

# 利用红色荧光蛋白分析里氏木霉合成纤维素酶的机理

刘 刚 张 燕 李 云 余少文 邢 苗

(深圳市微生物基因工程重点实验室 深圳大学生命科学学院 深圳 518060)

**摘 要:**以红色荧光蛋白作为报告蛋白研究了里氏木霉的纤维素酶合成机理。构建了里氏木霉的表达盒,通过该表达盒使红色荧光蛋白的基因整合到里氏木霉的基因组 DNA 上,并受纤维二糖水解脱酶基因启动子的调控,得到重组菌株 *T. reesei* TR2。在不同的条件下培养 *T. reesei* TR2,红色荧光蛋白的表达情况可以反映在不同条件下里氏木霉合成纤维素酶的情况。在诱导的情况下,红色荧光蛋白随时间变化的情况与培养液中纤维素酶活性的变化相似,培养至 36h 后可以观察到荧光,并且不断增强,到菌丝自溶时荧光减弱。另一方面,诱导后里氏木霉菌丝的各个部位均可以观察到荧光,而且分布均匀,表明菌丝的各个部位在纤维素酶合成过程中所起的作用相同。在非诱导的情况下,培养时间较长时也可以观察到较弱的荧光,表明在此条件下里氏木霉仍可以合成少量的纤维素酶,这一结果为解释纤维素诱导里氏木霉合成纤维素酶的机理提供了另一个试验依据。

**关键词:**丝状真菌;里氏木霉;红色荧光蛋白;纤维素酶;纤维二糖水解脱酶

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)01-0069-06

丝状真菌是一类重要的微生物,被广泛用于抗生素、酶制剂、有机酸等的生产。与细菌如大肠杆菌、枯草杆菌等相比,丝状真菌的生长、代谢机理比较特殊。一方面,丝状真菌的生长不是由裂殖方式实现的,而是通过菌丝生长尖端的延伸和在菌丝上形成新的分枝来完成的。一些学者根据丝状真菌菌丝各部位在生长和代谢中的不同作用将液体培养中的菌丝分为 3 种形态(morphology),即菌丝生长尖端(apical compartment)、分枝形成段(亦称尖端后部,subapical compartment)和菌丝主体(hyphal compartment)<sup>[1,2]</sup>。他们认为,丝状真菌在生长时菌丝生长尖端通过软化顶端的细胞壁并不断合成新的细胞壁和其它细胞组分而使菌丝延伸,分枝形成段通过类似的作用产生分枝(也就是新的菌丝生长尖端),菌丝主体与菌丝的延伸和分枝没有直接的关系,但可以合成菌丝生长所需要的一些中间体并向菌丝前端输送,为菌丝的延伸和分枝提供前体。另一方面,丝状真菌具有明显的细胞分化,在其世代周期中会形成形态及代谢模式都具有显著差异的细胞,如分生孢子。丝状微生物的这种形态分化过程往往与某些代谢产物的合成之间存在某种联系,而不同形态的细胞对菌体生长及代谢产物的合成可能具有不同的贡献<sup>[3,4]</sup>。深入了解丝状真菌的重要基

因在不同的培养阶段(时间)以及在菌丝的不同形态或部位(空间)的表达,将有利于对以丝状真菌为菌种的发酵过程进行优化<sup>[5]</sup>。

里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是重要的纤维素酶产生菌,可以合成至少包括 4 种内切- $\beta$ -葡萄糖苷酶(EG, EC 3.2.1.4)、两种纤维二糖水解脱酶(CBH, EC 3.2.1.91)和一种纤维二糖酶(BG, EC 3.2.1.21)的纤维素酶系<sup>[6,7]</sup>。在 *T. reesei* 的纤维素酶系中 CBH I 的含量最高<sup>[8]</sup>。本工作将红色荧光蛋白(DsRed)的基因整合到 *T. reesei* 的染色体上,使之位于在纤维二糖水解脱酶 I 基因(*cbh1*)的启动子下游,并使其表达受到该启动子的调控。研究了在诱导和非诱导的情况下 DsRed 在各个培养阶段以及在菌丝不同部位的表达情况,进一步阐明了纤维素酶在 *T. reesei* 中的合成机制,并通过直接的实验手段揭示了丝状真菌的不同菌丝形态在代谢产物合成中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**里氏木霉(*Trichoderma reesei*) QM9414 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心,大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP10F' 为本室保藏菌株。质粒 pDsRed2-N1 和 pPICZaA 分别由 Clontech

