DOI:10.12441/spyswjs.20230404002 [文章编号] 1673-1689(2024)11-0098-08

金针菇体外CRISPR-Cas9基因编辑系统的建立

杜燕燕[1,2] 伍土恒[1,2] 陈柏雄[1,2] 叶志伟[1,2] 林俊芳[1,2] 郭丽琼[1,2*]

（1. 华南农业大学食品学院,广东 广州 510640；2. 广东省微生态制剂工程技术研究中心,广东 广州 510640）

摘要:金针菇(*Flammulina filiformis*)具有很高的食用和药用价值。CRISPR-Cas9基因编辑技术近年来得到快速发展,虽然在食药用菌中也有一些成功应用,但其效率偏低。作者以*pyrG*为目的突变基因,设计并在体外合成gRNA,与蛋白质SpCas9组装成RNP复合物,采用PEG法将RNP复合物转入金针菇原生质体,同时对转化系统参数进行优化。结果表明,软件预测的高分值gRNA不一定有活性,需要在体外与SpCas9组装后对目的基因进行切割鉴定。有活性的RNP复合物转入金针菇原生质体后能够特异性编辑目的基因,而没有活性的RNP复合物转入金针菇后则不能编辑目的基因;在金针菇的转化体系中加入Triton X-100能有效促进RNP复合物进入原生质体。金针菇突变株Sanger测序结果显示,在靶点发生了小片段的插入,说明这些突变株主要是通过非同源末端连接(NHEJ)途径改变基因组信息。作者成功构建了金针菇体外CRISPR-Cas9基因编辑系统,编辑效率为60%。该研究为选育具有优良性状的金针菇新品种及其他食用菌提供理论依据和技术支持。

关键词:金针菇;基因编辑技术;CRISPR-Cas9

Establishment of an *in Vitro* CRISPR-Cas9 Genome Editing System for *Flammulina filiformis*

DU Yanyan[1,2] *WU Tuheng*[1,2] *CHEN Baixiong*[1,2] *YE Zhiwei*[1,2] *LIN Junfang*[1,2] *GUO Liqiong*[1,2*]

(1. College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510640, China; 2. Research Center for Micro-Ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Flammulina filiformis* has high nutritional and medicinal value. The CRISPR-Cas9 genome editing technology has been rapidly developed in recent years, with some successful applications in edible and medicinal fungus. However, its editing efficiency is comparatively low. The author targeted the *pyrG* gene for mutation, designing and synthesizing guide RNA (gRNA) *in vitro*. The gRNA was assembled with the SpCas9 protein to form ribonucleoprotein (RNP) complexes, which were introduced into the protoplasts of *Flammulina filiformis* using the PEG method, while the transformation parameters were optimized. The results demonstrated that computationally predicted high-scoring gRNA might not always exhibit activity and needed to be assembled with SpCas9 protein *in vitro* for cleavage verification of the target gene. Active RNP complexes specifically edited the target gene upon transformation into *Flammulina filiformis* protoplasts, whereas inactive complexes failed to induce genetic modifications. Adding Triton X-100 to the transformation system significantly enhanced RNP uptake into protoplasts. Sanger sequencing of mutant strains revealed small fragment insertions at the target site,

基金项目:国家自然科学基金项目(32072646,32272785);广东省现代农业产业技术体系创新团队(食用菌)建设项目(2022KJ103,2023KJ103);广东省重点领域研发计划项目(2022B0202050002);2022年省级乡村振兴战略专项资金种业振兴项目(2022-WPY-00-006)。

通信作者:郭丽琼(1963—),博士,教授,博士研究生导师,主要从事食药用菌分子生物学与天然产物研究。E-mail:guolq@scau.edu.cn

收稿日期:2023-04-04 **修回日期:**2023-06-22

indicating that genome modifications occurred primarily through the non-homologous end joining (NHEJ) pathway. The author successfully established an *in vitro* CRISPR-Cas9 genome editing technology in *Flammulina filiformis*, achieving an editing efficiency of 60%. Meanwhile, this study provides a theoretical basis and technical support for the breeding of new varieties of *Flammulina filiformis* with desirable traits, as well as other edible fungi.
Keywords: *Flammulina filiformis*; genome editing technology; CRISPR-Cas9

金针菇含有真菌免疫调节蛋白、多糖、黄酮类、萜类、纤维素、维生素和微量元素等营养物质[1]，具有抗炎、抗氧化、免疫调节等功能[2-4]，是市面上最受欢迎的食用菌之一。金针菇是典型的低温结实菌类，子实体形成过程需要低温刺激[5]，且菌种使用1~2年后会退化，品质和产量均下降，因此金针菇优良品种的培育有待研究。传统的育种方法主要有杂交育种、原生质体融合等[6]。但传统的育种方法往往目的性差、耗时长、效率低，已经不能满足生产需求。分子育种因灵活性好、准确性高和效率高成了研究热点[7]。

