



里氏木霉 *VPS13* 基因缺失对菌丝分支、生孢和纤维素酶产量的影响

刘瑞艳^{1,2}, 侯运华^{1*}, 王逸凡², 钱远超², 钟耀华^{2*}

¹ 齐鲁工业大学生物工程学院, 山东 济南 250353

² 山东大学生命科学学院, 微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100

摘要:【目的】丝状真菌里氏木霉是纤维素酶生产的主要工业真菌。纤维素酶分泌过程中的蛋白运输途径是控制大量纤维素酶成功输出的重要环节, 因此, 研究蛋白分泌途径的特定靶标基因功能将有助于鉴定纤维素酶运输分泌过程的关键调控因子。本研究借助基因敲除方法将里氏木霉液泡蛋白分选相关基因 *VPS13* 缺失, 分析了该基因缺失对菌株生长、生孢尤其是纤维素酶分泌的影响。【方法】利用 Double-joint PCR 技术和同源重组策略构建里氏木霉 *VPS13* 基因缺失突变株, 通过菌丝培养、显微观察、生孢检测、蛋白与酶活测定, 系统比较 *VPS13* 基因敲除前后菌株的生长特征、菌丝形态、孢子形成、蛋白分泌以及纤维素酶活等。【结果】成功获得两株 *VPS13* 基因缺失株。与出发菌株相比, 该基因突变后菌丝蔓延速率明显减慢, 但菌体生物量在对数生长期后显著增多。通过显微观察, 发现该基因缺失株菌丝更加密集, 分支明显增多。此外, 该基因缺失也导致菌株生孢延迟。纤维素底物平板分析发现 *VPS13* 基因缺失株菌落周围透明圈更加清晰, 且透明圈直径比是出发菌株的 4 倍, 说明降解纤维素的能力有明显提高。进一步的液体发酵实验结果显示, 该基因缺失导致蛋白产量及纤维素酶活力分别提高 16.4% 和 21.9%。【结论】里氏木霉 *VPS13* 基因在菌丝生长、生孢、蛋白分泌等不同生物学过程中具有功能多样性, 且该基因在菌种改良上可以作为提高纤维素酶产量的重要靶点。

关键词: 里氏木霉, *VPS13*, 基因缺失, 生孢, 蛋白分泌, 纤维素酶

木质纤维素降解转化为乙醇等生物能源过程中, 纤维素酶的生产成本是制约纤维乙醇等可再生新能源发展的重要因素^[1]。因此, 提高工业菌种

纤维素酶生产水平是降低纤维素酶生产成本的重要途径。里氏木霉是目前纤维素酶生产的主要工业丝状真菌, 具有菌丝生长快速、孢子繁殖旺盛、

基金项目: 国家自然科学基金(31370135); 山东大学基本科研业务费专项资金(2015JC005); 山东省农业科技成果转化资金(2014-45)

*通信作者: 侯运华, Tel: +86-531-89631776, E-mail: houyunhua@sohu.com; 钟耀华, Tel: +86-531-88366118, E-mail: zhongyaohua@sdu.edu.cn

收稿日期: 2016-11-29; 修回日期: 2017-02-19; 网络出版日期: 2017-02-24

纤维素酶产率高等优点^[2]。自 2008 年里氏木霉全基因组测序公布以来 (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>), 对里氏木霉关键功能基因的研究已成为热点, 尤其是揭示纤维素酶诱导表达调控机制方面取得了重要进展^[3-4]。然而, 对里氏木霉蛋白分泌机制的探索仍然不多, 因此, 深入研究纤维素酶分泌相关的重要基因功能将为菌种改良提供潜在靶点, 有利于提升纤维素酶生产水平^[5]。

纤维素酶通过蛋白分泌途径实现其合成与分泌。一般来说, 纤维素酶新生肽首先进入内质网进行折叠和修饰, 然后经高尔基体进一步处理, 并最终由复杂的囊泡分选系统实现胞外运输^[6]。在蛋白分泌途径的分选系统中, 不同真核生物的液泡蛋白分选相关基因(Vacuolar protein sorting, VPS)已经被鉴定^[7]。其中, VPS13 蛋白家族在真核细胞中是高度保守的^[8]。人类有 4 个 VPS13 同源基因: VPS13A、B、C 和 D。目前已证明, VPS13A、B 和 C 基因的突变分别与神经退行性疾病舞蹈症、棘红细胞增多症(ChAc)、发育障碍科恩综合征、帕金森氏病等有关^[9]。但是, VPS13 基因如何参与这些相关疾病的分子机理还不清楚。酿酒酵母 VPS13 同源基因只有 1 个, 它至少在 2 个不同生物学过程中是必需的: 囊泡分选和生孢作用^[8]。VPS13 基因突变导致羧肽酶 Y 分选受体不能从内体转运到高尔基体而导致羧肽酶 Y 分泌到胞外^[10]。VPS13 也是 Kex2 蛋白、Ste3 蛋白(2 型跨膜蛋白, α -因子合成所必需的)和 VPS10 蛋白有效定位到反面高尔基体网(TGN)所必需的。VPS13 基因的缺失显著影响 Kex2 蛋白和 Ste13 蛋白的 TGN 定位, 以及加速 VPS10 分选受体的降解^[11-12]。因此, VPS13 在蛋白分泌途径后期、囊泡分选运输过程中可能具有相当重要的功能。此外, VPS13 也是

生孢过程所必需的, 此功能被证实不依赖于囊泡分选功能^[13]。孢子形成的一个关键步骤是从头合成前孢子膜(prospore membranes), 而 VPS13 在生孢过程中定位到前孢子膜上且其缺失会导致前孢子膜上磷脂酸水平降低^[14]。最新研究也发现, VPS13 存在于细胞器之间(如核和液泡、内体和线粒体等)的膜连接处, 可能起到增强磷脂类分子交换的作用^[8]。综上所述, VPS13 基因功能的具体机制仍不很清楚, 但该基因在真核细胞蛋白分泌过程和生孢作用方面具有重要功能。

