

曲霉与木霉纤维素酶系基因组的属间遗传表达相容性*

艾云灿^{1,2} 藤如君² 高培基² 孟繁梅^{1,2} 王祖农²

(¹中山大学生命科学院 广州 510275) (²山东大学微生物学研究所 济南 250100)

摘要 选用三类典型重组子 3a、3b、 A_{7-1} 和双亲本菌株 *Aspergillus niger* AMS11、*Trichoderma reesei* QM9414 为材料,按照所设计的纤维素酶系基因的通用序列和同工酶分型方法,进行基因组 DNA 指纹和酶系同工酶多态性比较分析。旨在提供重组子中基因重组的分子证据,阐明远缘双亲本基因组间的遗传表达相容性,并讨论其杂种优势的分子基础。结果发现重组子中基因组 DNA 指纹的重组特征稳定遗传,并能够相容性增强表达重组后的羧甲基纤维素酶(CMCase)和 β -葡萄糖苷酶(β GLase)同工酶组分。纤维素酶系杂种优势的分子基础多样性包括:(1)3b 中来自于双亲本部分编码 β GLase 的基因的杂合迭加和增强表达;(2)3a 和 A_{7-1} 中对应继承双亲本部分编码 CMCase 和 β GLase 的基因间协调性增强表达,并导致相应酶组分蛋白合成量的显著增加。由此综合提出了一个由 β GLase 介导的纤维素酶系活性调节和诱导合成调控的“双重协同增效”模型。此外还建立了考察重组子中杂种优势分子基础及其遗传稳定性的可行方法。

关键词 纤维素酶系,遗传表达相容性,随机扩增多态性 DNA,同工酶分型,黑曲霉,里氏木霉
分类号 Q311

为了充分开发利用相当远缘的两个代表属种黑曲霉(*Aspergillus niger*)和里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的互补优势性状,多年来许多学者不断尝试其属间融合,但都未能够实现目标性状真正重组^[1,2]。这两个远缘属间的基因组能否相容性遗传和表达,就成为基础研究和实践应用共同关注的课题。艾云灿等通过改良常规方法成功地获得了两属间具有纤维素酶系杂种优势的稳定重组单倍体^[3~7],奠定了研究该课题的基础。本文着重报道对几类典型重组子基因组 DNA 随机扩增多态性(RAPD-PCR)和纤维素酶系同工酶多态性的比较分析结果。旨在提供基因重组的分子证据,阐明重组体中来自于远缘双亲本的纤维素酶系基因组间的遗传稳定性和表达相容性。并试图由此讨论其杂种优势表现的分子基础。基于这个基础还提出了一个由 β -葡萄糖苷酶介导的纤维素酶系合成调控与活性调节的“双重协同增效”模型。

1 材料和方法

1.1 菌株

双亲本 *A. niger* AMS11, *T. reesei* QM9414 特征及来源均见前报^[3],重组子 3a、3b、

*国家自然科学基金、中国博士后科学基金、国际科学基金(IFS)和广东省自然科学基金资助项目。

艾云灿现在通信地址:中山大学生命科学院 510275

收稿日期:1996-11-09

A_{7-1} 由艾云灿在博士论文研究期间(1989~1991)构建。 A_{7-1} 来自于菌落表型象单亲本 *A. niger* 状的融合子菌落的分离物。3a、3b 为同一个突变菌落的不同扇形角变的分离物, 3b(产黄绿色橄榄形分生孢子)来自于黄绿色扇形角变, 3a(产黑色球形分生孢子)为其扇变菌落的黑色背景部分。其他基本特征见文献 [3, 7]。

