

研究报告

基于转化相关重组克隆曲酸合成基因簇及其在黑曲霉中的异源整合表达

赵宇欣, 谭宇洋, 高莹, 朱柏松, 张明怡, 曹威*

天津科技大学 生物工程学院 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 300457

赵宇欣, 谭宇洋, 高莹, 朱柏松, 张明怡, 曹威. 基于转化相关重组克隆曲酸合成基因簇及其在黑曲霉中的异源整合表达[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4028-4042.

ZHAO Yuxin, TAN Yuyang, GAO Ying, ZHU Baisong, ZHANG Mingyi, CAO Wei. Transformation-associated recombination cloning and integrated expression of biosynthetic gene cluster for kojic acid in *Aspergillus niger*[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4028-4042.

摘要:【背景】黑曲霉(*Aspergillus niger*)是一种重要的丝状真菌底盘细胞, 然而对其进行大片段 DNA 的遗传操作存在工具缺乏、效率低下的问题。海量基因组数据中存在大量未被鉴定的次级代谢产物合成基因簇, 因相应 DNA 分子量大而难以克隆, 大部分基因与产物分子之间的映射关系尚未被解析。【目的】开发一种适配黑曲霉的大片段 DNA 分子直接克隆的方法。以直接克隆米曲霉(*Aspergillus oryzae*)来源的曲酸合成基因簇(约30 kb)在黑曲霉底盘细胞中表达, 实现曲酸的异源发酵。【方法】基于转化相关重组(transformation-associated recombination, TAR)克隆, 构建适配黑曲霉转化的 TAR 捕获骨架载体 pSEA-TAR; 将曲酸合成基因簇上下游各 1 kb 同源 DNA 序列先后引入 pSEA-TAR, 中间以唯一的 *Xho* I 相隔, 得到曲酸合成基因簇捕获载体 pSEA-KLR; 随后, 将 *Not* I/*Sbf* I 消化后含有完整曲酸合成基因簇及上下游同源序列的米曲霉基因组与经 *Xho* I 线性化的 pSEA-KLR 共同转化酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) VL6-48, 通过营养缺陷筛选获得成功捕获曲酸合成基因簇的重组子, 提取质粒, 电转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)扩增重组质粒; 借助农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导黑曲霉转化, 对获得的含有曲酸合成基因簇的黑曲霉转化子进行曲酸发酵, 检测曲酸合成水平。【结果】获得了含有 *ARSH4/CEN6*、*TRP1*、*hph* 和 LB/RB-T-DNA repeat 的基于 TAR 克隆、适配黑曲霉表达的大片段 DNA 捕获载体 pSEA-TAR。借助酿酒酵母高效的同源重组系统, 通过同源重组获得含有曲酸合成基因簇的重组质粒 pSEA-TAR-KA, 捕获成功率为 5.9%。对获得的含有曲酸合成基因簇的 10 株黑曲霉重组菌株 KA1–KA10 进行发酵分析发现均成功合成了曲酸, 其中黑曲霉 KA-2 发酵 7 d 后曲酸水平最高, 达到 5.86 g/L。【结论】构建了适配黑曲霉的 TAR 克隆体系, 用于大片段 DNA 高效捕获、重构和表达大型生物合成基因簇。以来源于米曲霉的曲酸合成基因簇捕获及在黑曲霉中成功实现曲酸合成验证了其有效性, 进一步丰富了黑曲霉作为底盘细

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100700)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100700).

*Corresponding author. E-mail: caowei040108@tust.edu.cn

Received: 2024-01-31; Accepted: 2024-04-19; Published online: 2024-05-07

胞在重要化合物绿色生物制造中的作用。

关键词：转化相关重组克隆；大片段 DNA；黑曲霉；曲酸合成基因簇

Transformation-associated recombination cloning and integrated expression of biosynthetic gene cluster for kojic acid in *Aspergillus niger*

ZHAO Yuxin, TAN Yuyang, GAO Ying, ZHU Baisong, ZHANG Mingyi, CAO Wei*

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, School of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Background] *Aspergillus niger* is a commonly used filamentous fungal chassis, whereas the genetic manipulation of large DNA fragments of this fungus lacks tools and is inefficient. The massive genomic data include a large number of unidentified gene clusters for the synthesis of secondary metabolites, which are difficult to be cloned due to the large molecular weights. In addition, the relationships between most genes and products have not been resolved. [Objective] To develop a method for direct cloning of large DNA fragments for *A. niger* and achieve the heterologous production of kojic acid in *A. niger* by cloning and expressing the gene cluster (about 30 kb) for the biosynthesis of kojic acid from *Aspergillus oryzae*. [Methods] Transformation-associated recombination (TAR) cloning was employed to construct the TAR capture backbone vector pSEA-TAR for the transformation of *A. niger*. The homologous DNA sequences (about 1 kb) flanking the gene cluster for the biosynthesis of kojic acid were successively introduced into pSEA-TAR and separated by a unique digestion sequence of *Xho* I. The obtained capture vector pSEA-KLR for the gene cluster was linearized by *Xho* I and transformed into *Saccharomyces cerevisiae* VL6-48 together with the *Not* I/*Sbf* I digested *A. oryzae* genome containing the complete gene cluster as well as the flanking homologous sequences. The recombinants successfully capturing the gene cluster for the biosynthesis of kojic acid were screened by the medium lacking corresponding nutrients. The plasmid was extracted from the recombinant and electroporated into *Escherichia coli* for amplification. The *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method was used for transformation of *A. niger*. The obtained transformants carrying the gene cluster for kojic acid biosynthesis were subjected to fermentation, and the kojic acid titer was measured. [Results] A large DNA fragment capture vector pSEA-TAR was obtained based on TAR cloning and adapted to the expression of *A. niger* with *ARSH4/CEN6*, *TRP1*, *hph*, and LB/RB-T-DNA repeats. pSEA-TAR-KA was obtained as a recombinant plasmid containing a gene cluster for the biosynthesis of kojic acid by an efficient homologous recombination system of *S. cerevisiae*, demonstrating a capture success rate of 5.9%. All the 10 *A. niger* recombinant strains (KA1–KA10) carrying the gene cluster produced kojic acid in fermentation, with the highest kojic acid titer (5.86 g/L) obtained by fermentation with the

strain KA-2 for 7 d. **[Conclusion]** A TAR cloning system was constructed and adapted to *A. niger* for the efficient capture, recombination, and expression of large biosynthetic gene clusters. The performance of the system was verified by the capture of *A. oryzae*-derived gene cluster for the biosynthesis of kojic acid and the successful synthesis of kojic acid by *A. niger*. This study enriched the role of *A. niger* as a chassis in the green biomanufacturing of important compounds.

Keywords: transformation-associated recombination (TAR) cloning; large DNA fragment; *Aspergillus niger*; biosynthetic gene cluster for kojic acid

黑曲霉(*Aspergillus niger*)是一种重要的工业丝状真菌,广泛应用于工业酶制剂和有机酸发酵领域。近年来,研究人员不断发现黑曲霉能够产生多种次级代谢产物^[1],加之其具有可高效利用廉价碳源、成熟的大规模发酵工艺基础以及良好的安全性,将黑曲霉作为底盘细胞,合成其他真菌来源的次级代谢产物,越来越受到人们的关注^[2-3]。然而,大多数次级代谢途径由多个反应步骤接续组成,对其中的单个步骤操作有时只会影响该步骤及其后续步骤中间产物的合成效率,缺乏对合成途径的整体调控,改造效果差强人意。另外,利用微生物细胞作为底盘细胞生产次级代谢产物时,有时会涉及重组不同来源的天然产物合成功能模块建立新型代谢途径,或者利用遗传元件的复杂组合来创建所需特性的新型基因线路以此获得天然产物及其衍生物。在这些科学研究和工程实践中,通常都会涉及多步连续克隆,包括引物设计、PCR 扩增、限制性内切酶消化、体外连接和转化等,而且往往需要多个质粒^[4-6]。这种构建策略不仅耗时低效,而且依赖于独特的限制性位点,而这些位点的可用性对于大片段 DNA 重组分子来说是有限的。除了 DNA 片段的组装,重组 DNA 的片段转移技术也影响着微生物细胞工厂的例行构建。然而,目前黑曲霉的遗传操作系统尚不完善,尤其是实现大片段 DNA 组装用于黑曲霉的遗传操作效率低、工作量大,这限制了黑曲霉的进一步应用。

