



毕赤酵母胞嘧啶碱基编辑器的设计与功能评价

张小鹃^{1,2}, 胡暄², 刘曦雨², 沈跃峰³, 王仲泉³, 张晓鹏^{2*}

1 安徽大学物质科学与信息技术研究院, 安徽 合肥 230601

2 军事医学研究院, 北京 100071

3 南湖实验室, 浙江 嘉兴 314002

张小鹃, 胡暄, 刘曦雨, 沈跃峰, 王仲泉, 张晓鹏. 毕赤酵母胞嘧啶碱基编辑器的设计与功能评价[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 3784-3792.

ZHANG Xiaojuan, HU Xuan, LIU Xiyu, SHEN Yuefeng, WANG Zhongxiao, ZHANG Xiaopeng. Design and function evaluation of cytosine base editors in *Pichia pastoris*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 3784-3792.

摘要:【目的】在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中建立一套分子靶向突变系统, 为毕赤酵母的基因工程改造提供高效的编辑工具。【方法】基于规律成簇的间隔短回文重复序列/Cas9 核酸酶(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 nuclease, CRISPR/Cas9)技术, 设计并构建 nCas9 与胞苷脱氨酶融合表达的胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE), 并选择酵母基因组中富含碱基 C 的一段序列作为靶标以评价 CBE 的碱基编辑功能。电转化酵母后, 利用高通量测序技术分析 CBE 的编辑效率及编辑模式, 并进一步探究连接肽长度、融合蛋白相对位置和 gRNA 靶向序列(即 spacer)长度等因素对 CBE 功能的影响。【结果】nCas9 与 PmCDA1 融合组成的 CBE 能够实现毕赤酵母基因组碱基 C 的高效编辑。当连接肽长度为 (GGGS)₁₀ 时, CBE 的编辑效率最高, 编辑窗口位于前间隔序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)远端的 C20–C14 之间, 其中 C18 的编辑效率可达 85.1%。nCas9 与 PmCDA1 相对位置的改变对 CBE 的编辑效率和编辑模式的影响不大。而 gRNA 靶向序列长度影响着 CBE 的编辑效率, 且 gRNA 靶向序列长度不能低于 17 nt, 但 19–23 nt 之间均可引导 CBE 对基因组的高效编辑。【结论】本研究在巴斯德毕赤酵母中构建了一套具有高效碱基编辑活性的胞嘧啶碱基编辑器, 为基于毕赤酵母的基础和应用研究提供了工具支持。

关键词: 巴斯德毕赤酵母; CRISPR/Cas9; 胞嘧啶碱基编辑器

资助项目: 国家自然科学基金(82173787)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82173787).

*Corresponding author. Tel: +86-10-66948865, E-mail: zxp8565@aliyun.com

Received: 2023-02-10; Accepted: 2023-04-27; Published online: 2023-05-08

Design and function evaluation of cytosine base editors in *Pichia pastoris*

ZHANG Xiaojuan^{1,2}, HU Xuan², LIU Xiyu², SHEN Yuefeng³, WANG Zhongxiao³, ZHANG Xiaopeng^{2*}

1 Institute of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

2 Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

3 Nanhu Laboratory, Jiaxing 314002, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] A targeted mutation system was established in *Pichia pastoris* to provide an efficient editing tool for genetic engineering. [Methods] A cytosine base editor (CBE) was designed with nCas9 derived from the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 nuclease (CRISPR/Cas9) system and a cytosine deaminase PmCDA1. A cytosine-rich sequence in the yeast genome was selected as the target to validate the CBE activity. High-throughput sequencing was employed to analyze the editing efficiency and mode of the CBE. Furthermore, we explored how factors such as the length of linker peptides, the relative position of fusion proteins, and the length of gRNA targeting sequence affect the CBE function. [Results] The CBEs established by the fusion of nCas9 and PmCDA1 were capable of editing the cytosine in the *P. pastoris* genome. The highest editing efficiency was achieved with a linker peptide of (GGGGS)₁₀, and the editing window was located between C20 and C14 at the distal end of the protospacer adjacent motif. The window location at C18 achieved the maximum editing efficiency of 85.1%. Changes in the relative position of nCas9 and PmCDA1 had minor effects on the editing efficiency and modes of CBEs. However, the length of gRNA targeting sequence affected the editing efficiency of CBEs and cannot be shorter than 17 nt. The gRNA targeting sequences of 19–23 nt were capable of guiding CBEs to edit the genome. [Conclusion] This study establishes a set of CBEs with high editing efficiency in *P. pastoris*, which serves as a solid foundation for further genetic engineering.

