

## · 底层技术开发 ·

王猛 博士，中国科学院天津工业生物技术研究所研究员、博士生导师。研究方向为合成生物学、高通量自动化技术等。领导团队建立的高通量编辑与筛选平台实验室初步实现软、硬件装备和生物技术的整合，建立高通量自动化合成生物改造技术体系，完成大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌等多种模式合成生物的高通量自动化改造，最大通量达到 9 000 位点/月以上。在 *Nat Commun*、*Sci Adv*、*Trends Biotechnol*、*ACS Catal*、*Metab Eng* 等国际一流期刊上发表 38 篇文章，申请专利 12 项。



# 工程菌种自动化高通量编辑与筛选研究进展

涂然<sup>1,2,3#</sup>，毛雨丰<sup>1,2#</sup>，刘叶<sup>1,2</sup>，程海娇<sup>1,2</sup>，袁伟<sup>1,2</sup>，于思礼<sup>1,2</sup>，潘文嘉<sup>1,2</sup>，安晶晶<sup>1,2</sup>，王猛<sup>1,2</sup>

1 中国科学院天津工业生物技术研究所，天津 300308

2 国家合成生物技术创新中心，天津 300308

3 重庆工商大学 环境与资源学院，重庆 400067

涂然，毛雨丰，刘叶，程海娇，袁伟，于思礼，潘文嘉，安晶晶，王猛. 工程菌种自动化高通量编辑与筛选研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(11): 4162-4179.

TU R, MAO YF, LIU Y, CHENG HJ, YUAN W, YU SL, PAN WJ, AN JJ, WANG M. Advances in automated high-throughput editing and screening of engineered strains. Chin J Biotech, 2022, 38(11): 4162-4179.

**摘要：**合成生物学 (synthetic biology) 与经典生物学研究的革命性区别之一是合成生物学能将生物实验的对象、方法、技术和流程高度标准化和模块化，创建出自动化与高通量的合成生物铸造模式。该模式通过复杂生物过程与自动化设施的结合，颠覆过往劳动密集型的研究范式，获得更高的技术迭代能力，极大促进了合成生物学的发展和产业化应用。值此天津工业生物技术研究所创立 10 周年之际，本文回顾了研究所在工业菌种自动化高通量编辑与筛选领域的系列重要工作进展，对基因克隆 (gene cloning)、基因组编辑 (genome editing)、编辑序列设计 (editing sequence design) 等生物技术的自动化实

**Received:** July 27, 2022; **Accepted:** September 8, 2022

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100201, 2021YFC2103302); National Natural Science Foundation of China (32101186); Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-PTJS-003, TSBICIP-KJGG-006)

**Corresponding author:** WANG Meng. E-mail: wangmeng@tib.cas.cn

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study

**基金项目：**国家重点研发计划 (2021YFC2100201, 2021YFC2103302); 国家自然科学基金 (32101186); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目 (TSBICIP-PTJS-003, TSBICIP-KJGG-006)

现,以及流式细胞、液滴微流控、全基因组规模扰动测序等高通量筛选技术进行了分析讨论,并展望了本领域未来的发展方向。望借此为创建具有自主知识产权的优秀菌种及其产业应用提供智能化、自动化和全链条覆盖的整体支撑能力。

**关键词:** 工程菌种; 自动化基因编辑; 高通量筛选技术; 生物铸造厂

## Advances in automated high-throughput editing and screening of engineered strains

TU Ran<sup>1,2,3#</sup>, MAO Yufeng<sup>1,2#</sup>, LIU Ye<sup>1,2</sup>, CHENG Haijiao<sup>1,2</sup>, YUAN Wei<sup>1,2</sup>, YU Sili<sup>1,2</sup>, PAN Wenjia<sup>1,2</sup>, AN Jingjing<sup>1,2</sup>, WANG Meng<sup>1,2</sup>

1 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

3 College of Environmental and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

**Abstract:** One of the revolutionary features of synthetic biology is that the standardization and modularization of biological experimental objects, methods, technologies and processes can be combined with various software and hardware to forge into an automated high-throughput synthetic biology biofoundry. Disrupting the conventional labor-intensive research paradigm, biofoundry represents a novel research paradigm with highly enhanced technical iteration capabilities, and remarkably promotes the development and industrial applications of synthetic biology. On the occasion of the 10th anniversary of the founding of Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, this review summarized a series of important achievements in the field of automated high-throughput editing and screening of industrial strains. These achievements range from automated editing technologies such as gene cloning, genome editing, and editing sequence design, to high-throughput screening technologies such as fluorescence activated cell sorting, fluorescence activated droplet sorting, and genome-scale gene perturb sequencing. Moreover, we prospected future development of this field, hoping to provide overall support for intelligent, automated and full chain integrated creation of excellent industrial strains with intellectual property rights.

**Keywords:** engineered strains; automated gene editing; high-throughput screening; biofoundries

利用人工设计的微生物细胞工厂将可再生资源高效转化目标化合物的新一代化学品制造模式,已成为当今世界经济可持续发展的重要战略驱动力<sup>[1]</sup>。根据世界经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)预测,到2030年约有35%的化学品和其他工业产品来自生物制造。但是

由于细胞代谢的高度复杂性及人工细胞理性设计能力的缺失,目前仍然需要进行长期、反复的人工实验试错,才能逐步将工程菌种的化学品合成能力(产品产量、得率与生产速率)提升至有商业竞争力的水平。

然而,海量的工程化试错实验将远远超出传统的劳动密集型研究范式的能力范畴,因此

亟需一种变革型工程化研究平台。近年来国内外数十个研究机构已搭建或者正在搭建自动化合成生物铸造厂(或工程化基础设施/云端实验室)<sup>[2-3]</sup>,旨在提升合成生物实验对象、方法、技术和流程的标准化和模块化水平,实现海量工程试错的自动化闭环运行,从而实现具有高通量、低成本、多循环特性的“设计-构建-测试-学习”(design-build-test-learn, DBTL)的合成生物系统创制技术能力。2019年,“全球合成生物设施联盟”(Global Biofoundry Alliance, GBA)于日本神户成立,旨在加强设施间的协作沟通,共同应对自动化合成生物研究的技术难题,制定国际统一标准,将智能制造、智能工厂的理念引入合成生物学<sup>[4]</sup>。目前,GBA已经包含来自世界范围内的32个不同研究机构(截至2022年7月),之前发表的综述<sup>[2,5]</sup>已对国内外这些设施建设现状与应用研究进行总结,这里不加赘述。

中国科学院天津工业生物技术研究所(以下简称“天津工业生物所”),早在2012年就自主设计了国内首套用于合成生物学领域的机器人自动化装备。作为GBA的现有成员机构之一,天津工业生物所聚焦于深度开发生物制造相关合成生物的创建能力,正在从头自主搭建工程菌种自动化铸造平台,旨在以硬件装备建设与软件、技术体系建设相结合,为具有自主知识产权的优秀菌种的创建及其产业应用等提供智能化、自动化和全链条覆盖的技术支撑。经过十年的发展,天津工业生物所生物铸造平台开发了大量相关的自动化、高通量技术、方法与实验流程,大大提高了工作服务能力。本文将重点综述天津工业生物所建立以来围绕工业菌种的自动化基因编辑与高通量筛选技术取得的研究成果,简介并展望天津工业生物所工程菌种自动化铸造平台的建设布局。

## 1 自动化基因编辑研究进展

要实现合成生物铸造的高通量自动化首先要摒弃手动生物学实验的概念,将传统实验室的人力实验完全转化为机器人自动化装备能操作实现的实验。这一方面需要将以前的实验技术与方法通过优化调整,转化为自动化实验流程,在自动化设备上优化原技术与方法的技术参数细节,例如各种试剂的用量比例、热激/培育的时间、离心的转速/时间等;而另一方面需要开发更加适合机器人自动化操作的新合成生物铸造技术,例如对比经典的筛选标记介导的同源重组,成簇的规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9)系统介导的同源重组与碱基编辑技术在标准化、模块化和成本控制上都具有较大优势,更适合于机器人自动化操作。同时开发相关软件和算法,与生物技术、自动化装备适配,实现合成生物铸造的全流程自动化。下文将从自动化基因编辑的3个主要环节总结自动化技术和流程的开发进展(1)编辑相关序列设计自动化;(2)基因克隆自动化;(3)基因组编辑自动化。

### 1.1 自动化编辑序列设计研究进展

基因克隆与基因组编辑的一个关键起始步骤是进行编辑序列设计,即针对遗传操作中用于精确定位和编辑目标DNA序列的相关序列(如引物序列、同源臂序列、sgRNA序列等)进行设计。目前,单一的计算机辅助设计工具往往只能覆盖遗传操作的部分环节。例如,美国能源部的Agile BioFoundry研发的DNA自动化组装设计软件J5(<https://j5.jbei.org/>)<sup>[6]</sup>、伊利诺伊大学香槟分校Huimin Zhao团队<sup>[7]</sup>依托iBioFAB铸造平台开发的质粒组装设计工具PlasmidMaker<sup>[7]</sup>(<https://biofoundry.web.illinois.edu/>),英国爱丁堡大学的Edinburgh Genome

Foundry 开发的 DNA 组装软件工具 (<https://cuba.genomefoundry.org/>) 等, 只覆盖了质粒构建环节的设计, 而面向基因组编辑还需要诸如 sgRNA、同源臂、基因组测序引物等功能序列的设计, 必须联用诸如 gBIG<sup>[8]</sup>、CHOPCHOP<sup>[9]</sup> 等其他软件或工具, 极大地增加了用户的学习成本。此外, 由于不同软件间的数据交互一般是非标准化的, 用户往往需要手动完成输入/输出信息的转换或加工, 大大限制了速度与通量。自动化菌种铸造的高速发展使高通量的基因克隆与基因组编辑成为可能, 人工或者多软件联用的“半自动化”的编辑序列设计模式, 已经无法匹配现有硬件设施的操作通量。

