



青島農業大學

# 学士学位论文

题 目	膨大弯茎霉中 NRPS 类基因与 PKS 类 基因功能的研究
姓 名	丁一凡
学 号	20170203447
学 院	生命科学学院
专 业	生物技术（食用菌）
班 级	201701
指导教师	于浩 杨秀青

二〇二一年五月

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是在导师的指导下进行研究工作所取得的原创性成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中标明。

本声明的法律后果由本人承担。

论文作者（签名）：

年 月 日

## 学位论文版权使用授权书

本论文作者完全了解青岛农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权青岛农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

论文作者（签名）：

年 月 日

指导教师（签名）：

年 月 日

## 膨大弯茎霉中 NRPS 类基因与 PKS 类基因功能的研究

**摘要：**膨大弯颈霉是一种能够产生多种次级代谢产物的丝状真菌，免疫抑制剂环孢霉素是其产生的很重要的一种次级代谢产物，具有很高的药用价值。丝状真菌产生的次级代谢产物一般是由非核糖体多肽合成酶（NRPS）、聚酮合酶（PKS）、萜类合成酶（TPS）等基因调控合成的。本研究通过生物信息学分析预测出，*TINF\_03094* 基因为 NRPS 类基因，*TINF\_00235* 基因为 PKS 类基因，利用根癌农杆菌介导的同源重组的方法构建膨大弯颈霉的基因敲除突变株，具体通过在大肠杆菌中分别构建该基因的敲除载体，转化根癌农杆菌，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。通过获得该基因对应的膨大弯颈霉敲除突变株，对照野生型菌株进行培养，利用高效液相色谱分别对发酵产物进行检测，对比分析两者化合物种类的差别，以期后续实现基因与化合物相对应。

**关键词：**膨大弯颈霉；NRPS；PKS；基因敲除；次级代谢

## **Study on the function of NRPS and PKS genes in *Tolypocladium inflatum***

**Abstract:** *Tolypocladium inflatum* is a filamentous fungi which can produce a variety of secondary metabolites. Cyclosporin, an immunosuppressant, is an important secondary metabolite produced by *Tolypocladium inflatum*, which has high medicinal value. The secondary metabolites produced by filamentous fungi are generally synthesized by NRPS, PKS and TPS genes. Through bioinformatics analysis, we predicted that the *TINF\_03094* gene of *Tolypocladium inflatum* is NRPS, and the *TINF\_00235* gene of *Tolypocladium inflatum* is PKS. A gene knockout mutant of *Tolypocladium inflatum* was constructed by homologous recombination mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Specifically, the knockout vectors were constructed in *E. coli*, transformed into *Agrobacterium tumefaciens*, co cultured with wild-type *Tolypocladium inflatum* spores, and the screening of positive mutants, The *Tolypocladium inflatum* knockout mutant was successfully obtained. Compared with the wild-type strains, the fermentation products were detected by HPLC, and the differences between the two compounds were compared and analyzed, in order to realize the correspondence between genes and compounds.

**Key words:** *Tolypocladium inflatum*; PKS; NRPS; Gene knockout; Secondary metabolites

# 目 录

1 文献综述 .....	1
2 材料与方法 .....	2
2.1 实验材料 .....	2
2.1.1 化学试剂 .....	2
2.1.2 生化试剂和试剂盒 .....	2
2.1.3 实验器皿及用具 .....	2
2.1.4 试验仪器 .....	3
2.1.5 培养基 .....	3
2.2 重组法构建敲除载体 .....	4
2.3 膨大弯颈霉的发酵检测 .....	7
2.3.1 膨大弯颈霉的液体发酵 .....	7
2.3.2 膨大弯颈霉的高效液相色谱（HPLC）检测 .....	7
3 结果 .....	8
3.1 质粒的构建 .....	8
3.2 高效液相色谱检测 .....	11
4 分析与讨论 .....	12
5 结论 .....	12
参考文献 .....	14
致谢 .....	16

## 1 文献综述

丝状真菌是环境中广泛存在的一种微生物<sup>[1]</sup>。其可产生许多种次级代谢产物,某些次级代谢产物可作为药物来使用。例如,他汀类、霉酚酸和环孢酶素等,已经开始大规模地用于器官移植领域,来延长人们的生命<sup>[2]</sup>。次级代谢物的合成是一个复杂过程,需要多类基因参与调控表达。基因组的挖掘工作表明,真菌产生次级代谢产物的能力被大大低估,因为许多真菌次级代谢物的合成基因簇在常规的培养条件下是不表达的<sup>[3]</sup>。真菌的次级代谢物的合成一般会受到多种因素的调控约束<sup>[4]</sup>。

