RNA 干扰技术降低黑曲霉细胞工厂的内源蛋白背景

银超，王云艳，何攀，陈婧，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：利用 RNA 干扰技术（RNA interference，RNAi）改造黑曲霉细胞工厂，减少其内源蛋白表达背景。研究 RNAi 载体中反向互补片段特异性对 RNA 干扰的影响，同步干扰糖化酶基因 glaA、淀粉酶基因 amyA 及蛋白酶调控因子基因 prtT，并利用经 RNA 干扰改造的黑曲霉宿主 SH-2 表达异源脂肪酶基因 tll。研究结果表明，不同长度的靶基因反向互补片段表现出不同程度的 RNA 干扰效应，载体 pAMDS-RNAi-glaA388 对糖化酶的干扰效果（94.40%）比载体 pAMDS-RNAi-glaA784（70.60%）好；经三基因 RNAi 载体 pAMDS-multi-RNAi 改造的黑曲霉菌株中 glaA、amyA、prtT 的表达量仅为原始菌株的 5.30%、17.10%和 34.60%；利用经三基因 RNAi 载体改造的黑曲霉菌株表达脂肪酶 tll，最高酶活达到 97.27 U/mL，比利用原始菌株表达 tll 的最高酶活（73.05 U/mL）提高 33.16%。因此，RNAi 技术可以有效降低黑曲霉宿主内源蛋白的表达背景，有利于提高外源基因在黑曲霉细胞工厂中的表达水平和稳定性。

关键词：RNA 干扰技术；黑曲霉；细胞工厂；糖化酶；淀粉酶

文章篇号：1673-9078(2014)5-178-184

Reducing the Endogenous Protein Background of *Aspergillus niger* Cell Factory by RNA Interference Technology

YIN Chao, WANG Yun-yan, HE Pan, CHEN Jing, WANG Bin, PAN Li

(Guangdong Province Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) technology was used to modify *Aspergillus niger* cell factory by reducing the expression level of its endogenous proteins. The effect of the specificity of reverse complementary sequence on RNA interference was investigated. Simultaneous interference of glucoamylase gene *glaA*, amylase gene *amyA* and protease regulator gene *prtT* was conducted in *A. niger* SH-2, and heterologous lipase *tll* was expressed in the RNAi-modified *A. niger* SH-2 host. Results illustrated that the reverse complementary sequence of different lengths exhibited RNA interference effect in different extent. RNAi vector pAMDS-RNAi-glaA388 with short reverse complementary sequence owned better interference effect (94.40%) than RNAi vector pAMDS-RNAi-glaA784 with long reverse complementary sequence (70.60%). Simultaneous interference of the three genes by pAMDS-multi-RNAi resulted in reduced expression of *glaA* (5.30%), *amyA* (17.10%) and *prtT* (34.60%) in *A. niger* SH-2. The expression of lipase *tll* in such RNAi-modified *A. niger* SH-2 reached the highest lipase activity of 97.27 U/ml, which was improved by 33.16% compared to *tll* expression in wild *A. niger* SH-2 (73.05 U/mL). Thus, RNAi technology could effectively reduce the expression background of endogenous proteins in *A. niger* SH-2, and could improve the expression level and stability of heterologous genes in *A. niger* cell factory.

Key words: RNA interference; *Aspergillus niger*; cell factory; glucoamylase; amylase

丝状真菌黑曲霉具有强大的蛋白表达、分泌能力，可以产生大量的糖类、蛋白质的分解酶类[1]，在酿造食品、污水处理、基因工程等方面发挥了重要作用。黑曲霉具有以下特点：（1）生长速率快；（2）对蛋白质能进行适当的糖基化等翻译后修饰；（3）已获得具有高效诱导转录起始的启动子glaA[2]；（4）黑曲霉是已认定的GRAS（Generally ragarded as safe）安全菌株。以上特点使得黑曲霉作为细胞工厂生产同源、异源蛋白具有诱人的前景[3~4]。

利用黑曲霉作为蛋白生产的细胞工厂的最大问题是其自身能够表达大量糖类、蛋白质的分解酶。例如，黑曲霉具有至少 2 个拷贝的糖化酶基因glaA和 4 个拷贝的淀粉酶基因amyA[5]。大量存在的糖化酶和淀

收稿日期：2014-01-19

基金项目：国家高技术研究发展（863）计划项目（2012AA022108）；广东省广州市高新区发展引导专项（2012B010900028）；华南理工大学广东省发酵与酶工程重点实验室开放基金项目（FJ2013005）

作者简介：银超（1986-），男，硕士研究生，研究方向：丝状真菌基因工程

通讯作者：潘力（1967-），男，博士，教授，主要从事工业微生物遗传生理及应用研究

粉酶使得目的蛋白的分离纯化耗费巨大，而且影响产品的纯度。而蛋白酶的存在则容易使目的蛋白降解，产品保质期大大缩短。因此，通过同源基因重组敲除黑曲霉的糖类、蛋白质分解酶基因，是改造黑曲霉细胞工厂的重要途径[6~7]。

