

研究报告

镁硅酸盐纳米粘土介导的深绿木霉 HB20111 的遗传转化

隋丽娜^{1,2}, 扈进冬², 吴远征², 魏艳丽², 李纪顺², 王燕^{*1}

1 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物工程学院, 山东 济南 250353

2 齐鲁工业大学(山东省科学院)生态研究所 山东省应用微生物重点实验室, 山东 济南 250103

隋丽娜, 扈进冬, 吴远征, 魏艳丽, 李纪顺, 王燕. 镁硅酸盐纳米粘土介导的深绿木霉 HB20111 的遗传转化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 956-963

Sui Lina, Hu Jindong, Wu Yuanzheng, Wei Yanli, Li Jishun, Wang Yan. Magnesium aminoclay-mediated genetic transformation of *Trichoderma atroviride* HB20111[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 956-963

摘 要:【背景】木霉菌遗传转化方法的烦琐复杂限制了对其基因克隆、基因功能的研究。【目的】建立深绿木霉 HB20111 便捷、高效的遗传转化体系。【方法】利用镁硅酸盐纳米粘土作为载体吸附含有荧光蛋白基因 *gfp* 的丝状真菌表达载体 pCAMBIA1303-gpdA-GFP-TrpC-Hygro, 形成质粒-镁硅酸盐纳米粘土复合物, 在超声条件下对深绿木霉 HB20111 分生孢子进行遗传转化。【结果】当分生孢子浓度为 10^6 CFU/mL、分生孢子悬液培养 12 h、镁硅酸盐纳米粘土浓度 100 mg/L 和超声处理 30 s (输出功率为 100 W/cm², 发射频率为 50 kHz)条件下对深绿木霉 HB20111 的转化效率最高, 可以达到 124 个转化子/ μ g-DNA。【结论】使用镁硅酸盐纳米粘土作为载体可以实现对深绿木霉 HB20111 便捷、高效的遗传转化, 转化子抗性基因和报告基因可以稳定遗传。

关键词: 镁硅酸盐纳米粘土; 深绿木霉 HB20111; 超声; 绿色荧光蛋白

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目(2020CXGC010803, 2019JZZY010718); 齐鲁工业大学(山东省科学院)校(院)地产学研协同创新基金项目(2020-CXY42); 山东省科学院国际科技合作项目(2019GHPY05); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2020KJC-GH07)

Supported by: Major Science and Technology Innovation Project of Shandong Province (2020CXGC010803, 2019JZZY010718); Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences) School (Academy) Real Estate Research Collaborative Innovation Fund Project (2020-CXY42); Shandong Academy of Sciences International Science and Technology Cooperation Project (2019GHPY05); Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences) Science, Education and Industry Integration Innovation Pilot Project (2020KJC-GH07)

*Corresponding author: E-mail: qywangyan61@163.com

Received: 2021-07-22; Accepted: 2021-12-10; Published online: 2021-12-29

Magnesium aminoclay-mediated genetic transformation of *Trichoderma atroviride* HB20111

SUI Lina^{1,2}, HU Jindong², WU Yuanzheng², WEI Yanli², LI Jishun², WANG Yan^{*1}

1 School of Bioengineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250353, Shandong, China

2 Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Ecology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, Shandong, China

Abstract: [Background] The complicated genetic transformation methods hinder the gene cloning and gene function characterization of *Trichoderma*. [Objective] To establish a convenient and efficient genetic transformation system for *Trichoderma atroviride* HB20111. [Methods] Magnesium aminoclay was used as a carrier to adsorb the filamentous fungal expression vector pCAMBIA1303-gpdA-GFP- TrpC-Hygro containing the fluorescent protein gene *gfp* to form a plasmid-magnesium aminoclay complex. The conidia of *T. atroviride* HB20111 were then genetically transformed under ultrasonic conditions. [Results] Under the conditions of the conidial suspension at a concentration of 10^6 CFU/mL, culture time of 12 h, magnesium aminoclay concentration of 100 mg/L, and ultrasonic treatment for 30 s (the ultrasonic output power was 100 W/cm^2 , and the emission frequency was 50 kHz), the transformation efficiency of HB20111 was the highest, which reached 124 CFU/ μg -DNA. [Conclusion] Using magnesium aminoclay as a carrier can realize convenient and efficient genetic transformation of *T. atroviride* HB20111, and the resistance gene and reporter gene can be inherited stably in the transformant.

