生命的化学, 2023, 43(6): 797-808 www.life.ac.cn doi: 10.13488/j.smhx.20230132

综述

丝状真菌遗传转化体系的研究进展

白 璐， 卢 萍*

(内蒙古师范大学生命科学与技术学院，呼和浩特 010022)

摘要：随着现代测序技术的飞速发展，主要丝状真菌的基因组序列相继公布，对丝状真菌基因水平的研究也不断深入，发展高效的遗传转化技术是真菌基因功能研究以及定向改良菌种的前提。近年来，尽管研究者不断优化并开发新的遗传转化方法，然而在丝状真菌中仍然存在转化效率较低、阳性转化子筛选困难等问题。适宜的转化方法和筛选标记对丝状真菌的遗传转化有至关重要的作用。该文综述了丝状真菌遗传转化系统的研究进展，主要从受体细胞的处理、外源基因的整合与表达、常用转化方法和阳性转化子的筛选鉴定等方面进行概述，旨在为今后丝状真菌遗传转化体系的构建提供思路。

关键词：丝状真菌；遗传转化；筛选标记；转化子

The research progress on genetic transformation system of filamentous fungi

BAI Lu, LU Ping*

(College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China)

Abstract: With the rapid development of modern sequencing technology, the genome sequences of major filamentous fungi have been published one after another, and the research on the gene level of filamentous fungi has also been deepened. The development of efficient genetic transformation technology is the premise of fungal gene function research and targeted improvement of strains. In recent years, researchers have continuously optimized and developed new genetic transformation methods. However, there are still some problems, such as low transformation efficiency and difficulty in screening positive transformants. Suitable transformation methods and screening markers play an important role in the genetic transformation of filamentous fungi. The research progress of filamentous fungi genetic transformation system is reviewed in this paper, mainly from the aspects of the treatment of recipient cells, integration and expression of foreign genes, common transformation methods and screening and identification of positive transformants in order to provide ideas for the construction of filamentous fungi genetic transformation system.

Key Words: filamentous fungi; genetic transformation; selective marker; transformant

丝状真菌是多细胞真核微生物，在自然界中分布广泛，可通过降解生物质来保持生物圈的碳循环，被称为“天然清道夫”，广泛应用于医药、农业、工业等多个领域[1,2]。例如，哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)可抑制植物病原菌，还可产生丰富酶系应用于木质纤维素的降解[3]；一些青

收稿日期：2023-02-21
基金项目：国家自然科学基金项目(31960130)；内蒙古自然科学基金项目(2022MS03014)
第一作者：E-mail: bl1434144573@163.com
***通信作者：**E-mail: luping@imnu.edu.cn

霉属和曲霉属的丝状真菌可生产非核糖体肽、β-内酰胺类抗生素、聚酮类化合物及普伐他汀，用于食品、药物、生物农药等的生产研发[4]。还有一些丝状真菌会威胁动植物及人类的生产生活，如尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)是一种土壤病原菌，能侵染植物，引起严重的作物枯萎病，其寄主范围广、防治效果差，对作物生产造成巨大损失[5]；棘豆链格孢(*Alternaria oxytropis*)与疯草(部分棘豆属、黄芪属植物)共生，合成有毒的苦马豆素(swainsonie，SW)，牲畜采食后患疯草病，从而制约草原畜牧业的发展[6]。

近年来，随着高通量测序技术的发展，许多丝状真菌完成全基因组测序，在基因水平的研究也更加深入，研究丝状真菌基因功能和定向改良菌种在工业生产及病害防治等方面有重要的现实意义，建立稳定高效的遗传转化体系是基础，而丝状真菌细胞壁结构复杂，遗传转化难度较大[7]，Mishra和Tatum于1973年首次报道了丝状真菌粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)的DNA转化[8]，到目前为止，已成功对100多种丝状真菌进行了遗传转化实验[9]。本课题组也对疯草小花棘豆内生真菌棘豆链格孢OW7.8进行了遗传转化[10,11]，研究其苦马豆素合成相关基因的功能。本文对丝状真菌的遗传转化进行系统综述。

1 受体细胞的处理

一些微生物在一定的环境条件下能够形成自然感受态细胞，可在自然生长过程中自发摄取外源DNA，目前已发现至少80种细菌具有自然转化的能力[12]，芽殖酵母经饥饿处理后也可能发生自然转化[13]，而目前尚未有实验证明丝状真菌能否从胞外环境中自发吸收外源DNA。真菌细胞壁是细胞吸收外源物质的天然屏障，通过合适方法增强细胞壁通透性是转化过程中的第一个关键步骤。常用化学方法或酶解法处理细胞壁，一些丝状真菌例如粗糙脉孢菌[14]或里氏木霉(*Trichoderma reesei*)[15]，在较短培养时间内就会产生大型分生孢子，利用山梨醇溶液对孢子进行洗涤后，可对其进行电转化；用一价或二价阳离子(如Li^+或Ca^{2+})处理细胞，可增强细胞壁的通透性[16]。另外，在高温条件下液体培养分生孢子，可使细胞快速膨胀，导致细胞壁变薄，从而利于实现外源DNA的转化[17]。多数丝状真菌的细胞壁较厚且成分复杂，根据其不同细胞壁成分，利用相应的混合酶液裂解细胞壁、制备原生质体，再对其进行电转化或聚乙二醇(polyethylene glycol，PEG)介导的转化，故选择合适的裂解酶及酶解条件是原生质体制备的关键。研究发现，混合酶的水解效率一般优于单一酶[7,18]。在细胞壁的酶解过程中，应维持稳定的渗透压避免细胞破裂，山梨醇、KCl、$MgSO_4$等都是原生质体制备及再生过程中常用的渗透压稳定剂[19-21]。此外，菌体发育阶段、孢子色素沉着程度[22]等都会影响原生质体的形成。本课题组探索棘豆链格孢OW7.8的原生质体制备与再生的最适条件，发现菌丝培养10 d，酶解反应温度为30 ℃、pH5.8时，原生质体产量最高，酶解时间为8 h时，获得的原生质体数量及其再生率均较高[7]。原生质体的制备很难标准化，没有适用于不同真菌的通用方法。

破坏细胞壁后，可通过PEG介导、电激转化、农杆菌介导等方法将外源DNA转化真菌原生质体，穿过质膜后，内化的外源DNA迅速与大量受体细胞的蛋白质结合形成复合体以避免被核酸酶降解，并在这些蛋白的辅助下转运至细胞核，通过核孔复合体进入细胞核[17]，最终有可能整合在染色体DNA上。

