

· 综述 ·

谷氨酸棒杆菌基因编辑的研究进展

杨娟娟, 马晓雨, 王晓蕊, 张朝晖, 王珊, 秦慧民, 毛淑红, 路福平

天津科技大学 生物工程学院, 天津 300451

杨娟娟, 马晓雨, 王晓蕊, 等. 谷氨酸棒杆菌基因编辑的研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(5): 820–828.

Yang JJ, Ma XY, Wang XR, et al. Advances in gene editing of *Corynebacterium glutamate*. Chin J Biotech, 2020, 36(5): 820–828.

摘要: 谷氨酸棒杆菌是生产氨基酸、有机酸等的重要菌株, 广泛应用于食品、医药领域。利用基因编辑技术对谷氨酸棒杆菌进行基因功能研究, 在提高目的产物产量、发现新的基因功能等方面有重要意义。近年来, 基因编辑技术发展日新月异, 从基于同源重组的传统基因编辑技术到以人工核酸酶介导的基因编辑均在谷氨酸棒杆菌中得到合理应用。其中, CRISPR 技术以其快速、简便、编辑效率高等优点成为现阶段研究者用于改造谷氨酸棒杆菌的主要技术, 但是更为简单、高效的编辑手段依旧需要进一步研究开发, 以获得优良菌株应用于工业生产中。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, 基因编辑, 同源重组, CRISPR

Advances in gene editing of *Corynebacterium glutamate*

Juanjuan Yang, Xiaoyu Ma, Xiaorui Wang, Zhaohui Zhang, Shan Wang, Huimin Qin, Shuhong Mao, and Fuping Lu

School of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300451, China

Abstract: *Corynebacterium glutamicum*, an important microorganism to produce amino acids and organic acids, has been widely applied in food and medicine fields. Therefore, using editing tools to study the function of unknown genes in *C. glutamicum* has great significance for systematic development of industrial strain with efficient and novel production capability. Recently, gene editing has been greatly developed. Traditional gene editing based on homologous recombination and gene editing mediated by nuclease are successfully applied in *C. glutamicum*. Among these, the CRISPR system has been developed to be a main tool used for gene knockout of *C. glutamicum* due to its advantages of efficiency, simplicity and good target specificity. However, more efficient and reliable knockout system is still urgently demanded, to help develop high-performing strains in industrial application.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, gene editing, homologous recombination, CRISPR

Received: September 5, 2019; **Accepted:** December 18, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21878233), Natural Science Foundation of Tianjin (No. 18JCYBJC91400).

Corresponding author: Shuhong Mao. Tel: +86-22-60206949; E-mail: shuhongmao@tust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21878233), 天津市自然科学基金 (No. 18JCYBJC91400) 资助。

网络出版时间: 2020-01-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200106.0934.005.html>

谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 是从土壤中分离到的一种非致病性的兼性厌氧菌,是革兰氏阳性菌^[1]。自 Kinoshita 等^[2]在 20 世纪 50 年代研究发现谷氨酸棒状杆菌可以高产谷氨酸之后,利用复杂繁琐的化学合成法合成谷氨酸的技术逐渐被淘汰,新的微生物发酵生产技术成为氨基酸生产的主要技术,由此开启了谷氨酸工业生产的新纪元。除谷氨酸外,谷氨酸棒状杆菌还被用于赖氨酸、异亮氨酸和维生素 D 等的生产^[3-6],在食品、医药、农业等领域得到了广泛应用。随着分子生物学技术的发展,谷氨酸棒状杆菌在基因工程改造方面的研究逐渐深入。Ozaki 等于 1984 年首次从谷氨酸棒状杆菌中分离得到质粒 DNA 并进行基因操作^[7]。基于这些质粒,研究人员构建了大肠杆菌-谷氨酸棒状杆菌穿梭载体,并建立了高效的 DNA 转化技术。从此,谷氨酸棒状杆菌中的基因操作技术得以开发,并成功地用于基因功能的分析及生产菌株的构建^[8]。目前,已经对 53 株谷氨酸棒状杆菌进行了基因组测序,如谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032^[9]、谷氨酸棒状杆菌 S9114^[10]、谷氨酸棒状杆菌 ATCC14067^[11]等,为深入了解谷氨酸棒状杆菌的代谢机制、发掘其更多生产功能提供了依据。

基因编辑技术是对生物体内源基因进行 DNA 的插入、删除、修改或替换^[12]。传统的基因编辑技术主要是以同源重组为基础进行基因组的定向修饰,随着基因工程技术的不断发展,基于核酸酶的基因编辑技术得以开发利用,其原理是通过核酸酶特异性地识别并切割靶 DNA 双链,激发细胞内源性的修复机制,从而实现基因定向改造^[13-14]。本文主要是对谷氨酸棒状杆菌现有报道的基因编辑技术进行汇总、比较,以期对谷氨酸棒状杆菌基因编辑的研究提供参考。

