

# 致病烟曲霉新基因 *Afu4g13170* 生孢致毒相关性初步研究

刘增然<sup>1\*</sup> 张光一<sup>1</sup> YU Jae-Hyuk<sup>2\*</sup>

(1. 河北经贸大学 生物科学与工程学院 河北 石家庄 050061)

(2. 美国威斯康星大学 农业与生命科学学院 麦迪逊 53706)

**摘要:**【目的】对烟曲霉 *Afu4g13170* 基因功能进行初步研究。【方法】利用 Double-joint PCR 方法和一步基因敲除技术, 构建 *Afu4g13170* 基因缺失突变株。【结果】序列比对表明烟曲霉 *Afu4g13170* 蛋白与构巢曲霉 *Ani04163* 蛋白和新型隐球菌 *Gib2* 蛋白的氨基酸序列相似性为 88.6%; 表型分析表明基因破坏使突变株生长迟缓、梗基伸长、孢子分化能力下降, 产孢推迟、产孢量减少, 色素产生量降低; 色谱分析显示基因缺失突变株的产毒能力下降。【结论】烟曲霉 *Afu4g13170* 基因可以作为控制曲霉致毒的一个靶位点。

**关键词:** 基因破坏, Double-joint PCR, 烟曲霉, 毒素控制, 表型分析

## The function of the *Afu4g13170* gene in conidiation and gliotoxin production of pathogenic *Aspergillus fumigatus*

LIU Zeng-Ran<sup>1\*</sup> ZHANG Guang-Yi<sup>1</sup> YU Jae-Hyuk<sup>2\*</sup>

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang, Hebei 050061, China)

(2. College of Agricultural and Life Sciences, University of Wisconsin, Madison 53706, USA)

**Abstract:** [Objective] The function of the uncharacterized gene *Afu4g13170* in *Aspergillus fumigatus* was ascertained. [Methods] Double-joint PCR method and one-step gene deletion technique were used to generate the *A. fumigatus*  $\Delta$ *Afu4g13170* mutant. [Results] Amino acid sequence alignment shows that the predicated *Afu4g13170* protein has a similarity of 88.6% to

基金项目: 河北省留学人员科技活动择优资助项目; 河北省自然科学基金项目(No. C2011208028)

\*通讯作者: Tel: 86-311-87655680; 信箱: liuzengran@163.com, jyul@wisc.edu

收稿日期: 2011-07-04; 接受日期: 2011-09-20

Gib2 protein in *Cryptococcus neoformans* and Ani04163 protein in *A. nidulans*. The phenotypic analysis indicated that deletion of *Afu4g13170* gene results in growth defect and incomplete development of phialides with elongated metulae, delayed and reduced sporulation, and less pigment production. Chromatographic analysis suggested that gliotoxin production is blocked partly by knocking out the *Afu4g13170* gene. [Conclusion] *Afu4g13170* gene may be used as one of target sites to control the virulence of *A. fumigatus*.

**Keywords:** Gene deletion, Double-joint PCR, *A. fumigatus*, Toxin control, Phenotypic analysis

致病性曲霉通过空气传播, 易污染花生和玉米制品及动物青储饲料, 使食品饲料的营养价值降低, 导致食品安全隐患。因此, 防治曲霉污染产毒对于保障食品质量安全意义重大, 但国内对此研究不多。曲霉如何将胞外信号传送到胞内, 进而影响细胞分化生长和产毒致病? 已经发现, G 蛋白在这一过程中具有不可或缺的作用, 其将细胞表面受体的信号传输给下游的靶蛋白。

近几年的研究表明, 曲霉的 G 蛋白是  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚单位形成的异源三聚体,  $G\alpha$  完成大部分调节功能, 游离的  $G\beta\gamma$  仅可以调节胞内效应酶的活性; 许多基因参与  $G\alpha$  介导的无性孢子产生和毒素合成的信号途径, 其中包括 26 个保守基因(结构基因或调控基因)<sup>[1]</sup>, 通过对下游发育调节基因如 *fluG*、*flbA-flbE*、*vosA*、*brlA*、*abaA*、*wetA*<sup>[2-3]</sup> 等的研究, 初步建立了相关的调控模型, 但还有一些调控关系有待确定; 丝状真菌中存在多个  $G\alpha$  亚单位和一个  $G\beta$  亚单位, 这说明丝状真菌中可能存在未发现的、非典型的 G 蛋白信号途径。另据报道, 新型隐球菌的 Gib2 蛋白是一个新型的必需蛋白, 参与 cAMP 信号转导途径, 具有  $G\beta$  蛋白的七叶草结构和功能<sup>[4]</sup>。那么, 烟曲霉是否有 *gib2* 的同源基因? 假设的同源基因是否与烟曲霉致毒相关?