Keywords: *Pichia pastoris*; CRISPR/Cas9; cytosine base editor

近年来, 规律成簇的间隔短回文重复序列/Cas9 核酸酶(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 nuclease, CRISPR/Cas9) 技术的开发极大地促进了基因工程的开展^[1-3]。该技术可通过在靶点处产生 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)而诱发细胞内修复途径, 以实现 DNA 的敲除、替换、插入等修饰。然而, DSB 引发的 DNA 修复很难实现高效稳定的单碱基突变。基于 CRISPR/Cas9 系统所衍生

的 CRISPR-碱基编辑器是一种能够实现精准单碱基突变的技术, 一般由 CRISPR 相关蛋白、脱氨酶和 gRNA 3 个组件构成, 因此能够结合 CRISPR 系统的精准定位能力以及脱氨酶的高效催化能力。以胞嘧啶碱基编辑器为例, 胞苷脱氨酶与 CRISPR 相关蛋白(如 nCas9、dCas9)融合后与 gRNA 形成复合物, 该复合物在 gRNA 的引导下, 靶向基因组特定位点, 将非互补链上的胞嘧啶(cytosine, C)脱氨基形成尿嘧啶(uracil, U),

再通过胞内 DNA 修复机制形成胸腺嘧啶 (thymine, T), 最终实现由碱基 C 到 T 的转换^[4]。

CRISPR-碱基编辑器已广泛应用于酿酒酵母的基因组工程, 在酿酒酵母的基因调控、功能基因组学、代谢工程等领域发挥重要作用, 如构建高质量基因突变文库改造合成生物学细胞工厂、调节细胞内外源基因的表达提高生物药产量等^[5-7]。这些研究突出了基于 CRISPR-碱基编辑器基因工程改造方法的潜力, 并为其他重要但缺少编辑工具的酵母物种的改造提供参考依据。巴斯德毕赤酵母是一种可以利用甲醇高效表达外源蛋白的真核表达系统。由于毕赤酵母具有生产成本低、发酵周期短、外源基因遗传稳定、翻译后修饰等与高等生物接近的优势, 所以其作为底盘细胞在外源蛋白生产应用方面具有巨大的潜力^[8-9]。但毕赤酵母基因工程的发展和应用研究也因缺乏多样化的基因编辑手段而受到限制^[10]。

为了在巴斯德毕赤酵母中建立胞嘧啶碱基编辑器并对其碱基编辑功能进行评价, 我们通过将 nick 形式的 Cas9 [nCas9 (D10A)] 和胞苷脱氨酶 PmCDA1 融合, 成功在毕赤酵母基因组引发碱基 C 到 T 的高效突变。此外, 我们发现融合 nCas9 和脱氨酶 2 个组分的连接肽以及 gRNA 靶向序列的长度对胞嘧啶碱基编辑器的编辑效率和编辑模式均有较大的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 由本实验室保存; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP 10 购自天根生化科技(北京)有限公司。YPD (1%酵母粉, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖)培养基用于酵母细胞的常规培养, YPDS 培养基(1%酵母粉, 2%蛋白胨, 2%葡萄糖, 1 mol/L 山梨醇)和 MD 培养基[(2%葡萄糖, 1.34%酵母氮源(YNB)]

用于酵母突变菌株的筛选。LB 培养基(0.5%酵母粉, 1%蛋白胨, 1%氯化钠)和 LLB 培养基(0.5%酵母粉, 1%蛋白胨, 0.5%氯化钠)用于大肠杆菌的培养。固体培养基需额外补加 2%琼脂粉, 作为筛选标记, 氨苄青霉素(ampicillin, A+)浓度为 100 mg/L, 博莱霉素(zeocin, Z+)浓度为 100 mg/L。

限制性内切酶、连接酶及去磷酸化酶购自 NEB 公司; KOD FX Neo 购自 TOYOBO 公司; 同源重组试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; 核酸回收试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司; 蛋白胨和酵母粉购自 OXOID 公司; 琼脂粉购自北京索莱宝科技有限公司; 琼脂糖和山梨醇购自 SIGMA 公司; 氨苄青霉素购自 SAITONC 公司; 博莱霉素购自 Invitrogen 公司; 其他化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。电穿孔仪 (GenePulser Xcell) 和 PCR 仪 (C1000 Touch) 购自 Bio-Rad 公司。除特别注明外, 基因序列合成及测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。本研究用全部引物如表 1 所示。

1.2 胞嘧啶碱基编辑器 (cytosine base editor, CBE) 表达质粒的设计与构建

来源七鳃鳗的胞苷脱氨酶 PmCDA1₁₋₂₀₈ 的氨基酸序列获取自 NCBI (GenBank No. ABO15149.1)。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used for this study