1.2 基因组 DNA 抽提及 RAPD 扩增反应

参照文献 [8~10] 方法, 在中国科学院遗传研究所朱立煌教授实验室完成。以氯化苜法制备 DNA。在 25 μ l 反应体系中, 加入 25ng 模板及 15ng 引物(为 Operon technologies Inc 产品)和 0.5u Tag 酶(中国科学院遗传研究所生产)。扩增反应在 Perkin Elmer Cetus PCR 扩增仪上进行。反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 1min 变性, 36 $^{\circ}$ C 1 min 退火, 72 $^{\circ}$ C 2 min 延伸, 共 45 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物在 1.2% Agarose 胶检测, EB 染色, 紫外灯下观察结果。并按文献 [9] 公式进行相似率计算。需要说明的是, 已知丝状真菌中编码纤维素酶系的基因数目庞大, 而目前却仅仅对典型模式菌株 *T. reesei* QM9414 的 eg1、eg2、cbh1 和 cbh2 等 4 个基因序列有较清晰的认识^[11, 12], 因此我们只能通过采用 RAPD 分子标记方法^[9] 来考察分类学上相当远缘的两个物种及其杂种姊妹菌株的整个基因组 DNA 分型, 借以间接分析纤维素酶系基因组的情况。但为了使结果具有一定的针对性, 我们基于对文献 [11, 12] 分析, 针对能够覆盖上述 4 个基因中大约 70% 同源保守性 A 区(纤维素结合活性区域 CBD)的 31 个氨基酸的 93bp 的部分同源性序列, 特别设计了相对应的通用引物序列为 3' CCGGTCACACCTCCATAACCA5' 和 5' ACATTGCGCATAATAAGGATT3', 来指导从 Operon 随机引物试剂盒中针对性地选取本项研究所使用的引物。

1.3 羧甲基纤维素酶(CMCase)、 β -葡萄糖苷酶(β GLase)同工酶电泳分析

重组子与双亲株分别在所选定的产纤维素酶最佳诱导培养条件下液体振荡培养 4~6d, 取同体积(50 μ l)发酵原液经离心后的上清液电泳^[3]。本实验所采用的上述同工酶的凝胶显色分析方法是在多种经典方法^[13]基础上改进设计的。主要改进之处:(1) CMCase 同工酶分析, 改用预含 0.5% 羧甲基纤维素(CMC, w/v)的凝胶平板电泳结束后, 取下凝胶浸入 0.1 mol/L pH 5.2 的醋酸缓冲液于 50 $^{\circ}$ C 进行催酶反应 30 min, 流水冲洗去酸液。再浸入刚果红溶液(1 mg/ml)于室温下放置 30 min, 经流水冲洗后浸入 1 mol/L NaCl 溶液 5~10 min 至有透明带出现后用流水冲洗。最后浸入 1 mol/L HCl 溶液中调蓝色, 即可观察在蓝色背景上无色的 CMCase 同工酶谱带。该带清晰稳定。(2) β GLase 同工酶分析, 依常规方法电泳结束后, 取下凝胶置新配制的显色液中于 37 $^{\circ}$ C 浸泡 5~10 min 即可见有褐色谱带出现, 其谱带清晰但极易扩散应迅速观察记录。该显色液是在临用前将 0.1% 七叶苷和 0.1% (w/v) 柠檬酸铁铵贮存液按等比例混合而成。所用主要试剂 CMC 和七叶苷均购自 Sigma 公司, 其他试剂购自国内各供应商。

2 结果

2.1 融合子代群体表型与基因型的广泛变异

图版 I-A 归纳出了 *A. niger* AMS11 \times *T. reesei* QM9414 融合子代群体的主要典型变异。我们从中获得了若干株具有纤维素酶系杂种优势的稳定重组单倍体菌株^[3, 5, 6, 7]。这里值得指出的是 3a、3b 和 A_{7-1} 是三类约占子代群体 80% 的重组单倍体的典型代表, 它们

表型稳定。每隔 30d 取分生孢子转接在麦芽汁斜面培养基上,置 28℃ 培养 7d 待产孢子后置 4℃ 保存 21d。如此定期转接历经 5 年大约连续传代 60 代后仍然稳定,没有发生表型分离现象,作 Benomyl 诱发分离试验^[3,7]也十分稳定(图版 I-A 中左下角和右下角所示)。

2.2 重组子 3a、3b 和 A_{7-1} 基因组 DNA 的 RAPD 分子指纹特征

表1 重组子代与双亲本间 RAPD 片段多态性相似率统计 (%)

Table 1 Similarity analysis of RAPD between recombinants and parents (%)

