

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-076

## CRISPR/Cas 基因组编辑技术在丝状真菌次级代谢产物合成中的应用

林继聪<sup>1</sup>, 邹根<sup>2</sup>, 刘宏民<sup>1</sup>, 魏勇军<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 郑州大学药学院, 郑州大学药物研究院, 郑州大学合成生物学实验室, 药物关键制备技术教育部重点实验室, 河南郑州 450001; <sup>2</sup> 上海市农业科学院食用菌研究所, 农业农村部南方食用菌资源利用重点实验室, 国家食用菌工程技术研究中心, 上海 201403)

**摘要:** 丝状真菌能够合成抗生素、色素、酶制剂、激素等多种天然产物, 广泛应用于医药、化工、农业和基础生物学研究等领域。丝状真菌遗传背景复杂, 阻碍了对它的进一步开发利用。基因组编辑是基于核酸酶对基因组位点特异性序列进行靶向切割, 产生双链断裂, 从而通过非同源末端连接或同源重组进行修复的技术。其中, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 系统是目前使用最普遍的基因组编辑技术, 已在丝状真菌遗传育种、基因改造和多种天然产物合成等方面进行了大量应用。本文总结了丝状真菌 CRISPR/Cas 的技术原理、元件表达、递送方式及该系统在次级代谢产物等研究中的应用。对于脱靶效应以及转化率低的问题, 本文讨论了可能的解决方法。在此基础上, 展望了基于 CRISPR/Cas 的基因组编辑技术在真菌基因功能表征、天然产物合成代谢途径解析与重构、高效丝状真菌底盘细胞构建、天然产物合成等方面的应用。

**关键词:** 丝状真菌; CRISPR/Cas 系统; 次级代谢产物; 基因敲除; 异源表达

中图分类号: Q812 文献标志码: A

## Application of CRISPR/Cas genome editing technology in the synthesis of secondary metabolites of filamentous fungi

LIN Jicong<sup>1</sup>, ZOU Gen<sup>2</sup>, LIU Hongmin<sup>1</sup>, WEI Yongjun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> School of Pharmaceutical Sciences, Institute of Drug Discovery and Development, Laboratory of Synthetic Biology, Key Laboratory of Advanced Drug Preparation Technologies, Ministry of Education of China, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China; <sup>2</sup> Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Southern Key Laboratory of Edible Fungus Resource Utilization, Ministry of Agriculture, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201403, China)

**Abstract:** Filamentous fungi are the producers of antibiotics, pigments, enzymes, hormones, and other natural products, which are widely applied in the industries of medicine, chemical engineering, agriculture, and basic biology studies. The genetic

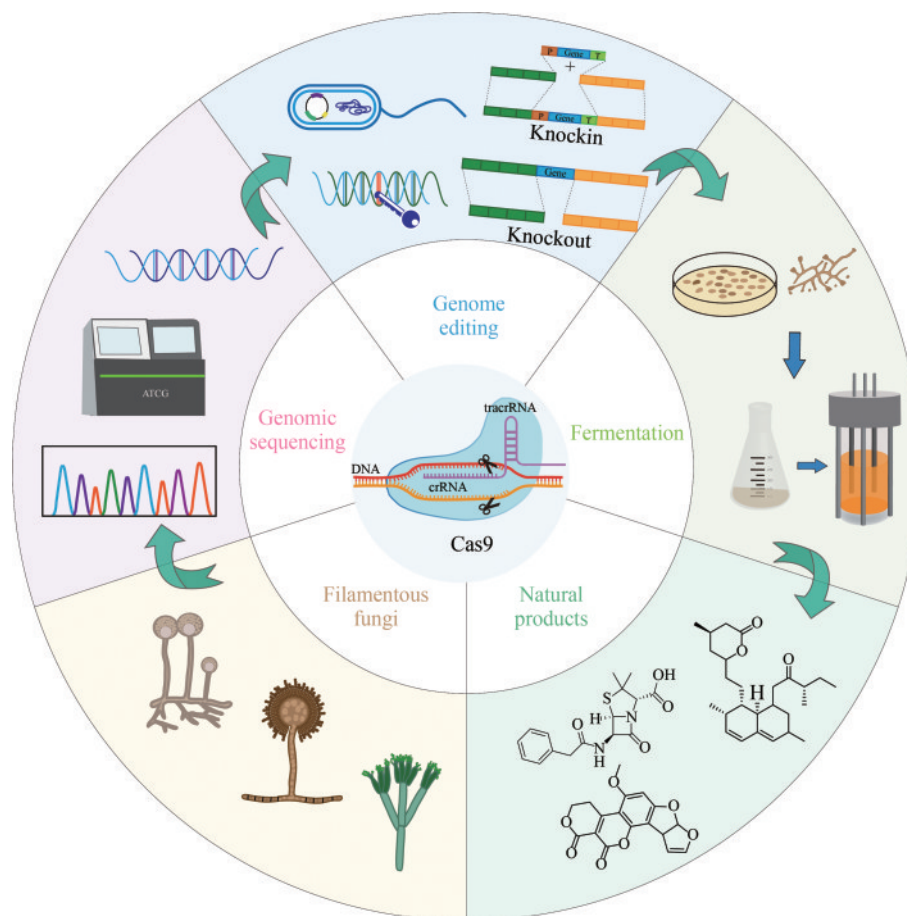
收稿日期: 2022-12-28 修回日期: 2023-02-27

基金项目: 国家自然科学基金 (32111530179)

引用本文: 林继聪, 邹根, 刘宏民, 魏勇军. CRISPR/Cas 基因组编辑技术在丝状真菌次级代谢产物合成中的应用[J]. 合成生物学, 2023, 4(4): 738-755

Citation: LIN Jicong, ZOU Gen, LIU Hongmin, WEI Yongjun. Application of CRISPR/Cas genome editing technology in the synthesis of secondary metabolites of filamentous fungi[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(4): 738-755

background of filamentous fungi is complex, and molecular biology studies of filamentous fungi are difficult. Genome editing can cut specific sites of the genomic double-stranded DNA, to finish the insertion, deletion, or replacement of genomic information *in vivo* based on non-homologous end joining repair or homologous recombination repair. CRISPR system is the most widely used genome editing technology, which has been applied in genetic breeding, metabolic engineering, and the production of valuable natural products with filamentous fungi. The secondary metabolites of filamentous fungi, the gene editing principles, biopart design and expression, and delivery strategy of the CRISPR/Cas system were introduced, and the application of CRISPR/Cas system of filamentous fungi was summarized. Possible solutions to solve the problems of off-target effect and low conversion rates of gene editing were discussed. Besides, the application of the CRISPR/Cas system in the characterization of fungal gene function, natural product biosynthetic pathway recovery and rebuilding, construction of efficient filamentous fungi chassis cells, and natural product biosynthesis were also discussed.



**Keywords:** filamentous fungi; CRISPR-Cas system; secondary metabolites; gene editing; heterologous expression

丝状真菌 (filamentous fungi) 能够合成抗生素、色素、酶、激素等多种产品<sup>[1]</sup>, 在医药、化工、农业和基础生物学研究中广泛应用。黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 会分泌对人类或动物具有致病性的黄曲霉毒素<sup>[2]</sup>; 产黄青霉 (*Penicillium*

*chrysogenum*)、顶头孢霉 (*Acremonium chrysogenum*) 和土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 能合成  $\beta$ -内酰胺类抗生素<sup>[3-4]</sup> (青霉素和头孢菌素) 或他汀类药物<sup>[5]</sup> (图1)。黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 是葡糖淀粉酶<sup>[6]</sup> 和果胶酶<sup>[7]</sup> 的主要生产宿主, 里氏木霉

(*Trichoderma reesei*) 是纤维素酶的主要生产宿主<sup>[8]</sup>；丝状真菌生产的酶占据工业酶市场份额的50%<sup>[9]</sup>。部分丝状真菌的次级代谢产物在特定环境条件下产生，但难以在实验室的生长条件下合成<sup>[10]</sup>。丝状真菌中含有大量“沉默的”生物合成基因簇 (biosynthetic gene clusters, BGC)，这些合成基因簇具有合成活性天然产物的潜力<sup>[11]</sup>。

功能基因组研究对真菌次级代谢产物的合成具有重大影响<sup>[12]</sup>。基因组研究需要对宿主基因组进行缺失、插入和替换等遗传操作，以探究基因的功能及其与其他基因的相互作用。与细菌和酵母相比，丝状真菌的遗传背景较为复杂<sup>[13]</sup>；在进行分子水平研究时，可用的遗传筛选标记有限。此外，丝状真菌的同源重组效率低，生长缓慢，遗传操作困难，阻碍了对其的工程改造<sup>[14]</sup>，限制了对其的进一步开发应用<sup>[15]</sup>。

基因组编辑技术为探究真菌生理特性、合成多种天然产物等提供了技术基础，也是获取高性能工业生产菌株的关键。目前，基因组编辑技术主要有锌指核酸酶技术 (zinc-finger nucleases, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease proteins, TALEN) 以及成簇的规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)<sup>[16]</sup> 等三种。其中，CRISPR系统最简便，在丝状真菌遗传育种及基因改造方面得到广泛应用<sup>[17-18]</sup>。本文对丝状真菌次级代谢产物 (secondary metabolites, SM) 合成以及基因组编辑技术进行了综述，并阐述了丝状真菌CRISPR介导的基因组编辑技术的发展及其在次级代谢产物合成等方面的应用趋势。

## 1 丝状真菌次级代谢产物

丝状真菌次级代谢产物是药物的重要来源之一。青霉素类、头孢菌素类药物、灰黄霉素<sup>[19]</sup>等均属于丝状真菌次级代谢产物<sup>[20]</sup> (图1)。

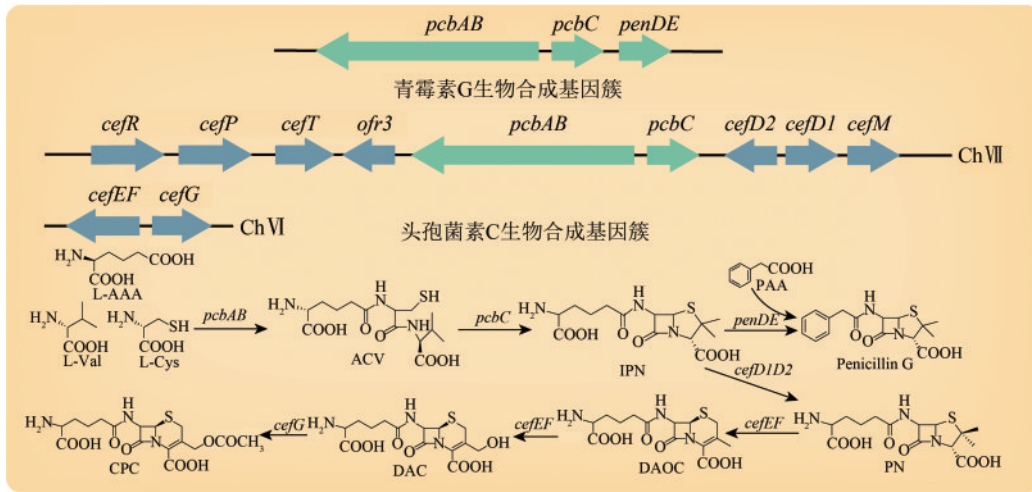
弯颈霉属 (*Tolyocladium*) 的环孢菌素被用来预防器官或组织移植产生的排斥反应<sup>[24]</sup>。短密青霉 (*Penicillium brevicompactum*) 的霉酚酸可以抑制免疫排斥反应，在医药领域具有重要的应用价值<sup>[25]</sup>。高血脂会增加血液的黏稠度，且可能引发

