

农杆菌介导的出芽短梗霉遗传转化及高效筛选聚苹果酸高产菌株

涂光伟^{1,2}, 王永康^{1,2}, 冯骏^{1,2}, 李晓荣^{1,2}, 郭美锦³, 邹祥^{1,2,4}

1 西南大学药学院, 重庆 400715

2 重庆药物过程与质量控制工程技术中心, 重庆 400715

3 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

4 重庆大学生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044

涂光伟, 王永康, 冯骏, 等. 农杆菌介导的出芽短梗霉遗传转化及高效筛选聚苹果酸高产菌株. 生物工程学报, 2015, 31(7): 1063–1072.

Tu GW, Wang YK, Feng J, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aureobasidium pullulans* and high-efficient screening for polyamic acid producing strain. Chin J Biotech, 2015, 31(7): 1063–1072.

摘要: 建立根癌农杆菌介导的出芽短梗霉遗传转化方法及 T-DNA 突变库, 高效筛选聚苹果酸高产菌株及功能基因。通过含潮霉素和草铵磷抗性基因的农杆菌转化出芽短梗霉, 抗性压力筛选及 PCR 验证建立根癌农杆菌介导的出芽短梗霉遗传转化方法, 结合发酵液 pH 与聚苹果酸含量响应变化, 微孔板高效筛选高产聚苹果酸的 T-DNA 插入突变株, 基因组步移确定 T-DNA 插入位点及功能基因。结果获得遗传稳定的抗性基因菌株, 每 10^7 个细胞可获得 80–120 个转化子, 出芽短梗霉 H27 号 T-DNA 突变株聚苹果酸摇瓶发酵产量提高 24.5%, 基因组步移证实糖酵解途径磷酸甘油酸变位酶基因被破坏。成功建立了根癌农杆菌介导的出芽短梗霉遗传转化方法和 T-DNA 插入突变库, 结合高效筛选方法为聚苹果酸合成功能基因挖掘及高产机制解析奠定基础。

关键词: 农杆菌, 出芽短梗霉, 遗传转化, 高效筛选, 聚苹果酸

Received: December 1, 2014; **Accepted:** January 4, 2015

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2015AA021005, 2014AA021205), Fundamental Research Funds for the Central Universities (Nos. XDJK2013B039, 2362014XK07), Visiting Scholar Foundation of Key Laboratory of Biorheological Science and Technology (Chongqing University), Ministry of Education (No. CQKLBST-2014-006).

Corresponding author: Xiang Zou. Tel/Fax: +86-23-68251225; E-mail: zhx1030@swu.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863计划)(Nos. 2015AA021005, 2014AA021205), 中央高校基本科研业务费专项资金 (Nos. XDJK2013B039, 2362014XK07), 重庆大学“生物流变科学与技术”教育部重点实验室访问学者基金 (No. CQKLBST-2014-006) 资助。

网络出版时间: 2015-02-27

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150227.1140.006.html>

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Aureobasidium pullulans* and high-efficient screening for poly malic acid producing strain

Guangwei Tu^{1,2}, Yongkang Wang^{1,2}, Jun Feng^{1,2}, Xiaorong Li^{1,2}, Meijin Guo³,
and Xiang Zou^{1,2,4}

1 College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 400715, China

3 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China

4 Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Chongqing University, Ministry of Education, Chongqing 400044, China

Abstract: To develop a genetic transformation method of *Aureobasidium pullulans* and T-DNA insertion for high-efficient screening of poly malic acid (PMA) producing strain. *Agrobacterium tumefaciens*-AGL1, containing the selection genes encoding hygromycin B phosphotase or phosphinothricin acetyltransferase, was used to transform *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 and transformants were confirmed by colony PCR method. Transferred DNA (T-DNA) insertional mutants were cultured in microwell plate, and screened for high-titer PMA producing strain according to the pH response model. DNA walking was used to detect the insertion sites in the mutant. Results show that the selection markers could stably generated in the transformants, and 80 to 120 transformants could be found per 10⁷ single cells. A high-titer PMA mutant H27 was obtained, giving a good PMA production caused by the disruption of phosphoglycerate mutase, that increased by 24.5% compared with the control. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and high-efficient screening method were successfully developed, which will be helpful for genetic transformation of *Aureobasidium pullulans* and its functional genes discovery.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *Aureobasidium pullulans*, transformation, high-efficient screening, poly malic acid

出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* 是一种具有工业应用价值的真菌，能发酵产生聚苹果酸、葡萄糖酸、普鲁兰多糖、酶制剂等多种代谢产物，其中聚苹果酸是一种新型聚酯型聚合物，具有良好的水溶性、生物安全性和易降解性，可用于新型药物载体、组织工程、食品包装材料等领域。本课题组前期分离得到一株聚苹果酸高产菌株 *A. pullulans* CCTCC M2012223，建立了聚苹果酸酸水解制备苹果酸新工艺技术^[1]，并对聚苹果酸发酵调控、聚合途径解析等方面开展研究^[2-3]。

