

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(11): 1477 - 1482; 4 November 2009
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

灰黄青霉 *Pa-pex11* 基因对青霉素产生的影响

杨晶^{1,2}, 安洋^{1,2}, 徐欣欣^{1,2}, 刘钢^{1*}

(¹中国科学院微生物研究所中国科学院真菌地衣系统学实验室, 北京 100101)

(²中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:【目的】研究灰黄青霉 *Pa-pex11* 对青霉素产生的影响。【方法】通过保守序列设计引物从灰黄青霉中克隆了含有 *pex11* 同源基因 DNA 片段, 进而通过热不对称交错 PCR (Thermal asymmetric interlaced PCR, Tail PCR) 扩增得到灰黄青霉中 *Pa-pex11* 基因的全序列。利用根癌农杆菌介导的遗传转化 (ATMT) 系统, 在灰黄青霉基因组上导入额外的 *Pa-pex11* 基因。对灰黄青霉野生型菌株和转化子进行了青霉素发酵及生物活性测定。通过荧光定量 PCR (quantitative PCR) 对转化子中的 *Pa-pex11* 拷贝数进行了相对定量。同时通过透射电镜观察了菌体中微体数量的变化。【结果】实现了灰黄青霉根癌农杆菌介导的遗传转化, 获得了在灰黄青霉基因组上插入额外 *Pa-pex11* 基因的转化子, 在转化子中青霉素产量较野生型菌株提高了 1.7 倍, 电镜照片显示转化子中微体数量明显增加。【结论】通过在基因组中增加 *Pa-pex11* 拷贝数能有效地增加灰黄青霉微体的数量, 进而提高青霉素的产量。

关键词: *Pa-pex11* 基因; ATMT; 青霉素; 微体

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1477-06

微体是真核细胞内一种重要的圆形细胞器, 具有单层膜结构, 因其基质中含丰富的参与各种代谢途径的蛋白和酶类也被称为过氧化物酶体^[1]。微体在动植物体内是重要的细胞器, 参与 β -氧化、乙醛酸循环以及胆固醇合成等多种代谢途径^[2-3]。一些可遗传的哺乳动物代谢紊乱如 Zellweger 综合症、Refsum 病与微体形成缺陷相关^[4]。而在丝状真菌中对微体的研究还不详细, 但是它也发挥着重要的生物学功能, 如可能参与丝状真菌合成 β -内酰胺类抗生素^[5]。也有报道称微体与粗糙脉孢菌及米曲霉伏卢宁体的形成相关^[6]。

包括青霉素和头孢菌素在内的 β -内酰胺类药物, 是最为常用的一大类广谱抗生素。自从 1929 年 Fleming 发现青霉素以来, 青霉素的产量较最初相比

至少提高了 1000 倍。研究发现其中一部分青霉素产生菌株, 如产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 和构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*), 青霉素产量的提高是由于胞内微体的数量和膜面积得到了显著增加^[7]。

产黄青霉 *Pc-pex11* 基因编码的 Pex11p 蛋白, 是位于微体膜中的一种蛋白, 与青霉素的产量及微体膜的分化相关^[8]。灰黄青霉 (*Penicillium aurantiogriseum* 3.4049) 是一株产青霉素的菌株。本实验室的前期工作曾在其基因组 DNA 中扩增到青霉素合成相关基因 *pcbAB* 和 *pcbC*, 并对其发酵液中青霉素 G 产量进行了初步测定 (安洋等, 内部交流)。本文研究的目的在于通过增加 *Pa-pex11* 在基因组 DNA 中的拷贝数, 来研究 *Pa-pex11* 是否能促进微体的分化, 进而提高灰黄青霉中青霉素的产量。

基金项目: 国家科技支撑计划 (2007BAI26B01)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807892; E-mail: liug@sun.im.ac.cn

作者简介: 杨晶 (1984 -), 女, 四川自贡人, 硕士研究生, 主要从事丝状真菌次生代谢产物分子调控相关的研究。E-mail: yangjing106@mails.gucas.ac.cn

