

丝状真菌基因敲除技术研究进展

廖海艳, 薛萍红, 田学琴, 胡志宏

江西科技师范大学, 生命科学学院, 江西 南昌

收稿日期: 2024年7月3日; 录用日期: 2024年8月29日; 发布日期: 2024年9月6日

摘要

丝状真菌是一类具有生产多种活性天然化合物的菌种, 其在工业生产中的经济价值较高。丝状真菌具有较为复杂的遗传背景, 基因工程应用与丝状真菌的时间与应用于其他的物种相比较晚, 基因敲除作为改造丝状真菌的重要方法之一, 能够被用于明确基因在同种菌株中的功能, 另外, 基因敲除能有效地阻遏旁路代谢, 增加目的产物的产量。本文重点介绍了丝状真菌的价值和研究进展, 并分别对常用于丝状真菌基因敲除的技术以及另外几种少见的用于丝状真菌基因敲除的技术进行了介绍, 总结了各项技术应用于丝状真菌的研究进展, 尤其是无痕敲除技术在丝状真菌中的应用, 对丝状真菌基因敲除技术的应用前景进行了展望, 以为丝状真菌基因敲除的深远发展提供一定的理论参考。

关键词

丝状真菌, 基因敲除, 同源重组, CRISPR

Research Progress on Gene Knockout in Filamentous Fungi

Haiyan Liao, Pinghong Xue, Xueqin Tian, Zhihong Hu

College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang Jiangxi

Received: Jul. 3rd, 2024; accepted: Aug. 29th, 2024; published: Sep. 6th, 2024

Abstract

Filamentous fungi show good economic value, because it has the ability to produce a variety of active natural compounds. The genetic background of filamentous fungi is relatively complex, and the use of genetic engineering to modify filamentous fungi is relatively late. Gene knockout is one of the important methods to modify filamentous fungi. Gene knockout technology can clarify the function of genes and effectively block or weaken the bypass metabolic pathway, so that the metabolic flux is concentrated to the target product. This review focuses on the value and research progress of filamentous fungi, and introduces the commonly used techniques for gene knockout of filamentous

fungi and several other rare techniques for gene knockout of filamentous fungi, and summarizes the research progress of each technology applied to filamentous fungi, especially the application of non-striatal knockout technology in filamentous fungi. The application prospect of filamentous fungi gene knockout technology was prospected in order to provide some theoretical reference for the far-reaching development of filamentous fungi gene knockout.

Keywords

Filamentous Fungi, Gene Knockout, Homologous Recombination, CRISPR

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

基因敲除(gene knockout)也被称为基因打靶,是一种 20 世纪 80 年代诞生并随后飞速发展起来的分子生物学技术,它能够通过一定的途径准确的使机体特定的基因失活或缺失,被敲除特定基因的生物体能够稳定地遗传[1]。传统基因敲除技术利用自发的同源染色体随机交换或进行大规模随机插入突变,随着基因敲除技术的不断发展,诞生了多种新兴的可控的定点基因敲除技术,如锌指核酸内切酶技术(Zinc Finger Nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶技术(Transcription Activator-like Effector Nuclease, TALEN)、成簇的规律间隔的短回文重复序列技术(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)和 RNA 干扰(RNAi)等。基因敲除技术是一种重要的基因修饰技术,也是研究微生物基因功能、改造微生物代谢途径、调节微生物产物产量的重要手段。

微生物是廉价的、可持续发展的自然资源,其代谢产物可广泛用于工业生产,但微生物自身固有的代谢途径通常在工业生产中生产效率不高[2]。因此,研究者常利用过度表达技术以及基因敲除技术调节微生物提高目的代谢产物产量。丝状真菌(Filamentous Fungi),又称霉菌真菌,是一类菌丝发达的微生物,其代谢产生的多肽、多糖、植物激素、抗生素、有机酸等代谢产物具有重要的工业价值。丝状真菌基因遗传较复杂,其含有更多的参与植物聚合物降解和次生代谢产物产生的基因;难以在液体培养中高密度生长;通过重组进行菌株开发耗时;利用基因敲除技术对其进行基因改造相对其他常见的微生物较晚;与细菌和酵母相比,基因操作方法复杂[3]。但丝状真菌能够较高效率地产出具有生物活性的产物,学者看重其巨大的发展潜力,从而对丝状真菌广泛地关注和研究[4]。目前,已经有大量的利用基因敲除技术进行丝状真菌基因改造的实验性研究,但关于丝状真菌基因敲除技术研究的综述较少。本文重点介绍了丝状真菌的价值和研究进展,并分别对常用于丝状真菌基因敲除的技术以及另外几种少见的用于丝状真菌基因敲除的技术进行了介绍,总结了各项技术应用于丝状真菌的研究进展,尤其是无痕敲除技术在丝状真菌中的应用,对丝状真菌基因敲除技术的应用前景进行了展望,以为丝状真菌基因敲除的深远发展提供一定的理论参考。

