



crgA 调控三孢布拉霉合成类胡萝卜素

巩尊洋, 罗玮*, 杜瑶, 余晓斌

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】探究 *crgA* 基因在三孢布拉霉合成类胡萝卜素过程中的调控作用。【方法】克隆三孢布拉霉 *crgA* 基因并利用 split-marker 策略敲除该基因; 在表型特征、关键酶基因转录水平、类胡萝卜素合成水平等方面将基因敲除株与野生株进行比较分析。【结果】与野生型菌株相比, *crgA* 基因敲除菌产孢能力明显下降, 而类胡萝卜素合成途径中的关键酶基因转录水平明显提高, 在发酵 120 h 后 β -胡萝卜素的积累量提高了 31.2%。将 *crgA* 基因重新导入到敲除菌后, 该菌的性状恢复至野生型。【结论】*crgA* 基因调控三孢布拉霉的生长和产孢能力, 并通过调控类胡萝卜素关键酶基因表达来调控类胡萝卜素的合成, 是一个负调控因子。

关键词: 三孢布拉霉, 类胡萝卜素, *crgA* 基因, 负调控因子

类胡萝卜素是一类具有多种生物学功能的天然色素, 其中 β -胡萝卜素和番茄红素具有较强的抗氧化作用, 能够清除机体自由基从而避免遗传物质受到攻击, 在防癌抗癌^[1]、预防心脑血管疾病^[2]等方面有着广泛的应用。类胡萝卜素广泛存在于植物、真菌及藻类中。丝状真菌三孢布拉霉生长速度快、类胡萝卜素含量高, 被认为是类胡萝卜素的理想生产菌^[3]。在三孢布拉霉中, 类胡萝卜素是通过甲羟戊酸(MVA)途径合成的。首先, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)在 HMG-CoA 还原酶的作用下转化为甲羟戊酸, 然后经过多步酶促反应合成番茄红素, 再经番茄红素环化酶最终生成 β -胡萝卜素^[4]。在 MVA 途径中, *hmgR* 基

因编码的 HMG-CoA 还原酶是第一个限速酶, 是萜类化合物合成过程中的重要调控位点^[5]。*carRA* 和 *carB* 是类胡萝卜素合成过程另外 2 个关键酶基因, 分别编码八氢番茄红素合成酶及番茄红素环化酶、八氢番茄红素脱氢酶, 其表达水平与类胡萝卜素的合成呈正相关^[6]。除此以外, 三孢布拉霉合成类胡萝卜素仍受到其他一些未知基因的调控。

crgA 基因是在卷枝毛霉中发现的一个负调控因子, 该基因缺失突变后能够引起上述关键酶基因表达水平^[7]和类胡萝卜素合成量的提高^[8]。但在卷枝毛霉中 *crgA* 基因并不是直接通过控制关键酶基因的表达来控制类胡萝卜素的合成, 而是与基因家族 *mcwc-1* (*Mucor circinelloides white collar-1*)

基金项目: 国家自然科学基金(21606105); 江苏省自然科学基金(BK20130130); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP51504)

*通信作者。E-mail: wluo@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-11-13; 修回日期: 2017-02-13; 网络出版日期: 2017-03-14

有关^[9]。该基因家族中的 *mcwc-1b* 和 *mcwc-1c* 在光照下被活化, 其编码的蛋白共同作用促进类胡萝卜素关键酶基因的表达。而 *crgA* 编码的 CrgA 蛋白具有泛素连接酶的活性, 能够使 Mcwc-1b 泛素化以控制类胡萝卜素关键酶基因的过量表达和类胡萝卜素大量积累^[10]。有研究者发现在三孢布拉霉正菌中存在 *crgA* 的同源基因, 将该基因导入到卷枝毛霉 *crgA* 基因缺失突变菌中, 能够使其恢复野生株合成类胡萝卜素的表型, 表明在三孢布拉霉和卷枝毛霉中 *crgA* 基因调控类胡萝卜素的合成是保守的^[11]。尽管如此, *crgA* 基因在三孢布拉霉中的调控作用至今尚无文献报道。由于三孢布拉霉负菌是 β -胡萝卜素和番茄红素的主要生产菌, 因此在负菌中进行该基因的确定以及调控类胡萝卜素合成的研究具有重要的理论意义和潜在的经济价值。本实验以三孢布拉霉负菌为研究对象, 从中克隆 *crgA* 基因并采用高效基因敲除策略对其进行功能缺失处理, 以研究 *crgA* 基因对三孢布拉霉生长及其对类胡萝卜素合成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养基: 本实验所用出发菌株为三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)NRRL2896 负菌。三孢布拉霉用以下培养基培养: 麦汁培养基: 5°麦汁加入 2%琼脂, 自然 pH; 种子培养基(g/L): 玉米粉 30, 大豆粉 50, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 6.5; 发酵培养基(g/L): 玉米粉 50, 大豆粉 25, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 棉籽油 40 mL/L, pH 6.5; 所用培养基 121 °C 灭菌 20 min 备用。

