

里氏木霉分泌型表达载体的构建及绿色荧光蛋白的表达

余希尧[△] 钟泽民[△] 黄毓茂* 谭博敏 蒋志琼

(华南农业大学 兽医学院 广东 广州 510642)

摘要: 【目的】构建里氏木霉分泌型表达载体,通过表达绿色荧光蛋白论证载体的可行性并初步观察绿色荧光蛋白在里氏木霉中的分泌过程。【方法】应用 PCR 及分子克隆技术将里氏木霉(*Trichoderma reesei*)纤维二糖水解酶(CBH1)的启动子及 CBH1 自身信号肽、终止子和潮霉素筛选基因依次插入骨架质粒 pUC19 中,构建出 *T. reesei* 表达载体 Ppth15。将增强型绿色荧光蛋白(eGFP)基因装载入 Ppth15 中,获得 eGFP 表达载体 Ppth15-eGFP。再将 Ppth15-eGFP 转化进 *T. reesei* 原生质体,通过潮霉素抗性筛选、基因组 PCR 检测等方法鉴定,获得阳性重组转化子。【结果】用 PDA 培养基培养阳性转化子 2–3 d 后,可在菌丝顶端、隔膜及培养基中清晰地观察到大量绿色荧光。【结论】表达载体构建成功且能够用于 eGFP 的表达,实验为进一步研究 *T. reesei* 表达其他基因提供了有效工具,同时为 *T. reesei* 胞外蛋白分泌的研究提供了参考。

关键词: 里氏木霉, 载体构建, 增强型绿色荧光蛋白, 重组表达

Construction of secretory expression vector of *Trichoderma reesei* and expression of enhanced GFP

YU Xi-Yao[△] ZHONG Ze-Min[△] HUANG Yu-Mao* TAN Bo-Min JIANG Zhi-Qiong

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: [Objective] To construct a secretory expression vector of *Trichoderma reesei* and prove its feasibility by recombinant expression of enhanced green fluorescence protein (eGFP), and observe the process of the expression of eGFP, spontaneously. [Methods] Construct the expression vector pPth15 by successively ligate the promoter of the CBH1 gene of *T. reesei*, the signal peptide sequence, the terminator and the hygromycin resistance gene into the backbone plasmid pUC19. Insert eGFP gene into pPth15 to acquire the recombinant plasmid pPth15-eGFP, and transformate it into the *T. reesei* protoplasts. Screening positive transformants via hygromycin resistance and PCR amplification. [Results] After culturing the positive transformants on the PDA medium for 2 to 3 days, green fluorescence distribution was emerged on the hyphae tips, the septum and the extracellular medium. [Conclusion] The constructed expression vector could be used for eGFP expression, and this work makes contribution to the follow-up study of heterogeneous protein expression in *T. reesei* and provides a reference in the research of extracellular protein expression of

*通讯作者: ✉: ymaohuang@scau.edu.cn

△共同第一作者

收稿日期: 2013-06-23; 接受日期: 2013-07-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

T. reesei.

Keywords: *Trichoderma reesei*, Construction of vector, Enhanced green fluorescence protein, Recombinant expression

里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是纤维素酶的重要工业生产菌株^[1]。近年来,国内外科技工作者对里氏木霉进行了大量的研究,在内源性蛋白的表达上取得了很大的进步。目前,表达量最高的菌株分泌的纤维素酶总量可达 100 g/L^[2]。纤维二糖水解酶(CBH1)的启动子是里氏木霉中非常强效的启动子^[3],其启动表达的 CBH1 占里氏木霉胞外分泌蛋白总量的 60%^[4],足见 CBH1 的启动子可以很好地启动表达外源蛋白。里氏木霉在发酵生产过程中不会产生有毒有害物质来干扰下游生产,按照经济合作发展组织(OECD)的规定,里氏木霉是公认的二十几种安全的工业生产菌株之一^[5],里氏木霉基因组大小约为 33 Mb^[6],美国能源部资助支持了对 *T. reesei* 全基因组的测序工作,并于 2008 年将全部序列发布在 NCBI 上。同原核表达系统相比,在真核蛋白表达上,丝状真菌表达系统具有许多优点,其对蛋白的折叠、修饰及糖基化比原核宿主更全面和准确,如适度的甘露糖基化和 N-糖基化^[5,7]。与哺乳动物细胞、昆虫细胞等高等生物表达系统相比,丝状真菌培养简便,成本低,生长迅速,容易大规模开发并产业化^[8]。正因里氏木霉具有这些优点,将里氏木霉改造成一种优秀的外源蛋白表达宿主成为理想的研究方向,而构建出一个简捷高效的里氏木霉外源基因表达载体则是开展研究的重要基础。随着分子生物学技术的快速发展,已经有很多异源基因通过丝状真菌进行了实验性表达^[5,8],但大部分外源蛋白的产量还达不到工业生产的要求^[9-11]。早期,大部分研究集中在使用强力启动子及优化^[12]、增加基因拷贝数^[13]、密码子优化^[14]、应用蛋白酶缺陷菌株^[15]、融合蛋白表达策略^[16]、发酵条件优化等因素来提高外源蛋白的表达量。在许多外源蛋白表达的实验中,目的蛋白的表达水平很低,而 mRNA 却可以稳定在较高的水平,这表明限制外源蛋白表达量的瓶颈主要存在于转录后阶段^[17]。目前,研究

