



## CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术在丝状真菌中的研究进展

刘星晨, 谷守芹\*, 董金皋\*

河北农业大学生命科学学院, 真菌毒素与植物分子病理学实验室, 河北 保定 071001

**摘要:** CRISPR/Cas9 技术是在特定的 RNA 引导下, 利用特异的核酸酶实现对基因组进行编辑的新技术。自 2013 年该技术体系建立起来已成功应用于动物、植物及真菌中。本文简述了 3 种基于核酸酶的基因编辑技术及其应用, 概述了 CRISPR/Cas9 系统的组成及其作用机理, 总结了 CRISPR/Cas9 在模式真菌酿酒酵母及丝状真菌中的应用, 并就在丝状真菌中应用该技术时 sgRNA 表达盒的设计、Cas9 表达盒的优化、抗性标记的筛选、受体的选择等方面提出具体的研究方法。另外, 针对该技术应用过程中出现的脱靶效应、Cas9 核定位信号的添加、启动子的选择及多个靶基因的编辑等问题提出了建议与展望, 希望能够为初次涉足该领域的科研人员提供理论参考和技术支持。

**关键词:** 基因组编辑, 人工核酸酶, CRISPR/Cas9, 植物病原真菌

基因组定向编辑技术是指对基因组中的不同功能区段进行编辑, 或通过剪除 DNA 片段来敲除某基因的功能, 或通过向基因组中插入新的片段引入新的功能, 可实现对染色体特定部位的基因进行改造, 是研究基因功能的重要手段之一。早期的基因编辑技术主要是利用基于同源重组原理进行基因打靶, 但由于基因重组效率极低, 大大限制了基因功能的研究进展。近年来, 科研人员研发出基于特殊核酸酶的基因编辑技术使基因编

辑效率大为提高, 其中 CRISPR/Cas9 技术目前已经成为基因功能研究中首选的“标准技术”, 该技术在未来一段时间里将继续推进功能基因组的研究, 不仅可使遗传工程进入崭新的阶段, 也将使生命科学各个领域发生日新月异的巨变。本文简述了 3 种基于核酸内切酶的基因编辑技术及其应用, 概述了 CRISPR/Cas9 系统的组成及作用机理, 详细阐述了该技术在模式生物酿酒酵母及植物病原真菌中的应用现状, 并根据本课题组的研究经

基金项目: 国家自然科学基金(31371897, 31671983); 河北省自然科学基金(C2014105067, C2017204069, C2017204076); 河北省研究生创新项目(1099009)

\*通信作者。谷守芹, Tel/Fax: +86-312-7528876, E-mail: [gushouqin@126.com](mailto:gushouqin@126.com); 董金皋, Tel/Fax: +86-312-7528266, E-mail: [dongjingao@126.com](mailto:dongjingao@126.com)

收稿日期: 2017-02-28; 修回日期: 2017-05-23; 网络出版日期: 2017-07-10

验提出了该技术在丝状真菌中应用的优势及技术要点, 以期如初涉本研究领域的学者提供理论和技术参考。

## 1 基于核酸内切酶的基因编辑技术

最早应用的核酸内切酶包括锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs), 这 2 种核酸内切酶都是由 DNA 结合域和核酸内切酶 FokI 组成, 在这些酶的作用下首先形成双链断裂(double strand broken, DSB), 然后通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR)进行修复。ZFN 首先成功应用于人类、动物(秀丽隐形线虫、海胆、果蝇、家蚕、斑马鱼、大鼠、小鼠、中国仓鼠、猪、牛)、植物(烟草、玉米)、微生物(细菌、真菌)中<sup>[1]</sup>, 之后创建的 TALEN 技术也在植物、小鼠、斑马鱼、猪、牛及人类细胞中成功实现了对基因的修饰<sup>[2]</sup>。但 ZFN 和 TALEN 技术需要对每一个基因位点都进行重新设计、合成和组装 2 个核酸酶, 程序较复杂、效率较低, 在一定程度上制约了其应用前景。2013 年 Zhang 等首次将 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 技术应用于哺乳动物细胞的基因编辑<sup>[3]</sup>, 自此 CRISPR-Cas9 开始被作为一种基因编辑技术而被广泛使用, 该技术操作简单、特异性强, 仅在短短几年时间里已经在人体细胞、小鼠、大鼠、斑马鱼、秀丽隐形线虫、植物、细菌、真菌等生物中成功实现了对靶基因的定向编辑, 目前该技术已经成为靶基因编辑的首选技术<sup>[4]</sup>。

