

## CRISPR/Cas9 技术在微生物研究中的应用进展

张昆 陈景超 李祎 刘磊 王海磊\*

(河南师范大学生命科学学院 河南省功能微生物绿色转化技术工程实验室 河南 新乡 453007)

**摘要:** CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas (CRISPR associated proteins)系统是在细菌和古生菌中发现的一种 RNA 指导的降解入侵病毒或质粒 DNA 的适应性免疫系统。由 II 型 CRISPR/Cas 系统改造而成的 CRISPR/Cas9 技术已经被开发成一种强大的基因组编辑和表达调控工具, 并且广泛应用于基因功能研究、代谢工程和合成生物学等领域。本文从 CRISPR/Cas9 系统的发现过程、分类、作用原理、在微生物研究中的应用进展等方面进行总结, 并展望了该技术的应用前景。

**关键词:** CRISPR/Cas9, 基因组编辑, 表达调控

### Application progress of CRISPR/Cas9 technology in microbiological research

ZHANG Kun CHEN Jing-Chao LI Yi LIU Lei WANG Hai-Lei\*

(Henan Province Engineering Laboratory for Bioconversion Technology of Functional Microbes, College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

**Abstract:** CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas (CRISPR associated proteins) is an acquired immune system found in bacteria and archaea that degrade target sequences of DNA from invading viruses or plasmids in a RNA-guided manner. CRISPR/Cas9 technology modified from type II CRISPR/Cas system has been developed as a strong genome editing and expression regulation tool, and widely used for studying gene function, metabolic engineering, synthetic biology, and other related fields. In this review, we summarize recent progress in development, classification, functional principle, applications and prospects of CRISPR/Cas9 technology in microbes.

**Keywords:** CRISPR/Cas9, Genome editing, Expression regulation

**Foundation items:** Doctoral Scientific Research Start-up Foundation of Henan Normal University (5101049170167); Key Scientific Research Programs of Henan Education Department (17A180028)

\*Corresponding author: Tel: 86-373-3326340; E-mail: whl@htu.cn

**Received:** April 21, 2017; **Accepted:** July 07, 2017; **Published online** (www.cnki.net): August 08, 2017

基金项目: 河南师范大学博士科研启动经费(5101049170167); 河南省高等学校重点科研项目(17A180028)

\*通信作者: Tel: 86-373-3326340; E-mail: whl@htu.cn

收稿日期: 2017-04-21; 接受日期: 2017-07-07; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-08-08

基因组编辑(Genome editing)技术是研究基因功能的重要工具,一直是现代分子生物学的研究热点。由于同源重组的基因打靶效率较低,因此它的应用受到极大的限制。直到人工核酸内切酶的出现,这一现状才得到较大的改变。近15年来,基于人工核酸内切酶的基因组编辑技术经历了3次大的改善,分别是锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)和CRISPR/Cas系统,这3种技术的共同点是都需要一个DNA识别结构域和一个DNA切割结构域<sup>[1]</sup>。然而,由于ZFNs和TALENs这两项技术难度较大、组装时间较长、费用较高,因此应用范围有限。2013年,一种新型的基因组编辑技术——CRISPR/Cas系统的出现,迅速受到全世界科研人员的关注。CRISPR/Cas系统广泛分布在细菌和古生菌的基因组中,是进化过程中形成的一种可以降解入侵病毒或质粒DNA的适应性免疫系统。CRISPR/Cas系统作为一种高效的基因组编辑技术,具有制备简单、靶向性强、成本低和脱靶率低等诸多优势,并在多个动植物以及微生物物种中成功应用,极大地促进了基因功能、代谢工程、转基因生物和基因治疗等方面的研究。本文将从II型CRISPR/Cas系统的历史、基本结构、分类、作用原理、在微生物研究中的应用及其可能存在的问题等方面的研究进展进行介绍。

## 1 CRISPR/Cas系统的发现历史

CRISPR/Cas介导的基因组编辑技术与现代分子生物学和生物信息学的发展密切相关。1987年,日本研究者Ishino等<sup>[2]</sup>发现大肠杆菌(*Escherichia coli*) K12菌株碱性磷酸酶基因(*iap*)编码区附近存在一段由长度为29 bp的重复片段(Repeats)和32 bp的非重复片段(Spacers)间隔组成的特殊序列。随后的研究发现,在已测序的大约40%细菌和90%古细菌中都能够观察到这种重复序列。Mojica等<sup>[3]</sup>和Jansen等<sup>[4-5]</sup>将这些间隔排列的串联重复序列命名为CRISPR (Clustered regularly interspaced short

palindromic repeats),即成簇规律间隔的短回文重复序列。2005年,美国的3个研究小组相继发现CRISPR的间隔序列来源于外源的噬菌体或质粒的DNA序列,同时Cas9蛋白和共有序列即PAM (Protospacer adjacent motif, PAM)也被揭示出来<sup>[6-8]</sup>,推测CRISPR/Cas系统可能与细菌抵抗外源遗传物质入侵的免疫保护机制有关。2007年, Barrangou等<sup>[9]</sup>发现嗜热链球菌(*Streptococcus thermophiles*)可利用CRISPR/Cas系统用于对噬菌体的免疫抵抗,并且免疫特异性取决于间隔序列。2008年,Marraffini等<sup>[10]</sup>发现细菌的CRISPR/Cas系统能直接作用于靶DNA,而非RNA来限制外源基因的水平转移,首次利用实验证明了CRISPR系统的功能。随后Brouns等<sup>[11]</sup>发现CRISPR的间隔区(Spacer)可被转录成CRISPR RNA (crRNA),这些crRNA和Cas蛋白一起可干扰噬菌体增殖。2010年,Garneau等<sup>[12]</sup>发现CRISPR-1/Cas系统可以在靶DNA的PAM区上游3个碱基处切割造成双链断裂。2011年,Deltcheva等<sup>[13]</sup>报道一种名为反式激活RNA分子即tracrRNA (Trans-activating CRISPR RNA),与内源性的RNase III和Cas9蛋白共同作用,负责生成crRNA,同时推测tracrRNA和crRNA可以形成双链复合物指导Cas9降解外源DNA。Saprunauskas等<sup>[14]</sup>证明嗜热链球菌的CRISPR/Cas系统在大肠杆菌表达可避免噬菌体感染和降低质粒转化的风险。2012年,Gasiunas等<sup>[15]</sup>证明Cas9蛋白的HNN结构域和RuvC结构域分别负责切割靶DNA的互补链和非互补链,并且切割位点取决于crRNA序列。Jinek等<sup>[16]</sup>对II型CRISPR/Cas9系统进行改造,将tracrRNA:crRNA双链复合体简化为一条嵌合的单链向导RNA。至此,II型CRISPR/Cas系统的作用机制基本清晰,为进一步应用奠定基础。

2013年,Cong等<sup>[17]</sup>和Mali等<sup>[18]</sup>率先将CRISPR/Cas9系统应用在人类和小鼠胚胎干细胞中,不仅基因敲除效率显著提高,而且还可以实现多基因的敲除。目前该技术已成功应用到秀丽

线虫 (*Caenorhabditis elegans*)<sup>[19]</sup>、斑马鱼 (*Zebrafish*)<sup>[20]</sup>、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[21]</sup>、高粱 (*Sorghum bicolor*)<sup>[21]</sup>、烟草 (*Nicotiana tabacum*)<sup>[21]</sup>、水稻 (*Oryza sativa*)<sup>[21]</sup>、大肠杆菌<sup>[22]</sup>和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[23]</sup>等多种动植物和微生物中。

