

## · 底层技术开发 ·

毕昌昊 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员，曾担任国家“863计划”首席科学家。本科及硕士毕业于南开大学，2009年于佛罗里达大学取得博士学位，先后在美国特拉华大学和劳伦斯伯克利国家实验室工作，2014年开始在中科院天津工业生物所担任合成生物技术研究组PI。现从事合成生物学技术方法的创建与运用，基因编辑技术研发和基因治疗，人工细胞和细胞机器设计构建等方向研究。几种代表性的合成生物学和基因组编辑技术方法产生较大影响，已有上百个国内外实验室索取材料并使用。在*Nature Biotechnology*、*Advanced Science*、*Molecular Therapy*、*Cell Reports*、*Nucleic acid Research*、*Metabolic Engineering*、*ACS Synthetic Biology*等主流学术期刊发表SCI论文60余篇，申请国际专利2项。



# 基因组编辑技术在工业生物领域中的应用现状及展望

杨超<sup>1</sup>，董兴啸<sup>2</sup>，张学礼<sup>1</sup>，毕昌昊<sup>1</sup>

1 中国科学院天津工业生物技术研究所，天津 300308

2 大连工业大学 生物工程学院，辽宁 大连 116034

杨超, 董兴啸, 张学礼, 毕昌昊. 基因组编辑技术在工业生物领域中的应用现状及展望. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4132-4145.  
YANG C, DONG XX, ZHANG XL, BI CH. Application of genome editing technology in industrial microorganisms: current status and perspectives. Chin J Biotech, 2022, 38(11): 4132-4145.

**摘要：**精准且高效的操纵基因表达或改写基因组序列是基因组编辑领域的研究热点，也是助力工业生物技术快速发展的核心使能技术。基因组编辑技术经历了从锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 和 Cas 核酸酶 3 个发展阶段，目前随着 CRISPR/Cas 这一基因组编辑工具的蓬勃发展，研究人员在工业生物中建立了一系列基于该技术的一代及二代 Cas 基因组编辑技术，助力大肠杆菌等原核及酿酒酵母等真核工业生物底盘细胞的建立及优化。本文对目前基于常用底盘细胞的工业生物技术进行介绍，并对技术的发展历程、应用效果等特点进行总结，最后展望工业生物技术的未来发展前景，以期为科研人员提供参考。

**关键词：**基因组编辑；CRISPR/Cas；工业生物技术；工业生物学

Received: July 21, 2022; Accepted: October 27, 2022

Supported by: Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-017)

Corresponding author: BI Changhao. E-mail: bi\_ch@tib.cas.cn

基金项目：天津市合成生物技术创新能力提升行动项目 (TSBICIP-KJGG-017)

# Application of genome editing technology in industrial microorganisms: current status and perspectives

YANG Chao<sup>1</sup>, DONG Xingxiao<sup>2</sup>, ZHANG Xueli<sup>1</sup>, BI Changhao<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

<sup>2</sup> School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

**Abstract:** Precise and efficient manipulation of gene expression or rewriting genome sequence is the research hotspots of genome editing, and it is also the core enabling technology contributing to the rapid development of industrial biotechnology. Genome editing technology has experienced three stages of development, from zinc finger nuclease (ZFNs), to transcription activator like effector nuclease (TALEN) and Cas nuclease. Currently, vigorous development of CRISPR/Cas has enabled researchers establish a series of first-generation and second-generation Cas-based genome editing technologies. This contributed to the establishment and optimization for prokaryotic chassis such as *Escherichia coli* or eukaryotic chassis such as *Saccharomyces cerevisiae*. This paper summarizes the current development and application of industrial biotechnology using conventional chassis cells, and prospects future development trend with the aim to facilitate researchers to optimize industrial biotechnology and its potential applications.

**Keywords:** genome editing; CRISPR/Cas; industrial biotechnology; industrial biology

工业生物学是一门从分子、细胞和系统 3 个方面解析工业环境下生物体行为的基本规律与作用机制的一门科学, 助力工业环境下各类生物体设计及应用等关键科学问题的解决<sup>[1-2]</sup>。伴随工业生物学概念的提出, 工业生物技术的发展也随之而至, 在工业生物学这一基础学科的支撑下, 工业生物技术迎来蓬勃发展, 并为人类经济发展提供所需的基础化学品、医药产品和材料等。目前, 工业生物学以分子、细胞和系统 3 个层面为基础, 进一步发展了工业蛋白质科学、工业细胞科学及工业发酵科学等方向, 研究人员也从蛋白、细胞和发酵 3 个方向进行优化, 以大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等工业生物为核心底盘细胞, 开发优异的工业化产品。值得注意的是, 蛋白、细胞和发酵系统的优化离不

开基因组编辑技术的发展, 快速且精准的实现工业生物基因组的编辑可助力分子、细胞和系统的迅速进化, 加速工业生物技术的发展。

## 1 基因组编辑技术的发展历程

基因组编辑技术是指一类可对生物体基因组进行设计、改造的生物学技术, 可实现基因组表达的操控或基因组序列的改写, 其发展阶段经历了锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN) 和 Cas 核酸酶 3 次技术革新 (表 1)。

### 1.1 锌指核酸酶技术

ZFN 技术<sup>[3-4]</sup>主要包括两个组分, 一是用于结合特异性 DNA 序列的含有锌指结构的蛋白质, 二是可实现 DNA 非特异性切割的核酸

表 1 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术比较  
Table 1 Comparison among ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 technologies

Feature	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Efficiency	Low	Low	High
Specificity	High	High	High
Simplicity	Hard	Hard	Easy
Universality	Restrict	Restrict	Wide

内切酶 *Fok I*，该技术利用一对串联的锌指蛋白靶向 DNA 序列，从而将内切酶 *Fok I* 锚定至目标切割位点，进行基因组序列的切割，产生 DNA 双链断裂。ZFN 技术可通过锌指蛋白的数量调整 DNA 序列结合的特异性，然而靶向的基因组序列和锌指蛋白序列需要复杂的工序进行分析设计，且 ZFN 相关的技术存在专利封锁，造成该技术至今无法广泛应用。

## 1.2 转录激活因子样效应物核酸酶技术

TALEN 技术<sup>[5-6]</sup>同样由两部分构成，一是来源于转录激活物样效应物的重复序列，可特异性靶向基因组序列，二是介导 DNA 序列切割的核酸酶 *Fok I*。相比于 ZFN 技术，TALEN 技术的设计更为简单，毒性低且效率相当，然而 TALEN 技术对应的融合蛋白尺寸更大，且重复序列更多，造成其在大肠杆菌等工业生物中组装困难。

