

• 生物技术与方法 •

一种高效无选择标记的黑曲霉基因组编辑方法

申玉玉, 陈忠秀, 陈杰, 赵宝顶, 吕佳, 桂玲, 路福平, 黎明

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

申玉玉, 陈忠秀, 陈杰, 赵宝顶, 吕佳, 桂玲, 路福平, 黎明. 一种高效无选择标记的黑曲霉基因组编辑方法. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4744-4755.

SHEN YY, CHEN ZX, CHEN J, ZHAO BD, LÜ J, GUI L, LU FP, LI M. An efficient marker-free genome editing method for *Aspergillus niger*. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4744-4755.

摘 要: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 是一种重要的工业生产菌株, 被广泛地应用于生产酶制剂和有机酸, 但仍需要进行基因组改造提高它的应用潜力。CRISPR/Cas9 技术是一种被广泛采用的黑曲霉基因组编辑技术, 但由于需要在基因组中整合选择标记或基因编辑效率还有待提高, 影响了其在工业菌株改造中的应用。本研究建立了一种基于 CRISPR/Cas9 技术的高效无选择标记的基因编辑方法。首先, 利用 5S rRNA 启动子启动 sgRNA 的表达, 构建了一个含有 AMA1 (autonomously maintained in *Aspergillus*) 复制起始片段的 sgRNA 和 Cas9 共表达质粒; 同时通过敲除 *kusA* 基因构建非同源末端连接 (non-homologous end joining pathway, NHEJ) 修复缺陷的高效同源重组菌株; 最后利用含有 AMA1 片段质粒的不稳定性, 通过无抗平板传代丢失含有 sgRNA 和 Cas9 共表达质粒。利用该方法, 在采用同源臂长度仅为 20 bp 的无选择标记供体 DNA 进行基因编辑时, 基因编辑效率可达到 100%。该方法为黑曲霉基因功能的研究和细胞工厂的构建奠定了基础。

关键词: 黑曲霉; CRISPR/Cas9; 无标记; 基因组编辑; 非同源末端连接; 同源重组

Received: March 3, 2022; **Accepted:** April 24, 2022; **Published online:** June 1, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32072161, 22278321); National Key Research and Development Program of China (2021YFC2101800)

Corresponding author: LI Ming. E-mail: liming09@tust.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (32072161, 22278321); 国家重点研发计划项目 (2021YFC2101800)

An efficient marker-free genome editing method for *Aspergillus niger*

SHEN Yuyu, CHEN Zhongxiu, CHEN Jie, ZHAO Baoding, LÜ Jia, GUI Ling,
LU Fuping, LI Ming

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology (Tianjin University of Science and Technology), Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: *Aspergillus niger* is an important industrial strain which has been widely used for production of enzymes and organic acids. Genome modification of *A. niger* is required to further improve its potential for industrial production. CRISPR/Cas9 is a widely used genome editing technique for *A. niger*, but its application in industrial strains modification is hampered by the need for integration of a selection marker into the genome or low gene editing efficiency. Here we report a highly efficient marker-free genome editing method for *A. niger* based on CRISPR/Cas9 technique. Firstly, we constructed a co-expression plasmid of sgRNA and Cas9 with a replication initiation region fragment AMA1 (autonomously maintained in *Aspergillus*) by using 5S rRNA promoter which improved sgRNA expression. Meanwhile, a strain deficient in non-homologous end-joining (NHEJ) was developed by knocking out the *kusA* gene. Finally, we took advantage of the instability of plasmid containing AMA1 fragment to cure the co-expression plasmid containing sgRNA and Cas9 through passaging on non-selective plate. With this method, the efficiency of gene editing reached 100% when using marker-free donor DNA with a short homologous arm of 20 bp. This method may facilitate investigation of gene functions and construction of cell factories for *A. niger*.

Keywords: *Aspergillus niger*; CRISPR/Cas9; marker-free; genome editing; non-homologous end-joining (NHEJ); homologous recombination

黑曲霉培养成本低, 极端酸性环境中具有强大的稳定性, 具有较高的蛋白分泌能力和食品安全性, 是一个不可多得的细胞工厂, 是有机酸和酶制剂的重要工业生产菌株^[1-4]。随着黑曲霉基因组信息的公布, 越来越多的功能未知的DNA序列涌入视野, 它们的功能鉴定及生物学特性研究成了后基因组时代的研究热点。不论是细胞工厂的构建还是基因功能的研究, 往往都涉及基因组中不同基因的编辑。高效的黑曲霉基因编辑体系是进行黑曲霉基因功能研究和细胞工厂构建的关键技术之一^[5]。

基于CRISPR/Cas9系统的新一代基因编辑技术已经成为生物研究中重要的一部分。由于CRISPR/Cas9介导的基因编辑技术具有高度的灵活性、简单性和较高的编辑效率, 已经被广泛应用于各个物种^[6]。在利用CRISPR/Cas9技术进行基因编辑时, sgRNA的高效表达和成熟是进行高效基因编辑的关键。在真核生物中, sgRNA的表达主要依赖两类启动子: 被RNA聚合酶II识别的II型启动子和被RNA聚合酶III识别的III型启动子。II型启动子需要在sgRNA的5'端加上HH核酶、3'端加HDV核

酶才能保证 sgRNA 的正常成熟, 不仅编辑效率有待提高, 而且 sgRNA 的构建相对烦琐^[7]。与 II 型启动子相比, III 型启动子不需要 HH 和 HDV 核酶, 构建相对简单, 但 III 型启动子具有种属的特异性, 使用也受到一些限制。Zheng 等^[8]使用 III 型 RNA 聚合酶启动子——U6 启动子启动 sgRNA 的表达, 基因编辑效率最高达 79%。为了提高基因编辑效率, Zheng 等^[9]创建了以 5S rRNA 启动子作为 sgRNA 表达启动子的 CRISPR/Cas9 系统, 该系统基因编辑效率高达 100%, 说明 5S rRNA 启动子是一个非常好的启动 sgRNA 表达的启动子。

