

• 关键核心技术 •

刘嵘明 大连理工大学生物工程学院教授、博士生导师。南京工业大学生物化工博士，美国科罗拉多大学博尔德分校博士后，国家高层次人才青年项目获得者，江苏省优秀博士毕业论文获得者。主要研究方向为合成生物学、基因编辑、代谢工程等，发表了 50 余篇国内外知名学术期刊论文，以第一作者和通信作者发表期刊论文 21 篇，包括 *Nature Communications*、*Trends in Biotechnology*、*Metabolic Engineering*、*Bioresource Technology* 等领域内权威期刊，参与编著英文专著 3 本；申请及授权发明专利 10 余项，PCT 专利 5 项。



梁丽亚 大连理工大学生物工程学院副教授，大连市紧缺人才。主要从事微生物催化调控合成生物基建筑材料、微生物全局代谢网络多重调控合成生物基化学品、高通量 CRISPR 定向进化 CAR-T 细胞等方面研究工作。发表了近 50 篇国内外知名学术期刊论文，申请及授权发明专利 10 余项。



基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因编辑与调控技术

樊祥瑞，王俊燕，梁丽亚*，刘嵘明*

大连理工大学生物工程学院，辽宁 大连 116000

樊祥瑞，王俊燕，梁丽亚，刘嵘明. 基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因编辑与调控技术[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2449-2464.

FAN Xiangrui, WANG Junyan, LIANG Liya, LIU Rongming. Multiplex gene editing and regulation techniques based on CRISPR/Cas system[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2449-2464.

摘要：规律成簇的间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关 Cas 蛋白所构建的 CRISPR/Cas 系统是古细菌或细菌中特有的一种获得性免疫系统。研究人员将其开发成基因编辑工具之后，凭借其高效、精准和通用性强等优点迅速成为合成生物学领域的热门研究方向，在生命科学、生物工程技术、食品科学及农作物育种等多个领域引发了革命性的影响。目前基于 CRISPR/Cas 系统单基因编辑与调控技术日益完善，但在多重基因

资助项目：国家自然科学基金(22278058, 22208044)；大连理工大学基本科研业务费(DUT22RC(3)012, DUT22RC(3)013)
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22278058, 22208044) and the Basic Research Expenses of Dalian University of Technology (DUT22RC(3)012, DUT22RC(3)013).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Rongming, Rongming_Liu@dlut.edu.cn; LIANG Liya, liya_liang@dlut.edu.cn

Received: 2022-12-09; Accepted: 2023-03-29; Published online: 2023-04-13

编辑和调控方面仍存在挑战。本文聚焦基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因编辑与调控技术开发及应用, 针对单个细胞内实现多位点基因编辑或调控和细胞群体内实现多位点基因编辑或调控技术, 依据作用原理对其进行了系统总结和阐述, 包括基于 CRISPR/Cas 系统的双链断裂、单链断裂以及多重基因调控技术等。这些工作丰富了多重基因编辑与调控的工具, 为 CRISPR/Cas 系统在多领域的应用作出了贡献。

关键词: 规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关 Cas 蛋白; 可追踪基因编辑技术; 碱基编辑器; 先导编辑器; 基因激活; 基因抑制

Multiplex gene editing and regulation techniques based on CRISPR/Cas system

FAN Xiangrui, WANG Junyan, LIANG Liya*, LIU Rongming*

School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116000, Liaoning, China

Abstract: The CRISPR/Cas systems comprising the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and its associated Cas protein is an acquired immune system unique to archaea or bacteria. Since its development as a gene editing tool, it has rapidly become a popular research direction in the field of synthetic biology due to its advantages of high efficiency, precision, and versatility. This technique has since revolutionized the research of many fields including life sciences, bioengineering technology, food science, and crop breeding. Currently, the single gene editing and regulation techniques based on CRISPR/Cas systems have been increasingly improved, but challenges still exist in the multiplex gene editing and regulation. This review focuses on the development and application of multiplex gene editing and regulation techniques based on the CRISPR/Cas systems, and summarizes the techniques for multiplex gene editing or regulation within a single cell or within a cell population. This includes the multiplex gene editing techniques developed based on the CRISPR/Cas systems with double-strand breaks; or with single-strand breaks; or with multiple gene regulation techniques, etc. These works have enriched the tools for the multiplex gene editing and regulation and contributed to the application of CRISPR/Cas systems in the multiple fields.

Keywords: CRISPR/Cas; CRISPR-enabled trackable genome engineering (CREATE) technology; base editors; prime editors; CRISPR activation; CRISPR interference

CRISPR/Cas 系统是存在于古细菌或细菌中特有的一种获得性免疫系统^[1]。相较于锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)^[2]和转录激活样效应因子核酸酶 (transcription activator-like

effector nuclease, TALENs)^[3]等传统的基因编辑方法, 基于 CRISPR/Cas 系统的识别和剪切作用开发出的基因编辑工具能够使用较短的向导 RNA (guide RNA, gRNA)序列实现精准定位, 大

大降低了设计难度和应用成本,并且已经在微生物、植物、动物及人体细胞内得到了广泛应用^[4]。目前,基于 CRISPR/Cas 系统开发的技术和工具呈现井喷式发展趋势,尤其在基因编辑^[5-6]、基因调控^[7-8]、基因成像^[9]和表观遗传^[10]等领域相较于传统技术具有明显优势。

基于 CRISPR/Cas 系统开发的基因编辑与调控工具,主要是在 II 类 CRISPR-Cas 系统基础上构建的,包括 Cas9^[11]、Cas12a/b/c^[12]及 Cas13a/b/c^[13]等。不同于 I 类 CRISPR/Cas 系统需要编码多个蛋白串联为多蛋白效应复合物发挥作用,II 类 CRISPR/Cas 系统只需要编码单个蛋白即可对外源基因或菌株自身特定位点进行剪切^[14],这种剪切会导致 DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSB),触发菌株自身易错修复,这种修复极易导致碱基的插入、缺失、倒置和替换,但可以通过同源片段的重组来实现精准修复^[15]。目前,通过对 CRISPR/Cas 系统的优化和改造,已经开发出了一系列基因编辑与调控工具,如碱基编辑器(base editor, BE)^[16-17]、先导编辑器(prime editor, PE)^[18-19]、基于 CRISPR/Cas 系统的基因抑制(CRISPR interference, CRISPRi)^[20]和基于 CRISPR/Cas 系统的基因激活(CRISPR activation, CRISPRa)^[21]等。这些基于 CRISPR/Cas 系统的基因编辑与调控工具已经在合成生物学等领域得到了广泛应用,为生命科学、生物工程、生物医药和农业新物种培育领域带来了创造性的变革。然而,基于 CRISPR/Cas 系统开发的基因编辑与调控工具在多重基因编辑与调控方面还仍然存在着挑战,尤其是在提高基因编辑与调控的效率、特异性以及降低脱靶率等方面^[22]。随着第三代测序技术和 DNA 合成技术的不断发展以及计算机辅助设计在生物学中的应用,多重基因编辑与调控的准确度和特异性不断提升。本文对基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因编辑与调

控技术的优化方法及相关进展进行了系统阐述。这些研究工作显著地扩展了 CRISPR/Cas 系统在多重基因编辑与调控方面的应用,并为 CRISPR/Cas 系统在多个领域的应用作出了重要贡献。

