

上海交通大学

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

学士学位论文

THESIS OF BACHELOR



论文题目：深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 功能分析

学生姓名：周于聪

学生学号：5111509040

专 业：植物生物技术

指导教师：李雅乾

学院(系)：农业与生物学院

木霉菌碳代谢抑制因子 CRE1 功能分析

摘要

木霉菌(*Trichoderma.spp*)是一种广泛存在于土壤及植物根系生态环境中的真菌,能够有效拮抗植物病原真菌,促进植物的生长。已有研究表明:木霉菌碳代谢抑制因子 CRE1 全局性调控细胞生长代谢过程,保障木霉在不同生境中的存活及拮抗病原菌特性。本研究以拮抗深绿木霉 *T.atroviride* 23 为研究对象,采用生物信息学和分子遗传操作相结合策略,利用农杆菌介导的遗传转化技术 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 敲除碳代谢抑制因子 CRE1。比较突变株 ($\Delta cre1$) 与野生株 (wide type, WT) 的生长性状,初步探究 *cre1* 基因对深绿木霉的生长和代谢的调控作用。研究发现 *cre1* 基因沉默后, $\Delta cre1$ 较 WT 菌丝生长变慢,产孢滞后。而且 *cre1* 调控菌丝和产孢特性依赖于培养基组分。此外,碳代谢因子 CRE1 还调控木霉菌分泌的细胞壁降解酶和多种拮抗性代谢产物, *cre1* 基因抑制几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶基因转录,调控与抗生素和毒素合成密切相关的非核糖体肽合成酶和聚酮合成酶基因的表达,全局性调控木霉抗菌代谢产物的合成与转运。深入探究 CRE1 对参与代谢产物运输相关的 ABC 转运蛋白 *Taabc2* 的表达调控机制,系统分析 *Taabc2* 基因转录启动子区域各区段在野生株和突变株中的表达情况,确定 CRE1 与 *Taabc2* 编码基因启动区直接作用的关键区域。明确 CRE1 通过抑制 *Taabc2* 的表达间接影响相关重要代谢产物运输。综上,碳代谢因子 CRE1 作为一个全局性的转录调控因子,对深绿木霉 T23 的生长代谢及其产物运输相关的基因具有明显的抑制作用,指导以 CRE1 为靶标,提高木霉菌细胞壁降解酶及生防相关次级代谢产物的合成和分泌,提高木霉菌生防效果具有重要意义。

关键词: 深绿木霉, 碳代谢抑制因子 CRE1, 细胞壁降解酶, 次级代谢, 转运蛋白 *Taabc2*

FUNCTIONAL ANALYSIS OF CARBON CATABOLITE REPRESSOR CRE1 IN *TRICHODERMA ATROVIRIDE*

ABSTRACT

Trichoderma spp., a sort of rich resources of fungi that isolated from soil and plant rhizospheres, which can antagonize plant pathogens and facilitate the growth of the plants, has an important value of bio-control in agriculture. The latest studies have found that CRE1, carbon catabolite repressor, regulated the cell growth and metabolic procedures, which will be helpful for it's antagonism to various pathogen and survival in different habitats. This research was focused on the effect of CRE1 on bio-coontrol efficient in *T.atroviride*. Firstly, the *cre1* knock out mutant strain of *T.atroviride* 23 was constructed by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) after genetic analysis on CRE1 coding gene. Then, it brought out the function analysis of CRE1. (1)The phenptypic assays of *cre1* mutant and the different chatacters between mutant and wide type had been done. According to the comparison of these strains, the *cre1* gene is related to the growth and sporulation of *T.atroviride*. When *cre1* was silenced, the growth rate of the mutant slows down and sporulation apparently lagged. What's more, the response of mutant to carbon soures and nitrogen sources was diversified to wide type. (2)It had been deeply studied how CRE1 regulated the expression of some cell-wall degraditon enzymes and the biosynthesis of secondary metabolites, which values in bio-control on plant pathogenic fungi. The results of the enzyme activity assay and qRT-PCR showed that CRE1 repressed the expression of the chitiansse and β -1,3- glucanase. And meanwhile, CRE1 regulated the expression of NRPSs and PKS, which influenced the biosynthesis of effective antibiotics and cytotoxin essential to pathogen antagonism. (3)CRE1 was one of global transcription factors, it did regulate the expression of a specific ATP-binding cassette transporter *Taabc2* in *T.atroviride* due to qRT-PCR analysis. The elaborate regulation mechanism had been studied by several methods. The GUS activities of *Taabc2* promoter indicated CRE1 repressed *Taabc2* transcription by binding to a conserved site in *Taabc2* promoter, which impacted the transportion efficient of various biocontrol core factors.As a conclusion, carbon catabolite repressor CRE1, as a key gene, regulates mycelia growth, secondary metabolites biosynthesis and transportion, which exactly played an intricate role in the biocontrol procedure of *T.atroviride*. And those findings are pretty valuable for controlling synthesis and secretion of metabolites and improving bio-control effects of *T.atroviride*.

KEY WORDS: *Trichoderma atroviride*, Carbon Catabolite Repression *cre1*, Cell Wall Dedragdation Enzymes, Secondary Metabolism, ABC Transporter *Taabc2*

目 录

摘要	I
ABSTRACT	II
第一章 文献综述	1
1.1 生防木霉简介	1
1.1.1 木霉菌	1
1.1.2 木霉菌的生防价值	1
1.2 碳代谢抑制和碳代谢抑制因子 CRE1 的研究现状	3
1.2.1 细菌的碳代谢抑制	3
1.2.2 真菌的碳代谢抑制	5
1.2.3 真菌碳代谢调控网络	8
1.3 本文主要研究内容、目的与意义	10
1.3.1 研究意义	10
1.3.2 研究目的与内容	11
1.3.3 实验技术路线	12
第二章 深绿木霉碳代谢抑制因子 cre1 基因的敲除	13
2.1 引言	13
2.2 实验材料与方法	13
2.2.1 实验材料	13
2.2.2 实验方法	16
2.3 结果与分析	20
2.3.1 深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1	20
2.3.2 cre1 敲除载体构建	24
2.3.3 根瘤农杆菌介导的 cre1 基因的敲除、筛选和验证	28
2.4 讨论与小结	30
第三章 碳代谢抑制因子 CRE1 对木霉菌生长和代谢的影响	32
3.1 引言	32
3.2 实验材料与方法	33
3.2.1 实验材料	33
3.2.2 实验方法	35
3.3 结果与分析	36
3.3.1 cre1 基因影响菌丝生长和发育	36
3.3.2 CRE1 介导的木霉菌对不同碳源的差异利用	37
3.3.3 CRE1 抑制木霉菌中细胞壁降解酶等活性	40
3.3.4 CRE1 影响木霉菌生防次级代谢产物的合成	45
3.4 讨论与小结	46
第四章 碳代谢抑制因子 CRE1 调控 ABC 转运蛋白 Taabc2 表达机制研究	48
4.1 引言	48
4.2 实验材料与方法	50
4.2.1 实验材料	50
4.2.2 实验方法	53



4.3 结果与分析	54
4.3.1 深绿木霉 ABC 转运蛋白表达量分析	54
4.3.2 深绿木霉 ABC 转运蛋白 <i>Taabc2</i> 基因分析	56
4.3.3 <i>Taabc2</i> 基因启动子区 CRE1 调控区段解析	57
4.3.4 CRE1 调控 <i>Taabc2</i> 基因网络预测	69
4.4 讨论与小结	70
第五章 结论与展望	72
5.1 结论	72
5.2 本研究特色与创新点	73
5.3 研究展望	73
参考文献	74
附录	80
致谢	93

第一章 文献综述

1.1 生防木霉简介

1.1.1 木霉菌

木霉菌 (*Trichoderma* spp.) 属于真菌门 (Fungi)、半知菌亚门 (Deuteromycotina)、丝孢纲 (Hyphomycetes)、丝孢目 (Hyphomycetales)、丛梗孢科 (Moniliaceae)、木霉属 (*Trichoderma*), 是一类有效的生防真菌, 广泛分布于自然界各类生态环境中。

木霉菌的形态多样, 生长环境要求相对较低, 温湿度、pH 适应性较广能够在较广。一般实验室用土豆葡萄糖培养基 (Potato Dextrose Agar, PDA) 培养木霉菌, 菌落一开始呈白色毛绒状, 性状近辐射状生长^[1]。一般培养 2 天菌丝即可铺满平板, 自中心开始向边缘逐渐产孢, 慢慢被绿色的产孢区覆盖, 反面无色。分生孢子呈球形, 浅色或无色^[2]。

1.1.2 木霉菌的生防价值

在木霉菌早期的研究中, 仅仅是停留在其形态和性质的研究层面, 后来才逐渐关注其重要的拮抗病院菌特性, 并不断深入, 探究其拮抗机理和代谢产物合成途径等。近几年来, 低碳环保理念深入人心, 生态文明建设不断推进, 国际上对于木霉菌生防领域的研究和应用日益深入。

木霉菌在工业和农业生防领域扮演重要的角色。在工业中, 以里氏木霉为代表的工业重要底盘细胞, 常用于工业生产纤维素酶等酶制剂等产品; 而在农业生防领域, 主要是以深绿木霉、哈茨木霉为代表的生防菌剂的开放和应用。

木霉菌在植物病原真菌的生物防治中主要通过重寄生作用, 与病原微生物竞争营养和生长环境、产生毒性物质抑制病原菌生长、分泌细胞壁降解酶降解病原菌细胞壁组分, 产生激发子诱导寄主植物抗性过程拮抗植物病原菌, 促进植物生长^[3,4]。如图 1.1 所示, 在与病原菌直接接触前, 生长在植物根际的木霉菌会分泌很多胞外酶, 如胞外蛋白酶等, 在胞外蛋白酶的作用下, 一些植物病原菌会释放一些小分子, 如多肽类物质。木霉菌通过识别这些病原菌分泌的小分子, 引起一系列重寄生信号反应。这些小分子可以与木霉菌丝细胞表面的 G 蛋白偶联受体或氮源传感受体结合, 激发由 G 蛋白和丝裂原活化蛋白激酶

(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)组成的信号级联反应，最终引起相关转录调控因子表达量的变化。这些转录因子可以提高一些次级代谢产物生物合成和细胞壁降解相关的酶类编码基因的表达^[5]。

木霉菌起拮抗作用时，与它自身产生的功能因子有着不可或缺的关联。木霉菌可产生多种代谢产物，其中初级代谢产物主要是一些细胞壁降解酶类，如有几丁质酶（chitinases）、 β -1,3-葡聚糖酶（ β -1,3-glucanases）、蛋白酶（proteinases）、纤维素酶（cellulases）、木聚糖酶（xylanases）等等^[6]。由于很多引起植物病害的真菌，其细胞壁主要由几丁质、 β -1,3-葡聚糖等多糖组成，而木霉菌分泌的细胞壁降解酶类则恰恰能够高效降解真菌细胞壁等结构，使病原菌失去侵染性或者引起死亡，有效防治植物病害。此外，在次级代谢产物方面，目前国内研究逐渐将视角转向次生代谢物质的基因以及信号转导方面^[7]，如非核糖体肽（Nonribosomal Peptides, NRPs）的生物合成方面。Mukherjee 等人的研究证实非核糖体肽合成酶（Nonribosomal Peptide Synthetases, NRPSs）和聚酮合成酶（Polyketide Synthases, PKS）在玉米系统抗病性反应过程中做出了重要贡献^[8]。

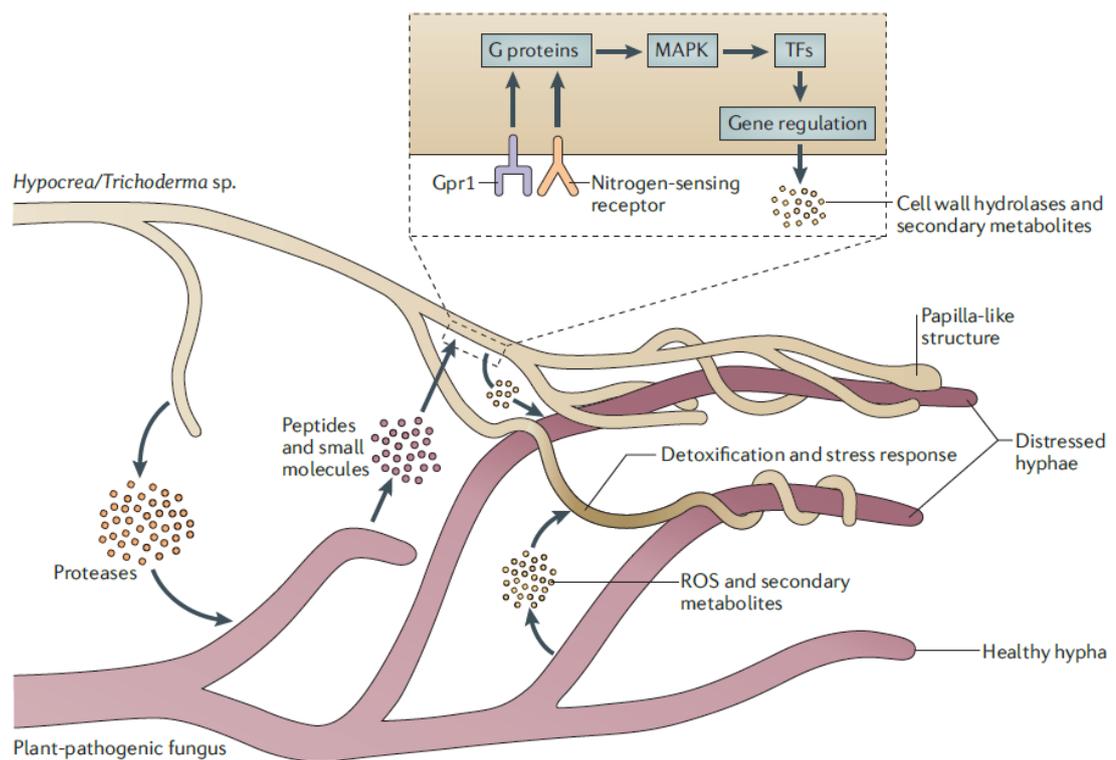


图 1.1 土壤中木霉菌的重寄生作用^[5]

Fig 1.1 Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. within the soil community

1.2 碳代谢抑制和碳代谢抑制因子 CRE1 的研究现状

当环境中存在多种碳源时，微生物会优先选择利用某一种优先碳源，如葡萄糖、果糖等，同时在碳代谢抑制蛋白参与下抑制其他碳源的代谢和利用。这种机制保证了微生物可以在复杂环境中提升竞争力和环境适应能力，使得其能在复杂生境处于一个较为优势生态位这种全局性的碳代谢利用调控机制称作是碳代谢抑制（Carbon Catabolite Repression, CCR）或者葡萄糖抑制。

1.2.1 细菌的碳代谢抑制

碳代谢抑制蛋白普遍存在于各种微生物中，具有多种多样的调控模式和途径，主要发生在转录层面的激活/抑制，以及转录后的翻译控制，调节碳源转运蛋白活性或碳代谢抑制效应蛋白复合物稳定性等方式。目前研究较为透彻的是在细菌中，如大肠杆菌和假单胞菌。在大肠杆菌中，由转录激活子 CRP (cAMP Receptor Protein, cAMP 受体蛋白)、cAMP、腺苷酸环化酶以及 EIIA (糖特异性通透多聚体 II A) 等组成磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的转运系统 PTS，主要介导了大肠杆菌在含有葡萄糖的培养基中对其他碳源代谢利用的阻遏 (图 1.2)。在这个调控途径中，葡萄糖特异性通透多聚体 (EIIA^{Glc}) 中的 EIIA 亚基处于核心地位。当 EIIA 磷酸化后，其可以与腺苷酸环化酶 AC 结合从而激活 AC 活性，合成环状腺苷酸 cAMP。细胞中高浓度的 cAMP 有利于 cAMP-CRP 复合体的形成和积累，cAMP-CRP 复合体再激活下游代谢基因启动子，开始代谢基因的转录。而没有磷酸化的 EIIA^{Glc} 则不能激活 AC 从而无法激活代谢基因的转录。EIIA^{Glc} 的磷酸化由葡萄糖磷酸烯醇式丙酮酸盐磷酸转移酶系统 PTS 的转运活性和细胞内磷酸烯醇式丙酮酸盐和丙酮酸盐的比例决定，任何一种 PTS 糖的出现将导致 EIIA^{Glc} 的去磷酸化。脱磷酸化的 EIIA^{Glc} 可以与非优先碳源的代谢酶和转运蛋白等结合，抑制其活性，如 GlpK, LacY 及其他蛋白等，阻断非优先碳源的代谢利用，保证细胞优先代谢葡萄糖等碳源。而在假单胞菌中这种碳代谢的调控主要集中在转录后水平上，有 RNA 结合蛋白介导的翻译调控 (图 1.3)。细菌的 CCR 机制有效提升了细菌对各种碳源的利用效率，尤其有利于生活在营养贫瘠的环境中的微生物以及从宿主中高效吸取潜在营养的病原微生物的生长和代谢。虽然这种现象普遍存在，但不同的细菌又是通过其独特的方式和路径来实现 CCR 机制。

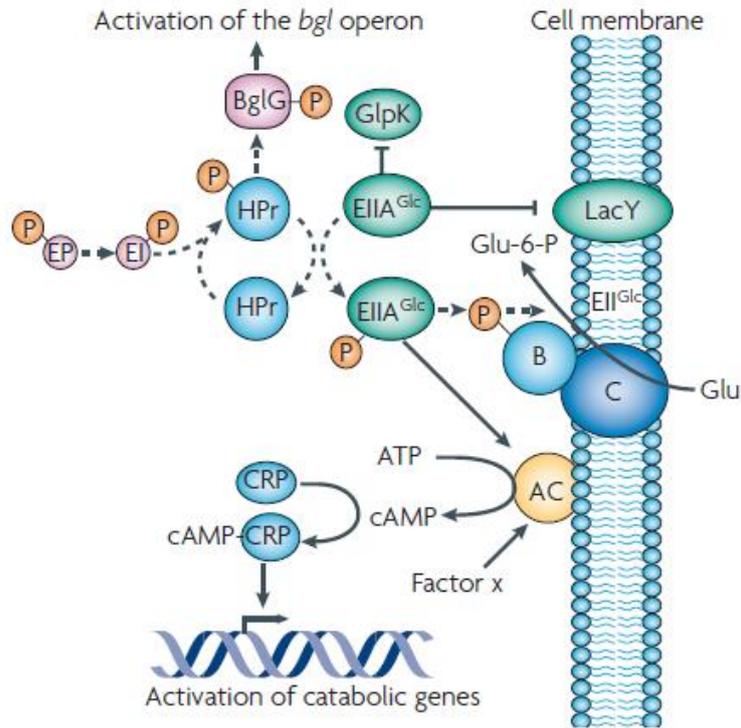


图 1.2 大肠杆菌中的碳代谢抑制^[9]

Fig 1.2 Carbon catabolite repression (CCR) in *Escherichia coli*

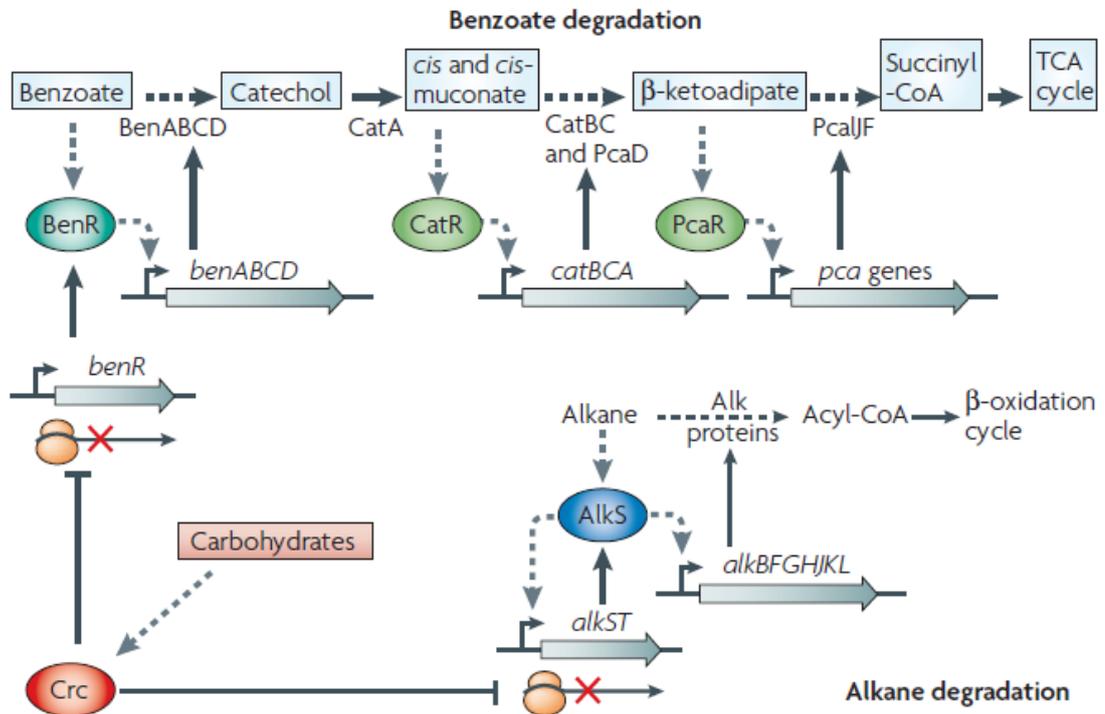


图 1.3 恶臭假单胞菌中在蛋白翻译水平上的碳代谢抑制^[9]

Fig 1.3 Carbon catabolite repression (CCR) by translational repression in *Pseudomonas putida*.

1.2.2 真菌的碳代谢抑制

同样地,在酵母等真菌中,也存在着类似的碳代谢抑制机制,被称为葡萄糖抑制或葡萄糖效应。真菌中碳代谢抑制现象的发现远远早于细菌,大约在 110 年前初次发现了真菌的葡萄糖效应,但其研究并不如细菌深入。真菌的碳代谢抑制机制有着和细菌完全不同的调控模式。真菌中的 CCR 机制并不是由细胞中的 cAMP 水平介导的,而是通过一种直接的 DNA 结合蛋白抑制基因的转录等方式实现的对不同碳源利用的调控。在很多子囊菌类的真菌中,葡萄糖抑制机制有一种 Cys₂His₂ 型转录调控因子 CreA/CRE1 所介导。很多丝状真菌中,如曲霉属、木霉属的真菌,这个因子均已被克隆。真菌的 CCR 调控机制研究最为深入的是在构巢曲霉的乙醇合成基因簇中^[10]。研究发现,葡萄糖磷酸化酶己糖激酶和葡萄糖激酶在构巢曲霉的 CCR 机制中起到了重要作用,其与碳代谢抑制因子 CreA 的联系已经被 Flipphi 等的研究报道^[11]。

目前发现的大部分真菌的葡萄糖抑制的确是由 *cre* 基因介导的。在曲霉和里氏木霉的研究报道中,通过对 *cre* 基因敲除株的研究,很多代谢酶类如纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶等酶的编码基因均被发现受 Cre 蛋白调控^[12-19]。总之, *cre* 基因的敲除会导致葡萄糖对很多酶编码基因表达抑制的全部或部分解除。例如,一种超纤维素水解酶工业菌株里氏木霉 Rt-C30,由于其 *cre1* 基因缺失了部分序列,在葡萄糖存在抑制培养条件下,纤维素酶和很多半纤维素酶的编码基因仍能出现一定的表达水平。当将完整的 *cre1* 基因导入 Rt-30 后,葡萄糖又恢复对纤维素和半纤维素酶基因表达的抑制,这证实了在里氏木霉中 CRE1 介导了纤维素酶和很多半纤维素酶基因表达的葡萄糖抑制效应^[12, 20]。但是,据目前的文献报道,科学家们还没有在任何担子菌类的白色腐生真菌中克隆到 *cre* 基因,对白腐菌 *P. chrysosporium* 的全基因组数据分析发现,其不包含任何与已知的构巢曲霉 CreA 蛋白同源的基因序列。但是当白腐菌在含葡萄糖的环境中生长时,其与木质素分解相关酶的编码基因并没有表达^[21]。近来还有文献报道葡萄糖抑制也存在担子菌 *T. versicolor* 中,在降解木质素的纤维二糖脱氢酶 *cdh* 基因启动子区存在 Cre 结合的保守位点序列^[22]。

真菌的碳代谢抑制因子蛋白 CreA/CRE1 存在保守的结合位点。综合研究发现,构巢曲霉 CreA 蛋白存在一个结合共有基序,为 5'-SYGGRG-3'^[23-25]。当葡萄糖存在时,实验缺失里氏木霉 *cbh1*、*xyn1* 基因及构巢曲霉 *xynA* 基因启动子区的 CRE/Cre 功能性结合位点,发现这些基因也出现了表达^[26-28]。同样的,在塔宾曲霉 *A. tubingensis* 中,缺失在 *xlnA* 基因启动子中预测到的 4 个可能的 CreA 蛋

白结合位点后其表达量上升，这表明其中至少有一个位点是有效结合位点^[29]。有研究者认为，只有同时存在两个相邻的 5'-SYGGRG-3'序列时，CRE1/CreA 的结合才能引起有效的直接抑制作用。但是，也有体外实验发现 CRE1/CreA 与单位点的 DNA 片段也能结合，而且在里氏木霉 *cbh2* 基因启动子中只包含一个 CRE1 结合位点，这表明不论在诱导还是抑制作用中，核小体的精确定位都至少需要一个这样的结合位点^[30]。

真菌碳代谢机制的分子机理研究现状，碳代谢抑制因子 CRE1 与 DNA 的结合受到磷酸化调控。里氏木霉 CRE1 蛋白酸性区域中存在一个保守短片段，其中的苏氨酸磷酸化的介导了 CRE1 与 DNA 的结合。该苏氨酸磷酸化也被发现与一个酪蛋白激酶 II 相关^[31]，在其他很多生物中，这个酪蛋白激酶 II 在很多转录调控因子调控作用中扮演了重要角色^[32]。虽然目前还没有在丝状真菌中克隆到这种酪蛋白激酶编码基因，但粗胞脉胞霉 *N. crassa* 基因组、里氏木霉 *T.reesi* 的 EST 序列和构巢曲霉 *A.nidulans* 中包含与酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 酪蛋白激酶亚基相似的氨基酸序列的 DNA 序列。在对大豆核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* CreI 的研究中已证实，在生长在葡萄糖培养集中 CreI 蛋白定位于核仁中，而当培养基中去除葡萄糖时，CreI 蛋白被转运到细胞质中，这表明 CreI 的活性受到核转位的控制^[33]。此外，在大豆核盘菌中缺失与里氏木霉 CRE1 蛋白磷酸化位点一致的苏氨酸，导致了其阻遏活性的丧失，但并不影响其核定位。此外，作者还认为大豆核盘菌 CreI 的磷酸化还与一种环状 AMP 依赖的蛋白激酶相关^[34]。但是其序列并没有与环状 AMP 依赖的蛋白激酶保守识别位点完全匹配，因此 CRE/Cre 的磷酸化机制仍有待进一步的验证。

Cre/CRE 蛋白在葡萄糖或果糖存在的抑制环境中不仅仅扮演一个阻遏物的角色，他们对纤维素酶和半纤维素酶基因表达的影响是通过一个更为复杂的方式，而不是仅仅与酶基因启动子结合。首先，在里氏木霉 *T.reesi*、构巢曲霉 *A.nidulans*、藤仓赤霉 *Gibberella fujikuroi* 和葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 中均发现，在诱导环境中 *cre* 的转录稳定水平高于葡萄糖抑制环境^[20, 35, 36]。而且作为对培养基中抑制性碳源的应答，构巢曲霉 *cre* 的转录受到自我负调控^[35]。其次，在基因组中缺失 *cre* 基因或者对其诱变均导致了酶基因表达量的提高，甚至在诱导环境中，这表明 Cre/CRE 即使在诱导环境中也对酶基因的表达有抑制效果，不仅仅在葡萄糖存在的时候。当黑曲霉 *A.niger* 生长在含有阿拉伯糖或阿拉伯醇等的诱导碳源的培养基中，突变株中阿拉伯呋喃糖酶编码基因 *abfA* 和 *abfB* 及内切阿拉伯糖酶基因 *abnA* 的表达量出现了高达 10 倍的提高，相较于野生株而言^[15, 16]。构巢曲霉木聚糖酶基因 *xlnA* 和 *xlnB* 的表达水平在 *creA^d30* 突变株中也被诱导到一个很高的水

平，导致当转移到含有木聚糖的培养基中后木聚糖酶的表达得以诱导^[11, 27, 37]。在黑曲霉中，当生长在含有不同浓度木聚糖的培养基中，*creA* 突变株的半纤维素酶基因 *xlnB*, *xnlD*, *faeA* 和 *aguA* 表达水平均高于野生株^[38]。Orejas 等人证实构巢曲霉 *xlnB* 基因启动子受到葡萄糖抑制，在 *creA*^d 30 突变株中其表达量高于野生型^[37]。虽然体内实验中启动子中四个预测的 CreA 结合位点均未发现是有效的。这些实验结果也说明了一个问题，即存在一种阻遏和诱导的平衡，Cre 还可以通过间接作用机制抑制一些转录诱导因子编码基因的表达来加强碳代谢抑制的效果，如 XlnB^[11, 27, 37, 38]。这种由 CreA 介导的双重保险机制已经研究构巢曲霉与酒精利用相关基因 *alcA* 的转录调控中得到了完美的诠释^[10, 25]。

此外，碳代谢抑制机制还通过改变一些糖类透性酶或诱导因子的活性等方式来影响对碳源的利用。当一种抑制碳源如葡萄糖的出现可能会导致糖分子透酶水平上的抑制效应、CreA 可能控制了一些与葡萄糖转运相关的透酶^[39, 40]或者一些诱导组分的表达^[27, 37]。而且，最新的关于里氏木霉 *cbh2* 和构巢曲霉 *xlnA* 基因的葡萄糖抑制效应研究的结果表明在葡萄糖出现时酶基因表达的抑制可能与排斥诱导因子相关，如葡萄糖阻遏了诱导因子向菌丝体内的转运，从而引起了抑制效果或者其防止被诱导激活。Flippin 等人的研究发现当在含有木糖的培养基中额外加入葡萄糖后，构巢曲霉 *xlnA* 基因的表达更低。这种表达水平的下降同样也出现在 *creA*^d 30 突变株中，表明 *creA* 并不直接参与 *xlnA* 基因表达的抑制作用，而可能是通过糖类透性酶水平的竞争或透性酶蛋白活性的改变引起的^[11]。但果糖就不存在这中形式的效应。据此，大量的木糖和葡萄糖一起存在时，如 50mM，会诱导 *cre* 突变株中 *xlnA* 基因表达，而在野生株中出现了抑制。

在碳代谢抑制机理中，除了起到核心作用的 CRE1/CreA 蛋白，还存在其他一些组分也参与或影响了调控过程。在为分离影响构巢曲霉碳代谢抑制机制的一些调控蛋白而设计的基因筛选中，研究人员还分离到了两个与 *creA* 同时存在的其他基因 *creB* 和 *creC*^[41]。CreC 蛋白含有 4 个 WD40 重复基序和一个富含脯氨酸的区域，这些结构在其他蛋白中被发现与蛋白互作相关^[42, 43]。目前，其生化功能还未曾有研究发表。CreB 基因则编码一个脱泛素化酶^[43]。脱泛素化酶通常是半胱氨酸蛋白酶用来断开泛素的连接。泛素最常见的功能是用来标记一些需要被蛋白酶体降解的蛋白。就在最近，有研究发现一些特定的转录因子的活化后的结构域通常被作为泛素化的靶标，在泛素化水平上对活化结构域进行调整被认为是一种重要的基因转录调控机制之一^[44]。然而，目前还没有脱泛素化酶在转录调控的直接作用被报道。蛋白产物 CreB 和 CreC 被发现是以复合物的形式存在，

在复合体中 CreC 主要起到了稳定 CreB 的功能。同时，CreB/CreC 复合体还可以直接作用于 CreA，影响 CreA 的稳定性^[45]。

1.2.3 真菌碳代谢调控网络

近年来随着芯片技术和测序技术的不断发展，从组学角度研究和分析某个基因的功能已经不存在技术层面的障碍，2011 年和 2014 年里氏木霉 CRE1 敲除突变株的全基因组微阵列数据和 RNA-seq 数据相继发表，展示了从转录组的角度分析 CRE1 作为全局性调控因子，在细胞生长和代谢多方面的转录调控作用。

研究发现，在里氏木霉中 CRE1 抑制 47.3% 基因的转录，诱导 29.0% 基因转录，17.2% 的转录本不依赖 CRE1 而受生长速率调控^[46]。而且，CRE1 对基因的调控还受培养基中碳源成分的影响，在高葡萄糖浓度的抑制条件下，里氏木霉 9129 个基因中，相较于野生株，CRE1 突变株中有 251 个基因表达上调，230 个基因表达下调；而在含有纤维素而缺乏葡萄糖的非抑制环境中，268 个基因表达上调，85 个基因表达下调，其中有 71 个基因在不同的培养条件下同时被调控。这些被调控的基因主要的负责糖代谢的酶类、进行转录调控的调控因子、和与细胞运输相关的转运蛋白等。特别是在非抑制环境中，一系列与氧化还原代谢和逆境应答代谢相关的 Fe³⁺还原酶，铜转运蛋白等编码基因的转录明显抑制或上调。其中非抑制环境中，表达量最高的是一个与染色质重组相关的蛋白，其通过参与染色质的重组，将影响一系列基因的转录。

结合早前的研究对构巢曲霉 CREA 基因上游调控的因子，如碳代谢抑制因子自身 CRE1/CREA (5'-SYGGRG-3')、氮源调控因子 AREA (5'-HGATAR)、pH 调控因子 PACC (5'-GCCARG-3') 和逆境应答元件 (5'-AGGGG-3')，在木霉 CRE1 基因的上游也存在一个或多个上述多种调控的调控位点 (图 1.4)，因此，环境因子同样通过多种调控机制影响 CRE1 的表达。

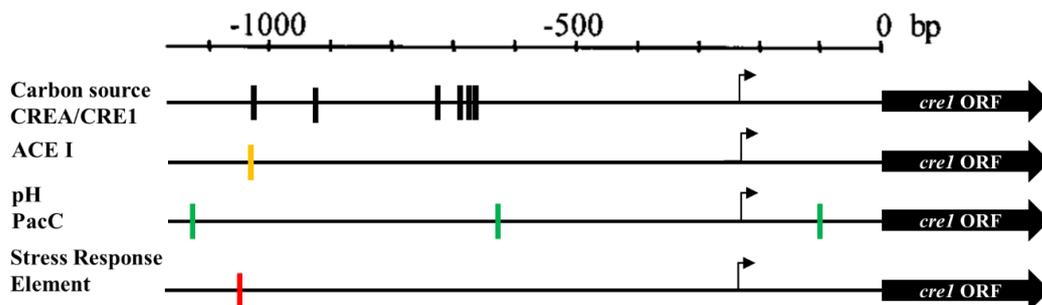


图 1.4 深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 启动子区转录调控因子结合位点预测

Fig 1.4 Putative binding sites of different transcription factors in the promoter of CRE1 in *T. atroviride*

因此，综合 CRE1 上游调控因子以及被 CRE1 调控的下游基因，在真菌细胞内存在着一个以碳代谢抑制因子 CRE1 为核心的庞大而复杂的碳代谢调控网络及其分子调控机理。本研究根据已有报道将碳代谢调控网络（图 1.5）和分子调控机理（图 1.6）总结如下：

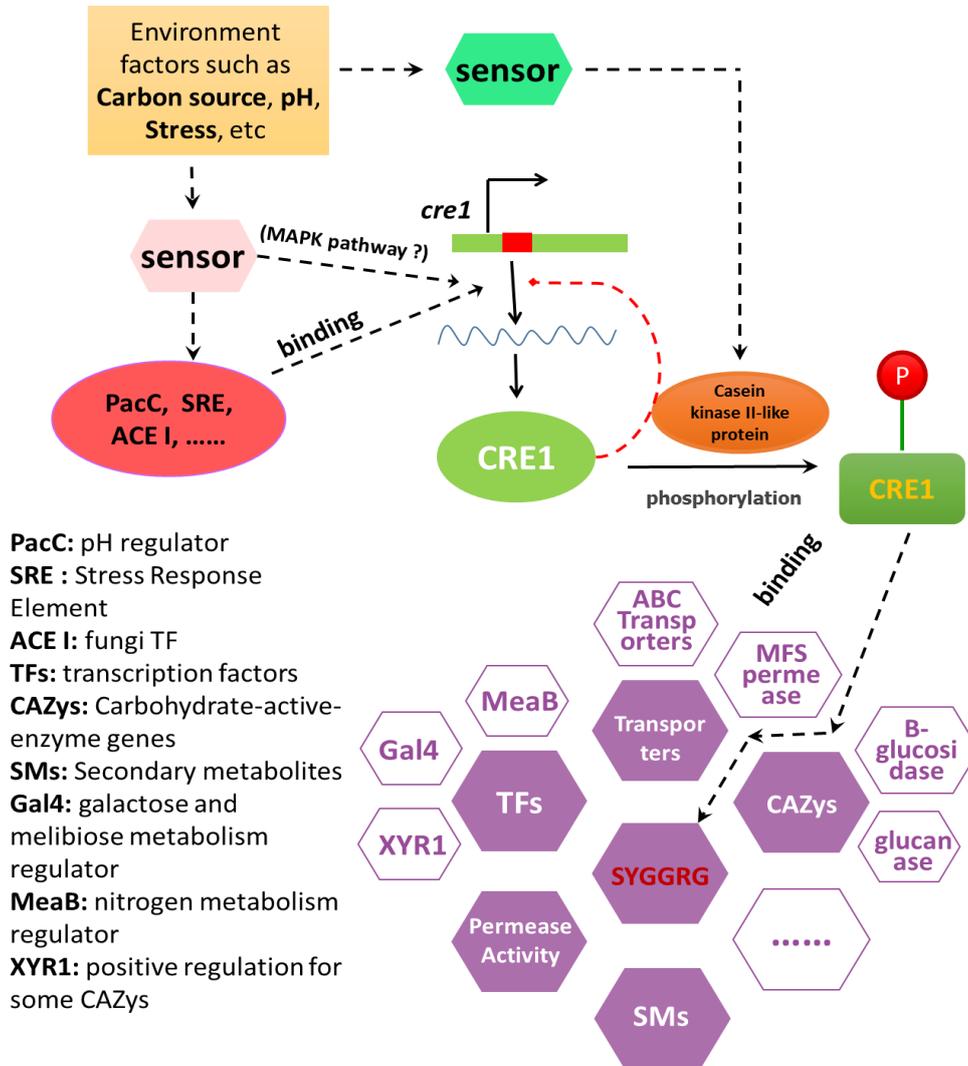


图 1.5 以 CRE1 为核心的深绿木霉碳代谢调控网络

Fig 1.5 The carbon catabolite regulatory network centered on CRE1 in *T.atroviride*

