

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(1):115-121; 4 January 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

根癌农杆菌介导的日本曲霉转化体系的建立

郭慧, 杨哲, 邢来君, 李明春*

南开大学微生物学系, 分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

摘要:【目的】通过根癌农杆菌介导的方法构建日本曲霉转化子库, 从而筛选出高产甘没氧化酶的日本曲霉突变菌株。【方法】本文通过三亲杂交的方法将双元载体 pBI-hphII 转移至根癌农杆菌 EHA105 中并作为侵染菌株, 以日本曲霉 As5999 为受体菌株, 建立了农杆菌介导的日本曲霉转化体系, 构建了突变体库, 并对影响转化效率的根癌农杆菌浓度, 乙酰丁香酮(As)加入与否, 共培养时间, 共培养温度等因素进行了分析。【结果】对转化子的 PCR 检测和 Southern 杂交分析表明, T-DNA 已整合进日本曲霉基因组中, 随机挑选的 9 个转化子连续转接 10 代后均能稳定遗传。【结论】该转化体系的建立为筛选出高产甘油氧化酶的日本曲霉突变菌株奠定了基础。

关键词: 日本曲霉, 根癌农杆菌, 转化体系

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)01-0115-07

日本曲霉 (*Aspergillus japonicus*) 属于半知菌纲, 丛梗孢目, 丛梗孢科, 曲霉属的黑曲霉群, 分布十分广泛, 目前发现日本曲霉产生甘油氧化酶的活力最高^[1]。甘油氧化酶可应用于血清甘油三酯(TG)的测定, 替代酶促偶联法^[2]中的甘油激酶和甘油磷酸氧化酶, 其中甘油激酶和甘油磷酸氧化酶两种酶制剂由于技术的限制目前国内尚不能生产, 国内组装的 TG 测定试剂盒中上述两种酶均需要购买进口产品然后分装, 这就造成了 TG 试剂盒成本居高不下。如果能以甘油氧化酶代替甘油激酶和甘油磷酸氧化酶进行 TG 测定, 则可不必要进口甘油激酶和甘油磷酸氧化酶成品^[3-4]。我们想通过根癌农杆菌介导的方法构建日本曲霉转化子库, 从而筛选出高产甘油氧化酶的日本曲霉突变菌株, 而这一工作的前提就是建立起有效的日本曲霉转化体系。

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 是一种革兰氏阴性土壤杆菌, 它能够在植物的受伤部位侵染植物细胞, 将 T-DNA (transferred DNA) 转入植物细胞并整合到植物的基因组, 导致肿瘤的发生。自 1998 年 de Groot 等^[5]首次将根癌农杆菌介导的转化法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 应用于丝状真菌的遗传转化以来, 已有大量的丝状真菌通过 ATMT 法成功实现了遗传转化^[6-8], 曲霉中有烟曲霉^[9], 黑曲霉^[10], 泡盛曲霉^[11]等, 该方法具有操作简单、转化效率高和转化子遗传稳定等特点^[12-14]。本文利用这一转化系统成功构建了日本曲霉转化子库, 并对影响转化效率的因素进行了分析, 为筛选出高产甘油氧化酶的日本曲霉突变菌株奠定了基础。

基金项目: 天津市科技支撑计划重点项目 (08ZCKFSH02100); 国家自然科学基金 (30771355); 国家科技部“863”项目 (2007AA10Z189)

* 通信作者。Tel: +86-22-23508506; Fax: +86-22-23508800; E-mail: nklimingchun@yahoo.com.cn

作者简介: 郭慧 (1986-), 女, 内蒙古鄂尔多斯市人, 硕士研究生, 主要从事现代真菌学的学习与研究。E-mail: guohui204@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-07-07; **修回时间:** 2010-10-29

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒:日本曲霉 As5999 购于中科院微生物研究所;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 根癌农杆菌 EHA105, *E. coli* helper 均为本研究室保存。pBI121 (Kan^r) 本研究室保存; pAN7-1 (Amp^r) 沈萍老师赠送; 带有构巢曲霉 *gpdA* 启动子和 *hph* 基因及构巢曲霉 *trpC* 终止子的 pBI/hphII 质粒由本研究室构建。