## 2 CRISPR/Cas9 系统的组成及作用机理

### 2.1 CRISPR/Cas9 系统的组成

CRISPR 是规律成簇的间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)的简称, 该类序列广泛存在于 40% 的细菌和 90% 的古细菌中, 是在进化进程中形成的一种获得性自我免疫防御系统, 可降解入侵的病毒或质粒 DNA, 并在自身基因组中留下外来基因片段以对抗该外源 DNA 的再次入侵<sup>[5]</sup>。CRISPR 由高度保守的重复序列和完全不同的间隔序列交替排列组成<sup>[2]</sup>。根据目前最新的报道, 可将 CRISPR-Cas 系统分为两大类, 进一步又可分为 6 种类型和 19 种亚型<sup>[6-8]</sup>。现在常用的 CRISPR/Cas 系统由第二大类的类型 II 系统改造而来。II 型 CRISPR/Cas 系统比其他 CRISPR 系统更简单, 只需要 Cas9 蛋白(核酸酶)、成熟的 crRNA (CRISPR associate RNA)、tracrRNA (trans-activating crRNA)及 RNase III 4 种组分, 即可对特异序列的外源 DNA 进行识别、剪切<sup>[9]</sup>。Jinek 等进一步将细菌的 II 型 CRISPR 系统进行了改造和优化, 将 crRNA 和 tracrRNA 连接成一条单链引导 RNA (single-guide RNA, sgRNA), 在 sgRNA 的引导下可高效介导 Cas9 蛋白对 DNA 的定点切割<sup>[10]</sup>, 随后学者将该技术在多种真核生物中成功实现了对基因组的修饰(包括删除和插入、激活或抑制基因转录)及同时对多个靶位点的有效切割<sup>[3]</sup>, 后续研究中利用该技术还实现了基于 CRISPR-dCas9 技术的基因表达调控<sup>[11-12]</sup>, 定点的表观遗传学修饰<sup>[13]</sup>以及 Liu 等开发的基因单碱基编辑技术<sup>[14]</sup>等诸多方面的研究进展。

## 2.2 CRISPR/Cas9 系统的作用机理

CRISPR/Cas9 系统的研发是基于在细菌和古生菌中 CRISPR/Cas 系统相关的数十年的基础生物学研究<sup>[9]</sup>,目前对该系统的作用机理已形成了一致的观点,概括起来主要包括 3 个步骤:(1) 新闻隔区序列的获得:当外源噬菌体或质粒等侵染细菌后,CRISPR 系统首先识别(protospacer adjacent motif, PAM)序列,Cas1-Cas2 蛋白复合物(在某些情况下还包含其他亚单位)参与将外源新闻隔序列加工整合到细菌基因组的 5'末端的重复序列之间,这些新闻隔序列被同向重复序列隔开,保证了 CRISPR 系统对自身序列和外源序列的正确识别<sup>[8]</sup>;(2) crRNA 的合成与加工:当同类的病毒或者质粒再次入侵该细菌时,CRISPR 的短重复序列与插入的新闻隔序列一起转录为 pre-crRNA 初级转录本,加工后形成含有间隔序列的 crRNA,进一步与 tracrRNA 结合形成 crRNA-tracrRNA 复合体;(3) CRISPR/Cas9 介导的沉默免疫干扰:crRNA-tracrRNA (sgRNA)复合体进一步与 Cas9 形成 crRNA-tracrRNA-Cas9 复合体,在 sgRNA 的介导下,Cas9 蛋白能够与靶位点序列结合,并对 DNA 双链进行剪切.Cas9 蛋白含有 HNH 和 RuvC 两个关键结构域,分别对 DNA 的两条链进行剪切,HNH 结构域能够对与 crRNA 互补的 DNA 链进行剪切,RuvC 结构域负责剪切与 crRNA 非互补的 DNA 链<sup>[15]</sup>。因此,sgRNA 负责识别 PAM 位点上游的 20 个核苷酸序列,Cas9 蛋白负责将 PAM 上游 3-4 bp 处剪切形成平滑末端。因此,CRISPR-Cas9 系统中靶位点的选择是由 sgRNA 序列起始的 20 nt 及 PAM 序列共同决定的。

