

产毒红曲菌中生物合成桔霉素基因 ——pksCT 基因的保守性分析

付桂明, 许 杨*, 李燕萍, 吴酬飞

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘 要: 选用 7 种 14 株产桔霉素红曲菌, 运用基因组 PCR 分析方法, 从它们的基因组中分别扩增到两条大小分别为 669bp 和 591bp 的 pksCT 基因翻译起始区部分序列和终止密码子区部分序列片段。扩增产物的测序结果通过 NCBI 进行 BLAST 同源性分析。结果显示扩增产物序列之间具有高度同源性, 且分别与 Genbank 中公布的紫色红曲菌中 pksCT 基因翻译起始区部分序列和终止密码子区部分序列一致。pksCT 基因是红曲菌中普遍存在的生物合成桔霉素基因。运用基因组 PCR 分析 pksCT 基因, 是鉴别红曲菌产毒株的有效方法之一。

关键词: 红曲菌; 桔霉素合成基因; 保守性

Analyzing Conservativeness of pksCT Gene for Citrinin Biosynthesis from Citrinin-producing *Monascus* spp.

FU Gui-ming, XU Yang*, LI Yan-ping, WU Chou-fei

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-Germany Joint Research Institute,
Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: pksCT gene was a related gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. In this study, fourteen citrinin-producing *Monascus* spp. coming from seven *Monascus* species were used in the experiment. Two DNA fragments from the transcriptional start region and the stop codon region of pksCT gene, which were 669 bp and 591 bp respectively, were gained from fourteen *Monascus* spp. by genomic PCR. Results of NCBI BLAST showed that PCR products exhibited high identity with each other, and were in accordance with the partial sequences of pksCT gene in *M. purpureus* which was announced in the Genbank. It was suggested that pksCT gene was a general gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus* species. It was also indicated that it was the effective way to distinguish the citrinin-producing *Monascus* strain by analyzing the pksCT gene with genomic PCR.

Key words *Monascus*; citrinin biosynthesis gene; conservativeness

中图分类号: TS201

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0359-05

红曲菌是用于生产天然肉制品色素——红曲色素^[1]、具有抑制胆固醇合成的 Monacolin 类化合物^[2]和降压功能的 γ -氨基丁酸^[3]的生产菌株。但 1995 年发现红曲菌在代谢过程中会产生一种肾毒性毒素——桔霉素, 红曲产品的安全性在世界范围内引起了广泛的关注。因此鉴定红曲菌菌种产桔霉素的特性, 筛选低产或不产桔霉素的红曲菌菌株、减少桔霉素的污染是非常重要的。研究表明同一株红曲菌菌种在不同培养条件下的发酵产物中, 桔霉素含量往往有很大差异^[4], 因此传统检测发酵产物中是否含有桔霉素的产毒红曲菌菌株的传统鉴别方

法, 不适合红曲菌产毒株的鉴定。

近年来世界各国纷纷开展红曲菌生物合成桔霉素的遗传背景的研究, 试图从分子水平上对红曲菌株的产桔霉素特性进行鉴定。红曲菌的代谢调控研究发现桔霉素与红曲色素的合成开始于同一个生物合成途径^[5]。2005 年日本大阪大学的 Shimizu 从紫色红曲菌中克隆到一个与生物合成桔霉素相关的基因——pksCT 基因^[6]。分析不同红曲菌产毒菌株中 pksCT 基因之间是否存在差异, 探讨 pksCT 基因在产桔霉素的红曲菌菌株中存在的普遍性, 可为从分子水平上鉴别红曲菌产毒株提供了理论基础。

收稿日期: 2007-03-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30460006); 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0540)

作者简介: 付桂明(1972-), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: gmfu1026@163.com

* 通讯作者: 许杨(1951-), 女, 教授, 博士, 研究方向为微生物及食品生物技术。E-mail: xuyang1951@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 菌株