1.1.2 抗生素和试剂:潮霉素 B、卡那霉素、氨基青霉素、利福平、头孢霉素、乙酰丁香酮(As)购自北京鼎国生物技术有限责任公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基:土豆培养基(PDA)、YEB 培养基、

LB 培养基和查氏培养基见文献[15], MM 培养基和 IM 培养基见文献[16]。发酵培养基为甘油 4%, 胰蛋白胨 0.1%, MgSO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, 玉米浆 0.2%, 酵母膏 0.6%。

1.1.4 酶活力检测体系:甘油 0.1 mol/L, PBS 缓冲液 (pH6.5) 0.3 mol/L, 4-氨基安替比林 2.4 mmol/L, 苯酚 42 mmol/L, 过氧化物酶 (比活大于 250), 去离子水。

1.2 载体的构建

用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *XbaI* 切下质粒 pAN7-1 上的潮霉素 B 基因片段, 连接到同样用 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切的 pBI121 质粒 12.6 kb 片段上, 构建双元载体 pBI/hphII, 以潮霉素 B 抗性作为转化子筛选标记, 构建过程如图 1 所示。

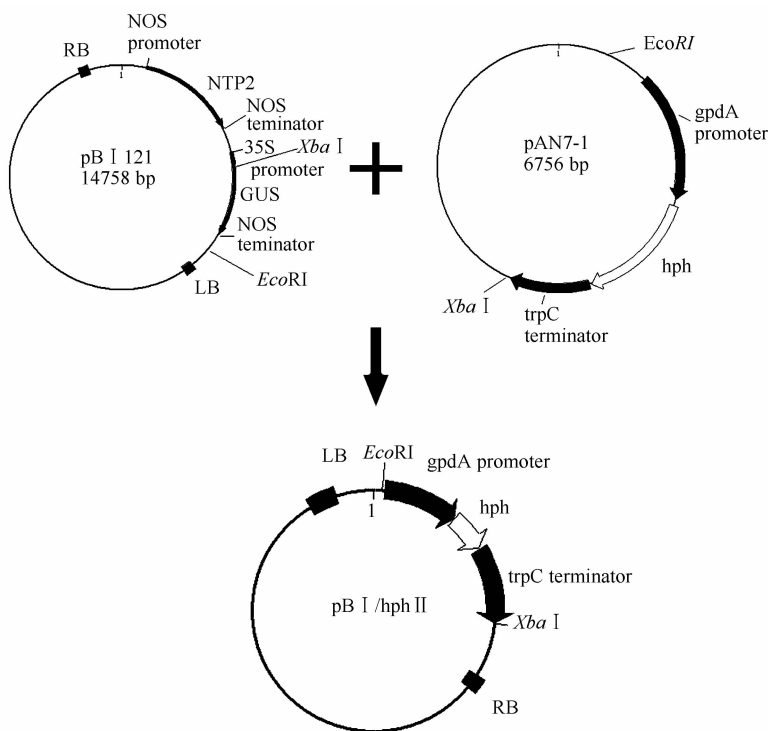


图 1 双元载体 pBI/hphII 构建示意图

Fig. 1 Map of construction of novel binary vector pBI/hphII.

1.3 潮霉素对日本曲霉最小抑菌浓度的确定

无菌水冲洗 30℃ 培养 5-7 d 的日本曲霉 PDA 培养基斜面, 得到分生孢子悬浮液, 稀释到 10³ 个/mL, 取 200 μ L 涂于含有不同浓度潮霉素 B 的查氏培养基上, 30℃ 培养 72 h, 计算在不同浓度潮霉素存在下的致死率, 确定潮霉素 B 对日本曲霉的最小抑菌浓度。

