



电穿孔法转化齐整小核菌

潘小红¹, 刘佳宁¹, 罗锋^{2*}, 常鹏^{1*}

1 西南大学资源环境学院, 重庆 400715

2 能源生物资源开发重庆市重点实验室, 重庆 400715

潘小红, 刘佳宁, 罗锋, 常鹏. 电穿孔法转化齐整小核菌[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1681-1689.

PAN Xiaohong, LIU Jianing, LUO Feng, CHANG Peng. Electroporation-mediated transformation of *Sclerotium rolfsii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1681-1689.

摘要: 【目的】建立齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)的电穿孔法转化方案, 以实现经济、快速地遗传转化。【方法】将齐整小核菌 *gpd* 基因启动子控制的 *basta* 抗性基因 *bar* 与红色荧光蛋白基因 DsRed Max 组成的融合蛋白表达盒, 通过电击转入野生型齐整小核菌细胞中, 筛选转化子并进行 PCR 与荧光观察验证。在此基础上, 测试了不同电压、脉冲时间、外源 DNA 片段与受体细胞比例等条件下的转化效率, 以得到优化的电转化参数。最后, 采用优化的条件, 尝试转化多种抗性基因与荧光蛋白融合表达盒以测试其可用性。【结果】成功得到了 *bar*、*sdhR* 与 *aphI* 基因的转化子。【结论】成功建立了优化的齐整小核菌电穿孔转化法。优化的参数条件为电压 2 kV/cm、脉冲时间 1 ms、DNA/匀浆细胞比例 3 μg/300 mg, 电击 1 次。

关键词: 齐整小核菌; 丝状真菌; 电穿孔法; 转化

资助项目: 国家自然科学基金(32100092); 重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX0392)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32100092) and the Chongqing Natural Science Foundation (cstc2021jcyj-msxmX0392).

*Corresponding authors. CHANG Peng, Tel: +86-23-68250994, E-mail: chang1986@swu.edu.cn;

LUO Feng, Tel: +86-23-68250109, E-mail: vanlott@hotmail.com

Received: 2022-09-12; Accepted: 2022-11-27; Published online: 2022-12-22

Electroporation-mediated transformation of *Sclerotium rolfsii*

PAN Xiaohong¹, LIU Jianing¹, LUO Feng^{2*}, CHANG Peng^{1*}

¹ College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

² Chongqing Key Laboratory of Bio-Resource Development for Bioenergy, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] To establish an electroporation-mediated transformation method for the economical and rapid genetic transformation of *Sclerotium rolfsii*. [Methods] The fusion protein expression cassette composed of the basta-resistant gene *bar* and the red fluorescent protein gene DsRed Max, controlled by the promoter of the native *gpd* gene, was transferred into the wild-type cells of *S. rolfsii*. The transformants were screened and validated by PCR and fluorescence observation. Further, we tested the transformation efficiencies under the different conditions of field strength, pulse time, and the ratio of foreign DNA fragments to recipient cells, to figure out the optimized electroporation parameters. Finally, we transformed the expression cassettes fusing multiple resistance genes and DsRed under optimized conditions to test their availabilities. [Results] The transformants carrying gene *bar*, *sdhR*, and *aphI* were obtained successfully. [Conclusion] The electroporation-mediated transformation method of *S. rolfsii* was successfully established. The optimized transformation parameters were field strength of 2 kV/cm, pulse time of 1 ms, DNA/homogenized cell ratio of 3 µg/300 mg, and pulse once.

Keywords: *Sclerotium rolfsii*; filamentous fungi; electroporation; transformation

齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)是一种丝状植物致病真菌,可以感染植物产生“白绢病”^[1]。该菌没有明显的宿主偏好性,能够寄生于数百种植物,其中包括一些重要的农作物,如马铃薯、番茄、玉米、小麦、烟草、棉花等,从而导致经济作物明显减产^[2]。在工业上,齐整小核菌主要用于发酵生产硬葡聚糖(scleroglucan)^[3]。硬葡聚糖是一种非离子型高分子多聚物,具有多种优良的理化特性,广泛应用于医疗、食品、石油、美容等多种行业,具有很高的经济价值^[4]。齐整小核菌还产生具有抗癌活性的凝集素,能抑制人结肠癌、乳腺癌和卵巢癌细胞增殖^[5]。因此齐整小核菌是一种具有重要开发潜力的工业菌株。