丝状真菌里氏木霉作为低等真核微生物, 不仅有生长快速、繁殖/生孢迅速、易于培养等优点, 而且具有极强的蛋白分泌能力。据报道, 里氏木霉突变菌株的纤维素酶产量在高水平发酵条件下可达 100 g/L^[5]。VPS13 基因在蛋白分泌过程中具有重要作用, 其是否参与里氏木霉纤维素酶合成分泌以及相关生理代谢值得深入探讨。本研究借助基因敲除方法成功构建里氏木霉 VPS13 缺失株, 并分别对野生株、缺失株的生长特征、孢子形成、蛋白产量及纤维素酶水平进行了系统分析, 证明该基因缺失对菌丝分支、孢子形成以及纤维素酶合成分泌具有重要影响, 这为里氏木霉菌种改良、提升纤维素酶产量提供了一个潜在的重要靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 里氏木霉 QP4 菌株(尿嘧啶营养缺陷型)来自本实验室构建^[15]。质粒 pAB4-1 含有黑曲霉乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶基因(*pyrG*), 氨苄抗性(本实验室保存)。

1.1.2 主要的酶和试剂: 里氏木霉原生质体制备所用的哈茨木霉裂解酶购自 SIGMA; DNA 聚合

酶 HiFiTaq polymerase、EasyTaq polymerase 购自 TransGen; 琼脂糖凝胶回收纯化、PCR 纯化和质粒小提试剂盒均购自 Omega; Southern 杂交的试剂盒 DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche; 酶活测定所用滤纸为 Whaterman 1 号滤纸; DNA GeneRuler 1 kb 购自 ThermoFisher Scientific; 尿嘧啶(Uracil)购自上海生工; 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.1.3 主要培养基: (1) 基本培养基(MM)(g/L): 葡萄糖 20.0, KH_2PO_4 15.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6, CaCl_2 0.6, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0016, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0014, CoCl_2 0.002, 调节 pH 至 4.5–5.5, 配固体培养基需添加 2% 琼脂粉, 115 °C 灭菌 30 min。(2) 土豆培养基(PDA): 去皮的土豆 200 g 切块加水 1 L 煮 30 min 后用纱布过滤取滤液, 加 20 g 葡萄糖至滤液中溶解后定容至 1 L, pH 自然。115 °C 灭菌 30 min。

(3) 纤维素双层平板上层培养基(g/L): 球磨纤维素 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, KH_2PO_4 15.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6, CaCl_2 0.6, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0016, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0014, CoCl_2 0.002, Triton 10.0, 琼脂粉 20.0。纤维素双层平板下层培养基为 2% 水琼脂培养基。(4) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 10, CaCl_2 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6, KH_2PO_4 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5, 玉米浆 20, 115 °C 灭菌 30 min。(5) 产酶发酵培养基(g/L): 结晶纤维 20.0, CaCl_2 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6, KH_2PO_4 5.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5, 玉米浆 20.0, 121 °C 灭菌 30 min。(6) 细菌培养基(LB)(g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 10, 用 NaOH 调节 pH 至 7.2, 固体培养基添加 2% 的琼脂粉, 115 °C 灭菌 30 min。若需要, 可加入氨苄青霉素至终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以上培养基在培养尿嘧啶缺陷型时均需添加 10 mmol/L 的尿嘧啶。

1.1.4 引物: 本研究构建 *VPS13* 缺失菌株及其验证所用引物名称和序列见表 1。

表 1. 本研究中使用的引物

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')
<i>VPS13</i> -2352UF (P1)	TAAGGCAGCGTCCCTGTAAG
<i>VPS13</i> -451UR (P2)	<u>AGACGAGACACGACGGCGGCTTCAGGTCAGGGCAGAG</u>
<i>pyrG</i> -S (P3)	CGCCGTCGTGTCTCGTCT
<i>VPS13</i> -10270DF (P5)	<u>GATAACATTGACCAGCGGCTCGTCTACAGGGCTCACTTGC</u>
<i>pyrG</i> -A (P4)	AGCCGCTGGTCAATGTTATC
<i>VPS13</i> -12076DR (P6)	GAAACTGCTGGTTCTTCGCTAC
<i>VPS13</i> -12037DR (P7)	TGCCCATACCGCAACTTCT
<i>VPS13</i> -2593UF (P8)	TGGGTTAGAAATAGGCGAGATAC
<i>pyrG</i> -731UR (P9)	TACTTCAGTCCAGCTACCAG
<i>pyrG</i> -780F (P10)	TCTCGGCTACTCCGTCCAAT
<i>pyrG</i> -356F (P11)	TCATTGACATCGGCAACACG
<i>pyrG</i> -1149DR (P12)	GTCGCCATTTTCTCTACGCAA
<i>VPS13</i> -951F (P13)	TTCGCCATCAAGAATACAAGG
<i>VPS13</i> -1869R (P14)	CTTTGTCGTGGGAGTTGTGTCG

The sequences underlined are the complementary sequences of the next adjacent segments. The names in brackets are the abbreviations for the corresponding primers.

1.2 里氏木霉 *VPS13* 缺失菌株构建、纯化及 Southern blot

以里氏木霉 QP4 基因组 DNA 为模板, 用引物 P1/P2、P5/P6 分别扩增得到 1.90 kb 上游同源臂 (U-*VPS13*) 和 1.80 kb 下游同源臂 (D-*VPS13*)。以 pAB4-1 质粒 DNA 为模板, 用引物 P3/P4 扩增得到 2.75 kb 黑曲霉 *pyrG* 片段。然后采用原生质体法转化里氏木霉 QP4, 里氏木霉原生质体的制备和转化实验主要参照 Penttilä 的方法进行^[17]。待长出转化子, 首先将转化平板上的转化子在基本平板上进行培养并连续转接 4 次, 随后利用 PCR 验证基因敲除的正确性, 再对验证正确的菌株进行生孢传代, 也连续传代 4 次, 同时进行 PCR 的验证, 直至随机挑取的 4 个单孢的 PCR 验证结果均正确, 说明转化子已经分纯。以引物 P1/P2 扩增得到的 1.90 kb 片段, 经 *EcoR* I 酶切回收后的片段 (1.29 kb) 制作探针。用探针对 *Nco* I 酶切的基因组进行 Southern blot 验证, 预期结果是缺失菌株杂交条带大小为 6.38 kb, 出发菌株为 4.38 kb。Southern blot 杂交方法主要参照 Roche 的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 说明书。

1.3 菌株生长规律及分支观察

1.3.1 菌丝生长速率测定: 取 1 μL 孢子(浓度约 10^8 个/mL)接种至 MM 固体平板中央, 每个菌株做 3 个重复(本研究中的所有实验数据均采用 3 个生物学平行, 后续实验中不再赘述), 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 每隔 12 h 测量菌落直径来表征菌株生长速度。