目前报道的常用体外构建策略,如不依赖于序列和连接的克隆(sequence and ligation-independent cloning, SLIC)^[7]、In-fusion^[8]、吉布森(Gibson)组装^[9]和 Golden Gate 组装^[9]等无缝组装技术在小片段 DNA 组装与转移中已成熟应用。然而,大片段 DNA 存在分子量大、易受物理剪切力作用断裂等问题,多种基于体内的组装方法被建立起来,主要应用的宿主包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。利用大肠杆菌的 λ Red/ET、RecET 等重组系统可实现较大 DNA 片段的组装。虽然大肠杆菌具有易于培养、遗传操作工具简单等优点,但是其对异源 DNA 的承载能力有限^[10-11]。借助枯草芽孢杆菌的天然转化能力,人们开发出了一种被称为“多米诺克隆”的策略,通过枯草芽孢杆菌体内同源重组,在载体中构建出许多 DNA 片段,交替使用 2 种选择性标记,成功实现了 16.3 kb 的小鼠线粒体基因组和 134.5 kb 的水稻叶绿体基因组的体内组装;然而,每个“多米诺克隆”都需要先在载体中制备,整个组装过程按顺序进行,因此需要耗费大量的时间和人力^[11-12]。线性 DNA 片段可以有效刺激酿酒酵母体内发生 DNA 重组,这一发现促进了基于酵母的多种遗传操作工具的发展,它已被广泛用于基因克隆、质粒构建和文库创建^[10,13-14]。酿酒酵母中同源重组效率是高效的。通过 PCR 获得含有 30-40 bp 线性化酵母质粒同源序列的 DNA

片段,与相应质粒共转化酿酒酵母,发现在同源序列所指向的位置发生了同源重组^[15]。后续研究又利用酿酒酵母的高效同源重组效率扩展到基因组改造,并确定了定向基因整合和敲除所需的同源序列长度^[16]。随后,在酿酒酵母中开发了一种转化相关重组(transformation-associated recombination, TAR)的克隆方法,该技术基于基因组 DNA 与包含目标基因同源序列或捕获用线性化载体之间的体内重组,从而实现从复杂基因组中选择性地、准确地分离染色体区域和基因。这一重组过程发生在酵母球形体转化过程中,可获得含有目的基因的酵母人工染色体^[17]。目前, TAR 克隆已被用于从环境 DNA 样本中捕获和表达大型生物合成基因簇^[18-20]。

本研究拟在黑曲霉中建立一种基于 TAR 的“即插即用”型大片段 DNA 克隆平台,规避传统克隆方法的潜在问题,实现直接克隆、重构和异源表达次级代谢的生物合成途径,从而为次级代谢产物的高效生物合成开辟道路。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) VL6-48

(*MATa*, *his3-Δ200*, *trp1-Δ1*, *ura3-52*, *lys2*, *ade2-101*, *met14*, *psi+cir⁰*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP 10 和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) AGL-1 [C58, *RecA* (*Rif^R/Carb^R*), Ti pTiBo542 ΔT-DNA (*Str^R*), succinamopine type]由本实验室保藏。其他质粒和菌株见表 1。

1.2 培养基

LB 培养基、PDA 培养基、黑曲霉诱导培养基(inducing medium, IM)、黑曲霉完全培养基(complete medium, CM)、黑曲霉基本培养基(minimal medium, MM)、黑曲霉液体培养基、米曲霉液体培养基按照参考文献[22]配制。酵母肉汤培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)和 SD-Trp 上下层选择培养基按照参考文献[21]配制。曲酸发酵培养基按照参考文献[23]配制。

1.3 主要试剂和仪器

酵母氮源基础,北京泛基诺公司;草铵膦, MedChemExpress 公司;潮霉素 B, 上海起发实验试剂有限公司;其余化学试剂,北京索莱宝科技有限公司;限制性核酸内切酶, New England Biolabs 公司;其余分子生物学试剂,北京全式金生物技术股份有限公司;分子克隆试剂盒,南京

表 1 本研究所构建质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Strain/Plasmid	Characteristic	Source
Strain		
S834	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015, Tet-on:: <i>cre</i> , Δ <i>oahA</i> , Δ <i>cexA</i> , <i>hyg^s</i>	[2]
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 3488	Containing kojic acid biosynthesis cluster	Guangdong Microbial Culture Collection Center (GDMCC)
Plasmid		
pCAP01	<i>ARSH4/CEN6</i> , <i>pUC ori</i> , <i>aph(3)II</i> , <i>φC31 int-attP</i> , <i>oriT (RP4)</i> , <i>kan^r</i>	[21]
pLH454	<i>loxP-hph-loxP</i> , <i>gpdA</i> promoter, <i>trpC</i> terminator, <i>pUCori</i> , <i>hyg^r</i> , <i>kan^r</i>	[22]
pSEA-TAR	<i>ARSH4/CEN6</i> , <i>TRP1</i> , <i>loxP-hph-loxP</i> , <i>pUCori</i> , <i>hyg^r</i> , <i>kan^r</i>	This study
pSEA-KLR	<i>ARSH4/CEN6</i> , <i>TRP1</i> , <i>loxP-hph-loxP</i> , Larm, Rarm, <i>pUCori</i> , <i>hyg^r</i> , <i>kan^r</i>	This study
pSEA-TAR-KA	Larm, kojic acid biosynthesis cluster, Rarm, <i>ARSH4/CEN6-TRP1</i> , <i>loxP-hph-loxP</i> , <i>pUCori</i> , <i>hyg^r</i> , <i>kan^r</i>	This study

诺唯赞生物科技股份有限公司; 甲醇(色谱级), Oceanpak 化学公司。高效液相色谱仪, Agilent 公司。

1.4 引物

本研究所用引物见表 2, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.5 适配黑曲霉转化的 TAR 捕获骨架载体的构建

以 pCAP01 质粒 DNA 为模板, 设计引物 CAT-F 和 CAT-R, 扩增获得负责在酵母中稳定存在的 *ARSH4/CEN6* 复制起始位点序列元件和营养缺陷筛选标记 *TRP1* 基因表达盒(*ARSH4/CEN6-TRP1*)。PCR 反应体系(50 μ L): pCAP01 质粒 0.5 μ L, CAT-F 和 CAT-R (10 μ mol/L)各

1 μ L, 5 \times TransStart[®] *FastPfu* Buffer 10 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, TransStart[®] *FastPfu* DNA Polymerase 1 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 *ARSH4/CEN6-TRP1* 片段。利用 *Spe* I 和 *Xba* I 双酶切黑曲霉表达质粒 pLH454^[22], 使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 将 *ARSH4/CEN6-TRP1* 连接到 pLH454 载体上, 利用化学转化法转化到大肠杆菌感受态 TOP 10 中, 并将转化菌液涂布于含有 100 μ g/mL 硫酸卡那霉素的 LB 固体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 挑取单菌落进行菌液 PCR 与质粒 *Xho* I/*Xba* I 双酶切验证, 阳性重组子进一步

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	用途 Purpose
CAT-F	ATGGAGAAACTCGAGACTAGTAACACTTGAGGTACCT GTATTTA (<i>Xho</i> I/ <i>Spe</i> I/ <i>Kpn</i> I)	扩增 <i>ARSH4/CEN6-TRP1</i> 酵母元件 Amplification of <i>ARSH4/CEN6-TRP1</i>
CAT-R	GTAGGGCCCCCGGGTCTAGACTATTTCTTAGCATTTTT GACGA (<i>Xba</i> I)	
Up-F	TTATTATGGAGAAAGATTTATCACGCAGGGGAATTACG GGATGAC	扩增曲酸合成基因簇上游 986 bp 同源臂序列 Amplification of the 986 bp homologous upstream sequence of biosynthetic gene cluster for kojic acid
Up-R	GTCGCTGGGAACTTACTCGAGGGTGAATGAAAGATGT GTGATGATG (<i>Xho</i> I)	
Down-F	TAAGTTCCAGCGACGATACGCGACGGAGTCGAAATG AG	扩增曲酸合成基因簇下游 1 103 bp 同源臂序列 Amplification of the 1 103 bp homologous downstream sequence of biosynthetic gene cluster for kojic acid
Down-R	ATTTTTCTAAATACAGTTTGTATGGCTTACCCGATGGG CCATG	
P1	GGACATGATCATCCGGAGATTTATC	曲酸合成基因簇大片段不同位置验证引物
P2	CTGAGGAGAGAGAGATGGTGATGAG	Verification primers for different positions of large fragments in biosynthetic gene cluster for kojic acid
P3	GGAGGCCTCATTGAGCTGTTGCTC	
P4	GTCTGCAAGTTGCTAGTGTGGTGC	
P5	CGACGGGTATCTGCTAGGATTGGA	
P6	ACTCAAGTTCGAGTCCATCGTCG	
P7	GACGAGGGCTAGCTCTTATGATAT	
P8	TGGAGCTGCCAGACACAACAGTCA	
P9	TTTGTATGGCTTACCCGATGGG	

下划线为酶切位点

The restriction sites are underlined.

