



红曲霉繁殖相关 *brlM* 基因鉴定及功能分析

杨孙玉悦, 廖鑫琳, 潘妍妍, 王嘉琦*, 蒋冬花*

浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

杨孙玉悦, 廖鑫琳, 潘妍妍, 王嘉琦, 蒋冬花. 红曲霉繁殖相关 *brlM* 基因鉴定及功能分析. 微生物学报, 2022, 62(12): 4992–5004.

Yang Sunyuyue, Liao Xinlin, Pan Yanyan, Wang Jiaqi, Jiang Donghua. Identification and function analysis of the *brlM* gene related to *Monascus* reproduction. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4992–5004.

摘要: *brlA* 作为曲霉分生孢子形成的中心调控路径中最上游的转录因子, 能够诱导下游特异基因的表达调控分生孢子的产生, *brlA* 缺失将导致曲霉无法产生分生孢子, 同时生长代谢发生改变, 但对不同菌种的影响有显著差异。【目的】探究 *brlA* 同源基因 *brlM* 在红曲霉中的基因功能, 探索红曲霉繁殖调控机制。【方法】从紫色红曲霉 Mp-21 菌株中克隆了 *brlA* 同源基因 *brlM*。利用同源重组原理, 用农杆菌介导转化法构建了 *brlM* 基因缺失突变株($\Delta brlM$), 分析 $\Delta brlM$ 和野生菌株 Mp-21 在菌落表型、显微结构、生长速率和次生代谢产物等方面的差异, 明确 *brlM* 基因在红曲霉中的主要功能。【结果】在形态水平上, *brlM* 基因缺失菌株导致菌丝生长更加旺盛, 赋予菌落更加蓬松的表型; 显微观察发现 $\Delta brlM$ 失去了有性繁殖产生闭囊壳的能力, 但却提升了无性繁殖产生分生孢子的能力; 同时代谢产物红曲色素、莫纳可林 K 和桔霉素产量显著下降。【结论】红曲霉 *brlM* 基因的功能与曲霉属中的 *brlA* 并不相同, *brlM* 基因在红曲霉有性繁殖中的作用不可替代。本研究的结果对进一步探索丝状真菌繁殖调控机制提供了新的思路。

关键词: 红曲霉; *brlM* 基因; 基因克隆; 基因敲除; 繁殖; 农杆菌介导转化

基金项目: 国家自然科学基金(31570013)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570013)

*Corresponding authors. E-mail: WANG Jiaqi, wangjiaqi@zjnu.edu.com; JIANG Donghua, jdh@zjnu.cn

Received: 1 April 2022; Revised: 21 June 2022; Published online: 15 July 2022

Identification and function analysis of the *brlM* gene related to *Monascus* reproduction

YANG Sunyuyue, LIAO Xinlin, PAN Yanyan, WANG Jiaqi*, JIANG Donghua*

College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

Abstract: *brlA* gene, as the initiator in the central regulatory pathway in *Aspergillus* conidiation, modulates the downstream conidiation-specific genes. *Aspergillus* without *brlA* fails to produce conidia, with growth and metabolism changed. However, the effect of *brlA* deletion is significantly different among different strains. **[Objective]** To explore the functions of *brlM* in *Monascus*, a homologous gene of *brlA*, and the regulatory mechanism of *Monascus* reproduction. **[Methods]** *brlM* was cloned from *Monascus purpureus* Mp-21. Based on homologous recombination, the *brlM*-deleted mutant ($\Delta brlM$) was constructed by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, and the colony phenotype, microstructure, growth rate, and secondary metabolites were compared between $\Delta brlM$ and the wild-type Mp-21 to clarify the functions of *brlM* in *Monascus*. **[Results]** For the morphology, $\Delta brlM$ showed more vigorous mycelial growth and a more fluffy phenotype of the colony than the wild type. According to the microscopy, $\Delta brlM$ lost the ability of producing cleistothecia through sexual reproduction but had stronger ability of produce conidia through asexual reproduction. Meanwhile, the yield of *Monascus* pigment, monacolin K, and citrinin of mutant $\Delta brlM$ was significantly lower than that of the wild type. **[Conclusion]** Different from *brlA* in *Aspergillus*, *brlM* gene is irreplaceable in the sexual reproduction of *Monascus*. This study provides a new idea for further research on the regulatory mechanism of the reproduction of filamentous fungi.

Keywords: *Monascus*; *brlM* gene; gene cloning; gene knockout; reproduction; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation

红曲霉(*Monascus*)作为一类重要的丝状真菌,能产生大量的天然色素^[1]和多种生物活性物质^[2],被广泛应用于生产生活的各个领域,红曲霉的大规模工业化生产依赖于其产孢能力和产生活性代谢物质能力。与其他真菌一样^[3],孢子的形成在红曲霉的繁殖、代谢产物合成和抵御外界不良环境等方面发挥着十分重要的作用^[4]。

我们对 1 株紫色红曲霉 (*Monascus purpureus*)进行了转录组测序,发现了与模式丝状真菌构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)孢子发育相关 *brlA* (bristle“松脆样”)有较高同源性的 1 个基因,推测这个基因可能与红曲霉产孢相关,

并将其命名为 *brlM* (bristle *Monascus*)基因。研究发现 *brlA* 是构巢曲霉孢子发育的上游调控基因^[5],为孢子发生所必需,能够阻遏营养生长进程和诱导分生孢子的形成^[6]、参与调控曲霉属真菌的生长发育和生殖等过程^[7-8]。*brlA* 在分生孢子形成过程中不可替代,到目前为止没有发现任何环境信号包括营养和渗透压等能绕过 *brlA* 引起的无性发育;即便在没有上游发育激活因子的参与,*brlA* 也能逐级调节控制一系列无性发育特异基因的表达^[9-10]。有趣的是,不同物种的 *brlA* 缺失表现出不同的结果,同时在红曲霉中具有与曲霉属不同的孢子发育调控网络,还未被探明。

因此, 为了进一步探明 *brlA* 同源基因在红曲霉中的功能, 我们从紫色红曲霉 Mp-21 菌株中克隆 *brlA* 同源基因 *brlM* 并根据测序结果进行初步功能预测, 构建 *brlM* 敲除载体, 利用农杆菌介导转化筛选得到缺失突变体 $\Delta brlM$, 对其形态、代谢产物和生理生化指标等方面进行分析。*brlM* 基因功能的探明能够为红曲霉繁殖发育和代谢产物合成调控研究提供参考, 为红曲工业菌种改良提供理论依据^[11]。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