CRISPR-Cas系统由成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白质（clustered regulatory interspaced short palindromic repeats-associated protein，CRISPR）和CRISPR-associated（Cas）蛋白质组成，是细菌和古细菌抵抗外来侵染（质粒和病毒）的免疫系统[8]。CRISPR-Cas9基因编辑技术由化脓链球菌II型CRISPR-Cas9系统改造而来[9]。自从2015年首次在白色念珠菌和曲霉中建立CRISPR-Cas9系统后[10-11]，CRISPR-Cas9基因编辑技术在真菌的基因敲除、表达激活和表达抑制等方面得到广泛应用[12]。2016年Waltz等[13]对双孢蘑菇进行基因编辑后，CRISPR-Cas9基因编辑技术在食用菌中的运用开始得到关注，目前在许多食药用菌中已成功应用。Chen等[14]尝试在蛹虫草中利用构巢曲霉的trpC启动子转录gRNA，但未获得转化子，后续利用T7试剂盒转录gRNA并导入相应的Cas9过表达菌株，成功获得对应靶点突变株。Chen等[15]在蛹虫草中挖掘出7个内源tRNA来优化gRNA转录单元，构建tRNA-gRNA-tRNA的gRNA表达框并插入Cas9表达载体，以*ura3*为目的基因，通过ATMT转化最终得到对应的靶点突变株。Wang等[16]通过灵芝内源的U6启动子和HDV核酶共同作用，实现gRNA成功转录，利用PEG转化法获得突变株。Sugano等[17]发现灰盖鬼伞内源的CcDED1 pro启动子比传统gpd启动子的启动效率高7倍，因此可用来高效表达Cas9，同时利用内源U6启动子转录gRNA，将两者构成共表达载体，通过PEG转化可在GFP系统中稳定表达，最后在转化子中检测到了GFP功能丧失。在金针菇的CRISPR-Cas9基因编辑技术方面，最早是罗润和欧阳萍兰等[18-19]使用H1启动子表达gRNA和人类密码子优化的Cas9蛋白质，并利用PEG介导技术转化单核菌株原生质体，尝试在金针菇中建立CRISPR-Cas9基因编辑系统，但没有成功敲除目的基因。林金德等[20]通过金针菇gpd启动子驱动gRNA表达，并采用金针菇密码子优化的Cas9蛋白质及农杆菌介导法转化单核菌丝原生质体，建立了CRISPR-Cas9基因编辑系统，但目的基因未能成功敲除。Liu等[21]以*pyrG*为目的基因，通过CRISPR-Cas9基因编辑技术挖掘出金针菇内源U6启动子，将携带Cas9和双靶点的质粒分别转入单核金针菇Dan3原生质体，使对应靶点成功突变。以上研究表明CRISPR-Cas9基因编辑技术在金针菇体内的基因编辑效率较低。

体外CRISPR-Cas9基因编辑技术主要是通过体外表达的Cas9蛋白质与体外转录的gRNA组成RNP复合物，再利用PEG法将该复合物转入受体，从而获得目的基因突变株的技术，其优点是Cas9和gRNA在宿主体内“无残留”，所以从分子育种的长远角度来看更具优势。Cas9经过原核表达后可直接纯化，无需针对不同物种密码子的偏好进行优化。gRNA通过T7启动子体外转录后即可获得高质量的gRNA。基于此，体外CRISPR-Cas9基因编辑技术理论上可应用于所有物种[22]。体外CRISPR-Cas9基因编辑技术在食用菌中已有成功报道，如Vank等[23]首次在裂褶菌中使用RNP复合物以无选择标记基因*hom2*为靶点，设计含有选择标记的同源模板进行敲除，最终获得了65个缺失突变株，同时发现250 bp的同源臂足以有效诱导同源重组发生，这也是首例有关担子菌的体外CRISPR-Cas9基因编辑技术的报道。Zou等[24]优化PEG法转化效果时发现，当

RNPs浓度为170 nmol/L时，蛹虫草中*Cmura5*基因的敲除率高达100%。这些研究表明，CRISPR-Cas9基因编辑技术在体外的基因编辑效率可能高于体内。综上所述，针对金针菇的*pyrG*基因建立金针菇体外CRISPR-Cas9基因编辑系统，可为日后选育优良性状的金针菇新品种提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

金针菇单核菌株YX-D-D：作者所在课题组分离并保存；大肠杆菌DH5α感受态细胞：北京擎科生物有限公司；卡那抗性克隆载体TOPO：中美泰和公司。

1.2 试剂

2×Rapid Taq Master Mix、Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase、Cas9 Nuclease：南京诺唯赞有限公司；OneScribe T7 Transcription Kit（E081）体外转录试剂盒：中国南京爱必梦生物材料有限公司；Hipure RNA Clear Up试剂盒、凝胶回收试剂盒：美基生物有限公司；5-氟乳清酸（5-FOA）、尿嘧啶核苷、卡那霉素：成硕试剂公司；北京擎科生物有限公司提供测序服务。