2 外源基因的整合与表达

丝状真菌中外源基因的整合与表达有3种方式：(1)自主复制和表达载体在真菌细胞中独立复制并表达；(2)随机整合到基因组；(3)靶向整合至基因组特定位点[17]。应用于丝状真菌的自主复制载体常含有构巢曲霉中的自主复制元件(autonomously maintained in *Aspergillus*，AMA1)[23]，由于不需整合至真菌基因组，携带AMA1的载体通常转化效率更高，但需在抗性培养基中培养，在非选择性条件下，该载体通常会在传代过程中丢失[24]。Katayama等[25]将AMA1的一半序列插入基因编辑载体转化米曲霉(*Aspergillus oryzae*)，携带AMA1的质粒在细胞中自主复制，以多拷贝的形式存在，提高了载体中*Cas9*和*sgRNA*的表达，从而增加了*wA*、*yA*及乳清酸核苷-5′-磷酸脱羧酶基因(*pyrG*)的

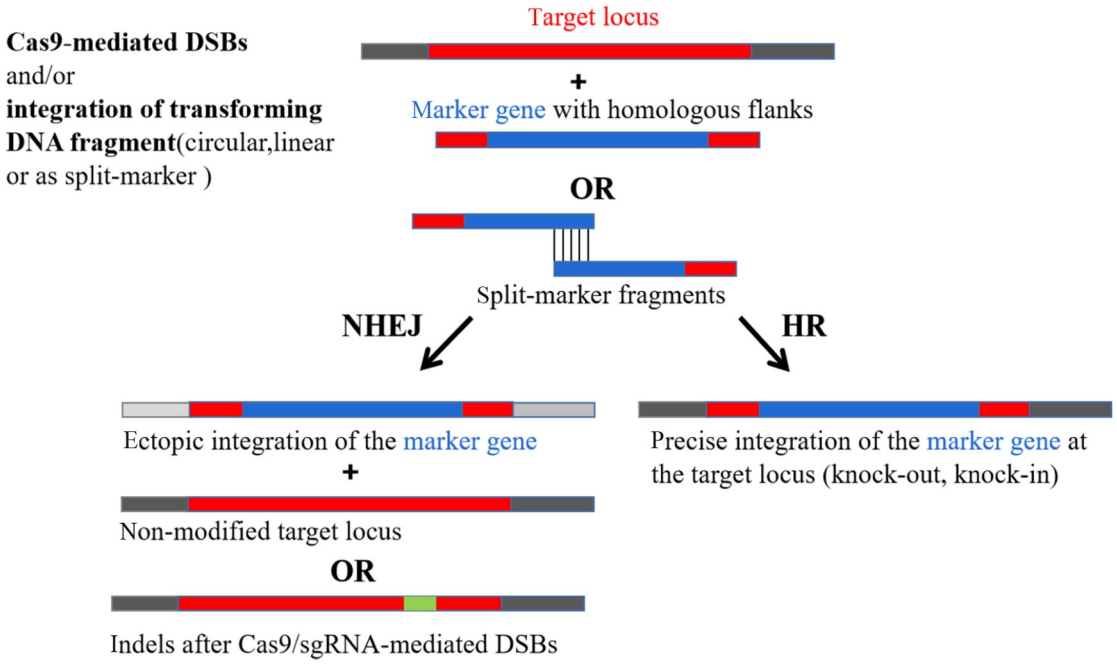
突变效率。

在多数情况下，外源DNA与受体细胞染色体重组，随机或靶向整合至基因组中。同源重组(homologous recombination，HR)和非同源末端连接(non-homologous end joining，NHEJ)是生物体修复DNA双链断裂(double-strand breaks，DSBs)的内在机制[26]，HR以同源序列作为模板，复制遗传信息并替换受损区域，从而完成DNA的精准修复，也是丝状真菌外源基因定点整合的分子基础，可在外源DNA片段两端连接靶位点上下游同源序列转化细胞，期望发生同源重组，实现外源基因的靶向整合[27,28]。丝状真菌中的同源重组频率较低，限制了定点改造基因组的效率，同源片段长度一般为0.5~1.0 kb，不同真菌及转化方法对片段长度的要求不同，多数情况下片段越长，同源重组效率越高，本课题组在潮霉素磷酸转移酶基因(*hygromycin phosphotransferase*，*hph*)两侧连接目的基因上下游同源区序列，分别构建了酵母氨酸还原酶基因(saccharopine reductase gene，*sac*)基因敲除载体[10]及*swnK*基因ACP结构域敲除载体[11]，用于棘豆链格孢OW7.8的遗传转化。NHEJ是一种将DSBs末端直接连接的修复机制，不依赖同源序列，是许多真核生物中DSBs的一种主要修复机制，HR更为灵活和高效，但其修复常不精确、易出错，容易造成序列缺失或片段插入，且外源DNA容易随机整合至其他基因组位点[29]，NHEJ和HR之间的主要区别如图1所示[17]。HR和NHEJ存在一定的竞争关系，*ku70*及*ku80*是参与真核生物NHEJ修复的重要基因，其功能缺失可抑制细胞内NHEJ修复，因此，使用*ku70*或*ku80*基因阻断突变株作为受体，可提高以同源重组为修复方式的基因打靶效率[30]。另外，利用核酸酶对基因组DNA进行切割而在特定位点引入双链断裂，能够显著提高同源重组效率[28]，常用的特异性核酸内切酶技术包括锌指核酸酶(zinc finger nucleases，ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases，TALENs)、CRISPR/Cas(clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein)系统等[31]。

3　遗传转化方法

3.1 PEG-$CaCl_2$介导的原生质体转化

PEG是一种理化性质稳定的高分子聚合物，



深灰色：目标基因座；浅灰色：基因组随机位置；蓝色：标记基因；绿色：序列缺失或片段插入

图1　NHEJ和HR之间的主要区别[17]

可通过干扰细胞膜表面电荷或作为DNA与细胞膜的黏合剂发挥作用，促进外源DNA与原生质体的融合。PEG介导法的基本步骤见图2[32]。该方法首次于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中获得成功[33]，其后应用于丝状真菌。Zhao等[34]基于CRISPR/Cas9技术构建了多重碱基编辑系统(multiplex base-editing，MBE)，利用PEG介导法转化构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)，一次同时敲除了8个基因，并进一步利用该系统激活了8个生物合成基因簇，从构巢曲霉突变株中获得了4个从未报道的化合物。Zou等[35]使用聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)增强细胞膜通透性，用肌醇或苯菌灵处理分生孢子以控制有丝分裂周期，提高了里氏木霉中PEG介导的原生质体转化效率。陈莹莹等[36]采用PEG介导法成功转化粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)，对短链脱氢酶基因*CrSdr*进行敲除与回补研究。Amalamol等[37]首次在甘蔗赤腐病菌(*Colletotrichum falcatum*)中建立了高效的原生质体转化体系，并且成功转化绿色荧光蛋白标记的载体。本课题组利用PEG介导法成功将*sac*基因敲除载体转化棘豆链格孢OW7.8，得到*sac*缺失突变株[10]；在不断优化转化条件及操作方法后，成功构建*swnK*基因缺失突变株[11]。PEG浓度及分子量，真菌菌龄，再生方式等都对转化效率有一定影响，PEG是提高转化效率的关键因素，通常，低相对分子质量的PEG介导的转化效率优于高相对分子质量的PEG，但转化条件需针对不同的受体菌进行优化[32]。PEG介导法简单有效，操作方便，不需要昂贵的仪器设备，且能够共转化多个DNA片段，目前仍是丝状真菌中应用最广泛的转化方法。但原生质体培养难度大，再生率低，且转化条件具有菌种特异性。