然而，黑曲霉中基于同源重组的基因敲除效率很低，大多数的重组事件发生在随机的非同源位点，使得通过基因敲除降低黑曲霉自身蛋白的表达背景十分困难。相对于基因敲除，RNA干扰（RNA interference，RNAi）技术通过内源性或外源性的反向重复双链RNA介导细胞内mRNA发生特异性降解，实现对靶基因表达的调控[8]。例如，Qin L.N.等利用RNAi技术抑制了里氏木霉纤维二糖水解酶Ⅰ（CBH I）的表达，同时提高了其中外源脂肪酶的表达量达 2.2 倍[9]。RNAi技术具有通用性强、快捷简便、靶向性高等特点，在植物、动物基因工程中应用广泛[10~11]。本研究利用RNAi技术改造丝状真菌的外源基因表达系统，研究了反向互补片段特异性对RNAi效果的影响，构建了包含glaA、amyA、胞外蛋白酶调控因子基因prtT三个基因的RNAi载体，实现了对上述三个基因的同步干扰，并利用经RNAi改造后的黑曲霉宿主表达异源脂肪酶基因tll，以评估RNAi技术改造黑曲霉宿主的效果和可行性。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 微生物菌种和培养条件

大肠杆菌菌株 Match1 T1 和 ccdB survival 感受态细胞用于质粒构建，购于 Invitrogen 公司；黑曲霉 *Aspergillus niger* SH-2，本实验室保存；pHGW 质粒：由比利时 VIB Department of Plant Systems Biology，Ghent University 惠赠；质粒 pPTRI 和 pUC119，购自 TaKaRa 公司。YPD 培养基：1 L 培养基中含有葡萄糖 20 g，酵母提取物 10 g，胰蛋白胨 20 g，pH 5.5；CD-acetamide 培养基（筛选培养基）：1 L 培养基中含有葡萄糖 20.00 g，乙酰胺（acetamide）0.60 g，KCl 0.50 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50 g，KH_2PO_4 1.00 g，$FeSO_4 \cdot 12H_2O$ 0.01 g，琼脂 20.00 g，pH 5.5。

1.1.2 试剂

Gateway 载体构建试剂盒，Invitrogen 公司（下文中 attR1、attR2、attB1、attB2 是载体构建所需要的 Gateway 重组位点）；PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒、SYBR Green 试剂盒、pSIMPLE-18 *Eco*R V/BAP Vector、PCR 试剂盒等分子生物学试剂，宝生物工程（大连）有限公司；限制酶，美国 Fermentas 公司；胰蛋白胨、酵母提取物，英国 OXOID 公司；乙酰胺，sigma 公司；纤维素酶 R-10、溶菌酶、聚乙二醇（PEG）、氯化钙，北京普博欣公司。

1.2 仪器与设备

高速冷冻台式离心机，德国 Heraeus Sepatech 公司；霉菌培养箱 MJP-450D，上海森信实验仪器有限公司；蛋白电泳仪、核酸水平电泳仪、核酸凝胶成像分析系统，美国 Bio-RAD 公司；Mastercycler 梯度 PCR 仪，德国 Eppendorf 公司；Applied Biosystems7500 荧光 PCR 仪，美国 ABI 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒构建

1.3.1.1 RNA 干扰骨架质粒

提取米曲霉 *Aspergillus oryzae* RIB40 基因组 DNA 作为模板，通过引物 Intron-F、Intron-R 扩增米曲霉 amyB 基因第八个内含子序列（质粒构建的所有引物见表 1），将扩增出的内含子序列连接到 pSIMPLE-18 *Eco*R V/BAP Vector 上获得 pSIMPLE18-intron。以 pHGW 质粒为模板（图 1），通过引物 ccdB-F、ccdB-R 扩增带有 LR 反应位点 attR1 和 attR2 的大肠杆菌毒蛋白基因 R1-ccdB-R2，用 FastDigest *Hind*Ⅲ切割 ccdB 扩增片段、pSIMPLE18-intron 载体后用高效连接液 Solution Ⅰ（TaKaRa 公司）连接，转化大肠杆菌 ccdB survival，筛选 intron-R2ccdBR1 转化子，记作 pSIMPLE18-intron-R2ccdBR1。以 *A. oryzae* RIB40 基因组 DNA 作为模板，通过引物 TagdA-F、TagdA-R 扩增米曲霉 agdA 基因终止子序列记为 TagdA。FastDigest *Spe* Ⅰ、FastDigest *Sac* Ⅰ切割 pHGW 质粒、TagdA 扩增片段后纯化、连接，转化大肠杆菌 ccdB survival 获得转化子，记作 pHGW-R1ccdBR2-TagdA。

