

研究报告



基于 CRISPR-Cas9 技术构建橡胶树胶孢炭疽菌的基因敲除系统

郭燕华 安邦*

海南大学热带作物学院 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室 海南 海口 570228

摘要:【背景】CRISPR-Cas9 基因组编辑技术为病原真菌的基因敲除、敲入及定点编辑提供了新的思路。【目的】建立适用于橡胶树胶孢炭疽菌的 CRISPR-Cas9 基因敲除系统。【方法】通过大肠杆菌原核表达系统合成含有细胞核定位信号的 Cas9 蛋白; 以 *URA5* 为靶标基因, 预测该基因中 Cas9 的切割位点, 并在体外转录合成相应的 SgRNA; 体外构建 Cas9-SgRNA 复合体, 并将该复合体转入橡胶树胶孢炭疽菌原生质体; 通过表型筛选及测序鉴定, 筛选 *URA5* 的敲除突变体菌株。【结果】体外表达的 Cas9 蛋白与 SgRNA 能够形成复合体, 并在体外对目标基因 *URA5* 的 DNA 序列进行切割; Cas9-SgRNA 复合体能够成功转入橡胶树胶孢炭疽菌原生质体, 并完成对 *URA5* 的敲除; 敲除突变株表现出尿嘧啶缺陷表现型。【结论】建立了适用于橡胶树胶孢炭疽菌的基因敲除系统。

关键词: CRISPR-Cas9, 橡胶树胶孢炭疽菌, 基因敲除

CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein-mediated gene knock-out in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*

GUO Yan-Hua AN Bang*

Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: [Background] Genome editing with CRISPR-Cas9 technique may provide some new ways for gene knock-out, knock-in and gene editing in fungal pathogens. [Objective] To construct a system for gene editing in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*. [Methods] Cas9 containing the nuclear localization signal peptide was expressed in *Escherichia coli* and purified. Potential cleavage sites of *URA5* was analyzed and an SgRNA was transcribed *in vitro*. The Cas9 protein and SgRNA were assembled *in vitro* to form a ribonucleoprotein. The ribonucleoprotein was transformed into the protoplast of *C. gloeosporioides* and the transformants were screened. [Results] The Cas9 protein and SgRNA could form a stable ribonucleoprotein and this complex showed high DNA cleavage activity *in vitro*. The ribonucleoprotein was transformed into the protoplast of *C. gloeosporioides* and *URA5* was successfully knocked out. [Conclusion] The system is convenient for gene editing in *C. gloeosporioides*

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31571967, 31560044); Natural Science Foundation of Hainan Province (319QN166)

*Corresponding author: E-mail: anbang@hainu.edu.cn

Received: 31-03-2019; Accepted: 30-05-2019; Published online: 15-07-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31571967, 31560044); 海南省自然科学基金(319QN166)

*通信作者: E-mail: anbang@hainu.edu.cn

收稿日期: 2019-03-31; 接受日期: 2019-05-30; 网络首发日期: 2019-07-15

of *H. brasiliensis*.

Keywords: CRISPR-Cas9, *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*, Gene knock-out

胶孢炭疽菌是引起海南省橡胶树炭疽病害的主要病原菌^[1]。橡胶树胶孢炭疽菌能够侵染橡胶树嫩叶及橡胶树的多个组织,引起橡胶树嫩梢回枯及重复落叶,并严重影响胶乳产量。因此,深入研究该病原真菌致病力分子机制,能够为橡胶树炭疽病的防控提供新的思路。在前期工作中,本课题组已经成功建立了橡胶树胶孢炭疽菌的遗传转化及基因敲除系统,该基因敲除系统采用同源重组策略,能够对基因组中的单一基因进行基因敲除^[2]。但是在病原真菌中,与致病力相关的基因经常呈现出多拷贝的现象,如效应蛋白编码基因等^[3],因此难以采用常规的同源重组策略对这些基因进行敲除。此外,利用同源重组策略对目标基因进行定点突变、编辑等工作时,常常需要进行多次的基因扩增及载体构建工作,耗时较长。

近年来,CRISPR-Cas9 基因组编辑技术的快速发展,极大地促进了遗传学的研究。与传统的基因敲除、敲入技术相比,CRISPR/Cas 技术可以精确地在基因组上对靶标序列进行插入、敲除及定点突变等操作。CRISPR/Cas 系统是存在于细菌和古细菌中的一种获得性免疫机制^[4-5],其中属于 II 型的 CRISPR-Cas9 系统组分较为简单,应用也最为广泛^[6-9]。经过研究人员的研究及改造,CRISPR/Cas 系统已经成为一个有效的基因组编辑系统。CRISPR-Cas9 系统的基本结构包括 tracrRNA (trans-activating-crRNA) 序列区、cas (CRISPR associated system) 基因序列区、crRNA (CRISPR RNA) 序列区^[10]。其中 crRNA 和 tracrRNA 可以形成嵌合 RNA 分子,被称为 SgRNA; 该 SgRNA 能够进一步与 Cas9 蛋白形成核糖核酸-蛋白复合物 (ribonucleoprotein, RNP), 然后与 tracrRNA 序列互补的 DNA 双链结合,并对 DNA 双链进行切割,产生双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs); 之后借助活细胞内的 DNA 修复机制对受损的 DNA 进行修复。DNA 的修复过程主要以两种方式