出芽短梗霉俗称“类酵母真菌”，由于遗传不

稳定性，形成许多变种，其生活史中具有酵母样和真菌菌丝体两种形态，形态形成受到外界培养基、培养条件等各种因素影响，导致其遗传操作困难^[4]。本课题组尝试利用酵母成熟的遗传转化方法如电转化^[5]、PEG 介导的 LiAc 转化^[6]等，用于出芽短梗霉遗传转化，但未获成功，原因可能在于出芽短梗霉通常分泌多糖到细胞壁外形成粘性保护层^[7]；Cullen 等^[8]最早报道了出芽短梗霉原生质体转化方法，但是该方法操作复杂，转化效率不高；本课题组也曾尝试该方法发现对原生质体的质量要求很高，转化操作苛刻，对同源重组的敲除株转化效率低。

根癌农杆菌介导的转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 作为一种高效的遗传转化方法, 在真菌遗传转化中得到广泛应用^[9], 与原生质体转化相比, ATMT 更高效、方便、省时。此外, 大部分 ATMT 产生的转化子含有单个 T-DNA (Transferred DNA) 拷贝^[9-10], 通过 ATMT 方法将 T-DNA 随机插入至真菌基因组, 构建突变体库, 已成为根据突变体的表型筛选相关功能基因的有效方法^[11]。因此, 为了深入探究聚苹果酸生物合成调控基因, 本文尝试建立根癌农杆菌介导的出芽短梗霉遗传转化方法, 并利用 ATMT 构建出芽短梗霉随机 T-DNA 突变库, 结合发酵液 pH 值与聚苹果酸产量的响应模型, 微孔板高效筛选聚苹果酸高产突变株, 获得一株 T-DNA 破坏磷酸甘油酸变位酶基因的突变株, 聚苹果酸发酵产量提高了 24.5%。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

根癌农杆菌 *A. tumefaciens* AGL-1.pk2-*hyg* 包含带潮霉素 B 磷酸转移酶基因 (Hygromycin B phosphotransferase, *hyg*) 的双元载体 pk2-*hyg*, 根癌农杆菌 *A. tumefaciens* AGL-1.pk2-*bar* 包含的双元载体由编码草胺磷抗性基因草胺磷乙酰转移酶 (Phosphinothricin acetyltransferase, *bar*) 替换 pk2-*hyg* 上的 *hyg* 而来, 由西南大学生物技术中心张永军研究员馈赠。质粒图谱见图 1。出芽短梗霉 *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 由本实验室筛选保藏。

1.2 主要试剂和引物

潮霉素 B (Genview)、乙酰丁香酮 (Aldrich)、

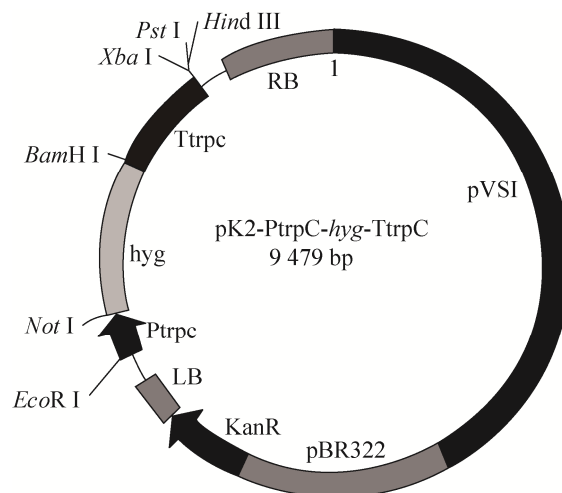


图 1 双元载体 pk2-*hyg*

Fig. 1 Plasmid profile of binary vector pk2-*hyg*.

卡那霉素 (Japan)、羧苄青霉素 (Germany)、溴酚蓝 (Genview)、溶壁酶 (Sigma)、蛋白酶 K (Sigma) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 草胺磷(除草剂 Basta glufosinate-ammonium, phosphinothricin, ppt) 购自永农生物科学有限公司; 头孢他啶 (注射液) 由深圳立健药业生产; DNA Walking SpeedUP™ Premix Kit (Seegene)、DNA 聚合酶等分子生物学常规试剂购自 TaKaRa。常规理化试剂均为国产分析纯。本研究所用引物见表 1, 由金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.3 培养基及培养条件

