

PEG 法介导蛹虫草遗传转化体系的建立^{*}

孙丹^{1,2} 张敏^{1,2} 解长睿^{1,2} 郭晓威^{1,2} 徐赫韩^{1,2}高红桃^{1,2} 李晓薇^{1,2} 孙天旭^{1,2}^{**} 李海燕^{1,2}^{**}

(1 吉林农业大学生命科学学院 长春 130118)

(2 吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心 长春 130118)

摘要 由于真菌的遗传转化体系中一般以原生质体作为受体细胞,因而对蛹虫草原生质体制备的各种因素进行比较研究。结果表明,蛹虫草原生质体制备的最佳体系为:液体培养4天的蛹虫草菌球,以0.8 mol/L 甘露醇作为稳渗剂,加入含1.5% 蜗牛酶+1.5% 溶壁酶复合酶,在34℃ 酶解蛹虫草菌球4 h 时,原生质体得率达到 1.0×10^7 个/ml。潮霉素筛选压实验表明,蛹虫草原生质体在PDA 固体培养基上的潮霉素最低筛选浓度为650 mg/L。采用正交试验的方法,设计PEG 介导蛹虫草原生质体转化,将质粒pSB130-GFP 转化蛹虫草原生质体,在荧光倒置显微镜下观察比较,得到最佳的转化体系为:PEG 浓度为25%,冰浴时间为10 min,室温时间为20 min,质粒质量为30 μ g,原生质体个数为 10^7 个/ml。最终得到PEG 法介导蛹虫草遗传转化的转化频率约为100~200 个/ μ g(抗性转化子/质粒+ 10^7 个原生质体)。转化子在含潮霉素的培养基上经4代以上的继代培养后仍可以表达潮霉素抗性并稳定遗传。为通过基因工程手段定向、快速改良蛹虫草药用品质,利用蛹虫草发酵方法生产一些具有重大经济价值的外源蛋白等奠定基础,并且有助于进一步了解蛹虫草这一大型真菌中基因的表达调控机制。

关键词 蛹虫草 转化 PEG 法 潮霉素

中图分类号 Q819

蛹虫草(*Cordyceps militaris*),又名北虫草,北冬虫夏草,隶属于子囊菌门(*Ascomycotina*) 麦角菌目(*Clavicipitales*) 麦角菌科(*Cordyceps*) 虫草属(*Cordyceps*),世界各地有广泛分布^[1-2]。由于蛹虫草中虫草素、虫草酸、多糖等很多有效成分具有抗肿瘤、降血糖、降血脂以及抗炎等功效^[3],因此近年来,在蛹虫草的化学成分及药理作用等方面均有广泛研究。

随着蛹虫草全基因组测序的完成^[4],对其分子生物学和遗传学的研究也会更加深入,同时分子遗传学的研究离不开有效的遗传转化体系。然而真菌细胞壁的复杂性,使其成为遗传转化的难点,故一般以原生质体作为受体细胞^[5],以此建立真菌遗传转化体系。常用的转化体系有PEG 转化法,基因枪转化法和农杆菌

介导的遗传转化法等^[6]。基因枪转化法存在价格昂贵、嵌合体不易排除、不易选择转化体、转化率低等因素^[7-8]。农杆菌转化法存在工作量大,受寄主范围限制,有时仍会出现多拷贝插入等问题^[5]。而本研究采用的PEG 法较上述两种方法,实验方法相对简便。在蛹虫草转化中的成功应用,丰富了蛹虫草的遗传转化手段,提供了一个有效简便的遗传转化方法。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

蛹虫草菌株由吉林农业大学菌物研究所提供。质粒由吉林农业大学生物反应器提供。溶壁酶购自广州微生物研究所;蜗牛酶购自北京普博欣公司;潮霉素购自广州科因生物科技有限公司。真菌基因组试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。

PDA 液体培养基:新鲜土豆 200g,葡萄糖 20g,

收稿日期:2016-11-22 修回日期:2016-12-13

^{*} 吉林省科技厅资助项目(20150204027NY,20140520164JH)

