

CRISPR/Cas 基因编辑和表达调控工具箱在放线菌中的应用

丁金艳^{1,2}, 亓慧^{2,3}, 王猛^{2*}, 张玥^{2*}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 低碳合成工程生物学全国重点实验室 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 天津农学院 食品科学与生物工程学院, 天津 300384

丁金艳, 亓慧, 王猛, 张玥. CRISPR/Cas 基因编辑和表达调控工具箱在放线菌中的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 1736-1750.

DING Jinyan, Qi Hui, WANG Meng, ZHANG Yue. CRISPR/Cas toolkit for gene editing and expression regulation in actinomycetes[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 1736-1750.

摘 要: 放线菌是一类具有强大次级代谢能力的微生物, 对放线菌菌株进行理性改造, 对提升其天然产物的生产能力具有重要意义。CRISPR/Cas 系统因具有高效性、易操作性和良好的靶向精确性, 已成为放线菌基因改造和功能研究的重要工具。本文从工作原理、系统构建、适用场景等角度对放线菌中的各类 CRISPR/Cas 基因编辑及表达调控工具进行了汇总和比较, 包括基于 DNA 双链断裂的 CRISPR/Cas 系统、CRISPR 干扰系统、CRISPR 激活系统, 以及 CRISPR 碱基编辑系统。同时, 本文还总结了这些工具在放线菌天然产物生物合成方面的应用情况。CRISPR/Cas 工具箱在放线菌中的开发和应用, 极大地推动了放线菌微生物学和天然产物相关的研究。

关键词: CRISPR/Cas 系统; 放线菌; CRISPR 干扰; CRISPR 激活; 碱基编辑

CRISPR/Cas toolkit for gene editing and expression regulation in actinomycetes

DING Jinyan^{1,2}, Qi Hui^{2,3}, WANG Meng^{2*}, ZHANG Yue^{2*}

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 State Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 College of Food Science and Bioengineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China

Abstract: Actinomycetes are a class of microorganisms with robust secondary metabolism.

资助项目: 国家自然科学基金(32200043); 中国科学院青年创新促进会(2023187)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32200043) and the Youth Innovation Promotion Association of the Chinese Academy of Sciences (2023187).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Yue, zhangy@tib.cas.cn; WANG Meng, wangmeng@tib.cas.cn

Received: 2024-11-01; Accepted: 2025-01-03; Published online: 2025-01-06

Rationally engineering actinomycete strains to enhance their production of natural products is of significant importance. The CRISPR/Cas system, known for its high efficiency, ease of operation, and excellent targeting precision, has become a vital tool for genetic modification and functional studies in actinomycetes. This article provides a comprehensive overview and comparison of various CRISPR/Cas tools for gene editing and expression regulation in actinomycetes, including DNA double-strand break-based CRISPR/Cas systems, CRISPR interference systems, CRISPR activation systems, and CRISPR base editing systems. In addition, this article summarizes the applications of these tools in the biosynthesis of natural products in actinomycetes. The development and application of the CRISPR/Cas toolkit in actinomycetes have greatly promoted the research of microbiology and natural products of actinomycetes.

Keywords: CRISPR/Cas system; actinomycetes; CRISPR interference; CRISPR activation; base editing

放线菌是一类广泛分布于土壤、海洋等自然环境中的革兰氏阳性丝状细菌,它们在次级代谢过程中能够产生丰富的具有生物活性的天然产物,包括红霉素^[1]、四环素^[2]等抗细菌药物,金褐霉素^[3]、两性霉素^[4]等抗真菌药物,阿霉素^[5]、博来霉素^[6]等抗癌药物,以及阿维菌素^[7]、多杀菌素^[8]等杀虫药物等。放线菌的这种强大的生产次级代谢产物的能力,赋予了其重要的经济和科学价值。因此,对放线菌菌株进行理性改造以提升其高附加值天然产物的生物合成能力,一直是科学界和工业界的研究热点。

实现放线菌基因组的可控精准编辑需要依靠高效的基因编辑技术。传统的基因插入与删除方法依赖于双交换重组^[9],由于其操作周期长且成功率低,难以满足多基因位点改造和大批量工程菌株的构建需求。近 10 年来,CRISPR/Cas 技术的崛起,为放线菌底盘内的基因编辑和基因调控提供了一系列更为便捷和高效的工具。这一技术的发展不仅为放线菌遗传学研究开辟了新的可能,也加速了放线菌工程菌株的构建和相关天然产物生物合成的研究进程。本文将对放线菌中应用各类 CRISPR/Cas 基因编辑和表达调控工具进行综合汇总和比

较,并介绍这些工具在放线菌天然产物生物合成方面的应用情况。

1 CRISPR/Cas 系统及其作用机制

CRISPR/Cas 系统是原核生物的一种适应性免疫系统,广泛存在于约 47% 的细菌基因组和 87% 的古细菌基因组中^[10]。该系统通过识别 DNA 中的原间隔序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)来实现核酸靶向防御,从而区分“自我”与“非自我”^[11]。在遭受噬菌体攻击后,宿主细菌能够将一小段外源 DNA 作为新的间隔序列整合到自身基因组中,从而在遭遇二次入侵时进行特异性切割^[12]。CRISPR/Cas 系统是通过 Cas 蛋白与 CRISPR RNA (crRNA) 形成的复合物来发挥功能的,其中 crRNA 可以引导复合物定位到靶基因,而 Cas 蛋白可以发挥核酸内切酶活性对外源 DNA 进行切割,产生双链断裂(double-strand break, DSB)^[13]。在这之后,生物体可以通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或者同源重组修复(homology directed repair, HDR)途径修复产生 DSB 的基因组 DNA,从而存活下来(图 1)。

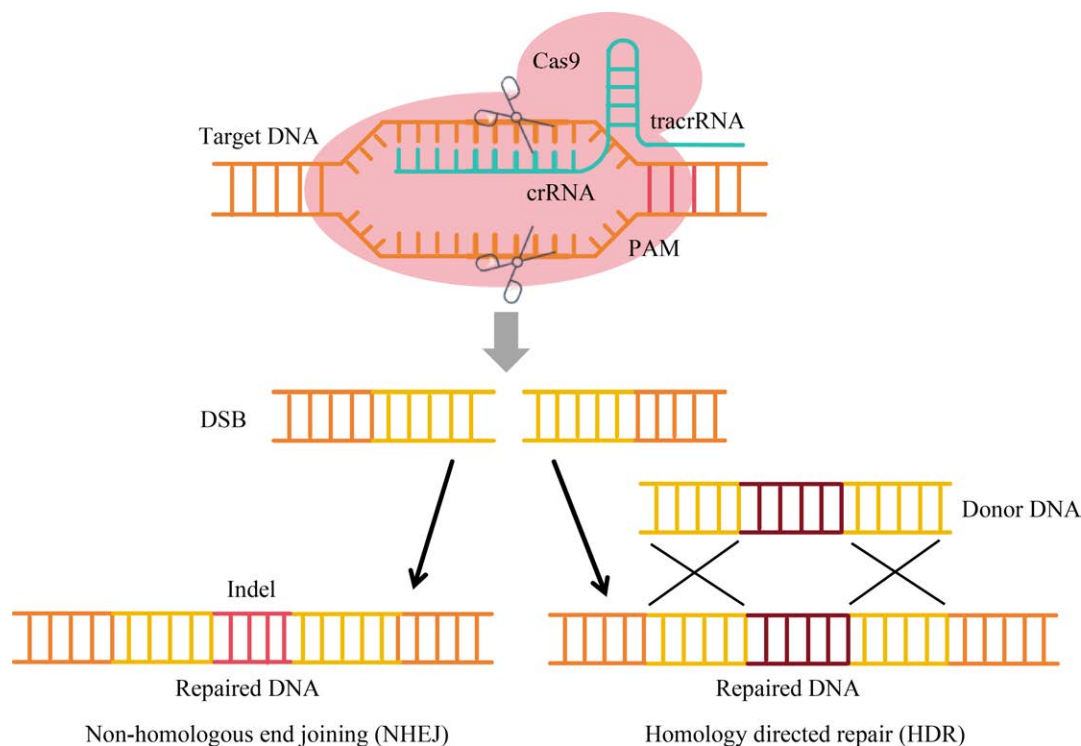


图1 CRISPR/CAS9 系统切割目标 DNA 及 DSB 修复的原理

Figure 1 Mechanisms of CRISPR/Cas9-mediated genome editing and DSB repair.