1.4 农杆菌的转化和培养

利用三亲杂交方法将构建好的 pBI/hphII 转入农杆菌中, 从 YEB 平板 (Kan 50 mg/L, Rif 50 mg/L) 上挑取农杆菌单菌落接入到 5 mL 液体 MM 中 (Kan 50 mg/L, Rif 50 mg/L), 200 r/min, 30℃ 培养 48 h, 然后取 50 μ L 接入 5 mL IM (含或不含 200 μ mol/L 的乙酰丁香酮) 培养基中, 200 r/min, 30℃ 培养至

OD_{600} 为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 (菌落形成单位 (cfu) 分别为 $6.3 \times 10^7/\text{mL}$ 、 $6.5 \times 10^7/\text{mL}$ 、 $7.2 \times 10^7/\text{mL}$ 、 $8.0 \times 10^7/\text{mL}$ 、 $1.0 \times 10^8/\text{mL}$ 、 $1.5 \times 10^8/\text{mL}$), 备用。

1.5 日本曲霉孢子悬液的制备

用 5 mL 无菌水从培养 5-7 d 的 PDA 平板上洗下日本曲霉的分生孢子, 血球计数板计数, 然后用无菌水调节孢子浓度为 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 个/mL。

1.6 转化

取不同孢子浓度的日本曲霉孢子悬浮液 100 μL 和等体积的不同浓度的农杆菌菌液混合到一无菌 1.5 mL 离心管中, 混匀, 涂布在已铺有微孔滤膜的固体 IM (含 200 $\mu\text{mol/L}$ 的乙酰丁香酮) 培养基上, 24 $^{\circ}\text{C}$ 共培养 3 d 后将微孔滤膜揭下, 反铺到含有潮霉素 B (60 mg/L) 和头孢霉素 (200 mg/L) 的查氏培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d 后揭下微孔滤膜, 继续培养至抗性菌落生长, 将抗性菌落转到同样的选择培养基上, 进行二次筛选并保存。

1.7 转化子抗性的遗传稳定性检测

从平板上任意挑选 9 个阳性转化子转至新的不含有潮霉素抗性的土豆培养基上传代培养, 培养 10 代后, 重新转接到含有潮霉素 B 的查氏培养基中观测其是否丧失潮霉素抗性, 以此来检测转化子抗性的稳定性。

1.8 转化子 PCR 和 Southern blot 检测

日本曲霉总 DNA 的提取按文献 [15] 方法进行。以潮霉素 B 抗性基因上两段序列设计引物为: hph1: 5'-ATGCCTGAACTCACCGCGAC-3', hph2: 5'-CTATTCCTTTGCCCTCGGAC-3' (由北京三博生物工程技术服务有限公司合成)。PCR 扩增潮霉素 B 抗性基因反应体系 (25 μL): 模板 (DNA) 2 μL , $10 \times$ 缓冲液 (含 20 mmol/L MgCl_2) 2.5 μL , dNTP (10mmol/L) 2 μL , hph1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , hph2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Taq DNA polymerase (5 U/ μL) 1 μL , H_2O 15.5 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 S, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 S, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

探针的标记及杂交按试剂盒 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (购于 Roche 公司) 上提供方法进行。

1.9 日本曲霉转化子的甘油氧化酶活力性状检测

将由日本曲霉 As5999 作为出发菌株筛选得到的日本曲霉转化子接种到土豆斜面培养至孢子萌

发, 用无菌水冲洗斜面制得孢子悬浮液, 取 1 mL 孢子悬浮液接种到装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 24 h。三层纱布过滤收集菌体并充分洗涤, 液氮研磨三次之后溶于 30 mL 硼砂碳酸钠 (含 5 mmol/L EDTA) 缓冲液中, 5000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 取 33 μL 上清液加入到甘油氧化酶活力检测体系中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 min, 在 500 nm 处测其反应前后的 OD 值变化。37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min 催化氧化 1 μmol 的甘油所需要的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。利用同样的方法检测原始菌株的酶活力, 通过比较筛选得到酶活力明显提高的转化子后再进行复筛。