(1) 质粒: 质粒 pKO1B 用于敲除载体的构建; 质粒 pCB1003 用于潮霉素磷酸转移酶基因 (*hygromycin B phosphotransferase gene*, *hph*) 的克隆。

(2) 菌株: 红曲色素、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 和莫纳可林 K (monacolin K) 产量相对较高但桔霉素产量较低的紫色红曲霉 (*Monascus purpureus*) 菌株 Mp-21, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL-1 菌株, 购于北京科百奥生物科技有限公司。

1.1.2 主要培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)、马铃薯葡萄糖培养液 (PDB)、Luria-Bertani 培养基 (LB)、诱导培养基 (IM)、共培养诱导培养基 (Co-IM)、麦芽提取物琼脂培养基 (MEA)、25% 甘油硝酸盐琼脂培养基 (G25N)、察氏酵母膏琼脂培养基 (CYA)、酵母浸粉蔗糖培养基 (YES) 和米饭培养基等, 配方和配制方法参考文献 [12]。

1.1.3 酶和试剂盒

LA *Taq* DNA 聚合酶、Prime STAR 酶、*Xba* I、*Bam*H I、T4 DNA Ligase 和 Es *Taq* Master Mix

等酶, OMEGA Fungal DNA Kit、Axygen DNA Gel Extraction Kit 和 AxyPrep Plasmid Miniprep Kit 等试剂盒, 均购于北京科百奥生物科技有限公司。

1.2 红曲霉 *brlM* 基因的克隆、测序和信息学分析

(1) *brlM* 基因的克隆与测序: 在红曲霉转录组测序结果的基础上, 根据 NCBI 数据库公开信息, 通过与其他丝状真菌同源序列比对设计引物 (表 1)。以紫色红曲霉 Mp-21 菌株基因组 DNA 为模板, 利用 PCR 技术扩增, 将扩增产物进行凝胶电泳, 对目的条带割胶回收纯化, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

(2) *brlM* 基因的信息学分析: 使用 NCBI 在线 Blast、ExPASy、DNAMAN 和 SWISS-MODEL 等软件分别对 *brlM* 基因的同源性、酶切图谱以及对应的氨基酸序列, 并对蛋白的保守区域进行同源建模。

1.3 红曲霉 *brlM* 基因敲除盒和敲除载体的构建

(1) *brlM* 基因 5'端、3'端侧翼序列和 *hph* 基因片段的扩增和测序: 用 Primer 5.0 软件设计引物 (表 1), 用 PCR 技术分别扩增 *brlM* 基因的 5'端 (*brlM*-5')、3'端 (*brlM*-3') 和从 pCB1003 质粒中扩增 *hph* 基因。将扩增产物回收, 测序验证。

(2) 三片段融合法构建 *brlM* 基因的敲除盒: 三片段 PCR 融合法连接的原理和方法参考文献 [13], 连接 *brlM*-5'、*hph* 基因、*brlM*-3', 完成 *brlM* 基因敲除盒的构建。

(3) *brlM* 基因敲除载体的构建: 根据 *brlM* 基因酶切图谱和质粒 pKO1B 多克隆位点, 在引物 3'和 5'端分别设计酶切位点 (*Bam*H I 和 *Xba* I), 再用限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I 对含 *brlM* 基因的敲除盒和 pKO1B 质粒进行双酶

表 1 本研究所用的引物序列信息

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Primer usage
<i>brlM</i> -F	AATCCCACGGAATCAAC	For the amplification of <i>brlM</i> gene
<i>brlM</i> -R	TTCTTCCAACAAGGTGCT	
<i>hph</i> -F	CGAGAGAAGATGATATTGAAGGAGC	For the amplification of <i>hph</i> gene
<i>hph</i> -R	TCTTGTTTCGGTCGGCATCTACTCTA	
<i>GAPDH</i> -F	GTCTATGCGTGTGCCTACTTCC	For the RT-PCR
<i>GAPDH</i> -R	GAGTTGAGGGCGATAACCAGC	
<i>brlM</i> -5F	<u>CGGGATCCCG</u> -AATCCCACGGAATCAAAC	For the amplification of 5' flanking region
<i>brlM</i> -5R	<u>CAATATCATCTTCTCTCG</u> -GACTACTCCTCATCGCTCT	
<i>brlM</i> -3F	<u>ATAGAGTAGATGCCGACA</u> -GGGTCTTGACAAATAGGG	For the amplification of 3' flanking region
<i>brlM</i> -3R	<u>GCTCTAGAGC</u> -TTCTTCCAACAAGGTGCT	

The primers *brlM*-5R and *brlM*-3F were designed with a *hph* marker tail which showed by double lines. The sequences underlined by a single underline in primers *brlM*-5F and *brlM*-3R represent the restriction sites *Bam*H I and *Xba* I respectively.

切, 可得有相同黏性末端的 DNA 片段。然后用 T4 DNA 连接酶连接上述 2 个 DNA 片段, 形成 pKO1B-*brlM* 敲除载体, 再将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 中培养, 取菌液 PCR 验证。

1.4 敲除载体转化农杆菌和鉴定

(1) 敲除载体 pKO1B-*brlM* 转化农杆菌: 参考文献中的液氮冻融法^[14]将 pKO1B-*brlM* 敲除载体转入农杆菌 AGL-1 中, 后在利福平 (rifampin, Rif) 和卡那霉素 (kanamycin, Kan) 双重抗性 LB 平板上涂布, 在 28 °C 培养箱中培养 48 h, 筛选出抗性单菌落。

(2) 含敲除载体 pKO1B-*brlM* 农杆菌的验证: 将双重抗性单菌落转至含 Kan 的 LB 液体培养基中, 培养得到 OD_{600} 约为 0.5 的农杆菌菌液, 用 PCR 技术分别对农杆菌目标转化子 *hph* 基因和敲除盒进行扩增, 用 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切验证, 测序鉴定。最后筛选出含敲除载体 pKO1B-*brlM* 的农杆菌菌株。

1.5 根癌农杆菌介导(ATMT)的 Mp-21 转化

(1) 用 LB 固体培养基活化含有敲除载体 pKO1B-*brlM* 的农杆菌, 随后转接于 LB 液体培养基培养 12–16 h, 离心去上清, 用 IM 培养基

