

## 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

陈晓敏, 欧阳浩森, 唐国敏, 王敖全, 金城\*

(中国科学院微生物研究所微生物资源国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要:**【目的】在酵母细胞中蛋白质的糖基磷酸肌醇化(GPI)修饰是将GPI定位于细胞膜或细胞壁的信号。目前已对酵母GPI蛋白的细胞定位信号有一定了解,但对丝状真菌GPI蛋白的定位则了解甚少。AfPhoA是丝状真菌烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)的酸性磷酸酯酶,是GPI修饰的蛋白。该蛋白首先分离自细胞膜,随后又发现该蛋白与细胞壁结合。分析其C-端序列也未发现已知的定位信号,因此目前还不能确定其细胞定位。【方法】我们以绿色荧光蛋白(GFP)作为报告分子,将AfPhoA的C-端序列与GFP的C-端融合后检测融合GFP的细胞定位。【结果】我们用烟曲霉几丁质酶AfChiB1的启动子和N-端信号肽构建了可在烟曲霉中分泌表达GFP的表达载体pchiGFP。在此基础上将AfPhoA的C-端与GFP融合,融合质粒与pCDA14共转化烟曲霉后筛选到一株转化子。该转化子可表达融合GFP,在诱导和非诱导条件下,融合GFP均主要分布在细胞膜上,随培养时间的延长,融合GFP在细胞壁上也有少量分布;在培养上清液中只能检出约30KD的GFP融合蛋白,而没有完整的GFP融合蛋白,推测为从GPI锚上水解释放的。【结论】我们的研究表明,AfPhoA蛋白GPI修饰的作用是使该蛋白定位于细胞膜。本研究不仅初步确定了AfPhoA蛋白GPI修饰的细胞膜定位功能,而且为烟曲霉基因与蛋白质功能的研究建立了一个有效表达系统。

**关键词:** 烟曲霉; 信号; GPI锚; 蛋白定位

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2008)10-1330-09

真核细胞内蛋白质的GPI(glycosylphosphatidylinositol)修饰是一种保守的翻译后糖基化修饰,可将蛋白质定位于细胞膜上,同时也是蛋白质转运的一种途径。GPI修饰的蛋白质通常带有一段疏水的N-端信号肽和一段C-端疏水信号肽;其中N-端信号肽是蛋白质外泌所必需的,而C-端信号肽则GPI修饰的信号,含有一个位于C-端17-25位的 $\omega$ -氨基酸。在内质网中由转氨酶复合体催化将GPI共价连接到 $\omega$ -位点<sup>[1~6]</sup>。高等真核生物的GPI蛋白最终定位于细胞膜上,而在真菌中许多GPI蛋白还被定位于细胞壁上,细胞膜和细胞壁定位的蛋白质有着不同的功能<sup>[7~11]</sup>。对模式生物啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的研究表明,

定位于细胞膜的某些GPI蛋白可在GPI的糖链部分发生断裂,然后通过残留的在蛋白上的糖残基使蛋白与细胞壁上的 $\beta$ -1,6-葡聚糖连接,从而将蛋白定位到细胞壁上,但该转移过程的具体机制还不清楚<sup>[12~14]</sup>。

酵母GPI信号肽中 $\omega$ -位点上游的4个氨基酸残基中如果有2个碱性氨基酸,则蛋白质将被定位于细胞膜;如果没有碱性氨基酸或碱性氨基酸被疏水氨基酸代替,蛋白质就会被定位到细胞壁上<sup>[3,15~17]</sup>;如果GPI蛋白的C-端富含丝氨酸和苏氨酸(高于30%)也会使蛋白定位于细胞壁<sup>[18~20]</sup>,说明GPI蛋白的定位信号可能不止一种。另外,一些GPI蛋白往往在细胞膜和细胞壁上均有分布,对这些蛋白的定位目前还有争

基金项目:“863计划”专题(2007AA02Z164)

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

作者简介:陈晓敏(1981-),女,山西人,中国科学院微生物研究所硕士研究生。E-mail: lizyily@163.com

收稿日期:2008-05-12; 修回日期:2008-07-14

议。尽管对酵母 GPI 蛋白的定位信号还需进行深入的研究, 但 GPI 信号肽的细胞定位功能已被成功应用于外源蛋白在酵母细胞表面的定位表达<sup>[29]</sup>。

与酵母 GPI 蛋白相比, 对丝状真菌的 GPI 蛋白的了解还非常有限。有证据表明丝状真菌的 GPI 蛋白也与酵母一样参与蛋白质的转运和定位, 但又与酵母有显著的不同<sup>[21-22]</sup>。因此对丝状真菌 GPI 蛋白转运和定位的研究将能使我们更深入地了解这一与人类生活密切相关的重要微生物类群。烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) 是一种广泛存在于自然界中的丝状真菌, 其细胞壁合成与 GPI 蛋白密切相关<sup>[11, 34]</sup>。磷酸是烟曲霉生长所必需的, 在 Pi 浓度低于 10  $\mu\text{mol/L}$  时烟曲霉不能生长, 烟曲霉通过其产生的酸性磷酸酯酶 (AfPhoA) (XM745014) 及植酸酶利用环境中的 Pi<sup>[22]</sup>。AfPhoA 是烟曲霉细胞膜中几种主要的 GPI 蛋白之一<sup>[21]</sup>; 同时也有报道表明 AfPhoA 可与细胞壁  $\beta$ -1,3-葡聚糖非共价结合从而定位于细胞壁<sup>[22]</sup>。因此, AfPhoA 的确切定位目前尚无定论。为研究 AfPhoA 的定位, 我们将烟曲霉几丁质酶 AfChiB1 的 N-端信号肽和 AfPhoA 的 C-端序列分别与绿色荧光蛋白 (GFP) 的 N-端和 C-端融合后在烟曲霉中表达, 并对融合 GFP 的细胞定位进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:** 烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) YJ-407 (CGMCC0386) 保存于中国科学院微生物研究所菌种保藏中心, 烟曲霉 CEA17 菌株 (尿昔/尿嘧啶营养缺陷株) 和 pCDA14 质粒由法国巴斯德研究所 D'Enfert 博士馈赠<sup>[23]</sup>; pGT21 质粒由 pGT10 衍生而来<sup>[33]</sup>; GFP 基因 *gfp(2-5)* 为 S65T/V163A/I167T/ S175G 位点突变的基因<sup>[24]</sup>。