然而,齐整小核菌分子生物学层面的研究却近乎停滞不前,主要原因就是缺乏有效的遗传转化方法和可用DNA元件(抗性基因、报告基

因、启动子等)及遗传操作工具质粒系统。目前已报道的转化方法主要有聚乙二醇介导的原生质体转化法(protooplast mediated transformation, PMT)^[6]和本研究组发表的根癌农杆菌介导转化法(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)^[7]2种。ATMT能够将长片段DNA插入到齐整小核菌基因组中进行表达,但是其包括质粒转化农杆菌、农杆菌筛选和鉴定、农杆菌与真菌共培养、农杆菌洗涤等多个步骤,周期较长,工作量大。PMT方法中原生质体的制备需要的溶壁酶成本高、效率低,原生质体制备和再生的周期也较长。因此当我们想要为齐整小核菌准备DNA元件库时,就需要一种简便、快速、低成本遗传转化方法,可以用于快速转化与测试DNA元件和简单DNA结构在齐整小核菌中的功能。电穿孔转化法的特点刚好满足这一需求。

电穿孔转化法具有简单、快捷等特点, 已经在细菌、酵母、哺乳动物细胞等遗传转化方面得到广泛应用^[8-10], 在丝状真菌(filamentous fungi)转化中也有报道^[11-12]。因此, 在本研究中我们建立了齐整小核菌的电击转化方案, 同时优化了电转化相关的参数条件, 实现了快速、简便的齐整小核菌转化。使用该方法, 我们尝试了 5 种常用的杀菌剂抗性基因表达盒电转化齐整小核菌, 成功得到了 3 种抗性的转化子, 并测试了转化子的遗传稳定性。本研究建立的齐整小核菌电穿孔转化法丰富了其遗传转化技术体系, 有助于其分子生物学相关研究的开展。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基

齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*, 菌株编号 NBRC 5253)购自日本技术评价研究所生物资源中心(Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, NBRC)。齐整小核菌培养主要使用的液体 YMB 培养基(1 L): 酵母提取物 3 g, 麦芽提取物 3 g, 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g。YMB 培养基加入 1.5%琼脂即为 YMA 固体培养基。采用 115 °C 灭菌 15 min。克隆所用大肠杆菌 Trans10 感受态(CD101)购自北京全式金生物技术公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

电穿孔仪(MicroPulser™)购于 BIO-RAD 公

司, 使用 2 mm 电转杯。PCR 仪购于 Thermo Fisher 公司, 型号为 Veriti™ 96-Well Thermal Cycler。化学发光凝胶成像分析系统购于 BIO-RAD 公司, 型号为 Chemidoc XRS+。正置荧光显微镜为尼康公司的 NIKON Eclipse 80i。BM2000 DNA Marker (MD101)、2×Taq PCR MasterMix (MT201)、高纯度质粒小量提取试剂盒(DP102)购于北京博迈德生物公司。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物纯化试剂盒(B518141)、氨苄青霉素(A610028)、硫酸卡那霉素(A506636)、10%草铵膦 basta (A614229)、萎锈灵 Carboxin (A500271)、潮霉素 B (A600230)、遗传霉素 G418 (A600958)等购于生工生物工程(上海)股份有限公司。中生菌素(12%粉剂)购自凯立生物。

1.1.3 引物、质粒及测序

本研究使用的质粒见表 1, 质粒全序列数据已上传至国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC), 编号 NMDCX0000150 (<https://nmdc.cn/resource/attachment/detail/NMDCX0000150>)。质粒克隆构建采用基于 T5 核酸外切酶的 DNA 组装方法^[13]。本研究所使用的引物(HAP 纯化)以及所有的测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。引物及其序列见表 2。

1.2 齐整小核菌匀浆细胞制备

取 5 个新鲜的齐整小核菌菌丝块置于 100 mL YMB 培养基中, 28 °C、150 r/min 培养 3 d, 挑出菌丝球到无菌的 50 mL 离心管(预先称重)中,

表 1 本研究所用质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmid	Characterization	Resource
pFV54s	P _{gpd} -DsRed Max- <i>bar</i> -T _{CaMV} , KanR (basta resistance)	This lab
pSrV23	P _{gpd} -DsRed E2- <i>sdhR</i> -T _{CaMV} , KanR (carboxin resistance)	This study
pSrV24	P _{gpd} -DsRed E2- <i>aphI</i> -T _{CaMV} , KanR (G418 resistance)	This study
pSrV25	P _{gpd} -DsRed E2- <i>hph</i> -T _{CaMV} , KanR (hygromycin B resistance)	This study
pSrV26	P _{gpd} -DsRed E2-NAT1-T _{CaMV} , KanR (zhongshengmycin resistance)	This study

