优化黑曲霉柠檬酸生产菌株原生质体形成条件及表达系统的建立

殷 娴[1,2]，庞冬洽[2]，韩瑞枝[2]，李江华[1,2]，刘 龙[1,2]，堵国成[1,2]，陈 坚*[1,2]
(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122)

摘要：优化了黑曲霉柠檬酸生产菌株的原生质体形成条件并建立基因表达系统。利用酶解法制备原生质体，最优的酶解液配比为 5 mg/mL 溶壁酶、0.2 U/mL 几丁质酶和 460 U/mL 葡萄糖醛酸酶。最优的渗透压稳定剂为 0.7 mol/L KCl，菌丝层厚度 50 μm，菌体量为 0.003 g/mL。在培养基中添加 1 mmol/L Mn^{2+}有助于减少原生质体形成所需的酶量，在培养基中添加葡萄糖醛酸酶有助于得到独立的孢子进行萌发，从而促进原生质体的形成。利用共转化的方式，可以同时将两个表达框整合到基因组上并实现基因表达。

关键词：黑曲霉；柠檬酸；原生质体；共转化
中图分类号：Q 93　**文献标志码：**A　**文章编号：**1673—1689(2016)09—0963—08

Protoplasting Improvement of Industrial Citrate-Producing *Aspergillus niger* for DNA Transformation

YIN Xian[1,2]，*PANG Dongqia*[2]，*HAN Ruizhi*[2]，*LI Jianghua*[1,2]，*LIU Long*[1,2]，*DU Guocheng*[1,2]，*CHEN Jian*[1,2]
(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This article aimed to optimize protoplast formation conditions of industrial citrate-producing *Aspergillus niger* to establish genetic transformation system. As protoplasts were formed by enzyme digestion, components of enzyme mixtures, digestion conditions and hyphae growth conditions were studied. The optimized enzyme mixture contained 5 mg/mL lysing enzyme, 0.2 U/mL chitinase and 460 U/mL glucuronidase. The best conditions for protoplasting were using 0.7 M KCl as osmotic stabilizer, thickness of pellets hyphae for 50 μm, cell weight of 0.003 g/mL. Furthermore, addition of Mn^{2+} in culture medium helped reduce the chitinase concentration necessary for protoplasting. In addition, glucuronidase in culture medium facilitated conidia separation during germination, further improved protoplast formation. Finally, two cassettes were inserted into genome

收稿日期：2015-01-14
基金项目：江苏省研究生创新工程项目(CXZZ11_0477)；江南大学博士研究生科学研究基金(JUDCF11008)。
作者简介：殷 娴(1982—)，女，江苏无锡人，发酵工程博士研究生。E-mail：yinxianshirley@yahoo.com.cn
***通信作者：**陈 坚(1962—)，男，江苏扬州人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品生物技术和生化工程方面的研究。E-mail：jchen@jiangnan.edu.cn

simultaneously.
Keywords: *Aspergillus niger*, citric acid, protoplast, co-transformation

黑曲霉（*Aspergillus niger*）是重要的工业生产菌，作为生物反应器广泛应用于酶、抗生素、有机酸等物质的生产。随着黑曲霉基因组测序工作的完成以及对黑曲霉基因组表达谱进行挖掘，黑曲霉的代谢网络模型不断得到完善，黑曲霉高产柠檬酸机制和高效分泌蛋白质的机制得到更深层次的阐述[1-2]，通过分子改造对黑曲霉的代谢进行调控来实现目的产物的积累已经有诸多成功的报道[3-5]。但是，这些报道所使用的菌株均非柠檬酸生产菌株，目前还没有对柠檬酸生产菌株进行遗传转化来积累目标产物的报道。不同株系的黑曲霉基因组差别巨大[1]，基因表达的差异造成其形态差异明显，细胞壁成分也有所不同。因此，需要建立黑曲霉柠檬酸生产菌株的表达系统。