Primers	Sequences (5'→3')
GAP1-F	CGTCGCTGGCAATAATAGCG
CYC1-R	CCTTCCTTTTCGGTTAGAGC
TC-F	CGGTGTAACCAAATTTAGAGT
TC-R	ATGAACTTGAGAATTTGAGGGTA
TC-F2	AGTTCCCAGAATGTGCAAC
TC-R2	CCCGAACGTGTTATTCAACT
choose-F1	CTAATCTAAGGGGCGATCTG
choose-F2	AGTAAGCTCGTCTCAGATCTTAAG
3'AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC

将酵母密码子优化后的胞苷脱氨基酶 PmCDA1 的序列融合在 nCas9 的 N 端, 二者通过 GGGGS 连接肽连接以构建 CBE 融合表达质粒。(GGGGS)_n-PmCDA1 片段由北京中美泰和生物技术有限公司合成, 点突变 nCas9 (D10A) 片段由质粒 pGAP-Cas9 (本实验室保存) 扩增获得。通过同源重组的方式, 构建得到融合表达质粒 pGAP-PmCDA1-(GGGGS)₂-nCas9、pGAP-PmCDA1-(GGGGS)₅-nCas9、pGAP-PmCDA1-(GGGGS)₈-nCas9、pGAP-PmCDA1-(GGGGS)₁₀-nCas9 和 pGAP-nCas9-(GGGGS)₁₀-PmCDA1。

1.3 gRNA 重组表达质粒的构建

本研究采用双质粒系统。经过筛选, 选择毕赤酵母基因组上位于 XM_002490399.1 上的一段富含碱基 C 的序列, 设计构建了 15 条含不同长度靶向序列(14–28 nt)的 gRNA 表达质粒, 如表 2 所示。利用同源重组方法, 将 gRNA 靶向序列克隆到 pTEF-gRNA 表达载体(本实验室保存)上, 经测序确认得到构建正确的 15 条 gRNA 重组表达质粒, 分别命名为 TC-14–TC-28。

表 2 不同长度靶向序列的 gRNA

Table 2 Different target sequence lengths of gRNA

gRNA length (nt)	Target sequences (5'→3')
14	CTCCCGCCACCTTC
15	TCTCCCGCCACCTTC
16	CTCTCCCGCCACCTTC
17	TCTCTCCCGCCACCTTC
18	CTCTCTCCCGCCACCTTC
19	TCTCTCTCCCGCCACCTTC
20	CTCTCTCTCCCGCCACCTTC
21	TCTCTCTCTCCCGCCACCTTC
22	CTCTCTCTCTCCCGCCACCTTC
23	CCTCTCTCTCTCCCGCCACCTTC
24	TCCTCTCTCTCTCCCGCCACCTTC
25	TTCCTCTCTCTCTCCCGCCACCTTC
26	CTTCCTCTCTCTCTCCCGCCACCTTC
27	GCTTCCTCTCTCTCTCCCGCCACCTTC
28	AGCTTCCTCTCTCTCTCCCGCCACCTTC

1.4 酵母感受态的制备及电转化

挑取 YPD 平板上单菌落到 4 mL YPD 培养基中, 于 30 °C、220 r/min 条件下培养 24 h 后转接 2 mL 至 200 mL YPD 培养基。待 OD₆₀₀ 为 1.0–1.5 时离心 5 min, 收集菌体。使用预冷的无菌水重悬、离心洗涤 2 次(5 min/次), 用预冷的 1 mol/L 山梨醇重悬、离心洗涤 1 次(10 min), 弃上清。所有离心条件为 4 °C、2 000×g。最后用预冷的 1 mol/L 山梨醇后轻轻重悬细胞并定容至 1.0–1.5 mL 备用, 此即为酵母感受态细胞。

取 80 μL 感受态细胞与 20 μL 线性化质粒充分混匀后转移至电转杯中, 冰浴 5 min, 于电穿孔仪 2 kV、5 ms 下电击 1 次, 立即加入预冷的 1 mol/L 山梨醇轻轻混匀, 并涂布于具相应筛选的培养基平板中, 30 °C 培养直至单克隆出现。

1.5 CBE 重组菌株的构建

CBE 融合表达质粒经 *Nhe* I 限制性内切酶进行线性化, 参照 1.4 的方法将线性化质粒电转入 GS115 酵母菌, 使用 MD 平板筛选阳性克隆, 通过引物 GAP1-F/CYC1-R 进行菌落 PCR 鉴定, 经测序确认后获得 CBE 重组菌株。本文共设计构建了 5 种 CBE, 分别命名为 CBE1–CBE5。