表 2 本研究用于扩增的引物

Table 2 Primers used for amplification in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Description
TP24	TGAAGAGGGCAGATAAAAAGATTGA	Amplification of fusion protein cassette
TP25	AACACATTGCGGACGTCTCT	
op679	ATGGTGAGCAAGGGCATGGAC	Validation of pFV54s
op433	CTCAGCCGAATTAATTCGGG	
L857	AGCGAATAGATCTCGGTGACG	Validation of pFV54s
op580	ATGGACTCCACCGAAAACGTCA	
TP7	GATCTGGATTTTAGTACTGGATTTTGGTT	Validation of pSrV23
L25	AATGCAGTCTCTGCTTACAGCCAC	
TP44	GACATAAGAGTTGGCGTGCC	Validation of pSrV24
L272	GTAACCGAAGTCGGGCTGGAA	

加入 30 mL 无菌水上下颠倒洗涤, 9 000×g 离心 5 min, 去上清。再加入 30 mL 无菌水重悬, 用高速匀浆机 FSH-2A (江苏金坛新宝仪器厂) 将菌丝匀浆至无明显的大块菌丝。9 000×g 离心 5 min, 去除上清。加入 30 mL 4 °C 预冷的无菌超纯水进行洗涤, 9 000×g 离心 5 min 去除上清, 重复洗涤 3 次。尽可能地去除上清, 再次称重并计算出菌丝的湿重。加入预冷的 10% 甘油(超纯水配制)重悬细胞, 使其菌丝最终密度为 200 mg/mL, 置于冰上备用。

1.3 外源 DNA 制备和电穿孔转化

所有转化用的 DNA 片段均以对应质粒为模板, 采用 2×Taq PCR MasterMix 和引物 TP24、TP25 进行扩增。得到的 PCR 产物, 使用 PCR 产物回收试剂盒进行回收。用 NanoDrop 2000 微量分光光度计(ThermoFisher)测定浓度, 储存于-20 °C 备用。

每 500 μL 真菌匀浆细胞中加入 2 μg 待转化 DNA 片段, 用枪头充分吹打混匀。然后转入 0.4 cm 规格的电转杯中, 进行电击。初始设置脉冲时间为 2 ms, 电压设置分别为 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8 kV/cm 等。待电击完成后, 迅速将菌丝转入 50 mL YMB 液体培养基(含有浓度 50 μg/mL 的卡那霉素以防止细菌污染)中

28 °C、150 r/min 进行复苏培养。复苏 24 h 后加入相应的杀菌剂进行筛选, 培养 7–10 d 可得到候选转化子菌丝球。

1.4 转化子的 PCR 鉴定与荧光观察

将候选转化子菌丝球外侧菌丝切取一部分, 转移到 24 孔细胞培养板, 并加入含相应杀菌剂的 1 mL YMB 培养基, 静置培养 3–5 d。待菌丝长满培养孔, 取出一半菌丝用于基因组 DNA 提取。提取方法为盐酸胍法^[14]。然后选用相应的引物(表 2), 使用 2×Taq PCR MasterMix (MT201)进行标准 PCR 反应后, 再经电泳分析是否为转化子。另一半菌丝加入 200 μL 无菌水后, 用电动组织研磨器[生工生物工程(上海)股份有限公司, G50]进行轻度研磨, 然后使用正置荧光相差显微镜(NIKON Eclipse 80i)进行荧光观察, 滤光器为 G-2A (RFP), RFP 拍照曝光时间为 600–800 ms。

2 结果与分析

2.1 电穿孔法转化齐整小核菌

为了测试电穿孔法转化齐整小核菌的可行性, 我们选用了之前本实验室报道的可以经根癌农杆菌介导转化齐整小核菌并成功表达红色荧光蛋白的质粒 pFV54s^[7], 作为初始转化的外

源 DNA 模板。其 DNA 组成结构为齐整小核菌 GPD 基因启动子控制的红色荧光蛋白 DsRed Max 与 basta 抗性基因融合表达盒，长度约为 2.1 kb (图 1A)。

电击转化时，我们首先考虑了电压的影响。因此在待转化匀浆细胞为 500 μ L (约 100 mg)，外加 DNA 为 2 μ g，脉冲时间为 2 ms 的条件下，设置了 0.5–8.0 kV/cm 的梯度分别进行电转化。电击后的菌丝在液体培养基中进行复苏和筛选后，我们在多个电压都得到了若干候选转化子 (图 1B)。转化子菌丝在液体筛选培养基中呈现圆球状，而野生型菌丝被杀菌剂抑制，无明显生长。将转化子菌丝球的外侧新生菌丝挑取一部分接种到固体筛选平板上培养，结果如图 1C 所示，部分转化子有明显生长，而部分转化子