动脉粥样硬化、高血压、冠心病等严重疾病。土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 和橘青霉 (*Penicillium citrinum*) 的他汀类活性天然产物是降血脂的首选<sup>[26]</sup>。洛伐他汀是一种重要的降脂药，但与其相比，辛伐他汀的降脂作用更强，是效果更好的降脂药物。在工业上，先运用土曲霉合成洛伐他汀，然后通过碱水解的方法获得了中间产物莫纳克林J，再通过化学方法合成辛伐他汀。吕雪峰团队<sup>[27]</sup> 鉴定了一个新的水解酶PcEST，该酶可以高效转化洛伐他汀为莫纳克林J。同时，研究人员利用土曲霉内源性组成型强启动子Pgp*At*过表达特异性转录调控因子*lovE*，将莫纳克林J的产量提高了52.5%<sup>[28]</sup>。

丝状真菌次级代谢产物的合成过程复杂，相关基因通常成簇排列 (图1)。AntiSMASH等生物信息学软件可以预测基因组中的BGC，但仍需通过敲除等基因操作研究证实相关BGC的功能<sup>[29]</sup>。天然宿主在实验室条件下生长缓慢且遗传工具稀缺，部分天然产物BGC难以表达；尽管可在模式宿主中异源表达天然产物BGC，但成功率较低<sup>[30]</sup>。通常，酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是异源合成天然产物BGC的真菌宿主<sup>[31]</sup>。酿酒酵母的高效重组方法和多种基因组编辑技术为复杂天然产物合成途径的异源表达提供了基础。青蒿酸<sup>[32]</sup>、人参皂苷Rh<sub>2</sub><sup>[33]</sup>、文多灵和长春质碱<sup>[34]</sup>等多种复杂植物天然产物已在酵母中成功合成，但长片段天然产物BGC的表达仍较为困难。开发真菌类基因组编辑系统是深入研究和表征天然产物BGC的重要途径。

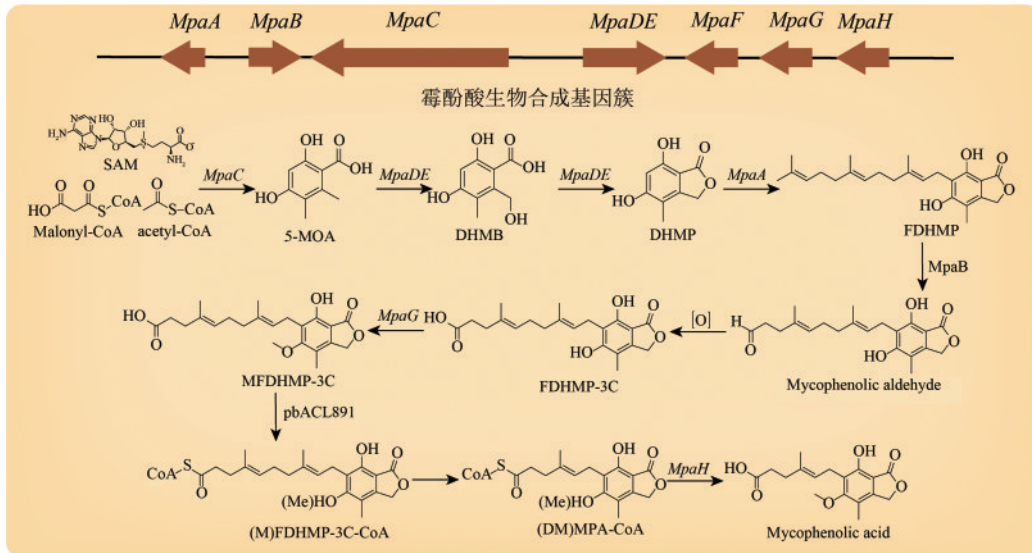
## 2 CRISPR/Cas 基因组编辑技术

2013年，新一代基因编辑技术CRISPR/Cas9诞生<sup>[35]</sup>，开启了基因组编辑的新时代。CRISPR/Cas9系统作为细菌的一种特殊防御机制，主要用来抵御入侵的病毒和质粒<sup>[36]</sup>。DiCarlo等<sup>[37]</sup>在酿酒酵母中实现了基于CRISPR/Cas9的基因编辑。2015年，Liu等<sup>[38]</sup>第一次将CRISPR/Cas9技术应用于里氏木霉，为CRISPR/Cas9基因组编辑系统广泛应用于丝状真菌的遗传改造奠定了基础。与ZFN和TALEN技术相比，CRISPR/Cas9系统能够诱导宿主细胞中DNA的双链断裂 (double strand break, DSB)，提高了基因编辑整合的效率。



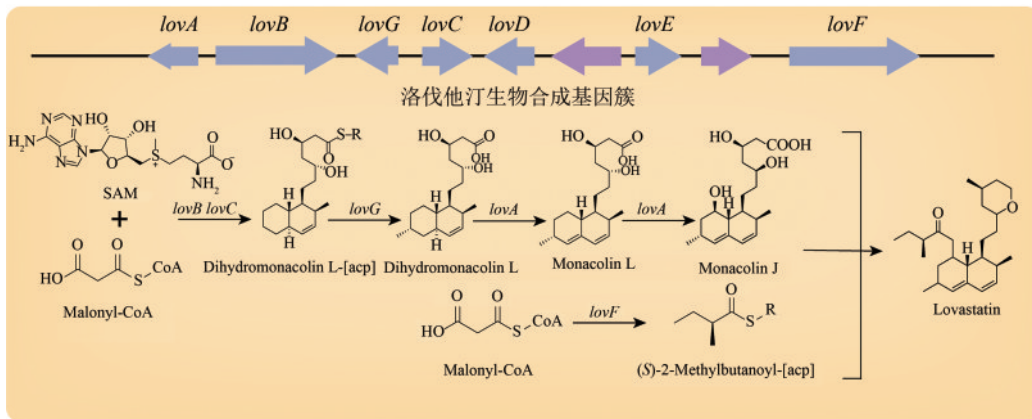
(a) 青霉素G及头孢菌素C生物合成基因簇及生物合成途径<sup>[21]</sup>

(a) Biosynthetic gene clusters and biosynthetic pathways of penicillin G and cephalosporin C



(b) 霉酚酸生物合成基因簇及生物合成途径<sup>[22]</sup>

(b) Biosynthetic gene clusters and biosynthetic pathways of mycophenolic acid



(c) 洛伐他汀生物合成基因簇及生物合成途径<sup>[23]</sup>

(c) Biosynthetic gene clusters and biosynthetic pathways of lovastatin

图1 部分次级代谢产物生物合成基因簇及生物合成途径<sup>[21-23]</sup>

Fig. 1 Biosynthetic gene clusters and biosynthetic pathways of some secondary metabolites

## 2.1 CRISPR/Cas9系统的工作原理

CRISPR/Cas9 基因组编辑系统由 Cas9 核酸酶以及通过融合 CRISPR RNA (crRNA) 和 transactivating crRNA (tracrRNA) 形成的 sgRNA (single guide RNA) 组成。与 ZFN 和 TALEN 相比, CRISPR 系统在基因组编辑方面更加快速、通用且精准<sup>[39]</sup>。其中, sgRNA 负责识别原间隔区相邻基序 (PAM) 位点上游的 20 个核苷酸序列。当 sgRNA 识别出目标 DNA 序列后, Cas9 将在 PAM 和其上游 20 bp 之间的位点断裂 DNA 双链, 进而激活宿主 DNA 非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (homologous recombination, HR) 修复过程 (图 2)。

## 2.2 NHEJ和HR修复机制

Cas9 蛋白切割目标靶点产生的 DSB, 可以通过非同源末端连接 (NHEJ) 或同源重组 (HR) 修复。NHEJ 修复可能会随机插入、删除 DNA 序列,

精准度不高; HR 修复通过同源序列进行, 精准度高, 是进行精准基因编辑的关键<sup>[40]</sup>。NHEJ 在细胞周期的 G<sub>1</sub> 期随机发生, 在 Ku 蛋白复合物 (Ku70/80) 的作用下, NHEJ 修复途径可直接使 DNA 末端双链断裂进行连接。HR 修复发生在 DNA 复制过程中, 同源供体 DNA 片段与其特定靶标二者缺一不可<sup>[41]</sup>, 能进行精确修复。

基于 HR 的原理, Liu 等<sup>[38]</sup> 在丝状真菌里氏木霉中建立了 CRISPR/Cas9 系统, 发现不同长度同源臂的同源重组效率均在 93% 以上, 实现了有效的外源基因整合。Suzuki 等<sup>[42]</sup> 设计了一种基于 CRISPR/Cas9 的同源独立靶向整合 (HITI) 策略, 该方法利用 NHEJ 途径, 在分裂和非分裂细胞中实现靶向敲入, 允许通过 NHEJ 修复将片段整合到基因组中。Clemmensen 等<sup>[43]</sup> 将环形供体、线性供体分别转入扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 中, 发现转入环形供体的活转化子数量高于线性供体。这可能是由于环形供体不存在 DSB, 不能通过 NHEJ 途径整合到染色体上, 从而有利于 HR 修复<sup>[44]</sup>。

