

里氏木霉细胞表面表达系统的构建

苏建臣¹, 欧阳浩淼¹, 赵婉¹, 董志扬², 金城^{1*}

中国科学院微生物研究所,¹ 真菌学国家重点实验室,² 微生物资源国家重点实验室, 北京 100101

摘要: 【目的】烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 的 AfMplp 是一种通过糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 修饰定位于细胞壁上的蛋白, 其细胞壁定位信号位于蛋白质的 C 末端。里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 是一种重要的工业生产菌种。构建里氏木霉的细胞表面表达系统具有十分重要的意义。【方法】我们将 AfMplp 的细胞壁定位 GPI 信号肽和烟曲霉几丁质酶 AfChiB1 的 N 端信号肽分别与绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的 C 末端和 N 末端融合并转化里氏木霉。本文首先对木霉遗传转化系统进行了优化; 随后通过 Real-time PCR 和蛋白定量, 对 GFP 融合蛋白在里氏木霉中不同时期的表达情况进行了研究; 最后对里氏木霉表达的 GFP 融合蛋白进行细胞定位研究。【结果】荧光观察结合 Western blot 的结果表明, 在平台期中期和后期, 带有 GPI 信号的 GFP 融合蛋白定位于细胞壁。【结论】烟曲霉来源的 GPI 信号可被里氏木霉识别, 本论文所构建的表达系统可用于外源蛋白在里氏木霉中的细胞壁定位表达。

关键词: 里氏木霉, 细胞表面表达系统, 烟曲霉, GPI 信号

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 01-0038-09

里氏木霉属于真菌界、子囊菌门、丛梗孢目、木霉属, 是在自然界中广泛分布的腐生嗜温性丝状真菌, 其有性生殖方式的种类属于肉座菌属 (*Hypocrea jecorina*)^[1]。由于其具有较高的蛋白质合成和分泌能力, 以及公认的高生物安全性, 因此它在工业生产中被广泛应用于同源或者异源蛋白质的生产^[2]。因而在里氏木霉中发展种类更丰富的表达系统具有十分重要的意义。

蛋白质或者多肽的细胞表面表达系统在配体筛选、生物反应器开发和活疫苗的制备等领域具有重要的应用价值^[3-10]。目前, 人们在许多种类的细菌和酵母中已经成功建立了该系统^[3, 11-15], 而在丝状真菌中仅报道了一例^[7]。因此, 在更多的丝状真菌

类群中实现细胞表面表达系统的建立十分必要。

蛋白质在细胞表面的表达需要一段将该目的蛋白锚定在细胞表面的结构域。目前一共有 4 种锚定系统被应用于细胞表面表达系统的构建: GPI 锚定系统^[5, 7]、黏附因子 (Flo1p) 锚定系统^[16]、分选酶 (Sortase) 介导的锚定系统^[17] 和在革兰氏阴性细菌中广泛应用的细胞膜蛋白介导的锚定系统^[9]。

在酵母细胞表面表达系统的构建中广泛应用的是 GPI 锚定系统。该系统是通过一类 GPI 修饰的细胞壁蛋白 (即 GPI-CWPs) 将目的蛋白锚定在细胞表面的。GPI-CWPs 含有一个 N 端信号肽和一个 C 端 GPI 信号肽^[18]。在真菌中, GPI-CWPs 通过内部的特定氨基酸 (ω 位点) 与经过修饰的 GPI 结合, 从而

基金项目: 国家自然科学基金 (31100113, 31030025, 30921605)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807425; Fax: +86-10-64807429; E-mail: jinc@sun.im.ac.cn

作者简介: 苏建臣 (1986-), 男, 河北人, 硕士研究生。E-mail: sjzsjc05@126.com

收稿日期: 2012-10-09; 修回日期: 2012-10-26

连接到细胞壁上^[19]。

为了在里氏木霉中构建细胞表面表达系统,我们研究了烟曲霉细胞壁蛋白 *AfMp1p* 的 C 端 GPI 信号肽在里氏木霉中的应用,将 GPI 信号肽与绿色荧光蛋白(GFP)的 C 端融合并转化里氏木霉,通过荧光显微镜和蛋白免疫杂交对 GFP 在木霉细胞表面的表达进行了分析;同时还从转录和翻译水平对 GFP 融合蛋白在不同时期的表达变化进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:里氏木霉 Tu-6 (*pyr4*⁻) 为尿苷合成缺陷型菌株 (American Type Culture Collection, ATCC MYA-256)^[20], TA kulox *pyr4* 为含有 *pyr4* 基因的质粒,质粒 *GPDA-Pro::GFP*, *afchiB::chiB-N-signal-GFP* 和 *afchiB::chiB-N-signal-GFP-MP1-C* 为本实验室前期构建载体^[22]。

1.1.2 培养基和培养条件:木霉基本培养基 (MM, Minimal Medium) 为 2% 葡萄糖, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 1.5% KH₂PO₄, 0.005% FeSO₄·7H₂O, 0.0016% MnSO₄·7H₂O, 0.0014% ZnSO₄·7H₂O, 0.0037% CoCl₂, 0.6% CaCl₂ 和 0.6% MgSO₄·7H₂O;向 MM 中添加 5 mmol/L 的尿苷得到用于培养木霉 Tu-6 的尿苷培养基 (MMU);向 MM 中添加 1 mol/L 的 D-山梨醇得到转化子再生筛选培养基 (MMS);向 MM 中

