

• 工业生物技术 •

# 荧光标记米曲霉细胞器菌株构建及细胞器形态观察

尚怡彤, 金奇, 黄慧, 秦坤海, 闫欢欢, 胡志宏\*

江西科技师范大学 生命科学学院 江西省生物加工过程重点实验室, 江西 南昌 330013

尚怡彤, 金奇, 黄慧, 秦坤海, 闫欢欢, 胡志宏. 荧光标记米曲霉细胞器菌株构建及细胞器形态观察[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 2998-3010.

SHANG Yitong, JIN Qi, HUANG Hui, QIN Kunhai, YAN Huanhuan, HU Zhihong. Construction of *Aspergillus oryzae* strains with organelles labeled with fluorescence and observation of organelle morphology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 2998-3010.

**摘要:** 多核丝状真菌米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的细胞器具有多态性。为了观察米曲霉细胞器的形态以及为米曲霉中未知蛋白的定位分析和一系列生物反应通路的揭示提供参考, 将不同的亚细胞定位信号与荧光蛋白融合, 得到不同亚细胞定位的荧光蛋白表达载体, 再利用农杆菌介导转化法(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)将构建好的载体转入米曲霉中, 通过显微观察证明成功构建了米曲霉荧光标记细胞核、线粒体、内质网、液泡、脂滴、过氧化物酶体和高尔基体的报告菌株。通过小分子特异性染料对线粒体、细胞核和脂滴荧光定位报告菌株染色进行共定位, 对报告菌株进行了进一步验证。本研究对这些荧光标记的细胞器在不同生长时期和不同培养条件下的分布和形态进行了动态观察。报告菌株的构建为研究米曲霉的细胞器形态提供了工具, 同时也为米曲霉中未知目的蛋白的定位以及亚细胞层面上的研究提供了工具。

**关键词:** 米曲霉; 细胞器; 融合荧光蛋白; 共定位

## Construction of *Aspergillus oryzae* strains with organelles labeled with fluorescence and observation of organelle morphology

SHANG Yitong, JIN Qi, HUANG Hui, QIN Kunhai, YAN Huanhuan, HU Zhihong\*

Jiangxi Key Laboratory of Bioprocess Engineering, College of Life Science, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

**Abstract:** The organelles in the multi-nucleated filamentous fungus *Aspergillus oryzae* present

资助项目: 国家自然科学基金(32260009)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260009).

\*Corresponding author. E-mail: huzhihong426@163.com

Received: 2024-01-09; Accepted: 2024-03-29; Published online: 2024-04-02

polymorphism. To observe the organelle morphology in *A. oryzae* and provide references for the localization prediction of unknown proteins and the disclosure of biological reaction pathways in *A. oryzae*, we fused different subcellular localization signals with green fluorescent protein (GFP) to obtain different subcellular localization vectors, which were then transferred into *A. oryzae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The *A. oryzae* reporter strains with fluorescence-labeled nuclei, mitochondria, endoplasmic reticulum, vacuole, lipid droplets, peroxisome, and Golgi apparatus were successfully constructed. Furthermore, staining with small-molecule specific dyes was carried out to validate the co-localization of fluorescence-labeled mitochondria, nuclei, and lipid droplets in the reporter strains, which further confirmed that the reporter strains were successfully constructed. The distribution and morphology of fluorescence-labeled organelles were observed at different growth stages and under different culture conditions. The constructed reporter strains provide basic tools for studying the organelle morphology, localization of unknown target proteins, and subcellular localization in *A. oryzae*.

**Keywords:** *Aspergillus oryzae*; organelles; fusion fluorescent protein; co-localization

米曲霉是一种丝状真菌，是半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目、从梗孢科、曲霉属真菌中的一个常见种。米曲霉在传统食品酿造中有着近千年的历史，是一种工业上应用非常广泛的安全菌株，并且被食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 和世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 认定为安全生产 (Generally Recognized as Safe, GRAS) 菌株<sup>[1]</sup>。米曲霉具有较强的蛋白生产和分泌能力，比大肠杆菌和酵母菌具有更强大的翻译后修饰功能，因此可以用于生产结构更加复杂的蛋白质及抗生素等产品<sup>[2]</sup>。随着米曲霉基因组测序的完成和米曲霉遗传修饰手段的发展，近几年国内对米曲霉的研究不再局限于发酵生产及表观研究层面。研究者通过分子生物学手段对米曲霉中麦角甾醇<sup>[3]</sup>、神经酰胺<sup>[4]</sup>、曲酸<sup>[5]</sup>等合成通路进行解析，从而达到优化菌种提高目标产物产量的目的。因此，米曲霉可以作为一些初级和次级代谢产物的生产菌株，并逐渐成为异源生产有用代谢物的宿主细胞。

米曲霉细胞具有复杂的生物膜结构，将

一个细胞分成很多区域，在这些区域内发生着各种各样的反应，执行不同的生物学功能，为米曲霉的生命活动提供着能量。由于细胞内各种与生命活动相关的反应都需要酶的催化，因此很多蛋白都有它们特定的反应区域，通过研究其定位还可以帮助揭示不同蛋白之间功能的关系，并帮助解析一些产物合成通路。蛋白质亚细胞定位的鉴定对功能基因组学、代谢产物合成途径和外源基因蛋白表达的研究具有重要意义。特异性的小分子荧光染料可以用于标记一些细胞器，例如 MitoTracker Green 可以特异性地对线粒体进行标记，发出绿色荧光<sup>[6]</sup>，4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 可以与 DNA 强力结合，从而使细胞核被标记发出蓝色荧光<sup>[7]</sup>，Nile Red 可将细胞内脂滴染成红色<sup>[8]</sup>等。但用染料定位荧光容易淬灭，保存的时间比较短，需要复杂的染色过程，而且特定的亚细胞定位染料十分有限。

