

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53 (11):1226-1232; 4 November 2013
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

霉酚酸产生菌原生质体转基因方法的建立

任志红, 苏彩云, 闫敬, 戴梦, 赵颖, 王红怡, 代明伟, 张佳*

华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 微生物药物国家工程研究中心, 石家庄 050015

摘要: 【目的】建立霉酚酸产生菌短密青霉菌的遗传转化体系。【方法】以腐草霉素抗性为选择标记, 利用聚乙二醇介导原生质体融合, 进行外源基因转化。【结果】聚乙二醇介导的短密青霉菌原生质体转化效率为每微克 DNA 2-3 个转化子; 转化子的 PCR 检测结果显示外源基因已经整合到短密青霉菌基因组中, 转化子抗性稳定。【结论】霉酚酸产生菌短密青霉菌转基因体系的建立为该菌进行分子生物学研究以及基因工程育种奠定了基础。

关键词: 霉酚酸, 短密青霉, 原生质体, 基因转化

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 11-1226-07

霉酚酸酯 (mycophenolate mofetil MMF) 是美国食品药品监督管理局 (FDA) 于 1998 年 10 月批准上市的具免疫抑制作用的抗生素。霉酚酸酯在体内快速水解为霉酚酸, 可高效、选择性、非竞争性、可逆性地抑制次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶。在生物体内, 一般是先合成次黄嘌呤核苷酸, 经氧化生成黄嘌呤核苷酸, 再经氨基化生成鸟嘌呤核苷酸, 从而合成 DNA。淋巴细胞合成嘌呤依赖于此途径, 因而淋巴细胞的增殖受到霉酚酸抑制。其它迅速分裂的细胞能够通过补救途径合成鸟嘌呤核苷酸, 不受霉酚酸的阻碍。而嘌呤类似物硫唑嘌呤的作用是竞争性的抑制嘌呤合成^[1-3]。霉酚酸脂主要用于肾脏及心脏移植术后器官排斥的预防, 并能与环孢霉素合用, 降低后者的剂量和毒性^[4]。

霉酚酸酯是霉酚酸 (mycophenolic acid, MPA), 麦考酚酸的吗啉代乙酯^[5] (morpholinoethyl ester of mycophenolic acid), 而霉酚酸为丝状真菌短密青霉

(*Penicillium brevicompactum*) 经发酵产生^[6]。为提高霉酚酸发酵水平, 对短密青霉菌进行传统诱变育种有大量的报道。据世界专利^[7]报道应用亚硝基胍对青霉菌属的菌株进行诱变处理, 得到 MPA 高产菌种; 杨亚勇等^[8]报道紫外线和亚硝酸复合诱变 MPA 产生菌的原生质体, 经原生质体再生获得了高产菌株。娄忻等^[9]报道了应用紫外诱变与定向筛选重金属离子抗性株相结合的方式, 进行 MPA 育种研究, 但未见采用基因工程育种的报道。随着生物技术的不断发展, 基因工程育种技术成为新的育种手段, 基因的定点突变、易错 PCR、DAN 重排、基因组重排等技术应用于工业微生物育种领域^[10], 进行微生物产物代谢途径的改造、能量代谢途径的改造以及大幅提高目标代谢产物的产量。而高效的基因转化系统是进行分子生物学研究以及利用分子生物学进行菌种改造的基础, 本文报道了霉酚酸工业生产菌株短密青霉的原生质体转基因方法的建立。

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目 (ZX09401-403, ZX09401-306)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-311-85992744; E-mail: huohudiyusha@sina.com

作者简介: 任志红 (1966-), 女, 河北省人, 硕士, 副高级工程师, 主要从事微生物制药。

收稿日期: 2013-04-15; **修回日期:** 2013-06-22

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 短密青霉菌 (*Penicillium brevicompactum*) PB-12。质粒 pPTPVT, 为整合型质粒, 选择标记为腐草霉素抗性基因, 功能基因为明颤菌血红蛋白 (VHb) 基因 *vgb*。本实验室构建。