LB培养基：胰蛋白胨10 g、NaCl 10 g、酵母提取物5 g、水1 L，调节pH至7.0。

CYM培养基：麦芽糖10 g、葡萄糖20 g、酵母提取物2 g、胰蛋白胨2 g、$MgSO_4$ 0.5 g、KH_2PO_4 4.6 g，溶于1 L纯水中。

再生培养基：CYM、甘露醇0.6 mol/L、尿嘧啶核苷0.5 mg/mL。

复筛培养基：CYM、5-FOA 300 μg/mL、尿嘧啶核苷0.5 mg/mL、琼脂8 g/L。

STC缓冲液：将18.22 g山梨醇溶解于超纯水，加入1 mL的1 mol/L Tris-HCl（pH 7.5）和2.5 mL的1 mol/L $CaCl_2$，用超纯水定容到100 mL，使山梨醇浓度为1 mol/L、Tris-HCl浓度为10 mmol/L、$CaCl_2$浓度为25 mmol/L，过滤除菌，室温保存。

PEG缓冲液：将5 g PEG 4000（250 g/L）溶解于超纯水，加入0.2 mL的1 mol/L Tris-HCl（pH 7.5）和0.5 mL的1 mol/L $CaCl_2$，60 ℃混合溶解，定容到20 mL，使Tris-HCl浓度为10 mmol/L、$CaCl_2$浓度为25 mmol/L，过滤除菌，室温保存。

缓冲液A：将7.46 g KCl溶解于去离子水，加入10 mL的1 mol/L Tris-HCl（pH 9.5）和10 mL的0.1 mol/L EDTA（pH 9.5），定容至100 mL，使Tris-HCl浓度为100 mmol/L、KCl浓度为1 mol/L、EDTA浓度为10 mmol/L，采用0.22 μm的滤膜过滤除菌，4 ℃保存。

1.3 5-FOA敏感性试验

将YX-D-D的菌块分别接种于5-FOA质量浓度为0、50、100、150、200、250、300 μg/mL的平板上，25 ℃培养12 d，观察菌丝的生长速度，选出最低抑制质量浓度。

1.4 *pyrG*基因靶点的选择

选择乳清苷-5'-磷酸脱羧酶编码基因*pyrG*为目的基因。在NCBI上搜索金针菇中的*pyrG*基因，得到一段长为902 bp的CDS序列（GenBank：JN618986.1），根据该序列设计引物。步骤如下：用牙签在平板上刮取部分菌丝，加适量缓冲液A，捣碎后使菌丝均匀分散在裂解液中，95 ℃加热10 min，待裂解液冷却后用沾有石蜡的牙签蘸取裂解液中的核酸，然后直接在PCR体系中上下戳3~4次后取出牙签，剩余体系进行PCR扩增（扩增体系见表1）。扩增出单核金针菇YX-D-D的*pyrG*基因序列并测序。将得到的序列信息（见表2）上传至Eukaryotic Pathogen gRNA Design Tool（EuPaGDT，http://grna.ctegd.uga.edu/），以金针菇基因组为背景数据库进行gRNA的设计，选择得分较高的两条gRNA进行体外消化试验。

表1 PCR扩增体系

Table 1 PCR amplification system

组分	体积/μL
菌丝	1
正向引物	2
反向引物	2
dNTP	1
Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1
2×Phanta® Max Buffer	25
ddH_2O	18

PCR的扩增程序如下：95 ℃预变性3 min；95 ℃变性15 s，55 ℃退火15 s，72 ℃延伸30 s，共30个循环；再72 ℃延伸5 min。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析，然后使用美基凝胶电泳回收试剂盒对目的条带进行回收及测序。

表2 引物序列信息

Table 2 Primer sequence information

引物名称	引物序列（5′—3′）	引物用途
Fv-pyrG-F	ATGCAGTCCTACGCCGCTCGCGCC	扩增*pyrG*序列
Fv-pyrG-R	TCATGCTGTTCTCTCCAAGTATGCC	扩增*pyrG*序列
gRNA-1	AGACTTTCTTGCTATCATCCAGG	*pyrG*靶点
gRNA-2	GGACTGGATGTCAAGGGCGATGG	*pyrG*靶点
gRNA-1-F	TAATACGACTCACTATAGGAGACTTTCTTGCTATCATCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT	体外转录gRNA1上游DNA模板
gRNA-1-R	GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGC	体外转录gRNA1下游DNA模板
gRNA-2-F	TAATACGACTCACTATAGGGGACTGGATGTCAAGGGCGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT	体外转录gRNA2上游DNA模板
gRNA-2-R	GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGC	体外转录gRNA2下游DNA模板

