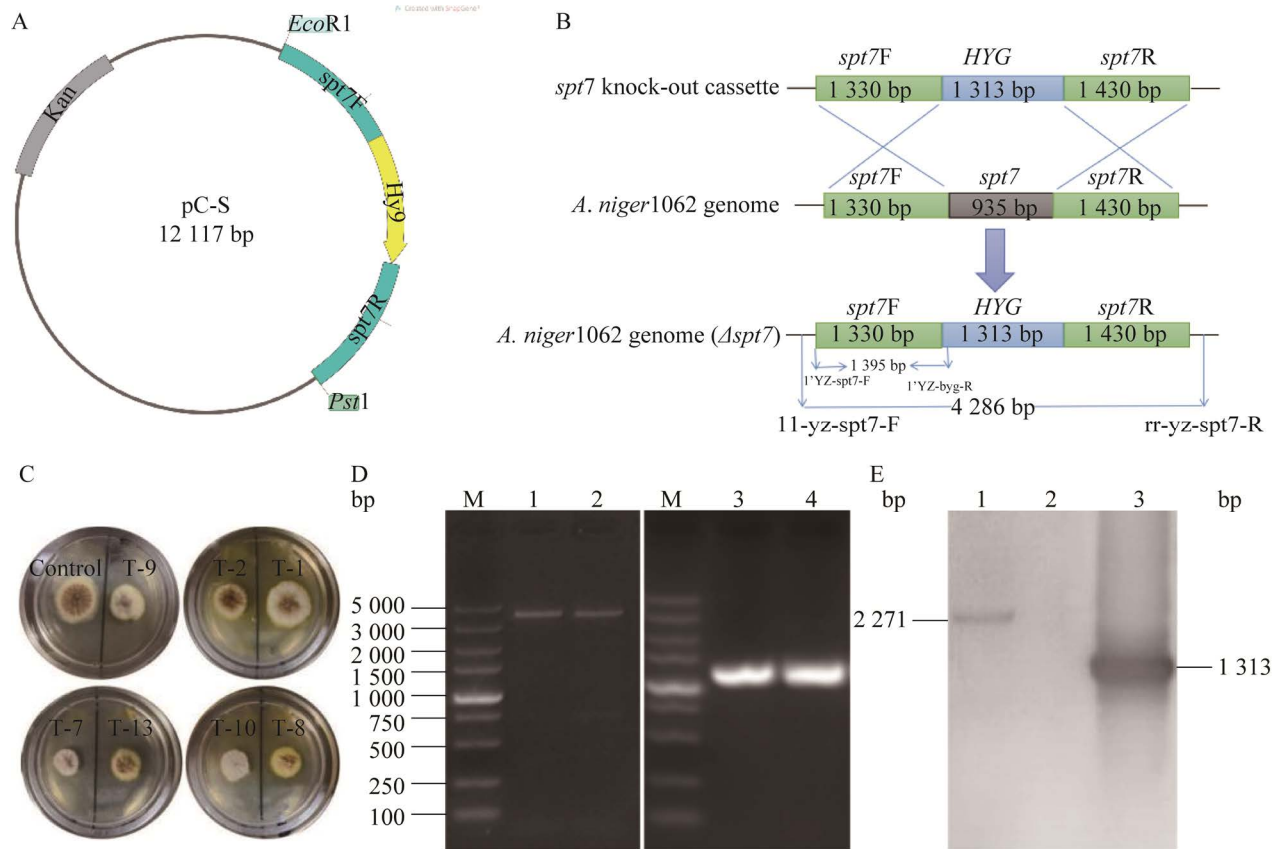


图 1 *spt7* 敲除质粒 p44- $\Delta spt7$ 的构建及阳性转化子的筛选验证

Figure 1 Construction of *spt7* knockout plasmid p44- $\Delta spt7$ and screening and validation of positive transformants. A: Schematic diagram of $\Delta spt7$ knockout plasmid. B: *spt7* knockout schematic diagram. C: Preliminary screening of $\Delta spt7$ positive transformant. D: $\Delta spt7$ positive transformant was inserted *in situ* for PCR verification, and M channel in the figure was DL5000. 1 and 2 were *spt7* left arm to *spt7* right arm of T-7 and T-10, respectively. 3 and 4 are *spt7* left arm to *HYG* validation of $\Delta spt7$ -7 and $\Delta spt7$ -10, respectively. E: 1, 2 and 3 were $\Delta spt7$ strain and *A. niger* CGMCC 1062 genome DNA lined by restrict enzyme *Sac* I, and *hyg* fragment, respectively.

2.2 转化子与野生型的生长形态观察

将转化子与对照组点种在 CM 培养基上观察 7 d, 结果如图 2 所示。与对照菌株相比, $\Delta spt7$

