

农杆菌介导转化黑曲霉条件优化及脂肪酶表达

朱思远^{1,2,3}, 徐岩^{1,2,3}, 喻晓蔚^{*1,2,3}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 宿迁市江南大学产业技术研究院, 江苏 宿迁 223814)

摘要: 优化了农杆菌介导转化黑曲霉的方法, 优化条件包括共培养材料、农杆菌种类、诱导剂浓度、共培养时间、共培养温度以及共培养时农杆菌的菌体浓度。结果表明, 农杆菌介导转化黑曲霉的最适条件为 10^7 个/mL 不萌发的新鲜孢子与 OD_{600} 培养至 0.9~1.0 的农杆菌以 1:1 的比例混合后, 在乙酰丁香酮浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 IM 平板上, 23 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 48 h 后进行转膜, 转化子个数可达到 (60 ± 5) 个转化子/ 10^6 个孢子, 且阳性率达到 90% 以上。并且构建了同源黑曲霉脂肪酶的组成型和诱导型启动子表达载体, 通过优化后的农杆菌介导转化方法转化至黑曲霉中, 利用罗丹明橄榄油平板对产酶转化子进行筛选鉴定, 并获得了阳性克隆。

关键词: 农杆菌转化; 二元载体; 黑曲霉; 脂肪酶; 优化

中图分类号: Q 785 文章编号: 1673-1689(2020)05-0051-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.05.008

Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Aspergillus niger* and Expression of Lipase

ZHU Siyuan^{1,2,3}, XU Yan^{1,2,3}, YU Xiaowei^{*1,2,3}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Industrial Technology Research Institute of Jiangnan University, Suqian 223814, China)

Abstract: The method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus niger* was improved by optimizing the co-culture materials, *Agrobacterium* species, inducer concentration, co-culture time and temperature as well as the *Agrobacterium* concentration during co-culture. The optimum conditions for the transformation of *A. niger* were $10^7/\text{mL}$ non-germinated fresh spores and *Agrobacterium* with OD_{600} 0.9~1.0 in a ratio of 1:1, and 200 $\mu\text{mol/L}$ acetosyringone in the IM plate. The mixed cells were then transfected at 23 $^{\circ}\text{C}$ for 48 h, and the number of transformants reached 60 ± 5 transformants / 10^6 spores, and the positive rate reached over 90%. The expression vector of homologous *A. niger* lipase with constitutive or inducible promoter was constructed and transformed into *A. niger* by the optimized *Agrobacterium*-mediated transformation method. Finally the positive transformants were identified by Rhodamine-olive oil plate.

Keywords: *Agrobacterium*-mediated transformation, binary vector, *Aspergillus niger*, lipase, optimization

收稿日期: 2018-07-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671799); 江苏省“六大人才高峰”计划项目(NY-010); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目。

* 通信作者: 喻晓蔚(1978—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事分子生物学、酶工程等方面的研究。E-mail: bioyuxw@aliyun.com

黑曲霉被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA) 定义为基本安全 (Generally Recognized As Safe, GRAS) 菌株^[1], 在食品工业中具有良好的应用前景。黑曲霉在工业酶制剂、有机酸发酵方面应用广泛, 在工业、农业、医药以及基础生物学研究具有重要作用^[2]。

目前常见的转化丝状真菌的方法, 包括农杆菌介导转化法、原生质体-PEG 转化法、电转化法、限制酶介导转化法、脂质体转化法、醋酸锂转化法、基因枪转化法^[3]等, 各有优缺点。De Groot 等^[4]首先将农杆菌转化法应用于丝状真菌 *Aspergillus awamori* 的转化, 并证明了在原核生物和丝状真菌之间能够进行 DNA 转移, 而且转化效率比泡盛曲霉常规的 PEG 转化方法提高了 600 倍。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌。在农杆菌转化中通常采用双元载体, 一个是带有 T-DNA 的微型克隆质粒 (mini-Ti 载体), 一个是带有 Vir 区的辅助质粒。根癌农杆菌将 T-DNA 转移进宿主细胞主要是依赖于辅助质粒上一系列 vir 基因的表达, 而这些 vir 基因的表达受小分子的酚类和糖类物质的双重调节, 诱导物乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 和羟基乙酰丁香酮 (hydroxyacetosyringone, OH-AS) 在诱导 vir 基因活化过程中起主导作用^[5]。一系列毒力蛋白的刺激活化使得在克隆载体上 2 个边界的底部链重复区 (RB/LB) 断开, 导致 T-DNA 的释放, 并且继续在其它毒力蛋白的作用下将 T-DNA 进行运输转移, 通过农杆菌细胞与宿主细胞之间的接触, 将转移的 T-DNA 靶向细胞整合到基因组中, 从而实现基因的插入、靶向替换或者敲除的作用^[6], 见图 1。

