

· 综 述 ·

## 基因编辑技术在大肠杆菌中的应用

晁双英, 胡学军

大连大学 医学院, 辽宁 大连 116622

晁双英, 胡学军. 基因编辑技术在大肠杆菌中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1446-1461.

CHAO SY, HU XJ. Application of gene editing technology in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1446-1461.

**摘 要:** 利用基因编辑技术对大肠杆菌基因组进行改造可以研究基因功能, 或改变其代谢途径大量生产原本成本较高的产物, 从而获得可以生产特定产物的遗传稳定性工程菌株。目前可以对细菌基因组编辑的方法有 Red 同源重组、CRISPR/Cas9 技术等。Red 同源重组是比较传统的基因编辑技术, 应用广泛, 但编辑效率受整合片段大小的限制, 基因编辑过程比较烦琐, 且重组后基因组会有 FRT 位点残留。CRISPR/Cas9 技术应用广泛, 可靶向基因组特定位置进行编辑, 但需要根据编辑位点设计特定的 DNA 打靶片段。随着人们对这两种技术越来越深入的研究, 衍生出了多种复合基因编辑技术。如 Red 同源重组和归巢核酸内切酶 I-Sce I 的联合运用, Red 同源重组和 CRISPR/Cas9 的联合运用等。本文总结了常用的几种基因编辑技术及复合基因编辑技术的基本原理及在大肠杆菌中的应用, 可为原核生物基因编辑方法的选择提供依据。

**关键词:** 基因编辑; 工程菌株; 代谢途径

## Application of gene editing technology in *Escherichia coli*

CHAO Shuangying, HU Xuejun

Medical College, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning, China

**Abstract:** Gene editing technology can be used to modify the genome of *Escherichia coli* for the investigation of gene functions, or to change the metabolic pathways for the efficient production of high-value products in engineered strains with genetic stability. A variety of gene editing technologies

**Received:** August 13, 2021; **Accepted:** December 6, 2021; **Published online:** January 6, 2022

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (32070936); Department of Science & Technology of Liaoning Province-2021 Central Guiding Local Science and Technology Development Fund Plan (the First Batch) Project (2021JH6/10500147)

**Corresponding author:** HU Xuejun. E-mail: Huxuejun@dlu.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金 (32070936); 辽宁省科学技术厅-2021 年中央引导地方科技发展资金计划 (第一批) 项目 (2021JH6/10500147)

have been applied in prokaryotes, such as  $\lambda$ -Red homologous recombination and CRISPR/Cas9. As a traditional gene editing technique,  $\lambda$ -Red recombination is widely used. However, it has a few shortcomings, such as the limited integration efficiency by the integrated fragment size, the cumbersome gene editing process, and the FRT scar in the genome after recombination. CRISPR/Cas9 is widely used for genome editing at specific sites, which requires specific DNA segments according to the editing site. As the understanding of the two technologies deepens, a variety of composite gene editing techniques have been developed, such as the application of  $\lambda$ -Red homologous recombination in combination with homing endonuclease I-Sce I or CRISPR/Cas9. In this review, we summarized the basic principles of common gene editing techniques and composite gene editing techniques, as well as their applications in *Escherichia coli*, which can provide a basis for the selection of gene editing methods in prokaryotes.

**Keywords:** gene editing; engineered strain; metabolic pathways

作为一种多功能微生物, 细菌是基因工程中的重要研究对象, 利用基因编辑技术对其基因组进行特异性修饰在代谢工程和分子生物学研究中有着广泛应用。在枯草芽孢杆菌中, 其基因组减少 8%后, 生理功能仅受到很小的影响<sup>[1]</sup>; 甚至有研究表明, 将恶臭假单胞菌的基因组减少 3.76%后, 菌株的生长速度和转化效率均有提高<sup>[2]</sup>; 将大肠杆菌的基因组减少 6%、8%或 15%后, 其生理特性并没有受到明显影响, 而减少 30%后, 会引起细胞复制上的缺陷<sup>[3]</sup>。这些例子表明在实验室控制条件下, 细菌基因组中有很一部分不是必需的<sup>[3]</sup>。因此, 对一些原核生物 (例如: 大肠杆菌) 的基因组进行改造来构建非天然合成途径或代谢途径以生产所需产物在系统代谢工程上有很大的应用价值。而随着分子生物学和测序技术的发展, 人类基因及各种微生物基因得以解码, 这些技术的发展让人工合成基因成为可能。2006年, Heinemann 等<sup>[3]</sup>首次将人工基因网络的设计、小型基因组的重构、信号通路的重新编程以及代谢工程均称为“合成生物学”。合成生物学是通过引入异源基因, 合成新的 DNA 和新的酶或激发新的相互作用来构建非天然途径<sup>[4]</sup>。除了将

人工合成途径整合到生物体的基因组上来表达我们所需的产物 (如新型抗生素<sup>[5]</sup>), 还可根据不同的微生物类型进行相应的改造, 以生产与其自然过量产生的代谢产物具有相同生物合成途径的化学物质<sup>[6]</sup>。

目前对原核生物进行基因编辑的系统主要分为 3 类: 同源重组、位点特异性重组、基于人工核酸内切酶的基因组编辑技术 (如: CRISPR/Cas9 系统)。同源重组技术是发展较早, 最为传统的一种基因编辑技术, 它利用细菌自身所存在的同源重组在人为干预下完成异源基因的敲入或敲除。位点特异性重组也是基于同源性所进行的一种重组技术, 与前者不同的是, 它可以在基因组的特异位点进行改造, 但是在最后会有特殊位点的残留。CRISPR/Cas9 技术出现后被广泛应用于真核生物的基因编辑, 后来有研究者将其应用于原核生物, 使原核生物的基因编辑技术有了新的选择。但是每种技术都存在着缺陷。近年来, 越来越多的研究者选择将这几种基因编辑技术联合使用, 大大提高了基因编辑的效率。在基因编辑的过程中, 微同源序列 (microhomology) (1–8 nt) 对于大肠杆菌天然末端连接 (*E. coli* native end-joining,

ENEJ) 至关重要<sup>[7]</sup>, 即在大肠杆菌基因组修复过程中至少需要 1–8 nt 的同源序列。所以在很多基因编辑技术中, Red 同源重组常常参与其中, 与其他技术共同完成基因编辑过程。

大肠杆菌是目前研究得最清楚、分析得最透彻的一种微生物, 早在 20 世纪 90 年代就已经完成了大肠杆菌基因组的测序<sup>[8–10]</sup>。尽管仍有很多基因的功能尚不明确, 但由于其来源清楚, 易于在基因水平上进行操作, 所以在基因工程中被广泛使用。