3.2 电激转化法(electroporation transformation)

电激转化法利用高压脉冲在生物膜上形成电穿孔，使外源DNA进入受体细胞，该方法最早在酿酒酵母中实现成功转化[38]，而后逐渐应用于丝状真菌。沈思巧等[39]优化了电转化三孢布拉霉(*Blakeslea trispora*)原生质体的多个参数，同时构建了*btwc-1c*基因过表达菌株，电转化最佳条件为电压0.4 kV、电脉冲时间2 ms、再生培养3 h；Balabanova等[40]开发了一种电穿孔法介导的高效转化体系，构建植物双元载体pPZP-RCS2-EGFP-hph，将*hph*基因及增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein，*EGFP*)基因同时转入嗜热毁丝霉菌(*Thermothelomyces thermophila*)。Yao等[41]通过PEG介导法和电激转化法构建了土曲霉(*Aspergillus terreus*)甲基转移酶基因(*laeA*)高表达株，提高了土曲霉酮的产量。潘小红等[42]通过电激转化法将杀菌剂抗性基因转入齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)中，得到了草胺膦抗性基因(*bar*)、G418抗性基因(*aphI*)和萎锈灵抗性基因(*sdhR*)基因的转化子。电激转化法以原生质体或完整细胞作为受体，在合适的电场强度下，受体细胞表面产生可逆的瞬间通道，一定时间内细胞膜中的脂质和蛋白质分子可恢复原来结构，过高的电场强度会导致细胞修复失败而死亡，而过低则形成穿孔较少而不足以达到转化要求[32]。电激转化法需要电转化仪，目前转化丝状真菌多以原生质体作为转化材料，存在原生质体制备及再生较困难的问题，导致该方法的应用有一定的局限性。

3.3 根癌农杆菌介导的转化

根癌农杆菌介导的转化(*Agrobacterium*

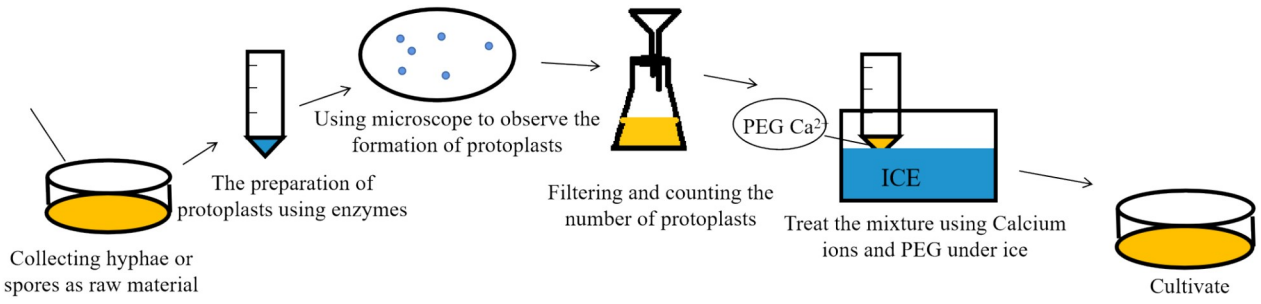


图2 PEG介导法的基本步骤[32]

tumefaciens-mediated transformation，ATMT)方法需将目的基因插入到Ti质粒的T-DNA左右边界之间构建载体，导入根癌农杆菌，在乙酰丁香酮(acetosyringone，AS)等小分子酚类化合物的诱导下，农杆菌经创口感染进入真菌细胞，并将T-DNA整合到基因组中。根癌农杆菌是一种革兰氏阴性细菌，其感染能力主要依赖于Ti质粒上一系列*vir*基因的表达，在这些Vir毒力蛋白的调控下，T-DNA经剪切、包装，最后被转运至细胞核，在受体菌中稳定遗传[43]。ATMT的大致过程如图3[44,45]。ATMT最初用于植物的遗传转化，Bundock等[46]利用该方法成功转化酿酒酵母。Tran等[47]构建了一种基于*pyrG*营养缺陷型标记的ATMT系统，用于产红青霉(*Penicillium rubens*)的重组表达；王一川等[48]通过ATMT敲除了黑曲霉(*Aspergillus niger*)的*spt7*基因；Wei等[49]使用根癌农杆菌LBA4404介导转化洛佐亚棘白菌(*Glarea lozoyensis*)，提高了其合成肺炎菌素(pneumocandin B_0，PB_0)的纯度。李娜等[50]构建了根癌农杆菌侵染三孢布拉霉原生质体的转化体系，实现*ku80*基因的敲除。影响ATMT转化效率的因素包括双元载体及农杆菌的类型、共培养的浓度与时间、培养温度和pH值等。该方法具有受体广泛、单拷贝率高、转化率高且遗传稳定等优点，但一些丝状真菌对AS较为敏感，另外，ATMT耗时较长，可能引起染色体重排[51]，未来还可进一步完善。

3.4 基因枪法(biolistic transformation)

基因枪法，又称微弹轰击法或生物弹道技术。该方法首次于1987年应用于细胞转化[52]，其原理是使外源DNA吸附在钨粒或金粒表面，利用基因枪的高压作用射入受体细胞或组织中。在近年的研究中，Florencio等[53]使用基因枪法转化裴氏着色霉(*Fonsecaea pedrosoi*)分生孢子，获得了表达绿色荧光蛋白的突变株；Jung等[54]通过基因枪法转化新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)，使用*CTR4*启动子或*H3*启动子替换野生株天然启动子，同时构建了基因敲除突变株*rnr22*、*ssn6*Δ、*tup1*Δ和双敲除株*bdr1mbs1*Δ，研究核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide reductases，*RNRs*)基因对DNA复制及损伤的调控机制。Schmoll等[55]利用基因枪法成功对里氏木霉进行了遗传转化。基因枪法转化法受体材料广泛，包括孢子、菌丝等具分生能力的组织和细胞，且受体细胞无需预处理，对一些培养困难或难以制备原生质体的丝状真菌来说，该方法简单有效，但基因枪法仪器耗材昂贵，转化率相对较低，一般只有在其他方法难以成功时才会考虑。