根癌农杆菌介导转化具有如下优点: 1) 转化操作简便, 避免了原生质体制备过程中复杂的操作过程及其他方法中的设备要求^[5]; 2) 转化效率高, 并且转化材料可用范围广, 已有报道利用农杆菌介导转化可以成功转化分生孢子、菌丝体、原生质体及子实体^[7]; 3) 转化子大部分为单拷贝插入, 便于进行遗传分析; 4) 重组子遗传稳定, 同源整合效率高, 可用于进行丝状真菌基因靶向敲除, 重复性好, 是一种有效的基因靶向工具^[8-9]。不同种类的根癌农杆菌对于不同物种的侵染效率存在差异, 并且不同的转化条件也会导致转化效率的不同^[10-11]。与细菌及酵母等真菌不同的是, 丝状真菌的转化中存在较为严重

的假阳性问题, 筛选板上生长的转化子并不一定为阳性, 所以在优化条件获得较多转化子的同时也需要考虑阳性率。

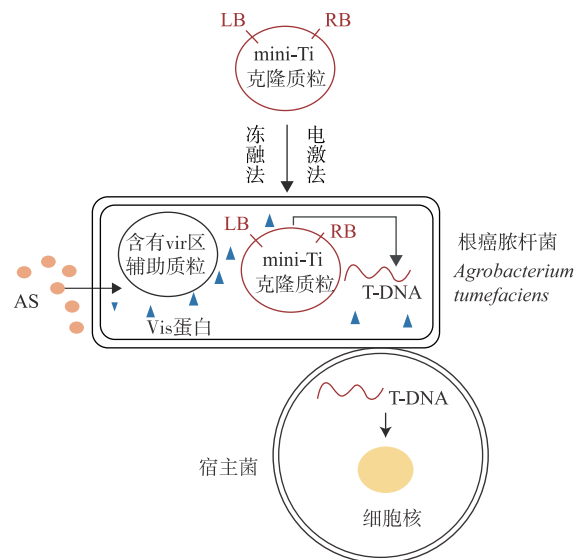


图 1 克隆质粒通过农杆菌介导转化丝状真菌原理

Fig. 1 Cloning plasmids were transformed to filamentous fungi by *Agrobacterium* mediation

作者利用 2 种根癌农杆菌介导转化黑曲霉, 确定了转化黑曲霉的最适条件, 并且分别构建了组成型启动子 *gpdA* 与诱导型启动子 *glaA* 表达同源黑曲霉脂肪酶的载体, 通过农杆菌介导转化黑曲霉, 利用罗丹明橄榄油平板初筛^[12], 快速确定产酶转化子。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株: 黑曲霉 CICC2169、CICC2475、CICC2089, 农杆菌 EHA105、AGL1, 大肠杆菌 JM109 均由作者所在实验室保藏。

质粒: pCambia1301-*gpdA*, pCAMPEP, pCAMRCL-*glaA* 由作者所在实验室保藏。

1.1.2 培养基

1) LB 培养基 (1 L) 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g。

2) YEB 培养基 (1 L) 酵母提取物 1 g, 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 5 g, 蔗糖 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.493 g; pH 7.0, 固体培养基中加入琼脂 2 g/dL。

3) PDA 培养基 (1 L) 称取 37 g PDA 粉末, 定容至 1 L。

4) IM 诱导培养基 (1 L)^[13] K_2HPO_4 2.05 g,

KH_2PO_4 1.45 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.15 g, CaCl_2 0.066 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 48 g, 葡萄糖 1.8 g, 甘油 5 mL, 蒸馏水定容至 940 mL; 在 121 °C 条件下湿热灭菌 20 min, 待冷却至 50 °C 时加入 40 mL、1 mol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES), 1 mL、200 mmol/L 乙酰丁香酮(AS)。在上述配方中补加琼脂粉 15 g 为诱导固体培养基(IMA), 试管液体配方同上, 用前加入 MES 及 AS 至所需量。

2-(N-吗啡啉)乙磺酸母液(MES)(1 mol/L): 用天平称取 19.52 g 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES), 加入 80 mL 蒸馏水, 用 KOH 溶液(5 mol/L)调节至 pH 5.3, 100 mL 容量瓶定容, 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20 °C 保存。

乙酰丁香酮母液(AS)(200 mmol/L): 称取 0.196 2 g 乙酰丁香酮, 用 5 mL 二甲基亚砜(DMSO)溶解, 0.22 μm 有机滤膜过滤除菌, -20 °C 保存

5) 罗丹明橄榄油平板(1 L) KCl 0.5 g, K_2HPO_4

1 g, NaNO_3 3 g, MgSO_4 0.5 g, 葡萄糖 2.5 g, 淀粉 2.5 g, 麦芽糖 2.5 g, 橄榄油乳化剂 10 mL, 罗丹明母液 1 mL(母液 0.01 g/mL)。橄榄油乳化剂为 $V_{4\% \text{ PVA}}: V_{\text{橄榄油}}=3:1$ 。

