

木聚糖酶重组菌株的筛选及其分泌表达的比较分析

张会, 樊俊博, 马佳欣, 李柱, 邵志伟, 李杰*
(东北农业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 为了进一步提高木聚糖酶 (Xylanase, XynB) 的分泌表达量, 该研究以黑曲霉内源高表达的糖化酶 (Glucoamylase, GlaA) 位点作为基因整合靶点。基于 *glaA* 基因六拷贝强启动子, 分别利用糖化酶信号肽 *SglaA* 和酸性蛋白酶 B (Acid Protease B, PepB) 信号肽 *SpepB* 调控 XynB 的表达与分泌, 并探讨缺失高背景蛋白酸稳定 α -淀粉酶 (Acid-stable Amylase, AsAA) 对 XynB 分泌的影响。结果显示, 重组菌株 TgX、TpX、 Δ AgX 和 Δ ApX 在约 22 kDa 处均显现出明显的 XynB 蛋白条带。其中, 菌株 Δ ApX 的木聚糖酶活性 (21 413.74 U/mL) 较菌株 TgX、TpX 及 Δ AgX 提高了 70.67%、14.92% 和 35.42%。信号肽对 *xynB* 基因及 UPR 标志基因的转录水平无显著影响。缺失高背景蛋白 AsAA 能够提升 *xynB* 基因的转录水平, 促进重组蛋白质的折叠与分泌, 从而改善内质网应激。综上, 该研究基于高效分泌信号肽和敲除高背景蛋白成功优化和提高了 XynB 在黑曲霉中的表达, 为后续持续提升 XynB 的研究奠定了基础。

关键词: 木聚糖酶; 黑曲霉; 信号肽; 分泌表达
文章编号: 1673-9078(2025)11-99-107 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.11.1274

Screening for Recombinant Xylanase Strains and Comparative Analysis of Their Secretory Expression

ZHANG Hui, FAN Junbo, MA Jiaxin, LI Zhu, SHAO Zhiwei, LI Jie*
(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To further enhance the secretory expression level of xylanase (Xylanase, XynB), the locus of endogenous high-expression glucoamylase (Glucoamylase, GlaA) of *Aspergillus niger* was used as the target site for gene integration. Based on the six-copy strong promoter of the *glaA* gene, the expression and secretion of *xynB* were regulated by the signal peptide *SglaA* from glucoamylase and the signal peptide *SpepB* from acid protease B (Acid Protease B, PepB), respectively. Additionally, the impact of deleting the high-background protein acid-stable α -amylase (Acid-stable α -amylase, AsAA) on XynB secretion was also investigated. The results indicated that the recombinant strains TgX, TpX, Δ AgX, and Δ ApX all displayed significant XynB protein bands at approximately 22 kDa. Among them, the xylanase activity of strain Δ ApX (21 413.74 U/mL) was elevated by 70.67%, 14.92%, and 35.42% compared with the strains TgX, TpX, and Δ AgX, respectively. The signal peptide exerted insignificant effects on the transcription levels of the *xynB* gene and UPR marker genes. The deletion of high-background protein AsAA could enhance the transcription level of the *xynB* gene and facilitated the folding and secretion of the recombinant protein, thereby alleviating endoplasmic reticulum stress. In summary, this study successfully optimized and enhanced the expression of XynB in *Aspergillus niger* based on efficient secretion of signal peptides and the deletion of high-background proteins, which lays a foundation for further

引文格式:
张会,樊俊博,马佳欣,等.木聚糖酶重组菌株的筛选及其分泌表达的比较分析[J].现代食品科技,2025,41(11):99-107.
ZHANG Hui, FAN Junbo, MA Jiaxin, et al. Screening for recombinant xylanase strains and comparative analysis of their secretory expression [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(11): 99-107.

收稿日期: 2024-08-28 ; 修回日期: 2024-09-20 ; 接受日期: 2024-09-30
基金项目: 中国博士后科学基金 (2019M651149)
作者简介: 张会 (1984-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 酶工程与绿色生物制造, E-mail : zhangyonghuihui@126.com
通讯作者: 李杰 (1972-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 酶工程与绿色生物制造, E-mail : lijie_neau@126.com

research on improvement of XynB.

Key words: xylanase; aspergillus niger; signal peptide; secretory expression

β -1,4-木聚糖酶(Xylanase, XynB)是一种能将长链木聚糖降解为低聚木糖,如木二糖、木三糖、木四糖或更长寡聚体的关键水解酶^[1]。作为一种工业用酶制剂,被广泛应用于能源^[2,3]、食品^[4,5]、纺织和造纸^[6,7]等领域,以改善产品质量和环境保护等。相较于许多发达国家,我国生产的木聚糖酶仍存在产量低、生产成本高等问题。杨然等^[8]将枝链霉菌 L200 木聚糖酶基因导入毕赤酵母 GS115 中,在密度发酵优化后产量可达到 8 459 U/mL。刘学强等^[9]利用定向进化技术使得木聚糖酶高密度发酵时的活力达到 18 000 U/mL。Lu 等^[10]通过密码子优化获得的摇瓶发酵木聚糖酶活性为 6 403 U/mL,在 5 L 生物反应器中,该酶活性增加到 48 241 U/mL。因此,通过基因工程技术获得高产木聚糖酶菌株对于提高我国木聚糖酶酶制剂的市场竞争力具有重要意义。

近年来,常见的提高重组蛋白产量的方法主要包括使用强启动子、高效分泌信号肽、增加基因拷贝数、密码子优化、融合蛋白表达、利用蛋白酶缺陷菌株、调控未折叠蛋白反应(Unfolded Protein Response, UPR)等^[11-18]。其中,信号肽的选择和优化对实现重组蛋白的高效分泌和提高重组蛋白产量至关重要^[19,20]。信号肽是位于蛋白质 N 端的一段长度为 3~30 个氨基酸的短肽,其可介导新合成的多肽跨越细胞膜而进入内质网,在内质网进行折叠与修饰,并最终被定位到目标位置或者释放到胞外^[21,22]。通过使用高效分泌信号肽替代目标基因自身信号肽,可以使 α -半乳糖苷酶活性增加 22 倍^[23],胞外角蛋白酶活力约为原始菌株的 8.1 倍^[24]。研究发现^[25,26],相同基因在不同位点上整合时,其表达水平也会有差异,高表达基因位点能提高重组蛋白的表达水平。