**1.1.2 培养基及培养条件:** ①烟曲霉的培养基为完全培养基 (CM) 或添加 5 mmol/L 尿昔/尿嘧啶的完全培养基

(CMU)<sup>[25]</sup>。②诱导培养基为: 1% 胶体几丁质, 0.05% 蛋白胨, 0.05% 酵母膏, 0.1% 葡萄糖, 0.03%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.07%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4$ , 0.001%  $\text{FeSO}_4$ , 0.0001%  $\text{ZnSO}_4$ , pH 5.0。烟曲霉在固体 CMU 上 37 $^\circ\text{C}$  培养 48 h 后, 将孢子用含有 0.1% Tween 20 的 PBS 和去离子水冲洗 2 次后计数。将 100  $\mu\text{L}$  孢子悬液 ( $1 \times 10^7$  孢子/mL) 接种于 200 mL CM 液体培养基中 37 $^\circ\text{C}$ , 250 r/min 培养。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶、EX Taq DNA polymerase 和 T4 DNA 连接酶购自宝生物工程有公司; RNase® Plant Mini kit 来源于美国 QIAGEN Sci. 公司; 蜗牛酶来自中国科学院生物物理研究所; 化学发光荧光底物购自 Pierce 公司; 地高辛标记杂交试剂盒为 Roche Applied science 的产品; 胶回收试剂盒来源于北京博大生物技术公司。其它试剂均为分析纯。主要仪器有 721 分光光度计 (上海分析仪器厂产品), 超声细胞破碎仪 (宁波新芝科仪器研究所), 冷冻离心机 GS-15R、Avanti™J-25 和超速离心机 XL-90 (Beckman 公司), 离心干燥仪 (美国 Jouan 公司), 冻干仪 (美国 Stone Ridge 公司) 和倒置荧光显微镜 (Axiovert 200M, Zeiss 公司)。

### 1.2 融合基因的构建

用 BamH I /Kpn I 酶切 pMCB17 质粒分离 *gfp(2-5)* 基因, 将 *gfp(2-5)* 基因连接到 pGT21 质粒上获得 pGT21:GFP; 用 EcoRI/KpnI 消化的 1.5 kb 含有烟曲霉 AfchiB1 基因启动子 ( $P_{chiB1}$ ) 和 AfChiB1 分泌信号肽<sup>[27]</sup> 编码区的序列、Kpn I /BamH I 消化的 GFP 基因 *gfp(2-5)* 以及黑曲霉的 TrpC 终止子区共同连接到 EcoR I /Kpn I 消化的 pUC19 中获得 pchiGFP; 用 EcoR I /Kpn I 消化的 1.4 kb 仅含有烟曲霉 AfchiB1 基因启动子 ( $P_{chiB1}$ ) 连接到 EcoR I /Kpn I 消化的 pchiGFP 获得 pchiGFP-S 载体; 用 overlap extending PCR 扩增得到 AfphoA (XM745014) C-端的 477 bp 编码区与 GFP 的 C-端融合的片段, 将该片段连接到 EcoR I /Kpn I 消化的 pchiGFP 中获得 pGFP/PhoA 融合质粒。载体构建所用引物见表 1。

表 1 本研究构建载体所用引物  
Table 1 Primers used for vector construction in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Purpose
PhoA-mid-5	GGCATGGATGAACTATACAAATCCGTGTCCGCGAACTGG	Construction of pGFP/PhoA
PhoA-mid-3	CCAGTTCGCGGACACGGATTTGTATAGTTCATCCATGCC	
pGT21GFP-N	GGTGGTGATATCGCATGAGTAAAGGAGAAGAAC	GFP amplification for construction of pGT21: GFP
pGT21GFP-C	GGTGGTGGGCCCTTATTTGTATAGTTCATCC	
ChiG-N	GGAATTCGAGCCATTGCCTACATCCTTCAC	$P_{chiB1}5'$ amplification for construction of pchiGFP
ChiG-C	GGGGTACCGCGCCCTCCAGATCAGTAC	
ChiG-CS	GGGGTACCGCTGTTGTCTGTTTCAGTCGAGCTTG	Amplification of $P_{chiB1}3'$ without signal peptide for pchiGFP-S construction

### 1.3 质粒转化

按 Yelton 等的方法<sup>[28]</sup>将 pGFP/PhoA 融合质粒与 pCDA14 共转化 CEA-17 菌株。在 MM 培养基上筛选尿苷/尿嘧啶营养缺陷回复转化子,然后在荧光显微镜下进一步筛选表达 GFP 的菌株。

### 1.4 GFP 的观察

带有融合质粒的烟曲霉转化子在 CM 培养基上培养后,将菌丝放在载玻片上用荧光显微镜(Zeiss microscope, 460- to 480-nm excitation filter set)下观察并拍照。

### 1.5 质壁分离

将菌丝用 PBS (pH7.4) 冲洗两次,用 0.5 mol/L 山梨醇溶液处理后用显微镜检测。

### 1.6 PCR 与 Southern 杂交

以烟曲霉基因组 DNA 为模板, GFP-N-1 (5'-GGGTACCATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC-3') 和 PhoA-C (5'-CGGGATCCTTAAAGCAGGTTTAGA-GCGAGTCC-3') 为引物,用 Taq DNA polymerase (Tiangen, China) 进行 30 个循环的扩增 (94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s)。

将 10 μg 用 *KpnI/BamHI* 消化的基因组 DNA 用 0.8% 琼脂糖电泳分离并转移到 Hybond-N 尼龙膜 (Amersham, USA) 上,用 DIG-标记的 *gfp(2-5)* 片段 (*KpnI/BamHI*) 杂交。