1.1 Cas 蛋白

Cas 蛋白是 CRISPR/Cas 系统发挥功能的核心元件。根据 Cas 蛋白的结构和功能, CRISPR/Cas 系统可以分为 2 大类(Class I 和 Class II), 并进一步被划分为 6 种小类(I-VI 型)和 33 个亚型^[10,14-15]。Class I 系统由多个蛋白亚基组成效应复合体共同发挥功能, 包括 I 型、III 型和 IV 型。与此相对, Class II 系统仅需 1 个多功能的单一蛋白即可发挥功能, 包含 II 型、V 型和 VI 型。Class II 系统的 Cas 蛋白整合了 crRNA 成熟和靶序列切割的功能, 因其便捷性而被更多地开发为基因编辑工具, 如来源于化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 II 型 SpCas9^[16], 以及来源于弗朗西斯杆菌新种 (*Francisella tularensis* subsp. *novicida*) U112 的 V 型 FnCpf1 (Cas12a)^[17], 前者可切割 DNA 产生平直末端, 而后者则产生黏性末端。此外, 不同物种来源的 CRISPR/Cas 系统所识别的

PAM 序列具有显著差异, 其中 II 型的 SpCas9 识别的 PAM 为 5'-NGG-3' (N 为任意核苷酸)^[18], 由于其富含 GC 碱基对, 因此更适合应用于放线菌等高 GC 物种的基因组编辑。

1.2 CRISPR 序列

CRISPR 序列通常包括前导序列 (lead sequence)、重复序列 (interval sequence) 和间隔序列 (repeat sequence), 其中后二者交替排列形成 CRISPR 基因座 (CRISPR array)。SpCas9 系统是由双重 RNA 引导发挥作用的: 首先, 前导序列可以启动转录过程并合成 crRNA 前体 (pre-crRNA) 和与之互补配对的反式激活 CRISPR RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)。随后, 在 tracrRNA 启动下, Cas 蛋白和核酸酶会加工 pre-crRNA 得到成熟的 crRNA^[13]。最终, Cas 蛋白会与 tracrRNA、crRNA 形成复合物, 继而识别靶序列并实现特异性切割。在基因编辑工具的开发过程中, 此方法可以用于多个靶基因

的同时编辑。有时, tracrRNA 和 crRNA 可以组合表达为一条向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 与前者相比, 这种方法更简单、靶向效率更高且多用于单基因的编辑^[19]。与 Cas9 不同, Cas12a 系统是由单一 RNA 引导的核酸内切酶系统, 仅需 crRNA 参与^[20], 因此在实验方案的设计中具有更大的便捷性。

1.3 NHEJ 和 HDR 修复机制

在指定的基因位点引入 DSB 是基因编辑的第 1 步, 而基因编辑的成功与否还依赖于细胞选择的 DNA 修复途径。Cas 核酸内切酶通过 2 个核酸酶结构域 HNH (作用于互补链) 和 RuvC (作用于非互补链) 来诱导 DSB^[21]。当 DNA 发生断裂时, 细胞可以通过 NHEJ 或 HDR 途径来修复 DSB。在利用 NHEJ 途径进行 DNA 修复的过程中, DNA 切割位点可能会随机发生小的插入或缺失, 这种修复方式在 DNA 聚合酶和核酸酶的作用下, 增加了产生基因突变的可能性, 编辑结果不可预测。相比之下, HDR 需要将供体 DNA 同源重组至切割位点, 编辑结果可预期, 是一种更为精确的修复机制, 可用于靶基因的精准编辑(图 1)。

2 放线菌中的 CRISPR/Cas 基因编辑和表达调控工具箱

基于 CRISPR/Cas 系统原理在放线菌中构建的基因编辑和表达调控工具箱通常包括 4 类, 即基于 DSB 的 CRISPR/Cas 系统、CRISPR 干扰系统(CRISPR interference, CRISPRi)、CRISPR 激活系统(CRISPR activation, CRISPRa)以及 CRISPR 碱基编辑系统(CRISPR base editing, CRISPR/BE) (图 2)。这几类 CRISPR/Cas 工具在工作原理、系统构建、实现功能和应用场景上均有不同。

2.1 基于 DSB 的 CRISPR/Cas 系统

在表达具有核酸切割活性的 Cas 蛋白时, CRISPR/Cas 系统会在靶序列位置形成 DSB, 并通过后续的 HDR 修复在目标位点上进行精准

的基因插入、敲除和替换。目前在放线菌中使用最多的是 CRISPR/Cas9 系统(图 2A), 包括 pCRISPomyces-1^[22]、pCRISPomyces-2^[22]、pKCCas9dO^[23]、pCRISPR-Cas9^[24]、pWHU2653^[25]以及 pKECas9-sgRNAII-HA^[26]等; 也有少数使用 CRISPR/Cas12a 系统, 如 pKCCpf1^[27]、pYL-kasOp*-FnCas12a1^[28]、pYL-kasOp*-FnCas12a2^[28]等。这些系统均为游离型单质粒编辑系统, 装载所有 CRISPR/Cas 编辑所需的核心元件, 包括 Cas 蛋白表达框、sgRNA (或 crRNA+tracrRNA) 表达框, 以及同源重组修复模板。同时, 质粒多携带温敏型复制子 pSG5 或不稳定的多拷贝复制子 pIJ101 以便后续的质粒去除和迭代编辑。在 CRISPR/Cas9 系统中, 密码子优化过的 cas9 基因会被组成型或诱导型的启动子启动表达, 常用的启动子包括组成型的 *ermE***p* 以及诱导型的 *tipA*p 等。除 pCRISPomyces-1^[22]使用独立表达的 tracrRNA 和 CRISPR array 外, 上述提到的其余 CRISPR/Cas9 系统均使用组成型启动子 (如 *ermE***p*、*j23119p* 等) 表达融合的 sgRNA 以引导 Cas9 蛋白切割目标 DNA。由于链霉菌内源的核酸酶可能无法有效地加工表达出的 pre-crRNA, 因此导致 pCRISPomyces-1 的编辑效率较低^[29], 而大多数表达 sgRNA 的系统可以实现高效的基因编辑。另外, 在稀有放线菌红色糖多孢菌(*Saccharopolyspora erythraea*)菌株中开发的 pKECas9-sgRNAII-HA 系统还使用双 sgRNA 共同靶向同一位点的策略来提高编辑效率^[26]。为拓展 PAM 的多样性, 同时增加 CRISPR/Cas 技术在不同放线菌物种中的可及性, 研究人员还开发了 CRISPR/Cas12a 系统(图 2B), 例如携带 pSG5 复制子的 pKCCpf1^[27]和 pYL-kasOp*-FnCas12a2^[28]系统以及携带 pIJ101 复制子的 pYL-kasOp*-FnCas12a1^[28]系统等。这些系统都通过常用的链霉菌组成型或诱导型启动子表达密码子优化的 cas12a 基因以及特异性的 crRNA 序列。