本文将主要介绍几种基因编辑方法以及它们在大肠杆菌基因编辑中的主要应用。

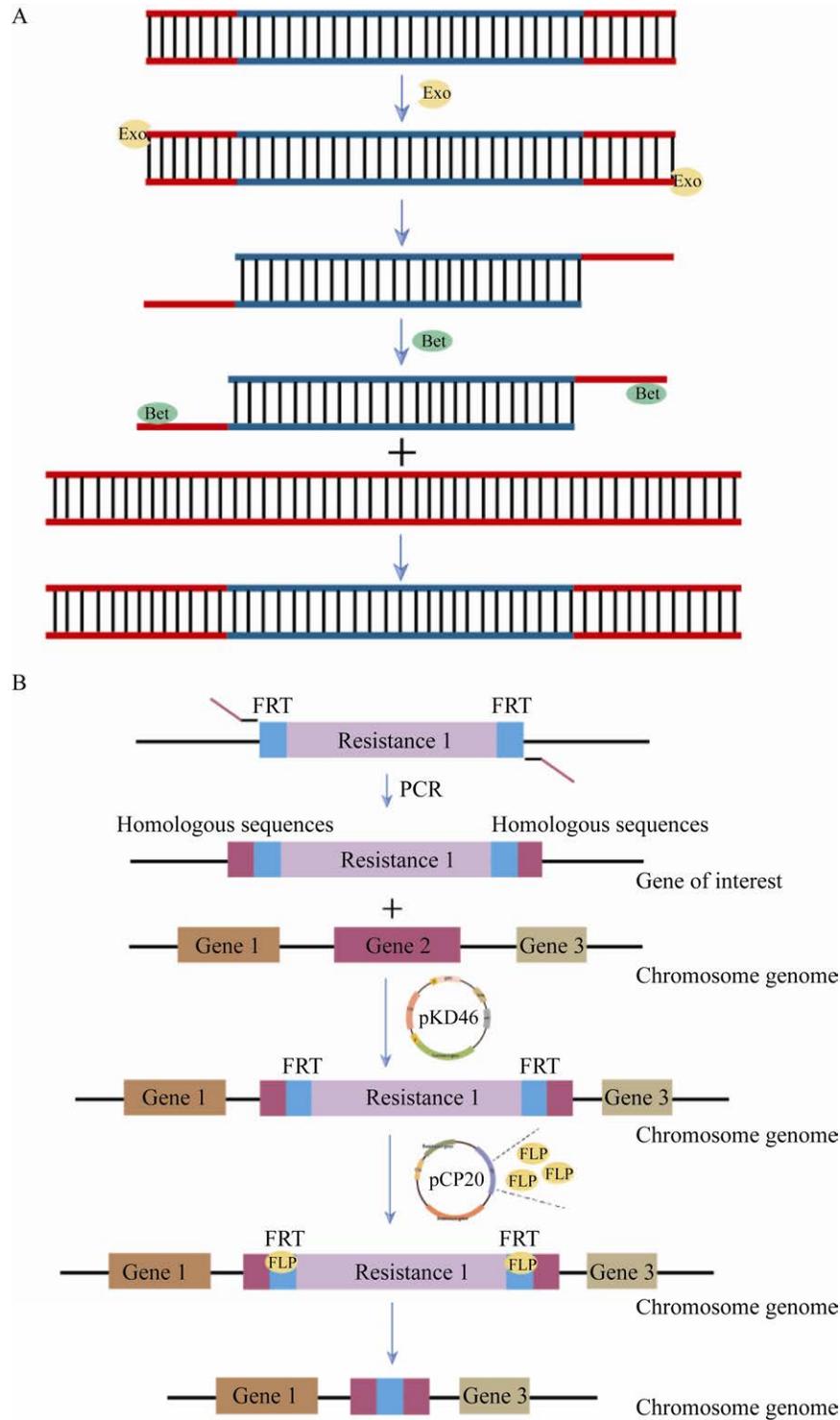
## 1 同源重组系统

同源重组是原核生物获得遗传多样性的一种手段, 是其基因组的主要进化机制之一<sup>[11]</sup>。同源重组包括 RecA 重组系统和 Red 重组系统。RecA 重组系统是大肠杆菌自身存在的一种重组系统, 由 RecA 蛋白和辅助蛋白 (如 RecBCD、RecFOR 等) 组成, 前者在基因重组及基因修复过程中起着重要作用<sup>[12]</sup>, RecBCD 是一种多功能酶复合物, 其中 RecB 具有核酸内切酶活性和 3'→5'解旋酶活性, RecC 可介导双链断裂并识别 Chi 位点, RecD 具有 5'→3'解旋酶活性<sup>[13]</sup>。该复合体辅助 RecA 完成基因重组及修复过程。而  $\lambda$ -Red 重组系统是来自  $\lambda$  噬菌体的一种重组系统, 1998 年被首次应用于大肠杆菌染色体改造<sup>[14]</sup>。该重组系统包括 3 种基因: *red $\alpha$*  (*gam*)、*red $\beta$*  (*bet*) 和 *red $\gamma$*  (*exo*), 分别编码 Gam、Bet 和 Exo 三种蛋白。Exo 蛋白是一种由 226 个氨基酸组成的核酸外切酶<sup>[15]</sup> (分子量为 24.9 kDa), 晶体结构显示: 核酸外切酶在溶液中是环状三聚体, 中间有一条通道, 一端可以容纳双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA), 另一端只能容纳单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)<sup>[15]</sup>。

一旦与双链 DNA 结合, 它将 5'-链依次消化为单核苷酸, 形成一个长长的 3'-突出末端。Bet 蛋白是一种由 261 个氨基酸组成的单链退火蛋白<sup>[15]</sup> (分子量为 29.7 kDa), 它与 ssDNA 结合并促进互补链的退火。Gam 蛋白不直接参与重组过程, 而是和宿主 RecBCD 酶复合体结合并使其失活<sup>[15]</sup> (分子量为 16 kDa)。2000 年, Datsenko 和 Wanner<sup>[16]</sup>首次将这 3 种蛋白整合至 pKD46, 培养过程中, Exo 蛋白发挥核酸外切酶活性, 从 5'-端消化目的片段, 形成 3'-突出末端 (含同源臂序列)。在大肠杆菌 DNA 复制过程中, 3'-突出末端的单链 DNA 序列与大肠杆菌基因组同源序列发生重组, 将目的片段整合至大肠杆菌基因组 (图 1A)。之后转入 pCP20, 该质粒含有温度敏感型复制起点和 FLP 重组酶基因, FLP 重组酶可识别 FRT 位点, 促使抗性基因两侧的 FRT 位点自身重组, 从而将抗性基因消除 (图 1B), 接着升高温度培养使该质粒自行丢失。由此完成基因修饰。

在同源重组过程中往往需要一定长度的同源臂。人们通常会通过 PCR 扩增方法在基因编辑模板两侧添加一定长度的同源臂, 以便进行重组<sup>[16–19]</sup>。但是通过这种方式得到的线性 DNA 模板转入大肠杆菌后, 容易遭受 RecBCD 核酸酶的降解, 使重组效率和编辑效率大大降低<sup>[20]</sup>。而 Red 重组系统中的 Gam 可抑制宿主 RecBCD 核酸外切酶 V, 从而防止电转过程中的线性 DNA 模板片段被破坏<sup>[21]</sup>, 这样 Bet 和 Exo 便可结合 DNA 末端促进重组。此外, Red 同源重组具有不受酶切位点限制、需要基因打靶同源臂短的优点<sup>[22]</sup>。

来自大肠杆菌 Rac 原噬菌体的 RecE/RecT 重组系统与  $\lambda$ -Red 重组系统有些相似, 且 RecE/RecT 和 Red $\alpha$ /Red $\beta$  介导的重组在机制和功能上是等效的。二者均为核酸外切酶和单链



**图 1** 同源重组的基因编辑策略 A: 同源重组基本原理; B: 利用  $\lambda$ -Red 同源重组系统完成基因敲除  
 Figure 1 Genome editing strategies by homologous recombination. (A) The basic principles of homologous recombination. (B) The process of gene knockout via  $\lambda$ -Red system. pKD46: expressing Exo/Beta/Gam. pCP20: expressing FLP recombinase.

退火蛋白的结合。RecE 是一种 5'→3'核酸外切酶, RecT 是一种 ssDNA 结合蛋白, 在体外可促进 ssDNA 退火、链转移和链入侵。另外, 有研究指出两种蛋白的相对表达水平与重组效率密切相关。RecT 表达水平升高会促进重组效率的提高, 而 RecE 的过表达则不利于重组<sup>[23]</sup>。由于 Red $\alpha$ /Red $\beta$  和 RecE/RecT 介导的重组均不需 RecBCD 活性, 该研究者将其命名为 Red/ET 重组<sup>[24]</sup>。

之后有研究者运用 Red/ET 重组技术将来自短芽孢杆菌 X23 的伊短菌素合成途径基因片段 (48.3 kb) 和来自解淀粉芽孢杆菌 FZB42 的芽孢菌霉素合成途径基因片段 (37.2 kb) 整合到了枯草芽孢杆菌的染色体中, 虽然无法检测到伊短菌素, 但是成功表达出了芽孢菌霉素<sup>[25]</sup>。

## 2 位点特异性重组

位点特异性重组是 DNA 重组的重要方式之一, 这种重组方式需要特定的位点特异性重组酶。该酶可识别 DNA 序列上的特定位点, 然后剪切 DNA 双链并将其重新连接, 由此来促进 DNA 序列的精确重排<sup>[26]</sup>。位点特异性重组可以分为几个简单步骤: (1) 重组酶结合两个重组位点; (2) 两个重组酶结合位点配对, 形成带有交叉位点并列的突触复合体; (3) 重组酶催化裂解、链交换以及突触复合物中 DNA 的重新结合; (4) 突触复合物分解, 释放出重组产物。经过以上过程可实现基因消除、基因插入以及基因倒置。位点特异性重组系统至少需要一种重组酶和一对重组位点。以 loxP 位点和 Cre 重组酶为例, 图 2A 展示了位点特异性重组的 3 种结果。

几乎所有已鉴定的位点特异性重组酶都属于以下两个家族之一: 酪氨酸重组酶 (tyrosine recombinase) 和丝氨酸重组酶 (serine recombinase), 该命名方法是根据在反应中间体