者已经把研究方向转向蛋白分泌途径^[18]、胞内蛋白过量表达细胞控制机制^[19]、工程菌稳定性等方面。已经证实,内质网压力效应(UPR)^[20]、蛋白翻译后的加工修饰、蛋白酶的降解作用^[21]等因素在蛋白翻译及翻译后阶段具有重要作用。

本研究根据 NCBI 记录的里氏木霉 CBH1 的启动子、信号肽及终止子序列,设计引物扩增得到启动子及信号肽片段 *Pcbh1* 和终止子片段 *Tcbh1*。PCR 扩增出潮霉素磷酸转移酶基因(*HygB*)。以 pUC19 质粒为骨架,构建出里氏木霉分泌型表达载体 Ppth15,并通过成功表达增强型绿色荧光蛋白(eGFP)证明该载体的可行性及表达系统的正确性,同时清晰地观察到绿色荧光蛋白在菌丝中的分泌特点,为进一步研究 *T. reesei* 表达其他基因提供了有效工具,同时为里氏木霉胞外蛋白分泌的研究提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒: 里氏木霉 ATCC 56765 购自中国工业微生物菌种保藏中心;质粒 sGFP(含有潮霉素磷酸转移酶基因 *HygB*),质粒 pEN51(含有增强型绿色荧光蛋白基因 *eGFP*)由本实验室构建;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α ,骨架质粒 pUC19、质粒 Simple-pMD-18T 购自于 TaKaRa 公司。

1.1.2 试剂及工具酶: 丝状真菌基因提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、纯化试剂盒购自 Omega 公司;各限制性内切酶、T4 连接酶、DNA 聚合酶、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;PCR 引物合成及测序由 Invitrogen 公司完成,氨苄青霉素、潮霉素 B、溶菌酶、蜗牛酶购自 Sigma 公司;溶壁酶购自广东微生物菌种保藏中心;培养基成分如蛋白胨、酵母提取物、葡糖糖、PDA 培养基等均购自北京鼎国生物技术公司;低分子量蛋白质 Marker1 购自北京中科瑞泰公司;其他试剂均为国

产分析纯。

1.1.3 培养基：LB 液体培养基(g/L)：胰蛋白胨 10，酵母提取物 5，NaCl 10；固体 LB 培养基在液体 LB 培养基基础上加 15 g 琼脂粉。里氏木霉菌丝基础培养基：Mandels 营养盐浓缩液 100 mL，Mandels 微量元素浓缩液 1 mL，1 mol/L 的柠檬酸缓冲液(pH 4.5) 50 mL，吐温-80 2 mL，胰蛋白胨 1.5 g，D-葡萄糖 20 g，双蒸水定容至 1 L。原生质体再生培养基由含 0.6 mol/L 的蔗糖，1.5%琼脂粉，100 mg/L 潮霉素的菌丝基础培养基构成。PDA 培养基(g/L)：土豆琼脂葡萄糖粉 40，双蒸水定容至 1 L。发酵培养基：以 20 g 麦麸替代 20 g 葡萄糖的基础培养基。配制完成后均 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 备用。