AS3.4384(橙色红曲菌, *M. aurantiacus*)、AS3.2636(安卡红曲菌, *M. anka* Nakazawa et Sato)、AS3.4444(丛毛红曲菌, *M. pilosus* Sato)、AS3.4451(紫色红曲, *M. purpureus* Went)、AS3.4452(巴斯红曲菌, *M. paxii* Lingelsheim)、AS3.4453(巴克红曲菌, *M. barkeri* Dangerd)、AS3.976(变红红曲菌, *M. serorubescens*) 中科院微生物研究所; IFFI05007(红色红曲菌, *M. ruber* van. Tieghem)、IFFI05012、IFFI05013、IFFI05022、IFFI05031、IFFI05032、IFFI05033(安卡红曲菌, *M. anka* Nakazawa et Sato) 中国轻工业发酵研究所。

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、脱氧核糖核苷酸(dNTPs)、DNA Marker Takara(大连)有限公司; 蛋白质 KAmresco 公司; Goldview 核酸染料 上海赛北盛生物技术有限公司; 甲醇、乙腈 国产色谱纯; 桔霉素标准品 Sigma 公司。

1.3 仪器与设备

ULTRASPEC 4300紫外分光光度计 美国Pharmacia 公司; Gene Amp PCR system 2400型 PCR扩增仪 美国PE 公司; FR-200 生物图像分析系统 上海复日科技有限公司; S1121 高效液相色谱仪 德国Sykm 公司。

1.4 红曲菌产桔霉素特性的研究

1.4.1 红曲菌液体发酵培养

接种斜面保存的14株红曲菌到麦芽汁(MES)固体培养基^[7], 28℃静置培养13d后, 用无菌孢子洗液(0.05%吐温80的生理盐水)将孢子洗脱, 孢子悬液分别接种到100ml酵母蔗糖(YES)液体培养基^[8], 至终浓度为 3.0×10^5 个/ml, 于28℃静置培养13d^[9]。

1.4.2 发酵液样品处理

在培养液中加入等体积甲醇, 用涡旋振荡器充分混匀, 超声波处理20min, 室温下放置5~8h, 混合液12000r/min离心20min分离菌丝, 上清液通过0.45μm直径薄膜过滤, 滤过液用甲醇/水缓冲液(50/50, V/V)稀释到100倍, 用HPLC测量桔霉素含量。

1.4.3 桔霉素HPLC法检测

桔霉素检测参照1996年Franco C M的HPLC法^[10]。色谱柱: Symmetry C₁₈(5μm, 250×4.6mm); 流动相: 乙腈-水(pH2.5)(77/23, V/V); 检测器: Waters 荧光检测器, 检测波长为 $\lambda_{ex}=331\text{nm}$, $\lambda_{em}=500\text{nm}$; 柱温: 28℃; 流速: 0.8ml/min; 进样量: 10μl。

1.5 红曲菌基因组DNA的分离纯化

从真菌中获得纯度高、完整性好的DNA是进行分子生物学研究的前提条件, 采用本实验室改进的氯化苄法分别从14株红曲菌菌丝体中分离纯化基因组DNA^[11], 并用0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定基因组DNA的纯度。

1.6 pksCT基因部分序列的PCR扩增

1.6.1 PCR引物的设计与合成

利用Gene Bank中公布的紫色红曲菌中与生物合成桔霉素相关的基因——pksCT基因序列(No. AB167465), 设计两对为引物, 以7种14株的红曲菌基因组DNA作为模板进行PCR扩增, 引物序列、产物长度和扩增靶基因pksCT的区域等见表1(引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。

1.6.2 PCR扩增体系和条件

以提取的14株红曲菌基因组DNA为模板, 扩增pksCT的启动子区部分序列(A, 678bp)和终止子区部分序列(B, 618bp), PCR扩增体系见表2。

表2 片段A和B的PCR反应体系
Table 2 PCR reactive system of fragment A and B

项目	体积(μl)
10× PCR Buffer	2
dNTP (2.0mmol/L)	2
MgCl ₂ (25mmol/L)	1.6
上游引物 (10μmol/L)	1.0
下游引物 (10μmol/L)	1.0
模板基因组DNA (50ng/μl)	2
Taq酶 (5.0U/μl)	0.2
无菌水	10.2
合计	20

PCR 扩增反应条件:

片段A PCR扩增条件: 94℃预变性, 3min, 1个循环; 94℃变性1min, 56℃梯度温度退火1min, 72℃延伸1min, 30个循环; 最后72℃延伸10min。