生长非常缓慢。这可能是由于不同转化子中外源 DNA 随机整合到不同的基因组位点，导致了抗性基因表达水平差异较大而引起了抗性条件下生长速度的明显不同。

从液体培养的转化子中挑选较大的 13 个转化子菌丝球，使用引物 op433 和 op679 进行 PCR 鉴定，其中 6 个转化子得到了与阳性对照一致的预期条带。同时对 PCR 产物进行了测序，显示确为转入的外源 DNA 片段。从而确认了候选转化子的 PCR 阳性率约为 46% (图 1D)。然后对 PCR 阳性的转化子进行了荧光观察 (图 1E)，可以看到在相同的曝光条件下，野生型菌丝没有红色荧光，而转化子菌丝有明显的红色荧光，对比明显。这些结果证明了外源 DNA 通过电穿孔转化法成功整合到齐整小核菌基因组，并成功表达。

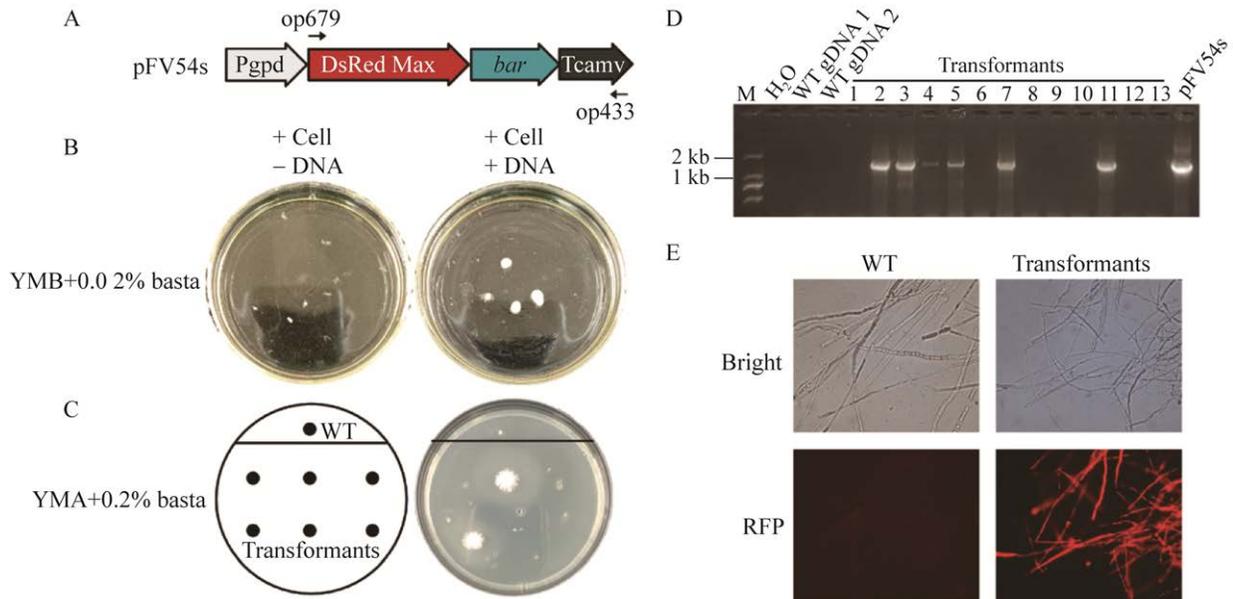


图 1 电穿孔法转化齐整小核菌

Figure 1 Electroporation-mediated transformation of *Sclerotium rolfsii*. A: Structure of foreign DNA to be transformed. DsRed Max: Red fluorescent protein; Pgpd: The native promoter of *S. rolfsii* *gpd* gene; Tcamv: CaMV 35s terminator; *bar*: Basta resistance gene. Diagnostic PCR primers are marked with arrows. B: Screening of transformants in liquid YMB+0.02% basta. C: Screening of transformants on YMB+0.2% basta plates. D: Diagnostic PCR of transformants. M: BM2000 DNA marker. WT gDNA 1: gDNA of wild-type cells without electroporation; WT gDNA 2: gDNA of electroporated cells without DNA. E: Fluorescence observation of transformants.

