



论文

Chaetomium globosum PKS 编码基因 *pks-1* 参与球毛壳甲菌素、黑色素和孢子形成

胡阳, 郝晓冉, 娄静, 张萍, 潘皎, 朱旭东*

南开大学生命科学学院微生物系, 天津 300071

* 联系人, E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

收稿日期: 2012-08-28; 接受日期: 2012-09-17

国家自然科学基金(批准号: 30970084)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB707801)资助项目

摘要 球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)是自然界中分布最广泛的真菌之一, 因产生球毛壳菌素(chaetoglobosins)而被人们所熟知. 然而, 该真菌球毛壳菌素合成的分子机制尚不清楚. 本研究利用 RNAi 技术证实 *C. globosum* 的一个聚酮合酶(polyketide synthase)基因 *pks-1* 参与 chaetoglobosin A 合成. RNA 干扰 *pks-1* 后, chaetoglobosin A 的产量明显下降, 同时沉默转化子的黑色素合成降低、菌丝变白, 表明两种聚酮类化合物——黑色素和 chaetoglobosin A, 可能共有相同合成步骤. 实验还发现 *pks-1* 在孢子生成过程中也起着重要的作用, *pks-1* 基因沉默转化子失去了产孢的能力, 聚酮类化合物可能通过未知过程调控孢子生成. *C. globosum* 的 *pks-1* 基因的多重作用未有报道. 本研究为 *C. globosum* 的 chaetoglobosins 生物合成以及次生代谢和真菌形态发生的关系提供了有用信息.

关键词聚酮合酶(PKS)
黑色素
球毛壳菌素 A
球毛壳菌

球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)是一类分布广泛在土壤、植物碎屑腐生真菌, 也是活体植物宿主的内生菌或病原菌. 还有报告其引起人类室内空气综合症(sick building syndrome, SBS)和过敏症^[1], 一些菌株能够对人类产生入侵性感染的病原体^[2]. 此外, 球毛壳菌在农业和工业上都有应用, 如对病原微生物和蚜虫的生物防治^[3,4]、对植物木质纤维素的分解可以用于生物能源制造等^[5]. 球毛壳菌产生丰富的次生代谢产物^[6,7], 这些产物有些能够引起食品污染, 有的具有很强的生物活性, 可以用于生物制药开发^[8], 其中研究最多的是球毛壳菌素^[6,7,9]. 球毛壳菌素属于

细胞松弛素(cytochalasans)家族, 能够与细胞内肌动蛋白微丝结合, 抑制肿瘤细胞运动和分裂^[10]. 球毛壳菌素早于 20 世纪 70 年代中期在球毛壳菌中发现, 后来也在其他的真菌中分离得到^[11,12]. 在 *C. globosum* 产生的众多次生代谢产物中, 球毛壳菌素 A (chaetoglobosin A) 是最主要的成分, 由于具有对肿瘤细胞强烈的细胞毒性、抗细菌和真菌活性而受到关注^[13]. Chaetoglobosin A 是由 9 个单位的乙酸盐/丙二酸缩合而成的聚酮骨架组成的, 在环状结构上还带有 1 个色氨酸基团^[14,15].

大量真菌基因组测序揭示大量参与聚酮合成基

英文版见: Hu Y, Hao X R, Lou J, et al. RNAi demonstration of a novel PKS gene *pks-1* involved in chaetoglobosin biosynthesis, pigmentation and sporulation in *Chaetomium globosum*. Sci China Life Sci, 2012, 55, in press

因族的存在,为研究和利用真菌聚酮类次生代谢物提供了基础^[16].近年来,真菌此生代谢的分子生物学取得许多进展,基本阐明了重要聚酮类此生代谢物的合成步骤和调节的规律,如黄曲霉毒素 aflatoxin^[17-22].控制次生代谢的调节网络逐渐在一些真菌中被描述,如 G protein-cAMP-PKA 代谢调节通路、LaeA 和 VeA 代谢调控蛋白复合体^[19,23-25]等.

相比较而言,对 *C. globosum* 的分子生物学研究进展甚少,甚至到目前,在球毛壳菌中还没有基因敲除的工作报道,也没有研究 chaetoglobosin 的生物合成机制的报道.本小组最近研究发现,在 *C. globosum* 中实施同源重组敲除基因的方法非常困难,可能是分子研究进展缓慢的原因.RNA 干扰技术(RNAi)是研究基因功能的有效手段,已经应用于多种真菌^[26-28].参与 RNAi 的基本蛋白成员,即 RNA 依赖的 RNA 聚合酶、Argonaut 蛋白和 Dicer 酶在一些真菌中具有高度保守性,如在 *Cryptococcus neoformans*^[29], *Bipolaris oryzae*^[30], *Aspergillus* 和 *Fusarium*^[31], *Cochl- iobolus sativus*^[32]等真菌中均有报道和利用.

为建立 *C. globosum* 基因功能研究方法,本文选择了一个聚酮合酶基因 *pks-I*(CHGG_00542),尝试建立了 RNAi 基因沉默的方法.*C. globosum* CBS 148.51 基因组数据库 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/chaetomium_globosum/Home.html)以及本实验室 *C. globosum* NK102 基因组数据库均证明此真菌中确实存在 RNAi 沉默机制.CBS 148.51 中发现了 RNAi 的 3 个重要组成元件,分别是 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(CHGG_04734)、Argonaut 蛋白(CHGG_08996)和 Dicer 酶(CHGG_03638).选择 *pks-I* 基因是因为它与介导黑色素合成的聚酮合酶 PKSs 同源性最高,能够通过菌体颜色的表型变化鉴别沉默转化子.参与黑色素生物合成通路的聚酮合酶的分子遗传研究已经在许多真菌中展开,如 *Sordaria macrospora*^[33], *Bipolaris oryzae*^[34] 和 *Colletotrichum lagenarium*^[35].*C. globosum pks-I* 基因编码的 PKS 蛋白与 *Neurospora tetrasperma* 中参与黑色素合成的 PKS 蛋白具有高度同源性(EGO61342.1, 达 65%一致).本研究发现 *pks-I* 基因不仅参与黑色素产生,还在 chaetoglobosin 的生物合成以及孢子形成过程中发挥着关键作用.

1 材料与方法

1.1 菌株与培养条件

球毛壳菌 *C. globosum* NK102 野生型为本实验室分离保存,其培养条件见文献[6].NK-102 接种于 PDA 固体培养基或者 PDB 液体培养基中,28℃培养,液体培养基需振荡培养(150 r/min).