丝状真菌的转化方法主要有 4 种：电转化法、农杆菌介导法、基因枪法和 PEG 介导法。电击转化法是以原生质体或者完整的细胞为受体的转化方法。利用短暂的电场脉冲作用，使生物膜的类脂分子层发生瞬时混乱，膜通透性瞬时增大，使 DNA 进入细胞。由于质膜的可修复性，外加电场造成的膜穿孔在一定时间内可自动修复，使细胞恢复到正常的生理状态，但该方法对黑曲霉的转化效率极低[6]。农杆菌介导法是根瘤农杆菌 *A. tumefaciens* 通过类似结合的过程把 Ti 质粒中的 T-DNA 转移到受体细胞基因组中。在产酶黑曲霉中，该转化方法获得成功的应用[7]，但对产酸黑曲霉转化效率很低。基因枪法作为一种万能基因转化法，可以直接将外源 DNA 导入可再生的细胞，但缺点是价格昂贵、嵌合体不易排除、不易选择转化体、转化频率低以及转化受体细胞再生困难，目前尚无在黑曲霉中应用的报道。PEG 介导法是目前在黑曲霉中应用最广泛的方法，转化材料为原生质体。原生质体作为受体细胞具有群体数量大、容易获得纯合性的转化子等优点，但原生质体具有培养难度大、再生频率低和周期长等缺点。该方法已经在野生菌株 *A. niger* N400[8-9]、N402[3,5]中应用。在来源于 N402 的 pyrG 缺陷型菌株 AB4.1[10]、野生型菌株 CAD4[11]、NW185 的 pyrA 缺陷型菌株 NW186 [4] 以及糖化酶生产菌株 BO-1[12]中获得应用。野生型菌株和产酶菌株可以控制真菌形态，使其长成长丝状菌丝，易于制备原生质体，而本研究使用的黑曲霉柠檬酸生产菌株 H915-1 未能通过培养基优化得到长丝状菌体，而始终以粗短菌丝存在，故而原生质体制备非常困难。

作者对黑曲霉柠檬酸生产菌株 H915-1 的原生质体形成条件进行了优化，从酶解液成分与配比、酶解作用条件和菌体生长条件三方面入手，系统探索了 PEG 介导的原生质体法，建立了遗传转化系统，提供了始终只能以粗短菌丝存在的黑曲霉的原生质体制备的方法，为进一步改造黑曲霉工业生产菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒 黑曲霉 H915-1：江苏国信协联能源有限公司柠檬酸生产菌株；构巢曲霉：南京师范大学陆玲教授惠赠；pUC18 和 pMD19：TaKaRa 公司；*E. coli* JM109：Stratagene 公司；pRS303：作者所在实验室保存。

1.1.2 培养基和培养条件

1）LB 培养基：胰蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 5 g/L，NaCl 10 g/L；pH 7.0，固体培养基添加 1.5 g/dL 的琼脂粉。筛选培养基需加入 100 μg/mL 氨苄青霉素或硫酸卡那霉素。

2）LB 孢子萌发培养基：胰蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 5 g/L，NaCl 5 g/L；pH 5.0。

3）ME 培养基：麦芽提取物 30 g/L，胰蛋白胨 5 g/L。

4）上层培养基：麦芽提取物 30 g/L，胰蛋白胨 5 g/L，1.2 mol/L 山梨醇，1 g/dL 的琼脂。

5）下层培养基：麦芽提取物 30 g/L，胰蛋白胨 5 g/L，1.2 mol/L 山梨醇，1.5 g/dL 的琼脂，加入相应抗生素。

以上培养基均为 121 ℃灭菌 15 min。

6）MC 缓冲液：50 mmol/L $CaCl_2$，20 mmol/L Mes/NaOH，pH 5.8。

7）STC 缓冲液：1.2 mol/L 山梨醇，50 mmol/L

$CaCl_2$,10 mmol/L Tris,pH 7.5。

8)PEG 缓冲液:25% PEG 6000,50 mmol/L $CaCl_2$,10 mmol/L Tris,pH 7.5。

1.2 实验方法

1.2.1 黑曲霉和构巢曲霉基因组的提取 在茄子瓶中用 ME 斜面培养黑曲霉 H915-1 或构巢曲霉,35 ℃倒置培养 5~7 d 至长出浓密孢子,加入 5 mL 0.1% Tween-20,用接种铲刮取孢子,用 mirocloth 过滤除去菌丝体,孢子液经稀释后用血球计数器计数。按 3×10^5 CFU/mL 接种孢子至 ME 液体培养基,35 ℃、200 r/min 培养 2 d,用 mirocloth 收集菌球,并挤压干水分。按照 DNeasy Plant Mini Kit 说明书提取丝状真菌基因组。

1.2.2 表达载体的构建

1)pMHT 载体的构建:mbf 启动子通过引物 mbf-F 和 mbf-R-hph 从黑曲霉基因组中克隆得到,*hph* 基因通过引物 mbf-F-hph 和 hph-R-trpC 以 pRS303 为模板得到,trp 终止子通过引物 hph-F-trpC 和 trp-R 从构巢曲霉基因组中克隆得到,通过融合 PCR 构建 Pmbf-hph-Ttrp 表达框,并连接到 pMD19 上得到 pMHT。转化黑曲霉的抗性表达框为通过引物 mbf-F 和 trp-R,以 pMHT 为模板扩增得到 3 300 bp 的片段。