1.2 方法

1.2.1 里氏木霉的培养和基因组提取：将里氏木霉接种到 PDA 斜面培养基上培养 6–7 d，出现大量绿色分生孢子后，用 1–2 mL 无菌水配制浓度为 5×10^6 – 5×10^7 个/mL 孢子悬浮液。取 1 mL 接种于 100 mL 菌丝基础培养基中培养 24 h (100 r/min、30 °C)。将菌丝收集后用液氮处理 2–3 次并研磨，使用 Omega 公司的丝状真菌基因提取试剂盒提取基因组。

1.2.2 PCR 引物设计及序列扩增：根据 NCBI 的序列，运用 Primer 5 软件设计引物。扩增 CBH1

的启动子及信号肽的引物为 pPcbh1，下游引物的 *Spe* I、*EcoR* V、*Afl* II 三个酶切位点构成多克隆位点；扩增 CBH1 终止子序列的引物为 pTcbh1；设计扩增 *HygB* 及其启动子 *PgpdA* 和终止子 *trpC* 的引物为 pHygB；设计扩增绿色荧光蛋白序列的引物为 peGFP。具体的 PCR 引物序列见表 1。

使用引物 pPcbh1 和 pTcbh1 从里氏木霉基因组里扩增出 *Pcbh1* 和 CBH1 的信号肽和 *Tcbh1*；以质粒 sGFP 为模板，*PhygB* 为引物扩增出 *HygB* 及启动子和终止子；以质粒 pEN51 为模板，pGFP 为引物扩增出绿色荧光蛋白序列。

1.2.3 表达载体 Ppth15 的构建及 eGFP 的装载：PCR 扩增得到的 *Tcbh1* 经纯化试剂盒纯化后用 *Sal* I 和 *Bam*H I 进行双酶切，然后与经过同样双酶切的 pUC19 质粒进行连接，得到重组质粒 Pt3A；用 *Sal* I 和 *Spe* I 同时双酶切 *Pcbh1* 和重组质粒 Pt3A，经纯化后，将这两个片段进行连接得到重组质粒 Ppt8A；再用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 同时双酶切 *HygB* 序列和重组质粒 Ppt8A，经纯化后，将这两个片段进行连接得到重组质粒 Ppth15，即里氏木霉外源基因表达载体。对 PCR 扩增得到的 *eGFP* 序列和表达载体 Ppth15 同时用 *Afl* II 和 *Spe* I 进行双酶切处理，连接得到含有 *eGFP* 的表达载体 Ppth15-*eGFP*。载体构建如图 1 所示。

表 1 PCR 引物设计
Table 1 Design of PCR primers

引物名称 The names of primers	引物序列 Primer sequences (5'→3')	酶切位点 Restriction sites
pPcbh1	P1: CGCGTCGACAATGCGGCCGCAATTCTGGAGACGGCTTGTGAATC P2: GGACTAGTGC GGATATCCGCCTTAAGAGCACGAGCTGTG GCCAAGAAG	<i>Sal</i> I, <i>Not</i> I <i>Spe</i> I, <i>EcoR</i> V, <i>Afl</i> II
pTcbh1	P1: ACGCGTTCGACGGACTAGTAGGTCACCTTCTCCAACAT P2: CGCGGATCCACGAAGAGCGGCGATTCTA	<i>Sal</i> I, <i>Spe</i> I <i>Bam</i> H I
pHygB	P1: CGCGGATCCGATCTTTCGACACTGAAATACGTCGAG P2: GGGGTACCCGGTTAACGGTCGAGTGGAGATGTGGAGT	<i>Bam</i> H I <i>Kpn</i> I, <i>Hpa</i> I
peGFP	P1: GCGCTTAAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG P2: GGACTAGTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	<i>Afl</i> II <i>Spe</i> I

