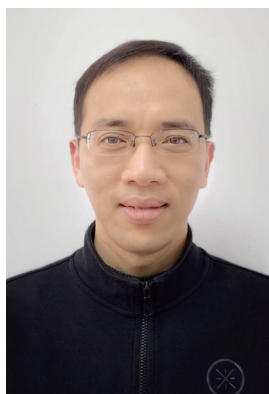


DOI: 10.13376/j.cbls/2019201

文章编号: 1004-0374(2019)05-0473-20



杨晟, 博士, 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所研究员、博士生导师。主要研究方向: 合成生物学与生物催化剂工程。发现适配大肠杆菌生长与产酶的通用参数, 从而建立了基于基因组探矿的酶高效生产关键技术, 通过定制将 200 多种酶逐步试剂化, 为酶催化工艺开发与推广扫除了障碍。发现一批重要底盘细胞基因组编辑的适配机制, 发展了基于 CRISPR-Cas9 等系统的高效基因组编辑技术。以上述技术合成一批生物催化剂并揭示其中高效机理, 发表论文百余篇, 在数十家企业用于生产 30 余种酶与化学品; 在新增百亿销售额的同时, 大幅减少了有毒物质与溶剂使用及二氧化碳排放。获 DuPont Young Professor Award、Novozymes Innovation Award 与国家杰出青年科学基金。

细菌基因组编辑技术进展

李琦^{1,2}, 武美贤^{2,3}, 郭清华^{2,4}, 邵悠然^{2,5}, 杨俊杰², 蒋宇^{2*}, 杨晟^{2*}

(1 四川师范大学生命科学院, 成都 610101; 2 中国科学院分子植物科学卓越创新中心/植物生理生态研究所, 上海 200032; 3 中国科学院大学, 北京 100049; 4 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业部微生物资源采集与保藏重点实验室, 北京 100081; 5 浙江大学化学工程与生物工程学系, 生物质化工教育部重点实验室, 杭州 310027)

摘要: 基因组编辑工具不仅方便构建高效鲁棒的工程细胞, 还能用于深入地理解生物系统。现综述在细菌中建立基因组编辑方法, 特别是基于 CRISPR-Cas 的编辑工具的进展, 并尝试归纳细菌基因组编辑技术开发通用流程, 供打算自建基因组编辑工具的同行参考。

关键词: 基因组编辑; 细菌; 可编程核酸酶; CRISPR-Cas

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A

Advances in bacterial genome editing techniques

LI Qi^{1,2}, WU Mei-Xian^{2,3}, GUO Qing-Hua^{2,4}, SHAO You-Ran^{2,5}, YANG Jun-Jie², JIANG Yu^{2*}, YANG Sheng^{2*}

(1 College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China; 2 Centre for Excellence in Molecular Plant Sciences/Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4 Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 5 Key Laboratory of Biomass Chemical Engineering of Ministry of Education, College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Genome editing tools not only facilitate the development of robust engineered cells, but also provide insight into biological systems. Here, we summarized the genome editing tools in bacteria, particularly the progress

收稿日期: 2018-07-30; 修回日期: 2019-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(21825804, 31670094, 31470209, 31500068); 上海市自然科学基金项目(18ZR1446500, 18ZR1446800); 国家科技重大专项《重大新药创制》(2018ZX09711002); 科技部973计划项目(2014CB745101)

*通信作者: E-mail: syang@sibs.ac.cn (杨晟); yjiang@cibt.ac.cn (蒋宇)

of CRISPR-Cas based genome editing, and we attempted to conclude the universal processes of establishing genome editing techniques in bacteria which may provide reference for persons who intend to build genome editing tools.

Key words: genome editing; bacteria; engineered endonuclease; CRISPR-Cas

基因组编辑技术是指对目的基因进行精确修饰的技术,包括对靶基因的敲除、敲入或碱基的删除、替换或插入^[1],可应用于工程细胞的构建、生命机理的认识,推动了生命科学研究领域的进程。近年来,基因组编辑技术快速发展,多种高效的基因组编辑工具被开发,其中以可编程核酸酶介导的基因组编辑技术应用较为广泛^[2]。目前用于基因组编辑中的可编程核酸酶有锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)^[3]、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effectors nuclease, TALEN)^[4]和成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)相关蛋白(CRISPR associated nuclease, Cas)^[5]。这类核酸酶能在基因组上匹配位置进行切割而形成双链断裂缺口(double strand break, DSB),DSB主要通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous repair, HR)两条途径进行修复^[2]。其中,NHEJ能在DSB处随机插入或缺失碱基,从而实现基因失活的目的;而同源重组修复途径中,在有修复模板的情况下,可精确实现碱基突变、片段删除或敲入。

细菌作为生物界重要组成部分,其种类繁多、数量巨大、分布广泛,已被广泛应用于农业、工业和医学等研究中,在细菌中开发和建立遗传操作工具可加快对细菌的研究和应用。虽然细菌基因组编

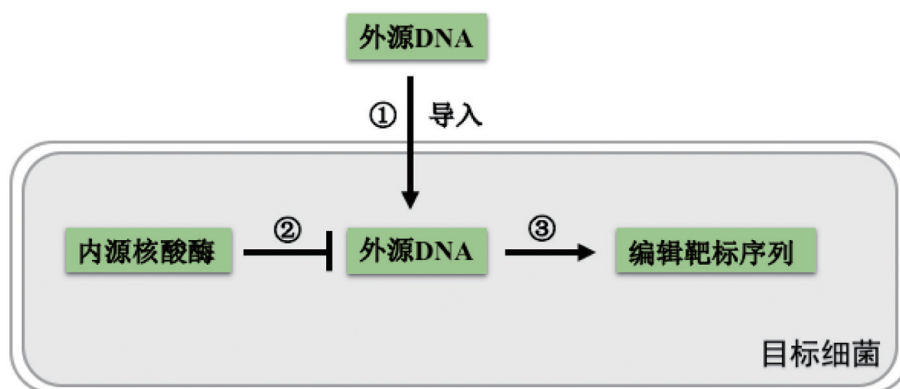
辑技术不如真核生物基因组编辑技术备受关注,但两者的基因组编辑原理相通。与真核生物修复途径相比,大部分细菌缺乏内源NHEJ途径,只能通过HR途径或借助外源NHEJ系统对DSB修复^[6-7]。细菌基因组编辑一般过程为DNA导入宿主细胞、导入DNA的复制和筛选编辑过的细胞(图1)。本文将围绕上述几个部分阐述在细菌中建立基因组编辑方法,特别是CRISPR-Cas介导的编辑工具进展,并尝试归纳细菌基因组编辑技术开发通用流程。

1 DNA的导入

DNA跨越细胞膜屏障进入细胞这一过程称为DNA的导入。可以借助多种方法将DNA导入细菌中:利用细胞天然生理活动,如自然转化、接合转移或噬菌体介导的转导;或依靠化学和物理手段来促进细胞摄入外源DNA,如化学转化和电转化。

1.1 自然转化

细菌或古菌具有自发地摄取外源DNA并使其稳定遗传的能力,这种现象或过程被称作自然转化^[8]。1944年,美国科学家O. Avery等证明DNA转移至肺炎球菌中是第一个被发现的细菌自然转化现象,其他还包括枯草芽孢杆菌、奈瑟氏淋球菌、霍乱弧菌和流感嗜血杆菌^[9]。可通过导入外源*comK*等转化相关基因赋予宿主菌被自然转化能力^[10-11],外源DNA在宿主中通过同源重组整合至基因组或作为质粒自主复制从而被稳定遗传下去^[12-13]。



DNA导入目标细菌的效率、导入DNA避开内源核酸酶降解并利用宿主复制机制稳定遗传的机率以及编辑靶标序列的效率是基因组编辑技术开发需要优化的三个指标。

图1 细菌基因组编辑技术开发通用流程

1.2 接合转移

接合转移是指 DNA 从一个细菌(供体细菌,通常为大肠杆菌)传递给另一个细菌(受体细菌)的过程^[14-16],接合转移发生的必要条件是:(1)供体细菌中含有 *tra* 基因,可将 *tra* 基因放在质粒上表达或整合至供体细胞基因组上;(2)待导入受体细菌的穿梭质粒上含有被 Tra 蛋白识别的 *oriT* 序列。常见的大肠杆菌供体宿主包括 S17-1^[17] 和 ET12567^[18],两者均经过修饰并可表达广谱宿主转移元件。研究人员已在链霉菌^[19]、梭菌^[20-21]、枯草芽孢杆菌^[22]、解淀粉芽孢杆菌^[23]、中华根瘤菌^[24]、需钠弧菌^[25]、恶臭假单胞菌^[26]等细菌中利用接合转移实现了质粒的传递。

1.3 转导

在自然环境中,噬菌体被认为是微生物中遗传物质转移的重要载体^[27-28],转导是指由噬菌体将一个细胞的 DNA 传递给另外一个细胞的过程。通常利用宿主细菌将噬菌体增殖至高滴度,然后收获噬菌体并通过普遍性转导将 DNA 转移至受体细胞,如大肠杆菌 P1 转导^[29]和枯草芽孢杆菌 PBS1 转导^[30],转导频率通常在 10^{-7} 到 10^{-6} 之间^[29-31],传递片段可长达 400 kb。

1.4 化学转化

缺乏天然转化能力的细菌通常可以尝试通过化学方式来促进吸收外源 DNA。用盐溶液处理有助于在细胞膜上形成孔并促进外源 DNA 的结合,氯化钙常用于制造大肠杆菌感受态细胞^[32-34]。额外加入细胞壁处理剂,如二甲基亚砜、聚乙二醇、溶菌酶或二硫苏糖醇,可增加细胞壁的渗透性,进而可提高转化效率;也可通过敲除肽聚糖合成相关基因,如谷氨酸棒状杆菌中的 *ponA* 基因来提高外源 DNA 转化效率^[35]。除此,生长状态、复苏培养基的组成和生长温度也可影响转化效率^[36-38]。感受态细胞与 DNA 混合后,用短暂的热休克处理有助于 DNA 转运入细胞^[32,36]。

1.5 电转化

除了化学转化,可通过电场作用于细胞几微秒到几毫秒,在细胞膜上瞬时形成小孔,把 DNA 导入细胞;也可利用酶解法事先去除细胞壁获得原生质体后,将原生质体与 DNA 混合,再在电场的作用下进行转化^[39]。电转感受态细胞的转化效率通常比化学感受态细胞更高^[36],并且在一些菌株中,电转化是唯一报道的转化方法^[40]。

可通过以下调试来对电转效率进行优化:(1)