1.1.2 试剂配制: (1) PP 缓冲液: 聚乙二醇 (PEG) (MW 6000) 40%, 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液; (2) PPC: 950 μ L PP + 50 μ L 1 mol/L CaCl_2 ; (3) 1% 消化酶: 1% 消化酶 Novozyme 234 (购自 Sigma 公司), 0.8 mol/L KCl, 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液; (4) KMP 缓冲液: 0.8 mol/L KCl, 0.8 mol/L mannitol, 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液; (5) KMPC: 950 μ L KMP + 50 μ L 1 mol/L CaCl_2 。

1.1.3 培养基: (1) GNY 菌丝培养基: 葡萄糖 3.0%、硫酸铵 0.35%、酵母粉 0.3%、碳酸钙 0.5%、氢氧化钠调节 pH6.0; (2) PDA 固体培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA, 北京双旋微生物培养基制品厂) 3.6%, pH 自然; (3) PDA 再生培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 3.6%、3.91% 氯化钠, pH 自然; (4) YPD 培养基: 1% 酵母粉、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖, pH 自然。

1.2 短密青霉药物敏感性研究

将不同浓度的单孢子悬浮液涂于含不同腐草霉素浓度的平板上, 进行培养。观察孢子萌发及菌落生长情况。

1.3 菌丝体培养及生长曲线的测定

以蒸馏水洗下斜面孢子, 接入 GNY 菌丝培养基装量 40 mL 的 250 mL 三角瓶中, 于 26.0 $^{\circ}$ C, 220 r/min, 振荡培养。将培养 12、20、28、36、44、52、60 h 的菌丝用布氏漏斗过滤, 用蒸馏水洗涤, 将菌丝烘干称重, 每个培养时间 3 瓶重复。分别计算菌丝干重对数值, 以菌丝干重对数值的“平均数 \pm 标准误差”为纵坐标, 培养时间为横坐标, 绘制生长曲线。

1.4 短密青霉原生质体制备及再生

将培养好的菌丝加入 50 mL 离心管中, 离心去上清, 以 0.9% 生理盐水反复洗涤离心菌丝 3 次。向湿菌丝中加 1% 消化酶 Novozyme 234, 30 $^{\circ}$ C 酶解一定时间。丝网过滤酶解液, 去除未消化菌丝。将

滤液离心, 离心力为 340 \times g, 10 min, 弃去上清, 取管底沉淀, 即原生质体, 用 0.8 mol/L KCl 溶液反复洗涤离心 3 次, 悬于 KMP Buffer 中, 镜检计数产生的原生质体总量。

将原生质体悬液分别用 0.8 mol/L KCl 高渗溶液和无菌水进行一系列稀释, 取 0.1 - 0.3 mL 涂布于 PDA 再生培养基上, 26.0 $^{\circ}$ C 培养 5 天, 统计再生的菌落数, 按下面公式计算原生质体再生频率。

原生质体再生率 (%) = (0.8 mol/L KCl 稀释后的再生菌落数 - 无菌水稀释后的再生菌落数) \div 镜检计数的原生质体总数 \times 100%

1.5 短密青霉原生质体基因转化^[11]

以 KMPC 悬浮原生质体, 使原生质体终浓度为 1×10^7 个/mL, 取 200 μ L 原生质体于 2 mL 离心管内并置于冰上。于 200 μ L 原生质体悬浮液中加 50 μ L PPC 及待转化的质粒 DNA 10 μ g, 轻轻混匀。冰上放置 30 min。然后在上述各离心管中加入 1 mL PPC, 混匀。将转化后的原生质体加至 200 mL PDA 再生培养基中, 轻轻混匀后, 倒平皿培养。

1.6 短密青霉阳性转化子筛选

将上述平皿培养 2 - 4 天, 覆盖含 10 - 20 μ g/mL 腐草霉素抗性培养基 PDA, 28 $^{\circ}$ C 培养 10 天, 挑选阳性转化子。其中在腐草霉素抗性培养基上生长正常, 产生绿色孢子菌落为阳性转化子。转化效率为每微克 DNA 形成的阳性转化子数。

