

青岛农业大学

毕业论文（设计）

题 目： 膨大弯颈霉 PKS 和 NRPS 基因
敲除突变株的构建

姓 名： 许新港

学 院： 生命科学学院

专 业： 生物技术（食用菌）

班 级： 2015 级 01 班

学 号： 20154709

指导教师： 于浩 杨秀青

2019 年 5 月 31 日

青岛农业大学

毕业论文（设计）诚信声明

本人郑重声明：所呈交的本科毕业论文（设计）是本人在指导老师的指导下，进行研究工作所取得的成果，成果不存在知识产权争议。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体在文中均作了明确的说明并表示了谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

毕业论文（设计）作者签名：

年 月 日

目录

中文摘要	I
Abstract	II
引言	1
1 材料与方法	2
1.1 实验材料	2
1.1.1 化学试剂	2
1.1.2 生化试剂和试剂盒	3
1.1.3 实验器皿及用具	3
1.1.4 试验仪器	3
1.1.5 培养基	3
1.2 感受态的制备与转化方法	6
1.2.1 大肠杆菌 Top10 感受态制备	6
1.2.2 敲除载体的大肠杆菌转化及筛选阳性克隆	6
1.2.3 根癌农杆菌 AGL-1 感受态的制备	7
1.2.4 敲除载体转化根癌农杆菌 AGL-1	7
1.3 敲除载体构建与转化	8
1.3.1 重组法构建敲除载体	8
1.3.2 根癌农杆菌介导的膨大弯颈霉遗传转化	12
2 结果与分析	14
2.1 基因敲除	14
2.2 转化	15
2.3 共培养	16
3 讨论	18
参考文献	19
致谢	21

膨大弯颈霉 PKS 和 NRPS 基因敲除突变株的构建

生物技术（食用菌）专业 许新港

指导教师 于浩 杨秀青

摘要：丝状真菌膨大弯颈霉能够产生多种次级代谢产物，某些具有很高的药用价值，如免疫抑制剂环孢霉素。丝状真菌产生的次级代谢产物很多是由 NRPS 和 PKS 基因调控合成的，本研究主要是通过根癌农杆菌介导的同源重组的方法构建膨大弯颈霉两类基因的敲除突变株，通过生物信息学分析预测出，*TINF_05969* 基因为 NRPS 类基因，*TINF_06105* 基因为 PKS 类基因，通过构建基因敲除载体，转化根癌农杆菌，根癌农杆菌与野生型膨大弯颈霉孢子共培养，以及阳性突变株的筛选等实验，成功地获得了两个基因对应的敲除突变株，为后续深入研究膨大弯颈霉聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶基因在生物合成重要次级代谢产物过程中的功能奠定了基础。

关键字：膨大弯颈霉；NRPS；PKS；同源重组；基因敲除

The Construction of PKS and NRPS gene knockout mutants of *Tolypocladium inflatum*

Student Majoring in Biotechnology Xu Xingang

Tutor Yu Hao Yang Xiuqing

Abstract: *Tolypocladium inflatum* is a filamentous fungus, which can produce a variety of secondary metabolites, some of which have high medicinal value, such as the immunosuppressant cyclosporine. The synthesis of many secondary metabolites produced by filamentous fungi are regulated by NRPS and PKS genes. In this thesis, we used the homologous recombination mediated by *Agrobacterium tumefaciens* to get the gene knockout mutants of these two types of genes. The bioinformatics analysis predicted that the *TINF_05969* gene is a NRPS-like gene. The *TINF_06105* gene is a PKS-like gene, and we get two mutants successfully by constructing knockout vectors, transferring into *A. tumefaciens*, co-cultivating *A. tumefaciens* with *T. inflatum* spores, and screening the mutants. The mutants lay the foundation for further study on the function of the polyketide synthase and non-ribosomal polypeptide synthase and the biosynthesis mechanism of the important secondary metabolites.

Key words: *Tolypocladium inflatum*;PKS;NRPS;Homologous recombination;Gene knockout

引言

丝状真菌包括霉菌和大型真菌，它与人类的生产、生活密切相关，且广泛分布于自然界中^[1]。丝状真菌可产生多种多样的次级代谢产物，其中很多次级代谢产物都可以作为药物，四环素、卡那霉素、环孢霉素 A 等都是丝状真菌次级代谢产物^[2]。鉴于丝状真菌次级代谢产物在医学上重要的应用价值，它们的生物合成过程成为人们关注的焦点，也是新药开发的重要来源之一。在遗传水平上，丝状真菌次级代谢产物的生物合成过程研究取得了很大进展，一系列基因操作和分子转化技术已应用于研究各种丝状真菌^[1]。丝状真菌的次级代谢生物合成一般涉及多步酶学反应过程，而且受到不同层级的调控^[3]。

丝状真菌膨大弯颈霉 (*Tolypocladium inflatum*) 于 1971 年由 Gams 从土壤中分离得到并创立新属和命名为 *T. inflatum* W. Gams^[4]。膨大弯颈霉 (*T. inflatum*) 从分类学上属于子囊菌门、粪壳菌纲、肉座菌目、线虫草科、弯颈霉属^[5]。免疫抑制剂环孢霉素 A (Cyclosporin A) 是膨大弯颈霉产生的重要次级代谢产物之一，它能够抑制免疫系统的排斥反应，在不破坏免疫系统的前提下，有效地防止骨髓或器官移植过程发生排斥反应，还能够治疗多种自身免疫缺陷疾病^[6]。膨大弯颈霉菌株 *T. inflatum* NRRL 8044 (ATCC 34921) 全基因组测序已完成，环孢菌素合成基因簇以及其他次级代谢产物的生物合成基因等已有预测和分析^[5]。目前，环孢霉素的生物合成机理已经有研究报告^[7]。

聚酮合酶 (Polyketide synthase, PKS) 是一类具有模块化的多功能酶，其催化聚酮类化合物 (PK) 合成的原理与脂肪酸的合成大致相同^[8]。常见的聚酮类化合物有作为降血脂药物的普伐他丁、作为抗癌药的多柔比星等。PKS 的核心结构域由酮基合酶结构域 (ketosynthase, KS)、乙酰转移酶结构域 (acyltransferase, AT) 和酰基载体蛋白结构域 (acyl-carrier protein, ACP) 组成，一般按“酮基合酶结构域-乙酰转移酶结构域-酰基载体蛋白结构域”顺序排列^[9]。PKS 按照聚酮类化合物合成的途径可以分为三类 (I 型 II 型 III 型)，真菌中的聚酮类化合物主要是由 I 型聚酮合成酶合成的^[10]，在 I 型 PKS 中有一类模块式的聚酮合成酶具备合成大环内酯类抗生素的能力，每个模块的具体功能是将脂肪酸单体识别并把它整合到中间产物中去，此模块式 PKS 通过对单一模块的重复利用，经过多个催化循环，最终能够合成长度不同的碳链^[9,11,12]。尽管聚酮化合物在临床上使用普遍，但其高效生产和应用受到天然菌株对聚酮化合物