1 基于 CRISPR/Cas 系统的双链断裂的多重基因编辑技术

1.1 基于 CRISPR/Cas 系统的单细胞多位点编辑

基于 CRISPR/Cas 系统的基因编辑过程中, DNA 双链进行剪切后在自身或者外源 DNA 片段的作用下进行同源重组对 DNA 双链进行恢复。在真核生物方面, Bao 等^[23]在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞中通过对 Cas9 蛋白的改造(D147Y 和 P411T)、质粒系统以及培养条件的优化建立了一种可实现高效同源整合 CRISPR 基因编辑技术(homology-integrated CRISPR, HI-CRISPR),此方法可以同时 3 个基因进行敲除。该系统中多基因敲除效率与质粒拷贝数成正比,因此可以通过增加培养时间提高敲除效率。使用 HI-CRISPR 技术培养 4 d 后,成功实现了对 3 个基因的同时敲除,敲除效率分别为 27%、75%和 80%;使用同样的技术培养 6 d 后,其 3 个基因同时敲除的效率高达 100%,是当前报道最高的基因敲除效率。Xie 等^[24]也开发了一种便捷的基因组编辑工具,利用植物中的转录机制与 tRNA-gRNA 阵列相结合开发了一种内源性 RNA 处理系统。通过将 tRNA 和 gRNA 串联形成紧凑的重复序列,利用植物中的 RNase 识别 tRNA 并进行切割,能够同时产生多个特异性靶向目标序列的 gRNA,进而分别引导 Cas9 蛋白对靶 DNA 链进行切割,提供了一种在植物中进行多位点基因编辑的简单方法。其中,在水稻中可以同时靶向 4 个基因位点,染色体敲除效

率为 4%–20%。在原核生物方面, Jiang 等^[25]在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中通过设计与构建双质粒系统,可实现同时对 3 个基因的敲除,并且使用温敏型复制子特性,利用控制温度的方法去除 Cas 质粒,使菌株不含有任何质粒,更有利于生产菌株的进一步改造; Zhang 等^[26]在酿酒酵母中利用 tRNA 阵列的方式,通过 2 轮迭代成功实现了 8 个位点的同时敲除。除此之外,还有很多团队在不同的物种中开发了单细胞多位点基因编辑技术,如乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)^[27]、汉逊酵母(*Ogataea polymorpha*)^[28]、斑马鱼^[29]、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)^[30]、水稻^[31]和人体细胞^[32]等。但是多位点基因编辑效率在单细胞中随着编辑位点的增加而降低(表 1)。

CRISPR 相关转座酶(CRISPR-associated transposases, CASTs)^[39]是 CRISPR 元件在进化过程中被 Tn7 转座子劫持,协同进化衍生出的一

种转座酶, CASTs 能够在 RNA 的引导下介导 DNA 转座并且不依赖同源重组,2019 年 Strecker 等^[40]利用来源于蓝藻的 CASTs 系统构建了一种基因插入工具,可以用于在大肠杆菌中进行基因整合。利用此技术,在大肠杆菌中选择了 48 个可插入位点,经过一轮基因编辑后在 29 个位点检测到了插入基因,基因整合效率达到 60.4%。2020 年, Zhang 等^[41-42]开发了基于 CRISPR 转座酶的多拷贝基因组整合工具(multicopy chromosomal integration using CRISPR-associated transposases, MUCICAT),此方法可利用单个 crRNA 靶向基因组上的重复序列,在大肠杆菌基因组中实现了 10 个基因拷贝的整合,此外, MUCICAT 方法也可以使用 crRNA 阵列的方式进行多基因失活或 DNA 插入,成功实现了对大肠杆菌基因组上的 11 个基因进行改造,通过 2 轮改造使 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine, GlcNAc)产量提升至 11.59 g/L。2021 年, Yang 等^[43]利用半透

表 1 基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因编辑

Table 1 Multiplex gene editing techniques based on CRISPR/Cas systems

CRISPR/Cas systems	Number of the targets	Editing efficiency (%)	Organisms	References
Prokaryotes				
CRISPR/Cas9	4 loci	40	<i>Escherichia coli</i>	[33]
CRISPR/Cas12a	3 loci	20	<i>Escherichia coli</i>	[34]
CRISPR/Cas9	3 loci	100	<i>Escherichia coli</i>	[25]
CRISPR/Cas12a	2 loci	75	<i>Streptomyces coelicolor</i>	[35]
CRISPR/Cas9	3 loci	23	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	[30]
Eukaryotes				
CRISPR/Cas9	5 loci	33	Zebra fish	[29]
Csy4	4 loci	96	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[36]
CRISPR/Cas9	8 loci	87	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[26]
CRISPR/Cas9	6 loci	65	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[37]
CRISPR/Cas12a	4 loci	85	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[38]
CRISPR/Cas9	3 loci	100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[23]
CRISPR/Cas12a	9 loci	<54	Rice	[31]
CRISPR/Cas9	3 loci	30	<i>Ogataea polymorpha</i>	[28]
CRISPR/Cas9	3 loci	2	<i>Kluyveromyces lactis</i>	[27]
CRISPR/Cas12a	5 loci	40	HEK293T cells	[32]

明假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas translucida*) KMM520 的高活性 I-F 型 CRISPR 转座酶 PtrCAST, 与霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) Tn6677 I-F 型 CRISPR 转座酶 VchCAST 组成正交 CASTs, 分别能以 100% 的效率将相应的目的基因插入大肠杆菌染色体上实现基因的多拷贝。

1.2 基于 CRISPR/Cas 系统的可追踪基因编辑技术

Wang 等^[44]在 2009 年开发的多重自动基因编辑工具(multiplex automated genome engineering, MAGE)技术可以在细胞群中实现多重基因编辑, 可以高效地进行基因组的整合或调控。MAGE 技术主要用于原核生物的基因编辑, 如 Isaacs 等^[45]使用 MAGE 技术将大肠杆菌中的终止密码子进行替换。MAGE 技术虽然可以在细胞群的高通量基因编辑, 但是需要对筛选获得的单个细胞进行基因组测序才能对基因编辑进行追踪。可追踪的基因编辑技术可以实现只需要对分子条形码(barcode)进行短序列的高通量测序, 即可实现性状和基因型的一一对应, 极大地减少了在对目标菌株改造过程中物力和时间的投入。Warner 等^[46]在 2010 年开发的可追踪多元重组技术(trackable multiplex recombineering, TRMR), 通过在靶向基因前插入上调及下调核糖体结合位点(ribosomebinding site, RBS)片段及用于追踪的分子条形码, 进而实现对基因转录的调控, 并结合文库高通量合成进而实现全基因组层面的基因转录调节, 在经过特定筛选后, 可通过高通量测序分子条形码追踪基因编辑情况。

Garst 等^[47]开发的基于 CRISPR/Cas 系统的可追踪基因编辑技术(CRISPR-enabled trackable genome engineering, CREATE)是一种基于 CRISPR/Cas 系统的高通量多重基因编辑技术(图 1)。CREATE 为 3 质粒系统, 其中 2 个质粒用于表达 Cas9 蛋白和 λ -red 蛋白, 另一个用于

表达 CREATE 盒[gRNA 和同源臂(homology arm, HA)], 多个功能单元协同作用实现精准定位的基因编辑和同源重组。其中, 借助计算机辅助设计及 DNA 合成技术, 可实现高通量合成 CREATE 盒, 从而实现在细胞群层面针对多个靶向位点引入不同突变, 并且将 CREATE 盒的特征序列设计成可以用于追踪基因编辑的 DNA 条形码。在基因编辑以及菌株筛选后, 只需要对 DNA 条形码进行高通量测序就可追踪导入序列的信息, 可以通过一次高通量测序得到细胞群中基因编辑引入突变的变化情况, 大幅减少了追踪时间及成本, 为细胞工厂的快速构建及筛选提供了一种强有力的工具。Garst 等^[47]利用 CREATE 技术成功提高了大肠杆菌对利福平的耐受性。随后 Bassalo 等^[48]利用 CREATE 技术对赖氨酸代谢途径设计了 16 300 个同源片段, 对赖氨酸的整体代谢过程进行了深入解析; Zheng 等^[49]利用 CREATE 和实验室自适应突变提高了大肠杆菌对糠醛的耐受性; Liu 等^[50-51]使用 CREATE 技术实现了对大肠杆菌全局调控网络的 82 个基因特定位点的饱和突变, 使突变菌株对糠醛、苯乙烯、异丙醇和异丁醇耐受性得到了不同水平的提高, 并将 CREATE 技术引入到了酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, 对酿酒酵母中的全局调控因子进行了多基因改造, 提高了酿酒酵母在高葡萄糖和高乙醇条件下的耐受性。