制备电转感受态细胞时细菌所处的生长阶段对电转效率有影响,如德氏乳杆菌电转过程中,用平台期初期的菌株做电转时,其转化效率最高^[41],而在菌株培养过程中可添加甘氨酸和 DL-苏氨酸来弱化细胞壁合成,可提高转化效率,而吐温 80 则可以通过改变细胞膜的流动性来提高电转效率^[42];(2)洗涤缓冲液和电转缓冲液的成分对电转效率有影响,已有文献证明缓冲液的成分在乳杆菌的转化中起重要作用,蔗糖的添加可提高转化效率^[41];(3)可通过调节电转参数来提高转化效率,如电阻、电压等^[41]。

2 导入DNA的抗降解

细菌拥有一系列先天和后天防御系统,可以保护它们免受外源遗传物质的侵入。现在已知的系统包括限制修饰^[43]、CRISPR-Cas^[44]、顿挫感染^[45]、Agos^[46]、DISARM^[47]以及近期刚被挖掘出来的十种系统^[48]。

在这些系统中,限制修饰系统是最普遍的。大部分限制修饰系统由限制酶和 DNA 甲基转移酶组成,它们通常成对出现。限制修饰系统是外源 DNA 进入异源宿主的屏障,该系统可通过 DNA 甲基化模式的差异识别并降解外源 DNA,阻碍了遗传物质的传递。约 95% 的已被测序的细菌中含有限制修饰系统^[49],根据亚基组成、切割位点、序列特异性和辅因子要求,可分为 4 种类型:I 型、II 型和 III 型限制酶在特异位点切割非甲基化的 DNA,IV 型限制酶切割具有外源模式的甲基化修饰 DNA^[50]。

为了克服宿主细菌中的限制修饰系统,可通过以下 3 个策略使外源 DNA 顺利转入细菌中:①使用过渡菌株对外源遗传物质进行修饰或提前用商业化的 DNA 甲基转移酶孵育要转化的质粒;②敲除宿主细菌中的限制酶;③在体外建立模拟宿主细菌甲基化修饰的系统,质粒进行修饰后再转入细菌。策略①中可事先将待转质粒转入过渡菌株中进行甲基化修饰,将过渡菌株中修饰过的待转质粒抽提后再转入目标菌株,该方法已被证明可以提高植物乳杆菌的转化效率^[51],但这个方法通常受限于过渡菌株中仅有的甲基化修饰步骤。商业化的 DNA 甲基转移酶,如 CpG 甲基转移酶(M.SssI)或 GpC 甲基转移酶(M.CviPI)可甲基化修饰 GC 或 CG,可能适用高 GC 宿主^[52],但该方法受数量有限的商业化甲基转移酶限制。在策略②中,有研究人员敲除了宿主菌中的限制酶基因,如将丙酮丁醇梭菌中的 *Cac824I* 基因敲除后,使得外源质粒顺利导入该细

菌中^[53-54]。目前,还可采用由温廷益实验室建立的策略③去克服 DNA 被降解^[55]:通过 REBASE 在线软件^[49]预测靶细菌中推定的甲基转移酶编码基因,然后在特定大肠杆菌中表达对应的酶以模拟靶细菌 DNA 甲基化模式 (mimicking of DNA methylation patterns, MoDMP), 穿越靶细菌限制屏障, 实现含有多套限制修饰系统的细菌遗传操作。具体做法为:在一株内源限制修饰系统全部缺失的大肠杆菌 EC135 中分别共表达了来自汉氏硝化细菌 X14、蜡样芽孢杆菌 ATCC 10987 和解淀粉芽孢杆菌 TA208 中有活性的 DNA 甲基转移酶, 先将待转化的质粒在该大肠杆菌中进行甲基化修饰, 后再转至目标宿主中。结果表明, 修饰后质粒具有与受体细菌相似的甲基化修饰模式, 利用 MoMDP 系统, 研究人员首次成功实现了硝化细菌 X14 的遗传转化, 并大幅度提高了另外两株芽孢杆菌的转化效率。用类似于③的策略, 俄亥俄州立大学的研究者在大肠杆菌中表达了来自嗜纤维梭菌中的两个甲基化酶 *M. Cce743I* 和 *M. Cce743II*, 成功将质粒转入嗜纤维梭菌中^[56]; 日本的研究人员在大肠杆菌中表达青春双歧杆菌的推定甲基转移酶 BAD-1233 和 BAD-1283, 以提高大肠杆菌-青春双歧杆菌的穿梭质粒的转化效率^[57]。这里要指出的是, 有些限制修饰系统是 REBASE 软件预测不出来的, 如长双歧杆菌中的限制酶 *SacII*^[52]。上述策略③在革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌中的成功应用, 表明该方法可被应用于其他已知全基因组序列但尚不能进行遗传转化的细菌的遗传操作, 或进一步提高宿主菌的转化效率。

3 导入DNA的复制

一旦攻破外源遗传物质传递屏障问题, 即可向细胞内引入并稳定地维持外源 DNA 以表达异源基因或用作重组修复模板。启动子是实现外源基因高效表达的关键, 从诱导机制上启动子可分为组成型和诱导型启动子。组成型启动子是指可以持续表达目标蛋白的启动子, 它们很方便, 因为组成型启动子不需要额外的诱导物质, 但也存在一些问题, 如表达量不易控制、组成型表达载体不稳定。与组成型启动子相比, 诱导型启动子需要特定的诱导条件, 控制基因转录的“开”和“关”。对于已知基因组序列信息的细菌, 可通过在线软件对启动子区域进行预测 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html); 还可对受体菌的转录组数据进行分析, 利用依赖 Sigma 因子识别的启动子序列规律, 设计启动

子文库序列, 以荧光蛋白等基因为报告系统, 筛选出强度梯度分布的启动子^[58-59]。

表达载体是基因重组技术中的重要工具, 常用的是独立自主复制型载体和整合型载体。独立复制载体一般可在宿主菌中自主复制, 穿梭质粒是外源 DNA 进入细胞并表达的重要“运输工具”, 该质粒上囊括了构建克隆菌株, 如大肠杆菌中的复制子和筛选标记, 同时还含有操作菌株的复制子和筛选标记, 因此可借助两套复制子和筛选标记分别实现外源 DNA 表达克隆的构建、传递以及在宿主菌中的复制和表达^[60-61]。独立自主复制的载体存在一些问题, 如在传代培养中质粒的不稳定性, 解决这一问题的有效途径之一是使用整合型载体取而代之。整合型载体只有整合进宿主基因组中才能正常表达目的基因, 可通过同源重组整合至靶标基因组上, 主要原理是通过载体与宿主基因组之间的同源序列发生同源重组, 从而将外源基因整合至基因组上。

除了可采用整合型载体, 还可通过位点特异性重组和转座系统来整合外源 DNA。位点特异性重组不依赖于 DNA 序列的同源性, 而依赖于能与某些酶 (如整合酶) 相结合的 DNA 序列, 这些特异的酶能催化 DNA 链的断裂和重新连接, 它们能发动位点特异性重组作用^[62-63]。转座系统中转座酶识别转座子两端的特异序列, 把转座子断裂下来, 将其环化后再插入另一 DNA 位点^[64-65]。本文对部分菌株中的筛选标记基因 (表 1)^[66-81] 及复制子 (表 2)^[82-102] 进行了统计。

4 细菌中的基因组编辑

除了表达异源基因之外, 还可以将 DNA 导入细胞中, 以对细菌的基因组进行编辑。传统的基因编辑须通过两轮同源重组且依赖于筛选标记, 第一轮同源重组将含有筛选标记 (如反筛标记 *upp*、*mazF* 等) 的质粒整合至基因组获得单交换菌株, 第二轮同源重组在将靶标基因删除的同时将筛选标记等质粒元件删除获得双交换菌株, 因此可通过筛选培养基获得基因删除菌株^[103-104]。或者, 可利用 Cre-LoxP 位点特异性重组系统, 先利用含有抗性筛选标记基因、LoxP 位点及同源序列的 DNA 与目的基因交换, 再通过 Cre 重组酶删除两方向相同的 LoxP 位点之间的抗性标记, 以获得无标记的基因敲除菌株^[105]。

鉴于大多数细菌中通过内源同源重组发生编辑的概率低, 使得单交换菌株的获得成为传统方法的

表1 细菌中常用的抗生素及其抗性基因和工作浓度

名称	溶剂	抗性基因	使用浓度(μg/mL)	宿主菌	参考文献
氨苄青霉素(ampicillin)	水	<i>Bla</i>	50	<i>E. coli</i>	[66]
			500	<i>P. putida</i> KT2440	[67]
			100	<i>S. meliloti</i>	[68]
卡那霉素(kanamycin)	水	<i>KanR</i>	50	<i>E. coli</i>	[69]
			50	<i>S. meliloti</i>	[68]
			50	<i>P. putida</i> KT2440	[70]
			20	<i>B. subtilis</i>	
氯霉素(chloramphenicol)	乙醇	<i>Caf</i>	34	<i>E. coli</i>	[71]
			10	<i>Methanobacteriaceae</i>	[72]
			10	<i>L. brevis</i>	[73]
			5	<i>L. plantarum</i>	
硫酸链霉素(streptomycin sulfate)	水	<i>Str</i>	50	<i>E. coli</i>	[74]
			500	<i>S. meliloti</i>	[68]
			80	<i>P. putida</i> KT2440	[67]
红霉素(erythromycin)	乙醇	<i>ermE</i>	25	<i>C. acetobutylicum</i>	[75]
			20	<i>C. beijerinckii</i>	[75]
			10	<i>L. brevis</i>	[73]
			5	<i>L. plantarum</i>	
庆大霉素(gentamicin)	水	<i>gmrA</i>	10	<i>P. putida</i> KT2440	[67]
四环素(tetracycline)	乙醇	<i>Tetr</i>	≥50	<i>P. putida</i> KT2440	[76]
安普霉素(apramycin)	水	<i>Am</i>	50	<i>E. coli</i>	[77]
壮观霉素(spectinomycin)	水	<i>aadA</i>	300	<i>E. coli</i>	[78]
			100	<i>B. subtilis</i>	[79]
			200	<i>S. meliloti</i>	[68]
			350	<i>C. beijerinckii</i>	[80]
甲砒霉素(thiamphenicol)	N,N-二甲基 甲酰胺	<i>catP</i>	5	<i>C. ljungdahlii</i>	[81]
			17	<i>C. acetobutylicum</i>	[80]

瓶颈。而后,有研究表明可通过引入基于细菌噬菌体的重组酶以增强同源重组的概率,分为:(1) RecT 辅助的单链 DNA (single-strand DNA, ssDNA) 重组,如大肠杆菌^[106]、谷氨酸棒状杆菌^[107]、罗伊氏乳杆菌^[108]等宿主可借助 RecT 蛋白以 ssDNA 进行基因编辑;(2) λ-red 系统辅助的双链 DNA (double-strand DNA, dsDNA) 重组,如植物乳杆菌^[109]中 dsDNA 介导的基因编辑。

