

少孢节丛孢中 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的建立及 6-甲基水杨酸合酶新活性位点的发现

贺志强 岳熙桐 黄为平 张克勤 牛雪梅[✉]

云南大学 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室 云南 昆明 650091

摘要:以捕食线虫真菌少孢节丛孢 *Arthrobotrys oligospora* YMF 1.03170 为研究材料,通过优化 sgRNA 表达驱动体系 tRNA^{Gly}, 构建 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 成功获得基因定点编辑菌株。将该 CRISPR/Cas9 系统与同源重组相结合, 可精确地对两个目的氨基酸编码基因同时进行定点置换。结合代谢图谱及前体化合物饲喂实验, 发现 6-甲基水杨酸合酶编码蛋白新的活性位点 Arg17、Arg18、His33 和 His34。本研究将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统应用在少孢节丛孢中, 并成功建立基因编辑精细体系, 为快速构建少孢节丛孢的遗传转化体系和研究该菌的基因功能提供有效方法。

关键词: 少孢节丛孢, CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 定点编辑, 捕食线虫真菌, 6-甲基水杨酸合成酶

[引用本文] 贺志强, 岳熙桐, 黄为平, 张克勤, 牛雪梅, 2021. 少孢节丛孢中 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的建立及 6-甲基水杨酸合酶新活性位点的发现. 菌物学报, 40(9): 2282-2298

He ZQ, Yue XT, Huang WP, Zhang KQ, Niu XM, 2021. Establishment and application of the CRISPR/Cas9 system in *Arthrobotrys oligospora* to identify new active sites of 6-methylsalicylate synthase. Mycosystema, 40(9): 2282-2298

Establishment and application of the CRISPR/Cas9 system in *Arthrobotrys oligospora* to identify new active sites of 6-methylsalicylate synthase

HE Zhi-Qiang YUE Xi-Tong HUANG Wei-Ping ZHANG Ke-Qin NIU Xue-Mei[✉]

State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China

Abstract: A CRISPR/Cas9 gene editing system was successfully constructed in nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* YMF 1.03170 by optimizing the sgRNA expression driving system tRNA^{Gly}. The CRISPR/Cas9 system combined with homologous recombination led to the precise replacement of the two target amino acid coding genes at the same time. Combined with

基金项目: 国家自然科学基金 (21977086, 21867018)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21977086, 21867018).

✉ Corresponding author. E-mail: xmniu@ynu.edu.cn

ORCID: NIU Xue-Mei (0000-0002-8977-8956)

Received: 2021-04-30, accepted: 2021-05-28

metabolic profile and feeding experiment of precursor compounds, new active sites Arg17, Arg18, His33 and His34 in 6-methylsalicylate synthase 283 were found. The fine gene editing system CRISPR/Cas9 established in *Arthrobotrys oligospora* provided an effective method for rapidly constructing the genetic transformation system of *Arthrobotrys oligospora* and studying the gene function of this fungus.

Key words: *Arthrobotrys oligospora*, CRISPR/Cas9 gene editing system, targeted gene editing, nematode-trapping fungus, 6-methylsalicylate synthase

少孢节丛孢 *Arthrobotrys oligospora* 是分布最为广泛、研究最为系统深入的捕食线虫真菌 (Balogh *et al.* 2003; He *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2019)。前期本实验室从捕食线虫真菌少孢节丛孢中分离到一类可以调控真菌形态的 Polyketide synthase-Terpenoid synthase 杂

合的少孢素 (arthrosporol) 类化合物 (Zhang *et al.* 2012)，并通过基因敲除表明少孢素生物合成基因位于 215g 基因簇上，且 AOL_s00215g283 (以下简称 283) 编码 6-甲基水杨酸 (6-MSA) 合成酶，是少孢素生物合成的第一个基因 (图 1A)，对其进行基因敲除后，

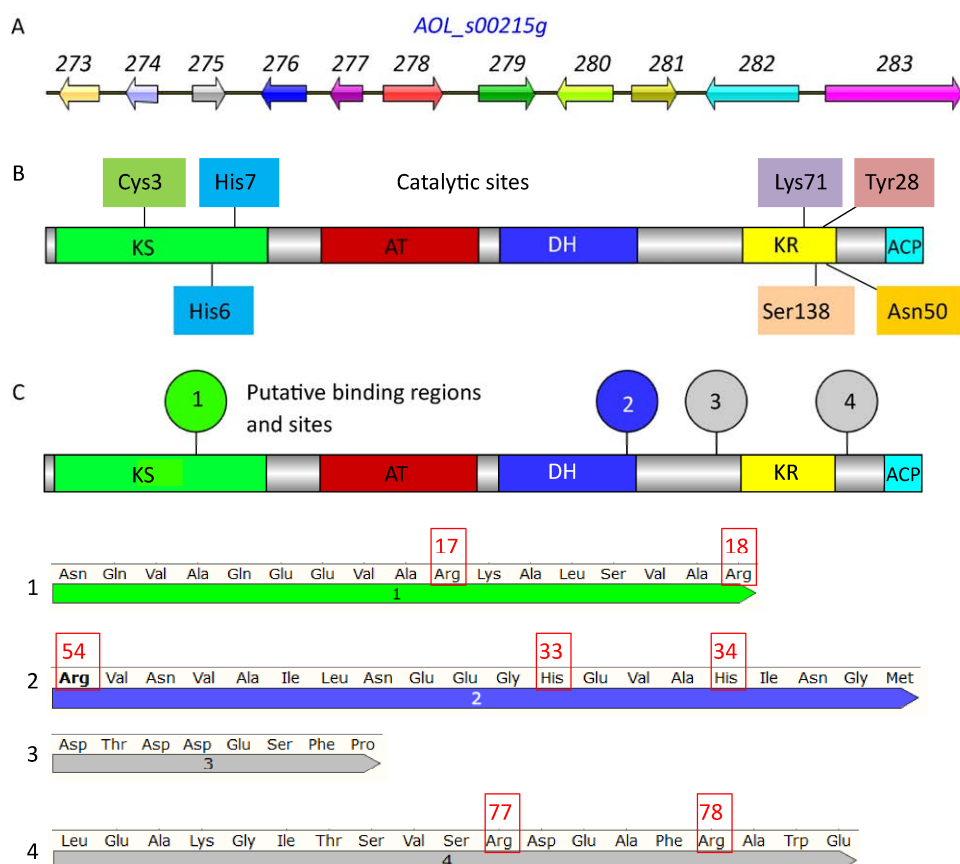


图 1 283 催化活性位点及可能的绑定功能位点 A: 215g 基因簇; B: 283 催化活性位点; C: 预测的 4 个可能绑定区域位置及目标氨基酸

Fig. 1 Catalytic active sites and possible binding functional sites of 283. A: 215g gene cluster; B: Catalytic active site of 283; C: Four predicted possible binding sites and target amino acids.

不仅缺失了少孢素类化合物,且整个代谢图谱上有 $2/3$ 的峰均消失,生长及产孢与野生型 (wild type, WT) 相比无明显差异 (Xu *et al.* 2015)。少孢素合成的前三步分别是 283 参与 6-MSA 合成,经 281 脱羧生成 m-cresol,再经加 282 羟基生成 toluquinol (Xu *et al.* 2016),对前期报道的突变菌株 $\Delta 283$ 进行 6-MSA、m-cresol、toluquinol 的饲喂实验时,发现 $\Delta 283$ 中均未产生少孢素类化合物,也未恢复其缺失的化合物 (卢兰凤 2020)。因此推测 283 除编码 6-MSA 合成酶的功能外,可能也参与调控了少孢素合成通路下游相关基因的转录表达。

通过保守域分析,283 有 5 个聚酮合酶的基本保守域:酮基合成酶 (ketoacyl synthase, KS)、酰基转移酶 (acyltransferase, AT)、酮基还原酶 (ketoreductase, KR)、脱水酶 (dehydratase, DH)、酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP), 7 个催化活性位点 (Cys3、His6、His7、Lys71、Ser138、Tyr28、Asn50, 图 1B) (Hutchinson 1999; Keating & Walsh 1999; Khosla *et al.* 1999; Staunton & Weissman 2001)。通过转录因子预测网站 footprintDB (Contreras-Moreira & Sebastian 2016) 对蛋白 283 进行可能的绑定区域预测。共预测到 4 个区域 (图 1C), 1 号区域位于 KS 上 (KS1), 2 号区域位于 DH 上 (DH2), 3 号区域位于 DH 和 KR 之间 (DK3), 4 号区域位于 KR 和 ACP 之间 (KA4)。通过前期研究报道的转录因子的关键绑定氨基酸 (Ruegg *et al.* 2018), 初步确定了 283 上 4 个区域的关键氨基酸。可以看出这些预测的 4 个可能的绑定区域中的关键氨基酸 (图 1B) 与 7 个已报道催化氨基酸位点并不吻合 (Hutchinson *et al.* 1999; Keating & Walsh 1999; Khosla *et al.* 1999; Staunton & Weissman 2001)。为了验证预测的绑定位点的功能和作用,需要通过定点基因编辑技术对关键氨基酸编码基因进