注：下划线为PAM位点。

1.5 gRNA的特异性验证试验

将引物gRNA-1-F、gRNA-1-R和gRNA-2-F、gRNA-2-R分别作为模板，利用高保真酶Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase扩增出包含有T7启动子、gRNA spacer和gRNA scaffold的DNA模板，用回收试剂盒回收PCR产物，然后按照体外转录试剂盒的操作说明体外转录成gRNA。步骤如下：在冰上解冻DNA模板和所有试剂，然后依次加入1 μg模板，ATP、UTP、CTP、GTP各1.5 μL，10× Transcription Buffer 2 μL、OneScribe Enzyme Mix 2 μL，最后用Nuclease-free ddH_2O补足20 μL，将溶液混合均匀后在37 ℃孵育4 h。孵育后的产物用Hipure RNA Clear Up试剂盒回收。回收后的产物置于−80 ℃保存待用。

按照Cas9 Nuclease的说明书操作，验证所选靶点对目的基因*pyrG*是否能够有效切割。步骤如下：首先用引物Fv-pyrG-F和Fv-pyrG-R扩增出金针菇*pyrG*基因用作后续模板，然后依次在PCR管中加入10× Cas9 Nuclease Reaction Buffer 3 μL、sgRNA 3 μL、Cas9 Nuclease 1 μL，用Nuclease-free ddH_2O补足30 μL后混匀，37 ℃孵育10 min。孵育结束加入3 μL的*pyrG*模板混匀，37 ℃反应1 h，将产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 RNP复合物的金针菇CRISPR-Cas9基因编辑系统建立

gRNA的体外制备同1.5。分别取5 μg的gRNA1和gRNA2与商用SpCas9蛋白质（质量浓度为160 ng/μL）在37 ℃预组装10 min，利用PEG法将RNP复合物转入金针菇原生质体。金针菇原生质体制备参考文献[25]并稍加修改。将制备好的原生质体均分成4份，其中2份加体积分数0.006%的Triton X-100作为试验组，不加Triton X-100的2份作为对照组。RNP1和RNP2复合物分别转入2组原生质体，添加50 μL PEG缓冲液后轻柔混匀冰浴30 min，冰浴结束后加入500 μL PEG缓冲液混匀，28 ℃孵育20 min，最后加入500 μL STC缓冲液室温静置10 min，4 000 r/min离心5 min，弃上清液，加适量STC缓冲液重悬后涂布在再生培养基上，待菌落形成后将复筛培养基盖在上面，等新菌丝长出后进行PCR扩增并测序。

2 结果与讨论

2.1 5-FOA敏感性试验结果

供试金针菇单核菌株YX-D-D在含不同质量浓度5-FOA的平板上的生长情况见图1。与对照组相比，在含有5-FOA的平板上供试菌株的生长都受到了不同程度的抑制。在5-FOA质量浓度为250 μg/mL的平板上菌丝略萌发；在5-FOA质量浓度为300 μg/mL的平板上菌丝完全不萌发，所以选择300 μg/mL作为筛选转化子的5-FOA质量浓度。

2.2 *pyrG*基因靶点筛选结果

根据上传的数据在Eukaryotic Pathogen gRNA Design Tool网站上预测出106条gRNA，其中不符合预期的有17条，包括不能契合靶点、脱靶可能性高和含有4个“T”及以上的gRNA，最终筛选得到89条符合预期的gRNA。选择得分高并且在正链上的两条gRNA，使用体外转录试剂盒

转录，用 RNA 纯化试剂盒回收后得到 2 条高纯度的 gRNA（见图 2）进行下一步试验。

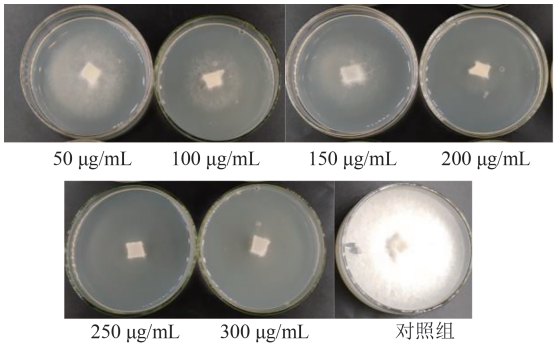
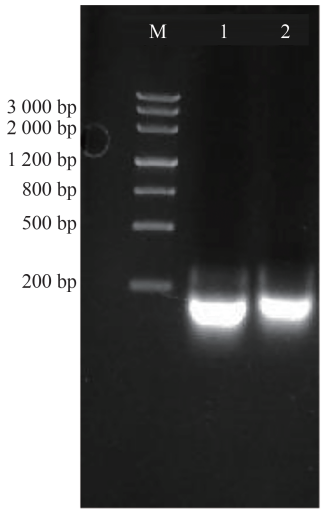