收稿日期: 2009-04-24; **修回日期:** 2009-05-11

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 灰黄青霉 (*Penicillium aurantiogriseum* 3.4049)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus* 1.1848) 购自中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCCC); 根癌农杆菌 AGL-1 (*Agrobacterium tumefaciens* AGL-1) 由何朝族研究员惠赠; 大肠杆菌 JM109 和 pBluescript II KS(-) 购自 Stratagene 公司; pUAC 43 为本实验室保存; pCAMBIA1302-lx-1-1 由方荣祥研究员惠赠。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, dNTP, pMD19T Kit 购自宝生物工程(大连)公司; *Taq* DNA 聚合酶购自 Genescript 公司; 青霉素 G 购自经科宏达生物技术公司; Power SYBR Green PCR MIX 购自 Applied Biosystems 公司; 其它常规生化试剂均为国产分析纯。

1.1.3 PCR 引物: 由 Invitrogen 公司合成(表 1)。

表 1 本文所使用的引物

Table 1 Primers used in this paper

Primer	Sequence(5'→3')	$T_m/^\circ\text{C}$	Source or reference
pex01	CG GGATCC CTCCGACAATCCAATAC	54	This study
pex02	CG GAAATC ACCAACAGCAGACAAAGG	54	This study
PL1	AAGTATTGGATTGTGCCGAG	55.2	This study
PL2	CGAGGAATTTGCCGATACGC	63	This study
PL3	GTCGAGACTCAAGTAGCCGG	57.3	This study
PR2	TGGCATTCGGAAACTGTCTT	58	This study
PR2	GAAGACTATTGACCCTAAGG	49.1	This study
PR3	TGGGAATGGGAATGTATGC	60.3	This study
AD1	NGTCGASWGANAWGAA	[9]	
AD5	NTCGASTWTSWGWT	[9]	
pex11L	<u>CGGAATTC</u> CACATTACATCGTCCCTCCG	55	This study
pex11R	CGGGATCCTATGAACGGACACCGCTGC	55.5	This study
bleF	TCCTGCTCCTCGGCCAC	58	This study
bleR	AAGTTGACCAGTGCCGTTCC	62	This study
pexf	GTCATCGATGTGATTGGCAT	59.3	This study
pexr	TTCTCTGCAGACGAACAAG	59.1	This study
act1f	AGTCG AAGCG TGTA TCCT	58	[10]
act1r	ACTTG GGGTT GATGG GAG	56	[10]

Restriction sites (*Bam*HI and *Eco*RI) used for cloning are underlined.

1.1.4 培养基: YPD(酵母粉 1%, 蛋白胨 2%, 葡萄糖 2%); LYP(乳糖 1.5%, 酵母粉 0.5%, 大豆蛋白胨 0.5%, NaCl 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, KH_2PO_4 0.006%, FeCl_3 0.005%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.002%, 琼脂 2.5%); 种子液培养基 MCIP(玉米浆 2%, 酵母粉 1%, 蔗糖 2%, CaCO_3 0.5%, NaOH 调 pH 至 5.7); 发酵培养基 MCFP(玉米浆 3.5%, 乳糖 5.5%, CaCO_3

1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3%, KH_2PO_4 0.7%); TB(牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, 琼脂 0.8%, pH 7.4-7.6)。

1.2 *Pa-pex11* 的克隆

根据产黄青霉 *Pc-pex11* 基因内部保守区设计引物 pex01 和 pex02, 以灰黄青霉基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到 *Pa-pex11* 内部 DNA 片段并连接到载体 pBluescript II KS(-) 上。扩增条件为初始变性 (94°C 4 min), 扩增循环 (94°C 1 min, 53°C 50 s, 72°C 1 min, 30 个循环), 延伸 (72°C 8 min)。从得到的黄灰青霉 *Pa-pex11* 基因内部的序列各设计 3 条嵌套引物 (PL1、PL2、PL3 和 PR1、PR2、PR3), 避开可能的内含子所在的序列。随机引物采用 AD1 和 AD5。采用热不对称交错 PCR (Tail PCR)^[9] 的方法经过三轮 PCR 分别扩增得到 *Pa-pex11* 上下游序列, 分别克隆到 pMD19T 载体上并进行序列测定。根据获得的 *Pa-pex11* 上下游序列设计引物 pex11L 和 pex11R, 以灰黄青霉基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *Pa-pex11* 全长序列。扩增条件为初始变性 (94°C 5 min), 扩增循环 (94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环), 延伸 (72°C 10 min)。

