



## 黑曲霉 RAF106 *sakA* 基因的敲除及功能分析

朱韵琦<sup>1,2#</sup>, 周刚<sup>1,2#</sup>, 刘通<sup>1,2</sup>, 王颖思<sup>1</sup>, 李素娟<sup>1</sup>, 彭如群<sup>1</sup>, 彭红<sup>1</sup>, 施庆珊<sup>1</sup>,  
王洁<sup>2\*</sup>, 谢小保<sup>1\*</sup>

1 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室,  
广东 广州 510070

2 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642

朱韵琦, 周刚, 刘通, 王颖思, 李素娟, 彭如群, 彭红, 施庆珊, 王洁, 谢小保. 黑曲霉 RAF106 *sakA* 基因的敲除及功能分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2684-2701.

ZHU Yunqi, ZHOU Gang, LIU Tong, WANG Yingsi, LI Sujuan, PENG Ruqun, PENG Hong, SHI Qingshan, WANG Jie, XIE Xiaobao. Gene knockout reveals the roles of *sakA* in *Aspergillus niger* RAF106[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2684-2701.

**摘要:** 【目的】黑曲霉 (*Aspergillus niger*) *sakA* 基因是应激丝裂原活化蛋白激酶家族 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的重要成员, 然而, 在黑曲霉中, 关于 *SakA* 的分子功能研究很少。本研究通过构建黑曲霉 *sakA* 缺失突变株探究 *SakA* 在黑曲霉中的功能。【方法】以黑曲霉 RAF106 为出发菌株, 通过农杆菌介导法构建突变株  $\Delta sakA$  菌株。监测  $\Delta sakA$  菌株与野生菌株在 3 种不同培养基上生长与产孢情况; 研究  $\Delta sakA$  菌株对不同逆境胁迫的敏感性变化; 测定  $\Delta sakA$  菌株的胞内外淀粉酶、果胶酶和纤维素酶酶活差异; qRT-PCR 分析  $\Delta sakA$  菌株产孢相关基因、淀粉酶相关基因、果胶酶相关基因、纤维素酶相关基因及高渗调节相关基因的相对转录水平。【结果】成功获得 3 株 *sakA* 缺失突变株  $\Delta sakA$  菌株; 发现  $\Delta sakA$  菌株较野生菌株生长缓慢、产孢延迟及分生孢子梗分化延迟;  $\Delta sakA$  菌株在 0.6 mol/L KCl、0.8 mol/L NaCl 和 1.2 mol/L NaCl 胁迫条件下, 菌落生长均比野生型缓慢;  $\Delta sakA$  菌株胞外淀粉酶产量提高 20.68%–21.43%, 胞内淀粉酶产量显著下降 19.18%–20.26%; 胞外果胶酶产量显著下降 36.71%–38.30%, 胞内果胶酶产量显著上升 35.68%–36.53%; 与野生菌株相比,  $\Delta sakA$  菌株胞外纤维素酶产量显著下降

资助项目: 广东省自然科学基金(2023A1515030059, 2023A1515012057); 广东省重点领域研发计划(2022B1111040002, 2020B020226008, 2022B0202040002); 广东省科学院打造综合产业技术创新中心行动资金(2022GDASZH-2022010101)  
This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2023A1515030059, 2023A1515012057), the Research and Development Plan in Key Areas of Guangdong Province (2022B1111040002, 2020B020226008, 2022B0202040002), and the GDAS' Project of Science and Technology Development (2022GDASZH-2022010101).

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Jie, jiewang@scau.edu.cn; XIE Xiaobao, xiexb@gdim.cn

Received: 2024-01-05; Accepted: 2024-03-21; Published online: 2024-03-28

28.04%–33.82%，而胞内纤维素酶产量显著上升 15.28%–18.19%；产孢相关基因(*fluG*、*sfgA*、*flbA*、*flbB*、*flbD*、*laeA*、*brlA*、*abaA*、*vosA*、*stuA* 和 *velB*)的转录水平相较于野生菌株下调 8.53%–90.87%；淀粉酶相关基因(*amyC*、*amyD*、*amyE*、*amyF*、*amyG* 和 *amyH*)及转录因子(*amyR*)下调 8.87%–87.50%，果胶酶相关基因(*aglB*、*lacA*、*pexB*、*pecA*、*pecC*、*pecB*、*endA*、*endC* 和 *poly*)下调 23.23%–84.01%，纤维素酶相关基因(*xlnR*、*chbA*、*chbB* 和 *eglB*)下调 3.75%–81.02%，高渗调节相关基因(*ena1*、*ena2*、*sho1*、*nik1*、*ypd1*、*pkA* 和 *hAD*)下调 5.27%–94.36%。【结论】*sakA* 基因正向调控黑曲霉 RAF106 的产孢能力，是产孢过程中的重要基因，其缺失影响黑曲霉分生孢子的产生；在参与渗透压胁迫应答的同时对淀粉酶、果胶酶与纤维素酶的合成与分泌有重要作用。

关键词：黑曲霉；*sakA* 基因；丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路；产孢；渗透压；代谢

## Gene knockout reveals the roles of *sakA* in *Aspergillus niger* RAF106

ZHU Yunqi<sup>1,2#</sup>, ZHOU Gang<sup>1,2#</sup>, LIU Tong<sup>1,2</sup>, WANG Yingsi<sup>1</sup>, LI Sujuan<sup>1</sup>, PENG Ruqun<sup>1</sup>, PENG Hong<sup>1</sup>, SHI Qingshan<sup>1</sup>, WANG Jie<sup>2\*</sup>, XIE Xiaobao<sup>1\*</sup>

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

2 College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

**Abstract: [Objective]** The protein SakA encoded by *sakA* is a member of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family in *Aspergillus niger*. However, little is known about the roles of SakA in *A. niger*. In this study, we constructed the *A. niger* strains with knockout of *sakA* to investigate the roles of this gene. **[Methods]** The *Agrobacterium*-mediated method was utilized to construct  $\Delta$ *sakA* strains from *A. niger* RAF106 (the wild type, WT). The growth and spore production of  $\Delta$ *sakA* and WT were observed on three different media. The sensitivity of  $\Delta$ *sakA* and WT to different stress conditions was studied. The intracellular and extracellular levels of amylase, pectinase, and cellulase were compared between  $\Delta$ *sakA* and WT. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed to determine the relative transcript levels of the genes associated with spore production, amylase, pectinase, cellulase, and hyperosmotic regulation. **[Results]** Three  $\Delta$ *sakA* strains were successfully obtained and verified by PCR and qRT-PCR. The  $\Delta$ *sakA* strains had slow growth, delayed spore production, and delayed conidiophore differentiation compared with WT. The  $\Delta$ *sakA* strains showcased slower colony growth than WT under the stress conditions of 0.6 mol/L KCl, 0.8 mol/L NaCl, and 1.2 mol/L NaCl. Compared with WT, the knockout of *sakA* increased the extracellular amylase production by 20.68%–21.43% and decreased the intracellular amylase production by 19.18%–20.26%, decreased the extracellular pectinase production by 36.71%–38.30% and increased the intracellular pectinase production by 35.68%–36.53%, decreased the extracellular cellulase production by 28.04%–33.82% and increased the intracellular cellulase production by

15.28%–18.19%. Compared with WT, the knockout of *sakA* down-regulated the transcript levels of spore production-related genes (*fluG*, *sfgA*, *flbA*, *flbB*, *flbD*, *laeA*, *brlA*, *abaA*, *vosA*, *stuA*, and *velB*) by 8.53%–90.87%. Furthermore, it down-regulated the transcript levels of amylase-related genes (*amyC*, *amyD*, *amyE*, *amyF*, *amyG*, and *amyH*) and the transcription factor (*amyR*) by 8.87%–87.50%, the pectinase-related genes (*aglB*, *lacA*, *pexB*, *pecA*, *pecC*, *pecB*, *endA*, *endC*, and *poly*) by 23.23%–84.01%, the cellulase-related genes (*xlnR*, *chbA*, *chbB*, and *eglB*) by 3.75%–81.02%, and the hyperosmotic regulation-related genes (*ena1*, *ena2*, *sho1*, *nik1*, *ypdl*, *pkA*, and *hAD*) by 5.27%–94.36%. **[Conclusion]** The *sakA* gene of *A. niger* positively regulates spore production and is essential for spore production. The knockout of *sakA* affects the spore production of *A. niger*. Furthermore, SakA plays a crucial role in the synthesis and secretion of amylase, pectinase, and cellulase as well as osmotic stress response.

**Keywords:** *Aspergillus niger*; *sakA*; mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway; spore production; osmotic stress; metabolism

真核生物在面对各种外界刺激时, 需要利用一系列的蛋白质信号级联反应及时作出快速响应<sup>[1]</sup>。应激丝裂原活化蛋白激酶家族 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路是真核生物中高度保守的信号级联典型通路之一<sup>[2]</sup>, 可调节真菌从有性生殖到应激反应的众多过程, 是许多丝状真菌调节发育和次级代谢的关键途径, 被广泛研究和利用<sup>[3]</sup>。MAPK 级联的特点是具有三级模块, 由 MAPKKK、MAPKK 和 MAPK 三种蛋白激酶组成; 它将细胞外刺激转化为真核生物的细胞内反应, 3 个蛋白激酶依次进行磷酸化激活, 最终结果是激活不同的转录因子, 启动相应的生物学过程, 从而适应环境的变化<sup>[4]</sup>。

MAPK 信号通路参与真核生物对各种胁迫的响应和发育过程; 通路中相关基因的突变导致病原菌的表型异常、在不同生长条件下的严重损伤、发育和分化的改变, 以及病原菌的毒力降低或丧失<sup>[5]</sup>。Kawasaki 等<sup>[6]</sup>鉴定并报道的 *sakA* 基因为编码应激 MAPK 的家族之一, 其编码的 SakA 蛋白为上游 MAPKK (MAPK 激酶) 家族中的底物<sup>[7]</sup>。Miskei 等<sup>[8]</sup>对构巢曲霉、黄曲霉、黑曲霉、烟曲霉和米曲霉等 8 种曲霉的应