图 1　金针菇单核菌株 YX-D-D 对 5-FOA 的敏感性

Fig. 1　Sensitivity of single-nucleated *Flammulina filiformis* YX-D-D to 5-FOA



M—Marker；1—gRNA1；2—gRNA2。

图 2　gRNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2　Agarose gel electrophoresis of gRNA

2.3　体外验证 gRNA 特异性

高效的 gRNA 对基因编辑起着至关重要的作用。将供试金针菇单核菌株 YX-D-D 的菌丝作为模板，采取 30 s 快提基因组，利用引物 Fv-pyrG-F 和 Fv-pyrG-R 扩增出一段 902 bp 的片段。如图 3 所示，理论上 gRNA1 会把目的基因切成 139 bp 和 763 bp 两个片段，gRNA2 会把目的基因切成 178 bp 和 724 bp 两个片段。然而实际试验发现（见图 4），在体外只有 gRNA1 对目的基因 *pyrG* 进行了有效切割，与 *pygG* 模板相比，gRNA1 将部分目的基因切割开，在 750 bp 左右出现了目的条带，大小为 763 bp，而大小为 139 bp 的条带被降解的 gRNA 掩盖。gRNA2 没有切割出相应的片段。该结果表明，只有 gRNA1 在体外对目的基因有特异性。考虑到体内和体外的环境及作用条件有差异，所以将两条 gRNA 都用于下一步转化金针菇单核原生质体试验。

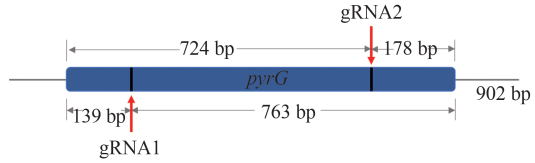
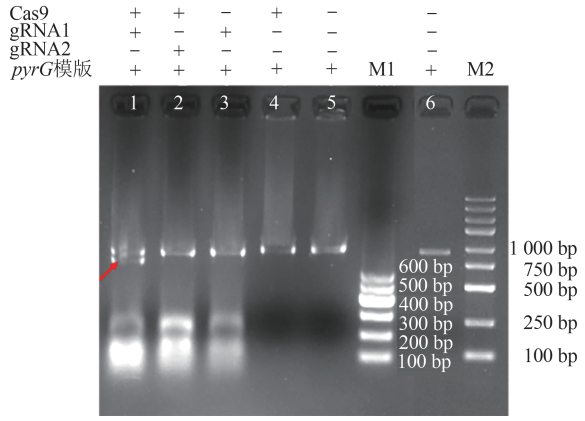


图 3　体外切割示意图

Fig. 3　Diagram of *in vitro* cleave



M1—Marker1；M2—Marker DL5 000；1—gRNA1 切割后对应的条带；2—gRNA2 切割后对应的条带；3—未加 Cas9 蛋白质的阴性对照；4—未加 gRNA 的阴性对照；5、6—*pygG* 模板对应的条带。

图 4　体外切割琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4　Agarose gel electrophoresis of *in vitro* cleavage

2.4　RNP 复合物的金针菇 CRISPR-Cas9 基因编辑系统建立结果

通过 PEG 法将制备好的 RNP1 和 RNP2 复合物分别转入试验组和对照组的金针菇单核原生质体，待原生质体萌发后，将复筛培养基盖在萌发后的原生质体上进行初筛，20 d 后添加 RNP1 复合物的试验组平板上有零星菌落生长，见图 5。这些菌落拟定为突变株，继续转移到复筛培养基中进行复筛，最后将复筛培养基上长出来的菌丝作为模板，直接用引物 Fv-pyrG-F 和 Fv-pyrG-R 将 *pyrG* 基因扩增后测序。测序结果表明（见图 6），在基因组修复过程中，gRNA1 处的 PAM 位点上游出现了插入突变，金针菇突变株 M1 中插入了 4 个 T 碱基代替了原来的 C 碱基；突变株 M2 的 DNA 产生双链断裂后，在缺口处启动 NHEJ 修复过程，随机插入了 3 个 T 碱基；突变株 M3 通过错配修复强行将 DSB 补上。3

株突变株都产生不同程度的突变，并且由于每个突变株的修复机制不同，其NHEJ修复方式也不一样。突然出现的多T峰值偏低可能是由于新插入的片段信号不够强，从而导致测序结果峰值偏低。添加了RNP2复合物的试验组和对照组中，覆盖复筛培养基后均未见抗性菌落生长。在添加了RNP1和RNP2复合物的试验组中，只有添加了RNP1复合物的金针菇原生质体中筛选到突变株，而添加RNP2复合物的试验组中并没有长出突变株，该结果与体外切割试验结果一致，表明在体内没有特异性的gRNA，在体外也没有特异性，并且与Cas9蛋白质组装后也不具备切割目的基因的功能。

