

蓝光作用下黑曲霉形态发育与消减文库的分析

Study on the Asexual Sporulation of *Aspergillus niger* under Blue Light Induction and Analysis of its Subtractive Library

朱俊晨^{1,2}, 王小菁^{1*}

ZHU Jun-Chen^{1,2} and WANG Xiao-Jing^{1*}

1 华南师范大学生命科学院, 广州 510641

2 深圳职业技术学院生物工程系, 深圳 518055

1 College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

2 Department of Applied Biological Engineering, Shenzhen Polytechnic College, Shenzhen 518055, China

摘 要 以持续黑暗培养为对照, 采用扫描电镜观察了蓝光对黑曲霉孢子发育的影响, 结果表明蓝光处理使菌丝粗壮, 孢囊增大。以黑暗培养至 36h 再经蓝光处理 3~4h 的菌丝为实验组, 对应时间段的黑曲霉菌丝为对照组, 采用抑制性消减杂交 (SSH) 方法, 构建了蓝光作用下黑曲霉的差异表达基因的 cDNA 文库。阳性克隆菌落经 PCR 扩增出 200~500bp 差异表达基因的 cDNA 片段, 对序列进行同源性分析后发现两个差异表达的未知基因片段, 为进一步研究蓝光诱导下黑曲霉差异表达的未知基因的功能提供依据。差异表达的基因片段大都与黑曲霉线粒体氧化还原酶类同源, 荧光定量 PCR 分析结果表明所选取的部分差异基因片段在蓝光诱导下表达量均有提高。

关键词 蓝光, 信号转导, 黑曲霉, 抑制性消减杂交, cDNA 文库

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0263-05

Abstract The effect of blue light (BL) on the morphological development of *Aspergillus niger* was studied by the scanning electron microscopy (SEM) observation. Comparing with the darkness, BL was able to stimulate development of sporangiospore and conidiospore, promote growth of mycelium. Suppression subtractive hybridization (SSH) was conducted with tester cDNA which was from 39~40h-old mycelium cultured under darkness and driver cDNA which was from mycelium illuminated for 3~4h under BL after dark growth. Some cDNA bands were obtained by suppression PCR (polymerase chain reaction) with the subtractive cDNA. Positive bacterial clones were randomly picked and identified by colony PCR method. Through sequence alignments from GenBank, most of differential cDNA fragments were highly identical with some redox enzymes existing in mitochondria, and the quantitative measurement of these differential mRNA by real time RT-PCR indicated that relative expression of the identified gene fragments under BL induction was higher than that under darkness. Furthermore, the result suggested that some respiratory chain redox enzymes of mitochondria were involved in the photoresponse and consequently influence the metabolism. Among differential cDNA fragments two unknown sequences were found and their complete gene and gene function remained to be investigated.

Key words Blue light, signal transduction, *Aspergillus niger*, suppression subtractive hybridization, cDNA library

Received: September 21, 2005; Accepted: December 7, 2005.

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30170558).

* Corresponding author. Tel: 86-20-85216417; E-mail: sciencezc@126.com

国家自然科学基金项目(No. 30170558)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

蓝光和近紫外光可以调节从真菌到哺乳动物等大多数生物的生理活动,尤其是蓝光能够调节真菌包括生长发育、向光性和生理节律变化在内的很多生命活动^[1],有研究^[2,3]表明,蓝光对子囊菌属的粗糙链孢霉和须霉菌的生长发育有明显的调控作用。我们也曾报道^[4],蓝光能明显促进黑曲霉(*Aspergillus niger*)分生孢子发育和产孢阶段包括糖化酶在内的多种淀粉酶活力的迅速增加。然而,迄今为止,对于光调控黑曲霉表达的基因方面的研究尚未见报道,我们选择了产糖化酶黑曲霉东酒一号为材料,进一步研究了蓝光作用下黑曲霉形态发育的变化,并采用抑制性消减杂交(SSH),建立了差异表达基因消减 cDNA 文库,初步分析了蓝光诱导下黑曲霉特异表达基因,为研究黑曲霉中部分与蓝光作用相关的基因以及蓝光对黑曲霉生长发育影响的分子机理提供线索。