1.3 根癌农杆菌介导的灰黄青霉转化

1.3.1 农杆菌转化质粒的构建: 用 *Xho*I 和 *Eco*R I 双酶切 pUAC43, 回收带 P_{pbc} 启动子的博莱霉素抗性基因 *ble* 表达元件。pCAMBIA1302-lx-1-1 经 *Xho*I 和 *Eco*R I 双酶切去除潮霉素磷酸转移酶基因 *hyg* 后, 与 *ble* 表达元件连接, 构建得到农杆菌转化的载体 p1302:: *ble*。将 PCR 扩增得到的含有完整 *Pa-pex11* 基因的 DNA 片段用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切纯化后, 与 p1302:: *ble* 载体多克隆位点连接, 得到质粒 p1302:: *ble*:: *Pa-pex11*。将 p1302:: *ble*:: *Pa-pex11* 转化农杆菌 AGL-1。农杆菌感受态的制备与转化参考文献^[10], 随机挑选农杆菌转化子, 并通过菌液 PCR 验证。

1.3.2 农杆菌介导的灰黄青霉转化: 选择萌发 10 h, 浓度为 10^6 个/mL 的灰黄青霉孢子为受体材料, 与含有 p1302:: *ble*:: *Pa-pex11* 质粒的 AGL-1 共培养 24 h。其它转化条件参考文献^[11]。

1.3.3 转化子的鉴定: 转化子孢子悬液接种于 YPD 液体培养基, 28°C, 220 r/min 条件下培养 2 d, 离心收集菌体。氯化苜法^[12] 提取转化子基因组 DNA, 以此为模板, 以 bleR 和 bleF 为引物进行 PCR 扩增博莱霉素抗性基因内部 368 bp DNA 片段。同时以灰黄青霉野生型菌株基因组 DNA 为对照。扩增条件为

初始变性(94℃ 5 min), 扩增循环(94℃ 30 s, 63℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30个循环), 延伸(72℃ 10 min)。

1.3.4 转化子 *Pa-pex11* 拷贝数的确定: 通过优化条件以荧光定量 PCR (quantitative PCR) 确定 *Pa-pex11* 在基因组上的拷贝数, 以看家基因 γ -actin 为内参。 γ -actin 基因 PCR 引物为 act1f 和 act1r, *Pa-pex11* PCR 引物为 pexf 和 pexr, 分别以转化子和野生型菌株基因组 DNA 为模板进行扩增。 qPCR 扩增条件为初始变性(94℃ 4 min), 扩增循环(94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40个循环), 延伸(72℃ 5 min)。 每个循环 76℃, 80℃ 各读板一次。 得到 Ct 值后 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 换算进行相对定量^[13]。

1.4 青霉素的发酵

将 1×10^7 个/mL 灰黄青霉孢子接种于 50 mL MCIP 中, 28℃, 220 r/min 培养 2 d; 取种子发酵培养物按 10% 接种量接种于 100 mL MCFP 中, 添加 0.4% 苯乙酸前体后于 28℃, 220 r/min 培养 7 d。

1.5 青霉素检测

发酵液每隔 24 h 取样, 以藤黄微球菌为指示菌进行检测。 藤黄微球菌在 LB 液体培养基中 28℃, 220 r/min 培养 2 d, 按 1% 添加到 TB 固体培养基中, 待培养基凝固后, 打上大小一致的孔洞, 并加入 100 μ L 不同时间点发酵液样品, 于 28℃ 培养 16 h 后测量抑菌圈直径。 同等条件以不同稀释度青霉素 G 标准品制作标准曲线。

