



## 多靶向沉默里氏木霉碳代谢阻遏物对纤维素酶活性和表达的控制研究

邓嘉雯<sup>#</sup>, 高云雨<sup>#</sup>, 刘旭坤, 张珂珂, 钟路遥, 田生礼<sup>\*</sup>

深圳大学生命与海洋科学学院 深圳市微生物基因工程重点实验室, 广东 深圳 518052

**摘要:**【目的】构建多靶向 siRNA 表达载体对里氏木霉碳阻遏抑制因子 CRE1、CRE2、CRE3 和 CRE4 进行同时多靶向 siRNA 干扰, 以研究其对里氏木霉纤维素酶基因表达的调控作用。【方法】根据此前研究筛选出沉默 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因的 4 个最佳 siRNA 序列, 设计并构建了 A 多靶向表达载体, 另根据 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因中所含有的 5 个共有序列设计并构建了 B 多靶向表达载体, 将两者转化至里氏木霉 QM9414。经筛选后分别在 48 h 和 120 h 对各转化子进行纤维素酶活力测试(CMC 活力测试和滤纸酶活力测试)及利用 qPCR 检测相关基因的表达。【结果】通过 RT-qPCR 测定结果表明, 两种表达载体均可同时抑制里氏木霉的分解代谢物阻遏基因 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 的表达, 纤维素酶活力比出发菌株明显升高, 多靶向抑制菌株的 CMC 酶活和滤纸酶活比出发菌株平均提高了 1.95 倍和 2.66 倍。纤维素酶基因 *cbh1* 和 *egl1* 的表达水平比出发菌株也有明显提升, 平均提高了 3.83 倍和 3.95 倍。纤维素酶相关基因 *xyr1* 的表达水平与出发菌株相比也明显上升, 平均提高了 2.78 倍。【结论】多靶向沉默里氏木霉的碳代谢阻遏蛋白有利于解除葡萄糖效应, 提高非还原糖的利用, 从而提高纤维素酶的产量, 使纤维素酶的表达得到更大的提升, 为里氏木霉表达纤维素酶在分解代谢物阻遏基因调控方面提供了实验依据和新的技术思路。

**关键词:** 里氏木霉, RNA 干扰, 碳代谢阻遏物, 纤维素酶

里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)的无性型, 是一种重要的产纤维素酶的丝状真菌, 其广泛用于生产纤维素酶<sup>[1]</sup>。里氏木霉所产的纤维素酶是一种复杂的酶体系,

主要由 3 类酶组成: 内切葡聚糖酶(endo- $\beta$ -1,4-D-glucanase, EG)、外切葡聚糖酶(exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase, CBH)以及  $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase, BGL)。里氏木霉具有极强的合成和分泌蛋白的能

基金项目: 国家自然科学基金(31070044); 深圳市科技基础研究发展计划(ZYC201105130092A)

\*通信作者。Tel: +86-755-26534149; Fax: +86-755-26534274; E-mail: sltian@szu.edu.cn

<sup>#</sup>并列第一作者。

收稿日期: 2018-06-19; 修回日期: 2018-08-27; 网络出版日期: 2018-11-26

力, 其合成和分泌蛋白已经可以达到克级以上<sup>[2]</sup>, 主要生产纤维素酶和纤维二糖水解酶 I (CBH1), 表达量最高的菌株分泌的纤维素酶总量可达 100 g/L<sup>[3]</sup>。里氏木霉培养方法成熟, 产酶能力强, 而且安全, 对环境无损坏, 不会产生有毒的副产物。因此, 里氏木霉成为重组蛋白表达和生产的优良宿主, 可以通过基因工程等手段对里氏木霉纤维素酶基因进行调控, 以达到提高纤维素酶产量的目的<sup>[4]</sup>。里氏木霉的纤维素酶基因表达存在着一种效应, 当存在快速利用碳源如葡萄糖时, 纤维素酶基因的表达会受到抑制, 这种现象就是分解代谢物阻遏效应, 也称为碳阻遏效应<sup>[5-6]</sup>, 目前公开发表的阻遏蛋白是 CRE1、CRE2 和 ACE1。CRE1 是里氏木霉中介导葡萄糖分解代谢物阻遏作用的蛋白, 含有 2 个 Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> 锌指结构域, 并且参与了脯氨酸代谢、乙醇代谢、多糖水解等过程中的基因转录调控。除此之外, 参与里氏木霉碳源代谢阻遏的调控蛋白还包括 CRE2、CRE3 和 CRE4, 它们分别与构巢曲霉碳源代谢阻遏蛋白 CREA、CREB、CREC 和 CRED 具有较高的同源性<sup>[7-8]</sup>。CRE2 和 CRE3 分别与 CREB 和 CREC 高度同源, CREB 和 CREC 结合形成去泛素化复合蛋白, 使泛素化的蛋白质去泛素化, 使蛋白稳定<sup>[9]</sup>。Denton 敲除里氏木霉中 *creB* 的同源序列 *cre2*, 可以提高纤维素酶的产量<sup>[10]</sup>。CRED 参与对靶蛋白进行泛素化标记的过程, 与 CREB-CREC 复合物的去泛素化过程相反<sup>[7]</sup>。*creB* 和 *creC* 的基因突变可导致“碳抑制”的部分解除, 并影响一些其他基因的表达, 但不像 *creA* 的突变那样能引起严重的形态学改变。ACE1 是纤维素酶基因表达的转录抑制因子, 是含有 3 个 Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> 锌指结构域的 DNA 结合蛋白<sup>[11]</sup>, 在里氏木霉中敲除基因 *ace1*

后, 在含有纤维素和槐糖的培养条件下能够提高主要的纤维素酶基因和半纤维素酶基因的表达量<sup>[12]</sup>。

目前, RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi) 应用广泛, 该技术在丝状真菌如里氏木霉、康宁木霉中对基因进行调控已有较多的报道。在里氏木霉中进行 siRNA 干扰已经有了较为成熟的技术手段。例如使用发夹结构的 RNAi 技术成功将里氏木霉中高表达的基因 *cbh1* 和 *cel6a* 基因进行抑制<sup>[13]</sup>。但 RNAi 技术仍停留在单基因单抑制的水平上, 对于需要同时进行多基因共同作用的现象则难以发挥其功效。多靶向 RNAi 技术在治疗基因疾病上运用较多, 但在真菌中的应用较少, He 等<sup>[14]</sup>在里氏木霉中建立了包含 *trpC* 和 *rp2* 的反向双启动子系统同时抑制了靶基因和 eGFP 基因, 为里氏木霉多靶向 siRNA 提供了技术路线。本研究通过设计 2 种不同的多靶向干扰系统, 构建里氏木霉多靶向 siRNA 干扰载体, 对里氏木霉碳阻遏抑制因子 CRE1、CRE2、CRE3 和 CRE4 进行同时多靶向 siRNA 干扰, 探讨里氏木霉 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 同时沉默对纤维素酶基因的表达的影响, 为里氏木霉进一步基因调控提供了新的技术手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及质粒:** 大肠埃希菌 JM109 由本实验室保存, 里氏木霉 QM9414 菌株购自美国模式菌种收藏中心(ATCC); 质粒 pLXT 带有真菌筛选标记潮霉素 B 抗性基因(*hph*)和大肠埃希菌筛选标记氨苄青霉素抗性基因(*Amp*), 由本实验室构建及保存。

