



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106480036 A

(43)申请公布日 2017.03.08

(21)申请号 201611083079.4

(22)申请日 2016.11.30

(71)申请人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路
381号

(72)发明人 潘力 董宏智

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 苏运贞

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12R 1/685(2006.01)

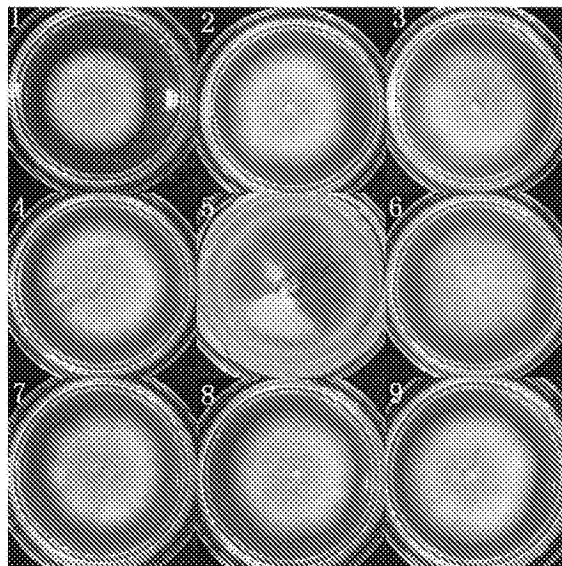
权利要求书1页 说明书8页
序列表7页 附图5页

(54)发明名称

一种具有启动子功能的DNA片段及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种具有启动子功能的DNA片段及其应用。该DNA片段为如下任一序列:(a)如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列或者其互补序列;(b)对如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列进行一个或多个核苷酸取代、缺失或添加所获得的,具有与如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列相同的作为启动子功能的核苷酸序列或者其互补序列。该DNA片段具有启动子的功能,有很强的特异表达活性,在不需要添加诱导物的条件下即能实现CRISPR-Cas9系统中gRNA的表达,使得黑曲霉来源的U6启动子可以在黑曲霉自身的CRISPR-Cas9系统中运用。



1. 一种具有启动子功能的DNA片段,其特征在于:所述DNA片段为如下任一序列:
 - (a) 如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列或者其互补序列;
 - (b) 对如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列进行一个或多个核苷酸取代、缺失或添加所获得的,具有与如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列相同的作为启动子功能的核苷酸序列或者其互补序列。
2. 权利要求1所述的所述的具有启动子功能的DNA片段在黑曲霉CRISPR-Cas9系统中的应用。
3. 一种载体,其特征在于:包含如权利要求1所述的具有启动子功能的DNA片段。
4. 根据权利要求3所述的载体,其特征在于:还包含有fwnA前间区序列、sgRNA和米曲霉U6终止子片段的核苷酸序列,所述的具有启动子功能的DNA片段、fwnA前间区序列、sgRNA和米曲霉U6终止子片段依次连接。
5. 根据权利要求4所述的载体,其特征在于:含有如SEQ ID NO.9或SEQ ID NO.10所示的核苷酸序列。
6. 一种表达质粒,其特征在于:包含权利要求3~5任一项所述的载体以及与该载体可操作连接的位于所述具有启动子功能的DNA片段下游的核苷酸序列。
7. 根据权利要求6所述的表达质粒,其特征在于:所述的核苷酸序列为CRISPR-Cas9系统中Cas9表达框和AMA1自主复制的核苷酸序列。
8. 一种重组工程细胞,,其特征在于:为权利要求3~5任一项所述的载体或者权利要求6或7所述的质粒转化或转导宿主细胞得到的细胞株。
9. 根据权利要求8所述的重组工程细胞,其特征在于:所述的宿主细胞为黑曲霉。
10. 根据权利要求9所述的重组工程细胞,其特征在于:所述的宿主细胞为黑曲霉CBS513.88。

一种具有启动子功能的DNA片段及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种DNA片段,特别涉及一种具有启动子功能的DNA片段及其应用。

背景技术

[0002] 基因编辑技术是进行功能基因组研究的一类重要工具,他可以被用来在多种物种中实现精确的修饰,有着精确、高效的优势。锌指核酸酶技术(ZFNS)、类转录激活因子核酸酶技术(TALENs)以及CRISPR-Cas9系统是最近发展起来的3种主流基因组编辑技术。

[0003] 上述3种基因组编辑技术的原理都是通过在生物基因组特定位点制造DNA断裂损伤,从而激活机体自身的DNA损伤修复机制,在此过程中引发各种变异。ZFNS是最早发展的通用基因组编辑技术,可用于实施定点敲除和定点敲入变异,但ZFNS技术的发展受限于构建难度大、成本高等缺点。TALENs技术在ZFNS基础上发展而来,较ZFNS技术而言,TALENs技术具备构建灵活度高、成本低等优势,不同于ZFNS与TALENs技术,CRISPR/Cas技术具有独特的DNA靶向机制,这种机制使其非常适合进行多位点编辑。

[0004] 目前,CRISPR/Cas系统已在多种物种中测试成功,例如小鼠、斑马鱼、果蝇、线虫和家蚕,在曲霉中也已经有了该技术的成功运用。

[0005] Cas9蛋白和gRNA是CRISPR-Cas9系统得以运转的两个必备因素,缺一不可,其中gRNA的作用更是重中之重。gRNA为一段有着向导作用的短的单链核苷酸序列,其特殊的结构决定了其功能的重要性。一般来说有功能活性的RNA是需要一类特殊的真核II型启动子来启动其转录。目前为止关于曲霉II型启动子的报道微乎其微,所以可以用来启动gRNA转录的曲霉II型启动子更是凤毛麟角。

[0006] 曲霉中的CRISPR-Cas9系统已经被成功运用。黑曲霉的CRISPR-Cas9系统的运用使用的是一种“hammerhead”的技术来启动gRNA的正确转录,但是“hammerhead”技术构建成本高,技术难度大。迄今为止仍未发现一种黑曲霉来源的gRNA启动子用来正确指导gRNA在体内的合成。

发明内容

[0007] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种具有启动子功能的DNA片段。

[0008] 本发明的另一目的在于提供所述DNA片段的应用。

[0009] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种具有启动子功能的DNA片段,所述DNA片段为如下任一序列:

[0010] (a) 如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列或者其互补序列;

[0011] (b) 对如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列进行一个或多个核苷酸取代、缺失或添加所获得的,具有与如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列相同的作为启动子功能的核苷酸序列或者其互补序列。

[0012] 所述的具有启动子功能的DNA片段在黑曲霉CRISPR-Cas9系统中的应用。

[0013] 一种载体,包含上述具有启动子功能的DNA片段,特别是如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。