^{**} 通讯作者,电子信箱:hyl99@163.com

KH₂PO₄ 3g, MgSO₄ 1.5g, 加蒸馏水定容至 1L。

PDA 固体培养基: PDA 液体培养基加琼脂粉 18 g 加蒸馏水定容至 1L。

筛选培养基: PDA 固体培养基中加 0.8 mol/L 甘露醇。

25% PEG 缓冲溶液: PEG4000 25 g, Tris-HCl 12.11 g, 甘露醇 14.57 g, CaCl₂ 1 g, 调 pH7.5, 加蒸馏水定容至 100 ml。

1.2 蛹虫草原生质体的制备与再生

取 PDA 固体培养基上长势较好的蛹虫草菌丝接种于 PDA 液体培养基中, 25℃, 130 r/min 摇床培养 4 天, 滤纸吸去菌球水分, 按 200 mg 菌球加入 1 200 μl 酶液 (以溶壁酶与蜗牛酶按 1.5% : 1.5% 的比例用 pH 4.5, 0.8 mol/L 甘露醇溶解配制), 34℃ 水浴酶解 4 h。在 5 ml 注射器中塞入 1 ml 左右棉花, 过滤酶解液。4 000 g/mim 离心 10 min 弃上清, 沉淀用 pH 4.5, 0.8 mol/L 甘露醇 500 μl 回溶, 适量稀释后用血球计数板计数。最后将提取的原生质体悬液涂布在含 PDA 固体培养基中, 25℃ 培养 7 天。

1.3 不同因素对蛹草原生质体制备的影响

1.3.1 菌龄对原生质体制备的影响 在保持其他条件相同的情况下, 分别采用 2 天、4 天、6 天、8 天摇瓶培养的蛹虫草菌球制备原生质体, 以分析菌龄对原生质体释放的影响。进行 3 次平行实验。

1.3.2 酶解时间对原生质体制备的影响 在保持其他条件相同的情况下, 分别采用 2 h、3 h、4 h、5 h 酶解时间, 制备蛹草原生质体, 以分析酶解时间对原生质体得率的影响。进行 3 次平行实验。

1.3.3 不同种酶液对原生质体制备的影响 在保持其他条件相同的情况下, 用甘露醇配制不同浓度的蜗牛酶、溶壁酶, 单酶及组合酶, 酶解蛹虫草菌球, 以确定最佳的酶解液及其浓度。进行 3 次平行实验。

1.4 PEG 介导蛹草原生质体转化条件的确定

以 PEG4000 浓度、冰浴时间、室温时间、质粒质量及原生质体个数为影响因素, 设计 4 因素 4 水平的正交试验, 转化质粒 pSB130-*GFP* 确定最佳的转化条件。正交试验见表 1。

表 1 PEG 转化条件的正交实验表
Table 1 PEG orthogonal design transformation conditions

| 影响因素 | PEG 浓度 (%) | 冰浴时间 (min) | 室温时间 (min) | 质粒质量 (μg) | 原生质体个数 (个/ml) |
|-------|------------|------------|------------|-----------|-----------------------|
| 实验 1 | 30 | 10 | 20 | 30 | 1.0 × 10 ⁷ |
| 实验 2 | 30 | 12 | 22 | 32 | 1.5 × 10 ⁷ |
| 实验 3 | 30 | 14 | 24 | 34 | 2.0 × 10 ⁷ |
| 实验 4 | 30 | 16 | 26 | 36 | 2.5 × 10 ⁷ |
| 实验 5 | 25 | 12 | 22 | 32 | 1.5 × 10 ⁷ |
| 实验 6 | 25 | 10 | 20 | 30 | 1.0 × 10 ⁷ |
| 实验 7 | 25 | 16 | 26 | 36 | 2.5 × 10 ⁷ |
| 实验 8 | 25 | 14 | 24 | 34 | 2.0 × 10 ⁷ |
| 实验 9 | 20 | 14 | 24 | 34 | 2.0 × 10 ⁷ |
| 实验 10 | 20 | 16 | 26 | 36 | 2.5 × 10 ⁷ |
| 实验 11 | 20 | 10 | 20 | 30 | 1.0 × 10 ⁷ |
| 实验 12 | 20 | 12 | 22 | 32 | 1.5 × 10 ⁷ |
| 实验 13 | 15 | 16 | 26 | 36 | 2.5 × 10 ⁷ |
| 实验 14 | 15 | 14 | 24 | 34 | 2.0 × 10 ⁷ |
| 实验 15 | 15 | 12 | 22 | 32 | 1.5 × 10 ⁷ |
| 实验 16 | 15 | 10 | 20 | 30 | 1.0 × 10 ⁷ |