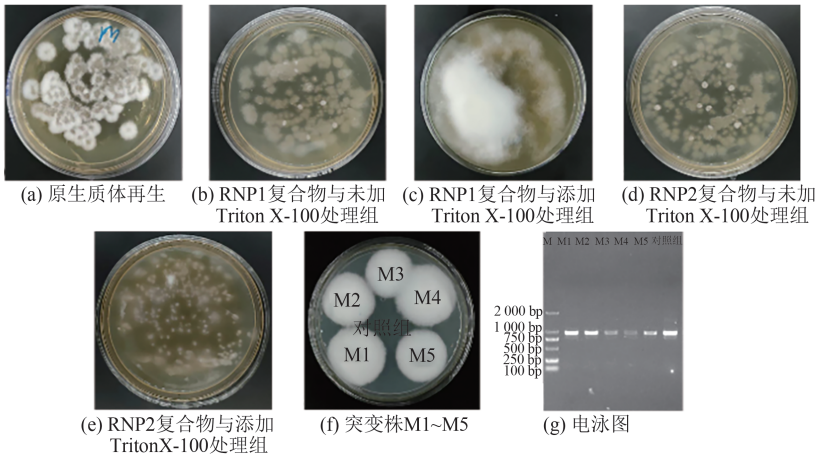
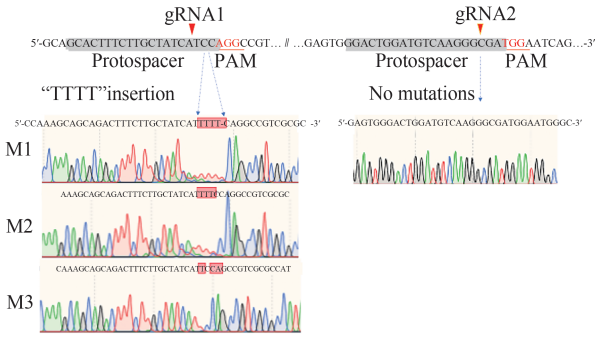


图5　原生质体再生及突变株筛选

Fig. 5　Protoplasts regeneration and mutants screening



M1—金针菇突变株1；M2—金针菇突变株2；M3—金针菇突变株3。

图6　突变株*pyrG*基因序列的插入突变

Fig. 6　Sequence of the *pyrG* gene in the mutant strain showing the insertion mutation

Triton X-100作为一种常用的表面活性剂，在金针菇的遗传转化中极大促进了外源物质进入原生质体。作者从6.45×10^6个原生质体中筛选得到5株拟转化子，其中3株经测序鉴定为突变株，成功建立了金针菇体外CRISPR-Cas9基因组编辑系统，编辑效率为60%。Liu等[26]用同样的方法筛选了表面活性剂Triton X-100的适宜体积分数，通过在原生质体中添加体积分数为0.01%的Triton X-100有效促进了RNP复合物进入细胞核，然后采用一条有活性的gRNA对两条*pyrG*基因进行编辑，获得了5株转化子，其转化效率高达100%。该研究中编辑效率偏低的原因可能是Triton X-100的体积分数和出发菌株品种不同，导致对DSB的修复能力和强度也不同，因此编辑效率偏低。

2.5　讨论

CRISPR-Cas9基因编辑技术的发展给食用菌的分子育种带来了更加高效的基因编辑工具[27]。作者发现编辑效率主要受以下3个方面的影响：第一，在递送方面，Triton X-100作为一种常用的表面活性剂，不但能够通过溶解脂质双分子层中的两亲性磷脂来增加细胞膜的通透性，而且不会影响酶的活性[28]。该研究证明了Triton X-100对RNP复合物进入金针菇原生质体起到了促进作用。第二，合适的目的基因对建立整个系统起着关键作用。*pyrG*基因编码乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶，该酶是真菌生长过程中尿嘧啶核苷合成的关键酶，它能催化5-FOA合成有毒的5-氟尿嘧啶单磷酸盐，所以其自带反向筛选标记[29-31]，敲除该基因的突变株能在添加尿嘧啶核苷的5-FOA抗性平板上生长。第三，gRNA的有效性。相关研究中[26,32-33]建立的体外基因编辑系统中只选择将体外有特异性的gRNA和Cas9蛋白质组装后进行体外