进行:非同源末端连接(non-homologous DNA end joining, NHEJ)及同源重组修复(homology directed repair, HDR)。NHEJ 是指不依赖于 DNA 同源片段,直接将 DNA 断裂端连接在一起的修复过程;该修复过程保真度较低,在 DNA 连接的过程中易于发生碱基的随机插入或丢失,造成移码突变,从而实现基因失活或目的基因的突变^[11]。HDR 是指在同源片段存在的情况下,通过同源重组方式,同源片段替换受损的基因组区段,从而完成 DNA 的修复;该修复过程具有较高的保真度^[12-13]。在 CRISPR-Cas9 系统的应用中,可以人为地将 tracrRNA-crRNA 设计为具有特定序列的 sgRNA,引导 Cas9 与靶标 DNA 结合并进一步实现基因编辑。

本研究通过体外合成含有细胞核定位信号的 Cas9 蛋白、SgRNA,以及体外构建 Cas9-SgRNA 复合物,并将该复合物转入橡胶树胶孢炭疽菌原生质体等操作,完成对基因组目标基因的敲除及定点突变,建立适用于橡胶树胶孢炭疽菌的基因敲除系统,该系统可为进一步研究胶孢炭疽菌致病力分子机制打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及引物

橡胶树胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) 野生型菌株由本实验室分离保存,并在前期工作中完成该菌株的基因组测序工作。采用 pQE-80L 质粒作为原核表达载体。载体构建过程所使用的大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1 及原核表达所使用大肠杆菌 Transetta(DE3)均购自北京全式金公司。引物合成及 DNA 测序由华大基因公司完成。本研究所使用的引物如表 1 所示。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

DNA 聚合酶 TransStart *FastPfu*、PCR Mix、DNA Marker,北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, Fermentas 公司;

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in the study

Primers name	Primers sequence (5'→3')
NLSCg-F	GGATCCATGCCCCCAAGGCCGCC
NLSCg-R	GTCGACCTTGTAGATGTAAGAAGA
Cas9-F	GTCGACATGGCCCAAGAAGAA
Cas9-R	AAGCTTTTACTTTTCTTTTTTGT
CgU5-TF	CGATGTCCAGGAAGCTCTTGCG
CgU5-TR	TTGGCACCTCAATGATGTCG
CgU5-SR	TTGGCACCTCAATGATGTCG
SgCgU5-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCG AGGGCGGCAACATTGTGTTTTAGAG CTAGAAATAGCAAG
SgRNA-UR	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTT TCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATT TTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC
doCgU5-F	GCCAAGGACCACGGCGAGGGCGGCA ACATTTGATAACGCGCCCTCAAGGG CAAGAAGGTCCTGAT
doCgU5-R	ATCAGGACCTTCTTGCCCTGAGGGG CGCGTTATCAAATGTTGCCGCCCTCGC CGTGGTCCTTGGC

DNA 回收试剂盒、植物基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; 羧苄青霉素、卡那霉素、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)、裂解酶 (lysing enzyme)、聚乙二醇 (PEG-3350), Sigma-Aldrich 公司; 5-氟乳清酸 (5-fluoroorotic acid, 5-FOA)、尿嘧啶、透析袋, 索莱宝公司; RNA 体外转录试剂盒, New England Biolabs 公司; Ni-NTA 琼脂糖珠, Qiagen 公司; 超滤离心管, Millipore 公司; 不含尿嘧啶的氨基酸添加物 (-URA, DO Supplement), Clontech 公司; 常规化学试剂均为国产分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。引物合成及 DNA 测序由华大基因公司完成。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 生化培养箱, 上海博迅实业有限公司。

土豆浸膏培养基购自北京双旋微生物培养基制品厂, 称取粉状试剂 62.5 g, 加蒸馏水至 1 L, pH 自然。

改良 M9 基础培养基(g/L): 磷酸氢二钠 6.0, 磷酸二氢钾 3.0, 不含尿嘧啶的氨基酸添加物 0.77, 蔗糖 2.0, 琼脂粉 20.0, 加蒸馏水至 1 L, pH 自然。

原生质体再生培养基(g/L): 酵母浸粉 2.0, 酸水解酪蛋白 2.0, 蔗糖 200.0, 加蒸馏水至 1 L, pH 自然。

1.3 原核表达载体的构建

以橡胶树胶孢炭疽菌的基因组为模板, 利用引物 NLSCg-F/NLSCg-R 扩增组蛋白 H₂B 的细胞核定位信号肽(nuclear localization sequence, NLS)的编码序列 *NLS_{H2B}*; 以 35S-CAS9-NOS-SK 载体为模板, 利用引物 Cas9-F/Cas9-R 扩增 Cas9 蛋白的编码序列。PCR 反应体系参照 TransStart *FastPfu* 说明书配制: 模板 500 ng, 缓冲液 1×, 正、反向引物各 0.2 μmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *FastPfu* 2.5 U, 加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s (或 90 s), 35 个循环; 72 °C 5 min。之后将两个 PCR 扩增片段分别连入测序载体并进行测序分析。待序列检测无误后, 分别利用 *Bam*H I/*Sal* I 切割 *NLS_{H2B}* 序列、利用 *Sal* I/*Hind* III 切割 Cas9 序列, 并将酶切后的 DNA 序列连入 pQE-80L 质粒的相应位点, 以构建 *NLS_{H2B}*Cas9 融合蛋白的原核表达载体。

