



新型隐球酵母 U6 启动子的鉴定、克隆及功能验证

王宇¹, 肖婷婷¹, 朱项阳¹, 赵雪茹¹, 魏东盛^{1*}, 朱旭东^{1,2*}

¹南开大学生命科学学院, 天津 300071

²北京师范大学生命科学院, 北京 100875

摘要:【目的】鉴定及克隆新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)中 Pol III型的 U6 启动子(CnU6 启动子), 并验证 CnU6 启动子能否有效转录 shRNA 及 CRISPR/Cas9 系统中 gRNA。【方法】结合 GenBank 数据库已公布的新型隐球酵母基因组信息和本实验室 RNA-seq 文库数据, 利用生物信息学技术分析得到新型隐球酵母中具有高转录水平的 U6 RNA 序列。使用重叠 PCR 和 EasyGeno 方法将预测的 CnU6 启动子分别克隆到 shRNA 及 gRNA 的上游区域, 通过观察 shRNA 对靶基因的 RNAi 效果及 gRNA 引导 Cas9 核酸酶对靶位点的切割结果, 确定 CnU6 启动子能否转录短 RNA。【结果】CnU6 启动子能够转录形成 shRNA 对靶基因进行沉默, 并且能转录形成 gRNA 引导 Cas9 核酸酶对靶点进行切割。【结论】新型隐球酵母的 CnU6 启动子被成功鉴定及克隆, 它能有效驱动 shRNA 和 gRNA 的转录。

关键词: 新型隐球酵母, CnU6 启动子, shRNA, CRISPR/Cas9

新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)作为一种条件致病真菌, 能引起免疫缺陷人群的严重感染。近些年来, 随着艾滋病患者的不断增加, 高致死率隐球菌病的患者数量也在不断增多^[1-2]。现在, 新型隐球酵母已发展成为一种模式生物, 多种血清型菌株均已完成全基因组测序和注释。然而新型隐球酵母自身同源重组效率极低, 很难进行基因定向敲除, 这已严重阻碍了新型隐球酵母功能基因方面的研究。目前, 国际上通常使用

基因枪法对新型隐球酵母的基因进行定向敲除^[3], 但该方法的实验成本较高, 且在新型隐球酵母血清型 D 菌株中发生同源重组的效率依然很低(约 1-4%)^[4], 使得筛选正确转化子的工作量极大。

在高等真核生物中, 外源 DNA 与靶细胞 DNA 序列自然发生同源重组的频率也非常低, 如人类 ES 细胞中同源重组频率仅为 10^{-5} - 10^{-7} ^[5]。以哺乳细胞为例, 对于基因功能的研究主要有两种方式: 一种是利用 Pol III型启动子(如 U6、H1、7SK 等)

基金项目: 天津市自然科学基金(16JCYBJC23800); 国家自然科学基金(81271801)

*通信作者。魏东盛, Tel/Fax: +86-22-23505961, E-mail: weidongsheng@nankai.edu.cn; 朱旭东, Tel/Fax: +86-10-58804266, +86-22-23506510; E-mail: zhu11187@bnu.edu.cn, xudong82@nankai.edu.cn

收稿日期: 2016-05-18; 修回日期: 2016-07-06; 网络出版日期: 2016-07-19

转录短发卡 RNA (shRNA, short hairpin RNA), shRNA 经 Dicer 切割后成为 siRNA, 通过 RNAi 系统对靶基因表达进行干扰^[6]。因 RNAi 导致靶基因表达水平降低, 使得细胞显现出类似于基因缺失的表型, 从而对靶基因的功能进行研究。在各种 Pol III 型启动子中, 以 U6 启动子的转录效果最好, 使用最为普遍。U6 启动子具有明确的转录起始点 G, 所有启动子元件均位于转录起始点上游, 以位于启动子下游的 5'-TTTTT-3' 序列作为转录终止信号, 转录产物会在 3' 端悬挂 2-4 个寡聚 U^[7]。另一种是通过基因打靶技术对目标基因进行编辑^[8-10], 其中以近年来新兴的第三代打靶技术 CRISPR/Cas9 系统操作最为简单、打靶效率最高。目前广泛使用的 CRISPR/Cas9 系统基于产脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes* SF370) 中的 II 型 CRISPR/Cas9 系统改造而成, 由 gRNA 和 Cas9 人工核酸内切酶构成^[11]。gRNA 以 5' 端 17-20 nt 作为靶标序列, 以碱基互补配对为原则在全基因组范围内寻找位于 PAM 位点(NGG)5' 端且能正确配对的靶点, 并引导 Cas9 核酸酶对正确靶点位置的双链 DNA 进行切割, 形成双链断裂切口(DSB, double-strand break)。无同源序列存在时, 细胞将以非同源性末端接合(NHEJ, non-homologous end joining)方式对 DSB 进行修复, 高频率引入移码突变。有同源序列存在时, 细胞主要以同源重组方式(HR, homologous recombination)修复 DSB, 进而能大大提高同源重组频率^[12]。

对于新型隐球酵母, 目前主要报道有 2 种类型的 RNAi 表达质粒。一类是 Liu 等报道的通过单启动子转录一段由正反靶基因序列和间隔序列组成的表达框, 转录产物内部可自发形成茎环结构, 进入 RNAi 途径^[13]。该方法获得的转化子中约 10% 可表现出清晰的突变表型。第二类是 Bose 等报道

的通过反向双启动子转录同一段靶基因序列, 两个反向启动子的转录产物完全互补, 互相也可自发形成双链 RNA, 进入 RNAi 途径^[14]。该方法获得的转化子中超过 80% 可表现出一系列程度的突变表型。然而这两类 RNAi 表达质粒均使用 Pol II 型启动子驱动转录, 它们或需要较长的正反向靶基因序列用于形成双链 RNA, 或需要两个相同序列的启动子启动转录, 而这些较长的同源序列在酵母细胞中易发生重组, 引起干扰效果不稳定^[15]。Pol III 型启动子仅需极短的靶序列(19-21 nt)即可成功介导 RNAi, 能有效避免同源序列间发生重组, 维持干扰效果的稳定。目前尚未有使用 Pol III 型启动子转录 shRNA 对新型隐球酵母中靶基因进行 RNAi 的报道。