将根癌农杆菌 *A. tumefaciens* AGL-1 接种于 YCK 琼脂平板 (g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 5, 蔗糖 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, 琼脂 20, 卡那霉素 50 mg/L, 羧苄青霉素 50 mg/L, 28 °C 培养 48 h, 挑取单菌落接种于 250 mL 摇瓶培养 24 h 至 OD_{660} 达到 0.6–0.8。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Description
Bar.F	TCTGCACCATCGTCAACCACT	Amplification of the <i>bar</i> gene
Bar.R	CTGCCAGAAACCCACGTCAT	
Hyg.F	GAAAAAGCCTGAACTCACCGC	Amplification of the <i>hyg</i> gene
Hyg.R	CTATTTCTTTGCCCTCGGACG	
TSP1	AATGGAACGAACTGTTTGCG	Genome walking
TSP2	CGTGGTTCGTCGTCTACTATT	
TSP3	CGTAAGTAACAACCTGGAGGTGA	

将出芽短梗霉 *A. pullulans* CCTCC M2012223 接种于 PDA 琼脂平板中, 25 °C 培养 48 h 挑取单菌落培养种子, 出芽短梗霉种子培养基 (g/L): 葡萄糖 60, NH₄NO₃ 2, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.1, ZnSO₄ 0.1, KCl 0.5, CaCO₃ 20, 种子培养 48 h, 按 10% (V/V) 接种量接种发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 90, NH₄NO₃ 2, KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.1, ZnSO₄ 0.1, KCl 0.5, CaCO₃ 30, 摇床 220 r/min 培养 4 d。

1.4 出芽短梗霉筛选压力敏感性试验

取出芽短梗霉培养液 100 μL 均匀涂布于含有不同浓度草铵磷或潮霉素 B 的 M100 琼脂平板上, 25 °C 培养 7 d, 观察并记录生长情况。

1.5 根癌农杆菌介导转化出芽短梗霉

将根癌农杆菌 AGL-1 培养 OD₆₆₀ 至 0.7–0.8, 4 °C 离心收集菌体, 冰上用 IM 液体培养基 (g/L): 葡萄糖 1.8, K₂HPO₄ 0.3, NaCl 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.3, MES 7.8, 200 μmol/L 乙酰丁香酮, pH 5.3, 清洗并重悬至 OD₆₆₀ 约 0.2, 培

养 8 h 后待用。收集对数期出芽短梗霉细胞, 用无菌水稀释至 10⁹–10¹² 个/L 后, 取 100 μL 细胞与培养待用的农杆菌 AGL-1 混匀后, 均匀涂布于表面铺有水相微孔滤膜的 IM 琼脂平板上, 22 °C 共培养 60 h, 将微孔滤膜转移至含有合适筛选压力 (0.5 g/L 头孢他啶和 30 mL/L 草铵磷或 100 mg/L 潮霉素 B) 的 M100 琼脂平板上^[10], 25 °C 培养 3–6 d 至出现转化子, 将滤膜上的转化子挑至含有双倍筛选压力的 M100 液体培养基的 96 孔板中复筛。

1.6 转化子基因组提取及 PCR 验证

以转化子基因组为模板, 出芽短梗霉原始菌 *A. pullulans* CCTCC M2012223 基因组为对照, pk2-*hyg* 和 pk2-*bar* 质粒为阳性对照, Bar.F/Bar.R、Hyg.F/Hyg.R、Gus.F/Gus.R 为引物检测转化子基因组中是否存在标记基因序列。PCR 条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 10 °C 保持。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.7 T-DNA 插入突变株发酵验证与聚苹果酸产物分析

将 T-DNA 插入突变株在不含筛选压力的 PDA 琼脂平板上连续接传 5 代, 再接种于含有相应筛选压力的平板上观察生长情况, 考察突变株的遗传稳定性, 并接种发酵培养基, 以出芽短梗霉 *A. pullulans* CCTCC M2012223 为对照菌株, 摇瓶验证突变株的产聚苹果酸产量。聚苹果酸产物分析采用高效液相色谱法, 取发酵液上清液 1 mL, 加入 1 mL 2 mol/L H₂SO₄, 90 °C 酸水解 9 h, 进行 HPLC 分析^[1]。

1.8 基因组 DNA 步移

以发酵验证的高产聚苹果酸突变株 H27 基因组为模板, 参考报道的方法扩增 T-DNA 标记基因侧翼序列^[12]。引物为标记基因启动子 P_{trpC} 靶序列特异结合的 TSP1、TSP2、TSP3 和 DNA Walking SpeedUPTM Premix Kit 试剂盒中的随机引物 DW-ACP, 以突变株 H27 基因组为模板经三轮巢式 PCR 扩增侧翼序列。PCR 产物胶回收后, 送华大基因测序, 将所测序列与出芽短梗霉 *A. pullulans* CCTCC M2012223 基因组进行比对, 以确定 T-DNA 插入位点。