1.4 融合蛋白的原核表达及纯化

将构建完成的原核表达载体转入大肠杆菌 *Transtetta*(DE3)菌株, 利用引物 NLSCg-F/Cas9-R 对转化后的阳性菌落进行 PCR 鉴定。挑取生长速率较快的阳性单克隆菌落, 接入含有 100 μg/mL 羧苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 14 h。然后将菌液按照稀释 100 倍的比例转接入 500 mL 新鲜的、含有 100 μg/mL 羧苄青霉素的 LB 培养基中, 继续振荡培养约 4–6 h, 期间测定菌液浓度。待菌液的 *OD*₆₀₀ 达到 0.6 后, 加入 IPTG 并使其终浓度达到 0.3 mmol/L, 再将菌液转入室温 (约 26 °C) 环境中, 160 r/min 诱导培养 5 h。诱导培养结束后, 6 000×g 离心 10 min 收集大肠杆菌菌体, 并将菌体转入研钵, 加液氮研磨破碎细胞, 再用 15 mL 冰冷的裂解缓冲液 (20 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 1 mmol/L imidazole, 1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, pH 7.5) 重悬菌体, 涡旋振荡 30 s, 置于冰上 5 min 后于 4 °C、12 000×g 离心 30 min, 收集上清溶液, 并用 0.22 μm 的滤器过滤除去残余细胞杂质。将诱导前的大肠杆菌菌体、诱导

并破碎后的细胞菌体沉淀组分以及诱导并破碎后细胞菌体可溶组分取 10 μ L 样品, 并进行 SDS-PAGE 检测, 分析融合蛋白的表达情况。

参照 Qiagen 公司提供的说明书, 在上述上清液中加入 300 μ L 平衡后的 Ni-NTA 琼脂糖珠, 并将混合物在 4 $^{\circ}$ C 下颠倒孵育 3 h; 然后在 4 $^{\circ}$ C、700 \times g 离心 5 min, 小心吸除上清液, 并加入 8 mL 漂洗缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 下轻柔颠倒洗涤 5 min, 同上离心后重复漂洗一次; 最后在 Ni-NTA 琼脂糖珠中加入 2 mL 洗脱缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 下轻柔颠倒洗涤 5 min, 同上离心后再重复洗脱一次, 并将 2 次的洗脱溶液合并后转入透析袋中, 置于 1 L 冰冷的透析液 (20 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 20% glycerol, pH 7.5) 中, 在冰浴条件下透析 6 h。待透析结束后, 小心收集透析袋中的溶液, 并将溶液转入 4 mL 50 kD 规格的超滤离心管中, 4 $^{\circ}$ C、2 000 \times g 离心 10–15 min, 待超滤离心管上层溶液体积达到 0.5 mL 后, 将上层溶液转入 1.5 mL 离心管中, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。将诱导并破碎后细胞菌体可溶组分, 以及透析后的蛋白溶液取 10 μ L 样品进行 SDS-PAGE 检测, 分析融合蛋白的纯化情况。

1.5 SgRNA 的设计及体外转录

使用 SgRNA 在线预测软件 ChopChop^[14] 预测目标基因可用的 SgRNA 序列, 在预测结果中选择切割效率较高且在目标基因序列中位置靠前的 SgRNA; 之后将预测到的 SgRNA 序列在胶孢炭疽菌基因组中进行 BLAST 分析, 排除多位点结合的 SgRNA 以降低脱靶率。选择胶孢炭疽菌尿嘧啶合成途径中的乳清酸磷酸核糖转移酶的编码基因 (*URA5*) 作为验证本系统的靶标基因; 根据预测所得的 SgRNA 序列以及 Cas9 所必需的 SgRNA 骨架序列, 设计 SgRNA 转录所需的模板 DNA 的扩增引物; 根据胶孢炭疽菌 *URA5* 序列及预测所得的 SgRNA 序列, 设计引物对 SgCgU5-F/SgRNA-UR 通过 PCR 扩增该序列。PCR 反应体系参照 TransStart *FastPfu* 说明书配制: 缓冲液 1 \times , 正、反向引物各 0.2 μ mol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *FastPfu* 2.5 U, 加

ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。测序分析正确后, 以该 DNA 序列为模板, 使用 RNA 体外转录试剂盒, 参照说明书进行 SgRNA 的体外转录。待转录结束后, 使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 SgRNA 的合成情况。

1.6 SgRNA 与 NLS_{H2B}Cas9 复合体的切割活性检测

为了验证预测所得 SgRNA 是否能够指导 NLS_{H2B}Cas9 蛋白进行目标 DNA 的切割, 首先要进行体外切割活性检测。以橡胶树胶孢炭疽菌的基因组为模板, 利用引物 CgU5-TF/CgU5-TR 扩增出一段 1.8 kb、包含有 *URA5* 及其上下游序列的 DNA 片段, 将该片段作为切割活性检测的切割底物 DNA (DNA PCR fragment)。PCR 反应体系参照 TransStart *FastPfu* 说明书配制: 模板 200 ng, 缓冲液 1 \times , 正、反向引物各 0.2 μ mol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, *FastPfu* 2.5 U, 加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。然后将 SgRNA、NLS_{H2B}Cas9 以及 10 \times 的反应缓冲液 (200 mmol/L HEPES, 1 mol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L EDTA, pH 6.5) 按照表 2 所示配制酶切体系并进行酶切反应。酶切检测分两步进行, 首先在 26 $^{\circ}$ C 条件下将 SgRNA 与 NLS_{H2B}Cas9 蛋白共同孵育 10 min, 使其形成复合体; 然后在反应体系中加入 5 μ L 切割底物 DNA, 并于 37 $^{\circ}$ C 条件下酶切 1 h。酶切结束后, 在酶切体系中加入 1 μ L 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 15 min 后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