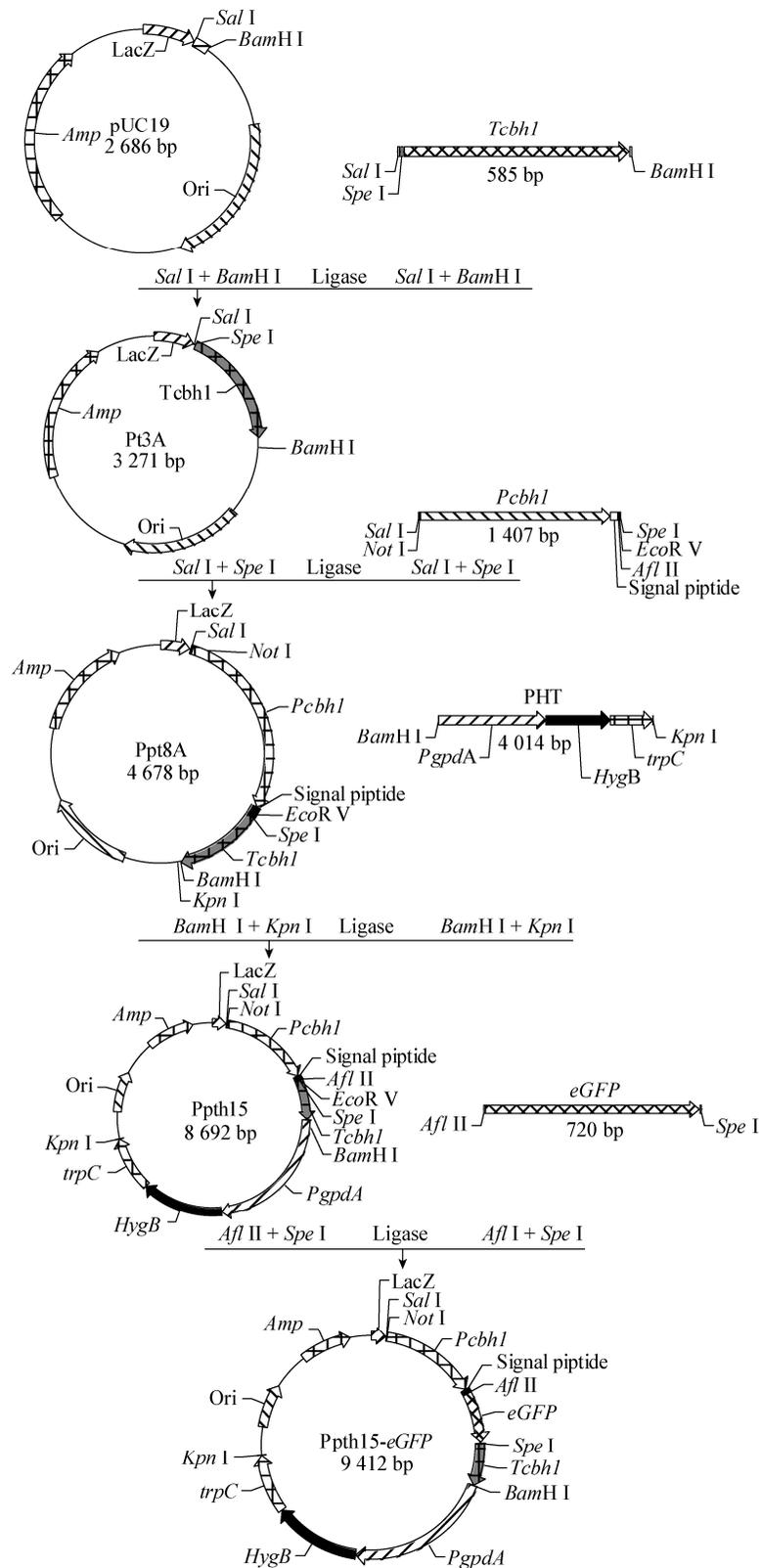


图1 里氏木霉绿色荧光蛋白表达载体 *Ppth15-eGFP* 的构建
Figure 1 Construction of expression vector of *T. reesei* *Ppth15-eGFP*

1.2.4 表达质粒转化里氏木霉及绿色荧光蛋白的检测：原生质体制备和转化方法在参照 Penttila M. 等^[22]方法的基础上稍加改变，即酶解液为 2%溶壁酶、1%蜗牛酶、1%溶菌酶溶于高渗液(0.6 mol/L NaCl、0.2 mol/L CaCl₂)制备而成。将转化液均匀涂布在含有 100 mg/L 潮霉素的再生培养基上。28 °C 培养 2-3 d，阳性转化子长出后，参照郑红玉等^[23]的方法，在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。

1.2.5 *eGFP* 基因的 PCR 鉴定和蛋白凝胶电泳分析：将观测到有荧光产生的菌丝转接到 PDA 培养基上培养 6-7 d 后，按 1.2.1 的提取方法提取基因组 DNA，以引物 peGFP 作为检测引物鉴定 *eGFP* 基因是否已经整合入里氏木霉基因组中。同时将 10⁸ 个阳性转化子的孢子接种到 100 mL 发酵培养基中，150 r/min、30 °C 培养 48 h，取发酵上清液通过真空干燥浓缩 5 倍后进行蛋白凝胶电泳分析，检测发酵液中是否有绿色荧光蛋白产生。