但是, Zheng 等^[9]建立的 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑时, 需要在基因组中整合选择标记 (潮霉素抗性基因表达盒) 帮助筛选。真菌的选择标记有限, 标记的回收利用耗时较长或需要先构建缺陷型菌株; 而且, 在工程菌株的改造过程中应尽量避免选择标记的累积, 避免抗性标记整合到基因组。随着黑曲霉的基因组编辑技术的发展, 无痕编辑和多基因编辑成了重要的研究方向^[5]。无痕编辑后的基因组中未插入选择标记, 这样就避免了连续基因编辑时标记的回收利用, 大大缩短了基因编辑的周期。CRISPR/Cas9 基因编辑技术和具有复制起始功能的 AMA1 (autonomously maintained in *Aspergillus*) 片段的发现, 为建立丝状真菌的无痕编辑技术奠定了基础。1991 年, Gems 等^[10]首次从构巢曲霉中分离出携带 AMA1 片段的质粒 pARp1, 发现 AMA1 片段在丝状真菌的质粒中具有复制起始功能。1994 年, Verdoes 等^[11]发现含有 AMA1 片段的质粒在黑曲霉中转化效率提高 10–100 倍, 之后 AMA1 片段被广泛用于黑曲霉的质粒构建。1997 年, Aleksenko 等^[12]研究表明含有 AMA1 片段的质粒在没有选择压

力下极易丢失。它的这一不稳定特性被用于丝状真菌 CRISPR/Cas9 的基因编辑, 短暂地表达 Cas9 蛋白和 (或) sgRNA, 避免向基因组中整合 Cas9 蛋白基因和 Cas9 蛋白持续表达带来的脱靶效应; 同时在基因编辑完成后很容易通过无抗平板传代丢失质粒, 解决了抗性质粒存在于细胞内不易丢失的问题。2016 年, Pohl 等^[13]首次在产黄青霉菌中利用携带 AMA1 片段的线性化质粒 YN-2、hCas9-sgRNA 片段和 sgRNA-*amdS* 片段共转化宿主细胞进行无选择标记的基因组编辑。但供体 DNA 需要 1 kb 左右的同源臂, 且编辑载体构建比较复杂, 编辑效率也有待提高。2019 年, Van Leeuwe 等^[14]在黑曲霉中进行了无选择标记的基因组编辑研究, 采用 PtRNA^{Pro1} 启动 sgRNA 的表达, 利用携带 AMA1 片段的质粒 pFC332-sgRNA 共表达 sgRNA 和 Cas9 蛋白, 结果一些基因的编辑效率仅为 66.7%, 且供体 DNA 同样需要较长的同源臂 (800–1 000 bp)。编辑效率低的原因可能是 PtRNA^{Pro1} 启动 sgRNA 表达的效率不高。2020 年, Vanegas 等^[15]在黑曲霉中实现了仅有 60 bp 同源臂的无选择标记供体 DNA 进行的无选择标记的基因编辑, 但是他们使用的是 CRISPR/ LbCpf1 系统, 而且编辑效率有待提高, 原因可能与采用的是 U3 启动子启动 sgRNA 的表达效率不高有关。

自然条件下丝状真菌进行同源重组 (homologous recombination, HR) 的概率很低, 原因是在丝状真菌中双链 DNA 的断裂修复时, 非同源末端连接 (non-homologous end joining pathway, NHEJ) 优先于 HR, 所以很多研究通过阻断 NHEJ 修复来提高 HR 的效率^[16–18]。Meyer 等^[16]研究表明, 敲除 *kusA* (Ku70 蛋白编码基因) 可以阻断 NHEJ 修复, 获得高效的基

因靶向突变体,与野生型相比 HR 提高 70%;而且 *kusA* 基因的缺失并不会给菌株生长造成明显影响。本研究利用 5S rRNA 启动子启动 sgRNA 的表达,构建了基于 AMA1 复制起始片段的 sgRNA 和 Cas9 共表达质粒;同时通过敲除 *kusA* 基因,获得一株 NHEJ 修复缺陷的高效同源重组菌株;最后利用含有 AMA1 片段质粒的不稳定特性通过无抗平板传代实现抗性质粒的丢失,从而建立了一种高效无选择标记的黑曲霉基因组编辑方法。该方法在采用 20 bp 同源臂的无选择标记供体 DNA 进行基因编辑时,基因编辑效率也达到 100%。该方法为黑曲霉基因功能的研究和细胞工厂的构建奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基

本研究所用的出发菌株为果胶酶黑曲霉生产菌 AnP1.0,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 用于构建质粒,所用菌株见表 1。本研究使用的培养基有 PDA、CM、MM、MMS、MMS 上层琼脂,所有培养基参照 Arentshorst 等^[19]描述的配制,使用的 MMS 培养基未添加咖啡因,与转化液混合的 MMS 上层琼脂添加潮霉素(hygromycin B, hyg)抗性。

1.1.2 主要试剂

制备原生质体所用试剂按照 Arentshorst 等^[19]描述配制, PrimeSTAR Max DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、*Bgl* II、*Bam*H I、*Nhe* I、*Xho* I 等限制性核酸内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司,*Pac* I 和 *Bbs* I 为 NEB 公司生产,潮霉素 B 购自天津百奥泰科技有限公司。