限制合成的影响。通过聚酮化合物的非均匀表达去有效消除这些局限性，已经成为了当前研究的热门话题^[13]。

非核糖体多肽合成酶（Non-ribosomal peptide synthase, NRPS）组成同聚酮合酶类似，不依赖核糖体而能催化合成肽类化合物^[14]，常见的非核糖体多肽（NRP）有环孢霉素、青霉素等。许多微生物可以使用 NRPS 来合成复杂的，多样的生物活性肽。在 NRPS 作用下，利用常见或非常见氨基酸，经过肽键形成，某些基团的修饰等形成最终产物，有些产物还通过连接糖基或脂肪酸链等有了更不同的功能^[15]。典型的 NRPS 模块具有腺苷酰化结构域（adenylation 结构域，A 结构域）、硫酯化结构域（thiolation 结构域，T 结构域）、缩合结构域（condensation 结构域，C 结构域）和硫酯酶结构域（thioesterases 结构域，TE 结构域），分别负责氨基酸的活化、肽链的延伸、酰胺键的形成，以及肽链的释放^[16]。NRPS 模块空间排列顺序的不同从而造成了多肽产物的氨基酸序列特异性^[17]。催化合成的产物具有的结构和功能具有多样性已被普遍关注，具有很大的商业开发潜力。此类化合物被广泛运用在新化合物开发方面，人们已经利用天然的 NRPS 或者是某些特定的结构域，将已知非核糖体多肽合成酶的模块或特定的结构域进行组合构建成的新的 NRPS 来合成目的多肽^[18]。

基因敲除技术和遗传转化技术被人们广泛应用于丝状真菌研究中。同源重组作为传统基因敲除方法中的一种，得到了广泛的运用^[19]。生物体用于纠正 DNA 复制过程中发生的 DNA 突变或者是由外界因素诱导所致 DNA 突变时，就是运用的同源重组，它的完成由体内的同源重组酶行使功能^[20]。常用的遗传转化技术主要包括电击法、基因枪法、CaCl₂/聚乙二醇法和农杆菌介导转化，利用这些技术可以有目标的改造丝状真菌的遗传物质^[21]。在本实验运用的就是农杆菌介导的转化方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 化学试剂

Potato Dextrose Agar 粉末、蛋白胨、酵母粉、琼脂粉、琼脂糖、葡萄糖、蔗糖、甘油、二甲基亚砜、2-吗啉乙磺酸、乙酰丁香酮、NaCl、NaOH、KCl、CaCl₂、ZnCl₂、MnCl₂·4H₂O、KNO₃、Na₂MoO₄·2H₂O、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、Na₂SO₄、FeSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O、FeCl₃·6H₂O、K₂HPO₄·3H₂O、(NH₄)₂SO₄、H₃BO₃、Tris-HCl、草铵膦

抗生素：卡那霉素（Kanamycin）、羧苄青霉素（Carbenicillin）、噻孢霉素（Cefotaxime）

1.1.2 生化试剂和试剂盒

酶：Taq 酶、2×ClonExpress Mix（Vazyme）、2×Phanta Master Mix（Vazyme）、*Xba* I 限制性内切酶（TaKaRa）、*Spe* I 限制性内切酶（TaKaRa）；

试剂盒：FastPure Plasmid Mini Kit(200)试剂盒（南京诺唯赞生物科技有限公司）、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒（南京诺唯赞生物科技有限公司）；

其他：DL 5000 DNA Maker、DL 10000 DNA Marker、超纯水、10× loading buffer、10×QuickCut Green Buffer（TaKaRa）、核酸染液。

1.1.3 实验器皿及用具

量筒、离心管、试管、三角瓶、烧杯、移液枪、枪头、冻存管、培养皿等。

1.1.4 试验仪器

表 1 实验仪器设备

仪器名称	仪器型号	仪器厂家
精密天平	AR1140	奥豪斯仪器（上海）有限公司
高压蒸汽灭菌锅	MLS-3750	日本三洋电机株式会社
恒温震荡培养箱	HZQ-F160	哈尔滨东联电子技术开发有限公司
电热恒温培养箱	DRP-9082	上海森信实验仪器有限公司
高速离心机	GTR22-1	时代北利离心机有限公司
低温恒温水浴锅	DC-1015	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
PCR 仪	T100TM	美国伯乐公司
电泳仪	DYY-12	北京六一仪器厂
凝胶成像系统	GelDocXR+	美国伯乐公司
超净工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
4℃、-20℃冰箱	BCD-532WDPT	青岛海尔股份公司
-80℃冰箱	MDF-U54V	松下健康医疗器械株式会社
分光光度计	22331Hamburg	EppendorfAG
生物显微镜	CX21	日本奥林巴斯株式会社

1.1.5 培养基

1) LB 培养基

表 2 LB 培养基配制方法

药品	质量 (g/L)
蛋白胨	10.0
酵母粉	5.0
氯化钠	10.0

将以上药品按照表 2 所列方法配制好后使用高压蒸汽灭菌锅 121℃灭菌 15 min。
固体培养基配制时需在此基础上加入 1.5%的琼脂粉。

2) PDA 培养基

按 39 g/L 的比例称取所需要 Potato Dextrose Agar 粉末的量，定容后使用高压蒸汽灭菌锅 121℃灭菌 15 min 备用。

3) YEB 培养基

表 3 YEB 培养基配制方法

成分	质量 (g/L)
蔗糖	5.0
蛋白胨	10.0
酵母浸膏	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5

将以上药品按照表 3 所列方法配制好后使用高压蒸汽灭菌锅 121℃灭菌 15 min。
固体培养基配制时需在此基础上加入 1.5%的琼脂粉。

4) 真菌-农杆菌共培养培养基

表 4 2.5×MM 盐溶液

成分	质量 (g/L)
KH ₂ PO ₄	3.625
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	6.720
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.250
NaCl	0.375
CaCl ₂	0.125
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0062
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.250

