

## 特约评述

DOI:10.12211/2096-8280.2020-078

## CRISPR-Cas 系统编辑丝状真菌的进展与挑战

肖晗, 刘宜欣

(上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 教育部代谢与发育科学国际合作联合实验室, 上海 200240)

**摘要:** 丝状真菌是一类在蛋白分泌、活性次级代谢物生产、环境污染治理等方面起着重要作用的微生物, 关于它们的各项基础和应用研究均高度依赖基因编辑平台。然而, 丝状真菌的顶端生长、异核性、同源重组效率低和遗传标记匮乏等生理特点为构建这类微生物成熟的基因编辑平台带来挑战。近年来, 基于 RNA 介导的 CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein) 系统在丝状真菌中得到越来越广泛的应用。由于构成简单、靶向特异, CRISPR-Cas 系统极大促进了丝状真菌的基因编辑, 包括基因插入、缺失、碱基转换和转录激活等。编辑的基因包括标记基因、非筛选标记的其他功能基因、功能未知的基因, 甚至多个基因。编辑的尺度包括从 1 个碱基变化到缺失 48 kb 的基因簇。此外, 借助精妙的同源重组供体设计和中断宿主 NHEJ 的关键基因, CRISPR-Cas 系统能在特定位点引入精准修饰。本文围绕 CRISPR-Cas 系统的递送、体内表达、同源臂设计和宿主改造几方面重点介绍了该系统编辑丝状真菌近三年的进展。转化效率低和编辑效率低是现阶段 CRISPR-Cas 系统编辑丝状真菌存在的问题。针对这些问题, 本文还讨论了可能的解决办法, 为构建丝状真菌成熟的基因编辑平台提供了思路。

**关键词:** 丝状真菌; CRISPR-Cas; 同源重组; 基因编辑; 递送; 表达

**中图分类号:** Q81 **文献标志码:** A

## Progress and challenge of the CRISPR-Cas system in gene editing for filamentous fungi

XIAO Han, LIU Yixin

(Joint International Research Laboratory of Metabolic and Developmental Sciences, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** Filamentous fungi are a group of microorganisms that play important roles in producing proteins (enzymes) and secondary metabolites as well as treating environmental pollutants. The basic and applied research on filamentous fungi, including identification of gene function and activation of silent gene cluster, relies heavily on gene

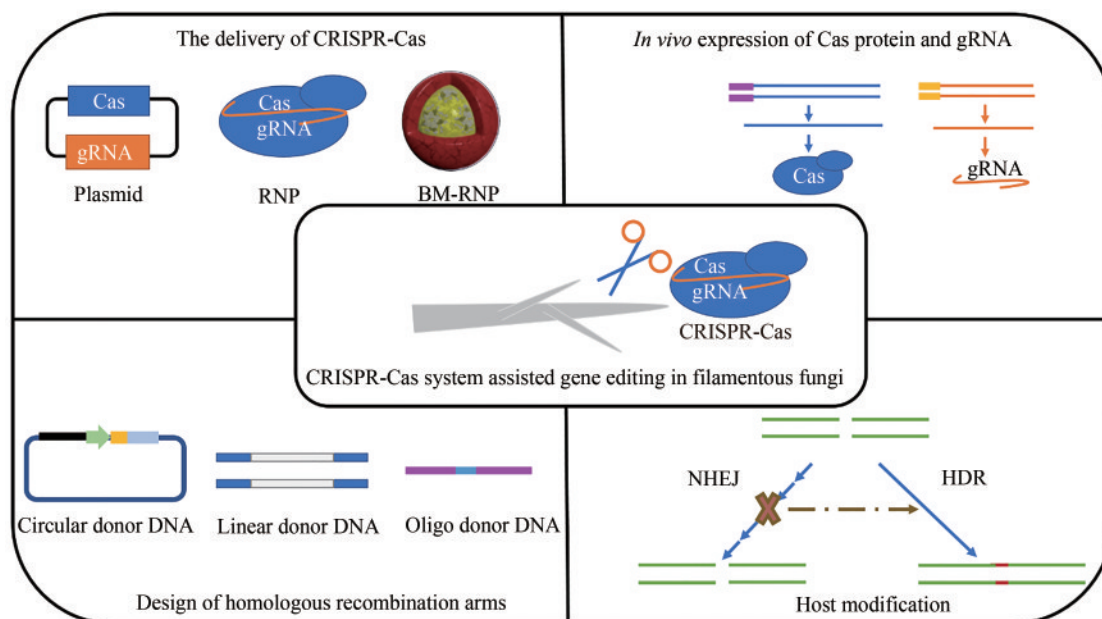
收稿日期: 2020-10-06 修回日期: 2020-12-22

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0900600); 国家自然科学基金 (319713144 和 31600071); 上海市自然科学基金 (17ZR1448900 和 18ZR1420300)

引用本文: 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

Citation: XIAO Han, LIU Yixin. Progress and challenge of the CRISPR-Cas system in gene editing for filamentous fungi[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(2): 274-286

editing. However, the apical growth, heterokaryosis, low efficiency of homologous recombination, and the lack of selective marker pose challenges for establishing gene editing platforms in filamentous fungi. In recent years, the RNA-mediated Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) system has been widely employed in engineering filamentous fungi. Due to its simplicity and target specificity, the CRISPR-Cas system has assisted gene insertion, gene deletion, base conversion and transcriptional activation in this species. The edited targets can be single gene encoding a marker or enzyme with known or unknown function, and multiple genes as well, and the editing scale varies from one base to 48 kb. Furthermore, the CRISPR-Cas system allows precise modification at target site by introducing the cleverly designed homologous recombination donor and disrupting key genes in the non-homologous end joining (NHEJ). In this review, we comment research progress of the CRISPR-Cas system in gene editing for filamentous fungi that has been achieved in the past three years, with main focus on the delivery of CRISPR-Cas, *in vivo* expression of Cas protein and guide RNA (gRNA), the design of homologous recombination arms, and host modifications. The low efficiencies in both gene transformation and editing are still main challenges for CRISPR-Cas assisted gene editing in filamentous fungi, which is expected to be addressed by breakthroughs in fundamentals such as interactions between genotype and phenotype to discover genetic determinants.



**Keywords:** filamentous fungi; CRISPR-Cas; homologous recombination; gene editing; delivery; expression

丝状真菌大多隶属于子囊菌和担子菌，是一类对生物、环境和材料等学科有着重要意义的微生物。丝状真菌是蛋白分泌的理想宿主，其中曲霉属和木霉属的菌株被广泛用于生产木聚糖酶和纤维素酶<sup>[1]</sup>。不少担子菌因具有较强的重金属吸附能力，在环境污染治理方面展示出较大潜力<sup>[2]</sup>。更为重要的是，丝状真菌能天然合成多种具有重要生物学活性的次级代谢物，例如青霉菌生产的

青霉素<sup>[3]</sup>、曲霉生产的洛伐他汀<sup>[4]</sup>和灵芝生产的灵芝酸<sup>[5]</sup>等等，是生产高附加值化合物的细胞工厂。

基于丝状真菌的各项基础和应用研究高度依赖基因编辑平台，比如鉴定基因功能<sup>[6]</sup>、激活沉默基因簇<sup>[7]</sup>等。然而，丝状真菌独特的生理性能给这类微生物基因编辑平台的构建带来挑战。这主要表现在以下四方面：