1.1.3 引物

本实验所用引物如表 2 所示。

1.2 方法

1.2.1 CRISPR/Cas9 质粒的构建

sgRNA 以 5S rRNA 为启动子进行表达,启动子序列参照 Zheng 等^[9]设计,在 5'端添加 *Xho* I 和 *Bgl* II 的酶切位点,在 3'端添加 *Pac* I 的酶切位点,送华大基因合成。靶位点通过 CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) 或者 CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) 在线设计,通过 *Bbs* I 酶切 pUC57-sgRNA 将合成的靶位点序列连接到质粒中,构建 pUC57-sgRNA-target 的靶向质粒(图 1A)。用 *Bgl* II/*Pac* I 酶切 pUC57-sgRNA-target 质粒得到线性的 sgRNA-target 表达盒片段,再用同样的酶酶切 pFC332,将酶切后的 pFC332 载体与 sgRNA-target 表达盒片段连接,构建 pFC332_target-sgRNA 靶向质粒(图 1B)。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Names	Genotypes/plasmids	References
AnP1.0	Pectinase <i>Aspergillus niger</i>	Our lab
DH5 α	—	Our lab
DH5 α -sgRNA	pUC57-sgRNA	From BGI Genomics Co., Ltd.
DH5 α -Cas9	pFC332 ^[20]	Addgene
AnP1.1	$\Delta albA$	This study
AnP2.1	$\Delta albA$, $\Delta kusA::DR-prtT-DR$	This study

表 2 本研究所用引物
Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
sgRNA-albA1 F	CACCAGTGGGATCTCAAGAACTAC	24
sgRNA-albA1 R	AAACGTAGTTCTTGAGATCCCACT	24
sgRNA-prtT F	CACCAGATGTGATCTAGATCCGCG	24
sgRNA-prtT R	AAACCGCGGATCTAGATCACATCT	24
GHsgRNA-kusA1 F	CACCTGATGATAAGACCTACGGT	24
GHsgRNA-kusA1 R	AAACACCGTAGGGTCTTATCATCA	24
GHsgRNA-kusA3 F	CACCAGAAAGGCATATAAGTTCGG	24
GHsgRNA-kusA3 R	AAACCCGAACCTTATATGCCTTTCT	24
AlbA 100 F	GACGAGCTCCACGAAGTCT	19
AlbA 100 R	TGGCCTTGAATGACGCGG	18
DFkusA F	AACCAGATATTCACATCCAGAGCGC	25
DFkusA R	ccgcgcggatctagatcacatctACCGTAGGGTCTTATCATCACCATGG	49
DRkusA F	agatgtgatctagatccgcgcggAGACCAAGTAACCTTTTCGCCTGAT	48
DRkusA R	TGGAAGCGCAGTGATAGGCTTGA	24
sgRNA L F	CCGCTCGAGAACTGCTGAGATCTCACATACGACCACAGG	39
sgRNA L R	CGCGGATCCAAAAAAGCACCGACTCGG	27
D60kusA F	GGCGCTTGTTTCATCATAACCGAC	23
D60kusA R	ACTGGCTCACCGAAGTCCC	19
D40kusA F	GACAAATGACAACCCCCATGGTG	22
D40kusA R	GAGCGCCTTCTGTTCATCAGG	21
D20 kusAF	TGATGATAAGACCTACGGT	20
D20 kusAR	GCGAAAAGGTTACTTGGTCT	20

lowercase letters – 23 bp prtT sequence.

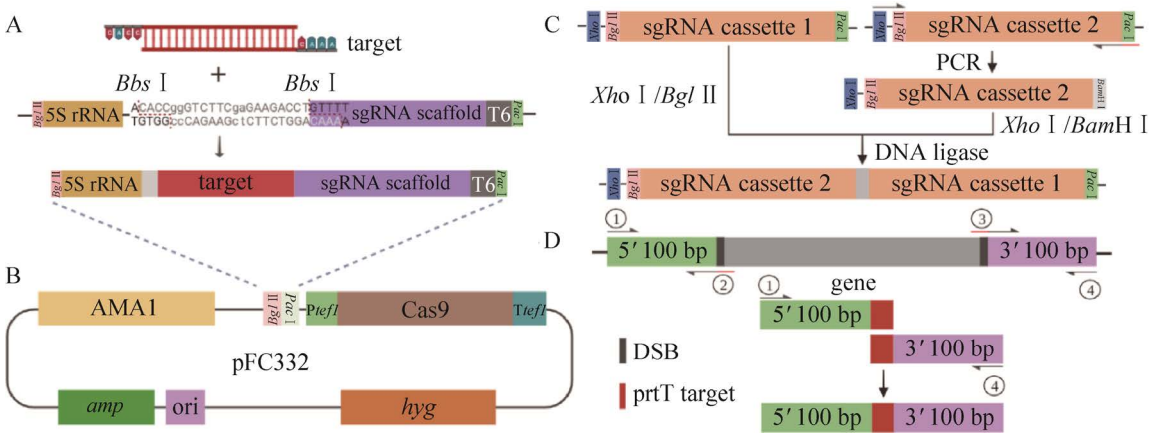


图 1 质粒及供体 DNA 的构建 A: sgRNA 表达盒的构建; B: pFC332_target-sgRNA 的构建; C: sgRNA 表达盒的串联; D: 无选择标记供体 DNA 片段构建。图用 BioRender.com 在线制作

Figure 1 Schematic representation of the plasmid and donor DNA construction. (A) Construction of sgRNA cassette. (B) Construction of pFC332_target-sgRNA. (C) Thread of the sgRNA cassettes. (D) Construction of marker-free donor DNA fragments. Created with BioRender.com.