基金项目:国家自然科学基金(20206017)

作者简介:刘 刚(1969-),男,湖北人,副教授,博士,研究方向为应用微生物学。Tel:86-755-26534977; Fax:86-755-26534274; E-mail: zjuliug@szu.edu.cn

收稿日期:2006-03-09;接受日期:2006-05-08;修回日期:2006-06-25

和 Invitrogen 提供,质粒 pAN7-1 由山东大学汪天虹教授惠赠。

**1.1.2 工具酶和试剂** 限制性内切酶、DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 片段纯化试剂盒等为大连宝生物公司产品。卡那霉素、氨基青霉素、蛋白胨、酵母抽提物、山梨醇等为上海生物工程技术有限公司的产品。抗生素 zeocin 和潮霉素 B (hygromycin B) 购自 Invitrogen 公司。寡核苷酸合成和 DNA 序列测定由 TaKaRa 公司完成。

**1.1.3 培养基** 用低盐 LB 培养基进行 *E. coli* 的培养。在 *E. coli* 转化菌落时加入 25 $\mu$ g/mL zeocin。使用 PDA 培养基(土豆汁 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 2%) 进行 *T. reesei* 的平板培养,用 Mandels 培养基进行 *T. reesei* 的三角瓶培养<sup>[9]</sup>。*T. reesei* 的原生质体再生培养基为用 1.2mol/L 山梨醇-10mmol/L Tris·Cl (pH7.5)-50mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液(STC 溶液)配制的 Mandels 培养基,在进行固体培养时加入 2% 的琼脂。*T. reesei* 重组菌株的筛选培养基为用 STC 溶液配制的 PDA,并含 100 $\mu$ g/mL 的潮霉素 B。*T. reesei* 原菌株以及重组菌株的诱导产酶培养基为含 20g/L 乳糖和 0.3g/L 酵母抽提物的 Mandels 培养基,非诱导培养基为含 20g/L 葡萄糖和 0.3g/L 酵母抽提物的 Mandels 培养基。在平板上进行固体产酶培养时在上述培养基中加入 2% 的琼脂。

## 1.2 *cbh1* 启动子和终止序列及 *DsRed* 基因的分离

采用 PCR 扩增方法以里氏木霉的基因组 DNA 为模板分离 *cbh1* 的启动子( $P_{cbh1}$ )和终止序列( $T_{cbh1}$ ),以质粒 pDsRed2-N1 为模板分离 *DsRed*。PCR 扩增所用的引物列于表 1。扩增 *cbh1* 启动子序列的上下游引物分别为 TRU1 和 TRU2。PCR 反应体系(总体积 50 $\mu$ L)含 200 $\mu$ mol/L dNTP,1.25U *Taq* DNA 聚合酶,20pmol 引物,200ng 模板。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,54 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。扩增 *cbh1* 终止序列( $T_{cbh1}$ )和扩

表 1 本研究所使用的 PCR 引物

Table 1 The PCR primers used in this work

Primers	Sequence(5' ~ 3')	Restriction site
TRU1	AGT GAGCTC ACTCCGAAGCTGCTGCGAA	<i>Sac</i> I
TRU2	GTA GAAATTC CATGATGCCAGTCCGA	<i>Eco</i> R I
TRT1	GTC TCTAGA AGCTCCGTCCGAAAGCCTGA	<i>Xba</i> I
TRT2	AGT GGAATCCTGGTACTGGGATACAGGAAGA	<i>Bam</i> H I
DsRed1	AGT GGTACC ATGGCCTCCTCCGAGGT	<i>Kpn</i> I
DsRed2	GTA GCGGCCGCTACAGGAACAGTGGTGGCG	<i>Not</i> I
HPH1	ATGCCTGAACCTACCCGAC	none
HPH2	ACTCTATTCTTTCCTCCG	none

增红色荧光蛋白基因(*DsRed*)的 PCR 反应体系同上。扩增  $T_{cbh1}$  序列所使用的上下游引物分别为 TRT1 和 TRT2,退火温度为 52 $^{\circ}$ C;扩增 *DsRed* 所使用的上下游引物分别为 DsRed1 和 DsRed2,退火温度为 56 $^{\circ}$ C。扩增不同片段的延伸时间根据片段大小进行相应的调整。