CRISPR/Cas9 系统目前已在包括酵母^[16-18]和丝状真菌^[19-21]在内的多种真菌、植物和动物中成功应用, 而在新型隐球酵母中成功应用 CRISPR/Cas9 系统还未有报道, 其中的一个关键问题是没有合适的启动子驱动 gRNA 的表达。考虑到新型隐球酵母自然重组率低, 基因敲除困难的研究现状, 本小组尝试将 CRISPR/Cas9 系统引入新型隐球酵母中, 利用该系统对新型隐球酵母的基因进行人工打靶。

CRISPR/Cas9 系统中的 gRNA 需要有明确的转录起点, 在高等生物中通常由 Pol III 型的 U6 启动子驱动 gRNA 转录。在无 U6 启动子报道的生物中, 主要使用两种策略来产生有功能的 gRNA。一种策略以酿酒酵母使用的 SNR52 启动子为代表^[16], 该启动子转录的初始 gRNA 带有一段前导序列, 但该前导序列能在加工成熟过程中被切除, 形成有功能的 gRNA。SNR52 启动子也被成功用于同为子囊菌门的一些丝状真菌中, 如粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)^[20] 和烟曲霉 (*Aspergillus*

fumigatus)^[21]等。然而本实验室实验证明, 酿酒酵母 SNR52 启动子不能在担子菌门的新型隐球酵母中发挥功能。另一种策略是使用来源于噬菌体的 T7 启动子驱动 gRNA 转录, 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)^[22] 和秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)^[23] 等使用该策略成功表达 CRISPR/Cas9 系统。然而, T7 启动子只能被 T7 RNA 聚合酶所特异识别, 因此必须事先在受体细胞中导入可表达的外源 T7 RNA 聚合酶基因。

为了能在新型隐球酵母中成功表达 shRNA 及 CRISPR/Cas9 系统, 寻找一个能高效转录 shRNA 及 gRNA 的 Pol III 型启动子显得尤为重要。本研究中, 我们通过与人源 U6 RNA 序列比对, 成功找到了新型隐球酵母 U6 RNA。根据 U6 RNA 序列特点, 结合本实验室的 RNA-seq 文库数据, 我们成功确定了新型隐球酵母 U6 RNA 转录起始点、终止序列并克隆了具有 U6 启动子活性的 CnU6 启动子。通过使用 CnU6 启动子转录 shRNA, 靶基因表达成功被 shRNA 介导的 RNAi 系统所沉默。通过使用 CnU6 启动子转录 gRNA, CRISPR/Cas9 系统成功对靶点双链 DNA 进行了切割, 靶基因以 NHEJ 修复方式高频率产生了插入缺失突变。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 购自康为世纪公司。新型隐球酵母野生型菌株 JEC21, 尿嘧啶营养缺陷型菌株 4500FOA, 由本实验室保藏。

1.1.2 培养基: YPD 培养基(2%葡萄糖, 2%蛋白胨, 1%酵母浸粉, pH 6.0–6.2)。YPD/0.3%培养基(2.0%葡萄糖, 2.0%蛋白胨, 0.3%酵母浸粉, pH 6.0–6.2)。YNB 培养基(0.17% YNB, 0.50%硫酸铵,

2.00%葡萄糖, pH 6.2–6.5)。YNBA 培养基(YNB 培养基灭菌后补加 5 mg/L 腺嘌呤)。0.1%Asn 培养基(0.1%天冬酰胺, 0.3% KH₂PO₄, 0.1% 葡萄糖, pH 5.1)是诱导漆酶产生培养基, 灭菌后补加终浓度 25 mg/L MgSO₄ 和用作黑色素生成底物的终浓度 100 mg/L 去甲肾上腺素(NE, norepinephrine), 避光保存。所有培养基 115 °C、20 min 灭菌处理, 固体补加 2%琼脂粉。

1.1.3 主要试剂和仪器: TRNzol Universal (天根), EsayGeno 快速重组克隆试剂盒(天根), PrimerSTAR HS 高保真酶(TaKaRa), 限制性内切酶(TaKaRa), DNase I (TaKaRa), MLV 反转录酶(TaKaRa), Oligo dT-18 (TaKaRa), FastStart Universal SYBR Master (Roche), 去甲肾上腺素(Sigma), 电转化仪(BTX), StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems)。

1.2 siRNA 位点预测及 shRNA 表达质粒构建

使用 EasyGeno Primer 在线软件(<http://123.56.75.195/>)设计 3 对引物, 分别用于从 pLV 质粒上扩增质粒骨架, 从 JEC21 菌株基因组中扩增 *URA5* 筛选标记基因和 CnU6 启动子。3 个 PCR 目的产物经纯化后, 使用 EasyGeno 重组技术进行无缝克隆, 得到 pZ-shRNA 质粒。pZ-shRNA 质粒在 CnU6 启动子 3'端连接有 2 个 *BspQ I* 酶切位点, 经 *BspQ I* 酶切后会形成 5'端各有 3 个碱基凸出的线性化质粒。

使用 BLOCK-iT™ RNAi Designer 软件(<http://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>)对新型隐球酵母 JEC21 菌株 *ADE2* 基因的 CDS 序列中潜在 siRNA 序列进行预测分析, 选择软件给出的候选位点中评分等级最高的潜在 siRNA 序列, 经与基因组 BLASTn 比对确认无高相似度序列后, 按

GTT-N₁₉ (正义链)-TTCAAGAGA-N₁₉ (互补链)和 AAA-N₁₉ (正义链)-TCTCTTGAA-N₁₉ (互补链)模式合成 2 条以 *ADE2* 为靶基因的 shRNA 引物。将 2 条 shRNA 引物等摩尔量混合, PCR 仪中 95 °C 温育 5 min 后自然冷却至室温, 此时 2 条引物可互相退火形成 5'端各带 3 个突出碱基的双链 DNA。将形成退火双链的引物直接连入 *BspQ I* 线性化的 pZ-shRNA 质粒中即可获得能转录产生针对 *ADE2* 基因的 shRNA 的 pZ-ADE2i 质粒, 该质粒可使用通用引物 SP6 测序验证连入的 shRNA 序列是否正确(图 1)。

