



# 基于 Golden Gate 技术的齐整小核菌转录单元高效组装系统

刘佳宁<sup>#</sup>, 吴洁<sup>#</sup>, 五十岚泰夫, 罗锋<sup>\*</sup>, 常鹏<sup>\*</sup>

西南大学资源环境学院 能源生物资源开发重庆市重点实验室, 重庆 400715

刘佳宁, 吴洁, 五十岚泰夫, 罗锋, 常鹏. 基于 Golden Gate 技术的齐整小核菌转录单元高效组装系统[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4414-4429.

LIU Jianing, WU Jie, IGARASHI Yasuo, LUO Feng, CHANG Peng. A Golden Gate-based efficient assembly system of transcription units for *Sclerotium rolfsii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4414-4429.

**摘要:**【目的】为齐整小核菌代谢工程研究建立高效的转录单元组装系统。【方法】通过应用 Golden Gate 技术, 以 mobius assembly 为基础, 分别设计并构建 DNA 元件标准化接口改造、单转录单元组装、应用质粒(多转录单元)组装等功能的载体, 从而形成一套完整的多转录单元组装系统。【结果】构建了 2 个用于 DNA 元件标准化接口改造的 Level 0 载体, 4 个用于单转录单元组装的 Level 1 载体, 4 个用于应用质粒组装的 Level 2 载体和 13 个应用质粒组装的辅助质粒。然后应用此系统为齐整小核菌组装了若干经过标准化接口改造的 DNA 元件质粒、单转录单元质粒和硬葡聚糖相关基因的功能分析质粒。所构建的最终应用质粒可以同时适用于齐整小核菌的根癌农杆菌介导转化法、电穿孔转化法和原生质体转化法。【结论】此质粒系统具有强大的 DNA 设计、组装和容纳能力, 为未来齐整小核菌代谢工程和功能基因组学研究提供了高效的质粒构建技术平台。

**关键词:** 齐整小核菌; Golden Gate; 转录单元; DNA 组装

资助项目: 国家自然科学基金(32100092); 重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX0392)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32100092) and the Chongqing Natural Science Foundation (cstc2021jcyj-msxmX0392).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding authors. CHANG Peng, Tel: +86-23-68250994, E-mail: chang1986@swu.edu.cn;

LUO Feng, Tel: +86-23-68250109, E-mail: vanlott@hotmail.com

Received: 2023-04-10; Accepted: 2023-07-05; Published online: 2023-07-12

# A Golden Gate-based efficient assembly system of transcription units for *Sclerotium rolfii*

LIU Jianing<sup>#</sup>, WU Jie<sup>#</sup>, IGARASHI Yasuo, LUO Feng<sup>\*</sup>, CHANG Peng<sup>\*</sup>

Chongqing Key Laboratory of Bio-resource Development, College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** [Objective] To establish an efficient transcription unit assembly system for the metabolic engineering of *Sclerotium rolfii*. [Methods] Based on Golden Gate technology and Mobius assembly, the scaffold plasmids for DNA part domestication, single transcription unit assembly, and application plasmid (multi-transcription-unit) assembly, were designed and constructed to provide a complete multi-transcription-unit assembly system. [Results] Two Level 0 vectors for DNA part domestication, four Level 1 vectors for single transcription unit assembly, and four Level 2 vectors and 13 auxiliary plasmids for application plasmid assembly were constructed. Using this system, we assembled tens of plasmids for domesticated DNA parts, single transcription units, and function analysis of scleroglucan-related genes. The constructed application plasmids could be directly applied in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, electroporation transformation, and protoplast transformation of *S. rolfii*. [Conclusion] The plasmid system we built has strong capabilities of DNA design, assembly, and capacity, providing an efficient plasmid construction platform for metabolic engineering and functional genomics research of *S. rolfii* in the future.

**Keywords:** *Sclerotium rolfii*; Golden Gate; transcription unit; DNA assembly

齐整小核菌(*Sclerotium rolfii*)是一种在世界范围内十分重要的土传植物病原真菌<sup>[1]</sup>。同时,齐整小核菌也是一种生产硬葡聚糖的重要工业菌株,硬葡聚糖在石油、食品、医药、保健食品和化妆品等领域都有广泛应用<sup>[2]</sup>。此外,齐整小核菌还能够生产多种有应用前景的生物产品。例如,齐整小核菌产生的凝集素在白血病和乳腺癌等疾病的诊断和治疗方面具有广阔的应用前景<sup>[3-4]</sup>。齐整小核菌还是一种血黄素蛋白纤维二糖脱氢酶的高效生产菌,对传感器、生物催化和生物修复领域具有重要的意义<sup>[5]</sup>。齐整小核菌培养成本低廉,生长快速,保存传代简便,已实现工程化发酵,因而具有成为一种优良的丝状真菌代谢工程底盘细胞的巨大潜力。

由于齐整小核菌遗传操作系统的严重缺失,导致对该菌的研究一直集中在代谢产物应用层面,而无法开展分子水平菌种构建工作,严重阻碍了该菌的代谢工程研究。因此,建立一个完整的遗传操作系统,是齐整小核菌研究与应用开发工作面临的迫切需求。遗传操作系统的核心前提技术是稳定的转化方法。在这一方面已经建立了齐整小核菌的根癌农杆菌转化法<sup>[6]</sup>和电转化法<sup>[7]</sup>,初步解决了齐整小核菌的遗传转化方法这一难题。

对于代谢工程研究而言,除了转化方法外,一个高效的质粒构建平台仍然是必不可少的。因为代谢工程常常需要对多个基因转录单元(transcription unit, TU)同时进行克隆和转

化, 或者重复利用相同的 DNA 元件或转录单元。Golden Gate 技术的出现几乎完美地解决了这一需求。Golden Gate 技术最早由 Engler 等在 2008 年提出<sup>[8-9]</sup>。该技术利用 Type II 型限制性内切酶(例如 *Bsa* I)切割 DNA, 在识别序列以外固定位置剪切 DNA 双键, 产生 4 个碱基的黏性末端。这 4 个碱基的黏性末端赋予了每个 DNA 片段末端的可定制性, 从而可以实现预先设计的接口连接顺序下多个 DNA 片段的模块化有序组装。这个技术系统有耗时短、成功率高、多片段连接效率高等优点。因此, 这一技术成为了代谢工程和合成生物学领域重要的质粒克隆方法。

目前已经报道了数种基于 Golden Gate 技术的克隆方法<sup>[10-14]</sup>。其中, mobius assembly<sup>[14]</sup>展示的精妙的设计、强大的容量和应用的便捷让人惊叹。该策略有几个特点: (1) 利用肉眼可视的色素蛋白作为筛选标记以减少筛选试剂的成本; (2) 该系统采用了 *Aar* I 酶(7 bp 识别位点), 大大减少了 DNA 元件需要去除内部酶切位点的可能性; (3) 设计了 4 个 Level 2 组装载体, 每个载体分别可以组装 4 个 TU; (4) 通过引入辅助质粒再生接口, 如果需要, 全部 16 个 TU 可以再次进入同一个 Level 1 载体, 组装成一个含全部 16 个转录单元的单一质粒中, 并具有进一步组装改造的能力。因此, 该系统具有强大的转录单元组装能力和灵活的扩展升级潜力。

为了解决齐整小核菌代谢工程研究缺乏高效的质粒构建系统的难题, 本研究基于 Golden Gate 技术, 以 mobius assembly 的设计理念为基础, 为齐整小核菌构建了一套基本的多转录单元质粒组装系统。这一系统具有强大的 DNA 设计和组装能力。利用这一系统, 为齐整小核菌的常用 DNA 元件进行了标准化接口改造,

并组装了部分常用的转录单元和几个硬葡聚糖合成相关基因的功能测试质粒。所构建的 DNA 可以同时适用于根瘤农杆菌介导转化法、电穿孔转化法和原生质体转化法。这一系统可以有助于齐整小核菌代谢工程和功能基因组学的研究进展, 有利于解决齐整小核菌领域缺乏分子工具的难题。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒

本研究中所构建的质粒见表 1。其中, 箭头方向表示 *Aar* I 和 *Bsa* I 的酶切方向。表中质粒全序列数据见补充材料 SM 1。全部补充材料已上传至国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC), 编号 NMDCX0000198 (<https://nmdc.cn/resource/attachment/detail/NMDCX0000198>)。全部质粒的序列与测序文件可从 <https://pan.baidu.com/s/19Hv09t0njK31EKY3z328EQ?pwd=qofv> 下载。质粒克隆构建采用基于 T5 核酸外切酶的 DNA 组装方法<sup>[15]</sup>。

### 1.2 主要引物与测序

本研究所使用的引物以及所有的测序服务均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。主要测序引物及其序列见表 2。

### 1.3 Golden Gate 反应体系

酶切连接反应体系配制如下: 50 ng/kb 插入片段 DNA 或质粒, 25 ng/kb 载体质粒, 1  $\mu$ L 10 $\times$  T4 DNA Ligase buffer, 0.5  $\mu$ L 5  $\mu$ mol/L PaqCI Activator (仅 PaqCI 需要加入), 0.8  $\mu$ L T4 DNA Ligase (D7008, 上海碧云天生物技术有限公司), 0.2  $\mu$ L *Bsa* I (R3733, New England Biolabs, USA)或 PaqCI (R0745, New England Biolabs, USA), 加水至 10  $\mu$ L。其中, PaqCI 是 *Aar* I 的完全同裂酶。配制完整的反应体系后, 在 PCR 仪中运行程序: 37  $^{\circ}$ C 5 min, 30–180 个

表 1 本研究所构建的质粒

Table 1 Plasmids constructed in this study

| Plasmids | Characteristics  | Description                       |
|----------|--|-----------------------------------|
| pGDK4    | <i>Aar</i> I→ <i>Sma</i> I← <i>Aar</i> I-sfGFP, KanR                             | DNA part domestication            |
| pGDK5    | <i>Aar</i> I→ <i>Pvu</i> II← <i>Aar</i> I-sfGFP, KanR                            | DNA part domestication            |
| pGAC1A   | <i>Bsa</i> I→F1← <i>Aar</i> I-sfGFP- <i>Aar</i> I→F11-F12← <i>Bsa</i> I, CmR     | TU 1 assembly                     |
| pGAC1B   | <i>Bsa</i> I→F12-F1← <i>Aar</i> I-sfGFP- <i>Aar</i> I→F11-F26← <i>Bsa</i> I, CmR | TU 2 assembly                     |
| pGAC1C   | <i>Bsa</i> I→F26-F1← <i>Aar</i> I-sfGFP- <i>Aar</i> I→F11-F27← <i>Bsa</i> I, CmR | TU 3 assembly                     |
| pGAC1D   | <i>Bsa</i> I→F27-F1← <i>Aar</i> I-sfGFP- <i>Aar</i> I→F11← <i>Bsa</i> I, CmR     | TU 4 assembly                     |
| pGAK2A   | T-DNA, MRS- <i>Aar</i> I→F1← <i>Bsa</i> I-sfGFP- <i>Bsa</i> I→F25-MRS, KanR      | Multi-TU assembly (TU 1–4)        |
| pGAK2B   | T-DNA, MRS- <i>Aar</i> I→F12-F1← <i>Bsa</i> I-sfGFP- <i>Bsa</i> I→F25-MRS, KanR  | Multi-TU assembly (TU 5–8)        |
| pGAK2C   | T-DNA, MRS- <i>Aar</i> I→F26-F1← <i>Bsa</i> I-sfGFP- <i>Bsa</i> I→F25-MRS, KanR  | Multi-TU assembly (TU 9–12)       |
| pGAK2D   | T-DNA, MRS- <i>Aar</i> I→F27-F1← <i>Bsa</i> I-sfGFP- <i>Bsa</i> I→F25-MRS, KanR  | Multi-TU assembly (TU 13–16)      |
| pGHAn1   | <i>Bsa</i> I→F1-random DNA-F12← <i>Bsa</i> I, AmpR                               | =TU1                              |
| pGHAn2   | <i>Bsa</i> I→F12-random DNA-F26← <i>Bsa</i> I, AmpR                              | =TU2                              |
| pGHAn3   | <i>Bsa</i> I→F26-random DNA-F27← <i>Bsa</i> I, AmpR                              | =TU3                              |
| pGHAn4   | <i>Bsa</i> I→F1-random DNA-F26← <i>Bsa</i> I, AmpR                               | =TU1+TU2                          |
| pGHAn5   | <i>Bsa</i> I→F12-random DNA-F27← <i>Bsa</i> I, AmpR                              | =TU2+TU3                          |
| pGHAn6   | <i>Bsa</i> I→F1-random DNA-F27← <i>Bsa</i> I, AmpR                               | =TU1+TU2+TU3                      |
| pGHA1    | <i>Bsa</i> I→F12-F11← <i>Aar</i> I-random DNA-F25← <i>Bsa</i> I, AmpR            | =TU2+TU3+TU4+end                  |
| pGHA2    | <i>Bsa</i> I→F26-F11← <i>Aar</i> I-random DNA-F25← <i>Bsa</i> I, AmpR            | =TU3+TU4+end                      |
| pGHA3    | <i>Bsa</i> I→F27-F11← <i>Aar</i> I-random DNA-F25← <i>Bsa</i> I, AmpR            | =TU4+end                          |
| pGHA4A   | <i>Bsa</i> I→F11-F12← <i>Aar</i> I-random DNA-F25← <i>Bsa</i> I, AmpR            | =end for 4 TUs assembly in pGAK2A |
| pGHA4B   | <i>Bsa</i> I→F11-F26← <i>Aar</i> I-random DNA-F25← <i>Bsa</i> I, AmpR            | =end for 4 TUs assembly in pGAK2B |
| pGHA4C   | <i>Bsa</i> I→F11-F27← <i>Aar</i> I-random DNA-F25← <i>Bsa</i> I, AmpR            | =end for 4 TUs assembly in pGAK2C |
| pGHA4D   | <i>Bsa</i> I→F11← <i>Aar</i> I-random DNA-F25← <i>Bsa</i> I, AmpR                | =end for 4 TUs assembly in pGAK2D |

The arrows indicate the directions of *Bsa* I or *Aar* I recognition sites.

表 2 本研究中所用的主要测序引物

Table 2 Primary sequencing primers used in this study

| Primer | Sequence (5'→3')      | Description                        |
|--------|-----------------------|------------------------------------|
| TP52   | ATGCTTCCGGCTCGTATGTT  | Sequencing primer for pGDK4/5      |
| TP57   | TTCAGGGTCAGTTTGCCGTT  | Sequencing primer for pGDK4/5      |
| TP36   | ACATTTCCCCGAAAAGTGCC  | Sequencing primer for pGAC1A/B/C/D |
| TP39   | CACGACAGGTTTCCCGACTG  | Sequencing primer for pGAC1A/B/C/D |
| TP38   | TCTCTTAGGTTTACCCGCCAA | Sequencing primer for pGAK2A/B/C/D |
| TP37   | GAGCTGTTGGCTGGCTGGTG  | Sequencing primer for pGAK2A/B/C/D |

循环; 16 °C 5 min; 37 °C 5 min; 60 °C 5 min。一般 *Bsa* I 反应 30 个循环后即可进行转化, 而 *Paq*CI 在超过 60 个循环后再进行转化效果较好。

#### 1.4 大肠杆菌转化与鉴定

将连接产物 2–5 μL 直接加入大肠杆菌 TOP10 感受态细胞(BC101, 北京博迈德基因技术有限公司进行常规化学转化。复苏后涂布

100–200  $\mu\text{L}$  菌液到抗生素平板上进行筛选。挑取单克隆进行 PCR 鉴定。阳性克隆接种后提取质粒送测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 元件的标准化接口改造质粒 (Level 0)

根据 Golden Gate 技术的原理, 启动子、目标基因、报告基因、筛选基因、抗原表位标签和终止子等 DNA 元件都需要预先进行标准化, 在元件两侧加上预设的通用接口(4 bp 固定碱基), 才能实现元件的重复利用。本研究采用了代谢工程领域内基于 Golden Gate 技术体系的克隆方法通用的预设接口, 以实现与其他 Golden Gate 系统元件的通用兼容性。具体的接口序列见图 1A。其中, 每个接口序列分配了 1 个编码 (F1–F11) 以便于记忆和书写。DNA 元件被分为 3 大类 10 小类。其中, 5' NT (non-translated) 大类为 5' 非翻译区, 主要包含启动子、转录调控元件和 5' UTR (untranslated region)。CDS (coding sequences) 大类包括 N 端标签(含起始密码子), 2 个 CDS 区域和 C 端标签(含终止密码子)。其中, 接口处完整的密码子已经用下划线标出以防设计时出现移码突变。Terminator 大类包括 3' UTR 和终止子序列。3 个大类按顺序组装即可得到一个完整的转录单元(transcription unit, TU)。在标准化接口改造时, 只要明确元件的类型, 即可确定应该在其两侧加上的接口序列。对于同一元件可能归于不同类别, 则需要分别进行不同接口的标准化接口改造。