表 5 诱导液体培养基

成分	用量/300 mL
2.5×MM 盐溶液	120 mL
10 mM 葡萄糖	0.54 g
0.5%甘油	1.50 mL
ddH ₂ O	168 mL

灭菌后的诱导液体培养基冷却至 50℃后添加 12 mL MES（2-吗啉乙磺酸水溶液，浓度为 1 M）母液，工作浓度 40 mM，添加 40 μ L AS（乙酰丁香酮，溶剂为二甲基亚砷 DMSO，浓度为 1 M）母液，工作浓度为 200 μ M。MES 母液与 AS 母液于-20℃保存，AS 需要避光。使用时，MES 可于 50-60℃水浴助其解冻复溶，AS 自然避光溶化。

表 6 诱导固体培养基

成分	用量/300 mL
2.5×MM 盐溶液	120 mL
5 mM 葡萄糖	0.27 g
0.5%甘油	1.50 mL
1.5%琼脂粉	6 g
ddH ₂ O	166.50 mL

灭菌后的 IM 培养基冷却至 50℃后添加 12 mL 浓度为 1 M 的 MES 母液，终浓度 40 mM，添加 80 μ L 的浓度为 1 M 的 AS（DMSO）母液，终浓度为 200 μ M。平板避光 4℃保存。

5) 真菌转化筛选培养基

表 7 M-100 缓冲液

成分	用量/500 mL
H ₃ BO ₃	30 mg
ZnCl ₂	200 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	70 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	20 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	50 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	200 mg
ddH ₂ O	500 mL

表 8 M-100 盐溶液

成分	用量/1000 mL
KH ₂ PO ₄	16 g
KCl	8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g
Na ₂ SO ₄	4 g
CaCl ₂	1 g
M-100 缓冲液	8 mL
ddH ₂ O	992 mL

表 9 M-100 固体培养基

成分	用量/400 mL
M-100 盐溶液	25 mL
葡萄糖	4 g
KNO ₃	1.2 g
1.5% 琼脂粉	6 g
ddH ₂ O	375 mL

灭菌后的 M-100 固体培养基冷却至 50℃左右后添加筛选药物草铵膦，工作浓度为 300 µg/mL。

1.2 感受态的制备与转化方法

1.2.1 大肠杆菌 Top10 感受态制备

- 1) 以无抗 LB 平板对 Top10 进行划线复苏，37℃倒置培养。
- 2) 从过夜复苏的 LB 平板上挑取一个 Top10 单菌落，转接到 5 mL LB 液体培养基中。
- 3) 以 1:100 比例转至 100 mL 液体 LB 培养基中，37℃，250 rpm 培养 2-3 h 至 OD₆₀₀≈0.4。
- 4) 将细菌转移到无菌的 50 mL 离心管中，冰上放置 10 min，使培养物冷却 4℃，12000 rpm 离心 2 min，回收菌体。倒出培养液，尽量使其流尽。
- 5) 每 50 mL 初始培养液用 10 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液重新悬浮菌体。4℃，12000 rpm 离心 2 min，回收菌体。
- 6) 每 50 mL 培养物加 10 mL 0.1mol/L CaCl₂ 溶液，冰上放置 30 min，12000 rpm 离心 2 min，倒掉上清。
- 7) 每 50 mL 培养物用 1.5 mL 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液重新悬浮。加甘油至终浓度 15%。
- 8) 迅速将细菌悬液分装到冷却的无菌 1.5 mL 离心管（100 µL/管）中，封紧管口，没入液氮中快速冰冻感受态细胞。-80℃保存。

1.2.2 敲除载体的大肠杆菌转化及筛选阳性克隆

- 1) 取-80℃冻存的大肠杆菌感受态细胞，冰上融化约 10 min。
- 2) 加入 10 µL 重组产物，轻轻用移液枪吹吸，温和混匀，冰上静置 30 min，静

置期间可以混合一到两次。

- 3) 42°C水浴中热击 90 s, 迅速置于冰上冷却 2 min。
- 4) 加入 1 mL 无抗 LB 液体培养基。37°C摇床复苏培养 1 h。
- 5) 将复苏后菌液 8000 rpm, 离心 2 min, 去上清, 收集菌体。
- 6) 加入 200 μ L 无抗 LB, 将菌体重悬, 并均匀涂布于含有相应抗性的 LB 固体平板上。
- 7) 待菌液干后, 37°C倒置培养适当长的时间, 约 12 h。
- 8) 待长出克隆, 挑取平板上单个菌落, 加 10 μ L ddH₂O 制成菌液后用 2 $\times$ Taq 酶通过菌液 PCR (PCR 体系、程序同表 16、17) 选阳性克隆。
- 9) 以抗性 LB 液体培养基 (含 50 μ g/mL Kan) 对阳性菌落进行 37°C摇菌培养, 超速离心收集足量菌体, 使用试剂盒抽提质粒。然后取少量质粒进行酶切鉴定。
- 10) 将酶切产物琼脂糖凝胶电泳, 将酶切鉴定正确阳性转化子菌液加甘油 (15% 终浓度) 于-80°C保存。

1.2.3 根癌农杆菌 AGL-1 感受态的制备

- 1) 用牙签挑取根癌农杆菌原始保存菌株 AGL-1, 于 YEB 平板 (含 50 μ g/mL Carb) 上划线培养进行活化。
- 2) 挑取平板上单菌落, 接种至 50 mL YEB 液体培养基中 (含 50 μ g/mL Carb)。28°C, 200 rpm, 培养过夜。
- 3) 取出菌液, 然后放入 50 mL 的离心管中, 共计 600 mL 菌液, 分装 12 管。
- 4) 冰浴 30 min, 4°C, 12000 rpm, 离心 5 min 收集菌体。
- 5) 小心地弃掉上清, 然后加入 10 mL 20 mM 的 CaCl₂ 溶液重悬菌体沉淀。
- 6) 4°C, 12000 rpm, 再次离心 5 min 收集菌体。
- 7) 弃上清, 离心管置于冰上, 用 2 mL 20mM 的 CaCl₂ 再次重悬菌体沉淀。将六管中重悬起来的菌体沉淀合成一管, 一共 12 mL, 加入无菌甘油至终浓度的 15%。
- 8) 用枪轻轻吹吸将液体充分混匀, 分装至 1.5 mL 的离心管中, 每一管中装 100 μ L, 然后利用液氮速冻后保存于-80°C冰箱中。

1.2.4 敲除载体转化根癌农杆菌 AGL-1

- 1) 取出在-80°C冰箱里冻存的农杆菌感受态和-20°C冰箱里冻存的目的质粒, 置

于冰上融化，约 10 min。

2) 向农杆菌感受态中加入 0.5-1 μg 目的质粒，温和混匀后冰上静置 30 min。

3) 液氮速冻 5 min，37°C 水浴 5 min，之后立即置于冰上 2 min。

4) 向 1.5 mL 的离心管中加入 1 mL 无抗 YEB 液体培养基，放在 28°C，150 rpm 的摇床里，复苏 3 h。

5) 10000 rpm，离心 2 min，去上清，收集菌体。

6) 向 1.5 mL 的离心管中加入 200 μL 无抗 YEB 培养基，将菌体重悬后均匀涂布于 YEB 平板（含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Carb 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan），28°C 培养箱中倒置培养 2-3 d。

