

张二豪, 张 杰. CRISPR/Cas9 基因编辑技术应用于绿僵菌[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(11): 48–53.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.11.008

CRISPR/Cas9 基因编辑技术应用于绿僵菌

张二豪¹, 张 杰²

(1. 西藏农牧学院食品科学学院, 西藏林芝 860000; 2. 周口师范学院生命科学与农学院, 河南周口 466001)

摘要:近年来的研究显示, CRISPR/Cas9 系统是强有力的基因编辑新技术。以蝗绿僵菌为试验对象, 以同源重组敲除系统为对照, 研究 CRISPR/Cas9 系统敲除蝗绿僵菌的基因 *isp4* 核苷酸序列。阐明了 CRISPR/Cas9 载体构建的方法, 比较了 CRISPR/Cas9 和 Recombinase 敲除技术的异同, 最后通过 PCR 和突变菌株的表型验证了 CRISPR/Cas9 系统能够应用于绿僵菌。结果表明, CRISPR/Cas9 在昆虫病原真菌绿僵菌中是有效的基因编辑技术。

关键词: CRISPR/Cas9; 重组酶; 基因编辑; 绿僵菌

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)11-0048-06

分子遗传修饰和基因工程技术需要精确地改变基因组的核苷酸序列。随着基因修饰新技术的不断发展, 某些基因可被敲除或被降低表达水平^[1], 这些技术为基因功能的研究提供了便捷的途径。基因编辑就是对细胞基因组中目的基因的核苷酸序列甚至是单个核苷酸进行替换、切除, 增加或者是插入外源的 DNA 序列, 使之产生可遗传的改变, 进而研究其功能的手段^[2]。绿僵菌的研究已有 135 年的历史^[3], 它作为一个昆虫病原真菌的模式丝状真菌, 常常用来研究真核细胞的生物学过程、基因的相关表型和侵染昆虫致病的过程。

为了更好地研究病原真菌的基因特征, 多种基因操作技术已经在绿僵菌研究中应用^[4]。以位点为靶向的 DNA 内切酶是基因编辑技术中强有力的方法之一^[5]。这些内切酶能在基因组范围内与靶向序列直接结合, 进而使 DNA 双链断裂, 断裂的 DNA 被修复过程中产生 DNA 序列的修饰。开发这些工具酶的起始方向集中在同源内切酶、锌指内切酶和转录激活内切酶类^[6-7]。与传统突变体材料的获得方法相比, 基因编辑技术能定向改变基因的组成和结构, 具有高效、可控和定向操作的优点^[8-9]。

在目标基因 DNA 产生双链断裂^[10]的基础上进行基因编辑是传统基因编辑技术的共同之处, 但是各种基因编辑技术的原理及作用方式并不相同。

同源内切酶利用单一结构域识别和切割双链 DNA^[11] 的基因编辑技术具有一定的局限性。CRISPR/Cas9 是新一代的识别和绑定特异 DNA 序列为导向的基因编辑技术^[12]。Generoso 等首次报道, CRISPR/Cas 作为特异的短间隔序列, 成簇存在于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 基因组内的特殊短重复序列之中^[13]。随后的研究表明, CRISPR 位点在细菌和古细菌的基因组中分别占 40% 和 90%, 这些位点具有适应性的免疫功能^[14]。在 2012 年, CRISPR/Cas9 在链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 中, 通过锚定 crRNA 5' 端的 20 nt 核苷酸序列行使功能^[15]。经过优化的 CRISPR/Cas9 系统编码序列在哺乳动物细胞中可以高度激活^[16-17]。在实际操作时, 在 sgRNA 上 5' 端设计的 20 nt 核苷酸序列能够与目标基因完全互补, 即可达到基因编辑的作用^[18]。基因编辑技术 CRISPR/Cas9 在高等真核生物上已经成功应用^[19-20]。CRISPR/Cas9 介导的基因编辑过程实质上是非同源末端重组 (non-homologous end joining, NHEJ) 修复和同源末端重组修复 (homology-directed repair, HDR) 过程^[21]。与传统基因编辑技术相比, CRISPR/Cas9 系统最大的优点是易形成基因序列倍增, 这些倍增区域在 sgRNA 的锚定下很容易突变^[22]。如果 2 个 sgRNA 位于基因组侧的两翼, 它们中间区域的基因组会被删除或发生颠倒^[23-24]。通过双 sgRNA 可以进行基因组序列置换^[25]。