(1) 顶端生长 丝状真菌通过顶端菌丝体的分裂实现生长, 外源质粒难以均匀分布到分裂的多个菌丝体中<sup>[8]</sup>。菌丝体的胞质成分甚至细胞器可通过隔膜孔进入到相邻细胞中, 造成抗性筛选的假阳性。

(2) 异核性 担子菌中的菌丝体细胞通常包含2个不同的细胞核, 如果包含有抗性筛选标记的转化子没有同时整合到两个核中, 后续的转化子由于分裂稀释会不再包含抗性标记<sup>[8]</sup>。

(3) 同源重组效率低 同源重组是精准基因编辑的基础, 大部分丝状真菌中非同源性末端接合 (non-homologous end joining, NHEJ) 的修复机制占主导地位, 很难实现基于同源重组的精准基因编辑<sup>[9]</sup>。

(4) 遗传筛选标记匮乏 由于遗传操作工具不成熟, 营养缺陷型标记在不少丝状真菌中尚不可用, 可用的筛选标记仅有少数几种抗生素 (如萎锈灵<sup>[10]</sup>、潮霉素<sup>[8]</sup>等) 的抗性基因。

近年来, 基于RNA介导的核酸内切酶CRISPR-Cas系统能在基因组特定位点引入DNA或RNA的链缺口, 诱发宿主启动自身的防御机制修补缺口, 大幅提高了同源重组效率, 减少对筛选标记的依赖, 实现多个物种的多基因编辑<sup>[11-13]</sup>。随着研究的深入, CRISPR-Cas系统也被应用于丝状真菌中, 为构建成熟的丝状真菌基因编辑平台奠定基础。本综述重点介绍了近三年丝状真菌基因编辑的最新进展, 讨论了该系统协助丝状真菌基因编辑存在的挑战及可能的解决方法。

## 1 CRISPR-Cas 系统编辑丝状真菌的进展

自2015年Liu等首次将CRISPR-Cas系统引入模式丝状真菌里氏木霉中以来<sup>[14]</sup>, 5年多时间里, 该系统在越来越多的丝状真菌中成功构建, 它不但能更加高效、快速地编辑模式菌株, 更为重要的是, 它协助很多传统方法无法实现基因编辑的菌株进行基因编辑<sup>[9, 15]</sup>, 大幅提高了人们对这类重要微生物的认识和改造。本部分围绕CRISPR-Cas系统的递送、体内表达、同源臂设计和宿主改造几方面介绍了其编辑丝状真菌的进展。

### 1.1 CRISPR-Cas 系统的递送

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 和根瘤农杆菌介导的原生质体转化 (agrobacterium-mediated transformation, AMT) 是把CRISPR-Cas系统递送到丝状真菌中最主要的两种方式<sup>[16]</sup>。外源DNA片段经PEG介导的转化后, 通常以多拷贝的形式随机整合到丝状真菌基因组上<sup>[17]</sup>, 而AMT则倾向于将外源片段以单拷贝的形式随机整合到基因组上<sup>[18]</sup>。经PEG或AMT递送的CRISPR-Cas系统, 可以是DNA、RNA<sup>[9, 19]</sup>, 也可以是体外表达的Cas蛋白和体外转录的引导RNA (guide RNA, gRNA) 组装好的CRISPR-Cas核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, RNP)<sup>[20-22]</sup>。由于提供了一种瞬时的、不依赖于体内表达元件和遗传筛选标记的基因编辑方式, RNP在丝状真菌中的应用得到越来越多的关注。在2019年的一项研究中, Li等<sup>[23]</sup>开发了一种仿生矿化的RNP递送系统, 将利用磷酸钙矿化的纳米颗粒承载RNP递送至植物病原真菌稻瘟病菌的原生质体中。仿生矿化处理的RNP可保护gRNA免受酶水解, 提高RNA的稳定性, 保留Cas9蛋白的酶活性。同时, 他们还使用聚丙烯酸改善仿生矿化的RNP纳米颗粒 (biomimetic mineralized RNP nanoparticle, BM-RNP NP) 的分散性。通过观察与BM-RNP NP有相似形态和尺寸分布的EGFP纳米颗粒 (BM-EGFP NP) 的递送过程, 发现BM-EGFP NP附着在细胞膜表面可能会增加经胞吞途径被细胞摄取的概率。研究者将中断编码Sytalone dehydratase的*sdh*基因的BM-RNP NP加入原生质体中, 检测发现该基因的编辑效率达20%, 而仅通过RNP处理的细胞中该基因的表达并未发生明显变化。进一步序列分析显示, 用BM-RNP NP处理的米曲霉在7个潜在的脱靶位点均未发生变化。他们认为使用仿生矿化的RNP进行基因编辑有望提供一种通用且不依赖DNA的方法来提高编辑效率。

此外, CRISPR-Cas系统还能介导外源片段在丝状真菌中的定向整合, 彻底改变外源片段随机整合的递送模式。Lu等<sup>[24]</sup>在根瘤农杆菌介导的T-DNA中间插入了靶向*mfa2*基因的CRISPR-Cas表达盒, 在潮霉素筛选条件下, 原本随机插入的T-DNA片段能定向插入到经CRISPR-Cas切割的*mfa2*

的靶位点, 实现该基因的中断。更进一步地, 将 CRISPR-Cas 系统靶向到上述插入至 *mfa2* 的 CRISPR-Cas 表达盒的潮霉素抗性基因, 可在潮霉素抗性基因的靶位点插入同义突变的 *mfa2* 基因用以规避 CRISPR-Cas 的识别, 实现该基因的回补。类似地, 通过巧妙设计 CRISPR-Cas 系统, 可将外源片段定向整合到基因组的特定位点。Sarkari 等<sup>[25]</sup> 首先利用 CRISPR-Cas 系统破坏了黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 整合靶位点 *pyrG* 基因, 使得突变株成为尿嘧啶营养缺陷菌株。然后, 在含有递送外源片段的表达盒两端引入回复 *pyrG* 功能的同源臂, 在同源臂的两端再引入另一段靶向 *pyrG* 的识别序列。基于此, 在体内产生功能的 CRISPR 系统将切割三处识别序列, 切割含有外源片段质粒的两处后产生线性化的、与 *pyrG* 具有同源臂的外源片段, 该片段可定向插入到第三处切割 *pyrG* 位点产生的双链缺口处, 此时 *pyrG* 功能得到回复。

## 1.2 CRISPR-Cas 系统的体内表达

在丝状真菌中构建基于 CRISPR-Cas 的基因编辑系统的关键在于让该系统在丝状真菌中工作, 即执行对目标 DNA/RNA 的切割或靶向的功能。和体外表达 CRISPR-Cas 系统相比, 在丝状真菌体内表达 CRISPR-Cas 系统具有不可替代的优势, 也是 CRISPR-Cas 系统在丝状真菌中研究最多、发展最快的方向之一。其原因可能有两方面: 一方面是因为持续表达的 CRISPR-Cas 能提高对目标 DNA/RNA 的切割或靶向的概率, 进而提高基因编辑效率; 另一方面, 在表达 Cas 蛋白的菌株中递送 gRNA 可降低 Cas 蛋白和 gRNA 无法进入同一细胞核的风险。本小节将系统介绍 Cas 蛋白和 gRNA 在丝状真菌体内表达的进展。

