

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-047

基因组编辑技术及其在合成生物学中的应用

曹中正^{1,2}, 张心怡³, 徐艺源³, 周卓^{3,4,5,6}, 魏文胜^{1,3,4,5,6}

(¹北大-清华生命科学联合中心, 北京 100871; ²北京大学前沿交叉学科研究院, 北京 100871; ³北京大学生命科学学院, 北京 100871; ⁴北京大学生物医学前沿创新中心, 北京 100871; ⁵北京未来基因诊断高精尖创新中心, 北京 100871; ⁶北京大学基因组编辑研究中心, 北京 100871)

摘要: 基因组编辑技术是一种能够定向修改基因组的强有力工具。近年来, CRISPR/Cas9 系统因其易于构建、编辑效率高等优点逐渐成为应用最为广泛的基因组编辑工具。合成生物学作为一门整合了工程学思维以及生物学原理的新生交叉学科, 在生物学、医学、化学、农业、能源和环境等领域发挥着重要的作用。合成生物学对于 DNA 等遗传物质的合成、组装和编辑等操作有着巨大的需求, 因此基因组编辑技术在合成生物学中有着广泛的应用。本文综述了以 ZFN 和 TALEN 为代表的早期基因组编辑技术, 以及新型 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的原理、发展、作用机制、系统优化、衍生技术以及应用。同时也介绍了基因组编辑技术在基因表达调控、微生物基因编辑和分子记录等合成生物学领域的应用, 并展望了基因组编辑技术的前景以及在合成生物学领域的发展趋势。

关键词: 基因组编辑; CRISPR/Cas9; 合成生物学; 基因表达调控; 微生物基因编辑; 分子记录

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A

Genome editing technology and its applications in synthetic biology

CAO Zhongzheng^{1,2}, ZHANG Xinyi³, XU Yiyuan³, ZHOU Zhuo^{3,4,5,6}, WEI Wensheng^{1,3,4,5,6}

(¹PKU-Tsinghua Center for Life Sciences, Beijing 100871, China; ²Academy for Advanced Interdisciplinary Studies, Peking University, Beijing 100871, China; ³School of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China; ⁴Biomedical Pioneering Innovation Center, Peking University, Beijing 100871, China; ⁵Beijing Advanced Innovation Center of Genomics, Beijing 100871, China; ⁶Peking University Genome Editing Research Center, Beijing 100871, China)

Abstract: A vast amount of genetic information has been garnered with the rapid development of sequencing technology over the past decades. To decipher this information, genome editing tools that could functionally perturb specific genomic sequences have been developed. By recognizing DNA sequence, ZFN and TALEN emerged early as primitive genome editing approaches. Recently, the CRISPR/Cas9 system has become the most widely used genome editing tool due to its convenience of assembly and high efficiency. As a novel interdisciplinary field, synthetic biology has been developed through integrating engineering principles and biological fundamentals with the help from biotechnology tools. With the aim of improving our ability to decode and reprogram biological systems, synthetic

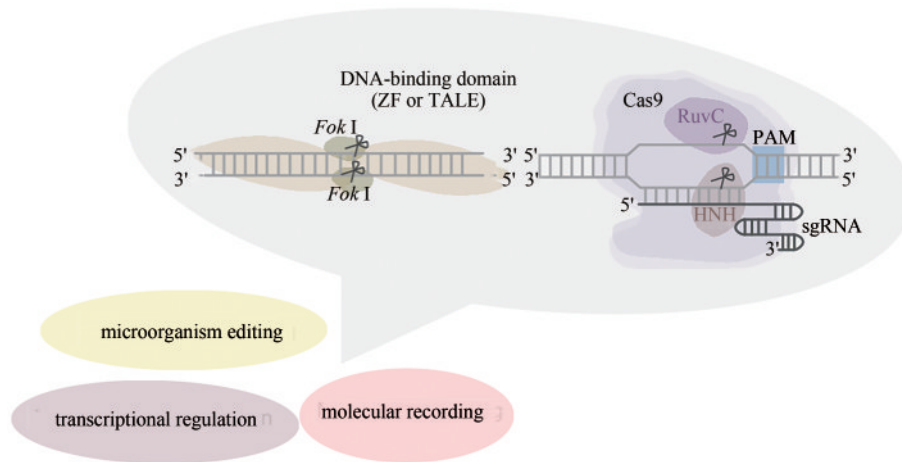
收稿日期: 2020-04-13 修回日期: 2020-09-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31930016)

引用本文: 曹中正, 张心怡, 徐艺源, 周卓, 魏文胜. 基因组编辑技术及其在合成生物学中的应用[J]. 合成生物学, 2020, 1(4): 413-426

Citation: CAO Zhongzheng, ZHANG Xinyi, XU Yiyuan, ZHOU Zhuo, WEI Wensheng. Genome editing technology and its applications in synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(4): 413-426

biology has a tremendous demand for DNA synthesis, assembly and editing. With genome editing tools, synthetic biology promises innovations in the fields of biology, medicine, chemistry, agriculture, energy, environment, *etc.* In this review, we briefly describe the early genome editing tools: ZFN and TALEN. Furthermore, we comprehensively introduce the discovery, principle, development, optimization, derivative tools and applications of CRISPR/Cas9 system. Especially, we review the applications of these genome editing tools in synthetic biology from three aspects. The first is the application of genome editing tools in transcriptional regulation, such as precise gene expression regulation in dynamic biological process; the second is the application in engineering microbial strains, such as boosting the yield of antibiotic drugs and discovering potential resource for active natural products by manipulating specific gene or synthetic pathway; the last is their application in molecular recording, such as various approaches to record occurrence of detected signal or dynamic transcriptional information and to complete lineage tracing in live cells. Finally, we discuss current challenges and potential improvements of genome editing tools and envisage the future development of genome editing technology in synthetic biology.



