

牛樟芝非还原型聚酮合酶基因的克隆及表达分析

原晓龙^{1,2,3}, 华梅^{1,2,3}, 陈剑^{1,2,3}, 陈中华^{1,2,3}, 王娟^{1,2,3}, 杨宇明^{1,2,3}, 王毅^{1,2,3*}

1. 云南省林业科学院, 云南 昆明 650204

2. 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 云南 昆明 650204

3. 国家林业局云南珍稀濒危森林植物保护和繁育重点实验室, 云南 昆明 650204

摘要: 目的 获得牛樟芝聚酮合酶基因(AcPKS1)全长, 对其进行生物学分析并分析该基因在不同培养基上的表达差异。方法 通过对牛樟芝基因组分析获得牛樟芝聚酮合酶基因, 通过设计含有起始密码子和终止密码子的特异引物并以牛樟芝cDNA为模板克隆得到AcPKS1基因全长, 并对该基因进行生物信息学分析及在不同培养基上的表达谱分析。结果 AcPKS1全长6348 bp, 含有6个内含子和7个外显子, 外显子编码2115个氨基酸; 通过生物信息学分析, 推测该基因为真菌I型非还原型PKS, 结构域为SAT-KS-PT-ACP-ACP-TE, 系统树分析显示AcPKS1与其他未知功能的聚酮合酶(PKS)聚为一支, 说明AcPKS1可能是一种新的聚酮化合物环化方式; 表达谱分析表明, 葡萄糖为AcPKS1基因表达的必要条件, 且葡萄糖含量与AcPKS1基因表达量呈正相关。结论 本研究为AcPKS1功能鉴定以及牛樟芝基因资源利用奠定基础。

关键词: 牛樟芝; 聚酮合酶; 生物信息学分析; 表达谱; AcPKS1

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)20-4870-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.025

Cloning and expressing of a polyketide synthase gene in *Antrodia camphorata*

YUAN Xiao-long^{1, 2, 3}, HUA Mei^{1, 2, 3}, CHEN Jian^{1, 2, 3}, CHEN Zhong-hua^{1, 2, 3}, WANG Juan^{1, 2, 3}, YANG Yu-ming^{1, 2, 3}, WANG Yi^{1, 2, 3}

1. Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China

2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Cultivation and Exploitation of Forest Plants, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China

3. Conservation of Rare, Endangered & Endemic Forest Plants, Public Key Laboratory of the State Forestry Administration, Kunming 650204, China

Abstract: Objective To obtain the gene AcPKS1 of *Antrodia camphorata*, analyze using bioinformatics, and detect the condition of expressing in the different medium. **Methods** Polyketide synthases gene was obtained from the genome of *A. camphorata* through analyzing the genome, and the full length of the gene was obtained through designed the special primers including initiation codon and termination codon and the template using cDNA of *A. camphorata*, which named the gene AcPKS1, and using the bioinformatics analysis and expression profiles analysis in the different medium. **Results** The full length of AcPKS1 gene was 6348 bp, including six introns and seven exons, and the expression region encoded 2115 amino acids; the bioinformatics analysis showed that AcPKS1 was a kind of nonreduced PKS of type I in fungi, the domains was SAT-KS-PT-ACP-ACP-TE, and the enzyme catalyzed a new kind of cyclization in the process of polyketides biosynthesis; The expression profiles revealed that glucose was necessary during the expression of AcPKS protein, and the expression quantity of the AcPKS1 protein basically proportion to the content of glucose. **Conclusion** The result of this text has applied foundation to identify the polyketide synthase gene and take full advantage genomic resources of *A. camphorata*.