2. 丝状真菌

丝状真菌菌丝发达,且不产生大型子实体结构,营养型为异养型,常见的丝状真菌包括曲霉菌、青霉菌、孢子丝菌和镰刀菌等。丝状真菌因具有能发酵廉价原料地能力,常被用作工业发酵微生物,其生产的各种天然活性物质可以加工成多种产品进行销售,并且其加工产品十分受欢迎,用丝状真菌进行生产能够大幅度降低生产成本、增加经济效益。大约 50%的工业酶是由丝状真菌产生的,产量往往能达到

每升几十克。据研究,丝状真菌与其他蛋白质表达系统相比具有明显优势[5][6]。丝状真菌广泛存在于高盐、高温、高压等极端环境中,具有产生特殊次级代谢产物抵消不利生存条件的能力[7],且其生长速率快。丝状真菌产生的天然活性化合物具有制成药品、充当食品添加剂、生产生物燃料等经济价值,其产物包括多肽类、多糖类、植物激素类、抗生素类(如青霉素、头孢菌素药物、灰黄霉素等)等。丝状真菌所具有的高产量、高生长速率、发酵原料廉价等特点使其有较好的发展前景,越来越多的学者利用基因工程对丝状真菌基因表达、代谢功能、代谢产物、研究方法等进行研究。例如,Deng H [8]等研究了一种优化方法来识别丝状真菌潜在途径、修改内源途径、整合外源途径、并为其多样化的代谢物和理想的生产力开发新的途径。Liu J [9]等结合基因组测序分析 74 个丝状真菌次生代谢产物簇,发现经少量修改后,该程序也可用于其他真菌。Alberti F [10]等总结了丝状真菌的生物活性天然产物的用途以及丝状真菌中的异源表达。丝状真菌多合胞体的生长习性是目前丝状真菌研究的热点之一,丝状真菌能通过菌丝融合交换遗传物质、共享遗传资源和营养。对丝状真菌合胞体生长习性的研究以及进行了数十年,以往的研究主要集中在合胞体基因表达、代谢功能和蛋白质生产方面。现阶段,更多的学者对更深层次的合胞体发挥作用和增殖的机制进行研究。Fischer MS [11]等总结了子囊菌丝状真菌细胞间介导细胞间通讯和细胞融合的分子和遗传机制,表明了调节细胞间相互作用的动态分子信号传导网络结构组成。

丝状真菌在工业中常被用于生产各种酶和代谢物,但由于其固有的代谢途径往往不是最适合工业生产的,往往会对丝状真菌进行特殊改造使其适用于工业生产[2]。目前最常用的基因改造方法是利用基因工程对丝状真菌进行基因改造,使目的产物产量增多、副产物产量减少,进而提高丝状真菌应用于工业生产的效益。Lena Wohlschlagler [12]等使用基因重组法实现乙二醛氧化酶在 *Pichia pastoris* 和 *Trichoderma reesei* 这两种丝状真菌中的异源表达,结果表明,这两种表达宿主都适合高水平生产目标蛋白。Bailey AM [13]等发现,使用组成型启动子在 *A. oryzae* 中异源表达七个截短侧耳素生物合成基因,比原始生产菌株 *C. passeckerianus* 高 10 倍。目前,由于丝状真菌具有重要经济发展潜能,越来越多的学者对丝状真菌生长、发育、增殖机制进行研究,利用基因工程等手段对其进行改造。但丝状真菌有一层成分复杂且具有多样性的细胞壁,是外源基因进入细胞并整合进基因组的主要障碍,丝状真菌有多核、遗传背景复杂也加大了对其进行基因敲除的难度,利用基因工程对丝状真菌进行改造起步较晚[4],丝状真菌的许多内在机制仍然是未知的,基因工程中的多种敲除策略在大多数丝状真菌的研究中尚未成熟,对丝状真菌的研究方法其内在机制以及研究方法仍需要进一步发展探索。

3. 丝状真菌基因敲除技术

基因敲除是一种现代分子生物学技术,该技术于 20 世纪 80 年代后半期基于基因同源重组技术诞生,在随后迅速兴起。在技术发展初期,常利用同源重组或随机插入突变进行基因敲除。到如今,基因敲除发展出了三代新型技术 ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9 以及 RNAi,也就是新兴基因敲除技术。基因敲除方法众多、各有优劣,因此,根据不同物种的特点选择合适的基因敲除方法至关重要[14]。常用于丝状真菌基因敲除的技术为同源重组技术和 CRISPR 技术,CRISPR 技术在真菌遗传育种方面具有重要应用前景,已经成为近年丝状真菌的研究热点。