基因编辑。而作者将体外没有特异性的gRNA导入体内，从而验证了gRNA和Cas9蛋白质组装后在体外和体内的切割能力一致，这为快速筛选有特异性的gRNA提供了数据支撑。结合前人均未获得突变株的试验结果[18-19,34]表明，对所选gRNA进行体外消化试验是基因编辑的关键环节，影响其效果的因素主要是转入受体时gRNA的降解程度。

3 结论

作者在体外高效合成gRNA，并与SpCas9蛋白质组装，通过添加体积分数为0.006%的Triton X-100提高了RNP复合物进入金针菇单核原生质体YX-D-D的效率，从而获得了*pyrG*的突变株，建立了金针菇体外CRISPR-Cas9基因编辑系统。

该过程无需优化金针菇中Cas9蛋白质的密码子和挖掘gRNA的U6启动子。通过体外转录即可获得大量高质量gRNA，也无需构建敲除载体，给基因编辑过程节约了大量时间。并且RNP复合物在发挥作用后可被体内的酶降解，不需引入外源基因，从而达到无痕编辑的效果。

研究中建立的CRISPR-Cas9基因编辑系统对金针菇*pyrG*基因的编辑效率达到了60%，未来还需进一步优化，以便将该基因编辑系统运用于其他基因上。

综上，作者建立的金针菇体外基因编辑系统较体内基因编辑系统具有周期更短、简便快捷的优点，可为gRNA的筛选提供理论依据。未来，可利用研究中建立的基因编辑系统对其他功能基因进行编辑改造，从而获得性状更加优良的金针菇菌株。

参考文献

[1] 谭一罗，杨和川，苏文英，等. 金针菇活性成分及药理活性研究进展[J]. 江苏农业学报，2018，34(5)：1191-1197.
TAN Y L，YANG H C，SU W Y，et al. Research progress on bioactive composition and pharmacological activity of *Flammulina velutipes*[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences，2018，34(5)：1191-1197.(in Chinese)

[2] YAN Z F，LIU N X，MAO X X，et al. Activation effects of polysaccharides of *Flammulina velutipes* mycorrhizae on the T lymphocyte immune function [J]. Journal of Immunology Research，2014，2014(1)：285421.

[3] ZHAO R Q，JI Y，CHEN X，et al. Effects of a *β*-type glycosidic polysaccharide from *Flammulina velutipes* on anti-inflammation and gut microbiota modulation in colitis mice[J]. Food & Function，2020，11(5)：4259-4274.

[4] 马升，沈城，徐建雄. 发酵金针菇菇根多糖提取、结构及抗氧化活性[J]. 食品科技，2021，46(3)：147-154.
MA S，SHEN C，XU J X. Extraction，structure and antioxidant activity of polysaccharide from fermented *Flammulina velutipes* root [J]. Food Science and Technology，2021，46(3)：147-154.(in Chinese)

[5] CHEN J，LI J M，TANG Y J，et al. Genome-wide analysis and prediction of genes involved in the biosynthesis of polysaccharides and bioactive secondary metabolites in high-temperature-tolerant wild *Flammulina filiformis*[J]. BMC Genomics，2020，21(1)：719.

[6] DONG Y T，MIAO R Y，FENG R C，et al. Edible and medicinal fungi breeding techniques，a review：current status and future prospects[J]. Current Research in Food Science，2022，5：2070-2080.

[7] SHARMA V P，BARH A，BAIRWA R K，et al. Enoki mushroom (*Flammulina velutipes* (Curtis) singer) breeding[M]. Cham：Springer International Publishing，2021：423-441.

[8] BARRANGOU R，FREMAUX C，DEVEAU H，et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science，2007，315(5819)：1709-1712.

[9] MALI P，YANG L H，ESVELT K M，et al. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9[J]. Science，2013，339(6121)：823-826.

[10] FULLER K K，CHEN S，LOROS J J，et al. Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*[J]. Eukaryotic Cell，2015，14(11)：1073-1080.

[11] VYAS V K，BARRASA M I，FINK G R. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families[J]. Science Advances，2015，1(3)：e1500248.

[12] 殷朝敏，范秀芝，史德芳，等. CRISPR/Cas基因编辑技术及其在真菌中的应用[J]. 生物技术通报，2017，33(3)：58-65.
YIN C M，FAN X Z，SHI D F，et al. CRISPR/Cas genome editing technology and its application in fungi [J]. Biotechnology Bulletin，2017，33(3)：58-65.(in Chinese)

[13] WALTZ E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation[J]. Nature，2016，532(7599)：293.

[14] CHEN B X，WEI T，YE Z W，et al. Efficient CRISPR-Cas9 gene disruption system in edible-medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. Frontiers in Microbiology，2018，9：1157.

[15] CHEN B X，XUE L N，WEI T，et al. Multiplex gene

precise editing and large DNA fragment deletion by the CRISPR-Cas9-TRAMA system in edible mushroom *Cordyceps militaris*[J]. Microbial Biotechnology, 2022, 15(12): 2982-2991.