1.6 菌体干重的测定

同一批次发酵培养基, 每隔 24 h 过滤收集 100 mL 发酵培养基菌体, 烘干称重。

1.7 电镜观察微体数量

选取 114 h 发酵菌体, 制作切片, 并通过透射电镜观察细胞内微体数量。 以同一时间点野生型灰黄青霉菌体为对照。

2 结果

2.1 *Pa-pex11* 的克隆

参照产黄青霉 *Pc-pex11* 基因序列, 以保守区设计引物, 通过 PCR 扩增得到部分灰黄青霉 *Pa-pex11* 基因, 进而通过 Tail-PCR 克隆得到了含有灰黄青霉 *Pa-pex11* 全基因及其上下游约 2 kb 的 DNA 片段。 对该片段进行序列测定。 序列分析表明, 该片段仅含有一个开放阅读框即 *Pa-pex11* 基因, 长度为 993 bp, 含有 2 个可能的内含子, 编码 238 个氨基酸, 同源比对发现其 N 端含有一个保守的微体靶定位序列, 蛋白内部还具有两个跨膜区(图 1)。 同源比

对发现灰黄青霉来源的 *Pa-pex11* 基因推测的编码产物与产黄青霉 *Pc-Pex11* 蛋白具有很高的序列相似性(99%)。 得到的 *Pa-pex11* 基因已提交了 GeneBank, 基因序列号为 FJ937947。

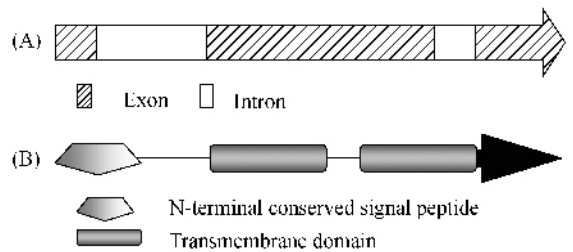


图 1 *Pa-pex11* 基因结构及推测蛋白结构域示意图

Fig.1 *Pa-pex11* gene structure and the predicted structure of Pa-Pex11 protein. A: *Pa-pex11* gene with three exons; B: The predicted N-terminal signal and transmembrane domain of Pa-Pex11.

2.2 灰黄青霉 *Pa-pex11* 转化子的构建

通过农杆菌介导的转化系统(ATMT)将构建好的质粒 p1302::ble::*Pa-pex11* 导入灰黄青霉中。 以 10 μ g/mL 博来霉素抗性浓度筛选 p1302::ble::*Pa-pex11* 转化子。 随机挑选转化子, 提取转化子基因组 DNA, PCR 验证表明 *ble* 成功地插入到灰黄青霉菌基因组上(图 2)。

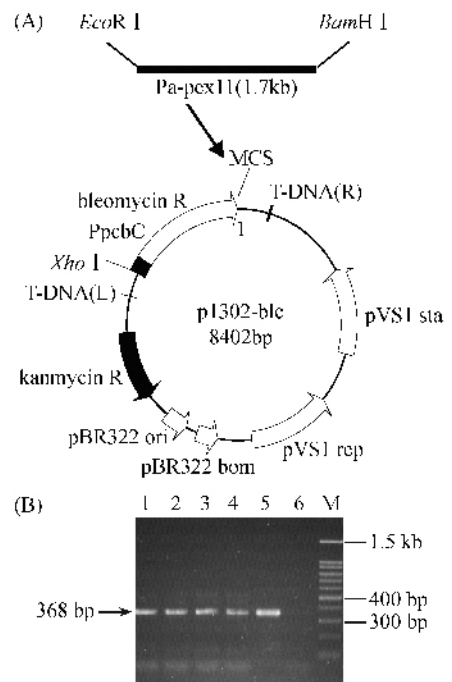


图 2 灰黄青霉农杆菌转化质粒的构建(A)及转化子 PCR 验证凝胶电泳(B)

Fig.2 Construction of plasmid p1302::ble::*Pa-pex11* (A) and confirmation of the transformants by PCR(B). The multiple cloning sites compose of restriction sites for *EcoR* I, *Bam*HI, *Pst* I, *Hind*III, *Nhe* I and *Pml* I. Lane 1-4: random selected transformants; Lane 5: positive control; Lane 6: negative control; Lane M: 100bp ladder.