1.1.2 试剂: 真菌 DNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 总 RNA 提取试剂盒购自苏州科晴生物公司, Ex-Taq 聚合酶、

SYBR[®] Premix Ex-Taq II 购自 TaKaRa 公司, 溶菌酶、纤维素酶、蜗牛酶购自无锡特达生物公司, 潮霉素、AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒、引物合成及测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供, 其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。稳渗液: 0.6 mol/L NaCl; ST 溶液: 蔗糖 188.2 g/L, Tris 1.2 g/L, pH 7.5; STC 溶液: 蔗糖 188.2 g/L, Tris 1.2 g/L, CaCl_2 2.78 g/L, pH 7.5; PTC 溶液: PEG6000 600 g/L, Tris 1.2 g/L, CaCl_2 2.78 g/L, pH 7.5; 以上溶液 115 °C 灭菌 30 min。

1.2 三孢布拉霉的培养

吸取 100 μL 三孢布拉霉负菌孢子悬液至麦汁培养基平板上, 涂布均匀后置于 25 °C 培养箱培养 4–5 d, 待菌丝长满整个平板, 用适量无菌水洗下孢子并稀释至 1×10^6 个/mL。吸取新生孢子接种至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中并置于摇床, 于 25 °C、180 r/min 培养 48 h; 吸取种子液至发酵培养基(25 mL/250 mL)用于发酵培养, 接种量均为 10%。

1.3 *crgA* 基因的克隆

取培养好的种子液, 离心去上清后反复洗涤 2 次获得菌丝体, 然后加入适量液氮研磨至白色粉末状, 用真菌 DNA 试剂盒提取基因组。以该基因组为模板, 利用表 1 中的引物进行 PCR。所有 PCR 产物连接至 pMD-18T 载体, 然后转化至大肠杆菌 DH5 α 中扩增, 重新抽提后测序。

1.4 Gene deletion cassette 的合成

crgA 基因的敲除采用 split-marker 法^[12], 该方法需由 2 轮 PCR 反应获得敲除载体, 其原理如图 1 所示。在第 1 轮 PCR 反应中, 根据测得的 *crgA* 基因序列在两端设计引物, 以扩增获得 1 kb 左右的同源臂。同时, 所用的筛选标记为潮霉素抗性基因(*hyg*), 该基因从质粒 pCSN44 上扩增而来,

表 1. 本实验所用的引物
Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Purpose
Fu/Cu	GGAAATTAAGCTATGCACCGCAGTATAGTC	<i>crgA</i> clone/complementation
Fd/Cr	TATTTTCATATGGAACAAGATTTGTCTATA	<i>crgA</i> clone/complementation
Cd	CGTGGATCCATTGTCGAACGACAAGGCAGT	<i>crgA</i> complementation
Cf	TCAAAAATATTAATGCTAAAAATGGAGAA	<i>crgA</i> complementation
hF	GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAG	<i>hyg</i> cassette
hR	GTTGGAGATTTAGTAACGTTAAGTGGAT	<i>hyg</i> cassette
5f	GGAAATTAAGCTATGCACCGCAGTATAGTCA	5' flank region
5r	ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACAGG AAGGTTTGAACAGAAAACCTTTGTAGC	5' flank region
3f	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACACA GACGACTGAAGAGATGATTGATGAACT	3' flank region
3r	TATTTTCATATGGAACAAGATTTGTCTATACTG	3' flank region
hf	GCGAAGAATCTCGTGCTTTCA	Split marker
hr	TCCAGAAGAAGATGTTGGCGAC	Split marker
P1	AGCCTACGTTTTGAGTAGCTCGATC	Confirm mutants
P2	ATACATTGTTGTGATGAAGCCACAC	Confirm mutants
P3	ATGGGCATGTTTTGGGCTAGCAGT	Confirm mutants
P4	CGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGAT	Confirm mutants
P5	CTCCTACATCGAAGCTGAAAGCACG	Confirm mutants
P6	ACTCCTCTCCAAGAGCACTAGGTA	Confirm mutants
<i>hmgR</i> -F	AAACGATGGATTGAACAAGAGGG	RT-qPCR
<i>hmgR</i> -R	TAGACTAGACGACCGGCAAGAGC	RT-qPCR
<i>carB</i> -F	TATTGGCGGAAGTCTACTGC	RT-qPCR
<i>carB</i> -R	CCCTGATCAAAGCGATGACC	RT-qPCR
<i>carRA</i> -F	TCTTGAGCGTCGTCCTATCC	RT-qPCR
<i>carRA</i> -R	GCACGGTCAATTATCCAAGC	RT-qPCR
<i>tefl</i> -F	AACTCGGTAAGGGTTCCTTCAAG	RT-qPCR
<i>tefl</i> -R	CGGGAGCATCAATAACGGTAAC	RT-qPCR

