微生物所在酵母中开发CRISPR-Cas9介导的多重基因组编辑新技术

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/2544.html

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

微生物所在酵母中开发CRISPR-Cas9介导的多重基因组编辑新技术。汉逊酵母(Ogataea polymorpha)是一种重要的工业微生物，常被用于研究甲醇利用、自噬、过氧化物酶体生物合成和硝酸盐同化等。除此之外，它有一个重要的特性，就是能够通过NHEJ将多达100个拷贝的靶基因整合到基因组上，这一特性可用于过表达外源基因合成多种产物。虽然CRISPR/Cas9基因编辑技术已经在O. polymorpha中成功建立，但是多基因的编辑技术尚未实现。

中国科学院微生物研究所病原室温廷益研究组与工业室何秀萍研究组合作在汉逊酵母中建立了一套CRISPR-Cas9介导的多基因编辑技术(CMGE)，尤其用于多基因一步敲除、多位点(ML)、多拷贝(MC)目标基因的同时插入。由于O. polymorpha中没有稳定的游离载体，Cas9和gRNA被整合到基因组上进行表达，先将Cas9基因通过同源重组的方式整合到基因组上，然后将表达gRNA的质粒线性化并与修复模板同时转入整合了Cas9基因的O. polymorpha中，最终达到基因编辑的目的(图1)。为了实现多基因的同时敲除，研究人员靶向三个基因：OpURA3，OpHIS3和OpLEU2，并将相应的三个修复模板与线性化后的gRNA质粒转入O. polymorpha中，最终多基因编辑效率达到了23.61± 6.36%。

为了实现多拷贝基因插入，Cas9基因在诱导型启动子PMox的控制下表达，并选择具有50-60重复的rDNA(核糖体DNA(rDNA)是编码核糖体RNA的DNA序列。在酵母中，rDNA通常由高拷贝数的相同重复序列组成，这些重复序列头尾相连成簇存在)簇作为整合位点，整合gfpmut3a表达框，编辑效率为75.00±12.5%，拷贝数最高达11.15±1.10个。并通过传代验证多拷贝基因的插入在传代18.5天(55代)后仍然稳定存在(图2)。

研究人员利用CMGE在O. polymorpha中实现了多基因敲除、多位点、多拷贝基因的同时插入以及精准的点突变，并利用CMGE实现了白藜芦醇、戊二胺和人血清白蛋白(HSA)的生物合成，证明了CMGE在O. polymorpha基因工程中的实用性和有效性。此外，CMGE-MC方法也被证明适用于模式酵母酿酒酵母。

该研究进展已于近日发表于Biotechnology for Biofuels，微生物所博士生王来友为该文的第一作者，研究员温廷益与副研究员邓爱华为通讯作者。该研究得到中科院战略性先导专项A(XDA17010503)、国家自然科学基金(31870070)、国家高技术研究发展计划(863计划)(2014AA021203)、中科院科技服务网络计划(STS计划)(KFJ-STS-QYZD-047)项目的资助。