1.3.2 液体生物量测定: 将孢子液接种到 150 mL MM 液体培养基中(孢子接种终浓度为 10^6 个/mL), 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养。每隔 12 h 取样 10 mL, 13000 r/min 离心 10 min, 用真空泵抽滤收集菌丝, 并用镊子小心将菌丝聚到一团, 用滤纸包裹放到 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干至恒重后测定生物量。

1.3.3 菌丝分支观察: 取 1 μL 孢子(浓度约 10^8 个/mL)接种 MM 固体平板中央, 将无菌盖玻片以 45 $^{\circ}$ 角斜插入培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 待边缘菌丝蔓延过插片时显微镜观察菌丝分支。

1.4 生孢检测

1.4.1 生孢观察: 取 1 μL 孢子液(浓度约 10^8 个/mL)接种 PDA 固体平板中央, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 待生孢满板时拍照记录生孢形态, 并用适量体积的无菌水洗下平板上的所有孢子, 用血球计数板计数。

1.4.2 等距离插片法观察孢子形态: 取 1 μL 孢子(浓度约 10^8 个/mL)接种 PDA 固体平板中央, 将无菌盖玻片以 45 $^{\circ}$ 角斜插入培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 待边缘菌丝蔓延过插片时显微镜观察孢子形态。

1.5 纤维素双层平板分析

将 1 μL 孢子液(浓度约 10^8 个/mL)接种到 0.5% 纤维素双层平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 d, 观察并测量纤维素平板上透明圈大小, 计算圈径比, 同时拍照记录实验结果。

1.6 纤维素酶活力测定

将孢子悬液接种到 100 mL (500 mL 的三角瓶) 复合种子培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 36 h, 取 10 mL 菌液转接到 100 mL (500 mL 的三角瓶) 发酵培养基中, 一定时间后取样。将样品 13000 r/min 离心 10 min, 取上清测定胞外蛋白量及滤纸酶活。胞外蛋白含量的测定采用 Bradford 方法进行测定。滤纸酶活的测定如下: 将(50 \pm 1) mg Whatman 滤纸折叠放到 25 mL 酶标管底部, 加入 1.5 mL pH 4.8 的柠檬酸缓冲液和 0.5 mL 稀释一定倍数的粗酶液, 混匀; 然后在 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴 60 min, 再加入 3.0 mL DNS 终止反应, 煮沸 10 min, 用蒸馏水定容到 25.0 mL, 摇匀, 540 nm 处测 OD 值。对照开始不加酶液, 加入 DNS 之后再加入酶液。

2 结果和分析

2.1 里氏木霉 *VPS13* 鉴定

根据酿酒酵母液泡蛋白分选相关蛋白 *VPS13* 基因序列(NCBI GenBank: Z73145.1), 利用里氏木霉基因组(<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>)比对查找里氏木霉 *VPS13* 同源基因。该基因序列(jgi|Trire2|65104|)翻译成氨基酸序列得到 3124 个氨基酸残基。再经 BLASTp 比对分析, 发现该基因在氨基酸水平上与 *Ceratocystis platani* (KKF96583)、*Hypsizygos marmoreus* (KYQ45681)、*Komagataella phaffii* (CCA36675)、*Saccharomyces cerevisiae* (CAA97491)、*Drosophila melanogaster* (NP_610299)和 *Homo sapiens VPS13A* (Q96RL7)蛋白具有较高相似性。将以上 *VPS13* 序列与里氏木霉 *VPS13* 序列在氨基酸水平上构建系统发育树(图 1-A)。里氏木霉与 *Ceratocystis platani* 亲缘关系最为相近且 *VPS13* 蛋白从低等单细胞真核生物到高等真核生物均是保守的。另一方面, 选择里氏木霉、酿酒酵母的 *VPS13* 蛋白及人类 *VPS13A* 蛋白进行结构域分析, 结果发现 *VPS13* 蛋白均含有 3 个功能保守的结构域: Chorein_N (Chorein 或者 *VPS13* N 端区域; pfam12624)、SHR-BD (液泡分选相关蛋白 13 SHR 结合区域; pfam06650)和 ATG_C (自噬相关蛋白 C 端结构域; pfam09333)(图 1-B)。综上, *VPS13* 基因在真核生物中是高度保守的, 且该基因在真核细胞中可能具有重要功能。

2.2 里氏木霉 $\Delta VPS13$ 菌株构建及 PCR 和 Southern blot 验证

参照 Double-joint PCR 融合技术^[6], 将 U-*VPS13*、*pyrG*、D-*VPS13* 进行 3 片段融合, 使用巢式引物 P1/P7 扩增得到敲除盒, 构建示意图如图 2-A。

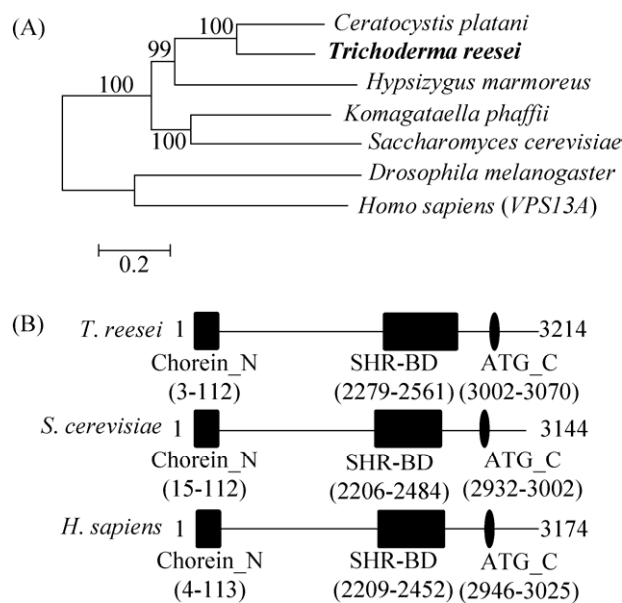


图 1. 里氏木霉 *VPS13* 蛋白鉴定

Figure 1. Identification of *T. reesei* *VPS13* protein. A: phylogenetic analyses of *VPS13* proteins were performed using Neighbour Joining from *T. reesei* (XP_006967068), *C. platani* (KKF96583), *H. marmoreus* (KYQ45681), *K. phaffii* (CCA36675), *S. cerevisiae* (CAA97491), *D. melanogaster* (NP_610299) and *H. sapiens VPS13A* (Q96RL7). Numbers indicate the bootstrap value. The bar marker indicates the genetic distance, which is proportional to the number of amino acid substitutions. B: domain analysis of *VPS13* proteins shows relatively higher level of homology in the Chorein_N, SHR-BD and ATG_C from *T. reesei* (XP_006967068), *S. cerevisiae* (CAA97491), and *H. sapiens VPS13A* (Q96RL7).