膨大弯颈霉 (*Tolypocladium inflatum* W. Gams) 是首次由 Gams 在 1971 年分离并命名的,为弯颈霉属的模式种<sup>[5]</sup>。因其代谢过程中可产生能作为器官移植中抗排异反应的主要免疫抑制剂环孢霉素 A(Cyclosporin A),对器官移植的发展起着重要的推动作用,并且还能产生抗真菌、杀虫的物质<sup>[6][7][8]</sup>,因而备受关注,具有极高的开发利用价值。目前,环孢霉素的合成机理已经被研究者所报道<sup>[9]</sup>。

聚酮类化合物是由细菌、真菌或植物通过连续的低级羧酸脱羧缩合形成的,结构多样的一类丝状真菌次级代谢产物,具有许多种的生物学活性,包括抗菌、抗肿瘤、免疫抑制和降低胆固醇等功能,被广泛应用于农业、医学和工业<sup>[10][11]</sup>。聚酮化合物的结构多种多样,但其生物合成的核心是由聚酮合酶 (Polyketide synthase, PKS) 催化多个酰基单元发生缩合形成的<sup>[12]</sup>。聚酮是由一个启动单元与若干延展单元为原料反复缩合延伸形成,它由短链羧酸单体(乙酸、丙酸和丁酸等)从头到尾缩合成复杂的分子支架。真菌产生的聚酮类化合物现已为药物开发的重要来源<sup>[13]</sup>。聚酮化合物在临床上使用较为普遍,现已经成为了当前的热门研究方向<sup>[14]</sup>。

在某些微生物体内,不以 20 种常见氨基酸的氨基酸为原料,不依赖于核糖体所合成多肽类化合物,催化生成这些多肽类化合物合成起关键作用的酶称为非核糖体多肽合成酶 (non-ribosomal peptidesynthetase, NRPS) <sup>[15]</sup>。NRPS 在调节微生物生存、生长和繁殖方面具有关键的作用,主要起到以下几种功能: 抗生素,抑制竞争者生长; 铁载体; 毒素; 含氮物质的储存场所; 作为调节生长、繁殖和分化的信号分子等<sup>[15]</sup>。NRPS 基因的出现伴往往随着重要的次级代谢物,对于寻找新型抗生素或生物活性物质具有极大的帮助<sup>[16][17]</sup>。在新型药物的研究领域中,微生物次级代谢产物是一类重要的天然产物。而 NRPS 代谢产物亦属于天然产物的行列,可用于研制抗生素、抗真菌剂、抗癌和抗肿瘤药物等,是当前药物领域

研究的热点<sup>[18]</sup>。

基因敲除通常采用同源重组的方法将转化入靶细胞的 DNA 序列与靶细胞染色体上面的同源序列发生同源重组，将目标片段替换为外源 DNA 片段，从而实现对目标片段的敲除。利用基因敲除技术，能够对细胞染色体进行精确地修饰和改造，而且经过修饰和改造的基因能够随染色体 DNA 稳定地遗传复制<sup>[19]</sup>。早在 1973 年，Mishra 等就首次报道了丝状真菌粗糙链孢霉的 DNA 转化现象<sup>[20]</sup>。至 2000 年，已有超过 100 种丝状真菌实现了转化<sup>[21]</sup>，基因敲除技术在丝状真菌的研究中也开始得到应用。常用的遗传转化方法有电击转化法、聚乙二醇介导法、基因枪介导法、限制性酶介导的整合法和根癌农杆菌介导法，利用这些技术可以改变丝状真菌的遗传物质，使其在宿主细胞中得到稳定整合、表达并遗传<sup>[22]</sup>。本实验所采用的是根癌农杆菌介导法。

高效液相色谱法是物质分析的重要方法，特别是在药物检验中发挥了重要作用<sup>[23]</sup>，而膨大弯颈霉产生的重要代谢产物是环孢霉素，是医学上重要的一种药物，故可以采用高效液相色谱法进行检测。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 化学试剂

PDA 粉末、LB 肉汤、琼脂粉、琼脂糖、甘油、Yeast extract、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、色谱纯乙腈、色谱纯甲醇；

抗生素：卡那霉素（Kanamycin）。

#### 2.1.2 生化试剂和试剂盒

酶：2×Phanta Master Mix、2×ClonExpress Mix、HindIII/SacI 限制性内切酶；质粒提取和 DNA 纯化试剂盒购买自南京诺唯赞。

其他：DL 5000 DNA Maker、DL 10037 DNA Marker、ddH<sub>2</sub>O、10×loading buffer、10×QuickCut Green Buffer（TaKaRa）、核酸染色剂。

#### 2.1.3 实验器皿及用具

分析天平、EP 管、注射器、滤器、移液枪、玻璃棒、封口膜、牛皮纸、锥

形瓶、称量纸、PE 手套、药匙等。

## 2.1.4 试验仪器

表 2.1 实验仪器设备

仪器名称	仪器型号	仪器厂家
紫外可见分光光度计	UV-2102PC	上海福玛实验设备有限公司
震荡培养箱	ZQZY-A8	上海知初仪器有限公司
电子天平	电子天平	梅特勒-托利多（常州）称重设备有限公司
高效液相色谱	E2695	Waters
高效液相检测器	2998 PDA	Waters
琼脂糖水平电泳槽	DYCP-31BN	北京六一仪器厂