## 1.3 表达盒 $P_{cbh1}$ -*DsRed*- $T_{cbh1}$ 的构建

由 PCR 扩增得到的  $P_{cbh1}$  序列经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后用 *Sac* I 和 *Eco* R I 进行双酶切,然后与同样酶切的 pPICZ $\alpha$ A 连接,得到重组质粒 pPICZ $\alpha$ A- $P_{cbh1}$ 。由 PCR 扩增得到的  $T_{cbh1}$  序列经纯化后用 *Xba* I 和 *Bam* H I 进行双酶切后与同样双酶切的重组质粒 pPICZ $\alpha$ A- $P_{cbh1}$  连接,得到重组质粒 pPICZ $\alpha$ A- $PT_{cbh1}$ 。最后将经 *Kpn* I 和 *Not* I 酶切的 *DsRed* 的扩增产物与 pPICZ $\alpha$ A- $PT_{cbh1}$  连接,得到含  $P_{cbh1}$ -*DsRed*- $T_{cbh1}$  表达盒的重组质粒 pPICZ $\alpha$ A-PDT。

## 1.4 *T. reesei* 的转化

*T. reesei* 原生质体的制备和转化主要按照 Penttilä 等<sup>[10]</sup>的方法进行,但略作改进。*T. reesei* 于 Mandels 培养基中培养 24h 后用 5mg/mL 溶壁酶(广东省微生物研究所,用 1mol/L MgSO<sub>4</sub> 配制)制备原生质体,并将原生质体悬浮于 STC 溶液中。调整原生质体的浓度为 10<sup>8</sup> 个/mL,取 200 $\mu$ L,加入 10 $\mu$ g  $P_{cbh1}$ -*DsRed*- $T_{cbh1}$  和 10 $\mu$ g pAN7-1 进行转化。转化完毕后原生质体经 STC 缓冲液洗涤、重悬,并加入到 10mL 液体再生培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、70r/min 的条件下培养 24h。液体再生产物经离心、1mL STC 溶液重悬后,涂布于 5 个选择性平板上,28 $^{\circ}$ C 培养 3~5d。

## 1.5 *T. reesei* 转化子的基因型鉴定

根据 pAN7-1 上潮霉素抗性基因(*hph*)设计 PCR 引物 HPH1 和 HPH2(表 1)。以转化子基因组 DNA 为模板,分别以引物 HPH1 和 HPH2, DsRed1 和 DsRed2, TRU1 和 DsRed2, DsRed1 和 TRU2 以及 TRU1 和 TRU2 进行 PCR 扩增。并将用引物 TRU1 和 TRU2 扩增所得的 PCR 产物进行核苷酸序列测定。

## 1.6 重组 *T. reesei* 的培养和荧光蛋白的观察

分别在平板和 250mL 三角瓶中进行重组 *T. reesei* 菌株的诱导和非诱导培养。在三角瓶中培养时,分别用诱导培养基和非诱导培养基进行培养,每隔 12h 取样一次,于 Olympus DP70 数码荧光显微镜下观察菌丝中红色荧光蛋白的表达情况。在平板上培养时,分别使用加入 2% 琼脂的诱导培养基和非诱导培养基进行培养,每隔 12h 将平板直接置于荧

光显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 表达盒 $P_{cbh1}$ -*DsRed*- $T_{cbh1}$ 的构建

以 *T. reesei* 基因组 DNA 为模板,分别扩增了 *T. reesei* 中 *cbh1* 基因的启动子序列 ( $P_{cbh1}$ ) 和终止序列 ( $T_{cbh1}$ ),得到了分子量为 1500bp 和 340bp 的片段,与预期的大小相符。以质粒 pDsRed2-N1 为模板,经 PCR 扩增得到了 680bp 的 *DsRed* 基因。依次将  $P_{cbh1}$ 、 $T_{cbh1}$  和 *DsRed* 连接到质粒 pPICZ $\alpha$ A 中,得到含  $P_{cbh1}$  的重组质粒 pPIC- $P_{cbh1}$  (4.1kb)、含  $P_{cbh1}$  和  $T_{cbh1}$  的重组质粒 pPIC-PT $_{cbh1}$  (4.0kb) 以及含  $P_{cbh1}$ -*DsRed*- $T_{cbh1}$  表达盒的重组质粒 pPIC-PDT (4.7kb)。重组质粒 pPIC-PDT 的结构如图 1 所示。采用酶切、PCR 扩增和序列测定对质粒 pPIC-PDT 进行了鉴定,结果表明,质粒 pPIC-PDT 经 *Kpn* I 和 *Not* I 双酶切得到大小约为 4.0kb 和 680bp 的片段,分别对应于 pPIC-PT $_{cbh1}$  和 *DsRed* 基因的大小。以质粒 pPIC-PDT 为模板,用引物 TRU1 和 TRT2 进行 PCR 扩增,得到大小为 2.5kb 左右的片段,对应于表达盒  $P_{cbh1}$ -*DsRed*- $T_{cbh1}$  的大小。对该表达盒进行了序列测定,结果表明该表达盒中各部分的核苷酸序列正确,而且 *DsRed* 与  $P_{cbh1}$  的连接正确(即具有正确的阅读框)。