1.2 质粒构建

沉默质粒 pSilent-1 曾用于多种真菌 RNAi 研究^[26,27],本实验中的 pSilent-1 由中国哈尔滨工业大学杨谦、宋金柱教授惠赠,其质粒图谱见图 1C.实验前首先验证了潮霉素 B 抗性选择标记基因(*hph*)在 NK102 中是否具有正常功能.RNA 发卡结构和 *hph* 基因表达的启动子为 *P_{trpC}*(图 1C).质粒在 *E. coli* DH5α 中扩增.

根据 *C. globosum pks-I* 基因(CHGG_00542)的序列,设计引物 PKS-ia/ib(表 1),从 *pks-I* 上扩增 320 bp 片段插入 pSilent-1 构成反向重复序列(图 1A 和 C).片段 *pks1a* 位于 *pks-I* 的 5'端(图 1A),核酸序列具有特异性,即与基因组其他基因没有相似性,以防止干扰的脱靶(off-target).分别用 *Xho* I 和 *Hind* III, *Bgl* II 和 *Kpn* I 两组限制性内切酶酶切 *pks-I* 片段,正向和反向序列分别插入到 pSilent-1 相应的酶切位点,得到沉默质粒 pPKS-1a(图 1C).另外,本研究还同时构建了沉默质粒 pPKS-1b.

1.3 原生质体转化和转化子的筛选

将沉默质粒 pPKS-1a 转化到 *C. globosum* 野生型中,原生质体转化方法参阅 Turgeon 等人^[36]的方法.转化子接种于含有 100 mg/L 潮霉素 B 的 PDA 培养基上进行筛选.为确定沉默质粒转化到 *C. globosum* 基因组中,用引物 *hyg(s)/hyg(as)*(表 1)扩增潮霉素抗性基因(200 bp),并对扩增产物进行测序.

1.4 Southern blot 检测

NK-102 转化子基因组的提取按照 Raeder 和 Broda^[37]的方法进行,Southern blot 按照 Yang 等人^[18]描述的方法进行.用限制性内切酶进行基因组 DNA 的消化,0.8% 琼脂糖凝胶电泳后转移至纤维素尼龙膜上(Osmonics, 美国).用于杂交的探针有 3 个:来

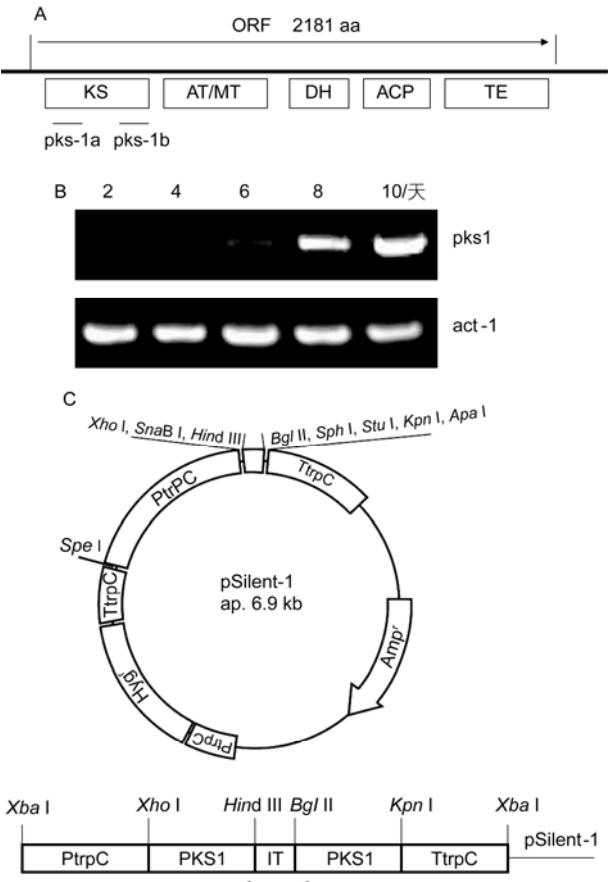


图 1 PKS 分析以及沉默质粒的构建

A: PKS-1 蛋白结构域示意图. KS(β -酮酰合酶, 氨基酸序列 349~822), AT/MT(酰基转移酶, 926-1224); DH(脱水酶, 1341-1492); ACP(酰基载体蛋白, 1667-1731)和 TE(硫酯酶, 1939-2179). RNAi 的靶位点 *pks-1a* 位于 *pks-1* 的 366~685 核酸序列(320 bp), *pks-1b* 位于 1847-2073(227 bp). B: RT-PCR 检测 *pks-1* 基因不同时间梯度的表达量. 菌体于 500 mL 三角瓶中(装有 200 mL PDB), 150 r/min, 28°C 振荡培养 2~10 天后, 提取总 RNA. 下图为内参基因 *actin* 的表达量. C: 质粒 pSilent-1 和 RNAi 发卡结构的构建图谱. 箭头方向为 *pks-1* 片段的方向. IT, *Magnaporthe oryzae* 中 CUT 基因的内含子; PtrpC, *A. nidulans trpC* 基因的启动子; TrpC, *A. nidulans trpC* 基因的终止子

源于质粒 pSilent-1 且经引物 Hyg(s)/Hyg(as)扩增的潮霉素基因片段; 连接到沉默质粒 pPKS-1a 上 320 bp *pks-1* 片段; 以及 *Xho* I 酶切 pSilent-1 得到的线性质粒. 探针标记, 杂交和检测按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒 (Roche China, 上海)说明书介绍方法进行.

1.5 RNA 提取和反转录 PCR(RT-PCR)

菌丝尖端接种法将各菌株接种于 200 mL 的 PDB

表 1 实验所用引物^{a)}

引物	序列 (5'→3')
PKS-ia(s)	ATTA CTCGAG GGTACC TTTTCTCGTCGGGCTTTGC
PKS-ia(as)	TCCGC AAGCTT AGATCT TCGGTGGACCAGATACTAC
PKS-ib(s)	ATAT CTCGAG GGTACC TTGACAATGATGCCGATGG
PKS-ib(as)	GGGCC AAGCTT AGATCT AACATCATGGGGATCAACT
Hyg(s)	ATGAAAAAGCCTGAACTCAC
Hyg(as)	GCAAAGTGCCGATAAACAT
qActin(s)	AACCGAGGCTCCCATCAAC
qActin(as)	TCACGGACGATTTACGCTC
qPKS(s)	ATCTTTCCGCCTAACCCGA
qPKS(as)	GTCCTTCGTTTCTGGGTTGTC

液体培养基中, 于 28°C 培养箱中, 以 160~200 r/min 的转速连续振荡培养 2~10 天, 菌丝冷冻干燥研磨后用 TRIzol 试剂盒提取(Invitrogen, CA, USA). 总 RNA 用 RNase-free DNase(TaKaRa Inc, 大连)进行消化处理. cDNA 第一链的合成使用 1 μ g 总 RNA 作为模板, Oligo(dT)作为引物, 在 M-MLV 反转录酶作用下进行. 具体步骤参照 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书(TaKaRa Inc, 大连).