文章链接

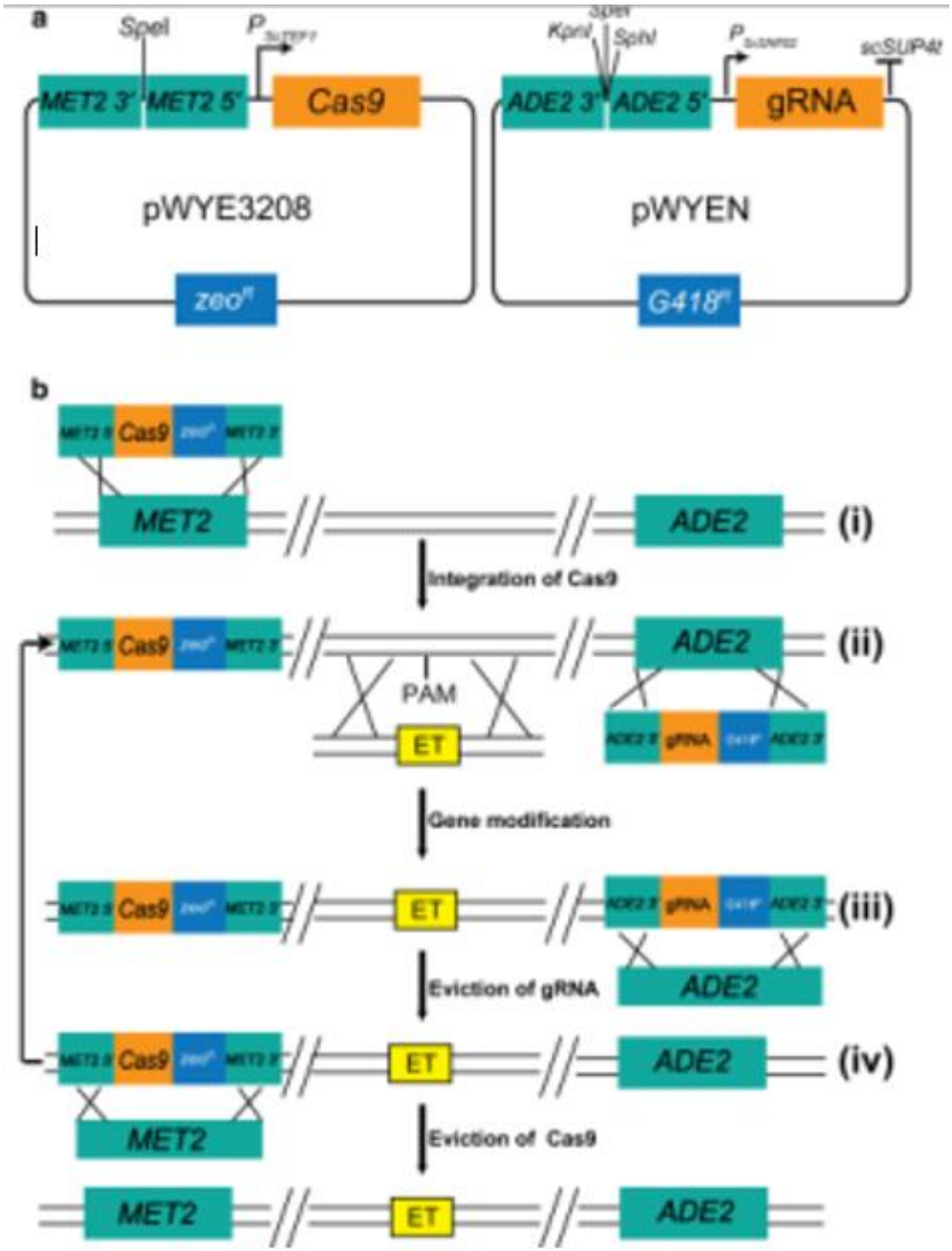


图1O. polymorpha中CRISPR-Cas9介导的基因编辑系统

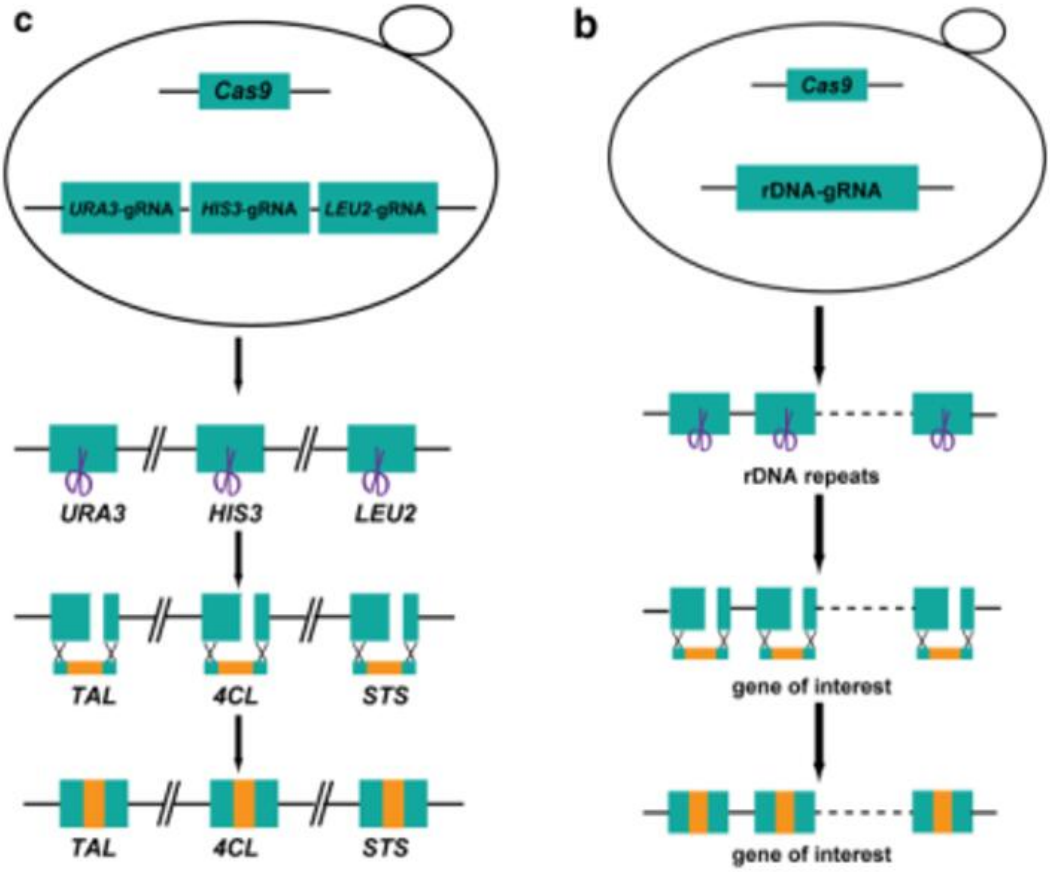


图2多基因同时整合与多位点同时插入示意图

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发