1.1.3 主要试剂 潮霉素 hyg、利福平 Rif、头孢噻肟 cefo、乙酰丁香酮: 购自上海生工公司; Primestar HS、限制性内切酶等: 购自 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 黑曲霉潮霉素敏感度测试 利用潮霉素为筛选标记, 首先对作者所在实验室保藏的 3 株黑曲霉(CICC2169、CICC2475、CICC2089)进行潮霉素抗性敏感度测试。配制 PDA 平板, 分别添加潮霉素 hyg 抗性, 使终质量浓度为 100、200、300、400、500 $\mu\text{g/mL}$ 。将黑曲霉分别点种到不同 hyg 抗性的平板上。

1.2.2 农杆菌转化条件的确立及优化 图 2 所示为农杆菌转化的基本流程, 初始转化条件如下:

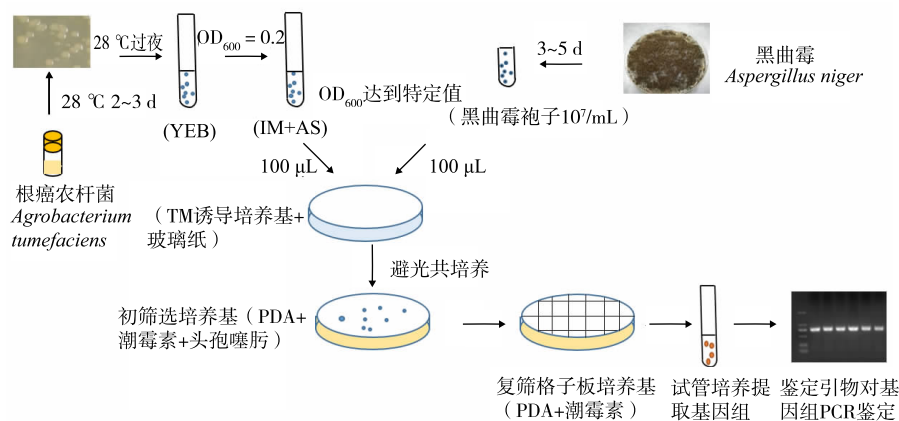


图 2 农杆菌转化基本流程示意图

Fig. 2 Process of *Agrobacterium*-mediated transformation

1) 黑曲霉孢子准备 将黑曲霉在平板上培养 5 d, 使其充分产孢。利用生理盐水洗下孢子利用 4 层擦镜纸过滤, 利用血球计数板计数, 使孢子浓度在 10^7 个/mL 备用。

2) 农杆菌准备与预培养 将质粒通过冻融法转化^[14]农杆菌中, 含有双元载体的农杆菌, 在平板上划线活化后转接 YEB 试管中培养 24 h, 进行农杆菌的预培养, 转接至 IM+AS 试管中使其 OD_{600} 在 0.2 左右, 培养至 OD_{600} 为 0.7 备用。

3) 黑曲霉与农杆菌共培养 将准备好的黑曲霉和农杆菌, 各取 100 μL 进行充分混合, 均匀涂布于含有玻璃纸的 IM+AS 平板上。置于 22 °C 下避光

共培养 36 h, 转膜至初筛培养基上培养, 初筛培养基上添加潮霉素及头孢噻肟。初筛板生长的转化子转接至复筛格子板进行传代复筛。

对以下条件进行优化: 共培养材料(萌发与非萌发孢子)、两种农杆菌(AGL1 与 EHA105)的转化效率进行比较、诱导剂乙酰丁香酮浓度 (0~400 $\mu\text{mol/L}$)、共培养温度(17~26 °C)、农杆菌共培养时的 OD_{600} 值(0.5~1.0 以上)、共培养时间(12~72 h)。

1.2.3 脂肪酶表达载体构建 构建黑曲霉脂肪酶 ANL 表达载体, 分别以组成型启动子甘油醛-3-磷酸脱氢酶(gpdA)和诱导型启动子糖化酶基因启动子(glaA)来启动脂肪酶基因的表达。首先基于 NCBI

对于黑曲霉脂肪酶基因进行查找,设计引物 P1-P8,以黑曲霉基因组为模板,扩增出包含 3 段内含子的 ANL 脂肪酶基因序列,后通过重叠延伸 PCR 去除 ANL 中的内含子序列,将 4 段 ANL 拼接,可获得除去内含子的 ANL 基因。构建过程用到的引物见表 1。