Keywords: magnesium aminoclay; *Trichoderma atroviride* HB20111; ultrasound; green fluorescent protein

木霉菌作为一种重要的生防功能菌,在植物病害的生物防治中占非常重要的地位。据统计,全球 90%的真菌生物防治剂来源于不同菌株的木霉,60%以上的真菌生物杀菌剂含有木霉^[1]。对木霉菌从基因水平上进行功能研究,有助于加快对木霉生防机制的认知。应用 DNA 遗传转化技术获得突变子是对基因克隆、基因功能研究的重要方法。目前获得突变子的方法有限制性内切酶介导整合技术(restriction enzyme mediated integration, REMI)、 CaCl_2 -PEG 介导转化法、电转化和根癌农杆菌介导转化方法(*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformant, ATMT)等。获得高质量的原生质体是 CaCl_2 -PEG 介导转化法的首要条件,而高质量的原生质体制备困难,操作烦琐且转化效率低^[2]。REMI 与 PEG 介导一

样需要制备原生质体,转化率比 PEG 高但容易造成基因的误译,还存在多位点、串联插入及质粒的重排问题,这阻碍了质粒拯救的克隆途径^[3]。电击转化法是 PEG 方法的发展,操作简便,但需要专门的电转化仪器,对设备的要求较高^[4-6]。ATMT 在理论和技术水平上已经相对完善,是目前应用最广泛的一种木霉菌遗传转化方法。然而影响 ATMT 成败的因素较多,不同的双元载体、不同的农杆菌菌株类型、共培养的时间、温度、pH 等都对转化效率有一定的影响^[7],操作也很烦琐,因此限制了对木霉菌基因克隆和基因功能的研究。

深绿木霉(*Trichoderma atroviride*) HB20111 是本实验室筛选获得的一株具有优良生防功能的木霉菌,对多种植物病原真菌如假禾谷镰刀菌(*Fusarium pseudograminis*)、尖孢镰孢菌

(*Fusarium oxysporum*)、麦根离蠕孢(*Bipolaris sorokinianum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等具有抑制作用。实验室前期通过 ATMT、REMI 及 CaCl_2 -PEG 介导转化法构建了深绿木霉的 HB20111 遗传转化体系,但转化效率较低,不能满足突变子库构建的需要,为此,本实验采用了一种镁硅酸盐纳米粘土介导转化法,初步建立了深绿木霉 HB20111 高效遗传转化体系,用于突变子库的构建,以期为进一步深入研究深绿木霉抑菌功能基因奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒

深绿木霉(*Trichoderma atroviride*) HB20111 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(保藏编号为 CGMCC16963),本实验室保存。丝状真菌载体 pCAMBIA1303-gpdA-GFP-TrpC-Hygro 购自武汉森灵生物科技有限公司,该质粒含构巢曲霉 TrpC 启动子控制的潮霉素抗性基因 *hph* 和 *gpdA* 启动子控制的绿色荧光蛋白基因 *gfp*。

1.1.2 主要试剂和仪器

潮霉素 B, Roche 公司; DNA 分子量标准、*Taq* DNA 聚合酶, TaKaRa 公司;羧苄青霉素、氯霉素,生工生物工程(上海)股份有限公司;质粒大提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯。微量分光光度计,岛津公司;荧光共聚焦显微镜,奥林巴斯(中国)有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基参考文献[8]配制;马铃薯葡萄糖琼脂固体培养基(potato dextrose agar, PDA)参考文献[9]配制。

1.2 方 法

1.2.1 镁硅酸盐纳米粘土的制备

将 4.2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100 g 乙醇中,然

后向该溶液中滴入 6.5 mL 的 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),加入的同时不断地搅拌,5 min 后溶液变成白色浆液,继续搅拌过夜,然后 6 000 r/min 离心 10 min 分离沉淀,用 250 mL 乙醇漂洗 2 次,40 °C 干燥即获得镁硅酸盐纳米粘土。称取粘土 0.1 g,溶于 100 g 无菌超纯水中制成 1 g/L 悬浮液备用^[10]。