收稿日期: 2020-10-09

基金项目: 周口师范学院高层次人才科研启动经费研究项目 (编号: 2018B180061); 西藏自治区自然科学基金 (编号: XZ2018ZRG-19)。

作者简介: 张二豪 (1989—), 男, 河南平顶山人, 硕士, 讲师, 主要研究方向为分子生物学。E-mail: 1158496424@qq.com。

通信作者: 张 杰, 博士, 讲师, 主要研究方向为分子生物学与生物工程。E-mail: Zhangjiezk@qq.com。

CRISPR/Cas9 系统的高效和便利,促使它很快地成为了细菌、植物和细胞培养时的基因编辑工具。CRISPR/Cas9 可以直接导入到受精卵中进行早期的胚胎基因修饰,进而获得基因修饰动物^[26-27]。在基因组编辑工具应用时,通常是将含有特殊启动子的 CRISPR/Cas9 质粒通过农杆菌介导法或电激法送到目的细胞内^[27-28]。然而 CRISPR/Cas9 基因系统在昆虫病原真菌中的应用尚未见报道。

本研究以蝗绿僵菌为材料,同源重组敲除系统为对照,利用 CRISPR/Cas9 系统敲除蝗绿僵菌的基因 *isp4* 核苷酸序列。试验结果显示,CRISPR/Cas9 敲除载体构建的方法和 Recombinase 敲除载体的构建技术不同,PCR 和突变菌株的表型验证了 CRISPR/Cas9 基因编辑和 Recombinase 基因编辑技术一样成功应用于绿僵菌。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

蝗绿僵菌 (*Metarhizium acridum*) (CGMCC No. 1877),将该菌株接种到 1/4 萨氏葡萄糖酵母固体培养基(1/4SDA)上,28 ℃,避光倒置培养。DNA 提取时用液体培养基摇瓶培养,培养后经过真空抽滤获得菌丝体。

大肠杆菌 (*Escherichia coli* DH5 α , 鼎国试剂公司),固体培养时,将转化的大肠杆菌菌株接种到 LB 固体培养基上倒置培养,培养基含有终浓度 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素。绿僵菌转化时选择的培养基为细胞核分离基液 (NIM) 培养基,含有终浓度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗草丁膦 (PPT)。选择性靶基因为 PPT 基因。

1.2 质粒

商业人工改造质粒 CRISPR/Cas9 pGK1. 1 (Puror) 和同源敲除质粒 PUC19,含有抗卡那霉素和 PPT 基因。

1.3 核酸操作

将含有抗性的大肠杆菌接种到液体 LB 培养基中,经过离心获得菌体,用质粒提取试剂盒 (TIANGEN) 获得质粒 DNA。

将绿僵菌菌丝体用液氮研磨,然后用基因组 DNA 提取试剂盒 (Omega) 提取, *Taq* Plus DNA Polymerase (TIANGEN) 进行 PCR 克隆,进而获得目标核苷酸序列。

目标片段和质粒的连接用 NovoRec[®] PCR 一

步定向克隆操作。其余的分子生物学技术按照参考文献[14]执行。

1.4 转化试验

根据转化说明书 (Invitrogen) 将改造的质粒转入到 *E. coli* 感受态细胞;用电转化的方法,将目标质粒转化到感受态根癌农杆菌中;然后根据参考文献将含有抗性质粒的脓杆菌和绿僵菌孢子接种于含有 PPT 的固体培养基上,进而获得转化的绿僵菌。

1.5 转化子纯化

转化后,被转化的目的菌株经过 PCR 验证,然后在筛选培养基上进行纯化培养,保存菌种以便后续试验。

2 结果与分析

2.1 CRISPR/Cas9 和 Recombinase 编辑系统的识别基础

CRISPR/Cas9 系统主要是依靠 crRNA (CRISPR-derived RNA) 通过碱基配对与 tracrRNA (trans-activating RNA) 结合形成双链 RNA,此 tracrRNA/crRNA 二元复合体指导 Cas9 蛋白在 crRNA 引导序列靶定位点切断双链 DNA。在基因组编辑过程中, tracrRNA 和 crRNA 可以融合成为 1 条 RNA (sgRNA) 表达,同样可以起到靶向剪切的作用。靶向剪切的链缺口会促进同源重组,从而达到基因编辑的目的(图 1-A)。对照 Recombinase 基因编辑技术主要依靠靶基因两侧左右臂引导生物本身的重组酶到靶位点进行基因编辑(图 1-B)。由此可知,这 2 种基因编辑系统锚定目的基因位置的方式是不一致的。

