

中文摘要

真菌疏水蛋白（fungal hydrophobin）是一类分泌性的具中等疏水性的小分子结构蛋白。疏水蛋白在结构上具有八个位置相对保守的半胱氨酸残基和大量的疏水氨基酸，其性质特点是遇到亲水-疏水界面会自我装配成两亲性薄膜。疏水蛋白对丝状真菌的生长和发育过程起重要作用并具有潜在的应用前景。本论文以瑞氏木霉疏水蛋白 HFBI 为模式研究了小试规模的疏水蛋白生产技术并成功地获得了一整套 HFBI 小试发酵技术。本论文还针对 HFBI 的分离纯化方法进行了深入的探讨。使用补料技术在 30L 全自动发酵罐发酵瑞氏木霉高产工程菌株 NQM3 共 71 小时，放罐体积 18.2L，生物量 17.39 g/L，菌丝体 HFBI 含量 508.4 mg/L。纯化使用组合工艺：SDS 法、ATPS 法和层析法联用，计算头两步纯化总收率为 50%。小试的成功为中试和应用奠定了坚实的基础。

关键词：真菌疏水蛋白 瑞氏木霉 HFBI 小试生产

ABSTRACT

Fungal hydrophobins are small, secreted, moderately hydrophobic structural proteins, which are characterized by the presence of eight conserved cysteine residues and have a special property to self-assemble at hydrophilic-hydrophobic interfaces into a highly amphipathic film. Hydrophobins play a role in a broad range of processes in the growth and development of filamentous fungi, and have putative applications. In this thesis, it is reported that a small-scale fermentation production process of the hydrophobin HFBI of *Trichoderma reesei* was studied and a series of small-scale fermentation production techniques of HFBI was developed successfully. The methods of purification of the hydrophobin HFBI was also studied in this thesis. A fed-batch fermentation of HFBI-overproducing *Trichoderma reesei* NQM3 was performed for 71 hours by a 30-L automatic fermentor and at the end of the fermentation, 18.2 L of total volume, 17.39 g/L of biomass and 508.4 mg/L of HFBI in mycelium were obtained. A combination of purification techniques including SDS-extraction, ATPS separation and chromatography was studied. The 50% of total yield was achieved if the first two steps of purification were calculated. The achievement of small-scale-production of HFBI paves a way for larger-scale production and application of hydrophobins.

Keywords: fungal hydrophobin, *Trichoderma reesei*, HFBI, small-scale-production

第一部分 绪论

1. 真菌疏水蛋白综述

1.1 真菌疏水蛋白的特性

疏水蛋白(hydrophobin)^[1,2]是高等丝状真菌在特定发育阶段大量分泌的一类特殊的小型结构蛋白。这类蛋白具有两大特性:(1)氨基酸序列差别很大,但都保留有八个位置相对保守的半胱氨酸残基、前体的N段都有指导分泌到细胞外的信号肽和极多的疏水性氨基酸。氨基酸序列的水溶性图谱也很相似。成熟蛋白的结构通式见图1。(2)分泌到细胞外的疏水蛋白在亲水-疏水界面自我装配成约10nm厚的两亲性薄膜,这层薄膜的形成不需要其它物质的协助并且性质很稳定^[3,4,5]。

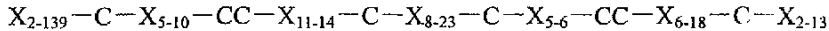


图1.成熟真菌疏水蛋白的一级结构
图中X代表除C以外的任何氨基酸残基

Fig 1. Primary structure of mature fungal hydrophobins.

有关疏水蛋白在细胞内肽链折叠和构象变化的研究不多。成熟的疏水蛋白在细胞外具有三种状态:游离单体、可溶性多聚体和界面自组装的多聚体膜^[6]。关于疏水蛋白的三维结构所知不多。X射线的核磁共振研究表明SC3的甘露糖残基暴露在装配好的SC3膜的亲水面^[7]。有证据显示二聚体SC3是溶液中聚合和亲水-疏水界面自我组装的起始元件^[7,8]。当前三维结构测定疏水蛋白只有唯一的一个:HFBI,见图2。其组成显示,蛋白表面基本亲水,为一个 α -螺旋的紧密单环和包裹两个二硫键四个反向平行的 β -链, β -发夹环含有几个保守的脂肪族侧链,形成扁平的疏水碎片^[9]。疏水蛋白单体稳定性很差。容易被蛋白酶降解和在高pH下脱酰胺。有趣的是,发现SDS可以抑制蛋白酶对HFBI的降解。另外,发现疏水蛋白非常耐热^[10]。疏水蛋白在水中和60%乙醇中的溶解很高。如疏水蛋白SC3单体在80℃以下加热聚合不明显,在液氮和-20℃形成不多的多聚物,室温下超滤聚合不明显,可溶于水,2% SDS,60%乙醇,0%~50%丙酮,0%~60%乙腈;在50%乙醇振荡无聚合,在纯水中振荡立即聚合^[3]。

1.2 真菌疏水蛋白的种类和分布

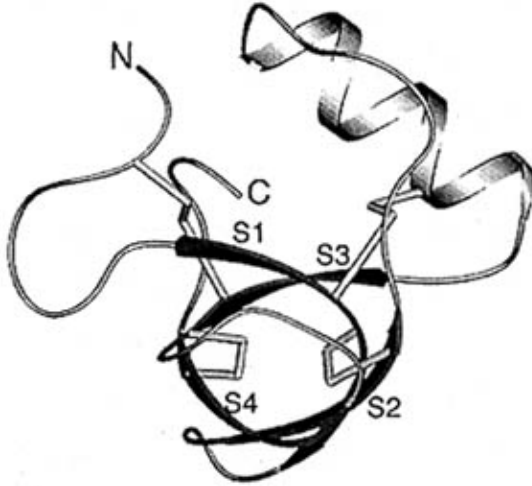


图2. HFBII分子的三维结构。黄色为二硫键，紫色为 β -折叠结构，蓝色为 α -螺旋结构^[9]。

Fig.2 Structure of HFBII in stereo.

根据在水缘性图谱和性质差异，可以把疏水蛋白分为 I 型和 II 型^[11]。在 I 型疏水蛋白中紧接着半胱氨酸双联体（Cys2-Cys3 和 Cys6-Cys7）之后的是亲水性氨基酸的延伸，而在 II 型疏水蛋白中则在半胱氨酸双联体之后直接地与疏水性氨基酸相连。另外，与 II 型疏水蛋白的相比较，在 I 型疏水蛋白中分开第 3 和第 4 个半胱氨酸残基的氨基酸数目要少些（见图 3）^[12]。迄今为止，仅在子囊菌中发现 II 型疏水蛋白；而 I 型疏水蛋白在子囊菌和担子菌都有发现。

I 型疏水蛋白形成的膜是高度不溶的，热 SDS 不能使其解聚，仅能在如甲酸和三氟乙酸之类的极端试剂中离解。相比，II 型疏水蛋白形成的聚合物的稳定性

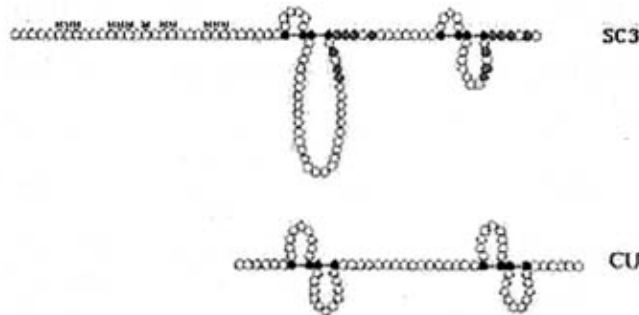


图 3. 推测的 I 型疏水蛋白 SC3 和 II 型疏水蛋白 CU 的二硫键结合方式。

Fig.3 Putative primary structure of hydrophobins. Class I: SC3 and class II: CU (SC3 的二硫键组成模式假设同 CU)

稍差。如 CU 和 CRP 的聚合物能被 60% 乙醇和 2% SDS 离解, 而且装配好的 CU 在受压和冷却中也能离解。最具典型特征的 I 型疏水蛋白是裂褶菌的 SC3^[11-8], 而 II 型疏水蛋白的代表是 CU^[13]和 HFBI^[10]。

根据 NCBI 的蛋白质数据库索引疏水蛋白“hydrophobin”所获得的 226 条序列, 并参考公开的文献, 经整理认为到目前(二〇〇四年五月十五日)为止, 共在约 31 种真菌中发现约 68 种疏水蛋白(见表 1)。将这些序列用软件 Anthept v6.0 和 ClustalW 进行多序列比较, 比较结果用软件 TreeView v1.6.6 绘出进化树(见图 4)。从进化树图上可以看出 II 型疏水蛋白都集中在一个进化分支上, 并且都属于子囊菌类。I 型疏水蛋白分布在子囊菌和担子菌类。疏水蛋白序列在低等真菌还未见报道。很明显, 从进化的分支看, 现有的疏水蛋白序列仅分成 I 和 II 型是不够的, 还应该分成 3 到 4 个类型^[6,19]。

表 1 已发现的 68 个疏水蛋白。

Tab.1 All 68 hydrophobins found.(according to Statistic on May 15th,2004)

蛋白名称	菌种	数据库索引号 (gi)
AA-Pri2p	<i>Agrocybe aegerita</i>	5256969
AB-ABH3	<i>Agaricus bisporus</i>	2342559 12643535/ 9796020 9796018 2342557
AB-HYPA	<i>Agaricus bisporus</i>	1346333 2133370 3714234 3714232 3714226 3714224 1122754 1235754 944821
AB-HYPB	<i>Agaricus bisporus</i>	12230130 2706553 2706551 3714236 3714230 3714228
AB-HYPC	<i>Agaricus bisporus</i>	2133371 1708379 1235755
AF-hyp1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	19577391
AF-RODA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1173120 551469 / 577666
AF-RodBp	<i>Aspergillus fumigatus</i>	27461063
AN-DEWA	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Emericella nidulans</i>	40739619 2133276 1706367 533425
AN-RODA	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Emericella nidulans</i>	133264
AO-hypA	<i>Aspergillus oryzae</i>	31376263 28875529
AO-hypB	<i>Aspergillus oryzae</i>	31376265
CC-CoH1	<i>Coprinopsis cinerea</i> (<i>Coprinus cinereus</i>)	1805691
CC-coH2	<i>Coprinopsis cinerea</i> (<i>Coprinus cinereus</i>)	1843438
CF-CFTH1	<i>Claviceps fusiformis</i>	25091421 6448504
CF-HCF-1	<i>Cladosporium fulvum</i>	1729752
CF-hcf-2	<i>Cladosporium fulvum</i>	31744994 4499821
CF-hcf-3	<i>Cladosporium fulvum</i>	4499824/ 31620939
CF-hcf-4	<i>Cladosporium fulvum</i>	4499827/ 31620941
CF-hcf-5	<i>Cladosporium fulvum</i>	4499830 12584530
CF-hcf-6	<i>Cladosporium fulvum</i>	12584528

CH-hch-1	<i>Cladosporium herbarum</i> <i>Davidiella tassiana</i>	22796153
CP-cpph1	<i>Claviceps purpurea</i>	24474507
CP-CRP	<i>Cryphonectria parasitica</i>	1706154
DG-h1	<i>Dictyonema glabratum</i>	16974108
DG-h2	<i>Dictyonema glabratum</i>	16974110
DG-h3	<i>Dictyonema glabratum</i>	16974112
FV-fvh1	<i>Flammulina velutipes</i>	11094188 11094186
Fv-hyd1	<i>Flammulina velutipes</i>	41688058
GM-HYD1	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Gibberella moniliformis</i>	37723307
GM-HYD2	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Gibberella moniliformis</i>	37723311
GM-HYD3	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Gibberella moniliformis</i>	37723313
GM-HYD4	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Gibberella moniliformis</i>	37723315
GM-HYD5	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Gibberella moniliformis</i>	37724083
HJ-HFB1	<i>Hypocrea jecorina</i> <i>Trichoderma reesei</i>	1708378 2133304 1587211 1085118/ 2133305
HJ-HFB2	<i>Hypocrea jecorina</i> <i>Trichoderma reesei</i>	6647555 1903325/ 42543468 42543467
HL-QID3	<i>Hypocrea lixii</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	1709966
HL-srh1	<i>Hypocrea lixii</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	1903321
LE-Hyd1	<i>Lentinula edodes</i>	9857708 7340031
LE-hyd2	<i>Lentinula edodes</i>	7340033 9857710
MA-SSGA	<i>Metarhizium anisopliae</i>	323022 1711536 168345
MG-MAG	<i>Magnaporthe grisea</i>	4337063
MG-MPG1	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	38101264 39969409 308951 1709085
NC-EAS	<i>Neurospora crassa</i>	416771 422231 384210 2984
OU-CU	<i>Ophiostoma ulmi</i>	1705756
PB-hyd1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	22000822
PB-HYD2	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	38122640
PN-pdi251	<i>Pholiota nameko</i>	18479003
PN-pdi263	<i>Pholiota nameko</i>	18479008
PN-pdi315	<i>Pholiota nameko</i>	18479013
PO-fbh1	<i>Pleurotus</i> sp. 'Florida'	14329765 2982627 / 16304680
PO-H	<i>Pleurotus ostreatus</i>	18033192
PO-POH1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	2982618 2370369
PO-POH2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	2370371 2982620
PO-poh3	<i>Pleurotus ostreatus</i>	2960350
PO-vmh1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4688984
PO-Vmh2	<i>Pleurotus</i> sp. 'Florida'	17426764
PO-vmh3	<i>Pleurotus</i> sp. 'Florida'	4688986
PT-HYD-1	<i>Pisolithus tinctorius</i>	1708377 2144197 905371
PT-HYD-2	<i>Pisolithus tinctorius</i>	2144198 905373 1708380
PT-hyd-3	<i>Pisolithus tinctorius</i>	4008016
SC-SC1	<i>Schizophyllum commune</i>	134274
SC-SC3	<i>Schizophyllum commune</i>	1710860/ 101957
SC-SC4	<i>Schizophyllum commune</i>	134284
SC-SC6	<i>Schizophyllum commune</i>	6647796 3293029
TT-Hyd1	<i>Tricholoma terreum</i>	19335606

XE-XEH1	<i>Xanthoria ectaneoides</i>	19849935	19849933	19849929	
	<i>Xanthoria parietina</i>	19849927	14595094	14595092	
	<i>Xanthoria calcicola</i>	14595090	14595088	10178911/	
	<i>Xanthoria sp.</i>	19849895	30230849	19849941	
		19849931	19849943	14595096	
		19849937	19849939	14595098	
XP-XPH1	<i>Xanthoria parietina</i>	14595102	/	14595100	19849925
		19849923		19849919	19849917
		19849915		19849913	19849911
		19849909		19849907	19849905
		19849903		19849901	19849899
		19849897		19849893	19849891
		10178913			

表 1 说明：数据来自 NCBI 蛋白质数据库。疏水蛋白的命名我基本采用文献的命名法，但许多疏水蛋白都叫“hyd”、“hyp”等，不好区分，为了方便，我在每个疏水蛋白文献名前加上菌种名两个单词的手字母。*Fusarium verticillioides*（异名：*Gibberella moniliformis*）为防止和 *Flammulina velutipes* 重复，采用它的异名缩写。像 *Hypocrea jecorina*（异名：*Trichoderma reesei*）这种情况，我一般采用前者，排名靠前的优先，更标准的菌种名优先。菌种栏列的出现不同属的实际上是同物种的异名，而同属不同种的则是我认为是相同基因或等位基因的蛋白序列合并后的情况。数据库索引号，我采用 genbank 的索引号，蛋白质的氨基酸序列太长，考虑篇幅没有列出。索引号（gi|）栏中用“/”标出相同和相似序列，/之前为具有代表性的序列，而之后则为同源性极高的相似性序列。参考文献（共 195 篇，见附录三）太多，此处省略。

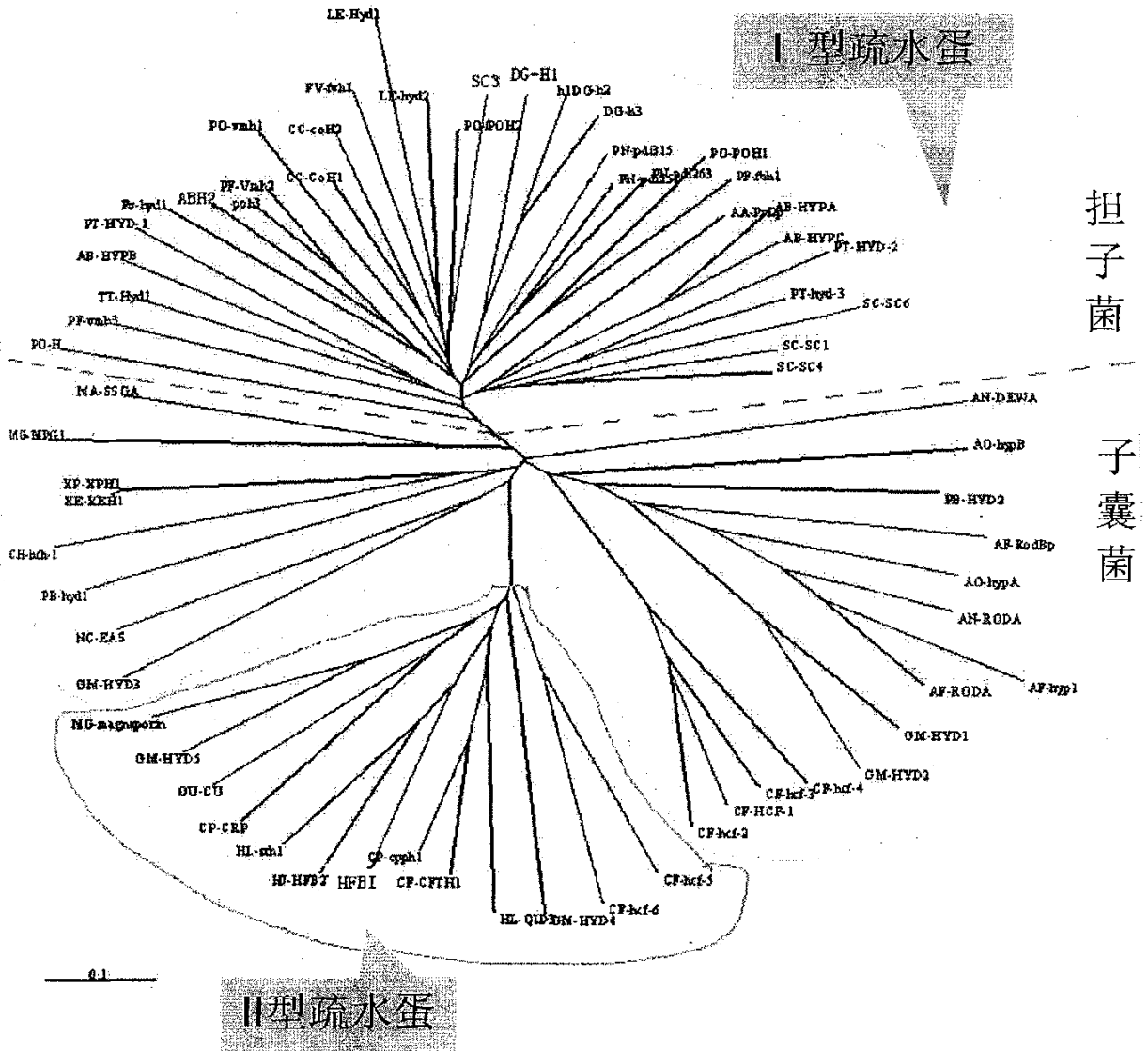


图 4. 已知 68 个疏水蛋白的进化树。

进化距离尺代表 0.1 的氨基酸取代率/位点。

Fig.4 An un-rooted phylogenetic tree of 68 hydrophobins.

The scale bar indicates the distance equivalent to 0.1 amino acid substitutions per site.

1.3 真菌疏水蛋白的发现方法

在 1991 年 Wessels 命名疏水蛋白“hydrophobin”之前用生化方法几乎没纯化过出疏水蛋白^[1]。而今天看来,疏水蛋白在丝状真菌中的特定阶段的产量是丰富的,如 SC3 在生产气生菌丝时总蛋白的 8.1%^[1-8], hypA 在双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 子实体帽子的表皮组织里特异高表达, 占总 mRNA 的 6%, 第十天累积占总 mRNA 的 60%^[14]。疏水蛋白难分离的原因主要是疏水蛋白的 (主要指 I

型) 不溶于热的 SDS 溶液, 在 SDS-PAGE 上由于聚合物分子量特高而不能进入分离胶中或者由于单体分子量太小与 SDS 微团共迁移到分离胶的最前沿而不容易被发现。自从 Wessels 发现用甲酸 FA (过氧甲酸 PFA)^[1]和三氟乙酸 TFA^[2,3]可以使疏水蛋白多聚物解聚, 疏水蛋白的发现工作就反而是简单的事了, 因为杂蛋白可以用热 SDS 预先除去。但热 SDS 不溶并且只能被 FA(PFA)和 TFA 解聚的蛋白不一定就都是疏水蛋白。

经过对已知公开文献(包括蛋白数据库)的整理, 认为发现疏水蛋白的方法主要有三种(具体列表及参考文献, 考虑篇幅而省略)。

(1) **cDNA 文库法**: 建立特定发育阶段的 cDNA 文库, 个别克隆, 一般是高丰度 cDNA, 进行测序, 由序列推断的蛋白质序列, 根据序列的特点分析和同源比较判定为疏水蛋白。用这种方法获得的疏水蛋白序列最多, 据不完全统计有 34 个。这类蛋白在发现之前根本不知道所发现蛋白属于疏水蛋白。

(2) **纯化蛋白法**: 从菌丝或者孢子或者培养液上清中抽提出疏水蛋白, SDS-PAGE 分析, 获得合适分子量的带, 再进行 N 端氨基酸测序, 设计简并引物进行 RT-PCR 获得 cDNA 序列, 再由推断的氨基酸序列同源比较并符合疏水蛋白的通式就可以初步认定为疏水蛋白。据不完全统计, 用这种方法获得疏水蛋白序列共有 21 个, 位居第二。

(3) **同源法**: 获得一种疏水蛋白 cDNA 后, 在基因组 DNA 中搜索时有些能找到除本身对应基因以外的同源疏水蛋白基因; 或者用已知疏水蛋白的序列合成简并引物进行 PCR 或 RT-PCR 也能找到其他新的疏水蛋白, 尤其进化上关系较近的生物, 比如属于同一个属的真菌。还有就整个基因组测序后搜索 ORF, 也能获得同源的新的疏水蛋白基因。由于疏水蛋白在氨基酸序列上的同源性一般较差, 这种方法的通用性不强。此法获得的疏水蛋白序列加起来一共约 8 种。

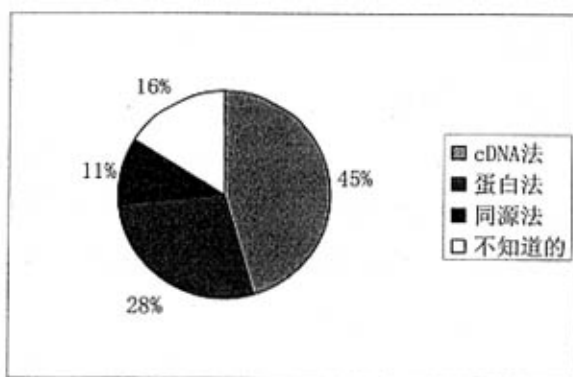


图 5. 疏水蛋白的发现方法。

Fig.5 Ways to find hydrophobins.

最后,由于资料不足,暂时没有找到发现途径的疏水蛋白序列是:AF-hyp、AO-hypA、AO-hypB、CF-hcf-6、FV-fvh1、GM-HYD1、GM-HYD2、GM-HYD3、GM-HYD4、GM-HYD5、MG-magnaporin、SC-SC6,共12种。随着文献的深入研究,必能将这些序列的发现方法归入上述的三个类别中。三种发现途径的比例见图5。

1.4 真菌疏水蛋白的功用

据研究,真菌疏水蛋白具有以下生理功能:

(1) 帮助真菌克服气液屏障形成气生结构:水下菌丝分泌的疏水蛋白扩散到水-空气界面,在此处自我组装成一层两亲性薄膜,伴随着水的表面张力的急剧下降(低到 27 mJ m^{-2}),这能使菌丝向空中生长,形成气生菌丝等挺水结构^[1-8]。

(2) 赋予真菌菌丝以疏水性:气生菌丝分泌的疏水蛋白在菌丝表面自我组装成薄膜,其亲水面朝向细胞壁而疏水面暴露在空气中,因此气生菌丝表现为疏水性。疏水蛋白还覆盖于其它气生结构^[11],如子实体、产孢菌丝和孢子的表面、子实体和地衣内部通气孔道的表面甚至一些真菌的营养菌丝的表面^[15]。疏水性表面有利于孢子的扩散和营养菌丝的分散。而通气孔道的疏水性,对真菌在潮湿环境下进行气体交换是必须的。目前还不知道为什么有些疏水蛋白覆盖在营养菌丝的表面,推测与通气培养有关^[15,16]。

(3) 粘附真菌菌丝到固体疏水表面:如 SC3^[11,12]和 MPG^[11]。

(4) 疏水蛋白使细胞壁更完整:发现疏水蛋白 SC3 对细胞壁基质的交联也起作用(作用于细胞壁中几丁质以 1,3/1,6- β -糖苷键对葡聚糖的连接)^[17]。

(5) 保护作用:疏水蛋白覆盖在真菌的表面,保护真菌细胞抵抗恶劣环境:化学与酶的处理,干燥和细菌感染。疏水蛋白是一种弱免疫原,覆盖真菌表面屏蔽了其它抗原,使病原真菌能抵抗免疫系统攻击^[11,18]。

(6) 其它生物学功能:疏水蛋白还作为毒素和诱导物;还能促进孢子扩散;还形成亲水环境,促进孢子萌发;还可能在信号传导中起作用^[19]。

疏水蛋白的应用:

(1) 安全性:疏水蛋白在食用真菌中广泛存在,因此认为它们无毒性,用在食品中是安全的。另外,数据初步显示疏水蛋白既无带细胞毒性也无强免疫原性,因此认为在医学使用中是安全的^[11,18]。

(2) 改变表面的属性, 保护表面: 例如, 在医学移植物的表面组装上疏水蛋白, 能提高这些移植物的生物相容性或者能防止微生物细胞粘附到如导管的表面^[12,20]。在果蔬保鲜上面, 由于疏水蛋白具有表面活性并能够自我装配, 因此可以在果蔬表面形成一层防腐保鲜被膜。

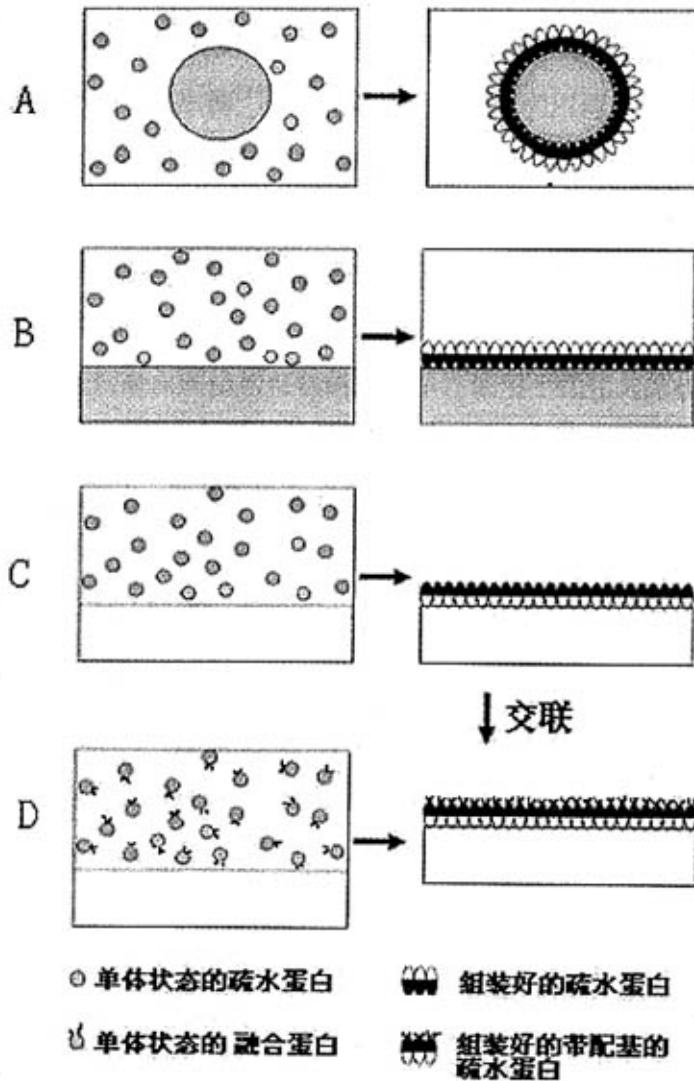


图 6. 疏水蛋白在亲水与疏水界面自我组装的特性能改变表面的可湿性^[12]。

Fig.6 Hydrophobins can change the wettability of surfaces by their property to self-assembly at hydrophilic-hydrophobic interfaces.