1.2.2 pCAMBIA1303-gpdA-GFP-TrpC-Hygro 质粒和镁硅酸盐纳米粘土载体复合物的制备

挑取含 pCAMBIA1303-gpdA-GFP-TrpC-Hygro 质粒的大肠杆菌 Top10 单菌落于 LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素)中,37 °C、200 r/min 振荡培养 16 h 用于质粒提取。采用质粒大提试剂盒提取质粒 pCAMBIA1303-gpdA-GFP-TrpC-Hygro,提取完成后采用微量分光光度计测定质粒浓度,并调整为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 备用。将 1 g/L 镁硅酸盐纳米粘土悬浮液用无菌超纯水稀释成 25、50、75、100、150、200、250 mg/L 这 7 个不同的浓度,取质粒 5 μL 加入 100 μL 不同浓度镁硅酸盐纳米粘土悬浮液中,充分涡旋,室温孵育 5 min,得到质粒-镁硅酸盐纳米粘土载体复合物。

1.2.3 转化用深绿木霉 HB20111 分生孢子悬液的制备与萌发

用 5 mL 灭菌蒸馏水从培养 5 d 的 PDA 平板上洗下深绿木霉 HB20111 菌株的分生孢子,3 000 r/min 离心 2 min 收集,灭菌蒸馏水调整孢子浓度为 1×10^8 个/mL 分生孢子悬液,按 10% (体积分数)接种量将悬液接种于 PDB 培养基中,28 °C、120 r/min 振荡培养过夜,在显微镜下观察孢子的萌发情况。

1.2.4 镁硅酸盐纳米粘土介导质粒转化

取 100 μL 质粒-镁硅酸盐纳米粘土载体复合物和 100 μL 木霉悬浮液以 1:1 的体积比混合,将混合液放入超声波清洗机中,在超声波输出功率为 100 W/cm^2 、发射频率为 50 kHz 条件下超声 30 s,涂布在含 150 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素和 0.1% 曲酮的抗性平板上,28 °C 恒温培养箱中黑暗条件下培养 5 d;以野生型深绿木霉 HB20111 作对照,观察野生型

能否在抗性平板上生长。统计转化子, 计算转化率。

1.2.5 转化体系条件优化

在转化过程中, 采用单因素法考察分生孢子浓度(10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 个/mL)、纳米粘土浓度(25、50、75、100、150、200、250 mg/L)、深绿木霉 HB20111 分生孢子悬液培养时间(0、4、8、12、16、20 h)和超声时间(10、20、30、60、90、120 s)对转化率的影响, 每个处理 4 个重复, 超声波输出功率、发射频率和培养温度等条件保持不变。

1.2.6 深绿木霉 HB20111 转化子 PCR 验证

将转化子转接到 60 mm 平板于 28 °C 恒温培养 1–2 d, 待木霉长出新生菌丝后, 采用快速制备 DNA 模板的方法^[11]制备菌落 PCR 模板, 用潮霉素引物 hph-F (5'-ACAGCGTCTCCGACCTGAT-3') 和 hph-R (5'-3'GCTCCATACAAGCCAACCAC-3') 扩增 hph 基因, 产物用 1% 琼脂糖电泳检测。

1.2.7 转化子的稳定性检测

将深绿木霉 HB20111 转化子在不含潮霉素的 PDA 固体平板上连续转接 5 代后, 再接种至含 150 μ g/mL 潮霉素的 PDA 固体平板上, 以不含潮霉素的 PDA 固体平板为对照, 观察转化子的生长情况。同时, 快速制备 DNA 模板扩增 hph 基因进行 PCR 验证。

1.2.8 深绿木霉 HB20111 转化子的表达检测

将 PCR 验证无误的转化子于 PDA 固体平板培养 3–4 d 至产分生孢子, 然后挑取少量菌丝和孢子于载玻片上, 滴加无菌水, 使菌丝及孢子展开, 制成水压片, 在荧光共聚焦显微镜激发波长为 488 nm、发射波长为 510 nm 下观察菌丝及孢子中绿色荧光蛋白的表达。

