



生命科学前沿及应用生物技术

黄曲霉与黄曲霉毒素

汪世华 等 编著



科学出版社

生命科学前沿及应用生物技术

黄曲霉与黄曲霉毒素

汪世华 等 编著



科学出版社

北京

内 容 简 介

本书首先介绍了黄曲霉分类学、繁殖体、营养生长、基因组和危害,黄曲霉毒素种类、危害和生物合成途径;接着详细介绍了黄曲霉生长和黄曲霉毒素形成的影响因素,包括环境因子、营养元素、翻译后修饰以及转录调控因子。还对黄曲霉中的非编码 RNA、重要蛋白质的结构与功能进行了介绍,最后对黄曲霉和黄曲霉毒素的检测与防控进行了介绍。旨在让读者了解黄曲霉与黄曲霉毒素的危害及毒素合成的影响因素,进而了解黄曲霉与黄曲霉毒素的检测方法与防控措施,并为相关学科提供基础知识和技术。

本书适合生物学、医学、食品、环境等相关领域的研究和教学人员参考阅读,同时也适合生物科学、生物技术、生物工程、生物医学工程、食品科学与工程、环境科学等专业的研究生和科研人员作为教材和参考书。

图书在版编目(CIP)数据

黄曲霉与黄曲霉毒素/汪世华等编著. —北京:科学出版社, 2017.12

(生命科学前沿及应用生物技术)

ISBN 978-7-03-054377-6

I. ①黄… II. ①汪… III. ①黄曲霉-研究 ②黄曲霉毒素-研究
IV. ①Q949.327.1 ②R996.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 219021 号

责任编辑:罗 静 / 责任校对:郑金红

责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京教图印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 12 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2017 年 12 月第一次印刷 印张: 10 3/4

字数: 214 000

定价: 98.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

参加编写人员

(按姓氏拼音顺序排列)

白有煌 蓝华辉 李明祝 李 宇 梁林林

聂鑫怡 秦秋平 邱孟广 汪 斌 王 森

王秀娜 王 宇 杨 奇 姚光山 袁 军

张 峰 庄振宏

前 言

黄曲霉是一种重要的植物病原真菌，又是一种条件性的人畜共患病原菌。除了大家熟知的孢子，黄曲霉还产生一种抗性的休眠结构——菌核，帮助黄曲霉度过不良的生存条件，因此黄曲霉广泛存在于土壤、空气、农产品和食品中。黄曲霉可以侵染生长过程中或收获后的农作物，尤其对油料作物的种子危害最为严重。黄曲霉还威胁着人类和动物的身体健康，可以引起人类和动物多个器官的真菌感染，其中对肺部的感染最为严重。黄曲霉已经成为仅次于烟曲霉的侵袭性曲霉病的第二大致病真菌。黄曲霉还因其在侵染植物种子的过程中产生目前最强的致癌物——黄曲霉毒素而臭名昭著，黄曲霉毒素是黄曲霉产生的次级代谢产物，是一类结构类似的二呋喃香豆素衍生物，是迄今为止发现的致癌性最强、毒性最强的天然污染物之一，对人类和动物健康造成巨大的危害。长期食用含低浓度黄曲霉毒素污染的食物能引起动物消化系统紊乱、贫血、胚胎中毒和生育力严重下降等；而高浓度的黄曲霉毒素摄入能直接导致肝脏和胆囊增生、胆囊水肿或大量出血坏死，甚至直接导致死亡。同时黄曲霉毒素的污染也会给农业经济造成巨大损失。因此了解黄曲霉毒素的种类和危害特点，阐明黄曲霉毒素的分子生物合成路径，有利于解析黄曲霉毒素合成的分子机制，为黄曲霉及黄曲霉毒素危害的防控奠定重要理论基础。

本实验室（福建省病原真菌与真菌毒素重点实验室）从2004年开始从事真菌毒素的检测研究，建立了主要真菌毒素的系列检测方法；2013年参加了国家重点基础研究发展计划课题，主要研究储藏过程中真菌毒素形成机制——黄曲霉毒素合成与调控机制；本实验室也连续

获得了多个国家自然科学基金的支持，还有国家科学技术部、福建省科学技术厅等部委和省级项目的资助和支持。正是在这些项目的持续支持下，本实验室取得了系列研究成果。在结合前人研究成果和文献报道的基础上，本书的主要内容得以形成。

