

文章编号: 1673-1689(2007)01-0120-07

# 丝状真菌基因敲除技术研究进展

许杨<sup>1,2</sup>, 涂追<sup>1,2</sup>

(1. 南昌大学 中德联合研究院, 江西 南昌 330047; 2. 南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

**摘要:** 丝状真菌在自然界分布广泛, 与人类的生产、生活密切相关。近年来, 对于其基因功能的研究取得了较大的进展, 一系列转化和基因操作技术已在不同的丝状真菌中得到运用。许多对于工业、农业和医药卫生具有重要意义的丝状真菌已经完成或正在进行全基因组序列测定。作者简述了丝状真菌基因敲除的历史, 重点介绍了近年来基因敲除技术在丝状真菌研究中的进展, 并对其在丝状真菌基因功能研究、工业菌株改良等方面进行了展望。

**关键词:** 丝状真菌; 基因置换; 基因打靶; 同源重组

中图分类号: Q 949

文献标识码: A

## Application and Progress of Filamentous Fungi Gene Targeting

XU Yang<sup>1,2</sup>, TU Zhui<sup>1,2</sup>

(1. Sino-Germany Joint Research Institute, National Key Laboratory of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Ministry of Education, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** Gene targeting technology which based on homologous recombination is an important strategy in functional genomics, and it has been widely used in the genome specific manipulation, especially applied in the genetic trait modification of animal. However, the efficiency of gene targeting in filamentous fungi is usually low. Recent years, tremendous efforts have been made to improve the efficiency. This paper introduced the history of gene targeting in filamentous fungi. The latest application and research progress have also been reviewed.

**Key words:** filamentous fungi; gene targeting; gene replacement; homologous recombination

丝状真菌广泛分布于自然界, 与人类的生产、生活密切相关, 在工业、农业、医药、保健卫生以及基础生物学研究具有重要作用。近年来, 对于其基因功能的研究取得了较大的进展, 一系列转化和基因操作技术已在不同的丝状真菌中得到运用。许多对于工业、农业和医药卫生等具有重要意义的

丝状真菌, 如致病烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、工业生产菌黑曲霉(*Aspergillus niger*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)等, 已经完成或正在进行全基因组序列测定。表1列出了部分已经完成全序列测定的菌种, 更多信息可参阅文献[1]。对丝状真菌的研究已步入后基因组时代, 大规模基因功能的研究

收稿日期: 2006-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30460006)和长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0540).

作者简介: 许杨(1951-), 女, 安徽安庆人, 德国博士, 教授, 博导. 主要从事微生物及食品生物技术研究. Email: xuy-

万方数据 951@yahoo.com.cn

正成为丝状真菌研究的热点。目前,基因功能的研究已有多种方法,如 RNA 干扰、基因标记(gene tagging)、体外转座子标记(in vitro transposon tagging)、异源表达和基因敲除/置换等<sup>[2]</sup>。当确定了某个基因需要研究其功能时,最直接的方法之一就是将其从基因组中敲除或置换,然后再观察其表型变化。

作者简述了丝状真菌基因敲除的历史,重点介绍了近年来基因敲除技术在丝状真菌研究中的进展,并对其在丝状真菌基因功能研究、工业菌株改良等方面作了展望。

## 1 丝状真菌与基因敲除

### 1.1 基因敲除的概念

基因敲除是利用 DNA 转化技术,将构建的打靶载体导入靶细胞后,通过载体 DNA 序列与靶细胞内染色体上同源 DNA 序列间的重组,将载体 DNA 定点整合入靶细胞基因组上某一确定的位点,或与靶细胞基因组上某一确定片段置换,从而改变细胞遗传特性的方法。利用基因敲除技术,能够对细胞染色体进行精确地修饰和改造,而且经修饰和改造的基因能够随染色体 DNA 的复制而稳定地复制<sup>[3]</sup>。