说明: (A) 在疏水蛋白水溶液中气泡或油滴表面被着两亲性膜, 能使其稳定的存在于水中。(B) 类似的, 当一片疏水性塑料如Teflon ($\theta = 110^\circ$) 浸泡于这样的溶液中, 塑料被紧密粘附的蛋白膜包被, 使其表面变得可湿 ($\theta = 22 \sim 63$ 度)。(C) 相反, 疏水蛋白单体在亲水性表面变干, 能使表面变得疏水 ($\theta = 110$ 度)。(D) 融合蛋白的自我组装可以赋予表面以特殊的性质; 也可以在成膜后对膜直接修饰。这是一种新型的固定化技术。

(3) 表面活性: 疏水性固体(Teflon 小珠)或液体(油)能通过在其表面包被疏水蛋白而稳定地分散在水中^[12]。疏水蛋白可以作为洗洁产品的成分,可改善食品对抗相变能力并形成稳定泡沫,可以用于促进土壤中的污染物的降解和应用在石油泄漏后回收石油的过程中^[12,21]。

(4) 作为蛋白和细胞固定化的媒介: 交联上配体或形成融合蛋白,能使特定分子固定化到特定表面。如在生物传感器中,作为引发层^[21,22]。进一步的,与特定功能的蛋白,如脂酶^[23],形成融合蛋白后,利用疏水蛋白在固体表面形成稳定的两性单层蛋白膜的特性,可以将特定分子固定在膜的特定面。

(5) 作为纳米材料和基因工程研究的材料: 疏水蛋白单体 3nm,覆盖在表面形成 10nm 厚薄膜的性质也使这些蛋白成为纳米科技中有价值的候选材料,而研究不同疏水蛋白混合时的聚合特性也是个有趣的纳米课题。疏水蛋白在基因工程中被用于研究蛋白的结构与功能的关系,或用于优化其结构以用于特定方面。例如,能改变疏水蛋白的溶解特性或改变两亲性薄膜的亲水面或疏水面的生物物理性质^[12]。实际上,形成的融合蛋白可以用双水相等疏水蛋白特异性的分离方法快速地纯化这些配体^[24,25,26]。

疏水蛋白的功用图示见图 6。

1.5 真菌疏水蛋白的纯化方法

由于疏水蛋白的特殊性质,疏水蛋白的纯化与一般蛋白的相比难度很大。为了探索瑞氏木霉疏水蛋白 HFBI 的分离纯化方法,我从所有公开的有关疏水蛋白的文献中搜索了疏水蛋白的纯化方法(考虑篇幅不在此列表了)。发现对于疏水蛋白的纯化,开始时利摆脱不了对 I 型疏水蛋白 SC3 的研究,后期以瑞氏木霉的 II 型疏水蛋白为主。主要纯化方法如下:

(1) 三氟乙酸法: 对 I 型疏水蛋白,是利用其特殊的聚合和解聚性质纯化。如 SC3、SC4、EAS、hypA、MPG1、ABH1 (HYPA)、HCF-1、CoH1、ABH3、FBH1、POH1、POH2、XPH、XEH、HYDpt-1 等 I 型疏水蛋白是利用此类蛋白在界面形成的聚合物(包括菌丝和孢子的表面)不能在热 SDS 溶液中解聚和溶解,只能在强酸如过氧甲酸(PFA)和三氟乙酸(TFA)中解聚成单体(只在早期用 PA,后期都用 TFA),经气流吹干 PFA 或 TFA,形成的沉淀溶解于 60%

乙醇的部分是疏水蛋白。瑞氏木霉 HFBI 在早期也用 0.1%TFA~20%乙腈抽提菌丝体获得^[15]。

(2) 唯一的一种温和条件下提取 I 型疏水蛋白的方法: 1998 年发现裂褶菌分泌 SC3 的同时分泌高分子量的多糖裂褶菌素, 裂褶菌素在水溶液能稳定 SC3^[27]。以此, 作者发明了用疏水层析法从发酵清液中分离 I 型疏水蛋白的方法^[28]。除此之外, 对 I 型疏水蛋白还没有提出 TFA (或 PFA) 解聚以外的分离纯化方法。

(3) II 型疏水蛋白纯化法: 因为 II 型疏水蛋白能被 1%~2%SDS 溶液和 60%乙醇溶液解聚和溶解, 所以如 CU、CFTH1、HFBI、HFBII 以及融合蛋白 EGICore-HFBI 都一般都不用 PA 或 TFA 解聚。近几年, II 型疏水蛋白的大规模纯化方法发展得很快, HFBI 融合蛋白已经达到发酵 1500L, 纯化 1160L 的规模。使用的方法为 SDS 抽提法、双水相系统 ATPS 分离法和各种层析法^[15-16,24-26]。

2. 瑞氏木霉 HFBI 的研究

2.1 瑞氏木霉的生物特性

瑞氏木霉 *Trichoderma reesei* E. G. Simmons 是 1977 年 Simmons 为纪念这个菌的主要研究者 Elwyn T. Reesei 而命名的^[29]。Kuhls et al(1996)证明 *T. reesei* 是有性型肉座菌属 *Hypocrea jecorina* 的无性型^[30]。

瑞氏木霉 (*T. reesei*) 为好气菌, 其菌落在 PDA 平板上生长快, 菌丝层较厚, 致密丛束状, 初期为白色, 平坦, 后期因产生分生孢子而呈深绿色。产孢区常排列成同心轮纹状。菌落背面无色, 有时呈浅黄色。菌丝透明, 有隔, 细胞壁光滑, 分生孢子梗由菌丝直立生出, 无色, 分枝多, 对生或互生二至三级分枝, 整体象树枝; 分枝与分生孢子梗近似直角, 末端为小梗, 小梗瓶形, 分生孢子球形或长椭圆形, 表面粗糙, 布满小刺; 单胞, 靠粘液在小梗上聚集成球状绿色的分生孢子头^[31]。

瑞氏木霉是多细胞的真核微生物, 作为工业菌株被广泛用于生产分解不同植物材料的酶类, 包括纤维素酶、半纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶等, 已有多年历史。瑞氏木霉不仅具有适于蛋白生产的诸多优点, 且对人没有毒性, 在工业生产条件下也不产生真菌毒素和抗生素^[31-33]。

2.2 瑞氏木霉 HFBI 生产的研究进展

瑞氏木霉生产纤维素酶的规模已经高达 360 吨发酵液,但是纤维素酶生产必须由复杂碳源才能诱导,在葡萄糖培养基中不表达纤维素酶和木质素酶。为了经过基因工程技术能使瑞氏木霉在葡萄糖培养条件下表达这些工业用酶,芬兰 Helsinki 大学及 VTT 生物技术和食品研究中心的一个研究组在 1990~1995 年寻找 *T. reesei* 在葡萄糖培养基上高表达的基因^[15,16],从葡萄糖为唯一碳源的五个高表达基因中鉴定出一个疏水蛋白基因,即 *hfb1*。用 *hfb1* 作探针在 cDNA 文库中筛选第二个疏水蛋白基因 *hfb2*。这两个蛋白的一级结构高度类似于 II 型疏水蛋白 CU 和 CRYP。图 7 是 HFBI 蛋白的序列图(NCBI 网站)。

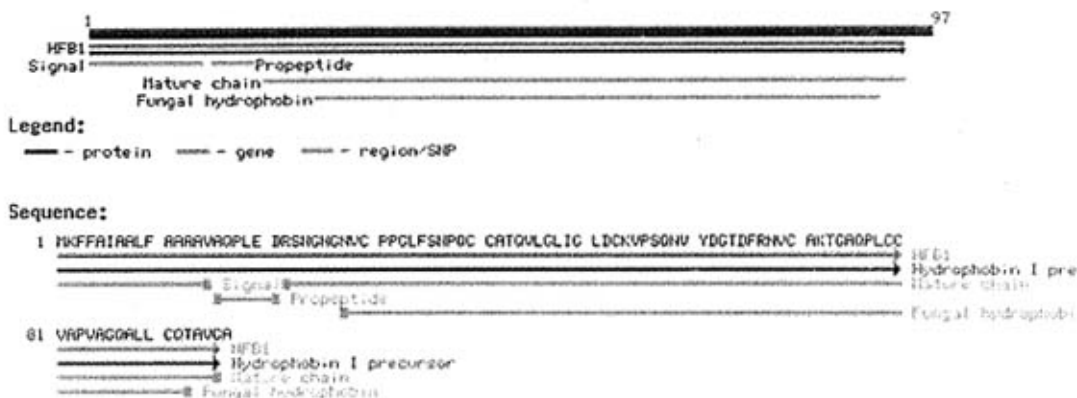


图 7. HFBI 蛋白序列图示
 Fig.7 Display the graphics of HFBI

基因 *hfb1* 和 *hfb2* 的表达条件不一样。*hfb1* 在葡萄糖培养基下高表达但在含植物多糖的诱导纤维素酶的培养基中不表达, *hfb2* 却在这种复杂培养基中表达。*hfb2* 在葡萄糖培养基中表达情况很复杂,受碳源和氮源饥饿的诱导,也受孢子化培养条件和光照的诱导。HFBI 蛋白分泌到培养基中,可用鼓泡法从培养基中或用 0.1% TFA-20% 乙腈抽提营养菌丝体获得。HFBI 可从孢子和气生孢子丝的细胞壁中抽提到^[16]。

同一研究小组在 1997 年报道了 HFBI 和 HFBI 在不同培养条件下的表达情况,尤其讲到小罐发酵的情况。葡萄糖培养基下第 71 小时 HFBI 的表达量最高,20 和 125 小时时候 HFBI 几乎不表达, HFBI 受葡萄糖抑制^[16,34]。在 2001 年报道了三拷贝 *hfb1* 高产菌株的构建,用 SDS 三步法和双水相法抽提 HFBI 蛋白的纯化工艺。SDS 三步法从菌丝体中纯化 HFBI^[10]: (1) 1% SDS 从菌丝体里抽提蛋白

质; (2) KCl 沉淀法除去抽提缓冲液里的 SDS; (3) 接着继续用疏水相互作用层析 (HIC) 纯化。HIC 制备液的一部分进一步用阴离子交换柱子 Resource Q 纯化。双水相法 (ATPS) [35]: 培养物上清中加入 2%(v/v) 表面活性剂, 混合, 再放入恒温器中分离两相: $C_{11}EO_2$ 为 20°C, $C_{12-18}EO_5$ 用 30°C。异丁醇的加入体积相当于表面活性剂原始加量的 5 倍, 水相用 RP-HPLC 纯化, 纯化蛋白再冻干, 以干品贮存。HFBI 在 $C_{11}EO_2$ 的 ATPS 中分配系数超过 1000 (最高 2500), 体积因子为 22.6。ATPS 法包括反抽提的实际纯化收率, HFBI 为 80% (40mg/L)。发现 HFBI 和 HFBI 在水中的溶解度很高, 其浓度至少可达到 10mg/mL。2002 年在 HFBI 的分离中, 采用 Reppal PES100/Triton X-114 两相系统中 [25], 分配系数 $K=15$ 。分出富胶团相后, 加入环氧丙烷-环氧乙烷 (EOPO) 共聚物, 并升温到 55°C, 诱导相分离, HFBI 被定量的反抽提到水相 ($K=155$, 收率=99%)。经两步分离, HFBI 的总收率为 90%, 而体积减少 6 倍。同年报道 [34], 小试的罐工作体积达到 15L, 经 92 小时的葡萄糖补料发酵, 获得最大生物量: 37.8g/L, HFBI: 1.4g/L, 分泌总蛋白: 0.2g/L, 一半为 HFBI。并报道了用 2% Berol 532 的双水相系统分离 HFBI, 再经 RP-HPLC 纯化的工艺。小试的发酵过程参数图见图 8。

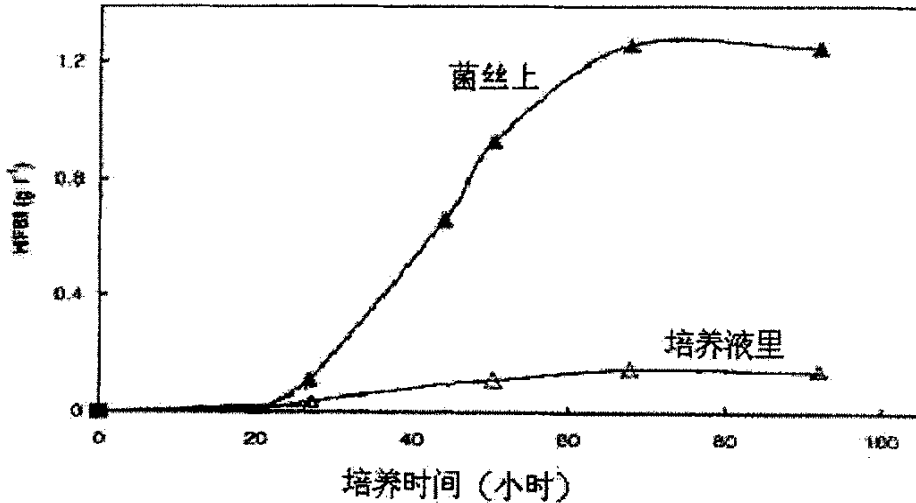


图 8. 小试发酵过程中 HFBI 的分布情况 [34]。

Fig. 8 Distribution of hydrophobin I (HFBI)

between mycelium and growth medium during the small-scale fermentation.

图 8 中, 菌株: HFBI 高产菌株 VTT D-98692。菌丝上 HFBI 量用其三次 1% SDS 抽提液含量之和来估计。

2004年,报道了融合蛋白 EGIcore-HFBI 用 4.1% Agrimul NRE 1205 ($C_{12-18}E_5$) 的 ATPS 法纯化,放大 12 万倍,工艺不受影响^[26]。发酵规模 1500L。纯化规模: 1160L。但到目前为止,经仔细查证,只为疏水蛋白 HFBI 而生产的发酵规模没有超过 15L 罐^[34,36]; 没有其它疏水蛋白的生产超过 HFBI 的研究水平。

3.本文的目的与研究意义

研究意义: 疏水蛋白对丝状真菌的生长和发育过程起重要作用并具有潜在的应用前景。研究疏水蛋白在理论上可以加深理解丝状真菌复杂的形态分化和发育过程,以及致病真菌的致病机理; 在实践上,利用这类特殊的“界面”蛋白作为新的生物材料,其安全无毒,可用作乳化剂、增溶剂和表面活性剂,或改变固体的表面属性、作为新的固定化载体。

本论文的工作将是疏水蛋白的产业化和商品化发展进程中重要的一环,所做的研究工作在国际上是领先的,在国内是独一无二的。

本论文的目的: 以 HFBI 为模式研究疏水蛋白的大规模生产技术。首先在实验室建立蛋白的研究体系; 与芬兰进行国际合作,引进 HFBI 高产菌种后在实验室重新建立小试技术,在此基础上与天津市工业微生物研究所合作进行 500L 的中试研发; 此外,还为疏水蛋白的应用研究提供充足的材料。

本论文就是 HFBI 小试技术的研究报告(而中试已经计划在下一个个月内进行)。

注: 本论文受天津市科技发展计划重点攻关项目(编号: 023105511)的资金支持。

第二部分 实验材料与方法

1. 菌种

实验菌种为 *Trichoderma reesei* NQM3, 来源于芬兰赫尔辛基大学的舍三拷贝 HFB1 高产菌株 VTT D-98692 的一支分离株(中芬国际合作项目授权专利菌株, 仅供科学研究工作使用)^[10]。

2. 主要仪器与设备

HH-B11-402 型电热恒温培养箱, 天津市实验仪器厂。

201 型电热恒温干燥箱, 天津市实验仪器厂。

FD-2 型密封式恒温可调加热器, 浙江嘉兴凤桥电热器厂。

TGL-16G 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂。

Beckman 高速离心机。

SK-1 型快速混匀器, 金坛医疗仪器厂。

SW-CJ-5 型双人垂直超净工作台, 上海市锦屏仪器仪表有限公司通州分公司。

HZQ-Q 振荡器(恒温摇床), 中国哈尔滨东联电子技术开发有限公司。

C10-3 全自动发酵罐型号, NO. 167 SuS, 生产厂家: B. Braum Biotech International 公司, 建造时间: 1999 年, 最大体积: 15 L。控制单机: BIostat, 上位控制微机: 方正电脑。软件: MFCSPLO。

MSJ U2 发酵罐, 商标: BEM, 出厂日期 1993 年 9 月, 最大容量 30L。编号: MFG. No.2031, 生产厂家: TOKYO B. E. MARUBISHI Co., LTD. JAPAN。补料罐有 3 个, 每罐最大体积 250 mL。

DY CZ-24D 型垂直板电泳槽, 北京六一仪器厂。

DDY-2 型稳压稳流电泳仪, 北京六一仪器厂。

TY-80B 型脱色摇床, 南京大学南达生物技术开发公司。

ST-I 型小型半干式转移电泳槽, 大连竞迈生物技术有限公司。

915 型 Accumet pH Meter, Fisher scientific company。

752 紫外光栅分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。

凝胶扫描系统, UVP Bio Imaging System, Lab Works Image Acquisition and Analysis Software。UVP Inc., CA; Ultra-violet Products Ltd. Cambridge, UK。

其它: 如水浴锅等。

3.主要试剂

3.1 发酵部分

葡萄糖: 天津化学试剂三厂, AR。

蛋白胨: 北京奥博星公司, BR。

酵母抽提物: 武汉生物技术公司, BR。

其它试剂来自市售, 至少化学纯。

3.2 纯化部分

葡聚糖凝胶 G-25 Sephadex, Q Sepharose FF 阴离子交换剂均购自 Pharmacia 公司。

Berol 532 来自 AKzo Nobel Surface Chemistry AB, Sweden。

SDS, KCl, Tris, HCl 等常见试剂都要求化学纯以上。

3.3 检测部分

丙烯酰胺, 甲叉丙烯酰胺, SDS, 过硫酸氨, TEMED, Tris, Tricine, 巯基乙醇, 考马斯亮蓝 G250, 符合电泳级或电泳要求的试剂。

疏水蛋白 HFBI 标准品和 HFBI 的兔抗体, 芬兰科学研究中心 VTT 惠赠。

碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG, 华美公司提供。

0.45 μ m 硝酸纤维素膜, 华美公司提供。

M3913 蛋白质分子量标准品, Sigma 公司生产, SDS-PAGE 低分子量标准, 6500-66000Da, 共八条带。

M3546 蛋白质分子量标准品, Sigma 公司生产, Tricine 多肽 SDS-PAGE 超低分子量标准, 1060-26600Da, 共六条带。

上海国产的 SDS-PAGE 低分子量标准, 14400~97400Da, 六条带, 后在此分子量标准品里加入自己纯化的 HFBI (7542Da), 变成七条带。

BSA: 华美公司产品 (蛋白含量>95%)。

葡萄糖检测等试剂要求分析纯以上。

4.实验方法

4.1 摇瓶发酵

培养基组成: 葡萄糖 (20.0 g/L), 蛋白胨 (4.0 g/L), 酵母抽提物 (1.0 g/L), KH_2PO_4 (4.0 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.8 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.6 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.8 g/L), 自来水配制。消前用 HCl 调到 pH4.6^[10]。

摇瓶培养使用 250-ml 和 500-ml 三角瓶, 有效体积为 20~40%, 装入的培养液体积越少则通气越好。4-8 层纱布扎口, 121 度灭菌 20 分钟。

接种后, 温度 29℃, 转速 200RPM 振荡培养, 时间一般为 3~7 天。

发酵完毕, 用 6℃ 8000g 离心 25 min, 分开菌丝体和发酵清液。菌丝体立即进行抽提或先放在 -20℃ 储存。发酵清液立即进行纯化或先放在 4℃ 储存。

4.2 小罐发酵

小罐发酵的培养基组成同摇瓶, 试剂的级别可以降为化学纯, 甚至工业级。

采用 15 或 30 升全自动发酵罐, 工作体积 50~75%, 即 15-L 发酵罐的装罐体积为 8L, 30L 发酵罐为 15~7L。自来水配制, 115℃ 灭菌 20 分钟。冷却到 29℃ 后, 接种。

培养时, 搅拌转速 300~1000rpm, 空气的通气量约 0.5~2: 1 (每分钟通过发酵液总体积的 0.5~2 倍)。罐压 0.05~0.10 MPa。用 NaOH 和 H_3PO_4 调 pH 4.5~5.0。准备 30% (w/v) 的葡萄糖溶液, 110℃ 灭菌 20 分钟。小罐发酵过程隔适当时间测一次葡萄糖的浓度, 保持罐内葡萄糖在 10~30 g/L 范围内。发酵 3~7 天。初期加少量消泡剂, 后期不加。

放罐条件: 3 天以后, 发酵液特别粘稠, 泡沫控制不住, 菌丝体湿重达到 90g/L 以上, HFBI 总含量达 500mg/L 以上。等葡萄糖浓度降到约 0.5 g/L 立即放罐, 即认定菌丝生长在稳定期即可放罐。

放罐后发酵液经抽滤将菌丝体和发酵清液分开。若有泡沫, 也进行收集。不立即进行纯化的材料的储存方法见 4.1。

4.3 SDS 法抽提出 HFBI

配制 1.7×STH 缓冲液: 称 20.6 g Tris 碱溶于 800 mL 蒸馏水中, 用 2N HCl 调 pH 到 9.0 (使用 pH 计), 加入 17 g SDS, 加水定容至 1000 mL, 混匀即得 1.7×STH 缓冲液。

每批菌丝体可用终浓度 1% 的 SDS 抽提三次^[10]。第一次抽提时, 考虑菌丝含水, 使用 1.7×STH (都假设干重 19.5%)。第二和第三次则只用 1×STH 进行

抽提。具体加法如下：

(1) 第一次按 1.144 mL/ (1g 湿菌丝体) 加 $1.7 \times \text{STH}$,

(2) 第二和第三次按 1.949 mL/ (1g 湿菌丝体) 加 $1.0 \times \text{STH}$ 。

加完 STH 缓冲液后在室温下振荡 1 小时, 6°C 8000g 离心 25 min, 分开菌丝体和清液。清液量体积后加入 $0.4 \times$ 体积的 2 M KCl , 混匀, 6°C 8000g 离心 25 min。上清即所需 HFBI 制备液。

具体实例

称 10 g 湿重的 F2 菌丝体于 50-mL 离心管, 加入 $1.7 \times \text{STH}$ 11.44 mL, 37°C 下摇 1 小时, 之后 8000g 离心 25min, 获上清 12.5 mL。加入 $0.4 \times$ 体积的 2M KCl 5 mL, 振摇片刻, 8000g 离心, 获得上清 12.0 mL, 取样标为 F2A0。

4.4 双水相系统对 HFBI 的纯化

(1) 萃取: 待纯化的 HFBI 溶液在 6°C 8000g 离心 25 min 后, 量取适当体积的上清, 加入 2% (或 5%) 体积的 Berol 532。混匀, 20°C 下振摇 1 小时后, 在 20°C 下 8000g 离心 25 min, 溶液分成上相 Berol 532 和下相水溶液。

(2) 反萃取: 分出 ATPS 萃取的上相 Berol 532, 加入一定体积的缓冲液 (根据 HFBI 浓度和残留的下相水溶液, 一般是加与 Berol 532 同体积的 pH 8.9 20 mM 的 Tris 缓冲液)。再加入 5 倍所加 Berol 532 体积的水饱和正丁醇。混合, 8000 g 离心 25 min。弃去正丁醇, 所得的水溶液即已纯化的 HFBI 制备液。

具体实例

(a) ATPS 抽提发酵上清和泡沫沉降液获得 HFBI:

收集 F2 发酵泡沫的破碎液, 离心, 取上清。此上清取样标为 F2B0。F2 发酵滤液也离心, 取上清, 此上清取样标为 F2S0。

取 F2B0 和 F2S0 各 950 μL , 各加入 Berol 532 50 μL , 20°C 振摇 1 小时, 6000g 离心 5min, 下相分别标为 F2B1 和 F2S1, 在上相中加入水饱和正丁醇 250 μL , 振摇片刻, 离心分相后, 取下相溶液, 标为 F2B2 和 F2S2。

(b)、ATPS 法分离来源于菌丝体的 SDS 抽提液:

SDS 法抽提菌丝体获得的 HFBI 溶液 F2A0 通过葡聚糖凝胶 G-25 的 Sephadex 柱脱盐, 将含 HFBI 流分收集起来, 标为 F2C0 (层析见下一章)。

没有脱盐的溶液 F2A0 和脱盐的溶液 F2C0 都用如上的 ATPS 法抽提。抽提

时分离的下相水溶液分别标为 F2A1 和 F2C1, 正丁醇反抽提后获得下相水溶液标为 F2A2 和 F2C2。

4.5 葡聚糖凝胶 G-25 脱色

葡聚糖凝胶 G-25 的预处理和装柱参见《精编分子生物学指南》^[37]第 373~377 页。实验中使用自制的玻璃柱。柱内直径为 1cm, 装柱的工作体积 10mL, 柱高 12.7cm。手动调流速和分管收集。

进柱前, HFBI 制备液(F2A1 样品)经过 6℃ 10 000g 离心 25 min 以上, 弃去沉淀。上清进柱 3 mL。进完立即用 pH 8.9 20 mM 的 Tris 缓冲液洗脱。流速控制在 0.5 mL/min。在进柱和洗脱的同时用 1.5-mL 离心管收集流分。每管约 1mL。一般收集 20 管就够了。20 管之后继续洗过但不必再分管了。30min 后停止洗脱。称重法计算准确的体积(假设密度为纯水的密度)。用 A₂₈₀ 紫外法测总蛋白相对含量。用 SDS-PAGE 分析蛋白质组成

4.6 离子交换层析纯化

阴离子交换填料 Q Sepharose Fast Flow 的操作说明见 Pharmacia 56-1191-00 手册, 版本 AC 或 AD。使用的柱子同 4.5。实际柱高 14.5cm, 高径比为 14.5:1, 床体积为 11.4mL。自然最大流速进行进柱和洗脱。自动分部收集器收集, 每管最大收集体积不超过 4mL。

工作基本缓冲液为 pH 8.9 的 20mM Tris-HCl 缓冲液, 进柱样品的缓冲液也先用葡聚糖凝胶 G-25 柱层析交换到此工作缓冲液中。在进柱之前样品经过 6℃ 10 000g 离心 25 min 离心, 弃去沉淀。进样 16mL 后按顺序用含 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 2.0M NaCl 的工作缓冲液各约 50mL 进行阶梯式洗脱。

洗脱时用 215nm 和 225nm 双波长紫外法测量已出流分的吸光值。洗脱完毕计算各管的双波长法总蛋白含量, 用 Excel 绘制层析图。选取几个蛋白峰的流分进行 SDS-PAGE 分析。选取最高峰的流分用 ELISA 法测 HFBI 含量。

4.7 检测方法

4.7.1 紫外双波长法测总蛋白

(1) 标准曲线的绘制: 取 1.00 mg/mL 的 BSA 溶液用 PBS 缓冲液按表 3 稀释, 测 215nm 和 225nm 的吸光值。用软件 curveexpert 绘制标准曲线。

(2) 样品总蛋白浓度测量: 用 PBS 缓冲液适当稀释样品, 测量 A₂₁₅ 和 A₂₂₅

并计算吸光值差，用软件 curveexpert 直接读出总蛋白浓度，或者用公式计算：

$$\text{总蛋白浓度} (\mu\text{g/mL}) = 144 \times (A_{215} - A_{225}) \times \text{稀释倍数}$$

4.7.2 SDS-PAGE 与 Western Blotting 分析

具体操作参见《精编分子生物学指南》^[37]第 333~373 页。半干转移操作还另参见 ST-I 型小型半干式转移电泳槽的使用说明书。

4.7.2.1 普通 Laemmli 系统 SDS-PAGE 流程简述

(1) 组装 DYCZ-24D 型垂直板电泳槽，一般使用 0.75mm 胶厚的规格。标记分离胶 5cm。

(2) 配胶：20% 的分离胶，脱气，灌胶。饱和正丁醇封胶。1~2h 后洗去正丁醇，配 5% 的浓缩胶并灌胶。一般插 10 齿梳子。1~2h 后浓缩胶就凝固了。

(3) 制样：样品和标准品分别和 2× 样缓冲液混合。100℃ 加热 5min。冷至室温，离心后点上清。

(3) 电泳：浓缩胶中电压 50 伏，分离胶中电压 100 伏。

(4) 电泳完后用 25% 异丙醇加 10% 乙酸的溶液固定，0.06% 考马斯亮蓝 G250 加 10% 乙酸的溶液染色 2 小时（室温）。用 7% 甲醇加 5% 乙酸的溶液脱色至无底色。可用微波炉加热来加快显色和脱色速度。