CREATE 技术解决了多重基因编辑的难题, 但因其无法对含有 CREATE 盒的质粒进行清除, 故无法实现迭代基因编辑。针对以上问题, Liu 等^[52]设计构建了靶向 CREATE 盒质粒的 gRNA 元件并将其整合至 Cas 蛋白质粒中。在每轮基因编辑之后, 通过阿拉伯糖诱导上述 gRNA 的转录, 进而消除 CREATE 盒质粒。这一方法不仅成功实现了 CREATE 的迭代编辑还进一步提升了菌株性状的稳定性, 此技术被称为迭代 CRISPR

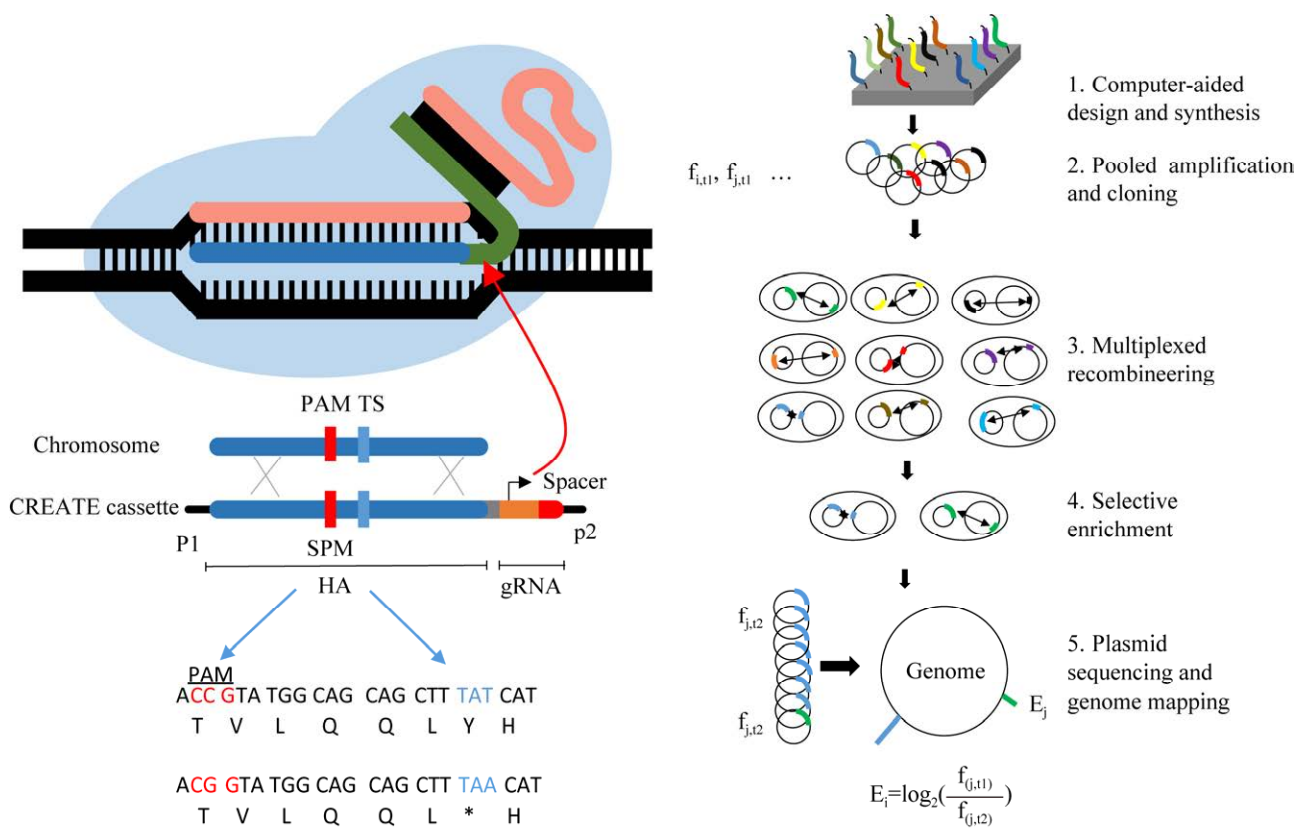


图 1 CREATE 技术的基本原理及实现流程

Figure 1 Schematic diagram and workflow for CREATE strategy.

支持可追踪的基因组工程(iterative CRISPR enabled trackable genome engineering, iCREATE)。为了验证 iCREATE 的基因编辑效率,使用 iCREATE 来提高大肠杆菌的 3-羟基丙酸产量,一共进行了 13 轮 iCREATE。在前 7 轮 iCREATE 中,敲除了 3-羟基丙酸的竞争途径;然后又通过 5 轮 iCREATE 对 3-羟基丙酸生成过程中的关键酶以及前体物质的生成量进行了优化;最后 1 轮使用 iCREATE 对大肠杆菌中的全局调控因子进行了优化,提高了大肠杆菌对 3-羟基丙酸的耐受性。经过共 13 轮 iCREATE 改造后得到的菌株 3-羟基丙酸的产量比出发菌株提高了 57 倍。Liu 等^[53]还将 iCREATE 用于木糖和葡萄糖的代谢调控,经过数轮 iCREATE 改造后的菌株成功提高了对含有木糖和葡萄糖的混合

糖代谢速率以及对秸秆等水解液副产物的耐受性,最终得到一株可利用高糠醛和高乙酸秸秆水解液生产 3-羟基丙酸(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)的突变菌株,其 3-羟基丙酸产量比出发菌株提高了 7 倍。

2 基于 CRISPR/Cas 系统的单链断裂的多重基因编辑技术

2.1 基于碱基编辑器的多重基因编辑

Komo 等^[15]利用人工改造的 Cas9 蛋白先后开发了胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(adenosine base editor, ABE)^[17]。碱基编辑器主要是由两部分组成的,sgRNA 以及由人工改造只保留单链截切能力的

Cas9 (D10A, nCas9)蛋白与胞嘧啶脱氨酶或者 tRNA 腺嘌呤脱氨酶组成的融合蛋白, 通过 sgRNA 引导, 人工改造的 Cas9 蛋白可以靶向目标 DNA 链, 经过脱氨酶的作用实现了 C-T 或 G-A 碱基替换(图 2)。

Wang 等^[30]利用碱基编辑器 nCas9 (D10A)-AID [活化诱导的胞苷脱氨酶(activation induced cytidine deaminase, AID)]开发了一种多位点自动化谷氨酸棒状杆菌碱基编辑方法(multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method, MACBETH), 在谷氨酸棒状杆菌中实现了单、双和三位点编辑, 其编辑效率分别达到了 100%、87.2%和 23.3%。另外, 通过对谷氨酸合成相关的 3 个基因(*odhA*、*pyk* 和 *ldhA*)进行组合建库, 使得 *pyk* 和 *ldhA* 双失活菌株的谷氨酸产量提高了 3 倍。Tong 等^[54]利用不含 DSB 的单核苷酸碱基编辑系统(CRISPR-base editing system, CRISPR-BEST)。通过 Csy4 (I-F 型 CRISPR 相关核糖核酸内切酶

Cas6)识别位点分离设计的 3-spacer sgRNA 阵列, 该阵列能够同时靶向链霉菌中 3 个生物合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs)的关键基因, 实现了对 SCO5087、SCO3230 和 SCO5892 这 3 个位点的同时编辑, 其中, SCO5087 和 SCO5892 的编辑效率达到了 100%, 但是 SCO3230 的编辑效率只有 33%。Banno 等^[55]将尿嘧啶 DNA 糖化酶抑制剂(uracil glycosylase inhibitor, UGI)和 LVA 标签(序列为 AANDENYALVA 的蛋白质降解标签)与 dCas-CDA (*Petromyza marinus* cytosine deaminase PmCDA1, CDA)相结合, 开发了碱基编辑器 dCas-CDA-UL, 通过将其与包含 2 组串联重复 sgRNA 表达单元的多重 sgRNA 表达质粒结合使用, 实现了在大肠杆菌中同时编辑 6 个位点。

