

利用根癌农杆菌 T-DNA 插入突变寻找参与漆酶葡萄糖阻遏的关键基因

李中明, 潘皎, 朱旭东*

南开大学生命科学学院微生物系, 天津 300071

摘要: 【目的】新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*) 是人类重要致病真菌, 主要毒性因子之一漆酶的表达受葡萄糖阻遏, 机制未知。本文拟寻找参与葡萄糖阻遏的关键基因。【方法】建立根癌农杆菌介导的转化方法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 建立一个容量约 200000 的随即插入突变文库, 在高浓度葡萄糖条件下从中筛选葡萄糖去阻遏的突变株。通过 Southern 确定突变株中 T-DNA 的拷贝数, 利用反向 PCR 获得依赖葡萄糖的漆酶阻遏基因序列。【结果】筛选到了 30 株葡萄糖去阻遏突变株, Southern blot 发现 83% 的葡萄糖去抑制突变株含有单个 T-DNA 拷贝。初步鉴定了可能参与漆酶阻遏的 10 个不同生物学功能基因, 如参与碳水化合物的代谢, 固醇的合成, 几丁质的合成, GPI 脂锚钩的合成等等。【结论】ATMT 突变策略可以找到一些参与漆酶葡萄糖阻遏的关键基因, 为理解漆酶在致病过程中的作用机制和工业改进漆酶活性提供参考。

关键词: 新型隐球酵母, 根癌农杆菌介导的转化, 漆酶

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 01-0044-08

漆酶 (EC 1. 10. 3. 2) 是一类蓝色的含铜的多酚氧化酶, 广泛分布于昆虫, 植物, 真菌和细菌中^[1-4]。Yoshida 首先在漆树中发现了漆酶^[5]。一直以来, 漆酶受到了科学界的广泛关注, 并且在工业生产和环境治理领域得到了广泛的应用。例如, 白腐菌产生的漆酶可用于木质素降解, 纺织品漂白和食物处理等^[6-7]。漆酶还可用于环境污染物降解^[8-11]和土壤有机物转化^[12]。漆酶在降解木质纤维素产乙醇中也具有潜在的应用价值^[13]。目前, 工业上应用的漆酶主要来源于真菌。但是, 真菌中对漆酶的表达调控机制的了解还不是很清楚。

担子菌新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*)

可以产生大量的漆酶, 是研究真菌漆酶表达调控的理想模式生物^[14-15]。新型隐球酵母广泛分布在土壤中, 特别是富含鸟粪和热带树木的土壤中^[16]。新型隐球酵母作为一种条件致病菌可感染免疫缺陷人群的中枢神经系统引发脑膜炎^[16]。新型隐球酵母的基因组中含有两个漆酶基因——*LAC1* 和 *LAC2*, 但是新型隐球酵母的漆酶活性主要由 *LAC1* 决定的^[15-17]。新型隐球酵母的漆酶可以氧化多酚底物 (如去甲肾上腺素) 产生黑色素^[15-17]。*LAC1* 的缺失会导致漆酶活性的丧失^[15,17]。在新型隐球酵母中, 漆酶的活性一般是由以下几种环境因素决定的。微量的铜离子可以高效地诱导漆酶的表达,

基金项目: 国家自然科学基金 (30770043); 国家重点基础研究发展规划项目 (2007CB707801)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

作者简介: 李中明 (1982 -), 男, 山东人, 博士研究生, 主要从事条件病原真菌的致病因子表达调控研究。E-mail: lizhongming82@yahoo.cn

收稿日期: 2011-08-26; **修回日期:** 2011-10-16

而高温(37℃)则会抑制漆酶的表达^[18-19]。葡萄糖是漆酶表达的强抑制因子^[15,20]。当培养基中含有葡萄糖时,*LAC1*的表达会受到阻遏,只有当葡萄糖耗尽后,*LAC1*的转录才起始,而这个过程是由经典的葡萄糖和其他营养感应通路 $G\alpha$ -cAMP-PKA 信号通路调控的^[21]。但是新型隐球酵母中葡萄糖抑制漆酶表达的机制还没有被揭示清楚。