2 结果与分析

2.1 里氏木霉基因组 DNA 的提取：使用丝状真菌基因提取试剂盒提取里氏木霉基因组 DNA，提取结果通过核酸凝胶电泳检验，如图 2 所示。

2.2 *Pcbh1*、*Tcbh1*、*HygB*、*eGFP* 的基因克隆：以 *T. reesei* 基因组为模板，扩增得到 *Pcbh1* 及 *Tcbh1* 片段，大小分别为 1.4 kb 和 0.6 kb，其中 CBH1 信号肽为 51 个核苷酸编码，该序列随 *Pcbh1* 一起扩增得到，具体序列为 5'-ATGTATCGGAAGTTGGCCGTGCT-3'。以质粒 sGFP 为模板，扩增得到 *HygB* 片段，大小为 4 kb。以质粒 pEN51 为模板，扩增得到 *eGFP* 片段，大小为 0.7 kb，凝胶电泳结果见图 3、4。

2.3 表达载体 Ppth15 的构建及 *eGFP* 的装载：通过将扩增得到的 *Pcbh1*、*Tcbh1*、*HygB*、*eGFP* 序列分别通过限制性内切酶处理相应酶切位点后，使用 T4 连接酶依次连接到 pUC19 骨架质粒上，得到里氏木霉外源基因表达载体 Ppth15，大小为 8 750 bp。通过双酶切质粒 Ppth15 和 *eGFP*，然后连接得到 *eGFP* 表达载体 Ppth15-*eGFP*。用 *Afl* II 和 *Spe* I 对

该表达质粒进行双酶切后进行凝胶电泳鉴定，得到 8.8 kb 载体片段和 0.7 kb 的 *eGFP* 片段(图 5)。最后对整个表达质粒进行全基因测序，确认绿色荧光蛋白基因完整无误地被装载入表达载体 Ppth15 中。

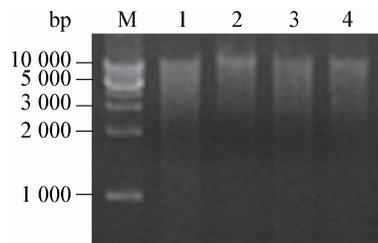


图 2 里氏木霉基因组 DNA 提取结果

Figure 2 Results of *T. reesei* genome DNA extraction

注：M：1 kb marker；1，2，3，4：里氏木霉基因组。

Note: M: 1 kb marker; 1, 2, 3, 4: *T. reesei* genome.

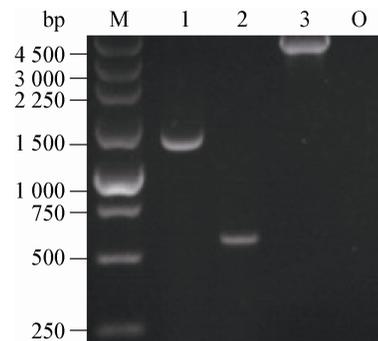


图 3 *Pcbh1*、*Tcbh1*、*HygB* 的 PCR 结果

Figure 3 PCR results of *Pcbh1*, *Tcbh1* and *HygB*

注：M：250 bp marker；1：*Pcbh1*；2：*Tcbh1*；3：*HygB*；O：空白对照。

Note: M: 250 bp marker; 1: *Pcbh1*; 2: *Tcbh1*; 3: *HygB*; O: Blank control.

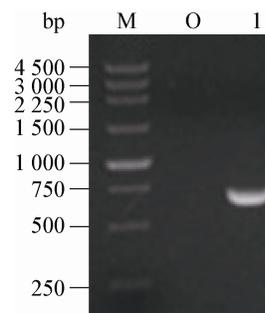


图 4 *eGFP* 扩增结果

Figure 4 PCR result of *eGFP*

注：M：250 bp marker；O：阴性对照；1：*eGFP*。

Note: M: 250 bp marker; O: Negative control; 1: *eGFP*.