3.1. 利用同源重组进行基因敲除

同源重组(homology directed repair, HDR)是一种生物体生来就具有的细胞内修复 DNA 损伤的机制,由限制性内切酶、DNA 连接酶等多种重组酶介导的多种重组系统,可使带有目标基因同源臂的外源 DNA 与目标基因发生基因重组,进而实现目的基因的精准敲除[15]。丝状菌在工业中广泛应用,研究者利用同源重组对微丝状菌进行改造以提高其生产性能,有研究显示[16],丝状细菌、丝状酵母和丝状真菌是三大类工业丝状菌。丝状细菌主要包括工程丝状菌和天然放线菌,工程丝状菌可通过基因工程技术将细胞形

态调节为丝状,以增加聚羟基脂肪酸酯、酶、海藻酸寡糖等天然产物的合成,用于工程丝状菌的基因工程主要涉及细胞分裂、细胞壁和寿命。天然放线菌通过孢子繁殖,并且以菌丝状生长,其与分生孢子能够共同形成分枝菌丝体,突变体筛选和基因工程技术常被用于改造放线菌,从而达到增强目的产物的合成的目的。丝状酵母可以形成胚芽孢子和假菌丝,以丝状形式生长,进一步提高细胞耐受性和基因工程能有效增强其生产效率。丝状真菌不同于丝状细菌和酵母,其具有真正的发达菌丝,主要包括曲霉属、根霉属、青霉属、毛霉属,常利用基因工程和突变体筛选进行改造。

目前,丝状真菌同源重组的研究主要是明确特定的基因功能、改变生物体特定产物的代谢途径、辅助明确调控机制和代谢机制等。同源重组敲出技术在改变代谢途径,提高目的产物产量方面的研究一直是一大研究热点,例如,Aigner团队使用丝状真菌中的里氏木霉菌株,通过Cre-loxP同源重组系统在丝状真菌中实现了多轮抗性筛选基因重复使用[17]。基于Cre-loxP的遗传系统删除oahA基因,并插入pyc、mdh3和C4二羧酸转运蛋白基因c4t318。由此产生的菌株在发酵罐中产生L-苹果酸的含量高达约200 g/L,同时还产生28 g/l柠檬酸和1.87 g/l富马酸[18]。明确基因功能以及明确合成与代谢机制是同源重组技术重要的作用之一。吕佳[19]运用利用同源重组的方式对丝状真菌基因组中Myrothecisin类化合物预测核心基因进行敲除,明确了两个负责调控myrothecisin E生物合成的基因,基于此进一步推测了myrothecisin E的合成途径。陈思羽[20]等利用同源重组法对丝状真菌中的两个光敏色素基因PaPhy1和PaPhy2进行基因定点敲除,发现两个光敏色素基因对丝状真菌有性生殖过程起正调节作用,对SOD酶活性和POD酶活性起负调节作用,突变型菌株的ROS含量改变,导致其衰老延缓、生命周期延长,将其作为工程菌株应用于纤维素降解中可能生产更多的纤维素降解酶。

利用同源重组进行基因敲除已经广泛应用于基因研究领域。在真核生物基因修复中,非同源末端连接占主导地位,同源重组发生概率极其低,并且外源DNA序列容易产生脱靶效应。非同源末端连接(Nonhomologous end joining, NHEJ)主要是依靠Ku和LigD两种蛋白质来完成DNA双链断裂的修复,NHEJ中Ku70或LigD基因的缺失,能够使基因靶向效率提高[21]。例如,Hidetoshi Nakamura等[22]主要研究了工业菌株ECCR基因的靶向效率,其结果表明,基因组编辑引入LigD突变能够有效提高A基因靶向效率。Xiulin Qin [23]等为提高木质纤维素分解丝状真菌的基因靶向频率,删除了非同源端联基因LigD,其研究表明,PLigD基因的缺失可显著增加P中三个不同部位的GTF,并且敲除LigD基因所获得的产物在某些敏感性方面无明显缺陷。Ting Zhang [24]等敲除了丝状真菌黄松的非同源重组通路中Ku70同系物,发现敲除Ku70同系物的基因所产生的黄松菌株的同源重组效率明显高于野生型菌株。同源重组的完成需要对大量的转化子进行多次筛选验证,步骤十分繁琐,并且工作量巨大,近年来已逐渐被操作更为简便的基因编辑、RNA干扰等技术所替代[25]。

3.2. 靶向核酸酶介导基因编辑技术

随着人工核酸酶技术的不断发展,基因编辑技术已经日益成熟,发展出了三代技术,即ZFN、TALEN和CRISPR技术,根据Cas蛋白的类型,将CRISPR/Cas系统划分为三大类型,目前应用十分广泛的成熟类型是CRISPR/Cas9 [Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas (CRISPR associated 9)],其属于Type II型。ZFN技术由锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)和FokI核酸内切酶组成。ZFP可以特异识别18 bp长度的DNA序列,两个锌指结构域与FokI核酸内切酶形成二聚体切开DNA双链,二聚化的FokI核酸内切酶在ZFP的引导下对DNA片段进行切割。ZFN技术通过设计两个ZFN对目的基因进行定点切割。二聚体非特异性结合时会由此造成脱靶现象,产生较强的细胞毒性,在一定程度上阻碍了ZFN的应用[26]。ZFN是二代基因编辑工具TALEN技术的基础,TALEN靶向基因敲除技术与ZFN靶向基因敲除技术的作用原理基本一致,结构也相似,TALEN是由FokI核酸酶与DNA结合的结构域进行结合,