表 1 引物表

Table 1 Primer table

序号	引物名称	引物序列(5'-3')
P1	ANL-F	ATGTTCTCTGGACGGTTTGG
P2	1ANL-R	TCCAACGTGGAAGTCGAGACGCTCCGCACATCAAGTGGT
P3	2ANL-F	CACCACTTGATGTGCGGAGTGCTCTCGACTTCCACGTTG
P4	2ANL-R	GTGCCTCCAAAGTTATTTGTCAGGTCAAATCTCCAGCAGC
P5	3ANL-F	TGCTGCTGGAGTTCGACCTGACAAATAACTTTGGAGGCACA
P6	3ANL-R	CGAGGACATCCATAGGTGTACAGTTCAACACTATAACCGTC
P7	4ANL-F	GACGGTTATAGCGTTGAAGTGTACACCTATGGATGTCCTCG
P8	4ANL-R	TAGCAGACACTCTGAAATTGC
P9	gpdA-F	GCAGCCACCATGTTGGCGGAGAATATGGAGCTTC
P10	gpdA-R	GCTAGACGTCGCGGTGAGTTCAGGCTTTTTCATGGTGATGTCTGCTCAAGC
P11	pCAMANL-F	AGTGGGCCCCGACCCGACACCACTTGATG
P12	pCAMANL-R1	TTAATGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCTAGCAGACACTCTGAAATTGCG
P13	pCAMANL-R2	CAGAGATCTGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGGCT
P14	lgpdAF1	GCAGGTACCCGGAGAATATGGAGCTTC
P15	lglaAF1	CGTTCTAGAGCAGCTTGAAGAATTAGTGGC

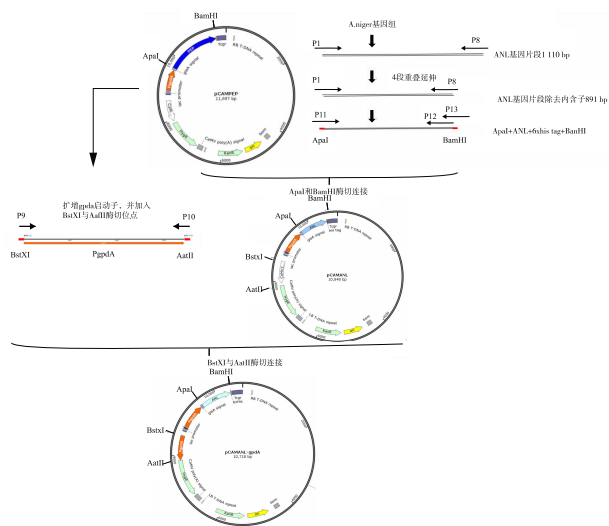


图 3 pCAMANL-gpdA 表达载体构建示意图

Fig. 3 Construction of pCAMANL -gpdA expression vector

1) 组成型启动子 gpdA 表达载体构建 以 pCAMPEP 质粒为载体构建组成型表达载体 pCAMANL-gpdA,包括将表达基因替换为黑曲霉脂肪酶 ANL 基因,以及将原有潮霉素基因 hyg 启动子 CaMV35S 替换为 gpdA,构建过程见图 3。

2) 诱导型启动子 glaA 表达载体构建 以 pCAMRCL-glaA 质粒为模板构建诱导型表达载体 pCAMANL-glaA。将 proRCL 基因通过 ApaI 和 Bgl II 酶切连接替换为 ANL 基因,构建流程见图 4。其中 pCAMRCL-glaA 的启动子 PglaA 序列是以黑曲霉 2475 基因组为模板,扩增 PglaA+glaA 信号肽序列,并在信号肽后加入 kex2 酶切位点。

1.2.4 转化子鉴定 转化子在初筛生长后转至复筛格子板复筛,通过复筛生长的转化子,转接土豆葡萄糖试管培养生长,提取基因组进行鉴定,黑曲霉基因组提取采用苯酚氯仿抽提法^[15]。转化子基因组利用引物 P12、P14 和引物 P12、P15 进行鉴定,确定是否有目标条带。将转化子接种罗丹明橄榄油平板,初步确定产酶情况。

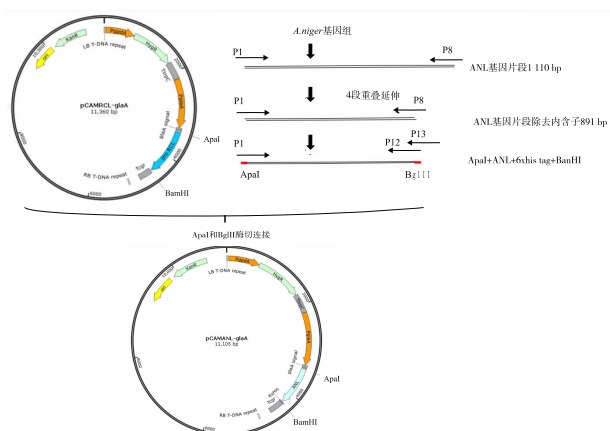


图4 pCAMANL-glaA 表达载体构建示意图

Fig. 4 Construction of pCAMANL-glaA expression vector

2 结果与讨论

2.1 黑曲霉的潮霉素抗性敏感度测试

利用潮霉素为筛选标记,首先对实验室保藏的3株黑曲霉 CICC2169、CICC2475 和 CICC2089 进行了潮霉素抗性敏感度测试,结果见表2。CICC2475、CICC2089 对于潮霉素有着较高的耐受性,对潮霉素不敏感,会导致筛选困难。CICC2169 对于潮霉素有着较高的敏感度,野生型菌株在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的条件下不生长,因此选择黑曲霉 CICC2169 作为转化的宿主菌。

