

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20200114

数字出版日期: 2020-09-29; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20200928.1341.004.html>

一个黑曲霉细胞色素 P450 基因启动子的结构与表征

高丽影, 马梅, 王艳梅, 寇航, 申玉玉, 路福平, 黎明

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 工业酶国家工程实验室,
天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 黑曲霉是工业生产上的重要模式菌株, 其启动子活性对其生产效率有重要影响; 细胞色素 P450 是调控菌体能量代谢、细胞生长和各种代谢产物合成的关键酶。通过对细胞色素 P450 基因启动子区域(PP450)的克隆、结构分析和功能鉴定, 为 P450 基因的表达调节研究和 P450 启动子的应用提供基础。从黑曲霉基因组克隆出细胞色素 P450 基因(An11g01980)的上游片段 PP450, 连接到 pGEM-T 载体进行测序, 用启动子分析网站 GPMiner 和 EMBOSS 分析 PP450 片段的启动子功能元件, 结果显示: PP450 片段的-864~-106 bp 处有一段长为 759 bp 的 CpG 区域, 含有 2 个 TATA 盒、6 个 CAAT 盒、2 个 GC 盒和 1 个可能的 AmyR 结合位点。构建含 PP450 启动子的启动子-报告基因表达载体 pPZP-PP450 并转化黑曲霉, 通过荧光强度检测启动子功能, 结果表明该启动子是一个组成型启动子, 但添加沃氏氧化物后启动子表达强度明显增强, 推测该启动子区域可能含有沃氏氧化物相关的反应元件或增强子。

关键词: 黑曲霉; 细胞色素 P450 启动子; 启动子元件; 荧光素酶

中图分类号: Q814.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2020)06-0007-06

Structure and Characterization of the Promoter of *Aspergillus niger* Cytochrome P450 Gene

GAO Liying, MA Mei, WANG Yanmei, KOU Hang, SHEN Yuyu, LU Fuping, LI Ming

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Aspergillus niger* is an important model strain in industrial production, and its promoter activity has an important effect on its production efficiency. Cytochrome P450 is a key enzyme that regulates energy metabolism, cell growth and the synthesis of various metabolites. Through cloning, structural analysis and functional identification of the cytochrome P450 promoter region (PP450), the foundation for research on the expression regulation of P450 gene and the application of P450 promoter have been laid. PP450, an upstream segment of the cytochrome P450 gene (An11g01980), was cloned from *A. niger* genome, ligated into pGEM-T plasmid and sequenced to analyze its functional elements in PP450 using the promoter sites GPMiner and EMBOSS. The results show that PP450 has a 759 bp long CpG area between -864 and -106 bp, contains 2 TATA boxes, 6 CAAT boxes, 2 GC boxes and a possible AmyR binding site. The promoter-reporter expression vector pPZP-PP450 containing PP450 was thus constructed and then transformed in *A. niger*, and the function of PP450 was identified in fluorescence intensity test. The results show that P450 promoter is a constitutive promoter. However, the expression strength of P450 promoter was significantly enhanced after adding 16, 17- α -epoxyprogesterone in culture. It is speculated that P450 promoter region may contain 16, 17- α -epoxyprogesterone-related response elements or enhancer.

Key words: *Aspergillus niger*; cytochrome P450 promoter; promoter element; luciferase

收稿日期: 2020-07-09; 修回日期: 2020-07-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671806)

