

# 18S rDNA 介导的桔青霉核酸酶 P1 表达载体的构建及表达分析

陈筱仪, 王斌, 潘力

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

**摘要:** 本研究采用黑曲霉 Bdel4 菌株为宿主菌, 敲除 *glaA*, *aamA*, *An05g02100* 和 *An12g06930* 四个主要的胞外分泌蛋白, 为核酸酶 P1 的表达和分泌提供通路。通过 PCR 扩增得到黑曲霉 Bdel4 的 rDNA 序列, 构建了以 rDNA 序列为整合位点的重组质粒 pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S, 将构建的重组质粒 pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S 转入黑曲霉 Bdel4。通过半荧光定量 PCR 进行转化子初筛, 之后测定核酸酶 P1 的酶活复筛, 选出一株高活性菌株用于工业生产。采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 法对含外源目的基因 *nuc P1* 的总基因组样本重复检测, 取平均值作为目的基因拷贝数, 探究其与酶活表达水平之间的联系。结果显示含 9 个 *nuc P1* 基因拷贝数的菌株的酶活水平达到 88.5 U/mL, 较核酸酶 P1 单拷贝菌株增加了 3.86 倍, 较之前研究中异源表达核酸酶产量提高 1.20 倍, 再增加 *nuc P1* 的拷贝数时, 酶活水平随着拷贝数的增加而降低。

**关键词:** 核酸酶 P1; 黑曲霉; SYBR Green 实时荧光定量 PCR; 拷贝数

文章编号: 1673-9078(2019)06-145-153

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.019

## Construction and Expression Analysis of 18S rDNA-mediated Expression Vector of Nuclease P1 from *Penicillium citrinum*

CHEN Xiao-yi, WANG Bin, PAN Li

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** In this study, the *Aspergillus niger* Bdel4 strain was used as the host strain, and the four major extracellular secretion proteins, *glaA*, *aamA*, *An05g02100* and *An12g06930*, were knocked out to provide a pathway for the expression and secretion of nuclease P1. The rDNA sequence of *A. niger* Bdel4 was amplified by PCR, and the recombinant plasmids, pRpT-nucP1-18S and pRpT-2A-nucP1-18S were constructed through using the rDNA sequence as integration sites. The constructed recombinant plasmids pRpT-nucP1-18S and pRpT-2A-nucP1-18S were then transferred into *A. niger* Bdel4. Prescreening of the transformants was carried out by semi-quantitative fluorescent PCR, and the activity of nuclease P1 was then measured to screen a strain with high activity for industrial production. The total genomic samples containing the exogenous target gene of *nuc P1* were repeatedly detected by SYBR Green real-time fluorescent quantitative PCR, and the average value was taken as the copy number of the target gene *nuc P1* to explore the relationship between the copy number and the expression level of the enzyme. The result showed that the enzymatic activity of the strain containing 9 *nuc P1* gene copies reached 88.52 U/ml, which was 3.86 times higher than that of the nuclease P1 for the single copy strain, and 1.2-fold as high as that of the heterologous nuclease P1 reported in the previous studies. When the copy number of *nuc P1* was increased to over 9, the enzyme activity decreased.

**Key words:** nuclease P1; *A. niger*; SYBR Green real-time fluorescent quantitative PCR; copy number

核酸酶 S1-P1 家族 (EC3.1.30.1) 包括有核酸酶 P1 和核酸酶 S1, 存在于细菌、真菌和植物中, 是具有三个锌离子结合位点的锌金属酶。来源于桔青霉的

收稿日期: 2018-08-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31871736; 31870024); 广东省自然科学基金 (2017A030313097); 广东省调味食品生物发酵先进技术企业重点实验室开放基金项目 (2017B030302002)

作者简介: 陈筱仪 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 酶的表达

核酸酶 P1 由 270 个氨基酸组成, 组成核酸酶 P1 的氨基酸有较多的疏水性氨基酸, 如酪氨酸和色氨酸<sup>[1]</sup>。核酸酶 P1 水解单链 DNA 或者 RNA 为 5'-核苷酸, 因这一功能被用于水解酵母自溶产物生产核苷酸, 是核苷酸工业生产中不可缺少的原料, 生成的核苷酸还可作为食品添加剂应用于食品生产。核酸酶 P1 还可以应用于分子生物学方面的研究, 如测定病毒 RNA 的 5'-末端核苷酸序列<sup>[2]</sup>。

核酸酶 P1 的生产方法主要分为固定化法和微生物法。但固定化法对于载体的选择要求较高,且产量不高<sup>[3]</sup>。而微生物发酵法具有生长周期短,产量高,生产成本低等优点。生产核酸酶 P1 的微生物通常包括:桔青霉,大肠杆菌,酵母细胞<sup>[4,5]</sup>,其中最常用为桔青霉。2015 年桔青霉生产核酸酶 P1 的最高产量为 1200 U/mL<sup>[6]</sup>,但异源表达的产量不高,王亚楠<sup>[4]</sup>等人分别在大肠杆菌和酵母细胞中表达了核酸酶 P1,测得酶活水平分别为 4 U/mL 和 72.7 U/mL。且由于在大肠杆菌中表达的蛋白容易形成包涵体和酵母中的生产需要甲醇作为诱导剂,而毒性物质的加入,将会限制生产的核酸酶 P1 的应用范围。本文采用黑曲霉 Bdel4 作为表达宿主,其蛋白表达量大,培养方便,是同源蛋白和异源蛋白生产的常用菌。

rDNA 在真核细胞基因组中通常有 100~200 个串联重复单元,在黑曲霉中以 28S rDNA, 5S rDNA 和 18S rDNA 顺向串联方式排列,以此为同源重组位点,能给载体提供更多同源整合的机会。研究表明以 rDNA 为整合位点的策略已经在酿酒酵母,产朊假丝酵母和乳酸克鲁维酵母等多种微生物中应用<sup>[7-9]</sup>。因此以 rDNA 为同源整合的靶序列,避免了构建载体时因多个拷贝的目的基因形成的表达框的长度过长而造成连接效率低下或者转化效率低的问题,而且消除了只能形成单拷贝或者几个拷贝整合的菌株的局限。本文从 *A. niger* Bdel4 基因组中克隆得到 2.0 kb rDNA 片段,从质粒 pRpT-nu 和 pRpT-2A 扩增出核酸酶 P1 单拷贝和核酸酶 P1 双拷贝表达框,用 NEBuilder Hifi DNA Assembly Master Mix (Catalog #E2621L) 将纯化后的 PCR 片段克隆到载体 PMD-19 上,之后通过 SDS-PAGE 胶和 western blot 验证和测定核酸酶 P1 的酶活,以此来检测目的蛋白是否表达及其表达水平。通过 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 法检测筛选出的转化子中的 *nuc P1* 基因的拷贝数,以探究核酸酶 P1 的酶活水平与 *nuc P1* 基因的拷贝数之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、菌种和主要试剂

