

三孢布拉霉遗传转化体系的构建及应用

李娜¹, 曲音波², 杨培龙³, 余晓斌¹, 罗玮^{*1}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国农业科学院饲料研究所 农业农村部饲料生物技术重点实验室, 北京 100081)

摘要: 为解决三孢布拉霉转化过程中原生质体转化率低、孢子细胞壁厚难以导入外源载体等问题, 本研究中构建了根癌农杆菌侵染原生质体的转化体系, 同时克隆了与非同源末端连接修复途径相关的 *ku80* 基因, 并将该转化体系应用于 *ku80* 的敲除中。将 *ku80* 基因敲除框插入双元载体 pDHT-sk 上构建了重组敲除载体 pDH-85H3, 通过化学转化法将敲除载体 pDH-85H3 导入根癌农杆菌 LBA4404, 并基于农杆菌介导法转化三孢布拉霉原生质体。结果表明, 经潮霉素筛选和 PCR 鉴定, 得到的 20 株转化子中, 有 18 株的基因组插入了敲除框, 转化率达 90%。经鉴定有 2 株转化子发生了同源重组, 敲除率为 10%。该结论表明了根癌农杆菌介导三孢布拉霉原生质体转化技术的可行性。

关键词: 三孢布拉霉; 原生质体; *ku80*; 根癌农杆菌; 基因敲除

中图分类号: Q 939.97 文章编号: 1673-1689(2021)09-0033-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.09.005

Construction and Application of Genetic Transformation System in *Blakeslea trispora*

LI Na¹, QU Yinbo², YANG Peilong³, YU Xiaobin¹, LUO Wei^{*1}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China; 3. Key Laboratory for Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture, Feed Research Institute Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: *Blakeslea trispora* (*B. trispora*), an important filamentous fungus, is used industrially in the mass production of carotenoids. The lack of a deep understanding of the genetic background of *B. trispora* and the shortage of genetic manipulation tools have hampered the genetic studies of *B. trispora* and the biological studies of carotenoid synthesis. For *B. trispora*, protoplast transformation rate is low and the spore cell wall is thick, which cause difficulty in introducing exogenous vectors into the cell. To solve this problem, this study constructed a transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) infecting protoplast, and cloned *ku80* gene which was related with the non-homologous end joining repair pathways at the same time, and then applied the transformation system in the knockout of *ku80*. A recombinant knockout vector pDH-85H3 was

收稿日期: 2020-09-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(21878123, 21606105); 中国博士后科学基金项目(2018M630525); 微生物技术国家重点实验室开放课题项目(M2020-06); 农业农村部饲料生物技术重点实验室开放课题项目(KLFB-FRI-202001)。

* 通信作者: 罗玮(1981—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物代谢工程和发酵工程研究。E-mail: wluo@jiangnan.edu.cn

constructed by inserting *ku80* knockout frame into the binary vector pDht-sk. And then the vector pDH-85H3 was introduced into *A. tumefaciens* LBA4404 by chemical transformation. Finally, the protoplast of *B. trispora* was transformed by *A. tumefaciens*-mediated method. By hygromycin screening and PCR analysis, there were 18 transformants in which the knockout box was inserted into the genome out of 20 transformants, and the transformation rate was 90%. Further analysis indicated that there were 2 transformants in which homologous recombination occurred and the knockout rate was 10%. The result indicated that *A. tumefaciens* mediated protoplast transformation in *B. trispora* was feasible.

Keywords: *Blakeslea trispora*, protoplast, *ku80*, *Agrobacterium tumefaciens*, gene knockout

三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)是一种重要的丝状真菌,因其具有类胡萝卜素积累量高、工艺相对简单、成本较低和易于提取等优点,可用于工业大规模生产类胡萝卜素。目前,对于三孢布拉霉的研究主要集中在通过传统诱变选育手段获得类胡萝卜素高效合成菌株,但该技术工作量大、效率低,且获得的菌株容易出现退化^[1]。采用系统代谢工程策略和合成生物学技术无疑是解决上述问题的最好替代方法,但是目前缺乏针对三孢布拉霉的高效遗传转化工具。