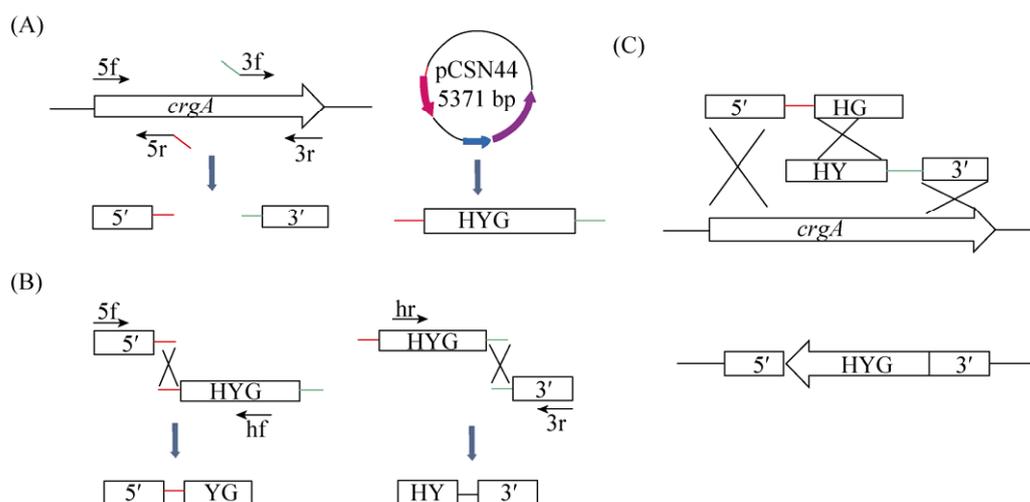


图 1. Split-marker 法敲除 *crgA* 基因的策略

Figure 1. Disruption of *crgA* with split-marker strategy. A: Round 1; B: Round 2; C: Deletion.

其包含潮霉素磷酸转移酶基因(*hph*)和 *trpC* 启动子。在第二轮重叠延伸 PCR 中, 分别将同源臂与筛选标记基因连接在一起形成敲除载体。

1.5 三孢布拉霉原生质体制备及转化

将培养好的菌丝体用磁力搅拌器打散并用无菌水冲洗 2 次, 然后每克菌丝体加入 5 mL 复合酶系并置于摇床上, 28 °C、75 r/min 避光酶解菌丝, 显微镜观察原生质体生成情况。其中复合酶系为: 2% 溶菌酶+3% 纤维素酶+3% 蜗牛酶, pH 6.0, 由稳渗液配制而成^[13]。待获得足够量的原生质体, 将酶解液用 4 层擦镜纸过滤去除菌丝, 4000 r/min 离心 10 min, 去除上清并用稳渗液重悬, 重复 2 次获得原生质体悬浮液。三孢布拉霉原生质体的转化方法如 Turgeon 等^[14]所述并略有改动。将获得的原生质体用 ST 溶液洗涤 2 次, 4000 r/min 离心 10 min, 用 STC 溶液重新悬浮原生质体, 并将浓度稀释至 1×10^6 个/mL。吸取 200 μ L 原生质体悬浮液, 加入 5–10 μ g split-marker 敲除载体片段, 置于冰水中冰浴 20 min。然后缓慢混合 10 倍体积 PTC 溶液, 25 °C 水浴 20 min, 并用稳渗液重新悬浮。转化子的筛选使用双层麦汁培养基, 先将悬浮液涂布至第一层麦汁培养基上, 25 °C 培养 12 h 待原生质体长出细胞壁后, 再添加 10 mL 含有浓度为 200 μ g/mL 潮霉素和 0.1% Triton \times 100 的麦汁培养基, 置于 25 °C 培养箱继续培养, 其中 200 μ g/mL 的潮霉素能够完全抑制野生三孢布拉霉的生长, 而 Triton \times 100 能够抑制菌丝蔓延。待长出孢子后, 传代 4–5 次获得纯合潮霉素抗性菌株, 并提取基因组进行 PCR 验证阳性即为 *crgA* 基因敲除菌株 Δ *crgA* 菌。

1.6 *crgA* 基因回补菌株的构建

crgA 基因的回补也采用 split-marker 法, 原理同图 1-C, 即根据测得的基因序列设计引物, PCR

扩增出 2 段 *crgA* 基因片段, 两片段之间有部分重叠。将基因片段同时转化三孢布拉霉原生质体后涂布麦汁培养基, 待长出孢子并传代 4–5 次, 测序验证阳性即为 *crgA* 基因回补菌株 C- Δ *crgA* 菌。

