

黄曲霉菌 *aflR* 基因启动子序列变异与 黄曲霉毒素产生相关联

陈 茹 刘钟滨*

(同济大学医学院病原生物学教研室, 上海 200092)

摘要 为探讨黄曲霉菌 *aflR* 基因启动子序列变异与黄曲霉毒素产生的关系, 收集黄曲霉菌、米曲霉菌和寄生曲霉菌若干株。在有利于黄曲霉毒素产生的条件下培养后, 提取各菌株的总 RNA, RT-PCR 法检测 *aflR* 基因的 mRNA 表达水平; 并应用 ELISA 法检测各菌株产生黄曲霉毒素 B1 的情况。提取各菌株的基因组 DNA, PCR 扩增 *aflR* 基因启动子序列并测序。应用基因分析软件将不产毒素的黄曲霉菌与产毒黄曲霉菌的 *aflR* 基因启动子序列进行比较, 找出不产毒菌株 *aflR* 基因启动子序列的变异位点。ELISA 法和 RT-PCR 法结果表明, 产毒的黄曲霉菌菌株均有明显的 *aflR* 基因转录, 而在 2 株不产毒的黄曲霉菌菌株中, 一株 *aflR* 基因无转录, 另一株仅有较低水平的转录。序列比较结果表明, 不产毒黄曲霉菌菌株的 *aflR* 基因启动子序列存在如下共同变异位点: -90、-236、-253、-262、-282 位。米曲霉菌产生黄曲霉毒素 B1 和 *aflR* 基因转录的检测均为阴性, 并且其 *aflR* 基因启动子序列中存在与上述不产毒黄曲霉菌菌株相同的变异位点。寄生曲霉菌产生黄曲霉毒素 B1 和 *aflR* 基因转录的检测均呈阳性, 并且其 *aflR* 基因启动子序列的上述 5 个位点与产毒黄曲霉菌完全一致。在不产毒素的黄曲霉菌 *aflR* 基因启动子序列中发现了 5 个共同变异位点, 实验结果提示这些变异位点可能与黄曲霉毒素的产生有关。

关键词 黄曲霉菌; 黄曲霉毒素; *aflR* 基因; 启动子; 序列变异

黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)是由黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*, *A.flavus*)和寄生曲霉菌(*Aspergillus parasiticus*, *A.parasiticus*)产生的一类剧毒且致癌的代谢产物^[1]。黄曲霉毒素是所有真菌毒素中对环境污染最严重、对人畜危害最大的一种毒素, 主要以污染玉米、花生、坚果等农作物及其制品为主^[2,3]。1993年, 世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构把黄曲霉毒素划定为 I 类致癌物。流行病学调查表明, 黄曲霉毒素 B1 是肝癌的重要致病因素, 在许多肝癌高发区, 食品的黄曲霉毒素污染率均较高^[4]。

黄曲霉毒素的生物合成过程非常复杂, 共涉及到 21 步酶促反应^[5]。迄今为止, 大部分与黄曲霉毒素及其前体柄曲霉素(sterigmatocystin, ST)生物合成相关的酶促反应已为人们所认识, 这些酶的编码基因也相继被克隆^[6]。参与黄曲霉毒素合成的绝大多数基因聚集于某特定基因簇中, 其中包括黄曲霉毒素生物合成途径调节基因(aflatoxin biosynthetic pathway regulatory gene, *aflR*), 该基因为其他参与黄曲霉毒素合成的基因表达所必需。研究者从多个

角度证明了 *aflR* 基因在黄曲霉毒素产生中的重要性: *aflR* 基因为其他黄曲霉毒素合成相关基因的表达所必需^[7], *aflR* 基因的中断可抑制其他黄曲霉毒素合成相关基因的表达^[8]。用一个野生型 *aflR* 基因转化 *aflR* 基因突变的黄曲霉菌, 可恢复黄曲霉毒素合成相关基因的转录^[2]。用包含完整 *aflR* 基因的质粒转化寄生曲霉菌, 转化株产生的黄曲霉毒素相关代谢物比未转化株多 5 倍^[7]; *aflR* 基因的表达产物 AflR 蛋白是黄曲霉毒素生物合成途径中的主要正性转录因子^[7], 大多数黄曲霉毒素合成相关基因受 AflR 蛋白的调节^[9], 而且现认为 AflR 蛋白既参与其他黄曲霉毒素合成相关基因的转录调节, 也参与自身基因的转录调节^[2]。一些环境和营养因素如 pH、温度、氧气、碳源、氮源可能通过影响 *aflR* 基因的表达而影响黄曲霉毒素的生物合成^[10]。