在最初的接口改造质粒中, DNA 元件是通过 Golden Gate 技术进行接口改造的。但是, 这种方式单个改造反应的成本太高。因此, 本研究设计了新的用于接口改造的 Level 0 载体质粒, 结构见图 1B。在 sfGFP 的 N 端,

插入了一段序列, 包括 2 个方向相反的 *Aar* I 位点序列及位于其中的 *Sma* I 或 *Pvu* II 位点序列, 从而得到了 2 个 Level 0 载体, 即 pGDK4 和 pGDK5。选用 *Sma* I 和 *Pvu* II 位点是因为其切口是平末端, 可以实现边酶切边连接反应。

Level 0 载体可以通过 2 种方式进行元件改造(图 1C)。方法一是通过引物结合区域外加 4 nt 的接口序列, PCR 产物(无需磷酸化)即可直接与 Level 0 质粒(无需预先酶切)在 *Sma* I 或者 *Pvu* II 内切酶与 T4 DNA 连接酶同时存在的酶切连接共体系中进行边酶切边连接的平末端连接反应, 这是成本最低的方式。但是实际使用中可能发现可能存在由于引物质量的问题导致 4 bp 的接口序列不完整的小概率事件。方法二是在引物结合区域外加 4 nt 的接口序列, 再加上 15 bp 与 Level 0 载体切口同源的序列, 这样 PCR 产物即可通过基于核酸外切酶的同源重组克隆方法<sup>[15]</sup>, 快速完整的重组到经过 *Sma* I 或者 *Pvu* II 酶切线性化后的 Level 0 载体上。图 1B 和 1C 中的序列以 pGDK5 为例进行说明。这一方法的缺点是引物合成成本偏高, 优点是快速高效(大约 40 min)且准确度极高。同时, 方法二还有一个优点, 即可以同步进行元件的点突变组装(去除元件内部的 *Bsa* I 或 *Aar* I 酶切位点)。本研究采用了 sfGFP 作为筛选报告基因, 因为其高表达时大肠杆菌菌落呈现肉眼可见的黄色, 肉眼可见之前的阶段在蓝光切胶仪下也有明亮的荧光黄色。当 DNA 元件成功插入时, sfGFP 产生移码突变, 菌落不显色, 从而可以极大地方便后续的筛选(图 1D)。

最终得到的元件标准化接口改造后的质粒被命名为 pGP 系列质粒, 卡那霉素抗性。所有改造完成的 pGP 质粒均可以通过 *Aar* I 酶切得到具有标准接口的 DNA 元件。对齐整小核菌可能用到的元件(包括组成型启动子、硬葡聚糖

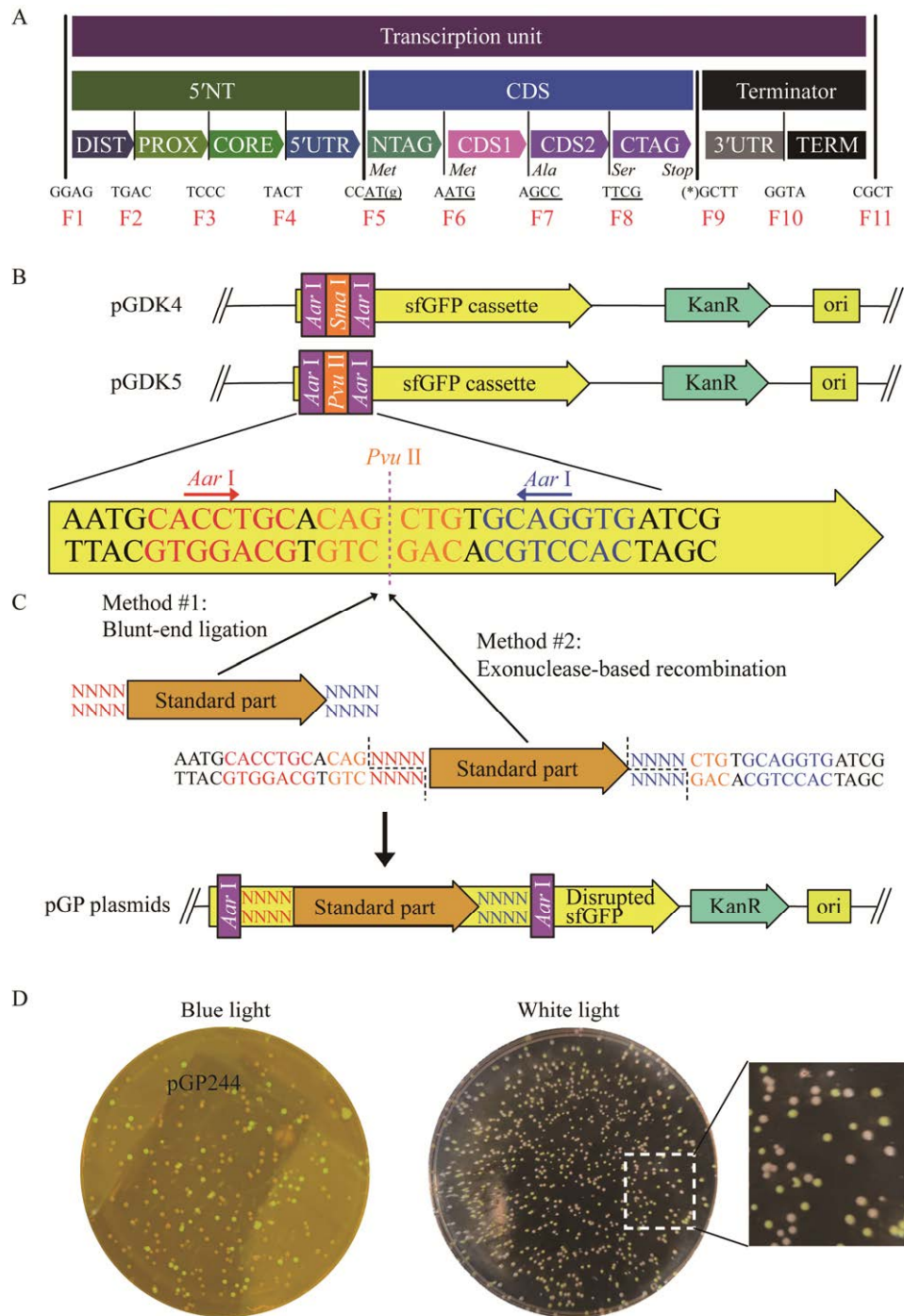


图 1 用于 DNA 元件标准化接口改造的 Level 0 载体的原理图

Figure 1 The schematic diagram of Level 0 vectors for DNA part domestication. A: The 4 bp standard part overhangs that was generally defined by FungalBraid<sup>[11]</sup>, GoldenBraid<sup>[12]</sup>, MoClo<sup>[16]</sup>, and Phytobricks<sup>[17]</sup>. F1–F11: Identifiers of 4 bp overhangs. The complete codons are underlined. The stop codon was indicated with an asterisk. B: The core region's structures of Level 0 vectors pGDK4 and pGDK5. C: The cloning methods for DNA insertion into the Level 0 vectors pGDK4 and pGDK5. The dash lines indicate the cleavage sites of each *Aar I* enzyme. D: The transformation plates under blue and white lights.