1.3 CRISPR/Cas9 靶点筛选及质粒构建

CRISPR/Cas9 系统识别的靶位点为 N₂₀-NGG, 其中 NGG 作为 PAM 位点进行识别, 不含在 gRNA 靶点序列中。我们以 GN₁₉-NGG 为标准进行靶点筛选, 当无合适 GN₁₉-NGG 序列时, 选择 N₁₉-NGG 序列, 并人工在 5'端添加一个 G, 作为 CnU6 启动

子的转录起始信号。靶点尽量靠近目标基因编码序列(CDS, coding sequence)的 5'端, 此时靶点区域发生移码突变造成基因功能失活的可能性最大。同时, 靶点序列应在全基因组中无高风险脱靶位点, 以避免 CRISPR/Cas9 系统对非靶点位置进行错误切割。根据上述原则, 我们利用 sgRNAs9 靶点设计软件^[24], 在 *LacI* 编码区中确定了一个最优的 CRISPR 靶点, 序列为 5'-GGGCA TGGTTTGC GGCAGCT-GGG-3', 5'端第一个 G 为人工添加, 用作 CnU6 启动子转录起始信号。

通过 PCR 及酶切连接将 *URA5* 筛选标记基因和 *actin* 启动子驱动的 *Cas9* 基因依次连入 pBluescript II KS(+)克隆载体中, 获得 pBS-URA5-Cas9 质粒。以 *LacI* 基因的 CRISPR 靶点作为重叠区, 通过重叠 PCR 将 CnU6 启动子、*LacI* 靶点、gRNA 和 6 个连续 T 顺次连接成为 1 个完整的 gDNA 表达框, 经 *Xho I* 和 *Cla I* 双酶切后连入 pBS-URA5-Cas9 载体中, 获得能在新型隐球酵母中以 *LacI* 基因为靶标的 pBS-URA5-CRISPR/*LacI* 质粒, 该质粒可使用通用引物 T3 测序验证连入的 gDNA 序列是否正确。

本实验中, 目的产物用于克隆连接的 PCR 均使用 PrimerSTAR HS 高保真酶, 所构建的质粒均经过 DNA 测序验证。本实验所使用的所有引物见表 1。

1.4 新型隐球酵母的转化

本实验采用电转化的方式将线性化质粒转化进新型隐球酵母中, 大致流程为: 按 2%接种量将过夜培养的新鲜菌液接种至 50 mL YPD 液体中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 3–4 h 至 OD₆₀₀ 值为 0.3–0.4 后, 将菌液冰浴 30 min 以上。5000 r/min 离心 5 min 取菌体, 预冷无菌水洗涤 2 遍, 预冷无菌 EB 缓冲液洗涤 3 遍后, 将菌体溶于 50 μL EB

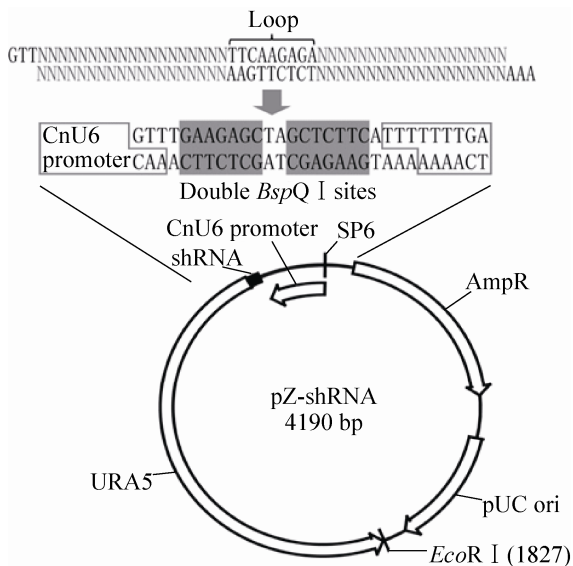


图 1. shRNA 表达载体 pZ-shRNA 构建示意图

Figure 1. Schematic diagram of the construction of shRNA expression vector pZ-shRNA.

表 1. 本实验所用的引物
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
shpLV-F	CTATAGTGTACCTAAATCCGCGGAACCCCTATTTGTTT
shpLV-R	GAATTCAGGGGATAACGCAGGAAAG
shURA5-F	TTATCCCCTGAATTCATCCCAGTACTACCCGCTCT
shURA5-R	AGCTAGCTCTTCATTTTTTGTATCTTGGGGATGGTATTGA
shCnU6-F	AATGAAGAGCTAGCTCTTCAAACAGTATACCCTGCCGGTGTATG
shCnU6-R	TAGGTGACACTATAGTTGCATTAGAACTAAAAACAAAGCA
ADE2-shRNA-F	GTTGCGATGCTGAGCTCAATGATTCAAGAGATCATTGAGCTCAGCATCGC
ADE2-shRNA-R	AAAGCGATGCTGAGCTCAATGATCTCTTGAATCATTGAGCTCAGCATCGC
ADE2-seqF	CCTGCACATACTCCATGACA
ADE2-seqR	TGAAGAAGAAGAGCAGGAGG
Control-shRNA-F	GTTGCTGAAGGTGACCAAGGGCTTCAAGAGAGCCCTTGGTCACCTTCAGC
Control-shRNA-R	AAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCTCTCTTGAAGCCCTTGGTCACCTTCAGC
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
CnU6-F	CCATCGATTTGCATTAGAACTAAAAACAAAGCA
Lac1-CnU6-R	AGCTGCCGCAAACCATGCCCAACAGTATACCCTGCCGGTG
Lac1-gRNA-F	GGGCATGGTTTGCGGCAGCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
gRNA-R	CCGCTCGAGTAAAAACAAAAAGCACCGAC
T3	ATTAACCCCTCACTAAAGGGA
Lac1-seqF	CTAATCACTGTTTCAGGTCGCC
Lac1-seqR	TACCTCACCACCGCCAAT
Tsp-CnU6-R	CCTAAGCTTTGGCTTCTTCCAACAGTATACCCTGCCGGTG
Tsp-gRNA-F	GGAAGAAGCCAAAGCTTAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
Tsp-seqF	ATTCGCTCCCCATTCTGATC
Tsp-seqR	GAGAACGCGACGTTCAAGAC