中形成共价蛋白质-DNA 连接的氨基酸残基命名的。这两个重组酶家族的主要成员及其功能, 以及这两种酶的结构特点在 Grindley 等<sup>[27]</sup>的综述中已总结。二者的重组机制截然不同。酪氨酸重组酶通过形成 Holliday 连接中间体成对地断裂并重新连接单链, 从而实现链交换; 而丝氨酸重组酶会切断所有链, 通过双链断裂、180° 旋转和重新连接实现链交换<sup>[27-28]</sup>。

目前常用的几种重组系统有: 基于  $\lambda$  噬菌体整合酶 (phage-encoded integrase, Int) 的 Int/*att* 重组系统<sup>[29-30]</sup>、基于酿酒酵母的 FLP/*FRT* 重组系统<sup>[31]</sup>、基于大肠杆菌噬菌体 P1 的 Cre/*lox* 系统<sup>[32-34]</sup>以及基于内源性 Xer 重组酶的 Xer/*dif* 重组系统<sup>[35]</sup>。

Int/*att* 重组系统中的  $\lambda$ Int 重组酶属于丝氨酸重组酶, 该酶可促进 DNA 上 *attP* 和 *attB* 两个位点间的重组形成新的位点 *attL* 和 *attR*。该重组反应是不可逆的, 这使 DNA 整合具有一定的稳定性, 广泛应用于基因工程、基因治疗以及合成生物学等领域<sup>[36]</sup>。然而, 另外一种噬菌体编码的被称为重组定向因子 (recombination directionality factor, RDF) 的蛋白可与整合酶发生蛋白质-蛋白质相互作用, 从而改变整合酶的特性, 使其激活 *attL* 和 *attR* 重组而抑制 *attP* 和 *attB* 重组<sup>[37]</sup>。有研究将丝氨酸整合酶和其同源 RDFs 融合产生新的单一蛋白, 该蛋白可高效催化 *attL* 和 *attR* 重组, 而 *attP* 和 *attB* 重组效率降低<sup>[37]</sup>, 证明了利用融合重组酶来完成 DNA 重组的可行性。

FLP/*FRT* 重组系统和 Cre/*lox* 重组系统中的重组酶均属于酪氨酸重组酶。其中 FLP/*FRT* 重组系统经常和  $\lambda$ -Red 重组系统结合使用, 作为基因重组之后抗性消除的辅助手段<sup>[38-39]</sup>, 但该方法存在耗时长缺点, 且重组后会有 *FRT* 位点残留。

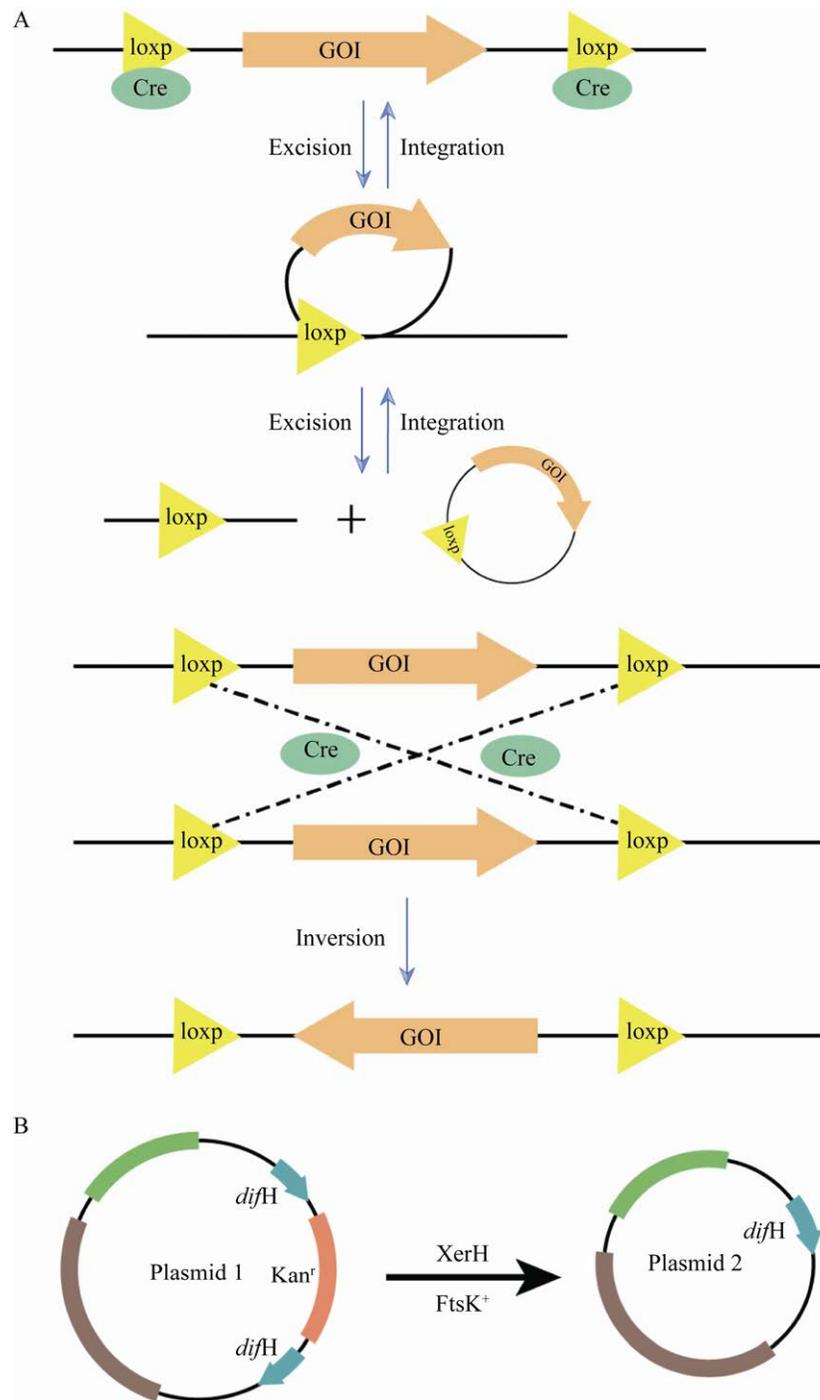


图2 位点特异性重组过程 A: 位点特异性重组的3种结果: 基因消除、基因整合与基因倒置; B: 由 XerH 催化的两个 *difH* 位点间的特异性重组

Figure 2 The process of site-specific recombination. (A) Three outcomes of site-specific recombination: gene excision (upper), integration (upper) and inversion (lower). GOI: gene of interest. (B) Site-specific recombination between the two *difH* sites catalysed by XerH. Plasmid 1 represents the primary plasmid containing site-specific for recombination; plasmid 2 represents the product after site-specific recombination.

Xer/*dif*重组系统中的重组酶有很多种,均属于酪氨酸重组酶,继 XerC 和 XerD 被发现后<sup>[40]</sup>, Le Bourgeois 等<sup>[41]</sup>发现一些乳球菌和链球菌使用单一的酪氨酸重组酶 XerS 完成基因重组。之后,2013年, Leroux 等<sup>[42]</sup>又在空肠弯曲杆菌中发现了 XerH 蛋白,它可催化质粒上的两个 *dif*H 位点间的重组(图 2B)。XerH 蛋白(354–362 aa)在大小和蛋白同源性上与传统的 XerCD(298 aa)均有很大的不同,二者的同源性仅 26%,但它与 XerS(365 aa)有着更高的相似性<sup>[43]</sup>。

虽然现在已经发现了多种重组酶,但目前关于一些重组酶,特别是丝氨酸重组酶的具体作用机制仍不清楚<sup>[27]</sup>,有待进一步研究。另外,所有位点特异性重组系统都存在一个问题,即重组之后基因组上会有一个位点的残留,在下次的基因整合中可能会发生预期之外的重组。

### 3 基于 Red 重组系统的无痕敲除

虽然 Red 同源重组可以对基因组的任意位置进行改造,但是缺乏特异性。很多研究者将同源重组与位点特异性重组相结合,从而对原核生物染色体的特定位置进行改造,但是,在进行染色体整合之后会留下一个重组位点(如 FRT 或 *loxP*),在以后的重组过程中可能会引起预期之外的重组结果<sup>[44]</sup>。所以,越来越多的研究者在探索一种无痕的基因编辑技术。如:将 Red 重组系统与 I-*Sce* I 归巢内切酶相结合,从而得到了无痕编辑的效果<sup>[45-46]</sup>。