载体 pRpT (糖化酶 *glaA* 的启动子 P<sub>glaA</sub>, 终止子 T<sub>glaA</sub>, 标记基因 PyrG), 大肠杆菌 Match1 T1, 黑曲霉 Bdel4 ( $\Delta glaA$ ,  $\Delta aamA$ ,  $\Delta An05 g 02100$ ,  $\Delta An12 g 06930$ ) 菌株为本实验室保存; DNA 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, 高保真 Dream tag Green Premix 酶, DNA Marker, SYBR Green 荧光染料 I 购自于 TaKaRa

公司; 通用引物为广州天一辉远生物技术有限公司合成; His-tag 抗体 (小鼠单抗), 小鼠抗兔抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司。

#### 1.1.2 培养基和培养方法

LB, CD, YPD 培养基的配制和培养方法参见 Invitrogen 公司操作手册。LB 培养基用于大肠杆菌的培养; CD 培养基和淀粉固体培养基 (0.3% (W/V) 牛肉膏, 0.2% (W/V) 酵母粉, 1% (W/V) 蛋白胨, 0.2% (W/V) NaCl, 1% (W/V) 可溶性淀粉 (高温煮沸), 2% (W/V) Agar, pH 至 5.5, 121 °C 灭菌 20 min) 用于黑曲霉的培养。用高温灭菌牙签挑取构建质粒转化黑曲霉后的转化子到 CD 培养基与淀粉培养基上, 培养 72 h 后挑取淀粉培养基上菌落提基因组作为模板进行 PCR 验证, 验证得到正确的转化子, 将 CD 固体培养基上对应编号的转化子接种到 CD 液体培养基中 (250 mL 三角瓶), 培养 72~96 h 后接种淀粉发酵培养基 (5% (W/V) 玉米淀粉, 3% (W/V) 玉米浆, 2% (W/V) 豆粕粉, 121 °C 灭菌 20 min) 培养 168 h 进行摇瓶复筛。

#### 1.1.3 使用的仪器

ABI7500 荧光定量 PCR 仪, 荧光定量反应使用的 8 排管购自 AXYGENE, 荧光定量试剂是购自 Takara-Bio。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 NP1 基因的合成

依据 GenBank 中核酸酶 P1 的氨基酸序列 (GenBank Accession No.AAB19975), 将此序列送至金斯瑞生物技术有限公司进行密码子优化, 以 P1, P2 (表 1) 为引物扩增密码子优化后的 *nuc P1*, 基因的 C 末端加上 6xHis 标签。使用 NEBuilder Hifi DNA Assembly Master Mix (Catalog #E2621L) 将其连接至载体 pRpT 上, 得到质粒 pRpT-nu。以 P1 和 P3, P2 和 P4 为引物, 以密码子优化后的 *nuc P1* 为模板, 扩增出两段 *nuc P1* 片段 (引物 P2 和 P3 加有 P2A 剪切肽序列, 序列见附表 1)。以 P1 和 P3 为引物, 通过重合 PCR 技术, 融合 2 个片段得到 N2A 片段, 使用 NEBuilder Hifi DNA Assembly Master Mix (Catalog #E2621L) 将融合后的片段与载体 pRpT 连接, 得到质粒 pRpT-2A。

#### 1.2.2 pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S 质粒构建

分别以 1.2.1 构建的质粒 pRpT-nu, pRpT-2A 为模板, 以 P3 和 P4, P5 和 P6 引物扩增 N1, N2 片段, 以 P3 和 P6, P7 和 P8 为引物扩增 A1 与 A2 片段。以



引物 P9 和 P10, P11 和 P12, 以黑曲霉 Bdel4 基因组为模板, 扩增出 28S(1003 bp)和 18S(1387 bp)的部分片段作为同源臂, 胶回收后的产物分别与 N1 和 N2, A1 和 A2 混合, 使用 NEBuilder Hifi DNA Assembly Master Mix 将 4 个片段连接到 PMD-19 载体, 连接产物转化

*E.Coli* Match 1T1 菌株, 得到质粒 pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S。挑取单克隆用 *Apal* 酶进行质粒酶切鉴定, 挑取正确的转化子送广州天一辉远基因科技公司测序。

表 1 用于 pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S 载体构建的寡核苷酸序列

| Table 1 Sequences of oligonucleotides for pRpT-nucP1-18S and pRpT-2A-nucP1-18S plasmids construction |                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 引物名称                                                                                                 | 序列(5' to 3')                                                         |
| P1                                                                                                   | cattacacctcagcaatgctgctccgatctctactcgc                               |
| P2                                                                                                   | aaatggattgattgttcagtgatgatgatgatgcttggcgatctcggaaccatg               |
| P3                                                                                                   | cacgtcgccggctctttagtaggctgaagttgtggcgccgctgcctcagtgatgatgatgatgctt   |
| P4                                                                                                   | ttcagcctactaaaagaagccggcgacgtggaagaaaaccccgcccatgctgctccgatctctactcg |
| P5                                                                                                   | gcagcaggtctccaacaagtatatgatgcggtagtggaa                              |
| P6                                                                                                   | tctcgaggaagtgtctaccctttcttgattctcgcc                                 |
| P7                                                                                                   | gcaacttctcgagaacgcgc                                                 |
| P8                                                                                                   | ggtagccgtttctcataactccgaggagctcatgg                                  |
| P9                                                                                                   | cacgtcgccggctctttagtaggctgaagttgtggcgccgctgcctcagtgatgatgatgatgctt   |
| P10                                                                                                  | ttcagcctactaaaagaagccggcgacgtggaagaaaaccccgcccatgctgctccgatctctactcg |
| P11                                                                                                  | gatcttcagagattggccctggaggctcgacgcggttct                              |
| P12                                                                                                  | cgcacatatactgttgagacctgctcggttatg                                    |
| P13                                                                                                  | gcctccgaggagttacctgagaacggctaccacatc                                 |
| P14                                                                                                  | gcctgccgttcgacggggccccctacggaacctgtttacgactt                         |
| P15                                                                                                  | atctcgcgtatcgccaactac                                                |
| P16                                                                                                  | aggtgtcccaatcgctatg                                                  |

