

反义 RNA 技术在丝状真菌代谢工程中的应用

丁月月, 李霜, 黄和

南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

摘要: 丝状真菌作为一种重要的工业微生物, 采用各种表达调控技术对其代谢途径进行改造以便适应生产需求成为当前的研究热点之一。反义 RNA 技术是代谢工程中调控基因表达的一种重要手段, 且由于其操作简单避免了基因敲除技术的复杂性, 在丝状真菌体系中有着良好的应用前景。本综述中, 从反义 RNA 的作用机理、真菌体系的基因工程技术以及目前反义 RNA 技术的应用等方面, 对反义 RNA 技术在丝状真菌代谢工程中的应用进行了概述。

关键词: 反义 RNA, 丝状真菌, 代谢工程

Applications of antisense-RNA technology in filamentous fungal metabolic engineering— a review

Yueyue Ding, Shuang Li, and He Huang

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, State Key Laboratory of Materials-oriented Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: Filamentous fungi are important industrial microorganisms. The focus on its metabolic engineering is to optimize the metabolic pathway with gene expression regulation technology to meet with the industrial production needs. Antisense RNA technology due to its simplicity compared with the gene knock-out technology has great perspectives in filamentous fungal metabolic control. It is an efficient method for regulating gene expression and a key tool for metabolic engineering. In this article, we addressed the mechanism of antisense RNA technology and its applications in filamentous fungal metabolic engineering. Additionally, future perspectives were discussed.

Keywords: antisense RNA, filamentous fungi, metabolic engineering

20 世纪 80 年代, 人们首次从细菌中发现了反义 RNA^[1]。反义 RNA 是一段本身不被翻译的转录产物, 但是可以通过碱基配对的方式与靶 RNA(通常是 mRNA)的特定互补区域结合, 控制基因的表达, 参

与基因表达的调控。近年来通过人工合成反义 RNA 的基因, 并将其导入细胞内转录成反义 RNA, 能够形成较长期的基因沉默作用^[2]。当前, 反义 RNA 技术主要应用于农产品遗传改良、功能基因组学、药物

Received: April 21, 2009; **Accepted:** July 11, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20706031), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z240), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707805), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2007186).

Corresponding author: He Huang. Tel: +86-25-83172094; Fax: +86-25-83172094; E-mail: biotech@njut.edu.cn

国家自然科学基金(No. 20706031), 国家高科技研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA02Z240), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2007CB707805), 江苏省自然科学基金(No. BK2007186)资助。

靶目标的筛选以及基因治疗等领域的研究。

丝状真菌^[3](Filamentous fungi)是一类重要的工业微生物, 广泛用于生产工业用酶(如葡萄糖淀粉酶、纤维酶、蛋白酶、脂肪酶等)、初级代谢产物(如氨基酸、有机酸等)和次级代谢产物(如抗生素青霉素、头孢菌素等)等。当前, 利用代谢工程^[4]技术改造或优化细胞现存代谢途径, 获得代谢新产物已成为研究热点。对细胞现存代谢途径的改造手段包括诱变育种、基因表达和基因敲除等手段。但是由于真菌遗传体系的复杂性, 代谢工程技术的经典手段——基因敲除技术相对较难开展, 而反义 RNA 技术为丝状真菌的基因表达抑制调控提供了捷径。

1 反义 RNA 技术机理及丝状真菌基因工程技术

1.1 反义 RNA 技术机理

反义 RNA 以序列互补的形式作用于目标 RNA, 是一种可变更的、灵活可行的酶活力向下调节的方法。反义 RNA 分顺式编码与反式编码 2 种形式^[5]: 顺式编码的反义 RNA 能与目标 RNA 完全互补, 它们是由位于同一 DNA 分子相反序列上的启动子转录而来; 而反式编码的反义 RNA 只与目标 RNA 进行部分互补, 且有多个目标 RNA。在大部分情况下, 反义 RNA 具有对目标 RNA 转录后抑制的功能。不同的反义 RNA 其功能和作用方式不尽相同, 其作用机理人们通常认为可能是反义 RNA 与靶 RNA 通过形成的杂交结构在复制、转录、翻译等过程起负调控作用。