## 2 CRISPR/Cas 系统的结构和作用原理

CRISPR/Cas 系统主要由 CRISPR 和 CRISPR 相关蛋白基因组成<sup>[24]</sup>。CRISPR 由多个高度保守的重复序列和间隔序列相互串联而成, 一个 CRISPR 位点的重复序列具有结构保守性, 不同 CRISPR 位点重复序列的序列和结构均不相同。重复片段的序列存在二重对称性, 可以形成发夹结构, 这些重复序列的具体功能迄今为止尚不清楚。CRISPR 的间隔序列与一些噬菌体或质粒的序列存在同源性, 很可能来源于某些入侵的噬菌体或质粒。在 CRISPR 位点第一个重复序列的上游是前导序列 (Leader sequence), 前导序列可以作为启动子, 负责 CRISPR 序列的转录, 产生 crRNA<sup>[24-25]</sup>。在 CRISPR 位点附近是 CRISPR 相关蛋白基因 *cas*。*cas* 基因是一类较大的多态性家族, 编码的蛋白具有核酸酶切割活性, 能将外源 DNA 切断, 是 CRISPR/Cas 免疫防御途径中的重要组成成分。

CRISPR/Cas 介导的免疫过程主要包括 3 个阶段: 适应、表达和干扰<sup>[24-26]</sup>。在适应阶段, 当噬菌体或者质粒 DNA 进入携带有 CRISPR 系统的细胞时, 宿主的 Cas1 核酸结合蛋白会迅速地介导 CRISPR 相关蛋白质复合体与噬菌体 DNA 结合, 通过 Cas2 核酸内切酶等蛋白的作用, 将该 DNA 切割成 17–84 bp 不等的核酸小片段, 然后在相关蛋白的作用下, Cas 蛋白复合体将这些短片段 DNA 插入到宿主 CRISPR 位点的前导序列与第一段重复序列之间, 形成一个新的重复序列——间隔序列单元<sup>[9]</sup>。在表达阶段, 这些掺入的间隔序列被转录成 crRNA 前体即 pre-crRNA, 在 Cas 蛋白复合体的参与下加工成短的包括重复序列和间隔序列的成熟

crRNA, 这些 crRNA 与 tracrRNA 结合形成 tracrRNA/crRNA 复合物。在干扰阶段, 当噬菌体等外源 DNA 再次侵染细菌时, tracrRNA/crRNA 复合物通过碱基配对寻找同源的靶标核酸, 然后引导 Cas 蛋白对与 crRNA 配对的外源 DNA 进行切割, 产生一个双链 DNA 缺口, 导致入侵 DNA 降解<sup>[13]</sup>。2016 年 2 月, 美国科学家 Silas 等<sup>[27]</sup>发现一种新的 CRISPR 间隔序列获取方式, 在海洋细菌 *Marinomonas mediterranea* (MMB-1) 中, 反转录酶 RT (Reverse-transcriptase)/Cas1 复合体可以将外源 RNA 直接插入到 CRISPR 位点内的 DNA 重复序列之间, 形成新的间隔序列, 这种类型的 CRISPR/Cas 系统与先前发现的将 DNA 作为间隔序列明显不同, 有利于细菌防御 RNA 病毒。

目前应用最为成功的是 II 型 CRISPR/Cas9 系统, 最初的 Cas9 蛋白来源于化脓性链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*), 其结构和功能研究已比较透彻, 由 1 409 个氨基酸组成, 含有 2 个核酸酶结构域: 氨基端的 RuvC 结构域和位于中间的 HNH 结构域。在噬菌体或者质粒上同间隔序列对应的序列通常称为原型间隔序列 (Protospacer), 一般情况下 Protospacer 的 5' 或 3' 端有几个延伸的保守的碱基序列, 称为 PAM, II 型 CRISPR/Cas 系统的 PAM 一般为 NGG。HNH 结构域可以切割与 crRNA 互补配对的 DNA 链, 切割位点位于 PAM 上游 3 bp 处, RuvC 结构域切割与 crRNA 非互补的 DNA 链, 切割位点位于 PAM 上游 3–8 bp 处。当 Cas9 剪切基因组时, 可以在 PAM 序列前产生一个 DNA 双链断裂缺口 (Double-strand breaks, DSBs), 由于细胞具有修复功能, 当细胞内存在靶位点的同源序列模板时, 细胞就会进行同源修复 (Homology-directed repair, HDR), 这种方式的准确率较高; 如果没有同源序列模板存在, 细胞就会通过非同源末端连接 (Nonhomologous end-joining, NHEJ) 的方式使基因组发生随机的 INDEL (Insertion and deletion) 效应, 由于 NHEJ 只是将断

裂的 DNA 片段简单加工之后连接起来, 因此这种方式的准确率较低, 容易造成基因突变<sup>[28]</sup>。

由于细菌 CRISPR 基因位点内的间隔序列周围不存在 PAM, 而外源 DNA 则存在相应的 PAM, 因此 CRISPR/Cas 系统能够区分自身 DNA 和外源 DNA。除此之外, 对于不需要 PAM 的 CRISPR/Cas 系统而言, crRNA 不仅含有间隔序列, 而且在其 5'端和 3'端包含有部分重复序列, 对于宿主菌来说, crRNA 除了能与间隔区配对外, 两端的重复序列也能与间隔序列两侧的基因组 DNA 完全配对。当外源 DNA 入侵宿主菌时, crRNA 可以和外源 DNA 序列的 Protospacer 配对, 但重复序列却不能配对, 一旦发生不完全配对, 核糖核蛋白复合体就会发挥切割活性, 通过这样的机制, CRISPR/Cas 系统能够保护宿主和避免自我免疫<sup>[29]</sup>。

### 3 CRISPR/Cas 系统的分类

随着生物信息学的发展和测序微生物的不断增多, 绝大多数细菌和 40% 古细菌中均已发现 CRISPR/Cas 系统。2005 年, Haft 等<sup>[30]</sup>将几十个细菌的 CRISPR/Cas 系统划分为 8 个亚型。2011 年, Makarova 等<sup>[31]</sup>根据 Cas 基因核心元件序列的不同, 将 CRISPR/Cas 系统划分为 I、II 和 III 型, 其核心蛋白分别是 Cas3、Cas9 和 Cas10。这 3 种类型还可以进一步划分为 10 个亚类。I 型和 III 型 CRISPR/Cas 系统需要多个 Cas 蛋白形成复合体来切割 DNA 双链, 而 II 型 CRISPR/Cas 系统只需要一个 Cas9 蛋白就可以发挥作用。值得注意的是, III 型 CRISPR/Cas 系统的两种亚型 III-A 和 III-B 的靶序列分别是 DNA 和 RNA, 它们在切割时不需要 PAM。

2015 年, Makarova 等<sup>[32]</sup>根据 CRISPR/Cas 系统中 CRISPR 核酸酶复合体蛋白成分的不同提出 2 类-5 型-16 亚类的分类系统。其中属于第 1 类的核酸酶复合体由多个 Cas 蛋白组成, 而第 2 类的核酸酶复合体具有单个 Cas 蛋白。属于第 1 类 CRISPR/Cas 系统的有 I、III 和 IV 型, 属于第 2 类