同源重组(Homologous Recombination, HR)是多种生物体内普遍存在的一种生理现象,它是生物

体用于纠正自身(DNA 复制过程中产生)或因外界因素诱导所致 DNA 突变的一种内在机制,是基因敲除的分子生物学基础<sup>[4]</sup>。关于同源重组的分子机制目前尚未阐明,但已提出了多种解释同源重组的模型,如 Meselson-Radding 模型、双链断裂修复模型(DSBR)、单链退火模型(SSA)、三链 DNA 模型等<sup>[5-8]</sup>。

### 1.2 丝状真菌基因敲除的历史

基因敲除技术是建立在 DNA 转化技术的基础之上的。早在 1973 年, Mishra 等首次报道了丝状真菌粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)的 DNA 转化现象,他们用野生型菌株的总 DNA 处理肌醇缺陷型菌株,获得了肌醇原养型转化菌株<sup>[9]</sup>。但在当时受到了质疑,因为普遍认为真核生物发生转化几乎是不可能的,上述实验的结果有可能是由于回复突变造成。Mishra 改进了设计,用含有温度敏感肌醇等位基因突变菌株的 DNA 来处理肌醇缺陷型菌株,得到了温度敏感转化菌株<sup>[10]</sup>。随后, Case 等证实 DNA 介导的粗糙链孢霉遗传转化,在转化子中含有整合于染色体上的质粒 DNA 片段<sup>[11]</sup>。据不完全统计,已有超过 100 种丝状真菌实现了转化<sup>[12]</sup>(表 1 列出了部分常见的实现转化的丝状真菌),基因敲除技术在丝状真菌的研究中也开始得到应用。

表 1 常见实现转化的丝状真菌

Tab. 1 Partial Filamentous Fungal species in which transformation has been achieved

菌名	作者参考文献
<i>Neurospora crassa</i> *	Bull, J. H. et al. 1984. [ 13 ] [ 14 * ]
<i>Ashbya gossypii</i> *	Wright MC. et al. 1991. [ 15 ] [ 16 * ]
<i>Aspergillus nidulans</i> *	Tilburn, J. et al. 1983. [ 17 ] [ 18 * ]
<i>Aspergillus oryzae</i> *	Mattern, IE. et al. 1987. [ 19 ] [ 20 * ]
<i>Aspergillus fumigatus</i> *	Tang CM. et al. 1992. [ 21 ] [ 22 * ]
<i>Aspergillus niger</i> *	Goosen, T. et al. 1987. [ 23 ] [ 24 * ]
<i>Aspergillus monascus</i>	Kim JG. et al. 2003. [ 25 ]
<i>Aspergillus terreus</i>	Katz ME. et al. 1989. [ 26 ]
<i>Aspergillus flavus</i>	Woloshuk CP et al. 1989. [ 27 ]
<i>Fusarium oxysporum</i>	Kistler, HC. et al. 1988. [ 28 ]
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Whitehead M. P. et al. 1990. [ 29 ]
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Beri, R. K. et al. 1987. [ 30 ]

\* 已经完成全基因组序列测定  
万方数据

## 2 丝状真菌基因敲除技术研究现状

### 2.1 存在的问题

虽然基因敲除目前已广泛应用于细菌、酵母等低等生物和小鼠动物模型的建立,但对于丝状真菌还存在一些技术问题阻碍其应用。主要包括:需要不断地克隆、筛选,获得所需打靶载体费时费力;丝状真菌基因敲除通常需要较长的同源序列;一般在丝状真菌中发生同源重组的频率低,打靶效率低,例如孙晶等构建黑曲霉 *pepB* 基因缺失株,但是从62个转化子中只分离到一个同源重组转化子<sup>[31]</sup>。同源重组的频率主要受打靶载体同源序列的长度、载体构型、打靶位点和菌株等因素的影响<sup>[32]</sup>。