作者简介: 高丽影(1995—), 女, 河南人, 硕士研究生; 通信作者: 黎明, 教授, liming09@tust.edu.cn

黑曲霉是一种重要的细胞工厂。自 20 世纪初发现黑曲霉在含糖培养基中生长时会产生高浓度柠檬酸以来,黑曲霉被广泛利用生产柠檬酸等有机酸、抗生素等多种次生代谢产物和工业用酶制剂^[1]。随着生物技术的不断发展,人们开始有目的地对黑曲霉细胞工厂进行合理设计,以满足生产各种目的产物的需要。由于启动子在基因的转录过程中发挥着重要作用,它不仅控制着转录调节的起始,也涉及整个代谢网络的控制,因此启动子的类型及其表达调节是进行细胞工厂设计的基础^[2]。与其他真菌来源的启动子一样,黑曲霉启动子包括诱导型启动子和组成型启动子。诱导型启动子有化学诱导型^[3]和 pH 诱导型^[4]等,组成型启动子有糖化酶启动子^[5]、环氧酶启动子^[2]等。即使如此,目前关于黑曲霉启动子的数量仍然比较少,因此需要不断挖掘新的黑曲霉基因启动子,这对黑曲霉细胞工厂设计、代谢调控和合成生物学都具有重要意义。

在利用黑曲霉进行甾体羟基化的研究^[6]过程中发现:当加入沃氏氧化物(16, 17- α -环氧黄体酮)时,甾体羟基化效率加强。转录组分析表明,一种与细胞色素 P450 相似的基因转录水平大幅度提高,这说明该基因可能受到一个诱导型启动子控制。BLAST 比对表明,该基因与黑曲霉 CBS513.88 的 An11c0060 重叠群上 An11g01980 基因高度相似,基因注释为假定的细胞色素 P450 单加氧酶,本实验室研究表明它具有细胞色素 P450 基因的功能。该基因与其他来源的细胞色素 P450 基因(GenBank 号为:XM_025603499、XM_025655375.1)的主要区别在于其 N 端多 67 个氨基酸。因此,把这个基因称之为细胞色素 P450 基因。

细胞色素 P450(CYP)是一类多功能氧化酶^[6],在真核细胞内与内质网、线粒体和高尔基体等细胞器结合形成膜蛋白,是一类含有亚铁血红素的血红蛋白的总称^[7]。真菌拥有最多多样化的 CYP 家族,因其生物催化作用被广泛应用于生物技术和医学领域^[8]。在真菌中,CYPs 在促进真菌代谢的多功能性方面起着关键作用^[9],因此 CYP 基因启动子的研究对研究真菌的代谢调节具有重要的意义。目前,已有对细胞色素 P450 家族 CYP51^[10]、CYP6B4 和 CYP6B1^[11]基因的启动子的研究,发现它们均为化学诱导型的启动子。本研究按照黑曲霉基因组序列,克隆出细胞色素 P450 基因(An11g01980)的上游序列作为其启动子 P450 区域进行结构和功能分析。结果表明,P450 基因启动子是一个组成型启动子,沃氏氧化物能增强其

表达,说明该启动子可能含有与沃氏氧化物相关的反应元件或增强子元件,证明细胞色素 P450 不仅仅是诱导型表达,也可以进行组成型表达。本研究旨在提供一种新的细胞色素 P450 表达调节方式,为细胞色素 P450 的表达调节研究以及该启动子的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL-1、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 41671、质粒 pPZP-Pepo1、pGEM-T 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂与工具酶

DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Hind* III、*Avr* II、连接酶, Takara 公司;质粒快速提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、切胶回收试剂盒, Omega 公司;通用型柱式基因组提取试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司;蛋白胨和酵母浸粉, Oxoid 公司;底物荧光素 (D-Luciferin), Abcam 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

PDA 培养基:土豆去皮,切块,按 1:4 加水煮沸 30 min 至土豆块变软,用 8 层纱布过滤,滤液定容至原体积,在滤液中加入 2% 葡萄糖,115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

麦芽汁培养基:将 130.1 g 麦芽汁培养基固体粉末溶于水并定容至 1 L, 121 °C 灭菌 20 min。

诱导培养基(IM)^[12]: K buffer 0.8 mL, MN buffer 20 mL, 1% CaCl₂·2H₂O 1 mL, 0.01% FeSO₄ 10 mL, 微量元素 5 mL, 20% NH₄NO₃ 2.5 mL, 50% 甘油 10 mL, 1 mol/L MES 40 mL, 20% 葡萄糖 10 mL, pH 为 5.5, 加 900.7 mL 无菌水定容至 1 L。