1 传统基因编辑技术

传统基因编辑技术主要依赖于同源重组,将含有目的基因同源序列的外源基因导入宿主菌,然后通过核酸链间等位替换的方式对目的基因进行突

变、缺失或插入^[15],主要包括自杀质粒介导的同源重组、Cre/loxP 介导的位点特异性重组、RecT 介导的单链重组等多种方式,在谷氨酸棒状杆菌中均有报道。

1.1 自杀质粒介导的同源重组

自杀质粒,也称非复制型质粒,其携带的复制元件可以在大肠杆菌中正常作用,但在待改造菌株中无法正常发挥其功能^[16]。自杀质粒介导的同源重组又分为一次交换重组和双交换重组两种方式。一次交换重组主要是通过引入抗性标记的方法使外源基因插入宿主菌的基因组中,从而使目的基因失活。但是,抗性基因的引入可能造成极性效应,影响菌体的生长或其他功能性基因的表达。为了克服这一缺陷,双交换重组得到了应用,即在一次交换重组的基础上再进行一次等位替换,丢掉基因编辑过程中不必要的外源部分(图 1^[17])。在谷氨酸棒状杆菌中,依赖于双交换重组的基因敲除系统主要是通过含有反向筛选标记的自杀性质粒来实现的,其中最常用的反向筛选标记为蔗糖致死基因 *sacB* 基因。早在 1994 年, Schäfer 等^[18]便将源于大肠杆菌的 pK 系列质粒如 pK18、pK19 与 RP4 质粒的转移机制相结合,再将来源于枯草芽孢杆菌的 *sacB* 基因扩增到具有转移性质的 pK 系列质粒中,基于同源重组的原理对谷氨酸棒状杆菌的基因组进行改造,敲除了其基因组上的 *thrB* 基因。在此基础上, Tan 等^[17]对 *sacB* 基因的启动子进行了更换、筛选,其中包括启动子 *PsacB*、*Pneo*、*PlacM* 以及 *PF104*,实验结果显示启动子 *PlacM* 在谷氨酸棒状杆菌中的使用效果最好。随着研究的深入,一些新的反向筛选标记也逐渐被开发利用。2011 年, Kim 等^[19]将链霉素抗性基因 *rpsL* 作为谷氨酸棒状杆菌基因编辑过程的反向筛选标记,提高了谷氨酸棒状杆菌的编辑效率;2014 年, Ma 等^[20]开发了 *upp* 基因作为反向筛选标记,并结合 I-Sce I 介导的重组系统,实现了突变体的高效筛选。此外,与自杀质粒具有相同作用的条件复制型质粒也经常出现在谷氨酸棒状杆菌的基因编辑过程中。目前在谷氨酸棒

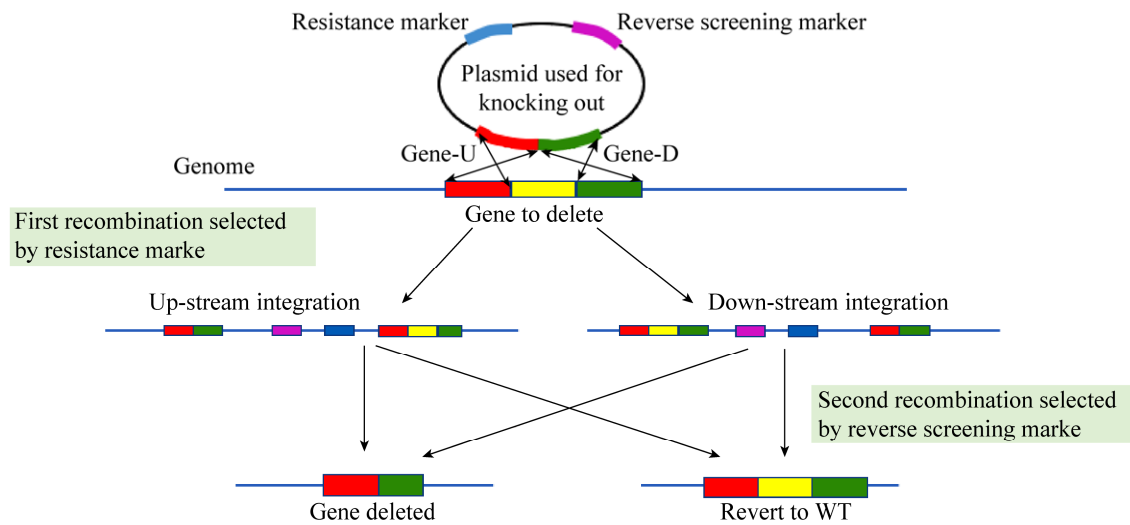


图1 由自杀质粒介导的基因敲除的双交换重组机制^[17]

Fig. 1 The double-exchange integration mechanism of gene knockout mediated by suicide plasmid^[17].