根癌农杆菌介导转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)是依靠 T-DNA 在诱导条件下转移基因到宿主基因组中的能力,将外源基因导入宿主的转化技术^[2],已成功在卷枝毛霉^[3]、里氏木霉^[4]等丝状真菌得到应用。相比于其他遗传转化方法,ATMT 具有转化效率高、侵染受体选择多样等优点^[5],已是丝状真菌遗传转化系统中常用的方法。黄琼瑶^[6]首次证明农杆菌介导三孢布拉霉孢子遗传转化的可行性。但在研究中发现农杆菌介导的孢子转化法难以得到转化子,其原因可能是孢子细胞壁厚的缘故。

由 *ku80* 基因编码的 *ku80* 蛋白是组成 *ku* 蛋白的两个亚基之一,最早是在患有多肌炎硬皮病重叠综合征的日本姓 *ku* 的患者血清中发现^[7],因该亚基的相对分子质量大小为 83 000,故命名为 *ku80*^[8]。*Ku80* 参与的非同源末端连接(NHEJ)修复途径,是造成三孢布拉霉等丝状真菌敲除困难的原因之一^[9]。有研究表明对丝状真菌中涉及 NHEJ 的相关基因进行敲除后,能够提高同源重组(HR)频率^[10],比如在黑曲霉^[11]、粗糙脉孢霉^[12]、大丽花轮枝孢^[13-14]、里氏木霉^[15]中均有研究报道。本研究中通过根癌农

杆菌介导三孢布拉霉原生质体转化的方法,导入敲除片段进三孢布拉霉基因组,从而实现 *ku80* 基因的敲除。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 野生型三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*) 负菌 NRRL2896、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、质粒 pDht-sk、质粒 pCSN44:作者所在实验室保藏;根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404:购自苏州金唯智公司;载体 pMD18-T:购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 抗生素和试剂 卡那霉素、利福平、潮霉素 B、头孢噻肟钠、乙酰丁香酮(AS):上海生物工程公司产品;DNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司产品;HiScript II One Step RT-PCR Kit(Dye Plus)试剂盒、EsTaq 聚合酶:南京诺唯赞生物公司产品;高保真酶 PrimerSTAR Max 酶,限制性内切酶 *Sma* I、*Xho* I:TaKaRa 公司产品;溶壁酶、纤维素酶、蜗牛酶:北京索莱宝公司产品;引物合成及测序:苏州金唯智公司提供;其他试剂:国药集团化学试剂有限公司产品。

1.1.3 培养基 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5g/L,NaCl 10g/L)用于大肠杆菌 DH5 α 和根癌农杆菌 LBA4404 的培养;糖度 5°麦汁培养基和种子培养基(玉米粉 30 g/L,大豆粉 50 g/L,KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L;pH 6.5)用于三孢布拉霉 NRRL2896 的培养。

1.1.4 引物 实验中用到的引物序列见表 1。

1.2 方法

1.2.1 三孢布拉霉 *ku80* 基因的克隆 在 NCBI 中,

表 1 实验中用到的引物
Table 1 Primers used in this experiment

引物	序列 (5'-3')	作用
Ku80-F	ATGGCACAAAAAAGGGCTACTTGTT	扩增 <i>ku80</i> 基因
Ku80-R	CAATTCATCTGCATCAAATGAACAG	
85-F	CCGCTCGAGCGGCATCTTGAAATGGATCTGCC (<i>Xho</i> I)	扩增 <i>ku80</i> 基因 5'同源臂
85-R	CTTCTGTGACGGTATCGATAAAGAAAGGAGAAACGCG	
83-F	CGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGCAATCTGTTTGCCATTTTCTC	扩增 <i>ku80</i> 基因 3'同源臂
83-R	TCCCCGGGGGAAAAATAGCCTCATTCTCGCG (<i>Sma</i> I)	
8H-F	CGCGTTTCTCCCTTTCTTTATCGATAACCGTCGACAGAAG	扩增 <i>HygR</i> 基因
8H-R	GAGAAAATGGCAAACAGATTGCTACTCTATTCTTTGCCCTCG	
8H1-F	CCGGGGGAAAAATAGCCTCAT	验证转化子
8H1-R	TAAATAGCTGCGCCGATGGT	
8H2-F	GCCCTCCTACATCGAAGCTG	
8H2-R	ATTTGTGAGACTGGCGGTCC	

根据瓜笄霉 *ku80*(OBZ83437.1)蛋白质序列,在三孢布拉霉全基因组中进行 tblast,找到 *ku80* 基因序列,设计 Ku80-F 和 Ku80-R 引物扩增得到 *Btku80* 基因(三孢布拉霉的 *ku80* 基因)。以提取的 RNA 为模板,使用 HiScript II One Step RT-PCR Kit (Dye Plus)试剂盒直接扩增出 *Btku80* cDNA 序列。