Key words: *Antrodia camphorata* M. Zang & C. H. Su; polyketides synthases; bioinformatics; expression profiles; AcPKS1

聚酮化合物(polyketides)数量庞大、结构多样,广泛存在于植物、细菌、放线菌及真菌中,在生物体内扮演色素、病原体毒力因子、信息化合物及防

收稿日期: 2018-03-06

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31400488); 云南省面上基金资助项目(2016FB055); 云南省对外科技合作计划(2015IA004)

作者简介: 原晓龙(1986—), 男, 助理研究员, 硕士, 从事林木分子生物学研究。E-mail: xiaolony@126.com

*通信作者 王毅(1981—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事植物学和分子生物学研究。E-mail: 22825818@qq.com

御因子等^[1]。聚酮化合物是新天然药物的重要来源之一,可作为抗生素、抗寄生虫药物、降胆固醇药物、免疫抑制剂及抗癌药物等^[2],来源于真菌的重要聚酮化合物包括:降胆固醇药物洛伐他汀(lovastatin)^[3]、抗真菌药物两性霉素(doxorubicin)^[4]、抗寄生虫药物阿维菌素(ivermectin)^[5]、免疫抑制剂雷帕霉素(rapamycin)^[6]等;对人体健康和农业有害的真菌毒素黄曲霉素(aflatoxin)^[7]、伏马菌素(fumonisin)^[8]等。聚酮合酶(polyketide synthases, PKS)是介导聚酮类化合物生物合成的关键酶,其过程类似于脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)催化脂肪酸合成^[9]。PKS主要分为I型、II型和III型^[10-11]。1990年,Beck等^[12]通过多克隆抗体基因组DNA表达文库的免疫学筛选获得了第一条真菌I型PKS基因6MSAS。真菌PKS主要属于I型PKS,常见的主要结构域包括:酮体合成酶(ketosynthase, KS)、酰基转移酶(acyltransferase, AT)、脱水酶(dehydratase, DH)、甲基转移酶(methyltransferase, MeT)、烯酯酰还原酶(enoylreductase, ER)、酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)及环化酶(cyclase, CYC)等^[11,13-14]。真菌I型PKS根据其各自所拥有的结构域可分为非还原型、部分还原型及高度还原型^[11,14],I型PKS主要产生芳香型聚酮类化合物^[1,13,15]。非还原型聚酮合酶含有KS、AT、ACP 3个最基本的PKS结构域,而缺少与 β -酮还原相关的KR、DH、ER^[16]。Li等^[17]用产物模板结构域(product template domain, PT)对真菌I型PKS进行聚类分析,结果分为5组,通过催化不同形式的第1环化反应,合成苯醌类和蒽醌类聚酮化合物。

随着二代测序技术的快速发展,近年来已完成了多种真菌的基因组测序^[14,18-21],并从有机体中发现了大量潜在的次生代谢产物合成途径,其中PKS和非核糖体多肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)途径数量尤其丰富^[22]。但是,其中多数酶在实验室及野生型状态中是沉默的,所以天然次生代谢产物尚未被发现或分离出来^[23],且其次生代谢产物的合成潜力多未被评估。因此从真菌基因组挖掘出这些能产生新活性化合物和酶结构的途径成为当前研究的热点^[17],为了激活潜藏的基因簇,不同的方式被发明出来,其中通过“一菌多产物”策略(one strain, many compounds)来改变培养基成分,能诱导真菌中隐藏基因簇的表达以获得新天然产物^[24]。Yuan等^[15,24]利用PDB培养

基培养基地衣内生真菌 *Myxotrichum* sp. 获得柠檬菌素和褐菌素的独特骨架;利用大米培养基获得了3种聚酮化合物(myxotritones A-C)和1个新的天然产物(7,8-dihydro-7R,8S-dihydroxy-3,7-dimethyl-2-benzopyran-6-one)。牛樟芝基因组测序工作已于2014年完成^[25],并从其基因组数据中挖掘出潜在的PKS基因。本实验为了研究牛樟芝中PKS基因与化合物之间的具体联系,首先通过对其基因组数据的分析,分离并克隆得到牛樟芝中的PKS基因(AcPKS1)全长,采用生物信息学分析的方法对AcPKS1基因进行分析;再将牛樟芝菌丝体在含有不同碳氮源添加物的培养基上培养后,测定AcPKS1基因在不同培养基成分上的表达量,以期为进一步AcPKS1基因的异源表达、AcPKS1基因和具体化合物的联系奠定研究基础。