状杆菌中有报道的主要是温度敏感型质粒,其在不同温度条件下,质粒拷贝数不同^[21]。在谷氨酸棒状杆菌的基因敲除过程中,经常使用含有温敏型复制子的质粒有 pBS5T^[22]和 pSFKT2^[23]。Chinen 等^[22]利用质粒 pBS5T 对谷氨酸棒状杆菌的 *pfk* 基因和 *aceE* 基因进行了敲除。随着基因工程的发展,已经有研究尝试含有将 *sacB* 负筛选标记的自杀质粒与温度敏感型复制子相结合,来提高谷氨酸棒状杆菌基因敲除过程的筛选效率^[23]。

1.2 Cre/loxP 介导的位点特异性重组

随着基因编辑技术的发展,为了进一步提高基因编辑过程中的重组效率,研究者在同源序列的两端加入两个能被序列特异性重组酶识别的位点,使得重组酶能够识别这两个位点并进行重组。在谷氨酸棒状杆菌中,基于 Cre/loxP 特异位点重组技术的基因敲除体系已经得到发展^[24-27]。Cre/loxP 重组系统是由 Cre 重组酶和其所识别的两个 loxP 位点共同组成,当两个 loxP 位点方向相同且位于同一条 DNA 链上,Cre 酶介导两个 loxP 位点完成分子内重组,使 loxP 位点间的序列被剪切,并留下 1 个 loxP 位点。根据两个 loxP 位点之间序列及位置的不同,Cre 酶能够实现两个 loxP 位点间的序

列倒位或者丢失。通过自杀质粒在基因组中导入 loxP 位点,再利用 Cre 切除 loxP 位点中序列的方式实现目的基因的敲除^[25,28-30]。2005 年, Nobuakis 等^[25]便采用 Cre/loxP 将谷氨酸棒状杆菌中 250 bp 的片段成功敲除。随着谷氨酸棒状杆菌基因敲除技术研究的深入, Hu 等^[31]还将自杀性质粒介导的同源重组与 Cre/loxP 技术结合,开发了 pDTW109 基因敲除系统。其在 pDTW-201 和 pDTW-202 质粒中都存在连接有 loxp、loxPLE 和 loxpRE 重组位点的 kan 盒; pDTW109 包含有重组酶 Cre,通过连接目的基因上下游同源臂和带有 loxP 位点的 kan 盒实现目的基因的敲除,最终在 Cre 作用下通过基因重组去除 loxP 位点中的 kan 盒,提高了谷氨酸棒状杆菌基因敲除的筛选效率。

1.3 RecT 介导的单链重组

RecT 单链重组不依赖于菌体本身的 RecA 重组系统,而是依赖于来自原噬菌体 Rac 中的 recT 基因编码的 RecT 重组系统。相较于菌株本身的重组系统,该系统操作更为简单,且不受 DNA 序列及长度的影响。

1998 年 A. Francis Stewart 课题组^[32]通过突变大肠杆菌 *recBCsbcA* 菌株中的 *sbcA* 基因,激活了

已经整合在基因组上的来源于原噬菌体 *Rac* 的 *RecT* 重组系统, 并成功实现了目的基因的编辑, 从此 *RecT* 介导的基因编辑系统得以建立。此后, *RecT* 介导的基因编辑系统在沙门氏菌^[33]、分枝杆菌^[34]、枯草芽孢杆菌^[35]等多种微生物中都得到应用。谷氨酸棒杆菌作为一种重要的工业生产菌株, *RecT* 介导的单链重组系统由于其操作简单、筛选效率高的优势也逐渐得到应用, 并不断优化。2013年, Binder 等^[36]受其他微生物研究过程中重组系统的启发, 首次构建了谷氨酸棒杆菌的 *RecT* 重组体系, 并将其与纳米传感器技术相结合, 实现了基于荧光激发的单细胞水平检测, 提高了突变体的分离效率。

2 CRISPR 技术

CRISPR (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats), 即成簇的、有规律的、间隔短回文重复序列, 是广泛存在于细菌和古菌中的特异性保护机制, 用来抵御病毒、外源 DNA 等的入侵^[37-40]。现阶段基于 CRISPR 的基因工程改造技术主要分为 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 调控目的基因表达^[41]和 CRISPR/Cas9 蛋白^[42]介导的基因敲除、插入, 以及 CRISPR 介导的碱基编辑 3 个方面。其中, CRISPRi^[43]调控系统是将 CRISPR 基因编辑体系中具有核酸内切酶活性的 Cas9 蛋白替换为失去核酸内切酶活性的 dCas9 蛋白, 然后在导向 RNA (Guide RNA, gRNA) 的引导下与目的基因序列结合, 产生空间位阻效应, 从而干扰靶基因的转录。Cleto 等^[44]首次将 CRISPRi 应用于谷氨酸棒杆菌中, 有效干扰了 *pgi*、*pck* 和 *pyk* 的转录。此后 CRISPR/Cas9 蛋白介导的基因敲除、插入, 以及 CRISPR 介导的碱基编辑在谷氨酸棒杆菌中的研究不断深入。