## 2.1.5 培养基

### 1) PDA 真菌培养基

按 46 g/L 的比例称取 PDA 粉末，定容后高压蒸汽 121 °C 灭菌 15 min 备用。

### 2) LB 细菌培养基

按照 25 g/L 的比例称取所需的 LB 肉汤粉末的量，定容后高压蒸汽 121 °C 灭菌 15 min。固体培养基配制时需在此基础上加入 2%的琼脂粉。

### 3) FNY 真菌发酵培养基

表 2.2 FNY 培养基配制方法

成分	质量 (g/L)
D-fructose	30.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0
Yeast extract	5.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.05
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.32
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0274
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0275
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0178
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0031

将以上药品按照表 2.2 所列方法配制好后，高压蒸汽 121°C 灭菌 15 min。



## 2.2 重组法构建敲除载体

本实验采用重组法敲除目的基因。首先选择自己想要敲除的目的基因，在 cDNA 文库中找到目的基因的基因序列，再从基因组中找到目的基因的所在位置，并找到目的基因的启动子。在不破坏上一个基因和下一个基因的前提下，在启动子前后端设计一段同源臂，通过基因组扩增得到同源臂。将获得的同源臂连接到质粒载体上，并将其导入到膨大弯颈霉的细胞内，利用同源双交换的原理，可以从基因组上把目的基因的启动子序列敲除，使该基因无法进行表达，从而获得基因敲除的突变株。

先在载体的抗性基因两端插入需要敲除基因启动子两端的 1,000 bp 左右的同源序列。在重组酶的催化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，以达到对目的基因的敲除。本实验选用 pDHt-Bar 载体，其序列上携带有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：

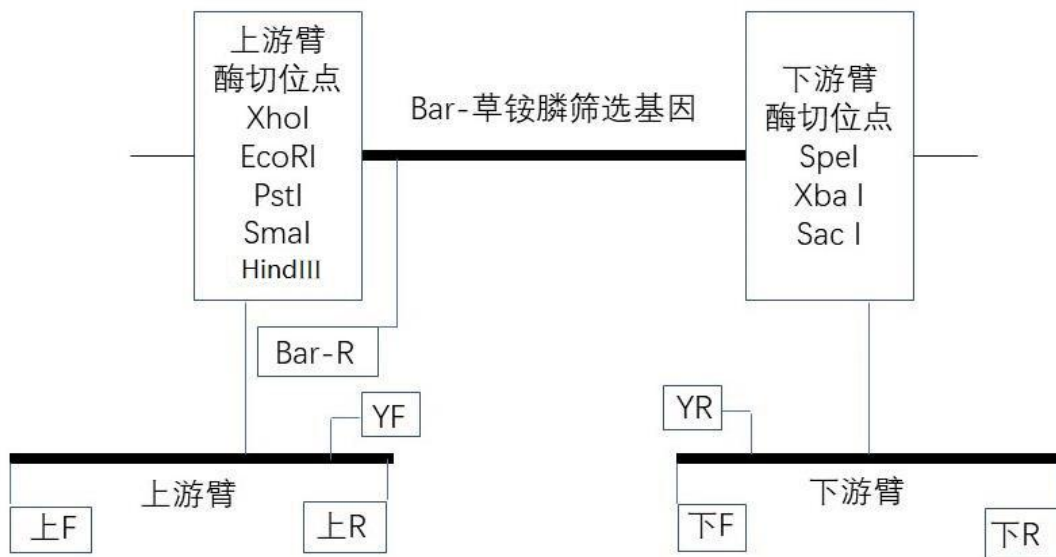


图 2.1 pDHt-Bar 载体模式图

首先，blast 分析目标基因，找到其一些关键功能域的位置，取此部分适当长度的基因作为预敲除片段，其长度要区别于筛选基因的长度，为了同源重组的顺利进行，也不宜过长。其次，在敲除片段的上游和下游各选取一段长度在 1,000 bp 左右的片段分别设计一对引物，即上下游臂引物，引物大小为 20 bp，并在引物两端添加与载体相连的同源序列，上下游臂方向要一致。将上下游臂分别连入载体的筛选基因两侧，则基因组中上下游臂之间的片段即为敲除片段。限制性内切酶选取以不影响后续实验中已经连好的单条同源臂为宜。最后，在跨上下游同源臂，设计一对引物为验证引物（表 2.3、表 2.4）。敲除载体构建流程如下：

表 2.3 *TINF\_00235* 引物和验证引物序列

<i>TINF_00235</i>	上游臂	上 F	<i>TCGACGGTATCGATAAGGTTTCAGGCCTCGTGTGT</i>
		上 R	<i>ATTCGATATCAAGCTCCGTTGGTAAGCTGTCTCGA</i>
	下游臂	下 F	<i>CACCGCGGTGGAGCTGATCGGCAAGGCAGTGTAAG</i>
		下 R	<i>GGGAACAAAAGCTGGCACGTATGCGGTCTGGTCAA</i>
	验证引物	验证 F	TGCTATCGAGCCTCCATCAG
		验证 R	GCAACATCCCCTTTGAGGAA