2.2 CRISPR/Cas9 和 Recombinase 基因编辑质粒的构建

基因编辑过程中,最重要的是构建一个高效的质粒载体。CRISPR/Cas9 和 Recombinase 基因编辑系统的载体都是建立在商业质粒 Puc19 的基础之上。由图 2-A 可知,把优化的 U6 启动子 (U6)、核定位基因序列 (NLS)、Cas9 蛋白基因、BGHpA、抗性基因和 GFP 序列共同整合到商业质粒 pUC19 中。在 U6 启动子后有一个靶基因酶切位点 *EcoR* V。Recombinase 基因编辑系统是把抗性筛选 PPT 基因 (含启动子) 和 GFP 序列连接到商业质粒 pUC19 中 (图 2-B)。由此可知,CRISPR/Cas9 基因编辑系统质粒的构建比 Recombinase 基因编辑系统复杂。CRISPR/Cas9 基因编辑质粒含有多个基因敲除元

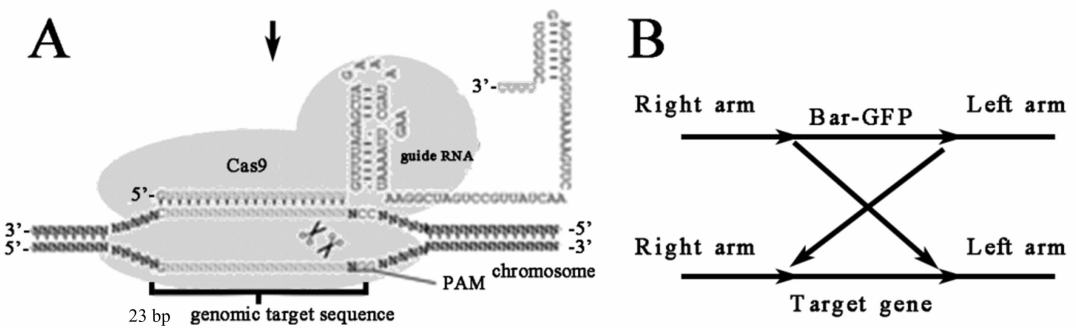


图1 CRISPR/Cas9 基因编辑系统原理示意图(A)和 Recombinase 基因编辑系统原理示意图(B)

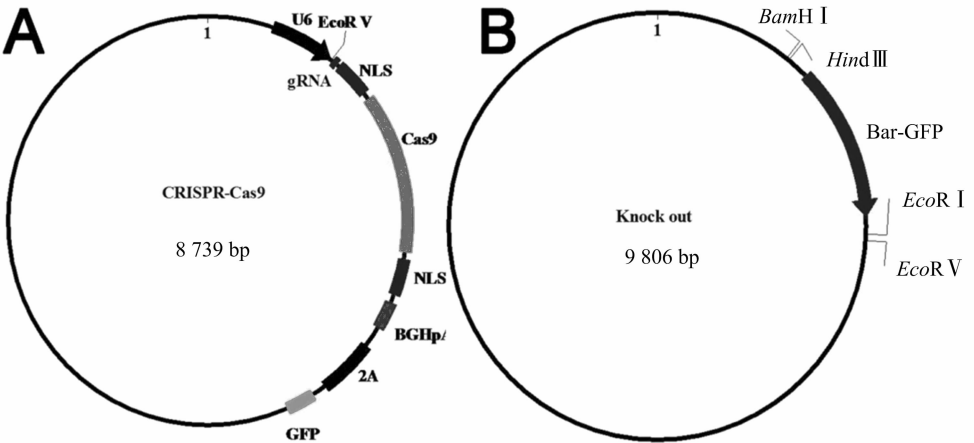


图2 CRISPR/Cas9 基因编辑系统载体构建示意图(A)和 Recombinase 基因编辑系统载体构建示意图(B)

件,而对照 Recombinase 基因编辑系统的质粒中只含有 Bar 基因序列和 GFP 序列。由此可知,构建的初始敲除质粒 CRISPR/Cas9 基因编辑系统比 Recombinase 基因编辑系统含有更多的复杂元件。