菌株菌落边缘无明显的分散型菌丝, 生长相对缓慢, 且菌体颜色为雪白色, 前期无明显分生孢子形成, 但生长到第 7 天时, 菌体表面开始变为

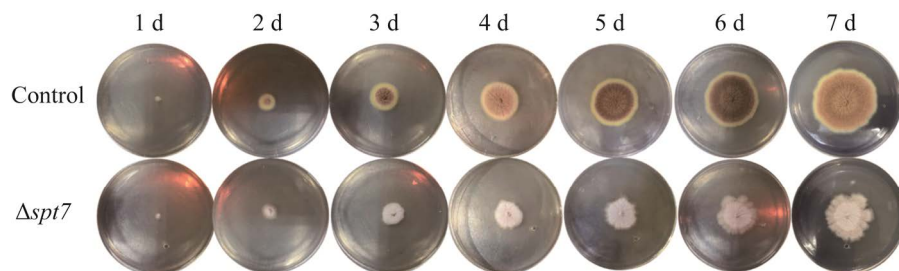


图 2 对照组与 $\Delta spt7$ 菌株的生长形态观察

Figure 2 Growth morphological observation of control group and $\Delta spt7$ strain.

浅灰色，疑似分生孢子。另外， $\Delta spt7$ 菌株从第 5 天开始菌落边缘出现角突变，呈现不规则的菌丝。说明缺失 *spt7* 基因导致菌体生长缓慢，会使分生孢子产生大大延迟且不再产生色素。

2.3 $\Delta spt7$ 菌株对不同碳源利用分析

为研究敲除 *spt7* 基因是否影响菌株对碳源的利用，将 $\Delta spt7$ 及对照菌株点种在不同碳源的培养基上观察 6 d，结果如图 3 所示。第 1 天， $\Delta spt7$ 及对照菌株均已萌发，但 $\Delta spt7$ 菌株萌发的菌落较小。第 3 天，以阿拉伯糖，麦芽糖，乳糖，甘露醇，乙酸钠为碳源时， $\Delta spt7$ 的生长均受到抑制，其中间突起，菌落边缘出现不规则菌丝。在第 6 天时，以果糖为碳源时， $\Delta spt7$ 菌落周围气生菌丝生长较明显，且相对其他培养基，长势最好。乙酸钠作为真菌生长抑制剂， $\Delta spt7$ 及对照菌株以乙酸钠为碳源时生长都很缓慢。

2.4 $\Delta spt7$ 菌株对 H_2O_2 氧化胁迫分析

通过将 $\Delta spt7$ 菌株与对照组菌株孢子分别取 10^4 个孢子悬液依次点种在含有 6、10、15、

20 mmol/L H_2O_2 的 CM 培养基平板中央。28 °C 静置培养 3 d，结果如图 4 所示， $\Delta spt7$ 在接种 1 d 后萌发的速度比对照组快，且从图中可以看出 $\Delta spt7$ 菌株对 H_2O_2 依然保留很高的耐受性，在 20 mmol/L H_2O_2 的培养基上正常生长。