激反应蛋白按应激类型进行了标注和分组, 显示 8 种曲霉均含有与 SakA 直接关联的胁迫信号元件。许多研究也表明<sup>[9–11]</sup>, SakA 及其同源物也在许多真菌中与应激感知和发育或致病性调节有关。SakA 参与了丝状真菌胁迫信号转导和有性发育抑制, 是孢子抗胁迫和存活所必需的<sup>[6]</sup>, 在渗透和氧化胁迫下以及诱导无性孢子形成(分生)后的早期都发生了短暂的磷酸化, 虽然 *sakA* 突变体对渗透胁迫不敏感, 但它们产生的无性孢子逐渐失去生存能力, 对氧化和热休克胁迫敏感; SakA 对分生孢子维持其生存能力和在高浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中存活也是至关重要的<sup>[12]</sup>。然而, SakA 在黑曲霉中的功能研究报道极少。黑曲霉因其代谢系统强大, 广泛应用于生产有机酸和各种酶制剂等, 是工业领域生产中常用的工程微生物之一。研究人员对黑曲霉代谢通路中某个或某些基因的敲除甚至过表达是改造野生型黑曲霉为工业化菌株的常用手段。

本课题组前期从普洱茶中分离到一株能降解黄曲霉毒素 B1 (aflatoxin B1, AFB1) 的黑曲霉 RAF106, 该菌株能合成  $\alpha$ -淀粉酶、纤维素酶、果胶酶、单宁酶和柠檬酸等活性物质, 不产生真菌毒素, 可介导多酚、黄酮类化合物生物转化

而提高生物可利用度和生理活性<sup>[13-15]</sup>, 因而颇具食品加工与工业发酵应用潜力。因此, 本研究以黑曲霉 RAF106 为出发菌株, 利用同源重组技术敲除 *sakA* 基因, 通过分析对比野生株和 *sakA* 突变株之间的多表型变化、各种酶活及表型相关基因的转录表达情况, 以期全面揭示黑曲霉中 *SakA* 的功能, 为进一步探究黑曲霉 MAPK 信号途径基因的功能奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和质粒

黑曲霉(*Aspergillus niger*) RAF106 野生菌株(wide type, WT)由本课题组从普洱茶中自行分离, 并保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 保藏编号为 CGMCC NO. 9608; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  用于质粒的扩增; 根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) AGL-1 用于黑曲霉 RAF106 的遗传转化。

p0380-hygR 为真菌敲除质粒并保存于本实验室, 质粒构建参照文献[16]。

### 1.2 培养基

生长与产孢培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)固体培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0; 察氏(Czapek agar, CZA)固体培养基(g/L): 蔗糖 30.0, NaNO<sub>3</sub> 30.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.0, KCl 5.0, MgSO<sub>4</sub> 5.0, FeSO<sub>4</sub> 0.1, 琼脂 15.0; 萨氏(Sabouraud dextrose agar, SDAY)培养基(g/L): 葡萄糖 40.0, 蛋白胨 10.0, 酵母粉 10.0, 琼脂 15.0。发酵培养基为麦麸-秸秆(WBS)液体培养基(g/L): 秸秆粉 25.0, 麦麸 30.0, 蛋白胨 30.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.6, MgSO<sub>4</sub> 0.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0, CaCl<sub>2</sub> 0.01, ZnCl<sub>2</sub> 0.002, 尿素 0.02, pH 5.0。

### 1.3 主要试剂和仪器

主要试剂: TRIzol<sup>®</sup> Reagent, Invitrogen 公

司; RNase 抑制剂和 *Taq* 酶, Promega 公司; 核酸内切酶, Biolabs 公司; 吐温 80, 天津市大茂化学试剂厂; 潮霉素 HYG 和噻孢霉素, 北京索莱宝科技有限公司; 高保真聚合酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 和 DNA Ligation Kit 连接酶, TaKaRa 公司; ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, Vazyme 公司。

试剂盒: 真菌基因组 DNA 提取试剂盒, BioFlux 公司; 质粒回收和胶回收试剂盒 E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit, Omega 公司; HiScript<sup>®</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, Vazyme 公司; SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

仪器: PCR 扩增仪和荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 酶标仪, 赛默飞世尔科技公司; 生化培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; 生物显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司。

### 1.4 黑曲霉基因组的提取

黑曲霉在 PDA 上 30 °C 培养 5 d, 在平板上加入吐温 80, 刮下孢子, 用自制带棉花滤头过滤制得孢子悬液。将浓度为 10<sup>6</sup> 个/mL 的黑曲霉 RAF106 孢子悬液 100  $\mu$ L 涂布接种于铺有玻璃纸的 PDA 平板上, 30 °C 静置培养 24 h 后, 轻刮平板收集菌丝, 在研钵中加入液氮研磨至粉末, 按照 BioFlux 真菌基因组提取试剂盒提取黑曲霉基因组总 DNA。

### 1.5 *sakA* 基因的克隆及分析

使用 NCBI 数据库进行查询, 在黑曲霉基因组中鉴定了一个 MAP 激酶 *SakA*。用配对引物 *sakA*-F/R (表 1) 从 WT 扩增基因序列, 并送往 Invitrogen 进行测序验证。通过在线 BLAST 对推导的蛋白质序列进行结构分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>), 搜索并下载与 *SakA* 同源性较高的蛋白序列, 随后使用 MEGA 7.0 软件进行系统聚类分析。

表 1 p0380- $\Delta$ sakA 质粒构建和验证所用引物Table 1 Primers for plasmid construction and verification of p0380- $\Delta$ sakA

Primers	Paired sequences (5'→3')	Purpose
sakA-F/R	ATGGCTGAGTTCTTGGCGATC/CTAAATCTGGAGGTACTGCA	Cloning ORF of sakA
5'sakA-F/R	aaaaa <u>CCCGGGG</u> GCCAACAACAAACCACCACG/ aaaaa <u>GGATCCT</u> CTGACTGAAGGGGGAATCG	Cloning sakA 5' (1 892 bp)
3'sakA-F/R	aaaaa <u>CTCGAGCT</u> ATCTGATTACGGATGCTCTG/ aaaaa <u>AGATCT</u> TGGGGAGTATTGGAAGTCTG	Cloning sakA 3' (1 969 bp)
sakA-ID-F/R	GCTTTGCCACCTACAGTTGC/AAACAAAGTCGCCCAAGGAG	PCR detecting sakA
qsakA-F/R	GAGAATTGTGACTTGAAG/ATCTAGTTGAGACATATCC	qPCR detecting sakA gene
q $\beta$ -tubulin-F/R	TCAAGATGTCCTCTACCT/GGAACATAGCAGTGAAT	qPCR detecting $\beta$ -tubulin gene

Underlined regions denote the sites of restriction enzyme for disruption of *sakA* (endonuclease *Xma* I/*Bam* H I and *Xho* I/*Bgl* II) through homogenous recombination of 5' and 3' fragments separated by *hygR* marker and for the expression cassette including the promoter and open reading frame of *hygR* (*Bam* H I/*Xho* I).

### 1.6 sakA 基因缺失突变株的构建

提取黑曲霉 RAF106 总 DNA，使用 5'sakA-F/R 和 3'sakA-F/R (表 1) 以及高保真聚合酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 分别扩增 *sakA* 的上、下游同源臂 *sakA*-F (1 892 bp) 和 *sakA*-R (1 969 bp) 的片段，对扩增产物进行胶回收。分别经 *Xma* I/*Bam* H I、*Xho* I/*Bgl* II 双酶切后用 DNA Ligation Kit 连接酶依次插入 p0380-*hygR* 质粒 *hygR* 两端。经 DH5 $\alpha$  转化、PCR 验证即获得正确的转化子，LB 液体培养基中扩大培养，按照 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒说明书提取质粒。通过酶切验证 *sakA* 缺失突变株的正确性。采用农杆菌介导的真菌转化法<sup>[17]</sup>，将该敲除质粒导入黑曲霉 RAF106 中，在含有噻孢霉素(300  $\mu$ g/mL)和潮霉素(50  $\mu$ g/mL)的 M-100 抗性平板进行筛选，分别使用引物 *sakA*-ID (表 1) 进行 PCR 及 qRT-PCR 鉴定，获得 *sakA* 缺失突变株。构建质粒所用引物见表 1。

### 1.7 sakA 缺失对黑曲霉生长与产孢的影响

将 10<sup>6</sup> 个/mL 的孢子悬液点样 1  $\mu$ L 在 PDA、SDAY 和 CZA 的平板上，在 30  $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h，十字交叉法测量各菌落直径，计算相对

生长抑制率(relative growth inhibition, RGI)，作为评估真菌生长的指标。为了评估  $\Delta$ sakA 菌株产孢能力，将 10<sup>6</sup> 个/mL 孢子悬液均匀涂布于 PDA、SDAY 和 CZA 平板，置于 30  $^{\circ}$ C 下培养 7 d，从第 3 天起用打孔器从各平板上切取直径 5 mm 的菌片于 1.5 mL 离心管中，每管加入 1 mL 0.02% 吐温 80，超声 10 min 洗下孢子，用血球计数板测定各管中孢子浓度，再转换为每板单位面积的产孢量(spores/cm<sup>2</sup>)。使用刀片切取 PDA 平板上培养 3 d 的黑曲霉 RAF106 野生株与  $\Delta$ sakA 菌株的菌丝块，在光学显微镜下观察分生孢子梗形态。

### 1.8 sakA 缺失对黑曲霉逆境胁迫反应的影响

通过将 10<sup>6</sup> 个/mL 的  $\Delta$ sakA 菌株分生孢子悬液点样 1  $\mu$ L 在单独的 PDA (对照) 或添加刚果红(CR: 2 mg/mL、3 mg/mL)、十二烷基硫酸钠(SDS: 0.02%、0.03%)的平板上，评估分生孢子对细胞壁胁迫的敏感度。同时观察菌株在不同胁迫条件下的生长差异，计算相对生长抑制率，不同胁迫条件包含：氯化钾(KCl: 0.6 mol/L)、氯化钠(NaCl: 0.8 mol/L、1.2 mol/L)、氧化剂 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 6 mmol/L、9 mmol/L)、山梨醇