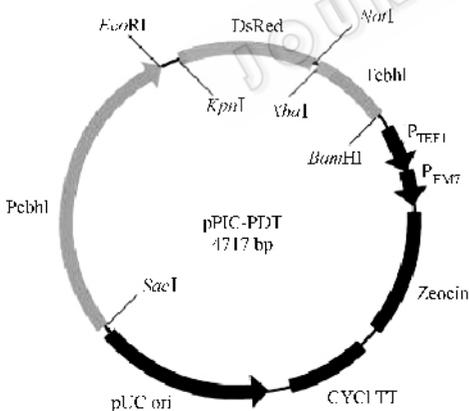


图 1 重组质粒 pPIC-PDT 的物理图谱

Fig.1 Physical map of the recombinant plasmid pPIC-PDT.

### 2.2 表达盒 $P_{cbh1}$ -*DsRed*- $T_{cbh1}$ 与质粒 pAN7-1 对 *T. reesei* 的共转化

将  $10\mu\text{g}$   $P_{cbh1}$ -*DsRed*- $T_{cbh1}$  表达盒和  $10\mu\text{g}$  pAN7-1 对 *T. reesei* 进行共转化,并在液体再生培养基中进行转化子的再生。再生培养 24h 后球状原生质体再生并长出芽管,呈短丝状,有些则凝集在一起。将此阶段的再生转化子均匀地涂布在含  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B 的筛选平板上,于  $28^\circ\text{C}$  培养 3~5d 后得到具有

潮霉素抗性的转化子 20 株,转化效率为 2 株转化子/ $\mu\text{g}$ DNA。在对照实验中,未转化质粒的 *T. reesei* 原生质体在  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B 的筛选平板上不生长。以转化子的基因组 DNA 为模板,用引物 HPH1 和 HPH2 进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳得到大小约 1.0kb 的潮霉素磷酸转移酶基因 *hph* 的特异带。而用 *T. reesei* QM9414 的基因组 DNA 为模板进行同样的 PCR 反应,没有出现扩增产物。

将 20 株转化子分别于诱导培养基中进行培养,48h 后在荧光显微镜上观察,有 5 株转化子可以表达红色荧光蛋白。表达盒  $P_{cbh1}$ -*DsRed*- $T_{cbh1}$  与 pAN7-1 的共转率达 25%。在非诱导产酶培养基中进行培养,这些转化子均不表达红色荧光蛋白,表明在转化子中 *DsRed* 的表达是受 *cbh1* 启动子调控的。取一株表达红色荧光蛋白的转化子 TR2 进行基因型鉴定。以转化子 TR2 的基因组 DNA 为模板,用引物 *DsRed*1 和 *DsRed*2 可以扩增出 680bp 的片段,对应于基因 *DsRed* 的大小;用引物 TRU1 和 *DsRed*2 可以扩增出 2.2kb 左右的片段,对应于  $P_{cbh1}$  序列和基因 *DsRed* 的大小之和;用引物 *DsRed*1 和 TRU2 可以扩增出对应于基因 *DsRed* 和  $T_{cbh1}$  序列总大小的 1.0kb 左右的片段;用引物 TRU1 和 TRT2 扩增出约 2.5kb 和 3.5kb 的两个片段,分别对应于表达盒  $P_{cbh1}$ -*DsRed*- $T_{cbh1}$  和 *cbh1* 基因的大小。以 *T. reesei* QM9414 的基因组 DNA 为模板进行上述 PCR 反应,只有引物 TRU1 和 TRT2 可以扩增出一条长 3.5kb 左右的条带,对应于基因 *cbh1* 及其上下游序列的大小。