CRISPR/Cas 系统的有 II、V 和 VI 型。其中 IV 型缺乏 CRISPR 系统中广泛存在的 Cas1、Cas2 基因和内在的 CRISPR 序列, 因此它的作用机制尚不清楚。V 型的 3 个亚类 V-A、V-B 和 V-C 分别具有典型的 Cpf1、C2c1 和 C2c3 蛋白, 这些蛋白单独存在就可以发挥切割活性。Cpf1 蛋白切割 DNA 时不需要 tracrRNA, 并且识别位点和剪切位点相距较远, 产生粘性末端缺口; 相比之下, Cas9 蛋白需要 tracrRNA 才能激活, 识别位点和切割位点相距较近, 可产生平末端缺口。Cpf1 的 PAM 一般位于原型间隔序列的 5'端, 而 Cas9 蛋白的 PAM 区则位于间隔序列的 3'端。此外, Cpf1 酶比标准的 SpCas9 要小, 更容易进入组织和细胞, 因此表现出良好的应用前景。C2c1 蛋白需要 crRNA 和 tracrRNA 才能发挥作用, 但是其 PAM 位于原型间隔序列的 5'端。C2c3 蛋白功能不详, 只存在于宏基因组中。

2016 年 6 月, Abudayyeh 等<sup>[33]</sup>报告了一种新型 CRISPR/Cas 系统即 VI-A 型 CRISPR/C2c2, 该系统利用 RNA 引导酶 Cas13a (先前被称为 C2c2) 来靶向和降解 RNA, Cas13a 不需要 tracrRNA 和 PAM 的向导作用, 但是需要一个位于原型间隔序列 3'端的侧翼位点(Protospacer flanking site, PFS)。C2c2 引起的断裂位点并不固定, 受靶位点单链 RNA 二级结构和序列组成的影响。2017 年 2 月, Smargon 等<sup>[34]</sup>利用生物信息学数据挖掘的方法, 发现了两种新的 VI-B 型 CRISPR/Cas 系统, 这类系统缺乏 Cas1 和 Cas2, 只利用单个的 Cas 酶 (Cas13b) 即可发挥活性。与 Cas13a 相同, Cas13b 仅需要单个向导 RNA 就能找到靶序列并引起 ssRNA 的断裂, 并且能够同时靶向多个 RNA 转录本, 因此该型 CRISPR/Cas 系统可以像 RNAi 一样用于降低基因的表达水平。

## 4 CRISPR/Cas 系统在微生物中的应用进展

### 4.1 CRISPR/Cas 系统在微生物中介导的基因组编辑

CRISPR/Cas 系统在微生物和在真核生物中的

应用几乎同时进行, 2013 年, Jiang 等<sup>[22]</sup>利用 CRISPR/Cas9 系统对 *S. pneumoniae* 和 *E. coli* 进行基因组编辑。但此后, 该系统并没有在微生物中广泛应用, 究其原因是: (1) 一些常见的细菌已经存在许多高效和便利的基因组编辑方法, 缺乏发展新技术的动力; (2) 多数细菌缺少 NHEJ 的修复途径, 必需依靠 DNA 模板介导的 HDR 途径才能完成修复, 否则 Cas9 蛋白引起的 DSBs 很容易引起细胞死亡, 这种需要模板的要求也限制了 CRISPR/Cas 系统的应用。对于需要基因组编辑的微生物而言, 存在两种策略: (1) 利用外源的 CRISPR/Cas 系统, CRISPR/Cas9 系统经过 Jinek 等改造后非常简单, 用一个四碱基的连接环将 crRNA 和 tracrRNA 连接在一起构成一个具有向导作用的 sgRNA (Single guide RNA)。Cas9 蛋白可识别 sgRNA, 从而定点切割 DNA<sup>[16]</sup>; (2) 利用自身 CRISPR/Cas 系统, 如果细胞内在的 CRISPR/Cas 系统比较活跃, 构建可表达一个或者多个 crRNAs 的 pre-RNA 表达系统, 转化细胞后也可以用于基因组编辑。

CRISPR/Cas9 系统包括 Cas9 蛋白和 sgRNA 两部分。目前使用的 Cas9 蛋白主要来源于 *S. pyogenes* 和 *S. thermophiles*。由于 tracrRNA 和 Cas9 蛋白的序列相对固定, 因此只需要改变 crRNA 序列就可以改变靶基因, 再添加一个修复模板就可以用于基因组编辑。目前 CRISPR/Cas9 技术的基因组编辑应用策略如图 1 所示, Cas9 蛋白和 sgRNA 的表达框可以构建在 1 个载体上, 有利于该系统的协同表达; 也可以构建在 2 个载体上, 含有 Cas9 基因的质粒既可以和 sgRNA 质粒同步转化, 也可以先转化细胞, 然后再转化 sgRNA 质粒, 能更快速地检测候选 sgRNA 的打靶效率和脱靶情况; 还可以利用体外转录的方法获得 sgRNA, 然后和 Cas9 质粒共转化, 适合缺少诱导型启动子的微生物(图 1A、B、C)。对于多基因位点的编辑, 目前存在两种方法: (1) 在重组质粒中将多个

sgRNA 的 DNA 序列进行串联, 由于多数细菌存在内源性的 RNase III, 因此转录出来的 crRNA 前体 pre-crRNA 可以被加工成多个 sgRNA; (2) 体外转录出多个 sgRNA 形成一个混合池, 然后和含有 Cas9 的质粒一起转化。需要注意的是, 打靶序列必需包含 PAM 序列, 这是由 II 型 CRISPR/Cas9 系统依赖 PAM 识别外源 DNA 序列的特点所决定的。目前该技术已经成功运用在 *E. coli*<sup>[22,35-37]</sup>、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)<sup>[38-39]</sup>、丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)<sup>[40]</sup>、拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*)<sup>[40]</sup>、罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)<sup>[41]</sup>、蓝细菌聚球藻 (*Synechococcus elongatus*)<sup>[42]</sup>、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)<sup>[22]</sup>、柠檬塔特姆菌 (*Tatumella citrea*)<sup>[35]</sup>、运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)<sup>[43]</sup> 等(表 1)。2013 年, DiCarlo 等<sup>[23]</sup>首次将 CRISPR/Cas9 技术应用于真核微生物酿酒酵母中, 敲除了细胞膜精氨酸透性酶 *CAN1* 基因和磷酸核糖酰氨基咪唑羧化酶基因 *ade2-101*。随后, 不少研究者将 CRISPR/Cas9 应用到丝状真菌, 例如, 2015 年, 中国科学院 Liu 等<sup>[44]</sup>将该技术应用到里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)。丹麦科学家 Nødvig 等<sup>[45]</sup>将该技术应用到包含构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 在内的 6 种丝状真菌。中国科学院 Liu 等<sup>[46]</sup>将该技术应用到产纤维素酶的真菌 *Myceliophthora thermophila* 和 *Myceliophthora heterothallica*。2017 年, Nayak 和 Metcalf 首次报道在古生菌乙酸甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina acetivorans*) 中建立 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑方法<sup>[47]</sup>。这些应用证明 CRISPR/Cas9 有效解决了非模式微生物难以进行基因组编辑的问题, 而且为阐明微生物的基因功能、解析代谢途径提供一种有用的工具, 为细菌、古生菌和真菌功能基因的挖掘、菌株改良、重要基因定点突变以及创制新的种质资源带来突破性进展。