全书共 9 章，由汪世华等编著，同时本实验室的老师、博士后、博士研究生和硕士研究生在图表绘制、文字排版和校对等方面做了大量工作，他们分别是白有煌、聂鑫怡、王秀娜、王宇、袁军、张峰、庄振宏、汪斌、姚光山、蓝华辉、李明祝、李宇、梁林林、秦秋平、邱孟广、王森和杨奇。

本书的顺利出版，首先要感谢国家 973 计划项目首席科学家、中国农业科学院刘阳研究员，感谢 973 计划课题负责人、浙江大学马忠华教授，还要感谢暨南大学的刘大岭教授和美国农业部南方中心的张蓬光教授对本研究的大力支持和关心。同时要感谢国家科学技术部、国家自然科学基金委员会、福建省科学技术厅、福建省发展和改革委员会等机构对本研究的项目支持。本实验室的研究生、博士后、留学生、老师等对黄曲霉课题做了大量的研究工作，在此一并表示感谢。

由于黄曲霉和黄曲霉毒素的污染和危害严重，国家和各级政府越来越重视，目前，这方面的发展势头异常迅猛、日新月异，一些内容尚无统一的结论，再加上编者水平有限，难免有遗漏和疏忽之处，敬请广大读者批评指正。

汪世华

2017 年 7 月于福州

目 录

第 1 章 黄曲霉	1
1.1 黄曲霉的分类学	1
1.2 黄曲霉的繁殖体	3
1.3 黄曲霉的营养生长	6
1.4 黄曲霉的基因组	8
1.5 黄曲霉的危害	9
1.6 黄曲霉的分布	16
第 2 章 黄曲霉毒素	20
2.1 黄曲霉毒素的种类和性质	20
2.2 黄曲霉毒素的危害	22
2.3 黄曲霉毒素的生物合成途径	24
2.4 黄曲霉毒素合成的调控基因	32
第 3 章 环境因子对黄曲霉生长和毒素合成的影响	36
3.1 温度的影响	36
3.2 水活度的影响	42
第 4 章 营养元素对黄曲霉生长和毒素合成的影响	48
4.1 营养物质的分类	48
4.2 氮源的影响	51
4.3 碳源的影响	58
第 5 章 翻译后修饰对黄曲霉生长和产毒的影响	67
5.1 甲基化修饰	68

5.2	乙酰化修饰	73
5.3	磷酸化修饰	77
5.4	琥珀酰化修饰	80
5.5	SUMO 化修饰	82
第 6 章	转录调控因子	84
6.1	转录调控因子常见的种类	84
6.2	黄曲霉中的转录调控因子的功能	88
第 7 章	黄曲霉非编码 RNA	98
7.1	真菌 miRNA	98
7.2	黄曲霉 small RNA 分析以及 miRNA 预测	100
7.3	温度和水活度影响下的黄曲霉 miRNA	103
第 8 章	黄曲霉中蛋白质结构与功能研究	109
8.1	蛋白质结构研究的基本方法	109
8.2	黄曲霉中蛋白质结构与功能研究	117
第 9 章	黄曲霉和黄曲霉毒素的检测与防控	127
9.1	黄曲霉与黄曲霉毒素的检测	127
9.2	黄曲霉毒素的检出标准	137
9.3	黄曲霉与黄曲霉毒素的防控措施	138
参考文献		142

第1章 黄曲霉

黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 是子囊菌亚门的一种丝状真菌，是曲霉属真菌中最为常见的种。黄曲霉既是一种重要的植物病原真菌，又是一种条件性的人畜共患病原菌。黄曲霉是营腐生生活的土壤真菌，在适宜的条件下，黄曲霉可以侵染生长过程中或收获后的农作物，尤其对油料作物的种子危害最为严重。黄曲霉因其在侵染植物种子的过程中产生目前最强的致癌物——黄曲霉毒素而臭名昭著。黄曲霉的营养生长和无性发育与曲霉属其他真菌非常相似，无性发育主要通过产生大量的分生孢子进行繁殖。值得注意的是，不同于曲霉属的其他真菌，黄曲霉产生一种抗性休眠结构——菌核，帮助黄曲霉度过不良的生存条件。除了可以产生包括黄曲霉毒素在内的次级代谢产物，黄曲霉时刻直接威胁着人类和动物的身体健康。研究表明，黄曲霉可以引起人类和动物多个器官的真菌感染。其中，对肺部的感染最为严重，黄曲霉已经成为仅次于烟曲霉的侵袭性曲霉病的第二大致病真菌。黄曲霉的基因组已经完成了全测序，国际上的研究人员和福建省病原真菌与真菌毒素重点实验室（本实验室）也分别对黄曲霉在不同生长条件下的转录组和蛋白质组进行了测序，这些成果加速了黄曲霉功能基因组学的发展。通过世界各国研究人员的共同努力，必将揭示黄曲霉的致病机制及黄曲霉毒素合成的代谢机制，从而可以更好地防治黄曲霉产生的危害。