用毒素合成的相关基因作为靶位点构建抗曲霉的作物, 控制曲霉的毒害作用、减少食品安全

隐患, 这一策略前景光明。因此, 本研究采用 Double-joint PCR 获得嵌合基因、使其通过整合破坏基因表达的方法, 对与 *gib2* 基因具有较高同源性的烟曲霉 *Afu4g13170* 新基因进行研究, 确定该基因与烟曲霉生长、产孢和致毒的相关性, 以期对曲霉污染的防治提供参考和启示。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和引物:** 本研究所用曲霉菌株见表 1, PCR 所用引物见表 2。

**1.1.2 培养基:** 基础培养基(MMG, g/L): 葡萄糖 10, 硝酸钠 6, 硫酸镁 0.52, 氯化钾 0.52, 磷酸二氢钾 1.52, 1 000×微量元素溶液 1 mL, pH 6.5。

YG 培养基(g/L): 酵母粉(YE) 5, 葡萄糖 20, 1 000×微量元素溶液 400  $\mu$ L。

选择培养基: 氯化钾 0.6 mol/L, YE 0.2%; 相应固体培养基添加 20 g/L 琼脂。

菌名 Strain	基因型 Genotype	来源 Source
Af293	<i>A. fumigatus</i> wild-type	[5]
Af293.1	<i>pyrG1</i>	[6]
AM9.1	<i>pyrG1; Afu4g13170::AnipyrG<sup>+</sup></i>	本研究
FGSC4	<i>A. nidulans</i> wild type	FGSC <sup>a</sup>

Note: <sup>a</sup>: Fungal genetics stock center of USA.

表2 PCR引物  
Table 2 PCR primers used in this study

名称 Name	序列(5'→3') Sequence	用途 Function
Oligo1	TGGTCCTGAAACTAATAGAGTGAC	Afu4g13170 5' For
Oligo2	TTTGTAGGCTTTGGGCTGTTACAA TAAGCCCTAAACTAGCCCCGTTCTG	Afu4g13170 5' Rev with <i>AnpyrG</i> tail
Oligo3	CTGATCTACCCCTTGGAAACGCAGCA TCCGACATGTCTAGCTTGATTCCG	Afu4g13170 3' For with <i>AnpyrG</i> tail
Oligo4	TGAACCTATCCGAGATTGCCACTG	Afu4g13170 3' Rev
Oligo5	ACGACCGTTTCTGGACGAGAATG	Afu4g13170 5' For Nest
Oligo6	ACGCACAGACGAAGGCAGCACAC	Afu4g13170 3' Rev Nest
Oligo7	GCAATGTAAAGCTAACGTGCGTG	An <i>pyrG</i> 5' For
Oligo8	TGCCTTTAAGCTTCGGGTAGAG	An <i>pyrG</i> 3' Rev
Oligo9	TGGTCCTGAAACTAATAGAGTGAC	ΔAfu 4g13170 verification 5' For
Oligo10	TGAACCTATCCGAGATTGCCACTG	ΔAfu 4g13170 verification 3' Rev

1 000×微量元素溶液(g/L): 硫酸锌 22, 硼酸 11, 氯化锰 5, 硫酸亚铁 5, 氯化亚钴 1.6, 硫酸铜 1.6, 七钨酸铵 1.1, Na<sub>2</sub>EDTA 50。

烟曲霉菌株 Af293.1 用 MMG+UU (5 mmol/L 尿苷, 10 mmol/L 尿嘧啶) 固体培养基保存, 其它曲霉菌株用 MMG 固体培养基保存, 如果需要可添加 0.2% 的 YE。

**1.1.3 主要试剂:** DNA 提取试剂、胶霉毒素均购自 Sigma 公司; DNA 纯化试剂盒、内切酶及 PCR 相关试剂均购自 TaKaRa 公司。

原生质体制备液: Vinoflow FCE (Novozymes, 具有果胶酶和葡萄糖酶活性) 1.28 g, 加入 10 mL 氯化钾/柠檬酸溶液(氯化钾 8.2 g, 一水柠檬酸 2.1 g, 重蒸水 100 mL, pH 5.8)。