2.5 关键基因 qRT-PCR 分析

2.5.1 Spt7 对 SAGA 复合物中重要亚基的影响

为了检测 Spt7 对 SAGA 复合物中其他亚基的影响，选取关键亚基 Gcn5 和 Ada2 进行转录组分析，如图 5A 所示： $\Delta spt7$ 菌株中 *spt7* 不转录，Gcn5 的转录水平比对照组低了 236 倍；推测敲除 *spt7* 直接影响了 Gcn5，而 Ada2 的转录水平比对照组高了 0.9 倍。

2.5.2 菌体生长相关基因的 qRT-PCR 分析

菌体生长相关基因的 qRT-PCR 分析，如图 5B 所示，相比于对照组， $\Delta spt7$ 菌株的 *ras* 基因转录水平下调 0.69 倍，*sch9* 基因转录水平下调 2 倍；但是 *htmA* 基因上调了 1.5 倍；*atg2* 基因也上调 1 倍。*sch9* 的转录趋势与 *spt7* 相同且下

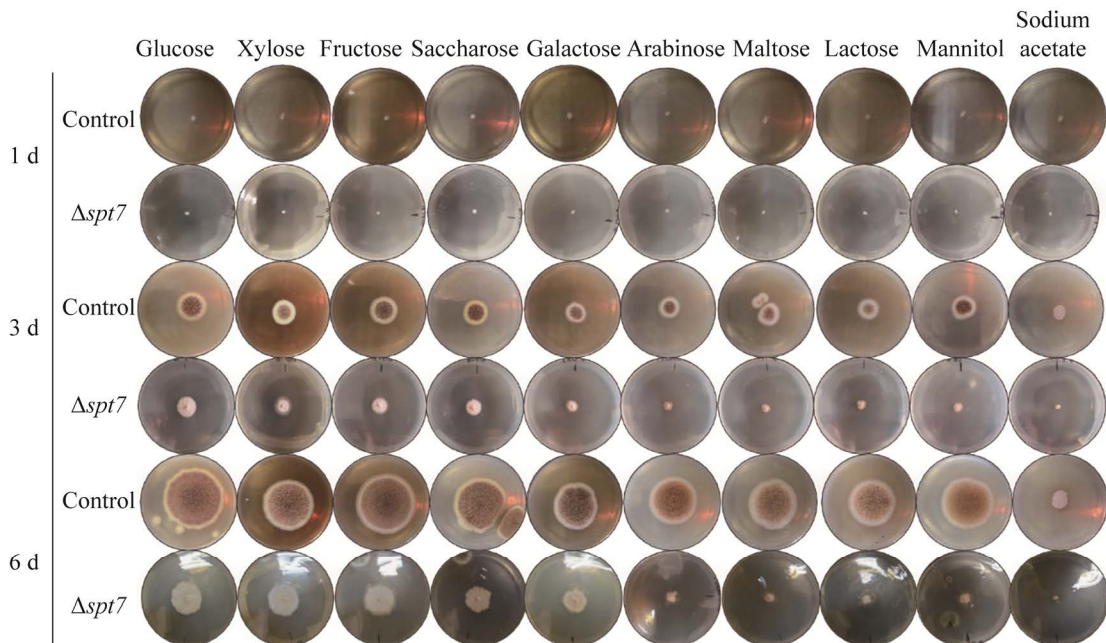


图 3 对照组与 $\Delta spt7$ 菌株的生长情况

Figure 3 Growth of control group and $\Delta spt7$ strain.