因此,当构建的外源 CRISPR/Cas9 系统被导入受体细胞后,由 sgRNA 识别靶标位点,Cas9

负责对 DNA 双链进行切割,细胞可以利用其自身的 NHEJ 和 HR 2 条修复途径对受损 DNA 进行修复。研究者可以根据研究需要向细胞中导入目的 DNA 片段,如抗性基因/荧光蛋白基因等,即可实现对靶基因的定向编辑。

## 3 CRISPR/Cas9 系统在酿酒酵母基因组定点编辑中的研究进展

近几年来众多研究者将 CRISPR/Cas9 技术应用于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)基因功能的研究中,使靶基因编辑的数目和编辑效率显著提高,并实现了对靶基因片段的删除。如 DiCarlo 等首先利用 CRISPR/Cas9 技术,使单链及双链靶基因断裂效率分别提高至 5 倍和 130 倍,另外将携带 sgRNA 的质粒与供体 DNA (donor DNA)转至含有组成型表达的 Cas9 细胞中可使供体 DNA 的同源重组率接近 100%<sup>[16]</sup>。Ronda 等利用 CrEdit (CRISPR/Cas9 mediated genome editing)技术结合基因同源重组技术,在同源臂减少至 60 bp 时可使靶基因的敲除效率接近 100%;另外,利用该技术实现了对同一代谢途径中多个基因的编辑<sup>[17]</sup>。Jakočiūnas 等成功地利用 CRISPR/Cas9 系统在一步转化中同时完成了对酵母基因组中 5 个位点的编辑<sup>[18]</sup>。Yu 等将 CRISPR/Cas9 与 PCS (PCR-mediated chromosome splitting)技术相结合,建立了 CRISPR-PCS 技术,该技术使染色体断裂(chromosome splitting)效率提高 200 倍,实现了对多个位点染色体的同时断裂与编辑<sup>[19]</sup>。Hao 等利用 CRISPR 技术实现了比传统的 Latour system 更高的基因编辑效率,可删除大于 30 kb 的大片段基因<sup>[20]</sup>。由此可见,在酿酒酵母中应用 CRISPR/Cas9 技术比传统的基因编

辑技术展示了更高的编辑效率,尤其在同时编辑多个基因时显示了更强的优势。

#### 4 CRISPR/Cas9 系统在丝状真菌基因组定点编辑中的研究进展

在丝状真菌研究领域有关 CRISPR/Cas9 基因编辑体系的研究报道主要集中在曲霉属 (*Aspergillus*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、玉米黑粉菌 (*Ustilagomaydis*)、水稻稻瘟病菌 (*Pyriculariaoryzae*)等(表 1)。目前在该领域的研究重点主要集中于在不同物种中建立 CRISPR/Cas9 体系并分析其基因编辑效率等方面。如 Nødvig 等在曲霉属的 6 个物种中建立了 CRISPR/Cas9 基因编辑体系,这些物种包括构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、巴西曲霉 (*A. brasiliensis*)、炭黑曲霉菌 (*A. carbonarius*)、泡盛曲霉 (*A. luchuensis*)、黑曲霉 (*A. niger*)、塔宾曲霉 (*A. tubingensis*)等,他们所建立的技术体系不仅可以进行单基因编辑,也实现了对多个基因的同时编辑<sup>[21]</sup>。Fuller 等在烟曲霉 (*A. fumigatus*)也建立了 CRISPR/Cas9 基因编辑体系,

