

# 提高丝状真菌精准基因编辑效率的策略

杨浩萌, 梁丽存, 宋祖洹, 徐欣欣, 罗会颖, 姚斌, 黄火清\*

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

杨浩萌, 梁丽存, 宋祖洹, 徐欣欣, 罗会颖, 姚斌, 黄火清. 提高丝状真菌精准基因编辑效率的策略[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1425-1440.

YANG Haomeng, LIANG Licun, SONG Zuhuan, XU Xinxin, LUO Huiying, YAO Bin, HUANG Huoqing. Strategies for improving the efficiency of precise gene editing in filamentous fungi[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1425-1440.

**摘要:** 基因编辑技术的应用使对丝状真菌进行高效、精准的基因改造成为可能。然而, 在实际实验操作过程中, 仍然存在很多影响因素, 导致同源重组介导的精准基因编辑的效率很低。本文对目前提高丝状真菌精准编辑效率的方法进行了总结, 使基因编辑方法更好地应用于丝状真菌的菌种改造。

**关键词:** CRISPR/Cas; 精准编辑; 同源重组; 非同源末端连接

## Strategies for improving the efficiency of precise gene editing in filamentous fungi

YANG Haomeng, LIANG Licun, SONG Zuhuan, XU Xinxin, LUO Huiying, YAO Bin, HUANG Huoqing\*

Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** The application of gene editing enables the efficient and accurate genome modification of filamentous fungi. However, the actual operation is influenced by a variety of factors, which result in low efficiency of precise gene editing mediated by homologous recombination. In this review, we summarize the current methods to improve the precision editing efficiency of filamentous fungi, so as to improve the application of gene editing in strain modification.

**Keywords:** CRISPR/Cas; precise gene editing; homologous recombination; non-homologous end joining

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100204); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-41)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100204) and the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-41).

\*Corresponding author. E-mail: huanghuoqing@caas.cn

Received: 2023-08-17; Accepted: 2023-10-31; Published online: 2023-12-12

丝状真菌(filamentous fungi)一般指菌体呈丝状的一类真核微生物,在自然界中分布广泛,作为工业酶制剂、有机酸、抗生素、次级代谢产物等发酵产品的“细胞工厂”,是十分重要的工业微生物,例如,黑曲霉(*Aspergillus niger*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)可以用来生产糖化酶、淀粉酶等酶制剂,还可以生产柠檬酸等大宗食品添加剂<sup>[1]</sup>;在传统发酵工艺中,也可以用作酒类、酱油等的生产菌株,因此成为国际公认的食品安全菌株<sup>[2]</sup>。丝状真菌也用于生产抗生素,如 $\beta$ 内酰胺类抗生素,包括青霉素类和头孢菌素类;他汀类药物,如地曲霉(*Aspergillus terreus*)生产的洛伐他汀和柑橘青霉(*Penicillium citrinum*)生产的美伐他汀等<sup>[3]</sup>。

由于这些丝状真菌生产的工业酶制剂、抗生素和有机酸等绿色生物产品在食品、医药、饲料、纺织、造纸、能源及生物防治等多个领域具有广阔的应用前景和巨大的经济价值,针对工业用丝状真菌的菌种迭代进化与遗传改造一直是研究的热点。随着生物技术的不断发展,基于CRISPR系统的基因编辑技术为代表的新型遗传操作体系已经逐渐替代原始的方法,应用于工业丝状真菌的菌种改造。目前,CRISPR/Cas介导的基因编辑方法已经成功应用于多种丝状真菌<sup>[4]</sup>,并成功实现基因的敲除、插入、单碱基编辑、表达调控等操作。然而,对于提高CRISPR/Cas的精准基因编辑效率的研究,在丝状真菌中相对较少,仍然是CRISPR/Cas系统在丝状真菌中应用的瓶颈。

在丝状真菌中,CRISPR/Cas介导的基因编辑发生时,细胞选择哪种修复机制确保基因组完整和生命活动的延续,其实是非常复杂的过程。如图1所示,当Cas蛋白在丝状真菌特定的DNA位点上引发双链断裂(double strand

break, DSB),断裂的DNA双链对细胞是一种极度危险的信号,会激活细胞中的DNA修复机制。丝状真菌可以通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR)等方式完成DSB的修复,其中NHEJ往往造成基因片段的缺失或非目标基因的插入(insertion and deletion, Indel),造成基因编辑的不确定性;而HR介导的双链修复能在基因组特定位点完成精准修复,如基因插入或突变,具有更大的应用潜力。然而,值得注意的是,HR只在S/G2期较活跃,而NHEJ在整个细胞周期都处于活跃状态,并且HR过程需要的时间更长,相对速率更低且影响因素更多。可以说NHEJ才是细胞自主修复DNA双链损伤最常用的机制(图1)<sup>[5-6]</sup>。研究发现,DSB的发生,使HR修复方式发生的概率比自然条件下提高了1 000倍<sup>[7]</sup>,但是HR发生的概率仍然比较低,因此,分析影响HR效率的因素也是获得更高效、准确、无害的基因编辑技术的必经之路。

本文从丝状真菌基因编辑元件的优化、受体细胞生理状态的优化、DNA修复途径的改造三方面,探讨提高丝状真菌精准基因编辑效率的策略,寻找规律和突破口,使CRISPR基因编辑系统更好地应用于丝状真菌的菌种改造。

## 1 基因编辑组件的优化

随着基因编辑技术的发展,适用于不同丝状真菌的CRISPR技术相继研发并建立。然而,该系统仍然存在脱靶效应、前间区序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)识别范围有限等问题,因此,CRISPR/Cas系统组成元件的优化也成为研究的热点,为提高编辑效率、降低脱靶率、高效表达基因等奠定了基础。

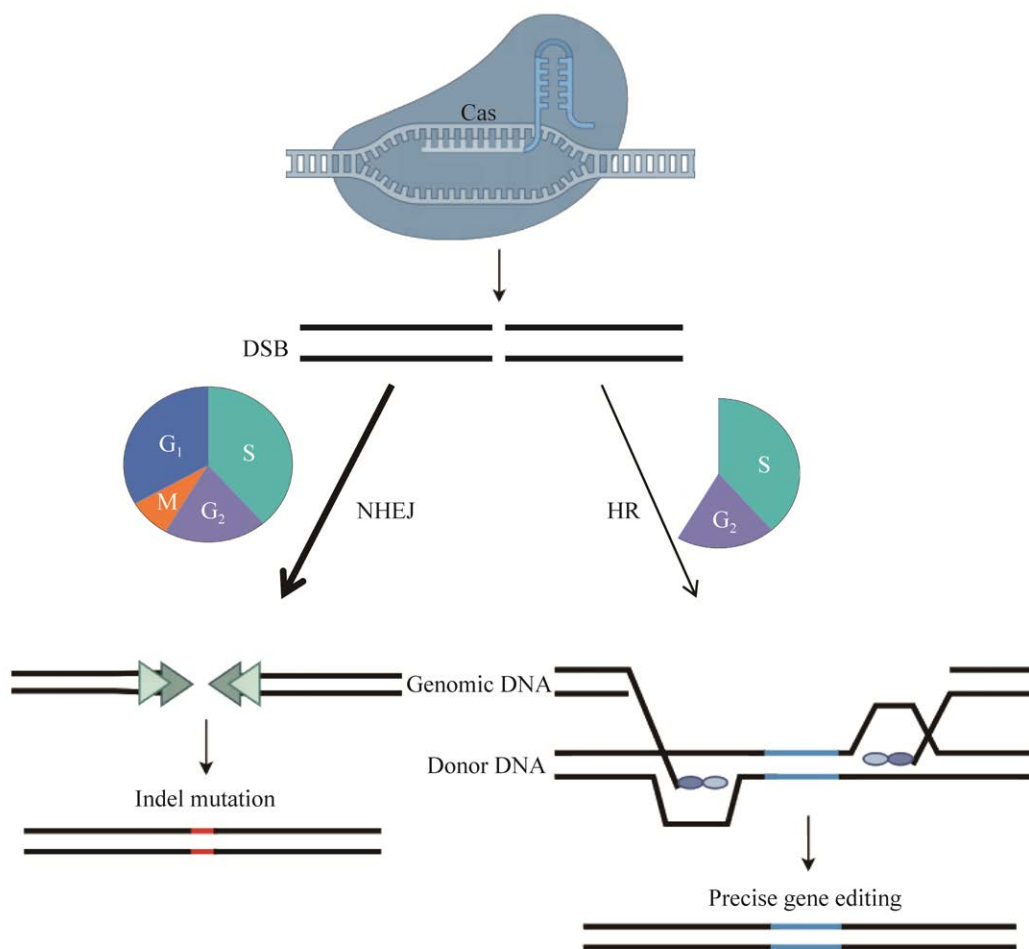


图1 DNA修复途径示意图 DSB: 双链断裂; NHEJ: 非同源末端连接; HR: 同源重组

Figure 1 Schematic illustration of DNA repair pathways. DSB: Double strand break; NHEJ: Non-homologous end joining; HR: Homologous recombination.