### 1.2.1 Cas 蛋白的表达

Cas 蛋白的密码子优化被认为是促使它在丝状真菌中发挥功能的关键策略。Liu 等<sup>[14]</sup> 尝试用人源密码子优化的 Cas9 在丝状真菌里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 中构建 CRISPR-Cas 系统时并未获得成功, 采用经里氏木霉的密码子优化的 Cas9 成功构建了 CRISPR-Cas9 系统。除了里氏木霉外, 采用特定宿主密码子优化 Cas9 的策略在多种丝状真菌如稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*)<sup>[26]</sup>、

灵芝 (*Ganoderma lucidum*)<sup>[9]</sup> 等中, 也成功构建了基于 CRISPR-Cas 的基因编辑系统。为了保证 Cas 蛋白在丝状真菌的高效表达, 除了选用内源强启动子外<sup>[27]</sup>, 最新一项研究发现在 Cas 蛋白中引入内含子也能提高灵芝的基因编辑效率<sup>[28]</sup>。在 Cas9 基因的上游引入灵芝内源 3-磷酸甘油醛脱氢酶编码基因 *gpd* 5' 端的内含子可使得 CRISPR-Cas9 中断 5'-单磷酸脱羧酶编码基因 *ura3* 的效率提高 10.6 倍, 每转化  $10^7$  个原生质体可获得 14~18 个基因编辑的突变株, 研究者推测这可能是因为内含子的加入有利于异源基因的 mRNA 在担子菌中的积累, 进一步增强蛋白的表达<sup>[28]</sup>。来源于构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的 AMA1 序列是迄今为止发现的唯一能在曲霉属中自主复制的元件, Katayama 等<sup>[29]</sup> 利用截短至一半的 AMA1 序列驱动 CRISPR 质粒的复制, 将多株米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的基因编辑效率提高到 50%~100%, 这可能由于 AMA1 在细胞以多拷贝的形式存在, 提高了 Cas9 和 gRNA 的表达所致。在该质粒上加入了能抑制菌丝体生长的 *aoace2* 基因表达盒, 诱导表达该基因使得 CRISPR 质粒快速丢失, 便于多轮的基因编辑<sup>[29]</sup>。

另外, 诱导表达的 Cas9 由于可调控 CRISPR-Cas 系统基因编辑时的活力, 减少脱靶效应等, 在丝状真菌中也有不少应用。Weber 等<sup>[30]</sup> 利用一个合成的四环素依赖的系统诱导 Cas9 在烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 中表达, 在转化前加入四环素筛选表达 Cas9 的菌株, 将 gRNA 表达盒和分裂失活的筛选标记整合到基因组上, 该分裂的筛选标记中间有 CRISPR-Cas 系统的靶向目标基因的识别序列, 两侧是自我同源序列, 经切割后同源重组回复筛选标记的基因功能。通过该设计, 可以经筛选获得靶基因发生编辑的突变体。

基于 CRISPR-Cas 系统的靶向功能, Huang 等<sup>[31]</sup> 在黑曲霉 (*A. niger*) 中开发了单碱基编辑器。具体而言, 他们将不具有切割 DNA 活力的 nCas9 或 dCas9 与大鼠的胞嘧啶脱氨酶 rAPOBEC1 融合, 把 CRISPR-Cas 识别的靶序列的胞嘧啶转化为胸腺嘧啶 (图 1)。该编辑器编辑报告基因 *pyrG* 和 *fwnA* 的效率为 47.36%~100%, 编辑非报告基因 *prtT* 的效率为 60%, 当胞嘧啶位于 CRISPR-Cas 识别序列的第 2 到第 9 个位置之间时, 均可被编辑。

虽然 Cas9 至今仍是丝状真菌中应用最多的 Cas 蛋白，但近两年，开发 Cas12a (Cpf1) 在丝状真菌中进行基因编辑的研究逐渐增多<sup>[32-35]</sup>。Cas12a 和 Cas9 同属于 Class II CRISPR-Cas 系统，识别序列、切割方式并不相同。Cas12a 识别的原间隔序列 (protospacer) 为 5' 端富含胸腺嘧啶的 TTTN，而 Cas9 识别的 protospacer 为 3' 端富含鸟嘌呤的 NGG；Cas12a 切割 DNA 双链产生黏性末端，而 Cas9 切割双链 DNA 产生平末端。和 Cas9 相比，Cas12a 可以识别一个简单的转录本中多个串联的 crRNA，为多基因编辑提供便利。Liu 等利用密码子优化的 AsCpf1 在嗜热毁丝菌 (*Myceliophthora thermophila*) 中构建了基于 CRISPR-Cas12a 的多基因编辑系统。他们用一个单独的 crRNA 阵列或三个单独的 crRNA 同时靶向碳代谢抑制的转录因子 *cre-1* 和两个与纤维素酶生产相关的基因 *res-1* 和 *ghl-1*，在一步转化中除了包括 Cas12a 和 crRNA 的库 (或单一阵列) 以外，还有供体 DNA 用于修复缺口。和只转化供体 DNA 的对照相比，用 crRNA 库和 crRNA 阵列分别达到 40% 和 32% 的三基因编辑效率。基于 CRISPR-Cas12a 介导的高效多基因编辑，Liu 等<sup>[35]</sup> 进一步开发了 CRISPR-Cas 辅助的标记回收技术。在编辑的多基因的其中一个基因

内部插入 *neo* 标记，在第二次编辑其他基因时同时靶向 *neo* 将其敲除，同时引入 *bar* 标记。以此类推，在连续转化中迭代替换标记基因，减少对多个筛选标记的依赖。此外，研究者们还在构巢曲霉 (*A. nidulans*)<sup>[34]</sup>、棉阿舒囊霉菌 (*Ashbya gossypii*)<sup>[33]</sup> 等丝状真菌中建立了基于 CRISPR-Cas12a 的基因编辑工具。在最新的一项研究中，将不具有切割 DNA 活力的 dCas12a 和一个含有三个转录激活结构域的转录激活因子 VP64-p65-Rta (VPR) 融合 (图 1)，靶向调节构巢曲霉 (*A. nidulans*) 中生物合成基因簇的调控区域，可激活基因表达并提高天然产物的产量<sup>[32]</sup>。

### 1.2.2 gRNA 的表达

作为 CRISPR-Cas 系统中另一核心组成成分，gRNA 的高效表达对于该系统在丝状真菌中功能实现也同样重要。gRNA 在真核细胞中的表达是由 RNA 聚合酶 III 型启动子驱动的，在对体内 RNA 聚合酶 III 型启动子元件不甚清楚的时候，不少研究者采用了转化经体外转录的成熟的 gRNA 的方式，成功实现了黑曲霉 (*A. niger*)<sup>[36]</sup>、里氏木霉 (*T. reesei*)<sup>[14]</sup>、灵芝 (*G. lucidum*)<sup>[9]</sup>、多节孢属菌 (*Sporormiella minima*)<sup>[37]</sup> 等多种丝状真菌的基因编辑。但是，和体内转录 gRNA 相比，体外转录 gRNA 虽然不依赖体内的启动子元件转录，也存