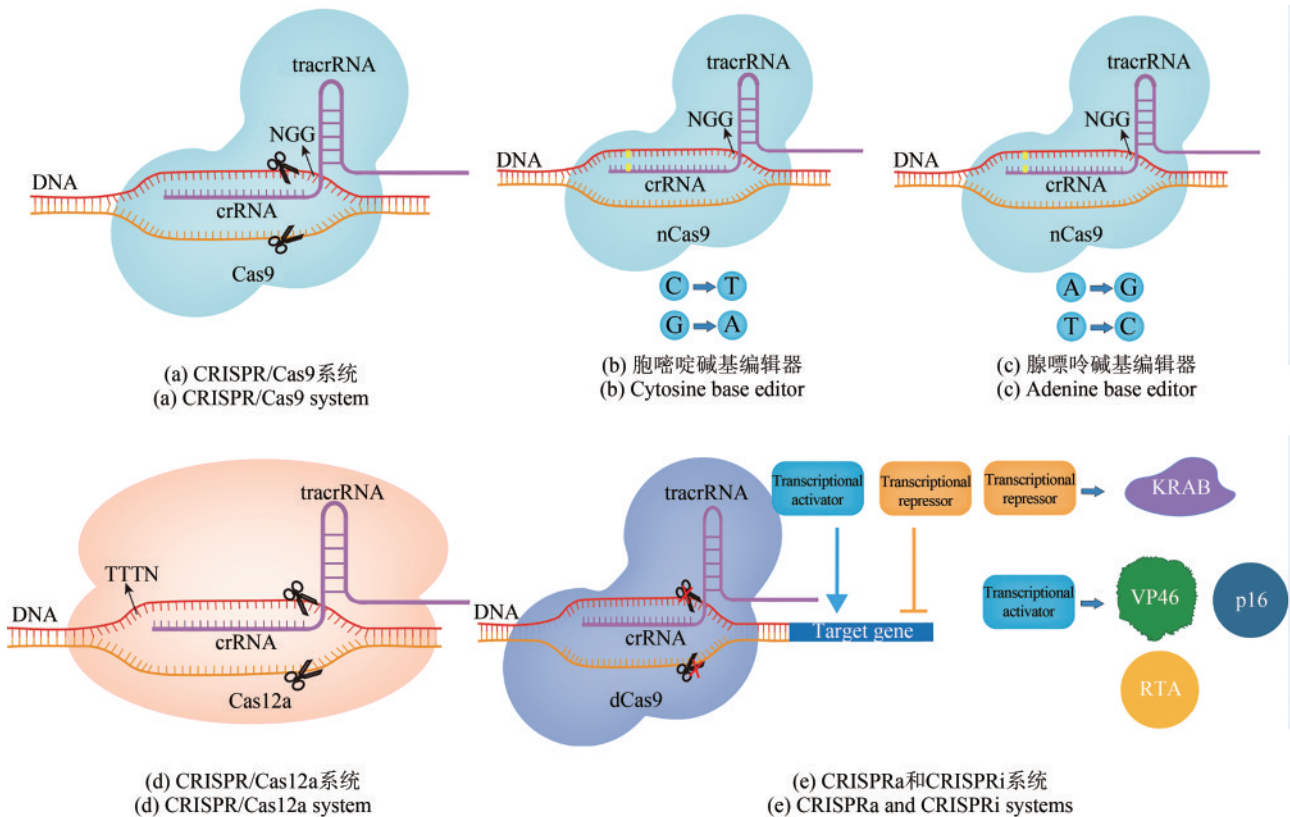


图 2 CRISPR/Cas 基因组编辑系统作用机制

Fig. 2 Mechanism of CRISPR/Cas genome editing systems

## 2.3 Cas9的表达

Cas9 蛋白是 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统的重要组成部分，具有切割目标靶点的作用<sup>[45]</sup>。CRISPR/Cas9 系统是在细菌或古细菌中发现的，而真菌中不存在 Cas9 蛋白<sup>[46]</sup>。因此，需根据真菌密码子偏好性，重新设计优化 Cas9 基因序列。此外，需在 Cas9 基因两端添加 SV40 等核定位信号<sup>[47]</sup>，以实现 Cas9 蛋白的定向表达，完成对真菌基因组的编辑。尽管 SV40 广泛应用，但在尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)<sup>[48]</sup> 和藤仓镰刀菌 (*Fusarium fujikuroi*)<sup>[49]</sup> 等真菌中，需使用其特有的内源核定位信号序列连接 Cas9 蛋白。

Cas9 蛋白的成功表达依赖于系统所用启动子的类型和强度，选择合适的启动子对于建立高效的 CRISPR/Cas9 系统至关重要<sup>[50]</sup>。在丝状真菌中，主要使用构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的 *trpC*<sup>[51]</sup>、*gpdA*<sup>[52]</sup> 和 *tefl*<sup>[53]</sup> 组成型启动子表达 Cas9 蛋白。有研究表明 Cas9 的持续表达会产生细胞毒性<sup>[54-55]</sup>，因此，里氏木霉的 *cbh1* 启动子或构巢曲霉的 *xlnA* 启动子等诱导型启动子常用于 Cas9 的表达。在里氏木霉中，多使用 *cbh1* 启动子表达 Cas9 基因，以减少基因编辑的脱靶效应<sup>[38]</sup>。经基因组学研究后，工业青霉素生产菌产黄青霉 Wisconsin 54-1255 被归属于鲁本斯青霉 (*Penicillium rubens*)<sup>[56]</sup>。在鲁本斯青霉中，*xlnA* 启动子用于高表达 Cas9 蛋白<sup>[57]</sup>。因此，合适的启动子是优化丝状真菌 CRISPR/Cas9 系统的方案之一。

## 2.4 sgRNA的表达

sgRNA 的高效表达是 CRISPR/Cas9 系统发挥作用的关键。sgRNA 转录后才能在丝状真菌中发挥作用。*U6* snRNA 基因序列高度保守<sup>[58]</sup>，因此，RNA 聚合酶 III 型 *U6* 启动子是 sgRNA 转录的常用启动子之一。在嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora thermophila*) 中，Liu 等<sup>[59]</sup> 使用 *U6* 启动子，以 *cre-1* 等基因为靶点，单基因编辑效率高达 95%，多基因共编辑效率最高为 70%。除 *U6* 启动子外，tRNA 启动子也可以用于 sgRNA 的转录。通过鲁本斯青霉全基因组测序以及序列注释<sup>[60]</sup>，鉴定出 145 个 tRNA 编码基因。格罗宁根大学的 Pohl 等<sup>[57]</sup> 基

于序列分析选取了 tRNA-Met 和 tRNA-Leu 两个启动子，成功敲除了与色素合成有关的 *pks17* 基因。Song 等<sup>[61]</sup> 报道了在黑曲霉中由内源性 tRNA 启动子驱动的 gRNA 转录，该启动子包括一个 tRNA 基因及其上游的 100 bp 序列。进一步研究表明，将表达 Cas9 的质粒与线性的 gRNA 共转化后，37 个 tRNA 启动子中有 36 个能够在黑曲霉中转录 gRNA<sup>[61]</sup>。当 gRNA 和 Cas9 在质粒中表达时，基因突变的效率高达 97%<sup>[61]</sup>。Zheng 等<sup>[62]</sup> 发现 5S rRNA 在细胞中高度保守且丰富，他们以黑曲霉的 5S rRNA 基因为启动子驱动 sgRNA 的转录。黑曲霉的一个多肽合成酶编码基因 *alba* 的敲除效率高达 96%，远远高于 *PhU6* 启动子 15%~23% 的敲除效率<sup>[62]</sup>。

除了上述两种启动子，酿酒酵母的 *SNR52* 启动子也成功应用于烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 等丝状真菌的基因组编辑系统的构建<sup>[63]</sup>。*utp25* 是鲁本斯青霉中 U3 小核 RNA 相关蛋白，也可以作为启动子驱动 sgRNA 的转录<sup>[57]</sup>。

## 2.5 CRISPR/Cas 系统在丝状真菌中的构建

### 2.5.1 CRISPR/Cas 元件的染色体表达

脱靶效应是丝状真菌基因编辑效率低下的原因之一，CRISPR/Cas 元件的瞬时表达可以降低脱靶现象。诱导型 *tet<sup>on</sup>* 启动子已被用于调控烟曲霉菌株中染色体 Cas9 的表达<sup>[64]</sup>。通过将体外转录的 sgRNA 传递到表达 Cas9 的真菌菌株中，可以实现 CRISPR/Cas9 的瞬时表达，已被用于构建藤仓镰刀菌<sup>[65]</sup> 等丝状真菌的基因编辑系统 (图 3)。Xiang 等<sup>[66]</sup> 开发了一种自杀载体，该载体将 Cas9 元件编码在线性修复模板上，该模板包括一个与靶位点同源的标记基因；Cas9 切割靶基因时，标记基因可以在目标靶点重组，Cas9 则会降解，该方法已用于球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) 的基因组编辑。

### 2.5.2 自主复制质粒

在丝状真菌中，大多数环状质粒没有染色体体外维持和复制的能力，构巢曲霉的 AMA1 序列 (autonomous replicator derived from *Aspergillus nidulans*, 曲霉自主复制因子) 为质粒在丝状真菌

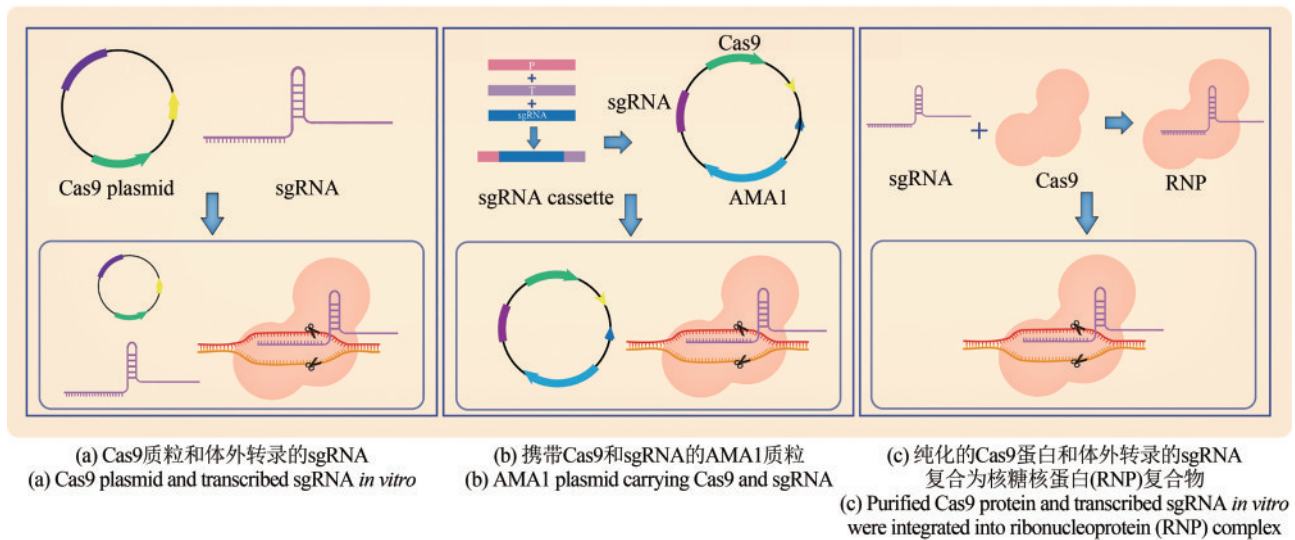


图3 在丝状真菌中构建的CRISPR/Cas系统

Fig. 3 The CRISPR/Cas system constructed in filamentous fungi

染色体外进行自主复制提供了可能<sup>[67]</sup>。由于高表达的Cas9和多拷贝的sgRNA，AMA1质粒可以显著提高转化效率；在非选择性条件下的传代培养可以去除转化子中带有AMA1的质粒，实现筛选标记的循环使用（图3）<sup>[68]</sup>。利用AMA1质粒在鲁本斯青霉<sup>[57]</sup>、扩展青霉<sup>[43]</sup>和米曲霉（*Aspergillus oryzae*）<sup>[68]</sup>等丝状真菌中实现了高效的基因组编辑。