2)pGGT 载体的构建:gpdA 启动子通过引物 gpd-F 和 gpd-R 从构巢曲霉基因组中克隆得到,序列的 5′ 和 3′ 端分别加入 *Sma* I 和 *Bam* HI 位点,sGFP 参照文献由全序列合成得到[13],序列 5′ 和 3′ 端分别加入 *Bam* HI 和 *Pst* I 位点,trp 终止子通过 trp-F 和 trp-R 以 pMHT 为模板扩增得到,序列的 5′ 和 3′ 端分别加入 *Pst* I 和 *Hind*III 位点。PgpdA-sGFP-Ttrp 表达框通过酶切连接构建。Ttrp 由 *Hind* Ⅲ 和 *Pst* Ⅰ 酶切,sGFP 由 *Pst* Ⅰ 和 *Bam* HI 酶切,PgpdA 由 *Xma* Ⅰ 和 *Bam* HI 酶切,3 个片段依次连接到 pUC18 上,得到 pGGT。转化黑曲霉的 GFP 表达框为通过引物 gpd-F 和 trp-R,以 pGGT 为模板扩增得到 3 800 bp 的片段。

利用引物 hph-F1 和 hph-R1 鉴定 hph 整合的转化子,利用引物 GFP-F1 和 GFP-R1 鉴定 sGFP 整合的转化子。

载体构建和鉴定重组子整合所用到的引物见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5′→3′)
mbf-F	GTACAGTGGCCATGAAATCCAA
mbf-R-hph	TGAGTTCAGGCTTTTTACCCATTTTGAAGATGGATGAGAAGTCGGTG
mbf-F-hph	CACCGACTTCTCATCCATCTTCAAAATGGGTAAAAAGCCTGAACTCA
hph-R-trpC	TTTGATGATTTCAGTAACGTTAAGTGGATCTTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGT
hph-F-trpC	ACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAAGATCCACTTAACGTTACTGAAATCATCAAA
trpC-R	TCAAGTGGAGATGTGGAGTGGGCGCTTA
gpd-F	CCCGGGCAATTCCCTTGTATCTCTACACACAG
gpd-R	GGATCCGGTGATGTCTGCTCAAGCGG
trp-F	CTGCAGAGATCCACTTAAACGTTACTGAAATC
trp-R	AAGCTTCTCGAGTGGAGATGTGGAGTGG
hph-F1	ATGGGTAAAAAGCCTGAACTCA
hph-R1	TTATTCCTTTGCCCTCG
GFP-F1	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
GFP-R1	TTACTTGTACAGCTCGTCCAT

1.2.3 黑曲霉 H915-1 原生质体的制备 按 3×10^5 CFU/mL 的浓度接种孢子至 ME 液体培养基,30 ℃、200 r/min 培养过夜。用 mirocloth 收集菌球,并用无菌水清洗菌球。称取一定量的酶,并用含不同渗透压稳定剂的 MC 溶解,用无菌滤膜过滤除菌。称取一定量菌球加入到酶解液中,37 ℃、120 r/min 振荡培养 2~4 h,4 ℃、2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入相同体积预冷的 STC,4 ℃、1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,洗涤 2 次,加入 100 μL STC,混匀得到原生质体悬液,可直接用于转化。

1.2.4 原生质体再生 将原生质体悬液在显微镜下用血球计数板进行计数 A,用 STC 溶液进行适当

稀释,涂布于上层培养基上。35 ℃培养 1~2 d 至单菌落出现,进行计数 B。为消除菌丝体片段形成菌落造成的误差,等量稀释的原生质体涂布于 ME 固体培养基,菌落计数 C。再生率计算公式:原生质体再生率=[(*B*–*C*)/*A*]×100%。

1.2.5 PEG 介导法转化黑曲霉原生质体 100 μL 黑曲霉原生质体中加入 1 μg 质粒和 330 μL PEG 缓冲液,冰上放置 20 min,加入 2 mL PEG,室温放置 10 min,依次加入 4 mL STC 和 4 mL 于 48 ℃预热的上层培养基,铺板于含有 180 mg/L 潮霉素的下层培养基上。平板在 33 ℃倒置培养 3~7 d,直至出现菌落,挑取单菌落传代。