2 结果和分析

2.1 载体的构建

选用 *EcoRI* 和 *XbaI* 双酶切 pAN7-1 质粒, 回收含有 *hph* 基因的 4058 bp 片段, 同样将 pBI121 质粒用 *EcoRI* 和 *XbaI* 进行双酶切, 回收 12.6 kb 片段, 将 12.6 kb 片段与 4058 bp 带有潮霉素基因的片段连接, 构建得到双元载体 pBI/hphII。经酶切和 PCR 扩增得到预期长度 (1020 bp) 的潮霉素 B 抗性基因片段, 证明带有潮霉素 B 抗性筛选标记的载体 pBI/hphII 构建成功。

2.2 潮霉素 B 对日本曲霉最小抑菌浓度的确定

在含有不同浓度潮霉素 B 的查氏培养基上培养日本曲霉 As5999, 确定潮霉素 B 对日本曲霉的最小抑制浓度, 如表 1 所示。

表 1 日本曲霉在含有不同浓度潮霉素 B 的查氏培养基上致死率情况

Table 1 Death rate of *Aspergillus japonicus* on Czapek's agar containing different concentration of HmB

$c(\text{HmB}) / (\text{mg/L})$	0	10	20	30	40	50	60	70
Death rate/%	0	18	35	55	73	95	100	100

从表中可以得出, 在一定浓度范围内, 致死率随潮霉素 B 浓度的增加而增加, 当潮霉素 B 浓度上升到 60 mg/L 时, 潮霉素 B 对日本曲霉的致死率为 100%, 致死率达最大值, 再不随潮霉素 B 浓度的升高而增加, 所以最终确定潮霉素 B 对日本曲霉的最小抑菌浓度为 60 mg/L。

2.3 农杆菌预培养时是否加入 AS 对侵染效率的影响

在加入 AS 和不加入 AS 的 IM 培养基中预培养

带有双元载体的根癌农杆菌 EHA105, 培养至 OD_{600} 达到 0.8, 取 100 μL 菌液与等体积的浓度为 10^8 个/mL 的孢子悬浮液混合, 在 24°C 下共培养 3 d, 转膜到含有潮霉素 B 的查氏培养基, 筛选转化子检测侵染效率。

由图 2-A 所示可知, 农杆菌 EHA105 在侵染日本曲霉之前的预培养时, IM 液体培养基中加入 AS 可以明显提高侵染效率, 而不加入 AS 时侵染效率明显降低。

2.4 农杆菌浓度对转化效率的影响

在加入 AS 的 IM 培养基中预培养带有双元载体的根癌农杆菌 EHA105, 培养至 OD_{600} 达到 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 取 100 μL 菌液与等体积的浓度为 10^8 个/mL 的孢子悬浮液混合, 在 24°C 下共培养 3 d, 转膜到含有潮霉素 B 的查氏培养基, 筛选转化子检测侵染效率。

由图 2-B 可知, 培养农杆菌 EHA105 至 OD_{600} 为 0.8 时转化效率最高, 而在 OD_{600} 为 0.6 时较低, OD_{600} 为 1.2 时转化效率也较低。

2.5 孢子悬浮液浓度对侵染效率的影响

在加入 AS 的 IM 培养基中预培养带有双元载体的根癌农杆菌 EHA105, 培养至 OD_{600} 达到 0.8, 取 100 μL 菌液与等体积的浓度为 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 个/mL 的孢子悬浮液混合, 在 24°C 下共培养 3 d, 转膜到含有潮霉素 B 的查氏培养基, 筛选转化子检测侵染效率。

由图 2-C 分析可知道, 农杆菌与日本曲霉共培养时, 转化子数随孢子浓度的增加而明显增加, 孢子浓度为 10^9 个/mL 时平板上的转化子过多, 几乎无法挑取单菌落转化子, 孢子浓度为 10^8 个/mL 时转化子数量为 80 - 100 个, 转化子较多, 且有利于单菌落转化子的挑取, 所以选择最适宜的日本曲霉孢子浓度为 10^8 个/mL。