本研究选用的受体菌株黑曲霉 TH-2 (*Aspergillus Niger* TH-2, *A. niger* TH-2)能够大量分泌糖化酶和淀粉酶等分泌背景蛋白,菌体分泌的总蛋白量过高会造成内质网压力过大,触发 UPR 等蛋白降解机制,减少目标蛋白的表达。这些内源高表达的蛋白会对木聚糖酶的分泌产生竞争性抑制,而敲除高分泌背景蛋白,可以加快菌株生长速度,减轻菌株的分泌压力^[27]。因此,本研究以内源高表达的 *glaA* 位点作为基因整合的靶位点,基于 *glaA* 基因的六拷贝强启动子,分别利用高表达信号肽 *SglaA* 和 *SpepB* 调控木聚糖酶的分泌表达。同时,本研究还探讨了高背景蛋白 AsAA 的缺失

对蛋白分泌的影响。以期进一步提高木聚糖酶的产量,为提高重组蛋白的产量探索新途径,为该表达系统的持续改进和广泛应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 实验材料

受体菌株 *A. niger* TH-2 由肇东日程酶制剂有限公司赠予;受体菌株 TH-2 (Δ asAA::pyrG) 由本研究室构建;菌株 TgX、TpX、 Δ AgX 和 Δ ApX 由本研究构建;载体 pSZHG6R-SglaA-xynB 和 pSZHG6R-SpepB-xynB 由本研究构建;克隆载体 pMD-19T (simple)、T4 DNA Ligase、限制性核酸内切酶,购于大连 TaKaRa 工程有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、超纯 RNA 提取试剂盒(DNase I)、通用型逆转录试剂盒(去基因组)、SYBR 染料法 qPCR Mix、植物基因组 DNA 快速提取试剂盒、高纯度质粒小提试剂盒,购于北京康维世纪生物科技有限公司;大肠杆菌 *DH5 α* (*Escherichia coli DH5 α*)感受态细胞,购于北京全式金生物技术股份有限公司;利福平(Rifamycin, Rif)、头孢氨苄(Cefalexin)、乙酰丁香酮(Acetylsyringone, As)、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、卡那霉素(Kanamycin, Km)、潮霉素(Hygromycin B),购于北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2 实验仪器

TC-96/G/H (b) B 型基因扩增仪,购于杭州博日科技股份有限公司;DD5M 型低速大容量离心机,购于湖南凯达科学仪器有限公司;BSC1100IIA2-X 型生物安全柜,购于济南鑫贝西生物技术有限公司;Micro 17R 型冷冻离心机,购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;UV-5800PC 型紫外可见分光光度计,购于上海元析仪器有限公司;CFX Connect 型荧光定量 PCR 检测系统、Mini-PROTEAN Tetra 型垂直电泳槽,购于美国伯乐 Bio-Rad 公司;ZQTY-70V 型低温振荡培养箱,购于上海知楚仪器有限公司。

1.1.3 菌株的培养

1.1.3.1 LB (Luria Bertani, LB) 培养基

用于培养大肠杆菌,由 1 g/L 酵母提取物,10 g/L 蛋白胨,10 g/L 氯化钠组成,自然 pH,固体培养基加入 20 g/L 琼脂粉,121 °C 高压灭菌 30 min。

表 1 本研究所采用的PCR引物
Table 1 PCR primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'-3')	用途
xynBMC-FW	TCTAGAGTTCCCCACGACTCTGTC	克隆 <i>xynB</i> 基因
xynBMC-RW	AAGCTTAGATCTTACTGAACAGTGATGGACGAAG	克隆 <i>xynB</i> 基因
glaA3p-FW	CGCTATAGGCTGGTTCTCC	同源重组鉴定
glaA4p-RW	TCGGCTATTATTGAACTGGG	同源重组鉴定
xynB-FW	TCCATTCAGGGAACCGCTACCTT	Real-time PCR 鉴定
xynB-RW	CCAGGTTTCATTCCCAGCTTAGCCCAA	Real-time PCR 鉴定
actA-FW	CCACGAGACCACCTTCAACTCCA	Real-time PCR 鉴定
actA-RW	CCACCGATCCAGACGGAGTACTTGC	Real-time PCR 鉴定
bipA-FW	ACCAATACGCCGCCAACC	Real-time PCR 鉴定
bipA-RW	CAGCGTGGGTAACCTTCTTTC	Real-time PCR 鉴定
pdiA-FW	AGCTCAAGGCGAAGAATATCCCT	Real-time PCR 鉴定
pdiA-RW	TAAGGCTTGCTAGAGTCAACACC	Real-time PCR 鉴定
hacA-FW	CGTCGGCTCAAACCTGAACCTC	Real-time PCR 鉴定
hacA-RW	CTCCTCCGTCGAGAACGTCAAAGGC	Real-time PCR 鉴定

1.1.3.2 YEB (Yeast Extract Beef medium, YEB) 培养基
用于培养农杆菌 *AGL1*, 由 1 g/L 酵母提取物, 5 g/L 蛋白胨, 0.493 g/L 七水合硫酸镁, 5 g/L 蔗糖, 5 g/L 牛肉膏组成, pH 值 7.0, 固体培养基加入 20 g/L 琼脂粉, 121 ℃ 高压灭菌 30 min。

1.1.3.3 PDA (Potato Dextrose Agar, PDA) 培养基
用于培养黑曲霉菌株, 由 20 g/L 葡萄糖, 3 g/L 磷酸二氢钾, 1.5 g/L 七水合硫酸镁和 200 g/L 马铃薯 (称量 200 g 马铃薯, 去皮后切成小块, 加入 1 500 mL 蒸馏水, 电磁炉煮 30 min, 纱布过滤留滤液) 组成, 自然 pH, 固体培养基加入 20 g/L 琼脂粉, 121 ℃ 高压灭菌 30 min ;