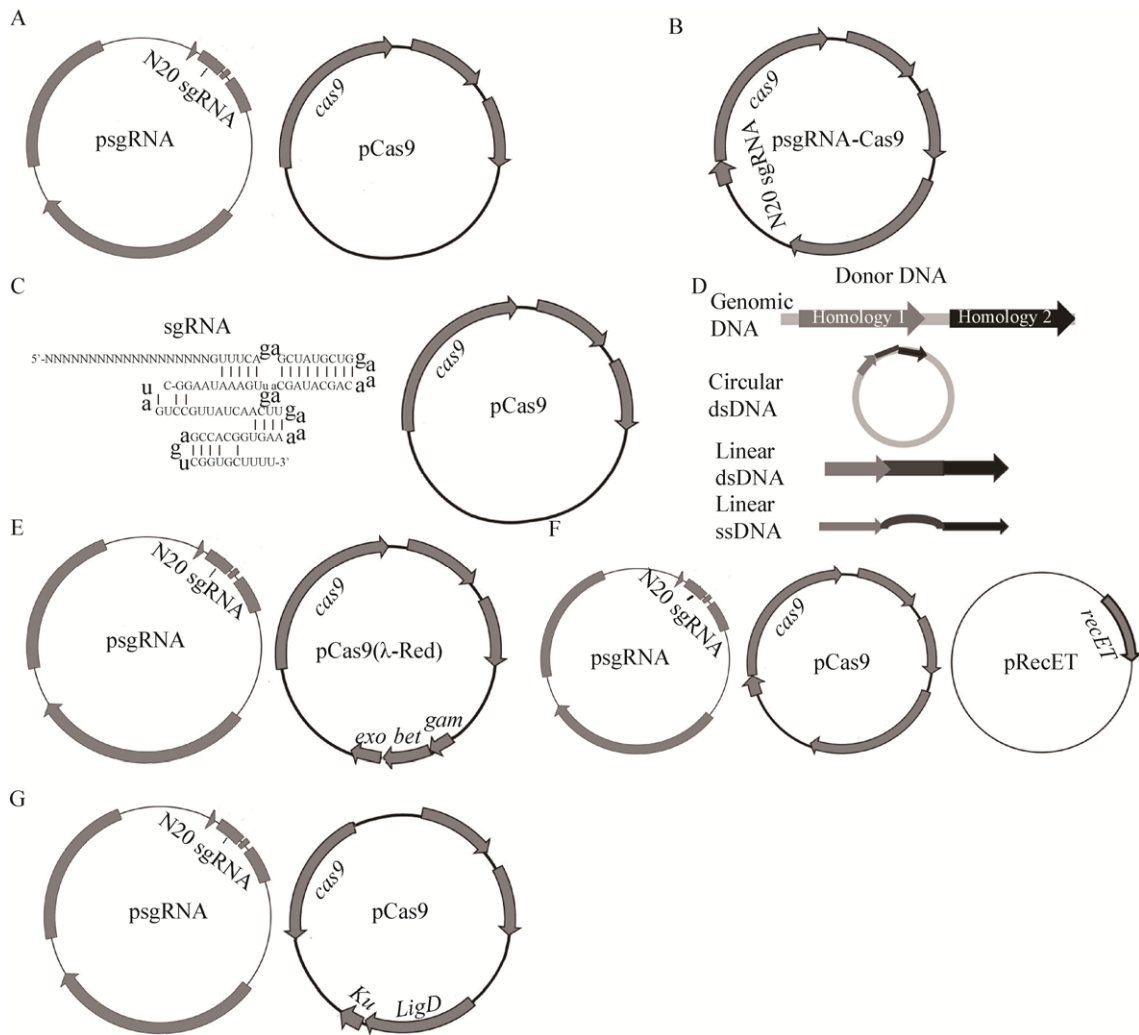


图 1 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑策略

Figure 1 CRISPR/Cas9-mediated genome editing strategies

注: A、B: sgRNA、Cas9 表达框在不同质粒和同一质粒; C: 体外转录形成 sgRNA 和 Cas9 表达质粒; D: Donor 的形式; E、F 和 G: CRISPR/Cas9 系统分别和  $\lambda$ -Red、RecET 和 NHEJ 系统联合使用。

Note: A, B: sgRNA and Cas9 expression cassettes were constructed in two plasmids or one plasmid; C: sgRNA obtained by *in vitro* transcription and Cas9 expression plasmid; D: Different forms of donor; E, F and G: CRISPR/Cas9 technology was used in combination with  $\lambda$ -Red, RecET and NHEJ system, respectively.

Cas9 蛋白在切割靶位点后产生的 DSBs 具有致死效应, 细胞必需修复才能存活。由于多数细菌细胞内不存在 NHEJ 的修复途径, 因此 DSBs 必需依靠供体 DNA (Donor) 或者内源 DNA 才能完成 HDR 修复。用于修复 DSBs 的模板可以是环状 dsDNA (质粒)、线性 dsDNA 或者线性 ssDNA (图 1D)。由于同源重组的效率较低, 并且在非分裂细胞中这种修复途径的效率会进一步降低, 因此

CRISPR/Cas9 系统介导的编辑效率仍有改进的空间。将 CRISPR/Cas9 技术和噬菌体重组工程  $\lambda$ -Red (Exo、Beta 和 Gam 蛋白)、RecET (RecE 和 RecT 蛋白) 或者 NHEJ 途径 (Ku 和 LigD 蛋白) 的异源表达相结合可进一步提高编辑效率, 同时还可以实现多基因和连续的基因组编辑 (图 1E、F、G)。例如, 天津大学的科研人员将  $\lambda$ -Red 系统、Cas9 蛋白表达系统和质粒消除系统整合在一个质粒 pREDCas 中,

表 1 CRISPR/Cas9 技术在微生物基因组编辑中的应用

Table 1 Application of CRISPR/Cas9 technology for microbial genome editing

物种 Species	靶基因的编辑效率 Editing efficiency of targeted genes	修复途径 Repair pathway	参考文献 References
<i>Escherichia coli</i>	<i>rpsL</i> : 65%	HDR ( $\lambda$ -Red)	[22]
	<i>cadA</i> : 86%; <i>maeA+maeB</i> : 97%; <i>cadA+maeA+maeB</i> : 47%; <i>LacZ</i> : 100%;		[35]
	<i>LacZ+galK</i> : 83%; <i>LacZ+galK+ldhA</i> : 23% <i>ppc/FadD</i> : NC		[36]
			[37]
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>stfC/spoIIAC/nprE/aprE/amyE</i> : 33%–53%; <i>amyE</i> : 90%; <i>yvmC</i> : 97%	HDR	[38]
			[39]
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>pyrE</i> : 30%; <i>adc</i> : 6.7%; <i>agrA</i> : 100%	HDR	[40]
<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>adc/xlyR/araR/cbei3923/cbei4495/xylR</i> : 18.8%–100%		
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>lacL/ctrl/srtA/dp6</i> : 90%–100%	HDR (RecT)	[41]
<i>Synechococcus elongatus</i>	<i>nblA</i> : 100%	HDR	[42]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>srtA/bgaA</i> : 75%–100%	HDR	[22]
<i>Tatumella citrea</i>	<i>trkA/glk</i> : 94%–100%	HDR ( $\lambda$ -Red)	[35]
<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>rep</i> : 5%	NHEJ	[43]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>CAN1/ade2-101</i> : 80%–100%	HDR	[23]
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>ura5</i> : 100%; <i>lae1+vib1+clr2</i> : 4.2%	HDR	[44]
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>yA</i> : NC	NHEJ	[45]
<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>alba/pyrG</i> : NC		
<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>amdS</i> : NC	NHEJ	[46]
	<i>cre-1</i> : 95%; <i>cre-1+res-1+gh1-1</i> : 30%; <i>cre-1+res-1+gh1-1+alp-1</i> : 22%	HDR	
<i>Myceliophthora heterothallica</i>	<i>cre-1</i> : 90%	HDR	
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	<i>ssuC/mtmCB1/mtmCB2/mcrA/hdrED</i> : NC	HDR	[47]

注: NC: 没有计算编辑效率; +: 多个基因同时敲除; /: 单个基因敲除。

Note: NC: The editing efficiency was not calculated; +: Multiple genes were simultaneously deleted; /: Single gene was deleted.

