

# 建立以 TK 基因为标记将外源基因导入臭曲霉 (*Aspergillus foetidus*) 的选择系统及 外源基因的表达

刘宏迪 曹旭\* 吴晓军 阮力\* 梁平彦

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道建立以胸腺嘧啶核苷激酶 (TK) 为标记, 利用痘苗病毒 TK 基因为旁侧序列的外源基因载体, 通过体内同源重组的原理将外源基因导入臭曲霉菌, 并用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BUdR) 进行转化株选择的新系统, 对黑曲霉菌 TK<sup>+</sup> 株的挑选、转化及选择条件等进行了研究。用这一系统, 成功地将臭曲霉菌自身分离到的启动基因 H8 驱动下的乙肝表面抗原 (HBsAg) 基因导入臭曲霉菌。Southern blot 和多次孢子传代证实, HBsAg 基因已与宿主的 DNA 稳定整合; 在发酵上清液中, ELIAS 检测 HBsAg 为阳性 (P/N 值在 20 左右), Western blot 有特异的带存在, 免疫电镜观察发现, 在发酵液中存在有与人血清中 HBsAg 颗粒大小、形态相似的 22nm 的颗粒。这些结果表明, HBsAg 基因在臭曲霉菌中已获表达。

本文建立的基因导入和选择系统可广泛应用于各种外源基因在臭曲霉菌中表达的研究。

**关键词** 臭曲霉; 胸腺嘧啶核苷激酶; H8 启动子; 乙肝表面抗原

近几年来, 丝状真菌在基因表达中具有高效、糖基化、外泌、易于生产及其产物性质较原核及酵母菌更接近高等生物的特点, 引起了人们的极大兴趣并已获得了一些可喜的结果<sup>[1-2]</sup>。臭曲霉菌具有大量外泌多种胞外酶及大量代谢产物的功能。但作为一个新的外源基因表达系统, 臭曲霉菌同样面临着解决外源基因高效表达和外泌等技术及分子生物学等理论问题。首先是要解决如何导入外源基因并选择已获得外源基因的转化菌株。

## 材料和方法

### (一) 菌种

臭曲霉菌 (*Aspergillus foetidus*), 由本所齐祖同先生鉴定。

### (二) 酶和其他重要试剂

所用蜗牛酶和纤维素酶分别购自中

国科学院生物物理研究所, 上海东风试剂厂。限制性内切酶、T<sub>4</sub> 连接酶等分别购自华美生物工程公司, 医学科技公司及 New England Biolabs。<sup>32</sup>P- $\alpha$ -dCTP、<sup>32</sup>P- $\alpha$ -dATP 购自 Amersham。乙肝表面抗原诊断血清, 乙肝表面抗原诊断血清 (马抗人 HBsAg 对流免疫电泳 1:512), 酶联免疫检测 HBsAg ELISA 药盒, 及其它检测试剂均用北京生物制品研究所制品。放射免疫测定 (RIA)、HBsAg 固相放免测定使用美国 Abbott 公司产品。AUSRIA-1-125 药盒由北京生物制品研究所生产。

### (三) TK<sup>+</sup> 臭曲霉菌株的筛选

本文于 1988 年 11 月 11 日收到。

\* 中国预防医学科学院病毒研究所, 北京  
本工作得到朱既明, 任贵芳和张树政教授指导,  
谨致谢意。

“863”资助项目。

将臭曲霉菌接种到含有不同浓度的氨基喋呤 (A) 基础培养基 (MM) 上, 找出最适抑制量, 在此基础上在 MM 含有氨基喋呤 (A) 的培养基中分别加入不同浓度的次黄嘌呤 (Hypoxanthine) 和胸腺嘧啶脱氧核苷 (Thymidine)。在最佳浓度的 HAT 培养基中即能挑选出 TK<sup>+</sup> 菌。

#### (四) BUdR 最适量的选择

将挑选出的 TK<sup>+</sup> 菌用蜗牛酶和纤维素混合酶处理<sup>[3]</sup> 制备原生质体, 洗涤后按下述转化条件处理, 然后接种在含有不同浓度 5-溴脱氧尿嘧啶 (BUdR) 培养基上, 选择最适用量。