### 2.3 *T. reesei* 中纤维素酶基因时空表达的分析

2.3.1 菌丝各部位在纤维素酶合成中的作用:在用乳糖诱导的情况下,在液体培养基中培养重组里氏木霉菌株 *T. reesei* TR2 至 48h 可以观察到较强的荧光,此时荧光蛋白在菌丝中已经有一定程度的积累。对比荧光下的菌丝形态和可见光下的菌丝形态,可以发现菌丝的各个部位都能够合成 *DsRed*,而且该蛋白在菌丝中的分布均匀。继续培养该菌株,直至菌丝发生自溶以前,*DsRed* 在里氏木霉菌丝的各个部位的积累也未发生明显的变化(图 2)。由于在重组菌株 *T. reesei* TR2 中 *DsRed* 的表达受 *T. reesei* *cbh1* 启动子的调控,因此红色荧光蛋白的积累可以比较直观地反映菌丝各个部位合成纤维素酶的情况。图 2 所示的结果表明,里氏木霉菌丝的各个部位在纤维素酶合成中所起的作用相同。

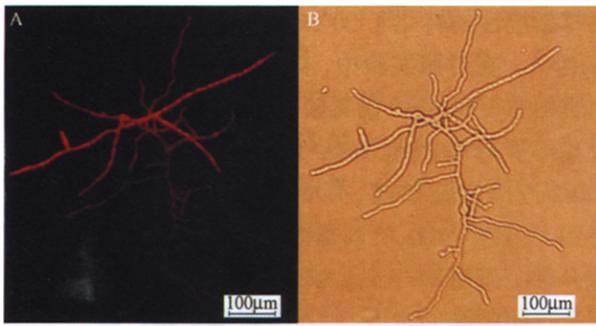


图2 诱导培养 48h DsRed 在重组菌株 *T. reesei* TR2 菌丝各部位的分布

Fig.2 The distribution of expressed DsRed in the hyphae of *T. reesei* TR2 at 48h of lactose induced cultivation. The fluorescent (A) and transmission (B) images are shown respectively.

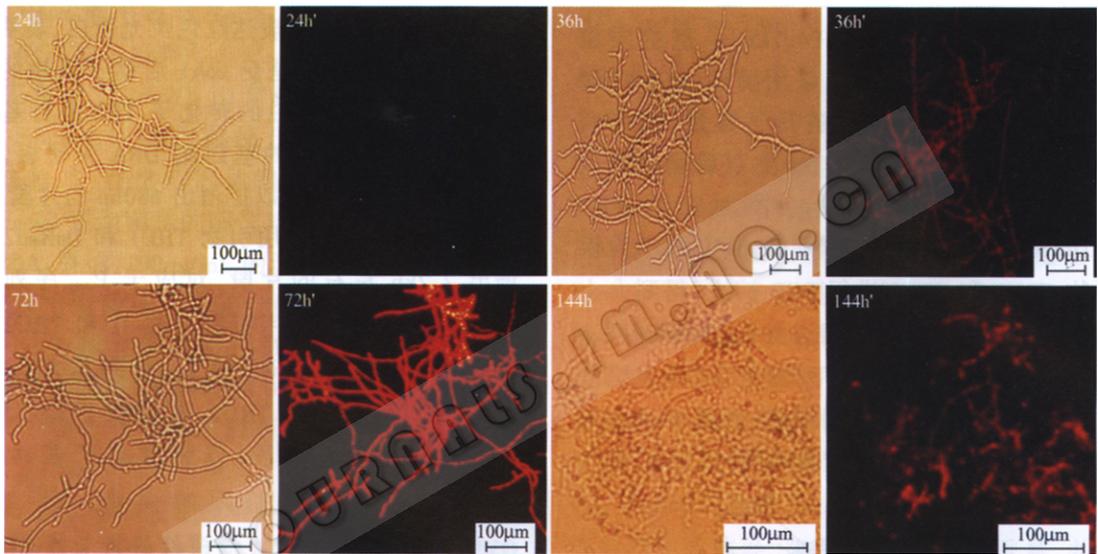


图3 诱导表达后不同培养时间 DsRed 在重组菌株 *T. reesei* TR2 菌丝中的表达情况

Fig.3 The temporal expression of DsRed in *T. reesei* TR2 at different incubation time after induction. The fluorescent and transmission images are shown on the right and left respectively.