4.7.2.2 Tris-Tricine 缓冲系统 SDS-PAGE 流程简述

(1) 组装完模具，同时配制 16% 的分离胶和 5% 的浓缩胶，脱气，先灌分离胶后立即灌浓缩胶，最后插梳子。

(2) 制样流程与普通 Laemmli 的相同。

(3) 电泳：30 伏 1h 之后恒流 10mA 下 4 小时。

(4) 考马斯亮蓝 G250 染色过程同普通 Laemmli 系统，也可采用《精编》上快速银染法显色。

4.7.2.3 Western Blotting 流程简述

电泳后半干式转移 1 小时，膜用丽春红 S 染色，洗后用 2% (w/v) 脱脂牛奶粉封闭，洗后加一抗（稀释度 1:1000），洗后加二抗（稀释度 1:400），最后用 BCIP 和 NBT 显色。洗液都为 TBST 缓冲液，每次洗 4 次。

显色后膜在室温下晾干，扫描或摄像变成电子图像。

4.7.3 ELISA 法定量检测 HFBI

具体操作参见《精编分子生物学指南》^[37]第 411~425 页。实验由其他师弟师妹代测，使用直接抗原 ELISA 法和抗原竞争 ELISA 法检测 HFBI 的浓度。

4.7.4 斐林法测葡萄糖浓度

具体操作见中华人民共和国专业标准：还原糖测定法 ZB X 66040—871 亚铁氰化钾快速法，详细的方法这里不再列出。但注意事项很重要：每批试样测试前必须做空白滴定，二次平行测定误差不得超过 0.1mL。空白滴定、预备滴定及正式滴定操作条件应保持一致。滴定速度应以每秒 1~2 滴为宜。热源要稳定，在正式滴定时，待试样沸腾后，标准糖液的滴定量必须控制在 0.5~1mL 之内，否则要重做。整个滴定过程必须始终保持沸腾状态。凡样品含糖量在 6% 以上时，应适当增加稀释倍数，否则会加大误差。

第三部分 结果与讨论

1. 实验结果

1.1 摇瓶发酵的结果

研究了不同的起始 pH 值和接种量、发酵天数等因素对菌丝体的湿重和 pH 值的影响情况, 并做出了木霉的生长曲线。结果见图 9。

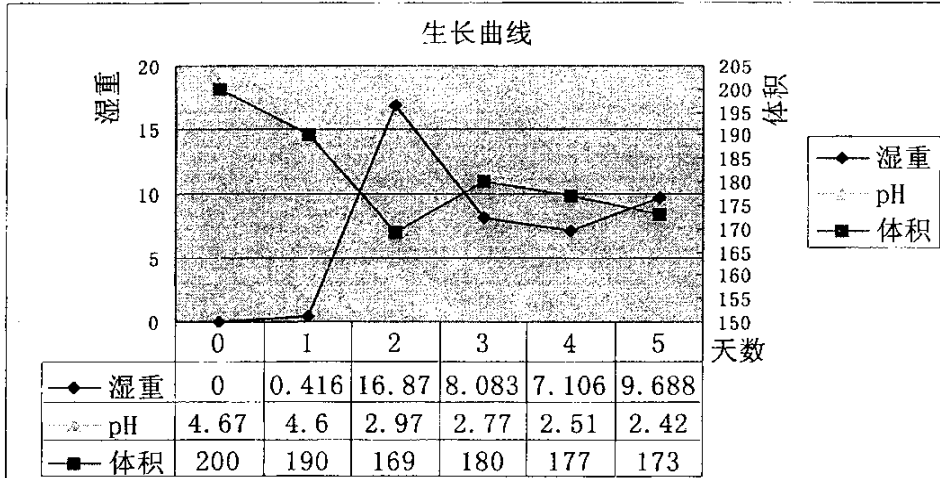


图 9. 瑞氏木霉摇瓶生长曲线

Fig.9 The growth curve of shaking culture of *T. reesei*

从图 9 中可以发现消前 pH 值对摇瓶发酵的影响不大。接种量和发酵天数对发酵有很大的影响, 这可能预示培养基的成分对发酵菌丝体收率有极大的关系。

根据接种量的不同, 菌丝的生长情况可以分三种:

(1) 形成几个大球型 孢子或接斜面菌丝极少时, 或者摇瓶过程中菌丝贴壁难以分开, 菌丝体在培养中形成几个菌丝球, 成团生长。

(2) 菌丝较少但粗壮型和菌丝密集而细碎型 当接种量达到十几个到几百个时, 菌丝发育得充分, 菌丝粗壮, 抱团现象不明显。

(3) 菌丝密集而细碎型 当接种量达到一定数, 如 100 ml 接 300 个孢子以上时, 菌丝太多, 菌丝的就变的很细且容易断裂, 菌丝生长旺盛, pH 下降得很快, 接近 pH2。显微镜下观察, 4 天后有孢子出现和菌丝自溶形象。

1.2 小罐发酵的结果

根据多次摇瓶试验结果用 15-L 发酵罐共进行了两次发酵, 批号编为 F1 和 F2; 取得两次初步小试发酵数据后, 用 30-L 发酵罐进行了一次完整的小试发酵,

批号编为 F3。三次小罐发酵过程记录见附录二。总共三次发酵的结果见表 2。

表 2. F1、F2 和 F3 批小罐发酵的统计数据
Tab.2 The statistic data of fermentations of Batch No. F1 , F2 and F3.

批号	F1	F2	F3
发酵液起始体积	8.0 L	8.0 L	17.0 L
发酵起始 pH	4.83	4.74	4.80
发酵起始葡萄糖浓度	1.66 %	1.78 %	1.4 %
接种	孢子悬浮液 1 mL	孢子悬浮液 1 mL	2 天的摇瓶液 200mL
发酵总小时数	99 h	135 h	71 h
放罐葡萄糖浓度	0 %	0 %	0.9 %
发酵共耗葡萄糖	240 g	380 g	1623 g
放罐 pH	2.39	3.86	pH 5.03
放罐体积	6.0 L	6.2 L	18.2 L
放罐时泡沫	多	多	无
放罐菌丝体总湿重	248 g	265 g	1836 g
放罐湿重	41.3 g/L	42.7 g/L	89.2 g/L
放罐时总 HFBI 含量(估) ^①	235 mg/L	244 mg/L	508.4 mg/L

由实验原始记录上看(不便公示)和表 2 可以看出: F1 和 F2 补糖不及时, 并且总量不足; 调 pH 值时补碱没有跟上。发酵液溶氧后期总达不到 0% 以上。结果: 放罐时葡萄糖被完全消耗, pH 很低, 收获的湿重和估算的 HFBI 含量都约是预期放罐要求(放罐最低标准: 湿重 90 g/L, HFBI 总含量 500 mg/L)的一半。

F3 批发酵是成功的。从原始记录和表 2 看, pH 及其稳定, 为 4.78~4.82(要求 pH 4.5~5.0); 补糖虽没有完全达到要求(葡萄糖浓度 1.0~3.0%), 但控制在 0.6~1.7% 的范围内。溶氧 pO_2 也基本控制在正值。总体看, 基本上达到了发酵过程控制策略的要求。发酵结果也是成功的: 放罐湿重达到了 89.2 g/L, 放罐时总 HFBI 含量达到了 508.4 mg/L, 分别达到最低放罐要求的 127% 和 102%。

1.3 用 SDS 法抽提出 HFBI

使用标准的 1×STH 缓冲液抽提菌丝体的实验是测定菌丝体 HFBI 含量的依据, 所以本论文对此不再具体重复其中的定量计算了。从本文结果 1.7 节部分的电泳图 16.、图 17.和图 18.中可以看出: 菌丝体经 SDS 抽提能获得大量的 HFBI。

1.4 双水相系统对 HFBI 的纯化

用 ATPS 法从 F2 泡沫沉降液中抽提 HFBI, 结果见图 10, 实验很理想。

^① 答辩时刘如林教授提出过“转化率”, 作者认为无意义, 生产蛋白的发酵从不用此参数。

用 ATPS 法从 F2 发酵上清中抽提 HFBI 的结果见图 11，效果也很好。

为了证实盐浓度对 ATPS 法抽提的影响，用 SDS 法抽提菌丝体获得的 HFBI 溶液进行 ATPS 试验，结果见图 12，说明论是否脱盐都不影响对 ATPS 法分离的效果。

从所有的 ATPS 试验的电泳图上都可以看出经 ATPS 抽提后的 HFBI 浓度提高了，基本达到了电泳上单带，几乎没有可显示的杂蛋白。

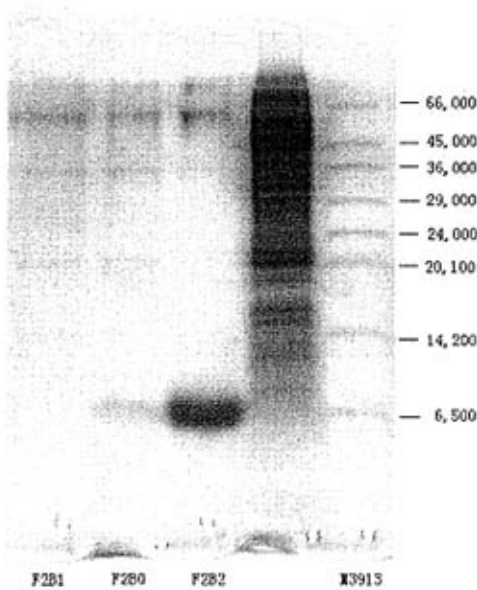


图 10. ATPS 法从泡沫中分离 HFBI

Fig.10 The Separation of HFBI from Foam

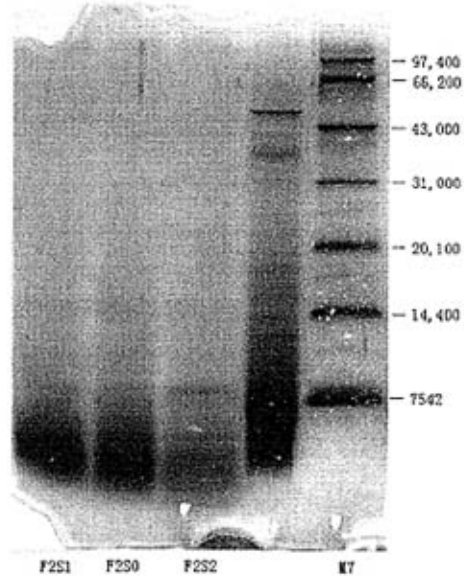


图 11. ATPS 法从发酵清液中分离 HFBI

Fig.11 The Separation of HFBI from Culture Media

为了计算 ATPS 的收率，使用 ATPS 对发酵泡沫沉降液 30mL (Berol 532 加 1.5 mL) 进行了抽提，结果见表 3。可见，ATPS 的 HFBI 收率为 50%；HFBI 的浓度提高了约 9 倍，HFBI 与总蛋白之比提高了 11.15 倍。分离系数 $K=1230$ 。

表 3. 30mL 规模 ATPS 抽提的结果
Tab.3 Extraction of ATPS at 30-mL Scale

F2 发酵泡沫	体积 (mL)	ELSIA 测 HFBI ($\mu\text{g/mL}$)	总 HFBI (μg)	双波长测总蛋白 (mg/mL)	蛋白比
沉降液上清 (B0)	30	208	6252	10.68	19.51
抽提下相 (B1)	28.1mL	3.136	88	9.86	0.32
反抽提水相 (B2)	1.666mL	1859.6	3098	8.55	217.50

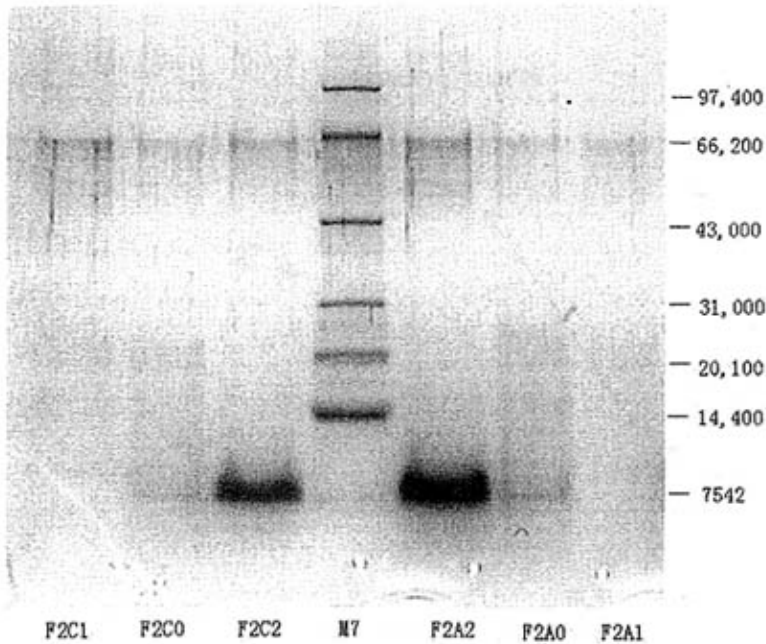


图 12. ATPS 法从 SDS 抽提液中分离 HFBI

Fig.12 The Separation HFBI from SDS-abstracted Solution of Mycelia

图 12.说明:

F2A0: 未脱盐; F2C0: 脱盐的。两者都经过 KCl 除 SDS。

M3913 为 Σ 分子量标准, M7 为国产 6 带分子量标准, 加上自制的 HFBI

1.5 葡聚糖凝胶 G-25 的脱色效果

ATPS 萃取获得的 HFBI 溶液为黄色, 说明有色素。为了脱色, 进行了葡聚糖凝胶 G-25 层析。图 13 是样品 F2A2 进行 G-25 脱色的层析图。对 200 倍的稀释液的 A_{280} 大于 0.1 的流分进行 SDS-PAGE 分析。结果发现只有第 6 和第 7 管有 HFBI, 其它各管没有 HFBI 或极低 (本文中未展示 SDS-PAGE 图)。层析的回收率以 A_{280} 计算为 101.8%, 第 6 和第 7 管的 A_{280} 物质之和占总 A_{280} 物质的 18.26%, 这意味着有 81.74% 的有 A_{280} 的物质被除去, 这些杂质有待进一步分析是何种杂质。

葡聚糖凝胶G-25层析图

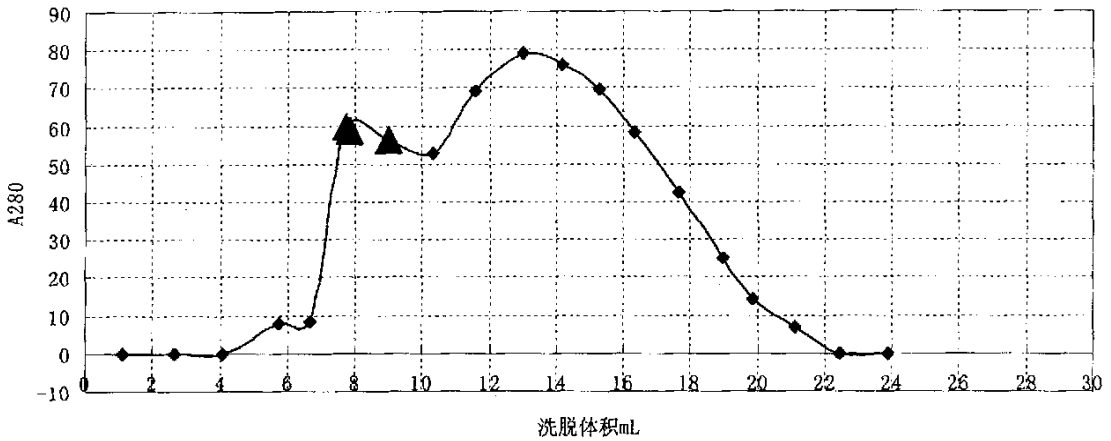


图 13. 葡聚糖凝胶 G-25 层析图
fig.13 The Chromatograph of Sephadex G-25

1.6 离子交换层析的纯化效果

为了获得验证 HFBI 的纯度和获得更高纯度的 HFBI，对 G-25 脱色液进行了离子交换层析，结果见图 14。

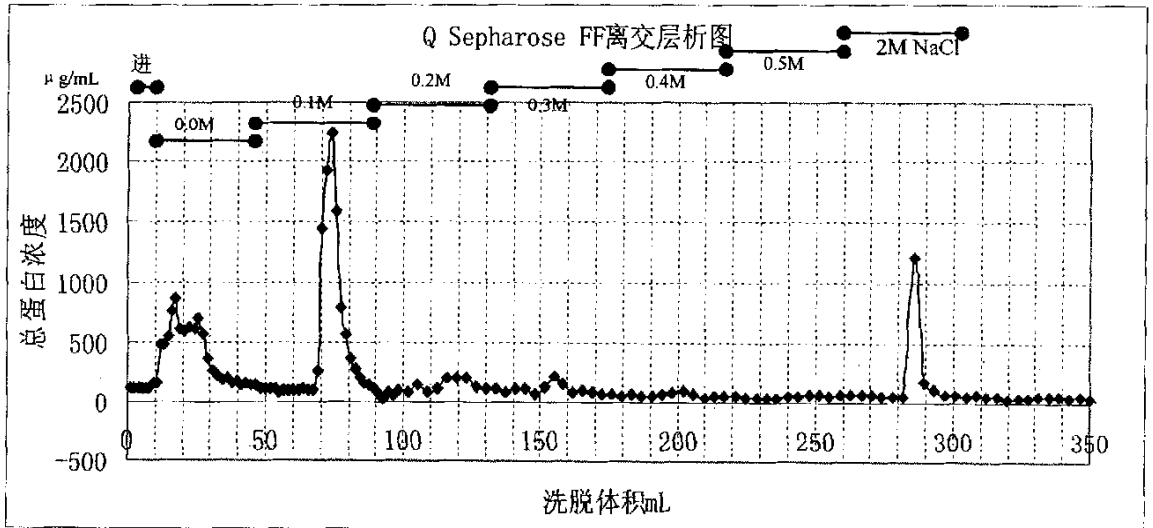


图 14. Q Sepharose Fast Flow 的层析图

Fig.14 The Chromatograph of Q Sepharose Fast Flow

层析时测得自然最大流速，进柱时为 0.423 mL/min，洗脱时为 0.531~0.625 mL/min。所收集流分体积最大 3.9mL，最小 1.23mL。从图 14 中可以看出有 7 个峰，分别取高峰的流分进行 SDS-PAGE 分析，电泳图见图 15。从层析图中可以看出进柱后用 0.0 M NaCl 的工作液就能洗脱出头两个峰，电泳图显示含极少的 7KDa 蛋白，用 0.1 M NaCl 洗脱的第三峰是最大主峰，电泳图和 ELISA 都证明是纯 HFBI 成分。此后用 0.2M, 0.3M 和 0.4M NaCl 洗脱出的几个小峰电泳图也显示为 HFBI 的位置, 0.5M NaCl 没有洗脱出任何明显的峰, 而最后用 2.0 M NaCl 洗脱的成分虽然表现总蛋白很高, 但电泳图显示基本不含任何蛋白。

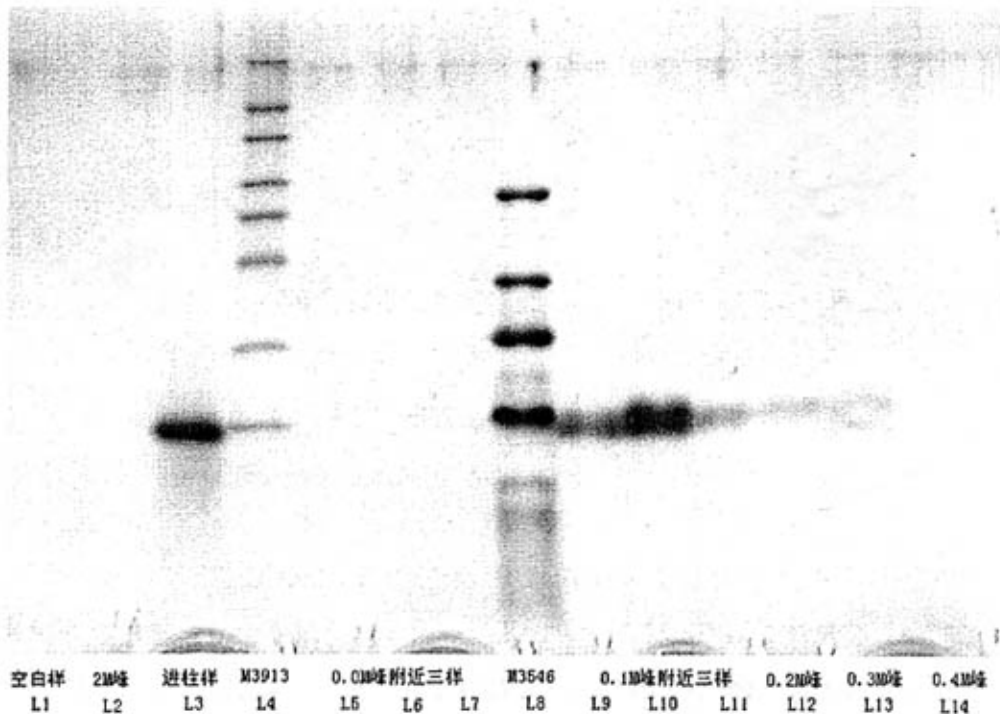


图 15. Q Sepharose Fast Flow 的层析峰的 Tris-Tricine SDS-PAGE 图

Fig.15 Tris-Tricine SDS-PAGE Analysis of Peaks from Chromatograph of Q Sepharose Fast Flow

用 ELISA 法只测量了最高峰即第 46 管的 HFBI 含量，为 2404 $\mu\text{g/mL}$ ，与双波长测的总蛋白 2235 μg 蛋白/mL 很吻合。这也进一步证明主峰就是 HFBI。相关的其它信息还在分析中。

1.7 SDS-PAGE 两系统电泳效果的初步比较

从2002年9月18日到2003年9月21日约一年的时间里共做普通 SDS-PAGE 电泳 47 次, 编号 G1 至 G47。没有编号的还有十几次。发现 SDS-PAGE 对用 SDS 抽提的样品表现得很不稳定, 图 16. 是普通电泳常见的四个例子。

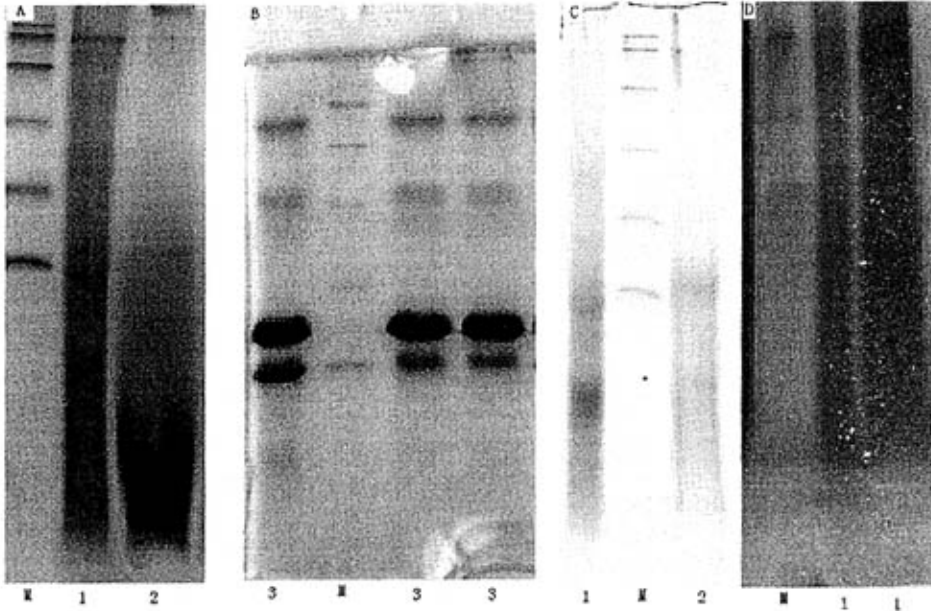


图 16. 普通 SDS-PAGE 上常见的四个图
(简单比较, 所以不标分子量标准)

Fig.16 Four pictures of SDS-PAGE of Laemmli System

图 16. 中 A、C、D 都是 HFBI 的样, B 为 SOD 酶同样条件下的图。1 号样为 1% SDS 溶液从菌丝中的抽提液, 已经用 KCl 除去大部 SDS, 2 号样为发酵滤液 80°C 浓缩后的离心上清, 3 号样为纯 SOD 酶。M 为上海产的六条带的分子量标准, 最小的为 14.4 KDa。

结果显示当蛋白分子量低于 14KDa 后, 普通 Laemmli 的 SDS-PAGE 分辨率明显下降。芬兰的 HFBI 标准品在普通 SDS-PAGE 上也表现为 2mm 的宽带(未示)。从图 C 中还可见 1 号和 2 号样中存在 14KDa 附近的两条带。从纯 SOD 酶蛋白的电泳图上看, 电泳过程没大的问题, 而是电泳系统的适用性和样品处理上有问题。从 2003 年 10 月 14 日到 2004 年 3 月 22 日, 有关疏水蛋白的电泳系统都改为对低分子量蛋白和多肽具有高分辨率的 Tris-Tricine 系统, 图 17. 为新 Tris-Tricine 系统的第一张电泳图。1 号样还是与图 16. 相同的 SDS 抽提液。M7 为国产六条带低分子量标准加上 HFBI, M3913 为 Sigma 公司的 8 条带低分子量

标准。FOAM 为小罐 F2 发酵的泡沫沉降液。与普通电泳图相比，HFBI 位置的蛋白带分辨率明显提高。普通 Laemmli 系统与 Tris-Tricine 系统 SDS-PAGE 后的 Western Blotting 图谱见图 18。样品 1 号、2 号和 M 的含义同上图，HFBI 为芬兰纯蛋白标准品。图谱显示 HFBI 的 7 KDa 带很宽，此外还存在高分子量的 HFBI 多聚体，尤其是 14K 附近的二聚体。

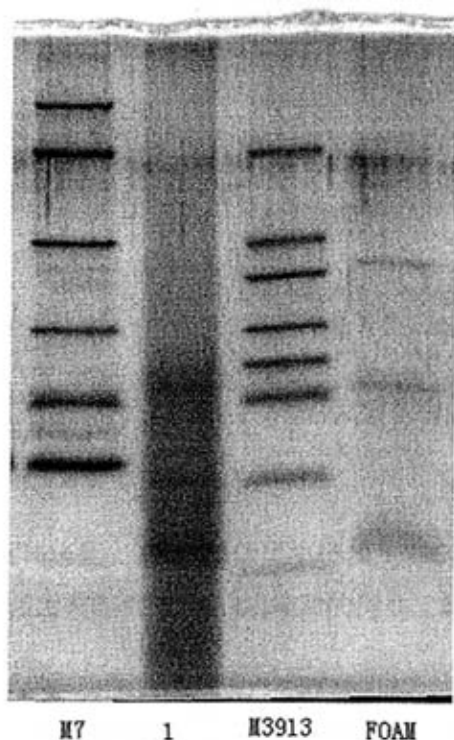


图 17.Tris-Tricine 系统的电泳图

Fig.17 SDS-PAGE by Tris-Tricine System

← HFBI 的位置

图 17 中 1 号样为 1% SDS 溶液从菌丝中的抽提液，已经用 KCl 除去大部 SDS，FOAM 为发酵 F2 批的泡沫。M7 分子量标准（最小带即为 HFBI）。M3913 为 Sigma 分子量标准（最小的分子量为 6.5 KDa）

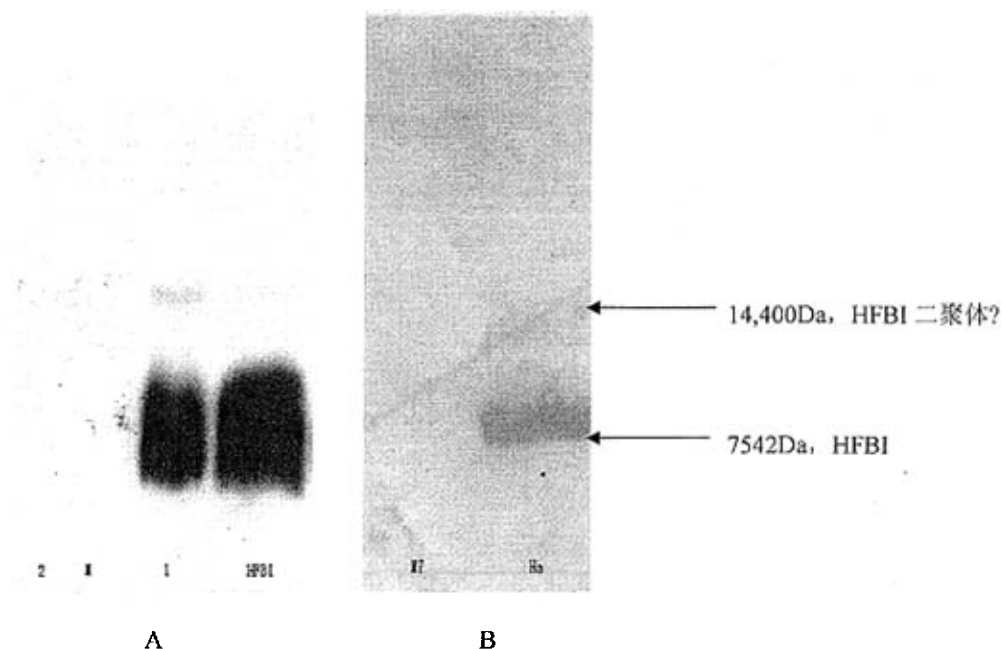


图 18. 两系统 Western Blotting 效果比较图
A 为普通系统, B 为 Tris-Tricine 系统

Fig.18 Compare Effects of Western Blotting Between Two SDS-PAGE System

图 18 中 1 号样为 1% SDS 溶液从菌丝中的抽提液, 已经用 KCl 除去大部 SDS, 2 号样为发酵滤液 80°C 浓缩后的离心上清。HFBI 为芬兰标准, M7 和 M 为分子量标准。

1.8 紫外双波长法测总蛋白浓度的标准曲线

用 BSA 作总蛋白标准, 测定 5 - 110 $\mu\text{g/mL}$ 的 225nm 和 215nm 的吸光值, 结果见表 4. 并作出标准曲线, 见图 19.。

表 4. 紫外双波长法测总蛋白标准曲线的配制表

Tab.4 Assay Concentration of Total Proteins by Two Wavelengths of U.V.