3.5 限制性内切酶介导的转化

限制性内切酶介导的整合(restriction enzyme mediated integration，REMI)指在相应的限制性内切酶的介导下，使用线性化质粒转化原生质体，限制性内切酶识别受体细胞DNA上的特异位点产生黏性末端，与质粒互补相连，从而使DNA插入受体细胞的基因组[56]。以*BamH* Ⅰ为例，REMI的作用机理如图4所示。REMI系统最初由Schiestl和Petes在酿酒酵母的外源基因转化中建立起来[57]，至今已成功转化十多种丝状真菌[58]。He等[59]通过

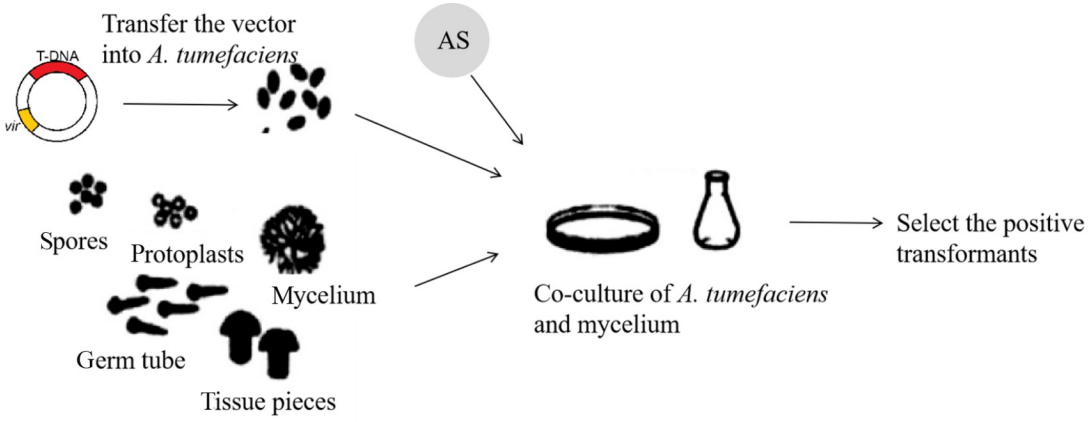


图3　根癌农杆菌介导转化的大致过程[44,45]

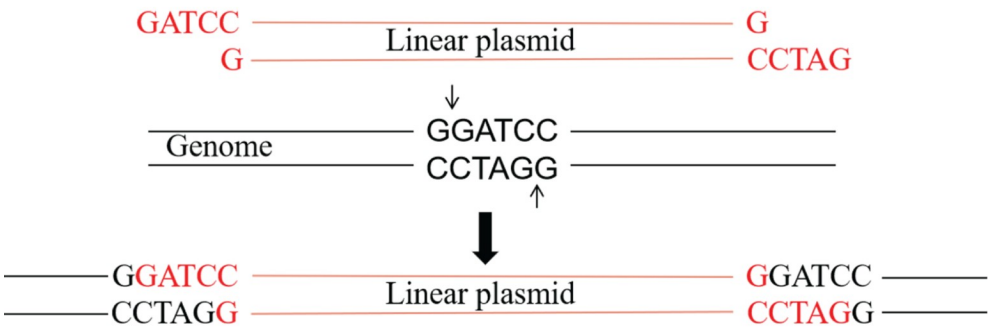


图4 限制酶*BamH* Ⅰ介导整合的机理

REMI敲除了稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)的*MoNFR*基因，发现该基因对稻瘟病菌的致病性具有重要作用。Miura等[60]利用REMI构建了米曲霉ABC转运蛋白基因*atrA*、*atrG*、及*atrH*过表达株，发现这些基因的过表达增强了米曲霉对唑类药物的耐药性。限制性内切酶的种类和酶量对转化效率有较大影响，限制性内切酶浓度过高可能导致基因组被过度酶切而破坏其原有框架，另外，DNA酶切缓冲液、质粒种类、受体细胞浓度等也会对转化效率有一定影响。REMI单拷贝插入概率大、定向性强、范围广，但需精准控制酶的种类及酶量，且易出现非标记突变的转化子。

3.6 冲击波法

冲击波介导的转化(shock-wave-mediated transformation，SWMT)利用高强度的冲击波改变细胞膜的通透性，从而使外源DNA能够进入细胞。2013年，Magana-Ortiz等[61]将该方法用于真菌的遗传转化，目前已成功转化黑曲霉、尖孢镰刀菌、里氏木霉、斐济球腔菌(*Mycosphaerella fijiensis*)及黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)等[1]。Rojas-Sanchez等[62]构建了黑曲霉*vps*、*prtT*、*algC*及*och1*基因的CRISPR/Cas9基因编辑载体，通过冲击波法及PEG介导法转化真菌的孢子或原生质体，对这些基因进行编辑，获得了不含蛋白酶的菌株。Magana-Ortiz等[63]利用冲击波法转化黑曲霉，首次实现利什曼原虫(*Leishmania*)抗原蛋白在丝状真菌中的重组表达。冲击波法转化以菌丝体、孢子等为转化材料，转化效率高且转化条件容易控制，需注意冲击波的速度、能量以及受体细胞的数量。但该方法所需的仪器设备等主要为医疗设计，价格昂贵，在资源有限的实验室内使用存在诸多不便。

4 转化子的检测技术

4.1 真菌常用的筛选标记

为了检测转化后外源基因的瞬时表达情况，遗传转化载体或DNA片段上一般要加入选择性标记基因，通过特定的选择培养基抑制野生型菌株生长，从而筛选出转化子，合适的选择标记能够减少假阳性，提高筛选效率，避免外源基因在纯化培养的过程中丢失，对筛选转化子至关重要。

4.1.1 营养缺陷型标记

营养缺陷型突变株指经过人工诱变或自发突变而失去某种生长因子的合成能力，只有在外源添加该生长因子的培养基中才能正常生长的突变菌株。营养缺陷型筛选通过将营养缺陷型互补基因转入受体细胞，使受体细胞恢复野生型生长。如在黑曲霉中，鸟氨酸氨甲酰基转移酶基因(*argB*)缺失突变株无法正常合成精氨酸，不能在基本培养基中生长，在培养基中外源添加精氨酸或瓜氨酸后才能正常生长，构建以*argB*基因为回补标记的载体转化*argB*营养缺陷型菌株，以实现其他基因在黑曲霉中的表达[64]。目前，应用较为广泛的营养缺陷型互补基因还包括*pyrG*基因[65]、色氨酸生物合成酶基因(*trp1*)[66]等。胡江峰等[67]通过5-氟乳清酸(5-FOA)筛选得到稳定遗传的黑曲霉尿苷/尿嘧啶营养缺陷型菌株，并以*pyrG*作为筛选标记转化该突变株，获得黑曲霉红色荧光蛋白(red fluorescent protein，RFP)表达菌株。高育青等[68]通过对米曲霉的*pyrG*和*ku70*基因进行双敲除，构建了高同源重组效率的营养缺陷型菌株，将编码红