1.2.2 敲除载体 pDH-85H3 构建 挑取部分三孢布拉霉野生型菌丝接种于种子培养基中,25 °C、180 r/min 培养 48 h,液氮研磨后按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA。以基因组 DNA 为

模板,以 85-F 和 85-R 为引物扩增 *ku80* 基因的 5'同源臂,以 83-F 和 83-R 为引物扩增 *ku80* 基因的 3'同源臂。以质粒 pCSN44 为模板,以 8H-F 和 8H-R 为引物扩增编码 *HygR*(潮霉素抗性基因)的 DNA 片段。以上 3 个片段均使用高保真酶 PrimerSTAR Max 酶扩增,并通过重叠延伸 PCR 技术连接起来,得到敲除片段 85H3,随后通过 *Sma* I、*Xho* I 双酶切连接至双元载体 pDHt-sk,得到敲除载体 pDH-85H3。敲除原理见图 1,敲除载体具体构建过程见图 2。

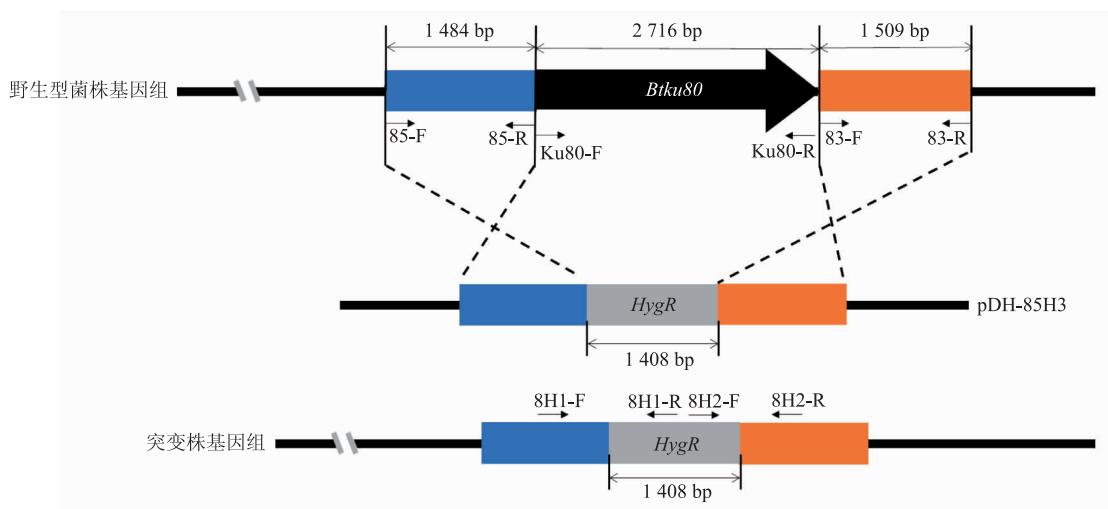


图 1 *Btku80* 基因敲除原理示意

Fig. 1 Gene replacement strategy of *Btku80*

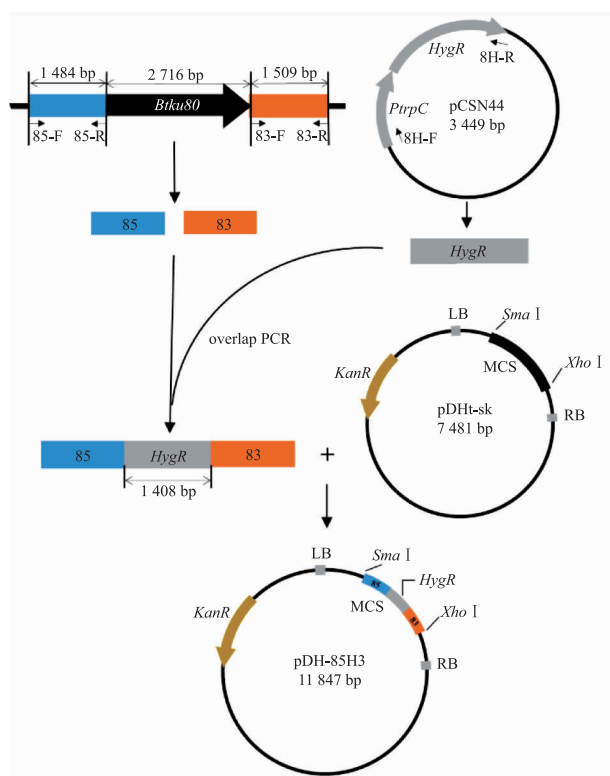


图2 敲除质粒 pDH-85H3 构建示意

Fig. 2 Construction procedure of knock-out vector pDH-85H3

1.2.3 敲除载体转化根癌农杆菌 LBA4404 制备根癌农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 方法如 Jyothishwaran 等^[16]所述。取根癌农杆菌感受态细胞 100 μL , 加 1.5 μL 质粒, 冰浴 30 min; 放入液氮中速冻 1 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min, 冰浴 3 min; 加入 LB 液体培养基 300 μL , 200 r/min, 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 3.5 h; 随后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 吸除上清液 200 μL , 剩下的轻轻吹吸混匀, 涂于 LB (含卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d。待平板上出现单菌落后, 取单菌落接入 50 mL LB 液体培养基 (含卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 中, 200 r/min, 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养过夜, 提取质粒, 进行 PCR 检测。