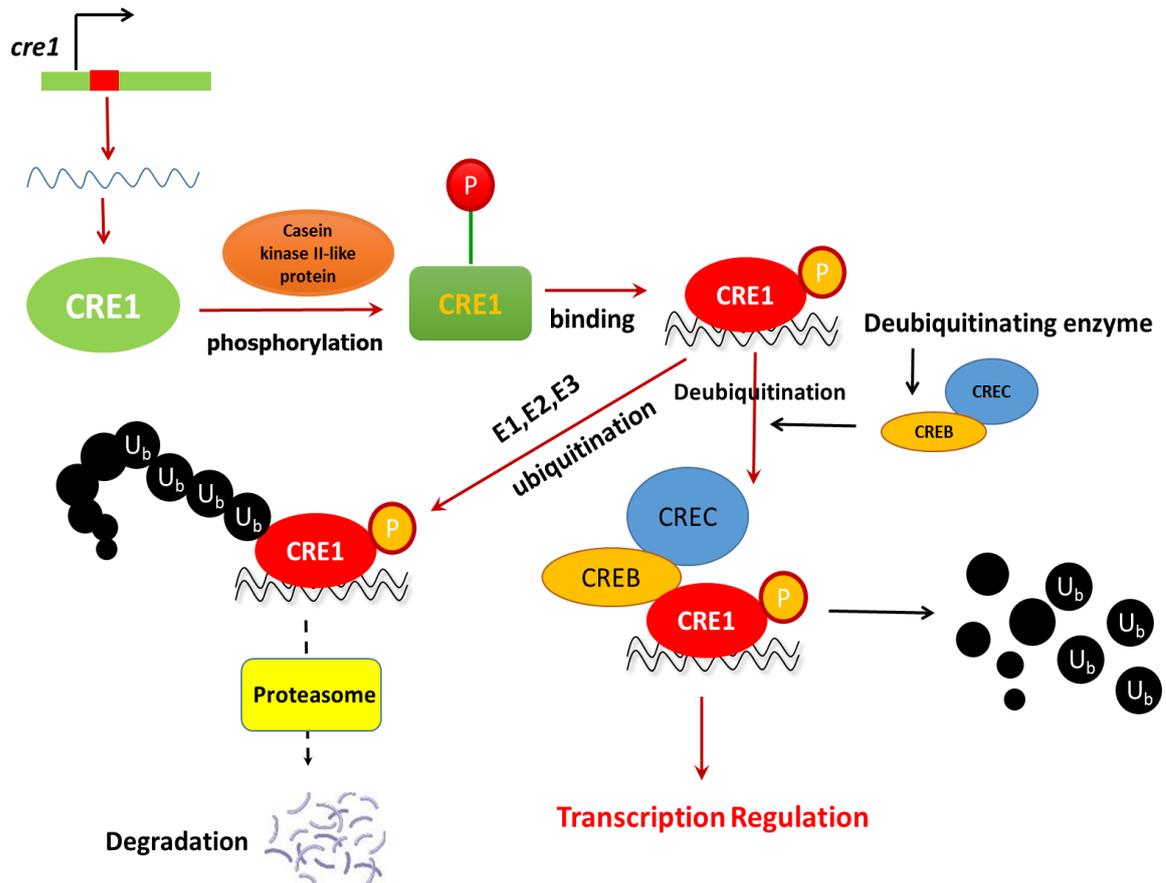


图 1.6 碳代谢抑制因子 CRE1 分子调控途径预测

Fig 1.6 Putative molecular regulation pathway of carbon catabolite repressor CRE1

1.3 本文主要研究内容、目的与意义

1.3.1 研究意义

目前，全球对农副产品需求量（数量和质量）逐年提高，传统模式下的农作物种植需要依靠高效的化学农药来预防病原微生物侵袭，以创造稳定、可观的经济效益，而多种化学农药的田间使用所产生的负面效应日益彰显，首先一些病原菌对低剂量的化学农药产生抗药性，杀灭活性受到影响；另外针对某些植物病害，还没有高效防治的化学制剂，或者现有的制剂不具备很好的防病效果；更重要的是，消费者对于食用健康、安全、无农药残留的农产品及食品关注和重视程度不断提高^[47, 48]。因此安全无毒的绿色生防制品的研发势在必行。木霉菌剂成为最具潜力和前景的生防制品，它们具有拮抗和抑制多种植物病原真菌、促进植物生长、提高营养利用效率，诱导植物抗性，激发防御能力和修复农用化肥造成环境污染等系列功能^[49, 50]。木霉菌制剂的研发和应用是对环境保护和

生态系统良性循环的有力保障，其潜在的社会效益和生态效益，对我国农业可持续性稳定、健康发展起到促进作用。

木霉菌与病原菌互作过程中，拮抗机制中关键因素：细胞壁水解酶和抗生素代谢物，水解酶包括：几丁质酶和蛋白酶等。抗生素包括聚酮类、氨基酸及其衍生物、萜烯类等化合物^[51]。二者通过不同的作用机制联合起来高效的拮抗植物病原真菌活性、促进植物生长活性。然而水解酶基因和代谢产物合成基因簇的表达受包括碳源在内的多种环境中生物和非生物因子的影响。最新研究表明里氏木霉菌 CRE1 全局性调控多种生长代谢相关基因的变化，全基因组微阵列分析表明里氏木霉的 CRE1 抑制 47.3% 基因的转录，诱导 29.0% 基因转录，17.2% 的转录本不依赖 CRE1 而受生长速率调控。因此，碳代谢因子 CRE1 作为碳代谢全局性调控因子，对深绿木霉的生长产孢以及代谢产物表达具有重要的调控作用，本研究将丰富碳代谢抑制因子的调控网络，填补碳代谢抑制因子 CRE1 在木霉菌生防功能研究领域的空白，对今后有目的的控制木霉菌生防相关次级代谢产物的合成和分泌，提高木霉菌生防效果具有重要意义。

1.3.2 研究目的与内容

本研究以深绿木霉 *T. atroviride* 23 为研究对象，采用生物信息学和分子操作相结合的方法对木霉菌 T23 中碳代谢抑制因子 *cre1* 进行基因比对，克隆，构建侧翼序列敲除载体，通过农杆菌介导的转化实现同源重组构建 *cre1* 突变株，并从生长表型和代谢产物表达上分析突变株与野生株的差异，为 CRE1 功能研究奠定了基础。具体内容如下：

(1) 利用生物信息学软件对深绿木霉 T23 菌株 *cre1* 基因序列拷贝数、及编码蛋白结构和功能域分析，与里氏木霉和绿木霉中同源序列比对；

(2) CRE1 基因克隆、构建基因敲除载体；

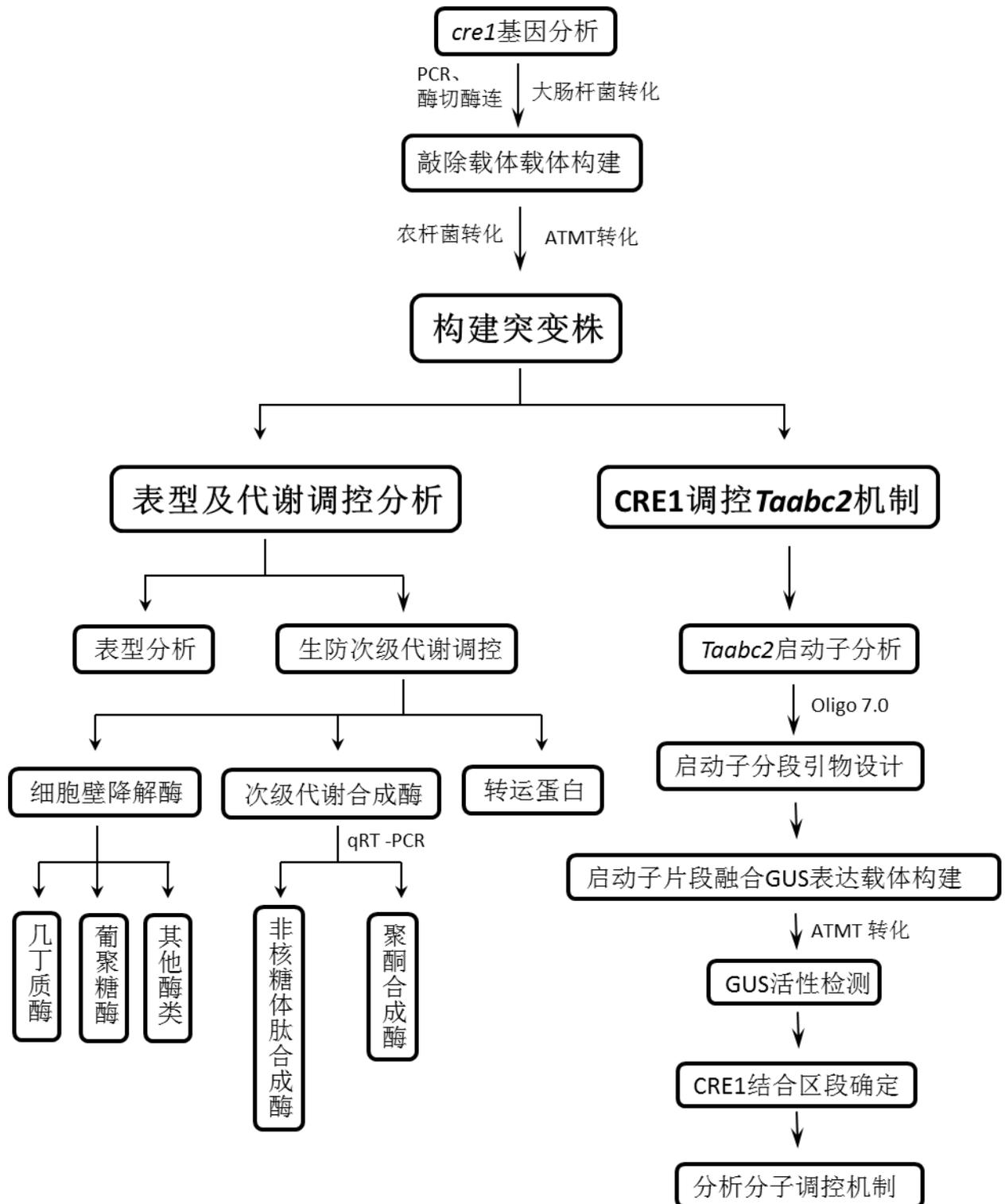
(3) $\Delta cre1$ 突变株构建。观察和测定突变株和野生株的菌落形态，细胞生长及孢子产量的差异，显微镜观察菌丝形态。

(4) 分析 *cre1* 突变后，突变株与野生株在碳源利用层面的差异。

(5) 选取木霉菌重要代谢产物几丁质酶、葡聚糖酶、纤维素酶等细胞壁降解酶和非核糖体肽合成酶、聚酮合成酶、转运蛋白 *Taabc2* 等与木霉菌次级代谢生物合成与转运相关蛋白，测定突变株和野生株的酶活差异，利用 qRT-PCR 检测并分析 CRE1 蛋白对上述酶类表达调控影响。

(6) 初步探究 CRE1 蛋白对 ABC 转运蛋白 *Taabc2* 表达的调控机制

1.3.3 实验技术路线



第二章 深绿木霉碳代谢抑制因子 *cre1* 基因的敲除

2.1 引言

目前,曲霉中关于碳代谢抑制研究的不断深入,其分子作用机理不断得到解。木霉菌中,碳代谢抑制研究尚处起步阶段,主要集中在一些工业重要菌株如里氏木霉的纤维素酶和半纤维素酶表达调控,以及生防木霉如哈茨木霉中细胞壁降解酶的表达。关于 CCR 在生防其他代谢因子方面调控的研究还尚属空白。

在真菌中,对真菌进行分子水平的遗传改造主要通过的是原生质体融合或根癌农杆菌介导的遗传转化(ATMT)等遗传操作。ATMT 转化是目前比较常用、相对简单快捷的方法,其主要利用同源重组的原理实现基因的敲除。在 Ti 质粒的 T-DNA 左右边界内构建需要转化的遗传元件,如同源重组敲除框、报告基因表达框等,利用农杆菌与受体菌的分子互作,将 T-DNA 中的遗传元件导入受体菌细胞核内,进一步整合到受体菌染色体组中,或者通过同源片段的互补配对,实现目的基因的双交换敲除。在构建敲除株的过程中,敲除载体和同源重组敲除框的构建十分关键,结构正确的敲除载体是获得基因敲除突变株的分子基础。

本研究首先克隆和分析了深绿木霉的碳代谢抑制因子 CRE1 的编码序列、蛋白结构等,然后从构建敲除载体出发,通过对 *cre1* 基因侧翼序列的 PCR 扩增,再将上下游侧翼序列分别插入敲除质粒 pC1300qh 潮霉素筛选标记的上下游,形成可以与基因组互补配对的同源臂。然后将构建好的重组质粒导入根癌农杆菌中,利用 ATMT 转化,得到抗性转化子,再利用 PCR 和 Southern blot 等筛选和验证 *cre1* 基因敲除突变株。

2.2 实验材料与方法

2.2.1 实验材料

(1) 菌种和质粒

本实验所用深绿木霉菌野生株由上海交通大学木霉菌菌种保藏管理中心提供;大肠杆菌 DH5 α 购于天根生化科技有限公司;根癌农杆菌 AGL1 由本实验室保存。

表 2.1 本研究所用质粒和引物
Table 2.1 Plasmids and Primers used in this article.

资源	特征	来源
质粒		
pMD 18-T vector	T 载体克隆及测序	Takara 公司 购买
pC1300qh	木霉菌基因敲除载体,Hyg+,Kan+	实验室保存
pC1300- $\Delta cre1$	深绿木霉 <i>cre1</i> 基因敲除载体,潮霉素抗性	本研究
引物		
引物序列 (5'-3')		
<i>pcr1</i> -F1	GCCCAAGCTTTCCCACTGAGCGAAGACAA (<i>Hind</i> III)	本研究
<i>pcr1</i> -R1	ATAACTGCAGTGAGCGGCGGTCAACGAAG (<i>Pst</i> I)	本研究
<i>dcre1</i> -F2	ATCGGGTACCACGACGGTGCCTCGAATG (<i>Kpn</i> I)	本研究
<i>dcre1</i> -R2	ATCGGAATTCGTGGTGCGGCGATGAAGT (<i>EcoR</i> I)	本研究
<i>cre1</i> -f	CGGTAAGCTTGGTCTGCCGTGGATTACTC (<i>Hind</i> III)	本研究
<i>cre1</i> -r	GCCGCTAGATCGGGACGATTGATGATGT (<i>Xba</i> I)	本研究
tDNA-F	CCTCTTCGCTATTACGCC	本研究
<i>Hph</i> -R	ACATCGCCTCGCTCCAGT	本研究
$\Delta cre1$ -F	CAACAAAGAATGAGCCCTGAG	本研究
$\Delta cre1$ -R	TGCCAAGTGCCGATAAACA	本研究

(2) 本章所用酶、试剂、试剂盒

酶:限制性内切酶及 T4 连接酶购于 Fermentas 公司;一般 PCR 用 Premix Taq 购于上海前尘生物科技有限公司;高保真 PCR 用 KOD-plus-Neo 购于 TOYOBO 公司。

试剂:氨苄青霉素、卡那霉素、遗传霉素、特美汀等抗生素粉末、MES 盐、乙酰丁香酮 AS 粉末及潮霉素 50mg/mL 储液均购于上海前尘生物技术有限公司;DNA Marker2000 及 DNA Marker5000 购于生工生物有限公司;EB 替代燃料购于上海业力生物科技有限公司;一般常见药品及试剂如非特殊说明均购于中国医药集团上海化学试剂公司。

试剂盒:植物基因组 DNA 提取试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒、质粒小提试剂盒、均购于天根生化科技有限公司;胶回收试剂盒、TA 克隆试剂盒购于 Takara 公司;Southern blot 探针标记及杂交试剂盒(Amersham Gene Images Alkphos Direct Labelling and Detect System) 购于 GE 公司。

(3) 相关溶液配制

1) 抗生素溶液配制:

氨苄青霉素、特美汀、遗传霉素、卡那霉素: 均配制成 50mg/mL 的储液, 取 1g 粉末加 20ml 灭菌 ddH₂O 溶解后, 过 0.22 μ m 滤膜分装, -20 $^{\circ}$ C 冻存。

利福霉素: 取 1g 粉末加 20ml 甲醇完全溶解后用 0.22 μ m 滤膜过滤并分装, -20 $^{\circ}$ C 冻存。

2) CTAB 提取全基因组 DNA

CTAB 提取液: 1.4 mol/L NaCl, 2%CTAB, 0.02 mol/L EDTA, 2% β -巯基乙醇, 0.1 mol/L Tris·HCl (pH8.0)。

3) DNA 凝胶电泳

50 \times TAE 电泳缓冲液: 称取 Tris 242 g, 量取冰醋酸 57.1 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 100 mL, 蒸馏水定容至 1000 mL, 调 pH 8.0。

4) ATMT 相关使用试剂:

1 M MES: 将 19.25g MES 溶解到 80ml 蒸馏水中, 用 5 M KOH 调节 pH 到 5.3, 定容至 100ml。然后用 0.22 μ m 滤纸过滤除菌后, 置于-20 $^{\circ}$ C 保存。这种盐会在产生沉淀, 如果产生沉淀, 52 $^{\circ}$ C 水浴震荡溶解。

10 mM 己酰丁香酮 (Acetosyringone AS): 19.62 mg 己酰丁香酮溶解在 10ml 蒸馏水中, 搅拌 20 min 后, 用 5M 的 KOH 调 pH 值到 8.0, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

(4) 培养基

1) PDA 培养基: 取 200g 去皮土豆, 加 1L 水煮沸 30min, 用三层纱布过滤, 取滤液加入 20g 葡萄糖, 用 ddH₂O 定容至 1L, 200mL 每份分装, 高压蒸汽灭菌后使用。液体不加琼脂粉, 固体加 14g/L 琼脂粉。

2) LB 培养基: 取 10g 胰蛋白胨, 5g 酵母粉, 5gNaCl 用去离子水溶解后定容至 1L, 高压蒸汽灭菌后使用。

3) IM 固体培养基: 10mM K₂HPO₄, 10mM KH₂PO₄, 2.5mM NaCl, 2mM MgSO₄, 0.7mM CaCl₂, 9mM FeSO₄·7H₂O, 4mM (NH₄)₂SO₄, 10mM 葡萄糖, 40mM MES(pH 5.3), 200 μ M AS, 0.5% 甘油, 1.4% 琼脂。

4) IM 液体培养基: 10mM K₂HPO₄, 10mM KH₂PO₄, 2.5mM NaCl, 2mM MgSO₄, 0.7mM CaCl₂, 9mM FeSO₄·7H₂O, 4mM (NH₄)₂SO₄, 5mM 葡萄糖, 40mM MES(pH 5.3), 200 μ M AS, 0.5% 甘油。

5) CYA 培养基: NaNO₃ 2g, K₂HPO₄·3H₂O 1g, KCl 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, 蔗糖 30g, 1.4% 琼脂粉, pH 7.4。

(5) 数据预测和分析软件

本研究所用到的软件包括：(1) Primer 5.0 软件，主要用于 PCR 引物设计；(2) DNAMAN 软件，主要用于核酸或蛋白质序列比对；(3) Vector-NTI 软件主要用于质粒查看和设计；(4) DNAClub 主要用于 DNA 序列转换及酶切位点分析；(5) Oligo 7.4 主要用于 PCR 引物设计等；(6) Clustal X2 和 MEGA6 用于蛋白比对与聚类分析；(7) SWISS-MODEL, NNPP, NCBI 等网站相关在线软件。

2.2.2 实验方法

(1) 深绿木霉孢子培养及孢悬液制备及保藏

取保存在试管中的木霉菌转接到 PDA 平板 28 °C 倒置培养 2 d 后，取边缘菌饼(直径 0.5 cm)转接到新的 PDA 平板中，活化两代后，培养 4-5d 直至长孢。向平板中加入约 5ml 灭菌水，用枪头刮取孢子，过三层擦镜纸得木霉菌孢悬液。

取孢悬液 1:1 加 60% 灭菌甘油，置于冻存管中于 -80°C 可保存数年。获取木霉菌菌饼置于斜面培养基中，4°C 保存，每三个月活化一次。

(2) 木霉菌液体发酵

将木霉菌种接种到 PDA 培养基平板（直径 9cm），于 28°C 培养箱中倒置培养 5 天，使其长孢。在长满孢子的平板中加入用 5mL 灭菌 ddH₂O，用移液枪枪头轻轻刮洗下孢子及菌丝体，放入盖有三层擦镜纸的小瓶中，过滤除去菌丝体，滤液即为孢子悬浮液。根据血球记数板法进行计数，每瓶 100mLPD 培养基，按 10⁶ 个·mL⁻¹ 孢子量接种 5 mL，置于恒温摇床以 180 r·min⁻¹，28 °C 培养 3d。在超净工作台上，用抽滤机抽滤菌丝并用无菌水洗涤三次后，称取 1g 菌丝接种到 100mL 发酵培养基中，于 180r/min，28°C 摇床培养。对于无法产孢或产孢较差的菌株，可以直接向培养基中接种 0.5cm 菌饼，每百毫升余额 5-8 个。

(3) 大肠杆菌培养

制备 LB 固体平板，加入合适浓度的抗生素，接种大肠杆菌后，37°C 培养箱倒置培养 12h 以上；液体培养则在 LB 液体培养基中加入相应的抗生素，37°C，200r/min 培养过夜。

(4) 根癌农杆菌培养

LB 固体平板加相应含量抗生素，接种农杆菌，28℃倒置培养 2-3 天可见明显菌落；液体培养时加入合适含量的抗生素，200μg/ml 的利福平，28℃，180r/min 摇菌 24-36h。

(5) 深绿木霉全基因组 DNA 提取

取保存在试管中的木霉菌转接到 PDA 平板 28℃倒置培养 2 d 后，取边缘菌饼（直径 0.5 cm）转接新的 PDA 平板中，培养 5d 直至长孢。用无菌水洗孢子并过滤。调节孢子浓度至 1×10^6 个/ml，接种 2mL 孢悬液到含 50 mL PD 的 250 mL 三角瓶，振荡培养 3 d (28℃，180 r/min)，用无菌水冲洗三遍，抽滤控干菌丝后于 -80℃下速冻 30 min，冷冻干燥。液氮研磨成粉末状，随后按照天根生化科技有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作。提取完成后，取 4 μL DNA 进行琼脂糖电泳检测。

(6) 深绿木霉基因克隆 PCR 体系及程序

1) 常用 premix taq 体系

成分	用量/μl	
2×premix taq	12.5	25
primer F	1	1
primer R	1	1
DNA	1	1
ddH ₂ O	9.5	22
总体积	25	50

2) KOD 高保真酶体系

成分	用量/μl
10×buffer	5
dNTP	5
Mg ²⁺	3
primer F	1.5
primer R	1.5
DNA	1
KOD plus neo	1
ddH ₂ O	32
总体积	50

3) Takara 高保真酶 GXL 体系

成分	用量/ μl
5X PrimeSTAR GXL Buffer	10
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4
primer1	10-15pmol
primer2	10-15pmol
DNA template	1
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	1
Sterile distilled wate	up to 50
总体积	50

4) 常用 PCR 扩增程序

94°C 预变性 5min; 94°C 变性 30s, 56/58°C 退火 30s, 72°C 延伸 1kb/min, 共 30-35 个循环; 72°C 终延伸 10min; 10°C 储存。

5) KOD 扩增程序

94°C 预变性 5min; 94°C 变性 15s, 55/60°C 退火 15s, 68°C 延伸 1kb/30s, 共 30-35 个循环; 10°C 储存。

6) GXL 扩增程序

98°C 变性 10s, 55/60°C 退火 15s, 68°C 延伸 1kb/min, 共 30-35 个循环; 10°C 储存。

(7) DNA PCR 产物胶回收纯化

按照试剂盒说明书操作。

(8) TA 克隆体系及条件

取 1 μL PCR 产物纯化产物, 加入 1 μL LT 载体及 3 μL 灭菌水, 再加入 5 μL Solution I 溶液, 置于 16°C 连接仪中连接 30min。将产物进行大肠杆菌感受态转化, 挑取阳性克隆测序。

(9) 限制性酶切体系及条件

片段酶切体系:

DNA 片段酶切	用量/ μl
DNA fragment	13
enzyme1	2
enzyme2	2
10 \times Buffer	3
ddH ₂ O	10
总体积	30

质粒酶切体系:

质粒载体酶切	用量/ μl
Plasmid	6
enzyme1	2
enzyme2	2
10 \times Buffer	3
ddH ₂ O	17
总体积	30

酶切条件：37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 25min

(10) 酶切产物纯化回收

按照天根生化科技有限公司的普通 DNA 产物纯化试剂盒说明书操作

(11) T4 连接酶连接体系及连接条件

连接体系：

成分	用量/ μl
purified DNA enzyme-digested product	14.5
purified plasmid enzyme-digested product	3
2 \times T4 ligase buffer	2
T4 ligase	0.5
总体积	20

连接条件：4 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。

(12) 大肠杆菌感受态转化方法

参考试剂盒说明

(13) 根癌农杆菌感受态制备和转化方法

1) 感受态制备方法

①将农杆菌菌株在 LB 平板上活化，然后转到 5 mL LB 液体培养基（含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的利福平）中 29 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡过夜培养。

②取 1 mL 活化的菌液接种于 50 ml LB 培养基（含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的利福平）同样条件下培养至 OD600 值为 0.5 左右。

③将菌液冰浴 30 min 后，装至 50 ml 预冷离心管(用尖底离心管)。

④4 $^{\circ}\text{C}$ ，8000 g 离心 10 min，收集菌体。

⑤弃上清，用 0.8 mL 20 mM 的冰预冷 CaCl₂ 重悬沉淀，并加入 0.4 ml，60% 的甘油，混匀。

⑥按每管 200 μL 分装，液氮速冻 2 min 后于-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2) 转化方法

①取适量载体 DNA（一般 15 μ l）加到 200 μ L 冰上溶化的感受态细胞中，轻混，冰浴 30 min；

②液氮中速冻 2 min，37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min，再迅速冰浴 5 min；

③加入 800 μ L LB 液体培养基，28 $^{\circ}$ C 轻摇 4-6 hr；

④取 200 μ L 菌液涂布于 YEB 或 LB 选择平板上(100ug/ml 卡那霉素)，28 $^{\circ}$ C 倒置培养 2 天；

⑤待平板上长出阳性菌落后，挑取大小合适的菌落进行菌落 PCR，同时转接到液体 LB 中，5mlLB，加 10 μ l 的卡那霉素和利福平，28 $^{\circ}$ C，180r/min 摇菌 36h 以上。

(14) 根癌农杆菌介导的遗传转化方法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)

①将含有需要转化的 Ti 质粒的农杆菌菌株在含有 100 μ g/mL 利福平和卡那霉素的 LB 平板活化 2-3d，挑取单菌落转接至 10mL LB 液体培养基（含 100 μ g/mL 利福平和卡那霉素），28 $^{\circ}$ C，180r/min 振荡培养至对数期，约 30h；

②用 5mL IM 培养基将木霉菌分生孢子冲洗后三层擦镜纸过滤，显微镜计数后用 10mL IM 培养基稀释到终浓度为 1×10^6 个/mL，28 摄氏度萌发 6h；

③取 1mL 活化后的农杆菌菌液 1000r/min 离心 2min 后，用 IM 液体培养基冲洗一次，然后溶于 0.2mL IM 液体培养基中，测定 OD₆₀₀，确定浓度，然后按量加入 10mL IM 液体培养基中，终浓度达到 OD₆₀₀=0.5；

④将农杆菌置于 29 $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培养 5 hr，使 OD₆₀₀=0.6-0.8。

⑤将农杆菌与木霉孢子等量混匀后，取 200 μ L 涂 IM 平板（已加玻璃纸），静置 30 min 让水份吸干后，25 $^{\circ}$ C 共培养 48 hr。

⑥将玻璃纸转移到筛选培养基（含 300 μ g/mL 的特美汀与 200 μ g/mL 的潮霉素）上，培养 4 d 后开始挑选可能的转化子到 CY 培养基（含 300 μ g/mL 的头孢与 200 μ g/mL 的潮霉素），验证后在含头孢的 CYA 平板上传 5 代后，单孢分离再传一代后用含潮霉素的平板验证。

2.3 结果与分析

2.3.1 深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1

通过 NCBI 网站查到已经登录发表的里氏木霉 CRE1 蛋白序列（Genebank Accession: AAB01677），检索已测序发表的深绿木霉全基因组蛋白序列获取 *cre1* 蛋白检索号，根据检索号检索深绿木霉 cDNA 全序列，然后截取同源片段检索

全基因组序列查到深绿木霉的 *cre1* 基因序列。。用 primer premire5.0 软件设计引物 *cre1ORF-F* 和 *cre1ORF-R* (序列详见附录 1)。用设计的引物和提取的深绿木霉 T23 菌株 DNA 为模板, PCR 扩增目的序列, 片段电泳结果如图 2.1 所示。将片段用试剂盒纯化后, 连接 T 载体, 送往上海生工生物工程股份有限公司测序。

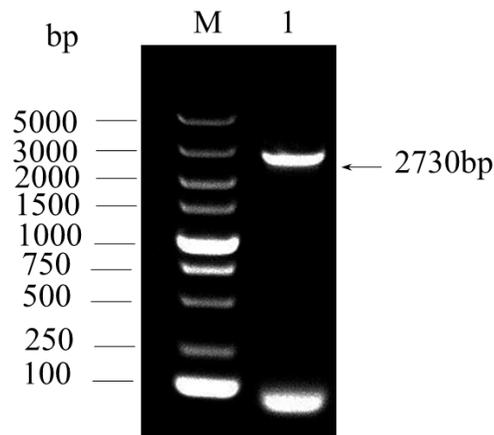


图 2.1 深绿木霉 *cre1* 基因测序序列扩增

泳道 M: DNA Marker5000; 泳道 1: 以深绿木霉 T23 全基因组为模板扩增到的 *cre1* 基因序列。

Fig 2. 1 sequencing of *cre1* in *T.atroviride*

Lane M: DNA Marker5000; Lane 1: *cre1* PCR product.

根据测序结果及比对分析, 得到深绿木霉碳代谢抑制因子 *cre1* 基因编码序列, 如下所示:

```

1      ATGCAACGAG CTCGGTCTGC CGTGGATTTTCC TCCAATCTCC TTAATCCATC
51     GTCGGCAGCA CCCAGCCAGG ACCAAGGCAG CGGAGCAATG TCTACCGCTG
101    CGGTGACCGT CATCAAGCCC AATGGGCCCA TTCCAGGAGC GCAGGCCTCC
151    GAGTCTGCCA ACGAGCTCCC TCGTCCCTAC AAGTGCCCTC TCTGGCAGAA
201    GGCCTTCCGC CGTCTGGAGC ACCAGACTCG ACACATCCGC ACCCACACCG
251    GCGAGAAGCC GCATGCCTGC CAGTTCCCGG GCTGCAGCAA GAAGTTCTCC
301    CGTCCGATG AGCTGACCAG GCACTCGAGG ATACACAGCA ACCCCAACTC
351    GAGGCGAGGC AACAAAGGCC AGCAGCAGCA CCAGCAGCAC CTCCACCAGG
401    GCATGCCTCA CCCTCTGCAC GTCGACGGCA TGATGGCTCC TCCCCCTGCG
451    CCCAAGGCCA TCCGCTCAGC GCCCGCCTCG GCGCTGGTCT CGCCCAACGT
501    CTCGCCTCCT CACTCCTACT CTTCTTTTCGC CGTGCTGCA GTTTCATGC
551    CTCCTATGG TCGTGGCACC GACATCTCCA TGCTCGCAA CGCCGCCCAT
601    CAGATTGAGC GCGAGACTCT TTCTGGCGGT CCCTCCAACC ACAACTCAAG
651    GCACCACCTT TACTTCAGCC CTGGTATGCA GGGCCCCCGG GGCCACGGCC
701    CTTGCTCTC GTCGTACCAC ATGGCCAGAT CTCACTTCAA CGATGATGAC
751    GATCACTACC ACGGAAGCAT GAGGCACGCC AAGAGGTCGA GACCCAACTC
801    GCCCAACTCT ACCGCTCCCT CTTCCCCAC CTTTTCGCAC GACTCTCTGT
    
```

```

851      CGCCCACTCC GGACCACACT CCCATCGCAA CTCCCGCTCA CTCACCTCGA
901      CTCCGCCCTT TTTCCGGATA TGAGCTGCCC AGCTTGAGGA ACTTGTCCTT
951      GGGCCACAAC ACCACTCCGG CGTTGGCCCC CATGGAGCCC ACTCTCGATA
1001     CTCATCAGTT CCCTCCTCAG GCGCAGGGAC TGACCTCTCG CGGCTCCGGC
1051     ATTTACTATA CCGACATCAT CAGTCGTCCC GATGGAAGCC AGAGGAAACT
1101     GCCTGTTCCC CAGGTCCCCA AGGTTGCGGT GCAAGACCTC CTCTCTGACG
1151     GGATTTTCAC CAACAGCGGC AGGAGTTCAA CCACAGGCAG CCTTGCTGGC
1201     GGTGATCTCA TGGATCGGAT GTAG
    
```

深绿木霉 *cre1* 基因编码框全长 1224bp，共编码 402 个氨基酸，无内含子，与绿色木霉 *cre1* 基因同源性高达 93%，里氏木霉 *cre1* 基因同源性达 86%。次序列在 Genbank 登录号为 KP635377。

根据 CRE1 测序结果翻译成其氨基酸序列，通过 NCBI 在线 BLAST 工具进

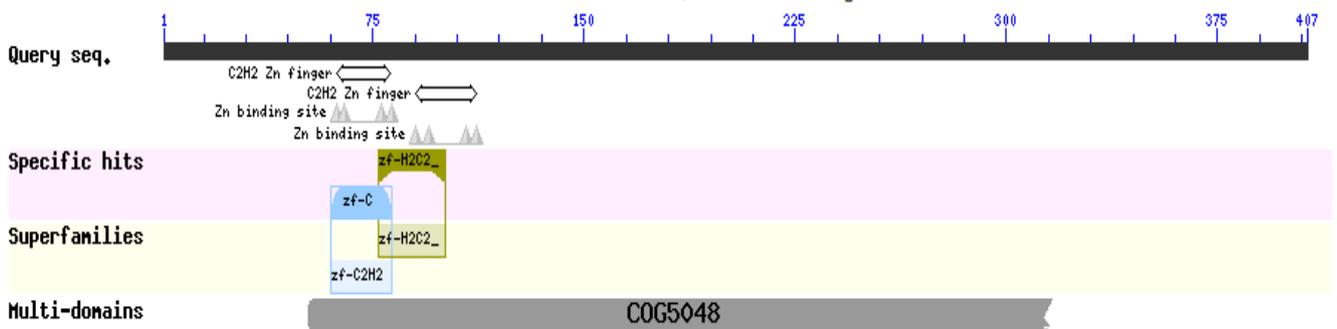


图 2.2 CRE1 蛋白结构域预测

Fig 2.2 Detection of putative conserved domains of CRE1

行氨基酸保守结构和功能的分析（图 2.2）。

利用 GENSCAN 在线预测软件，得到深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 氨基酸序列如下：

1-402:

```

MQRARSVDFSNLLNPSSAAPSQDQSGAMSTA AVTVIKPNGPIPGAQASESA
NELPRPYKCPLCDKAFRRLEHQTRHIRTHTGKPHACQFPGCSKKFSSRDEL
RHSRIHSNPNSRRGNKGQQHQHQLHQGMPHPLHVDGMMAPPPAPKAIRSAP
ASALVSPNVSPPHSYSSFAVPAVSMPHYGRGTDISMLANA AHQIERETLSGGPS
NHNSRHHPYFSPGMQGPRGHGPSLSSYHMARSHFNDDDDHYHGS MRHAKR
SRPNSTAPSSPTFSHDSLSPDHTPIATPAHSPRLRPFSGYELPSLRNLSLG
HNTTPALAPMEPTLDTHQFPPQAQGLTSRSGISLTDIISRPDGSQRKLPVPQVP
KVAVQDLLSDGIFTNSGRSSTTGSLAGGDLMDRM
    
```

根据预测结果和在其他菌中关于碳代谢抑制因子的研究，我们发现深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 非常保守，和很多其他菌的蛋白序列和结构域上存在保守

性。深绿木霉的碳代谢抑制因子也是典型的 Cys2His2 型锌指蛋白，在蛋白结构 N 端存在两个 C2H2 型锌指结构和锌离子结合位点。同样的，对深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 进行了聚类分析（图 2.3，图 2.4），发现其蛋白在木霉属中保守性很高，与绿色木霉 CRE1 蛋白相似性高达 96%，与其他蛋白相似性也在 85% 以上。

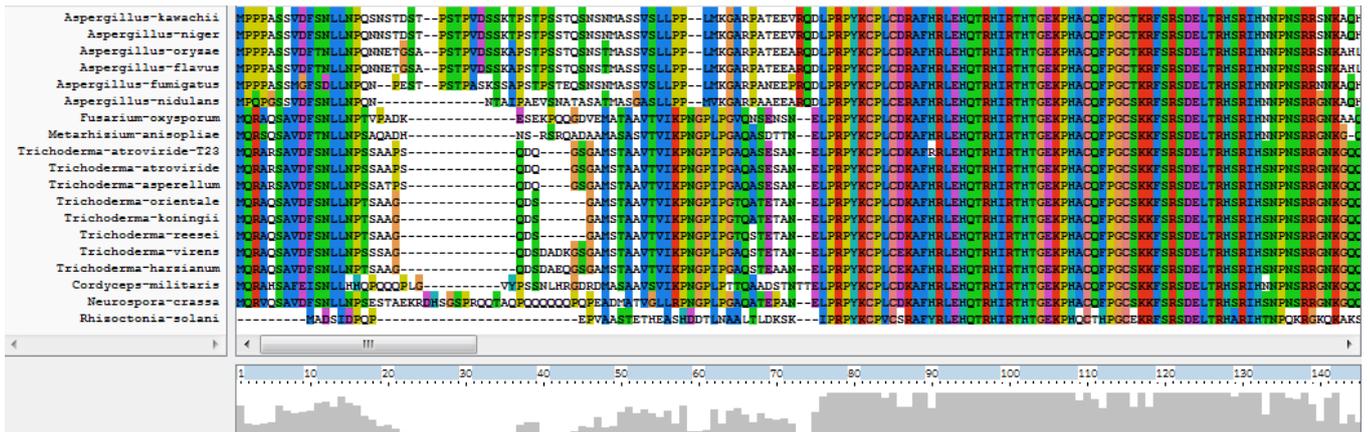


图 2.3 深绿木霉 CRE1 蛋白与其他种属碳代谢抑制因子 BLAST 分析

Fig 2.3 Blast of CRE1 in *T.atroviride* and other carbon catabolite repressor in other organisms.