(sorbitol: 0.6、0.8、1.2 mol/L)、甲萘醌(MND: 0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、2.0  $\mu\text{mol/L}$ )。

### 1.9 胞内外淀粉酶、果胶酶和纤维素酶酶活测定

采用 DNS 法测定淀粉酶、果胶酶、纤维素酶活性<sup>[14]</sup>。首先, 将  $10^8$  个/mL 的孢子悬液接种于 WBS, 置于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 下培养 3 d, 取上清液用于胞外酶活测定; 与此同时, 取 WBS 培养基中菌丝于预冷的研钵中, 液氮充分研磨后转移至离心管, 加入 1 mL pH 5.0 的 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液, 振荡 5 min 后于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min 即为胞内酶粗提液, 用于胞内酶活测定。

对于淀粉酶酶活测定, 在 0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲液中加入 0.45 mL 1%可溶性淀粉溶液于刻度管中, 吸取 0.05 mL 发酵上清液混合均匀, 50  $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。对于果胶酶酶活测定, 在 0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲液中加入 0.45 mL 0.5%果胶酶溶液于刻度管中, 吸取 0.05 mL 发酵上清液混合均匀, 50  $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。对于纤维素酶酶活测定, 在 0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲液中加入 0.95 mL 1%羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethylcellulose, CMC-Na)溶液于刻度管中, 吸取 0.05 mL 发酵上清液混合均匀, 50  $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。上述反应液分别加入 0.75 mL DNS 显色液, 将刻度管放在沸水中加热 10 min, 反应停止。空白组中加入 0.05 mL 煮沸灭酶(灭活)的发酵上清液。一个酶活力单位(U)定义为在一定的 pH 条件下, 每分钟水解底物产生 1 mmol 葡萄糖、1 mmol 半乳糖醛酸和 1 mmol 纤维二糖所需的酶量。

### 1.10 RNA 提取及反转录

将  $10^6$  个/mL 的孢子悬液接种于 PDA 和 WSA (加入 2%的琼脂粉到 WBS 中)平板表面的玻璃纸上, 于 30  $^{\circ}\text{C}$ 下培养 1 d 后收获菌丝。

取适量菌丝于液氮预冷的研钵中研磨至粉末, 参照文献[18]的方法提取 RNA。根据反转录试剂盒说明书操作, 反转录反应体系(20  $\mu\text{L}$ ): 5 $\times$ PrimeScript<sup>®</sup> Buffer 4  $\mu\text{L}$ , PrimeScript<sup>®</sup> RT Enzyme Mix I 1  $\mu\text{L}$ , Oligo Dt Primer (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , Random 6 mers (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , RNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , RNase-free ddH<sub>2</sub>O 11  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 即获得野生株的 cDNA。

### 1.11 实时荧光定量 PCR

以  $\beta$ -tubulin 为内参, 通过 qRT-PCR 和配对引物评估 15 个产孢基因、11 个淀粉酶相关基因、9 个果胶酶相关基因、6 个纤维素酶相关基因及 9 个高渗调节相关基因的转录水平, 采用 Livak 阈值循环( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )方法进行相对定量分析, 利用 SPSS Statistics 23 分析不同组间的差异性。实时荧光定量 PCR 所用引物见表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 *sakA* 基因的生物学特征

使用 NCBI 数据库进行查询, 在黑曲霉 RAF106 基因组中定位到单个 *sakA* (基因库登录号: 01755), 保守结构域如图 1A 所示。通过基因组 DNA 和 cDNA 序列, 获得了 8 个内含子, 分别由 55、84、54、69、50、51、69 和 50 个碱基组成, *SakA* 的开放阅读框由 1 191 个碱基组成, 这些碱基编码 396 个氨基酸, 其分子量约为 25.52 kDa, 等电点为 5.00。氨基酸序列比较和系统发育分析显示, 与 *Aspergillus piperis* 的 MAP 激酶 *SakA* 相似性最高(99.64%), 与 *Aspergillus sclerotiiicarbonarius* 的丝裂原活化蛋白激酶 *Mpkc* 相似性最低(72.13%, 图 1B)。将 *SakA* 蛋白进行结构域分析(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)发现, *SakA* 具有丝裂原活化蛋白激酶的保守位点和典型的 ATP 结合位点。ATP 结合位点在保守结构域

表 2 qRT-PCR 所用引物

Table 2 Primers used for qRT-PCR

Tag code	Gene	Annotation	Sequences of paired primers (5'→3')
Gene08183	<i>fluG</i>	Upstream development activator	AAGATTGCTGCTGCTGATA/GTCGTAGGTAATCGTCTCATT
Gene03944	<i>flbA</i>	Upstream development activator	AGCAGCATCTCTACTTCAG/CTCCTTCGCCATCTTCAC
Gene04120	<i>flbC</i>	Upstream development activator	CTACTATTCCGCCTCTGT/GCCATTCTCGTAAGATTCC
Gene06270	<i>flbB</i>	Upstream development activator	CTCTTCCTCCATCTCTA/TCATTCTAGTACGCTTTG
Gene04684	<i>flbD</i>	Upstream development activator	TGGACATGAGACAGCAATAC/AGAGATCGTGGTAGGCATA
Gene02514	<i>flbE</i>	Upstream development activator	TGGTGGATTGTGTATAAC/CTCATCATACCCATCATC
Gene00348	<i>laeA</i>	Developmental repressor	GGACTTGGAGAGAATCAG/AGATGTTGTAAGCGTGTAT
Gene02682	<i>veA</i>	Developmental activator	GTTCTCTTACACTTCTCAT/GAGTTCCAGGTAGTTGTG
Gene00832	<i>sfgA</i>	Developmental repressor	CGAACAACTGCTTATAGTC/GCTGCTTGAATCTCCATC
Gene04565	<i>velB</i>	Developmental repressor; Regulation for conidial maturation	CCTCAGATGAACAATTAC/TAGTAAGGCTGATAATAGG
Gene04761	<i>abaA</i>	Regulation for sterigmata formation	AACATCCTTTCCTTACCT/GTCATCCATCAACTTCAG
Gene04357	<i>wetA</i>	Regulation for conidial maturation	CAGTGTGGATGGCAACAA/CGCTGGACAATGACTCAAG
Gene10505	<i>vosA</i>	Regulation for conidial maturation	ATGTGGATAATACTGATG/ATCTATCTGTGATGATTG
Gene00550	<i>brlA</i>	Initiator for conidiogenesis	AGAACCTTCCGTCTATTATCA/ATGCTCTTGCCCTTGAA
Gene05820	<i>stuA</i>	Modulator for conidiophore formation	ATATGATTAACGGCACAA/CTCACTCTTCAGAATACC
Gene00245	<i>creA</i>	Carbon catabolite repressor	TTCTTCTGATGAGGAGAG/CGGACTAACAACAACCTTT
Gene08487	<i>srgA</i>	Secretion related GTPase	TACTGCTGATTGGTGACT/TAATGAACGACGGAGTGA
Gene08788	<i>amyA</i>	Alpha-amylase	GCGAAGAATATCCTCACAT/CATCCAAATGCTGTTCC
Gene06696	<i>amyC</i>	Alpha-amylase	TCTAATGGTTCGGCTTAT/GTATAGTTGACGCAGTTC
Gene00277	<i>amyD</i>	Alpha-amylase	AACATCTTCTCTGATACATTAGT/GATTGTCCTGGTTGAGTG
Gene11416	<i>amyE</i>	Alpha-amylase	GCTTGTCTCTAACTACTC/TTCTTGACTGTGTCTATAC
Gene08787	<i>amyF</i>	Alpha-amylase	GAAGTGGATTATGTCTGT/ATAAACTCCCTCTGAAAC
Gene07580	<i>amyG</i>	Glucan 1,4-alpha-glucosidase	TCAATCCATCTACTTCCT/ATAATTCCTTGCCAACTT
Gene10420	<i>amyH</i>	Alpha-amylase	GCTTGTCTCTAACTACTC/TTCTTGACTGTGTCTATAC
Gene05110	<i>amyM</i>	Alpha-amylase	TCCATTGTACTACATTCTCA/GCTGATAGACTCGGTAAT
Gene10422	<i>amyR</i>	Transcription regulator of maltose utilization	CAGTAGATGGAATGAATATAGAA/GCTTGACAGAGGTAGAAC
Gene00933	<i>aglB</i>	Alpha-galactosidase	GAGTTGAAGAGTAAGAATT/CACCTCATACTTATCCTT
Gene00399	<i>lacA</i>	Beta-galactosidase	ATTGCCATTATGAACTTGTA/TAGTCGTAGGAGGTGTAT
Gene03324	<i>pexB</i>	Pectinase	ACTCTTCAGCGACTTCCT/GCCTCTAATTGTATTCCATAACG
Gene04089	<i>pecA</i>	Pectinase	GAGACTCTTGACTTGACT/CTTCCATTCCCTGTAACC
Gene08774	<i>pecB</i>	Pectinase	CGTCAAGATCGAGAACAT/CGCAGAGGATGTAGTAATC
Gene06504	<i>pecC</i>	Pectinase	TTGACCTCACTGACCTTA/CTGTCCATTCCCTATAACC
Gene09643	<i>endA</i>	NADH dehydrogenase	AAGACCGTTTATGATGCTA/CGATGACAATACCGTAGT
Gene06504	<i>endC</i>	NADH dehydrogenase	TTGACCTCACTGACCTTA/CTGTCCATTCCCTATAACC

(待续)

(续表 2)