2.1 基于双链断裂的 CRISPR 技术

CRISPR/Cas 介导的基因编辑系统中研究最为成熟的是 CRISPR/Cas9 系统^[45], 其最早被发现于酿脓链球菌, 该系统结构简单, 作用快速, 被广泛

用于动、植物以及微生物的基因功能研究^[46-47]。Martin 等于 2012 年报道了 CRISPR/Cas9 系统的结构, 其仅包括一个 Cas9 蛋白以及 crRNA 和 tracrRNA 两个非编码的 RNA, 当有外源 DNA 进入细胞后, 菌体自身的 RNase III 催化 crRNA 成熟, 然后与 tracrRNA 结合形成双链, 从而引导 Cas9 蛋白与靶序列结合, 并对双链 DNA 进行剪切, 形成双链断裂 (Double strand breaks, DSB), 再通过非同源修复与同源修复两种机制来实现基因编辑, 且成功实现了体外 20 bp 重复间隔序列区域双链的靶位点特异性切割^[48] (图 2^[49])。此外, 为了简化操作流程, 研究者还将 crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA (*trans*-acting CRISPR RNA) 两个非编码的 RNA 合二为一, 除去中间不必要的区域, 最终得到一段长为 102 nt 的 RNA 序列, 称其为导向 RNA, 实验证明仅含有 Cas9 和 gRNA 的组合就可以实现对 DNA 的靶向切割^[48]。该系统因其作用周期短、筛选容易等^[50]优点已经被应用于谷氨酸棒状杆菌。Liu 等^[51]成功构建了 CRISPR/Cas9 盒, 通过 Cas9 和 gRNA 表达质粒的共转化实现了谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 和 ATCC 13869 基因的敲除、插入 (编辑效率分别为 60% 和 62.5%)。此外, 研究者还将 ssDNA 重组技术与构建完成的 CRISPR/Cas 盒结合, 将对谷氨酸基因组小片段的修饰和单碱基突变效率提高到 80%, 并且在谷氨酸棒杆菌中实现了双位点编辑。Peng 等^[52]构建了 CRISPR/Cas9 的双质粒系统, 提供同源修复模板后, 对 *C. glutamicum* ATCC 13032 和 *C. glutamicum* CGMCC1.15647 中 *porb* 基因的敲除效率接近 100%。Cho 等^[53]选择含有温敏型复制子 pBL1 的质粒 pEKEEx1 作为携带 Cas9 基因的载体, 在 Cas9 基因发挥其切割作用之后通过调节培养温度, 使载体从菌株中丢失, 以防其对菌体的生长产生影响; 此外, 由于谷氨酸棒状杆菌中缺乏非同源末端修复机制, 产生的 DSB 只能通过同源修复机制进行修复, 为了提高其同源修复效率, 研究者将含有表达重组酶的 *recT* 基因的质粒同时转入谷氨酸棒状杆