1 材料

牛樟芝菌由从中国台湾省购买的段木上的牛樟芝子实体分离获得,经云南省林业科学院王毅博士鉴定为牛樟芝 *Antrodia camphorate* M. Zang & C. H. Su, 菌种编号为LKYAC01。在25℃恒温培养箱中用麦芽糖酵母提取物培养基(美国BD公司)进行扩繁培养。

2 方法

2.1 AcPKS1 基因全长的克隆

收集于25℃条件下培养30 d的牛樟芝菌丝体,用植物RNA提取试剂盒(康为世纪有限公司)提取牛樟芝总RNA,使用NanoDropTM 2000紫外分光光度计(美国Thermo Fisher公司)检测RNA的浓度和质量,并将RNA反转录成cDNA,保存于-80℃冰箱。

在已测序的牛樟芝基因组数据中通过搜索获得一个与聚酮化合物生物合成相关的基因AcPKS1的全长cDNA序列,利用在线程序GENE Fisher分别设计含有起始密码子(AcPKSF0)和终止密码子(AcPKSR0)的一对特异引物(表1),进行cDNA克隆,以AcPKSF0和AcPKSR0为引物,利用高保真聚合酶(HiFi-DNA polymerase)进行PCR扩增,对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的基因与载体连接,筛选阳性克隆进行测序。

2.2 AcPKS1 基因及其蛋白的生物信息学分析

利用NCBI上的在线程序ORF Finder进行开放阅读框(ORF)预测,BLAST程序进行序列同源性比较,ProtParam进行蛋白质理化性质[等电点(pI)、相对分子质量]分析,用SignalP 4.1 server预测信号

肽的有无,用 Target P 预测其亚细胞定位,用 NCBI 中的 Conserved Domain Database 数据库搜索 AcPKS1 蛋白的结构功能域。在 Li 等^[17]数据的基础上,同时选取与牛樟芝 AcPKS 蛋白序列同源性较高的其他真菌的 PKS 蛋白序列一起,用 MEGA

6.0 软件进行氨基酸序列同源性分析及系统发育分析,进行 Clustal W 程序比对后,采用 neighbor-joining 程序构建进化树,1 000 次重复,其他参数选用默认值。生物信息学所用在线工具及其网址见表 2。

表 1 克隆反应中所用引物序列
Table 1 Primers sequences in PCR

引物名称	序列	目的
AcTPS1F0	5'-TACATTTGACTTCAATGTGCT-3'	载体序列 cDNA 全长
AcTPS1R0	5'-ATGAGAAGTCAAGAAGACACT-3'	克隆
TacTPSF	5'-AGATGTCGTAGCATATGT-3'	RT-PCR 检测
TacTPSR	5'-CGTACGATAGATACGTTTC-3'	
AcactinF	5'-ATGAGCAGGAGATGCGCA-3'	对照
AcactinR	5'-TCGAGCACCACATGTTCT-3'	

表 2 生物信息学在线工具及其网址
Table 2 Software online of bioinformatics and its websites

在线工具	网址
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
ProParam	http://web.expasy.org/protparam/
SignalP 4.1 server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Target P	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/output.php
CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/

2.3 AcPKS1 基因在不同培养基上的表达分析

项目组之前的研究表明,碳氮源及不同配方的培养基对牛樟芝生长速度有显著影响^[26]。以前期结果为基础,选取适合牛樟芝菌丝体快速生长的培养基作为 AcPKS1 基因表达的配方(表 3)。按照不同培养基配方配制培养基,将牛樟芝菌丝体接种在不同培养基上,置于 25 ℃恒温培养箱中培养 40 d 后,从每种培养基上各获取 0.5 g 牛樟芝真菌菌丝体,重复 3 次取样,并提取总 RNA。按照牛樟芝总 RNA 参照反转录试剂盒(Transgen 公司)说明书合成第一条链 cDNA,并于-20 ℃冰箱保存备用。然后,以特异引物(表 1)检测 AcPKS1 基因在不同培养基上的具体表达情况,进行琼脂糖凝胶电泳检测后,利用图像分析软件 GENE-SNAPS 分析其积分吸光度,并进行相对定量表达分析。