Tag code	Gene	Annotation	Sequences of paired primers (5'→3')
Gene08115	<i>poly</i>	Polymerase	GGCTCTGATACCAATGTTAG/CTACCTCCGTTGCTCTTA
Gene05290	<i>xlnR</i>	Xylanolytic transcriptional activator	CAACTTTCCTTCTTTCAG/ATAATGGAGGCAATATGT
Gene01326	<i>cbhA</i>	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase	AATAATGACAACACAGGTA/GAGATACTATTGGCTTCC
Gene00450	<i>cbhB</i>	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase	ATGTCTTCCTTTCAGATC/GTCTCAGTAGTGAGGTT
Gene08250	<i>eglA</i>	Endoglucanase	GAGCAGAAGACATATAGC/GTGAGATAGTTGAAGAAGT
Gene01363	<i>eglB</i>	Endoglucanase	TATCTCCTTCTATTGCTTCC/ATCGTTCTATCGTCACTAC
Gene11315	<i>eglC</i>	Endoglucanase	TCTCTACACCATGATTCAAG/GAAGTATCCTGGGCAATG
Gene09061	<i>ena1</i>	Sodium P-type ATPase	ATCTGTGCTGTCATTGTC/GTGAAGCGATTCCATAGT
Gene05606	<i>ena2</i>	Sodium P-type ATPase	CTAGTGGAGACGATGAAC/GGAAGGTAGTAGTAGATGATT
Gene03146	<i>ena4</i>	Sodium P-type ATPase	AGGCTATTGCTGCTCTTC/CTTGACACGCTTGTAAC
Gene11257	<i>sho1</i>	High osmolarity signaling protein	TTACAACAATCTCCATCA/CCGAAGTAGAATATCCAA
Gene01120	<i>fhlA</i>	Sensor histidine kinase/response regulator	CACACCAACATCAACATC/CCTTCTCCATATCATCCAA
Gene03514	<i>nik1</i>	Two-component response regulator	TGAACGGTAATACGATAG/TTGCTTCCATACTAACAT
Gene10443	<i>ypd1</i>	Phosphotransmitter protein	ACGATAGCGACAGAGATT/AAGCATCCTCCATCTTGA
Gene09867	<i>pkA</i>	CAMP-dependent protein kinase subunit	CAGCAACTTCTCTTCTC/GATAGGCTTCTCCACCAG
Gene02843	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	Internal standard	TCAAGATGTCCTCTACCT/GGAACATAGCAGTGAAGT

STKc\_Sty1\_Hog1 上, 构成此保守特征的 22 个残基中有 22 个序列已被查询(附图 1A, 数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDCX0000265)。通过与蛋白激酶的保守性比对分析(附图 1B, 数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0000265), 发现 SakA 蛋白具有 PKC 蛋白激酶超家族(NCBI 登录号为 c121453)。蛋白激酶超家族主要由丝氨酸/苏氨酸特异性和酪氨酸特异性蛋白激酶的催化结构域组成, 它还包括 RIO 激酶, 即非典型丝氨酸蛋白激酶、氨基糖苷磷酸转移酶和胆碱激酶<sup>[19]</sup>。这些蛋白质催化  $\gamma$ -磷酸基团从 ATP 转移到特定底物(如蛋白质的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基)中的羟基; 丝裂原活化蛋白激酶通过磷酸化途径在真菌逆境胁迫响应中发挥重要作用<sup>[20]</sup>, 因

此推测 SakA 可能与发育过程中逆境胁迫响应有关。

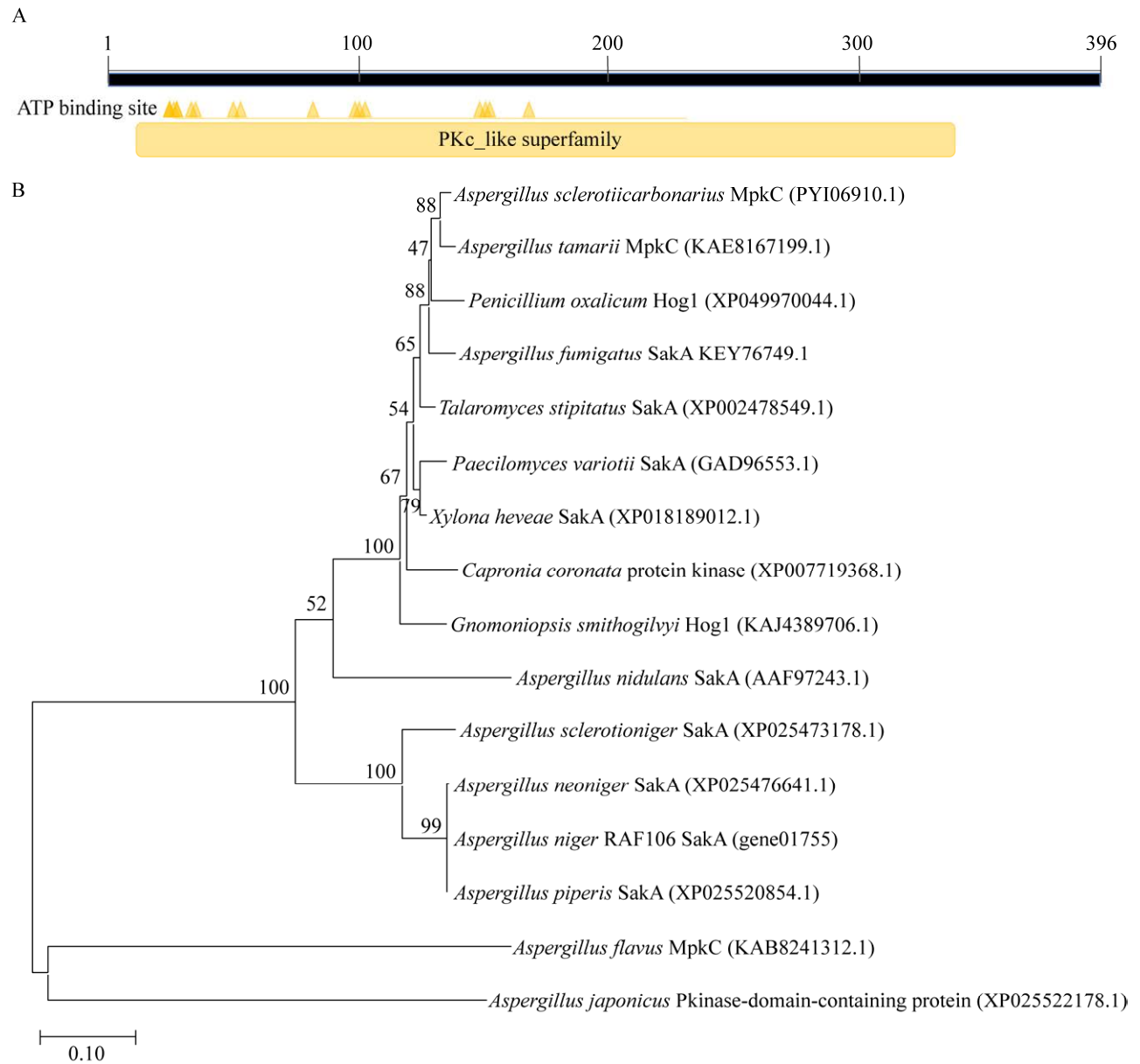
## 2.2 *sakA* 敲除质粒的构建及转化子筛选

利用同源重组的方法, 以潮霉素的抗性基因 *hygR* 表达元件替换 *sakA* 基因中的部分序列(图 2A)。如图 2B 所示, 通过 PCR 鉴定, 获得 3 株 *sakA* 缺失突变株( $\Delta sakA$ )。qRT-PCR 结果(图 2C)显示, 在 3 株突变株中未检测到 *sakA* 的表达, 进一步表明突变体中的 *sakA* 基因已被敲除。

## 2.3 *sakA* 缺失影响黑曲霉的生长及产孢

在 PDA、SDAY 和 CZA 平板上培养 24 h 后, 所有  $\Delta sakA$  菌株的菌落直径与野生型相比无明显差异(图 3A)。然而, *sakA* 缺失后生长缓慢导致黑曲霉 RAF106 分生孢子产量降低, 孢子





**图 1** 黑曲霉 SakA 的结构特征及系统发育分析

Figure 1 Structural features and phylogenetic analysis of SakA in *Aspergillus niger*. A: The conserved domains of SakA. B: Phylogenetic tree constructed for SakA in *A. niger* and other fungal MAP kinases in the NCBI database (accession codes given in parentheses) using a neighbor-joining method. Scale bar: Branch length proportional to genetic distance.

梗发育迟缓。与野生菌株相比， $\Delta sakA$  菌株在第 3-7 天的平均孢子量在 PDA 平板上分别减少 87.50%、66.80%、51.03%、38.86%和 40.68% (图 3B)，在 SDAY 平板上分别减少 57.77%、

73.77%、56.35%、49.68%和 31.64% (图 3C)，在 CZA 平板上分别减少 90.38%、84.38%、73.68%、75.96%和 62.72% (图 3D)。通过光学显微镜观察野生株与  $\Delta sakA$  菌株分生孢子梗发现：黑曲霉