黄曲霉菌容易发生变异, 变异菌株往往失去产

收稿日期: 2005-12-12 接受日期: 2006-07-25

* 通讯作者。Tel: 021-65985615, Fax: 021-65983793, E-mail:

lzbjh@126.com

生黄曲霉毒素的能力。导致黄曲霉菌失去产毒能力的原因很多, 基因变异无疑是一重要原因。本文收集了在国内所能收集到的8株黄曲霉菌及2株与黄曲霉菌有密切亲缘关系的米曲霉菌(一般认为不产黄曲霉毒素)和1株寄生曲霉菌(一般能稳定地产生黄曲霉毒素), 对黄曲霉菌 *aflR* 基因启动子序列可能存在的变异与黄曲霉毒素(以 B1 为代表)产生间的关联进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 黄曲霉菌 3.4408、3.4409、3.4410、3.2890、3.1398、3.2758 和寄生曲霉菌 3.124 购自中科院微生物研究所; 黄曲霉菌 M273、M154 和米曲霉菌 M14、3.800 购自上海工业微生物研究所。

1.1.2 主要试剂 EX-Taq DNA聚合酶购自 TaKaRa 公司; Trizol 购自 Sigma 公司; 黄曲霉毒素 B1 酶联免疫测试盒购自江苏省微生物研究所有限责任公司; AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 BBI 公司; DNA 纯化试剂盒购自英骏生物技术有限公司; 其他化学试剂为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 黄曲霉毒素 B1 的检测 各菌株在利于黄曲霉毒素产生条件^[11]下培养后, 用甲醇、三氯甲烷抽提黄曲霉毒素 B1, 用黄曲霉毒素 B1 酶联免疫测试盒定性测定黄曲霉毒素 B1 的产生情况。

1.2.2 曲霉菌总 RNA 的提取 将各曲霉菌菌株接种于察氏培养基(6 g 蔗糖, 2.8 g 琼脂, 0.6 g NaNO₃, 0.1 g MgSO₄·7H₂O, 0.1 g KCl, 0.002 g FeSO₄·7H₂O, 0.2 g K₂HPO₄·3H₂O, 200 ml ddH₂O), 28 °C 恒温培养 7 天; 将菌落转入 A 和 M 培养基^[12], 以 29 °C, 150 r/min 振荡培养 60 h; 过滤收集菌体, 用液氮破壁并将其碾磨成粉末。称取 0.1 g 粉末, 加入 1 ml Trizol, 反复抽吸混匀, 剧烈振荡, 再用 1 ml 针筒, 26 号针头抽吸两次, 冰浴 5 min; 加 0.5 ml 三氯甲烷, 剧烈振荡, 冰浴 10 min, 以 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min; 取上层液相, 加等体积的异丙醇, 振荡混匀, 冰浴 30 min, 以 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清液, 用 75% 乙醇清洗沉淀。沉淀于真空干燥后溶于 RNase-free ddH₂O 中, 保存于 -70 °C。

1.2.3 RT-PCR 检测 *aflR* mRNA 分别以各菌株的总 RNA 为模板, 用 AMV 第一链 cDNA 合成试剂

Table 1 Primer sequences used in RT-PCR and PCR

Gene	Primer sequence
<i>aflR</i> in RT-PCR	5'-CAACCTGATGACGACTGATATGG-3' 5'-TGCTGCCGCAGCATACC-3'
The 18S rRNA control in RT-PCR	5'-GCTCTTTTGGGTCTCGTAATTGG-3' 5'-CGCTATTGGAGCTGGAATTACC-3'
The promoter of <i>aflR</i> in PCR	5'-CTCATGCAGGTGCTAAAGA-3' 5'-GCACAACCTCGTACAGCTAT-3'