色荧光蛋白的*mCherry*基因转化该双缺失菌株的原生质体，荧光蛋白定位于细胞核。杨鑫等[69]以*pyr4*作为筛选标记，构建了里氏木霉翻转酶基因(*drs2*)的敲除突变株。最初，丝状真菌的遗传转化多是通过营养缺陷型筛选获取转化子，但合适的营养缺陷型突变株获取困难，有时不稳定、易回复为野生型，限制了该方法的使用。

4.1.2 药物抗性标记

抗性筛选是指将抗性基因转入受体细胞而使转化子产生抗药性，从而可在一定的药物浓度下进行筛选，常用的抗性基因包括潮霉素B抗性基因(*Hyg*^{r})、新霉素抗性基因(*neo*^{r})、卡那霉素抗性基因(*Kan*)、草胺膦抗性基因等。He等[70]在黄曲霉(*Aspergillus flavus*)的遗传转化中首次利用腐草霉素抗性筛选得到*ble*基因稳定遗传表达的转化子，并使用含*ble*基因的载体pBC-phleo及含*pyr4*基因的载体pBSK-pyr4共转化*pyrG*突变株*A. flavus* 3357-5，发现pBC-phleo的转化效率高于pBSK-pyr4。王猛等[71]以*Hyg*^{r}为筛选标记，对新暗色柱节孢菌(*Neoscytalidium dimidiatum*)的孢子进行根癌农杆菌介导的转化，成功实现绿色荧光蛋白基因的稳定遗传表达；陈绮艺等[72]分别使用腐草霉素和潮霉素抗性培养基筛选*Podospora anserina*转化子得到突变菌株Δ*PaPho1*和Δ*PaPho2*，遗传杂交构建同时具有腐草霉素和潮霉素抗性的双重突变菌株Δ*PaPho1* Δ*PaPho2*，随后使用诺尔斯菌素抗性培养基筛选回补转化子，回补菌株Δ*PaPho1* Δ*PaPho2*^{com}表型恢复。孙璐等[73]构建以苯菌灵抗性基因(*ben*)为筛选标记的*swnR*基因敲除载体，转化金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)筛选得到稳定遗传的*swnR*基因突变型菌株，并以草铵膦抗性基因作为筛选标记，将*swnR*基因回补。本课题组构建以*Hyg*^{r}为选择标记基因的*sac*基因敲除载体，转化棘豆链格孢OW7.8原生质体得到*sac*缺失突变株M1，并进一步将*sac*功能互补载体转化至M1原生质体，通过草胺磷抗性筛选得到*sac*功能互补菌株，互补株同时具Hyg抗性，*sac*基因敲除后苦马豆素水平下降，回补后其苦马豆素瞬时水平高于OW7.8和M1[10,74]。利用潮霉素抗性筛选得到*swnK*缺失突变株，该基因敲除后真菌不能合成苦马豆素。药物抗性标记使用方便，不需要特殊的突变菌株，目前已被广泛应用于真菌的遗传转化。

4.1.3 致突变型或建立特殊代谢途径的标记

对受体功能基因进行编辑或诱导突变，造成基因功能缺失以进行筛选。如构巢曲霉*pyrG*缺失突变株对反向筛选药物5-FOA产生抗性，而野生株中的乳清酸核苷-5′-磷酸脱羧酶会催化5-FOA生成致死物质5-氟尿嘧啶，因而野生株不能在含5-FOA的培养基上生长，利用这一特性可以通过5-FOA抗性筛选得到转化子[9,75,76]。Vieira等[77]使用基因枪法将*pyr4*基因的CRISPR/Cas9基因编辑载体转化哈茨木霉分生孢子，在含有5-FOA和尿苷的选择性培养基上筛选获得尿苷/尿嘧啶营养缺陷型突变株。也可采用建立特殊代谢途径的方法，如构巢曲霉中的乙酰胺酶能够将乙酰胺降解成氨，而其他丝状真菌则无法利用乙酰胺，以乙酰胺酶基因(*amdS*)作为筛选标记转化这些丝状真菌后，可在以乙酰胺为唯一氮源的培养基上筛选转化子[78]。

4.1.4 荧光标记

荧光蛋白是一种多功能的生物标记物，在特定波长的激发光照射下会产生明亮荧光，同时具有良好的生物相容性。荧光蛋白家族包括绿色、红色、黄色荧光蛋白等，其中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein，*GFP*)基因在丝状真菌的基因表达测定中应用最为广泛，其表达无毒且易于检测，是一种良好报告基因。

荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting，FACS)和荧光激活液滴分选(fluorescence-activated droplet sorting，FADS)技术可通过检测荧光信号对细胞进行高效分选[79-81]。FACS可以根据细胞大小或荧光，利用流式细胞仪(flow cytometer，FCM)对流动的细胞或颗粒进行分选，其原理是通过气压装置使待测样本通过水相鞘液，细胞有序排列并逐个进入激光聚焦区，经激光束激发产生散射光和荧光等信号，借助光学元件检测信号并转化成相应的数字信号，计算机处理分析后通过电压偏转分选分离出目标细胞。FACS技术分选速度快、纯度高，在一定程度上提高了丝状真菌的筛选效率，但由于丝状真菌菌丝形状不规则、容易堵塞液流通道，只能使用孢子或原生质体进行

检测筛选[81,82]。

FADS是一种基于微芯片的高通量筛选技术，在微通道内，通过压力将2种互不相溶的流体分散成微米级的单分散液滴，将待检测的细胞单独包埋在这些液滴微反应器中，通过检测液滴内的物质信号对单细胞及其胞外分泌物进行定量分析与分选。FADS灵敏度极高，可对丝状真菌次级代谢产物进行检测，是菌株定向改造实验中高效可靠的超高通量筛选平台[80,81]。Wang等[83]在里氏木霉中进行了基于孢子GFP信号偶联外源基因表达的研究，利用FACS完成了脂酰辅酶A还原酶高表达菌株的筛选。Vlaardingerbroek等[84]利用FACS成功筛选到以GFP和RFP为标记的尖孢镰刀菌转化子。Luu等[85]利用FADS完成了对GFP高表达的里氏木霉转化子的筛选。李岑等[86]将融合绿色荧光蛋白的天冬酰胺酶基因整合至黑曲霉糖化酶位点，并通过流式细胞仪分选到表达天冬酰胺酶基因的孢子。高通量筛选是一种规模化、自动化、灵敏快速的筛选方法，该技术广泛用于细菌、酵母和藻类[81]，但在丝状真菌基因工程的培养、分析和分离过程中的应用仍然有限，需要进一步的开发研究。