7) 挑取单克隆菌落混于 10 μL 无菌水中，PCR（PCR 体系、程序同表 16、17）验证转化子，挑取阳性转化子接种于 3 mL YEB 液体培养基（含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Carb 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan）中，放在 28°C，200 rpm 的摇床里，过夜摇菌。

8) 菌液较浓后，取 1200 mL 菌液，加入 600 mL 无菌甘油，保存于 -80°C 冰箱。

1.3 敲除载体构建与转化

1.3.1 重组法构建敲除载体

本实验利用同源重组双交换的原理进行基因敲除，在载体的抗性基因两端分别插入膨大弯颈霉菌株中需要敲除的基因两端适当长度的同源序列，在体内重组酶的作用下通过同源重组将基因组中需要敲除的基因片段置换为载体上的抗性基因，以达到目的基因敲除的目的。本实验选用 pDHT-Bar 载体，其上携带草铵膦药物筛选基因，其上游端和下游端分别带有不同的酶切位点，模式图如下：

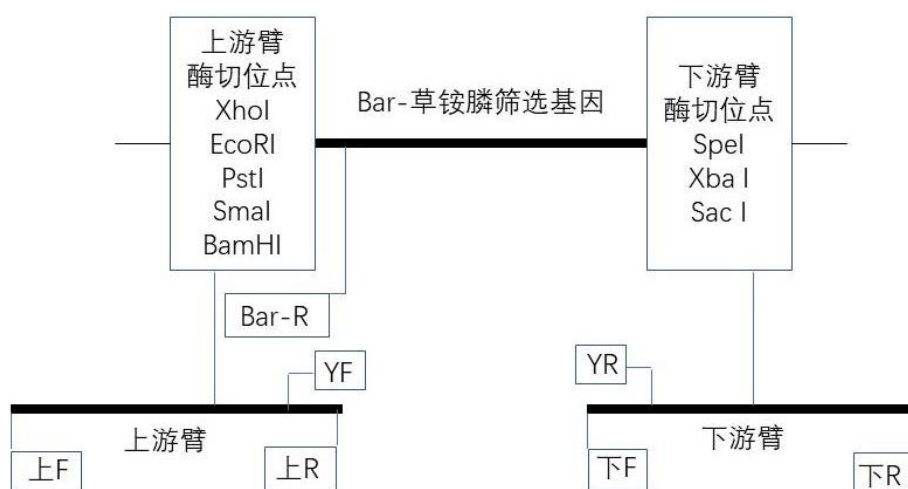


图 1 pDHT-Bar 载体模式图

1) 用 antiSMASH fungal version 网页版分析膨大弯颈霉 cDNA 文库，筛选出被预测编码 NRPS 的 *TINF_05969* 基因（如图 2 所示）和被预测编码 PKS 的 *TINF_06105* 基因（如图 3 所示），根据相应蛋白序列 blast 分析，选取核心结构域作为敲除区域。