测序验证, 最终获得酿酒酵母-大肠杆菌穿梭并可整合到黑曲霉基因组上的 TAR 捕获骨架载体 pSEA-TAR, 其中在 LB T-DNA repeat 和 ARSH4/CEN6-TRP1 中间, 由引物 CAT-F 引入了 3 个单克隆位点, 即 *Xho* I、*Spe* I 和 *Kpn* I, 用于后续构建不同类型的大片段 DNA 捕获载体 (图 1A)。

1.6 霉菌基因组 DNA 的提取

取 1×10^8 个米曲霉孢子接种于米曲霉液体培养基中, 28 °C、220 r/min 振荡培养 36 h, 收集菌丝体, 液氮研磨成细粉末 (约 150 μ g), 加入 950 μ L 提取缓冲液和 5 μ L RNase A (10 mg/mL) 涡旋振荡混合均匀, 65 °C 孵育 30 min (期间上下颠倒混匀 3 次) 后加入 350 μ L 5 mol/L 乙酸钾混匀, -20 °C 孵育 15 min。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 加入等体积的苯酚缓冲液 (苯酚: 氯仿: 异戊醇体积比为 25:24:1, pH>7.8) 振荡混匀, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后取上清, 加入 350 μ L 异丙醇, 离心可得到基因组 DNA 沉淀。随后向 DNA 沉淀中加入 1 mL 70% 乙醇溶液进行漂洗、离心、风干, 加入 100–200 μ L TE 缓冲液 (2 mmol/L Tris-HCl 和 0.2 mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶解。-20 °C 储存备用^[24]。

1.7 米曲霉基因组 DNA 片段的制备

取约 100 μ g 米曲霉基因组 DNA, 分别加入约 200 U *Not* I/*Sbf* I 限制性内切酶组合, 在 37 °C 条件下酶切过夜。这两个酶切组合均不切割曲酸合成基因簇及其上下游 1 kb 的 DNA 区域。酶切后的基因组 DNA 片段经苯酚缓冲液 (苯酚: 氯仿: 异戊醇体积比为 25:24:1, pH>7.8) 抽提、异戊醇沉淀和 70% 乙醇洗涤, 获得的 DNA 沉淀溶解在 100 μ L 的 TE 缓冲液中。

1.8 曲酸合成基因簇捕获载体的构建

分别设计引物 Up-F/Up-R 和 Down-F/Down-R, 以米曲霉基因组 DNA 为模板, 扩增曲酸合成基

因簇上下游侧翼同源序列 Larm 和 Rarm (分别长 1 000 bp)。引物 Up-R 和 Down-F 均包含一个 *Xho* I 限制性核酸内切酶序列。使用 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 将 Larm、Rarm 和经过 *Xho* I/*Kpn* I 双酶切的 pSEA-TAR 进行一步克隆, 获得曲酸合成基因簇捕获载体 pSEA-KLR (图 1B)。在直接 TAR 克隆之前, 这个环形的 pSEA-KLR 载体需经 *Xho* I 酶切线性化, 从而产生一个两端含有约 1 kb 捕获序列同源臂的捕获载体。

1.9 酿酒酵母球状体的制备

挑取 *S. cerevisiae* VL6-48 单菌落接种于含有 100 mg/L 腺嘌呤的 YPD 培养基中, 30 °C、220 r/min 振荡培养过夜, 制备种子液。以 3% 的接种量接种至 50 mL YPD 培养基中, 培养至 OD_{600} 达到 0.7–1.0 后, 细胞液冰浴 10 min, 而后在 4 °C、4 000 r/min 条件下离心 3 min 收集菌体。用无菌冰水洗涤后菌体重悬于 1 mol/L 山梨醇溶液中, 4 °C 渗透稳定 20 h。4 °C、4 000 r/min 条件下离心 5 min, 收集菌体重悬于 10 mL SPE 缓冲液 (10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L EDTA, 1 mol/L 山梨醇, pH 8.0) 中, 加入 20 μ L β -巯基乙醇和 40 μ L 裂解酶 Zymolyase-20T 溶液 (1 mg/mL), 于 30 °C 水浴 35 min 得到球状体悬液。球状体经 1 mol/L 山梨醇漂洗后, 重悬于 200 μ L STC 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L $CaCl_2$, 1 mol/L 山梨醇) 中备用。

1.10 TAR 方法直接克隆曲酸合成基因簇

取 2–3 μ g 经 *Not* I/*Sbf* I 酶切消化的米曲霉基因组片段、1 μ g 经 *Xho* I 酶切的线性化 pSEA-KLR 载体 (总体积 \leq 40 μ L) 与 200 μ L 酵母球状混合, 室温放置 10 min 后缓慢加入 800 μ L 20% 聚乙二醇溶液, 室温孵育 10 min 后 4 °C、700 r/min 微离心 10 min, 除去上清, 加入 800 μ L SOS 缓冲液 (1 mol/L 山梨醇, 6.5 mmol/L $CaCl_2$, 0.25%