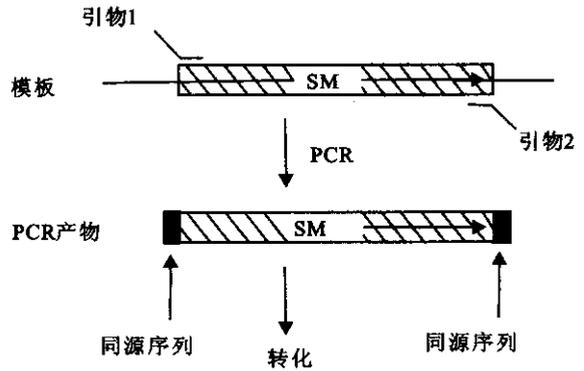
### 2.2 丝状真菌基因敲除技术研究现状

针对上述问题,近年来研究者从载体构建、提高打靶效率等方面提出了许多有效的改进措施,有的菌种已经建立了高效打靶系统,打靶效率可达100%,这使得在丝状真菌中进行基因敲除试验变得简便、迅速和高效。

**2.2.1 载体构建** 传统的载体构建方法需要载体外对DNA片段进行繁琐的酶切、连接、亚克隆和鉴定等步骤,费力费时。对此,研究者发展出其它方法构建打靶载体,如基于PCR技术的基因打靶、重组工程系统、体内或体外转位子突变等。

利用PCR技术辅助构建打靶载体可以快速获得目的片段,不需要进行克隆,不使用连接酶。第一个应用基于PCR技术基因打靶的丝状真菌是棉阿舒囊霉,Wendland等采用一步PCR法构建打靶载体(图1)将 $\rho$ 4基因开放阅读框敲除。虽然打靶载体的同源臂长度只有40~46 bp,但足以介导同源重组,这可能是由于棉阿舒囊霉具有某种高效同源重组机制而且其基因组比较小。一步PCR法构建打靶载体在此以前已经用于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)通常同源序列只需要数10 bp,而对于丝状真菌则不能满足试验<sup>[33]</sup>。

Yu等详细描述了一种基于PCR技术构建打靶载体的方法——双连接PCR法(如图2所示)。其中:A为第1轮PCR,分别扩增所需片段,一般包括5'同源序列、3'同源序列和选择标记序列。引物2和引物3末端分别带有25~30 bp与标记序列重叠的片段;B为第2轮PCR,不需要另外加入引物,将第1轮PCR产物进行PCR;C为第3轮PCR,用嵌套引物扩增,获得最终产物。图2中箭头(编号1~8)



PCR引物末端为目的基因同源序列,不能与选择标记退火,得到的PCR产物经纯化后可直接转化受体菌。SM:表示选择标记基因。

图1 PCR一步构建打靶载体示意图<sup>[33]</sup>

Fig. 1 Schematic illustration of one-step PCR approaches to construct a gene targeting cassette<sup>[33]</sup>

分别指引物。通过3轮PCR就能够获得所需要打靶载体,载体上下游同源臂的长度在0.5 kb至3.0 kb之间,避免了繁琐的亚克隆、筛选目的载体等步骤。他们利用这一技术,成功失活了构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)和禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)等3种丝状真菌的31个基因,同源重组率在0%~40%之间<sup>[34]</sup>。

重组工程系统是基于大肠杆菌体内同源重组的遗传工程技术,由噬菌体重组酶基因介导的体内同源重组过程,能够方便地对任意大的DNA片段进行修饰,而且由于整个过程在工程菌体内完成,可以避免碱基的无谓突变。

Chaverroche等首次介绍了利用大肠杆菌RecE/T系统构建置换型打靶载体,转化构巢曲霉后得到正确置换的转化子可达到60%,指出采用这种方法还可以进行基因融合、启动子替换等操作,并推测能够应用于其他大多数丝状真菌<sup>[35]</sup>。

此外,Hamer等建立了一种转座子体外标记的方法,称为转座子排列基因敲除(transposon arrayed gene knockout, TAGKO)<sup>[36]</sup>。这种方法可同时用于发现基因和构建基因敲除载体。