转化效率 = 阳性转化子总数 \div DNA 总量 (μ g)。原生质体转化每组实验重复 3 次, 转化效率数据为“平均数 \pm 标准误差”。

1.7 短密青霉菌丝体生长时间对转化效率的影响

根据绘制的生长曲线, 选择对数生长期前期、中期、后期以及稳定期的菌丝制备原生质体, 进行转化, 考察短密青霉菌丝体生长时间对转化效率的影响。

1.8 短密青霉原生质体状态对转化效率的影响

在其他条件不变的情况下, 菌丝分别酶解 2.0、2.5、3.0、3.5 h 制备原生质体, 考察原生质体的再生频率和转化效率。

1.9 短密青霉原生质体转基因体系优化

在其他条件不变的情况下, 转基因体系中磷酸缓冲液 pH 分别为 6.0、6.5、7.0 时, 考察缓冲液 pH 对转化效率的影响; 转基因反应温度分别采用冰浴 0 $^{\circ}$ C 和室温 25 $^{\circ}$ C 进行反应, 0 $^{\circ}$ C 放反应时间分别为 30 min 和 60 min, 25 $^{\circ}$ C 反应时间分别为 20 min 和

40 min, 考察反应温度和时间对转化效率的影响; 分别采用分子量为 3300、4000、6000 的 PEG 进行转化, 考察聚乙二醇分子量对转化效率的影响。

1.10 短密青霉基因组 DNA 的提取

将短密青霉斜面孢子接种于 YPD 培养基中, 26℃、220 r/min 震荡培养 40 h。菌丝过滤后, 加液 N2 磨碎, 用 Easy-DNA 试剂盒 (Invitrogen 公司), 按说明书操作, 抽提基因组 DNA。

1.11 短密青霉阳性转化子 PCR 分析

对得到的抗腐草霉素的阳性转化子采用 PCR 方法进行分析。根据质粒中所携带的透明颤菌结合蛋白基因 *vgb* 序列设计一对引物: 正向引物 pttt1: 5'-CATATGTTAGACCAGCAAACC-3', 反向引物 pttt2: 5'-TTAATTAATTATTCAACCGCTTG-3', 以阳性转化子的基因组 DNA 为模板进行 PCR, 反应体系 50 μL, 扩增条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 30 s, 共 35 个循环; 冷却至 4℃, 电泳分析 PCR 结果。

1.12 短密青霉阳性转化子稳定性分析

将筛选到阳性克在无抗性培养基上连续传 3 代, 再转接至含有腐草霉素抗性培养基上进行培养。

2 结果和分析

2.1 短密青霉转化子筛选标记的确定

为确定构建基因工程菌的筛选标记, 对短密青霉进行了腐草霉素敏感性研究。霉酚酸产生菌为青霉属, 基于产黄青霉对腐草霉素敏感^[12], 首先选取腐草霉素进行抗性试验, 为基因工程菌的构建提供筛选标记。不同浓度的短密青霉孢子在腐草霉素浓度梯度平板上的生长情况如表 1 所示。在孢子量 10^6 个/皿时, 20 μg/mL 可抑制其生长; 孢子量 10^7 个/皿时, 30 μg/mL 可抑制其生长。在腐草霉素浓度 20 μg/mL 时, 短密青霉的生长即受到抑制。短密青霉对腐草霉素敏感, 可以作为构建基因工程菌的筛选标记。

2.2 短密青霉菌丝生长时间对转化效率的影响

将菌丝分别培养 12、20、28、36、44、52、60 h, 绘制菌丝培养生长曲线, 如图 1 所示。20 - 44 h 为对数生长期, 52 h 开始进入稳定生长期。取培养时间 20、28、36、44、52 h 的菌丝, 制备原生质体, 进行

DNA 转化, 转化效率见图 2。

表 1. 短密青霉菌 PB-12 对腐草霉素敏感性

Table 1. Assay on phleomycin sensitivity for PB-12

Group	c (spores/mL)	c (phleomycin) / (μg/mL)			
		10	15	20	30
1	10^2	-	-	-	-
2	10^3	-	-	-	-
3	10^4	-	-	-	-
4	10^5	+	-	-	-
5	10^6	+	+	-	-
6	10^7	+	+	+	-

Symbol (-): The spores was completely inhibited by the phleomycin.

Symbol (+): The spores germinated and grew.