荧光蛋白常用于跟踪蛋白质的亚细胞定位和细胞器的形态，在米曲霉中利用荧光蛋白标记进行功能基因或者亚细胞定位观察相关的研

究越来越多。例如, 2006年, 研究人员从米曲霉中克隆酿酒酵母液泡生成相关酶 VAM3 编码基因的同源基因 *Aovam3*, 并通过构建增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)融合蛋白, 成功标记了米曲霉液泡, 并对液泡的形态进行了动态观察<sup>[9]</sup>。为了可视化内质网的形态, 从米曲霉中克隆了哺乳动物钙连接蛋白的同源蛋白 *AoClxA*, 该蛋白与内质网 *Glc1Man9GlcNAc2* 特异性结合, 通过该蛋白编码基因与 EGFP 融合, 成功标记了米曲霉内质网<sup>[10]</sup>。研究表明, 过氧化物酶体蛋白通常具有过氧化物酶体靶向信号(PTSI或 PTSII)<sup>[11]</sup>。PTSI的 C 端具有 S、R、L 这 3 个氨基酸, 这一序列与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)融合(GFP-PTS)可以使 GFP 靶向过氧化物酶体, 用于观察动物和植物细胞中的过氧化物酶体<sup>[12-13]</sup>。在本课题组之前的研究中, 已经通过 GFP-PTS 融合蛋白成功标记了米曲霉中的过氧化物酶体<sup>[14-15]</sup>。通常线粒体蛋白在 N 端有一个信号肽, 柠檬酸合成酶(*AoCit1*)的 N 端信号肽已被证明足以靶向米曲霉线粒体<sup>[16]</sup>。AAM-B 是一种存在于脂滴中的甲基转移酶, 研究结果表明, 动物细胞中 AAM-BN 端 28 个氨基酸的疏水序列对于将蛋白质靶向到脂滴是必要和充分的<sup>[17]</sup>。研究者将曲霉组蛋白 H2B 蛋白与 EGFP 融合(H2B::EGFP), 观察到米曲霉的细胞核<sup>[18]</sup>。2007年, 研究人员对米曲霉中 21 个 SNARE 基因进行鉴定, 以获得囊泡运输的基本知识和蛋白质运输途径中细胞器的空间分布, 其中 *AoGos1* 蛋白被证明定位于高尔基体<sup>[19]</sup>。但是, 目前缺乏对米曲霉不同细胞器进行荧光标记和系统性观察米曲霉细胞器分布和形态的报道。

本研究利用荧光融合蛋白对米曲霉的各种细胞器进行可视化, 将不同亚细胞定位基因克隆出来, 构建与 GFP 融合的表达载体, 包括可

定位于细胞核、线粒体、内质网、液泡、脂滴、过氧化物酶体和高尔基体的载体, 并通过农杆菌介导转化法将这些载体转入米曲霉中, 成功构建用于米曲霉不同亚细胞定位的荧光报告菌株体系, 并通过与小分子荧光染料共定位, 进一步证明该体系的适用性。对这些细胞器在米曲霉生长过程中的形态以及不同培养条件下的细胞器形态进行动态观察, 为进一步研究米曲霉细胞器的动态变化及未知蛋白的功能奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

将从中国工业微生物菌种保藏中心(北京)获得的野生型米曲霉 3.042 (CICC 40092)作为 DNA 供体, 尿苷/尿嘧啶营养缺陷型( $\Delta pyrG$ )米曲霉 3.042 菌株由本实验室构建<sup>[1]</sup>。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  用于质粒构建, 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) AGL1 用于米曲霉转化。质粒 ptrA-pEX1 和 pEX2B 由本实验室改造并保存<sup>[1,20]</sup>。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

尿苷、尿嘧啶、头孢噻肟钠、硫酸卡那霉素、利福平和乙酰丁香酮, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 吡啶硫胺素, 购自 Sigma 公司; 限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I、*Afl* II, 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; KOD DNA 聚合酶, 购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; *Rapid Taq*、*ClonExpress II One Step Cloning Kit*, 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。PCR 仪、凝胶电泳系统和凝胶成像仪, 购自 Bio-Rad 公司; 荧光显微镜, 购自 Leica 公司。

#### 1.1.3 培养基

LB 培养基、DPY 培养基、IM 诱导培养基

(pH 5.8)、Czapek-Dox (CD)培养基(pH 5.5)配方详见参考文献[20]。以上固体培养基使用时添加 1.5%琼脂粉。

## 1.2 方法

### 1.2.1 表达载体的构建

本实验用于扩增细胞器定位相关基因的引物见表 1, 将曲霉组蛋白 H2B (GenBank 登录号: XP\_023092665.1)融合到 GFP 的 N 端, 用于定位细胞核<sup>[21]</sup>, AoCit1 (GenBank 登录号: EIT83345.1)蛋白的前 72 个氨基酸作为线粒体靶向信号 MTS<sup>[22]</sup>, 将 AoClxA (GenBank 登录号: EIT72779.1)与 GFP 的 N 端融合, 以显示内质网<sup>[10]</sup>, 将米曲霉液泡分选蛋白 AoVam3 (GenBank 登录号: EIT78486.1)作为液泡标记<sup>[9]</sup>, 合成了人类基因组中的脂滴靶向序列 AAMB (GenBank 登录号: NP\_054752.3)<sup>[17]</sup>, SRL 氨基酸被融合到 GFP 的 C 端, 以产生过氧化物酶体靶向信号(PTS1)<sup>[13]</sup>,

还克隆了高尔基定位蛋白 Qb-SNARE AoGos1 (GenBank 登录号: EIT74681.1)<sup>[23]</sup>, 所有载体构建方案如图 1 所示。将 ptrA-pEX1 载体用 *Xho* I 或 *Bam*H I 线性化, pEX2B 载体用 *Afl* II 线性化, 使用一步克隆试剂盒(ClonExpress II One Step Cloning Kit)将各目的片段与线性化载体连接, 得到与 GFP 或 Mcherry 融合的亚细胞定位表达载体, 并根据参考文献[1]中的方法进行米曲霉的转化。

### 1.2.2 融合蛋白与特异性荧光染料的共定位

**线粒体共定位:** 在载玻片上培养 pEX2B-MTS-Mcherry 米曲霉菌丝体, 转移到 MitoTracker Green 染料中避光孵育 30 min, 然后用蒸馏水清洗菌丝 20 min。

**细胞核共定位:** 将 ptrA-pEX1-H2B 米曲霉样片在 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI 染色液中室温孵育 15 min 后, 用 PBS 洗涤 2 次。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
H2B-F	GCAGACATCACCTCGAG ATGGCACCCAAGGCTGCTGAG	477
H2B-R	GGTACCTACGTACTCGAG TTTGGCAGAAGAGGAGTACTTC	
MTS-F	GAGCAGACATCACCTCGAG ATGGCTTCTTCCTTGAGAATCG	228
MTS-R	CTCACCATGGTACCTACGTAG CTGGTCGAGGGTGACCTCGC	
AoClxA-F	GCAGACATCACCTCGAG ATGCGTTTCAACGCAGCTGTTG	1 686
AoClxA-R	GGTACCTACGTACTCGAG CTGGGCAGAAGAACGGGTGGTA	
Aovam-F	GAGCAGACATCACCTCGAG ATGTCTTCGACCGTCTTAG	813
Aovam-R	CTCACCATGGTACCTACGTA TCCAATAGTAGCCGCCAGCA	
GFP-PTS-F	GAGCAGACATCACCTCGAG ATGGTGAGCAAGGGCGAGG	729
GFP-PTS-R	CTCACCATGGTACCTACGTA CTACAGACGGGACTTGTACAGCTC	
AAMB-F	CTTGAGCAGACATCACCTCGAG ATGGAGCTTACCATCTTTATCC	117
AAMB-R	TTGCTCACCATGGTACCTACGTA GAAGTAGGGGAACCATTTTTTG	
GFP-Aogos1-F	TGTACAAGCTTAAGGGATCC ATGGCTGCCTCAACAGGTAC	824
GFP-Aogos1-R	TGATTCAGTAACGTTAAGT TTATCGGAAAAAAGCAGCA	
MTS-Mcherry-F	TTCACGTGCCCGTGCTTAAG ATGGCTTCTTCCTTGAGAATCG	228
MTS-Mcherry-R	CCCTTGCTCACCATGATATC CTGGTCGAGGGTGACCTCGC	
AoClxA-Mcherry-F	TTCACGTGCCCGTGCTTAAG ATGCGTTTCAACGCAGCTGTTG	1 686
AoClxA-Mcherry-R	CCCTTGCTCACCATGATATC CTGGGCAGAAGAACGGGTGGTAC	