## 1.3 Cas 核酸酶

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas 系统是存在于细菌等微生物体内的一类适应性免疫反应蛋白系统，可用于抵御外源病原体的侵入，CRISPR/Cas 系统通过引导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 靶向识别病原体的基因组，并在 Cas 核酸酶的作用下破坏病原体的基因组。近年来，随着研究人员对这一系统的认知和改造，CRISPR/Cas 系统已被广泛应用于原核生物基因组的编辑，

并且由于 CRISPR/Cas9 技术在基因组编辑及改造中的优越性，研究人员基于该技术优化并进一步发展了多个助力工业生物细胞进化的新技术，极大促进工业生物技术的发展。

### 1.3.1 一代 CRISPR 技术

CRISPR/Cas 系统包含了靶向基因组序列的 sgRNA 序列以及行使 DNA 切割功能的 Cas 蛋白<sup>[7-8]</sup>，因此，研究人员可直接通过设计成对的 sgRNA 靶向序列，实现对靶基因序列的双链切割，而切割的 DNA 双链会通过两种方式进行修复<sup>[9]</sup>，其中非同源末端连接 (non-homologous end-joining, NHEJ) 的修复方式会造成目标序列的删除，诱导靶基因的敲除<sup>[10-11]</sup>，而高保真的同源重组修复 (homology-directed repair, HDR) 可在外源 DNA 片段的引入下实现目标序列的插入，诱导靶基因的表达<sup>[12-13]</sup>。然而，Cas 核酸酶诱导的 DNA 双链断裂会造成基因组的不稳定，且该方法诱导的靶基因敲除和表达效率较低。

### 1.3.2 二代 CRISPR 技术

研究人员通过对 Cas9 蛋白分子机制的分析，理性设计了可不诱导 DNA 双链断裂的 dCas9 (dead Cas9) 蛋白，随后将能够发挥转录激活或抑制的效应蛋白与 dCas9 蛋白进行融合表达，在经由 sgRNA 的引导下，靶向特定基因的启动子或增强子区域，诱导靶基因的激活或抑制表达。由此，研究人员开发了 CRISPRa (CRISPR activation)<sup>[14]</sup> 和 CRISPRi (CRISPR interference)<sup>[15]</sup> 技术，可分别诱导基因的转录激活和抑制，CRISPRa 和 CRISPRi 技术虽然特异性强，且效率高，但并不能实现基因组序列的改写。

碱基编辑 (base editing, BE) 技术同样利用了核酸酶失活的 Cas9 突变体 (dead Cas9 或 nickase Cas9)，研究人员将 Cas9 突变体与效应

蛋白-脱氨酶蛋白融合表达, 构建了碱基编辑系统<sup>[16-18]</sup>。该技术在脱氨酶和 Cas9/sgRNA 的作用下可诱导靶基因序列的胞嘧啶、腺嘌呤发生脱氨反应, 随后在 DNA 修复及 DNA 复制机制的作用下, 实现碱基的转换, 迄今, 碱基编辑系统已经实现了碱基 C-T<sup>[18]</sup>、A-G<sup>[17]</sup>、C-G<sup>[16]</sup>、C-A<sup>[16]</sup>的转换。碱基编辑系统不会诱导 DNA 双链断裂, 也无需外源 DNA 的引入, 即可实现靶基因的突变, 且具有设计和操作简便、效率高的特点。

引导编辑 (prime editor, PE) 系统包含了发挥逆转录功能的逆转录酶以及核酸酶部分失活的 nCas9 蛋白, 同时在 sgRNA 的 3'端添加了一段引物和模板序列, 可实现任意碱基之间的转换及靶基因序列的插入<sup>[19-20]</sup>, 但引导编辑的设计较为繁琐, 且靶向编辑效率有待进一步的优化。

## 2 基因组编辑技术在工业生物技术中的应用

基因组编辑技术在工业生物技术中的应用载体主要为工业生物底盘细胞, 如大肠杆菌、酿酒酵母等微生物, 我们将以工业底盘细胞为主, 分类介绍基因组编辑技术在工业生物技术

的发展历程、应用效果等特点 (表 2)。

### 2.1 大肠杆菌基因组编辑技术进展

大肠杆菌是肠杆菌科的一员, 现作为细菌的模式生物广泛用于科学研究, 不仅如此, 随着工业生物技术的发展, 大肠杆菌作为工业生物产品的底盘细胞也被广泛应用, 如利用大肠杆菌生产  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[21]</sup>、丁二酸<sup>[22]</sup>等。2013 年, 洛克菲勒大学 Luciano A. Marraffini 团队首次应用 CRISPR/Cas9 系统 (Cas9 蛋白、双 RNA、 $\lambda$ -Red 蛋白和单链线性 DNA) 对大肠杆菌进行基因组编辑, 诱导基因组突变效率可达 65%<sup>[23]</sup>; 2015 年, 天津大学赵学明团队对 RNA 系统简化, 并在单个 sgRNA 的介导下实现大肠杆菌的基因组编辑, 最高效率可达 100%<sup>[21]</sup>; 随后为进一步简化基因组编辑步骤及缩短筛选时间, 2017 年, 中国科学院天津工业生物技术研究所 (简称天津工业生物所) 毕昌昊和张学礼团队共同开发了 CFPO (CRISPR/Cas9-facilitated multiplex pathway optimization) 技术<sup>[24]</sup>, 研究人员首先将 pRedCas9 质粒和 RBS (ribosome binding site) 供体 DNA 文库共转染至大肠杆菌中, 诱导基因重组, 随后继续转染 gRNA 文库质粒, 在染色质水平上进一步诱导基因组编辑, 提高了优势细胞筛选的效率。CFPO 技术

表 2 工业生物中 CRISPR/Cas 技术的进展

Table 2 Advances of CRISPR/Cas technologies in industrial microorganisms

Organism	Type	CRISPR/Cas	Next-generation CRISPR/Cas
<i>Escherichia coli</i>	Prokaryote	CRISPR/Cas9, CFPO, CAGO	CBE, DBE, GBE
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Prokaryote	CRISP/Cas12, CRISPR/Cas9	CRISPRi, CBE, MACBETH, ABE, TadA-dCas9-AID, BETTER
<i>Bacillus subtilis</i>	Prokaryote	CRISPR/Cas9	CRISPRi, CBE
<i>Streptomyces</i>	Prokaryote	CRISPR/Cas9, CRISP/Cas12	CRISPRa/i, asRNA-BE
<i>Ralstonia eutropha</i>	Prokaryote	CRISPR/Cas9	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eukaryote	CRISPR/Cas9, GTR-CRISPR, mGE	CRISPRa, CBE
<i>Myceliophthora</i>	Eukaryote	Cas9/Cas12, CAMR	CBE
<i>Aspergillus niger</i>	Eukaryote	CRISPR/Cas9	CBE