1.5 蛹草原生质体潮霉素抗性筛选

以潮霉素作为抗性筛选标记, 探索蛹草原生质

体在不同潮霉素浓度下的耐受能力, 确定潮霉素使用的最低抑制浓度。选取 100 ~ 800 mg/L 范围浓度值的

潮霉素放入固体 PDA 培养基中,将制备完全的原生质体悬液均匀地涂布到 PDA 固体培养基中,25℃ 培养 7~15 天观察结果。

1.6 蛹虫草转化菌株鉴定

1.6.1 转化菌株的 PCR 检测 将质粒 pSB130(图 1)转化入蛹虫草,转化菌株按照真菌基因组试剂盒的步骤提取基因组,以质粒 pSB130 的潮霉素基因序列中 400 bp 为目标序列设计检测引物进行 PCR 扩增,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行结果检测。

引物 1 F:CGTCAGGCTGTCTACGATGTC

R:TGAAAGAGGAGGCAGGGGT

反应体系为 25 μ l:含菌丝的基因组模板 1 μ l,2 \times Mix 12.5 μ l,引物(0.1 mmol/L)各 1 μ l,ddH₂O 9.5 μ l。

PCR 扩增:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,扩增 30 个循环;72℃ 延伸 5 min,4℃ 保存。

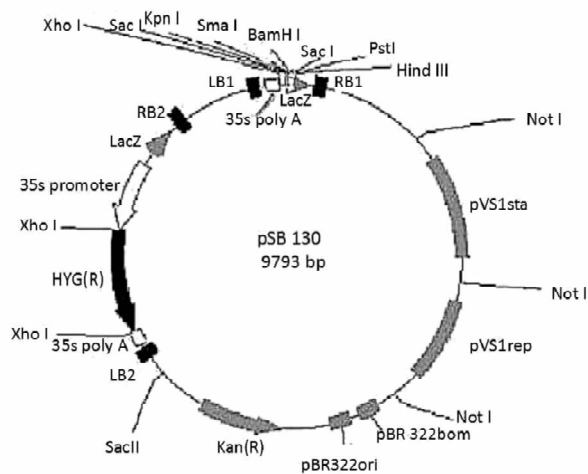


图 1 质粒 pSB130 图谱

Fig.1 The map of plasmid pSB130

1.6.2 转化株的遗传稳定性检测 在筛选培养基上挑选出经过初筛的转化子,挑取 1 cm \times 1 cm 菌块用 0.9% 生理盐水冲洗均匀涂在筛选培养基上,25℃ 培养,继代培养 4 次,检测转化子的遗传稳定性。

2 结果与讨论

2.1 不同因素对蛹虫草原生质体制备的影响

2.1.1 菌龄对原生质体制备的影响 菌龄对原生质体释放的影响很明显,由于幼龄菌球细胞正处于生长期,细胞壁相对较薄,容易被酶解,但可能由于细胞膜发育并不完善,使原生质体不稳定,易发生破损;老龄

菌球,由于细胞壁上沉积了色素等物质,阻碍了酶与细胞壁的作用,细胞壁的解离效率降低,原生质体的得率相对低^[9]。在一定时间内,随着菌龄的增加,得到的原生质体数也增加,在 4 天时达到最大值 1.0×10^7 个/ml,以后又有所下降结果如图 2 所示,所以采用适宜菌龄的菌丝体可以获得更高数量的原生质体。