#### (五) 质粒构建

将 pAFH8 质粒用 XhoI-EcoRI 双酶解分离得到 0.75bp 的 *A. foetidus* 启动子。质粒 P<sup>133</sup> (曹旭, 待发表) 含有 HBsAg (adr) 及痘苗病毒 TK 片段用 XhoI-EcoRI 双酶与 0.75bp 的 A.F 启动基因<sup>[4]</sup> 片段连接得到重组 pAFH8HB。

#### (六) 重组质粒转化臭曲霉菌

臭曲霉原生质体的制备参照文献<sup>[1]</sup>。将制备好的原生质体充分洗涤后, 离心收集原生质体用 0.5mol/L 甘露醇悬浮, 10<sup>6-7</sup>/ml 原生质体加入提纯的质粒 DNA 10—20μg/ml, 混均后加 37℃ 温育的聚乙二醇 (PEG, 分子量 6000), 摇均后 37℃ 温育 30min, 接种到含有 BUdR 的高渗培养基上, 30℃ 温育 3—5 天, 挑出单菌落接种到含有 BUdR 的培养基上, 长出孢子后接种斜面。

#### (七) 杂交

1. 转化菌原生质体打点杂交: 将转化菌株分别制备原生质体, 直接在硝基纤维素膜上点样 5μl, 以 TK<sup>+</sup> 未转化菌株为对照, 点样后的膜处理同文献<sup>[2]</sup>, 有两点改动: 即 0.5mol/L 改用 0.8mol/L, 此步骤重复 2 次。用 <sup>32</sup>P 标记的 HBsAg DNA

为探针, 打点杂交筛选出阳性菌株。

2. Southern blot: 将转化菌株和 TK<sup>+</sup> 菌株摇瓶发酵收集菌体制备总 DNA (见文献<sup>[5]</sup>)。电泳后吸附转移分别用 <sup>32</sup>P 标记的痘苗病毒 TK-DNA<sup>+</sup> 和 HBsAg-DNA 为探针进行杂交, 方法见文献<sup>[3]</sup>。

#### (八) 聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blot

发酵上清液经硫酸胺沉淀浓缩 60 倍, 透析后经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染色及 Western blot, 电转时 0.5A—0.7A, 2—2.5h, 38—40℃, 10% 牛血清室温封闭 1h, 洗 3 次, 每次 10min, 用 PBST (0.02 mol/L PBS, 0.05% Tween 20) 加入酶标抗体室温摇动 1h, 用 PBS-T 洗 3 次, 每次 10min, 加入二氨基联苯二胺 0.5mg/ml 显色, 用水终止。

#### (九) 转化菌株发酵液中 HBsAg 活性检测

将发酵 5 天的不同转化株上清液进行反向血凝 (RPHA)、酶联免疫 (ELISA) 和放射免疫 (RIA) 测定, 方法均按各自说明书进行。

#### (十) 免疫电镜观察

取转化菌株发酵上清液及阳性人血清对照于高速离心机每分钟 15000 转离心 1h, 取上清液与马抗人纯抗体以不同稀释梯度 1:1 混合后 4℃ 过夜, 然后经过 15000 转离心, 弃上清、沉淀悬浮后用铜网 (火棉胶膜, 喷碳) 沾取, 滤纸吸干残留液体, 2% 磷钨酸 (pH 6.5) 负染凉干后备检。

## 结 果

#### (一) TK<sup>+</sup> 菌株的筛选及 BUdR 对其杀死量的选择

当氨基喋呤 (A) 的浓度在 44μg/ml 时即可抑制臭曲霉菌的生长。再加入次黄嘌呤 (H) 和胸腺嘧啶脱氧核苷 (T), 浓

度为  $60\mu\text{g/ml}$  时即能够筛选出  $\text{TK}^+$  菌株,按上述浓度配比的 HAT 培养基是筛选臭曲霉  $\text{TK}^+$  菌株的最佳配比。当培养基中 BUdR 的含量为  $25\mu\text{g/ml}$  时,即可杀死  $\text{TK}^+$  菌的原生质体。故选择此浓度为挑选转化菌的合适浓度(图版 I-1,2)。