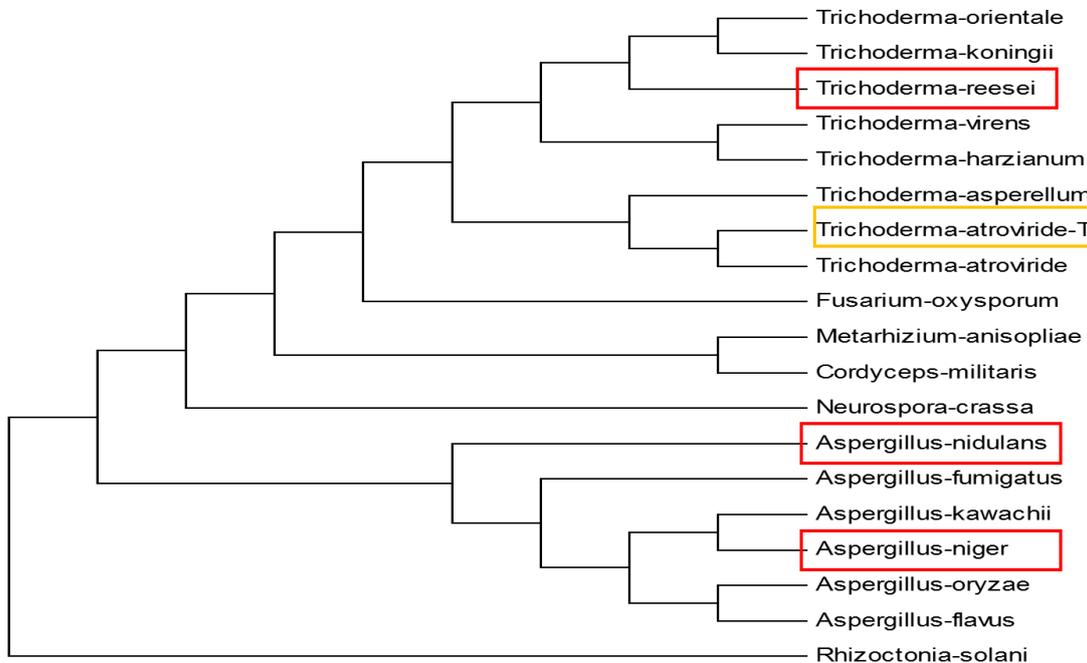


图 2.4 深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 蛋白聚类分析

Fig 2.4 Cluster analysis of CRE1 protein in *T.atroviride*

从测序结果以及比对结果看，本实验获得的 *cre1* 基因与已发表的序列具有高度的同源性，确为本实验所要研究的目的基因 *cre1*。基于此，后续实验对 *cre1* 基因侧翼序列的。

2.3.2 *cre1* 敲除载体构建

根据 *cre1* 测序结果，设计引物扩增 *cre1* 基因上下游侧翼序列的引物 *pcrel-F*, *pcrel-R* 和引物 *dcrel-F*, *dcrel-R*（序列详见附录 1），并以提取的深绿木霉 T23 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 特异性扩增，获得 *cre1* 基因的上下游侧翼序列，电泳结果如图 2.5 所示。

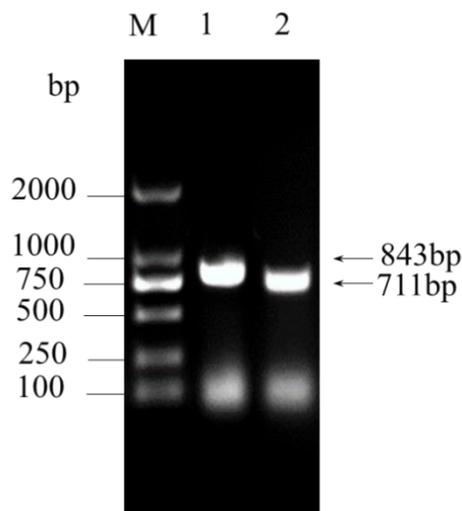


图 2.5 深绿木霉 *cre1* 基因侧翼序列克隆

泳道 M: DNA Marker 2000; 泳道 1: *cre1* 基因下游侧翼片段 *cre1-down*; 泳道 2: *cre1* 上游侧翼片段 *cre1-up*.

Fig 2. 5 *cre1* flanking fragments cloning of *T.atroviride*.

Lane M: DNA Marker 2000; Lane 1: the 3' flanking fragment of *cre1*, *cre1-down*;

Lane 2: the 5' flanking fragment of *cre1*, *cre1-up*.

将 PCR 产物纯化后，连接 T 载体，转化大肠杆菌，送往上海生工测序。测序结果表明，本实验选取的特异性扩增上游片段长度为 711bp，下游片段长度为 843bp，电泳结果与此一致。在获得 *cre1* 上下游侧翼序列后，利用限制性酶切和酶连将上下游片段分别导入敲除质粒 pC1300qh，构建 *cre1* 基因敲除框，形成 *cre1* 基因敲除载体 pC1300qh- $\Delta cre1$ ，载体构建如图 2.6 所示。

首先胶回收 *cre1* 基因上下游侧翼序列，用 *Hind* III 和 *Pst* I 限制性内切酶酶切上游片段 *cre1-up* 和载体质粒 pC1300qh（载体自带抗卡那霉素基因），用 DNA 纯化试剂盒纯化酶切产物，然后用 T4 连接酶连接酶切产物，构建 *cre1-up::hyg*

重组片段。然后将重组质粒 pC1300qhcre1-up 导入大肠杆菌感受态，大量扩增目的质粒。

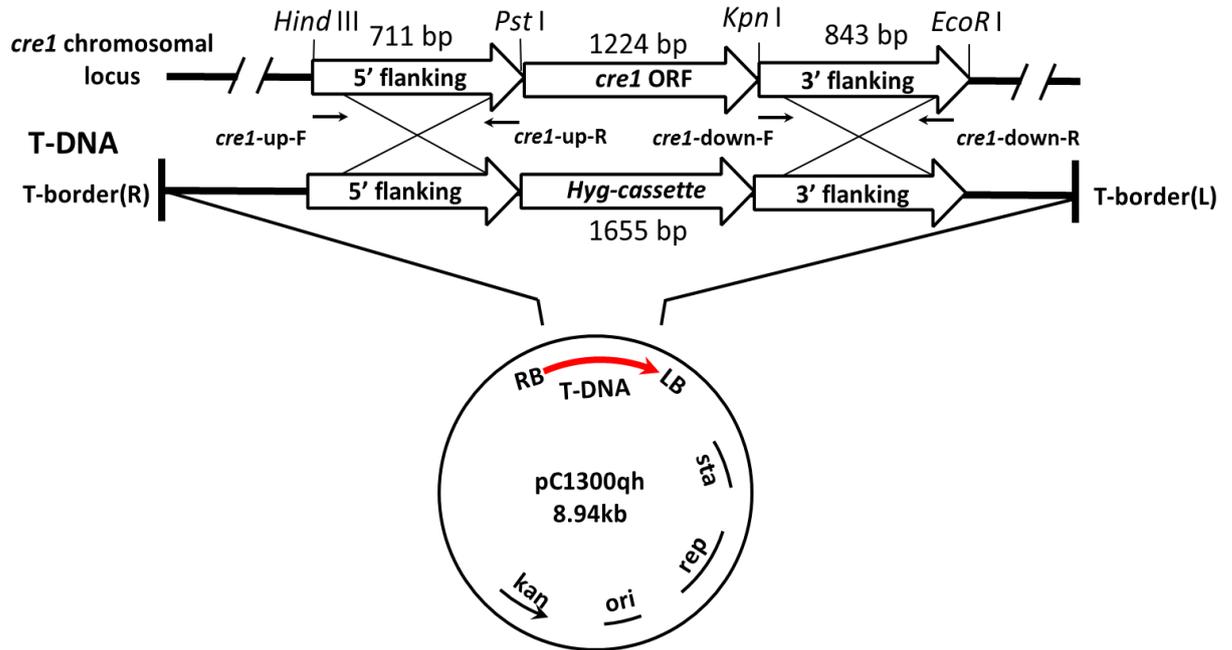


图 2.6 *cre1* 基因敲除载体的构建

Fig 2. 6 Construction of *cre1* knock out vector.

将转化完成大肠杆菌涂布于含有卡那霉素的 LB 平板中，37°C 培养过夜。第二天挑取阳性克隆，用扩增上游片段的引物 *pcre1-F* 和 *pcre1-R* 以单菌落为模板进行菌落 PCR，筛选成功导入上游片段的大肠杆菌，PCR 结果如图 2.7 所示。将合适阳性克隆进行液体扩大培养，用质粒小提试剂盒提取阳性克隆的质粒 pC1300qh::*cre1-up*::*hyg*，作为导入 *cre1* 基因下游片段的载体质粒。

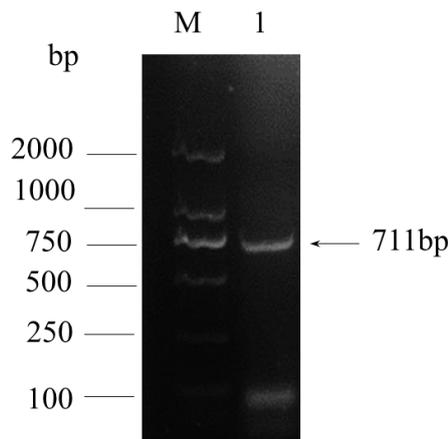


图 2.7 *cre1* 敲除载体上游序列阳性克隆 PCR 筛选

泳道 M: DNA Marker 2000; 泳道 1: 导入 *cre1-up* 片段的阳性克隆 PCR 筛选

Fig 2.7 The positive *E.coli* cloning screening for *cre1*-up::hyg vector.

Lane M: DNA Marker 2000; Lane 1: the positive clone that successfully bringing in the *cre1*-up fragment.

用与上游同源臂构建相同的方法，用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶切后经 T4 连接酶将 *cre1* 基因下游片段导入含 *cre1*-up 片段的载体 pC1300qh 的下游多克隆位点，形成 *cre1* 基因敲除框 *cre1*-up::hyg::*cre1*-down，构建重组质粒 pC1300qh- Δ *cre1*，如图 2.8 所示。将连接产物转化大肠杆菌感受态，挑取阳性克隆 PCR 鉴定(图 2.9)，液体培养阳性克隆大量扩增 *cre1* 敲除载体 pC1300qh- Δ *cre1*。用质粒提取试剂盒提取质粒，进行双酶切验证(图 2.10)，同时送往上海生工测序。

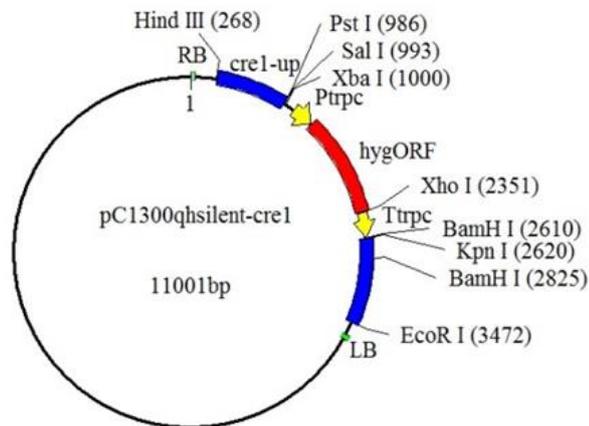


图 2.8 深绿木霉碳代谢抑制因子 *cre1* 基因敲除载体

Fig 2. 8 *cre1* knock out vector for carbon catabolite repressor silencing in *T.atroviride*.

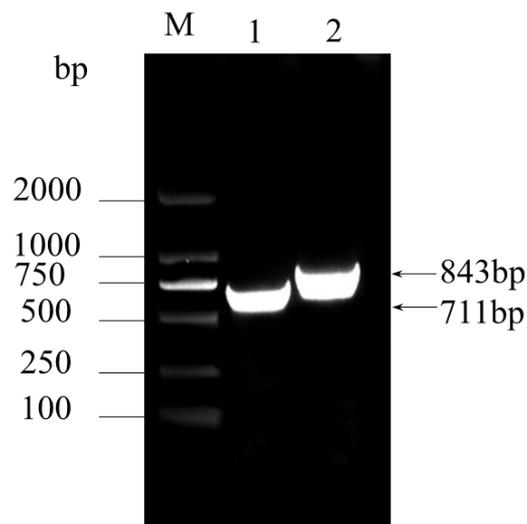


图 2.9 *cre1* 敲除载体 pC1300qh- Δ *cre1* 阳性克隆 PCR 鉴定

泳道 M: DNA Marker 2000; 泳道 1: 敲除载体阳性克隆 pC1300qh- $\Delta cre1$ 上游片段 *cre1*-up 扩增鉴定; 泳道 2: 敲除载体 pC1300qh- $\Delta cre1$ 阳性克隆下游 *cre1*-down 片段扩增鉴定。

Fig 2. 9 The PCR identification for positive *E.coli* clones of *cre1* knock out vector pC1300qh- $\Delta cre1$

Lane M: DNA Marker 2000; Lane 1: PCR for *cre1*-up of the positive clone; Lane 2: PCR for *cre1*-down of the positive clone

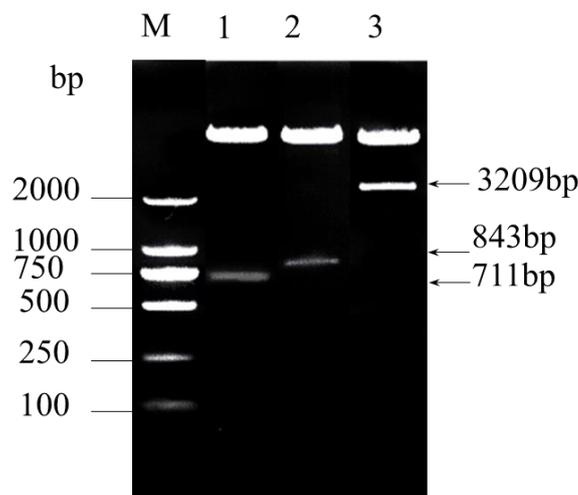


图 2.10 *cre1* 敲除质粒 pC1300qh- $\Delta cre1$ 双酶切验证

泳道 M: DNA Marker 2000; 泳道 1: 敲除载体 pC1300qh- $\Delta cre1$ 用 *Hind* III 和 *Pst* I 双酶切 *cre1*-up; 泳道 2: 敲除载体 pC1300qh- $\Delta cre1$ 用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 双酶切 *cre1*-down; 泳道 3: 敲除载体 pC1300qh- $\Delta cre1$ 用 *Hind* III 和 *EcoR* I 双酶切 *cre1*-up::*hyg*::*cre1*-down

Fig 2. 10 The double enzyme validation for *cre1* knock out vector pC1300qh- $\Delta cre1$

Lane M: DNA Marker 2000; Lane 1: Restriction enzyme digestion of pC1300qh- $\Delta cre1$ for *cre1*-up using *Hind* III and *Pst* I; Lane 2: Restriction enzyme digestion of pC1300qh- $\Delta cre1$ for *cre1*-down using *EcoR* I and *Kpn* I; Lane 3: Restriction enzyme digestion of pC1300qh- $\Delta cre1$ for *cre1*-up::*hyg*::*cre1*-down using *Hind* III and *EcoR* I.

根据测序结果和 PCR、酶切验证结果，确保敲除载体序列正确结构正确无误后，将质粒导入根癌农杆菌 AGL1 进行 ATMT 转化。

2.3.3 根瘤农杆菌介导的 *cre1* 基因的敲除、筛选和验证

将构建成功的 *cre1* 敲除载体 pC1300qh- $\Delta cre1$ 利用 CaCl₂ 介导的感受态转化导入根瘤农杆菌 AGL1 菌株感受态中, 并筛选阳性克隆进行 PCR 鉴定(图 2.11)。得到正确含有 *cre1* 敲除载体的农杆菌后, 利用 ATMT 转化技术, 通过同源重组, 进行深绿木霉碳代谢抑制因子 *cre1* 基因敲除。

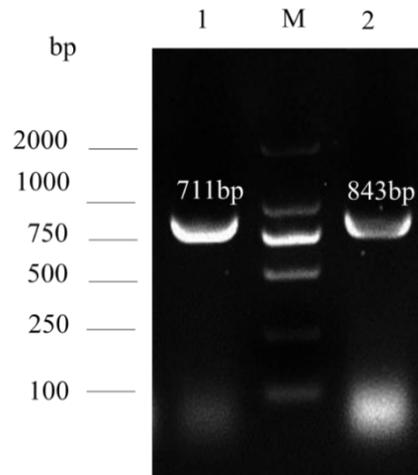


图 2.11 成功导入敲除载体 pC1300qh- $\Delta cre1$ 的根瘤农杆菌阳性克隆 PCR 鉴定
泳道 1: 农杆菌阳性克隆 *cre1* 上游侧翼序列 *cre1*-up PCR 扩增; 泳道 M: DNA Marker 2000; 泳道 2: 农杆菌阳性克隆 *cre1* 下游侧翼序列 *cre1*-down PCR 扩增

Fig 2. 11 The PCR identification for positive clones of *cre1* knock out vector pC1300qh- $\Delta cre1$ in *A.tumeficiens* AGL1

Lane 1: PCR for *cre1*-up of the positive clone in *A.tumeficiens*; Lane M: DNA Marker 2000; Lane 2: CR for *cre1*-down of the positive clone in *A.tumeficiens*

ATMT 转化方法主要参考了 ATMT 转化的经典方法^[76]和金欣^[54]等在里氏木霉中进行遗传改造的方法, 对于 ATMT 转化过程中的诱导和筛选进行优化。将选择性 PDA 培养基替换为含 200 μ g/L 潮霉素和 300 μ g/mL 特美汀的 IM 培养基。在选择性培养基上培养 4-5 天后, 开始挑选可能的转化子到选择性 PDA 培养基 (含 300 μ g/mL 的特美汀与 200 μ g/mL 的潮霉素), 验证后在含 300 μ g/mL 特美汀的 PDA 平板上传 3 代后, 单孢分离再传一代后用含潮霉素的平板验证。进一步通过 PCR 验证。本研究共进行了 2 次 ATMT, 抗生素筛选得到 20 个转化子。在所有转化子中有 1 个为同源重组, 其余均为 T-DNA 插入, 对于转化子 PCR 验证的电泳结果如图 2.12 所示。根据实验引物设计, 同源重组的 PCR 结果条带长度应为 1720bp, 而 T-DNA 插入的 PCR 结果条带长度为 1833bp, 图 2.12 所

示的电泳结果与实验设计基本符合，可以认定筛选得到了发生同源重组的转化子，即本实验需要构建的 *cre1* 基因敲除突变株。

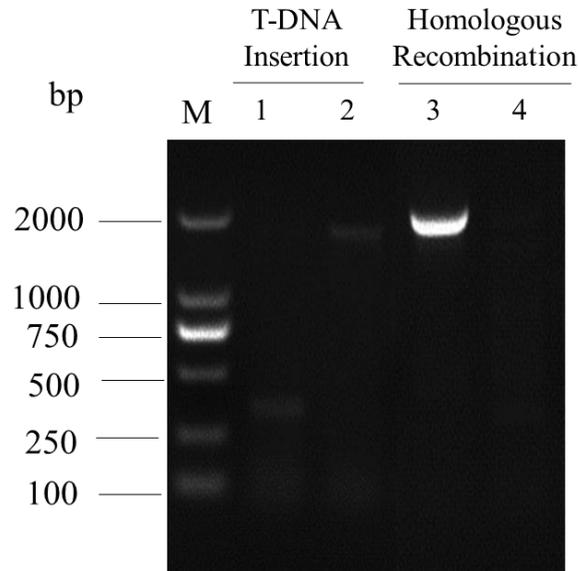


图 2.12 *cre1* 基因敲除深绿木霉菌 PCR 鉴定

泳道 M: DNA Marker 2000; 泳道 1: T-DNA 插入单交换转化子同源重组引物 ($\Delta cre1$ -F/ $\Delta cre1$ -F) 扩增; 泳道 2: T-DNA 插入单交换转化子 T-DNA 插入引物 (tDNA-F/Hph-R) 扩增; 泳道 3: 同源重组双交换转化子同源重组引物 ($\Delta cre1$ -F/ $\Delta cre1$ -F) 扩增; 泳道 4: 同源重组双交换转化子 T-DNA 插入引物 (tDNA-F/Hph-R) 扩增;

Fig 2.12 Molecular identification of transgenic *Trichoderma* strain

Lane M: DNA Marker 2000; Lane 1: PCR amplification of homologous recombination for T-DNA insertion (single crossing over) transformants by primer $\Delta cre1$ -F/ $\Delta cre1$ -F; Lane 2: PCR amplification of T-DNA insertion for T-DNA insertion (single crossing over) transformants by primer tDNA-F/Hph-R; Lane 3: PCR amplification of homologous recombination for homologous recombination (double crossing over) transformants by primer $\Delta cre1$ -F/ $\Delta cre1$ -F; Lane 4: PCR amplification of T-DNA insertion for homologous recombination (double crossing over) transformants by primer tDNA-F/Hph-R;

利用改良的 ATMT 方法，我们成功构建了深绿木霉 $\Delta cre1$ 敲除株，如图 2.13 所示，*cre1* 基因突变后，其作为一个全局性调控因子对深绿木霉生长等表型性状产生了重要的影响，后续对突变株性状和代谢的分析尤为关键，意义非凡。

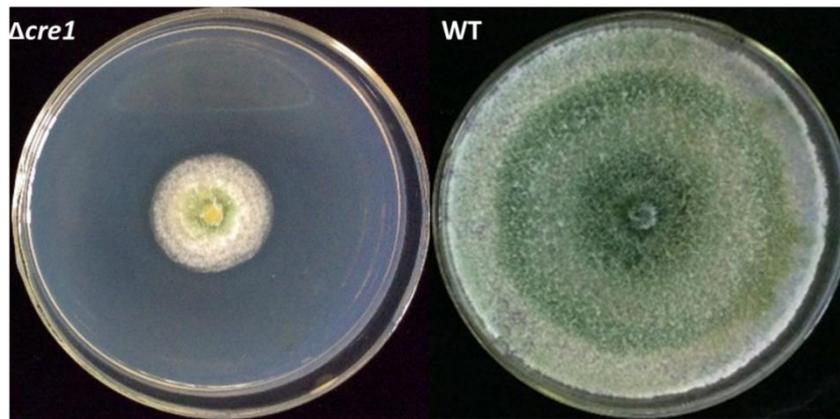


图 2.13 利用改良的 ATMT 转化方法得到的深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 敲除突变株 $\Delta cre1$

Fig 2. 13 The *cre1* knock out strain $\Delta cre1$ of *T.atroviride* via advanced ATMT

2.4 讨论与小结

本章中通过改进 ATMT 转化技术，成功实现深绿木霉 T23 $\Delta cre1$ 突变株的构建。为下一阶段敲除株和野生株性状和代谢差异奠定了基础。但在构建 CRE1 互补株的时候，通过将 *cre1* 基因编码区及启动子共同构建到互补质粒，含遗传霉素抗性标记的改造质粒 pC1300kh，通过 ATMT 转化将互补框导入桥除突变株后，转化子生长较少，且遗传不稳定，在传代过程中均出现了抗性的情况，互补株构建困难。可能需要进行互补质粒的改良或更换抗性筛选标记来实现深绿木霉中基因的互补，但由于时间关系，目前没有获得回复互补株。

本研究中 ATMT 转化子包含 T-DNA 插入和同源重组两种情况，并且均能在抗性培养基上生长的是含有抗性筛选标记抗潮霉素基因的抗性培养基上正常生长。因此，为了筛选仅发生同源重组的转化子，还需进一步提取 DNA 进行 PCR 验证。PCR 鉴定的原理主要是设计两对特异性引物，分别筛选 T-DNA

(tDNA-F/Hph-R) 和同源重组的转化子 ($\Delta cre1$ -F/ $\Delta cre1$ -F)，如图 2.14 所示。在 T-DNA 的上游多克隆位点，即 5'同源臂的上方设计一个上游引物 tDNA-F，在抗性筛选标记潮霉素基因编码框序列中设计下游引物 Hph-R，PCR 扩增包含上游同源臂和部分潮霉素基因的片段，如果电泳结果有条带，则表明该转化子中包含 T-DNA 随机插入的情况。另一对引物的设计则以双交换后的 DNA 序列为模板，在 *cre1* 基因 5'同源臂的上游设计上游引物 $\Delta cre1$ -F，在潮霉素编码框序列中设计下游引物 $\Delta cre1$ -R，PCR 扩增包含上游同源臂和部分潮霉素抗性基因的交换片段，上游引物一般能与基因组 DNA 结合，但只有发生了同源双交换，下游引物才能结合到潮霉素编码框序列，才能扩增得到长度正确的 DNA 片段，因此

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后长度正确的条带则表明该转化子发生了同源重组，若上述两种 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳均显示有长度正确的条带，则表明该转化子在发生同源重组的同时还存在单拷贝甚至多拷贝的 T-DNA 插入的情况。

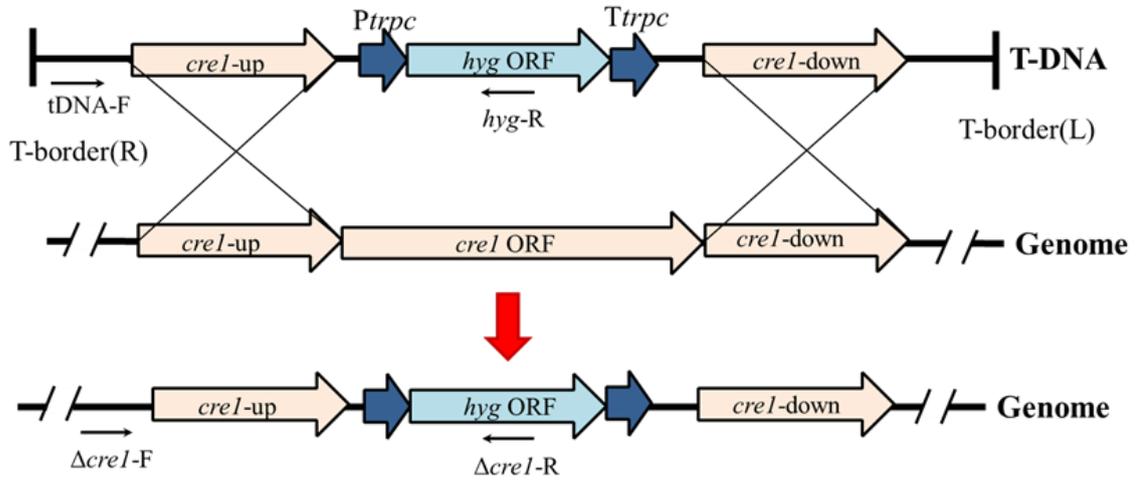


图 2.14 ATMT 转化原理及筛选引物设计

Fig 2. 14 Mechanism of ATMT and primers design for screening.

第三章 碳代谢抑制因子 CRE1 对木霉菌生长和代谢的影响

3.1 引言

碳代谢抑制因子 CRE1 作为一个全局性的调控因子,对于木霉菌菌丝生长和产孢肯定具有一定的调控作用。特别是作为一个碳代谢的调控因子,对于木霉菌丝碳源利用和能量代谢影响较大。2014 年, A.C. C Antoniêto 等根据对里氏木霉野生株 QM9414 和碳代谢抑制因子 CRE1 敲除株在不同碳源中的 RNA-Seq 测序结果的分析发现,在里氏木霉基因组 9129 个基因中,含纤维素的培养环境中, CRE1 上调了 268 个基因的表达,85 个基因表达受到抑制,而在高浓度的葡萄糖培养环境中,251 个基因上调,230 个基因受到抑制。在这些被调控的基因中,大多是与营养元素转运和氧化代谢相关的酶和蛋白以及转录因子等的编码基因^[57]。因此碳代谢抑制因子对基因表达的调控主要与培养基营养条件相关,在不同的碳源中对基因表达的调控有一定差异。

于此同时,相较于里氏木霉等因其较强的产工业重要酶类的功能,在工业生产中常备用做底盘细胞,工业经济价值很高,而深绿木霉则因其能够产生很多具有抗菌特性的次级代谢产物在生防领域的应用十分广泛。深绿木霉中重要的生防功能因子主要是细胞壁降解酶类、抗菌次级代谢产物等具有抗菌活性的物质。木霉菌在主要通过重寄生作用拮抗病原菌,促进植物抗逆性等,在重寄生过程中主要分泌代谢产物有几丁质酶(chitinases)、葡聚糖酶(β -1,3-glucanases)、胞外蛋白酶及纤维素酶等一系列细胞壁降解酶和抗菌次级代谢产物,如抗菌肽,抗菌毒素等。

目前,国内外的研究已从传统的分析木霉菌中抗菌肽等物质的分离、含量测定等方面,转向与抗菌肽等合成相关的基因和信号转导方面,其中非核糖体肽(NRPs)的生物合成是该领域研究的新热点。NRPs 的生物合成是由非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetases, NRPSs)、聚酮合成酶(polyketide synthases, PKSs)、NRPSs / PKSs 杂合酶等多功能蛋白复合体完成。其中, NRPSs 是 NRPs 生物合成的主要酶,也是研究最多最深入的酶。碳代谢因子 *cre1* 作为全局性碳代谢调节因子,可能对上述三类木霉菌生防功能因子的表达有一定的调节作用。

3.2 实验材料与方法

3.2.1 实验材料

(1) 菌种和引物

本章所用菌株如第二章所述。

资源	特征	来源
质粒		
pMD 18-T vector	T 载体克隆及测序	Takara 公司 购买
pC1300qh	木霉菌基因敲除载体,Hyg+,Kan+	实验室保存
pC1300- $\Delta cre1$ 引物	深绿木霉 <i>cre1</i> 基因敲除载体, 潮霉素抗性 引物序列 (5'-3')	本研究
<i>pcre1</i> -F1	GCCCAAGCTTTCCCACTGAGCGAAGACAA (<i>Hind</i> III)	本研究
<i>pcre1</i> -R1	ATAACTGCAGTGAGCGGCGGTCAACGAAG (<i>Pst</i> I)	本研究
<i>dcre1</i> -F2	ATCGGGTACCACGACGGTGCCTCGAATG (<i>Kpn</i> I)	本研究
<i>dcre1</i> -R2	ATCGGAATTCGTGGTGC GGCGATGAAGT (<i>EcoR</i> I)	本研究
<i>cre1</i> -f	CGGTaagcttGGTCTGCCGTGGATTACTC (<i>Hind</i> III)	本研究
<i>cre1</i> -r	GCCGtctagaTCGGGACGATTGATGATGT (<i>Xba</i> I)	本研究
tDNA-F	CCTCTTCGCTATTACGCC	本研究
Hph-R	ACATCGCCTCGCTCCAGT	本研究
$\Delta cre1$ -F	CAACAAAGAATGAGCCCTGAG	本研究
$\Delta cre1$ -R	TGCCAAGTGCCGATAAACA	本研究

(2) 所用试剂、试剂盒

试剂：昆布多糖粉末购于上海前尘生物科技有限公司；一般常见药品及试剂如非特殊说明均购于中国医药集团上海化学试剂公司。试剂盒：RNAprep

Pure Plant Kit 购于天根生化科技有限公司；PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒购于 Takara 公司；

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 购于 TOYOBO 公司；

DNS 试剂：酒石酸钾钠 91 g，用 500 mL ddH₂O 溶解，然后依次加入 3.15g 3,5-二硝基水杨酸和 20 g NaOH，用磁力搅拌器不断加热搅拌溶解，再加入 2.5 g 重蒸酚，2.5 g Na₂SO₃，溶解冷却后定容至 1000 mL，用棕色瓶储存，放置一周后即可使用。

胶态几丁质制备：称取 10g 粉状几丁质，溶于 300mL 浓盐酸中，置于 4℃ 冰箱溶解过夜，待其完全溶解后加入约 3L ddH₂O 至胶状几丁质完全析出。6000r/min, 4℃ 离心收集沉淀，将沉淀用 ddH₂O 洗至中性，最后用 ddH₂O 定容至 1L。

0.05M Tris-HCl (pH8.5) :称取 6g Tris base，溶于 800mL ddH₂O 后，用浓盐酸调节 pH 至 8.5，然后用 ddH₂O 定容至 1L。

0.1mg/ml 昆布多糖溶液：称取 0.1g 昆布多糖，用 ddH₂O 完全溶解，定容至 1L。

(3) 培养基

1) PNGu/PNGy 培养基：10g 蛋白胨，5g NaCl，20g 葡萄糖 (PNGu)或 40g 甘油 (PNGy)，加 ddH₂O 定容至 1L，pH6.0。

2) SMGu/SMGy 培养基：680 mg KH₂PO₄，870 mg K₂HPO₄，1.7 g (NH₄)₂SO₄，200 mg KCl，200 mg CaCl₂，200 mg MgSO₄ · 7 H₂O，2 mg FeSO₄，2 mg MnSO₄，2 mg ZnSO₄，20g 葡萄糖(SMGu)或 40g 甘油 (SMGy)，加水定容至 1L，pH 6.0。

3) MYG 培养基：10.0 g 葡萄糖，5.0 g 麦芽糖，5.0 g 酵母膏，1000 mL 蒸馏水。

4) 产几丁质酶诱导培养基：NH₄NO₃ 3 g，KH₂PO₄ 2 g，MgSO₄ · 7H₂O 0.6g，FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g，20% (v/v) 胶体几丁质，用 ddH₂O 定容至 1L。

5) MM 培养基：葡萄糖 20 g, K₂HPO₄ 15 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, CaCl₂ 0.6g, MgCl₂ 0.6 g, 50×微量元素 20 ml, 蛋白胨 2 g。定容至 1 L, 调节 pH 到 4.5-5.5。

6) 几丁质酶活快速检测培养基：制备基础培养基：MgSO₄ · 7H₂O 0.3g, (NH₄)₂SO₄ 3g, KH₂PO₄ 2g, 一水柠檬酸 1.0g, 琼脂 15g, Tween-80 200μl, 胶体几丁质 4.5g, 溴甲酚紫 0.15g, pH4.7。

7) 产纤维素酶菌株初筛培养基：CMC 10g, (NH₄)₂SO₄ 4g, KH₂PO₄ 2g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, 蛋白胨 1.0g, 琼脂 16g, 去氧胆酸钠 0.5g, 加水 1000ml。