2 结果与讨论

2.1 原生质体制备条件的优化

2.1.1 黑曲霉 H915–1 细胞壁消化的酶复合液成分比例的优化 黑曲霉的细胞壁成分主要是葡聚糖和几丁质[1,14],此外,β–葡萄糖醛酸酶的酶活作用影响原生质体形成效率[14]。不同株系的黑曲霉细胞壁成分略有差别,黑曲霉 CBS 513.88 只用溶壁酶一种成分即可消化得到黑曲霉原生质体,黑曲霉 K10 仅需使用蜗牛酶即可获得原生质体,找到合适的细胞壁裂解酶的配比是制作原生质体的基础[15]。对酶复合液的成分和比例进行了优化。对于黑曲霉 H915–1,单独使用蜗牛酶和溶壁酶都无法获得原生质体,当使用复合酶液均可以得到原生质体,但效果不同。当使用溶壁酶、几丁质酶和葡萄糖醛酸酶时,相较于其它种类的酶解液得到的原生质体数最多,进一步优化该酶解液中各酶浓度,发现 5 mg/mL 溶壁酶、0.2 U/mL 几丁质酶和 460 U/mL 葡萄糖醛酸酶时,得到的原生质体数目最多,为 6.7 × 10^5 个/mL,见表 2。对于 H915–1,溶壁酶破坏葡聚糖,几丁质酶降解几丁质,β–葡萄糖醛酸酶促进破坏细胞间的粘附作用,这 3 种酶共同作用得到最优的原生质体酶解条件。消化酶的浓度需要严格的界定,任意一种酶的过量都会造成原生质体浓度下降。一方面,由于原生质体是从细胞壁间隙挤出,需要配合间隙大小(由消化酶活性控制)、胞内外渗透压差和转速来完成原生质体的形成和释放;另一方面,消化酶对细胞膜具有破坏作用,过量的酶会造成细胞的损伤,这也可能与消化酶并非纯酶有关,商品化的酶虽然经过纯化但依然含有大量杂质。

表 2 原生质体形成的酶复合液的优化

Table 2 Improvement of *A. niger* protoplasting with different digest enzyme

溶壁酶	几丁质酶	葡萄糖醛酸酶	半纤维素酶	蜗牛酶	纤维素酶	原生质体数/(×10^5/mL)
–	–	–	–	1×	–	–
1×	–	–	–	–	–	–
1×	–	–	–	1×	1×	0.18
1×	1×			1×		1.03
1×	1×				1×	0.82
1×	–	1×	1×	–	–	0.9
1×	1×	1×	–	–	–	1.62
1×	2×	2×	–	–	–	4.73(±0.62)
1×	2×	1×	–	–	–	6.7(±0.78)

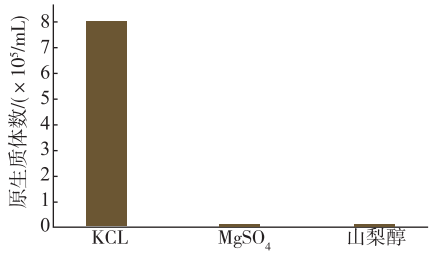
2.1.2 酶解作用条件的优化 渗透压稳定剂的种类对原生质体形成有重要影响,不仅可以保护原生质体减慢膨胀破裂的速度,而且其中的离子可能会对酶起激活作用。丝状真菌原生质体形成所需的渗透压稳定剂包括无机盐类的 KCl、NH_4Cl、$MgSO_4$、$(NH_4)_2SO_4$[16]等,有机物稳定剂为山梨醇和甘露醇。Arati Das 的研究认为,黑曲霉原生质体形成的最适渗透压稳定剂是 $MgCl_2$ [17],Charissa de Bekker 则以山梨醇为渗透压稳定剂来制备黑曲霉原生质体[17]。有机物稳定剂可以提高原生质体制备时离心收集的回收率,因此尽可能选用有机物稳定剂提供渗透压。选择了原生质体制备常用的渗透压稳定剂,由图 1(a)可知,H915–1 在 0.9 mol/L KCl 中易形成原生质体,在 0.4 mol/L $MgSO_4$ 和 0.8 mol/L 山梨醇溶液中,菌丝体很少被消化,只有极少量原生质体形成,而且不同的消化酶成分在这两种渗透压稳定剂下都很难促使原生质体生成,只有以 KCl 为渗透压稳定剂时,原生质体大量形成。细胞壁本身带负电荷,具有吸附阳离子的功能[19],可能细胞壁成分的差异造成了阳离子吸附量的差异,对酶解液的酶活有影响,从而找到合适的渗透压稳定剂是原生质体制备的关键因素之一。

KCl 的浓度与原生质体形成相关,只有胞外渗透压略低于胞内渗透压引起黑曲霉细胞膨胀,才会从被酶解的细胞壁间隙“排”出原生质体,当原生质体渗出到一定程度,适当程度的振动使原生质体脱离菌丝,形成游离的原生质体。渗透压稳定剂浓度越低,原生质体产生的速度越快,但其膨胀速度也快,最终破裂,因此低渗溶液的原生质体稳定性差,