在原核生物中, 反义 RNA 的作用机理可能有^[6]:

- 1) 在 DNA 复制水平上: 反义 RNA 可以与作为转录起始引物的 RNA 形成杂交体, 从而阻止了引物 RNA 与质粒 DNA 的结合, 抑制了 DNA 的复制;
- 2) 在转录水平上的调控: 反义 RNA 与 mRNA 5' 末端结合, 阻止完整的 RNA 转录;
- 3) 在翻译水平上的调控: 反义 RNA 可通过互补序列与特定的 mRNA 相结合, 结合位置包括 mRNA 结合核糖体的序列 (SD 序列) 和起始密码子 AUG, 从而直接或间接抑制 mRNA 的翻译或使得 mRNA 降解。

在真核生物中, 反义 RNA 可以存在细胞质中,

也有存在细胞核内, 在复制、转录、转录后加工及向细胞质转运、翻译等水平上起作用, 除了在原核中发挥的作用外, 真核生物中还存在下列功能: 1) 作用于 mRNA 末端, 影响 5' 端和 3' 端的正常修饰; 2) 作用于外显子和内含子的连接区, 阻止前 mRNA 的剪接; 3) 作用于 polyA 形成位点, 阻止 mRNA 的成熟及其向胞浆中的转运。

1.2 丝状真菌基因工程技术

1.2.1 载体的构建

真核载体大多数是穿梭载体。由于真菌体系中表达载体并没有像原核那样达到商业化, 因此大多数载体是将原核载体(如 pBR322)进行重新组装或者是改装植物细胞或动物细胞转基因常用载体如 pCAMBIA、pSV 系列载体。目前, 已见于文献的丝状真菌基因工程转化载体有如下几种: pCMVp-NEO-BAN 载体、pEGFP(增强型绿色荧光蛋白表达载体)、pEGFT-Actin(增强型绿色荧光蛋白/人肌动蛋白表达载体)、pSV2 表达载体和 pCMV4 等载体。

无论是目的基因还是选择标记基因在宿主真菌中的表达, 均须受到一个能在宿主真菌中起作用的启动子和终止子的调控^[7]。一般情况下, 真菌启动子具有广谱性, 可在多种真菌中起作用; 如来自构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的 3-磷酸甘油醛脱氢酶(gdpA)和色氨酸合成基因(*trpC*)的启动子常被作为构建真菌载体的启动子。但在某些情况下, 来源于某一类真菌的启动子有可能不能在另一类真菌中起作用; 如来源于玉米黑粉病菌(*Ustilago maydis*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的启动子不能在一些子囊菌中发挥作用。这时, 就必须对含不同启动子的载体进行选择。找不到合适的载体时, 就必须重新构建载体。如通过基因融合把目的基因或选择标记基因和强的同源启动子顺序或已知的启动子相连, 或者直接从宿主真菌中分离启动子与之连接。由于丝状真菌基因工程体系中缺乏完善的商业化表达载体, 使得丝状真菌基因工程研究工作的开展相对困难。对几种真菌转化载体比较结果如表 1 所示。

1.2.2 载体的转化技术

丝状真菌的 DNA 转化方法有 CaCl₂/PEG 介导的原生质体的转化、基因枪转化、电穿孔转化、限制酶介(REMI)的转化、根癌农杆菌介导(ATMT)的转化

表 1 真菌转化载体比较

Table 1 Comparison of different fungi's transformation vectors

Vectors' name	Resource	Selective marker	Promotor	Remarks
pCMVp-NEO-BAN	pBR322	G418	CMVp	/
pEGFP	Prokaryotic vector	G418	PCMV	Contain GFP
pSV2	/	Can't use G418	SV40	Without neo gene
pCMV4	/	Can't use G418	CMV	Without neo gene
pCAMBIA	Used in plants	Exogenous	Exogenous	Binary vector