### 1.7 蛋白印迹

将 10 μg 蛋白用 12% SDS-PAGE 分离后转移到硝酸纤维素膜上,用 5% 溶于 TBS (10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH8.0) 的脱脂奶粉封闭,以 1:1000 稀释的 anti-GFP 多抗 (Clontech) 进行杂交,然后用 TBS+0.05% Triton X-100 (TBST)、TBST+0.5 mol/L NaCl 和 TBST 洗膜,再将膜与 HRP-conjugated swine anti rabbit IgG (1:5000 稀释) 温育。洗膜后用 enhanced chemiluminescence (ECL) substrate (Pierce) 显影。

## 2 结果

### 2.1 外泌 GFP 融合蛋白的构建与表达

由于 GPI 蛋白的合成转运不仅需要 C-端信号肽,而且也需要 N-端信号肽,因此我们首先在 GFP 报告分子的 N-端融合 N-端信号肽以保证其正常分泌。以带有黑曲霉葡萄糖淀粉酶启动子和 N-端信号肽的 pGT21 为载体在烟曲霉中表达 GFP, 结果发现 pGT21: GFP 在烟曲霉中表达并不高,而且由于需要用较高浓度的淀粉进行诱导,培养上清液中的淀粉导致分泌蛋白的分离研究困难。因此我们用烟曲霉几丁质酶基因 *AfchiB1* 的启动子

( $P_{chiB1}$ )、N-端信号肽<sup>[27]</sup>和黑曲霉 TrpC 终止子区构建了一个新的载体,并在 N-端信号肽的 C-端插入 GFP 的基因,获得 pchiGFP;另外还构建了不含 N-端信号肽的 GFP 表达载体 pchiGFP-S。将 pchiGFP 和 pchiGFP-S 分别与 pCDA14 共转化 CEA17 菌株后,筛选尿苷/尿嘧啶自养型菌株。在非诱导条件下 (CM 培养基) 对转化菌株在菌丝生长初期 (7 h)、对数生长期 (30 h)、平台期 (60 h) 和衰亡期 (140 h) 的 GFP 表达进行研究。如图 1 所示,在 pchiGFP-S 转化的菌株中 GFP 的表达受生长周期调控,在菌丝生长初期开始表达,在对数生长期和平台期逐渐增强,并在衰亡期达到最大;在培养上清液中未检测到 GFP 蛋白,说明  $P_{chiB1}$  可以在非诱导条件下启动 GFP 的表达,由于没有分泌信号肽, GFP 只能在胞内表达 (图 1-B)。pchiGFP 转化的菌株也在菌丝生长初期开始表达 GFP,但在对数期、平台期及衰亡期的菌丝细胞内只有微弱的荧光信号,而培养上清液中的 27 kDa 的 GFP 在菌丝生长初期开始出现,并随培养时间的延长而逐渐增强,而且 GFP 的分泌与几丁质酶 *AfChiB1* 的分泌同步 (图 1-A),说明 *AfChiB1* 的 N-端信号肽可以使 GFP 分泌到细胞外。

### 2.2 GFP/PhoA 融合蛋白的构建及表达

*AfPhoA* 由 448 个氨基酸残基组成,有 12 个潜在糖基化位点,第 424 位氨基酸为其 C-端信号肽的  $\omega$ -位点 (图 2-A); 在  $\omega$ -10 至  $\omega$ -1 位点除  $\omega$ -3 的 Ala 和  $\omega$ -5 的 Pro 外,其余的氨基酸残基均为 Ser,说明该信号肽中不存在酵母的细胞膜定位信号;其 C-端的 150 个氨基酸残基中 Ser/Thr 含量为 19%。由于目前已知的、决定酵母 GPI 蛋白细胞定位的信号存在于 C-端信号肽或 C-端的至少 170 个氨基酸残基内,因此为避免遗漏可能存在的定位信号、使融合 GFP 能准确报告 *AfPhoA* 在烟曲霉中的细胞定位,我们将 GFP 的 C 末端与 *AfPhoA* C-端的 159 个氨基酸融合。融合质粒 pGFP/PhoA 与 pCDA14 共转化 CEA17 菌株后,筛选获得一个阳性克隆 PHOA-7。经 PCR 和 Southern 杂交分析证实融合基因已整合到 PHOA-7 菌株的基因组 DNA 中 (图 2-B); PHOA-7 菌株在 37°C 培养 48 h 后提取膜蛋白,用抗 GFP 抗体可检测到 GFP,其中一条约 45 kDa 的带大于融合蛋白的理论分子量 (43.5 kDa),分析可能是糖基化修饰所致,因为与 GFP 融合的 *AfPhoA* 片段有 4 个潜在的糖基化位点;另两个分子量小于 43 kDa 的条带可能分别是未被糖基化修饰和被部分降解的融合 GFP (图 2-C),说明融合 GFP 可以在烟曲霉中正常表达并被转运到细胞膜上。