FastDigest *Spe* Ⅰ切割质粒 pSIMPLE18-intron-R2ccdBR1，回收 intron-R2ccdBR1 片段。FastDigest *Spe* Ⅰ切割 pHGW-R1ccdBR2-TagdA 线性化后，与 intron-R2ccdBR1 片段连接，转化大肠杆菌 ccdB survival，筛选片段顺序为 intron、R2ccdBR1、TagdA 的转化子，记作 pHGW-2ccdB-TagdA。

FastDigest *Xba* Ⅰ和 FastDigest *Sac* Ⅰ切割质粒 pHGW-2ccdB-TagdA，回收 2ccdB-TagdA 片段，T4 polymerase（TaKaRa 公司）处理 2ccdB-TagdA 片段使其成为平末端。质粒 pPTRI（图 1）经 FastDigest *Sma* Ⅰ线性化后与平末端的 2ccdB-TagdA 片段连接，转化大肠杆菌 ccdB survival，筛选 TagdA 方向与 lacZ 方向

相反的转化子，记作 pPTRI-2ccdB-TagdA。以黑曲霉 *A. niger* SH-2 基因组 DNA 为模板，通过引物 PgpdA-F、PgpdA-R 扩增 gpdA 基因启动子序列，记作 PgpdA。PgpdA 扩增片段、pPTRI-2ccdB-TagdA 经 FastDigest *Kpn* Ⅰ切割后连接，转化大肠杆菌 ccdB survival，筛选 PgpdA 与 lacZ 方向相反的转化子，记作 pPTRI-PgpdA-2ccdB-TagdA。

以构巢曲霉 *A. nidulans* FGSC A4 基因组 DNA 为模板，通过引物 amdS-F、amdS-R 扩增构巢曲霉乙酰胺酶基因 amdS。T4 PNK 酶处理 amdS 扩增片段使其 5’端磷酸化。FastDigest *Nde* Ⅰ和 FastAP 处理质粒 pPTRI-PgpdA-2ccdB-TagdA，使其线性化和末端去磷酸化。T4 Polymerase 处理线性化和去磷酸化后的质粒片段，使其成为平末端。磷酸化后的 amdS 片段与末端去磷酸化和平端化的线性质粒连接，转化大肠杆菌 ccdB survival，筛选 amdS 与 lacZ 方向一致的转化子，获得 RNAi 骨架质粒 pAMDS-RNAi（图 1）。

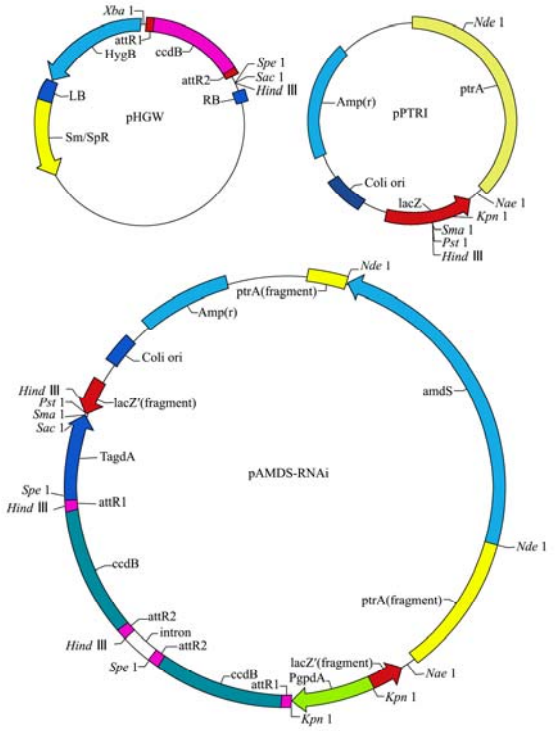


图 1 黑曲霉 RNA 干扰载体构建示意图

Fig.1 The construction depiction of *A. niger* RNA interference vector

1.3.1.2 单基因干扰质粒构建

以黑曲霉 *A. niger* SH-2 基因组 DNA 为模板，通过引物 388bp-F、388bp-R 扩增黑曲霉糖化酶基因 glaA 长度为 388 bp 的外显子序列片段，记为 attB1-388bp-attB2。attB1-388bp-attB2 片段与质粒 pDONOR221（Gateway 试剂盒，Invitrogen）在 BP Clonase（Gateway 试剂盒）的作用下发生 BP 反应将 attB1-388bp-attB2 克隆到 pDONOR221 载体上，转化大肠杆菌 Match1T1，记作 pDONOR221-388bp。质粒 pDONOR221-388bp 与质粒 pAMDS-RNAi 在 LR Clonase（Gateway 试剂盒）作用下发生 LR 反应将 attB1-388bp-attB2 克隆到 RNAi 载体 pAMDS-RNAi 上，转化大肠杆菌 Match1T1，获得带有反向重复序列（388 bp 片段）的 RNA 干扰载体 pAMDS-RNAi-glaA388。同样的方法，将利用引物 784bp-F、784bp-R 扩增到的 glaA 基因长度为 784bp 的外显子序列片段 attB1-784bp-attB2 克隆到 RNA 干扰载体 pAMDS-RNAi 上，获得获得带有反向重复序列（784bp 片段）的 RNAi 载体 pAMDS-RNAi-glaA784（图 2）。