为了匹配高速发展的自动化菌种铸造, 研究者着手开发一站式、自动化的编辑序列设计工具。例如, 美国麻省理工学院的学者开发了面向疟状疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 基

因组编辑的在线工具 GeneTargeter<sup>[10]</sup> (<http://genetargeter.mit.edu/>), 可以实现目标基因的敲除、条件抑制所需编辑序列的全流程一站式设计。天津工业生物所马红武团队, 针对谷氨酸棒杆菌的基因组点突变构建的编辑序列设计场景, 开发了在线工具 GEDpm-cg (<https://gedpm-cg.biodesign.ac.cn/>) (图 1), 可在 5 min 内完成  $10^4$  级别的单碱基插入、敲除与替换的编辑序列设计一站式自动化设计, 后续经笔者团队实验验证, 证实了设计结果的可靠性<sup>[11]</sup>。

随后, 为了进一步拓展编辑序列设计自动化工具的适用范围, 马红武团队开发了面向微生物遗传操作的全流程自动化的高通量编辑序列设计在线工具 AutoESD (<https://autoesd.biodesign.ac.cn/>) (图 2)<sup>[12]</sup>。通过对遗传操作技术的模块化解构与标准化处理, AutoESD 实现了全流程、自动化的编辑序列设计, 支持多种常见的

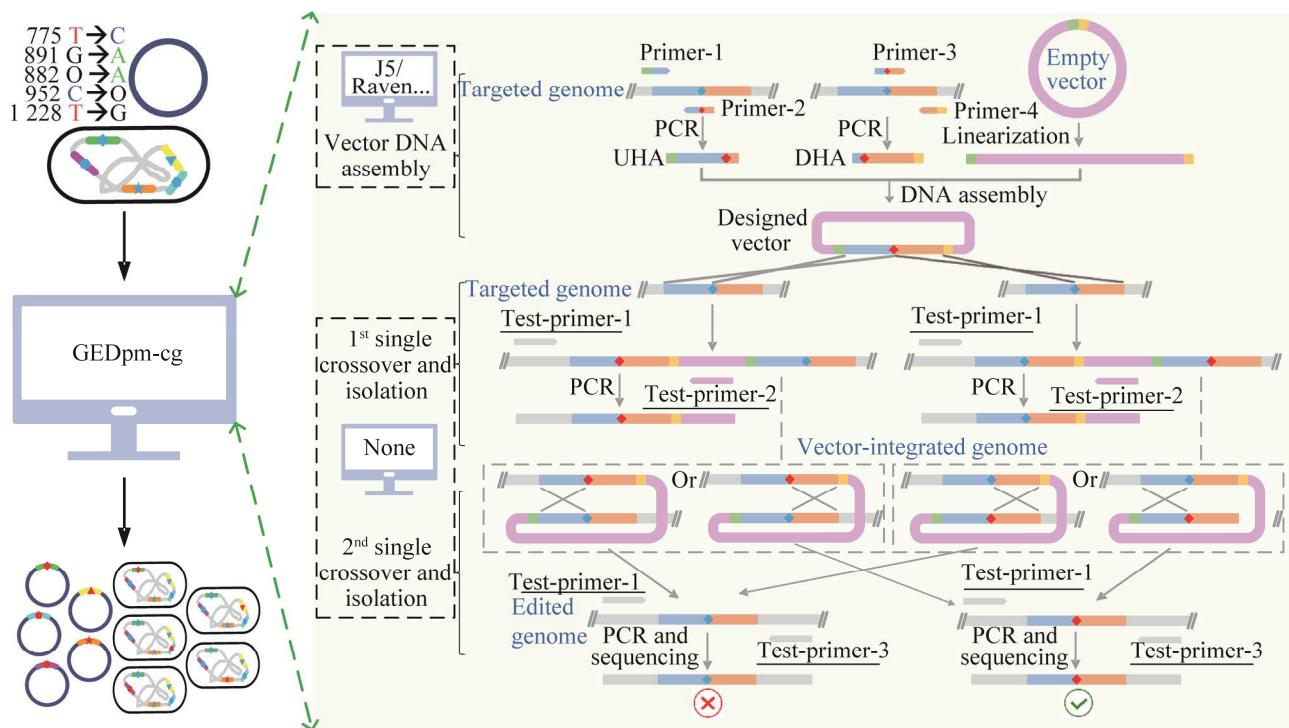


图 1 GEDpm-cg 自动化高通量点突变编辑序列设计示意图

Figure 1 Schematic diagram for automated and high-throughput design of editing sequence for point mutation editing on GEDpm-cg.

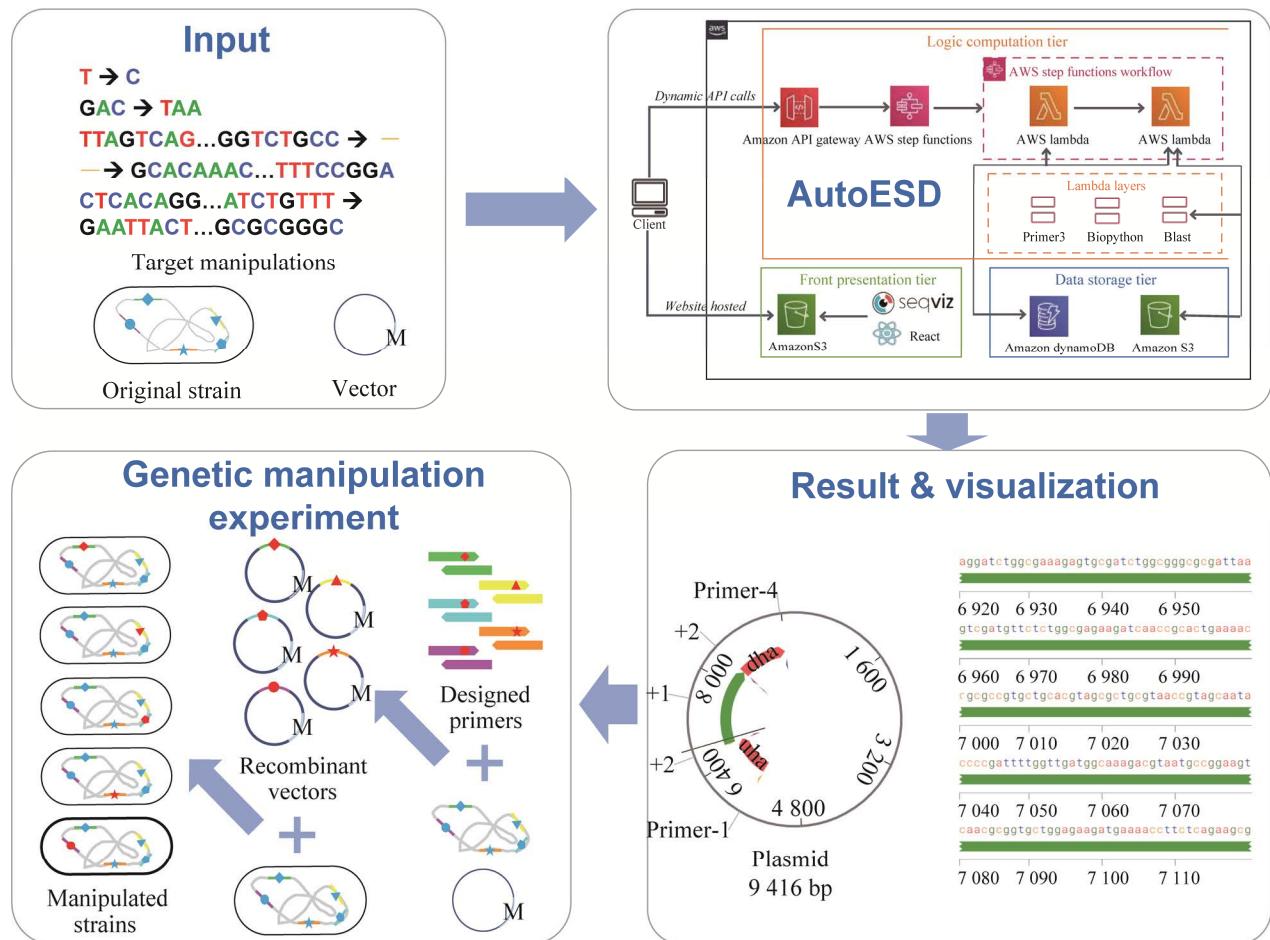


图2 AutoESD 工作流程示意图

Figure 2 Workflow for AutoESD.