3.2.2 实验方法

(1) 菌株菌丝生长和产孢情况对比方法

选取长满目的菌株菌丝的 PDA 平板，用直径为 0.5cm 的打孔器，在平板上哒若干个菌饼。用接种针挑取深绿木霉 T23 野生株和 *cre1* 敲除株的菌饼接种到 PDA 平板的中心，每个菌株 3 个重复。静置 30min 后，于 28℃ 恒温培养箱倒置培养 10 天，每天观察拍照存档。

(2) 菌株碳源利用差异分析方法

在基础培养基中加入不同成分含碳量相同的碳源，高压蒸汽灭菌后，制备平板。每种碳源接种突变株及野生株，3 个重复，每天测量菌落直径并拍照观察菌丝生长情况。

(3) 发酵酶活测定方法

几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶方法参见参考文献^[58]

(4) 平板酶活测定方法

1) β -1,3-葡聚糖酶(I): 配制 100ml MM 培养基，补充 0.05g 葡萄糖、0.067 酵母浸膏；加入苯胺兰 (aniline blue) 6mg，茯苓聚糖(pachyman)400mg，pH 调至 6.8，然后加入 1.2g 琼脂；4、121℃ 灭菌 15min，制平板；接种木霉菌菌饼，培养 3d，观察菌饼周围是否有透明圈直径。

2) 几丁质酶(I): 制备几丁质酶活快速检测培养基，121℃ 灭菌 15 min，制平板，凝固，接种木霉菌饼，25±2℃ 培养 7-10 天，观察菌落色泽。

3) 纤维素酶初筛方法: 将木霉菌株在 PDA 培养基平板上于 28℃ 下培养 5d，用打孔器从 PDA 平板菌落边缘打取菌落小块，放置于产纤维素酶菌株初筛培养基平板上，28℃ 下培养 4d。用 0.1% 的刚果红染液覆盖平板，静置 30min，再用 1mol.L-1NaCl 洗 1h，观察各菌株是否产生水解透明圈，选择产生明显水解透明圈的菌株进行复筛。复筛采用 DNS 染色法，通过酶活力筛选出产纤维素酶活高的菌株。

4) 蛋白酶活: 采用明胶法。配制 PDA 培养基，pH 调至 6.0。制备 8.0% 动物明胶 (Sigma) 水溶液，灭菌后，再加入 50℃ 培养基内，制明胶固体培养基平板。平板上接种木霉菌菌片，室温下培养 3d，观察菌落周围是否有透明的圈，可用饱和的硫酸铵溶液覆该平板，菌落周围透明圈更明显。

(5) 深绿木霉总 RNA 提取

木霉菌丝快速抽滤后，液氮研磨，然后按照天根生化科技有限公司的 RNAPrep Pure Plant Kit 说明书操作。

(6) 反转录

cDNA 第一链合成: 参考 RT-PCR 试剂盒(Takara 公司)。反转录体系 10 μL : 5 \times PrimeScript Buffer 4 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix 1 μL , Oligo dT Primer (50 μM) 1 μL , Random 6 mers (100 μM) 1 μL , 总 RNA 样品 500 ng, 最后加无 RNase 水补足至 20 μL 。混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 5 s, 立即使用或者于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

(7) 荧光定量 PCR

使用 TOYOBO SYBR Green® Realtime PCR Master Mix -Plus-试剂盒进行荧光定量 PCR, 操作过程按试剂盒说明进行, 仪器为德国艾本德公司 realplex 4s。PCR 体系为 25 μL : 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq, 1 μL 正向引物, 1 μL 反向引物, 1 μL cDNA 模板 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预热 30 sec; 95 $^{\circ}\text{C}$, 20 sec; 56 $^{\circ}\text{C}$, 30 sec; 72 $^{\circ}\text{C}$, 20 sec; 40 个循环。 β -actin gene (154bp) 为内参。计算公式:

$$\text{Relative mRNA} = 2^{-((\text{Ctt}-\text{Ctti})-(\text{Ctw}-\text{Ctwi}))}$$

其中 Ctt = 目标基因 Ct 值, Ctti = 目标基因内参 Ct 值, Ctw = 野生株 Ct 值, Ctwi = 野生株内参 Ct 值。

3.3 结果与分析

3.3.1 *cre1* 基因影响菌丝生长和发育

cre1 敲除突变株与野生株共同置于 PDA 平板上培养 10 天, 观察其在平板上生长情况。图 3.1 中可见, *cre1* 基因突变后, 菌丝生长受到影响, 生长速度明显下降, 产孢滞后且产孢量下降。根据已有的研究, *cre1* 是木霉菌细胞内全局性的碳代谢调控因子, 尤其是当葡萄糖存在的条件下, *cre1* 基因调控其各种碳代谢酶类, 能够抑制分解其他碳源的水解酶类如几丁质酶、纤维素酶等, 从而使细胞优先利用葡萄糖代谢, 本研究证实了在葡萄糖存在条件下, 野生菌株中 *cre1* 基因首先利用葡萄糖代谢生长, 而缺失 *cre1* 基因的敲除株则失去了优先代谢葡萄糖能力, 表现为生长缓慢, 菌丝形态纤细和密集。

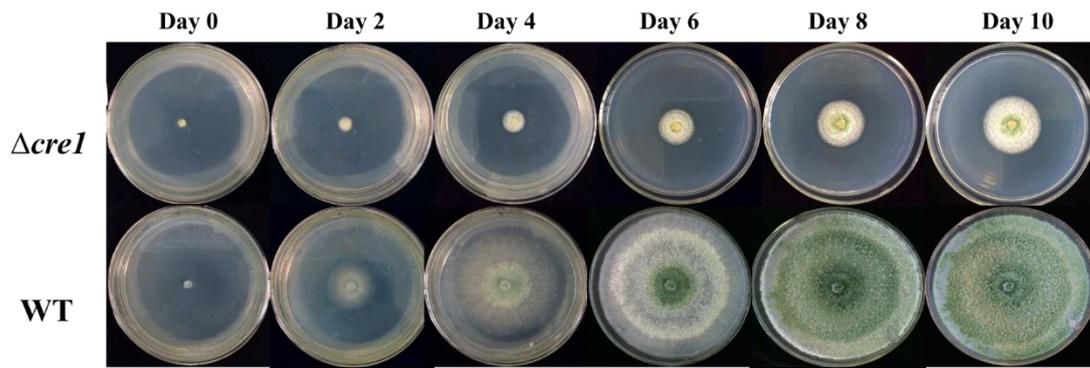


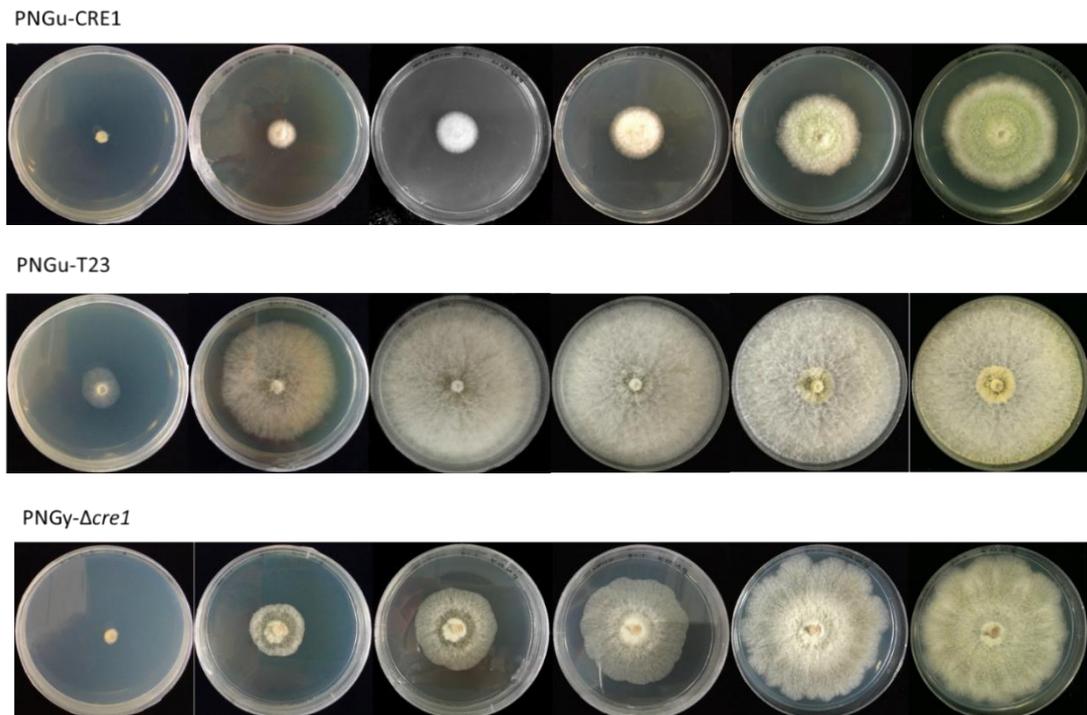
图 3.1 野生株和突变株平板生长表型比较

Fig 3.1 Phenotypic comparison on wild type and *cre1* knock out mutant $\Delta cre1$

3.3.2 CRE1 介导的木霉菌对不同碳源的差异利用

为了进一步探究碳代谢抑制因子 CRE1 对菌丝体碳源利用情况的影响，我们选取了 2 种不同氮源的基础培养基，加入不同的碳源，观察了野生株和突变株在不同碳源和氮源情况下的菌丝生长和产孢情况。

两种基础培养基分别为 PN 和 SM，选用葡萄糖或甘油作为碳源，在平板上接种等量的菌丝体后置于 28°C 黑暗培养 10 天，间隔记录不同培养时间菌株生长和产孢状况。图 3.2 和图 3.3 中从左至右分别为第 0, 2, 4, 6, 8, 10 天菌丝生长情况。



PNGy-T23

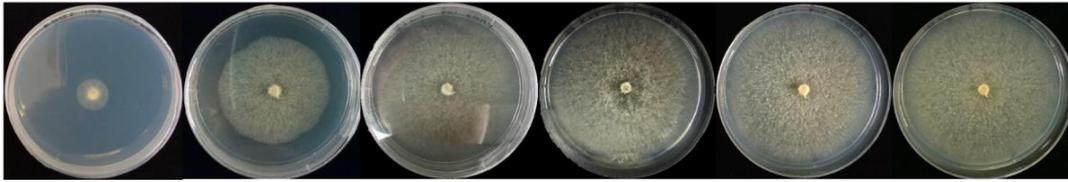
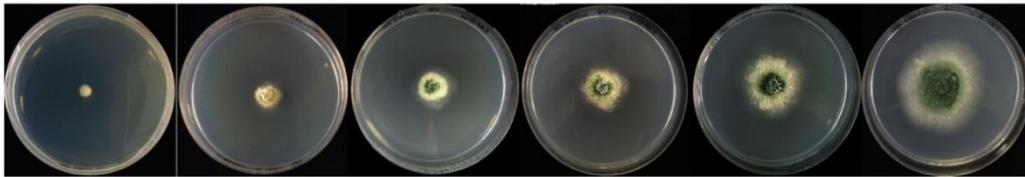


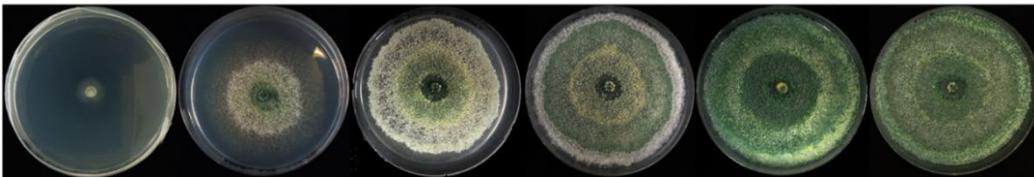
图 3.2 PN 基础培养基中野生株和突变株对不同碳源表型差异

Fig 3.2 The phenotypic differences between wide type and $\Delta cre1$ mutant when cultured on PN basic medium with diverse carbon sources

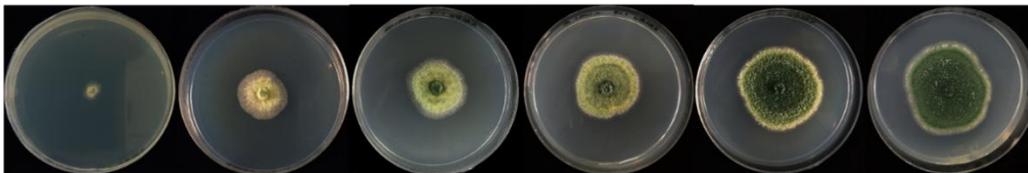
SMGu- $\Delta cre1$



SMGu-T23



SMGy- $\Delta cre1$



SMGy-T23

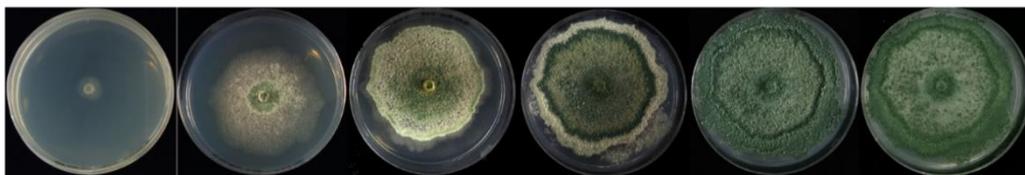


图 3.3 SM 基础培养基中野生株和突变株对不同碳源的表型差异

Fig 3.3 The phenotypic differences between wide type and $\Delta cre1$ mutant when cultured on SM basic medium with diverse carbon sources

实验选取了六碳糖葡萄糖及三碳糖甘油作为培养基的碳源，通过平板培养对比发现，野生株和突变株对于培养基中葡萄糖和甘油的反应存在差异。葡萄糖作为抑制性碳源，在碳代谢抑制因子 CRE1 的作用下，野生株对其的利用处于优先地位，而对甘油的利用则处在次要利用方面，因此，野生株含有葡萄糖的培养基

中生长相对较快。而突变株 $\Delta cre1$ 由于缺失了碳代谢抑制因子 CRE1，对其碳源代谢酶类和氧化还原系统的调控出现了异常，导致其生长速度非常缓慢，不论在葡萄糖还是在甘油中，其生长速度都因自身调控因子缺失导致的代谢紊乱而慢于野生型，但突变株对甘油和葡萄糖的反应却相异，不论是在 PN 基础培养基还是在 SM 基础培养基中，突变株均在含有甘油的培养基中生长快于在葡萄糖中，与野生株对碳源的反应恰恰相反（图 3.4）。CRE1 敲除后利用甘油生长代谢能力增强。

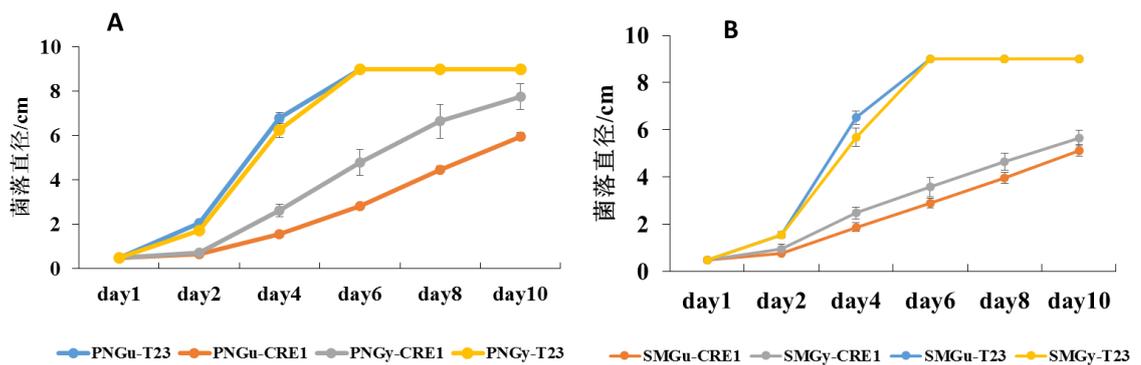


图 3.4 PN 和 SM 培养基中突变株 $\Delta cre1$ 和野生株的菌丝生长情况

Gu: 葡萄糖; Gy: 甘油(A:PN 培养基; B:SM 培养基)

Fig 3.4 the mycelia growth rates of wide type and $\Delta cre1$ mutant on PN basic medium

Gu: Glucose; Gy: glycerol(A: PN medium; B: SM medium)

此外，由于基础培养基中氮源的不同，菌丝形态和产孢上存在较大的差异。PN 培养基以蛋白胨为主要氮源，是有机成分，营养较为丰富，而 SM 培养基以无机盐 $(NH_4)_2SO_4$ 为主要氮源。野生株和突变株均在有机氮的培养基 PN 中生长相对较快（图 3.2，图 3.3），气生菌丝茂盛，产孢延迟，野生株孢子偏黄色，量较少，而突变株产孢较多且颜色偏绿。在 SM 培养基中，由于培养基中氮源含量较少，随着菌丝的向外扩展，孢子逐渐产生，产孢量大，且产绿色孢子。

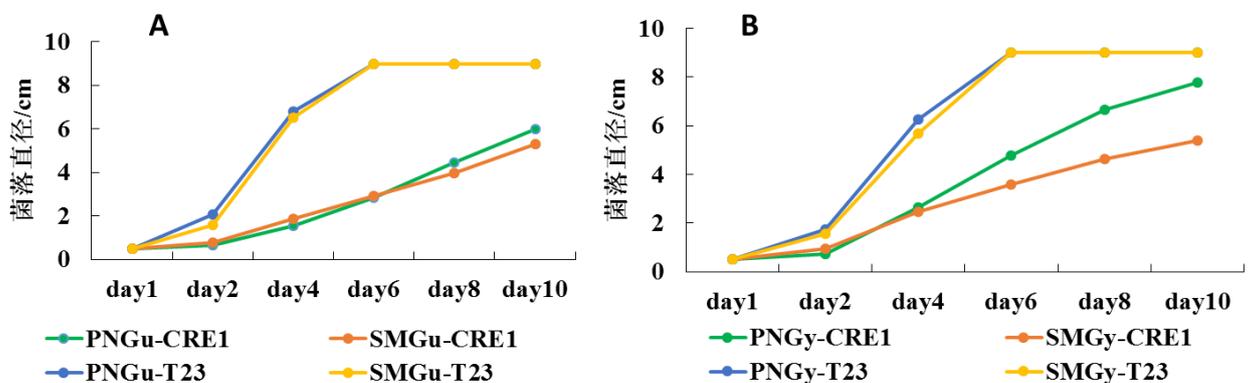


图 3.5 氮源对菌丝生长和产孢的影响

PN: 有机氮源 SM: 无机氮源 (A: 葡萄糖碳源; B: 甘油碳源)

Fig 3.5 The influence on mycelia growth due to different kinds of nitrogen sources

PN: Organic nitrogen source SM: inorganic nitrogen source(A: glucose as carbon source; B: glycerol as carbon source)

3.3.3 CRE1 抑制木霉菌中细胞壁降解酶等活性

本研究从平板透明圈或显色反应、发酵酶活测定、实时定量 PCR 测定相关基因表达等三个方面比较突变株和野生株代谢活性差异。

(1) 酶的活性分析

首先,对几丁质酶活进行了定性分析,结果如图 3.6 A 所示。培养基的颜色深浅代表了几丁质酶活性的高低,实验发现,突变株在培养后期培养基颜色有中间向外延逐渐变成紫色,至第 8 天时平板全部变成深紫色,表明其活性非常高。而野生株则一直是培养基本底颜色并没有变成紫色,且生长速度也较突变株慢。野生株和突变株的差异表明 CRE1 敲除后,几丁质酶活提升,且能够利用几丁质促进菌丝生长,而野生株几丁质酶活很低,几乎不能利用几丁质,生长缓慢。

进而对发酵液酶活测定。按照实验方法所述绘制了 NAG 标准曲线,选取发酵至第六天的发酵液,测定野生株、*cre1* 突变株的几丁质酶活,分析 *cre1* 基因对于深绿木霉菌几丁质酶表达的调控。野生株、*cre1* 敲除突变株的发酵液第六天几丁质酶活如图 3.6 B 所示,当发酵至第六天时,*cre1* 敲除株的几丁质酶活显著高于野生株,结果表明,在深绿木霉中,*cre1* 基因抑制几丁质酶的表达,在野生株中几丁质酶活处于较低的水平,而当 *cre1* 基因敲除以后,碳代谢抑制对于几丁质酶基因的表达的抑制解除,几丁质酶表达量上升,酶活提高。

其次,对 β -1,3-葡聚糖酶活测定,培养至其长满平板并全部产孢,突变株和野生株均没有出现透明圈(图 3.6 C)。有意思的是,突变株的菌丝生长和产孢均成水晕状,平板背面也有明显的纹路,而野生株正面表型不明显,但平板背面也有水晕状纹路。将上述两个菌株接种至葡聚糖酶产酶诱导培养基 MYG 中发酵 6 天后,测定第六天的 β -1,3-葡聚糖酶活,测定结果如图 3.6 B 所示。结果表明,*cre1* 基因对于深绿木霉葡聚糖酶的表达的影响和几丁质酶类似。在野生株中,由于 *cre1* 基因的正常表达,使得葡聚糖酶的表达受到碳代谢抑制机制的调控,处于低表达水平;当 *cre1* 基因敲除后,碳代谢抑制解除,葡聚糖酶表达量上升,酶活上升。

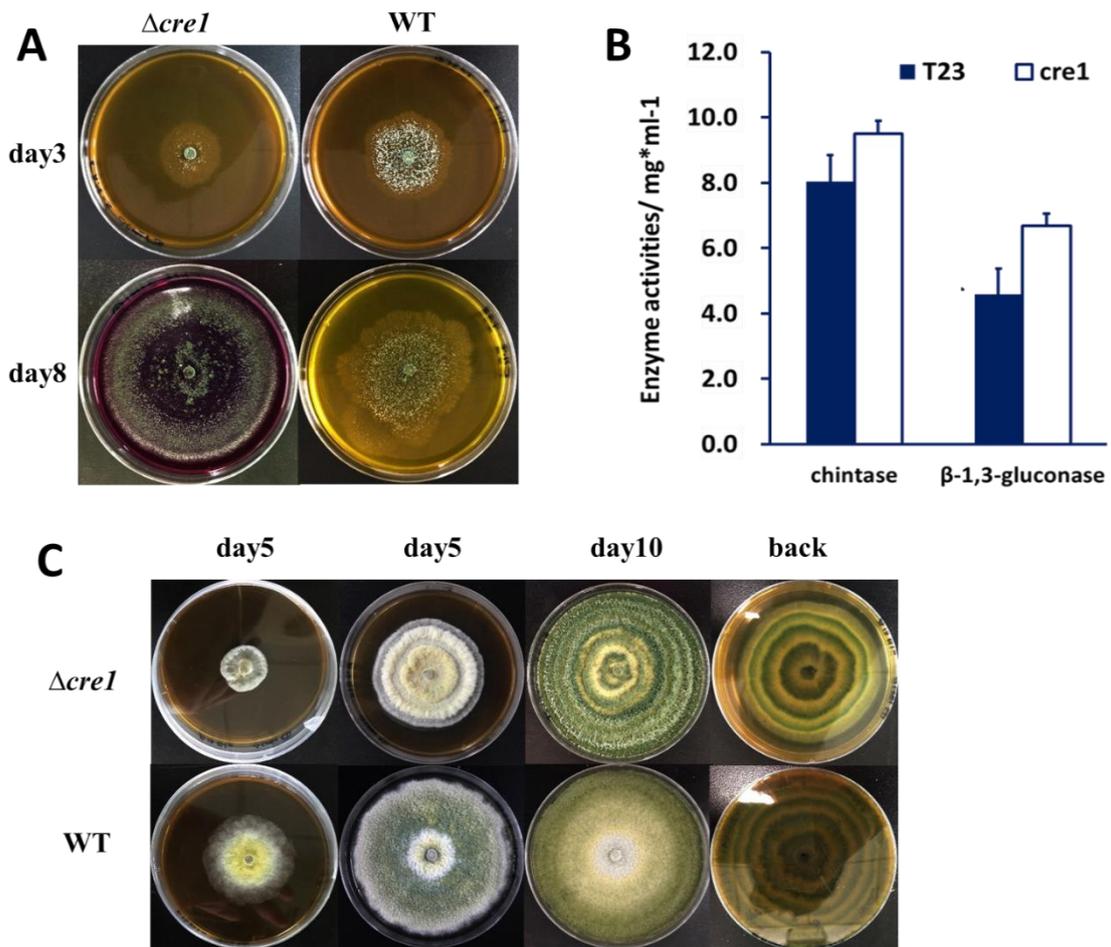


图 3.6 野生株和突变株几丁质和葡聚糖酶活测定

A: 几丁质酶活平板测定; B: 液体发酵几丁质酶活和葡聚糖酶活; C: 平板测定 β -1,3-葡聚糖酶酶活

Fig 3.6 The assays of enzyme activity on wide type and $\Delta cre1$ mutant.

A: chitinase activity on plate; B: The enzyme activity of Chitnase and β -1,3-glucanase after fermentation; C: β -1,3-glucanase activity on plate.

(2)其他细胞壁降解酶类——纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶

此外，本研究还对其他酶如纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶等进行了平板酶活测定。结果如下图所示：

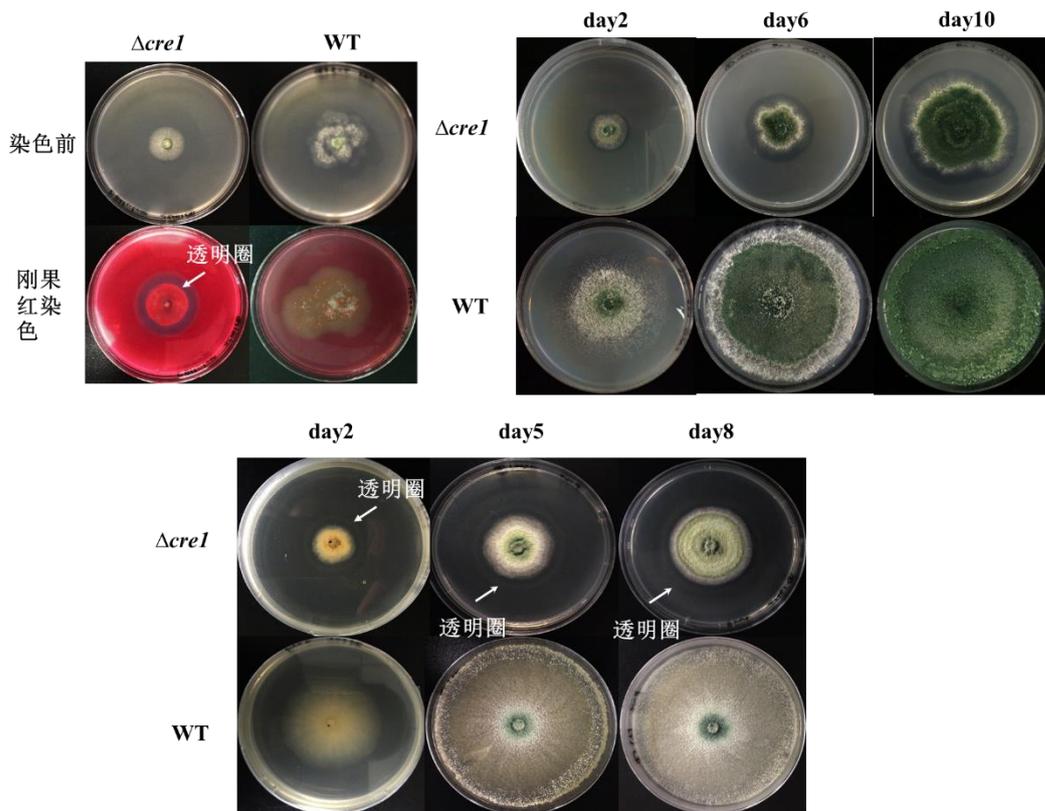


图 3.7 野生株和突变株其他细胞壁降解酶酶活测定

A: 平板纤维素酶活测定; B: 淀粉酶活平板测定; C: 蛋白酶活平板测定

Fig 3.7 The assays of enzyme activity about cell wall degradation enzymes on wide type and $\Delta cre1$ mutant.

A: The enzyme activity of cellulose cultivated on plates;

B: The enzyme activity of amylase cultivated on plates; C: The enzyme activity of proteinase cultivated on plates

在平板酶活测定的过程中(图 3.7), 针对上述 3 种酶类纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶, 突变株均出现了明显的透明圈, 说明突变株虽然生长缓慢但其代谢旺盛, 酶活水平较高, 而野生株则并没有明显的透明圈, 显示其酶活水平低。

(3) 部分细胞壁降解酶类编码基因转录水平分析

酶活测定结果表明 CRE1 蛋白抑制了细胞壁降解酶几丁质酶和葡聚糖酶的表达, 当 *cre1* 基因敲除后, 突变株的酶活均有不同程度的提升。为了验证 CRE1 对几丁质酶和葡聚糖酶表达的抑制作用, 本研究定量分析了几丁质酶编码基因 *chit42* 和 β -1,3-葡聚糖酶编码基因 *glucanase* 的转录水平。qPCR 实验结果(表 3.1, 图 3.8)表明, CRE1 对几丁质酶和葡聚糖酶的调控发生转录过程中, CRE1 蛋白抑制了 *chit42* 和 *glucanase* 酶基因转录, 从而下调了几丁质酶和葡聚糖酶的表达。通过检索几丁质酶基因 *chit42* 和葡聚糖酶基因 *glucanase* 的启动子序列,

研究并没有发现碳代谢抑制因子保守的结合基序“5'-SYGGRG-3'”，由此推断 CRE1 对几丁质酶和葡聚糖酶转录水平的抑制不是直接与启动子结合阻遏基因转录，可能通过某未知蛋白或途径的间接调控作用。

表 3.1 野生株和突变株 $\Delta cre1$ 几丁质酶基因 *chit42* 和 β -1,3-葡聚糖酶基因 *glucanase* 转录水平检测

Table 3.1 Transcriptional levels of *chit42* and *glucanase* in wide type and $\Delta cre1$

gene	Wide type (<i>T.atroviride</i> T23)			$\Delta cre1$ mutant (<i>T.atroviride</i> T23)			Fold
	CT β -actin	CT ^{WT}	Δ CT ^{WT}	CT β -actin	CT ^{$\Delta cre1$}	Δ CT ^{$\Delta cre1$}	
<i>chit42</i>	23.77±0.40	26.50±0.22	2.73	21.57±0.29	23.87±0.17	2.30	1.35
<i>glucanase</i>	23.77±0.40	25.05±0.72	1.28	21.57±0.30	21.21±0.45	-0.36	3.12

注：表中误差均为标准误 SE； Δ CT=CT^{目的基因}-CT ^{β -actin}；Fold= $2^{-\Delta(\Delta$ CT_{WT}- Δ CT _{$\Delta cre1$})}

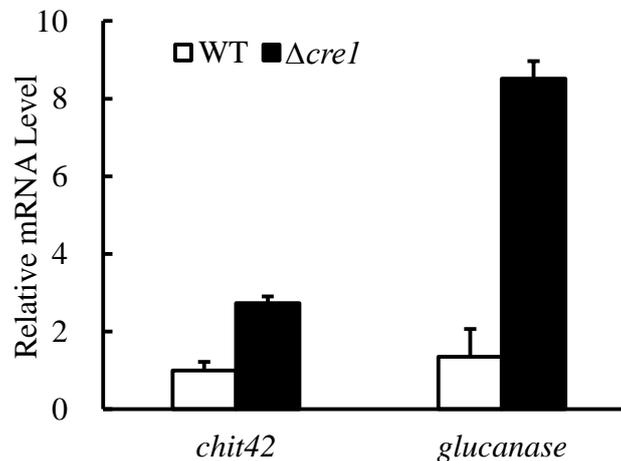


图 3.8 qRT-PCR 分析几丁质酶和葡聚糖酶的转录水平

Fig 3.8 The transcriptional level of *chit42* and *glucanase* by qRT-PCR

(4) CRE1 介导的细胞壁降解酶表达调控机制

本研究发现，碳代谢抑制因子 CRE1 对深绿木霉合成和分泌的细胞壁降解酶存在调控作用，CRE1 抑制了细胞壁降解酶中纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶、几丁质酶和葡聚糖酶等酶的表达，间接影响了生防木霉对植物病原真菌细胞壁等降解过程，从一定程度上限制了木霉菌的生防效果。深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 对木霉菌细胞壁降解酶的表达调控网络总结如下：

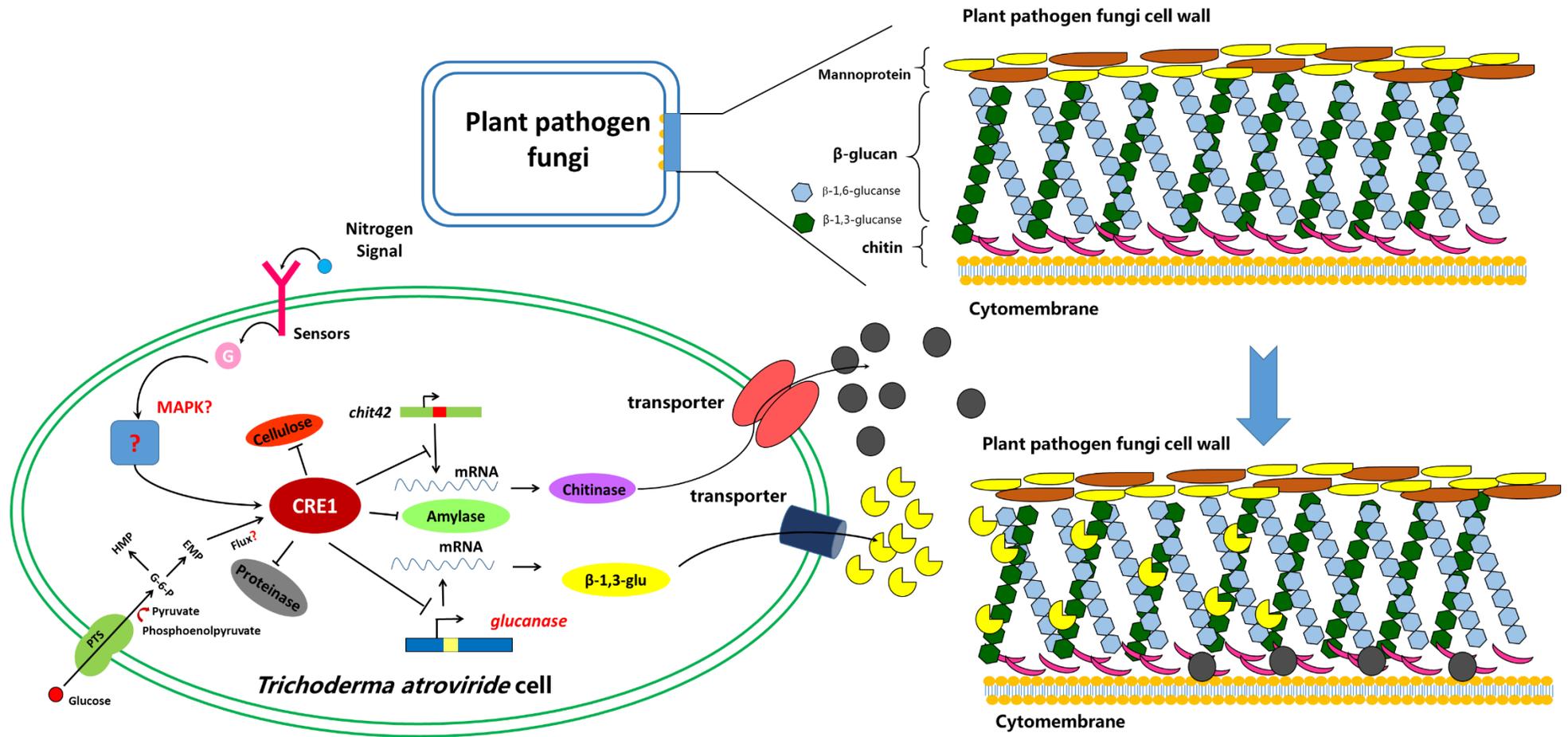


图 3.9 深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 对几丁质酶、葡聚糖酶等的表达调控

Fig 3.9 Regulation of CRE1 on the expression of chitinase and glucanase in *T.atroviride*

3.3.4 CRE1 影响木霉菌生防次级代谢产物的合成

深绿木霉在生物防治领域有着十分关键的作用，是常见生防制剂的主要成分之一。而深绿木霉高效的生防效益离不开其丰富的具有抗菌作用的次级代谢产物，如抗菌肽、抗菌活性物质等，这些中重要的次级代谢产物多属于非核糖体肽

(Nonribosomal Peptides, NRPs)。NRPs 的生物合成是由非核糖体肽合成酶 (Nonribosomal Peptide Synthetases, NRPSs)、聚酮合成酶 (Polyketide Synthases, PKSs)、NRPSs / PKSs 杂合酶等多功能蛋白复合体完成。其中，NRPSs 是 NRPs 生物合成的主要酶，也是研究最多最深入的酶^[80]。而聚酮合成酶是一类复杂的多酶体系，多以脂酰 CoA 为底物，通过重复的脱羧缩合过程产生线性聚酮化合物或环状的酮内酯，其过程类似于脂肪酸合酶催化的脂肪酸生物合成^[60]。

目前对于木霉菌生防次级代谢产物的合成和分泌的研究已有一定的成果，非核糖体肽合成酶主要负责合成木霉菌抗菌肽，而其他很多活性抗菌物质的合成则与聚酮合酶基因簇有关。本研究主要分析深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 对木霉菌生防次级代谢产物合成的影响，重点分析 CRE1 对非核糖体肽合成酶和聚酮合酶基因簇中重要的编码基因表达调控。