表 2 反义 RNA 技术应用举例

Table 2 Examples of the applications of antisense-RNA technology

Applictions	Years	Authors	Strains
Filamentous fungi	2002 ^[16]	J. Moralejo Francisco	<i>Aspergillus awamori</i>
	2003 ^[17]	Lin Xie	<i>Aspergillus oryzae</i>
	2005 ^[18]	T.H. Wang	<i>Trichoderma reesei</i>
	2006 ^[19]	Herrmann Martina	<i>Aspergillus nidulans</i>
	2007 ^[20]	Juan F Martin	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Bacteria	1991 ^[14]	A.M Willy	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
	1998 ^[15]	Ruchir P. Desai	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
	2003 ^[21]	Adam P. Roberts	<i>Clostridium difficile</i>

等几种方法。目前应用较多的是原生质体转化和根癌农杆菌介导的转化。

1) 原生质体转化法。该方法是丝状真菌转化的传统方法,通过制备原生质体,在 CaCl_2 、PEG 等的作用下使外源 DNA 进入细胞实现转化。在溶壁酶 (Novozyme 234、纤维素酶、蜗牛酶)和渗透压稳定剂的存在下,处理菌丝体或萌发的孢子,除去细胞壁获得原生质体;然后将原生质体、重组载体 DNA 混合于一定浓度的 CaCl_2 、PEG(聚乙二醇)缓冲液中进行融合转化,涂布于再生培养基选择转化子。该转化方法容易形成多倍体且细胞再生相对困难,转化频率一般都较低,为 10~30 个转化子/ μg 质粒 DNA。

2) 根癌农杆菌介导转化法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)。根癌农杆菌介导的转化体系是植物遗传转化的标准方法,1998 年 Marcel 等首次利用根癌农杆菌介导转化技术对多种曲霉、里氏木霉、粗糙脉孢霉等进行了成功转化^[8],其转化率是传统方法的 600 倍,且发现其转化机理与植物体系相似。现如今该转化方法已经成为丝状真菌中插入诱变的一个有效体系,现已实现了 60 多种真菌的遗传转化。

根癌农杆菌介导的转化原理是在一些酚类化合物(如乙酰丁香酮 AS)的诱导下,诱导 Ti 质粒上的 vir 基因的表达,合成 T-DNA 转移所需要的一些蛋白质。ATMT 与其他转化方法相比较有明显的优势在于起始材料真菌受体选择的灵活性,可以是原生质体、菌丝、孢子或者菌体组织,采用不同的真菌受体,转化效率往往不同。2008 年,Maruthachalam 等利用 *Colletotrichum falcatum* 和 *C. acutatum* 的分生孢子对其成功实现了根癌农杆菌的转化^[9];Michielse 等发现以原生质体可以成功转化根霉,但是以孢子为受体却得不到转化子^[10]。

1.2.3 阳性克隆的筛选

丝状真菌载体系统中采用的选择性标记主要有 2 大类:一是营养选择性标记;二是显性选择性标记。营养选择性标记大多通过营养缺陷型的互补来筛选转化子,如构巢曲霉中常用的选择标记是 *pyrG*、*argB*、*trpC* 和 *amdS* 等,是构巢曲霉中最广泛使用的第一类选择性标记。丝状真菌中使用的显性选择性标记主要是抗生素性标记(氨基糖苷类抗生素 G418、潮霉素和腐草霉素)以及对化合物苯菌灵显示抗性的一些 β -微管蛋白突变基因。此外,绿色荧光蛋白(GFP)近年来也被作为报告基因在丝状真菌

基因工程中得以应用^[11]。

2 反义 RNA 技术的应用举例

反义 RNA 技术在植物、病毒及细菌中的应用比较广泛。在植物上最显著的应用是在果实成熟的控制上, 通过调节乙烯合成途径中的两步关键酶来限制乙烯的合成, 从而达到控制果实成熟的目的, 该技术在保藏储存、加工运输的研究中前景较好^[12]; 在病毒上的应用在于对病毒基因的调控、癌基因表达的抑制等^[13]; 在细菌上主要应用在乳酸菌、溶剂芽孢杆菌等细菌体系, 其研究工作主要是在于对目标蛋白活力的调控研究中。1991 年, Van den Berg 等首次发表了利用反义 RNA 策略对 *Desulfovibrio vulgaris* 氢化酶的调控导致其初级代谢途径中乳酸产量的变化^[14]; 此后, 1999 年 Ruchir 等利用反义 RNA 技术对溶剂梭菌中丁酸激酶进行调节, 结果经调控后丁酸激酶活力下降了 85%~90%, 丁酸产量上升了 35%, 同时还对细胞代谢流的分配进行了较为详尽的研究^[15]。以下是反义 RNA 技术应用较成功的几个例子。