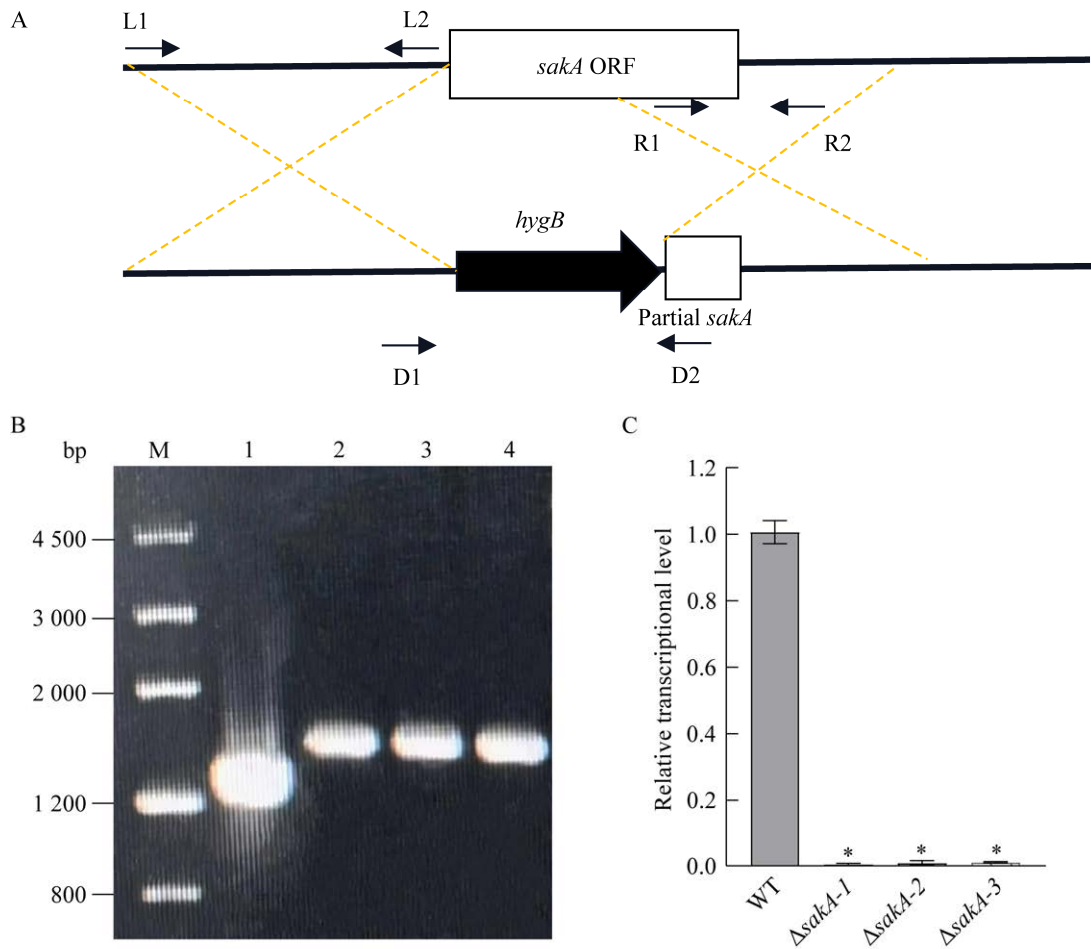


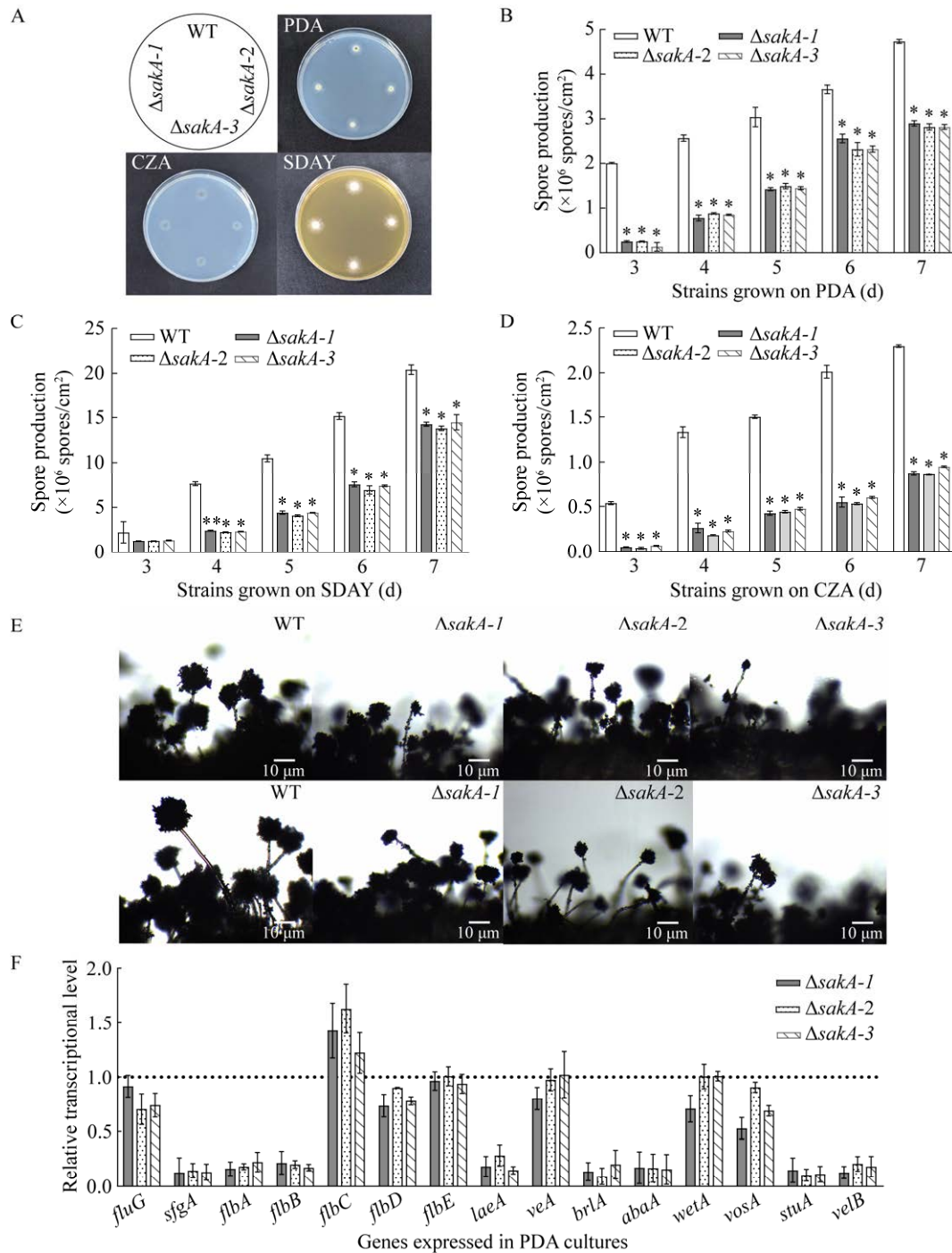
图 2 *sakA* 敲除示意图及阳性转化子的验证

Figure 2 Construction of *sakA* knockout and validation of positive transformants. A: Diagram for the disruption of *sakA*. L1/L2 and R1/R2: Paired primers used for cloning the 5' and 3' regions of *sakA*, respectively. D1/D2: Paired primers used for PCR detection of disrupted target gene. B: Identifying the disruption of *sakA* by PCR. M: DNA marker; Lane 1, 2, 3, and 4: WT, disruption mutant 1, disruption mutant 2, and disruption mutant 3, respectively. C: Identifying the disruption of *sakA* by qRT-PCR. Asterisked bars in each bar group differ significantly from those unmarked (Tukey's HSD,  $P < 0.05$ ). Error bars: SDs from three replicates.

RAF106 野生株分生孢子梗分化完全, 顶端膨大, 孢子囊呈圆形, 而  $\Delta sakA$  菌株的分生孢子梗分化延迟, 孢子囊形态有变形(图 3E)。

鉴于黑曲霉 *sakA* 基因可能在响应生长与产孢调控过程中发挥作用, 采用 qRT-PCR 反应测得 WT 与  $\Delta sakA$  菌株产孢基因的表达水平。通过测定黑曲霉中 15 个产孢相关基因的转录水

平发现, 它们在  $\Delta sakA$  菌株中有不同程度的上调或下调(图 3F),  $\Delta sakA$  菌株表现严重产孢缺陷, 产孢相关基因(*fluG*、*sfgA*、*flbA*、*flbB*、*flbD*、*laeA*、*brlA*、*abaA*、*vosA*、*stuA* 和 *velB*)的转录水平下调 8.53%–90.87%, 仅 *flbC* 产孢基因有所上调。产孢相关基因转录水平的下调显然是其表现产孢缺陷的重要原因。



**图 3 SakA 在黑曲霉生长发育中的作用**

Figure 3 Roles of SakA in the asexual development of *Aspergillus niger*. A: Images of fungal colonies after two-day growth on PDA, SDAY, and CZA plates at 30 °C. B–D: Conidial yields during the period of incubation on PDA, SDAY, and CZA plates at 30 °C, respectively. E: Images of formed conidiophores during incubation for 3 days on PDA at 30 °C. F: Relative transcript levels of conidiation-associated genes in  $\Delta sakA$  strains versus WT. All cDNA samples were derived from one-day old hyphal cells incubated on PDA plates and analyzed *via* qRT-PCR. The dashed line represents the transcriptional levels of genes in the WT. Asterisk bars in each bar group differ significantly from those unmarked (Tukey's HSD,  $P < 0.05$ ). Error bars: SDs from three replicates.

## 2.4 *sakA* 基因对黑曲霉逆境胁迫反应的影响

为了探究 *SakA* 是否参与到黑曲霉对外界环境胁迫应答反应, 分析了  $\Delta sakA$  菌株在不同胁迫条件下的生长情况(图 4A)。在 0.6 mol/L KCl、0.8 mol/L NaCl 和 1.2 mol/L NaCl 的胁迫

条件下,  $\Delta sakA$  菌株菌落生长均较野生型缓慢, 与 WT 相比,  $\Delta sakA$  菌株生长平均抑制率分别为 12.46%、16.09%和 55.35%。相比渗透压胁迫剂, 在 0.8 mol/L sorbitol、0.02% SDS、0.03% SDS、6 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 9 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫条件下,