(二) HBsAg 表达质粒的构建

从臭曲霉菌的染色体中克隆了一个作用较强的启动基因片段(见前报)按下图的操作流程构建了使 HBsAg 基因在臭曲霉启动基因控制下,以痘苗病毒 TK 基因为旁侧序列,并能在大肠杆菌中自主复制的重组体 pAFH8HB 质粒(图 1)。

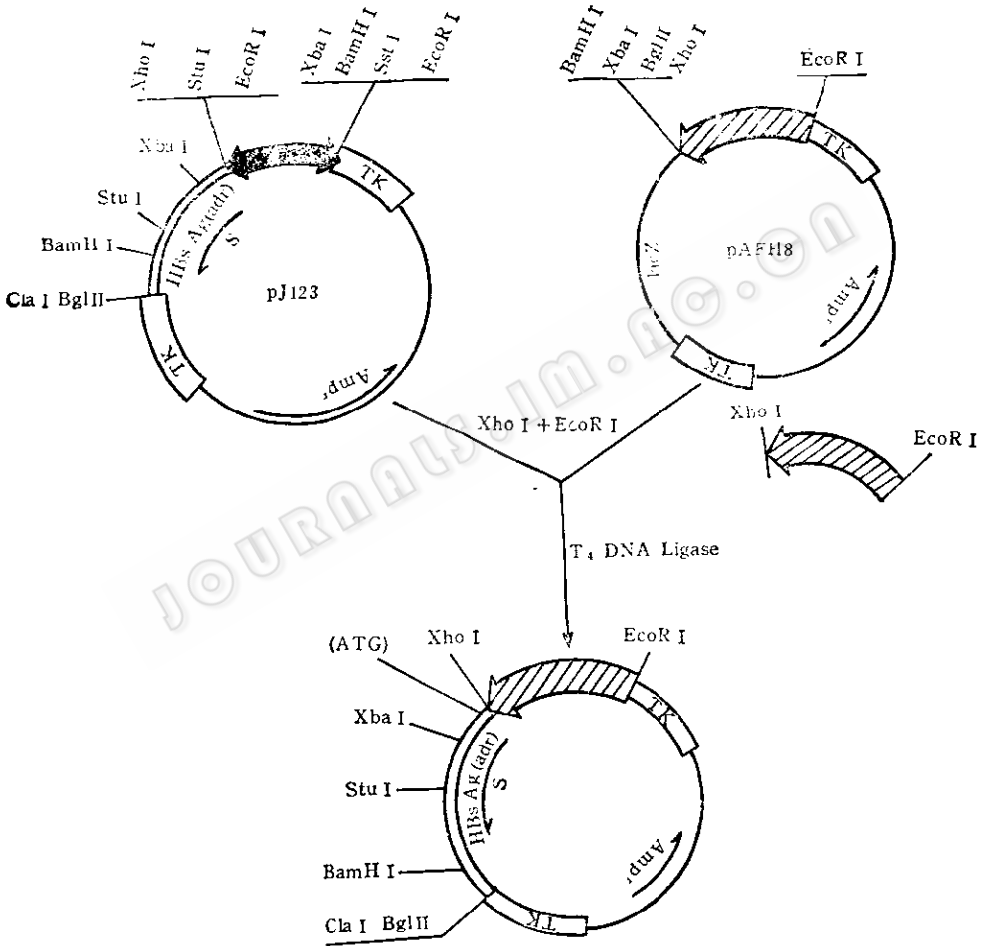


图 1 pAFH8HB 质粒构建

Fig. 1 The construction pAFH8HB

(三) 转化及转化菌株的挑选

臭曲霉  $\text{TK}^+$  菌为受体菌,用原生质体融合的方法将重组质粒 pAFH8HB 导入臭曲霉菌,在含有 BUdR 的选择性培养基上挑选转化菌株(图版 I-3)。