1.1.3.4 工业发酵培养基
用于黑曲霉摇瓶发酵培养, 由 100 g/L 葡萄糖, 20 mL/L 玉米浆和 20 g/L 豆饼粉组成, pH 值 5.5~6.0, 固体培养基加入 20 g/L 琼脂粉, 121 ℃ 高压灭菌 30 min。

1.2 实验方法

1.2.1 基因克隆和重组表达载体的构建

根据 GenBank 上的基因序列信息, 使用 PrimerPremier 5.0 软件 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) 设计基因克隆引物、同源重组 PCR 鉴定引物和实时荧光定量 PCR 引物 (表 1)。以 *A. niger* TH-2 基因组 DNA 为模板, 利用上游引物 xynBMC-F 和下游引物 xynBMC-R 扩增大约 746 bp 的 *xynB* 基因片段。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 退火 45 s、72 ℃ 延伸 45 s

进行 30 个循环, 72 ℃ 终延伸 10 min, 4 ℃ 反应终止。使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的基因片段 *xynB*。得到的 *xynB* 基因片段与克隆载体 pMD-19T (simple) 连接, 转化至大肠杆菌感受态细胞 *DH5a*, 双酶切鉴定正确的质粒送至上海生工生物工程有限公司进行测序。同时, GenBank 上 BLAST 分析 *xynB* 基因的准确性。通过 T4 DNA Ligase 将经 *Xba* I/*Hind* III 双酶切的克隆载体 pMD-*xynB* 与经 *Nhe* I/*Hind* III 双酶切的表达载体 pSZHG6R-*SglaA* 和 pSZHG6R-*SpepB* 进行连接, 分别得到带有信号肽 *SglaA* 和 *SpepB* 的重组表达载体 pSZHG6R-*SglaA*-*xynB* 和 pSZHG6R-*SpepB*-*xynB*, 表达盒示意图如图 1 所示。

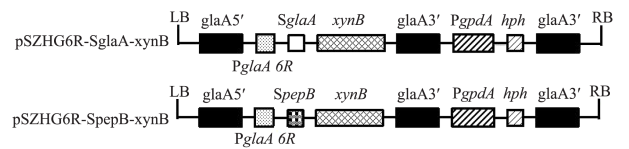


图 1 不同信号肽修饰的 *xynB* 基因表达盒示意图

Fig.1 Schematic representation of the *xynB* gene expression cassette featuring various signal peptide modifications

注: *glaA5'* 和 *glaA3'* 为同源重组的同源臂, 其中 *glaA3'* 含有终止子; *hph* 是筛选标记; *PglA6R* 是 *glaA* 基因的六拷贝强启动子。

1.2.2 木聚糖酶黑曲霉重组菌株的构建

通过冻融法将酶切鉴定正确的质粒载体 pSZHG6Rsp-*xynB* 和 pSZHG6Rsg-*xynB* 转入农杆菌 *AGL1* 中。将鉴定正确的农杆菌转化子接种于液体

YEB 培养基 (含 100 mg/L Rif, 100 mg/L Km), 25 °C 180 r/min 震荡培养 14~16 h 作为初次活化菌液。取 1 mL 初次活化菌液接种于另一瓶 20 mL 液体 YEB 培养基 (含 100 mg/L Rif, 100 mg/L Km, 200 μmol/L As) 中, 25 °C 180 r/min 震荡培养 3~4 h 直至 OD₆₀₀ 值达到 0.4~0.6, 作为二次活化菌液待用。取二次活化农杆菌菌液 1.0 mL 于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 1 min, 沉淀用 1.0 mL 液体 PDA 培养基重悬 (含 200 μmol/L As)。分别取 1.0 mL 野生型菌株 *A. niger* TH-2 和缺失高背景蛋白 AsAA 的受体菌株 TH-2 (ΔasAA::pyrG) 菌丝体, 匀浆器打碎 2~3 min 后静置 5~10 min, 取 30 μL 黑曲霉菌丝体与 60 μL 农杆菌二次活化菌液于 1.5 mL 离心管中混匀, 涂布于铺有玻璃纸的 PDA 固体培养基 (含 200 μmol/L As), 25 °C 共培养 48 h。用镊子将覆盖有菌丝的玻璃纸倒置于 PDA 筛选培养基上 (含 200 mmol/L Cephalosporin, 200 mmol/L Hygromycin B), 25 °C 静置培养 24 h 后揭去玻璃纸, 30 °C 静置培养 5~6 d, 直至长出明显的黑曲霉菌落。挑取部分黑曲霉菌丝体于 20 mL PDA 液体培养基 (含 200 mmol/L Cephalosporin, 200 mmol/L Hygromycin B), 30 °C 静置培养 3~4 d 直至长出大量的黑曲霉菌丝。取 1.0 mL 菌丝于 1.5 mL 离心管中, 使用植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA。以水做空白对照, 受体菌株基因组 DNA 作为阴性对照, 载体质粒作为阳性对照, glaA3p-FW 和 glaA4p-RW 作为引物进行同源重组 PCR 鉴定。

1.2.3 木聚糖酶黑曲霉重组菌株的表达检测

1.2.3.1 重组菌株的SDS-PAGE检测

将在 PDA 液体培养基中培养 3~4 d 的重组菌株 TgX、TpX、ΔAgX 和 ΔApX, 受体菌株 TH-2、TH-2 (ΔasAA::pyrG) 的新鲜菌丝按 10% 接种量接入 30 mL 液体发酵培养基中, 30 °C、180 r/min 震荡培养 11 d。将 4~11 d 的发酵液 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。电泳结束后, 用 0.25% 的考马斯亮蓝 R-250 过夜染色凝胶, 然后用洗脱液脱色, 直到蛋白条带清晰可见。

1.2.3.2 重组菌株的酶活性检测

木聚糖酶活力单位定义: 在 37 °C、pH 值 5.5 条件下, 每分钟从质量浓度为 5 mg/mL 的木聚糖溶液中降解释放 1 μmol 还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位 (U), 计算公式如下^[28]:

$$X_D = \frac{(A_E - A_B) \times K + C_0}{M \times t} \times 1000 \quad (1)$$

$$X = X_D \times D_f \quad (2)$$

式中:

X ——试样木聚糖酶的活力, U/mL;

D_f ——试样的总稀释倍数;

X_D ——试样稀释液的木聚糖活力, U/mL;

A_E ——酶反应液的吸光度;

A_B ——酶空白样的吸光度;

K ——标准曲线的斜率;

C_0 ——标准曲线的截距;

M ——木糖的分子量, 150.2;

t ——酶解反应时间, min;

1000——转化因子, 1 mmol=1 000 μmol。

酶活测定方法: 样品管测定方法如下: 取 2 mL 适当稀释后的酶液加入到 25 mL 刻度试管中, 然后再加入 2 mL 1.0% 的木聚糖底物, 混匀后在 37 °C 条件下保温 30 min。接着加入 5 mL DNS 试剂终止酶解反应。将试管置于沸水浴中加热 5 min, 然后用水定容至 25 mL, 混匀后在 540 nm 下测定吸光度。以先加入 DNS, 再加入酶液的过程为空白对照。

1.2.3.3 RNA提取、cDNA合成和实时荧光定量PCR

收集重组菌株 TgX、TpX、ΔAgX 和 ΔApX, 受体菌株 TH-2、TH-2 (ΔasAA::pyrG) 摇瓶发酵第 5 天的菌丝体沉淀。液氮充分研磨后, 使用超纯 RNA 提取试剂盒 (DNase I) 提取菌体总 RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 条带完整性, 通过 Nanodrop 检测 RNA 的浓度和纯度。以提取的总 RNA 为模板, 使用通用型逆转录试剂盒 (去基因组) 进行逆转录, 合成 cDNA (supplementary DNA) 第一条链。以 cDNA 为模板, *actA* 为内参引物、*xynB*、*hacA*、*bipA*、*pdiA* 为引物, 使用 BIO-RAD 仪器和 SYBR 染料法一步法 RT-qPCR mix 进行实时荧光定量 PCR。实时荧光定量 PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火/延伸 30 s 进行 40 个循环, 融解曲线阶段 95 °C 变性 15 s、60 °C 退火/延伸 5 s、95 °C 变性 15 s。

1.3 统计分析

在酶活性相关实验中, 每种实验进行三个重复。计算得到的酶活性数据利用 SPSS 20.0 软件 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) 进行单因素方差分析, 以确定组间显著差异。使用 Graphpad Prism v8.0 软件 (GraphPad Software, USA) 绘图。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶黑曲霉重组表达载体的鉴定

以 *A. niger* TH-2 基因组 DNA 为模板, 利用引物 *xynB*MC-FW 和 *xynB*MC-RW 成功扩增出 746 bp 的

xynB 基因片段 (图 2)。将 *xynB* 基因回收片段与克隆载体 pMD19-T (simple) 连接, 得到的单克隆质粒经测序和 BLAST 分析, 该序列与 GenBank 上登录号为 EU423881.1 的序列相似度达 100%, 说明克隆的 *xynB* 基因序列正确。

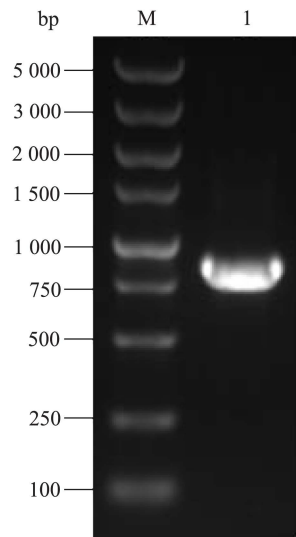


图 2 *xynB* 基因 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification results of the *xynB* gene

注: M 为 DL 5 000 bp, 1 为 *xynB* 基因 PCR 扩增。

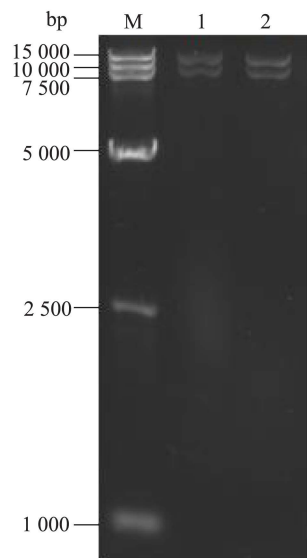


图 3 木聚糖酶表达载体的酶切鉴定结果

Fig.3 The enzymatic digestion results of the xylanase expression vector

注: M 为 DL 15000 bp, 1 为 pSZHG6R-SglaA-*xynB* (*Xba* I/ *Hind* III) 双酶切, 2 为 pSZHG6R-SpepB-*xynB* (*Xba* I/ *Hind* III) 双酶切。

用 *Xba* I/*Hind* III 双酶切克隆载体 pMD-*xynB*, 得到的 *xynB* 基因片段分别与用 *Nhe* I/*Hind* III 双酶切

的表达载体 pSZHG6R-SglaA 和 pSZHG6R-SpepB 进行连接, 构建带有 *SglaA* 信号肽和 *SpepB* 信号肽的木聚糖酶黑曲霉表达载体 pSZHG6R-SglaA-*xynB* 和 pSZHG6R-SpepB-*xynB*。对得到的上述两个表达载体, 用 *Xba* I/*Hind* III 双酶切鉴定 (图 3), 泳道 1 和 2 能切出约 12 000 bp 的表达载体条带和 8 000 bp 的木聚糖酶表达框条带, 说明载体构建正确。