1.2.4 三孢布拉霉原生质体的制备 将在种子培养基培养 2 d 的菌丝体 8 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 使用灭菌称量勺尽量刮取上层培养基, 并用灭菌水洗 2 次菌丝体, 然后每克菌丝体加入 5 mL 复合酶液, 置于摇床上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、75 r/min 避光酶解 4 h。其中复合酶液组成为: 2 g/dL 溶壁酶、3 g/dL 纤维素酶、3 g/dL 蜗牛酶, 用稳渗液 0.6 mol/L NaCl 溶解; pH 6.0。酶解获得足够多的三孢布拉霉原生质体

后, 使用 4 层灭菌擦镜纸过滤菌丝体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min, 去上清液并用稳渗液重悬, 得到三孢布拉霉原生质体悬浮液, 计数并将原生质体细胞浓度稀释到 10^6 个/mL 备用。

1.2.5 根癌农杆菌介导三孢布拉霉原生质体转化 将根癌农杆菌 LBA4404 接种于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养至 $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.6$ 备用。取根癌农杆菌 200 μL 和三孢布拉霉原生质体 200 μL 混合, 加入终浓度为 200 mmol/L 的 AS 诱导, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 共同培养 2 d, 再加入麦汁液体培养基过夜活化后, 涂布于含有 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻肟钠的麦汁培养基中, 待长出单菌落后进行 PCR 验证。

1.2.6 三孢布拉霉转化子的鉴定 采用碱裂解法^[17]快速提取三孢布拉霉基因组。挑取少量菌丝体于 80 μL 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液中浸泡 15 s, 随后加入 160 μL 0.1 mol/L Tris-HCl 中和混匀, 取 1 μL 上清液做模板。以快速提取的基因组为模板, 使用引物对 Ku80-F 和 Ku80-R、引物对 8H1-F 和 8H1-R (或 8H2-F 和 8H2-R) 进行 PCR 扩增验证, 根据扩增片段的大小以及测序结果确定 *ku80* 基因是否被敲除。

2 结果与分析

2.1 三孢布拉霉 *ku80* 基因的克隆

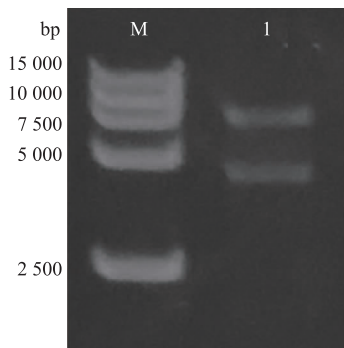
经 NCBI tblast 比对, 在野生型三孢布拉霉基因组中搜索到了与瓜筲霉 *ku80* 蛋白质序列相近的 *Btku80* 序列。提取基因组, 以 Ku80-F 和 Ku80-R 为引物扩增 *Btku80* 基因全长。提取总 RNA, 经逆转录反应及 PCR 扩增, 测序得到 *Btku80* 的 CDS 序列。得到的 *Btku80* 基因全长 2 716 bp, CDS 区 2 202 bp, 编码 732 个氨基酸; 保守域有 3 个, 分别为 vWFA、KU80、Ku-PK-bind domains。

