2025, 65(5): 1867-1884
CSTR: 32112.14.j.AMS.20240688
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20240688

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Review 综述

CRISPR 系统在枯草芽孢杆菌基因编辑中的研究进展

公涵萱[1,2]，王智伟[1]，陈玉林[1]，杨雨鑫[1*]，刘功炜[1*]

1 西北农林科技大学 动物科技学院，陕西 杨凌
2 辽宁省微生物科学研究院，辽宁 朝阳

公涵萱, 王智伟, 陈玉林, 杨雨鑫, 刘功炜. CRISPR 系统在枯草芽孢杆菌基因编辑中的研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 1867-1884.
GONG Hanxuan, WANG Zhiwei, CHEN Yulin, YANG Yuxin, LIU Gongwei. Research advances in CRISPR-based genetic editing of *Bacillus subtilis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(5): 1867-1884.

摘　要：枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种公认安全的(generally recognized as safe, GRAS)益生菌，同时也是优良的工业生产底盘菌株，具有异源蛋白分泌能力强、低品质碳源生长特性良好以及无明显密码子偏好性等优点。自 2016 年以来，成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)基因编辑技术已成功应用于枯草芽孢杆菌，实现了精准的基因点突变、基因敲除、外源基因插入、基因表达调控及碱基替换等多种基因工程操作。这些进展极大地推动了枯草芽孢杆菌作为高效微生物细胞工厂的发展，并在农业、医药、食品以及合成生物学等领域展现了广泛的应用潜力。本文系统回顾了 CRISPR 系统在枯草芽孢杆菌中的发展历程，重点总结了其在高效生产不同产物方面的应用成果。旨在通过 CRISPR 系统靶向优化枯草芽孢杆菌的代谢通路，为在工业化生产中高效、稳定地合成目标产物提供参考，并为新型基因编辑系统的进一步开发与应用提供启示。

关键词：枯草芽孢杆菌；CRISPR；基因编辑；基因表达调控；合成生物学

资助项目：国家重点研发计划(2022YFD1300201)；中国博士后科学基金(2023M732893)；陕西省博士后科研项目(2023BSHEDZZ145)；国家绒毛用羊产业技术体系(CARS-39-12)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1300201), the China Postdoctoral Science Foundation (2023M732893), the Shaanxi Postdoctoral Research Project (2023BSHEDZZ145), and the China Agriculture Research System (CARS-39-12).
*Corresponding authors. E-mail: YANG Yuxin, yangyuxin2002@126.com; LIU Gongwei, liugongwei2010@163.com
Received: 2024-11-05; Accepted: 2025-02-25; Published online: 2025-03-25

Research advances in CRISPR-based genetic editing of *Bacillus subtilis*

GONG Hanxuan[1,2], WANG Zhiwei[1], CHEN Yulin[1], YANG Yuxin[1*], LIU Gongwei[1*]

1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China
2 Microbial Research Institute of Liaoning Province, Chaoyang, Liaoning, China

Abstract: *Bacillus subtilis* is a generally recognized as safe (GRAS) probiotic and an excellent industrial chassis strain. It possesses advantages such as strong heterologous protein secretion capability, robust growth with low-quality carbon sources, and negligible codon bias. Since 2016, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-based gene editing has been successfully applied to *B. subtilis*, enabling precise genetic modifications, including point mutations, gene knockout, foreign gene insertion, gene expression regulation, and base editing. These advancements have significantly promoted the development of *B. subtilis* as an efficient microbial cell factory and have shown broad application potential in agriculture, pharmaceuticals, food production, and synthetic biology. This paper systematically review the development of the CRISPR system in *B. subtilis* and summarize its application in the efficient production of various products. The aim is to provide insights into the targeted optimization of metabolic pathways in *B. subtilis via* the CRISPR system to achieve efficient and stable industrial production of target products, as well as to offer references for the further development and application of novel gene editing systems.

Keywords: *Bacillus subtilis*; CRISPR; gene editing; gene expression regulation; synthetic biology

人类生活与微生物活动密切相关。随着系统生物学、合成生物学和进化工程等现代生物技术的快速发展，研究人员能够更深入地理解微生物活动的内在功能机制，对微生物的研究应用已从天然可培养微生物的分离鉴定转向可编程的基因工程菌研究。人类应用微生物至今，经历了 3 个完全不同的时代：微生物应用 1.0 时代是充分发挥微生物的自然特性；2.0 时代是基于重组 DNA 技术或物理、化学诱变获得性能更佳的突变菌；3.0 时代则是基于现代生物技术的“设计(design)-构建(construction)-评估(evaluation)-优化(optimization) (DCEO)”或“设计(design)-构建(build)-测试(test)-学习(learn) (DBTL)”循环获得基因工程菌，甚至完全从头合成细菌基因组[1-2]。目前，以大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、链霉菌(*Streptomyces* sp.)等为底盘菌株的基因工程菌在活性化合物生物合成方面取得了快速发展。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种常见的革兰氏阳性菌，也是公认安全的(generally recognized as safe, GRAS)益生菌，具有异源蛋白分泌能力强、在低品质碳源上生长特性良好、无明显密码子偏好性等特点[3]。在畜禽养殖业、食品加工业、合成生物学等多个领域中应用广泛。在枯草芽孢杆菌中，已经创建了基因蛋白功能数据库 SubtiWiki[4]、启动子和核糖体结合位点(ribosomebinding site, RBS)数据库 BioBrick Box[5]、转录系统数据库 DBTBS[6]以及代谢途径数据库 MetaCyc[7]，这些数据库提供了关于基因功能、代谢途径等方面的关键遗传信息，对开

✉ actamicro@im.ac.cn, ☏ 010-64807516

展枯草芽孢杆菌的基因工程改造具有重要的参考意义。此外，与真核表达系统相比，枯草芽孢杆菌易于培养且具有较高的生长速率；与革兰氏阴性细菌表达系统相比，枯草芽孢杆菌表达可有效避免胞内蛋白质积累和不溶性蛋白质包涵体形成的毒性[8]。通过基因工程技术进行定向遗传改造，枯草芽孢杆菌已应用于酶、维生素、功能性糖等产物合成的微生物细胞工厂构建[9]。在枯草芽孢杆菌中建立了自发整合、反向选择标记、位点特异性重组等成熟的基因编辑系统。自发整合利用枯草芽孢杆菌能够天然形成感受态的能力，吸收异源 DNA 分子整合至染色体中，但往往效率低下且具有随机性[10]。反向选择标记系统通常由靶向染色体基因座侧翼的 2 个同源区、抗性基因、诱导型启动子控制下的毒素基因和 2 个直接重复序列组成，常用的反向选择标记包括 *upp*、*blaI*、*mazF*、*ysbC*、*hewl* 和 *cat* 等[3]。位点特异性重组系统引入了重组酶，相比反向选择标记的天然重组，其效率要高得多，常用的位点特异性重组系统包括 Xer/dif[11]和 Cre/loxP 系统[12]。

尽管传统基因工程操作方法经过多年发展取得了许多突破，但依然存在技术难度大、费时、成本高等不足，这也限制了枯草芽孢杆菌基因工程改造的进一步发展，尤其是在进行全局代谢网络调控中的应用。自 2013 年以来，成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其关联(CRISPR associated, Cas)系统(CRISPR/Cas)因操作简单、适用范围广、编辑效率高等诸多优点，迅速发展成为第三代基因编辑技术[13]。1987 年，研究人员首次在大肠埃希氏菌的 *iap* 基因内观察到一段特殊重复序列，但当时并未明确其功能[14]。2002 年，这些序列被正式命名为 CRISPR 序列[15]。2005 年，有研究提出 CRISPR 识别特定的病毒基因序列，参与细菌免疫机制的假设[16]。2007 年，研究证明了 CRISPR/Cas 系统确实能够介导原核生物对噬菌体的适应性免疫[17]。2011 年，验证了反式激活 CRISPR RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)和 CRISPR RNA (crRNA)形成复合物后能够引导 Cas9 蛋白切割双链[18]。2012 年，研究表明 RuvC 和 HNH 结构域对 Cas9 蛋白发挥内切核酸酶活性至关重要，并且提出了以合成小向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)代替 tracrRNA 和 crRNA 复合物的靶向作用[19]。2013 年，有研究首次报道了 CRISPR/Cas9 在真核生物基因编辑中的应用[13]，实现了多基因的高效率敲除，这为后续 CRISPR/Cas 系统及其衍生技术广泛应用于真核生物和原核生物的靶向基因编辑奠定了基础。2020 年，CRISPR/Cas9 基因修饰方法的发明者埃马纽埃尔·卡彭蒂耶(Emmanuelle Charpentier)与美国科学家詹妮弗·杜德纳(Jennifer A. Doudna)被授予“诺贝尔化学奖”，这无疑再次掀起了基因编辑领域的新技术革命。

本文系统地介绍了 CRISPR/Cas 系统的作用原理，梳理了 CRISPR 基因编辑工具在枯草芽孢杆菌中的发展历程，总结了 CRISPR 系统靶向编辑枯草芽孢杆菌以促进核黄素、透明质酸、酶蛋白等产物高效生物合成的成功案例，并对 CRISPR 系统在枯草芽孢杆菌中的发展应用进行了展望，以期为基于全局代谢网络调控的枯草芽孢杆菌基因工程提供参考。