当前, 反义 RNA 技术在丝状真菌中的应用集中于曲霉等适合外源基因表达的体系, 其目的集中于以下几个方向。

2.1 利用反义 RNA 技术促进代谢终产物积累

2002 年, Francisco 等在利用 *Aspergillus awamori* 发酵产竹芋蛋白的研究中发现, pepB 蛋白酶与竹芋蛋白的降解有关联, 此后利用反义 RNA 技术对 pepB 蛋白酶基因表达进行了抑制, 有效抑制了对竹芋蛋白的水解作用, 提高了竹芋蛋白在曲霉中的分泌水平^[16]。

2.2 利用反义 RNA 技术促进中间代谢产物积累

2003 年, 谢林等利用反义 RNA 技术构建 *Aspergillus oryzae* SAICAR 合成酶基因的反义表达载体^[17], 用于抑制中间产物红色色素 CAIR 经 SAICAR 合成酶催化的进一步代谢, 从而积累天然红色色素 CAIR, 最终筛选出红色表型菌株用于天然色素 CAIR 的生产。2005 年, Wang 等利用反义 RNA 技术对丝状真菌 *Trichoderma reesei* 的木糖代谢途径进行改造^[18], 结果表明采用反义 RNA 技术可

以有效抑制木糖醇代谢的关键酶——木糖醇脱氢酶 (XDH) 的表达, 抑制率达到 65%, 中间代谢产物木糖醇的积累量明显高于原始菌株。

上述研究成果, 一方面证实了反义 RNA 技术能够作为丝状真菌基因表达抑制的一种方式; 另一方面也证明了该技术对构造能够积累中间代谢产物特殊菌株的可行性。

2.3 利用反义 RNA 技术解析基因表达调控机理

2006 年, Martina Herrmann 等采用反义 RNA 技术对丝状真菌 *Aspergillus nidulans* 的蛋白激酶 C (pkcA) 进行了抑制, 结果发现合成 β -内酰胺类抗生素青霉素关键酶 *aatA* 的阻遏蛋白 AnBH1 在细胞中的分布由细胞核改变至细胞质中, 从而削弱了对其抑制作用^[19]。2007 年, Juan F Martin 等采用反义 RNA 技术对产黄青霉 *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 编码异源三聚体 G 蛋白 α 亚基的 *pgal* 基因进行了抑制, 结果表明 *pgal* 基因对该菌的生长和发育具有重要影响^[20]。

3 反义 RNA 技术应用存在的问题与展望

3.1 存在的问题

相对细菌体系而言, 反义 RNA 技术在丝状真菌体系中的应用更复杂, 由于不存在商业化的载体, 同时针对不同真菌体系需要构建不同的转化载体, 存在一定的复杂性与挑战性; 反义 RNA 在真菌体系中的作用机制仍然尚未明确, 反义 RNA 技术的遗传稳定性及可操作性仍然是有待进一步解决的问题。在实际应用中, 由于真菌基因组的复杂性, 对特殊基因的靶向定位是很困难的。

3.2 展望

随着基因工程的发展, 人们对反义 RNA 已经有了比较成熟的认识, 同时对该技术的利用也取得了不少的成就。与传统基因敲除技术相比, 反义 RNA 技术除了能够迅速完成选择性地抑制基因表达外, 由于该技术不可能对蛋白质产生完全抑制, 从而能避免致死性突变, 对细胞的正常生长影响较小; 同时可以在菌体达到一定浓度时进行诱导表达, 达到既抑制基因的表达、又不影响菌体的正常生长的效果。反义 RNA 技术从基因功能的角度对代谢网络进