Davis 等^[56]通过 tRNA-gRNA 阵列开发了一种新的腺嘌呤碱基编辑器 ABE8e, 解决了需要通过 2 个腺病毒运输载体(adeno-associated virus, AAV)来运输胞嘧啶碱基编辑器的问题, 通过将

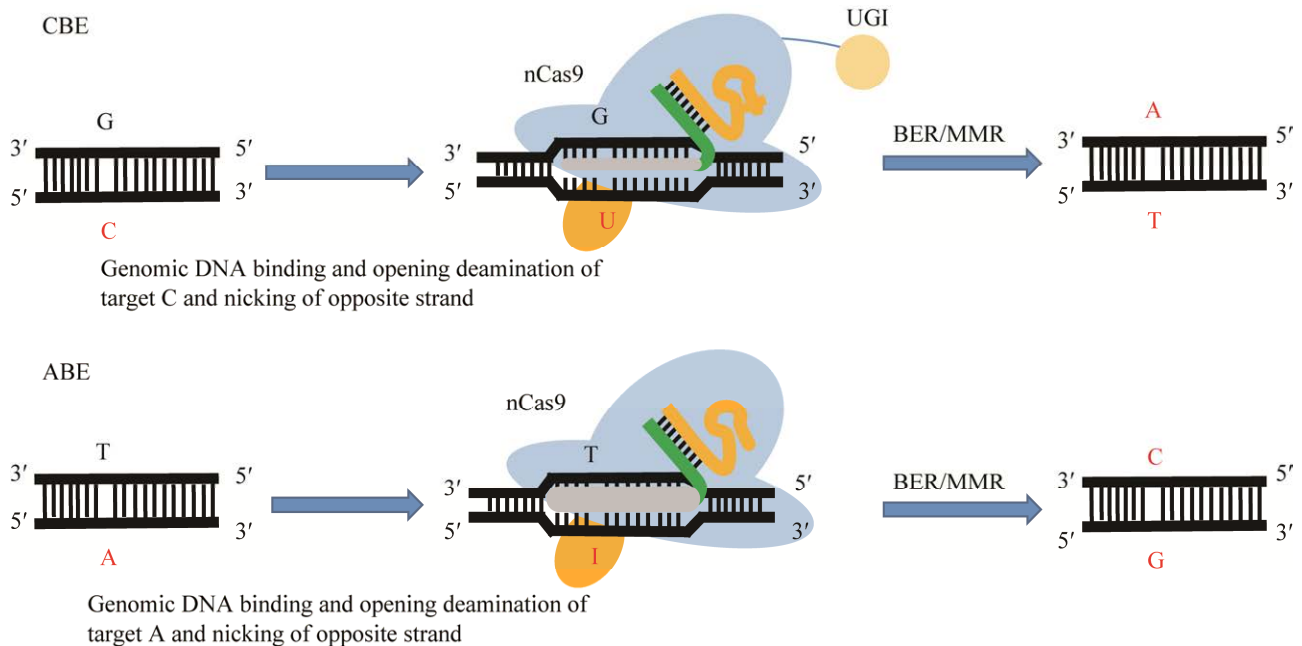


图 2 CBE 和 ABE 的工作原理

Figure 2 Schematic diagrams of CBE and ABE.

gRNA 与改造的 tRNA 开发成紧凑串联结构, 实现了在一个质粒上可以同时产生多个 gRNA 进行多基因编辑。基于内源性 RNA 处理系统, Yuan 等^[57]通过设计 hCtRNA (75 nt 人类半胱氨酸 tRNA), 开发基于串联组装 tRNA-gRNA 阵列的 DAP 架构(drive-and-process architectures), 并在 nCas9 (D10A)的 N 端融合 TadA-8e (V106W)-1xUGI-hA3A (Y130F)脱氨模块, 开发了基于 nCas9 的双脱氨酶碱基编辑器(A-to-G and C-to-T multiplex editor, ACME)。将 2 个 16 个基因座阵列与 ACME 相结合, 在人体细胞中实现了多重碱基编辑(multiple base-editing, MBE), 其碱基编辑位点最高可达到 31 个, 平均编辑效率达到 $51.3\% \pm 11.5\%$ 。

2.2 基于先导编辑器的多重基因编辑

先导编辑器(prime editor, PE)最初是由 Anzalone 等^[58]开发的一种基因编辑工具(图 3)。

PE 可以实现 DNA 片段的插入、删除以及 12 种碱基替换(其中包括转换和颠换)。PE 是由两部分组成的,一部分是 pegRNA (prime editing guide RNA, 在 sgRNA3'末端添加一段 RNA 序列, 该序列包含引物结合位点以及携带有目标编辑序列的逆转录模板), 另一部分是融合蛋白[nCas9 (H840A)和逆转录酶两部分的融合蛋白]。其基本原理是 nCas9 (H840A)在 pegRNA 的引导下进行靶 DNA 链的切割, pegRNA3'端的引物结合位点与断裂 DNA 单链的互补序列相结合, 之后逆转录酶沿 pegRNA 上的逆转录模板进行转录, DNA 双链经过编辑之后延伸出一段新合成的 DNA 单链, 即携带目标突变的 3'flap 和不携带目标突变的 5'flap, 通过结构特异性内切酶切除以及修复之后最终实现精准编辑。

PE 的靶向能力因 gRNA 的表达装置受到限制, 其在多重基因编辑方面未取得较好的研究进

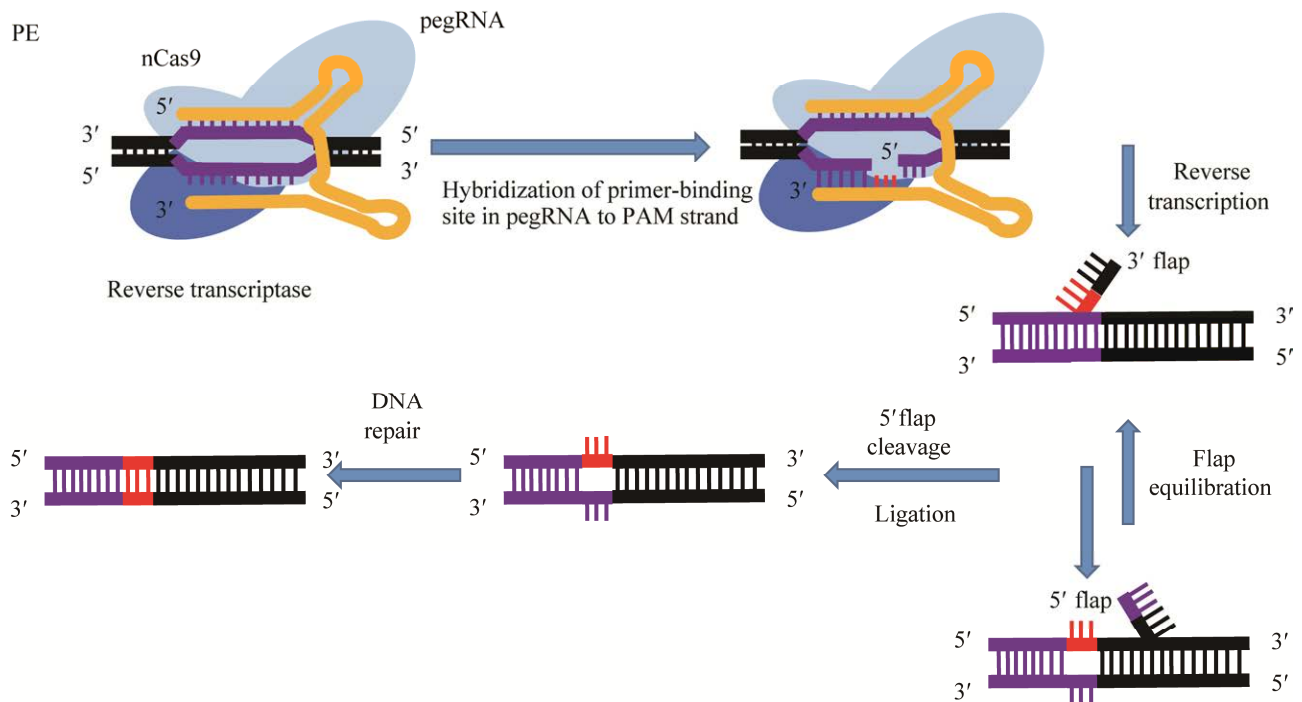


图 3 Prime editor 的工作原理

Figure 3 Schematic diagram of prime editor.