1 材料与方法

1.1 光源

40W 蓝色荧光灯由广州灯泡厂生产,将蓝色光源通过蓝色滤膜(#73)(日本ケールデイユ株式会社生产的截止型滤膜)而获得较纯的蓝光(BL),蓝光最强波长为 450nm,半高宽为 50nm,光强均为 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。所有光源装置均放在遮光的控温室中,温度为 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

1.2 黑曲霉的培养与电镜形态观察

黑曲霉(*Aspergillus niger*)东酒一号,由广东微生物研究所提供。采用查氏培养基并添加 1% 葡萄糖和 0.1% 酵母膏, pH6.0。试管斜面菌种转接到新的试管斜面上,经过培养,待长出孢子后,做成孢子悬浮液(稀释至 10^6 个/mL)。将 25mL 上述高压灭菌后的液体培养基倒入培养皿内,接入孢子悬浮液 1mL,混和均匀后,黑暗下培养后再在蓝光下培养,每隔 6h 取样,样品经前固定后用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,质量分数 $W = 1\%$ 的锇酸后固定 1h,双蒸水洗涤 3 次,单宁酸 + 戊二醛双导电染色,双蒸水洗涤 3 次,转入酒精梯度脱水,干燥,喷金膜,采用 Philips-XL-300 电镜扫描、观察并摄影。

1.3 消减杂交文库的建立

1.3.1 总 RNA 的提取:以黑暗培养 36h 菌丝为材料,蓝光处理 4h 后的菌丝体为实验组,黑暗培养至同一时间段的菌丝为对照组。液氮研磨后,按照总 RNA 提取试剂盒 TRIZOL(GIBCOBRL)的方法提取菌丝总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计

(260nm/280nm)进行定性定量检测后 -70°C 备用。

1.3.2 抑制性消减杂交:具体操作按 PCR-Select™ cDNA Subtraction 试剂盒(CLONTECH)常规 SSH 方法说明书进行:以黑暗培养 36h 后再经蓝光处理 3~4h 后的菌丝体 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA,标记为 Tester,以持续黑暗培养至同一时间段的菌丝所合成的 cDNA 为对照组,标记为 Driver。将 Tester 的 cDNA 分为两份,再经 *Rsa* I 酶切后通过 T4 DNA 连接酶作用,分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adaptor1 和 Adaptor2,变性后与过量的 Driver cDNA 进行杂交;合并两种杂交产物后再与 Driver cDNA 作第 2 次杂交,将杂交产物分别以 Adaptor1 和 Adaptor2 的内外侧引物先后做两轮选择性 PCR 扩增,使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。

1.4 消减文库扩增及克隆分析

扩增产物与 pUC18T-vector 载体连接,转化感受态大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 琼脂平板上 37°C 培养 18h。挑取白色菌落,以载体多克隆位点两端引物进行菌落 PCR 扩增,证明含有插入片段(200~500 bp)后,PEABIPRISM 3700 测序仪测序(上海博亚公司)。测序结果用软件 VectorNTI9.0 分析,将测得序列 GenBank 数据库进行同源性分析。

1.5 荧光定量 PCR 分析

参照荧光定量 PCR(FQ RT-PCR)引物与探针设计要求,设计合成差异 cDNA 片段及其 TaqMan 荧光探针和黑曲霉 18S RNA 等引物。分别提取对应时间段的黑曲霉菌丝 mRNA 进行 RT-PCR 反应,将扩增的差异 cDNA 片段为目的基因,克隆于 pUC18 载体上,抽提质粒后定量,作为标准品。每个样品取逆转录产物 cDNA $5 \mu\text{L}$,分别进行对应引物及其相应探针的 FQ RT-PCR 反应,每组设一个既无 cDNA 又无阳性标准品的阴性对照管。样品扩增的同时,将已经进行从 1×10^1 至 1×10^7 梯度稀释的阳性标准品各取 $5 \mu\text{L}$ 作模板,进行与样本同条件的 FQ RT-PCR,电脑自动绘制标准曲线,以和 18S RNA 拷贝数的相对值为报告数据。