1.2.3 转化子的筛选与发酵上清液的 SDS-PAGE 分析

黑曲霉 Bdel4 接入 YPD 液体培养基中, 在 30 ℃ 培养 72 h, 质粒 pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S 通过 *Apal* 酶切线性化, 利用原生质体转化法转入黑曲霉 Bdel4<sup>[10]</sup>, 通过半定量 PCR 验证转化子, 引物为 P13 和 P14, 扩增片段为 *nuc P1* 基因上约 200 bp 片段, 提取黑曲霉转化子的基因组作为模板, 按照下表体系扩增检测。

表 2 半定量 PCR 扩增体系

| Table 2 Semi-quantitative PCR amplification system |             |
|----------------------------------------------------|-------------|
| 组分                                                 | 体积/ $\mu$ L |
| 2xDream tag Green Premix                           | 10          |
| 正向引物                                               | 0.5         |
| 反向引物                                               | 0.5         |
| 转化子基因组                                             | 1           |
| ddH <sub>2</sub> O                                 | 8           |
| 总体积                                                | 20          |

PCR 反应程序设置: 98 ℃ 5 min; (98 ℃ 30 s; 60 ℃ 30 s; 72 ℃ 3 min 40 s)17 个循环; 72 ℃ 10 min。得到转化子 Bpnu-18S 和 Bp2A-18S。挑选凝胶

电泳后呈不同亮度目的条带的转化子进一步测定酶活筛选高酶活菌株。

使用 100 mL 的发酵培养基 (500 mL 锥形瓶), 30 ℃, 250 r/min 摇瓶培养 168 h, 期间每 24 h 取一次样, 发酵液过滤离心后上清液用于 12% SDS-PAGE 电泳分析检测目的蛋白的表达和测定核酸酶 P1 酶活。

1.2.4 核酸酶 P1 酶活测定

按照 Qinting He 等<sup>[11]</sup>的方法改进: 将 200  $\mu$ L 底物溶液(100  $\mu$ L 50 g/L RNA 溶液、100  $\mu$ L 0.03 mol/L pH 5.3 醋酸钠缓冲液, 含 10 mmol/L ZnSO<sub>4</sub>)在 67 ℃水浴锅温浴 10 min 之后与稀释 a 倍的 25  $\mu$ L 酶液(67 ℃水浴锅温浴 10 min 后冰上冷却)混匀, 67 ℃反应 15 min, 加入 450  $\mu$ L 核酸沉淀剂(0.25%钼酸氨, 2.5%高氯酸), 冰浴 20 min 后 4 ℃、5000 r/min 离心 5 min, 用双蒸水将上清液稀释 b 倍后测定 OD<sub>260</sub> 值。以不加酶液的反应液作为对照。在上述条件下每分钟生成的核苷酸量在 260 nm 处的吸光值差值为 1.0 时定义为一个酶活力单位。

酶活计算公式: 酶活(U/mL) =  $\frac{A * a * b * 675}{25 * 15}$

其中: A 为实验组与对照组吸光值的差值。

本文中出现的酶活数值均为三个平行样的平均值。

1.2.5 核酸酶 P1 的 western blot 分析

取 nu2 号转化子和 n2 号菌株的上清液,按照 1.2.3 方法进行 SDS-PAGE 检测,并将相应的样品电转印至 PVDF 膜,用 1% BSA-TBS 溶液封闭 1 h, TBST 溶液清洗,用 His-tag 抗体(小鼠单抗)孵育 1 h, TBST 溶液清洗,之后用小鼠抗兔抗体孵育 1 h, TBST 溶液清洗后,加入适量 BeyoECL Plus 化学发光液显色反应,最后将 PVDF 膜放置到荧光成像仪中曝光。

1.2.6 实时荧光 PCR 的体系和反应条件

荧光定量 PCR 的添加的反应体系如表 3。

表 3 荧光定量 PCR 扩增体系

Table 3 Fluorescent quantitative PCR amplification system

| 组分                               | 含量/ $\mu\text{L}$ |
|----------------------------------|-------------------|
| SYBR Premix Ex Taq <sup>TM</sup> | 5                 |
| 正向引物                             | 0.1               |
| 反向引物                             | 0.1               |
| ROX Reference Dye II             | 0.2               |
| 模板(标准质粒)                         | 1                 |
| dH <sub>2</sub> O                | 3.6               |
| 总体积                              | 10                |

程序 95 °C 30 s; (95 °C 5 s; 60 °C 34 s) 40 个循环。

1.2.7 表达菌株拷贝数的测定

参考实验室前期研究<sup>[12]</sup>,本研究选用 *gapdh* (甘油醛-3-磷酸脱氢酶) 为内源参照基因,对核酸酶 P1 编码基因 *nucP1* 进行 qRT-PCR 分析,构建包含 *nucP1* 基因和内源参照基因 *gapdh* 单拷贝质粒 pGN (图 1)。使用 NanoDrop1000 测定质粒 pGN 的浓度和质量,由下式计算相应的分子数(拷贝数):

$$\text{DNA copies}=6.02\times10^{23}\times C/(L\times660)$$

其中: C: DNA 浓度, g/mL; L: DNA 长度, bp。

并用无菌 RNase free 水将质粒的拷贝数分别稀释到 10<sup>9</sup> 拷贝/ $\mu\text{L}$ , 10<sup>8</sup> 拷贝/ $\mu\text{L}$ , 10<sup>7</sup> 拷贝/ $\mu\text{L}$ , 10<sup>6</sup> 拷贝/ $\mu\text{L}$ , 10<sup>5</sup> 拷贝/ $\mu\text{L}$  五个梯度。用初始浓度为 10 ng/ $\mu\text{L}$  重组菌基因组作为模板连续 10 倍稀释 5 个梯度,分别以 P13 和 P14, P15 和 P16 为引物扩增 *nuc P1* (200 bp) 和 *gapdh* (140 bp) 的部分片段,根据其 Ct 值和内参质粒的拷贝数作出标准曲线,qRT-PCR 的扩增效率由下式计算出:

$$\text{PCR efficiency}=10^{1/S}-1$$

其中: S: 标准曲线的斜率。

之后将得到的内参基因和目的基因的 Ct 值代入标准曲线<sup>[13]</sup>,可得到各重组菌株中 *nuc P1* 基因的初始

模板拷贝数,由下式计算 *nuc P1* 基因的拷贝数:

$$\text{Copy number}=\text{Copy}_N/\text{Copy}_G$$

其中: Copy<sub>N</sub>: *nuc P1* 起始模板拷贝数; Copy<sub>G</sub>: *gapdh* 基因起始模板拷贝数。

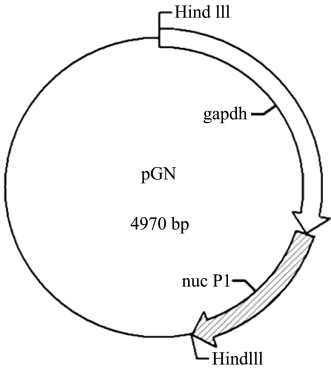
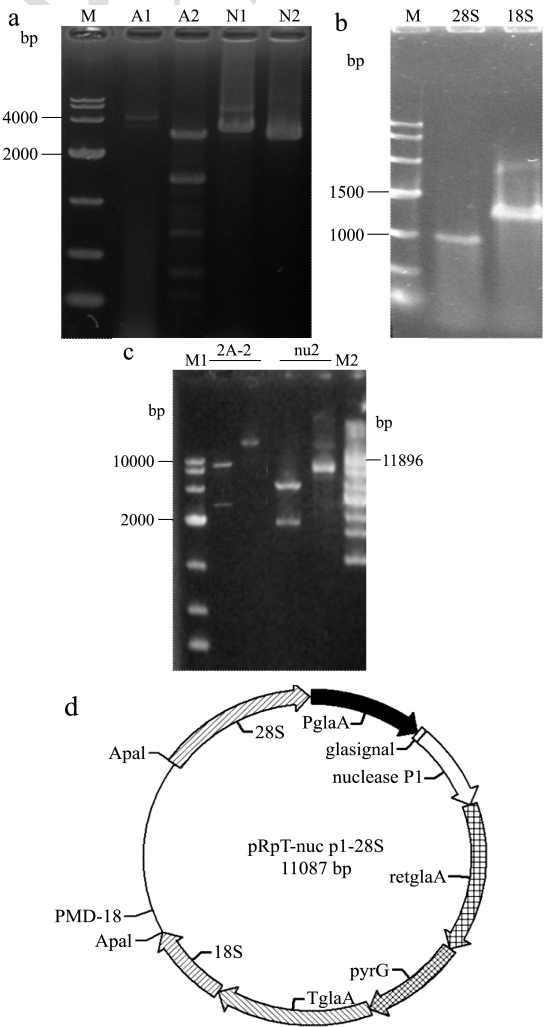


图 1 pGN 质粒图谱

Fig.1 Schematic diagram of plasmid map of pGN

2 实验结果

2.1 质粒构建



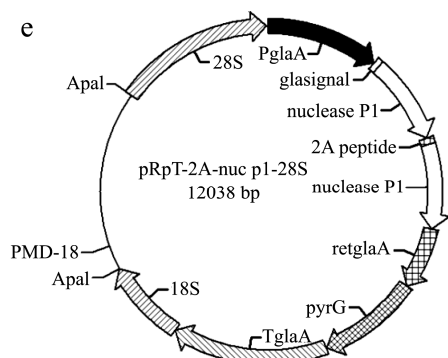


图2 PCR 扩增 pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S 相关片段电泳检测、质粒示意图及酶切鉴定

Fig.2 PCR amplification of pRpT-nucP1-18S and pRpT-2A-nucP1-18S related fragments with electrophoresis detection, plasmid schematic and restriction enzyme digestion

注: (a) 质粒 pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S 的 PCR 扩增片段。M: DNA ladder; 1,2,3,4: A1, A2, N1, N2 片段; (b) M: DNA ladder; 1,2: 28S, 18S 片段; (c) 质粒 pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S 酶切后片段。M1: DNA ladder; M2: supercoli marker; 1,3: *Apal* 酶切质粒 pRpT-2A-18S 和 pRpT-nucP1-18S 后片段; 2,4: 质粒 pRpT-2A-18S 和 pRpT-nucP1-18S; (d), (e) pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S 质粒图谱。

通过扩增密码子优化后的来源于桔青霉的核酸酶 P1 编码基因得到 *nuc P1*, 基因大小为 813 bp。构建两种 rDNA 介导的质粒: pRpT-*nucP1*-18S 和 pRpT-2A-*nucP1*-18S。扩增片段如图 2a, b 所示, 将纯化后的片段与载体 PMD-19 连接, 质粒 pRpT-2A-*nuc P1*-18S 构建成功。按 1.2.2 的方法构建出质粒 pRpT-*nucP1*-18S 和 pRpT-2A-*nucP1*-18S(图 2d, e)。质粒经 *Apal* 酶切后释放出正确大小的目的片段(图 2c)。

## 2.2 半定量 PCR 筛选重组菌株

质粒转化黑曲霉 Bdel4 后(同源重组过程鉴定图由图 3a 表示, pNU 和 p2A 即为 *nuc P1* 单拷贝和双拷贝的表达框), 在高渗 CD 板上随机挑选转化子, 提取各转化子基因组进行半定量 PCR, 之后通过凝胶验证, 得到图 3b 和 3c, 挑选有目的条带的 Bpnu-18S, Bp2A-18S 各 5 株转化子进行 500 mL 摇瓶发酵复筛(Bpnu5-18S: 1, 2, 3, 4, 5 号转化子, Bp2A-18S: 1, 2, 3, 4, 5 号转化子)。其中阳性对照的模板为 1.2.6 步骤构建的质粒 pGN, 阴性对照的模板为黑曲霉 Bdel4 基因组。