2 结果与分析

2.1 出芽短梗霉筛选压力敏感性试验

为了筛选出芽短梗霉菌株敏感的选择压力和确定其工作浓度, 以真菌培养常用的抑制剂草铵磷和潮霉素 B 为例, 考察了出芽短梗霉菌株在不同抑制剂浓度条件下的生长情况, 结果如表 2 所示, 草铵磷浓度为 30 mL/L 时, 在培养 4 d 内能有效抑制细胞生长, 第 7 天出现极少量微小菌落; 潮霉素浓度在 100–300 mg/L 时,

可完全抑制菌株生长。因此确定草铵磷浓度 30 mL/L 和潮霉素 B 浓度 100 mg/L 为抑制出芽短梗霉生长的最低抑制浓度。

2.2 转化子筛选

以潮霉素 B 为筛选压力, 进行根癌农杆菌遗传转化。如图 2 所示, M100 琼脂平板中培养

表 2 不同浓度潮霉素 B 和草铵磷对出芽短梗霉的生长抑制情况

Table 2 Inhibition effect of hygromycin B and phosphinothricin on the cell growth of *A. pullulans*

	Concentration	Time (d)	Inhibition ^b
Phosphinothricin ^a (mL/L)	10	2	+
		4	-
		7	-
	20	2	+
		4	-
		7	-
	30	2	+
		4	+
		7	-
	40	2	+
		4	+
		7	+
100	2	+	
	4	+	
	7	+	
150	2	+	
	4	+	
	7	+	
200	2	+	
	4	+	
	7	+	
250	2	+	
	4	+	
	7	+	
300	2	+	
	4	+	
	7	+	

a: weedicide liquid Basta glufosinate-ammonium; b: 100% inhibited; +: inhibited; -: growth.

约 6 d 后微孔滤膜上长出可见菌落, 随机挑选 16 株复筛得到的转化子进行菌落 PCR 验证标记基因是否插入出芽短梗霉基因组, 其中 14 株检出标记基因 *hyg*, 占 87.5%。对转化子进行菌落计数, 结合几次转化效果表明, 农杆菌介导的出芽短梗霉遗传转化效率为每 10^7 个细胞可获得 80–120 个转化子。

2.3 转化子基因组 PCR 验证

各选取 5 株菌落 PCR 筛选出的抗草铵磷和抗潮霉素的转化子提取基因组, 分别对标记基因 *hyg*、*bar* 进行扩增, 转化子中均检测出与阳性对照相同的条带 (图 3A), 表明标记基因已经整合到基因组中。以筛选出的含有 *bar* 标记基因的转化子为出发株, 再次转化 *hyg* 标记基因, 获得了同时整合多个标记基因的转化子 (图 3B), 基于此可以实现对宿主的多次遗传改造。

2.4 T-DNA 突变库高效筛选

农杆菌介导的遗传转化可以将 T-DNA 随机整合到宿主基因组中, 从而获得一定数量的突变株, 这些突变株在基因组水平上受到外源 DNA 的插入干扰可能会引起不同的性状改变。

突变株在不含有潮霉素和草铵磷的培养基上连续传 5 代后依然能在含潮霉素和草铵磷的平板上生长, 表明插入的 T-DNA 可以在出芽短梗霉基因组中稳定遗传。出芽短梗霉 *A. pullulans* CCTCC M2012223 是本课题组筛选获得的聚苹果酸高产菌株, 由于聚苹果酸分子结构中带弱酸基团 (-COOH), 导致发酵液呈酸性变化。通过向微孔板中加入 pH 指示剂溴甲酚绿培养发现如图 4A 所示, 突变株发酵液颜色由绿色向黄色不同程度变化, 表明发酵液中 pH 值能一定程度上反映菌株产酸能力的强弱。本课题组前期研究发现, 出芽短梗霉发酵产生酸性物质主要是聚苹果酸, 其次有乳酸、乙酸、琥珀酸等杂酸, 且总杂酸含量较低^[13], 因此, 可建立发酵液 pH 值与氢离子浓度的响应模型:

$$x = \sqrt{K_0 \cdot C_0} + \sqrt{K_1 \cdot C_1 + K_w} + \sqrt{K_2 \cdot C_2 + K_w} + \sqrt{K_3 \cdot C_3 + K_w} + K \quad (1)$$

$$y = -\lg x \quad (2)$$

式中, x 为氢离子浓度; y 为 pH; K_0 为聚苹果酸电离常数; C_0 为聚苹果酸浓度 (g/L); $K_1=10^{-3.86}$ 为乳酸电离常数; C_1 为乳酸浓度 (mol/L); $K_2=10^{-4.76}$ 为乙酸电离常数; C_2 为乙酸浓度 (mol/L); $K_3=10^{-4.21}$ 为琥珀酸电离常数;