表2 3株黑曲霉潮霉素抗性敏感度测试

Table 2 Sensitivity of *A. niger* to hygromycin B

潮霉素抗性质量 浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CICC2169	CICC2475	CICC2089
100	+	+	+
200	-	+	+
300	-	+	+
400	-	+	-
500	-	-	-

注:“+”表示由生长,“-”表示不生长

2.2 农杆菌转化黑曲霉的条件优化

将质粒 pCAMBIA1301-gpdA 转化农杆菌,获得阳性克隆,然后考察阳性农杆菌转化黑曲霉的最适条件。分别对于共培养材料的选择、EHA105 农杆菌和 AGL1 农杆菌转化效率、诱导剂乙酰丁香酮浓度、共培养温度、共培养过程中农杆菌初始 OD 值、共培养时间进行优化,并且从转化子个数和阳性率 2 个

方面评估最佳条件。

选择共培养材料,分别以不萌发的黑曲霉新鲜孢子和刚萌发孢子进行比较,结果表明,萌发孢子进行共培养转化时,黑曲霉的生长速度明显快于农杆菌,导致后续筛选中假阳性较高,而以不萌发孢子为转化材料时,两者的生长可基本平衡,获得的转化子 90%以上均为阳性转化子,因此后续实验以不萌发的新鲜孢子为共培养材料。许多已报道的文献是选择萌发的黑曲霉孢子进行实验^[16],萌发的孢子已破壁生长,原理上更容易被农杆菌侵染,但在本研究中效果并不明显,而且会导致较高的假阳性。

考察两种农杆菌转化黑曲霉的效率。将农杆菌 EHA105/pCAMBIA1301-gpdA 和 AGL1/pCAMBIA1301-gpdA 向黑曲霉 CICC2169 转化。如图5所示,利用农杆菌 AGL1 获得的转化子个数约是利用农杆菌 EHA105 获得的转化子个数的 14 倍。所以,选择农杆菌 AGL1 进行后续转化实验。

优化了诱导剂乙酰丁香酮(AS)的浓度,分别为 0、100、200、300、400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。以 AGL1/pCAMBIA1301-gpdA 进行介导转化,在其他条件相同的情况下,进行培养,结果见图6。不添加 AS 时,没有获得转化子,在 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的条件下转化率都相对较高,且差异不大,因此选择 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 为 AS 诱导浓度。

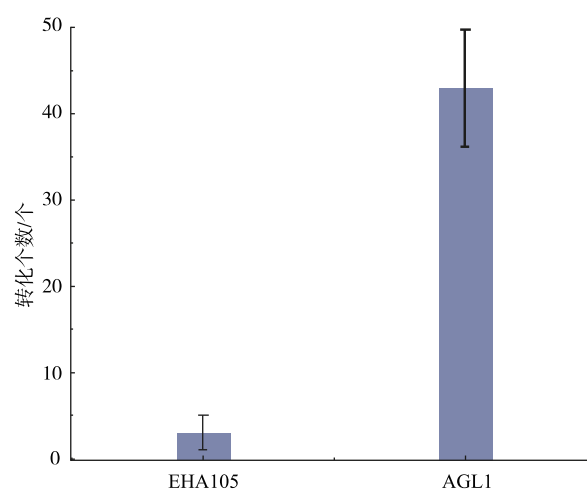


图5 农杆菌转化效率比较

Fig. 5 Effect of *Agrobacterium* species on transformation efficiency

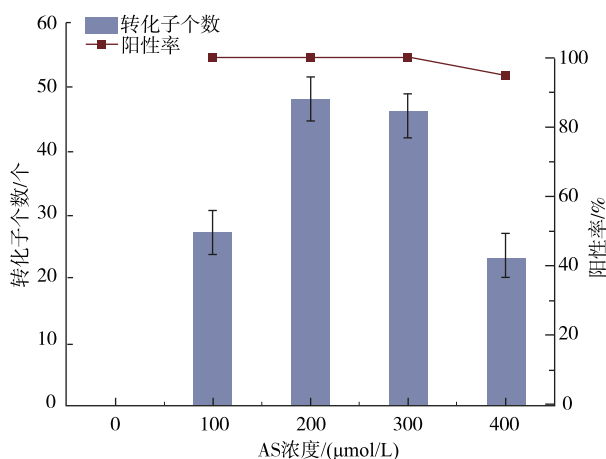


图 6 不同浓度 AS 转化效率比较

Fig. 6 Effect of concentration of AS in inducing medium on transformation efficiency