Keywords: genome editing; CRISPR/Cas9; synthetic biology; gene expression regulation; gene editing; molecular recording

随着人类基因组计划的完成和测序数据的不断积累, 研究者们已经掌握了海量的DNA遗传信息, 但是这些信息所代表的生物学意义却有待进一步的挖掘。近年来, 以基因组编辑为代表的新型生物技术正在飞速发展。这种简单易行的技术使得研究者们可以对基因组或者基因转录后产物进行编辑, 从而大大提高了科学家们解码基因功能以及调控基因表达的能力。基因组编辑这一革命性技术的发现与完善, 必将对人类的基础科学研究、工农业生产以及生命健康等诸多领域产生深远的影响。本文将着重介绍以CRISPR系统为代表的新型基因组编辑技术, 并对该技术在合成生

物学中的应用进行阐述。

1 基因组编辑技术

基因组编辑技术, 是指一种对目标基因进行编辑或修饰的基因工程技术。目前, 应用最为广泛的主要有以下3种技术: 锌指蛋白核酸酶 (zinc-finger nuclease, ZFN)^[1]、类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN)^[2] 以及 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR; CRISPR-associated, Cas) 系统^[3-5]。

1.1 早期基因组编辑工具

1.1.1 ZFN 技术

ZFN是由锌指蛋白(zinc-finger protein, ZFP) DNA结合域与核酸内切酶Fok I切割结构域融合而成的一种基因编辑工具^[1]。锌指是构成锌指蛋白的基本单元,每个锌指大约含有30个氨基酸,并通过保守的Cys2-His2残基与锌原子螯合,形成稳定而紧实的 β - β - α (N端-C端)基序^[6-8]。锌指 α 螺旋表面的氨基酸残基与DNA双螺旋大沟中的碱基通过相互作用进行识别,每个锌指能够识别3个碱基。因此,将不同的锌指进行串联就可以设计出识别特定DNA序列的锌指蛋白^[9-10]。

Fok I是一种IIS型限制性核酸内切酶^[11],与识别特定DNA序列的锌指蛋白融合后,可构成一个锌指蛋白核酸酶的单体^[1]。只有当两组锌指蛋白核酸酶的单体分别靶向DNA的正反两条链,并在基因组上具备适宜的间隔时(通常是5~7 bp),Fok I才能够形成具有切割活性的二聚体^[12-13]。ZFN产生双链断裂(double-stranded break, DSB)后,会激活细胞内非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)^[14]或同源重组(homologous recombination, HR)^[15]修复途径,从而实现特定基因的编辑。但ZFN设计成本昂贵,制备复杂,且容易受到上下文效应(context effect)的影响,严重限制了该技术的推广与应用^[8]。

1.1.2 TALEN 技术

类转录激活因子效应物(transcription activator-like effector, TALE)是一种来自于植物致病菌黄单胞杆菌(*Xanthomonas*)中的蛋白^[16]。TALE蛋白N端是转运信号(translocation signal)^[17],C端含有核定位信号(nuclear localization signal)^[18]与转录激活结构域(activation domain)^[19],中间部分则是具有特异性识别和结合DNA功能的结构域^[20]。这些DNA结合结构域由33~35个氨基酸组成的重复序列串联而成,在这些重复序列中,第12、13位氨基酸是高度可变的,被称为重复可变双残基(repeat variable di-residue, RVD)^[21-22]。RVD的不同决定了TALE识别碱基的特异性,例如NI、HD、NG和

NN四种RVD分别对应识别A、C、T和G四种碱基^[21]。与ZFN类似,研究者们将不同TALE蛋白串联后与Fok I融合形成TALEN,两个TALEN单体分别靶向DNA的两条链即可达到基因编辑的目的^[2]。由于TALEN的制备比较复杂,其应用也有着一定的限制。

1.2 CRISPR/Cas系统

1.2.1 CRISPR/Cas系统的发现与发展

CRISPR/Cas系统是细菌和古生菌中一种抵御外源遗传物质入侵的适应性免疫机制。1987年,科学家们最早在大肠杆菌中发现了间隔串联重复序列^[23],随后的研究发现这样的重复序列广泛存在于细菌与古生菌中^[24]。2007年,Barrangou等^[25]提供了CRISPR作为免疫系统抵抗噬菌体感染的首个直接证据。2010年,Garneau等^[26]首次证实了crRNA(CRISPR RNA)可以在体内介导CRISPR系统切割双链DNA。2011年,Siksnys课题组^[27]将嗜热链球菌的CRISPR系统转移到大肠杆菌中,发现这种异源系统可以抵抗质粒转化和噬菌体侵染。2012年,Doudna和Charpentier课题组^[4]以及Siksnys课题组^[28]证实,体外重构的CRISPR系统可以对双链DNA进行切割。2013年,Zhang课题组^[3]和Church课题组^[5]成功运用CRISPR系统,在哺乳动物细胞中实现内源基因的编辑。至此,CRISPR系统开始发展成为快捷高效的基因组编辑工具。

CRISPR/Cas通常由一系列CRISPR相关(CRISPR-associated, Cas)基因与CRISPR阵列组成。CRISPR阵列由一系列高度保守的正向重复序列和序列特异的间隔序列组成。目前CRISPR系统可以被分为2大类和6小型^[29-31],1类系统包括I型、III型和IV型,2类系统包括II型、V型和VI型,每种类型使用一组独特的Cas蛋白和crRNA来行使功能^[32]。本文作者将以II型CRISPR系统产脓链球菌的SpCas9(*Streptococcus pyogenes* Cas9)蛋白为例,介绍其具体的作用机理。

1.2.2 CRISPR/Cas9系统的作用机制

CRISPR介导的防御机制可分为3个阶段:适应、表达与干扰^[33]。在适应阶段,系统对入侵质

粒或噬菌体的DNA片段进行选择 and 切割^[25]，在Cas1-Cas2复合体的帮助下，将其整合成新的间隔序列^[33]。间隔序列的选择由原间隔区相邻基序（protospacer adjacent motif, PAM）引导，不同物种来源的CRISPR/Cas系统具有不同的PAM，同时PAM对于系统区分自身序列和外源序列具有至关重要的作用^[34]。在表达阶段，系统将CRISPR阵列转录成长的前体CRISPR RNA（pre-crRNA），同时转录出与pre-crRNA中重复序列互补配对的反式激活crRNA（trans-activating crRNA, tracrRNA）。pre-crRNA与tracrRNA的互补配对能够触发体内RNase III等核酸酶的切割机制，产生一系列间隔序列不同的成熟crRNA^[4, 35]。在干扰阶段，Cas9蛋白与tracrRNA-crRNA形成的复合物在外源基因组上寻找PAM序列，并在PAM序列处停留与识别。一旦间隔序列能够与外源基因组上的序列完全互补配对，Cas9蛋白就会对基因组位点进行切割，从而达到降解外源遗传物质的目的^[36]。

1.2.3 SpCas9的结构及其系统优化

SpCas9的结构被分为 α 螺旋识别区（recognition lobe, REC）和核酸酶区（nuclease lobe, NUC）^[37]。前者是Cas9蛋白家族中序列保守度最低的区域，负责RNA-DNA的识别，而核酸酶区则包含了HNH、RuvC以及负责与PAM识别的PI结构域。RuvC和HNH是两个核酸酶结构域，其中HNH以独立的形式存在，而RuvC则被分成3个亚结构域，RuvC I位于SpCas9的N端，RuvC II和III排列在HNH结构域的两端。HNH结构域对sgRNA的互补链进行切割，而RuvC结构域则对sgRNA的非互补链进行切割（图1）。两个区之间通过富含精氨酸的桥螺旋（bridge helix, BH）连接起来，该部分与sgRNA有直接的相互作用。