AMA1质粒丢失的难易程度取决于真菌种类。Nielsen等<sup>[69]</sup>的研究表明一些菌株可能需要多轮的非选择性生长才会失去所有的AMA1质粒。使用标记基因*pyrG*<sup>[70]</sup>或条件致死基因*Aoace2*<sup>[71]</sup>等的反向选择策略可以快速去除转化子中的AMA1质粒。

### 2.5.3 核糖核蛋白复合物递送

核糖核蛋白（ribonucleoprotein, RNP）复合物由Cas蛋白和体外转录的gRNA组成，可以递送至丝状真菌细胞内，实现基因组编辑（图3）。RNP转化无需优化CRISPR/Cas表达盒，减少了评估启动子转录效率等构建步骤，且RNP只是短暂存在于体内，降低了脱靶的风险<sup>[72]</sup>。然而，RNP介导的编辑效率可能会受到sgRNA不稳定和Cas9转运效率低的限制<sup>[57]</sup>。RNP已经在里氏木霉<sup>[73]</sup>、斜卧青霉（*Penicillium decumbens*）<sup>[74]</sup>、波兰青霉（*Penicillium polonicum*）<sup>[75]</sup>、层出镰刀菌（*Fusarium proliferatum*）<sup>[76]</sup>等多种真菌中应用。

## 3 CRISPR/Cas基因组编辑在丝状真菌中的应用

CRISPR/Cas系统已用于多种丝状真菌的基因编辑。通过敲除天然代谢途径中的基因或在宿主细胞中表达异源基因，有助于解析天然产物生物合成途径、增强目标天然产物表达、削弱或消除毒性产物等，促进丝状真菌的开发与应用。

### 3.1 CRISPR/Cas9介导的基因敲除

基于CRISPR/Cas9的基因敲除是进行功能缺失研究和探究宿主次级代谢产物生物合成途径的有效策略。基因敲除后，可以改变菌株表型，消除工业真菌中的真菌毒素BGC或解析特定基因/结构域的功能等。

鲁本斯青霉是生产青霉素的主要工业菌种，经典菌株改良（classical strain improvement, CSI）积累的突变有助于建立以该菌为底盘菌株的天然产物生产平台<sup>[77]</sup>。CRISPR系统可显著提高青霉菌的遗传改造效率。在鲁本斯青霉菌的基因编辑系统中，AMA1质粒会在无筛选压力培养时丢失，可以实现无痕编辑。同时，在测试不同长度的供体DNA（donor DNA, dDNA）同源臂后，显示短同源臂（60 bp）即能实现基因功能缺失。通过破坏与色素合成相关的基因，实现了鲁本斯青霉的

表型变化, 从而表明在鲁本斯青霉中建立了基于CRISPR/Cas9的基因组编辑系统。

由红曲霉 (*Monascus purpureus*) 生产的红曲红被用作食品着色剂, 但其产生的肾毒性霉菌毒素 (橘霉素) 会降低红曲红的产量且具有毒副作用。Liang 等<sup>[78]</sup> 认为橘霉素生物合成存在冗余基因或同工酶。因此, 为了避免工业真菌合成橘霉素, 需要删除整个BGC而不是破坏单个基因。Liu 等<sup>[79]</sup> 设计了一种双质粒CRISPR/Cas系统, 该系统使用环形供体质粒代替线性DNA供体片段。双质粒CRISPR/Cas9系统实现了红曲霉工业菌株中15 kb的橘霉素BGC的敲除, 获得了稳定的同核突变体。传代培养10轮, 在每轮发酵过程中均未检测到橘霉素。与原始菌株红曲红色素值 (885.30 U/mL) 相比, 同核突变体红曲红色素值 (926.00 U/mL) 增加了4.6%。含AMA1的质粒可以无痕敲除大片段基因簇, 因此, 可以继续对 *M. purpureus* 工业菌株进行迭代基因组编辑。

黑麦角菌 (*Claviceps purpurea*) 生产的麦角生物碱可用于治疗偏头痛、高血压, 也可以在产妇产后帮助子宫收缩, 减少流血<sup>[80]</sup>。Yu 等<sup>[81]</sup> 开发了基于体外组装的RNP的CRISPR/Cas9系统, 对尿苷生物合成 (*ura5*)、菌丝形态学 (*rac*) 和麦角生物碱 (*easA*) 产生密切相关的3个靶基因进行敲除, 编辑效率达50%~100%。基于体外组装的RNP可以有效地删除麦角生物碱途径中涉及的相关基因, 有助于阐明麦角生物碱的生物合成途径, 促进对麦角菌的代谢工程改造, 提高麦角生物碱合成效率。

固醇14 $\alpha$ -去甲基化酶 (Cyp51) 可以催化去除固醇前体中的14 $\alpha$ -甲基基团以转化为麦角固醇<sup>[82]</sup>。麦角固醇参与多种真菌调控和发育过程, 在真菌细胞膜的渗透性和流动性方面发挥重要作用<sup>[83]</sup>。唑类抗真菌药通过抑制Cyp51酶削弱其前体的去甲基化、阻断麦角固醇的合成, 导致细胞内甲基化固醇的积累, 从而影响/破坏真菌膜的流动性, 抑制细胞增殖<sup>[84]</sup>。临床上, 曲霉属真菌会引起侵袭性曲霉病 (invasive aspergillosis, IA)<sup>[85]</sup>。Pérez-Cantero 等<sup>[86]</sup> 构建了具有不同遗传背景和不同唑类敏感性的 *cyp51A* 和 *cyp51B* 单敲除突变体。 *cyp51* 的单基因缺失导致伏立康唑最低抑菌浓度值低于

其流行病学临界值<sup>[86]</sup>。

赤霉素 (gibberellic acids, GA) 是一类四环二萜类化合物, 在植物生长调节中起着重要作用, 但其生物合成基因并不成簇分布。在藤仓镰刀菌中, GA的生物合成主要分为牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP)、GA12-醛和一系列不同GA类似物3个部分。GA4和GA7的混合物与传统使用的GA3相比, 效果更加温和。但在GA天然代谢途径中, GA4和GA7会通过细胞色素P450单加氧酶基因 *P450-3* 进一步转化为GA1与GA3。Shi 等<sup>[49]</sup> 利用CRISPR/Cas9系统重构藤仓镰刀菌中GAs生物合成途径。首先破坏了 *P450-3* 基因以阻断GA3的合成; 在 *P450-3* 缺失菌株基础上, 分别对两个关键基因 *Cps/Ks* 和截短的 *HMGR* (*tHMGR*) 进行过表达。与原始菌株 (88.38 mg/L) 相比, 代谢途径重构的菌株中GA4/GA7混合物的产量达716.37 mg/L, 提高了约7倍。很多次级代谢产物的基因并不成簇排列, CRISPR/Cas系统可以对代谢途径中的基因进行敲除或过表达, 重构代谢途径和调控网络, 从而获得目的产物并提高其产量。

Zhang 等<sup>[87]</sup> 使用CRISPR/Cas9破坏了黑曲霉中的 *pyrG* 和 *kusA* 基因后, 与对照菌株的产量 [(16.98 $\pm$ 1.91) g/L] 相比, 突变菌株的柠檬酸产量 [(33.59 $\pm$ 3.24) g/L] 提高了2.17倍, 表明抑制尿苷/嘧啶的合成可促进柠檬酸的生产。基于RNP的CRISPR/Cas9系统已经成功应用于黑曲霉, 通过该系统在工程菌株中破坏和过量表达多个琥珀酸合成相关基因, 并优化温度、pH等条件, 显著提高了琥珀酸的产量<sup>[88]</sup>。

基于CRISPR/Cas的基因敲除菌株已用于解析次级代谢产物途径中的单个合成关键酶, 并阐明其中间产物的结构与合成途径。Brasiliamides是由巴西青霉 (*Penicillium brasilianum*) 合成的一类含有哌嗪的生物碱, 具有多种药理活性<sup>[89]</sup>。Yuan 等<sup>[90]</sup> 通过删除组蛋白去乙酰化酶激活Brasiliamides的合成。根据对突变体非核糖体多肽合成酶 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS) 的研究, 他们提出了一条新的Brasiliamides生物合成途径, 为后续Brasiliamides的大量生产提供了新思路。

### 3.2 CRISPR/Cas9介导的基因敲入

卡泊芬净是首个获得FDA批准的棘白菌素类抗真菌剂,对念珠菌属和曲霉属真菌有良好的临床活性<sup>[91]</sup>。*Glarea lozoyensis*可以合成卡泊芬净的重要前体纽莫康定B0 (Pneumocandin B0)。在发酵过程中,由于脯氨酸羟化酶基因*gloF*的区域选择性不高,*G. lozoyensis*会产生PC0等纽莫康定B0的类似物。棘白菌素B生物合成中的脯氨酸羟化酶Ap-Hty具有高区域选择性<sup>[92]</sup>。Wei等<sup>[93]</sup>采用CRISPR/Cas9策略表达*ap-htyE*并成功取代*gloF*,突变菌株保留了合成纽莫康定B0的能力,但消除了合成纽莫康定C0的能力。通过替换关键酶,可以减少纽莫康定C0的分离步骤,具有工业应用的潜力。

来自青霉属和曲霉属的部分真菌已经成为真菌BGC的异源表达宿主<sup>[94]</sup>。McLean等<sup>[77]</sup>使用鲁本斯青霉表达来自橘青霉的美伐他汀BGC (*mlcA*、*mlcB*、*mlcC*、*mlcD*、*mlcE*、*mlcF*、*mlcG*、*mlcH*、*mlcR*),同时表达一个细胞色素P450基因,将美伐他汀转化为普伐他汀。在中试规模下,普伐他汀发酵产量超过6 g/L。他们使用的鲁本斯青霉删除了青霉素合成基因簇,该宿主经过多轮菌株改良,释放了发酵条件下合成次级代谢产物的潜力。这项工作降低了异源宿主合成天然产物的优化成本,为表达其他天然产物合成基因簇提供了基础。

3(2*H*)-咪喃酮是一些活性天然产物的重要组成部分<sup>[95]</sup>。Setosusin是一种真菌类二萜,具有独特的螺-稠合3(2*H*)-咪喃酮结构。Wei等<sup>[96]</sup>在真菌杜氏曲霉(*Aspergillus duricaulis*)中鉴定了与Setosusin相关的BGC,通过在米曲霉中异源重组相关酶基因,阐明了其生物合成途径。Katayama等<sup>[68, 97]</sup>在半AMA1载体上提供了可诱导的反选择标记Aoace2,实现了米曲霉的无标记整合。