表 2.4 *TINF\_03094* 引物和验证引物序列

<i>TINF_03094</i>	上游臂	上 F	<i>TCGACGGTATCGATAAGCTATCAGATGGTGCGCAA</i>
		上 R	<i>ATTCGATATCAAGCTACACACAACACACAGCACCG</i>
	下游臂	下 F	<i>CACCGCGGTGGAGCTAGCTGGCTCTGGTGATGATG</i>
		下 R	<i>GGGAACAAAAGCTGGGACTGCGGACTTCAGCATGT</i>
	验证引物	验证 F	TTCGTCGAGGAGGCTCAAAG
		验证 R	AGCCTCGTTGGGTGATTCAT

1) 利用膨大弯颈霉基因组 DNA 作为模板, 用 2×Phanta Master Mix 酶 PCR 扩增上下游臂, 上下游同源臂的扩增体系如表 2.5 和表 2.6 所示。根据所需用 Hind III 或 Sac I 限制性内切酶切开 Bar 载体, 使之成为线性化载体。pDHt-Bar 的酶切体系如表 2.7 所示。

表 2.5 PCR 扩增同源臂反应体系 (25 μL)

成分	体积 (μL)
引物上/下 F	1.6
引物上/下 R	1.6
2×Phanta Master Mix	12.5
ddH <sub>2</sub> O	8.1
膨大弯颈霉基因组	1.2

表 2.6 PCR 反应程序

程序/温度 (°C)	时间 (s)
1:98	180
2:98	20

3:60	60
4:72	60
5:goto2	36 Cycles
6:72	600

表 2.7 酶切体系 (50  $\mu\text{L}$ )

试剂	加入量 ( $\mu\text{L}$ )
HindIII/SacI限制酶	2.5
10 $\times$ QuickCut Green Buffer	5.0
pDHt-Bar	20.0
ddH <sub>2</sub> O	22.5

在水浴 37 $^{\circ}\text{C}$  的条件下酶切 30 min

2) 对扩增上下游臂的 PCR 产物和酶切后的载体经琼脂糖电泳检测, 并使用试剂盒进行胶回收。胶回收后对上下游臂片段和 pDHt-Bar 载体进行浓度检测。

3) 对经限制酶酶切后的 pDHt-Bar 载体与上下游臂片段进行连接, 反应体系如表 2.8 所示。

表 2.8 酶连体系 (10  $\mu\text{L}$ )

试剂	加入量 ( $\mu\text{L}$ )
同源上/下游臂	1.0
经 Hind III/Sac I酶切的线性载体	3.0
2 $\times$ ClonExpress Mix	5.0
水	1.0

水浴 50  $^{\circ}\text{C}$  酶切 10 min

4) 反应结束后, 将连接产物转化进大肠杆菌 Top10 感受态。

5) 进行 PCR 反应验证, 筛选出连接上的大肠杆菌, 进行质粒抽提, 验证体系如表 2.9、2.10 所示。

表 2.9 菌液 PCR 体系 (14  $\mu\text{L}$ )

试剂	加入量 ( $\mu\text{L}$ )
引物上/下 F	0.5
引物上/下 R	0.5
菌液 DNA	1.0

2×Taq 酶	7.0
ddH <sub>2</sub> O	5.0

表 2.10 菌液 PCR 反应程序

程序/温度 (°C)	时间 (s)
1:95	300
2:95	30
3:60	30
4:72	20
5:goto2	34 Cycles
6:72	600

6) 同样按上述步骤连接上另外一条同源臂, 注意单酶切连接时要验证连入方向。

## 2.3 膨大弯颈霉的发酵检测

### 2.3.1 膨大弯颈霉的液体发酵

1) 取 4 周以内的在 PDA 培养基上长势良好的膨大弯颈霉野生型或基因敲除突变株, 收集孢子, 滤去菌丝后得到孢子悬液。

2) 取孢子悬液按照 1: 1000 的比例接种于装有 FNY 培养基的三角瓶中, 于 25°C 摇床, 200 rpm, 培养 3d, 作为种子液。

3) 将种子液接种于装有 50 mL FNY 培养基的三角瓶中, 每瓶接种量为培养基体积的 1%。

4) 25°C 摇床, 200 rpm, 摇床培养 10 天。

5) 高压真空泵抽滤, 分离菌丝和发酵液。收集菌丝, 冻干, 研磨成粉, 称取 100 mg 粉末, 溶解于 2 mL 甲醇中, 4°C 静置萃取 48 h, 期间多次超声波助溶。萃取结束后, 12000 rpm 超速离心 10 min 后取上清, 用于 HPLC 检测, 进样量 40 μL, 检测波长 210 nm。