为了更便捷地使用CRISPR/Cas9系统，研究人员对其进行了一些优化。Jinek等^[4]通过一段GAAA序列将crRNA的3'端与tracrRNA的5'端融合在一起，形成了单链引导RNA（single guide RNA, sgRNA），在不影响效率的同时简化了系统组分（图1）。此外，Zhang课题组^[3]对SpCas9蛋白进行密码子优化，并加入核定位信号，提高了SpCas9蛋白转运到哺乳动物细胞核内的效率。有研究表明，sgRNA在哺乳动物细胞内的表达水平

较低，限制了CRISPR/Cas9系统的应用^[38]。因此Chen等^[39]对sgRNA的骨架结构进行了优化：他们将sgRNA茎环结构中第4个连续的U替换为A，避免了Pol III启动子的提前终止；同时他们将sgRNA骨架上的发夹结构延伸了5对碱基，以便SpCas9与sgRNA的结合。基于以上的优化，CRISPR/Cas9系统只需要导入Cas9与sgRNA即可实现高效的基因组编辑。

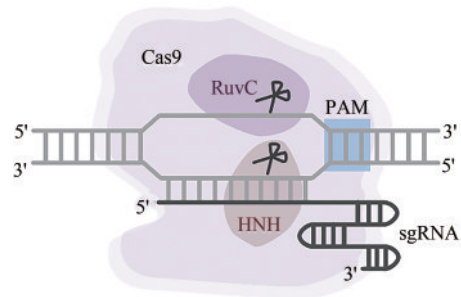


图1 CRISPR/Cas9系统介导基因组编辑

Fig. 1 Schematic of the CRISPR/Cas9 mediated genome editing

1.2.4 多种CRISPR/Cas系统

由于1类CRISPR系统需要多个Cas蛋白形成复合物才能发挥功能，而2类系统只需要单个Cas蛋白即可对靶向序列进行切割^[29]，因此2类系统被广泛应用于各项研究中。除了SpCas9，目前还有多种系统正处于开发和应用的过程中。SaCas9（*Staphylococcus aureus* Cas9）是来自金黄色葡萄球菌的Cas9蛋白，其作用机理和编辑效率与SpCas9类似，识别NNGRRT的PAM序列^[40]。SaCas9蛋白较小，只有1053个氨基酸，可以和sgRNA一起被装载进单个腺相关病毒（adeno-associated virus, AAV）载体中，因此在基因治疗的临床应用上具有优势。2015年，Zetsche等^[41]报道了另一种2类系统Cpf1（也称Cas12a），该系统只需要crRNA介导即可进行基因组编辑，不依赖于tracrRNA的产生。Cpf1识别PAM序列为TTN，切割靶向DNA后会产生黏性末端。随后，通过对CRISPR/Cas基因座进行序列比对分析，Shmakov等^[30]与Abudayyeh等^[42]报道了C2c1（Cas12b）、C2c2（Cas13a）等新系统。其中C2c2是靶向RNA的系统，通过一条crRNA介导，能够实现对单链RNA的切割。相信在不远的将来，具有新型应用特点的CRISPR系统会不断被发现。

1.2.5 CRISPR/Cas 延展技术

随着研究的深入,人们对CRISPR结构和功能的认知越来越清晰,多种基于CRISPR系统的新工具也应运而生。2013年,Qi等^[43]对Cas9核酸酶结构域进行突变(H840A,D10A),产生了只有结合功能但不具有切割活性的dCas9(dead Cas9),实现了利用CRISPR进行基因表达调控的目的,他们将这一系统命名为CRISPRi(CRISPR interference)。该技术通过靶向基因的转录起始位点(transcriptional starting site, TSS),干扰RNA聚合酶或转录因子与DNA的结合以及转录的延伸,从而达到抑制基因表达的目的。在此基础上,Gilbert等^[44]将dCas9与转录抑制因子KRAB融合,提高了CRISPRi的效率,有效抑制了内源基因的表达。此外,研究人员将dCas9与招募转录激活因子的蛋白例如VP64或p65激活结构域(p65AD)融合,开发出CRISPRa(CRISPR activation)系统,可以高效上调基因的表达^[44-46]。

如果将调节转录的结构域替换成其他功能的蛋白,则可以产生多种不同的工具。例如,通过将dCas9与组蛋白去甲基化酶LSD1进行融合,Kearns等^[47]建立了一种可以检测远端顺式调控元件的方法。Hilton等^[48]将dCas9与乙酰转移酶p300进行融合,开发了可以在表观修饰水平上调节基因表达的工具。在活细胞成像领域dCas9系统同样大放异彩,例如Chen等^[39]将EGFP与dCas9蛋白融合在一起,利用sgRNA介导,成功在活细胞中实现了端粒重复元件与编码基因的成像,促进了自然状态下染色体构象和动力学的研究。

2016年,多个课题组开发了可以将胞嘧啶转换为胸腺嘧啶的碱基编辑器(cytosine base editor, CBE),在不引入DSB的情况下,实现了精准的单碱基编辑^[49-51]。经过一系列的优化^[52],CBE目前常用的形式是将胞嘧啶脱氨酶与Cas9切口酶(nickase Cas9, nCas9)融合,通过sgRNA靶向到特定序列,脱氨酶将编辑窗口内单链DNA上的胞嘧啶脱氨成尿嘧啶,nCas9则在与sgRNA互补的DNA链上进行切割,造成单链断裂,激活细胞内DNA修复机制,促使细胞以被脱氨后的单链为模板进行修复,将原有的C-G碱基对替换为T-A。同时融合表达的尿嘧啶DNA糖苷酶抑制剂(uracil

DNA glycosylase inhibitor, UGI)能够抑制碱基切除修复途径,提高编辑效率。2017年,Liu课题组^[53]进一步扩大了碱基编辑系统的类型,通过将人工进化的腺嘌呤脱氨酶与nCas9融合,开发出能将腺嘌呤转换为鸟嘌呤的腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)。腺嘌呤脱氨后变成次黄嘌呤,在下次DNA复制过程中被识别为鸟嘌呤,实现A到G的替换。2019年,Liu课题组^[54]又报道了Prime Editor技术,将逆转录酶融合在nCas9的C端,同时在sgRNA的3'端延伸出一段序列作为逆转录的引物和模板,实现了任意碱基之间的替换以及特定碱基序列的插入与删除。