除此,还可绕开同源重组进行基因编辑,如通过二类内含子。二类内含子具有核酶活性,能够自我剪接之后离开 mRNA 前体,然后在内含子编码蛋白 (intron-encoded protein, IEP) 的辅助下整合到特定的 DNA 位点,随后通过 IEP 的反转录活性形成完整的 DNA 双链。二类内含子通过 EBS1 和 EBS2 区域的碱基与靶标 DNA 互补配对来实现对特定靶

标 DNA 位点的识别,因此可以通过改变 EBS1 和 EBS2 区域的碱基序列来改变编辑位点^[110]。由于该基因失活方法是有痕的,因此在细菌中可能会导致极性效应。

ZFN、TALEN 和 CRISPR-Cas 是基因编辑中应用最为广泛的三种核酸酶。ZFN 可通过锌指结构识别特定的核酸序列,然后通过核酸内切酶 Fok I 切割 DNA; TALEN 通过转录激活剂效应物识别特定的核酸序列,同样通过 Fok I 切割 DNA。ZFN 和 TALEN 通常被用于真核细胞中的基因编辑^[111]。目前,实现基因组编辑的最普遍的方法是 CRISPR-Cas 系统,使用向导 RNA (guide RNA, gRNA) 来引导 Cas 核酸酶结合和切割互补配对的 DNA 序列。下面着重阐述 CRISPR-Cas 在细菌中进行基因编辑的建立流程。

表2 细菌中常用的复制子及其拷贝数

复制子	拷贝数	宿主	参考文献
pMB1 (derivative)	~500-700	<i>E. coli</i>	Addgene
pMB1	~15-20	<i>E. coli</i>	Addgene
pBR322	~15-20	<i>E. coli</i>	Addgene
ColE1	~15-20	<i>E. coli</i>	Addgene
R6K	~15-20	<i>E. coli</i>	Addgene
P15A	~10	<i>E. coli</i>	Addgene
pSC101	~5	<i>E. coli</i>	Addgene
ColE1 (derivative) and F1	~300-500	<i>E. coli</i>	Addgene
pUC and F1	~300-500	<i>E. coli</i>	Addgene
RK2	—	<i>P. fluorescens</i>	[82]
	—	<i>X. campestris</i>	[82]
PBBR1	—	<i>A. tumefaciens</i>	[83]
	—	<i>E. coli</i>	[84]
	—	<i>P. putida</i>	[84]
pRO1600	—	<i>P. syringae</i>	[85]
RSF1010	—	<i>P. putida</i>	[86]
pE194	~10	<i>B. subtilis</i>	[87]
	~6-9	<i>L. lactis</i>	[88]
	~10-25	<i>S. aureus</i>	[87]
pC194	~25-36	<i>L. plantarum</i>	[89-90]
	~80	<i>B. choshinensis</i>	[91]
	—	<i>S. aureus</i>	[92]
pUB110	~20	<i>B. choshinensis</i>	[91]
	—	<i>S. aureus</i>	[93]
pWV01	~60	<i>E. coli</i>	[94]
	~5	<i>B. subtilis</i>	
	~3	<i>S. lactis</i>	
pBC1	~60	<i>B. subtilis</i>	[95]
	—	<i>B. amyloliquefaciens</i>	[95]
	—	<i>S. aureus</i>	[95]
	—	<i>S. carnosus</i>	[95]
	—	<i>L. reuteri</i>	[95]
pAM β 1	—	<i>B. subtilis</i>	[96]
	—	<i>L. lactis</i>	[97]
pSH71	—	<i>L. lactis</i>	[98]
pT181	~20	<i>S. aureus</i>	[99]
pIJ101	—	<i>E. coli</i>	[100]
	~40-300	<i>S. lividans</i>	
PSG5	~40-50	<i>S. ghanaensis</i>	[101]
pIM13	~6-8	<i>C. acetobutylicum</i>	[102]

“—”为未获得相关信息。

5 CRISPR-Cas系统在细菌中进行单、多点编辑及基因组突变文库建立中的应用

CRISPR-Cas 系统在许多细菌和古细菌中的获得性免疫系统，用来抵御外源遗传物质的入侵^[44]。该系统主要由两部分组成：一是由高度保守的重复

系列 (repeat) 和含外源遗传物质信息的间隔序列 (spacer) 组成的 CRISPR 阵列；二是 CRISPR 阵列附近成簇的 Cas 基因，由这些元件共同完成免疫过程的各个步骤^[112]。2012 年，Jennifer Doudna 和 Emmanuelle Charpentier 以化脓链球菌出发，首次在体外证明了 II 型 CRISPR 系统的切割机制，为

CRISPR-Cas 系统在生物中进行基因编辑奠定了重要基础^[5]。

基因组编辑是 CRISPR-Cas 系统最为广泛的应用,可以通过两种方式对细菌基因组进行 CRISPR-Cas 介导的编辑:(1)向宿主菌中引入异源 CRISPR-Cas 系统,如应用较多的来自化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9(spCas9);(2)利用内源的 CRISPR-Cas 系统,如肺炎链球菌、巴氏梭菌等具有天然的 CRISPR-Cas 系统^[113-114]。2013年, Jiang 等^[113]利用 CRISPR-Cas9 系统分别在肺炎链球菌和大肠杆菌中实现基因修饰是 CRISPR-Cas 用于细菌基因组编辑的第一个例子。如今,已有多项研究报道可将 CRISPR-Cas 用于各种细菌的基因编辑,表3总结了迄今为止报道的34种细菌中所涉及的多基因编辑,其中革兰氏阳性细菌有28种,革兰氏阴性细菌有6种。在 CRISPR 类型方面,有30种细菌中采用了化脓链球菌来源的 Cas9,4种细菌中使用了新凶手弗朗西丝菌来源的 Cpf1,1种细菌中应用了表皮葡萄球菌来源的 CRISPR-Cas 系统,4种细菌借助的是内源的 CRISPR-Cas 系统。在供体 DNA 形式方面,有4、4和29种细菌分别采用 ssDNA、非复制型 dsDNA 和复制型 dsDNA 的形式来提供修复模板,其中大肠杆菌的修复 DNA 可以为这三种形式之一。

多重基因组编辑技术,如 MAGE (multiplex automated genome engineering)、TRMR (trackable multiplex recombineering) 和 Tn-seq (Transposon mutagenesis with next-generation sequencing) 能快速对大肠杆菌基因进行突变,该技术已被证实可用到基因工程中^[160-162],但这些方法难以追踪组合的基因型^[163-165]。而 CRISPR-Cas 系统可用于构建可跟踪的多基因编辑基因组突变文库。2017年,有研究人员建立了基于 CRISPR-Cas9 的基因组多位点整合,条形码可追踪突变位点的基因组文库方法 CREATE^[166]。每个 CREATE 盒都含有一个 gRNA 和同源臂,其中 gRNA 引导 Cas9 在感兴趣位点的附近进行切割,而同源臂上有同义突变的 PAM 和感兴趣位点突变后的序列,CREATE 盒可通过同源重组整合到基因组,在基因组上引入突变。CREATE 寡核苷酸以成池的形式合成,成池的寡核苷酸接下来进行 PCR 扩增并克隆到质粒上,以形成稳定的供体 DNA 载体;CREATE 质粒转化至表达 Cas9 及 λ Red 系统的大肠杆菌中,大肠杆菌基因组不同位点经同源重组后发生突变,然后通过相应培养条件对具有目标表型的突变株进

行富集,对富集之后细胞中的质粒进行测序,最后将测序结果比对到基因组上,以寻找到对特殊表型有贡献的基因。CREATE 可用于蛋白质工程中的位点饱和诱变、适应性实验室进化实验的重建,以及细菌中的应激耐受性和抗生素抗性基因的鉴定等。

CREATE 成功率较高,但必须通过测序以筛选阳性克隆菌株。有研究人员建立了更为简单的文库构建方法 CRISPR-FRT,该方法可避免新 gRNA 的构建,并为阳性克隆提供了简单的表型筛选^[167]。具体做法为:将一段含有卡那霉素抗性基因,并在卡那霉素抗性基因两侧分别带有 FRT (flippase recognition target) 序列的 DNA 盒子先整合至大肠杆菌基因组上的非必需基因处,Cas9 在 gRNA 的引导下切割两段 FRT 序列形成 DSBs,修复 DSBs 的供体模板是以质粒形式或线性片段形式导入的突变文库,随着供体模板整合至基因组上,卡那霉素抗性基因被替换,因此,通过卡那霉素抗性表型来筛选阳性克隆菌株。

6 基于CRISPR-Cas的基因组编辑系统建立

6.1 CRISPR-Cas系统表达方式的选择

若须借助 CRISPR-Cas 系统在细菌中发挥切割功能,以化脓链球菌来源的 CRISPR-spCas9 系统为例,细菌中必须包含 Cas 效应蛋白、CRISPR RNA (crRNA) 和反式作用 CRISPR RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 这三个元件,同时还需要靶序列中含有间隔相邻基序 (proto-spacer adjacent motifs, PAM 基序)^[168]。为了便于载体构建,减少表达 RNA 需要的启动子和终止子,且在不影响切割效率的前提下,可将 crRNA 和 tracrRNA 融合成一个 gRNA^[5]。细菌中一般无非同源末端连接修复系统^[169]。因此,CRISPR-Cas 在细菌中的应用还须要提供修复 DSB 的模板。

以上 CRISPR 系统必要元件的表达可选择:(1)单质粒表达;(2)双或多质粒表达;(3)整合至染色体。单质粒表达是 CRISPR-Cas 系统应用中最常见的策略,即将 gRNA、CEP 和修复模板放在一个质粒上(通用质粒图谱见图2),结合 GoldenGate^[170]、Gibson 重组^[171]或重组酶试剂盒可加快质粒的构建。在操作过程中,单轮转化即可实现靶标位点的切割和修复,然后将质粒消除后进行次轮的基因编辑。该策略在操作过程中简便,但在单轮多基因编辑操作时,可能会因为同源臂的长度限制了多位点编辑的实现。