使得研究人员可以从染色质水平上同时调控多个基因，与通过质粒同时过表达多个基因相比<sup>[25-26]</sup>，该技术不会给细胞造成生长负担，也可以忽略质粒表达的不稳定性；同年两团队再次合作建立了 CAGO (CRISPR/Cas9-assisted gRNA-free one-step) 基因组编辑技术<sup>[27]</sup>，该技术首先借由同源重组的方法将 Cas9 高效靶向的 N20 序列提前插入大肠杆菌基因组中，随后通过 Cas9 蛋白诱导基因组删除、插入的功能，完成高效、特异的基因组编辑。值得注意的是，Cas9 蛋白与基因序列特异性的结合受限于前间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 序列的识别<sup>[28]</sup>，而 CAGO 技术的使用可以忽略 Cas9 蛋白结合的 PAM 序列限制，且研究人员通过该技术可高效删除 100 kb 甚至更大的染色质片段。

为进一步提高 CRISPR/Cas9 技术在大肠杆菌基因组中的编辑效率，2018 年，神户大学 Akihiko Kondo 团队首次将 PmCDA 脱氨酶与

Cas9 蛋白系统融合，建立了大肠杆菌 C>T 突变的碱基编辑系统，突变效率可达 95.1%<sup>[29]</sup>；2019 年，天津工业生物所毕昌昊和张学礼团队将脱氨酶 TadA 和 nCas9 (nickase Cas9) 构建的碱基编辑系统与诱导性的活性 Cas9 融合，开发了 DBE (double-check editing) 编辑技术<sup>[30]</sup>，该技术在碱基编辑的基础上同时引入了靶向序列一致的活性 Cas9 蛋白，可诱导未发生碱基编辑细胞的死亡，进一步提升大肠杆菌中 ABE (adenosine base editor) 的编辑效率；2021 年，两团队再次合作首次报道了一种新型碱基编辑工具-糖基化酶碱基编辑系统 (glycosylase base editor, GBE)，可在大肠杆菌中高效实现碱基 C>A 的突变，极大助力大肠杆菌的基因组编辑<sup>[16]</sup>，该技术将活化诱导的胞苷脱氨酶 (activation-induced cytidine deaminase, AID) 与 nCas9 蛋白融合表达，随后转入大肠杆菌中，实现了大肠杆菌碱基 C>A 的突变 (图 1)，效率可达近 90%，与既往碱基 C>T 和 A>G 突变类型相比<sup>[17-18]</sup>，

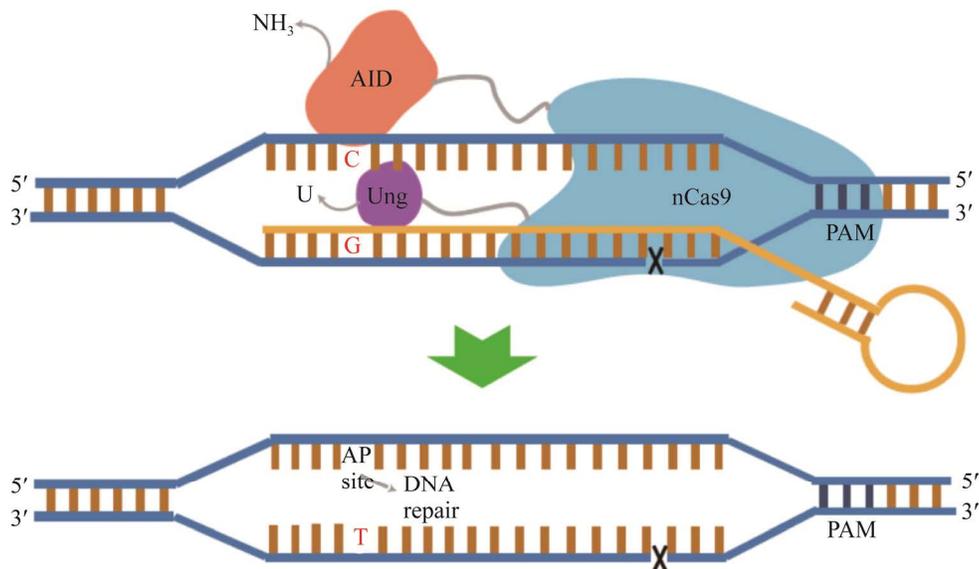


图 1 糖基化酶碱基编辑器在大肠杆菌中的基因组编辑<sup>[16]</sup>

Figure 1 Genome editing in *Escherichia coli* using glycosylase base editor<sup>[16]</sup>. AID: activation induced cytidine deaminase; Ung: uracil DNA glycosylase; PAM: protospacer adjacent motif; AP site: abasic site.

该技术首次报道了一种新型基因组碱基突变类型 C>A 突变, 丰富了大肠杆菌基因组编辑工具。

## 2.2 谷氨酸棒状杆菌基因组编辑技术进展

谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是一类革兰氏阳性菌, 是工业生物领域中重要的底盘细胞之一, 被广泛用于氨基酸的生物制造<sup>[31]</sup>。近年来, 谷氨酸棒状杆菌基因组编辑技术正在不断发展, 不仅推动了谷氨酸棒状杆菌的基础研究, 也加速了基于谷氨酸棒状杆菌的细胞工厂的创建和优化。2016 年, 麻省理工学院 Timothy K. Lu 团队首次成功应用 CRISPR/Cas9 系统对谷氨酸棒状杆菌进行基因组编辑, 研究人员将失活的 dCas9 蛋白靶向特定基因组, 建立了 CRISPRi 技术, 其抑制单个基因的表达效率可达 98%<sup>[32]</sup>; 2017 年, 中国科学院上海生命科学研究院杨晟团队在谷氨酸棒状杆菌中成功将 CRISPR/Cas12 系统与单链 DNA 重组系统结合, 并介导基因组突变, 编辑效率可达 86%–100%<sup>[33]</sup>; 同年 7 月, 韩国科学技术院 Sang Yup Lee 团队发现可通过密码子优化的方式降低 Cas9 蛋白在细菌中的毒性, 并首次在谷氨酸棒状杆菌中建立基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑技术<sup>[34]</sup>; 同年 11 月, 天津工业生物所郑平和孙际宾团队在谷氨酸棒状杆菌中也通过重构 Cas9 和 gRNA 的表达盒, 解决了 Cas9 毒性和 gRNA 自身转录终止子无法终止的问题, 且研究人员采用双质粒共转化的方法在谷氨酸棒状杆菌中实现了基因敲除和插入 (效率可达 47.3%)<sup>[35]</sup>, 与 Cas12 介导的基因组编辑相比<sup>[33]</sup>, Cas9 诱导基因组富含 GC 序列的谷氨酸棒状杆菌的编辑范围更为广谱。此外, 为提升谷氨酸棒状杆菌基因组的编辑效率和多样性, 研究人员还将噬菌体重组酶 RecT 与 CRISPR 系统进行联合应用, 提升了基因组编辑效率, 并进一步优化实现了多基因靶点的高效基因组