**1.1.4 主要仪器:** PCR 仪和凝胶成像仪(Bio-Rad, USA), DSC-W55 数码相机(Sony, 无锡), M<sup>2</sup>BIO 荧光显微镜(Carl Zeiss, Germany), Waters 600-717-2487 型高效液相色谱仪(Waters, USA), 小型珠磨式组织研磨器(BioSpec, USA)。

## 1.2 方法

**1.2.1 孢子悬液制备:** 曲霉接种 MMG+0.2% YE 固体培养基平板, 37 °C 培养 2 d; 用 5–10 mL 无

菌重蒸水悬浮并收集孢子, 获得孢子悬液, 并用血球计数板计数。

**1.2.2 DNA 提取:** 将曲霉孢子悬液接入装有 2 mL MMG 液体培养基的试管, 接种量为 1×10<sup>5</sup> 个/mL; 试管斜放、37 °C 静置培养 16 h; 收集菌丝体, 加入 500 μL 细胞破碎液(pH 8.0 Tris-HCl 10 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, pH 8.0 EDTA 1 mmol/L, SDS 1%, Triton X-100 2%), 500 μL 酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1, V/V/V) 和 300 μL 0.5 mm 氧化锆/硅胶珠, 4 °C、高速均质 2 min; 离心取水相, 经无水乙醇沉淀、70%乙醇洗涤、pH 8.0 TE 溶解。

**1.2.3 嵌合基因构建:** 采用 Double-joint PCR 法<sup>[7]</sup>。分别用烟曲霉 *Afu4g13170* 基因的上游序列、下游序列及构巢曲霉 *AnipyrG* 标记基因序列作为模板设计引物, 进行 3 轮 PCR。第 1 轮: 以烟曲霉 Af293 基因组 DNA 为模板, 分别用引物 1 和 2、3 和 4 进行 PCR, 获得 *Afu4g13170* 基因的 5'上游序列和 3'下游序列片段; 以构巢曲霉 FGSC4 基因组 DNA 为模板, 用引物 7 和 8 进行 PCR, 获得选择标记 *AnipyrG* 基因片段。反应程序与传统 PCR 类似。第 2 轮: 第一轮的 PCR 产物按 *Afu4g13170* 基因上游产物:下游产物:*AnipyrG*

标记基因产物=1:1:3 的比例混合作为模板, 进行 PCR, 获得融合产物为 *Afu4g13170* 基因的 5'上游片段-*AnipyrG*-3'下游片段。反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 10 min, 72 °C 5 min, 10 个循环; 72 °C 10 min。第 3 轮: 第二轮的 PCR 产物直接作为模板, 用引物 5 和 6 进行巢式 PCR, 获得 *Afu4g13170* 基因的嵌合片段。反应程序为: 94 °C 2 min; 93 °C 45 s, 62 °C 45 s, 68 °C 12 min, 35 个循环; 72 °C 15 min。

**1.2.4 原生质体制备:** 将约  $1 \times 10^8$  个曲霉孢子接种到 20 mL YG 液体培养基中, 30 °C、120–150 r/min 摇床培养 13–14 h。收集菌丝, 制备原生质体<sup>[8]</sup>。步骤: 将适量菌丝置于 50 mL 离心管中, 添加 8 mL YG 液体培养基和 8 mL 原生质体制备液; 30 °C、100 r/min 摇床培养, 定期镜检; 培养时间视原生质体产生情况而定, 要严格控制, 一般不超过 2.5 h。然后, 将原生质体轻轻转移至装有适量蔗糖溶液的离心管中, 4 °C、4 800 r/min 密度梯度离心 10 min; 吸出离心管夹层的原生质体, 用分别用 KCl 溶液、KCl 和 CaCl<sub>2</sub> 混合液清洗; 最后用 100 μL KCl 和 CaCl<sub>2</sub> 混合液悬浮。