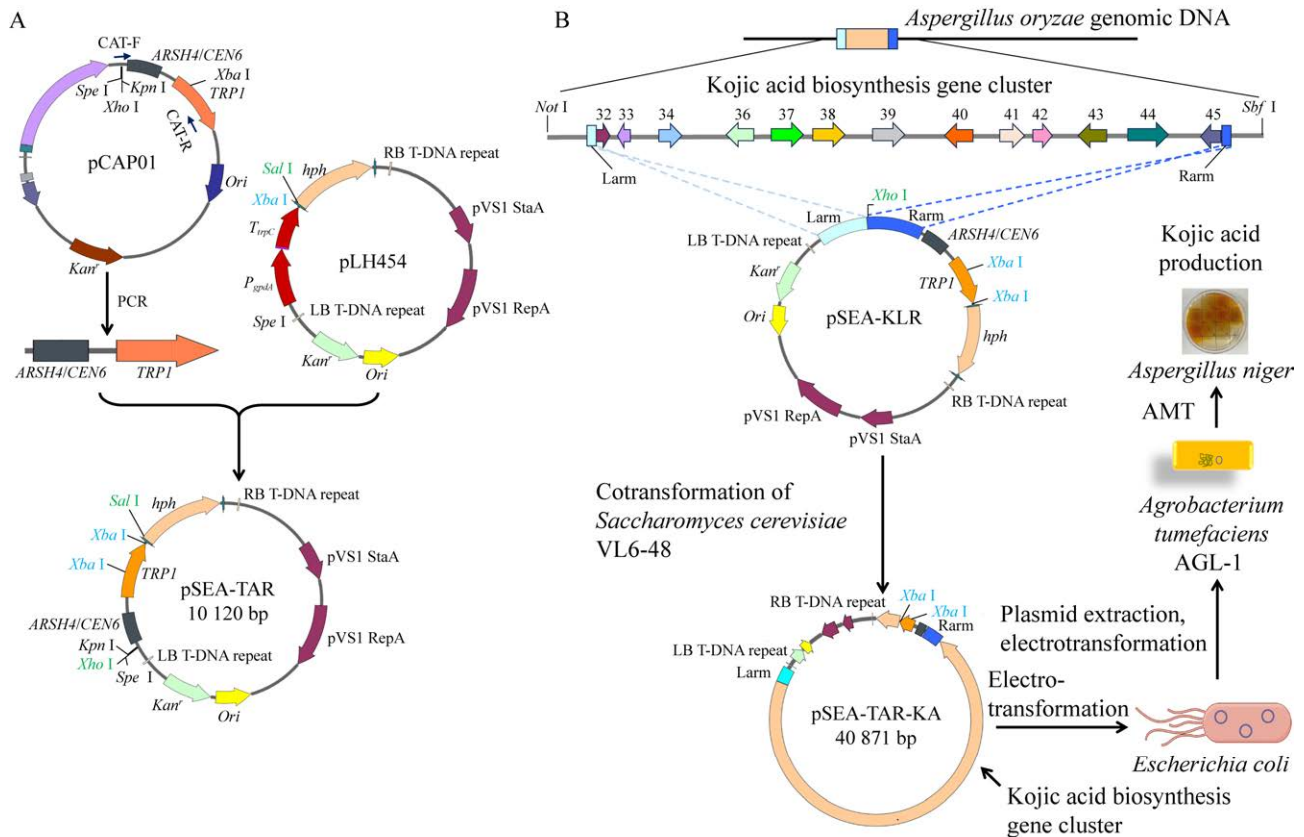


图 1 基于 TAR 克隆的黑曲霉曲酸合成基因簇大片段 DNA 捕获流程 A: 适配黑曲霉转化的 TAR 捕获骨架载体 pSEA-TAR 的构建. B: 曲酸合成基因簇捕获、黑曲霉转化和曲酸发酵. 米曲霉来源的曲酸合成基因簇 DNA 片段由 13 个开放阅读框组成, 基因组 DNA 经 *Not I/Sbf I* 消化后得到包含完成曲酸合成基因簇的 DNA 片段, 随后与经 *Xho I* 线性化的含有曲酸合成基因簇上下游同源臂(Larm 和 Rarm)的捕获性载体 pSEA-KLR 共转化 *S. cerevisiae* VL6-48 的球状体. 在酿酒酵母细胞中, 线性化的 pSEA-KLR 中 1 kb 的同源臂与米曲霉基因组 DNA 之间发生同源重组, 即曲酸合成基因簇被 pSEA-KLR 载体捕获, 产生了可在酵母-大肠杆菌穿梭的质粒, 在电转化大肠杆菌后扩增质粒, 经过 AMT 转化黑曲霉, 曲酸合成基因簇整合进黑曲霉基因组, 实现曲酸的合成

Figure 1 Schematic illustration of direct capture of the kojic acid biosynthesis gene cluster from *Aspergillus oryzae* based on TAR cloning in *Aspergillus niger*. A: Construction of TAR capture backbone vector pSEA-TAR adapted for transformation of *A. niger*. B: Kojic acid biosynthesis gene cluster capture, *A. niger* transformation and kojic acid production. The DNA fragment of the *A. oryzae*-derived kojic acid biosynthesis gene cluster consisted of 13 ORFs, and the genomic DNA was digested by *Not I/Sbf I* to obtain the DNA fragment containing the completed kojic acid synthesis gene cluster, which was subsequently co-transformed with the capture vector pSEA-KLR containing upstream and downstream homologous arms (Larm and Rarm) of the kojic acid biosynthesis gene cluster linearized by *Xho I* into spheroplasts of *S. cerevisiae* VL6-48. In *S. cerevisiae* cells, homologous recombination occurred between the 1 kb homology arm of linearised pSEA-KLR and *A. oryzae* genomic DNA, i.e., the gene cluster for kojic acid biosynthesis was captured by the pSEA-KLR vector, generating a plasmid that could shuttle between yeast and *E. coli*, and the plasmid was amplified after electro-transformation of *E. coli* and transformed into *A. niger* by AMT, where the gene cluster for kojic acid biosynthesis integrated into the genome of *A. niger*, realising kojic acid production.

酵母提取物, 0.5%蛋白胨)重悬球状体, 于 30 °C 孵育 30–40 min。将转化后的球状体与 7 mL SD-Trp 上层培养基混匀后覆盖在 SD-Trp 琼脂上, 在 30 °C 培养 3 d 后挑取转化子, 转移到新的 SD-Trp 固体培养基上, 继续 30 °C 培养 2 d。

采用菌落 PCR 方法筛选成功克隆曲酸基因簇的阳性转化子。具体操作如下: 挑取菌落, 接种于 Zymolyase-20T 裂解液中, 30 °C 振荡孵育 2 h, 然后沸水浴 5 min, 取上清液作为模板, 设计引物 P1/P2 (扩增基因簇左侧同源臂 *Larm*)、P1/P3 (扩增基因簇左侧同源臂 *Larm*+*AO090113000132*)、P4/P5 (扩增 *AO090113000136* 和部分与 *AO090113000137* 之间的间隔序列)、P6/P7 (扩增部分 *AO090113000142* 和部分 *AO090113000143* 序列)和 P8/P9 (扩增 *AO090113000142* 和基因簇右侧同源臂 *Rarm*)进行 PCR 筛选。

利用 BAC/PAC DNA 大量提取试剂盒从筛选出的正确转化子中, 提取质粒。通过电击转化法将质粒重新导入大肠杆菌 TOP 10 细胞, 挑取硫酸卡那霉素(100 µg/mL)抗性大肠杆菌细胞, 提取质粒, 利用引物 P1/P5 和 P6/P9 验证质粒, 确认提取质粒为捕获了曲酸合成基因簇的质粒, 命名为 pSEA-TAR-KA。

1.11 农杆菌介导的黑曲霉转化

农杆菌介导的转化(*Agrobacterium*-mediated transformation, AMT)黑曲霉方法参考文献[22]。将质粒 pSEA-TAR-KA 电转化到农杆菌 AGL-1 中, 将含有质粒的农杆菌细胞培养至 OD_{600} 为 0.8 左右, 与浓度为 1×10^7 个/mL 的黑曲霉分生孢子悬液等体积混合均匀, 取 400 µL 混合液逐滴加到铺在 IM 固体培养基(含有 100 µg/mL 卡那霉素和 200 µmol/L 乙酰丁香酮)上的 0.45 µm 滤膜表面, 25 °C 培养 2 d 后将培养物转接到完全培养基上(含有 100 µg/mL 头孢噻肟钠、100 µg/mL 氨基青霉素、100 µg/mL 链霉素、250 µg/mL 潮霉

素 B), 直至出现菌落。将转化子依次点接至 PDA 培养基和含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上进行抗性确认。选取具有潮霉素 B 抗性的转化子, 提取其基因组 DNA, 使用引物 P1/P3、P4/P5、P6/P7 和 P8/P9 进行 PCR 验证。

1.12 含有曲酸合成基因簇黑曲霉菌株的曲酸发酵及分析

定性分析: 曲酸与 Fe^{3+} 可发生络合作用, 呈现特殊的红色, 最大吸收峰在 495 nm 处^[25]。将验证正确的黑曲霉克隆接种至曲酸发酵培养基中, 培养 4 d 后向培养基中加入适量 10 mmol/L $FeCl_3$ 溶液, 观察培养基颜色反应。

定量分析: 取 2×10^8 个黑曲霉菌株分生孢子接种于 50 mL 曲酸发酵培养基中, 9 层纱布包裹瓶口后, 于 28 °C、200 r/min 培养 7 d。取 5 d 和 7 d 的发酵样品于 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, 适当倍数稀释, 经 0.22 µm 的水系膜过滤后采用高效液相色谱仪, 使用 COSMOSIL-5C18-MS-II (4.6 ID×250 mm) 色谱柱进行检测。进样量为 10 µL, 柱温为 50 °C, 流动相为甲醇:20 mmol/L KH_2PO_4 (18:82, 体积比)混合液, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 273 nm。