1.3.1.3 多基因干扰质粒 pAMDS-multi-RNAi 构建

以黑曲霉 *A. niger* SH-2 基因组 DNA 为模板，通过引物 amyA-F、amyA-R；glaA-F、glaA-R；prtT-F、prtT-R 扩增淀粉酶基因 amyA、糖化酶基因 glaA 和蛋白酶转录因子基因 prtT 的序列片段，通过重叠 PCR 技术将三个片段融合在一起，记作 attB1-multi-attB2。将 attB1-multi-attB2 片段克隆到质粒 pAMDS-RNAi，获得同时对三个基因进行 RNA 干扰的载体 pAMDS-multi-RNAi（图 2）。

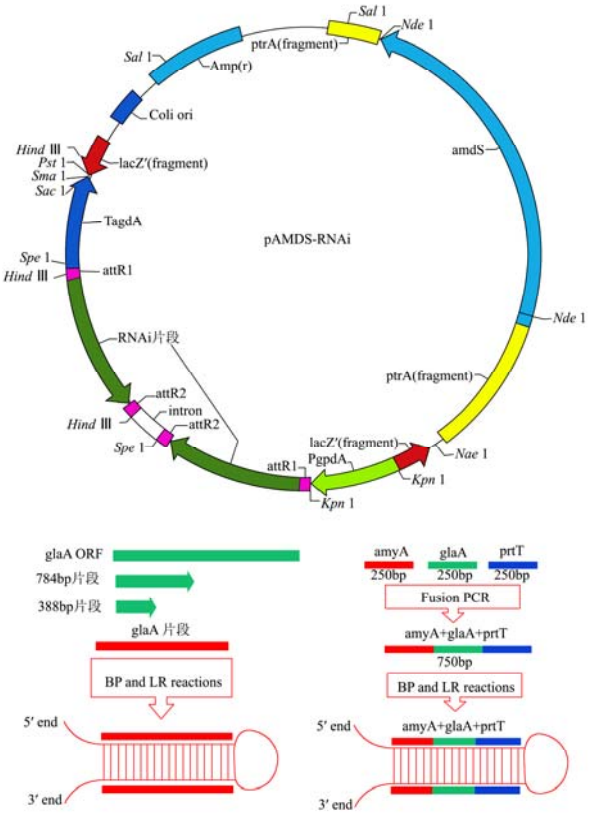


图 2 黑曲霉单基因（*glaA*）、三基因（*amyA*、*glaA*、*prtT*）RNAi 载体构建示意图

Fig.2 The construction depiction of *A. niger* RNAi vector for single gene (*glaA*) and triple genes (*amyA*, *glaA*, *prtT*)

表 1 构建 RNA 干扰载体所用的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for RNAi vector construction

引物名称	引物序列（5'→3'）	备注
PgpdA-F	CGGGGTACCAATAAGAATGGGGAAGGCGA	*Kpn* Ⅰ（下划线）
PgpdA-R	CGGGGTACCTGTTTAGATGTGTCTATGTGGCG	*Kpn* Ⅰ（下划线）
Intron-F	ACTAGTGTAAGCACAACCTCTAAGCATA	*Spe*I（阴影）
Intron-R	ACTAGTAAGCTTCTGTATTGCCAGTGATTAGTCTCTT	*Spe*I（阴影）、*Hind*Ⅲ（下划线）
ccdB-F	AAGCTTACAAGTTTGTACAAAAAAGCT	*Hind*Ⅲ（下划线）
ccdB-R	AAGCTTTGATATCACCACTTTGTACAA	*Hind*Ⅲ（下划线）
TagdA-F	ACTAGTTGAAGGAAGCGTAACAGGATAGC	*Spe*I（下划线）
TagdA-R	GAGCTCGGCAGTAACCCATTCCCG	*Sac*I（下划线）
amdS-F	GGCCCTGAAGGTCGGA	
amdS-R	TACTGATGTCTATTGGAAGAAAACT	
784bp-F	attB1-CAGGGTTGGCAAATGTGA	
784bp-R	attB2-CTTCCCAGGAGGGTGTTT	
388bp-F	attB1-CAGGGTTGGCAAATGTGA	
388bp-R	attB2-CAAGAACCAGTGTAGGCAG	
amyA-F	attB1-TTACACCAACGACATAGCCCT	
amyA-R	GATGGCAGTAGGTCACGAATCCTGTATCTTTG	
glaA-F	ATTCGTGACCTACTGCCATCCTGAATAACATCG	
glaA-R	GTCCACGGTTCCTGGGCGGAGATGTAGTTC	
prtT-F	TCCGCCCAGGAACCGTGGACGAGATCAAATA	
prtT-R	attB2-AAGCGGTCGGTCGTTTCA	