I-*Sce* I 是一个染色体的稀有内切酶,亦被称为归巢核酸内切酶,首先发现于酵母线粒体的内含子中。I-*Sce* I 识别 18 bp 的非对称序列(5'-ATTACCCTGTTATCCCTA-3'),在染色体上加入这个序列可以被该酶识别并切割,诱导宿主体内的重组蛋白表达参与双链断裂(double strand break, DSB)的修复,最终导致分子间的

重组修复。该系统本质是基于传统的重组臂交换或非同源末端连接(NHEJ)等分子机理以达到敲除基因组上特定 DNA 片段的技术。

Red 重组与归巢核酸内切酶 I-*Sce* I 的反选择相结合最多需要两步即可完成重组过程。第一,通过 Red 重组将目的片段整合到原核生物的染色体上,由此通过阳性选择标记即可筛选出阳性克隆;第二, I-*Sce* I 对其识别位点(阳性选择标记)进行剪切,产生 DSB,由于在阳性选择标记两侧含有相同的基因片段,之后在重组酶的作用下完成第二次的同源重组,从而将阳性选择标记去除,通过阴性选择可得到目的菌株(图 3)。由于该重组过程涉及两步同源重组,所以通常需要两个质粒。一般将重组酶基因和目的基因构建于质粒 1, I-*Sce* I 归巢核酸内切酶基因构建于质粒 2,且该基因通常由诱导型启动子来调控其表达,以便更好地控制整个重组过程。

2002年, Kolisnychenko 等<sup>[45]</sup>首次结合 Red 重组和 I-*Sce* I 归巢核酸内切酶相结合的基因编辑技术对大肠杆菌 MG1655 的基因组实现了无痕删减,使大肠杆菌基因组减少了 8.1%,而对大肠杆菌生长速率并无明显影响,证明了该删除的基因岛对大肠杆菌来说是非必需基因。2006年, Tischer 等<sup>[47]</sup>将 Red 重组技术和归巢核酸内切酶 I-*Sce* I 的反向选择应用于大肠杆菌,完成了点突变、短片段及长片段的敲入和敲除。同时也证明了 I-*Sce* I 归巢核酸内切酶的表达对整个重组过程起着至关重要的作用。2007年, Rivero-Müller 等<sup>[48]</sup>将 Red 重组酶和 I-*Sce* I 构建于一个质粒,分别用阿拉伯糖启动子和四环素启动子来调控其表达。最终实现了约 3–55 kb 的基因片段的敲入,且除目的基因外没有其他位点的残留。2014年,葛高顺等<sup>[46]</sup>通过巧妙设计同源片段,利用基因打靶实现了无痕敲除

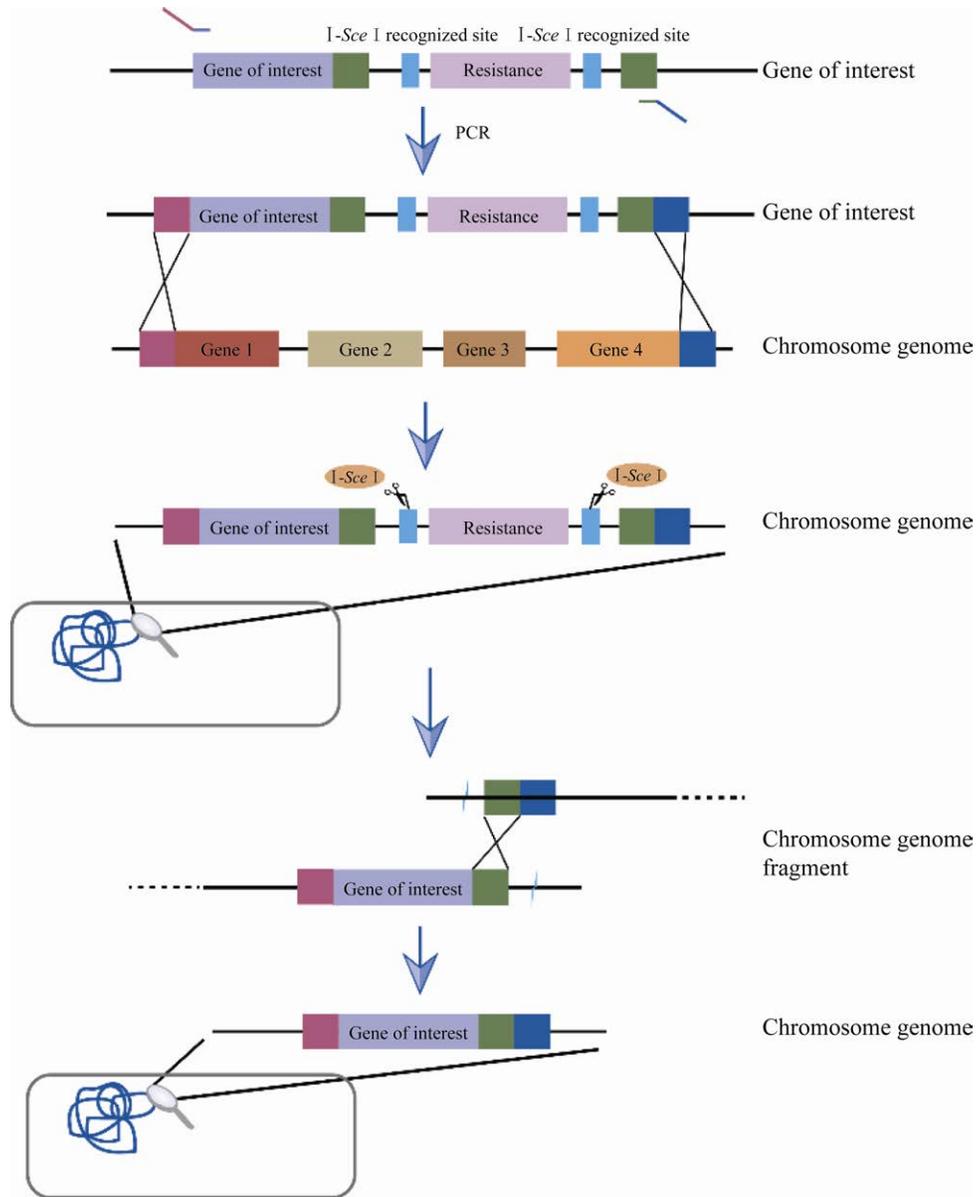


图3 结合  $\lambda$ -Red 重组和 I-Sce I 完成基因组基因的敲除和外源基因的敲入

Figure 3 Knockout of the genes and knockin of foreign genes in genome via  $\lambda$ -Red and I-Sce I.

大肠杆菌 CLM37 中的 *nanKETa* 基因簇，减少了唾液酸在大肠杆菌中的消耗<sup>[49]</sup>，对于在大肠杆菌内实现唾液酸化修饰有重要意义。但需要多次 PCR 扩增，实验过程较烦琐，且需要的无痕打靶片段长达 684 bp，增加了实验成本。

以上几种方法都需要通过 PCR 在目的基因片段的两侧加入同源臂，从而将纯化的 PCR 回

收产物通过电击转化进入菌株。为了简化实验过程，2016 年，Hook 等<sup>[50]</sup>结合基于噬菌体的位点特异性重组和  $\lambda$ -Red/RecET 介导的同源重组创建了一种新的基因组编辑方法；他们构建了 pGL2 质粒，该质粒包含两个 I-Sce I 酶切位点（用于消除复制起点）、 $\phi$ 80-*attP* 位点（基因整合）、 $\lambda$ -*attR*/ $\lambda$ -*attL* 位点（整合后抗性基因的

消除)及 *cat* 抗性基因 (筛选标记)。该方法无需通过 PCR 扩增,而是通过质粒的相同酶切位点酶切及自我连接产生供体 DNA 片段。该方法最终实现了 >10 kb 的 DNA 片段的基因组整合,但是仍会在基因组上留下一段 31 nt 的残留序列。