稀释菌液至 $OD_{600}=0.5$, 培养 5–6 h。

(2) 制备 Mp-21 孢子悬浮液, 稀释至浓度为 10^5 个/mL。

(3) 混合农杆菌菌液和孢子悬浮液, 取 200 μ L 涂布于硝酸纤维素膜 (nitrocellulose membrane, NC 膜) 上, 共培养 3 d。

1.6 红曲霉转化子库的构建和 *brlM* 基因缺失突变株($\Delta brlM$)的筛选

(1) 转化子筛选及遗传稳定性分析: 将 NC 膜上长出的菌落转接至含潮霉素 B (hygromycin B, hyg) 的 PDA 培养基上培养 7 d 后连续传代, 观察菌落形态是否发生明显变化。

(2) 转化子菌落形态及显微结构观察: 观察培养 7 d 的转化子菌落形态; 挑取菌丝制片, 在显微镜下观察菌丝及色素颗粒、分生孢子发育情况及闭囊壳等结构。

(3) 转化子的分子生物学验证: 以基因组 DNA 为模板, 设计特异性引物 (表 1) 分别对 *hph* 基因和 *brlM* 基因敲除盒进行 PCR 扩增验证; 提取 RNA, 通过 RT-PCR 验证转化子的 *brlM* 基因被敲除载体 pKO1B-*brlM* 中的同源区段置换。

1.7 Mp-21 和 $\Delta brlM$ 菌落形态及显微结构比较

将 Mp-21 和 $\Delta brlM$ 分别接种于 PDA、CYA、G25N、MEA 和 YES 培养基, 观察菌落形态; 显微镜下观察两者的菌丝、闭囊壳及分生孢子等结构特征。

1.8 Mp-21 和 $\Delta brlM$ 生长速率与生物量测定

(1) 生长速率测定: 接种于 PDA 培养基上 30 °C 培养, 每 2 d 用十字交叉法测定菌落直径, 绘制生长速率曲线。

(2) 生物量测定: 接种于 PDB 培养液中 30 °C、180 r/min 摇床培养, 每 2 d 取样, 3 层纱布过滤后收集菌丝置于 50 °C 烘箱中干燥, 测定干重并绘制生长曲线。

1.9 Mp-21 和 $\Delta brlM$ 次级代谢产物产量测定

(1) 色素色价检测^[15]: 用 70%乙醇溶液浸取发酵 7 d 的红曲米粉, 60 °C 水浴后离心, 分光光度法依次测定上清液 OD_{505} 。红曲色素色价 (U/mL)=稀释倍数×吸光值, 根据公式计算色价。

(2) GABA 产量测定: 点样, 展开剂(冰醋酸:正丁醇:水=1.5:4:3)充分展开后高温显色 5–15 min。洗脱剂充分洗脱后, 测定 OD_{520} , 计算产量。

(3) Monacolin K 产量测定: 用 75%甲醇抽提发酵液备用, 标准品和样品用 0.22 μ m 滤膜过滤, HPLC 检测产量^[16–17]。

(4) 桔霉素产量测定: 按照甲苯:乙酸乙酯:甲酸=7:3:1 配制桔霉素提取液, 将等量提取液与发酵液混合离心, 0.22 μ m 滤膜过滤后检测。HPLC 检测条件同上。

2 结果与分析

2.1 *brlM* 生物信息学分析

2.1.1 红曲霉 *brlM* 基因克隆和核苷酸序列

Mp-21 菌株 *brlM* 基因的 PCR 扩增产物琼

脂糖电泳结果如图 1 所示, 测序结果显示 *brlM* 基因全长为 1 781 bp。

2.1.2 红曲霉 *brlM* 基因的核苷酸序列和对应氨基酸的同源性

红曲霉 *brlM* 基因完整的开放阅读框(open reading frame, ORF)长度为 1 182 bp, 翻译 393 个对应氨基酸; BLAST 比对结果表明, 红曲霉 *brlM* 基因对应氨基酸序列与其他丝状真菌如赭曲霉 (*A. ochraceus*)、斯坦尼曲霉 (*A. steynii*)、土曲霉 (*A. terreus*) 和娄地青霉 (*Penicillium roqueforti*) 的 BrlA 蛋白相似度均在 50% ($\pm 1\%$) 左右, 其中相似度最高的是娄地青霉 BrlA 序列, 相似度为 51.0%; 最低的是蓝状菌 BrlA 序列, 相似度为 49.0%。相较于其他丝状真菌的 *brlA* 基因对应氨基酸序列, 紫色红曲霉 BrlM 蛋白氨基酸序列稍短, 且在蛋白非保守区域的相似度较低, 但在核心保守功能区域 (330–393) 内, 显示出极高相似度。

2.1.3 红曲霉 *brlM* 编码蛋白三级结构同源建模

分析 BrlM 蛋白的保守结构域可知, 其属于锌指结构(COG)超家族蛋白, 是一种 C2H2 (cys2his2)型锌指蛋白(结构域 ID 11472214), 在 300–353 区间内存在 2 个锌指结构域, 即红曲霉 BrlM 蛋白中的保守功能结构区域。该结构模型可以与 DNA 分子结合从而起到调控转录的作用, *brlM* 基因编码预测蛋白三级结构见图 2。

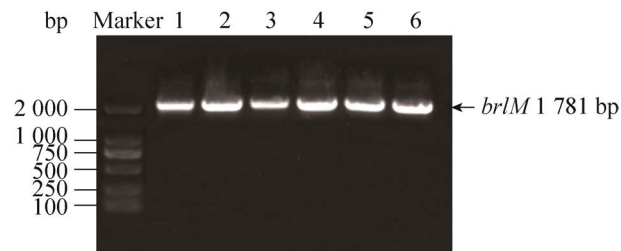


图 1 红曲霉 Mp-21 菌株 *brlM* 基因 PCR 扩增产物
Figure 1 PCR products of *brlM* gene of *Monascus* Mp-21. Line 1–6: *brlM* gene.



图2 紫色红曲霉 Mp-21 *brlM* 基因编码蛋白质保守区三级结构预测图

Figure 2 Prediction of the tertiary structure of protein conserved region encoded by the *brlM* genes of *Monascus purpureus* Mp-21.