1 CRISPR/Cas 系统的作用原理及发展

1.1 CRISPR/Cas 系统的基因编辑原理

CRISPR/Cas 系统作为原核生物的获得性免疫系统，主要由 CRISPR 基因序列与 Cas 基因组成。CRISPR 基因序列能够储存病毒等侵入宿主的核苷酸信息，Cas 基因能够编码核酸内切酶等功能性蛋白。CRISPR 系统可划分为适应模块、表达模块、干扰模块和辅助模块[20]。在病毒入侵时，CRISPR 系统中的 Cas 蛋白作为外源性基因的识别者，识别 protospacer adjacent motif

(PAM)序列并定位入侵的外源遗传元件。经 Cas 核酸酶精确切割后，外源基因以间隔序列的形式整合至 CRISPR 序列中。作为前体 crRNA 生成的模板，间隔序列存储着外源基因的遗传信息。当相同类型的病毒二次入侵时，宿主细胞会启动防御机制，利用转录和复杂的分子机制，重组具备高度特异性识别能力的复合体，基于碱基互补配对原则，识别并切割基因序列，致使双链 DNA 的特异性断裂，从而有效阻断病毒的复制[21]。以典型的 CRISPR/Cas9 系统为例，来源于化脓性链球菌的 Cas9 蛋白(SpCas9)，包括切割靶向链的 HNH 和切割非靶向链的 RuvC 两个核酸酶结构域，其靶向 PAM 序列为 NGG[22]。经过优化后的 CRISPR/Cas9 系统仅需 sgRNA 引导 Cas9 蛋白在靶基因位点切割 DNA 双链，之后通过随机突变、同源重组(homologous recombination, HDR)或非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)进行断裂的双链修复，修复过程中即可发生基因编辑(图 1)[23]。

1.2 CRISPR/Cas 系统的分类

基于 Cas 蛋白的组成，CRISPR 系统被分为两大类。I类 CRISPR 系统(如 I 型、III 型和 IV 型系统)需要多种 Cas 蛋白才能发挥作用，而II类

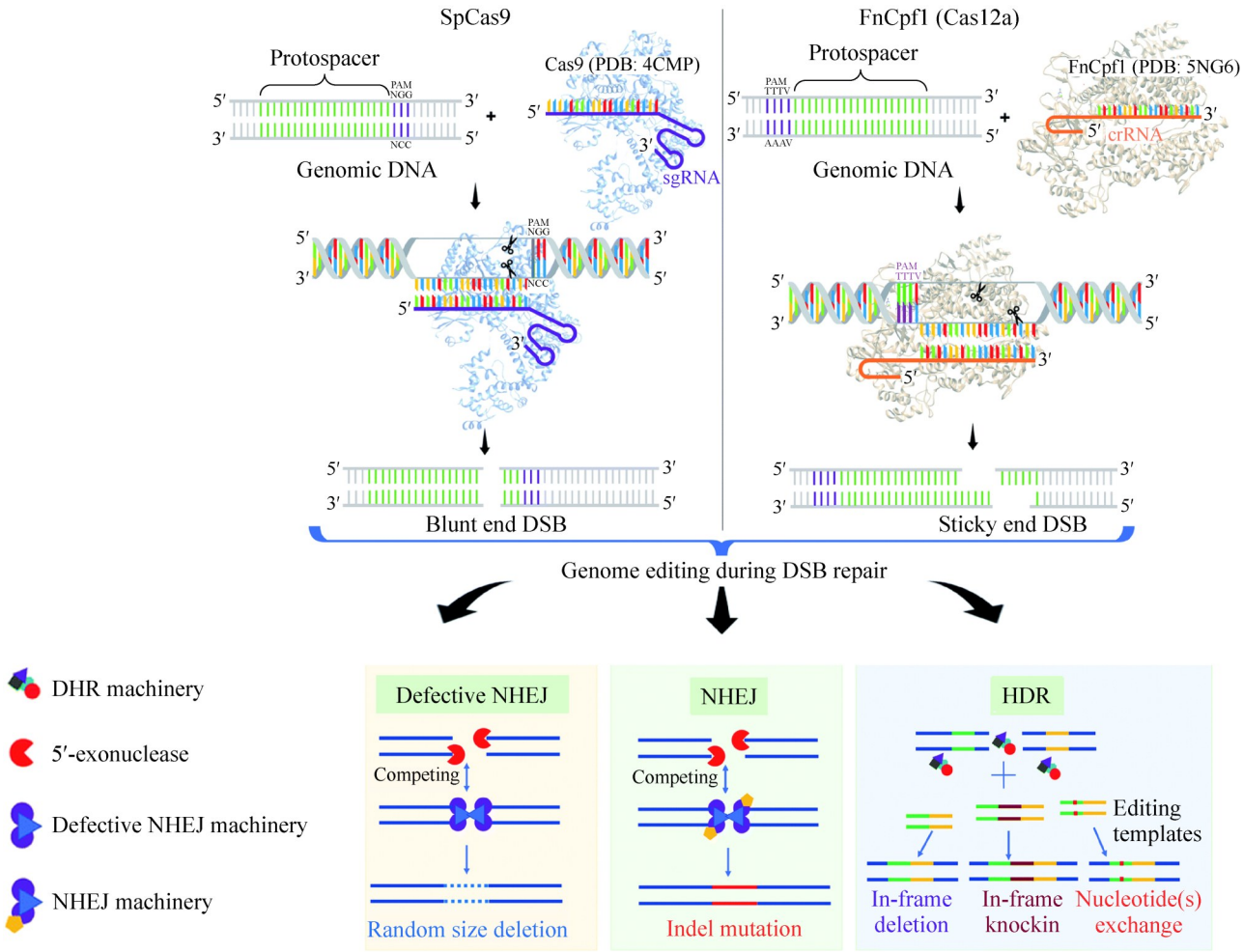

图1 CRISPR/Cas9和CRISPR/Cas12a基因编辑示意图[23]

Figure 1 Schematic depicting gene editing based on CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cas12a[23].

CRISPR 系统(如 II 型、V 型和 VI 型系统)只需要一个 Cas 蛋白实现其功能[23]。II类 CRISPR 系统中的每个亚型使用独特的 Cas 蛋白发挥切割活性，例如，II 型系统为 Cas9 蛋白；V 型系统中包括 Cas12a (Cpf1)、Cas12b (C2c1)、Cas12c (C2c3)、Cas12d (CasY)、Cas12e (CasX)、Cas12g、Cas12h 和 Cas12i；VI 型系统则包括 Cas13a (C2c2)、Cas13b 和 Cas13c[23-24]。xCas9 蛋白[25]、SpRY[26]等 Cas 变体蛋白的不断出现，进一步提高了精准基因编辑的可行性。可以预见，随着研究的不断深入，特异性更强、蛋白更小、编辑范围更广、效率更高的 Cas 蛋白依然会不断被发现并应用于基因编辑研究。

1.3 CRISPR/Cas 系统衍生的基因编辑工具发展

Cas9 蛋白 HNH 结构域的 H840A 以及 RuvC 结构域的 D10A 发生点突变获得缺乏内切核酸酶活性的变体蛋白 dCas9，但其依然能结合靶位点 DNA 序列，dCas9 融合阻遏因子可实现对靶基因的抑制表达调控，即 CRISPR 干扰(CRISPR interference, CRISPRi) (图 2)[27]。在细菌的实际应用中，dCas9 无需融合阻遏因子同样能有效发挥基因抑制作用，CRISPRi 借助 sgRNA 的靶向作用，只需改变 20 nt 的靶向碱基即可实现靶基因的切换。此外，dCas9 可直接融合激活因子，在 sgRNA 的引导下实现对靶基因的激活表达调控，即 CRISPR 激活 (CRISPR activation, CRISPRa) (图 2)[19,27]。已报道的激活因子包括 α 亚基、ω 亚基、SoxS、TetD 等。与 CRISPRi 不同的是，CRISPRa 的有效靶位点区域在转录起始位点的上游，并且仅在有限的靶区域表现出有效激活作用[27-28]。

Komor 等[29]利用 dCas9 结合脱氨酶、逆转录酶等工具，开发出了可实现特定碱基精确点突变的碱基编辑系统(base editor, BE)，包括能进行 C 到 T 替换的胞嘧啶碱基编辑系统(cytosine

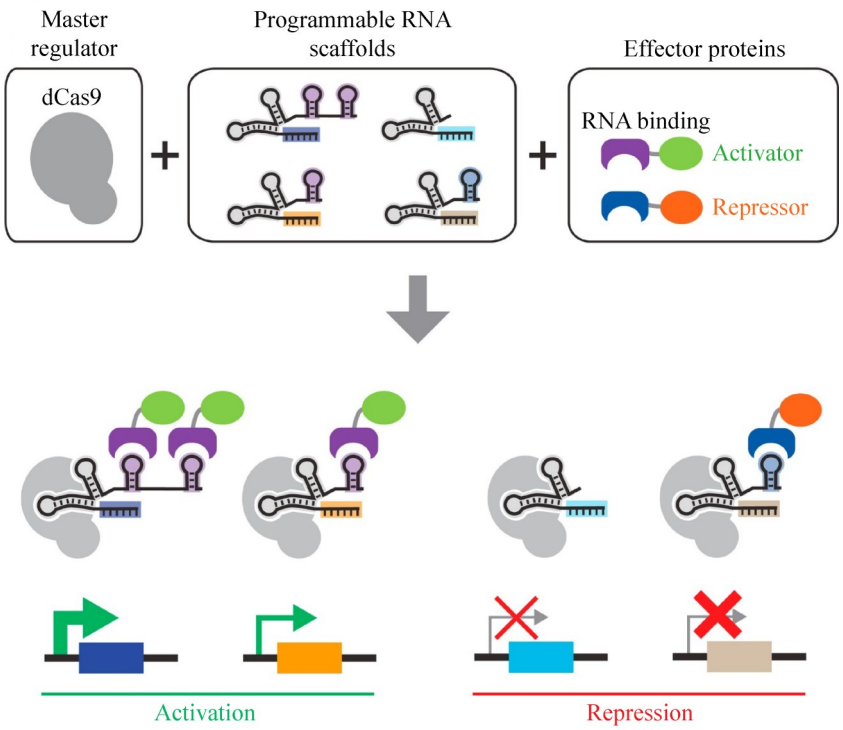

图2 CRISPRi和CRISPRa系统示意图[27]