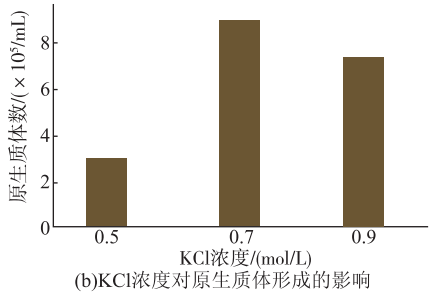
为此需要确认最佳的渗透压稳定剂浓度，由图 1(b)可知最适的 KCl 浓度为 0.7 mol/L，可以得到 9×10^5 个/mL 原生质体，0.9 mol/L KCl 得到的原生质体数略低，而在 0.5 mol/L KCl 中消化后的得到的原生质体比 0.7 mol/L KCl 减少了 2/3，说明低渗溶液严重影响了原生质体的形成和稳定性。

菌体量是制备原生质体的关键因素，过量的菌体意味着酶的底物增加，会造成被酶解的细胞壁间隙变小，菌丝消化不彻底会导致原生质体制备失败；而菌体量不足会造成原生质体数量的减少。如图 1(c)所示，在 5 mL 酶解液中，制备 H915–1 原生质体的最适菌体量为 15 mg，增加菌体量会导致原生质体量急剧减少，20 mg 的菌体量是 15 mg 菌体量产生的原生质体量的 1/5。

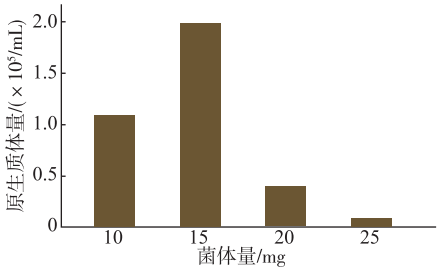
温度对原生质体形成的影响在于酶液在不同温度下的酶活及酶的稳定性不同，而原生质体形成需要用到 3 种酶，葡萄糖醛酸酶和几丁质酶的最适温度为 37 ℃，但几丁质酶在 37 ℃的稳定性较差，因此需要考察它们在不同温度下的协同作用，由图 1(d)可见，37 ℃是比较适合的酶作用温度。



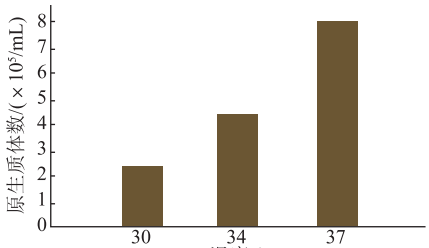
(a)不同的渗透压稳定剂对原生质体形成的影响



(b)KCl浓度对原生质体形成的影响



(c)菌体量对原生质体形成的影响



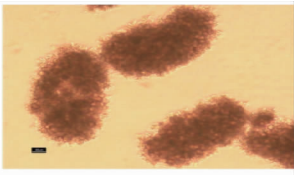
(d)温度对原生质体形成的影响

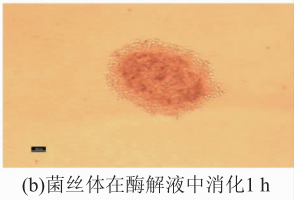
图 1　酶解作用条件的优化

Fig. 1　Optimization of digestion conditions for protoplasting

酶解时间对获得原生质体的影响在于需要尽可能完全消化掉菌丝体，但维持时间不宜过长，以减少低渗及酶的作用造成的原生质体破裂及活力下降。酶解 1 h，菌丝体即被消化成原生质体。酶解 2 h 时，原生质体被释放到酶解液中，且获得的原生质体活性较好，存活率为 95%以上。酶解 3 h 时，原生质体存活率下降至 85%，见图 2。

2.1.3　菌体生长条件的优化　菌丝体的菌龄对原生质体形成有重要影响。在20 mL ME 培养基中接种 10^7 个孢子，30 ℃、200 r/min 培养不同时间。由图 3 可知，孢子由分散的状态逐渐粘附到固形颗粒上；8 h 时，固形颗粒上粘附了大量的孢子，且固形颗粒也相互粘连在一起，此时孢子吸胀；12 h 时，孢子刚萌发出菌丝，形成菌球；16 h 的菌球更大，菌丝层刚好完全包裹住固形颗粒及孢子；20 h 的菌丝层更厚，菌球形状更规则，趋于圆形。