**1.2.5 基因缺失菌株构建:** 通过原生质体转化法, 将获得的嵌合基因转化烟曲霉 Af293.1 菌株<sup>[8]</sup>。向 100 μL 原生质体悬液加入 10 μL PCR 产物(对照组不加), 添加 50 μL PEG, 冰浴 25 min; 再添加 1 mL PEG, 室温放置 25 min; 将转化混合物涂布于选择培养基表面, 37 °C 培养至菌落长出。

**1.2.6 胶霉毒素(Gliotoxin)萃取:** 烟曲霉孢子悬液接种 50 mL MMG 液体培养基, 接种量为  $1 \times 10^6$  个/mL, 37 °C、250 r/min 摇床培养 2 d。培养上清液用等量氯仿摇床萃取、风干、甲醇溶解<sup>[9]</sup>。

**1.2.7 胶霉毒素分析:** 高效液相色谱法, 采用 C-18 反相色谱柱: 300 mm×3.9 mm 内径, 填充粒径 5 μm (Waters, Eschborn, Germany), 上样量

50 μL, 用水和乙腈(57:43, V/V)混合物进行梯度洗脱, 流速为 1 mL/min, 280 nm 检测<sup>[10]</sup>。

**1.2.8 序列比对:** 采用 NCBI Popular Resources 栏的 BLAST。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *Afu4g13170* 基因特征研究

根据基因库, *Afu4g13170* 基因全长 1 448 bp, 编码区长度为 951 bp, 预计编码 317 个氨基酸。烟曲霉 *Afu4g13170* 基因与报道的新型隐球菌 *gib2* 基因和构巢曲霉 *Ani04163* 基因的蛋白质的氨基酸序列比对显示, *Afu4g13170* 基因与 *gib2* 基因和 *Ani04163* 基因编码蛋白的氨基酸序列有 88.6% 的相似性(图 1)。据报道<sup>[4]</sup>新型隐球菌 *gib2* 基因过表达促进黑色素与荚膜形成, 这些表型受 cAMP 信号途径调控、与菌体致毒有关。由此可以推测烟曲霉 *Afu4g13170* 基因可能具有类似功能。

### 2.2 *Afu4g13170* 嵌合基因获得

分别用烟曲霉 *Afu4g13170* 基因的上游序列、下游序列及构巢曲霉 *AnipyrG* 标记基因作为模板进行第一轮 PCR, PCR 产物按上游产物:下游产物:标记物产物=1:1:3 的比例混合作为模板, 进行第二轮 PCR; PCR 产物直接作为模板进行第三轮 PCR。最后的 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测、酶切验证其正确性。从电泳结果可知 PCR 产物是正确的(图 2)。PCR 产物可直接转化烟曲霉 Af293.1, 减少载体构建的繁琐。

### 2.3 *Afu4g13170* 嵌合基因转化 Af293.1

利用原生质体转化法, 将 PCR 产物直接转化受体 Af293.1。突变子获得的 *AnipyrG* 表型, 使其恢复尿苷和尿嘧啶的产生能力。培养 3–4 d 后挑取可疑突变子接至装有 3 mL MMG+0.5% YE 液体培养基的试管中, 静置培养 15–20 h, 收集菌丝, 提取基因组 DNA。

Cneoformans	51	LYGEPKILHGHNEFVSDVAISSDCQEFALSSSWDHLLRLWDLNLTGLTTKK
Anidulans	51	AYGYPKRSLEGHSHIVSDCVISSDGAYALSASWDKSLRLWELSSGQTTTRT
Afumigatus	51	AYGYPKRSLEGHSHIVSDCVISSDGAYALSASWDKSLRLWELATGCTTTRT
Cneoformans	101	FVGHTECDVLSVSVFSADNRQIVSA SRDRS I K L W N T L G E C K F D I V E D G H T E W
Anidulans	101	FVGHTECDVLSVSVFSADNRQIVSGSRDRTIK L W N T L G D C K Y T I T D K G H T E W
Afumigatus	101	FVGHTECDVLSVSVFSADNRQIVSGSRDRTIK L W N T L G D C K F T I T D K G H T D W
Cneoformans	151	VSCVRFSPNPALPVIISAGWDKTVK V W E L S N C K L K T T H H G H T G Y L N T L A V
Anidulans	151	VSCVRFSPNPQNPVIVSAGWDKLVK V W E L A S C R L Q T D H I G H T G Y I N T V T I
Afumigatus	151	VSCVRFSPNPQNPVIVSAGWDKLVK V W E L A S C R L Q T D H I G H T G Y I N T V T I
Cneoformans	201	SPDGSLAASGGKDCVTMLWDLNECKHLYSLDAGDVTINALVFSPNRYWLCA
Anidulans	201	SPDGSLCASGGKDCVTMLWDLNESKHLYSLHAGDEIHALVFSPNRYWLCA
Afumigatus	201	SPDGSLCASGGKDCVTMLWDLNESKHLYSLHAGDEIHALVFSPNRYWLCA
Cneoformans	251	ATASSIKIFDLESKSLVDDLPDFFDGLSDKARKPECTSLAWSADGQTLFA
Anidulans	251	ATSSITIFDLEKKSVDLKPFEIEKGGKSRPEPCVSLAWSADGQTLFA
Afumigatus	251	ATASSITIFDLEKKSVDLKPFEIEKSKAREPECTSLAWSADGQTLFA
Cneoformans	301	GFSDNLVVRVWAVVA--
Anidulans	301	GYTDNKIRAWGVMSRA
Afumigatus	301	GYTDNKIRAWGVMSRA