2.2 木聚糖酶黑曲霉重组菌株的鉴定

采用冻融法将木聚糖酶黑曲霉重组表达载体质粒 pSZHG6R-SglaA-*xynB* 和 pSZHG6R-SpepB-*xynB* 转化入农杆菌 *AGL1*, 培养后获得农杆菌 *AGL1* 单菌落。以水作为空白对照、载体质粒作为阳性对照, 以转入 pSZHG6R-SglaA-*xynB* 和 pSZHG6R-SpepB-*xynB* 的农杆菌单菌落为模板, 利用引物 *xynBMC-FW* 和 *xynBMC-RW* 进行菌落 PCR 扩增鉴定 (图 4)。结果显示, 泳道 1 和 2 扩增出与阳性对照相同大小的 *xynB* 基因片段, 说明成功筛选出农杆菌阳性转化子 *AGL1* (pSZHG6R-SglaA-*xynB*) 和 *AGL1* (pSZHG6R-SpepB-*xynB*)。

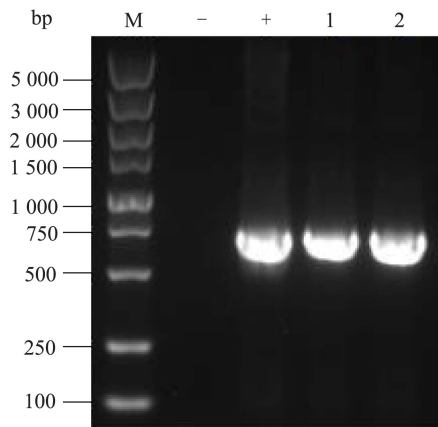


图 4 木聚糖酶农杆菌转化子的 PCR 鉴定结果

Fig.4 Identification of xylanase *Agrobacterium tumefaciens* transformants by PCR

注: M 为 DL 5 000 bp, - 为空白对照 (水), + 为阳性对照 (质粒), 1 为 pSZHG6R-SglaA-*xynB* 农杆菌转化子, 2 为 pSZHG6R-SpepB-*xynB* 农杆菌转化子。

农杆菌转化子 *AGL1* (pSZHG6R-SglaA-*xynB*) 和 *AGL1* (pSZHG6R-SpepB-*xynB*) 分别与受体菌株 TH-2 和 TH-2 (Δ asAA::pyrG) 进行共培养和筛选, 获得生长状态良好的黑曲霉单菌落。以水作为空白对照、受体菌株基因组 DNA 作为阴性对照, 以载体质粒作为阳性对照, 黑曲霉转化子基因组 DNA 为模板, 利用同源重组引物 *glaA3p-FW* 和 *glaA4p-RW* 进行 PCR 鉴定, 鉴定原理如图 5a, 鉴定结果如图 5b。图中位置

1 为受体菌株扩增条带，位置 2 为载体质粒扩增条带。本研究选用的受体菌株黑曲霉为多核菌丝体，不产孢子，所以获得的转化子会出现杂合现象。图 5b 中泳道 2、3、4、5 只扩增出与阳性对照载体质粒相同大小 DNA 片段，而无受体菌株条带，说明其为纯合转化子。泳道 1 既扩增出与阳性对照载体质粒相同大小 DNA 片段，又扩增出受体菌株条带，说明其为杂合转化子。获得的木聚糖酶纯合菌株分别命名为 TgX (SglaA-xynB)、TpX (SpepB-xynB)、 Δ AgX (SglaA-xynB, asAA::pyrG) 和 Δ ApX (SpepB-xynB, asAA::pyrG)。

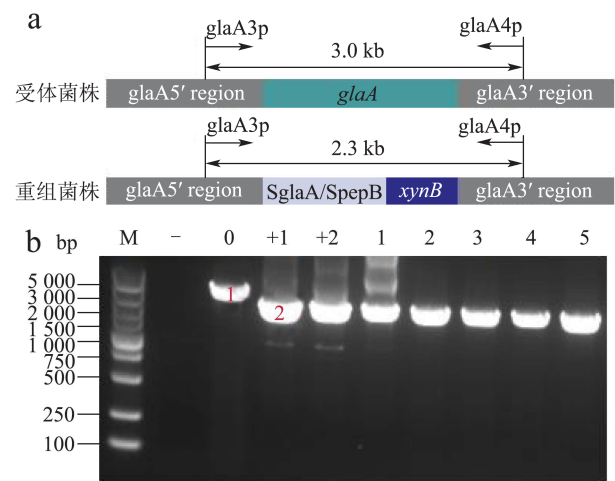


图 5 木聚糖酶黑曲霉转化子的 PCR 鉴定结果
Fig.5 Identification of xylanase *Aspergillus niger* transformants by PCR

注：(a) 菌株鉴定原理示意图；(b) 菌株 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图，其中 M 为 DL 5 000 bp，- 为空对照（水），0 为受体菌株，+1 为阳性对照（质粒 pSZHG6R-SglaA-xynB），+2 为阳性对照（质粒 pSZHG6R-SpepB-xynB），1 为木聚糖酶黑曲霉杂合转化子，2 为菌株 TgX，3 为菌株 TpX，4 为菌株 Δ AgX，5 为菌株 Δ ApX。

2.3 木聚糖酶黑曲霉重组菌株的表达水平分析

分别吸取重组菌株 TgX、TpX、 Δ AgX 和 Δ ApX，以及受体菌株 TH-2、TH-2 (Δ asAA::pyrG) 5~11 d 的摇瓶发酵液，13 000 r/min 离心 10 min，取上清进行分泌蛋白的 SDS-PAGE 和酶活性检测。SDS-PAGE 检测结果如图 6 所示，与对照菌株 TH-2、TH-2 (Δ asAA::pyrG) 相比，重组菌株 TgX、TpX、 Δ AgX 和 Δ ApX 在位置 4 分子量约为 22 kDa 处均呈现明显的木聚糖酶 XynB 蛋白条带，并且无位置 1 糖化酶基因整合位点条带，说明这四株菌均为纯合同源重组菌株。同时，重组菌株 Δ ApX 蛋白条带颜色较深、表达量较大，说明使用 *SpepB* 信号肽并敲除高背景蛋白 AsAA 可以明显提高 XynB 蛋白的分泌表达量。