由于质粒大小的限制,单质粒上插入的供体

表3 CRISPR-Cas系统在细菌中进行单、多基因编辑的总结

菌株	CEP ^a	模式 ^b (HDR/ NHEJ/碱基 编辑)	靶标数	KO或 KI ^c	供体DNA 形式	编辑效率	是否借助	参考文献
<i>Actinoplanes sp.</i> SE50/110	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	80%	否	[115]
<i>B. subtilis</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	2 (同时)	KI	NR-dsDNA	69%~100%	否	[116]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	2 (同时)	KO	NR-dsDNA	23%~100%	否	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	2 (同时)	KO	NR-dsDNA	85%	否	
<i>B. subtilis</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	33%~55%	否	[117]
<i>B. subtilis</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	89%~97%	否	[118]
<i>B. smithii</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	1/10	否	[119]
<i>B. licheniformis</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	100%	否	[120]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	2 (同时)	KO	R-dsDNA	12%	否	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	79%	否	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	76.5%	否	
<i>C. difficile</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	1/5	否	[121]
<i>C. difficile</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	100%	否	[122]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	80%	否	
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	4/10	否	[123]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	4/10	否	
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	75%	否	[122]
<i>C. autoethanogenum</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	>50%	否	[124]
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	6.7%~100%	否	[125]
<i>C. beijerinckii</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	18.8%~100%	否	[125]
<i>C. beijerinckii</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	8/15	否	[126]
<i>C. cellulovorans</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	2	KO	R-dsDNA	ND	否	[127]
<i>C. pasteurianum</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	100%	否	[114]
	native type I-B CRISPR/Cas	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	100%	否	
<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i> type I-B CRISPR-Cas	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	100%	否	[128]
	<i>C. tyrobutyricum</i> type I-B CRISPR-Cas	宿主HDR	2	KO	R-dsDNA	6%	否	
	<i>C. tyrobutyricum</i> type I-B CRISPR-Cas	宿主HDR	2	KO	R-dsDNA	100%	否	
<i>C. glutamicum</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	60%	否	[129]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	62.5%	否	
<i>C. glutamicum</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	16.7%~100%	否	[130]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	3/12~8/12	否	
<i>C. glutamicum</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	RecT-介导的 同源重组	1	KO	ssDNA	11.1%~100%	是	[131]
<i>C. glutamicum</i>	<i>F. novicida</i> Cpf1	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	~15%	否	[107]
	<i>F. novicida</i> Cpf1	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	~5%	否	

续表

菌株	CEP ^a	模式 ^b (HDR/ NHEJ/碱基 编辑)	靶标数	KO或 KI ^c	供体DNA 形式	编辑效率	是否借助	参考文献
<i>C. glutamicum</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	RecET-HDR	1	KO	R-dsDNA	83.33%	是	[132]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	RecET-HDR	1	KI	R-dsDNA	69.23±3.85%	是	
<i>C. pekinense</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	RecET-HDR	1	KO	R-dsDNA	30.3%	是	[132]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	RecET-HDR	1	KI	R-dsDNA	30%	是	
<i>L. casei</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	1	KO、 KI	R-dsDNA	25%~62%	否	[133]
<i>L. reuteri</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	RecT-介导的 同源重组	1	KO	ssDNA	90%~100%	是	[108]
<i>P. putida</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	38/76、1/52	否	[119]
<i>P. putida</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KO	NR-dsDNA	80%~100%	是	[134]
	<i>F. novicida</i> Cpf1	λ Red-HDR	1	KO	NR-dsDNA	100%	是	
<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i> type III-A CRISPR- Cas	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	75%、85%、 90%	否	[135]
<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	6/12、8/12、 9/12	否	[136]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	6/12	否	
<i>S. lividans</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	70%~100%	否	[137]
<i>S. viridochromogenes</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	100%、67%	否	[137]
<i>S. albus</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	100%、67%	否	[137]
<i>S. coelicolor</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	60%~100%	否	[138]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	2 (同时)	KO	R-dsDNA	54%、45%	否	
<i>S. coelicolor</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	94%	否	[139]
<i>S. coelicolor</i> A3	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	2 (同时)	KO	R-dsDNA	97%~100%	否	[140]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	内源NHEJ	3 (同时)	KO	无	3%~54%	否	[140]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	重构的NHEJ: <i>S. coelicolor</i> LigD	4 (同时)	KO	无	69%~77%	否	[140]
<i>S. albus</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	100%、79%	否	[141]
<i>S. lividans</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	100%	否	[141]
<i>S. roseosporus</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	50%	否	[141]
<i>S. viridochromogenes</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	62%	否	[141]
<i>R. cellulolyticum</i> (<i>C. cellulolyticum</i>)	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	NR-dsDNA	>95%	否	[142]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	100%	否	
<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	NR-dsDNA	75%~100%	否	[113]
<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	ND	否	[143]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	2	KI	R-dsDNA	ND	否	
<i>S. thermophilus</i>	<i>S. thermophilus</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	通过IS元件	ND	否	[144]
<i>S. elongatus</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	100%	否	[145]
<i>M. smegmatis</i>	<i>F. novicida</i> Cpf1	λ Red-HDR	1	KO	ssDNA	10%~90%	是	[146]
	<i>F. novicida</i> Cpf1	λ Red-HDR	1	KI	ssDNA	3%~29%	是	
<i>T. citrea</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KO	R-dsDNA	94%~100%	是	[147]
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KI	ssDNA	65%	是	[113]
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KO	R-dsDNA	86% ± 4%	是	[147]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	2	KO	R-dsDNA	97% ± 4%	是	

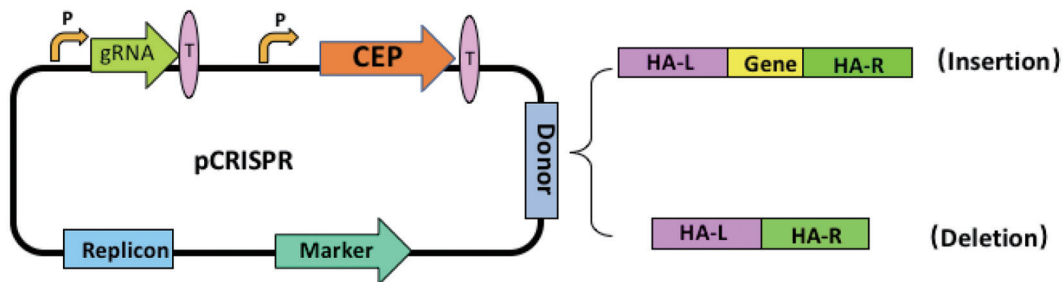
续表

菌株	CEP ^a	模式 ^b (HDR/ NHEJ/碱基 编辑)	靶标数	KO或 KI ^c	供体DNA 形式	编辑效率	是否借助	参考文献
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	3	KO	R-dsDNA	47% ± 8%	是	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KI	R-dsDNA	75%~92%	是	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	2	KI	R-dsDNA	78% ± 26%	是	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KI	NR-dsDNA	6%~69%	是	
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KO	NR-dsDNA	1%~47%	是	[148]
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KO	NR-dsDNA	90%~100%	是	[149]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KO	ssDNA	7%~95%	是	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KI	NR-dsDNA	12%~100%	是	
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	1	KO	在IS元件 附近产生 双缺刻	17% ± 1.6%、 11% ± 3.2%	否	[150]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	2 (同时)	KO	在IS元件 附近产生 双缺刻	3%	否	
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KO	NR-dsDNA	100%	是	[151]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KI	ssDNA	48%~100%	是	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KO	ssDNA	0.01%~100%	是	
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KO、 KI	NR-dsDNA	ND	是	[152]
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KI	R-dsDNA	6.7%~100%	是	[153]
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	1	KI	NR-dsDNA	61%~92%	是	[154]
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	2	KO	R-dsDNA	100%	是	[155]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	3	KO	R-dsDNA	88.3%	是	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	λ Red-HDR	4	KO	R-dsDNA	40%	是	
<i>E. faecalis</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9 native CRISPR1- cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	21.8%~94.4%	否	[156]
<i>B. licheniformis</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	79%~100%	否	[120]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	2	KO	R-dsDNA	11.60%	否	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9 nickase	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	76.50%	否	
<i>S. elongatus</i> PCC 7942	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	4/5	否	[125]
<i>S. elongatus</i> UTEX 2973	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	100%	否	[145]
<i>S. elongatus</i> UTEX 2973	<i>F. novicida</i> Cpf1	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	2/10	否	[157]
	<i>F. novicida</i> Cpf1	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	9/10	否	
<i>Synechocystis</i> 6803	<i>F. novicida</i> Cpf1	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	7/8	否	[157]
	<i>F. novicida</i> Cpf1	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	7/16	否	
<i>Anabaena</i> 7120	<i>F. novicida</i> Cpf1	宿主HDR	1	KI	R-dsDNA	6/8	否	[157]
<i>C. ljungdahlii</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	宿主HDR	1	KO	R-dsDNA	50%~100%	否	[81]
<i>C. glutamicum</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9	碱基编辑	1	—	—	100%	—	[158]
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	碱基编辑	2	—	—	87.2%	—	
	<i>S. pyogenes</i> Cas9	碱基编辑	3	—	—	23.3%	—	
<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i> Cas9 (D10A H840A)	碱基编辑	1	—	—	1/8~2/8	—	[159]

续表

菌株	CEP ^a	模式 ^b (HDR/ NHEJ/碱基 编辑)	靶标数	KO或 KI ^c	供体DNA 形式	编辑效率	是否借助	参考文献
	<i>S. pyogenes</i> Cas9 (D10A H840A)	碱基编辑	2			2/8		
	<i>S. pyogenes</i> Cas9 (D10A H840A)	碱基编辑	3			5/8		

^aCEP, Cas效应蛋白; ^bHDR, 同源重组修复; NHEJ, 非同源末端链接; ^cKO, 敲除; KI, 敲入; R-dsDNA, 复制型 dsDNA; NR-dsDNA, 非复制型dsDNA; λ Red-HDR, λ Red-介导的同源重组; RecET-HDR, RecET-辅助的同源重组; ND, 未测定



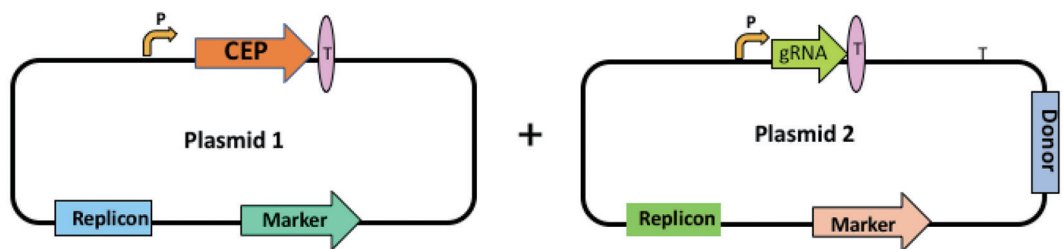
P为启动子(promotor); T为终止子(terminator); CEP为Cas效应蛋白(Cas effector protein); HA-L和HA-R分别为左同源臂(left homology arm)和右同源臂(right homology arm)。

图2 细菌中建立基于CRISPR-Cas基因编辑系统的单质粒通用图谱

DNA 长度有限, 因此阻碍了长片段的插入和多位点编辑的开展, 为解决该问题, 可利用双质粒表达策略(图3)。双质粒的另外一个优点是便于连续编辑基因, 如可将 gRNA 表达盒单独放到温敏型复制质粒上, 当 gRNA 质粒发挥完功能后, 通过改变温度让质粒删除, 而 CRISPR 质粒一直保留在细胞中, 以继续后轮的基因敲除^[149]。除了质粒表达的形式, 还可将 CEP 基因或 CEP 基因与 gRNA 表达框整合至基因组上^[132], 这样既解决了单质粒系统中载体大小问题及双质粒系统中的转化问题, 也解决了质粒表达的不稳定性, 能够弥补质粒表达的不足。但需注意的是, 该操作过程比较复杂, 须选择合适位点提前将 CEP 或 gRNA 表达框整合进去。