基于筛选标记的同源重组技术变种，理论上支持所有基因组序列已知的微生物的编辑序列设计，并可以在单批次任务中处理针对不同目标序列（CDS 或基因间区域）的多种类型的遗传操作（敲除、插入和替换）。用户仅需要在网站界面，选择参考基因组和遗传操作技术，上传目标操作序列与用户自己的载体和筛选标记序列，AutoESD 即可自动实现编辑序列设计供用户下载，并可通过网站进行可视化分析。此外，AutoESD 还提供失败任务原因分析、同源序列脱靶风险评估等功能，用户可以根据这些结果，更改默认的参数，进行优化再设计。AutoESD 的开发采用了基于云端的无服务器架构，确保了高可靠性、稳健性和可扩展性，能够

在几分钟内并行处理包含上千个编辑序列设计目标的数百个设计任务，不仅大大提高了天津工业生物所菌种铸造的自动化程度与实际编辑通量，也可为世界范围内的合成生物铸造厂提供免费、灵活、用户友好的编辑序列设计自动化支持。

## 1.2 自动化基因克隆研究进展

基因克隆，即将目标基因通过 DNA 组装技术与载体 DNA 进行拼接、组装，然后将其转入宿主细胞进行表达或进一步研究的分子操作过程，也是菌种改造的基本手段。然而，即使是 Integrated DNA Technologies (IDT)、金唯智等 DNA 合成、基因克隆的专业公司，绝大部分的分子克隆工作都是由人力完成的，定制几千个克隆的任务无论从成本还是时间上都是



客户无法接受的。为此,世界范围内的生物铸造厂都开展了针对基因克隆(或质粒构建)的技术流程研发工作。例如,英国帝国理工学院 Geoff S. Baldwin 团队<sup>[13]</sup>依托 London DNA Foundry 铸造平台,开发了多片段 DNA 组装的 DNA-BOT 技术流程,支持多片段自动化高通量组装。利用该技术,该团队成功地在大肠杆菌中自动化构建了 88 个质粒,评估了不同启动子、核糖体结合位点序列元件与基因次序对于三基因操纵子表达的影响。美国伊利诺伊大学 Huimin Zhao 团队<sup>[7]</sup>开发了编辑序列设计工具 PlasmidMaker,依托 iBioFAB 铸造平台,仅通过极少的人工干预,利用 11 个 DNA 片段,成功地自动化构建了 101 个质粒。克隆的基因涉及 6 个不同的物种(细菌、酵母、植物和哺乳动物),大小从 5–18 kb 不等。美国麻省理工学院 D. Benjamin Gordon 团队<sup>[14]</sup>开展了一项为期 90 d 的 10 种新分子生物合成挑战。该团队依托 MIT-Broad Foundry,成功地在规定时间内完成了 1.2 Mb 规模的 DNA 构建,组装了一系列包含不同生物合成基因簇的质粒,基于酿酒酵母、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、白黄链霉菌 (*Streptomyces albidoflavus*)、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 和白酒红链霉菌 (*Streptomyces albobovineus*) 5 种不同底盘,构建了 215 株工程菌种和 2 套无细胞催化体系,成功合成了 2 种与目标分子结构近似的新分子与 4 种目标分子。

天津工业生物所王猛团队基于自动化相关设备(液体处理工作站、封膜仪、LabChip 核酸/蛋白定性及定量分析仪、全自动克隆挑选系统、高通量振荡摇床等),通过研究、整合、开发机器人自动化平台,实现了包括 PCR、DNA 检测(芯片检测)、PCR 产物纯化、质粒 DNA 组装与转化、平板涂布、单克隆挑选、质粒提取以及测序分析等共计 8 个独立步骤的全流程高通量自动化,克隆通量可达 3 000 克隆/月。基于该技

术,该团队开展了谷氨酸棒杆菌基因组规模的过表达库的构建工作,将基因组上每一个已注释的基因 CDS 序列分别克隆到质粒上,并转化到谷氨酸棒杆菌中,获得的完整的过表达库(3 099 个单基因过表达的菌株库)是国际上唯一的谷氨酸棒杆菌基因组水平过表达库。基于该单基因过表达文库,该团队联合天津工业生物所郑平团队正在开展谷氨酸棒杆菌抗逆性的高通量筛选研究工作,并鉴定了各种抗逆性状的关键基因,挖掘到多组新型的抗逆元件。目前,相关工作正在整理文章和公开共享中。

### 1.3 自动化基因组编辑研究进展

使用游离型质粒进行目标基因的表达调控,存在质粒不稳定、代谢负担重、生产过程引入抗性基因等问题。因此,借助基因组编辑技术(基于筛选标记的经典同源重组技术、CRISPR/Cas 介导的同源重组技术以及碱基编辑技术等)直接对基因组 DNA 序列进行精准的靶向改造(敲除、插入和替换),构建稳定、安全的工程菌种,是实现绿色、高效、稳定、安全的生物制造的必要手段。基于生物铸造平台,可以大大提高基因组编辑的速度与通量。例如, Huimin Zhao 团队<sup>[15]</sup>依托伊利诺伊大学 iBioFAB 铸造平台,仅经过 6 周(共 3 轮)的工程菌株自动化构建和筛选,便快速获得已报道乙酸耐受性能最高的酵母菌株。然而由于不同微生物底盘细胞的独有特性,部分技术如 CRISPR/Cas9 等虽具备一定共通性,但也需要根据不同微生物进行适应性调整,因此面向不同微生物的基因组编辑自动化报道相对较少。笔者团队与其合作者围绕 3 种工业生物制造领域最重要也最具代表性的模式微生物——谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母,开展了自动化基因组编辑的相关研究。基于机器人自动化设备,通过调整已有的生物改造手段与方

案, 开发新的生物技术, 使这些模式微生物都能适用于自动化机器人系统, 受合成生物铸造平台软硬件调配, 初步实现了 3 种模式生物的自动化改造。

### 1.3.1 谷氨酸棒杆菌

谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是最重要的氨基酸生产工业微生物, 被广泛应用于转化各种可再生资源生产生物基化学品的研究<sup>[16]</sup>。2018 年, 笔者团队与郑平团队联合开发了基于 CRISPR/Cas9 系统和胞嘧啶脱氨酶的谷氨酸棒杆菌多元自动化编辑技术 MACBETH (multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method), 可在染色体靶位点实现从 C 到 T 的高效编辑, 效率高达 90%<sup>[17]</sup>。MACBETH 可同时在多个基因中提前生成终止密码子, 以失活靶基因。借助天津工业生物所的自动化平台, 可实现从质粒构建、基因组编辑、获取正确突变株和表型验证的全流程自动化操作, 编辑能力可达到每月数千突变株<sup>[17]</sup>, 是国内首个面向微生物基因组编辑的自动化改造平台。对比基于 iBioFAB 的酿酒酵母基因组自动化编辑平台<sup>[15]</sup>, MACBETH 依托不依赖外源供体 DNA 的碱基编辑技术对目标基因组进行编辑, 更为方便灵活, 但相应可支持的目标序列编辑类型相对较少, 有待进一步升级。作为示例, MACBETH 用于一次性构建 94 个调控因子单独失活的菌株库, 成功率达到 100%, 使得快速构建全基因组规模的单基因失活菌株库成为可能, 有望加快谷氨酸棒杆菌的基础和应用研究。相关工作发表在 *Metabolic Engineering* 杂志上, 是国内首次发表高通量自动化生物改造方面的文章, 为在其他原核生物中实现自动化高通量的基因组编辑提供了参考。

2019 年, MACBETH 主创团队进一步联合天津工业生物所马红武团队, 通过引入识别不同前间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent

motif, PAM) 的 Cas 突变体、调整 sgRNA 长度及引入腺苷脱氨酶等改进措施, 进一步扩大了可编辑的靶标范围、编辑窗口和碱基转化种类, 并通过开发在线工具 gBIG (<https://gbig.ibiodesign.net/>), 打通了 sgRNA 的自动设计与脱靶风险评估流程, 大大提高了谷氨酸棒杆菌基因组编辑的自动化程度, 实现了从 sgRNA 设计、质粒构建、基因组编辑、获取正确突变株和表型验证的全流程自动化操作<sup>[8]</sup>。相关工作以封面文章发表于 *Biotechnology and Bioengineering* 杂志上 (图 3)。

### 1.3.2 枯草芽孢杆菌

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是最重要的蛋白生产工业微生物之一, 广泛地应用于工业酶、食品、生物防治等领域<sup>[18]</sup>。基于笔者团队、毕昌昊团队与爱丁堡大学 Susan J. Rosser 团队共同开发的枯草芽孢杆菌多位点碱基编辑技术<sup>[19]</sup>, 笔者团队进一步优化了枯草芽孢杆菌转化的方法, 将手工的枯草芽孢杆菌碱基编辑技术流程移植到自动化设备上, 打通了枯草芽孢杆菌从编辑质粒构建到基因组编辑的全流程自动化。此外, 通过使用纳升级移液系统 ECHO, 能够大大缩减 PCR 制备、质粒构建等分子操作过程中的试剂用量, 大幅节约物料成本。作为示例, 团队尝试一次性构建 212 个调控因子单独失活的菌株库, 成功获得所有编辑质粒, 并构建出 161 个转录因子失活的突变菌株 (未发表工作), 是首个枯草芽孢杆菌转录调控因子的单基因失活库, 使得快速构建枯草芽孢杆菌全基因组规模的单基因失活菌株库成为可能, 为进一步研究枯草芽孢杆菌的生理代谢特征提供了强大的技术支持。

### 1.3.3 酿酒酵母

数千年来, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 一直被人类用于生产发酵食品和饮料, 是最重要模式微生物<sup>[20]</sup>。笔者团队首先建立了酿酒酵母高通量自动化转化技术 (图 4)。基