[0014] 所述的载体,还包含有fwnA前间区序列、sgRNA和米曲霉U6终止子片段的核苷酸序列,所述的具有启动子功能的DNA片段、fwnA前间区序列、sgRNA和米曲霉U6终止子片段依次连接,优选如SEQ ID NO.9或SEQ ID NO.10所示的核苷酸序列。

[0015] 所述的fwnA前间区序列的核苷酸序列如下所示:agtgggatctcaagaactac。

[0016] 一种表达质粒,包含上述载体以及与该载体可操作连接的位于所述具有启动子功能的DNA片段下游的核苷酸序列。

[0017] 所述的核苷酸序列为CRISPR-Cas9系统中Cas9表达框和AMA1自主复制的核苷酸序列。

[0018] 一种重组工程细胞,为上述载体或者上述质粒转化或转导宿主细胞得到的细胞株。

[0019] 所述的宿主细胞为黑曲霉。

[0020] 所述的宿主细胞为黑曲霉CBS513.88。

[0021] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0022] 1、本发明提供了一种DNA片段,该DNA是启动子,具有特异表达活性,在不需要添加诱导物的条件下即能实现CRISPR-Cas9系统中gRNA的表达,使得黑曲霉来源的U6启动子在黑曲霉自身的CRISPR-Cas9系统的运用成为了可能。

[0023] 2、本发明中使用U6启动子作为gRNA的启动子的话构建起来相对于锤头状(hammerhead)结构更加简便。

附图说明

[0024] 图1是PFC-Cas9胞内蛋白western blot结果图,其中,泳道1为PFC-Cas9菌株,泳道2为宿主菌。

[0025] 图2是黑曲霉U6-1和U6-2与其它曲霉中U6编码区的比对图,其中第一行为烟曲霉U6-2的编码区,第二行为烟曲霉U6-3的编码区,第三行与第四行为黑曲霉的两个U6的编码区。

[0026] 图3是带有2种黑曲霉U6启动子的大质粒PFC-AnU6(以下均称为“PFC-AnU6”)的构建示意图。

[0027] 图4是PFC-AnU6转化入宿主菌后转化板的生长情况图,其中箭头所指的菌落为白色孢子的转化子。

[0028] 图5是PFC-AnU6转化黑曲后转化子表型情况图,其中,1和2是PFC-AnU61转化子,3、4、6、7、8、9是PFC-AnU62转化子,5为野生型对照。

[0029] 图6是PFC-AnU6黑曲霉转化子扩增目的片段的电泳图,其中,泳道1~4、6~9为转化子;泳道5为野生型对照;泳道M为250bp marker,从上到下的条带依次是4500,3000,2250,1500,1000,750,500,250;目的条带为901bp。

[0030] 图7是中PFC-AnU6黑曲霉转化子目的片段测序结果比对图,其中第1行为模板序列,第2行为PFC-AnU61的2号转化子,第3~6行分别为PFC-AnU62的4、6、8、9号转化子。

具体实施方式

[0031] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0032] 通过查找数据库查询到黑曲霉中的U6启动子,设计引物以黑曲霉基因组为模板扩增启动子。将扩增到的启动子片段、gRNA结构区和包含完整Cas9表达框的线性化的PFC质粒(文献Nødvig C S, Nielsen J B, Kogle M E, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi [J]. PloS one, 2015, 10 (7) : e0133085.) 进行组装,构建包含有PAnU6启动子的CRISPR-Cas9表达质粒。转化黑曲霉原生质体,并对转化子进行表型、基因型的筛选。

[0033] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件。

[0034] 实施例1

[0035] 1、Cas9表达质粒的获得

[0036] 将包含有PFC330质粒(已在文献“Nødvig C S, Nielsen J B, Kogle M E, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi [J]. PloS one, 2015, 10 (7) : e0133085.”公开)的大肠杆菌菌种(大肠杆菌mech1T1、购自takara公司)活化,接种于液体LB+Amp(氨苄的终浓度100ug/ml) 37℃、200rpm培养10h后提取质粒,得到Cas9表达质粒。

[0037] 2、Cas9蛋白在黑曲霉CBS513.88中的表达

[0038] (1) CBS513.88 Δ pyrG菌株的获得:

[0039] 从荷兰CBS菌种保藏中心购得黑曲霉CBS513.88野生菌株,以黑曲霉CBS513.88基因组为模板,使用F-pyrG-up和R-pyrG-up引物扩增pyrG编码区上游1500bp片段,命名为pyrGup1500bp;使用F-pyrG-down和R-pyrG-down引物扩增pyrG编码区下游1000bp片段,命名为pyrGdown1000bp。使用NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit试剂盒,将pyrGup1500bp、pyrGdown1000bp、T载体pMD20-T三个片段组装成为一个环状质粒pKO-pyrG(具体参考试剂盒说明书)。得到测序正确的质粒pKO-pyrG后将其大量提取至100 μ g以上,转化CBS513.88野生型菌株原生质体(原生质体制备方法参照文献Gomi K, Iimura Y, Hara S. Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans* argB gene [J]. Agricultural and biological chemistry, 1987, 51 (9) : 2549-2555.), 涂布CD高渗+5FOA+U的平板,待转化子长出后挑取至普通固体CD+5FOA+U平板。其中,平板的配方如下:

[0040] ①普通CD高渗平板:包含1M蔗糖,0.3% (w/v) NaNO₃,0.2% (w/v) KCl,0.05% (w/v) MgSO₄·7H₂O,0.1% (w/v) K₂HPO₄·3H₂O,0.001% (w/v) FeSO₄·7H₂O,2% (w/v) 琼脂粉,pH 5.5。

[0041] ②高渗CD+5FOA+U平板:在普通CD高渗平板的基础上,加终浓度为0.1% (w/v) 的5FOA(5-氟乳清酸)粉末,加终浓度为10mM的尿嘧啶核苷(Uridine)。

[0042] ③普通CD固体平板:包含2% (w/v) 葡萄糖,0.3% (w/v) NaNO₃,0.2% (w/v) KCl,0.05% (w/v) MgSO₄·7H₂O,0.1% (w/v) K₂HPO₄·3H₂O,0.001% (w/v) FeSO₄·7H₂O,2% (w/v) 琼脂粉,pH 5.5。

[0043] ④普通固体CD+5FOA+U平板:在普通CD固体平板的基础上,加终浓度为0.1% (w/v) 的5FOA(5-氟乳清酸)粉末,加终浓度为10mM的尿嘧啶核苷(Uridine)。