关于阳性克隆的筛选过程,大部分是通过第一步的阳性选择和第二步的反向选择来筛选阳性菌株。2020 年, Egger 等<sup>[51]</sup>设计了一种更为简单的筛选阳性菌株的方法;他们将 I-*Sce* I 识别位点整合到大肠杆菌基因组,构建了含有 I-*Sce* I 识别位点的菌株 BL21(DE3)::I-*Sce* I RS 和 HMS174(DE3)::I-*Sce* I RS。之后将  $\lambda$ -Red 重组系统中的 3 种重组酶和来自酿酒酵母的归巢核酸内切酶 (I-*Sce* I) 结合起来,构建了质粒 pAIO。该质粒主要含有 3 种重组蛋白 (Exo、Bet、Gam)、I-*Sce* I 酶切位点 (I-*Sce* I restriction site, I-*Sce* I RS)、编码 I-*Sce* I 归巢核酸内切酶基因。I-*Sce* I 基因由阿拉伯糖启动子 *araB* 调控,由此在重组过程中,加入阿拉伯糖可诱

导 I-*Sce* I 归巢核酸内切酶表达,在基因组整合成功的菌株中,该酶可酶切质粒 pAIO 中的 I-*Sce* I RS,从而使质粒由环型变为线型,失去活性;而在未发生重组的菌株中,该酶可同时酶切基因组和质粒 pAIO 中的 I-*Sce* I RS,从而将未发生重组的细胞杀死,使其无法生长,同时将质粒由环型变为线型,由此完成阳性菌株的筛选过程。虽然阳性率未达到 100%,但与  $\lambda$ -Red-FRT-FLP 方法相比,减少了 pCP20 转化及抗性基因消除的过程,节省了时间。而且基因组上无多余的残留位点。

不论是最初的 Red 重组与位点特异性重组直接相结合的基因编辑策略,还是后来将 Red 重组系统与 I-*Sce* I 归巢核酸内切酶结合以达到无痕敲除的基因编辑策略,都在大肠杆菌基因整合中得到了应用并取得了很好的效果。表 1 列举了近几年内运用复合基因编辑技术将不同的代谢途径整合至原核生物 (主要是大肠杆菌) 基因组并高效表达目的产物的研究成果。

表 1 不同基因编辑技术在不同细菌基因组整合中的应用

Table 1 Application of genome editing technology in different bacteria

Bacteria	Methods	Gene knock out/in	Production	Yield	References
<i>Komagataeibacter xylinus</i>	A $\lambda$ -Red and FLP/FRT-mediated site-specific recombination	Knock out: <i>gcd</i> gene Knock in: <i>glf</i> gene Overexpression: <i>glk</i> gene	Bacterial cellulose	5.91 g/L	[39]
<i>Escherichia coli</i> CLM24	“Clonetegration”: site-specific recombination	Knock in: <i>pglB</i> gene	Oligosaccharyl transferase	The glycosylation efficiency increased by 85%	[52]
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	$\lambda$ -Red and I- <i>Sce</i> I	Knock in: TAL pathway (two foreign pathways)	Violacein	Improved	[53]
<i>Escherichia coli</i> K12	$\lambda$ -Red	Knock out: non-essential polysaccharide gene clusters Knock in: orthogonal glycosylation components	spDsbA-MBP-hGHv <sup>138-DQNAT-142</sup>	(5.7 $\pm$ 0.2) mg/L (~2-fold greater)	[54]
<i>Escherichia coli</i>	FLP/FRT-mediated site-specific recombination	Knock in: SA biosynthetic module	Salicylate (SA)	(1 560 $\pm$ 50.2) mg/L	[55]
<i>Escherichia coli</i>	–	Combining the polyketide biosynthesis pathway and benzene ring cleavage pathway	Maleate	7.1 g/L	[56]

## 4 CRISPR/Cas9 与 $\lambda$ -Red 重组系统

CRISPR/Cas9 存在于细菌的免疫系统中,是细菌和古菌抵抗病毒的自我保护机制。CRISPR 序列在 1987 年被首次发现,而该序列的抗病毒功能则是在 2007 年被首次证明。2012 年,法国微生物学家 Emmanuelle Charpentier 和美国生物化学家 Jennifer A. Doudna 对 CRISPR/Cas9 靶向切割 DNA 分子机制进行了精细解析,创建了最方便快捷的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,并于 2020 年荣获“诺贝尔化学奖”<sup>[57]</sup>。该系统包括成簇的有规律的间隔短回文重复 (clustered regularly-interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 和 *cas* 基因 (CRISPR-associated, Cas)。*cas* 基因编码 Cas 蛋白,该蛋白具有解旋酶活性和核酸酶活性,可以将 DNA 链解旋并切割 DNA 链。Cas 蛋白上具有两个核酸酶结构域,分别结合 crRNA (结合到 Cas9 蛋白上) 和 tracrRNA (将 crRNA 固定在正确位置),二者组合形成切割 DNA 复合体。Doudna JA 和 Charpentier E 团队<sup>[58]</sup>根据结构生物学信息对该三组分进行了简化,他们将 crRNA 和 tracrRNA 相连接,形成一条单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA),这样便得到一个更简单的基因编辑系统。经过简化之后的 CRISPR/Cas9 系统被越来越多的研究者用于原核生物的基因组编辑中。

CRISPR/Cas9 系统最早由 Jiang 等<sup>[59]</sup>开发用于细菌基因组编辑,是微生物基因组编辑的重大突破,但在大肠杆菌中并没有实现较高的编辑效率。另外,CRISPR/Cas9 系统需要依赖于原间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif, PAM),但是较短的 PAM 序列在基因组中出现的频率高,因此很有可能在目的序列附近

会存在一段与之相似的序列<sup>[60]</sup>,而且 Cas9 蛋白对 PAM 的容忍度高<sup>[61]</sup>,导致其可能和该序列结合而引起预期之外的基因编辑,即所谓的“脱靶效应”。有研究指出可以通过选择独特的靶序列,并优化 sgRNA 和 Cas9 来避免或减少脱靶突变的发生<sup>[62]</sup>。限制其在微生物中应用的另外一个原因是修复方式。一般情况下,微生物体内,如大肠杆菌中存在自我修复的一种方式,即同源修复 (homology-directed repair, HDR),这是一种比较可靠的修复方式。而 CRISPR/Cas9 剪切基因组后,由于没有同源序列模板的存在,细胞会通过非同源末端连接 (nonhomologous end-joining, NHEJ) 来完成基因组修复,这种连接方式由于随机性强,所以准确率比较低<sup>[63-64]</sup>。

近年来,CRISPR/Cas9 系统和  $\lambda$ -Red 系统的结合使用备受研究者的欢迎,两种系统的结合使用不仅可以解除 Red 系统在同源重组过程中存在重组效率受目的片段大小的限制的问题,极大地提高基因编辑效率和基因编辑的准确率,还可以明显地减少 CRISPR/Cas9 系统本身存在的脱靶效应<sup>[20,65-68]</sup>。这两种系统结合后,在 sgRNA 的引导下,具有核酸水解酶活性的 Cas9 蛋白和 Exo 蛋白可以定向剪切 DNA 链,一是剪切受体菌的染色体 DNA 片段,二是剪切含有供体 DNA 的质粒,从而得到线性的供体 DNA 片段,而 Gam 蛋白可以保护线性 DNA 片段,防止其被宿主本身存在的核酸内切酶水解,从而配合 Bet 蛋白完成整个重组和修复过程,最终完成整个基因编辑过程<sup>[65]</sup> (图 4)。在两种系统的结合使用下,为了减少脱靶效应,获得更精确的编辑效果,Cas9 蛋白和 3 种重组蛋白 (Gam、Beta 和 Exo) 往往需要诱导型启动子的调控,以便通过诱导剂的添加来严格控制基因的表达水平,从而更精准地完成基因编辑过程。