1.7 总 RNA 提取、反转录及荧光定量 PCR

将培养不同时间的发酵液 10000 r/min 离心 3 min 收集菌丝体, 取适量置于预冷的研钵中, 加入液氮将菌丝体研磨至粉末状, 之后按照总 RNA 提取试剂盒说明书进行提取。反转录按照 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒说明书进行, 产物(cDNA)置于 -20 °C 保存或直接用于下一步实验。将 cDNA 稀释至 50 ng/ μ L, 按照说明书配制 20 μ L 反应体系: cDNA 2 μ L, SYBR[®] Premix Ex-Taq II 10 μ L, 引物(10 μ mol/L) 0.8 μ L, ddH₂O 6.4 μ L。反应程序: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 55 °C 20 s, 40 个循环; 溶解曲线分析: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 60 °C 5 s。 *tef1* 为真核生物的转录因子, 其表达不受菌的状态和所处环境的影响, 所以在该荧光定量 PCR 中, 选用 *tef1* 为内参基因^[15]。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析实验结果, 计算基因表达差异倍数, 所用引物见表 1。

1.8 类胡萝卜素的提取及测定

取培养不同时间的发酵液 10000 r/min 离心 5 min, 将获得的菌丝体置于真空干燥箱 40 °C 干燥 24 h, 取适量加入石油醚多次研磨至菌丝无色, 收集提取液按 20:1 (石油醚: BHT, V/M) 的比例加入 BHT, 然后置于 -70 °C 或直接用于下一步实验。将提取液置于旋转蒸发仪, 50 °C 蒸干并加入 5 mL 乙腈重新溶解, 取少量用 0.22 μ m 有机系滤膜过滤, HPLC 法测定色素含量。其中, 色谱柱为安捷伦 TC-C18, 流动相为 80% 乙腈、20% 甲醇, 检测波长 450 nm, 流速 0.1 mL/min, 进样量 10 μ L, 柱温为 28 °C。

2 结果和讨论

2.1 *crgA* 基因的克隆及分析

测得的三孢布拉霉负菌 *crgA* 基因全长 4289 bp, 利用 DNAMAN 将负菌 *crgA* 基因序列与正菌 (EMBL Accession No. AJ585199) 进行比对分析, 两者相似性为 94%, 并且在该基因的两端分别有 1335 bp、1396 bp 完全相同(图 2), 表明在三孢布拉霉负菌中也存在 *crgA* 基因。但在中间部分负菌 *crgA* 基因比正菌长 28 bp, 相似性仅为 83%, 而此

部分位于正菌 *crgA* 基因的 CDS 区。因此, 尽管在三孢布拉霉负菌中也含有 *crgA* 基因, 但其序列与已报道的正菌 *crgA* 基因序列并不完全相同, 两者的区别仍需进一步探究。

2.2 *crgA* 基因敲除菌株的筛选

将转化后的原生质体涂布在麦汁平板上, 培养约 12 h 后原生质体会再生出细胞壁, 此时添加另外一层含有潮霉素的麦汁培养基, 由于潮霉素对野生三孢布拉霉有抑制作用, 能够正常生长的表明是具有潮霉素抗性的转化子(图 3-A)。为了进

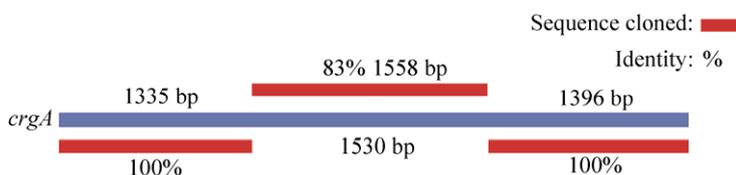


图 2. 三孢布拉霉正、负菌 *crgA* 基因序列比对

Figure 2. Sequence comparison of *crgA* in *Blakeslea trispora* mating type (+) and (-).