(a)菌丝体在酶解液中消化0 h


(b)菌丝体在酶解液中消化1 h

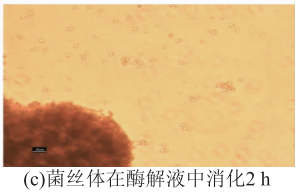

(c)菌丝体在酶解液中消化2 h

图 2　黑曲霉原生质体的形成和释放

Fig. 2　*A. niger* protoplasts formed from mycelium

制备原生质体需要幼嫩的菌丝,孢子萌发初期的菌丝体更容易被降解。但随着培养时间的缩短,菌丝可能无法完全包裹住菌球,造成 ME 固形物裸露于酶解液中,被酶解为小碎片。其混杂于原生质体中,不仅影响酶液降解菌丝体,并且无法与原生质体分离,影响后续化学转化;相反,随着菌龄增加,菌球更大,表层疏散的菌丝体被消化后,开始消化内部连接较为紧密的菌丝体,见图 3。此时,由于负责降解细胞间的粘连作用的葡萄糖醛酸酶只能作用于表层菌丝,因此形成大量未分散的原生质体团,且粘连在固形颗粒上,为使原生质体团分散,只能延长酶解时间,而酶解时间的延长造成早期形成的原生质体的损失,为此需要确定黑曲霉在 ME 中培养的时间,即菌丝层厚度对原生质体形成的影响。由图 4 可知,30 ℃、200 r/min 培养 16 h 得到的原生质体最多,此时的菌丝层厚度为 50 μm 左右。

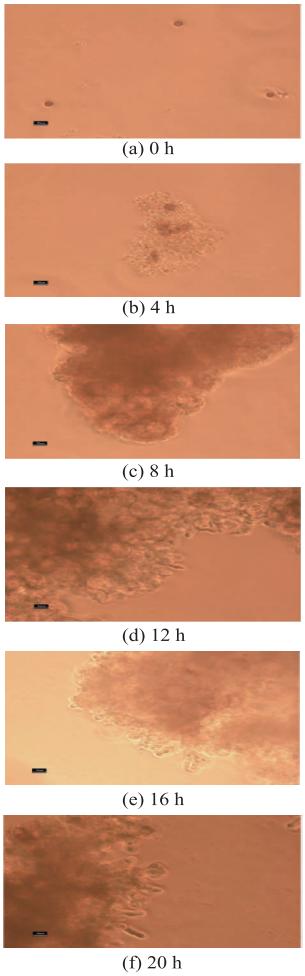


图 3 黑曲霉 H915-1 在 ME 培养基中的生长

Fig. 3 Growth of *A. niger* H915-1 in ME medium

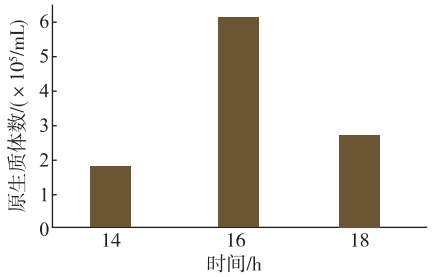


图 4 培养时间对原生质体形成的影响

Fig. 4 Effect of culture time on protoplasting

为减少制备原生质体的成本,需要尽可能减少几丁质酶的用量。通过在菌体生长阶段添加 Mn^{2+},考察最终将等量菌体在相同时间内完全消化成原生质体所需的几丁质酶的用量,见表 3。在不添加 Mn^{2+}时,几丁质酶浓度需要 0.2 U/mL;添加 Mn^{2+}至 1 mg/mL 和 10 mg/mL,几丁质酶用量可以减少 1/2。Mn^{2+}对黑曲霉合成柠檬酸有重要影响[19],同时也反映了它对黑曲霉细胞壁合成、孢子形成和次级代谢产物的合成有重要影响[20]。在缺乏Mn^{2+}时,细胞壁含有更高含量的几丁质,而本研究中添加 Mn^{2+}显著减少了制备原生质体所需的几丁质酶的用量。

表 3 培养基中添加 $MnCl_2$ 对原生质体形成的影响

Table 3 $MnCl_2$ addition in ME medium facilitated *A. niger* protoplasting

$MnCl_2$ 质量浓度/(mg/L)	几丁质酶酶活/(U/mL)
0	0.2
1	0.10
10	0.10

黑曲霉在孢子萌发前首先进行聚集,因此黑曲霉是以菌丝聚集体的形式存在于液体培养基中。为增加菌体与酶解液的接触面积,促进消化,期望孢子以单体形式萌发,而不形成菌球。葡萄糖醛酸酶具有减少原生质体间粘附的作用[6],在 LB 孢子萌发培养基中添加 460 U/mL 葡萄糖醛酸酶,获得了分散生长的孢子,见图 5。以萌发的孢子取代菌球进行酶解,完全消化菌丝体的时间从 2 h 缩短至 1.5 h,获得的原生质体量提升了 20%。获得分散的孢子还可以在其它方面进行应用,比如利用流式细胞仪进行转化后筛选已经在动物细胞中获得广泛的应用[21],利用GFP 为标记基因,不需要繁杂的抗性筛选,直接用流式细胞仪即可筛选阳性克隆,而且由于筛选的是单个细胞,因此可以避免嵌合体的产生。但这个方法需要获得单个的营养细胞,本研究提供了获得