加入 1.5 % 的琼脂粉得到转化子复筛培养基 (MMA);木霉孢子收集培养基为 PDA 培养基。木霉在固体培养基上 28℃ 培养 7-9 d,用超纯去离子水冲洗 2 次后收集孢子并计数。将适量孢子悬液接种于液体培养基中,28℃ 振荡培养。

1.1.3 试剂和仪器设备: PrimeStar HS DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司,限制性内切酶购自 Fermentas 公司,连接酶购自 NEB 公司,GFP 单克隆抗体购自 Abmart 公司,碱性磷酸酶标记的抗小鼠 IgG 购自 Promega 公司,蛋白酶抑制剂和细胞壁消化酶购自 Sigma 公司,聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜购自 Millipore 公司,BCIP/NBT Solution 购自 Amresco 公司,其他试剂均为国产分析纯。主要仪器有:高速冷冻离心机 GS-15R 和 AvantiTM J-25 (Beckman 公司),超速离心机 XL-90 (Beckman 公司),冷冻干燥仪 (Stone Ridge 公司),正置荧光显微镜 (zeiss 公司),蛋白电泳和电转膜相关设备 (Bio-Rad 公司)。

1.2 载体构建

GPDA Promoter 序列是以质粒 *GPDA-Pro::GFP* 为模板,经 PCR 扩增获得的;烟曲霉几丁质酶 B (ChiB) N 端信号肽序列 *afchiB N-signal* 是以质粒 *afchiB::chiB-N-signal-GFP* 为模板,经 PCR 扩增获得的;*GPDA Promoter-afchiB N-signal* 融合 DNA 片段是将 *GPDA Promoter* 的扩增片段和 *afchiB N-signal* 的扩增片段等比例混合,互相作为模板,通过重叠延伸 PCR 获得的。载体构建所用引物见表 1。

表 1 载体构建所用到的引物

Table 1 Primers used for plasmid constructions

DNA fragments	Primer names	Primer sequences ^a (5'→3')
<i>GPDA Promoter</i>	<i>Pro-5'</i>	GGAATTCGAATTCCCTTGTATCTCTACAC
	<i>Pro-3'</i>	GGTGGAAAGTTGCAAAGCCGATGGTGATGTCTGCTCAAGC
<i>afchiB N-signal</i>	<i>chiB-5'</i>	CCCGCTTGAGCAGACATCACCATGCGCTTTGCAACTTCCAC
	<i>chiB-3'</i>	GGGGTACCGCGCGCTCCAGATCAGT
<i>GPDA Promoter-afchiB N-signal</i>	<i>Pro-5'</i>	GGAATTCGAATTCCCTTGTATCTCTACAC
	<i>chiB-3'</i>	GGGGTACCGCGCGCTCCAGATCAGT

^a Italics indicate the restriction enzyme sequences

表达载体 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP-MP1-C* 的构建以质粒 *afchiB::chiB-N-signal-GFP-MP1-C* 为骨架。重叠延伸 PCR 扩增得到 *GPDA* 启动子和烟曲霉 *AfChiB* N 端信号肽编码序列的融合 DNA 片段 *GPDA-Pro-afchiB N-signal*。用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *KpnI* 分别对质粒 *afchiB::chiB-N-signal-GFP-MP1-C* 和融合 DNA 片段 *GPDA-Pro-afchiB N-*

signal 双酶切,电泳检测,回收相应的酶切产物,分别测定浓度,按照载体:融合 DNA 片段 = 1:10 的摩尔比,用 T₄ DNA 连接酶 4℃ 连接过夜,反应体系为 10 μL。

表达载体 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP* 的构建以质粒 *afchiB::chiB-N-signal-GFP* 为骨架。其余操作同上所述。

1.3 里氏木霉原生质体转化

按照 Gruber 等人的方法^[23],将构建的表达载体与 TA kulox pyr4 共转化里氏木霉 Tu-6。从培养基 MMS 上挑取转化子,转接到去除高渗条件的 MMA 固体培养基中,28℃培养 4-6 d,挑选生长良好的转化子,再次转接,如此重复复筛 3 次。

基于对其他微生物、植物等原生质体转化的研究,人们发现,宿主的生长状态、制备原生质体选用的渗透压稳定剂、PEG 的分子量和浓度、细胞壁消化酶的酶解时间、待转化 DNA 分子的大小和构象以及目的载体与共转化载体的摩尔比例等因素能够显著影响转化率^[24-26]。为了对里氏木霉的原生质体转化进行具有普遍适用的优化,我们对所列的前 4 种因素分别进行了优化。

1.4 不同时期融合 *gfp* 表达水平的 Real-time PCR 检测

里氏木霉总 RNA 的提取和反转录按照 Fermentas 公司的试剂盒说明进行。本实验采用相对定量法对不同时期融合 *gfp* 的表达水平进行 Real-time PCR 检测。具体操作按照 TaKaRa 公司的说明书进行。

1.5 里氏木霉的荧光显微镜观察和质壁分离

将液体培养至相应时期的里氏木霉转化子菌丝用 PB 缓冲液冲洗 3 次,转移到载玻片上,使用 zeiss 荧光显微镜在 450-490 nm 激发光通道下观察并拍照^[27]。