相关的目标基因、报告基因、筛选基因、抗原表位标签和终止子等)进行了接口改造,得到的 pGP 质粒列表见表 3,质粒序列、注释与测序结果见补充材料 SM 2。

## 2.2 转录单元组装质粒(Level 1)

为了组装转录单元,本研究仿照 *mobius assembly*, 构建了 4 个 Level 1 载体,见图 2A。每个载体都拥有相同的中间核心元件,即 F1←Aar I-sfGFP cassette-Aar I→F11。这保证了已改造的元件可以按照预设的顺序组装进任一质粒中。核心元件外侧由 *Bsa* I 负责产生的接口各不相同,但是首尾串联相接,保证最终这 4 个载体组装的转录单元可以按照 A→B→C→D 的顺序组装到更高级的载体中。其中, sfGFP 表达单元可以使菌落显黄色。DNA 元件组装时, *Aar* I 可以将 F1←Aar I-sfGFP cassette-Aar I→F11 这一核心元件从载体上切下来,新组装的质粒就无法使菌落显黄色。CmR 元件(氯霉素抗性元件)的应用,使得未酶切的 pGP 质粒(卡那霉素抗性)即使进入细胞也无法生长。这 2 种机制使得新长出的白色菌落一定含有组装后的质粒。

pGAC1A/B/C/D 这 4 个载体对应的转录单元是有先后顺序的,分别对应更高级质粒中顺序从左到右的 TU 1/2/3/4。转录单元的组装过程如下:按照要组装的转录单元,选定需要的 pGP 元件质粒(必须包含启动子、CDS 和终止子 3 个部分,接口从 F1-F11),然后决定该转录单

元的位置且对应选用不同的载体。例如, TU 1 组装选用 pGAC1A, TU 2 组装则选用 pGAC1B。将全部 pGP 质粒和选定的载体一起放入一个含有 *Aar* I 和 T4 DNA 连接酶的反应体系进行边切边连的反应,最终得到的转录单元质粒命名为 pGT 质粒(图 2B)。为了应对没有 N-tag 或 C-tag 的情况,本研究设计了一个包含 Kozak (翻译增强作用)序列的 linker (F5-Kozak-F6)序列质粒 pGP213, 和一个包含终止子序列(F8-TAA-F9)的质粒 pGP214。当不需要 N-tag 或 C-tag 质粒时,可以对应的使用 pGP213/214 进行替代,即可完成组装。

此外,由于 *Aar* I 的价格非常昂贵,导致单个组装反应的成本非常高(大约 40 元)。为了降低组装成本,我们进行了不同浓度的 *Aar* I 组装效果测试,结果发现当 *Aar* I 使用量为标准用量(1 μL 酶/20 μL 反应体系)的 20%–40% 时,循环反应时的酶切与连接时间都为 5 min,循环数超过 60 个时(过夜循环效果更好)即可轻易得到足够的阳性转化子,这使得组装成本降低了超过一半。如图 2C 所示,8 个随机挑选的 pGT61 的单克隆中,5'端启动子与载体的连接全部正确,3'终止子与载体的连接有 4 个是正确的,即阳性率达到 50%。

本研究运用这些载体为齐整小核菌构建了一些常用的转录单元。得到的 PGT 质粒列表见表 4,质粒序列、注释与测序结果见补充材料 SM 2。

表 3 齐整小核菌 DNA 元件标准化改造质粒

Table 3 Domesticated DNA parts for *Sclerotium rolfii*

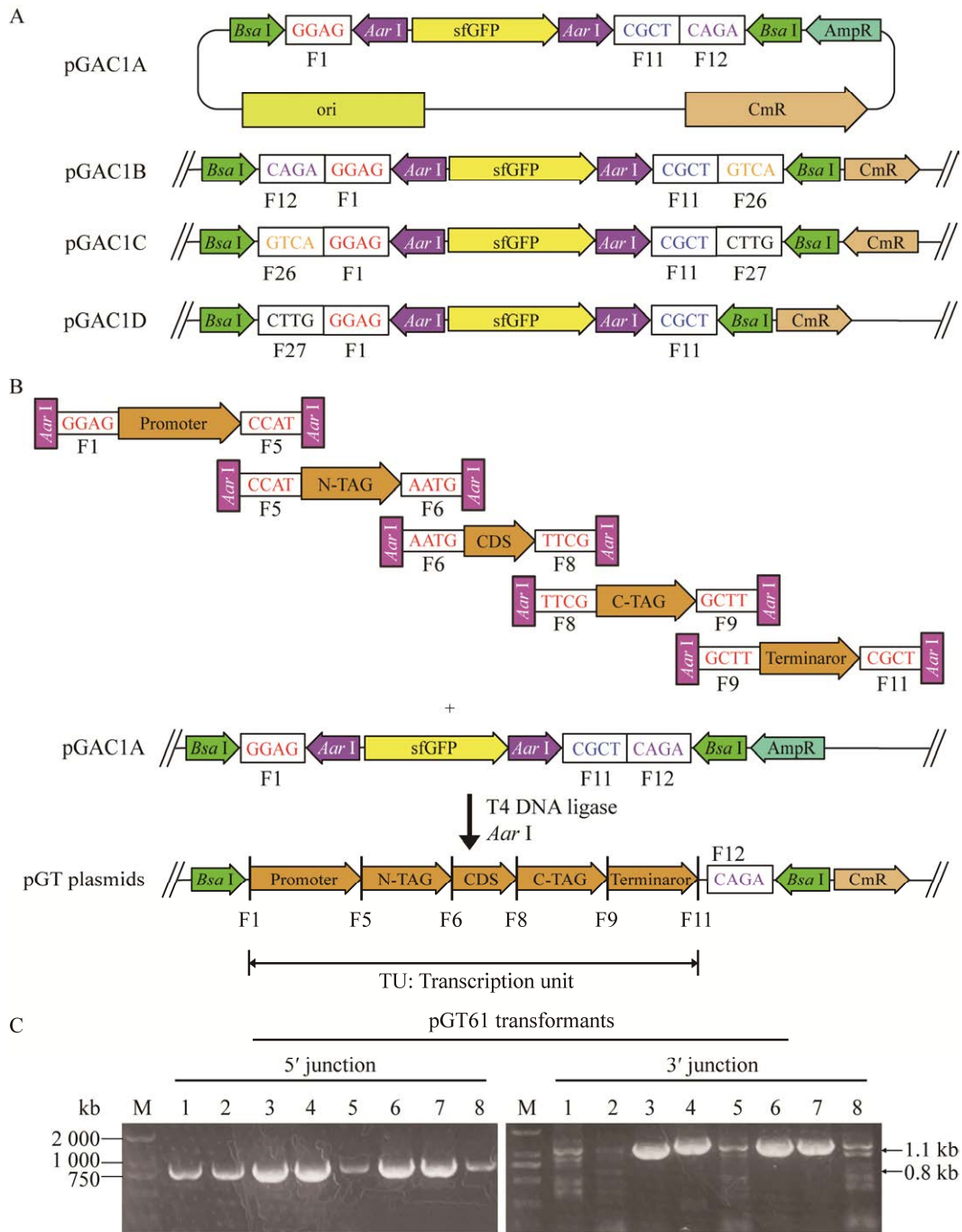
| Part | F1-F5  | F5-F6 | F6-F8 | F8-F9 | F9-F11 | Description                   |
|------|--------|-------|-------|-------|--------|-------------------------------|
| Psr1 | pGP216 |       |       |       |        | Promoter of beta-tubulin      |
| Psr2 | pGP65  |       |       |       |        | Promoter of <i>CYT</i> gene   |
| Psr3 | pGP217 |       |       |       |        | Promoter of <i>GPD</i> gene   |
| Psr4 | pGP73  |       |       |       |        | Promoter of <i>TEF1a</i> gene |

(待续)