2 结果与讨论

2.1 蓝光对黑曲霉分生孢子形成的影响

我们先前的实验^[4]表明,蓝光促进菌丝增粗,顶端膨大。进一步运用扫描电镜观察(图 1)发现,在黑暗中生长 36h 的菌丝,顶端膨大,顶囊初步形成。

此时给予蓝光处理后,相比于黑暗处理的对照组而言,菌丝顶囊初生孢子梗较为密集,分生孢子柄粗短,菌丝较粗(图 1E、1F);而持续黑暗处理的菌丝(图 1B 至 D)顶端分化出的初生孢子梗较稀疏,分生孢子柄较小,菌丝较细。蓝光下培养 12~18h 后形成的孢子穗已完全成熟,且大而结实,但孢子穗有蜂窝状结构出现(图 1G),相比之下持续黑暗培养形成的孢子穗较小,孢子形成滞后。蓝光诱导 24h 时菌

落直径较持续黑暗培养的大,生长速度也大于持续黑暗培养的菌落(表 1)。

表 1 持续黑暗和蓝光诱导后黑曲霉菌落形态及生长的比较

Time after BL/h	Colony diameter/cm		Growth rate/(mm/h)	
	Darkness	Blue light	Darkness	Blue light
24	3.58 ± 0.70	3.82 ± 0.28	1.10	1.20
36	4.51 ± 0.30	4.76 ± 0.064	0.77	0.95

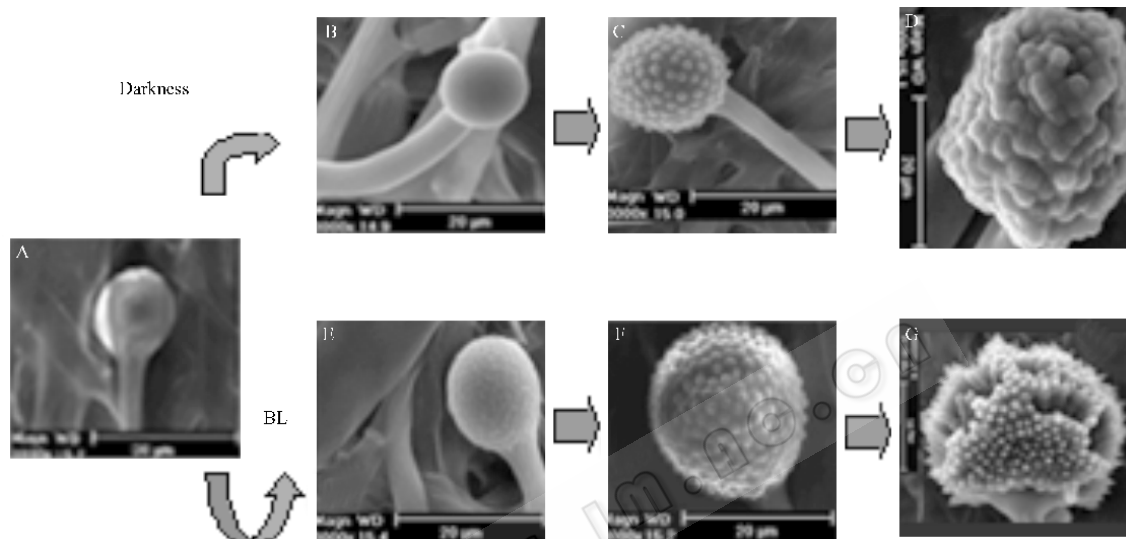


图 1 蓝光影响黑曲霉菌丝生长和分生孢子形成的扫描电镜观察(×3000)

Fig. 1 Scanning electron microscopy observations(×3000) of morphological changes during conidiophore formation after blue light induction

A: control (which is 36h old after dark culture); B~D: cultured under dark condition at the time corresponding to those treated by blue light; E~G: 6h, 12h, 18h after blue light irradiation, respectively.