独立的萌发孢子的方法，为后续研究提供技术支撑。

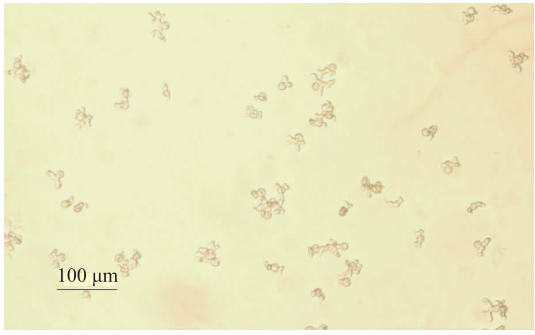
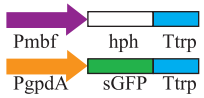


图 5　葡萄糖醛酸酶作用下孢子的萌发

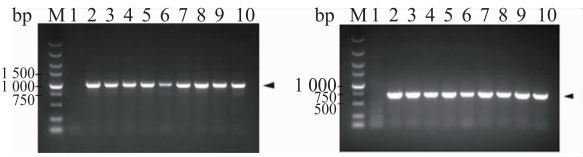
Fig. 5　Conidia grew separated in media with glucuronidase

2.2　sGFP 在黑曲霉 H915–1 中的整合表达

利用 PEG 介导法，将线性化的 sGFP 表达框和 hph 表达框（图 6a）进行共转化（片段比例为 10:1），共得到 31 个转化子有持续的潮霉素抗性，提取转化子的基因组进行 PCR 鉴定，所有的潮霉素抗性转化子均能扩增到 hph 条带（图 6b），为整合表达 hph 的转化子。其中有 18 个转化子的基因组可以扩增出 sGFP 条带（图 6c），为整合 hph 和 sGFP 两个片段的转化子，片段共整合的概率为 58%，图 7 为转化子表达 GFP 在蓝光激发光下的荧光。在高等生物中，主要利用非同源末端连接进行外源片段对基因组的整合[22-23]，利用该方式，可以同时使多个片段整合到基因组上，是目前改造高等生物包括真菌最常用的方式。本研究针对菌丝粗短的黑曲霉柠檬酸生产菌株建立了高效的原生质体制备方法并建立了 PEG 介导的共转化方法，为后续改造此类黑曲霉奠定了基础。



(a)hph表达框和sGFP表达框示意图

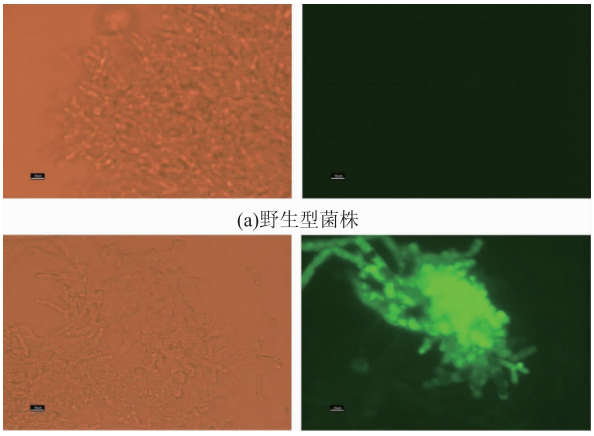


(b)PCR鉴定转化子基因组中的hph基因　(c)PCR鉴定转化

M，DNA Marker；1，野生型 H915–1；2–10，共表达 sGFP 和 hph 的转化子

图 6　共转化表达框示意图及转化子基因组的 PCR 鉴定

Fig. 6　Structures of cassettes for co–transformation and PCR amplification for gene insertion in genomes of transformants



(a)野生型菌株

(b)sGFP转化子

左图，白光场；右图，蓝光场。

图 7　黑曲霉菌丝体表达 sGFP 在激发光下产生绿色荧光

Fig. 7　*sGFP* expression in *A. niger* hyphae

3　结　语

黑曲霉是重要的工业生产菌，作为丝状真菌，对其进行遗传改造最有效的方法是 PEG–介导的原生质体法，实验的关键是制备有活力的原生质体，但一般需要对长丝状菌丝体进行消化来进行原生质体的制备，而柠檬酸生产菌 H915–1 在培养基中始终以短粗菌丝存在，故需要建立其适用的原生质体制备方法并建立遗传转化方法。本文对酶解液成分与配比、酶解作用条件和菌体生长条件三方面进行系统优化，确定了原生质体制备的最优条件。此外，鉴于 Mn2+对黑曲霉细胞壁合成、孢子形成和次级代谢产物的合成有重要影响，本文通过在菌体生长时添加 Mn2+可以减少原生质体形成所需的酶量，并通过葡萄糖醛酸酶的添加获得了独立萌发的孢子，对其进行处理可以进一步促进原生质体的形成。最终以 PEG 介导法实现了两个表达框的共转化，且基因在黑曲霉中可以进行稳定的表达。该方法的建立为代谢改造黑曲霉柠檬酸工业生产菌株奠定基础。

参考文献:

[1] ANDERSEN M R,SALAZAR M P,SCHAAP P J,et al. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88[J]. **Genome Research**,2011,21(6):885-897.