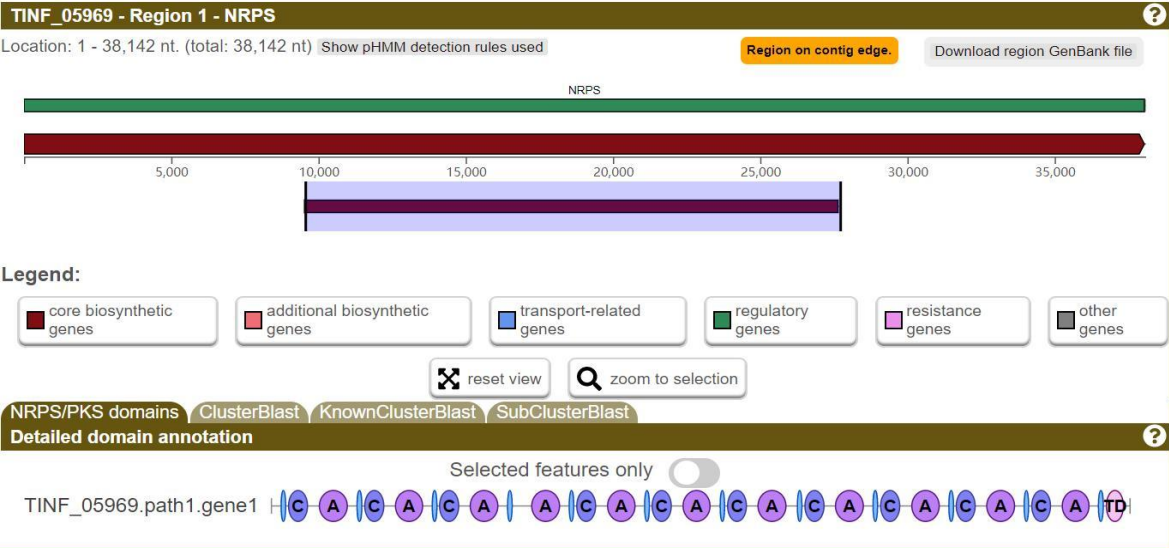


图 2 编码 NRPS 的 *TINF_05969* 基因

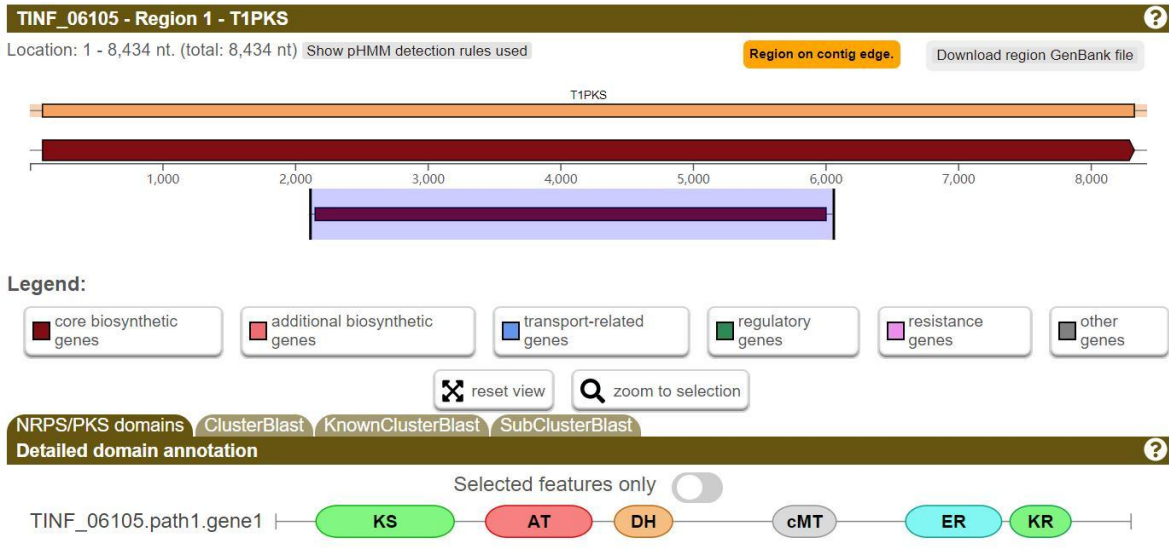


图 3 编码 PKS 的 *TINF_06105* 基因

2) 在其上游和下游各选取一段片段作为上、下游同源序列，称之为上、下游臂，设计相应引物，同时，在跨上、下游同源臂设计一对验证引物，引物列表如下：

表 10 *TINF_05969* 引物和验证引物序列

<i>TINF_05969</i>	上游臂 (1367bp)	上 F	<i>GCTTGATATCGAATTTGCTTCAGAACTCGGTCCTT</i>
		上 R	<i>CGGGCTGCAGGAATTTGGAGGATGTTTACCCTTGC</i>
	下游臂 (1082bp)	下 F	<i>GATCTGATGAAGTAGTTCGAAGTCTTTTCCGTGCT</i>
		下 R	<i>CCGCTCTAGAAGTAGAGAAGGTGCCGAATTGACAG</i>
	验证引物 (WT: 739bp KO: 1250 bp)	YF	GAGCCATGAGTCCTTCTTGC
		YR	GATCCTTCGGTGAAGCAGAC

注：本实验用同源重组法构载体，斜体序列为载体酶切后游离端的同源序列。WT：膨大弯颈霉野生型；KO：Knock out，敲除的片段长度

表 11 *TINF_06105* 引物和验证引物序列

<i>TINF_06105</i>	上游臂 (1421bp)	上 F	<i>GCTTGATATCGAATTGGCAAAGAGAAGTGGTGAGC</i>
		上 R	<i>CGGGCTGCAGGAATTTGTTGGTGGTCTCGTTGGTA</i>
	下游臂 (1013bp)	下 F	<i>GATCTGATGAAGTAGATGCAGTGGCCTCTGGTATC</i>
		下 R	<i>CCGCTCTAGAAGTAGCGTGGCACTCTACAAAAGCA</i>
	验证引物 (WT: 839bp KO: 1150bp)	YF	GCCACCGTTCTGAATAGAGC
		YR	AAACGCATCCGAGTTGTACC

注：本实验用同源重组法构载体，斜体序列为载体酶切后游离端的同源序列。WT：膨大弯颈霉野生型；KO：Knock out，敲除的片段长度

3) 用高保真酶 2×Phanta Master Mix 酶 PCR（见表 12、13）扩增上下游臂，反应体系及程序如下：

表 12 扩增体系

试剂	加入量 (μL)
F-Primer	1.0
R-Primer	1.0
膨大弯颈霉基因组	1.0
2×Phanta Master Mix	12.5
水	9.5
Total	25.0

表 13 PCR 反应程序

程序/温度 (°C)	时间 (s)
1:98	180
2:98	15
3:58	15
4:72	75
5:goto2	30 Cycles
6:72	600

4) 用 *Xba* I 限制性内切酶切割载体 pDHt-Bar, 反应体系如表 14 所示:

表 14 酶切体系

试剂	加入量 (μL)
<i>Xba</i> I/ <i>Spe</i> I	2.5
10×QuickCut Green Buffer	5.0
pDHt-Bar	20.0
水	22.5
Total	50.0

使用移液器轻轻吸打混匀, 短暂离心将反应液收集至管底, 37°C 水浴, 15 min。

5) 对扩增上下游臂的 PCR 产物和酶切后的载体经琼脂糖凝胶电泳, 在紫外光下切胶回收目的条带, 使用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒回收 DNA 片段, 按照说明书进行操作。

6) 将酶切好的载体同上游臂进行连接, 连接体系如表 15 所示:

表 15 连接体系

组分	加入量 (μL)
线性化载体	1.0
上游臂	1.0
2×ClonExpress Mix	5.0
ddH ₂ O	2.0

使用移液器轻轻吸打混匀, 短暂离心将反应液收集至管底。然后 50°C 水浴, 5 min, 迅速置于冰上冷却。

7) 将连接好的重组体系按 1.2.2 所述方法转化大肠杆菌 Top10 感受态, 然后均匀涂布于含有卡那霉素抗性的 LB 固体平板上。等单克隆长出后在每个平板上挑取单菌落分别装到 5 mL 含有 50 mg/mL Kan 的 LB 液体培养基的试管中。37°C 摇床中培养 8h, 然后进行菌液 PCR 验证上游臂是否连接成功, 反应体系、程序见表 16、17 所示, 使用表 10、11 中的验证引物和载体所带筛选基因上的反向引物 (Bar-R:

GCCTGGACGACTAAACCAAA) 进行验证。验证成功后使用 FastPure Plasmid Mini Kit(200)试剂盒提取质粒。

表 16 菌液 PCR 体系

试剂	加入量 (μL)
引物 YF	0.5
引物 Bar-R	0.5
菌液 DNA	1.0
2×Taq	7.0
水	5.0
Total	14.0

表 17 菌液 PCR 反应程序

程序/温度 (°C)	时间 (s)
1:95	160
2:95	30
3:56	30
4:72	30
5:goto2	30 Cycles
6:72	600

8)按表 14 的酶切体系将已连接上游臂的质粒用 *Spe* I 限制性内切酶进行单酶切,回收酶切产物后,按表 15 的重组反应体系将其同下游臂进行重组连接,重组产物转化大肠杆菌,筛选阳性克隆,使用 YF 和 YR 引物进行验证,方法同上,此时获得的即为构建好的基因敲除载体。

9)将敲除载体转化根癌农杆菌 AGL-1 感受态,并用 YF 和 YR 验证引物进行验证筛选出阳性克隆,并-80℃保存菌液。

1.3.2 根癌农杆菌介导的膨大弯颈霉遗传转化

1)取 10 μL 在-80℃冰箱里保菌的含有敲除载体的根癌农杆菌,接种到 3 mL YEB 液体(含 50 μg/mL Carb 和 50 μg/mL Kan)培养基中,于 28℃,200 rpm,过夜摇菌。