盒逆转录合成 cDNA 第一链。分别以各菌株的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *aflR* cDNA。用于 RT-PCR 扩增的引物序列^[13]见表 1。采用 50 μl PCR 体系, 依次加入: 5 μl 10 × Ex-Taq 缓冲液, 4 μl 2.5 mmol/L dNTP 混合物, 5 μmol/L 的上、下游引物各 2.5 μl, 2.5 μl cDNA, 0.5 μl 5 U/μl EX-Taq DNA 聚合酶, 33 μl ddH₂O。在每种 *aflR* cDNA 扩增的同时, 进行内参(18S 核糖体 RNA)cDNA 的扩增。PCR 扩增条件如下: 95 °C 变性 60 s, 然后进入循环程序: 95 °C 变性 40 s, 50 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 30 次。再 72 °C, 10 min。最后 35 °C, 30 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用 Genesnap 凝胶成像系统扫描, 测定标本的灰度值, 以 18S 核糖体 RNA 作为内参照, 计算各菌株 *aflR* mRNA 的相对表达量。

1.2.4 曲霉菌基因组 DNA 的提取 将各曲霉菌菌株接种于 PDA 固体斜面培养基(3.7 g 马铃薯葡萄糖琼脂培养基、100 ml ddH₂O), 30 °C 恒温培养 5 天; 转移菌落到 YES 液体培养基(20 g 酵母抽提物、150 g 蔗糖、1000 ml ddH₂O), 以 30 °C、150 r/min 振荡培养 20 h; 滤过收集菌体, 用液氮破壁并将其碾磨成粉末。称取 0.5 g 粉末, 依次加入 10 ml DNA 抽提缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、25 mmol/L EDTA(pH 8.0)、500 mmol/L NaCl、1% SDS]、5 ml Tris 饱和酚和 5 ml 三氯甲烷, 混匀后以 4 °C, 4 800 r/min 离心 20 min; 取上层液相, 依次加入 1/2 体积的 Tris 饱和酚和 1/2 体积的三氯甲烷, 混匀后以 4 °C, 4 800 r/min 离心 20 min; 取上层液相, 加入等体积的三氯甲烷, 混匀后以 4 °C, 4 800 r/min 离心 10 min; 取上层液相, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 混匀, 室温静置 30 min, 以 4 °C, 4 800 r/min 离心 30 min; 弃上清液, 用 70% 乙醇清洗沉淀并于室温干燥 30 min, 用 TE(pH 8.0)溶解沉淀, 保存于 4 °C。

1.2.5 *aflR* 基因启动子序列的 PCR 扩增及序列测定

Table 2 The aflatoxin production of 11 *Aspergillus* strains

	F-M273	F-3.2758	F-3.4408	F-3.4409	F-3.4410	F-3.2890	F-M154	F-3.1398	O-M14	O-3.800	P-3.124
AF	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+

AF: aflatoxin; F: *A.flavus*; P: *A.parasiticus*; O: *A.oryzae*.



Fig.1 The electrophoresis results of *aflR* mRNA of 11 *Aspergillus* strains by RT-PCR

A-C: the *aflR* cDNA of *A.parasiticus* 3.124, *A.oryzae* M14 and *A.oryzae* 3.800; D-K: the *aflR* cDNA of *A.flavus* M273, 3.2758, 3.4408, 3.4409, 3.4410, 3.2890, M154 and 3.1398; M: DNA marker; a-c: the 18S rRNA cDNA of *A.parasiticus* 3.124, *A.oryzae* M14 and *A.oryzae* 3.800; d-k: the 18S rRNA cDNA of *A.flavus* M273, 3.2758, 3.4408, 3.4409, 3.4410, 3.2890, M154 and 3.1398.

和分析 分别以各菌株的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *aflR* 基因的启动子序列, 所用引物见表 1。采用 30 μ l PCR 体系, 加样如下: 3 μ l 10 \times Ex-Taq 缓冲液, 2.4 μ l 2.5 mmol/L dNTP 混合物, 5 μ mol/L 的上、下游引物各 1.5 μ l, 1.5 μ l 模板 DNA, 0.3 μ l 5 U/ μ l EX-Taq DNA 聚合酶, 19.8 μ l ddH₂O。PCR 扩增条件如下: 95 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 然后进入循环程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 循环 30 次。再 72 $^{\circ}$ C, 10 min。最后 35 $^{\circ}$ C, 30 min。PCR 产物经纯化后送上海英骏生物技术有限公司测序。用基因分析软件 OMIGA 将各菌株的 *aflR* 基因启动子序列进行比较, 以产毒黄曲霉菌菌株的 *aflR* 基因启动子序列作为野生型序列, 找出不产毒黄曲霉菌菌株 *aflR* 基因启动子序列的变异位点。