	QM9414	3a	3b	A_{7-1}
AMS11	28.6	45.8	67.9	69.2
QM9414		39.0	34.8	48.9
3a			31.1	50.0
3b				61.3

参照自行设计的目标序列从 Operon 随机引物中选取 23 种引物,都能够扩增出有显著差异的 DNA 片段的多态性(表 1)。图版 I-B 示出了其中较典型的 3 个引物(从左

至右依次为 L5: ACGCAGGCAC, L7: AGGCGGGAAC, L8: AGCAGGTGGA) 所介导的 RAPD 多态性指纹。经重复实验证实其主带型稳定性和重复性较好,结果明确,可以分别作为一个遗传标志来进行分型。

根据表 1 和图版 I-A、B 还可以看出:远缘双亲本 AMS11(产黑色球形分生孢子)与 QM9414(产绿色橄榄型分生孢子)之间表型和多态性差异较大。三个重组子 3a、3b 和 A_{7-1} 之间的姊妹关系明确。子代 A_{7-1} 虽然存在有与 QM9414 的对应片段(表现为有 48.9% 相似率),但总体上看却更相似于而又不同于 AMS11(相似率为 69.2%)。子代 3a(产黑色球形分生孢子)与 3b(产绿色橄榄型分生孢子)是来源于同一突变菌落的不同扇形角变的分离物(图版 I-A),在所使用的全 23 种引物介导的多态性中总是存在相互对应的片段,它们共同与双亲本间的继承和重组关系明确(相似率都在 34.8%~67.9% 之间)。显然从统计意义上看 3a、3b 和 A_{7-1} 都不是某个对应单亲本的简单回复或突变株而是真正的重组子。这与其他表型特征分析^[3,5,6,7]所得到的结论相印证。

值得指出的是,L5、L7 和 L8 三个具有较强序列相似性的引物所介导的多态性主带型之间相似性也很高。这些引物都与我们设计的纤维素酶系基因的通用目标序列(见材料与方法中)存在一定的相似性,所以上述 RAPD 实验结果“准专一性”地反映了纤维素酶系基因家族的特征。且经三次以上重复试验证实是可靠的。因此,结果能够提供子代中的确发生了包括纤维素酶系基因组在内的 DNA 重组的分子证据。但是,由于在所有 23 种引物情形下,都没有发现重组子中存在有双亲本的全部基因种类杂合迭加或其部分基因拷贝数目显著增加的现象,故不能够由此简单的解释三个重组子 3a、3b 和 A_{7-1} 中总纤维素酶系活性^[5]和酶蛋白表达量^[6]等杂种优势表现的分子基础,而是比我们原本所期望的情形^[3]复杂得多。

2.3 重组子 3a、3b 和 A_{7-1} 的 CMCCase 同工酶多态性

从图版 I-C 可见,3a 和 A_{7-1} 与亲本 AMS11 CMCCase 主谱带型相似,但在低分子量端(高 R_f 值)分别多出数条微弱新生谱带,在高分子量端(低 R_f 值)又分别继承了亲本 QM9414 的部分特征谱带。特别是与 AMS11 和 QM9414 所对应的 3 条主要谱带(就 R_f 相同而言)都大大加强了,表明重组子中来自于双亲本 AMS11 和 QM9414 的编码 CMCCase 酶组分的基因表达水平显著提高了。这些特征是二个重组子超双亲杂种优势表现^[3,5]的实

质原因。3b 产孢表型特征相似于亲本 QM9414^[3,7], 这里主要继承了来自 QM9414 的部分 CMCase 带, 在低分子量端也有一条明显的新生谱带。新生谱带是否来源于基因重组或是翻译后修饰, 尚难定论。不过从 3b 菌株已经丢失了双亲株许多特征 CMCase 谱带却仍然表现出总酶系活性超双亲优势^[3,5]看来, 这种优势的基础不是主要来源于 CMCase 的贡献, 而应当是另有其因。