BSA (μL)	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
水 (μL)	995	990	980	970	960	950	940	930	920	910	900	890
A_{215}	0.085	0.151	0.294	0.462	0.606	0.766	0.903	1.090	1.210	1.364	1.453	1.655
A_{225}	0.048	0.082	0.163	0.259	0.343	0.438	0.512	0.597	0.685	0.771	0.831	0.933
吸收差	0.037	0.069	0.131	0.203	0.263	0.328	0.391	0.493	0.525	0.593	0.622	0.722

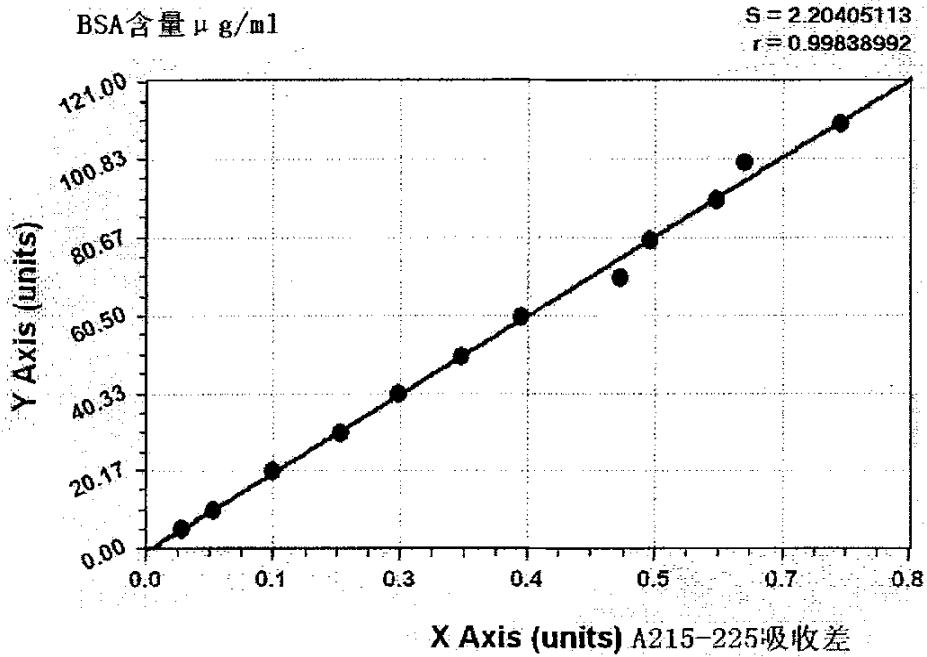


图 19. 紫外双波长法测总蛋白浓度的标准曲线

Fig.19 Standard Curve of Assay Concentration of Total Proteins by Two Wavelengths of U.V.

从标准曲线上看 BSA 在 5 ~110 μ g/mL 完全符合 Beer 定律。

直线方程式：蛋白浓度 = -0.66329327 + 153.9 \times ($A_{215} - A_{225}$)

1.9 最后确定的纯化工艺

通过对纯化过程的研究，包括成功的和失败的，加上个人科研和生产的经验我认为图 21 所示从瑞氏木霉菌丝体纯化 HFBI 的工艺是可行的：

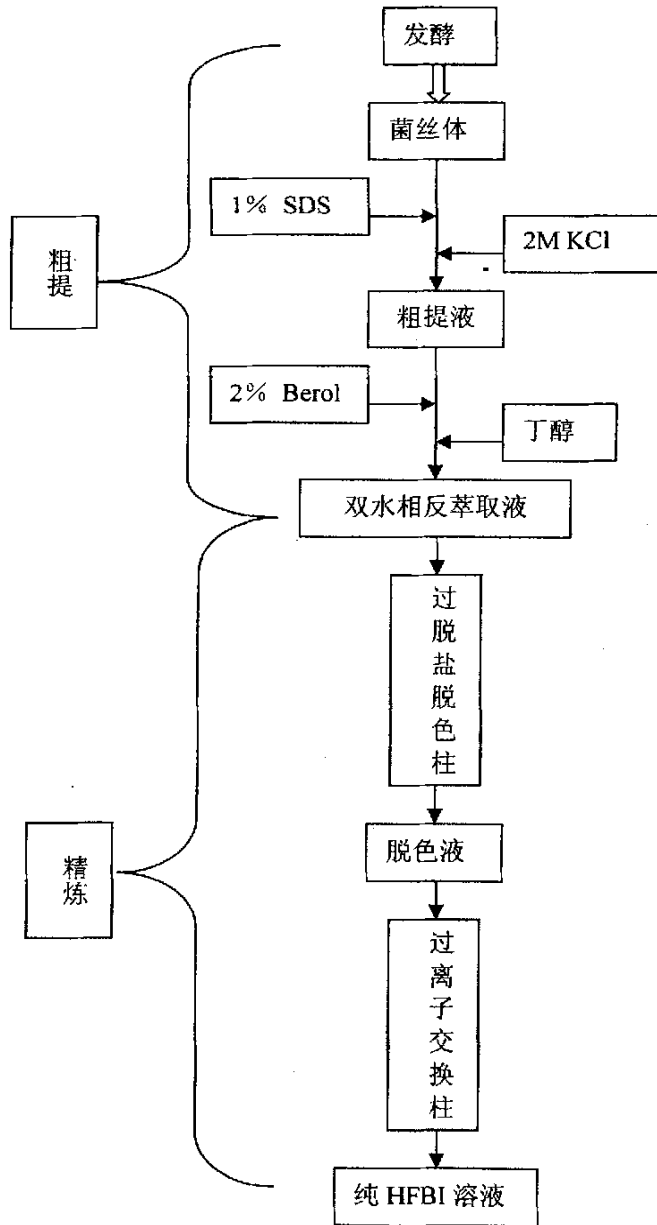


图 21. HFBI 的纯化工艺
Fig.21 Purification Process of HFBI

2. 讨论

2.1 发酵的讨论

2.1.1 生长量的衡量

丝状真菌的生长曲线不同于细菌和酵母。在有限培养基里，生长时期可以分潜伏期、加速期、对数期、直线期、减速期、稳定期和衰亡期。菌丝的生长主要体现在顶端生长和分支上，因此对数期很短，而直线期时间较长。在瑞氏木霉摇瓶培养实验中，我没有测比生长率，可以说是个遗憾。因为干重检测起来不容易，我用湿重表示。湿重受菌丝体含水量的影响，而含水量又与菌丝体的形态相关，使湿重和干重无可比性。如图 9 中摇瓶第二天的菌丝体湿重竟然是最高的，这是因为此时菌丝体高度分枝，整体如同一块海绵，用离心方法是不能除去水分的。所以应该用菌丝体的干重来表示真菌的生物量。干重的测定方法应该参考文献^[34]的方法：103 °C 干燥 6 h 或过夜称重至重量的失重小于 2% 的相对值。文献^[38]上使用高氯酸法测干重，这是一种用强酸溶解菌丝，以释放出来的核酸含量来间接测定生长量的方法。我开始对此法期望很高，但预实验后觉得不好用，因为瑞氏木霉的菌丝太长，只取 3ml 发酵液，误差也太大。还有我怀疑 0.5 mol/L 的高氯酸不能完全溶解菌丝体。当然这种方法还需要进一步验证。

开始时期摇瓶培养的菌种都是用接种环挑木霉菌丝来接，这很容易受斜面菌丝的生长情况和操作手法的影响。而接种量对摇瓶菌丝体的形态起作用的机理我推测是受营养条件的影响。接种菌丝太少，单个生长的好，变得粗大，但整个摇瓶中并没有生物量。在摇瓶条件下，菌丝很难断裂，所以个别菌就形成一个巨大的菌丝球。当接种量太大时，菌丝生长到一定阶段不可避免的出现营养匮乏，菌丝变得脆弱而易断裂，而且整个摇瓶菌丝很快进入孢子化阶段，随后营养菌丝自溶。所以适当的接种量对发酵很重要。接种量有个范围，罐式发酵因为可以补料和优越的溶氧条件，接种量只影响生长的潜伏期长短，一般要求大些，比如可以达到 20% 的体积比（种子罐：发酵罐）。

2.1.2 摇瓶的用途

初期，摇瓶的目的是为了观察木霉的生长情况，配合平板培养，对瑞氏木霉的生长情况有总体上的了解。接着，摇瓶培养分析瑞氏木霉生长的曲线，筛选最有利的生长条件。摇瓶还可以获得少量的菌丝体供纯化使用；也可以检验保藏菌

种的情况或者用于筛选菌种,防止菌种的退化;摇瓶两天的瑞氏木霉也可以作为小罐生长的菌种。木霉是特别好氧的菌株,在摇瓶条件下当菌体生长旺盛时供氧明显不足,并且不方便检测和补料,因此摇瓶试验获得的数据不能完全用于罐式发酵中。但即使是成熟的工业发酵技术,在日常研究中摇瓶也是必不可少的。摇瓶数据是工业发酵实验的重要参考,尤其用于培养基配方的筛选。在重要配方成分更换,更换产地,甚至只更换试剂生产批号都必须做摇瓶试验。

2.1.3 小罐是最好的发酵环境

摇瓶发酵条件不等于生产上的发酵条件。对于瑞氏木霉来说,发酵研究的很透彻了,其水平已经达到 360 吨罐^[33]。因此,我认为对于疏水蛋白 HFBI 的生产来说,发酵不是研究的重点。但大试必上中试,上中试必先上小试。没经过小罐发酵就匆忙上中罐大罐发酵是不妥的。实际上,小试的发酵条件是所有发酵规模中效果最好的,不论是摇瓶还是罐式发酵(厌氧发酵另作别论)。首先,小罐的全自动水平最高;再次,小罐的通气和搅拌所给的供氧和混合条件是最好的。许多高附加值的生物产品只需要小罐水平就能满足生产需求。为了瑞氏木霉的中试和大试,我们先研究了 15-L 和 30-L 小罐发酵的条件。

2.1.4 小罐发酵的差异主要是补料与控制的问题

我们使用了两种小罐:15-L 和 30-L 罐,分别是南开大学的 C10-3 型和天津市工业微生物研究所的 MSJ U2 型。C10-3 型 15-L 罐体积小但自动化程度高,搅拌形式为罐顶安装;MSJ U2 型 30-L 罐生产的要早些,自动化程度稍低,如不能记录过程,但罐体积大些,视窗也大,搅拌为罐底安装,补料和观察要方便些。头两次用 15-L 罐 C10-3 型(批次:F1 和 F2),接种用孢子悬浮液,后一次(F3)预想使用在 15-L 罐用摇瓶液作种子,但应合作方要求改在天津工微所共同进行,发酵罐也变成了 MSJ U2 型 30-L 罐。所以造成了不但罐型不一样,而且接种形式也有差异。但据我的观察与经验,两罐的自动化程度都很高,而控制策略都按文献报道的进行,它们结果的差异只是有没有达到控制要求的问题。实际上,F1 和 F2 没有控制住 pH 值和葡萄糖浓度,pO₂的控制也不好,但上罐的目的是为了熟悉小罐发酵和补料控制技术;而 F3 在前两次的经验上,三者控制程度基本达到要求。结果是前两次没有达到放罐要求但考虑到目的已经达到而且已经没法控制了(出现菌丝自溶)就放了。后一次 F3 放罐时菌丝则很年轻,还有潜力,时

间也没达到文献报道的 92 小时^[34]或 167 小时^[10], 但因为湿重和总 HFBI 含量已经达到最低放罐要求的 127% 和 102%, 所以放罐了。今后, 如果更严格地控制发酵过程, 比如不但补糖而且补氮和微量元素, 适当提高溶氧水平, 小罐发酵达到或超过国外报道的发酵菌丝 HFBI 含量 1.4 g/L 的水平^[34]应该不是难事。

2.1.5 中罐和大罐发酵的展望

中罐和大罐的发酵一般是两级到三级发酵, 其中种子罐发酵为一到二级。对于中罐 500L, 种子罐为 50L 左右。对于大罐 5 吨, 种子罐若为两级则可用中罐发酵的两级, 若只设一级, 则种子罐应设为 200L~500L 的罐。第一级种子罐的若体积小, 则直接用孢子悬浮液; 若体积大, 则应该用摇瓶 2 天的培养液。

中大罐发酵一次的成本很高, 所以无菌要求很严格。每次接种或转罐都要求进行无菌检验, 包括显微镜镜检和平板涂布检验。小试发酵我们只测了还原糖浓度, 没有测总糖、总氮、还原氮等参数, 在中大罐发酵都必须检测。对发酵过程的控制策略同小罐的控制。对生产而言, 技术上实际上已经不需要多大的创新, 而现场管理非常得重要, 难度加大。在 F3 小试中明显看出凌晨时段菌丝的耗糖量明显下降, 这显然不能用真菌生物钟来解释, 而更像现场人员的生物节奏在起作用。一般而言, 中罐和大罐的自动化程度要低得多, 更需要良好的现场管理方案。比如, 对原始记录的要求, 对各种参数的检测, 等等。

2.2 纯化的讨论

2.2.1 刚开始时的研究计划的实现情况

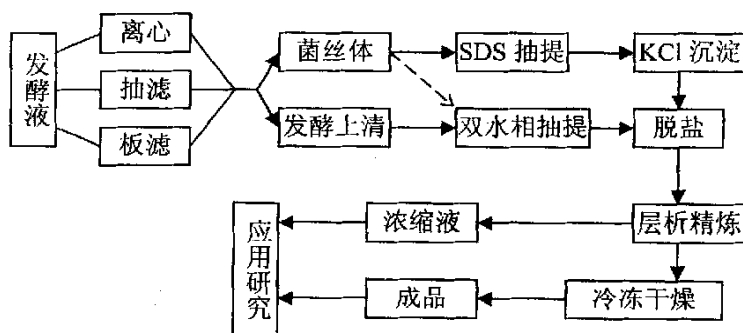


图 20. 开始时的纯化研究计划

Fig.20 Research Plan of Purification at beginning

在研究中由于检测技术的落后, 许多项目都没有研究完。

2.2.2 SDS 抽提菌丝体分离 HFBI

对于 II 型疏水蛋白,虽然在界面也如 I 型疏水蛋白一样形成聚合物,但聚合物的稳定性要比 I 型差得多^[6,11,20,21],可以用 1-2% 的 SDS 或 60% 的乙醇解聚与溶解,甚至在受压或离心就能解聚。HFBI 是瑞氏木霉在葡萄糖培养基上诱导产生的 II 型疏水蛋白,几乎所有的 HFBI 都集中在浸水营养菌丝的细胞壁上,只有细胞壁上容纳的 HFBI 跟不上菌丝分泌的量时, HFBI 才能以可溶形式存在于发酵液中^[10,34]。因此工业生产的主要目标从菌丝体细胞壁上抽提 HFBI。从安全性和成本上考虑 SDS 法要优于乙醇法。所以文献上普遍使用含 SDS 的缓冲液抽提 HFBI,但缓冲液的 pH 值有不同的描述:1. 含 1% SDS 的 pH5.0 的 50mM 乙酸盐缓冲液^{[35][36][39]};2. 含 1% SDS 的 pH9.0 的 100mM Tris 盐酸缓冲液^[10];3. pH 6.0 含 1% SDS 的 100mM 柠檬酸缓冲液抽提 HFBI 三次^[34]。到底哪一种 pH 下抽提效果更好呢?文献^[10]上讲“SDS 抽提 HFBI 的能力在碱性 pH 下有所提高,但在 SDS 浓度大于 1% 的情况下提高得不明显。在实验中使用的另两种去污剂: Triton X-100 和 Tween 20 的抽提效果达不到 SDS 0.6 % 浓度的抽提水平”。

为验证这段话,我比较了不同 pH 下,也意味着不同的缓冲液系统下,1% SDS 从菌丝体中抽提 HFBI 的效果。过程简述:称 10 份瑞氏木霉小罐发酵 F1 的菌丝体,每份 1g,加入 pH 为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 的 110mM 缓冲液各 2mL,再加 10% (w/v) 的 SDS 溶液,37℃ 震荡 2 小时,离心取上清各 1650 μ L,加入 2 M KCl 各 660 μ L,混合后再离心,取上清分析总蛋白、HFBI 含量以及进行 SDS-PAGE 分析。实验结果:只用紫外双波长测得了总蛋白浓度,用普通 SDS-PAGE 和 Western 点杂交法半定量分析 HFBI 含量的实验效果很差,两者的结果互相矛盾。连续做了两批实验,都是如此。希望以后在分析技术提高后再来重复这个实验并优化最佳的 pH 浓度和缓冲液系统。

2.2.3 ATPS 法纯化 HFBI

双水相萃取(Aqueous two phase extraction)是 1896 年当 Beijerinck 把琼脂和可溶性淀粉或明胶相混合时最早发现的^[40]。1956 年,瑞典伦德大学的 Albertson 重新发现此体系并第一次用来提取生物物质。1979 年,Kula 和 Kroner 等人将双水相体系用于从细胞匀浆液中提取酶和蛋白质,使胞内酶的提取过程大为改善^[41]。此后,对于双水相体系的研究和应用逐步展开,并取得很大进展。在提纯有生理活性的生物物质方面,与其他提取方法相比,它是一项具有许多优势的分离新技术。现在

双水相萃取已被广泛用于蛋白质、酶、核酸、病毒、细胞、细胞器等生物产品的分离和纯化,并逐步向工业化生产迈进^[40]。

双水相萃取与水-有机相萃取的原理相似,都是依据物质在两相间的选择性分配,但萃取体系的性质不同。当物质进入双水相体系后,由于表面性质、电荷作用和各种力(如疏水键、氢键和离子键等)的存在和环境因素的影响,使其在上、下相中的浓度不同。分配系数 K 等于物质在两相的浓度比,由于各种物质的 K 值不同,可利用双水相萃取体系对物质进行分离^{[41][42]}。

双水相体系萃取分离的特点。(1)条件温和:与传统的萃取方法相比,由于双水相萃取体系中的两相大部分(质量分数 >0.7)是水,所形成的两相不涉及有机溶剂,对被分离的物质不会起破坏作用,所使用的聚合物有时还对被分离物质起保护作用,无三废处理之需,所以特别适合生物活性物质的分离提纯;(2)操作方便:所使用的设备简单,操作方便,即使在常温下操作亦不易导致失活;由于是双水相,两相间的张力小,有利于萃取,且可直接与后续提纯工序相连接,无需进行特殊的处理;(3)回收率高:提纯的倍数可达 $2\sim 20$ 倍,如体系选择适当,回收率可达 $80\%\sim 90\%$ 以上,且分离速度快^[42]。

我用 Tris-Tricine 电泳系统从发酵泡沫的沉降液中发现存在 7K 的主要蛋白。从这种特殊起始材料开始,结合文献报道,精心设计了实验,重复出了文献^[39]所提的纯化 HFBI 的方法(即:含 2% SDS 的 pH5.0 的 100mM 乙酸钠抽提菌丝 3h,离心,上清加 AG 2-X8 (Bio-Rad)阴离子交换剂,然后再 RT-HPLC 分离,冻干),从而形成自己的双水相系统纯化 HFBI 的生产工艺。

虽然实验开始时采用的是比较含 HFBI 纯的发酵泡沫材料,但获得成熟的方法后发现对发酵上清、SDS 抽提菌丝体后用 KCl 除去大部分 SDS 的高盐溶液或者经 G-25 凝胶脱盐的溶液都是很有有效的。收率只有 50% ,比文献^[35]的 80% 要低得多,推测原因是在正丁醇反抽提时混合剧烈,许多 HFBI 在水与正丁醇的界面自我组装形成的聚合物特别多,为分析方便,我取下相水溶液时也弃去了这层膜。这也在侧面说明了为什么文献中加入环氧丙烷-环氧乙烷(EOPO)共聚物的反抽提效果(总收率 90%)^[25]比异丁醇反抽提效果(总收率 80%)^[35]要好的原因,因为这种 EOPO 共聚物是水溶性的大分子,比疏水性的丁醇引入“界面”的可能性大大下降了。所以我推荐在今后的优化工作,要改进反抽提这一步才能保证总收率。

2.2.4 层析技术用于纯化 HFBI 的讨论

层析法 (Chromatography) 是分离复杂物质的首选方法。层析和色谱法是同一个英文词, 差异只是翻译和理解的问题。原理是将各物质之间物理性质的微小差异通过流体对固相时进行层层积累得以放大从而分开的一门分离和纯化技术。层析过程可分两个阶段: 上柱吸附和层析洗脱, 这两阶段皆有分离作用。层析的分类方法很多, 对于柱层析, 按填料分常见的有: 凝胶过滤、离子交换、亲和、反相和疏水层析等。

对于疏水蛋白, 因为可溶单体遇见亲水-疏水界面立成难溶解的多聚物, 所以前期文献 (1991 年到 2000 年) 没提到层析方法。1998 年报道裂褶菌分泌的大分子多糖裂褶菌素 Schizophyllan 在溶液中对 SC3 成分有稳定作用^[27], 运用这种物质在 2000 年发展出不需强酸的纯化 SC3 的方法: HIC 疏水层析^[28]。这也是到目前为止唯一一篇报道直接用层析方法从发酵液中纯化 I 型疏水蛋白的文献。2002 年用 RP-HPLC 从烟曲霉分生孢子 (rodA 缺失) TFA 抽提物中纯化出疏水蛋白 rodB^[26]。当然, 如果算上在大肠杆菌中表达的融合蛋白, 层析方法纯化 I 型疏水蛋白的例子就多了。如 His-tag 的 HYDpt-1 先经 LC318 柱层析, 再 RP-HPLC 纯化^[43]。II 型疏水蛋白在亲水-疏水界面形成聚合物的稳定性比 I 型要差, 容易解聚。所以实际上第一个获得纯化的疏水蛋白反而是 II 型疏水蛋白 CU (Stevenson 1979 年, 见文献^[11]引述)。到目前为止, 芬兰 VTT 对瑞氏木霉中 II 型疏水蛋白 HFBI 和 HFBII 的层析技术是公开文献中最多的^[10,15,34,35,36,39]。

对 HFBI, 1996 年: 用 0.1% TFA-20% 乙腈溶液室温下抽提瑞氏木霉 5min, TFA-ACN 抽提液用 RP-HPLC 纯化^[10]。2000 年: SDS 抽提菌丝, 离心获得的上清用 Bio-Gel P6 脱盐, 之后上 Resource Q 柱 (Amersham Pharmacia), 最后用制备型 RP-HPLC 进行纯化^[15]。2001 年用疏水相互作用层析 (HIC) 纯化菌丝的 SDS 抽提液, 进一步用阴离子交换柱子 Resource Q 纯化^[34]。发酵液中的 HFBI 经 Berol 去污剂双水相法分离后再经 Resource Q 层析, RP-HPLC 分离纯化^[35]。2002 年: 菌丝体 1% SDS 抽提, 用 BioRad 10DG 柱脱盐, 再经 Resource Q 层析, 然后用 Vydac C4 柱 RP-HPLC 分离^[36]。2003 年: 含 2% SDS 抽提菌丝, 离心, 上清加 AG 2-X8 (Bio-Rad) 阴离子交换剂, 然后用 Berol 去污剂 ATPS 法分离, 再经 RT-HPLC 纯化^[39] ^[45]。可见, 在 HFBI 的纯化中使用的层析法有: 脱盐, 阴离子交换 Resource Q, 疏水层析和 RP-HPLC。

我们实验室试验了用阴离子树脂脱 SDS, 用葡聚糖凝胶 Sephadex G25 脱盐和 G50 分子筛层析 HFBI, 以及用阴离子 Q Sepharose FF 层析柱纯化 HFBI。强碱性阴离子树脂 201GF 和 D296 由南开大学化工厂惠赠。使用吡啶橙法测定 SDS 含量。实验了静态吸附和动态吸附。对于去除杂蛋白的效果, 电泳观察发现 D296 比 201GF 要好一些。但与原液比较可见, 这两种树脂对疏水蛋白 HFBI 都有一定的吸附作用。对于除去 SDS 的效果, KCl 法为 84.80%, 树脂 201GF 为 87.94%, D296 为 88.93%, 相比, 树脂法比 KCl 法要好一些的, 但其脱 SDS 效果还是不太理想。这可能是由于所选树脂有关, 但说明树脂法可行。要想取得更好的结果, 还需要筛选更多的树脂。具体参见南开大学丁飞翔的 2003 年本科论文^[45]。

葡聚糖G-25装柱后, 柱高12.7cm, 柱内直径1cm, 床体积10mL。进样和洗脱的流速为0.5mL/min。进样3mL, 样品为F2A1即发酵F2批菌丝体的1%SDS抽提液(已用KCl除大部分SDS), A280为1.248×200。从进样开始处收集, 每约1mL为一管。测每管的A280, 若200倍稀释液A280大于0.1则进行SDS-PAGE分析。结果如图。只有第6和第7管有HFBI, 其它各管没有HFBI或极低。层析的回收率以A280计算为101.8%, 第6和第7管的A280物质之和占总A280物质的18.26%, 这意味着有81.74%的有A280的物质被除去, 这些杂质可能是SDS和黄色色素, 有待进一步分析。

葡聚糖G-50装相同的柱子, 柱高16cm, 床体积12.6mL, 高径比为12.6:1。层析和分析的过程同上面G-25的一样。但结果是HFBI基本上没有分开, 这里就不在展示了。推测与HFBI在水中形成不同的水溶性多聚体有关, 也可能是层析过程的问题, 有待以后的实验来分析。

2.3 检测技术的讨论

2.3.1 总蛋白的测定

测总蛋白的方法很多。常用紫外吸收法和 Bradford 法。文献^[46]上提到了六种紫外法, 我用 BSA (华美公司 BP0081, 冻干粉, 蛋白含量>95%) 做了实验。先称 30mg BSA 溶于 30mL 水, 得约 1mg/mL 的溶液, 设实际浓度为 X。以双蒸水为参照, 测定波长 240-300nm 的吸光值 A:

波长: 240	250	260	270	280	290	300	nm
A 值: 0.900	0.312	0.373	0.524	0.615	0.334	0.050	

再稀释 30 倍, 测:

波长: 205 215 225 nm

A 值: 0.903 0.454 0.245

然后代入公式计算 X (mg/mL):

公式 1: $1.55 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260}$ 得 0.6698

公式 2: $144 \times (A_{215} - A_{225})$ 得 0.9029

公式 3: $27 + 120 \times (A_{280}/A_{205})$ 得 0.8917

公式 4: $A_{205}/[27 + 120 \times (A_{280}/A_{205})]$ 得 0.9114

公式 5: $1.45 \times A_{280} + 0.74 \times A_{260}$ 得 0.6157

公式 6: $F \times (1/d) \times A_{280} \times D = 1.08 \times (1/1) \times 0.615 \times 1 = 0.6642$