为了实现精准编辑, CRISPR/Cas 系统所装

载的同源修复模板通常包含目的 DNA 序列以及上下游约 2 kb 的同源臂序列,在某些菌株中也可以使用较短的同源序列(约为 1 kb)^[30]。然而,在 DSB 的修复过程中,NHEJ 和 HDR 这 2 条途径存在竞争关系,如果菌株自身的 NHEJ 修复能力较强,可能导致非定向突变增加,从而降低精准编辑的效率^[31-32]。因此,一方面可以通过开发可诱导的 CRISPR/Cas9-重组酶 A (RecA)系统加强发生 DSB 后的 HDR 过程,提高 CRISPR/Cas 基因组编辑的效率^[33]。另一方面,也可通过抑制菌株内源的 NHEJ 修复过程来间接增加 HDR 的发生概率,从而实现 CRISPR/Cas 系统在目标位点的精准编辑^[34]。在 CRISPR/Cas 系统中整合反筛标签,如 CodA(sm),也可以提高编辑后阳性克隆的获得率以及后续质粒的去除率^[25]。除此之外,有研究表明使用 nCas9 (nickase Cas9)代替 Cas9 构建的 pKCnCas9-sgRNA^{target}-HA^{target} 系统可以显著降低 CRISPR/Cas 系统所造成的细胞毒性,提高转化子存活率,在避免发生 DSB 的同时实现较为高效的基因敲除^[35]。

2.2 CRISPRi 系统和 CRISPRa 系统

CRISPRi 是一种利用无 DNA 切割活性的 Cas 蛋白和 sgRNA 复合物阻断或下调基因表达的方法^[36]。对 SpCas9 核酸酶结构域的研究表明,通过改变 HNH 和 RuvC 结构域(D10A 和 H840A 突变)可以产生催化活性缺失的 Cas9 变体(deactivated Cas9, dCas9)^[13]。该变体虽然失去了内切酶活性,但仍然能够与 sgRNA 形成复合物,并高效地结合到目标 DNA 上^[37]。通常,sgRNA 可以设计在目标基因启动子或增强子处,引导 dCas9 蛋白靶向结合到这些区域,阻止 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)在此处发挥功能,从而抑制下游基因的转录;或设计 sgRNA 令其结合在编码基因内部,以中止转录延伸,从而达到下调基因表达的目的^[38](图 2C)。对于 Cas12a,通过在其 RuvC 结构域的关键催化残基位点处引入点突变(D917A 和 E1006A)^[39],

同样可以获得 DNA 切割功能失活的变体 dCas12a (图 2D)。在 CRISPRi 的基础上,通过将转录激活因子与 dCas 蛋白的 C 端结合,可以实现基因组特定位点的转录激活。在这种情况下,dCas9 与转录激活因子的复合物会特异性结合在靶基因的上游区域,并招募 RNAP 以激活转录,从而增强靶基因的表达^[38](图 2E)。

在放线菌中,已报道的 CRISPRi 系统包括表达 dCas12a 蛋白的 pSETddCpf1,是 Φ C31 整合酶介导的整合型质粒;此系统通过组成型启动子 *ermE***p* 和 *kasO***p* 分别表达 dCas12a 和串联的 crRNA array,可以用于下调多个靶基因的表达^[27]。此外,常见的 CRISPRi 系统还有表达 dCas9 蛋白的 pCRISPR-dCas9^[24]和 pKE-dCas9-sgRNA^[40],均为携带温敏型 pSG5 复制子的游离型质粒。在 CRISPRi 系统中,如果 dCas 蛋白的表达由组成型启动子驱动,在质粒未去除时,系统对于靶基因的表达抑制是持续存在的。近期有研究使用无毒性的 4-异丙基苯甲酸(cumate)为诱导剂的调控系统来表达 dCas 蛋白等核心元件,以构建诱导型的 CRISPRi 系统,可实现对于靶基因转录抑制的可控开关,在多个放线菌菌株中均实现了成功应用^[41-42]。在 CRISPRi 系统的基础上稍加改动,将 dCas 蛋白与蛋白活化结构域融合表达,可稳定转录中间体、增强转录过程,从而构建 CRISPRa 系统。在链霉菌委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)中,研究人员尝试了 RNAP 的 α 亚基 N 端(α NTD)、 ω 亚基以及结合蛋白 RbpA 这 3 种不同的蛋白活化结构域,最终发现 α NTD 与 dCas9 的 C 端融合的 CRISPRa 系统可以成功实现荧光报告基因表达的上调和沉默基因簇的激活^[43]。

2.3 CRISPR/BE 系统

由于 CRISPR/Cas 系统在编辑过程一般会产生产生 DSB,因此具有较强的细胞毒性,且需要高剂量的供体 DNA 模板进行修复才能实现精准编辑。相较而言,CRISPR/BE 系统无需产生 DSB,具有较低的细胞毒性和较高的转化效率。

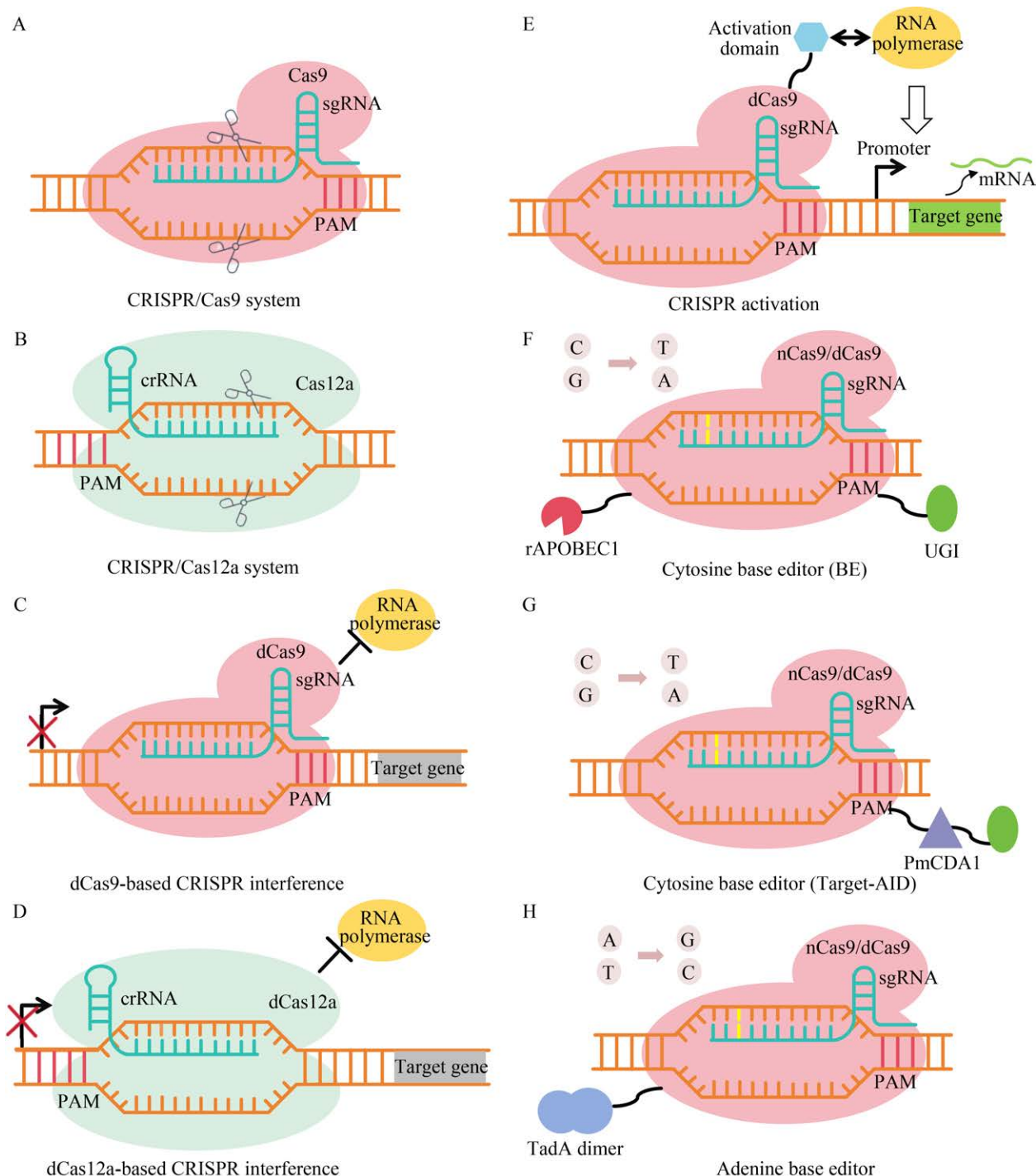


图2 放线菌中不同 CRISPR/Cas 工具的构建方式和工作原理 A: CRISPR/Cas9 系统; B: CRISPR/Cas12a 系统; C: 基于 dCas9 的 CRISPR 干扰系统; D: 基于 dCas12a 的 CRISPR 干扰系统; E: CRISPR 激活系统; F: BE 类型胞嘧啶碱基编辑器; G: Target-AID 类型碱基编辑器; H: 腺嘌呤碱基编辑器。

Figure 2 Construction and functional mechanisms of diverse CRISPR/Cas tools in actinomycetes. A: CRISPR/Cas9 system; B: CRISPR/Cas12a system; C: dCas9-based CRISPR interference system; D: dCas12a-based CRISPR interference system; E: CRISPR activation system; F: Cytosine base editor (BE type); G: Cytosine base editor (Target-AID type); H: Adenine base editor.