2.2 $\Delta brlM$ 的筛选、获得和鉴定

(1) *hph* 基因和 *brlM* 基因的 PCR 验证: 目标转化子 *hph* 基因扩增产物在 1 000–2 000 bp 之间存在单一明亮条带(图 3A), 符合潮霉素基因(1 406 bp)长度, 证明 *brlM* 基因敲除载体 pKO1B-*brlM* 已成功导入红曲霉基因组中。其中在 1 000–1 500 bp 无 *brlM* 条带出现, 说明已成功敲除 *brlM* 基因。

(2) *brlM* 基因的 RT-PCR 验证: Mp-21 和目标转化子泳道在约 500 bp 处均能观察到内参 *GAPDH* 基因的明亮条带(图 3B); 然而两者相比, 在 1 000–2 000 bp 处目标转化子($\Delta brlM$)

无明亮条带, 该条带与 *brlM* 基因片段的长度相吻合, 证明其基因组中的 *brlM* 基因已无法正常转录。

综合以上结果, 通过分子生物学方法证明了目标转化子中的 *brlM* 基因已被敲除载体 pKO1B-*brlM* 中的同源区段置换, 即目标转化子为所需要的 *brlM* 基因缺失突变株($\Delta brlM$)。

2.3 $\Delta brlM$ 菌落形态和显微结构

野生型 Mp-21 和突变型 $\Delta brlM$ 在 4 种培养基上的菌落形态和显微结构存在显著差异(图 4)。 $\Delta brlM$ 孢外色素含量明显降低, 菌落边缘圆整, 菌丝较多且分布均匀, 呈绒地毯状。在显微结构上(图 5), 能够观察到 $\Delta brlM$ 具有更多的气生菌丝、分生孢子梗及分生孢子, 且 $\Delta brlM$ 菌丝内的色素颗粒要少于 Mp-21。但 Mp-21 菌株中能观察到的有性繁殖(产生闭囊壳)现象在 $\Delta brlM$ 中消失。

2.4 $\Delta brlM$ 生长速率与生物量测定

Mp-21 和 $\Delta brlM$ 在生长速率上差异不大(图 6A), 13 d 后均接近菌落直径最大值。而生物量(菌丝干重)则存在显著差异(图 6B), $\Delta brlM$ 在 7 d 时达到最大约 0.63 g, 而 Mp-21 到 9 d 时才达到最大约 0.50 g, 且显著低于 $\Delta brlM$ 。

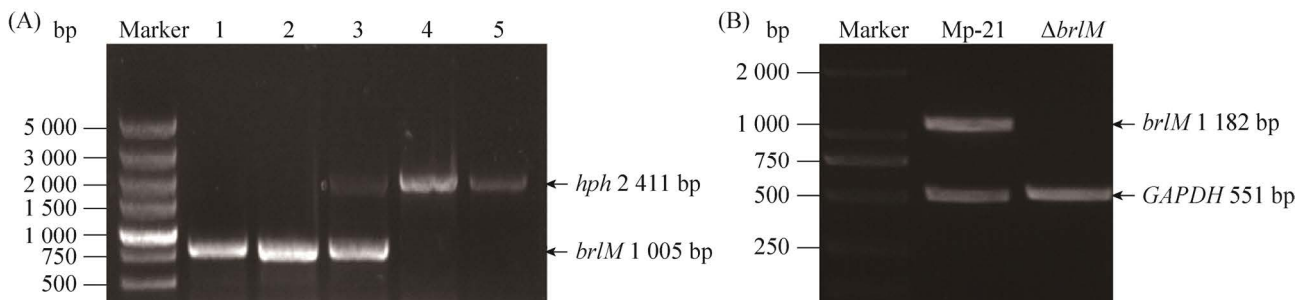


图3 红曲霉 *brlM* 缺失突变体的验证

Figure 3 The verification of *brlM* deletion mutant ($\Delta brlM$). A: PCR testing for the confirmation of the deletion mutant strain $\Delta brlM$. Lane 1, 2: wild-type strain Mp-21; lane 3: ectopic insertion mutant; lane 4, 5: $\Delta brlM$. B: gene expression in the wild-type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$ determined by RT-PCR.

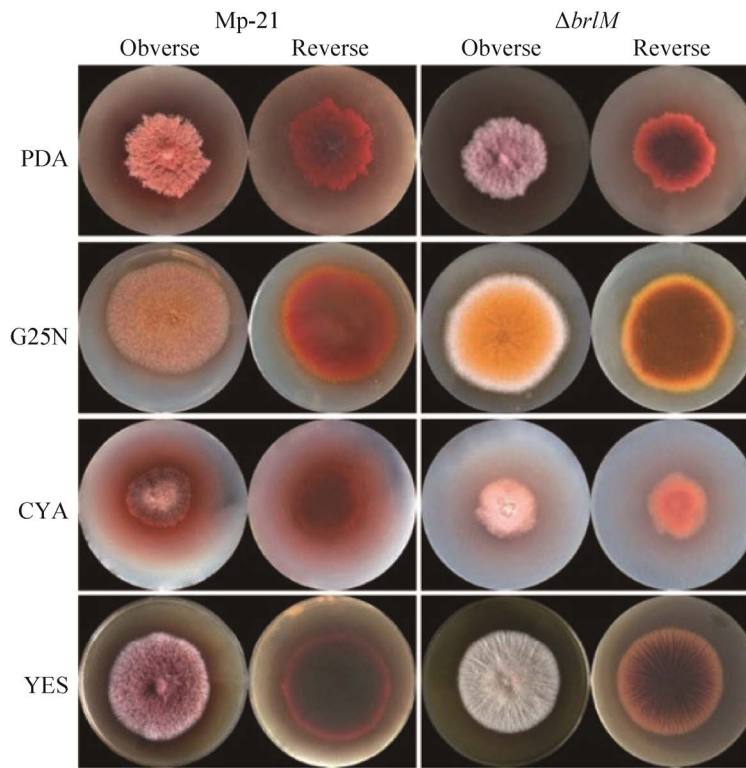


图 4 野生型 Mp-21 和突变型 $\Delta brlM$ 在不同培养基培养 7 d 的菌落形态

Figure 4 Colony morphology of the wild-type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$ cultured in different media at 30 °C for 7 d.