行替换。

本研究在少孢节丛孢中构建了 CRISPR/Cas9 体系,通过同源重组 (homologous recombination, HDR) 介导的修复原理,补充 donor DNA,对关键氨基酸编码基因用丙氨酸编码基因进行替换,从而研究 283 是否有转录调控作用;同时用传统同源重组方法对 283 进行敲除作为对照,并对其突变菌株及 CRISPR/Cas9 编辑菌株饲喂 3 种前体,来检测其代谢。本研究成功在少孢节丛孢中建立了稳定的 CRISPR/Cas9 编辑体系,通过非同源末端修复 (non-homologous end joining, NHEJ) 以及提供 DNA 供体 HDR 的修复方式成功对少孢节丛孢基因组上的单位点和双位点进行了编辑以及两个目的氨基酸的点突变,通过对新敲除基因 283 的突变菌株进行代谢产物图谱分析以及底物饲喂实验,表明小分子化合物少孢素具有调控作用,并发现未报道的 6-甲基水杨酸合酶的新活性位点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试菌株和质粒: 以少孢节丛孢 *Arthrobotrys oligospora* YMF 1.03170 菌株作为转化受体,由云南生物资源保护与利用国家重点实验室提供,含潮霉素 B 抗性基因 (*hyg B*) 的 *PUC19* 质粒 *p-HygB*,以 *PUC19* 为骨架的 *spCas9* 质粒 *p-TrpC-NLS-coSpCas9-NLS* 根据嗜热杜邦菌进行密码子优化,序列参见 Huang *et al.* (2020) 的报道。

1.1.2 酶、引物和试剂: 本实验所用的 PCR 酶、DNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒等购自宝生物工程 (大连) 有限公司;质粒提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司;PCR 引物合成及测序交由北京擎科生物有限公司 (昆明合成部) 完成,引物序列见表 1;纤维素酶 (cellulase)、蜗牛酶

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因	引物	序列
Gene	Primer	Sequence (5'-3')
283 up	283up-5f	CGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCGAGCCGAGAGGACAACA
	283up-3r	ATCTAGAGGATCCTTGCGCGCCTAGGGACGTCGAGGTGTGGAAG
283 dw	283dw-5f	AACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAAGCCACGCTACCTCGAC
	283dw-3r	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGGAGCGCTCATCGCAACAG
283	283yz-5f	CTTTCCGCTTCAGCTACGC
	283yz-3r	GACACCTCGAATGACCTCG
tRNA	tRNA-f1	CGACTAGTGC GCGATCGC
	tRNA-R2	GGGAAGCTTCAATATCATCTTCTGTGCAAAAAAAGCA
KS1	KS1guide1-r1	CTTCTTCTGTGCAACCTGATGCGCTAGCTGGGAATCG
	KS1guide1-f2	TCAGGTTGCACAGGAAGAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
	KS1guide2-r1	ACTGGAGTCGAGGTAGCGTGTGCGCTAGCTGGGAATCG
	KS1guide2-f2	CACGCTACCTCGACTCCAGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
	KS1donor-f1	GCGGTTGCTGGCGCCTATATTATCGGCACAGCCTTCTGTGG
	KS1donor-r1	TGCAGCAACGGAGAGAGCTTTTGCTGCCACTTCTTCTGTGCAACC
	KS1donor-f2	GCAAAAGCTCTCTCCGTTGCTGCAGTAGACCCATTATCGGTAGCCTTTG
	KS1donor-r2	GCATGCCTGCAGGTCGACATACAGCATGTGCGACAGTTCC
	KS1yz-5f	TATCGGCACAGCCTTCTGTGG
	KS1yz-3r	ACAGCATGTGCGACAGTTCC
DH2	DH2guide-r1	ACTGGAGTCGAGGTAGCGTGTGCGCTAGCTGGGAATCG
	DH2guide-f2	CACGCTACCTCGACTCCAGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
	DH2donor-f1	GCGGTTGCTGGCGCCTATATCACACACCACCGGACATGTC
	DH2donor-r1	TGCAGCTACCTCTGCTCCTTCTCGTTGAGAATTGCGACATTAAGTCCCATCCCGTTTCAACAG
	DH2donor-f2	GCAGTTAATGTCGAATTCTCAACGAGGAAGGAGCAGAGGTAGCTGCAATCAACGGAATGCGATTTTCTGC
	DH2donor-r2	GCATGCCTGCAGGTCGACATGACGAGGAGCTTTGCGATGTC
	DH2yz-5f	ATCGTCTCTCGACTACAAGCCTC
	DH2yz-3r	GATGCAATGATCCTGGAGAGGCC
DK3	DK3guide1-r1	TCCCCAACCTCAGGGTGCTTGC GCTAGCTGGGAATCG
	DK3guide1-f2	AGCACCTGAGGTTTGGGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
	DK3guide2-r1	GTGACAATCTTGAGCGTGGTGC GCTAGCTGGGAATCG
	DK3guide2-f2	CCACGCTCCAAGATTGTACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
	DK3donor-f1	GCGGTTGCTGGCGCCTATATCCAGTGCGAGTGTGGAGAG

待续

续表 1

	DK3donor-r1	TGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCAACGAGCCCTCCCAAACC
	DK3donor-f2	GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCACTTCAAGCTGTCAAGTATGTCAAATCTGTC
	DK3donor-r2	GCATGCCTGCAGGTCGACATCCATCTGGCTTGGAGATATCGG
	DK3yz-5f	GCATGCCTGCAGGTCGACATCCATCTGGCTTGGAGATATCGG
	DK3yz-3r	CCATCTGGCTTGGAGATATCGG
KA4	KA4guide-r1	TACCCAACCCATTCCAGCTTTGCGCTAGCTGGGAATCG
	KA4guide-f2	AAGCTGGAATGGGTTGGGTAGTTTtagagctagaaatagcaagttaaaataaggc
	KA4donor-f1	GCGGTTGCTGGCGCCTATATCAGTGGTGTCTTCATGCC
	KA4donor-r1	TGCGAAAGCTTCATCTGCACTAACGGAGGTGATGCC
	KA4donor-f2	GCAGATGAAGCTTTCGAGCCTGGGAGCACGCTATCA
	KA4donor-r2	GCATGCCTGCAGGTCGACATCCATCTCCGTCAAAGCCG
	KA4yz-5f	CACGACGTGGCTTGCCTC
	KA4yz-3r	AGGAAGTCTGCAATGCTTCCTC

(snailase)、潮霉素 B, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他化学试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.3 主要溶液及培养基: PDA: 200g/L 新鲜土豆, 20g/L 葡萄糖, 16g/L 琼脂粉, 去离子水定容至 1L; TG: 10g/L 葡萄糖, 10g/L 胰蛋白胨; MN buffer: 0.3mol/L MgSO_4 , 0.3mol/L NaCl; 0.6mol/L KCl 溶液: 44.73g/L KCl, 去离子水定容至 60mL; STC 溶液: 山梨醇 182.1g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.35g/L, Tris-HCl 缓冲液 50mmol/L (pH=8.0), 去离子水定容至 100mL; PTC 转化液: 40% PEG4000, KCl 44.73g/L, Tris-HCl 缓冲液 50mmol/L (pH=8.0), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50mmol/L, 去离子水定容至 30mL; TB3 培养基: 蔗糖 200g/L, 酵母浸粉 3g/L, 水解酪蛋白 3g/L, 琼脂粉 7.5g/L, 去离子水定容至 1L。

1.2 方法

1.2.1 编辑载体的构建: 本研究选用少孢素生物合成基因簇上的 6-甲基水杨酸合酶基因 283 作为目标基因, 本实验室前期利用 tRNA^{Gly} self-processing system 系统和来自常