1.6 荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)

本实验的 qPCR 反应使用的是 Eppendorf 的 Mastercycler ep realplex 系统和相应的软件(Eppendorf, 德国). 以 SYBR green(BioRad, 美国)作为荧光标记, 实验步骤按照说明书进行. 以 *actin* 编码基因作为内参基因, 引物 qPKS(s)/qPKS(as)扩增 *pks-1*, qActin(s)/qActin(as)扩增 *actin* 基因(表 1). 反应体系(20 μ L)含有 10 μ L SYBR Green I PCR master mix (Roche China, 上海). PCR 反应条件如下: 94°C 10 min, 94°C 15 s, 59°C 30 s; 40 个循环后做熔解曲线分析. 每个样品 3 个重复. 通过连续 4 倍稀释 cDNA 样品浓度得到标准曲线, 目的基因和内参基因扩增效率基本一致. 数据用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析本实验中基因相对表达量^[38].

1.7 高效液相色谱(HPLC)检测 chaetoglobosin A

菌丝尖端接种法分别接菌于装有 200 mL PDB 液体培养基中, 28°C, 180 r/min 连续振荡培养 8 天, 得到上清液培养液后加入等体积氯仿甲醇混合液(10:1, 体积比)萃取, 收集有机相, 55°C 减压蒸馏有机相得到粗提产物, 粗提产物重悬于甲醇中, 浓缩体积至 2 mL, 12000 r/min, 10 min 离心弃杂质, 上清液用 0.45

μm 的有机滤膜过滤后上样 HPLC.

HPLC 使用 Angilent 1100(Angilent Technologies, 美国), 分析柱为 Kromasil C18 ODS(4.6×250 mm, AKZO Nobel, 瑞士), 检测波段 227 nm, 流速 1 mL/min, 标准样品 chaetoglobosin A(Sigma, 美国)作为对照, 制作标准曲线以定量 chaetoglobosin A.

2 结果

2.1 *C. globosum* PKS 编码基因 *pks-1* 的表达量随时间梯度变化

C. globosum CBS 148.51 全基因组注释表明聚酮合酶基因在十几个以上. *pks-1* 基因编码基因组中最大的 PKS, 并与其他真菌中编码黑色素生物合成的 PKS 具有同源性. *pks-1* 基因全长从本实验室保存的 NK102 克隆得到, 并进行测序 (GenBank ID: JX125042). 预测聚酮合酶有 5 个特征性结构域构成, 属于 I 型重复型 PKS 即 KS(β-酮酰合酶)、AT/MT(酰基转移酶)、DH(脱水酶)、ACP(酰基载体蛋白)和 TE(硫酯酶). 这些结构域的作用包括完成 Claisen 缩合反应、延伸形成 chaetoglobosins 的聚酮碳骨架^[39-41](图 1A). 但在 PKS-1 中没有发现烯醇还原酶(ER)和酮基还原酶(KR).

在众多丝状真菌中, 次生代谢相关的基因常常成簇存在, 大都是处于沉默^[42]. 通过反转录 PCR 的方法确定 *pks-1* 基因在 *C. globosum* 中的表达情况. 结果表明, *pks-1* 的表达依赖于培养时间, 直到培养的第 8 天基因开始表达. 事实上, *pks-1* 基因的表达与生长平台期和真菌色素的生成相关联(未发表数据). NK102 的菌体生物量在第 8 天达到最大值, 菌丝在第 7 天时颜色开始变深. 作为内参的 *actin* 基因表达量则持续不变(图 1B). 反转录 PCR 结果表明, *pks-1* 基因并未沉默, 其表达与真菌生长状态有关.

2.2 沉默质粒转化得到黑色素缺失转化子

针对 *pks-1* 基因的 RNA 干扰质粒 pPKS-1a 构建方法如图 1C 所示. 之后以 PEG 介导的原生质体转化方法转化到 NK102 中, 得到了具有潮霉素抗性的转化子 40 株(命名为 pA), 随机挑选用 PCR 扩增证明质粒 pPKS-1a 转入到转化子中, PCR 产物进行测序.

大部分转化子表型产生变化, 菌丝颜色较野生型 NK102 浅. 根据菌落颜色深浅, 40 株转化子大致分为 3 个组. 第 1 组(7 株转化子)表型与野生型相似, 菌丝体为黑色或者深灰色(图 2A), 如 pA6; 第 2 组(31 株转化子), 占转化子的绝对数量, 菌丝颜色明显变浅, 但是没有变成无色或白色, 图 2A 中 pA3, pA10, pA11 和 pA25 即为此类; 第 3 组菌丝完全呈现白色, 表型与加入三环唑的培养基上的表型相似, 如 pA27 和 pA28(图 2B). 三环唑是二羟基萘 DHN 黑色素合成通路中两个关键还原酶(1,3,6,8-四羟基萘还原酶和 1,3,8-三羟基萘还原酶)的专一性抑制剂^[43]. 由此可以证明, *pks-1* 的表达受到了 RNAi 的影响, 导致 *C. globosum* 的黑色素产量下降, 即 *pks-1* 介导 *C. globosum* 黑色素的合成, 色素量的差异可能是干扰效率不同造成的.

2.3 RNA 干扰质粒在转化子中的存在状态

为证明色素含量的下降是由于 RNA 干扰引起, 而不是由于 *pks-1* 基因被转化的质粒截断(disrupted)的结果, 使用 Southern blot 进行了检测. 随机挑选了 7 株转化子, 如图 2A 所示, pA3, pA6, pA10, pA11, pA25, pA27 和 pA28. 首先对未经过酶切的基因组 DNA 用潮霉素基因作为探针进行杂交, 发现质粒 pPKS-1a 不是游离存在, 而是完全整合到基因组中(图 3A). 经过 *Xba* I 消化过夜的基因组 DNA, 用 *pks-1* 沉默片段 *pks1a* 作为探针杂交. 由于 *pks-1* 基因上没有 *Xba* I 酶切位点, *pks-1* 杂交结果会得到 1 条 9.2 kb 大小的全基因条带, 被检测的 7 株转化子中都得到了这条片段(图 3B). 此外, *Xba* I 酶切 pPKS-1a 后会得到带有完整发卡结构的 3.0 kb 片段. 如图 1C 和 3B 所示, 转化子中的发卡结构都完整存在. 作为对照, 质粒 pPKS-1a 具有相同的酶切位点, 也能够产生 3.0 kb 杂交带(P 带, 图 3B). 这些结果证明, 表型发生变化的转化子, 其 *pks-1* 基因本身没有受到破坏, 排除了 *pks-1* 突变的可能影响.