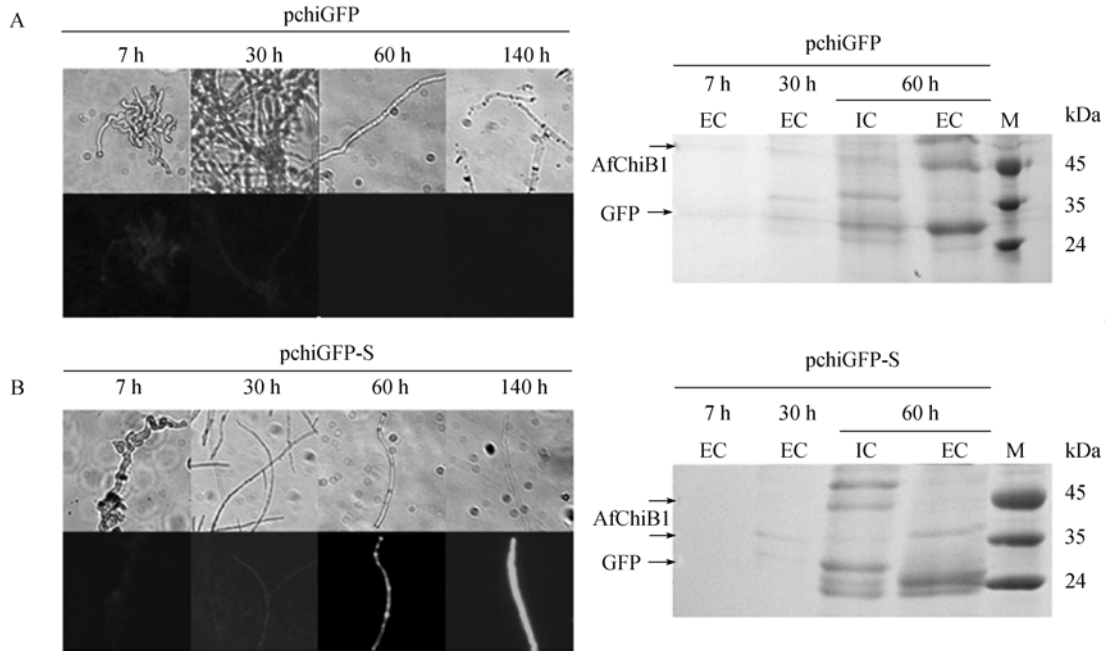


图 1 GFP 在烟曲霉中胞外(A)与胞内(B)表达

Fig. 1 Intra- and extra-cellular expression of GFP in *A. fumigatus* strain harboring pchiGFP (A) or pchiGFP-S (B). The conidia slurry of 100  $\mu$ L ( $1 \times 10^7$ /mL) was inoculated in 200 mL CM liquid medium and incubated at 37°C with shaking of 250 r/min for 7-140 h. At intervals, the mycelia were harvested and analyzed under fluorescent light, using Zeiss microscope ( $\times 200$ ) equipped with a 460- to 480-nm excitation filter set, captured with CCD camera. The culture supernatant was taken and analyzed using SDS-PAGE. EC, extracellular protein; IC, intracellular protein.

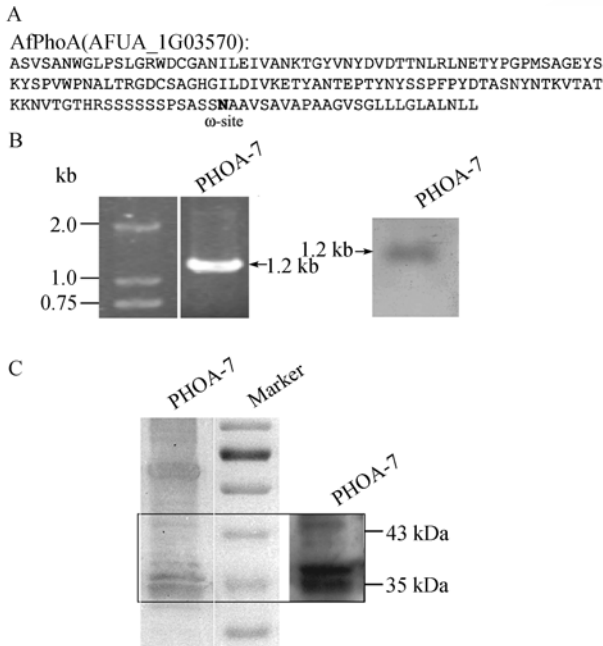


图 2 GFP/PhoA 融合蛋白的构建与表达

Fig. 2 Construction and expression of the GFP/PhoA in *A. fumigatus*. In A, the C-terminal sequence used for the chimeric construct is shown. Bold letter indicates the  $\omega$  amino acid that was predicted by the Big-Pi prediction program (<http://mendel.imp.ac.at/gpi/cgi-bin/gpipred.cgi>). In B, PCR and Southern blot were carried out using genomic DNA isolated from strain PHOA-7. In C, the membrane proteins from strain PHOA-7 incubated at 37°C for 48 h were analyzed by Western blot. Anti-GFP polyclonal antibodies (Clontech) at 1:1000 dilution was used for Western blot.

### 2.3 GFP/PhoA 融合蛋白的细胞定位分析

将 PHOA-7 菌株在 CM 中 37°C 培养时，融合蛋白 GFP/PhoA 在对数生长期时（10 ~ 38 h）出现在菌丝细胞的表面，并稳定地表达；将对数生长期和平台期（60 h）的菌丝用 0.5 mol/L 山梨醇处理使菌丝细胞脱水，细胞膜与细胞壁分离后发现 GFP/PhoA 的荧光信号集中于收缩细胞的细胞膜上，说明 GFP/PhoA 定位于细胞膜（图 3）。

为提高融合 GFP 的表达量以检测细胞壁上是否有分布，我们在几丁质诱导的条件下表达融合 GFP，将 PHOA-7 在 CM 培养基中培养 24 h 后转入诱导培养基中继续培养。结果发现在几丁质诱导 2 h 后，GFP/PhoA 开始在细胞内大量合成并开始出现在细胞表面，诱导 36 h 后荧光信号主要分布于细胞表面。取不同诱导培养时间的菌丝进行质壁分离后检测 GFP 荧光，发现诱导 2 ~ 76 h 的 GFP 荧光信号主要分布于细胞膜上，在诱导培养 76 h 后细胞壁上也有少量信号，说明在烟曲霉中 GFP/PhoA 主要定位于细胞膜（图 4-A）。提取相同培养时间的菌丝细胞膜进行 Western 分析也证实 30 kDa 的 GFP/PhoA 在诱导培养 8 h 后大量出现在细胞膜上，并在 36 h 达到最大，随后逐渐减少（图 4-B）。对培养上清液中的蛋白质进