3 结果与分析

3.1 AcPKS1 基因全长的获得

以牛樟芝真菌菌丝体的 RNA 反转录的 cDNA

为模板,以 AcPKSF0 和 AcPKSR0 为引物,利用高保真聚合酶(HiFi-DNA polymerase)进行 PCR 扩增的方法获得一条长度约为 6 000 bp 的片段,经回收、克隆、测序获得 6 348 bp 的完整 ORF 序列,通过高通量全基因组测序并比对发现该基因在牛樟芝基因组中为单拷贝。BLAST 比对分析显示该基因与黑孢块菌 *Tuber melanosporum* (XM_002837084)、莲花菌 *Grifola frondosa* (AB828671)的 PKS 基因的相应序列分别具 73%和 74%的一致性,因此初步推测其为牛樟芝的 PKS 基因,命名为 AcPKS1。通过比对 AcPKS1 的 DNA 序列和 cDNA 序列,显示该基因有 6 个内含子(以起始密码子为开端 631-684、1355-1421、1749-1799、1984-2036、3279-3333、3544-3593)和 7 个外显子,编码 2 115 个氨基酸。

3.2 AcPKS1 蛋白结构及其序列分析

用在线软件 Protparam 预测 AcPKS 蛋白质序列的理化性质,相对分子质量为 228 150,点(pI)

表 3 不同培养基配方

Table 3 Formula of different medium	
代号	基础培养基
Mal	麦芽糖 6 g·L ⁻¹ , 酵母提取物 3 g·L ⁻¹
Man	麦芽糖 6 g·L ⁻¹ , 酵母提取物 3 g·L ⁻¹ , 甘露糖 4 g·L ⁻¹
Lac	麦芽糖 6 g·L ⁻¹ , 酵母提取物 3 g·L ⁻¹ , 乳糖 4 g·L ⁻¹
Glu	麦芽糖 6 g·L ⁻¹ , 酵母提取物 3 g·L ⁻¹ , 葡萄糖 4 g·L ⁻¹
Fru	麦芽糖 6 g·L ⁻¹ , 酵母提取物 3 g·L ⁻¹ , 果糖 4 g·L ⁻¹
MFB	麦芽糖 1.8 g, 葡萄糖 6 g, 牛肉浸粉 4 g·L ⁻¹
MFY1	麦芽糖 1.8 g, 葡萄糖 6 g, 胰蛋白胨 4 g·L ⁻¹
MFY2	麦芽糖 1.8 g, 葡萄糖 6 g, 酵母提取物 4 g·L ⁻¹
MFT	麦芽糖 1.8 g, 葡萄糖 6 g, 番茄浸粉 4 g·L ⁻¹
MFL	麦芽糖 1.8 g, 葡萄糖 6 g, 酪蛋白胨 4 g·L ⁻¹
MFS	麦芽糖 1.8 g, 葡萄糖 6 g, 土豆蛋白胨 4 g·L ⁻¹
MEB	麦芽浸粉 13 g·L ⁻¹
PDA	马铃薯浸粉 5 g·L ⁻¹ , 葡萄糖 20 g·L ⁻¹
WB	麦芽浸粉 15 g·L ⁻¹ , 麦芽糖 12.75 g·L ⁻¹
YMB	酵母提取物 3 g·L ⁻¹ , 麦芽浸粉 3 g·L ⁻¹ , 葡萄糖 10 g·L ⁻¹
SA	葡萄糖 20 g·L ⁻¹
TMG	番茄浸粉 10 g·L ⁻¹ , 麦芽糖 5 g·L ⁻¹ , 葡萄糖 10 g·L ⁻¹