2.2 电穿孔转化法的条件优化

为了更加稳定、高效地得到更多的转化子,我们对电穿孔转化法的电压、脉冲时间、DNA/湿重菌丝比例等 3 个重要影响因素进行了条件优化。

首先,设置电压分别为 1–5 kV/cm,脉冲时间为 2 ms, DNA/湿重菌丝比例分别为 2 μ g/300 mg,电击次数为 1 次。电转化结果显示电压为 2 kV/cm 时转化子最多(68 个)。然后,固定电压条件为 2 kV/cm, DNA/湿重菌丝比例分别为 2 μ g/300 mg,脉冲时间分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 ms。电转化结果显示脉冲时间为 1 ms 时转化子最多(77 个)。最后,固定电压条件为 2 kV/cm,脉冲时间为 1 ms, DNA/湿重菌丝比例分别为 1、2、3、6 μ g/300 mg。电转化结果显示 DNA/湿重菌丝比例为 3 μ g/300 mg 时转化子最多(262 个),见表 3。此外,我们同时还进行了同一电击条件电击 2 次或 3 次的实

表 3 电穿孔转化法的条件优化与结果

Table 3 Condition optimization and results of electroporation

Voltage (kV/cm)	Time constant (ms)	DNA/cell weight	Number of transformants
1	2.0	2 μ g/300 mg	2
2	2.0	2 μ g/300 mg	68
3	2.0	2 μ g/300 mg	16
4	2.0	2 μ g/300 mg	6
5	2.0	2 μ g/300 mg	1
2	1.0	2 μ g/300 mg	77
2	1.5	2 μ g/300 mg	5
2	2.0	2 μ g/300 mg	2
2	2.5	2 μ g/300 mg	28
2	3.0	2 μ g/300 mg	1
2	4.0	2 μ g/300 mg	3
2	1.0	1 μ g/300 mg	79
2	1.0	2 μ g/300 mg	108
2	1.0	3 μ g/300 mg	262
2	1.0	6 μ g/300 mg	140

验,结果发现在所有条件中,电击次数超过 1 次后,均无转化子生长。这很可能是因为多次电击对细胞造成了过度损伤以致细胞存活率太低而严重影响了转化效率。

以上结果表明,电击电压为 2 kV/cm、脉冲时间为 1 ms、DNA/湿重菌丝为 3 μ g/300 mg、电击次数为 1 次时,通过电穿孔转化法得到的候选转化子数量最多。

2.3 多种抗性基因的电转化测试

在真菌遗传操作中常常需要使用不同的杀菌剂抗性基因。因此我们利用优化后的齐整小核菌电转化方案,测试了 5 种杀菌剂(basta、carboxin、hygromycin B、G418 和中生菌素)对应的抗性基因在齐整小核菌中是否有功能。

首先,我们测试了齐整小核菌对这 5 种杀菌剂的敏感性(数据已上传至国家微生物科学数据中心,编号 NMDCX0000150,见补充材料 S1)。结果表明对于齐整小核菌, basta 的有效抑制浓度为 0.02% (YMB)和 0.2% (YMA), carboxin 的有效抑制浓度为 40 μ g/mL (YMB)和 20 μ g/mL (YMA),潮霉素 B 的有效抑制浓度为 40 μ g/mL (YMB)和 200 μ g/mL (YMA), G418 的有效抑制浓度为 20 μ g/mL (YMB)和 >500 μ g/mL (YMA),中生菌素的有效抑制浓度为 150 μ g/mL (YMB)和 1.6 mg/mL (YMA)。

然后我们在 pFV54s 的基础上,构建了红色荧光蛋白 DsRed 融合另外 4 种抗性基因的质粒,质粒主要结构见图 2A。其中, *bar* 基因是 basta 抗性基因, *sdhR* 是 carboxin 抗性基因, *aphI* 是 G418 抗性基因, *hph* 是潮霉素 B 抗性基因, NAT1 是中生菌抗性基因。用高保真酶扩增抗性基因表达片段并使用电穿孔转化法将其转入齐整小核菌菌丝。

结果经过 5–7 d 的筛选培养,我们只得到了 *bar*、*sdhR* 和 *aphI* 基因的转化子菌丝(图 2B)。

其中, pSrV23 质粒(*sdhR*)的转化得到的转化子球个数比 pFV54s (*bar*)和 pSrV24 (*aphI*)明显更多。而 *hph* 和 NAT1 基因的转化菌丝培养 14 d 后, 仍没有菌丝生长的迹象。我们反复电转化多次, 始终没有得到转化子。