为确定转化子中 pPKS-1a 的拷贝数, 基因组 DNA 用 *Xho* I 消化过夜, *Xho* I 在 pPKS-1a 质粒上只有 1 个酶切位点(图 1C), 用同样经 *Xho* I 酶切的线性质粒 pSilent-1(不含 *pks-1* 片段)作为探针杂交. 如果是 1 个拷贝插入到基因组, 那么应该可以杂交得到两条带, 如图 3C 所示, 在分析的转化子中, pA6 为单拷

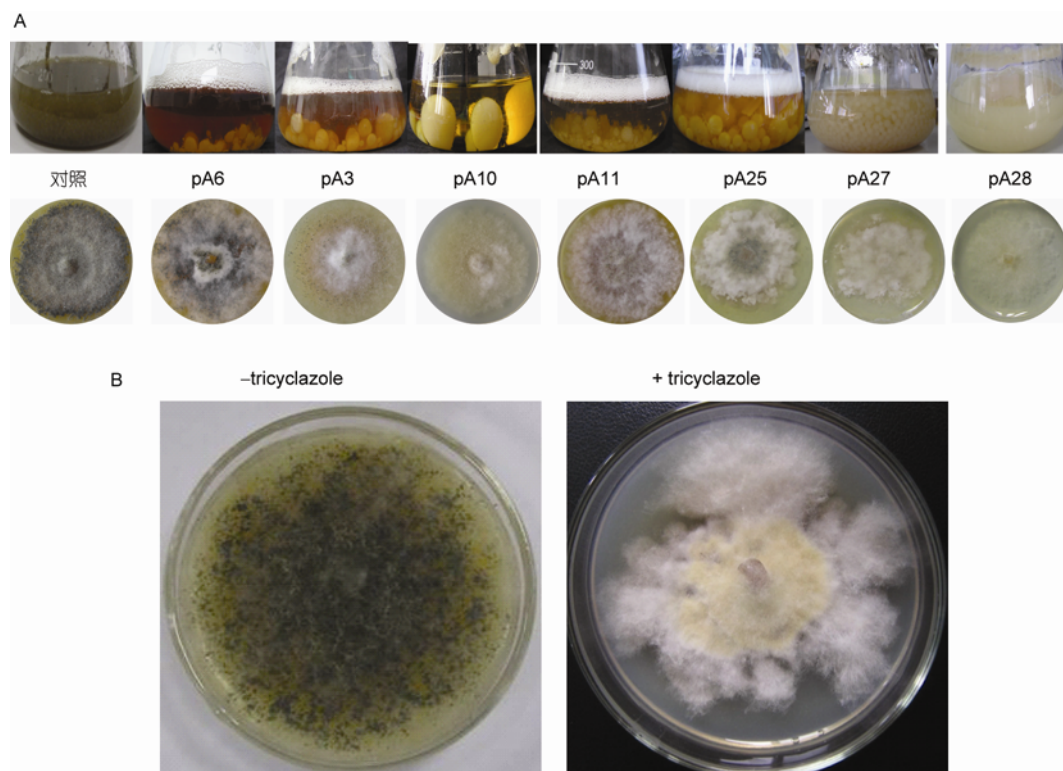


图 2 *pks-1* 基因沉默转化子的表型

A: 上图为转化子在液体培养基中的表型. 菌体于 200 mL PDB 中, 28℃ 振荡培养 8 天. 下图为转化子在固体培养基中的表型, 与上图转化子一一对应. 转化子培养于含有浓度为 100 mg/L 潮霉素的固体 PDA 平板上, 野生型菌株的培养基不加潮霉素. B: 三环唑抑制 *C. globosum* 黑色素生成. 右图为 PDA 培养基中加入 50 μg/mL 三环唑的表型, 左图为对照, *C. globosum* 均在 28℃ 培养 7 天

贝插入, pA25, pA28 和 pA11 均有 3 条带, 可能是 2 个拷贝 pPKS-1a 以首尾相接的形式在同一位点插入, 另外 3 个转化子 pA3, pA10 和 pA27 为多个拷贝插入. 作为对照的野生型(Wt)没有杂交到任何带(图 3C). 和这些转化子的表型比较, 可以说明插入质粒的拷贝数与 RNAi 沉默效果并没有直接的相关性.

2.4 沉默转化子的 *pks-1* 基因表达下降

为证实黑色素量减少转化子是 *pks-1* 基因表达沉默的结果, 本研究使用荧光实时定量技术 qRT-PCR 对 *pks-1* mRNA 进行了检测. 结果表明 7 株转化子的 *pks-1* mRNA 水平都明显下降(图 4A), 表达量是对照的 11%~61%(对照为转入 pSilent-1 质粒的转化子, Ct). 有趣的是, 第 3 组中表型白化的转化子 pA27 和 pA28, 其 *pks-1* 表达量最低; 相反, 与野生型表型接近的第一组转化子, pA3 和 pA6, *pks-1* mRNA 量最高, 分别是对照菌株的 61% 和 57%, 第 2 组转化子 pA10, pA11 和 pA25 的表达量则处于中间值(图 4A). qRT-PCR 结

果表明, *pks-1* mRNA 表达水平与色素含量之间存在密切关系, 进一步证明 *pks-1* 介导了黑色素合成, 并且 RNAi 方法可以有效的降低 *C. globosum* 中基因的表达.

实际上, 本研究在构建 pPKS-1a 的同时, 还构建了另 1 个干扰质粒 pPKS-1b, *pks-1* 片段 pks1b 的位点选择如图 1A 所示. 整个实验过程, pPKS-1b 与 pPKS-1a 都同时进行. 得到的沉默转化子(命名为 pB)也使用 qRT-PCR 检测 *pks-1* 基因的表达量. 结果符合预期, 随机挑选的转化子的 *pks-1* 表达量都明显下降, 是对照的 34% 到 59%(图 4B).