丝在荧光显微镜下观察时,菌丝的荧光非常强,很难分辨不同培养时间菌丝荧光强度的差别。培养至

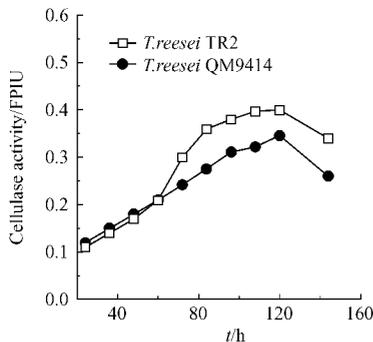


图4 诱导后重组菌株 *T. reesei* TR2 和原菌株 *T. reesei* QM9414 培养液中纤维素酶活性的时间曲线

Fig.4 The time course of cellulase production from the recombinant strain *T. reesei* TR2 and the original strain *T. reesei* QM9414 after induction.

2.3.2 纤维素酶的表达与培养时间的关系:*T. reesei* 纤维素酶的发酵分为种子培养和产酶培养两个阶段,在产酶培养时还需要加入纤维素或乳糖等诱导物进行诱导。为便于在荧光显微镜下观察菌丝,本工作采用乳糖诱导。在种子培养阶段,由于没有诱导,而且培养时间不长(48h),因此没有观察到荧光。将种子培养物接入到诱导产酶培养基后 DsRed 的表达情况如图 3 所示。培养到 12h 时,可能红色荧光蛋白的基因已开始进行表达,但由于表达量太少的缘故,仍看不到荧光。在培养至 36h 时观察,绝大多数菌丝都表达了红色荧光蛋白,但荧光的强度相对较弱。培养时间在 48h 至 96h 之间的菌

144h 时菌丝开始自溶,仍可以观察到荧光,但强度减弱。一般而言,菌丝自溶后其内容物会被降解,但从本文的结果来看,DsRed 被降解的程度较轻。在相同的条件下培养原菌株 *T. reesei* QM9414 和重组菌株 *T. reesei* TR2,分析其培养液中纤维素酶的活性(图 4)。培养液中纤维素酶的活性变化和红色荧光强度的变化相似,在培养至 120h 以前酶活性逐渐上升,在 120h 后因菌丝的自溶而出现下降。

在不进行诱导的情况下,培养重组菌株 *T. reesei* TR2 在 72h 以前均观察不到荧光,但从 72h 开始在较大的菌丝团中出现了少数可表达少量荧光蛋白的菌丝(图 5)。这一结果说明在非诱导的情况下,里氏木霉中纤维素酶的表达受到调控,但调控并不是十分严谨,仍可以产生少量的纤维素酶。

2.3.3 重组菌株 *T. reesei* TR2 在皿上的培养:取

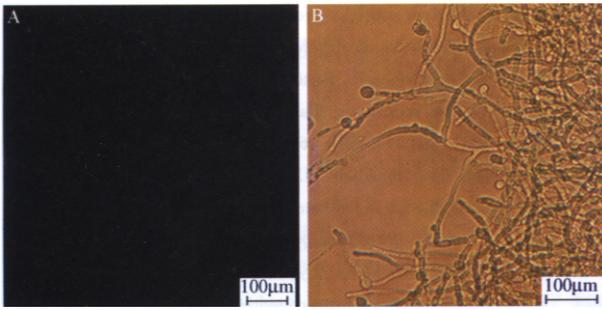


图 5 非诱导情况下 DsRed 在重组菌株 *T. reesei* TR2 菌丝中的表达情况

Fig.5 Expression of DsRed in *T. reesei* TR2 without induction. The fluorescent (A) and transmission (B) images are shown respectively.

*T. reesei* TR2 的孢子悬浮液,经过适当的稀释后涂布到含诱导或非诱导固体培养基的平板上,使每个平板约产生 20 个菌落,定期在荧光显微镜下观察菌丝形态。在进行诱导的情况下培养至 72h 时可以观察到荧光。与液体培养的情况一致,菌丝的各个部位都有红色荧光蛋白的积累,表明菌丝的各个部位都在纤维素酶的合成中发挥作用。在非诱导的情况下,培养至 9d 时也可出现少量的荧光蛋白的表达,但表达量非常少,与液体培养情况类似(图 6)。