**1.1.2 培养基:** 里氏木霉液体基本培养基(g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4, 尿素 0.3,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.0016,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0017,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0037, 蛋白胨 2, 吐温-80 1, 葡萄糖 20。里氏木霉产酶培养基: 产酶培养基组分与基本培养基一致, 用微晶纤维素 20 g/L 代替葡萄糖作碳源。

**1.1.3 试剂:** 各种 DNA 工具酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 和 RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$  等均购自 TaKaRa 公司; DNA 胶回收纯化试剂盒、PCR 产物回收纯化试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 真菌总 RNA 提取试剂盒购自 Omega 公司; 反转录试剂盒(EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix)购自北京全式金生物技术有限公司; qPCR 试剂盒(Bestar<sup>®</sup>SybrGreen qPCR mastermix)购自 DBI Bioscience 公司; 溶壁酶(Lysing Enzyme from *Trichoderma harzianum*)购自 Sigma 公司; 潮霉素和氨基青霉素购自 Invitrogen 公司; 其他试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

**1.1.4 仪器:** 超净工作台(苏州净化设备总厂, SW-SJID); 高压自动灭菌锅(Hirayama, HVE-50); PCR 仪(ABI, 2720); 冷冻离心机(Thermo Scientific, Multifuge XIR); 荧光定量 PCR 仪(analytik jena, qTOWER3); NanoDrop2000 超微量分光光度计(Thermo Scientific, ND2000); pH 计(Mettler-Toledo, 320-S); 小型离心机(Eppendorf, Minispin); 电泳仪(Amersham Pharmacia, EPS-601); 水平电泳槽(北京六一, DYCP-31D); 核酸成像系统(BioRad, GEL DOX XR +); 高纯水仪(力新仪器有限公司, Heal force ROP3); 低温摇床(上海苏坤, SKY-200B); 低温培养箱(上海爱朗,

LTI-700)。

## 1.2 多靶向沉默片段的选择与合成

根据高云雨等<sup>[4]</sup>的研究, 已筛选出 *cre1* 中具有明确抑制效果的 siRNA 序列, 及经过本实验室此前的实验研究<sup>[15-17]</sup>已筛选出沉默 *cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因中具有最佳效果的 siRNA 序列。选择出 4 条 siRNA 序列, 见表 1。

确定了筛选的 siRNA 序列后, 需对其设计合理的表达系统, 从而形成一条反向重复长发夹结构的 DNA 片段。设计 A 和 B 两种表达系统, 这两种表达系统均采用反向重复序列, 前端序列与后端序列中间以无义序列作为 loop 连接, 在序列两端分别加上 *Not I* 和 *Afl II* 限制性内切酶位点。

A 载体为直接串联的各个优化选择的编码 siRNA 的寡核苷酸序列: *cre1*-T10、*cre2*-T15、*cre3*-T11 和 *cre4*-T2, 且已被证明是有效的 siRNA 序列。所以将 *cre1*-T10、*cre2*-T15、*cre3*-T11 和 *cre4*-T2 分别以 9 bp 的 loop 连接形成 1 个小的发夹结构, 将 4 个发夹结构按顺序分别以 23 bp 的无义序列连接并命名为 *cres*, 见图 1-A。

B 载体是根据 4 个 *cre* 基因的正义链之间使用 5 bp 共同序列作为缓冲序列连接, 当 Dicer 酶在体内切割该序列的时候, 无论以 19-24 bp 中任意位置切割, 切割出来的 siRNA 都具有很高的特异性,

表 1. 多靶向沉默碳代谢阻遏物 *cre* 基因的最佳序列  
Table 1. The best option of siRNA sequences for silencing *cre1*, *cre2*, *cre3* and *cre4*

Gene	siRNA name	Sequence (5'→3')
<i>cre1</i>	<i>cre1</i> -T10	GCATGTCACCTTACCGACAT
<i>cre2</i>	<i>cre2</i> -T15	AGCGTCATCAACTATCCAT
<i>cre3</i>	<i>cre3</i> -T11	CCAAGATGTCCATATTGAG
<i>cre4</i>	<i>cre4</i> -T2	GAAGACTTCATCGTCTTCC

能和靶基因完全匹配。参考 Cong 等的方法<sup>[18]</sup>寻找共同序列, 尽量选择符合 siRNA 设计原则的序列。将 4 个 *cre* 基因的 mRNA 序列输入网站(Invitrogen Block-iT RNAi Designer)进行 siRNA 靶序列的设计, 找出各个基因所有 25 bp 的 siRNA 序列, 通过比对寻找各基因的 siRNA 序列首尾是否有 5 bp 的共同序列, 将首尾有共同序列的 siRNA 片段进行连接, 连接结果如图 2 所示。将前端序列反向重复形成后端序列, 前端序列和后端序列之间加入 *Hap* I 限制性内切酶位点 GTTAAC 以及 *egl* 基因的内含子 2 的一段序列(agtgagtaccctgtttcctggtgtgctggctggtggcgggtatacagcgaagcggacgcaagaacaccg ccggtccgccaccatcaagatgtgggtgtaagcggcggtgtttgtaca actacgtgacagctcactcaggaaatgagaattaatggaagtctgttacag)

将前端序列和后端序列连接起来, 并命名为 *cre1423*。同理得到另一条长链 siRNA 命名为 *cre4132*。两条长链 siRNA 序列见表 2, 其表达系统模型示意图如图 1-B。

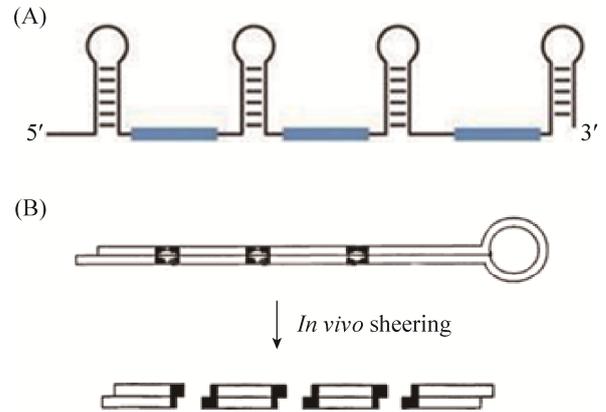


图 1. 多靶向 siRNA 表达系统示意图  
Figure 1. Multiple target siRNA expression system.

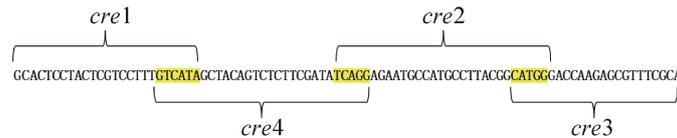


图 2. 表达系统中的 siRNA

Figure 2. The sequence of oligonucleotides coding for long siRNAs.