从深绿木霉菌的注释基因组中查找了 3 个 NRPS 编码基因及 2 个 PKS 编码基因，进行 qRT-PCR 分析其转录水平。定量结果（表 3.2，图 3.10）表明碳代谢抑制因子对不同的 NRPS 和 PKS 存在不同的调控模式。

表 3.2 CRE1 对 NRPSs 和 PKS 编码基因转录水平的影响

Table 3.2 Effect of CRE1 on the transcription levels of NRPSs and PKS coding genes

gene	Wide type (<i>T.atroviride</i> T23)			<i>Δcre1</i> mutant (<i>T.atroviride</i> T23)			Fold
	CT ^{β-actin}	CT ^{WT}	ΔCT ^{WT}	CT ^{β-actin}	CT ^{Δcre1}	ΔCT ^{Δcre1}	
<i>NRPS1</i>	20.04±0.30	31.24±0.31	11.20	22.33±0.42	34.42±0.30	12.09	0.54
<i>NRPS2</i>	20.04±0.30	32.52±0.74	12.48	22.33±0.42	31.69±0.16	9.36	8.72
<i>NRPS3</i>	23.77±0.40	29.75±1.27	5.98	21.57±0.30	27.39±0.12	5.82	1.12
<i>PKS1</i>	20.04±0.30	29.73±0.14	9.69	22.33±0.42	31.77±0.01	9.44	1.19
<i>PKS3</i>	20.04±0.30	26.46±0.29	6.42	22.33±0.43	27.22±0.24	4.89	2.88

注：表中误差均为标准误 SE； $\Delta CT = CT^{\text{目的基因}} - CT^{\beta\text{-actin}}$ ；Fold = $2^{-\Delta(\Delta CT_{WT} - \Delta CT_{\Delta cre1})}$

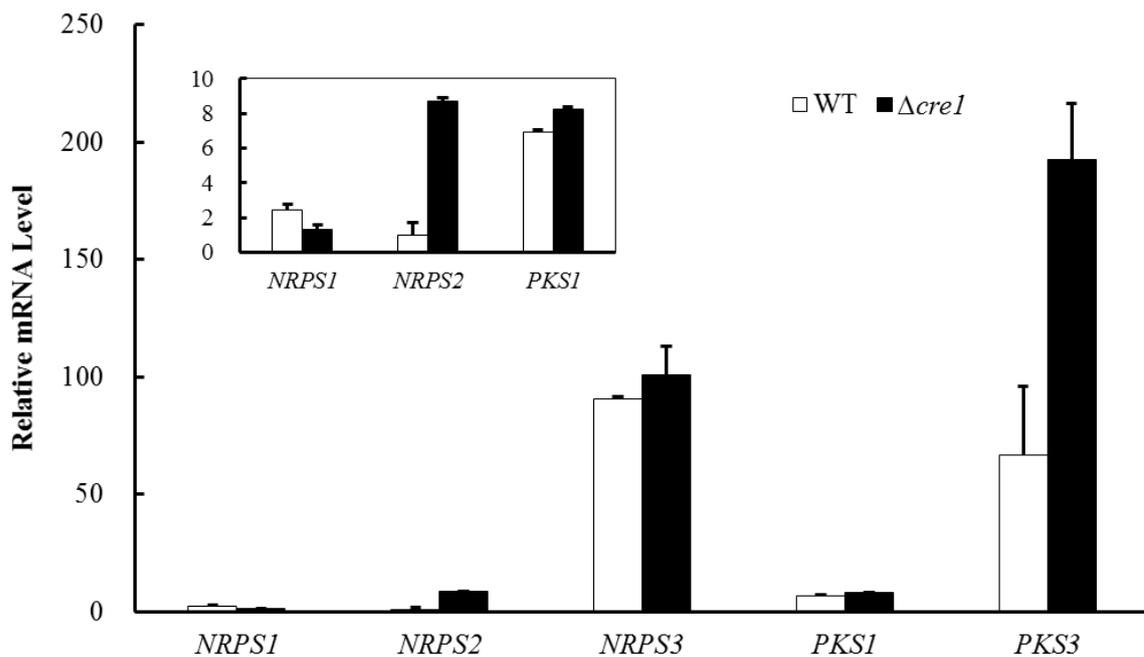


图 3.10 qRT-PCR 分析 NRPSs 和 PKS 编码基因转录水平

Fig 3.10 The transcriptional level of NRPSs and PKS in wide type and $\Delta cre1$ mutant by qRT-PCR

在 3 个 NRPS 编码基因中, NRPS1 和 NRPS2 表达量较 NRPS3 相对低很多, 而 NRPS3 的表达很高, CRE1 抑制 NRPS2 表达显著, 分析其原因可能是不同 NRPS 负责合成相异的非核糖体肽, 特别是木霉菌的抗菌肽, 其在不同环境中合成和分泌的抗菌肽大不相同, 因此不同 NRPS 间表达量的差异主要受培养环境等其他因子的影响。而低于 PKS, 我们选取了两个其基因簇中相对重要的聚酮合成酶 PKS1 和 PKS3, CRE1 对其的表达都存在一定抑制作用。

3.4 讨论与小结

本章主要研究了碳代谢抑制因子 CRE1 对木霉菌生长和代谢的影响, 通过比较野生株和突变株的平板性状差异以及代谢产物表达变化, 得出以下结论: (1) CRE1 明显抑制了木霉菌菌丝的生长, 在不同的碳源、氮源环境中, 突变株的生长速率均小于野生株, 突变株和野生株对碳源的生长反应相异; (2) CRE1 抑制了木霉菌细胞壁降解酶的转录和活性, 抑制了纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶等酶的活性, 同时也下调几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的转录从而抑制其酶活; (3) 此外, CRE1 还影响了木霉菌重要抗菌次级代谢产物的合成, 对与合成相关的非核糖体肽合成酶 NRPSs 和聚酮合成酶 PKSs 存在复杂的调控, 存在抑制的组分也存在表达上调的元件; CRE1 作为全局性的转录调控因子, 对木霉菌的生长和代

谢,特别是与其生防特性相关的生防因子表达和合成的调控,从多方面影响了木霉菌的生防效果,对今后有目的改良木霉菌生防特性具有一定的指导意义。

此为,通过实验发现 $\Delta cre1$ 敲除突变株生长速率低,特别是在平板中,野生株平均 3-4 天菌丝铺满平板,但突变株需要 10 天以上的培养时间才有可能铺满平板。比较其在不同碳源、氮源的环境中,只有在含有丰富有机氮和葡萄糖的培养基中生长相对较快。不仅在深绿木霉中,里氏木霉 *cre1* 敲除株也存在这种应环境差异影响生长速度的现象,在很多培养及中生长速度相对较慢^[46]。碳代谢抑制因子作为一个全局性的转录调控因子,对木霉菌基因的转录存在多方面的调控作用,可能其敲除以后,对于木霉菌丝生长相关的基因表达下调,导致其生长速率显著下降。但突变株的生长速率虽慢但其酶活性等显著高于野生株,这表明 *cre1* 基因敲除后可能抑制了木霉菌的初级代谢,诱导了次级代谢。通过抑制初级代谢过程中酶类的表达,下调初级代谢能量和物质的代谢流,影响了其菌丝生长速率,但上调了次级代谢相关的酶类,将代谢流导向次级代谢。

碳源影响碳代谢抑制因子的调控,碳代谢抑制因子缺失后,突变株对不同碳源的利用缺失了选择机制,而是一些碳源自身特性及其吸收利用途径中的相关透酶活性等对其利用效率的影响处于显著地位,甘油是三碳的小分子,细胞对其的吸收利用可以通过简单扩散等模式进入胞内,利用相对简单,可以通过甘油激酶磷酸化后进入 EMP 等代谢途径;而细胞对葡萄糖的吸收与利用需要主动转运过程,当碳代谢抑制机制缺失,细胞的葡萄糖利用效应消失,由于其转运效率等问题,葡萄糖的优先代谢地位丧失,导致突变株在葡萄糖中生长相对较慢。

研究发现了碳代谢抑制因子对细胞壁降解酶中的几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶、淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶等存在抑制作用,分析了转录水平上,CRE1 下调了几丁质酶编码基因 *chit42*、 β -1,3-葡聚糖酶编码基因 *glucanase* 的转录。本研究并未全面分析 CRE1 对各种细胞壁降解酶活性的影响,也未深入分析 CRE1 对纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶等编码基因的转录调控水平,仍有很多工作需要完善。根据里氏木霉中的研究成果^[12, 61-63],CRE1 对纤维素酶、木聚糖酶及部分半纤维素酶可能在转录水平存在直接抑制。NRPS 和 PKS 均为较大是基因簇,其基因簇中含有诸多组分,且在很多次级代谢产物基因簇中,存在一个或数个 NRPSs 和 PKSs 单元,用于合成抗菌肽或聚酮化合物单元等,对次级代谢产物合成有关键作用。本研究选择了 3 个 NRPSs 和 PKSs 合成酶基因,均通过 NCBI 网站调取,并未追溯其基因组位置及具体的次级产物合成基因簇位置,因此本研究成果仅能证实碳代谢抑制对 NRPSs、PKSs 具有复杂而全面的调控作用,但其精细调控机制,对具体次级代谢产物合成的影响仍需更进一步的实验探究。

第四章 碳代谢抑制因子 CRE1 调控 ABC 转运蛋白 Taabc2 表达机制研究

4.1 引言

作为一个全局性调控因子，碳代谢抑制因子 CRE1 调控的靶标基因备受关注。在木霉中，CRE1 主要调控了与非优先利用碳源代谢相关酶类编码基因的表达，如里氏木霉菌 (*T.reesei*) 中碳代谢抑制子 CRE1 调控木聚糖酶 I (*xyn1*) 基因的表达，通过 CRE1 蛋白与 *xyn1* 基因启动子区的 5'-SYGGRG-3' 保守序列结合抑制其转录^[64]；同样地，在哈茨木霉 (*T.harzianum*) 中，CRE1 蛋白与 *ech42* 基因的启动子区结合同样抑制其转录和表达^[65]。2011 年，里氏木霉全基因组微阵列分析数据发表，Portnoy 等人发现 CRE1 抑制了 47.3% 基因的转录，诱导 29.0% 基因转录，17.2% 的转录本不依赖 CRE1 而受生长速率调控^[46]。在这 76% 受 CRE1 调控的基因中，我们发现了一个与微生物多效耐药性相关的转运蛋白 (ID: 59014)，里氏木霉中该基因的表达受 CRE1 诱导 (图 4.1)，CRE1 敲除后其表达量下调 (图 4.1，表 4.1)。该转运蛋白与 Ruocco 等^[66] 在 2009 年发现的深绿木霉 ABC 转运蛋白 Taabc2 (GeneBank Accession: AAX68676.1) 同源性高达 90%。根据已有的研究，我们推测深绿木霉中这个 ABC 蛋白家族的多效耐药性转运蛋白 Taabc2 的表达也受碳代谢抑制因子 CRE1 的调控，而具体调控方式通过实验进一步解析。

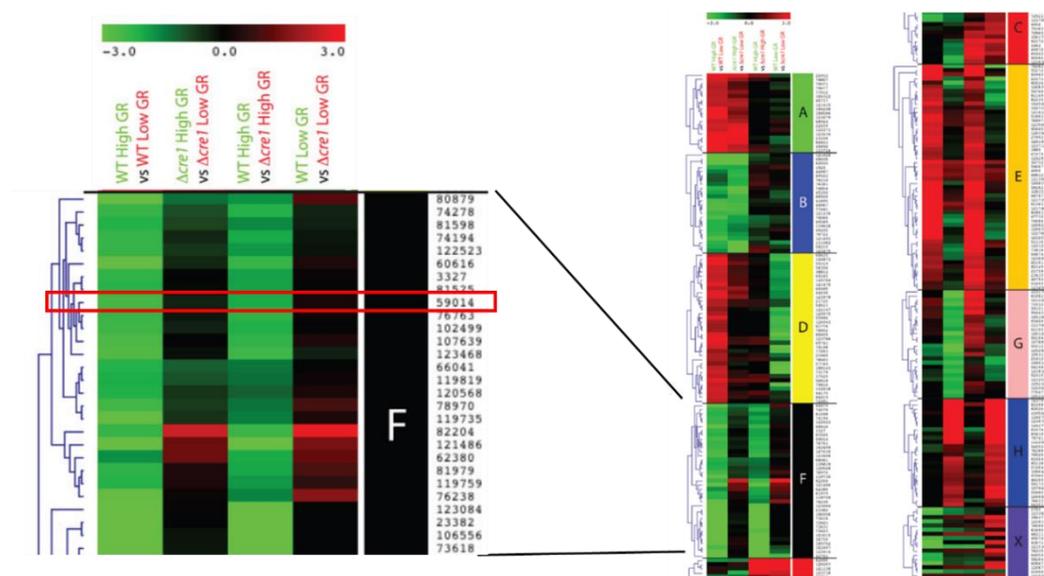


图 4.1 全基因组微阵列分析 CRE1 对蛋白 59014 表达的影响

Fig 4.1 Gene expression analysis with microarrays on the regulation of protein No.59014 transcription by CRE1 in *T.reesei*.

表 4.1 里氏木霉 CRE1 对蛋白 59014 表达的调控

Table 4.1 The regulation of protein No.59014 transcription by CRE1 in *T.reesei*.

protein ID	Function	category	1	2	3	4	cluster
59014	ABC multidrug transporter	Cellular transport, transport facilitation and transport routes; Cell rescue, defense and virulence;	-2.544	-0.375	-2.036	0.264	F

注：1: WT High GR vs WT Low GR; 2: $\Delta cre1$ High GR vs $\Delta cre1$ Low GR; 3: WT High GR vs $\Delta cre1$ High GR; 4: WT Low GR vs $\Delta cre1$ Low GR.

ABC(ATP-binding cassette transporters)转运系统广泛存在于原核和真核微生物中，通过水解 ATP 驱动化合物的吸收和外排，促使底物实现跨膜转运的一类膜结合蛋白^[67]。一个典型的原核微生物 ABC 转运系统由 4 个结构域组成(图 1a)，其中：两个高度疏水，各包含 6 个跨膜片段；2 个亲水，为 ATP 结合结构域，负责 ATP 结合与水解。真核微生物的 ABC 转运蛋白是多个基因组成的超家族结构，由跨膜蛋白 (MSD)和 ATP 结合蛋白(NBD)融合，形成由 MSD 和 NBD 组成一个多结构域蛋白，如酿酒酵母有 31 个基因编码的蛋白质属于 ABC 超家族，而白念珠菌有 28 个基因编码的蛋白质属于 ABC 超家族^[68]。ABC 转运蛋白在细胞膜上充当外排泵的作用，驱除细胞内的毒性化合物，防止它们的积累，保护细胞不受毒性物质危害，增强对抗生素的自身抗性以提高免疫保护。

蛋白组学研究表明，在植物，真菌病原菌三方相互作用时，木霉菌中存在一定数量的 ABC 转运系统表达基因上调，有利于木霉的根剂定植和拮抗活性。M. Lorito 研究小组首次在深绿木霉菌株 P1 中克隆了四个 ABC 转运系统代表性基因 TAABC1,TAABC2,TAABC3 和 TAABC4，其中鉴定了 *Taabc2* 基因全基因序列长度 6536bp，包含 162bp 启动子区域，642bp 中止子，编码基因 4264bp,启动子区域包含潜在的转录因子结合位点，与几丁质酶 *ech42* 基因 5'-非编码区启动子区域结合位点的特征序列类似，包括热激蛋白 (HSF)，氮调节因子 (Nit-2)，抗逆性原件 (STRE)，CRE1 结合的 BP1 基序等。Northern 分析和定量 RT-PCR 证实深绿木霉生长在灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 滤液培养基中，*Taabc2* 基因在氮缺乏时大量表达，*Taabc2* 和细胞壁降解酶编码的基因受到共同调控，而者共同参与重寄生作用。深绿木霉 ABC 转运蛋白的关键基因 *Taabc2*，是木霉菌与其他微生物及有毒环境的互作中的重要因子，对木霉拮抗和生防作用是必不可少的，同时在对化学杀菌剂产生抗性和耐受性过程中也起了重要作用^[66]。此外，ABC 转

运蛋白 *Taabc2* 能够参与抵抗和运输毒素及其他抗菌物质，帮助机体提高对环境的适应能力；参与机体自分泌毒素的运输，表明该基因在 *T.atroviride* 的生防过程中发挥着一定的作用。

本研究希望基于前期对于碳代谢抑制因子在木霉菌生防代谢方面的调控作用，结合其对转运蛋白的调控，深入分析其调控机制，丰富 CRE1 全局性代谢调控网络，填补碳代谢抑制机制对转运蛋白表达调控研究的空白，探究其对木霉菌生防特性的影响。

4.2 实验材料与方法

4.2.1 实验材料

(1) 菌种、质粒和引物

本章所用菌株如第二章所述。

表 4.2 本章所用菌种、质粒和引物

Table 4.2 Strains, Plasmids and Primers used in this research.

资源	特征	来源
质粒		
pC1300th	木霉菌遗传改造载体,Hyg+,Kan+	实验室保存
pC1300kh	木霉菌遗传改造载体,G418+,Kan+	实验室保存
pC1304	植物 GUS 报告基因表达载体,Hyg+,Kan+	实验室保存
1300th AG3F	野生株 <i>Taabc2</i> 启动子敲除 delA-GUS 表达载体, Hyg+,Kan+	本研究
1300th BG3F	野生株 <i>Taabc2</i> 启动子敲除 delB-GUS 表达载体,Hyg+,Kan+	本研究
1300th CG3F	野生株 <i>Taabc2</i> 启动子敲除 delC-GUS 表达载体,Hyg+,Kan+	本研究
1300th DG3F	野生株 <i>Taabc2</i> 启动子敲除 delD-GUS 表达载体,Hyg+,Kan+	本研究
1300kh AG3F	突变株 <i>Taabc2</i> 启动子敲除 delA-GUS 表达载体,G418+,Kan+	本研究
1300kh BG3F	突变株 <i>Taabc2</i> 启动子敲除 delB-GUS 表达载体,G418+,Kan+	本研究
1300kh CG3F	突变株 <i>Taabc2</i> 启动子敲除 delC-GUS 表达载体	本研究

1300kh DG3F	体,G418+,Kan+ 突变株 <i>Taabc2</i> 启动子敲除 delD-GUS 表达载 体,G418+,Kan+	本研究
引物	引物序列 (5'-3')	
F1-Pdr1-F	CCTGAAGTAGTCCTCGCTGAA	本研究
F1-Pdr1-R	GACGGGATGCTCTTATGGAG	本研究
F2-Pdr2-F	TGCTGCTGATGTTGATGTTG	本研究
F2-Pdr2-R	CGTCTCCTTTCCAAGAATGC	本研究
F3-Mrp1-F	GCCAAATCCTCCTTGACG	本研究
F3-Mrp1-R	CGTTGAAGCGTATCGTGTTG	本研究
F4-Taabc2-F	CCAGTCTGCCTATCAC	本研究
F4-Taabc2-R	TAAACAGTCTTGCCACC	本研究
F5-Mrp3-F	ATCCGCTCTCGTCTCATCAC	本研究
F5-Mrp3-R	CCATAGGTTCACTGCTTGGAG	本研究
F6-Pdr4-F	TATCTGGCGGGACTTTGG	本研究
F6-Pdr4-R	CGCTTGAATGGGTTCCTG	本研究
F7-Mrp4-F	GTCTCCGCACCATCATTG	本研究
F7-Mrp4-R	ATGCCGTCCATCTTCCAC	本研究
F8-Mrp2-F	CGTGGAAGGAGGTGTGAAGA	本研究
F8-Mrp2-R	ACAAGAGCCGCAAACCTGG	本研究
F-actin-F	CGACTGCTCTCCAACAAGC	本研究
F-actin-R	TTCACTCAGGCTCACAAAGC	本研究
Th-AF	TAAAACGACGGCCAGTGCCATGCCAGTAC CGAGTATCCAC	本研究
Th-BF	TAAAACGACGGCCAGTGCCATGCGCTTCA GACGTTATCCAG	本研究
Th-CF	TAAAACGACGGCCAGTGCCACACCAAGGT AATGTCCGATGC	本研究
Th-DF	TAAAACGACGGCCAGTGCCATCATGTGCA GCAACTATCGG	本研究
TpGus-TpR	TCTACAGGACGTAACATGATTTCTGGCTTC ATAA	本研究
TpGus-GusF	TTATGAAGCCAGAAATCATGTTACGTCCT	本研究

	GTAGA	
Gus3F-GusR	CCTACTCAGCCTTCTTGTCATTGTTTGCCT CCCTG	本研究
GusA3F-3FF	CAGGGAGGCAAACAATGACAAGAAGGCT GAGTAGG	本研究
3FTh-3FR	GACCTCCGAATTCGAGCTCG-TTAGCCATA GATACCGC	本研究
Thdel-F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTG	本研究
Thdel-R	GAAACCCCATTTGTGACTCAGC	本研究
delGus-F	CGTTATCCAGAATCCTA	本研究
delGus-R	TTGCCGTAATGAGTGAC	本研究
GusA3F-F	GGCTGCACTCAATGTACACC	本研究
GusA3F-R	TGGAATTTGCTGCTTATCCCTT	本研究
3Fth-F	GGGCTTCTTCATCTTCGACT	本研究
3Fth-R	AGATTCTTCGCCCTCCGAGA	本研究

(2) 酶、试剂、试剂盒

酶：一般 PCR 用 Premix Taq，Hieff Clone 多片段一步克隆试剂盒购于上海前尘生物科技有限公司；高保真 PCR 用 GXL 高保真酶购于 Takara 公司。

试剂：4-甲基伞形酮- β -葡萄糖醛酸苷购于上海前尘生物技术有限公司；一般常见药品及试剂如非特殊说明均购于中国医药集团上海化学试剂公司。

试剂盒：Bradford 蛋白定量试剂盒均购于天根生化科技有限公司

1mol/L Na_2HPO_4 溶液：35.814g Na_2HPO_4 溶于 100ml 水。

1mol/L NaH_2PO_4 溶液：15.601g NaH_2PO_4 溶于 100ml 水。

0.1M 磷酸缓冲液(PH7.0)：1mol/L Na_2HPO_4 取 5.77ml，1mol/L NaH_2PO_4 取 4.23ml，定容至 100ml。

0.5 M EDTA (PH8.0)：在 80ml 水中加入 18.61g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，用 NaOH 调 PH 至 8.0（约需 2g 左右的固体 NaOH），溶解后定容至 100ml。

GUS 酶提取液：0.1M 磷酸缓冲液 (PH7.0) 50ml；10% SDS 1ml；0.5M EDTA (pH8.0) 2ml；Triton X-100 100ul； β -巯基乙醇 100ul；用 ddH₂O 定容至 100ml。

MUG 底物：称 200mg MUG，溶于 10ml GUS 酶提取液中，配制成 50mmol/L 储液，于 -20℃ 储存。使用时稀释成 2mmol/L 的工作液即可。

反应终止液 (0.2 mol/L Na_2CO_3)：称 2.12g Na_2CO_3 ，用 ddH₂O 定容到 100ml。

4.2.2 实验方法

(1) GUS 活性测定方法

GUS 蛋白可以与 4-甲基伞型酮- β -葡萄糖醛酸苷 (4-MUG) 反应产生能产生荧光的物质 4-甲基伞型酮 (4-MU)。4-MU 的激发波长为 365nm, 发射波长为 456, 其含量可由荧光分光光度计测出。因此, 我们可以根据单位质量的植物总蛋白在单位时间内产生的荧光物质的多少来定量的检测 GUS 含量。

1) 总蛋白的提取

①取木霉菌菌丝用液氮研磨, 迅速加入 EP 管中, 置于液氮中暂时储存。

②所有样品研磨充分后, 取出 EP 管并立即加入 1ml 的 GUS 提取缓冲液, 涡旋混匀。

③4°C, 12000r/min, 离心 5min, 小心吸取上清, 转移至新的 Ep 管中, 置于冰上待用。

2) 蛋白浓度的测定 (Bradford 法)

参考天根生化科技有限公司 Bradford 法蛋白定量试剂盒说明书。

3) GUS 表达水平的定量测定

①在棕色 EP 管中加入 400 μ l GUS 提取缓冲液, 置于 37°C 水浴锅中预热 15min;

②向预热的 GUS 提取缓冲液中加入 100 μ l 提取的蛋白上清, 充分混匀后再加入 500 μ l 4- MUG 底物, 37°C 温浴;

③取 0min、15min、30min、45min 和 60min 分别取混合反应物 200 μ l 于 EP 管置于冰上, 加入 800 μ l 反应终止液, 室温避光保存。

④用全波长酶标仪在激发波长 365nm、发射波长 455nm 下时测定不同时间点的荧光强度值。

⑤以荧光强度值对反应时间作曲线, 求出斜率 k。

⑥GUS 活性计算公式为: $A=k/\text{总蛋白浓度}$ (单位: $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)

(2) 荧光定量 PCR

将野生株和突变株接种于 PDA 液体培养基发酵培养 3 天, 用总 RNA 提取试剂盒提取野生株和突变株的 RNA。用 Takara 公司 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA 后, 进行实时定量 PCR 检测野生株和突变株中 10 个 ABC 转录蛋白编码基因的转录水平 (TOYOBO THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix)。

4.3 结果与分析

4.3.1 深绿木霉 ABC 转运蛋白表达量分析

通过木霉菌基因组查找，获得 8 个 ABC 转运蛋白基因，ABC1-8，根据其蛋白序列检索深绿木霉转录组序列库查找 cDNA 序列。以上述 8 个 ABC 转运蛋白的 cDNA 为模板设计引物，利用实时定量 PCR 检测 T23 和 $\Delta cre1$ 突变株对 ABC 转运蛋白基因的表达量。

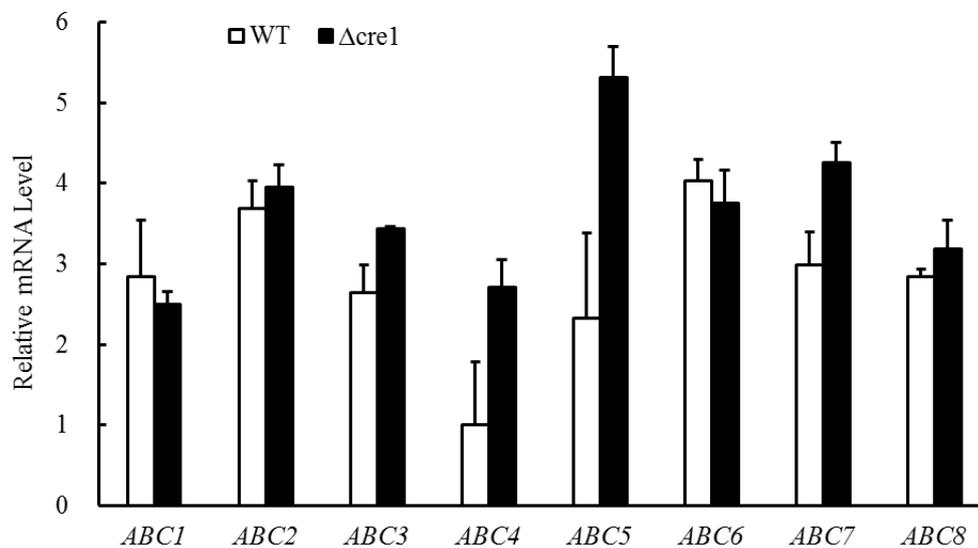


图 4.2 CRE1 对深绿木霉中 ABC 转运蛋白的表达调控

Fig 4.2 The expression levels of eight ABC Transporters in *T. atroviride* regulated by CRE1

表 4.3 CRE1 对深绿木霉 8 个 ABC 转运蛋白表达的调控

Table 4.3 Regulation of CRE1 on ten ABC transporters transcription in *T.atroviride*

gene	Wide type (<i>T.atroviride</i> T23)			$\Delta cre1$ mutant (<i>T.atroviride</i> T23)			Fold $2^{-\Delta(\Delta CT_{WT}-\Delta CT_{\Delta cre1})}$
	CT $\beta actin$	CT WT	ΔCT WT	CT $\beta actin$	CT $\Delta cre1$	ΔCT $\Delta cre1$	
<i>ABC1</i>	23.77±0.40	23.78±0.70	0.01	21.57±0.19	21.77±0.16	0.20	0.88
<i>ABC2</i>	23.77±0.40	23.41±0.35	-0.36	21.57±0.20	21.11±0.28	-0.46	1.07
<i>ABC3</i>	23.77±0.40	23.89±0.35	0.12	21.57±0.21	21.31±0.03	-0.26	1.30
<i>ABC4</i>	23.77±0.40	25.29±0.78	1.52	21.57±0.22	21.65±0.33	0.08	2.71
<i>ABC5</i>	23.77±0.40	24.07±1.06	0.30	21.57±0.23	20.68±0.38	-0.89	2.28
<i>ABC6</i>	23.77±0.40	23.28±0.27	-0.49	21.57±0.24	21.18±0.41	-0.39	0.93
<i>ABC7</i>	23.77±0.40	23.71±0.41	-0.06	21.57±0.25	21.00±0.25	-0.57	1.42
<i>ABC8</i>	23.77±0.40	23.78±0.09	0.01	21.57±0.26	21.42±0.36	-0.15	1.12

注：表中误差均为标准误 SE； $\Delta CT = CT_{目的基因} - CT_{\beta-actin}$ ；Fold = $2^{-\Delta(\Delta CT_{WT} - \Delta CT_{\Delta cre1})}$ ；ABC1-8 各个蛋白质的功能和说明详见附录 1。

根据实时定量 PCR 检测结果 (表 4.3, 图 4.2), 研究发现碳代谢抑制因子 CRE1 对这 8 个基因表达的调控存在不同的模式。6 个 ABC 转运蛋白表达受到 CRE1 抑制, ABC2, 3, 4, 5, 7 和 8, 其余 2 个受 CRE1 诱导表达。其中 ABC4 在 CRE1 突变株中表达量最大, 受 CRE1 抑制调控影响最大; 而 ABC10 的表达受 CRE1 诱导影响最大。

根据定量测定的结果, 我们选择了在这 8 个基因中表达受 CRE1 影响最大的基因 ABC4 作为我们研究碳代谢抑制因子 CRE1 调控 ABC 转运蛋白表达机制的研究对象。经过克隆 ABC4 cDNA 序列, 测序比对发现其与 2011 年转录组数据中报道的 59014 蛋白编码基因以及 2009 年 R.Michelina 等人首次发现的深绿木霉 ABC 转运蛋白 *Taabc2* 编码基因同源性极高, 就是深绿木霉中的 *Taabc2* 基因。

4.3.2 深绿木霉 ABC 转运蛋白 *Taabc2* 基因分析

根据 NCBI 网站中登陆的深绿木霉 ABC 转运蛋白 *Taabc2* 的氨基酸序列, 检索深绿木霉全基因组蛋白序列获取蛋白登录号, 进而检索其 cDNA 以及编码的 DNA 序列。以检索到的 DNA 序列为模板, 设计引物 TaF 和 TaR, 以深绿木霉 T23 全基因组 DNA 为模板, PCR 扩加深 *Taabc2* 基因, 连接 T 载体后, 送往上海生工测序。将测序结果与发表序列比对, 发现深绿木霉 T23 菌株的 *Taabc2* 基因长约 4276bp, 含有两个内含子, 共编码 1413 个氨基酸 (图 4.3)。利用在线基因启动子预测网站 NNPP (Neural Network Promoter Prediction) 提交深绿木霉转运蛋白 *Taabc2* 的编码基因序列后, 预测得该基因启动子约在翻译起始密码子上游 204 个碱基位置。

此外, 我们还将 *Taabc2* 氨基酸序列提交至 NCBI Protein Blast 进行在线预测, 预测结果表明 (图 4.4), 其二维结构与 Multidrug resistance protein 1a 和 ABC transporter AT-binding protein 等存在较高的相似性, 其可能的结构域多与 ATP-binding protein、ATP-dependent transporter 等功能相关。

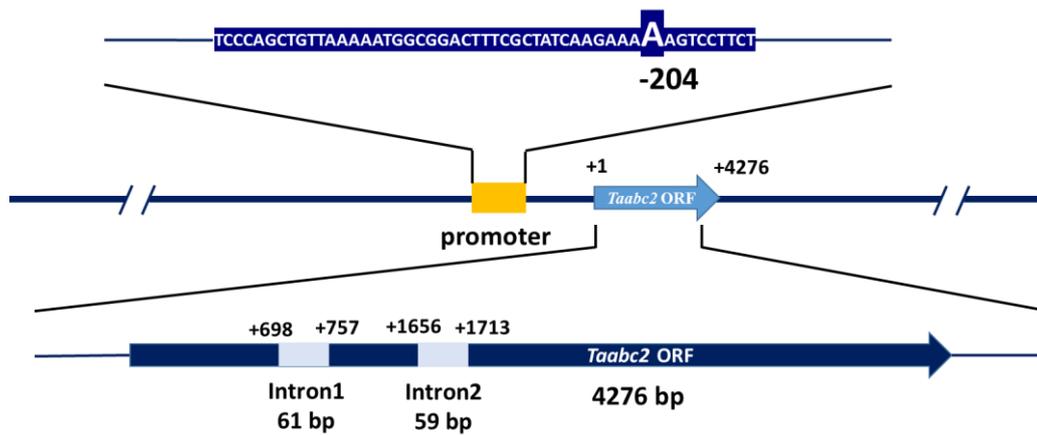


图 4.3 深绿木霉 ABC 转运蛋白 *Taabc2* 基因结构

Fig 4.3 Gene structure of ABC transporter *Taabc2* coding gene in *T.atroviride*.

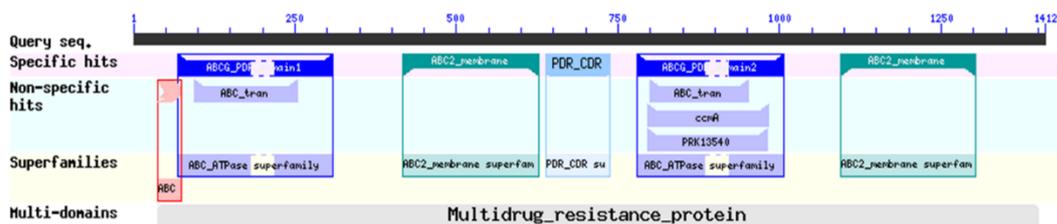


图 4.4 深绿木霉 *Taabc2* 蛋白保守结构比对

Fig 4.4 Putative conserved protein domains of *Taabc2* in *T.atroviride*.

根据 *Taabc2* 基因的测序和比对结果，利用 GENSCAN 预测其编码框及 CDS 并翻译成氨基酸序列，将 *Taabc2* 氨基酸序列提交至 NCBI Protein BLAST，比对其保守结构和序列同源性分析。比对结果表明，深绿木霉的 *Taabc2* 蛋白是一个非常典型的 ABC 超家族转运蛋白，其蛋白质结构中分别含有 2 个 ABC2 跨膜结构域和 2 个 ATP 结合结构域，其功能主要与多效抗药物耐性相关。深绿木霉的 *Taabc2* 蛋白与哈茨木霉的相似性高达 99%，与其他木霉的 ABC 转运蛋白相似也均在 90% 以上。

综合测序、比对和预测结果，*Taabc2* 蛋白在深绿木霉中应该同样具有保守的结构和功能，相关研究表明其在深绿木霉耐药性机理、毒性次级代谢产物转运等方面可能有非常关键的作用，参与木霉菌的重寄生作用。

4.3.3 *Taabc2* 基因启动子区 CRE1 调控区段解析

根据 *Taabc2* 编码基因测序结果以及 NNPP 对其启动子位置的预测，我们检索了 *Taabc2* 编码基因启动子上游 1500bp 内的碱基序列，预测了碳代谢抑制因子 CRE1 的保守结合位点“5'-SYGGRG-3'”，发现在其启动子上游共存在 5 个可能的结合位点，分别位于启动子上游-337, -538, -570, -1098, -1108bp 附近（图 4.