温细菌 mesophilic bacterium *Streptococcus pyogenes* 的 SpCas9 成功在嗜热杜邦菌中构建了高编辑效率的 CRISPR/Cas9 体系 (Huang *et al.* 2020)。本研究对 tRNA^{Gly} 进行优化, 通过与水稻和果蝇的 tRNA^{Gly} 基因的比对, 确定了少孢节丛孢中的 tRNA^{Gly} 基因和假设的 tRNA^{Gly} 启动子。在要突变的目的氨基酸附近查找 PAM 区序列 NGG, NGG 5'端的 20bp 即为 protospacer。构建单 sgRNA 时, PAM 选在目的氨基酸编码基因的 5'端; 构建双 sgRNA 时, 则选取目的氨基酸编码基因前后各一个 PAM 区 (图 2A)。

1.2.2 少孢节丛孢原生质体的制备: 取少孢节丛孢的菌丝块接种于 PDA 培养基中心, 28℃、培养 5d, 将长好的平板接种于 TG 培养基中, 1 板/瓶, 28℃静置 12h, 180r/min 振荡培养 24h, 将上述培养的菌丝倒入无菌漏斗 (内含 4 层擦镜纸) 中过滤收集菌丝体, 用 MN-buffer 溶液洗涤菌丝体两次。挑取适量菌丝转移至 100mL 无菌三角瓶内, 加入经过滤除菌的蜗牛酶液和纤维素酶液各 20mL (蜗牛酶液为

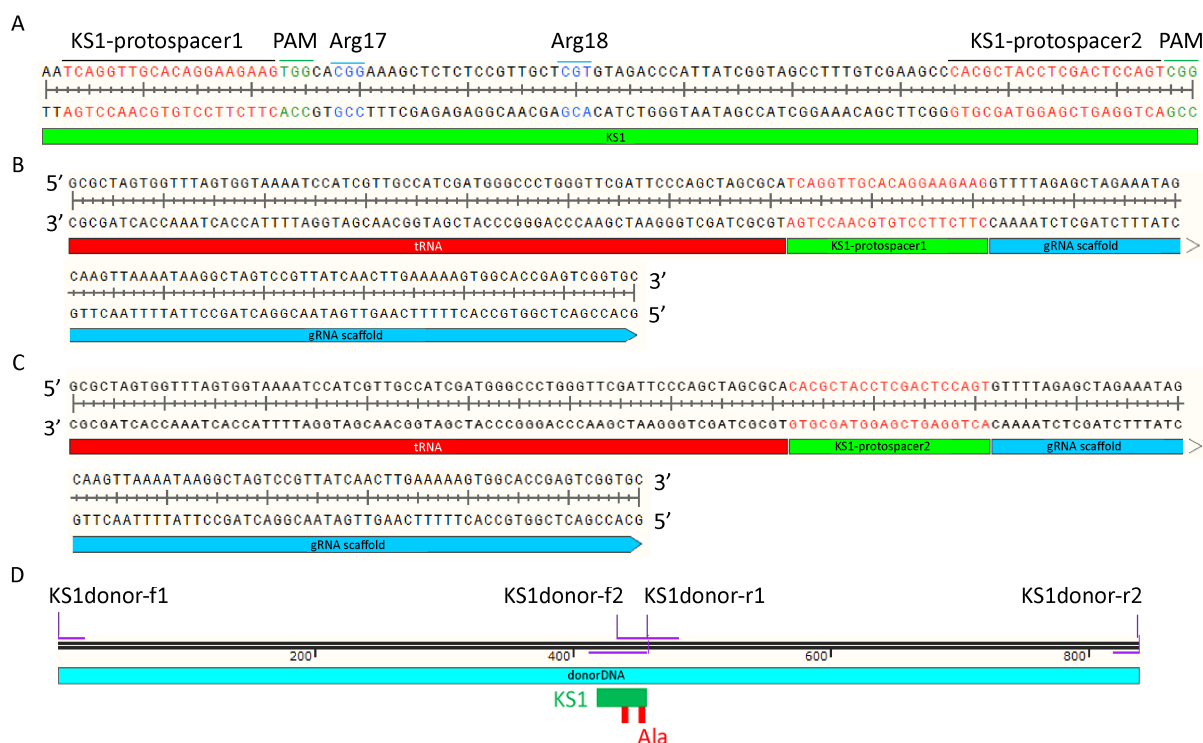


图 2 Protospacer 选择、sgRNA 和 donor DNA 示意图

A: Protospacer 选择; B: sgRNA1; C: sgRNA2; D: Donor DNA

Fig. 2 Protospacer, sgRNA, donor DNA. A: Protospacer; B: sgRNA1; C: sgRNA2; D: Donor DNA.

1g 蜗牛酶/70mL MN-buffer, 纤维素酶液为 1g 纤维素酶/70mL MN-buffer)。30℃ 180r/min 振荡酶解 5h, 加入 20mL 0.6mol/L 的 KCl 终止酶解反应。然后用无菌漏斗 (内含 6 层擦镜纸) 过滤菌丝残片, 收集酶解完全的原生质体, 将原生质体滤液收集至离心管中, 7 000r/min、4℃ 离心 10min。去上清液, 用稳渗液 STC 洗涤原生质体 2 次, 7 000r/min、4℃ 离心 10min, 然后加入 STC 溶液将原生质体富集并调至浓度为 1×10^8 个/mL。

1.2.3 原生质体的转化: 将制备好的原生质体分装到 2mL 的无菌 EP 管中, 每管 200μL, 将 10μg 同源重组的敲除全长片段加入至原生质体悬浮液中轻轻混匀, 迅速放置冰上 30min。向冰浴后的溶液中加入 1mL PTC 液体, 放置于 28℃ 培养箱中静置 30min。然后将离心管

取出, 放置于冰上 5min。吸取上述混匀液均匀涂布于 TB3 固体培养基表面, 放置于 28℃ 培养箱中培养 16h。在平板表面覆上一层含有 200μg/mL 潮霉素 B 的 TB3 培养基。

1.2.4 转化子的鉴定: 待 TB3 固体培养基上长出转化子后, 挑取转化子并转接到含有 200μg/mL 潮霉素 B 的 TYGA 固体平板上。待平板上长满菌丝后, 取菌丝于 1.5mL 离心管中, 加入液氮冷冻后研磨, 利用 DNAiso Reagent 提取 DNA。利用表中的引物对所提基因组进行 PCR 检测, 送北京擎科生物有限公司 (昆明合成部) 测序鉴定阳性转化子。

1.2.5 代谢差异分析: (1) 点突变转化子: 将野生菌株与突变菌株接种于 PDA 培养基上, 28℃ 培养 7d, 接种相同大小的菌块于装有 250mL PDB 培养基中, 28℃、180r/min 发酵 7d;

(2) 喂养实验: 接种相同大小的菌块于装有 250mL PDB 培养基中, 28℃、180r/min 培养 3d, 在突变菌株中分别加入 0.125、0.25、0.5 和 1mmol/L 的 6-MSA、0.25mmol/L 的 m-cresol 和 0.25mmol/L 的 toluquinol, 继续培养 5d, 发酵完成后所有样品加入等体积乙酸乙酯超声萃取, 用真空离心浓缩仪对乙酸乙酯部分进行蒸发浓缩; 用 700μL 的色谱甲醇溶解样品, 过滤到 2mL 的样品瓶中, LC-MS 检测。LC-MS 相关参数参见 Chen *et al.* (2020) 的报道。

2 结果与分析

2.1 283 中 KS 预测绑定区域编辑结果分析

同时选用两个 sgRNA 进行 KS1 定点编辑时, 得到一个成功对 Arg17、Arg18 编码基因 CGG 和 CGT 突变为编码 Ala 的碱基 GCA 但同时意外地缺失了一个 Glu20 编码的 3 碱基(这不会引起基因移码突变)的转化子 KS1-1。同时得到了 11 个在两个 sgRNA 之间缺失 82bp 的敲除株(KS1-4、KS1-8、KS1-9 等)(图 3B)。选用 KS1-1、KS1-4、KS1-8、KS1-9 突变菌株进行发酵提取和代谢分析; 结果显示 KS1-1 与 KS1-4、KS1-8 及 KS1-9 的代谢图谱均与报道的 Δ 283 敲除株的检测结果一致(图 3D), 且均未检测到少孢素(图 2E)。