2)将摇好的菌转接到 3 mL YEB 液体(含 50 μg/mL Carb 和 50 μg/mL Kan)培养基中,于 28℃,200 rpm,过夜摇菌。

3)菌液较浓后,将菌液加入 1.5 mL 的无菌离心管中,12000 rpm 离心 2 min,将上清弃掉,菌种接于已经灭好菌的 IM 培养基中。

4)调菌液 OD₆₅₀≈0.15,稀释到菌液量 12 mL OD 值刚好合适,于 28℃摇床培养,诱导 6 h。

5)在诱导结束前,选取 PDA 平板上长势良好的培养约在两周左右的膨大弯颈霉,刮取适量的菌丝混于 1 mL 的无菌水中,用棉滤芯过滤,收集滤液,获得孢子悬液。

6) 血球计数板统计孢子数目, 计算浓度后, 将孢子悬液浓度调至 5×10^5 conidia/mL。

7) 等到诱导时间结束, 取农杆菌菌液及上一步刚刚稀释好的孢子悬液各 200 μ L, 在 1.5 mL 的离心管中混合均匀。

8) 取上述混合液 200 μ L 涂布于 IM 平板上, 设置三个平行, 28°C 共培养 48 h。

9) 用加入适量抗真菌药物和抗农杆菌药物的 M-100 筛选培养基覆盖共培养 48 h 后的 IM 平板, 温和覆盖, 直至把所有菌覆盖住, 培养基凝固后, 于 25°C 培养 5-7 d 至单个抗性菌落出现。

10) 使用灭过菌的牙签将单个的抗性菌落挑取一点至 PDA 培养基平板上, 每一种做三个平行。待菌落长大后, 挑选长势良好的平板抽取各个菌落的 DNA。

11) 使用简易法抽取各个菌落的 DNA:

①用灭好菌的牙签刮取平板上生长旺盛的膨大弯颈霉鲜嫩的菌丝, 加入放有 10 μ L 0.3M NaOH 的离心管中, 保证菌丝充分浸润。

②置于沸水浴中 3-5 min。然后置于凉水中冷却 1 min。

③加入 100 μ L 0.05 M Tris-HCl, 混合均匀后瞬间离心一次, 取上清可作为 PCR 实验的模板。

12) 利用 PCR (PCR 体系、程序同表 16、17) 对菌落进行验证, 挑选出阳性个体, 保留三个不同的阳性菌落。

13) 用灭过菌的牙签刮取验证为阳性个体的菌丝, 将其混于无菌水中, 滤去菌丝, 制成孢子悬液, 将其浓度调到 10^2 - 10^3 conidia/mL, 取 100 μ L 涂于 PDA 培养基平板上, 于 25°C 培养 2-3 d。挑取刚刚生长出来的单菌落到新的 PDA 平板上, 25°C 培养 5-7 d, 菌落长大后提取单菌落的 DNA, 用验证引物 PCR (PCR 体系、程序同表 13、14) 验证突变株。

13) 将验证得到的突变株转接于新的 PDA 平板上, 25°C 培养两周, 收集孢子使用 25% 的甘油保存于 -80°C 冰箱。

2 结果与分析

2.1 基因敲除

分别构建 *TINF_05969* 和 *TINF_06105* 基因的敲除质粒：

将设计好的 *TINF_05969* 和 *TINF_06105* 基因的上下游臂引物分别进行 PCR 扩增出 *TINF_05969* 和 *TINF_06105* 基因的上下游臂，如图 4、5 所示。

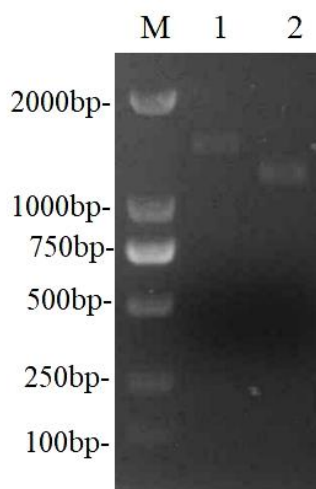


图 4 *TINF_05969* 上游臂，下游臂的 PCR 结果

注：M，DNA Marker；1，*TINF_05969* 基因敲除载体上游臂 PCR 扩增产物；2，*TINF_05969* 基因敲除载体下游臂 PCR 扩增产物

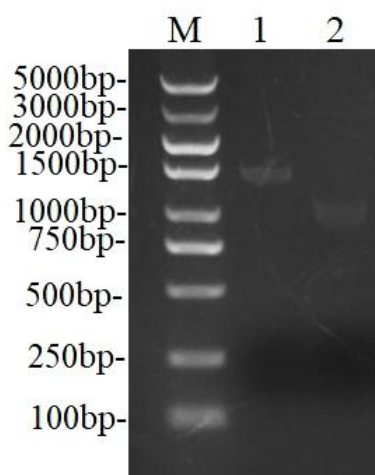


图 5 *TINF_06105* 上游臂，下游臂的 PCR 结果

1，*TINF_06105* 基因上游臂 PCR 扩增产物；2，*TINF_06105* 基因下游臂 PCR 扩增产物

先将扩增的上游臂进行回收后利用同源重组酶将其连接到线性化的载体 pDHt-Bar 上（*Xba* I 限制性内切酶切割），然后转化大肠杆菌 Top10 感受态。挑取在 LB 平板（50 μ g/mL Kan）上生长的单菌落接种到 LB 液体培养基（50 μ g/mL Kan）中

培养，使用验证引物（YF 和 Bar-R）进行菌液 PCR 筛选出阳性克隆，如图 6 所示。

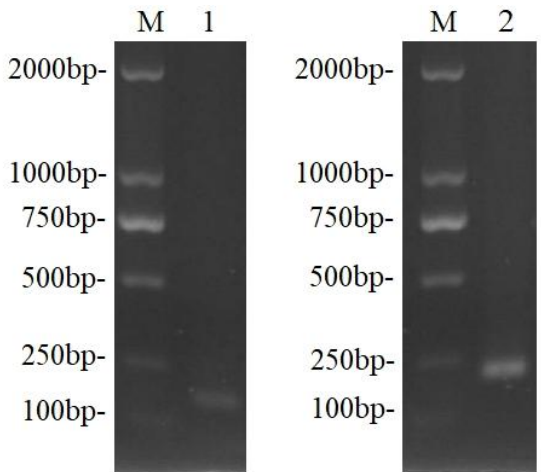


图 6 菌液 PCR 筛选阳性克隆结果

注：M，DNA Marker；1，PCR 验证 *TINF_05969* 基因敲除载体上游臂连接成功；2，PCR 验证 *TINF_06105* 基因敲除载体下游臂连接成功