1.2.2 多靶位点 sgRNA 表达盒及供体 DNA 片段的设计

进行多靶位点基因编辑时,需串联两个或两个以上的 sgRNA 表达盒。先分别构建单个靶位点的 sgRNA 表达盒质粒 pUC57-sgRNA-target 1、pUC57-sgRNA-target 2 等,然后用 sgRNA 表达盒的上游引物和添加 *Bam*H I 酶切位点的下游引物 PCR 扩增表达盒 sgRNA-target 2,用 *Xho* I/*Bam*H I 酶切 sgRNA 表达盒 2 片段;用 *Xho* I/*Bgl* II 酶切 pUC57-sgRNA-target 1,将酶切后的载体和片段连接构建含有两个靶位点 sgRNA 表达盒质粒 pUC57-sgRNA-target 2-sgRNA-target 1 (图 1C);同理可以构建出含有多个靶位点的 sgRNA 表达盒质粒。将构建的 pUC57-sgRNA-target 2-sgRNA-target 1 质粒用 *Bgl* II/*Pac* I 酶切得到 sgRNA-target 2-sgRNA-target 1 片段,再将酶切后的 sgRNA 表达盒连接到 pFC332 载体上,构建 pFC332-sgRNA-target 2-sgRNA-target 1 靶向质粒 (图 1B)。无选择标记的敲除供体 DNA 片段选取靶位点两端的左右各 100 bp 的同源臂,中间由一个 20 bp 的核苷酸和 PAM 序列连接,两对引物重叠 PCR 得到供体 DNA 片段 (图 1D)。供体 *kusA* 片段由图 1D 引物 1 和 4 PCR 扩增 AnP1.1 基因组得到,缩短的供体 DNA 片段由相应引物扩增供体 *kusA* 片段得到。

1.2.3 原生质体转化及转化子筛选

原生质体的制备及转化参照 Arentshorst 等^[19]描述,转化子平板培养 5–7 d,挑取转化子于 MM+200 μ g/mL hyg 平板,30 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d,再次传代并挑取适量菌丝于 1.5 mL 离心管中,加 50 μ L 10 \times TE 和少量石英砂,振荡使菌丝分散,置于微波炉 700 W 加热 2 min,然后立即冰浴 2 min,13 000 \times g 离心 1 min,吸取 10 μ L 上清作模板。用验证引物进行 PCR 扩增靶向

基因,送华大基因测序验证或琼脂糖凝胶电泳验证。

1.2.4 靶向质粒的丢失

携带 AMA1 片段的质粒极不稳定,在无选择压力下易丢失。挑取验证正确的转化子在 MM 无抗板上进行单孢子划线,以丢失 Cas9-sgRNA 质粒。再挑取单菌落于 MM 平板上划线,划出尽可能多的单菌落。选取多个单菌落分别在 MM 平板和 MM+200 μ g/mL hyg 平板上划线作丢失质粒的对照,在 MM 平板上生长同时在抗性平板上不生长的为质粒丢失菌株,可用于下一次的基因编辑。大多数菌株经两次无抗平板传代后,会出现质粒丢失菌株。

2 结果与分析

2.1 CRISPR/Cas9 系统构建及编辑效率的验证

构建的 CRISPR/Cas9 系统以潮霉素为转化筛选标记的自主复制型质粒 pFC332^[20]来同时表达 Cas9 蛋白和 sgRNA (图 1B)。Cas9 基因序列来源于酿脓链球菌,按照黑曲霉密码子的偏好性优化并在其 3'端添加了核定位信号 SV40。Cas9 由构巢曲霉的强组成型启动子 *tefl* 启动表达、终止子 *tefl* 终止表达。由 5S rRNA 启动子启动 sgRNA 的表达,5S rRNA 在胞内被 RNA 聚合酶 III 转录,为 Cas9-sgRNA 复合物的形成提供充足的 sgRNA;5S rRNA 具有明确的结构 (5S rRNA 结构由 <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi> 网站预测),既不妨碍暴露的 spacer,也不干扰 sgRNA 骨架的结构,可以有效形成 Cas9-sgRNA 复合物并结合到靶位点进行基因编辑 (图 3A)。为了测试 CRISPR/Cas9 系统的作用,我们选择一个假定聚酮合酶 (PKS) 的基因 *albA* 为黑曲霉的靶基因。*albA* 编码的 PKS 是合成黑色素的第一个

关键酶,其突变体为可见的分生孢子白化表型。根据方法 1.2.1 构建靶向质粒 pFC332_*albA*-sgRNA (表 3),转化黑曲霉菌株 AnP1.0,通过孢子颜色的变化来检测 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑效率。

为了测试 sgRNA 表达盒是以片段形式还是以质粒形式存在基因编辑效率高,我们测试了两种方法:一种是用 sgRNA-*albA* 表达盒片段与 pFC332 质粒共转化,另一种将 sgRNA-*albA* 表达盒片段插入到 pFC332 中构建成 pFC332_*albA*-sgRNA 质粒进行转化。然后随机从潮霉素筛选平板上各随机挑取转化子接种到 MM 抗性平板上培养并观察孢子颜色 (图 2B)。结果表明:当用 sgRNA-*albA* 表达盒片段与 pFC332 质粒共转化时,70 个转化子中仅一个转化子的孢子颜色变成灰白色 (图 2B 红圈所示),*albA* 的基因编辑效率仅为 1.4%;而用 pFC332_*albA*-sgRNA 质粒进行转化时,59 个转化子的孢子颜色全部变成了灰白色,*albA* 的基因编辑效率达到了 100%,说明将 sgRNA 表达盒克隆到 pFC332 质粒中进行转化的基因编辑方式明显优于线性片段 sgRNA 表达盒与 pFC332 共转化的基因编辑方式,这可能与黑曲霉转化困难和线性片段在胞内容易被降解有关^[17-18]。当 sgRNA-*albA* 表达盒片段与 pFC332 质粒共