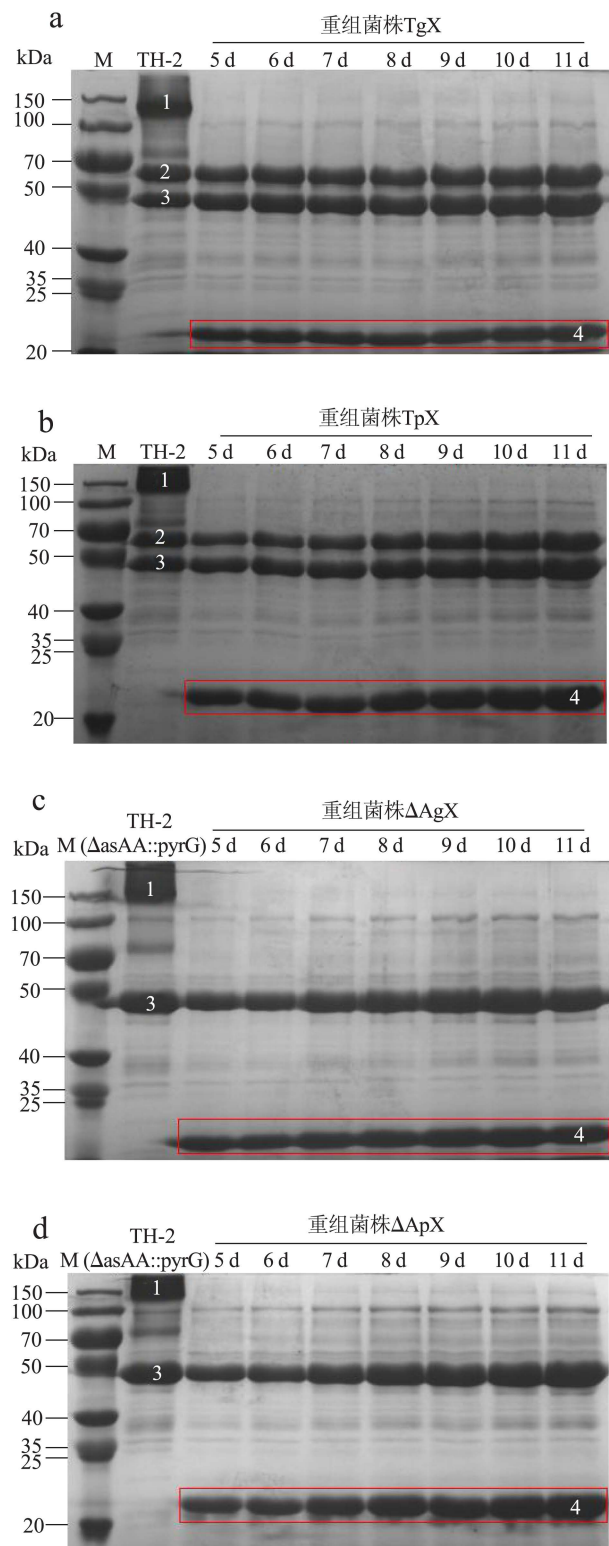


图 6 木聚糖酶黑曲霉转化子的 SDS-PAGE 检测结果
Fig.6 SDS-PAGE detection of xylanase *Aspergillus niger* transformants

注：1 为糖化酶，2 为酸稳定的 α -淀粉酶，3 为 α -淀粉酶，4 为木聚糖酶，M 为 Protein Marker。a 为重组菌株 TgX (5~11 d)，b 为重组菌株 TpX (5~11 d)，c 为重组菌株 Δ AgX (5~11 d)，d 为重组菌株 Δ ApX (5~11 d)。

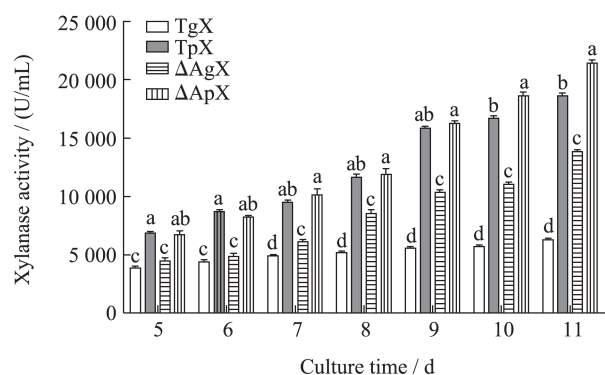


图7 木聚糖酶黑曲霉重组转化子的酶活性检测

Fig.7 Detecting the enzyme activity of xylanase *Aspergillus niger* transformants

注：字母 a、b、c、d 表示在 0.05 水平上菌株之间具有显著差异 ($n=3$)。

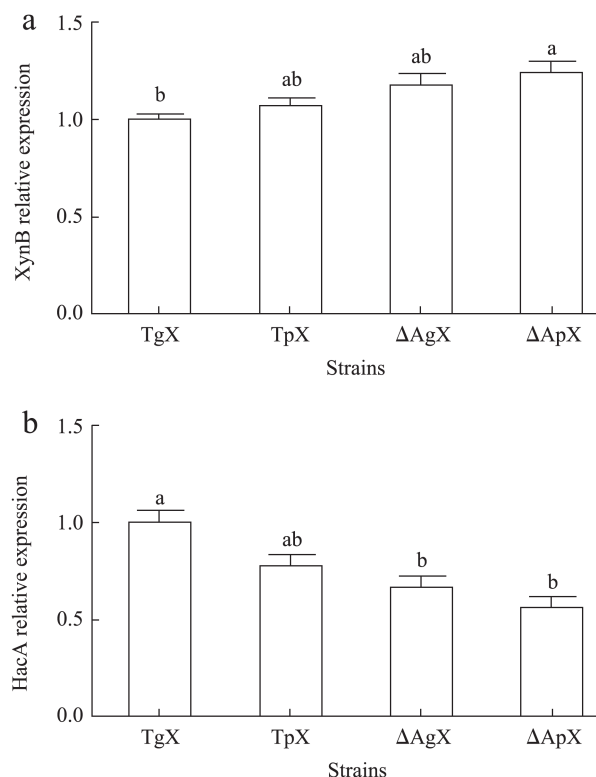
酶活检测结果如图 7 所示，菌株 TgX、TpX、ΔAgX 和 ΔApX 的最高酶活分别为 6 279.74、18 633.56、13 828.32 和 21 413.74 U/mL。与菌株 TgX 相比，菌株 TpX 的酶活性提高了 196.73%；与菌株 ΔAgX 相比，菌株 ΔApX 的酶活性提高了 54.85%。这表明 PglA6R-SpepB 组合作为 *xynB* 基因的有效表达元件，其强启动子与高效信号肽之间的协同作用能够显著提高木聚糖酶蛋白产量。与菌株 TgX 相比，菌株 ΔAgX 的酶活性提高了 120.21%；与菌株 TpX 相比，菌株 ΔApX 的酶活性提高了 14.92%；说明高背景蛋白 AsAA 的缺失也进一步促进了木聚糖酶蛋白的分泌表达。然而，与现有木聚糖酶工业生产水平相比，木聚糖酶在大规模发酵方面仍存在一定的差距。