将验证为阳性克隆的菌液进行质粒抽取，之后用 *Spe* I 限制性内切酶切割，利用同源重组酶将下游臂基因片段重组连接到此线性化的载体上，连接产物转化到大肠杆菌 Top10 感受态。挑取在 LB 平板（50 μ g/mL Kan）上生长的单菌落接种到 LB 液体培养基（50 μ g/mL Kan）中培养，使用验证引物（YF 和 YR）通过菌液 PCR 筛选阳性克隆，如图 7 所示。

将阳性克隆进行摇菌培养后再次抽提质粒，即获得两个基因的敲除载体。

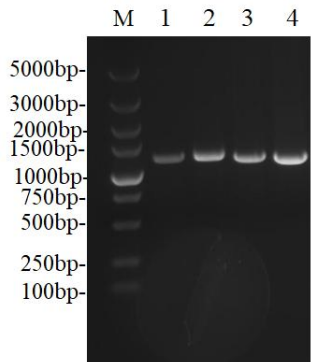


图 7 菌液 PCR 筛选阳性克隆结果

注：M，DNA Marker；1，2：PCR 验证 *TINF_05969* 基因敲除载体构建成功；3，4，PCR 验证 *TINF_06105* 基因敲除载体构建成功

2.2 转化

将上述敲除载体转化根癌农杆菌 AGL-1 感受态，在 YEB 平板（50 μ g/mL Kan

和 50 $\mu\text{g/mL}$ Carb) 上挑取单克隆菌落进行 PCR 验证, 筛选阳性克隆。

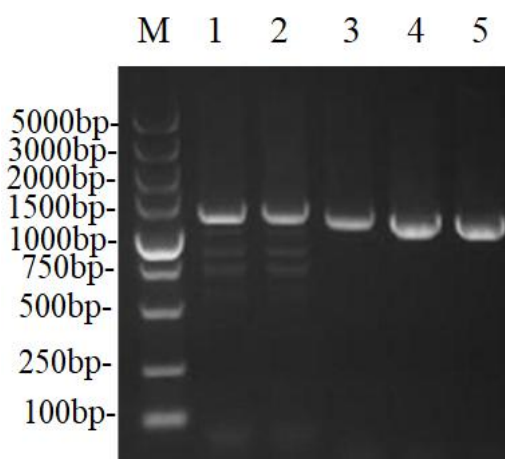


图 8 菌液 PCR 筛选阳性克隆

注: M, DNA Marker; 1, 2: PCR 验证 *TINF_05969* 基因敲除载体成功转化根癌农杆菌 AGL-1;
3, 4, 5, PCR 验证 *TINF_06105* 基因敲除载体成功转化根癌农杆菌 AGL-1

2.3 共培养

用加入适量抗真菌药物(草铵膦, 300 $\mu\text{g/mL}$)和抗农杆菌药物(噻孢霉素, 300 $\mu\text{g/mL}$)的 M-100 筛选培养基覆盖共培养 48h 后的 IM 平板, 温和覆盖, 直至把所有菌覆盖住, 培养基凝固后, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 7 d, 表面出现突破覆盖培养基表面的菌落。用牙签挑取单菌落少许菌丝至 PDA 平板上, 生长 3 d 菌落足够大后, 形态如图 9 所示。



图 9 PDA 平板上生长出的菌落

抽取各个菌落的 DNA, 用验证引物进行 PCR 验证, 然后进行琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 10、11, 挑选出阳性个体, 此为一次验证。

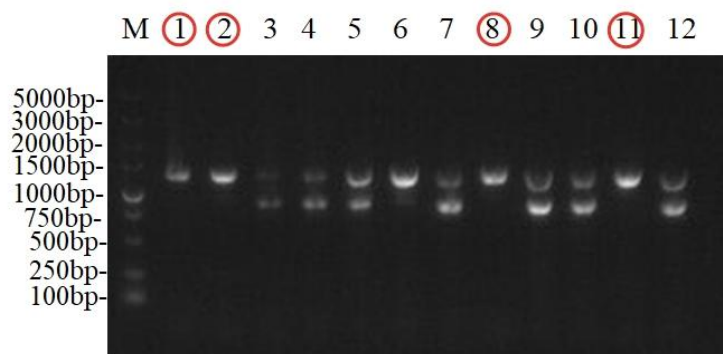


图 10 敲除载体 (*TINF_05969*) 转膨大弯颈霉菌落 PCR 验证结果

注: M, DNA Marker; 1-12, *TINF_05969* 基因敲除疑似转化子

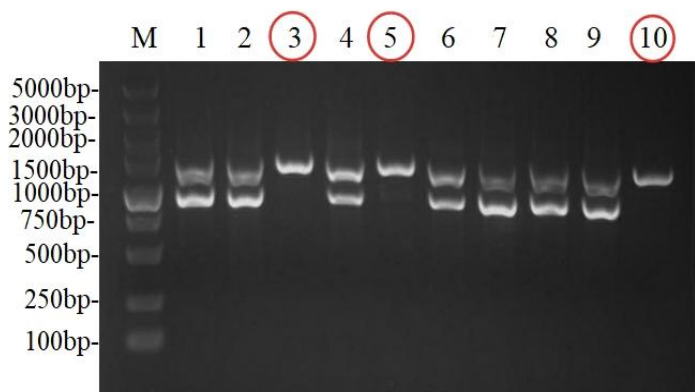


图 11 敲除载体 (*TINF_06105*) 转膨大弯颈霉菌落 PCR 验证结果

注: M, DNA Marker; 1-12, *TINF_06105* 基因敲除疑似转化子

刮取验证为阳性个体的菌丝, 混于超纯水中, 过滤菌丝制作成孢子悬液后, 稀释到浓度约为 1000 个/mL, 取 100 μ L 涂于 PDA 平板上, 待菌落萌发后, 肉眼可见形成小菌落, 挑取其菌丝到新的 PDA 平板上, 菌落生长足够大时, 抽取其 DNA, 用验证引物进行 PCR 验证, 此为二次验证, 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 12。

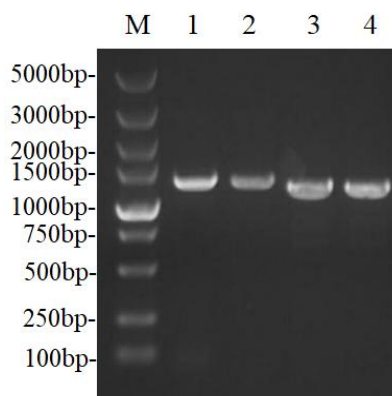


图 12 敲除载体转膨大弯颈霉菌落 PCR 二次验证结果

注: M, DNA Marker; 1, 2, PCR 二次验证 *TINF_05969* 基因敲除成功; 3, 4, PCR 二次验证 *TINF_06105* 基因敲除成功