[0044] 待转化子其菌落长大后,使用研磨杵研磨提取基因组,使用验证引物F-pyrG和R-pyrG扩增转化子基因组。成功敲除pyrG的转化子目的条带为1390bp,未能成功敲除pyrG的条带为2302bp。将扩增出目的条带1390bp的PCR条带送去测序公司测序进一步验证得到CBS513.88的pyrG编码区确实被敲除,测序正确的为黑曲霉CBS513.88 Δ pyrG菌株。

[0045] 引物列表如下(5'-3'):

[0046]

F-pyrG-up	gatataACGCACGTGTCCGCTGTTTG
R-pyrG-up	acttegatcctccttCCTTGGTGTGATGGAGGGG
F-pyrG-down	ccctccatcaacaccAAGGAGGATCGAAGTTCTGATG
R-pyrG-down	gatataATAGAGGCGCCAGCTCTTTC
F-pyrG	CTTCTACTTGCTTGCACAGGGAGC
R-pyrG	GGCCCACTTGAATGTCTTGG

[0047] (2) 按照文献(Gomi K, Iimura Y, Hara S. Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans* argB gene [J]. *Agricultural and biological chemistry*, 1987, 51 (9): 2549-2555.) 中的步骤制备宿主菌黑曲霉CBS513.88 Δ pyrG原生质体,再将上述得到的Cas9表达质粒转化入黑曲霉CBS513.88 Δ pyrG原生质体中,涂布高渗CD培养基(包含1M蔗糖,0.3% (w/v) NaNO₃,0.2% (w/v) KCl,0.05% (w/v) MgSO₄·7H₂O,0.1% (w/v) K₂HPO₄·3H₂O,0.001% (w/v) FeSO₄·7H₂O,2% (w/v) 琼脂粉,pH 5.5),放入30℃培养箱,3~4d后观察转化子生长情况。

[0048] 将转化子挑取至CD固体平板(包含2% (w/v) 葡萄糖,0.3% (w/v) NaNO₃,0.2% (w/v) KCl,0.05% (w/v) MgSO₄·7H₂O,0.1% (w/v) K₂HPO₄·3H₂O,0.001% (w/v) FeSO₄·7H₂O,2% (w/v) 琼脂粉,pH 5.5),30℃培养3d后转化子长出黑色孢子。将转化子长出的黑色孢子挑至液体DPY培养基(2% (w/v) 葡萄糖,1% (w/v) 蛋白胨,0.5% (w/v) 酵母提取物,0.5% (w/v) KH₂PO₄,0.05% (w/v) MgSO₄·7H₂O,下同),30℃、200rpm培养1d后生长为菌丝球,用组织研磨器研磨提取基因组。

[0049] 以转化子的基因组为模板,用引物Cas9up-F和Cas9up-R检测Cas9表达框的上游片段,用引物Cas9 down-F和Cas9 down-R检测Cas9表达框的下游片段。仅当上下游均检测到的转化子视为成功转入Cas9表达框的转化子;其中,用于检测Cas9表达框上下游片段的引物为:

[0050] Cas9 up-F: 5'-gacaaattaaaaggcgcaaac-3'

[0051] Cas9 up-R: 5'-tcagaattatcggggttcaggt-3'

[0052] Cas9 down-F: 5'-ctgggctctatgaaacccgtat-3'

[0053] Cas9 down-R: 5'-tcacatcagcagagacggtaac-3'

[0054] 采用western blot(蛋白质印迹法)的方法(具体方法步骤参考文献:Zhang, Chi, et al. "Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*." *Fungal Genetics and Biology* 86 (2016): 47-57.) 检测Cas9蛋白表达,其中所用一抗为Cas9 (7A9-3A3) Mouse mAb#14697,二抗为Anti-mouse IgG,HRP-linked Antibody#7076(抗体均购自Cell Signaling Technology公司)。PFC-Cas9胞内蛋白western blot的结果如图1所示,转入PFC-Cas9质粒的菌株检测到了Cas9蛋

白的条带,说明Cas9蛋白已经在菌株中得到了表达。

[0055] 3、表达质粒PFC-AnU61和PFC-AnU62的构建

[0056] 从真菌数据库中搜索U6,然后在物种里面选择*Aspergillus niger* (黑曲霉),找到2个U6的序列,然后将这两个U6编码区与烟曲霉2个U6 (U6-1和U6-2) 编码区进行比对,发现其同源度非常高(见图2)。截取黑曲霉2个U6编码区5'端501bp的序列,即作为U6启动子,其核苷酸序列如下所示:

[0057] PFC-AnU61:

[0058]

```
ccacgggctccgaagatctcaggcctttgagcaaggaggaaagcggagagattatacaggagagaatggaggaggaa
tacgcgaagcgggaggagggtgcttaattgggggtctttgatctaaaaataacctctacggagtattgtgtatata
atatacagattgacctgcacaaccatcatgaaccggaaggaaataactaattgctctgatcgaccaagtaacataaac
gtgcctttcgtagtggtatgccactccctgggggggaaaaaaaaggctaagtgaagcattatataaaaaacaaggga
gccaacagegcgatcgaacccggcacctcctcgacggcgatattgcacgagacacttctaccttcatatgaagcc
tgtaaaagttacaaaaaaaaactggtagcttctctttgattgagcgtgtcatccttagtgcaggggcatgctaactc
tctctgtatcgtttcaaattgaccaaattgcccgaaggca;
```

[0059] PFC-AnU62:

[0060]

```
acaaaatgcaggaacctgggctatggtaatctatagcggatactaggaagccacaccccccaagagtgatagccctgg
aatcttaatgggacgttctctgctcggtcattactacgatcctgaagttgaaataaggagtatggcttattgtatcctt
tctttctgaccgcacatcccttagaccaactatgtgcatctgaagggaaaattccatcgagcccccttgaatgaagtc
accctcattatacgtgtgtatatacacaacccccattaaagagtagtaatcgagctaaacccctttttaategcct
aaacattactcaaaaaccggatgacccttaatacaccgtagtctgcttagccaactgccccataaccaataaga
aagaaaaagaaaaagaccatctcagccgcgattcgaacccccgcctctacaaaccacaccgattgggtctcaaaaa
caacaaacctctcaaatgaagtctgtaaaagttgcaaaa。
```

[0061] 以黑曲霉CBS513.88基因组作为模板,以引物F-PAnU6-1和R-PAnU6-1扩增PFC-AnU61启动子片段;以引物F-PAnU6-2和R-PAnU6-2扩增PFC-AnU62启动子片段;其中,用以扩增U6启动子片段的引物分别为:

[0062] F-PAnU6-1:

[0063] 5'-gtttccgctgagggtttaatccacgggctccgaagatctcag-3'

[0064] R-PAnU6-1:

[0065] 5'-gtagttcttgagatcccacttgccttcgggcatttgggtcaattt-3'

[0066] F-PAnU6-2:

[0067] 5'-gtttccgctgagggtttaatacaaaatgcaggaacctgggctat-3'

[0068] R-PAnU6-2:

[0069] 5'-gtagttcttgagatcccactttttgcaacttttacagacttcatttga-3'

[0070] 选取文献(Nødvig C S, Nielsen J B, Kogle M E, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi [J]. *PLoS one*, 2015, 10 (7) : e0133085.) 中的黑曲霉来源的fwnA protospacer (前间区) 序列, 选取文献 (Katayama T, Tanaka Y, Okabe T, et al. Development of a genome editing technique using the

CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae* [J]. *Biotechnology letters*, 2016, 38 (4) :637-642.) 中的sgRNA序列以及米曲霉U6终止子片段(米曲霉RIB40),将上述三段序列从5'到3'依次首尾连接,得到序列gRNAscaffold,送到基因合成公司合成;其中,上述三段序列和gRNAscaffold序列分别为:

[0071] fwnAprotospacer (前间区序列) 核苷酸序列: agtgggatctcaagaactac;

[0072] sgRNA核苷酸序列:

[0073]

gttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgc;

[0074] 米曲霉U6终止子片段的核苷酸序列: tttttttttgagcatttatcagcttgatatagaggtag
gaatgtatggaggtgcagaatggctat tttgttattggagcgggttcgaaacggagggcaggagactttttctaaat
acgtcacgtgatatagagctgct;

[0075] gRNAscaffold核苷酸序列:

[0076]

agtgggatctcaagaactacgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaa
agtggcaccgagtcggtgctttttttttgagcatttatcagcttgatatagaggttaggaatgtatggaggtgcagaa
tggctat tttgttattggagcgggttcgaaacggagggcaggagactttttctaaat acgtcacgtgatatagagct
gct。

[0077] 以合成的sgRNA和米曲霉U6终止子为模板,以引物F-gRNA和引物R-gRNA扩增得到gRNAscaffold序列(其中:20bp的fwnA前间区序列核苷酸序列是设计在引物上面的)。分别
将两个U6启动子和gRNAscaffold做fusionPCR(融合PCR):

[0078] 模板:片段PFC-AnU61(或PFC-AnU62)和gRNAscaffold,摩尔比为1:1,模板的终浓度为2ng/ μ L(片段PFC-AnU61(或PFC-AnU62)和gRNAscaffold的总和);

[0079] 引物:正向引物F-PAnU6-1(或F-PAnU6-2),反向引物R-gRNA,每条引物的终浓度为0.4 μ M;

[0080] PCR酶:Prime STAR premix HS(购自takara公司);

[0081] PCR程序:按照高保真酶的说明书,退火温度68 $^{\circ}$ C;

[0082] PCR反应条件:

步骤	温度	时间	
1、预变性	98 $^{\circ}$ C	10min	
[0083] 2、变性	98 $^{\circ}$ C	30s	35个循环 (cycle)
3、退火+延伸	68 $^{\circ}$ C	1min	
4、补齐	72 $^{\circ}$ C	7min	

[0084] 扩增得到PAnU61-gRNAORF和PAnU62-gRNAORF,其中,上述扩增引物和得到的序列分别为:

[0085] F-gRNA:5'-agtgggatctcaagaactacgtttta-3';

[0086] R-gRNA:5'-ctgtctcggctgaggtcttaagcagctctatatacagtgacgtat-3';

[0087] PAnU61-gRNAORF核苷酸序列:

[0088]

ccacgggctccgaagatctcaggcctttgagcaaggaggaagcggagagattatacaggagagaatggaggaggaa

tacgcgaagcgggaggagggtgcttaattggggttctttgatctaaaaataacctctacggagtattgtgtatataat
atatcagattgacctgcacaaccatcatgaaccggaaggaaataactaattgctctgatcgaccaagtaacataaac
gtgcccttctgtagtgatgccactccctgggggggaaaaaaaggctaagtgaagcattatataaaaaacaaggga
gccaacagegcgattegaacecggcacctcctcgacggcgtatattgcacgagacacttctaccttcatatgaagcc
tgtaaaagttacaaaaaaaaactggtagcttctctttgattgagcgtgtcatccttagtgcaggggcatgctaactt
tctctgtatcgtttcaaattgaccaaattgcccgaaggcaagtgggatctcaagaactacgttttagagctagaaata
gcaagttaaaaaaggctagtcctgtatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctttttttttgagcatttat
cagcttgatatagaggttagaatgtatggaggtgcagaaatggctattttgttattggagcgggttcgaaacggaggg
caggagacttttctaaatacgtcacgtgatatagagctgct;

[0089] PAnU62-gRNAORF核苷酸序列:

[0090]

acaaaatgcaggaacctgggctatggtaatctatagcggatactaggaagccacaccccccaagagtgatagccctgg
aatcttaatgggacgttctctgctggcattactacgatcctgaagttgaaataaggagtatggcttattgtatcctt
tctttctgaccgcacatcccttagaccaactatttgcactcgaagggaaaattccatcgagcccccttgaatgaagtc
accctcattatacgtgtgtatatacaacccccattaaagagtagtaatcgagctaaaccctttttaatcgccct
aaacattactcaaaaaccggatgacccttaatacaccgtagtgctgctagccaactgccccataaccaataaga
aagaaaaagaaaaagaccatctcagccgcgattcgaacccccgcctctacaaaccacaccgattggctcaaaaa
caacaaacctctcaaatgaagctgtaaaagttgaaaaagtgggatctcaagaactacgttttagagctagaaata
gcaagttaaaaaaggctagtcctgtatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctttttttttgagcatttat
cagcttgatatagaggttagaatgtatggaggtgcagaaatggctattttgttattggagcgggttcgaaacggaggg
caggagacttttctaaatacgtcacgtgatatagagctgct.