20 h 对数增长期初期转化效率较低; 28 - 36 h 转化效率较高; 对数生长期后期 44 h 转化效率开始下降; 稳定期 52 h 转化效率大幅下降。20 - 44 h 菌丝处于对数生长期, 细胞代谢活性最强, 组成新细胞的物质最快, 所有形成的新细胞代谢旺盛, 生长速度快, 细胞数量成几何级数增长。利用这一时期制备出的原生质体进行转化, 外源 DNA 容易被吸收, 并整合到基因组 DNA 上。20 h 对数生长期初期, 可能有无核原生质体, 影响原生质体的转化效率; 44 h 为对数生长期后期, 细胞活性开始降低, 转化效率开始降低。52 h 后, 菌丝处于稳定生长期, 新增值的细胞数和老化细胞的死亡数基本相同, 细胞分裂周期增长, 细胞的生理状态和结构出现差别, 细胞活性降低, 导致转化效率降低。不同生长周期的细胞在结构和生理上有很大的差别, 各种理化因子对其影响也不相。通过测定生长曲线, 可以确定出外源 DNA 转化效率高的菌丝培养周期。

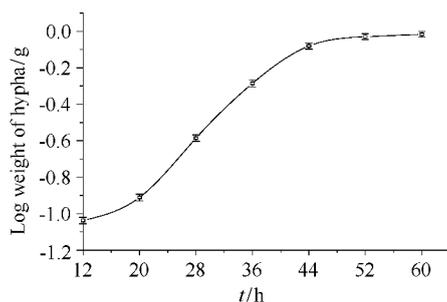


图 1. 生长曲线

Figure 1. Growth curve.

2.3 短密青霉原生质体状态对转化效率的影响

高质量的原生质体是原生质体转基因的基础。原生质体制备过程中, 细胞壁消化酶的浓度、酶解时间, 直接影响原生质体的状态和再生频率。采用一

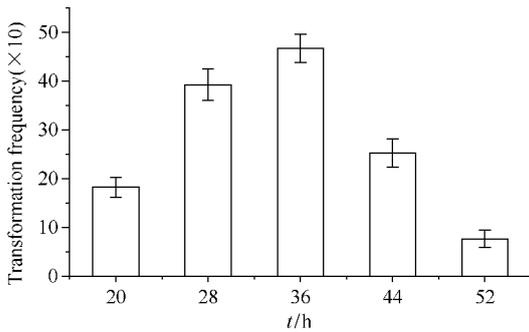


图 2. 菌龄对转化效率的影响

Figure 2. Effect of culture time of hypha on transformation frequencies.

定酶浓度,酶解时间分别为 2.0、2.5、3.0、3.5 h,进行原生质体再生和转化,原生质体再生频率与转化效率并不成正相关。见图 3。

原生质体酶解时间短,原生质体再生频率高,但转化效率并不一定高。酶解时间短,原生质体表面留有残存细胞壁成份,原生质体容易再生。但对于转化来说,残存的细胞壁影响原生质体的融合和外源 DNA 进入胞内。酶解时间过长,原生质体再生频率过低,转化效率也会降低。因此,要控制酶的浓度和酶解时间。

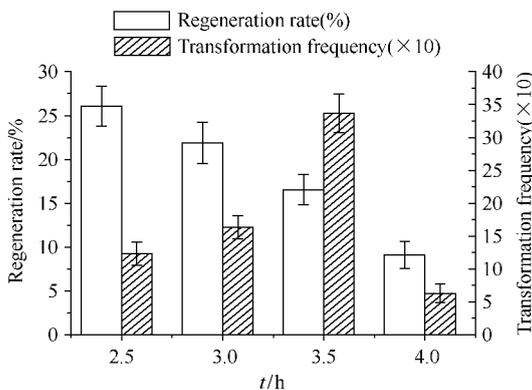


图 3. 酶解时间对再生频率和转化效率的影响

Figure 3. Effect of digestion time on regeneration rate and transformation frequency.

2.4 短密青霉原生质体转基因体系优化

原生质体转基因体系包括缓冲体系、转基因反应温度和时间、聚乙二醇分子量等。分别采用 pH6.0、6.5、7.0 磷酸缓冲体系进行转化。其中 pH7.0 无阳性转化子生成, pH6.0、6.5 转化效率分别为 2.87 ± 0.260 、 1.37 ± 0.176 个转化子/ μg DNA。缓冲液的 pH 可能影响细胞膜对外源 DNA 的吸附,从而影响转化效率。