2 结果与分析

2.1 深绿木霉孢子过夜萌发状态

深绿木霉 HB20111 在 PDB 培养基中于 28 °C、120 r/min 振荡培养过夜, 孢子处于萌动状态(图 1), 萌发率为 45%左右。

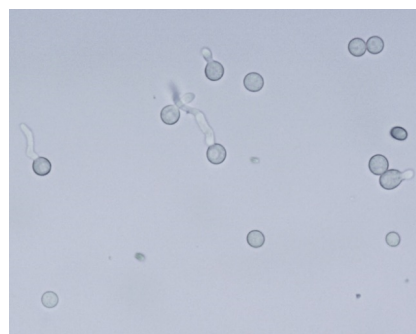


图 1 深绿木霉 HB20111 萌发

Figure 1 Germination status of *Trichoderma atroviride* HB20111.

2.2 深绿木霉 HB20111 的转化

质粒-镁硅酸盐纳米粘土载体复合物和木霉悬浮液经超声处理后, 悬浮液平均涂布于 3 个含 150 μ g/mL 潮霉素和 0.1% 曲酮的抗性平板, 28 °C 恒温培养箱中黑暗条件下培养 5 d 后, 能在抗性平板上正常生长的菌落初步断定为转化子, 而野生型深绿木霉 HB20111 在抗性平板中不能生长(图 2)。

2.3 深绿木霉 HB20111 转化子的 PCR 检测

随机挑选 10 株深绿木霉 HB20111 转化子快速制备菌落 PCR 模板, PCR 扩增潮霉素基因, 以 1303 质粒为阳性对照、野生型深绿木霉 HB20111 为阴性对照, 除阴性对照外其余菌株均可检测到约 700 bp 的条带(图 3)。说明质粒已经整合到深绿木霉 HB20111 基因组中。

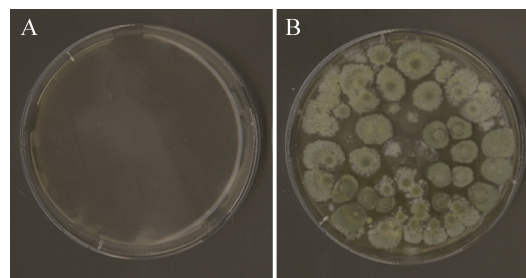


图 2 深绿木霉 HB20111 的纳米粘土介导转化

Figure 2 Aminoclay-mediated transformation of *Trichoderma atroviride* HB20111. A: Wild-type transformation of *T. atroviride* HB20111; B: Transformants of *T. atroviride* HB20111.

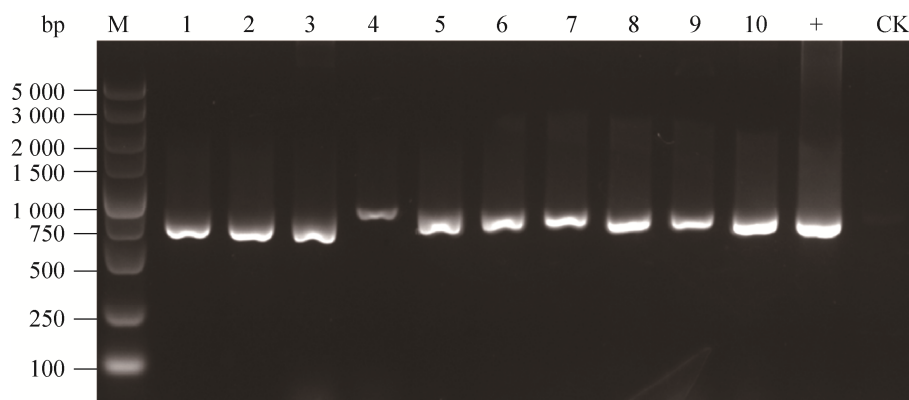


图3 深绿木霉 HB20111 转化子 PCR 检测

Figure 3 PCR analysis of *Trichoderma atroviride* transformant. +: 1303 plasmid; CK: Wild-type strain HB20111; 1–10: HB20111 transformants; M: DL5000 DNA Marker.