表 2. 合成的长链编码 siRNA 的寡核苷酸序列

Table 2. The sequence of oligonucleotides coding for long siRNAs

Name	Sequence	Expression system
CRES	<u>CTTAAGGCATGTC</u> ACTTACCGACATttcaagagaATGTCGGTAAGTGACATGCCAGCTT GACTAGATGATGACCTAAGCGTCATCAACTATCCATttcaagagaATGGATAGTTGATG ACGCTTCAATTACGTTCTACTGTCACTCTCCAAGATGTCCATAATTGAGttcaagagaCTC AATATGGACATCTTGGAGACTAGGGTGTACGCACTAGTGAAGACTTCATCGTCT TCC ttcaagagaGGAAGACGATGAAGTCTT TTTTTT <u>GCGGCCGC</u>	A
CRE1423	<u>CTTAAGGC</u> ACTCCTACTCGTCCTTTGTCATAGCTACAGTCTCTTCGATATCAGGAG AATGCCATGCCTTACGGCATGGTGACCAAGAGCGTTTCGCAGTTAACagtgagtaccctt gtttcctggtgtgctggctggtggcgggtatacagcgaagcggacgcaagaacaccg ccggtccgccaccatcaagatgtg gtgtaagcggcggtgtttgtacaactacgtgacagctcactcaggaaatgagaattaatggaagtctgttacagTGCGAAA CGCTCTTGGTACCATGCCGTAAGGCATGGCATTCTCCTGATATCGAAGAGACTG TAGCTATGACAAAGGACGAGTAGGAGTGC <u>GCGGCCGC</u>	B
CRE4132	<u>CTTAAGAGCGTCTCA</u> CTGGATCAGTCGCAGCCCCGGCATGTCACTTACCGACATC ACCAACCAAGCAAGATTACTTGACAAGCACTTTGTGCGCAATTTCTGTTAACagtga gtaccctgtttcctggtgtgctggctggtggcgggtatacagcgaagcggacgcaagaacaccg ccggtccgccaccatcaa gatgtgggtgtaagcggcggtgtttgtacaactacgtgacagctcactcaggaaatgagaattaatggaagtctgttacagAG AAATGCGCACAAAGTGCTTGTCAAGTAATCTTGCTTGGTTGGTGATGTCCGGTAA GTGACATGCCGGGGCTGCGACTGATCCAGTGAGACGCTTTTTTT <u>GCGGCCGC</u>	B

The lower case is loop and the single underlines are *Afl* II, *Hap* I and *Not* I restriction sites, respectively.

将设计好的序列送广州艾基生物技术有限公司进行合成, 将合成产物退火, 连接到 pUC19 质粒载体中, 分别为 pUC19-*cre*s、pUC19-*cre*1423、pUC19-*cre*4132。

### 1.3 多靶向沉默载体的构建

pLXT 载体(载体图谱见图 3)的特征是含有潮霉素抗性基因 *hph*, 丙酮酸脱羧酶启动子 *Ppdc* 和其终止子 *Tpdc*, 将该载体与目的基因重组后的重组质粒转化里氏木霉原生质体, 在选择培养平板上长出含有抗性基因的阳性转化子, 再通过 PCR 验证可大大减少筛选的工作量。该载体和质粒 pUC19-*cre*s、pUC19-*cre*1423、pUC19-*cre*4132 均通过限制性内切酶 *Afl* II 和 *Not* I 酶切后, 回收载体片段和相应目的基因片段, 用 T4 连接酶进行连接, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。构建成功的含有干扰多靶向 siRNA 基因的重组质粒, 提取质粒分别命名为 pLXT-*cre*s、pLXT-*cre*1423 和 pLXT-*cre*4132, 这些质粒可直接进行里氏木霉原生质体转化。

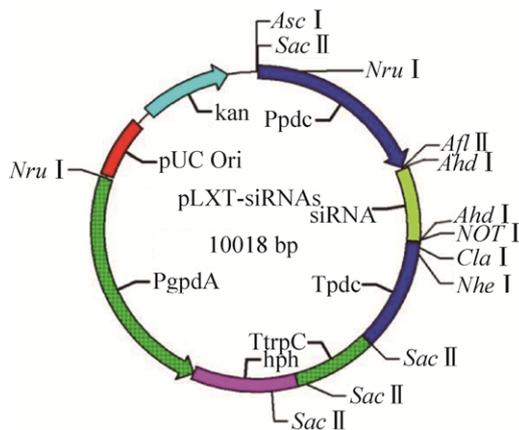


图 3. 载体 pLXT-siRNAs 图谱

Figure 3. Map of the vector pLXT-siRNAs.

### 1.4 里氏木霉原生质体转化

参考 Penttilä 等<sup>[19]</sup>的实验方法, 用聚乙二醇进行原生质体的制备与里氏木霉转化。哈茨木霉的溶壁酶(100 mg/mL)溶于 1 mol/L MgSO<sub>4</sub> 用于原生质体的制备。转化时, 用 10 μg 质粒 DNA (pLXT-*cre*s、pLXT-*cre*1423 和 pLXT-*cre*4132)和 200 μL PEG buffer (60% PEG4000, 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)。涂布到含有 100 μg/mL 潮霉素 B 的 PDA 固体平板用于筛选转化子, 生长 2–3 d。用牙签挑取转化子接种到新的筛选培养基上, 并连续筛选培养观察 6 代。提取转化子的 DNA 经 PCR 鉴定确认干扰表达盒插入到转化子的基因组中。

### 1.5 里氏木霉基因组 DNA 提取

将 PCR 筛选出来的转化子接种于里氏木霉液体基本培养基中, 28 °C、250 r/min 条件下培养 2 d。通过抽滤得到菌丝体, 液氮研磨成粉之后, 使用 Omega 的 E.Z.N.A<sup>®</sup> Fungal DNA Kit 提取基因组 DNA。用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的浓度和质量。

### 1.6 RNA 提取

为分析 siRNA 干扰片段对纤维素酶活力的影响, 将重组菌 *T. reesei-cre*s, *T. reesei-cre*1423, *T. reesei-cre*4132 和出发菌株 *T. reesei* QM9414 分别接种于 10 mL 基本培养基中, 每个菌株分别做 3 个平行样品, 28 °C、250 r/min 培养 48 h 后, 取每种重组菌 1.5 mL 菌液接种到 30 mL 含有 0.1% 微晶纤维素(质量分数)的产酶培养基中, 28 °C、250 r/min 培养 48 h 和 120 h 后, 利用 Omega 的 E.Z.N.A<sup>®</sup> Fungal RNA Kit, 按照说明书的方法, 将菌丝通过液氮冷冻研磨成粉后, 提取总 RNA。用

NanoDrop 2000 超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品的浓度和质量。

### 1.7 RNA 反转录和荧光定量 PCR

使用反转录试剂盒, 以 Random Primer 为引物, 将约 100 ng RNA 反转录成 cDNA。使用荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR。每个反应 20  $\mu$ L 体积, 包括 2  $\mu$ L 模板(1:60 稀释反转录产物), 10  $\mu$ L 2 $\times$ SybrGreen qPCR mastermix, 8  $\mu$ mol/L 正反向引物(表 3)各 0.5  $\mu$ L 和 7  $\mu$ L nuclease-free 水。程序设置: 预变性 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 5 s, 60  $^{\circ}$ C 延伸 31 s, 运行 40 个循环。运行结束后得到融解曲线, 用以核对 PCR 产物的特异性。所有 PCR 反应每个样品做 3 个复孔。目的基因的表达量通过内参基因 *sar1* 的表达量校正。以对照菌株的表达量为 1, 其他转化子的表达量与对照样品的比值作为数据分析。