2 结果

2.1 各曲霉菌菌株产生黄曲霉毒素 B1 的检测结果

各菌株产生黄曲霉毒素 B1 的测定结果见表 2。本研究对各菌株黄曲霉毒素 B1 产生情况的检测结果与该菌株的供应单位所标明的产毒特性完全相符。

2.2 *aflR* mRNA 的检测结果

各菌株经 RT-PCR 分别扩增 *aflR* 基因片段(157 bp), 同时扩增内参(18S 核糖体 RNA)基因片段(110 bp), 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果见图 1。用 Genesnap 凝胶成像系统对电泳结果进行灰度扫描, 得到各条带的灰度值。同一个菌株 *aflR* 条带(图 1, A~K)和内参条带(图 1, a~k)灰度的比值

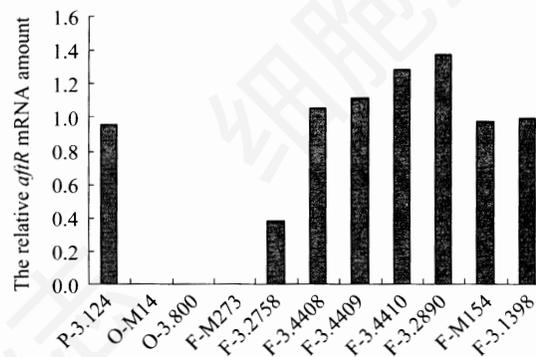


Fig.2 The relative *aflR* mRNA amount of 11 *Aspergillus* strains

F: *A.flavus*; P: *A.parasiticus*; O: *A.oryzae*.

即为 *aflR* mRNA 的相对表达量, 结果列于图 2。6 株产毒黄曲霉菌均存在 *aflR* 的转录, 它们的 *aflR* mRNA 的相对表达量较高, 从 0.97 到 1.37 不等。在 2 株不产毒黄曲霉菌中, 黄曲霉菌 M273 不表达 *aflR* mRNA, 黄曲霉菌 3.2758 的 *aflR* mRNA 相对表达量为 0.38, 明显低于产毒黄曲霉菌。2 株米曲霉菌均未检出 *aflR* 的转录。寄生曲霉菌 3.124 的 *aflR* 转录阳性, 其相对表达量为 0.95。

2.3 *aflR* 基因启动子序列的序列测定与分析

各曲霉菌菌株分别以提取出的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *aflR* 基因的启动子序列, 并测序。用基因分析软件 OMIGA 对各曲霉菌菌株的 *aflR* 启动子序列进行分析表明, 黄曲霉菌 3.4408 和黄曲霉菌 3.4409、3.4410、3.1398 的测序结果完全相同, 它们的黄曲霉毒素 B1 检测均为阳性, 其中黄曲霉菌

Table 3 The mutation points in the promoter region of *aflR* of none aflatoxin producing strains

Mutation sites	Non aflatoxin producing strains				Aflatoxin producing strains							
	O-M14	O-3.800	F-M273	F-3.2758	P-3.124	F-3.4408	F-3.4409	F-3.4410	F-3.2890	F-M154	F-3.1398	
-90	T	T	T	T	C	C	C	C	C	C	C	
-236	A	A	A	A	C	C	C	C	C	C	C	
-253	C	C	C	C	T	T	T	T	T	T	T	
-262	C	C	C	C	G	G	G	G	G	G	G	
-282	A	A	A	A	T	T	T	T	T	T	T	

F: *A.flavus*; P: *A.parasiticus*; O: *A.oryzae*.

```

AGGTGCTAAA GATCTAGCTT GCAGGAAACA AGTCTTTTCT
-350 GGGTTCTAAG CCGGCCCATG ACGGACTACG TTATCTTGAG CCCGAGGCAT
-300 GCATGCAGGC GGGCCAGCTA GCTGAACATT ACTTGTGCTT CTTGGTTTGC
250 TTCGTTAAAC CGATTCACGA GTTCTCTGGT CACCCGGTTT CAGCCTCGGT
200 ACGTAAACAA GGAACGCACA GCTAGACAAT CCTTGGGCCA AGTCAGAACC
-150 CCTCAGCTGG TGACAGGAGT GTACATACAT TTAGGTCTAA GTGCGAGGCA
-100 ACGAAAAGGG TGGGCTACTC TCCCGGAGAA AGCCTTCACA TTGTGTGTTT
-050 TCTTTCC-GC TTTCAATTGA GAATTCCTGA ATTCTTCTCT CACCTCCAGG ATG