Figure 2 Schematic diagrams of the CRISPRi and CRISPRa systems[27].

base editor, CBE)，A 到 G 替换的腺嘌呤碱基编辑系统(adenine base editor, ABE)[30]，以及能进行 A、T、C、G 4 种碱基任意变化的先导编辑器(prime editing, PE)系统[31]。针对碱基编辑器编辑方式的单一性，众多研究团队开发出了能进行 C 到 G 替换及同时进行 C 到 T 与 A 到 G 替换的碱基编辑器变体，这些变体的提出进一步扩展了基因编辑的应用方式及范围[32-33]。BE 系统已经在大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)等多种细菌中实现了碱基编辑[34]。

BE 和 PE 系统可实现靶位点的单碱基替换，导致编码基因的提前终止，从而用于基因功能研究或有害基因功能沉默(图 3)。在大肠埃希氏菌中，运用 BE3 系统将 CAA、CAG 和 CGA 突变为终止密码子(TAA、TAG 和 TGA)，实现了 100% 编辑效率的四环素抗性基因功能丧失，且编辑效率顺序为 TC≥CC≥AC≥GC；同时在靶向布鲁氏菌的致病力因子(*virB10*)时也表现出高效率的基因功能失活[37]。Wang 等[38]在 CBE 的基础上开发了一种以碱基编辑为目标和无模板的基因表达调控(base editor-targeted and template-free expression regulation, BETTER)方法，用于优化谷氨酸棒杆菌的木糖代谢途径。为验证 BETTER 方法在复杂多基因调控过程中的有效性，Wang 等[38]设计了同时靶向谷氨酸棒杆菌番茄红素生物合成途径中 10 个关键基因的 BETTER 工具，获得了番茄红素产量提高 4.8 倍的工程菌。总的来说，建立基于基因组规模的 BE 和 PE 编辑系统、降低脱靶效率、增大编辑通量等方面都是必要的。

2 枯草芽孢杆菌中 CRISPR/Cas 基因编辑工具的发展

自 2016 年以来，CRISPR/Cas 系统在枯草芽孢杆菌中实现了高效率的单基因点突变、多基因点突变、单基因敲除、多基因缺失、大片段删除和外源基因插入等基因编辑操作，同时，CRISPRi、CRISPRa 和 BE 系统等遗传工具的开发应用，以及将 CRISPR 系统结合生物传感器实现代谢途径多模块的动态调控，已拓展到生物制造领域。2016 年，CRISPR/Cas 系统首次应用于枯草芽孢杆菌的遗传改造，通过 CRISPR/Cas9 技术成功修复了 *B. subtilis* 168 的 *trpC2* 基因突变[39]。同时，以 dCas9 为基础的 CRISPRi 也应用于枯草芽孢杆菌全基因组规模的基因功能研究[40]。2017 年，基于 CRISPR/Cas9 技术，在枯草芽孢杆菌中实现了高效率的大片段基因组缺失和基因敲入[41]。2018 年，CRISPR/Cas9n 应用于枯草芽孢杆菌[42]。2019 年，Lu 等[43]开发了基于 dCas9 的 CRISPRa 工具。2020 年，CRISPR/Cpf1 系统和 MAD7 变体用于枯草芽孢杆菌基因编辑[44-46]；CBE 首次应用于枯草芽孢杆菌[47]。2021 年，Kim 等[48]构建了融合 rAPOBEC1 和 PmCDA1 的 4 种 CBE；BETTER 方法也应用到 *B. subtilis* 168 中构建 RBS 文库[38]。2022 年，ABE 结合 CBE 应用于枯草芽孢杆菌定向进化，成功增强了枯草芽孢杆菌对羊毛硫细菌素的抗性[49]，温度传感器与 CRISPRi 系统结合应用于枯草芽孢杆菌，成功提高了枯草芽孢杆菌的 2′-岩藻糖基乳糖产量[50]。2023 年，Ferrando 等[51]开发了 CRISPR 系统介导的基因组多基因插入方法，实现了枯草芽孢杆菌中一步多基因插入。2024 年，Zhu 等[52]结合全基因组规模的 CRISPRi 筛选和靶向 CRISPRa 激活，用于增强枯草芽孢杆菌重组蛋白表达；同时 CRISPR 的 I-E 型可编程系统应用于枯草芽孢杆菌[53]。随着 CRISPRi、CRISPRa 和 BE 等 CRISPR 基因编辑技术的迭代更新，将进一步拓宽枯草芽孢杆菌中的可编程基因操作应用范围，促进其代谢工程研究和合成生物学应用(图 4)。

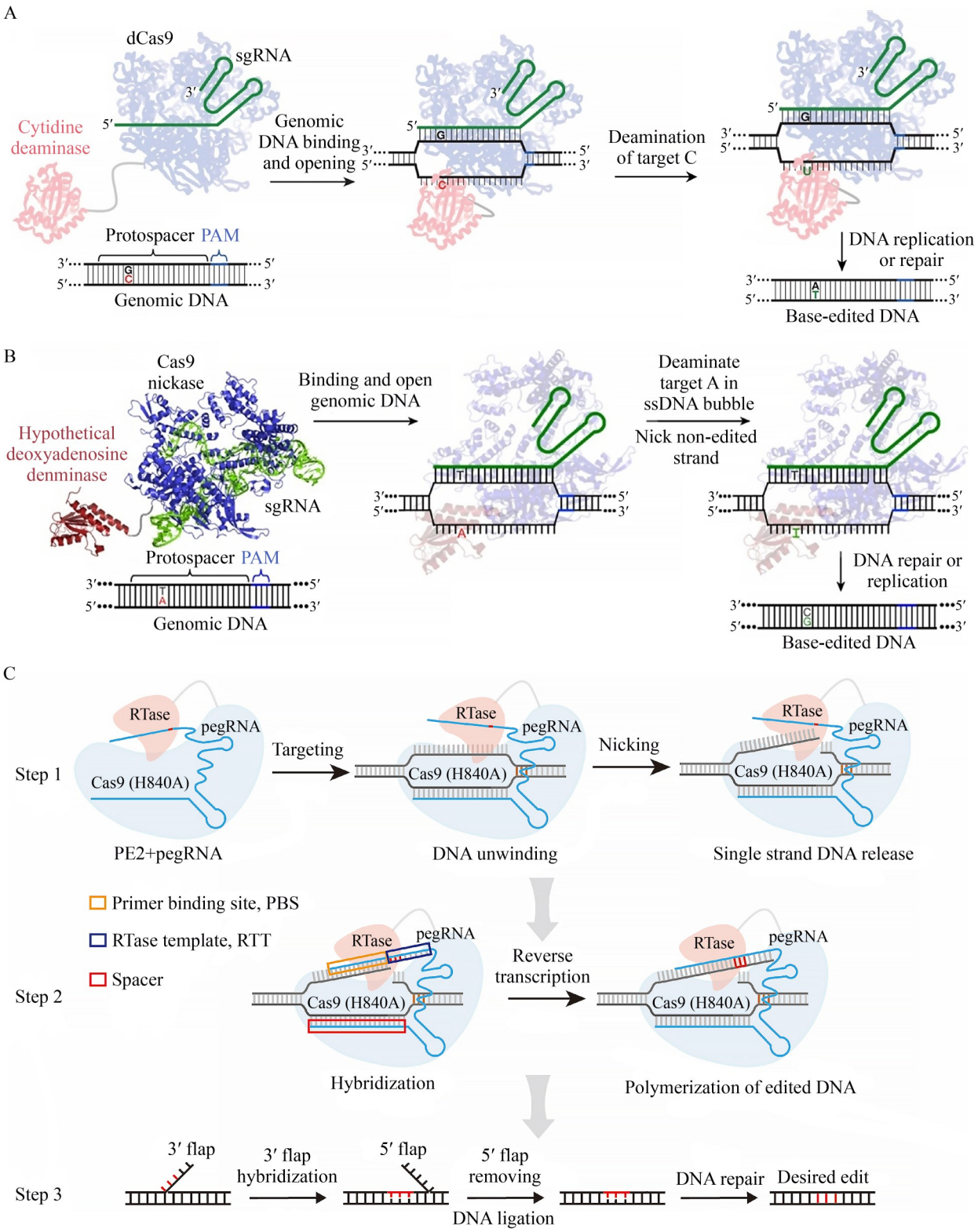

图3 CBE (A)[29]、ABE (B)[35]和PE (C)[36]系统示意图

Figure 3 Schematic diagrams of the CBE (A)[29], ABE (B)[35], and PE (C)[36] systems.