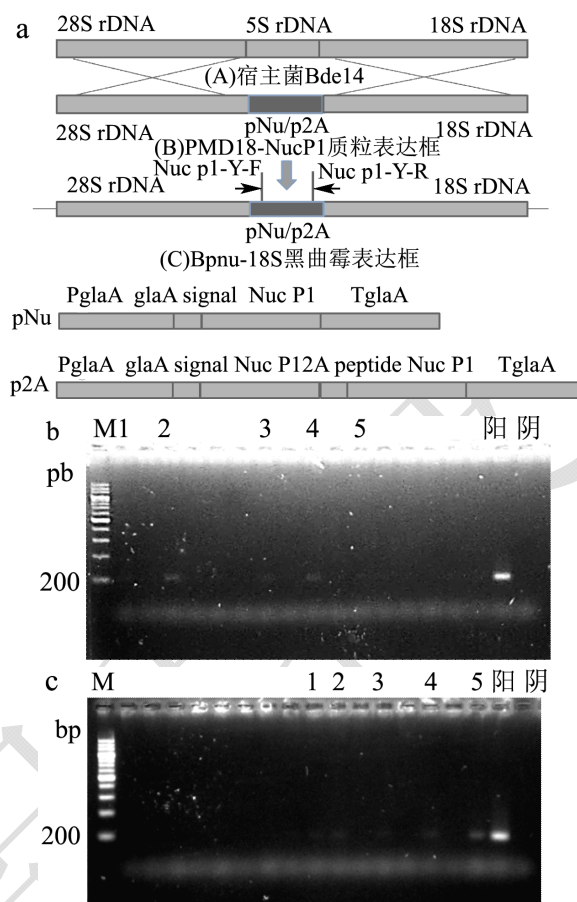


图3 半定量 PCR 鉴定转化子

Fig.3 Identification of transformants by semi-quantitative PCR.

注: (a) 转化子鉴定图谱; (b) Bpnu-18S 系列转化子鉴定。M: DNA ladder; 1,2,3,4,5: 筛选的转化子; (c) Bp2A-18S 系列转化子鉴定。M: DNA ladder; 1,2,3,4,5: 筛选的转化子。

## 2.3 菌株表达情况与核酸酶 P1 的酶活测定

将 Bpnu-18S 和 Bp2A-18S 各 5 个高拷贝的转化子接入发酵培养基, 每隔 24 h 取次样, 发现各转化子均在发酵第 6 d 有最高酶活(图 4a), 取发酵第 6 d 各转化子的发酵上清液跑 SDS-PAGE 胶, 发现各转化子在 38 ku 处均存在目的条带, 表明核酸酶 P1 实现了分泌表达。其中 nu2 号和 2A2 号菌株在此处条带浓度较高, 表明其蛋白含量较高。测定各转化子第 6 d 的酶活(图 4b)。实验结果发现筛选得到的 10 个高拷贝转化子的核酸酶 P1 酶活力均高于单拷贝菌株(18.2 U/mL), nu2 号和 2A2 号菌株酶活显著高于其它株, 分别为 88.5、81.2 U/mL, 相比单拷贝菌株酶活提高 3.85 倍, 且为异源表达核酸酶 P1 的最高产量。之后测定这两株菌 1~7 d 的核酸酶 P1 的酶活(图 4c)。由图可知, 培养

1~6 d, 酶活逐天递增, 第 6 d 达到最高值, 第 7 d 酶活稍有下降。以上结果可知所构建的质粒 pRpT-nucP1-18S 和 pRpT-2A-nucP1-18S 转化黑曲霉 Bdel4 后均成功实现了核酸酶 P1 的表达, 达到本研究预期目的。运用 SPSS 软件对各个转化子的酶活进行多重比较分析, 结果显示不同转化子之间酶活差异显著 ( $p<0.05$ )。

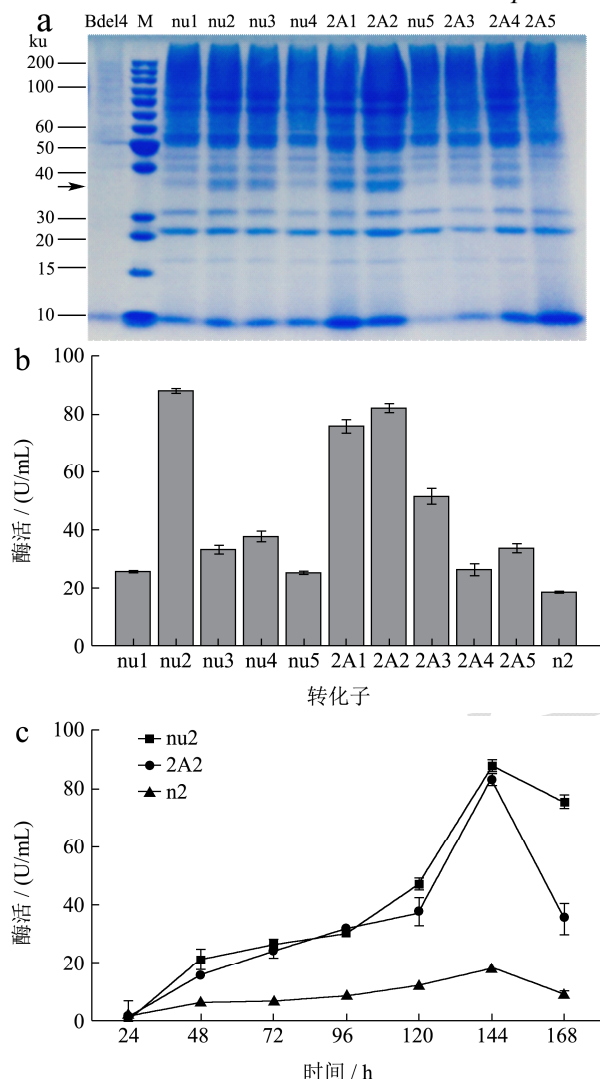


图4 转化子第 6 d SDS-PAGE 胶、酶活及 nu2, 2A2 在 1~7 d 的酶活

Fig.4 SDS-PAGE and Enzyme activity of transformants at sixth day and enzyme activity of nu2 and 2A2 at different fermentation times

注: (a) 各转化子的蛋白胶图。M: 蛋白 marker; Bdel4: 宿主菌; (b) 各转化子第 6 d 的酶活; (c) nu2, 2A2, n2 转化子 1~7 d 酶活。n2 为核酸酶 P1 的单拷贝菌株, 误差线代表标准差。

## 2.4 黑曲霉表达核酸酶 P1 蛋白的 Western blot 检测

以核酸酶 P1 的单拷贝菌株的发酵液作为对照, 将上述筛选出的 nu2 号菌株进行 western blot 鉴定, 结果与 SDS-PAGE 检测的结果一致, 多拷贝表达菌株 nu2 表达的分泌蛋白和单拷贝表达菌株 n2 号表达的分泌蛋白均呈阳性, 如图 5 所示, 结果说明核酸酶 P1 蛋白在黑曲霉中实现了分泌表达。