利用该体系使黑色素合成途径的关键基因聚酮合酶基因 (*pksP*)的敲除效率达到 25%–53%;也证明了 Cas9 核酸酶对菌体的生长发育和毒力均无影响,表明了该系统可以用于病菌致病机理研究及基因功能的研究<sup>[22]</sup>。Zhang 等也在烟曲霉 (*A. fumigatus*)中建立了以 CRISPR/Cas9 技术为基础的微同源臂介导的末端连接(microhomology-mediated end joining, MMEJ)靶基因突变系统,不仅实现了精确高效的靶基因编辑,可在同源臂仅为 35 bp 时使基因的编辑效率高达 95%–100%<sup>[23]</sup>。Liu 等在里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)建立了 CRISPR/Cas9 系统,不仅可以在同源臂较短的条件下实现靶基因高效率的同源重组,也可对多个靶基因进行同时编辑<sup>[24]</sup>。Schuster 等在玉米黑粉菌 (*Ustilago maydis*)中建立了 CRISPR/Cas9 体系,使供试靶基因的平均编辑效率达 70%<sup>[25]</sup>。Araoz 等在水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)中建立了 CRISPR/Cas 系统,利用在丝状真菌中具有密码子偏好的 Cas9 酶、内源的 RNA 聚合酶 III、U6 启动子和 RNA 聚合酶 II 真菌启动子表达 sgRNA (single-guideRNA),并例证了该系统可以识别目标序列、通过基因同源

表 1. 丝状真菌中已报道利用 CRISPR/Cas9 实现基因编辑的部分实例

Table 1. Partial examples using CRISPR/Cas9-mediated genome editing in filamentous fungi

Species	Genes	Transformation efficiency/%	Screening markers	References
<i>A. nidulans</i>	<i>yA</i>	70–80	AN_argB	[21]
<i>A. aculeatus</i>	<i>albA, pyrG</i>	–	hygR	[21]
<i>A. niger</i>	<i>albA</i>	–	–	[21]
<i>A. luchuensis</i>	<i>albA</i>	–	–	[21]
<i>A. brasiliensis</i>	<i>albA</i>	–	–	[21]
<i>A. carbonarius</i>	<i>albA</i>	–	–	[21]
<i>A. fumigatus</i>	<i>pksP</i>	25–53	hph	[22]
<i>A. fumigatus</i>	<i>pksP</i>	95–100	hph	[23]
<i>T. reesei</i>	<i>LaeI, vib1, clr2</i>	≥93	–	[24]
<i>U. maydis</i>	<i>bE1, bW2</i>	70–100	–	[25]
<i>M. grisea</i>	–	–	–	[26]

The lines in the table indicate that the related data are not shown in the references.

重组方式高效编辑靶基因<sup>[26]</sup>。总之,目前在上述真菌中的研究结果表明,利用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术可以有效地对丝状真菌的靶基因进行编辑,利用该体系不仅可以对单个的目的基因进行编辑,也可对基因家族、整个基因座及代谢通路中的多个基因同时进行编辑。

## 5 植物病原真菌中 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的构建方法及技术要点

本课题组李坡等利用 RNAi、靶基因敲除技术分析玉米大斑病菌基因功能过程中发现,靶基因编辑的效率很低<sup>[27-28]</sup>,这很可能是由于在正常条件下形成双链断裂的几率很低造成的。近两年我们尝试在玉米大斑病菌中建立 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,并总结出了在丝状真菌中建立该体系的基本技术流程及注意的问题,概括起来主要包括以下几个方面:(1) 确定 sgRNA 表达盒。sgRNA 表达盒由启动子、gRNA、sgRNA scaffold 序列和终止子所组成。其中,筛选合适的 sgRNA 序列是决定基因编辑成功与否的关键因素,首先需要在靶标 DNA 区域寻找 PAM (protospacer associated motif)序列 NGG/NAG,在 PAM 序列上游 20 bp 左右序列即为 sgRNA 序列,之后需要在基因组数据库中检测 sgRNA 靶序列的特异性。目前的研究表明,靶序列最好含有 11-14 个 C/G,因为靶序列 C/G 含量百分比的提高可提高打靶效率<sup>[29]</sup>; sgRNA 序列的设计及评估通常需要借助特定软件完成,如 CRISPR Design、ZiFiT、Cas9 Design、E-CRISP、CRISPR-P、sgRNAs9<sup>[30-44]</sup>等(表 2)。另外,启动子的选择也是影响 sgRNA 表达的因素,目前在丝状真菌中常用的启动子为 U3、U6 等<sup>[45]</sup>。