根癌农杆菌介导的转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 作为一种高效的转化方法,在植物,动物和真菌中得到了广泛的应用^[22-24]。在真菌中,ATMT 既可以转化酵母细胞,也可以转化菌丝,孢子甚至蘑菇的菌丝组织^[25-27]。与原生质体转化相比,ATMT 更高效,方便,省时。还有,大部分 ATMT 产生的转化子含有单个 T-DNA 拷贝,便于后续的研究分析。近年来,ATMT 在新型隐球酵母中也得到了广泛的应用^[28-30]。为了探究新型隐球酵母中依赖葡萄糖的漆酶表达抑制基因,利用 ATMT 构建了一个容量为 200000 的随机突变文库。漆酶去阻遏菌株即使在高浓度葡萄糖条件下,仍然能产生漆酶活性,并氧化去甲肾上腺素 (nor-epinephrine, NE) 生成黑色素而得到分别,按照此方法,分离到了 30 株葡萄糖去抑制突变株。Southern blot 发现 83% 的葡萄糖去抑制突变株含有单个 T-DNA 拷贝。利用反向 PCR (inverse PCR) 初步得到了 10 个依赖葡萄糖的漆酶表达抑制基因。此外,还发现 3 株葡萄糖去抑制突变株中 T-DNA 破坏了 *LAC1* 的启动子区。这个方法可以用于寻找参与漆酶阻遏的关键基因。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 新型隐球酵母血清型 D 菌株 JEC21 (*MAT α*) 作为野生型菌株。B4500FOA 是 JEC21 的尿嘧啶营养缺陷性突变株,作为构建随机突变库的受体菌株^[31]。含有质粒 pBI121-URA5 的根癌农杆菌 LBA4404 用于 B4500FOA 的转化。

1.1.2 培养基: YPD 培养基用于培养新型隐球酵母^[31]。LB 培养基用于培养根癌农杆菌 LBA4404^[31]。含有尿嘧啶的诱导培养基用于根癌农杆菌介导的转化^[29]。含有 100mg/L 去甲肾上腺素的高葡萄糖培养基 (2% 葡萄糖,0.1% 天门冬酰胺,

0.3% KH_2PO_4 ; pH 5.1) 用于检测黑色素的合成^[14]。

1.1.3 主要试剂和仪器: 去甲肾上腺素 (Sigma), 带正电荷的尼龙膜 (GE Osmonics), $[\alpha - ^{32}P]$ dCTP (上海恒远生物科技有限公司), 随机引物 DNA 标记试剂盒 (TaKaRa), 限制性内切酶 *Xba* I (TaKaRa), LA *Taq* 酶 (TaKaRa), T4 DNA Ligase (TaKaRa), 常规 PCR 仪 (Bio-Rad)。

1.2 随机突变文库的构建和葡萄糖去阻遏突变株的分离

含有 pBI121-URA5 的根癌农杆菌 LBA4404 和新型隐球酵母 B4500FOA 混匀后,在含有尿嘧啶的固体诱导培养基上,25℃ 共培养 72h^[29]。用无菌水把菌体洗下,涂布到含有去甲肾上腺素 (NE) 和氨苄青霉素 (杀死农杆菌 LBA4404) 的高浓度葡萄糖 (2%) 筛选培养基上,30℃ 培养 3-5d,检测黑色素的合成。

1.3 Southern blot 分析转化子

用 *Xba* I 消化 8 μ g 随机挑选的转化子基因组 DNA。*Xba* I 可以把 T-DNA 切为两段 (图 1)。酶切基因组 DNA 经过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离后,转移到带正电荷的尼龙膜上。用随机引物 DNA 标记试剂盒把质粒 pBI121 的 T-DNA 做 $[\alpha - ^{32}P]$ dCTP 标记,作为探针。

1.4 通过反向 PCR 获得葡萄糖去抑制突变株的突变基因

取 2 μ g 基因组 DNA 经过 *Xba* I 酶切后,用 T4 DNA 连接酶在 200 μ L 反应体系中自连过夜 (4℃)。取 10 μ L 连接产物作为模板,用 T-DNA 引物 (p1-S 5'-ACTGGAACAACACTCAACCCTA-3' 和 p1-A 5'-TGGTTTCTACAGGACC-3', 或 p2-S 5'-TGGCGGGTA AACCTAAGAG-3' 和 p2-A 5'-CGCACAATCCCACTAT CC-3') 进行反向 PCR 扩增。PCR 产物经测序后与 GenBank 数据库中的隐球酵母测序计划中的序列进行比对,确定突变基因。