5)。此外，CRE1 蛋白是 Cys2His2 锌指蛋白转录调控因子之一，C2H2 型性质蛋白 DNA 识别位点可以通过已有的模型进行预测，我们通过网上

(<http://compbio.cs.princeton.edu/zf/form.html>) 提交 *Taabc2* 编码基因上游起始区序列预测其可能的 C2H2 型锌指蛋白结合位点，发现在上游起始区中存在 2 个可能的结合位点，即-538 和-570 位点，与特征序列检索结果一致。且分析已有研究对 CRE1 结合位点特征的总结，当同时存在两个相邻的位点时，CRE1 蛋白与 DNA 的结合更为的有效，这表明上述两个模型同时预测到的-538 和-570 位点极有可能是其结合位点所在。

为了确定在上述预测的 5 个位点中 CRE1 蛋白的有效结合位点，设计了体内 *Taabc2* 启动子分段敲除测定报告基因 GUS 表达量和体外 EMSA 实验，进行体内体外双向发掘和验证位点有效性。

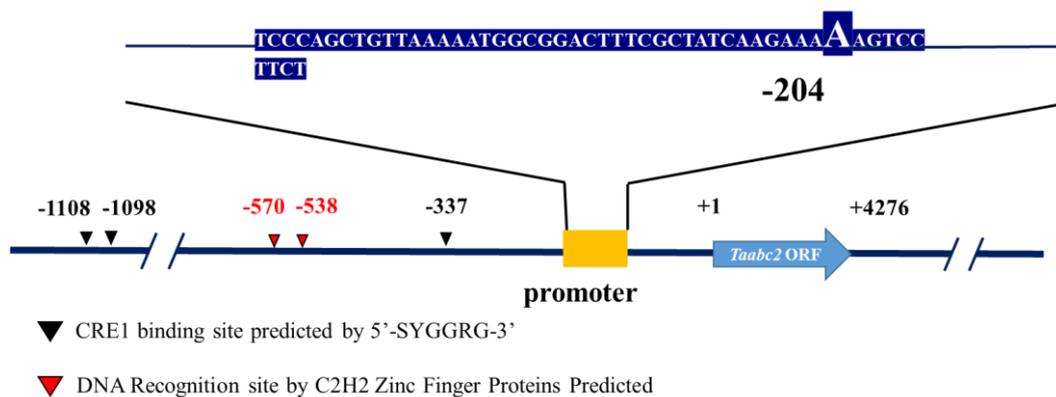


图 4.5 深绿木霉 *Taabc2* 启动子上游 CRE1 结合位点预测

Fig 4.5 Prediction of CRE1 binding sites in the 5'upstream on *Taabc2* promoter.

(1) *Taabc2* 编码基因起始区分段敲除挖掘 CRE1 有效结合位点

CRE1 有效结合位点的发掘主要依靠 *Taabc2* 分段启动子融合 β -葡萄糖苷酸酶基因 (GUS 报告基因) 表达体系的构建，通过在 GUS 编码框前插入包含不同长度的 *Taabc2* 启动子，再连接 *Taabc2* 自身的终止子，构建完整的 GUS 表达框。利用 ATMT 转化技术将表达框导入深绿木霉野生株和突变株，根据野生株和突变株不同片段 GUS 表达的差异，确定 CRE1 结合位点分布片段。根据 CRE1 蛋白可能的结合位点在 *Taabc2* 基因上游起始区的分布位置。

因此，根据 CRE1 蛋白可能的结合位点在 *Taabc2* 基因上游起始区的分布位置，按照引物设计的原则，本研究初步将 *Taabc2* 编码基因起始区分成 4 个部分 (图 4.6)，delA: 不包含任何可能的结合位点；delB: 仅包含-337 位点；delC: 包含-337, -538 及-570 位点；delD: 含有完整的 *Taabc2* 的上游起始区。由于-538 和-570 位点，-1098 和-1108 位点非常靠近，对引物设计和片段扩增造成了一定

的困难, 因此分别将上述 2 个距离相近的位点置于同一个片段中进行体内敲除实验探究, 后期再用 EMSA 等实验技术区分两个位点的效应。

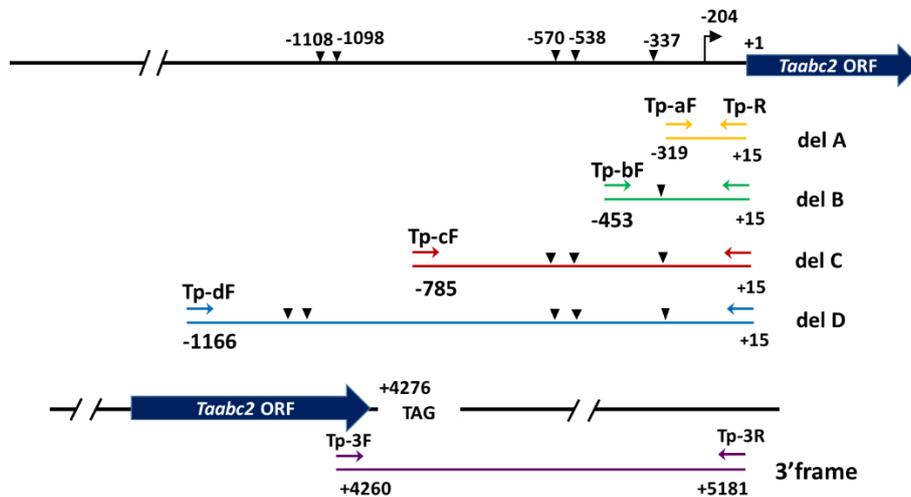


图 4.6 体内 *Taabc2* 启动区分段敲除实验引物设计

Fig 4.6 Primers design for *Taabc2* promoter part-knock out experiment *in vivo*.

按照设计的引物, 以深绿木霉全基因组 DNA 为模板, PCR 扩增上述 4 个 delA,B,C,D 片段、GUS 报告基因开放阅读框及深绿木霉 *Taabc2* 编码基因终止子 (图 4.7), 胶回收纯化上述 6 个片段。由于片段较多, 曾尝试多次酶切酶连及 over-lapping PCR 等试验方法将上述片段导入 pC1300th 和 pC1300kh 质粒中, 但均因效率不高而失败。本研究最终采用了前尘生物科技有限公司的多片段一步法 (快速/无缝) 克隆试剂盒 (Hieff Clone™ Multi One Step Pcr Cloning Kit), 通过在引物两端设计 20bp 重叠序列, 一次将分段启动区 delX、GUS ORF 和 3'frame 一次性与载体 pC1300th 或 pC1300kh 连接 (图 4.8), 转化大肠杆菌, 利用菌落 PCR 验证载体构建正确性。

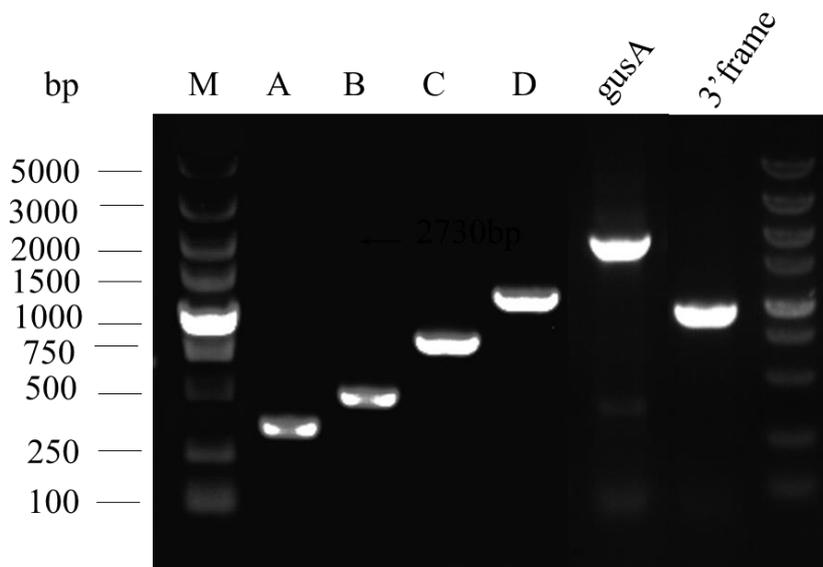


图 4.7 *Taabc2* 编码基因分段起始区、GUS 编码框和终止子 PCR 扩增
泳道 M: DNA Marker 5000; 泳道 A-D: *Taabc2* 分段起始区 delA-D; 泳道 gusA: β -葡萄糖苷酸酶基因 *gusA* 开放阅读框; 泳道 3'frame: *Taabc2* 编码基因终止子
Fig 4.7 PCR amplification for initiator parts, terminator of *Taabc2* coding gene and *gusA* ORF.

Lane M: DNA Marker 5000; Lane A-D: delA-D of *Taabc2* initiator; Lane gusA: β -glucuronidase coding gene open reading frame; Lane 3'frame: terminator of *Taabc2* coding gene.

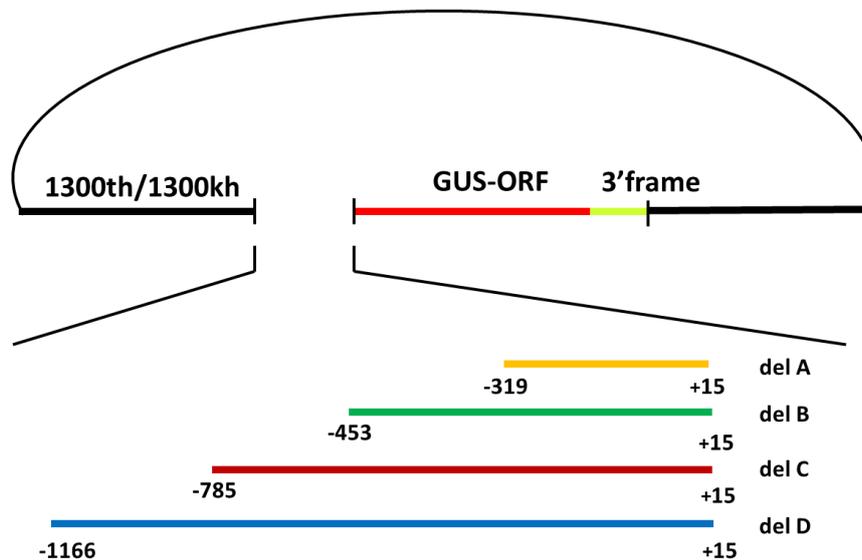


图 4.8 *Taabc2* 分段起始区 delA-D 融合 GUS 报告基因表达载体构建
Fig 4.8 Expression vector construction of *Taabc2* partial initiator delA-D fused with GUS reporter gene.

实验中针对 8 个不同载体和片段连接转化产物，每种载体和片段挑取 4 个阳性克隆，利用跨片段验证引物和片段克隆引物共同进行 PCR 验证，筛选长度正确，片段完整的大肠杆菌。各验证引物位置及片段大小如图 4.10 所示，阳性克隆菌落 PCR 电泳结果如（图 4.9，图 4.11，图 4.12，图 4.13，图 4.14，图 4.15，图 4.16，图 4.17）所示。

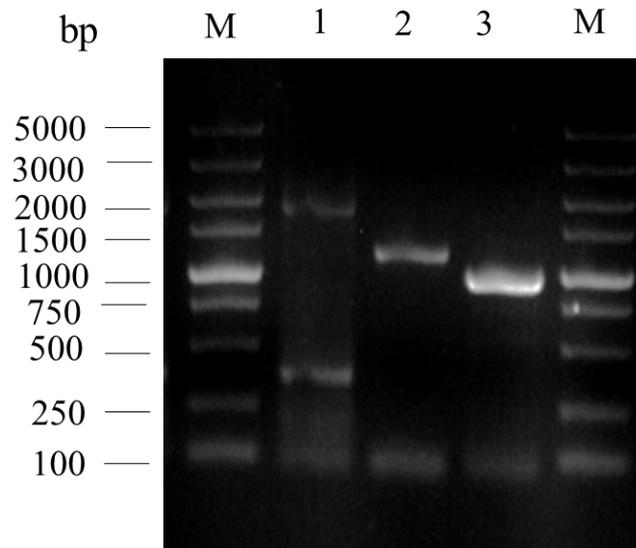


图 4.9 野生株 *Taabc2 delD* 连接 1300th GUS 表达载体 1300th-DG3F PC 验证
泳道 M: DNA Marker 5000; 泳道 1: *gusA* ORF, 约 1806bp; 泳道 2: *Taabc2* 分段起始区 del D, 约 1195bp; 泳道 3: *Taabc2* 终止子 3'frame, 约 965bp.

Fig 4.9 PCR verification for plasmid 1300th-DG3F used in wide type transformation
Lane M: DNA Marker 5000; Lane 1: *gusA*ORF, about 1806bp; Lane 2: *Taabc2* partial initiator delD, about 1195bp; Lane 3: *Taabc2* terminator 3'frame, about 965bp.

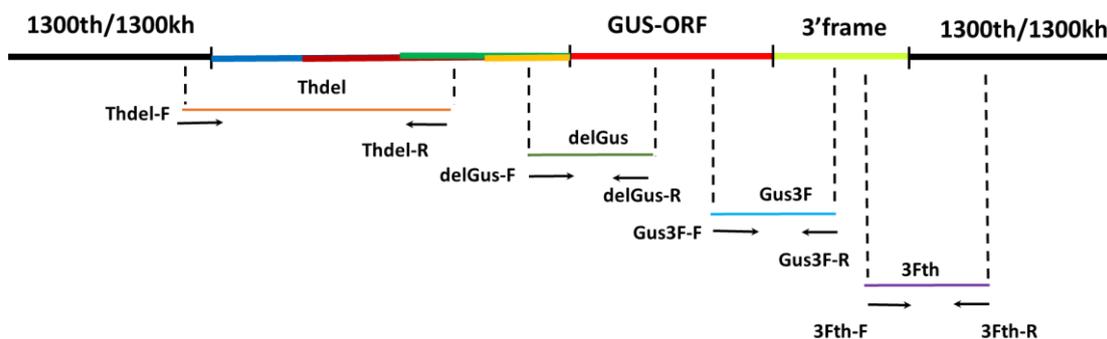


图 4.10 阳性克隆菌落 PCR 验证引物设计原理

Fig 4.10 Design of primers in positive clones PCR amplification.

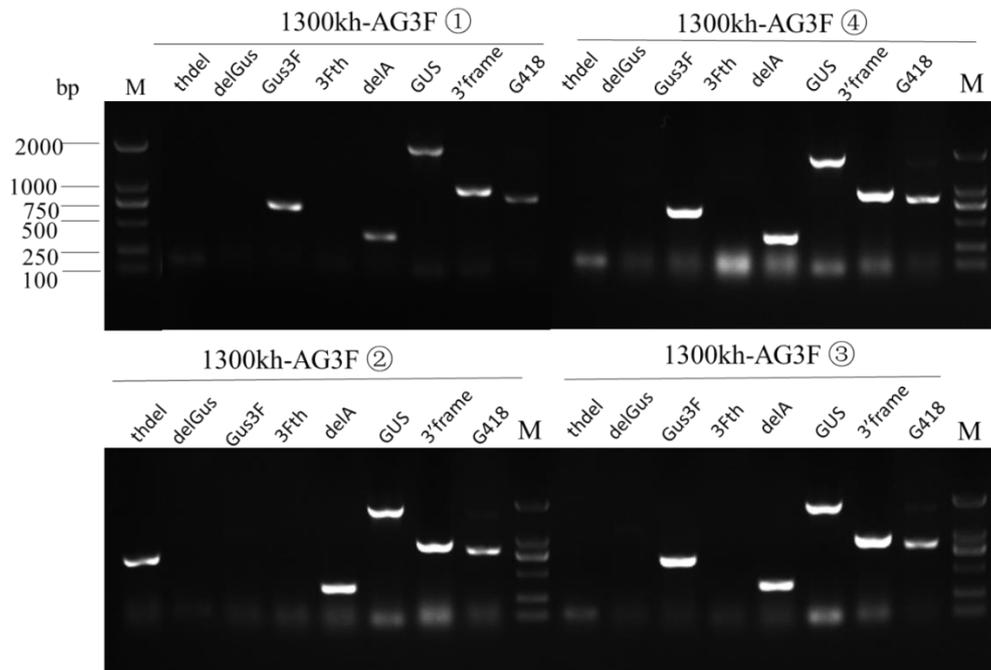


图 4.11 敲除株转化质粒 *delA* 融合 GUS 表达载体 pC1300kh-AG3F 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig 4.11 PCR verifications for *delA*::GUS expression vector pC1300kh-AG3F used in $\Delta cre1$ mutant transformation

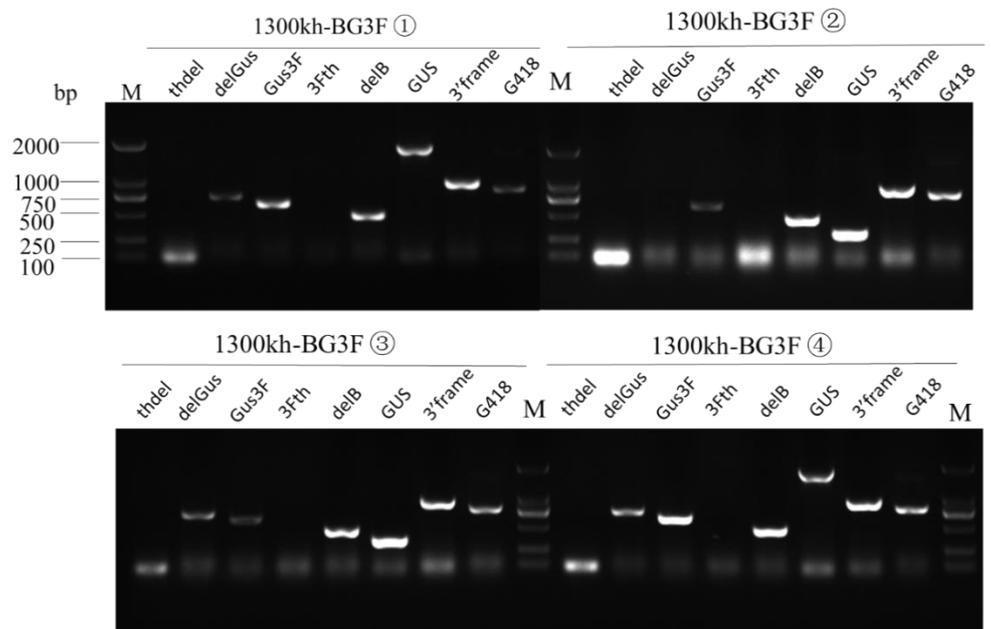


图 4.12 敲除株转化质粒 *delB* 融合 GUS 表达载体 pC1300kh-BG3F 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig 4.12 PCR verifications for *delB*::GUS expression vector pC1300kh-BG3F used in $\Delta cre1$ mutant transformation

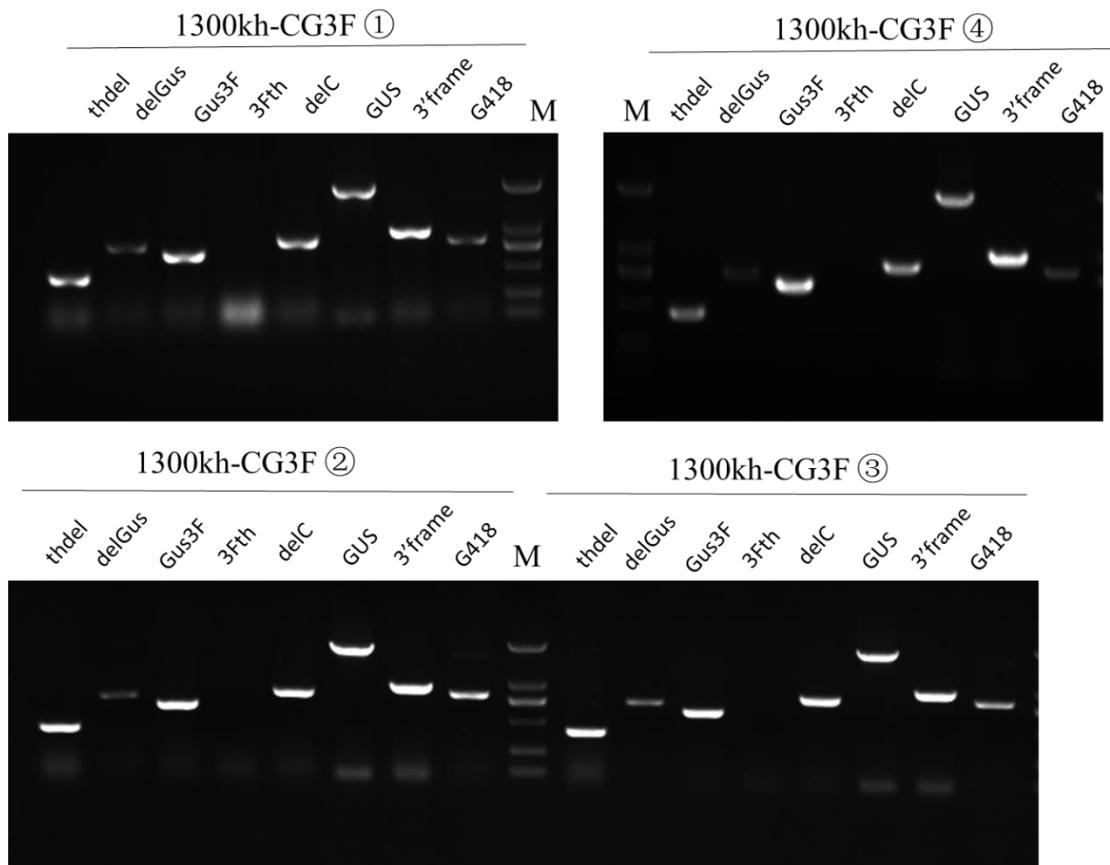


图 4.13 敲除株转化质粒 *delC* 融合 GUS 表达载体 pC1300kh-CG3F 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig 4.13 PCR verifications for *delC*::GUS expression vector pC1300kh-CG3F used in $\Delta cre1$ mutant transformation

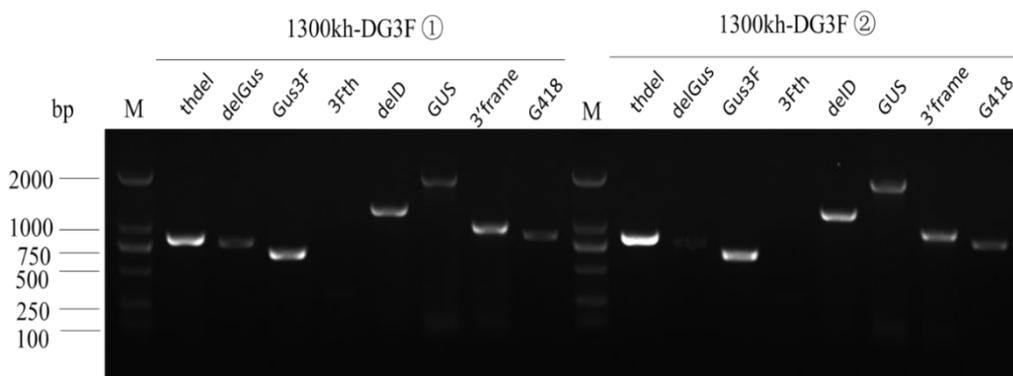


图 4.14 敲除株转化质粒 *delD* 融合 GUS 表达载体 pC1300kh-DG3F 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig 4.14 PCR verifications for *delD*::GUS expression vector pC1300kh-DG3F used in $\Delta cre1$ mutant transformation

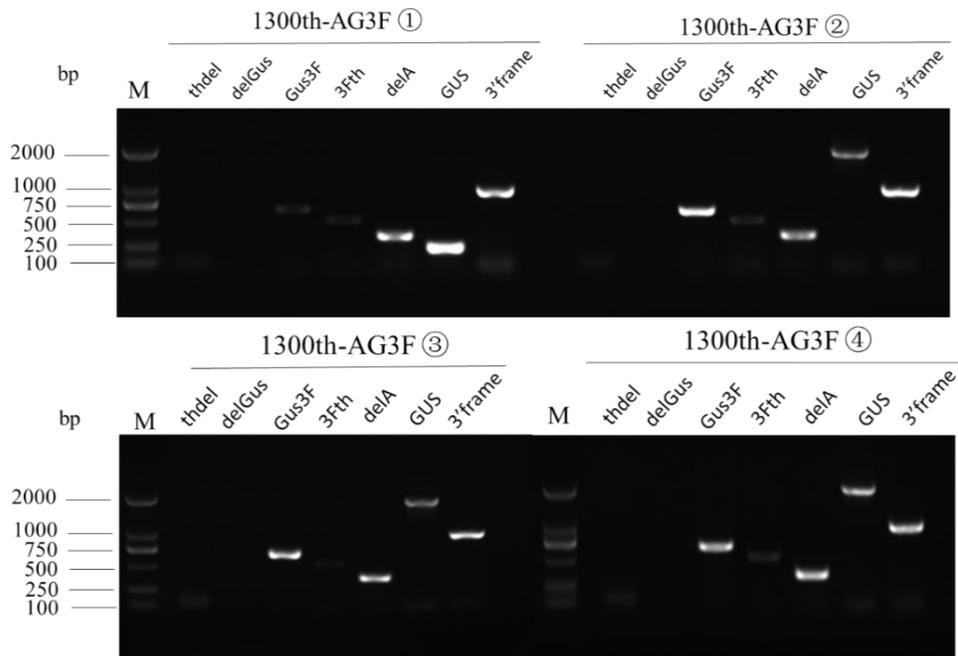


图 4.15 野生株转化质粒 *delA* 融合 GUS 表达载体 pC1300th-AG3F 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig 4.15 PCR verifications for *delA*::GUS expression vector pC1300th-AG3F used in wide type transformation

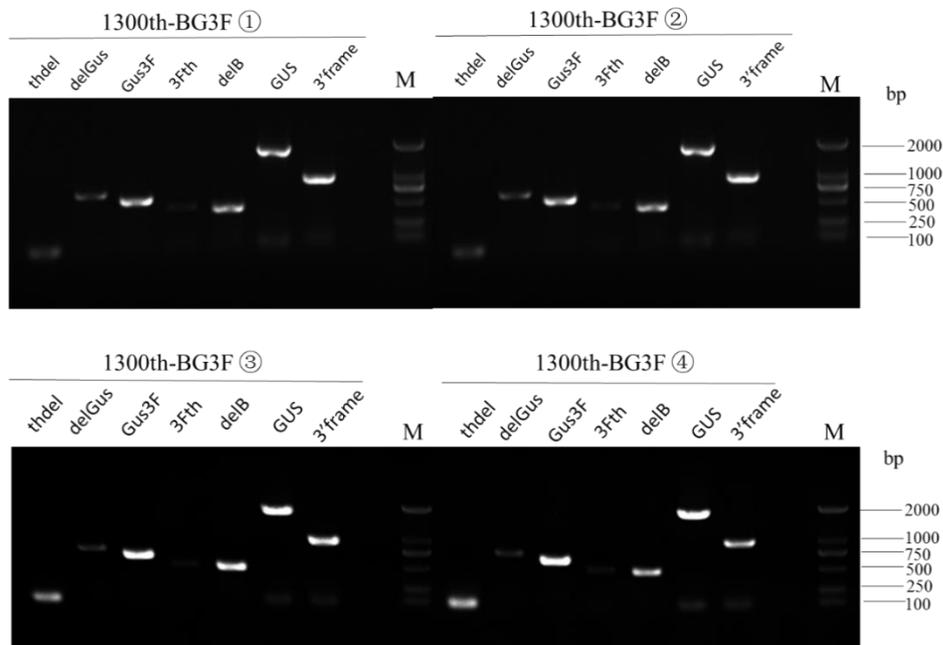


图 4.16 野生株转化质粒 *delB* 融合 GUS 表达载体 pC1300th-BG3F 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig 4.16 PCR verifications for *delB*::GUS expression vector pC1300th-BG3F used in wide type transformation

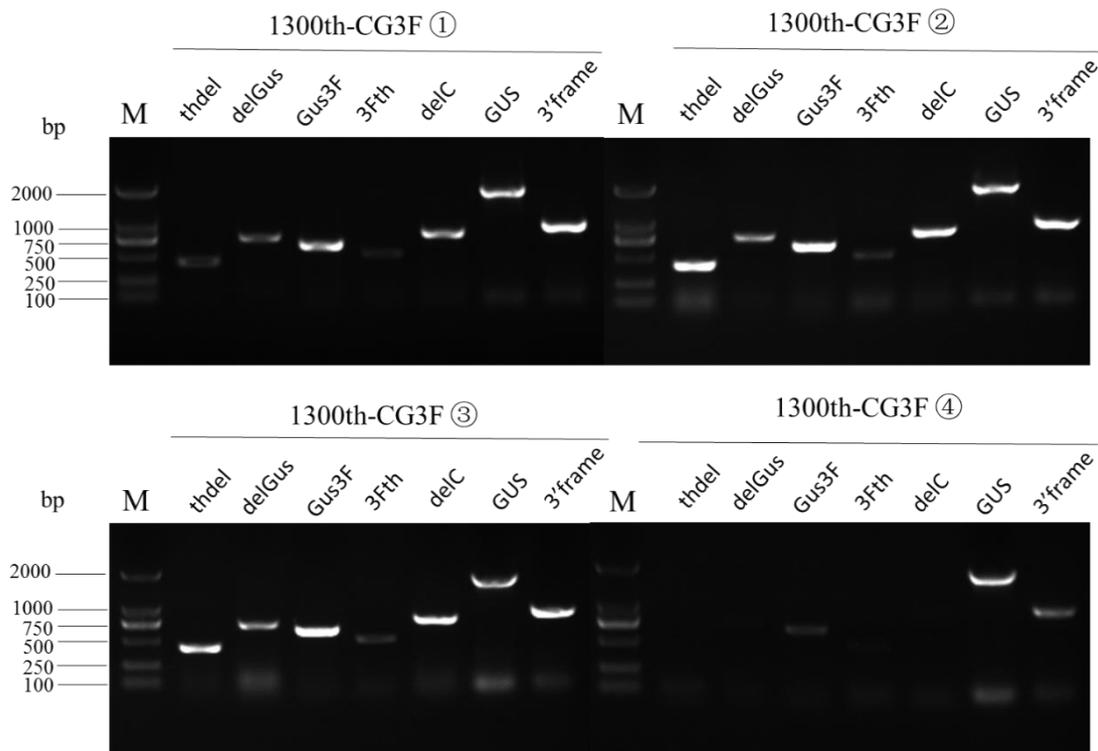


图 4.17 野生株转化质粒 delC 融合 GUS 表达载体 pC1300th-CG3F 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig 4.17 PCR verifications for delC::GUS expression vector pC1300th-CG3F used in wide type transformation

根据电泳结果，挑取了 TA2、TA3、TB3、TB4、TC2、TC3、TD1、KA3、KA4、KB3、KB4、KC2、KC3、KD1、KD2 把个菌株扩大培养，用质粒提取试剂盒提取质粒，将质粒和菌液送往上海生工测序。测序结果表明送样质粒中片段扩增正确连接完整，比对结果 100% 同源。

根据测序结果选择连接无误的载体，转化根癌农杆菌感受态，转化方法如第二章所述。用 PCR 筛选正确的农杆菌阳性克隆，并液体扩大培养。按照改良的 ATMT 转化方法，将 GUS 报告基因表达框分别导入野生株和突变株 $\Delta cre1$ 。将含有待转化质粒的农杆菌分别转化深绿木霉野生株和突变株，共获得近 130 个转化子。

研究对转化子进行了传代培养使其遗传性状稳定，并选择生长较快，产孢健康，生长速度差异较小的 4 个转化子 TA18, TB5, TC14, TD5 进行单孢分离进行转化子纯化。纯化后，与野生株平行对比生长（图 4.18），4 个转化子在生长速度上差异较小，但产孢水平略有差异，TB 气生菌丝发达，孢子颜色较暗沉，而 TC 产孢量大，颜色鲜绿。

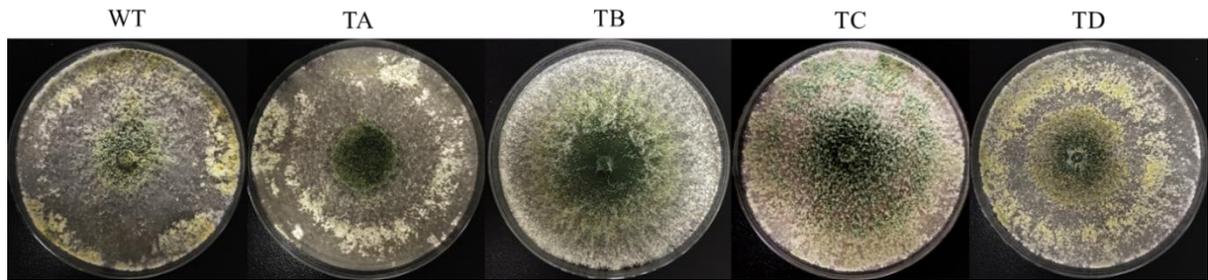


图 4.18 *Taabc2* 分段起始区转化子表型比较

Fig 4.18 The phenotypic comparement on delA-D transformants.

得到相应的转化子后，选择 TA-TD，KA-KD 共 8 个转化子及野生株和突变株进行发酵培养，进行 GUS 活性检测。以野生株为对照，比较不同转化子间 GUS 活性的差异。

首先对用 GUS 提取液提取的总蛋白用天根生化科技有限公司的 Bradford Protein Assay Kit 进行了蛋白定量。测定方法按照说明书所述，绘制的标准曲线如图 4.19 所示。各转化子的蛋白测定结果如表 4.4 所示。8 个转化子及野生株和突变株蛋白提取总量相近，提取结果良好。

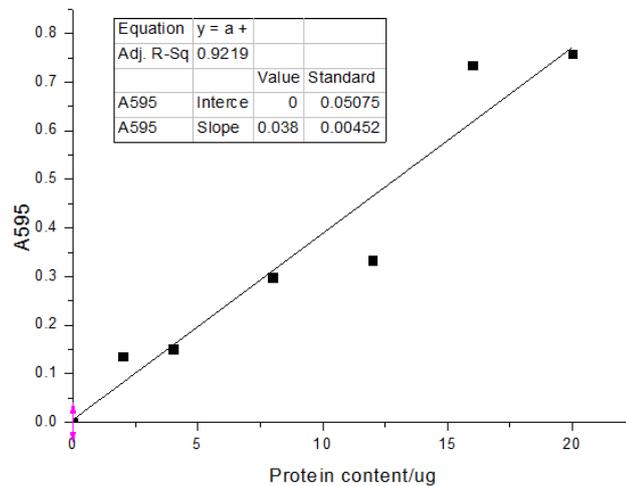


图 4.19 BSA 蛋白标准曲线

Fig 4.19 BSA protein standard curve

表 4.4 野生株及突变株各片段转化子总蛋白含量测定

Table 4.4 Protein content assay of different transformants in wide type and $\Delta cre1$ mutant.