2.3 CRISPR/Cas9 和 Recombinase 基因编辑系统敲除 *isp4* 基因

为证明 CRISPR/Cas9 系统能够在绿僵菌上应用,经过生物信息学分析获得了绿僵菌性别分化基

因 *isp4* 的 mRNA 序列 (XM_007813236.1),作为敲除的目的基因。构建 CRISPR/Cas9 基因编辑载体时只需在该基因的 mRNA 编码序列中找到靶序列位点 (GN20GG),然后在该序列的两侧加上接头 (F:TATATCTTGTGAAAGGACGAT;接头 R:GGTGC CACTTTTTCAAGTTGAT) 和 gRNA 序列即可。

通过 CasFinder 软件或 word 的查找功能均可找到以下 19 条靶序列 (表 1)。

表 1 CRISPR/Cas9 介导基因编辑的靶序列

编号	序列(5'-3')	编号	序列(5'-3')
1	GTATAGCCTTTGCATCATCGG	11	ATCCAGTCTCTGGCCTATCCGG
2	GGAGCTCGTGCTGCCAGACTGG	12	CCACAGCTTGAACCCGTGTCGG
3	TCTTTACGGA CTGAGGCAGG	13	CCACCATCTCTTTGGCTTTGG
4	CCTGACTTGCTCTGGCCTGGGG	14	CTCTCAACTCCGCCCTGCATGG
5	ACCTGATCTTTCCTGCTCTTGG	15	CAGTCGTCAACCAAGTTTTTGG
6	CCCCTCATTGTTCCAACCTGGG	16	GGTGATAAATGCCAAGAATGGG
7	GCCAAGTTTGCTGCTTACTCGG	17	GTTGTTTTCTCGAAAAGCGACGG
8	TTATCCACAAGCACCTTTGTGG	18	CCGTACAAC TCGCGTGGTACGG
9	CCTGGTTGCTGGATATCTTTGG	19	GAAAGTCCTTGCTAACATCTGG
10	GATCTATATCCACTACCAAAGG		

以第 1 条靶序列为例合成如下的寡核苷酸序列:

casF:TATATCTTGTGGAAAGGACGATGGTATAGGCTTTTGCATCATCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG;
casR:GGTGCCACTTTTTCAAGTTGATCGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCCGATGATGCAAAAGCCTATACC。

将上述引物交给公司合成 PAGE 纯化寡核苷酸。然后寡核苷酸退火,退火后的寡核苷酸可以立刻使用或者在 -20 ℃ 条件下长期保存。用 *EcoR* V 酶切 CRISPR/Cas9 基因编辑载体致使其线性化,回收后即可根据 NovoRec® PCR 一步定向克隆试剂

盒说明书将上述退火后的寡核苷酸连接到线性化的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体上。阳性克隆用引物 gRNA - F 和 gRNA - R 进行 PCR 验证时,能够扩增出 180 bp 的条带(图 3 - A),表明载体构建正确。

用生物信息学方法获得了绿僵菌性别分化基因 *isp4* 及其侧翼序列,该序列左臂含有 *EcoR* V (GATATC) 酶切位点和 *Bam*H I (GGATCC) 酶切位点,右臂含有 *Hind* III (AAGCTT) 酶切位点。故构建 Recombinase 基因编辑载体时选用 *Bam*H I 和 *EcoR* I 酶先后线性化载体。