内消旋半乳糖二酸是一种六元酸,可以作为护肤品成分使用,也可以用于生产聚合物,它可通过果胶的主要成分D-半乳糖醛酸氧化生成。黑曲霉生产的果胶酶效率高,适合于转化富含果胶的生物物质。Kuivanen等<sup>[98]</sup>使用CRISPR/Cas9与体外合成sgRNA删除了内消旋半乳糖二酸相关的基因,中断内消旋半乳糖二酸代谢,构建了D-半乳糖醛酸分解代谢与异源糖醛酸脱氢酶表达相结合的

工程化黑曲霉菌株,最终可以通过D-半乳糖醛酸合成内消旋半乳糖二酸。Dong等<sup>[99]</sup>利用CRISPR/Cas9介导的多拷贝敲入表达策略,在黑曲霉中高效表达了来自嗜热毁丝霉的高活性海藻糖酶(MthT),最终,工程黑曲霉催化海藻糖水解,酶滴度可达1698.83 U/mL。

除青霉属和曲霉属之外,多种其他真菌也被开发为异源天然产物生产平台。麦角酸(LA)和二氢麦角酸(DHLA)是许多药物的先导化合物,可用于治疗痴呆、偏头痛、高催乳素血症和其他疾病<sup>[100-101]</sup>。但它们通常是麦角生物碱和二氢麦角生物碱合成途径中的中间代谢产物,难以获取。褐色绿僵菌(*Metarhizium brunneum*)可以天然合成多种LA酰胺,最终合成麦角酸 $\alpha$ -羟乙胺(LAH)以及少量的麦角新碱<sup>[102]</sup>。Davis等<sup>[103]</sup>通过RNP策略在褐色绿僵菌中沉默麦角生物碱途径,并异源表达外源基因,合成了麦角酸和二氢麦角酸,且麦角酸(86.9%)和二氢麦角酸(72.8%)的相对产量远高于已有的工程烟曲霉菌株(分别为2.6%和2.0%)。

表1总结了丝状真菌中CRISPR/Cas基因组编辑系统的应用情况。

### 3.3 CRISPRa和CRISPRi系统

CRISPRa通过核酸内切酶失活的Cas9(nuclease-dead mutants of Cas9, dCas9)连接转录激活子,实现基因组特定位点的转录<sup>[110]</sup>。CRISPRi通过dCas9与转录抑制子连接,在gRNA引导下,结合到靶基因位点,抑制转录起始,沉默靶基因的表达<sup>[111]</sup>。Roux等<sup>[112]</sup>在构巢曲霉中构建了首个CRISPRa系统,通过激活*micA*基因,提高了微咪喃酮的产量,并通过多基因CRISPRa鉴定出新代谢产物脱氢微咪喃酮。丝状真菌有能力合成多种高价值次级代谢产物,但大多数BGC是沉默的。CRISPRa与次级代谢产物BGC的表达激活有助于获取活性天然产物。Li等<sup>[113]</sup>使用CRISPRi对黑曲霉中的表观遗传效应进行了研究。通过dCas9作用于内源性组蛋白乙酰化酶GcnE和组蛋白去乙酰化酶HosA和RpdA,抑制了BGC的转录,但未发现表型的变化和新代谢产物的产生。

表1 丝状真菌中CRISPR/Cas基因组编辑系统的应用

Table 1 Application of CRISPR/Cas genome editing system in filamentous fungi

丝状真菌	sgRNA 启动子	表达方式	靶标基因	编辑效率	参考文献
里氏木霉		体内表达密码子优化的 Cas9 和体外转录的 sgRNA	<i>ura5, lae1, vib1, clr2</i>	单基因 93%~100% ; 多基因 4.2%~45%	[38]
里氏木霉	<i>U6</i>	体内表达密码子优化的 Cas9 和 <i>U6</i> 启动子驱动 sgRNA1 的表达	<i>ura5</i>	8%~10%	[104]
里氏木霉	5S rRNA	体内表达密码子优化的 Cas9 和 5S rRNA 驱动 sgRNA 的表达	<i>lae1</i>	36.67%	[105]
里氏木霉		体外组装的核糖核蛋白(RNP)复合物	<i>ura5, lae1, cbh1, cbh2, egl</i>	56.52%~100%	[73]
草酸青霉	5S rRNA	体内表达密码子优化的 Cas9 和 5S rRNA 驱动 sgRNA 的表达	<i>bgl2, creA</i>	30%~80%	[105]
鲁本斯青霉	<i>U6, tRNA, utp25</i>	体内表达密码子优化的 Cas9 与 <i>U6, tRNA</i> 和 <i>utp25</i> 启动子驱动 sgRNA 的表达; 体外组装的核糖核蛋白(RNP)复合物	<i>pks17, roqA, lovF, hcpA, pcbA, penDE, chyA</i>	60%~100%	[57]
黑曲霉	tRNA	体内表达密码子优化的 Cas9 和 tRNA 驱动 sgRNA 的表达	<i>albA, olvA, glaA</i>	20%~93%	[61]
黑曲霉	5S rRNA	体内表达密码子优化的 Cas9 和 tRNA 驱动 sgRNA 的表达	<i>albA, fum5, fum1</i>	33%~100%	[62]
米曲霉	<i>U6</i>	体内表达密码子优化的 Cas9 和 <i>U6</i> 启动子驱动 sgRNA 的表达	<i>wA, pyrG, yA</i>	10%~100%	[106]
米曲霉	<i>U6</i>	携带 Cas9 和 sgRNA 的自主复制质粒	<i>wA, pyrG, yA</i>	55.6%~100%	[68]
烟曲霉		体内表达密码子优化的 Cas9 和体外转录的 sgRNA	<i>pksP, cnaA</i>	95%~100%	[107]
藤仓镰刀菌	<i>P<sub>gpdA</sub>, U6, 5S rRNA</i>	体内表达密码子优化的 Cas9 与 <i>P<sub>gpdA</sub>, U6, 5S rRNA</i> 启动子驱动 sgRNA 的表达	<i>fcc1, ura3, ppt1</i>	37.5%~79.2%	[49]
<i>Glarea lozoyensis</i>	5S rRNA	体内表达密码子优化的 Cas9 和 5S rRNA 驱动 sgRNA 的表达	<i>gloA, gloF</i>	28%	[93]
嗜热毁丝霉	<i>U6</i>	体内表达密码子优化的 Cas9 和 <i>U6</i> 启动子驱动 sgRNA 的表达	<i>cre-1, res-1, gh1-1, alp-1</i>	单基因 95% ; 多基因 22%~70%	[59]
嗜热毁丝霉	<i>U6</i>	体内表达密码子优化的 Cas12a 和 <i>U6</i> 启动子驱动 sgRNA 的表达	<i>cre-1, res-1, gh1-1</i>	单基因 90% ; 多基因 13%~41%	[108]
稻瘟病菌		体外组装的 Cas12a 核糖核蛋白(RNP)复合物	<i>BUF1, FKBP12, FTR1, BAS4, AVRPI9</i>	25%~77%	[109]

### 3.4 基于CRISPR/Cas的高通量筛选

与 ZFN 和 TALEN 相比, CRISPR/Cas 系统可以用于高通量正向遗传筛选<sup>[114]</sup>。sgRNA 是 CRISPR/Cas 系统的关键元件, 传统的构建 sgRNA 文库方法是基于已知的全基因组序列设计并合成上万个 sgRNA, 但昂贵的成本以及未知的真菌全基因组阻碍了基于 CRISPR/Cas9 的全基因组筛选应用。Li 等<sup>[115]</sup> 开发了酶切/结合农杆菌介导的转化方法 (restriction/ligation coupled with Agrobacterium-mediated transformation, RELATe), 在人类真菌病原体新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 中创

建的 sgRNA 文库可以靶向基因组中超过 98% 的蛋白质编码基因。新型隐球菌可以穿透血脑屏障, 在免疫功能低下的人群中会引发中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 感染。通过高通量功能筛选确定了 142 个与发病机制相关的潜在基因。研究人员选择 *SFPI* 和 *WDR1* 两个基因进行了敲除, 结果表明 *SFPI* 和 *WDR1* 是新型隐球菌渗透血脑屏障的必需基因。新开发的 RELATe 方法降低了高通量筛选的成本, 与 CRISPR/Cas 系统结合可以用于阐明真菌功能基因。

有效的高通量筛选策略可以从突变体库中分离所需的突变体, 进而使用 CRISPR/Cas 系统对其

进行遗传改造。Luu等<sup>[116]</sup>在里氏木霉中开发了一种基于液滴微流控技术的绿色荧光蛋白表达的新方法。他们将转化绿色荧光蛋白的里氏木霉原生质体封装并在液滴中孵育24小时,通过高通量筛选液滴,最终收集到一个转化文库,标记基因转化率达96%以上。与传统转化相比,该方法使原生质体再生时间大大缩短,再生频率提高了8倍,筛选速度可达每分钟8000液滴。该方法提高了筛选效率,有望应用于其他丝状真菌转化子的筛选,加快遗传转化速度。

### 3.5 丝状真菌 CRISPR/Cas9 系统面临的问题及可能的解决方案

#### 3.5.1 脱靶效应

在基因编辑过程中,sgRNA引导Cas9至与靶位点相似核苷酸序列结合,会造成潜在的脱靶效应。为了减少脱靶的出现,需要设计序列特异性较高的sgRNA。近年来,已经有多个用于预测脱靶位点并为sgRNA进行评估的网站,如E-CRISP<sup>[117]</sup>、CHOPCHOP<sup>[118]</sup>、Cas-OFFinder<sup>[119]</sup>等。此外,研究人员开发了多种方法提高Cas9切割的特异性,如构建Cas9-sgRNA核糖核蛋白复合物进入细胞<sup>[120]</sup>、使用Cas12a替换Cas9<sup>[121]</sup>等。设计适宜的sgRNA是限制脱靶效应的关键因素。sgRNA邻近原型间隔区相邻基序(PAM)的10~12 bp决定了Cas9切割特异性<sup>[122]</sup>。如果基因组含有与靶点sgRNA相似性过高的序列,会导致Cas9在非靶向基因位点的非预期DNA切割<sup>[123]</sup>。因此,设计独特适宜的sgRNA,能够降低Cas9脱靶切割的可能性。新发现的Cas12b<sup>[124]</sup>、Cas13<sup>[125]</sup>、Cas14<sup>[126]</sup>等核酸酶的应用有望在解决脱靶效应等问题中发挥作用。

#### 3.5.2 转化效率低

丝状真菌较厚的细胞壁是外源基因片段进入细胞的主要障碍。破除细胞壁后的原生质体可以有效吸收外源DNA,但是原生质体的低再生率降低了丝状真菌的转化效率。Han等<sup>[127]</sup>引入并优化了一种微流体细胞膜变形方法,这个方法使用快速的细胞机械变形来产生瞬时膜孔,不但能将sgRNA和Cas9传递至难以转染的淋巴瘤细胞和胚胎干细胞中,还能保持较高的细胞活力。丝状真菌是多核微生物,在菌丝和孢子中含有数量不定