TALEN 中 DNA 结构域为转录激活因子样效应蛋白(TALE), 但 ZFN 的 DNA 结合域为 ZFP。与 ZFN 相比, TALEN 具有操作成本低、识别位点多样、作用效率高、细胞毒性小的优势[27] [28]。但 TALEN 有一定的限制, 目前其很少应用于多基因敲除中, 主要应用于单基因敲除。由于丝状真菌本身的遗传复杂性、技术的弊端限制等因素, ZFN 和 TALEN 技术应用在丝状真菌中的研究较少。

相较于 ZFN 和 TALEN 技术, CRISPR 技术具有显著优势, 近年来已经成为丝状真菌研究中的一大热点。CRISPR-Cas9 是第三代基因编辑工具, tracrRNA、核糖核酸酶 III、crRNA 和 Cas9 蛋白是 CRISPR-Cas9 的三大组成部分。tracrRNA 和 crRNA 形成的 tracrRNA-crRNA 复合体和 Cas9 蛋白共同作用对双链 DNA 进行切割, 诱发非同源性末端接合 NHEJ 修复机制。该机制通过引起错配, 从而导致基因移码突变, 最终实现基因敲除。CRISPR-Cas9 基因敲除技术通过人工设计引导 RNA (single guide RNA, sgRNA)来代替 tracrRNA-crRNA 复合体发挥作用, 以此达到基因敲除的目的。CRISPR-Cas9 基因编辑系统具有众多优点, 其设计简单, sgRNA 易获得且成本低, 能同时作用于多个靶点实现多基因敲除。因此, CRISPR-Cas9 系统自出现以后就受到广泛的关注和应用[29]。

Nødvig CS [30]等构建了一个简单而多功能的丝状真菌 CRISPR-Cas9 系统, 通过一系列实验表明了此系统可引入不同真菌物种的特定等位基因中, 虽然使用相同的原间隔器来进行诱变, 但不同物种的诱变效率差异较大。并且说明了 RNA 引导的诱变和基因靶向连续使用的可行性。值得注意的是, 该研究表明 CRISPR-Cas9 技术可以在功能上适应丝状真菌的工作。CRISPR 技术应用于丝状真菌可以准确地编辑基因, 从而提高通路效率。例如, 黑曲霉通过 CRISPR-Cas9 技术进行单碱基编辑, 实现基因修饰。构建 CRISPR-Cas9 系统敲除 pyrG 和 fwnA 基因, 效率为 47%~100% [31]。在此基础上, 利用 CRISPR 通过功能缺失突变鉴定了转运蛋白 CexA, 构建的可诱导 pmbfA 的工程菌株基因表达表现出比组成型表达对照菌株更高的性能。最终, 在诱导系统中获得了 109 g/L 的柠檬酸, 与组成型表达系统相比提高了三倍[32]。CRISPR 技术应用于丝状真菌有助于发现新的生物活性次生代谢物。László Mózsik [33]等提出一种基于 CRISPR 激活方法的沉默基因组编辑的丝状真菌转录调控工具, 将一个具有核缺陷的 CAS9 突变体(DCAS9)融合到一个高度活跃的三方激活剂 VP64-P65-RTA (VPR)中, 组成了与几个丝状真菌种类兼容的非整合性的 AM-VECT, 以实现 SGNA 定向靶向基因调控。其研究表明, 基于 MAM1 的 DCAS9-VPR 融合表达可用于沉默 BGCS 的转录激活, 文章提出了一个可以发现新的生物活性代谢物、鉴别抗菌剂等新型化合物的 CRISPR 工具, 并指出该工具可以广泛用于激活丝状真菌中的沉默的生物代谢物合成基因集群。另外, 丝状真菌的 CRISPR 系统优化具有重要研究意义。Yuzhen Li [34]等以米曲霉 ptrA 作为对硫脲素抗性的选择标记, 对含有 AMA7 自主复制序列的黄曲霉菌株构建了一种简单的 CRISPR-Cas9 基因组编辑系统, 结果表明该系统在各种表型的黄曲霉基因敲除具有高转化率和高基因靶向效率, 该系统可能广泛应用于曲霉属中。Alberto Jiménez [35]等使用 CRISPR/Cas9 系统对棉阿舒囊霉(*Ashbya gossypii*)进行了基因编辑, 提出了一个用于棉阿舒囊霉的基因编辑新方法, 展示了无标记的 CRISPR-Cas9 系统用于该菌株的效率, 验证了该系统可用于处理可见和不可见表型的核苷酸缺失和替换, 该系统已被验证为三种基因组编辑方法: 基因失活、loxP 疤痕的基因组敲除和点突变。该研究在很大程度上有助于以无标记的方式促进这种工业真菌的基因组操作。Song R [36]等指出, 在丝状真菌中建立 CRISPR-Cas9 系统遇到的问题通常涉及 Cas9 或 sgRNA 的表达、非工作的 sgRNA、编辑效率、毒性、异地靶效应和阳性转化剂的选择。要实现 CRISPR-Cas9 系统在丝状真菌中的高效应用, 可以从这些方面进行优化。