并且,此类系统无需供体 DNA 模板也可在特定位点实现精准编辑,可在 5–7 nt 的编辑窗口内实现碱基颠换^[44-46],从而在靶基因内部引入早期终止密码子或造成氨基酸的改变。CRISPR/BE 使用核酸酶催化活性缺陷的 Cas 蛋白,例如 dCas9 (D10A 和 H840A)或 nCas9 (nickase Cas9, D10A 或 H840A),允许在不产生 DSB 的情况下进行编辑^[13,35]。BE 可分为 2 种主要类型:第 1 种是胞嘧啶碱基编辑器^[44](cytosine base editors, CBE),它将 C·G 碱基对转化为 T·A 碱基对。CBE 的构建策略是将胞嘧啶脱氨酶与 dCas9 或 nCas9 蛋白融合,使融合蛋白在 sgRNA 的引导下,对靶位点的 DNA 碱基进行脱氨反应,将胞嘧啶核苷 C 转化成尿嘧啶核苷 U,经历 1 次复制后使得 U 转变为胸腺嘧啶核苷 T^[45](图 2F、2G);第 2 种是腺嘌呤编辑器(adenine base editors, ABE),它将 A·T 碱基对转变为 G·C 碱基对。ABE 由腺苷脱氨酶与 nCas9 蛋白融合组成,通过脱氨化作用将 T·A 转化为 T·I,之后这一变化被 DNA 修复和复制机制识别并转化为 C·G 碱基对^[46](图 2H)。

目前,在放线菌中报道的 CBE 分为 BE 系统(如 CRISPR-cBEST),以及 Target-AID 系统(如 dCas9-CDA-UL_{str}),二者均为携带 pSG5 温敏型复制子的游离型单质粒编辑系统,且以诱导型启动子 *tipAp* 驱动胞苷脱氨酶融合蛋白的表达,以组成型启动子启动 sgRNA 的表达。在 BE 系统中,大鼠来源的胞苷脱氨酶 rAPOBEC1、nCas9 或 dCas9 以及尿嘧啶糖基化酶抑制因子(uracil glycosylase inhibitor, UGI)^[44]融合表达为 rAPOBEC1-nCas9-UGI (BE3)或 rAPOBEC1-dCas9-UGI (BE2)结构(图 2F)。而 Target-AID 系统则融合表达 dCas9、七鳃鳗来源的胞苷脱氨酶 PmCDA1、UGI 和蛋白质降解标签(LVA 标签)^[47-48](图 2G),且 dCas9 位于 PmCDA1 蛋白的 N 端。由于 BE 和 Target-AID 编辑器的结构差异,它们的编辑窗口也略有不同,前者拥有约 7 nt 的编辑窗口,而后的编辑窗口略小,

为 5 nt^[29,48]。在 CRISPR-cBEST 的基础上表达核酸酶 Csy4,基于 Csy4 加工 sgRNA array 所构建的多位点碱基编辑系统 CRISPR-mcBEST,可实现 9 个以上位点的同时编辑^[49]。碱基编辑在不同放线菌菌株中的编辑效率可能存在差异,在变青链霉菌(*Streptomyces lividans*) 66 中通过反义 RNA 策略抑制菌株内源尿嘧啶糖基化酶 UDG 的表达,构建的 asRNA-BE 编辑器可以有效地提高碱基编辑的效率^[50]。

此外,在放线菌中也开发了 ABE,如 CRISPR-aBEST^[51]。在这一系统中,实验室进化的大肠杆菌(*Escherichia coli*)来源的腺苷脱氨酶 ecTadA 经天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) A3(2)密码子优化后与 nCas9 融合表达,且由诱导型启动子 *tipAp* 控制,编辑器拥有约 6 nt 的编辑窗口^[51]。

3 CRISPR/Cas 基因编辑和表达调控工具箱在放线菌中的应用

3.1 基于 DSB 的 CRISPR/Cas 系统在基因组精准改造方面的应用

CRISPR/Cas 系统是强有力的基因编辑工具,可以在放线菌中实现单基因、多基因、基因簇的敲除和替换。CRISPR/Cas 系统在基因敲除方面的应用是最多的。2015 年,赵惠民团队首次将 CRISPR/Cas 技术引入到链霉菌中,利用 CRISPR/Cas9 系统在 *S. lividans*、绿产色链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)、白色链霉菌(*Streptomyces albus*)这 3 种不同的链霉菌中成功实现了 20 bp 至 31 kb 不同长度 DNA 片段的敲除,其中对 31 kb 的 *red* 基因簇的敲除效率可达 100%^[22]。Tong 等^[24]也利用 CRISPR/Cas9 系统敲除了 *S. coelicolor* A3(2)菌株中的 *actI-orf1* 和 *actVB* 基因,从而成功阻断了放线紫红素的生物合成。2016 年,Wolf 等^[52]在稀有放线菌游动放线菌(*Actinoplanes* sp.) SE50/110 中应用 CRISPR/Cas9 系统失活了酪氨酸酶基因 *melC2*,成功阻断了黑色素的生物合成。2017 年,张利

平团队利用 CRISPR/Cas9 系统在龟裂链霉菌 (*Streptomyces rimosus*) 中进行了单、双、多碱基突变以及基因敲除, 成功破坏了 *zwf2* 和 *devB* 基因的表达, 最后获得产量提升 36.8% 的土霉素高产突变株^[53]。2018 年, 芦银华团队利用 CRISPR/Cas12a 系统在 *S. coelicolor* 中同时失活了 ACT 途径中的 *actI-orf1* 基因和 RED 途径中的 *redX* 基因, 使基因工程菌株不再产生蓝色色素放线紫红素和红色色素十一烷基灵菌红素^[27]。2020 年, 李永泉团队在稀有放线菌野野村氏菌属菌株 (*Nonomuraea gerenzanensis*) 中成功建立了诱导型的 CRISPR/Cas9-RecA 系统并利用此系统敲除了 *dbv23* 基因, 与野生型菌株相比, 敲除菌株的 A40926 产量从 150 mg/L 提高至 200 mg/L^[33]。

CRISPR/Cas 技术介导的目标基因、调控元件的敲入和替换在放线菌中也有很多应用实例, 利用此方法可以在放线菌底盘内实现对宿主基因组或目标基因簇的精准改造, 以理性手段提升目标产物的产量^[54]。叶邦策团队利用 CRISPR/Cas9 系统在稀有放线菌红色糖多孢菌中对红霉素生物合成基因簇进行了改造, 通过在 *eryBIV* 和 *eryAI* 基因之间插入双向强启动子 *j23119p-kasOp* 提高了生物合成基因的表达水平, 最终使工程菌株的红霉素产量提高了 58.3%^[40]。类似地, 王猛团队在红色糖多孢菌中进行了基于 CRISPR/Cas9 的启动子工程, 通过在红霉素生物合成基因簇的 4 个位点分别敲入不同强度的启动子, 实现了生物合成限速酶编码基因的原位过表达, 最终成功提升了工程菌株红霉素的产量^[55]。