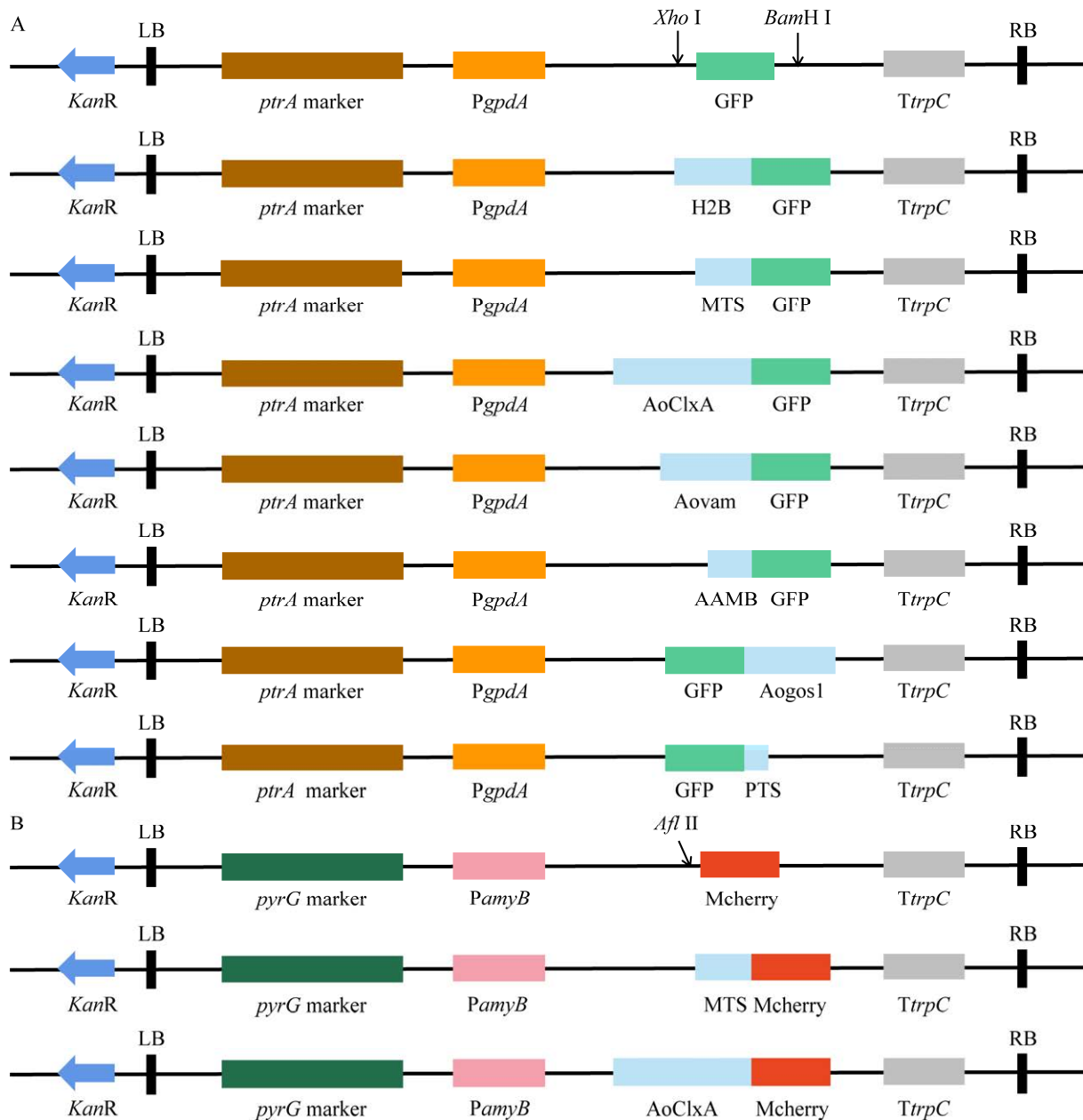


图1 融合蛋白表达载体的构建方案 A: 以 *ptrA*-pEX1 为母载体构建 GFP 融合蛋白表达载体, 筛选标记为 *ptrA* marker, 在 *gpdA* 启动子下表达, 用于细胞核、脂滴的染色和细胞器形态的观察. B: 以 pEX2B 为母载体构建 Mcherry 融合蛋白表达载体, 筛选标记为 *pyrG* marker, 在 *amyB* 启动子下表达, 用于线粒体的染色和内质网与脂滴的发育观察

Figure 1 Construction scheme of fusion protein expression vectors. A: The expression vector of GFP fusion protein was constructed with *ptrA*-pEX1 as the parent vector, which was screened by *ptrA* marker and expressed under *gpdA* promoter, which was used for staining of nuclei and lipid droplets and observation of organelle morphology. B: The expression vector of Mcherry fusion protein was constructed with pEX2B as the parent vector, which was screened by *pyrG* marker and expressed under *amyB* promoter, which was used for mitochondria staining and observation of the development of endoplasmic reticulum and lipid droplets.

脂滴共定位:表达 AAMB-GFP 的米曲霉菌株在 CD 培养基中爬片,菌丝在染色液[先用无水二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配制 1 mmol/L 尼罗红母液,再用 HBSS 缓冲液稀释 1 000 倍]中避光孵育 15 min,然后用 HBSS 缓冲液洗涤 2 次。所有荧光观察实验均使用 Leica 显微镜进行。

### 1.2.3 米曲霉生长过程中细胞器形态的观察

收集单个转化子的孢子进行培养以做进一步分析。将分生孢子悬浮液滴加至涂有 2%琼脂 CD 培养基的载玻片上,用盖玻片压片,然后将载玻片置于密封的培养皿中,30 °C 孵育 3–72 h,用 Leica 显微镜观察细胞器形态。

### 1.2.4 内质网和脂滴的共定位

为了研究内质网和脂滴的发育,将构建的表达 AoClxA-Mcherry 和 AAMB-GFP 的载体共转到米曲霉中。观察 Mcherry 和 GFP 荧光的形态变化,以研究内质网和脂滴的发育情况。