表 2 体外切割活性检测体系

Table 2 *In vitro* cleavage assay

Reagents	Volume
10 \times Reaction buffer	3 μ L
NLS _{H2B} Cas9	200 ng
SgRNA	40 ng
DEPC H ₂ O	Up to 25 μ L
26 $^{\circ}$ C, incubation for 10 min	
Add DNA PCR fragment	5 μ L
37 $^{\circ}$ C, incubation for 1 h	

1.7 橡胶树胶孢炭疽菌原生质体的制备及转化

橡胶树胶孢炭疽菌原生质体的制备及转化参照文献[2]所述方法进行。将野生型菌株接种到 PDA 培养基上, 28 °C 培养 7 d。然后使用无菌水收集分生孢子, 使用无菌滤膜除去菌丝体。再将孢悬液接种于 200 mL 液体培养基中, 使得孢子初始浓度为 10^5 个/mL, 将孢子在 28 °C、160 r/min 振荡培养 14–16 h。采用无菌滤膜收集菌丝体, 并将菌丝体转移到含 10 mg/mL 裂解酶的 1 mol/L 山梨醇缓冲液中, 28 °C、100 r/min 培养 3 h 以降解菌丝体细胞壁。然后在冰浴条件下, 使用无菌滤膜过滤收集原生质体, 在 4 °C、2 000×g 条件下离心 10 min 收集原生质体, 并用冰冷的 1 mol/L 山梨醇缓冲液冲洗 2 次除去残余酶液。最后用山梨醇缓冲液将原生质体浓度调整至 10^8 个/mL。此外, 在原生质体制备结束前 15 min, 开始制备 SgRNA 与 NLS_{H2B}Cas9 的复合体。

采用两种 DNA 切割及修复方式构建目标基因的敲除突变体, 原理如图 1 所示。(1) 非同源末端连接(NHEJ): 将 10 倍反应缓冲液、2 μg 的 NLS_{H2B}Cas9 与 1 μg 的 SgRNA 按比例混合, 并在室温下孵育 15 min, 用于后续原生质体转化。(2) 同源重组修复(HDR): 准备用于切口修复的双链供体 DNA, 该 DNA 链序列中含有切割位点处上下游各 30 bp 的同源序列以及两个终止密码子。将

2 μg 的供体 DNA、10 倍反应缓冲液、2 μg 的 NLS_{H2B}Cas9、1 μg 的 SgRNA 按比例混合, 并在室温下孵育 15 min, 用于后续原生质体转化。

待原生质体制备结束后, 将上述 SgRNA、NLS_{H2B}Cas9 的复合体或 SgRNA、NLS_{H2B}Cas9、供体 DNA 的复合体溶液分别加入原生质体中, 轻柔混匀, 并于冰上放置 20 min。然后在混合物中缓慢加入 1 mL 含 40% PEG 的山梨醇缓冲液, 颠倒混匀, 于 28 °C 放置 20 min。待转化完成后, 在转化混合物中加入 5 mL 液体再生培养基, 28 °C、100 r/min 再生培养 5 h。之后在培养物中加入处于熔化状态、温度在 50 °C 左右、含 1% 琼脂的固体再生培养基, 混匀后平铺于培养皿中。待培养基凝固后, 再在其上平铺含 2 g/L 的 5-FOA、20 μg/L 尿嘧啶及 20 μg/L 尿苷的 M9 基础培养基。将培养皿置于 28 °C 培养 4–5 d, 期间观察转化子的生长情况。

1.8 突变株的筛选及检测

待再生培养基上长出转化子后, 将每个转化子同时转接到含有 5-FOA 的 M9 基础培养基以及含有 5-FOA、20 μg/L 尿嘧啶、20 μg/L 尿苷的 M9 基础培养基中进行二次筛选。能够在添加尿嘧啶和尿苷的培养基中生长而不能在不含尿嘧啶和尿苷的培养基中生长的菌株为阳性转化子。之后挑取阳性转化子的菌丝体, 采用植物基因组提取试剂盒提取其基因组 DNA 并进行 PCR 扩增及测序鉴定。