2.2 敲除载体 pDH-85H3 的验证

敲除载体 pDH-85H3 经 *Sma* I 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 2 h 后, 加入 *Xho* I, 37 $^{\circ}\text{C}$ 再次酶切 2 h, 随后进行核酸电泳, 结果如图 3。结果显示敲除载体 pDH-85H3 经 *Sma* I 和 *Xho* I 双酶切后, 出现了大小分别约为 7 400 bp 和 4 400 bp 的两个片段, 分别与质粒 pDHt-sk 线性化大小、敲除片段大小一致, 初步证明敲除载体 pDH-85H3 构建成功。

2.3 含敲除载体的根癌农杆菌阳性克隆子的鉴定

采用化学转化法将敲除载体 pDH-85H3 导入

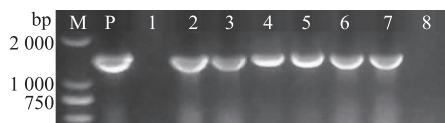


M: 15 000 bp DNA marker; 1: 敲除载体 pDH-85H3。

图3 敲除载体 pDH-85H3 经双酶切后的电泳图

Fig. 3 Identification of knock-out vector pDH-85H3 digested by *Sma* I and *Xho* I

根癌农杆菌 LBA4404, 28 °C 培养, 挑取单菌落提取质粒, 使用引物 8H-F 和 8H-R 进行 PCR 扩增 *HygR* 基因并经电泳验证, 结果见图 4。由图 4 可见, 2~7 号转化子均得到片段大小约为 1 400 bp 的扩增产物, 与 *HygR* 片段预期大小一致, 且测序正确, 说明敲除载体 pDH-85H3 已成功转化进根癌农杆菌 LBA4404 中。



M: 2 000 bp DNA marker; P: 以敲除载体 pDH-85H3 为模板, 使用引物 8H-F 和 8H-R 的 PCR 扩增结果; 1~8: 以根癌农杆菌 LBA4404 转化子为模板, 使用引物 8H-F 和 8H-R 的 PCR 扩增结果。

图4 提取根癌农杆菌 LBA4404 中重组敲除载体 pDH-85H3 对其 PCR 产物的电泳分析

Fig. 4 Analysis of PCR products of recombinant vector pDH-85H3 extracted from *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

2.4 潮霉素 B 与头孢噻肟钠筛选压力的选择

野生型三孢布拉霉原生质体在含有潮霉素 B 质量浓度为 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高渗再生培养基上培养, 发现潮霉素 B 质量浓度达到 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 野生型三孢布拉霉不能生长, 因此以 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 作为三孢布拉霉转化子的筛选压力。

根癌农杆菌 LBA4404 在含有质量浓度为 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻肟钠的 LB 固体培养基上培养 2 d 后, 发现头孢噻肟钠质量浓度达到 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 根癌农杆菌完全不能生长, 而三孢布拉霉生长不受头孢

噻肟钠影响, 因此筛选培养基中加入终质量浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的头孢噻肟钠来抑制根癌农杆菌生长。