菌株名称	A595	标准曲线	蛋白质量/ug	蛋白浓度/mg ml ⁻¹
WT	0.58	y=A595/0.0387	15.04	1.00
TA	0.56		14.40	0.96
TB	0.75		19.47	1.30
TC	0.66		17.09	1.14
TD	0.77		19.97	1.33
$\Delta cre1$	0.60		15.58	1.04
KA	0.56		14.52	0.97
KB	0.58		15.09	1.01
KC	0.65		16.87	1.12
KD	0.64		16.49	1.10

表 4.5 转化子 GUS 活性检测
Table 4.5 GUS activity assay of transfrmants

菌株名称	<i>Taabc2</i> 启动子区段	CRE1 蛋白	GUS 编码框	蛋白浓度 /mg ml ⁻¹	总蛋白含量 ^a /μg	荧光强度(average) ^b					单位时间荧光强度变化/k ^c	GUS 活性 ^d
						0min	15min	30min	45min	60min		
WT	/	+	-	1.00	20.05	21.30	35.13	53.13	66.13	78.13	1.45	0.00
TA	delA	+	+	0.96	19.20	17.13	31.13	59.13	69.47	87.13	1.57	1.54
TB	delB	+	+	1.30	25.97	22.13	57.13	128.80	157.13	209.13	3.61	82.13
TC	delC	+	+	1.14	22.78	21.93	66.47	147.80	197.47	254.80	4.39	124.90
TD	delD	+	+	1.33	26.63	25.47	82.47	170.13	231.13	333.47	4.98	129.08
<i>Δcre1</i>	/	-	-	1.04	20.78	20.32	28.75	47.55	75.56	87.11	1.55	0.00
KA	delA	-	+	0.97	19.36	17.86	41.13	65.13	76.47	88.53	1.68	6.42
KB	delB	-	+	1.01	20.12	20.90	48.96	106.77	140.57	193.33	3.24	83.78
KC	delC	-	+	1.12	22.50	23.53	85.37	156.80	247.47	344.80	5.60	179.93
KD	delD	-	+	1.10	21.98	21.37	92.43	170.83	251.75	353.97	5.79	192.72

a: 根据 GUS 活性测定方法, 每个时间点取样的反应液中含有 20μl 的蛋白提取液, 因此总蛋白含量为蛋白浓度与 20μl 的乘积; b: 每个菌株均做 3 个重复, 各时间的荧光强度为 3 个重复的平均值减去空白对照后的数值, 原始数据详见附录; c: 单位时间内的荧光强度变化为各个时间点荧光强度值对时间作图, 以截距为 0, 线性拟合所得的斜率 k 即为单位时间荧光强度变化值; d: GUS 活性, 即单位质量的蛋白单位时间内荧光强度变化, 斜率 k 与总蛋白含量的商*1000, 其中由于野生株和突变株内不存在 GUS 编码框, 其荧光强度的变化为其他蛋白引起, 应此为空白对照, 将转化子的 k 减去野生株或突变株的 k 即为由 GUS 蛋白引起的荧光强度变化。

从含有各个片段的不同转化子的 GUS 测定结果可以看出，野生株和突变株在短片段的 delA，delB 启动子的 GUS 活性相近，delA 由于片段仅包含 200bp 左右的启动子，缺乏转录起始因子，导致 GUS 的转录水平低，从而 GUS 活性很低；而 delB 较 delA 含有更长的启动子，GUS 活性较高，KB 与 TB 的活性测定相近，KB 略高，这表明预测的保守结合位点 337 位点对其表达的影响相对较小。GUS 活性的转折出现在 delC 片段中，TC、KC 的活性明显高于 TB、KB，表明 delC 片段包含对 *Taabc2* 基因转录的重要位点，当这些位点缺失，导致 delB 的转化子不论在野生株还是突变株中均处于一个较低的表达水平。而 delD 和 delC 的活性水平相近，说明 delC 已经包含了大部分 *Taabc2* 大部分的启动子。在 delC 和 delD 中 KC，KD 的活性水平均明显高于 TC，TD，这个现象证实了碳代谢抑制因子 CRE1 对 *Taabc2* 表达的抑制作用，通过与 *Taabc2* 启动子的互作，直接抑制 *Taabc2* 编码基因的转录。而 CRE1 的结合位点则存在于翻译起始位点上游第 -454 个碱基至第 -785 个碱基之间，极有可能是我们预测到的 -538 位点或 -570 位点，甚至是两个位点同时结合。

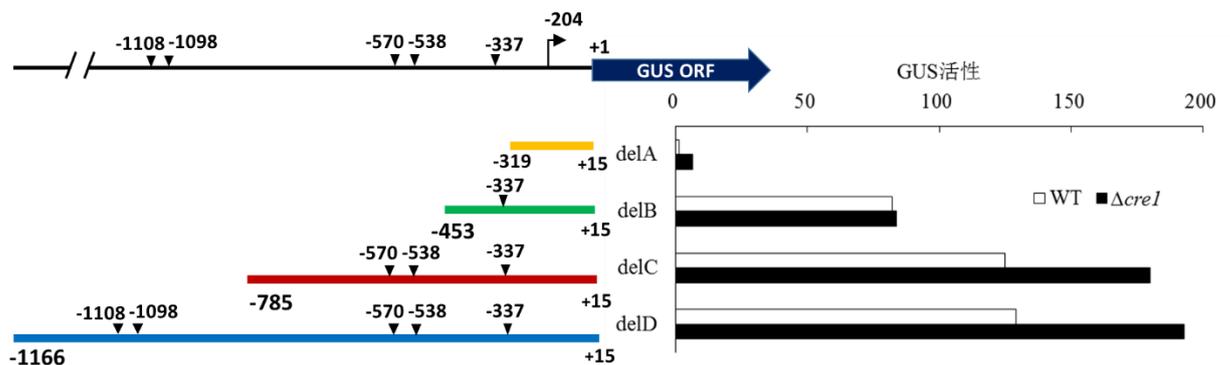


图 4.20 不同片段启动子 GUS 活性分析

Fig 4.20 GUS activity analysis of different parts of promoter

根据 GUS 测定结果，初步确定了 *Taabc2* 上游起始区中碳代谢抑制因子 CRE1 结合调控区段，位于翻译起始位点上游 -454bp 至 -785bp 区段中，预测的 -538 位点和 -570 位点均有可能是精确的结合位点。

4.3.4 CRE1 调控 *Taabc2* 基因网络预测

通过构建 *Taabc2* 分段启动子融合 GUS 报告基因表达载体分别转化野生株和突变株，根据不同片段转化子 GUS 活性的比较确定了 CRE1 的结合区段。综合 qRT-PCR 和 GUS 测定结果，结合已有文献报道，将 CRE1 调控 *Taabc2* 编码基因

表达的可能途径总结如下：环境中的信号因子通过细胞膜表面的受体引起细胞体内一系列信号传导反应，影响碳代谢抑制因子 CRE1 的转录与表达；而 CRE1 蛋白表达后将通过磷酸化、脱泛素化等一系列过程渐渐与转运蛋白 *Taabc2* 编码基因上游起始区结合，可能通过与激活子竞争结合位点等过程抑制 RNA 聚合酶复合物起始 *Taabc2* 的转录过程，下调其 mRNA 水平，减少 *Taabc2* 蛋白的翻译。细胞膜上 *Taabc2* 蛋白的减少将影响木霉菌次级代谢产物的内外转运，影响其生防过程，可能抑制了木霉菌的生防效果。

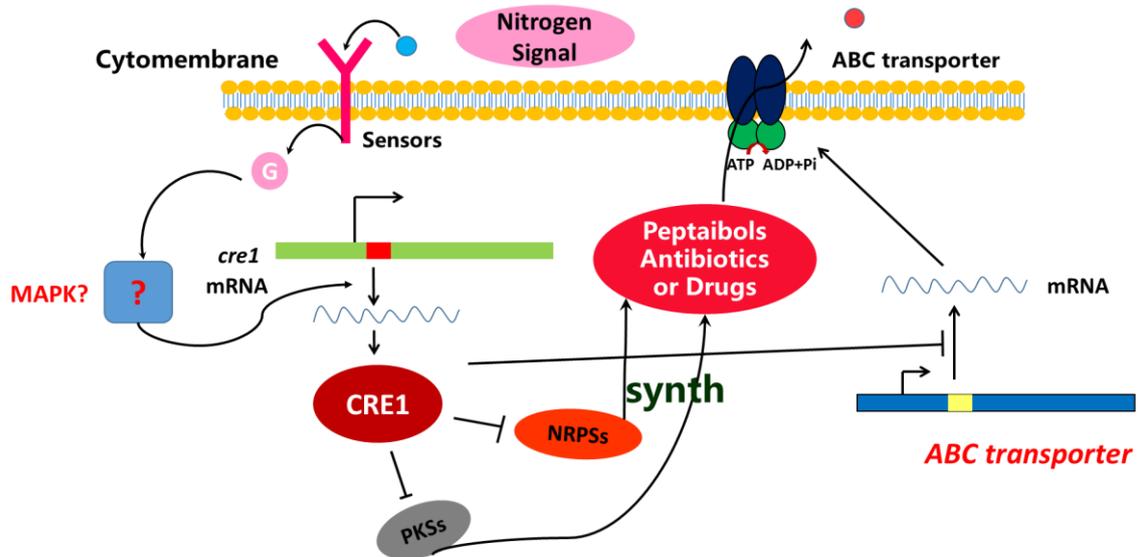


图 4.21 碳代谢抑制因子 CRE1 对转录蛋白 *Taabc2* 表达调控

Fig 4.21 The regulation mechanism of CRE1 on *Taabc2* transcription.

4.4 讨论与小结

本章深入探究了 CRE1 对木霉菌 ABC 转运蛋白 *Taabc2* 的表达机制。通过预测 *Taabc2* 编码基因启动子区 CRE1 的保守结合基序“5'-SYGGRG-3'”，再根据预测位点的分布将启动子分成 4 个区段，融合 GUS 报告基因构建一个完整的 GUS 报告系统导入深绿木霉菌野生株和突变株体内，用 GUS 活性变化表征 *Taabc2* 分段启动子的活性，从而确定 CRE1 蛋白具体调控的区段。经过一系列个载体构建和转化子获取，最终确定 CRE1 的结合位点可能位于 *Taabc2* 翻译起始位点上游-454bp 至-785bp 之间。该区段中含有 2 个相邻的预测位点。

关于碳代谢抑制对木霉菌转运蛋白的表达调控作用，目前还没有相关文献报道。本研究选择的 8 个 ABC 转运蛋白（注释详见附录），多与多效耐药性相关，负责向内或向外运输细胞毒性物质，在木霉菌与病原菌的“生化战”中发挥重要作用。根据 qRT-PCR 测定结果，除了对 ABC1 与 ABC6 存在小幅的转录诱导，

对其他备选的 6 个 ABC 转运蛋白均表现为转录下调。CRE1 对木霉菌转运蛋白的调控也存在着多效性,并不是一致的诱导或抑制,这对木霉菌适应不同的环境,根据环境需求通过有效调节转运蛋白的合成来调控代谢产物的内外运输有着非常重要的作用。

此外,本研究通过体内 GUS 活性的检测将 *Taabc2* 启动子分成 4 个片段,分析其活性,确定 CRE1 蛋白作用的区段。但实验结果仅确定了 CRE1 蛋白的结合区段,还没有直接证据证明 CRE1 与该区段的结合,以及具体的结合位点等。因此,后续还需要将片段进一步细化,或设计一些列探针通过凝胶电泳阻滞实验确定其明确的结合位点,分析其分子调控途径。

第五章 结论与展望

5.1 结论

深绿木霉作为重要生防菌株，其有效的拮抗植物病原菌的特性使其在木霉生防菌剂中应用越来越为广泛。而随着碳代谢抑制机制研究的深入，除了其在工业产酶菌株中对细胞壁降解酶等的转录调控作用，其在生防领域的研究亦逐步开展。本研究将目光集中于碳代谢抑制机制对深绿木霉生防抗菌代谢产物的表达调控以及对多效耐药性 ABC 转运蛋白的调控机制方面，得出的结论如下：

(1) 通过 ATMT 转化技术成功构建了深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 敲除突变株，发现 *cre1* 基因与深绿木霉的生长和产孢有关。*cre1* 基因敲除后，突变株较野生株菌丝生长变慢，产孢明显滞后。且 CRE1 对生长和产孢的调控与培养基中氮源和碳源的条件有关。

(2) 碳代谢抑制因子 CRE1 作为碳源利用的全局性调控因子，对木霉菌细胞壁降解酶、抗菌次级代谢产物合成酶类 NRPSs,PKSs 等存在调控作用。CRE1 抑制了几丁质酶、葡聚糖酶编码基因的转录从而降低了其酶活水平，同时还抑制了纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶等酶的活性。但是，CRE1 对 NRPS 合成基因簇和 PKS 基因簇各个重要基因的转录调控存在不同的调控模式，对部分基因存在转录上调，也有被转录下调的基因，也可能存在不受 CRE1 调控的组分，对抗菌肽、聚酮化合物合成过程存在复杂的调控影响。碳代谢抑制基因对深绿木霉生防效应分子的表达和合成存在一个复杂的调控网络。

(3) 木霉菌重寄生的过程中会产生大量的抗菌物质，而其自身则受这些物质的影响较小，归功于其发达的细胞膜转运蛋白系统，特别是多效耐药性 ABC 转运蛋白。本研究证实碳代谢抑制因子 CRE1 对转运蛋白 Taabc2 的表达存在直接抑制作用，CRE1 通过与 Taabc2 编码基因启动子结合下调了 Taabc2 的表达水平，将对抗菌代谢产物转运和木霉菌耐药性等方面产生影响。

深绿木霉的碳代谢抑制因子通过调控木霉菌的生长和代谢，影响细胞壁降解酶、抗菌肽、聚酮化合物、耐药性转运蛋白等生防功能因子的表达与合成，对深绿木霉的生防效益存在复杂而关键的调控机制，本研究的成果对今后有目的的控制木霉菌生防相关次级代谢产物的合成和分泌，提高木霉菌生防效果具有重要意义。

5.2 本研究特色与创新点

木霉菌是国际上广泛应用的生防菌，通过竞争、重寄生、抗生作用抑制多种植物病原菌活性，国际上已登记50多种木霉菌剂作为生物农药或肥料，具有广泛的市场前景。本实验近几年在优良拮抗木霉菌资源的筛选、木霉菌抗逆性机制和木霉菌剂的研发、产业化应用方面做了大量工作。而关于深绿木霉碳代谢抑制因子 CRE1 调控生防相关代谢物合成基因表达以及和 ABC 转运系统互作的分子机理方面研究未有报道，此项研究在国内外尚属首次，其创新性在于：

- (1) 明确碳代谢抑制因子 CRE1 全局性调控木霉菌生防特性
- (2) 明确 CRE1 调控 *Taabc2* 基因表达的关键的调控区域，CRE1 的结合位点可能位于 *Taabc2* 翻译起始位点上游 -454bp 至 -785bp 之间。
- (3) 绘制了 CRE1 调控细胞壁降解酶，次级代谢产物合酶以及 ABC 转运蛋白相关的调控网络，为进一步阐明 CRE1 全局性调控木霉菌生防代谢奠定基础。

5.3 研究展望

本研究确定深绿木霉菌 T23 中碳代谢抑制因子 *cre1* 参与 ABC 转运蛋白 *Taabc2* 基因调控方式，探明 *cre1* 通过调控 *Taabc2* 启动子特定区域影响 ABC 转运蛋白的转运效率，寻找 CRE1 蛋白可能的结合位点及分析序列特征，揭示木霉菌中 *cre1* 和 ABC 转运蛋白互作的分子机制，为 CRE1 全局性调控网络构建增加新的调控路径。因此，碳代谢抑制因子 CRE1 具有调控细胞壁降解酶、次级代谢产物合成酶以及转运蛋白运输等多效性的功能，尤其在木霉菌次级代谢产物合成及其运输方面的研究报道较少，本研究只是揭开了冰山的一角，关于 CRE1 如何调控 NRPSs、PKSs 中不同的结构单元，以及 CRE1 和 *Taabc2* 直接结合的证据，以及 CRE1 结合精确位点都需要未来进一步分析，完善以 CRE1 为核心的木霉菌生防因子调控的图谱。

参考文献

- [1] 张素琴, 郡永琦. 绿色木霉菌产生纤维素酶的研究[J]. 应用与环境生物学报. 2000, 21(10): 24-25.
- [2] 邵力平. 真菌分类学[M]. 中国林业出版社, 1983: 315.
- [3] 宋漳. 绿色木霉对土传病原真菌的体外拮抗作用[J]. 福建林学院学报. 2002, 22(3): 219-222.
- [4] 陶刚. 木霉几丁质酶对烟草赤星病菌的作用[J]. 中国生物防治. 2004, 20(4): 252-255.
- [5] Druzhinina I S, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success[J]. Nature Reviews Microbiology. 2011, 9(10): 749-759.
- [6] Bertagnolli L D. Antimycotic compounds from the plant pathogen *Rhizoctonia solani* and its antagonist *Trichoderma harzianum*[J]. Phytochem. 1998(146): 131-135.
- [7] Mukherjee P K, Horwitz B A, Kenerley C, et al. MSecondary metabolism in *Trichoderma*-a genomic perspective[J]. Microbiology. 2012(158): 34-45.
- [8] Ilmen M, Onnela M L, Klemsdal S, et al. Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS) /NRPS hybrid enzyme involved in induced systemic resistance response in maize[J]. Microbiology. 2012(158): 155-165.
- [9] Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients[J]. Nature Reviews Microbiology. 2008, 6(8): 613-624.
- [10] Felenbok B, Flipphi M, Nikolaev I, et al. Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation[J]. Progress in nucleic acid research and molecular biology. 2001, 69: 149.
- [11] Flipphi M, van de Vondervoort P, Ruijter G, et al. Onset of Carbon Catabolite Repression in *Aspergillus nidulans*[J]. Journal of Biological Chemistry. 2003, 278(14): 11849.
- [12] Pamela K, Foreman D, Nigel S, et al. Expression patterns of 10 hemicellulase genes from filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources.[J]. The Journal of Biological Chemistry. 2003, 278(34): 31988-31997.
- [13] Ilmén M, Saloheimo A, Onnela M L, et al. Regulation of cellulase gene

expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Applied and Environmental Microbiology. 1997, 63(4): 1298-1306.

[14] Graaff D L H, Gielkens M, Visser J, et al. Arabinoxylan degradation by fungi: characterization of the arabinoxylan-arabinofuranohydrolase encoding genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*[J]. Current Genetics. 1997, 31(1): 22-29.

[15] Ruijter G J, Vanhanen S A, Gielkens M M, et al. Isolation of *Aspergillus niger* creA mutants and effects of the mutations on expression of arabinases and L-arabinose catabolic enzyme[J]. Microbiology. 1997, 143: 2991-2998.

[16] Gielkens M, Gonzalez-Candelas L, Sanchez-Torres P, et al. The *abfB* gene encoding the major {alpha}-L-arabinofuranosidase of *Aspergillus nidulans*: nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strain[Z]. 1999: 145, 735.

[17] Pinaga F, Fernandez-Espinar M T, Valles S, et al. Xylanase production in *Aspergillus nidulans*: induction and carbon catabolite repression.[J]. FEMS Microbiol. Lett. 1994, 115: 319-342.

[18] Kumar S, Ramon D. Purification and regulation of the synthesis of a β -xylosidase from *Aspergillus nidulans* [J]. FEMS Microbiol Lett. 1996, 135: 287-293.

[19] Bussink H, Buxton F P, Visser J, et al. Expression and sequence comparison of the *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* genes encoding polygalacturonase II[J]. Current Genetics. 1991, 19(6): 467-474.

[20] Ilme'N M, Thrane C, Penttila" M, et al. The glucose repressor gene creI of *Trichoderma*: Isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form[J]. Mol Gen Genet. 1996(251): 451-460.

[21] Broda P, Birch P R, Brooks P R, et al. PCR-mediated analysis of lignocellulolytic gene transcription by *Phanerochaete chrysosporium*: substrate-dependent differential expression within gene families[J]. Applied and Environmental Microbiology. 1995, 61(6): 2358-2364.

[22] Stapleton P C, Dobson. Carbon repression of cellobiose dehydrogenase production in the white rot fungus *Trametes versicolor* is mediated at the level of gene transcription [J]. FEMS Microbiology Letters. 2003, 221(2): 167-172.

[23] Cubero B, Scazzocchio C. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CRE1-mediated carbon catabolite repression in the

- proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*[J]. EMBO J. 1994, 13(2): 407-415.
- [24] Espeso E A, Penalva M A. In vitro binding of the two-finger repressor CreA to several consensus and nonconsensus sites at the *ipnA* upstream region is context dependent[J]. FEBS Lett. 1994(342): 43-48.
- [25] Kulmburg P, Mathieu M, Dowzer C, et al. Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*[J]. Mol. Microbiol. 1993, 7: 847-857.
- [26] Mach R L, Strauss J, Zeilinger S, et al. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xynI*) gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. Molecular microbiology. 1996, 21(6): 1273.
- [27] Orejas M, Maccabe A P, Pérez González J A, et al. Carbon catabolite repression of the *Aspergillus nidulans xlnA* gene[J]. Molecular Microbiology. 1999, 31(1): 177-184.
- [28] Ilmen M, Onnela M L, Klemsdal S, et al. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Mol Gen Genet. 1998, 257(3): 386.
- [29] de Graaff L H, van den Broeck H C, van Ooijen A J, et al. Regulation of the xylanase-encoding *xlnA* gene of *Aspergillus tubigenensis*[J]. Molecular microbiology. 1994, 12(3): 479.
- [30] Zeilinger S, Schmoll M, Pail M, et al. Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter *cbh2* associated with cellulase induction[J]. Molecular Genetics and Genomics. 2003, 270(1): 46-55.
- [31] Cziferszky A, Seiboth B, Kubicek C P, et al. The Snf1 kinase of the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* phosphorylates regulation-relevant serine residues in the yeast carbon catabolite repressor Mig1 but not in the filamentous fungal counterpart Cre1[J]. Fungal Genetics and Biology. 2003, 40(2): 166-175.
- [32] Meggio F, Pinna L. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?[J]. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2003, 17(3): 349-368.
- [33] Vautard-Mey G, Cotton P, Fèvre M, et al. Expression and compartmentation of the glucose repressor CRE1 from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. European journal of biochemistry / FEBS. 1999, 266(1): 252.
- [34] Vautard-Mey, G éraldine, Fèvre M, et al. Mutation of a putative AMPK phosphorylation site abolishes the repressor activity but not the nuclear targeting of

- the fungal glucose regulator CRE1[J]. *Current Genetics*. 2000, 37(5): 328-332.
- [35] Strauss J, Horvath H K, Abdallah B M, et al. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post - transcriptional level[J]. *Molecular Microbiology*. 1999, 32(1): 169-178.
- [36] Tudzynski B, Liu S, Kelly J M, et al. Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea creA* genes[J]. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, 184(1): 9-15.
- [37] Margarita Orejas A, Sudeep Kumar A. The Wide-Domain Carbon Catabolite Repressor CreA Indirectly Controls Expression of the *Aspergillus nidulans xlnB* Gene, Encoding the Acidic Endo-b-(1,4)-Xylanase X24[J]. *Journal of Bacteriology*. 2001, 183(5): 1517-1523.
- [38] P. De Vries R, Visser J, de Graaff L H, et al. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation[J]. *Research in Microbiology*. 1999, 150(4): 281-285.
- [39] Vankuyk P A, Diderich J A, Maccabe A P, et al. *Aspergillus niger mstA* encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH[J]. *The Biochemical journal*. 2004, 379(Pt 2): 375-383.
- [40] Maccabe A P, Miro P, Ventura L, et al. Glucose uptake in germinating *Aspergillus nidulans* conidia: involvement of the *creA* and *sorA* genes[J]. *Microbiology*. 2003, 149(8): 2129-2136.
- [41] Hynes M, Kelly J. Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* altered in carbon metabolism[J]. *Molecular & general genetics : MGG*. 1977, 150(2): 193.
- [42] Todd R B, Lockington R A, Kelly J M, et al. The *Aspergillus nidulans creC* gene involved in carbon catabolite repression encodes a WD40 repeat protein[J]. *Molecular & general genetics : MGG*. 2000, 263(4): 561-570.
- [43] Lockington, Robin A, Kelly J, et al. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination[J]. *Molecular Microbiology*. 2001, 40(6): 1311-1321.
- [44] Salghetti S E, Caudy A A, Chenoweth J G, et al. Regulation of Transcriptional Activation Domain Function by Ubiquitin[J]. *Science*. 2001, 293(5535): 1651-1653.
- [45] Lockington, Robin A, Kelly J, et al. The WD40 - repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB *in vivo* in *Aspergillus nidulans*[J]. *Molecular Microbiology*. 2002, 43(5): 1173-1182.
- [46] Portnoy T, Margeot A, Linke R, et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of

the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation[J]. BMC Genomics. 2011, 12: 269.

[47] Schuster, André Schmoll Monika, et al. Biology and biotechnology of *Trichoderma*[J]. Appl Microbiol Biotechnol. 2010, 87(3): 787-799.

[48] Benitez T, Rincon A M, Limon M C, et al. Limon M.C. and Codon A.C., Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains[J]. Int Microbiol. 2004(7): 249-260.

[49] Harman G E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp[J]. Phytopathology. 2006(96): 190-194.

[50] Harman G E, Howell C R, Viterbo A, et al. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. Nat Rev Microbiol. 2004(2): 43-56.

[51] Mukherjee P K, Horwitz B A, Kenerley C M, et al. Secondary metabolism in *Trichoderma* - A genomic perspective[J]. Microbiology. 2012(158): 35-45.

[52] 李国田, 杨合同, 周红姿等. 根癌农杆菌介导的木霉插入转化及其应用[J]. 山东科学. 2006(06): 24-30.

[53] 金欣, 夏黎明. 厌氧真菌内切- β -葡聚糖酶基因在里氏木霉中的重组与表达[J]. 高校化学工程学报. 2011(04): 637-642.

[54] Antoni \hat{e} to A C, Dos Santos Castro L, Silva-Rocha R, et al. Defining the genome-wide role of CRE1 during carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* using RNA-Seq analysis[J]. Fungal Genetics and Biology. 2014, 73: 93-103.

[55] 孙瑞艳. 中国南方地区木霉菌资源收集、鉴定与生防功能评价研究[D]. 上海交通大学, 2013.

[56] 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.

[57] 杨凯睿, 高向东, 顾觉奋等. 聚酮合成酶应用研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册). 2012(03): 99-103.

[58] Takashima S, Iikura H, Nakamura A, et al. Analysis of Cre1 binding sites in the *Trichoderma reesei cbh1* upstream region[J]. FEMS Microbiology Letters. 1996, 145(3): 361-366.

[59] Robert L Mach, Joseph Strauss, Susanne Zeilinger, et al. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xynI*) gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. Molecular Microbiology. 1996, 6(21).

[60] W \ddot{u} rlleitner E, Pera L, Wacenovskyy C, et al. Transcriptional Regulation of *xyn2* in *Hypocrea jecorina*[J]. Eukaryotic Cell. 2003, 2(1): 150-158.

[61] Mach R L, Strauss S J, Zeilinger, et al. Carbon catabolite repression of xylanase I

(*xynI*) gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. Molecular microbiology. 1996, 21(6): 1273-1281.

[62] Lorito M, Mach R L, Sposato P, et al. Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93(25): 14868-14872.

[63] Ruocco M, Lanzuise S, Vinale F, et al. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi[J]. Mol Plant Microbe Interact. 2009, 22(3): 291-301.

[64] Locher K P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2009, 364(1514): 239-245.

[65] 王继红, 李西川, 蒋伶活等. 酵母细胞中ABC转运蛋白的分类和功能[J]. 细胞生物学杂志. 2009(04): 491-496.

[66] Bundock P. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. EMBO J. 1995(14): 3206-3208.

[67] Marcel J, de Groot, Bundock P, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of filamentous fungi[J]. Nature Biotechnology. 1998(16): 839-842.

[68] 黄亚丽. 农杆菌介导哈茨木霉转化系统优化及突变体分析[D]. 2008.

[69] Caroline B, Michielse, Paul J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. Curr Genet. 2005(48): 1-17.

[70] 黄亚丽, 潘玮, 蒋细良等. 根癌农杆菌介导丝状真菌遗传转化的研究进展[J]. 生物技术通报. 2007(3): 111-114.

[71] Wang J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*[J]. Zhejiang Univ SciB. 2008, 10(9): 823-828.

[72] Huang Y, Yang H, Chen K, et al. Modification of *Trichoderma viride* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation.[J]. Shandong Science. 2005(18): 30-35.

附录

1、本研究中涉及的 8 个 ABC 转运蛋白的基因 ID 及基因组注释

Name	type	gene ID	Annotations
ABC1	Pdr1	jgi.Triat2.230310.estExt_G enewise1Plus.C_contig_28 0396	Hypothetical half-sized ABC transporter, predicted half-sized PDR topology of transmembrane domains and nucleotide binding folds: NBF-TMD6. Similar to the ABC transporter AbcG1 of <i>Dictyostelium discoideum</i> (29% aa identity). Half-sized ABC transporters are assumed to function after dimerization.
ABC2	Pdr2	jgi.Triat2.246378.estExt_G enewise1.C_contig_260455	Candidate pleiotropic drug resistance protein, ABC superfamily, predicted PDR-type topology of transmembrane domains and nucleotide-binding folds, PDR/CDR subgroup, similar to the multidrug transporter abc1 of <i>Gibberella pulicaris</i> (73% aa identity), that is necessary for tolerance to phytoalexins and virulence on potato tubers, and to ABC1 of <i>Magnaporthe grisea</i> (68% aa identity) which is inducible by toxic drugs and a rice phytoalexin
ABC3	Mrp1	jgi.Triat2.29756.Triat1.e_g w1.	Hypothetical multidrug resistance-related protein, ABC superfamily predicted MRP-type topology of transmembrane domains and nucleotide-binding folds: TMDn(TMD6-NBF)2; similar to the ABC transporter AtrA of <i>Alternaria brassicicola</i> (35% aa identity) and the FUM19 fumonisin exporter proteins of <i>Gibberella moniliformis</i> and <i>Fusarium oxysporum</i> (31% aa identity)

ABC4	Taabc2	jgi.Triat2.53468.Triat1.e_gw1.	pleiotropic drug resistance protein TABC2 domains and nucleotide-binding folds: (NBF-TMD6)2, PDR/CDR subgroup, highly expressed under predicted PDR-type topology of transmembranes of <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Pythium ultimum</i> , appears to be coregulated with some nitrogen starvation and in the presence of culture filtrate CWDE-encoding genes, ABC superfamily
ABC5	Mrp3	jgi.Triat2.294283.estExt_fg enesh1_pm.C_contig_2605 87	Hypothetical multidrug resistance-like protein, ABC superfamily predicted MRP-type topology of transmembrane domains and nucleotide-binding folds, similar to the MRP-type ABC transporter Atr1 of <i>Alternaria brassicicola</i> (38% aa identity) which shows increased expression during host-plant infection.
ABC6	Pdr4	jgi.Triat2.314045.estExt_G enemark.C_contig_120067	hypothetical pleiotropic drug resistance protein, ABC superfamily predicted PDR-type topology of transmembrane domains and nucleotide-binding folds: (NBF-TMD6)2, PDR/CDR subgroup, similar to the ABC transporter atrF of <i>A. fumigatus</i> (43% aa identity) which shows increased expression in the presence of itraconazole, to BcatrB from <i>Botrytis cinerea</i> (42% aa identity), that influences the activity of phenylpyrrole fungicides against the pathogen, and to MfABC1 of <i>Monilinia fructicola</i> (43% aa identity) that is supposed to be a DMI fungicide resistance determinant
ABC7	Mrp4	jgi.Triat2.211243.estExt_G enewise1Plus.C_contig_13 0463	Hypothetical multidrug resistance-associated protein, ABC superfamily Predicted topology of transmembrane domains and nucleotide binding folds: (TMD6-NBF)2. Contains ABCC_MRP domains. Similar to ABC1 of <i>Phanaerochate chrysosporium</i> (CAD98883, 31% aa identity) and to oligomycin-resistance protein YOR1 of <i>S. cerevisiae</i> (33% aa identity).
ABC8	Mdr2	jgi.Triat2.206230.e_gw1.27 .18	Hypothetical multidrug resistance-type transporter protein, ABC superfamily. Predicted MDR-type topology of transmembrane domains and nucleotide-binding folds (TMD6-NBF)2. Similar to the ABC-transporter atrD of <i>Emericella nidulans</i> (39% aa identity) which is involved in protection against cytotoxic compounds. Repetitive element (GAA) in the 8th intron

2、本科期间发表论文

周于聪, 谢秋瑾, 李雅乾等. 改良 ATMT 转化技术在深绿木霉基因敲除中的应用[J]. 中国生物工程杂志. 2015, (8). 已录用, 将于 2015 年 8 月 25 日出版。附文章全文及录用证明。

中国生物工程杂志社

录用证明

上海交通大学农业与生物学院 周于聪; 李雅乾; 谢秋瑾等同志的论文“改良 ATMT 转化技术在深绿木霉基因敲除中的应用”(稿件编号: 1504-039) 经同行评议和本刊编委会评审, 拟定发表在《中国生物工程杂志》2015 年第 8 期 (2015 年 8 月 25 日出版)。

特此证明。

敬礼!

《中国生物工程杂志》编辑部

二〇一五年四月二十七日

地址: 北京市中关村北四环西路 33 号 5D (100190)
电话: 010-82624544; 010-82626611-6631
网址: <http://www.biotech.ac.cn>
微博: <http://weibo.com/2552750147>
Email: biotech@mail.las.ac.cn

改良 ATMT 转化技术在深绿木霉基因敲除中的应用

Optimal *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transformation Technology Applied In Gene Knockout For *Trichoderma atroviride*

周于聪 谢秋瑾 宋凯 杨朝晖 陈捷 李雅乾¹

ZHOU Yu-Cong XIE Qiu-Jin SONG Kai YANG Zhao-Fui Chen Jie LI Ya-Qian*

(上海交通大学 农业与生物学院, 农业部都市南方重点实验室 上海 闵行 200240)

School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Minhang, Shanghai 200240, China

摘要: 木霉菌是环境中具有重要经济价值的丝状真菌之一。高效率的基因敲除技术是深入研究木霉菌功能的必要手段。研究改进了传统的农杆菌介导的遗传转化技术(ATMT), 成功构建深绿木霉 T23 中碳代谢抑制因子 *cre1* 基因敲除突变株。首先查找深绿木霉全基因组序列, 比对并扩增 *cre1* 基因侧翼序列, 以改造后的 p1300qh 质粒为骨架构建 *cre1* 敲除载体 pC1300qh:*cre1*-up::hyg::*cre1*-down, 转化到农杆菌 AGL-1。通过优化 ATMT 转化中木霉菌分生孢子浓度, 改良培养方式和延长诱导转化时间等参数, 获得最佳转化条件: 木霉菌分生孢子浓度为 8×10^6 , 筛选培养基改为 IM 培养基, 诱导转化时间延长, 成功筛选到可能的转化子 10 个。最后, 经鉴定 1 个转化子为 *cre1* 敲除转化子, 9 个为 T-DNA 随机插入。此研究为深绿木霉菌基因功能研究提供了可借鉴的高效便捷的遗传转化方法。

关键词: 深绿木霉 T23; 农杆菌介导的遗传转化方法 ATMT; 碳代谢抑制因子 CRE1; 筛选鉴定; 优化

Abstract: *Trichoderma.spp* was one of most economic filament fungi in various environments. And the efficient gene knock out technologies are key ways to do intensive researches of gene functions in *Trichoderma.spp*. We aim to optimize the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT), and successfully construct the *cre1* gene knock out strain of *Trichoderma atroviride*. Firstly, the strain of *T.atroviride* 23 is adopted as original strain, analysis of genome sequence and confirmation DNA sequence of *cre1* and its flanking sequence by combination of bioinformatics and molecular genetics operation strategy. Secondly, the flanking sequences of the upstream and downstream for *cre1* are cloned and purified and then ligated into the plasmid p1300qh in sequence. Then, the knock-out vector p1300qhsilent-*cre1* is transform into *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1. The spore concentration, culture mode and inducing period were optimizing. The optimal condition of ATMT is as follows: concentration of conidia attains 8×10^6 , IM medium the screening medium and increase of the period of induction. As a result, we

¹基金项目: 国家自然科学基金 (31201557), 上海市自然科学基金 (12ZR1414100), 高等学校博士学科点新教师专项科研基金 (20120073120070), 上海交通大学“蓉政”项目基金资助(2014-2-03)

周于聪, 本科生, 研究方向: 微生物代谢分子调控。E-mail: yczhou2011@126.com

通讯作者: 李雅乾, 讲师。研究方向: 微生物代谢分子调控和生物防治。E-mail: lauren@sjtu.edu.cn

got 8 transformants, which was much more than that by traditional methods. After verification, there were one *cre1* gene knock out strain that we needed and seven transformants of TDNA random insertion. This research achievement contributes an efficient, reliable and convenient method of ATMT for gene functional analysis in *Trichoderma atroviride*.

Key words: *Trichoderma atroviride* 23, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, carbon catabolite repressor CRE1, Identification, Optimization

1 引言

木霉菌(*Trichoderma.spp*)是土壤和植物根际生态中资源丰富的真菌,能够分泌多种细胞壁降解酶,拮抗植物病原真菌,促进植物的生长,具有重要生防和工业应用价值^[1-4]。以里氏木霉为代表的工业用产酶菌株和以深绿木霉为代表的农业用生防菌株是最受关注。基因敲除技术是理解木霉菌重要生防功能基因的有效途径之一,目前在里氏木霉菌中较成功的基因敲除技术包括原生质体、PEG/CaCl₂、基因枪等转化方法。而深绿木霉因其细胞壁厚,所以上述方法转化效率较低,筛选工作量大。因此探索高效率的遗传转化方法,解释深绿木霉生防机制至关重要。根癌农杆菌介导的遗传转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)是植物研究领域常用的方法。1995年, Bundock 等首次成功进行了根癌农杆菌介导的酵母菌遗传转化^[5]; 1998年, De Groot 等首次利用 ATMT 法对 6 种丝状真菌(包括里氏木霉 *Trichoderma reesei*)进行了转化,并获得了成功^[6]。此后, ATMT 因其操作简便、转化效率高、遗传稳定、转基因低拷贝以及能够转化大片段 DNA 等优点,广泛地应用于丝状真菌的遗传转化中。

ATMT 的转化效率受多个因素影响,如环境条件 pH、温度、诱导剂浓度等影响。研究发现,培养基较低 pH 值有利于丝状真菌的转化,当 pH 为 5.3 时有助于哈茨木霉遗传转化, pH 高于 6.5 之后几乎没有任何转化子形成,这可能与高 pH 不利于毒性蛋白的表达有关^[7]。Michielse 研究转化温度对农杆菌转化效率的影响,结果表明:共转化温度在 20-37℃这个范围内时,最适合农杆菌转化的温度是 22-25℃^[8]。乙酰丁香酮(AS)是诱导毒性基因表达,因此在转化过程的共培养和诱导过程中起关键作用^[9]。共培养中缺少 AS 会导致无转化子的产生,而诱导过程中缺失 AS 则会引起转化效率下降^[10]。Leclerque 等的研究发现 AS 的浓度达到 200μM 时,可以增加转化子的数目,达到很高的转化效率^[11]。共培养时间依赖不同丝状真菌细胞壁结构、产孢时间以及胞内酶环境。此外,根癌农杆菌类型、受体菌株类型等内源因素对转化效率也有显著影响。

本研究旨在对 ATMT 转化中关键因子进行优化,成功构建深绿木霉菌碳代谢抑制子 *cre1* 基因敲除株,为进一步研究此基因的生防特性奠定基础。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 供试菌株及质粒 深绿木霉菌 (*T. atroviride*) T23, 大肠杆菌 DH5α 菌株, 农杆菌 AGL-1 菌株均为上海交通大学木霉菌种资源保藏中心提供。敲除载体质粒 p1300qh 由浙江大学农学院生物技术所林福呈教授惠赠。实验所用引物均有上海生工生物有限公司合成,引物序列及酶切位点如表 1 所示。

2.1.2 培养基、试剂及引物 PDA 培养基和 PDB 培养基(不加琼脂粉)分别用于木霉菌固体培养和液体发酵; LB 培养基用于大肠杆菌和农杆菌培养; IM 培养基用于 ATMT 转化中诱导共培养及筛选^[12]。实验中涉及的卡那霉素、利福平、头孢霉素、潮霉素等抗生素溶液均配制成 50 mg/mL 母液,用 0.22 μm 滤器过滤除菌后,小管分装后-20℃保存备用。

2.1.3 实验所用酶、试剂与试剂盒 植物基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒购于天根天根生化科技有限公司。限制性内切酶及 T4 连接酶购于 Fermentas 公司；一般 PCR 用 Premix Taq 购于大连宝生物(TaKaRa, Japan)。氨苄青霉素、卡那霉素、潮霉素 B 及头孢等抗生素及 MES、乙酰丁香酮等试剂均购于上海前尘生物技术有限公司。

2.2 深绿木霉菌株活化及基因组 DNA 提取

提取方法参考里氏木霉常用基因组 DNA 提取方法^[13]。

2.3 深绿木霉碳代谢抑制因子 *cre1* 基因侧翼序列扩增

以全基因组 DNA 为模板，用引物 *pcr1*-F, *pcr1*-R 和引物 *dcre1*-F, *dcre1*-R 分别扩增 *cre1* 基因上下游侧翼序列，PCR 反应体系：PCR 反应体 25 μ L，包括基因组模板 1 μ L，premix Taq 12.5 μ L，上下游引物各 1 μ L，最后加灭菌 ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 扩增程序：94 $^{\circ}$ C 预变性 5min；94 $^{\circ}$ C 变性 30s，56 $^{\circ}$ C 退火 30s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1min，共 35 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10min；4 $^{\circ}$ C 储存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 PCR 产物胶回收纯化获得 *cre1* 基因上下游侧翼序列 *cre1*-up 和 *cre1*-down。

表 1 实验所用主要引物

Table 1 Primers used in this research.