分别以里氏木霉 QP4 基因组 DNA 和 pAB4-1 质粒 DNA 为模板, 扩增得到的 1.90、1.80 和 2.75 kb 的 *VPS13* 上下游同源臂和 *pyrG* 基因片段经融合 PCR 得到 6.45 kb 的 *VPS13* 敲除盒。然后采用 CaCl_2 -PEG 介导的原生质体法转化里氏木霉 QP4, 挑取转化子进行传代和分纯。通过 PCR 及 Southern blot 验证, 成功获得 2 株验证正确的 *VPS13* 基因缺失株, 将其命名为 $\Delta VPS13-1$ 和

$\Delta VPS13$ -2。验证结果显示, *VPS13* 转化子中可以扩增得到敲除盒 *pyrG* 编码区内部基因 0.79 kb (图 2-B)、染色体上游锚定片段 2.38 kb (图 2-C)和染色体下游锚定片段 2.08 kb 左右的条带(图 2-D), 而出发菌株 QP4 染色体和阴性对照 H_2O 为模板时没有扩展出目的片段条带, 与预期结果符合。这

表明 *VPS13* 敲除盒已经发生同源交换, 成功插入里氏木霉 QP4 染色体中。进而使用 *VPS13* 基因内部引物(P13/P14)扩增 0.91 kb 片段, *VPS13* 转化子和 H_2O 没有目的条带, QP4 能扩增出 0.91 kb 的目的带(图 2-E), 说明里氏木霉 *VPS13* 在染色体水平已经被定点敲除。为了进一步确认 *VPS13* 基因敲

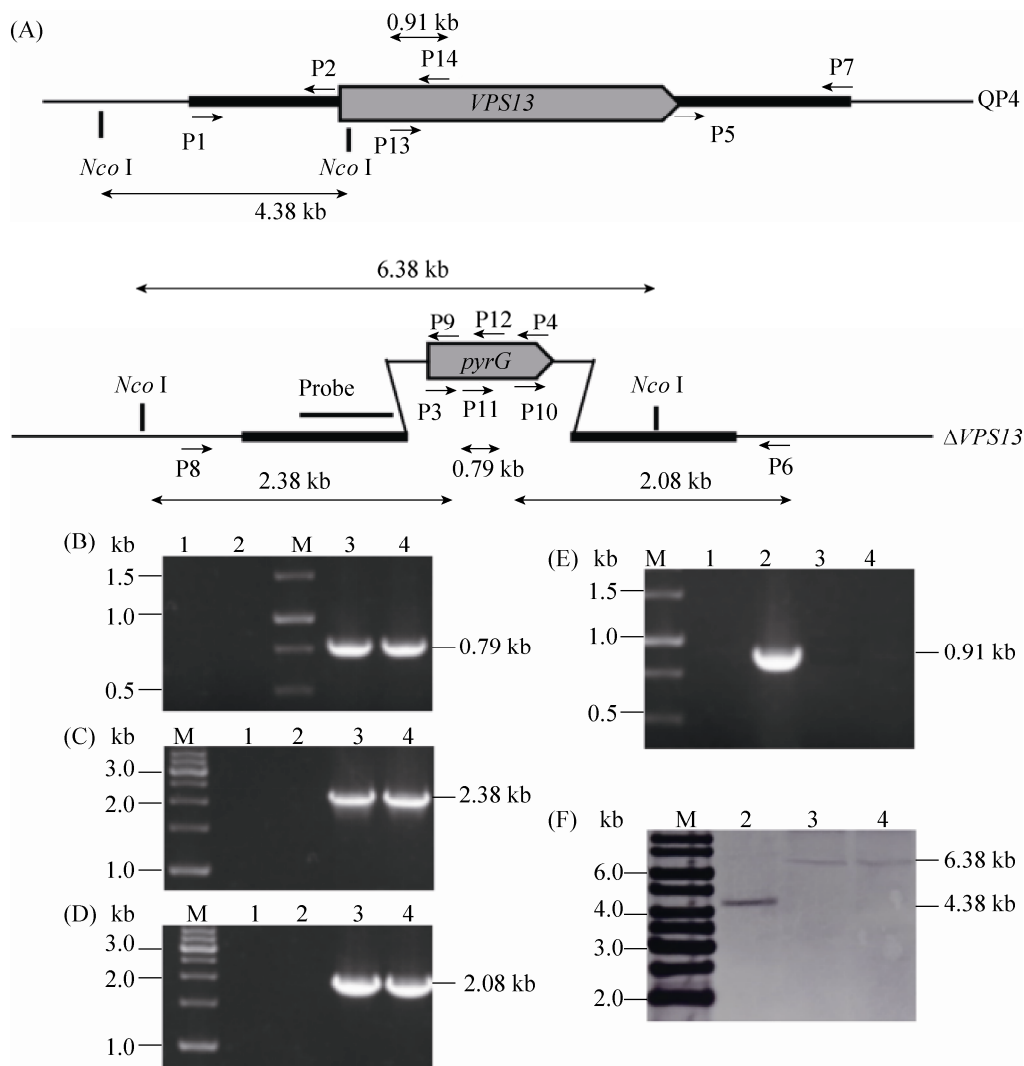


图 2. 里氏木霉 *VPS13* 基因缺失菌株构建及 PCR 和 Southern blot 验证

Figure 2. Construction of *VPS13* deletion in *T. reesei* and identification of the mutants by PCR and Southern blot. A: schematic representation of the deletion of *VPS13*; B-E: confirmation of *VPS13* deletion by PCR amplification; F: confirmation of *VPS13* deletion by Southern blot. M: 1 kb ladder DNA marker; 1: PCR product with H_2O as template; 2-4: products of PCR or Southern blot with the genomic DNA of QP4, $\Delta VPS13$ -1 and $\Delta VPS13$ -2, respectively.