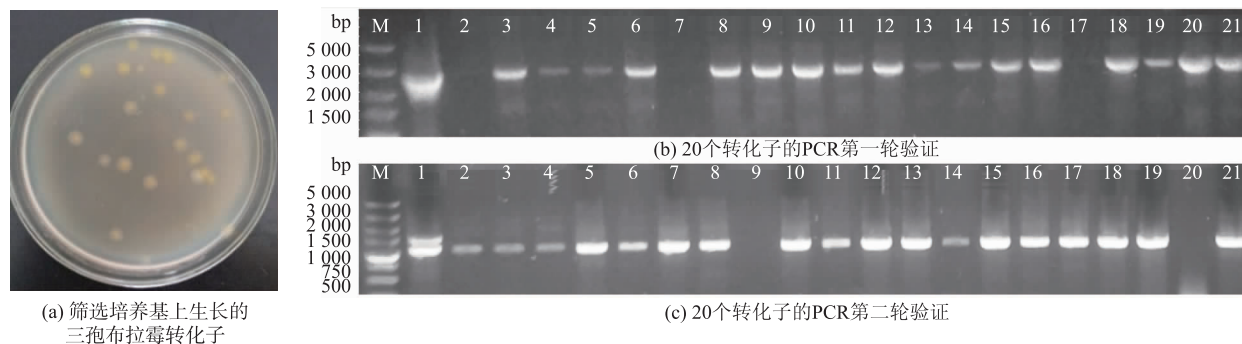
2.5 三孢布拉霉转化子的鉴定

受侵染的原生质体经活化后, 涂布于含有 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢噻肟钠的麦汁培养基。头孢噻肟钠可以抑制根癌农杆菌在培养基上的生长, 三孢布拉霉的生长不受影响, 而潮霉素 B 对野生型三孢布拉霉有抑制作用, 对于具有潮霉素抗性的转化子的生长则无影响。经过潮霉素初筛, 得到 20 个三孢布拉霉转化子, 结果见图 5(a)。为进一步确定潮霉素抗性基因是否插入且替换了 *ku80* 基因, 对这 20 株转化子进行 PCR 验证, 并对 PCR 产物进行 sanger 测序验证。第一轮验证转化子中是否含有 *ku80* 基因, 使用引物 Ku80-F 和 Ku80-R 进行扩增, 扩增得到的 *ku80* 片段存在于野生型三孢布拉霉中, 不存在于转化子中, 结果见图 5(b)。

第二轮验证敲除片段。8H1-F 和 8H1-R 引物扩增 5' 同源臂下部分和 *HygR* 基因上部分, 得到 8H1 片段, 大小约为 1 180 bp, 8H2-F 和 8H2-R 引物扩增 3' 同源臂上部分和 *HygR* 基因下部分, 得到 8H2 片段, 大小约为 1 800 bp。这两个片段无法在野生菌中扩增得到, 而能在转化子扩增得到。20 株转化子经 PCR 扩增和 sanger 测序验证发现, 其中 18 株含有插入的敲除片段, 转化率高达 90%, 有 2 个转化子是经过同源重组交换的正确敲除株, 敲除率为 10%, 结果见图 5(c)。

3 结 语

对丝状真菌基因功能的研究依赖于遗传转化系统的建立。丝状真菌遗传转化方法有 PEG 介导的原生质体法、农杆菌介导侵染法、基因枪法、电激法等^[18]。原生质体法转化成功的关键在于原生质体的再生, 因三孢布拉霉原生质体再生相对困难^[6], 再生率小于 10%^[19], 难以得到转化子^[6]。基因枪法的原理是在高压作用下, 将表面包被有外源 DNA 的微小金粒或钨粒, 高速射入到受体细胞或组织, 从而实现外源基因与受体基因组的整合^[18]。黄琼瑶^[6]曾利用基因枪法, 将融合基因表达载体导入到三孢布拉霉中, 但影响其转化成功的因素较多且成本较高^[18]。电激法对部分丝状真菌的转化效率较低, 应用受到限制^[18], 尚未发现成功使用电激法进行三孢布拉霉遗传转化的研究。



(a) 筛选培养基上生长的三孢布拉霉转化子
(b) 中以引物Ku80-F和Ku80-R扩增的ku80基因, 1: 野生型三孢布拉霉; 2~21: 20个转化子。(c) 中以引物8H1-F和8H1-R扩增的敲除载体的片段8H1, 1: 敲除载体pDH-85H3; 2~21: 20个转化子。

图5 三孢布拉霉转化子的鉴定

Fig. 5 Identification of *Blakeslea trispora* transformants

相较于以上转化方法, 本研究中考考虑使用根瘤农杆菌转化法, 但如果以细胞壁极厚的孢子作为受体, 很难侵染成功, 因此首次将原生质体作为农杆菌转化的受体, 虽过程相对烦琐, 但转化率得到了很大提高, 可以用于三孢布拉霉遗传转化。

另外, 以同源重组(HR)为基础的基因敲除技术是进行基因功能研究的常用方法, 但包括三孢布拉霉在内的大多数丝状真菌因非同源末端连接

(NHEJ)修复占主导^[20-21], 同源重组频率极低, 降低了基因敲除的效率, 因此有必要对参与 NHEJ 过程的基因进行破坏, 以此促进 HR^[22]。本研究中发现利用同源重组原理敲除 *ku80* 基因, 敲除率仅为 10%, 可见三孢布拉霉同源重组频率较低, 将来可以通过进一步研究, 以此缺陷株为受体, 来提高基因敲除效率^[23]。

参考文献:

- [1] 巩尊洋. *argA* 调控三孢布拉霉合成类胡萝卜素作用分析[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [2] HAN G, SHAO Q, LI C, et al. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method for aflatoxin generation fungus *Aspergillus flavus*[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 56(5): 356-364.
- [3] PAPP T, CSERNETICS Á, NAGY G, et al. Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(11): 4937-4950.
- [4] FU K H, LIU L X, FAN L L, et al. Accumulation of copper in *Trichoderma reesei* transformants, constructed with the modified *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation technique[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(12): 1815-1820.
- [5] 黄亚丽, 叶婧, 蒋细良, 等. 真菌遗传转化系统的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(6): 1213-1217.
- [6] 黄琼瑶. 三孢布拉霉基因转化方法研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [7] 张小娟. *Ku* 基因在微生物中的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2011, 1(1): 26-31.
- [8] OSIPOVICH O, DURUM S K, MUEGGE K. Defining the minimal domain of *ku80* for interaction with *ku70*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(3): 27259-27265.
- [9] SHRIVASTAV M, DE-HARO L P, NICKOLOFF J A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice[J]. *Cell Research*, 2008, 18(1): 134-147.
- [10] TAKAHASHI T, MASUDA T, KOYAMA Y. Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, 275(5): 460-470.
- [11] CARVALHO N D, ARENTSHORST M, JIN K M, et al. Expanding the *ku70* toolbox for filamentous fungi: establishment of complementation vectors and recipient strains for advanced gene analyses[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4): 1463-1473.
- [12] MARTINS M P, GOMES E V, SANCHES P R, et al. *Mus-52* disruption and metabolic regulation in *Neurospora crassa*: transcriptional responses to extracellular phosphate availability[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): 1-20.

- [13] XIONG D, DENG C, WANG Y, et al. Deletion of *VdKu80* enhances targeted gene replacement in *Verticillium dahliae* [J]. **Australasian Plant Pathology**, 2018, 47(6): 601-608.
- [14] QI X, SU X, GUO H, et al. A *ku70* null mutant improves gene targeting frequency in the fungal pathogen *Verticillium dahliae* [J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2015, 31(12): 1889-1897.
- [15] STEIGER M G, VITIKAINEN M, USKONEN P, et al. Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011, 77(1): 114-121.
- [16] JYOTHISHWARAN G, KOTRESHA D, SELVARAJ T, et al. A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. **Current Science**, 2008, 93(6): 770-772.
- [17] 王茜, 侯飞侠, 王艺璇, 等. 碱裂解法快速提取虫草属真菌 DNA 研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(4): 995-997.
- [18] 赵美, 王陈骄子, 周而勋, 等. 丝状真菌遗传转化系统的最新研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(3): 1138-1143.
- [19] 李晔. RNA 干扰三孢布拉氏霉菌番茄红素环化酶基因的研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2009.
- [20] KRAPPMANN S. Gene targeting in filamentous fungi: the benefits of impaired repair [J]. **Fungal Biology Reviews**, 2007, 21(1): 25-29.
- [21] PASTWA E, BLASIAK J. Non-homologous DNA end joining [J]. **Acta Biochimica Polonica**, 2003, 50(4): 891-908.
- [22] HE Y, LIU Q, SHAO Y, et al. *Ku70* and *ku80* null mutants improve the gene targeting frequency in *Monascus ruber* M7 [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(11): 4965-4976.
- [23] DE-JONG J F, OHM R A, DE-BEKKER C, et al. Inactivation of *ku80* in the mushroom-forming fungus *Schizophyllum commune* increases the relative incidence of homologous recombination [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2010, 310(1): 91-95.

科技信息

欧盟评估一种富含类黄酮的柑橘干提取物作为所有动物饲料添加剂的安全性和有效性

2021年7月27日,据欧盟食品安全局(EFSA)消息,应欧盟委员会要求,欧盟动物饲料添加剂和产品(FEEDAP)研究小组就一种富含类黄酮的柑橘干提取物(a flavonoid-rich dried extract of *Citrus aurantium* L. fruit)作为所有动物饲料添加剂的安全性和有效性发表科学意见。

经过评估,专家小组认为在建议的使用条件下该添加剂对环境是安全的。由于其在饲料中的作用与在食品中的作用基本相同,因此认为没有必要进一步证明其功效。

[信息来源]食品伙伴网.欧盟评估一种富含类黄酮的柑橘干提取物作为所有动物饲料添加剂的安全性和有效性 [EB/OL]. (2021-7-27).<http://news.foodmate.net/2021/07/601108.html>