K buffer:用 1.25 mol/L KH₂PO₄ 调节 1.25 mol/L K₂HPO₄ 至 pH 为 4.8, 121 °C 灭菌 20 min。

MN buffer:溶解 3 g MgSO₄·7H₂O 和 1.5 g NaCl 于去离子水并定容至 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

IM 培养基微量元素:将 100 mg Na₂MoO₄·2H₂O、100 mg ZnSO₄·7H₂O、100 mg H₃BO₃、100 mg CuSO₄·5H₂O、100 mg MnSO₄·H₂O 溶解于去离子水,

定容至 1 L, 121 °C 灭菌 20 min.

完全培养基 (CM): 称取 20 g 琼脂, 加水至 897 mL; 高压灭菌后加入 ASP + N 20 mL、50% 葡萄糖 20 mL、1 mol/L MgSO₄ 2 mL、微量元素 1 mL、酪蛋白氨基酸 10 mL 和酵母提取物 50 mL, 制成 1 L CM 培养基.

ASP + N: 溶解 2.61 g KCl (350 mmol/L)、7.48 g KH₂PO₄ (550 mmol/L)、29.75 g NaNO₃ (3.5 mol/L) 于去离子水中, 用 5 mol/L KOH 调节 pH 为 5.5, 用去离子水定容至 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min.

CM 培养基微量元素: 将 2.1 g ZnSO₄·7H₂O、0.15 g Na₂MoO₄·2H₂O、0.5 g FeSO₄·7H₂O、1.1 g H₃BO₃、0.17 g CoCl₂·6H₂O、5.1 g EDTA、0.16 g CuSO₄·5H₂O、0.5 g MnCl₂·4H₂O 溶解于去离子水, 定容至 100 mL, 121 °C 灭菌 20 min.

1.2 方法

1.2.1 启动子的克隆与结构分析

根据黑曲霉 CBS513.88 的 An11g01980 基因的上游区域设计引物 EP1079F: 5'-GTCTAAGCTTCAGTTGGGTCTTGAAGGGCA-3' (下划线部分为加入的 *Hind* III 酶切位点) 和 EP-1R: 5'-GAGAGACCTAGGTGCTGGAGTGGGTAGCAAAAGGC-3' (下划线部分为加入的 *Avr* II 酶切位点). 提取黑曲霉基因组为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min. 扩增出细胞色素 P450 基因的启动子片段命名为 PP450, 将 PP450 片段连接到 pGEM-T 载体上构建出 pT-PP450 并进行测序; 再将其在启动子分析网站 GPMiner (<http://gpminer.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) 和 EMBOSS (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>) 上进行结构和功能分析^[13].

1.2.2 载体的构建与鉴定

将 pT-PP450 载体用 *Hind* III 和 *Avr* II 酶切, 回收启动子片段并将其连接至经相同酶切的表达载体 pPZP-Pepo1, 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞, 转化子经卡那霉素抗性筛选, 挑选阳性转化子进行菌落 PCR 并提质粒酶切验证. 将验证正确的含 PP450 质粒命名为 pPZP-PP450.

1.2.3 根瘤农杆菌介导黑曲霉的转化和验证

取 0.5 μL pPZP-PP450 质粒加入根瘤农杆菌 AGL-1 感受态混匀, 冰浴 20 min 后转入电转杯, 1 800 V 电击后立即加复苏液, 混匀吸出并在 28 °C 摇床复苏 3 h 后, 涂布在含 100 μg/mL 的卡那霉素和 20 μg/mL 的利福平抗性平板; 28 °C 培养 3 d 至转化子

长出后, 用荧光素酶基因验证引物 (Luc-F: 5'-GGACGCCAAGAACATCAAGAAGGG-3', Luc-R: 5'-CGAAGAAGGAGAAGAGGGTGGGA-3') 进行菌落 PCR 验证, 得到正确的根瘤农杆菌转化子.