2.4 木聚糖酶黑曲霉重组菌株的转录水平分析

从前面结果可知，重组菌株间 XynB 蛋白分泌量具有明显差异。为探究该差异是否与 *xynB* 基因的转录水平和内质网 UPR 调控有关，本研究进一步通过 RT-PCR 检测了不同菌株中目的基因 *xynB* 和 UPR 标志基因 *hacA*、*bipA*、*pdiA* 的转录水平。不同菌株中 *xynB* 基因的转录水平如图 8a 所示，与菌株 TgX 相比，菌株 TpX 的 *xynB* 基因转录水平提高了 4.74%；与菌株 ΔAgX 相比，菌株 ΔApX 的 *xynB* 基因转录水平提高了 6.54%。菌株 TgX 与菌株 TpX、ΔAgX 与 ΔApX 在 *xynB* 基因转录水平上无显著差异 ($P>0.05$)，说明信号肽的更换对 *xynB* 基因转录水平影响较小。与菌株 TgX 相比，菌株 ΔAgX 的 *xynB* 基因转录水平提高了 17.60%；与菌株 TpX 相比，菌株 ΔApX 的 *xynB* 基因转录水平提高了 19.40%。菌株 TgX 与菌株 ΔAgX，菌株 TpX 与菌株 ΔApX，采用相同的信号肽，不同背景

蛋白的受体菌株，*xynB* 基因转录水平间的微小差异可能是由于缺失高背景蛋白 AsAA 后，*xynB* 基因 mRNA 的稳定性提高引起的。也有报道^[29]，基因的转录水平与 mRNA 的稳定性呈正相关。

UPR 标志基因 *hacA*、*bipA*、*pdiA* 的检测结果如图 8b~8d 所示，与菌株 TgX 相比，菌株 TpX 的 *hacA*、*bipA* 及 *pdiA* 基因的转录水平分别降低了 23.00%、26.00% 和 12.00%；与菌株 ΔAgX 相比，菌株 ΔApX 的 *hacA*、*bipA* 及 *pdiA* 基因的转录水平分别降低了 11.00%、9.00% 和 4.00%。信号肽通过引导蛋白质正确折叠和定位，从而帮助内质网维持其功能与稳态。当内质网中蛋白质发生错误折叠时，会激活 UPR，通过调节蛋白质合成与降解以恢复内质网功能。比较菌株 TgX 与 TpX，以及 ΔAgX 与 ΔApX，可以看出信号肽 SglA 和 SpepB 在 UPR 标志基因转录水平上的影响并不显著。与菌株 TgX 相比，菌株 ΔAgX 的 *hacA*、*bipA* 及 *pdiA* 基因的转录水平分别降低了 34%、67.00% 和 74.00%；与菌株 TpX 相比，菌株 ΔApX 的 *hacA*、*bipA* 及 *pdiA* 基因的转录水平分别降低了 28.57%、60.71% 和 78.21%。比较菌株 ΔAgX 与 TgX，以及 ΔApX 与 TpX，可以看出缺失高背景蛋白 AsAA 对 UPR 标志基因转录水平具有显著影响，这表明缺失高背景蛋白 AsAA 能够显著减轻内质网 UPR 应激，改善蛋白正确折叠，从而促进更多蛋白质向外分泌。



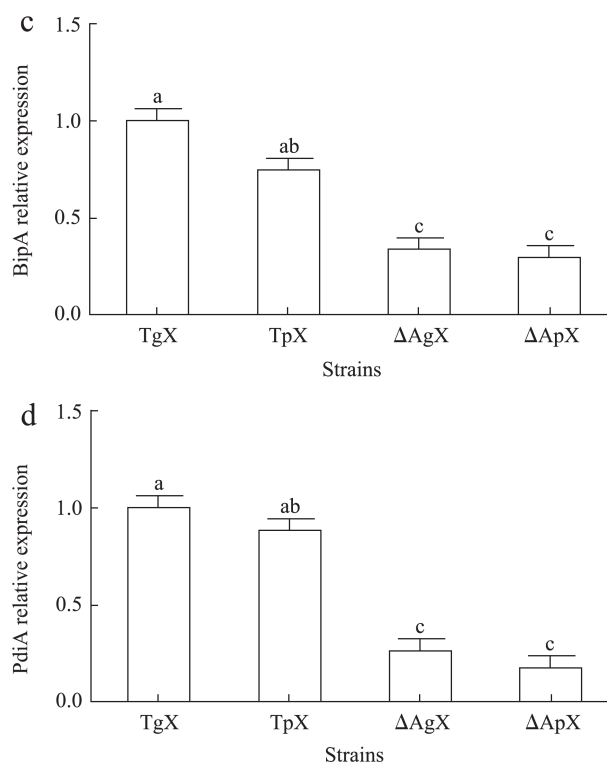


图8 木聚糖酶黑曲霉重组转化子的转录水平检测

Fig.8 Detection of transcription levels of xylanase *Aspergillus niger* transformants