**2.2.2 载体中加入特殊的结构元件或采用特殊的报告基因** 在打靶载体中加入非同源重组选择标记是提高筛选效率的一种非常有效的方法。Mansour等人在小鼠胚胎干细胞进行基因敲除试验中,首先采用了正负筛选策略(positive and negative selection, PNS)<sup>[37]</sup>。正选择标记可以筛选出发生重组的转化子,负选择标记排除发生非同源重组的转化子。Takahashi等将这种方法用于酱油曲霉(*Aspergillus sojae*)。他们以 $\rho$ yrG为正选择标记, $\rho$ liC31

(来源于 *A. nidulans* 编码 FIFO - ATPase 第 9 亚基的突变型)为负选择标记,宿主菌为 *pyrG* 缺陷型,成功失活了 *niaD*、*areA* 和丹宁酸酶基因。为验证这种方法是否适用于其它位点,他们将 *alfR*(与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 合成有关)也成功敲除,由此推测这一技术也适用于其他丝状真菌<sup>[38]</sup>。

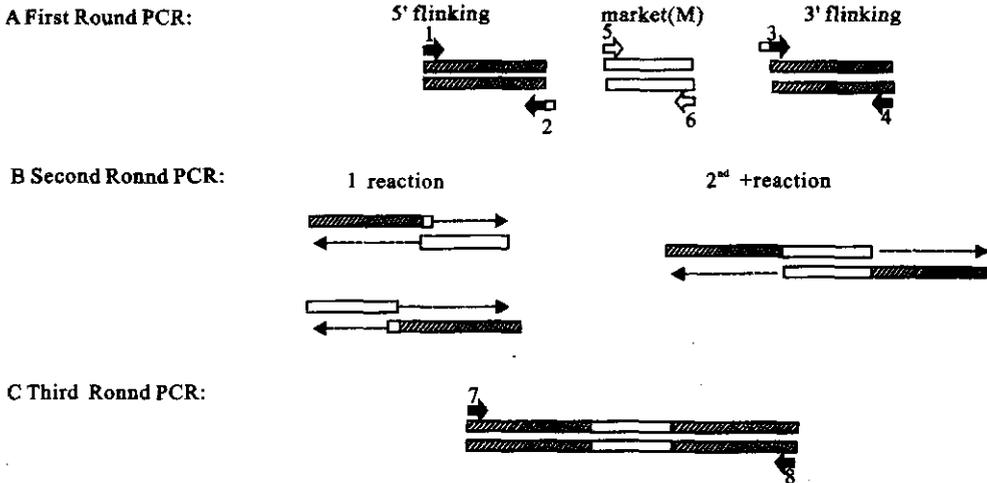


图 2 PCR 连接构建打靶载体示意图<sup>[34]</sup>

Fig. 2 Schematic representation of double-joint PCR approaches to construct a gene replacement cassette<sup>[34]</sup>

Maier 等以失活聚酮合酶基因 *pks12* 为选择标记(失活 *pks12* 基因的菌株会发生白化现象),建立了禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)的高效打靶系统,并且研究了同源序列长度、基因种类、打靶载体构造(环型/线型)、双载体共转化等因素对转化和同源重组率的影响。结果显示,当同源序列长度为 800 bp、线性载体打靶,同源重组率可达到 93% 以上。双载体打靶策略也能得到较高的同源重组率(约 70%),因此可以省去构建单一打靶载体的时间<sup>[32]</sup>。

此外,一些研究者将绿色荧光蛋白基因作为报告基因,深入研究基因的功能。Langfelder 等采用这种方法研究了烟曲霉 *pksP* 基因。该基因编码乳清酸-5'-磷酸脱羧酶,与色素合成和致病力有关。他们发现从感染组织中分离到的菌株在各个生长阶段都有荧光,而在标准条件下体外培养的菌株在瓶梗和分生孢子中才有荧光<sup>[40]</sup>。

**2.2.3 构建高同源重组率菌株** Ninomiya 等将粗糙链孢霉中与人 *KU70*、*KU80*(编码与非同源重组有关蛋白质的基因)同源的两个基因分别敲除,突变株的生长及产生的孢子都正常,但对于一些抗真菌药物比野生型菌株更加敏感。对其进行基因打靶,转化子的同源重组率达 100%,而对照的野生菌株