缓冲液中, 并与 3–5 μg 线性化质粒(不超过 10 μL) 混合, 冰浴 30 min 后使用 1400 V 电压进行电击。电击后的细胞在 YPD 液体中复苏 2–4 h, 预冷无菌水洗涤 3 遍, 涂布相应的筛选平板, 倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 4 d 至转化子长出^[25]。

1.5 酵母总 RNA 提取及实时定量荧光 PCR(RT-qPCR)检测

取新鲜的酵母培养物, 使用血球计数板对酵母细胞进行计数后, 取 2×10^8 个细胞接种于 5 mL YPD/0.3%液体试管中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 24 h 后收集酵母细胞, 无菌水洗涤 1 遍, 使用

TRNzol Universal 试剂提取总 RNA, 提取方法参见说明书, 略有修改。反转录反应体系为 10 μL , 以 Oligo dT-18 为反转录引物, 使用 MLV 反转录酶对 1 μg 总 RNA 进行反转录, 反转录体系配置及流程参见说明书。每个 RT-qPCR 反应体系为 20 μL , 其中加入约 50 ng cDNA, 每种引物终浓度为 250 nmol/L, 荧光染料为 FastStart Universal SYBR Green Master, 每个样品设置 3 个平行样。本实验以 *actin* 作为内参基因, 采用相对定量法, 对样品中的 *ADE2* 基因表达水平进行测定。总 RNA 提取及 RT-qPCR 实验均使用 DNase/RNase-free 去离子水。

2 结果和分析

2.1 新型隐球酵母 U6 RNA 及 CnU6 启动子鉴定

以人源 U6 RNA 序列与 NCBI 上的新型隐球酵母 JEC21 菌株(*C. neoformans* var. *neoformans*, 血清型 D)基因组序列进行 BLASTn 比对, 仅获得一条高相似度序列, 该序列位于 JEC21 菌株的 8 号染色体上。再以人源 U6 RNA 序列与 NCBI 上的新型隐球酵母 H99 菌株(*C. neoformans* var. *grubii*, 血清型 A)基因组序列进行 BLASTn 比对, 也仅获得一条高相似度序列, 该序列位于 H99 菌株的 14 号染色体上。运用 DNAMAN 软件对人源 U6 RNA 序列、JEC21 疑似 U6 RNA 序列和 H99 疑似 U6 RNA 序列进行多序列比对, 结果显示 JEC21 菌株和 H99 菌株的疑似 U6 RNA 序列完全相同, 与人源 U6 RNA 序列相似度为 84.02%。根据 U6 RNA 以 G 为转录起始点、5-6 个 T 为转录终止序列的特性, 并结合本实验室新型隐球酵母 RNA-seq 文库数据, 成功确定了 JEC21 和 H99 菌株中疑似 U6 RNA 序列的转录起始点和终止位置。通过参考人源 U6 启动子和鼠源 U6 启动子长度, 并结合 JEC21 菌株 U6 RNA 转录起始点上游 273 bp 与 H99 菌株 U6 RNA 转录起始点上游 267 bp 具有较高相似度的特点, 我们截取 JEC21 菌株 U6 RNA 转录起始点上游的 273 bp 作为 CnU6 启动子使用, 后续实验结果表明该长度序列已具有 U6 启动子功能。

2.2 新型隐球酵母中 shRNA 表达载体的构建

为了构建能在 *C. neoformans* JEC21 菌株中进行 RNAi 的 shRNA 表达载体, 我们以 pLV 质粒为模板, 扩增得到 1831 bp 的 Amp 抗性质粒骨架; 以 JEC21 菌株基因组为模板, 扩增得到 293 bp 的 CnU6 启动子片段和 2032 bp 的 *URA5* 筛选标记基

因(图 2-A)。将质粒骨架、*URA5* 和 CnU6 启动子片段纯化后等摩尔比混合, 使用 EasyGeno 无缝克隆试剂盒进行连接, 获得 pZ-shRNA 质粒。pZ-shRNA 质粒在 CnU6 启动子和终止序列间反向接入 2 个 *BspQ I* 酶切位点, 经 *BspQ I* 酶切线性化后接入退火得到的 shRNA 寡核苷酸引物双链, 构成完整的 shRNA 表达框。按照预期, CnU6 启动子在 RNA 聚合酶 III 的催化作用下转录 shRNA, shRNA 再经过 Dicer 核酸内切酶及其他 RNAi 相关酶系的加工, 形成每条链 3' 末端带有 2 个悬挂 U 碱基的成熟 siRNA, 以 RNAi 方式干扰靶基因的表达(图 2-B)。

2.3 shRNA 介导 ADE2 基因沉默

ADE2 基因, 编码磷酸核糖酰氨基咪唑羧化酶(phosphoribosylaminoimidazole carboxylase), 是腺嘌呤生物合成途径的一个关键酶^[13]。细胞在低腺嘌呤培养基上培养时, 由于环境中的腺嘌呤含量不足生长所需, 会自行合成腺嘌呤。此时若 *ADE2* 基因功能失活或表达量降低, 将会导致上一步代谢产物积累, 使得菌体显现粉红色, 这是一个直观的表型用于观测 CnU6 启动子能否转录 shRNA 沉默靶基因。同时, 我们以新型隐球酵母基因组中不存在且无同源序列的 *mCherry* 基因作为对照。

分别将测序正确的 pZ-ADE2i 质粒和 pZ-mCherryi 对照质粒使用 *EcoR I* 酶切线性化后, 通过电转化导入 4500FOA 营养缺陷株中, 涂布 YNBA 平板, 置于 30 °C 培养箱倒置培养 4 d。转化子长出后, 将 YNBA 转化子平板转置于 14 °C 低温培养箱继续培养, 观察菌落颜色变化。低温处理 1 周后, 可观察到约 60% 的 ADE2i 转化子呈现粉红色(图 2-C), 而作为对照组的 mCherryi 转化子均为白色。从粉红色菌落中挑取 2 个颜色最深的单菌落 ADE2i-1 和 ADE2i-2 在酵母浸粉仅为正