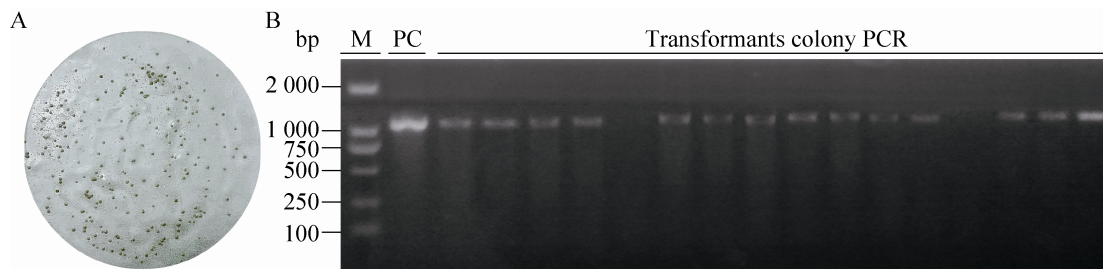


图 2 转化子的抗性筛选及菌落 PCR

Fig. 2 ATMT results of *A. pullulans* CCTCC M2012223 and the identification of *hyg* gene. (A) Screening of transfer membrane based on the the resistance of hygromycin B. (B) Colony PCR of *hyg* gene identification. M: DNA marker; PC: positive control.

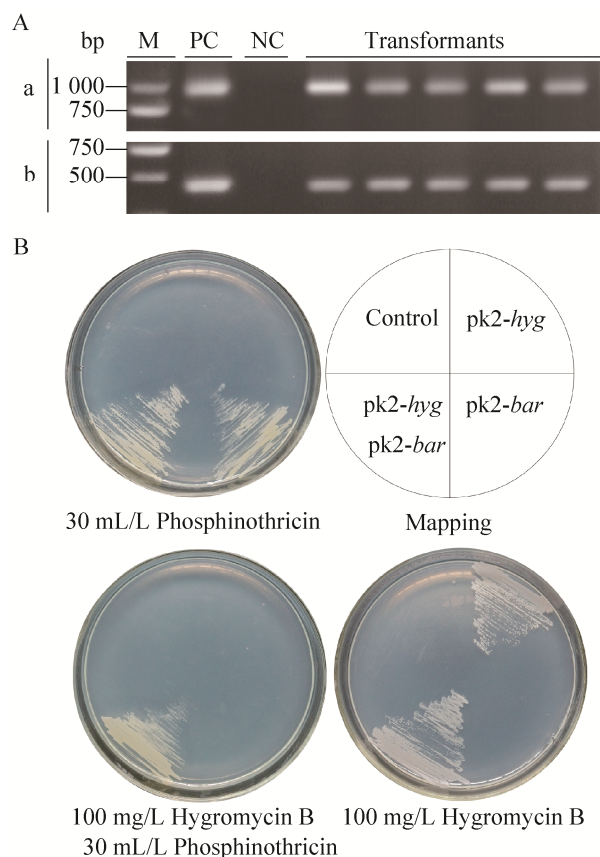


图3 转化子的耐受筛选及标记基因分析

Fig. 3 ATMT results of *A. pullulans* CCTCC M2012223 and the identification of *hyg*, *bar* and *gus* gene. (A) PCR identification of *hyg*, *bar* and *gus* gene. PC: positive control, NC: negative control; M: DNA marker, a: *hyg* gene identification, b: *bar* gene identification. (B) The resistance of transformant on the plate containing Hygromycin B and phosphinothricin confirmation results. Control: *A. pullulans* CCTCC M2012223; pk2-*hyg*: transformant containing *hyg* gene; pk2-*bar*: transformant containing *bar* gene.

C_3 为琥珀酸浓度 (mol/L); $K_w=10^{-14}$ 为水电离常数; K 为常数。将聚苹果酸发酵液上清按比例稀释, 测定的多组 C_0 以及对应的 y 值, 代入公式 (1) 和 (2), 通过遗传算法迭代处理, 非线性拟和得到发酵液中聚苹果酸浓度与环境 pH 值