黑曲霉菌株在 PDA 斜面上于 35 °C 孵育 3 d, 孢子萌发后用生理盐水洗脱并过滤至含少量玻璃珠的锥形瓶中打散, 用血球计数板测定孢子液浓度, 并在 IM 液体培养基中稀释至每毫升 1×10^7 个分生孢子. 同时, 将根瘤农杆菌转化子在含有 20 μg/mL 利福平和 100 μg/mL 卡那霉素的 10 mL LB 液体培养基中 28 °C、200 r/min 摇床孵育 24 h, 在室温下 2 400 g 离心培养物 (1.5 mL) 10 min, 再将细胞重悬于 5 mL 含 5 μL 的 0.2 mol/L 乙酰丁香酮 (AS) 的液体 IM 中, 28 °C、100 r/min 孵育 5 ~ 8 h 至 A_{600} 为 0.6 ~ 0.8. 将 100 μL 诱导的农杆菌细胞和 100 μL 的真菌分生孢子液 (1×10^7 mL⁻¹) 混合, 将混合物涂布至含 AS 的 IM 培养基平板的硝酸纤维膜上, 于 24 °C 在黑暗中培养 3 d. 之后, 将硝酸纤维膜转移至选择培养基 (含有潮霉素抗性和 200 μmol/L 头孢噻污的 CM) 中, 35 °C 黑暗培养 5 d, 直到出现单菌落. 转接单菌落 3 次, 用微波法提取黑曲霉转化子基因组^[14], 用荧光素酶基因验证引物进行 PCR 验证筛选^[15], 得到验证正确的黑曲霉转化子.

1.2.4 启动子的强度检测

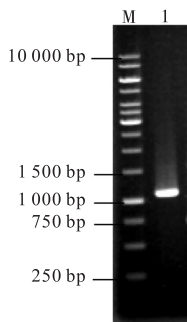
按照利用荧光素酶为报告基因检测黑曲霉启动子特性的方案进行启动子强度检测^[16-17], 但根据本研究的具体需要略有修改. 将验证正确的黑曲霉转化子和出发菌株同时在 PDA 斜面上活化, 培养约 3 d 长出黑色孢子后洗下孢子并计数至 1×10^7 mL⁻¹. 接种 100 μL 孢子液于 48 孔深孔培养板中, 35 °C 振荡培养. 转化子菌株培养分为 3 组, 即不添加沃氏氧化物组、添加 10 μg/mL 的沃氏氧化物组、添加 30 μg/mL 的沃氏氧化物组, 每组 3 个平行. 培养 12 h 后在每组培养孔中分别添加 10 μL 沃氏氧化物溶液或者其溶剂, 使 3 组中的沃氏氧化物的终质量浓度分别为 0、10、30 μg/mL, 以诱导 P450 启动子控制的荧光素酶基因的表达. 继续培养 12 h 后在各培养孔中添加 100 μL 底物荧光素溶液 (终浓度为 1.4 mmol/L). 以没有转化的黑曲霉出发菌株为对照, 按照同样培养方式进行, 只是添加的沃氏氧化物的终质量浓度为 10 μg/mL. 添加沃氏氧化物底物后, 将培养板放进 SpectraMax i3X 型酶标仪, 用 537 nm 波长每隔 5 min 或 10 min 测定荧光强度. 荧光强度越高, 表明 P450 启动子控制的荧光素酶基因表达量越高, 说明启动子

活性越强. 由于各种影响因素控制一致, 因此直接用荧光强度表示启动子的相对强度.

2 结果与分析

2.1 启动子的克隆与结构分析

以黑曲霉基因组为模版, 以引物 EP1079F 和 EP-1R 扩增目的片段 PP450, 结果如图 1 所示. 结果与理论大小(1 080 bp)一致, 证明目的片段 PP450 克隆成功.