常浓度 30%的 YPD/0.3%培养基划线传代,同时随机挑选一个 mCherryi-1 单菌落及野生型 JEC21 菌株划线作为对照。30 °C 培养箱倒置培养 3 d 至菌体长出后,转至 14 °C 低温处理 1 周,可观察到 ADE2i-1 和 ADE2i-2 菌体呈现出粉红色,而 JEC21 和 mCherry-i1 菌体仍为白色(图 2-D)。DNA 测序表明 ADE2i-1 和 ADE2i-2 菌株的 *ADE2* 基因未发生突变。此外我们以 *actin* 作为内参基因,采用

RT-qPCR 从转录水平检测了这 4 个划线菌株中 *ADE2* 基因的表达量,结果表明 ADE2i-1 和 ADE2i-2 菌株中 *ADE2* mRNA 水平明显降低,分别仅为野生型的 21.7%和 18.4%,而 mCherryi-1 菌株的 *ADE2* mRNA 水平与野生型相比无显著变化($P<0.05$)(图 2-E)。以上结果表明,CnU6 启动子能有效转录 shRNA,该方法介导的 RNAi 沉默效率介于 Liu 等^[13]与 Bose 等^[14]之间。

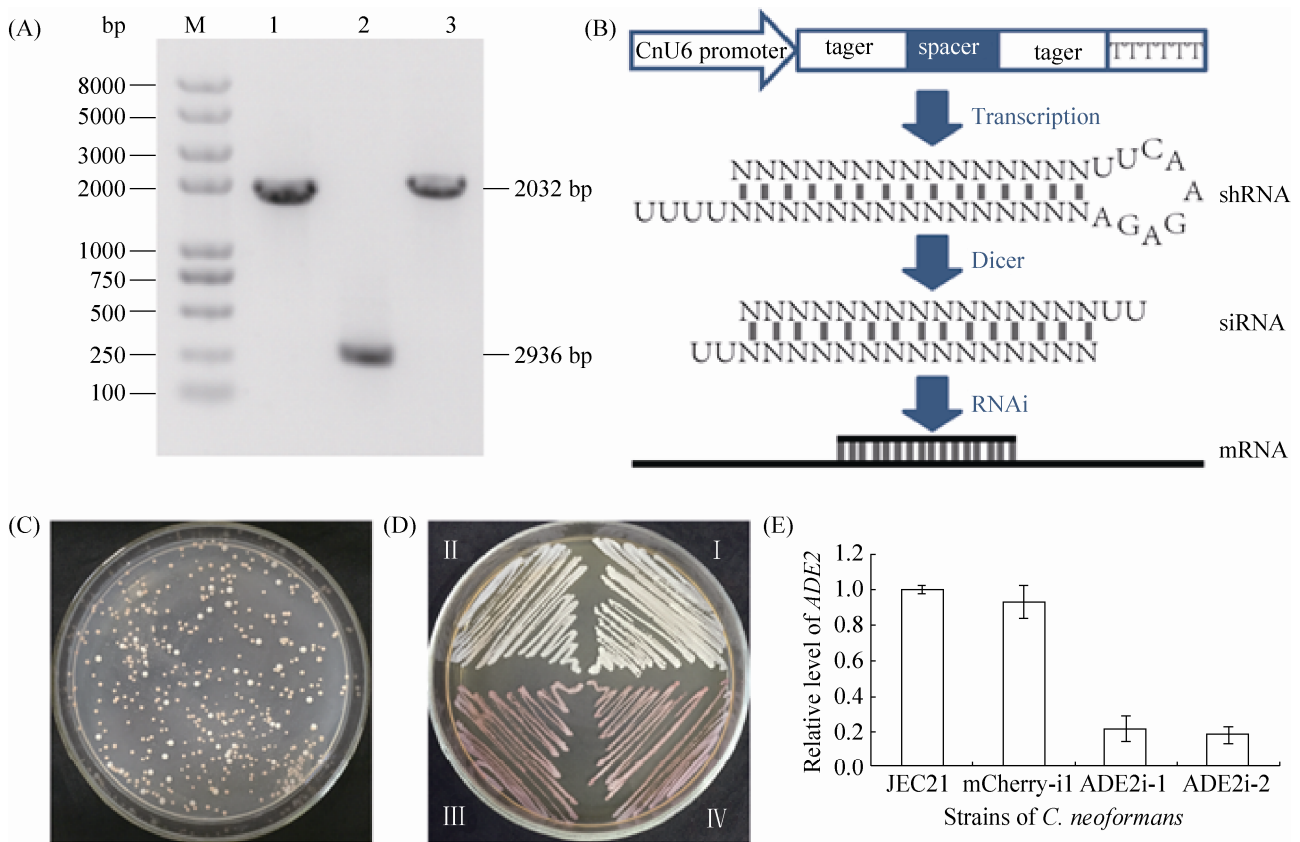


图 2. CnU6 启动子转录 shRNA, 以 RNAi 方式介导靶基因 *ADE2* 沉默

Figure 2. CnU6 promoter could drive the expression of shRNA, which mediated target gene silencing of *ADE2* by RNAi. A: the electrophoretogram for three fragments used for assembling the pZ-shRNA plasmid. M: trans2K plus II DNA marker; 1: plasmid backbone; 2: CnU6 promoter; 3: *URA5*. B: schematic view of the generation, bioprocess and application of siRNA. C: transformants containing pZ-ADE2i on YNBA plates. Approximately 60% *URA5*-positive transformants generated pink color. D: two pinkest transformants were picked for further streaking on YPD/0.3% plates, JEC21 and mcherryi strains were used as controls. I: JEC21; II: mCherryi-1; III: ADE2i-1; IV: ADE2i-2. E: *ADE2*-specific mRNA levels as measured by RT-qPCR. The *ADE2*-specific mRNA levels of two pink strains (Figure 2-D) were significantly lower as compared to the WT and mcherryi control strains. Error bars represent the standard deviation calculated from three independent experiments.