编辑<sup>[33-34,36]</sup>。

谷氨酸棒状杆菌的同源重组修复效率低下, 而碱基编辑技术并不依赖于基因组的同源重组效率, 因此, 为进一步优化谷氨酸棒状杆菌基因组的编辑类型和编辑效率, 2018 年, 天津工业生物所郑平和孙际宾带领的系统与合成生物技术研究团队与王猛带领的高通量新分子生物合成研究团队合作, 在谷氨酸棒状杆菌中开发了基于碱基编辑技术的多元自动化基因组编辑方法 (multiplex automated corynebacterium glutamicum base editing method, MACBETH)<sup>[37]</sup>。研究人员首先结合 CRISPR/Cas9 系统的定位功能与胞嘧啶脱氨酶 (AID) 的碱基编辑功能, 可在染色体靶位点特异性实现 C>T 的编辑, 效率高达 90%, 并由此诱导基因的转录提前终止, 从而失活靶基因。随后借助自动化平台, 研究团队可实现从质粒构建、基因组编辑、获取正确突变株和表型验证的全流程自动化操作, 相比于人工操作的时效性长和不稳定性等缺点, MACBETH 技术可实现每月数千突变株的构建, 为谷氨酸棒状杆菌的基因组改造提供强大的技术支持。然而, 该技术仍存在靶标范围、编辑窗口和碱基转化种类有限的问题, 且人工设计碱基编辑所需 sgRNA 的过程繁琐, 限制了全流程自动化的碱基编辑。2019 年研究团队再次合作, 并对谷氨酸棒状杆菌的碱基编辑工具进行了扩展<sup>[38]</sup>。首先, 研究人员利用识别不同 PAM 的 Cas 突变体, 将 PAM 限制由 NGG 扩展为 NG, 使可编辑的靶点数量提高了 3.9 倍; 第二, 通过截短或延长 gRNA 长度, 将编辑窗口由原来的 5 bp 扩展为 7 bp; 第三, 在 CRISPR/Cas 系统上引入腺苷脱氨酶, 建立了 A 到 G 的腺嘌呤碱基编辑工具; 最后, 研究人员为精简 sgRNA 的设计流程, 开发了在线工具, 方便了碱基编辑工具在基因失活应用中

sgRNA 的设计与评估, 该研究进一步丰富了谷氨酸棒状杆菌基因组编辑工具库; 2020 年, 江南大学刘龙团队将胞嘧啶脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶进行融合, 在谷氨酸棒状杆菌中开发了双碱基编辑系统, 可同时实现 C>T/G 和 A>G 的基因组编辑<sup>[39]</sup>; 不仅如此, 研究人员还将碱基编辑系统应用于基因组的转录调控研究, 2022 年, 郑平等团队再次合作开发了基于碱基编辑的多基因精细表达调控新技术 BETTER (base editor-targeted and template-free expression regulation)<sup>[40]</sup>, 创新性地将碱基编辑用于基因组原位表达调控元件建库, 在谷氨酸棒状杆菌中首次实现了 10 个基因的组合表达调控, BETTER 技术的设计理念是预先在染色体中目的基因上游引入特定的转录或翻译元件 (如富含 G 的 RBS 序列), 应用碱基编辑器编辑产生转录或翻译元件多样性, 后根据目的表型进行筛选富集, 以获得符合调控目的的突变菌株 (图 2)。该技术颠覆了传统的基因表达调控方法<sup>[24]</sup>, 突破了组合调控对整合模板的依赖, 降低了对外源片段转化效率的要求, 可在一轮实验中完成多基因表达调控, 有望在多种难编辑工业细胞体内实现复杂的代谢调控, 为复杂的

代谢调控模式设计开拓新方向。

### 2.3 枯草芽孢杆菌基因组编辑技术进展

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一种被大量研究的革兰氏阳性菌, 被广泛应用于抗生素、药用蛋白、工业酶和生物聚合物的生产, 因其优良的蛋白质分泌能力, 常被用作工业生产中的重要底盘细胞之一<sup>[41]</sup>。2016 年, 滑铁卢大学 C. Perry Chou 团队首次在枯草芽孢杆菌中建立了 CRISPR/Cas9 系统, 包括基于活性 Cas9 的基因突变和基于 dCas9 的 CRISPRi 基因转录调控工具, 并成果实现单基因和双基因的基因组编辑, 效率可达 100% 和 85%<sup>[42]</sup>; 2019 年, 为进一步提升基因组编辑效率及减少活性 Cas9 蛋白双链切割的副反应, 天津大学赵学明团队开发了基于 nCas9 蛋白的基因组编辑技术, 该技术的整体编辑效率高于活性 Cas9 技术, 尤其在多基因的编辑中效果提升更为明显<sup>[43]</sup>。

2020 年, 天津工业生物所王猛和毕昌昊团队与爱丁堡大学 Susan J. Rosser 实验室合作, 利用 dCas9 (dead Cas9) 和 AID 脱氨酶在枯草芽孢杆菌中首次开发了枯草芽孢杆菌的基因组碱基编辑方法, 实现了基因组碱基 C>T 的编辑, 并在多基因组编辑中实现高效应用<sup>[44]</sup>。该碱基编