### 2.3.2 膨大弯颈霉的高效液相色谱 (HPLC) 检测

检测使用 Waters e2695 系统, 紫外检测器为 Waters 2998 PDA Detector, 检测波长为 210 nm, 色谱柱规格为 Agilent Eclipse XDB-C18 柱 (PN 990967-902; 孔径 80 Å; 粒径: 5 μm; 柱长: 4.6×250mm)。洗脱条件为: 柱温 60 °C; 流动相流速为 0.8 mL/min。流动相: A:水, B:乙腈 (CAN)。洗脱程序为: 0-45 min,

65-75% B; 45-50 min, 75-100% B; 50-60 min, 100% B; 60-68 min, 100-65% B;  
68-75 min, 65% B。

## 3 结果

### 3.1 质粒的构建

根据表 2.3 和表 2.4 所列的序列设计 *TINF\_00235* 和 *TINF\_03094* 基因的引物来扩增这两个基因的同源臂。得到的产物进行电泳检测, 结果如图 3.1、3.2 所示。

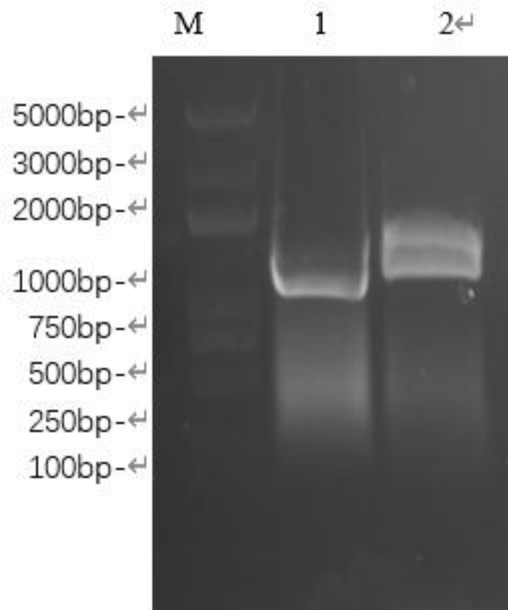


图 3.1 *TINF\_00235* 上下游臂 PCR 结果

注：M，DL 5000 DNA Marker；1，*TINF\_00235* 基因敲除载体上游臂 PCR 扩增产物；2，*TINF\_00235* 基因敲除载体下游臂 PCR 扩增产物

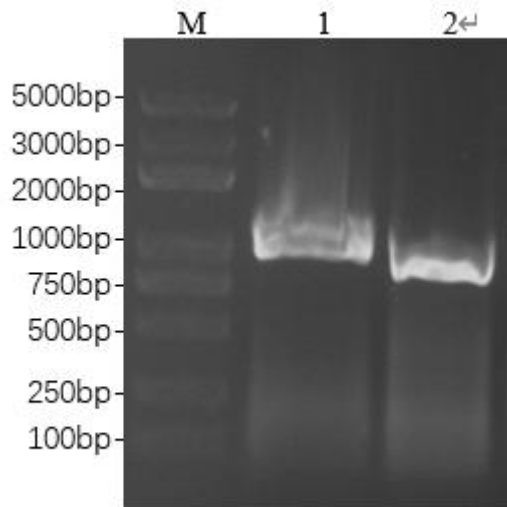


图 3.2 *TINF\_03094* 上下游臂 PCR 结果

注：M，DL 5000 DNA Marker；1，*TINF\_03094* 基因敲除载体上游臂 PCR 扩增产物；2，*TINF\_03094* 基因敲除载体下游臂 PCR 扩增产物