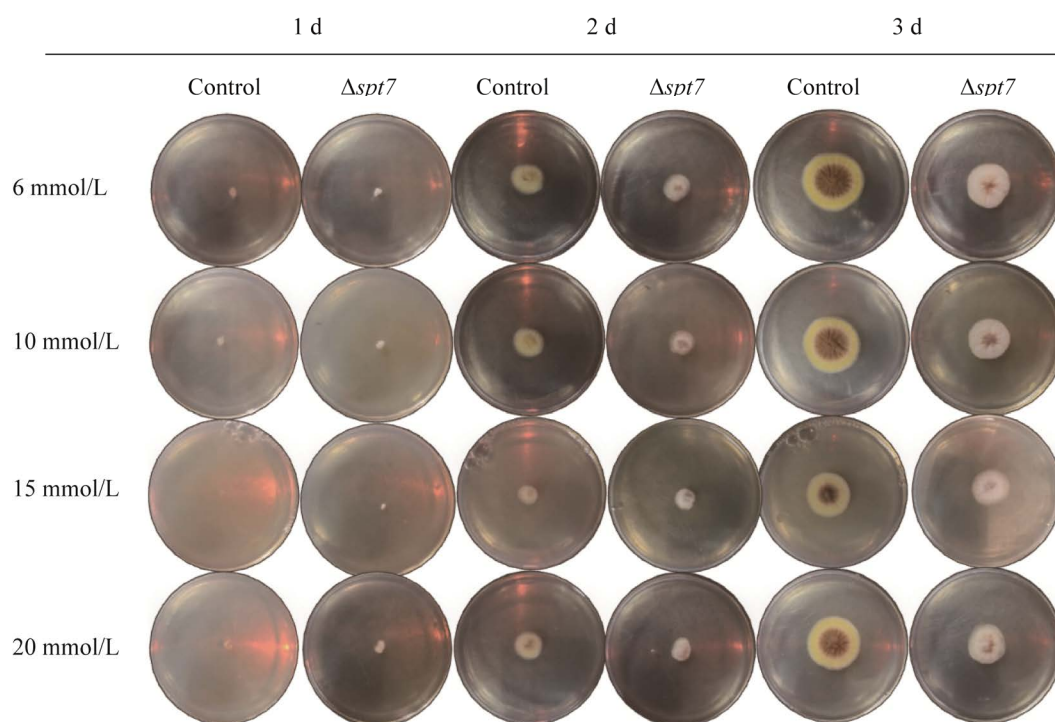


图 4 $\Delta spt7$ 与对照菌株在不同浓度过 H_2O_2 的培养基上生长形态观察

Figure 4 Growth morphology of $\Delta spt7$ strain and the control group on the medium with different concentrations of H_2O_2 .

调明显,说明 Spt7 直接参与该基因的转录调控;而 *ras* 基因的转录趋势虽与 *spt7* 相同但是下调不明显, *htmA* 与 *atg2* 的转录趋势与 *ada2* 相同,推测 Spt7 通过影响其他转录因子来间接影响其转录。

2.5.3 产孢相关基因的转录水平分析

与对照组相比, $\Delta spt7$ 菌株分生孢子明显降低,查阅文献[11-14]得:参与分生孢子形成的调控途径分为 Flb 组成的上游调控途径以及由 BrlA、WetA 和 AbaA 组成的下游途径。故对其进行 qRT-PCR 检测,结果如图 5C 所示,敲除 *spt7* 对上游调控途径 FlbC、FlbD、FlbE、FluG 等影响不明显, $\Delta spt7$ 中的 *wetA*、*abaA*、*brlA* 的转录水平相对于对照组分别低了 529.93 倍、172.4 倍和 9.61 倍。说明 *spt7* 直接调控分生孢子

形成的下游途径。

2.5.4 糖酵解途径相关基因的转录水平

因与对照组相比, $\Delta spt7$ 菌株生长发育明显缓慢、菌落直径较小,对糖酵解途径中选取关键酶进行转录水平的分析。如转酮醇酶 (transketolase, Trk)、果糖二磷酸酯醛缩酶 (fructose-bisphosphate aldolase, FDA)、果糖-1,6-二磷酸酶 (fructose-1,6-bisphosphatase, FBP)、果糖-6-磷酸磷酸酮酶 (fructose-6-phosphate phosphoketolase, Pks)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (6-phosphoglucose dehydrogenase, GsdA)、6-磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase, Pfk) 等。如图 5D, 相比于对照组, $\Delta spt7$ 菌株中 *fbp*、*pfk*、*trk*、*pks*、*fda*、*gsdA* 基因的转录水平分别下调了 2.65、4.46、6.05、4.9、3.2、3.2 倍。说明 *spt7* 基因可能直接