表 3. 荧光定量 PCR 使用的引物

Table 3. Sequences of primers used in RT-qPCR

Primer name	Sequence (5'→3')	Purpose
<i>sar1</i> -F	TGGATCGTCAACTGGTTCTACGA	Internal reference
<i>sar1</i> -R	GCATGTGTAGCAACGTGGTCTTT	
<i>cre1</i> -F	CGGCTCCTTCTTCTCCACCTT	<i>cre1</i> qPCR
<i>cre1</i> -R	TCTCAGACTCGGCAGCTCGTAG	
<i>cre2</i> -F	TGCGGGAAGATGCGACTGACA	<i>cre2</i> qPCR
<i>cre2</i> -R	GGCGAGAGCGATGGATAGTTGATG	
<i>cre3</i> -F	TGCGGGAAGATGCGACTGACA	<i>cre3</i> qPCR
<i>cre3</i> -R	AATGAGTTGCCCTCCCCGAATGCG	
<i>cre4</i> -F	CTCGACCAGCTGTATGACGA	<i>cre4</i> qPCR
<i>cre4</i> -R	TGCGACTGATCCAGTGAGAC	
<i>ace1</i> -F	GGACGAGGAGGAGATTATG	<i>ace1</i> -qPCR
<i>ace1</i> -R	GTGAGTCTTCTCGTGCTT	
<i>cbh1</i> -F	CCGAGCTTGGTAGTTACTCTG	<i>cbh1</i> qPCR
<i>cbh1</i> -R	GGTAGCCTTCTTGAAGTGAAGT	
<i>egl1</i> -F	CGGCTACAAAAGCTACTACG	<i>egl1</i> qPCR
<i>egl1</i> -R	CTGGTACTTGCGGGTGAT	
<i>xyr1</i> -F	CCCATTCGGCGGAGGATCAG	<i>xyr1</i> qPCR
<i>xyr1</i> -R	CGAATTCTATACAATGGGCACATGGG	

### 1.8 酶活测定

为分析 siRNA 干扰片段对纤维素酶活力的影响, 将重组菌 *T. reesei-cres*、*T. reesei-cre1423*、*T. reesei-cre4132* 和出发菌株 *T. reesei* QM9414 分别接种于 30 mL 基本培养基中, 每个菌株分别做 3 个平行样品, 28  $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 48 h 后, 每种重组菌取 1.5 mL 菌液接种到 30 mL 含有 0.1% 微晶纤维素(质量分数)的产酶培养基中, 28  $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 48 h, 每隔 24 h 收集酶液, 将粗酶液稀释一定倍数后测定其滤纸酶活和 CMC 酶活。滤纸酶活(FPA)和羧甲基纤维素(CMC)酶活测定方法参考 Ghose<sup>[20]</sup>。以 CMC 和 Whatman No.1 滤纸为底物, 分别加酶液 0.5 mL, 50  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 和 1 h, 加 DNS 沸水浴 5 min。测定  $OD_{540}$  值, 每个样品做 3 个重复, 结果取平均值。以 1 h 内水解 50 mg 滤纸释放出 2.0 mg 葡萄糖或 30 min 内水解 2% 羧甲基纤维素释放出 0.5 mg 葡萄糖的酶液稀释倍数来计算 FPUase 和 CMCase 活性单位, 单位为 IU/mL。

## 2 结果和分析

### 2.1 多靶向沉默转化子鉴定

将构建的重组质粒 pLXT-*cre1423*、pLXT-*cre4132* 和 pLXT-*cres* 分别使用 *Not* I 和 *Afl* II 限制性内切酶进行双酶切, 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 4。结果显示, 泳道 1、2、3 均在 10000 bp 处有明显条带, 其大小与 pLXT 载体一致; 泳道 1、2 在接近 500 bp 处有明显条带, 其大小与 *cre1423*、*cre4132* 片段大小一致; 泳道 3 在接近 250 bp 处有明显条带, 其大小与 *cres* 片段大小一致, 进一步对这 3 个目的片段进行测序分析(序列未列出), 进一步证明了 3 个 siRNA 干扰片段连接成功, 这些质粒可用于里氏木霉原生质体转化。

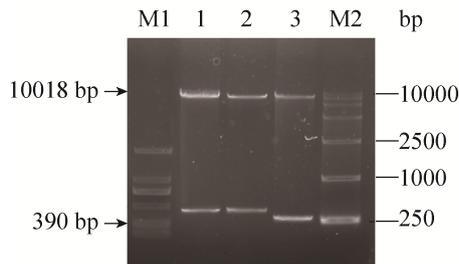


图 4. 重组干扰质粒酶切片段电泳图

Figure 4. The restriction fragment of interference recombinant vector. M1: TaKaRa DL 1000 marker; M2: TaKaRa DL 10000 marker; lane 1–3: The fragments of pLXT-cre1423, pLXT-cre4132 and pLXT-cre3 were digested with *Not* I+Afl II.

## 2.2 里氏木霉原生质体转化子的鉴定

将重组菌 *T. reesei-cre3*、*T. reesei-cre1423*、*T. reesei-cre4132* 和出发菌株 *T. reesei* QM9414 分别提取转化子基因组，使用引物 CRE-F: 5'-CCTGCAAGTCTCCATCACAAG-3'和 CRE-R: 5'-TTCATAGTCCCATTTGTCAGCA-3'进行 PCR 鉴定，结果见图 5。结果显示在 1000 bp 处有明显扩

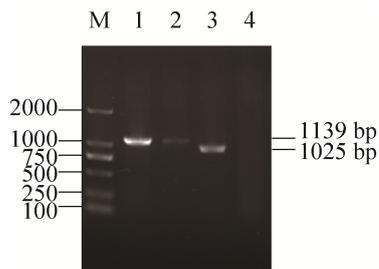


图 5. PCR 鉴定里氏木霉基因组中的 siRNA 干扰表达盒

Figure 5. PCR amplified siRNA disruption cassettes from recombinant strains. M: TaKaRa DL 2000 DNA Marker; lane 1–4: The PCR amplified siRNA disruption cassettes from recombinant strains *T. reesei-cre1423*, *T. reesei-cre4132*, *T. reesei-cre3* and *T. reesei*-QM9414.

增的条带，该条带的大小与 siRNA 干扰表达盒的大小基本一致，进一步对 PCR 扩增的 DNA 片段进行测序分析，表明 DNA 序列与 siRNA 干扰表达盒的序列完全一致，进一步证明了干扰表达盒成功整合到里氏木霉 QM9414 基因组中。

## 2.3 干扰重组菌的纤维素酶酶活的测定

滤纸酶活(FPA)代表的是纤维素酶三种酶组分，即内切型葡聚糖酶、外切型葡聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖苷酶协同作用的总酶活，是菌株整个纤维素酶系酶活力水平的综合体现。重组菌在产酶培养基中产生 FPA 的测定曲线见图 6-A。实验结果表明，所有菌株的滤纸酶活在 120 h 内呈现上升的状态。其中，3 个重组菌株 *T. reesei-cre4132*、*T. reesei-cre1423* 和 *T. reesei-cre3* 的酶活性曲线比出发菌株 *T. reesei* QM9414 明显升高。3 个重组菌中 *T. reesei-cre4132* 滤纸酶活的上升趋势最明显，其在 144 h 达到酶活的最高水平，而 *T. reesei-cre1423* 与 *T. reesei-cre3* 的滤纸酶活力在 120 h 达到最高点。原始出发菌 *T. reesei* QM9414 在 120 h 达到滤纸酶活最高点。3 个重组菌的滤纸酶活最高点平均是 *T. reesei* QM9414 的酶活最高点的 2.3 倍，而 *T. reesei-cre4132* 更是达到了 2.9 倍。这说明同时沉默 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因的表达，能够明显上调里氏木霉的纤维素酶的表达，而在构建多靶向载体时，构建的系统可能对干扰的程度有影响，从 RT-qPCR 测定的结果分析，siRNAs 对 4 个基因的沉默程度也不一致，这可能是导致不同重组菌之间出现了表达差异。

CMC 酶活(CMCA)是在纤维素酶组分中的内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖苷酶作用下水解 CMC-Na 产生纤维寡糖、纤维二糖、葡萄糖等还原糖的糖化力，它主要代表内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖苷酶的活力。重组菌