2.4 新型隐球酵母中 CRISPR/Cas9 系统表达载体的构建

为了构建能在 *C. neoformans* JEC21 菌株中成功应用的 CRISPR/Cas9 系统,我们以 *Lac1* 靶点序列作为重叠区,利用重叠 PCR 将 CnU6 启动子、靶点区、gRNA 和终止序列无缝连接成一个完整的 gRNA 表达框,并通过 gRNA 表达框两侧的 *Xho* I 和 *Cla* I 酶切位点连接进 pBS-URA5-Cas9 质粒中,构成以 *URA5* 作为筛选标记基因的 pBS-URA5-CRISPR 质粒。T3 引物测序结果表明 gRNA 表达框已成功重叠。按照预期,CnU6 启动子将以靶序列的第 1 个碱基 G 为起始点,直接转录有功能的 gRNA。gRNA 将与 Cas9 蛋白形成复合体,引导 Cas9 核酸酶切割靶点双链 DNA(图 3-A)。

2.5 CRISPR/Cas9 系统介导 *Lac1* 基因编辑

Lac1 基因编码一种含铜的多酚氧化酶,称作隐球菌漆酶。在新型隐球酵母中,隐球菌漆酶是唯一一种可氧化酚类底物形成黑色素的酶类^[26]。*Lac1* 突变株不能产生黑色素,在含 NE 的 0.1%Asn 平板上形成白色菌落,而野生型菌株形成黑色菌落,这便于我们从表型上区分 *Lac1* 基因是否被 CRISPR/Cas9 系统所突变。

通用引物 T3 测序正确的 pBS-CRISPR/*Lac1* 质粒被 *Kpn* I 酶切线性化后,以电转化方式转化 4500FOA 营养缺陷菌株,YPD 液体中复苏 2 h 后涂布 YNB 平板,置于 30 °C 培养箱倒置培养 4 d 至转化子长出。随机挑取 15 个转化子单菌落,使用无菌牙签点接在添加有 NE 的 0.1% Asn 平板上,同时点接野生型 JEC21 菌株作为对照。

黑色素诱导平板置于 3 °C 避光培养 3 d 后,可观察到 JEC21 菌株产生大量黑色素,而各转化子基本也有不同程度的黑色素产生,但与野生型

相比明显减少(图 3-B)。我们分析猜测,细胞导入线性化 pBS-URA5-CRISPR/*Lac1* 质粒后即可在 YNB 筛选平板上传代生长,此时 CRISPR/Cas9 系统还未能将 *Lac1* 基因突变。在不断的传代中,CRISPR/Cas9 系统才逐渐对靶点进行突变。简而言之,单菌落在传代过程中 CRISPR/Cas9 系统切割 *Lac1* 靶点的时间越早,突变细胞所占比例越大,则菌落产生的黑色素越少。我们挑取了其中颜色最浅的 *Lac1*-3、4、5 号转化子,在含 NE 的 0.1% Asn 平板上继续划线纯化。避光培养 3 d 后,可看到每个转化子平板上都有一些单菌落呈白色。每个转化子划线平板上各挑取一个白色单菌落点接在一块新的含 NE 的 0.1%Asn 平板上,避光培养 2 d 后可观察到 JEC21 菌体已呈现深棕色,而 3 个转化子单菌落菌体都依然为白色(图 3-C)。提取这 3 个白色单菌落的基因组 DNA,扩增 *Lac1* 靶点区域进行测序,结果显示 *Lac1* 靶点处确实产生了插入缺失突变(图 3-D)。该结果与之前报道的细胞以 NHEJ 方式修复 CRISPR/Cas9 系统所造成的 DSB 结果一致,表明 CnU6 启动子能有效转录 CRISPR/Cas9 系统中有功能的 gRNA。

2.6 CRISPR/Cas9 系统介导 *Tsp2-1* 基因编辑

为检测新型隐球酵母中 CRISPR/Cas9 系统介导的靶基因编辑效率,我们选择以新型隐球酵母生长非必需的 *Tsp2-1* 基因为新的靶基因。*Tsp2-1* 功能的缺失与否,不影响酵母转化子在 YNB 筛选平板上的生长与表型^[26]。

我们使用 sgRNAs9 软件在 *Tsp2-1* 编码区中确定了一个最优的 CRISPR 靶点,序列为 5'-GGAAGAAGCCAAAGCTTAGGTGG-3'。该靶点序列中含有 *Hind* III 酶切位点 5'-AAGCTT-3',且 Cas9 核酸酶的切点位于 *Hind* III 酶切位点内。