行调控,是一种精细的代谢调控手段,对推动代谢工程的发展起着至关重要的作用。

综上,反义RNA技术为丝状真菌的代谢工程技术提供了一个新的思路与研究手段,将会进一步推动人们对丝状真菌的深入研究,从而更好地服务于工业技术。

REFERENCES

- [1] Gerhart E, Wagner H, Flårdh K. Antisense RNAs everywhere? *Trends Genet*, 2002, **18**(5): 223–226.
- [2] Lee LK, Charles MR. Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**: 505–511.
- [3] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv*, 2004, **22**: 189–259.
- [4] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, **252**: 1668–1675.
- [5] Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1575**: 15–25.
- [6] Weintraub HM. Antisense RNA and DNA. *Sci Am*, 1990, **262**(1): 40–46.
- [7] Gurr SJ, Mcpherson MJ, Bowles DJ. A Practical Approach Gene Transformation in Plant Pathogenic Fungi// Molecular Plant Pathology. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1993: 79–97.
- [8] Marcel JA, Paul B, Paul JJ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 839–842.
- [9] Maruthachalam, Karunakaran, Vijiayan N, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(2): 234–241.
- [10] Michielse CB, Salim K, Ragas, et al. Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Mol Genet Genomics*, 2004, **271**: 499–510.
- [11] Shen WF, Weng HB, Niu BL, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the pathogen of *Botrytis cinerea*. *Hereditas*, 2008, **30**(4): 515–520.
沈卫锋, 翁宏飏, 牛宝龙, 等. 根癌农杆菌介导的灰葡萄孢菌遗传转化研究. *遗传*, 2008, **30**(4): 515–520.
- [12] Tu HY, Liu YF. The mechanism of antisense RNA and its application in the plant gene engineering. *Biomagnetism*, 2005, **5**(2): 32–34.
涂红艳, 刘元凤. 反义 RNA 的作用机理及其在植物基因工程领域的应用. *生物磁学*, 2005, **5**(2): 32–34.
- [13] Jin MF, Shao XJ, Wu SL. Effects of ppGalNacT2 antisense RNA on the biological behavior of human gastric cancer SGC7901 cell line. *J Jiangsu Univ (Medicine Edition)*, 2008, **18**(5): 389–392.
金美芳, 邵雪军, 吴士良. ppGalNacT2 反义 RNA 对胃癌细胞 SGC7901 生物学特性的影响. *江苏大学学报(医学版)*, 2008, **18**(5): 389–392.
- [14] Willy AM, Walter MAM, Veeger C. Reduction of the amount of periplasmic hydrogenase in *desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) with antisense RNA: direct evidence for an important role of this hydrogenase in lactate metabolism. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 3688–3694.
- [15] Ruchir PD, Eleftherios TP. Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 936–945.
- [16] Francisco JM, Cardoza RE, Gutierrez S, et al. Silencing of the aspergillopepsin B (pepB) gene of *Aspergillus awamori* by antisense RNA expression or protease removal by gene disruption results in a large increase in thaumatocin production. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(7): 3550–3559.
- [17] Xie L, Xie X, Ju GZ. Cloning of SAICAR synthetase gene of *Aspergillus oryzae* and construction of antisense expression vector. *Chin J Biological*, 2003, **16**(5): 261–263.
谢林, 谢欣, 鞠桂芝. *Aspergillus oryzae* SAICAR 合成酶基因的克隆及反义表达载体的构建. *中国生物制品学杂志*, 2003, **16**(5): 261–263.
- [18] Wang TH, Zhong YH, Huang W, et al. Antisense inhibition of xylitol dehydrogenase gene, *xdh1* from *Trichoderma reesei*. *Lett Appl Microbiol*, 2005, **40**: 424–429.
- [19] Herrmann M, Sprote P, Brakhage AA, et al. Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(4): 2957–2970.
- [20] Ramon OG, Martin JF, Fierro F, et al. The *pgal* gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. *Res Microbiol*, 2007, **158**: 437–446.
- [21] Roberts AP, Hennequin C, Elmore M, et al. Development of an integrative vector for the expression of antisense RNA in *Clostridium difficile*. *J Microbiol Meth*, 2003, **55**: 617–624.