展。tRNA-gRNA 阵列的出现,为实现多基因编辑提供了良好的思路。Yuan 等^[57]将 hCtRNA 分别与缺口 gRNA (nicking gRNA)和 pegRNA 组合形成实现单位点高效编辑的串联结构,通过在一个 hCtRNA-M 阵列上组装 6 个 gRNA,每 2 个 gRNA 靶向一个基因,实现对 HEK3、RNF2 和 FANCF 在内的 3 个基因同时编辑。由于 tRNA 从重复表达单元中剪切下来时,tRNA 序列的 5' 前导序列的一部分会保留在 pegRNA 序列的 3' 延伸序列,只有位于 hCtRNA-M 序列下游的 gRNA 碱基对对应的编辑位点 FANCF 表现出较高的编辑效率。为了提高 HEK3 和 RNF2 的编辑效率,以实现 3 个位点同时、高效的基因编辑。研究人员在 5'前导序列和 3'延伸序列之间插入了一段间隔序列。由于该间隔序列包含一部分终止子序列,从而阻碍了由于 tRNA 的 5'前导序列残留引起的基因编辑效率降低的过程。通过上述改造,最终实现了 3 个基因位点的同时编辑,其编辑效率分别达到 $39.1\% \pm 0.4\%$ 、 $57.5\% \pm 2.3\%$ 及 $36.1\% \pm 2.1\%$ 。

3 基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因调控技术

CRISPR 激活^[20](CRISPR activation, CRISPRa)和 CRISPR 抑制^[21](CRISPR interference or inhibition, CRISPRi)是利用 dCas (dead-Cas)蛋白(Cas 蛋白的核酸酶结构域 HNH 和 RuvC 突变,失去了核酸酶的活性)和转录激活因子(如 VP64)或阻遏结构域(如 KRAB)融合(图 4),通过结构域的不同功能实现对基因的表达进行精准控制。基于 CRISPR/Cas 系统的基因调控技术 CRISPRa 和 CRISPRi 在起作用时不会引起双链或单链断裂,对宿主细胞毒性较小,其在转录调控方面具有较广的应用前景(表 2)。

3.1 基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因抑制

在单个细胞多重基因抑制方面,Reis 等^[59]在大肠杆菌中通过设计互不重复的 gRNA 序列(extra-long sgRNA arrays, ELSAs),同时实现了对 9 个基因的抑制。在设计过程中,通过机器学习自动设计实现了 gRNA 的自动化设计,并设

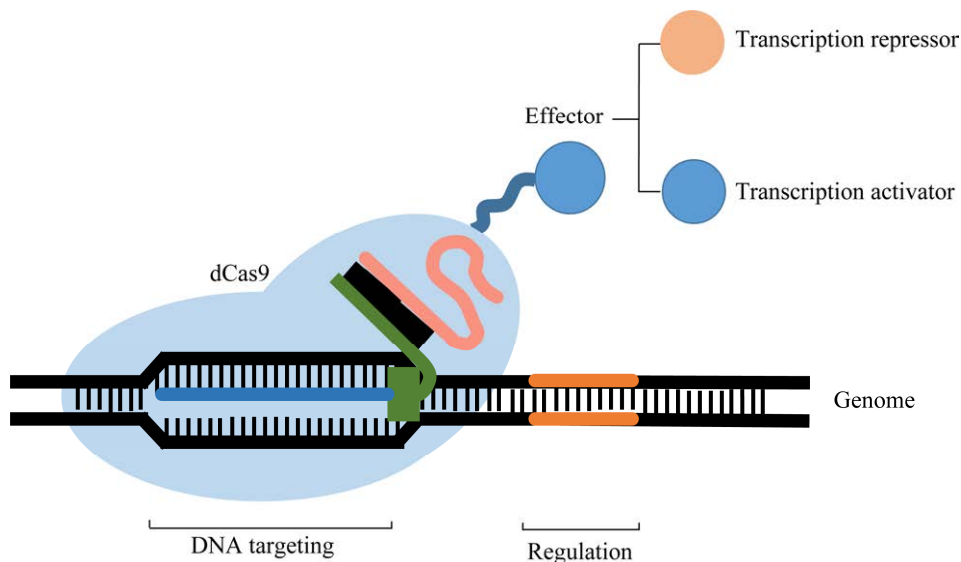


图 4 CRISPRi 和 CRISPRa 的工作原理

Figure 4 Schematic diagram of CRISPRi and CRISPRa.

表 2 基于 CRISPR/Cas 系统的多重调控编辑

Table 2 Multiplex regulation techniques based on CRISPR/Cas systems

CRISPR/Cas systems	Number of the genes	Regulation efficiencies (%)	Organisms	References
CRISPRi				
CRISPR/Cas9	9	85–100	<i>Escherichia coli</i>	[59]
CRISPR/Cas9	3	75–95	Yeast	[60]
CRISPR/Cas9	4	60–90	<i>Streptomyces</i>	[61]
CRISPR/Cas9	6	–	<i>Synechocystis</i>	[62]
CRISPR/Cas12a	4	–	<i>Escherichia coli</i>	[63]
CRISPR/Cas12a	10	40–80	Human	[64]
CRISPRa				
CRISPR/Cas9	4	55–85	Mice	[65]
CRISPR/Cas9	3	–	<i>Escherichia coli</i>	[66]
CRISPR/Cas9	3	–	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[67]

–: No relevant data.

计了最大长度为 22 bp 的组成型启动子。通过自动化设计含有 20 个 gRNA 的 ELSAs 序列,实现了对 6 个基因的抑制(*ackA*, *iclR*, *poxB*, *pta*, *sdhC*, *sdhD*),提高了大肠杆菌琥珀酸中的产量;通过自动化设计含有 15 个 gRNA 的 ELSAs 序列,对 9 个有关氨基酸生物合成途径基因的抑制(*hisD*, *proC*, *lysA*, *tyrA*, *aroF*, *pheA*, *leuA*, *ilvD*, *argH*),实现了对目的菌株生长的抑制。在这两种多基因抑制过程中,每个基因都有 1–2 个 gRNA 的靶点,此设计可以很大程度上降低 CRISPRi 脱靶率,其基因抑制效率均大于 85%。Mccarty 等^[60]在酵母中使用单个启动子对应 12 个 gRNA,每 4 个 gRNA 靶向向同一个基因,实现了对 3 个基因的抑制。

除 Cas9 外,CRISPR-Cas 系统中 II 类 V-A 型蛋白 Cas12a,也被广泛应用于多重基因抑制。Zhang 等^[63]通过同时转录 4 个 gRNA 及表达 dCas12a 蛋白,实现了对 *malt-proP-degP-rseA* 这 4 个基因的抑制。Campa 等^[64]将 Cas12a 与 Triplex 序列以及 20 个 gRNA 序列相连(图 5),实现了对 10 个不同基因(*RAB5A*, *RAB7A*, *PIK3C3*, *EEA1*, *RAB11A*, *RAB9A*, *CHRM3*, *PLCB1*, *PRKCI*, *FZD1*)的抑制,其基因抑制效率范围为 40%–80%。