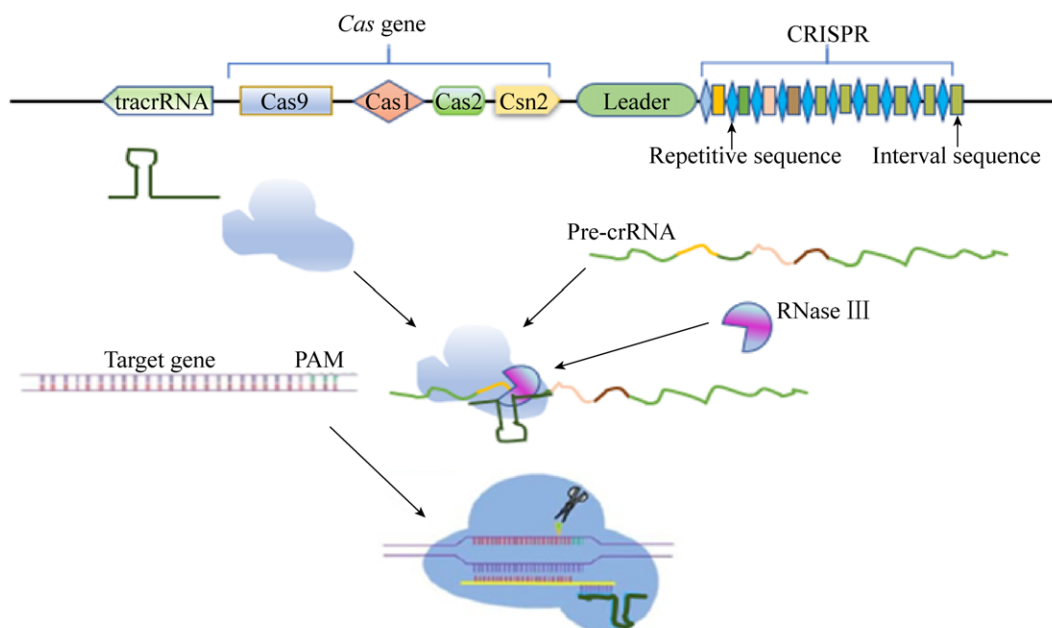


图 2 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑^[49]

Fig. 2 Gene editing mediated by CRISPR/Cas9^[49].

菌中，大大提高了谷氨酸棒状杆菌的单链重组效率^[53-54]。而且，有研究者认为 *cas9* 基因在质粒上的表达具有不稳定性，且对谷氨酸棒状杆菌进行双质粒的共转化时需要较高的转化效率，所以将 *cas9* 基因整合到基因组 DNA 上，构建了含有 gRNA 和同源修复模板的单质粒体系^[54]。随着研究的进一步深入，关于 CRISPR/Cas9 系统在谷氨酸棒状杆菌的应用体系不断在更新、优化，Coates 等^[55]研究表明，并不是所有类型的复制子都能将 CRISPR/Cas 体系成功引入谷氨酸棒状杆菌，例如含有 BL1、NG2 或 CC1 复制源的质粒并不能在谷氨酸棒状杆菌 NRRL-B11474 中进行有效转化，且与含有 CG1 复制源的质粒相比，携带有 CASE1 复制子类型的质粒在将 gRNA 以及 Cas9 蛋白基因转入谷氨酸棒状杆菌 NRRL-B11474 时具有更高的转化效率，从而获得更高的基因编辑效率。但是也有很大一部分研究者认为来自于酿脓链球菌 *Streptococcus pyogenes* 的 CRISPR/Cas 蛋白在谷氨酸棒状杆菌中的使用效果并不理想^[56]，Jiang 等^[57]开发了一种基于新弗朗西斯菌 *Francisella novicida*

CRISPR-Cpf1 的基因编辑系统，该系统通过 RecT 单链重组机制将谷氨酸棒状杆菌引入小片段的突变效率提高到 100%，但敲除效率还有待提高。

2.2 CRISPR 碱基编辑

对于缺乏非同源末端修复 (Non-homologous end joining, NHEJ) 的菌株，为了克服基因编辑过程中双链断裂产生致死效应^[58]，研究者对 CRISPR 编辑系统不断进行优化，除了在构建敲除体系时加入同源臂以外，一种更为简单的编辑工具——CRISPR 碱基编辑系统得到了开发利用。CRISPR 碱基编辑，顾名思义就是通过对碱基进行修饰实现基因的突变、失活等。David R. Liu 课题组^[59]将大鼠的胞嘧啶脱氨酶 rAPOBEC1 通过 linker 序列 XTEN 与失活 CRISPR/Cas9 与进行融合，由 gRNA 引导，在不引起 DNA 双链断裂情况下，直接实现胞嘧啶 (C) 到尿嘧啶 (U) 的转变。通过 DNA 复制，进一步使得 U 被 T 代替，从而实现 C→T (或 G→A) 的转换，实现了第一代碱基编辑。Nishida 等^[60]将来自海鳗的胞嘧啶脱氨酶 AID (Activation-induced cytidine deaminase) 与 Cas9 结

合构建了 Cas9n-AID 碱基编辑器, 进一步提高了碱基编辑效率。而且, 该技术在谷氨酸棒杆菌中成功应用, 实现了谷氨酸棒杆菌的单位点、双位点以及三位点的碱基编辑, 其效率分别达到 100%、87.2% 和 23.3%, 并通过碱基突变建立了谷氨酸生产过程中相关基因的失活库, 发现谷氨酸棒杆菌 *pyk* 和 *ldhA* 基因双失活菌株可以很大程度上提高谷氨酸的产量^[61]。但是该碱基编辑系统还存在很大的优化空间, Wang 等^[62]通过突变 Cas9 蛋白, 将 Cas9 突变体用于基因编辑, 降低了前间区序列邻近基序(Protospacer adjacent motif, PAM) 序列的限制性, 扩大了碱基编辑技术的靶向范围, 而且将编辑窗口由原来的 5 bp 增加到了 7 bp, 并开发了用于设计碱基编辑介导基因失活 (gBIG) 的 gRNAs 的在线工具; 此外, 还成功应用 Cas9 与腺苷脱氨酶融合蛋白实现了对腺嘌呤碱基的编辑, 提高了碱基编辑的范围。为了实现编辑系统的更大价值, 研究者在此基础上不断对现有碱基系统进行优化^[63], 真正进入基因编辑时代指日可待。