对上述选择性培养基中挑选的菌株分别制备原生质体, HBsAg 基因片段经缺口翻译法用  $^{32}\text{P}$  标记后为探针,与原生质

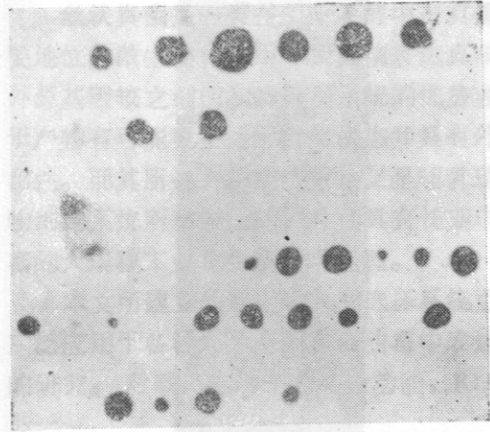


图2 转化后的黑曲霉菌原生质体与 HBsAg 探针杂交

Fig. 2 Dot hybridization of transformed *A. foetidus* with HBsAg probe

体进行打点杂交。用杂交测试阳性强的菌株(被测试者均为阳性,图 2)进行 Southern blot 及表达产物的分析鉴定。

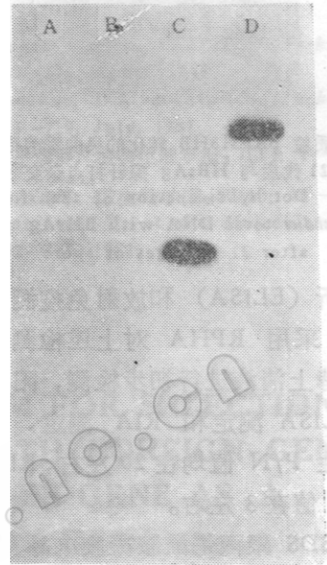


图4 转化后的臭曲霉菌株 DNA Southern blot  
A. 转化的臭曲霉总 DNA 用 ClaI-EcoRI 酶切;  
B. 未转化的臭曲霉总 DNA 用 Hae III 酶切;  
C. pAFH8HB DNA 用 ClaI-EcoRI 酶切;  
D. pAFH8HB DNA 用 XhoI 酶切

Fig. 4 Southern blot pattern of transformed *A. foetidus* DNA with HBsAg probe

- A. Transformed *A. foetidus* total DNA digested with ClaI-EcoRI;
- B. Untransformed *A. foetidus* total DNA digested with HaeIII;
- C. pAFH8HB plasmid DNA digested with ClaI-EcoRI;
- D. pAFH8HB plasmid DNA digested with XhoI

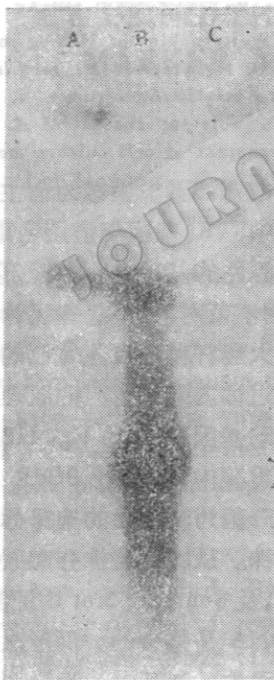


图3 臭曲霉总 DNA 与痘苗病 TK 基因的 Southern blot

- A. 臭曲霉总 DNA Hind 酶切;
  - B. PJ11(TK)阳性; C. λDNA Hind III 酶切
- Fig. 3 Southern blot of *A. foetidus* total DNA with TK gene of Vaccinia Virus.
- A. *A. foetidus* total DNA Hind III;
  - B. pJ11 TK positive; C. λDNA Hind III