1.1 黄曲霉的分类学

曲霉属真菌属于真菌界的子囊菌亚门散囊菌目发菌科的腐生菌。

2 | 黄曲霉与黄曲霉毒素

曲霉属的典型特征是在分生孢子梗的顶端形成单排或双排的瓶梗，瓶梗呈烧瓶形或圆柱形；分生孢子呈落叶状或球状、椭圆至圆形，因产生各种次级代谢产物而呈现各种不同的颜色。到目前为止，曲霉属一共包括 180 个种，分为 6 个不同的亚类。伴随着新种的不断被发现和鉴定，曲霉属中种的数量将不断增加。

黄曲霉由于黄曲霉孢子色素而呈现出黄色（图 1-1），它因产生强毒性的次级代谢产物——黄曲霉毒素而为人们所熟知。黄曲霉具有各种复杂的形态，根据所产生的菌核的大小可以把黄曲霉分为两大类：L 型黄曲霉和 S 型黄曲霉。L 型黄曲霉的菌核直径通常大于 $400\mu\text{m}$ ，而 S 型黄曲霉的菌核直径通常小于 $400\mu\text{m}$ 。不管是 L 型黄曲霉还是 S 型黄曲霉均可以产生黄曲霉毒素 B1 和 B2，但是，只有 S 型黄曲霉才可以产生黄曲霉毒素 G1 和 G2。虽然现在 S 型菌株很少发现，但是 S 型菌株在全世界均有分布。最近，有报道发现了黄曲霉的有性繁殖阶段，并且将黄曲霉有性阶段归为“石座菌属”。在自然条件下，在黄曲霉的菌核中可以产生有性孢子——子囊孢子。

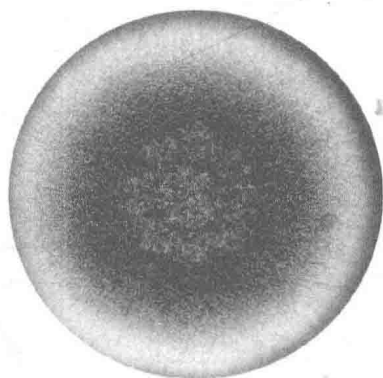


图 1-1 黄曲霉（彩图请见二维码）
PDA 平板上 37°C 培养 6 天时的黄曲霉

黄曲霉的另外一种形态发育特性与黄曲霉毒素的合成密切相关——营养兼容性，营养兼容性是指具有兼容性的 *bet* 位点的黄曲霉菌丝才

可以发生菌丝融合,进而完成后面的发育进程。因此,在不同兼容性群体中,黄曲霉产生的黄曲霉毒素的水平明显不同。由于兼容性群体所产生的黄曲霉毒素的水平是非常稳定的,因此,鉴定不产黄曲霉毒素的兼容性黄曲霉群体,在开发黄曲霉及黄曲霉毒素的生物防控措施方面具有重要的研究意义。拥有 MAT1-1 或 MAT1-2 位点的兼容性黄曲霉群体不仅可以进行准有性生殖,而且可以进行真正的有性生殖过程。