转化时共有 70 个转化子,在潮霉素抗性平板上均能生长但 69 个转化子孢子颜色仍表现为黑色,说明质粒已经转入但未完成基因编辑。因此,在后续的基因编辑实验中,采用 sgRNA 表达盒克隆到 pFC332 质粒上进行。随机挑取部分转化子提取基因组,用引物 AlbA 100 F 和 AlbA 100 R 进行 PCR 扩增靶位点区域,并进行测序验证,结果如图 2A 所示:靶位点区域都发生了基因突变,基因编辑方式是部分碱基插入或碱基缺失突变。其中 21 号和 42 号菌株基因组测序结果显示,靶位点处缺失 7 个碱基,30 号菌株的靶基因测序靶位点处插入一个碱基,均发生了移码突变。挑选一个已测序的转化子在 MM 无抗平板传代丢失质粒,如方法 1.2.4 所示,经两次无抗平板传代后,约有 85% 的转化子丢失质粒 (12/14),挑选一个质粒丢失的转化子保存为 AnP1.1,用于后续的基因编辑。

2.2 *kusA* 基因敲除菌株的构建

kusA 编码的 Ku70 蛋白是 DNA 双链断裂修复 NHEJ 途径的关键蛋白,研究表明, *kusA* 基因的敲除可造成 NHEJ 修复途径缺陷,有助于提高丝状真菌的同源重组效率^[16]。本研究通过敲除 *kusA* 基因构建 NHEJ 缺陷型菌株,提高了菌株的同源重组效率。

表 3 本研究所构建的质粒

Table 3 Plasmids constructed in this study

Plasmid name	Gene name	An# (gene)	Target sequences	PAM	References
pUC57_ <i>albA</i> -sgRNA	<i>albA</i>	An09g05730	AGTGGGATCTCAAGAACTAC	TGG	This study
pUC57_ <i>kusA3</i> -sgRNA	<i>kusA</i>	An15g02700	TGATGATAAGACCCTACGGT	CGG	This study
pUC57_ <i>kusA1</i> -sgRNA	<i>kusA</i>	An15g02700	AGAAAGGCATATAAGTTCGG	TGG	This study
pUC57_ <i>priT</i> -sgRNA	-	-	AGATGTGATCTAGATCCGCG	CGG	This study
pFC332_ <i>albA</i> -sgRNA	<i>albA</i>	An09g05730	AGTGGGATCTCAAGAACTAC	TGG	This study
pFC332_ <i>kusA3-1</i> -sgRNA	<i>kusA</i>	An15g02700	TGATGATAAGACCCTACGGT	CGG	This study
			AGAAAGGCATATAAGTTCGG	TGG	
pFC332_ <i>priT</i> -sgRNA	-	-	AGATGTGATCTAGATCCGCG	CGG	This study

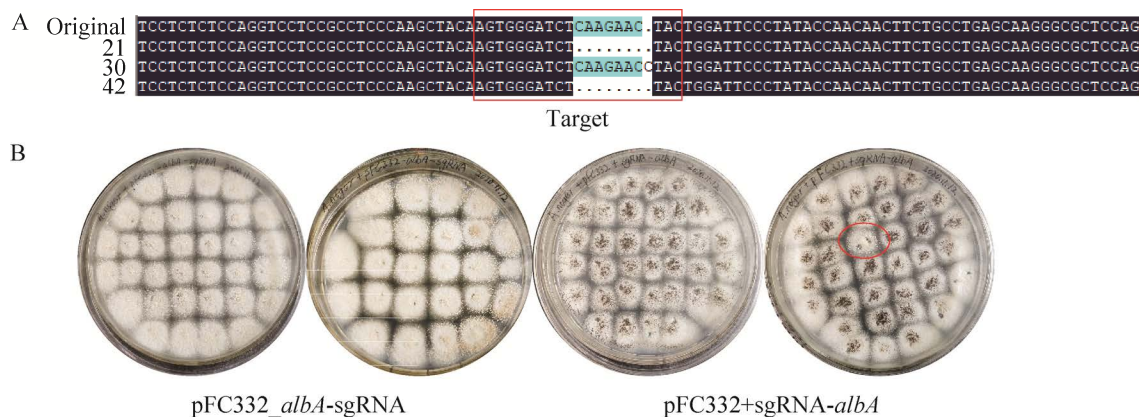


图 2 *alba* 基因的编辑 A: 转化子 *alba* 基因部分序列比对; B: 转化子菌落颜色。左: 用 pFC332_ *alba*-sgRNA 质粒进行转化后转化子; 右: pFC332 和 sgRNA 表达盒片段共转化后的转化子

Figure 2 Genome editing of *A. niger* at *alba* site. (A) Alignment of partial sequences of *alba* gene. (B) The colony color of transformants. Left: transformants for pFC332_ *alba*-sgRNA; right: transformants for pFC332 and sgRNA cassette.