3.3. 其他基因敲除方法

随机 T-DNA 插入突变法可以利用多种载体, 插入大量的随机突变在目的细胞的基因组中, 并且通过相应的标记进行筛选验证得到敲除目的基因的细胞。随机 T-DNA 插入突变法包括农杆菌介导的 T-DNA

插入突变技术和 U-转座子插入突变技术,二者都可以用于植物细胞基因敲除,但转座子插入突变只适用于细胞内具有活性转位子的植物中。T-DNA 插入突变已在真菌尤其是各种病原菌中广泛应用[37],其相较于同源重组更加简便、高效,能够实现目的基因的定向敲除。目前,越来越多的研究者利用 T-DNA 插入突变研究拟南芥,水稻等植株,对其在丝状真菌中的研究较少。Guo Z [38]等通过 T-DNA 整合得到丝状真菌突变体以研究丝状真菌 *C. magnum* 的致病性基因,在这种丝状真菌中发现了六个潜在的毒力基因,为研究丝状真菌致病机制奠定了基础。Zhang J [39]等通过 T-DNA 插入将烯化酶基因插入到丝状真菌 P6 中,发现突变体在磷酸盐溶解方面受损。

RNA 干扰(RNAi)是 RNA 分子介导的沉默机制, RNA 干扰主要是利用 siRNA、miRNA 或 piRNA 与同源 mRNA 结合,诱导目的 mRNA 降解或抑制目的 mRNA 翻译,从而达到基因沉默。RNAi 技术具有特异性、广谱性、高效性、系统性和环境安全性等优点[40],但 RNAi 存在临时性、位置效应和不完全敲除的弊端,因此, RNAi 不能完全取代同源重组技术[41]。由于原核细胞中存在共翻译的现象,故该策略广泛适用于真核生物的基因敲除。最早用于 RNAi 研究的生物中有一类丝状真菌 *Neurospora crassa*, Li L [42]等的研究阐述了此类丝状真菌两种 RNAi 途径中的多种机制以及其他丝状真菌中的 RNAi 防御机制,并且提出 RNAi 在丝状真菌中广泛保守,在理解基因功能和调节机制方面发挥重要作用。

4. 无痕敲除技术在丝状真菌中的应用

如今,使用大部分基因敲出技术进行连续敲除时,多种抗性标记基因在同一菌株中堆叠,过多的标记基因使得能够选用的标记基因越来越少,并且插入越多的标记基因,对上下游基因表达的影响可能就越大,故而无缝基因敲除技术越来越受到更多研究者的追捧。现今,无痕敲除技术主要有单质粒敲除技术、双质粒敲除技术、Cre/loxP 切除系统技术、两步 Red 同源重组系统正负筛选技术等。无痕基因敲除技术利用同源重组的原理,通过设计带有载体同源序列的引物进行目的基因扩增,通过外源重组酶使有同源序列的目的基因和线性载体在体外进行重组连接,将重组产物转入大肠杆菌感受态细胞内,进而筛选所需的阳性克隆。近年来,丝状真菌无痕敲除技术发展起来,且具有越来越多的应用实例,该技术常被用以构建突变体、辅助研究丝状真菌的基因功能。阮露晨[43]通过构建携带目的基因上下游同源臂和标记基因的重组质粒,利用结合转移和同源重组,实现第一次敲除,再进行第二次敲除,通过构建携带目的基因上下游同源臂的重组质粒对基因缺失株敲除标记基因,构建了不含标记的米曲霉尿嘧啶营养缺陷型菌株。高育青[44]等利用无痕敲除技术原理 $\Delta Aoku70\Delta AopyrG$ 双敲除载体,从而得到 $\Delta Aoku70\Delta AopyrG$ 双敲除米曲霉菌株,为米曲霉的遗传改造和功能基因研究奠定了基础。申王玉[45]等构建了一种即使采用 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的 CRISPR/Cas9 系统,其建立的黑曲霉无痕基因组编辑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。由丝状真菌 *Curvularia clavata* BAUA-2787 产生的 KK-1 是一种很有前途的农药活性化合物, Yamaguchi S [46]等使用无痕敲除技术为这种真菌开发的转化系统为每个簇基因生成过表达和缺失突变体,并分析了 KK-1 的产生和簇基因表达水平,以确认它们参与了 KK-1 的生物合成。结果发现,每个基因都参与了 KK-1 的产生,基因 *kk1A*、*kk1D*、*kk1H* 和 *kk1I* 由于缺失导致 KK-1 生产力显著下降,推测其直接参与了 KK-1 结构的形成。*kk1C*、*kk1E*、*kk1G* 和 *kk1J* 尽管被缺失,但仍保持了一定水平的 KK-1 生产力,可能参与了促进或协助 KK-1 的产生。Huang WP [47]等在嗜热真菌中构建了一种源自细菌的嗜热 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,将 CRISPR/Cas9 系统与同源重组相结合,精准敲入组成型启动子,激活沉默的聚酮化合物合酶-非核糖体肽合酶(PKS-NRPS)生物合成基因。对产生的基因突变体的代谢分析表明, *T. dupontii* 中存在一条合成嗜热菌素的关键途径,这些生物合成基因可能参与真菌菌丝体的生长、分生孢子形成和孢子萌发,以及真菌对渗透剂、氧化剂和细胞壁扰动剂的适应。