(2) Cas9 表达盒的选择。Cas9 蛋白的表达量是决定靶基因双链断裂效率的决定因素,通过选用真菌内源的组成型启动子,如 *gpdA* 启动子及木霉属 *pki1* 启动子<sup>[46]</sup>等;或采用对 Cas9 密码子进行优化也可显著提高 Cas9 蛋白的表达量并提高基因组编辑的效率;此外,还可对 Cas9 蛋白进行适当的修饰,如添加核定位信号(nuclear localization signal, NLS)或标签蛋白(GFP)等以提高基因组编辑效率或作为筛选标记。(3) 抗性标记的筛选。在丝状真菌靶基因编辑研究中,大多引入同源重组介导的修复(homology-directed repair, HR),转入受体细胞的同源臂中含有抗性基因盒及靶基因的同源臂,目前常用的抗性标记为潮霉素 B 或草铵膦,所采用的同源臂长度一般在 200 bp 至几十 bp 不等。(4) 受体的选择。目前在植物病原真菌中一般将 Cas9-sgRNA、同源臂及抗性基因盒等利用酶切连接或 Overlap PCR 技术克隆至一个质粒中,之后同时转入丝状真菌的原生质体中,通过抗性及分子生物学手段筛选得到靶基因编辑突变菌株。

## 6 问题与展望

CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术只需要根据靶基因序列设计出 sgRNA,即可实现对基因组的定点编辑,实验操作简单、周期短、高效、通用性广、费用低,但该技术仍存在一定的局限性,主要表现在以下两个方面:(1) 存在脱靶效应,可能引起基因组非靶向位点的突变,把无意义的片段带入靶向基因组中,从而增加了研究结果的不确定性;(2) 靶基因编辑的效率仍然较低。由于在丝状真菌中应用该技术的物种的报道还比较少,目前在很多物种中尚未建立成熟的基因编辑体系,笔者认为在该研究领域尚存在诸多需要深

表 2. sgRNA 设计与脱靶效应评估软件的部分实例  
Table 2. Part software examples of sgRNA design and off-target effect evaluation

Names of software	Research institutions	Internet sites	Application scope and function	References
Cas9 Design	Engineering College, Beijing University	<a href="http://cas9.cbi.pku.edu.cn/">http://cas9.cbi.pku.edu.cn/</a>	sgRNA design and transcriptional efficiency assessment in 10 model animals including mice, rats, zebrafish and so on	[30]
E-CRISP		<a href="http://www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html">http://www.e-crisp.org/E-CRISP/index.html</a>	sgRNA design and off-target effect assessment; "Paired-gRNA" design	[31]
Cas-OFFinder	Laboratory of Professor Jin-Soo Kim in Seoul National University	<a href="http://www.rgenome.net/cas-offinder/">http://www.rgenome.net/cas-offinder/</a>	Searching for potential off-target sites in a given genome or user-defined sequences	[32]
CRISPR-P	National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement at College of Life Science and Technology in Huazhong Agricultural University	<a href="http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/">http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/</a>	Selecting sgRNA in plants and marking comprehensive restriction enzyme cutting sites for each sgRNA	[33]
CHOPCHOP		<a href="https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/index.php">https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/index.php</a>	CRISPR/Cas9 or TALEN system-mediated genome editing technology	[34]
CRISPRdirect		<a href="http://crispr.dbcls.jp/">http://crispr.dbcls.jp/</a>	Designing special sgRNA	[35]
COSMID		<a href="https://crispr.bme.gatech.edu/crispr/">https://crispr.bme.gatech.edu/crispr/</a>	Identifying and validating CRISPR/Cas off-target sites	[36]
CRISPR Design	Laboratory of Zhang Feng in Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology	<a href="http://crispr.mit.edu/">http://crispr.mit.edu/</a>	sgRNA design and off -target effect evaluation	[37]
CasOT	College of Life Sciences in Beijing University	<a href="http://eendb.zfgenetics.org/casot/index.php">http://eendb.zfgenetics.org/casot/index.php</a>	sgRNA design and off -target effect evaluation	[38]
sgRNACas9	National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement in Huazhong Agricultural University and Laboratory of Huang Xingxu in Shanghai University of Science and Technology	<a href="http://www.biooools.com/">http://www.biooools.com/</a>	sgRNA design and off -target effect evaluation	[39]
SSFinder		<a href="https://code.google.com/p/ssfinder/">https://code.google.com/p/ssfinder/</a>	sgRNA design and off -target effect evaluation	[40]
GT-Scan		<a href="http://gt-scan.braembl.org.au/gt-scan/submit">http://gt-scan.braembl.org.au/gt-scan/submit</a>	sgRNA design and off-target prediction	[41]
flyCRISPR Optimal Target Finder		<a href="http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/">http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/</a>	sgRNA design and off -target effect evaluation	[42]
Off-Spotter		<a href="https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter/">https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter/</a>	sgRNA design and off -target effect evaluation	[43]
CCTop		<a href="http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/index.html">http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/index.html</a>	sgRNA design and off -target effect evaluation	[44]