## 1.1 Cas 蛋白的选择与表达策略

### 1.1.1 Cas 蛋白的选择

在细菌的基因编辑中, 我们可以利用异源甚至内源的 CRISPR/Cas 系统对其进行基因编辑<sup>[8]</sup>, 但在丝状真菌中无内源 Cas 蛋白, 只能通过异源表达实现基因编辑, 因此, 不同来源的 Cas 蛋白的选择对基因编辑效率也有不同的影响。最常用的且研究最多的 Cas 蛋白来源于酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的 SpCas9。研究发现, SpCas9 存在 NGG 识别位点依赖及潜在的脱靶风险, 因此也发展出了新型 Cas9 突

变体, 以提高基因编辑效率<sup>[9]</sup>。如“高保真”的 Cas9 突变体 SpCas9-HF1, 可以降低非特异 DNA 的结合, 表现出更高的同源重组效率<sup>[10]</sup>; HypaCas9 是在 Cas9 的非催化结构域 REC3 中引入多点突变的高保真突变体<sup>[11]</sup>, 可以提高 DNA 识别特异性, 从而降低脱靶率; nCas9 又称切口酶(D10A 或 H840A 突变的 Cas9), 它只能切割基因组上的 DNA 单链, 这种单链损伤可以通过无缝修复和同源重组得以恢复, 脱靶效率远低于 Cas9<sup>[12]</sup>; 两个 nCas9 同时作用在基因组 DNA 上时, 会产生单链黏性末端, 更有利于同源重

组的发生<sup>[13]</sup>。其他来源的 Cas9 蛋白,因其 PAM 识别位点不同或切割 DNA 的方式不同,也可以产生黏性末端,提高同源重组效率,或提高 DNA 识别的特异性。如来源于金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)的 SaCas9,其 PAM 为 NNGRRT,有 6 个碱基的识别位点,降低了脱靶效应,更利于精准基因编辑<sup>[14]</sup>; FnCas9 也可以产生黏性末端,增强同源重组效率<sup>[15]</sup>; SpCas9-NG 和 xCas9 也是 SpCas9 的突变体,可以拓宽 PAM 序列识别范围至 NG<sup>[16]</sup>; 2021 年研发出的 Cas9 突变体 SpRY 几乎完全消除了 PAM 序列的限制,大大提高了其在基因组中的编辑能力<sup>[17]</sup>。

近年来,应用 Cas12a (Cpf1)进行基因编辑的研究也越来越多。Cas12a 的优势在于较高的特异性和多基因编辑能力。多个 sgRNA 的引导序列可以以串联形式构建在同一个表达载体上,可以实现同时对多基因位点进行编辑,因此在代谢通路的改造上有很大优势,有效提高了基因编辑的效率。研究者们已经在丝状真菌,如米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)、棉阿舒囊霉(*Ashbya gossypii*)中建立了 CRISPR/Cas12a 基因编辑工具<sup>[18-19]</sup>。如 Vanegas 等<sup>[19]</sup>于 2019 年应用 Cas12a/CRISPR 系统,成功对构巢曲霉和黑曲霉的孢子颜色基因进行了编辑,成功将红色荧光蛋白整合到 *yA* 或 *albA* 位点;2020 年,Roux 等<sup>[20]</sup>在构巢曲霉中通过将 *LbCas12a* (D156R)与转录激活域 *VPR* (*VP64-P65ad-Rta*)融合,建立了转录激活 CRISPRa 系统。2020 年,Pausch 等<sup>[21]</sup>发现了一种新的超紧凑 CRISPR/Cas 系统,称为 CRISPR/CasΦ, CasΦ 蛋白大小仅 70 kDa,但功能完整,具有更广泛的靶向序列选择性,并且利于质粒或核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex, RNP)的细胞递送。

Cas9 和 Cas12a 的基因编辑效率也有差异,例如,在嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)中, SpCas9、FnCpf1 和 AsCpf1 对相同基因就表现出不同的编辑效率<sup>[22]</sup>。Cas9 和 Cas12a 的 PAM 位点和引导序列差异见表 1。据报道, SpCas9 还可以识别非常规的 5'-NAG-3'PAM 序列;在某些情况下, Cas12a 的 PAM 序列也被报告为 5'-TTTV-3'<sup>[23]</sup>,研究者可以按需选择。

除 Cas9 和 Cas12a 外, Cas13a 等最近发展起来的 RNA 编辑工具针对 RNA 进行编辑,更为安全,不会对基因组造成不可逆的损伤,在疾病治疗上具有一定优势<sup>[24]</sup>,但 RNA 编辑工具在丝状真菌中的应用还有待开展。总之, Cas 蛋白的选择要针对实验目的和对编辑精准度的要求,结合转化效率和构建难度综合进行判断,例如,如果实验者发现基因编辑过程中发生脱靶的概率较高,就可以考虑使用“高保真”的 Cas9 突变体 SpCas9-HF1 等;如果发现实验中多基因编辑效率较低,可以考虑使用 Cas12a。

表 1 不同 Cas9 和 Cas12a 的 PAM 位点和引导序列比较

Table 1 Comparison of PAM site and protospacer between different Cas9 and Cas12a

Cas enzymes	PAM motif	Protospacer size (bp)
SpCas9	5'-NGG-3'	20
nCas9	5'-NGG-3'	20
SpCas9-HF1	5'-NGG-3'	20
SpCas9-NG	5'-NG-3'	20
HypaCas9	5'-NGG-3'	20
SpRY	5'-NRN-3'	20
XCas9	NG, GAA, GAT (5'→3')	20
SaCas9	5'-NNGRRT-3'	20
FnCas9	5'-NGG-3'	20
NmCas9	5'-NNAGAAW-3'	24
AsCas12a	5'-TTTN-3'	23
LbCas12a	5'-TTTN-3'	23
FnCas12a	5'-TTN-3'	18-23

### 1.1.2 Cas 蛋白的表达策略

Cas 蛋白在细胞内表达时,要根据不同物种做密码子优化,特别是含有稀有密码子的物种,有针对性的密码子优化十分必要<sup>[25]</sup>;同时需要 Cas 蛋白与核定位信号如 SV40 核定位序列 NLS (PKKKRKV)进行融合表达,核定位信号数目的增加在一定程度上有助于编辑效率的提升<sup>[26]</sup>。值得注意的是,在尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和藤仓镰刀菌(*Fusarium fujikuroi*)等真菌中,需要使用其自身特有的内源核定位信号序列引导 Cas 蛋白的核定位<sup>[27]</sup>。

Cas 蛋白的本质是一种核酸内切酶,对 DNA 或 RNA 具有剪切活性,很容易对分裂活跃的细胞遗传物质造成影响,也可能激活细胞免疫机制,产生免疫反应,使生长受阻。有研究表明,Cas 蛋白的毒性会导致某些菌株如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、稻瘟病菌(*rice blast fungus*)、威尼斯镰刀菌(*Fusarium venenatum*)的转化子数量减少、生长速度变慢<sup>[28]</sup>,Cas 蛋白的过量表达也可能增加基因编辑的脱靶率<sup>[29]</sup>。特别是对工业用丝状真菌,Cas 蛋白毒性可能会对菌株的生长及生物安全性带来负面影响。