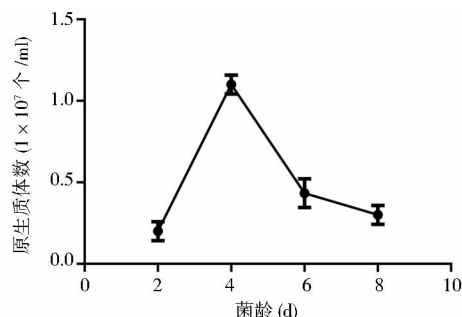


图 2 菌龄对原生质体制备的影响

Fig.2 Effect of hyphal age on protoplast yield

2.1.2 酶解时间对原生质体制备的影响 酶解时间也是影响原生质体制备的重要因素。当制备的原生质体释放到酶液中时,渗透压稳定剂和酶液会对原生质体同时产生保护和伤害作用,所以原生质体在酶液中的时间不宜过长,否则会使酶与原生质体膜过分接触,导致原生质体的再生能力下降,影响再生率。酶解时间也不能过短,时间过短,酶液不能达到最适温度,细胞壁不能完全破坏,原生质体不能完全释放出来。在相同的酶液下,不同酶解时间内所产生的原生质体数量如图 3 所示,原生质体数随时间的增加而增大,在 4h 时达到最大值;酶解时间超过 4h,原生质体数下降,继续延长酶解时间,原生质体数目逐渐降低。因此,不能将原生质体与酶液长时间接触,酶解完毕后应及时处理。

2.1.3 不同种酶液对原生质体制备的影响 真菌原生质体的制备过程中,不同种或同一种不同分布区域菌体的细胞壁结构均可能存在差异,用酶解法破壁制备原生质体,需要不同的酶系统,而且酶的质量、配比对原生质体的制备也有着非常大的影响。现已有多种破除真菌细胞壁的酶类,一般混合酶类比单一酶的效果好,原因在于不同酶之间存在互补作用^[10]。本实验设计用 1.5% 蜗牛酶、1.5% 溶壁酶、1.0% 蜗牛酶、1.0% 溶壁酶、1.5% 蜗牛酶 + 1.5% 溶壁酶、1.0% 蜗牛酶 + 1.0% 溶壁酶,酶解蛹虫草菌球。不同种酶液及其浓度对原生质体的提取影响很大。结果证明了混合酶

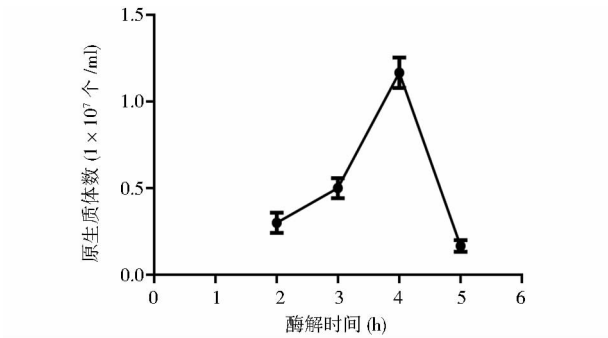


图3 酶解时间对原生质体制备的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis duration on protoplast yield

液对蛹虫草菌球细胞壁的酶解效果比单一酶好,得到原生质体效率最高的组合为1.5%蜗牛酶+1.5%溶壁酶(表2)。

表2 不同酶对蛹虫草原生质体制备得率的影响

Table 2 Effect of different enzymes on the protoplast yield of *Cordyceps militaris*

| Enzymes | Yield of Protoplasts ($10^7/\text{ml}$) |
|---------------------------------|--|
| 1.5% snailase | 0.8 |
| 1.5% lywallzyme | 0.6 |
| 1.0% snailase | 0.1 |
| 1.0% lywallzyme | 0.08 |
| 1.0% lywallzyme + 1.0% snailase | 0.9 |
| 1.5% lywallzyme + 1.5% snailase | 1.2 |

2.2 PEG 介导蛹虫草原生质体转化条件的确定

将计数后的原生质体用甘露醇稀释至 10^7 个/ml,吸取稀释液350 μl 加入30 μg 的pSB130-*GFP*质粒冰上放置5min后,加25%PEG 50 μl 冰上放置10min,再加入25%PEG 200 μl 室温放置20min,随后加入甘露醇1ml,5000g/min离心5min弃上清,用甘露醇200 μl 回溶,25 $^{\circ}\text{C}$ 培养7天于荧光倒置显微镜观察(图4)。