在细胞群多重基因抑制方面,Wang 等^[68]通过设计 2 281 个 gRNA,靶向 44 个已知表型的基因,通过观察各个基因的抑制效率,总结了

gRNA 的设计原则,包括可以使用 15 个 gRNA 同时靶向同一基因以实现基因的稳态抑制以及在开放阅读框(open reading frame, ORF)的前 5% 内尽可能多地选择 sgRNA 靶点等,并且以此规则建立了大肠杆菌的基因抑制的文库,包含 55 671 个 sgRNA,实现了对大肠杆菌代谢关键基因的筛选。Rousset 等^[69]合成了 7 177 个 sgRNA,通过对大肠杆菌中营养代谢限速酶的转录抑制,发现了对大肠杆菌代谢调控起到关键作用的基因,并对大肠杆菌的必需基因进行了解析。

3.2 基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因激活

在单细胞多位点激活方面,Cheng 等^[65]将 dCas9 与连续 10 个激活因子(VP16)偶联,成功实现了对小鼠内源基因的激活,并且可以利用不同的 gRNA 比例来调节基因的激活程度。Lian 等^[66]通过选择和优化 Cas 蛋白,开发出了基于 CRISPR 系统的同时可实现激活、抑制和删除的技术(CRISPR transcriptional activation, transcriptional interference, and gene deletion, CRISPR-AID),通过使用不同长度的 gRNA 设计或者使用 3 种不同 Cas 蛋白的共同表达,实现了在一个系统中同时实现基因的激活、敲除和插入,利用 CRISPR-AID 系统成功将 β -胡萝卜素的产量较出发菌提高了 2.8 倍,之后,Lian 等^[67]将 CRISPR-AID 系统进行了优化并在酿酒酵母中建立了高通量的基因注释方法。

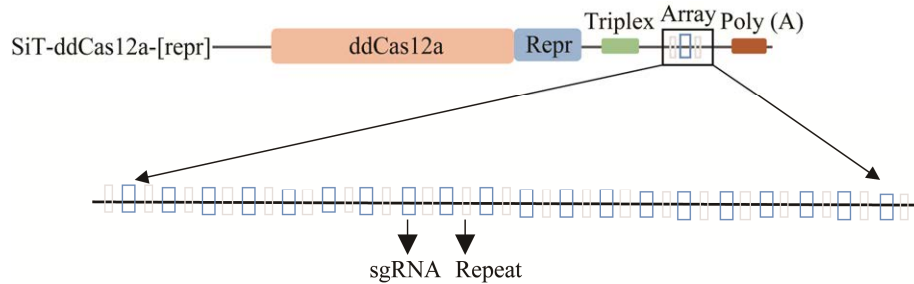


图 5 20 个 sgRNA 排列方式

Figure 5 20 sgRNA arrangements.

在细胞群基因激活方面, Schmidt 等^[70]研究 T 细胞中与信号因子调节相关的基因, 将 dCas9 与激活因子偶联, 并结合 CRISPRa 协同激活技术(CRISPRa synergistic activation mediator)^[71]进行 sgRNA 的设计, 成功对 T 细胞信号表达因子调节的相关基因进行了筛选及解析。

3.3 基于 base editor 的多重基因调控

CRISPRa 和 CRISPRi 在转录调控过程中需保持稳定才能发挥作用, 但是在进行工业化生产过程中 CRISPRa 和 CRISPRi 稳定性容易受到发酵环境以及生产周期的影响。Wang 等^[72]开发了基于 base editor 的基因转录调控技术(base editor-targeted and template-free expression regulation, BETTER)。此技术是通过在靶基因前插入特定的转录或翻译元件, 在 gRNA 的引导下, 在插入元件的靶向位点产生多个碱基突变, 从而构建突变文库, 如使用胞嘧啶编辑器在插入的 RBS 序列中靶向编辑连续 8 个 G 的核心序列, 从而构建不同强度的转录调控元件文库。他们将 BETTER 技术用于谷氨酸棒杆菌代谢木糖的调控, 结合高通量筛选获得的突变菌株, 其木糖吸收效率达到 7.3 mmol/g CDW, 高于谷氨酸棒杆菌已报道的最高效率; 将 BETTER 用于番茄红素合成途径 10 个基因的组合调控, 经过筛选获得的突变菌株, 其番茄红素产率达到 2.9 mg/g CDW, 优于报道的谷氨酸棒杆菌产番茄红素的最高

产量。

4 总结与展望

本文主要针对基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因编辑与调控技术进行了系统的总结与阐述, 包括基于 CRISPR/Cas 系统的双链断裂的基因编辑技术、基于 CRISPR/Cas 系统的单链断裂的基因编辑技术以及基于 CRISPR/Cas 系统的多重基因调控技术。这些研究表明可以通过优化功能元件以及改造 Cas 蛋白实现更加高效和精准的多重基因编辑与调控, 但是在高通量的多重基因编辑与调控方面依然有较大的挑战^[73]。首先, 在单个细胞的多位点基因编辑与调控方面, 提高编辑或者调控位点的个数、提高特异性以及开发新的编辑与调控系统都是急需解决的问题。其次在细胞群的多重基因编辑与调控方面, gRNA 文库的设计和高通量的筛选方法的不足同样也阻碍了多重基因编辑和调控技术的推广。

为解决以上问题, 研究人员正在进行不断的尝试, 尤其是近年来计算机辅助设计及深度学习在合成生物学方面的广泛应用, 在多重基因编辑与调控方面已经取得了一定的成就^[74]。iCREATE 技术^[52]利用计算机辅助设计用于分子条形码和基因文库的设计; ELSAs 序列^[59]用深度学习实现自动化设计等。另外, 通过在不同微生物中实现新的 CRISPR/Cas 系统的应用以及对

现有 CRISPR/Cas 系统的优化也在不断取得进展。Schuler 等^[75]提出的转座子编辑器,其使用的 IscB 转座子蛋白的体积仅为 Cas9 蛋白的 1/3。该研究揭示了 IscB 和 Cas9 核糖核蛋白之间的结构和机制相似性,通过替换开发出了“史上最小 Cas9”,为开发更小、更强大、更活跃的新一代基因组编辑工具提供了新起点。2020 年诺贝尔化学奖得主 Jennifer A. Doudna 教授团队^[76]在噬菌体中发现了多类 CRISPR/Cas 系统,其中一些来自噬菌体的 Cas λ 酶(属于 V 型,仅 700 多个氨基酸大小)能够编辑植物和人类细胞基因组,并且兼顾了小型化和高编辑效率。未来多种改造方法、改造方式的快速发展以及采用系统性的改造策略将会进一步提升 CRISPR/Cas 系统工具的特异性和安全性。

总而言之,CRISPR/Cas 系统的发现以及功能性开发,是基因编辑、基因调控等领域的革命性突破,是更好地认识世界和改造世界的一种有力工具,将会极大促进生命科学、生物工程以及农作物育种等领域的发展。