2 结果

2.1 二元载体 (binary vector) pBI121-URA5 的构建

筛选标记基因 *URA5* (1.9 kb) 编码乳清苷单磷酸焦磷酸化酶。pBI21-URA5 是 *URA5* 经过 *Xba* I 单

酶切插入到根癌农杆菌二元 Ti 载体 pBI121 中得到 的(图 1)。

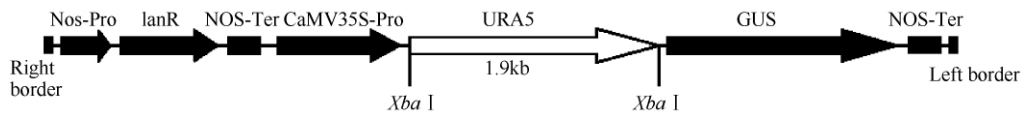


图 1 二元质粒载体 pBI121-URA5 示意图

Fig. 1 Construction design of binary vector pBI121-URA5.

2.2 随机突变文库的构建和葡萄糖去抑制突变株的分离

ATMT 是一种在新型隐球酵母中发现新基因的非常有效的方法^[28-30]。这种方法引起的突变具有随机性和稳定性。按照材料方法中描述的,含有质粒 pBI121-URA5 的根癌农杆菌 LBA4404 和新型隐球酵母 B4500FOA 在 25℃ 条件下共培养 72 h。农杆菌和酵母细胞的混合物在高浓度葡萄糖筛选培养基

上培养 3-5 d。通过 ATMT 构建了一个容量约为 200000 的随机突变文库。从中筛选出了 30 株葡萄糖去阻遏的突变株。如图 2 所示,在高浓度葡萄糖条件下,葡萄糖去阻遏突变株的菌落呈现黑色或棕色(含有漆酶底物去甲肾上腺素),而野生型 JEC21 的菌落颜色呈现白色。这说明葡萄糖去抑制突变株的漆酶活性明显得到表达。这些葡萄糖去抑制突变株经过分离纯化后用于进一步研究。

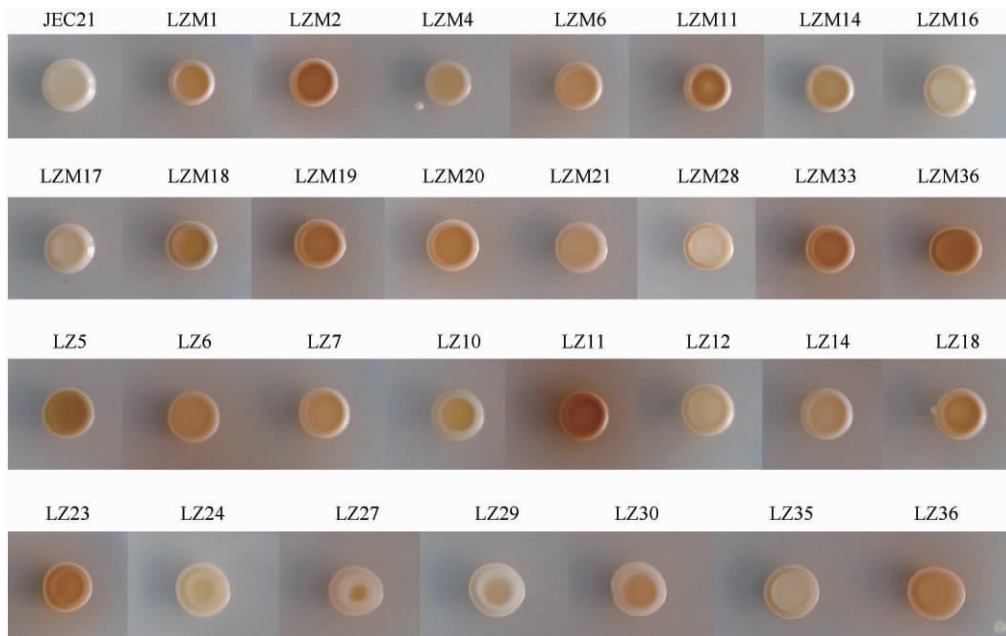


图 2 新型隐球酵母葡萄糖去抑制突变株

Fig. 2 Melanin biosynthesis assay of glucose derepression mutants of *C. neoformans*. LZM1, 2, 4, 6, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 33, 36 and LZ5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 18, 23, 24, 27, 29, 30, 35, 36. The wild type strain JEC21 as control.