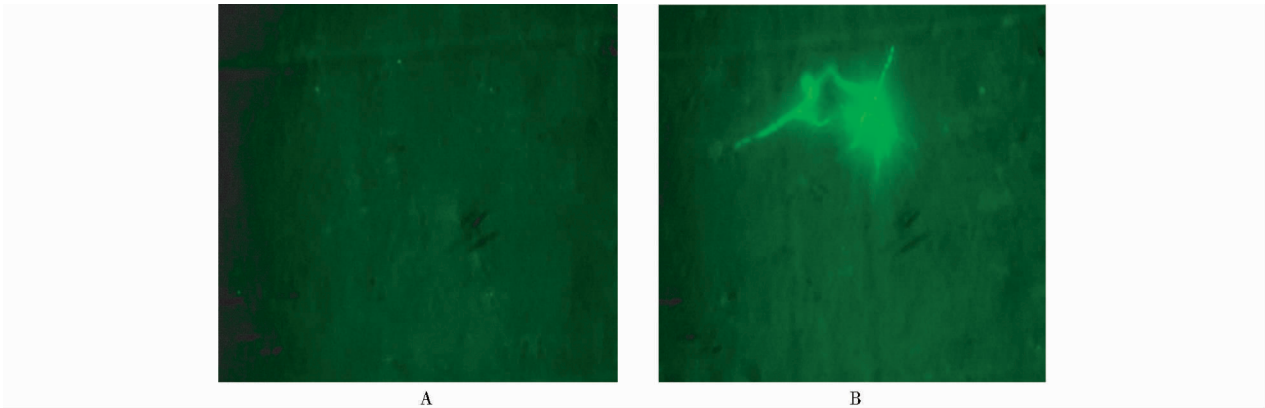


图4 绿色荧光蛋白在野生型菌株(A)和转化子(B)中的表达荧光显微镜

Fig.4 Expression of *GFP* in the wild-type (A) and transformant (B)

运用荧光倒置显微镜进行观察,结果显示野生型菌株A在激发光下未能观察到绿色荧光,而转化子B有绿色荧光,这证明质粒pSB130-*GFP*通过转化条件为:PEG4000浓度为25%,冰浴时间为10min,室温时间为20min,质粒质量为30 μg ,原生质体个数为 1.0×10^7 个的PEG法可成功转化入蛹虫草,携带的绿色荧光

蛋白基因可以成功进行表达。

2.3 蛹虫草原生质体潮霉素抗性筛选

将蛹虫草原生质体分别接种于含100~800mg/L潮霉素和不含潮霉素的PDA固体培养基上,25 $^{\circ}\text{C}$ 培养7~15天(表3)(图5)。

表3 蛹虫草原生质体对潮霉素的抗性筛选

Table 3 The test of sensitivity of the protoplast of *Cordyceps militaris* to the HmB

| | The concentrations of hygromycin B mg/L | | |
|-----------------------------|---|---------------------------|--------------------------|
| | 0 | 300 | 650 |
| The phenotype of protoplast | Lots of regenerative colonies | Few regenerative colonies | No regenerative colonies |

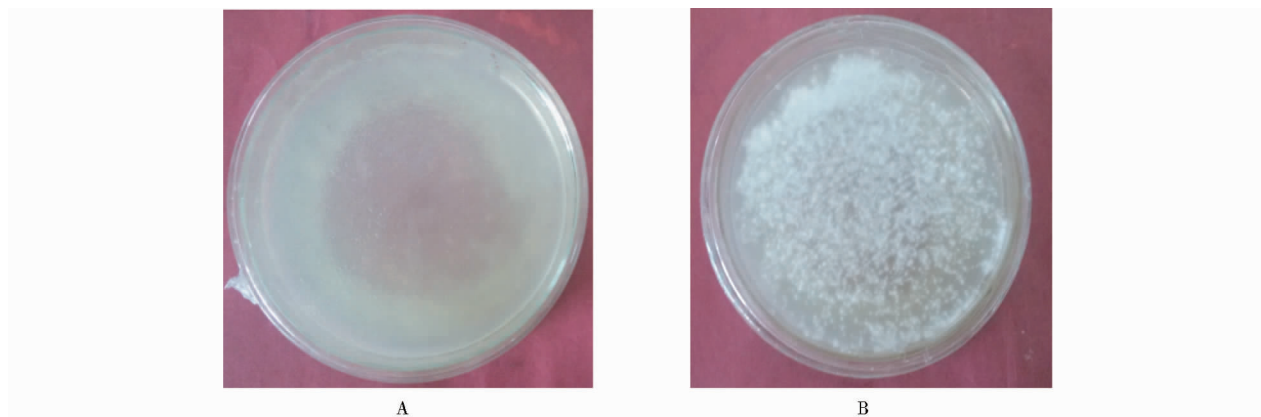


图5 野生型蛹虫草分别在含与不含潮霉素的PDA培养基上生长7~15天的情况

Fig. 5 Wild *Cordyceps militaris* on PDA plate with/without hygromycin in 7~15 days after inoculation