与黄曲霉分在同一亚类的其他 *Flavi* 曲霉种也可以产生黄曲霉毒素。例如,寄生曲霉也是一种重要的农业病原真菌,与黄曲霉一样,可以产生 B 型和 G 型黄曲霉毒素。尽管寄生曲霉的有性阶段与黄曲霉同属于石座菌属,但是,寄生曲霉的宿主特异性与黄曲霉明显不同。黄曲霉可以侵染各种各样的农作物,对宿主的选择缺乏专一性,而寄生曲霉通常只侵染地面的作物。其中的主要原因可能是不同真菌对生长温度的要求不同。当然,不能排除还有其他尚未鉴定的环境因子在决定宿主特异性方面发挥了重要的作用。曲霉属 *Flavi* 亚类的其他曲霉属真菌包括 *Aspergillus nomius*、*Aspergillus pseudoamarii*、*Aspergillus bombycis* 等也可以产生黄曲霉毒素。除此之外,有些曲霉属真菌如模式生物构巢曲霉可以产生黄曲霉毒素的倒数第二个前体化合物——杂色曲霉素,这种化合物和黄曲霉毒素类似,同样威胁着人畜的身体健康。

1.2 黄曲霉的繁殖体

黄曲霉的繁殖体主要包括两大类,即分生孢子和菌核。其中菌核是黄曲霉产生的一种特殊结构,即抗性休眠结构。

1.2.1 分生孢子

无性发育(产孢)是各种真菌常见的繁殖方式,包括黄曲霉在内

的高等真菌的无性孢子被称为分生孢子。曲霉属真菌不同种之间的产孢过程非常相似，且调控产孢的相关基因也极其保守，因而构巢曲霉一直以来作为模式物种，在发育进程及其调控层面研究得最为透彻，因此，本节主要根据构巢曲霉的研究结果结合我们自己的实验数据描述黄曲霉的产孢过程。

包括黄曲霉在内的曲霉属真菌的产孢过程极为复杂，但可以简单地分为 3 个不同的阶段：①营养生长至特定的阶段，感知产孢诱导信号，启动产孢调控基因的表达；②在菌落的中心位置形成第一个分生孢子梗及串珠状的分生孢子；③在第一个分生孢子形成后，真菌的发育过程开始向菌落的边缘移动。因此，位于菌落中心的分生孢子结构不断老化，而新生的孢子不断向菌落边缘扩展。根据我们的实验结果，在营养丰富的培养基中大约经过 48h 的生长，黄曲霉开始在菌落中心位置形成第一个分生孢子。分生孢子的形成过程是一个比较复杂的过程，能够分成几个明显的发育阶段。

首先，气生菌丝的不断延伸形成分生孢子茎 (stalk)，分生孢子茎在形态上与气生菌丝极为相似，但有很大的不同。等待分生孢子茎顶端延伸结束后，其顶端开始膨胀，直至其直径达到 $10\mu\text{m}$ ，形成一种新的结构——分生孢子囊泡 (vesicle)。分生孢子囊泡与足细胞之间不会产生隔膜，因此，足细胞、分生孢子茎及囊泡形成各自独立的单元。多个细胞核沿囊泡的外边缘排列，在囊泡的表面同步产生许多萌芽，形成初级小梗——梗基 (metulae)。在显微镜下，每个分生孢子梗包含大约 60 个梗基，每个小梗萌芽形成约 $6\mu\text{m}$ 长、 $2\mu\text{m}$ 宽的雪茄状的细胞，其中包括单个细胞核。梗基经过连续两次的萌发产生一层 120 个单核的小梗——瓶梗 (phialide)。此次的梗基萌发具有极性，因此，萌发只发生在囊泡远端的细胞层。图 1-2 为黄曲霉 CA14 分生孢子梗在 40 倍显微镜下的图片。与干细胞相似，瓶梗经过多次的细胞分裂后依然保持多能性，串珠状的分生孢子产生于成熟的瓶梗上 (图 1-3)。