1.6 CBE 功能的验证

参照 1.4 的方法将靶向序列长度为 20 nt 的 TC-20 电转至 CBE 中, 以评价 CBE1–CBE4 的碱基编辑功能。经 YPDS Z+ 固体平板筛选阳性克隆, 并挑取阳性克隆, 进行扩增与靶向序列区域互补的目标序列, 通过 Sanger 测序和高通量测序(>1 000 个克隆), 评价 CBE 的碱基编辑效率及编辑模式。高通量测序选用 NovaSeq PE150 平台, 测序由苏州泓迅生物科技股份有限公司完成。为便于讨论, 将靶向序列中离前间隔序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)序列最远的碱基定义为第 20 位碱基, 如该处碱基为 C 则以 C20 表示。

2 结果与分析

2.1 不同长度连接肽对 CBE 的影响

本部分成功构建了 4 种含不同长度连接肽的 CBE1–CBE4 以及用于评价 CBEs 功能的 TC-20 (图 1A)。高通量测序结果表明, CBE1 无编辑活性, CBE2–CBE4 的有效编辑窗口均为 PAM 基序远端的 C20–C14 位, 其中 C18 位编辑效率最高 (图 1B–1D)。连接肽的长度对 CBE 的编辑效率有较大影响。以 C18 位为例, 在该位置上, 随着 (GGGGS)_n 长度增加, CBE 编辑效率增大。CBE2 在 C18 位置上的编辑效率为 30%, CBE3 的编辑

效率为 73.2%, 而 CBE4 的编辑效率高达 85.1%。测序结果表明, 除了主要发生 C 到 T 突变, 部分碱基 C 被编辑为碱基 G/A, 其中 C 到 G 的编辑模式所占比例较多。我们发现, 在 CBE2 中, C20–C14 位上 C 到 G 的编辑占总编辑的 17.9%, CBE3 中占 14.3%, 而 CBE4 中仅有 4.8%。以上结果说明, 我们成功在毕赤酵母中构建了 CBE 编辑器, 且 10 个 GGGGS 的连接肽进行融合蛋白的连接较为合适 (图 1B–1D)。此外, 连接肽的长度不仅影响 CBE 的编辑效率, 还影响了 CBE 的编辑模式, 当 PmCDA1 融合在 nCas9 的 N 端时, C 到 G 的编辑效率随着连接肽长度缩短而增加。