[0091] 将PFC载体用PacI/BbvCI双酶切得到线性化的载体。再将上述得到的gRNAORF与线性化的载体用NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit(具体操作方法见NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit的说明书)进行组装(见图3),产物转化大肠杆菌mech1T1(购自takara公司)感受态,37°C培养10h以后挑取转化子于液体LB+Amp(终浓度100μg/ml)培养基,37°C、200rpm培养8h以上,做菌液PCR,筛选出阳性转化子。菌液PCR筛选到的阳性转化子分别挑取2~3个送去测序公司测序。拿到测序结果后与模板序列做比对,挑选测序完全正确的转化子,接种100mL液体LB+Amp(终浓度100μg/ml)培养基培养,大提质粒,得到PFC-AnU61质粒和PFC-AnU62质粒。

[0092] 4、PFC-AnU61和PFC-AnU62质粒在黑曲霉中的转化

[0093] 按照(Gomi K,Iimura Y,Hara S.Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene [J]. *Agricultural and biological chemistry*,1987,51(9):2549-2555.)中提供的步骤制备宿主菌黑曲霉CBS513.88 Δ pyrG的原生质体,将上述得到的得到PFC-AnU61质粒和PFC-AnU62质粒分别转化入原生质体中,涂布高渗CD培养基,放入30°C培养箱,3~4d后观察转化子生长情况(见图4),可以看到有白色孢子的转化子长出。

[0094] 5、黑曲霉转化子表型、基因型的筛选

[0095] 待上述转化子长出孢子以后,统计转化板长出的总孢子数量与其中白色孢子的数量。将白色孢子挑取至单独的CD固态平板,3d后小板的孢子长出,结果如图5所示,将图5中

的9个平板编号,为1~9号,其中1号和2号是PFC-AnU61转化子;3、4、6、7、8、9号是PFC-AnU62转化子;5号为野生型对照,野生型是未转化Cas9表达框的菌。将转化子孢子挑至液体DPY培养基,30℃200rpm培养1d后生长为菌丝球,用组织研磨器研磨提取基因组。

[0096] 设计扩增突变目的片段的引物,目的片段设计为900bp左右。以上述转化子的基因组为模板,用扩增突变目的片段的引物扩增目的片段(见图7),其中:

[0097] 扩增突变目的片段的引物(5'-3')

[0098]

fwnA detect-F	CTTTCGTCTCAGCCCTGTTCG
fwnA detect-R	CGTGGTCAGCCGTCTTCTTCC

[0099] 将扩增得到的PCR产物用凝胶电泳初步观察目的位点变化情况,结果如图6所示,图中,泳道1~9对应上述1~9号平板,泳道1~4、6~9为转化子;泳道5为野生型对照,可以看出扩增出的目的片段大小与野生型对照之间有细小的差别。

[0100] 将上述得到的PCR产物送往测序公司,得到测序结果以后,与目的位点原始序列做比对,检测目的位点突变情况,其对比结果如图7所示,图7中第1行为模板序列,第2行为PFC-AnU61的2号转化子,第3~6行分别为PFC-AnU62的4、6、8、9号转化子,可以看到图中的转化子的目的位点均发生了变化。

[0101] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 华南理工大学

<120> 一种具有启动子功能的DNA片段及其应用

<130> 1

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 501

<212> DNA

<213> 黑曲霉CBS513.88

<400> 1

ccacgggctc cgaagatctc aggcctttga gcaaggagga agcggagaga ttatacgagg 60
 agagaatgga ggaggaatac gcgaagcggg agggaggtgc ttaattgggg ttctttgatc 120
 taaaaataac ctctacggag tattgtgtat atatatatca gattgacctg cacaaccatc 180
 atgaaccgga aggaaatact aattgetctg atcgaccaag taaacataaa cgtgcctttc 240
 gtagtggatg ccaactccctg gggggaaaaa aaaggctaag tgaagcatta tatataaaaa 300
 acaagggagc caacagcgcg attcgaacc ggcacctcct cgacggcgta tattgcacga 360
 gacacttcta cttcatatg aagcctgtaa aagttacaaa aaaaactggg agcttctctt 420
 tgattgagcg tgcacatcctt agtgcagggg ccatgctaata cttctctgta tcgtttcaaa 480
 ttgaccaaata gcccgaggc a 501

<210> 2

<211> 501

<212> DNA

<213> 黑曲霉CBS513.88

<400> 2

acaaaatgca ggaacctggg ctatggtaat ctatagcgga tactaggaag ccacaccccc 60
 aagagtgata gccctggaat cttaatggga cgttcctgtc ggtcattact acgacacctga 120
 agttgaaata aggagtatgg cttattgtat cttttcttc tgaccgcaca tcccttagac 180
 caactatttg catctgaagg gaaaattcca tcgagccct tgaatgaagt caccctcat 240
 tatacgtgtg tatatcaciaa cccccattaa agagtagtaa tcgagctaaa ccccttttta 300
 atcgccctaa acattactca aaaaccggat gaccctaat atcacccgta gtgctgctag 360
 ccaactgccc ccataaccaa taagaaagaa aaagaaaaag accatctcag ccgcgattcg 420
 aacccccgcc ctctacaaac cacaccgat tggctctcaa aacaacaaac ctctcaaatg 480
 aagtctgtaa aagttgcaaa a 501

<210> 3

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> F-PAnU6-1

<400> 3

gtttccgctg agggtttaat ccacgggctc cgaagatctc ag 42

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> R-PAnU6-1

<400> 4

gtagttcttg agatcccact tgccttcggg catttggtca attt 44

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> F-PAnU6-2

<400> 5

gtttccgctg agggtttaat acaaaatgca ggaacctggg ctat 44

<210> 6

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> R-PAnU6-2

<400> 6

gtagttcttg agatcccact ttttgcaact tttacagact tcatttga 48

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> F-gRNA

<400> 7

agtgggatct caagaactac gtttta 26

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> R-gRNA

<400> 8

ctgtctcggc tgaggctcta agcagctcta taccacgtga cgtat 45

<210> 9

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PAnU61-gRNAORF

<400> 9

ccacgggctc cgaagatctc aggcctttga gcaaggagga agcggagaga ttatacgagg 60
 agagaatgga ggaggaatac gcgaagcggg agggaggtgc ttaattgggg ttctttgatc 120
 taaaaataac ctctacggag tattgtgtat atatatatca gattgacctg cacaaccatc 180
 atgaaccgga aggaaatact aattgctctg atcgaccaag taaacataaa cgtgcctttc 240
 gtagtggatg ccaactccctg gggggaaaaa aaaggctaag tgaagcatta tatataaaaa 300
 acaaggggagc caacagcgcg attcgaacc ggcacctcct cgacggcgta tattgcacga 360
 gacacttcta cttcatatg aagcctgtaa aagttacaaa aaaaactggt agcttctctt 420
 tgattgagcg tgcacacctt agtgcagggg ccatgctaata cttctctgta tcgtttcaaa 480
 ttgaccaaata gcccgaagc aagtgggatc tcaagaacta cgttttagag ctagaataag 540
 caagttaaaa taaggctagt ccgttatcaa cttgaaaaag tggcaccgag tcggtgcttt 600
 ttttttgagc atttatcagc ttgatataga ggtaggaatg tatggaggtg cagaatggct 660
 attttgttat tggagcgggt tcgaaacgga gggcaggaga ctttttctaa atacgtcacg 720
 tgatatagag ctgct 735