图 1-2 黄曲霉的分生孢子梗

黄曲霉生长在 YES 培养基上 24h 产生分生孢子梗，荧光显微镜明场时的图片，40×

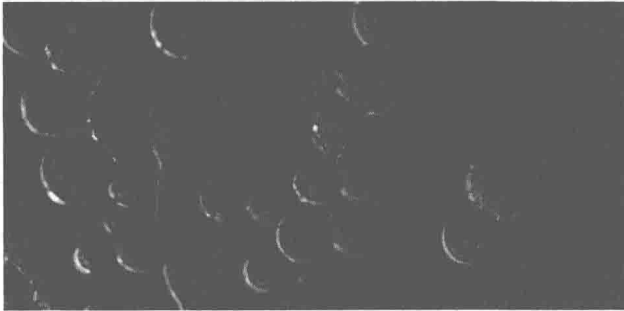


图 1-3 在激光扫描共聚焦显微镜下的黄曲霉分生孢子（100×

1.2.2 菌核

待黄曲霉生长到一定阶段，菌丝体不断地分化，相互缠绕融合，在一起最终形成一个颜色呈黑褐色且坚硬的菌丝体组织颗粒，是由拟薄壁组织和疏丝组织形成的一种坚硬的休眠体，即菌核（图 1-4）。菌核的功能是储存营养物质和帮助黄曲霉度过不良环境条件等。目前，也有一种观点认为，菌核很可能与黄曲霉有性发育有一定的关联，但是尚缺乏充足的证据。此外，菌核也是包括黄曲霉在内的初级侵染源，

其可以在极端环境下存活，等到条件适宜时，继续萌发导致二次侵染。最近，有研究认为，菌核的发育与真菌次级代谢产物的合成密切相关，这主要体现在以下两个方面：首先，把许多次级代谢产物的合成控制在菌核中，且这些有毒的次级代谢产物积累在菌核中，与真菌隔绝开来，主要用于抵御食真菌的昆虫及相同生态位的竞争者；其次，许多调控黄曲霉核发育的调控因子 *LaeA* 和 *veA* 等，同时影响黄曲霉次级代谢产物的表达合成。

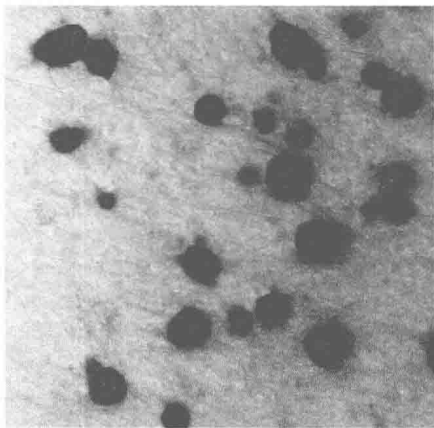


图 1-4 在荧光显微镜明场时的黄曲霉菌核 (20×) (彩图请见二维码)
黄曲霉培养在 WKM 培养基中 37℃ 黑暗培养 14 天诱导产生的菌核

1.3 黄曲霉的营养生长

黄曲霉能够栖息于各种各样的生态位，如土壤、水体、空气及植物等。这一特征很可能是其内在的生物学特征的外在反应，如代谢可塑性，对各种生物或非生物压力的忍耐性等。在这些特征中，高度极化的菌丝生长是其高效快速适应不同生态位的主要决定因素。显然，极性生长也是包括黄曲霉在内的丝状真菌区别于其他微生物的一种典型特征。菌丝生长包括几个不同的形态发生阶段。

第一步是真菌的营养生长开始于分生孢子的萌发。黄曲霉的分生

孢子在合适的环境条件下开始萌发，有研究发现高温、光照均可以明显诱导分生孢子的萌发，尽管其中的分子机制尚不清楚。在 37℃ 条件下，在营养丰富的 YGT 培养基中，黄曲霉的分生孢子在 6h 时就开始萌发。

第二步是顶端 (apical) 的确立，并建立和维持稳定的极性生长轴 (图 1-5)。在细胞的特定位置 (顶端)，细胞表面不断扩张，并伴随着细胞壁沉积，最终形成菌丝顶端。菌丝顶端不断延伸形成初级菌丝。在亚顶端区域产生分支，继而形成次级菌丝。菌丝的交织缠绕最终形成菌丝体。遗传学、生理学、形态学、细胞生物学连同计算生物学的结果均充分证实了极性轴的确立对菌丝伸长和延伸具有至关重要的作用。菌丝的生长模式充分体现了菌丝顶端确立的重要性，这种顶端优势明显限制了其他的潜在生长点的形成。

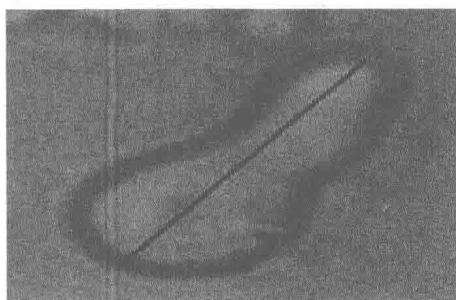


图 1-5 黄曲霉孢子萌发过程中极性轴的建立 (彩图请见二维码)