2.6 共培养温度对侵染效率的影响

在加入 AS 的 IM 培养基中预培养带有双元载体的根癌农杆菌 EHA105, 培养至 OD_{600} 达到 0.8, 取 100 μL 菌液与等体积的浓度为 10^8 个/mL 的孢子悬浮液混合, 在 20°C , 24°C , 28°C 下共培养 3 d, 转膜到含有潮霉素 B 的查氏培养基, 筛选转化子检测侵染效率。

由图 2-D 可知不同共培养温度对于农杆菌侵染日本曲霉的效率影响显著, 最佳的共培养温度为 24°C , 温度升高和降低都不利于农杆菌侵染日本曲霉。

2.7 共培养时间对侵染效率的影响

在加入 AS 的 IM 培养基中预培养带有双元载体的根癌农杆菌 EHA105, 培养至 OD_{600} 达到 0.8, 取 100 μL 菌液与等体积的浓度为 10^8 个/mL 的孢子悬浮液混合, 在 24°C 下共培养 1 - 6 d, 转膜到含有潮霉素 B 的查氏培养基, 筛选转化子检测侵染效率。

由图 2-E 可知, 最适宜的共培养时间为 3 d, 随着共培养时间的延长侵染效率有明显的下降。

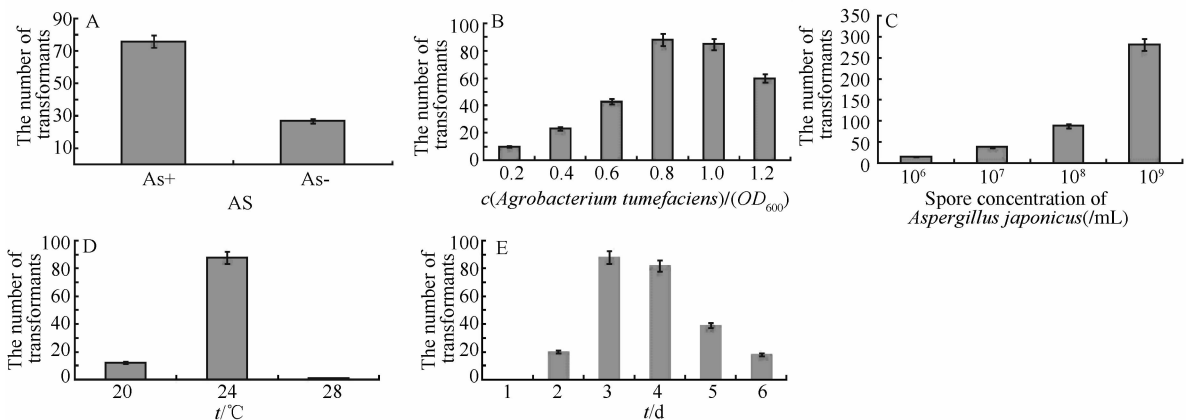


图 2 影响根癌农杆菌介导的日本曲霉转化效率的因素

Fig. 2 The factors affecting the transformation efficiency. A: Effect of adding and not adding AS on transformation efficiency; B: Effect of *Agrobacterium tumefaciens* concentration on transformation efficiency; C: Effect of spore concentration on transformation efficiency; D: Effect of co-culture temperature on transformation efficiency; E: Effect of co-culture time on transformation efficiency.

由以上结果可知, 农杆菌 EHA105 侵染日本曲霉的最佳条件确定为农杆菌培养至 OD_{600} 为 0.8, 日

本曲霉孢子悬浮液的浓度为 10^8 个/mL, 各取 100 μL 混合涂布于覆盖有微孔滤膜的 IM 培养基

(含有 200 $\mu\text{mol/L}$ AS)上,于 24 $^{\circ}\text{C}$ 共培养 3 d,将微孔滤膜转移到查氏培养基(含有 60 mg/L 潮霉素 B 和 200 mg/L 头孢霉素)上,筛选获得潮霉素 B 抗性的转化子。转化率约为 80 - 100 个转化子/ 10^8 个日本曲霉孢子。