1.3.1.4 耐热脂肪酶 tll 表达质粒 pUC119-PglaA-TLL-TglaA 的构建

以黑曲霉 *A. niger* SH-2 基因组 DNA 为模板，通过引物 PglaA-F、PglaA-R；TglaA-F、TglaA-R；Sig-F、Sig-R（表 2）分别扩增糖化酶基因 glaA 的启动子序列 PglaA、终止子序列 TglaA 和 Kozak-信号肽融合序列 Sig。以经过密码子优化的 tll 基因序列为模板，通过引物 tll-F、tll-R 扩增耐热脂肪酶基因 tll。利用重叠 PCR 技术将 PglaA 片段、TglaA 片段融合获得 PglaA-TglaA 片段，将 tll 片段和 Sig 片段融合获得 tll-Sig 片段。将 PglaA-TglaA 片段连接到经过 *Sma* Ⅰ切割和 FastAP 去磷酸化处理的 pUC119 质粒上。最后利用平末端限制酶 *Pvu* Ⅱ将融合片段 tll-Sig 插入 PglaA、TglaA 之间，获得耐热脂肪酶 tll 的表达质粒 pUC119-PglaA-TLL-TglaA。

表 2 构建耐热脂肪酶 tll 表达载体所用的 PCR 引物

Table 2 PCR primers for *tll* expression vector construction

引物名称	引物序列（5'→3'）
PglaA-F	GCTCTAGAGCTCCGCAACGGGACATATGAGTT
PglaA-R	GTCTCGAGGTCGACCAGCTGTGCTGAGGTGTAATGATGCTGGG (*Pvu* Ⅱ)
TglaA-F	CACAGCTGGTCGACCTCGAGACAATCAATCCATTTCGCTATAGTT (*Pvu* Ⅱ)
TglaA-R	CCCAAGCTTCATCCGTGAGAATGAAGAGGAAG
Sig-F	CACCTCAGCAATGTCGTTCCGATCTCTACTCGCCCTGAGCGGCCTCTGTCT
Sig-R	CAGAACGAGCGACGAACGCATTGCCAACCCTGTGCAGACGAGGCCGCTCA
tll-F	ATGCGTTCGTCGCTCGTTCTG
tll-R	TCAGTGATGATGATGATGATGGAGG

1.3.2 黑曲霉转化

黑曲霉的转化方法参考Punt等人的原生质体转化方法[12]。质粒 pAMDS-RNAi-glaA388、pAMDS-RNAi-glaA784、pAMDS-multi-RNAi经*Sal* Ⅰ酶切除去与大肠杆菌相关的序列后分别转化黑曲霉SH-2。通过CD-acetamide培养基筛选转化子，利用引物PgpdA-F、

388bp-R；PgpdA-F、784bp-R；PgpdA-F和gla-R进行PCR扩增分别验证pAMDS-RNAi-glaA388 8、pAMDS-RNAi-glaA784、pAMDS-multi-RNAi的黑曲霉转化子。

1.3.3 SDS-PAGE 电泳检测转化子胞外分泌蛋白图谱

将黑曲霉转化子接种到含有1%葡萄糖和1%麦芽糖的50 mL YPD培养基（500 mL三角摇瓶）中，250 r/min，30 ℃培养3 d后取样，1200 g离心5 min。取发酵液上清进行SDS-PAGE蛋白电泳，考马斯亮蓝染色、脱色后扫描成像。

1.3.4 实时荧光定量PCR（qRT-PCR）检测基因表达

黑曲霉野生型菌株SH-2、转化子培养所得菌丝体通过抽滤、洗涤，利用液氮冷冻后研磨成粉，加入Trizol试剂（TaKaRa公司），并抽提样品总RNA。利用生物分光光度计测定RNA样品的浓度（OD_{260}）、纯度（OD_{260}/OD_{280}）。利用PrimeScript RT reagent Kit试剂盒，进行反转录合成cDNA。然后，利用Applied Biosystems7500荧光PCR仪和SYBR Green试剂盒，对转化子中靶基因的转录表达进行检测，三磷酸甘油醛脱氢酶基因gapdh作为内参基因，每个样品设置三个平行实验。

1.3.5 耐热脂肪酶的酶活测定

采用橄榄油乳化液法测定耐热脂肪酶酶活，反应温度为60 ℃，pH为8，反应时间10 min。酶活单位：每分钟水解脂肪生成1 μmol脂肪酸所用的酶量为1个酶活单位（U）。

2 结果与讨论

2.1 靶基因反向互补片段对RNA干扰效率的影响

质粒pAMDS-RNAi含有两个反向互补的ccdB毒蛋白基因序列（图1），在LR反应过程中两个ccdB基因同时被靶基因的反向互补片段替换，获得靶基因的RNA干扰载体。RNA干扰载体在黑曲霉转化子中转录形成含有反向互补片段的双链RNA，随后被Dicer酶切割形成小干扰RNA（Small interfering RNA，siRNA），指导靶基因的转录后沉默。