2.5 *pks-1* 基因对 chaetoglobosin A 生物合成和孢子发生的影响

本研究的长远目的在于鉴定影响 chaetoglobosin A 生物合成的 PKS 基因, 因此, 使用 HPLC 检测了沉默转化子中 chaetoglobosin A 的产量(图 5). *C. globosum* 生物合成 chaetoglobosin A 的最优条件为

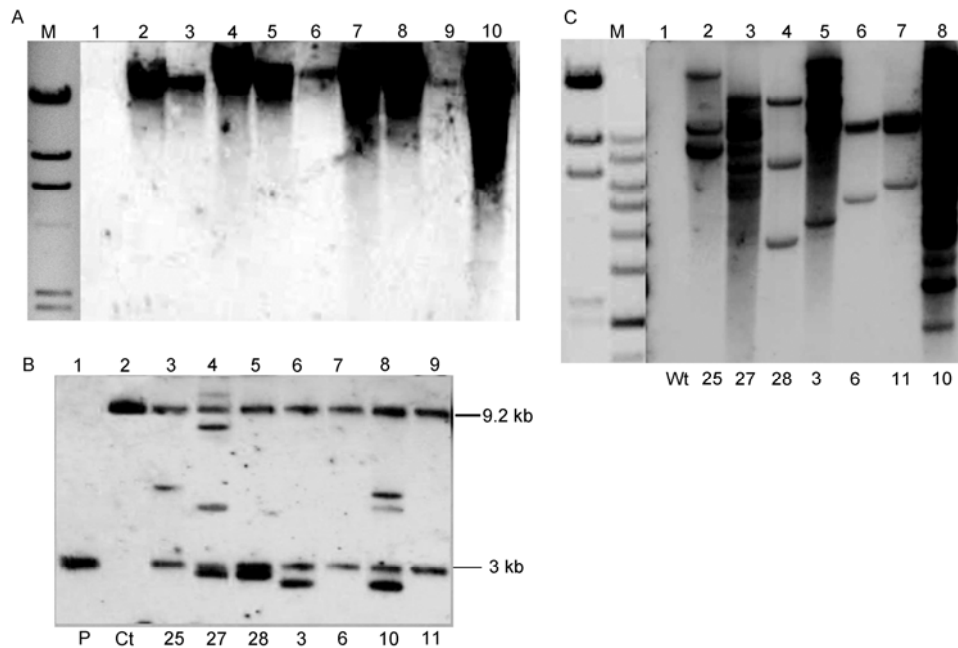


图3 Southern blot 检测 *pks-1a* 干扰质粒在转化子中的存在形式

A: DNA 样品不进行消化, 直接用 pSilent-1 上的潮霉素基因片段 *hph* 进行杂交. M: *Hind* III-digested λ DNA marker; 泳道 1: 野生型; 泳道 2~8: 随机挑选的沉默转化子; 泳道 9 和 10, 只带有空质粒 pSilent-1 而没有 *pks-1* 片段的转化子. 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 每个泳道上样 DNA 5 μ g; B: DNA 样品用 *Xba* I 进行消化处理, 用 320 bp 长的 *pks-1* 片段进行杂交. 图中标注的 9.2 和 3.0 kb 是与预期大小相同的条带. 泳道 P: *Xba* I 酶切过的 pPKS-1a 质粒; Ct: 与图 3A 的泳道 10 相同的对照菌株; 25, 27, 28, 3, 6, 10, 11 分别对应沉默转化子 25, 27, 28, 3, 6, 10, 11. 图上方的数字代表泳道; C: DNA 样品使用 *Xho* I 进行消化, 并用线性质粒 pSilent-1 进行杂交. Wt, 野生型作为负对照

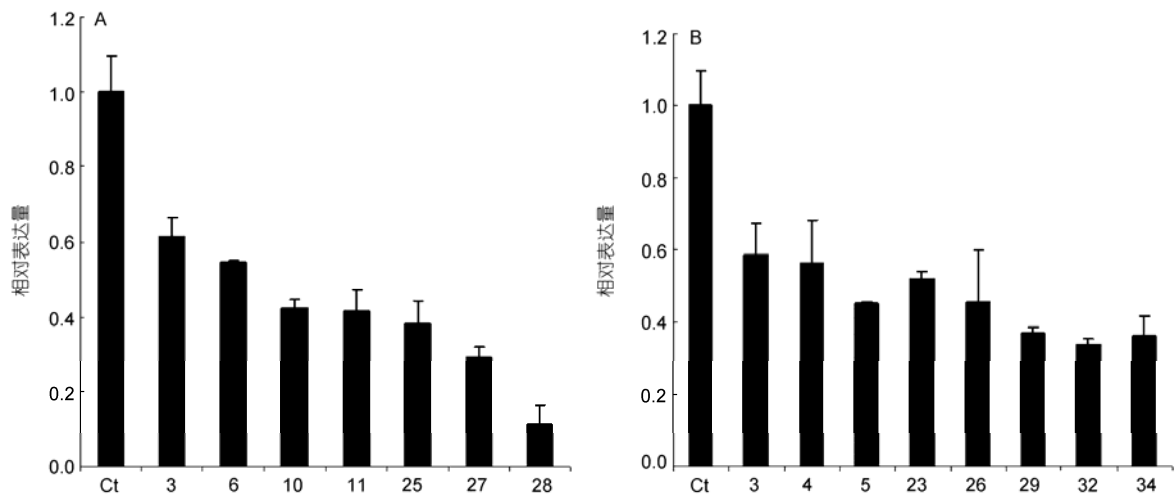


图4 实时定量 PCR 检测 *pks-1* 沉默转化子的 mRNA 水平

A: pPKS-1a 沉默转化子的 qRT-PCR 检测(3, 6, 10, 11, 25, 27 和 28 分别代表转化子的编号), Ct: 带有空质粒 pSilent-1 的转化子; *pks-1* cDNA 使用引物 qPKS(s)和 qPKS(as)进行扩增. 内参基因 *actin* cDNA 使用引物 qActin(s)和 qActin(as)(表 1)进行扩增. B: pPKS-1b 沉默转化子的 qRT-PCR 检测(具体步骤请查阅图 1A 和 2.4)

表 2 对照菌株和 *pks-1* 基因沉默转化子的 chaetoglobosin A 产量

菌株	出峰时间(min)	CheA 含量(mg/L)
Wt	10.973	50.51±8.79
Ct	11.012	53.71±4.34
pA6	10.957	8.13±0.37
pA25	10.967	2.44±0.28
pA28	10.937	2.94±0.72
pA27	10.943	4.83±0.55
pA10	11.000	9.88±2.13
pA3	10.947	16.14±3.69