片段B PCR扩增条件: 94℃预变性, 3min, 1个

表1 pksCT gene 部分序列的PCR扩增引物序列、产物长度和扩增区域
Table 1 Sequence of PCR primers,length and regions of PCR roducts in pksCT gene

	引物	引物序列	酶切位点	产物长度(bp)	扩增靶基因 pksCT 的区域
A	K	5'-GGGGATCCCCGAAGGAGATAAACAGTGAGAG-3'	<i>Kpn</i> I	684	启动子区 65~733
	L	5'-GCTCATGAAGGCGTTGATGAGATGTAG-3'	<i>Xba</i> I		
B	M	5'-GCTCATGAGCTACTATCCACTTCGCTAC-3	<i>Xba</i> I	608	终止子区 8349~8940
	N	5'-ACITGCAGAATCTCTCGTCTTAGTCGTATC-3'	<i>Pst</i> I		

循环; 94℃变性 1min, 55℃梯度温度退火 1min, 72℃延伸 50s, 30 个循环; 最后 72℃延伸 10min。

1.7 PCR 扩增片段的分析

PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 电泳电压为 5V/cm, 时间 50min, 电泳结束后用凝胶成像系统中成像分析, 目的片段 A 和 B 大小分别为 678bp 和 618bp; PCR 扩增的目的片段切胶回收后, 与 pMD 18 T-Vector (TaKaPa) 相连接, 并转化到大肠杆菌 DH5- α , 测序结果到 Genbank 进行 Blast 分析^[12]。

2 结果与分析

2.1 红曲菌发酵液中桔霉素量测定结果

14 株红曲菌 28℃静置培养 13d 的酵母浸膏蔗糖培养液的 HPLC 检测结果见表 3, 表 3 显示在 14 株红曲菌的培养液中都检测到桔霉素, 桔霉素含量范围为 65 ~ 1092mg/L, 其中菌株 AS3. 4384 的培养液中桔霉素的含量最高, 达到 1092mg/L; 最低是 IFFI05022, 为 65mg/L。

表 3 红曲菌菌株在 YES 液体培养基中培养产桔霉素的含量

Table 3 Concentrations of citrinin produced by *Monascus* in YES medium

菌株	桔霉素产量(mg/L)	菌株	桔霉素产量(mg/L)
IFFI05031	372	AS3. 4451	142
IFFI05033	329	AS3. 4452	79
IFFI05013	196	AS3. 976	204
IFFI05032	92	AS3. 4444	72
IFFI05022	65	AS3. 4453	137
IFFI05012	137	AS3. 2636	243
IFFI05007	221	AS3. 4384	1092

注: n=3; 培养条件与时间: YES 液体培养基, 28℃, 静置培养 13d。

2.2 基因组 DNA 的纯度鉴定

将 14 株红曲菌培养 72h 所得的菌丝体滤干, 采用改进的氯化苄法提取基因组 DNA, 提取的产物经电泳检测, 结果如图 1 所示, 电泳图谱均出现一条均一的 DNA 条带, 显示提取的基因组 DNA 分子量大小约为 23kb 左右, 且无明显降解现象, 具有较好得完整性, 可以进行 PCR 扩增研究。

2.2.1 14 株红曲菌中 pksCT 基因部分序列的 PCR 扩增结果

以提取的 14 株红曲菌基因组 DNA 为模板, 用设计的两对引物分别进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1.0% 琼脂糖电泳, 结果见图 2, 以 K 和 L 为上下游引物扩增得片段 A(图 2 I)和以 M 和 N 为上下游引物扩增得 B(图 2 II), 从各菌株基因组 DNA 中均能扩出一条 678bp 和 618bp 片段, 与设计扩增的序列长度一致。