M. DNA marker; 1. PP450 片段

图 1 PP450 片段的扩增

Fig. 1 Amplification of PP450 fragment

将 PP450 片段连接到 pGEM-T 载体上构建出 pT-PP450 并进行测序. 测序结果表明, 克隆的 PP450 序列长 1 080 bp, 与报道的 An11g01980 基因上游序列完全一致. 用启动子分析网站 GPMiner 和 EMBOSS 对 PP450 片段进行结构分析, 结果如图 2 所示, 其中阴影部分为预测的启动子元件, TSS 为转录起始位点.

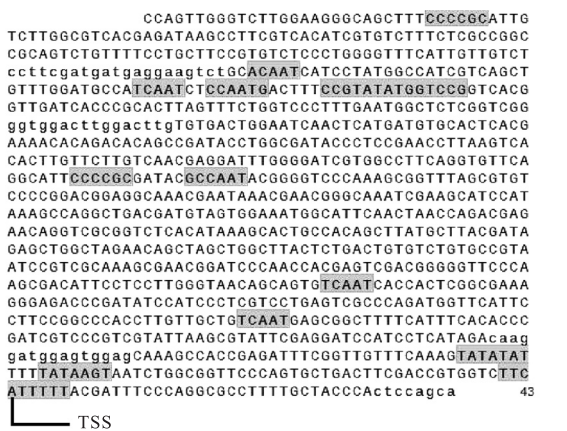


图 2 PP450 片段的分析

Fig. 2 Analysis of PP450 fragment

在翻译起始位点上游 43 bp 处为可能的转录起

始位点(TSS), 在 TSS 上游有两个可能的 TATA 盒, 它们与 TATA 盒的保守序列 TATAAAA 并不完全一致但高度相似; PP450 上还有 6 个可能的 CAAT 盒, 其中 2 个 CAAT 盒与其保守序列基本一致, 其余 4 个 CAAT 盒与其保守序列也高度相似; 另外, 还有 2 个 GC 盒在 PP450 的负链上; PP450 片段的-864 ~ -106 bp 处有一段长为 759 bp 的 CpG 区域. 特别有趣的是, 在 PP450 上还发现转录因子 AmyR 的 1 个可能的结合位点序列 CCGTATATGGTCCG, 这个序列是否真的能结合转录因子 AmyR 并参与转录调节, 还需要实验证实. PP450 启动子元件的具体信息见表 1.

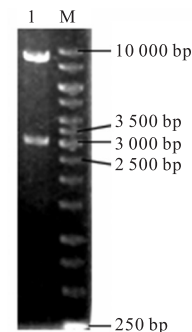
表 1 PP450 序列的启动子元件

Tab. 1 Promoter elements of PP450 sequence

启动子元件	位置/bp	序列	链
Inr	-3 ~ +6	TTCATTTT	+
TATA 盒	-47 ~ -41	TATAAGT	+
	-57 ~ -51	TATATAT	+
CAAT 盒	-178 ~ -174	TCAAT	+
	-270 ~ -266	TCAAT	+
	-582 ~ -578	GCCAAT	+
	-831 ~ -827	CCAATG	+
	-838 ~ -834	TCAAT	+
	-877 ~ -873	ACAAT	+
GC 盒	-594 ~ -589	GCGGGG	-
	-1 010 ~ -1 005	GCGGGG	-

2.2 pPZP-PP450 载体的构建与鉴定

将 pT-PP450 载体与 pPZP-Pepo1 载体均经 Hind III、Ava II 双酶切和连接后构建成所需要的目的载体 pPZP-PP450, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞后, 经 Kana 抗性筛选, 挑取阳性转化子提质粒并用 Hind III 和 Spe I 进行双酶切验证, 结果如图 3 所示. 条带与理论大小(10 000 bp 和 3 000 bp)一致, 说明目的载体 pPZP-PP450 构建成功.