### 1.2.5 气生菌丝的细胞器形态观察

将约 5  $\mu$ L 每种菌株的孢子悬浮液滴至无菌盖玻片之间,置于 CD 琼脂培养基上,30 °C 培养 3–5 d。当菌丝爬到盖玻片的 2/3 处时拔出盖玻片,擦拭其中一面的菌丝,将另一面菌丝压在滴加 50%甘油的载玻片上,在显微镜下进行观察。

### 1.2.6 液体培养菌丝的细胞器形态观察

为了观察不同培养条件下稻瘟病菌细胞器的形态,将 7 株转化稻瘟病菌进行液体培养。将孢子液接种于 CD 培养基中,30 °C 振荡培养,挑取分散的菌丝,使用凹玻片进行显微观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 米曲霉亚细胞定位菌株的构建

采用 ptrA-pEX1 载体(含 ptrA 吡啶硫胺素抗性基因和 GFP 绿色荧光蛋白,图 2A)构建荧光

报告蛋白表达载体。将 H2B、MTS、AoClxA、Aovam、AAMB、PTS 和 Aogosl 融合到 GFP 的 N 端或 C 端来构建 GFP 标记细胞核、线粒体、内质网、液泡、脂滴、过氧化物酶体和高尔基体等 7 个细胞器的载体。采用 pEX2B 载体(含 pyrG 筛选标记基因和 Mcherry 红色荧光蛋白,图 2A)构建表达载体,将 MTS 和 AoClxA 融合到 Mcherry 的 C 端来标记线粒体和内质网,对线粒体的染色进行验证和用来进行脂滴和内质网的形态观察。载体图谱和构建结果如图 2 所示,构建成功的载体经测序验证正确后转化农杆菌并通过农杆菌介导的方法转入米曲霉中,对转化子进行荧光观察并挑选荧光信号较强的转化子作为荧光定位报告菌株进一步观察。

### 2.2 线粒体、细胞核、脂滴与特定荧光染料的共定位

为了确认所构建的融合蛋白成功地定位于目标细胞器,使用特异性荧光染料 Nile Red、DAPI、MitoTracker Green 对 AAMB-GFP、H2B-GFP、MTS-Mcherry 米曲霉菌丝进行染色,与载体的荧光蛋白进行共定位观察。通过荧光观察发现,AAMB-GFP 与 Nile Red、H2B-GFP 与 DAPI、MTS-Mcherry 与 MitoTracker Green 的荧光信号都能很好地完全重合(图 3)。因此,构建的荧光报告蛋白可以成功标记相应的细胞器。

### 2.3 米曲霉生长过程中细胞器的形态

为了观察这些荧光标记的细胞器在生长过程中的形态变化,所有转化菌株在培养 3、6、72 h 后进行荧光观察。从孢子萌发开始,细胞核均匀分布在菌丝中,可以看到孢子或菌丝中有 2 个或 2 个以上的细胞核(图 4A)。线粒体是提供能量的细胞器,在菌丝生长过程中起着至关重要的作用。线粒体在不同生长时间均呈典型的线状或管状结构,荧光信号较强(图 4B)。内质网(endoplasmic reticulum, ER)通常呈核周分

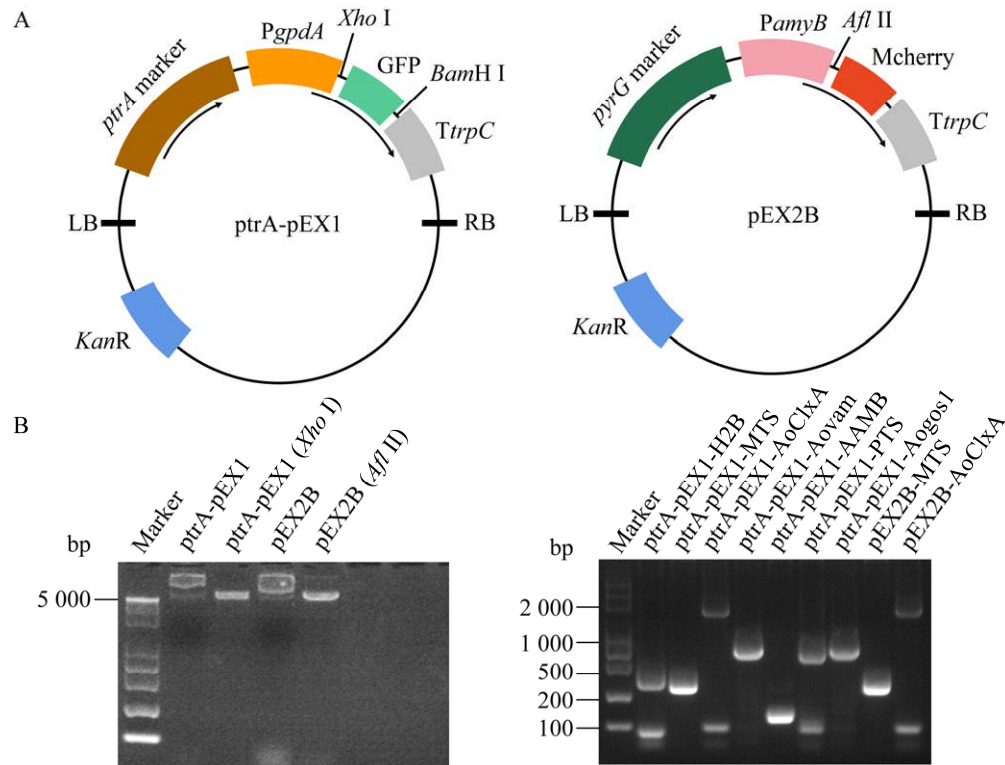


图2 融合蛋白表达载体的构建 A:含 *ptrA* 选择标记和 GFP 荧光蛋白的 *ptrA*-pEX1 二元载体(左侧), 携带 *pyrG* 选择标记和 Mcherry 荧光蛋白的二元载体 pEX2B(右侧). B: 载体线性化和基因扩增结果

Figure 2 Construction of fusion protein expression vector. A: The binary vector *ptrA*-pEX1 harboring *ptrA* marker and GFP fluorescent protein (left), the binary vector pEX2B harboring *pyrG* marker and Mcherry fluorescent protein (right). B: The results of vectors linearization and genes amplification.