2.2 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆

用接头序列的外侧引物对消减杂交产物进行扩增,如图 2 所示,30 循环后 PCR 产物位于 0.25kb 左右。用接头序列的内侧引物对第一轮 PCR 稀释产物进行扩增,15 个循环后见 PCR 产物表现为 0.2~0.5kb 之间的许多隐约可见的条带,这些条带可能代表差异表达的基因片段。100 μ L 转化菌液涂布的氨苄青霉素 X-gal/IPTG 平板上有大约 200 个白色及蓝色菌落生长,菌落清晰饱满,白色菌落占总菌落的 80% 以上。随机挑取的 25 个白色菌落繁殖后进行菌液 PCR 检测,结果(图 3)显示 15 个克隆有 200~500bp 的插入片段,与 cDNA 酶切结果相符,提示可能含有实验组差异表达基因 cDNA。纯化提取阳性克隆的质粒并进行了测序验证。

2.3 cDNA 测序与同源性分析

纯化提取阳性克隆质粒测序,与 GenBank 数据库进行同源序列比较。表 2 列举了部分片段与已知基因的序列同源性(89%~100%),表达谱包括的同

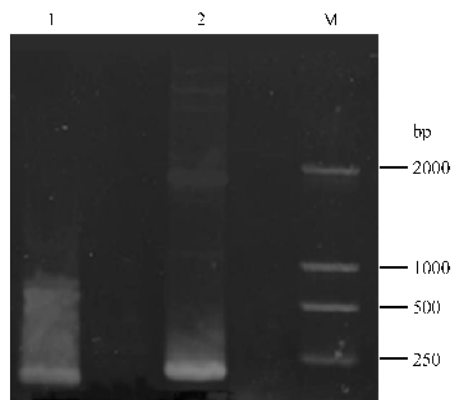


图 2 两轮抑制 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of two suppression

M: marker; 1: product of forward subtraction; 2: product of secondary subtraction.

源基因主要是黑曲霉的,基因功能涉及呼吸链氧化还原酶、线粒体小核糖体亚基、18S 核糖体 RNA 等等相关基因。其中有 5 个差异片段与黑曲霉糖化酶基因 cDNA 的同源性都是 100%,此外,还有 2 个克

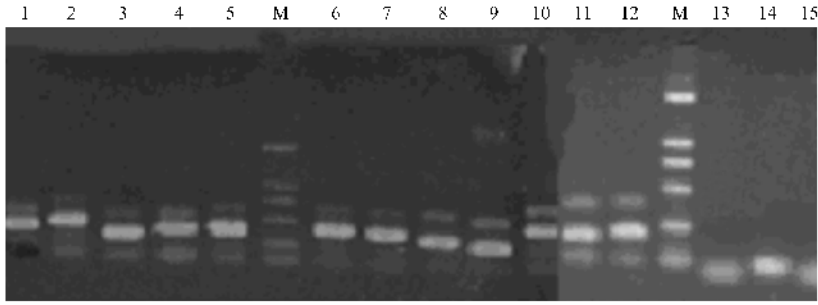


图3 菌落 PCR 筛选结果

Fig.3 Partial results of colony PCR amplification
M :marker ; 1 ~ 15 : product of colony PCR.

表2 阳性克隆与 Genbank 同源序列比较结果
Table 2 Sequences alignments

Clone No	Identified relative gene	Number of relative cDNA fragments	Identities	GenBank Hit
Z01. B06	glucoamylase genes G1 ,G2	5	100%	ANGA01 , AY250996.1
Z09. B06	18S ribosomal RNA gene , partial	2	100%	L76916.1
Z05. B06	soxA gene	1	99%	X91042.1
Z11. B06	mitochondrial small ribosomal RNA	3	99%	AF548064.1
Z10. B06	aox1 gene for alternative oxidase	1	89%	AB046619.1
Z05. B06	no identity aligned	1	—	—
Z06. B06	no identity aligned	1	—	—