的响应模型 (图 4B), 表明随着聚苹果酸浓度增加, 环境 pH 值呈下降趋势, 因此, 基于响应

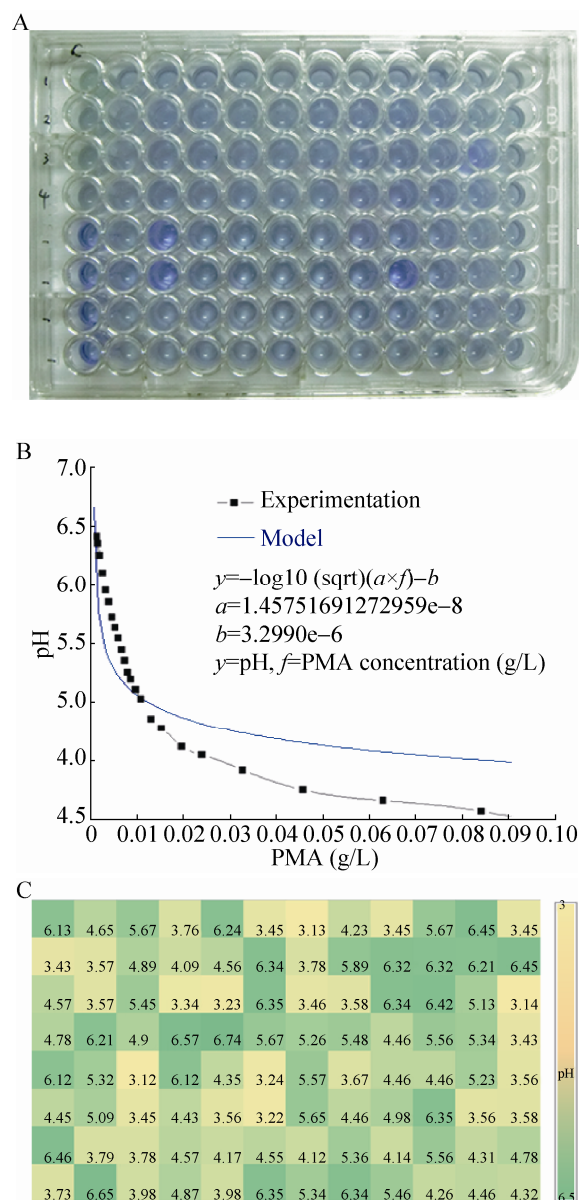


图4 微孔板出芽短梗霉发酵液 pH 值与聚苹果酸浓度响应变化

Fig. 4 Relationship of PMA concentration and pH value in the microwell plate. (A) The color change of fermentation broth in the microwell plate. (B) The response model of PMA concentration with the pH value. (C) pH assay in the microwell plate.

模型,可高效测定微孔板中培养物的 pH 值,作为聚苹果酸高产突变株的初筛依据(图 4C)。

根据微孔板初筛结果,随机挑选 14 株含 *hyg* 标记基因的转化子进行摇瓶发酵验证,结果如图 5 所示,与原始菌株相比,大多数 T-DNA 插入突变株聚苹果酸产量下降,而 H27 号菌株聚苹果酸发酵产量达到 (29.60 ± 0.88) g/L,比出发菌提高了 24.5%。表明采用 T-DNA 插入方式,导致多数转化子表现为负突变效应。

2.5 T-DNA 插入突变株 H27 基因组步移分析

对 T-DNA 插入突变株 H27 进行基因组步移分析,如图 6 所示, T-DNA 侧翼扩增得到 657 bp 片段,与本课题组完成的 *A. pullulans* CCTCC M2012223 基因组测序数据比对,发现 *g3187.t1* 基因(磷酸甘油酸变位酶, EC 5.4.2.4)读码框被破坏。

g3187.t1 基因编码区全长 2 220 bp,编码 739 个氨基酸,在 1 794 bp 处插入 T-DNA。磷酸甘油酸变位酶在糖酵解反应中,催化 1,3-二磷

酸甘油酸转变为 2,3-二磷酸甘油酸^[14]。已有的研究表明,聚苹果酸主要通过 TCA 循环来源的苹果酸聚合而成^[15],突变株 H27 磷酸甘油酸变位酶基因破坏可能会促进 1,3-二磷酸甘油酸向 3-磷酸甘油酸转化,导致糖酵解代谢通量增加,促进聚苹果酸合成。

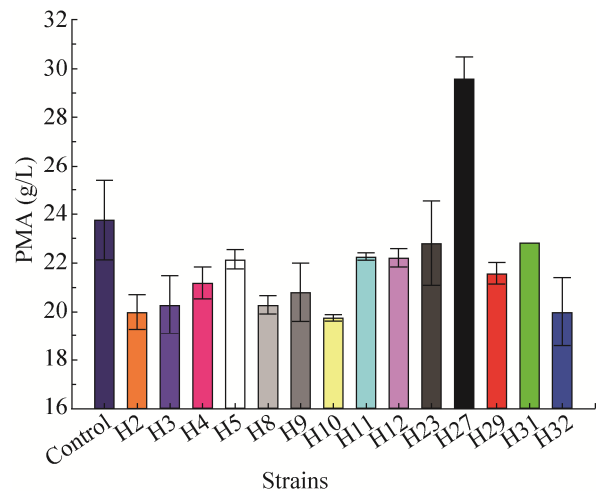


图 5 T-DNA 插入突变对聚苹果酸发酵产量的影响
Fig. 5 Effect of T-DNA insertion on the PMA production.