入研究的内容。(1) 如何获得高效的丝状真菌偏好的 Cas9 酶。研究者可以探索丝状真菌偏好的密码子优化的 Cas9 酶, 或者解析 Cas9 蛋白结构并对

酶本身进行改造, 使 Cas9 蛋白特异结合或切割 DNA 靶点, 提高其特异性。(2) 对 Cas9 添加核定位信号, 有效地指导 Cas9 蛋白入核或促使其在丝

状真菌细胞核内特异表达。(3) 对比不同来源的各种启动子(比如 H1 启动子、拟南芥 U6 启动子、烟草 U6 启动子、UBI 启动子、35S 启动子等)的靶标范围、精准度和表达效率, 选取适用于目标真菌的启动子。(4) 针对一条代谢途径、多基因控制的性状或代谢过程, 设计能同时对多个靶标基因进行编辑的 sgRNA 表达盒, 这样我们可以对某个代谢途径、代谢过程及功能相关的多个基因同时进行分析。(5) 如何应对脱靶效应方面, 可以借鉴植物中 CRISPR/Cas9 的研究方法和思路, 建立对脱靶效应进行全面准确评估的评价体系, 最大限度地降低可能存在的脱靶效应, 提高 CRISPR/Cas9 的特异性和编辑效率<sup>[47]</sup>。

总的来说, CRISPR/Cas9 系统在丝状真菌基因组编辑的应用方面还处于初级阶段, 目前的报道也仅限于几个物种中, 如何将该技术应用于大型且与人类生产生活密切相关的真菌物种中, 是否可以建立不局限于某个真菌物种的通用 Cas9、sgRNA 及基因编辑体系, 如何提高同源重组效率, 如何定向地插入和删除超长的目的基因片段等问题仍亟待解决。随着更广泛的真菌功能基因组研究的开展, 在不远的将来希望该技术可以广泛应用于人类病原真菌、动物病原真菌、植物病原真菌、药用真菌、食用真菌等的遗传改造、品质改良等方面。

## 参 考 文 献

- [1] Cui XX, Ji DN, Fisher DA, Wu YM, Briner DM, Weinstein EJ. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 2011, 29: 64–67.
- [2] Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu JK. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(6): 2623–2628.
- [3] 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.
- [4] Mussolino C, Cathomen T. RNA guides genome engineering. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 208–209.
- [5] Vestergaard G, Garrett RA, Shah SA. CRISPR adaptive immune systems of archaea. *RNA Biology*, 2014, 11(2): 156–167.
- [6] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13: 722–736.
- [7] Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems. *Molecular Cell*, 2015, 60(3): 385–397.
- [8] Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(3): 169–182.
- [9] Zheng XM, Zhang XL, Yu JD, Zheng P, Sun JB. CRISPR-Cas9-based genome engineering. *Current Biotechnology*, 2015, 5(1): 1–9. (in Chinese)  
郑小梅, 张晓立, 于建东, 郑平, 孙际宾. CRISPR-Cas9 介导的基因组编辑技术的研究进展. *生物技术进展*, 2015, 5(1): 1–9.
- [10] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [11] Bikard D, Jiang WY, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(15): 7429–7437.
- [12] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183.
- [13] Yang S, Duan XF, Fan XL, Cheng J. Progress in anti-HBV studies targeting HBV covalently closed circular DNA. *Chinese Journal of Liver Diseases (Electronic Version)*, 2015, 7(4): 19–21. (in Chinese)  
杨松, 段雪飞, 范小玲, 成军. 针对共价闭环状 DNA 的抗 HBV 治疗进展. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2015, 7(4): 19–21.
- [14] Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420–424.
- [15] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(39): E2579–E2586.
- [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] Ronda C, Maury J, Jakočiunas T, Jacobsen SAB, Germann SM,