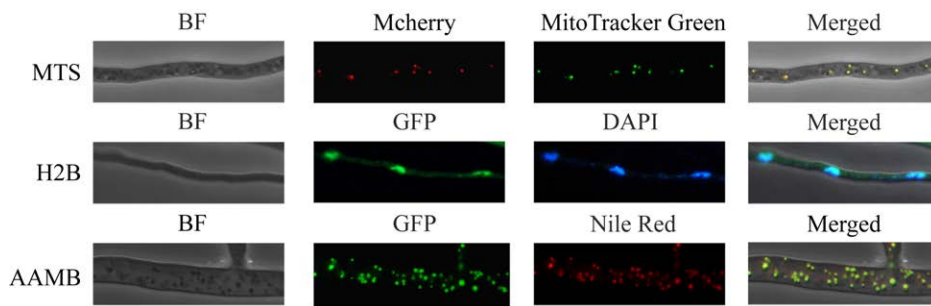
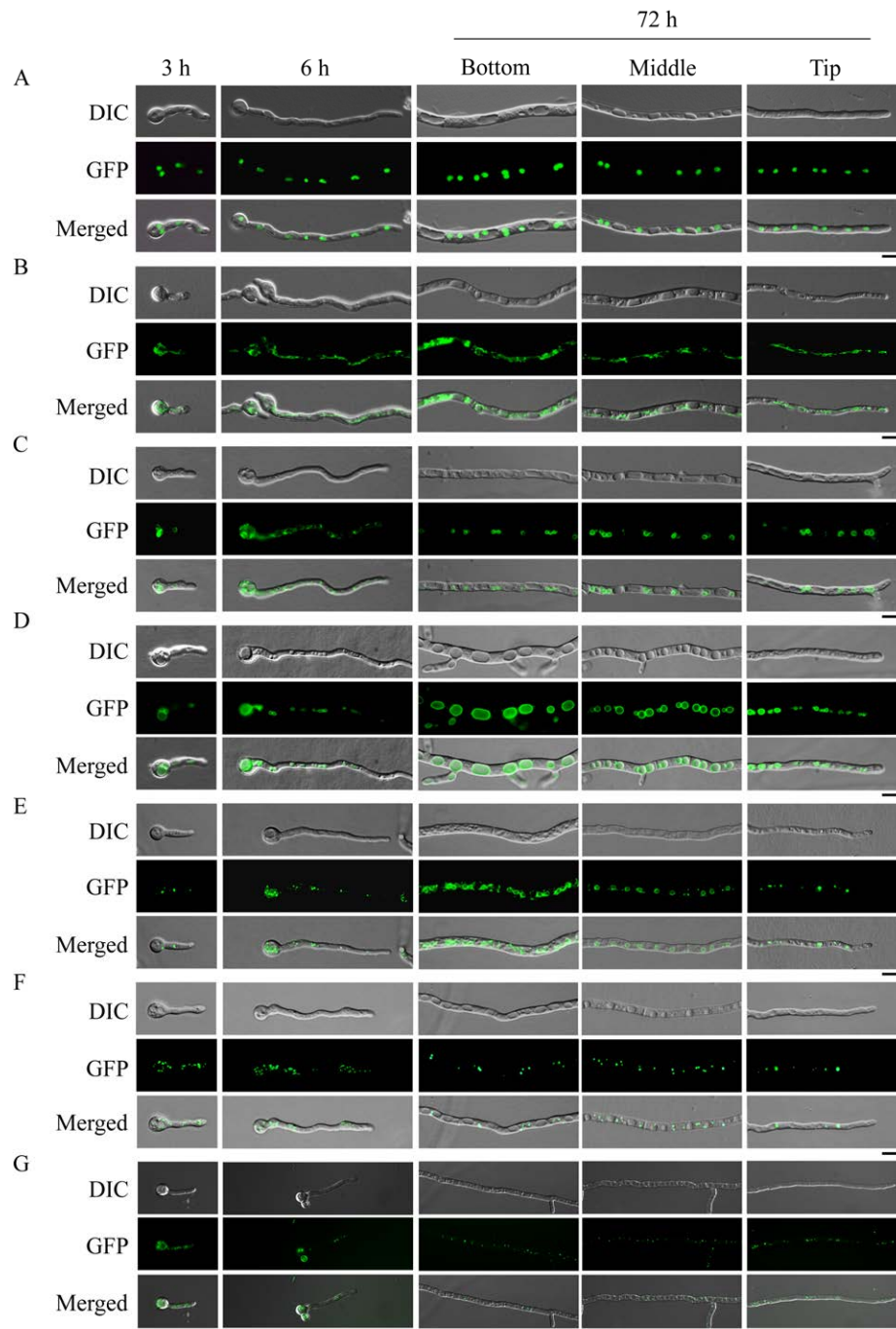


图3 MTS-Mcherry、H2B-GFP 和 AAMB-GFP 与特定荧光染料的共定位 将转化 MTS-Mcherry、H2B-GFP 或 AAMB-GFP 质粒的米曲霉 3.042 菌丝体用线粒体标记染料 MitoTracker Green、核标记染料 DAPI 或脂质标记染料 Nile Red 染色. 从左至右: 明场, 融合蛋白的荧光图像, 特定染料的荧光图像, 荧光与明场的合并图像. 比例尺=5 μm

Figure 3 Co-localization of MTS-Mcherry, H2B-GFP and AAMB-GFP with specific fluorescent dyes. The mycelium of *A. oryzae* 3.042 transformed with MTS-Mcherry, H2B-GFP or AAMB-GFP plasmid were stained with MitoTracker Green, DAPI or Nile Red. Left to right: Bright filed, fluorescent images of fused proteins, fluorescent images of specific dyes, merged images of fluorescent and bright field. Scale bar=5 μm.



**图 4** 米曲霉生长过程中细胞器的形态 A-G: 细胞器标记菌株(细胞核、线粒体、内质网、液泡、脂滴、过氧化物酶体和高尔基体)在微培养基上不同时期的形态. 携带 GFP 融合蛋白的转化子分生孢子子在 CD 琼脂培养基中 30 °C 孵育 3、6、72 h, 在 DIC 和荧光显微镜下观察. 比例尺=5  $\mu$ m

Figure 4 Morphologies of organelles during *Aspergillus oryzae* growth. A-G: Morphology of labeled strains (nuclei, mitochondria, ER, vacuoles, lipid droplets, peroxisome, and Golgi apparatus) at different periods on micro medium. Conidia of transformants harboring the GFP fusion proteins were incubated in CD agar medium at 30 °C for 3, 6, 72 h and observed with DIC and fluorescence microscope. Scale bar=5  $\mu$ m.



布和环状结构。ER 是脂质和蛋白质合成的场所，孢子萌发和菌丝生长的任何时期都离不开 ER (图 4C)。在微分干涉显微镜(differential interference contrast microscope, DIC)下，可以清楚地看到菌丝内部许多圆形的凹状结构，液泡靶向 Aovam-GFP 的绿色荧光与这些结构精准重合，表明这些结构所示即为液泡结构，并且可以观察到不同时期的液泡大小不同(图 4D)。由于脂滴定位信号蛋白位于脂滴膜上，所以可看到绿色小圆点圆环分别代表了不同大小的脂滴形态(图 4E)。从 GFP-PTS 的荧光信号可以看出，过氧化物酶体在各个生长阶段的形态都是小而致密的点(图 4F)。高尔基体显示的绿色荧光在菌丝体顶部更密集，这与它在菌丝顶端的代谢和分泌更活跃的功能是一致的(图 4G)。通过不同时期荧光观察，成功地观察到了不同时期所标记细胞的形态，从而也说明了米曲霉细胞器在不同时期具有不同形态。