对共培养温度进行优化, 在 AS 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的条件下, 分别以 17、20、23、26 $^{\circ}\text{C}$ 为温度梯度进行共培养。以 AGL1/pCambia1301-gpdA 进行介导转化, 结果见图 7。随着温度的升高, 转化子个数逐渐增多, 但是在利用 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养时, 孢子萌发速度较快, 黑曲霉生长较快, 结束共培养时已经有大量菌丝生长, 产生连片现象, 后期生长出的转化子有较高的假阳性, 因此我们选择 23 $^{\circ}\text{C}$ 作为共培养温度。

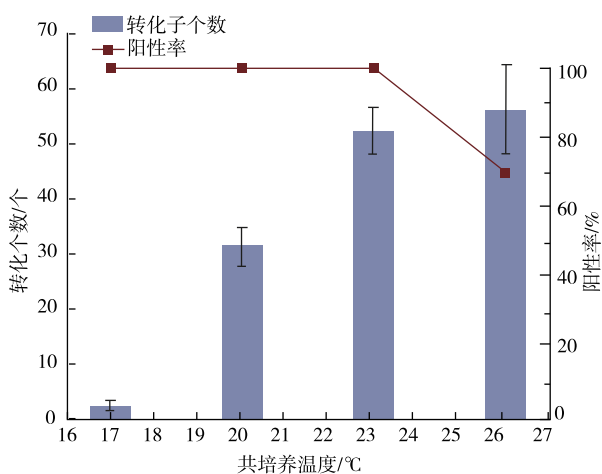
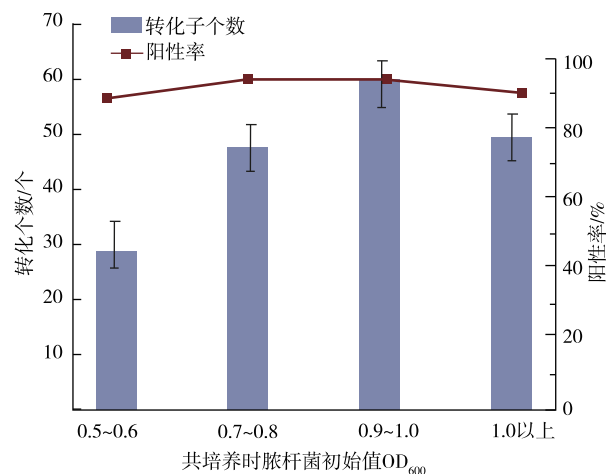


图 7 共培养温度优化

Fig. 7 Effect of co-culture temperature on transformation efficiency

对于共培养过程中农杆菌初始 OD_{600} 值进行优化, 以 AGL1/pCambia1301-gpdA 进行介导转化, 结果见图 8。在 AS 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 、共培养温度 23 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 农杆菌生长到 OD_{600} 为 0.9~1.0, 此

时进行共培养所获得转化子个数较多, 并且保持较高的阳性率。

图 8 共培养初始农杆菌 OD_{600} 优化Fig. 8 Effect of *Agrobacterium* OD_{600} during co-culture on transformation efficiency

对共培养时间进行优化, 在 AS 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$, 以 23 $^{\circ}\text{C}$ 的共培养温度, 初始农杆菌 OD_{600} 为 0.9~1.0 之间, 共培养时间设有 12、24、36、48、60、72 h, 结果见图 9。12 h 没有获得转化子, 在 24~48 h 内, 随着时间的增加转化子个数逐渐增加, 培养 60 h 和 72 h 时, 共培养结束时已经产生较多 (60 h) 以及满板 (72 h) 的菌丝, 转化培养时转化子个数不可计, 并且阳性率明显下降, 因此选择 48 h 为共培养时间。

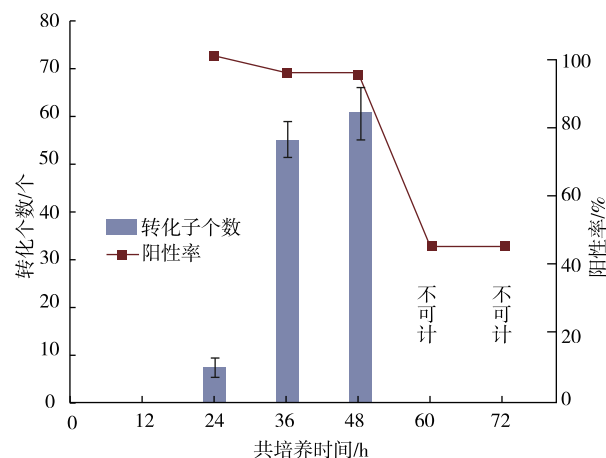


图 9 共培养时间优化

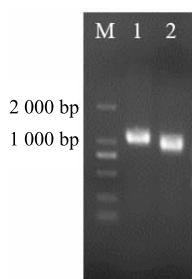
Fig. 9 Effect of co-culture time on transformation efficiency