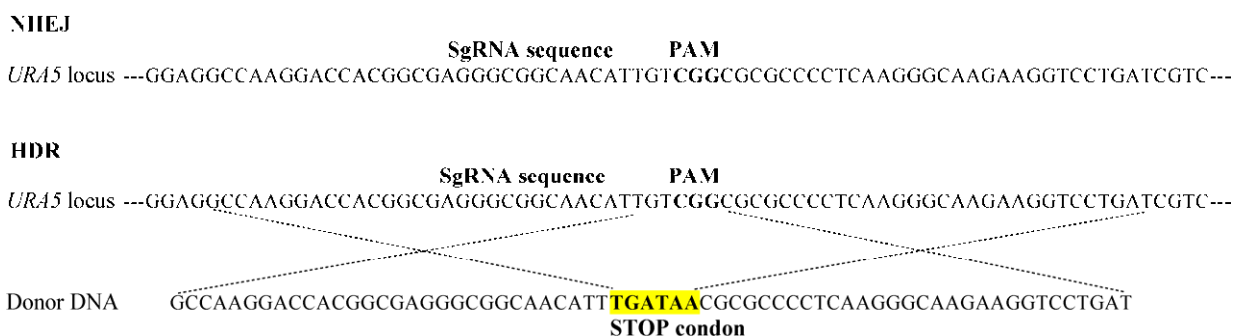


图 1 *URA5* 的 SgRNA 结合位点及其供体 DNA 重组位点示意图

Figure 1 Schematic illustration of the SgRNA binding site and donor DNA for *URA5* mutagenesis

注: NHEJ: 非同源末端连接; HDR: 同源重组修复。

Note: NHEJ: Non-homologous end joining; HDR: Homology directed repair.

利用引物对 CgU5-TF/CgU5-TR 扩增待测片段,再利用测序引物 CgU5-SR 检测片段中碱基缺失及插入情况,并依据测序结果分析突变体基因缺失情况。PCR 反应体系参照 PCR Mix 说明书配制:模板 200 ng,正、反向引物各 0.2 $\mu\text{mol/L}$,PCR Mix 10 μL ,加 ddH₂O 至 20 μL 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.9 突变株的表型分析

将野生型菌株及 *URA5* 的敲除突变株分别接种到 M9 基础培养基,含 2 g/L 5-FOA 的 M9 基础培养基,以及含 2 g/L 5-FOA、20 $\mu\text{g/L}$ 尿嘧啶、20 $\mu\text{g/L}$ 尿苷的 M9 基础培养基中,培养 4 d 并观测菌落的生长情况。

2 结果与分析

2.1 NLS_{H2B}Cas9 蛋白的原核表达及纯化

为了使 Cas9 蛋白能够顺利跨膜并进入胶孢炭疽菌的细胞核中,将组蛋白 H₂B 的一段细胞核定位信号肽(NLS_{H2B})与 Cas9 蛋白进行融合表达。NLS_{H2B} 信号肽的 DNA 编码序列为 162 bp,编码一段 5.7 kD 的肽段。以含有酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 基因的 35S-CAS9-NOS-SK 质粒为模板,扩增 4 203 bp Cas9 编码基因,编码一段 161.6 kD 的肽段。在将含有融合表达载体的大肠杆菌菌株诱导表达 5 h 后,NLS_{H2B}Cas9 融合蛋白的表达量显著提高;此外,NLS_{H2B}Cas9 融合蛋白主要分布于细胞裂解后的上清液中(图 2),说明该蛋白为可溶蛋白。在使用 Ni-NTA 琼脂糖纯化、透析、超滤离心管浓缩后,获得了纯度较高的 NLS_{H2B}Cas9 融合蛋白,可以用于下一步实验。

2.2 SgRNA 的体外转录

为了能够获得具有较高切割效率的 SgRNA,首先采用 ChopChop 软件及 BLAST 分析对胶孢炭疽菌 *URA5* 基因序列中可能存在的 SgRNA 切割位点进行了预测,结果预测到了一条具有较高切割活性的 SgRNA,其序列为 GGCGAGGGCGCAACATTGT;

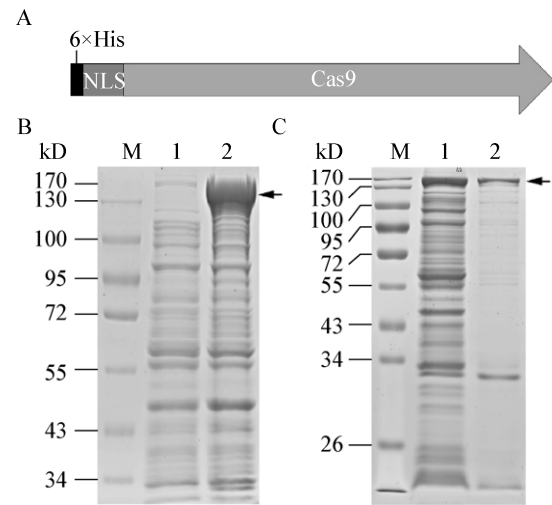


图 2 NLS_{H2B}Cas9 融合蛋白的表达纯化

Figure 2 Protein expression and purification assay

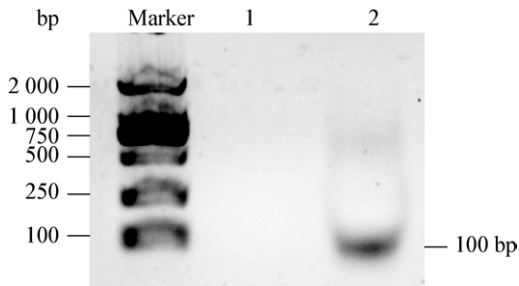
注: A: NLS_{H2B}Cas9 融合蛋白的结构图。B: 融合蛋白的诱导表达情况检测: 1: 诱导前的细菌菌体总蛋白; 2: 诱导后的细菌菌体总蛋白。C: Ni-NTA 纯化情况检测: 1: 诱导并破碎后的菌体可溶蛋白组分; 2: 纯化并透析后的蛋白溶液。M: 蛋白 Marker。

Note: A: Structure chart of His-NLS_{H2B}Cas9. B: Protein induction assay: 1: Total cell protein before induction; 2: Total cell protein after induction. C: Protein expression and purification assay: 1: Soluble protein before purification; 2: Soluble protein after purification. M: Protein marker.