除的正确性, 本文开展了 Southern blot 实验, 结果显示, 缺失菌株基因组的杂交条带由 4.38 kb 增大为 6.38 kb (图 2-F), 与预期相符(图 2-A), 因此, 里氏木霉 *VPS13* 基因缺失菌株构建成功。

2.3 里氏木霉 *VPS13* 基因缺失影响菌株的生长

首先对 *VPS13* 基因缺失株和出发菌株 QP4 进行了生长规律分析。在 2% 葡萄糖的 MM 固体平板上接种 $\Delta VPS13$ 和 QP4 孢子(孢子浓度 10^8 个/mL), 每隔 12 h 测量菌丝直径来表征菌丝生长速率。实验结果发现, 与 QP4 相比, $\Delta VPS13$ 菌丝蔓延变慢(图 3-A)。对其生物量测定发现, $\Delta VPS13$ 生物量

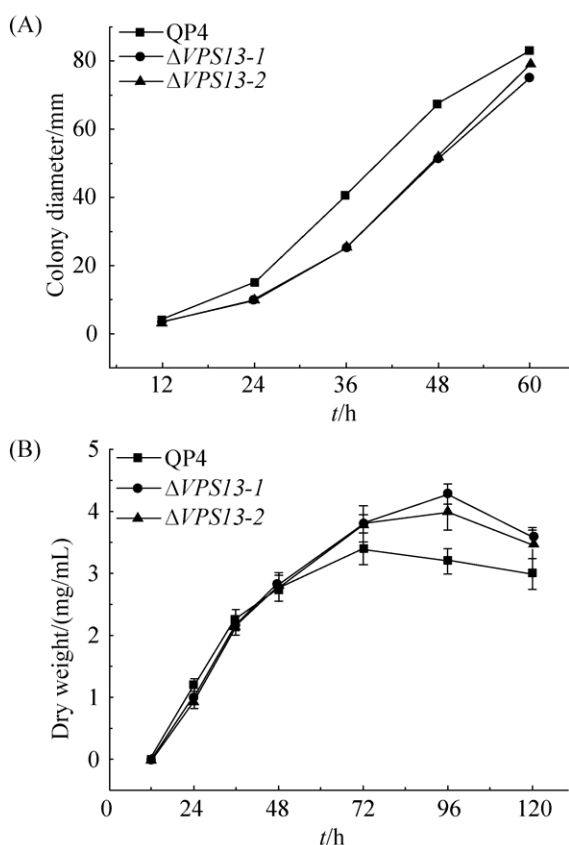


图 3. *VPS13* 基因缺失对里氏木霉生长的影响

Figure 3. Effects of *VPS13* deletion on growth of the *T. reesei*. A: colony diameter of the *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains grown on plates contained 2% glucose; B: growth curves for QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains.

在 48 h 之后比 QP4 明显增多, 且出发菌株 QP4 在 72 h 时生物量达到最大值 3.40 mg/mL, 而 $\Delta VPS13-1$ 和 $\Delta VPS13-2$ 在 96 h 生物量到达最大值, 分别为 4.70 mg/mL 和 4.47 mg/mL (图 3-B)。这个结果似乎与 $\Delta VPS13$ 菌丝蔓延速率减慢相矛盾。进一步对 $\Delta VPS13$ 及 QP4 的菌丝分支进行显微观察, 结果发现 $\Delta VPS13$ 菌丝分支明显比 QP4 增多(图 4)。因此, *VPS13* 基因缺失导致菌株生长速率变慢, 但同时增多了菌丝分支。

2.4 *VPS13* 基因缺失影响菌株的生孢

有研究报道, *VPS13* 是酿酒酵母孢子形成过程中胞质分裂所必需的^[13]。本研究对 *VPS13* 基因缺失是否影响里氏木霉菌株的生孢进行了分析。从生孢平板上绿色孢子的颜色可以看出, $\Delta VPS13$ 比 QP4 平板颜色浅(图 5-A)。对生孢 5 d 的平板进行孢子量统计, 结果表明 $\Delta VPS13-1$ 和 $\Delta VPS13-2$ 孢子量(均为 3.12×10^8 个/平板)约是 QP4 (14.1×10^9 个/平板)的 1/4 (图 5-C)。为进一步验证该结果, 对 $\Delta VPS13$ 和 QP4 进行等距离插片观察菌株生孢形态, 实验结果发现当 QP4 开始生孢时, $\Delta VPS13-1$ 和 $\Delta VPS13-2$ 还没有孢子形成(图 5-B)。因此, 里氏木霉 *VPS13* 基因缺失对菌株生孢具有重要影响。

2.5 *VPS13* 影响里氏木霉纤维素酶分泌

为了确定里氏木霉 *VPS13* 基因是否参与胞外蛋白及纤维素酶的分泌, 首先在含有尿嘧啶的 0.5% 纤维素平板上接种等量 $\Delta VPS13$ 和 QP4 孢子, 30 °C 培养 5 d, 分别测量纤维素平板上 $\Delta VPS13$ 和 QP4 菌落透明圈直径并计算圈径比来衡量菌株纤维素酶活力。从纤维素平板可以看出, 在 $\Delta VPS13-1$ 和 $\Delta VPS13-2$ 突变株菌丝周围有一个较明显的透明圈, 而出发菌株 QP4 菌丝周围的透明圈不显著(图 6-A)。