将 PB 缓冲液洗过的菌丝用 0.5 mol/L 的 D-山梨醇溶液处理 2-5 min^[22]进行质壁分离,荧光显微镜的观察同上。

1.6 蛋白酶 K 接触实验

取相应培养时期的木霉菌丝,用 50 mmol/L PB 缓冲液洗 3 遍。将菌丝用终浓度为 30 U/L 的蛋白酶 K 37℃处理 3 h。将酶解后的菌丝用 PB 缓冲液洗 3 遍,去除蛋白酶 K。将菌丝置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.7 细胞壁蛋白的提取

将木霉菌丝用液氮充分研磨,加入 Cell Wall Extraction Buffer I (200 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, pH8.0) 和 PMSF (终浓度为 1 mmol/L),置于 4℃,充分裂解菌丝体。离心,将沉淀细胞壁部分冻干后称重,按 25 μL/mg 的比例重悬于 Cell Wall Extraction Buffer II (50 mmol/L Tris-HCl, pH7.8) 中。

混匀后离心,除去上清残留的细胞质组分,重复该步骤 1 次。按 25 μL/mg 的比例将沉淀重悬于 SDS-extraction Buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 2% SDS, 100 mmol/L EDTA, 1 μL β-巯基乙醇) 中,煮沸 10 min。重复该步骤 3 次。收集每次离心后的上清液(以非共价键和弱的共价键方式与细胞壁相连的蛋白),分别命名为 SDS1、SDS2 和 SDS3。用灭过菌的 ddH₂O 洗沉淀 6 次。将洗过的菌丝冻干并称重。按 10 μL/mg 的比例向冻干的菌丝中加入吡啶氢氟酸,0℃,处理 3 h。离心收集上清弃沉淀。将上清液中的蛋白用甲醇缓冲液沉淀。将蛋白沉淀冻干,溶于 1 × SDS-PAGE 上样缓冲液中,进行后续实验。

1.8 里氏木霉转化子蛋白的 Western blot

蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上,用溶于 TBST (10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20, pH8.0) 的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。将 PVDF 膜浸润到一抗稀释液中 (1:1000),37℃杂交 1 h 或 4℃杂交过夜。然后用 TBST 洗膜 6 次,再将膜与 AP-conjugated anti mouse IgG (1:5000 稀释) 温育。洗膜后按照 Amresco 公司说明书用 BCIP/NBT Solution 显影。

2 结果

2.1 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP* 和 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP-MPI-C* 载体的构建

GPI 蛋白的转运和定位既需要 N 端信号肽,也需要 C 端 GPI 信号肽。因此我们在 GFP 蛋白的 N 端融合了烟曲霉几丁质酶 B 的 N 端信号肽,在 GFP 蛋白的 C 端融合了烟曲霉 GPI-CWP A/Mp1p 的 C 端 GPI 信号肽。以真菌通用组成型启动子 *GPDA* 启动子和构巢曲霉 TrpC 终止子为基因表达调控元件,构建了载体 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP* 和 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP-MPI-C*。

2.2 里氏木霉的原生质体转化

2.2.1 里氏木霉的生长状态:为了选取恰当的原生质体转化时机,我们对培养 7、13、19、25 和 31 h 的里氏木霉 Tu-6 分别进行了原生质体转化实验,分别统计最终的转化率,并对里氏木霉的生长状态与转化率之间的关系进行了分析,结果如图 1 所示。生长状态显著影响转化率。SPSS 生物统计学软件分析表明,刚萌发孢子所占比例在 $P < 0.01$ 水平上与

转化率呈显著正相关;而成熟菌丝所占比例在 $P < 0.05$ 水平上呈显著负相关。培养 13 h 的里氏木霉 Tu-6 菌株中刚萌发孢子所占比例最大,相应的转化率最高。综上可知,里氏木霉处于刚萌发孢子状态时,更有利于获得更高的转化率。

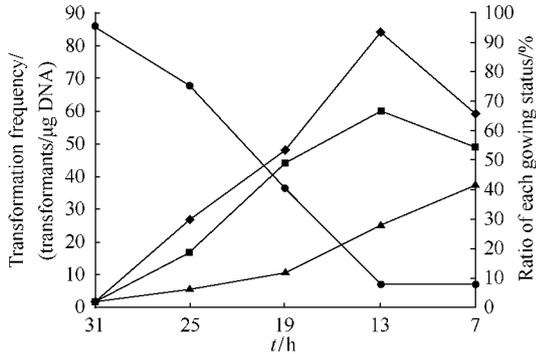


图 1 木霉生长状态对转化率的影响

Fig. 1 Effect of growth on transformation frequency. 10^8 spores of *T. reesei* Tu-6 were added into the MMU liquid medium and incubated at 28°C with constant agitation at the speed of 200 r /min. At different periods from 7 h to 31 h, the *T. reesei* cells were collected and counted the ratio of different growth status under the microscope respectively. Vectors were transformed at different periods and the transformants were counted. (◆, transformation frequency; ■, ratio of germinating spores; ▲, ratio of un-germinating spores; ●, ratio of hyphae).