```

Fig.3 The promoter sequence of *aflR* of *A.flavus* 3.4408

3.4408 的测序结果见图 3。而另 2 株产毒黄曲霉菌 3.2890 和 M154 的 *aflR* 基因启动子序列彼此间完全一致, 与上述 4 株产毒菌株比较, 它们均有以下变异: -18(T → C)、-134(G → C)、-269(C → T)和 -343(A → C)。不产毒的 2 株黄曲霉菌 M273 和 3.2758 的测序结果彼此间完全相同。与产毒黄曲霉菌菌株比较, 不产毒黄曲霉菌菌株 *aflR* 基因启动子序列存在如下共同的 5 个变异位点: -90(C → T)、-236(C → A)、-253(T → C)、-262(G → C)、-282(T → A)(图 3 中用方框表示)。

序列分析结果还表明, 两株米曲霉菌的序列均和不产毒黄曲霉菌完全一致, 即与产毒黄曲霉菌作比较, 这两株米曲霉菌在上述 -90、-236、-253、-262、-282 五个关键位点也发生了与不产毒黄曲霉菌完全相同的变异。所测寄生曲霉菌的基因序列在上述五个关键位点的碱基与产毒黄曲霉菌全部相同, 除 -8、-43、-115、-269、-277 和 -343 位不同外, 其余位点与产毒黄曲霉菌全同。将本实验全部菌株的 *aflR* 基因启动子序列作比较分析, 找出不产黄曲霉毒素 B1 菌株的 *aflR* 基因启动子序列的变异位点, 如表 3 所示。

3 讨论

正由于 *aflR* 基因的重要性, 有理由推测 *aflR* 基因及其启动子变异将影响黄曲霉毒素的产生。Ehrlich 等^[9]曾对来自曲霉菌 Flavi 群的黄曲霉菌、寄

生曲霉菌、*A.nomius*、*A.bombycis* 和 *A.pseudotamarii* 等 5 个产黄曲霉毒素菌种的 28 个菌株 *aflR* 基因启动子序列进行比较, 从中发现了已知真菌转录因子 AreA、AbaA、BrlA、PacC 和 AflR 的假定结合位点。Todd 等^[14]在 *aflR* 基因启动子序列中发现了另一真菌转录因子 FacB 的假定结合位点。Ehrlich 等^[10]用经适当改动后的 *aflR* 基因启动子去驱动一个大肠杆菌 β -葡萄糖醛酸酶编码基因 *uidA* 的表达, 结果表明, 移走 *aflR* 基因启动子中 -118 到 -100 的区域几乎完全消除了该基因的表达, 这说明该区域对 *aflR* 基因启动子活性十分关键。Cary 等^[8]用基因剔除实验确定了位于 *aflR* 基因启动子中的 3 个顺式作用位点, 分别是: AflR 蛋白结合位点(-118~-100)、富含 G+A 的位点(紧接着 AflR 蛋白结合位点下游, 并且靠近 *aflR* 基因的转录起始点)、PacC 蛋白结合位点(-164~-159)。这 3 个位点可能参与黄曲霉毒素合成相关基因表达的正性调节, 分别去除这 3 个位点都将导致黄曲霉毒素前体产物的减少。

本研究通过探讨不同黄曲霉菌菌株间 *aflR* 基因启动子序列差异与黄曲霉毒素产生间的关联, 发现在不产毒素的黄曲霉菌菌株 *aflR* 基因启动子序列中存在 5 个与黄曲霉毒素的产生完全关联的变异位点, 其中 -90 位恰好落在被认为是真菌转录因子 FacB 结合位点的区域内^[10,14], -236 和 -253 位也正好位于另一真菌转录因子 AflR 的假定结合位点内^[10,15], 而有关 -262、-282 位的意义尚未见相关报道。