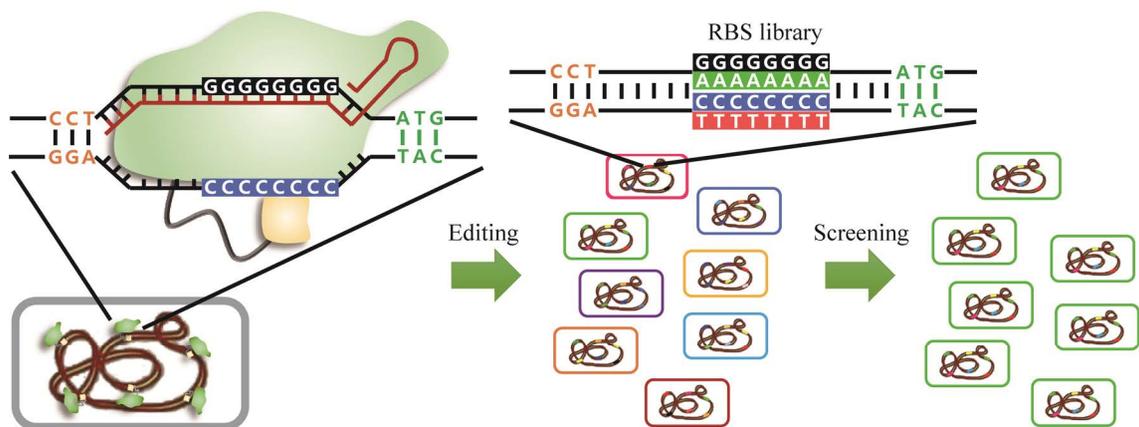


图 2 BETTER 技术示意图<sup>[40]</sup>

Figure 2 The schematic representation of BETTER technology<sup>[40]</sup>. RBS: ribosome binding site.

辑系统在枯草芽孢杆菌 168 菌株中有 5 nt 的编辑框, 位于 PAM 上游-16 至-20 区域, 其中-18 位点的编辑效率最好, 最高能够达到 100%。此外, 该方法还能同时实现 3-4 个基因的同时高效编辑, 为枯草芽孢杆菌的基因操作和工业应用提供有效工具。

## 2.4 链霉菌基因组编辑技术进展

链霉菌 (*Streptomyces*) 是许多重要天然产物的生产者, 其基因组蕴含着大量未被开发的次级代谢生物合成基因簇, 也是工业生物重要的底盘细胞之一<sup>[45]</sup>。2015 年, 伊利诺伊大学赵惠民团队在链霉菌中首次报道了基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑技术, 并在 3 种类型的链霉菌中实现染色质片段的删除, 编辑效率在 70%-100%<sup>[46]</sup>; 2020 年, 天津大学罗云孜团队在链霉菌中开发了基于 CRISPR/Cas12a 的基因组编辑技术, 该技术不仅能对长达 100 kb 的基因组片段进行高效删除, 同时研究人员发现了一个 PAM 框更为广谱的 Cas 突变体, 进一步优化了编辑工具的应用范围<sup>[47]</sup>。

2022 年, 为提升基因组中低表达生物合成基因簇的表达效率, 莱斯大学 James Chappell 团队在链霉菌中将 dCas9 蛋白与转录激活结构域融合, 开发了 CRISPRa 技术, 并通过靶向基因组转录起始及延伸的 sgRNA 优化了现有的 CRISPRi 技术, 研究人员还将这两种技术用于链霉菌内源性调控网络的基因表达调控, 成功实现沉默生物合成基因簇的高效表达<sup>[48]</sup>。

基于 CRISPR/Cas9 发展起来的单碱基编辑技术也已成功应用于天蓝色链霉菌等一些模式菌株中, 相较于传统 CRISPR 技术更为方便快捷。基于胞嘧啶脱氨酶的碱基编辑效率与底盘细胞尿嘧啶 DNA 糖苷酶 (uracil DNA glycosylase, UDG) 的功能密切相关, 枯草芽孢杆菌研究人员前期多用噬菌体来源的尿嘧啶 DNA 糖苷酶

抑制剂 (uracil glycosylase inhibitor, UGI) 来提升碱基编辑效率, 但在某些情况下, 其抑制效果却并不理想。2021 年, 天津工业生物所王猛研究员带领的高通量编辑与筛选平台实验室, 与天津科技大学花尔并教授团队合作, 在模式菌株变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 66 中研究了 UDG 与碱基编辑效率的关系, 并开发了新一代碱基编辑器 asRNA-BE (antisense RNA interference-enhanced CRISPR/Cas9 Base editing method)<sup>[49]</sup>。研究人员首先利用融合了胞苷脱氨酶 rAPOBEC1 的 BE 系列碱基编辑器成功实现基因组 3 个次级代谢基因的编辑。在此基础上, 研究团队利用 CRISPR/Cas9 辅助的基因敲除手段, 分别构建了尿嘧啶 DNA 糖苷酶 UDG1 和 UDG2 的单敲和双敲菌株, 发现在失活 UDG 的情况下, 碱基编辑效率可较原始提高 3.4 倍到 67.4 倍不等。考虑到 UDG 是细胞修复过程中的关键酶, 其长期缺失不利于菌株基因组的稳定, 团队利用反义 RNA 干扰降低基因表达水平的策略代替基因敲除, 在原始的 BE 编辑器基础上整合了针对 UDG 的反义 RNA 干扰模块, 构建了新一代碱基编辑器 asRNA-BE, 成功将编辑效率提高至原来的 2.8 倍到 65.8 倍不等。asRNA-BE 编辑器可以在碱基编辑过程中瞬时抑制 UDG 的表达。基因组测序结果也表明, 与 BE 编辑器相比, asRNA-BE 编辑器在大幅度提高编辑效率的同时, 并未引起额外的脱靶, 在工业细胞改造等方面具有良好的应用前景。

## 2.5 罗氏菌基因组编辑技术进展

罗氏菌 (*Ralstonia eutropha*) 是一种广泛存在于土壤和淡水环境中的革兰氏阴性杆菌, 近年来, 随着研究人员对其经济价值的挖掘, 罗氏菌也被开始用于设计生产如支链醇等生物燃料<sup>[50]</sup>。目前, 罗氏菌基因组编辑技术主要依赖于 II 型内含子和自杀性质粒介导的编辑, 但

这 2 种方法设计复杂、耗时且效率低下<sup>[51]</sup>。2018 年,中科院工业生物所毕昌昊和张学礼研究团队首次在罗氏菌中应用了 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,成功开发了基于 Cas9 编辑的基因组插入技术<sup>[52]</sup>,为将 Cas9 基因组编辑技术应用于罗氏菌,研究人员首先对罗氏菌的电穿孔效率进行优化提高质粒转化效率,随后利用阿拉伯糖诱导型启动子表达 Cas9 蛋白介导基因组编辑,最后研究人员在罗氏菌中共对 5 个基因进行了分别编辑,效率可达 78.3%–100%。