#### (四) Southern blot 杂交

从转移杂交的结果中证实, 臭曲霉菌中存在的 TK 基因与痘苗病毒 TK 基因具有同源性(图 3), 转化菌株中有外源 HBsAg 基因 DNA 的存在(图 4)。孢子传代 21 代的菌株提取总 DNA, 打点杂交外源 DNA-HBsAg 基因仍然存在(图 5)。

#### (五) 表达产物的分析鉴定

1. 反向血凝 (RPHA)、酶联免疫吸附

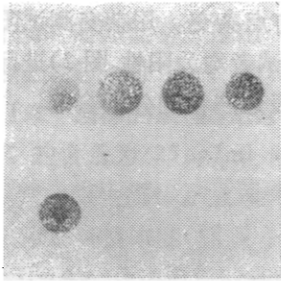


图5 质粒 pAFH8HB 转化的臭曲霉孢子传 21 代后与 HBsAg 探针打点杂交  
Fig. 5 Dot hybridization of transformed *A. foetidus* total DNA with HBsAg probe after 21 passages of spore

测定分析 (ELISA) 和放射免疫测定分析 (RIA): 采用 RPHA 对上述检测阳性菌株的发酵上清液进行初步检测, 阳性强者进行 ELISA 测定和 RIA 测定, ELISA 测定阳性 P/N 值均在 20 左右, RIA 测定的 P/N 值在 3 左右。

2. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blot: SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白转移杂交证实在 GP23 有一条特异的带(图 6)。

#### (六) 免疫电镜观察

免疫电镜观察在转化菌的发酵上清液中存在与人血清中 HBsAg 颗粒大小、形态相似的 22nm 的颗粒。在发酵上清液与 1:64 和 1:128 纯抗体 1:1 混合的梯度中电镜观察效果最佳(图版 1-3)。

## 讨 论

广泛用于动物细胞融合的 TK<sup>+</sup> TK<sup>-</sup> 细胞株, 是一个高效率灵敏的选择系统, 该系统如能用于丝状真菌, 无疑对生物工程技术有重要意义。

本文所报道的在 HAT 培养基上筛选臭曲霉的 TK<sup>+</sup> 菌株, 并能在含有 BUdR 培养基上挑选出转化菌, 以及外源 DNA HBsAg 在臭曲霉菌中的表达都是首次报道。

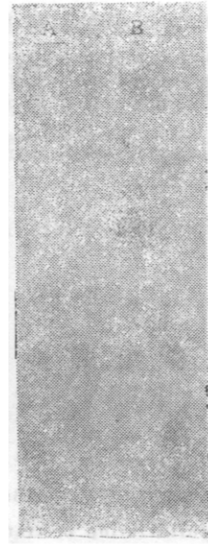


图6 转化的臭曲霉发酵液中 HBsAg 与抗血清的 Western blot  
A. 臭曲霉发酵上清液中 HBsAg;  
B. 细胞培养液中 HBsAg

Fig. 6 Western blot of HBsAg in growth medium of transformed *A. foetidus* with Anti-HBsAg serum  
A. fermentable supernatant of *A. foetidus*;  
B. supernatant of cell culture medium

以臭曲霉 TK<sup>+</sup> 菌株为宿主菌, 在证实了此菌中 TK 基因与痘苗病毒 TK 基因具有同源性的基础上, 构建了以 TK 为标记, 利用痘苗病毒 TK 基因为旁侧序列的并能在大肠杆菌中自主复制的外源基因载体。通过体内同源重组的原理将在臭曲霉自身启动基因 H8 驱动下的 HBsAg 基因导入臭曲霉菌中, 并且在 BUdR 的存在下可以 TK<sup>-</sup> 菌为转化菌的选择标记, 挑选出转化菌株。从转化菌株分离原生质体的打点杂交, 及 Southern blot 均证实 HBsAg 与宿主 DNA 是整合的。而多次孢子传代并未使其丢失, 这又进一步说明这种整合是稳定的。在转化菌株的发酵上清液中可以检测到 HBsAg 活性, 并可在电镜下观察到 22nm 的 HBsAg 颗粒, 与人血清中 22nm 的 HBsAg 颗粒大小、形态相似。这些结果都表明, HBsAg 基因在臭曲霉菌中