在产酶培养基中产生 CMCA 的测定曲线见图 6-B。与滤纸酶活性的测定的结果类似, 所有菌株的 CMC 酶活力曲线在 120 h 内都呈现一个较大的上升趋势, 其中 *T. reesei-cre1423* 和 *T. reesei QM9414* 在 120 h 达到了 CMC 酶活性的最高点, 而 *T. reesei-cre4132* 和 *T. reesei-cres* 在 144 h 达到酶活

曲线最高水平。3 个重组菌的酶活性最高水平都比原始出发菌 *T. reesei QM9414* 平均高出 1.9 倍。证明重组菌的内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖苷酶活性比原始出发菌 *T. reesei QM9414* 明显提高。

### 2.4 RT-qPCR 分析干扰重组菌中 *cre1*, *cre2*, *cre3* 和 *cre4* 基因的相对表达量

通过酶活测试实验发现, 滤纸酶活和 CMC 酶活都是在 120 h 时达到酶活性的最高水平, 因此在 48 h 和 120 h 分别收集菌液进行后续实验。为了进一步从基因转录水平上验证多靶向载体同时通过 siRNA 干扰里氏木霉碳代谢阻遏物 *cre1*, *cre2*, *cre3* 和 *cre4* 基因对里氏木霉产纤维素酶的影响, 分别在 48 h 和 120 h 时测定干扰重组菌株 *T. reesei-cres*, *T. reesei-cre4132*, *T. reesei-cre1423* 和 *T. reesei QM9414* 的 *cre1*, *cre2*, *cre3* 和 *cre4* 基因的表达水平。对所有样品进行实时荧光定量 PCR 反应, 使用 qPCR Software 3.2 软件对实验结果进行处理分析。实验数据经内参基因 *sar1* 定量值校正后, 以出发菌株 *T. reesei QM9414* 的基因表达量为 1, 分析其他基因的相对表达量, 结果见图 7。

结果显示, 重组菌 *T. reesei-cres*, *T. reesei-cre4132* 和 *T. reesei-cre1423* 在培养 48 h 时 *cre1*, *cre2*, *cre3* 和 *cre4* 的基因表达量与出发菌株 *T. reesei QM9414* 的表达水平没有明显差异, 甚至表达量有超过出发菌株 *T. reesei QM9414* 的趋势, 这与我们以往的研究结果是一致的, 分析其可能原因是转化过程或在真菌体内表达 siRNA 对其刺激所产生的一种应激反应; 但是在转化后培养 1-2 d 这种应激反应消失。在培养 120 h 时测定碳代谢阻遏物 *cre1*, *cre2*, *cre3* 和 *cre4* 基因表达水平均明显低于出发菌株 *T. reesei QM9414*。且基因的下落情况与酶活性的测定结果是对应的。*T. reesei-cre4132*

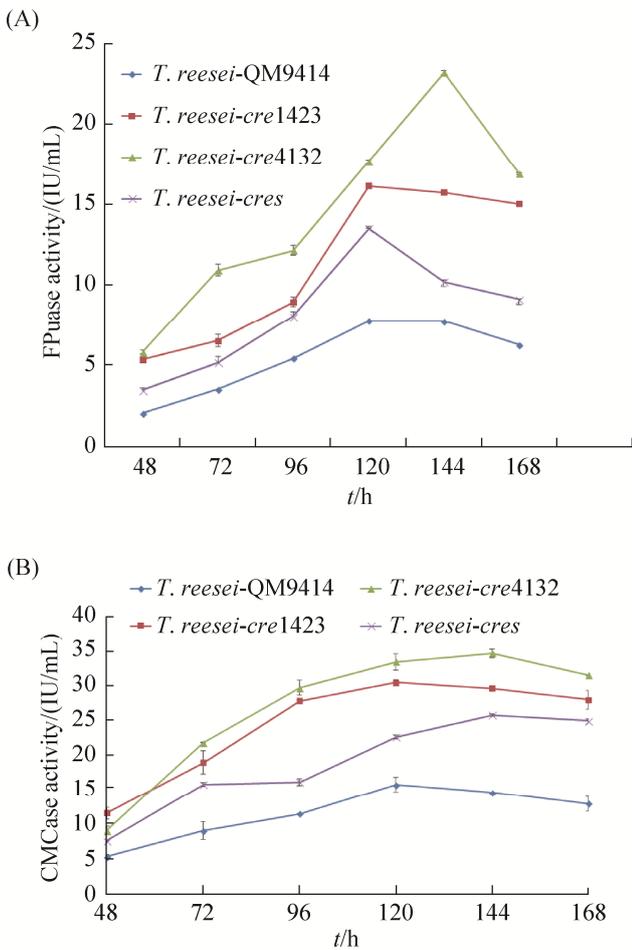


图 6. 重组菌在产酶培养基中分泌的滤纸酶活(FPA)和 CMC 酶活(CMCA)的时间过程

Figure 6. Time course of FPUase and CMCase produced by recombinant strains *T. reesei-cres*, *T. reesei-cre4132*, *T. reesei-cre1423* and *T. reesei QM9414* in induction medium. Results are expressed as mean±standard deviation.

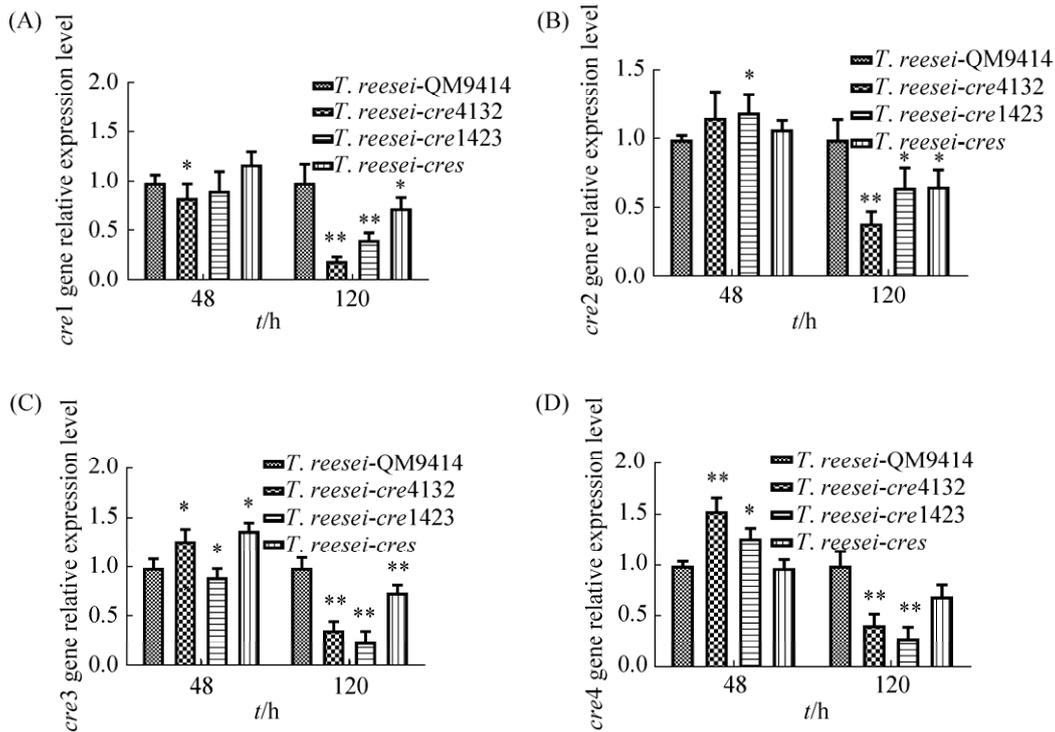


图 7. 干扰重组菌分别诱导培养 48 h 和 120 h 后 *cre1*、*cre2*、*cre3*、*cre4* 的相对表达量

Figure 7. The relative expression level of *cre1*、*cre2*、*cre3*、*cre4* in silencing recombinant strains after respectively inducing 48 h and 120 h.