2.3 葡萄糖去抑制突变株中 T-DNA 单拷贝概率为 83%

通过 Southern blot 来确定葡萄糖去阻遏突变株中 T-DNA 的拷贝数。提取突变株的基因组 DNA,经过 *Xba* I 消化后用于 Southern blot 分析。质粒 pBI121 的 T-DNA 作为探针,结果发现,葡萄糖去抑

制突变株中, LZM11, LZM28, LZ12, LZ24 和 LZ27 含有多拷贝 T-DNA, 其余的突变株含有单拷贝 T-DNA。葡萄糖去抑制突变株中单拷贝的概率为 83% (25/30) (图 3)。T-DNA 的单拷贝插入是确定突变基因参与漆酶阻遏的关键。

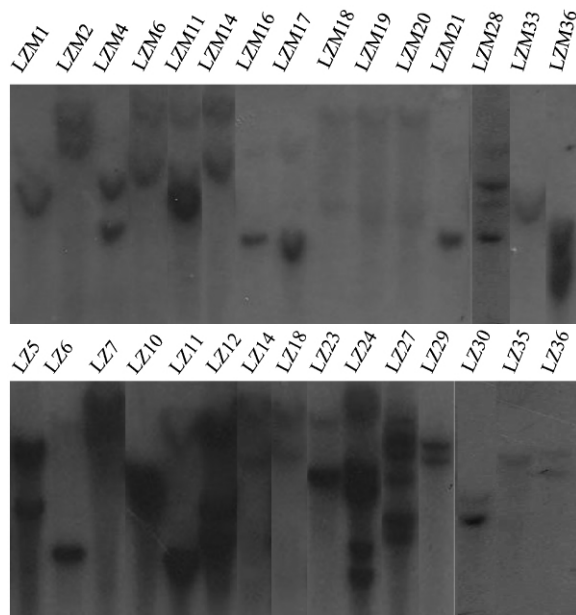


图 3 新型隐球酵母葡萄糖去抑制突变株
 Fig.3 Southern blot analysis of glucose derepression mutants of *C. neoformans*. LZM1, 2, 4, 6, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 33, 36 and LZ5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 18, 23, 24, 27, 29, 30, 35, 36. The wild type strain JEC21 as control.

2.4 依赖葡萄糖的漆酶表达抑制基因

通过反向 PCR 获得葡萄糖去抑制突变株中 T-DNA 的旁侧序列。PCR 产物经测序后, 与 GenBank 数据库中的序列进行比对。表 1 中是初步鉴定的依赖葡萄糖的漆酶表达抑制基因。表 1 中除了突变株 LZ11 之外, 其他的突变株只含有一个 T-DNA 拷贝。值得指出的是突变株 LZM6, LZ7 和 LZ18 中, T-DNA 破坏了 *LAC1* 的启动子, 说明 ATMT 在寻找葡萄糖去阻遏基因中的可靠性。如图 4 所示, 突变株 LZ7, LZ18 和 LZM6 中 T-DNA 的插入位点分别位于起始密码子上游 1412 bp, 1172 bp 和 581 bp。结果说明 *LAC1* 起始密码子的上游序列含有多个依赖葡萄糖的抑制因子的结合位点。我们分离到了 25 株 T-DNA 单拷贝葡萄糖去抑制突变株, 但是只获得了 12 株 T-DNA 单拷贝突变株中 T-DNA 的旁侧序列(表 1)。原因可能是因为其他 13 株 T-DNA 单拷贝突变株的基因组 DNA 经 *Xba* I 酶切自连后的片段太大, 通过努力, PCR 扩增未能得到任何片段, 这也是 ATMT 方法的一个短板。

表 1 依赖葡萄糖的漆酶表达抑制基因
 Table 1 Genes for glucose repression of laccase

Stain	GenBank accession	Description	Chromosome	No. of introns	Protein (aa)
LZM4	CNA00510	Citrate synthase	1	5	464
LZM6	CNG01240	LacI	7	13	624
LZM14	CNF02350	Stp1	6	5	594
LZM17	CNB02480	GPI anchor biosynthesis-related proreïn	2	6	273
LZM19	CNB04050	Glucose-6-phosphate isomerase	2	5	556
LZM33	CNI03250	GPI anchor biosynthesis-related proreïn	9	3	598
LZM36	CNJ00820	Tetraspanin family	10	4	533
LZ5	CND01920	PKC-like superfamily	4	5	945
LZ7	CNG01240	LacI	7	13	624
LZ11*	CNA06260	GTPase-activator protein for Rho-like GTPase	1	10	810
LZ18	CNG01240	LacI	7	13	624
LZ23	CNH02270	Chitin synthase 3	8	4	1423
LZ29	CNI02660	Integral to membrame protein	9	2	768

Annotations were obtained from NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) with additional hand editing based on BLAST searches.