1.2.6 CRISPR/Cas 系统的应用

CRISPR/Cas9系统作为一种高效的基因组编辑技术,目前已成功应用于酿酒酵母^[55]、线虫^[56]、果蝇^[57]、斑马鱼^[58]、拟南芥^[59]、水稻^[60]、小鼠^[61]、大鼠^[62]以及多种人类细胞系^[3, 5]中,同时其在高通量筛选、基因治疗、农作物育种及性状改良等方面也有着广泛的应用。

CRISPR/Cas9系统在建立混合文库型高通量筛选策略之后^[63-66],被迅速运用于多种细胞系中必需基因的筛选^[67]以及非编码调控元件的筛选^[68-72],这些研究极大促进了科学家们对基因功能的理解。单细胞测序技术与CRISPR高通量筛选技术的结合,大大拓宽了高通量筛选的适用场景^[73-77]。研究者们将等温扩增技术与CRISPR/Cas13a、CRISPR/Cas12a等系统结合,开发了一系列快速灵敏的核酸检测技术^[78-82],可以在短时间内检测病原物的存在,例如寨卡病毒、登革热病毒等。此外,利用CRISPR/Cas9与第3代纳米孔测序技术,研究人员实现了在起始基因组量很少的情况下,对DNA突变、区域修饰以及结构改变等的检测^[83]。

作为一种特殊的基因治疗方式,CRISPR系统可以通过基因组编辑对细胞进行工程改造,从而治疗多种疾病,例如单基因遗传病的突变校正、嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)T细胞疗法的改进以及再生医学的应用等^[84]。例如, β -地中海贫血病的治疗是通过腺相关病毒将CRISPR/Cas9系统与同源重组模板递送到病人造血干细胞中,实现HBB基因突变位点的校正^[85]。Xu等^[86]通过CRISPR/Cas9系统对成体造血干细胞的

CCR5 基因进行编辑，并回输到患有艾滋病和白血病的患者体内，成功缓解了两种疾病的症状。此外，利用 CRISPR/Cas9 技术编辑内源基因，可以最大限度地减弱 T 细胞受体或人类白细胞抗原介导的排异反应，产生更高效的 CAR-T 细胞^[87-89]。在作物育种与性状改良方面，CRISPR 系统也发挥了巨大的作用，研究人员已经实现了作物产量相关性状的改良^[90-92]、营养质量的提高^[93-95]以及抗逆抗病能力的增强^[96-98]。

2 基因组编辑技术在合成生物学中的应用

合成生物学是一门新兴的交叉学科，主要利用工程学的思维在生物学领域进行应用，旨在提高解码和重编程生物学系统的能力^[99]。合成生物学能够改造和优化已有的自然生物体系，或者重新设计合成具有特定功能的人工生物体系，实现在化工、能源、医药、环境等领域的规模化应用。在合成生物学的标准化以及模块化等诸多过程中，基因组编辑技术起着重要的作用。下面将介绍基因组编辑技术在合成生物学中的应用，着重以 CRISPR 系统为例（图2）。

2.1 基因组编辑技术介导的真核转录调控

基因组编辑技术可以进行精准的转录调控，因此被广泛应用于基因动态过程的调控以及细胞命运的操纵。

Rivenbark 等^[100]将 ZFP 与 DNA 甲基转移酶 DNMT3a 融合，使得 *Maspin* 和 *SOX2* 基因的启动子区域产生甲基化修饰，在乳腺癌细胞中实现了长期稳定的基因表达下调。Khalil 等^[101]利用人工合成的 ZFP 与多种转录因子融合，构建了正交合成的转录因子文库，通过改变不同的转录因子输入信号，可以在酵母中研究单个转录因子以及转录调控网络的功能。Keung 等^[102]将 223 个酵母染色质调节因子与 ZFP 融合，通过研究不同时空组合下染色质调节因子所产生的转录行为，解析了染色质调控的复杂性，为染色质介导的转录调控提供了新的工具。Maeder 等^[103]利用 TALE 与 TET1

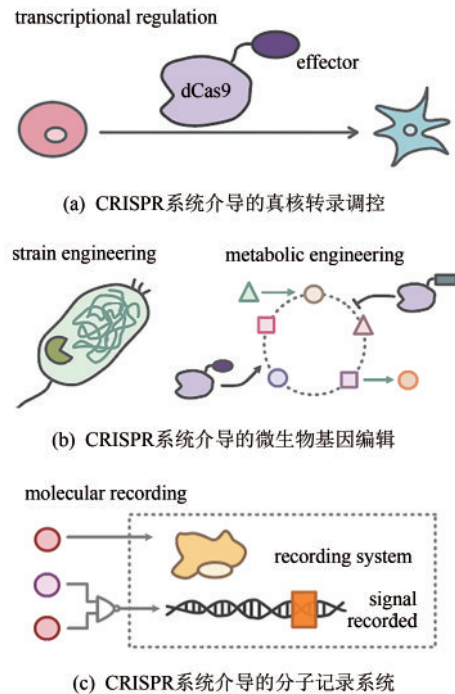


图2 CRISPR系统在合成生物学中的应用

Fig. 2 Applications of the CRISPR system in synthetic biology

羟化酶的融合蛋白，实现了启动子区域 CpG 位点的去甲基化，从而调节了内源基因的表达。Mendenhall 等^[104]将 TALE 与组蛋白去甲基化酶 LSD1 融合，通过在靶位点上去除增强子相关的染色质修饰，下调近端基因的表达。Konermann 等^[105]将 TALE 与光敏蛋白 CRY2 及其互作蛋白 CIB1 融合，开发了一套基于光诱导的双杂交转录效应物系统 LITE，成功在小鼠神经元细胞以及大脑中实现了可逆的内源基因表达及染色质表观修饰调控。Zhang 等^[106]通过融合 TALE 与 VP64，在 293FT 细胞中实现了内源基因 *SOX2* 与 *KLF4* 的上调表达。

Chavez 等^[107]通过 dCas9 与转录激活结构域 VP64-p65-Rta 的顺序组合，建立 dCas9-VPR 系统，成功在体内激活内源的编码基因和非编码基因，促使人诱导多能干细胞向神经元细胞的分化。Tanenbaum 等^[108]通过在 dCas9 的 C 端融合表达多个肽簇，同时表达该肽簇对应抗体与 VP64 的融合蛋白，建立了 Suntag 系统，高效地实现了 *CXCR4* 等基因的激活调控。Konermann 等^[109]通过在 sgRNA 上拼接适配体，并通过表达能够识别 RNA 适配体的转录激活因子融合蛋白，建立了 SAM 系