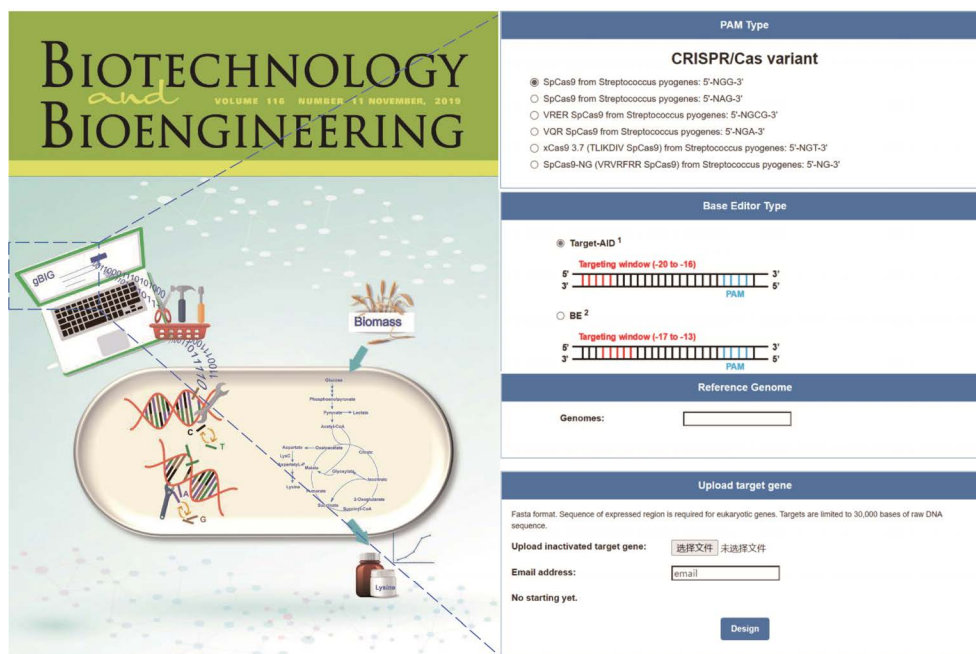


图3 谷氨酸棒杆菌碱基编辑文章期刊封面及在线工具 gBIG 用户界面 (共 PAM 种类选取、碱基编辑器种类选取、上传参考基因组、上传目标基因 4 个功能模块)

Figure 3 Journal cover for base editing in *Corynebacterium glutamicum* and the user interface of the online tool gBIG with functions of PAM type selection, base editor type selection, upload reference genome and upload target gene.

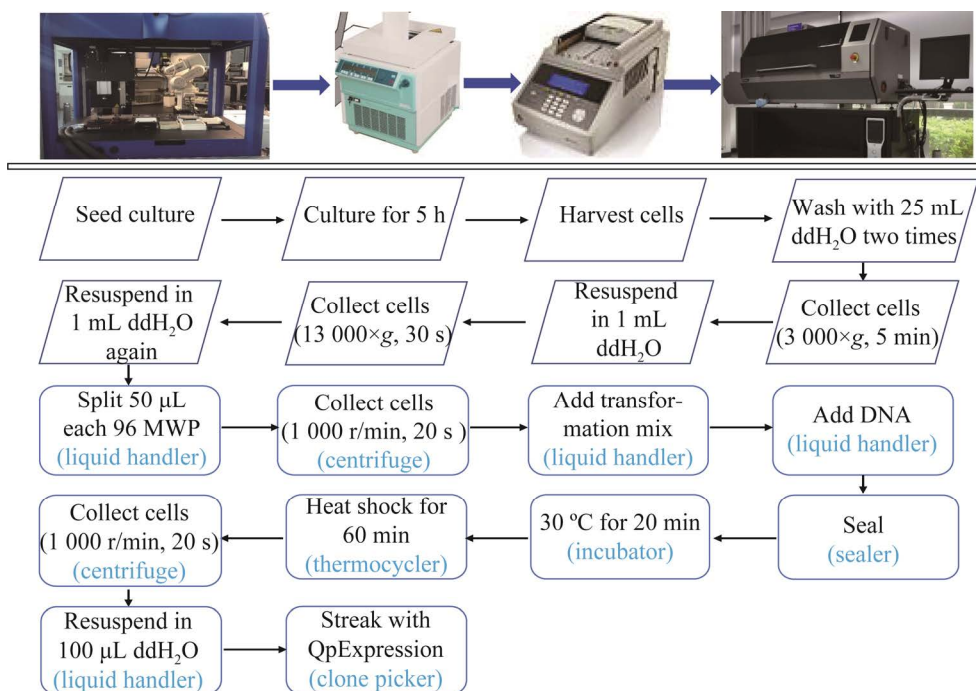


图4 酿酒酵母高通量自动化转化流程图

Figure 4 Workflow for automated high-throughput transformation of *Saccharomyces cerevisiae*.



于常规酿酒酵母化学转化方法，通过调整感受态制备方法、感受态用量、热激时间、恢复培养时间、离心时间，并调整自动化装备配合方法开发，最后通过编程程序化了所有高通量自动化酿酒酵母转化的步骤，成功实现了酿酒酵母的高通量自动化高效转化。基于该技术，可以实现高效转化，单次转化克隆数可以根据实际转化效率进行微调，以避免克隆数太多或者太少。解决了酿酒酵母高通量自动化转化这一关键性技术问题后，笔者团队进一步联合天津工业生物所王钦宏团队，先后打通了 CRISPR/Cas9 介导的同源重组与碱基编辑技术 (未发表工作)。基于联合开发的酿酒酵母基因组敲除、敲入、碱基编辑技术，配合前期建立的酿酒酵母高通量克

隆和转化技术，实现了自动化高通量的酿酒酵母基因组编辑，菌种构建能力可达 9 000 株/月。

作为展示，笔者团队联合上海交通大学肖晗团队，开展了酿酒酵母高产灵芝酸以及灵芝酸下游合成通路关键酶的挖掘研究<sup>[21]</sup>。灵芝酸是一类高度氧化的三萜类化合物，是药用蘑菇真菌灵芝特有的次级代谢产物，具有抗肿瘤等多种重要生物学活性。然而灵芝生长周期长、遗传操作不成熟、灵芝酸合成途径不清楚等因素严重限制了灵芝酸的广泛应用。为了解析灵芝酸合成途径，团队依托自动化高通量的酿酒酵母基因组编辑平台，开展了细胞色素 P450 潜在催化基因的迭代筛选鉴定工作 (图 5)：将灵芝基因组上 215 个潜在的 P450 催化基因分别

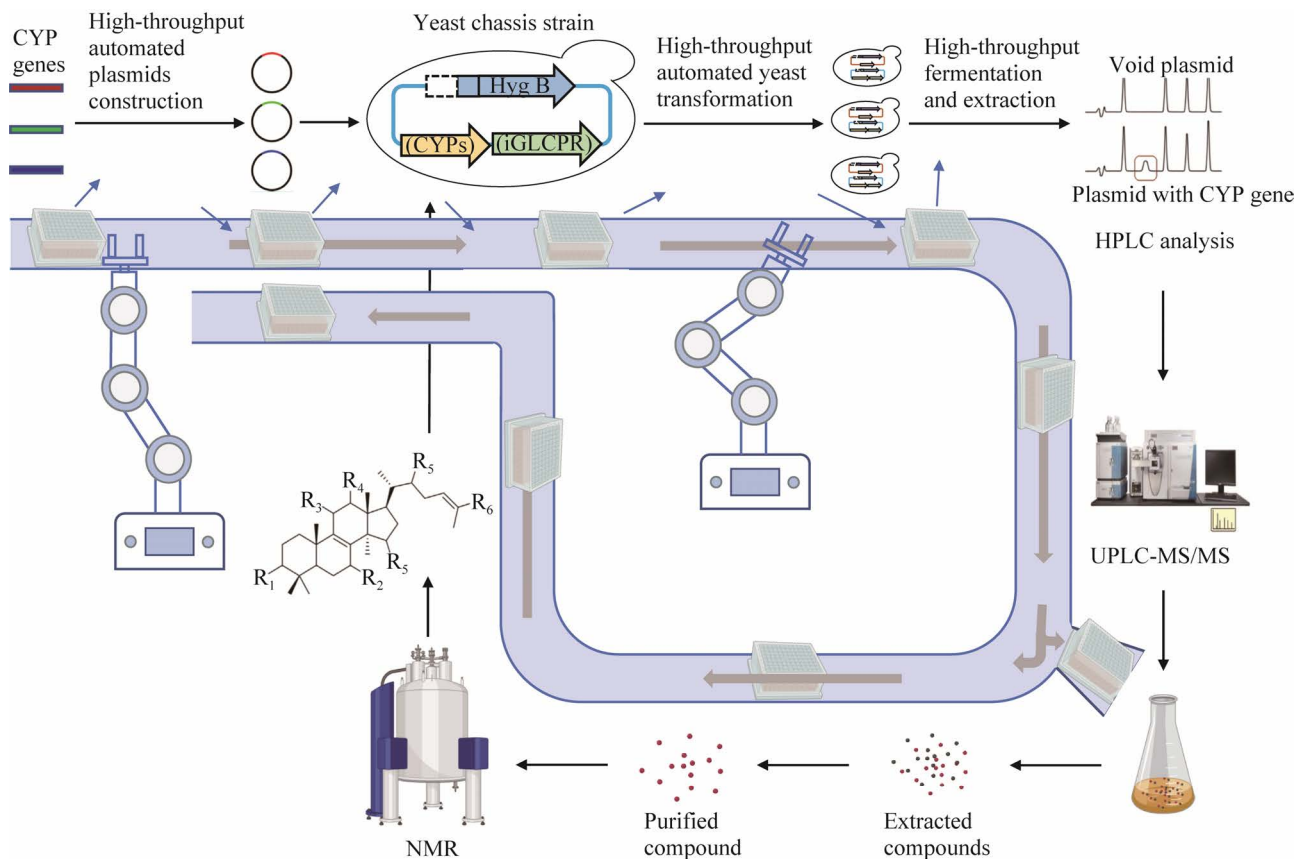


图 5 自动化系统辅助的灵芝酸合成 P450 酶迭代鉴定流程 (各个仪器间的交互由人工完成)

Figure 5 Workflow for automated and iterative identification of P450 candidates for ganoderic acid biosynthesis (the interaction of different instructions is done manually).