2.4 木霉转化子遗传稳定性检测

从转化平板中随机选取 10 株未经过 PCR 验证的深绿木霉转化子在不含潮霉素的 PDA 平板连续转接 5 代, 然后再转接到含潮霉素的 PDA 平板上, 其中 2 株转化子不能继续在抗性平板上正常生长(图 4)。PCR 检测发现这 2 株转化子无法扩增出潮霉素基因条带, 其余 8 株则可以扩增出潮霉素基因条带, 说明上述 8 株转化子潮霉素基因已整合到深绿木霉 HB20111 基因组中并可以稳定遗传。

2.5 转化体系条件优化

深绿木霉 HB20111 分生孢子浓度、纳米粘

土浓度、深绿木霉 HB20111 分生孢子悬液培养时间^[12]和超声时间对转化效率均有明显影响(图 5), 转化效率随分生孢子浓度增加而升高, 当分生孢子浓度在 10^6 个/mL 时转化效率最高, 继续提高分生孢子浓度转化效率则会降低, 同时可能导致涂布抗性平板后的转化子过多而不利于转化子的挑选; 镁硅酸盐纳米粘土浓度在 100 mg/L 条件下转化效率较高, 较低和较高的纳米粘土浓度均不利于深绿木霉的转化, 如在 25 mg/L 和 250 mg/L 浓度下仅为 2–3 个转化子/ μ g-DNA, 推测在较低的浓度下形成的质粒-镁硅酸盐纳米粘土载体复合物导入木霉分生孢子的量不足, 所

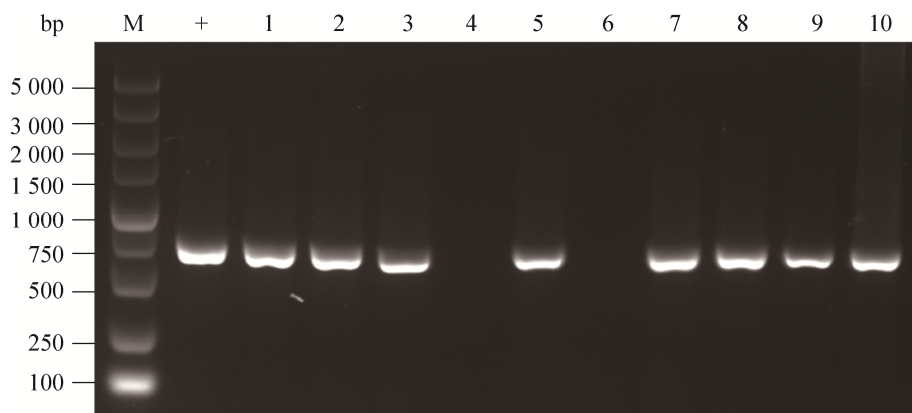


图4 木霉转化子遗传稳定性检测

Figure 4 Genetic stability test of *Trichoderma atroviride* transformants. +: 1303 plasmid; 1–10: HB20111 transformants; M: DL5000 DNA Marker.