* Based on Southern bolt, mutant LZ11 has two T-DNA insertions, but only one locus was identified.

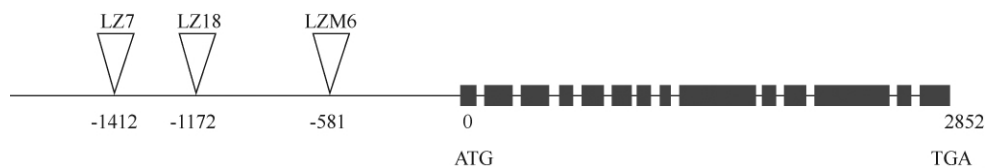


图 4 突变株 LZM6, LZ7 和 LZ18 中 T-DNA 在 *LAC1* 的启动子上的插入位点
 Fig.4 T-DNA insertions in the promoter of *LAC1*.

突变株 LZM14 中 T-DNA 破坏了柠檬酸合成酶基因的启动子区。柠檬酸合成酶参与柠檬酸循环的第一步反应,催化乙酰辅酶 A 和草酰乙酸反应生成柠檬酸和辅酶 A。突变株 LZM14 中 T-DNA 破坏了 *STP1* 基因的 ORF。新型隐球酵母中 *Stp1* 参与调节麦角固醇的合成^[32]。突变株 LZM17 和 LZM33 中 T-DNA 破坏了两个新基因的启动子区,这两个基因参与 GPI 脂锚钩的合成。突变株 LZM19 中 T-DNA 破坏了葡萄糖-6-磷酸异构酶基因的启动子区。突变株 LZ5 中 T-DNA 破坏了一个新基因的启动子区,该基因属于 PKC 超家族。突变株 LZ11 中 T-DNA 破坏了 GTP 酶激活子基因的 ORF。突变株 LZ23 中 T-DNA 破坏了几丁质合成酶 *CHS3* 的启动子区^[33]。突变株 LZ29 中 T-DNA 破坏了一个新基因的 ORF,该基因编码一种膜蛋白。突变株 LZM36 中 T-DNA 也破坏了一个新基因的 ORF,该基因属于 Tsp2 四次跨膜蛋白家族^[34]。还发现一个有意思的现象,T-DNA 更倾向于破坏基因的启动子区(9/13)。

3 讨论

新型隐球酵母可以产生大量的漆酶,但是其漆酶的合成受到了葡萄糖的抑制^[20]。为了探究葡萄糖是如何调节漆酶表达的机制,我们利用 ATMT 构建了一个容量约为 200000 的随机突变文库。在高浓度葡萄糖条件下筛选到了 30 株葡萄糖去抑制突变株。利用反向 PCR 初步获得了 10 个依赖葡萄糖的漆酶表达抑制基因。还发现 3 株突变株中 T-DNA 破坏了 *LAC1* 的启动子区中依赖葡萄糖的抑制因子的结合位点。

ATMT 在新型隐球酵母 JEC21 中的转化效率为 1/5600,在 B4500FOA 中的转化效率为 1/460^[28]。我们用 B4500FOA 作为受体菌,也得到了较高的转化效率(1/610)。ATMT 产生的 T-DNA 突变具有随机性,稳定性和高单拷贝率。我们对分离到的葡萄糖去抑制突变株做了 Southern blot 分析。结果发现 83% 的葡萄糖去抑制突变株含有单个 T-DNA 拷贝。T-DNA 的单拷贝插入有助于突变基因的鉴定。反向 PCR 结果还发现 T-DNA 更倾向于破坏基因的启动子区(9/13)。该结果说明在新型隐球酵母中

ATMT 引起突变的随机性是相对的。T-DNA 突变库中并不是所有的突变表型都是由 T-DNA 插入失活引起的,特别是突变库容量很大时,很容易出现随机突变。ATMT 适合构建大容量的随机突变文库,但是要有可以利用的表型差异(比如颜色差异),只有这样才能很容易的从中筛选出我们想要的突变株。