根据 NovoRec® PCR 一步定向克隆试剂盒说明书设计 PCR 扩增左右臂的引物和接头见表 2。

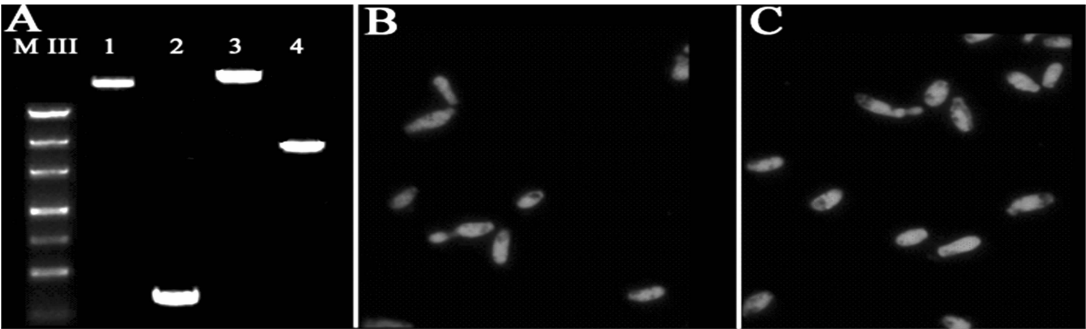
表 2 引物序列

引物名称	序列(5' - 3')
LF	GACTCTAGACTCGAGGGATCTTCTTTGCAACGGGGACAAC
LR	GACCTGCAGCCC GGGGGATCGTCGACCGCGCGCCGAGA
RF	TACGGTACCGAGCTCGAATTCAGAAAGGGCAGATCCCCC
RR	CTATGACATGATTACGAATTTTTTGGCCCCCTTGGCAAGC
isp4F	TTCTTTGCAACGGGGACAAC
gRNA - F	CAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA
gRNA - R	CAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA
isp4R	TTTTGGCCCCCTTGGCAAGC
RT - PCR - isp4F	ATTCTAGCCTTTGTAATATC
RT - PCR - isp4R	CTTTGCTAGTGGATATAGAT

注:下划线为接头序列。

经过 PCR 扩增获得敲除载体的左右臂,经过酶切后获得线性化载体,根据 NovoRec® PCR 一步定向克隆试剂盒说明书构建成 Recombinase 基因编辑载体。经过转化的阳性克隆用引物 *isp4*F 和 *isp4*R 能够扩增出 2 800 bp 的 DNA 条带(图 3 - A)。

含 CRISPR/Cas9 和 Recombinase 载体的农杆菌侵染绿僵菌后获得阳性敲除绿僵菌孢子,荧光显微镜观察看到绿色荧光的绿僵菌孢子(图 3 - B 和图 3 - C)。上述结果表明了 *isp4* 基因的 CRISPR/Cas9 和 Recombinase 敲除载体成功在绿僵菌中表达。



1—CRISPR/Cas9 基因编辑载体质粒; 2—PCR 验证 CRISPR/Cas9 基因编辑载体;
3—Recombinase 基因编辑载体质粒; 4—PCR 验证 Recombinase 基因编辑载体

图3 *isp4* 基因敲除载体质粒和 PCR 验证电泳图(A)、CRISPR/Cas9 敲除的 Δ *isp4*R 菌株的荧光验证(B)和 Recombinase 敲除的 Δ *isp4*R 菌株的荧光验证(C)

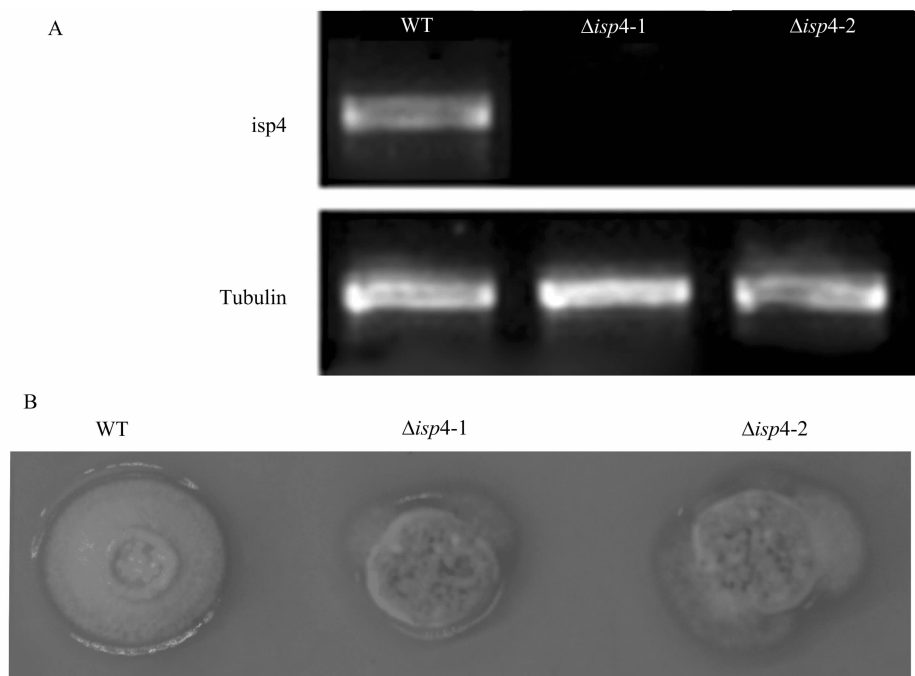


图4 RT-PCR 验证敲除菌株(A)和敲除菌株的生长表型验证(B)