从图5可看出,野生型蛹草原生质体在不含有潮霉素的PDA培养基上生长旺盛,7~15天可长满平板(图5B);而在含650 mg/L潮霉素的PDA培养基上生长7~15天后丝毫未长出(图5A)。因此本研究采用潮霉素浓度650 mg/L作为蛹虫草转化实验的筛选标记。

2.4 转化株的PCR鉴定及遗传稳定性检测

将质粒pSB130转化入蛹虫草,转化后的原生质体涂布于含有650 mg/L潮霉素的PDA筛选培养基上,于25℃培养7~15天后便可见到再生菌落的出现(图6B),而对照平板上(涂有不加pSB130质粒的转化液的平板)则未长出一个菌落(图6A)。

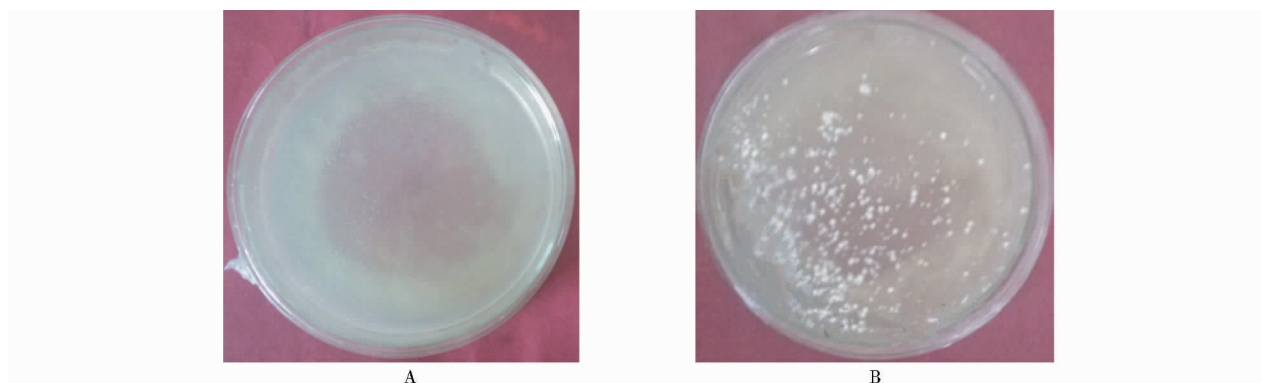


图6 质粒pSB130转化蛹虫草后,转化株在含有潮霉素的PDA筛选培养基上生长的情况

Fig. 6 The phenotype of transformants on PDA selection medium with hygromycin after transferring pSB130 into *Cordyceps militaris*

为了检测质粒pSB130是否转入蛹虫草中,从图6B中随机挑选转化株50个挑入PDA再生培养基,25℃培养15~30天,提取其基因组,用合成的引物进行PCR扩增并进行1%琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图7所示,其中12个转化子与阳性对照(质粒pSB130)都扩增出了400bp的潮霉素基因目的条带,条带大小为400bp左右,与所设计的PCR扩增的理论值相符。而阴性对照(未转化的野生型蛹虫草菌株)则未扩出任何条带,证明质粒pSB130已经转入蛹虫草中。

利用潮霉素抗性作为标记筛选转化子时,一般假

转化子背景高^[11-12],为了克服筛选假阳性,同时检测转化子的遗传稳定性。将初筛得到的转化株进行4次继代培养,再次提取其基因组,用引物1进行PCR扩增,1%琼脂糖凝胶电泳检测其遗传稳定性,结果如图8所示。经过4次继代培养,转化子具有的潮霉素抗性比较稳定。

3 结论

在真菌原生质体的制备过程中,有效地去除细胞壁,得到游离的原生质体是至关重要的。本实验采用

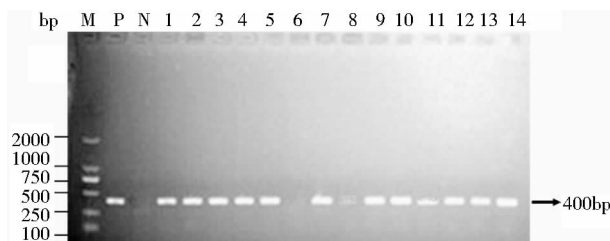


图7 蛹虫草转化株 PCR 扩增结果

Fig.7 Electrophoretogram of PCR products of *Cordyceps militaris* transformants

M: DNA molecular weight marker DL2000; P: Plasmid pSB130, as a positive control; N: Wild type *C. militaris*'s genome, as a negative control; 1 ~ 14: *Cordyceps militaris* transformed strain PCR amplification product electrophoresis