该 SgRNA 位于 *URA5* 编码序列的 349–369 bp 处,能够与 *URA5* 的反义链结合。依据 Cas9 蛋白所需要的骨架 RNA 序列,设计了该 SgRNA 转录模板 SgDNA 的引物对 SgCgU5-F/SgRNA-UR,并通过 PCR 扩增及纯化,获得了相应的 123 bp DNA 片段。之后以该 SgDNA 为模板,采用 RNA 体外转录试剂盒进行 SgRNA 的合成。结果表明,以该 DNA 为模板,成功合成出一条目标大小的 SgRNA 链(图 3),可以用于下一步实验。

2.3 SgRNA 与 NLS_{H2B}Cas9 复合体具有 DNA 切割活性

为了验证体外转录获得的 SgRNA 是否能与 NLS_{H2B}Cas9 形成复合体,并进一步完成对靶标 DNA 双链的切割,首先进行了体外切割活性检测分析。实验中选择了包含有 *URA5* 基因的一段 1.8 kb DNA 片段作为切割底物,预测的 SgRNA

图3 *URA5* 的 SgRNA 体外转录**Figure 3** *In vitro* transcription of SgRNA of *URA5*

注: 1: 转录体系中不加入 T7 RNA 聚合酶的阴性对照; 2: 加入 T7 RNA 聚合酶后转录形成的 SgRNA。

Note: 1: Negative control without adding T7 RNA polymerase; 2: Transcript of SgRNA of *URA5*.

切割位点位于该 DNA 的 1.1 kb 处, 因此切割后的产物应该为两条 DNA 条带, 分别为 1.1 kb 和 0.7 kb。切割结果如图 4 所示, 在反应体系中同时加入 SgRNA 和 NLS_{H2B}Cas9 之后, 能够成功切割底物 DNA, 通过分析条带灰度值, 计算得出切割效率大于 97%, 而当在反应体系中只加入 SgRNA 或 NLS_{H2B}Cas9 时, 则不能对底物 DNA 进行切割。因此, 本研究中所使用的 SgRNA 及 NLS_{H2B}Cas9 具有较高的切割活性, 可以用于下一步实验。

2.4 敲除突变体的筛选及检测

通过 SgRNA-Cas9 复合体的体外合成、原生质体转化及筛选, 成功获得了一批转化子。其中通过 NHEJ 方式获得阳性转化子 13 株, 通过 HDR 方式获得阳性转化子 9 株。之后在两类转化子中分别挑取 3 株菌落, 提取其基因组, PCR 扩增其切割位点附近的 DNA 序列并进行测序鉴定, 结果证明成功获得一系列 *URA5* 的不同位点缺失突变株, 并将这些突变株命名为 Δ *URA5*。其中通过 NHEJ 方式获得的突变株 Δ *URA5*-2 和 Δ *URA5*-3, 其 *URA5* 的编码序列分别缺失了 1 个和 12 个碱基, 而 Δ *URA5*-1 的编码序列则增加了 1 个碱基。通过 HDR 方式获得的突变株 Δ *URA5*-14 和 Δ *URA5*-15, 在 *URA5* 编码序列的目标靶标位点插入了 2 个终止密码子, 与预期结果一致; 而 Δ *URA5*-16 突变体除了在目标靶点位置插入了 2 个终止密码子外, 还额外整合了一段同源序列(图 5)。

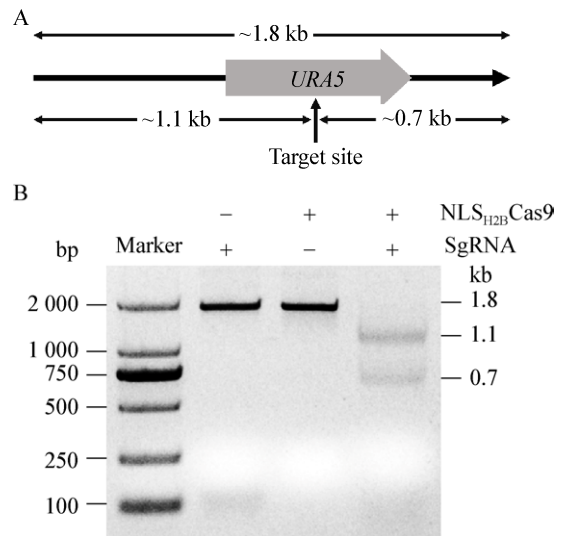


图4 体外切割活性检测

Figure 4 *In vitro* cleavage activity assay

注: A: 底物 DNA 及其切割位点示意图: Target site 为理论切割位点, 箭头所示为预测底物 DNA 切割后条带的大小; B: 体外切割 1 h 后琼脂糖凝胶电泳检测结果: 以 DNA marker 右边算起, 泳道 1 为只加 SgRNA 而不加 NLS_{H2B}Cas9 蛋白的阴性对照 1; 泳道 2 为只加 NLS_{H2B}Cas9 蛋白而不加 SgRNA 的阴性对照 2; 泳道 3 为同时加入 SgRNA 和 NLS_{H2B}Cas9 蛋白的样品。

Note: A: Diagram represents the template length, the sgRNA cleavage site, and the lengths of expected fragments after cleavage; B: Assessment of the cleavage efficiency by gel electrophoresis after incubation for 1 hour: Lane 1 represents negative control with SgRNA but without NLS_{H2B}Cas9; Lane 2 represents negative control with NLS_{H2B}Cas9 but without SgRNA; Lane 3 represents the assay with both NLS_{H2B}Cas9 and SgRNA.