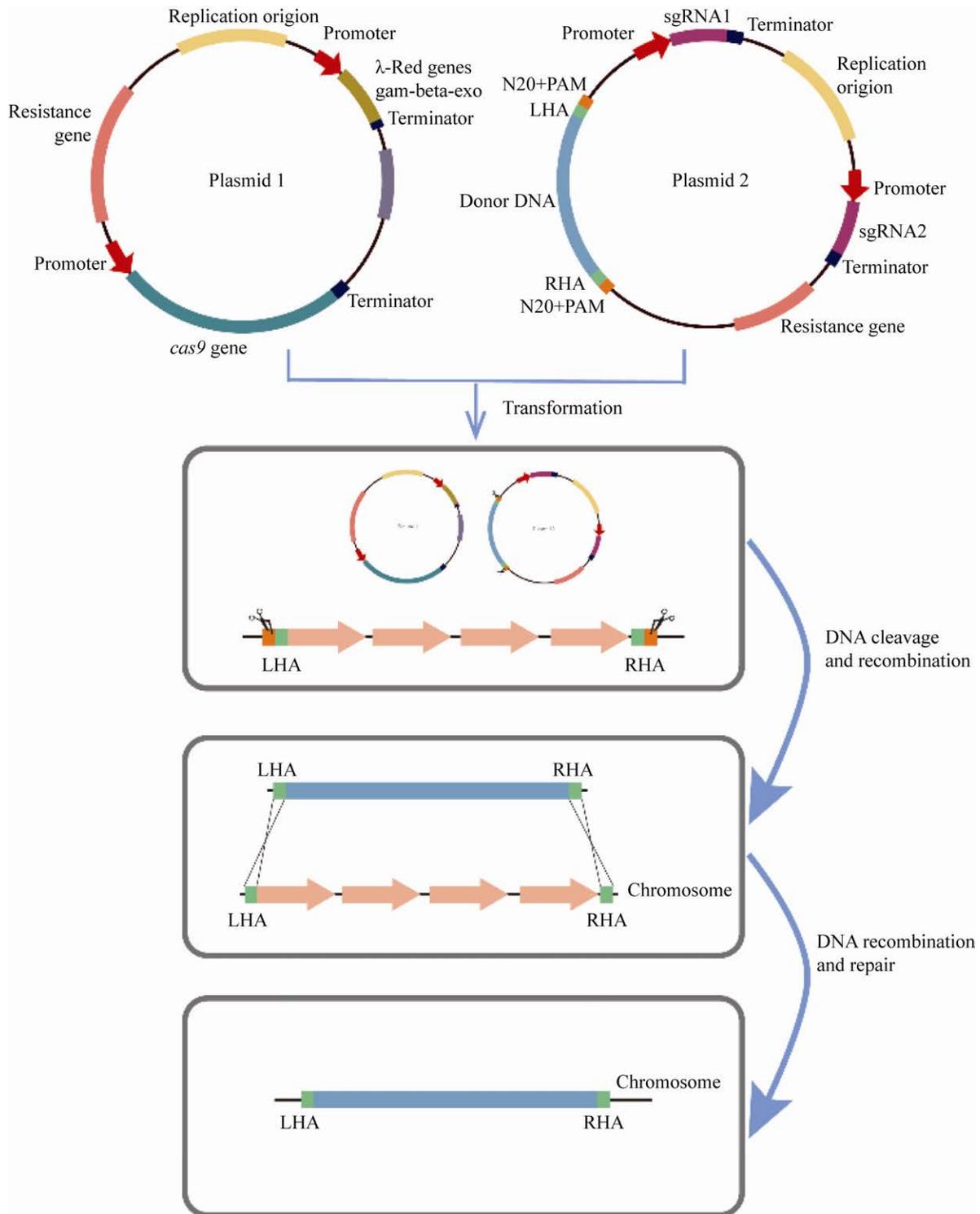


图4 结合  $\lambda$ -Red 重组和 CRISPR/Cas9 完成基因组基因的敲除和外源基因的敲入

Figure 4 Knockout of the genes and knockin of foreign genes in genome via  $\lambda$ -Red and CRISPR/Cas9. Plasmid 1: expressing Gam/Beta/Exo proteins and *cas9* gene; Plasmid 2: expressing donor DNA containing N20+PAM upstream and downstream and sgRNA. LHA: left homologous arm; RHA: right homologous arm.

2015年, Pyne等<sup>[69]</sup>首次结合 CRISPR/Cas9 和  $\lambda$ -Red 系统对大肠杆菌基因组进行了基因编辑。他们开发了一种三质粒策略, 分别表达  $\lambda$ -Red 功能 (Exo、Beta 和 Gam (pKD46))、Cas9 蛋白和相关的 tracrRNA (pCas9) 以及可编程 crRNA (pCRISPR)。他们利用该方法在大肠杆菌中完成了高达 19.4 kb 的 DNA 片段的缺失, 以及 3 kb 的异源 DNA 片段的插入, 而且没有疤痕位点的残留 (如 FRT 疤痕位点)。2016年, Zhao等<sup>[68]</sup>在此基础上进一步简化, 开发了一种简单、快速、高效的细菌基因组编辑方法; 具体方法为: 将 sgRNA、*cas9* 基因、Red 重组酶基因构建至一个质粒载体上, 仅通过一次转化便可完成基因编辑过程。在对未去除 PAM 序列的细胞进行基因编辑过程中, sgRNA 会引导 Cas9 靶向细胞基因组中的 PAM 序列使之发生裂解, 从而使细菌死亡<sup>[70]</sup>, 所以在基因组编辑过程中对 Cas9 或 gRNA 的调控表达很重要。Zhao等<sup>[68]</sup>选择可被 L-阿拉伯糖诱导的 pBAD 启动子来调控 Cas9 的表达, 并在大肠杆菌中完成了基因片段的敲除和短基因片段的替换, 编辑效率可达 100% (同源臂为 297 bp 和 298 bp)。但是该研究仍存在一些不足, 基因编辑效率会随着同源臂的缩短而降低: 当上下游同源臂减少至 101 bp 后, 编辑效率仅有 69.3% 左右, 而减少至 51 bp 后, 编辑效率为 0%<sup>[68]</sup>。2017年, Zhao等<sup>[66]</sup>对单质粒的基因调控进行了优化。在新构建的质粒 pCAGO 中, *cas9* 由 *araB* 启动子负责调控, 3 种重组蛋白由 *trc* 启动子负责调控, 而 gRNA 由组成型启动子负责调控。另外, 他们筛选出了最佳靶向效率的通用 N20 序列, 将 L-同源臂、marker、N20PAM、L\_short-同源臂、insertion、R-同源臂 6 个部分构建为基因编辑模块。之后将该基因模块和质粒 pCAGO

转入大肠杆菌, 在 3 种重组蛋白的作用下, 基因编辑模块通过同源重组整合到大肠杆菌基因组中, 之后, CRISPR/Cas9 系统会促使双链在 N20PAM 序列处发生双链断裂 (double-strand break, DSB), 接着, 在 L-同源臂和 L\_short-同源臂之间发生同源重组, 将 marker 消除, 由此完成无痕基因组编辑过程。该技术有效地解决了常规 CRISPR/Cas9 方法的序列限制, 并显著降低了脱靶频率。此外, 可以将 L\_short-同源臂设计为与 L-同源臂的上游区域互补序列, 由此可完成长片段的基因簇敲除。该研究完成了 10–100 kb 的基因簇敲除, 其中 10–30 kb 的编辑效率为 100%, 70–100 kb 的编辑效率为 75%。2020年, Huang等<sup>[20]</sup>将 CRISPR/Cas9 系统和  $\lambda$ -Red 系统构建于双质粒系统, 实现了 12 kb 的 DNA 片段的插入和 186.7 kb 的 DNA 片段的删除。12 kb 的 DNA 片段插入的基因编辑效率和阳性率分别达到了  $7.2 \times 10^{-4}$  和 98.3%。删除 186.7 kb 的 DNA 片段的基因编辑效率和阳性率分别为  $(1.20 \pm 0.09) \times 10^{-3}$  和  $(97.7\% \pm 2.6\%)$ 。他们又利用该方法将异丁醇合成途径整合到大肠杆菌 MG1665 基因组后, 得到了遗传稳定的菌株, 且异丁醇的产量达到了 1.3 g/L。

除此之外, CRISPR/Cas9 系统还可以同时对多位点进行编辑。Feng等<sup>[71]</sup>开发了 CRISPR/Cas9 辅助多基因组编辑 (CRISPR/Cas9 assisted multiplex genome editing, CMGE) 技术, 可以同时大肠杆菌的 4 个位点进行编辑。

CRISPR/Cas9 系统除了通过参与双链断裂, 在双链修复过程中完成基因编辑外, 还可通过对 Cas9 改造进行基因编辑。部分研究者通过使 Cas9 蛋白的单个或两个切割结构域失活, 并融合可以与突变特异碱基的脱氨酶进行融合, 从而使胞苷突变为胸苷, 完成精确的基因

编辑, 该系统被命名为“base editor” (缩写为 BE)<sup>[72]</sup>。来自哈佛大学的 David R. Liu 课题组创建了新型的腺嘌呤碱基编辑器 (adenine bases editors, ABEs), 该编辑器可将细菌和人类细胞基因组 DNA 中的 A·T 转换为 G·C 碱基对<sup>[73]</sup>。ABE 与之前的 BE 一起, 极大地扩展了碱基编辑的范围, 使基因组 DNA 四种碱基间的相互转换成为可能。华中农业大学的刘正飞教授课题组在此基础上创建了 CRISPR/Cas9 指导的 BE3 系统, 该系统可诱导 C 替换为 T, 将该系统分别应用于大肠杆菌和布鲁氏菌, 分别完成了 *rppH* 基因和 *virB10* 基因中的 Gln 密码子 (CAA) 到终止密码子 (TAA) 的突变, 编辑效率均达到了 99% 以上<sup>[74]</sup>。