原生质体加入外源 DNA 后,分别采用冰浴 0°C 和室温 25°C 进行反应, 0°C 反应时间分别为 30 和 60 min,转化效率为 2.63 ± 0.260 、 2.8 ± 0.296 个转化子/ μg DNA,无明显区别。 25°C 反应时间分别为 20 min 和 40 min,均无阳性转化子生成。室温条件下,由于细胞内各种酶活较强,可能引起外源 DNA 的降解。

聚乙二醇 (PEG) 起到促进细胞融合的作用。分别采用分子量为 3300、4000、6000 的 PEG 进行转化,转化效率分别为 0 、 0.43 ± 0.088 、 2.3 ± 0.231 个转化子/ μg DNA。由于细胞的大小、细胞的状态不同,不同分子量的 PEG 对转化效率影响不同。其中对于短密青霉原生质体,PEG6000 转化效率较高。

2.5 短密青霉阳性转化子筛选

腐草霉素可使复制过程中的 DNA 断裂^[13],腐草霉素抗性基因表达所形成的蛋白与腐草霉素结合^[14-15],从而阻断腐草霉素与 DNA 结合,抑制其对细胞的毒性,达到解毒的作用。

将与 DNA 反应后的原生质体加入再生固体培养基中,在腐草霉素抗性筛选条件下,长出的正常绿色菌落,即为阳性转化子;阴性转化子在抗性条件下,因菌丝不能够正常孢子化,为白色菌落。

对抗性筛选时间进行了考察。将转化后的原生质体加入再生固体培养基中,再生培养基中含有 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 腐草霉素,倒入平皿中进行培养,无阳性转化子产生。外源 DNA 腐草霉素抗性基因进入胞内后,表达蛋白需要有个时间过程,原生质体未再生即加入腐草霉素,原生质体死亡率高,很难筛选到阳性转化子。将转化后的原生质体加入不含腐草霉素的再生固体培养基中,倒入平皿中进行培养,分别培养 2、3、4 天后,上面覆盖含腐草霉素 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的固体培养基,继续培养 7 - 10 天,转化效率分别为 1.9 ± 0.203 、 3.1 ± 0.286 、 0 个转化子/ μg DNA。抗性加入时间晚,原生质体再生时间过长,分化出大量菌丝体,抗性相对降低,难于抑制阴性转化子的生长,筛选不到阳性转化子。因此,抗性筛选时间也是成功转化的一个重要因素。

2.6 转化子 PCR 鉴定

在腐草霉素抗性筛选条件下,长出的正常绿色菌落,即为腐草霉素抗性转化子,将其进行液体培养;提取基因组 DNA,以 *vgb* 基因特异引物,进行 PCR 检测。结果显示阳性转化子在 450 bp 附近有

一条明显条带(图4)。通过抗性筛选以及分子水平的鉴定,证明外源基因已经成功导入霉酚酸生产菌短密青霉。

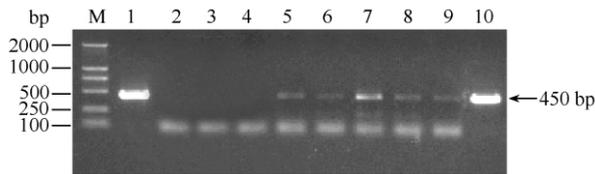


图4. 短密青霉菌转化子PCR分析

Figure 4. PCR Analysis of *Penicillium brevicompactum* transformants. Lane 1 and 10, pPTPVT; lane 2, host strains; lane 3 and 4, negative transformants (white clones); lane 5 - 9, positive transformants (green clones); M, Mark DL2000.

2.7 短密青霉转基因阳性转化子稳定性分析

对10个阳性转化子进行了稳定性分析。10个阳性转化子在无抗性培养基中传3代后,转至腐草霉素抗性培养基上,生长出正常的绿色菌落,对腐草霉素具有抗性,阳性转化子稳定。

3 讨论

采用PEG介导的原生质体转化方法是丝状真菌较常用的方法,与电转、基因枪转化方法相比,不需要特殊的仪器设备,简单、成本低,成功率高。有很多丝状真菌都成功地实现了PEG介导的原生质体转化。本研究成功建立了免疫抑制剂霉酚酸产生菌短密青霉的原生质体转基因方法。