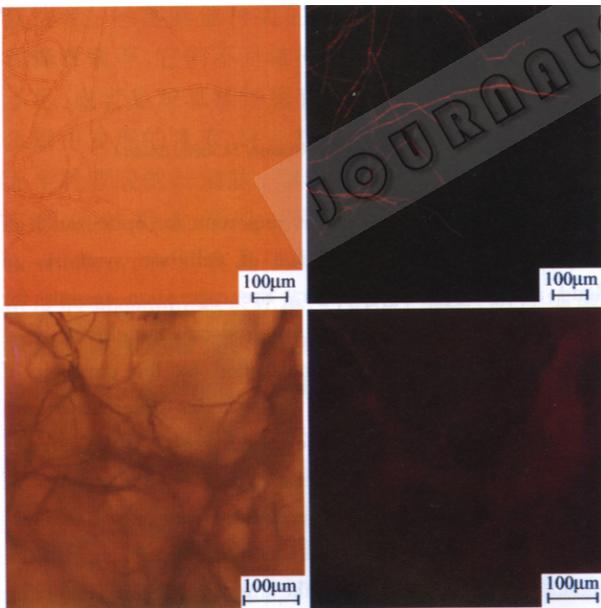


图 6 在诱导(上)和非诱导(下)的情况下进行平板固体培养时 DsRed 在重组菌株 *T. reesei* TR2 菌丝中的表达情况

Fig.6 Expression of DsRed in *T. reesei* TR2 cultivated on agar plates with (top) and without (bottom) induction. The fluorescent and transmission images are shown on the right and left respectively.

### 3 讨论

本研究以 DsRed 为报告蛋白,研究了里氏木霉

中纤维素酶的合成机制。将 DsRed 的基因插入到里氏木霉的基因组 DNA 上,并使其表达受 *cbh1* 启动子的调控,对该蛋白表达情况进行分析就可以揭示纤维素酶的合成机制。在诱导的情况下 *cbh1* 启动子被激活,重组菌株 *T. reesei* TR2 可以合成 DsRed。DsRed 在 *T. reesei* 菌丝的生长尖端、分枝形成段和菌丝主体的表达情况没有显著的差别,表明 *T. reesei* 菌丝的各个部位在纤维素酶的合成中发挥了相同的作用。在诱导的情况下,重组菌株 *T. reesei* TR2 培养至 36h 以后可以看到明显的荧光,培养至 48h 后荧光强度显著增加,培养至 144h 后由于菌丝的自溶,荧光强度又有所下降。在重组菌株中荧光强度的变化与培养液中纤维素酶活性的变化情况相似。在非诱导的情况下,重组菌株 *T. reesei* TR2 的少数菌丝培养至 72h 以后可以观察到较弱的荧光。这一结果表明即使在没有诱导的情况下,*cbh1* 也有少量表达。

有一些学者认为,除了在菌丝的延伸中发挥不同的作用以外,丝状真菌菌丝的不同部位在代谢中所起的作用也不相同。菌丝生长尖端只和菌丝的延伸有关,而与代谢产物,特别是次级代谢产物的合成无关,代谢产物主要由分枝形成段或菌丝主体合成<sup>[11,12]</sup>。这一观点被广泛接受,并被用来建立丝状真菌发酵的动力学模型<sup>[13]</sup>。然而,该观点只是一种假设,尚没有直接的实验现象能够支持它。本文的试验结果不支持这一假设。美国学者 Kyung 等将绿色荧光蛋白的基因克隆到 *Streptomyces calvuligerus* 中,并使之受头孢霉素(cephamycin)生物合成基因启动子的调控,观察了绿色荧光蛋白在菌丝中的表达情况。根据他们所提供的荧光显微图象,也能推断菌丝的各部位,如菌丝生长尖端、分枝形成段和菌丝主体在头孢霉素的生物合成中发挥了相同的作用<sup>[14]</sup>。