5. 小结与展望

丝状真菌的代谢产物具有重要经济价值, 其在环境保护方面也发挥了一定的作用。丝状真菌所具有的高产量、高生长速率、发酵原料廉价等特点, 使其有较好的研究价值。同源重组和 CRISPR Cas 等基因敲除技术常在丝状真菌研究中被使用来明确基因功能、理解调控机制、进行代谢途径改造, 最终是为了实现丝状真菌工业生产高效益。其他的基因敲除技术在研究丝状真菌方面应用较少。即使完全测序的丝状真菌基因组的数量正在迅速增加, 但由于基因工程技术对大多数丝状真菌来说开发不充分, 仅有同源重组和 CRISPR-Cas9 技术被熟练应用。同时, 对这些丝状真菌的生物学机制了解不足, 研究者很难在工业上充分利用丝状真菌。

即使目前对丝状真菌基因敲除的研究不断增多、不断深入, 但其仍旧存在着诸多问题, 基因敲除在丝状真菌中的研究大都单独使用同源重组或 CRISPR 技术, 可以尝试利用其他的基因敲除技术研究丝状真菌, 在选择敲除策略时可结合多种敲除技术以综合减少单个敲除技术的弊端限制。完全测序的真菌基因组的数量正在迅速增加, 但还存在着大量的未知基因组需要研究者探索, 未来的一段时间内, 将持续的有丝状真菌的未知基因被测出基因组序列并研究出其基因功能。随着丝状真菌菌丝融合的不断发 展, 将有可能出现一些性状良好、生产效率高且能稳定遗传的新型丝状真菌。

参考文献

- [1] Wah Tang, P., San Chua, P., Kee Chong, S., Saberi Mohamad, M., Wen Choon, Y., Deris, S., *et al.* (2016) A Review of Gene Knockout Strategies for Microbial Cells. *Recent Patents on Biotechnology*, **9**, 176-197. <https://doi.org/10.2174/1872208310666160517115047>
- [2] Menendez-Bravo, S., Comba, S., Gramajo, H. and Arabolaza, A. (2017) Metabolic Engineering of Microorganisms for the Production of Structurally Diverse Esters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 3043-3053. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8179-7>
- [3] Tamano, K., Brown, D.W. and Yoshimi, A. (2023) Editorial: The Use of Metabolic Engineering Techniques to Increase the Productivity of Primary and Secondary Metabolites within Filamentous Fungi. *Frontiers in Fungal Biology*, **4**, Article 1178290. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2023.1178290>
- [4] Bills, G.F. and Gloer, J.B. (2016) Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiology Spectrum*, **4**, 32. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0009-2016>
- [5] Nevalainen, H. and Peterson, R. (2014) Making Recombinant Proteins in Filamentous Fungi Are We Expecting Too Much? *Frontiers in Microbiology*, **5**, Article 75.
- [6] Nevalainen, K.M.H., Te'o, V.S.J. and Bergquist, P.L. (2005) Heterologous Protein Expression in Filamentous Fungi. *Trends in Biotechnology*, **23**, 468-474. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.06.002>
- [7] Śliżewska, W., Struszczyk-Świta, K. and Marchut-Mikołajczyk, O. (2022) Metabolic Potential of Halophilic Filamentous Fungi—Current Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article 4189. <https://doi.org/10.3390/ijms23084189>
- [8] Deng, H., Bai, Y., Fan, T., Zheng, X. and Cai, Y. (2020) Advanced Strategy for Metabolite Exploration in Filamentous Fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, **40**, 180-198. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1709798>
- [9] Liu, J. and Liu, G. (2018) Analysis of Secondary Metabolites from Plant Endophytic Fungi. In: Ma, W.B. and Wolpert, T., Eds., *Plant Pathogenic Fungi and Oomycetes*, Humana Press, 25-38. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8724-5_3
- [10] Alberti, F., Foster, G.D. and Bailey, A.M. (2016) Natural Products from Filamentous Fungi and Production by Heterologous Expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 493-500. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8034-2>
- [11] Fischer, M.S. and Glass, N.L. (2019) Communicate and Fuse: How Filamentous Fungi Establish and Maintain an Interconnected Mycelial Network. *Frontiers in Microbiology*, **10**, Article 619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00619>
- [12] Wohlschlager, L., Csarman, F., Zrilić, M., Seiboth, B. and Ludwig, R. (2021) Comparative Characterization of Glyoxal Oxidase from Phanerochaete Chrysosporium Expressed at High Levels in Pichia Pastoris and Trichoderma reesei. *Enzyme and Microbial Technology*, **145**, Article 109748. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109748>
- [13] Bailey, A.M., Alberti, F., Kilaru, S., Collins, C.M., de Mattos-Shipley, K., Hartley, A.J., *et al.* (2016) Identification and Manipulation of the Pleuromutilin Gene Cluster from *Clitopilus passeckerianus* for Increased Rapid Antibiotic Production. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 25202. <https://doi.org/10.1038/srep25202>