统, 成功实现了内源基因和非编码基因的激活, 同时完成了 BRAF 抑制剂的全基因组筛选。Chakraborty 等^[110] 利用 dCas9-VP64 系统上调小鼠 *MYOD1* 基因的表达, 成功使得小鼠胚胎成纤维细胞分化为骨骼肌细胞。Kearns 等^[111] 利用 dCas9-VP64 系统上调了指征人胚胎干细胞中内胚层分化的 *SOX17* 基因的表达, 同时也利用 CRISPRi 系统对人胚胎干细胞 *OCT4* 基因和 *NANOG* 基因进行抑制, 从而影响了干细胞的多能性。Liu 等^[112] 将 dCas9 与 DNMT3a 或 Tet1 融合, 通过催化甲基化或者去甲基化, 在体内外均能够实现基因的表达抑制或激活。Kwon 等^[113] 通过将 dCas9 与组蛋白去乙酰化酶 HDAC3 融合, 发现可以对内源基因实现转录抑制, 并且抑制效率与 sgRNA 呈现剂量依赖效应。诱导型的转录调控系统可以响应光或小分子等外界信号, 在特定信号存在时, 启动转录调控, 这一手段对了解基因的动态网络十分重要^[114-117]。Qi 课题组^[117] 报道了诱导型的正交转录调控系统, 在同一细胞内实现了复杂的转录调控。基于 dSpCas9 与 dSaCas9 的正交性, 他们利用 dSpCas9-KRAB 和 dSaCas9-VPR 在抑制 EGFP 报告基因表达的同时上调了 mCherry 报告基因的表达。此外, 他们将脱落酸诱导系统和赤霉素诱导系统与转录调控系统组合, 产生多种 AND、OR、NAND 及 NOR 的布尔逻辑门。同时 CRISPR 系统介导的真核转录调控在遗传性疾病的临床治疗中也发挥着重要的作用。Liao 等^[118] 通过对 SAM 系统进行优化, 利用 AAV 递送靶向序列较短的 sgRNA 和野生型的 Cas9 进入杜氏肌营养不良的小鼠中, 成功上调了 *DMD* 基因的表达, 显著改善了小鼠的肌肉功能。Liu 等^[119] 利用 dCas9-Tet1 融合蛋白, 在脆性 X 染色体综合征病人的诱导多功能干细胞中, 成功激活了 *FMRP* 基因的转录表达, 这种激活作用能够持续至少两周时间, 并且没有检测到明显的脱靶作用。Moreno 等^[120] 利用两个 AAV 载体, 将 CRISPRi 系统递送至色素性视网膜炎小鼠模型的视网膜下空间, 成功实现了对 *Nrl* 基因的抑制, 调控了视杆细胞向视锥细胞分化, 达到了治疗的效果。

2.2 基因组编辑技术介导的微生物基因编辑

微生物一直是许多抗生素类药物和活性天然产物的重要合成来源, 但是这些次级代谢产物在衍生品开发和规模化制备等方面都存在瓶颈, 需要对特定的基因或者同时对合成通路里面的多个基因进行编辑, 从而达到改良菌种的目的。

Zhang 课题组^[121] 利用 TALEN 在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中对乙醇脱氢酶 *ADH2* 进行敲除, 从而大幅度提高了酒精的产量。而后该课题组^[122] 在纤维素堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) 中, 利用 TALE-VP64 与 dCas9-VP64 系统, 使埃博霉素的产量得到了不同程度的提升。研究者们将 CRISPRi 系统用于谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*), 可以提升 L-赖氨酸的效价, 增加 L-谷氨酸的产量^[123-124]。Wu 等^[125] 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中应用 CRISPRi 系统对糖酵解途径、TCA 循环、脂肪酸合成途径进行调控, 实现了类黄酮的增产。此外, Schwartz 等^[126] 在耶氏解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 中利用 CRISPRa 系统提高 β -葡糖苷酶的表达, 获得了以纤维二糖为碳源的改良菌株, 拓宽了这一工程菌的适用范围。

研究者们也利用 CRISPR 系统进行多基因的编辑, 希望能够快速高效地获得目标菌株。Cobb 等^[127] 开发出 pCRISPOmyces 方法, 成功地在变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 中同时敲除了 *redN* 和 *actVA-ORF5* 基因, 并证实该方法在白色链霉菌 (*Streptomyces albus*) 和产绿色链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 中具有 67%~100% 不等的敲除效率。Jia 等^[128] 通过对环状链霉菌 (*Streptomyces rimosus*) 的 *zwf2* 和 *devB* 基因进行敲除, 使抗菌药物土霉素的产量提高了 36.8%。Zhang 等^[129] 在酿酒酵母中利用 gRNA-tRNA 串联的阵列, 能够同时靶向 8 个目的基因, 他们将此方法应用于简化酵母脂质代谢网络, 成功使得游离脂肪酸的产量提高了 30 倍。Li 等^[130] 利用 CRISPR/Cpf1 系统在天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中实现了一个或者多个基因的敲除, 效率最高可达 95%。Tong 等^[131] 利用碱基编辑技术开发出 CRISPR-BEST 系统, 成功地在放线菌黄色霉素合

成通路的 *kirN* 基因中引入提前的终止密码子, 通过结合 *Csy4* 他们还实现了多个位点的同时编辑。另外, 通过对多个基因进行快速敲除, 能够鉴定未知的生物合成途径。例如在旱地小单孢菌 (*Micromonospora chersina*) 中, 通过敲除 8 个不同的基因簇, Cohen 等^[132] 成功鉴定出聚酮合酶 *DynE8* 同时参与烯二炔和蒽醌的生物合成。除此之外, CRISPR/Cas9 系统还可以将异源的启动子定点整合至基因的上游, 从而激活基因的表达。例如, Zhang 等^[133] 利用该策略在玫瑰链球菌 (*Streptomyces roseosporus*) 得到具有抗真菌活性的物质、在委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*) 中得到具有抗原原虫活性的物质以及在产绿色链霉菌中得到新型的色素类产品。

2.3 基因组编辑技术介导的分子记录系统

基因组编辑技术的出现使得人们可以在活细胞中动态地更改遗传信息, 并利用基因组 DNA 的强大承载力对信息进行存储^[134]。基因组编辑技术通过响应光、温度或金属离子等对分子记录器元件进行控制, 可以实现对特定信号的活细胞记录。分子记录系统在研究细胞分化、免疫细胞的发育、疾病及环境监测等领域有着重要应用。

依赖于 CRISPR 系统的分子记录器可以分为 3 类: ①碱基编辑器介导的分子记录系统; ②Cas9 核酸酶及 sgRNA 介导的分子记录系统; ③Cas1-Cas2 蛋白介导的分子记录系统。