## 2.6 酿酒酵母基因组编辑技术进展

酿酒酵母作为工业生物领域中重要的底盘细胞之一,被广泛用于开发传统酿造食品、大宗化学品和高附加值工业产品<sup>[53]</sup>,而基因组编辑技术的发展同样为加快酿酒酵母细胞相关工业产品的开发提供强有力的使能技术。早在 2013 年,哈佛医学院 George M. Church 团队便在酿酒酵母中建立了 CRISPR/Cas9 基因组编辑工具,研究人员发现在供体 DNA 添加的情况下,Cas9 和瞬时表达的 gRNA 盒介导的 DNA 双链断裂最高可提升细胞同源重组效率达 130 倍,而在持续过表达 Cas9 和 gRNA 表达质粒后,同源重组编辑效率可达 100%<sup>[54]</sup>;虽然多个基因连续性编辑可以依赖选择性标记物的筛选,但标记物的回收耗时耗力,为进一步提升多基因同时编辑的效率,研究人员对 gRNA 表达系统进行优化,以实现酵母基因组多基因的高效编辑。2015 年,丹麦技术大学 Jay D. Keasling 团队使用单个 SNR52 启动子在同一质粒中启动多个 gRNA 的表达,虽然编辑效率较高,但转化效率出现明显下降<sup>[55]</sup>;2019 年,北京化工大学刘子鹤团队建立了 GTR-CRISPR (gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9) 系统,研究人员在不同的 gRNA 表达序列之间加入了 tRNAGly 序列,从而实现多个 gRNA 序列的同时等效表

达,并在该技术的支持下,最高实现 8 个基因的同时编辑,效率可达 87%<sup>[56]</sup>;2022 年,考虑到酿酒酵母 NHEJ 修复途径介导的基因组突变能力较差,天津工业生物所王钦宏团队基于对酿酒酵母内源双链 DNA 断裂修复途径的改造,将筛选的 DNA 修复蛋白与 Cas9 蛋白融合,建立了不依赖模板的高效致突变基因组技术 (mutagenic genome editing, mGE)<sup>[57]</sup>,与 CRISPR/Cas9 常规诱导的基因组突变<sup>[58-59]</sup>相比,该技术显著提升了酿酒酵母基因组突变的多样性,实现了靶向基因的可遗传多样性调控表达。研究人员通过评价和比较 DNA 修复途径中多个关键基因的敲除、过表达或氨基酸突变等对 CRISPR/Cas 系统诱导基因组编辑功能的影响,构建了基于 MRE11-H125N (MRE11 核酸酶活性失活的等位基因) 和 Cas9/Cpf1 的编辑工具组合,并在酿酒酵母中通过调节 FPS1 和 GPD1 的表达有效提高了乙醇生产能力。

2017 年,德克萨斯大学 Hal S Alper 团队在酿酒酵母中应用了 CRISPRa 技术实现了基因组的阶级表达水平,研究人员采用了 dCas9-VPR 编辑器,并使用靶向目标基因启动子不同位置的 gRNA 序列,结果发现,dCas9-VPR 介导的基因组表达水平与 gRNA 靶向序列和启动子的距离正相关,由此研究人员进一步利用该系统鉴定了酿酒酵母中关键代谢途径的限速步骤,从而提升甘油生产能力<sup>[60]</sup>。

2022 年,天津工业生物所毕昌昊和张学礼研究团队解析了酿酒酵母中碱基 C>G 突变的分子机制,并以此为基础开发了基于不同 DNA 聚合酶的碱基编辑系统,该系统在依赖于不同聚合酶的调控下,可在酵母中分别特异性实现碱基 C>G 和 C>A 的编辑<sup>[61]</sup>,为酵母基因组编辑提供高效、便捷的工具。

## 2.7 嗜热毁丝霉基因组编辑技术进展

嗜热毁丝霉 (*Myceliophthora*) 是一种能够快速降解纤维素的嗜热丝状真菌, 其分泌的纤维素水解酶的种类和数量丰富, 且稳定性好, 因此该菌在纤维素酶生产和生物基燃料的研发方面具有巨大潜力<sup>[62]</sup>。2017年, 天津工业生物所田朝光团队以嗜热毁丝霉为研究对象, 采用自主挖掘的嗜热毁丝霉 U6 启动子, 诱导 sgRNA 的转录表达, 并采用原生质体共转化的方法将编辑系统和同源重组模板导入到目标细胞中, 首次建立了 CRISPR/Cas9 介导的嗜热真菌基因组编辑系统<sup>[63]</sup>, 与既往通过 RNA 干扰实现的基因表达敲低效率 (约 20%)<sup>[64]</sup>相比, CRISPR 介导的单基因缺失的同源重组效率高达 90%–95%。Cas12 蛋白是一类 CRISPR 系统中的 V 型核酸酶, 因其诱导基因突变的能力同样被广泛应用于各类工业生物, 虽然 Cas12 核酸酶的应用已在谷氨酸棒状杆菌<sup>[33]</sup>、链霉菌<sup>[65]</sup>等微生物中报道, 但 Cas12 在嗜热真菌中的应用还未有报道。2019年, 该团队研究人员进一步升级了嗜热真菌基因组编辑技术, 构建了一种基于 V 型 Cas12a 核酸酶的新型基因组编辑体系<sup>[66]</sup>, 并将其与 crRNA-array 串联表达系统联合, 从而能够快速、简易地实现基因组多基因的编辑, 此外, 研究人员还将 Cas12a 系统和 Cas9 系统的交替使用, 进一步提高靶点选择的灵活性。不仅如此, 该团队基于嗜热真菌 CRISPR-Cas9/Cas12a 编辑系统, 交替使用 2 个选择性标记基因 *neo* 和 *bar*, 进一步构建了标记基因回收和交替使用的丝状真菌 CRISPR-Cas 基因组编辑技术系统 (CRISPR-Cas-assisted marker recycling, CAMR)<sup>[66]</sup>, 丰富了工业丝状真菌基因组编辑系统选择的多样性。

2022年, 田朝光团队通过对 APOBEC1、CDA 脱氨酶的进化, 在嗜热毁丝霉中成功开

发了胞嘧啶单碱基编辑系统, 可有效实现碱基 C>T 的置换, 随后研究人员还通过碱基编辑诱导终止密码子的功能成功实现 *amdS* 基因和 *cre-1* 基因的失活, 编辑效率最高可达 92%<sup>[67]</sup>, 该技术为快速、高效且精准的创建嗜热真菌突变体提供有力工具。