REFERENCES

- [1] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, SIKSNYS V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(39): E2579-E2586.
- [2] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases[J]. *Genetics*, 2011, 188(4): 773-782.
- [3] NEMUDRYI AA, VALETIDINOVA KR, MEDVEDEV SP, ZAKIAN SM. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery[J]. *Acta Naturae*, 2014, 6(3): 19-40.
- [4] GAJ T, GERSBACH CA, BARBAS CF, 3RD. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7): 397-405.
- [5] WANG HX, LI M, LEE CM, CHAKRABORTY S, KIM HW, BAO G, LEONG KW. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(15): 9874-9906.
- [6] JIANG W, BIKARD D, COX D, ZHANG F, MARRAFFINI LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239.
- [7] QI L S, LARSON MH, GILBERT LA, DOUDNA JA, WEISSMAN JS, ARKIN AP, LIM WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [8] GILBERT LA, LARSON MH, MORSUT L, LIU Z, BRAR GA, TORRES SE, STERN-GINOSSAR N, BRANDMAN O, WHITEHEAD EH, DOUDNA JA, LIM WA, WEISSMAN JS, QI L S. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451.
- [9] DREISSIG S, SCHIML S, SCHINDELE P, WEISS O, RUTTEN T, SCHUBERT V, GLADILIN E, METTE MF, PUCHTA H, HOUBEN A. Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements[J]. *Plant Journal*, 2017, 91(4): 565-573.
- [10] KANG JG, PARK JS, KO JH, KIM YS. Regulation of gene expression by altered promoter methylation using a CRISPR/Cas9-mediated epigenetic editing system[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1-12.
- [11] MALI P, YANG LH, ESVELT KM, AACH J, GUELLE M, DICARLO JE, NORVILLE JE, CHURCH GM. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [12] SHMAKOV S, SMARGON A, SCOTT D, COX D, PYZOSHA N, YAN W, ABUDAYYEH OO, GOOTENBERG JS, MAKAROVA KS, WOLF YI, SEVERINOV K, ZHANG F, KOONIN EV. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(3): 169-182.
- [13] BARRANGOU R, GERSBACH CA. Expanding the CRISPR toolbox: targeting RNA with Cas13b[J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(4): 582-584.
- [14] CONG L, RAN FA, COX D, LIN SL, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU XB, JIANG WY, MARRAFFINI LA, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [15] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU

- DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [16] REES HA, LIU DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(12): 770-788.
- [17] GAUDELLI NM, KOMOR AC, REES HA, PACKER MS, BADRAN AH, BRYSON DI, LIU DR. Programmable base editing of A.T to G.C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [18] LIN Q, ZONG Y, XUE C, WANG S, JIN S, ZHU Z, WANG Y, ANZALONE AV, RAGURAM A, DOMAN JL, LIU DR, GAO C. Prime genome editing in rice and wheat[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 582-585.
- [19] ANZALONE AV, KOBLAN LW, LIU DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 824-844.
- [20] SANDER JD, JOUNG JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(4): 347-355.
- [21] GILBERT LA, HORLBECK MA, ADAMSON B, VILLALTA JE, CHEN Y, WHITEHEAD EH, GUIMARAES C, PANNING B, PLOEGH HL, BASSIK MC, QI LS, KAMPMANN M, WEISSMAN JS. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation[J]. *Cell*, 2014, 159(3): 647-661.
- [22] TSAI SQ, WYVEKENS N, KHAYTER C, FODEN JA, THAPAR V, REYON D, GOODWIN MJ, ARYEE MJ, JOUNG JK. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(6): 569-576.
- [23] BAO Z, XIAO H, LIANG J, ZHANG L, XIONG X, SUN N, SI T, ZHAO H. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(5): 585-594.
- [24] XIE KB, MINKENBERG B, YANG YN. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(11): 3570-3575.
- [25] JIANG Y, CHEN B, DUAN CL, SUN BB, YANG JJ, YANG S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [26] ZHANG YP, WANG J, WANG ZB, ZHANG YM, SHI SB, NIELSEN J, LIU ZH. A gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1053.
- [27] HORWITZ AA, WALTER JM, SCHUBERT MG, KUNG SH, HAWKINS K, PLATT DM, HERNDAY AD, MAHATDEJKUL-MEADOWS T, SZETO W, CHANDRAN SS, NEWMAN JD. Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-Cas[J]. *Cell Systems*, 2015, 1(1): 88-96.
- [28] WANG LY, DENG AH, ZHANG Y, LIU SW, LIANG Y, BAI H, CUI D, QIU QD, SHANG XL, YANG Z, HE XP, WEN TY. Efficient CRISPR-Cas9 mediated multiplex genome editing in yeasts[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 1-16.
- [29] GUO SY, GAO G, ZHANG CZ, PENG G. Multiplexed genome editing for efficient phenotypic screening in Zebrafish[J]. *Veterinary Sciences*, 2022, 9(2): 92.
- [30] WANG Y, LIU Y, LIU J, GUO YM, FAN LW, NI XM, ZHENG XM, WANG M, ZHENG P, SUN JB, MA YH. MACBETH: Multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 200-210.
- [31] WANG MG, MAO YF, LU YM, WANG ZD, TAO XP, ZHU JK. Multiplex gene editing in rice with simplified CRISPR-Cpf1 and CRISPR-Cas9 systems[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(8): 626-631.
- [32] CHEN FB, LIAN M, MA BX, GOU SX, LUO X, YANG KM, SHI H, XIE JK, GE WK, OUYANG Z, LAI CD, LI N, ZHANG QJ, JIN Q, LIANG YH, CHEN T, WANG JW, ZHAO XZ, LI L, YU MY, et al. Multiplexed base editing through Cas12a variant-mediated cytosine and adenine base editors[J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1): 1163.
- [33] FENG X, ZHAO DD, ZHANG XL, DING X, BI CH. CRISPR/Cas9 assisted multiplex genome editing technique in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(9): e1700604.
- [34] AO X, YAO Y, LI T, YANG TT, DONG X, ZHENG ZT, CHEN GQ, WU Q, GUO YY. A multiplex genome editing method for *Escherichia coli* based on CRISPR-Cas12a[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2307.
- [35] LI L, WEI KK, ZHENG GS, LIU XC, CHEN SX,

- JIANG WH, LU YH. CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(18): e00827-18.
- [36] FERREIRA R, SKREKAS C, NIELSEN J, DAVID F. Multiplexed CRISPR/Cas9 genome editing and gene regulation using Csy4 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Acs Synthetic Biology, 2018, 7(1): 10-15.
- [37] MANS R, van ROSSUM HM, WIJSMAN M, BACKX A, KUIJPERS NGA, van den BROEK M, DARAN-LAPUJADE P, PRONK JT, van MARIS AJA, DARAN JMG. CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Fems Yeast Research, 2015, 15(2): fov004.
- [38] SWIAT MA, DASHKO S, DEN RIDDER M, WIJSMAN M, van der OOST J, DARAN JM, DARAN-LAPUJADE P. FnCpf1: a novel and efficient genome editing tool for *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(21): 12585-12598.
- [39] KLOMPE SE, VO PLH, HALPIN-HEALY TS, STERNBERG SH. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration[J]. Nature, 2019, 571(7764): 219-225.
- [40] STRECKER J, LADHA A, GARDNER Z, SCHMID-BURCK JL, MAKAROVA KS, KOONIN EV, ZHANG F. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases[J]. Science, 2019, 365(6448): 48-53.
- [41] ZHANG YW, SUN XM, WANG QZ, XU JQ, DONG F, YANG SQ, YANG JW, ZHANG ZX, QIAN Y, CHEN J, ZHANG J, LIU YM, TAO RS, JIANG Y, YANG JJ, YANG S. Multicopy chromosomal integration using CRISPR-associated transposases[J]. Acs Synthetic Biology, 2020, 9(8): 1998-2008.
- [42] ZHANG YW, YANG JW, YANG SQ, ZHANG JZ, CHEN J, TAO RS, JIANG Y, YANG JJ, YANG S. Programming cells by multicopy chromosomal integration using CRISPR-associated transposases[J]. Crispr Journal, 2021, 4(3): 350-359.
- [43] YANG SQ, ZHANG YW, XU JQ, ZHANG J, ZHANG JZ, YANG JJ, JIANG Y, YANG S. Orthogonal CRISPR-associated transposases for parallel and multiplexed chromosomal integration[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(17): 10192-10202.
- [44] WANG HH, ISAACS FJ, CARR PA, SUN ZZ, XU G, FOREST CR, CHURCH GM. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. Nature, 2009, 460(7257): 894-U133.
- [45] ISAACS FJ, CARR PA, WANG HH, LAJOIE MJ, STERLING B, KRAAL L, TOLONEN AC, GIANOULIS TA, GOODMAN DB, REPPAS NB, EMIG CJ, BANG D, HWANG SJ, JEWETT MC, JACOBSON JM, CHURCH GM. Precise manipulation of chromosomes *in vivo* enables genome-wide codon replacement[J]. Science, 2011, 333(6040): 348-353.
- [46] WARNER JR, REEDER PJ, KARIMPOUR-FARD A, WOODRUFF LBA, GILL RT. Rapid profiling of a microbial genome using mixtures of barcoded oligonucleotides[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(8): 856-U138.
- [47] GARST AD, BASSALO MC, PINES G, LYNCH SA, HALWEG-EDWARDS AL, LIU R, LIANG L, WANG Z, ZEITOUN R, ALEXANDER WG, GILL RT. Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(1): 48-55.
- [48] BASSALO MC, GARST AD, CHOUDHURY A, GRAU WC, OH EJ, SPINDLER E, LIPSCOMB T, GILL RT. Deep scanning lysine metabolism in *Escherichia coli*[J]. Molecular Systems Biology, 2018, 14(11): e8371.
- [49] ZHENG Y, KONG S, LUO S, CHEN C, CUI Z, SUN X, CHEN T, WANG Z. Improving furfural tolerance of *Escherichia coli* by integrating adaptive laboratory evolution with CRISPR-enabled trackable genome engineering (CREATE)[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2022, 10(7): 2318-2330.
- [50] LIU R, LIANG L, FREED EF, CHOUDHURY A, ECKERT CA, GILL RT. Engineering regulatory networks for complex phenotypes in *E. coli*[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 4050.
- [51] LIU R, LIANG L, CHOUDHURY A, GARST AD, ECKERT CA, OH EJ, WINKLER J, GILL RT. Multiplex navigation of global regulatory networks (MINR) in yeast for improved ethanol tolerance and production[J]. Metabolic Engineering, 2019, 51: 50-58.
- [52] LIU R, LIANG L, CHOUDHURY A, BASSALO MC, GARST AD, TARASAVA K, GILL RT. Iterative genome editing of *Escherichia coli* for 3-hydroxypropionic acid production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 303-313.
- [53] LIU R, LIANG L, GARST A D, CHOUDHURY A,