已获表达,并且外泌。

丝状真菌是一类在工业发酵中占有重要地位的微生物,利用丝状真菌表达真核外源基因较之细菌和酵母菌系统的优势在于产物有可能更接近于自然状态并具有外泌性。而其所具有的经济效益又是哺乳动物细胞系统所不能比的,并且具有长期丰富的大规模工业化生产管理经验。

本文所建立的基因导入和选择系统可广泛应用于各种外源基因在臭曲霉中表达的研究。对载体启动子的结构功能,RIA

测定比 ELISA 测定滴度低,表达产物糖基化程度以及提高表达效率的途径等有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Daniel Cullen, et al.: *Bio/Technology*, 5: 369—376, April, 1987.
- [2] Gwynne, D.I. et al.: *Bio/Technology*, 5: 713—719, July, 1987.
- [3] 梁平彦等: *植物生理学报*, 7(1): 1—10, 1981.
- [4] 刘宏迪等: *微生物学报*, 30(1): 16—21, 1990.
- [5] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, 382—386, 1982.

## DEVELOPMENT OF A NEW SYSTEM FOR SELECTION OF *A. FOETIDUS* TRANSFORMED WITH FOREIGN GENES BY USING THYMIDINE KINASE GENE AS A MARKER AND EXPRESSION OF HBsAg GENE IN *A. FOETIDUS*

Liu Hongdi Cao Xu\* Wu Xiaojun Ruan Li\* Liang Pingyan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

A new system for selection of transformed *Aspergillus foetidus* was reported. In this system, TK<sup>-</sup> *A. foetidus* which were constructed by homologous recombination of mutated TK gene of vaccinia virus with TK gene of *A. foetidus* were screened by adding BUdR in agar plates. Conditions for screen of TK<sup>+</sup> *A. foetidus* strain, transformation of *A. foetidus* and selection of transformed TK<sup>-</sup> *A. foetidus* have been studied. By using this system, several transformed *A. foetidus* which contained HBsAg gene driven by a promoter H8 cloned from genomic DNA of *A. foetidus* were isolated. It was demonstrated that HBsAg gene was integrated into the chromosome DNA of *A. foetidus* by Southern blot after many passages of spores. ELISA showed that HBsAg was positive in the growth medium (p/n=20). The 22 nm particles

which were very similar to the HBsAg particles in human serum were found in the growth medium by immunoelectromicroscope. Western blot also gave the specific bands. All these data showed that HBsAg gene was expressed in *A. foetidus* and the products were secreted into the growth medium. The selection system using TK gene as marker could generally be used to study the expression of foreign gene in *A. foetidus*.

### Key words

*Aspergillus foetidus*; Thymidine Kinase; Promoter H8; HBsAg

\* Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

## 图 版 说 明

## Explanation of plate

图版 I-1 HAT 培养基的最佳浓度配比为 C, 其它为不同浓度配比

Platel-1. The optimal condition for selection of *TK<sup>+</sup> A. foetidus* with HAT medium

图版 I-2 BUDR 浓度的选择, D 为 25 $\mu$ g/ml 为选择浓度

I-2. The concentration of BUDR inhibiting the growth of *A. foetidus*

图版 I-3 臭曲霉的转化菌及其发酵上清液的免疫电镜

A. 在 BUDR 上挑选臭曲霉转化菌株: A-1 未转化菌; A-2, A-3 转化菌株。

B. 臭曲霉菌发酵上清液中 HBsAg 免疫电镜颗粒。

C. 人血清中 HBsAg 免疫电镜颗粒。

I-3. Transformed *A. foetidus* and immunoelectro microscope A. Selection of transformed *A. foetidus* with BUDR;

A-1. Untransformed *A. foetidus*; A-2, A-3. Transformed *A. foetidus*;

B. HBsAg particles in the growth medium of transformed *A. foetidus* observed by Immunoelectro Microscope;

C. HBsAg particles in human sera by Immunoelectro Microscope