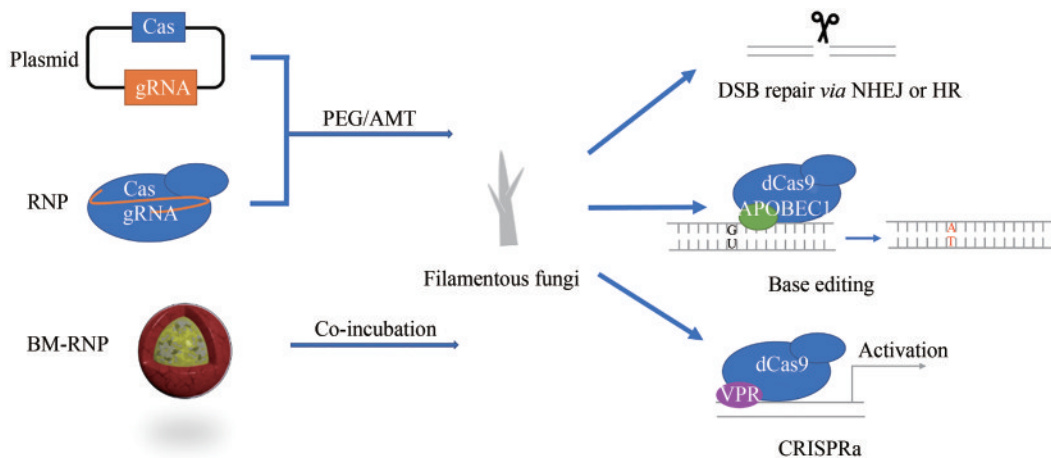


图1 CRISPR-Cas 系统介导的丝状真菌基因编辑

[RNP—核糖核蛋白；BM-RNP—仿生矿化的 RNP；PEG—聚乙二醇；AMT—根瘤农杆菌介导的原生质体转化；DSB—DNA 双链缺口；NHEJ—非同源末端连接；HR—同源重组；APOBEC1—载脂蛋白 B mRNA 编辑酶（胞嘧啶脱氨酶）；VPR—含有三个转录激活结构域的转录激活因子；CRISPRa—CRISPR 介导的基因转录激活系统]

Fig. 1 CRISPR-Cas system assisted gene editing for filamentous fungi

(RNP—ribonucleoprotein; BM-RNP—biomimetic mineralized RNP; PEG—polyethylene glycol; AMT—agrobacterium-mediated transformation; DSB—double stranded break; NHEJ—non-homologous end joining; HR—homologous recombination; APOBEC1—apolipoprotein B mRNA editing enzyme; VPR—VP64-p65-Rta, a tripartite transcriptional activator domain; CRISPRa—CRISPR activation)

在以下局限：①成本高，过程复杂；②很难保证细胞对其完全吸收；③进入胞内后，在等待Cas蛋白表达的过程中，可能被胞内RNA酶降解而进一步降低RNP的浓度。此外，还有研究认为体外转录的gRNA由于稳定性较差不适合转化丝状真菌<sup>[38]</sup>。

不难看出，体内转录gRNA的方法往往更受欢迎。在丝状真菌中体内表达gRNA主要分为两类元件：一类是用RNA聚合酶II型启动子和具有自我剪切功能的核酶；另一类是用宿主内源的RNA聚合酶III型启动子（图2）。真核生物中RNA聚合酶II型启动子比III型更为常见。但RNA聚合酶II型启动子负责mRNA的转录，转录后会在转录本5'端加帽，3'端加PolyA尾，引导转录本进入细胞质进行蛋白翻译。在gRNA的5'端引入锤头型核酶HH和3'端引入丁型肝炎病毒（HDV）核酶将介导转录本自我剪切去掉两端的修饰，避免后续出核而无法行使引导和靶向的功能。利用该方法驱动gRNA的表达在棘孢曲霉（*Aspergillus aculeatus*）<sup>[39]</sup>、互生交链孢菌（*Alternaria alternata*）<sup>[40]</sup>、皮炎芽生菌（*Blastomyces dermatitidis*）<sup>[41]</sup>、黑曲霉（*A.*

*niger*)<sup>[42]</sup>等丝状真菌中实现了基因编辑。关于利用宿主内源的RNA聚合酶III型启动子驱动gRNA的表达，*u6*基因的启动子在丝状真菌中使用最广泛<sup>[15, 43-46]</sup>。我们在最新一项研究中发现，利用灵芝*u6*基因的启动子驱动gRNA转录时，在3'端引入HDV能进一步提升基因编辑的效率，推测可能是因为由PolyT终止的转录本会产生不同长短的含有T的gRNA，而引入HDV后产生了大小均一的gRNA，有利于RNP更好地发挥功能<sup>[15]</sup>。除了U6启动子外，5S rRNA基因的启动子能更加高效驱动gRNA在黑曲霉中的表达。Zheng等<sup>[47]</sup>用5S rRNA基因启动子表达gRNA，中断黑曲霉（*A. niger*）的一个假定的多肽合成酶编码基因*alba*的效率高达96%，而用不同的U6启动子中断*alba*的效率只有15%~23%。他们还发现利用截短5'端区域的5S rRNA基因启动子并没有明显降低CRISPR-Cas的编辑效率。此外，Song等<sup>[48]</sup>测试了37个tRNA启动子驱动CRISPR-Cas系统在黑曲霉中基因编辑的效率，发现其中36个都能成功介导目标基因的编辑<sup>[48]</sup>。在2019年的一项研究中，Shi等<sup>[38]</sup>系统比较了三种体内表达gRNA的方式对水稻恶苗病菌

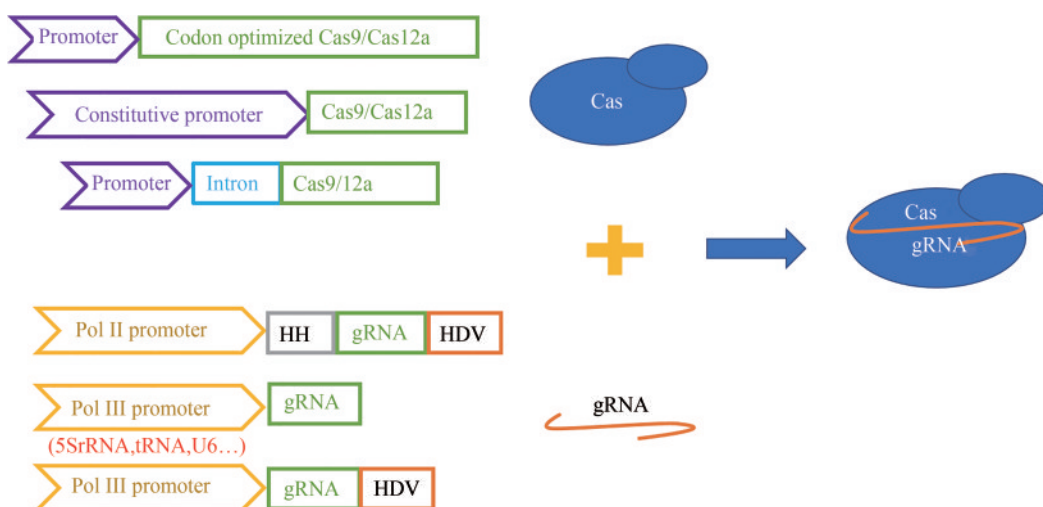


图2 CRISPR-Cas系统在丝状真菌中体内表达策略

（针对Cas蛋白的体内表达，有密码子优化，采用组成型启动子驱动蛋白表达和在Cas基因5'端引入内含子等策略。针对gRNA的体内表达，有用RNA聚合酶II型启动子联合具有自我剪切功能的核酶表达gRNA、RNA聚合酶III型启动子表达gRNA、RNA聚合酶III型启动子联合具有自我剪切功能的核酶表达gRNA等策略）

Fig. 2 Strategies for *in vivo* expression of the CRISPR-Cas system in filamentous fungi