和 *T. reesei*-cre1423 中 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 的基因下调情况均比 *T. reesei*-cres 和 *T. reesei* QM9414 明显。在 *cre1* 基因相对表达量测定的实验中, 48 h 时 *T. reesei* QM9414、*T. reesei*-cre4132、*T. reesei*-cre1423 和 *T. reesei*-cres 菌中的 *cre1* 相对表达量分别为 1.00、0.84、0.91 和 1.18, 而 120 h 后测定的 *cre1* 相对表达量分别为 1.00、0.20、0.41 和 0.73。重组菌株 *T. reesei*-cre4132、*T. reesei*-cre1423 和 *T. reesei*-cres 的 *cre1* 的相对表达量比出发菌株 *T. reesei* QM9414 分别下降了 0.80、0.59 和 0.27, 平均下降 0.55。而在测定 *cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因的相对基因表达量中, 重组菌株 *T. reesei*-cre4132、*T. reesei*-cre1423 和 *T. reesei*-cres 比出发菌株 *T. reesei* QM9414 分别平均下降了 0.44、

0.54 和 0.79。其中以上实验结果说明, 重组菌株 *T. reesei*-cre4132、*T. reesei*-cre1423 和 *T. reesei*-cres 的 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因均同时受到了不同程度的沉默, 多靶向载体在里氏木霉中可以成功转录出有效的 siRNA 并在菌体内加工形成有效的干扰片段, 沉默目的基因的表达, 从而起到下调目的基因的重要作用。

## 2.5 RT-qPCR 分析干扰重组菌中 *ace1* 基因的表达量

分别使用 *ace1*-F/*ace1*-R (表 3)对诱导培养 48 h 和 120 h 的重组菌及对照菌株进行荧光定量 PCR 分析, 结果见图 8。实验结果表明, 在各种干扰重组菌中 *ace1* 基因的表达水平均未见明显变化。说明沉默碳代谢阻遏物基因 *cre1*、*cre2*、*cre3*

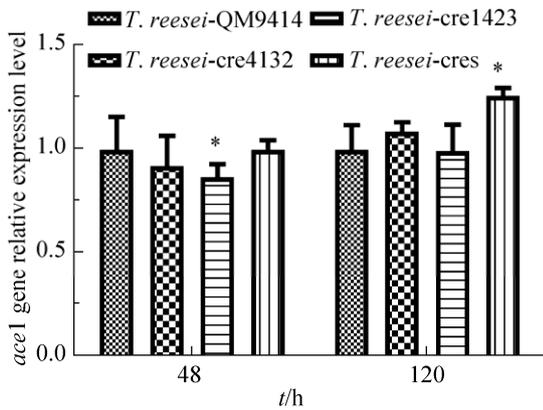


图 8. 干扰重组菌分别诱导 48 h 和 120 h 后 ace1 的相对表达量

Figure 8. Ace1 relative expression level in interfering recombinant strains after 48 h and 120 h, respectively.

和 cre4, 对木聚糖酶的一个阻遏因子 ace1 基因的表达调控不受影响, 提示沉默碳代谢阻遏物基因 cre1、cre2、cre3 和 cre4 对里氏木霉的其他调控因子可能不会造成影响。

### 2.6 RT-qPCR 分析干扰重组菌中 cbh1、egl1 和 xyr1 基因的相对表达量

天然纤维素降解酶系是起协同作用的多组分酶系, 不仅具有内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶活性, 还有很高的木聚糖酶活性。cbh1 是纤维二糖

水解酶 CBH1 的编码基因, egl1 内切 β-1,4-葡聚糖酶 EGL1 的编码基因<sup>[21]</sup>。据文献报道, XYR1 是主要纤维素酶和半纤维素酶基因包括 cbh1、cbh2、egl1、bgl1、xyn1、xyn2 等转录所必需的转录激活因子<sup>[22]</sup>。研究表明, xyr1 的转录受到 cre1 和 ace1 的调控<sup>[9]</sup>。为了分析重组菌株 *T. reesei*-cre4132、*T. reesei*-cre1423 和 *T. reesei*-cres 中同时沉默 cre1、cre2、cre3 和 cre4 基因是否会对纤维素酶基因 cbh1、egl1 和木聚糖酶转录激活因子 xyr1 基因的表达产生影响, 使用荧光定量 PCR 分别分析了干扰重组菌中纤维素酶基因 cbh1、egl1 和编码的转录激活因子 xyr1 的相对表达量, 结果见图 9。

实验结果显示, 在诱导培养 48 h 时, 重组菌 *T. reesei* QM9414、*T. reesei*-cre4132、*T. reesei*-cre1423 和 *T. reesei*-cres 中 cbh1 的相对表达量分别是 1.00、1.98、0.97 和 1.12, 而诱导培养 120 h 测得的结果分别是 1、4.68、6.7 和 1.32。可见在诱导培养 120 h 时, *T. reesei*-cre4132 和 *T. reesei*-cre1423 的 cbh1 基因表达量比诱导培养 48 h 得到了显著的提高。说明同时抑制碳代谢阻遏物基因 cre1、cre2、cre3 和 cre4 可调控 cbh1 的表达量, 使其明显升高。

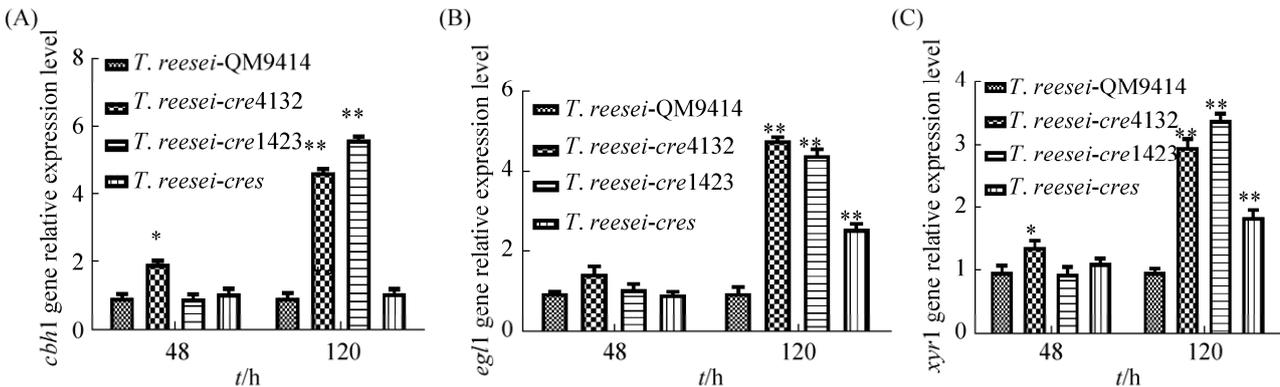


图 9. 干扰重组菌分别诱导培养 48 h 和 120 h 后 cbh1、egl1、xyr1 的相对表达量

Figure 9. The relative expression level of cbh1, egl1 and xyr1 in silencing recombinant strains after respectively inducing 48 h and 120 h.