为了减少 Cas 蛋白毒性对菌株的影响,选择合适的启动子表达 Cas 蛋白至关重要,而且不同的启动子也会影响基因编辑效率<sup>[4]</sup>。在丝状真菌中,主要使用构巢曲霉的 *trpC*、*gpdA* 和 *tef1* 组成型启动子表达 Cas9 蛋白<sup>[27]</sup>,也有使用诱导型启动子的报道。2017 年,Weber 等<sup>[30]</sup>利用四环素依赖系统诱导 Cas9 在烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)中的表达,显著提高了 CRISPR/Cas9 系统在烟曲霉中的编辑效率,降低了 Cas9 持续表达的细胞毒性;Liu 等使用纤维素、纤维寡糖激活启动子 *Pcbh1* 诱导里氏木霉(*Trichoderma reesei*)中 Cas9 的表达,成功敲除了 *ura5* 基因,并降低了脱靶率<sup>[25]</sup>;在烟曲霉

中也可以通过 *PniiA* 启动子和硝酸盐培养基诱导 Cas9 的表达<sup>[31]</sup>。

除了使用合适的启动子之外,也可以通过核糖核蛋白复合体即 RNP 直接递送进细胞的方式,减少 Cas 蛋白毒性和脱靶率。由于外源导入的 RNP 半衰期相对较短,完成对靶位点的切割后,RNP 在体内自然降解,避免 Cas 蛋白在细胞内持续表达的毒性<sup>[22]</sup>,RNP 复合体的体外组装与活性检测方法可以参考文献<sup>[32]</sup>。使用 RNP 直接递送或在细胞内通过质粒 DNA 表达 Cas 蛋白,在基因编辑效率上也存在差异,这一结论在嗜热毁丝霉中得到验证<sup>[22]</sup>,其原因可能是:(1)二者递送进细胞的效率不同;(2)二者在细胞中的稳定性不同,导致有效存在浓度和时间不同;(3)Cas 蛋白表达盒有可能整合进基因组中,造成 Cas 蛋白在细胞中的持续表达,可能导致脱靶率提高或细胞生长受限。

总之,在丝状真菌中,Cas 蛋白的表达需要兼顾 CRISPR/Cas 系统的编辑效率和菌株生长速度,通过选择合适的启动子、不同的 Cas 蛋白递送方式,尽量降低由于 Cas 蛋白过量表达造成的细胞毒性和脱靶效应,不同菌株可能需要选择不同的表达策略。

### 1.2 sgRNA 设计与表达

当 sgRNA (single guide RNA)与非靶标序列存在错配碱基时,若 Cas9 仍可对这一非靶标序列进行识别剪切,则会产生脱靶效应<sup>[3]</sup>。Fu 等发现在人类细胞中 Cas9 可对存在 5 个错配碱基的非靶标序列进行切割,引起严重的脱靶效应<sup>[33]</sup>。因此,sgRNA 设计的首要原则是引导序列在基因组中的特异性,特别是靠近 PAM 序列的 8–12 个碱基的特异性非常重要,好的设计能尽量避免脱靶效应。目前已研制出多种 sgRNA 设计软件供研究人员使用,但一定注意软件在不同物种之间的适用性。丝状真菌靶向 DNA 序

列的设计可利用以下软件进行, 如在线的 E-CRISPR design server (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>)、Cas-Designer (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>)和 Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>)等。软件安装与实验设计也可以参考文献[34]。

sgRNA 的表达可分为体外转录和体内表达两种方式, 在丝状真菌的基因编辑中均有应用。在无合适启动子的宿主中表达 sgRNA 时, 使用体外转录的方法更加方便。sgRNA 的体外转录是将设计好的 DNA 模板通过 T7 转录试剂盒体外转录成成熟的 sgRNA<sup>[3]</sup>。sgRNA 可以直接转化宿主细胞, 也可以通过与 Cas9 蛋白在体外组装成核糖核蛋白复合体 RNP, 再递送进宿主细胞, 这种方式在细胞内不会进行 RNA 的转录和蛋白质的翻译, 减少了 Cas9 蛋白在细胞内停留的时间, 减少了 Cas9 蛋白对宿主细胞的毒性; 同时, 递送 RNP 复合体不存在外源基因整合进基因组的风险, RNP 复合体短暂的存在, 也降低了脱靶率<sup>[31,35]</sup>。

sgRNA 的体内表达需要更简单有效的启动子驱动。依赖于 RNA 聚合酶 III (Pol III) 的 U6 启动子因其无需对转录产物的 5'端加帽和 3'端加 poly A 尾<sup>[36]</sup>而被广泛使用。黑曲霉内源的 U6 启动子, 甚至是来源于人类的 U6 启动子也可驱动 sgRNA 在黑曲霉中的表达, 但表达效率较低<sup>[37]</sup>; 5S rRNA 启动子也可以高效起始 sgRNA 的转录, 显著提高 sgRNA 的表达水平<sup>[38]</sup>; Song 等也利用 tRNA 的启动子成功在黑曲霉中表达 sgRNA, 但表达效率还有待提高<sup>[39]</sup>; 我们在对腐质霉 (*Humicola insolens*) 进行基因编辑时发现, 在 sgRNA 表达中使用 5S rRNA 和 tRNA<sup>Gly</sup> 串联启动子, 能大幅提高基因编辑效率, 当 *pks* 和 *xyl1* 作为靶基因时, 该系统被证明是非常有效的<sup>[40]</sup>。另外, 依赖于 RNA 聚合酶 II 的启动子也

可以驱动 sgRNA 的表达, 例如来源于 *A. nidulans* 的三磷酸甘油醛脱氢酶启动子 *PgpdA*<sup>[41]</sup>, 但当使用 RNA 聚合酶 II 启动子时, 自切割核酶 HDV 或 HH 要连接在 sgRNA 的 5'端和 3'端, 而 sgRNA 构象可能受到 RNA 聚合酶的影响, 同时这种表达载体构建也比较复杂, 使 RNA 聚合酶 II 类启动子的应用受限<sup>[37]</sup>。

目前, sgRNA 的设计方法已经比较成熟, sgRNA 体内或体外表达体系在丝状真菌中也多有成功的案例, 但基因编辑效率的提高, 还取决于剪切靶点的选择。例如, 在定点整合目标基因用于高效表达蛋白时, 选择基因组上的多拷贝基因作为剪切靶点是提高编辑效率的有效方法, 无须多次反复插入目标基因, 节省筛选标记, 而且使用相同的 sgRNA 和供体 DNA, 就可以同时对多个位点进行剪切和同源重组, 有利于实现快速、高效的基因整合和表达。如 Lin 等选择 *amyA* 位点在黑曲霉中高效表达 LAP 蛋白<sup>[42]</sup>; Dong 等也选择 *amyA* 作为整合位点, 向基因组引入了 2 个外源蛋白的拷贝, 最终使蛋白表达量提升了 4 倍<sup>[43]</sup>。

同一菌株中不同的靶基因的编辑效率具有较大差异<sup>[44]</sup>。Katayama 等<sup>[44]</sup>分别对米曲霉的 3 个基因 *wA*、*pyrG* 和 *yA* 进行编辑, 编辑效率分别为 10%–20%、10%和 100%; 同样地, 同一靶基因的不同靶位点的编辑效率也有差异。基因编辑效率和编辑后的 DNA 修复方式往往取决于切割位点的选择, 特别是靠近切割位点的序列及其空间结构对 DSB 的修复方式也有影响<sup>[45]</sup>。在对毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 进行基因组编辑时发现, PAM 位点是 CGG 时, 基因编辑效率略高并且更稳定; 而且 20 nt 引导序列的 G+C 含量越低, 越容易使 DNA 双链打开, 扩展 R-loop 结构, 便于形成 DSB, 因此提高了 HR 的效率<sup>[46]</sup>。具有重叠序列的多个引导序列可以通过 HR 的修