4.2 转化子的鉴定技术

利用选择性标记可对转化子进行初步筛选，但无法保证选择培养基中的所有菌落都成功转化并稳定表达，还需对转化子进一步筛选鉴定后，挑取阳性转化子单菌落进行多轮培养，以得到纯化且稳定的突变株。

利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction，PCR)在体外扩增DNA，可提取转化子单菌落DNA作模板，对目的基因进行特异性扩增从而实现对转化子的鉴定。该方法简单便捷，应用广泛，但特异性较低，有时出现假阳性，故在PCR检测后，通常需对扩增片段进行测序验证，以进一步确认鉴定结果。实时荧光定量PCR是在DNA扩增过程中，利用荧光定量PCR仪实时检测每个循环结束后的荧光信号，通过Ct值和标准曲线对起始模板进行定量分析。该方法特异性强、灵敏度高，可对目的基因进行基因表达量的研究，是目前应用较广的核酸检测技术。

Southern印迹杂交是检测基因组DNA特定片段的通用方法。该方法是利用琼脂糖凝胶电泳分离酶切后的转化子单菌落DNA片段，经碱变性处理原位转移至固相支持物上，再与相应的探针进行杂交，通过放射自显影等方法使阳性DNA条带显色，从而完成对目的基因的鉴定。Northern印迹杂交则用于检测RNA样品，提取的总RNA不需酶切，可直接进行电泳分离。印迹杂交技术特异性强，灵敏度高，经不断发展完善，也在丝状真菌的分子生物学检测中广泛应用[87]。

5 结语

丝状真菌遗传转化系统的成熟促进其基础研究的深化及在工业和医药卫生等领域的应用。通过建立转化系统，将外源的DNA递送至丝状真菌细胞核，整合到基因组，从而研究基因功能、解析分子机制或致病机理，并实现丝状真菌的工业改造。

目前丝状真菌的遗传转化主要存在操作较为复杂、转化率低、同源重组率低、筛选鉴定不够精准高效等问题，PEG介导法、电激法或REMI技术多以原生质体作为受体材料，而丝状真菌原生质体的制备及再生较为困难，是影响转化率的关键因素。PEG介导法是应用较早的遗传转化方法，在1978年第1次成功转化酵母至今的40年中，随着研究人员不断探索和改进该方法在不同菌株中的适用条件，其应用范围越来越广，但在丝状真菌中的转化效率仍远远低于酵母。电激转化法操作简便快捷，除原生质体外还可用于完整细胞，且可以转化大片段外源基因，但该方法需同时使用化学试剂和电场处理受体材料，容易导致细胞死亡。REMI技术具有更强的定向性，目前已被成功应用于基因突变、基因标记、寻找新基因等研究领域[56]，但限制内切酶可能引起DNA损伤，影响转化子的性状。

ATMT技术不需制备原生质体，转化效率高，转化子性状稳定性高，但需要构建双元载体，工作量较大，同时共培养的条件参数等也会影响转化效率。ATMT技术优于其他转化方法的一个突出特点是，T-DNA可以随机地插入到基因组中，为随机突变，因此，能够为正向遗传筛选提供资源[43]。基因枪法和冲击波法转化操作简单且受体

较为广泛，但需要特殊的仪器设备，还未在遗传转化实验中广泛使用。

致突变型及营养缺陷型标记在初期的遗传转化试验中有重要作用，但由于需要额外获取合适的营养缺陷型突变株，而药物抗性标记更加广泛地应用于真菌的遗传转化，但该方法也存在转化子筛选困难，菌株可能产生耐药性等问题。荧光标记检测方便，可通过高通量筛选技术自动化、规模化的快速筛选，但目前在丝状真菌中的应用较为有限。药物抗性标记在丝状真菌基因功能的研究中起重要作用，目前已广泛应用于基因表达载体的构建，或通过同源重组使抗性基因替换目的基因，实现基因的定向敲除，该方法简单方便，对受体菌无特殊要求，但其引入的抗性标记基因可能影响后续实验，同时也容易使菌株产生耐药性。不同的转化筛选方法各有优劣，根据不同真菌生长速度、受体材料制备难度、对化合物敏感程度等的不同选择合适的方法对转化效率有重要影响。

随着分子生物学基础理论及技术的日渐发展，对丝状真菌分子生物学特性的了解也会越来越深入，丝状真菌遗传转化体系将不断完善和创新；也会不断降低有害丝状真菌的危害，拓宽其研究和应用领域，使丝状真菌在人类的生产生活中将发挥越来越重要的作用。

参 考 文 献

[1] Ullah M, Xia L, Xie S, et al. CRISPR/Cas9-based genome engineering: a new breakthrough in the genetic manipulation of filamentous fungi. Biotechnol Appl Biochem, 2020, 67(6): 835-851

[2] Troiano D, Orsat V, Dumont MJ. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. Renew Sustain Energy Rev, 2020, 117: 109472

[3] 宋以梅, 刘晶晶, 高翠娟. 哈茨木霉生物降解木质纤维素研究进展. 山东农业大学学报(自然科学版), 2021, 52(5): 886-892

[4] Keller NP. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(3): 167-180

[5] 杨剑锋, 张园园, 王　娜, 等. 苜蓿根腐病病原菌的分离鉴定及苜蓿品种的抗性评价. 中国草地学报, 2020, 42(3): 52-60

[6] 卢萍, 赵萌莉, 韩国栋. 小花棘豆毒性的危害与利用. 草业科学, 2009, 26(3): 97-101

[7] 呼吉雅, 卢萍, 牛艳芳. 小花棘豆*Embellisia*内生真菌原生质体的制备与再生研究. 生物技术通报, 2015, 31(5): 134-139

[8] Mishra NC, Tatum EL. Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70(12): 3875-3879

[9] 邓大杰, 孟亚南, 邓二杰, 等. 丝状真菌遗传筛选系统的研究及其应用. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1165-1178

[10] Lu P, Li X, Wang S, et al. Saccharopine reductase influences production of swainsonine in *Alternaria oxytropis*. Sydowia, 2020, 73: 69-74

[11] 王维夫. 内生真菌*Alternaria oxytropis* OW7.8 *swnK*基因克隆及功能研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2022