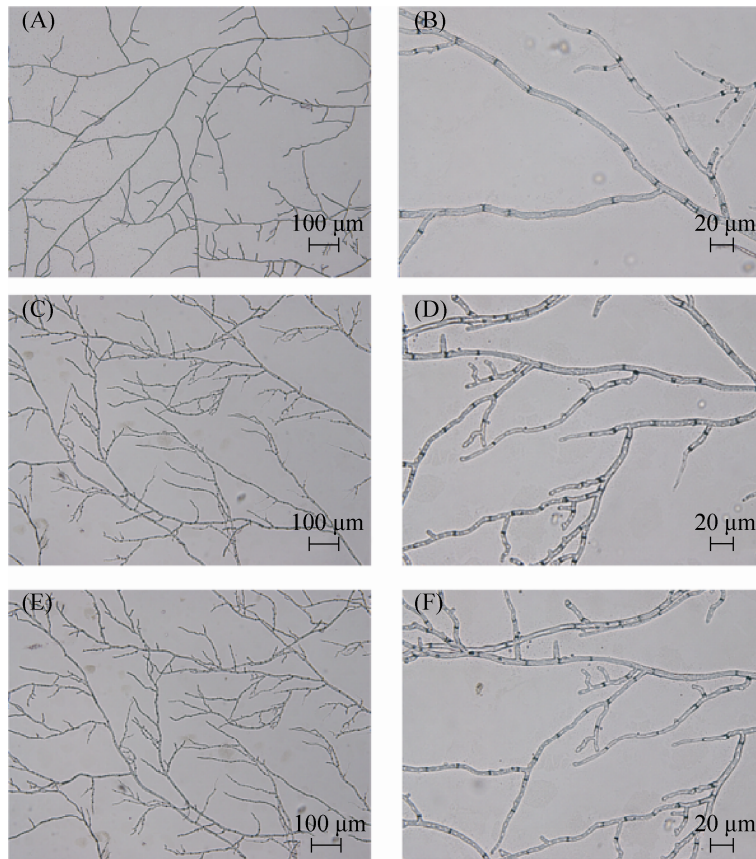


图 4. 里氏木霉 $\Delta VPS13$ 菌丝显微观察

Figure 4. Microscopic observation of hyphae of *T. reesei* $\Delta VPS13$ strains. A, C, E: microscopic images of hyphae of *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains; B, D, F: microscopic images of hyphae of *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains.

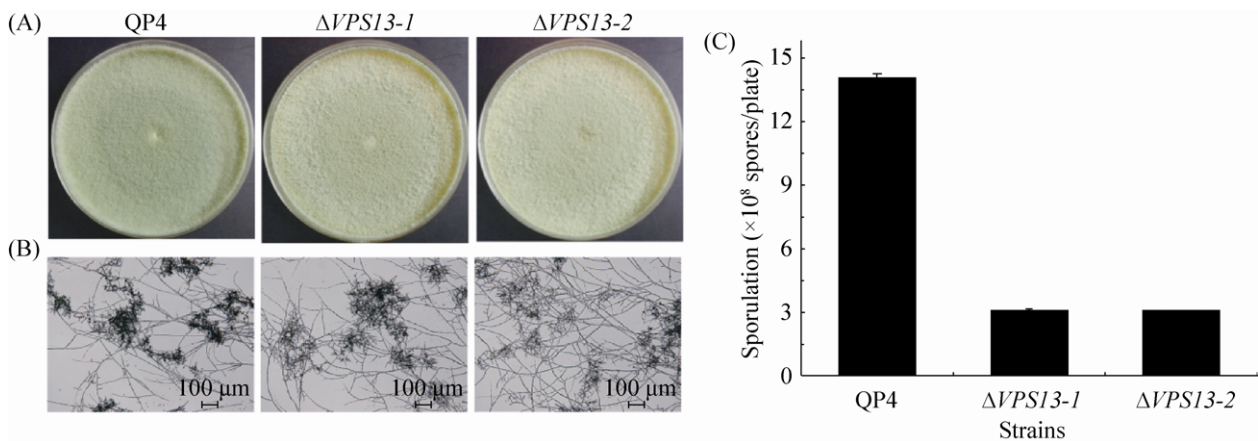


图 5. 里氏木霉 *VPS13* 基因缺失对生孢的影响

Figure 5. Impacts of the *VPS13* gene deletion on sporulation in *T. reesei*. A: spore plates of *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains grown on PDA plates. B: microscopic observation of sporulation of *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains. C: sporulation of *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains on PDA plates.

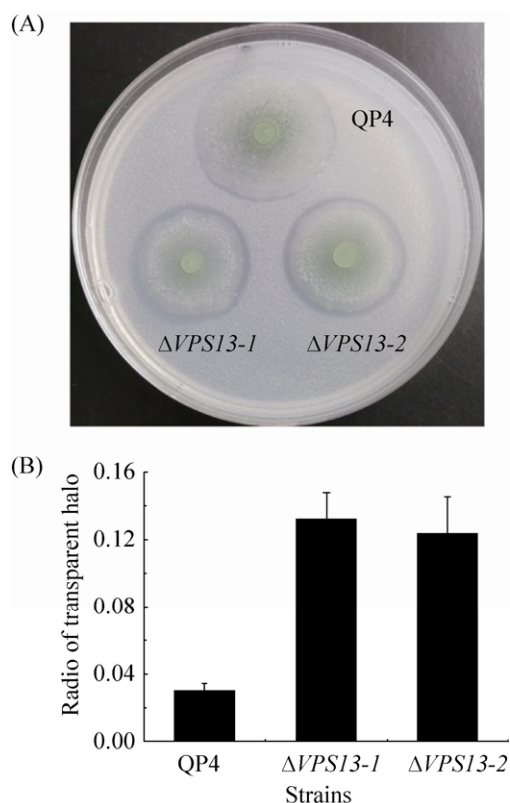


图 6. 里氏木霉 $\Delta VPS13$ 降解纤维素能力分析

Figure 6. Analysis of the capacity of *T. reesei* $\Delta VPS13$ strains to degrade cellulose. A: avicel double layer plates of *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains. B: the ratio of transparent halos of *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains.

进一步比较 $\Delta VPS13$ 和QP4的圈径比(图6-B),结果显示, $\Delta VPS13-1$ 和 $\Delta VPS13-2$ 圈径比(分别为0.13, 0.12)约是QP4圈径比(0.03)的4倍。因此, $\Delta VPS13$ 的纤维素酶分泌能力显著高于QP4。

对 $\Delta VPS13$ 与QP4进行纤维素诱导条件下液体发酵,取培养9d的酶液分别测定胞外蛋白及纤维素酶总活力。胞外蛋白含量的测定采用Bradford方法进行测定,总纤维素酶活力通过滤纸酶活(FPA)来测定。如图7所示,与出发菌株QP4相比, $\Delta VPS13$ 的胞外蛋白量和FPA活力分别平均提高了16.4%和21.9%。综上,里氏木霉VPS13基因缺失对胞外蛋白分泌和总纤维酶活均有重要影响,