为 5.81, 结构式为 C₁₀₀₈₀H₁₅₈₈₅N₂₈₀₃O₃₈₀₄S₇₇, 不稳定系数为 42.71, 为不稳定蛋白; 脂肪酸系数为 89.47, 平均亲水性值为-0.045。SignalP 4.1 server 分析结果显示, 该蛋白不存在信号肽, 为非分泌蛋白。采用 Target P 在线软件预测其亚细胞定位, 结果表明其蛋白位于细胞质基质中。用 CDD 预测其结构域, 结果显示该蛋白含有 SAT-KS-PT-ACP-ACP-TE 等结构域, 其中 PT 为非还原型聚酮合酶所独有的结构域。利用 MEGA 6.0 的 Clustal W 的程序对 AcPKS1 和其他 26 条真菌 PKS 蛋白序列进行比对后, 利用 neighbor-joining 算法建树 (图 1), 结果显示 AcPKS1 和密褐褶孔菌 *Gloeophyllum trabeum* (XP_007866703.1)、可可链疫孢荚腐病菌 *Moniliophthora roreri* (XP_007850276.1)、异缘多孔菌 *Heterobasidion irregulare* (XP_009546869.1)、皱革菌 *Punctularia strigosozonata* (XP_007386370.1) 形成独立分支, 该分支功能未知, 其结构域均为 SAT-KS-PT-ACP-ACP-TE; 其余 5 组的环化方式及化合物组成特点均已明确: 第 I 组的化合物为芳香环后接长链的聚酮类, 其环化通过 C₄-C₉ 或 C₂-C₁₁ 产生第一个芳香环; 第 II 组与第 I 组类似, 但其通过 C₂-C₇ 形成芳香环; 第 III 组通过 PKS 合成五酮体, 然后再经过醇醛缩合及 C₂-C₇ 环化产生双芳香

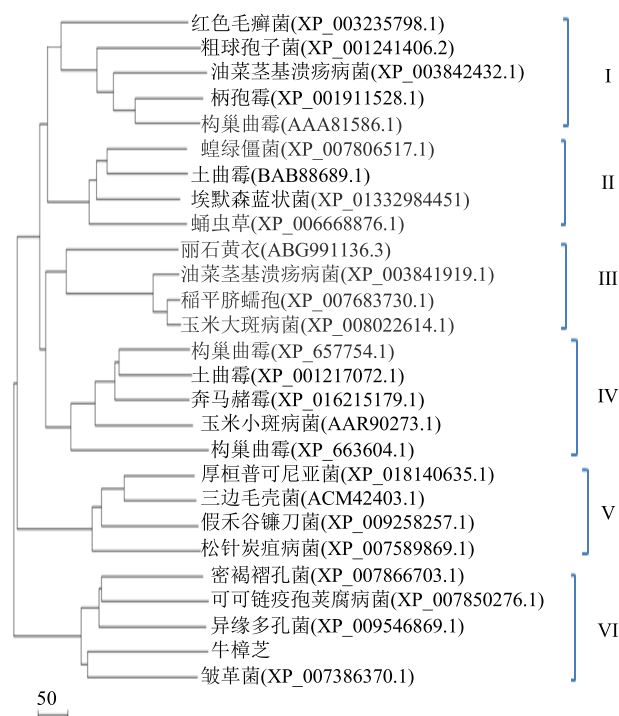


图 1 AcPKS1 蛋白与其他真菌 PKS 蛋白的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of AcPKS1 in *A. camphorata* with other related fungal protein

环; 第 IV 组聚酮类化合物同样为芳香环加长链的模式, 与 I 组和 II 组的区别在于其通过 C₆-C₁₁ 或 C₄-C₁₃ 环化生成芳香环; 第 V 组则是先由 PKS 合成四酮体, 再通过 C₂-C₇ 环化形成单芳香环聚酮化合物^[14,17]。