3.2 基于 DSB 的 CRISPR/Cas 系统在基因克隆方面的应用

直接克隆天然产物的生物合成途径, 以实现其在微生物中的高效重构和异源表达, 已成为天然产物研究和发现的重要策略。借助 CRISPR/Cas 系统可以在基因组任意位置进行精确切割的特性, 一些基因簇克隆及大片段抓取技术在放线菌中得到了发展, 为研究放线菌来源的生物合

成基因簇以及实现其异源表达提供了极大的便利。首先, 基于 CRISPR/Cas 的基因克隆技术在沉默基因簇激活及目标基因功能研究方面发挥着重要的作用。孙宇辉团队将 CRISPR/Cas9 与体外噬菌体包装系统相结合, 用于靶向克隆天然产物生物合成基因簇; 借助此方法, 研究人员分别从硫内酯链霉菌 (*Streptomyces thiolactonus*) NRRL 15439 和伊纽小单孢菌 (*Micromonospora inyoensis*) DSM 46123 中一步克隆了长 27.4 kb 的 Tü3010 基因簇和长 40.7 kb 的 sisomicin 基因簇, 成功实现了它们的异源表达, 并且证明了 *stuR* 基因对 Tü3010 的生物合成具有正调控作用^[56]。Genilloud 团队利用基于 CRISPR/Cas9 的 CATCH 技术捕获了可可链霉菌可可亚种 (*Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*) CA-170360 菌株来源的 *cyp* 基因簇, 并证实了该基因簇包含 2 个独立的 NRPS 基因且负责环肽产物的合成^[57]。

此外, 基于 CRISPR/Cas 的基因克隆技术也极大地助力了放线菌天然产物的发现。赵惠民团队结合 CRISPR/Cas12a 基因编辑和体内 Cre-lox 重组, 开发了 CAPTURE 技术, 成功从放线菌和芽孢杆菌中克隆了 47 个长度在 10–113 kb 之间的生物合成基因簇, 效率高达 100%; 这些基因簇在阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) SUKA17 宿主中的异源表达产生了 15 种新颖的天然产物, 其中 6 种是具有特殊五环碳骨架结构的异源二聚体化合物, 命名为双戊霉素 (bipentaromycins) A-F^[58]。同样基于 CRISPR/Cas12a 系统, 谭高翼团队开发了 CAT-FISHING 技术, 成功克隆了多个放线菌来源的生物合成基因簇, 其中最长的达 145 kb; 从小单孢菌 (*Micromonospora* sp.) 181 中直接克隆的 110 kb 聚酮化合物生物基因簇在链霉菌宿主中成功异源表达, 并产生了 1 个新颖的大环内酰胺类化合物马里诺霉素 A (marinolactam A)^[59]。

3.3 CRISPRi/CRISPRa 系统在放线菌基因表达调控方面的应用

与产生 DSB 的 CRISPR/Cas 技术相比,

CRISPRi 和 CRISPRa 系统仅在目标基因的转录水平上进行调控,不会导致放线菌基因组发生 DNA 水平上的永久性改变。CRISPRi 技术主要应用于靶基因表达水平的下调或沉默,特别是对于无法直接敲除的必需基因,CRISPRi 提供了一种有效的通过调控基因表达来研究基因功能的手段。目前,基于 dCas9 的 CRISPRi 系统在放线菌中已经有较多的应用实例。2015 年, Tong 等^[24]首次开发基于温敏型质粒的 CRISPRi 系统,可以在 *S. coelicolor* 菌株中可逆地下调 *actI*ORF1 基因的表达,展示了此类系统在调控放线菌次级代谢产物生物合成方面的潜力^[24]。2020 年,姜卫红和芦银华团队^[60]将 CRISPRi 系统应用到菌株的代谢调控中,在雷帕链霉菌 (*Streptomyces rapamycinicus*) 中将菌株内源性的群体感应与 CRISPRi 系统进行整合,开发了 EQCi 系统,可以同时多个目的基因进行自主的动态调节。通过下调 3 个关键的代谢节点基因 *fabH3*、*cm2* 和 *gltA2* 的表达,可以在不影响细胞生长的情况下将代谢流更多地导向生物合成方向,最终成功将雷帕毒素的产量提升了约 660%。2023 年, Wezel 团队利用诱导型的 CRISPRi 系统 CUBIC 在 *S. coelicolor* 菌株中敲减了与抗生素生产相关的 *actII-orf4* 基因以及和菌株形态发育相关的 *whiA*、*ftsZ* 和 *ssgB* 基因,均成功在诱导的条件下观测到了抗生素生产和形态分化表型上的改变^[41]。2024 年,储炬团队将诱导型的 CRISPRi 系统应用到了红色糖多孢菌中,用于在高产红霉素的 E3 菌株中动态调控编码琥珀酰 CoA 合成酶 β 亚基的 *sucC* 基因的表达水平,最终显著提高了红霉素的产量^[42]。此外,基于 dCas12a 的 CRISPRi 系统在放线菌中也有一些成功的应用。2018 年,芦银华团队利用整合型 CRISPRi 系统在 *S. coelicolor* 菌株中成功实现了针对多个基因靶点的表达抑制,同时下调了 3 个生物合成基因簇中的关键基因 *redX*、*actI-orf1* 和 *cpkA* 的表达水平^[27]。同样使用整合型的基于 dCas12a 的 CRISPRi 系统,

2022 年夏海洋团队在冰城链霉菌 (*Streptomyces bingchenggensis*) 菌株中成功筛选出影响米尔贝霉素产量的 SARP 家族调控因子中 MilR3,并鉴定了 MilR3 对米尔贝霉素生物合成基因以及负责生产黄色色素的 II 型 PKS 生物合成基因的转录有正向调控作用^[61]。

CRISPRa 系统则可以用于目标基因表达水平的上调,以及激活放线菌中沉默生物合成基因簇的表达,从而产生新颖的次级代谢产物。Chappell 团队在 *S. venezuelae* 菌株中建立了 CRISPRa 技术,并利用此技术上调杰多霉素 B 生物合成基因 *jadJ-V* 操纵子的表达,最终成功实现了生物合成基因簇的激活,并在工程菌株的发酵液中检测到了杰多霉素 B 的生产^[43]。

3.4 CRISPR/BE 系统在放线菌遗传改造方面的应用

CRISPR/BE 系统不引入 DSB,无需添加外源 DNA 模板,可以在基因内部插入早期终止密码子的方式代替基因敲除,同时也可用于氨基酸的替换来构建点突变工程菌株。CRISPR/BE 技术在放线菌中的发展仍处于早期,但近年来也已经有了一些成功应用。2019 年, Tong 等开发了 CRISPR-cBEST 和 CRISPR-aBEST,并成功应用于多个模式和非模式放线菌的基因组编辑,其中在非模式放线菌山丘链霉菌 (*Streptomyces collinus*) Tü365 中实现了 2 拷贝的 *kirN* 基因的同时失活,证明了该工具的实用性^[51]。此外,他们还开发了软件 CRISPy-web2.0,以支持使用“经典” CRISPR 和 CRISPR-BEST 系统中的 sgRNA 设计^[62]。2021 年,王猛团队实现了 BE2 和 BE3 在 *S. lividans* 66 菌株中的应用,并通过改良版的碱基编辑器 asRNA-BE 提高了碱基编辑的效率,同时实现了对于放线紫红素和十一烷基灵菌红素生物合成的干扰^[50]。同年,芦银华团队开发了适用于放线菌的 Target-AID 类型碱基编辑器,在 *S. coelicolor* 菌株中实现了高效的单位点突变,以及双位点和三位点的同时突变,并在工业菌株 *S. rapamycinicus* 中通过引入