kusA 基因敲除选择双靶点策略, 断裂两个位点, 产生两个双链断裂缺口, 同时整合上无选择标记的供体 DNA 片段 (图 3C)。供体 DNA 片段选取两断裂位点左右各 100 bp 同源臂, 中间加上一个 23 bp 的靶点序列 prtT (20 bp 核苷酸序列和 PAM 序列), 构建成同源重组片段 DR-prtT-DR。将质粒 pFC332_ *kusA3-1*-sgRNA 和同源重组片段 DR-prtT-DR 共同转化到 AnP1.1 菌株中, 随机挑选 6 个转化子提取基因组, 用引物 DFkusA F 和 DRkusA R PCR 扩增验证。若发生了同源重组, PCR 后琼脂糖凝胶电泳条带为 223 bp, 否则条带为 730 bp。电泳结果如图 3B 所示, 其中, 3 个转化子条带在 250 bp 左右, 发生同源重组修复。表明在 NHEJ 非缺陷的条件下, 该菌株发生同源重组的效率为 50%。随机选取已同源重组的菌株测序验证, 测序比对结果显示, prtT 靶点序列已正确整合到基因组的 *kusA* 基因位点 (图 3F), 表明 *kusA* 基因被敲除, NHEJ 修复缺陷型菌株构建成功。按方法 1.2.4 传代丢失质粒, 获得

NHEJ 缺陷菌株 AnP2.1。

2.3 NHEJ 缺陷株同源重组效率验证

为了检测 AnP2.1 菌株的同源重组效率, 本研究在基因组的 prtT 位点整合一段无选择标记的 *kusA* 基因片段 (图 3D)。将质粒 pFC332_ prtT-sgRNA 和供体 *kusA* (730 bp) 转入菌株 AnP2.1, 挑取所有转化子提取基因组, 用引物 DFkusA F 和 DRkusA R PCR 扩增验证。琼脂糖凝胶电泳结果如图 3E 所示, 所有转化子条带在 730 bp 左右, 表明转化子均已整合上供体 DNA, 发生同源重组效率为 100%。实验结果表明, NHEJ 缺陷型菌株在使用本研究构建的高效的 pFC332/5S rRNA-sgRNA 基因编辑系统, 同时提供 730 bp 的供体 DNA 片段的条件下, 菌株发生同源重组的效率为 100%。

2.4 供体 DNA 同源臂长度的优化

为探究不同长度同源臂的供体 DNA 对基因编辑的影响, 本研究设计了不同长度同源臂的供体 DNA 进行转化实验。在上述 2.3 中的供体 *kusA* 的同源臂分别缩短至 60、40 和 20 bp,

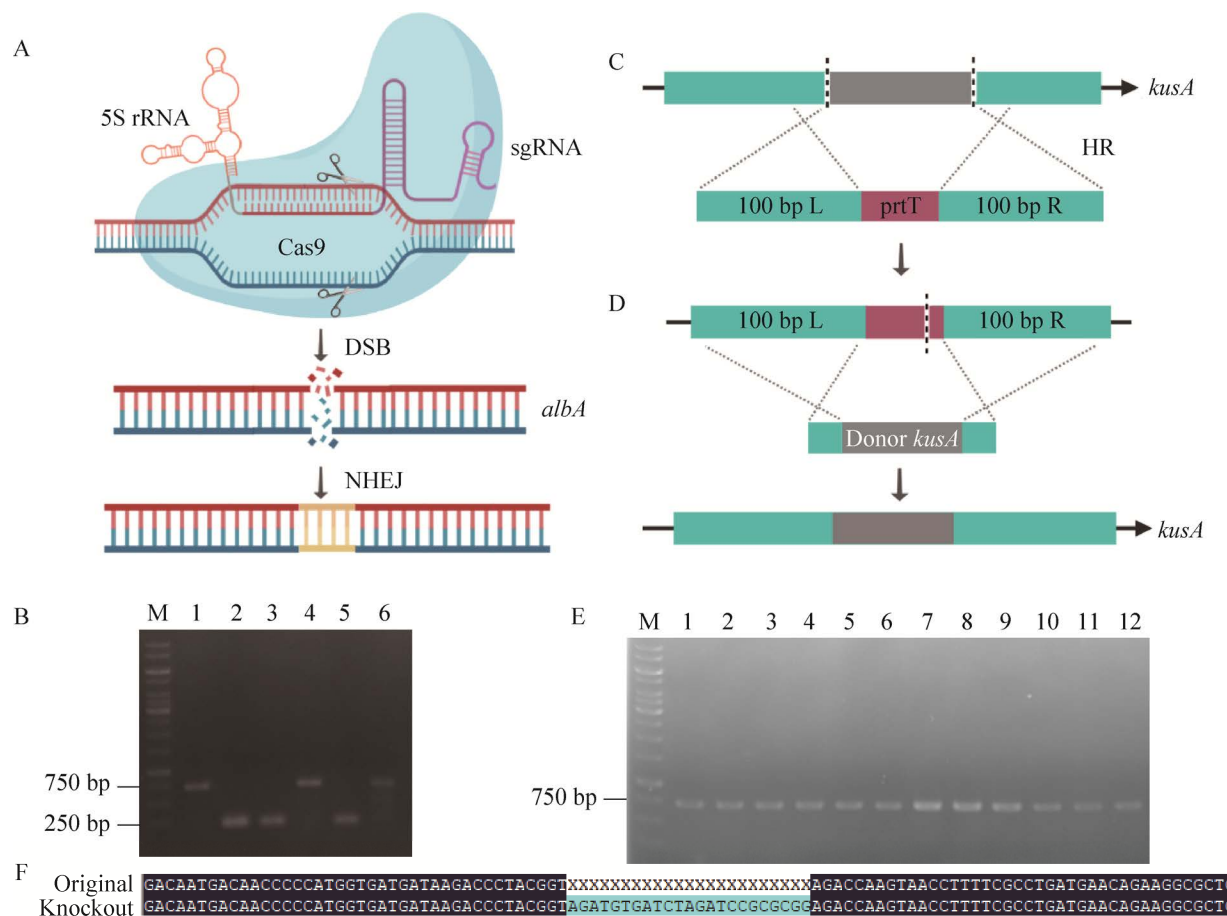


图3 基因编辑策略及验证 A: *alba* 基因编辑示意图; B: *kusA* 基因敲除验证; C: *kusA* 基因敲除策略; D: NHEJ 缺陷型菌株同源重组示意图; E: *kusA* 基因同源重组的 PCR 验证; F: *prtT* 靶点测序比对图。X 代表敲除的基因序列。图 A、C 和 D 用 BioRender.com 在线制作