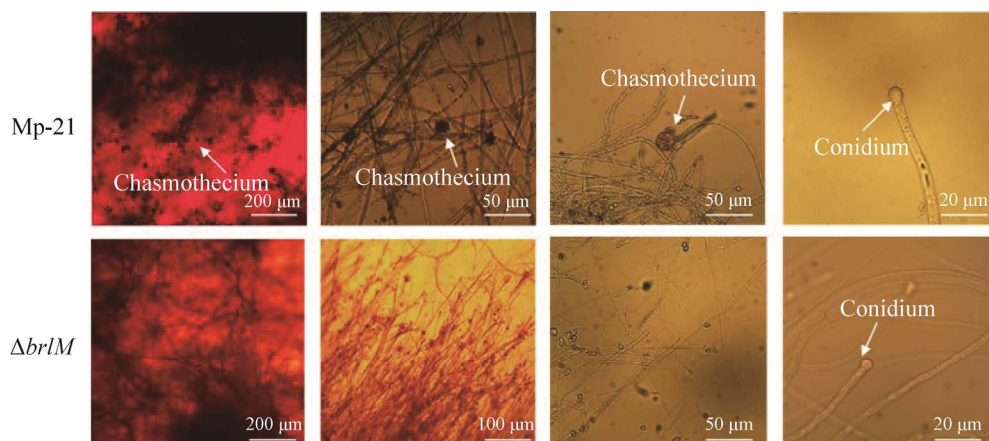


图 5 野生型 Mp-21 和突变型 $\Delta brlM$ 的显微形态

Figure 5 Micromorphology of wild-type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$ on PDA media at 30 °C for 7 d. The deletion $\Delta brlM$ mutant strain had more aerial hyphae, conidiophores and conidia compared with the wild-type strain Mp-21. But sexual reproduction (cleistothecium) phenomenon was not observed in the deletion $\Delta brlM$ mutant. At the same time, the pigment granules in the hypha of the deletion $\Delta brlM$ mutant were less than those of the wild-type strain Mp-21.

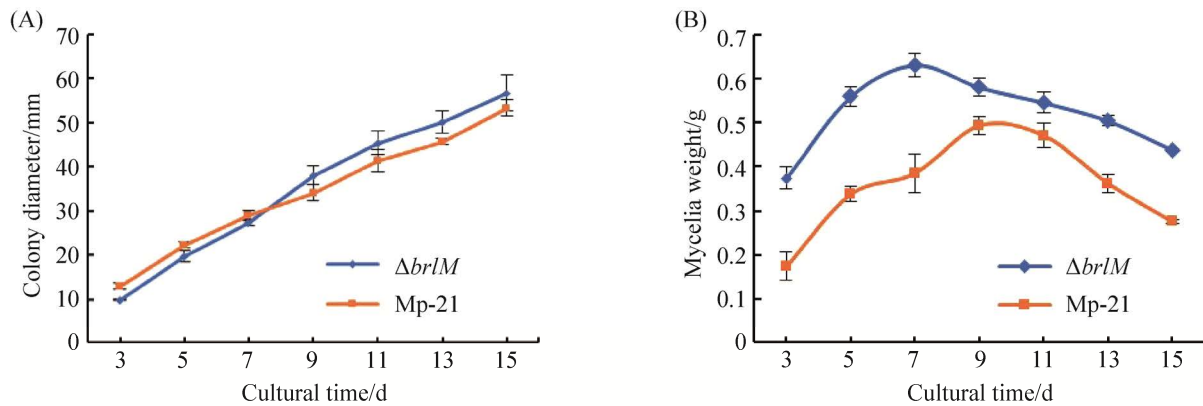


图 6 野生型 Mp-21 和突变型 $\Delta brlM$ 不同培养时间下生长速率变化

Figure 6 Growth characterization of the wild-type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$. A: the colony diameter of the wild-type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$ incubated on PDA plates at 30 °C for different days; B: the mycelial dry weight of the wild-type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$ on PDB media at 30 °C for different days. Results were expressed as the mean \pm standard deviation.

2.5 野生型 Mp-21 和突变型 $\Delta brlM$ 次级代谢产物的变化

2.5.1 红曲色素的色价

分别从野生型菌株 Mp-21 和突变型 $\Delta brlM$ 在米饭培养基中培养 7 d 时制作的红曲米中提取色素, 并通过分光光度法进行红曲米色价分析, 结果如图 7A 所示, 野生型 Mp-21 制作的红曲米中色价达到了 262.54 U/g, 而突变型 $\Delta brlM$ 只有 52.48 U/g, 突变型 $\Delta brlM$ 相较于野生型菌株 Mp-21, 红曲色素产量降低约 80%。

2.5.2 GABA 的产量

从野生型 Mp-21 和突变型 $\Delta brlM$ 发酵 7 d 的红曲米中测得 GABA 产量分别为 1.31 mg/mL 和 1.28 mg/mL (图 7B), 二者产量相近, 推测 *brlM* 基因对 GABA 产量无显著影响。从食品安全级微生物中富集 GABA 是当前研究热点, 故筛选高产 GABA 红曲霉菌株并优化其发酵底物, 将为研发富含 GABA 的功能性食品提供理论基础。

2.5.3 Monacolin K 的产量

2 种菌株在生长前期(培养 7 d)无明显差异,

但在中后期 Mp-21 monacolin K 产量显著增加。且在 9–13 d 时 $\Delta brlM$ 产量明显低于 Mp-21, 且差异最明显, 降低约 51.28% (图 7C)。Monacolin K 的产量与菌株自身差异相关, 也明显受外界发酵条件影响, 后续可通过培养工艺的进一步优化探究 monacolin K 的产量与 *brlM* 基因相关性。

2.5.4 桔霉素的含量

对在 PDB 培养基摇瓶培养不同天数的野生型 Mp-21 和突变型 $\Delta brlM$ 发酵液进行桔霉素含量检测。检测结果如图 7D 所示, 发现突变型 $\Delta brlM$ 发酵液中的桔霉素含量在各个时期都要低于野生型 Mp-21, 且结果显示野生型 Mp-21 发酵液中桔霉素含量在 5–11 d 表现出快速增长的趋势, 在 9–11 d 期间增速最快并在 11 d 时达到了峰值 9.53 mg/L; 而突变型 $\Delta brlM$ 发酵液在 5 d 时才开始检出桔霉素, 且在 11 d 之后仍旧桔霉素含量持续增加, 但总体桔霉素的含量要显著低于野生型 Mp-21。