图1 *Afu4g13170* 基因、*Ani04163* 基因和 *gib2* 基因编码蛋白的氨基酸序列比对  
Fig. 1 Protein sequence alignment of *Afu4g13170*, *Ani04163* and *gib2* genes

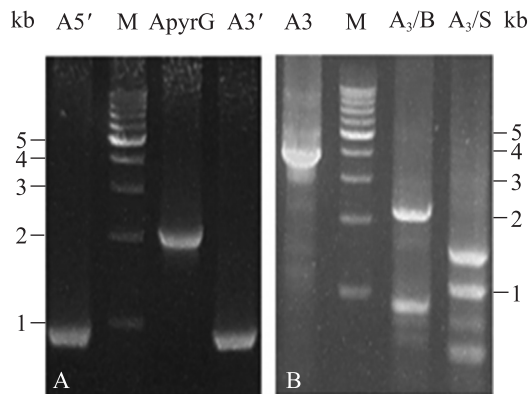


图2 第一轮 PCR 产物及第 3 轮 PCR 产物的酶切验证分析

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of 1<sup>st</sup> round amplicons and digested 3<sup>rd</sup> round amplicon

Note: A: 1<sup>st</sup> round amplicons; A5': Upstream amplicon; M: Marker; ApyrG: amplicon of *pyrG*; A3': Downstream amplicon. B: Digested 3<sup>rd</sup> round amplicon; A<sub>3</sub>: Amplicon; A<sub>3</sub>/B: Digested by *Bam*H I; A<sub>3</sub>/S: Digested by *Sal* I.

## 2.4 突变子验证

提取烟曲霉 Af293.1 和可疑突变子的基因组 DNA 作为模板, 用引物 9 和 10 进行 PCR。突变子的 PCR 产物约 3.6 kb, 而 Af293.1 的 PCR 产物

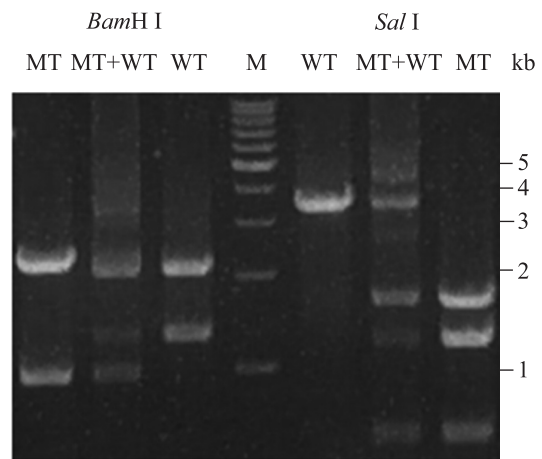


图3 基因组 DNA PCR 产物酶切分析

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of the digested PCR products amplified from genomic DNAs of Af293.1 and AM9.1

Note: WT: Af293.1; MT: AM9.1; M: Marker.