碱基编辑器介导的分子记录系统是利用 dCas9 (或 nCas9) 和脱氨酶的融合蛋白, 在 sgRNA 的引导下, 对特定位点进行脱氨, 达到改写的目的。Liu 研究组^[135] 开发的 CAMERA 技术和 Lu 研究组^[136] 开发的 DOMINO 技术均是利用可调控的碱基编辑器, 在被检测信号存在时, 完成位点特异性的编辑, 并通过荧光信号的变化或该位点编辑比例的变化指征事件的发生。这一类系统由于产生精准的突变类型, 可以被用于模拟记录、数字记录和各类复杂计算中。

Cas9 核酸酶及 sgRNA 介导的分子记录系统是指, 通过 NHEJ 修复途径在靶位点产生的丰富突变作为每一个细胞特有的条形码, 对特定的信号或

细胞的发育过程进行记录, 以完成谱系追踪。Shendure 研究组及合作者^[137] 开发了 GESTALT (genome editing of synthetic target arrays for lineage tracing) 技术, 通过细胞之间突变模式的不同来区分它们的世代关系, 并对斑马鱼的细胞进行谱系重构, 发现大多数成体斑马鱼的细胞均来自于少数胚胎祖细胞。Cai 研究组及合作者^[138] 报道了 MEMOIR (memory by engineered mutagenesis with optical *in situ* readout) 技术, 在 CRISPR/Cas9 系统产生突变后利用单分子 RNA 荧光杂交 (smFISH) 技术, 完成了胞内发生事件的记录以及胚胎干细胞的谱系重构。除对外源的靶位点进行突变以外, sgRNA 表达序列本身也可以被当作靶位点^[139-140]。Lu 研究组^[140] 开发了 mSCRIBE (mammalian synthetic cellular recorders integrating biological events) 技术, 将 sgRNA 表达序列作为靶位点, 利用 sgRNA 自切割所产生的多种突变作为条形码, 完成了 NF- κ B 通路激活和 LPS 介导的炎症反应的记录。

Cas1-Cas2 蛋白介导的分子记录系统是利用 CRISPR 系统的间隔序列获取机制, 将外源 DNA 整合进前导序列中, 以记录特定序列的存在。间隔序列的顺序, 也指征着该特定序列被 Cas1-Cas2 蛋白获取的先后次序^[141-143]。Church 研究组^[142] 利用 Cas1-Cas2 介导的间隔序列获取系统, 对黑白图像的像素值和一部数字电影进行了编码, 并将其记录在细菌中。Wang 研究组^[143] 开发了 TRACE (temporal recording in arrays by CRISPR expansion) 系统, 以生物录音带的形式将外界信号记录储存下来, 同时他们也尝试了对铜、海藻糖和岩藻糖这类代谢物进行记录。

3 展望

合成生物学是一个高度交叉的研究领域, 涉及基础的生物学研究、工程技术和计算机建模等诸多方面, 因此合成生物学的突破依赖于各个学科的协调发展。基因组编辑技术的出现加速了合成生物学的发展, 但是该技术仍然存在一些问题以及改善的空间, 同时该技术在合成生物学领域的应用也有待进一步的开发。

初代的基因组编辑技术 ZFN 和 TALEN, 虽说在构建上略显烦琐, 但是在某些应用场景中仍然具有独特的优势, 例如对真核细胞线粒体基因组的编辑。而目前以 CRISPR/Cas9 为代表的新型基因组编辑工具最为研究者们所关注的问题有三点: 一是拓宽可编辑的范围; 二是减少脱靶效应; 三是提高递送效率。由于 CRISPR 系统主要来源于微生物, 研究者们可以通过生物信息学的方法从环境微生物 (例如极端环境微生物) 的测序数据中发掘出具有不同特性的新型系统, 利用此方法拓宽可编辑的范围是未来的一个重要研究方向。同时研究者们也可以对已有的系统进行优化, 使其具有识别更广阔 PAM 的能力^[144-148]。这些方法虽然一定程度上减弱了 PAM 限制, 但是大多时候也会降低原始 PAM 的限制作用, 从而加剧脱靶效应, 在使用时应当按照实际需求选择适宜的突变体。对于减少脱靶效应, 目前研究者们可以通过结构优化或者随机突变的形式获得高保真的突变体^[149-151]。但是这些突变体均不完美, 都是以牺牲打靶效率为代价来降低脱靶效应, 因此继续优化发展真正意义上的高保真突变体将是未来的研究重点。此外, 小型 Cas 蛋白的发现^[152-153]或现有 Cas 蛋白的长度优化^[154]对于提高 AAV 等病毒载体的递送效率具有重要的意义。

虽然基因组编辑技术在合成生物学领域已经有了诸多的应用, 但是依然存在较大的改善空间。首先在基因表达调控方面, 发展多种正交的系统可以实现对不同基因不同方向的表达调控, 这对于基因网络的研究具有十分重要的作用。同时, 发展可控的表达调控系统 (例如小分子诱导或者光控) 以及运用布尔逻辑门也有助于对目的基因的精准调控。其次在微生物编辑方面, 目前绝大多数情况下只能通过效率较低的同源重组对双链断裂进行修复^[155], 极大限制了该技术的应用。未来可以通过碱基编辑器和引导编辑器 (PE 系统) 等不产生双链断裂的技术提高编辑效率或者结合 CRISPR 系统与重组酶等实现高效的插入和删除, 从而达到改良菌种、优化更多生物合成路径的目的。此外, 合成生物学利用 CRISPR 系统已经能够初步实现信息的存储和读取, 但在效率、容量和稳定性方面仍有较大的提升空间, 希望将来可以

将生物存储应用于更多的场景。

综上所述, 基因组编辑技术的发展能够极大促进合成生物学的应用, 同时合成生物学又能够指导和优化现有的基因组编辑工具, 两者相辅相成, 必将在生物医药、化工生产、环境能源等诸多领域取得突破性的进展。

参 考 文 献

- [1] KIM Yang Gyun, CHA Jooyeon, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93: 1156-1160.
- [2] CHRISTIAN M, CERMAK T, DOYLE E L, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases [J]. *Genetics*, 2010, 186: 757-761.
- [3] CONG Le, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339: 819-823.
- [4] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337: 816-821.
- [5] MALI P, YANG Luhan, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339: 823-826.
- [6] LEE M S, GIPPERT G P, SOMAN K V, et al. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain [J]. *Science*, 1989, 245: 635-637.
- [7] MILLER J, MCLACHLAN A D, KLUG A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes [J]. *EMBO Journal*, 1985, 4: 1609-1614.
- [8] WOLFE S A, NEKLUDOVA L, PABO C O. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins [J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2000, 29: 183-212.
- [9] CHOO Yen, SANCHEZ-GARCIA I, KLUG A. *In vivo* repression by a site-specific DNA-binding protein designed against an oncogenic sequence [J]. *Nature*, 1994, 372: 642-645.
- [10] DESJARLAIS J R, BERG J M. Use of a zinc-finger consensus sequence framework and specificity rules to design specific DNA binding proteins [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90: 2256-2260.
- [11] LI Lin, WU L P, CHANDRASEGARAN S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89: 4275-4279.
- [12] BIBIKOVA M, CARROLL D, SEGAL D J, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21: 289-297.