选用一个 sgRNA 进行 KS1 定点编辑时, 得到一个准确对 Arg17 和 Arg18 编码基因 CGG 和 CGT 突变为编码 Ala 的碱基 GCA 的转化子 KS1-13。同时得到了 3 个+1bp、1 个+2bp、2 个+3bp(多一个 Glu)、1 个-1bp、1 个-2bp、5 个-3bp(少一个 Glu)、1 个-14bp、1 个-26bp 的编辑菌株(图 3C)。选用 KS1-13、-3bp(少一个 Glu)的 KS1-16, +3bp(多一个 Glu)的 KS1-27 进行发酵提取和代谢分析, 结果显示 KS1-13、KS1-16、KS1-27 的代谢图谱均与报道的 Δ 283 敲除株结果一致(图 3F), 且均未检

测到少孢素(图 3G)。表明 KS1 的 Arg17 和 Arg18 为蛋白 283 的上关键氨基酸, 替换其会引起催化合成功能丧失。

2.2 283 中 DH 预测绑定区域编辑结果分析

选用一个 sgRNA 对 2 号位点进行编辑, 得到 14 个成功对 Arg54 以及 His33、His34 进行突变的转化子以及一个只对 His33、His34 进行突变的转化子 DH2-1, 此外还得到两个分别缺失 10/14bp 的突变株(图 4B)。选用 DH2-1、DH2-2、DH2-4、DH2-5 进行代谢分析, 结果显示 DH2-1、DH2-2、DH2-4、DH2-5 的代谢图谱均与 283 敲除株一致(图 4C), 且均未检测到少孢素(图 4D)。结果表明 DH2 的 His33、His34 为 283 的关键氨基酸, 替换会引起催化功能丧失。

2.3 283 中 DK 预测绑定区域编辑结果分析

选用两个 sgRNA 对 3 号位点进行编辑, 得到 9 个缺失 137bp 的敲除株, 未得到对氨基酸进行替换的目标转化子(图 5A), 选用 DK3-3、DK3-4、DK3-5 进行代谢分析, 结果显示 DK3-3、DK3-4、DK3-5 的代谢图谱均与 283 敲除株一致(图 5B), 且均未检测到少孢素(图 5C)。此区域未得到氨基酸替换的转化子, 表明此区域进行编辑时只采用了 NHEJ 的修复方式。

2.4 283 中 KA 预测绑定区域编辑结果分析

选用一个 sgRNA 对 KA 区域进行编辑, 得到 40 个对 Arg77、Arg78 进行突变的转化子, 但所有的转化子均在 PAM 区 5'端的第 3 个碱基处缺失一个 G(图 6B), 选用 KA4-1、KA4-2、KA4-3 进行发酵提取和代谢分析。结果显示 KA4-1、KA4-2、KA4-3 的代谢图谱均与 Δ 283 敲除株结果一致(图 6C), 且均未检测到少孢素(图 6D)。所得到的 40 个转化子均在供体 DNA 修复上之后发生了二次编辑。

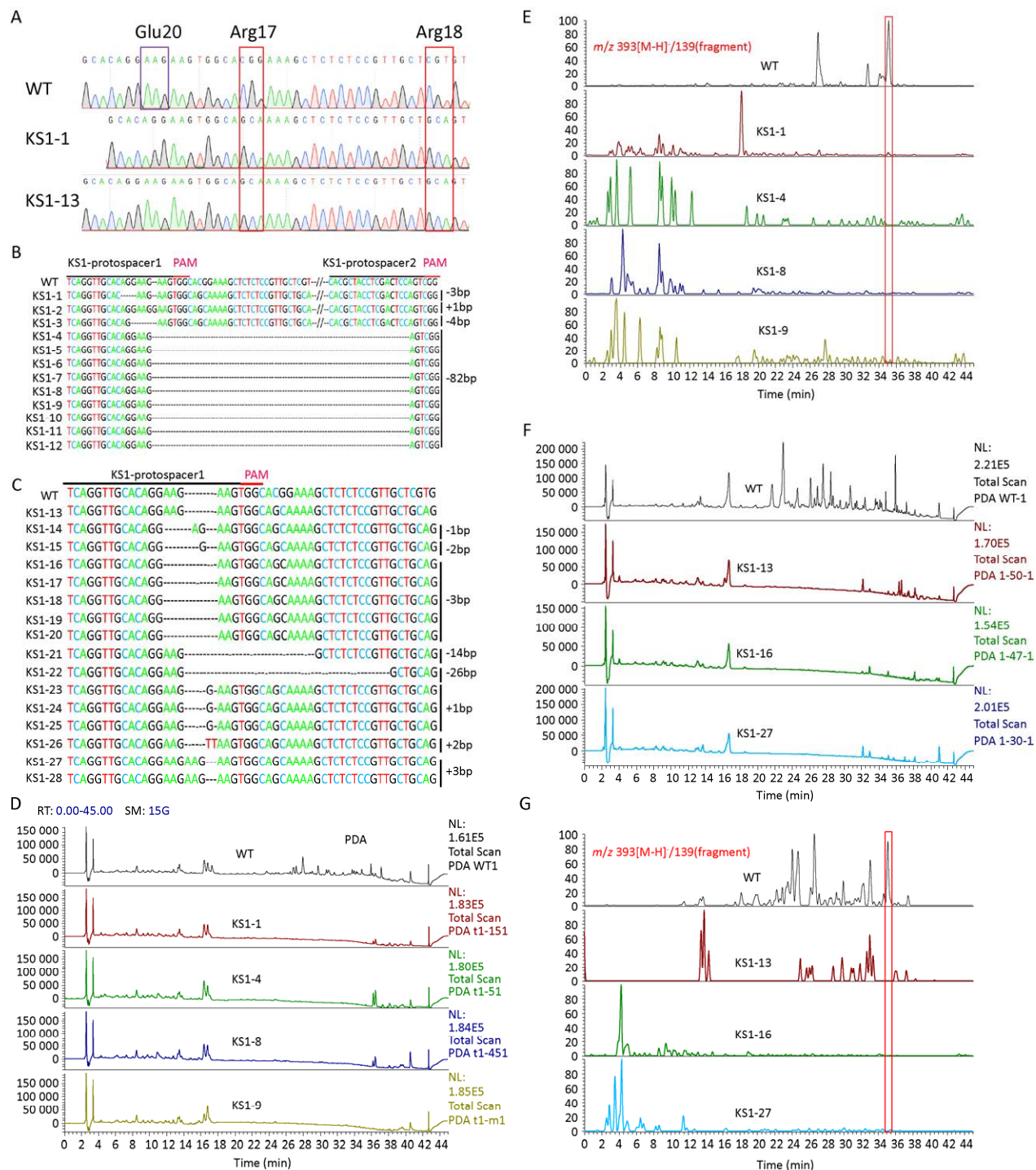


图 3 KS1 编辑形式及转化子代谢分析 A: KS1-1、KS1-13 测序峰图; B: KS1 双 sgRNA 编辑形式; C: KS1 单 sgRNA 编辑形式; D: KS1-1、KS1-4、KS1-8、KS1-9 代谢图谱; E: KS1-1、KS1-4、KS1-8、KS1-9 少孢素鉴定结果; F: KS1-13、KS1-16、KS1-27 代谢图谱; G: KS1-13、KS1-16、KS1-27 少孢素鉴定结果; WT: 野生型。下同

Fig. 3 Editing forms of KS1 and analysis of metabolism. A: Sequencing peak of KS1-1 and KS1-13; B: Editing forms of KS1 double sgRNA; C: Editing forms of KS1 single sgRNA; D: LC-MS of KS1-1, KS1-4, KS1-8 and KS1-9; E: Arthrosporum identification results of KS1-1, KS1-4, KS1-8 and KS1-9; F: LC-MS of KS1-13, KS1-16, KS1-27; G: Arthrosporum identification results of KS1-13, KS1-16, KS1-27. WT: Wild type. The same below.