2.5 *URA5* 缺失突变株的表型分析

为了验证 *URA5* 的缺失是否会引起突变株生理表型的变化, 分别将上述获得的两种类型的突变株接种到不同成分的培养基中, 观测其生长表型。结果表明两类 *URA5* 敲除突变株均能在添加 5-FOA、尿嘧啶及尿苷的培养基上生长, 且突变株表现出尿嘧啶营养缺陷型(图 6), 证明 *URA5* 基因被成功敲除。

3 讨论与结论

CRISPR-Cas9 系统在多种动植物以及真菌中得到了广泛应用。在植物病原真菌中, 研究者也对 CRISPR-Cas9 系统的应用进行了研究, 如构

	SgRNA binding site	PAM	
WT	AAGGACCACGGCGAGGGCGGCAACATTGT	CGGCGCGCCCC	TCAAGGGCAAGAAGGTCC
Δ URA5-1	AAGGACCACGGCGAGGGCGGCAACA	TATGT	CGGCGCGCCCC
Δ URA5-2	AAGGACCACGGCGAGGGCGGCAACA	T	GTCGGCGCGCCCC
Δ URA5-3	AAGGACCACGGCGAGGGCGGC	-----	GCCCC
Δ URA5-14	AAGGACCACGGCGAGGGCGGCAACATT	TGATAAC	CGCGCCCC
Δ URA5-15	AAGGACCACGGCGAGGGCGGCAACATT	TGATAAC	CGCGCCCC
Δ URA5-16	AAGGACCACGGCGAGGGCGGCAACATT	TGATAAC	CGCGCCCC
	CGCCCC	TCAAGGGCAAGAAGGTCC	
		STOP codon	
			+1 -1 -12 +6 +6 +37

图5 测序鉴定不同缺失突变体的突变位点

Figure 5 Characterization of individual mutants using PCR and sequencing analysis

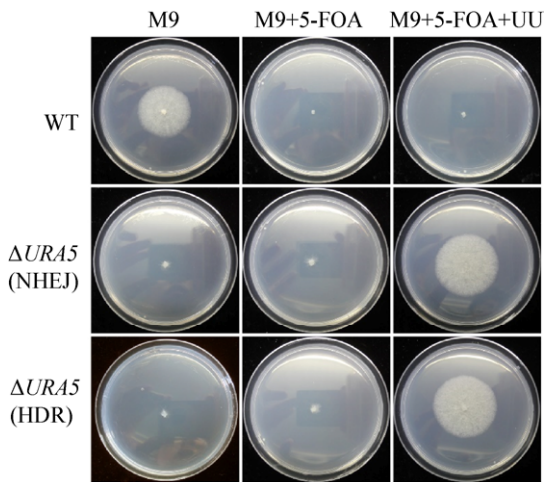


图6 突变体的生长表型分析

Figure 6 The phenotypes of mutants

注: M9 表示 M9 基本培养基; M9+5-FOA 表示添加了 5-氟乳清酸的 M9 基本培养基; M9+5-FOA+UU 表示添加了 5-氟乳清酸、尿嘧啶及尿苷的 M9 基本培养基。

Note: M9 represents M9 medium; M9+5-FOA represents M9 medium supplemented with 5-FOA; M9+5-FOA+UU represents M9 medium supplemented with 5-FOA, uracil and uridine.

巢曲霉^[15]、粗糙脉孢菌^[16]、稻瘟菌^[17]、尖孢镰刀菌^[18]、产黄青霉^[19]等。目前关于 CRISPR-Cas9 系统的应用主要有两种策略:第一种策略是将 Cas9 和 SgRNA 序列整合到目标生物的基因组上,利用生物本身的启动子在其细胞内表达 Cas9 和 SgRNA,并进一步完成对靶标基因的编辑^[20]。然而这种策略具有一定的局限性,如启动子的强弱、Cas9 密码子的选择、在细胞内的表达等,都会对基因编辑的效率及准确性产生影响。此外,细胞内过量表达 Cas9 会易于产生脱靶效应,产生非特异性的基因编辑。第二种策略是在体外表达 Cas9 和 SgRNA,然后以核糖体核蛋白复合体形式导入受