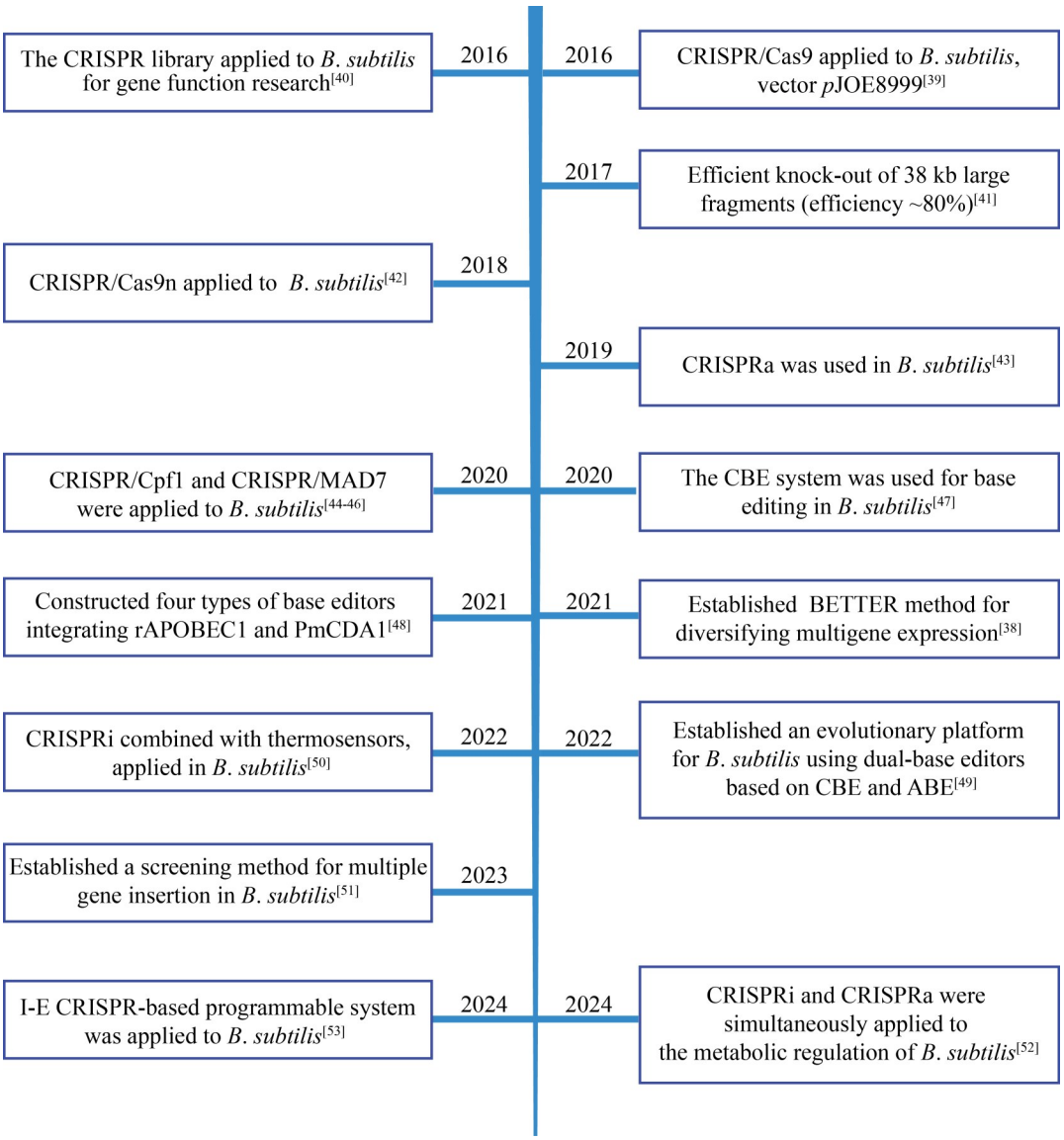

图4 CRISPR/Cas系统在枯草芽孢杆菌中的应用历程

Figure 4 An application history of the CRISPR/Cas system in *Bacillus subtilis*.

2.1 应用 CRISPR/Cas 系统实现高效基因敲除和敲入

在枯草芽孢杆菌中，CRISPR/Cas 系统已实现高效率的点突变、大片段基因敲除和敲入，并且在增加透明质酸产量[54]、研究噬菌体生物学特性[55-56]等方面均有成功应用。2016 年，在 *p*JOE8999 载体上同时连接了靶向 sgRNA 和同源修复模板，构建的 CRISPR/Cas9 系统实现了 100% 的 *trpC* 点突变基因修复、97% 的 4.1 kb 片段敲除和 89% 的 25.1 kb 大片段敲除[39]。该 *p*JOE8999 载体在后续多项研究中均成功实现高效率基因敲除或插入[42,56]，验证了该 CRISPR/Cas9 系统的稳定性。然而，在另一项研究中，CRISPR/Cas9 引起 *B. subtilis* ATCC6051a 双基因缺失效率约为 33%，6 bp 和 11 bp 基因插入效率约为 43%，284 bp 基因缺失效率仅为 9.1%，且

以 PCR 线性片段提供修复模板时未发生编辑。作者将 CRISPR 系统的低效率归因于出发菌株为未驯化的野生菌株，转化效率低，不易进行遗传操作[57]。2016 年，发表了枯草芽孢杆菌的 CRISPR/Cas9 操作指南[58]，该指南详细说明了试剂组成、处理时间、载体构建、检测方法(随机缺失、插入、点突变)等试验流程，运用该方法验证了 *MutS*2 基因缺失导致 *B. subtilis* PY79 对天然抗生素丝裂霉素(mitomycin C, MMC)敏感[58]。然而，该方法需要同时提供 tracrRNA 和 crRNA，在实际应用中较为繁琐。研究发现 NgAgo 能促进 CRISPR/Cpf1 系统的同源重组，应用于 *B. subtilis* 168 可实现双基因敲除，但对 3 个基因同时敲除无效；当同源修复模板长度为 1 kb 时，同时 6 个位点的点突变和单基因插入效率均达到 100%；且以 PCR 线性化产物和质粒形式提供修复模板均能成功发生预期编辑，大大提高了编辑效率[45]。Cai 等[59]将 CRISPR 系统结合重组酶 Cre，实现在枯草芽孢杆菌高效无抗性标记的基因插入和敲除(效率>95%)，并且以基因组嵌入的形式同时失活了蛋白酶基因 *mpr* 并表征了角蛋白酶功能。Ferrando 等[51]将 CRISPR/Cas9 系统结合高通量比色筛选方法，1 周内完成了最多 3 个拷贝基因在 *B. subtilis* BsMN0 中的同时插入，缩短了工程菌构建周期，快速构建了无质粒、高表达的枯草芽孢杆菌。

由此可见，CRISPR/Cas 系统自应用于枯草芽孢杆菌以来，发展出了单质粒系统、双质粒系统和基因组嵌入表达系统，基因编辑效率和稳定性不断提升(表 1)，不同系统也表现出明显的优缺点。单质粒系统的质粒转化效率高，能有效减轻宿主菌的负担，提高工程菌存活率；但同源重组效率很大程度上取决于同源臂的长度。双质粒系统的稳定性欠佳，并且可能在宿主菌中引入适应性压力，部分枯草芽孢杆菌难以转化 2 个质粒，同时质粒抗性选择较为严格，在迭代基因组编辑中需要更多时间进行质粒去除操作。基因组整合系统由于 Cas 蛋白插入到宿主基因组上，表达更为稳定，但同时由于基因组插入拷贝数低，可能因 Cas 蛋白表达量不足而引起编辑效率降低。

2.2 CRISPRi 和 CRISPRa 实现多通路基因表达调控

CRISPRi 和 CRISPRa 可特异性抑制或激活基因转录，实现目的基因表达的下调或激活。2016 年，CRISPR/Cas9 首次应用于枯草芽孢杆菌时，CRISPRi 也随即应用到枯草芽孢杆菌中，并在基因功能研究中展现出巨大潜力[40]。研究人员将木糖诱导启动子驱动的 dCas9 整合到 *lacA* 位点，将组成型启动子 P_{veg} 驱动的 sgRNA 插入到 *amyE* 位点，获得 CRISPRi 工程菌，并通过红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)验证了 CRISPRi 对上游基因和下游基因均表现出抑制作用[40]。Peters 等[40]设计了靶向 *B. subtilis* 168 中 289 个必需基因的 sgRNA 文库，发现约 95% 的 CRISPRi 菌株表现出生长曲线滞后，约 80% 的菌株最大生长速率与对照相当；CRISPRi 必需基因轻度敲减菌株约 94% 表现出菌落变小，且必需基因敲减菌株超过 60% 以菌落形态缺陷为最终表型。通过 CRISPRi 验证必需基因的功能，发现未知功能必需基因 *ylaN* 与菌体铁稳态缺陷相关，但当外源添加铁时，*ylaN* 基因则变为非必需[40]。在以枯草芽孢杆菌为底盘菌株的工业生产中，CRISPRi 已用于增加缬氨酸[60]、透明质酸[60]、N-乙酰氨基葡萄糖[63]、淀粉酶[43]等产物的产量，其本质是通过 CRISPRi 抑制产物合成竞争途径的基因表达。Westbrook 等[54]利用 CRISPRi 同时抑制枯草芽孢杆菌的 *pdhA*、*leuA*、*ilvA* 及 *sigF* 基因表达，实现缬氨酸浓度升高 14 倍以上。最近的一项研究中，通过改造 Cas 基因 mRNA 的 5′非翻译区，优化了 I 型 CRISPRi 系统的功效，并应用于枯草芽孢杆菌生物合成 D-泛酸的过程[53]。