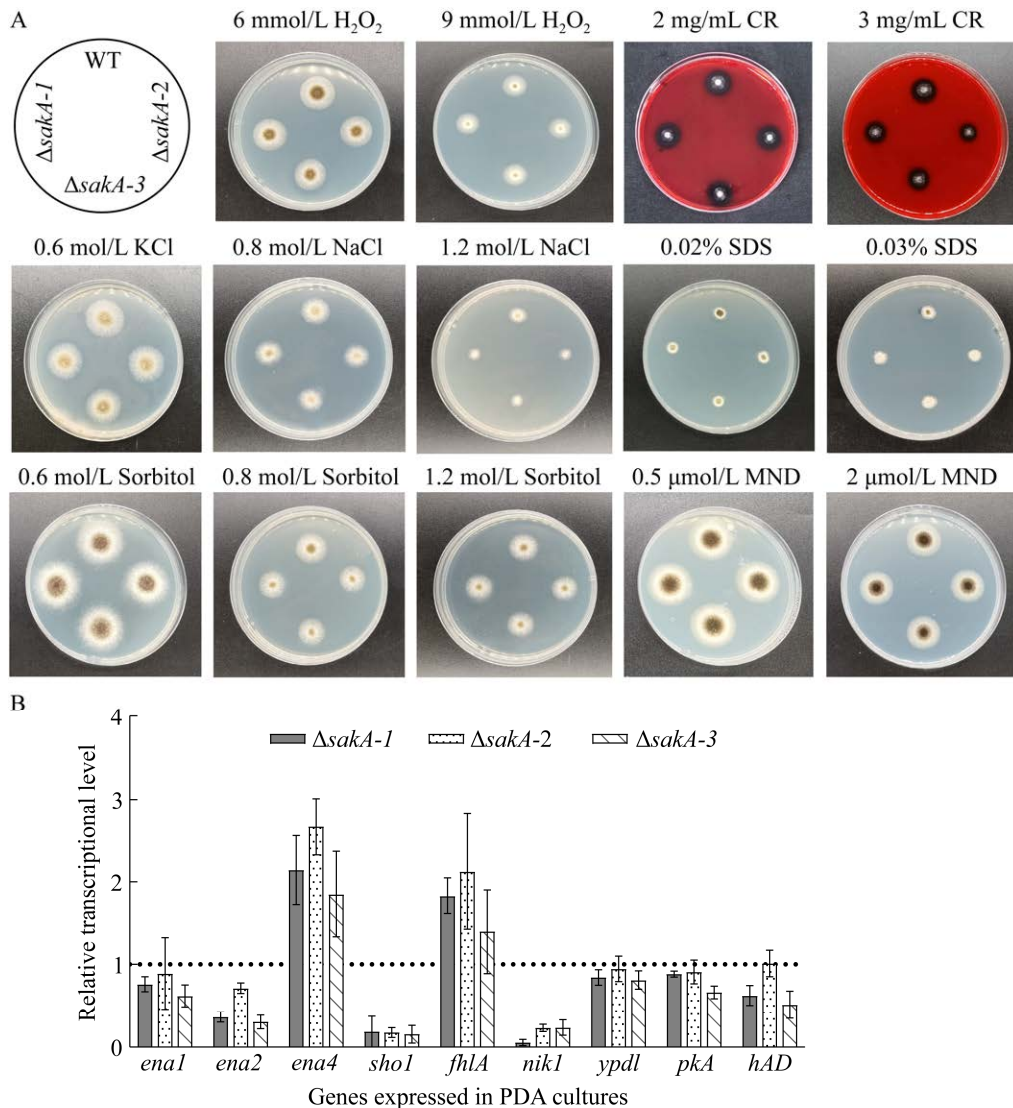


图 4 WT 和  $\Delta sakA$  菌株在不同胁迫条件下的生长情况

Figure 4 Growth of WT and  $\Delta sakA$  strains under different stress conditions. A: Images of fungal colonies after two-day growth on PDA and PDA supplemented with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mmol/L and 9 mmol/L), KCl (0.6 mol/L), NaCl (0.8 mol/L and 1.2 mol/L), sorbitol (0.6, 0.8 and 1.2 mol/L), Congo red (2 mg/mL and 3 mg/mL), SDS (0.02% and 0.03%), MND (0.5 μmol/L and 2 μmol/L) at 30 °C. B: Relative transcript levels of osmotic-associated genes in  $\Delta sakA$  strains versus WT. All cDNA samples were derived from one-day old hyphal cells incubated on PDA plates and analyzed via qRT-PCR.

WT 与突变株的相对生长抑制率较小，但是  $\Delta sakA$  菌株产孢量明显变少。以上结果表明，黑曲霉中 *sakA* 的缺失导致了菌株对渗透压更加敏感。与野生株相比， $\Delta sakA$  菌株在 0.6 mol/L sorbitol、1.2 mol/L sorbitol、0.5  $\mu\text{mol/L}$  MND、2  $\mu\text{mol/L}$  MND、2 mg/mL CR 和 3 mg/mL CR 胁迫条件下无差异。为分析 SakA 对黑曲霉抗渗透胁迫能力的影响，检测了突变株中 9 个高渗透调节相关基因的表达(图 4B)。除 *ena4* 和 *fhlA* 外，*ena1*、*ena2*、*sho1*、*nik1*、*ypdl*、*pkA* 和 *hAD* 平均表达量均低于野生型。

## 2.5 *sakA* 缺失影响淀粉酶、果胶酶与纤维素酶的合成与分泌

*sakA* 基因缺失影响了黑曲霉 RAF106 在常温条件下淀粉酶、果胶酶与纤维素酶的合成与分泌。与野生菌株相比， $\Delta sakA$  菌株胞外淀粉酶产量上升 20.68%–21.43% (图 5A)，胞内淀粉酶产量显著下降 19.18%–20.26% (图 5B)，这表明 *sakA* 基因缺失影响了黑曲霉在常温条件下淀粉酶的合成。 $\Delta sakA$  菌株胞外果胶酶产量显著下降 36.71%–38.30% (图 5C)，胞内果胶酶产量显著上升 35.68%–36.53% (图 5D)，这表明 *sakA*

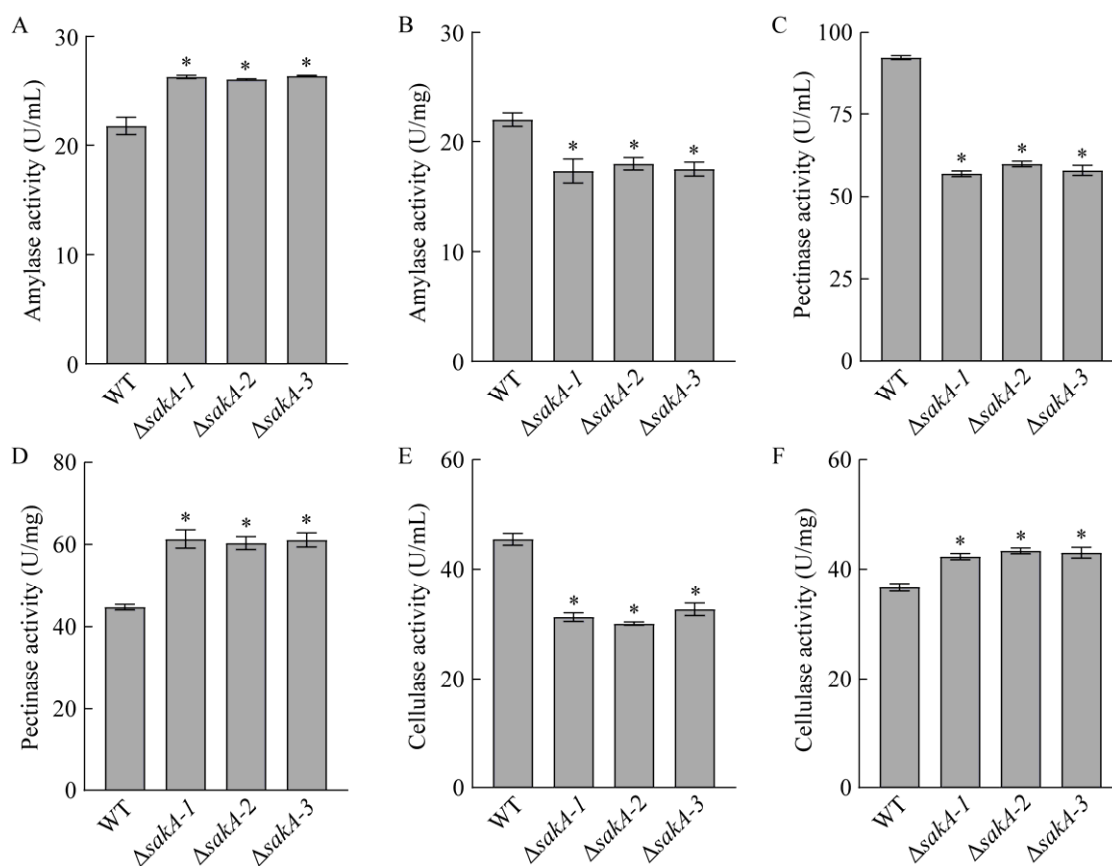


图 5 WT 和  $\Delta sakA$  菌株胞内外淀粉酶、果胶酶和纤维素酶酶活测定

Figure 5 Intracellular and extracellular amylase, pectinase, and cellulase activity assays for WT and  $\Delta sakA$  strains. The deletion of *sakA* affects the extracellular and intracellular productuin of amylases, pectinases, cellulases when the suspension of conidia from the WT and  $\Delta sakA$  strains were incubated in WBS with shaking at 30 °C for three days. A–B: Amylase. C–D: Pectinase. E–F: Cellulase. Asterisked bars in each bar group differ significantly from those unmarked (Tukey’s HSD,  $P < 0.05$ ). Error bars: SDs from three replicates.