6.2 CEP毒性的测试

随着 CRISPR-Cas 系统的广泛研究与应用, 研究人员也发现一些 CEP 具有局限性, 如化脓链球菌 Cas9 (spCas9) 对某些细菌具有毒性^[107, 172]。因此, 为了避免由于 CEP 的毒性导致后续应用或实验的失败, 须先单独对备选 CEP 进行毒性测试。在图2的通用质粒图谱上, CEP 的选择除了常用的 spCas9 外, 还有很多其他选择, 表4总结了在 Addgene 上可购买的相关 CEP。测试方法为将 CEP 先单独放在表达载体上形成 pCEP, 将质粒 pCEP 与对照质粒(建议是确定无毒性且大小一致的质粒, 如含对应失活的 CEP 的质粒)导入宿主菌中, 然后对菌落形成单位(colony-forming units, CFU)进行计数, 若



P为启动子(promotor); T为终止子(terminator); CEP为Cas效应蛋白(Cas effector protein)。

图3 细菌中建立基于CRISPR-Cas基因编辑系统的双质粒通用图谱

表4 Addgene保藏的Cas效应蛋白编码基因列表

编号	CEP	来源	密码子优化情况	Addgene号
1	NmCas9	<i>N. meningitidis</i>	人细胞	48646
2	St1Cas9	<i>S. thermophilus</i> CRISPR1	人细胞	48647
3	TdCas9	<i>T. denticola</i>	人细胞	48648
4	St1Cas9	<i>S. thermophilus</i> 1	哺乳动物细胞	65769
5	SaCas9	<i>S. aureus</i>	哺乳动物细胞	65770
6	NmCas9	<i>N. meningitidis</i>	未优化	71474
7	CdCas9	<i>C. diphtheriae</i>	哺乳动物细胞	68314
8	SwCas9	<i>S. wadsworthensis</i>	哺乳动物细胞	68315
9	LpCas9	<i>L. pneumophila str. Paris</i>	哺乳动物细胞	68316
10	TdCas9	<i>T. denticola</i>	哺乳动物细胞	68317
11	FaCas9	<i>F. alocis</i>	哺乳动物细胞	68318
12	SpsCas9	<i>S. pseudintermedius</i>	哺乳动物细胞	68319
13	LjCas9	<i>L. johnsonii</i>	哺乳动物细胞	68320
14	SpaCas9	<i>S. pasteurianus</i>	哺乳动物细胞	68322
15	LfCas9	<i>L. farciminis</i>	哺乳动物细胞	68323
16	MmCas9	<i>M. mobile</i>	哺乳动物细胞	68324
17	BcCas9	<i>B. coprophilus</i>	哺乳动物细胞	68325
18	FtCas9	<i>F. taffensis</i>	哺乳动物细胞	68326
19	FcCas9	<i>F. columnare</i>	哺乳动物细胞	68327
20	SgCas9	<i>S. globus str. Buddy</i>	哺乳动物细胞	68328
21	Azo	<i>Azospirillum</i> B510	哺乳动物细胞	68329
22	GdCas9	<i>G. diazotrophicus</i>	哺乳动物细胞	68330
23	NcCas9	<i>N. cinerea</i>	哺乳动物细胞	68331
24	RiCas9	<i>R. intestinalis</i>	哺乳动物细胞	68332
25	PICas9	<i>P. lavamentivorans</i>	哺乳动物细胞	68333
26	NsCas9	<i>N. salsuginis str</i> DSM 16511	哺乳动物细胞	68334
27	MgCas9	<i>M. gallisepticum str. F</i>	哺乳动物细胞	68335
28	CIcas9	<i>C. lari</i> CF89-12	哺乳动物细胞	68336
29	St3Cas9	<i>S. thermophilus</i> LMD-9 CRISPR 3	哺乳动物细胞	68337
30	CjCas9	<i>C. jejuni</i>	哺乳动物细胞	68338
31	NmCas9	<i>N. meningitidis</i>	哺乳动物细胞	68702
32	PmCas9	<i>P. multocida</i>	哺乳动物细胞	68703
33	FtCas9	<i>F. tularensis subsp. novicida</i>	哺乳动物细胞	68705
34	SpCas9 1.1	<i>S. pyogenes</i>	哺乳动物细胞	71814
35	SpCas9 (D10A)	<i>S. pyogenes</i>	未优化	73228
36	SpCas9 (D10A)	<i>S. pyogenes</i>	人细胞	42335
37	SpCas9 (H840A)	<i>S. pyogenes</i>	哺乳动物细胞	51129
38	NmeCas9 (D16A)	<i>N. meningitidis</i>	未优化	71476
39	AsCpf1	<i>Acidaminococcus sp</i> BV3L6	哺乳动物细胞	69982
40	LbCpf1	<i>L. bacterium</i> ND2006	大肠杆菌	79008
41	FnCpf1	<i>F. tularensis subsp. novicida</i> U112	人细胞	90094
42	BpCpf1	<i>B. proteoelasticus</i>	哺乳动物细胞	69978
43	PeCpf1	<i>P. bacterium</i> GW2011 GWA2 33 10	哺乳动物细胞	69979
44	PbCpf1	<i>P. bacterium</i> GW2011 GWC2 44 17	哺乳动物细胞	69980
45	SsCpf1	<i>Smithella sp. SC</i> K08D17	哺乳动物细胞	69981
46	Lb2Cpf1	<i>L. bacterium</i> MA2020	哺乳动物细胞	69983
47	CMtCpf1	<i>C. Methanoplasma</i> termitum	哺乳动物细胞	69984
48	EeCpf1	<i>E. eligens</i>	哺乳动物细胞	69985
49	MbCpf1	<i>M. bovoculi</i> 237	哺乳动物细胞	69986

续表

编号	CEP	来源	密码子优化情况	Addgene号
50	LiCpf1	<i>L. inadaï</i>	哺乳动物细胞	69987
51	PcCpf1	<i>P. crevioricanis</i>	哺乳动物细胞	69989
52	PdCpf1	<i>P. disiens</i>	哺乳动物细胞	69990
53	PmCpf1	<i>P. macacae</i>	哺乳动物细胞	69991
54	TsCpf1	<i>Thiomicrospira sp.</i> XS5	哺乳动物细胞	92267
55	SaCpf1	<i>S. amnii</i>	哺乳动物细胞	92269
56	Pb2Cpf1	<i>P. bryantii</i> B14	哺乳动物细胞	92272
57	PgCpf1	<i>P. group bacterium</i>	哺乳动物细胞	92273
58	MICpf1	<i>M. lacunata</i>	哺乳动物细胞	92275
59	Mb2Cpf1	<i>M. bovoculi</i> AAX08_00205	哺乳动物细胞	92292
60	Mb3Cpf1	<i>M. bovoculi</i> AAX11_00205	哺乳动物细胞	92293
61	Lb4Cpf1	<i>L. bacterium</i> MC2017	哺乳动物细胞	92294
62	Lb5Cpf1	<i>L. bacterium</i> MA2020	哺乳动物细胞	92295
63	FbCpf1	<i>F. branchiophilum</i> FL-15	哺乳动物细胞	92296
64	CPbCpf1	<i>C. Peregrinibacteria bacterium</i>	哺乳动物细胞	92298
65	CMaCpf1	<i>C. Methanomethylophilus alvus</i>	哺乳动物细胞	92299
66	BsCpf1	<i>Butyrivibrio sp.</i> NC3005	哺乳动物细胞	92300
67	BfCpf1	<i>B. fibrisolvens</i>	哺乳动物细胞	92301
68	BoCpf1	<i>B. oral taxon</i> 274	哺乳动物细胞	92302

二者 CFU 相当, 则认为该 CEP 在该宿主中无毒性, 可继续往下做切割测试 (图 4); 若 pCEP 的 CFU 低于对照质粒 (至少两个数量级), 则认为该 CEP 在该宿主中有毒性, 可弃之, 并选择表 4 中其他 CEP 进行测试。

6.3 gRNA 引导下的 CEP 切割靶标基因测试

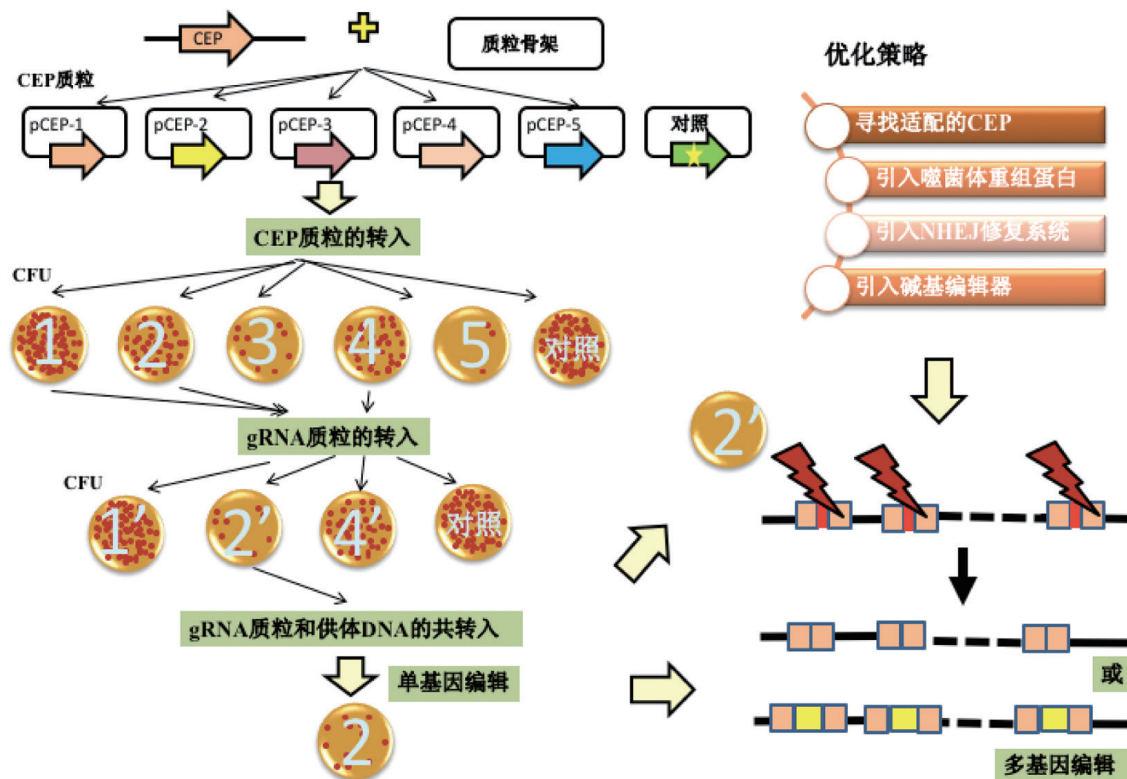
为进一步验证筛选出来的 CEP 活性, 须进行以下切割测试。将 CEP 与其对应的 gRNA 同时放在一个质粒上或分别放在两个质粒上, 然后转入宿主细胞中, CEP 在 gRNA 的引导下会切割细菌基因组形成 DSB, 且由于细菌中无 NHEJ 修复系统, 因此细菌无法对 DSB 进行修复, 进而无法存活 (图 4)。因此, 可通过 CFU 来判断 CEP 是否具有切割活性, 若 CEP 叠加 gRNA 后的 CFU 与对照相比明显降低, 则证明 CEP 是有切割活性的, 反之则没有切割活性。且在一定程度上, CFU 值越低越好, 即将靶标菌株切割的越彻底越好, 干净的背景便于后续编辑菌株的筛选。

gRNA 锚定位点的选择对编辑成功与否也至关重要, 切割活性差的 sgRNA 会导致许多野生型细胞在基因组编辑过程中存活下来, 增加了假阳性率。针对此问题, 有研究者就 CRISPR-Cas9 开发了预测 sgRNA 在大肠杆菌中活性的软件 (<https://github.com/zhangchonglab/sgRNA-cleavage-activity-prediction>)^[173]。