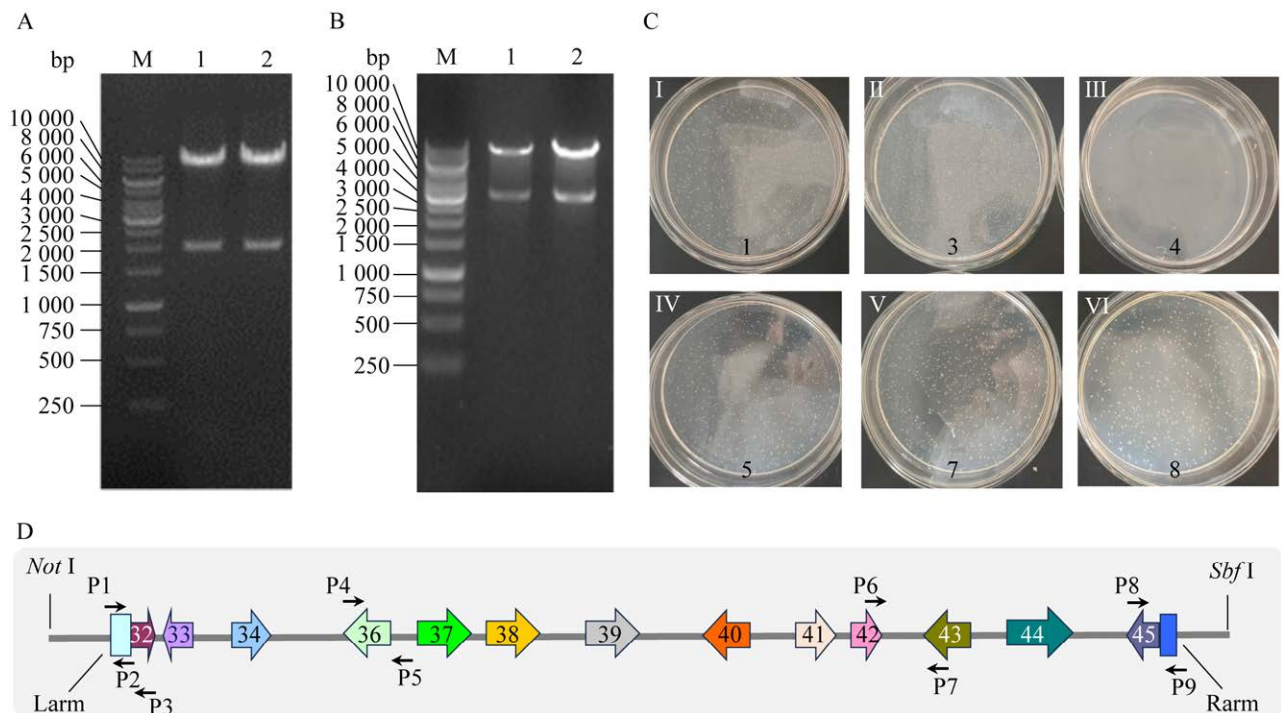
2 结果与分析

2.1 TAR 克隆曲酸合成基因簇

曲酸合成基因簇全长约 30 kb, 包含 13 个开放阅读框, 其中已经确定 *AO090113000136* 为一种黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)依赖的氧化还原酶编码基因 *kojA*, *AO090113000138* 为线粒体转运家族(mitochondrial carrier family, MCF)转运蛋白编码基因 *kojT*, *AO090113000137* 位于 *AO090113000136* 和 *AO090113000138* 之间, 组成三明治结构, 是一种 Zn(II)₂Cys₆ 型转录因子编码基因 *kojR*^[25]。最近, Wu 等^[23]通过生物信息学分析和

基因敲除/干扰技术发现, 基因簇中其他 10 个基因在黑曲霉中的直系同源基因也与曲酸合成有关, 但是具体的基因功能以及在曲酸合成代谢途径中的角色仍不清楚, 这制约了通过合成生物学策略进行曲酸绿色生物制造的进程。通过序列分析发现, 在曲酸合成基因簇的侧翼序列中存在独特的限制性酶切位点, 即基因簇左侧翼序列的 *Not* I, 右侧翼序列的 *Sbf* I (图 2D), 因此可以使用 *Not* I/*Sbf* I 这 2 个酶切位点组合来切割米曲霉基因组 DNA, 从而获得包含整个曲酸合成基因簇的 DNA 片段。出发质粒 pCAP01 在酿酒酵母中以单拷贝形式存在, 这避免了 TAR 克隆过程中的非特异性重组, 而其中的 *ARSH4/CEN6-TRP1* 元件是该质粒在酿酒酵母中稳定存在的必需元件; pUC *ori* 赋予该质粒及其衍生质粒在大肠杆菌中以多拷贝形式存在^[21]。通过 PCR 扩增了 *ARSH4/CEN6-TRP1* 元件序列, 并将其克隆到 pLH454 中的 LB-和 RB-T-DNA

repeat 序列之间, 获得适配黑曲霉转化的 TAR 捕获骨架质粒 pSEA-TAR (图 1A), 利用 *Xho* I/*Sal* I 双酶切验证正确(图 2A)。通过 PCR 扩增曲酸合成基因簇序列上下游约 1 kb 的两个区域, 并将其克隆至 pSEA-TAR 中, 获得了曲酸合成基因簇特异性捕获质粒 pSEA-KLR (图 1B), 利用 *Sal* I/*Xho* I 双酶切验证正确(图 2B)。将 *Xho* I 线性化质粒 pSEA-KLR, 以及利用 *Not* I/*Sbf* I 消化米曲霉基因组 DNA, 共同转化 *S. cerevisiae* VL6-48 球状体得到转化子(图 2C)。挑取克隆 237 个, 通过 PCR 鉴定出阳性转化子 14 个, 阳性率为 5.9%, 从中随机挑取一个阳性克隆 77[#] 转化子的验证结果如图 2E 所示。从曲酸合成基因簇阳性酵母菌落中提取质粒(图 2F), 通过电转化方法转化大肠杆菌 TOP 10 进行质粒扩增, 通过多轮 PCR 确认了从大肠杆菌 TOP 10 中提取的曲酸合成基因簇重组质粒 pSEA-TAR-KA (图 2F)。



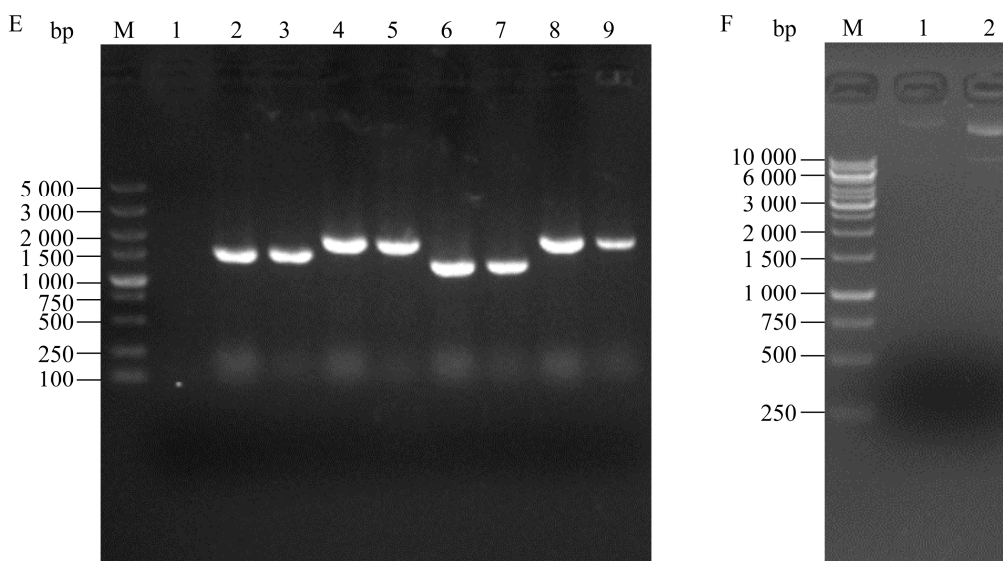


图 2 曲酸合成基因簇捕获及重组质粒的构建 A: 适配黑曲霉转化的 TAR 捕获骨架质粒 pSEA-TAR 利用 *Xho* I/*Sal* I 双酶切验证(2 个克隆). B: 曲酸合成基因簇特异性捕获质粒 pSEA-KLR 利用 *Sal* I/*Xho* I 双酶切验证(2 个克隆). C: 将 *Xho* I 线性化质粒 pSEA-KLR, 以及利用 *Not* I/*Sbf* I 消化米曲霉基因组 DNA, 共同转化 *S. cerevisiae* VL6-48 球状体得到的转化子. 其中 I 和 IV 为 *Not* I/*Sbf* I 双酶切基因组与经 *Xho* I 线性化 pSEA-KLR 载体共转化酿酒酵母; II 为 pSEA-TAR 质粒转化酿酒酵母; III 为 *Xho* I 线性化质粒 pSEA-KLR 转化酿酒酵母; V 为 pSEA-KLR 质粒转化酿酒酵母; VI 为 pCAP01 质粒转化酿酒酵母. D: 曲酸合成基因簇及其上下游序列示意图. E: 77[#] 阳性转化子 PCR 验证. 其中 1 为阴性对照; 以米曲霉基因组为模板, 分别以引物 P1/P3 (泳道 2)、P4/P5 (泳道 4)、P6/P7 (泳道 6) 和 P8/P9 (泳道 8) 进行 PCR 扩增, 作为阳性对照; 以 77[#] 酿酒酵母转化子总 DNA 作为模板, 以引物 P1/P3 (泳道 3)、P4/P5 (泳道 5)、P6/P7 (泳道 7) 和 P8/P9 (泳道 9) 进行菌落 PCR. F: 分别从酵母转化子(泳道 1) 和大肠杆菌转化子(泳道 2) 中提取重组质粒 pSEA-TAR-KA