可以看出公式 1、5 和 6 的值基本为 0.66 mg/mL, 而公式 2、3 和 4 的值基本为 0.9 mg/mL, 后者似乎更符合预期的 1 mg/mL。考虑到 BSA 在 280nm 的比消光系数: 1cm 光程, 10 mg/mL 的消光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 6.6$, 也就是说 1mg/mL BSA 的 $A_{280} = 0.66$ 。这样公式 6(1.0063mg/mL)、1(1.0148 mg/mL)和 5(0.9329mg/mL)也是符合实际浓度的。怎么选好了? 再考虑到误差和灵敏度, 波长越小, 吸光值越灵敏, 文献^[46]上说公式 1 和 2 的误差为 $\pm 15\%$, 公式 3 和 4 的误差为 $\pm 2\%$ 。但 A_{280} 和 A_{205} 不能一次测定, 需要稀释一次, 不方便, 所以选择灵敏度高而方便的公式 2 的方法来测总蛋白浓度。

公式 2 的浓度范围, 文献^[46]说是 10~100 $\mu\text{g/mL}$; 文献^{[47][48]}说是 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 。氯化钠、硫酸铵以及 0.1 mol/L 磷酸、硼酸和 Tris 等缓冲液都无显著的干扰作用。pH 值对紫外吸收法有影响。而 0.1 mol/L 乙酸、琥珀酸、邻苯二甲酸以及巴比妥等缓冲液在 215nm 下吸收较大, 必须降到 0.005mol/L 才无显著影响。因为, 我们分离纯化 HFBI 的缓冲液常是 Tris-HCl 缓冲液, 所以 225-215 nm 双波长紫外法很适合我们的实验^[45-48]。

另外, 我也试验了 Bradford 法^[37], BSA 在最终浓度 2~22 $\mu\text{g/mL}$ 也符合 Beer 定律(图未示), $R = 0.9936$ 。但发现精密度不行, 而且 Tris 和去污剂的干扰太大^[48]。所以我一直尽量不用这种方法测总蛋白。

2.3.2 定量检测疏水蛋白 HFBI

根据疏水蛋白含八个半胱氨酸残基的特点, 可以在培养时用 ^{35}S 放射性标记, 然后提蛋白, 分析放射性强度来定量^{[1][2]}。大部分研究者都使用 Northern 杂交分

析疏水蛋白的表达量(mRNA), 提纯疏水蛋白在 SDS-PAGE 后用 Western 杂交。这些方法对实验室研究工作有用, 但显然不适合于生产上的定量检测。

纯粹的 HFBI 生产在规模上达到了小试 7L 的水平(15-L 罐)^{[10][35]}(融合蛋白为 1160L, 1500L 罐)^[26], 检测的方法是用 1%SDS 抽提菌丝体三次, 抽提液用 RP-HPLC 定量, 三次的总和就是这批菌丝体的 HFBI 含量^{[10][34]}。HFBI 标准品蛋白质含量的测定: 用含正亮氨酸作内标的 3 ml 6M HCl 水解样品(0.2ml), 110 °C, 24h, 蒸干, 溶于 1.5 ml 0.2 M pH2.2 的柠檬酸钠缓冲液, 之后用氨基酸分析仪进行氨基酸分析。因为用这种方法不能检测出半胱氨酸、甲硫氨酸和色氨酸, 考虑到 HFBI 有 8 个半胱氨酸, 因此从氨基酸分析中获得的蛋白质浓度必须进行校正^[10]。

我们实验室没有 HPLC, 使用其他实验室的 HPLC 也跟不上我们对大量实验数据的处理。考虑到我们有芬兰 VTT 惠赠的 HFBI 标准品和抗体^[15], 选择使用点杂交 Western 检测和酶联免疫吸附检测 (ELISA) 作为定量 HFBI 的方法。

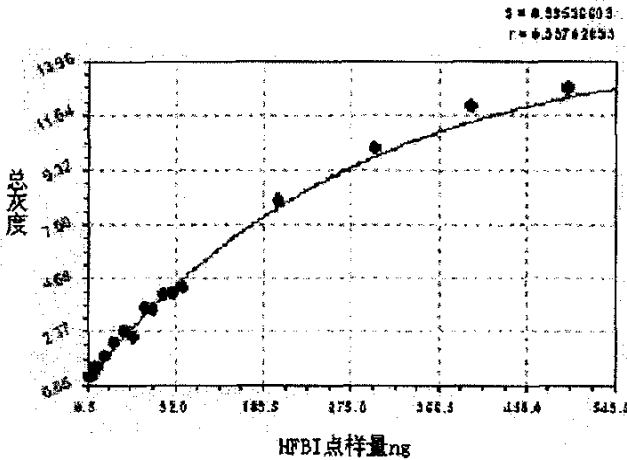


图 21. Western 点杂交的标准曲线

Fig.21 Standard Curve of Western Dot Blotting

点杂交 Western 检测的实验过程与 SDS-PAGE 转膜后的 Western 杂交过程原理相同, 只是省去了电泳和印迹的过程, 直接把电泳样缓处理的样品点在硝酸纤维素膜, 80°C 烘干 1 小时后, 再进行 Western 杂交显色。图 21. 是绘制的标准曲线。Western 杂交后, 膜在室温下干燥, 立即扫描进电脑, 用每个杂交点的黑白灰度总和对 HFBI 点样量进行函数拟合分析, 使用的软件是 curveexpert。

图 21.中这的曲线相关系数 r 值达到 0.998, 灰度值= 14.38362 × (1.0152921 -

$\exp(-0.0037356204 \times \text{点样量})$ 。但因为处理的过程太长，每次都要做标准曲线，实验中发现每个点的重复性太差，也就是精密度不够。所以做了几次后就放弃了，但这说明免疫检测方法是可行的。

ELISA 法的精密度是可信的，检测灵敏度也非常高。点杂交 Western 半定量法放弃后，ELISA 法就成为最佳选择。

实际上我实验的大部分时间花在 HFBI 的分析检测技术的研究上了。在实验室水平，许多检测方法实际就是一种纯化技术，比如 HPLC 就是这种情况。

我们实验室刚刚购买了蛋白质纯化仪，今后对 HFBI 和其他蛋白的分离、纯化和检测工作就方便得多了。我相信经过不断努力，对总蛋白和 HFBI 的定量分析必将比现在的水平更高。

结 论

1.在摇瓶培养和两次小罐培养（15-L）的基础上进行了一次完整的 30-L 小罐发酵（批号：F3），实验很成功。补料发酵 71 小时后，得到发酵液 18.2 L，生物量为 17.39 g/L，每升发酵液的菌丝体中 HFBI 含量达到 508.4 mg。发酵水平经查证：到目前为止，国际公开报道的疏水蛋白（除了融合蛋白 EGIcore-HFB 外）发酵放罐规模都没有超过 18.2 L 的。

2.以发酵（F2）的泡沫为原料，研究了双水相萃取 HFBI 的工艺，取得成功后继续使用发酵清液和菌丝体为起始材料，研究了 SDS 法抽提菌丝、双水相法萃取菌丝抽提液和发酵清液中的 HFBI、葡聚糖凝胶 G-25 脱色以及阴离子层析纯化 HFBI 的工艺。根据这些研究成果最后形成了一套完整的纯化 HFBI 的小试工艺。瑞氏木霉菌丝体经 SDS 抽提和双水相萃取这两步，HFBI 总收率达到了 50%，纯度基本达到电泳上单带。

3.本论文对疏水蛋白生产的研究工作在国际上属于领先；在国内是填补了的真菌疏水蛋白研究型论文的空白。

4.为实验室建立了一套很完善的蛋白质研究技术，包括真菌菌种保藏和培养、多肽电泳、Western Blotting、双水相抽提、小罐补料发酵、分子筛层析和离子交换层析等技术，这为今后真菌和蛋白的研究奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Wessels JG, de Vries OM, Asgeirsdottir SA, Springer J. The thn mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerialhyphae, affects expression of the Sc3 hydrophobin gene. *J Gen Microbiol*. 1991 Oct;137 (Pt 10):2439-45.
- [2] Wessels J, De Vries O, Asgeirsdottir SA, Schuren F. Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell*. 1991 Aug;3(8):793-799.
- [3] Wosten H, De Vries O, Wessels J. Interfacial Self-Assembly of a Fungal Hydrophobin into a Hydrophobic Rodlet Layer. *Plant Cell*. 1993 Nov;5(11):1567-1574.
- [4] van der Vegt W, van der Mei HC, Wosten HA, Wessels JG, Busscher HJ. A comparison of the surface activity of the fungal hydrophobin SC3p with those of other proteins. *Biophys Chem*. 1996 Jan;57(2-3):253-60.
- [5] Wösten H, Ruardy TG, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JGH. 1995. Interfacial self-assembly of a *Schizophyllum commune* hydrophobin into an insoluble amphipathic membrane depends on surface hydrophobicity. *Coll. Surf. B:Biointerf*. 5:189-95.
- [6] Wosten HA, de Vocht ML. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Sep 18;1469(2):79-86. Review
- [7] Wosten HA, de Vries OM, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JG. Atomic composition of the hydrophobic and hydrophilic membrane sides of self-assembled SC3p hydrophobin. *J Bacteriol*. 1994 Nov;176(22):7085-6.
- [8] Wang X, Graveland-Bikker JF, de Kruif CG, Robillard GT. Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: from soluble state to self-assembly. *Protein Sci*. 2004 Mar;13(3):810-21.
- [9] Hakapää J, Parkkinen T, Hakulinen N, Linder M, Rouvinen J. Crystallization and preliminary X-ray characterization of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBII. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Jan;60(Pt 1):163-5.
- [10] Askolin S, Nakari-Setälä T, Tenkanen M. Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFB1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001 Oct;57(1-2):124-30.
- [11] Wessels JG. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol*. 1997;38:1-45. Review. No abstract available.
- [12] Expression and engineering of hydrophobin genes / door Karin Scholtmeijer. - [S.l. : s.n.], 2000. - 120 p. : ill. ; 24 cm Proefschr. Rijksuniversiteit Groningen. - Met lit.opg. - Met samenvatting in het Nederlands. Ook verschenen in elektronische vorm.
- [13] Stringer MA, Timberlake WE. Cerato-ulmin, a toxin involved in Dutch elm disease, is a fungal hydrophobin. *Plant Cell*. 1993 Feb;5(2):145-6. No abstract available.
- [14] De Groot PW, Schaap PJ, Sonnenberg AS, Visser J, Van Griensven LJ. The *Agaricus bisporus* hypA gene encodes a hydrophobin and specifically accumulates in peel tissue of mushroom caps during fruit body development. *J Mol Biol*. 1996 Apr 19;257(5):1008-18
- [15] Nakari-Setälä T, Aro N, Kalkkinen N, Alatalo E, Penttilä M. Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFB1. *Eur J Biochem*. 1996 Jan 15;235(1-2):248-55.
- [16] Nakari-Setälä T, Aro N, Ilmen M, Munoz G, Kalkkinen N, Penttilä M. Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei*--cloning and characterization of the hfb2 gene. *Eur J Biochem*. 1997 Sep 1;248(2):415-23.
- [17] van Wetter MA, Wosten HA, Sietsma JH, Wessels JG. Hydrophobin gene expression affects hyphal wall composition in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet Biol*. 2000 Nov;31(2):99-104.
- [18] Kershaw MJ, Talbot NJ. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet Biol*. 1998 Feb;23(1):18-33.
- [19] Wösten, van Wetter, Lugones, van der Mei, Busscher & Wessels (1999) How a fungus escapes the water to grow into the air. *Current Biology* 9, 85-88.
- [20] Wosten HA. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:625-46. Review.
- [21] Scholtmeijer K, Wessels JG, Wosten HA. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001 Jul;56(1-2):1-8. Review.
- [22] Renata Bilewicz, Jaroslaw Witomski, Angeline Van der Heyden, Denis Tagu, Béatrice Palin, and Ewa Rogalska. Modification of Electrodes with Self-Assembled Hydrophobin Layers. *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 9772-9777.
- [23] Palomo JM, Penas MM, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Pisabarro AG, Fernandez-Lafuente R, Ramirez L, Guisan JM. Solid-phase handling of hydrophobins: immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. *Biomacromolecules*. 2003 Mar-Apr;4(2):204-10.
- [24] ollen A, Penttilä M, Stalbrand H, Tjerneld F, Veide A. Extraction of endoglucanase I (Ce17B) fusion proteins from *Trichoderma reesei* culture filtrate in a poly(ethylene glycol)-phosphate aqueous two-phase system. *J Chromatogr A*. 2002 Jan 11;943(1):55-62.
- [25] Collen A, Persson J, Linder M, Nakari-Setälä T, Penttilä M, Tjerneld F, Sivars U. A novel two-step extraction method with detergent/polymer systems for primary recovery of the fusion protein endoglucanase I-hydrophobin I. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jan 15;1569(1-3):139-50.
- [26] Klaus Selber, Teppo Hyytiä, Anna Collén, Tiina Nakari-Setälä, Michael Bailey, Richard Fagerström, John Kan, Joop van der Laan, Folke Tjerneld, Merja Penttilä, Maria-Regina Kula. Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for the purpose of facilitated recovery in detergent based

- aqueous two-phase extraction systems. *Process Biochem*, 39(7): 889-896, 2004.
- [27] Martin, G.G., Cannon, G.C., and McCormick, C.L. 1999. Adsorption of a fungal hydrophobin onto surfaces as mediated by the associated polysaccharide schizophyllan. *Biopolymers* 49: 621-633
- [28] Martin GG, Cannon GC, McCormick CL. Sc3p hydrophobin organization in aqueous media and assembly onto surfaces as mediated by the associated polysaccharide schizophyllan. *Biomacromolecules*. 2000 Spring;1(1):49-60.
- [29] 章初龙, 徐同, 木霉属分类研究进展. 云南农业大学学报. 2000年9月. 15(3): 269-274.
- [30] 肖性龙, 杨合同, 夏贤志, 徐砚珂, 王玉萍. 木霉菌的形态学和可溶性蛋白质电泳鉴定与分类. 山东科学. 2002年3月, 第15卷, 第1期: 5-12.
- [31] 张继泉, 王瑞明, 孙玉英, 关凤梅. 里氏木霉生产纤维素酶的研究进展. 《饲料工业》2003年第24卷第1期: 19-13.
- [32] 管斌, 谢来苏, 丁友昉, 隆言泉. 里氏木霉纤维素酶高产菌株发酵特性的测试. 中国酿造 2000年第5期 总第109期: 14-16.
- [33] 吴静, 江天虹. 丝状真菌瑞氏木霉生产重组蛋白的分子生物学研究进展. 《生物工程进展》1999, Vol.19, No.2: 8-12.
- [34] Bailey MJ, Askolin S, Horhammer N, Tenkanen M, Linder M, Penttilä M, Nakari-Setälä T. Process technological effects of deletion and amplification of hydrophobins I and II in transformants of *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002 May;58(6):721-7. Epub 2002 Mar 07.
- [35] Linder, M., Selber, K., Nakari-Setälä, T., Qiao, M., Kula, M.-R., and Penttilä, M. (2001). The hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems. *Biomacromolecules* 2: 511-517.
- [36] Torkkeli, M., Serimaa, R., Ikkala, O., and Linder, M. (2002). Aggregation and self-assembly of hydrophobins from *Trichoderma reesei*: low-resolution structural models. *Biophys. J.* 83 2240-2247.
- [37] F. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿, D. D. 穆尔, J. G. 塞德曼, J. A. 史密斯, K. 斯特拉尔 著; 颜子颖, 王海林 译. 精编分子生物学实验指南. 科学出版社, 1999年第一版.
- [38] 余晓斌, 具润漠. 里氏木霉 RutC-30 液态发酵法生产纤维素酶. 无锡轻工大学学报, 1998年第17卷, 第2期: 6-10.
- [39] A. Paananen, E. Vuorimaa, M. Torkkeli, M. Penttilä, M. Kauranen, O. Ikkala, H. Lemmetyinen, R. Scrimaa and M.B. Linder, Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins, *Biochemistry* 42 (2003) 5253-5258.
- [40] 董军芳, 林金清. 双水相萃取技术在分离提纯生物物质中的应用. 江西化工, 综述与专论, 2002年第2期: 3-6.
- [41] 郭黎平, 傅冬梅, 张卓勇, 刘思东. 双水相萃取技术的研究进展. 东北师大学报自然科学版, 2000年9月, 第32卷第3期: 34-40.
- [42] 彭华松, 宗敏华, 梁世中. 双水相生物反应体系的研究进展. 化学反应工程与工艺, 2002年6月, 第18卷第2期: 174-179.
- [43] Paris, S., Debeaupuis, J.-P., Crameri, R., Carey, M., Charlès, F., Prévost, M.C., Schmitt, C., Philippe, B. & Latgé, J.-P. 2003 Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Env. Microbiol.* 69:1581-1588
- [44] J. Hakanpää, A. Paananen, S. Askolin, T. Nakari-Setälä, T. Parkkinen, M. Penttilä, M. B. Linder, and J. Rouvinen Atomic Resolution Structure of the HFBII Hydrophobin, a Self-assembling Amphiphile *J. Biol. Chem.*, January 2, 2004; 279(1): 534 - 539
- [45] 丁飞翔. 层析方法分离纯化瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 疏水蛋白 HFBI 的初探. 南开大学 2003 年本科论文.
- [46] 张丰德, 王秀玲主编, 现代生物学技术, 南开大学出版社, 2001年3月第二版.
- [47] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编, 生化实验方法和技术, 高等教育出版社, 1997年7月第二版.
- [48] 李减压等合编, 生物化学实验原理和方法, 北京大学出版社, 1994年9月第一版.

附录一、已经发现疏水蛋白的真菌的中文菌种名称

英文菌种	中文菌种名	发现的疏水蛋白
<i>Agaricus bisporus</i>	担子菌双孢蘑菇	ABH3、HYPA、HYPB、HYPC
<i>Agrocybe aegerita</i>	担子菌柳松菇	Pri2p
<i>Aspergillus fumigatus</i>	子囊菌烟色曲霉	hyp1、RODA、RodBp
<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Emericella nidulans</i>	子囊菌构巢曲霉	DEWA、RODA
<i>Aspergillus oryzae</i>	子囊菌米曲霉	hypA、hypB
<i>Cladosporium fulvum</i>	子囊菌黄色芽枝霉	HCF-1、hcf-2、hcf-3、hcf-4、 hcf-5、hcf-6
<i>Cladosporium herbarum</i> <i>Davidiella tassiana</i>	子囊菌分支孢子菌	hch-1
<i>Claviceps fusiformis</i>	子囊菌梭形麦角菌	CFTH1
<i>Claviceps purpurea</i>	子囊菌紫色麦角菌	cpph1
<i>Coprinopsis cinerea</i> (<i>Coprinus cinereus</i>)	担子菌灰盖鬼伞	COH1、COH2
<i>Cryphonectria parasitica</i>	子囊菌栗树枯萎病真菌	CP-CRP
<i>Dictyonema glabratum</i>	担子菌地衣光叶网格菌	DGh1、DGh2、DGh3
<i>Flammulina velutipes</i>	担子菌金针菇	fvh1、hyd1
<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Gibberella moniliformis</i>	子囊菌念珠形赤霉菌	HYD1、HYD2、HYD3、HYD4、 HYD5
<i>Hypocrea jecorina</i> <i>Trichoderma reesei</i>	子囊菌瑞氏木霉	HFB1、HFB2
<i>Hypocrea lixii</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	子囊菌哈茨木霉	QID3、srh1
<i>Lentinula edodes</i>	担子菌香菇	Hyd1、hyd2
<i>Magnaporthe grisea</i>	子囊菌稻瘟霉	MAG、MPG1
<i>Metarhizium antisopliae</i>	子囊菌黑僵菌	SSGA
<i>Neurospora crassa</i>	子囊菌粗糙脉孢霉	EAS
<i>Ophiostoma ulmi</i>	子囊菌榆枯萎病菌	CU
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	子囊菌巴西芽生菌	hyd1、HYD2
<i>Pholiota nameko</i>	担子菌滑菇	pdi251、pdi263、pdi315
<i>Pisolithus tinctorius</i>	担子菌彩色豆马勃	HYD-PT1、HYD-PT2、HYD-PT3
<i>Pleurotus ostreatus</i>	担子菌平菇	POH、POH1、POH2、poh3、 vmh1、fbh1、Vmh2、vmh3
<i>Schizophyllum commune</i>	担子菌群集裂褶菌	SC1、SC3、SC4、SC6
<i>Tricholoma terreum</i>	担子菌棕灰口蘑	Hyd1
<i>Xanthoria sp.</i>	子囊菌石黄衣地衣形成菌	XEH1、XPH1
<i>Ustilago maydis</i>	子囊菌玉米黑粉菌	Hum2

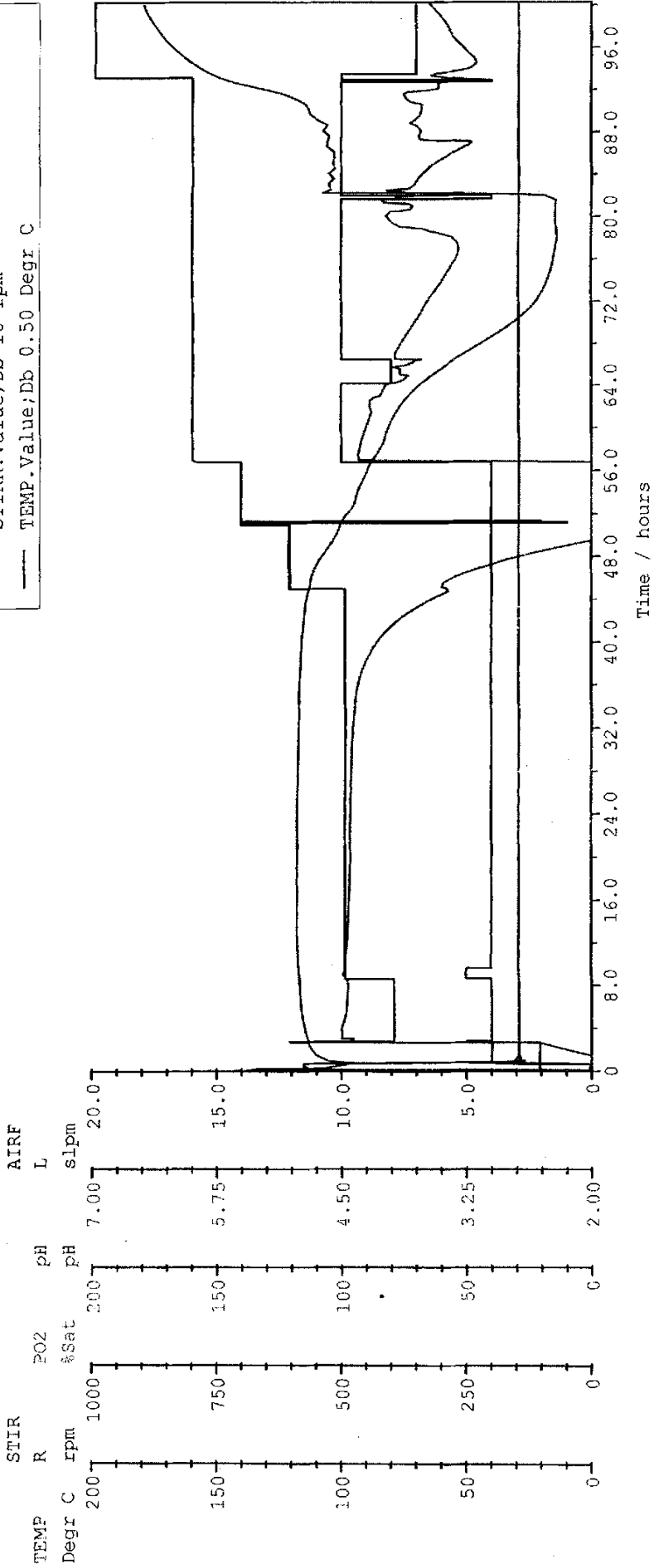
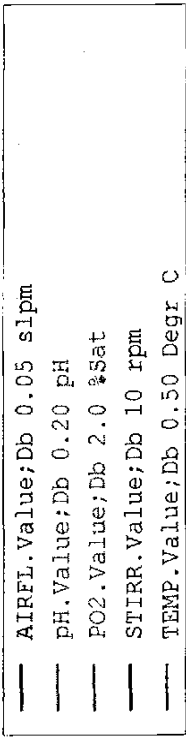
统计结论：在至少 24 个属，33 个菌种里发现至少 68 种疏水蛋白。

(不完全统计，数据来自 NCBI 蛋白质数据库，参见本论文表 1，附录三和四)

附录二 小罐 F1 批发酵过程

History Plot

Ding/Qiao-F1 Selection :02-12-27 11:42:20 - 02-12-31 16:03:47

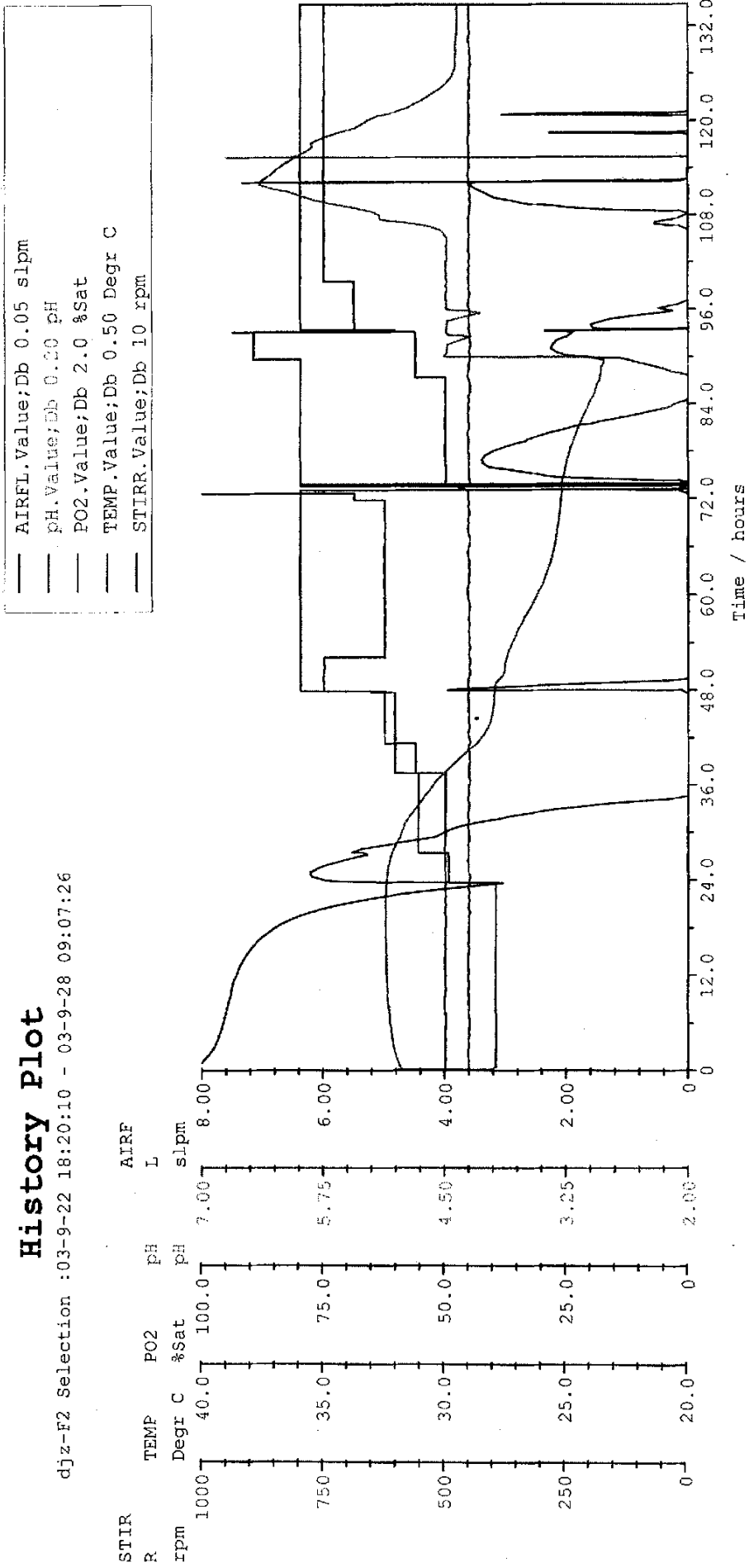


[49]