Primer name	Sequence(5'-3')	Restriction enzyme site
<i>pcr1</i> -F1	GCCCAAGCTTTCCTGAGCGAAGACAA	<i>Hind</i> III
<i>pcr1</i> -R1	ATAACTGCAGTGAGCGGTC AACGAAG	<i>Pst</i> I
<i>dcre1</i> -F2	ATCGGGTACCACGACGGTGCTCGAATG	<i>Kpn</i> I
<i>dcre1</i> -R2	ATCGGAATTCGTGGTGC GGCGATGAAGT	<i>EcoR</i> I
tDNA-F	CCTCTTCGCTATTACGCC	/
<i>Hph</i> -R	ACATCGCCTCGTCCAGT	/
Δ <i>cre1</i> -F	CAACAAAGAATGAGCCCTGAG	/
Δ <i>cre1</i> -R	TGCCAAGTGCCGATAAACA	/

2.4 敲除载体构建方法

将 *cre1* 基因侧翼序列 *cre1*-up 和 *cre1*-down 两个片段分别酶切和酶连到基因敲除质粒 p1300qh 的潮霉素标记两侧的多克隆位点，构建 *cre1* 基因敲除突变株。将 *cre1* 基因上游侧翼序列和载体质粒 p1300qh 分别用 *Hind*III 和 *Pst*I 限制性内切酶酶切上游片段 *cre1*-up，纯化，T4 连接酶连接酶切产物，构建 p1300qh::*cre1*-up::hyg 重组片段，转化到大肠杆菌 DH5 α ，菌落 PCR 验证后液体培养提取质粒验证。用同样的方法将 *cre1*-down 片段用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *EcoR* I 酶切，纯化后经 T4 连接酶将该片段导入含上游片段载体的下游多克隆位点，形成 *cre1* 基因敲除框 p1300qh::*cre1*-up::hyg::*cre1*-down。

2.5 根瘤农杆菌介导的转化 (ATMT)

ATMT 转化方法主要参考了 ATMT 转化的经典方法^[14]和金欣等在里氏木霉中进行遗传改造的方法^[15]，对于 ATMT 转化过程中的诱导和筛选过程稍作改动。将选择性 PDA 培养基替换为含 200 μ g/L 潮霉素和 300 μ g/mL 头孢霉素的 IM 培养基。在选择性培养基上培养 4-5 天后，开始挑选可能的转化子到选择性 PDA 培养基（含 300 μ g/mL 的头孢与 200 μ g/mL 的潮霉素），验证后在含 300 μ g/mL 头孢的 PDA 平板上传 3 代后，单孢分离再传一代后用含潮霉素的平板验证。

2.6 阳性转化子的筛选和鉴定

设计两对引物，分别筛选 T-DNA (tDNA-F/*Hph*-R) 和同源重组的转化子 ($\Delta cre1$ -F/ $\Delta cre1$ -R)，如图 2 所示。在 T-DNA 的上游多克隆位点，即 5'同源臂的上方设计一个上游引物 tDNA-F，在抗性筛选标记潮霉素基因编码框序列中设计下游引物 *Hph*-R，PCR 扩增包含上游同源臂和部分潮霉素基因的片段，如果电泳结果有条带，则表明该转化子中包含 T-DNA 随机插入的情况。另一对引物的设计则以双交换后的 DNA 序列为模板，在 *cre1* 基因 5'同源臂的上游设计上游引物 $\Delta cre1$ -F，在潮霉素抗性基因的交换片段中设计下游引物 $\Delta cre1$ -R，PCR 扩增包含上游同源臂和部分潮霉素抗性基因的交换片段，上游引物一般能与基因组 DNA 结合，但只有发生了同源双交换，下游引物才能结合到潮霉素编码框序列，才能扩增得到长度正确的 DNA 片段，因此将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后长度正确的条带则表明该转化子发生了同源重组，若上述两种 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳均显示有长度正确的条带，则表明该转化子在发生同源重组的同时还存在单拷贝甚至多拷贝的 T-DNA 插入的情况。

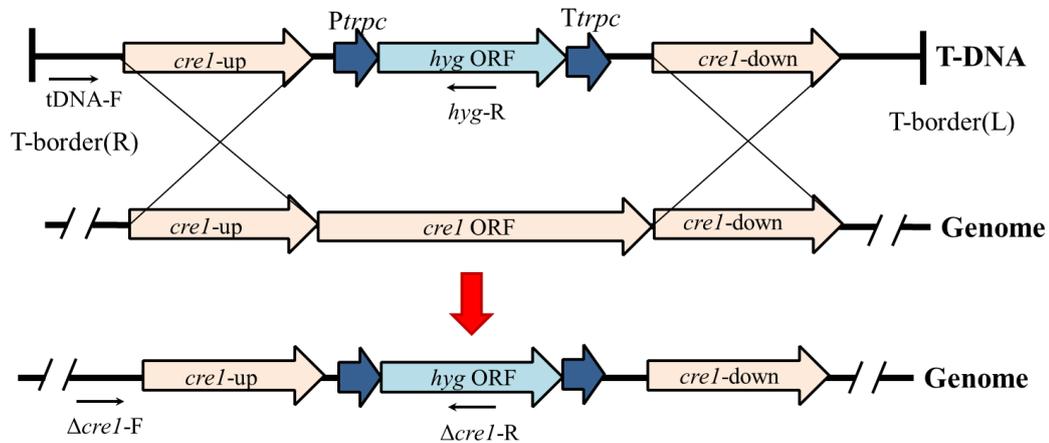


图 1 ATMT 转化原理及筛选引物设计

Fig. 1 Mechanism of ATMT and primers design for screening.

3 结果与讨论

3.1 构建 *cre1* 基因敲除载体构建

提取深绿木霉菌 DNA，根据 <http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html> 中深绿木霉全基因组序列，比对获得深绿木霉 *cre1* 基因及其侧翼序列，设计引物 *cre1*-F 和 *cre1*-R，PCR 扩增 *cre1* 基因上下游侧翼序列，扩增的上游片段和下游片段长度分别为 711bp 和 843bp，如图 2A 所示。根据敲除载体构建方法(图 3)，将两个片段分别连接到 pC1300qh 质粒载体的多克隆位点，经转化，挑取阳性克隆，PCR (图 2b) 和双酶切验证 (图 2c)，结果均正确无误。成功将 *cre1* 上下游侧翼序列导入到 pC1300qh 载体，形成敲除载体 pC1300qhsilent-*cre1*。

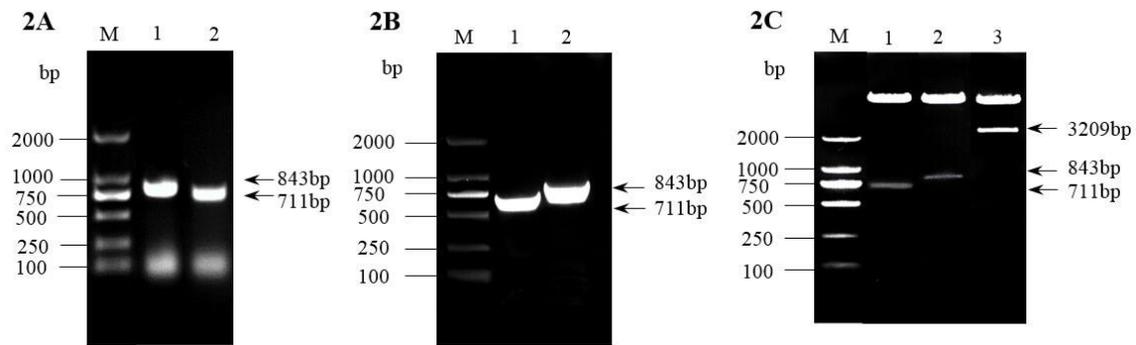


图 2 实验涉及电泳图

Fig.2 Electrophoretograms related in this research.

M:Matker2000; 1:*cre1*-up; 2:*cre1*-down ; 3: *cre1*-up::hyg::*cre1*-down ; 2A: Amplification of *cre1* flanking sequences; 2B: Verification of positive clone for plasmid p1300qhsilent-*cre1* after *Escherichia coli* transformation. 2C: Verification of plasmid p1300qhsilent-*cre1* by double digestion (1: *Hind* III and *Pst* I; 2: *Kpn* I and *EcoR* I; 3: *Hind* III and *EcoR* I).

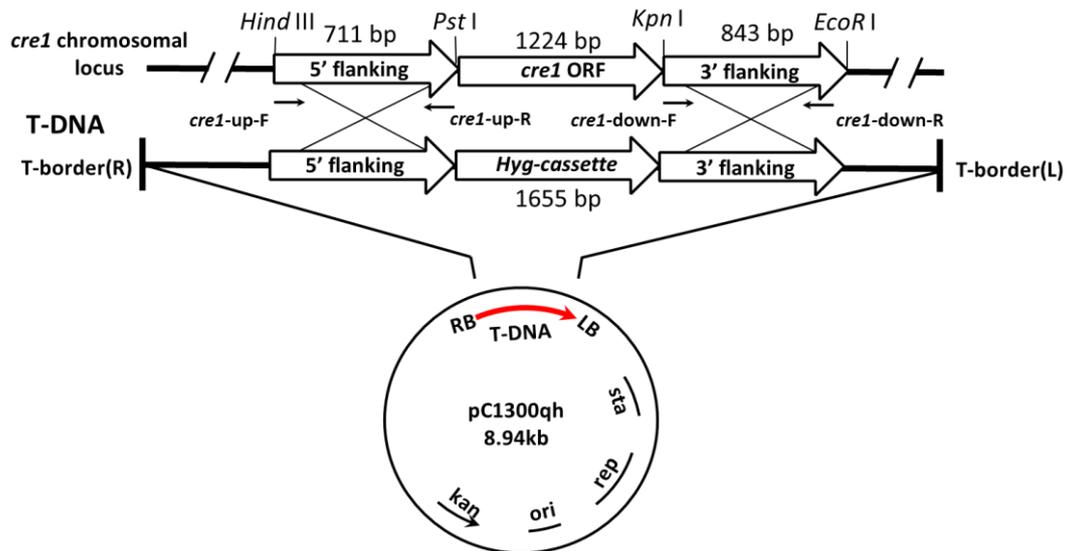


图 3 敲除载体 p1300qhsilent-*cre1* 构建示意图

Fig.3 The construction of knock out vector pC1300qhsilent-*cre1*.

RB: right border of TDNA; *cre1*-up: 5' flanking frame of *cre1*; Hyg cassette: hygromycin expression cassette in fungi, *cre1*-down: 3' flanking frame of *cre1*, LB: left border of TDNA

3.2 ATMT 转化过程优化

诱导时间是影响 ATMT 转化效率的关键因子，针对不同受体细胞特点，诱导时间存在较大差异^[16]。如在木霉菌中，里氏木霉、哈茨木霉等孢子壁较薄，诱导时间相对较短，而深绿木霉孢子壁厚，农杆菌毒性蛋白作用时间延长，或者是 T-DNA 在深绿木霉细胞中存在形式中有效重组的形式较少^[17]，引起效率下降，因此必须提供较长的诱导时间，才有可能获得转化子。深绿木霉在 IM 培养基中由于营养贫瘠，产孢较快。孢子的产生又抑制 ATMT 转化。

为了克服上述因素条件对转化效率的抑制，我们着重优化了 ATMT 转化的实验流程（图 4）。在前期诱导共培养时，在 IM 培养基（加 40M MES 及 200 μ M AS）中放入玻璃纸，再在玻璃纸上均匀涂布农杆菌和木霉菌孢悬液的等体积混合液，于 25 $^{\circ}$ C 培养箱共培养 36h 左右，待白色菌丝铺满玻璃纸表面而未产孢的

临界时期将玻璃纸转移至选择性培养基。传统的选择性培养基由 CYA 培养基或 PDA 加抗生素组成，不含诱导剂，因此在筛选过程中不产生诱导作用，而转化诱导时间仅 36h，对深绿木霉而言，诱导时间不足，将引起 ATMT 转化效率下降，平板中几乎没有转化子产生。按照传统的方法 20 个平板平均筛选到 1-2 个转化子，大多数时候没有转化子产生，且产生的转化子大多为 T-DNA 插入，同源双交换发生几率极低。

我们将传统选择性培养基优化为 IM 培养基，并加入相应浓度的筛选用的抗生素，诱导剂与抗生素同时作用，边诱导边筛选，抗生素的存在避免了孢子形成，而诱导剂起效又提升了诱导时间，转化子长出较多(图 5)，一般每个平板长 0.8-1 个，大大提升了转化效率。用改进后的 ATMT 转化方法，一般只需要 10 个平板，便可以筛选到 8-10 个转化子，而且同源双交换的转化子发生几率提高(表 2)。

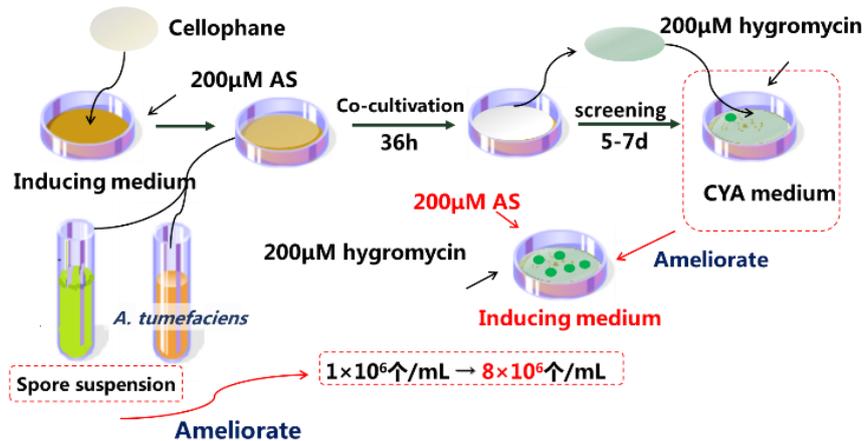


图 4 ATMT 转化过程优化

Fig. 4 Advancement of ATMT processing

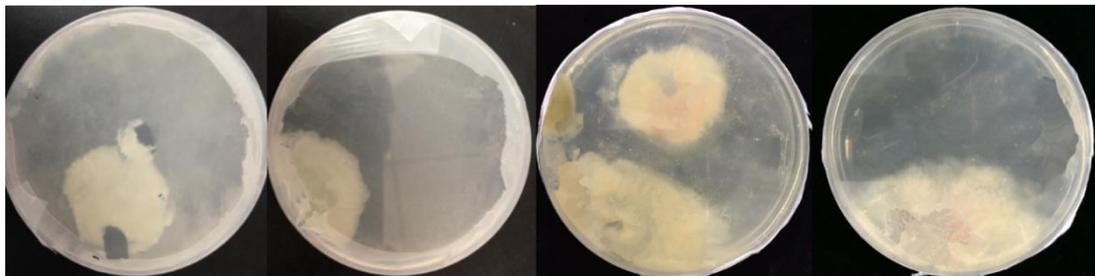


图 5 改进后 ATMT 转化子在筛选平板中生长状态

Fig.5 Growing status of transformants on selective plates by ATMT

表 2 ATMT 转化方法改进前后效果评价

Table 2 Evaluation of advanced ATMT processing.

	Number of plates used in transformation	Transformants	Homologous Recombinants	Transformation efficiency	Homologous recombination efficiency
Pre-advancing	20-30	1-2	0	+	-
Advanced	10	8-10	0.5	+++++	+++++

3.3 ATMT 转化木霉菌孢子浓度优化

含有敲除载体 p1300qhsilent-cre1 的农杆菌和深绿木霉 T23 野生型的孢子共培养 2 天后。选择不同木霉菌孢子浓度，比较了三个木霉菌孢子浓度 1×10^6 ， 2×10^6 ， 4×10^6 ， 6×10^6 ， 8×10^6 ， 1×10^7 六个梯度条件下，用 IM 培养基加抗生素筛选 ATMT 转化子。将筛选培养基置于 25℃ 培养箱培养 10d 左右，一般培养 4-5

天，第一批转化子出现，在后续的 5-10 天中还会陆续出现更多的转化子。结果表明（图 6）：当木霉菌分生孢子浓度为 8×10^6 时，转化效率较高，且同源重组的转化子出现几率较大。

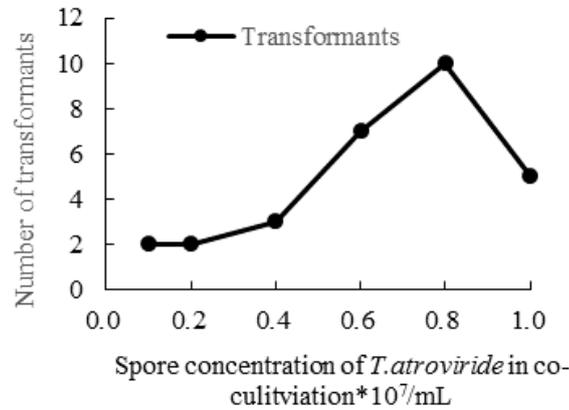


图 6 不同分生孢子浓度下 ATMT 转化得到的转化子数

Fig.6 The number of transformants after ATMT under different spore concentrations.

3.4 *cre1* 敲除突变株表型比较

利用改良的 ATMT 方法，我们成功构建了深绿木霉 $\Delta cre1$ 敲除株，比较了二者生长和产孢情况。如图 7 和图 8 所示，与野生株相比，*cre1* 基因突变后，菌丝生长缓慢，菌丝细腻密集，气生菌丝偏少，产孢量下降。*cre1* 是木霉菌细胞内全局性的碳代谢调控因子^[18]，尤其是当葡萄糖存在的条件下，*cre1* 基因调控其各种碳代谢酶类，能够抑制分解其他碳源的水解酶类如几丁质酶、纤维素酶等，从而使细胞优先利用较易代谢的葡萄糖而不是其他能量代价更好的碳源^[19]。葡萄糖存在条件下，野生菌株中 *cre1* 基因首先利用葡萄糖代谢生长，而缺失 *cre1* 基因的敲除株则减弱了葡萄糖代谢的能力，表现为生长缓慢，菌丝形态纤细和密集性。再次印证了改良的 ATMT 在深绿木霉中敲除基因的可行性。

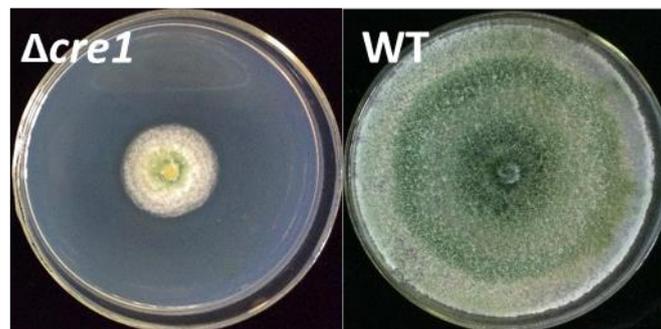


图 7 培养 5 天后突变株和野生株平板生长情况比较

Fig.7 Compare of *cre1* mutant strain and wild type when cultivated on PDA for 5 days.

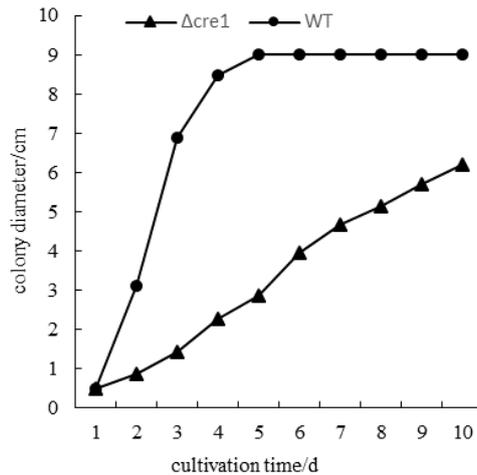


图 8 *cre1* 突变株和野生株平板生长速率

Fig.8 Growth rates of *cre1* mutant strain and wild type on PDA plates.

4 结论

传统的转化方法在深绿木霉转化效率很低，得到转化子极少且不稳定。本研究以深绿木霉碳代谢抑制因子 *cre1* 为靶标，对 ATMT 转化方式进行了优化，改进筛选培养基成分，增加了木霉菌分生孢子浓度，延长了诱导剂作用时间，提升了转化效率及同源双交换发生几率。

改良后的方法适用于细胞壁较厚的深绿木霉，一方面木霉菌孢子浓度从 1×10^6 提升到 8×10^6 ，另一方面，在保持诱导剂 AS 浓度不变的情况下，适当增加诱导培养的时间，从传统的 36h 延长到诱导时间无限制，边诱导边筛选。改变筛选培养基，200 μ MAS 的 IM 培养基，同时加上 200 μ g/ml 的潮霉素进行抗性筛选，辅以 300 μ g/ml 的特美汀抑制农杆菌的生长。改进方法减少农杆菌在侵染过程中阻力，增加其侵染效率，提高转化效率及转化子的稳定性。经筛选鉴定，在 10 个阳性的转化子中，经鉴定 1 个是同源重组，9 个是 T-DNA 插入，成功构建了深绿木霉 $\Delta cre1$ 敲除株。

此外，我们还利用此方法对深绿木霉 *velvet* 蛋白基因 *vel* 进行敲除，共进行了 1 次 ATMT 转化，10 个平板，获得 8 个转化子，1 个同源重组，7 个为 T-DNA 插入，证明此方法高效，可靠。目前正试着将此方法在其他生防木霉菌属中应用，希望此方法对研究木霉菌-植物-病菌三方互作调控方面研究提供技术支持。

参考文献：

- [1] Poosapati S, Ravulapalli P D, Tippirishetty N, et al. Selection of high temperature and salinity tolerant *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Sclerotium rolfsii*[J]. Springerplus. 2014, (3): 641.
- [2] Saxena A, Raghuvanshi R, Singh H B. *Trichoderma* species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L[J]. J Basic Microbiol. 2014.
- [3] Harman G E, Howell C R, Viterbo A, et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. Nature Reviews Microbiology. 2004, 2(1): 43-56.
- [4] 杨合同, 唐文华, Ryder M. 木霉菌与植物病害的生物防治[J]. 山东科学. 1999(04): 7-15. YANG He-tong, TANG Wen-hua, Ryder M. *Trichoderma* and biological control of plant diseases. Shandong Science[J]. 1999(04): 7-15.

- [5] Bundock P. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. EMBO J. 1995(14): 3206-3208.
- [6] Marcel J, de Groot, Bundock P. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of filamentous fungi[J]. Nature Biotechnology. 1998(16): 839-842.
- [7] 黄亚丽. 杆菌介导哈茨木霉转化系统优化及突变体分析[D]. 北京: 中国农业科学研究院, 2008.
HUANG Ya-li. The optimization of *Agrobacterium tumefaciens* mediated *Trichoderma harzianum* transformation system and analysis of T-DNA insertional mutants[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science. 2008.
- [8] Caroline B, Michielse, Paul J. *Agrobacterium-mediated* transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. Curr Genet. 2005(48): 1-17.
- [9] 黄亚丽, 潘玮, 蒋细良等. 根癌农杆菌介导丝状真菌遗传转化的研究进展[J]. 生物技术通报. 2007(3): 111-114.
HUANG Ya-li, PAN Wei, JIANG Xi-liang, et al. Transformation in Filamentous Fungi Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Biotechnology Bulletin*. 2007(3): 111-114.
- [10] Wang J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*[J]. Zhejiang Univ SciB. 2008, 10(9): 823-828.
- [11] Huang Y, Yang H, Chen K. Modification of *Trichoderma viride* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation [J]. Shandong Science. 2005(18): 30-35.
- [12] Sun W, Liu L, Hu X, et al. Generation and identification of DNA sequence flanking T-DNA integration site of *Trichoderma atroviride* mutants with high dichlorvos-degrading capacity[J]. Bioresource Technology. 2009, 100(23): 5941-5946.
- [13] 顾斌涛, 江守坤, 夏黎明. 中性内切- β -葡聚糖酶基因在里氏木霉中的重组与表达[J]. 高校化学工程学报. 2013(01): 108-112.
GU Bin-tao, JIANG Shou-kun, XIA Li-ming. Recombination and Expression of Neutral Endo- β -Glucanase Gene from *Humicola Insolens* in *Trichoderma Reesei*[J]. J Chem Eng of Chinese Univ. 2013(01): 108-112.
- [14] 李国田, 杨合同, 周红姿. 根癌农杆菌介导的木霉插入转化及其应用. 山东科学. 2006(06): 24-30.
LI Guo-tian, YANG He-tong, ZHOU Hong-zi. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and its application in *Trichoderma* spp[J]. Shandong Science. 2006(06): 24-30.
- [15] 金欣, 夏黎明. 厌氧真菌内切- β -葡聚糖酶基因在里氏木霉中的重组与表达[J]. 高校化学工程学报. 2011(04): 637-642.
JIN Xin, XIA Li-ming. Recombination and Expression of an Anaerobic Fungus Endo- β -Glucanase Gene in *Trichoderma Reesei* Cells[J]. J Chem Eng of Chinese Univ. 2011(04): 637-642.
- [16] 范亮波, 李梅, 冀颖等. 根癌农杆菌介导的木霉遗传转化及应用进展[J]. 生物技术通报. 2010(03): 1-5.
FAN Liang-bo, LI Mei, JI Ying, et al. *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation and Its Application in *Trichoderma* spp[J]. Biotechnology Bulletin. 2010(03): 1-5.
- [17] 方卫国, 张永军, 杨星勇等. 根癌农杆菌介导真菌遗传转化的研究进展[J]. 中国生物工程杂志. 2002, 22(5): 40-44.
FANG Wei-guo, ZHANG Yong-jun, YANG Xing-yong, et al. Transformation in fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. China Biotechnology. 2002, 22(5): 40-44.

- [18] Mubshara Saadia S A A J. Isolation and cloning of CRE1 gene from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*[J]. Pak. J. Bot. 2008, 40(1): 421-426. 2002, 22(5): 40-44.
- [19] Portnoy T, Margeot A, Linke R, et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation[J]. BMC Genomics. 2011, 12: 269.

致谢

不知不觉，大学生涯已接近尾声，大四这一年的毕业设计，是四年中十分充实有意义难以忘怀的一年。首先由衷感谢李雅乾老师在实验期间的精心指导和耐心培养！在老师的指导与帮助下，我学会了很多分子生物学以及微生物学方面的专业知识和实验技能，对科研实验的设计、实验操作技能和科研论文的撰写能力卓有提升。李老师是我科研生涯的领路人，是良师更是益友，在此对您真诚地说声谢谢！

作为一个对科研实验一片空白的本科生，能成功地完成一个实验，有丰富经验和知识的师兄师姐给予的帮助是不可或缺的，谢谢余传金师兄各种实验理论知识的辅导，在解决问题时提供的关键的指导和建议。感谢傅科鹤师兄在 ATMT 转化、Southern blot 等分子实验过程的耐心指导和帮助。感谢实验室的师兄师姐的真诚帮助，谢谢你们不厌其烦的指点。

同时，也要感谢学校和学院给予我这一次机会，为我的成长提供了一个优越而且宽广的平台，让我能从多方面提升自我，完善人生！

在这一年的时间里，我不仅熟练掌握了之前从未涉及过的分子实验部分操作，并且深化了书本上学到的许多知识，对今后的发展有着巨大的帮助。整个实验过程是十分快乐的，虽然经历了许多困难和挫折，犯过许多错误，懊恼过，彷徨过，也犹豫过，但秉着不抛弃不放弃的人生信条，为了探索到科学的真理，冲破重重险阻，最终按照计划达到预期目标。相信这段实验经历对未来的人生的道路将会有很大的影响！

Functional Analysis of Carbon Catabolite Repressor CRE1 in *Trichoderma atroviride*

The genus *Trichoderma* comprises a large number of filamentous fungal strains found in multitude of ecological niches, which illustrates the successful strategies for environmental opportunism and competition for habitats. Among of them, several strains such as *T. virens*, *T. atroviride* and *T.harazium* are opportunistic plant symbionts and have been developed as biocontrol agents against plant diseases, while others species such as *Trichoderma reesei* are industrially important cellulolytic filamentous fungi.

One such wide-domain regulatory circuit is carbon catabolite repression (CCR): it allows the preferred assimilation of carbon sources of high nutritional value over others [1-4]. CCR is mediated by the Cys2His2 type transcription factor CreA/CREI that has been cloned from numerous filamentous fungi. CRE mediated regulation has been studied in most detail for the alcohol gene cluster in *A. nidulans* and for hydrolytic enzyme genes in *Trichdoerma*. In general, mutations of the *cre* gene lead to (partial) derepression of enzyme gene expression on glucose. More studies have also addressed glucose repression is mediated by CREI, that involved in regulation of cellulose and hemicellulase by binding to the promoters of the respective target genes via the consensus motif 5'-SYGGRG-3' sequences. It appears that Cre/CRE proteins have roles beyond acting as repressors in conditions where glucose (or fructose) is present, and that their effects on cellulase and hemicellulase gene expression can be mediated in a more complex manner than by mere binding to the enzyme gene promoters.

There were numbers of researches about that the carbon catabolite repression factor CRE1 was regulating a series of functional genes in *T.reesei* which were widely applied in industry. However, little information is available on how *cre1* gene regulate the biocontrol factors, especially the gene related to synthesis of secondary metabolits and its transport gene.

To test the hypothesis that *cre1* is a global regulator of biocontrol related geneexpression in *T. virens*, we examined the functions of CRE1 in this T23 by using gene knockout and complementation. Here we report that in addition to a role in growth and morphology, *cre1* also regulatesmycoparasitism, and biocontrol efficacy in *T. virens*. Thus, our researches focused on the influence of CRE1 in important biological control strains *T.atroviride* 23 and hope to shed light on the multiple effects of CRE1 in the bioncontrol *T.atroviride*.

Analysis of *cre1* gene of T23 and its characteristic

In order to determine whether the expression of the glucose repressor *cre1* from *T.atroviride* 23 is related to the global regulation of biocontrol characteristic, we first searched and blasted the gene sequences. The gene encoding *T. atroviride* *cre1* (protein ID 301116) is a single-copy gene in the *T. atroviride* genome (<http://genome.jgi-psf.org/>). The 1,224-bp ORF codes for a protein consisting of 407 amino acids. A phylogenetic tree (Fig. 1 proteins from *T. atroviride* and other fungi revealed that *T. atroviride cre1* is most closely related to *T. asperellus cre1* and has strong homology with *cre1* of *T. asperellus* (93% amino acid identity). Interestingly, in a phylogenetic analysis ([http://www.phylogeny .fr/](http://www.phylogeny.fr/)) performed with the *cre1* sequence of others Trichoderma species. They formed a clade distinct from the other group of fungi analyzed, the *cre1* sequences of the three *Trichoderma* spp. are highly conserved.

Construction of T23 Δ *cre1* and its component strain

To delete the carbon catabolite repressor *cre1* in *T.atroviride* 23, the replacement cassettes pC1300- Δ *cre1* were constructed for deleting the wild-type glucose repressor gene *cre1* by replacing it with the *hph* marker gene. The pC1300qh Δ *cre1* were transformed to the wild-type strain T23. Two stable mutants showing the anagogenic characteristic to hygromycin were obtained using ATMT. Transformants were purified through single spore cultures, PCR and Southern analysis was performed to verify that the *cre1* gene was correctly replaced in the genomes with one copy of the pC1300- Δ *cre1*deletion cassette. In order to distinguish the transformants derived from homologous recombination not from the T-DNA insertion, two pairs of primers (*cre1*-F&*cre1*-R and *tdna*-F &*hyg*-R) were designed to verify the mutants. The PCR amplified results showed that the fragment of 5'flanking(*cre1*-up) and *hph* cassette was detected in Δ *cre1*, indicating that the *cre1* ORF was replaced by *hph* cassette; the flanking fragment adjacent to right border of T-DNA and *hph* cassette wasn't present in Δ *cre1*, which meant there was no additional T-DNA insertion. Southern blot results also showed that the Δ *cre1* mutant were single band, which confirm the replacement of *cre1* ORF and *hph* cassette and no additional T-DNA insertions meanwhile.

Effect of *cre1* on the growth and morphology

The mutant strain Δ *cre1* and WT were cultured on the PDA plates. Due to *cre1* deletion, Δ *cre1* exhibited a reduced growth rate, less aerial hypha and less conidia, resulting in a bit small, thin and light-green clones on the plates. The WT stain produce a large number of spores than that of mutant, Δ *cre1* mutant produce a small amount of spore. As the previous results, no obvious growth difference happened in PD medium, while *cre1* mediated regulation of mycelial growth was more significant in rich medium. The pictures of mycelia and conidia under microscope also showed that Δ *cre1* was lack of conidiophore and conidia, and had less septa hypha; while WT was rich of septahypha and could production a great amount of conidia. The results

further indicated *Cre1*-mediated the growth and formation of sporulation mainly depend on its conditions.

CRE1 repressed expression of cell-wall degradation enzymes chitinase and β -1,3-glucanase.

The features of secreting cell wall degrading enzymes such as chitinase, β -1,3-glucanase and protease are the crucial role in the antagonistic of *Trichoderma*. We assayed the effect of CRE1 on activities of chitinase and β -1,3-glucanase and its representative gene expression. The results of chitinase activities and β -1,3-glucanase activities showed consistent increase in *cre1* mutant compared with the wild strain. Chitinase activity was almost 1.5 times higher in $\Delta cre1$ than that in WT, the $\Delta cre1$ produced 1.2 times as much β -1,3-glucanase as WT. QRT-PCR was carried out to verify the above results and as shown in Fig4b, the expressions of *chit42* and β -1,3-glucanase gene were much higher in the *cre1* knockout strain. And the results were in good agreement with the enzyme activities results. Taken these results together into consideration, the knockout of *cre1* enhanced part of active substances which were effective in biocontrol of *T.atroviride*.

Cre1 mutant improve the secondary metabolites biosynthesis by NRPSs and PKSs.

Trichoderma.spp produced a multitude of low-molecular-mass compounds known as secondary metabolites, which have roles in a range of cellular processes, especially in mycoparasitism procession. In addition, many of these compounds now have important applications, for instance, as antibiotics or immunosuppressants. Most of the secondary metabolites, and of more biocontrol value, are peptaibols synthesized by non-ribosomal polypeptide synthetases (NRPSs). Another efficient biocontrol factor, polyketide synthases (PKSs) that gained less attention than NRPSs were also significant to biocontrol processes. According to the results of qRT-PCR, we found that the carbon catabolite repressor CRE1 played a multiple role in the regulation on the transcription of NRPSs and PKSs. As far as the chosen three NRPS coding genes and two PKS coding genes were concerned, CRE1 downregulated one NRPS and one PKS coding gene, but upregulated another NRPS. While others, the result showed little change in the transcriptional level, which means those genes may not be under the regulation of CRE1. So the complicated regulation in the NRPSs and PKSs by CRE1, had claimed the intricate network in secondary metabolism that CRE1 impacted.

The regulation mechanism of Taabc2 expression by CRE1

ATP-binding cassette transporters were one of best-developed translocation systems inside *Trichoderma*.spp cells. This study chosen eight ABC transporter coding genes as the targets for qRT-PCR to analyze the influence of CRE1 on their transcription.

More or less, we found that those genes were all regulated by CRE1, and most overwhelmed influenced gene was *Taabc2*, a multidrug resistant ABC transporter, the relative mRNA level in $\Delta cre1$ was 2.73 higher than that in wide type. Due to this finding, sequence analysis had been done afterwards. There was five predicted conserved motifs had been detected on the upstream of *Taabc2* promoter that CRE1 could be bind and repressed the expression. In order to find out which one or two or even more that exactly CRE1 binding, the GUS reporter gene was fused with the promoters of *Taabc2* containing different binding sites was delivered into wide type and $\Delta cre1$ mutant strain. By means of measuring the GUS enzyme activity, it brought out the identification of CRE1 binding site or sites' location. In accordance of this research, we find the CRE1 binding site was located in the -454 bp to -748 bp of *Taabc2* promoter since the translation code. The repression of *Taabc2* by CRE1 might lead to a lower transportation efficiency of secondary metabolite. In consequence, the carbon catabolite repression factor *cre1* has a significant influence on *Trichoderma* bio-control, the expression of *cre1* will reduce the profit of *Trichoderma* bio-control.

As a result, the research conclude that carbon metabolic factor CRE1, as a key gene, mainly regulates the sporulation and metabolites of *T.atroviride* 23. And those findings are pretty valuable for the guidance of the control of synthesis and secretion of related metabolites and improvement of the effects of *Trichoderma* bio-control.