3.3 不同碳氮源添加物对 AcPKS1 基因表达的影响

根据课题组之前的研究, 牛樟芝菌丝体在不同的培养基上生长速度差异较大^[26]。将牛樟芝菌丝体培育在 17 种不同的培养基上, 其中 1~5 号培养基添加不同碳源, 6~11 号添加不同氮源, 25 °C 恒温培养箱中培养 40 d 后, 提取 RNA 反转录成 cDNA, 并用特异引物检测其表达情况。结果显示, 在 5 种不同碳源添加物的培养基上 AcPKS1 基因均可表达, 但表达量差异较大, 以 Mal 基础培养基为基准, 甘露糖、果糖和葡萄糖能够增强 AcPKS1 基因的表达, 乳糖对 AcPKS1 基因的表达有一定的抑制作用, 其中葡萄糖能够显著地增强该基因的表达 (图 2-A)。在 6 种不同氮源添加物的培养基上, 该基因也都可表达, 但酪蛋白胨在一定程度上抑制了 AcPKS1 基因的表达, 牛肉浸粉、胰蛋白胨、酵母提取物、番茄浸粉和土豆蛋白胨均能有效增强该

基因的表达, 其中 MFB 的增强效果最明显 (图 2-B)。采用不同的商业培养基筛选实验结果显示 (图 2-C), 在具氮源的基础上, 葡萄糖含量越高, AcPKS1 基因表达水平愈高, 且其表达水平与培养基中的葡萄糖含量接近正比相关, 如 PDA 的表达量约为 YMB、TMG 表达量的 2 倍; 在无葡萄糖的 MEB 中该基因则不表达; 而 SA 的表达水平相对偏低, 则可能是因为缺少合适氮源的因素。综上所述, 可初步推测葡萄糖是 AcPKS1 基因的表达的必要条件。

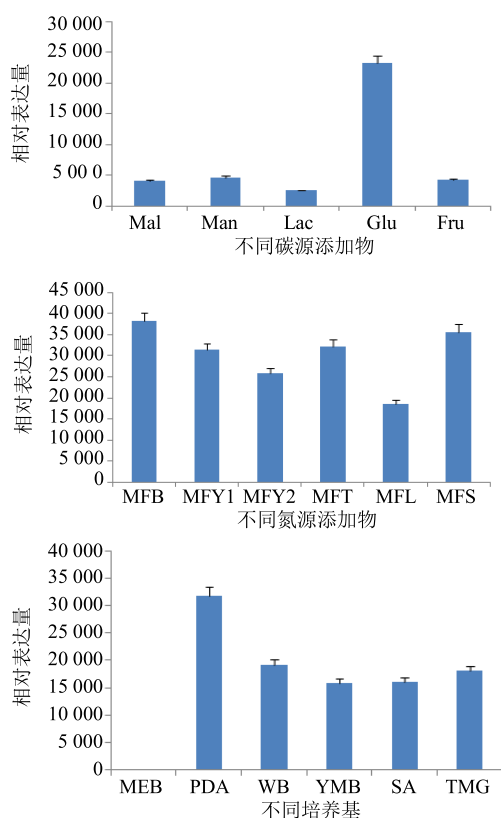


图 2 不同培养基条件下 AcPKS1 基因的表达量

Fig. 2 Expression levels of gene AcPKS1 in different medium

4 讨论

牛樟芝是多孔菌科 (Polyporaceae) 薄孔菌属 *Antrodia* 真菌, 为我国台湾地区所特有的珍贵食药两用真菌^[25,27]。牛樟芝中含有丰富的具生理活性的次生代谢产物, 如牛樟芝子实体中特有的聚酮化合物安多坎因 A (antrocaphin A)^[28-29]。根据牛樟芝基因组测序结果, 牛樟芝中存在可能是 PKS 基因的序列有 14 条^[25], 然而尚未见确定 AcPKS1 基因与某一具体化合物相关的报道。本研究的最终目的就是分离与验证牛樟芝中的 PKS 基因、确定基因与化