## 2.8 黑曲霉基因组编辑技术进展

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 是重要的传统工业生物细胞, 在有机酸与酶制剂等领域直接产值近百亿美元。黑曲霉具有极端环境耐受性、高生产经济性、强发酵鲁棒性和食品安全性等特性, 是不可多得理想细胞工厂<sup>[68]</sup>。2017年, 自然资源和生命科学大学的 Matthias G. Steiger 团队在黑曲霉中报道了基于 CRISPR/Cas9 的基因组编辑技术, 研究人员使用了 RNA 聚合酶 II 启动子诱导 sgRNA 的表达, 基因组整合的编辑效率最高可达 100%<sup>[69]</sup>; 2018年, 天津工业生物所孙际宾与郑平研究团队通过对异源性及黑曲霉内源性 U6 启动子的挖掘, 首次报道了基于 U6 启动子表达 sgRNA 的 CRISPR/Cas9 技术<sup>[70]</sup>, 与既往通过 RNA 聚合酶 II 启动子诱导的 sgRNA 表达系统相比<sup>[69]</sup>, 该技术在整体应用设计上更为灵活, 进一步丰富黑曲霉基因组编辑技术进展; 2019年, 两团队为解决 CRISPR/Cas9 系统中缺乏普适性的高效表达 sgRNA 这一问题, 首次提出以 5S rRNA 的启动子来驱动 sgRNA 表达的策略<sup>[71]</sup>, 研究发现 5S rRNA 启动子可显著提高黑曲霉中 sgRNA 的表达丰度, 引导 Cas9 蛋白靶向特定基因位点进行切割, 从而使基于 NHEJ 系统的基因失活效率达 100%。不仅如此, 研究人员发现在 NHEJ 失活的底盘细胞中利用“two-cuts”的基因精准敲除策略进行一次基因组编辑, 即可实现长达 48 kb 的基因簇敲除, 极大提升了黑曲霉基因组编辑效率。

2019年, 华南理工大学潘力团队首次报道了一种在黑曲霉中建立的碱基编辑系统<sup>[72]</sup>, 可高效诱导基因组 C>T 的碱基编辑, 实验中研究人员使用了 rAPOBEC1 和 nCas9 蛋白建立了碱基编辑系统, 编辑窗口达 8 个碱基, 此外, 研究人员还通过该技术诱导了尿苷营养缺陷型基因和色素基因的失活, 编辑效率可达 47.36%–100%, 该技术进一步丰富了黑曲霉基因组编辑工具文库。

### 3 基因组编辑技术的展望

伴随 CRISPR 相关基因组编辑技术的不断发展, 可以预见工业生物技术的发展也会迎来爆发期, 然而目前基于 CRISPR 发展的基因组编辑技术在工业生物领域中的应用潜力还有待进一步挖掘。首先, 基于 CRISPR 开发的基因组编辑技术多在真核生物领域中加以应用, 在微生物相关的工业生物领域中的应用还少有研究, 如先导编辑技术、RNA 编辑技术和转座酶编辑技术等, 目前在酿酒酵母、丝状真菌等工业生物基因组编辑中所需的逆转录酶、RNA 编辑催化酶等仍需进一步挖掘, 且这些技术助力基因组编辑的效率、方式等也需研究工作探索; 其次, 伴随工业生物细胞队伍的不断壮大, 对于新型工业基因组编辑技术的开发及发展也是工业生物技术研究中的重点, 此外对于现阶段基因组编辑效率、特异性较低的技术也要进一步地优化革新, 从而保证工业生物技术的多样性发展; 最后, 随着生物信息技术的不断进步和人工智能技术的快速发展, 新型基因组编辑技术的开发以及基于人工智能这一新模式开发的基因组编辑技术也值得期待。

#### REFERENCES

- [1] Straathof AJJ, Wahl SA, Benjamin KR, et al. Grand research challenges for sustainable industrial biotechnology. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(10): 1042-1050.
- [2] Clomburg JM, Crumbley AM, Gonzalez R. Industrial biomanufacturing: the future of chemical production. *Science*, 2017, 355(6320): aag0804.
- [3] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *PNAS*, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [4] Smith J, Bibikova M, Whitby FG, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(17): 3361-3369.
- [5] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-1512.
- [6] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501.
- [7] 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.
- [8] Barrangou R. RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(9): 836-838.
- [9] Paquet D, Kwart D, Chen A, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*, 2016, 533(7601): 125-129.
- [10] Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCH systems. *Nat Protoc*, 2016, 11(1): 118-133.
- [11] Mandl M, Ritthammer H, Ejaz A, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in human adipose stem/progenitor cells. *Adipocyte*, 2020, 9(1): 626-635.
- [12] Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, et al. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 339-344.
- [13] Albadri S, del Bene F, Revenu C. Genome editing using CRISPR/Cas9-based knock-in approaches in zebrafish. *Methods*, 2017, 121/122: 77-85.
- [14] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588.
- [15] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of

- transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451.
- [16] Zhao D, Li J, Li S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 35-40.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [20] Chen PJ, Hussmann JA, Yan J, et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell*, 2021, 184(22): 5635-5652.
- [21] Li Y, Lin Z, Huang C, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Metab Eng*, 2015, 31: 13-21.
- [22] Zhang W, Zhang T, Song M, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high yield production of succinic acid driven by methanol. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(12): 2803-2811.
- [23] Jiang WY, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233-239.
- [24] Zhu X, Zhao D, Qiu H, et al. The CRISPR/Cas9-facilitated multiplex pathway optimization (CFPO) technique and its application to improve the *Escherichia coli* xylose utilization pathway. *Metab Eng*, 2017, 43(pt a): 37-45.
- [25] Yin LH, Zhao JX, Chen C, et al. Enhancing the carbon flux and NADPH supply to increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2014, 19(1): 132-142.
- [26] Zelcbuch L, Antonovsky N, Bar-Even A, et al. Spanning high-dimensional expression space using ribosome-binding site combinatorics. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(9): e98.
- [27] Zhao DD, Feng X, Zhu XN, et al. CRISPR/Cas9-assisted gRNA-free one-step genome editing with no sequence limitations and improved targeting efficiency. *Sci Rep*, 2017, 7: 16624.
- [28] Zhang H, Cheng QX, Liu AM, et al. A novel and efficient method for bacteria genome editing employing both CRISPR/Cas9 and an antibiotic resistance cassette. *Front Microbiol*, 2017, 8: 812.
- [29] Banno S, Nishida K, Arazoe T, et al. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol*, 2018, 3(4): 423-429.
- [30] Xin X, Li J, Zhao D, et al. Double-check base editing for efficient A to G conversions. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(12): 2629-2634.
- [31] Tsuge Y, Matsuzawa H. Recent progress in production of amino acid-derived chemicals using *Corynebacterium glutamicum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(3): 49.
- [32] Cleto S, Jensen JV, Wendisch VF, et al. *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi). *ACS Synth Biol*, 2016, 5(5): 375-385.
- [33] Jiang Y, Qian FH, Yang JJ, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun*, 2017, 8: 15179.
- [34] Cho JS, Choi KR, Prabowo CPS, et al. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2017, 42: 157-167.
- [35] Liu J, Wang Y, Lu Y, et al. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 205.
- [36] Liu J, Wang Y, Zheng P, et al. CRISPR/Cas9-mediated ssDNA recombineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Bio Protoc*, 2018, 8(19): e3038.
- [37] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metab Eng*, 2018, 47: 200-210.
- [38] Wang Y, Liu Y, Li JW, et al. Expanding targeting scope, editing window, and base transition capability of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(11): 3016-3029.
- [39] Deng C, Lv X, Li J, et al. Development of a DNA double-strand break-free base editing tool in *Corynebacterium glutamicum* for genome editing and metabolic engineering. *Metab Eng Commun*, 2020, 11: e00135.
- [40] Wang Y, Cheng HJ, Liu Y, et al. *In-situ* generation of large numbers of genetic combinations for metabolic reprogramming via CRISPR-guided base editing. *Nat*