- [13] BITINAITE J, WAH D A, AGGARWAL A K, et al. FokI dimerization is required for DNA cleavage [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95: 10570-10575.
- [14] LIEBER M R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway [J]. Annual Review of Biochemistry, 2010, 79: 181-211.
- [15] SAN FILIPPO J, SUNG P, KLEIN H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination [J]. Annual Review of Biochemistry, 2008, 77: 229-257.
- [16] BONAS U, STALL R E, STASKAWICZ B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [J]. Molecular and General Genetics, 1989, 218: 127-136.
- [17] SZUREK B, ROSSIER O, HAUSE G, et al. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas AvrBs3* protein into the plant cell [J]. Molecular Microbiology, 2002, 46: 13-23.
- [18] YANG Yinong, GABRIEL D W. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995, 8: 627-631.
- [19] ZHU Weiguang, YANG Bing, CHITTOOR J M, et al. *AvrXa10* contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11: 824-832.
- [20] BOCH J, BONAS U. *Xanthomonas AvrBs3* family-type III effectors: discovery and function [J]. Annual Review of Phytopathology, 2010, 48: 419-436.
- [21] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. Science, 2009, 326: 1509-1512.
- [22] MOSCOU M J, BOGDANOVA A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. Science, 2009, 326: 1501.
- [23] 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: 5429-5433.
- [24] GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats [J]. BMC Bioinformatics, 2007, 8: 172.
- [25] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. Science, 2007, 315: 1709-1712.
- [26] GARNEAU J E, DUPUIS M E, VILLION M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. Nature, 2010, 468: 67-71.
- [27] SAPRANAUSKAS R, GASIUNAS G, FREMAUX C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39: 9275-9282.
- [28] 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: E2579-E2586.
- [29] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNABASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. Nature Reviews: Microbiology, 2015, 13: 722-736.
- [30] SHMAKOV S, ABUDAYYEH O O, MAKAROVA K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems [J]. Molecular Cell, 2015, 60: 385-397.
- [31] KOONIN E V, MAKAROVA K S, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems [J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 37: 67-78.
- [32] WRIGHT A V, NUNEZ J K, DOUDNA J. A biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering [J]. Cell, 2016, 164: 29-44.
- [33] RATH D, AMLINGER L, RATH A, et al. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications [J]. Biochimie, 2015, 117: 119-128.
- [34] MOJICA F J M, DIEZ-VILLASENOR C, GARCIA-MARTINEZ J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system [J]. Microbiology, 2009, 155: 733-740.
- [35] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. Nature, 2011, 471: 602-607.
- [36] STERNBERG S H, REDDING S, JINEK M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 [J]. Nature, 2014, 507: 62-67.
- [37] NISHIMASU H, RAN F A, HSU P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [J]. Cell, 2014, 156: 935-949.
- [38] JINEK M, EAST A, CHENG A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells [J]. eLife, 2013, 2: e00471.
- [39] CHEN Baohui, GILBERT L A, CIMINI B A, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system [J]. Cell, 2013, 155: 1479-1491.
- [40] RAN F A, CONG Le, YAN W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. Nature, 2015, 520: 186-191.
- [41] ZETSCHE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. Cell, 2015, 163: 759-771.
- [42] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S,

- et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. *Science*, 2016, 353: aaf5573.
- [43] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152: 1173-1183.
- [44] GILBERT L A, LARSON M H, MORSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes [J]. *Cell*, 2013, 154: 442-451.
- [45] MAEDER M L, LINDER S J, CASCIO V M, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes [J]. *Nature Methods*, 2013, 10: 977-979.
- [46] PEREZ-PINERA P, KOCAK D D, VOCKLEY C M, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors [J]. *Nature Methods*, 2013, 10: 973-976.
- [47] KEARNS N A, PHAM H, TABAK B, et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion [J]. *Nature Methods*, 2015, 12: 401-403.
- [48] HILTON I B, D'IPPOLITO A M, VOCKLEY C M, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33: 510-517.
- [49] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533: 420-424.
- [50] MA Yunqing, ZHANG Jiayuan, YIN t, et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells [J]. *Nature Methods*, 2016, 13: 1029-1035.
- [51] NISHIDA K, ARAZOE T, YACHIE N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems [J]. *Science*, 2016: 353.
- [52] REES H A, LIU D R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19: 770-788.
- [53] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551: 464-471.
- [54] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576: 149-157.
- [55] DICARLO J E, NORVILLE J E, MALI P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: 4336-4343.
- [56] FRIEDLAND A E, TZUR Y B, ESVELT K M, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system [J]. *Nature Methods*, 2013, 10: 741-743.
- [57] YU Zhongsheng, REN Mengda, WANG Zhanxiang, et al. Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila* [J]. *Genetics*, 2013, 195: 289-291.
- [58] HWANG W Y, FU Yanfang, REYON D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 227-229.
- [59] LI Jianfeng, NORVILLE J E, AACH J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 688-691.
- [60] JIANG Wenzhi, ZHOU Huanbin, BI Honghao, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: e188.
- [61] SHEN Bin, ZHANG Jun, WU Hongya, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. *Cell Research*, 2013, 23: 720-723.
- [62] LI Dali, QIU Zhongwei, SHAO Yanjiao, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 681-683.
- [63] WANG T, WEI J J, SABATINI D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Science*, 2014, 343: 80-84.
- [64] SHALEM O, SANJANA N E, HARTENIAN E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. *Science*, 2014, 343: 84-87.
- [65] ZHOU Yuexin, ZHU Shiyu, CAI Changzu, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells [J]. *Nature*, 2014, 509: 487-491.
- [66] KOIKE-YUSA H, LI Yilong, TAN E-Pien, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32: 267-273.
- [67] HART T, CHANDRASHEKHAR M, AREGGER M, et al. High-resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype-specific cancer liabilities [J]. *Cell*, 2015, 163: 1515-1526.
- [68] CANVER M C, SMITH E C, SHER F, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated *in situ* saturating mutagenesis [J]. *Nature*, 2015, 527: 192-197.
- [69] FULCO C P, MUNSCHAUER M, ANYOHA R, et al. Systematic mapping of functional enhancer-promoter connections with CRISPR interference [J]. *Science*, 2016, 354: 769-773.
- [70] ZHU Shiyu, LI Wei, LIU Jingze, et al. Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR-Cas9 library [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34: 1279-1286.
- [71] LIU S J, HORLBECK M A, CHO Seung Woo, et al. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells [J]. *Science*, 2017: 355.
- [72] LIU Ying, CAO Zhongzheng, WANG Yinan, et al. Genome-wide screening for functional long noncoding RNAs in human