实验结果表明, 适合 CICC2169 的转化条件为,

不萌发的新鲜孢子与 OD₆₀₀ 培养至 0.9~1.0 的农杆菌以 1:1 的比例混合后,在 AS 浓度在 200 μmol/L 的 IM 平板上,23 ℃避光培养 48 h 后进行转膜。最佳转化效率为 (60±5) 个转化子/10⁶ 个孢子,并且阳性率保持在 90% 以上。

2.3 脂肪酶表达载体的构建

以黑曲霉 CICC2475 基因组为模板,扩增 ANL 基因 1 110 bp,此时基因含有内 3 段含子序列,通过重叠延伸 PCR 将内含子去除,获得 891 bp 的片段,结果见图 10。



M:DNA marker;1:含有内含子的全长 ANL 基因,2:去除内含子的 ANL 基因。

图 10 ANL 基因 PCR 电泳图

Fig. 10 ANL gene

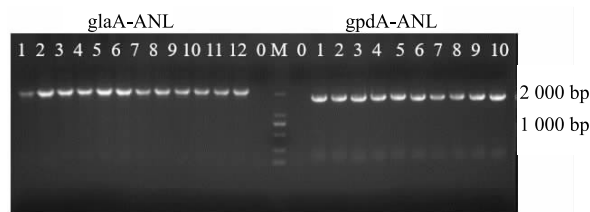
按照以上方法进行转化子构建,构建完成的转化子利用引物 P11,P13 进行鉴定。挑选条带大小正确的转化子测序,结果正确,黑曲霉脂肪酶基因 ANL 组成型启动子 pCAMANL-gpdA 表达载体和诱导型启动子 pCAMANL-glaA 表达载体构建完成。

2.4 阳性转化子鉴定及转化子产酶初筛

将构建完成的 2 种表达载体分别通过冻融法转化至农杆菌 AGL1 中获得 AGL1/ pCAMANL-gpdA 和 AGL1/ pCAMANL-glaA,并利用优化后的方法将 AGL1/ pCAMANL-gpdA 和 AGL1/ pCAMANL-glaA 分别转化黑曲霉 CICC2169 中,获得的阳性转化子分别命名 glaA-ANL 和 gpdA-ANL,初筛平板为 PDA+200 μg/mL hyg+100 μg/mL cefo,复筛平板为 PDA+200 μg/mL hyg,转化子进行 3 次传代后,提取基因组进行转化子鉴定。glaA-ANL 转化子利用引物 P12、P15 进行鉴定,条带大小为 2 111 bp 为阳性转化子,gpdA-ANL 转化子利用引物 P12、P14 进行鉴定,条带大小为 1 615 bp 为阳性转化子,见图 11。

将阳性转化子转接至罗丹明橄榄油平板进行产酶初筛。对于黑曲霉脂肪酶 ANL 转化子进行罗丹

明橄榄油平板鉴定,转化子大多出现了明显的水解圈,而对照原始菌并没有红色水解圈出现,由于插入位置的不同,导致不同的转化子可能有不同的产酶水平。其中组成型启动子 gpdA 转化子的水解圈比诱导型启动子 glaA 转化子更加明显,见图 12。