或间接调控这些基因的转录。

2.5.5 过氧化物酶 qRT-PCR 结果

因为 $\Delta spt7$ 菌株基本能在 20 mmol/L H_2O_2 的培养基上正常生长, 故通过 qRT-PCR 分析其关键性过氧化物酶的转录水平, 结果如图 5E, $\Delta spt7$ 菌株的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 相对转录水平比对照组下调了

0.28 倍, 过氧化氢酶-过氧化物酶编码基因 (catalase-peroxidase encoding gene, *CpeB*) 相对转录水平上调 0.67 倍, 虽然谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX) 和过氧化氢酶 (catalase, *CatR*) 的相对转录水平分别下调 5 倍和 3.2 倍, 但是 *GPX* 和 *catR* 基因本身的转录水平也很低。

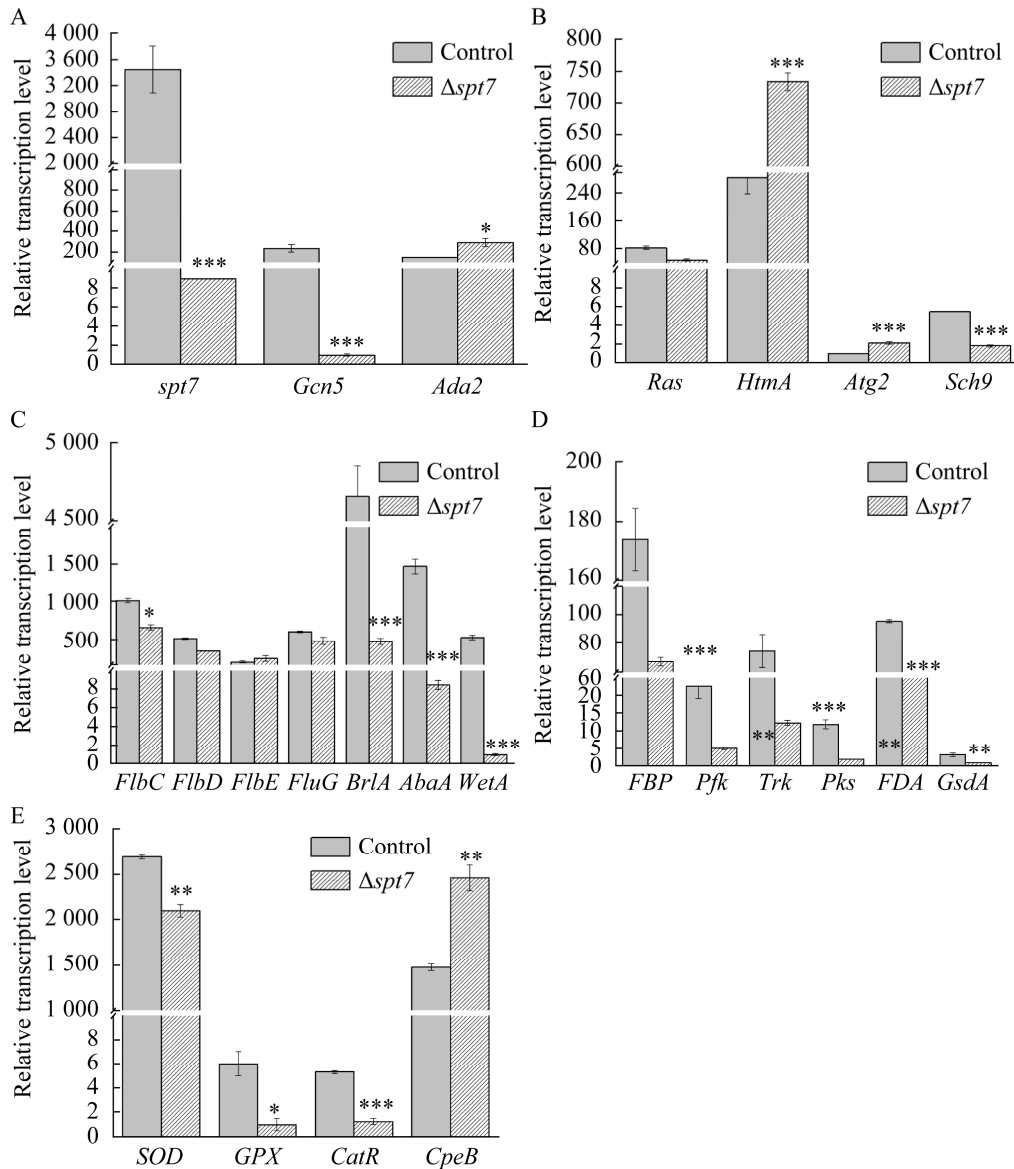


图 5 $\Delta spt7$ 菌株与对照组相应基因相对转录水平

Figure 5 Relative transcription levels of corresponding genes in strain $\Delta spt7$ and control group. There is no difference between the control group and $\Delta spt7$. *: $0.05 < P \leq 0.1$; **: $0.01 < P \leq 0.05$; ***: $P \leq 0.01$.

3 讨论与结论