(For *in vivo* expression of Cas protein, strategies include codon-optimization, adopting constitutive promoter for driving the expression of Cas protein, and incorporating intron sequence at the 5' end of cas gene. For *in vivo* expression of gRNA, strategies include adopting polymerase II promoter together with the self-cleaving ribozymes for gRNA expression, adopting polymerase III promoter for gRNA expression, and adopting polymerase III promoter together with the self-cleaving ribozyme for gRNA expression)

基因编辑效率的影响<sup>[38]</sup>。当用RNA聚合酶II型启动子加上自我剪切核酶的方式中断*Fusarium cyclin* C1编码基因*fcc1*时,并不能获得基因编辑的突变体。而用RNA聚合酶III型U6和5S rRNA启动子中断*fcc1*时,效率分别是37.5%和79.2%,表明用5S rRNA启动子表达的策略更为有效<sup>[38]</sup>。

### 1.3 同源臂的设计

当CRISPR-Cas系统产生DNA双链缺口(double-strand break, DSB)时,宿主会通过非同源末端连接(none homologous end joining, NHEJ)或同源介导的修复(homology-directed repair, HDR)修补缺口(图3)。尽管经NHEJ能在切割位点处缺失或插入片段可导致靶基因失活,但这样的编辑方式具有随机性,且不能引入研究者想要的变化。相比之下,HDR则更为重要,因为在CRISPR-Cas产生DSB的同时引入HDR供体修补缺口,宿主则有可能按照研究者的设计精准编辑靶位点,为研究基因功能、定点突变奠定基础。关于同源重组供体的设计,在丝状真菌中以线性双链DNA为主,通常在中心位置引入突变,两侧的同源臂紧邻基因组DSBs,长度为1~2kb左右<sup>[15, 49-52]</sup>。也有不少研究发现不超过40 bp的短同源臂就能协助CRISPR-Cas实现多种曲霉属丝状真菌的精准基因编辑<sup>[53-54]</sup>。Dong等<sup>[54]</sup>还发现在黑曲霉中,同源臂距离双链缺口越近,基因编辑效率越

高。具体而言,他们设计了三段线性的双链DNA供体,供体中间是抗性筛选标记基因*hygB*,两侧同源臂长度均为39 bp,距离切口分别为0 bp、1 kb和5 kb,经CRISPR-Cas介导的*hygB*的整合效率分别是80%、50%和10%。除了线性同源重组供体外,Katayama等<sup>[29]</sup>利用环状DNA供体在米曲霉(*A. oryzae*)中成功实现基因编辑(图3)。此外,在里氏木霉(*Trichoderma reesei*)中,环状DNA供体也可介导高效的基因编辑<sup>[14]</sup>。有研究者发现,和线性DNA供体相比,环状DNA供体介导的靶基因编辑效率更高。他们推测原因是完整的环状DNA由于缺少DSB,不大会通过在丝状真菌中占有主导地位的NHEJ修复途径整合到染色体上,因此,降低了筛选的假阳性率<sup>[39]</sup>。

近年来,单链寡核苷酸也被设计用于CRISPR-Cas编辑丝状真菌基因时的同源重组供体。Nødvig等<sup>[55]</sup>设计了90 bp的寡核苷酸链GE-Oligo1和GE-Oligo2,分别与CRISPR-Cas系统靶向的*yA*基因的反义链和正义链互补,在供体中心引入了AAC至TAA的无义突变。无论转化GE-Oligo1还是GE-Oligo2,大于90%的转化子都表现出*yA*基因中断的表型。随机挑取基因中断菌株测序发现,当转化GE-Oligo1时,12个随机挑取的基因中断株中有10株发生了和设计一致的变化,另外两株除了包含设计的变化以外,一株在TAA下游3个碱基处发生了单碱基缺失,另一株在TAA下游插入了69个碱基的重复序列;当转化GE-Oligo2时,所有

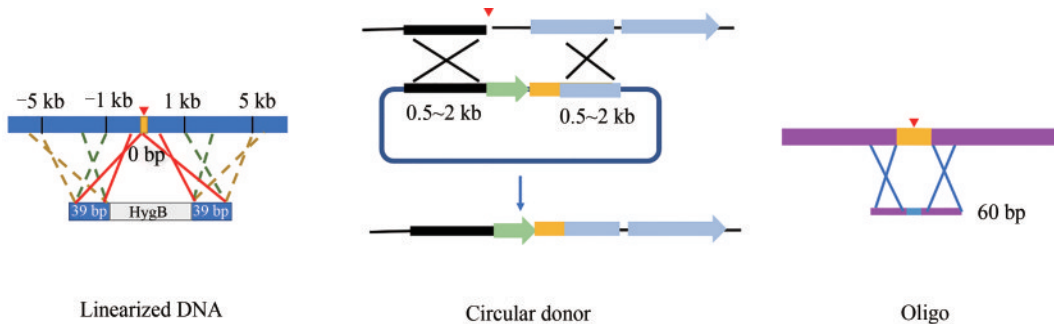


图3 同源重组供体的设计

(线性双链DNA供体,其两侧同源臂长39 bp,距离CRISPR-Cas系统产生的DNA双链缺口5 kb以内;环状DNA供体,两侧同源臂长约0.5~2 kb,中间往往包含筛选标记;单链寡核苷酸,供体中突变位点和PAM之间距离不超过7 bp)

Fig. 3 Design of homologous recombination donor

(For linearized DNA, it is flanked by 39 bp HR arms, which are within 5 kb from DSB as generated by CRISPR-Cas. For circular DNA, it is flanked by HR arms with the size from 0.5 to 2 kb, and a selective marker is usually contained in the middle. For oligo, the intended mutation and PAM sequence are interspaced by no more than 7 bp)

随机挑选基因中断菌株都发生了和设计一致的变化,且没有其他变化发生<sup>[55]</sup>。最近的一项研究表明,仅60 bp长度的单链寡核苷酸也可以协助CRISPR-Cas系统精准改变黑曲霉(*A. niger*)的靶序列,但需要精巧的设计。Kun等<sup>[56]</sup>首先利用设计了90 bp的单链寡核苷酸修复CRISPR-Cas系统切割黑曲霉转录因子*gaaR*的缺口,该供体包含了两处点突变:一处是CRISPR-Cas系统识别的PAM;另一处是距离PAM位点52 bp的突变。遗憾的是用该供体转化获得的转化子只在PAM的位点发生了突变,离它较远的突变并没有发生,保持同样的设计,将寡核苷酸链长度增加至200 bp仍然不能获得预期的变化,这说明这些寡核苷酸修复模板并没有完全插入到双链缺口中。鉴于此,Kun等重新设计了长度为60 bp的寡核苷酸供体,将PAM和预期突变位点的距离缩短至7个碱基。在挑取的5个转化子中,4个发生了预期变化,仅有1个转化子只发生了PAM位点的突变。他们还设计了另一条60 bp的寡核苷酸修补模板,除了包括上述2个突变外,在距离PAM 15 bp范围以内还增加了5处点突变。在随机挑取的5个转化子中,同样有4个都发生了预期的7处改变。综上,研究者推测距离DSBs 5'端不长于12个碱基的序列,更倾向于作为同源重组的修补模板<sup>[56]</sup>。