之后, 为了测试转化子的遗传稳定性, 我们将得到的部分生长较好的转化子取部分菌丝匀浆后进行传代培养和 PCR 鉴定(图 2C–2E)。然后将其中确定阳性的转化子择生长最好的一个进行传代, 且对每一代菌丝都进行 PCR 鉴定。结果发现, *bar* 基因第一代转化子可以在抗性条件下正常生长, 但是第二代生长极其缓慢, 最终放弃(图 2C)。*sdhR* 转化子则可以传至第 4 代

(图 2D)。*aphI* 转化子只可以传至第 2 代, 第 3 代也因为生长极其缓慢而放弃(图 2E)。

同时, 我们将每一代转化子在同一条件下进行了红色荧光观察, 结果如图 3 所示。*bar* 基因转化子第 1 代荧光信号明显, 第 2 代无明显生长而无法观察。*sdhR* 基因转化子传代至第 3 代都生长正常且荧光蛋白表达较好; 但是菌丝在第 4 代生长较艰难, 荧光信号明显减弱, 第 5 代则无法生长。因为 *sdhR* 基因仍然可以检测到(图 2D), 所以这可能是因为 *sdhR* 基因的表达逐渐下调导致的。*aphI* 基因转化子第 2 代荧光信号明显, 第 3 代无明显生长而无法观察。这些结果说明齐整小核菌对不同抗性基因的沉

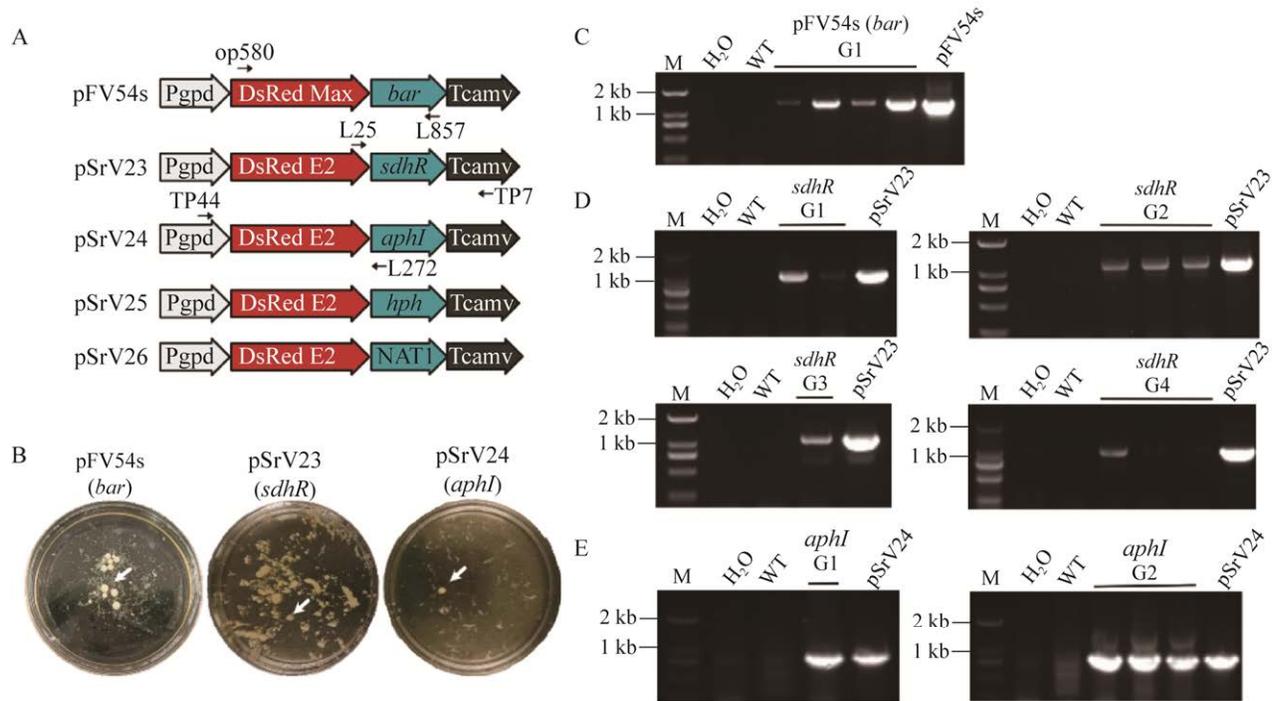


图 2 多种抗性基因转化齐整小核菌

Figure 2 Transformation of *Sclerotium rolfsii* with multiple resistance genes. A: Structures of resistance gene cassettes. DsRed Max & E2: Red fluorescent protein; P_{gpd}: The native promoter of *S. rolfsii* *gpd* gene; T_{camv}: CaMV 35s terminator; *bar*: Basta resistance gene; *sdhR*: Carboxin resistance gene; *hph*: Hygromycin B resistance gene; NAT1: Zhongshengmycin resistance gene. Diagnostic PCR primers are marked with arrows. B: Screening of transformants in appropriate medium. C, D, E: Diagnostic PCR of passaged transformants. M: DL2000 DNA Marker. WT: gDNA of wild-type cells. G1/2/3/4: Generations of plated cells.