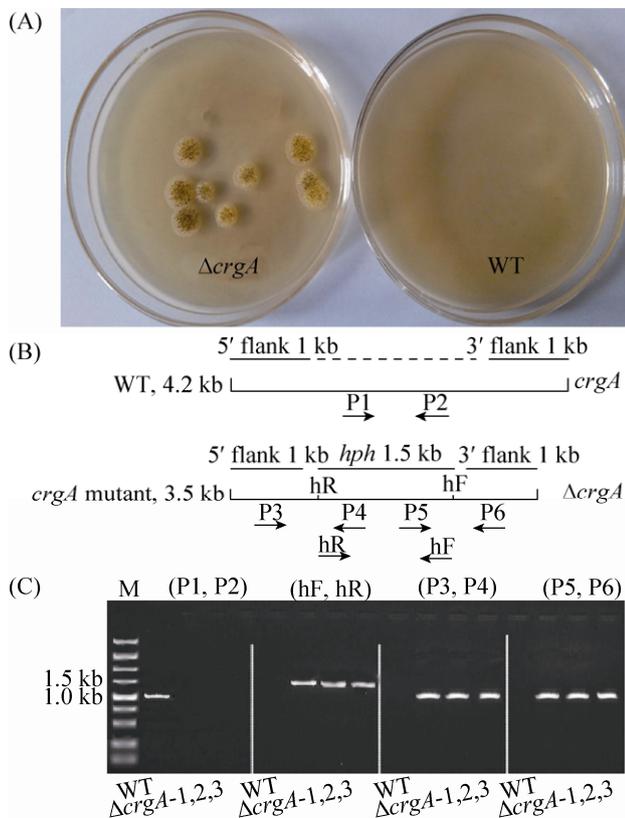


图 3. *crgA* 基因敲除菌株的筛选及验证

Figure 3. Screening and confirming of the *crgA* mutants.

一步确定潮霉素抗性基因插入位置正确并成功敲除 *crgA* 基因, 设计了引物进行 PCR 验证(图 3-B)。本实验利用 *hph* 基因替换 *crgA* 基因片段, 而引物 P1/P2 根据替换下来的片段序列设计, 因此该片段在野生菌中能够扩增得到, 而在 Δ *crgA* 菌株中则无法扩增得到。同理, *hph* 片段只能在 Δ *crgA* 菌株中扩增得到。对于引物 P3/P4 和 P5/P6, 其中一条位于同源臂中, 另一条位于 *hph* 中, 目的片段同样只能在 Δ *crgA* 菌株中扩增得到。所挑出的转化子 PCR 扩增后, 凝胶电泳结果如图 3-C 所示。结果与预期一致, 表明 *hyg* 基因插入了正确的位置并替换下 *crgA* 基因。

2.3 *crgA* 基因对三孢布拉霉产孢能力的影响

为了研究 *crgA* 基因对三孢布拉霉产孢能力的影响, 将野生菌、 Δ *crgA* 菌株和 C- Δ *crgA* 菌株的孢子悬液稀释至约 1×10^6 个/mL, 分别取 100 μ L 涂布在麦汁培养基上, 培养 1 周后观察两菌株在平板上菌丝生长和孢子生成状况, 结果如图 4 所示。

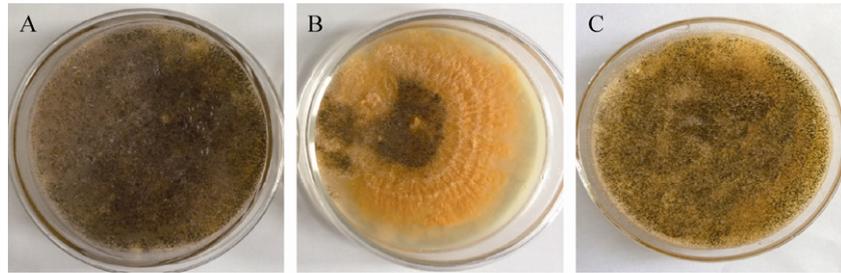


图 4. 三孢布拉霉不同菌株在固体培养基上的生长状况

Figure 4. The growth condition of different *Blakeslea trispora* strain in solid media. A: WT; B: Δ *crgA*; C: C- Δ *crgA*.

三孢布拉霉野生菌在适宜的生长条件下能够迅速蔓延至整个平板, 并且长出黑色孢子。

与野生菌相比, Δ *crgA* 菌株先长出较厚的菌丝膜, 然后长出少量的孢子, 产孢能力则明显下降。在接种量相近的情况下, Δ *crgA* 菌株的产孢量比野生菌低 3 个数量级, 而将该基因重新导入到 Δ *crgA* 菌株后恢复野生菌产孢能力(表 2), 表明 *crgA* 基因能够显著影响三孢布拉霉孢子的生成。在与三孢布拉霉相近的卷枝毛霉中, 孢子的生成也与 *crgA* 基因有关, 同时受光照的影响, 具体原因不详^[16]。

2.4 *crgA* 基因对 β -胡萝卜素合成关键酶基因表达的影响

在 MVA 途径中, *hmgR* 基因编码的 HMG-CoA 还原酶催化合成类异戊二烯的前体物质甲羟戊酸是不可逆反应, *hmgR* 被认为是 MVA 途径中的第 1 个关键基因^[17]。*carRA* 和 *carB* 是 β -胡萝卜素合