2 个早期终止密码子的方式失活了途径特异性抑制子编码基因 *rapS*, 最终将工程菌株的雷帕霉素产量提升了 63.3%^[48]。

此外, 碱基编辑器可以高效的在微生物基因组范围内引入大量突变, 是非常好的研究基因型-表型关联的工具^[63], 但是 PAM 的限制影响了碱基编辑器在放线菌基因组水平上的应用。2024 年, 孙宇辉团队开发了 eSCBE3-NG-Hypa 胞嘧啶单碱基编辑器, 可在链霉菌中识别更广泛

的 NGN PAM 位点, 对高 GC 含量或含有 GC 基序的靶点保持高效的编辑能力, 同时在基因组水平上表现出低脱靶率; 在工业菌株 *S. avermitilis* 中, 研究人员利用此系统失活了 *olm* 基因簇, 阻断了阿维菌素生物合成的竞争途径, 从而增强了前体供应, 成功使工程菌株的阿维菌素 B1a 产量提升了 4.45 倍^[64]。CRISPR/Cas 基因编辑和表达调控工具箱在放线菌中的代表性应用实例见表 1。

表 1 放线菌中应用 CRISPR/Cas 工具箱的代表性实例

Type	Strain	Function	Effect	Reference
CRISPR/Cas9 system	<i>Nonomuraea gerenzanensis</i> sp. ATCC 39727	Gene knockout	Increasing A40926 production from 150 mg/L to 200 mg/L	[33]
	<i>Streptomyces rimosus</i> ATCC 10970	Gene cluster knockout	Increasing oxytetracycline production to 5.2 g/L	[65]
	<i>Nonomuraea gerenzanensis</i>	Gene knockout	Abolishing A40926 production	[66]
	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Gene knock-in	Increasing erythromycin production by 58.3%	[40]
	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Gene knock-in	Increasing erythromycin production by 2.8 to 6.0 times	[55]
	<i>Streptomyces coelicolor</i> M145, <i>Streptomyces roseosporus</i> SW0702	Gene knockout, gene cluster knockout	Knockout efficiencies for single genes, gene clusters, and double genes reached 75%–90%, 75%, and 65%, respectively	[67]
	<i>Streptomyces lividans</i> , <i>Streptomyces viridochromogenes</i> , <i>Streptomyces albus</i>	Gene knockout, gene cluster knockout	Deleting DNA fragments with lengths varying from 20 bp to 31 kb	[22]
	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Gene knockout	Blocking actinorhodin biosynthesis	[24]
	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	Gene knockout	Inhibiting melanin biosynthesis	[52]
	<i>Streptomyces rimosus</i>	Point mutation, gene knockout	Increasing oxytetracycline production by 36.8%	[53]
	<i>Nonomuraea</i> sp. MJM5123	Gene knockout, gene knock-in	Increasing EcuH16 production to 310 mg/L	[68]
	<i>Streptomyces coelicolor</i> M145, <i>Verrucosipora</i> sp. MS100137	Gene cluster knockout, gene knockout	Gene knockout and plasmid curing efficiencies both reached 100%	[69]
	<i>Streptomyces thiolactonus</i> NRRL 15439, <i>Micromonospora inyoensis</i> DSM 46123	Gene cluster cloning	Achieving heterologous expression of Tü3010 and sisomicin gene clusters	[56]
	<i>Streptomyces cacaoi</i> CA-170360, <i>Streptomyces albus</i> J1074	Gene cluster cloning	Achieving heterologous biosynthesis of BE-18257 A–C and pentaminomycins A–H	[57]
	<i>Streptomyces coelicolor</i> M145, <i>Streptomyces rapamycinicus</i>	Gene knockout	The knockout efficiency for single genes, gene clusters, double genes, or double gene clusters reached 87%–100%, 63%–87%, 47%, or 43%, respectively	[35]

(待续)

(续表 1)

Type	Strain	Function	Effect	Reference
CRISPRi based on dCas9	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Downregulation of gene expression	Achieving reversible downregulation of the gene expression of <i>actI/ORF1</i>	[24]
	<i>Streptomyces rapamycinicus</i>	Downregulation of gene expression	Increasing rapamycin production by 660%	[60]
	<i>Streptomyces coelicolor</i> M145, <i>Streptomyces venezuelae</i> , <i>Streptomyces</i> <i>roseosporus</i> , <i>Streptomyces roseofaciens</i>	Downregulation of gene expression	Hindering aerial hyphae and spore development, and blocking the production of the blue and red pigments	[41]
	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL2338	Downregulation of gene expression	Increasing erythromycin production to 756.77 mg/L	[42]
	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Upregulation of gene expression	Activating jadomycin B biosynthesis	[43]
CRISPR/ BE system (CBE)	<i>Streptomyces lividans</i> 66	Point mutation	Blocking the production of the red and blue pigments	[50]
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Point mutation	Achieving multiplex base editing of nine sites	[49]
	<i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>Streptomyces</i> <i>rapamycinicus</i>	Point mutation	Increasing rapamycin production by 63.3%	[48]
CRISPR/ BE system (ABE)	<i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>Streptomyces</i> <i>avermitilis</i>	Point mutation	Increasing avermectin B1a production by 4.45 folds	[64]
	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Point mutation	Achieving A-to-G conversion with lower editing efficiency compared to CRISPR/cBEST-mediated C-to-T conversion	[51]
	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> , <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2), <i>Streptomyces roseosporus</i>	Gene cluster knockout, point mutation, gene insertion	Conferring resistance to streptomycin in the strain	[28]
CRISPR/ Cas12a system	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Gene knockout	Single-gene and double-gene knockout efficiencies achieved 75%–95%	[27]
	<i>Streptomyces bingchengensis</i>	Downregulation of gene expression	Identifying MilR3 as a key regulatory factor affecting milbemycin production	[61]
CRISPRi based on dCas12a				

4 总结与展望

CRISPR/Cas 系统是一类功能多样、操作简便且高效的基因编辑和表达调控工具，可以在短时间内实现对宿主细胞的无痕精准编辑。这类工具的建立和应用，让在放线菌内进行多位点、大片段的高效编辑成为了可能，同时缩短了获得基因改造工程菌株的时间，极大地推动了放线菌微生物学和天然产物相关的研究。但是，在放线菌中应用 CRISPR/Cas 系统仍存在

着一些挑战，例如许多放线菌菌株的同源重组效率较低^[48]且 Cas 核酸酶对于宿主细胞具有毒性，会造成编辑质粒的难转化以及编辑效率低等问题。此外，由于放线菌基因组高 GC 的特性，且在部分基因组位点上可能存在大量重复序列，基于 Cas9 的 CRISPR 系统容易发生脱靶效应^[70]，而基于 Cas12a 的 CRISPR 系统又会存在可用 PAM 受限的问题，从而难以实现基因组水平的编辑。基于生物信息学优化 gRNA 的选

择, 或对 Cas 蛋白进行定向进化或理性优化^[71], 可以有效地降低脱靶水平。同时, 开发识别宽松 PAM 或不依赖 PAM 的 CRISPR/Cas 系统^[72], 以及从不同的微生物物种中挖掘更多新颖的低毒性的 CRISPR 系统^[73-75], 也将大大拓展 CRISPR/Cas 工具箱, 从而推动这一系列工具在放线菌中的应用。

作者贡献声明

丁金艳: 文献收集、初稿写作; 亓慧: 文献收集; 王猛: 监督指导; 张玥: 方案设计、监督指导、经费支持、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有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。