复方式,提高小鼠细胞的外源 DNA 插入效率<sup>[47]</sup>。然而,以上研究结果是否在丝状真菌中也适用,还有待深入研究。

另外,有研究表明,剪切靶点所在染色质的状态和染色体上的位置,包括靶位点的转录因子占用、染色质紧密程度、核小体的空间位阻、是否位于端粒等对基因编辑效率也有一定的影响<sup>[48]</sup>。例如,当基因组 DNA 与组蛋白形成核小体时,由于空间位阻的差异性,剪切靶点的选择也会影响基因编辑效率,即剪切靶点所处的染色质的致密程度可能也是影响同源重组效率的因素,如常染色质的结构相对松散,理论上比异染色质的基因编辑效率更高,更容易获得有效剪切<sup>[23]</sup>。因此,有研究者将动物细胞染色质调节肽(CMP)与 Cas9 蛋白融合表达,因为染色质调节肽本身已经被证实可以与染色质相互作用,它与 Cas9 蛋白的融合表达,提高了 Cas9 的剪切活性,特别是某些难以编辑的基因位点,从而提高了同源重组效率<sup>[49]</sup>。

sgRNA 的自身结构和稳定性对基因编辑效率也有很大影响,特别是对于那些难以剪切的 DNA 序列,原因可能是 sgRNA 的错误折叠,针对这个问题,从改变 sgRNA 的结构和稳定性入手,在 sgRNA 的特定部位设计高度稳定的发夹结构、在 3'端加入特定 RNA 基序结构,并通过甲基化或硫代磷酸化等化学修饰进一步增强其稳定性,可使目标基因的编辑效率提高,也可以降低脱靶率,或减少 sgRNA 的预筛选步骤,从而进一步提高基因编辑的效率<sup>[50]</sup>。

总而言之,基因编辑过程中,sgRNA 在复杂的胞内生理生化环境中发挥作用,不同 sgRNA 的稳定性、与 DNA 结合能力,都会影响基因编辑效率,因此,对一个靶基因设计多个 sgRNA 进行基因编辑并择优录用,也是一种解决基因编辑效率较低的方法。

### 1.3 供体 DNA 的设计

供体 DNA (donor DNA)有 3 种存在形式:环状双链 DNA、线性双链 DNA、线性单链 DNA。通过 HR 方式对靶标基因进行修复时,供体 DNA 必不可少。对于丝状真菌而言,通常需要在 Cas 蛋白剪切位点两端设计上下游同源臂,在上下游同源臂之间插入抗性标记基因、表达盒等基因序列,用于目的基因的筛选和整合。影响供体 DNA 编辑效率的因素有同源臂的长度、同源臂起始序列距离剪切位点的距离、供体 DNA 的用量与纯度、供体 DNA 的长度、供体 DNA 的存在形式以及供体 DNA 的募集等。

有研究表明在黑曲霉中,同源臂起始序列距离 DSB 越近,基因编辑效率越高<sup>[43]</sup>,例如,带有距离切口分别为 0、1 和 5 kb 的同源臂的供体 DNA,包含潮霉素抗性基因 *hygB*,经 CRISPR/Cas 编辑后,*hygB* 的 HR 效率分别是 80%、50%和 10%<sup>[43]</sup>。

同源臂的长度也会影响基因编辑的效率<sup>[51]</sup>,对于大多数丝状真菌,供体 DNA 的同源臂长度,一般选择 1 kb 左右<sup>[52]</sup>。不同物种对同源臂的长度要求也不同。例如:酿酒酵母只需要 50 bp 同源臂,HR 效率可以达到 100%<sup>[53]</sup>;在小鼠干细胞中,同源臂越长,基因编辑效率越高,4 kb 同源臂的基因编辑效率比 0.4 kb 同源臂提高 5 倍,同源臂长度达 20 kb 时,编辑效率提高 10 倍<sup>[54]</sup>;在对里氏木霉的研究中发现,仅 0.2 kb 的同源臂就能成功进行目标基因的敲除,HR 效率高达 93%;随后通过优化 sgRNA 和供体 DNA 分子摩尔配比,成功实现单基因、双基因和三基因的同时敲除<sup>[24]</sup>。

另外,供体 DNA 的纯度和用量对基因编辑效率也有一定影响。根据转化体系不同,丝状真菌转化需要的双链供体 DNA 的量在 1–10  $\mu\text{g}$  不等。我们在实践中发现供体 DNA 尽量浓缩纯

化, 不含引物二聚体和杂蛋白, 对于提高转化效率和基因编辑效率也有一定作用。在哺乳动物细胞的基因编辑效率研究中也有报道表明, 同源臂的不对称设计(一般是 5'较 3'同源臂短)也能提高同源重组的效率<sup>[55-56]</sup>。然而, 在丝状真菌中, 这种同源臂的设计方案还有待研究。

当 CRISPR/Cas9 系统用于单点或多点突变时, 60–100 nt 的单链 DNA 即可作为供体 DNA。Kun 等<sup>[57]</sup>通过短单链 DNA 成功在黑曲霉基因组上进行多点突变。需要注意的是, 突变位点和 PAM 位点一定要相邻, 尽量在 20 nt 之内, 距离太远会使突变效率大幅下降。单点突变的供体 DNA 上至少存在两个碱基突变, 一个用于突变 NGG 位点其中之一, 防止 RNP 复合体对供体 DNA 进行剪切, 另一个碱基突变引入设计的目标突变; 多点突变的供体 DNA 上, 各个突变碱基尽量相邻, 并与 PAM 位点距离较近, 如果位点距离较远, 可以考虑多轮突变; 在稻瘟病菌中也使用 80 nt 单链核苷酸或双链 DNA 与 RNP 共转化, 高效完成了双基因同时编辑<sup>[58]</sup>。

供体 DNA 在 DSB 处的充分募集也有助于提高 HR 效率。有研究者将生物素标记的供体 DNA 与 Cas9-链霉亲和素融合蛋白共转化受体细胞, 通过链霉亲和素与生物素的特异性结合, 将供体 DNA 拉近至 DSB 位点, 有助于提高 HR 效率<sup>[59]</sup>。然而, 相似报道多见于哺乳动物细胞的研究。另外, 针对双链 DNA 在细胞内容易被降解或自连接等问题, 将双链供体 DNA 两端进行化学修饰, 可以增大空间位阻、阻止供体 DNA 之间发生自连, 并减少供体 DNA 的降解。比如, 对单链或双链供体 DNA 进行磷酸化的末端修饰, 可以减缓宿主细胞内的核酸酶对其降解, 提高 DNA 修复过程中供体 DNA 的浓度, 从而提高 HR 效率<sup>[59-60]</sup>; 对双链供体 DNA 两端进行生物素修饰, 也可以降低其自连的几率,

提高 HR 效率<sup>[61]</sup>; Yu 等<sup>[62]</sup>的研究比较了 13 种不同化学修饰的双链供体 DNA, 发现 5'C6-PEG10 化学修饰能够将 HR 效率提高近 5 倍。

#### 1.4 筛选标记的使用

真菌常用的营养缺陷型筛选标记有乙酰胺酶基因(*amdS*)、乳清苷-5'-磷酸脱羧酶基因(*pyrG*)、6-羟基-3-琥珀酰吡啶 3-单加氧酶基因(*nicB*)、乙酰谷氨酸激酶编码基因(*argB*)等; 常用的抗性筛选标记有潮霉素(hygromycin)、新霉素(neomycin, G418)、博来霉素(zeocin)、嘌呤霉素(puromycin)、杀稻瘟菌素(blasticidin)、腐草霉素(phleomycin)等<sup>[63]</sup>, 但不是所有筛选标记都可用于同一菌株, 在确定筛选标记前, 要对菌株做详尽的相关生长敏感性实验。

巧妙运用筛选标记也可以提高基因编辑效率, 例如, Liu 等利用标记基因可循环的基因组编辑技术, 成功地对嗜热毁丝霉的 10 个以上基因进行了基因编辑; 该技术通过交替使用 2 个标记基因进行 3 轮操作, 共编辑了 11 个基因组位点, 获得了纤维素酶产量显著提高的突变体菌株<sup>[64]</sup>。在假丝酵母(*Candida intermedia*)中, 将带有同源臂的筛选标记基因分成两段(split-marker)进行共转化宿主菌, 经过抗性筛选后可以大大提高同源重组效率, 从不足 1%提高到 55%–70%<sup>[65]</sup>。

*AMA1* 序列是来源于构巢曲霉的自主复制的元件, 利用截短的 *half-AMA1* 序列也可以驱动 CRISPR 质粒在米曲霉中的复制, 基因编辑效率提高到 50%–100%; 在该质粒上加入 *Aoace2* 表达盒, 通过特定培养基诱导该基因表达后, 菌丝生长受到抑制, 迫使 CRISPR 质粒丢失, 以便进行下一轮的基因编辑<sup>[66]</sup>。有研究表明 *AMA1* 自主复制的元件能大幅提高黑曲霉的转化效率(10–100 倍)<sup>[67]</sup>, 也能在产黄青霉菌