#### 2.4 生长过程中内质网和脂滴的形态观察

脂滴是细胞内脂质的主要储存部位，在细胞代谢和应急反应中起着重要作用。中性脂质

在内质网中合成，并在磷脂双分子层中间积聚，形成透镜状结构。随着中性脂质的不断积累，新的脂滴从内质网膜上冒出，然后成为成熟的脂滴。为了在米曲霉中观察这种现象，使用 AoClxA-Mcherry 和 AAMB-GFP 构建了转基因菌株，分别用于跟踪内质网和脂滴。如图 5 所示，在米曲霉生长早期(如萌发 6 h 内)，脂滴和内质网的荧光是分开分布的，直到 72 h，内质网和脂滴的荧光信号在菌丝基部的定位大部分是一致的。因此，通过不同荧光标记进一步成功观察到了脂滴形成与内质网的关系，进一步证明脂滴形成于内质网。

#### 2.5 气生菌丝的细胞器形态

丝状真菌通常包含营养菌丝和气生菌丝，前面观察到的细胞器形态为固体培养基中的菌丝，属于营养菌丝。因此进一步通过爬片培养观察气生菌丝中细胞器的形态。在气生菌丝的早期，其内部结构与固体培养的营养菌丝相似。持续观察 3 d，气生菌丝的内部结构开始发生变化(图 6)，细胞核和线粒体从均匀分布逐渐变成分散的聚集状态，内质网的形态由

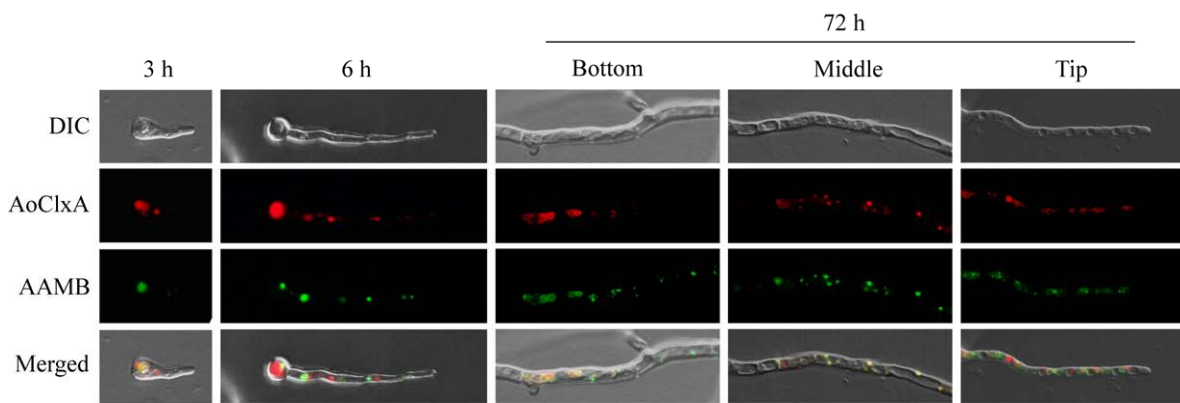
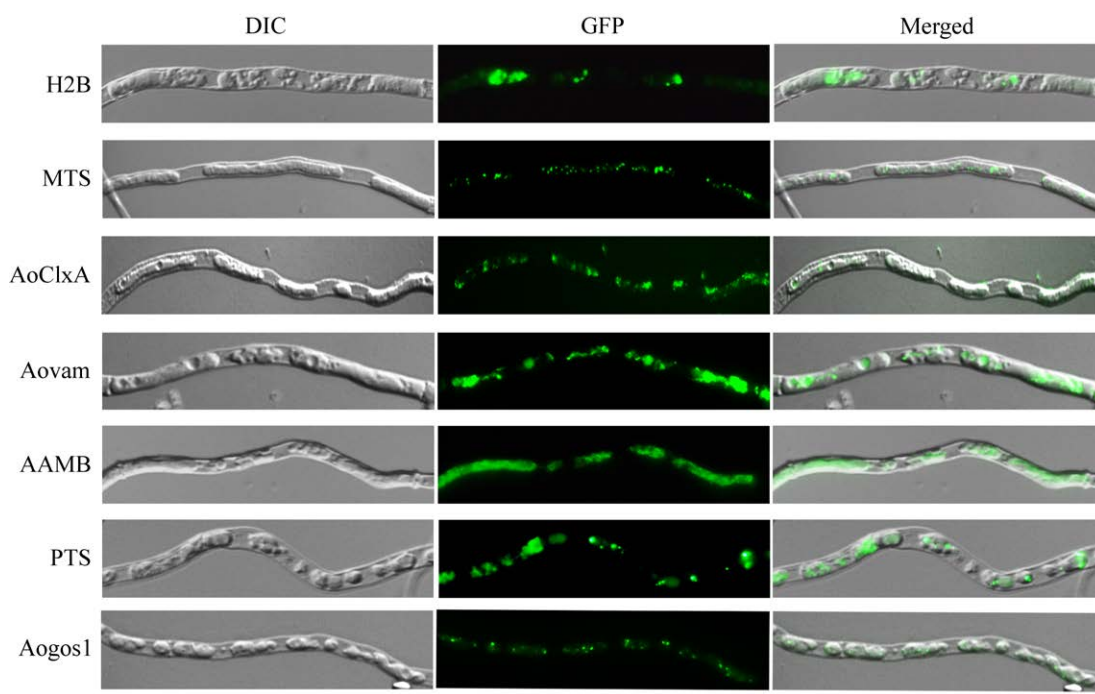


图 5 内质网和脂滴的形态 携带 AAMB-GFP 和 AoClxA-Mcherry 的转化子分生孢子在 CD 固体培养基中 30 °C 孵育 3、6、72 h，在 DIC 和荧光显微镜下观察。比例尺=5 μm。

Figure 5 The morphologies of ER and lipid droplets. Conidia of transformants harboring the AAMB-GFP and AoClxA-Mcherry were incubated in CD solid medium at 30 °C for 3, 6, 72 h and observed with DIC and fluorescence microscope. Scale bar=5 μm.



**图 6 气生菌丝细胞器形态** 将携带 GFP 融合基因的转化子分生孢子置于 CD 琼脂培养基中, 插入无菌盖玻片, 在 30 °C 下培养 3–5 d, 在 DIC 和荧光场下显微镜下观察. 比例尺=5  $\mu\text{m}$

Figure 6 Morphologies of organelles in aerial hyphae. Conidia of transformants harboring the GFP fusion proteins were incubated in CD agar medium inserted with sterilized cover glasses at 30 °C for 3–5 days and observed with DIC and fluorescence microscope. Scale bar=5  $\mu\text{m}$ .