2.3 转化子中 *Pa-pex11* 的相对拷贝数

随机选取其中一株转化子 *tz4*, 经 YPD 培养后提取基因组 DNA, 同时以野生型菌株基因组 DNA 为对照。经 qPCR 得到 Ct 值, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法相对比值换算如表 2 所示, 其中看家基因 γ -actin 作为内参。换算数值显示 *tz4* 基因组上 *Pa-pex11* 基因的拷贝数为野生型菌株的 1.9 倍。

表 2 野生型灰黄青霉(WT)与转化子 *tz4* *Pa-pex11* 基因拷贝数相对比值计算

	act1	pex11	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
WT	21.70	20.56			
	21.78	20.63			
	21.45	20.54			
	21.64	20.58	-1.06	0	1(0.89)
average	± 0.17	± 0.05	± 0.17	± 0.17	-1.12)
<i>tz4</i>	21.38	19.61			
	21.39	19.28			
	21.37	19.24			
	21.38	19.376	-2.00	-0.94	1.91(1.67)
average	± 0.01	± 0.2	± 0.2	± 0.2	-2.2)

2.4 青霉素 G 发酵产量

以不同浓度梯度青霉素 G 标品绘制青霉素 G 标准曲线(青霉素 G 标准品浓度为: 2-100 $\mu\text{g/mL}$)。

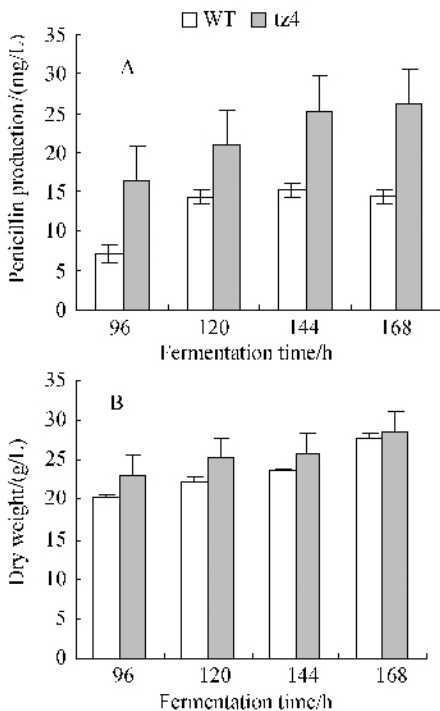


图 3 不同时间点灰黄青霉野生型与转化子菌株青霉素产量(A)及菌体干重(B)

Fig.3 Analysis of penicillin production (A) and mycelium dry weight (B) in different fermentation time. A: penicillin production (mg/L); B: mycelium dry weight (g/L). WT, the wild type strain; *tz4*, transformant with extra copy of *Pa-pex11*.

得到抑菌圈直径(x)与抗生素浓度对数值(y)的直线方程: $y = 0.8182x - 1.0426$ 。灰黄青霉发酵从第 3 天开始产生青霉素, 第 4 天有较小的抑菌圈出现。*tz4* 发酵产量与野生型菌株比较选取从第 4 天开始。换算野生型菌株与转化子 *tz4* 青霉素 G 产量, 如图 3-A 所示, 野生型菌株青霉素 G 在发酵第 5 天后达到平稳期, 而同样条件下 *tz4* 抗生素产量呈对数增长。发酵至第 7 天时, *tz4* 青霉素产量是野生型菌株的 1.8 倍。同时比较 *tz4* 与野生型菌株不同时间点菌体干重发现, *tz4* 菌体干重比同等条件野生型菌株略高, 如图 3-B。从单位质量的菌体产生抗生素的能力来看, *tz4* 每克菌体产生青霉素 G 的能力是野生型菌株的 1.7 倍。