合物间的关系、以及 PKS 基因在何种条件下表达量最大。

本课题组从牛樟芝基因组中分离得到 4 条完整的 PKS 基因, 确定基因功能一般通过生物信息学方法来分析, Kroken 等^[14]对病原微生物和污水中的子囊菌的 I 型 PKS 进行聚类分析, 其结果将不同真菌 PKS 分成还原型 PKS 和非还原型 PKS, 并将非还原型 PKS 根据其结构域和化合物分成 4 组, 并将部分 PKS 基因与化合物之间联结; Li 等^[17]根据产物模板结构域 (PT) 将真菌非还原型 PKS 根据其环化方式分成 5 组, 各组的环化方式和芳香环数量不同。本实验中 AcPKS1 酶蛋白序列与其他功能未知的 PKS 聚为一支, 其结构域与 Kroken 等^[14]分析出的非还原型 PKS 的 I、II、III 组相似, 且含有非还原型 PKS 独有的 SAT、PT 结构域, 可推测基因为 PKS 基因; 该分支的结构域与上述 5 组均存在不同, 可能为新的环化方式, 或存在合成新聚酮类化合物的可能。

为了验证 AcPKS1 基因的诱导表达条件, 本实验进行了牛樟芝在不同培养基上的表达谱分析, 虽尚未与化合物联结, 但本实验从基因水平上对其表达量进行了检测。证据表明, 不同培养基不仅对牛樟芝菌丝体的生长速度有显著影响, 以麦芽糖和果糖为碳源, 牛肉浸粉作为氮源时, 牛樟芝菌丝体生长最佳^[26,30], 且不同的培养方式对牛樟芝活性组分也有显著影响^[31], 本实验结果证明 AcPKS1 基因在不同培养基上的表达量存在显著差异, 且葡萄糖是其表达的必要条件。同一基因在不同培养条件下, 其基因表达量差异显著, 且其产物也有可能不同, Yuan 等^[15]利用“单菌多产物”策略从地衣内生真菌 *Myxotrichum sp.* 中得到 4 种新的非还原型聚酮化合物; Hemphill 等^[32]利用“一菌多素”成功的从内生真菌三线镰刀菌 *Fusarium tricinctum* 中得到 5 种化合物, 2 种新化合物 fusarilelin K 和 fusarilelin L 及 2 种已知化合物 fusarilelin A 和 fusarilelin B, 并将化合物 fusarilelin J 的量增加了 80 倍。“一菌多素”策略从侧面证明了同一基因在不同环境及前体物的条件, 其表达效果不同, 证明了本实验结论的可靠性^[32]。本实验关于 AcPKS1 基因在不同浓度葡萄糖下的表达量的关系, 即葡萄糖含量与 AcPKS1 基因的表达量呈正相关, 这一结果可能是由于葡萄糖是该基因的启动子诱导物, 或者是葡萄糖可

与该基因的增强子等顺式作用元件结合提高该基因的表达效率,需要下一步的实验进行验证;同时得到这一结论有助于牛樟芝聚酮类化合物的异源表达;该研究结果能够为提高牛樟芝聚酮化合物异源表达效率和基因调控表达分析奠定基础。