(续表 3)

| Part              | F1–F5  | F5–F6  | F6–F8  | F8–F9  | F9–F11 | Description  |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| Psr5              | pGP78  |        |        |        |        | Promoter of <i>UBI</i> gene                                      |
| Psr6              | pGP218 |        |        |        |        | Promoter of <i>DUF21</i> gene                                    |
| Psr7              | pGP219 |        |        |        |        | Promoter of <i>CWF19</i> gene                                    |
| rPcamv            |        |        |        |        | pGP113 | Reversed oriented promoter of <i>CaMV</i> 35s                    |
| rPsr4s            |        |        |        |        | pGP114 | Reversed oriented promoter of <i>TEF1a</i> gene                  |
| rPsr5s            |        |        |        |        | pGP115 | Reversed oriented promoter of <i>UBI</i> gene                    |
| SrDsRedE2         |        | pGP88  | pGP21  | pGP13  |        | Red fluorescence protein   |
| P2A-SrDsRedE2     |        |        |        | pGP184 |        | P2A peptide with red fluorescence protein                        |
| EGFP              |        | pGP91  | pGP28  | pGP14  |        | Enhanced green fluorescence protein                              |
| P2A-EGFP          |        |        |        | pGP221 |        | P2A peptide with enhanced green fluorescence protein             |
| sfGFP             |        | pGP92  | pGP26  | pGP93  |        | Super-folder green fluorescence protein                          |
| P2A-sfGFP         |        |        |        | pGP185 |        | P2A peptide with sfGFP   |
| FFLuc             |        |        | pGP223 |        |        | Firefly luciferase   |
| ReniLuc           |        |        | pGP224 |        |        | Renilla luciferase   |
| Nnull             |        | pGP213 |        |        |        | Kozak sequence to take place of N-tag                            |
| Cnull             |        |        |        | pGP214 |        | Stop codon sequence to take place of C-tag                       |
| 6×His             |        | pGP39  |        | pGP40  |        | 6×His epitope tag  |
| HA                |        | pGP41  |        | pGP44  |        | HA epitope tag   |
| c-Myc             |        | pGP54  |        | pGP57  |        | c-Myc epitope tag  |
| FLAG              |        | pGP48  |        | pGP51  |        | FLAG epitope tag   |
| nucleoplasmin NLS |        | pGP141 |        | pGP181 |        | Nuclear localization signal, NLS                                 |
| SV40 NLS          |        | pGP182 |        | pGP183 |        | Nuclear localization signal, NLS                                 |
| HygR              |        |        | pGP82  |        |        | Hygromycin B resistance gene                                     |
| G418R             |        |        | pGP38  |        |        | G418 resistance gene   |
| BlpR              |        |        | pGP136 |        |        | Basta resistance gene  |
| SdhR              |        |        | pGP85  |        |        | Carboxin resistance gene   |
| Tsr1              |        |        |        |        | pGP15  | Terminator of beta-tubulin gene                                  |
| Tsr2              |        |        |        |        | pGP68  | Terminator of <i>CYT</i> gene                                    |
| Tsr3              |        |        |        |        | pGP72  | Terminator of <i>GPD</i> gene                                    |
| Tsr4              |        |        |        |        | pGP76  | Terminator of <i>TEF1a</i> gene                                  |
| Tsr5              |        |        |        |        | pGP81  | Terminator of <i>UBI</i> gene                                    |
| GME1658           |        |        | pGP133 |        |        | GME1658 gDNA, predicted genes involved in scleroglucan synthesis |
| GME4934           |        |        | pGP135 |        |        | GME4934 gDNA, predicted genes involved in scleroglucan synthesis |
| GME7171           |        |        | pGP138 |        |        | GME7171 gDNA, predicted genes involved in scleroglucan synthesis |
| GME5438           |        |        | pGP139 |        |        | GME5438 gDNA, predicted genes involved in scleroglucan synthesis |
| GME4711           |        |        | pGP140 |        |        | GME4711 gDNA, predicted genes involved in scleroglucan synthesis |
| GME834            |        |        | pGP137 |        |        | GME834 gDNA, predicted genes involved in scleroglucan synthesis  |





**图 2 Level 1 载体与转录单元组装方法**

Figure 2 Level 1 vectors and procedure for transcription unit assembly. A: Level 1 vectors for transcription unit assembly. CmR: Chloramphenicol resistance gene. pGAC1A/B/C/D are designed for TU 1/2/3/4 assembly separately. B: The transcription unit assembly procedure. Domesticated plasmids and the chosen Level 1 vector (e.g., pGAC1A) are added into one tube containing T4 DNA ligase and *Aar* I to generate a pGT plasmid (TU 1). C: Presentative colony PCR results of pGT plasmid taking pGT61 as an example. The 0.8 kb fragment confirmed the 5' junction of vector and promoter, and the 1.1 kb fragment confirmed the 3' junction of terminator and vector. 1–8: Single colonies of pGT61 transformants. M: BM 2000 DNA marker.

表 4 齐整小核菌常用的转录单元质粒

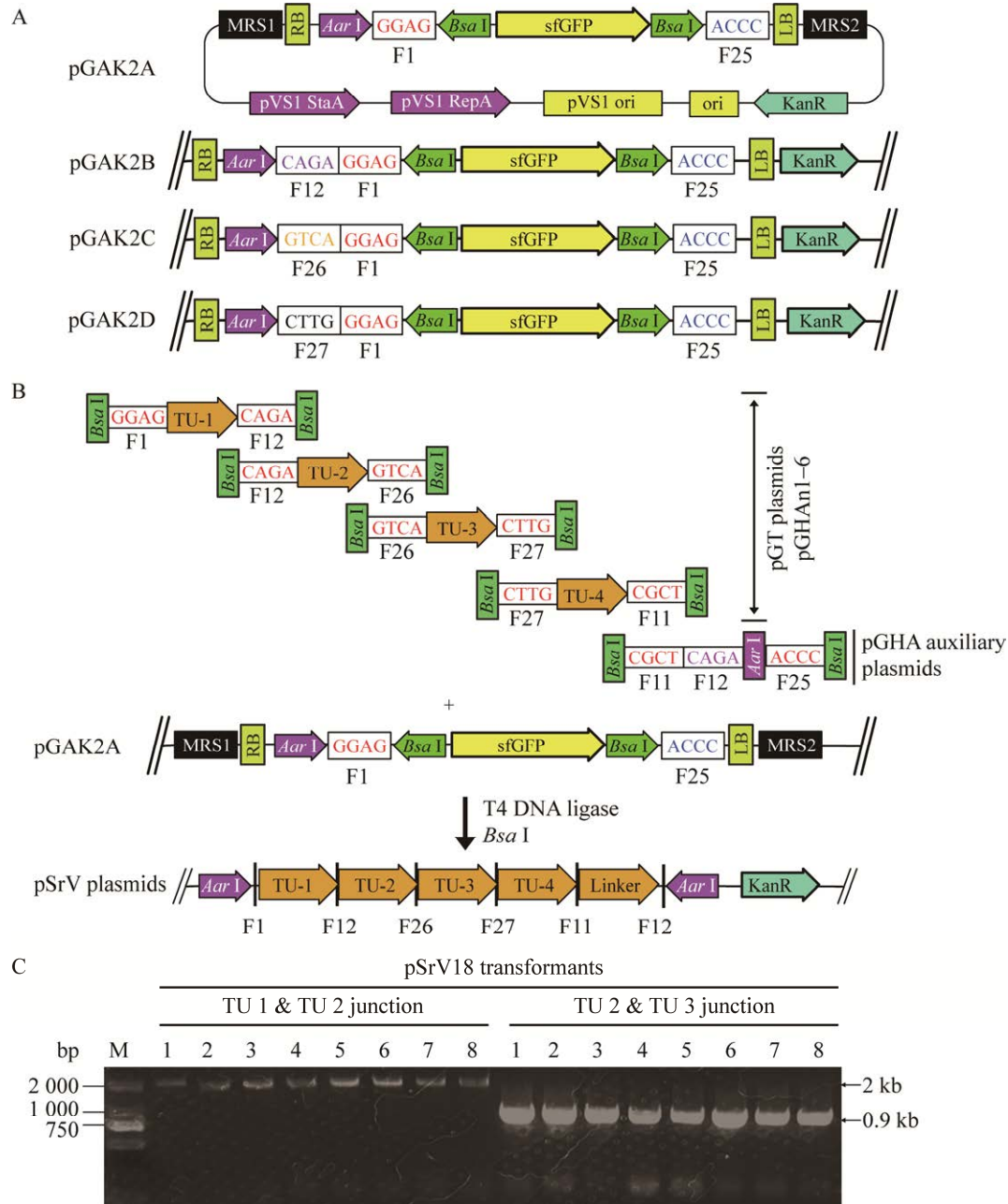
Table 4 Commonly used transcription unit plasmids