然后与 sgRNA 表达质粒、供体 DNA 一起用于大肠杆菌的基因组工程和代谢工程, 单基因缺失的编辑效率接近 100%, 而且还可以一次打靶 3 个基因位点。在突变体筛选之后, 经过诱导质粒消除系统还可以将 sgRNA 表达质粒消除掉, 这样又可以进行下一轮的基因组编辑, 因此十分适合需要改造多个基因的代谢工程研究<sup>[36]</sup>。中国科学院上海生命科学研究院的科研人员利用同样的策略, 证明  $\lambda$ -Red 系统和 CRISPR/Cas9 结合可以显著提高靶基因的编辑效率<sup>[35]</sup>。山东大学的科研人员在大肠

杆菌中表达来自于结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的 Ku 蛋白和 LigD 蛋白, 以重建一个简单的 NHEJ 途径, 结果显示不仅编辑效率显著提高, 而且不需要修复模板和筛选标记<sup>[48]</sup>。此外, CRISPR/Cas9 技术在缺失基因的同时也可以通过修复模板引入新的基因和代谢途径, Ronda 等<sup>[49]</sup>将含有 3 个 sgRNA 串联的载体和参与  $\beta$ -胡萝卜素合成的 3 个基因(*BTS1*、*crtYB* 和 *crtI*)的供体 DNA 一起转化可表达 Cas9 蛋白的酵母工程菌, 最终使酵母能够合成  $\beta$ -胡萝卜素。

为了避免 NHEJ 途径引起的 INDEL 效应, 哈佛大学 Komor 等<sup>[50]</sup>开发了一种新的 CRISPR/Cas9 技术, 主要包括 dCas9 或 Cas9 切口酶以及胞嘧啶脱氨酶, 可以对单个碱基进行编辑。胞嘧啶脱氨酶能将胞嘧啶转化为尿嘧啶, 通过 DNA 复制或修复, 尿嘧啶被转化成胸腺嘧啶, 从而将最初的 CAA 转变为 TAA, 相当于引入一个终止密码子。这种技术无需切割 DNA, 因此不会引起意外的突变, 可对靶基因精确修饰。这种酶最初在人类细胞中应用, 目前已经扩展到微生物中。武汉大学 Zeng 等<sup>[51]</sup>将 CRISPR/Cas9 系统与胞嘧啶脱氨酶 CodA (sm) 反向筛选系统结合起来, 对链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中的放线紫红素聚酮链延长因子基因 *actI-ORF2* 特异性敲除, 建立了一种无标记的基因组编辑和筛选技术。

随着 CRISPR/Cas9 技术的发展, 研究者开始关注该技术的脱靶问题, 即 sgRNA:Cas9 蛋白复合物切割非靶基因或者非靶位点<sup>[52]</sup>。为了提高靶向效率, 降低脱靶效应, 不同的研究者提出不同的策略和方法, 主要有以下两种: (1) 提高 sgRNA 的特异性, 可将 sgRNA 的 3'端或者 5'端缩短, 或者在 sgRNA 的 5'端添加 2 个鸟苷酸, 这些措施均可以降低脱靶效率, 但也有可能降低打靶效率<sup>[53-55]</sup>。由于染色质的状态严重影响 sgRNA:Cas9 蛋白复合物的活性, 因此虽然基因组上可供选择的靶位点较多, 但是绝大多数靶位点(>99%)不能被 sgRNA:Cas9 蛋白复合物结合, 因此靶位点应该尽可能在启动子、增强子和基因内部<sup>[56]</sup>。(2) 突变 Cas9 蛋白, 对野生型 Cas9 进行突变, 使其中 1 个结构域失活, 得到突变型 D10A Cas9 切口酶或者 H840A Cas9 切口酶。利用切口酶对 DNA 进行切割, 发现脱靶效应可降至 1/1 000<sup>[57-58]</sup>。随后, 研究者将 Cas9 蛋白的 2 个结构域同时突变, 产生失活的 dCas9, 然后将 dCas9 与 FokI 核酸酶结合形成融合蛋白(dCas9-FokI), 脱靶效应可降低至 1/5 000<sup>[59-60]</sup>。Slaymaker 等<sup>[61]</sup>对 spCas9 的 3 个氨基酸位点进行结构指导的突变后, 产生的增强型 Cas9 蛋白能够将脱靶突变降低到“无

法检测”的水平, 虽然脱靶效率是在人类胚肾细胞中检测的, 但是对于细菌中 Cas9 蛋白改造仍具有借鉴意义。此外还可以通过调整 sgRNA:Cas9 蛋白的浓度来降低脱靶效应, 但是由于会引起打靶效率的下降, 因此需要综合平衡<sup>[62]</sup>。

#### 4.2 CRISPR/Cas9 系统介导的基因表达调控

CRISPR/Cas9 技术不仅可以进行基因组编辑, 而且还可以在转录和翻译水平上调控基因的表达。dCas9 虽无核酸酶活性, 但是在 sgRNA 的指导下可与特定的 DNA 序列结合, 从而对特定基因表达进行调控。如果 dCas9 在 sgRNA 引导下被用来抑制基因表达, 这一方法称为 CRISPR 干扰技术 (CRISPR interference, CRISPRi)<sup>[63]</sup>。根据 Bikard 等<sup>[64]</sup>和 Qi 等<sup>[65]</sup>的研究结果, dCas9 主要通过两种方式抑制基因的转录: (1) 限制 RNA 聚合酶与启动子结合, 抑制转录起始; (2) 阻止 RNA 聚合酶在 DNA 双链上的滑动, 抑制转录延伸(图 2A)。目前来看, 第 1 种方式更为有效, 基因沉默的效率与目标链的位置无关, 即 dCas9 靶向模板链与非模板链均表现相似的抑制效率。对于第 2 种方式, dCas9 抑制基因转录的效率不仅受 DNA 双链位置的影响, 而且还受靶位点与转录起始位点距离的影响。dCas9 蛋白结合到非模板链时的抑制效率较高, 而且在 RBS 附近的位点更为有效; dCas9 蛋白结合在靶基因的启动子区域可以明显抑制基因的转录。如果结合在基因的 3'末端, 则抑制效率显著降低; 如果结合在模板链基因的末端, 抑制效率则进一步降低<sup>[66-67]</sup>。以上实验结果说明靶位点与转录起始位点的距离与 dCas9 抑制效率存在相反的关系。此外, 有研究者发现截短的 sgRNA 可以结合到靶位点上, 但是不会激发 Cas9 蛋白的核酸酶切割活性, 同样可以达到抑制基因表达的效果<sup>[22,68]</sup>。目前已有多位研究者采用该技术对 *E. coli*<sup>[64-65]</sup>、*S. pneumoniae*<sup>[64]</sup>、*B. subtilis*<sup>[69]</sup>、*Cyanobacterium synechococcus*<sup>[70]</sup>、*Corynebacterium glutamicum*<sup>[71]</sup>、*M. tuberculosis*<sup>[72]</sup>和 *S. cerevisiae*<sup>[73]</sup>等多种微生物进行了研究。