- NOGUE V SI, BECKHAM GT, GILL RT. Directed combinatorial mutagenesis of *Escherichia coli* for complex phenotype engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 10-20.
- [54] TONG YJ, WHITFORD CM, ROBERTSEN HL, BLIN K, JORGENSEN TS, KLITGAARD AK, GREN T, JIANG XL, WEBER T, LEE SY. Highly efficient DSB-free base editing for streptomycetes with CRISPR-BEST[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(41): 20366-20375.
- [55] BANNO S, NISHIDA K, ARAZOE T, MITSUNOBU H, KONDO A. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(4): 423-429.
- [56] DAVIS JR, WANG X, WITTE IP, HUANG TP, LEVY JM, RAGURAM A, BANSKOTA S, SEIDAH NG, MUSUNURU K, LIU DR. Efficient *in vivo* base editing *via* single adeno-associated viruses with size-optimized genomes encoding compact adenine base editors[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(11): 1272-1283.
- [57] YUAN QC, GAO X. Multiplex base- and prime-editing with drive-and-process CRISPR arrays[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 2771.
- [58] ANZALONE AV, RANDOLPH PB, DAVIS JR, SOUSA AA, KOBLAN LW, LEVY JM, CHEN PJ, WILSON C, NEWBY GA, RAGURAM A, LIU DR. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [59] REIS AC, HALPER SM, VEZEAU GE, CETNAR DP, HOSSAIN A, CLAUER PR, SALIS HM. Simultaneous repression of multiple bacterial genes using nonrepetitive extra-long sgRNA arrays[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(11): 1294-1301.
- [60] MCCARTY NS, SHAW WM, ELLIS T, LEDESMA-AMARO R. Rapid assembly of gRNA arrays *via* modular cloning in yeast[J]. *Acs Synthetic Biology*, 2019, 8(4): 906-910.
- [61] ZHAO YW, LI L, ZHENG GS, JIANG WH, DENG ZX, WANG ZJ, LU YH. CRISPR/dCas9-mediated multiplex gene repression in *Streptomyces*[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(9): e1800121.
- [62] KACZMARZYK D, CENGIC I, YAO L, HUDSON EP. Diversion of the long-chain acyl-ACP pool in *Synechocystis* to fatty alcohols through CRISPRi repression of the essential phosphate acyltransferase PIsX[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 45: 59-66.
- [63] ZHANG X, WANG J, CHENG Q, ZHENG X, ZHAO G, WANG J. Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1[J]. *Cell Discovery*, 2017, 3: 17018.
- [64] CAMPA CC, WEISBACH NR, SANTINHA AJ, INCARNATO D, PLATT RJ. Multiplexed genome engineering by Cas12a and CRISPR arrays encoded on single transcripts[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(9): 887-893.
- [65] CHENG AW, WANG H, YANG H, SHI L, KATZ Y, THEUNISSEN TW, RANGARAJAN S, SHIVALILA CS, DADON DB, JAENISCH R. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system[J]. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1163-1171.
- [66] LIAN J, HAMEDIRAD M, HU S, ZHAO H. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1688.
- [67] LIAN JZ, SCHULTZ C, CAO MF, HAMEDIRAD M, ZHAO HM. Multi-functional genome-wide CRISPR system for high throughput genotype-phenotype mapping[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5794.
- [68] WANG T, GUAN C, GUO J, LIU B, WU Y, XIE Z, ZHANG C, XING XH. Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 2475.
- [69] ROUSSET F, CUI L, SIOUVE E, BECAVIN C, DEPARDIEU F, BIKARD D. Genome-wide CRISPR-dCas9 screens in *E. coli* identify essential genes and phage host factors[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(11): e1007749.
- [70] SCHMIDT R, STEINHART Z, LAYEGHI M, FREIMER JW, BUENO R, NGUYEN VQ, BLAESCHKE F, YE CJ, MARSON A. CRISPR activation and interference screens decode stimulation responses in primary human T cells[J]. *Science*, 2022, 375(6580): eabj4008.
- [71] SANSON KR, HANNA RE, HEGDE M, DONOVAN KF, STRAND C, SULLENDER ME, VAIMBERG EW, GOODALE A, ROOT DE, PICCIONI F, DOENCH JG. Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 5416.

-
- [72] WANG Y, CHENG HJ, LIU Y, LIU Y, WEN X, ZHANG K, NI XM, GAO N, FAN LW, ZHANG ZH, LIU J, CHEN JZ, WANG LX, GUO YM, ZHENG P, WANG M, SUN JB, MA YH. *In-situ* generation of large numbers of genetic combinations for metabolic reprogramming *via* CRISPR-guided base editing[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 678.
- [73] LIU R, LIANG L, FREED EF, GILL RT. Directed evolution of CRISPR/Cas systems for precise gene editing[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(3): 262-273.
- [74] SAPOVAL N, AGHAZADEH A, NUTE MG, ANTUNES DA, BALAJI A, BARANIUK R, BARBERAN CJ, DANNENFELSER R, DUN C, EDRISI M, ELWORTH RAL, KILLE B, KYRILLIDIS A, NAKHLEH L, WOLFE CR, YAN Z, YAO V, TREANGEN TJ. Current progress and open challenges for applying deep learning across the biosciences[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 1728.
- [75] SCHULER G, HU CY, KE AL. Structural basis for RNA-guided DNA cleavage by IscB-omega RNA and mechanistic comparison with Cas9[J]. Science, 2022, 376(6600): 1476-1481.
- [76] AL-SHAYEB B, SKOPINTSEV P, SOCZEK KM, STAHL EC, LI Z, GROOVER E, SMOCK D, EGGERS AR, PAUSCH P, CRESS BF, HUANG CJ, STASKAWICZ B, SAVAGE DF, JACOBSEN SE, BANFIELD JF, DOUDNA JA. Diverse virus-encoded CRISPR-Cas systems include streamlined genome editors[J]. Cell, 2022, 185(24): 4574-4586.

(本文责编 陈宏宇)