2.2.2 PCR 产物 DNA 测序结果

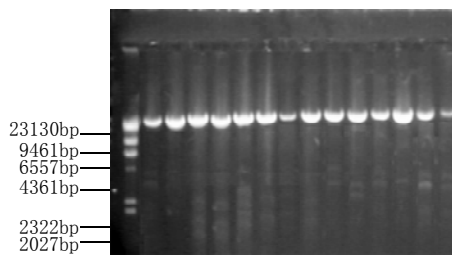
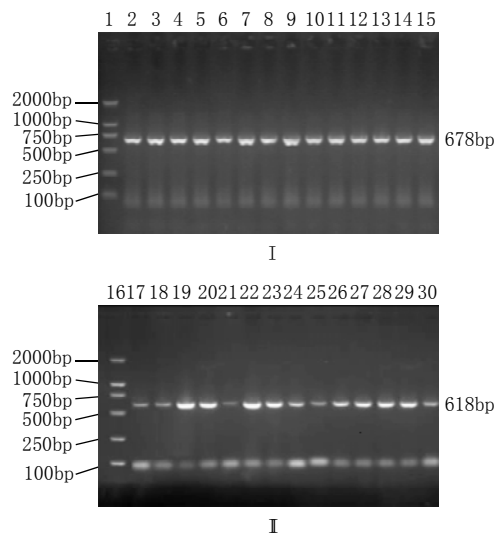


图 1 14 株红曲菌基因组 DNA 电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from fourteen *Monascus* spp. strains



泳道 1 和 16. DNA marker DL2000; 泳道 2~15 和泳道 17~30 分别为 AS3. 4451、AS3. 4453、AS3. 4384、AS3. 976、AS3. 4444、AS3. 4452、AS3. 2636、IFFI05012、IFFI05013、IFFI05022、IFFI05031、IFFI05032、IFFI05033、IFFI05007 的 PCR 产物片段 A 和 PCR 产物片段 B。

图 2 14 株红曲菌基因组 DNA 的 PCR 产物片段 A(I)和 B(II)电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products A(I) and B(II) from fourteen *Monascus* spp. genomic DNA

PCR 扩增的两个产物片段 A 和 B 经测序后, 测序结果送 Gene Bank 进行 Blast 比对。比对结果见图 3。图 3 表明, 各菌株中扩增的两个产物片段 A 和 B 与 Shimizu 在 Gene Bank 中 *M. purpureus* 的 pksCT 基因 (No. AB167465) 启动子区部分序列 (65~733) 和终止子区部分序列 (8349~8940) 同源性均在 99% 以上, 且各 PCR 产物之间同源性在 98% 以上, 说明生物合成桔霉素基因——pksCT 在 7 种 14 株产桔霉素的红曲菌菌株中具有高度地保守性。

3 讨论

研究结果显示在使用的 7 种 14 株红曲菌的 YES 培

1. 扩增产物A与 pksCT gene 的翻译起始区序列比对结果: (dbj|AB167465.1| 紫色红曲菌桔霉素聚酮合成基因——pksCT 基因, 全序列长度=9369, 得分=1318 bits(665), E 值=0.0, 同源性=669/669(99%), 缺口=0/669(0%), 链=负链/负链)

1	AAACAGTGAGAGCCACCAACATCTATAGATCTGTCATGGGTTTCAGCGTCGATCACATGCT	60
65	AAACAGTGAGAGCCACCAACATCTATAGATCTGTCATGGGTTTCAGCGCCGATCACATGCT	124
61	TCTTACCAACTTCCCTTTTTTCTTCAGCCAGTGCTTTGTACTTTCTCTTCTCCAGCGAT	120
125	TCTTACCAACTTCCCTTTTTTCTTCAGCCAGTGCTTTGTACTTTCTCTTCTCCAGCGAT	184
121	TCCTTCGTATACATAAGTGCCACCAATTGAACAAAGTTGCGTCCAACCTCTTACATGAT	180
185	TCCTTCGTATACATAAGTGCCACCAATTGAACAAAGTTGCGTCCAACCTCTTACATGAT	244
181	CCAGTATCCACTTGGCAAGTGATTCTCTTCAAATTCTGAAAGTTTGAGTCCATTTGCAA	240
245	CCAGTATCCACTTGGCAAGTGATTCTCTTCAAATTCTGAAAGTTTGAGTCCATTTGCAA	304
241	AAGGAATTTTGAGTTGTCAGCATGATTGATATGGGGATTTTCCATTTTTTAAATCAGAA	300
305	AAGGAATTTTGAGTTGTCAGCATGATTGATATGGGGATTTTCCATTTTTTAAATCAGAA	364
301	ATGGCTAATAAGACTCGACCTCGTGCTCAGCGAGATTATTTAAAGGTCCATCGCGAATT	360
365	ATGGCTAATAAGACTCGACCTCGTGCTCAGCGAGATTATTTAAAGGTCCATCGCGAATT	424
361	GGTGGCATTATGGCGCGTCGAATTGTATGGAATCAATATAGTGGACGTTTTTCCGAGTA	420
425	GGTGGCATTATGGCGCGTCGAATTGTATGGAATCAATATAGTGGACGTTTTTCCGAGTA	484
421	TGGTATATCCGGCGACCACTATGCACCATGAATAGATGCAACCTTACACCTTGTCAGAT	480
485	TGGTATATCCGGCGACCACTATGCACCATGAATAGATGCAACCTTACACCTTGTCAGAT	544
481	GCAAGATTACTCTATATAAGCTGGCATGCCGATGTGATTGCAACCACTCATTGAACTT	540
545	GCAAGATTACTCTATATAAGCTGGCATGCCGATGTGATTGCAACCACTCATTGAACTT	604
541	GGCTAAAGATCGGCAACAGTATTCTTGAAGAAAGGACGTGCGCCGACACGCATTCTGGT	600
605	GGCTAAAGATCGGCAACAGTATTCTTGAAGAAAGGACGTGCGCCGACACGCATTCTGGT	664
601	CCAAGCTCGTACAGCAGGGTTGGGGACCGTCCGTACTTCTACACGCTAGCCTACATCTCA	660
665	CCAAGCTCGTACAGCAGGGTTGGGGACCGTCCGTACTTCTACACGCTAGCCTACATCTCA	724
661	TCAACGCCT	669
725	TCAACGCCT	733