## 5 展望

随着分子生物学的快速发展, 各种基因编辑技术, 尤其是两种或三种基因编辑技术的结合使用让原核生物的基因组编辑有了很大的进步, 不仅可以在大肠杆菌中实现单基因的敲除与敲入, 还可以完成基因簇的敲除与敲入, 同时也使长片段的产物代谢途径敲入基因组成为可能。比如在糖蛋白生产上, 已有研究者将糖基化修饰旁途径整合至大肠杆菌基因组上, 改造后的大肠杆菌表现出更高的生长密度, 糖基化效率也有一定的提高<sup>[54]</sup>。

基因表达水平主要依赖于转录和翻译后修饰调节元件, 如启动子 (promoter)、核糖体结合位点 (ribosome binding site, RBS)、信号肽 (signal peptide) 等, 其中启动子作为基因转录的“开关”, 在调节基因表达水平和重构代谢通量方面起着重要作用。在将外源代谢途径整合入基因组后, 由于变为单拷贝, 所以基因表达量可能会有所下降, 这时需要更换强度适宜的

启动子来调节基因表达从而得到符合预期的表达量。在 Red 重组过程中, 由于有 FRT 位点的残留, 给下一步的基因编辑增加了很多不确定性。为了避免在替换启动子过程中将代谢途径敲除的可能, 我们提出了新的编辑策略, 即将含 FRT 位点的抗性筛选片段克隆在代谢途径的上游, 这样可以很方便地替换不同的调控元件, 同时不会干扰敲入的代谢途径相关基因 (图 5)。

通过基因组编辑将代谢途径整合至大肠杆菌基因组可以获得相应的可生产目标产物的遗传稳定性菌株, 同时可以避免由质粒系统给菌株带来的代谢负担以及抗生素的滥用, 这在工业生产上具有很大的应用价值。希望在不久的将来可以根据生产需要来定制相应的工程菌株, 从而为其大规模生产目标产物奠定基础。

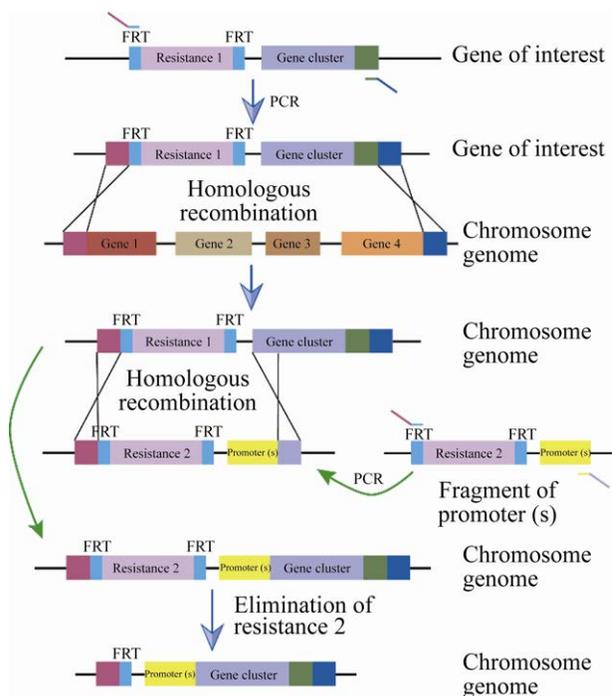


图 5 通过  $\lambda$ -Red 同源重组完成基因组基因的敲出、外源基因的敲入以及基因簇启动子的替换  
Figure 5 Knockout of the genes, knockin of foreign genes and replacement of promoter in genome via  $\lambda$ -Red homologous recombination.

## REFERENCES

- [1] Westers H, Dorenbos R, Van Dijn J, et al. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(12): 2076-2090.
- [2] Chen Z, Ling W, Shang G. Recombineering and I-Sce I-mediated *Pseudomonas putida* KT2440 scarless gene deletion. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(21): fnw231.
- [3] Heinemann M, Panke S. Synthetic biology-putting engineering into biology. *Bioinformatics*, 2006, 22(22): 2790-2799.
- [4] He F, Murabito E, Westerhoff HV. Synthetic biology and regulatory networks: where metabolic systems biology meets control engineering. *J Royal Soc Interface*, 2016, 13(117): 20151046.
- [5] Krishnamurthy M, Moore R, Rajamani S, et al. Bacterial genome engineering and synthetic biology: combating pathogens. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 258.
- [6] Choi K, Jang W, Yang D, et al. Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(8): 817-837.
- [7] Huang C, Ding T, Wang J, et al. CRISPR-Cas9-assisted native end-joining editing offers a simple strategy for efficient genetic engineering in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot*, 2019, 103(20): 8497-8509.
- [8] Yura T, Mori H, Nagai H, et al. Systematic sequencing of the *E. coli* genome analysis of the 0–2.4 min region. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(13): 3305-3308.
- [9] Fujita N, Mori H, Yura T, et al. Systematic sequencing of the *E. coli* genome analysis of the 2.4–4.1 min (110 917–193 643 bp) region. *Nucleic acids Res*, 1994, 22(9): 1637-1639.
- [10] Blattner FR, Plunkett 3rd G, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *E. coli* K-12. *Science*, 1997, 277(5331): 1453-1462.
- [11] González-Torres P, Rodríguez-Mateos F, Antón J, et al. Impact of homologous recombination on the evolution of prokaryotic core genomes. *mBio*, 2019, 10(1): e02494-18.
- [12] Cox MM. The RecA protein as a recombinational repair system. *Mol Microbiol*, 1991, 5(6): 1295-1299.
- [13] Singleton MR, Dillingham MS, Gaudier M, et al. Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks. *Nature*, 2004, 432(11): 187-193.
- [14] 张雪, 温廷益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(12): 89-93.
- [15] Zhang X, Wen TY. Advances of red recombination system in *Escherichia coli* gene modification. *China Biotechnol*, 2008, 28(12): 89-93 (in Chinese).
- [16] Poteete A. What makes the bacteriophage lambda red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 201(1): 9-14.
- [17] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [18] 李文静, 刘锦燕, 史册, 等. 融合 PCR 结合同源重组技术敲除白色假丝酵母菌 *FLO8* 基因. *上海交通大学学报(医学版)*, 2016, 36(3): 334-339.
- [19] Li WJ, Liu JY, Shi C, et al. Knock out *FLO8* gene in *Candida albicans* by fusion PCR combined with homologous recombination. *J Shanghai Jiao Tong Univ (Med Sci)*, 2016, 36(3): 334-339 (in Chinese).
- [20] 李素梅, 卢颖洪, 周敏. 利用 PCR 介导的同源重组制备 V 型 ATP 酶的亚基蛋白 VPH1. *江苏农业学报*, 2017, 33(5): 1016-1021.
- [21] Li SM, Lu YH, Zhou M. Preparation of VPH1 protein of V-ATPase using PCR-mediated homologous recombination. *Jiangsu J Agr Sci*, 2017, 33(5): 1016-1021 (in Chinese).
- [22] 柴冉, 孙强, 邱立友. 降落-重叠 PCR 法四重融合构建平菇同源重组片段. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(4): 375-379.
- [23] Chai R, Sun Q, Qiu LY. Quadruple DNA fragments fusion using touchdown-overlap extension PCR. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2012, 28(4): 375-379 (in Chinese).
- [24] Huang C, Guo L, Wang J, et al. Efficient long fragment editing technique enables large-scale and scarless bacterial genome engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(18): 7943-7956.
- [25] Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, et al. A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 2001, 73(1): 56-65.
- [26] 李鑫, 李亚芯, 戴建君. Red 两步同源重组法在大肠杆菌基因敲除中的应用. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(7): 1934-1940.
- [27] Li X, Li YX, Dai JJ. Usage of two-step red homologous recombination method to knockout the gene of *Escherichia coli*. *China Anim Husb Vet Med*, 2017, 44(7): 1934-1940 (in Chinese).
- [28] Muyrers JP, Zhang Y, Buchholz F, et al. RecE/RecT and Red $\alpha$ /Red $\beta$  initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners.