表1　枯草芽孢杆菌中的CRISPR基因编辑系统

Table 1　CRISPR-based genome editing systems in *Bacillus subtilis*

System types	Strains	Editing types	Editing efficiency	Purposes	References
dCas9	168	Single plasmid, CBE, point mutation	The fluorescence intensity of GFP in RBS library spaned three orders of magnitude	Improved the growth rate and glycerol utilization efficiency	[38]
Cas9	168	Single plasmid, KO, point mutation	*TrpC* point mutations 100%; 4.1 kb KO 97%; 25.1 kb KO >90%	The first CRISPR/Cas9 tool in *B. subtilis*	[39]
dCas9	168	Genome integration, CRISPRi	*GFP* and *RFP* suppression intensity 0.01−1.00 times	CRISPRi library validation of essential gene functions	[40]
Cas9	168	Dual plasmids, KO, KI, point mutation	Single gene deletion 100%; 38 kb KO 80%; *GFP* gene KI 97%	Efficient large gene deletions achieved	[41]
dCas9	SCK6	Dual plasmids, CRISPRi	Protease genes *vpr*, *bpr*, and *nprB* expression decreased by 95%, 78%, and 98%	Dual regulation of inhibition and activation, with a 260-fold increased in expression and a 2.6-fold increased in production of the amylase gene *BLA*	[43]
dCas9	SCK6	Dual plasmids, CRISPRa	*GFP* expression increased by 2.4−3.8 times		
MAD7	168	Single plasmid, KO	*Gfpmut3* KO 100%; *amyE* KO 93%	Efficient editing ensured by homologous recombination repair	[44]
dMAD7	168	Single plasmid, CRISPRi	*GFP* suppression 1.3−3.5 times; *amyE* suppression 2.0−2.4 times	Amylase activity decreased by 99.4%	[44]
dCpf1	168	Genome integration, CRISPRi, CRISPRa	*GFP* suppression intensity 0.008−0.248 times; 1.8-fold activation of mKate fluorescence	Simultaneous gene activation and inhibition achieved by dCpf1-RemA	[45]
Cpf1	168	Dual plasmids, KO, KI, point mutation	Gene KI 74%−82%; double gene KO 100%; 6 site point mutations 100%	NgAgo nucleases improved the efficiency of homologous recombination; inactivation of protease genes	[45]
Cpf1	168	Single plasmid, KO, KI	Small fragment KO >95%; large fragment >80%; 78 kb KO 16.7%	Higher stability of gene KO with Cpf1 protein than Cas9 protein	[46]
dCas9	168	Single plasmid, CBE, point mutation	3 site 100%, 4 site 50%	The first report of CBE application; 5 nt editing window	[47]
dCas9	168	Single plasmid, CBE, point mutation	Efficiency of mutations in 2, 3, 4, and 5 genes were 100%, 100%, 83.3%, and 75.5%, respectively	Construction of 4 types of base editing tools	[48]
Cas9n	168	Single plasmid, CBE, ABE	Editing efficiency of most sites >60%	Enhanced resistance to lanthionine antibiotics	[49]
Cas9	BsMN0	Single plasmid, KI	Single *amyQ* gene integration efficiency 97.5%−98.6%	Multi-gene one-step insertion and selection	[51]
dCas9	1A976	Single plasmid, CRISPRi, CRISPRa	GFP fluorescence decreased by 5.02−8.36 times	Increased expression of recombinant proteins	[52]

(待续)

(续表1)

System types	Strains	Editing types	Editing efficiency	Purposes	References
I型 CRISPRi	168	Single plasmid, CRISPRi	GFP fluorescence decreased by 26.84−34.18 times	The titer of D-pantothenic acid increased to 12.81 g/L	[53]
Cas9	YB886 (168 derivative)	Single plasmid, KO	NT	Enhanced resistance to bacteriophage SPP1	[55]
Cas9	TS01	Single plasmid, KO, KI	KO efficiency >40%; 2 kb KI 5%	Bacteriophage gene editing	[56]
Cas9	ATCC 6051A	Single plasmid, KO (gene damage)	*SrfC* 284 bp deletion efficiency 9.1%; *spoIIA* deletion efficiency 36%; double gene deletion efficiency 33%	Inhibition of foam formation and spore production	[57]
Cre-Cas9	DB428	Dual plasmids, KO, KI	Gene KO and KI efficiency >95%	Insertion of no resistant genes, inactivation of protease genes	[59]
Cas9 dCas9	1A751	Genome integration, KO, KI, CRISPRi	Point mutation 85%−100%; double gene KO 36%; 2.9 kb KI 69%	β-galactosidase activity decreased by 8 times	[60]
dCas9	168 1A751	Genome integration, CRISPRi	*FtsZ* relative suppression efficiency 25%−100%	Hyaluronic acid production increased by 204%	[60]
Cas9	168	Dual plasmids, KO	500 bp KO >80%	Self-targeted removal of plasmids	[61]
Cas9n	168	Dual plasmids, point mutation, KO, KI	8 kb KO−82%; 20.5 kb KO−23.6%; 1−2 kb KI >90%	Riboflavin production increased by 59%	[62]
dCas9	168	Genome integration, CRISPRi	GlcNAc production increased 81.7−131.6 g/L	Dynamic regulation of metabolic flux in response to intracellular GlcN6P concentration	[63]
dCas9	BNY (168 derivative)	Genome integration, CRISPRi	Simultaneously suppressed *zwf*, *pfkA*, and *glmM* intensity 0.01−0.10 times	GlcNAc yield increased by 88.5% with reduced by-products	[63]
dCas9	BY14 (168 derivative)	Genome integration, CRISPRi	*Pyk* and *zwf* expression decreased by 13.6 and 12.7 times	Lactose production increased by 59.2%; lactose titer increased by 17.4%	[64]
Cas9n	ATCC6051△5	Single plasmid, CBE	NT	Elimination of resistant genes in plasmids	[65]

KO：敲除；KI：敲入；CRISPRi：CRISPR干扰；CRISPRa：CRISPR激活；CBE：胞嘧啶碱基编辑器；ABE：腺嘌呤碱基编辑器。

KO: Knock-out; KI: Knock-in; CRISPRi: CRISPR interference; CRISPRa: CRISPR activation; CBE: Cytosine base editor; ABE: Adenine base editor.

2019年，Lu等[43]发表了CRISPRa首次应用于枯草芽孢杆菌的研究成果，研究人员将dCas9分别融合激活因子ω和α后，检测到*GFP*报告基因不同程度地增强表达，且在靶向外源和内源淀粉酶基因时均检测到酶活性的升高；但是激活作用存在高度靶位点依赖性，通

过在转录起始位点(transcription start site, TSS)上游位置进行严格的 sgRNA 设计，dCas9-ω 能够以位置依赖性方式同时实现激活和抑制基因表达，这说明 CRISPRa 能有效激活枯草芽孢杆菌中的内源和外源基因表达。然而，与真核细胞中多个激活因子的叠加募集作用能够进一步增强靶基因表达不同，在枯草芽孢杆菌中观察到多激活因子融合对激活基因表达有负效应[43]。Wu 等[45]在 dCpf1 蛋白的 C 端融合了 10 种不同激活蛋白，发现 dCpf1-RemA 具有最佳的激活作用，设计靶向模板链 TSS 上游 60−277 bp 的不同 crRNA，发现 90 bp 位置是实现同时抑制和激活的最佳位点，作者借助 dCpf1-RemA 工具将枯草芽孢杆菌的乙偶姻产量提高了 44.8%。尽管 CRISPR 系统在枯草芽孢杆菌的基因表达调控应用中得到了快速发展，但依然存在一些问题，如针对多基因表达调控的载体构建操作较为繁琐；同时进行 CRISPRi 和 CRISPRa 调控时，靶位点的有效作用区域限制比较严格，且针对不同基因的最佳靶向区域变化较大；CRISPRa 工具的有效激活调控因子较少，且往往不具有普适性，这些问题都需要进一步地研究解决。