#### 1.4 宿主的改造

在CRISPR-Cas编辑丝状真菌的研究中,针对宿主改造的研究尚不多见。如前所述,NHEJ和HDR是宿主修复DSB的两种形式,抑制或敲除NHEJ是大幅提高宿主HDR的有效策略,也是目前发现通过改造宿主细胞来提高CRISPR-Cas精准编辑丝状真菌基因效率的唯一策略。研究者们通常使用NHEJ途径失活的丝状真菌突变体为出发菌株,构建CRISPR-Cas系统<sup>[56-57]</sup>。但是,也有研究发现在NHEJ没被抑制的丝状菌株中,CRISPR-Cas系统介导的微同源重组同样能高效地发生<sup>[53]</sup>(表1),这提示我们可能存在不与NHEJ竞争的多种同源重组修复途径。如何改造宿主对DSBs进行高效的修复,可能还需依赖CRISPR-Cas等工具首先解析丝状真菌中的相关修复途径,才可能提出行之有效的策略。

## 2 CRISPR-Cas系统编辑丝状真菌的挑战及可能的解决方法

CRISPR-Cas系统改变了外源片段在丝状真菌中的整合方式,不仅大幅提高多种模式菌株如构巢曲霉(*A. nidulans*)、里氏木霉(*T. reesei*)等基因编辑的效率,甚至实现了传统方法无法编辑的、遗传操作困难的非模式菌株如灵芝(*G. lucidum*)等的精准基因编辑<sup>[9, 15]</sup>。尽管如此,CRISPR-Cas系统并没有改变外源片段转化丝状真菌的效率,此外,编辑效率低也是CRISPR-Cas系统在非模式丝状真菌中应用的另一大挑战(表1),本小节将针对这些挑战分析可能的原因并提出对应的解决办法。

### 2.1 转化效率低

丝状真菌的细胞壁是吸收外源DNA的障碍,人们往往以去掉细胞壁的原生质体作为受体接受外源片段,而原生质体的低再生率限制了转化效率<sup>[58]</sup>。尝试开发不依赖于原生质体的递送外源片段的方式可能是一种解决方法,这可以从其他难操作宿主的递送方式的有关研究中获得启发。在2015年的一项研究中,研究者设计了菱形缩颈的芯片,当细胞通过比其直径小的缩颈时,经历快速的机械变形可形成短暂的膜破裂或孔洞,gRNA和Cas蛋白在此时可以从周围的介质进入到细胞中。利用该方法,Han等<sup>[59]</sup>成功将CRISPR-Cas系统递送到了多种细胞中,包括难于转染的淋巴瘤细胞和胚胎干细胞。此外,向自然界学习病毒侵染丝状真菌的过程<sup>[60]</sup>,也可开发高效的、不依赖于原生质体转化的外源片段递送方式,其关键在于系统鉴定病毒在丝状真菌体内的复制元件。退而求其次,即便经原生质体再生限制了转化效率,挖掘菌株特异的自主复制元件用于装载外源片段,也能极大地提高转化效率。在前文中提到,AMA1是曲霉属中唯一发现的自主复制元件,有研究表明它能把黑曲霉(*A. niger*)的转化效率提高10~100倍<sup>[61]</sup>,也可在产黄青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)中实现高效的基因敲除<sup>[20]</sup>。

表1 CRISPR-Cas系统编辑丝状真菌的典型例子

Tab. 1 Examples of CRISPR-Cas system assisted gene editing in filamentous fungi.

菌株	CRISPR-Cas存在形式	递送方式	表达策略	同源重组供体	宿主改造	编辑方式和效率
稻瘟病菌 ( <i>Magnaporthe oryzae</i> )	RNP	利用磷酸钙矿化的纳米颗粒承载 RNP 与原生质体共培养	体外表达并组装成有功能的 RNP	—	—	NHEJ, 中断编码 Sytalone dehydratase 的 <i>sdh</i> 基因的效率为 20% <sup>[23]</sup>
水稻恶苗病菌 ( <i>Fusarium fujikuroi</i> )	质粒	PEG 介导的原生质体转化	内源表达水稻恶苗病菌密码子优化的 Cas9, 并用 RNA 聚合酶 II 型启动子加上自我剪切核酶的方式、RNA 聚合酶 III 型 U6 或 5S rRNA 启动子分别表达 gRNA	—	—	NHEJ, RNA 聚合酶 II 型启动子加上自我剪切核酶的方式表达 gRNA 时, 不能获得 <i>Fusarium cyclin C1</i> 编码基因 <i>fcc1</i> 的基因编辑突变体; 用 RNA 聚合酶 III 型 U6 和 5S rRNA 启动子表达 gRNA 时, <i>fcc1</i> 中断效率分别是 37.5% 和 79.2% <sup>[38]</sup>
嗜热毁丝霉 ( <i>Myceliophthora thermophila</i> )	PCR 产物	PEG 介导的原生质体转化	内源表达密码子优化的 Cas12a 并用 U6 启动子驱动 gRNA 的表达	PCR 产物; 两端靠近 CRISPR-Cas 切口处分别有 500~600 bp 的同源臂, 中间包含抗性筛选标记基因表达盒	—	HDR, 编辑单基因的效率为 90%; 编辑多个基因时, 单基因发生编辑的效率为 13%~41% <sup>[35]</sup> ;
黑曲霉 ( <i>Aspergillus niger</i> )	质粒	PEG 介导的原生质体转化	利用可自主复制并丢失的质粒装载 CRISPR-Cas 系统, RNA 聚合酶 II 型启动子加核酶的形式表达 gRNA	质粒; 插入片段两侧有 CRISPR-Cas 在基因组上产生切口附近的同源臂, 同源臂两侧有和 CRISPR-Cas 在基因组上识别区域一致的 spacer	<i>pyrG</i> 基因中断菌株	每转 1 $\mu$ g DNA 获得 2 个有正确整合形式的转化子 <sup>[25]</sup>
黑曲霉 ( <i>Aspergillus niger</i> )	质粒	—	融合表达大鼠的胞嘧啶脱氨酶 rAPOBEC1、黑曲霉密码子优化的 nCas9 和尿嘧啶糖基化抑制酶, 用米曲霉 U6 启动子驱动 gRNA 的表达	—	—	将靶基因中特定位置的胞嘧啶转变为胸腺嘧啶, 效率 47.36%~100% <sup>[31]</sup>
黑曲霉 ( <i>Aspergillus niger</i> )	质粒	PEG 介导的原生质体转化	利用黑曲霉密码子优化的 Cas9 和内源 5S rRNA 基因启动子驱动 gRNA 的表达	PCR 产物; 两端和 CRISPR-Cas 切口处分别有 40 bp 的同源臂	<i>kusA</i> 缺陷型菌株	HDR, 效率为 33.3%~100% <sup>[47]</sup>
黑曲霉 ( <i>Aspergillus niger</i> )	质粒	PEG 介导的原生质体转化	利用可自主复制的质粒装载 CRISPR-Cas 系统, 内源表达 Cas9, 并用 tRNA 基因启动子驱动 gRNA 的表达	60 bp 的寡核苷酸链, 突变位点和 PAM 的距离不超过 15 bp	<i>kusA</i> 缺陷型菌株	HDR, 效率为 80% <sup>[56]</sup>
烟曲霉 ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )	质粒和 RNA	PEG 介导的原生质体转化	内源表达人密码子优化的 Cas9 和体外转录 gRNA	PCR 产物; 两端靠近 CRISPR-Cas 切口处分别有 35 bp 的同源臂	—	HDR, 效率为 95%~100% <sup>[53]</sup>
里氏木霉 ( <i>Trichoderma reesei</i> )	质粒和 RNA	PEG 介导的原生质体转化	内源表达里氏木霉优化的 Cas9 和体外转录成熟的 gRNA	质粒; 两端和 CRISPR-Cas 切口处分别有 200 bp 的同源臂	以表达 Cas9 的菌株为出发菌株	HDR, 编辑内源一个假定的甲基转移酶基因 <i>lae1</i> 的效率为 93% <sup>[14]</sup>
灵芝 ( <i>Ganoderma lucidum</i> )	质粒	PEG 介导的原生质体转化	利用灵芝密码子优化的 Cas9 和内源 U6 启动子驱动 gRNA 的表达, 在 gRNA 3' 端加入 HDV	PCR 产物; 两端和 CRISPR-Cas 切口处分别有 1 kb 的同源臂, 中间缺失包括 PAM 在内的 8 bp 并引入终止密码子 TGA	—	HDR, 编辑细胞色素 P450 编码基因 <i>cyp515018</i> 的效率为每转化 $3 \times 10^7$ 个原生质体获得 2 个基因编辑菌株 <sup>[15]</sup>