利用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 试剂盒将扩增出的上下游臂进行切胶回收。

利用 Hind III 限制酶酶切载体 pDHt-Bar，后进行电泳鉴定，如图 3.3 所示。并进行胶回收。

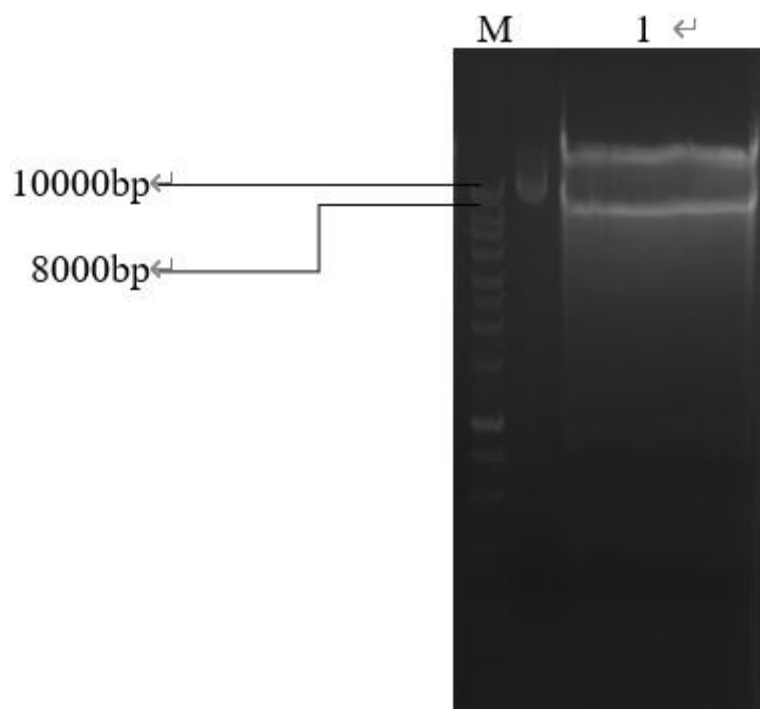


图 3.3 经 Hind III 酶切质粒

注：M，DNA Marker；1，经 Hind III 酶切的 pDHT-Bar 质粒

将回收的上游臂用重组酶连接到被切开的载体上，然后转入到大肠杆菌 Top10 感受态中。经涂布含有 Kan 的 LB 平板过夜培养。挑取单菌落培养。待菌液变浓后使用扩增引物（上 F 和上 R）进行菌液 PCR 筛选出阳性克隆。

将验证为阳性克隆的菌液接种于 LB 培养基（50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan）中过夜摇菌培养，待菌液浓度较高后利用 FastPure Plasmid Mini Kit(200)试剂盒进行质粒提取，之后再用 Sac I 限制酶酶切。将酶切后的线性载体再利用重组酶将下游臂连接至载体上。按照前面提到的方法进行转化和验证。