- Harrison SJ, Borodina I, Keasling JD, Jensen MK, Nielsen AT. CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 97.
- [18] Jakočiūnas T, Bonde I, Herrgård M, Harrison SJ, Kristensen M, Pedersen LE, Jensen MK, Keasling JD. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 213–222.
- [19] Sasano Y, Nagasawa K, Kaboli S, Sugiyama M, Harashima S. CRISPR-Cas9: a powerful new approach to inducing multiple chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30278.
- [20] Hao HH, Wang XF, Jia HY, Yu M, Zhang XY, Tang H, Zhang LP. Large fragment deletion using a CRISPR/Cas9 system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Biochemistry*, 2016, 509: 118–123.
- [21] Nødvig CS, Nielsen JB, Kogle ME, Mortensen UH. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133085.
- [22] 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.
- [23] Zhang C, Meng XH, Wei XL, Lu L. Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 2016, 86: 47–57.
- [24] 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.
- [25] Schuster M, Schweizer G, Reissmann S, Kahmann R. Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genetics and Biology*, 2016, 89: 3–9.
- [26] Arazoe T, Miyoshi K, Yamato T, Ogawa T, Ohsato S, Arie T, Kuwata S. Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(12): 2543–2549.
- [27] Li P, Gong XD, Jia H, Fan YS, Zhang YF, Cao ZY, Hao ZM, Han JM, Gu SQ, Dong JG. MAP kinase gene *STK1* is required for hyphal, conidial, and appressorial development, toxin biosynthesis, pathogenicity, and hypertonic stress response in the plant pathogenic fungus *Setosphaeria turcica*. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(12): 2786–2794.
- [28] Gu SQ, Li P, Wu M, Hao ZM, Gong XD, Zhang XY, Tian L, Zhang P, Wang Y, Cao ZY, Fan YS, Han JM, Dong JG. StSTE12 is required for the pathogenicity of *Setosphaeria turcica* by regulating appressorium development and penetration. *Microbiological Research*, 2014, 169(11): 817–823.
- [29] Xie KB, Yang YN. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 1975–1983.
- [30] Ma M, Ye AY, Zheng WG, Kong L. A guide RNA sequence design platform for the CRISPR/Cas9 system for model organism genomes. *Biomed Research International*, 2013, 2013: 270805.
- [31] Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nature Methods*, 2014, 11(2): 122–123.
- [32] Bae S, Park J, Kim JS. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 2014, 30(10): 1473–1475.
- [33] Lei Y, Lu L, Liu HY, Li S, Xing F, Chen LL. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Molecular Plant*, 2014, 7(9): 1494–1496.
- [34] Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): 401–407.
- [35] Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 2015, 31(7): 1120–1123.
- [36] Cradick TJ, Qiu P, Lee CM, Fine EJ, Bao G. COSMID: a web-based tool for identifying and validating CRISPR/Cas off-target sites. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2014, 3(12): e214.
- [37] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li YQ, Fine EJ, Wu XB, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 827–832.
- [38] Xiao A, Cheng ZC, Kong L, Zhu ZY, Lin S, Gao G, Zhang B. CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics*, 2014, 30(8): 1180–1182.
- [39] 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.
- [40] Upadhyay SK, Sharma S. SSFinder: high throughput CRISPR-Cas target sites prediction tool. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 742482.
- [41] O'Brien A, Bailey TL. GT-Scan: identifying unique genomic targets. *Bioinformatics*, 2014, 30(18): 2673–2675.
- [42] Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM, O'Connor-Giles KM. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*, 2014, 196(4): 961–971.
- [43] Pliatsika V, Rigoutsos I. "Off-Spotter": very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs. *Biology Direct*, 2015, 10: 4.
- [44] Stemmer M, Thumberger T, del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124633.
- [45] Qu LJ, Guo DS, Zhang JZ, Qin GJ. The application of CRISPR/Cas system in plant genome editing. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, 27(1): 64–70. (in Chinese)  
瞿礼嘉, 郭冬妹, 张金喆, 秦跟基. CRISPR/Cas 系统在植物基因组编辑中的应用. *生命科学*, 2015, 27(1): 64–70.
- [46] Lin T, Huang JZ. Research advance on promoters for heterologous gene expression in filamentous fungi. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2013, 41(7): 2862–2863, 2865. (in Chinese)  
林涛, 黄建忠. 丝状真菌启动子研究进展. *安徽农业科学*, 2013, 41(7): 2862–2863, 2865.
- [47] Ping WL, Li XJ, Lin J, Ding YF, Sun H, Sun JP. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering and its application in plant variety improvement. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(5): 16–22. (in Chinese)  
平文丽, 李雪君, 林娟, 丁燕芳, 孙焕, 孙计平. CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术及其在作物品种改良中的应用. *中国农学通报*, 2016, 32(5): 16–22.