3 谷氨酸棒杆菌基因编辑的发展趋势

在谷氨酸棒状杆菌基因工程技术发展过程中, 由传统的基因编辑技术到以人工核酸酶介导的基因编辑技术, 不断有旧的、有缺陷的编辑方法被淘汰, 新的、简单的方法得到开发应用。

同源重组介导的基因编辑体系作为最早的基因工程改造系统, 其使用范围非常广泛, 且操作简单, 对于新物种的基因功能研究仍然具有重要意义。开发新的反向筛选标记以提高同源重组介导的基因编辑效率是非常必要的。

CRISPR 系统相较于其他编辑系统来说具有操作简单、易筛选等多个优点, 被广泛应用于各种动植物、微生物等的基因编辑, 为基因功能的研究作出了巨大贡献^[63-65]。但在使用过程中发现, 该技术仍存在一些需要改进的不足之处。首先, CRISPR 碱基编辑技术的开发一定程度上提高了基因编辑的精确性, 但是, 该技术在使用过程中仍会存在一

定的脱靶效应, 已经不断有研究者对这个问题进行改进; 其次, CRISPR 系统在使用过程中存在物种特异性, 所以需要通过寻找不同来源的 Cas 蛋白来扩大其适用范围。

4 结语

谷氨酸棒状杆菌的基因编辑手段在不断地更新和完善。但是, 作为一种重要的工业生产菌株, 谷氨酸棒状杆菌的遗传体系及其代谢规律的研究并不是很深入。为了得到更多新型高效的生产菌株, 我们仍需要对基因编辑手段进行不断的改进和探索, 使所获得的优良菌株更好地应用于工业化生产。

REFERENCES

- [1] Zhao JX. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-isoleucine production[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015 (in Chinese). 赵建勋. 代谢工程改造谷氨酸棒状杆菌生产 L-异亮氨酸[D]. 无锡: 江南大学, 2015
- [2] Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J Gen Appl Microbiol, 2004, 50(6): 331-343.
- [3] Zhan ML, Kan BJ, Dong JJ, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for improved l-arginine synthesis by enhancing NADPH supply. J Ind Microbiol Biotechnol, 2019, 46(1): 45-54.
- [4] Shang XL, Chai X, Lu XM, et al. Native promoters of *Corynebacterium glutamicum* and its application in L-lysine production. Biotechnol Lett, 2018, 40(2): 383-391.
- [5] Becker J, Kuhl M, Kohlstedt M, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of *cis*, *cis*-muconic acid from lignin. Microb Cell Fact, 2018, 17: 115.
- [6] Kallscheuer N, Marienhagen J. *Corynebacterium glutamicum* as platform for the production of hydroxybenzoic acids. Microb Cell Fact, 2018, 17: 70.