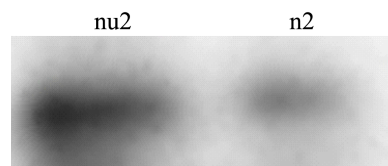


图5 western blot 检测核酸酶 P1 在黑曲霉中的表达  
Fig.5 Multicopy expression of nuclease P1 in *Aspergillus niger* by western blot

注: nu2 为筛选出多拷贝菌株发酵 144 h 上清, n2 为核酸酶单拷贝菌株发酵 144 h 上清。

## 2.5 Bpnu-18S 和 Bp2A-18S 拷贝数分析

如图 6a, 6b 所示, 每对引物扩增条带单一、溶解曲线为单峰且扩增效率为 99% 以上, 说明设计的引物特异性好, 可用于基因的拷贝数差异分析。通过每个浓度标准质粒扩增得到的 Ct 值对样品进行溶解曲线分析, 拟合标准曲线 (图 6c), 用于确定引物的扩增效率, 相关系数为 0.9981 和 0.9913, 说明定量标准曲线可靠。

通过 1.2.5 的方法测定 Bpnu-18S 和 Bp2A-18S 的拷贝数 (图 6d), 结果显示重组菌株的拷贝数分布在 1~16 拷贝之间, nu5 号和 2A4 号 *nuc P1* 基因的拷贝数最少, 分别为 0.918 和 0.867, 而 nu2 号和 2A3 号的拷贝数最多, 分别为 8.983 和 15.923, 其中 Bpnu-18S 得到的转化子平均拷贝数为 1.272, 而 Bp2A-18S 得到的转化子平均拷贝数为 7.677 (去掉了一个最高值和一个最低值, 取中间三个值的平均数)。说明相较于 Bpnu-18S 系列菌株, Bp2A-18S 系列菌株的 *nuc P1* 基因拷贝数明显增加, 能较为稳定的结合多个 *nuc P1* 基因到黑曲霉基因组上。

基因的拷贝数的增加对外源蛋白的表达水平既有正效应, 也存在负效应, 且其作用机理不尽相同<sup>[30]</sup>。如 1998 年, Lin<sup>[14]</sup>等人将葡糖淀粉酶在酿酒酵母中整合至 2.7 kb 的 rDNA 序列中实现其表达, 葡糖淀粉酶的转化子拷贝数达到 25 至 140 个, 且葡糖淀粉酶产量随着拷贝数的增加而提高。而在重组毕赤酵母中表达牛溶菌酶时随着基因拷贝数的增加, 表达水平反而下降, 单拷贝菌株为 0.46 g/L, 而 3 拷贝时表达量降到 0.25 g/L<sup>[15]</sup>。在本研究中, 含有 9 个 *nuc P1* 基因整合拷贝的重组菌核酸酶 P1 活性最高, 为 88.5 U/mL,



为含有单个 *nuc P1* 基因菌株的 4.85 倍(在之前的研究中测定 *nuc P1* 基因单拷贝转化子酶活为 18.2 U/mL)。但当 *nuc P1* 基因拷贝数继续增加时, 核酸酶 P1 的表达量明显下降; 而 *nucP1* 的拷贝数在 9 个拷贝以上的菌株, 转化子拷贝数增加的同时, 酶活表达水平反而下降, 含 16 个拷贝数的菌株酶活性反而降低, 仅为 49.40U/mL, 为单拷贝菌株酶活的 2.71 倍; 整合的 *nuc P1* 拷贝数为 5~9 个左右的菌株, 其核酸酶 P1 酶活约为 75~90 U/mL。而 *nuc P1* 拷贝数为 1~2 个左右的菌株, 其酶活水平为 25~40 U/mL, 由此发现 *nucP1* 的拷贝数在 9 个拷贝以下时, 菌株的酶活水平随着拷贝数的增加而增加, 但不是等比增长, Lin<sup>[14]</sup>等人对于葡糖淀粉酶的研究也证明了这点; 通过提高 *nuc P1* 基因的拷贝数, 显著提高了核酸酶 P1 的表达水平, 但是不能盲目追求多拷贝, 高拷贝低表达可能的原因有两点: 第一, *nuc P1* 基因的整合位点是基因组上的 rDNA 序列, 而 rDNA 序列与蛋白质的翻译相关, 整合上的位点过多可能会影响到蛋白的翻译进而影响到蛋白分泌表达。Kobayashi<sup>[16]</sup>等人的研究表明, 基因拷贝数过多时, 翻译机制和前体是产物分泌的两大限制因素。第二, 对于特定的分泌效率较低的蛋白, 过高的表达会对分泌途径产生负反馈抑制<sup>[17]</sup>。因此, 过多的核酸酶 P1 蛋白的形成, 可能会触发一系列的偶联机制。从而导致到达内质网的蛋白量减少, 或者已经生成的蛋白在内质网得不到正确折叠而降解, 可能是造成 *nuc P1* 拷贝数增加而蛋白分泌量反而减少的原因。