所检测的 2 株米曲霉菌均不产黄曲霉毒素 B1, 它们的 *aflR* 基因启动子序列也均存在上述变异位点。另外, 产生黄曲霉毒素 B1 的寄生曲霉菌 *aflR* 基因启动子序列的上述 5 个位点与产毒黄曲霉菌完全相同。这些结果为上述有关黄曲霉菌 *aflR* 基因启动子序列的变异与黄曲霉毒素的产生相关联的实验结果提供了有力佐证。

RT-PCR 结果表明, 产毒曲霉菌菌株均有明显的 *aflR* 基因转录; 而绝大多数不产毒曲霉菌菌株不存在

aflR 基因的转录。我们可以根据这些结果推测：正是由于 *aflR* 基因启动子序列的变异导致 *aflR* 基因转录受到抑制，并进而抑制了黄曲霉毒素产生。

由于国内各菌种保藏单位的曲霉菌株有限，本实验所用菌株样本量受到一定的限制，今后可着眼于采集野生型菌株以扩大实验样本。另外为阐明上述变异位点在黄曲霉毒素产生机制中可能起到的关键作用，尚需开展相关功能性实验进一步证实。

总之，本研究发现某些黄曲霉菌菌株的 *aflR* 基因启动子序列存在若干共同的变异位点，这与它们不产生黄曲霉毒素相关联。这一发现为深入揭示黄曲霉毒素的产生机制提供了新的线索。

参考文献 (references)

- [1] Eaton DL *et al.* *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1994, **34**: 135
- [2] Chang PK *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 2508
- [3] Abbas HK *et al.* *Eur J Plant Pathol*, 2005, **112**: 283
- [4] 刘江等。国外医学卫生学分册, 1995, **22**: 90
- [5] Bhatnagar D *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**: 83
- [6] Yabe K *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**: 745
- [7] Ehrlich KC *et al.* *Fungal Genet Biol*, 1998, **23**: 279
- [8] Cary JW *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **53**: 680
- [9] Ehrlich KC *et al.* *Fungal Genet Biol*, 2003, **38**: 63
- [10] Ehrlich KC *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1444**: 412
- [11] 马群飞等。海峡预防医学杂志, 1998, **4**: 7
- [12] Adye J *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1964, **86**: 418
- [13] Chang PK. *J Biotechnol*, 2004, **107**: 245
- [14] Todd RB *et al.* *EMBO J*, 1998, **17**: 2042
- [15] Fernandes M *et al.* *Mol Microbiol*, 1998, **28**: 1355

Promoter Sequence Mutations in the *aflR* Gene of *Aspergillus flavus* are Correlated with the Production of Aflatoxin

Ru Chen, Zhong-Bin Liu*

(Department of Pathogen Biology, Medical College, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract For a better understanding of aflatoxin biosynthesis in some aspergillus strains, the mutation in the *aflR* (aflatoxin biosynthetic pathway regulatory gene) promoter region of none-aflatoxin B1-producing *Aspergillus flavus* (*A.flavus*) strains was investigated. For each strain cultured in medium suitable for aflatoxin production, the ELISA was performed to detect the aflatoxin B1 level and the total RNA was extracted and then the RT-PCR was carried out to evaluate the *aflR* mRNA level. The *aflR* promoter region was amplified by PCR and then sequenced. Our experiment results showed that the *aflR* mRNA level was noticeably high in all the six aflatoxin B1-producing *A.flavus* strains while the *aflR* mRNA level was either low or rare in the two none-aflatoxin B1-producing *A.flavus* strains. Some mutation points at -90, -236, -253, -262 and -282 in the *aflR* promoter region were revealed in none-aflatoxin B1-producing *A.flavus* strains through analyzing via a gene software. In addition, the experiment results from *Aspergillus oryzae* strains were coincident with those of none-aflatoxin B1-producing *A.flavus* strains. And the results from the *Aspergillus parasiticus* strain were concordant with those of aflatoxin B1-producing *A.flavus* strains. All these data indicate that one or some of the mutation sites described above in the *aflR* promoter region from *A.flavus* strains may be correlated to the aflatoxin production.

Key words *Aspergillus flavus*; aflatoxin; *aflR*; promoter; sequence mutation

Received: December 12, 2005 Accepted: July 25, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-21-65985615, Fax: 86-21-65983793, E-mail: lzbj@126.com