| Plasmid | Transcription unit                            | Description   |
|---------|---|---|
| pGT27   | Psr1-SrBlpR-6×His-Tsr3                        | TU1; Basta resistance; 6×His tag                        |
| pGT28   | Psr2-SrBlpR-6×His-Tsr3                        | TU1; Basta resistance; 6×His tag                        |
| pGT29   | Psr3-SrBlpR-6×His-Tsr3                        | TU1; Basta resistance; 6×His tag                        |
| pGT30   | Psr4-SrBlpR-6×His-Tsr3                        | TU1; Basta resistance; 6×His tag                        |
| pGT31   | Psr5-SrBlpR-6×His-Tsr3                        | TU1; Basta resistance; 6×His tag                        |
| pGT32   | Psr6-BlpR-P2A-sfGFP-Tsr3                      | TU1; Basta resistance; sfGFP expression                 |
| pGT44   | Psr3-HygR-6×His-Tsr3                          | TU1; Hygromycin B resistance; 6×His tag                 |
| pGT45   | Psr3-G418-P2A-sfGFP-Tsr3                      | TU1; G418 resistance; sfGFP expression                  |
| pGT46   | Psr3-SrSdhR-6×His-Tsr3                        | TU1; Carboxin resistance; 6×His tag                     |
| pGT47   | Psr3-BlpR-6×His-Tsr3                          | TU1; Basta resistance; 6×His tag                        |
| pGT48   | Psr1-GME834 e5 partial-rPsr4s                 | TU2; GME834 RNAi  |
| pGT49   | Psr1-GME4934 e1 partial-rPsr4s                | TU2; GME4934 RNAi                                       |
| pGT50   | Psr1-GME1658 e1-e2 partial-rPsr4s             | TU2; GME1658 RNAi                                       |
| pGT51   | Psr1-GME5438 e8 partial-rPsr4s                | TU2; GME5438 RNAi                                       |
| pGT52   | Psr1-GME4711 e3 partial-rPsr4s                | TU2; GME4711 RNAi                                       |
| pGT53   | Psr1-GME7171 e7 partial-rPsr4s                | TU2; GME7171 RNAi                                       |
| pGT57   | Psr5-SrDsRedE2-myc-Tsr5                       | TU2; DsRed expression; c-myc tag                        |
| pGT58   | Psr1-GME834 gDNA-myc-Tsr1                     | TU2; GME834 overexpression                              |
| pGT59   | Psr5-GME7171 gDNA-HA-Tsr5                     | TU3; GME7171 overexpression                             |
| pGT60   | Psr1-GME5438 gDNA-myc-Tsr1                    | TU2; GME5438 overexpression                             |
| pGT61   | Psr1-GME4934 gDNA-myc-Tsr1                    | TU2; GME4934 overexpression                             |
| pGT62   | Psr3-GME1658 gDNA-HA-Tsr3                     | TU3; GME1658 overexpression                             |
| pGT109  | Psr5-GME4711 gDNA-HA-Tsr5                     | TU3; GME4711 overexpression                             |
| pGT67   | Psr7-SrSdhR-P2A-sfGFP-Tsr3                    | TU2; Carboxin resistance; sfGFP expression              |
| pGT81   | Psr3-G418-6×His-Tsr3                          | TU2; G418 resistance; 6×His tag                         |
| pGT95   | Psr5-sfGFP-myc-Tsr5                           | TU2; sfGFP expression; c-myc tag                        |
| pGT96   | Psr5-EGFP-myc-Tsr5                            | TU2; EGFP expression; c-myc tag                         |
| pGT104  | Psr5-Renilla Luciferase-FLAG-Tsr5             | TU3; Renilla Luciferase expression; FLAG tag            |
| pGT123  | Psr1-FF Luc-Tsr1                              | TU2; Firefly luciferase expression                      |
| pGT158  | Psr3-SrSdhR-6×His-P2A-SrDsRedE2-Tsr3          | TU1; Carboxin resistance; 6×His tag; DsRedE2 expression |
| pGT159  | Psr3-SrSdhR-6×His-P2A-EGFP-Tsr3               | TU1; Carboxin resistance; 6×His tag; EGFP expression    |
| pGT166  | Psr3-SrSdhR-6×His-P2A-Renilla Luciferase-Tsr3 | TU1; Carboxin resistance; 6×His tag; Renilla luciferase |

### 2.3 应用质粒组装的载体(Level 2)

Mobius assembly 最终应用质粒是为细菌构建, 因而不适用于需要进行根癌农杆菌转化的丝状真菌。为了构建可以同时适用于根癌农杆菌介导转化法(T-DNA binary 质粒)、电穿孔转化法(线性 double-stranded DNA, dsDNA)和原生质体转化法(线性 dsDNA)的 Level 2 可应用质

粒, 将其移植到根癌农杆菌 binary 质粒上, 优化设计了 4 个用于应用质粒组装的 Level 2 载体, 即 pGAK2A/B/C/D (图 3A)。其中, 每个载体都有一个核心元件区, 即 F1←*Bsa* I-sfGFP cassette-*Bsa* I→F25。这保证了前面组装的转录单元可以按照预定的顺序组装。同样地, sfGFP cassette 在组装时被 *Bsa* I 去除, 使得菌落不显



**图 3 Level 2 载体与应用质粒组装方法**

Figure 3 Level 2 vectors and procedure for application plasmid assembly. A: Level 2 vectors for application plasmid assembly. MRS1 and 2: Multiple restriction sites 1 and 2. MRS1 includes *Spe* I, *Bgl* II, *Hind* III, *Eco* R I, *Nco* I, *Pvu* II, *Eco*147 I, *Sca* I, *Sma* I, *Kpn* I, and *Mlu* I. MRS 2 includes *Bgl* II, *Nco* I, *Sac* I, *Kpn* I, *Sma* I, *Eco* R I, *Spe* I, *Hind* III, *Mlu* I, and *Eco*147 I. B: Procedure for application plasmid assembly. pGT plasmids (TU 1–TU 4, or less), one pGHA plasmid and one scaffold plasmid (e.g., pGAK2A) are mixed in one tube containing T4 DNA ligase and *Bsa* I to generate a pSrV plasmid. pGHA plasmids are auxiliary plasmids providing middle-to-end linkers with another *Aar* I site, see Figure 4A. pGHAn1–6 plasmids are introduced to replace certain TU if necessary. C: Presentative colony PCR results of application plasmid taking pSrV18 as an example. The 2 kb fragment confirmed the junction of TU 1 and TU 2, and the 0.9 kb fragment confirmed the junction of TU 2 and TU 3. 1–8: Single colonies of pSrV18 transformants. M: BM 2000 DNA marker.

色。质粒为卡那霉素抗性, 阴性背景 pGT 质粒的菌落在筛选板上无法生长。这 2 个机制使得新长出来的白色菌落为重组成功的菌落。同时, 在核心元件区外侧插入了 2 个多酶切位点区(MRS1 和 MRS2), 可以方便地通过单酶切制备已组装好的多转录单元的线性 dsDNA 以用于电穿孔转化法和原生质体转化法。

pGAK2A/B/C/D 这 4 个 Level 2 载体, 每一个都可以组装 4 个转录单元。进行组装时, 1-4 转录单元选用 pGAK2A, 5-8 转录单元选用 pGAK2B, 9-12 转录单元选用 pGAK2C, 13-16 转录单元选用 pGAK2D。然后, 将 1-4 个 pGT 质粒和 1 个辅助质粒(pGHA 质粒)一起放入含有 *Bsa* I 和 T4 DNA 连接酶的反应液中进行边切边连反应, 得到的应用质粒命名为 pSrV 质粒(图 3B)。pSrV 质粒即可用于转化根癌农杆菌或者进行 dsDNA 制备以通过电转化或原生质体转化齐整小核菌。

此处, 原样借用了此辅助质粒的设计, 即 pGHA1/2/3/4A/4B/4C/4D 这 7 个(图 4A), 对应于 mobius assembly 使用的 7 个辅助质粒。这是该方法的另一个特别显著的优点。通过引入辅助质粒, 给每个 Level 2 载体 pGAK2A/B/C/D 组装的多 TU 盒再生了位于两侧的 *Aar* I 位点, 使得已组装的多 TU 盒可以被视为一个单一的 TU。如果需要将超过 4 个 TU 连在一个载体上时, 全部的组装好的多 TU 盒可以被 *Aar* I 酶切, 然后可以按照 A-B-C-D 的顺序, 再次进入 Level 1 载体 pGAC1A, 成为新的含 TU 1 元件(实际包含全部 TU, 但视为新的 TU 1)的 pGT 质粒, 以进行下一步组装, 从而实现大型代谢工程质粒的组装。原方法中组装了 16 个 TU 的 20 kb 质粒。在实际应用中, 也可以轻易构建 20 kb 左右的质粒。实际上, 如果不考虑 DNA 的片段