2.2.2 渗透压稳定剂:基于目前已经报道过的在原生质体转化中用到的渗透压稳定剂,我们从中选取了 5 种,分别用它们进行原生质体转化实验,统计各自的转化率。图 2 表明,以 $MgSO_4$ 作为渗透压稳定剂可以得到最高的转化率(63 个转化子/ μg DNA),其次是 D-山梨醇(9 个转化子/ μg DNA),但远远少于以 $MgSO_4$ 作渗透压稳定剂时的转化率。据此,我们认为, $MgSO_4$ 是里氏木霉原生质体转化中最佳的渗透压稳定剂。

2.2.3 PEG 的分子量和浓度:实验表明(图 3-A、B),无论是 PEG 的分子量还是 PEG 的浓度,都对里氏木霉的转化率具有影响。

在 PEG 的常见分子量中,PEG 2000 所对应的转化率最低;PEG 3350、4000、6000 和 8000 具有相似的转化率;PEG 10000 对应的转化率最高,达到 100 个转化子/ μg DNA。由于分子量大于 6000 的 PEG Buffer 在室温下会很快变干,不利于长时间保存,因此在后续的实验中我们选取 PEG 4000 作为原生质体转化的诱导剂。

在对 PEG 4000 浓度的优化中发现,终浓度为

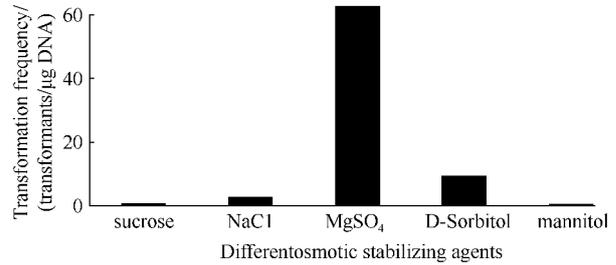


图 2 渗透压稳定剂对转化率的影响

Fig. 2 Effect of osmotic stabilizing agents on transformation frequency. Five different agents were used to maintain the osmosis during protoplasts generation. Then vectors were transformed into *T. reesei* cells that were under different agents treatments. The transformation frequencies of different osmotic stabilizing agents' treatment were compared.

50% 的 PEG 4000 所对应的转化率最高,过高或者过低的浓度都会相应的降低木霉原生质体的转化率。

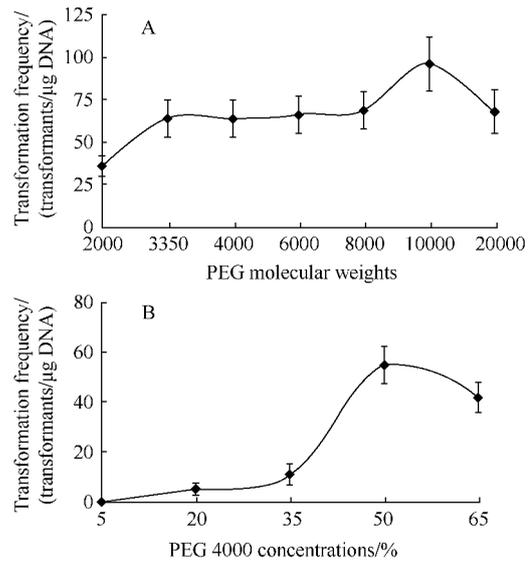


图 3 PEG 分子量和 PEG 浓度对转化率的影响

Fig. 3 Effect of PEG molecular weight (A) and concentration (B) on transformation frequency. A and B 10^8 spores of *T. reesei* Tu-6 were added into the MMU liquid medium and incubated at 28°C with constant agitation at the speed of 200 r /min. Then the *T. reesei* cells were collected and treated with the cell wall digest enzyme. The mixture of the protoplasts and vectors were treated with various PEGs and different PEG concentrations. The transformation frequencies of different treatment were compared respectively.

2.2.4 细胞壁消化酶的处理时间:细胞壁消化酶处理 60 min 可以获得最高的原生质体产率(图 4)。尽管处理时间少于 60 min 也可以获得相同的结果,但为了使原生质体能够充分生成,在后续实验中我

们选取 70 min 的细胞壁消化酶酶解时间。

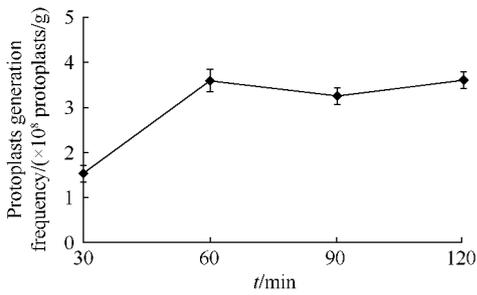


图 4 细胞壁消化酶的酶解时间对原生质体产率的影响

Fig. 4 Time course of cell wall digestion enzyme treatment. *T. reesei* Tu-6 cells were cultivated as mentioned above. Then the cells were collected and digested with cell wall digest enzyme for different times and the protoplasts generation frequencies were compared respectively.

2.3 GFP 融合片段在木霉生长的不同时期的表达情况分析

我们分别从转录水平和翻译水平对不同融合蛋白在木霉不同生长时期的表达情况进行了分析。从 Real-time PCR 的结果可以看出, *chiB-gfp* 的表达量在木霉生长中期达到最高(图 5-A), *chiB-gfp-mp1* 则在对数生长期时达到最高(图 5-B)。*chiB-gfp* 表达量最高和最低相差 75 倍, 而 *chiB-gfp-mp1* 仅相差 5 倍。

翻译水平的分析结果如图 6 所示, ChiB-GFP 在木霉不同生长时期的蛋白量变化趋势与转录水平的变化趋势相同, 表达量最高出现在平台期中期, 为 32 mg/L。然而, ChiB-GFP-MP1 的变化趋势与转录水平的变化趋势有较大不同, 其表达量最高出现在平台期前期(约 10 mg/L)而不是转录水平的对数生长期。