隆未检索到任何对应的相似序列,为未知序列(分别为 190bp 和 200bp),可能分别代表了两个新基因,关于该未知基因结构及功能分析的研究正在进行中。选取其中同源性较高的 3 个较长序列设计引物,以黑曲霉 18S 核糖体基因设为内置对照,进行荧光定量 PCR 验证。

2.4 荧光定量 PCR 分析

对同源性高的 3 个差异表达的基因片段(Z01. B06、Z05. B06、Z10. B06)进行实时荧光定量 PCR 分析,图 4 是将黑曲霉黑暗培养 36h 后再经蓝

光诱导不同时间的差异片段 cDNA 的拷贝数相对于 18S RNA 的表达量,由实验结果看出,所取的差异表达片段均受蓝光诱导,相比于持续黑暗培养的黑曲霉而言,在蓝光诱导 2h 后,上述差异表达 cDNA 片段的相对拷贝量增大至最高值,之后也始终高于对照组,在 6h 后才逐渐下降。其中以糖化酶基因 G1 高度同源的 cDNA 片段诱导后表达量最高,推测糖化酶基因的表达不是蓝光诱导的直接差异表达结果,很可能是蓝光诱导其它因素表达后促进黑曲霉菌丝体生长代谢的结果。此外,与交替氧化酶同源

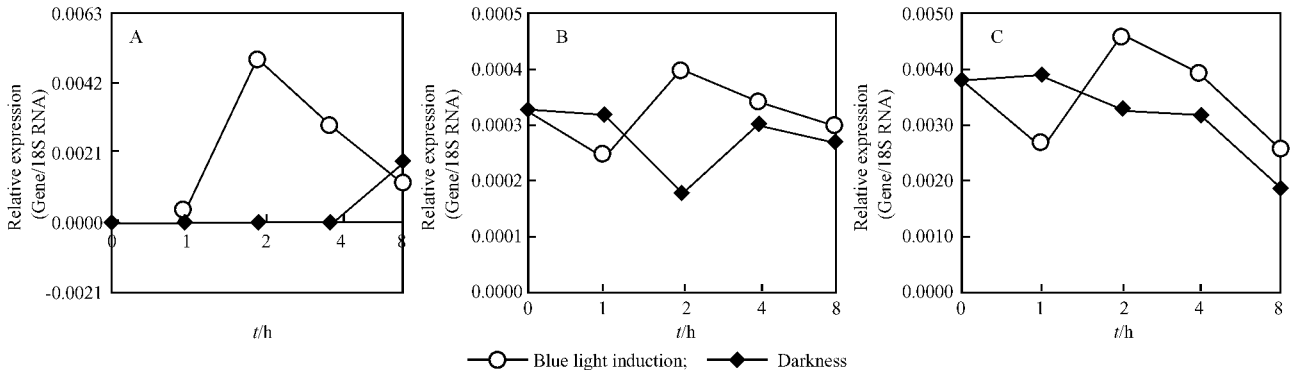


图4 消减文库部分 cDNA 片段荧光定量 PCR 分析结果

Fig.4 Real time-PCR result of differential cDNA fragments
A : Z10. B06 ; B : Z05. B06 ; C : Z01. B06(Glucoamylase genes G1).