<210> 10

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PAnU62-gRNAORF

<400> 10

acaaaatgca ggaacctggg ctatggtaat ctatagcgga tactaggaag ccacaccccc 60
 aagagtgata gccctggaat cttaatggga cgttctgtc ggctcattact acgatcctga 120
 agttgaaata aggagtatgg cttattgtat cttttcttc tgaccgcaca tcccttagac 180
 caactatttg catctgaagg gaaaattcca tcgagccct tgaatgaagt caccctcat 240
 tatacgtgtg tatatcacia cccccattaa agagtagtaa tcgagctaaa ccccttttta 300
 atcgcctcaa acattactca aaaaccggat gaccctaat atcaccgta gtgctgctag 360
 ccaactgccc ccataaccaa taagaaagaa aaagaaaaag accatctcag ccgcgattcg 420

aacccccgcc ctctacaaac cacacccgat tggctcmeta aacaacaaac ctctcaaag 480
aagtctgtaa aagttgcaa aagtgggatc tcaagaacta cgtttagag ctagaatag 540
caagttaaaa taaggctagt ccgttatcaa ctgaaaaag tggcaccgag tcggtgcttt 600
ttttttgagc atttatcagc ttgatataga ggtagaatg tatggaggtg cagaatggct 660
atthttgttat tggagcgggt tcgaaacgga gggcaggaga cthtttctaa atacgtcacg 720
tgatatagag ctgct 735

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cas9 up-F

<400> 11

gacaaattaa aaggcggcaa ac 22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cas9 up-R

<400> 12

tcagaattat cggggttcag gt 22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cas9 down-F

<400> 13

ctgggctcta tgaaaccgt at 22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cas9 down-R

<400> 14

tcacatcagc agagacggta ac 22

<210> 15

<211> 20
<212> DNA
<213> 黑曲霉CBS513.88
<400> 15
agtgggatct caagaactac 20
<210> 16
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> sgRNA
<400> 16
gttttagagc tagaaatage aagttaaata aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt 60
ggcaccgagt cgggtgc 76
<210> 17
<211> 138
<212> DNA
<213> 米曲霉RIB40
<400> 17
tttttttttg agcatttata agcttgatat agaggttaga atgtatggag gtcagaatg 60
gctattttgt tattggagcg ggttcgaaac ggagggcagg agacttttcc taaatagctc 120
acgtgatata gagctgct 138
<210> 18
<211> 234
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> gRNAscaffold
<400> 18
agtgggatct caagaactac gtttagagc tagaaatage aagttaaata aaggctagtc 60
cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cgggtgcttt ttttgagca tttatcagct 120
tgatatagag gtaggaatgt atggaggtgc agaatggcta tttgttatt ggagcggggt 180
cgaaacggag ggcaggagac tttttctaaa tacgtcacgt gatatagagc tgct 234
<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> F-pyrG-up

<400> 19
gatatcacgc acgtgtccgc tgtttg 26
<210> 20
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> R-pyrG-up
<400> 20
acttcgatcc tccttccttg gtgttgatgg agggg 35
<210> 21
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> F-pyrG-down
<400> 21
ccctcatca acaccaagga ggatcgaagt tctgatg 37
<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> R-pyrG-down
<400> 22
gatatcatag aggcgccagc tctttc 26
<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> F-pyrG
<400> 23
cttctacttg cttgcacagg gage 24
<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> R-pyrG
<400> 24
ggcccacttg gaatgtcttg g 21
<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> fwnA detect -F
<400> 25
ctttcgtctc agccctgttc g 21
<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> fwnA detect -R
<400> 26
cgtggtcage cgtcttcttc c 21

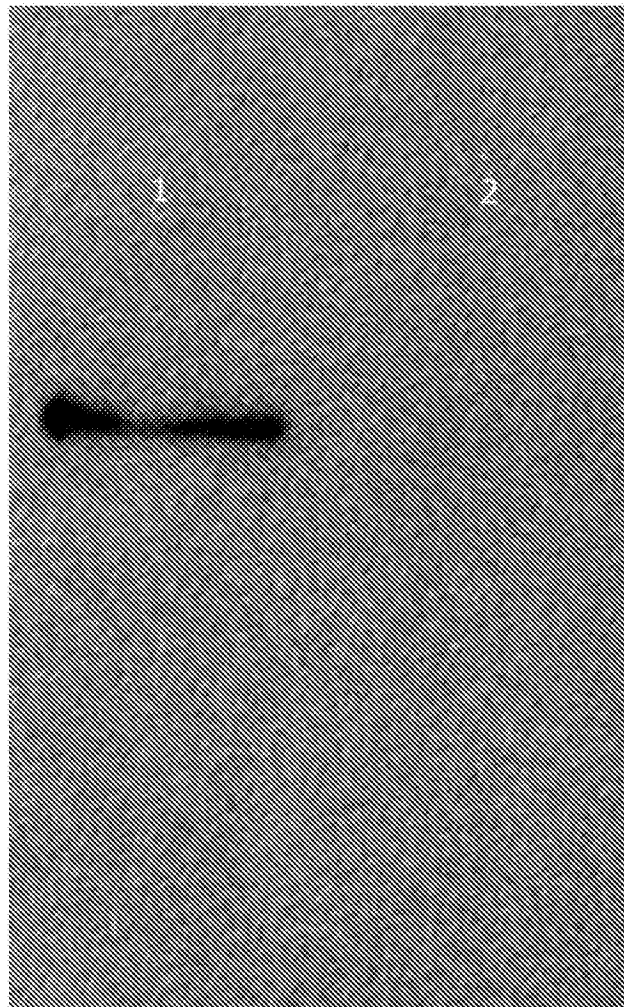


图1

对照U6-2	AAAACCTGTTAGCTTCTCTTGAATGAGCGTGTCACTCTTCTTCAGCGGCGCATGCTAAKCTTCCTGATCGCTTTCAGATGACCAATGCTCGAAGC
对照U6-3	AAAACCTGTTAGCTTCTCTTGAATGAGCGTGTCACTCTTCTTCAGCGGCGCATGCTAAKCTTCCTGATCGCTTTCAGATGACCAATGCTCGAAGC
对照U6-1	AAAACCTGTTAGCTTCTCTTGAATGAGCGTGTCACTCTTCTTCAGCGGCGCATGCTAAKCTTCCTGATCGCTTTCAGATGACCAATGCTCGAAGC
对照U6-2	AAAACCTGTTAGCTTCTCTTGAATGAGCGTGTCACTCTTCTTCAGCGGCGCATGCTAAKCTTCCTGATCGCTTTCAGATGACCAATGCTCGAAGC
病毒	AAAAACCTGTTAGCTTCTCTTGAATGAGCGTGTCACTCTTCTTCAGCGGCGCATGCTAAKCTTCCTGATCGCTTTCAGATGACCAATGCTCGAAGC