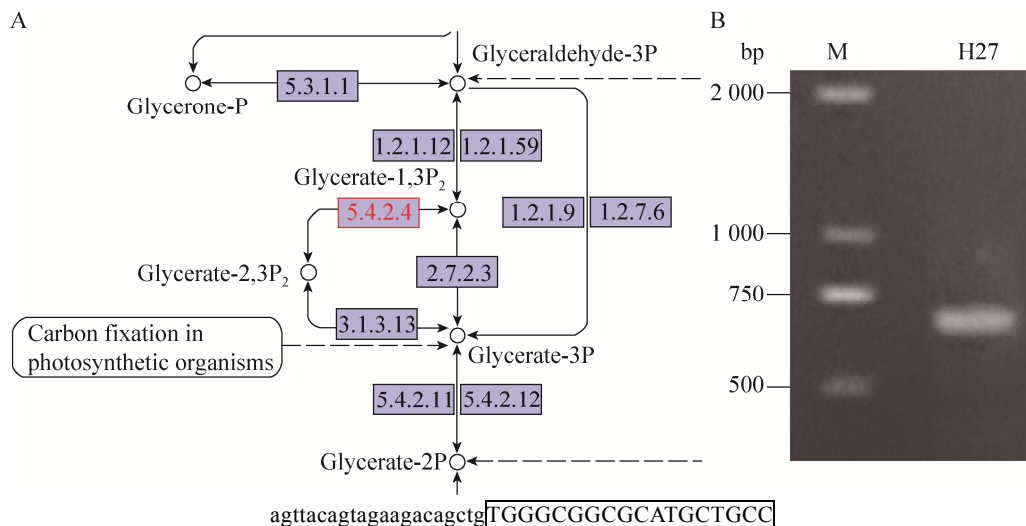


图 6 出芽短梗霉插入突变株 T-DNA 侧翼序列及破坏基因

Fig. 6 The flanking sequence of disrupted gene in T-DNA mutant H27. (A) Disrupted gene mapping to KEGG pathway (red). (B) Flanking sequencing of disrupted gene *g3187.t1*.

3 讨论

本实验研究表明,通过根癌农杆菌介导能够将外源 DNA 片段整合到出芽短梗霉基因组中稳定遗传,其转化效率是已报道原生质体转化的 50 倍以上。Zhang 等^[9]报道了农杆菌介导的蜡蚧轮枝菌 *Lecanicillium lecanii* 遗传转化方法,并观察到了 T-DNA 插入突变株的不同表型变化。Tzima 等^[16]利用潮霉素为筛选标记,以荧光蛋白为报告基因建立了农杆菌介导的根串珠霉 *Thielaviopsis basicola* 遗传转化方法。Lin 等^[17]报道了以潮霉素、博来霉素、诺尔丝菌素为筛选标记实现了农杆菌介导的圆红冬孢酵母 *Rhodospiridium toruloides* 遗传转化,每 10^5 个细胞含 400 个转化子。本实验以潮霉素和草铵磷为筛选压力建立的根癌农杆菌介导的出芽短梗霉遗传转化方法,每 10^7 个细胞含 80–120 个转化子,具有较高的转化效率,可实现对同一宿主的多次遗传改造。

目前从出芽短梗霉基因组水平进行遗传操作研究较少^[18],主要原因在于出芽短梗霉代谢产物的生物合成网络不清晰,传统原生质体遗传转化效率低下。利用根癌农杆菌介导的遗传转化方法构建 T-DNA 插入突变文库,为出芽短梗霉代谢产物的功能基因挖掘提供便利。如李中明等^[11]构建 T-DNA 插入突变库,快速筛选酵母葡萄糖去阻遏基因;罗志兵等^[19]利用环境胁迫来筛选对高温和高渗等逆境胁迫敏感的球孢白僵菌 T-DNA 随机插入突变体,并克隆相关基因。随着出芽短梗霉菌株的全基因组测序完成^[20],本研究构建的出芽短梗霉 T-DNA 突变库及高效筛选方法,将为后续全基因组覆盖的突

变株筛选、聚苹果酸合成的功能基因挖掘及调控机制解析提供基础。

致谢:本论文所用实验材料由西南大学生物技术中心张永军研究员馈赠,并参与实验指导和论文修改,在此一并表示感谢!