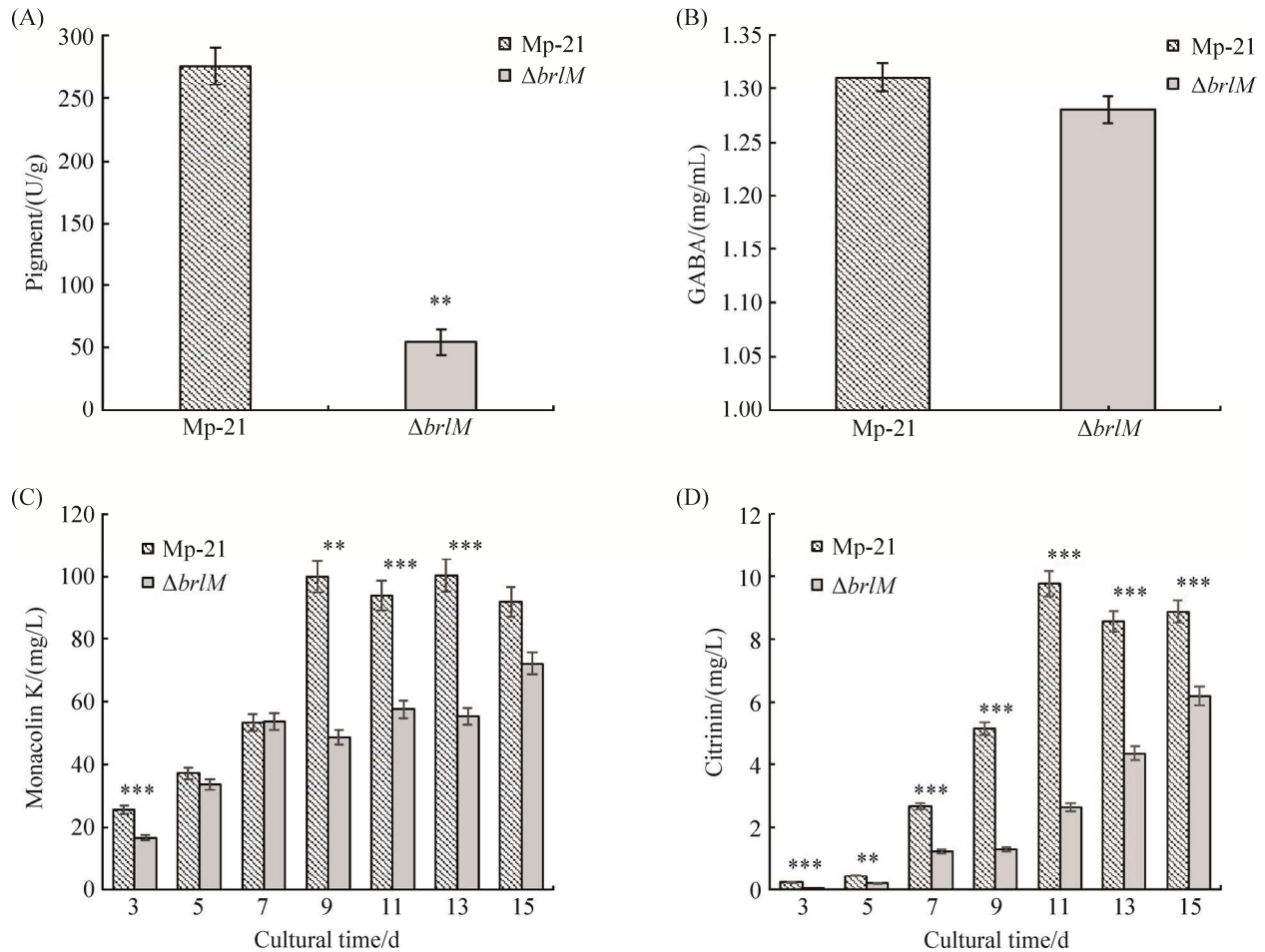


图7 野生型 Mp-21 和突变型 $\Delta brlM$ 次生代谢产物产量分析

Figure 7 Secondary metabolite production of wild type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$ under different culture time. A: color value of pigment in the wild-type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$ on rice media at 30 °C for 7 d; B: GABA in the wild-type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$ on rice media at 30 °C for 7 d; C: monacolin K in the wild-type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$ on PDB media at 30 °C after culturing different days; D: citrinin in the wild-type strain Mp-21 and the deletion mutant strain $\Delta brlM$ on PDB media at 30 °C after culturing different days. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

3 讨论与结论

3.1 构巢曲霉(*A. nidulans*)中分生孢子发育相关基因的研究

构巢曲霉作为丝状真菌的模式种, 对其分生孢子发育相关基因和调控途径已做了较为详细的研究^[18], 主要成员已基本明确(图 8)。可分为 2 个阶段: 第一阶段为分生孢子发生中心调

控路径的激活, 由 FluG 及 FlbA-E 来完成^[19]。其中 *fluG* 位于转录调节的最上游, 受光照和营养等因素的诱导表达^[20], 指导合成一种可分泌到胞外的发育诱导因子; *fluG* 基因的缺失, 会阻碍 *brlA* 基因的表达, 并直接导致菌株不产生孢子, 菌落由绿变白, 呈现蓬松样; Sfgs 是构巢曲霉孢子生成的抑制因子, 通过解除 Sfgs 的抑制效应可以重新激活孢子发生途径^[21], 当

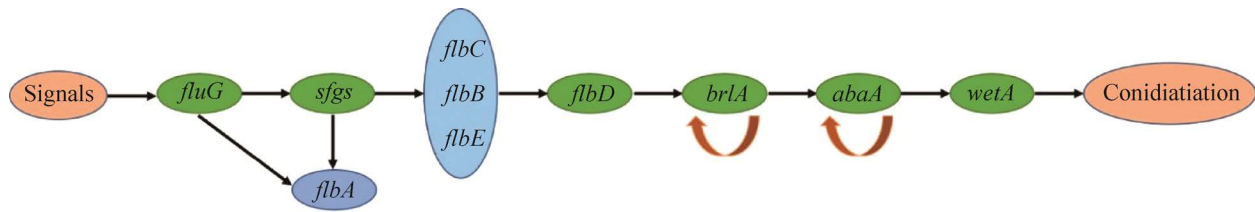


图 8 构巢曲霉(*A. nidulans*) *fluG-wetA* 分生孢子发育调控相关基因示意简图

Figure 8 Genetic model for regulation of *A. nidulans* conidiation about *fluG-wetA* pathway. *fluG* (fluffy, fluffy phenotype); *sfgs* (suppressors of FluG, inhibitory factor); *brlA* (bristle, bristle phenotype); *abaA* (abacus, abacus phenotype); *wetA* (wet-white, wet-white phenotype).