- [7] Ozaki A, Katsumata R, Oka T, et al. Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. Mol General Genet MGG, 1984, 169(1): 175–178.
- [8] Ikeda M, Nakagawa S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(2/3): 99–109.
- [9] Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. J Biotechnol, 2003, 104(1/3): 5–25.
- [10] Lv YY, Wu ZH, Han SY, et al. Genome sequence of *Corynebacterium glutamicum* S9114, a strain for industrial production of glutamate. JBacteriol, 2011, 193(21): 6096–6097.
- [11] Lv YY, Liao JJ, Wu ZH, et al. Genome sequence of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, which provides insight into amino acid biosynthesis in coryneform bacteria. J Bacteriol, 2012, 194(3): 742–743.
- [12] Howden SE, Thomson JA, Little MH. Simultaneous reprogramming and gene editing of human fibroblasts. Nat Protoc, 2018, 13(5): 875–898.
- [13] Lo TW, Pickle CS, Lin S, et al. Precise and heritable genome editing in evolutionarily diverse nematodes using TALENs and CRISPR/Cas9 to engineer insertions and deletions. Genetics, 2013, 195(2): 331–348.
- [14] Chaverra-Rodriguez D, Macias VM, Hughes GL, et al. Targeted delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein into arthropod ovaries for heritable germline gene editing. Nat Commun, 2018, 9(1): 3008.
- [15] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. Ann Rev Genet, 2002, 36: 361–388.
- [16] Selvaraj G, Iyer VN. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. J Bacteriol, 1983, 156(3): 1292–1300.
- [17] Tan YZ, Xu DQ, Li Y, et al. Construction of a novel *sacB*-based system for marker-free gene deletion in *Corynebacterium glutamicum*. Plasmid, 2012, 67(1): 44–52.
- [18] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene, 1994, 145(1): 69–73.
- [19] Kim IK, Jeong WK, Lim SH, et al. The small ribosomal protein S12P gene *rpsL* as an efficient positive selection marker in allelic exchange mutation systems for *Corynebacterium glutamicum*. J Microbiol Methods, 2010, 84(1): 128–130.
- [20] Ma WW, Wang XY, Mao FY, et al. Development of a markerless gene replacement system in *Corynebacterium glutamicum* using *upp* as a counter-selection marker. Biotechnol Lett, 2015, 37(3): 609–617.
- [21] Nakamura J, Kanno S, Kimura E, et al. Temperature-sensitive cloning vector for *Corynebacterium glutamicum*. Plasmid, 2006, 56(3): 179–186.
- [22] Chinen A, Kozlov YI, Hara Y, et al. Innovative metabolic pathway design for efficient L-glutamate production by suppressing CO₂ emission. J Biosci Bioeng, 2007, 103(3): 262–269.
- [23] Okibe N, Suzuki N, Inui M, et al. Efficient markerless gene replacement in *Corynebacterium glutamicum* using a new temperature-sensitive plasmid. J Microbiol Methods, 2011, 85(2): 155–163.
- [24] Suzuki N, Nonaka H, Tsuge Y, et al. Multiple large segment deletion method for *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 69(2): 151–161.
- [25] Suzuki N, Okayama S, Nonaka H, et al. Large-scale engineering of the *Corynebacterium glutamicum* genome. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(6): 3369–3372.
- [26] Suzuki N, Nonaka HY, Tsuge Y, et al. New multiple-deletion method for the *Corynebacterium glutamicum* genome, using a mutant *lox* sequence. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(12): 8472–8480.
- [27] Zhan ML, Kan BJ, Zhang H, et al. Comparison of CRISPR-Cpf1 with Cre/*loxP* for gene knockout in *Corynebacterium glutamicum*. Microbiol China, 2019, 46(2): 278–291 (in Chinese).

- 占米林, 阚宝军, 张辉, 等. 谷氨酸棒状杆菌 CRISPR-Cpf1 和 Cre/loxP 基因敲除技术的比较. 微生物学通报, 2019, 46(2): 278–291.
- [28] Guo F, Gopaul DN, van Duyne GD. Asymmetric DNA bending in the Cre-loxP site-specific recombination synapse. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(13): 7143–7148.
- [29] Suzuki N, Tsuge Y, Inui M, et al. Cre/loxP-mediated deletion system for large genome rearrangements in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67(2): 225–233.
- [30] McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-mediated recombination: general principles and experimental considerations. Curr Protocols Mouse Biol, 2017, 7(1): 1–12.
- [31] Hu JY, Li YY, Zhang HL, et al. Construction of a novel expression system for use in *Corynebacterium glutamicum*. Plasmid, 2014, 75: 18–26.
- [32] Zhang YM, Buchholz F, Muylers JPP, et al. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. Nat Genetics, 1998, 20(2): 123–128.
- [33] Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, et al. Recombineering: *in vivo* genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. Methods Enzymol, 2007, 421: 171–199.
- [34] van Kessel JC, Hatfull GF. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets. Mol Microbiol, 2010, 67(5): 1094–1107.
- [35] Wang Y, Weng J, Waseem R, et al. *Bacillus subtilis* genome editing using ssDNA with short homology regions. Nucleic Acids Res, 2012, 40(12): e91.
- [36] Binder S, Siedler S, Marienhagen J, et al. Recombineering in *Corynebacterium glutamicum* combined with optical nanosensors: a general strategy for fast producer strain generation. Nucleic Acids Res, 2013, 41(12): 6360–6369.
- [37] Chen SQ, Hou CX, Bi HL, et al. Transgenic clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9-Mediated viral gene targeting for antiviral therapy of bombyx mori nucleopolyhedrovirus. J Virol, 2017, 91(8): e02465–16.
- [38] Han P, Deem MW. Non-classical phase diagram for virus bacterial coevolution mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. J Roy Soc Interface, 2017, 14(127): 201–206.
- [39] Li HH, Huang CH. Functional genetic screening using CRISPR-Cas9 system. Chin J Biotech, 2018, 34(4): 461–472 (in Chinese).
李欢欢, 黄承浩. 基于 CRISPR-Cas9 的功能基因筛选研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(4): 461–472.
- [40] Khatodia S, Bhatotia K, Tuteja N. Development of CRISPR/Cas9 mediated virus resistance in agriculturally important crops. Bioengineered, 2017, 8(3): 274–279.
- [41] Berlec A, Škrlec K, Kocjan J, et al. Single plasmid systems for inducible dual protein expression and for CRISPR-Cas9/CRISPRi gene regulation in lactic acid bacterium *Lactococcus lactis*. Sci Rep, 2018, 8: 1009.
- [42] Kato-Inui T, Takahashi G, Hsu S, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair. Nucleic Acids Res, 2018, 46(9): 4677–4688.
- [43] Wang FY, Zhao DH, Qi L. Application of genome engineering in medical synthetic biology. Chin J Biotech, 2017, 33(3): 422–435 (in Chinese).
王方圆, 赵德华, 亓磊. 基因组工程在医学合成生物学中的应用. 生物工程学报, 2017, 33(3): 422–435.
- [44] Cleto S, Jensen JVK, Wendisch VF, et al. *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi). ACS Synth Biol, 2016, 5(5): 375–385.
- [45] Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. Nat Protoc, 2017, 12(4): 828–863.
- [46] Chang LX, Sun CC, Chen XJ, et al. Knocking out of human *DNAH2* gene in U2OS cells by CRISPR/Cas9n double nick system. Chin J Biotech, 2017, 33(2): 284–293 (in Chinese).
常丽贤, 孙聪聪, 陈晓娟, 等. 利用 CRISPR/Cas9n double nick 系统构建人 *DNAH2* 基因敲除的 U2OS 细胞株. 生物工程学报, 2017, 33(2): 284–293.
- [47] Guo MM, Yang LK, Du WL, et al. CRISPR/Cas9-mediated foreign gene targeted knock-in into the chicken EAV-HP genome. Chin J