2.4 ChiB-N-signal-GFP-MP1-C 融合蛋白的定位

将里氏木霉转化子分别进行质壁分离, 并置于荧光显微镜下观察(图 7)。从图 7a, b, d, e 中可以看出, 在平台期中期和末期 ChiB-GFP-MP1 出现在转化子细胞表面, 其他时期细胞表面没有荧光被激发; 里氏木霉 ChiB-GFP 不能出现在转化子细胞表面(图 7g, h, j, k)。

当用蛋白酶 K 对平台期中期的木霉 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP-MP1-C* 转化子进行处理, 原来存在于细胞表面的荧光消失, 而阴性对照 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP* 转化子没有发生变化(图

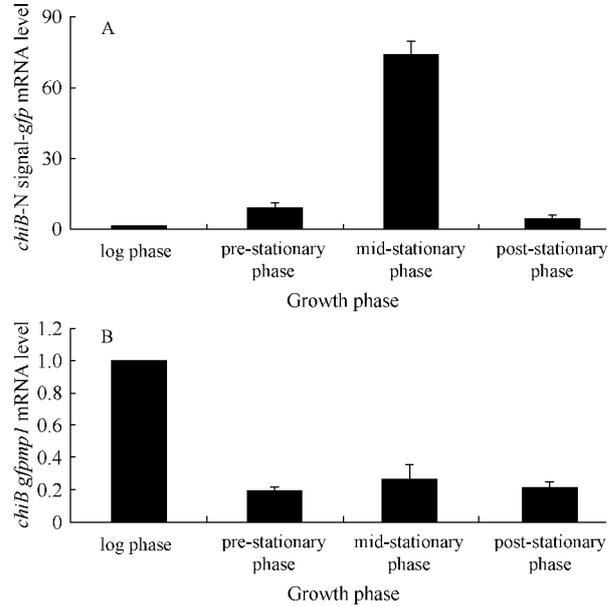


图 5 *chiB-gfp* 和 *chiB-gfp-mp1* 在转录水平的表达量变化

Fig. 5 Transcriptional levels of *chiB-gfp* (A) and *chiB-gfp-mp1* (B) in different growth phases. In A, the expression of *chiB-gfp* increased to the optimal peak at the mid-stationary phase and then decreased. The expression level in the log phase was used as a standard. In B, the expression level of *chiB-gfp-mp1* decreased and maintained at a stable level after the log phase. The expression level in the log phase was used as a standard.

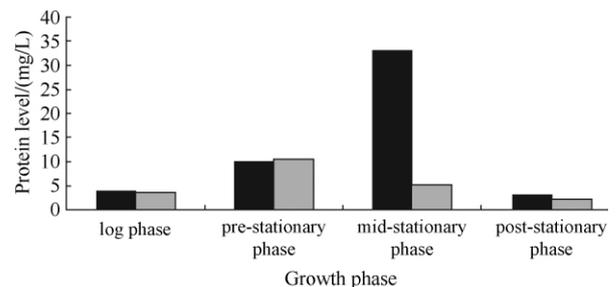


图 6 ChiB-GFP 和 ChiB-GFP-MP1 在木霉生长的不同时期的表达

Fig. 6 Translational levels of both ChiB-GFP and ChiB-GFP-MP1 at different growth phases. Black bar, protein level of ChiB-GFP; gray bar, protein level of ChiB-GFP-MP1.

7c, f, i, l)。

为了进一步研究 ChiB-GFP-MP1 融合蛋白的定位以及它与木霉细胞壁的连接方式, 我们提取了不同部分的木霉细胞壁蛋白, 并用抗 GFP 的单克隆抗体对其进行了 Western blot。

在氢氟酸-吡啶提取的细胞壁蛋白中没有杂交条带被检测到。在 SDS 提取的平台期中期和末期 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP-MP1-C* 转化子细胞