左 1~12:glaA-ANL 转化子;右 1~10:gpdA-ANL 转化子;0:对照,原始菌株 CICC2169。

图 11 转化子基因组鉴定

Fig. 11 Identification of transformants

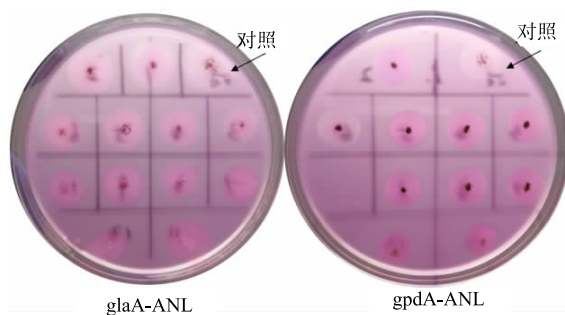


图 12 黑曲霉脂肪酶 ANL 转化子在罗丹明橄榄油平板生长情况

Fig. 12 Transformants grown on rhodamine-olive oil plate

3 结 语

在本研究中,对农杆菌介导转化黑曲霉的共培养条件进行了优化,最终确定条件为 10⁷ 个/mL 不萌发的新鲜孢子与 OD₆₀₀ 培养至 0.9~1.0 的农杆菌以 100 μL:100 μL 的比例混合后,在 AS 浓度在 200 μmol/L 的 IM 平板上,23 ℃避光培养 48 h 后进行转膜至含有头孢噻肟的初筛平板,其中头孢噻肟的作用为杀死农杆菌,在共培养结束后及时杀死农杆菌,避免由于农杆菌过量生长抑制转化子生长。有报道^[17]以硝化纤维膜作为膜材料进行培养效果最好,但是价格较为昂贵,本过程中以较廉价的转膜材料玻璃纸进行直接转膜培养,不采用倒置反贴的过程,不仅缩短农杆菌转化时间进程,还减少了转化子损失。但是宿主菌和农杆菌的种类不同,可能

会存在不同的转化效率及阳性率^[11]。

在进行脂肪酶的表达初试中,采用罗丹明橄榄油平板对于产酶转化子进行了初筛,表达的脂肪酶通过水解橄榄油产生脂肪酸,脂肪酸会与罗丹明相互作用而显色,颜色越深并且水解圈越大,表明脂肪酶表达量越高。转化黑曲霉脂肪酶 ANL 基因的阳性克隆在平板上有较明显的显色,由于农杆菌介导转化进行基因插入的位置是随机的,所以可能导致

产酶水平存在差异,可以通过转化子显色圈的颜色和大小进行较为直观的活性筛选。对照菌株本身内源产少量脂肪酶,但是由于表达量过低,并不显色及产生水解圈。在黑曲霉中进行基因的表达,可能会受到密码子偏好性、转录水平或翻译等不同方面的影响,在接下来的工作中,我们将重点提高目标基因的表达量。

参考文献:

- [1] ABARCA M L, ACCENSI F, CANO J, et al. Taxonomy and significance of black aspergilli[J]. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 2004, 86(1): 33-49.
- [2] 郭艳梅, 郑平, 孙际宾. 黑曲霉作为细胞工厂: 知识准备与技术基础[J]. **生物工程学报**, 2010, 26(10): 1410-1418.
- [3] WELD R J, PLUMMER K M, CARPENTER M A, et al. Approaches to functional genomics in filamentous fungi[J]. **Cell Res**, 2006, 16(1): 31-44.
- [4] GROOT M J, BUNDOCK P, HOOYKAAS P J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi[J]. **Nature Biotechnology**, 1998, 16(9): 839-842.
- [5] WANG S, CHEN H, TANG X, et al. Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2017, 101(22): 8063-8075.
- [6] MICHIELSE C B, HOOKAAS P J, HONDEL C A, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi[J]. **Curr Genet**, 2005, 48(1): 1-17.
- [7] WEYDA I, YANG L, VANG J, et al. A comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation and protoplast-mediated transformation with CRISPR-Cas9 and bipartite gene targeting substrates, as effective gene targeting tools for *Aspergillus carbonarius*[J]. **J Microbiol Methods**, 2017, 135: 26-34.
- [8] NGUYEN K T, HO Q N, DO L T B, et al. A new and efficient approach for construction of uridine/uracil auxotrophic mutants in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2017, 33(6): 107-118.
- [9] XIAO X, FENG J, LI Y, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: an efficient tool for targeted gene disruption in *Talaromyces marneffei*[J]. **World J Microbiol Biotechnol**, 2017, 33(10): 183.
- [10] LI M, ZHOU L, LIU M, et al. Construction of an engineering strain producing high yields of alpha-transglucosidase via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus niger*[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2013, 77(9): 1860-1866.
- [11] VU T X, NGO T T, MAI L T D, et al. A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using DsRed and GFP to visualize citrus host colonization[J]. **J Microbiol Methods**, 2018, 144: 134-144.
- [12] 朱珊珊, 喻晓蔚, 徐岩. 毕赤酵母组成型表达脂肪酶及其高通量筛选方法[J]. **微生物学通报**, 2012, 39(6): 873-881.
- [13] MICHIELAE C B, HOOYKAAS P J, HONDEL C A, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*[J]. **Nat Protoc**, 2008, 3(10): 1671-1678.
- [14] 王艳. 农杆菌介导 T-DNA 转化黑曲霉的初步研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2013.
- [15] LEE S M. A rapid high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi[J]. **Fungal Genet Newsl**, 1988, 35(1): 23-24.
- [16] ZHANG X, XIA L. Expression of *Talaromyces thermophilus* lipase gene in *Trichoderma reesei* by homologous recombination at the *cbh1* locus[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2016, 44(3): 1-9.
- [17] 曹张磊, 王德培, 张岚. 提高根癌农杆菌介导黑曲霉转化效率的研究[J]. **天津科技大学学报**, 2016, 31(2): 20-25.