2.4 重组子 3a、3b 和 A₇₋₁ 的 β GLase 同工酶多态性

图版 I-D 展示了重组子 3a、3b 和 A₇₋₁ 都直观存在 β GLase 活性超双亲优势。3a 和 A₇₋₁ 与亲本 AMS11 的 β GLase 多态性相似, 但所对应的那些谱带都显著加强了, 表明重组子中来自于亲本 AMS11 的编码 β GLase 的基因表达水平显著增强了。这是重组子 3a 和 A₇₋₁ 显著超双亲优势表现^[3,5,6] 的又一实质原因。3b 不仅对应继承了亲本 AMS11 的上端二带, 还对应继承了亲本 QM9414 的一条带, 这些条带的表达活性都相对加强了, 表明 3b 中编码 β GLase 组分的基因不仅种类增加了, 而且其表达水平显著提高了。这些特征就是 3b 杂种优势的真正主要原因。值得特别注意的是, 3a 和 A₇₋₁ 中来自双亲本的编码 CMCase 组分基因的增强表达(图版 I-C)是与编码 β GLase 组分基因的增强表达(图版 I-D)正相关联的。3b 中由于来自双亲本的编码 β GLase 的基因种类增加和增强表达(图版 I-D), 也能够显著增强酶系总活力^[3,5]。对此我们称之为 β GLase 介导了纤维素酶系活性和酶蛋白合成的“双重协同增效”作用。

3 讨论

3.1 关于纤维素酶系基因组的属间遗传表达相容性

遗传相容性是指远缘基因组能在杂种后代中长期稳定存在和遗传而不被限制性排除, 表型上无“疯狂分离”; 表达相容性则是指在遗传稳定的基础上, 还具有纤维素酶系基因家族功能性的促进关系, 表型上有“杂种优势”。这两个侧面都共同表征了杂种后代中远缘基因组间的亲和性。本研究结果展示了三类典型重组子 3a、3b 和 A₇₋₁ 在基因组总 DNA 和纤维素酶系同工酶两个层次上的稳定的分子重组特征, 以及远缘基因组间的遗传稳定性和表达相容性。不仅为支持我们所建立的技术体系^[3-7] 的有效性提供了明确的分子生物学证据, 而且提供了进一步考察重组子代中纤维素酶系基因组间的遗传表达相容性, 和评估其杂种优势分子基础及其遗传稳定性的具体实验方法。可以作为所建技术体系中的一个补充环节。

3.2 关于重组子 3a、3b 和 A₇₋₁ 杂种优势的分子基础及其“双重协同增效”模型

本研究阐明了三类典型重组子中纤维素酶系杂种优势表现^[3,5,6] 的分子生物学基础的多样性, 即 (1)、3b 来源于双亲本基因组中部分 β GLase 编码基因的杂合迭加和增强表达(图版 I-D); (2)、3a 和 A₇₋₁ 来源于所对应继承的双亲本中部分 CMCase 和 β GLase 编码基因间的协调性增强表达, 并导致酶系中相应酶组分蛋白合成量的显著增加(图版 I-C, D)。特别指出, 无论是 3b 中单一增强表达 β GLase(图版 I-D) 还是 3a 和 A₇₋₁ 中同时增强表达 CMCase 和 β GLase(图版 I-C, D) 的情形, 不仅都能够显著提高总纤维素酶系水解活力^[3,5], 而且能够使得 CMCase 和 β GLase 的蛋白合成量整体协调性增加(图版 I-C, D)。这些实验事实突出了 β GLase 的中介作用。由此综合本文和前文^[3,5,6,7,14,15] 相关研究结果, 我们归纳