克隆到质粒上，一次性构建了含有 158 个潜在 P450 单基因过表达质粒库，并将该质粒库以迭代的方式导入到可以合成不同 I 类灵芝酸的酿酒酵母底盘细胞中，构建了灵芝酸合成筛选菌株库 (3 轮共计 474 株菌种)。通过液相色谱、质谱、核磁等分析检测，挖掘到了催化 I 型灵芝酸向 II 型灵芝酸转化的关键 P450 酶，首次解析了 II 型灵芝酸的生物合成途径，并实现了其在酿酒酵母中的异源高效生产，产量相比灵芝子实体和液体深层发酵产生的菌丝体提高了 1-4 个数量级，生产速率提高了 2-5 个数量级。相关工作正在投稿中，为基于酿酒酵母的天然产物生物合成关键基因的自动化高通量挖掘提供了参考。

## 2 高通量筛选技术研发及应用的研究进展

随着自动化菌种铸造平台的建设和合成生物学的发展，海量的微生物工程菌株能在数天或数周内被构建，如何利用高通量筛选技术高效地检测和筛选这些工程菌株是获得目标性能工程菌株的关键<sup>[22]</sup>。天津工业生物所经过 10 年的研究，建立了国内先进的高通量检测筛

选技术与装置平台，包括基于装备的流式细胞技术、液滴微流控技术、微孔板筛选技术，以及基于二代测序的全基因组扰动测序筛选技术等。

### 2.1 流式细胞筛选技术

流式细胞分选技术 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 是采用流式细胞仪对处于快速流动的细胞或颗粒进行多参数、快速定量分析和分选的技术，也是目前最常用和成熟的细胞超高通量筛选技术<sup>[23]</sup>。其检测分选原理是待测样本 (细胞/颗粒的水悬液) 进入样品通道后，在气体压力作用下通过水相鞘液将细胞/颗粒阵列通过激光检测区，并受激光照射后产生一定的散射光和激发荧光等信号，信号借助光学元件检测并转化成相应的电信号传输至计算机进行处理分析获得每个细胞的物理化学特性，并通过电压偏转分选分离出目标细胞<sup>[22]</sup>。根据其检测原理，流式细胞技术检测的对象是细胞或颗粒物质，检测的信号来自于细胞或颗粒的内部或者表面。FACS 检测信号的产生方法主要包括待检测物质自身具有荧光信号、基于生物传感器 (目标物质含量与荧光信号强度偶联)、基于试剂反应 (目标物质直接或间接与其他试剂反应生成荧光信号) 3 种方式 (图 6)。

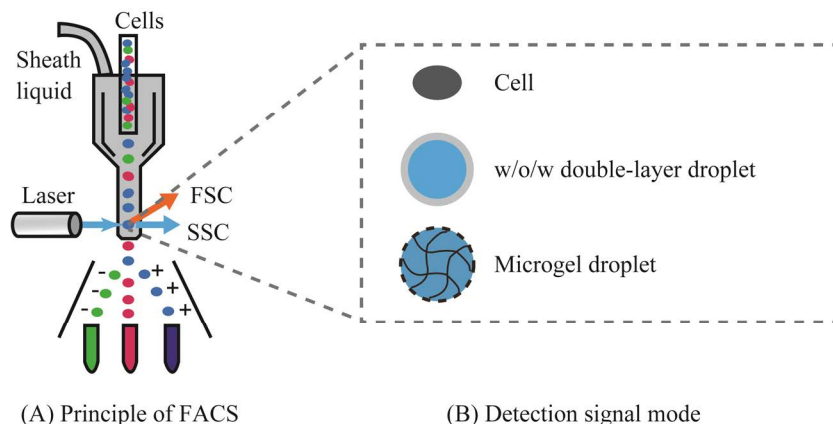


图 6 流式细胞筛选技术

Figure 6 Scheme of flow cytometry based screening technology.

其中基于生物传感器的 FACS 检测方式应用最为广泛<sup>[24-25]</sup>, 生物传感器的来源一方面通过文献检索对已有的传感器进行直接或改造后应用<sup>[26-27]</sup>, 另一方面通过组学分析挖掘或计算机模拟设计构建出新型传感器后应用<sup>[28]</sup>。在已有的生物传感器中, 基于转录因子的遗传编码的生物传感器应用最为广泛。例如, 张大伟团队利用已报道的透性酶 TyrP 的启动子能特异性结合感应 L-苯丙氨酸的特性, 通过将 *tyrP* 启动子区融合黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP) 建立苯丙氨酸的 FACS 筛选技术, 并通过筛选获得苯丙氨酸产量为 9.29 g/L 的菌株, 较出发菌株提高 160%–180%<sup>[29]</sup>。刘君团队与长江师范学院王庆团队合作将 *Lrp* 转录因子改造为能感应 L-缬氨酸的生物传感器, 通过 FACS 筛选获得缬氨酸产量为 3.2 g/L 的菌株<sup>[30]</sup>。针对某些代谢物还没有文献表征特异性生物传感器的问题, 王钦宏团队建立基于转录组学的生物传感器挖掘策略, 获得能特异性感应 3-脱氢莽草酸的生物传感器 *cusR*, 并筛选获得摇瓶发酵产量为 36.72 g/L 的高产菌株<sup>[28]</sup>。孙际宾和郑平团队通过启动子分析挖掘获得能感应 L-苏氨酸的生物传感器 *cysJHp*, 并筛选获得苏氨酸产量为 5.83 g/L 的菌株<sup>[27]</sup>。除了上述利用转录因子或功能基因的启动子构建生物传感器的方式, 张大伟团队联合天津工业生物所生物设计中心平台实验室<sup>[31]</sup>, 以人源的次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases, HGPRT) 为配体结合域, 基于 Rosetta 理性设计与流式细胞筛选技术, 分别构建了针对 3 个中心碳代谢关键代谢物——磷酸核糖-焦磷酸 (Phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)、D-赤藓糖-4-磷酸 (erythrose-4-phosphate, E4P) 和甘油酸-3-磷酸 (3-phosphoglycerate, 3PG) 的生物传感器, 为

无转录调控因子、无合适或未知结合蛋白的分子, 提供了一种基于配体结合域稳定性设计开发生物传感器的策略。此外, 张大伟团队开发了基于 RNA 适配体的色氨酸传感器<sup>[32]</sup>, 孙际宾和郑平团队开发了基于 tRNA 合成酶的异亮氨酸传感器<sup>[33]</sup>, 这些研究为创建获得新型生物传感器提供了很好的思路。

相较于基于生物传感器的方式, 基于自身荧光信号和外加试剂反应方式的流式分选技术操作步骤较为繁琐。为了将外加试剂及其反应限定在不同细胞的周边, 研究者采用液滴微流控芯片开发了通过液滴或者凝胶液滴方式对细胞 (待检测物质) 和试剂进行区室化限定的方法。例如通过生成水包油包水 (water-in-oil-in-water, w/o/w) 的双层液滴, 将单细胞和外加试剂包裹在液滴实现不同细胞的分隔培养, 再利用 FACS 检测双层液滴筛选获得脂肪酶<sup>[34]</sup>、纤维素酶<sup>[35]</sup>、乳酸<sup>[36]</sup>、核黄素<sup>[37]</sup>的高产菌株。此外, 也有研究者通过琼脂糖、明胶凝胶液滴的方式将不同细胞分隔培养, 对表达白介素的酵母菌<sup>[38]</sup>、产氨基酸的乳酸菌<sup>[39]</sup>、产油脂的微藻<sup>[40]</sup>等进行高效筛选并获得高产菌株。

在流式细胞仪检测分选时, 待检测的细胞样品需要经过数百微米的狭小液流通道, 因此流式细胞分选技术只适用于外形规整的原核微生物例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌等, 以及少数真核微生物例如酵母, 并不适合于形状不规则容易堵塞通道的丝状菌<sup>[41]</sup>。针对丝状菌的这一问题的, 研究者们通过对菌株的孢子或者原生质体进行检测筛选来解决。例如张东远团队建立了里氏木霉丝状真菌基于孢子表达荧光蛋白信号偶联目标产物的流式分选技术<sup>[42]</sup>, 田朝光团队建立了黑曲霉和嗜热毁丝霉基于原生质体萌发能力的流式分选技术<sup>[43]</sup>, 中国科学院微生物研究所张立新团队建立了基

于放线菌原生质体表达荧光蛋白偶联番茄红素产量的流式分选技术<sup>[44]</sup>。虽然这些研究在一定程度上提高了丝状菌的筛选效率,但它们只能用于丝状菌孢子时期或者丝状萌发初期物质的检测筛选。针对大多数菌丝生长后期物质的筛选例如抗生素等次级代谢产物,或者分泌表达蛋白的筛选仍需要进一步开发研究<sup>[45]</sup>。

## 2.2 液滴微流控筛选装置与技术

流式细胞技术检测的对象是细胞或颗粒物质,检测的信号来自于细胞或颗粒的内部或者表面,目前主要适用于细胞内物质的筛选<sup>[23]</sup>。大多数工业菌株的目标产物多分泌至细胞外,为了解决细胞外分泌物的高通量检测筛选问题,研究者提出了基于液滴的微流控筛选技术<sup>[46]</sup>。微流控技术是一种基于微流控芯片对流体进行操控的科学与技术,它主要包括连续微流控技术和以间断液滴为基础的液滴微流控技术。其中液滴微流控技术 (fluorescence-activated droplet sorting, FADS) 利用微芯片可以形成相对独立且大小可控的液滴微反应器,将待检测的细胞包埋在这些液滴微反应器中,并结合液滴微流控筛选装置实现单细胞及其分泌物质的检测和分选<sup>[46]</sup>。对比传统的微孔板筛选技术,液滴微流控具有检测体积小、试剂成本低、检测通量高等特点,在分泌型物质检测上具有显著优势<sup>[47]</sup>。目前用于液滴微流控检测分选的装置主要以实验室研究为主,商品化的仪器较少<sup>[48]</sup>,针对工程菌株筛选缺乏小型化、低成本的细胞外物质高通量筛选装备和技术的需求,天津工业生物所采用基于微流控芯片和荧光诱导激光检测技术,研制获得多台/套液滴微流控微生物高通量筛选装置设备,实现单细胞液滴包埋、培养、检测和分选,检测分选速度达到每天千万个样品 (图 7),解决了现有装置不能高通量检测筛选细胞外目标产物的难题<sup>[22]</sup>。