## Research progress of CRISPR/Cas9 system in genome targeted editing of filamentous fungi

Xingchen Liu, Shouqin Gu\*, Jingao Dong\*

Mycotoxin and Molecular Plant Pathology Laboratory, College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei Province, China

**Abstract:** CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 technology, established in 2013, guided by special RNA and initiated by endonuclease, has been developed into the third generation of genome editing technology, which is widely used in genome editing among varieties of species including animals, plants, bacteria and fungi with high efficiency and specificity. This review briefly introduces the characteristics and the application of three genome editing technologies based on endonucleases, describes the composition and mechanism of CRISPR/Cas9 mediated genome editing, summarizes the application of this tool in *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi in genome editing. In the other hand, we put forward the protocol about using CRISPR/Cas9 technology in filamentous fungi, such as the design of sgRNA cassette, the optimization of Cas9 cassette, the screening of resistance marker, the selection of receptor, and so on. Furthermore, some suggestions were given about the problems which often encounter in practical application, such as off-target effects, the addition of Cas9 nuclear localization signal, the selection of promoter, and multi-gene editing, to provide a theoretical and technological references for the beginners in filamentous fungus gene editing field.

**Keywords:** genome editing, artificial nucleases, CRISPR/Cas9, filamentous fungus

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371897, 31671983), by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2014105067, C2017204069, C2017204076) and by the Graduate Innovation Project of Hebei Province (1099009)

\*Corresponding author. Shouqin Gu, Tel/Fax: +86-312-7528876, E-mail: gushouqin@126.com; Jingao Dong, Tel/Fax: +86-312-7528266, E-mail: dongjingao@126.com

Received: 28 February 2017; Revised: 23 May 2017; Published online: 10 July 2017



**董金皋**, 教授, 博士, Los Alamos 国家实验室博士后, 博士生导师, 现任河北农业大学生命科学学院院长。主要研究领域包括: 植物与病原微生物互作的分子机理; 真菌遗传与微生物代谢; 植物活性物质分离、功能分析与药物开发; 植物病原微生物的生物信息学等。为河北省有突出贡献的中青年科技专家, 国家现代农业产业技术体系岗位专家, 河北省植物保护首席专家。先后主持和完成国家自然科学基金、国家“863 项目”等多项科研课题。获得教育部河北省科技进步一等奖、河北省自然科学二等奖等多项省部级奖励。在国内外期刊发表科研论文 200 多篇, 主编国家面向二十一世纪教材《农业植物病理学(北方本)》和国家“十一五”规划教材《农业植物病理学》等多部教材。