提出如图 1 所示的简化模型,借以从酶系活性表现和酶系诱导合成两个调控层次上来理解重组体内所发生的那种由 β GLase介导的“双重协同增效”作用。

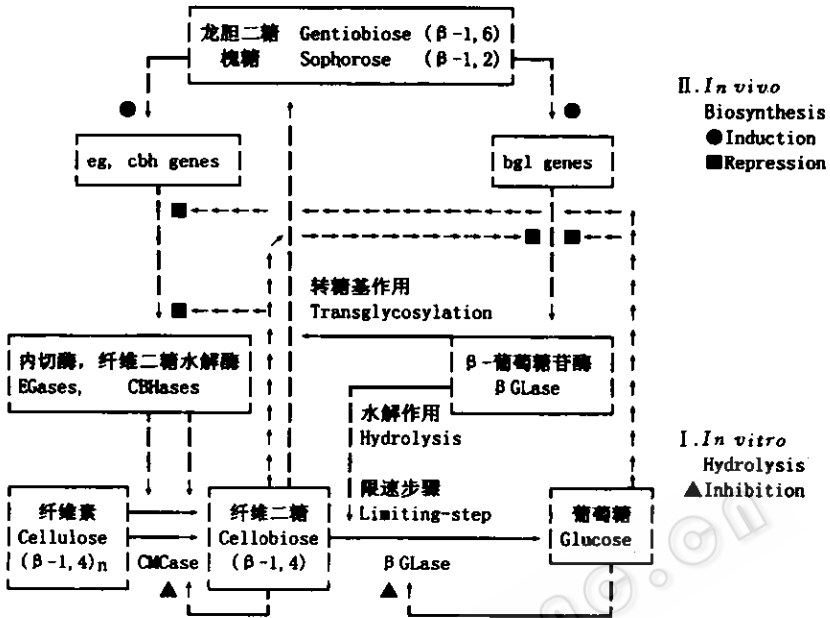


图 1 β GLase介导酶系体内生物合成与体外水解活性“双重协同增效”的假定模型

Fig.1 A proposed model for the double synergism on cellulase activity *in vitro* and its biosynthesis *in vivo* mediated by β -Glucosidase

图 1 模型假说不仅能够较好地概括以往生物化学、生理学、遗传学等研究所获得的关于体外酶系活性调节的描述性结论,而且有助于理解近年来关于体内酶系诱导合成调控的某些猜想和实验现象^[14,15],为在分子水平上深入探讨纤维素酶系多基因诱导表达级联调控的有关结构化学和分子生物学机制,提供了有益的启示。

正如图 1-I 部分所示,早年关于体外试验已认识到在酶系组分间协同作用的活性调节过程^[3,14]中, β GLase进一步催化纤维二糖水解起着关键性的限速因子作用。本项研究结果还展示出当重组子菌丝在纤维素诱导性基质上生长时,菌丝体内的情形是更加复杂的动态网络调控过程。除了发生上述酶系组分间的活性调节(图 1-I 部分示)外,还能进而促进菌体提高酶蛋白合成水平。尽管目前尚不清楚具体机制,但体外转化试验^[14,15]和本项研究(图版 I-C, D)结果已经强烈暗示了 β GLase在调节酶系诱导合成方面同样起着关键性的中介作用。例如,通过所谓的“转糖基作用”将纤维二糖(β -1,4)修饰为如槐糖(β -1,2)、龙胆二糖(β -1,6)等衍生物^[14,15]。由此不仅解除了过量积累的纤维二糖抑制酶系活性及阻遏酶系合成的效应,而且这些衍生物较纤维二糖具备了更强的诱导能力,进而在基因表达水平上极大地促进纤维素酶系(包括 β GLase组分自身)的合成(如图版 I-C, D 所示)。酶系蛋白合成量的增加又反过来促进了它对纤维素基质的降解,由此能够在更高速率水平上建立起新的动态平衡(如图 1-II 部分示)。如此衍化,直至所积累的降解终产物葡萄糖的浓度达到相当量后足以发生对纤维素酶系基因组转录的强烈阻遏调节时为止。最终综

合表现出重组子在酶系活性^[3,5]、酶蛋白合成量^[3,6]、菌体生长势和酶系合成速率(另文发表)等多方面相互关联的显著杂种优势。

致谢 感谢中国科学院遗传研究所朱立煌教授、李晓兵讲师对 RAPD 项目实验所提供的指导和帮助!