6.4 细菌对 CEP 切割后的修复测试

下一步将有切割活性的 CEP 继续往下做修复测试, 在 CEP 和 gRNA 基础上继续叠加用于修复的供体 DNA (图 4)。若宿主菌具有高效同源重组系统, 在 pCEP + gRNA 的基础上叠加供体 DNA 的转化子获得率要远高于 pCEP + gRNA 的转化子获得率; 而若宿主菌同源重组修复能力较弱, 在 CEP + gRNA 的基础上叠加供体的转化子获得率很低, 或菌体来不及修复导致无法获得发生编辑的菌株。

若要解决上述菌株自身同源重组能力弱的问题, 可通过以下一些策略。(1) 选择或寻找适配宿主细菌修复的 CEP: Cas9 nickase 是 Cas9 中一个核酸酶结构域失活后获得的刻痕酶, 与 Cas9 切割形成的 DSB 相比, 切口更易于修复, 对细胞生长压力较小, 因此适合应用于自身同源重组率低的宿主中。前期, 研究人员分别在梭菌中用 Cas9 nickase 成功将基因敲除^[75, 142]。(2) 引入适用于特定宿主菌的噬菌体重组蛋白: 可将上述 λ -Red 重组系统或 RecET 系统引入宿主细胞中以提高重组效率^[107, 132], 在这种同源重组速度高于切割速度的菌株中, 可把 CRISPR 系统当作一种选择工具, 选择发生了同源重组的细菌, 消除未发生编辑的野生型菌株。(3) 挖掘 NHEJ 蛋白, 通过 NHEJ 对 DSB 进行修复: 核酸酶切割基因组形成的 DSB 可通过非同源末端



将待选CEP先单独放在表达载体上形成pCEP，将质粒pCEP与对照质粒导入宿主菌中，根据CFU值判断CEP毒性的有无(图示中pCEP-1、pCEP-2和pCEP-4对宿主无毒性)；再将gRNA质粒导入含有各pCEP质粒的菌株中，根据CFU值判断细菌基因组是否被切割(图示中pCEP-2及其gRNA质粒能切割宿主基因组)；继续向有功能的CRISPR系统中叠加供体DNA，以实现单基因编辑目的。与此同时，还可结合优化策略，在宿主中实现多基因编辑的目的。

图4 建立基于CRISPR-Cas的细菌基因组编辑系统通用流程

链接 (NHEJ) 和同源重组 (HR) 两条途径进行修复，前者是真核生物修复DSB的天然主要途径。近年来，原核生物中也鉴定出NHEJ途径相关蛋白，与真核NHEJ系统相比较，原核生物中的NHEJ系统更简单，是一双组份系统，主要由平末端DNA结合蛋白和连接酶组成^[169]。NHEJ系统在断裂的DNA连接处易发生碱基缺失、插入，与CRISPR切割系统相结合，NHEJ可不依赖于同源重组来实现靶标基因的失活。目前，NHEJ系统辅助的基因编辑已被应用到链霉菌和大肠杆菌宿主中^[174-176]。(4) 借助碱基编辑器来修饰靶标位点：利用CRISPR-dCas9或Cas9刻痕酶系统将胞嘧啶脱氨酶、腺嘌呤脱氨酶定位至靶标基因组位置，利用酶催化反应实现有效窗口内胞嘧啶和胸腺嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤的转换，可绕开双链断裂缺口进行基因编辑。已利用该原理在哺乳动物、酿酒酵母、大肠杆菌等生物中实现了对靶标基因上碱基的编辑^[159,177-181]。除了利用胞嘧啶脱氨酶、腺嘌呤脱氨酶，还可将Cas9刻痕酶与DNA聚合酶联用，DNA聚合酶在修补Cas9刻痕酶切割形成的切口过

程中引入碱基突变，编辑框可高达350个核苷酸^[182]。

7 总结与展望

尽管几十年前就开始在细菌中建立遗传工具，但随着越来越多的研究者对不同细菌产生的兴趣，使得在各种非模式细菌中建立遗传工具显得尤为重要，并具有一定挑战性。对于一株新细菌，首先筛选合适的遗传标记及其工作浓度，如抗生素抗性基因(表1)，然后筛查合适的复制子(表2)。接下来是将候选质粒导入受体细菌，电击转化看来是最通用的方法，可作为首选。在此过程中，要特别留意绕开受体菌的外源DNA入侵防御系统，以提高转化效率。有了能转化的质粒，建立基于CRISPR-Cas的基因编辑工具就可按照图4中的流程进行。如果启动子元件有限，可用GFP等报告基因鉴定一批以备。

CRISPR-Cas系统已广泛应用到各种细菌中，本文中表3总结了近几年来所有涉及到用CRISPR-Cas系统进行基因编辑的细菌。大部分细菌中用

CRISPR-Cas 系统进行单基因的编辑不再是难题,但单轮多位点编辑仍是个挑战:一是对于常用的 spCas9 来讲,多靶点操作时 gRNA 的构建和矩阵上排列靠后的 gRNA 表达活力是个问题,针对这一方面研究人员可采用构建更为方便且 gRNA 表达不受排列位置影响的 CEP 蛋白,如 CpfI^[183];二是若采用同源重组方式来修复 CEP 切割后的多处靶基因上的 DSBs,各靶标基因的修复模板构建是个限制,针对这一方面研究人员可借助 NHEJ 或碱基编辑器来解决这一问题。需要指出的是,若采用这两种方案来修复 CEP 的切割,须使用特异性较高的 gRNA,以防止脱靶带来不必要的突变。另一方面,CRISPR-Cas 系统在细菌基因组文库建立方面,至今只在大肠杆菌中有尝试,针对其他细菌底盘细胞,若有较高的转化效率方法和高效同源重组系统,原理上可做同样测试来筛选具有研究价值的靶标基因。

[参 考 文 献]

- [1] Donohoue PD, Barrangou R, May AP. Advances in industrial biotechnology using CRISPR-Cas systems. *Trends Biotechnol*, 2018, 36: 134-46
- [2] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262-78
- [3] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435: 646-51
- [4] Sun N, Zhao H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 1811-21
- [5] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [6] Rocha EP, Cornet E, Michel B. Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS Genet*, 2005, 1: e15
- [7] Selle K, Barrangou R. Harnessing CRISPR-Cas systems for bacterial genome editing. *Trends Microbiol*, 2015, 23: 225-32
- [8] Dubnau D. DNA uptake in bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 1999, 53: 217-44
- [9] Johnsborg O, Eldholm V, Havarstein LS. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol*, 2007, 158: 767-78
- [10] Hamoen LW, Haijema B, Bijlsma JJ, et al. The *Bacillus subtilis* competence transcription factor, ComK, overrides LexA-imposed transcriptional inhibition without physically displacing LexA. *J Biol Chem*, 2001, 276: 42901-7
- [11] Dalia TN, Hayes CA, Stolyar S, et al. Multiplex genome editing by natural transformation (MuGENT) for synthetic biology in *Vibrio natriegens*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 1650-5
- [12] Blokesch M. Natural competence for transformation. *Curr Biol*, 2016, 26: 3255
- [13] Shaw AJ, Hogsett DA, Lynd LR. Natural competence in *Thermoanaerobacter* and *Thermoanaerobacterium* species. *App Environ Microbiol*, 2010, 76: 4713-9
- [14] Dodsworth JA, Li L, Wei S, et al. Interdomain conjugal transfer of DNA from bacteria to archaea. *App Environ Microbiol*, 2010, 76: 5644-7
- [15] Gormley GJ. Role of 5 α -reductase inhibitors in the treatment of advanced prostatic carcinoma. *Urol Clin North Am*, 1991, 18: 93-8
- [16] Prangishvili D, Albers SV, Holz I, et al. Conjugation in archaea: frequent occurrence of conjugative plasmids in *Sulfolobus*. *Plasmid*, 1998, 40: 190-202
- [17] Simon R, Priefer U, Puhler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nat Biotechnol*, 1983, 1: 784-91
- [18] Murakami T, Burian J, Yanai K, et al. A system for the targeted amplification of bacterial gene clusters multiplies antibiotic yield in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 16020-5
- [19] Mazodier P, Petter R, Thompson C. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J Bacteriol*, 1989, 171: 3583-5
- [20] Jennert KCB, Tardif C, Young DI, et al. Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. *Microbiology*, 2000, 146: 3071-80
- [21] Kirk JA, Fagan RP. Heat shock increases conjugation efficiency in *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 2016, 42: 1-5
- [22] Itaya M, Sakaya N, Matsunaga S, et al. Conjugational transfer kinetics of pLS20 between *Bacillus subtilis* in liquid medium. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70: 740-2
- [23] Chen XT, Ji JB, Liu YC, et al. Artificial induction of genetic competence in *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. *Biotechnol Lett*, 2016, 38: 2109-17
- [24] Pistorio M, Torres Tejerizo GA, del Papa MF, et al. *rptA*, a novel gene from *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* involved in conjugal transfer. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 345: 22-30
- [25] Lee HH, Ostrov N, Wong BG, et al. *Vibrio natriegens*, a new genomic powerhouse. *bioRxiv*, 2016
- [26] Pinedo CA, Smets BF. Conjugal TOL transfer from *Pseudomonas putida* to *Pseudomonas aeruginosa*: effects of restriction proficiency, toxicant exposure, cell density ratios, and conjugation detection method on observed transfer efficiencies. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 51-7
- [27] Schleper C, Kubo K, Zillig W. The particle SSV1 from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* is a virus: demonstration of infectivity and of transfection with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 7645-9
- [28] Zhaxybayeva O, Doolittle WF. Lateral gene transfer. *Curr Biol*, 2011, 21: R242-6