Cho 等利用线性极小元素(linear minimal element, LME)在 *Alternaria brassicicola* 中建立了高效率的打靶方法,使用 LME 结构的打靶载体对不同类别的目的基因都能够稳定转化,同源重组率可达 100%,而不含 LME 结构的环形打靶载体得到的转化子同源重组率一般低于 10%<sup>[39]</sup>。

只有 10% ~ 30%<sup>[41]</sup>。

Nayak 等确定了构巢曲霉中与人 *KU70* 基因同源的基因 *nkuA*, 将之敲除后,菌株的生长和敏感性几乎没受影响,但是同源重组率大幅度提高,90% 以上的转化子在正确的位点具有单拷贝插入。结合异源标记基因,建立了一个高效通用的构巢曲霉基因打靶系统<sup>[42]</sup>。

**2.2.4 其他** 农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的外源基因转化是目前植物转基因应用比较广泛的方法。De-Groot 等(1998)用农杆菌介导转化了 *Aspergillus awamori*、*Agaricus bisporus* 等丝状真菌,并证明异源的农杆菌 T-DNA 往往以单拷贝随机地插入到丝状真菌染色体中<sup>[43]</sup>。最近,Michielse 等以 *Aspergillus awamori* 为宿主对比研究了农杆菌介导转化法与 CaCl<sub>2</sub>/PEG 原生质体转化法。结果显示,前者比后者更加高效<sup>[44]</sup>。

### 3 基因敲除在丝状真菌研究中的应用及展望

#### 3.1 研究基因的结构与功能

基因敲除技术作为研究基因功能和结构的最直接最有效的方法之一,为从分子水平研究病原菌致病、耐药机理,并为最终防治病害提供了强有力

的手段。

烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)是曲霉属中最常见的致病真菌,在免疫受损的患者中常引起有致命危险的侵袭性肺曲霉病。Alcazar-Fuoli等研究了烟曲霉 *erg3A* 和 *erg3B* 两个基因在固醇合成和对抗真菌药物耐受性中的作用。分别敲除了 *erg3A* 基因、*erg3B* 基因和将两个基因共同敲除,结果显示 *erg3B* 编码 C-5 固醇脱氢酶,而 *erg3A* 对烟曲霉麦角固醇合成没有明显的作用,3种突变株对两性霉素 B、伊曲康唑、氟康唑、伏立康唑和酮康唑等抗真菌药物的敏感性没有改变<sup>[45]</sup>。

构巢曲霉(*A. nidulans*)和粗糙链孢霉由于其相对简单而被作为“模式”种用于真核生物的一些基础生物学特性研究。

丙酸盐可以作为丝状真菌的碳源,但是将它添加到含葡萄糖的培养基时又抑制真菌生长。为解释这一现象,人们对构巢曲霉进行了研究,发现了柠檬酸甲酯循环。Brock等进一步研究了这一机制,他们从构巢曲霉基因组序列中确定了上述循环中的一个关键酶——异柠檬甲酯裂合酶的编码基因,并将其敲除。得到的缺失株在以丙酸盐为碳源的培养基上不生长,在以其它物质为主要碳源且含有丙酸盐的培养基上受抑制。由此推论,柠檬酸甲酯循环的产物异柠檬甲酯是潜在的细胞代谢毒物<sup>[46]</sup>。

### 3.2 改良工业生产菌株

丝状真菌与其它生产菌株相比有其独特优点,即具有很高的蛋白质分泌能力,能正确进行各种翻译后加工,包括肽链剪切和糖基化等,且其糖基化的方式与高等真核生物类似;丝状真菌如曲霉等作为生产菌株,已有成熟的发酵和后处理工艺。但

是丝状真菌用作工业生产菌株也存在一些缺陷,例如对外源蛋白质的表达量低,有的菌株会产生一些有害物质影响产品品质等。基因敲除技术无疑给基因工程育种提供了一个有效的途径。