基因缺失影响了黑曲霉果胶酶的分泌。与野生菌株相比,在 30 °C 下  $\Delta sakA$  菌株胞外纤维素酶产量显著下降 28.04%–33.82% (图 5E),胞内纤维素酶产量显著上升 15.28%–18.19% (图 5F)。

## 2.6 淀粉酶、果胶酶与纤维素酶相关基因的转录水平分析

通过测定黑曲霉中 11 个淀粉酶、9 个果胶酶与 6 个纤维素酶相关基因的转录水平。在  $sakA$  缺失突变株中,淀粉酶相关基因 *amyC*、*amyD*、*amyE*、*amyF*、*amyG*、*amyH* 及转录因子 *amyR* 下调 8.87%–87.50% (图 6A),果胶酶相关基因 *aglB*、*lacA*、*pexB*、*pecA*、*pecC*、*pecB*、*endA*、*endC*、*poly* 下调 23.23%–84.01% (图 6B),纤维素酶相关基因 *xlnR*、*chbA*、*chbB*、*eglB* 下调 3.75%–81.02% (图 6C)。从图 6 可以看到突变株的淀粉酶、果胶酶与纤维素酶的相关基因比野生菌株的表达量低,这可能是淀粉酶、果胶酶与纤维素酶产量降低的主要原因。

## 3 讨论与结论

高渗透压甘油途径(high osmolarity glycerol pathway, HOGP)中的激酶 MAPK 是一种丝裂原活化的蛋白激酶,已在多种真菌物种中得到鉴定,它能够调节多种细胞过程,如渗透适应等<sup>[21–22]</sup>。*sakA* 是 Hog1-MAPK 信号通路中的核心基因,对它的研究主要集中在构巢曲霉与烟曲霉中,而在黑曲霉中鲜有报道。*SakA* 在构巢曲霉中被报道为反应调节器、响应氧化或渗透应激信号<sup>[23]</sup>。在马尔尼菲青霉(*Penicillium marneffe*)这种致病性真菌中,*sakA* 基因不仅参与氧化和热应激反应,而且对分生孢子的形成发挥重要作用<sup>[24]</sup>。本研究对  $\Delta sakA$  菌株在 3 种不同培养基下生长和产孢情况与野生菌株进行比较,同时分析产孢关键基因的转录水平。从表型上看, $\Delta sakA$  菌株菌落直径与野生型相比无明显差异,但是产

孢量明显下降。通过测定 3–7 d 在 PDA、SDAY 和 CZA 平板上的孢子量,发现  $\Delta sakA$  菌株产孢量均明显降低,显微镜下观察到孢子囊变小且孢子梗分化延迟。在构巢曲霉中 *sakA/atfA* 基因敲除后同样会导致菌株生长迟缓且分生孢子形成受到抑制<sup>[23]</sup>,同时,*sakA* 基因也是烟曲霉生长所必需的因子<sup>[25]</sup>。通过 qRT-PCR 分析发现,黑曲霉  $\Delta sakA$  菌株中 *sfgA*、*flbA*、*laeA*、*brlA*、*abaA*、*stuA* 和 *velB* 基因的表达量明显下调,这与 *sakA* 基因的缺失导致马尔尼菲青霉产孢数量减少,且 *abaA*、*wetA* 等基因的转录受抑制结果相似,但 *brlA* 基因的调控并无显著性变化<sup>[24]</sup>。黑曲霉中 *abaA*、*wetA* 和 *brlA* 基因是产孢调控的核心调节因子,组成了主要的产孢调控途径;这 3 个基因协同调节多个基因的表达,在孢子形成过程中起着重要的作用<sup>[25–26]</sup>。黑曲霉  $\Delta sakA$  菌株中 *sfgA*、*flbA*、*flbB*、*laeA*、*brlA*、*abaA*、*stuA* 和 *velB* 基因的表达量明显下调 90%左右,由此我们推测 *sakA* 基因直接调控 *abaA* 和 *brlA* 产孢核心调节基因,从而影响下游基因的表达。

真菌利用与 MAP 激酶模块偶联的磷酸化系统来感知和处理环境信号,*SakA* 信号在不同类型曲霉的应激反应中有重要作用<sup>[8]</sup>。在烟曲霉中,向培养基中添加  $H_2O_2$ 、甲萘醌或 SDS 时,*sakA* 缺失突变株生长抑制率增加<sup>[27]</sup>。在我们的研究中,0.8 mol/L sorbitol、0.02% SDS、0.03% SDS、6 mmol/L  $H_2O_2$  和 9 mmol/L  $H_2O_2$  胁迫条件下,相对生长抑制率较小。*sakA* 缺失突变株对  $H_2O_2$ 、甲萘醌或 SDS 不敏感。我们的研究发现, $\Delta sakA$  菌株在渗透压胁迫剂 0.6 mol/L KCl、0.8 mol/L NaCl 与 1.2 mol/L NaCl 的胁迫条件下,较野生株生长缓慢,对渗透压敏感,揭示 *sakA* 基因在黑曲霉抵抗外界胁迫中有着重要的作用。通过 qRT-PCR 分析发现,其中 *sho1* 与 *nik1* 响应稳压调节的基因下调 82.66%与 82.51%

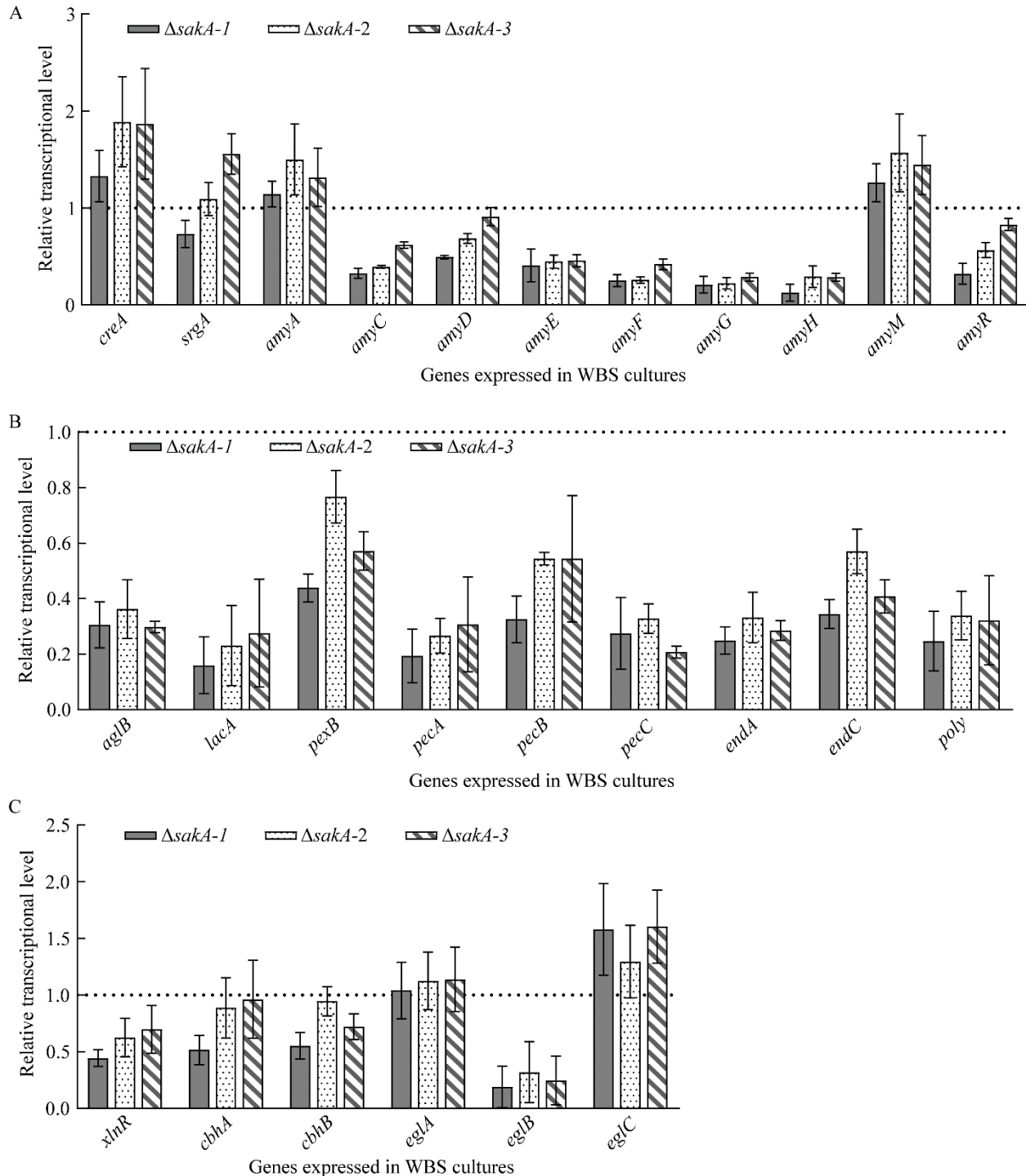


图 6  $\Delta saka$  菌株淀粉酶、果胶酶和纤维素酶相关基因的相对转录水平

Figure 6 Relative transcription levels of amylase, pectinase, and cellulase-related genes of  $\Delta saka$  strains. Relative transcript levels of genes involved in the synthesis of amylase, pectinase, cellulase in  $\Delta saka$  strains versus WT. A: Amylase. B: Pectinase. C: Cellulase. All cDNA samples were derived from 3-day-old hyphal cells incubated on WBS media and analyzed via qRT-PCR.

左右,这可能是导致 *sakA* 缺失突变体对渗透压敏感的原因<sup>[28-29]</sup>。

真菌具有适应环境不同渗透压的能力,从而引起酶系的变化<sup>[30-31]</sup>。在本研究中,与野生菌株相比,  $\Delta sakA$  菌株胞外淀粉酶产量上升,胞内淀粉酶产量显著下降,影响了黑曲霉淀粉酶的合成。果胶酶与纤维素酶结果相反,胞外酶产量显著下降,胞内酶产量上升,基因缺失影响了黑曲霉果胶酶与纤维素酶的分泌。通过 qRT-PCR 分析发现,黑曲霉  $\Delta sakA$  菌株中淀粉酶转录因子 *amyR* 及 6 个  $\alpha$ -淀粉酶基因转录下调,减少了调控水解淀粉的过程<sup>[32]</sup>,这可能是引起胞内淀粉酶酶活下降的主要原因,CreA 是黑曲霉碳源阻遏效应中的负调控因子,胞外淀粉酶产量上升可能与 *CreA* 基因表达量上调有关<sup>[33-34]</sup>;值得关注的是,9 个果胶酶相关基因均下调,这可能是引起胞外果胶酶活性变化的主要原因<sup>[35-36]</sup>,1999 年 Benen 等报道 *endA*、*endC* 为半乳糖醛酸酶,参与果胶分解,是果胶分解酶,胞内果胶酶酶活上升可能与 *endA*、*endC* 基因表达量下降有关<sup>[37-38]</sup>。*XlnR* 为纤维素酶分解的转录激活剂<sup>[39]</sup>, $\Delta sakA$  菌株胞外纤维素酶酶活较野生株有显著差异,这可能是由于 *xlnR* 基因表达量降低 41%所致。然而, $\Delta sakA$  菌株中 *eglA*、*eglC* 转录表达量上升,可能引起各种冗余机制<sup>[40-41]</sup>,从而阻止胞内纤维素酶的分解。不仅如此,测定  $\Delta sakA$  菌株生长与产孢能力时发现其分生孢子梗分化延迟,孢子囊形态有变形,说明菌株的生长代谢受到影响,导致内容物合成与分泌异常。