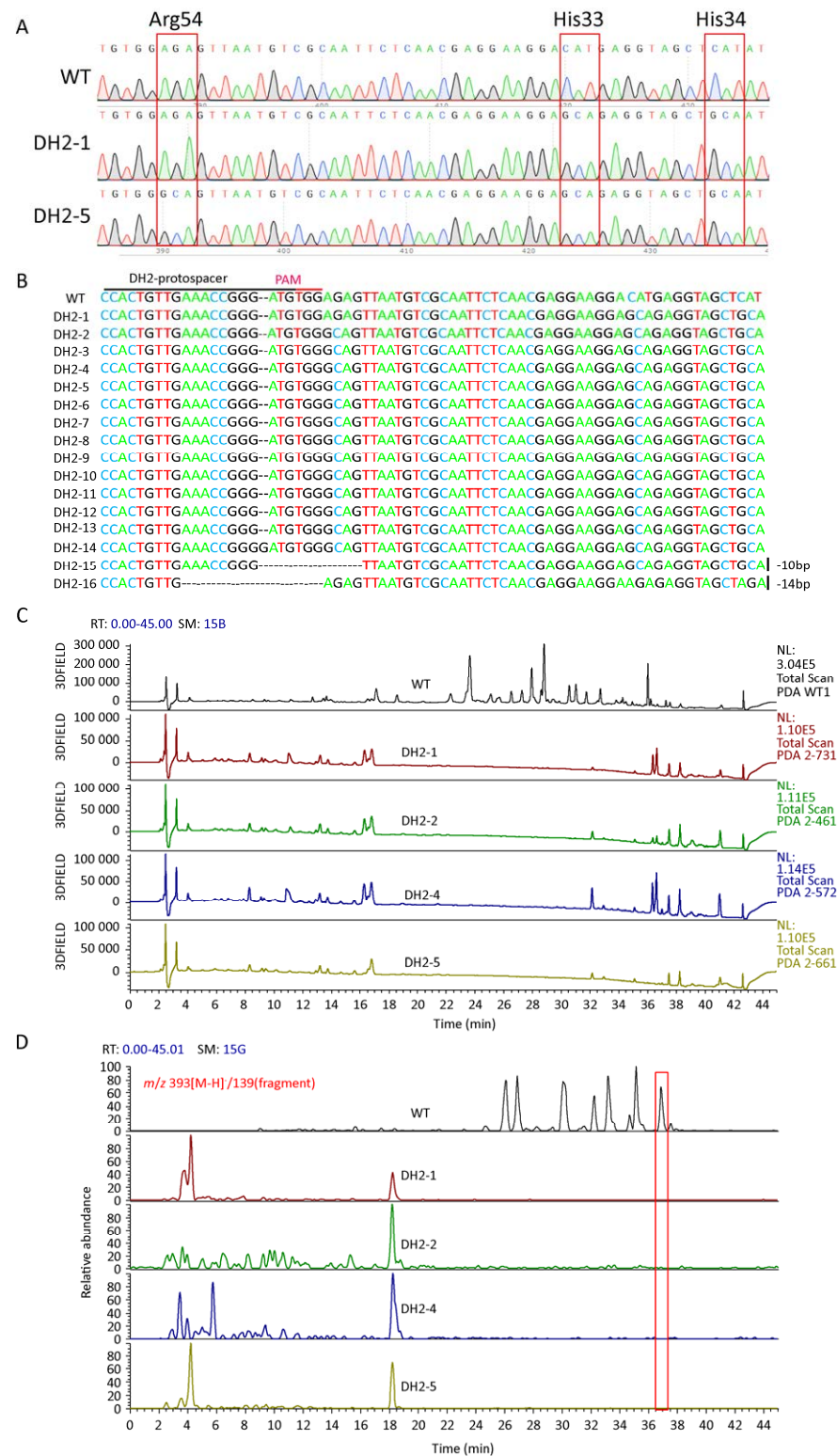


图 4 DH2 单 sgRNA 编辑形式及转化子代谢分析 A: DH2-1、DH2-5 测序峰图; B: DH2 单 sgRNA 编辑形式; C: DH2-1、DH2-2、DH2-4、DH2-5 代谢图谱; D: DH2-1、DH2-2、DH2-4、DH2-5 少孢素鉴定结果

Fig. 4 Editing forms of DH2 single sgRNA and analysis of metabolism. A: Sequencing peaks of DH2-1 and DH2-5; B: Editing forms of DH2-1 and DH2-5; C: LC-MS of DH2-1, DH2-2, DH2-4 and DH2-5; D: Arthrosporol identification results of DH2-1, DH2-2, DH2-4 and DH2-5.

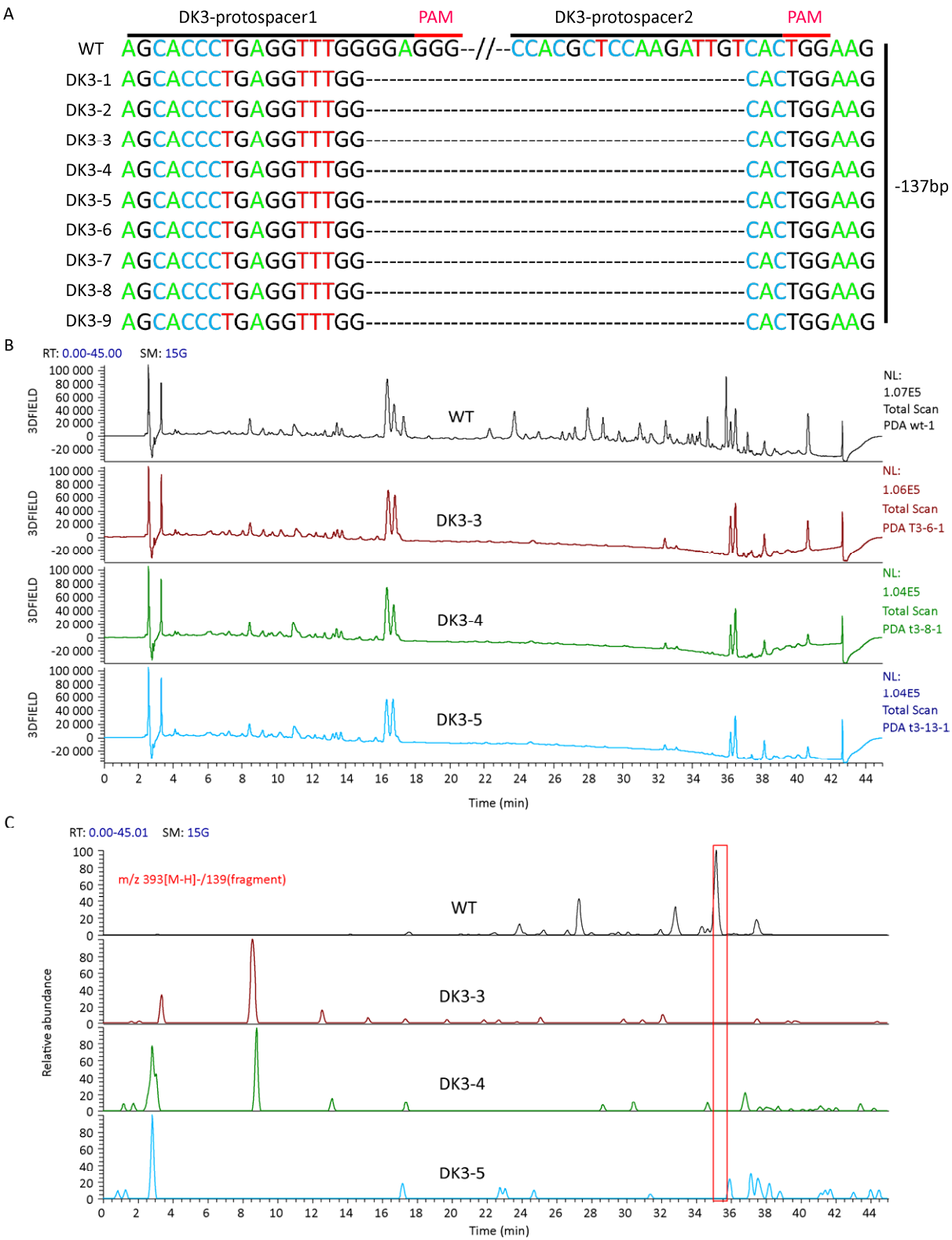


图 5 DK3 双 sgRNA 编辑形式及转化子代谢分析 A: DK3 双 sgRNA 编辑形式; B: DK3-3、DK3-4、DK3-5 代谢图谱; C: DK3-3、DK3-4、DK3-5 少孢素鉴定结果

Fig. 5 Editing forms of DK3 double sgRNA and metabolic analysis. A: Editing forms of DK3 double sgRNA; B: LC-MS of DK3-3, DK3-4, and DK3-5; C: Arthrosporel identification results of DK3-3, DK3-4, and DK3-5.