孙晶等以潮霉素抗性基因为标记,利用基因敲除技术将黑曲霉(*Aspergillus niger*) GICC2773 中一种编码天冬氨酸胞外蛋白酶的基因 *pepB* 敲除,功能分析显示突变株的酸性蛋白酶活性明显下降,外源蛋白漆酶的分泌表达提高,提示 *pepB* 基因的缺失对外源蛋白漆酶的表达有保护作用<sup>[31]</sup>。

### 3.3 次生代谢产物合成途径改造(代谢工程)

丝状真菌的许多次生代谢产物对人类的健康和营养有着非常重要的作用,如抗生素、statin 类药物、有机酸、多不饱和脂肪酸等。利用基因敲除技术可以有目的地对次生代谢产物生物合成途径进行改造,使代谢向目的产物积累方向进行。

棉阿舒囊霉(*Ashbya gossypii*)是一种棉花病原菌,能够过量生成核黄素(维生素 B<sub>2</sub>),但是其合成受到甘氨酸的限制(甘氨酸是嘌呤生物合成的前体)。Christina等将编码丝氨酸羧甲基转移酶的 *shm2* 基因敲除后,核黄素的生成量显著升高。经<sup>13</sup>C 分析,敲除 *shm2* 基因导致丝氨酸下降 2% ~ 5%,甘氨酸上升 59% ~ 67%<sup>[47]</sup>。

与传统的育种方法相比,采用分子生物学方法育种更具目的性,需要在分子水平对宿主菌及其代谢途径有相当的了解。目前关于利用基因敲除技术进行丝状真菌代谢控制育种的研究报道比较少见,主要还是集中在基因结构和功能的研究。相信随着生物信息学以及功能基因组学研究的深入,将会有大量的改良菌株应用于生产。

## 参考文献(References):

- [1] Fungal Genetics Stock Center[EB/OL](2006-11-01). <http://www.fgsc.net>
- [2] Richard J Weld, Kim M Plummer, Margaret A Carpenter, et al. Approaches to functional genomics in filamentous fungi[J]. Cell Research, 2006, (16) 31-44.
- [3] Capecchi M R. Altering the genome by homologous recombination[J]. Science, 1989, 224:1288-1292.
- [4] 王军平,张友明. Red/ET 重组及其在生物医学中的应用. 生物工程学报, 2005, 21(3) 501-506.  
WANG Jun-Ping, ZHANG You-Ming. Red/ET Recombination and its Biomedical Applications[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(3) 501-506. (in Chinese)
- [5] Meselson M S, Radding C M. A general model of genetic recombination[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72:358-361.
- [6] Lin F L, Sperle K, Sternber N. Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cell: role for DNA ends in the recombination process[J]. Mol Cell Biol, 1984, 4:1020-1034.
- [7] Rao B J, Dutier C M. Stable three-stranded DNA model by RecA protein[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:2948-2958.