Spt7 作为构成 SAGA 复合体的核心结构之一, 对它的研究主要集中在植物、人类和酵母真菌中, 除酵母之外的真菌中仅有一篇有关 Spt7 的文献报道, 且是本课题组前期研究, 在 *A. niger* CGMCC1062 中过表达 *spt7* 基因, 并发现 Spt7 过表达后菌株菌丝生长更茂盛, 菌丝分枝增多, 且分枝变短, 产孢延迟但产孢增多, 且过氧化氢、高温及高渗耐受性均明显增强^[2]。本研究中对 Δ spt7 菌株的生长、不同碳源培养基及 H₂O₂ 耐受力与对照组进行观察比较, 同时分析关键基因的转录水平。从表型上来看, Δ spt7 菌株与对照组相比虽然能在培养基上正常生长, 但是菌体生长发育明显受限、菌落发白、产孢延迟, 在酵母中敲除 *spt7* 基因同样导致细胞无法正常生长发育^[4]。通过 qRT-PCR 分析发现, 黑曲霉 Δ spt7 菌株中 *spt7* 与 *Gcn5* 基因的表达量明显下调, 这与 *spt7* 基因的缺失导致酿酒酵母生长缓慢且 *Ty*、*INO1*、*MFA1* 等基因的转录受抑制^[15-17]结果相似; 缺失 *spt7* 基因的细胞可以存活, 但生长缓慢, 并呈现多种表型如肌醇营养不良、细胞形态发生改变、产孢缺陷以及 *Ty* 元素的转录改变^[7]等结果一致。

整体来看, 无论是 Δ spt7 还是对照菌株均在葡萄糖、木糖、果糖、蔗糖和半乳糖这 5 种碳源上生长最好。其中, 在果糖为碳源的培养基上 Δ spt7 与对照菌株直径最大, 车轮状褶皱较浅。对照菌株在乳糖、甘露醇、阿拉伯糖、麦芽糖为碳源的培养基上较葡萄糖、木糖、果糖、半乳糖和蔗糖生长微弱迟缓, 但 Δ spt7 菌株则呈现显著的生长差异性, 生长受到抑制, 说明 *spt7* 敲除后影响其对这些糖类的利用。在木糖、蔗糖和半乳糖为碳源的培养基上, Δ spt7 菌株菌落中央开始出现棕色孢子。但是在其他碳源的培养基上孢子均无颜色, 且菌落角突变非常严重。推测在菌