约 4.4 kb。PCR 产物经 *Sal* I 和 *Bam*H I 酶切验证 (图 3)。由结果可知 *Afu4g13170* 嵌合基因已通过基因双交换整合在受体基因组的 *Afu4g13170* 基因上, 破坏了该基因正常功能的表达。将该突变菌株命名为 AM9.1。

## 2.5 突变株 AM9.1 表型分析

为了研究 *Afu4g13170* 基因的功能, 构建了突变株 AM9.1 ( $\Delta Afu4g13170$ )。用竹签分别将 Af293.1 和 AM9.1 二菌株的孢子悬液点接在 MMG+0.2% YE 的固体培养基表面, 37 °C 培养 3 d, 观察菌落产孢、产色素情况; 孢子悬液接种 MMG+0.2% YE 的液体培养基, 37 °C、250 r/min 摇床培养 18 h, 观察菌丝体生长情况(图 4)。

由固体培养条件下的表型比对可知, 不管是菌落中心还是菌落边缘, 突变株 AM9.1 的孢子数量比野生型曲霉 Af293.1 的少、白色孢子多, 而且突变株的菌落直径小、菌落高度增加。说明 *Afu4g13170* 基因破坏使 AM9.1 的生长缓慢, 产孢能力降低、产孢时间推迟; 色素产生减少、产生时间滞后; 液体培养条件下的表型比对表明 AM9.1 的菌丝伸长、梗基伸长、菌丝分化能力大大降低。说明烟曲霉的 *Afu4g13170* 基因缺失导致菌体生长缺陷和分化缺陷, 使菌株的无性繁殖能力和次生代谢物色素合成能力降低。已知烟曲霉的毒素合成能力与生孢和色素形成有密切关系,

可以初步确定该基因与致毒有关, 其表达促进空气传播的无性孢子萌发和毒素产生。

## 2.6 胶霉毒素分析

胶霉毒素是烟曲霉产生的高毒性次生代谢物之一, 其具有潜在免疫抑制、基因毒性、细胞毒性和细胞凋亡效应<sup>[11]</sup>。为了检测 *Afu4g13170* 基因与产生胶霉毒素的关系, 用 HPLC 分别检测烟曲霉 Af293.1 与 AM9.1 菌株 MMG 培养上清液的胶霉毒素含量(图 5)。由结果可知, *Afu4g13170* 基因破坏使胶霉毒素的产生量降低了 37%。说明该基因与烟曲霉产生胶霉毒素有关, *Afu4g13170* 基因可作为一个防治曲霉毒素污染食品饲料的作用靶位点。

## 3 结论

关于曲霉致毒相关基因及调控因子的研究, 利于寻找防治曲霉污染的方法, 减少食品饲料的污染及浪费。本研究通过 Double-joint PCR 方法获得可以在受体基因组直接整合的嵌合基因, 减少质粒构建的繁琐步骤, 降低科研费用。该方法

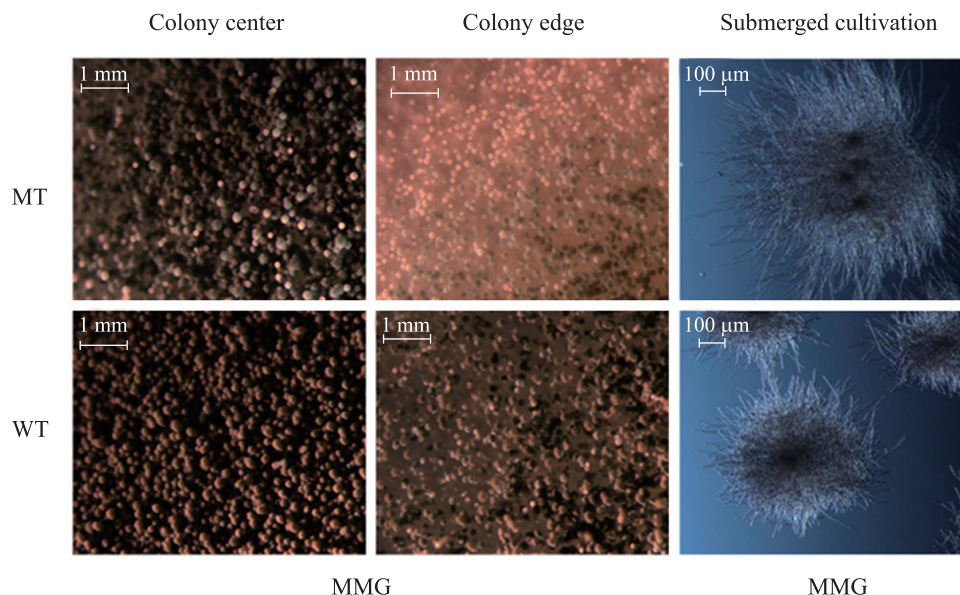


图 4 烟曲霉 Af293.1 与 AM9.1 菌株的表型分析

Fig. 4 Phenotypic analysis of *A. fumigatus* Af293.1 and AM9.1 strains

Note: Bar is equal to 1 mm or 100  $\mu$ m for solid culture or liquid culture respectively. WT: Af293.1; MT: AM9.1.