- [29] Thomason LC, Costantino N, Court DL. *E. coli* genome manipulation by P1 transduction. *Curr Protoc Mol Biol*, 2007, Chapter 1: Unit 1.17
- [30] Dubnau D, Davidoff R, Smith I. Transformation and transduction in *Bacillus subtilis*: evidence for separate modes of recombinant formation. *J Mol Biol*, 1969, 45: 155-79
- [31] Carlton BC. Transformation mapping of the genes controlling tryptophan biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1967, 94: 660-5
- [32] Anagnostopoulos C, Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 1961, 81: 741-6
- [33] Asif A, Mohsin H, Tanvir R, et al. Revisiting the mechanisms involved in calcium chloride induced bacterial transformation. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2169
- [34] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 1983, 166: 557-80
- [35] Liu J, Wang Y, Lu Y, et al. Mutations on peptidoglycan synthesis gene *ponA* improve electro-transformation efficiency of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869. *App Environ Microbiol*, 2018, 84: e02225-18
- [36] Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*, 1991, 204: 63-113
- [37] Lederberg EM, Cohen SN. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, 1974, 119: 1072-4
- [38] Serwolddavis TM, Groman N, Rabin M. Transformation of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium glutamicum*, and *Escherichia coli* with the *C. diphtheriae* plasmid pNG2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 4964-8
- [39] Kaiser AD, Hogness DS. The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage λ -DG. *J Mol Biol*, 1960, 2: 392-415
- [40] Kita A, Iwasaki Y, Sakai S, et al. Development of genetic transformation and heterologous expression system in carboxydrotrophic thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *J Biosci Bioeng*, 2013, 115: 347-52
- [41] Serror P, Sasaki T, Ehrlich SD, et al. Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. *App Environ Microbiol*, 2002, 68: 46-52
- [42] Zhang GQ, Bao P, Zhang Y, et al. Enhancing electro-transformation competency of recalcitrant *Bacillus amyloliquefaciens* by combining cell-wall weakening and cell-membrane fluidity disturbing. *Anal Biochem*, 2011, 409: 130-7
- [43] Tock MR, Dryden DT. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8: 466-72
- [44] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709-12
- [45] Molineux IJ. Host-parasite interactions: recent developments in the genetics of abortive phage infections. *New Biol*, 1991, 3: 230-6
- [46] Swarts DC, Jore MM, Westra ER, et al. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*, 2014, 507: 258-61
- [47] Ofir G, Melamed S, Sberro H, et al. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 90-8
- [48] Doron S, Melamed S, Ofir G, et al. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 2018, 359: eaar4120
- [49] Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, et al. REBASE -- a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: D234-6
- [50] Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 1805-12
- [51] Spath K, Heini S, Grabherr R. Direct cloning in *Lactobacillus plantarum*: electroporation with non-methylated plasmid DNA enhances transformation efficiency and makes shuttle vectors obsolete. *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 141
- [52] Kim JY, Wang Y, Park MS, et al. Improvement of transformation efficiency through *in vitro* methylation and SacII site mutation of plasmid vector in *Bifidobacterium longum* MG1. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20: 1022-6
- [53] Dong H, Zhang Y, Dai Z, et al. Engineering clostridium strain to accept unmethylated DNA. *PLoS One*, 2010, 5: e9038
- [54] Ehsaan M, Kuit W, Zhang Y, et al. Mutant generation by allelic exchange and genome resequencing of the biobutanol organism *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 4
- [55] Zhang G, Wang W, Deng A, et al. A mimicking-of-DNA-methylation-patterns pipeline for overcoming the restriction barrier of bacteria. *PLoS Genet*, 2012, 8: e1002987
- [56] Yang X, Xu M, Yang ST. Restriction modification system analysis and development of *in vivo* methylation for the transformation of *Clostridium cellulovorans*. *App Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 2289-99
- [57] Yasui K, Kano Y, Tanaka K, et al. Improvement of bacterial transformation efficiency using plasmid artificial modification. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: e3
- [58] Luo Y, Zhang L, Barton KW, et al. Systematic identification of a panel of strong constitutive promoters from *Streptomyces albus*. *ACS Synth Biol*, 2015, 4: 1001
- [59] Liu D, Mao Z, Guo J, et al. Construction, model-based analysis, and characterization of a promoter library for fine-tuned gene expression in *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 1785-97
- [60] Oh YH, Eom GT, Kang KH, et al. Optimized transformation of newly constructed *Escherichia coli*-Clostridia shuttle vectors into *Clostridium beijerinckii*. *App Biochem Biotechnol*, 2015, 177: 226-36
- [61] Perez-Arellano I, Zuniga M, Perez-Martinez G. Construction of compatible wide-host-range shuttle vectors for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 2001, 46: 106-16
- [62] Groth AC, Calos MP. Phage integrases: biology and appli-

- cations. *J Mol Biol*, 2004, 335: 667-78
- [63] Smith MC, Brown WR, McEwan AR, et al. Site-specific recombination by phiC31 integrase and other large serine recombinases. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38: 388-94
- [64] Akerley BJ, Rubin EJ, Camilli A, et al. Systematic identification of essential genes by *in vitro* mariner mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 8927-32
- [65] Choi KH, Kim KJ. Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19: 217-28
- [66] Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, 33: 103-19
- [67] Martinez-Garcia E, Aparicio T, de Lorenzo V, et al. New transposon tools tailored for metabolic engineering of gram-negative microbial cell factories. *Front Bioeng Biotechnol*, 2014, 2: 46
- [68] Arango Pinedo C, Gage DJ. Plasmids that insert into the rhamnose utilization locus, *rha*: a versatile tool for genetic studies in *Sinorhizobium meliloti*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2009, 17: 201-10
- [69] Ji A, Ning X. Construction and expression of prokaryotic expression vector pET28a-EGFP. *J Microbiol*, 2011, 31: 69-73
- [70] Elmore JR, Furches A, Wolff GN, et al. Development of a high efficiency integration system and promoter library for rapid modification of *Pseudomonas putida* KT2440. *Metab Eng Commun*, 2017, 5: 1-8
- [71] Coren JS. Retrofitting the BAC cloning vector pBelo-BAC11 by the insertion of a mutant loxP site. *BMC Res Notes*, 2017, 10: 344
- [72] Nilasari D, Dover N, Rech S, et al. Expression of recombinant green fluorescent protein in *Bacillus methanolicus*. *Biotechnol Prog*, 2012, 28: 662-8
- [73] 李键. 丁醇耐受菌株的筛选鉴定及异源丁醇合成研究[D]. 北京: 中国科学院大学. 2012
- [74] Zhu S, Wu J, Du G, et al. Efficient synthesis of eriodictyol from L-tyrosine in *Escherichia coli*. *App Environ Microbiol*, 2014, 80: 3072-80
- [75] Li Q, Chen J, Minton NP, et al. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol J*, 2016, 11: 961-72
- [76] Yun SH, Kim YH, Joo EJ, et al. Proteome analysis of cellular response of *Pseudomonas putida* KT2440 to tetracycline stress. *Curr Microbiol*, 2006, 53: 95-101
- [77] Leskela TT, Lackman JJ, Vierimaa MM, et al. Cys-27 variant of human δ -opioid receptor modulates maturation and cell surface delivery of Phe-27 variant via heteromerization. *J Biol Chem*, 2012, 287: 5008-20
- [78] Covarrubias L, Cervantes L, Covarrubias A, et al. Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene*, 1981, 13: 25-35
- [79] Zhang XZ, Yan X, Cui ZL, et al. mazF, a novel counter-selectable marker for unmarked chromosomal manipulation in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: e71
- [80] Zhang N, Shao L, Jiang Y, et al. I-SceI-mediated scarless gene modification via allelic exchange in *Clostridium*. *J Microbiol Methods*, 2015, 108: 49-60
- [81] Huang H, Chai C, Li N, et al. CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Clostridium ljungdahlii*, an autotrophic gas-fermenting bacterium. *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 1355-61
- [82] Aakvik T, Degnes KF, Dahlsrud R, et al. A plasmid RK2-based broad-host-range cloning vector useful for transfer of metagenomic libraries to a variety of bacterial species. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 296: 149-58
- [83] Khan SR, Gaines J, Roop RM 2nd, et al. Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 5053-62
- [84] Mi J, Sydow A, Schempp F, et al. Investigation of plasmid-induced growth defect in *Pseudomonas putida*. *J Biotechnol*, 2016, 231: 167-73
- [85] Lu SE, Scholz-Schroeder BK, Gross DC. Construction of pMEKm12, an expression vector for protein production in *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 210: 115-21
- [86] Lee JY, Jung KH, Choi SH, et al. Combination of the *tod* and the *tol* pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of a benzene, toluene, and p-xylene mixture. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 2211-7
- [87] Weisblum B, Graham MY, Gryczan T, et al. Plasmid copy number control: isolation and characterization of high-copy-number mutants of plasmid pE194. *J Bacteriol*, 1979, 137: 635-43
- [88] Chopin MC, Chopin A, Rouault A, et al. Insertion and amplification of foreign genes in the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* chromosome. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 1769-74
- [89] Li R, Zhai Z, Yin S, et al. Characterization of a rolling-circle replication plasmid pLR1 from *Lactobacillus plantarum* LR1. *Curr Microbiol*, 2009, 58: 106-10
- [90] Yin S, Hao Y, Zhai Z, et al. Characterization of a cryptic plasmid pM4 from *Lactobacillus plantarum* M4. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 285: 183-7
- [91] Ebisu S, Murahashi Y, Takagi H, et al. Nucleotide sequence and replication properties of the *Bacillus borstelensis* cryptic plasmid pHT926. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3154-7
- [92] Bjorland J, Steinum T, Sunde M, et al. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47: 3046-52
- [93] Kondo Y, Ito T, Ma XX, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents*