- Genes Dev, 2000, 14(15): 1971-1982.
- [24] Zhang Y, Muylers JP, Rientjes J, et al. Phage annealing proteins promote oligonucleotide-directed mutagenesis in *E. coli* and mouse ES cells. *BMC Mol Biol*, 2003, 4(1): 1-14.
- [25] Liu, Q, Shen Q, Bian X, et al. Simple and rapid direct cloning and heterologous expression of natural product biosynthetic gene cluster in *Bacillus subtilis* via Red/ET recombineering. *Sci Rep-UK*, 2016, 6: 34623.
- [26] Marshall Stark W, Boocock M, Olorunniji F, et al. Intermediates in serine recombinase-mediated site-specific recombination. *Biochemical Soc T*, 2011, 39(2): 617-622.
- [27] Grindley ND, Whiteson KL, Rice PA. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 567-605.
- [28] Krappmann S. Genetic surgery in fungi: employing site-specific recombinases for genome manipulation. *Appl Microbiol Biot*, 2014, 98(5): 1971-1982.
- [29] Landy A. The  $\lambda$  integrase site-specific recombination pathway. *Microbiol Spectrum*, 2015, 3(2): MDNA3-0051-2014.
- [30] Peredelchuk MY, Bennett GN. A method for construction of *E. coli* strains with multiple DNA insertions in the chromosome. *Gene*, 1997, 187(2): 231-238.
- [31] Broach JR, Hicks JB. Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle. *Cell*, 1980, 21(2): 501-508.
- [32] Sternberg N. Bacteriophage P1 site-specific recombination. III. Strand exchange during recombination at lox sites. *J Mol Biol*, 1981, 150(4): 603-608.
- [33] Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 1981, 150(4): 467-486.
- [34] Sternberg N, Hamilton D, Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol*, 1981, 150(4): 487-507.
- [35] Carnoy C, Roten CA. The dif/Xer recombination systems in proteobacteria. *PLoS One*, 2009, 4(9): e6531.
- [36] Li H, Sharp R, Rutherford K, et al. Serine integrase attP binding and specificity. *J Mol Biol*, 2018, 430(21): 4401-4418.
- [37] Olorunniji FJ, McPherson AL, Rosser SJ, et al. Control of serine integrase recombination directionality by fusion with the directionality factor. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(14): 8635-8645.
- [38] Sukhija K, Pyne M, Ali S, et al. Developing an extended genomic engineering approach based on recombineering to knock-in heterologous genes to *Escherichia coli* genome. *Mol Biotechnol*, 2012, 51(2): 109-118.
- [39] Liu LP, Yang X, Zhao XJ, et al. A Lambda red and FLP/FRT-Mediated site-specific recombination system in *Komagataeibacter xylinus* and its application to enhance the productivity of bacterial cellulose. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(11): 3171-3180.
- [40] Blakely G, May G, McCulloch R, et al. Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. *Cell*, 1993, 75(2): 351-361.
- [41] Le Bourgeois P, Bugarel M, Campo N, et al. The unconventional Xer recombination machinery of *Streptococci/Lactococci*. *PLoS Genet*, 2007, 3(7): e117.
- [42] Leroux M, Rezoug Z, Szatmari G. The Xer/dif site-specific recombination system of *Campylobacter jejuni*. *Mol Genet Genomics*, 2013, 288(10): 495-502.
- [43] Castillo F, Benmohamed A, Szatmari G. Xer site specific recombination: double and single recombinase systems. *Fron Microbiol*, 2017, 8: 453.
- [44] Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat Protoc*, 2009, 4(2): 206-223.
- [45] Kolisnychenko V, Plunkett G 3rd, Herring CD, et al. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Research*, 2002, 12(4): 640-647.
- [46] 葛高顺, 张立超, 赵昕, 等. 大肠杆菌基因组基因无痕敲除的优化方法. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(6): 68-74.
- Ge GS, Zhang LC, Zhao X, et al. Optimization of the method for scarless gene knockout in *Escherichia coli* genome. *China Biotechnol*, 2014, 34(6): 68-74 (in Chinese).
- [47] Tischer BK, Von Einem J, Kaufer B, et al. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*. *Biotechniques*, 2006, 40(2): 191-197.
- [48] Rivero-Müller A, Lajić S, Huhtaniemi I. Assisted large fragment insertion by Red/ET-recombination (ALFIRE)—an alternative and enhanced method for large fragment recombineering. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(10): e78.
- [49] Kalivoda KA, Steenbergen SM, Vimr ER, et al. Regulation of sialic acid catabolism by the DNA binding protein NanR in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2003, 185(16): 4806-4815.
- [50] Hook CD, Samsonov VV, Ublinskaya AA, et al. A

- novel approach for *E. coli* genome editing combining *in vivo* cloning and targeted long-length chromosomal insertion. *J Microbiol Meth*, 2016, 130: 83-91.
- [51] Egger E, Tauer C, Cserjan-Puschmann M, et al. Fast and antibiotic free genome integration into *Escherichia coli* chromosome. *Sci Rep-UK*, 2020, 10(1): 16510.
- [52] Strutton B, Jaffé SRP, Pandhal J, et al. Producing a glycosylating *Escherichia coli* cell factory: the placement of the bacterial oligosaccharyl transferase *pglB* onto the genome. *Biochem Bioph Res Co*, 2018, 495(1): 686-692.
- [53] Englaender JA, Jones JA, Cress BF, et al. Effect of genomic integration location on heterologous protein expression and metabolic engineering in *E. coli*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(4): 710-720.
- [54] Yatesa LE, Natarajan A, Li M, et al. Glyco-recoded *Escherichia coli*: recombineering-based genome editing of native polysaccharide biosynthesis gene clusters. *Metab Eng*, 2019, 53: 59-68.
- [55] Liu L, Li W, Li X, et al. Constructing an efficient salicylate biosynthesis platform by *E. coli* chromosome integration. *J Biotechnol*, 2019, 298: 5-10.
- [56] Noda S, Shirai T, Mori Y, et al. Engineering a synthetic pathway for maleate in *Escherichia coli*. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1153.
- [57] 向华. 来自细菌的魔剪: 2020 年诺贝尔化学奖. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3491-3493.  
Xiang H. Genetic Scissors from Bacteria: the 2020 Nobel Prize in Chemistry. *Microbiol China*, 2020, 47(11): 3491-3493 (in Chinese).
- [58] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [59] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233-239.
- [60] Kirchner M, Schneider S. CRISPR-Cas: from the bacterial adaptive immune system to a versatile tool for genome engineering. *Angew Chem Int Edit*, 2015, 54(46): 13508-13514.
- [61] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839-843.
- [62] Cho SW, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, 2014, 24(1): 132-141.
- [63] 张昆, 陈景超, 李祎, 等. CRISPR\_Cas9 技术在微生物研究中的应用进展. *微生物学通报*, 2018, 45(2): 451-464.  
Zhang K, Chen JC, Li Y, et al. Application progress of CRISPR/Cas9 technology in microbiological research. *Microbiol China*, 2018, 45(2): 451-464 (in Chinese).
- [64] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 181-211.
- [65] Chung ME, Yeh IH, Sung LY, et al. Enhanced integration of large DNA into *E. coli* chromosome by CRISPR/Cas9. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(1): 172-183.
- [66] Zhao D, Feng X, Zhu X, et al. CRISPR/Cas9-assisted gRNA-free one-step genome editing with no sequence limitations and improved targeting efficiency. *Sci Rep-UK*, 2017, 7(1): 16624.
- [67] Su B, Song D, Zhu H. Homology-dependent recombination of large synthetic pathways into *E. coli* genome via lambda-Red and CRISPR/Cas9 dependent selection methodology. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 108.
- [68] Zhao D, Yuan S, Xiong B, et al. Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 205.
- [69] Pyne ME, Moo-Young M, Chung D, et al. Coupling the CRISPR/Cas9 system with lambda red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb*, 2015, 81(15): 5103-5114.
- [70] Ronda C, Pedersen LE, Sommer MO, et al. CRMAGE: CRISPR optimized MAGE recombineering. *Sci Rep-UK*, 2016, 6: 19452.
- [71] Feng X, Zhao D, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9 assisted multiplex genome editing technique in *Escherichia coli*. *Biotechnol J*, 2018, 13(9): e1700604.
- [72] 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.
- [73] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [74] Zheng K, Wang Y, Li N, et al. Highly efficient base editing in bacteria using a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Commun Biol*, 2018, 1: 32.

(本文责编 郝丽芳)