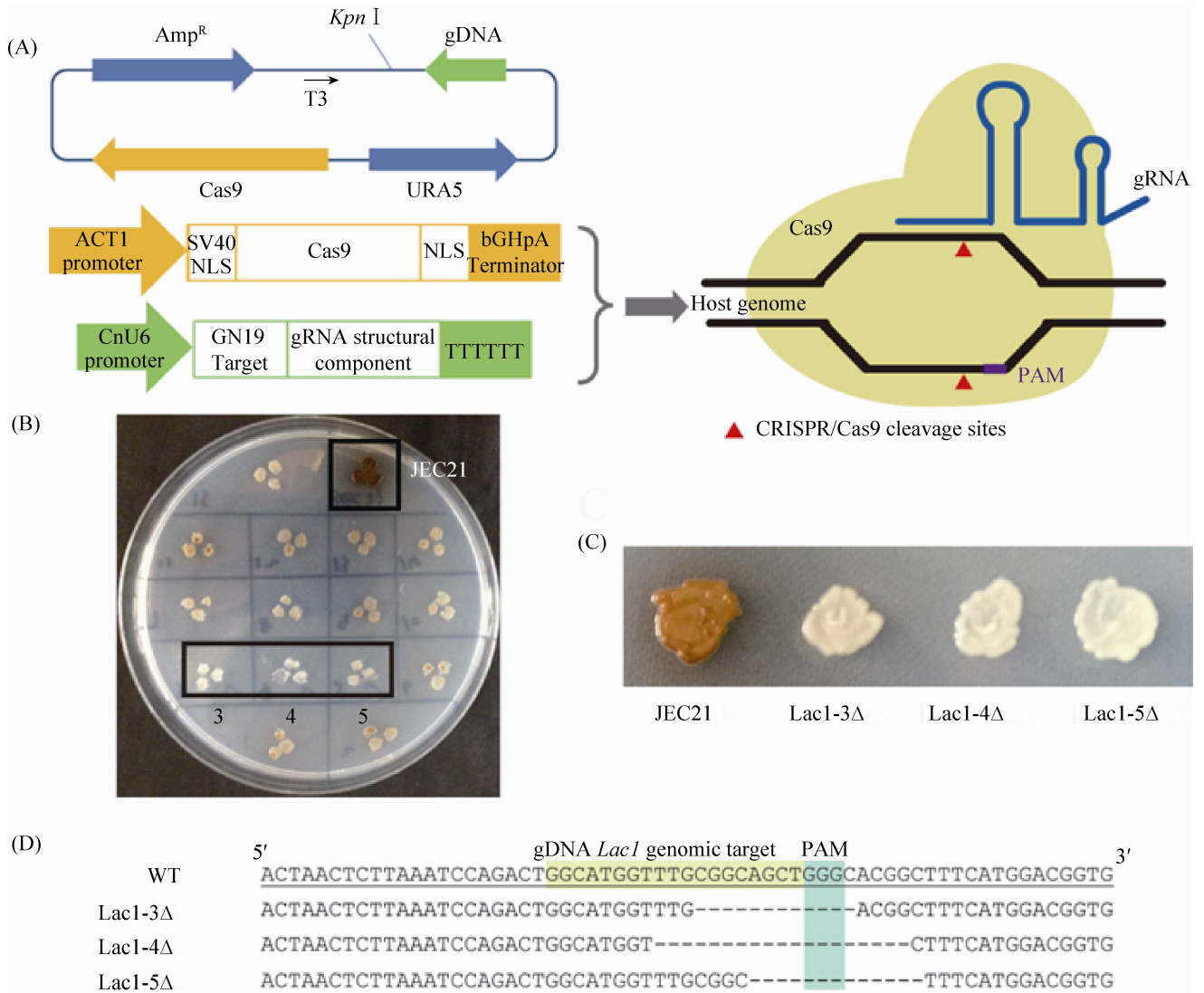


图 3. CnU6 启动子转录 gRNA，通过 CRISPR/Cas9 系统引导 Cas9 核酸酶切割 *Lac1* 靶点

Figure 3. CnU6 promoter could drive the expression of gRNA, which could guide Cas9 nuclease to cleave the target site of *Lac1* by CRISPR/Cas9 system. A: illustration of the pBS-URA5-CRISPR vector for Cas9 expression and gRNA production. Cas9 nuclease could interact with gRNA to direct endonuclease activity proximal to the PAM sequence and cleave target locus located 3 to 4 nucleotides upstream of the PAM site. *URA5* is a selection marker in yeast transformation, T3 primer can be used for gDNA sequencing. B: a master plate with a random selection of transformants of CRISPR/*Lac1* into 4500FOA. A large number of transformants displayed albinism, and the melanic WT strain JEC21 was marked. C: the phenotypic difference for brown JEC21 strain and three white *Lac1*Δ mutants. D: alignments of *Lac1* gene from white colonies. Indels at the *Lac1* target sites were confirmed by sequencing the PCR products. Target sequence and PAM site were highlighted.

当 Tsp 靶点被 CRISPR/Cas9 系统编辑后，该靶点将不能被 *Hind III* 切割。

测序正确的线性化 pBS-CRISPR/Tsp 质粒以

电转化方式转化 4500FOA 营养缺陷型菌株，考虑到 CRISPR/Cas9 系统介导编辑过程发生的滞后性，YPD 液体中延长复苏时间至 4 h 后涂布 YNB

筛选平板，同时以线性化的 pBS-CRISPR/Lac1 质粒作为对照组。随机在 YNB 筛选平板上挑取 50 个以 *Lac1* 为靶点的酵母转化子和 50 个以 *Tsp* 为靶点的酵母转化子，提取它们的基因组 DNA，扩增 *Tsp* 靶点区域并进行 *Hind* III 酶切验证。结果显示：经充分酶切后，对照组 50 个转化子的 *Tsp*

靶点全部可被 *Hind* III 切割(图 4-A)；而实验组 50 个转化子中，32 个不能被 *Hind* III 切割，10 个可被 *Hind* III 完全切割，8 个可被 *Hind* III 部分切割(图 4-B)。以上结果表明，复苏时间为 4 h 时，新型隐球酵母中 CRISPR/Cas9 系统对 *Tsp* 靶点的编辑效率约为 64% (32/50)。



图 4. CRISPR/Cas9 系统介导 *Tsp* 靶点编辑效率检测

Figure 4. Efficiency detection for CRISPR/Cas9 system mediated editing of *Tsp* target site. A: the CRISPR/Cas9 system could not cleave *Tsp* target locus without the guide of gRNA/*Tsp*. B: the CRISPR/Cas9 system mutated *Tsp* target locus efficiently with the guide of gRNA/*Tsp*.

3 讨论

作为模式病原真菌，新型隐球酵母由于同源重组频率低，基因敲除困难，基因功能研究进展缓慢。本实验室希望将目前热门的第三代人工打靶技术 CRISPR/Cas9 系统应用于新型隐球酵母中，实现对目的基因的人工打靶，从而克服新型隐球酵母基因敲除困难的瓶颈。在高等生物中，CRISPR/Cas9 系统中的 gRNA 通常由 Pol III 型的 U6 启动子转录，而新型隐球酵母中尚未有 U6 启动子的报道。为解决此问题，本实验根据 NCBI 上的新型隐球酵母基因组信息，结合本实验室 RNA-seq 文库数据，利用生物信息学方法成功鉴定和克隆了新型隐球酵母的 U6 RNA 及其 CnU6 启动子。在血清型 D 菌株 JEC21 和血清型 A 菌株

H99 中 U6 RNA 序列完全相同，但启动子序列具有一定的差异性。我们以基因敲除更为困难的 JEC21 菌株为研究对象，它的 CnU6 启动子能有效驱动 shRNA 转录，通过 RNAi 途径介导靶基因沉默。更为重要的是，CnU6 启动子还能直接转录有功能的 gRNA，通过 CRISPR/Cas9 系统介导靶基因移码突变。实验结果表明，当 CRISPR 靶点位于靶基因 CDS 区 5'端时，移码突变的产生可造成基因功能完全失活，其结果相当于基因敲除。CnU6 启动子的发现，为 shRNA 表达及 CRISPR/Cas9 系统在新型隐球酵母中的成功应用奠定了基础，它将有助于加快新型隐球酵母的功能基因研究。