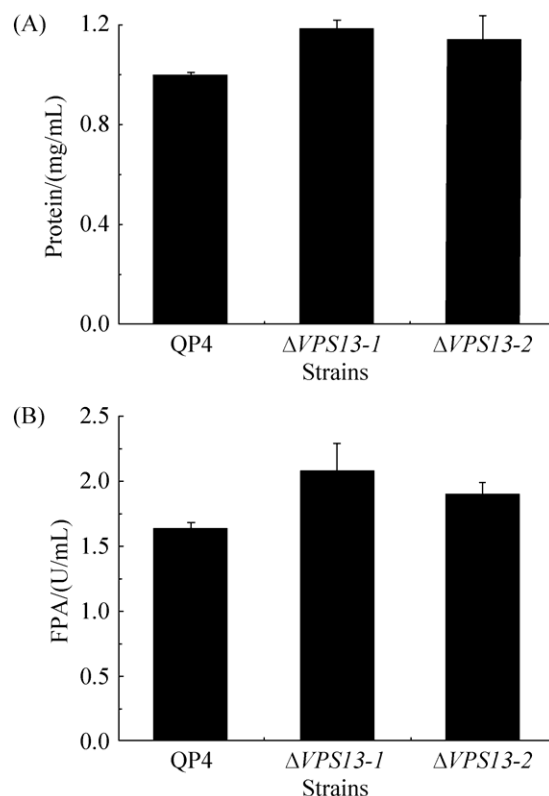


图 7. 里氏木霉 QP4 和 $\Delta VPS13$ 菌株蛋白量与 FPA 活力测定

Figure 7. Determination of protein content and the FPA activity of *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13$ strains. A: protein content of *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains; B: activity of FPA of *T. reesei* QP4 and $\Delta VPS13-1/2$ strains.

说明VPS13基因参与了里氏木霉纤维素酶分泌过程,且该基因的缺失有助于蛋白分泌和纤维素酶活力提高。

3 讨论

纤维素的有效降解是生物炼制过程中关键步骤,因此提高纤维素酶产量将有效降低生物燃料生产成本。最广泛使用的工业纤维素酶生产菌株如里氏木霉主要通过产生随机突变而实现了高效分泌,但是,其具体分泌机制还没有被阐明^[2]。里

氏木霉高产菌株 NG14 和 RUT-C30 与野生型菌株 QM6a 比较基因组数据发现,存在包含单核苷酸突变、小片段插入/缺失以及超过 100 kb 的大基因组 DNA 缺失等 200 多个突变^[18]。其中有些影响如参与蛋白分泌、液泡定位等功能的基因的突变可能有助于胞外蛋白的高效分泌^[19]。液泡蛋白分选相关蛋白 VPS13 在真核细胞中是高度保守的。有研究报道, VPS13 基因参与胞内运输和囊泡调控分选^[12]。其次, VPS13 基因缺失导致生孢过程的前孢子膜不能关闭,表明 VPS13 基因对前孢子膜的延伸和关闭具有更加直接的作用^[13]。基于 VPS13 基因在蛋白分泌系统中的重要作用,本文系统分析了里氏木霉 VPS13 基因缺失对菌株的生长、生孢及纤维素酶产量的影响。

对 VPS13 功能研究大部分来自酿酒酵母^[8],而其在丝状真菌中的功能还不清楚。本研究构建的 Δ VPS13 菌株展示的生长规律结果表明, Δ VPS13 在固体平板上菌丝延伸速率明显降低,但生物量显著增多。进一步显微观察发现, VPS13 基因缺失使得菌丝分支明显增多。但是, VPS13 基因的缺失是如何影响菌丝生长速率和分支的分子机制还有待于下一步研究。有研究报道,将近 20 个 VPS 基因突变已经证明在前孢子膜形成之前降低或阻碍了生孢作用^[20]。随后的研究也证明 VPS13 在孢子形成过程中定位到前孢子膜上且对前孢子膜的延伸和关闭具有直接的作用^[13]。故本研究对 Δ VPS13 与 QP4 进行生孢分析,结果发现 VPS13 基因缺失导致菌株生孢延迟。通过等距离插片观察菌丝生孢形态,发现在 QP4 开始生孢时 Δ VPS13 没有孢子形成,进一步佐证了 Δ VPS13 生孢延迟。酵母相关研究报道表明这种生孢缺陷可能是由于 VPS13 基因缺失降低了前孢子膜上磷脂水平而导致的^[14]。这将为后续研究该基因与菌丝生长和孢子

形成相关的作用机制提供了重要参考。

里氏木霉野生型菌株 QM6a 自 20 世纪 40 年代分离鉴定以来,经过不断的紫外线、NTG、离子诱变等筛选,获得了 NG14、RUT-C30 和 QM9414 等高产突变菌株^[2]。尽管不断对其纤维素酶产量进行改良,但其合成调控的分子机制还有待进一步阐明。最新研究报道,粗糙脉胞菌 VPS13 的敲除将胞外蛋白分泌量提高了 10.5%^[19]。本文研究中,里氏木霉 VPS13 基因敲除也显著促进了胞外蛋白的分泌,且总蛋白量增加了 16.4%,这与粗糙脉胞菌中的报道相吻合。此外, Δ VPS13 菌株在纤维素平板上的透明圈比出发菌株明显增大,而菌落变小,其圈径比提高了 4 倍。同时,液体发酵结果也证明, VPS13 基因的缺失提高了纤维素酶产量,说明 VPS13 基因对纤维素酶的合成分泌具有重要作用。另外,有研究报道里氏木霉的低生长速率有利于纤维素酶有效分泌^[21]。这与本研究中 Δ VPS13 菌株生长变慢而产酶提高也相一致。尽管低生长率与纤维素酶分泌之间相关联的具体机制目前还不清楚,但 Δ VPS13 的纤维素酶活力提高可能是与菌丝分支增多有相关性,因为菌丝分支增多可能有助于纤维素酶从菌丝顶端向胞外分泌。综上所述,里氏木霉 VPS13 基因参与了菌丝生长、生孢和蛋白分泌等不同生物学过程,这说明该基因具有功能多样性。值得关注的是,该基因缺失促进了纤维素酶分泌,因此,该基因在里氏木霉菌种改良上可作为提高纤维素酶产量的重要靶点。

参 考 文 献

- [1] Van Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1458-1480.