2.3 碱基编辑器的开发应用

2020 年，胞嘧啶碱基编辑系统 CBE 首次应用于枯草芽孢杆菌。研究人员发现，CBE 在枯草芽孢杆菌中具有 5 nt 的编辑窗口范围，在 PAM 位点上游−16−−20 位置的编辑效率显著不同，以淀粉酶基因 *amyE* 为靶位点时，−16−−20 位置的编辑效率分别为 2%、51%、100%、20% 和 13%；当运用 CBE 工具同时靶向 3 个位点和 4 个位点时，编辑效率分别为 100% 和 50%；因此，仅通过两轮基因编辑即可实现 8 个蛋白酶基因的失活，并检测到蛋白酶活性显著降低至与 WB800 菌株相当；进一步分析 BE 系统在 *B. subtilis* 168 基因组(共 4 106 个基因)的可编辑范围发现，共有 3 266 个非必需基因(占 85.1%)可编辑，而其他 569 个非必需基因的编码区缺乏合适的 PAM 位点[47]。后续研究中，研究人员分别将大鼠胞嘧啶脱氨酶(rat cytidine deaminase, rAPOBEC1) 和海七鳃鳗胞嘧啶脱氨酶(*Petromyzon marinus* cytidine deaminase, PmCDA1)融合在 dCas9 蛋白的 N 端和 C 端，并添加不同数量的蛋白降解标签和尿嘧啶糖基化酶抑制剂(uracil glycosylase inhibitor, UGI)，构建了 4 种不同的 CBE：*rAPOBEC1-dCas9-UGI* (CBE1)、*rAPOBEC1-dCas9-UGI-UGI* (CBE2)、*dCas9-PmCDA1-UGI-LVA* (CBE3) 和 *dCas9-PmCDA1-UGI* (CBE4)，CBE1−CBE4 使 GFP 失活的效率分别达到 97.07%、77.85%、90.17% 和 98.25%[48]。分析 CBE4 的编辑窗口范围发现，在 PAM 位点上游第 17−20 位碱基的突变效率超过 71%，而在第 11−15 位的效率低至 5%−20%，第 1−10 位未检测到有效编辑[48]。同时，研究发现启动子表达强度影响多基因突变效率，CBE4 的高表达可能会增加细胞负担从而降低多基因同时编辑效率；当诱导 dCas9 表达的启动子替换为弱表达强度的启动子后，2、3、4 和 5 个基因同时点突变的效率分别为 100%、100%、83.3% 和 75.5%，但同时也检测到非预期的脱靶效应[48]。为了验证 BETTER 方法在不同微生物中进行基因表达调控的普适性，研究人员将其应用到了 *B. subtilis* 168 中构建 RBS 文库，获得 GFP 表达强度差异跨越 3 个数量级的文库，验证了 BETTER 方法在枯草芽孢杆菌中的适用性；并且将来源于克雷伯氏菌的甘油利用途径以串联基因簇(P_{gapDH}-*glpFKs-dhaD-dhaK*)形式整合到枯草芽孢杆菌的基因组中，以甘油为唯一碳源，进行连续 6 代富集培养后，获得了生长速度快、可高效利用甘油的枯草芽孢杆菌[38]。Chen 等[65]使用 CRISPR/Cas9n-AID 碱基编辑系统，将碱基 C 转化为 T，将卡那霉素耐药基因的密码子转化为终止密码子，消除枯草芽孢杆菌质粒中的卡那霉素抗性基因，获得的无抗性标记重组菌的 γ-谷酰基肽酶产量提高 54 倍。研究人员通过对 CRISPR 阵列、nCas9、胞嘧啶和腺苷脱氨酶进行重编程，完成了 CBE 结合 ABE 的可编程双碱

基编辑器的构建，实现了基因组规模的单个或多个碱基转换，用于底盘细菌的快速进化，并成功增强了枯草芽孢杆菌的抗羊毛硫细菌素能力[49]。

由于 BE 系统在实现单碱基的精准替换方面表现出明显优势，后续在枯草芽孢杆菌中的研究应用将着重于文库构建寻找特定表型功能提升的突变株，或者对潜在耐药基因、毒力因子、致病性基因等特定有害基因功能的失活。此外，BE 系统在未知基因功能的研究也能发挥重要作用。另一方面，尽管 CBE 和 ABE 已经在枯草芽孢杆菌中成功应用，但仍存在可编辑范围较窄的问题，且在同时编辑多个靶基因时，编辑效率明显下降或存在脱靶效应，因此在枯草芽孢杆菌中的多路编辑的 BE 系统有很大的提升空间。此外，PE 系统至今尚未见在枯草芽孢杆菌中的文献报道，未来探究 PE 系统在枯草芽孢杆菌中的编辑应用也具有重要意义。

3 CRISPR 基因编辑技术在枯草芽孢杆菌底盘菌株改造中的应用

在合成生物学中，进行枯草芽孢杆菌底盘菌株改造的核心思路之一是对目的产物合成竞争途径的抑制以及对合成途径限速酶基因的过表达，从而使更多的代谢通量流入目的产物合成途径，应用 CRISPR/Cas 系统能方便快捷地达到这一目的。通过 CRISPR/Cas 系统对枯草芽孢杆菌的基因表达调控和全局代谢网络优化，已成功实现透明质酸、N-乙酰氨基葡萄糖、核黄素等各类活性化合物的分泌表达，以及促进蛋白酶、纤维素酶等生物酶的高效生产[9]。

Westbrook 等[54]利用 CRISPR/Cas9 技术异源表达 *SeHAS* 基因，过表达 *pgsA* 和 *clsA* 基因，并降低 *ftsZ* 基因的表达量，最终使枯草芽孢杆菌的透明质酸滴度增加了 204%。Zhao 等[66]利用 CRISPR/AsCpf1 系统，在 *B. subtilis* 168 中高效完成了透明质酸合成酶基因(*hasA*)、UDP-葡萄糖-脱氢酶基因(*tuaD*)在 *mpr*、*epr* 位点的基因敲入以及 *eps* 基因簇的敲除，实现了透明质酸的异源生产，产量达到 1.39 g/L。

Boumezbeur 等[67]基于 CRISPR/Cas9 技术降低了转录核糖开关对枯草芽孢杆菌嘌呤和核黄素合成代谢途径的限制，最终使核黄素产量增加了 53%。Liu 等[68]利用 CRISPR/Cas9n 系统调控核黄素操纵子中的 *ribB*、*ribA* 和 *ribH* 等 3 个基因，最终使核黄素产量提高了 59%，达到 1.39 g/L。

Wu 等[63]通过 CRISPRi 抑制枯草芽孢杆菌中 N-乙酰氨基葡萄糖合成竞争途径的 3 个基因(*zwf*、*pfkA*、*glmM*)，发现当靶向 *zwf*、*pfkA*、*glmM* 位点的前端、中端、后端时，抑制强度分别为高、中、低水平，最终获得 20.5 g/L 的最大 N-乙酰氨基葡萄糖产量，显著提升了木糖利用效率。在另一项研究中，Wu 等[69]基于 CRISPR-dCas12a 系统构建了遗传环路级联 ScrABBLE 系统，以实现代谢途径的高效多重优化，在生物反应器中，枯草芽孢杆菌 N-乙酰氨基葡萄糖的滴度达到 183.9 g/L。

在研究枯草芽孢杆菌产纤维素酶特性的工作中，研究人员以白蚁肠道来源的野生型 *B. subtilis* RLI2019 为出发菌，以超过 80% 的效率连续敲除其 10 个耐药性基因，获得无耐药性基因菌株，该菌株依然保留了高效的纤维素降解能力，并且能够提高动物生长性能[70-71]。同时，通过 CRISPR/Cas9 技术，以基因组多位点整合的方式在 *B. subtilis* RLI2019 的 *aprE*、*epr* 和 *amyE* 位点分别敲入 *eglS*、*Cel48S* 和 *bglS*，实现了三元纤维素酶基因的高效重组表达，重组工程菌的内切葡聚糖酶活性、外切葡聚糖酶活性和 β-葡萄糖苷酶活性分别是出发菌的 3.1 倍、6.6 倍和 3.0 倍，显著增强了对农作物秸秆的降解能力[72-74]。未来，通过 CRISPRi 结合 CRISPRa 重定向枯草芽孢杆菌的代谢通量，有望进一步提高其纤维素酶活性，促进枯草芽孢

杆菌在木质纤维素生物降解方面的应用。

此外，基于 CRISPR 基因编辑技术进行枯草芽孢杆菌全局代谢通路优化的遗传改造策略，已成功构建出涵盖酶制剂(淀粉酶[43])、天然产物(番茄红素[75])及高附加值营养添加剂(D-泛酸[53]、2′-岩藻糖基乳糖[50])等高效合成的微生物细胞工厂(表 2)。

4 总结与展望

遗传改造工具的技术迭代是推动基因工程菌研究的重要基础，而系统代谢工程是构建理想微生物细胞工厂的有力手段。在过去近 10 年间，以枯草芽孢杆菌为底盘菌的 CRISPR 基因编辑技术应用已突破传统基因工程的局限。通过目标基因过表达、代谢途径优化及代谢网络重构等策略，显著提升了目的产物的生物合成效率，为工业级量产提供了创新性解决方案。当前研究已形成以模式菌 *B. subtilis* 168 及其衍生菌株为核心的技术体系，但仍存在一些关键问题亟待解决，例如特异性不足导致的脱靶效应、全局代谢网络多层级调控的复杂性、自然环境分离的野生型菌株 CRISPR 基因编辑体系的不成熟性，以及工程菌生物安全性评估体系的不完善性等。在未来的技术发展中，应重点关注以下几个方面：(1) 全局基因表达调控系统的开发，例如开发 CRISPR 系统与群体感应系统耦合的

表2 CRISPR系统在枯草芽孢杆菌生物合成中的应用

Table 2 The application of CRISPR system in the biosynthesis of *Bacillus subtilis*