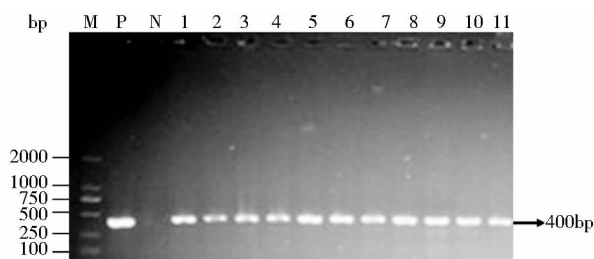


图8 蛹虫草转化株4次继代后 PCR 扩增结果

Fig.8 *Cordyceps* transformants were PCR results four times subculture

M: DNA molecular weight marker DL2000; P: Plasmid pSB130, as a positive control; N: Wild type *Cordyceps militaris*'s genome, as a negative control; 1 ~ 11: *Cordyceps militaris*

不同影响因素提取蛹虫草原生质体,从而得到最佳的提取条件:摇瓶培养4天的蛹虫草菌球用1.5%蜗牛酶+1.5%溶壁酶酶解4h可以得到 1.0×10^7 个/ml原生质体。

本实验运用正交试验转化质粒 pSB130-GFP,得到了最优的转化条件:PEG 浓度为25%,冰浴时间为10 min,室温时间为20 min,质粒质量为30 μ g,原生质体个数为 1.0×10^7 个,以此在蛹虫草中成功地建立了PEG 遗传转化法,并且以潮霉素作为抗性筛选标记得到了最低抑制筛选浓度650 mg/L。本实验的转化效率约为100~200个/ μ g(抗性转化子/pSB130+ 10^7 个原生质体)。大多数丝状真菌的转化效率为5~30个/ μ g^[13]。也有文献报道较高的转化效率,如 *Pleurotus ostreatus*^[11] 的转化效率为200个/ μ g, *Tolypocladium geodes*^[14] 的转化效率为3~5 $\times 10^3$ 个/ μ g。转化效率的高低可能与物种的本身有关,也可能与转

化条件各数值的标准不同有关。

本实验将转化子复筛4次,运用PCR 检测结果显示在含650 mg/L 潮霉素的抗性平板上,转化子均生长良好,这表明了转化子的潮霉素抗性比较稳定而且在继代培养中能稳定遗传。因此利用PEG 转化法并且结合多次抗性复筛,能够获得遗传稳定的转化子。这一方法可以作为外源基因转化蛹虫草的有效手段。

参考文献

- [1] Kirk P M, Cannon P F, David J C, et al. Dictionary of the fungi-9th ed. Oxon: CAB International, 2001. 56:1-655.
- [2] 梁宗琦,刘爱英,刘作易. 中国真菌志:虫草属. 北京:北京科学出版社,2007.
Liang Z Q, Liu A Y, Liu Z Y. Chinese Fungus Blog: Cordyceps Beijing: Beijing Science Press, 2007.
- [3] Yongxin Sun, Xingfan Du, Shuying Li, et al. Dietary *Cordyceps militaris* protects against *Vibrio splendidus* infection in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(3): 964-971.
- [4] Peng Zheng, Yongliang Xia, Guohua Xiao, et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese Medicine. Genome Biology, 2011, 12(11): 116.
- [5] 陈赞娟, 韦建福. 丝状真菌遗传转化的研究进展. 云南农业大学学报, 2009, 3(9): 448-454.
Chen Y J, Wei J F. Studies on the genetic transformation of filamentous fungi. Journal of Yunnan Agricultural University, 2009, 3(9): 448-454.
- [6] Rina Rachmawati, Hiroshi Kinoshita, Takuya Nihira. Establishment of transformation system in *Cordyceps militaris* by using integration vector with Benomyl resistance gene. Procedia Environmental Sciences, 2013, 17(8): 142-149.
- [7] 李欣龙, 张敏, 段霞瑜, 等. 丝状真菌遗传转化系统的研究进展. 中国植物保护学会2011年学术年会论文集. 苏州: 中国植物保护学会, 2011, 7.
Li X L, Zhang M, Duan X Y, et al. filamentous fungi segment of genetic transformation system. China Plant Protection 2011 Annual Conference Proceedings. Suzhou: China Society of Plant Protection. 2011, 7.
- [8] 茅文俊, 鲍大鹏, 周陈力, 等. 运用基因枪法进行蛹虫草遗传转化的研究. 园艺学报, 2015, 9(9): 1837-1842.
Mao W J, Bao D P, Zhou C L, et al. Conduct research using particle bombardment *Cordyceps* genetic transformation. Horticulture, 2015, 9(9): 1837-1842.
- [9] 董宏平, 袁生, 徐旭士, 等. 轮梗霉原生质体的制备. 菌物系统, 2001, 20(4): 561-565.
Dong H P, Yuan S, Xu X S, et al. *Diasporangium* prepared mold fungi protoplasts system, 2001, 20(4): 561-565.
- [10] 胡伟, 孔繁翔, 桑伟莲. 菌根真菌——赭丝膜伞原生质体分离