的细胞核<sup>[128]</sup>。即使其中一个细胞核的基因被破坏,其余细胞核的基因仍能保持完好,这也是转化菌株假阳性高的原因之一。中国科学院分子植物科学卓越创新中心周志华课题组<sup>[73]</sup>在多核孢子真菌米曲霉中开发了基于RNP的CRISPR系统,通过加入化学试剂肌醇或苯菌灵,增加了单核原生质体的形成,无需进行后期的孢子分离步骤,提高了单核菌株的形成率,最高转化效率达86.67%。通过加入Triton X-100、吐温-80等表面活性剂,可以促进RNP复合物进入细胞,提高转化效率。周志华团队<sup>[73]</sup>在里氏木霉原生质体转化中加入Triton X-100,菌落形成单位(colony forming units, CFU)较之前增加3.33倍。

### 3.6 丝状真菌中的CRISPR/Cas12a基因组编辑

使用Cas9进行基因编辑会受到其5'-NGG-3' PAM序列的限制<sup>[129]</sup>,位点特异性不高。因此,引入依赖于其他PAM序列的RNA引导的核酸酶能够更精确靶向基因组位点。毛螺菌科细菌的Cas12a(也被称为Cpf1)采用由5'-TTTN-3'组成的PAM序列(图2)<sup>[129]</sup>。Abdulrachman等<sup>[121]</sup>在棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*) TBRC 277中开发了基于AMA1的CRISPR/Cas12a表达载体,并建立了三种不同的靶向*pyrG*基因的引导crRNA,证明了Cas12a能够诱导位点特异性双链断裂。Huang等<sup>[109]</sup>在真菌病原体稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中建立了基于Cas12a核糖核蛋白的基因组编辑系统。*BUF1*编码真菌黑色素生物合成所需的三羟基萘还原酶,研究人员设计了两种靶向*BUF1*位点的gRNA,并与Cas12a蛋白复合为RNP转化原生质体,*BUF1*位点的编辑率达到77%。Cas12a提高了基因编辑精度,将在丝状真菌沉默基因簇挖掘和次级代谢产物研究中发挥作用。

破坏NHEJ修复是提高基因组精准编辑效率的有效策略。美国堪萨斯州立大学Huang等<sup>[109]</sup>在稻瘟病菌中发现CRISPR/Cas诱导的DNA双链断裂存在多种修复途径。在丝状真菌中,DNA双链断裂修复主要由NHEJ和HR两种途径,但仍存在微同源介导的末端连接(microhomology-mediated end-joining, MMEJ)<sup>[130]</sup>和单链退火(single strand

annealing, SSA)<sup>[131]</sup> 两条修复途径。研究人员通过 PCR、Sanger 测序和纳米孔长读值测序技术的组合,发现在进行 CRISPR/Cas12a 介导的基因编辑后, Ku80 缺失菌株中发生了较野生菌株中更大片段的 DNA 缺失,这是 MMEJ 介导的 DNA 突变的特征。MMEJ 等修复途径可能会产生不可预测的基因组变异,从而引发 CRISPR/Cas 系统的安全性问题。

### 3.7 基于 CRISPR 的丝状真菌碱基编辑系统

碱基编辑 (base editing, BE) 分为胞嘧啶碱基编辑器 (cytosine base editor, CBE) 和腺嘌呤碱基编辑器 (adenine base editor, ABE) (图 2)。CRISPR 介导的碱基编辑可以在靶基因组位点上转换碱基,具有无需双链断裂、无需供体 DNA 以及同源定向修复等优点。第三代碱基编辑器 (third-generation base editor, BE3) 是最常用的碱基编辑器系统,由 dCas9 或 Cas9-D10A 切口酶 (D10A nickase, nCas9) 与大鼠胞苷脱氨酶 (rat cytidine deaminase, rAPOBEC1) 和尿嘧啶糖基化酶抑制剂 (uracil glycosylase inhibitor, UGI) 组成,可以实现胞嘧啶 (C) 转化为胸腺嘧啶 (T) 或腺嘌呤 (A) 转化为鸟嘌呤 (G)<sup>[132]</sup>。华南理工大学 Huang 等<sup>[133]</sup>在黑曲霉中应用了胞嘧啶碱基编辑器,通过单碱基编辑诱导无义突变,灭活了尿苷相关基因 *pyrG* 和色素相关基因 *fwnA*, 效率为 47.36%~100%;对于非表型基因 *prtT* 的单碱基编辑效率达 60%。该系统为研究黑曲霉以及其他丝状真菌提供了便捷的工具。天津工业生物技术研究所田朝光团队<sup>[134]</sup>在嗜热毁丝霉中构建了进化型载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化亚基 1 (APOBEC1) 胞嘧啶碱基编辑器 4max (Mtevo-BE4max)、噬菌体 Mu Gam 蛋白胞嘧啶碱基编辑器 4max (MtGAM-BE4max)、进化型 CDA1 脱氨酶胞嘧啶碱基编辑器 (Mtevo-CDA1) 等三个新的胞嘧啶碱基编辑器,并成功编辑了 *amdS*、*cre-1* 和 *Mtclr-2* 三个靶基因。研究人员深入研究了 *Mtclr-2* 的功能,发现其与分生孢子的产生、菌丝生长和菌落形态的维持存在密切关系。Mtevo-CDA1 的碱基编辑效率可达 92.6%。由于碱基编辑不需要双链断裂和供体片

段,可以弥补 CRISPR/Cas9 的不足。但在水稻中应用 BE3 后,显示其诱导了大量的全基因组脱靶突变<sup>[135]</sup>。未来,仍需对碱基编辑系统组成元件和可靠性进行优化和验证<sup>[136-137]</sup>。

## 4 总结与展望

自 CRISPR/Cas 基因组编辑系统应用于丝状真菌以来,研究人员对 Cas9 核酸酶、sgRNA 的表达以及 CRISPR/Cas 系统的递送方式不断优化,在模式或非模式丝状真菌中建立了多个 CRISPR/Cas 系统。CRISPR/Cas9 系统是目前应用最广泛的基因组编辑系统,但也存在 Cas9 核酸酶毒性、脱靶效应、转化率低等问题。Cas12a、Cas12b、Cas13、Cas14 等核酸酶的应用有望解决这些问题。

本文聚焦于丝状真菌天然产物在医药领域的开发与应用。纽莫康定 B0 和他汀类药物等活性天然产物在野生菌株中存在生物合成途径基因表达强度不高、副产物代谢途径影响等问题。通过 CRISPR/Cas 进行基因缺失或异源表达,可以探索代谢产物的 BGC、改造次级代谢产物生物合成基因、促进丝状真菌细胞工厂的构建。CRISPR/Cas 技术可以进行多基因共编辑,调控副产物合成途径中的多种酶基因,增强目标产物的积累并减少毒性物质的产生。CRISPR/Cas 技术还可以通过选择功能元件、重构底盘细胞、优化代谢途径等一系列策略实现丝状真菌次级代谢产物的高产,从而加速丝状真菌功能基因组学和次级代谢产物的研究和工业应用。

## 参 考 文 献

- [1] HÜTTNER S, JOHANSSON A, GONÇALVES TEIXEIRA P, et al. Recent advances in the intellectual property landscape of filamentous fungi[J]. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2020, 7(1): 16.
- [2] EVANS D A, BEIGER J J, BURCH J D, et al. Total synthesis of aflastatin A[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(43): 19953-19972.
- [3] PÉREZ-PÉREZ W D, CARRASCO-NAVARRO U, GARCÍA-ESTRADA C, et al. bZIP transcription factors PcYap1 and PcRsmA link oxidative stress response to secondary metabo-

- lism and development in *Penicillium chrysogenum*[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 50.
- [4] LIU L, CHEN Z, LIU W Y, et al. Cephalosporin C biosynthesis and fermentation in *Acremonium chrysogenum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(19): 6413-6426.
- [5] YAO G S, BAI X F, ZHANG B X, et al. Enhanced production of terrein in marine-derived *Aspergillus terreus* by refactoring both global and pathway-specific transcription factors[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 136.
- [6] GUO W Z, YANG J H, HUANG T C, et al. Synergistic effects of multiple enzymes from industrial *Aspergillus niger* strain O1 on starch saccharification[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 225.
- [7] AHMED T, RANA M R, ZZAMAN W, et al. Optimization of substrate composition for pectinase production from Satkara (*Citrus macroptera*) peel using *Aspergillus niger*-ATCC 1640 in solid-state fermentation[J]. Heliyon, 2021, 7(10): e08133.
- [8] WANG Y, CHEN H Y, MA L, et al. Use of CRISPR-Cas tools to engineer *Trichoderma* species[J]. Microbial Biotechnology, 2022, 15(10): 2521-2532.
- [9] SCHALÉN M, ANYAOGU D C, HOOF J B, et al. Effect of secretory pathway gene overexpression on secretion of a fluorescent reporter protein in *Aspergillus nidulans*[J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2016, 3: 3.
- [10] SCHÜLLER A, STUDDT-REINHOLD L, STRAUSS J. How to completely squeeze a fungus—advanced genome mining tools for novel bioactive substances[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(9): 1837.
- [11] TANG S, MEN P, ZHANG W, et al. Identification of a polyketide biosynthesis gene cluster by transcriptional regulator activation in *Aspergillus terreus*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2022, 160: 103690.
- [12] ZHOU Y, WANG Y L, CHEN K, et al. Near-complete genomes of two *Trichoderma* species: a resource for biological control of plant pathogens[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2020, 33(8): 1036-1039.
- [13] ZOU G, NIELSEN J B, WEI Y J. Harnessing synthetic biology for mushroom farming[J]. Trends in Biotechnology, 2023, 41(4): 480-483.
- [14] WRIGHT A V, NUÑEZ J K, DOUDNA J A. Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing nature's toolbox for genome engineering[J]. Cell, 2016, 164(1/2): 29-44.
- [15] HUANG X N, MEN P, TANG S, et al. *Aspergillus terreus* as an industrial filamentous fungus for pharmaceutical biotechnology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 69: 273-280.
- [16] CUI Z F, LIU H, ZHANG H F, et al. The comparison of ZFNs, TALENs, and *SpCas9* by GUIDE-seq in HPV-targeted gene therapy[J]. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2021, 26: 1466-1478.
- [17] BARRANGOU R, DOUDNA J A. Applications of CRISPR technologies in research and beyond[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(9): 933-941.
- [18] DOUDNA J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing[J]. Nature, 2020, 578(7794): 229-236.
- [19] VALENTE S, COMETTO A, PIOMBO E, et al. Elaborated regulation of griseofulvin biosynthesis in *Penicillium griseofulvum* and its role on conidiation and virulence[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 328: 108687.
- [20] HOFFMEISTER D, KELLER N P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation[J]. Natural Product Reports, 2007, 24(2): 393-416.
- [21] 刘佳佳, 刘钢. 头孢菌素C生物合成调控研究进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(3): 461-470.
- LIU J J, LIU G. Advances in the regulation of cephalosporin C biosynthesis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(3): 461-470.
- [22] 黄润业, 元兰达, 陈国参, 等. 免疫抑制剂霉酚酸的研究及产业化进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(10): 3010-3025.
- HUANG R Y, QI L D, CHEN G C, et al. Research and industrialization progress of immunosuppressant mycophenolic acid [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(10): 3010-3025.
- [23] 黄雪年, 唐慎, 吕雪峰. 工业丝状真菌土曲霉合成生物技术研究进展及展望[J]. 合成生物学, 2020, 1(2): 187-211.
- HUANG X N, TANG S, LV X F. Progress and prospect for synthetic biology research of the industrial filamentous fungi *Aspergillus terreus* [J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(2): 187-211.
- [24] RAJA H A, MILLER A N, PEARCE C J, et al. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community[J]. Journal of Natural Products, 2017, 80(3): 756-770.
- [25] WU Q W, LI M Z, BILAL M, et al. Enhanced production of mycophenolic acid from *Penicillium brevicompactum* via optimized fermentation strategy[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(7): 3001-3015.
- [26] ISTVAN E S, DEISENHOFER J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase[J]. Science, 2001, 292(5519): 1160-1164.
- [27] HUANG X N, LIANG Y J, YANG Y, et al. Single-step production of the simvastatin precursor monacolin J by engineering of