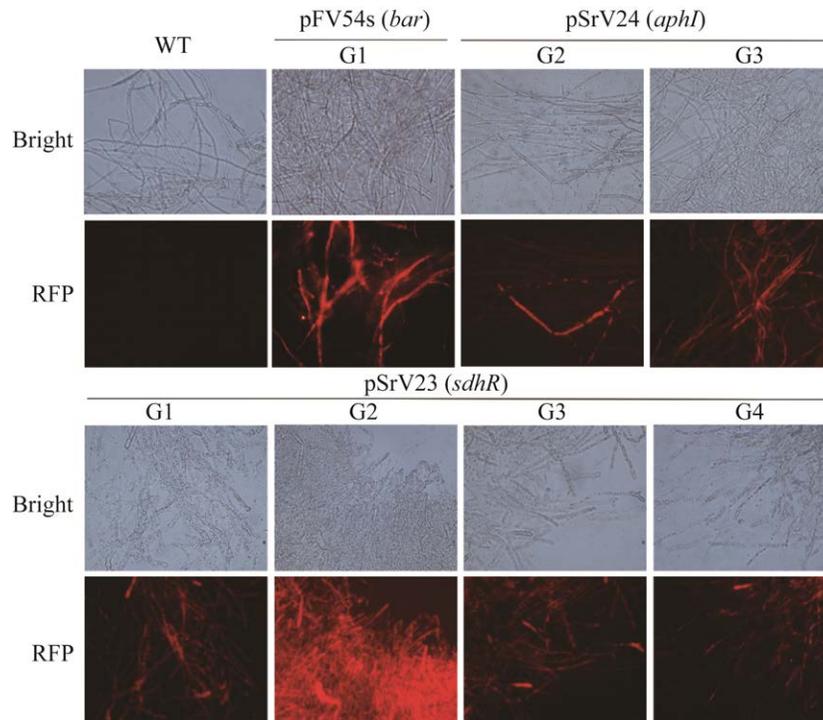


图 3 不同抗性基因转化子传代培养菌丝的红色荧光检测

Figure 3 Red fluorescent observation of passaged transformants with different resistance genes.

默效应可能不同。这些结果与此前我们在根癌农杆菌转化齐整小核菌中观察到的抗性基因沉默现象一致^[7]。其中 *sdhR* 基因的表达窗口期较长，适合作为齐整小核菌遗传转化的首选筛选基因。

此外，我们还对得到的部分转化子进行了抗性强弱的检测(数据已上传至国家微生物科学数据中心，编号 NMDCX0000150，见补充材料 S2)。结果发现，*bar* 转化子菌丝在 basta 浓度为 0.03% 时仍能够呈球状生长，而野生型菌丝在浓度为 0.01% 的培养基中即无法生长。*sdhR* 转化子菌丝能够在 carboxin 浓度 20–60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度中生长，同时野生型菌丝则完全无法生长。*aphI* 转化子菌丝在 G418 浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时生长较好，但在浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上则生长艰难。

3 讨论与结论

本研究成功建立了齐整小核菌的电击转化

方法。电击转化法与根癌农杆菌介导转化法相比，省略了根癌农杆菌质粒转化、筛选、诱导和共培养等耗时约一周的过程；与原生质体转化方法相比，省略了原生质体制备与细胞壁再生等过程，因而更加快速、简便。电击转化法也有一定的缺点，例如不适合进行大片段 DNA 转化真菌细胞。因此，电击转化法并非用于替代这 2 种方法，而是一种有益的补充，例如用于在小片段 DNA 结构中检测齐整小核菌各种启动子、报告基因、内含子等重要元件的活性，从而快速为齐整小核菌建立可用的功能元件库。

本研究还对转化条件进行了一定的优化，得到了较高的转化效率。必须注意的是，由于齐整小核菌的多核、丝状生长和多糖丰富等特性，以及匀浆细胞的研磨程度难以统一等问题，造成了齐整小核菌即使在同一条件下的平行转化的转化率也可以差异巨大(图 2B)，而不能如