荧光显微镜明场时的图片, 100×

第三步是隔膜的形成。在黄曲霉的营养生长过程中，另外一个较为重要的生理过程就是隔膜的形成。隔膜是通过胞质分裂形成的，这一过程类似于动物体内发生的细胞分裂。但是，胞质部分不分离，而是连在一起，分裂点形成一道横壁——隔膜 (图 1-6)。虽然，隔膜对于菌丝的极性生长并不是必需的，但是，有研究表明隔膜对于菌丝的细胞分化形成菌丝体，甚至病原真菌成功侵染宿主植物组织均是至关重要的。并且，隔膜的形成也是菌丝的典型特征之一。分隔过程并不

涉及减数分裂，仅仅是胞质分裂。包括黄曲霉在内的子囊菌的有规律的分隔伴随着核分裂。菌丝通过分隔作用区分新老菌丝。此外，分隔有助于新老菌丝之间交换细胞质及一些细胞器。



图 1-6 经过 CFW 染色后在荧光显微镜明场的黄曲霉隔膜 (20×) (彩图请见二维码)

第四步是菌丝融合。正如分隔一样，菌丝融合对于菌丝的极性延伸也并非必需的过程。但是，通过菌丝融合可以使菌丝相互交换代谢物，最终发育为功能菌丝体。由于菌丝生长对黄曲霉生命史具有重要的作用，因此，鉴定和阐明影响菌丝生长的分子机制具有重要的意义。特别是大量的研究均证明，黄曲霉的生长和它的致病过程密切相关。大量的基因敲除突变体在菌丝生长上受到抑制，从而导致突变体降低甚至丧失了侵染植物种子的能力。

1.4 黄曲霉的基因组

黄曲霉标准菌株 *Aspergillus flavus* NRRL 3357 全基因组测序已经完成，黄曲霉基因组大约 37Mb，包含 8 条染色体，共编码 12 000 多个蛋白质。黄曲霉的基因组稍稍大于曲霉属的其他真菌，如烟曲霉 (大约 30Mb)、土曲霉 (30Mb)、黑曲霉 (34Mb) 和构巢曲霉 (31Mb)。虽然不同曲霉的基因组大小存在一定差异，但是所有已测序的曲霉种都只含有 8 条染色体。尽管黄曲霉与米曲霉的基因组最为相似，但是

米曲霉并不产生强毒性次级代谢产物——黄曲霉毒素，因此被美国食品药品监督管理局（FDA）认定为安全菌株。我们认为比较研究黄曲霉和米曲霉基因组之间的差异，将有助于揭示黄曲霉毒素合成代谢及黄曲霉毒素基因簇表达调控的分子机制。最近，研究人员对黄曲霉的线粒体完成了全测序，发现黄曲霉的线粒体长度为 31 602bp，AT 含量约为 75%，并且，针对密码子使用偏好性分析发现，黄曲霉使用真菌标准的起始密码子和终止密码子。

到目前为止，笔者课题组已经综合利用包括转录组学和蛋白质组学在内的系统生物学技术在全基因组范围揭示黄曲霉响应水活度、温度及氮源调控的分子机制，并利用功能基因组学揭示 DNA 甲基转移酶、乙酰转移酶、腺苷酸环化酶、压力响应调控蛋白等在黄曲霉营养生长、分生孢子发育、菌核形成、黄曲霉毒素的生物合成等方面的生物学功能。为了全面和更深入地了解黄曲霉的生物学，我们测定并分析了黄曲霉的小 RNA 谱，发现了 mRNA-like 的小 RNA 差异地响应水活度和温度，暗示了这些小 RNA 很可能参与了黄曲霉的生长和产毒。

1.5 黄曲霉的危害

黄曲霉是一种非常重要的病原真菌，在工农业上，黄曲霉可以侵染花生、玉米、棉花等油料作物的种子，并且在侵染过程中产生致癌的黄曲霉毒素。在医学上，黄曲霉是条件性的人畜共患病原真菌。

1.5.1 黄曲霉对植物的危害

在自然界，黄曲霉可以侵染许多重要的农作物及农产品，最为严重的是油料作物如花生、玉米、核桃、棉花等，也可以侵染水稻。另外，黄曲霉在储存过程中，也可以对花生和玉米等造成危害，给工农业生产带来巨大的经济损失。