参考文献

- [1] Hertweck C. The biosynthetic logic of polyketide diversity [J]. *Angew Chem (Int Ed Engl)*, 2009, 48(26): 4688-4716.
- [2] Huffman J, Gerber R, Du L C. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins [J]. *Biopolymers*, 2010, 93(9): 764-776.
- [3] Yang T, Yao H, He G, *et al.* Effects of lovastatin on MDA-MB-231 breast cancer cells: An antibody microarray analysis [J]. *J Cancer*, 2016, 7(2): 192-199.
- [4] Yuan S, Hua J, Zhou Y, *et al.* Doxorubicin loaded chitosan-W₁₈O₄₉ hybrid nanoparticles for combined photothermal-chemotherapy [J]. *Macromol Biosci*, 2017, doi: 10.1002/mabi.201700033.
- [5] Cully D F, Vassilatis D K, Liu K K, *et al.* Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1994, 371(6499): 707-711.
- [6] Sarbassov D D, Ali S M, Sengupta S, *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB [J]. *Mol Cell*, 2006, 22(2): 159-168.
- [7] Ross R K, Yuan J M, Yu M C, *et al.* Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 1992, 339(8799): 943-946.
- [8] Munkvold G P, Desjardins A E. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence [J]. 2007, 81(6): 556-565.
- [9] Seshime Y, Juvvadi P R, Fujii I, *et al.* Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae* [J]. *Bioch Biophys Res Commun*, 2005, 331(1): 253-260.
- [10] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(2): 285-295.
- [11] Cox R J. Polyketides, proteins and genes in fungi: Programmed nano-machines begin to reveal their secrets [J]. *Organic Biom Chem*, 2007, 38(40): 2010-2026.
- [12] Beck J, Ripka S, Siegner A, *et al.* The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases [J]. *Eur J Biochem*, 1990, 192(2): 487-498.
- [13] 许 杨, 魏康霞. 真菌聚酮合酶基因的研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(2): 1-5.
- [14] Kroken S, Glass N L, Taylor J W, *et al.* Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15670-15675.
- [15] Yuan C, Wang H Y, Wu C S, *et al.* Austdiol, fulvic acid and citromycetin derivatives from an endolichenic fungus, *Myxotrichum sp* [J]. *Phytochem Lett*, 2013, 6(4): 662-666.
- [16] Sattely E S, Fischbach M A, Walsh C T. Total biosynthesis: Reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways [J]. *Nat Prod Rep*, 2008, 25(4): 757-793.
- [17] Li Y R, Xu W, Tang Y. Classification, prediction, and verification of the regioselectivity of fungal polyketide synthase product template domains [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(30): 22764-22773.
- [18] Galagan J E, Calvo S E, Cuomo C, *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae* [J]. *Nature*, 2005, 438(7071): 1105-1115.
- [19] Machida M, Asai K, Sano M, *et al.* Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae* [J]. *Nature*, 2005, 438(7071): 1157-1161.
- [20] Nierman W C, Pain A, Anderson M J, *et al.* Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. *Nature*, 2005, 438(7071): 1151-1156.
- [21] Yoder O C, Turgeon B G. Fungal genomics and pathogenicity [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(4): 315-321.
- [22] Brakhage A A, Schuemann J, Bergmann S, *et al.* Activation of fungal silent gene clusters: A new avenue to drug discovery [J]. *Prog Drug Res*, 2008, 66(66): 10-12.
- [23] Corre C, Challis G L. New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining [J]. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(8): 977-986.
- [24] Yuan C, Guo Y H, Wang H Y, *et al.* Allelopathic polyketides from an endolichenic fungus *Myxotrichum sp.* by using OSMAC strategy [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19350.
- [25] Lu M Y, Fan W L, Wang W F, *et al.* Genomic and transcriptomic analyses of the medicinal fungus *Antrodia cinnamomea* for its metabolite biosynthesis and sexual development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(44): E4743-E4752.
- [26] 赵 能, 原晓龙, 陈 剑, 等. 不同碳氮源对牛樟芝菌

- 丝体生长的影响 [J]. 西部林业科学, 2016, 45(4): 7-12.
- [27] Wu S H, Yu Z H, Dai Y C, *et al.* *Taiwanofungus*, a polypore new genus [J]. *Fungal Sci*, 2004, 19(3/4): 109-116.
- [28] Hsieh Y H, Chu F H, Wang Y S, *et al.* Antrocamphin A, an anti-inflammatory principal from the fruiting body of *Taiwanofungus camphoratus*, and its mechanisms [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(5): 3153-3158.
- [29] Lee C L, Huang C H, Wang H C, *et al.* First total synthesis of antrocamphin A and its analogs as anti-inflammatory and anti-platelet aggregation agents [J]. *Organ Biom Chem*, 2011, 9(1): 70-73.
- [30] 姚秋生, 朱盼盼, 王雅利. 牛樟芝固态培养的适宜培养基和光照强度试验 [J]. 食药菌, 2017, 25(3): 176-177.
- [31] 周璇, 夏永军, 刘胜男, 等. 不同培养方式对牛樟芝活性组分的影响 [J]. 工业微生物, 2017, 47(2): 18-23.
- [32] Hemphill C F, Sureechatchaiyan P, Kassack M U, *et al.* OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum* [J]. *J Antibiot*, 2017, 70(6): 726-732.