2.5 电镜结果

取发酵 114 h 的灰黄青霉野生型和 *tz4* 菌体, 经戊二醛固定, 超薄切片, 并通过醋酸铀和硝酸铅染色制作透射电镜样品。电镜显示细胞内具有多种膜结构细胞器, 在醋酸铀与硝酸铅的染色后具有不同的电子密度, 而与胞内其它的结构具有不同的相差。

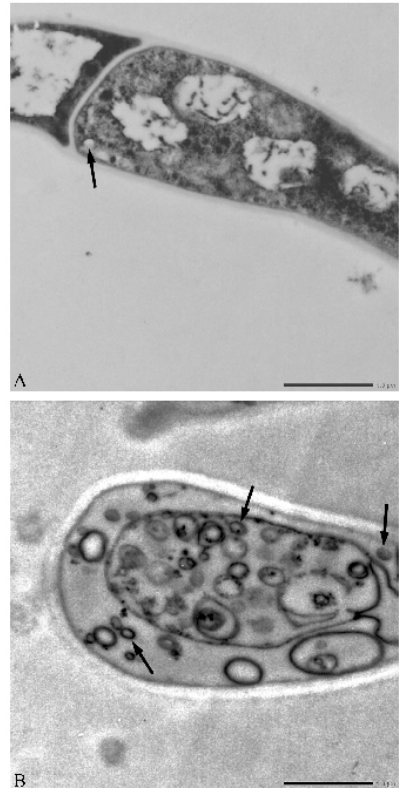


图 4 野生型菌株与 *tz4* 电镜下细胞结构

Fig.4 Electron micrographs of peroxisomes in *P. aurantiogriseum* cells. A: wild type cell; B: *tz4* cell. Peroxisomes are indicated by arrows. The bar represents 1 μm .

图中用箭头标识出了微体结构, 相比较于灰黄青霉野生型菌丝内部的结构(图 4-A), 在 *tz4* 细胞内微体数量明显增多, 但是体积未见变大(图 4-B)。

3 讨论

利用 ATMT 介导的遗传转化方法在多种丝状真菌中已经获得成功应用, 但是在本文所涉及的灰黄青霉菌株中的应用尚属首次。本文通过遗传学的手段在灰黄青霉菌基因组上增加了 *Pa-pex11* 基因的拷贝, 成功地提高了青霉素的产量。

合成青霉素所需要的几个关键酶, 在细胞内定位于不同的位置。对其合成途径区室化的研究表明, 其中一个关键酶异青霉素 N: 乙酰 CoA 乙酰转移酶就具有微体靶定序列, 如果缺失该定位信号, 合成青霉素的能力也将丧失, 可见微体在青霉素的合成中起着重要的功能。Kiel 等人在产黄青霉中过表达 *Pc-Pex11p* 发现青霉素产量提高了 2 倍, 但合成途径中几个关键酶表达水平无明显变化^[8]。而本文 *Pa-pex11* 编码的蛋白 *Pa-Pex11p* 也具有促进微体膜蛋白分化的功能, 使得增加一个 *Pa-pex11* 拷贝数的转化子细胞内微体数量明显增加, 推测青霉素产量提高的原因是 *Pa-pex11* 能促进微体的分化, 微体数量的增加有效地增加了膜面积, 进而提高了摄入前体和分泌抗生素的能力。

本文 *Pa-pex11* 的例子也为定向改造抗生素高产工程菌提供了新思路。可以通过筛选和发现更多的抗生素分泌相关基因, 在不涉及抗生素合成相关酶表达水平的前提下, 从提高抗生素的分泌能力入手来提高抗生素产量。

致谢 衷心感谢中国科学院微生物研究所电镜室的梁静南老师为本文制备透射电镜超薄切片样品。同时感谢中国科学院微生物研究所的方荣祥院士和何朝族研究员为实验所提供的农杆菌转化用的质粒 pCAMBIA1302-lx-1-1 及菌株 AGL-1。

参考文献

[1] Veenhuis M, Harder W. Microbodies//Rose AH, Harrison JS. The Yeasts, 4: 601 – 653. 2nd eds. London: Academic

Press, 1991.