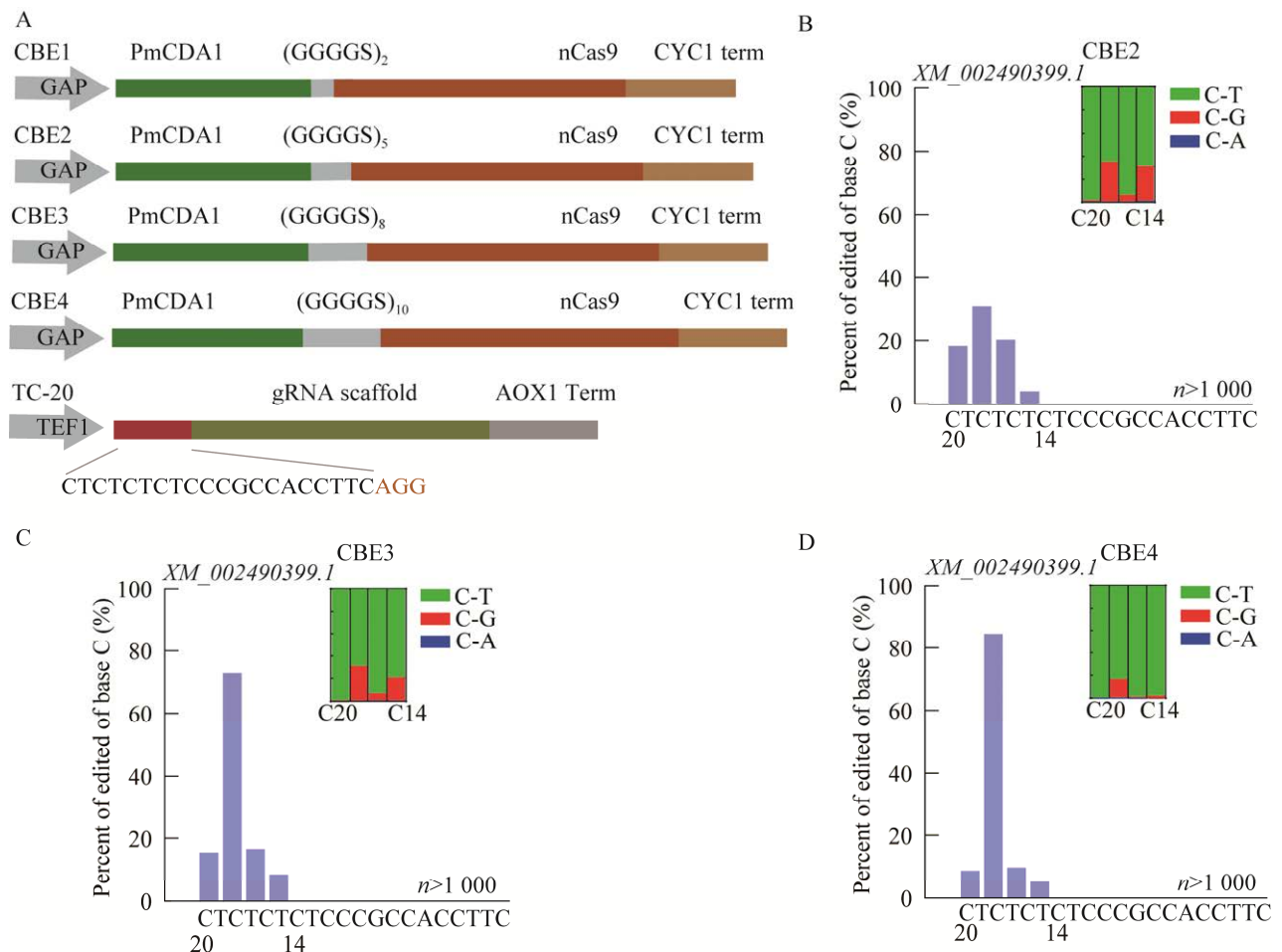


图 1 CBE 碱基编辑器的设计与评价

Figure 1 Design and evaluation of the CBE. Construction of CBE1–CBE4 and gRNA expression plasmid (A); Next generation sequencing (NGS) sequencing results of CBE2 (B), CBE3 (C), and CBE4 (D).

2.2 融合蛋白相对位置对 CBE 的影响

随后我们进一步探究了 nCas9 和 PmCDA1 融合时的相对位置对 CBE 功能的影响。在前面工作的基础上, 我们将 PmCDA1 融合在 nCas9 的 C 端, 并采用(GGGGS)₁₀ 连接肽连接, 构建得到 CBE5 (图 2A), 同样选取 TC-20 评价 CBE5 的编辑效率及编辑模式。高通量测序结果显示, CBE5 有效编辑窗口同样为 PAM 基序远端的 C20-C14 位, 且 C18 位的编辑效率同样是最高的, 可达 82.6% (图 2B), 这与 PmCDA1 位于 nCas9 N 端的 CBE4 编辑效率基本一致(85.1%, 图 1D)。在 CBE5 中, C20-C14 位上也有部分碱基 C 被编辑为碱基 G/A, 其中 C 到 G 的编辑占总编辑的 26.1%。以上结果表明, PmCDA1 融合在 nCas9 的 C 端时, CBE 的编辑效率及编辑窗口与 PmCDA1 位于 nCas9 N 端的 CBE4 相比变化不大, 但是碱基 C 到 G 的编辑占总编辑的概率(26.1%)比 CBE4 (4.8%)大幅增加。研究表明, PmCDA1 构建的 CBE 在某些位点将碱基 C 到 G

的突变频率与胞嘧啶位置有关, 因此 PmCDA1 与靶标距离靠近时, 细胞中修复的偏好变成了碱基 G, 从而导致在 CBE5 中 C 到 G 的编辑效率增大。

2.3 gRNA 靶向序列长度对 CBE 的影响

研究表明, gRNA 的靶向序列长度影响 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑效率^[11]。为了验证 gRNA 靶向序列长度是否影响 CBE 碱基编辑器在毕赤酵母中碱基编辑活性, 本研究设计了 15 条含不同长度靶向序列的 gRNA (表 2, 图 3A)并评价了它们对编辑效率和窗口接近、仅融合蛋白相对位置不同的 CBE4 和 CBE5 的影响。Sanger 测序结果显示, gRNA 靶向序列等于或低于 16 nt 时, CBE4/5 均失去编辑活性; gRNA 靶向序列为 17-18 nt 时, CBE4 C18 位的编辑效率仅为 40%, 编辑窗口为 PAM 远端 C20-C16 位, 而 CBE5 C18 位的编辑效率为 80%, 编辑窗口为 PAM 远端 C20-C14 位; gRNA 靶向序列为 19-23 nt 时, CBE4/5 C18 位的编辑效率均达 80%-100%, 编