RNA干扰载体pAMDS-RNAi-glaA388、pAMDS-RNAi-glaA784分别含糖化酶基因glaA编码区长度为388 bp和784 bp的序列片段。qRT-PCR检测表明（图3a），pAMDS-RNAi-glaA388、pAMDS-RNAi-glaA784转化子中glaA基因的mRNA水平分别比原始菌株（黑曲霉SH-2）减少94.40%和70.60%。因此，两种含有不同长度的反向互补片段的RNA干扰载体转化黑曲霉SH-2后，glaA基因转录得到的mRNA均被部分降解。转化子培养液上清的SDS-PAGE电泳分析表明（图3b），RNA干扰转化子的糖化酶含量（100 KD~150 KD之间的蛋白条带，已经质谱鉴定，结果未公布），较原始菌株低。而且，pAMDS-RNAi-glaA388转化子的糖化酶含量比pAMDS-RNAi-glaA784转化子低。SDS-PAGE结果与qRT-PCR的结果一致。

以上结果表明，在RNA干扰过程中靶基因反向互补片段并不是越长越好，388 bp的靶基因片段能高效地降低靶基因的mRNA水平。不同长度的靶基因片段的RNA干扰转化子表现出不同程度的RNA干扰效应，可能与靶基因片段在转录成RNA后形成的高级结构有关，也可能与RNA干扰载体在宿主基因组中的整合位点有关。

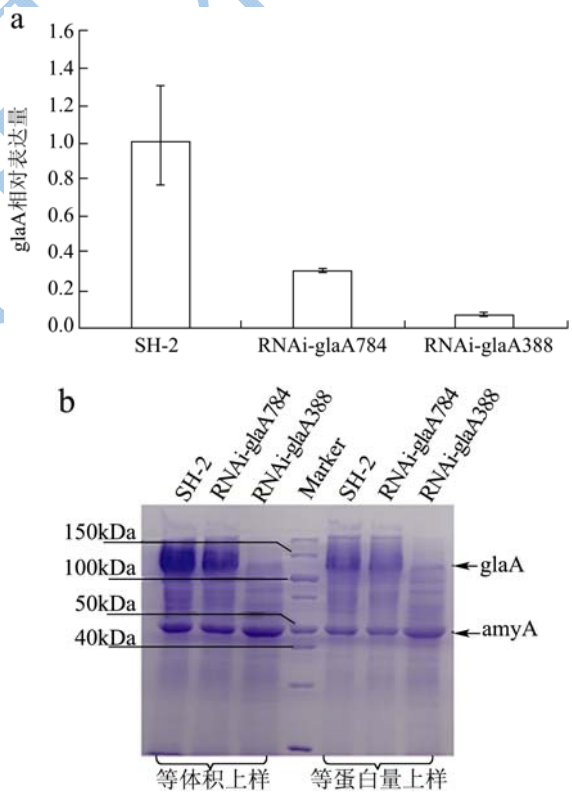


图3 RNA干扰黑曲霉SH-2糖化酶基因*glaA*的检测

Fig.3 RNA interference of *glaA* in *A. niger* SH-2. (A) qRT-PCR analysis. (B) SDS-PAGE analysis

2.2 RNAi技术同步干扰多个靶基因的转录表达

多基因干扰载体pAMDS-multi-RNAi的反向互补

序列由 amyA、glaA、prtT 三个靶基因的序列片段拼接而成（长度分别为 238 bp、212 bp、256 bp），通过 Dicer 酶切割产生的含有三个靶基因反向互补序列的 siRNA 同步干扰三个靶基因的转录表达。糖化酶、淀粉酶是黑曲霉 SH-2 表达量最大的两种胞外蛋白，prtT 基因编码黑曲霉胞外蛋白酶的调控因子，降低这三个基因的转录水平，可以有效降低黑曲霉的自身蛋白表达背景，同时减少胞外蛋白酶的表达，有利于外源基因在黑曲霉细胞工厂中的高效表达和维持稳定。