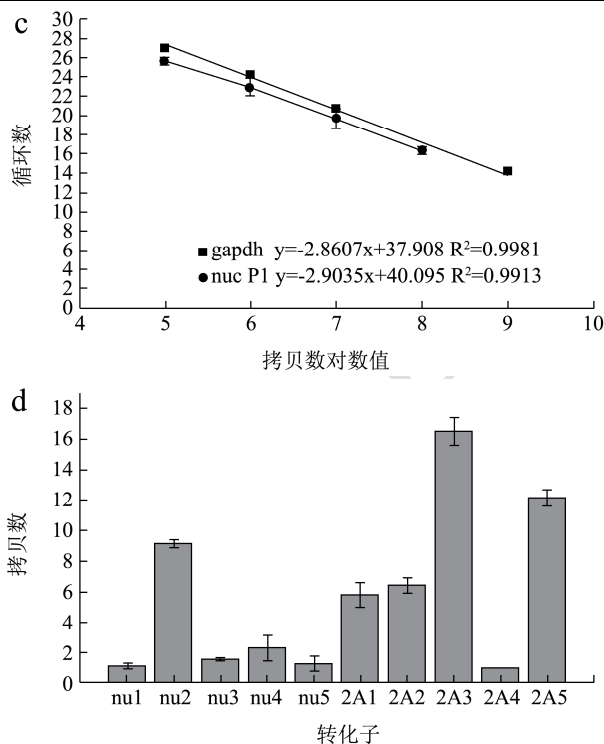
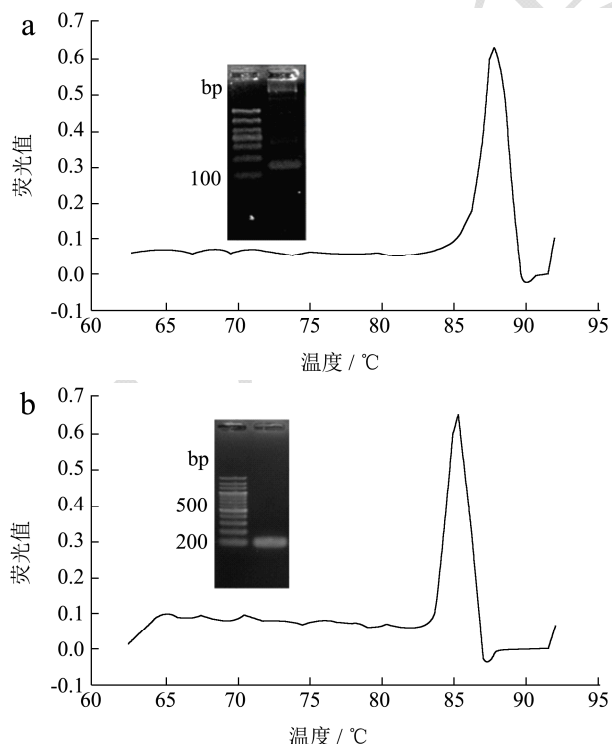


图6 qRT-PCR 引物特异性检测与转化子 *nuc P1* 的拷贝数  
Fig.6 confirmation of amplification specificity and efficiency of qRT-PCR primers and copy number of *nuc P1* of transformants

注: (a), (b)分别表示 *gapdh* 和 *nuc P1* 基因的 qPCR 引物检测的溶解曲线; (c) *gapdh* 和 *nuc P1* 基因的标准曲线; (d) 各转化子的拷贝数。误差线代表标准差。

### 3 结论

3.1 近年来通过融合蛋白, 2A 肽构建多拷贝菌株等方式来实现目的蛋白的高效表达<sup>[18-20]</sup>应用较广。Wang<sup>[21]</sup>等人成功构建了 anti-MM scFv-tP 融合蛋白, 并实现了其在大肠杆菌中的成功表达。Souza-Moreira T M<sup>[22]</sup>等人比较了 22 种 2A 肽在酵母细胞中蛋白表达情况。而 Meyer<sup>[23]</sup>等人利用 P2A 肽段串联三个基因, 实现了 *esyn1*, *ekivR* 和 *luc* 基因在黑曲霉中的共表达。本课题将其应用推广至黑曲霉中单基因的异源多拷贝表达。结果显示含有 2A 肽的表达框 (Bp2A-18S) 能够更加稳定地结合多个拷贝的目的基因到黑曲霉基因组上。且本实验构建的质粒可以通过替换表达框 (pglaA-glasignal-*nucP1*-2A peptide-*nucP1*-TglaA) 直接实现其他蛋白的多拷贝表达, 为黑曲霉中多拷贝表达的通用质粒。

3.2 黑曲霉常作为内源蛋白和外源蛋白的表达宿主, 为国际上公认的“GRAS”菌株, 其生成的产物可以直接用于食品生产, 拓展了核酸酶 P1 的应用范围。而外源蛋白由于其分泌环境, 通路等发生改变的原因,

通常在另一宿主中无法实现较高产量的表达,为了更好地实现外源蛋白的表达,本文通过增加目的基因的拷贝数来提高蛋白表达量。当前, rDNA 序列因具有保守性高、稳定性高、串联重复序列多等优点在同源重组的研究中日益受到关注,已经广泛应用于多种酵母表达系统中<sup>[24]</sup>。如酿酒酵母<sup>[25]</sup>,毕赤酵母<sup>[26]</sup>,乳酸菌<sup>[27]</sup>,汉参酵母<sup>[28]</sup>,八角菌<sup>[29]</sup>等。研究显示,真菌基因组中均存在 rDNA 重复序列,黑曲霉中的 rDNA 重复序列包括转录区和 NTS,其中转录区由 28S、5S、18S、ITS 和外转录间隔区(ETS)组成。通过增加外源单基因的拷贝数或共表达多个基因,以提高分泌表达的外源蛋白的含量,且对于宿主菌正常的生长代谢没有影响<sup>[30]</sup>,在异源蛋白的表达中兼具和稳定性的优点。本实验创新性的采用黑曲霉的 rDNA 序列为同源重组位点,实现核酸酶 P1 的高效表达。

3.3 含有 9 个 *nuc P1* 基因的转化子酶活最高,转化子 *nuc P1* 基因的拷贝数为 1~9 个时,核酸酶 P1 酶活增加,但非等比增长,*nuc P1* 基因的拷贝数超过 9 个时,因一系列的偶联机制,酶活不增加反而降低。筛选得到的核酸酶 P1 菌株具有良好的生产和传代稳定性,能够用于工业化生产。