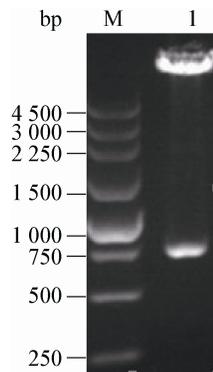


图5 Ppth15-*eGFP* 质粒双酶切鉴定
Figure 5 Identification of restriction enzyme digestion of Ppth15-*eGFP*

2.4 绿色荧光的观察: 将阳性转化子的孢子进行2-3代抗性筛选,最后选取能在含有175 mg/L HygB浓度的PDA平板上良好生长的菌株在荧光显微镜下观察。在蓝紫外光的激发下,可以观察到整个培养基中都发出强烈的绿光(图6A),在这种强烈绿光的背景下无法观察到菌丝。而在菌落的边缘、荧光较暗的部位,可以观察到单个菌丝的形态和荧光分布(图6B),观察发现,在菌丝的横隔膜、菌丝顶端均有大量绿色荧光被激发(图6B、C),该现象一定程度上揭示了外源蛋白在里氏木霉中表

达的分泌路径及聚集部位。同时结合培养基中有大量荧光被激发的现象,可以推测有大量绿色荧光蛋白由菌丝顶端被分泌进入培养基中,而本研究构建的载体所用的纤维二糖水解酶(CBH1)的启动子及其自身信号肽具有启动蛋白表达并引导分泌到胞外的功能,故证明 *Pcbh1* 及其自身信号肽有效地辅助了绿色荧光蛋白的分泌表达。

2.5 阳性转化子的PCR鉴定和蛋白凝胶电泳分析: 选取在荧光显微镜下有绿色荧光蛋白产生的阳性菌群进行扩大培养,然后根据1.2.1中提到的方法提取基因组。以阳性转化子基因组为模板、未转化表达质粒的 *T. reesei* 基因组为阴性模板,使用引物 peGFP 作为检测引物来进行PCR检测。结果如图7所示,该株阳性转化子基因组PCR得到了700 bp大小的条带,而阴性组无条带产生,表明绿色荧光蛋白基因已经成功整合入里氏木霉基因组中。对阳性转化子进行发酵培养48 h后,吸取发酵液离心后,再将发酵液真空干燥浓缩5倍后进行SDS-PAGE检测。结果如图8所示,在22 kD和31 kD条带之间,检测到一条27 kD大小的蛋白条带,而在未装载 *eGFP* 的空载体转化子发酵液中并未检测到,这与绿色荧光蛋白大小相符,可证明绿色荧光蛋白已经被成功分泌到发酵液中。

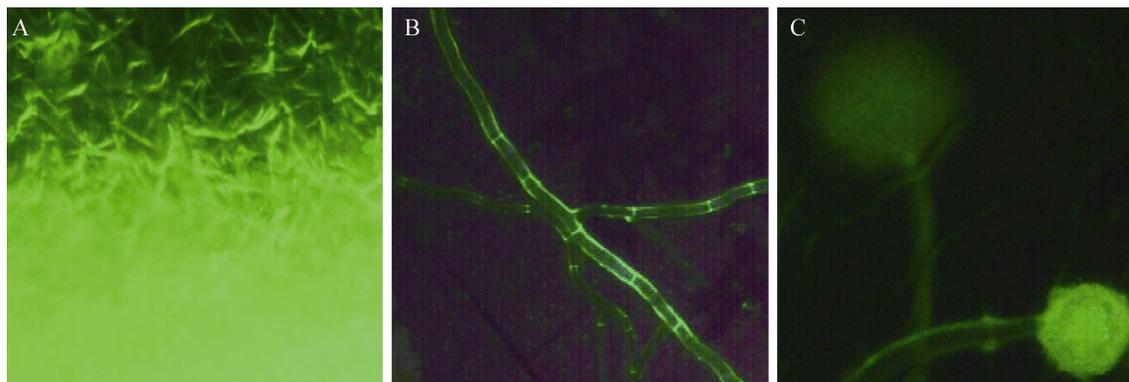


图6 阳性转化子绿色荧光的观察

Figure 6 Observation of green fluorescence of positive transformants

注: A: 培养基荧光观察; B: 菌丝横隔膜荧光观察; C: 菌丝顶端荧光观察。

Note: A: Fluorescence in medium; B: Fluorescence in hyphae septums; C: Fluorescence in hyphae tips.