细菌和酵母转化那样有比较一致的结果。我们认为选择最好结果的条件才能真正有助于综合确定较佳的条件。因此,表 3 的结果是我们转化中得到的最佳结果而非同一条件下的平均结果。我们也推荐转化时最好同时做 2-3 份平行组。

本研究中电击转化所使用的 DNA 片段较小(约 2.1 kb)。考虑到长的 dsDNA 可能在细胞内被内源核酸酶剪切导致降解或重组,我们认为电击转化比较适合用于短片段遗传元件的快速功能测试,如启动子活性、抗性基因和报告基因活性等。这样比 ATMT 和 PMT 方法省时省力。如果需要转化长片段(例如代谢工程质粒),ATMT 方法仍是首选。此外,如果使用 ssDNA,电转化理论上应该可以用于长片段的转化,因为 ssDNA 可以抗内源核酸酶剪切。

我们将 5 种杀菌剂抗性基因通过电穿孔转化法转入齐整小核菌中,只得到了 *bar*、*aphI* 和 *sdhR* 基因的转化子。这并不意味着潮霉素 B 和中生菌素抗性基因不能用于齐整小核菌。因为这可能只是基因编码的表达效率太低。转化子遗传稳定性检测发现这 3 种转化子的稳定性也有明显差别,说明了在齐整小核菌中应用的抗性基因和报告基因等外源基因可能都需要经过密码子优化或插入内含子改造等手段,使得其不被胞内防御机制识别和破坏,才能长期稳定表达。这些改造工作也将有助于明显提高所有齐整小核菌转化方法的转化效率,因为可以提高筛选浓度,从而避免假阳性克隆。此外,通过基因编辑,构建营养缺陷型起始菌株(如 *Δura3* 等)并进行营养缺陷型筛选可能比抗性筛选更加适合齐整小核菌。

参考文献

- [1] LIAMNGEE K, HOSEA ZY, OCHE OD. *Sclerotium rolfii*: causative organism of southern blight, stem rot, white mold and sclerotia rot disease[J]. *Annals of Biological Research*, 2015, 6(11): 78-89.
- [2] PUNJA ZK. *Sclerotium (Athelia) rolfii*, a pathogen of many plant species[A]//Genetics of Plant Pathogenic Fungi[M]. Amsterdam: Elsevier, 1988: 523-534.
- [3] SURVASE SA, SAUDAGAR PS, SINGHAL RS. Production of scleroglucan from *Sclerotium rolfii* MTCC 2156[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(8): 989-993.
- [4] VIÑARTA SC, MOLINA OE, FIGUEROA LIC, FARIÑA JI. A further insight into the practical applications of exopolysaccharides from *Sclerotium rolfii*[J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(5): 619-629.
- [5] CHACHADI VB, PUJARI R, SHASTRY P, SWAMY BM, INAMDAR SR. *Sclerotium rolfii* lectin induces opposite effects on normal PBMCs and leukemic Molt-4 cells by recognising TF antigen and its variants as receptors[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2020, 37(2): 251-261.
- [6] SCHMID J. Genetics of scleroglucan production by *Sclerotium rolfii*[D]. Berlin: Doctoral Thesis of der Technischen Universität Berlin, 2011.
- [7] LI ML, CHANG P, PAN XH, IMANAKA T, IGARASHI Y, LUO F. Efficient expressions of reporter genes in the industrial filamentous fungus *Sclerotium rolfii* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Fungal Biology*, 2020, 124(11): 932-939.
- [8] DOWER WJ, MILLER JF, RAGSDALE CW. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(13): 6127-6145.
- [9] HIGGINS DR, STRATHERN JN. Electroporation-stimulated recombination in yeast[J]. *Yeast (Chichester, England)*, 1991, 7(8): 823-831.
- [10] OSUMI N, INOUE T. Gene transfer into cultured mammalian embryos by electroporation[J]. *Methods*, 2001, 24(1): 35-42.
- [11] CHAKRABORTY BN. Electroporation mediated DNA transformation of filamentous fungi[A]//Fungal Biology[M]. Cham: Springer International Publishing, 2015: 67-79.
- [12] KAPOOR M. Gene transfer by electroporation of filamentous fungi[A]//Electroporation Protocols for Microorganisms[M]. New Jersey: Humana Press, 2003: 279-290.
- [13] XIA YZ, LI K, LI JJ, WANG TQ, GU LC, XUN LY. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(3): e15.
- [14] COX RA. The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids[J]. *Methods in Enzymology*, 1968, 12: 120-129.