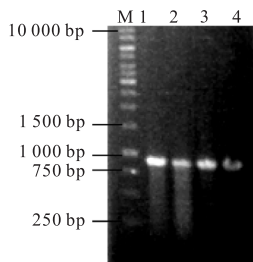
M. DNA marker; 1. pPZP-PP450

图 3 pPZP-PP450 载体的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pPZP-PP450 vector by digestion

2.3 黑曲霉的转化和验证

将 pPZP-PP450 质粒电转入根瘤农杆菌感受态,将电转液涂布于抗性平板,挑取阳性转化子用荧光素酶验证引物进行菌落 PCR 验证,结果如图 4 所示. 条带与理论大小(880 bp)一致,证明 pPZP-PP450 载体成功电转入根瘤农杆菌中.

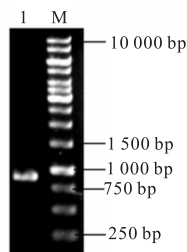


M. DNA marker; 1—4. pPZP-PP450 农杆菌转化子

图 4 pPZP-PP450 载体电转根瘤农杆菌的鉴定

Fig. 4 Identification of pPZP-PP450 vector electrotransformed in *A. tumefaciens*

将转化成功的根瘤农杆菌与黑曲霉共培养并涂布于抗性平板,挑取单克隆转化子传代并用验证引物进行 PCR 验证,结果如图 5 所示. 条带与理论大小(880 bp)一致,说明 pPZP-PP450 载体成功转化至黑曲霉中.



M. DNA marker; 1. pPZP-PP450 黑曲霉转化子

图 5 pPZP-PP450 载体转化黑曲霉的鉴定

Fig. 5 Identification of pPZP-PP450 vector transformed in *A. niger*

2.4 启动子荧光强度的测定

将转化成功的黑曲霉转化子与出发菌株分别在 48 孔板中培养 12 h,在相应的培养孔中添加 10 μ L 诱导剂沃氏氧化物溶液并使其在不同组中的终质量浓度分别为 0、10、30 μ g/mL,24 h 后均添加 100 μ L 底物荧光素溶液并进行荧光检测,结果如图 6 所示.

从图 6 可以看出:出发菌株中添加诱导剂和底物后没有检测到荧光信号,说明诱导剂和底物都不产生荧光信号,出发菌株中没有荧光素酶基因表达.当黑曲霉转化子的培养物中只添加底物不添加诱导剂时,检测到非常强的荧光信号,说明 PP450 启动了荧光

素酶基因的表达,表明 P450 启动子是一个组成型的启动子.当黑曲霉转化子的培养物中分别加入 10 μ g/mL 和 30 μ g/mL 的诱导剂时,荧光信号随着诱导剂浓度的增加而增强,表明 P450 启动子还受到沃氏氧化物的诱导调节.这说明 PP450 中可能含有与沃氏氧化物有关的反应元件或增强子元件.