制备原生质体的菌丝生理状态直接影响转化效率,对转化是否成功起着至关重要的作用。在以往的研究中,未见有通过生长曲线确定菌丝培养时间的报道,且多以原生质体生成量作为指标^[16-17]。本研究中,通过测定制备原生质体的菌丝生长曲线,来确定制备原生质体的菌丝培养时间,在菌丝对数生长期的中前期转化效率较高。该方法对其它品种也具有指导意义。由于不同的微生物生长特性不同,所采用的培养基成分不同,即使同一品种由于培养基不同,菌丝生长快慢也会有很大差异。因此,难于确定用于原生质体转化的菌丝培养时间。而通过绘制菌丝生长曲线,可以快速、明确地确定利于原生质体转化的菌丝培养时间。

高质量的原生质体是原生质体转基因的基础。通常以原生质体数量、原生质体再生频率高作为高

质量的原生质体的标准,进行原生质体转化^[16-17]。本研究发现,对于基因转化,转化效率与原生质体再生频率并非成正相关。因此,要想提高原生质体转化效率,要对制备原生质体酶的浓度、酶解的时间进行详细的研究。

对于不同微生物、不同的培养基,由于培养的菌丝生理状态不同,其原生质体细胞膜所带的电荷、膜蛋白的极性不同,转化体系中缓冲液的pH也非常关键。由于原生质体的大小、状态不同,原生质体转基因体系中,介导原生质体融合的PEG分子量大小也需要进行研究比较。张学炜等^[18]报道的深黄被孢霉原生质体转化中,PEG分子量4000转化效率较高,而本研究中,对于短密青霉PEG分子量6000转化效率高。

本研究成功建立了短密青霉原生质体转基因方法,为进一步对该菌种进行分子生物学研究和遗传学研究奠定了基础,也为利用现代生物技术进行菌种改造奠定了基础。

参考文献

- [1] Fulton B, Markham A. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical research in renal transplantation. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 1996, 51 (2): 278-298.
- [2] Allison AC, Kowalski WJ, Muller CD, Eugui EM. Mechanism of action of mycophenolic acid. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, 696: 63-87.
- [3] Bumgardner GL, Roberts JP. New immunosuppressive agents. *Gastroenterology of Clinics of North America*, 1993, 22: 421-429.
- [4] Groth C G, Ohlman S, Gannedahl G. New immunosuppressive drugs in transplantation. *Transplantation Proceedings*, 1993, 25: 2681-2688.
- [5] Birkin JH, Raustriek H, Ross DJ. The molecular constitution of mycophenolic acid. *Biochemical Journal*, 1952, 50 (5): 630-634.
- [6] Li X, Gong B, Zhu B. The status of microbial sources immunosuppressants research. *World Notes on Antibiotics*, 2000, 21 (6): 271-277. (in Chinese)
李彩虹,龚炳永,朱宝泉. 微生物来源的免疫抑制剂研究现状. 国外医药抗生素分册, 2000, 21 (6): 271-277.
- [7] Gabor A, Istvan B, Sandor B, Gyula H, Antonia J,