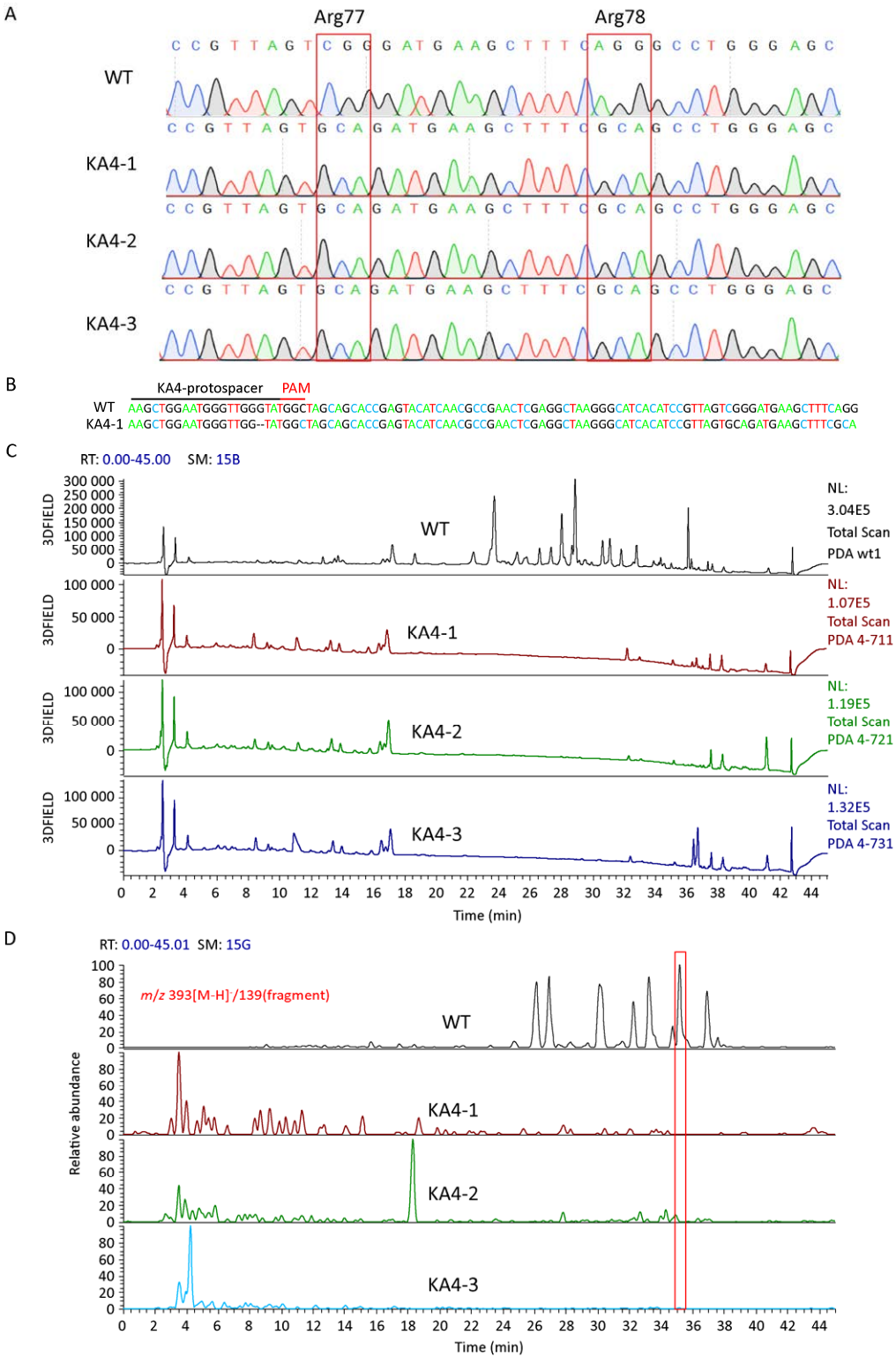


图 6 KA4 单 sgRNA 编辑形式及转化子代谢分析 A: KA4-1、KA4-2、KA4-3 测序峰图; B: KA4 单 sgRNA 编辑形式; C: KA4-1、KA4-2、KA4-3 代谢图谱; D: KA4-1、KA4-2、KA4-3 少孢素鉴定结果

Fig. 6 Editing forms of KA4 double sgRNA and metabolic analysis. A: Sequencing peaks of KA4-1, KA4-2 and KA4-3; B: KA4 single sgRNA editing pattern; C: LC-MS of KA4-1, KA4-2 and KA4-3; D: Arthrosporol identification results of KA4-1, KA4-2 and KA4-3.

2.5 编辑效率分析

对本研究构建的突变菌株进行编辑效率分析，不同位点的编辑效率存在差异，双 sgRNA 位点的碱基置换率低，甚至不能发生置换。大片段缺失率较高，是双 sgRNA 主要的编辑形式。单 sgRNA 位点碱基置换及小片段缺失/插入率较高。

2.6 Δ283 突变菌株喂养结果分析

利用同源重组对 283 中 KS 区域 1 023bp 进行敲除，WT 中理论大小为 1 707bp，突变株理论大小 3 863bp，提取基因组进行 PCR 验证得到 4 个阳性转化子（图 7A），选用 Δ283-E 进行 6-MSA、m-cresol、toluquinol 喂养实验，结果表明喂养 0.125–1mmol/L 的 6-MSA 能不同程度地恢复缺失的代谢产物（图 7B），并均能检测到少孢素类化合物（图 7C），喂养 0.25mmol/L 的 m-cresol、toluquinol 均能不同程度地恢复敲除株的代谢图谱（图 7D），并均能检测到少孢素类化合物（图 7E），对 CRISPR/Cas9 编辑的突变菌株（KS1-1、KS1-13、DH2-1、DH2-2、DK3-3、KA4-1）喂养 0.25mmol/L 的 6-MSA、m-cresol 和 toluquinol 均能不同程度地恢复缺失的代谢产物（图 8）。结果表明 283 编码的蛋白不具有调控作用，而是小分子化合物少孢素具有调控作用。

3 讨论

CRISPR/Cas9 作为新兴的基因编辑体系，既可以利用 NHEJ 造成碱基缺失、插入从而使目标基因丧失功能，又可以通过提供 DNA 供体以 HR 的修复方式实现敲入、单个氨基酸/碱基的定点突变或者插入强启动子进行过表达。例如在大肠杆菌中研究操作子与配体结合的关键位点（mechanisms of operator recognition and ligand binding）通过突变单个氨基酸来实现（Ruegg *et al.* 2018），在杜邦嗜热菌中插入强启动子激活 PKS-NRPS 杂合基因簇（Huang *et al.* 2020）。CRISPR/Cas9 体系已被报道可以在多个物种中进行编辑，但针对不同的物种仍需要进行探索优化才能发挥作用（Cong *et al.* 2013; Jacobs *et al.* 2014; Ji & Sha 2014; Hendel *et al.* 2015; Niu *et al.* 2015; Hammond *et al.* 2016; Port & Bullock 2016）。少孢节丛孢作为研究捕食线虫真菌与线虫互作的模式菌株，长期以来都是以同源重组的方式进行基因敲除研究其功能，缺乏有效地基因编辑技术。本研究成功建立了少孢节丛孢的 CRISPR/Cas9 体系，只需要 CRISPR/Cas9 系统即可完成基因的敲除，为研究少孢节丛孢基因功能，改造次级代谢产物生物合成途径，建立高效捕杀线虫的生防菌株提供了重要的研究方法。

表 2 编辑效率

Table 2 Editing efficiency

区域	sgRNA	碱基置换	小片段缺失/插入	大片段缺失
Region		Base replacement (%)	Small fragment missing/insertion (%)	Large fragment missing (%)
KS1	Single sgRNA	5.8	5.8	15.7
	Single sgRNA	26.3	24.6	/
DH2	Single sgRNA	26.4	3.7	/
DK3	Double sgRNA	/	/	64.3
KA4	Single sgRNA	83.3	83.3	/