将阳性克隆进行摇菌培养后再次抽提质粒，即获得两个含有目的基因上下游臂的质粒。

### 3.2 高效液相色谱检测

按照设定的程序进行检测，野生型及基因敲除突变株的膨大弯颈霉的高效液相色谱检测图如下：

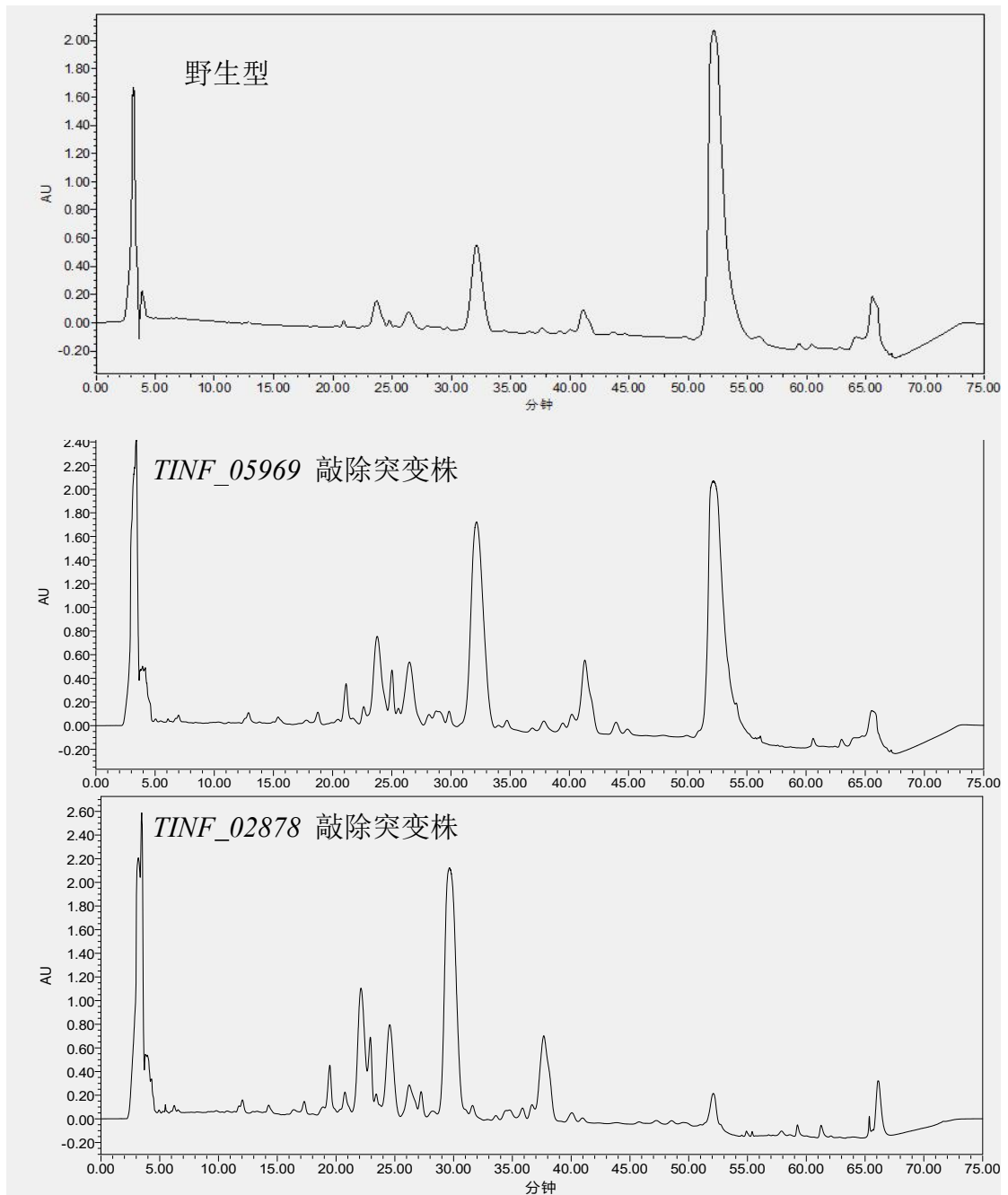


图 3.4 高效液相色谱检测



## 4 分析与讨论

当丝状真菌在面对自然环境的压力时,往往能够激发产生新的次级代谢产物,其目的是为了为了更好的适应变化中的环境。对于丝状真菌来说,次级代谢产物并不是其生存所必须的物质,但却是其发育以及人类应用的重要参与者。我们通过基因敲除的方法对丝状真菌的基因进行编辑,可以从结果可以看到,在野生型的基础上产出了比原先更大量的产物,以及产生了一些特殊的峰,所以我们可以考虑敲除掉的某些基因可以提高我们的目的产物,环孢霉素的产量。下一步的研究方向也可以向着利用诱导剂来诱导某些本先沉默的基因,看是否能够提高环孢霉素的产量。

随着对丝状真菌研究的深入,对其的研究已经进入到后基因组时代。对其基因功能的研究是大方向,也逐渐成为一个研究热点。现有的研究方法中,其理论依据就是利用遗传转化的方法。但是从我们的实验过程中,也发现了该技术存在的一些问题,比如转化率不足,受到各种因素的制约。当我们在实验过程中,利用 PCR 进行验证反应的时候,出现过假阳性的现象,让我们误以为是已经把上游臂连接到了载体上,对实验的研究造成了很大的困扰。我们对膨大弯颈霉的发酵产物进行高效液相色谱检测的时候,也会因为仪器的各种原因造成许多差异。所以当我们在检测的样品的时候,尽量安排在同一时间进行连续的检测,以减小误差。

环孢霉素作为一种重要的免疫抑制剂,是一种重要的抗真菌药物<sup>[24]</sup>,具有很高的医学应用价值。而丝状真菌作为一种具有较高经济价值的菌类,遗传研究开展得较晚,我相信随着分子生物学的技术的发展,其遗传表达调控等技术会变得更成熟。

## 5 结论

本实验未能构建出含有 *TINF\_03094* 基因和 *TINF\_00235* 基因上下游臂的质粒。我们在冷静分析和考虑可能造成这个现象的原因时,从酶,质粒,以及大肠杆菌等方面来考虑。我们考虑到有可能就是因为含有该质粒的大肠杆菌在-80 °C 冰箱中存放时间过长,其活性不能保证才出现这样的结果,我们重新划线培养,筛选出单菌来提取 pDHT-Bar 质粒,结果并没有成功;我们又考虑是因为我们自己制备的大肠杆菌质粒活性不够,不能成功转入质粒,于是又重新购买了一批大肠杆菌质粒,但是结果并没能如愿。我们考虑是 pDHT-Bar 质粒在目前的情况下

不适合作为基因敲除的质粒，或者因为该质粒已知的基因序列不正确，选择的酶切位点并不合适。

在后续研究中，我们考虑重新更换质粒和设计引物，并将获得的含有目的基因同源上下游臂的质粒通过农杆菌转化到野生型膨大弯颈霉中，从而得到基因敲除突变株。通过在培养液中加入诱导剂，辅以不同的诱导条件，进行发酵培养。可通过高效液相进行检测，通过对峰的比较，可发现某些产物的产量，甚至可能出现一些未知的产物。通过对比，可以有效的使基因与产物相关联，可以更好的深入了解某些次级代谢物的生物合成途径。

通过高效液相色谱的检测结果初步判断，我们可以发现三张色谱图的基线较平稳。当进样量相同的时候，峰的高度就反映了物质对该波长下的紫外线的响应量和物质的含量；我们对比 32 min 左右的峰，野生型的峰值最低，所以我们可以认为 *TINF\_05969* 基因和 *TINF\_02878* 基因的敲除导致了 32 min 处的代谢物含量的提高，但是目前并不清楚其具体的化学本质，需要进一步实验研究。