体生长后期因营养缺乏导致菌体生长受限, 进而出现边缘菌落不规则生长。丝状真菌以木糖为碳源的代谢首先要依靠 NADPH 的木糖还原酶 (xylosereductase, XR) 将木糖转化为木糖醇, 随后需要依靠 NAD⁺ 的木糖醇脱氢酶 (xylitol dehydrogenase, XD) 将木糖醇氧化成木酮糖, 在经过木酮糖激酶 (xylulokinase) 磷酸化处理后将木酮糖转化成 5-磷酸木酮糖, 然后再进入磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway, PPP)。 Δ spt7 菌株中涉及糖酵解途径中 *fbp*、*pfk*、*trk*、*pks*、*fda*、*gsdA* 基因的转录均受到不同程度的抑制, 可能原因为 Spt7 直接或间接调控这些基因的转录。

菌体生长发育过程中, 除了营养物质的代谢外, 还涉及到多种蛋白质的调控。例如: Ras 对细胞的增殖、分化、细胞凋亡及基因调控很重要; HtmA 与真菌菌丝生长分化有关; Sch9 不仅参与菌体菌丝的增长还与孢子的形成有关; Atg2 参与细胞自噬维持胞内稳态。本研究发现敲除 *spt7* 基因导致 *ras* 和 *sch9* 基因转录水平下调, 而 *htmA* 与 *atg2* 的转录趋势与 *ada2* 相同, 推测 Spt7 通过影响其他转录因子来间接影响其转录。再者, Δ spt7 菌株分生孢子明显降低, 是由于敲除 *spt7* 基因导致分生孢子形成的下游调控途径关联的基因 *wetA*、*abaA*、*brlA* 转录水平下调所致。黑曲霉中其他全局转录调控因子 *LaeA* 和 *VeA* 敲除后同样会导致菌株生长迟缓且分生孢子形成受到抑制^[8]。

真核细胞衰老导致各种功能逐渐下降是由生长代谢过程中产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 引起的氧化损伤累积^[18]所致, 主要原因是被氧化的蛋白质失去了完整的结构而丧失了催化活性, 从而引起细胞的衰老与死亡^[19], 如活性氧包括超氧阴离子 (O₂⁻), 羟自由基 (•OH) 和过氧化氢 (H₂O₂) 等。而耗氧细胞在进化过程中

产生了相应的抗氧化机制即抗氧化酶如过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SODs)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPXs)。它们协同工作以保护细胞免受来自内源性代谢或外部微环境的过多活性氧物种(ROS)的伤害。它们分工明确,其中CAT将 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2 负责去除高浓度 H_2O_2 ^[20];而SOD将高活性的超氧阴离子(O_2^-)歧化为 O_2 与低活性的 H_2O_2 ^[21];GPXs和PRDXs负责降低低浓度下的 H_2O_2 ^[22];在大肠杆菌中有人提出过饥饿诱导交叉保护机制。即在大肠杆菌生长的过程中,因为缺乏必要的营养物质而导致细胞生长停止,细胞内产生过氧化物酶使细胞对过氧化氢产生了较强的抵抗力^[23-25]对照组与 $\Delta spt7$ 菌株均能在20 mmol/L H_2O_2 的平板培养基上正常生长,推测Spt7的缺失使菌体营养物质代谢途径被抑制进而产生了饥饿诱导交叉保护,这也与糖酵解途径的相关基因qRT-PCR结果一致。