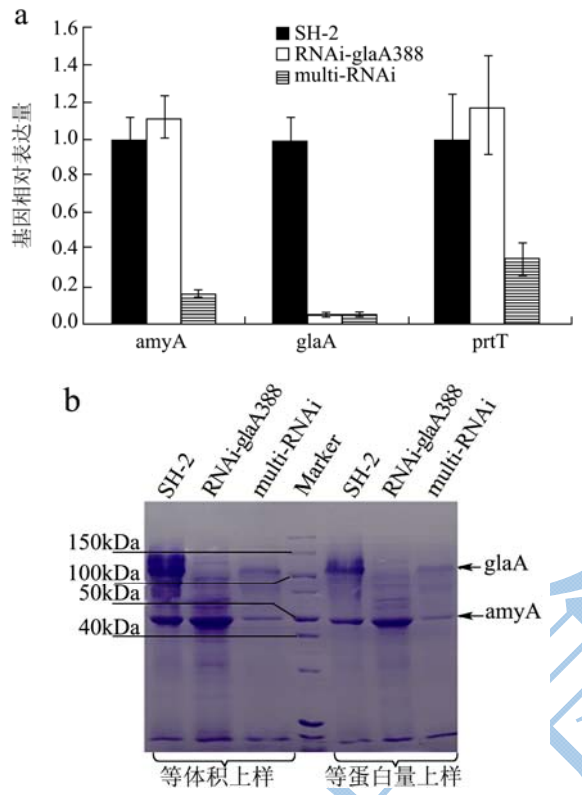


图 4 RNAi 技术同步干扰 *amyA*、*glaA*、*prtT* 三个基因的转录表达

Fig.4 Simultaneous interference of *amyA*, *glaA* and *prtT* in *A. niger* SH-2 by RNAi technology

Note: (a) qRT-PCR analysis, (b) SDS-PAGE analysis.

qRT-PCR 分析表明（图 4a），与原始菌株黑曲霉 SH-2 相比，pAMDS-RNAi-glaA388 转化子和 pAMDS-multi-RNAi 转化子的 glaA 基因的表达量显著降低。对于 pAMDS-multi-RNAi 转化子，glaA 基因的表达量是原始菌株的 5.30%，amyA 基因的表达量是原始菌株的 17.10%，prtT 基因的表达量是原始菌株的 34.60%。在 pAMDS-multi-RNAi 转化子中，不同靶基因的 RNA 干扰效果表现出较大的差异，这可能与靶基因片段的特异性以及形成的反向互补双链 RNA 的转录后加工有关。SDS-PAGE 电泳结果表明（图 4b），与原始菌株相比，pAMDS-multi-RNAi 转化子的糖化酶 glaA 和淀粉酶 amyA 的表达量均降低，这说明通过 RNA 干扰技术可以有效降低它们的 mRNA 水平，从而导致黑曲霉蛋白表达背景的降低，这与 qRT-PCR 的结果是一致的。

对于 pAMDS-RNAi-glaA388 转化子，glaA 的表达水平由于 RNA 干扰效应降低后，其他基因（amyA、prtT）的表达水平反而升高了，这说明降低 glaA 的表达水平有利于其他基因的表达，为在经 RNAi 改造的黑曲霉宿主中表达外源蛋白提供了一定的启发。

2.3 多基因 RNA 干扰对黑曲霉 SH-2 表达异源耐热脂肪酶 tll 的影响

耐热脂肪酶 tll 来自于疏棉状嗜热丝胞菌，经过密码子优化后在黑曲霉 SH-2 中分泌表达。以耐热脂肪酶表达质粒 pUC119-PglaA-TLL-TglaA 为模板，通过引物 PglaA-F、TglaA-R 扩增耐热脂肪酶的表达框 PglaA-TLL-TglaA。以质粒 pAMDS-RNAi 为模板，通过引物 amdS-F、amdS-R 扩增乙酰胺酶基因 amdS。耐热脂肪酶表达框 PglaA-TLL-TglaA、乙酰胺酶基因 amdS 共转化黑曲霉 SH-2 菌株，筛选获得表达耐热脂肪酶 tll 的转化子。转化子培养液上清的脂肪酶 tll 活力达到 73.05 U/mL、50.36 U/mL、43.48 U/mL。

耐热脂肪酶表达框 PglaA-TLL-TglaA，与线性化的去除大肠杆菌相关序列的多基因 RNA 干扰质粒 pAMDS-multi-RNAi 共转化黑曲霉 SH-2 菌株，筛选获得含有耐热脂肪酶 tll 表达框和多基因 RNA 干扰载体的转化子。随机挑取四个转化子进行培养，培养液上清的脂肪酶 tll 活力达到 63.15 U/mL、82.63 U/mL、39.87 U/mL 和 97.27 U/mL。

酶活检测结果表明，经过多基因RNA干扰改造不会抑制黑曲霉SH-2 表达异源耐热脂肪酶tll。经过改造的黑曲霉表达耐热脂肪酶tll的最高酶活为 97.27 U/mL，比未经RNA干扰改造的宿主表达tll的最高酶活（73.05 U/mL）提高 33.16%。耐热脂肪酶表达框、amdS 片段以及多基因RNA干扰载体均是随机插入宿主细胞的基因组中的，因此无法严格确定多基因RNA干扰是否对耐热脂肪酶表达有促进作用。从菌种选育的角度来看，多基因RNA干扰改造后的宿主有利于获得产酶能力更强的工程菌株。文献报道RNA干扰里氏木霉的CBHI基因可以提高异源脂肪酶的表达量[9]。SDS-PAGE结果表明（图 5），多基因RNA干扰后的黑曲霉菌株在表达耐热脂肪酶的过程中，内源外分泌蛋白背景相对于原始菌株黑曲霉SH-2 低很多，这有利于减少菌株的能量消耗和营养消耗，提高异源蛋白的表达水平，并简化目的蛋白的分离纯化。