Figure 2 Kojic acid biosynthesis gene cluster capture and recombinant plasmid construction. A: TAR capture backbone plasmid pSEA-TAR adapted for *A. niger* transformation was verified by using *Xho* I/*Sal* I double digestion (2 clones). B: Kojic acid biosynthesis gene cluster specific capture plasmid pSEA-KLR was verified by using *Sal* I/*Xho* I double digestion (2 clones). C: pSEA-KLR linearized by *Xho* I and *A. oryzae* genomic DNA digested by *Not* I/*Sbf* I were co-transformed into *S. cerevisiae* VL6-48 spheroplasts. Among them, I and IV are *Not* I/*Sbf* I double digestion of *A. oryzae* genomic DNA and pSEA-KLR linearized by *Xho* I were co-transformed into *S. cerevisiae*; II is the transformation of *S. cerevisiae* with pSEA-TAR plasmid; III is the transformation of *S. cerevisiae* with pSEA-KLR linearized by *Xho* I; V is the transformation of *S. cerevisiae* with pSEA-KLR plasmid; VI is the transformation of *S. cerevisiae* with pCAP01 plasmid. C: Schematic illustration of the kojic biosynthesis gene cluster and its upstream and downstream sequences. Primers used for verification were also shown. E: PCR validation of the positive transformants 77[#]. Where lane 1 is the negative control; the genome of *A. oryzae* was used as a template for PCR amplification with primers P1/P3 (lane 2), P4/P5 (lane 4), P6/P7 (lane 6), and P8/P9 (lane 8), respectively, as a positive control; and total DNA of 77[#] *S. cerevisiae* transformants was used as a template with primers P1/P3 (lane 3), P4/P5 (lane 5), P6/P7 (lane 7) and P8/P9 (lane 9) following colony PCR. F: Recombinant plasmid pSEA-TAR-KA was extracted from *S. cerevisiae* transformant (lane 1) and *E. coli* transformant (lane 2), respectively.

2.2 农杆菌介导的曲酸合成基因簇转化黑曲霉及转化子

农杆菌介导的黑曲霉转化是对黑曲霉进行遗传操作的常用方法。将从大肠杆菌中提取的曲酸合成基因簇重组质粒 pSEA-TAR-KA (图 2F) 电转化农杆菌 AGL-1, 而后将含有 pSEA-TAR-KA 质粒的农杆菌与 *A. niger* S834 菌株分生孢子共培养, 挑取转化子 51 个, 通过抗性表型筛选, 共获得 49 株有潮霉素 B 抗性的转化子(图 3A)。提取黑曲霉转化子基因组 DNA 进行进一步的 PCR 分析, 获得含有曲酸合成基因簇的黑曲霉转化子 10 株, 命名为 *A. niger* KA1-KA10, 其中克隆 *A. niger* KA1 的 PCR 验证结果如图 3B 所示。

2.3 含有曲酸合成基因簇的黑曲霉重组菌株发酵分析

首先, 本研究定性考察重组转化子是否可以

合成曲酸。将出发菌株 *A. niger* S834、*A. oryzae* NRRL 3488 和含有曲酸合成基因簇的 *A. niger* KA1-KA10 分别接种于曲酸发酵培养基的 12 孔板中, 培养 4 d 后进行显色反应。黑曲霉 S834 菌株培养基未出现红色, *A. oryzae* NRRL 3488 和 *A. niger* KA1-KA10 呈现出不同程度的红色, 表明培养基中存在曲酸(图 4A)。

为进一步研究含有曲酸合成基因簇的黑曲霉合成曲酸的水平, 以葡萄糖为碳源, 通过发酵法评估黑曲霉重组菌株的曲酸产量。分别在发酵 5 d 和 7 d 进行取样, 通过 HPLC 分析曲酸产量。如图 4B 所示, 出发菌株 *A. niger* S834 由于不含有曲酸合成基因簇, 发酵液中无曲酸生成, 而 *A. niger* KA1-KA10 在发酵 5 d 和 7 d 均有不同程度曲酸的积累, 其中 *A. niger* KA2 在 7 d 时, 发酵液中曲酸水平最高, 达到 5.86 g/L。

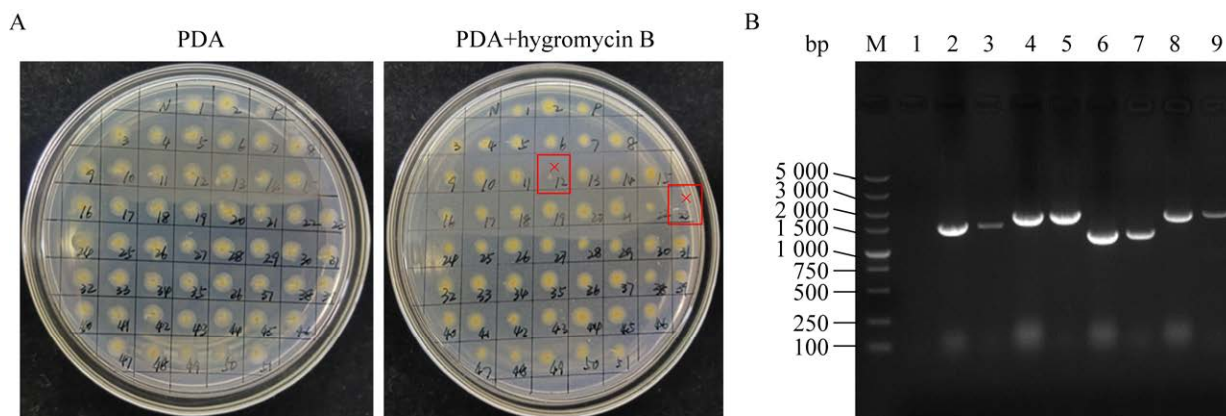


图 3 农杆菌介导的曲酸合成基因簇转化黑曲霉 A: 农杆菌介导曲酸合成基因簇转化黑曲霉 *A. niger* S834 转化子在 PDA 和含有潮霉素 B 的 PDA 培养基上的生长情况. B: *A. niger* KA1 PCR 验证电泳图. 其中 M: 5 000 bp DNA Marker; 1: 阴性对照; 2、4、6 和 8: 以米曲霉基因组为模板, 分别以 P1/P3、P4/P5、P6/P7 和 P8/P9 为引物进行 PCR 分析; 3、5、7 和 9: 以黑曲霉转化子基因组为模板, 分别以 P1/P3、P4/P5、P6/P7 和 P8/P9 为引物进行 PCR 分析

Figure 3 Kojic acid biosynthetic gene cluster integrated into *Aspergillus niger* through *Agrobacterium*-mediated transformation. A: Growth of *A. niger* transformants potentially harboring kojic acid biosynthetic gene cluster on PDA and PDA containing hygromycin B. B: PCR analysis of one of strain *A. niger* KA1. M: 5 000 bp DNA Marker; 1: Negative control; 2, 4, 6 and 8: PCR analysis using the *A. oryzae* NRRL 3488 genome as a template with P1/P3, P4/P5, P6/P7 and P8/P9 primers, respectively; 3, 5, 7 and 9: PCR analysis using *A. niger* KA1 genome as a template with P1/P3, P4/P5, P6/P7 and P8/P9 primers, respectively.