## 2.2 编辑效率低

CRISPR-Cas 系统编辑一些丝状真菌的效率较低, 可能有以下几方面原因: 第一, CRISPR-Cas 系统发挥功能的前提是 Cas 蛋白和 gRNA 同时进入同一个细胞核对 DNA 进行切除, 很多丝状真菌具有异核性, 中断其中一个细胞核的基因并不意味着另一个细胞核的基因能被有效中断, 这样的菌株往往因为仍然具有该基因的功能而不被筛选获得; 第二, 丝状真菌内源的防御机制阻碍 CRISPR-Cas 系统进入细胞; 第三, 丝状真菌内源的防御机制包括重复序列诱发的点突变和 RNA 沉默等<sup>[62]</sup>, 抑制了 CRISPR-Cas 系统的活力, 导致即便 CRISPR-Cas 系统同时进入所有细胞核, 它们却不能有效行使靶向和/或切割功能, 进而降低了编辑效率。

针对第一点, 通过孢子分离等手段获得单核、单倍体的突变体, 以它为出发菌株进行基因编辑, 或许是一种解决办法。针对第二点和第三点, 消除或缓解丝状真菌的多种内源防御是建立在对其充分理解和认识基础之上的。而正因为不清楚防御机制的关键遗传决定因子, 导致某些丝状真菌的编辑效率无法得到显著提高。鉴于此, 构建亲缘关系相近的模式丝状真菌的全基因组基因中断突变体库, 利用报告系统考察突变体的表型, 将有效地协助研究者解决上述问题。

## 3 总结与展望

丝状真菌成熟基因编辑平台的构建, 对挖掘这类微生物在工业、农业、医药等多种行业的应用价值与潜力起关键作用。CRISPR-Cas 系统由于其组成和设计简单、特定靶向的优势, 近年来在多种模式和/或非模式丝状真菌中得到越来越多的应用。基于 CRISPR-Cas 系统开发的丝状真菌基因编辑形式包括特定定位点的插入<sup>[24-25]</sup>、缺失<sup>[9]</sup>、碱基转换<sup>[31]</sup>和转录激活<sup>[32]</sup>。编辑的基因涵盖了易筛选的标记基因<sup>[14]</sup>, 非筛选标记的其他功能基因<sup>[15]</sup>, 甚至功能未知的基因<sup>[63]</sup>, 同时编辑的 5 个基因<sup>[33]</sup>。编辑的尺度可以是改变 1 个碱基<sup>[55-56]</sup>, 也可以是缺失长达 48 kb 的基因簇<sup>[47]</sup>。在此基础上, 通过中断

宿主 NHEJ 的关键基因和精妙的同源重组供体设计, 使得 CRISPR-Cas 系统能在特定位点引入变化, 提高了编辑的精准性。

CRISPR-Cas 系统确实提高了不少丝状真菌的同源重组效率, 在有些菌株中能达到 100% 的编辑效率, 节省了筛选标记的使用, 克服了这类微生物可使用筛选标记少的限制<sup>[35]</sup>。然而, 在大多数非模式丝状真菌中, CRISPR-Cas 系统的基因编辑效率并不高<sup>[15, 64]</sup>, 很可能是因为人们对这些难操作的宿主的代谢调控、防御机制认识有限, 尚不清楚宿主特异性限制 CRISPR-Cas 功能的决定因素。如 2.2 中所讨论的, 构建全基因组范围的基因中断突变体库将为解决这一基础科学问题奠定基础。关于构建全基因组范围的突变体库, 我们目前已在一些模式丝状真菌如 *Aspergillus nidulans*<sup>[65]</sup>、*Neurospora crassa*<sup>[66]</sup> 中看到希望。

**致谢:** 感谢科技部“国家重点研发计划”(2018YFA0900600)、国家自然科学基金(319713144 和 31600071)和上海市自然科学基金(17ZR1448900 和 18ZR1420300)对肖晗博士的资助。感谢上海交通大学钟建江教授等的支持和有益讨论。

## 参 考 文 献

- [1] WARD O P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(5): 1119-1139.
- [2] 刘剑飞, 胡留杰, 廖敦秀, 等. 食用菌生物修复重金属污染研究进展[J]. *应用生态学报*, 2011, 22(2): 543-548.  
LIU J F, HU L J, LIAO D X, et al. Bioremediation of heavy metal pollution by edible fungi: a review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(2): 543-548.
- [3] LAICH F, FIERRO F, MARTIN J F. Production of penicillin by fungi growing on food products: identification of a complete penicillin gene cluster in *Penicillium griseofulvum* and a truncated cluster in *Penicillium verrucosum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1211-1219.
- [4] BORUTA T, BIZUKOJC M. Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33(2): 34.
- [5] XU Y N, ZHONG J J. Impacts of calcium signal transduction on the fermentation production of antitumor ganoderic acids by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. *Biotechnology*