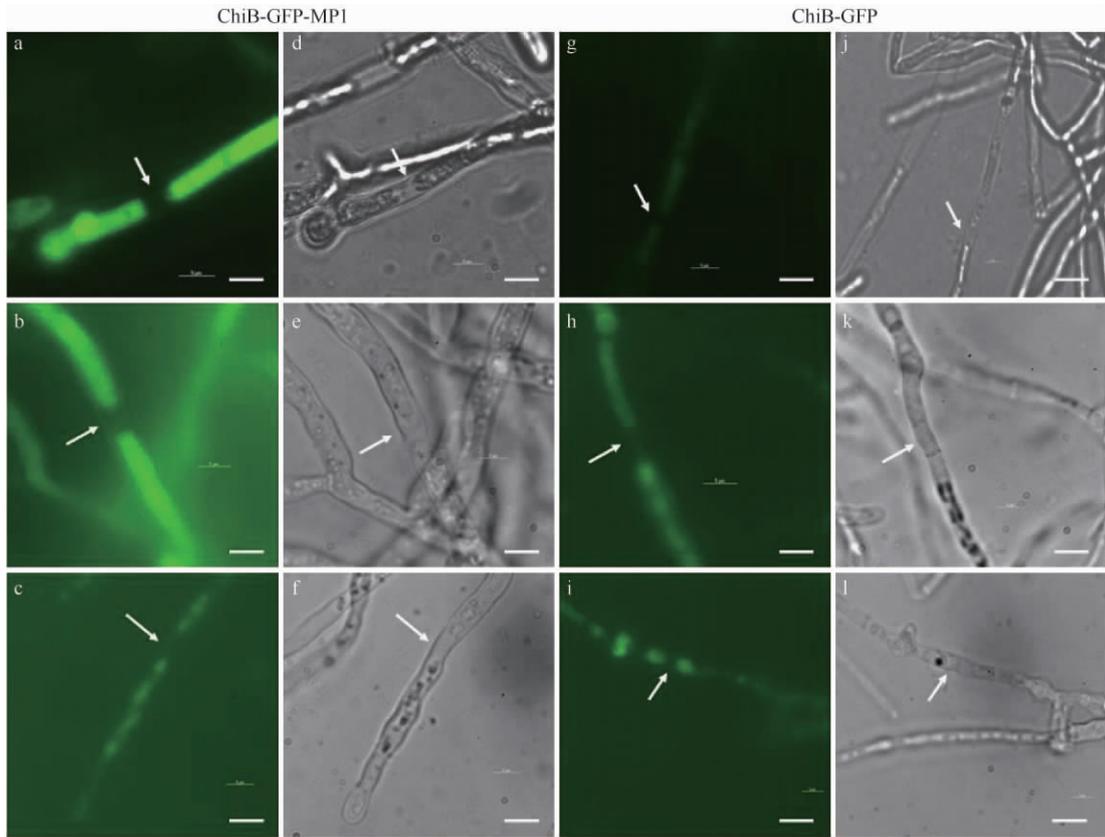


图 7 转化子菌丝的荧光显微镜观察

Fig. 7 Observation of plasmolyzed mycelial cells by fluorescent microscopy. Transformants at mid-stationary phase (a, d, g and j). Transformants at post-stationary phase (b, e, h and k). Fluorescence micrographs (a, b, c, g, h and i). Differential interference contrast micrographs (d, e, f, j, k and l). Proteinase K treatment of transformants (c, f, i, l). Each scale bar represents 5 μ m.

壁蛋白中我们均检测出了一条杂交条带,其分子量约为 45 kDa,大于理论分子量的 32 kDa,推测这是由于与 GFP 融合的 *AjMplp* 的糖基化造成的(图 8)。

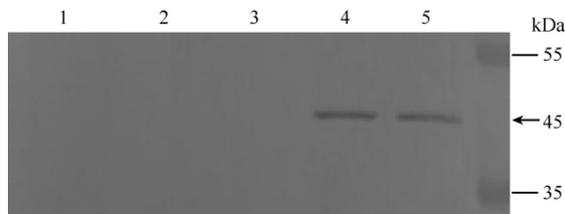


图 8 里氏木霉转化子细胞壁蛋白 SDS 提取部分的 Western blot 分析

Fig. 8 Western blot analysis of the SDS fraction of the *T. reesei* cell wall. Lane 1, wild type; lane 2, *T. reesei* expressing ChiB-GFP in mid-stationary phase; lane 3, *T. reesei* expressing ChiB-GFP in post-stationary phase; lane 4, *T. reesei* expressing ChiB-GFP-MP1 in mid-stationary phase; lane 5, *T. reesei* expressing ChiB-GFP-MP1 in post-stationary phase; M, Marker.

我们对提取到的 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP-MP1-C* 转化子胞外蛋白进行了 Western blot 检测。45 kDa 的糖基化蛋白在平台期前期开始出现,其含量不断增加,直到平台期末期。32 kDa 的非糖基化蛋白出现在平台期末期,推测是由裂解的菌丝释放出来的;40 kDa 的条带推测是 ChiB-GFP-MP1 的不完全糖基化形式(图 9)。

综合荧光观察和 Western blot 的结果,我们得出结论:ChiB-GFP-MP1 融合蛋白可被定向表达于里氏木霉细胞壁。

3 讨论

目前,大多数细胞表面表达系统都是以宿主内源的定位信号系统构建的^[3-9],在本研究中,我们首次尝试了异源定位信号在里氏木霉细胞表面表达系统构建中的应用。

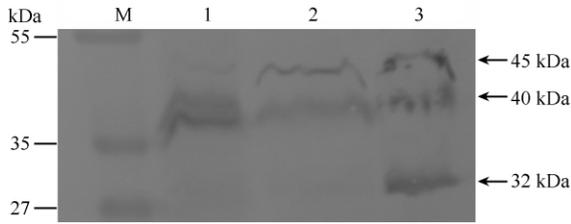


图9 里氏木霉 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP-MP1-C* 转化子胞外蛋白的 Western blot 分析

Fig. 9 Western blot analysis of the ChiB-GFP-MP1 in culture supernatant. Lane 1, *T. reesei* expressing ChiB-GFP-MP1 at pre-stationary phase; lane 2, *T. reesei* expressing ChiB-GFP-MP1 at mid-stationary phase; lane 3, *T. reesei* expressing ChiB-GFP-MP1 at post-stationary phase; M, Marker.