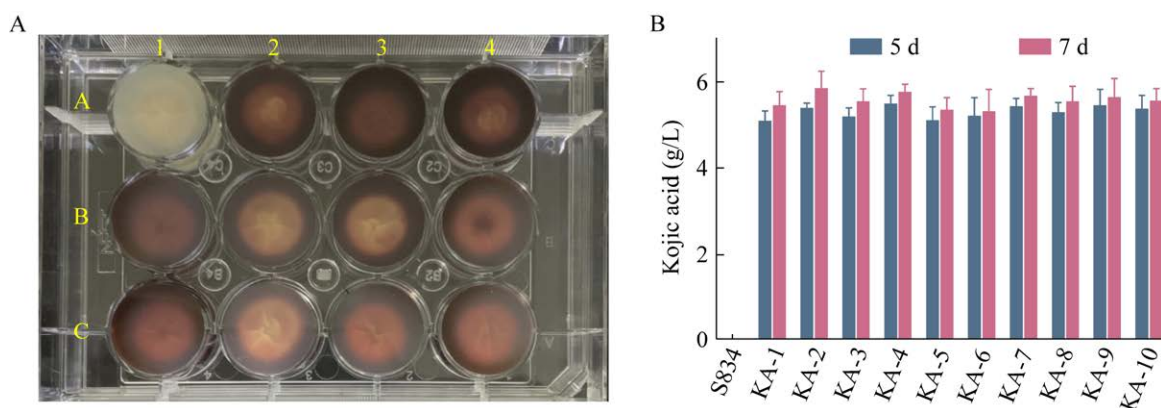


图4 含有曲酸合成基因簇的黑曲霉重组菌株发酵分析 A:含有曲酸合成基因簇的*A. niger* KA1–KA10重组菌株在曲酸发酵培养基上培养4 d后,加入10 mmol/L FeCl_3 溶液后的显色情况. A1: *A. niger* S834; A2: *A. oryzae* NRRL 3488; A3: *A. niger* KA1; A4: *A. niger* KA2; B1–B4: *A. niger* KA3–KA6; C1–C4: *A. niger* KA7–KA10. B: HPLC分析*A. niger* KA1–KA10重组菌株5 d和7 d发酵液中的曲酸含量

Figure 4 Fermentation analysis of recombinant strains of *Aspergillus niger* harboring kojic acid biosynthetic gene cluster. A: Phenotypes of *A. niger* KA1–KA10 recombinant strains after 4 d of growth on kojic acid producing medium with the incubation of 10 mmol/L FeCl_3 solution. A1: *A. niger* S834; A2: *A. oryzae* NRRL 3488; A3: *A. niger* KA1; A4: *A. niger* KA2; B1–B4: *A. niger* KA3–KA6; C1–C4: *A. niger* KA7–KA10. B: HPLC analysis of kojic acid content in the fermentation broths of *A. niger* KA1–KA10 recombinant strain for 5 d and 7 d.

这些结果表明,米曲霉来源的曲酸合成基因簇成功整合在黑曲霉基因组中,并成功实现了表达,合成了目标产物曲酸。

3 讨论与结论

次级代谢产物具有高度的结构多样性和生物活性,是许多医药和工业化学品的重要来源。研究这些天然产物的生物合成途径和机制,借助基因工程手段提高其产量和优化其结构,是基础研究和化学品生产的最重要的目标之一。常见的改造策略包括启动子工程、转录因子工程、表观遗传调控、酶工程、代谢重编程等,然而都存在一定的局限性^[26-28]。另外,拷贝整个次级代谢产物的合成基因簇并在现在底盘细胞中的表达是增加次级代谢产物产量的一种可行且有效的策略^[21,29]。大片段DNA的克隆和

转移技术的发展促进了次级代谢物工程菌株的理性设计和高效构建。基于随机文库的大片段DNA捕获法是通过将目标生物基因组酶切为小片段,构建一个包含随机插入片段的文库,随后转化宿主细胞,经过活性筛选、分子筛选和功能验证后实现生物合成基因簇大片段的克隆。该方法步骤烦琐,工作量大,效率不尽如人意^[29-30]。PCR扩增和组装程序昂贵,并且需要深度测序来确认其准确性。然而,同源重组相关的辅助克隆策略(如Red/ET技术和TAR技术)已经被成功用于从基因组DNA中直接克隆大片段的目标基因簇。Wu等^[29]利用TAR技术从金黄色链霉菌中克隆获得了6-去甲基氯四环素合成基因簇(43.5 kb),并借助 Φ C31整合酶的位点特异性重组,获得了含有双拷贝6-DCT合成基因簇的金黄色链霉菌菌株。Lebe等^[31]通过

基因敲除和基于 TAR 技术在米曲霉中进行基因簇的异源表达, 阐明了 4,8-二氧杂-双环[3.2.1]辛烷基 C-12 位置进行氧化修饰的机制和生物合成步骤。黑曲霉是一种出色底盘微生物, 在有机酸、蛋白质和次生代谢产物发酵方面具有广泛的工业应用, 虽然目前已经建立了诸如基于 Cre-loxP^[22]、CRISPR/Cas9^[32-33] 等的基因编辑工具, 但是对于大片段 DNA 序列仍未实现有效装载。基于此, 本研究构建了适配黑曲霉的 TAR 克隆体系, 用于大片段 DNA 高效捕获、重构和表达大型生物合成基因簇, 用于次级代谢产物的高效绿色制造。本研究中, 我们在黑曲霉中建立了限制性内切酶辅助的 TAR 定向克隆技术, 将整个来源于米曲霉的曲酸合成基因簇克隆到一个整合质粒 pSEA-TAR 中, 得到的重组质粒 pSEA-TAR-KA 通过 AMT 转化至黑曲霉中, 最终实现了曲酸合成基因簇在黑曲霉中的异源表达。

虽然本研究成功实现了基于 TAR 克隆大片段 DNA 基因簇及其在黑曲霉中的异源整合表达, 但仍有改善空间。由于本技术需要在目标基因簇两侧进行限制性酶切, 然而在多数情况下, 由于基因簇 DNA 片段较长, 环绕目标基因簇的限制性酶切位点选择空间较小或者不可用, 抑或酶切位点距离目的位置较远, 导致 TAR 克隆效率降低^[34]。后续可尝试基于 CRISPR/Cas9 基因编辑工具, 根据目标序列特征设计 sgRNA, 在体外对基因组 DNA 进行切割, 减小 TAR 克隆的目标片段大小, 提高 TAR 克隆效率^[35]。最近开发的 CReasPy-Fusion 方法, 通过将细菌细胞与携带 CRISPR-Cas9 系统的酵母球状体融合, 可在胞内同时进行克隆大型基因组片段和工程化酵母细胞^[36], 借助这种策略可进一步简化 TAR 克隆步骤, 提高大片段 DNA 捕获效率。

农杆菌介导 DNA 转化黑曲霉的方法转化频率低、步骤烦琐, 而聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体转化具有群体数量大、容易获得纯合的转化子的优点, 黑曲霉转化方法的优化有望进一步提升转化效率。另外, 农杆菌介导的 DNA 片段可能会整合到黑曲霉基因组的非预期位点, 导致基因组结构和功能的改变, 这可能引起位点效应, 影响黑曲霉基因的表达和调控, 因此可通过位点特异性重组实现 DNA 片段的精准导入^[37-38]。

总之, 这一基于 TAR 大片段 DNA 克隆体系证明了直接克隆在新型次级代谢产物挖掘中的作用, 即从海量的基因组数据中快速获得可能参与新型次级代谢产物合成的基因元件/线路的工具, 另外, 也进一步提升并扩展了黑曲霉在重要化合物绿色生物制造中的作用。

REFERENCES

- [1] YU RL, LIU J, WANG Y, WANG H, ZHANG HW. *Aspergillus niger* as a secondary metabolite factory[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 9: 701022.
- [2] 郭宇飞, 闫荣媚, 张小茹, 曹威, 刘浩. 代谢工程改造黑曲霉生产葡萄糖二酸[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(11): 227-237.
- [3] GUO YF, YAN RM, ZHANG XR, CAO W, LIU H. Metabolic engineering modification of *Aspergillus niger* for the production of D-glucaric acid[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(11): 227-237 (in Chinese).
- [3] 周文娟, 付刚, 齐显尼, 郑小梅, 房欢, 夏苗苗, 张大伟, 王钦宏, 郑平, 王钰, 孙际宾. 发酵工业菌种的迭代创制[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(11): 4200-4218.
- [4] ZHOU WJ, FU G, QI XN, ZHENG XM, FANG H, XIA MM, ZHANG DW, WANG QH, ZHENG P, WANG Y, SUN JB. Upgrading microbial strains for fermentation industry[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(11): 4200-4218 (in Chinese).
- [4] MOHEDANO MT, MAO JW, CHEN Y. Optimization of pinocembrin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(1): 144-152.