- [ 8 ] Stasiak A. Three – stranded DNA structure is this the secret of DNA homologous recombination ?[ J ]. **Mol Microbio** , 1992 , 6 :3267 – 3276.
- [ 9 ] Mishra N C , Tatum E L. Non-Mendelian inheritance of DNA – induced inositol independence in *Neurospora*[ J ]. **Proc Natl Acad Sci USA** , 1973 , 70( 12 ) :3875 – 9.
- [ 10 ] Mishra N C. DNA-mediated genetic changes in *Neurospora crassa*[ J ]. **J Gen Microbiol** , 1979 , 113( 2 ) :255 – 9.
- [ 11 ] Case M E , Schweizer M , Kushner S R , et al. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA[ J ]. **Proc Natl Acad Sci USA** , 1979 , 76( 10 ) :5259 – 63.
- [ 12 ] 黄卫 , 汪天虹 , 吴志红 , 等. 丝状真菌遗传转化系统研究进展[ J ]. 微生物学杂志 2000 , 20( 3 ) :40 – 44.  
HUANG Wei , WANG Tian-hong , WU Zhi-hong , et al. Advance in genetic transformation system of filamentous fung[ J ]. **Journal of Microbiology** , 2000 , 20( 3 ) :40 – 44.( in Chinese )
- [ 13 ] Bull J H , Wootton J C. Heavily methylated amplified DNA in transformants of *Neurospora crassa*[ J ]. **Nature** , 1984 , 310 :701 – 704.
- [ 14 ] Galagan J E , Calvo S E , Borkovich K A , et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*[ J ]. **Nature** , 2003 , 442 :859 – 868.
- [ 15 ] Wright M C , Philippsen P. Replicative transformation of the filamentous fungus *Ashbya gossypii* with plasmids containing *Saccharomyces cerevisiae* ARS elements[ J ]. **Gene** , 1991 , 109( 1 ) :99 – 105.
- [ 16 ] Wendland J , Walther A. *Ashbya gossypii* : a model for fungal developmental biology[ J ]. **Nat Rev Microbiol** , 2005 , 3( 5 ) :421 – 9.
- [ 17 ] Tilburn J C , Scazzocchio G G , Taylor J H , et al. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*[ J ]. **Gene** , 1983 , 26 :205 – 221.
- [ 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( 7070 ) :1105 – 1115.
- [ 19 ] Mattern I E , Unkles S , Kinghorn J R , et al. Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger* pyrG gene[ J ]. **Mol Gen Genet** , 1987 , 210 :460 – 461.
- [ 20 ] Machida M , Asai K , Sano M , et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*[ J ]. **Nature** , 2005 , 438( 7071 ) :1157 – 61.
- [ 21 ] Tang C M , Cohen J , Holden D W. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity[ J ]. **Mol Microbiol** , 1992 , 6( 12 ) :1663 – 1671.
- [ 22 ] William C , Arnab Pain , Michael J , et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*[ J ]. **Nature** , 2005 , 438( 7071 ) :1151 – 1156.
- [ 23 ] Goosen T , Bloemhevel G , Gysler C , et al. Transformation of *Aspergillus niger* using the homologous orotidine-5'-phosphatede-carboxylase gene[ J ]. **Curr Genet** , 1987 , 11 :499 – 503.
- [ 24 ] Fungal Genetics Stock Center[ EB/OL ].( 2006-11-01 ) [http://www.dsm.com/en\\_US/html/dfs/genomics\\_aniger.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/dfs/genomics_aniger.htm)
- [ 25 ] Kim J G , Choi Y D , Chang Y J , et al. Genetic transformation of *Monascus purpureus* DSM1379[ J ]. **BioTechnol Lett** , 2003 ; 25( 18 ) :1509 – 1514.
- [ 26 ] Katz M E , Hynes M J. Gene function identified by interspecific transformation[ J ]. **Gene** , 1989 , 78( 1 ) :167 – 71.
- [ 27 ] Woloshuk C P , Seip E R , Payne G A , et al. Genetic transformation system for the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus* [ J ]. **Appl Environ Microbiol** , 1989 , 55( 1 ) :86 – 90.
- [ 28 ] Kistler H C , Benny U K. Genetic transformation of the fungal plant with pathogen *Fusarium oxysporum*[ J ]. **Curr Genet** , 1988 , 13 :145 – 147.
- [ 29 ] Whitehead M P , Gurr S J , Unkles S E , et al. Homologous transformation of *Cephalosporium acremonium* with the mitrate reductase – encoding gene( *niaD* ) [ J ]. **Gene** , 1990 , 90( 2 ) :193 – 198.
- [ 30 ] Beri R K , Turner G. Transformation of *Penicillium chrysogenum* using the *Aspergillus nidulans amdS* gene as a dominant selective marker[ J ]. **Curr Genet** , 1987 , 11( 8 ) :639 – 641.
- [ 31 ] 孙晶 , 李景鹏 , 王敖全 , 等. 黑曲霉 *pepB* 基因缺失菌株的构建及其功能分析[ J ]. 微生物学报 2004 , 44( 6 ) :766 – 770.  
SUN Jing , LI Jing-Peng , WANG Ao-Quan , et al. Construction and functional analysis of the *pepB* Gene disruptant in *Aspergillus niger*[ J ]. **Acta Microbiologica Sinica** , 2004 , 44( 6 ) :766 – 770.( in Chinese )
- [ 32 ] Maier F J , Malz S , Losch A P , et al. Development of a highly efficient gene targeting system for *Fusarium graminearum* using the disruption of a polyketide synthase gene as a visible marker[ J ]. **FEMS Yeast Res** , 2005 , 5( 6 – 7 ) :653 – 662.
- [ 33 ] Wendland J , Ayad – Durieux Y , Knechtle P , et al. PCR – base gene targeting in filamentous fungus *Ashbya gossypii*[ J ]. **Gene** ,