[2] PEL H J,de Winde J H,ARCHER D B,et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88[J]. **Nature Biotechnology**,2007,25(2):221-231.

[3] de Jongh WA,Nielsen J. Enhanced citrate production through gene insertion in *Aspergillus niger* [J]. **Metabolic Engineering**,2008,10(2):87-96.

[4] Van der Straat L,Vernooij M,Lammers M,et al. Expression of the Aspergillus terreus itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger*[J]. **Microbial Cell Factories**,2014,13(1):1-9.

[5] MEIJER S,OTERO J,OLIVARES R,et al. Overexpression of isocitrate lyase—glyoxylate bypass influence on metabolism in *Aspergillus niger*[J]. **Metabolic Engineering**,2009,11(2):107-116.

[6] OZEKI K,KYOYA F,HIZUME K,et al. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation [J]. **Biosci Biotechnol Biochem**,1994,58(12):2224-2227.

[7] LI J,ZHANG H,ZHANG Y,SHUANG B,et al. Construction of a foodgrade xylanase engineering strain of *Aspergillus niger*[J]. **Journal of Northeast Agricultural University**,2013,44(11):7-13.

[8] RUIJTER G,PANNEMAN H,VISSER J. Overexpression of phosphofructokinase and pyruvate kinase in citric acid-producing *Aspergillus niger*[J]. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects**,1997,1334(2):317-326.

[9] RUIJTER G J,PANNEMAN H,XU DB,et al. Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of *citA* overexpression on citric acid production[J]. **FEMS Microbiology Letters**,2000,184(1):35-40.

[10] MEIJER S,NIELSEN M L,OLSSON L,et al. Gene deletion of cytosolic ATP:citrate lyase leads to altered organic acid production in *Aspergillus niger*[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,2009,36(10):1275-1280.

[11] Van der Straat L,Tamayo-Ramos JA,Schonewille T,et al. Overexpression of a modified 6-phosphofructo-1-kinase results in an increased itaconic acid productivity in *Aspergillus niger*[J]. **AMB Express**,2013,3(1):57.

[12] PEDERSEN H,CHRISTENSEN B,HJORT C,et al. Construction and characterization of an oxalic acid nonproducing strain of *Aspergillus niger*[J]. **Metabolic Engineering**,2000,2(1):34-41.

[13] CHIU W,NIWA Y,ZENG W,et al. Engineered GFP as a vital reporter in plants[J]. **Current Biology**,1996,6(3):325-330.

[14] HAMLYN P F,BRADSHAW R E,MELLON F M,et al. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,1981,3(4):321-325.

[15] 姚婷婷,王正祥. 黑曲霉原生质体的制备、再生及转化条件[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(4):116-120.
YAO Tingting,WANG Zhengxiang. Preparation,regeneration and transformation of *Aspergillus niger* protoplasts [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2006,25(4):116-120.(in Chinese)

[16] PEBERDY J,BUCKLEY C,DALTREY DC,et al. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi [J]. **Transactions of the British Mycological Society**,1976,67(1):23-26.

[17] DAS A,GOKHALE D,PEBERDY J. Protoplast fusion and genetic recombination in intra-and interstrain crossing in *Aspergillus niger*[J]. **Enzyme and Microbial Technology**,1989,11(1):2-5.

[18] PEREZ Silva RM,Abalos Rodriguez A,Gomez Montes De Oca JM,et al. Biosorption of chromium,copper,manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum[J]. **Bioresource Technology**,2009,100(4):1533-1538.

[19] NETIKetik A,TORRES N V,RIOL J-M,et al. Uptake and export of citric acid by *Aspergillus niger* is reciprocally regulated by manganese ions[J]. **Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Biomembranes**,1997,1326(2):287-294.

[20] PAPAGIANNI M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*:biochemical aspects,membrane transport and modeling[J]. **Biotechnology Advances**,2007,25(3):244-263.

[21] JANSE C J,Franke-Fayard B,WATERS A P. Selection by flow-sorting of genetically transformed,GFP-expressing blood stages of the rodent malaria parasite,*Plasmodium berghei*[J]. **Nature Protocols**,2006,1(2):614-623.

[22] ZHANG J,MAO Z,XUE W,et al. Ku80 gene is related to non-homologous end-joining and genome stability in *Aspergillus niger* [J]. **Current Microbiology**,2011,62(4):1342-1346.

[23] MEYER V,ARENTSHORST M,El-Ghezal A,et al. Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger* kusA mutant[J]. **Journal of Biotechnology**,2007,128(4):770-775.