[12] 田琇, 张利, 刘马峰. 细菌自然转化的分子机制及生物学功能研究进展. 微生物学通报, 2019, 46(7): 1723-1730

[13] Nevoigt E, Fassbender A, Stahl U. Cells of the yeastSaccharomyces cerevisiae are transformable by DNA under non-artificial conditions. Yeast, 2000, 16(12): 1107-1110

[14] Margolin BS, Freitag M, Selker EU. Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. Fungal Genet Rep, 1997, 44(1): 34-36

[15] Schuster A, Bruno KS, Collett JR, et al. A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. Biotechnol Biofuels, 2012, 5(1): 1

[16] Ito H, Fukuda Y, Murata K, et al. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J Bacteriol, 1983, 153(1): 163-168

[17] Lichius A, Ruiz DM, Zeilinger S. Genetic transformation of filamentous fungi: achievements and challenges// NEVALAINEN H. Grand challenges in fungal biotechnology. Cham: Springer, 2020: 123-164

[18] 陈清霞, 江贤章, 刘锦清, 等. 卷枝毛霉孢子原生质体的制备与再生. 生物加工过程, 2011, 9(2): 49-52

[19] Case ME, Schweizer M, Kushner SR, et al. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5259-5263

[20] 卢明锋, 张月杰. 丝状真菌AL18的原生质体制备和再生条件的优化. 生物技术, 2012, 22(3): 86-90

[21] 韩小路, 白静科, 张玮, 等. PEG介导的苹果果生刺盘孢*Colletotrichum fructicola*原生质体转化. 西北农业学报, 2016, 25(3): 442-449

[22] Bos CJ, Slakhorst SM. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores. Can J Microbiol, 1981, 27(4): 400-407

[23] Aleksenko A, Clutterbuck AJ. Autonomous plasmid replication in *Aspergillus nidulans*: AMA1 and MATE elements. Fungal Genet Biol, 1997, 21(3): 373-387
[24] 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 Microbiol Methods, 2017, 135: 26-34
[25] Katayama T, Nakamura H, Zhang Y, et al. Forced recycling of an AMA1-based genome-editing plasmid allows for efficient multiple gene deletion/integration in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Appl Environ Microbiol, 2018, 85(3): e01896-18
[26] Shen H, Li Z. DNA double-strand break repairs and their application in plant DNA integration. Genes, 2022, 13(2): 322
[27] Kaniecki K, De Tullio L, Greene EC. A change of view: homologous recombination at single-molecule resolution. Nat Rev Genet, 2018, 19(4): 191-207
[28] 李金根, 刘倩, 刘德飞, 等. 丝状真菌代谢工程研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1637-1658
[29] 杨丽芸, 陈丽娇, 李善刚. CRISPR/Cas9系统诱导DNA断裂的修复机制研究进展. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(3): 500-511
[30] 张小娟, 文莹. *Ku*基因在微生物中的研究进展. 生物技术进展, 2011, 1(1): 26-31
[31] 刘倩, 李金根, 张晨阳, 等. 工业丝状真菌基因组编辑技术研究进展. 合成生物学, 2021, 2(2): 256-273
[32] Li D, Tang Y, Lin J, et al. Methods for genetic transformation of filamentous fungi. Microb Cell Fact, 2017, 16(1): 168
[33] Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. Transformation of yeast. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(4): 1929-1933
[34] Zhao F, Sun C, Liu Z, et al. Multiplex base-editing enables combinatorial epigenetic regulation for genome mining of fungal natural products. J Am Chem Soc, 2023, 145(1): 413-421
[35] Zou G, Xiao M, Chai S, et al. Efficient genome editing in filamentous fungi via an improved CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein method facilitated by chemical reagents. Microb Biotechnol, 2020, 14(6): 2343-2355
[36] 陈莹莹, 王亚楠, 吕斌娜, 等. 粉红螺旋聚孢霉67-1短链脱氢酶基因*CrSdr*功能研究. 中国生物防治学报, 2021, 37(4): 749-760
[37] Amalamol D, Ashwin NMR, Lakshana KV, et al. A highly efficient stratagem for protoplast isolation and genetic transformation in filamentous fungus *Colletotrichum falcatum*. Folia Microbiol, 2022, 67(3): 479-490
[38] Karube I, Tamiya E, Matsuoka H. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse. FEBS Lett, 1985, 182(1): 90-94
[39] 沈思巧, 杨培龙, 曲音波, 等. 基于电击策略的三孢布拉霉遗传转化体系的优化及应用. 食品与发酵工业, 2022, 48(20): 15-28
[40] Balabanova LA, Shkryl YN, Slepchenko LV, et al. Development of host strains and vector system for an efficient genetic transformation of filamentous fungi. Plasmid, 2019, 101: 1-9
[41] Yao G, Chen X, Han Y, et al. Development of versatile and efficient genetic tools for the marine-derived fungus *Aspergillus terreus* RA2905. Curr Genet, 2022, 68(2): 153-164
[42] 潘小红, 刘佳宁, 罗锋, 等. 电穿孔法转化齐整小核菌. 微生物学报, 2023, 63(4): 1681-1689
[43] 李俊香, 古勤生. 根癌农杆菌介导的真菌遗传转化研究进展. 江苏农业科学, 2020, 48(3): 43-49
[44] 张震, 杜新法, 柴荣耀, 等. 根癌农杆菌介导丝状真菌遗传转化因素的研究进展. 微生物学杂志, 2007, 27(6): 88-91
[45] 邹嵘, 马嘉楠, 张凤. 根癌农杆菌介导的菌根真菌遗传转化研究进展. 菌物研究, 2021, 19(3): 197-206
[46] Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*.. EMBO J, 1995, 14(13): 3206-3214
[47] Tran VT, Thai HD, Vu TX, et al. An efficient *Agrobacterium*-mediated system based on the *pyrG* auxotrophic marker for recombinant expression in the filamentous fungus *Penicillium rubens*. Biotechnol Lett, 2023, 45(5-6): 689-702
[48] 王一川, 张香香, 王静然, 等. 敲除*Spt7*对黑曲霉生长及菌落形态的影响. 微生物学报, 2023, 63(2): 855-867
[49] Wei TY, Wu YJ, Xie QP, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in the filamentous fungus *Glarea lozoyensis* and its application in manipulating *gloF*. ACS Synth Biol, 2020, 9(8): 1968-1977
[50] 李娜, 曲音波, 杨培龙, 等. 三孢布拉霉遗传转化体系的构建及应用. 食品与生物技术学报, 2021, 40(9): 33-39
[51] 俞咪娜, 胡建坤, 黄磊, 等. 稻曲病菌T-DNA插入突变体5062的插入位点分析. 中国农业科学, 2013, 46(9): 1790-1798
[52] Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, et al. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. Particulate Sci Tech, 1987, 5(1): 27-37
[53] Florencio CS, Brandão FAS, Teixeira MM, et al. Genetic manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* using particles bombardment and *Agrobacterium* mediated transformation. Microbiol Res, 2018, 207: 269-279