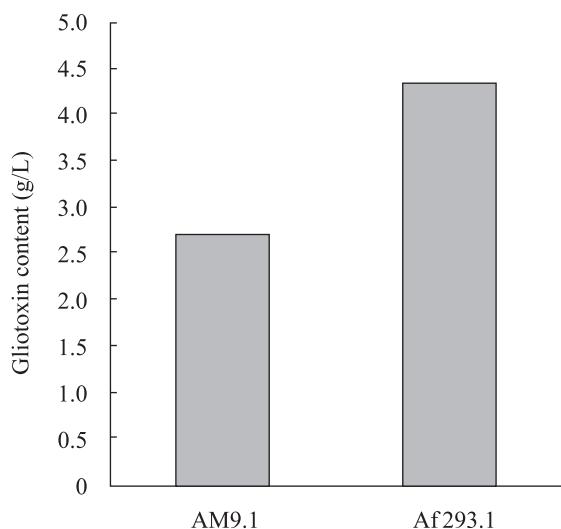


图5 烟曲霉培养上清液的胶霉毒素含量  
Fig. 5 The gliotoxin content in the culture supernatant of *A. fumigatus* Af293.1 and AM9.1 strains

可以推广到其它微生物基因功能的研究。烟曲霉 *Afu4g13170* 基因是未报导过的新基因, 研究表明 *Afu4g13170* 基因缺失导致严重的菌体生长缺陷和分化缺陷, 使菌株的无性繁殖能力和次生代谢物色素合成能力降低。说明该基因与烟曲霉生长、产孢有关, 但不是产孢的决定因素。色谱分析表明该新基因与烟曲霉产生胶霉毒素有关, 该基因破坏使烟曲霉胶霉毒素产生量减少了37%。由此可知控制该基因表达可使烟曲霉生长滞缓、产毒能力降低; *Afu4g13170* 基因可作为一个防治曲霉毒素污染的作用靶位点。将来应进一步研究该基因是否参与 G 蛋白信号转导途径, 并建立其与上下游调控因子之间的关联和应用控制方法。

## 参考文献

- [1] Keller NP. Research focus[Z]. <http://kellerlab.bact.isc.du>.  
[2] Xiao P, Shin KS, Wang TH, et al. *Aspergillus*

*fumigatus flbB* encodes two basic leucine zipper domain (bzip) proteins required for proper asexual development and gliotoxin production[J]. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9(11): 1711–1723.

- [3] Kwon NJ, Shin KS, Yu JH. Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(12): 981–93.  
[4] Palmer DA, Thompson JK, Li L, et al. Gib2, A novel G $\beta$ -like/RACK1 homolog, functions as a G $\beta$  Subunit in camp signaling and is essential in *Cryptococcus neoformans*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(43): 32596–32605.  
[5] Brookman JL, Denning DW. Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3(5): 468–474.  
[6] Xue T, Nguyen CK, Romans A, et al. Isogenic auxotrophic mutant strains in the *Aspergillus fumigatus* genome reference strain AF293[J]. *Archives of Microbiology*, 2004, 182(5): 346–353.  
[7] Yu JH, Hamari Z, Han KH, et al. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(11): 973–981.  
[8] Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, et al. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(6): 3111–3120.  
[9] Shin KS, Kwon NJ, Yu JH. G $\beta$ -mediated growth and developmental control in *Aspergillus fumigatus*[J]. *Current Genetics*, 2009, 55(6): 631–641.  
[10] Kupfahl C, Heinekamp T, Geginat G, et al. Deletion of the *gliP* gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(1): 292–302.  
[11] Pena GA, Pereyra CM, Armando MR, et al. *Aspergillus fumigatus* toxicity and gliotoxin levels in feedstuff for domestic animals and pets in Argentina[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50(1): 77–81.