REFERENCES

- [1] Zou X, Zhou Y, Yang ST. Production of polymeric acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(8): 2105–2113.
- [2] Zou X, Tu G, Zan Z. Cofactor and CO₂ donor regulation involved in reductive routes for polymeric acid production by *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223. *Bioproc Biosyst Eng*, 2014, 37(10): 2131–2136.
- [3] Wu XY, Zhou F, Tu GW, et al. Gene cloning, expression and characterization of malate-CoA ligase in the polymerization pathway of polymeric acid from *Aureobasidium pullulans*. *Acta Microbiol Sin*, 2014, 54(8): 919–925 (in Chinese). 吴小燕,周峰,涂光伟,等.聚苹果酸聚合途径中苹果酰辅酶 A 连接酶基因的克隆、表达及酶学性质. *微生物学报*, 2014, 54(8): 919–925.
- [4] Chi Z, Wang F, Chi Z, et al. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(5): 793–804.
- [5] Thompson JR, Register E, Curotto J, et al. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. *Yeast*, 1998, 14(6): 565–571.
- [6] Gietz RD. *Yeast Genetics: Methods in Molecular Biology*. New York: Springer, 2014: 33–44.
- [7] Simon L, Cayevaugien C, Bouchonneau M. Relation between pullulan production, morphological state and growth-conditions in *Aureobasidium pullulans* new observations. *J Gen Microbiol*, 1993, 139(5): 979–985.

- [8] Cullen D, Yang V, Jeffries T, et al. Genetic transformation of *Aureobasidium pullulans*. J Biotechnol, 1991, 21(3): 283–288.
- [9] Zhang YJ, Zhao JJ, Xie M, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in the entomopathogenic fungus *Lecanicillium lecanii* and development of benzimidazole fungicide resistant strains. J Microbiol Meth, 2014, 105(10): 168–173.
- [10] Gao XX, Yang Q. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Chaetomium globosum* and its T-DNA insertional mutagenesis. Acta Microbiol Sin, 2005, 45(1): 129–131 (in Chinese).
高兴喜, 杨谦. 根癌农杆菌介导的球毛壳菌遗传转化及 T-DNA 插入突变体的获得. 微生物学报, 2005, 45(1): 129–131.
- [11] Li ZM, Pan J, Zhu XD. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT) for the screening for genes involved in laccase glucose repression in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Acta Microbiol Sin, 2012, 52(1): 44–51 (in Chinese).
李中明, 潘皎, 朱旭东. 利用根癌农杆菌 T-DNA 插入突变寻找参与漆酶葡萄糖阻遏的关键基因. 微生物学报, 2012, 52(1): 44–51.
- [12] Liu YG, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. Biotechniques, 2007, 43(5): 649–650.
- [13] Zan ZQ, Zou X. Efficient production of polymalic acid from raw sweet potato hydrolysate with immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 in aerobic fibrous bed bioreactor. J Chem Technol Biot, 2013, 88(10): 1822–1827.
- [14] KEGG. [2015-06-29]. http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?ec00010+5.4.2.4.
- [15] Cheng RD, Wang H, Zhou H, et al. Investigation of poly (β -malic acid) synthesis pathways and regulation by strains of *Aureobasidium pullulans*. J Chem Ind Eng, 2012, 63(11): 3639–3644 (in Chinese).
程若东, 王浩, 周华, 等. 出芽短梗霉积累聚苹果酸途径及调控研究. 化工学报, 2012, 63(11): 3640–3644.
- [16] Tzima AK, Paplomatas EJ, Schoina C, et al. Successful *Agrobacterium* mediated transformation of *Thielaviopsis basicola* by optimizing multiple conditions. Fungal Biol, 2014, 118(8): 675–682.
- [17] Lin X, Wang Y, Zhang S, et al. Functional integration of multiple genes into the genome of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. FEMS Yeast Res, 2014, 14(4): 547–555.
- [18] Ma ZC, Chi Z, Geng Q, et al. Disruption of the pullulan synthetase gene in siderophore producing *Aureobasidium pullulans* enhances siderophore production and simplifies siderophore extraction. Process Biochem, 2012, 47(12): 1807–1812.
- [19] Luo ZB, Zhang YJ, Jin K, et al. Construction of *Beauveria bassiana* T-DNA insertion mutant collections and identification of thermosensitive and osmosensitive mutants. Acta Microbiol Sin, 2009, 49(10): 1301–1305 (in Chinese).
罗志兵, 张永军, 金凯, 等. 球孢白僵菌 T-DNA 突变体库的构建及高温和高渗敏感型突变体的筛选. 微生物学报, 2009, 49(10): 1301–1305.
- [20] Gostincar C, Ohm RA, Kogej T, et al. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. BMC Genomics, 2014, 15(1): 549.

(本文责编 郝丽芳)