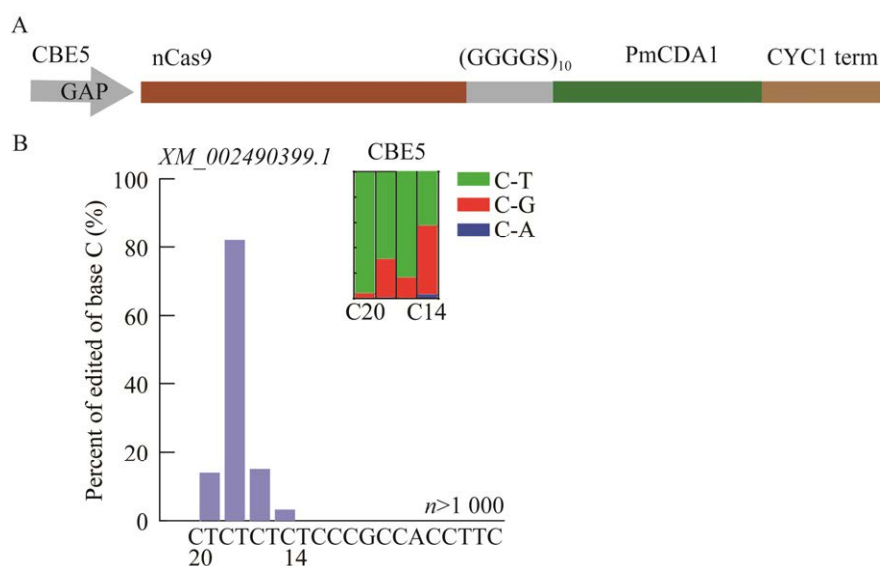


图 2 改变融合蛋白位置的碱基编辑器设计与评价

Figure 2 Design and evaluation of the base editor with different fusion. A: Construction of CBE5. B: NGS sequencing results of CBE5.

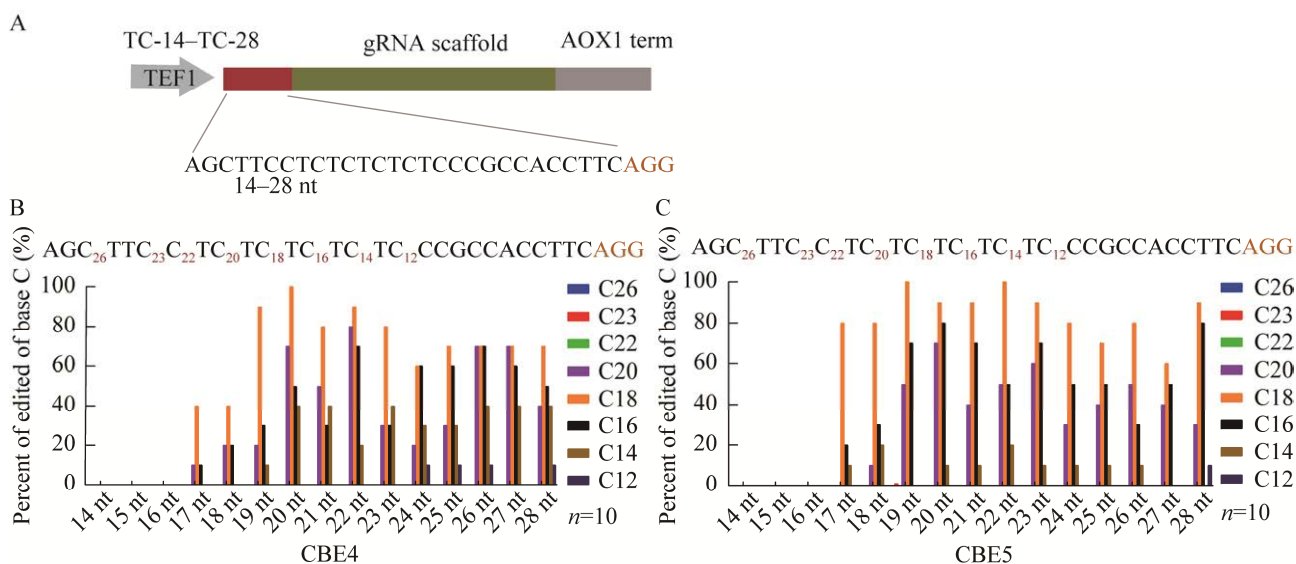


图3 GRNA 靶向序列长度对 CBE 的影响

Figure 3 Influence of the gRNA target sequence length on CBE. Construction of TC-gRNA with length between 14–28 NT (A); Sanger sequencing results of gRNA target sequence length between 14–28 nt on CBE4 (B) and CBE5 (C).