研制的液滴微流控装置系统在工业、农业、环境、医药等多领域,可以广泛应用于工程菌株选育、医药抗体筛选等方面<sup>[49-51]</sup>。

依托研制的新装置,天津工业生物所在国内率先开展液滴微流控筛选技术的应用研究,针对 6 种常用宿主菌体系,实现了一系列工业酶和代谢物的检测筛选,例如纤维素酶<sup>[52]</sup>、淀粉酶<sup>[53]</sup>、脂肪酶<sup>[54]</sup>、3-脱氢莽草酸<sup>[55]</sup>和红霉素<sup>[50]</sup>等的筛选,极大解决了工程菌株的高精度、高通量、高效率选育的难题,相关研究在国内外同领域处于领先行列。例如采用大肠杆菌宿主,王钦宏团队建立基于生物传感器和液滴的 3-脱氢莽草酸液滴微流控筛选技术,解决了原有流式细胞筛选技术筛选基于生物传感器的高产菌株时存在的细胞内荧光信号与细胞外物质产量不一致的问题<sup>[55]</sup>。采用枯草芽孢杆菌宿主,王钦宏团队和张大伟团队建立基于酶活性检测的淀粉酶高产菌株和核黄素高产菌株的 FADS 筛选技术,获得产量较出发菌株提高 50% 的改造菌株<sup>[53,56]</sup>。采用酵母宿主,王钦宏团队建立木聚糖酶高产菌株的筛选技术,获得木聚糖酶活性为 149 U/mL 的菌株,对比出发菌株酶活性提高了 160%<sup>[57]</sup>,进一步又建立纤维素酶高产菌株的 FADS 筛选技术,通过突变库筛选获得纤维素酶活为 11 110 U/mL 的高产工程菌株,对比出发菌株酶活性提高了 200%<sup>[52]</sup>。这些研究建立的筛选方法达到每小时数百万液滴样品的检测分选通量,有效提高了菌株的选育效率。在丝状菌的液滴微流控筛选方面,天津工业生物所也取得较好进展,例如王猛和涂然团队建立放线菌的液滴培养、检测和分选技术体系,能在液滴内稳定培养放线菌 7 d 以上,解决了流式细胞技术不能筛选丝状菌生长中后期表达物质的问题,实现次级代谢产物的检测筛选。该技术体系具有每批次培养百万株突变



体，一天内检测数十万突变株的能力，对比传统微孔板和摇瓶筛选技术，提高培养通量数十万倍，筛选效率数万倍<sup>[45]</sup>。此外，张东远和涂然团队与哈佛大学团队合作建立里氏木霉的液滴微流控筛选技术，通过筛选突变库获得滤纸酶活性为 16.5 IU/mL，纤维素酶活性比出发工程菌株提高 46%的高产菌株<sup>[49]</sup>。

由于大多数工业菌株属于非模式菌株，它们难以通过遗传操作构建出高通量筛选所需的荧光信号模块。为解决这些工业菌株筛选难的问题，笔者和涂然团队将筛选所需的荧光模块构建到容易遗传操作的感应菌中，并将构建好的感应菌株与生产菌株混合包埋在一个液滴内，使得生产菌株的产物量与感应菌的荧光信号相偶联，建立了基于生产菌和感应菌共包埋的液滴微流控筛选技术 WELCOME (whole-cell biosensor and producer co-cultivation-based microfluidic platform for screening)。利用该技术，研究人员在 3 个月内从高产工业菌株随机诱变突变库中快速筛选获得数个红霉素产量提高近 50%的突变株，孔板发酵产量达到 1.4 g/L，显著提高了工业菌株的改造筛选效率<sup>[58]</sup>。此外，

该团队利用液滴微流控筛选技术平台，从野生型 *S. erythraea* NRRL 23338 出发，通过启动子优化在数周内筛选获得红霉素产量为 288 mg/L 的高产菌株，比出发菌株提高 137 倍<sup>[50]</sup>，进一步论证了液滴微流控高通量筛选技术在链霉菌胞外产物筛选和合成生物学改造方面的巨大应用潜力。

鉴于荧光信号具有灵敏度和特异性高的特性，在已报道的液滴微流控技术中绝大多数都是基于荧光信号检测和分选。为了进一步拓展液滴筛选技术的应用范围，研究者也开发了基于吸光度<sup>[59]</sup>、拉曼<sup>[60-61]</sup>、质谱<sup>[62]</sup>、图像识别<sup>[63-64]</sup>等信号方式的液滴微流控技术与相关装置。随着合成生物学的发展，越来越多的新型化合物将被创制，基于物质自身光谱和特征信号例如拉曼、质谱和图像识别的无损伤免标记检测技术在未来将日益重要。此外，对比现有流式细胞仪能将单细胞直接分选至微孔板中并与自动化装置整合使用，目前的液滴微流控装置仍以手工操作为主。未来要进一步提高其自动化程度尤其是全自动进样和单液滴微孔板分选两个环节，实现液滴筛选技术与自动化铸造平台协作。

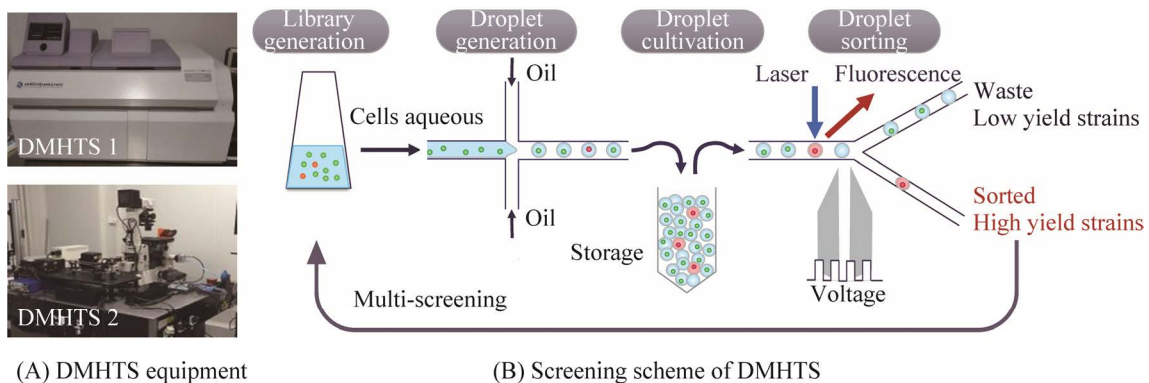


图 7 液滴微流控细胞筛选装置与技术

Figure 7 Droplet-based microfluidic screening equipment and technology. (A) Droplet-based microfluidic high-throughput screening equipment (DMHTS) developed by TIB. (B) Screening scheme of DMHTS.



### 2.3 基于微孔板和自动化装置的筛选技术

早期的高通量筛选技术主要采用微孔板为检测容器进行样品的检测筛选,例如 96 孔板、24 孔板、48 孔板或 384 孔板等。这些微孔板通常用塑料制成网络状规则排列、单面开口的板材,各个孔内可以放置待测样品,并配套微孔板读板仪使用<sup>[65]</sup>。通过人工操作或者结合自动化移液工作站等设备,微孔板能实现样品与试剂的添加、混合、孵育培养和检测,具有微量、快速、灵敏和准确等特点,可以应用于微生物工程菌株选育、药物筛选、生态环境监测等。天津工业生物所多个研究团队通过微量筛选模型与检测性状的关联性研究,建立了多种基于微孔板的代谢物和酶的检测方法,实现乙醇<sup>[66]</sup>、二元醇<sup>[67]</sup>、支链醇<sup>[68]</sup>、P450 单加氧酶<sup>[69]</sup>等筛选应用。结合自动化操作装置系统,进一步将检测筛选速度从每天数千个样品提高至每天近十万个样品通量,在人工设计新酶<sup>[70]</sup>、人工合成淀粉途径构造<sup>[71]</sup>、细胞工厂<sup>[72]</sup>的高效选育上起到重要作用。

### 2.4 全基因组规模扰动测序筛选技术

除了基于仪器装置的筛选技术,研究者也在不断探索其他高通量筛选技术如通过二代测序的全基因组规模扰动测序筛选技术。通过构

建全基因组规模的基因扰动文库,利用功能缺失型 (loss of function) 或功能获得型 (gain of function) 策略,可以实现特定表型下对功能基因的高通量筛选,从宏观基因组层面系统地研究基因型与表型的对应关系<sup>[73]</sup>。相较于对单个基因逐一扰动,全基因组规模扰动构建的混合文库筛选可以显著提高通量,通过一次实验即可实现特定压力下对上千个基因的同时筛选,再结合二代高通量测序技术,实现表型与基因型相关性的研究。近日,王猛团队<sup>[74]</sup>以谷氨酸棒杆菌为研究对象,利用胞嘧啶碱基编辑技术,以在基因编码区提前引入终止密码子的方式,构建了谷氨酸棒杆菌全基因组规模 (3 099 个基因) 的单基因失活混合文库,用于筛选和测序分析 (图 8)。不同于哺乳动物细胞以及酵母中已报道的数据处理方法<sup>[75-77]</sup>,通过压力筛选富集和全新建立的 FSsgRNA-Analyzer 云计算平台对 sgRNA 序列深度测序分析,获得了多种抗逆相关的靶标基因,不仅建立了一种通用性强的混合文库筛选策略,为高效发掘具有特定生物学功能的谷氨酸棒杆菌基因元件提供研究基础和新思路,同时也为其他原核生物的基因组规模功能筛选提供技术参考。相关工作发表于 *Science Advances* 杂志<sup>[74]</sup>。