- an industrial strain of *Aspergillus terreus*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 109-114.
- [28] HUANG X N, TANG S, ZHENG L H, et al. Construction of an efficient and robust *Aspergillus terreus* cell factory for monacolin J production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(4): 818-825.
- [29] KELLER N P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 167-180.
- [30] LAZARUS C M, WILLIAMS K, BAILEY A M. Reconstructing fungal natural product biosynthetic pathways[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(10): 1339-1347.
- [31] ZHANG R K, TAN Y S, CUI Y Z, et al. Lignin valorization for protocatechuic acid production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(17): 6515-6526.
- [32] RO D K, PARADISE E M, OUELLET M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [33] WANG P P, WEI W, YE W, et al. Synthesizing ginsenoside Rh2 in *Saccharomyces cerevisiae* cell factory at high-efficiency [J]. *Cell Discovery*, 2019, 5: 5.
- [34] ZHANG J, HANSEN L G, GUDICH O, et al. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine[J]. *Nature*, 2022, 609(7926): 341-347.
- [35] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [36] YANG W, YAN J Q, ZHUANG P Z, et al. Progress of delivery methods for CRISPR-Cas9[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2022, 19(8): 913-926.
- [37] DICARLO J E, NORVILLE J E, MALI P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): 4336-4343.
- [38] LIU R, CHEN L, JIANG Y P, et al. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Cell Discovery*, 2015, 1: 15007.
- [39] ZHU Y M. Advances in CRISPR/Cas9[J]. *BioMed Research International*, 2022, 2022: 9978571.
- [40] FAN C, ZHANG W, SU X Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing directed by a 5S rRNA-trRNA<sup>Gly</sup> hybrid promoter in the thermophilic filamentous fungus *Humicola insolens*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 206.
- [41] GHOSH D, RAGHAVAN S C. Nonhomologous end joining: new accessory factors fine tune the machinery[J]. *Trends in Genetics*, 2021, 37(6): 582-599.
- [42] SUZUKI K, TSUNEKAWA Y, HERNANDEZ-BENITEZ R, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration[J]. *Nature*, 2016, 540(7631): 144-149.
- [43] CLEMMENSEN S E, KROMPHARDT K K, FRANSEN R N. Marker-free CRISPR-Cas9 based genetic engineering of the phytopathogenic fungus, *Penicillium expansum*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2022, 160: 103689.
- [44] NØDVIK C S, NIELSEN J B, KOGLE M E, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133085.
- [45] SHOJAEI BAGHINI S, GARDANOVA Z R, ABADI S A H, et al. CRISPR/Cas9 application in cancer therapy: a pioneering genome editing tool[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2022, 27(1): 35.
- [46] LI J, ZHANG L Y, XU Q, et al. CRISPR-Cas9 toolkit for genome editing in an autotrophic CO<sub>2</sub>-fixing methanogenic archaeon[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e0116522.
- [47] DARMA R, LUTZ A, ELLIOTT C E, et al. Identification of a gene cluster for the synthesis of the plant hormone abscisic acid in the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2019, 130: 62-71.
- [48] WANG Q, COBINE P A, COLEMAN J J. Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2018, 117: 21-29.
- [49] SHI T Q, GAO J, WANG W J, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in the filamentous fungus *Fusarium fujikuroi* and its application in strain engineering for gibberellic acid production[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(2): 445-454.
- [50] REN C, LIU Y F, GUO Y C, et al. Optimizing the CRISPR/Cas9 system for genome editing in grape by using grape promoters[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8: 52.
- [51] DENG H X, GAO R J, LIAO X R, et al. Genome editing in *Shiraia bambusicola* using CRISPR-Cas9 system[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 259: 228-234.
- [52] CHEN J J, LAI Y L, WANG L L, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient genome editing via blastospore-based transformation in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45763.
- [53] LEYNAUD-KIEFFER L M C, CURRAN S C, KIM I, et al. A new approach to Cas9-based genome editing in *Aspergillus niger* that is precise, efficient and selectable[J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210243.
- [54] TONG S, AN K X, CHEN W X, et al. Evasion of Cas9 toxicity

- to develop an efficient genome editing system and its application to increase ethanol yield in *Fusarium venenatum* TB01[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(19): 6583-6593.
- [55] GUSTAFSSON O, RÄDLER J, ROUDI S, et al. Efficient peptide-mediated *in vitro* delivery of Cas9 RNP[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(6): 878.
- [56] DE VRIES R P, RILEY R, WIEBENGA A, et al. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*[J]. Genome Biology, 2017, 18(1): 28.
- [57] POHL C, KIEL J W, DRIESSEN A M, et al. CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(7): 754-764.
- [58] SONG R J, ZHAI Q, SUN L, et al. CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(17): 6919-6932.
- [59] LIU Q, GAO R R, LI J G, et al. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 1.
- [60] VAN DEN BERG M A, ALBANG R, ALBERMANN K, et al. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(10): 1161-1168.
- [61] SONG L T, OUEDRAOGO J P, KOLBUSZ M, et al. Efficient genome editing using tRNA promoter-driven CRISPR/Cas9 gRNA in *Aspergillus niger*[J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0202868.
- [62] ZHENG X M, ZHENG P, ZHANG K, et al. 5S rRNA promoter for guide RNA expression enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(7): 1568-1574.
- [63] FULLER K K, CHEN S, LOROS J J, et al. Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*[J]. Eukaryotic Cell, 2015, 14(11): 1073-1080.
- [64] WEBER J, VALIANTE V, NØDVIK C S, et al. Functional reconstitution of a fungal natural product gene cluster by advanced genome editing[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(1): 62-68.
- [65] ZHANG P, ZHOU S, WANG G, et al. Two transcription factors cooperatively regulate DHN melanin biosynthesis and development in *Pestalotiopsis fici*[J]. Molecular Microbiology, 2019, 112(2): 649-666.
- [66] XIANG B Y, HAO X R, XIE Q H, et al. Deletion of a rare fungal PKS CgPKS11 promotes chaetoglobosin A biosynthesis, yet defers the growth and development of *Chaetomium globosum*[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(9): 750.
- [67] ALEKSENKO A, CLUTTERBUCK A J. Autonomous plasmid replication in *Aspergillus nidulans*: AMA1 and MATE elements [J]. Fungal Genetics and Biology, 1997, 21(3): 373-387.
- [68] 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*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(3): e01896-e01818.
- [69] NIELSEN M L, ISBRANDT T, RASMUSSEN K B, et al. Genes linked to production of secondary metabolites in *Talaromyces atrovirens* revealed using CRISPR-Cas9[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169712.
- [70] WENDEROTH M, PINECKER C, VOß B, et al. Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2017, 101: 55-60.
- [71] SEEKLES S J, TEUNISSE P P P, PUNT M, et al. Preservation stress resistance of melanin deficient conidia from *Paecilomyces variotii* and *Penicillium roqueforti* mutants generated via CRISPR/Cas9 genome editing[J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2021, 8(1): 4.
- [72] VAKULSKAS C A, BEHLKE M A. Evaluation and reduction of CRISPR off-target cleavage events[J]. Nucleic Acid Therapeutics, 2019, 29(4): 167-174.
- [73] ZOU G, XIAO M L, CHAI S X, et al. Efficient genome editing in filamentous fungi via an improved CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein method facilitated by chemical reagents[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(6): 2343-2355.
- [74] GRIJSELS S, POHL C, NIELSEN J C, et al. Identification of the decumbenone biosynthetic gene cluster in *Penicillium decumbens* and the importance for production of calbistrin[J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2018, 5: 18.
- [75] VALENTE S, PIOMBO E, SCHROECKH V, et al. CRISPR-Cas9-based discovery of the verrucosidin biosynthesis gene cluster in *Penicillium polonicum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 660871.
- [76] FERRARA M, HAIDUKOWSKI M, LOGRIECO A F, et al. A CRISPR-Cas9 system for genome editing of *Fusarium proliferatum*[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 19836.
- [77] MCLEAN K J, HANS M, MEIJRINK B, et al. Single-step fermentative production of the cholesterol-lowering drug pravastatin via reprogramming of *Penicillium chrysogenum*[J]. Pro-

- ceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(9): 2847-2852.
- [78] LIANG B, DU X J, LI P, et al. Investigation of citrinin and pigment biosynthesis mechanisms in *Monascus purpureus* by transcriptomic analysis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1374.
- [79] LIU W W, AN C Y, SHU X, et al. A dual-plasmid CRISPR/cas system for mycotoxin elimination in polykaryotic industrial fungi[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(8): 2087-2095.
- [80] SILBERSTEIN S D, SHREWSBURY S B, HOEKMAN J. Dihydroergotamine (DHE) - then and now: a narrative review[J]. *Headache*, 2020, 60(1): 40-57.
- [81] YU L, XIAO M L, ZHU Z H, et al. Efficient genome editing in *Claviceps purpurea* using a CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein method[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 7(2): 664-670.
- [82] CELIA-SANCHEZ B N, MANGUM B, BREWER M, et al. Analysis of Cyp51 protein sequences shows 4 major Cyp51 gene family groups across fungi[J]. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2022, 12(11): jkac249.
- [83] GUO Z Q, LIU X Y, WANG N, et al. Membrane component ergosterol builds a platform for promoting effector secretion and virulence in *Magnaporthe oryzae*[J]. *The New Phytologist*, 2023, 237(3): 930-943.
- [84] ASSRESS H A, SELVARAJAN R, NYONI H, et al. Antifungal azoles and azole resistance in the environment: current status and future perspectives—a review[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2021, 20(4): 1011-1041.
- [85] KHAN A A, FAROOQ F, JAIN S K, et al. Comparative host-pathogen interaction analyses of SARS-CoV2 and *Aspergillus fumigatus*, and pathogenesis of COVID-19-associated aspergillosis[J]. *Microbial Ecology*, 2022, 84(4): 1236-1244.
- [86] PÉREZ-CANTERO A, MARTIN-VICENTE A, GUARRO J, et al. Analysis of the *cyp51* genes contribution to azole resistance in *Aspergillus* section *Nigri* with the CRISPR-Cas9 technique[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, 65(5): e01996-20.
- [87] ZHANG L H, ZHENG X M, CAIRNS T C, et al. Disruption or reduced expression of the orotidine-5'-decarboxylase gene *pyrG* increases citric acid production: a new discovery during recyclable genome editing in *Aspergillus niger*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 76.
- [88] YANG L, HENRIKSEN M M, HANSEN R S, et al. Metabolic engineering of *Aspergillus niger* via ribonucleoprotein-based CRISPR-Cas9 system for succinic acid production from renewable biomass[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 206.
- [89] BRITO A F, MOREIRA L K S, MENEGATTI R, et al. Piperazine derivatives with central pharmacological activity used as therapeutic tools[J]. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2019, 33(1): 13-24.
- [90] YUAN B C, LIU D, GUAN X, et al. Piperazine ring formation by a single-module NRPS and cleavage by an  $\alpha$ -KG-dependent nonheme iron dioxygenase in brasiliamide biosynthesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(14): 6149-6159.
- [91] SZYMAŃSKI M, CHMIELEWSKA S, CZYŻEWSKA U, et al. Echinocandins-structure, mechanism of action and use in antifungal therapy[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2022, 37(1): 876-894.
- [92] ZHANG F, LIU H, ZHANG T, et al. Biochemical and genetic characterization of fungal proline hydroxylase in echinocandin biosynthesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(18): 7877-7890.
- [93] WEI T Y, WU Y J, XIE Q P, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in the filamentous fungus *Glarea lozoyensis* and its application in manipulating *glcF*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(8): 1968-1977.
- [94] WOODCRAFT C, CHOOI Y H, ROUX I. The expanding CRISPR toolbox for natural product discovery and engineering in filamentous fungi[J]. *Natural Product Reports*, 2023, 40(1): 158-173.
- [95] OMANAKUTTAN V K, JOHN J, HOPF H. Synthesis of 3-(2H)-furanones: a review[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2021, 2021(2): 163-201.
- [96] WEI X X, MATSUYAMA T, SATO H, et al. Molecular and computational bases for spirofuranone formation in setosusin biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(42): 17708-17715.
- [97] NØDVIK C S, HOOF J B, KOGLE M E, et al. Efficient oligonucleotide mediated CRISPR-Cas9 gene editing in *Aspergillus* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2018, 115: 78-89.
- [98] KUIVANEN J, WANG Y M J, RICHARD P. Engineering *Aspergillus niger* for galactaric acid production: elimination of galactaric acid catabolism by using RNA sequencing and CRISPR/Cas9[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 210.
- [99] DONG L B, LIN X T, YU D, et al. High-level expression of highly active and thermostable trehalase from *Myceliophthora thermophila* in *Aspergillus niger* by using the CRISPR/Cas9 tool and its application in ethanol fermentation[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(1):

- 133-144.
- [100] WONG G, LIM L R, TAN Y Q, et al. Reconstituting the complete biosynthesis of D-lysergic acid in yeast[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 712.
- [101] JASTRZEBSKI M K, KACZOR A A, WRÓBEL T M. Methods of lysergic acid synthesis-the key ergot alkaloid[J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7322.
- [102] LEADMON C E, SAMPSON J K, MAUST M D, et al. Several *Metarhizium* species produce ergot alkaloids in a condition-specific manner[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(14): e00373-e00320.
- [103] DAVIS K A, SAMPSON J K, PANACCIONE D G. Genetic reprogramming of the ergot alkaloid pathway of *Metarhizium brunneum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(19): e01251-e01220.
- [104] WU C, CHEN Y M, QIU Y F, et al. A simple approach to mediate genome editing in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* by CRISPR/Cas9-coupled *in vivo* gRNA transcription[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(7): 1203-1210.
- [105] WANG Q, ZHAO Q Q, LIU Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Penicillium oxalicum* and *Trichoderma reesei* using 5S rRNA promoter-driven guide RNAs[J]. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(2): 495-502.
- [106] KATAYAMA T, TANAKA Y, OKABE T, et al. Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(4): 637-642.
- [107] ZHANG C, MENG X H, WEI X L, et al. Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2016, 86: 47-57.
- [108] LIU Q, ZHANG Y L, LI F Y, et al. Upgrading of efficient and scalable CRISPR-Cas-mediated technology for genetic engineering in thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 293.
- [109] HUANG J, ROWE D, SUBEDI P, et al. CRISPR-Cas12a induced DNA double-strand breaks are repaired by multiple pathways with different mutation profiles in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 7168.
- [110] JIA Y, XU R G, REN X J, et al. Next-generation CRISPR/Cas9 transcriptional activation in *Drosophila* using flySAM[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(18): 4719-4724.
- [111] JANG S, JANG S, JUNG G Y. Toward tunable dynamic repression using CRISPRi[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(9): e1800152.
- [112] ROUX I, WOODCRAFT C, HU J Y, et al. CRISPR-mediated activation of biosynthetic gene clusters for bioactive molecule discovery in filamentous fungi[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(7): 1843-1854.
- [113] LI X J, HUANG L G, PAN L J, et al. CRISPR/dCas9-mediated epigenetic modification reveals differential regulation of histone acetylation on *Aspergillus niger* secondary metabolite[J]. *Microbiological Research*, 2021, 245: 126694.
- [114] KEYS H R, KNOUSE K A. Genome-scale CRISPR screening in a single mouse liver[J]. *Cell Genomics*, 2022, 2(12): 100217.
- [115] LI Z M, KIM K S. RELATe enables genome-scale engineering in fungal genomics[J]. *Science Advances*, 2020, 6(38): eabb8783.
- [116] LUU X C, SHIDA Y, SUZUKI Y, et al. A novel high-throughput approach for transforming filamentous fungi employing a droplet-based microfluidic platform[J]. *New Biotechnology*, 2022, 72: 149-158.
- [117] HEIGWER F, BOUTROS M. Cloud-based design of short guide RNA (sgRNA) libraries for CRISPR experiments[M]// *CRISPR Guide RNA Design, Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US, 2020: 3-22.
- [118] LABUN K, MONTAGUE T G, GAGNON J A, et al. CHOP-CHOPv2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acid Res*, 2016, 44(W1): W272-276.
- [119] HWANG G H, KIM J S, BAE S S. Web-based CRISPR toolkits: Cas-OFFinder, Cas-designer, and Cas-analyzer[M]// *CRISPR Guide RNA Design, Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US, 2020: 23-33.
- [120] LEISEN T, BIETZ F, WERNER J, et al. CRISPR/Cas with ribonucleoprotein complexes and transiently selected telomere vectors allows highly efficient marker-free and multiple genome editing in *Botrytis cinerea*[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(8): e1008326.
- [121] ABDULRACHMAN D, EURWILAICHITR L, CHAMPREDA V, et al. Development of a CRISPR/Cpf1 system for targeted gene disruption in *Aspergillus aculeatus* TBRC 277[J]. *BMC Biotechnology*, 2021, 21(1): 15.
- [122] KIM B, KIM H J, LEE S J. Effective blocking of microbial transcriptional initiation by dCas9-NG-mediated CRISPR interference[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(12): 1919-1926.
- [123] HAN H A, PANG J K S, SOH B S. Mitigating off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated *in vivo* gene editing[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2020, 98(5): 615-632.

- [124] NGUYEN L T, MACALUSO N C, PIZZANO B L M, et al. A thermostable Cas12b from *Brevibacillus* leverages one-pot discrimination of SARS-CoV-2 variants of concern[J]. *eBioMedicine*, 2022, 77: 103926.
- [125] GHOUNEIMY A, MAHFOUZ M. Streamlined detection of SARS-CoV-2 via Cas13[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(8): 925-927.
- [126] ZHOU B, YANG R L, SOHAIL M, et al. CRISPR/Cas14 provides a promising platform in facile and versatile aptasensing with improved sensitivity[J]. *Talanta*, 2023, 254: 124120.
- [127] HAN X, LIU Z B, JO M C, et al. CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation[J]. *Science Advances*, 2015, 1(7): e1500454.
- [128] AMALAMOL D, ASHWIN N M R, LAKSHANA K V, et al. A highly efficient stratagem for protoplast isolation and genetic transformation in filamentous fungus *Colletotrichum falcatum* [J]. *Folia Microbiologica*, 2022, 67(3): 479-490.
- [129] WANG J, TENG Y X, GONG X Y, et al. Exploring and engineering PAM-diverse *Streptococci* Cas9 for PAM-directed bifunctional and titratable gene control in bacteria[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 75: 68-77.
- [130] FU Y W, DAI X Y, WANG W T, et al. Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(2): 969-985.
- [131] ENDO M, IWAKAMI S, TOKI S. Precision genome editing in plants via gene targeting and subsequent break-induced single-strand annealing[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(3): 563-574.
- [132] NEUGEBAUER M E, HSU A, ARBAB M, et al. Evolution of an adenine base editor into a small, efficient cytosine base editor with low off-target activity[J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2022[2023-01-03]. <https://www.nature.com/articles/s41587-022-01533-6>.
- [133] HUANG L G, DONG H Z, ZHENG J W, et al. Highly efficient single base editing in *Aspergillus niger* with CRISPR/Cas9 cytidine deaminase fusion[J]. *Microbiological Research*, 2019, 223/224/225: 44-50.
- [134] ZHANG C Y, LI N, RAO L, et al. Development of an efficient C-to-T base-editing system and its application to cellulase transcription factor precise engineering in thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(3): e0232121.
- [135] JIN S, ZONG Y, GAO Q, et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice[J]. *Science*, 2019, 364(6437): 292-295.
- [136] 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[J]. *合成生物学*, 2021, 2(2): 256-273.  
LIU Q, LI J G, ZHANG C Y, et al. Research progress of genome editing technologies for industrial filamentous fungi[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(2): 256-273.
- [137] 肖晗, 刘宜欣. CRISPR-Cas 系统编辑丝状真菌的进展与挑战[J]. *合成生物学*, 2021, 2(2): 274-286.  
XIAO H, LIU Y X. Progress and challenge of the CRISPR-Cas system in gene editing for filamentous fungi[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(2): 274-286.



**通讯作者:** 魏勇军(1986—),男,博士,副教授。研究方向为合成微生物组学。  
E-mail: yongjunwei@zzu.edu.cn



**通讯作者:** 刘宏民(1960—),男,博士,教授。研究方向为药物设计与合成。  
E-mail: liuhm@zzu.edu.cn



**第一作者:** 林继聪(1999—),男,硕士研究生。研究方向为丝状真菌合成生物学。  
E-mail: ljc990101@163.com