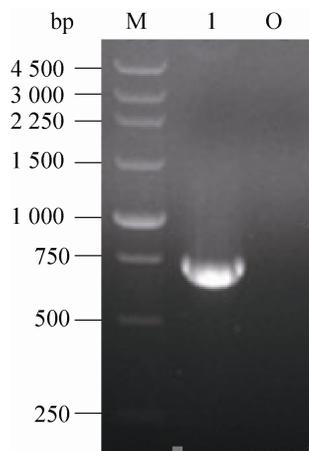


图7 阳性转化子鉴定结果

Figure 7 Identification of positive transformants

注：M：250 bp marker；O：阴性对照；1：eGFP.

Note: M: 250 bp marker; O: Negative control; 1: eGFP.

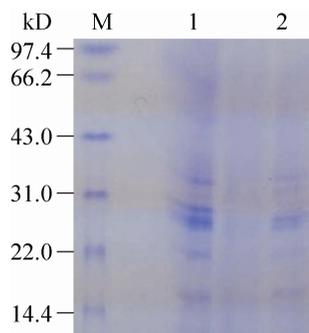


图8 阳性转化子表达上清液的 SDS-PAGE 分析

Figure 8 SDS-PAGE of positive transformants culture supernatants

注：M：低分子量蛋白质 Marker1；1：阳性转化子；2：空载体转化子对照.

Note: M: LMW protein marker1; 1: Positive transformants; 2: Negative control.

3 讨论

里氏木霉是一种具有巨大蛋白分泌潜力的微生物，并且一直以来被认为是安全的工业生产菌株，在同源蛋白表达方面，该表达系统已满足工业生产的要求，且质量优异，产量巨大。但在异源蛋白表达方面，除仅有的数种异源蛋白表达量满足工业化生产外，该表达系统尚不足以进行工业化生产。随着近年来里氏木霉基因组学和蛋白组学的相

关研究取得突飞猛进的发展，限制异源表达的瓶颈可能随时被打破，另一个类似于酵母表达系统稳定高效的异源蛋白表达系统即将产生。

本研究构建的里氏木霉外源基因表达载体 Ppth15，使用了里氏木霉最强效的启动子 *Pcbh1*，并引入 CBH1 自身信号肽来介导目的蛋白的分泌性表达。通过引物设计，在 *Pcbh1* 上游引入 *Sal I-Not I* 2 个酶切位点，其目的是为后续实验，如启动子的替换、基因改造等预留空间；在启动子下游使用 *Spe I-EcoR V-Afl II* 3 个常用酶切位点构成了多克隆位点，后续工作还可以在这个位点插入多种不同的酶切位点。根据坎贝尔机制^[24]，本实验使用里氏木霉 CBH1 的启动子 *Pcbh1* 与终止子 *Tcbh1* 形成两段同源性序列，以达到将目的基因表达框与里氏木霉 CBH1 表达框进行定向整合及替换的目的。表达载体 Ppth15 上搭载了潮霉素磷酸转移酶基因 (*HygB*)，启动 *HygB* 表达的是三磷酸甘油醛脱氢酶基因启动子 (*PgpdA*)，*PgpdA* 是组成型启动子，故当 *HygB* 整合入里氏木霉基因组后，它的翻译和表达不受培养基营养成分的影响，由此可使阳性转化子的筛选工作简单化。

本实验成功地在里氏木霉中表达了绿色荧光蛋白，通过荧光显微镜可以清楚地观察到菌丝的顶端、隔膜及培养基中有大量荧光，这与丝状真菌胞外蛋白主要通过菌丝顶端分泌的论断一致。但我们还发现一个有趣的现象，在横隔附近的细胞壁上，也可以看到有 eGFP 的堆积，分析原因可能是当横隔小孔转运 eGFP 的能力饱和后，造成 eGFP 的堆积，诱导宿主激活另一种蛋白分泌机制，同样的现象在黑曲霉表达中也有报道^[25]。通过对阳性菌株的发酵上清浓缩后进行 SDS-PAGE 分析，可以在预计大小位置观察到条带，这证明了绿色荧光蛋白被成功表达并分泌到了胞外。不可否认的是，在发酵液未经浓缩处理前，eGFP 的 SDS-PAGE 条带是不清晰的，说明表达量尚未达到最大化、发酵条件也并非最优。后续实验可以在发酵条件、密码子优化，启动子修饰及选用蛋白酶缺陷菌株上进行综合