综上所述,黑曲霉中Spt7作为转录调控因子,通过调控关键性的基因,调控细胞的生长,菌丝的分支及分生孢子的形成,抗氧化胁迫等生命活动。

参考文献

- [1] 郭艳梅, 郑平, 孙际宾. 黑曲霉作为细胞工厂: 知识准备与技术基础[J]. 生物工程学报, 2010, 26(10): 1410-1418.
GUO YM, ZHENG P, SUN JB. *Aspergillus niger* as a potential cellular factory: prior knowledge and key technology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(10): 1410-1418 (in Chinese).
- [2] 薛鲜丽, 王静然, 毕杭杭, 王德培. 过表达Spt7对黑曲霉生长及抗逆性影响[J]. 生物技术通报, 2022, 38(5): 112-122.
XUE XL, WANG JR, BI HH, WANG DP. Effect of Spt7 overexpression on the growth and stress resistance of *Aspergillus niger*[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(5): 112-122 (in Chinese).
- [3] MORAGA F, AQUEA F. Composition of the SAGA complex in plants and its role in controlling gene expression in response to abiotic stresses[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 865.
- [4] WU PY, WINSTON F. Analysis of Spt7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex[J]. Molecular and Cellular Biology, 2002, 22(15): 5367-5379.
- [5] KURDISTANI SIAVASH K, MICHAEL G. Histone acetylation and deacetylation in yeast[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, 4(4): 276-284.
- [6] MORGAN MT, HAJ-YAHYA M, RINGEL AE, BANDI P, BRIK A, WOLBERGER C. Structural basis for histone H2B deubiquitination by the SAGA DUB module[J]. Science, 2016, 351(6274): 725-728.
- [7] GANSHEROFF LJ, DOLLARD C, TAN P, WINSTON F. The *Saccharomyces cerevisiae* SPT7 gene encodes a very acidic protein important for transcription *in vivo*[J]. Genetics, 1995, 139(2): 523-536.
- [8] 陈浩宇. 黑曲霉中 *veA* 及 *laeA* 基因功能的研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2018.
CHEN HY. Study on the function of *veA* and *laeA* genes in *Aspergillus niger*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2018 (in Chinese).
- [9] 曹张磊, 王德培, 张岚. 提高根瘤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(2): 20-25.
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(2): 20-25 (in Chinese).
- [10] JOZEF CZUK J, ADJAYE J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression[J]. Methods in Enzymology, 2011, 500: 99-109.
- [11] WINSTON F, DOLLARD C, MALONE EA, CLARE J, KAPAKOS JG, FARABAUGH P, MINEHART PL. Three genes are required for trans-activation of Ty transcription in yeast[J]. Genetics, 1987, 115(4): 649-656.
- [12] SOUTHERN E. Southern blotting[J]. Nature Protocols, 2006, 1(2): 518-525.
- [13] YU JH. Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*[J]. Mycobiology, 2010, 38(4): 229-237.
- [14] ADAMS TH, BOYLAN MT, TIMBERLAKE WE. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*[J]. Cell, 1988, 54(3): 353-362.
- [15] CLUTTERBUCK AJ. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*[J]. Genetics, 1969, 63(2): 317-327.

- [16] SHEVCHENKO A, ROGUEV A, SCHAFT D, BUCHANAN L, HABERMANN B, SAKALAR C, THOMAS H, KROGAN NJ, SHEVCHENKO A, STEWART AF. Chromatin central: Towards the comparative proteome by accurate mapping of the yeast proteomic environment[J]. *Genome Biology*, 2008, 9(11): R167.
- [17] HELMLINGER D, MARGUERAT S, VILLÉN J, SWANEY DL, GYGI SP, BÄHLER J, WINSTON F. Tra1 has specific regulatory roles, rather than global functions, within the SAGA co-activator complex[J]. *The EMBO Journal*, 2011, 30(14): 2843-2852.
- [18] ORR WC, SOHAL RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*[J]. *Science*, 1994, 263(5150): 1128-1130.
- [19] LEVINE RL. Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(19): 11828-11833.
- [20] KIRKMAN HENRY N, GAETANI GIAN F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, 32(1): 44-50.
- [21] WANG Y, BRANICKY R, NOË A, HEKIMI S. Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2018, 217(6): 1915-1928.
- [22] HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*[M]. 5th edition. Oxford: Oxford University Press, 2015.
- [23] JENKINS DE, CHAISSON SA, MATIN A. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(5): 2779-2781.
- [24] JENKINS DE, AUGER EA, MATIN A. Role of RpoH, a heat shock regulator protein, in *Escherichia coli* carbon starvation protein synthesis and survival[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(6): 1992-1996.
- [25] NYSTRÖM T. To be or not to be: the ultimate decision of the growth-arrested bacterial cell[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, 21(4): 283-290.