成过程中另外 2 个关键基因, 控制着类胡萝卜素的合成^[6]。本文探究了 *crgA* 缺失对这 3 种关键酶基因表达的影响。从图 5 中可以看出, 在敲除 *crgA* 基因后, 三孢布拉霉中这 3 种关键酶基因的转录水平都得到提高, 但 3 种关键酶基因转录水平提高的倍数随时间的变化并不相同, *hmgR* 在发酵 48 h 时转录水平提高倍数最大, 而 *carRA* 和 *carB* 则在发酵 72 h 时转录水平提高倍数最大, 分别提高了 1.2、1.3 和 1.6 倍。这可能与 3 种关键酶在 MVA 途径中发挥作用的位置有关。HMG-CoA 还原酶处于 MVA 途径的上游, 控制着流向类胡萝卜素的代谢流, 而八氢番茄红素脱氢酶、八氢番茄红素合成酶及番茄红素环化酶则处于 MVA 途径的中下游, 负责将中间代谢物转化成番茄红素和 β -胡萝卜素。尽管关键酶基因转录水平最大提高出现在不同时间, 但在整个培养过程中转录水平都有一定的提高, 说明 *crgA* 基因对关键酶基因的调控是持续的。将 *crgA* 基因重新导入到 Δ *crgA* 菌株后, 3 种关键基因的转录明显受到抑制(图 6), 这表明 *crgA* 基因能够调控关键酶基因的表达。但 C- Δ *crgA* 菌株关键基因的转录并不完全与野生菌一致, 仍有 0.1–0.2 倍的提高, 这可能是关键基因的表达同时受光照^[11]、活性氧^[18]等因素的影响造成的。

表 2. 三孢布拉霉 *crgA* 基因对产孢能力的影响

Table 2. Effect of *crgA* on sporulation in *Blakeslea trispora*

Strain	Inoculum	Sporulation
WT	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^5$	$(2.6 \pm 0.4) \times 10^8$
Δ <i>crgA</i>	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^5$	$(5.8 \pm 0.6) \times 10^5$
C- Δ <i>crgA</i>	$(1.4 \pm 0.4) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^8$

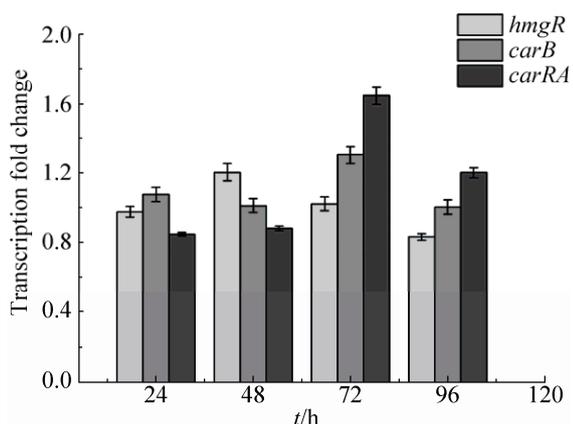


图 5. 三孢布拉霉 Δ *crgA* 菌相对于野生菌关键基因转录水平的提高倍数

Figure 5. Increase of key gene transcription in *Blakeslea trispora* Δ *crgA* versus wild type strain.

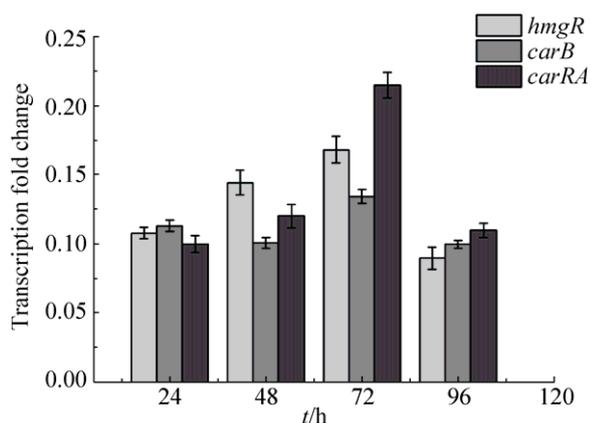


图 6. 三孢布拉霉 C- Δ *crgA* 菌相对于野生菌关键基因转录水平的提高倍数

Figure 6. Increase of key gene transcription in *Blakeslea trispora* C- Δ *crgA* versus wild type strain.