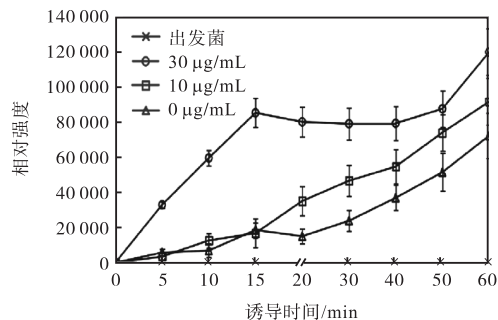


图 6 荧光强度检测

Fig. 6 Fluorescence intensity detection

3 结 语

根据前期的转录组学研究,从黑曲霉基因组克隆出细胞色素 P450 基因 (An11g01980) 的上游片段 PP450,并进行结构和功能分析.结构分析表明,该片段具有 RNA 聚合酶 II 启动子的结构特征:含有 1 个标准的起始子序列,起始子上游含有 2 个可能的 TATA 盒、2 个 CAAT 盒和 4 个与 CAAT 盒一致序列高度相似 CAAT 盒以及 2 个 GC 盒等启动子元件. PP450 片段的 -864 ~ -106 bp 处有一段长为 759 bp 的 CpG 区域.而且,在 PP450 上还发现 1 个转录因子 AmyR 的结合位点序列 CCGTATATGGTCCG.功能检测表明,PP450 启动子是一个组成型启动子,但添加诱导剂沃氏氧化物后启动子表达强度增强,推测该启动子区域可能含有沃氏氧化物相关的反应元件或增强子,需要进一步实验进行验证. PP450 启动子功能的阐明为研究细胞色素 P450 基因的表达调节方式和 PP450 启动子的应用奠定了基础.

致谢:感谢刘晓光教授对启动子分析的指导!

参考文献:

- [1] Cairns T C, Nai C, Meyer V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research[J]. Fungal Biology Biotechnology, 2018, 5: 13.
- [2] Blumhoff M, Steiger M G, Marx H, et al. Six novel constitutive promoters for metabolic engineering of *Aspergillus niger*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,

- 2013, 97(1): 259–267.
- [3] Paul S, Klutts J S, Moye-Rowley W S. Analysis of promoter function in *Aspergillus fumigatus*[J]. Eukaryotic Cell, 2012, 11(9): 1167–1177.
- [4] Yin X, Shin H D, Li J, et al. Pgas, a low-pH-induced promoter, as a tool for dynamic control of gene expression for metabolic engineering of *Aspergillus niger*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(6): e03222-16.
- [5] Henriksen A L S, Even S, Müller C, et al. Study of the glucoamylase promoter in *Aspergillus niger* using green fluorescent protein[J]. Microbiology, 1999, 145(3): 729–734.
- [6] 宁大亮. 白腐真菌细胞色素 P450 转化难降解有机物的功能研究[D]. 北京:清华大学, 2009.
- [7] 黎晨. 玉米黑粉菌 *cyp51* 基因上游启动子克隆及功能鉴定[D]. 武汉:华中师范大学, 2010.
- [8] Durairaj P, Hur J S, Yun H. Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases[J]. Microbiology Cell Factor, 2016, 15(1): 125.
- [9] Huarte-Bonnet C, Kumar S, Saparrat M C, et al. Insights into hydrocarbon assimilation by Eurotiales and *Hypocrealean fungi*: Roles for CYP52 and CYP53 clans of cytochrome P450 genes[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 184(3): 1047–1060.
- [10] Ghosop J M, Schmidt L S, Margosan D A, et al. Imazalil resistance linked to a unique insertion sequence in the PdCYP51 promoter region of *Penicillium digitatum*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 44(1): 9–18.
- [11] McDonnell C M, Brown R P, Berenbaum M R, et al. Conserved regulatory elements in the promoters of two allelochemical-inducible cytochrome P450 genes differentially regulate transcription[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 34(10): 1129–1139.
- [12] Michielse C B, Hooykaas P J, van den Hondel C A, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*[J]. Nature Protocols, 2008, 3(10): 1671–1678.
- [13] 王新芳. 少孢节丛孢菌 *Aoz1* 基因及其启动子的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2018.
- [14] 潘力, 崔翠, 王斌. 一种用于 PCR 扩增的丝状真菌 DNA 快速提取方法[J]. 微生物学通报, 2010, 37(3): 450–453.
- [15] Zhang Y, Li G, He D, et al. Efficient insertional mutagenesis system for the dimorphic pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Microbiology Methods, 2011, 84(3): 418–422.
- [16] Wanka F, Cairns T, Boecker S, et al. Tet-on, or Tet-off, that is the question: Advanced conditional gene expression in *Aspergillus*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 89: 72–83.
- [17] Meyer V, Wanka F, van Gent J, et al. Fungal gene expression on demand: An inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2011, 77(9): 2975–2983.

责任编辑: 郎婧