- Biotech, 2019, 35(2): 236–243 (in Chinese).
郭苗苗, 杨理凯, 杜伟立, 等. CRISPR/Cas9 介导的外源基因靶向插入鸡 EAV-HP 基因组. 生物工程学报, 2019, 35(2): 236–243.
- [48] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [49] Fu JH, Yang FY, Xie HH, et al. Application and optimization of CRISPR/Cas system in bacteria. *Chin J Biotech*, 2019, 35(3): 341–350 (in Chinese).
傅俊豪, 杨发誉, 谢海华, 等. 细菌中 CRISPR/Cas 系统的应用和优化. 生物工程学报, 2019, 35(3): 341–350.
- [50] Li ZX, Chen QQ, Tang JL, et al. Integrating balanced mevalonate pathway into chromosome for improving lycopene production in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2019, 35(3): 404–414 (in Chinese).
李贞霞, 陈倩倩, 唐金磊, 等. 稳定表达 MVA 途径基因提高番茄红素产量. 生物工程学报, 2019, 35(3): 404–414.
- [51] Liu J, Wang Y, Lu YJ, et al. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 205.
- [52] Peng F, Wang XY, Sun Y, et al. Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 201.
- [53] Cho JS, Choi KR, Prabowo CPS, et al. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metabol Eng*, 2017, 42: 157–167.
- [54] Wang B, Hu QT, Zhang Y, et al. A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 63.
- [55] Coates RC, Blaskowski S, Szyjka S, et al. Systematic investigation of CRISPR-Cas9 configurations for flexible and efficient genome editing in *Corynebacterium glutamicum* NRRL-B11474. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(2): 187–201.
- [56] Yang F, Li Y. The new generation tool for CRISPR genome editing: CRISPR/Cpf1. *Chin J Biotech*, 2017, 33(3): 361–371 (in Chinese).
杨帆, 李寅. 新一代基因组编辑系统 CRISPR/Cpf1. 生物工程学报, 2017, 33(3): 361–371.
- [57] Jiang Y, Qian FH, Yang JJ, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun*, 2017, 8: 151179.
- [58] Stewart S, Glickman MS. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(11): 852–861.
- [59] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424.
- [60] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729.
- [61] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metabol Eng*, 2018, 47: 200–210.
- [62] Wang Y, Liu Y, Li JW, et al. Expanding targeting scope, editing window, and base transition capability of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. *BiotechnolBioeng*, 2019, 116(11): 3016–3029.
- [63] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2018, 551(7681): 464–471.
- [64] Luo WB, Lin QP, Li XX, et al. Efficient identification of gene knockout mutant mediated by CRISPR/Cas9 by *CEL I* crude extracts. *Chin J Biotech*, 2017, 33(5): 775–784 (in Chinese).
罗婉冰, 林秋鹏, 李晓霞, 等. 采用 *CEL I* 酶粗提物高效鉴定 CRISPR/Cas9 介导的基因突变. 生物工程学报, 2017, 33(5): 775–784.
- [65] Zhang XT, Zhang Y, Dai JL, et al. Construction of a new isovalerylspiramycin I producing strain by CRISPR-Cas9 system. *Chin J Biotech*, 2019, 35(3): 472–481 (in Chinese).
张晓婷, 张妍, 戴剑滢, 等. 利用 CRISPR-Cas9 系统构建新型异戊酰螺旋霉素 I 产生菌. 生物工程学报, 2019, 35(3): 472–481.

(本文责编 陈宏宇)