- Advances, 2012, 30(6): 1301-1308.
- [6] WANG Q, ZHONG C, XIAO H. Genetic engineering of filamentous fungi for efficient protein expression and secretion[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 293.
- [7] BRAKHAGE A A, SCHROECKH V. Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48(1): 15-22.
- [8] KIM S, HA B S, RO H S. Current technologies and related issues for mushroom transformation[J]. Mycobiology, 2015, 43(1): 1-8.
- [9] QIN H, XIAO H, ZOU G, et al. CRISPR-Cas9 assisted gene disruption in the higher fungus *Ganoderma* species[J]. Process Biochemistry, 2017, 56: 57-61.
- [10] XU J W, XU N, ZHONG J J. Enhancement of ganoderic acid accumulation by overexpression of an N-Terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene in the basidiomycete *Ganoderma lucidum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(22): 7968-7976.
- [11] BAO Z H, XIAO H, LANG J, et al. Homology-Integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(5): 585-594.
- [12] JIANG Y, CHEN B, DUAN C L, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 System[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [13] NISSIM L, PERLI S D, FRIDKIN A, et al. Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an Integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells[J]. Molecular Cell, 2014, 54(4): 698-710.
- [14] LIU R, CHEN L, JIANG Y, et al. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system[J]. Cell Discovery, 2015, 1: 15007.
- [15] WANG P A, XIAO H, ZHONG J J. CRISPR-Cas9 assisted functional gene editing in the mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 104(4): 1661-1671.
- [16] SONG R, 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.
- [17] YU X, JI S L, HE Y L, et al. Development of an expression plasmid and its use in genetic manipulation of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes)[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2014, 16(2): 161-168.
- [18] SAYARI M, VAN DER Nest M A, STEENKAMP E T, et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Ceratocystis albifundus*[J]. Microbiological Research, 2019, 226: 55-64.
- [19] KWON M J, SCHÜTZE T, SPOHNER S, et al. Practical guidance for the implementation of the CRISPR genome editing tool in filamentous fungi[J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2019, 6(1):15.
- [20] POHL C, KIEL J A K W, DRIESSEN A J M, et al. CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(7): 754-764.
- [21] HAO Z, SU X. Fast gene disruption in *Trichoderma reesei* using *in vitro* assembled Cas9/gRNA complex[J]. BMC Biotechnology, 2019, 19(1): 2.
- [22] 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.
- [23] LI S, SONG Z, LIU C, et al. Biomimetic mineralization-based CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein nanoparticles for gene editing[J]. ACS Applied Materials and Interfaces, 2019, 11(51): 47762-47770.
- [24] LU S, SHEN X, CHEN B. Development of an efficient vector system for gene knock-out and near in-cis gene complementation in the *Sugarcane smut* fungus[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 3113.
- [25] SARKARI P, MARX H, BLUMHOFF M L, et al. An efficient tool for metabolic pathway construction and gene integration for *Aspergillus niger*[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1327-1333.
- [26] ARAZOE T, MIYOSHI K, YAMATO T, et al. Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(12): 2543-2549.
- [27] MATSU-URA T, BAEK M, KWON J, et al. Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology[J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2015, 2(1): 4.
- [28] LIU K, SUN B, YOU H, et al. Dual sgRNA-directed gene deletion in basidiomycete *Ganoderma lucidum* using the CRISPR/Cas9 system[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(2): 386-396.
- [29] 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):
- [30] 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.
- [31] HUANG L, DONG H, ZHENG J, 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.
- [32] ROUX I, WOODCRAFT C, HU J, 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.
- [33] JIMÉNEZ A, HOFF B, REVUELTA J L. Multiplex genome editing in *Ashbya gossypii* using CRISPR-CpfI[J]. *New Biotechnology*, 2020, 57: 29-33.
- [34] VANEGAS K G, JARCZYNSKA Z D, STRUCKO T, et al. CpfI enables fast and efficient genome editing in *Aspergilli*[J]. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2019, 6(1): 6.
- [35] LIU Q, ZHANG Y, LI F, 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.
- [36] 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.
- [37] ZHENG Y M, LIN F L, GAO H, et al. Development of a versatile and conventional technique for gene disruption in filamentous fungi based on CRISPR-Cas9 technology[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):9250.
- [38] 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.
- [39] NØDVIG 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.
- [40] WENDEROTH M, PINECKER C, VOß B, et al. Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2017, 101: 55-60.
- [41] KUJOTH G C, SULLIVAN T D, MERKHOFFER R, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene disruption reveals the importance of zinc metabolism for fitness of the dimorphic fungal pathogen *Blastomyces dermatitidis* [J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00412-18.
- [42] ZHANG Y, OUYANG L, NAN Y, et al. Efficient gene deletion and replacement in *Aspergillus niger* by modified *in vivo* CRISPR/Cas9 systems[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2019, 6(1): 4.
- [43] WANG Y, WEI D, ZHU X, et al. A 'suicide' CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in *Cryptococcus neoformans*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31145.
- [44] SCHUSTER M, SCHWEIZER G, KAHMANN R. Comparative analyses of secreted proteins in plant pathogenic smut fungi and related basidiomycetes[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2018, 112: 21-30.
- [45] CHUTRAKUL C, PANCHANAWAPORN S, JEENOR S, et al. Functional characterization of novel U6 RNA polymerase III promoters: Their implication for CRISPR-Cas9-mediated gene editing in *Aspergillus oryzae*[J]. *Current Microbiology*, 2019, 76(12): 1443-1451.
- [46] WU C, CHEN Y, QIU Y, 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.
- [47] ZHENG X, 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*, 2018, 8(7): 1568-1574.
- [48] SONG L, 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.
- [49] 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.
- [50] DONG L, YU D, LIN X, et al. Improving expression of thermostable trehalase from *Myceliophthora sepedonium* in *Aspergillus niger* mediated by the CRISPR/Cas9 tool and its purification, characterization[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 165: 105482.
- [51] XIE S, WANG Y, WEI W, et al. The Bax inhibitor UvBI-1, a negative regulator of mycelial growth and conidiation, mediates stress response and is critical for pathogenicity of the rice false smut fungus *Ustilaginoidea virens*[J]. *Current Genetics*, 2019, 65(5): 1185-1197.
- [52] YAMATO T, HANDA A, ARAZOE T, et al. Single crossover-mediated targeted nucleotide substitution and knock-in strategies with CRISPR/Cas9 system in the rice blast fungus[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 7427.
- [53] ZHANG C, MENG X, WEI X, et al. Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2016, 86: 47-57.
- [54] DONG H, ZHENG J, YU D, et al. Efficient genome editing in *Aspergillus niger* with an improved recyclable CRISPR-HDR toolbox and its application in introducing multiple copies of heterologous genes[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2019, 163: 105655.
- [55] NØDVIG C S, HOOF J B, KOGLE M E, et al. Efficient oligo nucleotide mediated CRISPR-Cas9 gene editing in *Aspergilli*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2018, 115: 78-89.
- [56] KUN R S, MENG J, SALAZAR-CEREZO S, et al. CRISPR/Cas9 facilitates rapid generation of constitutive forms of tran-

- scription factors in *Aspergillus niger* through specific on-site genomic mutations resulting in increased saccharification of plant biomass[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 136: 109508.
- [57] ZHANG L, ZHENG X, 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.
- [58] JIANG D W, ZHU W, WANG Y C, et al. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies[J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1562-1574.
- [59] 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.
- [60] EASTWOOD D, GREEN J, GROGAN H, et al. Viral agents causing brown cap mushroom disease of *Agaricus bisporus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(20): 7125-7134.
- [61] VERDOES J C, PUNT P J, VAN DER BERG P, et al. Characterization of an efficient gene cloning strategy for *Aspergillus niger* based on an autonomously replicating plasmid: cloning of the *nicB* gene of *A. niger*[J]. *Gene*, 1994, 146(2): 159-165.
- [62] SU X, SCHMITZ G, ZHANG M, et al. Heterologous gene expression in filamentous fungi[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2012, 81: 1-61.
- [63] CAIRNS T C, FEURSTEIN C, ZHENG X, et al. A quantitative image analysis pipeline for the characterization of filamentous fungal morphologies as a tool to uncover targets for morphology engineering: A case study using *aplD* in *Aspergillus niger*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 149.
- [64] WEYDA I, YANG L, VANG J, et al. A comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation and protoplast-mediated transformation with CRISPR-Cas9 and bipartite gene targeting substrates, as effective gene targeting tools for *Aspergillus carbonarius*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 135: 26-34.
- [65] KUIVANEN J, KORJA V, HOLMSTRÖM S, et al. Development of microtiter plate scale CRISPR/Cas9 transformation method for *Aspergillus niger* based on *in vitro* assembled ribonucleoprotein complexes[J]. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2019, 6(1): 3.
- [66] COLOT H V, PARK G, TURNER G E, et al. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 (27): 10352-10357.



通讯作者和第一作者: 肖晗 (1985—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事合成生物学、基因编辑和代谢工程研究。

E-mail: smallhan@sjtu.edu.cn