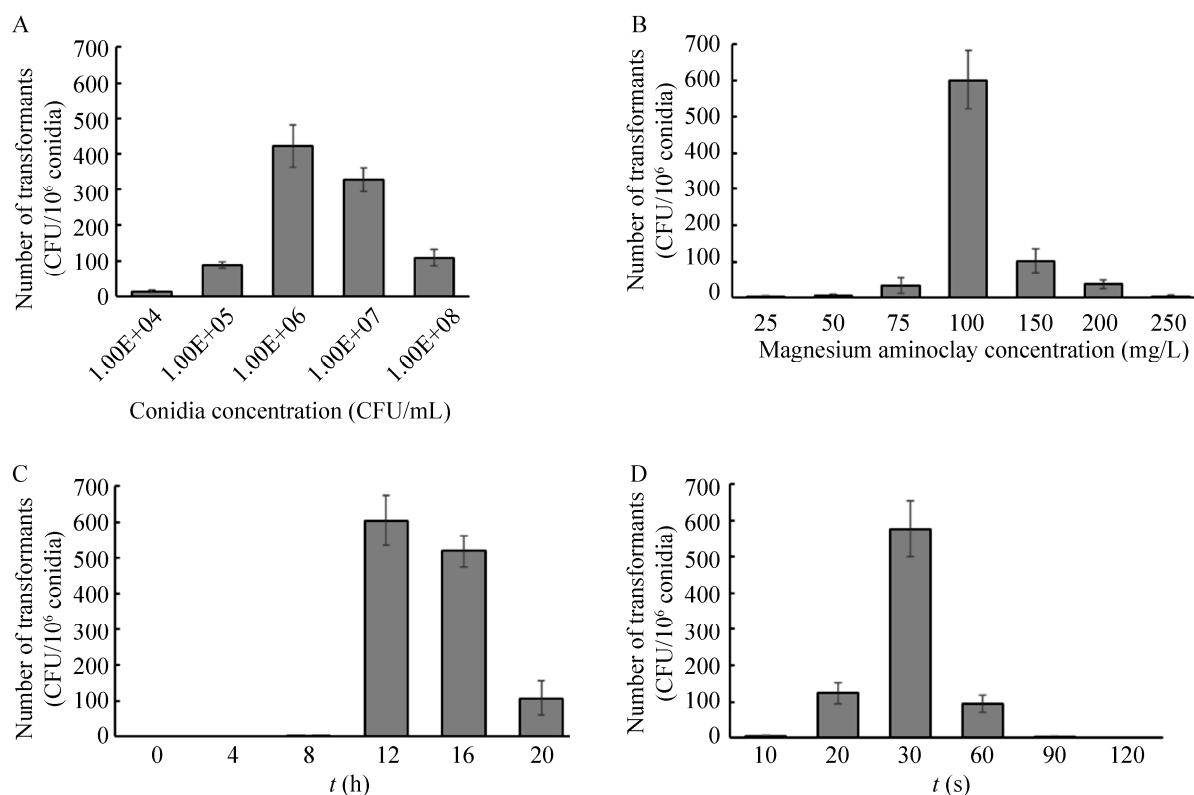


图5 镁硅酸盐纳米粘土介导的深绿木霉 HB20111 转化效率的影响因素 A: 分生孢子浓度对转化率的影响; B: 镁硅酸盐纳米粘土浓度对转化率的影响; C: 木霉孢子悬浮孵育时间对转化率的影响; D: 超声时间对转化率的影响

Figure 5 Influencing factors of transformation efficiency of *Trichoderma atroviride* HB20111 mediated by magnesium aminoclays. A: The effect of conidia concentration on transformation rate; B: Influence of magnesium aminoclay concentration on transformation rate; C: Effect of incubation time of *Trichoderma* spore suspension on transformation rate; D: The effect of ultrasound time on transformation rate.

以转化子较少, 而高浓度的纳米粘土则产生抑菌作用, 从而不利于转化子的生长; 深绿木霉 HB20111 分生孢子悬液在培养 12–16 h 时转化效率较高, 培养时间低于 8 h 或高于 20 h 转化效率会显著降低; 质粒-镁硅酸盐纳米粘土载体复合物与分生孢子悬液混合后超声 30 s 后转化效率最高, 超声时间超过 60 s 时转化效率会快速降低, 主要原因是超声时间过长对细胞产生了不可逆的损伤。

根据上述结果, 确定了深绿木霉 HB20111 转化的最佳条件, 在分生孢子浓度 10⁶ 个/mL、

纳米粘土浓度 100 mg/L、深绿木霉 HB20111 分生孢子悬液培养 12 h、超声时间 30 s 时转化效率最高, 可达 124 个转化子/ μ g-DNA。

2.6 转化子的荧光观察

挑选经过遗传稳定性检测生长良好的转化子单孢分离后, 使用荧光显微镜在 488 nm 蓝光激发下分别对菌丝和分生孢子进行观察, 菌丝和分生孢子在激发光下均能产生强烈的绿色荧光 (图 6), 表明绿色荧光蛋白可以在转化子的菌丝和分生孢子中有效表达。

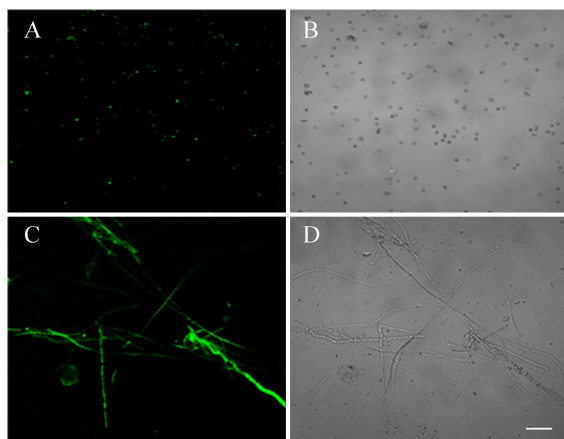


图6 绿色荧光蛋白在木霉转化子中的表达 A: 激发光下的分生孢子; B: 普通光源下的分生孢子; C: 激发光下的菌丝; D: 普通光源下的菌丝。标尺为 20 μm