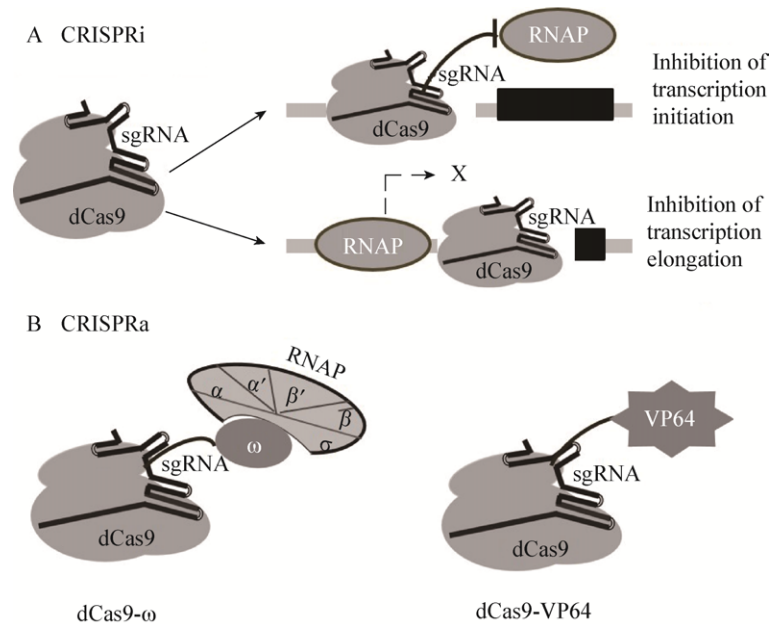


图 2 CRISPR/Cas9 介导的基因表达调控策略

Figure 2 CRISPR/Cas9-mediated gene expression regulation strategies

注: A: CRISPRi, dCas9:sgRNA 复合物结合在启动子区可抑制 RNAP 的转录起始, 或者结合在基因编码区可抑制转录延伸; B: CRISPRa, dCas9 与 RNAP 的  $\omega$  亚基或者转录激活域 VP64 融合表达以增加基因转录水平。

Note: A: CRISPRi, binding of Cas9:sgRNA complexes to promoter blocks binding of RNAP, preventing transcription initiation. Binding of dCas9 to the CDS of a gene blocks further elongation of the transcription. B: CRISPRa, binding of dCas9 fused to  $\omega$  subunit of RNA polymerase (dCas9- $\omega$ ) or transcription activation domain VP64 increases transcription rate.

除转录抑制外, 将 dCas9 蛋白与转录激活结构域融合, 还可以激活特定基因的转录, 这一工具称为 CRISPR activation (CRISPRa) 或者 CRISPR-on<sup>[74]</sup> (图 2B)。靶序列位置对 CRISPRa 激活效率有重要影响, 当靶序列与启动子的距离合适时, 激活效率较高; 靶序列与启动子上游相距较远时, 激活效率会有一定程度的下降。当靶序列与启动子距离过近或位于开放阅读框内时则会产生抑制效应。Bikard 等<sup>[64]</sup>将 RNA 聚合酶的  $\omega$  亚基分别与 dCas9 的 C 端和 N 端融合, 然后转入 *E. coli* MG1655 的  $\omega$  亚基基因 *rpoZ* 缺失突变体中, 结果发现当 dCas9- $\omega$  融合蛋白靶向 *LacZ* 启动子-35 区 59 nt 的位置时, 可以获得 23 倍的诱导效果。Dahlman 等<sup>[75]</sup>利用截短的 sgRNA 和转录激活域嵌合体同 Cas9 蛋白共同转化, 也可以增强基因表达效率。另外, 通过诱导型启动子控制的载体来编

码 dCas9 或 sgRNA 基因, 可以精准地抑制或者激活靶基因表达, 并且还具有可逆性。例如, Farzadfard 等<sup>[76]</sup>将 dCas9 和酿酒酵母的转录激活域蛋白 VP64 连接起来, 可以上调或者下调 GFP 的表达。这些研究扩大 CRISPR/Cas9 技术的应用范围, 同时也为细菌基因表达调控的研究提供一些新的工具和思路。

### 4.3 细菌分型

传统的细菌分型方法依赖于细菌表型特征鉴定, 如生化反应、血清学特点等, 这些方法存在分辨率低、重复性差、操作复杂, 费时费力等缺点。与表型分型相比, 分子分型技术具有快速、准确、重复性好等特点, 已得到广泛应用<sup>[77]</sup>。但是, 基因组测序需要操作人员较高的分析技术, 脉冲场凝胶电泳技术在电泳图谱比较、识别及不同研究之间互相对比时仍存在一定的局限性, 而

且难以区分长期进化过程中源于同一克隆的不同菌株之间微小的 DNA 位点变异。因此这两种方法不适合菌株的快速分型。多位点序列分析(MLST)和多位点可变重复序列分析(MLVA)具有快速简便、分辨率高、重复性好等优点,但是需要在数据库中参比,因而其应用也受到限制。另外,如果看家基因高度保守,也不能进行精确分型。由于有的菌株种间差异小,16S rRNA 基因鉴定只能定位到属的水平,不能鉴定到种的水平。CRISPR/Cas 系统提供一种快速有效和高分辨率的细菌分型方法。CRISPR 的间隔区来自入侵的噬菌体或者质粒 DNA 片段,其来源的多样性导致 CRISPR 位点间隔序列的多态性,通过 CRISPR 位点的 PCR 扩增和测序就可以分析间隔序列的组成和排列顺序,用于细菌分型,这种方法称为 CRISPR 位点基因分型<sup>[78]</sup>。这种方法已经应用在耶尔森氏菌(*Yersinia*)<sup>[78]</sup>、大肠杆菌属(*Escherichia*)<sup>[79]</sup>、沙门氏菌属(*Salmonella*)<sup>[80]</sup>和炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)<sup>[81]</sup>等。尽管依据 CRISPR 基因簇能够有效区分属、种及不同株系的菌株,但该方法也存在局限性。比如,某些细菌中的 CRISPR 位点出现频率低或间隔区种类较多,导致单纯依赖 CRISPR 位点的分辨效果降低,因此需要结合其他方法共同分析。另外,新间隔序列总是插入到前导序列和其临近的重复序列之间,而被剔除的间隔序列通常位于 CRISPR 位点 3'端的末端,不同的间隔序列代表着不同的外源 DNA 侵入历史。因此,CRISPR 位点间隔序列的变化可以反映细菌的进化历程,有助于研究不同细菌之间的亲缘关系。哈佛大学 Shipman 等<sup>[82]</sup>以 CRISPR 位点整合间隔序列的时序性特点为基础开发出一种简单的分子记录设备,即一种突变的大肠杆菌细胞(Cas 蛋白复合体仅由 Cas1 和 Cas2 组成)能够将人工合成的特定 DNA 序列按照时间排序的方式整合到自身的 CRISPR 位点中。该技术和反转录酶联合使用,则可以记录细胞内基因的 mRNA 表达谱,用于基因表达调控的