辑窗口为 PAM 远端 C20–C14 位(图 3B、3C)。gRNA 靶向序列为 24–28 nt 时，CBE4 和 CBE5 碱基编辑器中 C18 位的编辑效率稍低于 20 nt，编辑窗口为 PAM 远端 C20–C12 位(图 3B、3C)。以上结果表明，对于毕赤酵母胞嘧啶碱基编辑器而言，当 gRNA 靶向序列大于 17 nt 时才有编辑活性，gRNA 靶向序列在 19–23 nt 时，CBE 编辑效率最高；此外，gRNA 靶向序列对 CBE 的编辑窗口范围影响不大，但会影响不同位置 C 的编辑效率。

3 讨论与结论

本研究成功建立了高效的毕赤酵母胞嘧啶碱基编辑器，并评价了 CBE 的设计要素对其编辑功能的影响。本研究设计的 CBE，其编辑窗口大多位于 PAM 基序远端 C20–C14 位，C18 位的编辑效率最高。

连接肽在两个功能蛋白的融合中发挥着重要的作用^[12]。本研究表明，在毕赤酵母中，CBE

需要足够长的 GGGGS 连接肽进行 nCas9 和 PmCDA1 二者之间的连接，才能保证较高的编辑效率。目前在 CRISPR 碱基编辑器中应用最多的为 16 个氨基酸残基的 XTEN 连接肽，该连接肽可有效的平衡融合蛋白之间的功能活性^[13-15]。而相对于 XTEN 连接肽而言，我们使用的 GGGGS 连接肽则更具柔性^[16]，似乎需要更长的氨基酸残基以平衡 nCas9 和 PmCDA1 的功能。此外，文献报道融合蛋白相对位置的改变会对 Cas 蛋白的功能造成影响^[17]，但本研究将 PmCDA1 分别融合到 nCas9 的两端，CBE 均具有高效的编辑效率。这可能是由于足够长的 GGGGS 连接肽，可允许两个蛋白的位置变换而不影响 CBE 的编辑效率。本研究发现，GGGGS 的长度可能影响碱基 C 到 G 的编辑效率，且当 PmCDA1 融合在 nCas9 的 C 端时，碱基 C 到 G 的概率有所增加，这对于酵母基因进化的多样性具有重要的意义。

研究发现，gRNA 靶向序列长度的缩短可降

低脱靶效率,但降低到一定程度后编辑效率便大大降低,甚至失去编辑活性^[18]。一般研究通用的 gRNA 的靶向序列设置为 20 nt^[19],本研究结果证明了在毕赤酵母中,当 gRNA 靶向序列低于 17 nt 时,CBE 无编辑活性,当 gRNA 靶向序列为 17–18 nt 时,CBE 编辑效率低于 gRNA 靶向序列为 20 nt 时。而当 gRNA 长度为 19–23 nt 时,CBE 均具有较高的编辑效率。此外,在 CBE 中胞苷脱氨酶能利用细胞内修复机制将胞嘧啶 C 脱氨后最终转换成胸腺嘧啶 T,而胞嘧啶 C 脱氨后胞内发生的非同源随机修复机制会导致胞嘧啶 C 有一定概率转换为鸟嘌呤 G 和腺嘌呤 A,由此实现基因组中碱基 C 到 G/A 的转变^[20]。碱基 C 到 G/A 突变概率的增加不仅为菌种改造及外源蛋白随机进化的多样性创造了更多的可能,还为碱基 C 到 G 的新型碱基编辑器开发提供新的实验思路^[21]。

近年来,CRISPR-碱基编辑器在细胞、原核生物、动植物中的基因编辑与改造中得到了广泛应用和快速发展^[22-23],但其在毕赤酵母上的研究鲜有报道。本研究所建立的高效胞嘧啶碱基编辑器,为毕赤酵母提供了一套快速、便捷的遗传操作工具,从而加快基于毕赤酵母的药物筛选和外源蛋白表达等研究进程,同时也为其他新型编辑器在毕赤酵母中的建立奠定了基础。