- Chemother, 2007, 51: 264-74
- [94] Kok J, van der Vossen JM, Venema G. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 1984, 48: 726-31
- [95] De Rossi E, Brigidi P, Rossi M, et al. Characterization of gram-positive broad host-range plasmids carrying a thermophilic replicon. Res Microbiol, 1991, 142: 389-96
- [96] Farhat-Khemakhem A, Ben Farhat M, Boukhris I, et al. Heterologous expression and optimization using experimental designs allowed highly efficient production of the PHY US417 phytase in *Bacillus subtilis* 168. AMB Express, 2012, 2: 10
- [97] Luo H, Wan K, Wang HH. High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAM β 1 transmission by *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 2970-8
- [98] Platteeuw C, Simons G, de Vos WM. Use of the *Escherichia coli* β -glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 587-93
- [99] Novick RP, Adler GK, Projan SJ, et al. Control of pT181 replication I. The pT181 copy control function acts by inhibiting the synthesis of a replication protein. EMBO J, 1984, 3: 2399-405
- [100] Kieser T, Hopwood DA, Wright HM, et al. pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. Mol Gen Genet, 1982, 185: 223-38
- [101] Muth G, Nußbaumer B, Wohlleben W, et al. A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. Mol Gen Genet, 1989, 219: 341-8
- [102] Lee SY, Mermelstein LD, Papoutsakis ET. Determination of plasmid copy number and stability in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. FEMS Microbiol Lett, 1993, 108: 319-23
- [103] Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET. Northern, morphological, and fermentation analysis of spo0A inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J Bacteriol, 2002, 184: 3586-97
- [104] Schafer A, Tauch A, Jager W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene, 1994, 145: 69-73
- [105] Turan S, Galla M, Ernst E, et al. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges. J Mol Biol, 2011, 407: 193-221
- [106] Datta S, Costantino N, Zhou X, et al. Identification and analysis of recombineering functions from Gram-negative and Gram-positive bacteria and their phages. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 1626-31
- [107] Jiang Y, Qian F, Yang J, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. Nat Commun, 2017, 8: 15179
- [108] Oh JH, van Pijkeren JP. CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*. Nucleic Acids Res, 2014, 42: e131
- [109] Yang P, Wang J, Qi Q. Prophage recombinases-mediated genome engineering in *Lactobacillus plantarum*. Microb Cell Fact, 2015, 14: 154
- [110] Lambowitz AM, Zimmerly S. Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3: a003616
- [111] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol, 2013, 31: 397-405
- [112] Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol, 2002, 43: 1565-75
- [113] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nat Biotechnol, 2013, 31: 233-9
- [114] Pyne ME, Bruder MR, Moo-Young M, et al. Harnessing heterologous and endogenous CRISPR-Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*. Sci Rep, 2016, 6: 25666
- [115] Wolf T, Gren T, Thieme E, et al. Targeted genome editing in the rare actinomycete *Actinoplanes* sp. SE50/110 by using the CRISPR/Cas9 system. J Biotechnol, 2016, 231: 122-8
- [116] 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: 4876-95
- [117] Zhang K, Duan X, Wu J. Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system. Sci Rep, 2016, 6: 27943
- [118] Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system. Appl Environ Microbiol, 2016, 82: 5421-7
- [119] Mouggiakos I, Mohanraju P, Bosma EF, et al. Characterizing a thermostable Cas9 for bacterial genome editing and silencing. Nat Commun, 2017, 8: 1647
- [120] Li K, Cai D, Wang Z, et al. Development of an efficient genome editing tool in *Bacillus licheniformis* using CRISPR-Cas9 nickase. App Environ Microbiol, 2018, 84: e02608-17
- [121] McAllister KN, Bouillaud L, Kahn JN, et al. Using CRISPR-Cas9-mediated genome editing to generate *C. difficile* mutants defective in selenoproteins synthesis. Sci Rep, 2017, 7: 14672
- [122] Wang S, Hong W, Dong S, et al. Genome engineering of *Clostridium difficile* using the CRISPR-Cas9 system. Clin Microbiol Infect, 2018, 24: 1095-9
- [123] Wasels F, Jean-Marie J, Collas F, et al. A two-plasmid inducible CRISPR/Cas9 genome editing tool for *Clostridium acetobutylicum*. J Microbiol Methods, 2017, 140: 5-11
- [124] Nagaraju S, Davies NK, Walker DJ, et al. Genome editing of *Clostridium autoethanogenum* using CRISPR/Cas9. Biotechnol Biofuels, 2016, 9: 219
- [125] Li H, Shen CR, Huang CH, et al. CRISPR-Cas9 for the

- genome engineering of cyanobacteria and succinate production. *Metab Eng*, 2016, 38: 293-302
- [126] Wang Y, Zhang ZT, Seo SO, et al. Markerless chromosomal gene deletion in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR/Cas9 system. *J Biotechnol*, 2015, 200: 1-5
- [127] Wen Z, Minton NP, Zhang Y, et al. Enhanced solvent production by metabolic engineering of a twin-clostridial consortium. *Metab Eng*, 2017, 39: 38-48
- [128] Zhang J, Zong W, Hong W, et al. Exploiting endogenous CRISPR-Cas system for multiplex genome editing in *Clostridium tyrobutyricum* and engineer the strain for high-level butanol production. *Metab Eng*, 2018, 47: 49-59
- [129] Liu J, Wang Y, Lu Y, et al. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 205
- [130] Peng F, Wang X, Sun Y, et al. Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 201
- [131] Cho JS, Choi KR, Prabowo CPS, et al. CRISPR/Cas9-coupled recombineering for metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng*, 2017, 42: 157-67
- [132] Wang B, Hu Q, Zhang Y, et al. A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 63
- [133] Song X, Huang H, Xiong Z, et al. CRISPR-Cas9^{D10A} nickase-assisted genome editing in *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83: e01259-17
- [134] Sun J, Wang Q, Jiang Y, et al. Genome editing and transcriptional repression in *Pseudomonas putida* KT2440 via the type II CRISPR system. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 41
- [135] Guan J, Wang W, Sun B. Chromosomal targeting by the type III-A CRISPR-Cas system can reshape genomes in *Staphylococcus aureus*. *mSphere*, 2017, 2: e00403-17
- [136] Chen W, Zhang Y, Yeo WS, et al. Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 3790-5
- [137] Cobb RE, Wang Y, Zhao H. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synth Biol*, 2015, 4: 723-8
- [138] Huang H, Zheng G, Jiang W, et al. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2015, 47: 231-43
- [139] Zeng H, Wen S, Xu W, et al. Highly efficient editing of the actinorhodin polyketide chain length factor gene in *Streptomyces coelicolor* M145 using CRISPR/Cas9-CodA(sm) combined system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 10575-85
- [140] Tong Y, Charusanti P, Zhang L, et al. CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes. *ACS Synth Biol*, 2015, 4: 1020-9
- [141] Zhang MM, Wong FT, Wang Y, et al. CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 607-9
- [142] Xu T, Li Y, Shi Z, et al. Efficient genome editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 nickase. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81: 4423-31
- [143] Meng J, Feng R, Zheng G, et al. Improvement of pristinaamycin I (PI) production in *Streptomyces pristinaespiralis* by metabolic engineering approaches. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2: 130-6
- [144] Selle K, Klaenhammer TR, Barrangou R. CRISPR-based screening of genomic island excision events in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 8076-81
- [145] Wendt KE, Ungerer J, Cobb RE, et al. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 115
- [146] Yan MY, Yan HQ, Ren GX, et al. CRISPR-Cas12a-assisted recombineering in bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83: e00947-17
- [147] Jiang Y, Chen B, Duan C, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81: 2506-14
- [148] Pyne ME, Moo-Young M, Chung DA, et al. Coupling the CRISPR/Cas9 system with λ Red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81: 5103-14
- [149] 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
- [150] Standage-Beier K, Zhang Q, Wang X. Targeted large-scale deletion of bacterial genomes using CRISPR-nickases. *ACS Synth Biol*, 2015, 4: 1217-25
- [151] Reisch CR, Prather KLJ. The no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 15096
- [152] Xia J, Wang L, Zhu JB, et al. Expression of *Shewanella frigidimarina* fatty acid metabolic genes in *E. coli* by CRISPR/cas9-coupled λ Red recombineering. *Biotechnol Lett*, 2016, 38: 117-22
- [153] Bassalo MC, Garst AD, Halweg-Edwards AL, et al. Rapid and efficient one-step metabolic pathway integration in *E. coli*. *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 561-8
- [154] Chung ME, Yeh IH, Sung LY, et al. Enhanced integration of large DNA into *E. coli* chromosome by CRISPR/Cas9. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114: 172-83
- [155] Feng X, Zhao D, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9 assisted multiplex genome editing technique in *Escherichia coli*. *Biotechnol J*, 2018: e1700604
- [156] Hullahalli K, Rodrigues M, Nguyen UT, et al. An attenuated CRISPR-Cas system in *Enterococcus faecalis* permits DNA acquisition. *mBio*, 2018, 9: e00414-18
- [157] Ungerer J, Pakrasi HB. Cpf1 is a versatile tool for CRISPR genome editing across diverse species of cyanobacteria. *Sci Rep*, 2016, 6: 39681
- [158] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metab Eng*, 2018, 47: 200-10
- [159] Banno S, Nishida K, Arazoe T, et al. Deaminase-mediated

- multiplex genome editing in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 423-9
- [160] Isaacs FJ, Carr PA, Wang HH, et al. Precise manipulation of chromosomes *in vivo* enables genome-wide codon replacement. *Science*, 2011, 333: 348-53
- [161] Sandoval NR, Kim JY, Glebes TY, et al. Strategy for directing combinatorial genome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 10540-5
- [162] Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, 460: 894-6
- [163] Warner JR, Reeder PJ, Karimpour-Fard A, et al. Rapid profiling of a microbial genome using mixtures of barcoded oligonucleotides. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 856-62
- [164] Wetmore KM, Price MN, Waters RJ, et al. Rapid quantification of mutant fitness in diverse bacteria by sequencing randomly bar-coded transposons. *Mbio*, 2015, 6: e00306-15
- [165] Zeitoun RI, Garst AD, Degen GD, et al. Multiplexed tracking of combinatorial genomic mutations in engineered cell populations. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 631-7
- [166] Garst AD, Bassalo MC, Pines G, et al. Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 48-55
- [167] Swings T, Marciano DC, Atri B, et al. CRISPR-FRT targets shared sites in a knock-out collection for off-the-shelf genome editing. *Nat Commun*, 2018, 9: 2231
- [168] Sternberg SH, Redding S, Jinek M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, 507: 62-7
- [169] Hefferin ML, Tomkinson AE. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair*, 2005, 4: 639-48
- [170] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One*, 2009, 4: e5553
- [171] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 2009, 6: 343-5
- [172] Sun B, Yang J, Richard DY, et al. A CRISPR-Cpf1-assisted non-homologous end joining genome editing system of *Mycobacterium smegmatis*. *Biotechnol J*, 2018, 13: e1700588
- [173] Guo J, Wang T, Guan C, et al. Improved sgRNA design in bacteria via genome-wide activity profiling. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: 7052-69
- [174] Cui L, Bikard D. Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 4243-51
- [175] Su T, Liu F, Gu P, et al. A CRISPR-Cas9 assisted non-homologous end-joining strategy for one-step engineering of bacterial genome. *Sci Rep*, 2016, 6: 37895
- [176] Zheng X, Li SY, Zhao GP, et al. An efficient system for deletion of large DNA fragments in *Escherichia coli* via introduction of both Cas9 and the non-homologous end joining system from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485: 768-74
- [177] 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: 464-71
- [178] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556: 57-63
- [179] 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: 420-4
- [180] Li X, Wang Y, Liu Y, et al. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 324-7
- [181] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353: aaf8729
- [182] Halperin SO, Tou CJ, Wong EB, et al. CRISPR-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window. *Nature*, 2018, 560: 248-52
- [183] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163: 759-71