为进一步证明绿僵菌敲除载体被正确敲除,用 RT-PCR 对 *isp4* 基因的表达量(引物 RT-PCR-*isp4*F 和 RT-PCR-*isp4*R)进行了验证(图 4),菌落形态的观察也证明了 2 种敲除方法均改变了目的菌株的基因。这些结果表明 *isp4* 基因能够被正确敲除。

3 讨论

绿僵菌作为一种昆虫病原真菌的模式真菌,敲除技术限制影响了对其基因序列的大规模操作。CRISPR/Cas9 基因编辑系统首先在细菌中被报道,随后被应用于动植物的基因靶向技术,不断得到优化^[29-30]。CRISPR/Cas9 系统的特异性被限制在 sgRNA 5'端 20 nt 的位点,这 20 nt 的核苷酸和靶向 DNA 进行 Watson-Crick RNA-DNA 容错性碱基配对,也有可能形成脱靶效应^[22]。再者,多个物种的 Cas9 通过识别各自的 sgRNA 骨架,可在同一细胞中执行不同的功能,彼此之间互不干扰^[9]。CRISPR/Cas9 的特异性与靶序列的长度和构成及 Cas9 和 sgRNA 的浓度有关。sgRNA 靶序列中鸟嘌呤和胞嘧啶含量过高或过低都会影响打靶效应^[7]。

CRISPR/Cas9 技术是基因编辑有力的工具,且被广泛应用,但它仍是相对新颖的技术,还有待提高。目前,CRISPR/Cas9 技术的瓶颈是如何降低脱靶风险。正如上所述,降低 CRISPR/Cas9 的脱靶效应包括缩短 sgRNA、用双切口 dCas-FokI 等方法。

每条 sgRNA 序列都含有变化的脱靶位点,故在试验时,须要仔细分析影响脱靶的因素,降低脱靶效率。近年来积累了很多检测脱靶突变的方法,可以让研究者更有效地预测脱靶效应^[10,26]。众所周知,基因编辑技术的效应与内切核酸酶在识别基因组上的特异位点相关。例如,转录因子及近年来研究的 CRISPR/Cas9 易结合于基因组 DNA^[21]。转录因子绑定和染色质重塑与组氨酸修饰有关^[16]。由于基因组序列表观修饰和基因序列变化的复杂性,研究者仍然缺乏对 CRISPR/Cas9 的酶活性和 DNA 绑定对 CRISPR/Cas9 效果的认识^[20,31]。

在本研究中,利用 CRISPR/Cas9 技术和 Recombinase 技术同时敲除了绿僵菌的 *isp4* 基因。通过比较发现,CRISPR/Cas9 技术和 Recombinase 技术一样能够成功应用于昆虫病原真菌(绿僵菌)。在研究过程中发现,CRISPR/Cas9 在绿僵菌中也存在效率不是很高的现象。CRISPR/Cas9 技术在构建敲除质粒骨架时比 Recombinase 技术复杂,但是一旦建成熟骨架,后续进行大量基因敲除时就相对容易。对于 CRISPR/Cas9 的脱靶效应和转化效率方面尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Blasco R B, Karaca E, Ambrogio C, et al. Simple and rapid *in vivo* generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9