参考文献

- [1] ZHANG HM, QIN CH, AN CM, ZHENG XW, WEN SX, CHEN WJ, LIU XF, LV ZH, YANG PC, XU W, GAO W, WU YY. Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 126.
- [2] RAVI NS, WIENERT B, WYMAN SK, BELL HW, GEORGE A, MAHALINGAM G, VU JT, PRASAD K, BANDLAMUDI BP, DEVARAJU N, RAJENDIRAN V, SYEDBASHA N, PAI AA, NAKAMURA Y, KURITA R, NARAYANASAMY M, BALASUBRAMANIAN P, THANGAVEL S, MAREPALLY S, VELAYUDHAN SR, et al. Identification of novel HPFH-like mutations by CRISPR base editing that elevate the expression of fetal hemoglobin[J]. *eLife*, 2022, 11: e65421.
- [3] MODELL AE, LIM D, NGUYEN TM, SREEKANTH V, CHOUDHARY A. CRISPR-based therapeutics: current challenges and future applications[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2022, 43(2): 151-161.
- [4] DOMAN JL, RAGURAM A, NEWBY GA, LIU DR. Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 620-628.
- [5] SCHWARTZ C, CURTIS N, LÖBS AK, WHEELDON I. Multiplexed CRISPR activation of cryptic sugar metabolism enables *Yarrowia lipolytica* growth on cellobiose[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(9): e1700584.
- [6] DEANER M, HOLZMAN A, ALPER HS. Modular ligation extension of guide RNA operons (LEGO) for multiplexed dCas9 regulation of metabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(9): e1700582.
- [7] LIAN JZ, HAMEDIRAD M, HU SM, ZHAO HM. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1688.
- [8] BAGHBAN R, FARAJNIA S, GHASEMI Y, MORTAZAVI M, ZARGHAMI N, SAMADI N. New developments in *Pichia pastoris* expression system, review and update[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2018, 19(6): 451-467.
- [9] SCHWARZHANS JP, LUTTERMANN T, GEIER M, KALINOWSKI J, FRIEHS K. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(6): 681-710.
- [10] REES HA, LIU DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(12): 770-788.
- [11] HANNA RE, DOENCH JG. Design and analysis of CRISPR-Cas experiments[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 813-823.
- [12] DING YW, LU CZ, ZHENG Y, MA HZ, JIN J, JIA B, YUAN YJ. Directed evolution of the fusion enzyme for improving astaxanthin biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2022, 8(1): 46-53.
- [13] SCHELLENBERGER V, WANG CW, GEETHING NC, SPINK BJ, CAMPBELL A, TO W, SCHOLLE MD,

- YIN Y, YAO Y, BOGIN O, CLELAND JL, SILVERMAN J, STEMMER WPC. A recombinant polypeptide extends the *in vivo* half-life of peptides and proteins in a tunable manner[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(12): 1186-1190.
- [14] ANZALONE AV, RANDOLPH PB, DAVIS JR, SOUSA AA, KOBLAN LW, LEVY JM, CHEN PJ, WILSON C, NEWBY GA, RAGURAM A, LIU DR. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [15] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [16] CHEN HY, WU BG, ZHANG TX, JIA JR, LU J, CHEN Z, NI Z, TAN TW. Effect of linker length and flexibility on the *Clostridium thermocellum* esterase displayed on *Bacillus subtilis* spores[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 182(1): 168-180.
- [17] LI C, ZONG Y, WANG YP, JIN S, ZHANG DB, SONG QN, ZHANG R, GAO CX. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion[J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 1-9.
- [18] FU YF, SANDER JD, REYON D, CASCIO VM, JOUNG JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(3): 279-284.
- [19] PAUL HM, INSTANTO DD, HELDENBRAND J, HUDSON ME. CROPSR: an automated platform for complex genome-wide CRISPR gRNA design and validation[J]. *BMC Bioinformatics*, 2022, 23(1): 74.
- [20] NISHIDA K, ARAZOE T, YACHIE N, BANNO S, KAKIMOTO M, TABATA M, MOCHIZUKI M, MIYABE A, ARAKI M, HARA KY, SHIMATANI Z, KONDO A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems[J]. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729.
- [21] WENINGER A, FISCHER JE, RASCHMANOVÁ H, KNIELY C, VOGL T, GLIEDER A. Expanding the CRISPR/Cas9 toolkit for *Pichia pastoris* with efficient donor integration and alternative resistance markers[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119(4): 3183-3198.
- [22] CHEN LW, PARK JE, PAA P, RAJAKUMAR PD, PREKOP HT, CHEW YT, MANIVANNAN SN, LEONG CHEW W. Programmable C:G to G:C genome editing with CRISPR-Cas9-directed base excision repair proteins[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1384.
- [23] LIANG F, ZHANG Y, LI L, YANG YX, FEI JF, LIU YM, QIN W. SpG and SpRY variants expand the CRISPR toolbox for genome editing in zebrafish[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 3421.