2.5 *crgA* 基因对三孢布拉霉发酵过程的影响

将三孢布拉霉野生菌、 Δ *crgA* 菌和 C- Δ *crgA* 菌种子液转接至发酵培养基中, 观察整个发酵过程中生物量、类胡萝卜素含量的动态变化, 以确定 *crgA* 基因对三孢布拉霉发酵过程的影响。生物量的变化如图 7 所示, 从图中可以看出, *crgA* 基因对生物量的影响主要在菌体生长前期, 敲除菌

较野生菌生长速度更快; 之后两者趋于一致, 并在发酵 120 h 后由于营养即将耗尽菌丝体开始自溶, 生物量急剧下降。菌丝体中番茄红素的含量呈先上升后下降的趋势(图 8), 这是因为番茄红素是 MVA 途径中的中间代谢产物, 随着番茄红素环化酶发挥作用, 积累的番茄红素逐步转化成 β -胡萝卜素。而 Δ *crgA* 菌番茄红素的积累速度和转化速度则明显高于野生菌, 这可能是关键酶基因的转录水平得到提高引起的。 β -胡萝卜素在发酵前期几乎没有积累, 在发酵 24-96 h 缓慢上升, 在发酵 96 h 后开始迅速积累, 并在发酵 120 h 时达到最大值, 达到 46.39 mg/L 相对于野生菌提高了 31.2% (图 9)。此后, 菌丝体开始自溶, β -胡萝卜素被释放到发酵液中, 菌丝体中的积累量也急剧下降。而将 *crgA* 基因重新导入 Δ *crgA* 菌中, C- Δ *crgA* 菌的生物量、类胡萝卜素的含量变化恢复野生型性状, 表明该基因对三孢布拉霉的生长和发酵性能有显著影响。

同时光照^[11]、性激素^[15]、活性氧^[18]等因素也能够影响三孢布拉霉的生长和类胡萝卜素的积累, 共同组成代谢调控网络。由于三孢布拉霉调控机制十分复杂, 还需进一步的研究进行解析。

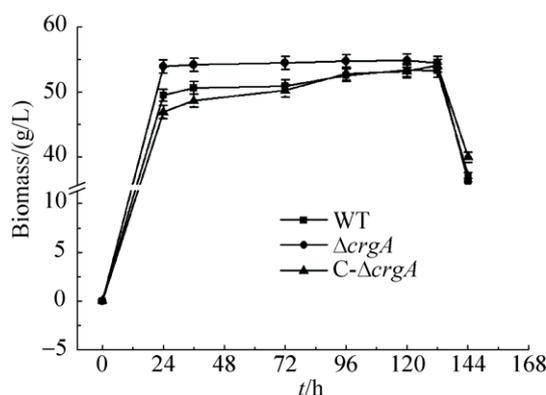


图 7. 生物量变化曲线

Figure 7. Time course of biomass in fermentation liquor.

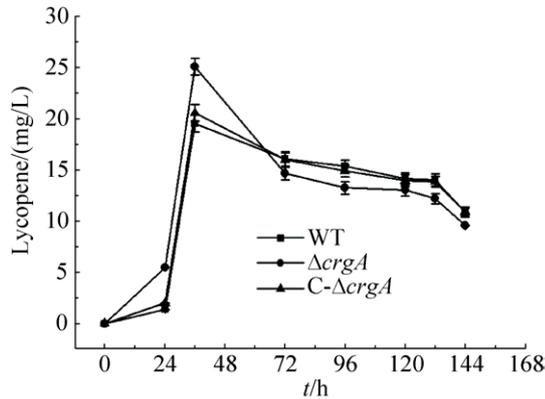


图 8. 番茄红素含量变化曲线

Figure 8. Time course of lycopene production.

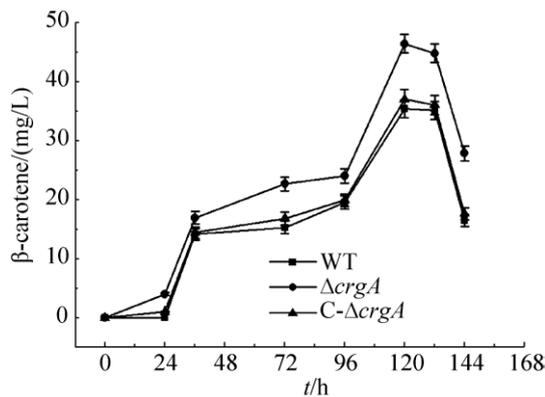


图 9. β-胡萝卜素含量变化曲线

Figure 9. Time course of β-carotene production.

3 结论

本实验在三孢布拉霉负菌中克隆到 *crgA* 基因, 并利用 split-marker 法将该基因敲除。与野生菌相比, $\Delta crgA$ 菌株的产孢能力受到限制, 但关键酶基因的转录和类胡萝卜素的积累量明显提高。而将 *crgA* 基因重新导入到 $\Delta crgA$ 菌株中, $\Delta crgA$ 菌株性状与野生菌一致, 表明 *crgA* 基因是三孢布拉霉代谢调控中的一个负调控因子。

参考文献

[1] Liu XJ, Liu RS, Li HM, Tang YJ. Lycopene production from

synthetic medium by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) and 2896 (-) in a stirred-tank fermenter. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(5): 739–749.