烟曲霉 *A/Mp1p* 是一个由 284 个氨基酸组成的半乳甘露聚糖蛋白,属于典型的 GPI-CWP。其氨基酸具有存在于马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffei*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) 细胞壁蛋白中的特征性序列,如较高的丝氨酸和苏氨酸含量 (29.93%), N 端内质网定位的信号肽, C 端富含丝氨酸 (34%) 的选择性定位信号序列^[28]。生物信息学分析表明,其第 260 位氨基酸为 ω 位点。实验室前期的研究表明, *A/Mp1p* 的 C 端 50 个氨基酸可以决定其细胞壁定位。因此,尽管 *A/Mp1p* 的功能未知,其 C 端的 GPI 选择性定位信号序列具有将蛋白质定位到细胞壁的能力。由于里氏木霉的细胞表面蛋白研究得还很不充分^[14],而且在其基因组中没有发现 *A/Mp1p* 的同源蛋白,因此我们尝试将 *A/Mp1p* 的 C 端 50 个氨基酸的选择性定位信号肽直接用于里氏木霉,以实现蛋白质的定位表达。

在本实验室的前期研究中发现,烟曲霉几丁质酶 B 的 N 端信号肽是一个较强的分泌信号^[22]。在本研究中,我们将其与 GFP 的 N 端融合,以保证 GFP 蛋白的正确加工转运。

起初,我们以 *A/ChiB* 的启动子作为基因表达调控元件,但后续的实验表明,其起始的转录水平过低,无法满足实验要求,因此,我们最终选择了构巢曲霉 *gpdA* 基因的启动子来起始 DNA 融合片段的转录。

在里氏木霉生长的平台期中期 *chiB-gfp* 的转录水平达到最高,而 *chiB-gfp-mp1* 在对数生长期时转录水平最高,到平台期前期下降到某一水平,并大致保持这一水平直到平台期后期。分析这种差异可能

是由于表达载体在里氏木霉基因组中的不同插入位点造成的。

为了区分细胞膜定位和细胞壁定位,我们用 0.5 mol/L 的 D-山梨醇对转化子菌丝进行了质壁分离^[22]。荧光显微镜观察得知,直到平台期中期和末期,绿色荧光才在 *GPDA-Pro::chiB-N-signal-GFP-MP1-C* 转化子的细胞壁上出现。我们用蛋白酶 K 处理这一时期的菌丝,原先在细胞壁上的绿色荧光消失,这进一步证明了 ChiB-GFP-Mp1 融合蛋白是分布在细胞壁上的。

根据与细胞壁成分连接方式的不同,细胞壁蛋白可以分为通过非共价或者弱的共价键连接的细胞壁蛋白和通过强的共价键连接的细胞壁蛋白。前者可以在细胞壁蛋白提取过程中被 SDS 提取出来,后者需要通过氢氟酸或者氢氟酸吡啶将共价键切断,从而将细胞壁蛋白释放出来^[19, 29-30]。我们的研究表明,ChiB-GFP-MP1 融合蛋白可被 SDS 提取,说明其在里氏木霉中是通过非共价或者弱的共价键与细胞壁成分相连的。

ChiB-GFP-MP1 融合蛋白的理论分子量为 32 kDa,但对胞外的 ChiB-GFP-MP1 融合蛋白进行 Western blot 分析发现还存在 45 kDa 和 40 kDa 的融合蛋白,考虑到与 GFP 融合的 *A/Mp1p* 的 C 端 50 个氨基酸中存在 14 个 O 糖基化位点,我们推测 45 kDa 和 40 kDa 的条带是融合蛋白的糖基化形式。

我们的研究表明,烟曲霉 *A/Mp1p* 中的 C 端 GPI 信号肽可被里氏木霉识别,从而用于介导外源蛋白在里氏木霉细胞壁中的定向表达。

参考文献

- [1] André S, Monika S. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87: 787-799.
- [2] Johanna MS, Richard JW, Artemio M-M, Alison S. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*, 2010, 156: 2887-2900.
- [3] Junya N, Kenji O, Toshihiro T, Takanori T, Tomomitsu S, Sung M-H, Hideki F, Kondo A. Display of active enzymes on the cell surface of *Escherichia coli* using PgsA anchor protein and their application to bioconversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70: 564-572.