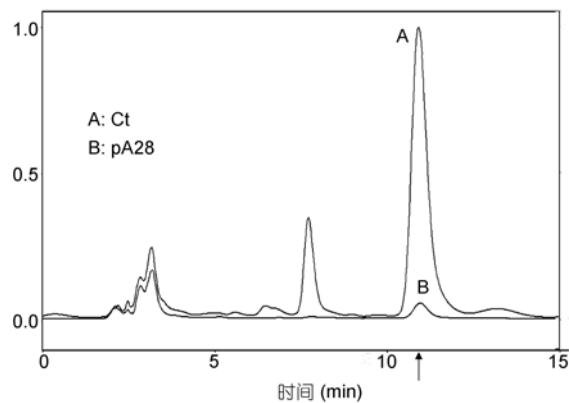


图 5 对照菌株(Ct)和 *pks-1* 基因沉默转化子(pA28)发酵液的 chaetoglobosin A 高效液相色谱分析
箭头所示即为 chaetoglobosin A 出峰

200 mL PDB 培养基 28℃振荡培养 8 天. 由表 2 和图 5 可见, 所有转化子的 chaetoglobosin A 的产量都明显下降. pA25, pA27 和 pA28 的 chaetoglobosin A 含量分别为 2.44, 4.83 和 2.94 mg/L. 而野生型和对照(Ct)的 chaetoglobosin A 含量分别为 53.71 和 50.51 mg/L. 这些结果表明, *pks-1* 基因参与了 chaetoglobosin A 的生物合成.

另外, 本研究还发现 *pks-1* 基因对于 *C. globosum* 的孢子发生也是必需的. 沉默转化子产孢少、或者不产孢子和子实体(子囊壳)(图 6). 与其构成鲜明对比, 野生型产生大量的孢子和子囊壳. 与预期相符, 对照菌株(Ct)的产孢子表型与野生型相似. 光学显微镜下可以明显观察到 pA28 菌丝颜色比野生型颜色浅、视野中的孢子几乎难以观察到.

3 讨论

本研究在使用同源重组方法敲除 *C. globosum* 基因的过程中遇到了极大的困难, *pks-1* 以及其他几个

单拷贝基因敲除的失败之后, 尝试使用 RNAi 的方法研究聚酮合酶 *pks-1* 基因. 结果表明, RNAi 在 *C. globosum* 中研究基因功能高效可行. 超过 80% 的转化子表现出明显的黑色素缺失表型(pA 系列 40 株转化子中有 33 株, pB 系列 40 株转化子中有 32 株)(图 2A). 观察表明, 转化子的表型与细胞中产生干扰的 PKS-1a 质粒的拷贝数并不直接相关(图 2 和 3). 沉默效率可能由其他因素决定, 例如质粒 PKS-1a 的插入位点不同会影响 RNA 发卡结构的产生. 在 *N. crassa* 中, RNAi 沉默效率不足 40%^[44,45]. 在担子菌类 *C. neoformans* 中, RNAi 沉默效率不足 10%^[46]. qRT-PCR 结果证实, 被检测的 7 株黑色素降低的转化子中, 其 *pks-1* mRNA 水平都明显下调(图 4A). pA27 和 pA28 两个转化子在培养基上和显微镜下都能观察到白化的菌丝体, 并且 *pks-1* mRNA 水平最低(图 2A 和 6). Southern blot 结果表明, 发卡结构是异位插入基因组, 排除了 *pks-1* 基因敲除的影响(图 3). 综上所述, *pks-1* 基因缺失参与了 *C. globosum* 黑色素的合成. *pks-1* 基因编码 2181 个氨基酸的多肽, 含有与其他真菌聚酮合酶相似的 5 个结构域(图 1A), 表明 *C. globosum* 黑色素的合成与其他一些真菌类似, 通过经典的 DHN 黑色素合成通路^[22,47,48]. 在培养基中加入了 DHN 黑色素合成通路的专一抑制剂三环唑, 结果发现黑色素合成受到抑制表现型和 *pks-1* 干扰突变株一致(图 2B).

更为重要的是, *pks-1* 的沉默对 chaetoglobosin A 生物合成产生了影响. HPLC 结果显示, 转化子 pA28 的 chaetoglobosin A 产率大大降低(图 5). 培养液中 chaetoglobosin A 的浓度为 2.94 mg/L, 仅是野生型的 5.8%(表 2). 因为 RNAi 使大部分 *pks-1* 基因的转录受到抑制, 转化子产物中可能还存留有少量的 chaetoglobosin A 是可以解释的. 需要指出的是, *pks-1* 与 *P. expansum*^[41]中负责 chaetoglobosin 生物合成, 编码聚酮合酶-非核糖体多肽杂合酶(PKS-NRPS)的 *cheA* 基因不同. PKS-1 和 CheA 蛋白只在 KS, AT 和 DH 结构域上具有保守性. 而其他一些结构域, 如 CheA 中的 MT, ER, KR 结构域和将色氨酸残基添加到聚酮骨架上的 PCP 结构域, 在 PKS-1 中并不存在. 而 PKS-1 上存在的参与释放聚酮链状结构的 TE 结构域在 CheA 中缺失^[15]. 另外, 本研究还查找了 *pks-1* 上下游的基因序列, 在 *C. globosum* 中没有发现类似的基因簇. 因为 chaetoglobosins 是由 1 个带有色氨酸集团的聚酮骨架组成的^[14,15], 仅 PKS-1 无法完成整个