研究。除了细菌分型,细菌 CRISPR 位点的间隔序列还可以反映细菌与周围噬菌体的互动情况。由于 CRISPR 的间隔序列来自于噬菌体,借助于 DNA 二代测序技术,将环境样品中海量的 CRISPR 序列信息与噬菌体的序列进行比对就能推测细菌生存环境周围的病毒组(Virome),可以反映噬菌体与宿主细菌之间的进化、相互作用及其生态适应等关系。Stern 等<sup>[83]</sup>对 124 个人肠道微生物进行宏基因组测序,通过 CRISPR 分析发现一个由 991 个噬菌体组成的病毒组。因此,CRISPR 结构可以作为细菌分型溯源与进化研究的理想位点,还适用于宿主与病毒之间的互动研究。

#### 4.4 在基因克隆和测序方面的应用

长片段基因簇(尤其是合成高附加值生物分子的基因簇)的克隆是合成生物学和化学生物学研究中最为基础和关键的步骤。传统的 PCR 克隆方法或者通过构建基因组文库筛选等方法存在着克隆片段长度的限制、易产生突变、步骤复杂、效率低下等缺点。中国科学院微生物研究所的研究人员<sup>[84-85]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术对 *E. coli* 基因簇位点两侧进行切割,利用 Gibson 组装方法将切割下来的基因簇和带有 30 bp 同源序列的克隆载体相连,完成 150 kb DNA 的一步克隆。该方法(Cas9-Assisted Targeting of Chromosome segments, CATCH)大大简化细菌长片段 DNA 的克隆步骤,显著缩短实验时间(8 h vs 数天),有利于微生物重要功能基因簇的研究。另外,Wang 等<sup>[86]</sup>将 CRISPR/Cas9 和 Gibson 方法结合起来,开发出一种无缝克隆的方法。由于待插入的目的基因和载体具有相同的同源臂,首先利用 Cas9 蛋白对载体进行切割,经 Gibson 组装后转化大肠杆菌,挑选阳性克隆,这样避开酶切连接法需要载体上必需具有酶切位点或者存在多个酶切位点的限制。根据同样的原理, Lee 等<sup>[87]</sup>利用 CRISPR/Cas9 介导的 TAR (Transformation-associated recombination)克隆方法(TAR-CRISPR)可以显著增加 *S. cerevisiae* 中阳性

克隆的比例,将筛选效率从 0.5%–2% 提高到 32%。

除了应用于基因克隆,CRISPR/Cas9 还被用于消除测序过程中产生的高丰度非特异序列。加州大学旧金山分校的 Gu 等<sup>[88]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术来优化 NGS 和 PCR 技术,这种方法称作 DASH (Depletion of abundant sequences by hybridization),即通过消除来实现靶序列的富集。该方法构建一个 sgRNA 文库来靶向非特异序列,然后利用 Cas9 将其切割以消除 HeLa 细胞线粒体 rRNA,达到富集病原菌序列的目的,有利于测序文库的构建和提高输出序列的质量。

## 5 总结和展望

近年来,能够识别特异性序列的核酸酶已被广泛应用于动植物和微生物的基因组修饰和功能研究。虽然 CRISPR/Cas9 技术发展相对迅速,但是仍有不少的研究者对其进一步改进,如增加 Cas9 酶的来源,有研究者发现蛋白分子量更小的 Cas 蛋白如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 SaCas9, SaCas9 比当前广泛使用的 SpCas9 小 25%,解决了腺病毒等载体因负载能力有限而难以同时包装 SpCas9 酶和其他基因编辑必需的元件进入到单个病毒颗粒中这一问题<sup>[89]</sup>。此外,研究人员还利用分子进化系统对 SaCas9 进行改造,从而扩大它的靶向范围<sup>[90]</sup>。该技术的应用范围也在不断扩大,如将 dCas9:sgRNA 和荧光蛋白结合起来可研究细菌染色结构和动态变化。通过基因工程技术,将小片段的病毒原间隔序列整合到 CRISPR 的重复序列中可以增强一些工业微生物或者发酵微生物的噬菌体抵抗能力<sup>[9]</sup>。将 dCas9 或者 sgRNA 与甲基化酶或者去甲基化酶、乙酰化酶或者去乙酰化酶、激酶等参与表观调控酶相耦联用于控制基因的表达与关闭,可用于表观遗传学的研究。因此,CRISPR/Cas 系统的广泛应用将对生物学的发展产生深远的影响。作为一项新技术,CRISPR/Cas 系统也存在一些需要解决的问题,如脱靶效应是所有基因组编辑技术所面临的主要问题之一,但是目前 Cas9 的切

割特异性仍然有待进一步提高。我们相信,随着越来越多研究者和实验室的加入,CRISPR/Cas9 技术的功能会进一步完善,不同版本的 CRISPR/Cas9 技术会被开发出来用于微生物以及动植物基因功能和代谢调控合成生物学等研究领域。

## REFERENCES

- [1] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(7): 397-405
- [2] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. 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
- [3] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, bacteria and mitochondria[J]. Molecular Microbiology, 2000, 36(1): 244-246
- [4] Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1565-1575
- [5] Jansen R, van Embden JD, Gaastra W, et al. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes[J]. OMICS: A Journal of Integrative Biology, 2002, 6(1): 23-33
- [6] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 60(2): 174-182
- [7] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies[J]. Microbiology, 2005, 151(3): 653-663
- [8] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. Microbiology, 2005, 151(8): 2551-2561
- [9] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712
- [10] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA[J]. Science, 2008, 322(5909): 1843-1845
- [11] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. Science, 2008, 321(5891): 960-964
- [12] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA[J]. Nature, 2010, 468(7320): 67-71
- [13] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. Nature, 2011, 471(7340): 602-607
- [14] Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(21):

- 9275-9282
- [15] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. 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
- [16] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821
- [17] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823
- [18] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826
- [19] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system[J]. Nature Methods, 2013, 10(8): 741-743
- [20] Chang NN, Sun CH, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos[J]. Cell Research, 2013, 23(4): 465-472
- [21] Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(20): e188
- [22] Jiang WY, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 233-239
- [23] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(7): 4336-4343
- [24] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 6(3): 181-186
- [25] Barrangou R, Marraffini L. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity[J]. Molecular Cell, 2014, 54(2): 234-244
- [26] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. Science, 2010, 327(5962): 167-170
- [27] Silas S, Mohr G, Sidote DJ, et al. Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein[J]. Science, 2016, 351(6276): aad4234
- [28] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway[J]. Annual Review of Biochemistry, 2010, 79(1): 181-211
- [29] Marraffini LA, Sontheimer EJ. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity[J]. Nature, 2010, 463(7280): 568-571
- [30] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes[J]. PLoS Computational Biology, 2005, 1(6): e60
- [31] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 467-477
- [32] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(11): 722-736
- [33] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. Science, 2016, 353(6299): aaf5573
- [34] Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, et al. Cas13b is a Type VI-B CRISPR-associated RNA-Guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28[J]. Molecular Cell, 2017, 65(4): 618-630
- [35] Jiang Y, Chen B, Duan CL, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(7): 2506-2514
- [36] Li YF, Lin ZQ, Huang C, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 13-21
- [37] Xia J, Zheng MG, Wang L, et al. Knocking out phosphoenolpyruvate carboxylase gene by CRISPR/Cas and its influence on fatty acid metabolism in *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2016, 48(8): 1864-1871 (in Chinese)  
夏军, 郑明刚, 王玲, 等. 运用 CRISPR/Cas 系统敲除大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因及其对脂肪酸代谢的影响[J]. 微生物学通报, 2016, 48(8): 1864-1871
- [38] Zhang K, Duan XG, Wu J. Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27943
- [39] Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system[J]. Applied Environmental Microbiology, 2011, 82(17): 5421-5427
- [40] Li Q, Chen J, Minton NP, et al. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*[J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(7): 961-972
- [41] Oh JH, van Pijkeren JP. CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 42(17): e131
- [42] Wendt KE, Ungerer J, Cobb RE, et al. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing Cyanobacterium *Synechococcus elongates* UTEX 2973[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 1-8
- [43] Cao QH, Shao HH, Qiu H, et al. Using the CRISPR/Cas9 system to eliminate native plasmids of *Zymomonas mobilis* ZM4[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, 81(3): 453-459
- [44] Liu R, Chen L, Jiang YP, et al. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system[J]. Cell Discovery, 2015, 1: 15007
- [45] Nødvig CS, Nielsen JB, Kogle ME, et al. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133085
- [46] Liu Q, Gao RR, Li JC, et al. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 1
- [47] Nayak DD, Metcalf WW. Cas9-mediated genome editing in the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(11): 2976-2981