REFERENCES

- [1] ROSS JI, SNELLING AM, CARNEGIE E, COATES P, CUNLIFFE WJ, BETTOLI V, TOSTI G, KATSAMBAS A, GALVAN PERÉZ del PULGAR JI, ROLLMAN O, TÖRÖK L, EADY EA, COVE JH. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe[J]. British Journal of Dermatology, 2003, 148(3): 467-478.
- [2] AGWUH KN, MacGOWAN A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(2): 256-265.
- [3] WEI J, MENG X, WANG Q. Enhanced production of aureofuscin by over-expression of AURJ3M, positive regulator of aureofuscin biosynthesis in *Streptomyces aureofuscus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(4): 322-329.
- [4] LANIADO-LABORÍN R, CABRALES-VARGAS MN. Amphotericin B: side effects and toxicity[J]. Revista Iberoamericana de Micología, 2009, 26(4): 223-227.
- [5] MINOTTI G, MENNA P, SALVATORELLI E, CAIRO G, GIANNI L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity[J]. Pharmacological Reviews, 2004, 56(2): 185-229.
- [6] SERSA G, MIKLAVCIC D, CEMAZAR M, RUDOLF Z, PUCIHAR G, SNOJ M. Electrochemotherapy in treatment of tumours[J]. European Journal of Surgical Oncology(EJSO), 2008, 34(2): 232-240.
- [7] YOON YJ, KIM ES, HWANG YS, CHOI CY. Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 63(6): 626-634.
- [8] DAYAN FE, CANTRELL CL, DUKE SO. Natural products in crop protection[J]. Bioorganic&Medicinal Chemistry, 2009, 17(12): 4022-4034.
- [9] VIERLING S, WEBER T, WOHLLEBEN W, MUTH G. Transcriptional and mutational analyses of the *Streptomyces lividans* recX gene and its interference with RecA activity[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(14): 4005-4011.
- [10] MAKAROVA KS, HAFT DH, BARRANGOU R, BROUNS SJJ, CHARPENTIER E, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA FJM, WOLF YI, YAKUNIN AF, van der OOST J, KOONIN EV. Evolution and classification of the CRISPR-cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 467-477.
- [11] HELER R, SAMAI P, MODELL JW, WEINER C, GOLDBERG GW, BIKARD D, MARRAFFINI LA. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation[J]. Nature, 2015, 519(7542): 199-202.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] KOONIN EV, MAKAROVA KS, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 37: 67-78.
- [15] MAKAROVA KS, WOLF YI, IRANZO J, SHMAKOV SA, ALKHNBASHI OS, BROUNS SJJ, CHARPENTIER E, CHENG D, HAFT DH, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA FJM, SCOTT D, SHAH SA, SIKSNYS V, TERNS MP, VENCLOVASC, WHITE MF, YAKUNIN AF, YAN W, et al. Evolutionary classification of CRISPR-cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(2): 67-83.
- [16] HSU PD, SCOTT DA, WEINSTEIN JA, RAN FA, KONERMANN S, AGARWALA V, LI YQ, FINE EJ, WU XB, SHALEM O, CRADICK TJ, MARRAFFINI LA, BAO G, ZHANG F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 827-832.
- [17] ZETSCHE B, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, SLAYMAKER IM, MAKAROVA KS, ESSLETZBICHLER P, VOLZ SE, JOUNG J, van der OOST J, REGEV A, KOONIN EV, ZHANG F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-cas system[J]. Cell, 2015, 163(3): 759-771.
- [18] MOJICA FJM, DíEZ-VILLASEÑOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, ALMENDROS C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system[J]. Microbiology,

- 2009, 155(Pt 3): 733-740.
- [19] XU T, LI YC, van NOSTRAND JD, HE ZL, ZHOU JZ. Cas9-based tools for targeted genome editing and transcriptional control[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(5): 1544-1552.
 - [20] FAGERLUND RD, STAALS RHJ, FINERAN PC. The Cpf1 CRISPR-Cas protein expands genome-editing tools[J]. *Genome Biology*, 2015, 16: 251.
 - [21] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, SIKSNYS V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(39): E2579-E2586.
 - [22] COBB RE, WANG YJ, ZHAO HM. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(6): 723-728.
 - [23] HUANG H, ZHENG GS, JIANG WH, HU HF, LU YH. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2015, 47(4): 231-243.
 - [24] TONG YJ, CHARUSANTI P, ZHANG LX, WEBER T, LEE SY. CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(9): 1020-1029.
 - [25] ZENG H, WEN SS, XU W, HE ZR, ZHAI GF, LIU YK, DENG ZX, SUN YH. Highly efficient editing of the actinorhodin polyketide chain length factor gene in *Streptomyces coelicolor* M145 using CRISPR/Cas9-CodA(sm) combined system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(24): 10575-10585.
 - [26] LIU Y, WEI WP, YE BC. High GC content Cas9-mediated genome-editing and biosynthetic gene cluster activation in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(5): 1338-1348.
 - [27] LI L, WEI KK, ZHENG GS, LIU XC, CHEN SX, JIANG WH, LU YH. CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(18): e00827-18.
 - [28] ZHANG J, ZHANG D, ZHU J, LIU HY, LIANG SF, LUO YZ. Efficient multiplex genome editing in *Streptomyces* via engineered CRISPR-Cas12a systems[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 726.
 - [29] ALBERTI F, CORRE C. Editing streptomycete genomes in the CRISPR/Cas9 age[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(9): 1237-1248.
 - [30] ZHANG MM, WONG FT, WANG YJ, LUO SW, LIM YH, HENG E, YEO WL, COBB RE, ENGHIAH B, ANG EL, ZHAO HM. CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13: 607-609.
 - [31] MAO ZY, BOZZELLA M, SELUANOV A, GORBUNOVA V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells[J]. *DNA Repair*, 2008, 7(10): 1765-1771.
 - [32] RAN FA, HSU PD, WRIGHT J, AGARWALA V, SCOTT DA, ZHANG F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308.
 - [33] YUE X, XIA TY, WANG S, DONG HJ, LI YQ. Highly efficient genome editing in *N. gorenzanensis* using an inducible CRISPR/Cas9-RecA system[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(9): 1699-1706.
 - [34] YANG H, REN SL, YU SY, PAN HF, LI TD, GE SX, ZHANG J, XIA NS. Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(18): 6461.
 - [35] MA JX, HE WY, HUA HM, ZHU Q, ZHENG GS, ZIMIN AA, WANG WF, LU YH. Development of a CRISPR/Cas9^{D10A} nickase(nCas9)-mediated genome editing tool in *Streptomyces*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(10): 3114-3123.
 - [36] LARSON MH, GILBERT LA, WANG XW, LIM WA, WEISSMAN JS, QI LS. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2180-2196.
 - [37] QI LS, LARSON MH, GILBERT LA, DOUDNA JA, WEISSMAN JS, ARKIN AP, LIM WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
 - [38] BIKARD D, JIANG WY, SAMAI P, HOCHSCHILD A, ZHANG F, MARRAFFINI LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(15): 7429-7437.
 - [39] LEENAY RT, MAKSIMCHUK KR, SLOTKOWSKI RA, AGRAWAL RN, GOMAA AA, BRINER AE, BARRANGOU R, BEISEL CL. Identifying and visualizing functional PAM diversity across CRISPR-cas systems[J]. *Molecular Cell*, 2016, 62(1): 137-147.
 - [40] LIU Y, REN CY, WEI WP, YOU D, YIN BC, YE BC. A CRISPR-Cas9 strategy for activating the *Saccharopolyspora erythraea* erythromycin biosynthetic gene cluster with knock-in bidirectional promoters[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(5): 1134-1143.
 - [41] BAI CX, van WEZEL GP. CUBIC: a versatile cumate-based inducible CRISPRi system in *Streptomyces*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(10): 3143-3147.
 - [42] JIANG X, KE X, TIAN XW, CHU J. An inducible CRISPRi circuit for tunable dynamic regulation of gene expression in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Biotechnology Letters*, 2024, 46(2): 161-172.