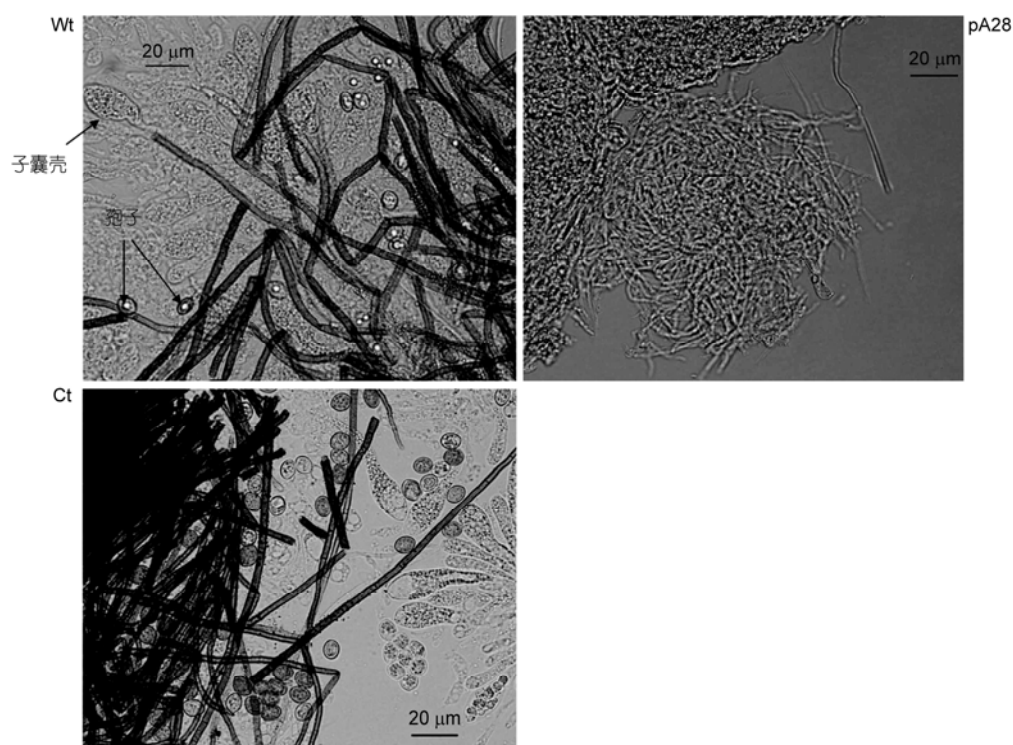


图 6 对照菌株和 *pks-1* 基因沉默转化子的显微结构图

分子的合成. HPLC 结果还显示, PKS-1 也影响了另外 1 个次生代谢产物的合成, 出峰时间在 7 min 的次生代谢物在 pA28 中消失(图 5). 这表明 PKS-1 可能为其他聚酮提供共同的前体物质, PKS-1 更有可能为黑色素和 chaetoglobosin 生物合成提供前体. 即单一 PKS 能够产生多种聚酮化合物, 而且真菌中存在着不同的 chaetoglobosin 生物合成机制. 但是 *C. globosum* 中 chaetoglobosin 的生物合成还有很多问题有待于解决, 例如将色氨酸残基连接到聚酮化合物的非核糖体多肽还未发现.

本研究还发现, *pks-1* 是孢子发生(分生孢子和子囊孢子)所必需的基因(图 6). *pks-1* 的沉默转化子不产生孢子或者孢子数量显著下降. *pks-1* 基因 mRNA 水平最低的白色转化子 pA28 完全丧失了产生孢子的能力(图 6). 这个结果提示次生代谢和繁殖分化之间可能存在直接的联系. 在大多数情况下, 次生代谢是由 G protein-cAMP-PKA 通路和 VeA-LaeA-VeB 复合蛋白共同调节的结果, 特别是在曲霉属中^[19,23,25,49-51]. 次生代谢产物可以作为真菌不同生长阶段的化学指示剂^[49]. 此前有研究表明, *C. lagenarium* 的黑色素对形成附着胞乃至侵入植物寄主具有至关重要的作

用^[52]. *A. alternata* 的黑色素则影响分生孢子的大小^[53]. 另有研究发现, *F. graminearum* 产生的雌激素类真菌毒素能够提高子囊壳的产量^[54]. *A. terreus* 的代谢物丁内酯 Butyrolactone I, 能够增加菌丝的分支和孢子的发生, 以及 lovastatin 的产量^[55]. 然而, 次生代谢和发育直接相关的现象还从未发现. *A. paraciticus* 的 6-甲基水杨酸甲酯合成酶(MSAS)基因 *fluP* 对黄曲霉毒素的生成没有直接的影响, 但与本研究的结果相似的是, 此基因是菌丝生长和孢子形成所必需的^[56]. 基于这些研究的发现, 本文推测细胞内某些聚酮化合物, 可能作为分子信号调控其他细胞活动, 例如孢子发生和附着胞形成.

本研究在 *C. globosum* 中建立了 RNAi 方法, 使得这个真菌的基因功能研究成为. 利用 RNAi 方法研究了聚酮合酶基因 *pks-1*, 发现其在黑色素和 chaetoglobosin 生物合成中的关键作用. 此外, 还发现 *pks-1* 在有性生殖和孢子发生过程中也具有至关重要的作用. 在黑色素、chaetoglobosin 生物合成和孢子发育中同时具有多种功能的聚酮合酶还属于首次报道. 本研究为 *C. globosum* 中真菌毒素 chaetoglobosin 和其他聚酮类化合物的生物合成提供了参考.

参考文献

- 1 Straus D C. The possible role of fungal contamination in sick building syndrome. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3: 562–580
- 2 Paterson P J, Seaton S, Yeghen T, et al. Molecular confirmation of invasive infection caused by *Chaetomium globosum*. *J Clin Pathol*, 2005, 58: 334
- 3 Inglis G D, Kawchuk L M. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Can J Microbiol*, 2002, 48: 60–70
- 4 Qi G, Lan N, Ma X, et al. Controlling *Myzus persicae* with recombinant endophytic fungi *Chaetomium globosum* expressing *Pinellia ternata agglutinin*: using recombinant endophytic fungi to control aphids. *J Appl Microbiol*, 110: 1314–1322
- 5 Longoni P, Rodolfi M, Pantaleoni L, et al. Functional analysis of the degradation of cellulosic substrates by a *Chaetomium globosum* endophytic isolate. *Appl Environ Microbiol*, 78: 3693–3705
- 6 Fogle M R, Douglas D R, Jumper C A, et al. Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia*, 2007, 164: 49–56
- 7 Sutton D A, Slifkin M, Yakulis R, et al. U.S. case report of cerebral phaeohyphomycosis caused by *Ramichloridium obovoideum* (*R. mackenziei*): Criteria for identification, therapy, and review of other known dematiaceous neurotropic taxa. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 708–715
- 8 Kapoor N, Tyagi M, Kumar H, et al. Production of cellulose enzyme by *Chaetomium* sp. using wheat straw in solid state fermentation. *Res J Microbio*, 2010, 5: 1199–1206
- 9 Qin J C, Zhang Y M, Gao J M, et al. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 1572–1574
- 10 Natori S, Yahara I, ed. *Cytochalasins in Mycotoxins and Phytoalexins*. Boca Raton: CRC Press, 1991
- 11 Umeda M, Ohtsubo K, Saito M, et al. Cytotoxicity of new cytochalasins from *Chaetomium globosum*. *Experientia*, 1975, 31: 435–438
- 12 Ohtsubo K, Saito M, Sekita S, et al. Acute toxic effects of chaetoglobosin A, a new cytochalasan compound produced by *Chaetomium globosum*, on mice and rats. *Jpn J Exp Med*, 1978, 48: 105–110
- 13 Jiao W, Feng Y, Blunt J W, et al. Chaetoglobosins Q, R, and T, three further new metabolites from *Chaetomium globosum*. *J Nat Prod*, 2004, 67: 1722–1725
- 14 Probst A, Tamm C. 19-O-acetylchaetoglobosin B and 19-O-acetylchaetoglobosin D, two new metabolites of *Chaetomium globosum*. *Helv Chim Acta*, 1981, 64: 2065–2077
- 15 Scherlach K, Boettger D, Remme N, et al. The chemistry and biology of cytochalasins. *Nat Prod Rep*, 2010, 27: 869–886
- 16 Brakhage A A, Schuemann J, Bergmann S, et al. Activation of fungal silent gene clusters: a new avenue to drug discovery. *Prog Drug Res*, 2008, 66: 1, 3–12
- 17 Georgianna D R, Payne G A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genet Biol*, 2009, 46: 113–125
- 18 Yang G, Rose M S, Turgeon B G, et al. A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin. *The Plant cell*, 1996, 8: 2139–2150
- 19 Wu D, Oide S, Zhang N, et al. ChLae1 and ChVel1 regulate T-toxin production, virulence, oxidative stress response, and development of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *PLoS Pathog*, 8: e1002542
- 20 Kennedy J, Auclair K, Kendrew S G, et al. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science*, 1999, 284: 1368–1372
- 21 Abe Y, Suzuki T, Ono C, et al. Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267: 636–646
- 22 Zhang A, Lu P, Dahl-Roshak A M, et al. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (*pks1*) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. *Mol Genet Genomics*, 2003, 268: 645–655
- 23 Bok J W, Balajee S A, Marr K A, et al. LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot Cell*, 2005, 4: 1574–1582
- 24 Bok J W, Keller N P. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell*, 2004, 3: 527–535
- 25 Bayram O, Krappmann S, Ni M, et al. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, 2008, 320: 1504–1506
- 26 Nakayashiki H. RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5950–5957
- 27 Nakayashiki H, Hanada S, Nguyen B Q, et al. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet Biol*, 2005, 42: 275–283
- 28 Salame T M, Ziv C, Hadar Y, et al. RNAi as a potential tool for biotechnological applications in fungi. *Appl Microbio Biot*, 2011, 89: 501–512