3 讨论

丝状真菌在面对自然环境的选择压力时,往往能够进化出合成复杂多样的次级代谢产物的能力,以更好地适应多变的外界环境,而随着对其研究的不断深入,人们发现真菌产生的次级代谢产物可以作为一个巨大的化合物资源库,从中能够筛选出大量的新药物及其他用途的新化合物。随着膨大弯颈霉 (*T. inflatum* NRRL 8044) 全基因组测序的完成,对其研究不再停留在化合物分离鉴定、化学描述、药用价值以及高产菌株的筛选等层面上了,根据生物信息学分析,发现基因组中包含了大量 NRPS、PKS、萜类、脂肪酸类等次级代谢产物合成基因,也就是说,后续研究有望从中挖掘出更多的结构新颖,具有特殊功效的已知或未知的化合物,并从基因水平上解析其生物合成过程。在膨大弯颈霉全基因组测序完成之前,已有研究发现其能合成免疫抑制剂环孢霉素,并发现其存在多种结构类似物^[22]。之后,人们对其发酵产物进一步研究发现,除此之外,还能够产生多种次级代谢产物,其中某些具有抗癌活性,如膨大弯颈霉能够产生新化合物 Inflatin G,它是一种新的 aphidicolin 类似物,以及另外七种已知化合物 pyridoxatin rotamers A 和 B, aphidicolin, aphidicolin-17-monoacetate, gulypyrone A, 吡哆醛旋转异构体 A 和 B,其中多种化合物对四种人类癌细胞系 A549, CNE1-MP1, A375 和 MCF-7 均具有细胞毒性^[23]。

本实验成功的敲除了膨大弯颈霉中被预测为 NRPS 的 *TINF_05969* 基因和被预测为 PKS 的 *TINF_06105*, 在后续研究中,将获得的敲除突变株对比野生型膨大弯颈霉,通过不同培养发酵条件,辅以不同诱导条件,可对比发现某种化合物的有无,以实现基因与其所调控合成的化合物的有效连接,进而可以深入解析化合物的生物合成过程。

参考文献

- [1] 许杨, 涂迫. 丝状真菌基因敲除技术研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007(01): 120-126.
- [2] 潘园园, 李二伟, 车永胜, 刘钢. 丝状真菌次级代谢产物的研究现状与发展趋势[J]. 菌物学报, 2015, 34(05): 890-899.
- [3] 潘园园, 刘钢. 中国丝状真菌次级代谢分子调控研究进展[J]. 遗传, 2018, 40(10): 874-887.
- [4] Gams W. *Tolypocladium* eine hyphomycetengattung mit gaschwollenen phialiden[J]. Persoonia, 1971, 6: 185-191.
- [5] Bushley K E, Raja R, Jaiswal P, et al. The Genome of *Tolypocladium inflatum*: evolution, organization, and expression of the cyclosporin biosynthetic gene cluster[J]. PlosGenetics, 2013, 9(6): e1003496.
- [6] 李兆兰. 中国弯颈霉新种及产环孢菌素的研究[J]. 真菌学报, 1988(02): 93-98.
- [7] Yang X, Feng P, Yin Y, et al. Cyclosporin biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* benefits fungal adaptation to the environment[J]. mBio, 2018, 9(5): e01211-18.
- [8] Smith S, Tsai S. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases[J]. Natural Product Reports, 2007, 24(5): 1041-1072.
- [9] Fujii I. Heterologous expression systems for polyketide synthases[J]. Natural Product Reports, 2009, 26(2): 155-169.
- [10] Hertweck C. The biosynthetic logic of polyketide diversity [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2009, 48: 4688-4716.
- [11] Keller N P, Turner G, Bennett J W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics[J]. Nature reviews microbiology, 2005, 3: 937-947.
- [12] Cronan J E, Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways [J]. Methods in enzymology, 2009, 459: 395-433.
- [13] 段月娇, 薛超友, 卢文玉. 异源表达聚酮类化合物前体的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(11): 107-114.
- [14] Reimer JM, Aloise MN, Harrison PM, et al. Synthetic cycle of the initiation module of a formylating nonribosomal peptide synthetase [J]. Nature, 2016, 529: 239-242.
- [15] Hur G H, Vickery C R, Burkart M D. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology[J]. Natural product reports, 2012, 29: 1074-1098.
- [16] 郑宗明, 顾晓波, 俞海青, 梁凤来, 刘如林. 非核糖体肽合成酶主要结构域的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2005(02): 120-124.

- [17] 韩梦瑶, 陈晶晶, 乔云明, 朱平. 非核糖体肽合成酶研究进展[J]. 药学学报, 2018, 53(07): 1080-1090.
- [18] 王世媛. 非核糖体肽合成酶(NRPSs)作用机理与应用的研究进展[J]. 微生物学报, 2007(04): 734-737.
- [19] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination[J]. Science, 1989, 224: 1288 -1292.
- [20] 王军平, 张友明. Red/ET 重组及其在生物医学中的应用[J]. 生物工程学报, 2005(03): 502-506.
- [21] 王教瑜, 杜新法, 柴荣耀, 孙国昌, 林福呈. 丝状真菌目标基因替换过程中的策略与方法[J]. 遗传, 2007(07): 898-904.
- [22] Ahn E Y, Shrestha A, Hoang N H, et al. Structural characterization of cyclosporin A, C and microbial bio-transformed cyclosporin A analog AM6 using HPLC–ESI–ion trap-mass spectrometry[J]. Talanta, 2014, 123: 89-94.
- [23] Lin J, Niu S, Ding Z, et al. Isolation and characterization of aphidicolin derivatives from *Tolypocladium inflatum*[J]. Molecules, 2017, 22(7).

致谢

四年的大学时光一晃而过，再多辞藻的堆积也难以形容这易逝的韶光。丰富多彩的大学生活让我得到了成长，奋斗是青春最亮丽的底色，探索的脚步一刻也不能停歇，努力做最好的自己。

感谢指导我完成毕业设计的杨秀青老师，从实验的完成到论文的修改，杨秀青老师都给了我极大的帮助，她告诉我做实验所需要的“匠心精神”值得我认真学习。感谢我的导师、我的班主任于浩老师，忘不了于老师的谆谆教导。感谢实验室里的师兄师姐，在他们身上体现出的自律、积极、勤奋，我要向他们学习。感谢我的那些团结友爱、互帮互助的同学们。

最后，向各位对本论文进行审阅的老师表示由衷的感谢！