*egl1* 编码的是内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶。在 48 h 时, 重组菌 *T. reesei-cre4132*、*T. reesei-cre1423* 和 *T. reesei-cre5* 的 *egl1* 相对表达量与原始菌株 *T. reesei* QM9414 相差无几。而 120 h 时, 重组菌 *T. reesei-cre4132*、*T. reesei-cre1423* 和 *T. reesei-cre5* 的 *egl1* 相对表达量分别为原始菌株 *T. reesei* QM9414 的 4.80 倍、4.59 倍和 2.56 倍, 证明重组菌株的 *egl* 基因表达量均得到了提升。同时抑制 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因可以解除内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶的由于葡萄糖效应而受到的抑制, 说明 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因对 *egl1* 表达的调控有十分重要的影响。

*xyr1* 是激活调控因子, 它可以激活纤维素酶相关基因的表达, 提高纤维素酶的产量和活性。同时 *xyr1* 也受到碳阻遏抑制因子的影响<sup>[23]</sup>。在 48 h 时, 重组菌和原始出发菌的 *xyr1* 相对表达量无明显差异, 而 120 h 时, 重组菌 *T. reesei-cre4132*、*T. reesei-cre1423* 和 *T. reesei-cre5* 的 *xyr1* 相对表达量为原始出发菌 *T. reesei* QM9414 的 2.99、3.48 和 1.88 倍, 说明多靶向同时干扰 4 个基因的表达可以明显提高 *xyr1* 的表达。

### 3 讨论

里氏木霉在工业生产纤维素酶中扮演着重要的角色, 但是生产纤维素酶能力仍然受其本身的生长代谢影响, CRE1、CRE2、CRE3 和 CRE4 是里氏木霉碳阻遏效应中的阻遏物, 与构巢曲霉具有高度同源性<sup>[8]</sup>。当培养基中存在葡萄糖等可快速利用的碳源时, 里氏木霉会优先利用这些碳源, 而像纤维素这样的复杂碳源则利用率低下, 从而影响了里氏木霉产纤维素酶的能力。通过本实验室此前的研究, 已经证明了单独抑制里氏木霉的

*cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因, 可以有效降低里氏木霉的葡萄糖效应, 使其纤维素酶表达量得到一定程度的提高<sup>[4,15-17]</sup>。但由于 4 个基因的表达产物中可能会存在相互作用<sup>[9]</sup>, 只抑制其中的一个基因难以实现完全解除碳阻遏效应, 所以本研究通过构建的多靶向 siRNA 系统, 将 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因同时抑制, 以期能够最大限度地解除其碳代谢阻遏效应, 进一步提高纤维素酶的产量。

本研究证明, A 和 B 两种系统中, A 系统对目的基因有一定程度的抑制沉默作用, 但其作用效果没有 B 系统好。主要原因可能与转录出来的 RNA 分子构型有重要的关系, 因为转录后形成多个颈环结构并且通过线性区域连接, 因此双链区域可能由于 RNA 分子存在线性区域, 容易形成扭转或重叠, 使 Dicer 蛋白酶体对折叠的 RNA 分子可能无法充分结合和加工, 因此产生的 siRNA 会减少, 对目的基因的沉默效果就会降低(图 10-A); 而 B 系统由于转录出来的线性 RNA 通过互补序列形成双链 RNA 分子, 其刚性强于含有线性区域的 A 系统的构型, 双链 RNA 不容易形成折叠(图 10-B), Dicer 蛋白酶体对 B 型的加工更容易, 因此产生的 siRNA 就更充分, 沉默效果就更好。

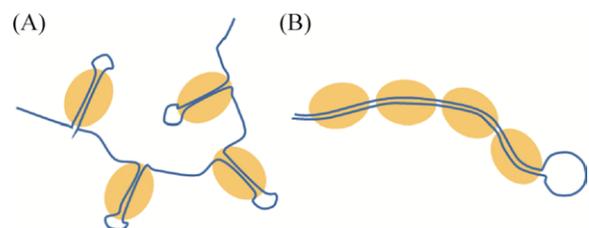


图 10. Dicer 结合 RNA 分子模式图

Figure 10. Pattern of Dicer binding RNA molecule.

在滤纸酶活和 CMC 酶活中, A、B 两种系统的所有重组菌均检测到了比原始菌株 QM9414 更高的酶活力, 但 B 系统的重组菌 *T. reesei-cre4132* 和 *T. reesei-cre1423* 表现出了比 A 系统中的 *T. reesei-cre* 更高的酶活力, 这与 2 个系统对 4 个阻遏物基因的干扰结果是一致的。

而对 *ace1* 基因的表达量检测中, 无论是 A 系统中的 *T. reesei-cre* 还是 B 系统的重组菌 *T. reesei-cre4132*、*T. reesei-cre1423* 中, *ace1* 相对表达量与原始出发菌 *T. reesei* QM9414 无明显差异, 说明 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因的沉默不会影响 *ace1* 基因的表达, 纤维素酶活性的提高也可能不受 *ace1* 基因表达的调控。

根据高云雨等<sup>[4]</sup>对 *cre1* 干扰的效果分析, 我们对单基因靶向抑制和多基因靶向抑制的 CMC 酶活、滤纸酶活以及纤维素酶基因 *cbh1*、*egl1* 和木聚糖酶基因激活因子基因 *xyr1* 表达进行了比较。结果发现, 当只对 *cre1* 基因进行抑制的时候, CMC 酶活和滤纸酶活比原始出发菌 QM9414 分别上升 1.7 和 2.0 倍, 而多靶向抑制的时候, *T. reesei-cre1423*、*T. reesei-cre4132* 和 *T. reesei-cre* 的 CMC 酶活和滤纸酶活比原始出发菌 QM9414 平均上升 1.95 和 2.66 倍, 其中 *T. reesei-cre4132* 更是上升了 2.13 和 2.99 倍, 是只对 *cre1* 基因进行抑制的 1.25 和 1.50 倍。

而纤维素酶相关基因 *cbh1*、*egl1* 和木聚糖酶激活因子基因 *xyr1* 的相对表达量中, 只对 *cre1* 基因进行抑制比原始出发菌 QM9414 分别上升了 2.50、2.90 和 1.98 倍, 而多靶向抑制菌株中 *T. reesei-cre1423* 和 *T. reesei-cre4132* 比原始出发菌 QM9414 分别上升了 4.69、5.67、4.45 倍和 4.80、2.99、3.48 倍, 可见多靶向抑制 *cre1*、*cre2*、*cre3* 和 *cre4* 基因的表达比单向抑制任何一个基因的表

达得到了更好的纤维素酶产量。

目前研究表明在丝状真菌中参与碳代谢阻遏物调控作用的不仅仅是碳代谢阻遏物基因的表达产物, 还涉及 cAMP 的参与和泛素化途径参与的碳代谢阻遏作用<sup>[9,24-25]</sup>, 可见其调控机制的复杂性。本项实验的设计思路和结果为进一步研究里氏木霉基因表达调控提供了新的技术手段和实验数据。