- 29 Janbon G, Maeng S, Yang D H, et al. Characterizing the role of RNA silencing components in *Cryptococcus neoformans*. Fungal Genet Biol, 2010, 47: 1070–1080
- 30 Moriwaki A, Katsube H, Ueno M, et al. Cloning and characterization of the BLR2, the homologue of the blue-light regulator of *Neurospora crassa* WC-2, in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. Curr Microbiol, 2008, 56: 115–121
- 31 McDonald T, Brown D, Keller N P, et al. RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. Mol Plant Microbe In, 2005, 18: 539–545
- 32 Leng Y, Wu C, Liu Z, et al. RNA-mediated gene silencing in the cereal fungal pathogen *Cochliobolus sativus*. Mol Plant Pathol, 2011, 12: 289–298
- 33 Engh I, Nowrousian M, Kück U. Regulation of melanin biosynthesis via the dihydroxynaphthalene pathway is dependent on sexual development in the ascomycete *Sordaria macrospora*. FEMS Microbiol Lett, 2007, 275: 62–70
- 34 Moriwaki A, Kihara J, Kobayashi T, et al. Insertional mutagenesis and characterization of a polyketide synthase gene (*pksI*) required for melanin biosynthesis in *Bipolaris oryzae*. FEMS Microbiol Lett, 2004, 238: 1–8
- 35 Takano Y, Kubo Y, Shimizu K, et al. Structural analysis of *pksI*, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. Mol Gen Genet, 1995, 249: 162–167
- 36 Turgeon B G, Garber R C, Yoder O C. Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity. Mol Cell Biol, 1987, 7: 3297–3305
- 37 Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett Appl Microbiol, 1985, 1: 17–20
- 38 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 2001, 25: 402–408
- 39 Anand S, Prasad M V, Yadav G, et al. Spsps: structure based sequence analysis of polyketide synthases. Nucleic Acids Res, 38: W487–496
- 40 Hopwood D A, Sherman D H. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. Annu Rev Genet, 1990, 24: 37–66
- 41 Schumann J, Hertweck C. Molecular basis of cytochalasan biosynthesis in fungi: gene cluster analysis and evidence for the involvement of a PKS-NRPS hybrid synthase by RNA silencing. J Am Chem Soc, 2007, 129: 9564–9565
- 42 Brakhage A A, Schroeckh V. Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters. Fungal Genet Biol, 2011, 48: 15–22
- 43 Wheeler M H, Bell A A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. Curr Top Med Mycol, 1988, 2: 338–387
- 44 Chang S S, Zhang Z, Liu Y. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. Annu Rev Microbiol, 2012, 66: 305–323
- 45 Tanguay P, Bozza S, Breuil C. Assessing RNAi frequency and efficiency in *Ophiostoma floccosum* and *O. piceae*. Fungal Genet Biol, 2006, 43: 804–812
- 46 Liu H, Cottrell T R, Pierini L M, et al. RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Genetics, 2002, 160: 463–470
- 47 Feng B, Wang X, Hauser M, et al. Molecular cloning and characterization of *WdPKSI*, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. Infect Immun, 2001, 69: 1781–1794
- 48 Takano Y, Kubo Y, Shimizu K, et al. Structural analysis of *PKSI*, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. Mol Gen Genet, 1995, 249: 162–167
- 49 Calvo A M, Wilson R A, Bok J W, et al. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiol Mol Biol Rev, 2002, 66: 447–459
- 50 Grosse C, Heinekamp T, Kniemeyer O, et al. Protein kinase A regulates growth, sporulation, and pigment formation in *Aspergillus fumigatus*. Appl Environ Microbiol, 2008, 74: 4923–4933
- 51 Shimizu K, Keller N P. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 2001, 157: 591–600
- 52 Takano Y, Kikuchi T, Kubo Y, et al. The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. Mol Plant Microbe Interact, 13, 374–383. Mol Plant Microbe Interact, 2000, 13: 374–383
- 53 Kawamura C, Tsujimoto T, Tsuge T. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. Mol Plant Microbe Interact, 1999, 12: 59–63
- 54 Wolf J C, Mirocha C J. Regulation of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roxeum* “graminearum”) by F-2 (Zearalenone). Can J Microbiol, 1973, 19: 725–734
- 55 Schimmel T G, Coffman A D, Parsons S J. Effect of butyrolactone I on the producing fungus, *Aspergillus terreus*. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 3707–3712
- 56 Zhou R, Rasooly R, Linz J E. Isolation and analysis of *fluP*, a gene associated with hyphal growth and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. Mol Gen Genet, 2000, 264: 514–520