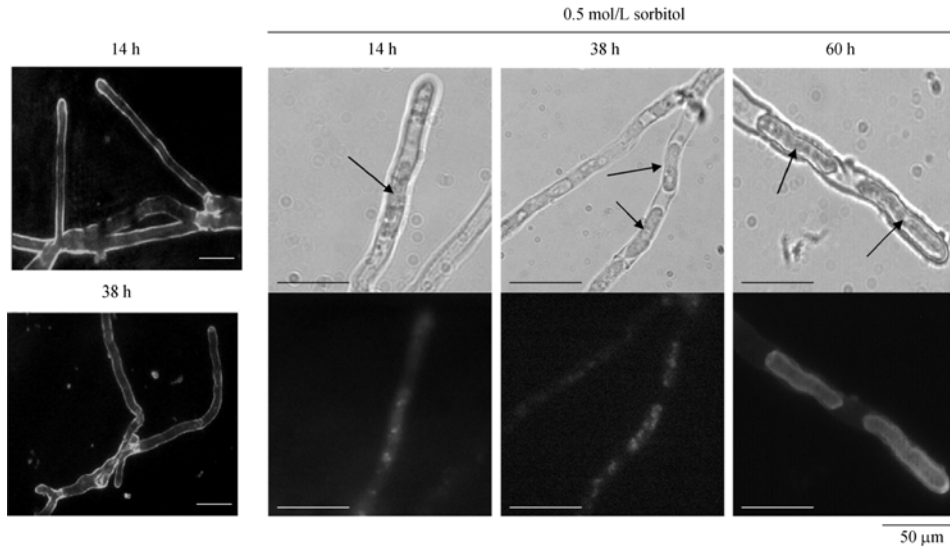


图3 GFP/PhoA 的非诱导表达和细胞定位

Fig. 3 Expression and localization of the GFP/PhoA in CM. The conidia slurry of 100  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^7/\text{mL}$ ) was inoculated in 200 mL CM liquid medium and incubated at 37°C with shaking of 250 r/min for 14-60 h. At intervals, the mycelia were harvested and analyzed under fluorescent light, using Zeiss microscope ( $\times 200$ ) equipped with a 460- to 480-nm excitation filter set, captured with CCD camera. Plasmolyzed cell is marked with arrow.

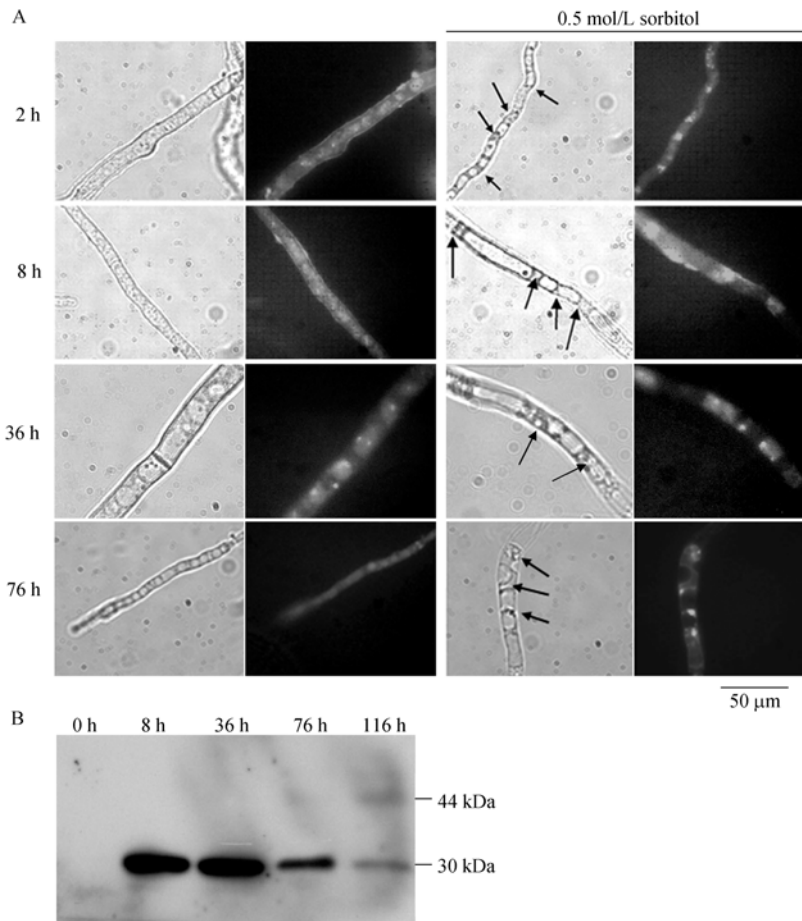


图4 GFP/PhoA 融合蛋白在烟曲霉中的诱导表达和细胞定位

Fig. 4 Induced expression and localization of the GFP/PhoA in *A. fumigatus*. A: the mycelia were grown as described under *Materials and Methods*. At intervals, the mycelia were harvested, treated with 0.5 mol/L sorbitol and then analyzed under fluorescent light, using Zeiss microscope equipped with a 460 to 480 nm excitation filter set, captured with CCD camera and edited with the image analyzer program Image (AxioVision Rel.4.6) ( $\times 1000$ ). Plasmolyzed cell is marked with arrow. B: the membrane proteins from strain PHOA-7 cultivated at 37°C after induction were analyzed by Western blot. Anti-GFP polyclonal antibodies (Clontech) at 1 : 1000 dilution was used for Western blot.