## 参考文献

- [1] Mach RL, Strauss J, Zeilinger S, Schindler M, Kubicek CP. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xyn1*) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(6): 1273-1281.
- [2] Joutsjoki VV, Kuittinen M, Torkkeli TK, Suominen PL. Secretion of the *Hormoconis resinae* glucoamylase p enzyme from *Trichoderma reesei* directed by the natural and the *cbh1* gene secretion signal. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 112(3): 281-286.
- [3] Zhang GT, Hartl L, Schuster A, Polak S, Schmoll M, Wang TH, Seidl V, Seiboth B. Gene targeting in a nonhomologous end joining deficient *Hypocrea jecorina*. *Journal of Biotechnology*, 2009, 139(2): 146-151.
- [4] Gao YY, Zhong LY, Dong GY, She WY, Zhou JJ, Liu SY, Tian SL. *Trichoderma reesei* constitutive type of expression vector siRNA interfering *cre1* gene on cellulases expression regulation. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(1): 12-19. (in Chinese)  
高云雨, 钟路遥, 董冠园, 余伟怡, 周娇娇, 刘思远, 田生礼. 里氏木霉组成型表达 siRNA 干扰 *cre1* 基因对纤维素酶表达的调控作用. *微生物学杂志*, 2018, 38(1): 12-19.
- [5] Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, Goedegebuur F, Houfek TD, England GJ, Kelley AS, Meerman HJ, Mitchell T, Mitchinson C, Olivares HA, Teunissen PJM, Yao J, Ward M. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(34): 31988-31997.
- [6] Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular

- perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35(5): 377–391.
- [7] Boase NA, Kelly JM. A role for *creD*, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(3): 929–940.
- [8] Kubicek CP, Mikus M, Schuster A, Schmoll M, Seiboth B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2: 19.
- [9] Lockington RA, Kelly JM. The WD40-repeat protein *creC* interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme *creB* *in vivo* in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(5): 1173–1182.
- [10] Denton JA, Kelly JM. Disruption of *trichoderma reesei cre2*, encoding an ubiquitin C-terminal hydrolase, results in increased cellulase activity. *BMC Biotechnology*, 2011, 11: 103.
- [11] Saloheimo A, Aro N, Ilmén M, Penttilä M. Isolation of the *ace1* gene encoding a *cys*<sub>2</sub>-*his*<sub>2</sub> transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(8): 5817–5825.
- [12] Aro N, Ilmén M, Saloheimo A, Penttilä M. *Ace1* of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 56–65.
- [13] Qin LN, Cai FR, Dong XR, Huang ZB, Tao Y, Huang JZ, Dong ZY. Improved production of heterologous lipase in *Trichoderma reesei* by RNAi mediated gene silencing of an endogenous highly expressed gene. *Bioresource Technology*, 2012, 109: 116–122.
- [14] He RL, Guo W, Wang LX, Zhang DY. Construction of an efficient *RNAi* system in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 108: 70–73.
- [15] Li JX. RNA interference on cellulase expression in *Trichoderma reesei* catabolite repressor *cre2*. Master Dissertation of Shenzhen University, 2014. (in Chinese)  
李洁璇. RNA 干扰里氏木霉分解代谢阻遏物 *cre2* 对纤维素酶表达的研究. 深圳大学硕士学位论文, 2014.
- [16] Liang XY. RNA interference with the catabolic repressor *cre3* of *Trichoderma reesei* and its effect on cellulase expression. Master Dissertation of Shenzhen University, 2015. (in Chinese)  
梁秀怡. RNA 干扰里氏木霉分解代谢阻遏物 *cre3* 及对纤维素酶表达影响的研究. 深圳大学硕士学位论文, 2015.
- [17] Liu WL. *Cre4* gene regulation of cellulase expression in *Trichoderma reesei*. Master Dissertation of Shenzhen University, 2016. (in Chinese)  
刘雯莉. *Cre4* 基因在里氏木霉中对纤维素酶表达的调控研究. 深圳大学硕士学位论文, 2016.
- [18] Cong W, Cui SQ, Chen JL, Zuo XP, Lu YG, Yan WY, Zheng ZX. Construction of a multiple targeting RNAi plasmid that inhibits target gene expression and FMDV replication in BHK-21 cells and suckling mice. *Veterinary Research Communications*, 2010, 34(4): 335–346.
- [19] Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen E, Knowles J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 1987, 61(2): 155–164.
- [20] Ghose TK, Bisaria VS. Measurement of hemicellulase activities: Part I xylanases. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59(12): 1739–1751.
- [21] Aro N, Saloheimo A, Ilmeé M, Penttilä M. *Aceii*, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(26): 24309–24314.
- [22] Stricker AR, Mach RL, de Graaff LH. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(2): 211–220.
- [23] Silva-Rocha R, Castro LDS, Antoniêto ACC, Guazzaroni ME, Persinoti GF, Silva RN. Deciphering the *cis*-regulatory elements for *xyl1* and *cre1* regulators in *Trichoderma reesei*. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e99366.
- [24] Lin CT, Chen YC, Jinn TR, Wu CC, Hong YM, Wu WH. Role of the *camp*-dependent carbon catabolite repression in capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e54430.
- [25] Borirak O, Bekker M, Hellingwerf KJ. Molecular physiology of the dynamic regulation of carbon catabolite repression in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2014, 160(6): 1214–1223.

# Cellulase activities and expression regulation by multiple targeted silencing carbon catabolic repressors in *Trichoderma reesei*

Jiawen Deng<sup>#</sup>, Yunyu Gao<sup>#</sup>, Xukun Liu, Keke Zhang, Luyao Zhong, Shengli Tian<sup>\*</sup>

Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518052, Guangdong Province, China

**Abstract:** [Objective] In order to study carbon metabolic repressors on cellulase activities and expression regulation in *Trichoderma reesei*, we constructed multi-targeting siRNA expression vectors to perform silencing carbon metabolic repressor *cre1*, *cre2*, *cre3* and *cre4* by simultaneous producing multi-targeting siRNAs. [Methods] According to previous studies and screening, the four best siRNAs targeting the *cre1*, *cre2*, *cre3* and *cre4* were selected and they were constructed a multi-targeting siRNA expression vector A. Additionally, according to 5 overlap common sequence in the *cre1*, *cre2*, *cre3* and *cre4*, we designed and constructed the vector B. The two vectors were transformed the protoplasm of *Trichoderma reesei* QM9414 and selected on the hygromycin selection medium. Cellulase activities (CMC activity and filter paper activity) of transformants were detected and related gene expressions were also detected by RT-qPCR after incubation for 48 and 120 hours respectively. [Results] RT-qPCR results showed that the *cre1*, *cre2*, *cre3* and *cre4* expression levels in *Trichoderma reesei* were simultaneously silenced, and the cellulase activities were much higher than that of the starting strain. The CMC activity and filter paper activity of the multi-targeted inhibitor strains were 1.95-fold and 2.66-fold higher than those of the original strains. The cellulase-related genes expression levels were also increased significantly. The expression levels of *cbh1*, *egl1* and *xyl1* were 3.83-fold, 3.95-fold and 2.78-fold higher than those of the original strain. [Conclusion] Our results indicated that simultaneous silencing multi-targets of the carbon metabolic repressors in *Trichoderma reesei* is beneficial to release the glucose repressor effects and increase the expression and production of cellulase. These results provide evidence and techniques for study of regulation of carbon catabolite repressor genes on cellulase expression in *Trichoderma reesei*.

**Keywords:** *Trichoderma reesei*, RNA interference, carbon metabolic repressor, cellulase

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070044) and by the Shenzhen Science and Technology Basic Research and Development Project (ZYC201105130092A)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-755-26534149; Fax: +86-755-26534274; E-mail: sltian@szu.edu.cn

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

Received: 19 June 2018; Revised: 27 August 2018; Published online: 26 November 2018