- [2] Parsons M, Furuya T, Pal S, et al. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 2001, 115(1): 19 – 28.
- [3] Müller WH, Van der Krift TP, Krouwer AJ, et al. Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Embo Journl*, 1991, 10(2): 489 – 495.
- [4] Gould SJ, Valle D. Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends in Genetics*, 2000, 16: 340 – 345.
- [5] Martín JF, Gutiérrez S. Genes for beta-lactam antibiotic biosynthesis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1995, 67, 181 – 200.
- [6] Escaño CS, Juvvadi PR, Jin FJ, et al. Disruption of the *Aopex11-1* gene involved in peroxisome proliferation leads to impaired woronin body formation in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryotic Cell*, 2009, (8): 296 – 305.
- [7] Müller WH, Bovenberg RA, Groothuis MH, et al. Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *Biochemistry Biophysics Acta*, 1992, 1116: 210 – 213.
- [8] Kiel JA, van der Klei IJ, van den Berg MA, et al. Overproduction of a single protein, *Pc-Pex11p*, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42: 154 – 164.
- [9] Liu YG, Huang N. Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16 (2): 175 – 181.
- [10] 李大鹏. 苹果醇酰基转移酶基因 *MdaAT2* 参与酯类香气合成调控机理的研究. 山东农业大学博士学位论文, 2005.
- [11] Mullins ED, Chen X, Romaine P, et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 2001, 91: 173 – 180.
- [12] 何叶喧, 王世英, 李兵等. 一种快速提取丝状真菌产黄青霉 DNA 的方法. 中国抗生素杂志(*Chinese Journal of Antibiotics*), 2005, 30(8): 503 – 504.
- [13] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)) method. *Methods*, 2001, 25: 402 – 408.

Effects of *Pa-pex11* gene on penicillin production in *Penicillium aurantiogriseum*

Jing Yang^{1,2}, Yang An^{1,2}, Xinxin Xu^{1,2}, Gang Liu^{1*}

(¹ Key Laboratory Systematic Mycology and Lichenology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(² Graduate School of Chinese academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] To study the effect of *Pa-pex11* gene on penicillin production in *Penicillium aurantiogriseum*. [Method] Based on the conserved domain of *pex11* from *Penicillium chrysogenum*, we designed primers *pex01* and *pex02* to amplify *Pa-pex11* gene from *P. aurantiogriseum*. The complete *Pa-pex11* gene was cloned via thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR). In order to obtain transformants with additional *Pa-pex11* gene copy, ATMT (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation) was used to transform *P. aurantiogriseum*. The copy number of *Pa-pex11* was measured by quantitative PCR. Penicillin production of the transformant was analyzed by bioassays and the microbodies were observed by transmission electron microscope (TEM). [Results] ATMT was successfully applied in *P. aurantiogriseum*. Increasing the copy number of *Pa-pex11* gene resulted in a 1.7-fold increase of penicillin production, and the electron microscope graph showed that the number of microbodies increased obviously. [Conclusion] Our results suggest that increasing the copy number of *Pa-pex11* can increase the number of microbodies, and stimulate the penicillin production.

Keywords: *Pa-pex11* gene; *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT); penicillin; microbodies

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of National Science & Technology Pillar Program(20 07BAI26B01)

* Corresponding authors. Tel: +86-10-64807892; E-mail: liug@sun.im.ac.cn

Received: 24 April 2009/Revised: 11 May 2009

《微生物学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要:基本要素包括研究目的、方法、结果和结论,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围,采用的手段和方法,得出的结果和重要结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要:包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点:英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。要求在文中按照[Objective]、[Methods]、[Results]、[Conclusion]顺序分项撰写。英文摘要完成后,务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的,即使学术上可以达到刊出的水平,本刊也将推迟发表。
 - (1)在英语摘要中,不要使用任何汉字字符,包括标点、括号、温度、希腊字母等。
 - (2)建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
 - (3)建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以免好多长句,以求简单清晰。
 - (4)摘要应当使用过去时态,语法正确,句子通顺。
 - (5)摘要中不用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA、ATP等。
 - (6)句子的开头处最好不要使用数字。