## 参考文献

- [1] Masao Fujimoto, Akira Kuninaka, Hiroshi Yoshino. Some physical and chemical properties of nuclease P1 [J]. Agr. Biol. Chem., 1975, 10(39): 1991-1997
- [2] Gite S, Reddy G, Shankar V. Active-site characterization of S1 nuclease I. Affinity purification and influence of amino-group modification [J]. Biochemical Journal, 1992, 285(2): 489-494
- [3] 宋威,张芹,李欢庆,等.复合载体固定化细胞发酵生产核酸酶 P1 的对比研究[J].河南工业大学学报(自然科学版), 2008,3:51-54  
SONG Wei, ZHANG Qin, LI Huan-qing, et al. Study on the immobilizing *Penicillium citrinum* cells for producing nuclease P1 using different multiple carriers [J]. Journal of Henan University of Technology (Nature Science Edition), 2008, 3: 51-54
- [4] Yanan W. Expression, Purification and activity analysis of nuclease P1 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* [D]. Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, 2012
- [5] Guo-Qing Y, Shi L E, Yu Y, et al. Production, purification and characterization of nuclease p1 from *Penicillium citrinum* [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 1276-1281
- [6] 梁剑光,顾秋忆,秦修东,等.利用常压室温等离子体(ARTP)诱变选育高产核酸酶 P1 菌株[J].食品工业科技,2015,21: 183-186  
LIANG Jian-guang, GU Qiu-yi, QIN Xiu-dong, et al. Screening of high yield nuclease P1 strain by exposed under atmospheric and room temperature plasma [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 21: 183-186
- [7] 刘向勇,沈煜,郭亭,等.rDNA 介导的多拷贝整合表达载体的构建及其在酿酒酵母工业菌株中的应用[J].山东大学学报,2005,40(3):105-109  
LIU Xiang-yong, SHEN Yu, GUO Ting, et al. Construction of a ribosomal DNA multi-copy integration vector and application in the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain [J]. Journal of Shandong University, 2005, 40(3): 105-109
- [8] 支晓慧.基于 rDNA 序列的酵母整合载体的构建及应用[J].中国医药生物技术,2011,5:330-335  
ZHI Xiao-hui. Construction and application of *Saccharomyces cerevisiae* integration vector based on rDNA sequence [J]. Chin Med Biotechnol, 2011, 5: 330-335
- [9] Klabunde J, Kunze G, Gellissen G, et al. Integration of heterologous genes in several yeast species using vectors containing a *Hansenula polymorpha*-derived rDNA-targeting element [J]. FEMS Yeast Research, 2003, 4(2): 185-193
- [10] Wim Hartingsveldt, Ineke E Mattern, Cora M J Zeijl, et al. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the pyrG gene [J]. Mol Gen Genet, 1987, 206(1): 71-75
- [11] Qinting He, Nan Li, Xiaochun Chen, et al. Mutation breeding of nuclease p1 production in *Penicillium citrinum* by low-energy ion beam implantation [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2011, 28(2): 544-549
- [12] Ye L, Pan L. A comparison of the unfolded protein response in solid-state with submerged cultures of *Aspergillus oryzae* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008,72(11): 2998-3001
- [13] Saliola, M, Mazzoni C, Solimando N, et al. Use of the KlADH4 promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis* [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(1): 53-60
- [14] Lin L L, Ma Y J, Chien H R, et al. Construction of an amylolytic yeast by multiple integration of the *Aspergillus awamori* glucoamylase gene into a *Saccharomyces cerevisiae* chromosome [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 23(6): 360-365
- [15] Hohenblum H, Brigitte Gasser, Michael Maurer, et al. Effects

- of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris* [J]. Biotechnol Bioeng, 2004, 85(4): 367-375
- [16] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, et al. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation [J]. Biosci. Bioeng, 2000, 89: 55-61
- [17] Zhu T, Guo M, Tang Z, et al. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris* [J]. Appl Microbiol, 2009, 107(3): 954-963
- [18] Jansing J, Sack M, Augustine S M, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking  $\beta$ -1, 2-xylose and core  $\alpha$ -1, 3-fucose [J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(2): 350-361
- [19] Subramanian V, Logan A Schuster, Kyle T Moore, et al. A versatile 2A peptide-based bicistronic protein expressing platform for the industrial cellulase producing fungus, *Trichoderma reesei* [J]. Biotechnol Biofuels, 2017, 10: 34
- [20] Archer D B, D J Jeenes, D A Mackenzie. Strategies for improving heterologous protein production from filamentous fungi [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1994, 65(3): 245-250
- [21] Wang H, Yang YF, Wang W, et al. Construction and verification of anti-MM scFv-tP fusion protein expression vector [J]. Journal of Southern Medical University, 2017, 37(9): 1149-1155
- [22] Souza-Moreira T M, Navarrete C, Chen X, et al. Screening of 2A peptides for polycistronic gene expression in yeast [J]. FEMS Yeast Research, 2018, 18(5): 36
- [23] Schuetze T, V Meyer. Polycistronic gene expression in *Aspergillus niger* [J]. Microb Cell Fact, 2017, 16(1): 162
- [24] 孙海焯. 18S rDNA 介导的乳酸克鲁维酵母整合型表达载体的构建及初步验证[D]. 无锡: 江南大学, 2017
- SUN Hai-ye. Construction and preliminary verification of a 18S ribosomal DNA-mediated integrative *K. lactis* expression vector [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017
- [25] Wery, J, Gutker D, Renniers A C, et al. High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma* [J]. Gene, 1997, 184(1): 89-97
- [26] Marx H, Mecklenbräuer A, Gasser B, et al. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus [J]. FEMS Yeast Research, 2009, 9(8): 1260-1270
- [27] Bergkamp R J, Kool I M, Geerse R H, et al. Multiple-copy integration of the alpha-galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis* [J]. Curr Genet, 1992, 21(4-5): 365-370
- [28] Klabunde, J, Diesel A, Waschk D, et al. Single-step co-integration of multiple expressible heterologous genes into the ribosomal DNA of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58(6): 797-805
- [29] Cheng, R, XiangZhi Lin, ZhaoKai Wang, et al. Establishment of a transgene expression system for the marine microalga *Schizochytrium* by 18S rDNA-targeted homologous recombination [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(3): 737-741
- [30] 郭美锦, 朱泰承, 张明, 等. 重组毕赤酵母甲醇利用表型与基因拷贝数对外源基因表达的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 7: 7-11
- GUO Mei-jin, ZHU Tai-cheng, ZHANG Ming, et al. Influence of ethanol utilization phenotype and gene dosage on heterologous protein expression in recombinant *Pichia pastoris* [J]. China Biotechnology 2007, 7: 7-11

(上接第 91 页)

- [24] 邹秀容, 朱建华, 刘日斌, 等. 基于动态流变学的明胶/变性淀粉共混体系溶胶-凝胶相互转变动力学解析[J/OL]. 食品科学: 1-15[2019-01-26] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20181213.1512.086.html>
- ZOU Xiu-rong, ZHU Jian-hua, LIU Ri-bin, et al. Sol-gel mutual transition kinetic analysis of gelatin/modified starch blends based on dynamic rheology method [J/OL]. Food Science, 1-15[2019-01-26] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20181213.1512.086.html>
- [25] Hashem Hosseiniad S M, Emam-Djomeha Z, Razavia S H, et al.  $\beta$ -Lactoglobulin-sodium alginate interaction as affected by polysaccharide depolymerization using high intensity ultrasound [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(2): 235-244
- [26] Sow L C, Yang H. Effects of salt and sugar addition on the physicochemical properties and nanostructure of fish gelatin [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 45: 72-82