优化、由此来提高外源蛋白的表达量。里氏木霉外源基因表达载体 Ppth15 的成功构建为进一步研究里氏木霉表达其他外源蛋白提供了有效的载体工具,绿色荧光蛋白的表达揭示了外源蛋白在里氏木霉中分泌的过程和特点,为里氏木霉高产工程菌株的培育提供了研究方向。

参 考 文 献

- [1] 汪天虹, 吴静, 邹玉霞. 瑞氏木霉分子生物学研究进展[J]. 菌物系统, 2000, 19(1): 147-152.
- [2] Guangtao Z, Hartl L, Schuster A, et al. Gene targeting in a nonhomologous end joining deficient *Hypocrea jecorina*[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 139(2): 146-151.
- [3] Harkki A, Mantyla A, Penttila M, et al. Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulase profiles[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1991, 13(3): 227-233.
- [4] Durand H, Clanet M, Tiraby GER. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1988, 10(6): 341-346.
- [5] Ward OP. Production of recombinant proteins by filamentous fungi[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(5): 1119-1139.
- [6] Diener SE, Chellappan MK, Mitchell TK, et al. Insight into *Trichoderma reesei*'s genome content, organization and evolution revealed through BAC library characterization[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41(12): 1077-1087.
- [7] Salovuori I, Makarow M, Rauvala H, et al. Low molecular weight high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Nature Biotechnology, 1987, 5(2): 152-156.
- [8] 钟耀华, 王晓利, 汪天虹. 丝状真菌高效表达异源蛋白研究进展[J]. 生物工程学报, 2008, 24(4): 531-540.
- [9] Nevalainen KMH, Te'O V SJ, Bergquist PL. Heterologous protein expression in filamentous fungi[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(9): 468-474.
- [10] van den Hombergh JP, van de Vondervoort PJ, Fraissinet-Tachet L, et al. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases[J]. Trends in Biotechnology, 1997, 15(7): 256-263.
- [11] Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production[J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20(5): 200-206.
- [12] Wang LP, Ridgway D, Gu TY, et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(2): 115-129.
- [13] 刘侗. 多拷贝策略构建瑞氏木霉外源基因系列表达载体[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2005, 58.
- [14] Te'O V SJ, Cziferszky AE, Bergquist PL, et al. Codon optimization of xylanase gene *xynB* from the thermophilic bacterium *Dictyoglomus thermophilum* for expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 190(1): 13-19.
- [15] 汪天虹, 刘侗, 刘世利, 等. 瑞氏木霉外源基因表达系统中受体菌株的改造[J]. 菌物学报, 2004, 23(2): 248-254.
- [16] Zhong YH, Liu X, Xiao P, et al. Expression and secretion of the human erythropoietin using an optimized *cbh1* promoter and the native CBH I signal sequence in the industrial fungus *Trichoderma reesei*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(5/6): 1169-1177.
- [17] Conesa A, Punt PJ, van Lwijk N, et al. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view[J]. Fungal Genetics and Biology, 2001, 33(3): 155-171.
- [18] Shoji JY, Arioka M, Kitamoto K. Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(1): 7-14.
- [19] Valkonen M, Penttila M, Saloheimo M. The *ire1* and *ptc2* genes involved in the unfolded protein response pathway in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 272(4): 443-451.
- [20] Saloheimo M, Lund M, Penttila AME. The protein disulphide isomerase gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1999, 262(1): 34-45.
- [21] Hampton RY. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2002, 14(4): 476-482.
- [22] Penttila M, Nevalainen H, Ratto M, et al. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Gene, 1987, 61(2): 155-164.
- [23] 郑红玉, 黄毓茂, 余希尧, 等. 黑曲霉分泌表达载体的构建以及绿色荧光蛋白的表达[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(4): 574-579.
- [24] Vosman B, Kooistra J, Olijve J, et al. Integration of vector-containing *Bacillus subtilis* chromosomal DNA by a Campbell-like mechanism[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1986, 204(3): 524-531.
- [25] Gordon CL, Khalaj V, Ram AF, et al. Glucoamylase: green fluorescent protein fusions to monitor protein secretion in *Aspergillus niger*[J]. Microbiology, 2000, 146(Pt2): 415-426.