- [5] ZHANG LJ, LIU X, LI JW, MENG YH, ZHAO GR. Improvement of betanin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 8(1): 54-60.
- [6] WANG YQ, GUO YF, CAO W, LIU H. Synergistic effects on itaconic acid production in engineered *Aspergillus niger* expressing the two distinct biosynthesis clusters from *Aspergillus terreus* and *Ustilago maydis*[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 158.
- [7] LI MZ, ELLEDGE SJ. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC[J]. Nature Methods, 2007, 4(3): 251-256.
- [8] ZHU BG, CAI GF, HALL EO, FREEMAN GJ. In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations[J]. BioTechniques, 2007, 43(3): 354-359.
- [9] GIBSON DG, YOUNG L, CHUANG RY, VENTER JC, HUTCHISON CA, SMITH HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 343-345.
- [10] 田方方, 何博, 吴毅. 基于酿酒酵母的大片段 DNA 组装与转移技术进展[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(7): 101-112.
TIAN FF, HE B, WU Y. Advances in large DNA assembly and transfer based on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. China Biotechnology, 2022, 42(7): 101-112 (in Chinese).
- [11] 王培霞, 马渊, 吴毅. 大 DNA 体内组装技术进展[J]. 生物加工过程, 2019, 17(1): 15-22.
WANG PX, MA Y, WU Y. Advances in large DNA *in vivo* assembly[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(1): 15-22 (in Chinese).
- [12] ITAYA M, FUJITA K, KUROKI A, TSUGE K. Bottom-up genome assembly using the *Bacillus subtilis* genome vector[J]. Nature Methods, 2008, 5(1): 41-43.
- [13] ORR-WEAVER TL, SZOSTAK JW, ROTHSTEIN RJ. Yeast transformation: a model system for the study of recombination[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981, 78(10): 6354-6358.
- [14] HE B, MA Y, TIAN FF, ZHAO GR, WU Y, YUAN YJ. YLC-assembly: large DNA assembly via yeast life cycle[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(15): 8283-8292.
- [15] KEVIN R O, VO KT, MICHAELIS S, PADDON C. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(2): 451-452.
- [16] MANIVASAKAM P, WEBER SC, McELVER J, SCHIESTL RH. Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(14): 2799-2800.
- [17] KOUPRINA N, LARIONOV V. TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution[J]. Nature Reviews Genetics, 2006, 7(10): 805-812.
- [18] KOUPRINA N, LARIONOV V. Selective isolation of genomic loci from complex genomes by transformation-associated recombination cloning in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nature Protocols, 2008, 3(3): 371-377.
- [19] AWAL RP, LEFEVRE CT, SCHÜLER D. Functional expression of foreign magnetosome genes in the alphaproteobacterium *Magnetospirillum gryphiswaldense*[J]. mBio, 2023, 14(4): e0328222.
- [20] BELLER P, FINK P, WOLF F, MÄNNLE D, HELMLE I, KUTTENLOCHNER W, UNTERFRAUNER D, ENGELBRECHT A, STAUDT ND, KULIK A, GROLL M, GROSS H, KAYSSER L. Characterization of the cystargolide biosynthetic gene cluster and functional analysis of the methyltransferase CysG[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2024, 300(1): 105507.
- [21] YAMANAKA K, REYNOLDS KA, KERSTEN RD, RYAN KS, GONZALEZ DJ, NIZET V, DORRESTEIN PC, MOORE BS. Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(5): 1957-1962.
- [22] XU YX, SHAN L, ZHOU YT, XIE ZJ, BALL AS, CAO W, LIU H. Development of a Cre-loxP-based genetic system in *Aspergillus niger* ATCC1015 and its application to construction of efficient organic acid-producing cell factories[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(19): 8105-8114.
- [23] WU L, ZHANG LC, LI XJ, LV RT, CAO W, GAO WX, LIU J, XIE ZJ, LIU H. Effective production of kojic acid in engineered *Aspergillus niger*[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 40.
- [24] AAMIR S. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods[J]. Plant Pathology & Quarantine, 2015, 5(2): 74-81.
- [25] TERABAYASHI Y, SANO M, YAMANE N, MARUI J, TAMANO K, SAGARA J, DOHMOTO M, ODA K,

- OHSIMA E, TACHIBANA K, HIGA Y, OHASHI S, KOIKE H, MACHIDA M. Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis of kojic acid, an industrially important compound from *Aspergillus oryzae*[J]. Fungal Genetics and Biology: FG & B, 2010, 47(12): 953-961.
- [26] JI CH, JE HW, KIM H, KANG HS. Promoter engineering of natural product biosynthetic gene clusters in actinomycetes: concepts and applications[J]. Natural Product Reports, 2024, 41(4): 672-699.
- [27] LI JW, ZHANG XY, WU H, BAI YP. Transcription factor engineering for high-throughput strain evolution and organic acid bioproduction: a review[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 98.
- [28] BIND S, BIND S, SHARMA AK, CHATURVEDI P. Epigenetic modification: a key tool for secondary metabolite production in microorganisms[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 784109.
- [29] WU NX, HUANG H, MIN TL, HU HF. TAR cloning and integrated overexpression of 6-demethylchlortetracycline biosynthetic gene cluster in *Streptomyces aureofaciens*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2017, 49(12): 1129-1134.
- [30] YADAV P, KIM N, KUMARI M, VERMA S, SHARMA TK, YADAV V, KUMAR A. G-quadruplex structures in bacteria: biological relevance and potential as an antimicrobial target[J]. Journal of Bacteriology, 2021, 203(13): e0057720.
- [31] LEBE KE, COX RJ. Oxidative steps during the biosynthesis of squalestatin S1[J]. Chemical Science, 2019, 10(4): 1227-1231.
- [32] ARENTSHORST M, VALAPPIL PK, MÓZSIK L, REGENSBURG-TUĀNK TJG, SEEKLES SJ, TJALLINKS G, FRAAIJE MW, VISSER J, RAM AFJ. A CRISPR/Cas9-based multicopy integration system for protein production in *Aspergillus niger*[J]. The FEBS Journal, 2023, 290(21): 5127-5140.
- [33] NAN YL, OUYANG LM, CHU J. *In vitro* CRISPR/Cas9 system for genome editing of *Aspergillus niger* based on removable bidirectional selection marker AmdS[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2021, 68(5): 964-970.
- [34] LEEM S, NOSKOV VN, PARK J, KIM SI, LARIONOV V, KOUPRINA N. Optimum conditions for selective isolation of genes from complex genomes by transformation-associated recombination cloning[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(6): e29.
- [35] LEE NCO, LARIONOV V, KOUPRINA N. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated TAR cloning of genes and chromosomal loci from complex genomes in yeast[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(8): e55.
- [36] GUESDON G, GOURGUES G, RIDEAU F, IPOUTCHA T, MANSO-SILVÁN L, JULES M, SIRAND-PUGNET P, BLANCHARD A, LARTIGUE C. Combining fusion of cells with CRISPR-Cas9 editing for the cloning of large DNA fragments or complete bacterial genomes in yeast[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(11): 3252-3266.
- [37] PUNT PJ, van den HONDEL CAMJJ. Transformation of filamentous fungi based on hygromycin b and phleomycin resistance markers[M]//Methods in Enzymology. Amsterdam: Elsevier, 1992: 447-457.
- [38] CARVALHO NDSP, ARENTSHORST M, KOOISTRA R, STAM H, SAGT CM, van den HONDEL CAMJJ, RAM AFJ. Effects of a defective ERAD pathway on growth and heterologous protein production in *Aspergillus niger*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(2): 357-373.