## 参考文献

- [1]汪元南.丝状真菌去除水体/底泥中重金属 Cd 的研究[D].湖南大学,2017.
- [2]Nancy P. Keller. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery[J]. Nature Reviews Microbiology,2019,17(3).
- [3]Brakhage, Axel A . Regulation of fungal secondary metabolism[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(1):21-32.
- [4]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.
- [5]Gams W . *Tolyposcladium*, eine Hyphomycetengattung mit geschwollenen Phialiden[J]. Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 1971, 6(2):185-191.
- [6]Samson RA. Entomopathogenic species of the hyphomycetes genus *Tolyposcladium* [J]. Invertebr Pathol, 1984, 43(2) : 133.
- [7]Krasnoff SB , Gupta S,St Leger RJ, et al. Antifungal and insecticidal properties of the efraeptins: metabolites of the fungus *Tolyposcladium niveum* [J] J Invertebr Pathol, 1991,58(2) : 180
- [8]Bandani Ar, Khambay BPS, Faull J L,et al. Production of efraeptins by *Tolyposcladium* species and evaluation of their insecticidal and antimicrobial properties [J] Mycolog Res, 2000, 104(5) : 537
- [9]Yang X, Feng P, Yin Y, et al. Cyclosporin biosynthesis in *Tolyposcladium inflatum* benefits fungal adaptation to the environment[J]. mBio, 2018, 9(5):e01211-18.
- [10]Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II, and III polyketide synthase paradigms[J]. Current Opinion in Chemical Biology2003,7(2):285-295.
- [11]荣辉, 黄惠琴, 鲍时翔.异源生物合成聚酮化合物的研究进展[J].天然产物研究与开发, 2007, 19(06):1097-1100. [12]孟晓琳,庞锡明,王洁.农杆菌介导海洋草酸青霉转化体系及聚酮合酶 Pks 生物学功能[J].中国生物工程杂志,2020,40(09):11-17.
- [13]贾晓迪,李力.真菌聚酮合酶及相关化合物的应用[J].精细与专用化学品,2020,28(05):6-10.
- [14]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.
- [15]任朝辉.冬虫夏草微生态区系中真菌及 PKS、NRPS 基因的多样性研究[D].贵州师范大学,2018.
- [16]李根.海洋放线菌 NRPS 基因克隆及生物信息学分析[D].大连工业大学,2017.
- [17]A, Frederik T. Hansen , et al. An update to polyketide synthase and non-ribosomal synthetase genes and nomenclature in *Fusarium*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 75(1):20-29.

- [18] Maria, Lund, Nielsen, et al. Linker Flexibility Facilitates Module Exchange in Fungal Hybrid PKS-NRPS Engineering[J]. PLOS ONE, 2016, 11(8):e0161199.
- [19] 滕安然,李力,苏红梅.聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶杂合体研究进展[J].药物生物技术,2019,26(05):455-460.
- [20] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination [J].Science, 1989,224:288-1292
- [21] Mishra N C, Tatum E L. Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*[J].Proc Natl Acad Sci USA,1973,70(12):3875-9.
- [22] 黄卫,汪天虹,吴志红,吴静,李滢冰.丝状真菌遗传转化系统研究进展[J].微生物学杂志,2000(03):40-44.
- [23] 王越,李雅凝,曲晓磊,王旭彤.丝状真菌遗传转化体系及筛选技术的研究进展[J].中国林副特产,2020(06):69-75.
- [24] Şen Kaya Sümeyye, et al. Effects of calcineurin inhibitors, cyclosporine A and tacrolimus (FK506), on the activity of antifungal drugs against *Candida* spp.[J]. Journal of Medical Microbiology,2021,70(4).

## 致谢

大学四年的时光一晃而过，学到了很多，收获了很多。我想我收获的不仅是丰富的知识，更是一种学习的能力和思维的方式，以及广阔视野，再也不像初入校门的那个懵懂无知的小孩。丰富多彩的大学生活让我得到了成长，丰富的科研生活也让我找到了努力的方向。在此非常感谢于浩老师和杨秀青老师，在我四年学习生活中，给予我指导和关怀。使我掌握了许多的实验技能和相关的专业知识，让我的专业水平和科研能力都得到了极大的提高。

本论文的研究和撰写均在杨老师和于老师的指导下完成，从实验的完成到论文的修改，两位老师都给了我极大的帮助。感谢带我学习的师兄师姐，在实验室很多不明白的问题也是他们耐心对我进行指导，从基本的实验技能开始教起，无微不至的帮助，让我受益匪浅。

回想起 2017 年的那个夏天，怀揣着梦想的我从一个小城市来到了这里，这是我梦想开始的地方，也是见证我努力的地方。又是一个夏天，我马上要毕业，去一个很远的地方继续求学深造。哲学家笛卡尔说过，越学习，越发现自己的无知。未来的路很长，要学的东西太多，感谢青农给了我这个平台，让我发现了自己的无知，也以此激发我追求知识。我相信，成功会留给有准备的人，也会属于努力的人。科研是漫长的，枯燥的，但我会年复一日的努力，沉下来学习。科研的路很长，我会努力坚持走下去。

最后，感谢我的父母。是他们一直在背后默默的支持我，无论是精神上还是经济上，感谢他们养育了我。也感谢我的弟弟，一直给我传播正能量，也一直给我加油打气。最后的最后，感谢所有在我求学路上所遇到的人。