FluG 积累超过阈值时将解除 Sfgs 的抑制作用, 从而触发无性发育^[22]。第二个阶段是分生孢子发育中心的调控, 主要包括 BrlA、AbaA 和 WetA 3 个调控因子, 具有按顺序激活分生孢子头发育和控制无性发育特有基因表达的作用^[23], 这 3 个基因中的任何一个发生突变都会阻止多种发育调控基因 mRNA 的表达, 从而将分生孢子发育阻止在某个特定的形态阶段。研究表明, *brlA* 基因位于中心调控途径最上游, 能编码 C₂H₂ 型转录调节因子(属 C₂H₂ 型锌指蛋白), 诱导包括 *abaA*、*wetA* 等多个分生孢子发育特异基因的表达。在形态水平上, *brlA* 基因缺失菌株将不能完成由分生孢子梗顶端膨大向分生孢子囊发育的转变, 反而无限制延长, 达到野生型分生孢子梗的 20–30 倍, 赋予菌落“松脆样”表型。在分子水平上, 在 *brlA* 基因缺失突变株内检测不到 *abaA* 和 *wetA* 等分生孢子发育调节基因转录产物的积累。强制激活 *brlA* 基因会引起 *abaA*、*wetA* 和其他发育特异基因激活和表达^[24]。而过表达 *brlA* 基因能够阻遏营养生长进程, 诱导分生孢子发育特异基因的表达并产生分生孢子^[25]。迄今为止, 没有发现任何环境信号(如渗透压、营养缺陷、氧化应激)能够绕过 BrlA 的参与而引起无性分生孢子发育, 表明 *brlA* 基因作用具有不可替代性。*abaA* 基因编码

产物作为中心调控路径的关键一员, 具有 DNA 结合蛋白的典型特征。*abaA* 基因突变使得分生孢子梗受损, 导致形成异常的且不育的分生孢子头, 外观呈现“串珠样”^[26]。*abaA* 基因表达不仅是分生孢子头上瓶梗形成和维持所必需的; 而且是诱导分生孢子产生和维持分生孢子数量所必需的^[27]。在分生孢子无性发育中期, *abaA* 基因接受 BrlA 的诱导, 顺序激活 *wetA* 等基因, 研究表明 BrlA 和 AbaA 之间存在正反馈调节。*wetA* 基因位于中心调控途径的下游, 在分生孢子成熟过程中发挥重要作用^[28]。其突变株能产生正常的分生孢子头, 但合成海藻糖的能力丧失, 产生的分生孢子壁不完整, 容易发生自溶且孢子色素合成能力丧失, 形成“湿-白”样菌落^[29], 表明 *wetA* 基因在指导分生孢子成熟过程中发挥了重要作用。

3.2 其他丝状真菌分生孢子产生相关基因及其与代谢产物合成相关性研究

敲除黑曲霉(*A. niger*)中的 *flbA* 基因, 将导致增加分泌蛋白质组的复杂性, 降低分泌物的异质性^[30]; 黑曲霉中 *brlA* 和 *flbA* 基因缺失突变株分析结果表明, *brlA* 和 *flbA* 与其生活史中糖苷水解酶的功能密切相关^[31]; 敲除黄曲霉(*A. flavus*)中的 *fluG* 基因, 降低了分生孢子的产量, 增加了菌核的数量, 但不能消除黄曲霉毒素的

合成^[32]；红色红曲霉(*M. ruber*)中 *flbA* 基因与其菌丝生长及次生代谢产物合成相关^[33]；工业菌株斜卧青霉(*P. decumbens*)中 *brlA* 基因的缺失阻碍了分生孢子的生成，引起菌丝分枝增加和胞外纤维素酶活力上升，主要包括 3 种主要的纤维素外切酶、2 种主要的纤维素内切酶以及 β -葡萄糖苷酶等表达水平上调^[34]；烟曲霉(*A. fumigatus*)中 *abaA* 和 *wetA* 基因还调控生长发育阶段的分化^[35]，且烟曲霉(*A. fumigatus*)中过氧化氢酶的表达和活性受 *flbA* 基因的调控^[36]；蛋白组学研究结果显示，烟曲霉(*A. fumigatus*)中 *brlA* 和 *abaA* 基因在胶霉毒素(gliotoxin)合成中起关键的作用，*brlA* 基因缺失突变株中的 6 种次级代谢基因的表达降低了 3 倍以上^[37]。

红曲霉在分类地位归入子囊菌亚门、不整子囊菌纲、散囊菌目、红曲科，为该科仅有一属，即红曲霉属(*Monascus*)。红曲霉无性繁殖产生分生孢子不发达，但能产生较发达的有性繁殖闭囊壳和子囊孢子。而曲霉(*Aspergillus*)的主要的繁殖方式是无性繁殖产生分生孢子。本研究以分析了紫色红曲霉繁殖相关 *brlM* 基因的功能，与前人研究结果不同的是，*brlM* 基因的缺失导致红曲霉失去有性繁殖产生闭囊壳的能力，但却提升了无性繁殖产生分生孢子的能力。表明在红曲霉 *brlM* 基因的功能与曲霉属中的 *brlA* 并不相同，红曲霉中存在特有的且尚未被探明的丝状真菌繁殖调控网络。在发酵工业中，菌株的繁殖能力对于降低生产成本、控制污染、菌株保藏具有重要意义，本研究的结果对进一步探索丝状真菌繁殖调控机制提供了新的思路。