的 Z10.B06 基因片段在持续黑暗培养下直到 6h 后才开始表达,而同一时间段的菌丝在蓝光诱导后的表达量却始终偏高。

3 讨论

光能调控真菌生长的形态发育的变化。蓝光是环境中的重要信号因子,可影响真菌的生理周期、形态变化、基因表达、进而影响真菌的代谢和生长发育^[2,3,6]。我们考察了黑曲霉生长发育过程不同阶段蓝光对其的诱导作用,发现黑暗中生长至 36h 时,菌丝顶端开始突起膨大产生顶囊再进一步形成孢子梗和孢子,以蓝光处理生长至 36h 阶段的菌丝后,相比于持续黑暗或一直持续蓝光培养的菌丝体而言,菌丝粗壮,产孢率较高,孢子穗大而结实,提示了黑暗生长至 36h 的菌丝对蓝光作用较为明显,提示黑曲霉只有在生长发育至一定阶段时,由于基因的多效性变化,进而影响了蓝光的应答机制,促进了生长和孢子发育。以此阶段的菌丝经蓝光作用 3~4h 后,进行 SSH,从实验结果分析来看,除了新发现的两个未知基因(目前正在克隆基因的全长和作进一步深入研究)外,差异片段主要是黑曲霉线粒体中呼吸链有关的氧化还原酶类(如交替氧化酶等)以及线粒体小核糖体亚基的部分 cDNA 序列,其中与交替氧化酶同源的片段表达差异较为明显,在经蓝光作用后即开始表达,而黑暗下同一时间段的菌丝中却未见表达,这也进一步提示,黑曲霉蓝光信号途径与线粒体中呼吸作用的氧化还原作用有关。此外,黑曲霉在黑暗下生长至 36h 时,经蓝光诱导后的形态差异更为明显,表明黑曲霉存在一个对蓝光反应产生最适光感应的发育阶段,事实上抑制性扣除杂交实验和部分差异基因片段表达分析的结果也提示了交替氧化酶可能参与了蓝光的光反应,呼吸链中电子传递(氧化还原)途径因蓝光作用而发生改变,最终产生黑曲霉孢子形态发育的变化,有关交替氧化酶呼吸途径参与蓝光信号途径的研究目前正在进一步的深入进行之中。

多细胞真核微生物的器官形成是一个复杂的过程,其中涉及到感应细胞外环境信号的多个途径,其

生命周期的无性阶段一般是先形成多细胞分生孢子梗,然后再产生分生孢子,而其分生孢子的发生也是由基因决定的一个程序的过程,发生在其生命周期的一个精确的时间段内^[5],Lauter 等^[2]曾报道子囊菌属的粗糙链胞霉有一些基因是在产孢阶段表达而受蓝光调控的,而 Cerda-Olmedo 等^[3,7]的研究也表明,真菌发育过程基因的多效性变化影响了光的应答机制,真菌的光信号转导途径是随着生长发育过程中多个基因的表达及其相互作用而完成的。黑曲霉只有在菌丝顶端膨大即将分化形成初生孢子梗时,才对蓝光作用更为敏感,说明这一阶段菌丝中已表达出一系列与蓝光信号调控有关的基因,并参与蓝光信号途径。随着对黑曲霉光信号传导网络以及光形态建成机制研究的深入,蓝光对黑曲霉的光效应的研究最终将有助于了解真菌光控发育机制和环境因素是如何调控真菌微生物的生长发育的,而致力于寻找黑曲霉光信号传导途径中的功能基因,并研究它们所起的作用就显得尤其迫切与需要,同时也可为该领域研究提供借鉴与参考。

REFERENCES(参考文献)

- [1] He QY, Cheng P, Yang YH *et al.* White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science*, 2002, **297**: 840 - 843
- [2] Lauter FR, Russo VE. Blue light induction of conidiations peci. c genes in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 6883 - 6886
- [3] Flores R, Cerda-Olmedo E, Corrochano LM. Separate sensory pathways for photomorphogenesis in *Phycomyces*. *Photochem Photobiol*, 1998, **67**: 467 - 472
- [4] Zhu JC(朱俊晨), Wang XJ(王小菁). Effect of blue light on conidiation development and glucoamylase enhancement in *Aspergillus niger*. *Acta Microbiologica Sinica(微生物学报)*, 2005 **45**(2): 275 - 278
- [5] Cletus A, Bee Na Lee, Thomas H *et al.* Characterization of the role of the flug protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 2001, **158**, 1027 - 1036
- [6] Galland P, Lebert M. Phototropism in *Phycomyces*. *Photo-sciences*, 2001 **1**: 621 - 657
- [7] Cerda-Olmedo E, Corrochano LM. *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, **25**: 503 - 512