- [14] 张斯童, 石佳, 王刚, 等. 基因敲除技术在微生物代谢途径改造中的研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2024, 46(2): 175-186.
- [15] Li, X. and Heyer, W. (2008) Homologous Recombination in DNA Repair and DNA Damage Tolerance. *Cell Research*, **18**, 99-113. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
- [16] Ding, Q. and Ye, C. (2023) Microbial Cell Factories Based on Filamentous Bacteria, Yeasts, and Fungi. *Microbial Cell Factories*, **22**, Article No. 20. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02025-1>
- [17] Martzy, R. and Mach-Aigner, A.R. (2020) The Potential of Synthetic Biology for *Trichoderma reesei*. In: Mach-Aigner, A.R. and Martzy, R., Eds., *Trichoderma reesei*, Humana, 45-54. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1048-0_3
- [18] Xu, Y., Shan, L., Zhou, Y., Xie, Z., Ball, A.S., Cao, W., et al. (2019) Development of a Cre-loxP-Based Genetic System in *Aspergillus niger* ATCC1015 and Its Application to Construction of Efficient Organic Acid-Producing Cell Factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**, 8105-8114. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10054-3>
- [19] 吕佳. 丽江来源丝状真菌次级代谢产物分离鉴定及 myrothecisin E 的生物合成途径研究[D]: [硕士学位论文]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [20] 陈思羽, 李晓, 杜文珍, 等. 丝状真菌 *Podospora anserina* 中光敏色素基因的鉴定及功能分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(2): 443-460.
- [21] Weld, R.J., Plummer, K.M., Carpenter, M.A. and Ridgway, H.J. (2006) Approaches to Functional Genomics in Filamentous Fungi. *Cell Research*, **16**, 31-44. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310006>
- [22] Nakamura, H., Katayama, T., Okabe, T., Iwashita, K., Fujii, W., Kitamoto, K., et al. (2017) Highly Efficient Gene Targeting in *Aspergillus Oryzae* Industrial Strains under *ligD* Mutation Introduced by Genome Editing: Strain-Specific Differences in the Effects of Deleting EcdR, the Negative Regulator of Sclerotia Formation. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **63**, 172-178. <https://doi.org/10.2323/jgam.2016.10.002>
- [23] Qin, X., Li, R., Luo, X., Lin, Y. and Feng, J. (2017) Deletion of *ligD* Significantly Improves Gene Targeting Frequency in the Lignocellulolytic Filamentous Fungus *Penicillium oxalicum*. *Fungal Biology*, **121**, 615-623. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.04.005>
- [24] Zhang, T., Zhao, S., Liao, L., Li, C., Liao, G. and Feng, J. (2017) Deletion of *TpKu70* Facilitates Gene Targeting in *Talaromyces pinophilus* and Identification of *TpAmyR* Involvement in Amylase Production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **33**, Article No. 171. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2331-5>
- [25] Wang, S., Chen, H., Tang, X., Zhang, H., Chen, W. and Chen, Y.Q. (2017) Molecular Tools for Gene Manipulation in Filamentous Fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 8063-8075. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8486-z>
- [26] Zhang, H., Zhang, Y. and Yin, H. (2019) Genome Editing with mRNA Encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Molecular Therapy*, **27**, 735-746. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.014>
- [27] Jiang, S. and Shen, Q.W. (2019) Principles of Gene Editing Techniques and Applications in Animal Husbandry. *3 Biotech*, **9**, Article No. 28. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1563-x>
- [28] 谢晓刚, 薛嘉, 康健, 等. 基因编辑技术发展及其在家畜上的应用[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(1): 139-149.
- [29] Hu, J.H., Davis, K.M. and Liu, D.R. (2016) Chemical Biology Approaches to Genome Editing: Understanding, Controlling, and Delivering Programmable Nucleases. *Cell Chemical Biology*, **23**, 57-73. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.12.009>
- [30] Nødvig, C.S., Nielsen, J.B., Kogle, M.E. and Mortensen, U.H. (2015) A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *PLOS ONE*, **10**, e0133085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133085>
- [31] Huang, L., Dong, H., Zheng, J., Wang, B. and Pan, L. (2019) Highly Efficient Single Base Editing in *Aspergillus Niger* with CRISPR/Cas9 Cytidine Deaminase Fusion. *Microbiological Research*, **223**, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.007>
- [32] Steiger, M.G., Rassinger, A., Mattanovich, D. and Sauer, M. (2019) Engineering of the Citrate Exporter Protein Enables High Citric Acid Production in *Aspergillus Niger*. *Metabolic Engineering*, **52**, 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.mben.2018.12.004>
- [33] Mózsik, L., Hoekzema, M., de Kok, N.A.W., Bovenberg, R.A.L., Nygård, Y. and Driessen, A.J.M. (2021) CRISPR-Based Transcriptional Activation Tool for Silent Genes in Filamentous Fungi. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 1118. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80864-3>
- [34] Li, Y., Zhang, H., Chen, Z., Fan, J., Chen, T., Zeng, B., et al. (2022) Construction of Single, Double, or Triple Mutants within kojic Acid Synthesis Genes *kojA*, *kojR*, and *kojT* by the CRISPR/Cas9 Tool in *Aspergillus oryzae*. *Folia Microbiologica*, **67**, 459-468. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-00949-6>
- [35] Jiménez, A., Muñoz-Fernández, G., Ledesma-Amaro, R., Buey, R.M. and Revuelta, J.L. (2019) One-Vector CRISPR/Cas9