[54] Jung KW, Kwon S, Jung JH, et al. Essential roles of ribonucleotide reductases under DNA damage and replication stresses in *Cryptococcus neoformans*. Microbiol Spectr, 2022, 10(4): e0104422
[55] Schmoll M, Zeilinger S. Resistance marker- and gene gun-mediated transformation of *Trichoderma reesei*. Methods Mol Biol, 2021, 2234: 55-62
[56] 姚学勤, 薛　冲, 刘志敏. 限制酶介导整合技术: 一种克隆新基因的新策略. 生物技术通讯, 2009, 20(2): 230-232, 262
[57] Schiestl RH, Petes TD. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(17): 7585-7589
[58] 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. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(3): 1138-1143
[59] He Y, Munir S, Wu Y, et al. *MoNFR*, encoding a putative NADPH-ferrihemoprotein reductase, is required for the pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. Physiol Mol Plant Pathol, 2020, 111: 101504
[60] Miura D, Sugiyama K, Ito A, et al. The PDR-type ABC transporters AtrA and AtrG are involved in azole drug resistance in *Aspergillus oryzae*. Biosci Biotechnol Biochem, 2018, 82(10): 1840-1848
[61] Magaña-Ortíz D, Coconi-Linares N, Ortiz-Vazquez E, et al. A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. Fungal Genet Biol, 2013, 56: 9-16
[62] Rojas-Sánchez U, López-Calleja AC, Millán-Chiu BE, et al. Enhancing the yield of human erythropoietin in *Aspergillus niger* by introns and CRISPR-Cas9. Protein Expression Purification, 2020, 168: 105570
[63] Magaña-Ortíz D, Fernández F, Loske AM, et al. Extracellular expression in *Aspergillus niger* of an antibody fused to *Leishmania* sp. antigens. Curr Microbiol, 2018, 75(1): 40-48
[64] Lenouvel FE, van de Vondervoort P, Visser J. Disruption of the *Aspergillus niger argB* gene: a tool for transformation. Curr Genet, 2002, 41(6): 425-432
[65] Long H, Wang T, Zhang Y. Isolation of *Trichoderma reesei pyrG* negative mutant by UV mutagenesis and its application in transformation. Chem Res Chin Universities, 2008, 24(5): 565-569
[66] Kim SY, Marzluf GA. Transformation of *Neurospora crassa* with the *trp-1* gene and the effect of host strain upon the fate of the transforming DNA. Curr Genet, 1988, 13(1): 65-70
[67] 胡江峰, 刘舒雯, 杨焱, 等. 黑曲霉*pyrG*遗传转化系统的构建及应用. 食品与发酵工业, 2022, 48(2): 15-19
[68] 高育青, 张豪杰, 张丹凤, 等. 米曲霉RIB40高效同源重组和尿苷/尿嘧啶营养缺陷型菌株的构建. 食品工业科技, 2022, 44(1): 200-207
[69] 杨鑫, 何若男, 江贤章, 等. 里氏木霉翻转酶DRS2对木质纤维素降解酶基因表达及分泌的影响. 微生物学报, 2022, 62(4): 1549-1562
[70] He ZM, Price MS, OBrian GR, et al. Improved protocols for functional analysis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. BMC Microbiol, 2007, 7(1): 104
[71] 王猛, 王周雯, 丁一, 等. 根癌农杆菌介导的新暗色柱节孢菌遗传转化. 热带生物学报, 2021, 12(4): 412-418
[72] 陈绮艺, 李晓, 杜文珍, 等. 转录因子PaPho与丝状真菌*Podospora anserina*中磷元素的吸收和利用研究. 微生物学报, 2022, 63(3): 1072-1087
[73] 孙璐, 宋润杰, 路浩, 等. *swnR*基因在金龟子绿僵菌合成苦马豆素中的作用. 畜牧兽医学报, 2021, 52(5): 1439-1446
[74] 王钰, 卢萍, 萨如拉, 等. 内生真菌(*Alternaria oxytropis*)酵母氨酸还原酶基因功能互补株的构建及筛选鉴定. 分子植物育种, 2020, 18(23): 7777-7783
[75] Boeke JD, La Croute F, Fink GR. A positive selection for mutants lacking orotidine-5′-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. Mol Gen Genet, 1984, 197(2): 345-346
[76] Chen J, Lai Y, Wang L, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient genome editing via blastospore-based transformation in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Sci Rep, 2017, 7(1): 45763
[77] Vieira AA, Vianna GR, Carrijo J, et al. Generation of *Trichoderma harzianum* with *pyr4* auxotrophic marker by using the CRISPR/Cas9 system. Sci Rep, 2021, 11(1): 1085
[78] Kelly JM, Hynes MJ. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. EMBO J, 1985, 4(2): 475-479
[79] 涂然, 李世新, 李昊霓, 等. 液滴微流控技术在微生物工程菌株选育中的应用进展. 合成生物学, 2023, 4(1): 165-184
[80] 涂然, 毛雨丰, 刘叶, 等. 工程菌种自动化高通量编辑与筛选研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4162-4179
[81] 杨建花, 苏晓岚, 朱蕾蕾. 高通量筛选系统在定向改造中的新进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2197-2210
[82] Nevalainen H, Peterson R, Curach N. Overview of gene expression using filamentous fungi. Curr Protoc Protein Sci, 2018, 92(1): e55
[83] Wang G, Jia W, Chen N, et al. A GFP-fusion coupling FACS platform for advancing the metabolic engineering of filamentous fungi. Biotechnol Biofuels, 2018, 11(1): 232

[84] Vlaardingerbroek I, Beerens B, Shahi S, et al. Fluorescence assisted selection of transformants (FAST): using flow cytometry to select fungal transformants. Fungal Genet Biol, 2015, 76: 104-109

[85] Luu XC, Shida Y, Suzuki Y, et al. A novel high-throughput approach for transforming filamentous fungi employing a droplet-based microfluidic platform. New Biotechnol, 2022, 72: 149-158

[86] 李岑, 刘松, 堵国成. 黑曲霉转化系统的优化及重组菌株高效筛选. 食品与发酵工业, 2022, 48(3): 1-8

[87] 王越, 李雅凝, 曲晓磊, 等. 丝状真菌遗传转化体系及筛选技术的研究进展. 中国林副特产, 2020(6): 69-75