- [43] AMERUOSO A, VILLEGAS KCAM MC, COHEN KP, CHAPPELL J. Activating natural product synthesis using CRISPR interference and activation systems in *Streptomyces*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(13): 7751-7760.
- [44] 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.
- [45] HUANG TP, NEWBY GA, LIU DR. Precision genome editing using cytosine and adenine base editors in mammalian cells[J]. *Nature Protocols*, 2021, 16(2): 1089-1128.
- [46] 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.
- [47] BANNO S, NISHIDA K, ARAZOE T, MITSUNOBU H, KONDO A. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(4): 423-429.
- [48] ZHAO YW, TIAN JZ, ZHENG GS, CHEN J, SUN CW, YANG ZY, ZIMIN AA, JIANG WH, DENG ZX, WANG ZJ, LU YH. Multiplex genome editing using a dCas9-cytidine deaminase fusion in *Streptomyces*[J]. *Science China Life Sciences*, 2020, 63(7): 1053-1062.
- [49] WHITFORD CM, GREN T, PALAZZOTTO E, LEE SY, TONG YJ, WEBER T. Systems analysis of highly multiplexed CRISPR-base editing in streptomycetes[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(8): 2353-2366.
- [50] ZHANG Y, YUN KY, HUANG HM, TU R, HUA EB, WANG M. Antisense RNA interference-enhanced CRISPR/Cas9 base editing method for improving base editing efficiency in *Streptomyces lividans* 66[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(5): 1053-1063.
- [51] TONG YJ, WHITFORD CM, ROBERTSEN HL, BLIN K, JØRGENSEN TS, KLITGAARD AK, GREN T, JIANG XL, WEBER T, LEE SY. Highly efficient DSB-free base editing for streptomycetes with CRISPR-BEST[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(41): 20366-20375.
- [52] WOLF T, GREN T, THIEME E, WIBBERG D, ZEMKE T, PÜHLER A, KALINOWSKI J. Targeted genome editing in the rare actinomycete *Actinoplanes* sp. SE50/110 by using the CRISPR/Cas9 System[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 231: 122-128.
- [53] JIA HY, ZHANG LM, WANG TT, HAN J, TANG H, ZHANG LP. Development of a CRISPR/Cas9-mediated gene-editing tool in *Streptomyces rimosus*[J]. *Microbiology*, 2017, 163(8): 1148-1155.
- [54] NEPAL KK, WANG GJ. Streptomycetes: Surrogate hosts for the genetic manipulation of biosynthetic gene clusters and production of natural products[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(1): 1-20.
- [55] ZHANG XM, WANG Y, ZHANG Y, WANG M. CRISPR/Cas9-mediated multi-locus promoter engineering in *ery* cluster to improve erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea*[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(3): 623.
- [56] TAO WX, CHEN L, ZHAO CH, WU J, YAN DZ, DENG ZX, SUN YH. *In vitro* packaging mediated one-step targeted cloning of natural product pathway[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(9): 1991-1997.
- [57] ROMÁN-HURTADO F, SÁNCHEZ-HIDALGO M, MARTÍN J, ORTIZ-LÓPEZ FJ, CARRETERO-MOLINA D, REYES F, GENILLOU O. One pathway, two cyclic non-ribosomal pentapeptides: heterologous expression of BE-18257 antibiotics and pentaminomycins from *Streptomyces cacaoi* CA-170360[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 135.
- [58] ENGHIAID B, HUANG CS, GUO F, JIANG GD, WANG B, TABATABAEI SK, MARTIN TA, ZHAO HM. Cas12a-assisted precise targeted cloning using *in vivo* Cre-lox recombination[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1171.
- [59] LIANG MD, LIU LS, XU F, ZENG XQ, WANG RJ, YANG JL, WANG WS, KARTHIK L, LIU JK, YANG ZH, ZHU GL, WANG SL, BAI LQ, TONG YJ, LIU XT, WU M, ZHANG LX, TAN GY. Activating cryptic biosynthetic gene cluster through a CRISPR-Cas12a-mediated direct cloning approach[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(6): 3581-3592.
- [60] TIAN JZ, YANG GH, GU Y, SUN XQ, LU YH, JIANG WH. Developing an endogenous quorum-sensing based CRISPRi circuit for autonomous and tunable dynamic regulation of multiple targets in *Streptomyces*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(14): 8188-8202.
- [61] YAN YS, YANG YQ, ZHOU LS, ZHANG L, XIA HY. MilR3, a unique SARP family pleiotropic regulator in *Streptomyces bingchenggensis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(10): 631.
- [62] BLIN K, SHAW S, TONG YJ, WEBER T. Designing sgRNAs for CRISPR-BEST base editing applications with CRISPy-web 2.0[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2020, 5(2): 99-102.
- [63] LIU Y, WANG RY, LIU JH, LU H, LI HR, WANG Y, NI XM, LI JW, GUO YM, MA HW, LIAO XP, WANG M. Base editor enables rational genome-scale functional screening for enhanced industrial phenotypes in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Science Advances*, 2022, 8(35): eabq2157.
- [64] WANG J, WANG K, DENG Z, ZHONG ZY, SUN G, MEI Q, ZHOU FL, DENG ZX, SUN YH. Engineered cytosine base editor enabling broad-scope and high-fidelity gene editing in *Streptomyces*[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 5687.
- [65] PŠENIČNIK A, SLEMC L, AVBELJ M, TOME M, ŠALA M, HERRON P, SHMATKOV M, PETEK M, BAEBLERŠ, MRAK P, HRANUELI D, STARČEVIČA, HUNTER IS, PETKOVIČH. Oxytetracycline hyperproduction through targeted genome reduction of *Streptomyces rimosus*[J]. *mSystems*, 2024, 9(5):

- e0025024.
- [66] TIAN L, YAN BY, HUO DD, SUN WH, CUI SF, LI XJ, ZHANG XM, DONG HJ. Establishment of a visual gene knockout system based on CRISPR/Cas9 for the rare actinomycete *Nonomuraea gerenzanensis*[J]. Biotechnology Letters, 2023, 45(3): 401-410.
- [67] JIANG YH, LIU YF, WANG K, ZHOU JY, GUO FZ, ZHAO QW, MAO XM. Fine-tuning Cas9 activity with a cognate inhibitor AcrIIA4 to improve genome editing in *Streptomyces*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(11): 2833-2841.
- [68] SU C, TUAN NQ, LEE MJ, ZHANG XY, CHENG JH, JIN YY, ZHAO XQ, SUH JW. Enhanced production of active ecumicin component with higher antituberculosis activity by the rare actinomycete *Nonomuraea* sp. MJM5123 using a novel promoter-engineering strategy[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(11): 3019-3029.
- [69] WANG QS, XIE F, TONG YJ, HABISCH R, YANG BW, ZHANG LX, MÜLLER R, FU CZ. Dual-function chromogenic screening-based CRISPR/Cas9 genome editing system for actinomycetes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(1): 225-239.
- [70] ZHANG XH, TEE LY, WANG XG, HUANG QS, YANG SH. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering[J]. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2015, 4: e264.
- [71] SU QW, ZHOU M, CHENG C, NIU J. Harnessing the power of directed evolution to improve genome editing systems[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2021, 64: 10-19.
- [72] 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.
- [73] ALTAE-TRAN H, KANNAN S, SUBERSKI AJ, MEARS KS, DEMIRCIOGLU FE, MOELLER L, KOCALAR S, OSHIRO R, MAKAROVA KS, MACRAE RK, KOONIN EV, ZHANG F. Uncovering the functional diversity of rare CRISPR-Cas systems with deep terascale clustering[J]. Science, 2023, 382(6673): eadi1910.
- [74] HUA HM, XU JF, HUANG XS, ZIMIN AA, WANG WF, LU YH. Low-toxicity and high-efficiency *Streptomyces* genome editing tool based on the miniature type V-F CRISPR/cas nuclease AsCas12f1[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(10): 5358-5367.
- [75] TAN L, HENG E, LEONG CY, NG V, YANG LK, SEOW DCS, KODURU L, KANAGASUNDARAM Y, NG SB, PEH G, LIM YH, WONG FT. Application of Cas12j for *Streptomyces* editing[J]. Biomolecules, 2024, 14(4): 486.