- [2] Peterson R, Nevalainen H. *Trichoderma reesei* RUT-C30-thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 2012, 158(Pt 1): 58–68.
- [3] Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EGJ, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Ho I, Larrondo LF, de Leon AL, Magnuson JK, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov AA, Schmoll M, Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, Schoch CL, Yao J, Barabote R, Nelson MA, Detter C, Bruce D, Kuske CR, Xie G, Richardson P, Rokhsar DS, Lucas SM, Rubin EM, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin TS. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 2008, 26(5): 553–560.
- [4] Zhang WX, Kou YB, Xu JT, Cao YL, Zhao GL, Shao J, Wang H, Wang ZX, Bao XM, Chen GJ, Liu WF. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(46): 32861–32872.
- [5] Saloheimo M, Pakula TM. The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology*, 2012, 158(Pt 1): 46–57.
- [6] Yan SM, Wu G. Secretory pathway of cellulase: a mini-review. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 177.
- [7] Lemmon SK, Traub LM. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12(4): 457–466.
- [8] Park JS, Thorsness MK, Policastro R, McGoldrick LL, Hollingsworth NM, Thorsness PE, Neiman AM. Yeast *Vps13* promotes mitochondrial function and is localized at membrane contact sites. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 27(15): 2435–2449.
- [9] Velayos-Baeza A, Vettori A, Copley RR, Dobson-Stone C, Monaco AP. Analysis of the human *VPS13* gene family. *Genomics*, 2004, 84(3): 536–549.
- [10] Bankaitis VA, Johnson LM, Emr SD. Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(23): 9075–9079.
- [11] Brickner JH, Fuller RS. *SOI1* encodes a novel, conserved protein that promotes TGN-endosomal cycling of Kex2p and other membrane proteins by modulating the function of two TGN localization signals. *The Journal of Cell Biology*, 1997, 139(1): 23–36.
- [12] Luo WJ, Chang A. Novel genes involved in endosomal traffic in yeast revealed by suppression of a targeting-defective plasma membrane ATPase mutant. *The Journal of Cell Biology*, 1997, 138(4): 731–746.
- [13] Park JS, Neiman AM. *VPS13* regulates membrane morphogenesis during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(Pt 12): 3004–3011.
- [14] Park JS, Haleboua S, Kishida S, Neiman AM. A conserved function in phosphatidylinositol metabolism for mammalian Vps13 family proteins. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124836.
- [15] Zhong LX, Qian YC, Dai MX, Zhong YH. Improvement of uracil auxotrophic transformation system in *Trichoderma reesei* QM9414 and overexpression of β -glucosidase. *CIESC Journal*, 2016, 67(6): 2510–2518. (in Chinese) 钟立霞, 钱远超, 戴美学, 钟耀华. 里氏木霉 QM9414 尿嘧啶缺陷型转化体系改进和 β -葡萄糖苷酶的过量表达. *化工学报*, 2016, 67(6): 2510–2518.
- [16] Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(11): 973–981.
- [17] Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen E, Knowles J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 1987, 61(2): 155–164.
- [18] Le Crom S, Schackwitz W, Pennacchio L, Magnuson JK, Culley DE, Collett JR, Martin J, Druzhinina IS, Mathis H, Monot F, Seiboth B, Cherry B, Rey M, Berka R, Kubicek CP, Baker SE, Margeot A. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(38): 16151–16156.
- [19] Pei X, Fan FY, Lin LC, Chen Y, Sun WL, Zhang SH, Tian CG. Involvement of the adaptor protein 3 complex in lignocellulase secretion in *Neurospora crassa* revealed by comparative genomic screening. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 124.
- [20] Piekarska I, Kucharczyk R, Mickowska B, Rytka J, Rempola B. Mutants of the *Saccharomyces cerevisiae* *VPS* genes *CCZ1* and *YPT7* are blocked in different stages of sporulation. *European Journal of Cell Biology*, 2010, 89(11): 780–787.
- [21] Pakula TM, Salonen K, Uusitalo J, Penttilä M. The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 1): 135–143.

Effects of VPS13 deletion on hyphal branch, sporulation and cellulase production in *Trichoderma reesei*

Ruiyan Liu^{1,2}, Yunhua Hou^{1*}, Yifan Wang², Yuanchao Qian², Yaohua Zhong^{2*}

¹ College of Biological Engineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, Shandong Province, China

² State Key Laboratory of Microbial Technology, School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] *Trichoderma reesei* is one of the major industrial fungi for cellulase production. A large amount of cellulases are secreted from the fungal cell through the protein secretion pathway. Therefore, knowledge of specific gene functions related to protein secretion would contribute to identification of key factors controlling cellulase production. In this study, the vacuolar protein sorting-associated gene *VPS13* was deleted by gene knockout strategy in *T. reesei* and effects of *VPS13* deletion on fungal growth and cellulase production were analyzed. [Methods] Double-joint PCR technique and homologous recombination method were used to delete *VPS13* gene in *T. reesei* QP4 strain. Fungal cultivation, microscopic observation, sporulation detection, protein content and enzyme activity determination were applied to compare the growth characteristics, morphology, spore formation, and cellulase activity between the deletion strains and the parental strain. [Results] Two *VPS13* deletion strains, $\Delta VPS13$ -1 and $\Delta VPS13$ -2, were obtained successfully. Compared with the parental strain, the mutants showed slower hyphae spreading, but their biomass increased significantly after the logarithmic growth phase. In addition, *VPS13* deletion led to delay of sporulation. Cellulose plate cultivation revealed that *VPS13* mutants produced clearer transparent halos around colonies than the parental strain, indicating that *VPS13* deletion increased the ability to degrade cellulose. Furthermore, liquid fermentation showed that *VPS13* deletion also improved protein yield and cellulase activity. [Conclusion] *T. reesei VPS13* gene can be used as an important target to improve cellulase yield.

Keywords: *Trichoderma reesei*, *VPS13*, gene deletion, sporulation, protein secretion, cellulase

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370135), by the Fundamental Research Funds of Shandong University (2015JC005) and by the Agricultural Science and Technology Achievement Transformation Fund of Shandong Province (2014-45)

*Corresponding author. Yunhua Hou, Tel: +86-531-89631776, E-mail: houyunhua@sohu.com; Yaohua Zhong, Tel: +86-531-88366118, E-mail: zhongyaohua@sdu.edu.cn

Received: 29 November 2016; Revised: 19 February 2017; Published online: 24 February 2017