参考文献

- [1] 郑春明, 梅璐. 红曲霉产红曲色素工艺优化. *安徽农业科学*, 2017, 45(17): 62–63.
- [2] Zheng CM, Mei L. Process optimization on *Monascus* pigment produced by *Monascus*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(17): 62–63. (in Chinese)
- [3] Chen G, Wu ZQ. Production and biological activities of yellow pigments from *Monascus* fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(8): 1–8.
- [4] Jessica B. Spore power. *Popular Science*, 2018, 290(4): 117–119.
- [5] Park HS, Yu JH. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 2012, 15(6): 669–677.
- [6] 鲍龙飞, 秦玉琪, 曲音波. FluG-BrlA 途径参与构巢曲霉无性发育机制的研究进展. *微生物学通报*, 2014, 41(1): 104–110.
- [7] Bao LF, Qin YQ, Qu YB. Advances in studies of FluG-BrlA pathway involved in asexual developmental mechanisms of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology China*, 2014, 41(1): 104–110. (in Chinese)
- [8] Adams TH, Boylan MT, Timberlake WE. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 1988, 54(3): 353–362.
- [9] Zetina-Serrano C, Rocher O, Naylies C, Lippi Y, Oswald IP, Lorber S, Puel O. The *brlA* gene deletion reveals that patulin biosynthesis is not related to conidiation in *Penicillium expansum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6660.
- [10] Chang YC, Timberlake WE. Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics*, 1993, 133(1): 29–38.
- [11] Kim YJ, Yu YM, Maeng PJ. Differential control of asexual development and sterigmatocystin biosynthesis by a novel regulator in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46340.
- [12] Etxebeste O, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends in Microbiology*, 2010, 18(12): 569–576.
- [13] Yang Y, Liu B, Du XJ, Li P, Liang B, Cheng XZ, Du LC, Huang D, Wang L, Wang S. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8331.
- [14] Atapattu SN, Poole CF. Recent advances in analytical

- methods for the determination of citrinin in food matrices. *Journal of Chromatography A*, 2020, 1627: 461399.
- [13] Hilgarth RS, Lanigan TM. Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction. *MethodsX*, 2020, 7: 100759.
- [14] Holsters M, Waele D, Depicker A, Messens E, Montagu M, Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics MGG*, 1978, 163(2): 181–187.
- [15] 管宏伟, 刘婷婷, 陈磊, 许赣荣, 张薄博. 红曲菌液态发酵产天然黄色素的条件优化. *食品与发酵工业*, 2020, 46(2): 150–156.
Guan HW, Liu TT, Chen L, Xu GR, Zhang BB. Optimization of conditions for producing natural yellow pigment by submerged fermentation of *Monascus* sp.. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(2): 150–156. (in Chinese)
- [16] 熊素玉, 杨丽. 高效液相色谱法及其在应用. *食品安全导刊*, 2017(9): 120.
Xiong SY, Yang L. High performance liquid chromatography and its application. *China Food Safety Magazine*, 2017(9): 120. (in Chinese)
- [17] 何晓娇, 陈璨, 周月婷, 马泽萍, 潘红影, 胡乔月, 蒋冬花. 高产 γ -氨基丁酸低产桔霉素红曲霉 (*Monascus ruber*) 突变子 1047 筛选与发酵特性研究. *微生物学杂志*, 2014, 34(5): 38–43.
He XJ, Chen C, Zhou YT, Ma ZP, Pan HY, Hu QY, Jiang DH. Screening *Monascus ruber* mutant 1047 of higher-yield γ -aminobutyric acid with lower-yield citrinin and its fermentation character. *Journal of Microbiology*, 2014, 34(5): 38–43. (in Chinese)
- [18] Han S, Adams T. Complex control of the developmental regulatory locus *brlA* in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 266(2): 260–270.
- [19] Adams TH, Hide WA, Yager LN, Lee BN. Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology*, 1992, 12(9): 3827–3833.
- [20] Wieser J, Lee BN, Fondon JW, Adams TH. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 1994, 27(1): 62–69.
- [21] Seo JA, Guan YJ, Yu JH. FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics*, 2006, 172(3): 1535–1544.
- [22] Wang FF, Krijgsheld P, Hulsman M, De Bekker C, Müller WH, Reinders M, De Vries RP, Wösten HAB. FluG affects secretion in colonies of *Aspergillus niger*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 107(1): 225–240.
- [23] Mirabito PM, Adams TH, Timberlake WE. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell*, 1989, 57(5): 859–868.
- [24] Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(1): 35–54.
- [25] Han S, Navarro J, Greve RA, Adams TH. Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *The EMBO Journal*, 1993, 12(6): 2449–2457.
- [26] Sewall TC, Mims CW, Timberlake WE. Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (*WetA*) mutant strains. *Developmental Biology*, 1990, 138(2): 499–508.
- [27] Andrianopoulos A, Timberlake WE. The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(4): 2503–2515.
- [28] Marshall MA, Timberlake WE. *Aspergillus nidulans WetA* activates spore-specific gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(1): 55–62.
- [29] Wu MY, Mead ME, Lee MK, Ostrem Loss EM, Kim SC, Rokas A, Yu JH. Systematic dissection of the evolutionarily conserved *WetA* developmental regulator across a genus of filamentous fungi. *mBio*, 2018, 9(4): e01130–e01118.
- [30] Krijgsheld P, Nitsche BM, Post H, Levin AM, Müller WH, Heck AJR, Ram AFJ, Altelaar AFM, Wösten HAB. Deletion of *flbA* results in increased secretome complexity and reduced secretion heterogeneity in colonies of *Aspergillus niger*. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12(4): 1808–1819.
- [31] Van Munster JM, Nitsche BM, Akeroyd M, Dijkhuizen L, Van Der Maarel MJEC, Ram AFJ. Systems approaches to predict the functions of glycoside hydrolases during the life cycle of *Aspergillus niger* using developmental mutants $\Delta brlA$ and $\Delta flbA$. *PLoS*

- One*, 2015, 10(1): e0116269.
- [32] Chang PK, Scharfenstein LL, Mack B, Ehrlich KC. Deletion of the *Aspergillus flavus* orthologue of *A. nidulans fluG* reduces conidiation and promotes production of *Sclerotia* but does not abolish aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7557–7563.
- [33] Yang YS, Li L, Li X, Shao YC, Chen FS. *mrflbA*, encoding a putative FlbA, is involved in aerial hyphal development and secondary metabolite production in *Monascus ruber* M-7. *Fungal Biology*, 2012, 116(2): 225–233.
- [34] Qin YQ, Bao LF, Gao MR, Chen M, Lei YF, Liu GD, Qu YB. *Penicillium decumbens* BrlA extensively regulates secondary metabolism and functionally associates with the expression of cellulase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(24): 10453–10467.
- [35] Tao L, Yu JH. AbaA and WetA govern distinct stages of *Aspergillus fumigatus* development. *Microbiology*, 2011, 157(2): 313–326.
- [36] Shin KS, Yu JH. Expression and activity of catalases is differentially affected by GpaA (Ga) and FlbA (regulator of G protein signaling) in *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, 2013, 41(3): 145–148.
- [37] Shin KS, Kim YH, Yu JH. Proteomic analyses reveal the key roles of BrlA and AbaA in biogenesis of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 463(3): 428–433.