- 与再生研究. 菌物系统, 2001, 20(4): 561-565.
- Hu W, Kong F X, Sang W L, Isolation and regeneration of protoplast from mycorrhizal Fungi-Ocher Films System, 2001, 20(4): 561-565.
- [11] Irie T, Honda Y, Hirano T, et al. Stable transformation of *Pleurotus ostreatus* to hygromycin B resistance using *Lentins edodes* GPD expression signals. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(10): 707-709.
- [12] 郭丽琼, 林俊芳, 熊盛, 等. 抗冷冻蛋白基因遗传转化草菇的研究. 微生物学报, 2005, 45(5): 39-43.
- Guo L Q, Lin J F, Xiong S, et al, Genetic transformation of cryoprotective genes in *Volvariella volvacea*. Journal of Microbiology, 2005, 45(5): 39-43.
- [13] Yelton M M, Hamer J E, Timblern A E. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using *atrC* plasmid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81(5): 1470-1474.
- [14] Calmelst, Parriche M, Durand H, et al. High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. Current Genetics, 1991, 20(4): 309-314.

Establishment of Genetic Transformation System of *Cordyceps militaris* using PEG Mediated Method

SUN Dan^{1,2} ZHANG Min^{1,2} XIE Chang-rui^{1,2} GUO Xiao-wei^{1,2} XU He-han^{1,2}
GAO Hong-tao^{1,2} LI Xiao-wei^{1,2} SUN Tian-xu^{1,2} LI Hai-yan^{1,2}

(1 College of Life Science, Jilin Agricultural University, Ministry of Education, Changchun 130118, China)

(2 Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract As protoplast is usually used as the recipient cell in the genetic transformation system of fungi, various factors in the preparation of *Cordyceps militaris* protoplast were compared. The 4 day old mycelia treated with the mixture of 1.5% snail enzyme and 1.5% lysozyme in 0.8 mol/L mannitol at 34°C for 4h could efficiently produce protoplasts with concentration up to 1.0×10^7 /ml. Drug resistance test of *H. erinaceus* against hygromycin B showed that the lowest selection concentration was 650 mg/L. The plasmid pSB130-*GFP* was transformed into the protoplast of *Cordyceps militaris* by the method of orthogonal test. The best transformation system was obtained under the fluorescence inverted microscope at PEG was 25% with freezing time of 10 min and temperature for 20 min. The mass of plasmid was 30 μ g, while the number of protoplasts was 10^7 cells/ml. The transformation frequency of PEG-mediated transformation of *Cordyceps militaris* was about 100 ~ 200/ μ g (resistant transformant/plasmid + 10^7 protoplasts). Transformants on medium with hygromycin after 4 or more passages expressed hygromycin resistance with stable inheritance. The study was directed by genetic engineering, rapid improvent of quality and the use of medicinal *Cordyceps* fermentation methods for producing of some exogenous protein is of great economic value. Such a foundation, also contribute to learn more about this major *Cordyceps* fungus gene expression regulation mechanism.

Key words *Cordyceps militaris* Transformation The PEG method Hygromycin B