2.8 日本曲霉转化子潮霉素 B 抗性稳定性检测

从平板上任意挑选 9 个阳性转化子转至新的不含有潮霉素 B 抗性的土豆培养基上传代培养,培养 10 代后,重新转接到含有 60 mg/L 潮霉素 B 的查氏培养基中,发现随机挑选的转化子在无抗生素压力的培养条件下,保持了对于潮霉素 B 的抗性,稳定性达到 100%,由此证明突变体获得的抗潮霉素基因能够较稳定地遗传。

2.9 转化子 PCR 和 Southern blot 检测

随机挑选了 8 个日本曲霉转化子,以野生型日本曲霉为对照,提取基因组 DNA 进行 PCR 检测,8 个样品均扩增出潮霉素抗性基因的特异片断,结果如图 3-A,以 pBI/hphII 质粒为模板,引物 hph1 和 hph2 扩增得到 1020 bp 的潮霉素抗性基因 *hph* 做探针, *Hind* III 酶切基因组, *Hind* III 在潮霉素抗性基因 *hph* 序列中无酶切位点。酶切过夜后电泳转膜,进行 Southern blot 分析(图 3-B),5 个样品均有杂交信号出现,且均为单拷贝,表明通过根癌农杆菌介导的遗传转化方法已经实现了对日本曲霉的转化。

2.10 日本曲霉转化子的甘油氧化酶活力性状检测

将筛选得到的几株酶活力提高的转化子传代 10 次后检测酶活力稳定性,初步获得一株酶活力稳定且甘油氧化酶活力较原始菌株提高 50% 的菌株,命名为 Ajyz0079。

3 讨论

甘油氧化酶是 20 世纪 70 年代后期才发现的新酶,至今尚未被国际酶学委员会确定其标号。该酶主要存在于微生物体如曲霉菌属和青霉菌属中,目前发现曲霉菌属的日本曲霉产生甘油氧化酶的活力最高。由于该酶发现较晚,国外只有关于该酶的实验室研究工作,没有工业化的生产,所以诸如 Sigma 公司、罗氏公司等大的生化试剂公司均无产品出售,更没有使用该酶配制的检测血清甘油三酯试剂盒在临床推广应用。我们建立的根癌农杆菌介导日本曲霉转化体系可以为甘油氧化酶的大规模生产奠定基础。

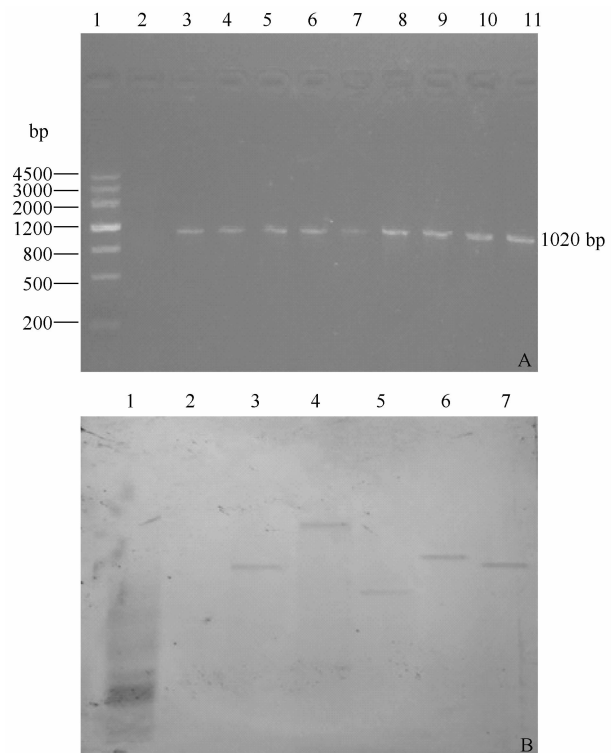


图 3 日本曲霉转化子的 PCR 检测(A)和 Southern 杂交结果(B)

Fig. 3 PCR (A) and southern analysis (B) results of the *Aspergillus japonicus* transformants. A: PCR results of the *Aspergillus japonicus* transformants. 1. Marker III; 2. Wide type; 3 - 10. transformant; 11. PCR product of *hph* gene; B: Southern analysis of *Aspergillus japonicus* transformants. 1. PCR product of *hph* gene; 2. genomic DNA of wide type 3 - 7. genomic DNA of transformant.