大小对克隆效率和质粒稳定性等方面的影响, 此系统的转录单元容量是没有上限的。因此, 此辅助质粒的引入可为未来可能的齐整小核菌代谢工程菌种构建提供强大的具有足够基因容量的质粒构建能力。

当需要组装的 TU 个数不足 4 个时, 辅助质粒对应的使用 pGHA1/2/3。当组装的 TU 为 4 个时, pGHA4A/4B/4C/4D 对应 pGAK2A/2B/2C/2D 使用。例如, 只有 3 个 TU 组装时, 选用 pGAK2A 和 pGHA3。当有 4 个 TU 组装时, 选用 pGAK2A 和 pGHA4A。有 6 个 TU 组装时, 前 1-4 个 TU 选用 pGAK2A 和 pGHA4A, 第 5-6 个 TU 选用 pGAK2B 和 pGHA2。实际上, pGHA1 接口相当于 TU 2+TU 3+TU 4+linker, pGHA2 接口相当于 TU 3+TU 4+linker, pGHA3 接口相当于 TU 4+linker, 而 pGHA4A/4B/4C/4D 相当于分别适配 pGAK2A/2B/2C/2D 的 linker。

但是 mobius assembly 没有考虑有些时候可能存在的转录单元空位的问题(例如只需要 TU 1、TU 3 和 TU 4), 而重复利用转录单元时常常会遇到这类问题。例如, 原方法中只能 TU 1-TU 2-TU 3 按顺序组装, 如果不想要 TU 1 或 TU 2 就无法组装。因此, 设计了一些短的随机片段加上相应接口的额外辅助质粒来代替对应的 pGT 质粒(图 4B)。pGHAn1 相当于 TU 1, pGHAn2 相当于 TU 2, pGHAn3 相当于 TU 3, pGHAn4 相当于 TU 1+TU 2, pGHAn5 相当于 TU 2+TU 3, pGHAn6 相当于 TU 1+TU 2+TU 3。组装时, 只需要选择空位 TU 对应的 pGHAn 质粒替代使用即可。例如, pGHAn1 (代替 TU 1), TU 2 和 TU 3 可直接组装, 组装后的质粒实际只有 TU 2 和 TU 3 两个转录单元。引入这样 6 个辅助质粒设计后, 可以实现任意个数任意位置的 TU 组合进行组装。在实际应用中, 这一补

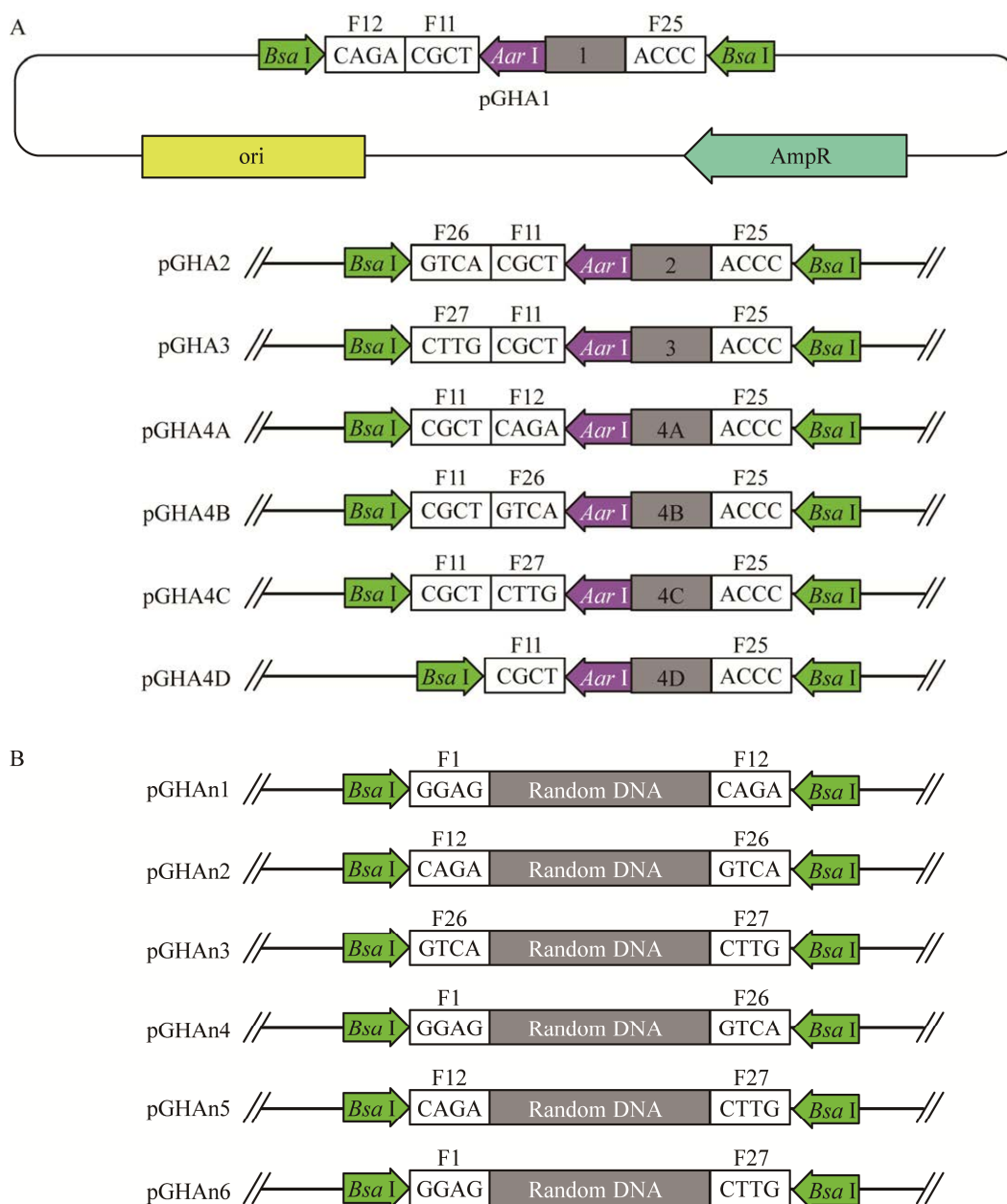


图 4 应用质粒组装的辅助质粒

Figure 4 Auxiliary plasmids for application plasmid assembly. A: Auxiliary plasmids for multi-transcription-unit assembly. 1/2/3/4A/4B/4C/4D are all different random DNA sequences. B: Auxiliary plasmids that could be used to substitute TUs. All grey blocks mean random DNA sequences.

充极大地方便了重复使用转录单元，避免了为同一基因表达盒构建不同 TU 位置的 pGT 质粒。

同样地，为了降低组装成本，本研究进行

了不同浓度的 *Bsa*I 组装效果测试，结果发现当 *Bsa*I 使用量为标准用量(1  $\mu$ L *Bsa*I/20  $\mu$ L 反应体系)的 40%，循环反应时的酶切与连接时间都为 5 min，循环数超过 30 个时即可轻易得

到足够的阳性转化子, 这使得组装成本降低了超过一半。如图 3C 所示, 随机挑选的 8 个 pSrV18 质粒的单克隆, TU 1 与 TU 2 的转接、TU 2 与 TU 3 的连接全部正确, 阳性率为 100%。

运用这套系统, 本研究成功组装了齐整小核菌硬葡聚糖生物合成相关基因的过表达和 RNAi 功能检测质粒, 还组装了多个转录单元的质粒。全部相关 pSrV 质粒列表见表 5, 质粒序列、注释与测序结果见补充材料 SM 2。

### 3 讨论与结论

齐整小核菌代谢工程研究离不开稳定的转化方法和高效的质粒构建系统。代谢工程领域普遍使用的 Golden Gate 技术完美地满足了灵活高效的多 DNA 元件组装和重复利用的需要。Mobius assembly 作为一种基于 Golden Gate 的多转录单元组装系统, 具有非常灵活的元件组装能力和强大的转录单元容纳能力。本实验室在前期解决了齐整小核菌的遗传转化方法。为进一步解决齐整小核菌领域缺乏高效的质粒构建系统这一问题, 本文以 Mobius assembly 为基础进行了方法移植和优化。