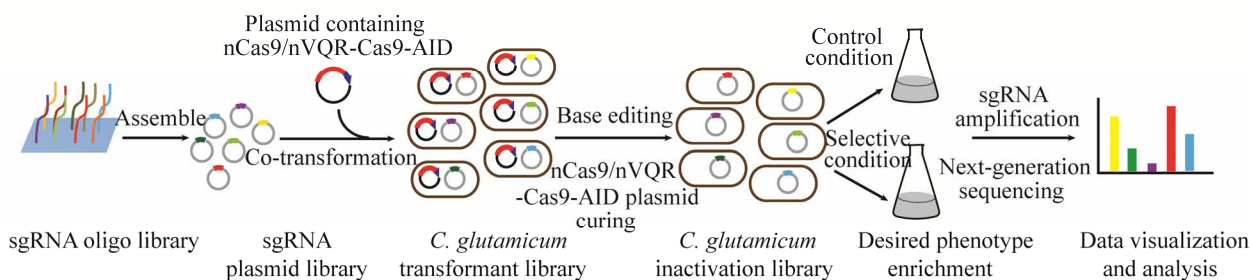


图 8 基于碱基编辑技术的谷氨酸棒杆菌基因失活文库构建与筛选

Figure 8 Construction and screening of CRISPR-mediated genome-scale *Corynebacterium glutamicum* library.

### 3 总结与展望

本文围绕菌种自动化铸造的研究进展,重点总结回顾了天津工业生物所过去 10 年在自动化基因编辑与高通量筛选领域所取得的重要进展。天津工业生物所建立了国内首个面向微生物遗传改造的自动化改造平台 MACBETH,开发了一系列计算机辅助工具 (gBIG、GEDpm-cg 与 AutoESD),实现了从上游编辑序列设计 (引物、同源臂、sgRNA 等)、DNA 载体组装、到基因组目标序列的插入、敲除、替换的全流程自动化,可以支持包括谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌和酿酒酵母在内的多种重要模式微生物的自动化改造,通量可达数千株/每月;建立了国内先进的高通量筛选平台,尤其在液滴微流控筛选装置与技术方面成果显著,不仅研制出新型液滴微流控微生物高通量筛选原型机,也实现了常用宿主工程菌种及其工业酶/代谢物等产品的检测筛选,相关指标居同行业先进水平,具有检测速度快、筛选成本低、适用范围广的优点,极大促进了我国在液滴微流控检测分选方向的研究,为提升工业微生物选育提供良好应用支撑和价值延展。目前,天津工业生物所已针对多种不同模式微生物底盘细胞的不同应用场景,搭建了相应的自动化高通量构建与筛选技术平台,但仍然面临着生物设计能力弱、生物设计与构建软件化成度低、合成生物铸造全流程自动化水平低、实验室信息系统对硬件的支持能力弱、可支持底盘细胞单一、高通量测试手段少等局限,为下一阶段菌种全流程自动化铸造提出了大量软件、硬件和生物技术融合的挑战。

在我国国民经济和社会发展第 14 个 5 年规划期间,为了大幅提升天津工业生物所菌种铸造能力,对标 Ginkgo Bioworks 等国际顶尖公

司,参与激烈的国际竞争,天津工业生物所将把握本领域发展趋势,颠覆现有研究模式,全面推动工程菌种铸造大设施建设,将搭建包括菌种计算设计平台、菌种合成构建平台、菌种高通量筛选平台、菌种测试评价平台、菌种系统分析平台和工艺优化放大平台在内的围绕菌种迭代创制的核心 6 个平台实验室,布局了可为菌种创制提供关键性辅助支撑的合成生物元件库和数据中心,正在自主设计开发综合信息系统 (comprehensive information system, CIS)。“六平台一库一中心”将在综合信息系统的支撑下,一体化设计,紧密联动,协同工作,通量匹配,不断推动“设计-创建-评价-学习-再设计”工程循环流程,为早日解决我国工业菌种“卡脖子”的重大需求奠定技术基础。

### REFERENCES

- [1] Clomburg JM, Crumbley AM, Gonzalez R. Industrial biomanufacturing: the future of chemical production. *Science*, 2017, 355(6320): aag0804.
- [2] 唐婷,付立豪,郭二鹏,等. 自动化合成生物技术与工程化设施平台. *科学通报*, 2021, 66(3): 300-309. Tang T, Fu LH, Guo EP, et al. Automation in synthetic biology using biological foundries. *Chin Sci Bull*, 2021, 66(3): 300-309 (in Chinese).
- [3] Arnold C. Cloud labs: where robots do the research. *Nature*, 2022, 606(7914): 612-613.
- [4] Hillson N, Caddick M, Cai Y, et al. Building a global alliance of biofoundries. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2040.
- [5] 金帆,冷梦甜,袁海,等. 合成生物研究重大科技基础设施概述. *合成生物学*, 2022, 3(1): 184-194. Jin F, Leng MT Yuan H, et al. Overview on platform for synthetic biology research at Shenzhen. *Syn Bio J*, 2022, 3(1): 184-194 (in Chinese).
- [6] Hillson NJ, Rosengarten RD, Keasling JD. J5 DNA assembly design automation software. *ACS Synth Biol*, 2012, 1(1): 14-21.
- [7] Enghiad B, Xue P, Singh N, et al. PlasmidMaker is a versatile, automated, and high throughput end-to-end platform for plasmid construction. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2697.

- [8] Wang Y, Liu Y, Li JW, et al. Expanding targeting scope, editing window, and base transition capability of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(11): 3016-3029.
- [9] Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, et al. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(W1): W401-W407.
- [10] Cárdenas P, Esherrick LY, Chambonnier G, et al. GeneTargeter: automated *in silico* design for genome editing in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *The CRISPR Journal*, 2022, 5(1): 155-164.
- [11] Yang Y, Mao YF, Liu Y, et al. GEDpm-cg: genome editing automated design platform for point mutation construction in *Corynebacterium glutamicum*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 768289.
- [12] Yang Y, Mao YF, Wang RY, et al. AutoESD: a web tool for automatic editing sequence design for genetic manipulation of microorganisms. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W75-W82.
- [13] Storch M, Haines MC, Baldwin GS. DNA-BOT: a low-cost, automated DNA assembly platform for synthetic biology. *Synthetic biology (Oxford, England)*, 2020, 5(1): ysaa010.
- [14] Casini A, Chang FY, Eluere R, et al. A pressure test to make 10 molecules in 90 days: external evaluation of methods to engineer biology. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(12): 4302-4316.
- [15] Si T, Chao R, Min YH, et al. Automated multiplex genome-scale engineering in yeast. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 15187.
- [16] Becker J, Rohles CM, Wittmann C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. *Metab Eng*, 2018, 50: 122-141.
- [17] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metab Eng*, 2018, 47: 200-210.
- [18] Park SA, Bhatia SK, Park HA, et al. *Bacillus subtilis* as a robust host for biochemical production utilizing biomass. *Crit Rev Biotechnol*, 2021, 41(6): 827-848.
- [19] Yu SL, Price MA, Wang Y, et al. CRISPR-dCas9 mediated cytosine deaminase base editing in *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(7): 1781-1789.
- [20] Lian JZ, Mishra S, Zhao HM. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: new tools and their applications. *Metab Eng*, 2018, 50: 85-108.
- [21] Lan XT, Yuan W, Wang M, et al. Efficient biosynthesis of antitumor ganoderic acid HLDOA using a dual tunable system for optimizing the expression of CYP5150L8 and a *Ganoderma* P450 reductase. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(12): 3301-3311.
- [22] 涂然, 李世新, 李昊霓, 等. 液滴微流控技术在微生物工程菌株选育中的应用进展. *合成生物学*, 2022, 3: 1-21.
- Tu R, Li SX, Li HN, et al. Advances and applications of droplet-based microfluidics in evolution and screening of engineered microbial strains. *Syn Bio J*, 2022, 3: 1-21 (in Chinese).
- [23] Leavell MD, Singh AH, Kaufmann-Malaga BB. High-throughput screening for improved microbial cell factories, perspective and promise. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 62: 22-28.
- [24] Liu Y, Liu Y, Wang M. Design, optimization and application of small molecule biosensor in metabolic engineering. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2012.
- [25] Schallmeyer M, Frunzke J, Eggeling L, et al. Looking for the pick of the bunch: high-throughput screening of producing microorganisms with biosensors. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 26: 148-154.
- [26] Wang Y, Li QG, Zheng P, et al. Evolving the L-lysine high-producing strain of *Escherichia coli* using a newly developed high-throughput screening method. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(9): 1227-1235.
- [27] Liu YN, Li QG, Zheng P, et al. Developing a high-throughput screening method for threonine overproduction based on an artificial promoter. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 121.
- [28] Li LP, Tu R, Song GT, et al. Development of a synthetic 3-dehydroshikimate biosensor in *Escherichia coli* for metabolite monitoring and genetic screening. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(2): 297-306.
- [29] Liu YF, Zhuang YY, Ding DQ, et al. Biosensor-based evolution and elucidation of a biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(5): 837-848.
- [30] Han GQ, Xu N, Sun XP, et al. Improvement of L-valine production by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening in *Corynebacterium glutamicum*. *ACS Omega*, 2020, 5(10): 4751-4758.
- [31] Ding D, Li J, Bai D, et al. Biosensor-based monitoring of the central metabolic pathway metabolites. *Biosens Bioelectron*, 2020, 167: 112456.
- [32] Liu YF, Yuan HL, Ding DQ, et al. Establishment of a biosensor-based high-throughput screening platform for tryptophan overproduction. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(6): 1373-1383.