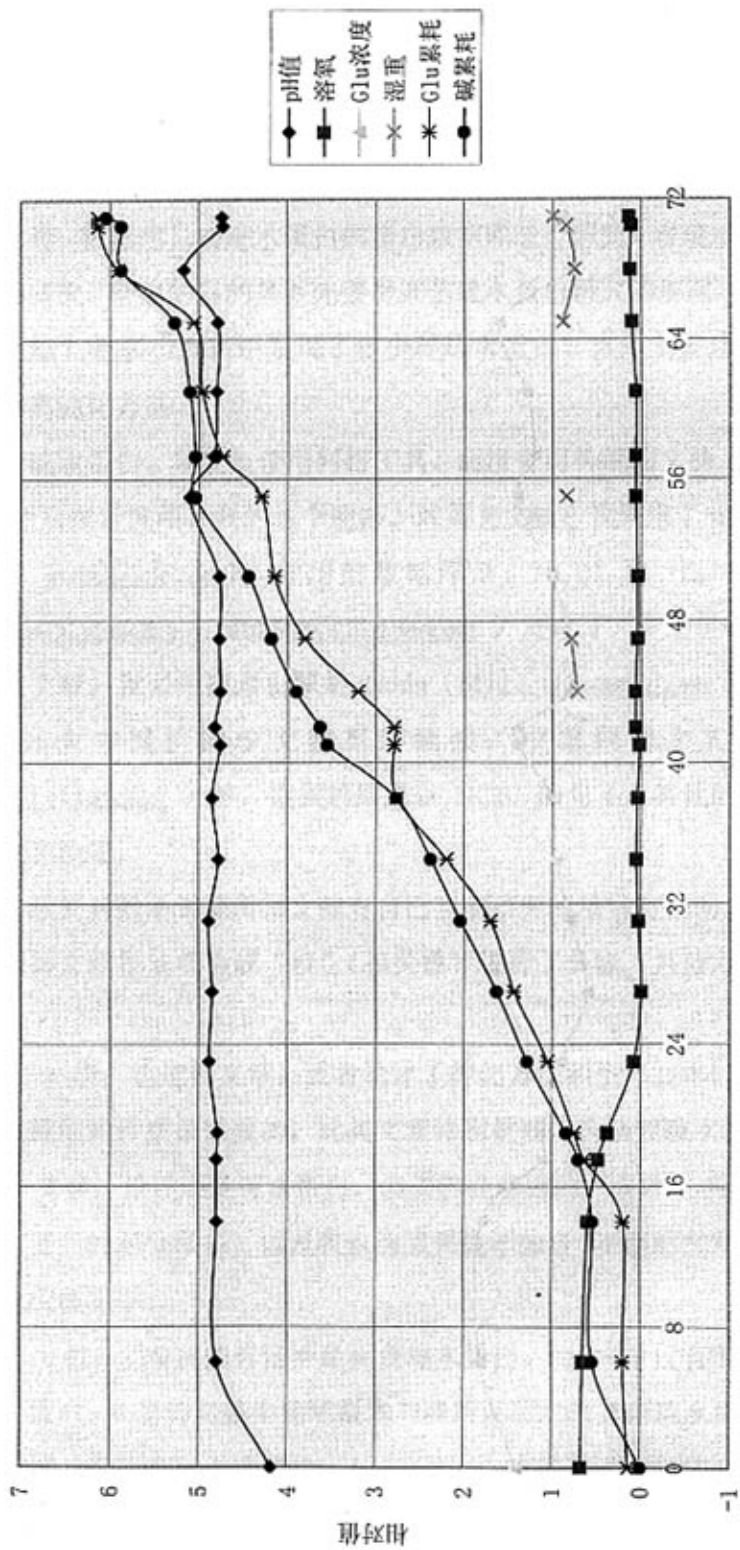
[50] 附录二 小罐 F2 批发酵过程

History Plot

djz-F2 Selection :03-9-22 18:20:10 - 03-9-28 09:07:26



F3发酵过程



发酵时间 (小时)

疏水蛋白文献统计

研究一个课题必定先查相关文献。查文献应该有两次。确立项目之前要看别人的进度,从而提出自己的研究计划;而完成项目之后需要查新,证明自己的成果是否首发创新性。

研究的对象是公开的有关真菌疏水蛋白的研究文献。论文包括期刊、书籍、毕业论文等;数据库只对疏水蛋白的蛋白数据库进行研究,对疏水蛋白的基因数据库暂不研究。研究的目的是首先要平评估疏水蛋白研究的现况,到底有多少篇公开的文献?在多少真菌中发现了多少种疏水蛋白?再是主要总结疏水蛋白的发现和分离纯化方法。

对于疏水蛋白,我主要使用网络工具,而没有用传统的文摘工具,如 CA 和 BA,希望后续者能填补我的这个遗憾。对英文文献,我采用了 google 搜索工具(网址:www.google.com),使用的数据库是:NCBI 和 HighWire(网址:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.highwire.org>)及南开大学提供的免费数据库。对于中文文献,我采用搜索引擎是 baidu(网址:www.baidu.com),使用的数据库是南开大学提供的中文数据库链接:中国期刊全文数据库(Web)(<http://202.113.20.226/>)等。搜索的结果以 NCBI 的为主,其他的数据库的资料进行补充和验证。

查文献的目的是希望所得文献对自己当前研究的项目有帮助。根据我的研究目的对所得文献按重要性或“权”(相关性)进行了分级,共分六级,实际为三个阶:

=5-4 级:综述性文章,或者论述了纯化方法和生产技术的,或者讲述的发现方法或结构性质很重要的。此类文章特别重要,为研究疏水蛋白者必读。

=3-2 级:论述还是疏水蛋白,但讲的是基因的;或者重点不是疏水蛋白,但含疏水蛋白的部分很多,以及我认为重要性不如 5-4 级的文章。此类文章,研究者也应该看看。

=1-0 级:主要讲的肯定不是真菌疏水蛋白。1 级文章仅有部分内容涉及到真菌疏水蛋白;0 级的文献中论述根本与我所要研究的真菌疏水蛋白无关,有的是“hydrophobic”单词误拼成“hydrophobin”;有的是讲的某些高疏水性的蛋白或物质,虽然也能拼成“hydrophobin”,并不是我所要研究的真菌疏水蛋白。标出这些文献的目的是希望给后继者一个“负对照”。

下面列出以 hydrophobin 索引的所有能搜到的中英文文献的列表(为减少篇幅, 0-1 级的文献不列), 以投稿日期为排序依据。每条的第一行标明文献投稿的大致日期(因为许多文献的投稿日期暂不能确定)文献的重要性分级和我们实验室对这篇文献的获得情况。以下条目同标准的参考文献的写法, 即基本格式依 NCBI 的格式。作者太多就只列前三位。

第一部分: hydrophobin (真菌) 为关键词的公开文献

- [1] 1991-03-15 级别=3 有全文复印件
Wessels JG, de Vries OM, Asgeirsdottir SA, Springer J. The thn mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the Sc3 hydrophobin gene. *J Gen Microbiol.* 1991 Oct;137 (Pt 10):2439-45.
- [2] 1991-04-22 级别=4 有全文 PDF
Wessels J, De Vries O, Asgeirsdottir SA, Schuren F. Hydrophobin Genes Involved in Formation of Aerial Hyphae and Fruit Bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell.* 1991 Aug;3(8):793-799.
- [3] 1991-10-01 级别=3 有全文 PDF
Chasan R. Building Hyphae in the Air. *Plant Cell.* 1991 Oct;3(10):1048-1050.
- [4] 1992-10-01 级别=2 只有文摘
St Leger RJ, Staples RC, Roberts DW. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene.* 1992 Oct 12;120(1):119-24.
- [5] 1992-10-01 级别=2 只有文摘
Bell-Pedersen D, Lewis ZA, Loros JJ, Dunlap JC. The *Neurospora* circadian clock regulates a transcription factor that controls rhythmic expression of the output *cas(ccg-2)* gene. *Mol Microbiol.* 2001 Aug;41(4):897-909.
- [6] 1992-10-12 级别=3 有全文复印件
Wessels, J. G. H. 1992. Gene expression during fruiting in *Schizophyllum commune*. *Mycol. Res.* 96:609-620
- [7] 1992-12-01 级别=2 只有文摘
Lauter FR, Russo VE, Yanofsky C. Developmental and light regulation of *cas*, the structural gene for the rodlet protein of *Neurospora*. *Genes Dev.* 1992 Dec;6(12A):2373-81.
- [8] 1993-02-01 级别=2 有全文 PDF
Stringer MA, Timberlake WE. Cerato-ulmin, a toxin involved in Dutch elm disease, is a fungal hydrophobin. *Plant Cell.* 1993 Feb;5(2):145-6. No abstract available.
- [9] 1993-06-15 级别=2 有全文 PDF
Talbot NJ, Ebbole DJ, Hamer JE. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell.* 1993 Nov;5(11):1575-90.
- [10] 1993-06-25 级别=5 有全文 PDF
Wosten H, De Vries O, Wessels J. Interfacial Self-Assembly of a Fungal Hydrophobin into a Hydrophobic Rodlet Layer. *Plant Cell.* 1993 Nov;5(11):1567-1574.
- [11] 1993-11-01 级别=2 只有文摘
Kaldenhoff R, Russo VE. Promoter analysis of the *bli-7/cas* gene. *Curr Genet.* 1993 Nov;24(5):394-9.
- [12] 1994-02-01 级别=3 只有文摘
Wosten HA, Asgeirsdottir SA, Krook JH, Drenth JH, Wessels JG. The fungal hydrophobin Sc3p self-assembles at the surface of aerial hyphae as a protein membrane constituting the hydrophobic rodlet layer. *Eur J Cell Biol.* 1994 Feb;63(1):122-9.
- [13] 1994-02-16 级别=2 有全文 PDF
Thau N, Monod M, Crestani B, Rolland C, Tronchin G, Latge JP, Paris S. rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 1994 Oct;62(10):4380-8. Erratum in: *Infect Immun* 1994 Dec;62(12):5706.
- [14] 1994-04-06 级别=3 有全文 PDF
Wösten HAB, Ruardy TG, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JGH. 1995. Interfacial self-assembly of a *Schizophyllum commune* hydrophobin into an insoluble amphipathic membrane depends on surface hydrophobicity. *Coll. Surf. B:Biointerf.* 5:189-95.
- [15] 1994-06-01 级别=2 只有文摘
Sticklen MB, Botlyard MG. Refinement of physiological roles for cerato-ulmin by analogy with other hydrophobins. *Trends Microbiol.* 1994 Jun;2(6):213-5.
- [16] 1994-06-14 级别=3 有全文 PDF
Wosten HA, de Vries OM, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JG. Atomic composition of the hydrophobic and hydrophilic membrane sides of self-assembled SC3p hydrophobin. *J Bacteriol.* 1994

- Nov;176(22):7085-6.
- [17] 1994-10-01 级别=2 有全文 PDF
Parta M, Chang Y, Rulong S, Pinto-DaSilva P, Kwon-Chung KJ. HYP1, a hydrophobin gene from *Aspergillus fumigatus*, complements the rodletless phenotype in *Aspergillus nidulans*. *Infect Immun*. 1994 Oct;62(10):4389-95.
- [18] 1994-10-15 级别=3 只有文摘
Wosten HA, Schuren FH, Wessels JG. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J*. 1994 Dec 15;13(24):5848-54.
- [19] 1994-10-25 级别=2 有全文 PDF
Munoz, G.A., Cotoras, M., San Martin, R. & Volpe, M.D. (1995). Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters* 125, 63-70.
- [20] 1995-01-18 级别=4 有全文 PDF
van der Vegt W, van der Mei HC, Wosten HA, Wessels JG, Busscher HJ. A comparison of the surface activity of the fungal hydrophobin SC3p with those of other proteins. *Biophys Chem*. 1996 Jan;57(2-3):253-60.
- [21] 1995-03-06 级别=4 有全文 PDF
Templeton MD, Greenwood DR, Beaver RE. Solubilization of *Neurospora crassa* rodlet proteins and identification of the predominant protein as the proteolytically processed eas (ccg-2) gene product. *Exp Mycol*. 1995 Jun;19(2):166-9.
- [22] 1995-04-01 级别=3 只有文摘
Stringer MA, Timberlake WE. *dewa* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol Microbiol*. 1995 Apr;16(1):33-44.
- [23] 1995-05-01 级别=3 只有文摘
Bidochka MJ, St Leger RJ, Joshi L, Roberts DW. An inner cell wall protein (cwp1) from conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*. 1995 May;141 (Pt 5):1075-80.
- [24] 1995-07-20 级别=3 有全文 PDF
Tagu, D., Nasse, B., and Martin F. 1996. Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene* 168: 93-97
- [25] 1995-07-27 级别=2 有全文 PDF
Kazmierczak P, Pfeiffer P, Zhang L, Van Alfen NK. Transcriptional repression of specific host genes by the mycovirus *Cryphonectria hypovirus 1*. *J Virol*. 1996 Feb;70(2):1137-42.
- [26] 1995-09-12 级别=2 有全文 PDF
Bell-Pedersen D, Dunlap JC, Loros JJ. Distinct cis-acting elements mediate clock, light, and developmental regulation of the *Neurospora crassa* eas (ccg-2) gene. *Mol Cell Biol*. 1996 Feb;16(2):513-21.
- [27] 1995-10-01 级别=2 无文摘无全文
Lora JM, Pintor-Toro JA, Benitez T, Romero LC. Qid3 protein links plant bimodular proteins with fungal hydrophobins. *Mol Microbiol*. 1995 Oct;18(2):380-2. No abstract available.
- [28] 1995-10-18 级别=3 有全文 PDF
Janssen MI, van Leeuwen MB, van Kooten TG, de Vries J, Dijkhuizen L, Wosten HA. Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the beta-sheet end state. *Biomaterials*. 2004 Jun;25(14):2731-9.
- [29] 1995-10-18 级别=4 有全文 PDF
De Groot PW, Schaap PJ, Sonnenberg AS, Visser J, Van Griensven LJ. The *Agaricus bisporus* hypA gene encodes a hydrophobin and specifically accumulates in peel tissue of mushroom caps during fruit body development. *J Mol Biol*. 1996 Apr 19;257(5):1008-18.
- [30] 1996-01-01 级别=4 有全文 PDF
Wessels J.G.H. 1996. Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends in Plant Sciences*, Vol.1, No.1, 9-15.
- [31] 1996-01-31 级别=4 有全文 PDF
Talbot NJ, Kershaw MJ, Wakley GE, De Vries O, Wessels J, Hamer JE. MPG1 Encodes a Fungal Hydrophobin Involved in Surface Interactions during Infection-Related Development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*. 1996 Jun;8(6):985-999.
- [32] 1996-04-02 级别=2 有全文 PDF
van Wetter, M.-A., F. H. J. Schuren, T. A. Schuurs, and J. G. H. Wessels. 1996. Targeted mutation of the SC3 hydrophobin gene of *Schizophyllum commune* affects formation of aerial hyphae. *FEMS Microbiol. Lett*. 140:265-269.
- [33] 1996-05-01 级别=4 有全文 PDF
Lugones LG, Bosscher JS, Scholtmeyer K, de Vries OM, Wessels JG. An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology*. 1996 May;142 (Pt 5):1321-9.
- [34] 1996-06-15 级别=5 有全文复印件
Nakari-Setälä T, Aro N, Kalkkinen N, Alatalo E, Penttilä M. Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Eur J Biochem*. 1996 Jan 15;235(1-2):248-55.
- [35] 1996-08-01 级别=3 只有文摘

- Beckerman JL, Ebbole DJ. MPG1, a gene encoding a fungal hydrophobin of *Magnaporthe grisea*, is involved in surface recognition. *Mol Plant Microbe Interact*. 1996 Aug;9(6):450-6.
- [36] 1996-09-01 级别=3 只有文摘
Bowden CG, Smailey E, Guries RP, Hubbes M, Temple B, Horgen PA. Lack of association between cerato-ulmin production and virulence in *Ophiostoma novo-ulmi*. *Mol Plant Microbe Interact*. 1996 Sep;9(7):556-64.
- [37] 1996-09-30 级别=4 有全文 PDF
Spanu P. HCF-1, a hydrophobin from the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Gene*. 1997 Jul 1;193(1):89-96.
- [38] 1996-11-12 级别=2 有全文 PDF
Arntz C, Tudzynski P. Identification of genes induced in alkaloid-producing cultures of *Claviceps* sp. *Curr Genet*. 1997 Apr;31(4):357-60.
- [39] 1997-01-01 级别=2 有全文 PDF
Talbot, N. J., McCafferty, H. R. K., Ma, M., Moore, K., Hamer, J. E. (1997) Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 50: 179-195.
- [40] 1997-01-01 级别=5 有全文复印件
Wessels JG. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol*. 1997;38:1-45. Review.
- [41] 1997-02-20 级别=3 有全文 PDF
Nakari-Setälä T, Aro N, Ilmen M, Muñoz G, Kalkkinen N, Penttilä M. Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei*--cloning and characterization of the *hfb2* gene. *Eur J Biochem*. 1997 Sep 1;248(2):415-23.
- [42] 1997-02-24 级别=2 有全文 PDF
Schuurs TA, Schaeffer EA, Wessels JG. Homology-dependent silencing of the *SC3* gene in *Schizophyllum commune*. *Genetics*. 1997 Oct;147(2):589-96.
- [43] 1997-02-28 级别=3 有全文 PDF
Muñoz G, Nakari-Setälä T, Agosin E, Penttilä M. Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet*. 1997 Sep;32(3):225-30.
- [44] 1997-05-28 级别=2 有全文 PDF
Temple B, Horgen PA, Bernier L, Hintz WE. Cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the causal agents of Dutch elm disease, is a parasitic fitness factor. *Fungal Genet Biol*. 1997 Aug;22(1):39-53.
- [45] 1997-05-28 级别=3 有全文 PDF
AP Gunning, PWJ de Groot, J. Visser, VJ Morris. Atomic force microscopy of a hydrophobin protein from the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Colloid Interface Sci*. 201 (1998) : 118-126.
- [46] 1997-06-04 级别=5 有全文 PDF
Asgeirsdóttir SA, Halsall JR, Casselton LA. Expression of two closely linked hydrophobin genes of *Coprinus cinereus* is monokaryon-specific and down-regulated by the *oid-1* mutation. *Fungal Genet Biol*. 1997 Aug;22(1):54-63.
- [47] 1997-06-30 级别=2 有全文 PDF
St Leger RJ, Joshi L, Roberts D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl Environ Microbiol*. 1998 Feb;64(2):709-13.
- [48] 1997-09-25 级别=4 有全文 PDF
de Vocht ML, Scholtmeijer K, van der Vegte EW, de Vries OM, Sonveaux N, Wosten HA, Ruyschaert JM, Hadziloannou G, Wessels JG, Robillard GT. Structural characterization of the hydrophobin SC3, as a monomer and after self-assembly at hydrophobic/hydrophilic interfaces. *Biophys J*. 1998 Apr;74(4):2059-68.
- [49] 1997-10-10 级别=3 有全文 PDF
Ebbole DJ. Hydrophobins and fungal infection of plants and animals. *Trends Microbiol*. 1997 Oct;5(10):405-8. Review.
- [50] 1997-10-23 级别=4 有全文 PDF
Lugones LG, Wosten HA, Wessels JG. A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology*. 1998 Aug;144 (Pt 8):2345-53.
- [51] 1997-11-04 级别=5 有全文 PDF
Kershaw MJ, Talbot NJ. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet Biol*. 1998 Feb;23(1):18-33. Review.
- [52] 1998-01-01 级别=2 有全文 PDF
Hamer JE, Talbot NJ. Infection-related development in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Curr Opin Microbiol*. 1998 Dec;1(6):693-7. Review.
- [53] 1998-03-01 级别=3 只有文摘
enberge KB, Stellamanns P, Plenz G, Robenek H. Nonradioactive in situ hybridization for detection of hydrophobin mRNA in the phytopathogenic fungus *Claviceps purpurea* during infection of rye. *Eur J Cell Biol*. 1998 Mar;75(3):265-72.
- [54] 1998-03-06 级别=3 有全文 PDF
Kershaw MJ, Wakley G, Talbot NJ. Complementation of the *mpg1* mutant phenotype in *Magnaporthe*

- grisea reveals functional relationships between fungal hydrophobins. *EMBO J.* 1998 Jul 15;17(14):3838-49.
- [55] 1998-03-18 级别=2 有全文 PDF
Hamada W, Spanu PD. Co-suppression of the hydrophobin gene HCF-1 is correlated with antisense RNA biosynthesis in *Cladosporium fulvum*. *Mol Gen Genet.* 1998 Oct;259(6):630-8.
- [56] 1998-03-20 级别=4 有全文 PDF
Penas MM, Asgeirsdottir SA, Lasa I, Culiñez-Macia FA, Pisabarro AG, Wessels JG, Ramirez L. Identification, characterization, and In situ detection of a fruit-body-specific hydrophobin of *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Oct;64(10):4028-34.
- [57] 1998-03-27 级别=3 有全文 PDF
Tillotson RD, Wosten HA, Richter M, Willey JM. A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. *Mol Microbiol.* 1998 Nov;30(3):595-602.
- [58] 1998-03-31 级别=4 有全文 PDF
Asgeirsdottir, SA, de Vries, OM, and Wessels, JGH (1998). Identification of three differentially expressed hydrophobins in *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Microbiology* 144:2961-9
- [59] 1998-04-01 级别=3 有全文 PDF
Spanu, P. (1998) Deletion of HCF-1, a hydrophobin gene of *Cladosporium fulvum*, does not affect pathogenicity in tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52: 323-334.
- [60] 1998-04-17 级别=2 有全文 PDF
Lau GW, Hamer JE. Acropetal: a genetic locus required for conidiophore architecture and pathogenicity in the rice blast fungus. *Fungal Genet Biol.* 1998 Jun-Jul;24(1-2):228-39.
- [61] 1998-06-01 级别=2 有全文 PDF
Identification and partial characterization of a developmentally regulated protein involved in sexual morphogenesis in the discomycete
- [62] 1998-06-02 级别=4 有全文 PDF
Martin, G.G, Gordon C. Cannon, Charles L. McCormick. "Stable Adsorption of a Fungal Hydrophobin onto Surfaces as Mediated by the Associated Polysaccharide Schizophyllan." *Biopolymers* 49 (1999): 621-633.
- [63] 1998-08-12 级别=4 有全文 PDF
Segers GC, Hamada W, Oliver RP, Spanu PD. Isolation and characterisation of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol Gen Genet.* 1999 Jun;261(4-5):644-52.
- [64] 1998-09-01 级别=3 有全文 PDF
Lugones LG, Scholtmeijer K, Klootwijk R, Wessels JG. Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*. *Mol Microbiol.* 1999 May;32(4):681-9.
- [65] 1998-09-28 级别=3 有全文 PDF
De Groot PW, Roeven RT, Van Griensven LJ, Visser J, Schaap PJ. Different temporal and spatial expression of two hydrophobin-encoding genes of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology.* 1999 May;145 (Pt 5):1105-13.
- [66] 1998-11-04 级别=2 有全文 PDF
Horton JS, Palmer GE, Smith WJ. Regulation of dikaryon-expressed genes by FRT1 in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet Biol.* 1999 Feb;26(1):33-47.
- [67] 1998-11-12 级别=3 有全文 PDF
Asgeirsdottir SA, Scholtmeijer K, Wessels JG. A sandwiched-culture technique for evaluation of heterologous protein production in a filamentous fungus. *Appl Environ Microbiol.* 1999 May;65(5):2250-2.
- [68] 1998-11-12 级别=5 有全文 PDF
Wosten HA, van Wetter MA, Lugones LG, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JG. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr Biol.* 1999 Jan 28;9(2):85-8.
- [69] 1998-11-17 级别=4 有全文 PDF
Santos C, Labarere J. Aa-Pri2, a single-copy gene from *Agrocybe aegerita*, specifically expressed during fruiting initiation, encodes a hydrophobin with a leucine-zipper domain. *Curr Genet.* 1999 Jun;35(5):564-70.
- [70] 1998-12-15 级别=4 有全文 PDF
De Vries OM, Moore S, Arntz C, Wessels JG, Tudzynski P. Identification and characterization of a tri-partite hydrophobin from *Claviceps fusiformis*. A novel type of class II hydrophobin. *Eur J Biochem.* 1999 Jun;262(2):377-85.
- [71] 1999-03-03 级别=4 有全文 PDF
Pazzagli L, Cappugi G, Manao G, Camici G, Santini A, Scala A. Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *J Biol Chem.* 1999 Aug 27;274(35):24959-64.
- [72] 1999-03-09 级别=3 有全文 PDF
Wosten HA, Richter M, Willey JM. Structural proteins involved in emergence of microbial aerial hyphae. *Fungal Genet Biol.* 1999 Jul-Aug;27(2-3):153-60. Review. PMID: 10441441.
- [73] 1999-03-12 级别=5 有全文 PDF
Wessels JG. Fungi in their own right. *Fungal Genet Biol.* 1999 Jul-Aug;27(2-3):134-45. Review.

- [74] 1999-04-08 级别=3 有全文 PDF
Martin F, Laurent P, de Carvalho D, Voiblet C, Balestrini R, Bonfante P, Tagu D. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal Genet Biol.* 1999 Jul-Aug;27(2-3):161-74. Review.
- [75] 1999-05-25 级别=3 无文摘无全文
Talbot NJ. Fungal biology. Coming up for air and sporulation. *Nature.* 1999 Mar 25;398(6725):295-6. No abstract available.
- [76] 1999-07-26 级别=3 有全文 PDF
McCabe PM, Van Alfen NK. Secretion of cryparin, a fungal hydrophobin. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Dec;65(12):5431-5.
- [77] 1999-08-08 级别=3 有全文 PDF
Girardin H, Paris S, Rault J, Bellon-Fontaine MN, Latge JP. The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus conidia*. *Lett Appl Microbiol.* 1999 Dec;29(6):364-9.
- [78] 1999-09-28 级别=2 有全文 PDF
Del Sorbo G, Scala F, Parrella G, Lorito M, Comparini C, Ruocco M, Scala A. Functional expression of the gene *cu*, encoding the phytotoxic hydrophobin *cerato-ulmin*, enables *Ophiostoma quercus*, a nonpathogen on elm, to cause symptoms of Dutch elm disease. *Mol Plant Microbe Interact.* 2000 Jan;13(1):43-53.
- [79] 1999-10-11 级别=5 有全文 PDF
an Wetter MA, Wosten HA, Wessels JG SC3 and SC4 hydrophobins have distinct roles in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Mol Microbiol.* 2000 Apr;36(1):201-10.
- [80] 1999-11-22 级别=3 有全文 PDF
Ng WL, Ng TP, Kwan HS. Cloning and characterization of two hydrophobin genes differentially expressed during fruit body development in *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Apr 15;185(2):139-45.
- [81] 1999-11-30 级别=4 有全文 PDF
Scherrer S, De Vries OM, Dudler R, Wessels JG, Honegger R. Interfacial self-assembly of fungal hydrophobins of the lichen-forming ascomycetes *Xanthoria parietina* and *X. ectaneoides*. *Fungal Genet Biol.* 2000 Jun;30(1):81-93.
- [82] 2000-01-14 级别=5 有全文 PDF
Martin GG, Cannon GC, McCormick CL. Sc3p hydrophobin organization in aqueous media and assembly onto surfaces as mediated by the associated polysaccharide schizophyllan. *Biomacromolecules.* 2000 Spring;1(1):49-60.
- [83] 2000-01-31 级别=4 有全文 PDF
de Vocht ML, Reviakine I, Wosten HA, Brisson A, Wessels JG, Robillard GT. Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *J Biol Chem.* 2000 Sep 15;275(37):28428-32.
- [84] 2000-02-01 级别=4 有全文 PDF
Wosten, HAB & Wiley, JM 2000 Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiol. (Reading)* 146:767-773.
- [85] 2000-03-07 级别=2 有全文 PDF
Pratt LR, Pohorille A. Hydrophobic effects and modeling of biophysical aqueous solution interfaces. *Chem Rev.* 2002 Aug;102(8):2671-92. Review..
- [86] 2000-03-17 级别=4 有全文 PDF
Wosten HA, de Vocht ML. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Sep 18;1469(2):79-86. Review
- [87] 2000-03-22 级别=3 有全文 PDF
D. Tagu, R. De Bellis, R. Balestrini, O. M. H. De Vries, G. Piccoli, V. Stocchi, P. Bonfante and F. Martin (2001). Immunolocalization of hydrophobin HYDPT-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. *New Phytologist* 149, 127-135.
- [88] 2000-06-01 级别=2 有全文 PDF
Kues U. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000 Jun;64(2):316-53. Review.
- [89] 2000-08-25 级别=3 有全文 PDF
ackay JP, Matthews JM, Winefield RD, Mackay LG, Haverkamp RG, Templeton MD. The hydrophobin EAS is largely unstructured in solution and functions by forming amyloid-like structures. *Structure (Camb).* 2001 Feb 7;9(2):83-91.
- [90] 2000-09-12 级别=3 有全文 PDF
van Wetter MA, Wosten HA, Sietsma JH, Wessels JG. Hydrophobin gene expression affects hyphal wall composition in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet Biol.* 2000 Nov;31(2):99-104.
- [91] 2000-09-27 级别=2 只有文摘
B-SHEET STACKING IN INTERFACIAL SELF-ASSEMBLY OF HYDROPHOBIN Sc3
- [92] 2000-10-21 级别=4 有全文 PDF
Linder, M., Selber, K., Nakari-Setälä, T., Qiao, M., Kula, M.-R., and Penttilä, M.(2001). The hydrophobins HFBI and HFBI from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems. *Biomacromolecules* 2: 511-517.
- [93] 2000-11-11 级别=5 有全文复印件