根癌农杆菌介导的转化系统因其简便、高效以及外源基因易于整合等优点,在植物、动物、微生物基因转化中得到广泛的应用。我们利用这一转化系统成功地实现了对日本曲霉的遗传转化,并对影响转化的日本曲霉孢子浓度,根癌农杆菌浓度,As 加入与否,共培养时间,共培养温度等因素进行了优化,优化条件后转化率约为 80 - 100 个转化子/ 10^8 个孢子,远高于传统的真菌转化方法,但转化效率低于根癌农杆菌介导的烟曲霉^[9](>100 个转化子/ 10^7 个孢子)和根癌农杆菌介导的泡盛曲霉^[11](200 - 250 个转化子/ 10^6 个孢子),可能由于不同农杆菌对不同菌株转化效率不同。现已构建了含 1000 多个转化子的突变体库,初步筛选出一株甘油氧化酶活力提高 50% 的转化子,已进行 10 L 罐体小试发酵,正在摸索 100 L 罐体发酵条件。血清甘油三酯(TG)测定试剂盒的研制工作也在同步进

行中。

日本曲霉孢子浓度和根癌农杆菌浓度对转化效率都具有显著的影响,而且要保证转化获得成功,两者都必须达到一定数值,不能过低。而另一方面,日本曲霉孢子浓度或根癌农杆菌浓度过高对转化反而不利,这可能是由于根癌农杆菌在侵染孢子时,相对于单个孢子而言,根癌农杆菌需要达到一定密度才能侵染成功,且两者之间可能存在着一定的比例关系^[17]。

对于预培养是否加入 As 文献说法不一,本研究结果显示在对农杆菌进行预培养时加入 As 可明显提高转染效率,而龙朝钦等^[18]研究显示在对农杆菌进行预培养时加入 As 与否对烟曲霉的转化效率影响不大,而在共培养时必须加 As,而且随着 As 浓度的加大转化频率越高,Leclercq 等^[19]在对巴西安白僵菌进行 ATMT 时也得出随着 As 浓度的加大转化频率越高的结论。

共培养温度和共培养时间也影响转化效率,Combiere 等^[20]认为,对转化起关键作用的根癌农杆菌 *vir* 基因需要在一定温度范围内才能得到表达,温度过高或者过低,这些基因的表达效率都会变低,可能使 T-DNA 的转移受阻。这与根癌农杆菌介导的植物转化相似。本实验选取 20℃、24℃ 和 28℃ 3 个温度梯度和 1、2、3、4、5、6 天 6 个时间梯度共培养,最终确定 24℃ 共培养 3 d 为最佳条件。

转化子中 T-DNA 插入的情况对以后功能基因的研究具有重要的意义,本实验中 T-DNA 在转化子中为单拷贝随机插入,与前人的研究结果相似^[9],有利于我们筛选到高产甘油氧化酶的日本曲霉突变菌株,且有利于后续实验中对甘油氧化酶基因的研究。