[2] Zhang WW, Wu YW, Ouyang J. Extraction of water-soluble β-carotene from carrots by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32(8): 854–860. (in Chinese)

张玮玮, 武彦文, 欧阳杰. 酶解水提法从胡萝卜中提取水溶性 β-胡萝卜素. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(8): 854–860.

[3] Papaioannou EH, Liakopoulou-Kyriakides M. Substrate contribution on carotenoids production in *Blakeslea trispora* cultivations. *Food and Bioprocess Processing*, 2010, 88(2/3): 305–311.

[4] Mantzouridou F, Tsimidou MZ. Lycopene formation in *Blakeslea trispora*. Chemical aspects of a bioprocess. *Trends in Food Science & Technology*, 2008, 19(7): 363–371.

[5] Bach TJ. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis? *Lipids*, 1986, 21(1): 82–88.

[6] Rodríguez-Sáiz M, Paz B, de la Fuente JL, López-Nieto MJ, Cabri W, Barredo JL. *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5589–5594.

[7] Navarro E, Ruiz-Pérez VL, Torres-Martínez S. Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(3): 800–807.

[8] Navarro E, Lorca-Pascual JM, Quiles-Rosillo MD, Nicolás FE, Garre V, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM. A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 266(3): 463–470.

[9] Silva F, Torres-Martínez S, Garre V. Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61(4): 1023–1037.

[10] Navarro E, Peñaranda A, Hansberg W, Torres-Martínez S, Garre V. A White Collar 1-like protein mediates opposite regulatory functions in *Mucor circinelloides*. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 52: 42–52.

[11] Quiles-Rosillo MD, Ruiz-Vázquez RM, Torres-Martínez S, Garre V. Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blakeslea trispora*. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42(2): 141–153.

[12] Yu NN, Wu CJ, Zhao W, Niu QQ, Wang B, Yan ZY, Qian DM,

- Song XX. Construction of ubiquitin C-terminal hydrolase (*creB*) gene deletion mutant via split-marker strategy. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(11): 2017–2021.
- [13] Li Y. Study on silencing of the *carRA* gene by RNA interference in filamentous fungus *Blakeslea trispora*. Doctor Dissertation of Beijing University of Chemical Technology, 2009. (in Chinese)
李晔. RNA 干扰三孢布拉氏霉菌番茄红素环化酶基因的研究. 北京化工大学博士学位论文, 2009.
- [14] Turgeon BG, Garber RC, Yoder OC. Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, 7(9): 3297–3305.
- [15] Schmidt AD, Heinekamp T, Matuschek M, Liebmann B, Bollschweiler C, Brakhage AA. Analysis of mating-dependent transcription of *Blakeslea trispora* carotenoid biosynthesis genes *carB* and *carRA* by quantitative real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(4): 549–555.
- [16] Nicolás FE, Calo S, Murcia-Flores L, Garre V, Ruiz-Vázquez RM, Torres-Martínez S. A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 280(1): 81–88.
- [17] Ruiz-Albert J, Cerdá-Olmedo E, Corrochano L. Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 266(5): 768–777.
- [18] Wang HB, Luo J, Huang XY, Lu MB, Yu LJ. Oxidative stress response of *Blakeslea trispora* induced by H₂O₂ during β -carotene biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(3): 555–561.

Regulation effect of *crgA* on carotenoid production in *Blakeslea trispora*

Zunyang Gong, Wei Luo^{*}, Yao Du, Xiaobin Yu

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We studied the regulation of *crgA* on carotenoid biosynthesis by *Blakeslea trispora*. [Methods] *crgA* was cloned from *B. trispora* and then disrupted by using split-marker strategy. Phenotypic characteristics, transcription of key enzyme genes and carotenoid accumulation between the wide-type and mutant strain were compared. [Results] In contrast to those of wild-type strain, the spore-forming ability of the mutant was weakened but transcription of key enzyme genes in the pathway of carotenoid biosynthesis increased and β -carotene production in the mycelia was improved by 31.2% after cultured for 120 h. After *crgA* was transformed into the mutant, the strain restored the phenotype as those of the wild-type strain. [Conclusion] *crgA* could regulate spore-forming and mycelia growth. Besides, the gene controlled carotenoid synthesis by regulating the transcription of key enzyme genes, which indicates that *crgA* is a negative regulator in *Blakeslea trispora*.

Keywords: *Blakeslea trispora*, carotenoid, *crgA*, negative regulator

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21606105), by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20130130) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51504)

*Corresponding author. E-mail: wluo@jiangnan.edu.cn

Received: 13 November 2016; Revised: 13 February 2017; Published online: 14 March 2017

<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>