- Scholtmeijer K, Wessels JG, Wosten HA. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001 Jul;56(1-2):1-8. Review.
- [94] 2000-11-20 级别=3 有全文 PDF
Butko P, Buford JP, Goodwin JS, Stroud PA, McCormick CL, Cannon GC. Spectroscopic evidence for amyloid-like interfacial self-assembly of hydrophobin Sc3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 12;280(1):212-5.
- [95] 2000-12-15 级别=4 有全文 PDF
Ando A, Harada A, Miura K, Tamai Y. A gene encoding a hydrophobin, *fvh1*, is specifically expressed after the induction of fruiting in the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Curr Genet*. 2001 May;39(3):190-7.
- [96] 2000-12-22 级别=4 有全文 PDF
Expression and engineering of hydrophobin genes / door Karin Scholtmeijer. - [S.l. : s.n.], 2000. - 120 p. : ill. ; 24 cm Proefschr. Rijksuniversiteit Groningen. - Met lit.opg. - Met samenvatting in het Nederlands. Ook verschenen in elektronische vorm.
- [97] 2001-01-01 级别=3 有全文 PDF
Tucker SL, Talbot NJ. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*. 2001;39:385-417. Review.
- [98] 2001-01-01 级别=4 只有文摘
Nielsen PS, Clark AJ, Oliver RP, Huber M, Spanu PD. Hcf-6, a novel class II hydrophobin from *Cladosporium fulvum*. *Microbiol Res*. 2001;156(1):59-63.
- [99] 2001-01-01 级别=5 有全文 PDF
Wosten HA. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:625-46. Review.
- [100] 2001-02-01 级别=3 有全文 PDF
Duplessis S, Sorin C, Voiblet C, Palin B, Martin F, Tagu D. Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus*. *Curr Genet*. 2001 Jul;39(5-6):335-9.
- [101] 2001-02-13 级别=4 有全文 PDF
Whiteford JR, Spanu PD. The hydrophobin Hcf-1 of *Cladosporium fulvum* is required for efficient water-mediated dispersal of conidia. *Fungal Genet Biol*. 2001 Apr;32(3):159-68.
- [102] 2001-02-27 级别=5 有全文 PDF
Askolin S, Nakari-Setälä T, Tenkanen M. Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001 Oct;57(1-2):124-30.
- [103] 2001-04-01 级别=2 有全文 PDF
Kahmann R, Basse C. Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. *Curr Opin Microbiol*. 2001 Aug;4(4):374-80. Review.
- [104] 2001-04-02 级别=4 有全文 PDF
ollen A, Penttilä M, Stalbrand H, Tjerneld F, Veide A. Extraction of endoglucanase I (Cel17B) fusion proteins from *Trichoderma reesei* culture filtrate in a poly(ethylene glycol)-phosphate aqueous two-phase system. *J Chromatogr A*. 2002 Jan 11;943(1):55-62.
- [105] 2001-04-12 级别=4 有全文 PDF
Renata Bilewicz, Jaroslaw Witomski, Angeline Van der Heyden, Denis Tagu, Béatrice Palin, and Ewa Rogalska .Modification of Electrodes with Self-Assembled Hydrophobin Layers. *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 9772-9777.
- [106] 2001-05-07 级别=3 有全文 PDF
Kleemola, T ; Nakari-Setälä, T ; Linder, M ; Penttilä, M ; Kotaviita, E ; Oikku, J ; Haikara. Characterisation and detection of the gushing factors produced by fungi. <http://www.vtt.fi/bel/mib/harmful.pdf> ©
- [107] 2001-05-29 级别=2 有全文 PDF
Bell-Pedersen D, Lewis ZA, Loros JJ, Dunlap JC. The *Neurospora* circadian clock regulates a transcription factor that controls rhythmic expression of the output *cas(ccg-2)* gene. *Mol Microbiol*. 2001 Aug;41(4):897-909.
- [108] 2001-06-12 级别=3 有全文 PDF
Hippeli S, Elstner EF. Are hydrophobins and/or non-specific lipid transfer proteins responsible for gushing in beer? New hypotheses on the chemical nature of gushing inducing factors. *Z Naturforsch [C]*. 2002 Jan-Feb;57(1-2):1-8.
- [109] 2001-06-18 级别=4 有全文 PDF
Mankel A, Krause K, Kothe E. Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Mar;68(3):1408-13.
- [110] 2001-06-19 级别=5 Collen A, Persson J, Linder M, Nakari-Setälä T, Penttilä M, Tjerneld F, Sivars U. A novel two-step extraction method with detergent/polymer systems for primary recovery of the fusion protein endoglucanase I-hydrophobin I. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jan 15;1569(1-3):139-50.
- [111] 2000-07-31 级别=4 有全文 PDF
中文 RECENT RESEARCHES ON FUNGAL HYDROPHOBINS.
林福呈. 真菌疏水蛋白的研究进展. 微生物学报, 2001 年第 41 卷 04 期: 518-521.
- [112] 2001-08-01 级别=2 有全文 PDF
Staples RC. A hydrophobin aids water-mediated dispersal of *Cladosporium* conidia. *Trends Plant Sci*. 2001 Aug;6(8):343-4.

- [113] 2001-08-10 级别=3 有全文 PDF
Scherrer, S., Haisch, A. & Honegger, R. (2002) Characterization and expression of XP111, the hydrophobin gene of the lichen-forming ascomycete *Xanthoria parietina*. *New Phytologist* 154: 175-184.
- [114] 2001-09-04 级别=3 有全文 PDF
Scholtmeijer K, Janssen MI, Gerssen B, de Vocht ML, van Leeuwen BM, van Kooten TG, Wosten IIA, Wessels JG. Surface modifications created by using engineered hydrophobins. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Mar;68(3):1367-73.
- [115] 2001-09-06 级别=4 有全文 PDF
Trembley, ML, Ringli, C. & Honegger, R. (2002) Differential expression of hydrophobins DGH1, DGH2 and DGH3 and immunolocalization of DGH1 in strata of the lichenized basidiocarp of *Dictyonema glabratum*. *New Phytologist* 154: 185-195.
- [116] 2001-09-11 级别=2 有全文 PDF
Bucking H, Kuhn AJ, Schroder WH, Heyser W. The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots: an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium, and potassium into the root cortex? *J Exp Bot.* 2002 Jul;53(374):1659-69.
- [117] 2001-09-27 级别=3 有全文 PDF
Zangi R, de Vocht ML, Robillard GT, Mark AE. Molecular dynamics study of the folding of hydrophobin SC3 at a hydrophilic/hydrophobic interface. *Biophys J.* 2002 Jul;83(1):112-24.
- [118] 2001-10-10 级别=2 有全文 PDF
Nakari-Setälä T, Azeredo J, Henriques M, Oliveira R, Teixeira J, Linder M, Penttilä M. Expression of a fungal hydrophobin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: effect on cell surface properties and immobilization. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Jul;68(7):3385-91.
- [119] 2001-11-01 级别=2 只有文摘
Kim S, Ahn IP, Lee YH. Analysis of genes expressed during rice-Magnaporthe grisea interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001 Nov;14(11):1340-6.
- [120] 2001-11-13 级别=3 有全文 PDF
Wang X, de Vocht ML, de Jonge J, Poolman B, Robillard GT. Structural changes and molecular interactions of hydrophobin SC3 in solution and on a hydrophobic surface. *Protein Sci.* 2002 May;11(5):1172-81.
- [121] 2001-11-13 级别=4 有全文 PDF
de Vocht ML, Reviakine I, Ulrich WP, Bergsma-Schutter W, Wosten HA, Vogel H, Brisson A, Wessels JG, Robillard GT. Self-assembly of the hydrophobin SC3 proceeds via two structural intermediates. *Protein Sci.* 2002 May;11(5):1199-205.
- [122] 2001-11-28 级别=4 有全文 PDF
Trembley ML, Ringli C, Honegger R. Hydrophobins DGH1, DGH2, and DGH3 in the lichen-forming basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *Fungal Genet Biol.* 2002 Apr;35(3):247-59.
- [123] 2001-12-01 级别=2 只有文摘
A protein to stick with. *Analytical Chemistry*; Dec2001, Vol. 73 Issue 23, p654.
- [124] 2001-12-20 级别=5 有全文 PDF
Bailey MJ, Askolin S, Horhammer N, Tenkanen M, Linder M, Penttilä M, Nakari-Setälä T. Process technological effects of deletion and amplification of hydrophobins I and II in transformants of *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 May;58(6):721-7. Epub 2002 Mar 07.
- [125] 2002-01-01 级别=2 只有文摘
Tagu D, Marmeisse R, Baillet Y, Riviere S, Palin B, Bernardini F, Mereau A, Gay G, Balestrini R, Bonfante P, Martin F. Hydrophobins in ectomycorrhizas: heterologous transcription of the *Pisolithus HydT-1* gene in yeast and *Hebeloma cylindrosporum*. *Eur J Histochem.* 2002;46(1):23-9.
- [126] 2002-01-01 级别=2 有全文 PDF
Hydrophobins in the lichen symbiosis An orchid-fungus marriage - physical promiscuity, conflict and cheating. Volume 154, Issue 1, April 2002
- [127] 2002-01-07 级别=2 有全文 PDF
TOWARDS THE IDENTIFICATION OF CANDIDATE PATHOGENICITY GENES OF *FUSARIUM GRAMINEARUM*. Proceedings of the Second Canadian Workshop on Fusarium Head Blight. November 3-5, 2001. Ottawa Congress Centre, Ottawa, Ontario, Canada. Posters
- [128] 2002-01-13 级别=2 只有文摘即全文 PDF
Jeffrey Shawn Goodwin, Paul A. Stroud, Peter Butko, Charles L. McCormick, Gordon C. Cannon. KINETICS AND MECHANISM OF INTERFACIAL SELF-ASSEMBLY OF HYDROPHOBIN SC3(文摘)
- [129] 2002-02-01 级别=4 有全文 PDF
T Torkkeli M, Serimaa R, Ikkala O, Linder M. Aggregation and self-assembly of hydrophobins from *Trichoderma reesei*: low-resolution structural models. *Biophys J.* 2002 Oct;83(4):2240-7.
- [130] 2002-02-04 级别=3 有全文 PDF
Nishizawa H, Miyazaki Y, Kaneko S, Shishido K. Distribution of hydrophobin 1 gene transcript in developing fruiting bodies of *Lentinula edodes*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002 Sep;66(9):1951-4.
- [131] 2002-02-13 级别=4 有全文 PDF
Penas MM, Rust B, Larraya LM, Ramirez L, Pisabarro AG. Differentially regulated,

- vegetative-mycelium-specific hydrophobins of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Aug;68(8):3891-8.
- [132] 2002-02-14 级别=3 有全文 PDF
Janssen MJ, van Leeuwen MB, Scholtmeijer K, van Kooten TG, Dijkhuizen L, Wosten HA. Coating with genetic engineered hydrophobin promotes growth of fibroblasts on a hydrophobic solid. *Biomaterials*. 2002 Dec;23(24):4847-54.
- [133] 2002-05-27 级别=2 有全文 PDF
Weichel M, Schmid-Grendelmeier P, Rhyner C, Achatz G, Blaser K, Cramer R. Immunoglobulin E-binding and skin test reactivity to hydrophobin HCh-I from *Cladosporium herbarum*, the first allergenic cell wall component of fungi. *Clin Exp Allergy*. 2003 Jan;33(1):72-7.
- [134] 2002-06-14 级别=4 有全文 PDF
Linder M, Szilvay GR, Nakari-Setälä T, Soderlund H, Penttilä M. Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBIIfrom *Trichoderma reesei*. *Protein Sci*. 2002 Sep;11(9):2257-66.
- [135] 2002-06-17=5 级别=5 有全文 PDF
Palomo JM, Penas MM, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Pisabarro AG, Fernandez-Lafuente R, Ramirez L, Guisan JM. Solid-phase handling of hydrophobins: immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. *Biomacromolecules* 4: 204-210.
- [136] S2002-06-20 级别=2 有全文 PDF
Kamp AM, Bidochka MJ. Protein analysis in a pleomorphically deteriorated strain of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can J Microbiol*. 2002 Sep;48(9):787-92
- [137] 2002-07-11 级别=4 有全文 PDF
Klaus Selber, Teppo Hyytiä, Anna Collén, Tiina Nakari-Setälä, Michael Bailey, Richard Fagerström, John Kan, Joop van der Laan, Folke Tjerneld, Merja Penttilä, Maria-Regina Kula. Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for the purpose of facilitated recovery in detergent based aqueous two-phase extraction systems. *Process Biochem*, 39(7): 889-896, 2004.
- [138] 2002-07-17 级别=3 有全文 PDF
Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaiia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell*. 2003 Feb;2(1):34-48.
- [139] 2002-07-25 级别=3 有全文 PDF
Calonje M, Bernardo D, Novaes-Ledieu M, Garcia Mendoza C. Properties of a hydrophobin isolated from the mycoparasitic fungus *Verticillium fungicola*. *Can J Microbiol*. 2002 Nov;48(11):1030-4.
- [140] 2002-07-30 级别=2 有全文 PDF
Segers GC, Nuss DL. Constitutively activated Galpha negatively regulates virulence, reproduction and hydrophobin gene expression in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet Biol*. 2003 Mar;38(2):198-208.
- [141] 2002-09-17 级别=3 有全文 PDF
Paris S, Debeauvais JP, Cramer R, Carey M, Charles F, Prevost MC, Schmitt C, Philippe B, Latge JP. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Mar;69(3):1581-8.
- [142] 2002-12-01 级别=2 只有文摘
Soanes DM, Kershaw MJ, Cooley RN, Talbot NJ. Regulation of the MPG1 hydrophobin gene in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2002 Dec;15(12):1253-67.
- [143] 2002-12-01 级别=2 有全文 PDF
Kamada T. Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *Bioessays*. 2002 May;24(5):449-59. Review.
- [144] 2003-01-01 级别=4 有全文 PDF
Mey G, Correia T, Oeser B, Kershaw MJ, Garre V, Arntz C, Talbot NJ, Tudzynski P (2003). Structural and functional analysis of an oligomeric hydrophobin gene from *Claviceps purpurea*. *Molec Plant Pathol* 4: 31-41.
- [145] 2003-01-09 级别=5 有全文 PDF
Paananen A, Vuorimaa E, Torkkeli M, Penttilä M, Kauranen M, Ikkala O, Lemmetyinen H, Serimaa R, Linder MB. Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. *Biochemistry*. 2003 May 13;42(18):5253-8.
- [146] 2003-01-17 级别=2 有全文 PDF
Tadesse Y, Bernier L, Hintz WE, Horgen PA. Real time RT-PCR quantification and Northern analysis of cerato-ulmin (CU) gene transcription in different strains of the phytopathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. *Mol Genet Genomics*. 2003 Sep;269(6):789-96. Epub 2003 Jul 24.
- [147] 2003-02-11 级别=3 有全文 PDF
Stroud PA, Goodwin JS, Butko P, Cannon GC, McCormick CL. Experimental Evidence for Multiple Assembled States of Sc3 from *Schizophyllum commune*. *Biomacromolecules*. 2003 Jul-Aug;4(4):956-67
- [148] 2003-02-14 级别=2 有全文 PDF
Dynesen J, Nielsen J. Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation. *Biotechnol Prog*. 2003 May-Jun;19(3):1049-52.

- [149] 2003-05-01 级别=2 只有文摘
Sandra Scherrer and Rosmarie Honegger. Inter- and intraspecific variation of homologous hydrophobin (H1) gene sequences among *Xanthoria* spp. (lichen-forming ascomycetes). Online publication date: 1-May-2003. *New Phytologist* 158: 2, 375-389.
- [150] 2003-05-12 级别=2 有全文 PDF
Johnson H, Whiteford JR, Eckert SE, Spanu PD. Production and secretion of *Aspergillus nidulans* catalase B in filamentous fungi driven by the promoter and signal peptide of the *Cladosporium fulvum* hydrophobin gene hcf-1. *Curr Genet*. 2003 Nov;44(3):155-63. Epub 2003 Sep 04.
- [151] 2003-05-29 级别=3 全文 PDF
Tasaki Y, Ohata K, Hara T, Joh T. Three genes specifically expressed during phosphate deficiency in *Pholiota nameko* strain N2 encode hydrophobins. *Curr Genet*. 2004 Feb;45(1):19-27. Epub 2003 Nov 08.
- [152] 2003-06-01 级别=3 只有文摘
Serimaa, R., Torkkeli, M., Paananen, A., Linder, M., Kisko, K., Knaapila, M., Ikkala, O., Vuorimaa, E., Lemmetyinen, H. and Seeck, O. 2003. Self-assembled structures of hydrophobins HFBI and HFBII. *J. Appl. Crystallogr.* 36, 499-502.
- [153] 2003-07-07 级别=2 全文 PDF
Matsumura H, Reich S, Ito A, Saitoh H, Kamoun S, Winter P, Kahl G, Reuter M, Kruger DH, Terauchi R. Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 23;100(26):15718-23. Epub 2003 Dec 15.
- [154] 2003-09-02 级别=5 全文 PDF
Hakanpaa J, Paananen A, Askolin S, Nakari-Setälä T, Parkkinen T, Penttilä M, Linder MB, Rouvinen J. Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. *J Biol Chem*. 2004 Jan 2;279(1):534-9. Epub 2003 Oct 10
- [155] 2003-10-12 级别=4 全文 PDF
Albuquerque P, Kyaw CM, Saldanha RR, Brigido MM, Felipe MS, Silva-Pereira I. Pbhyl1 and Pbhyl2: two mycelium-specific hydrophobin genes from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 2004 May;41(5):510-20
- [156] 2003-11-18 级别=5 全文 PDF
Whiteford JR, Lacroix H, Talbot NJ, Spanu PD. Stage-specific cellular localisation of two hydrophobins during plant infection by the pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genet Biol*. 2004 Jun;41(6):624-34
- [157] 2004-01-01 级别=2 只有文摘
Hakanpaa J, Parkkinen T, Hakulinen N, Linder M, Rouvinen J. Crystallization and preliminary X-ray characterization of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBII. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Jan;60(Pt 1):163-5
- [158] 2004-01-30 级别=2 只有文摘
Penas, M. M., Aranguren, J., Ramirez, L., Pisabarro, A. G. (2004). Structure of gene coding for the fruit body-specific hydrophobin Fbh1 of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 96: 75-82
- [159] 2004-03-01 级别=4 只有文摘
Wang X, Graveland-Bikker JF, de Kruijff CG, Robillard GT. Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: from soluble state to self-assembly. *Protein Sci*. 2004 Mar;13(3):810-21.

===== 第二部分 以下来自 NCBI 数据库及其他文献引用 =====

- [160] 2002-09-01 级别=3 只有文摘
James R. Whiteford and Pietro D. Spanu. Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Molecular Plant Pathology* 3: 5, 391-400. Online publication date: 1-Sep-2002.
- [161]
Carpenter, C. E., R. J. Mueller, P. Kazmierczak, L. Zhang, D. K. Villalon, and N. K. Van Alfen. 1992. Effect of a virus on accumulation of a tissuespecific cells-surface protein of the fungus *Cryphonectria* (*Endothia*) *parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:55-61. [Cryparin 提取法]
- [162] 1997-00-00 级别=5 ???
Wosten, H. A. B., and Wessels, J. G. H. 1997. Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience* 38: 363-374.
- [163]
Wessels, J. G. H. 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 413-437.
- [164]
de Vries OMH, Fekkes MP, Wosten HAB, Wessels JGH. 1993. Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch. Microbiol.* 159:330
- [165]
Schuren, F.H. and Wessels, J.G. Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating-type genes. *Gene* 90 (2), 199-205 (1990).
- [166]
Dons, J.J.M., Mulder, G.H., Rouwendal, G.J.A., Springer, J., Bremer, W and Wessels, J.G.H. Sequence analysis of a split gene involved in fruiting from the fungus *Schizophyllum commune*. *EMBO J.* 3, 2101-2106 (1984).

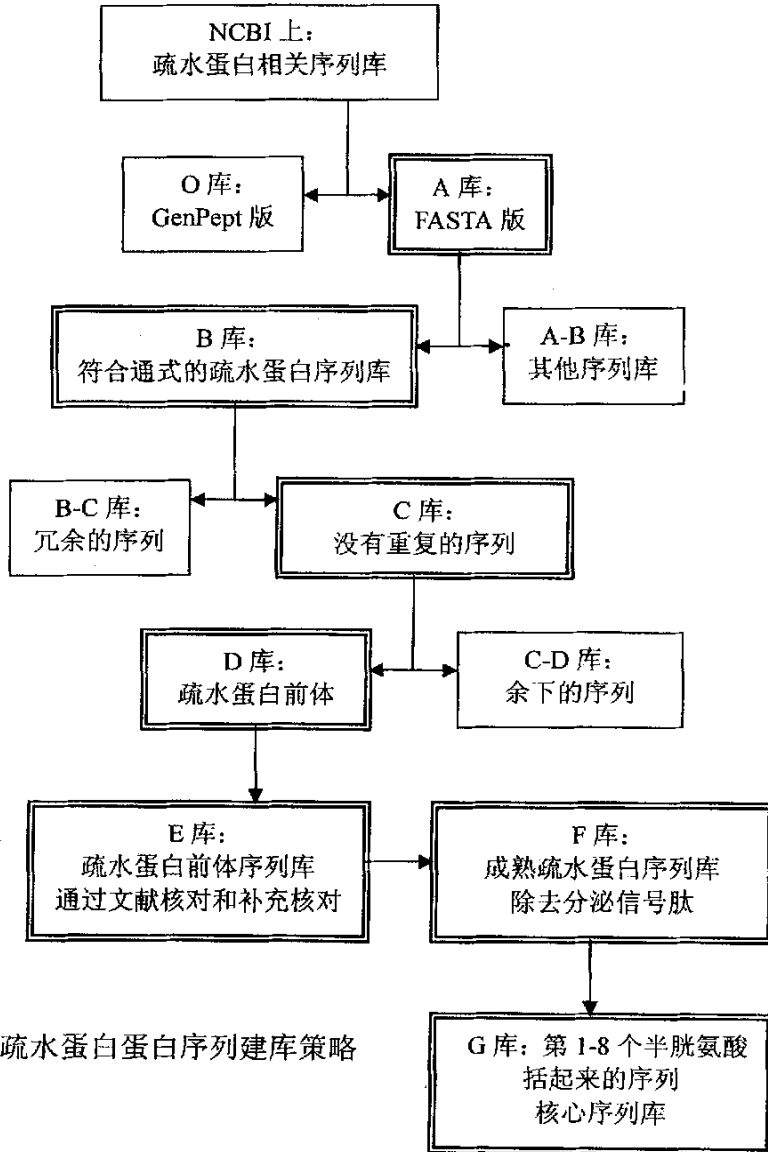
- [186] ~~Ando, T.~~ (2000). E-mail: ando@for.agr.hokudai.ac.jp// Sequence analysis of a cDNA for the gene *fvh1* encoding fungal.
- [187] Yamada, M., Sakuraba, S., Shibata, K., Okazaki, M. and Shimosaka, M. Cloning and characterization of a gene coding for a hydrophobin, which is specifically expressed during fruit body development in the basidiomycete *Flammulina velutipes*. ~~Unpublished~~. E-mail: mashimo@giptc.shinshu-u.ac.jp.
- [188] Fuchs, U.U. and Sweigard, J.A. The hydrophobins of *Fusarium verticillioides*. ~~Unpublished~~. Newark, DE 19714, USA
- [189] Ng, W.L., Ng, T.P. and Kwan, H.S. Cloning of two differentially expressed genes encoding hydrophobins during fruit body development in *Lentinula edodes*. ~~Unpublished~~
- [190] Kim, S.-O., Park, S.-G. and Lee, Y.-H. Isolation and characterization of magnaporin gene, a class II hydrophobin gene, of *Magnaporthe grisea*. ~~Unpublished~~. Submitted (09-FEB-1999) Seoul National University, 103, Seo-dun dong, KwonsunKu, Suwon 441-744, Korea
- [191] Birren, B., Nusbaum, C., Abebe, A., et al. The genome sequence of *Magnaporthe grisea*. ~~Unpublished~~. Submitted (02-OCT-2003) Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, 320 Charles Street, Cambridge, MA 02142, USA.
- [192] Albuquerque, P., Kyaw, C., Saldanha, R.R., Brigido, M.M., Soares, C.M.A., Felipe, M.S.S. and Silva-Pereira, I. Isolation and characterization of a phase-specific gene encoding a hydrophobin from the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. ~~Unpublished~~.
- [193] Albuquerque, P., Kyaw, C.M., Saldanha, R.R., Brigido, M.M., Felipe, M.S. and Silva-Pereira, I. Identification and characterization of phase-specific cDNAs encoding two hydrophobins in the dimorphic and human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. ~~Unpublished~~
- [194] Penas, M.M., Aranguren, J., Ramirez, L. and Pisabarro, A.G. High level of nucleotide allele polymorphism in *fbh1*, a gene coding for a fruit body-specific hydrophobin in the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. ~~Unpublished~~. Submitted (30-MAY-2001) Penas M.M., Produccion Agraria, Universidad Publica de Navarra, Pamplona, Navarra/31006, SPAIN.
- [195] Penas, M.M., Aranguren, J., Larraya, L.M., Culiñez-Macia, F.A., Ramirez, L. and Pisabarro, A.G. Genomic analysis of *fbh1*, a gene coding for a fruit body-specific hydrophobin in the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. ~~Unpublished~~. Submitted (11-OCT-2001) Pisabarro A.G., Produccion Agraria, Universidad Publica de Navarra, Pamplona, Navarra. 31006, SPAIN.
- [196] Tagu, D., De Bellis, R., Voiblet, C., de Vries, O., Piccoli, G., Stocchi, V., Bonfante, P. and Martin, F. Further characterization of hydrophobins from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. ~~Unpublished~~. Submitted (06-OCT-1998)

疏水蛋白的蛋白序列研究

以“hydrophobin”为关键词从 NCBI 的 Protein 数据库里获得的序列建成 A 和 O 库,以疏水蛋白的氨基酸组成的通式“ $X_{n1}-C-X_{n2}-CC-X_{n3}-C-X_{n4}-CC-X_{n5}-C-X_{n6}$ ”搜索序列,基本符合通式的序列建成 B 库,再从 B 库中除去重复的序列建成不含重复序列的 C 库,在 C 库留下前体疏水蛋白序列成为 D 库。根据文献对 D 库进行验证,从 B-C 库和 A-B 库核对无遗漏后,再根据序列比较,合并那些我认为是等位基因的序列,并补充序列形成疏水蛋白前体库 E 库。根据文献和 O 库,有些前体序列可直接得到成熟蛋白序列,而没有说明信号肽的用 Antheprot 2000 Vers6 软件预测序列的信号肽,并根据对疏水蛋白信号肽段的总结和同源已知序列信号肽的信息进行修正,获得成熟疏水蛋白的氨基酸序列,汇成 F 库。疏水蛋白 N 端和 C 段的序列变异较大,我除去第一个半胱氨酸残基前端的序列和最后一个(第八个)半胱氨酸残基后面的序列形成含八个半胱氨酸的核心序列,汇成 G 库。每个库的序列都用 Antheprot(下载地址:<http://antheprot-pbil.ibcp.fr>) 和 ClustW (直接上网页:<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) 软件进行同源性分析。相同的序列都合并,相似性大于 50% 并来源于同一个菌种或有的情况是同一个属的物种的序列,我个人认为是等位基因或同一基因的复制品,一般都合并成一个序列。

从 NCBI 蛋白质数据库调出疏水蛋白相关的序列,共获得 226 条。输出的格式有多种,最有用的是 FASTA 和 MedLine,我分别用这两版的数据建成数据库: A 库和 O 库。很多序列虽然与一般疏水蛋白有同源关系,但不含八个半胱氨酸;另一些序列,根本就与疏水蛋白关系不大,只是含“hydrophobin”这个关键词罢了。所以,我首先要排除这些序列,建成只含疏水蛋白的候选数据库 B。注意 QID3 蛋白序列并不完全符合疏水蛋白通式,但文献证明它是疏水蛋白,也放入 B 库,获得 165 个序列。含 7 个及以下半胱氨酸残基的序列归入 A-B 库,留互补库的目的是为了防止漏查,为了方便校对。B 库中有许多序列完全相同的重复序列,原因不外乎三类情况:报告者的重复输入;不同菌种有相同的序列;序列在同一个物种基因组内的重复。所以要建 C 库:没有相同序列的序列库,获得 91 个序列;同期建 B-C 库。C 库里的序列有的是前体,有的是成熟蛋白,所以要建一个只含前体疏水蛋白的 D 库,共获得 70 个序列。从 D 库到 E 库,主要是