CRISPR/Cas9 系统虽然能对新型隐球酵母进行高效的基因编辑，但若将该系统在新型隐球酵母中广泛应用，还需进行很多的检测和优化。作

为一个外源系统, Cas9 和 gRNA 在新型隐球酵母细胞中的持续表达对酵母的生长和致病性是否具有毒性, 还需进行检测。基因的敲除和回补, 是现代功能基因研究的基本流程。CRISPR/Cas9 系统介导的突变菌株, 无法进行靶基因的回补, 否则回补的靶基因将再次被细胞内持续表达的 CRISPR/Cas9 系统编辑。能否通过使用诱导型启动子或其他方法对 CRISPR/Cas9 系统的表达进行精确调控, 从而实现靶基因回补, 还需进行实验研究。CRISPR/Cas9 系统已在新型隐球酵母中表现出高效的基因编辑效率, 我们计划通过串联多个 gDNA, 尝试进行多靶点同时编辑, 拓宽 CRISPR/Cas9 系统在新型隐球酵母中的应用范围。

CRISPR/Cas9 系统在新型隐球酵母中的成功表达, 意味着它将成为新型隐球酵母的一个高效率基因组编辑工具, 这对于理解新型隐球酵母的致病机理和进一步的基因组研究具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Olszewski MA, Zhang YM, Huffnagle GB. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. *Future Microbiology*, 2010, 5(8): 1269–1288.
- [2] Voelz K, Msy RC. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9(6): 835–846.
- [3] Toffaletti DL, Rude TH, Johnston SA, Durack DT, Perfect JR. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(5): 1405–1411.
- [4] Davidson RC, Cruz MC, Sia RAL, Allen B, Alspaugh JA, Heitman J. Gene disruption by biolistic transformation in serotype D strains of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 29(1): 38–48.
- [5] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985, 317(6034): 230–234.
- [6] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, 296(5567): 550–553.
- [7] Lin XY, Yang JG, Chen J, Gunasekera A, Fesik SW, Shen Y. Development of a tightly regulated U6 promoter for shRNA expression. *FEBS Letters*, 2004, 577(3): 376–380.
- [8] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435(7042): 646–651.
- [9] Li T, Huang S, Zhao XF, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(14): 6315–6325.
- [10] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [11] Jinek M, Chylinski, Fonara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [12] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [13] Liu H, Cottrell TR, Pierini LM, Goldman WE, Doering TL. RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*, 2002, 160(2): 463–470.
- [14] Bose I, Doering TL. Efficient implementation of RNA interference in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(2): 156–159.
- [15] Janbon G, Maeng S, Yang DH, Ko YJ, Jung KW, Moyrand F, Floyd A, Heitman J, Bahn YS. Characterizing the role of RNA silencing components in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(12): 1070–1080.
- [16] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): 4336–4343.
- [17] Jacobs JZ, Ciccaglione KM, Tournier V, Zaratiegui M. Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast. *Nature Communications*, 2014, 5: 5344.
- [18] Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, Wheeldon I. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(4): 356–359.
- [19] Liu R, Chen L, Jiang YP, Zhou ZH, Zou G. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discovery*, 2015, 1: 15007.
- [20] Matsu-rua T, Baek M, Kwon J, Hong C. Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2015, 2(1): 4.
- [21] Fuller KK, Chen S, Loros JJ, Dunlap JC. Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus*

- fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 2015, 14(11): 1073–1080.
- [22] Wagner JC, Platt RJ, Goldfless SJ, Zhang F, Niles JC. Efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Plasmodium falciparum*. *Nature Methods*, 2014, 11(9): 915–918.
- [23] Waaijers S, Portegijs V, Kervek J, Lemmens BBLG, Tijsterman M, Van den Heuvel S, Bosem M. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 2013, 195(3): 1187–1191.
- [24] Xie SS, Shen B, Zhang CB, Huang XX, Zhang YL. sgRNACas9: a software package for designing CRISPR sgRNA and evaluating potential off-target cleavage sites. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100448.
- [25] Zhang P, Wei D, Li Z, Pan J, Zhu X. *Cryptococcus phosphoglucose* isomerase is required for virulence factor production, cell wall integrity and stress resistance. *FEMS Yeast Research*, 2015, 15(7): fov072.
- [26] Li ZM, Bi JN, Yang J, Pan J, Sun ZX, Zhu XD. Requirement of a Tsp2-type tetraspanin for laccase repression and stress resistance in the basidiomycete *Cryptococcus neoformans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(1): 21–27.

Identification, cloning and functional verification of U6 promoter from *Cryptococcus neoformans*

Yu Wang¹, Tingting Xiao¹, Xiangyang Zhu¹, Xueru Zhao¹, Dongsheng Wei^{1*}, Xudong Zhu^{1,2*}

¹ College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

² School of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

Abstract: [Objective] To identify and clone the polymerase III U6 promoter from *Cryptococcus neoformans* (CnU6 promoter), and verify if CnU6 promoter can effectively transcribe shRNA and gRNA of CRISPR/Cas9 system. [Methods] Combining the *C. neoformans* genome information published in GenBank database and RNA-seq library data from our laboratory, we obtained the U6 RNA sequence with high transcriptional level by bioinformatics analysis. The putative CnU6 promoter was ligated upstream of shRNA and gRNA by EasyGeno and overlapping PCR respectively. Based on shRNA-mediated target gene silencing phenotype by RNAi and gene mutation by gRNA-guided Cas9 nuclease mediated target sites editing by CRISPR/Cas9 system, we could identify if CnU6 promoter could drive the transcription of short RNA. [Results] CnU6 promoter could drive the transcription of shRNA, which could silence the target gene, and gRNA, which could guide Cas9 nuclease to cut the target site. [Conclusion] The CnU6 promoter from *C. neoformans* was successfully identified and cloned, which could drive the transcription of shRNA and gRNA efficiently.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, CnU6 promoter, shRNA, CRISPR/Cas9

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of Tianjin (16JCYBJC23800) and by the National Science Foundation of China (81271801)

*Corresponding author. Dongsheng Wei, Tel/Fax: +86-22-23505961, E-mail: weidongsheng@nankai.edu.cn; Xudong Zhu, Tel/Fax: +86-10-58804266, +86-22-23506510, E-mail: zhu11187@bnu.edu.cn, xudong82@nankai.edu.cn

Received: 18 May 2016; Revised: 6 July 2016; Published online: 19 July 2016