参考文献

- [1] Hayashi H, Nishimoto Y, Akiyama K, Nozaki H. New paralytic alkaloids, asperparalines A, B and C, from *Aspergillus japonicus* JV-23. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64(1) :111-115.
- [2] Charles CA, Lucy SP, Cicely SG. Enzyme determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, 1974, 20:470-475.
- [3] McPherson RA, Brown KD, Agarwal RP, Threatte GA, Jacobson RJ. Hydroxyurea interferes negatively with triglyceride measurement by a glycerol oxidase method. *Clinical Chemistry*, 1985, 31(8) :1355-1357.
- [4] Fletcher MJ. A colorimetric method for establishing serum triglycerides. *Clinical Chemistry*, 1968, 22:393-397.
- [5] de Groot MJA, Bundock P, Hooymaas PJJ, Beijersbergen AGM. *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of filamentous fungi. *Naure Biotechnology*, 1998, 16(9) : 839-842.
- [6] Weld RJ, Eady CC, Ridgway HJ. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 65(1) :202-207.
- [7] Klimes A, Neumann MJ, Grant SJ, Dobinson KF. Characterization of the glyoxalase I gene from the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2006, 52(9) :816-822.
- [8] Maruthachatham K, Nair V, Rho HS, Choi J, Kim S, Lee YH. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C-acuteum*. *Journa of Microbioogyl and Biotechnology*, 2008, 18(2) :234-241.
- [9] Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung KJ. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *aspergillus fumigatus*; an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4) :1798-1802.
- [10] Magana-Ortiz D, Torres-Calzada C, Chan-Rodriguez D, Ortiz-Vazquez E. Transformation of *Aspergillus niger* HPD 2 mediated by *Agrobacterium tumefaciens* EHA101. *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology*, 2007, 107:322-323.
- [11] Michielse CB, Hooymaas PJJ, van den Hondel CAMJJ, Ram AFJ. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nature Protocols*, 2008, 3(10) :1671-1678.
- [12] Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*; An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 2001, 91: 173-180.
- [13] Hanif M, Pardo AG, Gorfer M, Raudaskoski M. T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Current Genetics*, 2002, 41:183-188.
- [14] Combiere JP, Melayah D, Raffier C, Marmeisse R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 220(1) :141-148.
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 3rd Ed. Beijing: Science Press, 2002.

- [16] Nguyen TV, Thu TT, Claeys M, Angenon G. *Agrobacterium* mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved *in vitro* regeneration system. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2007, 91(2):155-164.
- [17] 高兴喜, 杨谦, 郭兆奎, 宋金柱. 影响根癌农杆菌介导的木霉菌遗传转化因素分析. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2005, 32(1):74-78.
- [18] 龙朝钦, 邓军, 郝飞, 钟白玉, 周村建. 根癌农杆菌介导的烟曲霉转化条件的优化. *西部医学 (Medical Journal of West China)*, 2008, 20(2):261-264.
- [19] Leclerque A, Wan H, Abschutz A, Chen S, Mitina GV, Zimmermann G, Schairer HU. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Current Genetics*, 2004, 45(2):111-119.
- [20] Combier JP, Melayah D, Raffier C, Marmeisse R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 220(1):141-148.

Transformation system of *Aspergillus japonicus* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

Hui Guo, Zhe Yang, Laijun Xing, Mingchun Li*

Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: [**Objective**] In order to select *Aspergillus japonicus* mutant strains that express high-yield of glycerol oxidase, we constructed a mutant library of *Aspergillus japonicus* that mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. [**Methods**] Tri-relative hybridization experiments were performed to transfer binary vector pB I -hph II into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 that was used as the infective strain and *Aspergillus japonicus* was used as the host strain. We established the transformation system of *Aspergillus japonicus* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and constructed a mutant library. At the same time, we analyzed the factors affecting the transformation efficiency such as the concentration of *Agrobacterium tumefaciens*, adding and not adding Acetosyringone, co-culture time, and co-culture temperature. [**Results**] PCR detection and Southern blot analysis showed that the T-DNA was integrated into genome of the *Aspergillus japonicus*. All 9 randomly selected transformants were stable after 10 rounds of successive cultures. [**Conclusion**] The transformation system is a good basis for selection of *Aspergillus japonicus* mutant strains that express high-yield of glycerol oxidase.

Keywords: *Aspergillus japonicus*, *Agrobacterium tumefaciens*, Transformation system

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Key project of Tianjin Science and Technology Support (08ZCKFSH02100), by the National Natural Science Foundation of China (30771355), and by the National Program for High Technology Research and Development ("863" Program) of China (2007AA10Z189)

* Corresponding author. Tel: +86-22-23508506; Fax: +86-22-23508800; E-mail: nklimingchun@yahoo.com.cn

Received: 7 July 2010 / Revised: 29 October 2010