通过文献校对前体序列,符合等位基因的要合并序列,留下最具代表性的序列,划分时还要考虑文献上出现的情况。这是最难判定的步骤。没有信号肽的,还要加上信号肽。经过综合考虑,E库为68个序列。列表和进化树见本论文正文部分的表1和图4。



上图为疏水蛋白序列建库策略

在两个低等真菌(鞭毛菌亚门 *Mastigomycotina* 和接合菌亚门 *Zygomycotina*) 还未发现直接的序列证据。从两个进化关系无根图的形状来看,地衣形成菌石黄衣菌属的两个疏水蛋白 XPH1 和 XEH1 序列同源性极高,可以看成是一个基因的突变序列。还有就是核心进化树与前体进化树有许多差别,这主要是 N 端长序列的差异引起的。而很明显,从进化的分支看,现有的疏水蛋白序列仅分成 I 和 II 型是不够的,我看还应该分成 3 到 4 个类型。

以下以 FASTA 版形式列出 68 个疏水蛋白的前体序列:

```
>AB-ABH3
MFA R I S T I I T T L F F A M L A A A T A V P R T D P P P A T G S Q C T A V G G D V N C C N S V Q D A S N P I V G L I A G L L G I V L G P I Q G L V G L T C
N P I S V I G G N S C S S Q T V C C T G N N F S G L L V I G C S P I N I D L
>AB-HYPA
M I S R V L V A A L V A L P A L V T A T P A P G K P K A S S Q C D V G E I H C C D T Q Q T P D H T S A A A S G L L G V P I N L G A F L G F D C T P I S V L G V
G G N N C A A Q P V C C T G N Q F T A L I N A L D C S P V N V N L
>AB-HYPB
M V S T F I T V A K T L L V A L L F V N I N I V V G T A T T G K H C S T G P I E C C K Q V M D S K S P Q A T E L L T K N G L G L G V L A G V K G L V G A N C S
P I T A I G I G S G S Q C S G Q T V C C Q N N N F N G V V A I G C T P I N A N V
>AB-HYPC
M F S R V L V A A L V A L P V L V S A S P T P G G Y P D S T T V V S Q C N V G E L H C C N T Q Q T P D H T N A A G L L G A A A N V G A L L G F D C T P I S V
I G I G G N C A A Q P V C C E A N E F T G L I N A L S C S P I N V N L
>AA-Pri2p
M V A I K S L A I L A L P V M A M A S P L V P R T D S P S Q C N N G S L Q C C N S S M T Q D R G N L Q T A Q G V L G G L L G G L L D L V D L N A L
I G V Q C S P I S I V G N A N T C T Q T V C C S N N N F N G L I A L G C T P I N I N L
>AF-hyp1
V G N K G N A N V R F P P D D I T V K Q A T E K C G D Q A Q L S C C N K A T Y A G D V T D I D E G I L A G T L K N L I G G G S G S E G L G L F N Q C S K L D
L Q S P I I I C Y C R P G S G Q P E V Q A E H C L L P E L S F R C R A V P S
>AF-RODA
M K F S L S A A V L A F A V S V A A L P Q H D V N A A G N G V G N K G N A N V R F P P D D I T V K Q A T E K C G D Q A Q L S C C N K A T Y A G D V T D I D E
G I L A G T L K N L I G G G S G T E G L G L F N Q C S N V D L Q I P V I G I P I Q A L V N Q K C K Q N I A C C Q N S P S D A S G S L I G I G L P C I A L G S I
L
>AF-RodBp
M K F L A V V S L L A A T A L A L P N A G V V H P T F A S A D K Y T L Q Q A Q N K C G E H T T L S C C N H V S K V G D T T A F N Y G L L N G L L G N A I S G P
E G V G I L S G C Q K I S V T A L I G V D D L I N K Q C Q N V A C C Q D N K S V A T G G L I N I A T P A C V A L D S I I
>AN-DEWA
M R F T V S L L A F T A A A T A T A L P A S A A K N A K L A T S A A F A K Q A E G T T C N V G S I A C C N S P A E T N N D S L L S G L L G A G L L N G L S G N
T G S A C A K A S L I D Q L G L L A L V D H T E E G P V C K N I V A C C P E G T T N C V A V D N A G A G T K A E
>AN-RODA
M K F S I A A A V V A F A S V A A L P P A H D S Q F A G N G V G N K G N S N V K F P V P E N V T V K Q A S D K C G D Q A Q L S C C N K A T Y A G D T T T V D
E G L L S G A L S G L I G A G S G A E G L G L F D Q C S K L D V A V L I G I Q D L V N Q K C K Q N I A C C Q N S P S A D G N L I G V G L P C V A L G S I L
>AO-hypA
M Q F S V A A V L A L A T A V A A L P P A S G T G A G Q Q V G H S K N D F P L P K E L T T K A A D K C G D Q A Q L T C C N K T V K T G D F T Q V E E G L L A
G L L S N L L G A G Q G S Q G L G L L D E C T N I P V I P I T S I A S P Q E K C K Q P I S C C Q N T K S S A D G D L V G I G L P C I A L G S L L
>AO-hypB
M K F F A V A A L F A T A A M A A P G S A P V P G A A A A A G N G N A P V I N Q T Q Q K A F T D A C S A K G N H P V C C D Q I D T S K T T T V N E G L L G L L
L G E G L G G V L N N L V G G E P G A C S G L V S A L N K Q C Q T S I G C C Q Q N A K G D N Y Q S G L L N L N L Q A P C I L S N G L
>CF-HCF-1
M Q F T S F A I L A I S A V A S A R V T R R D S S A T G A D K G G T C A V G S Q I S C C T T N S S G S D I L G N V L G G S C L L D N V S L I S S L N S N C P
```

AGNTFCCPSNQDGTLNINVSICIPVSA

>CF-hcf-2

MQFTTIVMTLAAAVAVTAYPGSSSAFGVGGQDEHKHHSSDDHSATGASKGATCAVGSQVSCCTTDSSGSDVLDGNVLGGSC
LVDNLSLISILNSQCPGANTFCCPSNQDGTLNIAACIPVAL

>CF-hcf-3

MQFIASILAVAAYAVAIIPDDNSATGASKGSTCATGAQVACCTTNSNSDLLGNVYVGGSCLLDNLSSLNINCPAG
NTFCCPSNSDGTLNINAQCIPISA

>CF-hcf-4

MQFTTTFALLAVAAATASAAQAPQAYYQGAQSAQVHTFETRKAVPTRVAEVYGEHEQERVTKTKVYHALVTEEAQHHGEE
HKAAPYKAYKVYSVASSYSAQPRATHAAEHYEGGKADHYAEPKAVHADPHVDPVKARPTMAATEMKQPEKEAPSTV
CAKGEISCCCTDSSNSGALGNVLGGSCLLQNLSSLNINCAAAANTFCCPTTQEGTLNINLSICIPISL

>CF-hcf-5

MQFLVLALASLAAAAPS IKLRAPSDVCPALDTPLCQADVLGVLDLTCEAPSDTSSVSNFEAACATTGLTARCCTPLL
GEALLCTTP

>CF-hcf-6

MNFMLLSAALASMAVAGPIAGTYPITYPSSNTPATYPGNAPTWSSPIHGGNNGGNGGNDNNGGNGGNGSGGGNTG
GNAGNGGGNNGNNGGNGGNTGGEGGNGGNGGAPVELCPANRVPQCCQLSVLGVADVTCASPSGLTSVSAFEA
DCANDGTTAQCCCLIPVLGLGLFCSNP

>CH-heh-1

MAFIKSLIASVAAVAFAPQGGASDNKKVEIDGQDSAPVCGNGQKVAACNSGEDLIGLNCLSTPILAIPIQKACGSN
IAACCQTGDSEGNLLNLEANCLAIPL

>CF-CFTH1

MKFLAAASLLVASTLAVPTSSGGSCRPRPPPGGGNGGNGGNGGNGYQPCPAGLYSNPQCCATDVLGVADLDCKNPS
SAPMSGDNFKSICNAVGGQAKCCVLPVAGQAVLCQDSINGGGNGGNGGNGGNGGNGGNTDYPGGNGGNGGNN
GGNNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGYQACPAGLLYSNPQCCSTGVLGVADLDCKNPSAPTS
GDDFQKICANGGQQAQCCSIPVAGQAVLCQPAIGGNGPGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNDYPPGGNGGNGGNSGG
GNGGNGGNGGSKCPSGLYSVPQCCATDVLGVADLDGCPNSRQPTDSSDFASVCAAKQRARCCVPLLGGAVLCTGA

>CP-cpph1

MKFLAVSSILFASSLAVPTSHGGSCRPRRPPVNYPGGDYPGGQGGDKPPGGGYPGTTPYGGDYPGGDHPGGYGGGGY
GGGDYPGGDYPGGDYPGGDYPGGDYPGGDYPGGNHGGNGHGGGNGGNGGNGGNGGNGGNTDYPGGNGGNGGNGG
GNVYKPCPSGLYSNPQCCSTNVLGVAALNCKTPSFAPTSFQSKSACSAGGQPCCVVAAGQGVLCQAPIGGGNGGN
GGNNGG
VLDVAVSLDCVNPSSKPRSGDDFKSTCGAEGKHASCCAI PVAGQGVLCQAPAMGGGGNGGNGGNGGNGGNGGNGG
NGG
IPVAGQAVLCQAPAMGGGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGGNGG
GNGG
LDCQSPSRTSFSSDFKSTCRSEGRKARCCVLPVAGQDVLCTNPL

>CC-CoH1

MQFKFLSTVALATLAVAAPAPTDPPTPIPPSQCNTGPIQCCNTVTQASNPVAGLLLGLLGLVLDLNLVGLTCSPIII
GLPGNSCNAQPVCCQNNNFNGLIAIGCTPININL

>CC-coH2

MQFKFLTVALATLAVAVPTDPPPTNQCNAPNNECCNSVQAPTNSGLIGTLLGLLNISVGDITGLVGLTCNPISLIGG
GNSCNAQIVCCQNNYFGLISIGCTPIIIDV

>CP-CRP

MQFSIIAISFLASLAMASPAKRGGGGGSGSGSGSGSGSGSGSTTYTACSSTLYSEAQCCATDVLGVADLDCEVPE
TPTSASSFESICATSGRDAKCTIPLLQALLCQDPVGL

>DG-h1

MFARTSVFIILALTASFVAAVPTTPKPPPKPLPKPSPPSAPVIQCNTGPVQCCDSVQNSNDKEIANLLGLGLIVTG
GDEVPIGVTCSPISVAGGTGSNSCTAQPVCCQNNTFNGVVAIGCNPININK

>DG-h2

MLIRVTAFTILALATSSFVGFALPSPAATIPASQCNTGSLQCCQTLSSNSNSGVTTLSGLLGIVIPANVPVGLTCNPISL
 LVGIGGNSCSAQPVCCQGNFNGLIVLGCTPVNLNL
 >DG-h3

MLIRITAFVTLALTTGSFVAALPSPALATTPIPASQCNTGVPVCCQSISSSSNSGTASLLGPLGLVLSGLNIPIGVTCT
 PISLLGIGGNSCSANPVCCQNNFNGVAVGCTPVNLNL
 >FV-fvh1

MVSFRAFTVAASLFATLAAATPLDTPALPRAADQCNSVNOCCNSVQQASSGPAALILGLLGVVLQDVNVLVGLDCSPIT
 VIGGGNGGCNASPVCCENNSFGSLISIGCVPII
 >Fv-hyd1

MRLSISKLSVVMALPILASASVLPRTGSTGASCGSTTSGQAQCCNSTQSNTPPLPFPLSVITGLLIDLGAITGLVGL
 TCNPITVGLGGTNCNSQAVCCTGNTFNGLINLGCSPNLVAL
 >GM-HYD1

MQYMTIVAFLAATVAAGPQIRAYPSIDQITVAQANNACGNMQVTCCKVTNTPAGNAVGNAGILNLSLFDQCSKLD
 VNVLAIANGLLNKECQANAACQNSGGSATGGLVNVLPCTIALSSLI
 >GM-HYD2

MYAYTVIAFLAASVAAAGNGPSISSLTVQAANSCANGQSVYCCNKTSNKPAGNSVGDGAGIANGLSLFSQCSKVDVNV
 IAIANNLLNKECQANAACQDSPGTAAAGLVNAALPCVAISNLV
 >GM-HYD3

MQFAKIASVLAAMAAVAAPAPGNYEVEPRTEGGSNNGNQPACSAQSSNVCCNGLGCLVQILGAGCSTKSYCCQSDAPL
 AVGALVNVNALNCVQVL
 >GM-HYD4

MQFYAIASLFLAGTAFAPATSPNGYDACPDDGLIGTPQCCSLDLVGLVSGECSSPSKTPNSAKEFQETCAASGQKARC
 CFLSEVFTLGAFCCQKPVGVTA
 >GM-HYD5

MQFSLALVTLATAVSALPTEEKRAYIPCSGLYGTSQCCATDVLGVADLDGPNPSTPANATDFSAVCSAIGQRARCC
 VLPILDQGILCNTPTGVQD
 >HJ-HFB1

MKFFAIAALFAAAVAQPLEDRSNGNGVCPGLFSNPQCCATQVLGLIGLDCKVPSQNVYDGTDFRNVCAKTGAQPLC
 CVAPVAGQALLCQTAVGA
 >HJ-HFB2

MQFFAVALFATSALAAVCPTGLFSNPLCCATNVLDLIGVDCKTPTIAVDTGAIFAQHCASKGSKPLCCVAPVADQALLC
 QKAIGTF
 >HL-srh1

MQFSIVALFATGALASVSVCPNGLYSNPQCCGANVLGVAALDCHTPRVDVLTGPIFQAVCAAEGGKQPLCCVVPVAGQD
 LLCEEAGQTF
 >LE-Hyd1

MLSLLSKAVSLAILVTAVVASPAGNGVEWSGGGTTTIVTASSPTTTVTQSCSTGDQKCCQSVQNSAAGVSSLLGLL
 GIVLSGTDVPVGLTCLPIVGGACQSQAQVCTDNSYGNLISLGCSPQL
 >LE-hyd2

MQFKLAFVSIALATLAVATPAPRGEPPASSCSTGDLQCCNTVEPASSPSASTILGLLGIVIQVDVVLVGLTCSPIITVIGL
 ESGGCSAQAVCTDNSNGLLISIGCLPVTL
 >MG-magnaporin

MQFSTIIATIFVAATGAVALPAEVQERQVPYTPCSGLYGSAQCCATDILGLANLDCGQPSDAPVDADNFSEICAAIGQR
 ARCCVLPILDQGILCNTPAGVTP
 >MG-MPG1

MFLSKTVVLALAAAAFVQAITPAPGEGPSVMAQQKCGAEKVSSCCNSKELKNSKSGAEIPIDVLSGECKNIPINILTIN
 QLIPINNFCSDTVSCCSGEBQIGLVNIQCTPILS
 >MA-SSGA

MFKALIVALAAVAAAIPQQPSSNEMNCDSGVYCCNKVAQNTGIVVPIDALSSCGDTLKLVTVDALNDKCTSQTVCEN
 NVQQNGLVNVACTPIDV
 >NC-EAS

MQFTSVFTILAIAMTAAAPAEVVP RATTIGPNTCS IDDYKPYCCQSMSGPAGSPGLLNLI PVDL SASLGCVVGVIGSQ
 CGASVKCKDDVTNTGNSFLI INAANCVA
 >OU-CU
 MQFSIATIALFLSSAMAAPYSGNSNSDSYDPCTGLLQKSPQCCNTDILGVANLDCHGPPSVPTSPSQFQASCVADGGRS
 ARCCTLSLLGLALVCTDPVGI
 >PB-hyd1
 MQLSNIVAVVALLATTAVASRSPPRPQRPSRPVAPVVFQSIQCCSSGSPFCCAPESTLGTCTAMSGSSVQCNSLI VCCNN
 NGSQTQVCSATLQQPVNFVDL
 >PB-HYD2
 MKFSLTAVVLALATAA VAAPGGNYKAGPREEGPSISRQCGQAQISCCNKQISTVNGGDKNSGLLNGVLGTVIGKGGSV
 GIFDQCSKLSLSALIGVTDNLNSQCKQTVACCCGDSKA EGLVALNLPCIPIAL
 >PN-pdi251
 MQFTKMSAFATLALATLAAATPTRRNDSPSNQCNTGSLQCCNSLQ SANSASLAGLLGLLVVVGITGQVGVTCSPITG
 VGVSGTSCSEQPVCC TNNAPNGVIALGCSPININL
 >PN-pdi263
 MFARAASVFLSLPILATANVLP RQDNQCNTGSLQCCSSVQSSSSSLVATLLGLL GVAAGGLTGQVGVTCSPITVIGVS
 GTSCSEQPVCC TGNTFNGVIATGCTPVNVNL
 >PN-pdi315
 MQFKVLAALVIGATLAAATGSPSNQCNTGSLQCCNSTG SATDPAIAKLFALLGINVEDVTALVGVTCSPITVVGASGSS
 CSEQPVCC TNSFNGLVIALGCAPINLNL
 >PT-HYD-1
 MKFAAVVLA AAAA AVSAETNAQRMARGLPPKAPIRRHGTPADTEKRSHPSSTGGGQCNTGPIQCCNTVATSGSQSGVD
 ELLTLLGLSVFVGTQV GASCSPISAVGTGSGAQCSGQTVCC EQNEWGLVNI GCMPI NLNA
 >PT-HYD-2
 EIVSLSLSLLAVVPLVVLV IAGPLNVRGGTPSQCCNTGT PQCCQVQQTSDLQQFRSSFG LVDALAGASALVGANCNPV
 SVLGTGNGAQCNTPVCC TSNQMLGAVNMGCMPLNVNA
 >PT-hyd-3
 MFSRVFAVASLAALAGPLSV RDQCNTGTIQCCQVQQASYYQSAPQEIGL GELLAGVTGQIGTQCSPISVVGASNGA
 QCNAQTVCC TNTQFNGLINIGCMPINVNA
 >PO-H
 MFSKATLFFTTVSRYRDTQAPIPTGQTNQPTTQCNTGPVQCCDTTQSASDPINIPGMGLVHVS NANGLVAFGNCSPLV
 SGGSKC NNQAVCCNGTEFNGLVNVGCTNVSL
 >PO-POH1
 MFSIRISTV VLAASALLAVATPMTNTETPQCNTGPIQCCNSVQSATSSAAAGPLAALGVLSGIASLLGEVGLDCSPLQV
 IGVGANS CSSQAACCTGNTFN GAVVLGCSPIKLL
 >PO-POH2
 MFFRTSSLFTTIVAF TVMAAAMPGNPKPTTTT VTVTAPAHPTATAPASECKTGPVQCCNSVQSSKSPAASLLLGLLGIV
 LQGVAVPVGLTCNPITVIGVGGNSCSAQTVCC ENNNSGLI AIGCTPINLSL
 >PO-poh3
 MFSRVIFCTFLILPLLAATAIPRTNPPAPTCTT GSLQCCNSVQAASNPVVG LLAGLLGIVLGPITGQVGLTCSPITVI
 GVGGTSCSAQTVCCNGNSFNGLI VVGCSPVNISL
 >PO-vmh1
 MLFKQA IIVATTLTDLAVATPVVDVRRRTDPASSCSTGTLNCCNSSGTVEDKTIAGLLGILNIVVSDITALVGITCTPI
 TVVGAGGT SCTSQTLCDDNNNSGLITLGCIPININL
 >PF-fbh1
 MFSIRIATV VLAASAALRPPARITNTETPVNQCGSGSIQCCESVQSASAAQAAGILGPLDILTNLQGLVGHCSPLAAV
 GVS GTSCSSQTVCC KDVSKSGLVNLGCSPINLNL
 >PF-Vmh2
 MFSRVIFCTFLILPLLAATAIPRTDT PSCSTGSLQCCSSVQKATDPLASLLIGLIGIVLGPLDLLVGVTCSPITVIGV
 GGT SCTQTVCC TGN SFNGLI AIGCSPINISL
 >PF-vmh3

MFFQTTIVAALAFVATPLALRTDSRCNTESVKCCNKSEDAETFKKSASAALIPKIGDITGKVYSECSPIVGLIGGS
 SCSAQTVCDDNAKFNGLVNIGCTPINVAL
 >SC-SC1
 MRFSLAILALPVLAAATAVPRGGASKCNSGVPVQCNTLVDTKDKHQTNIVGALLGLDLGSLTGLAGVNCSPVSVIGVGG
 NSCSTQTVCCGEGTQFNGLVNVGCTPINVGL
 >SC-SC3
 MFARLPVVFLYAFVAFGALVAALPGGHPGTTTPPVTTTVTVTPPSTTTIAAGGTCTTGSLSCCNQQSASSSPVTALL
 GLLGIVLSDLNVLVGISCSPLTVIGVGGSGCSAQTVCENTQFNGLVNIGCTPINIL
 >SC-SC4
 MRFSLALLALPALAAAAPVPGGGKAGQACNSGVPVCCNETTTVANAQKQGLLGLLGVVVPITGLVGLNCSPTISVVG
 VLTGNSCTAQTVCDDHVTQNGLVNVGCTPISL
 >SC-SC6
 MVSRLALISVAMLVGARPYQNVGDVLDNDVDATVGTGVVDTGMSGDLLAGLLANGLLADLLSEADGHIPEVTGSS'T
 EEATSSSTWSGASSKPTDSAPTQCNSGTLQCCESTTEAKDIDRVLLSTLLGVDVGSITGLIGKNCSPVSVVGVGAGSTC
 STQTVCCDGDSDGLINLGCKSGNAV
 >TT-Hyd1
 MFSKVALIVATLAAFVAATPLPGSSQCNTGSIQCCQTYSSTSSEASLIASIVGLDLGVTGSGISQCSPISAIGLGS
 GSSCTQQPVCCSNNNYQGLIVVGCSPINL
 >XE-XEH1
 MQPKNTIAFVSLAVMASAAPAENLVERTTPGQAVQNCSSGQTAKCCNSLSKAVANLPIQVGLNCVSLDLISVLPICK
 QCTQSALACSSGQQTGLVNLGNVCVPVSL
 >XP-XPH1
 MQPKNTIAFVSLAVMASAAPAENLVERTTPGQSIQNCSSGQTAKCCNSLSKAVANLPIQVGLNCVSLDLISVLPICK
 QCTQSALACSSGQQTGLVNLGNVCVPVSL
 >HL-QID3
 MKFLTVAAVFFTAVLAAPGNYPPTTYAPPPTTYLPPNGGGGNGNGNGGGGNGNGNTNTGCSALCPAGLY
 SNPQSCATDVLGLADLDCAVPSTTPHDGPNFQSIQVANGGKRARCCVLPVLGLGVLCQNPVGTN

注：玉米黑粉菌 *Ustilago maydis* 的疏水蛋白 Hum2 序列没有列出（原文 Bohlmann R. 1996. *Isolierung und Charakterisierung von Filamentspezifisch Exprimierten Genen*. Munich: Univ. Munich 慕尼黑，德国；被本论文附录三文献[99]引用）。

疏水蛋白在 SDS-PAGE 上的表现分子量

检测技术对无论研究和生产都是至关重要的。SDS-PAGE 是分离和分析蛋白的基本方法。所以研究疏水蛋白必须突破疏水蛋白电泳这一关。正如本论文所言,疏水蛋白的水溶液碰到界面容易聚合成多体,尤其是双体。I 型疏水蛋白的多聚物很难用热 SDS 解聚;II 型疏水蛋白的多聚物虽然可以用热 SDS 解聚,但是由于分子内八个半胱氨酸四个二硫键形成的结构特别稳定,无论 I 型还是 II 型疏水蛋白都不能保证还原剂 DTT 或巯基乙醇能永久的打开四个二硫键,使 SDS 单体完全覆盖在疏水蛋白单体的肽链上。有些疏水蛋白存在糖基化等修饰,加上疏水蛋白的分子量比较小,形成的 SDS 接合蛋白的半径接近于 SDS 自聚物胶体的半径,因此在电泳时疏水蛋白的表现分子量与理论分子量很少有符合的。见下列简表:

疏水蛋白	理论分子量	SDS-PAGE 表现分子量	参考文献
SC3	10865 (14.5K)	28K (PFA)、24K、25K	[1],[2]
SC4	8399	19K (PFA)、15K	[2]
hypA	9301	9K	[29]
MPG1	9706	15K、19.5K (PFA)	[31]
ABH1	9301	16、24、33K	[33]
HFBI	7542	8K、14K	[34]
HCF-1	8746	10K	[37]
HFBI	7198	8K 三条	[41]
CU	7628	13K	[44]
CoH1	9692	10K	[46]
ABH3	9073	19K	[50]
FBH1	8624	12K 和 7K 带	[56]
POH1	8442	15K、9K (依凝胶浓度)	[58]
POH2	10592	20K、10K	[58]
CFTH1	35227	53、63K	[70]
XPH、XEH	8462、8418	20K、10K	[81]
HYDPt-1	12323	13K、17K (PFA)	[87]

注:理论分子量用软件 ANTHEPROT 2000 V6.0 release 1.1.22 预测的,大多没有考虑糖基化。参考文献见附录三,非正文部分。

从表中和文献中可以看出,一般 SDS-PAGE 上疏水蛋白的表现分子量都比理论分离量大,没有被糖基化修饰的也是如此。很多疏水蛋白在 SDS-PAGE 上都存在所谓的双体。疏水蛋白经过氧甲酸(PFA)氧化后,表现分子量增大。文献^[58]还研究了不同凝胶浓度下 POH1 的表现分子量,发现依赖于凝胶浓度:在 12.5% 的胶上显示 15K,在 15% 的胶上显示为 9K。实际上,不同的凝胶系统上,疏水蛋白的表现也不一样。在 Tricine-Tris 系统里,疏水蛋白的表现分子量好像更符合理论分子量,不显示双体带^[37]。

疏水蛋白相关问题的思考题

1.疏水蛋白是丝状真菌长期进化的产物,是真菌与“界面”斗争的主要武器之一。那么在生物界里,还有哪些“界面武器”?

2.疏水蛋白的结构决定其性质,从而决定功能和应用。疏水蛋白的氨基酸序列同源性很差,但有三个相同的特性。那么八个半胱氨酸残基的作用是什么?信号肽决定的分泌途径到底是什么?疏水性氨基酸在表面的分布如何?较多的 β 结构和一个 α 螺旋起什么作用?

3.I型疏水蛋白形成的膜的疏水面为小杆层。一个小杆由几个疏水蛋白单体组成?显微镜下真菌表面的小杆层都是疏水蛋白组成的吗?又提到组成是淀粉纤维状,这与小杆层到底是什么关系?II型疏水蛋白在显微镜下的表现如何?

4.疏水蛋白的性质到底有那些?疏水蛋白的性质对于其应用有那些不利之处?如何克服?

5.发现疏水蛋白有很多方法,那么到底研究到什么程度才能说新发现的蛋白是疏水蛋白?接合菌中发现过疏水蛋白吗?

6.在HFBI的发酵中,影响成本和产率的主要因素是什么?为什么说转化率对蛋白的发酵生产没有意义?发酵中如果泡沫太多是什么原因?怎么克服?如果染了杂菌了怎么办?

7.在HFBI的纯化中,界面的影响是主要的。怎么样减少界面的产生但又不影响混合的效果啊?

8.对于SDS-PAGE,为什么说Tris-Tricine系统比普通Tris-Glycine系统优越?在蛋白质电泳中要注意哪些问题,才能获得高分辨和高灵敏度?

9.出发材料对疏水蛋白的研究至关重要。对于疏水蛋白研究材料,有什么具体要求,该怎么取得研究材料?

10.对于I型疏水蛋白生产,最大的难题将是什么?如何克服?

致 谢

首先,感谢我的导师乔明强教授两年来的精心指导。导师渊博的知识,严谨的治学态度,谦虚博大的胸怀,以及对所研究前沿的敏锐洞察力都使我获益良多,终身难忘。也感谢杨文博教授在第一学年对我的指导与教育,杨老师的研学风格也使我受益匪浅。

感谢高才昌教授、白艳玲副教授和张秀明老师对本论文研究工作所给予的大力支持与帮助,以及对本人的极大信任与热情鼓励。

感谢师弟于雷对本论文部分研究工作的参与,以及对本论文所有文稿的校对工作。近两年来同他的良好合作和共同探索给我留下了愉快的记忆。

感谢师妹崔怡在 ELISA 分析检测与数据库处理方面给予的帮助。

另外还有感谢刘玉芹老师、单志英老师、徐海津老师、赵凤梅老师和丁飞翔、王洪辉、张宝华、张玮、杨亮、邵斌等同学对我的帮助。

感谢郭世宜老师,天津市工微所姜文霞所长、张刚工程师、奚震老师和马志刚和孙凤雄等人在小试发酵上对我的帮助。

最后,感谢所有帮助过我的人!

丁靖志

2004年5月

南开大学

分子生物学研究所

3M 研究室

(二〇〇四年五月二十三日星期日 修订)