行分析发现(图 5-B), 30 kDa 的 GFP 蛋白在诱导 8 h 后也开始出现在细胞外, 并随随培养时间的延长而逐渐减少; 对蛋白电泳的扫描定量显示, 如果以诱导 8 h 的胞外 30 kDa 的 GFP/PhoA 为 100%, 而诱导培养 36、76 和 116 小时后则分别只有 14.3%、8.6% 和 5.2%。与此相对照的是诱导 36~116 h 的培养上清液中 AfChiB1 的量逐渐增加(图 5-A)。非糖基化 GFP/PhoA 的理论分子量约为 43.5 kDa, 糖基化的 GFP/PhoA 分子量约为 54 kDa, 我们在诱导培养 36~116 h 的上清液中也能检测到少量的糖基化和非糖基化的融合 GFP(图 5-B), 推测 44 kDa 和 54 kDa 的完整融合 GFP 是老化菌丝自溶后释放出来的。

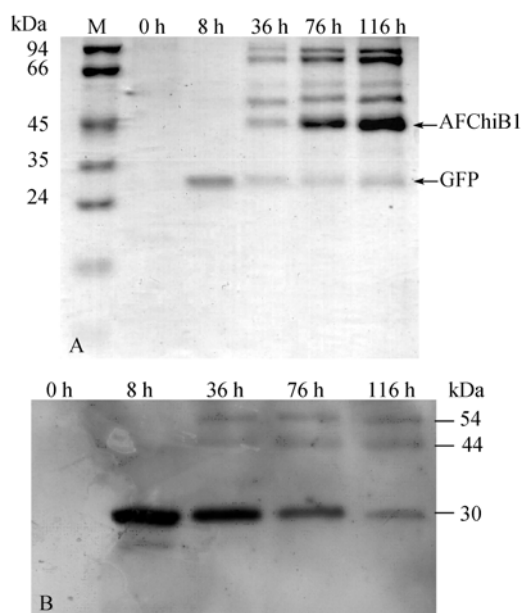


图 5 胞外 GFP/PhoA 的检测

Fig. 5 Analysis of GFP/PhoA in culture supernatant. In A, the PHOA-7 strain was grown in liquid CM at 37° for 24 h and then transferred to induction medium as described under *Materials and Methods*. After 0, 8, 36, 76, and 116 h of induction, 4 mL of culture supernatant were taken out and precipitated with 4-volume of cold acetone. The proteins were collected by centrifugation (12000 r/min for 20 min) and re-dissolved in 150  $\mu$ L of 50 mmol/L Tris-HCl. 20  $\mu$ L of each preparation were analyzed on SDS-PAGE. In B, the membrane proteins from strain PHOA-7 incubated at 37°C after induction were analyzed by Western blot. Anti-GFP polyclonal antibodies (Clontech) at 1 : 1000 dilution was used for Western blot.

### 3 讨论

#### 3.1 烟曲霉分泌表达载体的构建

遗传操作系统是进行基因与蛋白质功能研究必不可少的。目前已有一些遗传操作系统可用于烟曲

霉, 如以乳清酸核苷-5-磷酸脱羧酶基因 *pyrG* 为筛选标记的 pCDA14。pCDA14 转化烟曲霉尿苷/尿嘧啶营养缺陷株 CEA17 后可在不含尿苷/尿嘧啶的培养基上筛选自养型转化子<sup>[23]</sup>。虽然该载体还存在转化率和重组率不高的问题, 仍是目前研究烟曲霉基因功能的重要手段。但迄今为止还没有一个较好的载体系统可用于在烟曲霉中表达蛋白质。

在本研究中我们首先用带有黑曲霉葡萄糖淀粉酶基因 *glaA* 启动子 ( $P_{glaA}$ ) 和 N-端信号肽的 pGT21 为载体在烟曲霉中表达 GFP, 虽然该质粒在黑曲霉中能很好地表达外源蛋白, 但我们却发现  $P_{glaA}$  在烟曲霉中的活性并不高, 推测可能是宿主的差异所致; 同时用于诱导表达的淀粉还会导致胞外蛋白的分离、分析困难。因此需要构建一个适合于烟曲霉的表达载体。考虑到几丁质酶 AfChiB1 可以在烟曲霉中诱导高表达并分泌<sup>[27,31,32]</sup>, 我们以 pUC19 为出发质粒, 用 *AfchiB1* 的启动子  $P_{chiB1}$  和及黑曲霉 TrpC 终止子区构建了一个新的表达载体, 并以此为基础分别构建了含有和不含 AfChiB1 N-端信号肽的 GFP 表达载体。我们的结果显示 AfChiB1 的 N-端信号肽可以有效地引导外源蛋白在烟曲霉中的分泌表达。在  $P_{chiB1}$  的控制下, 融合 GFP 在菌丝生长初期 (7 h) 开始表达, 并在对数生长期 (30 h) 和平台期 (60 h) 逐渐上调, 并在衰亡期表达最高, 与烟曲霉内源几丁质酶 AfChiB1 的表达和外泌同步(图 1), 说明  $P_{chiB1}$  受菌丝生长周期的调控, 提示 AfChiB1 可能与生长过程中细胞壁的重建和老化菌丝的自溶有关。而且  $P_{chiB1}$  受几丁质的诱导, 在诱导培养时融合 GFP 可大量表达; 在 GFP 的 C-端融合 GPI 信号肽后还可以引导融合 GFP 定位于细胞膜。显然, 本研究中所构建的载体和共转化方法可以用于烟曲霉基因的表达调控、蛋白质转运/定位等功能研究, 也可以用于异源或内源蛋白质在烟曲霉中的胞内表达、分泌表达及细胞表面表达。

此外, 融合载体通过与 pCDA14 共转化 CEA17 菌株可以非常容易地通过筛选尿苷/尿嘧啶营养缺陷回复株进行筛选。因此, 本研究中构建的质粒和建立的共转化方法为烟曲霉基因/蛋白功能的研究提供了一个很好的表达系统。

#### 3.2 GPI 蛋白 AfPhoA 的定位分析

酵母细胞壁 GPI 蛋白的 C-端信号肽中  $\omega$ -2 位为 Tyr、Val 或 Asn, 同时在  $\omega$ -4 或  $\omega$ -5 位为 Val、Ile 或