- Genome Engineering of the Industrial Fungus *Ashbya gossypii*. *Microbial Biotechnology*, **12**, 1293-1301. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13425>
- [36] Song, R., Zhai, Q., Sun, L., Huang, E., Zhang, Y., Zhu, Y., *et al.* (2019) CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology in Filamentous Fungi: Progress and Perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**, 6919-6932. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10007-w>
- [37] Wang, S., Xing, H., Hua, C., Guo, H. and Zhang, J. (2016) An Improved Single-Step Cloning Strategy Simplifies the *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation (ATMT)-Based Gene-Disruption Method for *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, **106**, 645-652. <https://doi.org/10.1094/phyto-10-15-0280-r>
- [38] Guo, Z., Wu, H., Peng, B., Kang, B., Liu, L., Luo, C., *et al.* (2023) Identifying Pathogenicity-Related Genes in the Pathogen *Colletotrichum Magnum* Causing Watermelon Anthracnose Disease via T-DNA Insertion Mutagenesis. *Frontiers in Microbiology*, **14**, Article 1220116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1220116>
- [39] Zhang, J., Han, X., Su, Y., Staehelin, C. and Xu, C. (2023) T-DNA Insertion Mutagenesis in *Penicillium brocae* Results in Identification of an Enolase Gene Mutant Impaired in Secretion of Organic Acids and Phosphate Solubilization. *Microbiology*, **169**, Article 1325. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001325>
- [40] Whitten, M.M. (2019) Novel RNAi Delivery Systems in the Control of Medical and Veterinary Pests. *Current Opinion in Insect Science*, **34**, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.02.001>
- [41] 尹秀山, 张令强, 贺福初. RNAi 技术在转基因动物中的应用[J]. 遗传, 2006, 28(3): 251-256.
- [42] Li, L., Chang, S. and Liu, Y. (2010) RNA Interference Pathways in Filamentous Fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 3849-3863. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0471-y>
- [43] 阮露晨. 无痕敲除构建米曲霉尿嘧啶营养缺陷型菌株[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津科技大学, 2020.
- [44] 高育青, 张豪杰, 张丹凤, 等. 米曲霉 RIB40 高效同源重组和尿苷/尿嘧啶营养缺陷型菌株的构建[J]. 食品工业科技, 2023, 44(1): 200-207.
- [45] 申玉玉, 陈忠秀, 陈杰, 等. 一种高效无选择标记的黑曲霉基因组编辑方法[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4744-4755.
- [46] Yamaguchi, S., Fujioka, T., Yoshimi, A., Kumagai, T., Umemura, M., Abe, K., *et al.* (2023) Discovery of a Gene Cluster for the Biosynthesis of Novel Cyclic Peptide Compound, KK-1, in *Curvularia clavata*. *Frontiers in Fungal Biology*, **3**, Article 1081179. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.1081179>
- [47] Huang, W., Du, Y., Yang, Y., He, J., Lei, Q., Yang, X., *et al.* (2020) Two CRISPR/Cas9 Systems Developed in *Thermomyces dupontii* and Characterization of Key Gene Functions in Thermolide Biosynthesis and Fungal Adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, **86**, e01486-20. <https://doi.org/10.1128/aem.01486-20>