于菌丝内部的变化不易观察到典型的环状, 液泡仍然具有清晰的特点, 呈现出圆形的凹槽状, 菌丝内容物的流动导致脂滴汇集成为一体, 观察到整体处于动态, 过氧化物酶体由于小而密, 部分呈现出圆点状, 高尔基体依旧是便于区分的小点状, 随着时间的推移, 菌丝内部出现一些分隔的膜包裹的结构, 内质网、液泡、线粒体、过氧化物酶体、脂滴、细胞核和高尔基体等细胞器都聚集在其中, 可能是由于受到环境胁迫的影响。这种区隔化的膜包裹结构只存在于成熟的气生菌丝中, 这种结构变化需要一定的时间, 其中的机理还需要进一步研究。

## 2.6 液体培养菌丝的细胞器形态

观察液体培养下的菌丝形态, 发现其与固

体培养下的营养菌丝相似(图 7), 在明场下, 液泡能观察到明显的圆形凹状, 且液泡膜荧光明显, 这与液泡分选蛋白的功能相对应。线粒体呈点线状, 细胞核呈均匀点状分布, 内质网明显在核周分布, 并未观察到气生菌丝中的特殊结构。

## 3 讨论与结论

本研究构建了 7 株米曲霉细胞器荧光报告菌株, 成功对米曲霉细胞核、线粒体、内质网、液泡、脂滴、过氧化物酶体和高尔基体进行了定位。利用荧光显微镜对这些细胞器的形态结构进行了系统、连续和动态的观察, 说明米曲霉细胞器不同时期具有不同形态。本研究发现并证实了液泡在 DIC 显微镜场下呈现出明显

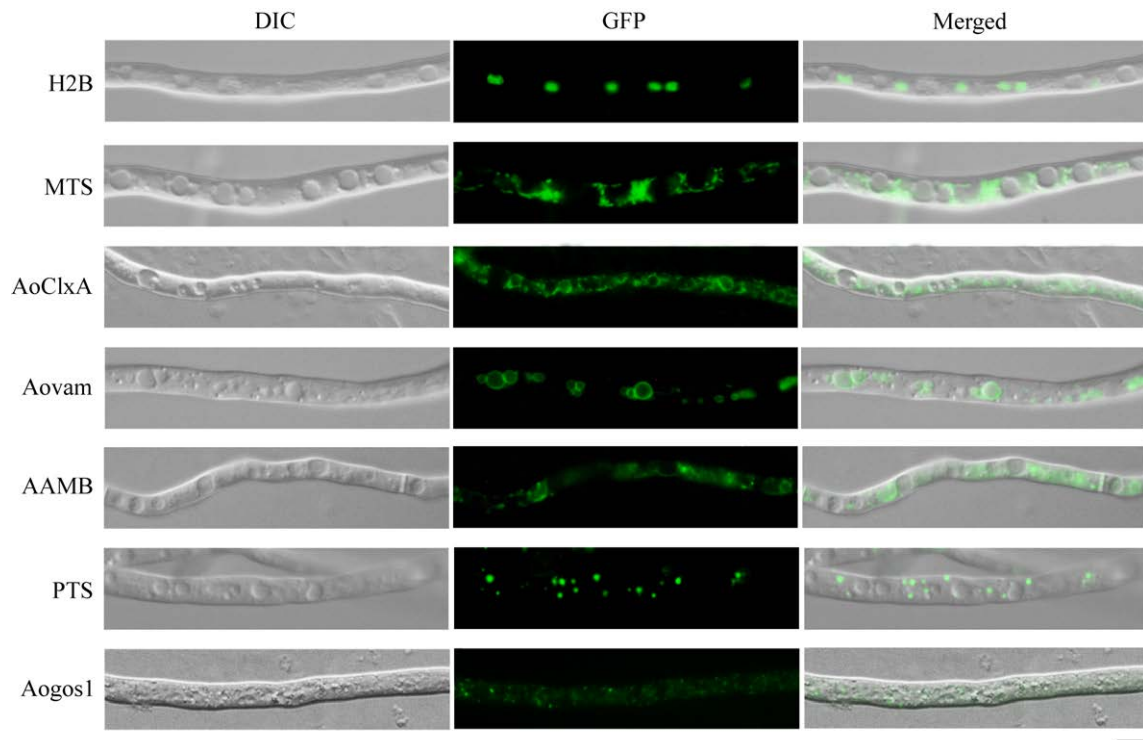


图7 液体培养下菌丝的细胞器形态 携带 GFP 融合基因的转化子分生孢子在 CD 培养基中 30 °C 孵育, 用荧光显微镜和 DIC 显微镜观察. 比例尺=5  $\mu\text{m}$

Figure 7 Morphologies of organelles in liquid culture. Conidia of transformants harboring the GFP fusion proteins were incubated in CD medium at 30 °C and observed with fluorescence and DIC microscope. Scale bar=5  $\mu\text{m}$ .

的凹形结构, 这为液泡的研究提供了支持, 后续可能不通过荧光观察就能识别液泡, 而其他细胞器没有明显特征, 必须提供特异性染料或者荧光蛋白标记来识别。本研究还观察了脂滴和内质网的形成过程, 据报道, 真核细胞中脂滴的形成与内质网密切相关<sup>[24-25]</sup>, 通过共转化观察荧光共定位情况, 进一步证明了脂滴来源于内质网。此外, 哺乳动物中的 AAMB 作为脂滴定位信号是首次在丝状真菌中使用。

对于米曲霉中亚细胞定位的研究, 研究人员大多从目的蛋白出发, 对其进行靶向定位或者对单个细胞器形态进行研究。例如, 使用 H2B-EGFP 的表达系统观察到米曲霉 *arpA* 缺失突变体中每个分生孢子的细胞核数量的增加、菌

丝顶端生长速率降低、细胞核向顶端区域的运输效率低下等现象, 这为研究 *arpA* 基因在控制细胞核进入分生孢子中的作用提供了证据<sup>[21]</sup>。PTS1-EGFP、AoCit1-EGFP、H2B-EGFP 用于研究 *AoAtg26* 在米曲霉过氧化物酶体、线粒体和细胞核自噬降解中的作用<sup>[26]</sup>。来自真菌红褐肉座菌 (*Hypocrea jecorina*) 的内切-b-N-乙酰葡萄糖苷酶 (endo-bouen-acetylglucosidase, ENGase) 在米曲霉中的高尔基体膜上表达<sup>[23]</sup>。2007 年, Watanabe 等<sup>[10]</sup>鉴定出 AoClxA 蛋白, 其定位于米曲霉内质网。研究者在 2006 年研究了米曲霉中液泡膜动力学, 并通过荧光染料证实了 AoVam 定位于液泡膜上<sup>[9]</sup>。本研究系统地对一系列米曲霉细胞器进行观察, 细胞器形态与已有文献