- [48] Su TY, Liu FP, Gu PF, et al. A CRISPR-Cas9 assisted non-homologous end-joining strategy for one-step engineering of bacterial genome[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37895
- [49] Ronda C, Maury J, Jakočianus T, et al. CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 97
- [50] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424
- [51] Zeng H, Wen SS, Xu W, et al. Highly efficient editing of the actinorhodin polyketide chain length factor gene in *Streptomyces coelicolor* M145 using CRISPR/Cas9-CodA(sm) combined system[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2015, 99(24): 10575-10585
- [52] Cho SW, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases [J]. *Genome Research*, 2014, 24(1): 132-141
- [53] Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(3): 279-284
- [54] Fu Y, Reyon D, Joung JK. Targeted genome editing in human cells using CRISPR/Cas nucleases and truncated guide RNAs[J]. *Methods in Enzymology*, 2013, 546: 21-45
- [55] Zhang XH, Tee LY, Wang XG, et al. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2015, 4(11): e264
- [56] Wu XB, Scott DA, Kriz AJ, et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(7): 670-676
- [57] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389
- [58] Mali P, Aach J, Stranges PB, et al. Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 833-838
- [59] Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(6): 569-576
- [60] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(6): 577-582
- [61] Slaymaker IM, Gao LY, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J]. *Science*, 2016, 351(6268): 84-88
- [62] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 827-832
- [63] Larson MH, Gilbert LA, Wang XW, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2180-2196
- [64] Bikard D, Jiang WY, Samai P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(15): 7429-7437
- [65] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183
- [66] Luo ML, Leenay RT, Beisel CL. Current and future prospects for CRISPR-based tools in bacteria[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(5): 930-943
- [67] Choi KR, Lee SY. CRISPR technologies for bacterial systems: current achievements and future directions[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(7): 1180-1209
- [68] Kiani S, Chavez A, Tuttle M, et al. Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(11): 1051-1054
- [69] 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
- [70] Gordon GC, Korosh TC, Cameron JC, et al. CRISPR interference as a titratable, *trans*-acting regulatory tool for metabolic engineering in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 170-179
- [71] Cleto S, Jensen JVK, Wendisch VF, et al. *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi)[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(5): 375-385
- [72] Singh AK, Carette X, Potluri LP, et al. Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(18): e143
- [73] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes[J]. *Cell*, 2013, 154(2): 442-451
- [74] Cheng AW, Wang HY, Yang H, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR- on, an RNA-guided transcriptional activator system[J]. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1163-1171
- [75] Dahlman JE, Abudayyeh OO, Joung J, et al. Orthogonal gene knockout and activation with a catalytically active Cas9 nuclease[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(11): 1159-1161
- [76] Farzadfar F, Perli SD, Lu TK. Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(2): 604-613
- [77] Barrangou R, Dudley EG. CRISPR-based typing and next-generation tracking technologies [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2016, 7(1): 395-411
- [78] Cui YJ, Li YJ, Gorgé O, et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2652
- [79] Toro M, Cao GJ, Ju WT, et al. Association of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) elements with specific serotypes and virulence potential of shiga toxin-producing *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(4): 1411-1420
- [80] Shariat N, Dimarzio MJ, Yin S, et al. The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar enteritidis[J]. *Food Microbiology*, 2013, 34(1): 164-173

- [81] Gao ZQ, Wang DS, Feng EL, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) site in *Bacillus anthracis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(11): 1362-1368 (in Chinese)  
高志奇, 王东澍, 冯尔玲, 等. 炭疽芽胞杆菌中 CRISPR 位点[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1362-1368
- [82] Shipman SL, Nivala J, Macklis JD, et al. Molecular recordings by directed CRISPR spacer acquisition[J]. Science, 2016, 353(6298): aaf1175
- [83] Stern A, Mick E, Tirosh I, et al. CRISPR targeting reveals a reservoir of common phages associated with the human gut microbiome[J]. Genome Research, 2012, 22(10): 1985-1994
- [84] Jiang WJ, Zhao XJ, Gabrieli T, et al. Cas9-assisted targeting of chromosome segments CATCH enables one-step targeted cloning of large gene clusters[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8101
- [85] Jiang WJ, Zhu TF. Targeted isolation and cloning of 100-kb microbial genomic sequences by Cas9-assisted targeting of chromosome segments[J]. Nature Protocols, 2016, 11(5): 960-975
- [86] Wang JW, Wang A, Li KY, et al. CRISPR/Cas9 nuclease cleavage combined with Gibson assembly for seamless cloning[J]. BioTechniques, 2015, 58(4): 161-170
- [87] Lee NC, Larionov V, Kouprina N. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated TAR cloning of genes and chromosomal loci from complex genomes in yeast[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(8): e55
- [88] Gu W, Crawford ED, O'Donovan BD, et al. Depletion of Abundant Sequences by Hybridization (DASH): using Cas9 to remove unwanted high-abundance species in sequencing libraries and molecular counting applications[J]. Genome Biology, 2016, 17: 41
- [89] Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9[J]. Nature, 2015, 520(7546): 186-191
- [90] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, et al. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(12): 1293-1298

### 2018 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-3)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
32	第三届全国病毒学青年学者学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	11 月	300	福建福州	吴莹
33	第三届合成微生物学与生物制造学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	11 月	300	上海	张立新 021-64252575
34	第十三届全国芽胞杆菌青年工作者学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	11 月	200	天津	蔡峻 caijun@nankai.edu.cn
35	第一届全国根际微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	11 月	200	山东泰安	杜秉海 du_binghai@163.com
36	第二十一次全国环境微生物学学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	11 月	600	广东汕头	胡忠 hzh@stu.edu.cn
37	2018 年酿造分会学术年会	中国微生物学会酿造分会	11 月 15-16 日	150	湖北武汉	高洁
38	中国微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	12 月	150	待定	010-53218310
39	幽门螺杆菌谷氏快速分离培养、鉴定、药敏试验试剂盒应用培训班	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	12 月	50	浙江宁波	曾雯琪 0574-87035856
40	第七届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	12 月	200 人	江西南昌	龙中儿, 杨慧林 0791-88121571
41	2018 年生物制品年会	中国微生物学会生物制品专业委员会	待定	1000	待定	毛群颖 18810054059