Figure 3 *A. niger* genome editing strategies and validation. (A) Schematic diagram of the *alba* gene editing. (B) Diagnostic PCR of the *kusA* locus. (C) The knockout strategy of *kusA* gene. (D) Schematic diagram of homologous recombination of NHEJ-deficient strain. (E) Diagnostic PCR of the *kusA* locus homologous recombination. (F) Alignment of partial sequences of *prtT*. X: knockout sequence. Figure A, C and D were created with BioRender.com.

再次转化 AnP2.1。培养 4 d 后观察，共转化不同长度同源臂的供体片段。在供体片段浓度相同的条件下，获得的转化子数量不同，同源臂长度越长，转化子的数量越多。挑取不同长度同源臂的所有转化子提取基因组，分别用 D60*kusA* F / D60*kusA* R、D40*kusA* F / D40*kusA* R 和 D20*kusA* F / D20*kusA* R 进行 PCR 验证，若整合上供体 DNA，正确条带大小分别为

650、610、570 bp。琼脂糖凝胶电泳结果如图 4 所示，所有转化子条带均显示已整合上供体 DNA。在提供 60、40、20 bp 同源臂的无筛选标记的供体 DNA 片段条件下，菌株发生同源重组概率均为 100%。表明本研究构建的 CRISPR/Cas9 系统，即使采用 20 bp 长度的同源臂供体 DNA，也可以进行高效的无痕基因组编辑。



图4 不同长度同源臂供体 DNA 的转化子 PCR 验证 1–10: 60 bp 同源臂; 11–17: 40 bp 同源臂; 18–19: 20 bp 同源臂

Figure 4 Diagnostic PCR of the transformants edited with homologous arms of different length. Lane 1–10: 60 bp homologous arms. Lane 11–17: 40 bp homologous arms. Lane 18–19: 20 bp homologous arms.

3 讨论

黑曲霉是一类重要的丝状真菌,在重组蛋白的分泌表达、次级代谢产品的生产和环境污染治理等方面都具有重要的应用价值。构建成熟高效的黑曲霉基因编辑系统对我们挖掘其潜在的应用价值具有重要意义。本研究利用 5S rRNA 启动子启动 sgRNA 的高效表达,构建了一个基于 AMA1 复制起始片段的 sgRNA 和 Cas9 共表达质粒,用该质粒转化黑曲霉菌株进行基因编辑时,基因编辑效率达到 100%。但是,若要整合一个外源供体 DNA 片段到目的基因位点时,定点整合的基因编辑效率降低到了 50%,这可能是由于黑曲霉中 NHEJ 修复优先于 HR 修复所致。为了提高同源重组效率,进一步敲除了黑曲霉基因组中的 *kusA* 基因,构建一株 NHEJ 修复缺陷型的高效同源重组菌株 AnP2.1。当 sgRNA 和 Cas9 的共表达质粒与同源臂长度为 20 bp 的无选择标记供体 DNA 共转化 NHEJ 修复缺陷菌株 AnP2.1 时,外源供体 DNA 可以高效地整合到目的基因位点,而且定点整合的基因编辑效率也达到了 100%。表明本研究建立了一种高效无选择标记的黑曲霉基因组编辑方法。该方法不仅实现了高效无选择标记的基因组编辑,还极大地缩

短了供体 DNA 片段同源臂的长度,利用一对引物即可构建出含有上下游同源臂的供体 DNA 片段,简化了供体 DNA 片段的构建过程。需要注意的是,在加入等量供体 DNA 片段的条件下,同源臂长度越短,转化子数量越少。当使用 20 bp 同源臂的供体 DNA 进行基因编辑时,增加供体 DNA 的量可以提高转化子的数量。

本研究构建的黑曲霉 CRISPR/Cas9 系统中, Cas9 表达盒和 sgRNA 表达盒在同一个载体共表达,与 sgRNA 表达盒片段和 Cas9 表达质粒共转化宿主细胞相比,基因编辑效率更高,这可能是由于 Cas9 和 sgRNA 表达盒位于同一载体上时,保证它们同时转化入宿主细胞并实现高效表达,并防止 sgRNA 表达盒片段单独转化时的降解。黑曲霉转化相对来说比较困难,当 sgRNA 表达盒片段与携带有筛选标记的 Cas9 表达盒质粒共转化时,抗性平板只能筛选出转入了携带抗性标记的 Cas9 表达盒质粒,而无法保证 sgRNA 表达盒片段是否转入宿主细胞。这个表达盒片段是否转入到宿主菌株以及转入量的多少,都会影响基因编辑效率^[9,21]。此外,胞内存在大量的核酸酶,线性的 sgRNA 表达盒片段在胞内容易降解,导致基因编辑效率降低^[22]。5S rRNA 启动子是一个基因内启动子,

5'末端融合有 5S rRNA 启动子的 sgRNA 模板序列可以被 RNA 聚合酶 III 高效识别并大量转录^[23], 而且 5S rRNA 融合在 sgRNA 的 5'端不影响 Cas9-sgRNA 复合物的形成与功能^[9], 这可能是 5S rRNA 启动子启动 sgRNA 的表达可有效提高基因编辑效率的关键因素之一。本系统还设计了一个含有 *Bgl* II 和 *Bam* H I 同尾酶的中间质粒 pUC57-sgRNA, 通过这对同尾酶可以简单高效地进行多个 sgRNA 表达盒的串联, 从而构建含有多个 sgRNA 表达盒的 sgRNA 和 Cas9 共表达质粒, 实现多基因的同时编辑。