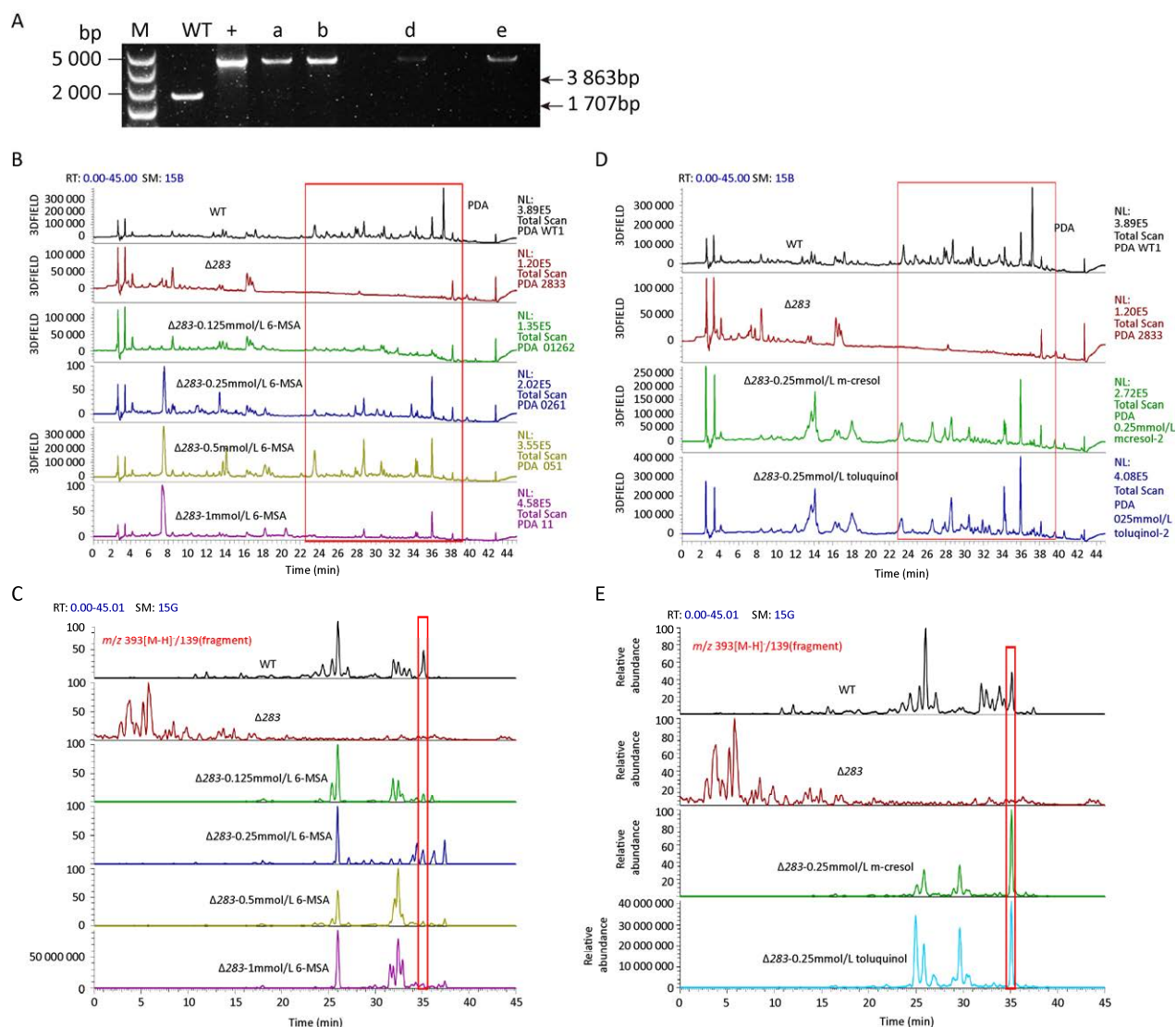


图 7 $\Delta 283$ 同源重组敲除转化子验证及饲喂结果 A: 对转化子进行扩增验证, a、b、d、e 为阳性转化子, M: DL5000marker, WT: 野生型菌株, +: 质粒为模板的阳性对照; B: 对转化子饲喂不同浓度 6-MSA 的代谢图谱; C: 转化子饲喂不同浓度 6-MSA 的少孢素鉴定结果; D: 饲喂 m-cresol、toluquinol 的代谢图谱 E: 转化子饲喂 m-cresol、toluquinol 的少孢素鉴定结果

Fig. 7 The verification and feeding results of homologous recombination knockout transformants. A: The transformants were amplified and verified. a, b, d, e were positive transformants, M: DL5000 marker, WT: wild-type strain, +: plasmid was the template positive control; B: LC-MS of transformers fed with different concentrations of 6-MSA; C: Arthrosporols identification results of transformers fed with different concentrations of 6-MSA; D: LC-MS of the feeders fed with m-cresol and toluquinol; E: Arthrosporols identification results of the feeders fed with m-cresol and toluquinol.

CRISPR/Cas9 的脱靶现象已有很多报道, 而双 sgRNA 可以减少脱靶的发生 (Ran *et al.* 2013)。因此本研究首先设计双 sgRNA 位点来进行编辑, 结果显示, 双 sgRNA 位点进行编

辑时, 基本以 NHEJ 的方式进行修复, 从而对两个 sgRNA 之间的序列进行剪切引起基因的大片段缺失, 而并未以供体 DNA 为模板进行 HDR 修复。当用单 sgRNA 进行编辑时, 基本

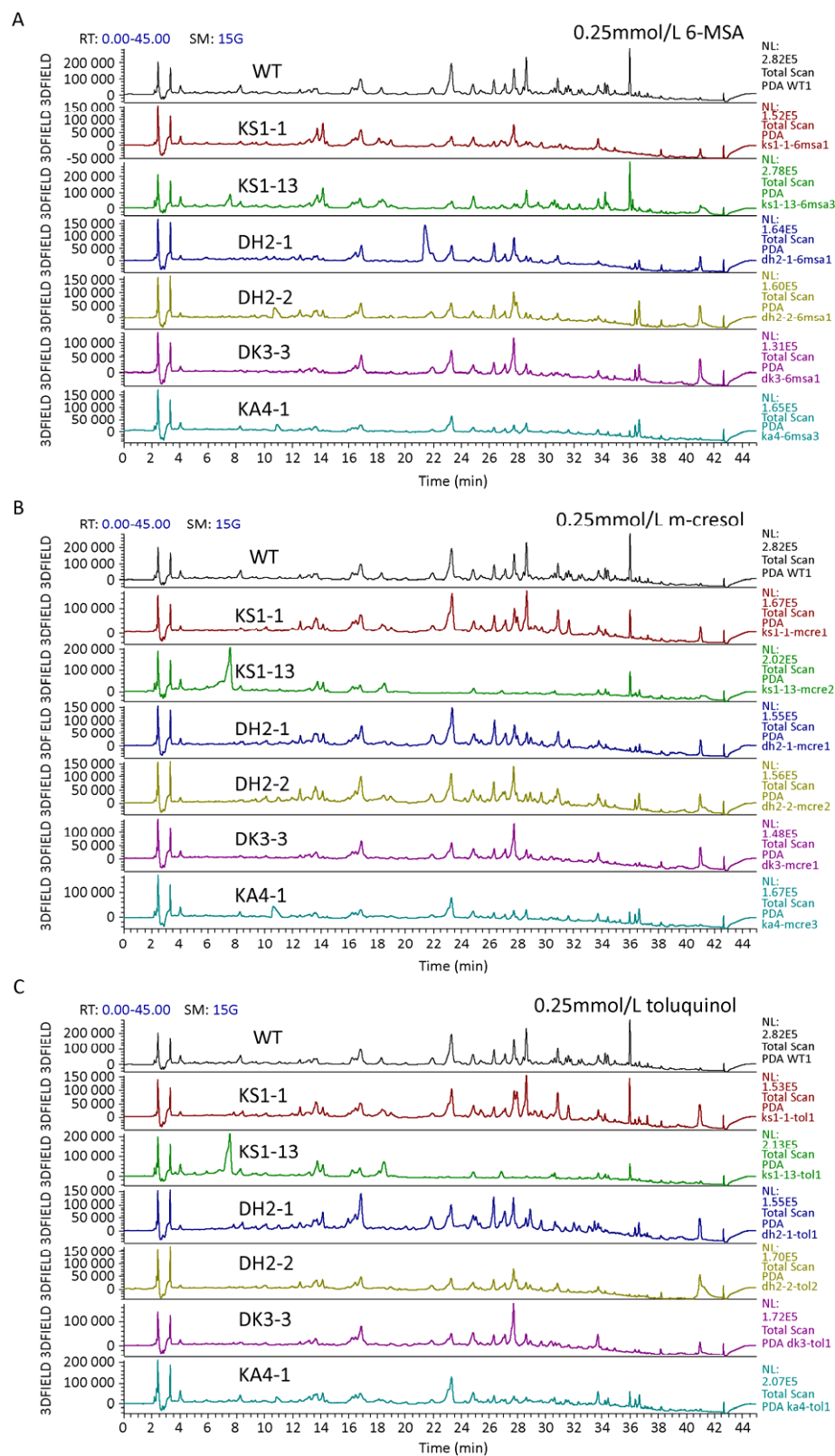


图 8 CRISPR/Cas9 编辑菌株饲喂结果 A: 6-MSA 饲喂结果; B: M-cresol 饲喂结果; C: Toluquinol 饲喂结果

Fig. 8 Feeder results of CRISPR/Cas9 editing strains. A: Feeder results of 6-MSA; B: Feeder results of m-cresol; C: Feeder results of toluquinol.