Leu; 细胞膜 GPI 蛋白的 C-端信号肽中 $\omega$ -4 至 $\omega$ -1 位则通常有双碱性氨基酸 (Lys 和 Arg 或者两个 Lys) [3, 15, 16, 26]。此外, 如果 GPI 蛋白 C-端为富含 Ser/Thr 的序列, 则该蛋白也会被定位于细胞壁, 在酵母中 70% 以上的细胞壁 GPI 蛋白的 C-端含有超过 30% 的 Ser/Thr [9, 18-20]。显然 GPI 蛋白的 C-端序列和 C-端信号肽均可决定其细胞定位。但对酵母 GPI 蛋白定位信号也存在争议, 如 De Sampaio 等 [18] 发现, 尽管 Gas1p 以及与 $\alpha$ -半乳糖苷酶融合的 Gas1p 的 C-端信号肽均含有特征性的双碱性氨基酸, 但这两个蛋白均定位于细胞壁, 而 Gas1p 和 $\alpha$ -半乳糖苷酶又都不是富含 Ser/Thr 的蛋白, 它们的细胞壁定位信号是什么目前还不清楚。另外, 还有一些 GPI 蛋白在细胞膜和细胞壁上呈连续分布, 从而使 GPI 信号和分拣机制更加复杂。

AfPhoA 是一种首先在烟曲霉细胞膜中分离到的 GPI 蛋白 [21], 随后又在细胞壁中发现 [22], 目前还不能确定该蛋白在细胞膜和细胞壁上共同存在的原因。AfPhoA 的 C-端信号肽中没有特征性的双碱性氨基酸膜定位信号, 虽然在 $\omega$ -3 和 $\omega$ -5 分别有 1 个疏水氨基酸 (分别为 Ala 和 Pro), 但却明显不同于酵母的细胞壁定位信号; 同时对 AfPhoA 的序列进行分析后发现其 C-端 150 个氨基酸残基中 Ser/Thr 的含量虽然高于 10% 的平均水平, 但却远低于酵母细胞壁 GPI 蛋白的 Ser/Thr 含量 (30% 以上)。显然, AfPhoA 中不存在已知的酵母定位信号。为研究 AfPhoA 的确切定位, 我们将 AfPhoA C-端的 159 个氨基酸残基与 GFP 的 C-端融合并在烟曲霉中表达, 结果表明 AfPhoA 定位于细胞膜, 有三个方面的证据支持其膜定位: 首先, 培养 48 小时的 PHOA-7 细胞膜中不仅有 54 kDa 的糖基化 GFP 融合蛋白, 而且还有两个可与抗 GFP 抗体结合的小于 43 kDa 的 GFP 融合蛋白, 说明这两个蛋白中的 C-端及与膜结合的 GPI 锚是完整的, 而其 N-端的 GFP 被部分降解并残留了抗原表位。其次, 在非诱导条件下, GFP 荧光信号在菌丝生长的对数期和平台期均定位于细胞膜。第三, 在几丁质诱导条件下大量表达的 30 kDa 融合 GFP 也主要定位于细胞膜。虽然我们目前还不知道是什么信号决定了 AfPhoA 细胞膜定位, 但可以肯定的是至少 AfPhoA 中 C-端 19% 的 Ser/Thr 含量或 C-端信号肽中 $\omega$ -3 与 $\omega$ -5 位的疏水氨基酸均不能引导 AfPhoA 定位于细胞壁, 显然烟曲霉中存在与酵母不同的定位信号。至于 AfPhoA 的 C-端信号肽中高含量的 Ser 是否对细胞膜定位有贡

献, 还有待于更深入的研究。

另一方面, 由于目前已知的大多数真菌酸性磷酸酯酶都是分泌蛋白, 其分泌由 N-端信号肽引导, 仅烟曲霉和 *Kluyveromyces marxianus* 的磷酸酯酶是 GPI 蛋白 [22, 30]。Bernard 等发现不仅烟曲霉细胞壁中有非共价结合的 AfPhoA, 而且在培养上清液中也能检测到 AfPhoA [22]。我们也在培养上清液中也检测到了 30 kDa 的 GFP 蛋白, 提示可能是膜上的 30 kDa 融合 GFP 被水解后从 GPI 锚上释放的。考虑到 GPI 修饰也是一种蛋白质分泌途径, 因此, 我们推测烟曲霉可能是通过水解释放细胞膜 AfPhoA 的策略来利用环境中 Pi 的, 而细胞壁中的 AfPhoA 则可能是该蛋白从细胞膜上被酶解释放后向胞外扩散的过程中滞留在细胞壁多糖网状结构中的。

## 参 考 文 献

- [1] Caras IW, Weddell GN. Signal peptide for protein secretion directing glycopospholipid membrane anchor attachment. *Science*, 1989, 243: 1196-1198.
- [2] Caras IW, Weddell GN, Williams SR. Analysis of the signal for attachment of a glycopospholipid membrane anchor. *J Cell Biol*, 1989, 108: 1387-1396.
- [3] Caro LH, Tettelin H, Vossen JH, et al. *In silico* identification of glycosylphosphatidylinositol- anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1997, 13: 1477-1489.
- [4] Orlean P, Menon AK. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospho- lipids. *J Lipid Res*, 2007, 48: 993-1011.
- [5] Moran P, Caras IW. A nonfunctional sequence converted to a signal for glycoposphatidylinositol membrane anchor attachment. *J Cell Biol*, 1991, 115: 329-336.
- [6] Fraering P, Imhof I, Meyer U, et al. The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Mol Biol Cell*, 2001, 12: 3295-3306.
- [7] Lu CF, Kurjan J, Lipke PN. A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 4825-4833.
- [8] Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. Architecture of the yeast cell wall.  $\beta$ (1-6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$ (1-3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem*, 1997, 272: 17762-17775.
- [9] Frieman MB, McCaffery JM, Cormack BP. Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesion Epa1p, a  $\beta$ 1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol*, 2002, 46: 479-492.