Figure 6 Expression of GFP in *Trichoderma atroviride* transformant. A: Conidia under florescence microscope; B: Conidia under normal option microscope; C: Mycelia under florescence microscope; D: Mycelia under normal option microscope. Scale=20 μm .

3 讨论

纳米材料作为基因载体目前已经在动植物遗传转化领域得到了广泛的应用^[13-16], 纳米材料可以通过静电作用与 DNA 分子形成复合物, 介导 DNA 分子传递到菌株细胞中^[17]。本文采用的纳米材料为镁硅酸盐纳米粘土, 已报道其能快速吸附到细菌细胞表面, 随后渗透到细胞内部成分中导致细胞膜受损, 起到抗菌的作用^[18], 但如果镁硅酸盐纳米粘土的浓度保持在适当的水平, 在不造成细胞严重损害的情况下则可以作为 DNA 分子的负载体并将其导入细胞^[10]。应用镁硅酸盐纳米粘土已经在大肠杆菌(*Escherichia coli*)、变形链球菌(*Streptococcus mutans*)、*Paenibacillus riograndensis* 等细菌中成功进行转化, 转化率为 2×10^5 – 6×10^3 个转化子/ μg -质粒^[19]。除细菌外, 该方法也在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)

转化中成功应用, 克服了限制藻类细胞基因工程的转化效率瓶颈^[20], 但目前尚未发现针对丝状真菌转化的报道。

本文在参考镁硅酸盐纳米粘土介导细菌转化方法的基础上建立了针对木霉菌遗传转化的方法, 本方法是对 CaCl_2 -PEG 介导转化法、REMI、ATMT、电转化等传统丝状真菌遗传转化方法的有益补充。同时, 本方法不需要制备原生质体, 也不需要特殊的设备进行操作, 解决了传统方法中存在的一些局限性。相较传统转化该方法具有以下优点: (1) 易于制备, 适用于高通量筛选和突变子库构建; (2) 生物相容性好, 是一种安全的纳米材料, 生态毒性小^[21], 细胞内降解后对细胞无毒性^[22]; (3) 转化过程简单, 转化效率高。实验室以传统农杆菌介导转化效率达到约 20 个转化子/ μg -DNA, 而镁硅酸盐纳米粘土介导效率是其 6 倍。该方法获得的转化子在多次传代的抗性平板上仍可正常生长, 遗传稳定性较好。我们重点考察了镁硅酸盐纳米粘土的浓度、木霉分生孢子的浓度、分生孢子悬液培养时间和超声时间对转化效率的影响, 而质粒浓度、超声波输出功率、超声波发射频率、纳米粘土的粒径分布也可能会影响转化效率。据报道, 粘土的表面和体积平均直径为 43.74 nm 和 44.93 nm, 在 10%、50% 和 99% 处的累计粒径为 35.86、44.31 和 64.60 nm^[22]。因此, 转化效率还有进一步的提升空间, 我们将对转化条件进行更进一步的优化和完善, 以获取最佳的转化方案。此外, 我们将对该方法进行拓展并建立一套丝状真菌通用的遗传转化方案。