System types	Strains	Optimization strategy	Optimization results	References
CRISPRa	SCK6	Inhibited and activated dual regulation	The amylase yield increased by 260 times	[43]
CRISPRi	168	Integration of temperature sensor with CRISPRi system	The production of 2′-fucosyl lactose reached 1 839.7 mg/L	[50]
CRISPRi	168	Reconstruction of type I CRISPRi system to control *pdhA* expression	The titer of D-pantothenic acid increased to 12.81 g/L	[53]
Cas9	168	Heterologous expression of *SeHAS* gene, overexpression of *pgsA* and *clsA* genes, downregulation of *ftsZ* gene expression	The hyaluronic acid titer increased by 204%	[54]
CRISPRi	BNY	Inhibition of *zwf*, *pfkA*, and *glmM* genes	The production of N-acetylglucosamine reached 20.5 g/L	[63]
AsCpf1	168	Knockout of *eps* gene cluster, knockin of *tuaD* gene at *mpr* and *epr* sites	The hyaluronic acid production reached 1.39 g/L	[66]
Cas9	168	Alleviation of transcriptional riboswitch restrictions on riboflavin biosynthesis pathway	The riboflavin production increased by 53%	[67]
Cas9n	168	Regulation of *ribB*, *ribA*, and *ribH* genes	The riboflavin production increased by 59% to reach 1.39 g/L	[68]
dCas12a	S5	Construction of genetic ScrABBLE system	The titer of N-acetylglucosamine reached 183.9 g/L	[69]
Cas9	RLI2019	Knockout of 10 antibiotic resistance genes	The strain was more sensitive to antibiotics	[70-71]
Cas9	RLI2019	Simultaneous integration of *eglS*, *Cel48S*, and *bglS* genes at *aprE*, *epr*, and *amyE* sites	The activities of endoglucanase, exoglucanase, and β-glucosidase were 3.1 times, 6.6 times, and 3.0 times of the starting strain, respectively	[72-74]
Cas9	168	Regulation of key genes in the synthetic pathway *trpC2*	The lycopene production reached 1.12 mg/L	[75]

自适应调控平台，实现代谢通路的动态平衡；(2) CRISPR 基因编辑工具的普适性应用，将经过模式菌验证的 CRISPR 工具包拓展至野生菌株；(3) 在提高 CRISPR 基因编辑精确性方面，须持续致力于发掘毒性低、分子量小、靶向范围宽、编辑效率高的新型核酸酶，同时，整合深度学习算法，甚至引入人工智能技术，构建脱靶效应预测模型。

为实现工程菌最终的工业化安全应用，全面评估基于 CRISPR 系统重构的工程菌遗传稳定性和潜在风险，并制定相应的安全性检测标准和风险调控策略至关重要。总体而言，随着 CRISPR 基因编辑技术的持续发展，枯草芽孢杆菌中的可编程基因操作应用前景将更为广阔，并将进一步推动其在生物制造和合成生物学领域的发展应用。

作者贡献声明

公涵萱：文献检索整理，综述撰写；王智伟：图表制作及修改；陈玉林：整体构思与设计；杨雨鑫：全文审阅与修订；刘功炜：全文指导与返修。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

[1] CHEN X, GAO C, GUO L, HU G, LUO Q, LIU J, NIELSEN J, CHEN J, LIU L. DCEO biotechnology: tools to design, construct, evaluate, and optimize the metabolic pathway for biosynthesis of chemicals[J]. Chemical Reviews, 2018, 118(1): 4-72.

[2] DVOŘÁK P, NIKEL PI, DAMBORSKÝ J, de LORENZO V. Bioremediation 3.0: engineering pollutant-removing bacteria in the times of systemic biology[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(7): 845-866.

[3] GU Y, XU X, WU Y, NIU T, LIU Y, LI J, DU G, LIU L. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 109-121.

[4] ZHU B, STÜLKE J. SubtiWiki in 2018: from genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1): D743-D748.

[5] POPP PF, DOTZLER M, RADECK J, BARTELS J, MASCHER T. The *Bacillus* BioBrick Box 2.0: expanding the genetic toolbox for the standardized work with *Bacillus subtilis*[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 15058.

[6] SIERRO N, MAKITA Y, de HOON M, NAKAI K. DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(Database issue): D93-D96.

[7] CASPI R, BILLINGTON R, FERRER L, FOERSTER H, FULCHER CA, KESELER IM, KOTHARI A, KRUMMENACKER M, LATENDRESSE M, MUELLER LA, ONG Q, PALEY S, SUBHRAVETI P, WEAVER DS, KARP PD. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1): D471-D480.

[8] CONTESINI FJ, MELO RR, SATO HH. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(3): 321-334.

[9] ZHANG Q, WU Y, GONG M, ZHANG H, LIU Y, LV X, LI J, DU G, LIU L. Production of proteins and commodity chemicals using engineered *Bacillus subtilis* platform strain[J]. Essays in Biochemistry, 2021, 65(2): 173-185.

[10] NIAUDET B, JANNIÈRE L, EHRLICH SD. Integration of linear, heterologous DNA molecules into the *Bacillus subtilis* chromosome: mechanism and use in induction of predictable rearrangements[J]. Journal of Bacteriology, 1985, 163(1): 111-120.

[11] POHL S, BHAVSAR G, HULME J, BLOOR AE, MISIRLI G, LECKENBY MW, RADFORD DS, SMITH W, WIPAT A, WILLIAMSON ED, HARWOOD CR, CRANENBURGH RM. Proteomic analysis of *Bacillus subtilis* strains engineered for improved production of heterologous proteins[J]. Proteomics, 2013, 13(22): 3298-3308.

[12] YAN X, YU HJ, HONG Q, LI SP. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5556-5562.

[13] MALI P, AACH J, STRANGES PB, ESVELT KM, MOOSBURNER M, KOSURI S, YANG L, CHURCH GM. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 833-838.

[14] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, AMEMURA M, NAKATA A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5429-5433.

[15] JANSEN R, EMBDEN JD, GAASTRA W, SCHOULS LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1565-1575.

[16] MOJICA FJ, DÍEZ-VILLASEÑOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, SORIA E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 60(2): 174-182.
[17] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, RICHARDS M, BOYAVAL P, MOINEAU S, ROMERO DA, HORVATH P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.
[18] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA CM, GONZALES K, CHAO Y, PIRZADA ZA, ECKERT MR, VOGEL J, CHARPENTIER E. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. Nature, 2011, 471(7340): 602-607.
[19] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.
[20] MAKAROVA KS, WOLF YI, ALKHNBASHI OS, COSTA F, SHAH SA, SAUNDERS SJ, BARRANGOU R, BROUNS SJ, CHARPENTIER E, HAFT DH, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA FJ, TERNS RM, TERNS MP, WHITE MF, YAKUNIN AF, GARRETT RA, van der OOST J, BACKOFEN R, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(11): 722-736.
[21] WANG JY, DOUDNA JA. CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning[J]. Science, 2023, 379(6629): eadd8643.
[22] NISHIMASU H, RAN FA, HSU PD, KONERMANN S, SHEHATA SI, DOHMAE N, ISHITANI R, ZHANG F, NUREKI O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA[J]. Cell, 2014, 156(5): 935-949.
[23] TONG Y, WEBER T, LEE SY. CRISPR/Cas-based genome engineering in natural product discovery[J]. Natural Product Reports, 2019, 36(9): 1262-1280.
[24] KOONIN EV, MAKAROVA KS, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 37: 67-78.
[25] HU JH, MILLER SM, GEURTS MH, TANG W, CHEN L, SUN N, ZEINA CM, GAO X, REES HA, LIN Z, LIU DR. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. Nature, 2018, 556(7699): 57-63.
[26] WALTON RT, CHRISTIE KA, WHITTAKER MN, KLEINSTIVER BP. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants[J]. Science, 2020, 368(6488): 290-296.
[27] ZALATAN JG, LEE ME, ALMEIDA R, GILBERT LA, WHITEHEAD EH, La RUSSA M, TSAI JC, WEISSMAN JS, DUEBER JE, QI LS, LIM WA. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds[J]. Cell, 2015, 160(1/2): 339-350.
[28] DOUDNA JA, CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. Science, 2014, 346(6213): 1258096.
[29] 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.
[30] MATSOUKAS IG. Commentary: programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. Frontiers in Genetics, 2018, 9: 21.
[31] ANZALONE AV, GAO XD, PODRACKY CJ, NELSON AT, KOBLAN LW, RAGURAM A, LEVY JM, MERCER JAM, LIU DR. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(5): 731-740.
[32] KOBLAN LW, ARBAB M, SHEN MW, HUSSMANN JA, ANZALONE AV, DOMAN JL, NEWBY GA, YANG D, MOK B, REPLOGLE JM, XU A, SISLEY TA, WEISSMAN JS, ADAMSON B, LIU DR. Efficient C•G-to-G•C base editors developed using CRISPRi screens, target-library analysis, and machine learning[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(11): 1414-1425.
[33] LIU Z, LU Z, YANG G, HUANG S, LI G, FENG S, LIU Y, LI J, YU W, ZHANG Y, CHEN J, SUN Q, HUANG X. Efficient generation of mouse models of human diseases *via* ABE- and BE-mediated base editing[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 2338.
[34] 宗媛, 高彩霞. 碱基编辑系统研究进展[J]. 遗传, 2019, 41(9): 777-800.
ZONG Y, GAO CX. Progress on base editing systems[J]. Hereditas, 2019, 41(9): 777-800 (in Chinese).
[35] 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.
[36] 刘尧, 周先辉, 黄舒泓, 王小龙. 引导编辑: 突破碱基编辑类型的新技术[J]. 遗传, 2022, 44(11): 993-1008.
LIU Y, ZHOU XH, HUANG SH, WANG XL. Prime editing: a search and replace tool with versatile base changes[J]. Hereditas, 2022, 44(11): 993-1008 (in Chinese).
[37] ZHENG K, WANG Y, LI N, JIANG FF, WU CX, LIU F, CHEN HC, LIU ZF. Highly efficient base editing in bacteria using a Cas9-cytidine deaminase fusion[J]. Communications Biology, 2018, 1: 32.
[38] WANG Y, CHENG H, LIU Y, LIU Y, WEN X, ZHANG K, NI X, GAO N, FAN L, ZHANG Z, LIU J, CHEN J, WANG L, GUO Y, ZHENG P, WANG M, SUN J, MA Y. *In-situ* generation of large numbers of genetic combinations for metabolic reprogramming *via* CRISPR-guided base editing[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 678.
[39] ALTENBUCHNER J. Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(17): 5421-5427.
[40] PETERS JM, COLAVIN A, SHI H, CZARNY TL, LARSON MH, WONG S, HAWKINS JS, LU CHS, KOO BM, MARTA E, SHIVER AL, WHITEHEAD EH, WEISSMAN JS, BROWN ED, QI LS, HUANG KC, GROSS CA. A comprehensive, CRISPR-based functional