- [10] Brul S, King A, van der Vaart JM, *et al.* The incorporation of mannoproteins in the cell wall of *S. cerevisiae* and filamentous Ascomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, 72: 229–237.
- [11] Bruneau J-M, Magnin T, Tagat E, *et al.* Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis*, 2001, 22: 2812–2823.
- [12] Fujii T, Shimoi H, Iimura Y. Structure of the glucanbinding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1427: 133–144.
- [13] Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, *et al.* Architecture of the yeast cell wall.  $\beta$ (1-6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$ (1-3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem*, 1997, 272: 17762–17775.
- [14] Van Der Vaart JM, te Biesebeke R, Chapman JW, *et al.* The beta-1, 6-glucan containing side-chain of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* is bound to the glycan core of the GPI moiety. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 145: 401–407.
- [15] Hamada K, Terashima H, Arisawa M, *et al.* Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1998, 273: 26946–26953.
- [16] Hamada K, Terashima H, Arisawa M, *et al.* Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J Bacteriol*, 1999, 181: 3886–3889.
- [17] Frieman MB, Cormack BP. The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol Microbiol*, 2003, 50: 883–896.
- [18] De Sampaio G, Bourdineaud JP, Lauquin GJ. A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol Microbiol*, 1999, 34: 247–256.
- [19] Meyer U, Fraering P, Bosson R, *et al.* The glycosylphosphatidylinositol (GPI) signal sequence of human placental alkaline phosphatase is not recognized by human Gpi8p in the context of the yeast GPI anchoring machinery. *Mol Microbiol*, 2002, 46: 745–748.
- [20] Frieman MB, Cormack BP. Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol*, 2004, 150: 3105–3114.
- [21] Fontaine T, Magnin T, Melhert A, *et al.* Structures of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane proteins. *Glycobiol*, 2003, 13: 169–177.
- [22] Bernard M, Mouyna I, Dubreucq G, *et al.* Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol*, 2002, 148: 2819–2829.
- [23] Weidner G, D'Enfert C, Koch A, *et al.* Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the *pyrG* gene encoding orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Curr Genet*, 1998, 33: 378–385.
- [24] Fernández-Ábalos JM, Fox H, Pitt C, *et al.* Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 1998, 27: 121–130.
- [25] Cove DJ. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta*, 1966, 113: 51–56.
- [26] Terashima H, Hamada K, Kitada K. The localization change of Ybr078w/Ecm33, a yeast GPI-associated protein, from the plasma membrane to the cell wall, affecting the cellular function. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 218: 175–180.
- [27] Wang Y, Wang J, Hu H, *et al.* Cloning and expression of chitinase gene from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *Chinese J Biotech*, 2004, 20: 843–850.
- [28] Yelton M, Hamer J, Timberlake W. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 1470–1474.
- [29] Gai SA, Wittrup KD. Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(4): 467–473.
- [30] Yoda K, Ko JH, Nagamatsu T, *et al.* Molecular characterization of a novel yeast cell-wall acid phosphatase cloned from *Kluyveromyces marxianus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64: 142–148.
- [31] Escort GM, Hearn VM, Adams DJ. Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol*, 1998, 144: 1575–1585.
- [32] Xia G, Jin C, Zhou J, *et al.* A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 4079–4085.
- [33] Liu L. Improving heterologous gene expression in *Aspergillus niger* by introducing multiple copies of protein-binding sequence containing CCTTA to the promoter. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 36: 358–361.
- [34] Li H, Zhou H, Luo Y, *et al.* Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor is required in *Aspergillus fumigatus* for morphogenesis and virulence. *Mol Microbiol*, 2007, 64(4): 1014–1027.



## Analysis of acid-phosphatase localization in *Aspergillus fumigatus* by a secreted chimeric green fluorescent protein as reporter

Xiaomin Chen, Haomiao Ouyang, Guomin Tang, Aoquan Wang, Cheng Jin\*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** [Objective] In yeast glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchoring is a signal directing localization of GPI proteins to the plasma membrane or cell wall. Some of the cis-requirements for the localization of GPI proteins are now understood, however, little is known the signals directing distribution of the GPI proteins in filamentous fungi. Previously, AfPhoA, a GPI-anchored acid phosphatase in filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*, was first isolated from the cell membrane and latter found to be associated with the cell wall. The actual distribution of the AfPhoA remains unclear. Meanwhile, the signature amino acid motif that determines the distribution of GPI protein in yeast is not found in the C-terminal sequence of the AfPhoA. We aimed to elucidate the cell distribution of the AfPhoA. [Methods] The green fluorescent protein (GFP) was used as reporter to track the localization of the AfPhoA. The C-terminal sequence of the AfPhoA was fused to the C-terminus of the GFP. [Results] We first constructed the expression plasmid pchiGFP, in which the N-terminal signal sequence of the *A. fumigatus* AfChiB1 was fused to the N-terminus of the GFP. After transformation, a secreted expression of the GFP was achieved in *A. fumigatus*. Based on this construct, The C-terminal sequence of the AfPhoA was fused to the C-terminus of the GFP to construct a chimeric GFP. After the co-transformation of the fusion construct with plasmid pCDA14, a transformant was confirmed to harbor the chimeric GFP in its genome and could express the chimeric GFP. The transformant cultivated with or without chitin induction could express the chimeric GFP mainly attached to the cell membrane, a prolonged cultivation led to a minor distribution of the chimeric GFP in the cell wall. Although a 30KD of GFP fragment, instead of an intact 43.5KDa chimeric GFP, was also detected in the culture supernatant, which might be released by the cleavage between the fusion protein and its GPI anchor. [Conclusion] Our results suggest that GPI anchoring determines the distribution of the AfPhoA in the cell membrane. In addition to our investigation of the GPI anchoring, an expression vector was also constructed, which would be useful for analyses of the function and regulation of the genes and proteins in *A. fumigatus*.

**Keywords:** *A. fumigatus*; signal; glycosylphosphatidylinositol; localization

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA02Z164)

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

Received: 12 May 2008/ Revised: 14 July 2008

### 《微生物学报》答作者问——关于署名

问：我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表，如果想在作者和单位方面增、减新的内容，并且修改作者及单位署名顺序是否可以？是否需要提供什么证明或者相关的材料？

答：可以变更，但需要作者再提供以下材料。

- (1) 如变单位署名顺序，需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信，证明内容：原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序，需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容：原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄或扫描后 E-mail 发来)，新的变更即可生效。