以 HDR 方式修复,从而达到氨基酸的置换,也并未发现脱靶现象。因此,建议在进行点突变等需要 HDR 修复方式时,选用单 sgRNA,需要大片段缺失时,可以选用双 sgRNA。对 4 个预测区域进行编辑,均得到多个发生编辑的菌株,但目的突变菌株却很少,主要为两个问题:1)设计双 sgRNA,对基因组进行准确切割后,没有以供体 DNA 为模板进行修复。2)设计单 sgRNA,以供体为模板修复后,发生二次编辑。两种修复方式 HDR 和 NHEJ 之间存在竞争关系 (Jayavaradhan *et al.* 2019),且 HDR 还受到细胞周期的局限 (Heyer *et al.* 2010),HDR 在作用时,供体 DNA 需要靠近 DSB 才可以发挥作用,因此可能导致 HDR 效率较低。HDR 的效率也和置换位点与 DSB 位点的距离有关,置换位点距离 DSB 位点越近效率越高 (Inui *et al.* 2014),本研究选取的 sgRNA 位点均是距离置换位点最近的,当用单 sgRNA 进行编辑时,突变株均进行了碱基的置换,表明,本研究所选用的 sgRNA 位点均有一个较高的置换效率。采用单 sgRNA 时,可以显著提高 HDR 的效率,但依然没有得到多个目的突变株,是由于采用 HDR 进行修复后,不能破坏核酸酶的识别位点,使 protospacer 依然完整存在,可以被 sgRNA 识别,从而通过 NHEJ 进行修复 (Cox *et al.* 2015),二次编辑的问题可以在 donor DNA 上利用密码子的简并性在不改变氨基酸序列的前提下改变 protospacer 的碱基序列,从而避免二次编辑。

此外,对 KS1 的 Arg17、Arg18, DH2 的 His33、His34 用丙氨酸替换后,均会使 283 基因丧失功能,表明这是未报道的新活性位点。对新敲除 283 的 $\Delta 283$ 及 CRISPR/Cas9 编辑菌株进行 6-MSA、m-cresol、toluquinol 3 种前体的饲喂实验,均能不同程度地恢复代

谢图谱以及重新产生少孢素类的化合物,表明 283 敲除后导致缺失的化合物是由于缺失少孢素化合物导致。而之前的敲除菌株饲喂不能恢复代谢图谱,可能是因为多次传代,菌株老化引起。

综上所述,本研究成功在少孢节丛孢中建立了 CRISPR/Cas9 编辑体系,发现了 283 新的活性位点,并表明小分子化合物少孢素具有调控作用,为研究少孢节丛孢基因功能,改造次级代谢产物生物合成途径,建立高效捕杀线虫的生防菌株提供了重要的研究方法。

[REFERENCES]

- Balogh J, Tunlid A, Rosén S, 2003. Deletion of a lectin gene does not affect the phenotype of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Fungal Genetics & Biology*, 39(2): 128-135
- Chen YH, Liu X, Dai R, Ou X, Xu ZF, Zhang KQ, Niu XM, 2020. Novel polyketide-terpenoid hybrid metabolites and increased fungal nematocidal ability by disruption of genes 277 and 279 in nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68: 7870-7879
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F, 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339: 819-823
- Contreras-Moreira B, Sebastian A, 2016. FootprintDB: analysis of plant Cis-regulatory elements, transcription factors, and binding interfaces. *Methods in Molecular Biology*, 1482: 259-277
- Cox DB, Platt RJ, Zhang F, 2015. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature Medicine*, 2015(2): 121-131
- Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi

- C, Katsanos D, Gribble M, Baker D, Marois E, Russell S, Burt A, Windbichler N, Crisanti A, Nolan T, 2016. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*, 34: 78-83
- He ZQ, Tan JL, Li N, Zhang HX, Chen YH, Wang LJ, Zhang KQ, Niu XM, 2019. Sesquiterpenyl epoxy-cyclohexenoids and their signaling functions in nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67: 13061-13072
- Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, Steinfeld I, Lunstad BD, Kaiser RJ, Wilkens AB, Bacchetta R, Tsalenko A, Dellinger D, Bruhn L, Porteus MH, 2015. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nature Biotechnology*, 33: 985-989
- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J, 2010. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 44: 113-139
- Huang WP, Du YJ, Yang Y, He JN, Lei Q, Yang XY, Zhang KQ, Niu XM, 2020. Development of two CRISPR/Cas9 systems in *Thermomyces dupontii* and characterization of key gene functions in thermolide biosynthesis and fungal adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(20): e01486-20
- Hutchinson CR, 1999. Microbial polyketide synthases: more and more prolific. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 3336-3338
- Inui M, Miyado M, Igarashi M, Tamano M, Kubo A, Yamashita S, Asahara H, Fukami M, Takada S, 2014. Rapid generation of mouse models with defined point mutations by the CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 4: 5396
- Jacobs JZ, Ciccaglione KM, Tournier V, Zaratiegui M, 2014. Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast. *Nature Communications*, 5: 5344
- Jayavaradhan R, Pillis DM, Goodman M, Zhang F, Zhang Y, Andreassen PR, Malik P, 2019. CRISPR-Cas9 fusion to dominant-negative 53BP1 enhances HDR and inhibits NHEJ specifically at Cas9 target sites. *Nature Communications*, 10(1): 2866
- Ji W, Sha J, 2014. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156: 836-843
- Keating TA, Walsh CT, 1999. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(5): 598-606
- Khosla C, Gokhale RS, Jacobsen JR, Cane DE, 1999. Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annual Review of Biochemistry*, 68: 219-253
- Lu LF, 2020. Studies on the metabolites of *Arthrobotrys oligospora* mutants and *Dactylella alba*. Yunnan University, Kunming. 1-144
- Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, Xiang AP, Zhou J, Guo X, Bi Y, Si C, Hu B, Dong G, Wang H, Zhou Z, Li T, Tan T, Pu X, Wang F, Ji S, Zhou Q, Huang X, Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu YG, 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular Plant*, 8: 1274-1284
- Port F, Bullock SL, 2016. Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs. *Nature Methods*, 13: 852-854
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F, 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6): 1380-1389
- Ruegg TL, Pereira JH, Chen JC, DeGiovanni A, Novichkov P, Mutalik VK, Tomaleri GP, Singer

- SW, Hillson NJ, Simmons BA, Adams PD, Thelen MP, 2018. Jungle express is a versatile repressor system for tight transcriptional control. *Nature Communications*, 9(1): 3617
- Staunton J, Weissman KJ, 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*, 18: 380-416
- Xu ZF, Chen YH, Song TY, Zeng ZJ, Yan N, Zhang KQ, Niu XM, 2016. Nematicidal key precursors for the biosynthesis of morphological regulatory arthrosporols in nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(42): 7949-7956
- Xu ZF, Wang BL, Sun HK, Yan N, Zeng ZJ, Zhang KQ, Niu XM, 2015. High trap formation and low metabolite production by disruption of the polyketide synthase gene involved in the biosynthesis of arthrosporols from nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 9076-9082
- Zhang GS, Zheng YQ, Ma YX, Yang L, Xie MH, Zhou DX, Niu XM, Zhang KQ, Yang JK, 2019. The velvet proteins Vosa and Velb play different roles in conidiation, trap formation, and pathogenicity in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1917
- Zhang HX, Tan JL, Wei LX, Wang YL, Zhang CP, Wu DK, Zhu CY, Zhang Y, Zhang KQ, Niu XM, 2012. Morphology regulatory metabolites from *Arthrobotrys oligospora*. *Journal of Natural Products*, 75(7): 1419-1423
- [附中文参考文献]
- 卢兰风, 2020. 捕食线虫真菌 *Arthrobotrys oligospora* 突变菌株及 *Dactylella alba* 菌株中代谢产物的研究. 云南大学硕士论文, 昆明. 1-144

(本文责编: 王敏)