analysis of essential genes in bacteria[J]. Cell, 2016, 165(6): 1493-1506.
[41] SO Y, PARK SY, PARK EH, PARK SH, KIM EJ, PAN JG, CHOI SK. A highly efficient CRISPR-Cas9-mediated large genomic deletion in *Bacillus subtilis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1167.
[42] TOYMENTSEVA AA, ALTENBUCHNER J. New CRISPR-Cas9 vectors for genetic modifications of *Bacillus* species[J]. FEMS Microbiology Letters, 2019, 366(1): fny284.
[43] LU Z, YANG S, YUAN X, SHI Y, OUYANG L, JIANG S, YI L, ZHANG G. CRISPR-assisted multi-dimensional regulation for fine-tuning gene expression in *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(7): e40.
[44] PRICE MA, CRUZ R, BRYSON J, ESCALETTES F, ROSSER SJ. Expanding and understanding the CRISPR toolbox for *Bacillus subtilis* with MAD7 and dMAD7[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(6): 1805-1816.
[45] WU Y, LIU Y, LV X, LI J, DU G, LIU L. CAMERS-B: CRISPR/Cpf1 assisted multiple-genes editing and regulation system for *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(6): 1817-1825.
[46] HAO W, SUO F, LIN Q, CHEN Q, ZHOU L, LIU Z, CUI W, ZHOU Z. Design and construction of portable CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in *Bacillus subtilis* 168 oriented toward multiple utilities[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 524676.
[47] YU S, PRICE MA, WANG Y, LIU Y, GUO Y, NI X, ROSSER SJ, BI C, WANG M. CRISPR-dCas9 mediated cytosine deaminase base editing in *Bacillus subtilis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(7): 1781-1789.
[48] KIM MS, KIM HR, JEONG DE, CHOI SK. Cytosine base editor-mediated multiplex genome editing to accelerate discovery of novel antibiotics in *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus polymyxa*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 691839.
[49] HAO W, CUI W, SUO F, HAN L, CHENG Z, ZHOU Z. Construction and application of an efficient dual-base editing platform for *Bacillus subtilis* evolution employing programmable base conversion[J]. Chemical Science, 2022, 13(48): 14395-14409.
[50] YU W, JIN K, WU Y, ZHANG Q, LIU Y, LI J, DU G, CHEN J, LV X, LEDESMA-AMARO R, LIU L. A pathway independent multi-modular ordered control system based on thermosensors and CRISPRi improves bioproduction in *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(11): 6587-6600.
[51] FERRANDO J, FILLUELO O, ZEIGLER DR, PICART P. Barriers to simultaneous multilocus integration in *Bacillus subtilis* tumble down: development of a straightforward screening method for the colorimetric detection of one-step multiple gene insertion using the CRISPR-Cas9 system[J]. Microbial Cell Factories, 2023, 22(1): 21.
[52] ZHU X, LUO H, YU X, LV H, SU L, ZHANG K, WU J. Genome-wide CRISPRi screening of key genes for recombinant protein expression in *Bacillus subtilis*[J]. Advanced Science, 2024, 11(33): e2404313.
[53] MAO C, ZHENG H, CHEN Y, YUAN P, SUN D. Development of a type I-E CRISPR-based programmable repression system for fine-tuning metabolic flux toward D-pantothenic acid in *Bacillus subtilis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2024, 13(8): 2480-2491.
[54] WESTBROOK AW, REN X, MOO-YOUNG M, CHOU CP. Engineering of cell membrane to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(1): 216-231.
[55] JAKUTYTE-GIRAITIENE L, GASIUNAS G. Design of a CRISPR-Cas system to increase resistance of *Bacillus subtilis* to bacteriophage SPP1[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(8): 1183-1188.
[56] SCHILLING T, DIETRICH S, HOPPERT M, HERTEL R. A CRISPR-Cas9-based toolkit for fast and precise *in vivo* genetic engineering of *Bacillus subtilis* phages[J]. Viruses, 2018, 10(5): 241.
[57] ZHANG K, DUAN X, WU J. Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27943.
[58] BURBY PE, SIMMONS LA. MutS2 promotes homologous recombination in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 199(2): e00682-16.
[59] CAI MZ, CHEN PT. Novel combined Cre-Cas system for improved chromosome editing in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2021, 132(2): 113-119.
[60] WESTBROOK AW, MOO-YOUNG M, CHOU CP. Development of a CRISPR-Cas9 tool kit for comprehensive engineering of *Bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(16): 4876-4895.
[61] LIM H, CHOI SK. Programmed gRNA removal system for CRISPR-Cas9-mediated multi-round genome editing in *Bacillus subtilis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1140.
[62] 刘丁玉 . 枯草芽孢杆菌启动子文库和CRISPR-Cas9n基因组编辑技术的建立与应用[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2019.
LIU DY. Establishment and application of promoter library and CRISPR-Cas9n mediated genome editing for *Bacillus subtilis*[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2019 (in Chinese).
[63] WU Y, CHEN T, LIU Y, LV X, LI J, DU G, LEDESMA-AMARO R, LIU L. CRISPRi allows optimal temporal control of N-acetylglucosamine bioproduction by a dynamic coordination of glucose and xylose metabolism in *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 232-241.
[64] DONG C, FONTANA J, PATEL A, CAROTHERS JM, ZALATAN JG. Author correction: synthetic CRISPR-Cas gene activators for transcriptional reprogramming in bacteria[J]. Nature Communications, 2018, 9: 4318.
[65] CHEN Q, WANG B, PAN L. Efficient expression of γ-glutamyl transpeptidase in *Bacillus subtilis via* CRISPR/Cas9n and its immobilization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 149.

[66] ZHAO X, CHEN X, XUE Y, WANG X. Development of an efficient iterative genome editing method in *Bacillus subtilis* using the CRISPR-AsCpf1 system[J]. Journal of Basic Microbiology, 2022, 62(7): 824-832.
[67] BOUMEZBEUR AH, BRUER M, STOECKLIN G, MACK M. Rational engineering of transcriptional riboswitches leads to enhanced metabolite levels in *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2020, 61: 58-68.
[68] LIU D, HUANG C, GUO J, ZHANG P, CHEN T, WANG Z, ZHAO X. Development and characterization of a CRISPR/Cas9n-based multiplex genome editing system for *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 197.
[69] WU Y, LI Y, JIN K, ZHANG L, LI J, LIU Y, DU G, LV X, CHEN J, LEDESMA-AMARO R, LIU L. CRISPR-dCas12a-mediated genetic circuit cascades for multiplexed pathway optimization[J]. Nature Chemical Biology, 2023, 19(3): 367-377.
[70] 陈玉林, 刘功炜, 杨雨鑫, 公涵萱, 崔雯元. 一株无特定抗性基因枯草芽孢杆菌及应用: CN116396915B[P]. 2023-10-31.
CHEN YL, LIU GW, YANG YX, GONG HX, CUI WY. A strain of *Bacillus subtilis* without specific resistance gene and its application: CN116396915B[P]. 2023-10-31 (in Chinese).
[71] 崔雯元. 白蚁源枯草芽孢杆菌的生物学特性与绒山羊饲喂效果研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2024.
CUI WY. Study on biological characteristics of *Bacillus subtilis* from termite and feeding effect of cashmere goats[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2024 (in Chinese).
[72] LIU G, GONG H, TANG H, MENG Z, WANG Z, CUI W, ZHANG K, CHEN Y, YANG Y. Enhanced lignocellulose degradation in *Bacillus subtilis* RLI2019 through CRISPR/Cas9-mediated chromosomal integration of ternary cellulase genes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 306(Pt3): 141727.
[73] 公涵萱. 基于CRISPR/Cas9技术增强枯草芽孢杆菌纤维素降解能力的研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2024.
Gong HX. Study on enhancing cellulose degradation ability of *Bacillus subtilis* based on CRISPR/Cas9 technology[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2024 (in Chinese).
[74] 杨雨鑫, 陈玉林, 刘功炜, 公涵萱, 崔雯元. 一株共表达多元纤维素酶基因的枯草芽孢杆菌及其构建方法与应用: CN117264861B[P]. 2024-02-20.
YANG YX, CHEN YL, LIU GW, GONG HX, CUI WY. A *Bacillus subtilis* strain expressing multiple cellulase genes and its construction method and application: CN117264861B[P]. 2024-02-20 (in Chinese).
[75] LIU Y, CHENG H, LI H, ZHANG Y, WANG M. A programmable CRISPR/Cas9 toolkit improves lycopene production in *Bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2023, 89(6): e0023023.