- Attila K, Julianna M, Janos S, Gyorgy S, Antal S, Istvan MS. Process for the preparation of mycophenolic acid and derivatives thereof. World Intellectual Property Organization : WO 01P21607 A2. 29 March 2001.
- [8] Yang Y, Li C, Meng W. Protoplast mutation breeding of mycophenolic acid producing strain *Penicillium brevicompactum*. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, 31 (10) : 587-590. (in Chinese)
杨亚勇, 李长洪, 孟文伟. 麦考酚酸产生菌原生质体诱变育种的研究. 中国抗生素杂志, 2006, 31 (10) : 587-590.
- [9] Lou X, Jia X, Liu S, Zhang H. Screening mycophenolic acid high producing strain with UV and heavy metal ion resistance mutation. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2007, 32 (9) : 536-537. (in Chinese)
娄忻, 贾啸静, 刘胜利, 张华. 紫外诱变复合重金属离子抗性突变选育霉酚酸高产菌株. 中国抗生素杂志, 2007, 32 (9) : 536-537.
- [10] Dai Y, Wang M, Du T. Progress in Study of Microbial Genetic Engineering Breeding. *World Notes on Antibiotics*, 2008, 29 (5) : 193-200. (in Chinese)
代云见, 王明蓉, 杜天飞. 微生物基因工程育种技术的研究进展. 国外医药抗生素分册, 2008, 29 (5) : 193-200.
- [11] Crawford L, Stepan AM, McAda PC, Rambossek JA, Conder MJ, Vinci VA, Reeves CD. Production of cephalosporin intermediates by feeding adipic acid to recombinant *Penicillium chrysogenum* strains expressing ring expansion activity. *Nature Biotechnology*, 1995, 13 : 58-62.
- [12] Wang F, Ren Z, Xu P, Zhao Y, Xiu J, Zhu Y, He B. Construction of vector pPIPKA and transformation of *Penicillium chrysogenum* industrial strain. *Mycosystema*, 2004, 23 : 66-72. (in Chinese)
王富强, 任志红, 徐平, 赵颖, 修建新, 朱研研, 贺秉坤. 产黄青霉转化载体 pPIPKA 的构建及青霉素工业生产菌株的转化研究. 菌物学报, 2004, 23 : 66-72.
- [13] Sleigh MJ, Grigg GW. The mechanism of sensitivity to phleomycin in growing *Escherichia coli* cells. *Journal of Biochemistry*, 1976, 155 : 87-99.
- [14] Rondeau JM, Cagnon C, Moras D, Masson JM. Crystallization and preliminary X-ray data of a phleomycin-binding protein from *Streptoalloteichus hindustanus*. *Journal of Molecular Biology*, 1989, 207 : 645-646.
- [15] Sugiyama M, Thompson CJ, Kumagai T, Suzuki K, Deblaere R, Villarroel R, Davies J. Characterisation by molecular cloning of two genes from *Streptomyces verticillus* encoding resistance to bleomycin. *Gene*, 1994, 151 : 11-16.
- [16] Yao T, Wang Z. Preparation, regeneration and transformation of *Aspergillus niger* protoplasts. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25 (4) : 116-120. (in Chinese)
姚婷婷, 王正祥. 黑曲霉原生质体的制备、再生及转化条件. 食品与生物技术学报, 2006, 25 (4) : 116-120.
- [17] Li Y, Tan W, Xu Y. Transformation of protoplast from *Monascus aurantiacus* AS3.4384. *Food Science*, 2007, 28 (10) : 317-322. (in Chinese)
李燕萍, 谭文辉, 许杨. 橙色红曲菌 AS3.4384 转化方法的建立. 食品科学, 2007, 28 (10) : 317-322.
- [18] Zhang X, Wang X, Li M, Wei S, Chen X, Xing L. Protoplast transformation of *Mortierella isabellina* with hygromycin B resistance plasmid PD4. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23 (3) : 462-466. (in Chinese)
张学炜, 王笑梅, 李明春, 魏东盛, 陈雪, 邢来君. 以潮霉素 B 抗性为选择标记的深黄被孢霉原生质体转化. 生物工程学报, 2007, 23 (3) : 462-466.

Establishment of a genetic transformation system for *Penicillium brevicompactum* to produce mycophenolic acid

Zhihong Ren, Caiyun Su, Jing Yan, Meng Dai, Ying Zhao, Hongyi Wang, Mingwei Dai, Jia Zhang*

New Drug Research and Developmental Center, North China Pharmaceutical Co. National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Shijiazhuang 050015, China

Abstract: [Objective] We established a genetic transformation system for *Penicillium brevicompactum* to produce mycophenolic acid. [Methods] We developed protoplast transformation methods mediated by Polyethylene glycol, using phleomycin resistance gene (*Sh ble*) as a dominant selection marker. [Result] The frequency of transformation was up to 2–3 transformants per μg DNA; analysis of the transformants by PCR showed that the foreign DNA had been integrated into the host genome. The transformants retained stable after generation. [Conclusion] The establishment of the genetic transformation system of *Penicillium brevicompactum* could serve as the basis for the research of molecular biology and the breeding of gene engineering of the fungus.

Keywords: mycophenolic acid, *Penicillium brevicompactum*, protoplast, genetic transformation

(本文责编:张晓丽)

Supported by National Science and Technology Major Project New Drugs Creation

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-311-85992744; E-mail: huohudiyusha@sina.com

Received: 15 April 2013/Revised: 22 June 2013

《微生物学报》审稿程序

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,3–6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后再送外审。将请2位专家进行审阅,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。