(*Penicillium chrysogenum*)中实现高效的基因敲除<sup>[68]</sup>。对于丝状真菌如红曲霉(*Monascus purpureus*)来说,菌丝细胞具有多核性,较难获得纯合的基因敲除突变体,同样借助于 *AMA1* 自主复制元件,成功实现了 *citS-citC* 基因簇的缺失纯合突变<sup>[69]</sup>。

## 2 受体细胞生理状态的优化

丝状真菌具有独特的细胞结构,包括菌丝形态的多样性,如营养菌丝、气生菌丝和生殖菌丝;并且菌丝顶端生长具有极化性;细胞具有多核性等特点。丝状真菌的菌丝通过顶端的细胞分裂实现生长,同时蛋白质外泌也可能主要发生在菌丝顶端和隔膜位置,如在里氏木霉中沉默 *Trcot1* 基因,获得了具有更多菌丝尖端的超支化表型,有利于纤维素酶的外泌生产<sup>[70]</sup>;另外,很多丝状真菌的细胞中具有多个细胞核,比如几乎所有的木霉细胞都是多核的,Harman 等对哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)的菌丝细胞进行染色发现,单个菌丝细胞根据大小不同,有 2–50 个不等的细胞核<sup>[71]</sup>,甚至在米曲霉和黑曲霉的分生孢子和人工制备的原生质体中也有多个细胞核存在<sup>[35]</sup>,这些特殊的生理现象虽然使丝状真菌具有更好的环境适应能力,但也给它们的基因编辑带来挑战。

### 2.1 原生质体制备的优化

基于以上生理特点,为了提高丝状真菌的基因编辑效率,对丝状真菌细胞的遗传转化多采用原生质体制备及聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的转化方法,通过原生质体的制备,打破菌丝极性及不对称生长的限制;也可以通过筛选更小的原生质体,尽量减少原生质体中细胞核的数量,控制多核现象;因为不能保证同一个原生质体的多个细胞核都进行了有效基因编辑,在丝状真菌的遗传转化结束

后,纯合体转化子的筛选和分离仍然是必须的,即对转化子进行多轮的单孢分离和表型验证。目前,这方面的相关研究较少,比较成功的案例如,Zou 等通过增加原生质体与 RNP 复合体的孵育时间,提高了蛹虫草(*Cordyceps militaris*)和里氏木霉的基因编辑效率,单基因编辑效率达 100%,HR 效率也提高到 56.52%;肌肉肌醇(myo-inositol)和苯菌灵(benomyl)等化学试剂在原生质体制备之前添加到培养基中,可以抑制细胞分裂并促进细胞壁的合成,减少孢子或原生质体多核的概率,从而也显著提高了米曲霉和里氏木霉获得纯合转化子的效率,进而减少了转化后期的多轮单孢分离过程,提高了基因编辑效率<sup>[35]</sup>。

### 2.2 细胞周期的优化

细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程,可以分为间期与分裂期(M 期)两个阶段。间期又可分为 DNA 合成前期(G1 期)、DNA 合成期(S 期)与 DNA 合成后期(G2 期)。有研究表明,当细胞处于 S 期和 G2 期时,细胞内的基因损伤通过 HR 修复的比例更高<sup>[35]</sup>,因为 HR 只发生在 S 期和 G2 期,而 NHEJ 在任何细胞周期都可以发生<sup>[72]</sup>。因此,提高处于 S 期的细胞数量,是提高 HR 效率的重要手段。一些药物,如羟基脲(hydroxyurea)浓度在 100–200 mmol/L 能使酵母细胞周期同步化,因此提高 HR 效率约 5 倍<sup>[65–73]</sup>;在丝状真菌细胞中,苯菌灵(benomyl)也有类似作用,可以阻滞细胞的有丝分裂,使细胞分裂状态同步化,在洗去苯菌灵试剂后,细胞依次进入 G1 期、S 期、G2 期,此时,控制操作时间大约 3.5–4.5 h 后进行转化,细胞正好处于 HR 易发的 S 期和 G2 期,可以有效地提高 HR 效率<sup>[35]</sup>。然而,也要注意化学试剂的用量和毒性。

除药物处理的方式以外,通过将细胞周期

相关蛋白与 Cas 蛋白融合表达,提高 Cas 蛋白在 S/G2 期的活性,也可以提高 HR 效率。如将 anti-CRISPR 蛋白 AcrIIA4 与 Cdt1 蛋白的 N 末端区域融合表达,而 Cdt1 在细胞 S 和 G2 期被降解,同时也使融合的 AcrIIA4 失活,此时 HR 占主导地位,AcrIIA4 失活导致 CRISPR/Cas 系统开启基因编辑功能,在 HR 占主导地位的细胞间期对基因进行替换和插入,不仅增加了 HR 的效率,还抑制了脱靶现象<sup>[74]</sup>;将 Geminin 蛋白与 Cas9 蛋白融合表达也有相似的目的,Geminin 蛋白在细胞周期的 S/G2/M 期高效表达,而在 G1 期发生降解,Cas9-Geminin 融合蛋白可以将 HR 效率提高 87%<sup>[75]</sup>。

### 3 DNA 修复途径的改造

基因编辑过程中,在基因组 DNA 上发生的 DSB 一般可以通过 NHEJ 或 HR 两种方式完成修复,因此提高 HR 效率的首选策略就是人为造成 NHEJ 途径的缺陷。在 NHEJ 修复途径中,Ku70-Ku80 以异源二聚体的形式结合于 DSB 的末端,然后招募 DNA 依赖的蛋白激酶催化亚基(DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKC)、DNA 连接酶 LigD 等与 DSB 结合,进行易错修复<sup>[45]</sup>。因此,构建包括 Ku70、Ku80 或 LigD 缺失的突变菌株,并以此为出发菌株,应用 CRISPR/Cas 系统进行基因编辑,可以明显提高 HR 效率。该方法已经广泛用于丝状真菌的操作,对曲霉、青霉、嗜热毁丝霉、粗糙脉孢菌等均能有效提高 HR 效率。例如,Zhang 等<sup>[31]</sup>使用仅 35 bp 长的同源臂,实现了在  $\Delta Ku80$  缺失突变体的烟曲霉中准确进行基因编辑,同源重组效率高达 95%–100%;Zheng 等<sup>[38]</sup>利用 NHEJ 缺陷菌株敲除长度为 5–48 kb 的基因组片段,编辑效率均达到 100%,而原始菌株敲除长度为 5 kb 的基因组片段,编辑效率仅为 33.3%;

最近,通过基因组测序分析发现,在 NHEJ 途径缺失的黑曲霉菌株中应用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑比在野生型中明显减少了脱靶率,为这一方法的有效性提供了依据<sup>[76]</sup>。

其次,在细胞内过表达 HR 相关蛋白,如酵母中的 RAD52、RAD52-Cas9 融合蛋白可以有效增强细胞中 CRISPR 介导的 HR 水平<sup>[77-78]</sup>。也有研究人员尝试将 HR 途径中的 Mre11 核酸外切酶与 Cas9 蛋白融合表达,可以在基因组指定位点上产生 DSB 的基础上再产生短的单链 DNA,用以招募 HR 相关蛋白与 DNA 的结合和互作,启动 HR 的发生,有助于提高 HR 的效率<sup>[79]</sup>;当 Cas9 蛋白与 Ctlp 蛋白 N 末端融合表达时,哺乳动物细胞对外源基因的 HR 效率是单独表达 Cas9 蛋白的 2 倍<sup>[80]</sup>;Wang 等发现调节 DNA 修复相关蛋白,如 MRE11、SAE2、EXO1 的表达等可以显著增强 CRISPR 系统引入突变的效率和多样性,并在酵母中建立了不依赖供体 DNA 的 CRISPR 高效致突变基因组技术<sup>[81]</sup>。另外,通过外源添加一些 DNA 修复机制相关蛋白的抑制剂或激活剂,也可以抑制 NHEJ 途径、激活 HR 途径,提高 HR 效率<sup>[59]</sup>。