首先, 对 DNA 元件标准化接口改造质粒进行了优化设计。原方法中要采用 Aar I 酶切

PCR 产物进行 Golden Gate 反应。这一方式需要用到价格昂贵的 Aar I 酶, 导致改造成本极高。采用在荧光蛋白 sfGFP 的 N 端插入酶切位点 Sma I 或 Pvu II 的方式, 使得 PCR 产物既可以通边酶切边连接的方式, 又可以通过同源重组的方式插入 Level 0 载体。这 2 种方式的阳性率都很高且成本显著降低。pGP 质粒克隆的阳性率极高且非常稳定, 基本实现随机挑选转化子进行测序即为阳性转化子。其次, 借鉴 mobius assembly 的设计逻辑, 构建了抗性 with Level 0 载体不同的 4 个 Level 1 单转录单元组装载体。同时测试了减少 Aar I 用量的效果。结果发现在不显著降低阳性转化子得率的情况下, Aar I 用量可以减少一半以上, 只需要多进行一些 Golden Gate 循环即可。pGT 质粒组装的效率偏低且变动较大, 但是一般也可以达到 50% 以上, 通常情况下可以在随机挑选 4 个转化子时即可以得到 1-4 个阳性转化子。

再次, 考虑到齐整小核菌需要进行根癌农杆菌转化而原方法的载体无法实现, 于是将其设计逻辑移植到根癌农杆菌 binary 质粒上。同时, 在 T-DNA 区域两侧都插入了多酶切位点以方便 dsDNA 的制备。这样最终的质粒可以同时满足根癌农杆菌转化、电转化和原生质体

表 5 齐整小核菌硬葡聚糖合成相关基因应用质粒

Table 5 Application plasmids of *Sclerotium rolfisii* scleroglucan-related genes

| Plasmid | Feature   | Description  |
|---------|---|--|
| pSrV18  | Psr5-SrBlpR-6×His-P2A-SrDsRedE2-Tsr5, Psr1-GME4934 gDNA-myc-Tsr1, Psr3-GME1658 gDNA-HA-Tsr3 | Carboxin resistance; DsRed expression; GME4934 +GME1658 overexpression |
| pSrV43  | Psr3-SrSdhR-6×His-P2A-SrDsRedE2-Tsr3; Psr1-GME834 e5 partial-rPsr4s                         | Carboxin resistance; DsRed expression; GME834 RNAi                     |
| pSrV44  | Psr3-SrSdhR-6×His-P2A-SrDsRedE2-Tsr3; Psr1-GME5438 e8 partial-rPsr4s                        | carboxin resistance; DsRed expression; GME5438 RNAi                    |
| pSrV45  | Psr3-SrSdhR-6×His-P2A-SrDsRedE2-Tsr3; Psr1-GME4711 e3 partial-rPsr4s                        | Carboxin resistance; DsRed expression; GME4711 RNAi                    |
| pSrV46  | Psr3-SrSdhR-6×His-P2A-SrDsRedE2-Tsr3; Psr1-GME7171 e7 partial-rPsr4s                        | Carboxin resistance; DsRed expression; GME7171 RNAi                    |

转化的需求。最后,在实践中发现 *mobius assembly* 对于有些时候可能存在的转录单元空位的问题(例如只需要 TU 1、TU 3 和 TU 4)没有应对措施,而重复利用转录单元时常会遇到这类问题。于是本文设计了 6 个 TU 占位辅助质粒,用于代替空位的 TU 进行多转录单元组装,从而常常可以避免为同一基因表达盒构建不同 TU 位置的 pGT 质粒。这样可以更加省时省力省成本。类似地,同样发现减少 *Bsa* I 用量,并没有显著降低阳性转化子的得率。这使得克隆成本进一步降低。这一级别质粒克隆的阳性转化子得率非常高且很稳定,常常可以达到 100%。实际应用中通常可以在随机挑选 4 个转化子时即可以得到 4 个阳性转化子。

总的来说,本文采用了代谢工程领域通用的 Golden Gate 技术,以 *mobius assembly* 为基础,为齐整小核菌构建了一套高效的多转录单元组装质粒构建系统。这一质粒系统具有强大的 DNA 设计、组装和容纳能力,为未来齐整小核菌代谢工程的菌种构建提供了具有足够大基因容量的质粒构建技术平台。本研究为齐整小核菌构建了一系列的已改造元件质粒,常用的转录单元质粒和硬葡聚糖合成相关基因的功能测试质粒,证明了此系统构建质粒的高效性和有效性,为齐整小核菌分子生物学和代谢工程研究提供了一个很好的工具系统。

## 参考文献

- [1] PUNJA ZK. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfii*[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1985, 23: 97-127.
- [2] WANG Y, MCNEIL B. Scleroglucan[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1996, 16(3): 185-215.
- [3] CHACHADI VB, PUJARI R, SHASTRY P, SWAMY BM, INAMDAR SR. *Sclerotium rolfii* lectin induces opposite effects on normal PBMCs and leukemic Molt-4 cells by recognising TF antigen and its variants as receptors[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2020, 37(2): 251-261.
- [4] HEGDE P, NARASIMHAPPAGARI J, SWAMY BM, INAMDAR SR. Efficacy studies of *Sclerotium rolfii* lectin on breast cancer using NOD SCID mouse model[J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2018, 92(2): 1488-1496.
- [5] LUDWIG R, HALTRICH D. Optimisation of cellobiose dehydrogenase production by the fungus *Sclerotium (Athelia) rolfii*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(1): 32-39.
- [6] LI ML, CHANG P, PAN XH, IMANAKA T, IGARASHI Y, LUO F. Efficient expressions of reporter genes in the industrial filamentous fungus *Sclerotium rolfii* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Fungal Biology*, 2020, 124(11): 932-939.
- [7] 潘小红, 刘佳宁, 罗锋, 常鹏. 电穿孔法转化齐整小核菌[J]. *微生物学报*, 2023, 63(4): 1681-1689.
- [8] PAN XH, LIU JN, LUO F, CHANG P. Electroporation-mediated transformation of *Sclerotium rolfii*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(4): 1681-1689 (in Chinese).
- [9] ENGLER C, KANDZIA R, MARILLONNET S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability[J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3647.
- [10] ENGLER C, GRUETZNER R, KANDZIA R, MARILLONNET S. Golden Gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5553.
- [11] CHIASSON D, GIMÉNEZ-OYA V, BIRCHENEDER M, BACHMAIER S, STUDTRUCKER T, RYAN J, SOLLWECK K, LEONHARDT H, BOSCHART M, DIETRICH P, PARNISKE M. A unified multi-Kingdom Golden Gate cloning platform[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 10131.
- [12] HERNANZ-KOERS M, GANDÍA M, GARRIGUES S, MANZANARES P, YENUSH L, ORZAEZ D, MARCOS JF. FungalBraid: a GoldenBraid-based modular cloning platform for the assembly and exchange of DNA elements tailored to fungal synthetic biology[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2018, 116: 51-61.

- [12] SARRION-PERDIGONES A, VAZQUEZ-VILAR M, PALACÍ J, CASTELIJNS B, FORMENT J, ZIARSOLO P, BLANCA J, GRANELL A, ORZAEZ D. GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(3): 1618-1631.
- [13] AGMON N, MITCHELL LA, CAI YZ, IKUSHIMA S, CHUANG J, ZHENG A, CHOI WJ, MARTIN JA, CARAVELLI K, STRACQUADANIO G, BOEKE JD. Yeast Golden Gate (yGG) for the efficient assembly of *S. cerevisiae* transcription units[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(7): 853-859.
- [14] ANDREOU AI, NAKAYAMA N. Mobius Assembly: a versatile Golden-Gate framework towards universal DNA assembly[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0189892.
- [15] XIA YZ, LI K, LI JJ, WANG TQ, GU LC, XUN LY. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(3): e15.
- [16] WEBER E, ENGLER C, GRUETZNER R, WERNER S, MARILLONNET S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16765.
- [17] CAI YM, CARRASCO LOPEZ JA, PATRON NJ. *PhytoBricks: manual and automated assembly of constructs for engineering plants*[M]//*Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US, 2020: 179-199.