葡萄糖去抑制突变株 LZ7, LZ18 和 LZM6 中 T-DNA 破坏了 *LAC1* 的启动子区。插入位点分别位于起始密码子上游 1412 bp, 1172 bp 和 581 bp (图 4)。结果说明 *LAC1* 起始密码子的上游序列含有多个依赖葡萄糖的抑制因子的结合位点。张等人在葡萄糖缺乏条件下对新型隐球酵母血清型 D 的 *LAC1* 起始密码子上游 2 kb 的非编码区做了系统研究^[35]。他们发现这 2 kb 的非编码区内含有两个增强因子结合位点和两个抑制因子结合位点。我们的实验结果进一步证明了 *LAC1* 起始密码子上游 2 kb 非编码区含有依赖葡萄糖的抑制因子结合位点。

初步鉴定了 10 个依赖葡萄糖的漆酶表达抑制基因。通过与 NCBI 中蛋白数据库比对发现它们具有不同的功能:碳源代谢(柠檬酸合成酶和葡萄糖-6-磷酸异构酶);固醇合成(*Stp1*);几丁质合成(*Chs3*);GPI 脂锚钩合成;细胞信号传递等等。初步鉴定的这 10 个基因还需要进一步验证。其中 CNJ00820(LZM36)我们已经通过定向敲除得到了进一步验证。在血清型 A H99 中 *CHS3* 定向敲除后漆酶活性明显升高^[33]。该结果说明 *Chs3* 确实是抑制了漆酶的表达。特别需要指出的是,LZM36 突变株被进一步鉴定,发现编码膜蛋白 Tetraspanin 基因 *TSP2* 被插入的 T-DNA 截断 (*Applied and Environmental Microbiology*, In revision)。Tsp2 可能参与了葡萄糖信号的转导,因此可能是该通路中的一个新成员。

在本研究中,我们首次利用 ATMT 鉴定出 10 个依赖葡萄糖的漆酶表达抑制基因。这些结果将有助于揭示新型隐球酵母中葡萄糖调节漆酶表达的机制,同时也为改进漆酶的工业生产提供了理论基础。

参考文献

- [1] Brijwani K, Rigdon A, Vadlani PV. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Resarch*, 2010, 2010, ID:149748.

- [2] Asgher M, Bhatti HN, Ashraf M, Legge RL. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 2008, 19 (6) :771-783.
- [3] Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. Laccases and their applications: a patent review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2008, 2 (1) :10-24.
- [4] Mayer AM, Staples RC. Laccase: New functions from an old enzyme. *Phytochemistry*, 2002, 60 (6) : 551-565.
- [5] Yoshida H. Chemistry of lacquer (urushi). *Journal of the Chemistry Society*, 1883, 43: 472-486.
- [6] Bajpai P, Anand A, Bajpai PK. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. *Biotechnology Annual Review*, 2006, 12:349-378.
- [7] Rodríguez Couto S, Toca Herrera JL. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*, 2006, 24 (5) :500-513.
- [8] Higson FK. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1991, 122:111-152.
- [9] Perumal K, Murugesan K, Kalaichelvan PT. Influence of culture parameters on paper mill effluent decolourization by a white rot fungus *Ganoderma lucidum*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2000, 38 (4) :385-389.
- [10] Pointing SB. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 57 (1-2) :20-33.
- [11] D'Annibale A, Rosetto F, Leonardi V, Federici F, Petruccioli M. Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons. *Applied Environmental Microbiology*, 2006, 72 (1) : 28-36.
- [12] Gallo M, Amonette R, Lauber C, et al. Microbial community structure and oxidative enzyme activity in nitrogen-amended north temperate forest soils. *Microb Ecol*, 2004, 48 (2) :218-229.
- [13] Balan V, da Costa Sousa L, Chundawat SP, Vismeh R, Jones AD, Dale BE. Mushroom spent straw: a potential substrate for an ethanol-based biorefinery. *Journal of Industry Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35 (5) : 293-301.
- [14] Williamson PR. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176 (3) :656-664.
- [15] Zhu X, Williamson PR. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research*, 2004, 5 (1) :1-10.
- [16] Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Review Microbiology*, 2005, 3 (10) :753-764.
- [17] Missall TA, Moran JM, Corbett JA, Lodge JK. Distinct stress responses of two functional laccases in *Cryptococcus neoformans* are revealed in the absence of the thiol-specific antioxidant Tsal. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4 (1) : 202-208.
- [18] Jiang N, Liu X, Yang J, Li Z, Pan J, Zhu X. Regulation of copper homeostasis by Cuf1 associates with its subcellular localization in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* H99. *FEMS Yeast Research*, 2011, 11 (5) :440-448.
- [19] Jiang N, Xiao D, Zhang D, Sun N, Yan B, Zhu X. Negative roles of a novel nitrogen metabolite repression-related gene, TAR1, in laccase production and nitrate utilization by the basidiomycete *Cryptococcus neoformans*. *Applied Environmental Microbiology*, 2009, 75 (21) : 6777-6782.
- [20] Kojima Y, Tsukuda Y, Kawai Y, Tsukamoto A, Sugiura J, Sakaino M, Kita Y. Cloning, sequence analysis, and expression of lignolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265 (25) : 15224-15230.
- [21] Alspaugh JA, Pukkila-Worley R, Harashima T, Cavallo LM, Funnell D, Cox GM, Perfect JR, Kronstad JW, Heitman J. Adenylyl cyclase functions downstream of the Galpha protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2002, 1 (1) :75-84.
- [22] Koncz C, Németh K, Rédei GP, Schell J. T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20 (5) :963-976.