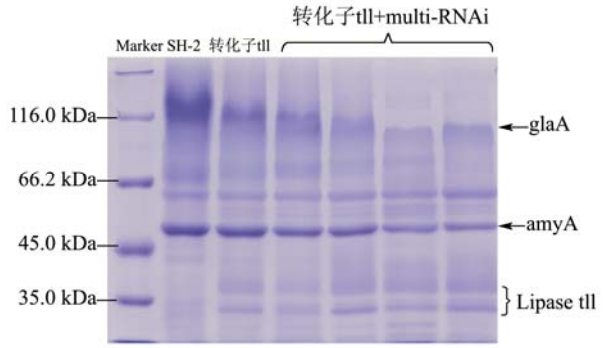


图 5 RNA 干扰对黑曲霉 SH-2 表达异源耐热脂肪酶 tll 的影响

Fig.5 The influence of RNA interference on the expression of heterologous heat-stable lipase *tll* in *A. niger* SH-2

3 结论

本研究利用 RNA 干扰技术改造黑曲霉细胞工厂。荧光定量 PCR 与 SDS-PAGE 蛋白电泳检测结果表明，不同长度的靶基因反向互补片段表现出不同程度的 RNA 干扰效应，载体 pAMDS-RNAi-glaA388 对糖化酶的干扰效果（94.40%）比载体 pAMDS-RNAi-glaA784（70.60%）好。经三基因 RNAi 载体 pAMDS-multi-RNAi 改造的黑曲霉菌株中 glaA、amyA、prtT 的表达量仅为原始菌株的 5.30%、17.10%和 34.60%，有效降低了黑曲霉内源蛋白的表达水平。利用经三基因 RNAi 载体改造的黑曲霉菌株表达脂肪酶 tll，最高酶活达到 97.27 U/mL，比利用原始菌株表达 tll 的最高酶活（73.05 U/mL）提高 33.16%，说明 RNA 干扰改造后的菌株具有更强的产酶能力。综上所述，RNAi 技术可以有效降低黑曲霉宿主自身蛋白的表达背景，后续研究将利用抗生素抗性标记筛选能够稳定表达多个基因 siRNA 的黑曲霉菌株，这对于提高外源基因在黑曲霉细胞工厂中的表达水平、稳定性以及工业化生产的效率具有重要意义。

参考文献

[1] 谭海刚,李静,杨文浩.高产淀粉酶和蛋白酶的黑曲霉菌株的发酵条件优化[J].现代食品科技,2013,29(4):808-811
TAN Hai-gang, LI Jing, YANG Wen-hao. Optimization of fermentation conditions for the produciton of amylase and protease by a strain of *Aspergillus niger* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(4): 808-811

[2] James E, van Zyl W, van Zyl P, et al. Recombinant hepatitis B surface antigen production in *Aspergillus niger*: Evaluating the strategy of gene fusion to native glucoamylase [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(2): 385-394

[3] Verdoes JC, Punt PJ, Schrickx JM, et al. Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: Molecular genetic analysis of strains containing multiple copies of the glaA gene [J]. Transgenic Research, 1993, 2(2): 84-92

[4] Prathumpai W, Flitter SJ, McIntyre M, et al. Lipase ction by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(6): 714-719

[5] Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, et al. Genome encing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 [J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(2): 221-231

[6] Maruyama J, Kitamoto K. Multiple gene disruptions by marker recycling with highly efficient gene-targeting background (deltaligD) in *Aspergillus oryzae* [J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(10): 1811-1817

[7] 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

[8] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811

[9] Qin LN, Cai FR, Dong XR, et al. Improved production of heterologous lipase in *Trichoderma reesei* by RNAi mediated gene silencing of an endogenic highly expressed gene [J]. Bioresource Technology, 2012, 109: 116-122

[10] 赵臻,邱凯,蒯本科.人工 microRNA 干扰拟南芥 AtCDKC;1 和 AtCDKC;2 基因表达的初步研究[J].植物生理学通讯, 2010, 46(7):693-700
ZHAO Zhen, QIU Kai, KUAI Ben-ke. A preliminary analysis of artificial microRNAs-mediated interference of AtCDKC;1 and AtCDKC; 2 expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology Communications, 2010, 46(7): 693-700

[11] 陈杰民,兰军,涂昌,等.RNA 干扰 GPR14 对自发性高血压大鼠血压和心血管重构的影响[J].临床和实验医学杂志, 2012,11(1):1-3,6
CHEN Jie-min, LAN Jun, TU Chang, et al. Effects of RNA iInterference targeting GPR14 on blood pressure and cardiova scular remodeling in spontaneous hypertensive rats [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2012, 11(1): 1-3, 6

[12] Punt PJ, Oliver RP, Dingemanse MA, et al. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli* [J]. Gene, 1987, 56(1): 117-124

现代食品科技