- Commun, 2021, 12: 678.
- [41] Liu Y, Liu L, Li J, et al. Synthetic biology toolbox and chassis development in *Bacillus subtilis*. Trends Biotechnol, 2019, 37(5): 548-562.
- [42] Westbrook AW, Moo-Young M, Chou CP. Development of a CRISPR-Cas9 tool kit for comprehensive engineering of *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(16): 4876-4895.
- [43] Liu D, Huang C, Guo J, et al. Development and characterization of a CRISPR/Cas9n-based multiplex genome editing system for *Bacillus subtilis*. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 197.
- [44] Yu S, Price MA, Wang Y, et al. CRISPR-dCas9 mediated cytosine deaminase base editing in *Bacillus subtilis*. ACS Synth Biol, 2020, 9(7): 1781-1789.
- [45] Lee N, Hwang S, Lee Y, et al. Synthetic biology tools for novel secondary metabolite discovery in *Streptomyces*. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(5): 667-686.
- [46] Cobb RE, Wang YJ, Zhao HM. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. ACS Synth Biol, 2015, 4(6): 723-728.
- [47] Zhang J, Zhang D, Zhu J, et al. Efficient multiplex genome editing in *Streptomyces* via engineered CRISPR-Cas12a systems. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 726.
- [48] Ameruoso A, Villegas Kcam MC, Cohen KP, et al. Activating natural product synthesis using CRISPR interference and activation systems in *Streptomyces*. Nucleic Acids Res, 2022, 50(13): 7751-7760.
- [49] Zhang Y, Yun KY, Huang HM, et al. Antisense RNA interference-enhanced CRISPR/Cas9 base editing method for improving base editing efficiency in *Streptomyces lividans* 66. ACS Synth Biol, 2021, 10(5): 1053-1063.
- [50] Li H, Oppenorth PH, Wernick DG, et al. Integrated electromicrobial conversion of CO<sub>2</sub> to higher alcohols. Science, 2012, 335(6076): 1596.
- [51] Park JM, Jang YS, Kim TY, et al. Development of a gene knockout system for *Ralstonia eutropha* H16 based on the broad-host-range vector expressing a mobile group II intron. FEMS Microbiol Lett, 2010, 309(2): 193-200.
- [52] Oh EJ, Jin YS. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. FEMS Yeast Res, 2020, 20(1): foz089.
- [53] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res, 2013, 41(7): 4336-4343.
- [54] Jakočiūnas T, Bonde I, Herrgård M, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab Eng, 2015, 28: 213-222.
- [55] Zhang YP, Wang J, Wang ZB, et al. A gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. Nat Commun, 2019, 10: 1053.
- [56] Wang Z, Lin Y, Dai Z, et al. Modulating DNA repair pathways to diversify genomic alterations in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Spectr, 2022, 10(2): e0232621.
- [57] Bao Z, Xiao H, Liang J, et al. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Synth Biol, 2015, 4(5): 585-594.
- [58] Pawelczak KS, Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, et al. Modulating DNA repair pathways to improve precision genome engineering. ACS Chem Biol, 2018, 13(2): 389-396.
- [59] Deaner M, Alper HS. Systematic testing of enzyme perturbation sensitivities via graded dCas9 modulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab Eng, 2017, 40: 14-22.
- [60] Jiang G, Wang J, Zhao D, et al. Molecular mechanism of the cytosine CRISPR base editing process and the roles of translesion DNA polymerases. ACS Synth Biol, 2021, 10(12): 3353-3358.
- [61] Wösten HAB. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. Curr Opin Biotechnol, 2019, 59: 65-70.
- [62] Liu Q, Gao R, Li J, et al. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering. Biotechnol Biofuels, 2017, 10: 1.
- [63] Yang F, Gong Y, Liu G, et al. Enhancing cellulase production in thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464 by RNA interference of *cre1* gene expression. J Microbiol Biotechnol, 2015, 25(7): 1101-1107.
- [64] Li L, Wei K, Zheng G, et al. CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional

- repression in *Streptomyces*. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(18): e00827-18.
- [65] Liu Q, Zhang Y, Li F, et al. Upgrading of efficient and scalable CRISPR-Cas-mediated technology for genetic engineering in thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 293.
- [66] Zhang C, Li N, Rao L, et al. Development of an efficient C-to-T base-editing system and its application to cellulase transcription factor precise engineering in thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(3): e0232121.
- [67] Park HS, Jun SC, Han KH, et al. Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. *Adv Appl Microbiol*, 2017, 100: 161-202.
- [68] Sarkari P, Marx H, Blumhoff ML, et al. An efficient tool for metabolic pathway construction and gene integration for *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol*, 2017, 245(pt b): 1327-1333.
- [69] Zheng X, Zheng P, Sun J, et al. Heterologous and endogenous *U6* snRNA promoters enable CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Aspergillus niger*. *Fungal Biol Biotechnol*, 2018, 5: 2.
- [70] Zheng X, Zheng P, Zhang K, et al. 5S rRNA promoter for guide RNA expression enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(7): 1568-1574.
- [71] Huang L, Dong H, Zheng J, et al. Highly efficient single base editing in *Aspergillus niger* with CRISPR/Cas9 cytidine deaminase fusion. *Microbiol Res*, 2019, 223/224/225: 44-50.

(本文责编 郝丽芳)