4 结论

镁硅酸盐纳米粘土转化方案是一种简单、高效、稳定的遗传转化方法, 利用它实现了对深绿木霉 HB20111 的高效转化, 经过转化条件优化

后转化效率可达 124 个转化子/ μg -DNA, 为深绿木霉 HB20111 突变体库的构建和进行遗传改良奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes[J]. Microbiology: Reading, England, 2012, 158(Pt 1): 17-25
- [2] Till P, Derntl C, Kiesenhofer DP, Mach RL, Yaver D, Mach-Aigner AR. Regulation of gene expression by the action of a fungal lncRNA on a transactivator[J]. RNA Biology, 2020, 17(1): 47-61
- [3] Vithalani KK, Shoffner JD, De Lozanne A. Isolation and characterization of a novel cytokinesis-deficient mutant in *Dictyostelium discoideum*[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 1996, 62(2): 290-301
- [4] Radakovits R, Jinkerson RE, Darzins A, Posewitz MC. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(4): 486-501
- [5] Qin S, Lin HZ, Jiang P. Advances in genetic engineering of marine algae[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1602-1613
- [6] Yamano T, Iguchi H, Fukuzawa H. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(6): 691-694
- [7] 赵美, 王陈骄子, 周而勋, 舒灿伟. 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
Zhao M, Wang CJZ, Zhou EX, Shu CW. The latest research progress on genetic transformation system of filamentous fungi[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(3): 1138-1143 (in Chinese)
- [8] Kumar P, Ray S, Patel SKS, Lee JK, Kalia VC. Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 78: 9-16
- [9] Adesemoye AO, Adedire CO. Use of cereals as basal medium for the formulation of alternative culture media for fungi[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(3): 329-336.
- [10] Choi HA, Lee YC, Lee JY, Shin HJ, Han HK, Kim GJ. A simple bacterial transformation method using magnesium- and calcium-aminoclays[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 95(2): 97-101
- [11] 罗中钦, 程琳, 张茜, 陈国华. 丝状真菌 PCR 模板 DNA 的快速制备方法[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 79-83
Luo ZQ, Cheng L, Zhang X, Chen GH. A rapid method of preparing DNA template of filamentous fungi for PCR amplification[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(9): 79-83 (in Chinese)
- [12] Kilaru S, Schuster M, Murray R, Steinberg G. Optimal timing for *Agrobacterium*-mediated DNA transformation of *Trichoderma reesei* conidia revealed by live cell imaging[J]. Fungal Genetics and Biology, 2020, 142: 103448
- [13] 辛颖, 张志强, 安宁, 张涛, 张建峰, 张智英. 小鼠精原干细胞不同转染方法效率的比较[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(1): 93-100
Xin Y, Zhang ZQ, An N, Zhang T, Zhang JF, Zhang ZY. Comparison of different methods for spermatogonial stem cells transfection efficiencies[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 30(1): 93-100 (in Chinese)
- [14] Chen YT, Tsai TC, Lai PS, Chen CM. A novel gene therapy in hemophilia A mouse model by using lipid-coated Fe_3O_4 nanoparticles[J]. FASEB Journal, 2017, 31(S1): 1-9
- [15] Cunningham FJ, Goh NS, Demirel GS, Matos JL, Landry MP. Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 36(9): 882-897
- [16] Kumar S, Nehra M, Dilbaghi N, Marrazza G, Tuteja SK, Kim KH. Nanovehicles for plant modifications towards pest- and disease-resistance traits[J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(2): 198-212
- [17] Nafissi N, Foldvari M. Neuroprotective therapies in glaucoma: II. Genetic nanotechnology tools[J]. Frontiers in Neuroscience, 2015, 9: 355
- [18] Chandrasekaran G, Han HK, Kim GJ, Shin HJ. Antimicrobial activity of delaminated aminopropyl functionalized magnesium phyllosilicates[J]. Applied Clay Science, 2011, 53(4): 729-736
- [19] Brito LF, Irla M, Walter T, Wendisch VF. Magnesium aminoclay-based transformation of *Paenibacillus riograndensis* and *Paenibacillus polymyxa* and development of tools for gene expression[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(2): 735-747
- [20] Kim S, Lee YC, Cho DH, Lee HU, Huh YS, Kim GJ, Kim HS. A simple and non-invasive method for nuclear transformation of intact-walled *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101018
- [21] Choi MH, Hwang Y, Lee HU, Kim B, Lee GW, Oh YK, Andersen HR, Lee YC, Huh YS. Aquatic ecotoxicity effect of engineered aminoclay nanoparticles[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 102: 34-41
- [22] Han HK, Lee YC, Lee MY, Patil AJ, Shin HJ. Magnesium and calcium organophyllosilicates: synthesis and *in vitro* cytotoxicity study[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2011, 3(7): 2564-2572