众所周知,纤维素可以诱导里氏木霉产生纤维素酶,但纤维素是一种不溶于水的固体底物,它是通过什么样的机理进行诱导的呢?关于这个问题目前有两种看法(1)纤维素酶的大量表达需要诱导,但有些纤维素酶组分在不诱导的情况下也可以少量表达,这些微量的酶使纤维素水解产生寡糖,这些可溶性的寡糖可以诱导纤维素酶的大量表达(2)在里氏木霉的细胞表面存在一些特殊的受体,这些受体可以与纤维素发生作用从而启动纤维素酶的表达。Carle-Urioste 等<sup>[15]</sup>提出了第一种观点,并在非诱导的情况下检测到里氏木霉 *cbh1* 和 *eg1* 基因的微量转录。本文的试验结果支持他们提出的诱导机理。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Megee KD, Kinoshita S, Fredrickson AG. Differentiation and product formation in molds. *Biotechnology and Bioengineering*, 1970, **12**(5):771-778.
- [ 2 ] Bellgardt KH. Process models for production of beta-lactam antibiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1998, **60**:153-194.
- [ 3 ] Liu G, Xu ZN, Cen PL. A morphologically structured model for mycelial growth and secondary metabolite formation. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2000, **8**(1):46-51.
- [ 4 ] Birol G, Unkey C, Parulekar SJ, *et al.* A morphologically structured model for penicillin production. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, **77**(5):538-552.
- [ 5 ] Nielsen J. Modelling the growth of filamentous fungi. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 1992, **46**:187-226.
- [ 6 ] Wood TM. Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochemistry Society Transactions*, 1984, **13**(3):407-410.
- [ 7 ] Claeysens M, van Tilbeurgh H, Kamerling JP, *et al.* Studies of the cellulolytic system of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* QM9414. *Biochemical Journal*, 1990, **270**(1):251-256.
- [ 8 ] Durand H, Clanot M, Tiraby G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology*, 1988, **10**(6):341-346.
- [ 9 ] Mandels M, Andreotti RE. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. *Process Biochemistry*, 1978, **13**:6-13.
- [ 10 ] Penttil M, Nevalainen H, Rättö M, *et al.* A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 1987, **6**(2):155-164.
- [ 11 ] Zangirolami TC, Johansen CL, Nielsen J, *et al.* Simulation of penicillin production in fed-batch cultivations using a morphologically structured model. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **56**(6):593-604.
- [ 12 ] Paul GC, Thomas CR. A structured model for hyphal differentiation and penicillin using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, **51**(5):558-572.
- [ 13 ] Agger T, Spohr AB, Carlsen M, *et al.* Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations: verification of a morphologically structured model using fluorescent probes. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **57**(3):321-329.
- [ 14 ] Kyung YS, Hu WS, Sherman DH. Analysis of temporal and spatial expression of the CcaR regulatory element in the cephamycin C biosynthetic pathway using green fluorescent protein. *Molecular Microbiology*, 2001, **40**(3):530-541.
- [ 15 ] Carle-Urioste JC, Escobar-Vera J, El-Gogary S, *et al.* Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(15):10169-10174.

## Analysis of cellulase synthesis mechanism in *Trichoderma reesei* using red fluorescent protein

LIU Gang\*, ZHANG Yan, LI Yun, YU Shao-wen, XING Miao

(Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

**Abstract** Comprehensive analysis of the mechanism of metabolite synthesis in filamentous fungi is important for optimization of the filamentous fungus related industrial fermentation processes. In this work, the mechanism of cellulase synthesis in *Trichoderma reesei* was analyzed with red fluorescent protein (DsRed) as the reporting protein. The expression cassette for heterologous protein expression in *T. reesei* was constructed, through which the DsRed gene was inserted into the chromosomal DNA of *T. reesei*. The recombinant *T. reesei* strain, in which expression of DsRed was controlled by the promoter of cellobiohydrolase gene, was designated as *T. reesei* TR2. Expression of DsRed in *T. reesei* TR2 under different culture conditions was analyzed by using a fluorescent microscopy, and thereby the mechanism of cellulase gene expression in *T. reesei* could be interpreted. With induction of lactose, the pattern of change of red fluorescence in *T. reesei* TR2 was similar to that of the cellulase activity in the cultivation supernatant. As the culture aged, the red fluorescence in the mycelial increased. This was followed by a reduction in the end of the culture period because of death and autolysis of the mycelial. In the spatial aspect, the red fluorescence was distributed uniformly in the whole hypha after induction, indicating that all the three morphology including apical compartment, subapical compartment and hyphal compartment played a same role in cellulase synthesis. When *T. reesei* TR2 was cultivated without induction, faint red fluorescence appeared after a relative long period of cultivation, indicating that a small amount of cellulase was still synthesized without induction. This result was useful in explaining the mechanism of cellulase induction by insoluble cellulose.

**Keywords**: Filamentous fungus; *Trichoderma reesei*; Red fluorescent protein; Cellulase; Cellobiohydrolase