也有研究表明,CRISPR/Cas9 介导的基因组 DSB 也可以通过 NHEJ 途径,在无同源臂的供体质粒存在的条件下进行外源基因的整合,整合效率甚至比 HR 高,并能整合长达 34 kb 的外源基因,但供体质粒上也要设计 sgRNA 位点,在基因组受 Cas9 蛋白剪切的同时,供体质粒也要剪切成线性化质粒,此时可以通过 NHEJ 途径将线性化供体 DNA 整合进基因组 DSB 位点<sup>[82]</sup>。这提示我们可能存在 HR 与 NHEJ 互相协同的多种修复机制。

值得注意的是,在对 DSB 进行修复的过程中,采用 NHEJ 还是 HR 的修复方式,取决于剪切靶点的空间位置、序列信息、细胞生理状

态等多方面因素,细胞往往采用多种 DNA 损伤修复机制,确保细胞生理功能的延续,因此,如何提高宿主对 DSB 进行精准、高效的 HR 修复,可能还需依赖对丝状真菌中的 DNA 修复途径的解析才能提出更有效的策略。同时,也有些报道表明,破坏 NHEJ 机制会对细胞在高温或紫外线照射下的生长产生负面影响<sup>[83]</sup>,增加细胞对化学 DNA 破坏剂(如甲基甲磺酸盐)的敏感性<sup>[84]</sup>。因此,是否通过对 DNA 修复途径的改造来提高 HR 效率也需要权衡利弊。

## 4 总结与展望

在丝状真菌中,精准基因编辑效率较低的原因,一方面是因为丝状真菌细胞结构多样,如具有极性、多核性;另一方面是对丝状真菌的遗传背景及 DNA 修复、重组机制缺乏深入的了解。对稻瘟菌的研究中发现,在 CRISPR/Cas12a 诱导的 DNA 断裂和修复过程中,不可预知的 DNA 片段的缺失、插入均被大量地检测到<sup>[85]</sup>;CRISPR/Cas9 介导的里氏木霉的基因编辑过程中也发现类似的现象<sup>[86]</sup>。这些广泛而复杂的脱靶现象和不可预知的修复结果表明,CRISPR/Cas 导致的 DNA 断裂可能通过多种 DNA 修复机制进行联合修复<sup>[45]</sup>。有报道表明,组蛋白脱乙酰酶抑制剂,可以促进染色质开放,从而提升编辑效率;Cas 导致的基因组断裂会诱发 p53 因子介导的细胞压力反应,而 p53 因子抑制剂可以提高编辑效率<sup>[87]</sup>。这些 DNA 修复相关路径及其影响因子还需要更多丝状真菌研究者的不断探索和挖掘,为提升丝状真菌的精准编辑效率提供理论依据。

对基因编辑元件如 Cas 蛋白、sgRNA 的工程化改造有效提升了 PAM 位点的识别能力及基因编辑的特异性,也反映了研究者对更高效、更精准的基因编辑工具的强烈需求。应运而生

的碱基编辑器和引导编辑系统<sup>[87]</sup>,结合了其他功能性蛋白的特性,扩展出基于 CRISPR/Cas 系统的新型精准编辑方法,为丝状真菌的精准编辑提供可行性方案,特别是当非模式菌株的 HR 机制不清或缺失时,引导编辑等新型编辑器可能将成为新的编辑手段。另外,RNP 的递送方式,能有效规避 Cas 蛋白、sgRNA 在非模式丝状真菌中的表达困境,降低脱靶率,规避外源基因整合进基因组的负面影响,结合脂质体或穿膜肽的递送方式<sup>[88]</sup>,解决 RNP 较难进入细胞的问题,也将成为有效提高丝状真菌精准编辑效率的方法。目前,很多提高精准基因编辑的方案都来自于对酵母或哺乳动物细胞的研究,要想提高丝状真菌的精准编辑效率,还需要更多实验数据的支撑,上述方法并不是放之四海而皆准,也需要更多的权衡和分析,以期达到个性化的实验目的。总而言之,随着基因编辑工具的不断开发和优化,我们期待有更加精准、高效的基因编辑方法应用于丝状真菌的菌种改造。

## REFERENCES

- [1] 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.
- [2] NISHIMURA I, SHINOHARA Y, OGUMA T, KOYAMA Y. Survival strategy of the salt-tolerant lactic acid bacterium, *Tetragenococcus halophilus*, to counteract koji mold, *Aspergillus oryzae*, in soy sauce brewing[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2018, 82(8): 1437-1443.
- [3] DENG HX, GAO RJ, LIAO XR, CAI YJ. CRISPR system in filamentous fungi: current achievements and future directions[J]. Gene, 2017, 627: 212-221.
- [4] JIN FJ, WANG BT, WANG ZD, JIN L, HAN P. CRISPR/Cas9-based genome editing and its application in *Aspergillus* species[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(5): 467.
- [5] FULLER KK, CHEN S, LOROS JJ, DUNLAP JC.

- Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*[J]. Eukaryotic Cell, 2015, 14(11): 1073-1080.
- [6] MEYER V, ARENTSHORST M, EL-GHEZAL A, DREWS AC, KOOISTRA R, VANDEN HONDEL CAMJJ, RAM AFJ. Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger kusA* mutant[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 128(4): 770-775.
- [7] RAN FA, HSU PD, WRIGHT J, AGARWALA V, SCOTT DA, ZHANG F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nature Protocols, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [8] ZHOU XQ, WANG XL, LUO HY, WANG YR, WANG Y, TU T, QIN X, SU XY, BAI YG, YAO B, HUANG HQ, ZHANG J. Exploiting heterologous and endogenous CRISPR-Cas systems for genome editing in the probiotic *Clostridium butyricum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(7): 2448-2459.
- [9] COLLIAS D, BEISEL CL. CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease[J]. Nature Communications, 2021, 12: 555.
- [10] KLEINSTIVER BP, PATTANAYAK V, PREW MS, TSAI SQ, NGUYEN NT, ZHENG ZL, JOUNG JK. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects[J]. Nature, 2016, 529(7587): 490-495.
- [11] CHEN JS, DAGDAS YS, KLEINSTIVER BP, WELCH MM, SOUSA AA, HARRINGTON LB, STERNBERG SH, JOUNG JK, YILDIZ A, DOUDNA JA. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy[J]. Nature, 2017, 550(7676): 407-410.
- [12] CONG L, RAN FA, COX D, LIN SL, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU XB, JIANG WY, MARRAFFINI LA, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [13] WANG YC, ZHAO JY, DUAN NN, LIU W, ZHANG YX, ZHOU MJ, HU ZQ, FENG M, LIU XH, WU LQ, LI Z, LIANG DS. Paired CRISPR/Cas9 nickases mediate efficient site-specific integration of F9 into rDNA locus of mouse ESCs[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 3035.
- [14] ROBERTSON L, PEDERICK D, PILTZ S, WHITE M, NIETO A, AHLADAS M, ADIKUSUMA F, THOMAS PQ. Expanding the RNA-guided endonuclease toolkit for mouse genome editing[J]. The CRISPR Journal, 2018, 1(6): 431-439.
- [15] ACHARYA S, MISHRA A, PAUL D, ANSARI AH, AZHAR M, KUMAR M, RAUTHAN R, SHARMA N, AICH M, SINHA D, SHARMA S, JAIN S, RAY A, JAIN S, RAMALINGAM S, MAITI S, CHAKRABORTY D. *Francisella novicida* Cas9 interrogates genomic DNA with very high specificity and can be used for mammalian genome editing[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(42): 20959-20968.
- [16] HU JH, MILLER SM, GEURTS MH, TANG WX, CHEN LW, SUN N, ZEINA CM, GAO X, REES HA, LIN Z, LIU DR. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. Nature, 2018, 556(7699): 57-63.
- [17] LI J, XU RF, QIN RY, LIU XS, KONG FN, WEI PC. Genome editing mediated by SpCas9 variants with broad non-canonical PAM compatibility in plants[J]. Molecular Plant, 2021, 14(2): 352-360.
- [18] TAKUYA K, JUN-LCHI M. CRISPR/Cpf1-mediated mutagenesis and gene deletion in industrial filamentous fungi *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 133(4): 353-361.
- [19] VANEGAS KG, JARCZYNSKA ZD, STRUCKO T, MORTENSEN UH. Cpf1 enables fast and efficient genome editing in *Aspergilli*[J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2019, 6: 6.
- [20] ROUX I, WOODCRAFT C, HU JY, WOLTERS R, GILCHRIST CLM, CHOOI YH. CRISPR-mediated activation of biosynthetic gene clusters for bioactive molecule discovery in filamentous fungi[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(7): 1843-1854.
- [21] PAUSCH P, AL-SHAYEB B, BISOM-RAPP E, TSUCHIDA CA, LI Z, CRESS BF, KNOTT GJ, JACOBSEN SE, BANFIELD JF, DOUDNA JA. CRISPR-CasΦ from huge phages is a hypercompact genome editor[J]. Science, 2020, 369(6501): 333-337.
- [22] KWON MJ, SCHÜTZE T, SPOHNER S, HAEFNER S, MEYER V. Practical guidance for the implementation of the CRISPR genome editing tool in filamentous fungi[J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2019, 6: 15.
- [23] ANTONY JS, HINZ JM, WYRICK JJ. Tips, tricks, and potential pitfalls of CRISPR genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 924914.
- [24] 洪甜, 罗庆华. 靶向 RNA 的 CRISPR-Cas 系统研究进