参 考 文 献

- [1] Kirimura K, Imura M, Kato Y *et al.* *Agric Biol Chem*, 1990, **54**(5): 1281~1283.
- [2] Taboun M K, Ibrahim A A, Badir E A. Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Program and Abstracts, Poster 94. Colorado, USA, May 7~11, 1995.
- [3] 艾云灿, 孟繁梅. 灭活原生质体介导纤维素酶系基因组转移实现木霉与曲霉属间融合育种. 见: 湖北省科学技术委员会编. 中国科协首届青年学术年会(湖北)优秀论文集. 武汉: 武汉大学出版社, 1994. 295~301.
- [4] 艾云灿. 丝状真菌纤维素酶系细胞融合育种方法改良. 见: 中国遗传学会微生物遗传专业委员会编. 中国微生物遗传学学术讨论会论文摘要集. 武汉: 武汉大学出版社, 1994. 1.
- [5] Ai Y C, Zhao X H, Yu J L. *Chinese J Biotechnol*, 1994, **10**(1): 61~66.
- [6] Ai Y C, Meng F M, Gao P J *et al.* *Chinese J Biotechnol*, 1996, **12**(1): 30~37.
- [7] 艾云灿, 孟繁梅, 许耀才, 等. 原养型黑曲霉与里氏木霉紫外致死融合子代群体的表型与基因型分析. 见: 钱新民等. 王祖农教授执教五十周年学术研讨会论文集. 济南: 山东大学出版社, 1995. 65~69.
- [8] Zu H, Jun F, Zhu L. *Nucl Acid Res*, 1993, **21**(22): 5279~5280.
- [9] Williams J G K. *Nucl Acid Res*, 1990, **18**(22): 6531~6535.
- [10] Roy A. *Theor Appl Genet*, 1992, **82**(2): 173~180.
- [11] Saloheimo M, Lehtovaara P, Penttila M *et al.* *Gene*, 1988, **63**: 11~21.
- [12] Gilkes N R, Henrissat B, Kilburn D G *et al.* *Microb Rev*, 1991, **55**(2): 303~315.
- [13] Coughlan M P. *Methods in Enzymology*, Vol. 160. London: Academic Press Inc, 1988. 135~145.
- [14] Kubicek C K, Messner R, Gruber F *et al.* *Enzyme Microb Technol*, 1993, **15**: 90~99.
- [15] 艾云灿, 孟繁梅, 高培基, 等. 色谱质谱联用研究质膜结合态 β -葡萄糖苷酶的体外原位转糖基与水解作用. 见: 中国博士后论文集编审委员会编. 中国博士后论文集. 北京: 科学出版社, 1996. 60~66.

THE INTERGENERIC COMPATIBILITY OF HEREDITY AND EXPRESSION FOR CELLULASE GENOMES BETWEEN *ASPERGILLUS NIGER* AND *TRICHODERMA REESEI*

Ai Yuncan^{1,2} Teng Rujun² Gao Peiji² Meng Fanmei^{1,2} Wang Zunong²

(¹ School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

(² Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract By using the developed display techniques of cellulase isozymes and the RAPD-PCR analysis guided by a deduced universal sequence of cellulase genes, the polymorphisms of genomic DNA fingerprints and cellulase isozymes were compared among three typical stable recombinants (3a, 3b, A₇₋₁) and their two parents

(*Aspergillus niger* AMS11, *Trichoderma reesei* QM9414) in order to provide the molecular evidence of gene recombination, to demonstrate the compatibility of heredity and expression of intergeneric genomes, and to assay on the molecular fundamentals of hybridization dominance. The results showed that in these recombinant strains the recombinant fingerprints of genomic DNA could be stably hereditary and the expression of recombinant CMCase (carboxymethylcellulase) and β GLase (β -glucosidase) could be compatibly enhanced. The diversity of molecular fundamentals of cellulase hybridization dominance were (1) the compatible co-existence and enhanced expression of some hereditary β GLase-coding genes from two parents in recombinant 3b; and (2) the compatibly enhancement of expression between the hereditary genes encoding β GLase and CMCase from two parents, resulting in the dramatic increase of proteins of corresponding isozymes in recombinants 3a and A₇₋₁. Based on these, a proposal model for the double synergism on cellulase activity in vitro and on its biosynthesis in vivo mediated by β GLase was suggested. A practical method for assaying on the molecular fundamentals and the stability of hybridization dominance of recombinants was thereby established in this study.

Key words Cellulase, Compatibility of heredity and expression, Polymorphism of random amplification of genomic DNA (RAPD-PCR), Isozyme display and type, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*