利用 CRISPR/Cas9 技术进行基因组编辑时, 为了筛选出目的转化子, 一般需要在编辑的基因位点插入选择标记基因以增加基因编辑的效率^[8-9,24]。由于真菌的选择标记有限, 若要进行多个基因的连续编辑, 标记的去除大大地增加了工作量和难度, 且工业生产菌株的改造需尽量避免在基因组中累积选择标记或构建营养缺陷型菌株。本研究构建了一个高效率无选择标记的编辑系统, 它既不需要在基因组中整合选择标记, 也不产生营养缺陷型菌株, 可轻松实现多个基因的连续编辑, 适宜于工业生产菌株的构建。

REFERENCES

- [1] Jin HX, OuYang XK, Hu ZC. Enhancement of epoxide hydrolase production by ⁶⁰Co gamma and UV irradiation mutagenesis of *Aspergillus niger* ZJB-09103. *Biotechnol Appl Biochem*, 2017, 64(3): 392-399.
- [2] Wang SY, Jiang BL, Zhou X, et al. Study of a high-yield cellulase system created by heavy-ion irradiation-induced mutagenesis of *Aspergillus niger* and mixed fermentation with *Trichoderma reesei*. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144233.
- [3] Meyer V, Fiedler M, Nitsche B, et al. The cell factory *Aspergillus* enters the big data era: opportunities and challenges for optimising product formation. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2015, 149: 91-132.
- [4] Behera BC. Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview. *Crit Rev Microbiol*, 2020, 46(6): 727-749.
- [5] 郑小梅, 郑平, 孙际宾. 基于 CRISPR/Cas 系统的黑曲霉基因组编辑技术. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 980-990.
Zheng XM, Zheng P, Sun JB. CRISPR/Cas-based genome editing in *Aspergillus niger*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(3): 980-990 (in Chinese).
- [6] 郑小梅, 张晓立, 于建东, 等. CRISPR-Cas9 介导的基因组编辑技术的研究进展. *生物技术进展*, 2015, 5(1): 1-9, I0003, F0003.
Zheng XM, Zhang XL, Yu JD, et al. CRISPR-Cas9-based genome engineering. *Curr Biotechnol*, 2015, 5(1): 1-9, I0003, F0003 (in Chinese).
- [7] Gao YB, Zhao YD. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56(04): 343-349.
- [8] Zheng XM, Zheng P, Sun JB, et al. Heterologous and endogenous *U6* snRNA promoters enable CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Aspergillus niger*. *Fungal Biol Biotechnol*, 2018, 5: 2.
- [9] Zheng XM, Zheng P, Zhang K, et al. 5S rRNA promoter for guide RNA expression enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(7): 1568-1574.
- [10] Gems D, Johnstone IL, Clutterbuck AJ. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene*, 1991, 98(1): 61-67.
- [11] Verdoes JC, Punt PJ, 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*. *Gene*, 1994, 146(2): 159-165.
- [12] Aleksenko A, Clutterbuck AJ. Autonomous plasmid replication in *Aspergillus nidulans*: AMA1 and MATE elements. *Fungal Genet Biol*, 1997, 21(3): 373-387.
- [13] Pohl C, Kiel JAKW, Driessen AJM, et al. CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(7): 754-764.
- [14] Van Leeuwe TM, Arentshorst M, Ernst T, et al. Efficient marker free CRISPR/Cas9 genome editing for functional analysis of gene families in filamentous

- fungi. Fungal Biol Biotechnol, 2019, 6: 13.
- [15] Vanegas KG, Jarczynska ZD, Strucko T, et al. Cpf1 enables fast and efficient genome editing in *Aspergilli*. Fungal Biol Biotechnol, 2019, 6: 6.
- [16] Meyer V, Arentshorst M, El-Ghezal A, et al. Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger kusA* mutant. J Biotechnol, 2007, 128(4): 770-775.
- [17] Krappmann S, Sasse C, Braus GH. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end-joining-deficient genetic background. Eukaryot Cell, 2006, 5(1): 212-215.
- [18] Takahashi T, Masuda T, Koyama Y. Enhanced gene targeting frequency in Ku70 and Ku80 disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. Mol Genet Genomics, 2006, 275(5): 460-470.
- [19] Arentshorst M, Ram AF, Meyer V. Using non-homologous end-joining-deficient strains for functional gene analyses in filamentous fungi. Methods Mol Biol, 2012, 835:133-150.
- [20] Nødvig C S, Nielsen JB, Kogle ME, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. PLoS One, 2015, 10(7): e0133085.
- [21] 姚善涇, 蔡礼年, 林东强. 黑曲霉作为分泌蛋白细胞工厂的研究进展. 化工学报, 2019, 70(10): 3690-3703. Yao SJ, Cai LN, Lin DQ. Progress in *Aspergillus niger* as cell factory for secretory proteins. CIESC J, 2019, 70(10): 3690-3703 (in Chinese).
- [22] Huang CY, Guo LW, Wang JG, et al. Efficient long fragment editing technique enables large-scale and scarless bacterial genome engineering. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(18): 7943-7956.
- [23] Ciganda M, Williams N. Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011, 2(4): 523-533.
- [24] Dong HZ, Zheng JW, 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 Microbiol Methods, 2019, 163: 105655.

(本文责编 郝丽芳)