2. 扩增产物B与 pksCT gene 的终止密码子区序列比对结果: (dbj|AB167465.1| 紫色红曲菌桔霉素聚酮合成基在——pksCT 基因, 全序列长度=9369, 得分=1144 bits(577), E 值=0.0, 同源性=590/593(99%), 缺口=1/593(0%), 链=负链/负链)

1	GCTACTATCCACTTCGCTACGGGAAATCATTGCTCCGGAAGAGACTATGACCGCAGATT	60
8349	GCTACTATCCACTTCGCTACGGGAAATCATTGCTCCGGAAGAGACTATGACCGCAGATT	8408
61	CCGTCTGCGCAGTTGGATATGCCGAAGCAAAGCTAGTCTGCGAGCGCATGCTGGACGAGA	120
8409	CCGTCTGCGCAGTTGGATATGCCGAAGCAAAGCTAGTCTGCGAGCGCATGCTGGACGAGA	8468
121	CGCTGCATCAATATCCAGATAGGTTTCAGACCAATGGCAGTAAGGATTGCCCAAATTGCTG	180
8469	CGCTGCATCAATATCCAGATAGGTTTCAGACCAATGGCAGTAAGGATTGCCCAAATTGCTG	8528
181	GCTCAACAAGCAACGGGCACTGGAATCCAGTCGAGCATTTTGCATTCTAATTAATCGT	240
8529	GCTCAACAAGCAACGGGCACTGGAATCCAGTCGAGCATTTTGCATTCTAATTAATCGT	8588
241	CTCAGACGTTGAAAGCGCTTCCGGACTTTGATGGTAGCCTCTCGTGGTGTCGGTTCGACG	300
8589	CTCAGACGTTGAAAGCGCTTCCGGACTTTGATGGTAGCCTCTCGTGGTGTCGGTTCGACG	8648
301	ACGTTTCCGCGACACTGGGCGAATTATTGATTCTAACACAACGCCCTATTTCGATCTACC	360
8649	ACGTTTCCGCGACACTGGGCGAATTATTGATTCTAACACAACGCCCTATTTCGATCTACC	8708
361	ATATCGAGAATCCGTCAAGGCAACAATGGCGGAAATGATGAAAACGCTGGGCCAGTCAC	420
8709	ATATCGAGAATCCGTCAAGGCAACAATGGCGGAAATGATGAAAACGCTGGGCCAGTCAC	8768
421	TTGACATCCACGAGACGGTATTATTCCTTTTCGATCAATGGATTGAACGAGTCCGAAATT	480
8769	TTGACATCCACGAGACGGTATTATTCCTTTTCGATCAATGGATTGAACGAGTCCGAAATT	8828