- [33] Sun X, Li QG, Wang Y, et al. Isoleucyl-tRNA synthetase mutant based whole-cell biosensor for high-throughput selection of isoleucine overproducers. *Biosens Bioelectron*, 2021, 172: 112783.
- [34] Ma FQ, Guo TJ, Zhang YF, et al. An ultrahigh-throughput screening platform based on flow cytometric droplet sorting for mining novel enzymes from metagenomic libraries. *Environ Microbiol*, 2021, 23(2): 996-1008.
- [35] Korfer G, Pitzler C, Vojcic L, et al. *In vitro* flow cytometry-based screening platform for cellulase engineering. *Sci Rep*, 2016, 6: 26128.
- [36] Zhu XD, Shi X, Wang SW, et al. High-throughput screening of high lactic acid-producing *Bacillus coagulans* by droplet microfluidic based flow cytometry with fluorescence activated cell sorting. *RSC Adv*, 2019, 9(8): 4507-4513.
- [37] Wagner JM, Liu L, Yuan SF, et al. A comparative analysis of single cell and droplet-based FACS for improving production phenotypes: riboflavin overproduction in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng*, 2018, 47: 346-356.
- [38] Yanakieva D, Elter A, Bratsch J, et al. FACS-based functional protein screening via microfluidic co-encapsulation of yeast secretor and mammalian reporter cells. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10182.
- [39] Hernandez-Valdes JA, Aan De Stegge M, Hermans J, et al. Enhancement of amino acid production and secretion by *Lactococcus lactis* using a droplet-based biosensing and selection system. *Metab Eng Commun*, 2020, 11: e00133.
- [40] Li M, Van Zee M, Riche CT, et al. A gelatin microdroplet platform for high-throughput sorting of hyperproducing single-cell-derived microalgal clones. *Small*, 2018, 14(44): e1803315.
- [41] Delgado-Ramos L, Marcos AT, Ramos-Guelfo MS, et al. Flow cytometry of microencapsulated colonies for genetics analysis of filamentous fungi. *G3 (Bethesda)*, 2014, 4(11): 2271-2278.
- [42] Wang GK, Jia WD, Chen N, et al. A GFP-fusion coupling FACS platform for advancing the metabolic engineering of filamentous fungi. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 232.
- [43] Yang YJ, Liu Y, Liu DD, et al. Development of a flow cytometry-based plating-free system for strain engineering in industrial fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(2): 713-727.
- [44] Bai CX, Zhang Y, Zhao XJ, et al. Exploiting a precise design of universal synthetic modular regulatory elements to unlock the microbial natural products in *Streptomyces*. *PNAS*, 2015, 112(39): 12181-12186.
- [45] Tu R, Zhang Y, Hua EB, et al. Droplet-based microfluidic platform for high-throughput screening of *Streptomyces*. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 647.
- [46] Yang JH, Tu R, Yuan HL, et al. Recent advances in droplet microfluidics for enzyme and cell factory engineering. *Crit Rev Biotechnol*, 2021, 41(7): 1023-1045.
- [47] Bowman EK, Alper HS. Microdroplet-assisted screening of biomolecule production for metabolic engineering applications. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(7): 701-714.
- [48] Josephides D, Davoli S, Whitley W, et al. Cyto-Mine: an integrated, picodroplet system for high-throughput single-cell analysis, sorting, dispensing, and monoclonality assurance. *SLAS Technol*, 2020, 25(2): 177-189.
- [49] He RL, Ding RH, Heyman JA, et al. Ultra-high-throughput picoliter-droplet microfluidics screening of the industrial cellulase-producing filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(11): 1603-1610.
- [50] Yun KY, Zhang Y, Li SX, et al. Droplet-microfluidic-based promoter engineering and expression fine-tuning for improved erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 23338. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 864977.
- [51] Ding RH, Hung KC, Mitra A, et al. Rapid isolation of antigen-specific B-cells using droplet microfluidics. *RSC Adv*, 2020, 10(45): 27006-27013.
- [52] Yuan HL, Zhou Y, Lin YP, et al. Microfluidic screening and genomic mutation identification for enhancing cellulase production in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Biofuels Bioprod*, 2022, 15(1): 50.
- [53] Yuan HL, Tu R, Tong XW, et al. Ultrahigh-throughput screening of industrial enzyme-producing strains by droplet-based microfluidic system. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2022, 49(3): 1-9temp.
- [54] Qiao YX, Zhao XY, Zhu J, et al. Fluorescence-activated droplet sorting of lipolytic microorganisms using a compact optical system. *Lab Chip*, 2017, 18(1): 190-196.
- [55] Tu R, Li LP, Yuan HL, et al. Biosensor-enabled droplet microfluidic system for the rapid screening of 3-dehydroshikimic acid produced in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2020, 47(12): 1155-1160.
- [56] 付首颖, 夏苗苗, 张祎凝, 等. 核黄素工业菌株高通量筛选方法的建立和应用. *生物技术通报*, 2020,

- 36(4): 47-53.
- Fu SY, Xia MM, Zhang YN, et al. Establishment and application of high-throughput screening method of riboflavin industrial strain. *Biotech Bull*, 2020, 36(4): 47-53 (in Chinese).
- [57] 吕彤, 涂然, 袁会领, 等. 毕赤酵母液滴微流控高通量筛选方法的建立与应用. *生物工程学报*, 2019, 35(7): 1317-1325.
- Lü T, Tu R, Yuan HL et al. Development and application of a droplet-based microfluidic high-throughput screening of *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2019, 35(7): 1317-1325 (in Chinese).
- [58] Hua EB, Zhang Y, Yun KY, et al. Whole-cell biosensor and producer co-cultivation-based microfluidic platform for screening *Saccharopolyspora erythraea* with hyper erythromycin production. *ACS Synth Biol*, 2022; 11(8): 2697-2708.
- [59] Gielen F, Hours R, Emond S, et al. Ultrahigh-throughput-directed enzyme evolution by absorbance-activated droplet sorting (AADS). *PNAS*, 2016, 113(47): E7383-E7389.
- [60] Wang XX, Ren LH, Su YT, et al. Raman-activated droplet sorting (RADS) for label-free high-throughput screening of microalgal single-cells. *Anal Chem*, 2017, 89(22): 12569-12577.
- [61] Wang XX, Xin Y, Ren LH, et al. Positive dielectrophoresis-based Raman-activated droplet sorting for culture-free and label-free screening of enzyme function *in vivo*. *Sci Adv*, 2020, 6(32): eabb3521.
- [62] Holland-Moritz DA, Wismer MK, Mann BF, et al. Mass activated droplet sorting (MADS) enables high-throughput screening of enzymatic reactions at nanoliter scale. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(11): 4470-4477.
- [63] Nitta N, Sugimura T, Isozaki A, et al. Intelligent image-activated cell sorting. *Cell*, 2018, 175(1): 266-276.e13.
- [64] Sesen M, Whyte G. Image-based single cell sorting automation in droplet microfluidics. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8736.
- [65] 崔金明, 刘陈立. 合成生物学中的高通量筛选与测量技术. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(11): 2083-2090.
- Cui JM, Liu CL. High-throughput screening and measurement techniques in synthetic biology. *Chin J Cell Biol*, 2019, 41(11): 2083-2090 (in Chinese).
- [66] Qi XN, Zhang YY, Tu R, et al. High-throughput screening and characterization of xylose-utilizing, ethanol-tolerant thermophilic bacteria for bioethanol production. *J Appl Microbiol*, 2011, 110(6): 1584-1591.
- [67] Sun L, Zhang H, Yuan HL, et al. A double-enzyme-coupled assay for high-throughput screening of succinic acid-producing strains. *J Appl Microbiol*, 2013, 114(6): 1696-1701.
- [68] Tu R, Lv T, Sun L, et al. Development of a simple colorimetric assay for determination of the isoamyl alcohol-producing strain. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 192(2): 632-642.
- [69] Jiang D, Tu R, Bai P, et al. Directed evolution of cytochrome P450 for sterol epoxidation. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(10): 1663-1668.
- [70] Lu XY, Liu YW, Yang YQ, et al. Constructing a synthetic pathway for acetyl-coenzyme A from one-carbon through enzyme design. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1378.
- [71] Cai T, Sun HB, Qiao J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide. *Science*, 2021, 373(6562): 1523-1527.
- [72] 杨建花, 苏晓岚, 朱蕾蕾. 高通量筛选系统在定向改造中的新进展. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2197-2210.
- Yang JH, Su XL, Zhu LL. Advances of high-throughput screening system in reengineering of biological entities. *Chin J Biotech*, 2021, 37(7): 2197-2210 (in Chinese).
- [73] Feng H, Yuan Y, Yang Z, et al. Genome-wide genotype-phenotype associations in microbes. *J Biosci Bioeng*, 2021, 132(1): 1-8.
- [74] Liu Y, Wang R, Liu J, et al. Base editor enables rational genome-scale functional screening for enhanced industrial phenotypes in *Corynebacterium glutamicum*. *Sci Adv*, 2022, 8(35): eabq2157.
- [75] Hanna RE, Hegde M, Fagre CR, et al. Massively parallel assessment of human variants with base editor screens. *Cell*, 2021, 184(4): 1064-1080.e20.
- [76] Cuella-Martin R, Hayward SB, Fan X, et al. Functional interrogation of DNA damage response variants with base editing screens. *Cell*, 2021, 184(4): 1081-1097.e19.
- [77] Despres PC, Dube AK, Seki M, et al. Perturbing proteomes at single residue resolution using base editing. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1871.

(本文责编 郝丽芳)