2000 ,242( 1 - 2 ) 381 - 391.

- [ 34 ] Yu JH , Hamari Z , Han K H , et al. Double-joint PCR : a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi [ J ]. **Fungal Genet Biol** , 2004 , 41( 11 ) 973 - 981.
- [ 35 ] Chaveroche M K , Ghigo J M , Christophe d 'Enfert. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*[ J ]. **Nucleic Acids Research** , 2000 , 28( 22 ) 97.
- [ 36 ] Lisbeth Hamer , Kiichi Adachi , Maria V. Momtenegro - Chamorr[ J ]. **PNAS** , 2001 , 98( 9 ) :5110 - 5115.
- [ 37 ] Mansour S L , Thomas K R , Capecchi M R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells : a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes[ J ]. **Nature** , 1988 , 336( 6197 ) 348 - 352.
- [ 38 ] Takahashi , Hatamoto T , Koyama O. Efficient gene disruption in the koji-mold *Aspergillus sojae* using a novel variation of the positive-negative method[ J ]. **Mol Genet Genomics** , 2004 , 272( 3 ) : 344 - 352.
- [ 39 ] Cho Y , Davis J W , Kim K H , et al. A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element ( LME ) constructs[ J ]. **Mol Plant Microbe Interact** , 2006 , 19( 1 ) 7 - 15.
- [ 40 ] Langfelder K , Philippe B. Jahn B , et al. Differential expression of the *Aspergillus fumigatus pksP* gene detected in vitro and in vivo with green fluorescent protein[ J ]. **Infect Immun** , 2001 , 69( 10 ) 6411 - 6418.
- [ 41 ] Yuuko Ninomiya , Keiichiro Suzuki , Chizu Ishii , et al. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for non-homologous end-joining[ J ]. **Proc Natl Acad Sci USA** , 2004 , 101( 33 ) :12248 - 12253.
- [ 42 ] Nayak T , Szewczyk E , Oakley C E , et al. A versatile and efficient gene targeting system for *Aspergillus nidulans*[ J ]. **Genetics** , 2005 , ( 12 ) 30.
- [ 43 ] De-Groot M , Bundock P , Hooykaas P , et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungus[ J ]. **Nature Biotechnol** , 1998 , 16 : 839 - 842.
- [ 44 ] Michielse C B , Arentshorst M , Ram A F J , et al. *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*[ J ]. **Fungal Genetics and Biology** , 2005 , 42 9 - 19.
- [ 45 ] Alcazar-Fuoli L , Mellado E , Garcia-Effron G , et al. *Aspergillus fumigatus* C-5 sterol desaturases Erg3A and Erg3B : role in sterol biosynthesis and antifungal drug susceptibility[ J ]. **Antimicrob Agents Chemother** , 2006 , 50( 2 ) 453 - 460.
- [ 46 ] Brock M. Generation and phenotypic characterization of *Aspergillus nidulans* methylisocitrate lyase deletion mutants : methylisocitrate inhibits growth and conidiation[ J ]. **Appl Environ Microbiol** , 2005 , 71( 9 ) 5465 - 54675.
- [ 47 ] Christina SCHLÜPEN , Maria A. SANTOS , Ulrike WEBER , et al. Disruption of the SHM2 gene , encoding one of two serine hydroxymethyltransferase isoenzymes , reduces the flux from glycine to serine in *Ashbya gossypii*[ J ]. **Biochem J** , 2003 , 369 : 263 - 273.

( 责任编辑 朱明 )