[16] WANG P G, XIAO H, ZHONG J J. CRISPR-Cas9 assisted functional gene editing in the mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(4): 1661-1671.

[17] SUGANO S S, SUZUKI H, SHIMOKITA E, et al. Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput transformation system[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1260.

[18] 罗润，林俊芳，郭丽琼，等. 基于CRISPR/Cas9系统的金针菇基因组编辑载体构建[J]. 食品工业科技，2016，37(20)：230-234.
LUO R, LIN J F, GUO L Q, et al. Construction of *Flammulina velutipes* genome editing vector by using CRISPR/Cas9 system [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(20): 230-234.(in Chinese)

[19] 欧阳萍兰，李琼洁，郭丽琼，等. 基于CRISPR/Cas9技术研究金针菇冷诱导结实基因*HK1*和*HK2*的编辑转化系统[J]. 食用菌学报，2018，25(3)：1-7，113.
OUYANG P L, LI Q J, GUO L Q, et al. Establishment of a CRISPR/Cas9 system for editing cold-induced gene *HK1*/*HK2* in *Flammulina velutipes* [J]. Acta Edulis Fungi, 2018, 25(3): 1-7, 113.(in Chinese)

[20] 林金德，杨雪琴，魏韬，等. 金针菇G蛋白偶联受体基因的CRISPR/Cas9基因组编辑载体构建及转化研究[J]. 菌物学报，2019，38(3)：349-361.
LIN J D, YANG X Q, WEI T, et al. Construction and transformation of CRISPR/Cas9 genome editing vector of *Flammulina filiformis* G protein-coupled receptor gene [J]. Mycosystema, 2019, 38(3): 349-361.(in Chinese)

[21] LIU X T, DONG J H, LIAO J, et al. Establishment of CRISPR/Cas9 genome-editing system based on dual sgRNAs in *Flammulina filiformis*[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(7): 693.

[22] 刘笑天，仇昊，田莉，等. CRISPR/Cas9基因编辑系统在食药用真菌中的研究进展[J]. 生物技术通报，2021，37(11)：4-13.
LIU X T, QIU H, TIAN L, et al. Research progress in CRISPR/Cas9 genome editing system in edible and medicinal fungi[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(11): 4-13.(in Chinese)

[23] VANK P J, ESCOBAR N, WÖSTEN H A B, et al. High-throughput targeted gene deletion in the model mushroom *Schizophyllum commune* using pre-assembled Cas9 ribonucleoproteins[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 7632.

[24] ZOU G, XIAO M L, CHAI S X, et al. Efficient genome editing in filamentous fungi *via* an improved CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein method facilitated by chemical reagents[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(6): 2343-2355.

[25] SHI L, CHEN D D, XU C, et al. Highly-efficient liposome-mediated transformation system for the basidiomycetous fungus *Flammulina velutipes*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2017, 63(3): 179-185.

[26] LIU J Y, CUI H Y, WANG R J, et al. A simple and efficient CRISPR/Cas9 system using a ribonucleoprotein method for *Flammulina filiformis*[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(10): 1000.

[27] WANG Q, COLEMAN J J. Progress and challenges: development and implementation of CRISPR/Cas9 technology in filamentous fungi[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2019, 17: 761-769.

[28] 刘霞，孔华庭，张继超，等. SDS与Triton X-100对细胞膜通透作用研究[J]. 核技术，2022，45(8)：49-54.
LIU X, KONG H T, ZHANG J C, et al. Comparative study on cell membrane permeability of SDS and Triton X-100[J]. Nuclear Techniques, 2022, 45(8): 49-54.(in Chinese)

[29] D'ENFERT C. Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker[J]. Current Genetics, 1996, 30: 76-82.

[30] TIAN L, MA Z D, QIU H, et al. Chitosan increases lysine content through amino acid transporters in *Flammulina filiformis*[J]. Foods, 2022, 11(14): 2163.

[31] SHI L, ZHANG T J, XU C, et al. Development of a dual promoter-mediated gene silencing system in *Flammulina velutipes*[J]. Mycoscience, 2017, 58(3): 181-187.

[32] LIANG Z, CHEN K L, ZHANG Y, et al. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 *in vitro* transcripts or ribonucleoproteins[J]. Nature Protocols, 2018, 13: 413-430.

[33] BOONTAWON T, NAKAZAWA T, XU H B, et al. Gene targeting using pre-assembled Cas9 ribonucleoprotein and split-marker recombination in *Pleurotus ostreatus* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2021, 368(13): 1-7.

[34] 伍土恒. 冷诱导金针菇子实体发育相关基因分析及CRISPR-Cas9突变技术体系的建立[D]. 广州：华南农业大学，2019.

（责任编辑：史润东东）