相符,且观察到不同形态说明米曲霉中细胞器形态的多变性。

成熟的气生菌丝可以形成膜包裹结构,而这种结构在液体和固体培养菌丝中是不存在的。利用荧光标记的细胞器,发现细胞器(包括细胞核、线粒体、内质网、液泡、脂滴、过氧化物酶体和高尔基体)包含在膜包裹结构中,推测这种形式的出现可能是由于气相菌丝在自然环境中对应激反应的保护行为,以维持正常的生命活动。通常气生菌丝的长度有限,这可能是由于营养物质的长距离运输不足。气生菌丝可以利用这种区隔结构来维持细胞活力或抵御环境胁迫。本研究为进一步研究米曲霉细胞器和米曲霉靶蛋白的定位提供了工具。

## REFERENCES

- [1] SUN YL, NIU YL, HE B, MA L, LI GH, TRAN VT, ZENG B, HU ZH. A dual selection marker transformation system using *Agrobacterium tumefaciens* for the industrial *Aspergillus oryzae* 3.042[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 29(2): 230-234.
- [2] KITAMOTO K. Cell biology of the *Koji* mold *Aspergillus oryzae*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2015, 79(6): 863-869.
- [3] JIN Q, LI GH, QIN KH, SHANG YT, YAN HH, LIU HL, ZENG B, HU ZH. The expression pattern, subcellular localization and function of three sterol 14 $\alpha$ -demethylases in *Aspergillus oryzae*[J]. Frontiers in Genetics, 2023, 14: 1009746.
- [4] GE JX, ZHANG Z, LI Y, HU ZH, HE B, LI YK, ZENG B, JIANG CM. Inhibition of *AoAur1* increases mycelial growth, hyphal fusion and improves physiological adaptation to high-temperature stress in *Aspergillus oryzae*[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(8): 477.
- [5] CHEN ZM, CHEN TM, ZHANG HX, LI YZ, FAN JX, YAO LH, ZENG B, ZHANG Z. Functional role of a novel zinc finger protein, *AoZFA*, in growth and kojic acid synthesis in *Aspergillus oryzae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2023, 89(10): e0090923.
- [6] AGNELLO M, MORICI G, RINALDI AM. A method for measuring mitochondrial mass and activity[J]. Cytotechnology, 2008, 56(3): 145-149.
- [7] TARNOWSKI BI, SPINALE FG, NICHOLSON JH. DAPI as a useful stain for nuclear quantitation[J]. Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission, 1991, 66(6): 297-302.
- [8] OPSTAD KS, BELL BA, GRIFFITHS JR, HOWE FA. An investigation of human brain tumour lipids by high-resolution magic angle spinning 1H MRS and histological analysis[J]. NMR in Biomedicine, 2008, 21(7): 677-685.
- [9] SHOJI JY, ARIOKA M, KITAMOTO K. Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. Eukaryotic Cell, 2006, 5(2): 411-421.
- [10] WATANABE T, MATSUO I, MARUYAMA JI, KITAMOTO K, ITO Y. Identification and characterization of an intracellular lectin, calnexin, from *Aspergillus oryzae* using *N*-glycan-conjugated beads[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(11): 2688-2696.
- [11] ITO M, ITO R, MIURA S, HUANG Y. Isolation of peroxisome-defective CHO mutant cells using green fluorescent protein[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2000, 32(1): 253-257.
- [12] TRELEASE RN, XIE W, LEE MS, MULLEN RT. Rat liver catalase is sorted to peroxisomes by its C-terminal tripeptide Ala-Asn-Leu, not by the internal Ser-Lys-Leu motif[J]. European Journal of Cell Biology, 1996, 71(3): 248-258.
- [13] BONGCAM V, MACDONALD-COMBER PETÉTOT J, MITTENDORF V, ROBERTSON EJ, LEECH RM, QIN YM, KALERVO HILTUNEN J, POIRIER Y. Importance of sequences adjacent to the terminal tripeptide in the import of a peroxisomal *Candida tropicalis* protein in plant peroxisomes[J]. Planta, 2000, 211(1): 150-157.
- [14] SUN YL, NIU YL, HUANG H, HE B, MA L, TU YY, TRAN VT, ZENG B, HU ZH. Mevalonate diphosphate decarboxylase MVD/Erg19 is required for ergosterol biosynthesis, growth, sporulation and stress tolerance in *Aspergillus oryzae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1074.
- [15] HUANG H, NIU YL, JIN Q, QIN KH, WANG L, SHANG YT, ZENG B, HU ZH. Identification of six thiolases and their effects on fatty acid and ergosterol biosynthesis in *Aspergillus oryzae*[J]. Applied and

- Environmental Microbiology, 2022, 88(6): e0237221.
- [16] MABASHI Y, KIKUMA T, MARUYAMA JI, ARIOKA M, KITAMOTO K. Development of a versatile expression plasmid construction system for *Aspergillus oryzae* and its application to visualization of mitochondria[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(8): 1882-1889.
- [17] ZEHMER JK, BARTZ R, LIU PS, ANDERSON RGW. Identification of a novel N-terminal hydrophobic sequence that targets proteins to lipid droplets[J]. Journal of Cell Science, 2008, 121(11): 1852-1860.
- [18] MARUYAMA JI, NAKAJIMA H, KITAMOTO K. Visualization of nuclei in *Aspergillus oryzae* with EGFP and analysis of the number of nuclei in each conidium by FACS[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(7): 1504-1510.
- [19] KURATSU M, TAURA A, SHOJI JY, KIKUCHI S, ARIOKA M, KITAMOTO K. Systematic analysis of SNARE localization in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. Fungal Genetics and Biology: FG & B, 2007, 44(12): 1310-1323.
- [20] NGUYEN KT, HO QN, PHAM TH, PHAN TN, TRAN VT. The construction and use of versatile binary vectors carrying *pyrG* auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(12): 204.
- [21] MARUYAMA JI, NAKAJIMA H, KITAMOTO K. Observation of EGFP-visualized nuclei and distribution of vacuoles in *Aspergillus oryzae arpA* null mutant[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 206(1): 57-61.
- [22] TAKAYA K, HIGUCHI Y, KITAMOTO K, ARIOKA M. A cytosolic phospholipase A2-like protein in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* localizes to the intramembrane space of the mitochondria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 301(2): 201-209.
- [23] LI QS, HIGUCHI Y, TANABE K, KATAKURA Y, TAKEGAWA K. Secretory production of N-glycan-deleted glycoprotein in *Aspergillus oryzae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 129(5): 573-580.
- [24] SUZUKI M. Regulation of lipid metabolism *via* a connection between the endoplasmic reticulum and lipid droplets[J]. Anatomical Science International, 2017, 92(1): 50-54.
- [25] ROBENEK H, HOFNAGEL O, BUERS I, ROBENEK MJ, TROYER D, SEVERS NJ. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis[J]. Journal of Cell Science, 2006, 119(Pt 20): 4215-4224.
- [26] KIKUMA T, TADOKORO T, MARUYAMA JI, KITAMOTO K. AoAtg26, a putative sterol glucosyltransferase, is required for autophagic degradation of peroxisomes, mitochondria, and nuclei in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, 81(2): 384-395.

(本文责编 郝丽芳)