- technology[J]. Cell Reports,2014,9(4):1219–1227.
- [2]Canver M C,Bauer D E,Dass A,et al. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells[J]. Journal of Biological Chemistry,2014,289(31):21312–21324.
- [3]Cho S W,Kim S,Kim J M,et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA – guided endonuclease[J]. Nat Biotechnol,2013,31(3):230–232.
- [4]Choi P S,Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology[J]. Nature Communications,2014,5(1):1–9.
- [5]Cong L,Ran F A,Cox D,et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science,2013,339(6121):819–823.
- [6]Deltcheva E,Chylinski K,Sharma C M,et al. CRISPR RNA maturation by trans – encoded small RNA and host factor RNase III[J]. Nature,2011,471(7340):602–607.
- [7]Doench J G,Hartenian E,Graham D B,et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR – Cas9 – mediated gene inactivation[J]. Nature Biotechnology,2014,32(12):1262–1267.
- [8]Doudna J A,Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR – Cas9[J]. Science,2014,28(346):6123–6128.
- [9]Esvelt K M,Mali P,Braff J L,et al. Orthogonal Cas9 proteins for RNA – guided gene regulation and editing[J]. Nature Methods,2013,10(11):1116–1121.
- [10]Frock R L,Hu J,Meyers R M,et al. Genome – wide detection of DNA double – stranded breaks induced by engineered nucleases[J]. Nat Biotechnol,2015,33(2):179–186.
- [11]Fu Y,Sander J D,Reyon D,et al. Improving CRISPR – Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. Nat Biotechnol,2014,32(3):279–284.
- [12]Fujii W,Kakuta S,Yoshioka S,et al. Zygote – mediated generation of genome – modified mice using Streptococcus thermophilus 1 – derived CRISPR/Cas system[J]. Biochem Biophys Res Commun,2016,477(3):473–476.
- [13]Generoso W C,Gottardi M,Oreb M,et al. Simplified CRISPR – Cas genome editing for *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Microbiological Methods,2016,127:203–205.
- [14]Hong M,Peng G,Keyhani N O,et al. Application of the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*, for leafroller (*Cnaphalocrocis medinalis*) control and its effect on rice phyllosphere microbial diversity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2017,101(2):6793–6807.
- [15]Horvath P,Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. Science,2010,327(5962):167–170.
- [16]Hwang W Y,Fu Y,Reyon D,et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR – Cas system[J]. Nature Biotechnology,2013,31(3):227–229.
- [17]Hynes A P,Lemay M L,Moineau S. Applications of CRISPR – Cas in its natural habitat[J]. Current Opinion in Chemical Biology,2016,34:30–36.
- [18]Ishino Y,Shinagawa H,Makino K,et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. J Bacteriol,1987,169(12):5429–5433.
- [19]Kieler J B,Duong K L,Moye – Rowley W S,et al. Targeted gene deletion in *Aspergillus fumigatus* using microbial machinery and a recyclable marker[J]. J Microbiol Methods,2013,95(3):373–378.
- [20]Kundaje A,Kyriazopoulou – Panagiotopoulou S,Libbrecht M,et al. Ubiquitous heterogeneity and asymmetry of the chromatin environment at regulatory elements[J]. Genome Research,2012,22(9):1735–1747.
- [21]Kuscu C,Arslan S,Singh R,et al. Genome – wide analysis reveals characteristics of off – target sites bound by the Cas9 endonuclease [J]. Nat Biotechnol,2014,32:677–683.
- [22]Lin Y,Cradick T J,Brown M T,et al. CRISPR/Cas9 systems have off – target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences[J]. Nucleic Acids Research,2014,42(11):7473–7485.
- [23]Luo S,He M,Cao Y,et al. The tetraspanin gene *MaPlsI* contributes to virulence by affecting germination, appressorial function and enzymes for cuticle degradation in the entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum* [J]. Environ Microbiol,2013,15(11):2966–2979.
- [24]Szewczyk E,Kasuga T,Fan Z. Efficient sequential repetitive gene deletions in *Neurospora crassa* employing a self – excising β – recombinase/six cassette[J]. Journal of Microbiological Methods,2013,92(3):236–243.
- [25]Szewczyk E,Kasuga T,Fan Z. A new variant of self – excising β – recombinase/six cassette for repetitive gene deletion and homokaryon purification in *Neurospora crassa* [J]. Journal of Microbiological Methods,2014,100:17–23.
- [26]Tsai S Q,Wyvekens N,Khayter C,et al. Dimeric CRISPR RNA – guided FokI nucleases for highly specific genome editing[J]. Nat Biotechnol,2014,32(6):569–576.
- [27]Tulloch M. The genus *Metarhizium*[J]. Trans Br Mycol Soc,1976,66(3):407–411.
- [28]Wan H,Feng C,Teng F,et al. One – step generation of *p53* gene biallelic mutant Cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system [J]. Cell Research,2015,25(2):258–261.
- [29]Wang H,Yang H,Shivalila CS,et al. One – step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas – mediated genome engineering[J]. Cell,2013,153(4):910–918.
- [30]Wang J,Zhuang J,Iyer S,et al. Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors[J]. Genome Res,2012,22(9):1798–1812.
- [31]Weninger A,Hatzl A M,Schmid C,et al. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Journal of Biotechnology,2016,235:139–149.