注：柱上不同小写字母表示在 0.05 水平上菌株之间具有显著差异 ($n=3$)。

3 结论

本研究通过同源重组定点整合技术, 获得了 4 株木聚糖酶黑曲霉纯合重组菌株 TgX、TpX、 Δ AgX 和 Δ ApX, 这些菌株在分子量约为 22 kDa 处均呈现出明显的木聚糖酶 XynB 蛋白条带。其中, 菌株 Δ ApX 的酶活性最高, 达到 21 413.74 U/mL。信号肽对 *xynB* 基因及 UPR 标志基因的转录水平无显著影响。缺失高背景蛋白 AsAA 能够提升 *xynB* 基因的转录水平, 同时改善内质网应激。未来, 可进一步通过多重策略组合, 解除对木聚糖酶在转录、翻译及转运水平上的限制, 从而进一步提高木聚糖酶的分泌与表达。

参考文献

- [1] 吴秀芸,戴琳,张舒,等.高效木聚糖降解酶系定制的新进展与挑战[J].微生物学通报,2020,47(7):2278-2289.
- [2] LYND L R, LIANG X Y, BIDDY M J, et al. Cellulosic ethanol: status and innovation [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2017, 45: 202-211.
- [3] BERI D, YORK W S, LYND L R, et al. Development of a thermophilic coculture for corn fiber conversion to ethanol [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 1937.
- [4] VALLS C, PASTOR F, VIDAL T, et al. Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates [J]. Carbohydrate Polymers, 2018(194): 43-50.
- [5] ATP P, VENTORIM R Z, MAITAN-ALFENAS G P, et al. Engineered GH11 xylanases from orpinomyces sp. PC-2 improve techno-functional properties of bread dough [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 2(99): 741-747.
- [6] CAMPIONI T S, DE J M L, MORETTO E, et al. Biobleaching of kraft pulp using *fungus* xylanases produced from sugarcane straw and the subsequent decrease of chlorine consumption [J]. Biomass and Bioenergy, 2019, 121: 22-27.
- [7] WU X Y, ZHANG Q, ZHANG L Z, et al. Insights into the role of exposed surface charged residues in the alkali-tolerance of GH11 xylanase [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 872.
- [8] 杨然,范光森,鄢金龙,等.重组毕赤酵母高产木聚糖酶菌株筛选及发酵条件优化[J].中国食品学报,2017,17(12):95-104.
- [9] 刘学强,江正强,余静,等.海栖热袍菌木聚糖酶B的分子改造、高效表达及其在啤酒中的应用[J].食品科学,2022,43(6): 66-73.
- [10] LU Y, FANG C, WANG Q, et al. High-level expression of improved thermo-stable alkaline xylanase variant in *Pichia Pastoris* through codon optimization, multiple gene insertion and high-density fermentation [J]. Scientific Reports, 2016, 6:37869.
- [11] LI C, ZHOU J, DU G, et al. Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production [J]. Biotechnology Advances, 2020, 44: 107630.
- [12] LIU D, GARRIGUES S, DE V R P. Heterologous protein production in *filamentous fungi* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2023, 107(16): 5019-33.
- [13] ROJAS-SANCHEZ U, LOPEZ-CALLEJA A C, MILLAN-CHIU B E, et al. Enhancing the yield of human erythropoietin in *Aspergillus niger* by introns and CRISPR-Cas9 [J]. Protein Expression and Purification, 2020, 168: 105570.
- [14] SUN X, SU X. Harnessing the knowledge of protein secretion for enhanced protein production in *filamentous fungi* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(4): 54.
- [15] QIAN Y, ZHONG L, SUN Y, et al. Enhancement of cellulase production in *Trichoderma reesei* via disruption of multiple protease genes identified by comparative secretomics [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2784.
- [16] HUANG L, DONG L, WANG B, et al. The transcription factor prtT and its target protease profiles in *Aspergillus niger* are negatively regulated by carbon sources [J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(4): 613-624.
- [17] LI W, YU J, LI Z, et al. Rational design for *fungus* laccase production in the model host *Aspergillus nidulans* [J]. Science China Life Sciences, 2019, 62(1): 84-94.
- [18] BOON L, UGARTE-BERZAL E, VANDOOREN J, et al. Protease propeptide structures, mechanisms of activation, and functions [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 55(2): 111-165.
- [19] NIEUWKOOP T, FINGER M, OOST J V D, et al. The ongoing quest to crack the genetic code for protein production [J].

- Molecular Cell, 2020, 80(2): 193-209.
- [20] WANG Y L, MAO Y H, XU X D, et al. Codon usage in signal sequences affects protein expression and secretion using baculovirus/insect cell expression system [J]. PLoS ONE, 2015, 10(12): e0145887.
- [21] PRATITI B, VOLKHARD H. Molecular modeling of signal peptide recognition by eukaryotic sec complexes [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(19): 107050.
- [22] DRIES S, JOCHEM S, YING X, et al. Signal peptide-rheostat dynamics delay secretory preprotein folding [J]. Journal of Molecular Biology, 2022, 434(19): 167790.
- [23] XU Y, WANG Y H, LIU T Q, et al. The *glaA* signal peptide substantially increases the expression and secretion of α -galactosidase in *Aspergillus niger* [J]. Biotechnology Letters, 2018, 40(6): 949-955.
- [24] 谈沐阳,陈希文,彭政,等.信号肽筛选和核糖体结合位点优化的组合策略提高角蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的胞外表达[J].食品与发酵工业,2023,49(4):8-16.
- [25] DONG H, ZHENG J, YU D, et al. Efficient genome editing in *Aspergillus niger* with an improved recyclable CRISPR-HDR toolbox and its application in introducing multiple copies of heterologous genes [J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 163: 105655.
- [26] LI C, ZHOU J, DU G, et al. Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production [J]. Biotechnology Advances, 2020, 44: 107630.
- [27] ZHANG H, WANG S, ZHANG X X, et al. The amyR-deletion strain of *Aspergillus niger* CICC2462 is a suitable host strain to express secreted protein with a low background [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 1-11.
- [28] GB/T 23874-2009,饲料添加剂木聚糖酶活力的测定-分光光度法[S].
- [29] 田娜,王力,龙凤,等.人乳溶菌酶密码子优化及其在牛乳腺细胞中高效表达[J].中国农业科学,2020,53(18):3805-3817.