- [23] Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(4): 1871-1876.
- [24] Michielse CB, Hooykaas PJ, van den Hondel CA, Ram AF. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, 2005, 48(1):1-17.
- [25] Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, Hooykaas PJ. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 1995, 14(13):3206-3214.
- [26] Mikosch TS, Lavrijssen B, Sonnenberg AS, van Griensven LJ. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Genetics*, 2001, 39(1):35-39.
- [27] 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.
- [28] McClelland CM, Chang YC, Kwon-Chung KJ. High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42(11):904-913.
- [29] Walton FJ, Idnurm A, Heitman J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(5):1381-1396.
- [30] Ingavale SS, Chang YC, Lee H, McClelland CM, Leong ML, Kwon-Chung KJ. Importance of mitochondria in survival of *Cryptococcus neoformans* under low oxygen conditions and tolerance to cobalt chloride. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(9):e1000155.
- [31] Yang J, Li D, Liu X, Pan J, Yan B, Zhu X. Regulation of virulence factors, carbon utilization and virulence by SNF1 in *Cryptococcus neoformans* JEC21 and divergent actions of SNF1 between cryptococcal strains. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(12):994-1000.
- [32] Chang YC, Ingavale SS, Bien C, Espenshade P, Kwon-Chung KJ. Conservation of the sterol regulatory element-binding protein pathway and its pathobiological importance in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2009, 8(11):1770-1779.
- [33] Banks IR, Specht CA, Donlin MJ, Gerik KJ, Levitz SM, Lodge JK. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(11):1902-1912.
- [34] Lambou K, Tharreau D, Kohler A, Sirven C, Marguerettaz M, Barbisan C, Sexton AC, Kellner EM, Martin F, Howlett BJ, Orbach MJ, Lebrun MH. Fungi have three tetraspanin families with distinct functions. *BMC Genomics*, 2008, 9:63.
- [35] Zhang S, Varma A, Williamson PR. The yeast *Cryptococcus neoformans* uses 'mammalian' enhancer sites in the regulation of the virulence gene, *CNLAC1*. *Gene*, 1999, 227(2):231-240.

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation (ATMT) for the screening for genes involved in laccase glucose repression in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*

Zhongming Li, Jiao Pan, Xudong Zhu*

Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: [Objective] To identify genes in glucose repression of laccase in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. [Methods] We created a random insertional mutagenesis library containing over 200000 transformants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT). We screened the glucose derepression mutants under high-glucose condition and obtained the genes for glucose repression of laccase via inverse polymerase chains reaction (PCR). [Results] Totally, we isolated 30 glucose derepression mutants from the library. We found that that 83% of the mutants contain a single T-DNA via Southern blot. We preliminarily identified 10 genes, which fall into a broad range of biological processes including: carbohydrate metabolism, sterol biosynthesis, chitin biosynthesis and glycosylphatidylinositol (GPI) anchor biosynthesis. Additionally, we found that three glucose derepression mutants have a single T-DNA insertion in the promoter region of *LAC1*, which encodes cryptococcal laccase. [Conclusion] As an effective way, ATMT can be utilized for identifying genes in glucose repression of laccase, which sheds lights on the roles of laccase in virulence and provides information for laccase production in industry.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT), laccase

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770043) and by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2007CB707801)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn

Received: 26 August 2011 / Revised: 16 October 2011

《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,5-7个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。