综上所述,本研究通过基因敲除技术证实 *sakA* 基因参与调控黑曲霉的生长与产孢,是影响黑曲霉产孢的关键基因;揭示了 *SakA* 在抵御环境渗透应激反应中发挥重要的调控作用;同时,*SakA* 还参与调控淀粉酶、果胶酶与纤维

素酶的合成与分泌。研究结果为进一步明确 *SakA* 在黑曲霉生长发育、逆境胁迫反应的生理功能奠定了基础。

## 参考文献

- [1] DHANASEKARAN DN, KASHEF K, LEE CM, XU H, REDDY EP. Scaffold proteins of MAP-kinase modules[J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3185-3202.
- [2] RISPAIL N, SOANES DM, ANT C, CZAJKOWSKI R, GRÜNLER A, HUGUET R, PEREZ-NADALES E, POLI A, SARTOREL E, VALIANTE V, YANG M, BEFFA R, BRAKHAGE AA, GOW NA, KAHMANN R, LEBRUN MH, LENASI H, PEREZ-MARTIN J, TALBOT NJ, WENDLAND J, et al. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(4): 287-298.
- [3] FRAWLEY D, KARAHODA B, SARIKAYA BAYRAM Ö, BAYRAM Ö. The HamE scaffold positively regulates MpkB phosphorylation to promote development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 16588.
- [4] ALONSO-MONGE R, ROMÁN E, ARANA DM, PLA J, NOMBELA C. Fungi sensing environmental stress[J]. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2009, 15(suppl 1): 17-19.
- [5] MARTÍNEZ-SOTO D, RUIZ-HERRERA J. Functional analysis of the MAPK pathways in fungi[J]. *Revista Iberoamericana De Micología*, 2017, 34(4): 192-202.
- [6] KAWASAKI L, SÁNCHEZ O, SHIOZAKI K, AGUIRRE J. *SakA* MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(4): 1153-1163.
- [7] FURUKAWA K, HOSHI Y, MAEDA T, NAKAJIMA T, ABE K. *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(5): 1246-1261.
- [8] MISKEI M, KARÁNYI Z, PÓCSI I. Annotation of stress-response proteins in the *Aspergilli*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(suppl 1): S105-S120.
- [9] ESQUIVEL-NARANJO EU, GARCÍA-ESQUIVEL M,



- MEDINA-CASTELLANOS E, CORREA-PÉREZ VA, PARRA-ARRIAGA JL, LANDEROS-JAIME F, CERVANTES-CHÁVEZ JA, HERRERA-ESTRELLA A. A *Trichoderma atroviride* stress-activated MAPK pathway integrates stress and light signals[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 100(5): 860-876.
- [10] LAMB TM, FINCH KE, BELL-PEDERSEN D. The *Neurospora crassa* OS MAPK pathway-activated transcription factor ASL-1 contributes to circadian rhythms in pathway responsive clock-controlled genes[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2012, 49(2): 180-188.
- [11] NIMMANEE P, WOO PCY, KUMMASOOK A, VANITTANAKOM N. Characterization of *sakA* gene from pathogenic dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2015, 305(1): 65-74.
- [12] GARRIDO-BAZÁN V, JAIMES-ARROYO R, SÁNCHEZ O, LARA-ROJAS F, AGUIRRE J. Saka and MpkC stress MAPKs show opposite and common functions during stress responses and development in *Aspergillus nidulans*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2518.
- [13] FANG QA, DU MR, CHEN JW, LIU T, ZHENG Y, LIAO ZL, ZHONG QP, WANG L, FANG X, WANG J. Degradation and detoxification of aflatoxin B1 by tea-derived *Aspergillus niger* RAF106[J]. *Toxins*, 2020, 12(12): 777.
- [14] LIU T, WANG J, DU MR, WANG YS, FANG X, PENG H, SHI QS, XIE XB, ZHOU G. The interplays between epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and *Aspergillus niger* RAF106 based on metabolism[J]. *Fungal Biology*, 2022, 126(11/12): 727-737.
- [15] LIU T, ZHOU G, DU MR, ZHANG X, ZHOU SY, CHEN GJ, LIAO ZL, ZHONG QP, WANG L, XU XY, FANG X, WANG J. The interplay between (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and *Aspergillus niger* RAF106, an EGCG-biotransforming fungus derived from Pu-erh tea[J]. *LWT*, 2023, 180: 114678.
- [16] ZHU YQ, LIU T, WANG YS, CHEN GJ, FANG X, ZHOU G, WANG J. ChsA, a class II chitin synthase, contributes to asexual conidiation, mycelial morphology, cell wall integrity, and the production of enzymes and organic acids in *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(8): 801.
- [17] FANG WG, ZHANG YJ, YANG XY, ZHENG XL, DUAN H, LI Y, PEI Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2004, 85(1): 18-24.
- [18] WANG J, CHEN JW, HU Y, YING SH, FENG MG. Roles of six *Hsp70* genes in virulence, cell wall integrity, antioxidant activity and multiple stress tolerance of *Beauveria bassiana*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2020, 144: 103437.
- [19] SCHWARTZ MA, MADHANI HD. Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38: 725-748.
- [20] SAITO H, TATEBAYASHI K. Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2004, 136(3): 267-272.
- [21] JIANG C, ZHANG X, LIU HQ, XU JR. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant pathogenic fungi[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(3): e1006875.
- [22] 马艳玲, 黎铭轩, 王梓祈, 廖兰, 郑永权, 刘阳. 环境胁迫下 HOG-MAPK 途径对真菌毒素形成的调控机制[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(7): 2433-2446.
- MA YL, LI MX, WANG ZQ, LIAO L, ZHENG YQ, LIU Y. Mechanism of HOG-MAPK pathway in regulating mycotoxins formation under environmental stresses[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(7): 2433-2446 (in Chinese).
- [23] LARA-ROJAS F, SÁNCHEZ O, KAWASAKI L, AGUIRRE J. *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK Saka to regulate general stress responses, development and spore functions[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 80(2): 436-454.
- [24] NIMMANEE P, TAM EWT, WOO PCY, VANITTANAKOM P, VANITTANAKOM N. Role of the *Talaromyces marneffeii* (*Penicillium marneffeii*) *sakA* gene in nitrosative stress response, conidiation and red pigment production[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2017, 364(8): fnw292.
- [25] YU JH. Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*[J]. *Mycobiology*, 2010, 38(4): 229-237.
- [26] CHO HJ, SON SH, CHEN WP, SON YE, LEE I, YU JH, PARK HS. Regulation of conidiogenesis in *Aspergillus flavus*[J]. *Cells*, 2022, 11(18): 2796.
- [27] DU C, SARFATI J, LATGE JP, CALDERONE R. The role of the *sakA* (*Hog1*) and *tc5B* (*sln1*) genes in the oxidant adaptation of *Aspergillus fumigatus*[J]. *Medical Mycology*, 2006, 44(3): 211-218.
- [28] MA D, LI R. Current understanding of HOG-MAPK

- pathway in *Aspergillus fumigatus*[J]. Mycopathologia, 2013, 175(1/2): 13-23.
- [29] HAGIWARA D, TAKAHASHI-NAKAGUCH A, TOYOTOME T, YOSHIMI A, ABE K, KAMEI K, GONOI T, KAWAMOTO S. Nika/TcsC histidine kinase is involved in conidiation, hyphal morphology, and responses to osmotic stress and antifungal chemicals in *Aspergillus fumigatus*[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e80881.
- [30] FIEDUREK J. Effect of osmotic stress on glucose oxidase production and secretion by *Aspergillus niger*[J]. Journal of Basic Microbiology, 1998, 38(2): 107-112.
- [31] FIEDUREK J. Production of *Aspergillus niger* catalase under various stress conditions[J]. Acta Microbiologica Polonica, 2000, 49(1): 43-49.
- [32] AN X, DING CJ, ZHANG H, LIU TQ, LI J. Overexpression of *amyA* and *glaA* substantially increases glucoamylase activity in *Aspergillus niger*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2019, 51(6): 638-644.
- [33] PI CY, ZHANG Z, XIANG BY, TIAN HW, LIAO QZ, CHEN Y, XIA LQ, HU YB, HU SB. Constructing a novel expression system by specific activation of amylase expression pathway in *Penicillium*[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 155.
- [34] NAKAMURA T, MAEDA Y, TANOUE N, MAKITA T, KATO M, KOBAYASHI T. Expression profile of amylolytic genes in *Aspergillus nidulans*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(10): 2363-2370.
- [35] de VRIES RP, van den BROECK HC, DEKKERS E, MANZANARES P, de GRAAFF LH, VISSER J. Differential expression of three alpha-galactosidase genes and a single beta-galactosidase gene from *Aspergillus niger*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2453-2460.
- [36] WHITEHEAD MP, SHIEH MT, CLEVELAND TE, CARY JW, DEAN RA. Isolation and characterization of polygalacturonase genes (*pecA* and *pecB*) from *Aspergillus flavus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(9): 3316-3322.
- [37] BENEN JA, KESTER HC, VISSER J. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C[J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 259(3): 577-585.
- [38] NAZIR Z, CHOCHAN R, MAHMOOD MS, REHMAN HM, GUL R, SALEEM M. Molecular cloning and characterization of an acidic polygalacturonase from grapes and its potential in industry[J]. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, 2020, 30(5): 411-425.
- [39] STRICKER AR, MACH RL, de GRAAFF LH. Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(2): 211-220.
- [40] HASPER AA, DEKKERS E, van MIL M, van de VONDERVOORT PJI, de GRAAFF LH. EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1556-1560.
- [41] XING S, LI GL, SUN XL, MA S, CHEN GJ, WANG LS, GAO PJ. Dynamic changes in xylanases and  $\beta$ -1,4-endoglucanases secreted by *Aspergillus niger* An-76 in response to hydrolysates of lignocellulose polysaccharide[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(4): 832-846.