体细胞进行基因组编辑^[21],这种策略具有特异性较高、对细胞毒性较低等优点。但是该策略的应用也具有一定的限制性:首先 Cas9 蛋白分子量较大,跨膜进入受体细胞的效率较低;其次 Cas9 需要与细胞核定位序列进行融合表达,才能准确进入细胞核中。在本研究中,选择第二种策略建立橡胶树胶孢炭疽菌基因敲除系统。为了使 Cas9 蛋白准确进入橡胶树胶孢炭疽菌细胞核中,本研究选择了细胞核组蛋白 H₂B 的细胞核定位序列用于构建融合表达蛋白。生物信息学分析表明胶孢炭疽菌组蛋白 H₂B 的蛋白序列的 N 端第 1-45 位氨基酸为细胞核定位序列 NLS_{H₂B}。因此本研究中选择扩增了 H₂B 的 DNA 序列 5'端 162 bp 序列,该段序列编码一段 5.7 kD 的肽段。通过将该段序列与 Cas9 序列串联连入原核表达载体,构建相应的融合表达蛋白。为了提高原核表达的效率,本研究选择了经过密码子优化的原核表达菌株大肠杆菌 Transetta(DE3)菌株,经过诱导表达,获得了较高表达量的可溶性融合蛋白 NLS_{H₂B}Cas9。之后再通过本课题组前期建立的原生质体转化系统,将 NLS_{H₂B}Cas9 与 SgRNA 的复合体转入胶孢炭疽菌中。

为了检测所建立的系统是否能够有效地进行橡胶树胶孢炭疽菌基因的敲除,本研究中选择了 URA5 作为靶标基因进行基因敲除。URA5 编码真菌尿嘧啶合成途径的关键酶——乳清酸磷酸核糖转移酶,该基因的缺失会导致真菌由野生型变为尿嘧啶依赖型。5-氟乳清酸(5-FOA)是尿嘧啶合成的前体乳清酸的类似物,它能够被尿嘧啶合成途径利用,生成对真菌细胞有毒的 5-氟尿嘧啶,因此

5-FOA 能够用来筛选 *URA5* 的缺失突变型^[22]。通过筛选及测序鉴定, 成功获得了 *URA5* 的敲除突变株 Δ *URA5*。通过在含有不同组分培养基中的生长表型检测, 证明 *URA5* 被成功敲除, 且 NHEJ 和 HDR 两种方式都能够成功获得相应的突变体。其中通过 HDR 方式构建的突变体中, Δ *URA5*-14 和 Δ *URA5*-15 菌株均在目标位点插入了 2 个终止密码子, 而 Δ *URA5*-16 突变体除了目标靶点位置插入了 2 个终止密码子外, 还额外整合了一段序列。经过比对发现, 额外整合的序列为原生质体转化时使用的同源序列中右侧 30 bp 的同源序列, 说明在 Δ *URA5*-16 突变体中, 同源序列与基因组序列重组的过程中, 只有左侧的序列发生了同源重组, 从而导致右侧序列整体插入基因组中。此外, 与 NHEJ 方式相比, HDR 方式能够在基因组序列中引入特定序列, 因此具有更广阔的应用场景, 如基因的点突变、标签基因的插入等^[23]。

本研究通过体外表达 Cas9 蛋白、体外转录 SgRNA 以及 Cas9-SgRNA 复合体转化真菌原生质体, 成功建立了橡胶树胶孢炭疽菌的基因敲除系统, 为该病原真菌致病力的分子机制研究提供了优良的工具。

REFERENCES

- [1] Cai ZY, Huang GX. Research advances in anthracnose of *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Southwest Forestry College, 2011, 31(1): 89-93 (in Chinese)
蔡志英, 黄贵修. 巴西橡胶树炭疽病研究进展[J]. 西南林业大学学报, 2011, 31(1): 89-93
- [2] Wang QN, An B, Hou XR, et al. Dicer-like proteins regulate the growth, conidiation, and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 8: 2621
- [3] Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici VA, et al. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2012, 15(4): 477-482
- [4] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712
- [5] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. Science, 2010, 327(5962): 167-170
- [6] Hwang WY, Fu YF, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 227-229
- [7] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823
- [8] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826
- [9] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 230-232
- [10] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. Cell, 2014, 157(6): 1262-1278
- [11] Bennardo N, Cheng A, Huang N, et al. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair[J]. PLoS Genetics, 2008, 4(6): e1000110
- [12] Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, et al. Brca1 controls homology-directed DNA repair[J]. Molecular Cell, 1999, 4(4): 511-518
- [13] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. Cell, 2013, 154(6): 1380-1389
- [14] Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, et al. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(W1): W401-W407
- [15] Nødvig CS, Nielsen JB, Kogle ME, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133085
- [16] 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
- [17] Foster AJ, Martin-Urdiroz M, Yan X, et al. CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein-mediated co-editing and counterselection in the rice blast fungus[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 14355
- [18] Wang Q, Cobine PA, Coleman JJ. Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. Fungal Genetics and Biology, 2018, 117: 21-29
- [19] Pohl C, Kiel JAKW, Driessen AJM, et al. CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(7): 754-764
- [20] Yan LH, Wei SW, Wu YR, et al. High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using YAO promoter-driven CRISPR/Cas9 system[J]. Molecular Plant, 2015, 8(12): 1820-1823
- [21] Woo JW, Kim J, Kwon SI, et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(11): 1162-1164
- [22] de Montigny J, Belarbi A, Hubert JC, et al. Structure and expression of the *URA5* gene of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular and General Genetics, 1989, 215(3): 455-462
- [23] Zhang C, Meng XH, Wei XL, et al. Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 86: 47-57