图2

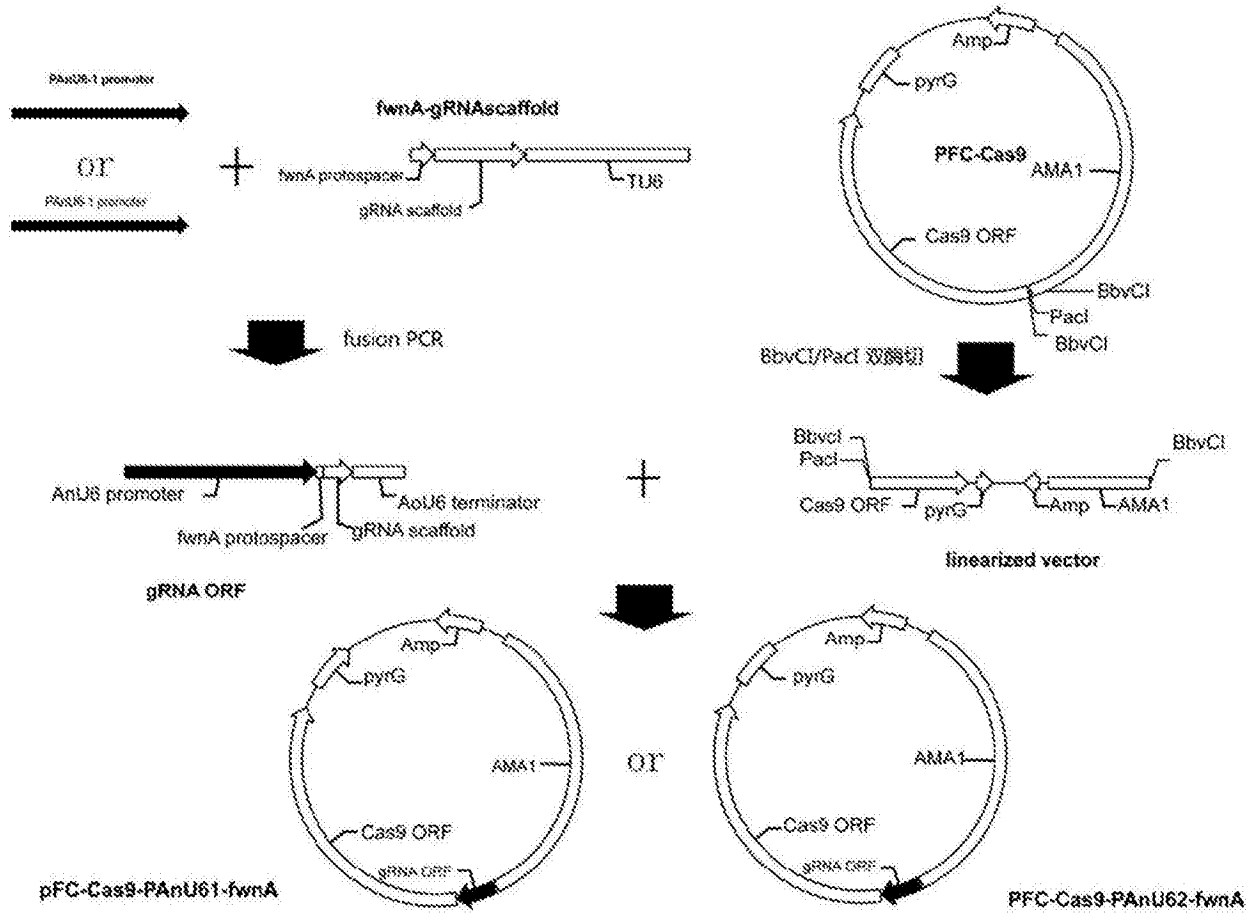


图3

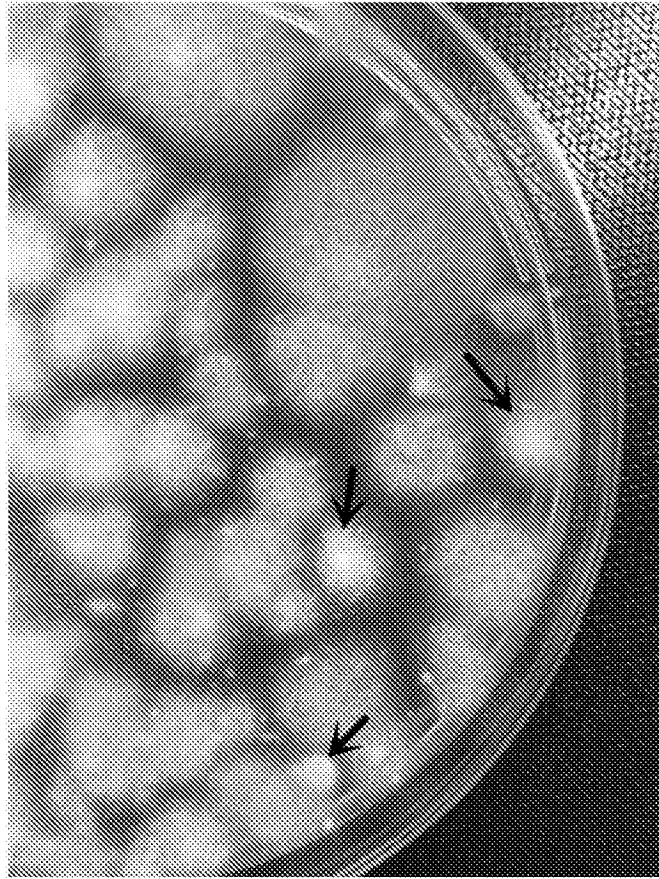


图4

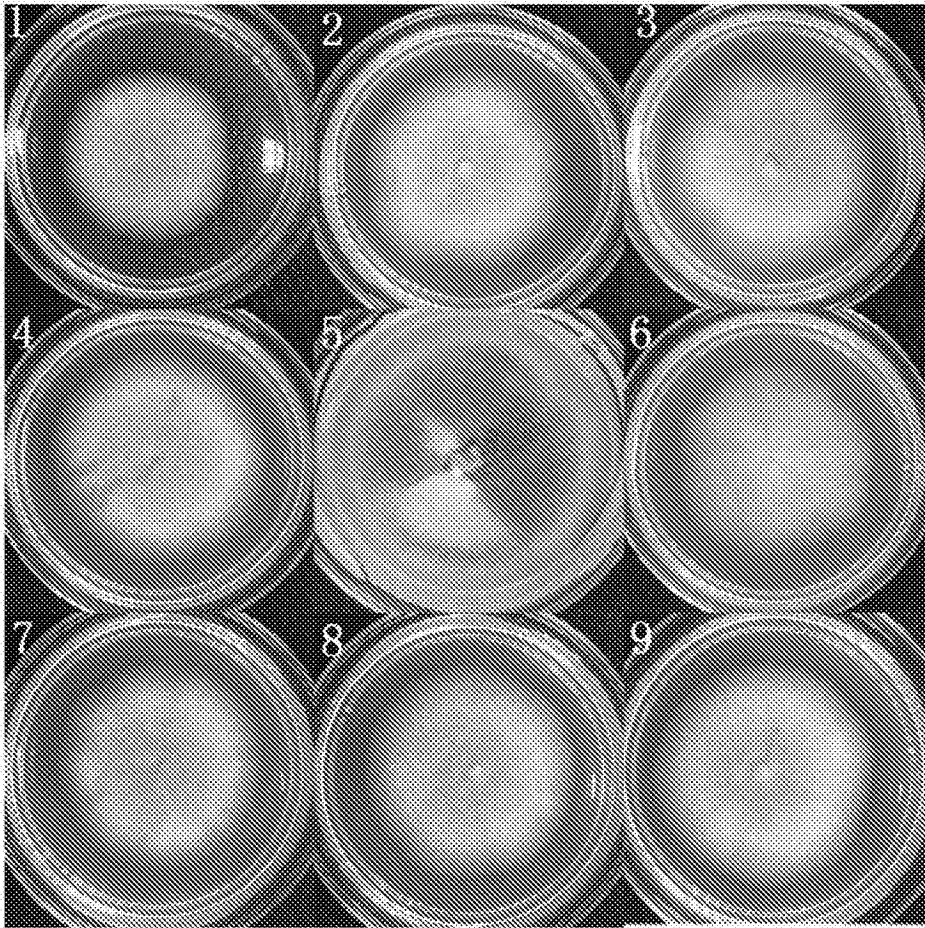


图5

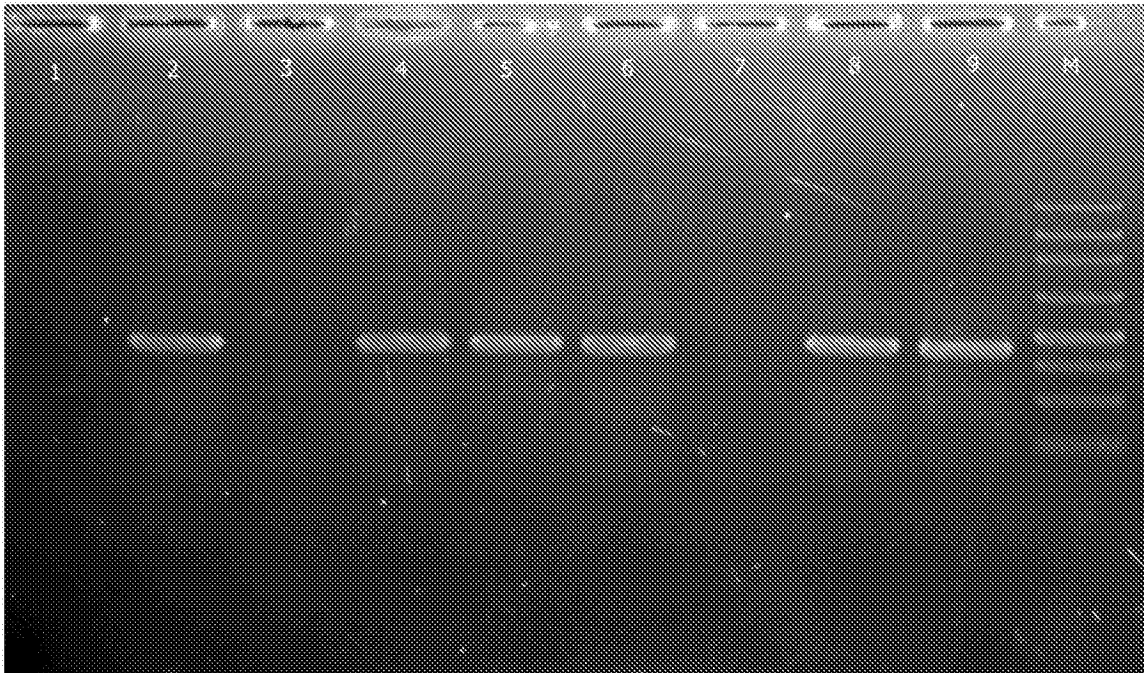


图6

```
模板  CTCAGGTCCCTCCGCGCTCCAGCCTACAAGTGGTCAATCAAGAAC.TACTGGATTCCCTATACCAACAACCTTCTGCCTGAGCAAG
2    CTCAGGTCCCTCCGCGCTCCAGCCTACAAGTGGTCAATCAAGAACCTACTGGATTCCCTATACCAACAACCTTCTGCCTGAGCAAG
4    CTCAGGTCCCTCCGCGCTCCAGCCTACAAGTGGTCAATCAAGAACCTACTGGATTCCCTATACCAACAACCTTCTGCCTGAGCAAG
6    CTCAGGTCCCTCCGCGCTCCAGCCTACAAGTAC.....TGGATTCCCTATACCAACAACCTTCTGCCTGAGCAAG
8    CTCAGGTCCCTCCGCGCTCCAGCCTACAAGTGGTCAATCAAGAAC.....ATTCCCTATACCAACAACCTTCTGCCTGAGCAAG
9    CTCAGGTCCCTCCGCGCTCCAGCCTACAAGTGGT.....ATTCCCTATACCAACAACCTTCTGCCTGAGCAAG
同源  CTCAGGTCCCTCCGCGCTCCAGCCTACAAGT.....ATTCCCTATACCAACAACCTTCTGCCTGAGCAAG
```

图7