- 展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1363-1373.
- HONG T, LUO QH. Advances in the RNA-targeting CRISPR-Cas systems[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1363-1373 (in Chinese).
- [25] LIU R, CHEN L, JIANG YP, ZHOU ZH, ZOU G. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system[J]. Cell Discovery, 2015, 1: 15007.
- [26] LI C, ZONG Y, WANG YP, JIN S, ZHANG DB, SONG QN, ZHANG R, GAO CX. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion[J]. Genome Biology, 2018, 19(1): 59.
- [27] 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): 738-755.
- LIN JC, ZOU G, LIU HM, WEI YJ. Application of CRISPR/Cas genome editing technology in the synthesis of secondary metabolites of filamentous fungi[J]. Synthetic Biology Journal, 2023(4): 738-755 (in Chinese).
- [28] TONG S, AN KX, CHEN WX, ZHOU WY, SUN YX, WANG QH, LI DM. 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(19/20): 6583-6593.
- [29] SHEN CC, HSU MN, CHANG CW, LIN MW, HWU JR, TU Y, HU YC. Synthetic switch to minimize CRISPR off-target effects by self-restricting Cas9 transcription and translation[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(3): e13.
- [30] WEBER J, VALIANTE V, NØDVIG CS, MATTERN DJ, SLOTKOWSKI RA, MORTENSEN UH, BRAKHAGE AA. Functional reconstitution of a fungal natural product gene cluster by advanced genome editing[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(1): 62-68.
- [31] ZHANG C, MENG XH, WEI XL, LU L. Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 86: 47-57.
- [32] 高伟欣, 黄火清, 赵晶, 张鑫, 杨宁, 杨浩萌. 应用于基因编辑的核糖核蛋白复合体的构建与活性验证[J]. 生物技术通报, 2022, 38(8): 60-68.
- GAO WX, HUANG HQ, ZHAO J, ZHANG X, YANG N, YANG HM. Construction and activity verification of ribonucleoprotein complex for gene editing[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(8): 60-68 (in Chinese).
- [33] FU YF, FODEN JA, KHAYTER C, MAEDER ML, REYON D, JOUNG JK, SANDER JD. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 822-826.
- [34] ZHENG XM, CAIRNS T, ZHENG P, MEYER V, SUN JB. Protocol for gene characterization in *Aspergillus niger* using 5S rRNA-CRISPR-Cas9-mediated Tet-on inducible promoter exchange[J]. STAR Protocols, 2022, 3(4): 101838.
- [35] ZOU G, XIAO ML, CHAI SX, ZHU ZH, WANG Y, ZHOU ZH. 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.
- [36] SCHUSTER M, SCHWEIZER G, REISSMANN S, KAHMANN R. Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system[J]. Fungal Genetics and Biology: FG & B, 2016, 89: 3-9.
- [37] ZHENG XM, ZHENG P, SUN JB, KUN Z, MA YH. Heterologous and endogenous *U6* snRNA promoters enable CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Aspergillus niger*[J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2018, 5: 2.
- [38] ZHENG XM, ZHENG P, ZHANG K, CAIRNS TC, MEYER V, SUN JB, MA YH. 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.
- [39] SONG LT, OUEDRAOGO JP, KOLBUSZ M, NGUYEN TTM, TSANG A. Efficient genome editing using tRNA promoter-driven CRISPR/Cas9 gRNA in *Aspergillus niger*[J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0202868.
- [40] FAN C, ZHANG W, SU XY, JI WL, LUO HY, ZHANG YH, LIU B, YAO B, HUANG HQ, XU XX. CRISPR/Cas9-mediated genome editing directed by a 5S rRNA-tRNA<sup>Gly</sup> hybrid promoter in the thermophilic filamentous fungus *Humicola insolens*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 206.
- [41] NØDVIG CS, HOOFF JB, KOGLE ME, JARCZYNSKA ZD, LEHMBECK J, KLITGAARD DK, MORTENSEN UH. Efficient oligo nucleotide mediated CRISPR-Cas9 gene editing in *Aspergilli*[J]. Fungal Genetics and Biology: FG & B, 2018, 115: 78-89.
- [42] LIN XT, DONG LB, YU D, WANG B, PAN L. High-level expression and characterization of the thermostable leucine aminopeptidase Thelap from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in

- Aspergillus niger* and its application in soy protein hydrolysis[J]. Protein Expression and Purification, 2020, 167: 105544.
- [43] DONG HZ, ZHENG JW, YU D, WANG B, PAN L. 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.
- [44] KATAYAMA T, TANAKA Y, OKABE T, NAKAMURA H, FUJII W, KITAMOTO K, MARUYAMA JI. 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.
- [45] XUE C, GREENE EC. DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9-mediated genome editing[J]. Trends in Genetics, 2021, 37(7): 639-656.
- [46] YANG YK, LIU GQ, CHEN X, LIU M, ZHAN CJ, LIU XX, BAI ZH. High efficiency CRISPR/Cas9 genome editing system with an eliminable episomal sgRNA plasmid in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 138: 109556.
- [47] JANG DE, LEE JY, LEE JH, KOO OJ, BAE HS, JUNG MH, BAE JH, HWANG WS, CHANG YJ, LEE YH, LEE HW, YEOM SC. Multiple sgRNAs with overlapping sequences enhance CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2018, 50(4): 1-9.
- [48] HUANG J, COOK DE. The contribution of DNA repair pathways to genome editing and evolution in filamentous pathogens[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2022, 46(6): 035.
- [49] DING X, SEEBECK T, FENG YM, JIANG YF, DAVIS GD, CHEN FQ. Improving CRISPR-Cas9 genome editing efficiency by fusion with chromatin-modulating peptides[J]. The CRISPR Journal, 2019, 2(1): 51-63.
- [50] RIESENBERG S, HELMBRECHT N, KANIS P, MARICIC T, PÄÄBO S. Improved gRNA secondary structures allow editing of target sites resistant to CRISPR-Cas9 cleavage[J]. Nature Communications, 2022, 13: 489.
- [51] KOMOR AC, BADRAN AH, LIU DR. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes[J]. Cell, 2017, 168(1/2): 20-36.
- [52] DING Y, WANG KF, WANG WJ, MA YR, SHI TQ, HUANG H, JI XJ. Increasing the homologous recombination efficiency of eukaryotic microorganisms for enhanced genome engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(11): 4313-4324.
- [53] CAI P, GAO J, ZHOU Y. CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 1-12.
- [54] BAKER O, TSURKAN S, FU J, KLINK B, RUMP A, OBST M, KRANZ A, SCHRÖCK E, ANASTASSIADIS K, STEWART AF. The contribution of homology arms to nuclease-assisted genome engineering[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(13): 8105-8115.
- [55] RICHARDSON CD, RAY GJ, DeWITT MA, CURIE GL, CORN JE. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(3): 339-344.
- [56] WANG YM, LIU KI, BINTE SUTRISNOH NA, SRINIVASAN H, ZHANG JY, LI J, ZHANG F, LALITH CRJ, XING HY, SHANMUGAM R, FOO JN, YEO HT, OOI KH, BLECKWEHL T, PAR YYR, LEE SM, BINTE ISMAIL NN, BINTI SANWARI NA, VANESSA LEE ST, LEW J, TAN MH. Systematic evaluation of CRISPR-Cas systems reveals design principles for genome editing in human cells[J]. Genome Biology, 2018, 19(1): 1-16.
- [57] KUN RS, MENG JL, SALAZAR-CEREZO S, MÄKELÄ MR, DE VRIES RP, GARRIGUES S. CRISPR/Cas9 facilitates rapid generation of constitutive forms of transcription 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.
- [58] FOSTER AJ, MARTIN-URDIROZ M, YAN X, WRIGHT HS, SOANES DM, TALBOT NJ. CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein-mediated co-editing and counter selection in the rice blast fungus[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 14355.
- [59] YE H CD, RICHARDSON CD, CORN JE. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways[J]. Nature Cell Biology, 2019, 21(12): 1468-1478.
- [60] RENAUD JB, BOIX C, CHARPENTIER M, De CIAN A, COCHENNEC J, DUVERNOIS-BERTHET E, PERROUAULT L, TESSON L, EDOUARD J, THINARD R, CHERIFI Y, MENORET S, FONTANIÈRE S, de CROZÉ N, FRAICHARD A,