- [4] Wu P-H, Giridhar R, Wu W-T. Surface display of transglucosidase on *Escherichia coli* by using the ice nucleation protein of *Xanthomonas campestris* and its application in glucosylation of hydroquinone. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95: 1138-1147.
- [5] Kim S-Y, Sohn J-H, Pyun Y-R, Choi E-S. A cell surface display system using novel GPI-anchored proteins in *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, 2002, 19: 1153-1163.
- [6] Susanne W, Jan T, Jaeger K-E. A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 6977-6986.
- [7] Takashi A, Junji I, Kouji K, Masahiro K, Hiroki I, Hiroshi S, Yoji H, Chiaki O, Hideki F, Kondo A. Construction of an *Aspergillus oryzae* cell-surface display system using a putative GPI-anchored protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81: 711-719.
- [8] Toshihiro T, Hideki F, Kondo A. Production of L-Lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying α -amylase on its cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 74: 1213-1220.
- [9] Chen Y-P, Hwang I-E, Lin C-J, Wang H-J, Tseng C-P. Enhancing the stability of xylanase from *Cellulomonas ? mi* by cell-surface display on *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 112: 455-463.
- [10] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64: 28-40.
- [11] Sirkka K, Merja P. Production of recombinant proteins in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Current Opinion Biotechnology*, 1995, 6: 534-537.
- [12] Paloheimo M, Mäntylä A, Kallio J, Suominen P. High-Yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. *Applied Environmental Microbiology*, 2003, 69: 7073-7082.
- [13] Poidevin L, Levasseur A, Paës G, Navarro D, Heiss-Blanquet S, Asther M, Record E. Heterologous production of the *Piromyces equi* cinnamoyl esterase in *Trichoderma reesei* for biotechnological applications. *Letters Applied Microbiology*, 2009, 49: 673-678.
- [14] Iván VR, Manuel R, Antonio CC, Javier G, Miguel AM, Tahía B. QID74 Cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. *Fungal Genetics Biology*, 2007, 44: 950-964.
- [15] Liu T, Wang TH, Li X, Liu X. Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbh1*) promoter optimization. *Acta Biochemistry Biophysics Sinica*, 2008, 40: 158-165.
- [16] Matsumoto T, Fukuda H, Ueda M, Tanaka A, Kondo A. Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68: 4517-4522.
- [17] Osaki M, Takamatsu D, Shimoji Y, Sekizaki T. Allelic variation in srtAs of *Streptococcus suis* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 219: 195-201.
- [18] Ferguson MA, Homans SW, Dwek RA, Rademacher TW. Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, 1988, 239: 753-759.
- [19] Piet WJ, Arthur FR, Frans MK. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics Biology*, 2005, 42: 657-675.
- [20] Bland SM, Douglas EE. Preparation of Mutants of *Trichoderma reesei* with Enhanced Cellulase Production. *Applied Environmental Microbiology*, 1977, 34: 777-782.
- [21] Jeffrey LS, Frank TB, Michael W. Sequence of the cloned *pyr4* gene of *Trichoderma reesei* and its use as a homologous selectable marker for transformation. *Current Genetics*, 1991, 19: 27-33.
- [22] Xiaomin Chen, Haomiao Ouyang, Guomin Tang, Aoquan Wang, Cheng Jin. Analysis of acid-phosphatase localization in *Aspergillus fumigatus* by a secreted chimeric green fluorescent protein as reporter (in Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48 (10): 1330-1338 (in Chinese).
- 陈晓敏, 欧阳浩淼, 唐国敏, 王敖全, 金城. 烟曲霉蛋白质分泌载体的构建及酸性磷酸酯酶的细胞定位. *微生物学报*, 2008, 48 (10): 1330-1338.
- [23] Gruber F, Visser J, Kubicek CP, de Graaff LH. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a *pyrG-negative* mutant strain. *Current Genetics*, 1990, 18: 71-76.
- [24] Jeffery KK, Larry LM. Plasmid Transformation of *Streptococcus lactis* Protoplasts: Optimization and Use in Molecular Cloning. *Applied Environmental Microbiology*, 1984, 48: 252-259.
- [25] Ján K, Bronislava Ř, Marian F. Optimization of

- Streptomyces aureofaciens* transformation and disruption of the *krdA* gene encoding a homologue of the principal σ factor. *Journal Genetics Microbiology*, 1993, 139:2525–2529.
- [26] He ZM, Michael SP, Gregory RO, Ryan G, Gary AP. Improved protocols for functional analysis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. *BMC Microbiology*, 2007, 7:104–114.
- [27] Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annual Review Biochemistry*, 1998, 67: 509–544.
- [28] Yuen K-Y, Chan C-M, Chan K-M, Woo PC, Che X-Y, Andy SP, Cao L. Characterization of *AFMP1*: a Novel Target for Serodiagnosis of Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39: 3830–3837.
- [29] Elorza MV, Murgui A, Sentandreu R. Dimorphism in *Candida albicans*: Contribution of Mannoproteins to the Architecture of Yeast and Mycelial Cell Walls. *Journal of Genetics Microbiology*, 1985, 131:2209–2216.
- [30] Robbert AD, Mark A, Patricia AV, Frans MK, Cees AM, Arthur FJ. Characterization of CwpA, a putative glycosylphosphatidylinositol- anchored cell wall mannoprotein in the filamentous fungus. *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics Biology*, 2005, 42:873–885.

Construction of a cell-surface expression system in *Trichoderma reesei*

Jianchen Su¹, Haomiao Ouyang¹, Wan Zhao¹, Zhiyang Dong², Cheng Jin^{1*}

¹ State Key Laboratory of Mycology, ² State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] *AfMp1p* is a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored cell wall protein (GPI-CWP) identified in filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*, which contains a specific C terminal signal for cell wall localization. *Trichoderma reesei* is known as a safe fungal species (GRAS) and widely used in the industry. Thus, developing of the cell-surface expression systems in *T. reesei* is of industrial interest. [Methods] The GPI signal from the *A. fumigatus AfMp1p* was fused to the C-terminal of green fluorescent protein (GFP) and transformed into *T. reesei*. The optimization of *T. reesei* transformation and the expression profiles of the GFP were investigated in detail. The cellular location of the GFP fusion protein was detected. [Results] Fluorescent image analysis and Western blot analysis indicate that the GFP fusion protein locates on the cell wall of *T. reesei*. [Conclusion] According to these results, the GPI signal from *A. fumigatus* can be recognized in *T. reesei* and the expression system constructed in this study can be used to express heterogeneous protein in the cell wall of *T. reesei*.

Keywords: *Trichoderma reesei*, Cell-surface display system, *Aspergillus fumigatus*, GPI signal

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100113, 31030025, 30921605)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807425; Fax: +86-10-64807429; E-mail: jinc@sun.im.ac.cn

Received: 9 October 2012/Revised: 26 October 2012