- SOHM F, ANEGON I, CONCORDET JP, GIOVANNANGELI C. Improved genome editing efficiency and flexibility using modified oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 nucleases[J]. *Cell Reports*, 2016, 14(9): 2263-2272.
- [61] GUTIERREZ-TRIANA JA, TAVHELIDSE T, THUMBERGER T, THOMAS I, WITTBRODT B, KELLNER T, ANLAS K, TSINGOS E, WITTBRODT J. Efficient single-copy HDR by 5' modified long dsDNA donors[J]. *eLife*, 2018, 7: 39468.
- [62] YU Y, GUO YJ, TIAN QQ, LAN YQ, YEH H, ZHANG M, TASAN I, JAIN S, ZHAO HM. An efficient gene knock-in strategy using 5'-modified double-stranded DNA donors with short homology arms[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(4): 387-390.
- [63] 邓大杰, 孟亚南, 邓二杰, 董金皋, 曾凡力. 丝状真菌遗传筛选系统的研究及其应用[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1165-1178.
- DENG DJ, MENG YN, DENG EJ, DONG JG, ZENG FL. Application of genetic selection system in filamentous fungi: a review[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1165-1178 (in Chinese).
- [64] LIU Q, ZHANG YL, LI FY, LI JG, SUN WL, TIAN CG. Upgrading of efficient and scalable CRISPR-Cas-mediated technology for genetic engineering in thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 1-19.
- [65] PERI KVR, FARIA-OLIVEIRA F, LARSSON A, PLOVIE A, PAPON N, GEIJER C. Split-marker-mediated genome editing improves homologous recombination frequency in the CTG clade yeast *Candida intermedia*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2023, 23: foad016.
- [66] KATAYAMA T, NAKAMURA H, ZHANG Y, PASCAL A, FUJII W, MARUYAMA JI. 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.
- [67] ZHANG JP, LI XL, LI GH, CHEN WQ, ARAKAKI C, BOTIMER GD, BAYLINK D, ZHANG L, WEN W, FU YW, XU J, CHUN N, YUAN WP, CHENG T, ZHANG XB. Efficient precise knock in with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage[J]. *Genome Biology*, 2017, 18(1): 1-18.
- [68] POHL C, KIEL JAKW, DRIESSEN AJM, BOVENBERG RAL, NYGÅRD Y. CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(7): 754-764.
- [69] LIU WW, AN CY, SHU X, MENG XX, YAO YP, ZHANG J, CHEN FS, XIANG H, YANG SY, GAO X, GAO SS. A dual-plasmid CRISPR/Cas system for mycotoxin elimination in polykaryotic industrial fungi[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(8): 2087-2095.
- [70] GAO F, LI MZ, LIU WQ, BAI YG, TU T, WANG Y, ZHANG J, LUO HY, YAO B, HUANG HQ, SU XY. RNAi-mediated gene silencing of *Trcot1* induces a hyperbranching phenotype in *Trichoderma reesei*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(2): 206-215.
- [71] HARMAN GE, KUBICEK CP, EBRARY I. *Trichoderma and Gliocladium* volume 1: Basic biology, Taxonomy and Genetics[M]. London: Taylor & Francis, 1998: 13-278.
- [72] YANG DE, SCAVUZZO MA, CHMIELOWIEC J, SHARP R, BAJIC A, BOROWIAK M. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21264.
- [73] ROSEBROCK AP. Synchronization and arrest of the budding yeast cell cycle using chemical and genetic methods[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017, 2017(1): pdb.prot088724.
- [74] MATSUMOTO D, TAMAMURA H, NOMURA W. A cell cycle-dependent CRISPR-Cas9 activation system based on an anti-CRISPR protein shows improved genome editing accuracy[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 601.
- [75] GUTSCHNER T, HAEMMERLE M, GENOVESE G, DRAETTA GF, CHIN L. Post-translational regulation of Cas9 during G1 enhances homology-directed repair[J]. *Cell Reports*, 2016, 14(6): 1555-1566.
- [76] GARRIGUES S, PENG M, KUN RS, de VRIES RP. Non-homologous end-joining-deficient filamentous fungal strains mitigate the impact of off-target mutations during the application of CRISPR/Cas9[J]. *mBio*, 2023, 14(4): e0066823.
- [77] SHAO SM, REN CH, LIU ZT, BAI YC, CHEN ZL, WEI ZH, WANG X, ZHANG ZY, XU K. Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2017, 92: 43-52.
- [78] TRAN NT, BASHIR S, LI X, ROSSIUS J, CHU VT,

- RAJEWSKY K, KÜHN R. Enhancement of precise gene editing by the association of Cas9 with homologous recombination factors[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 365.
- [79] ZHANG K, DUAN XP, CAI P, GAO LH, WU XY, YAO L, ZHOU YJ. Fusing an exonuclease with Cas9 enhances homologous recombination in *Pichia pastoris*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 182.
- [80] CHARPENTIER M, KHEDHER AHY, MENORET S, BRION A, LAMRIBET K, DARDILLAC E, BOIX C, PERROUAULT L, TESSON L, GENY S, de CIAN A, ITIER JM, ANEGON I, LOPEZ B, GIOVANNANGELI C, CONCORDET JP. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1133.
- [81] WANG Z, LIN YP, DAI ZJ, WANG QH. Modulating DNA repair pathways to diversify genomic alterations in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(2): e0232621.
- [82] HE XJ, TAN CL, WANG F, WANG YF, ZHOU R, CUI DX, YOU WX, ZHAO H, REN JW, FENG B. Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(9): e85.
- [83] GANDÍA M, XU SM, FONT C, MARCOS JF. Disruption of *ku70* involved in non-homologous end-joining facilitates homologous recombination but increases temperature sensitivity in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*[J]. *Fungal Biology*, 2016, 120(3): 317-323.
- [84] FANG Z, ZHANG Y, CAI MH, ZHANG J, ZHANG YX, ZHOU XS. Improved gene targeting frequency in marine-derived filamentous fungus *Aspergillus glaucus* by disrupting *ligD*[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2012, 53(3): 355-362.
- [85] HUANG J, COOK DE. CRISPR-Cas12a ribonucleoprotein-mediated gene editing in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *STAR Protocols*, 2022, 3(1): 101072.
- [86] HAO ZZ, SU XY. Fast gene disruption in *Trichoderma reesei* using *in vitro* assembled Cas9/gRNA complex[J]. *BMC Biotechnology*, 2019, 19(1): 2.
- [87] 许志锰, 谢震. 引导编辑研究进展及其应用[J]. *合成生物学*, 2023. DOI: 10.12211/2096-8280.2023-038.
- XU ZM, XIE Z. Research progress and biotechnological applications of prime editing[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023. DOI: 10.12211/2096-8280.2023-038 (in Chinese).
- [88] ZHANG S, SHEN JT, LI DL, CHENG YY. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing[J]. *Theranostics*, 2021, 11(2): 614-648.