- cells by Cas9 targeting of splice sites [J]. *Nature Biotechnology*, 2018.
- [73] ADAMSON B, NORMAN T M, JOST M, et al. A multiplexed single-cell CRISPR screening platform enables systematic dissection of the unfolded protein response [J]. *Cell*, 2016, 167: 1867-1882.
- [74] DATLINGER P, RENDEIRO A F, SCHMIDL C, et al. Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout [J]. *Nature Methods*, 2017, 14: 297-301.
- [75] DIXIT A, PARNAS O, LI Biyu, et al. Perturb-seq: dissecting molecular circuits with scalable single-cell RNA profiling of pooled genetic screens [J]. *Cell*, 2016, 167: 1853-1866.
- [76] JAITIN D A, WEINER A, YOFE I, et al. Dissecting immune circuits by linking CRISPR-pooled screens with single-cell RNA-seq [J]. *Cell*, 2016, 167: 1883-1896.
- [77] XIE Shiqi, DUAN Jialei, LI Boxun, et al. Multiplexed engineering and analysis of combinatorial enhancer activity in single cells [J]. *Molecular Cell*, 2017, 66: 285-299.
- [78] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. *Science*, 2018, 360: 439-444.
- [79] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE Jeong Wook, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356: 438-442.
- [80] CHEN J S, MA Enbo, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360: 436-439.
- [81] LI Shiyuan, CHENG Qiuxiang, WANG Jingman, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. *Cell Discovery*, 2018, 4: 20.
- [82] LI Linxian, LI Shiyuan, WU Na, et al. HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8: 2228-2237.
- [83] GILPATRICK T, LEE I, GRAHAM J E, et al. Targeted nanopore sequencing with Cas9-guided adapter ligation [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(4):433-438.
- [84] PORTEUS M H. A new class of medicines through DNA editing [J]. *New England Journal of Medicine*, 2019, 380: 947-959.
- [85] DEVER D P, BAK R O, REINISCH A, et al. CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2016, 539: 384-389.
- [86] XU Lei, WANG Jun, LIU Yulin, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia [J]. *New England Journal of Medicine*, 2019, 381: 1240-1247.
- [87] EYQUEM J, MANSILLA-SOTO J, GIAVRIDIS T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection [J]. *Nature*, 2017, 543: 113-117.
- [88] REN Jiangtao, ZHANG Xuhua, LIU Xiaojun, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 17002-17011.
- [89] LIU Xiaojuan, ZHANG Yongping, CHENG Chen, et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells [J]. *Cell Research*, 2017, 27: 154-157.
- [90] LI Meiru, LI Xiaoxia, ZHOU Zejiao, et al. Reassessment of the four yield-related Genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 377.
- [91] XU Rongfang, YANG Yachun, QIN Ruiying, et al. Rapid improvement of grain weight *via* highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice [J]. *J Genet Genomics*, 2016, 43: 529-532.
- [92] SOYK S, MULLER N A, PARK Soon Ju, et al. Variation in the flowering gene *SELF PRUNING 5G* promotes day-neutrality and early yield in tomato [J]. *Nature Genetics*, 2017, 49: 162-168.
- [93] SUN Yongwei, JIAO Guiai, LIU Zupei, et al. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017: 8, 298.
- [94] MORINEAU C, BELLEC Y, TELLIER F, et al. Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15: 729-739.
- [95] DONG O X, YU Shu, JAIN R, et al. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 1178.
- [96] WANG Fujun, WANG Chunlian, LIU Piqing, et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene *OsERF922* [J]. *PloS One*, 2016, 11: e0154027.
- [97] MCLEOD C, SMITH P, MCGUINNESS S L, et al. Human case of *Balantidium* infection in Australia [J]. *Pathology*, 2015, 47: 603-604.
- [98] ALI Z, ALI S, TASHKANDI M, et al. CRISPR/Cas9-mediated immunity to Geminiviruses: differential interference and evasion [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26912.
- [99] ANDRIANANTOANDRO E, BASU S, KARIG D K, et al. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline [J]. *Molecular Systems Biology*, 2006, 2: 2006.0028.
- [100] RIVENBARK A G, STOLZENBURG S, BELTRAN A S, et al. Epigenetic reprogramming of cancer cells *via* targeted DNA methylation [J]. *Epigenetics*, 2012, 7: 350-360.
- [101] KHALIL A S, LU T K, BASHOR C J, et al. A synthetic biology framework for programming eukaryotic transcription functions [J]. *Cell*, 2012, 150: 647-658.
- [102] KEUNG A J, BASHOR C J, KIRIAKOV S, et al. Using targeted chromatin regulators to engineer combinatorial and spatial

- transcriptional regulation [J]. *Cell*, 2014, 158: 110-120.
- [103] MAEDER M L, ANGSTMAN J F, RICHARDSON M E, et al. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 1137-1142.
- [104] MENDENHALL E M, WILLIAMSON K E, REYON D, et al. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 1133-1136.
- [105] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states [J]. *Nature*, 2013, 500: 472-476.
- [106] ZHANG Feng, CONG Le, LODATO S, et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29: 149-153.
- [107] CHAVEZ A, SCHEIMAN J, VORA S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming [J]. *Nature Methods*, 2015, 12: 326-328.
- [108] TANENBAUM M E, GILBERT L A, QI L S, et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging [J]. *Cell*, 2014, 159: 635-646.
- [109] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex [J]. *Nature*, 2015, 517: 583-588.
- [110] CHAKRABORTY S, JI HaYeun, KABADI A M, et al. A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3: 940-947.
- [111] KEARNS N A, GENGA R M, ENUAMEH M S, et al. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells [J]. *Development*, 2014, 141: 219-223.
- [112] LIU X S, WU Hao, JI Xiong, et al. Editing DNA methylation in the mammalian genome [J]. *Cell*, 2016, 167: 233-247.
- [113] KWON D Y, ZHAO Yingtao, LAMONICA J M, et al. Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15315.
- [114] ZETSCHKE B, VOLZ S E, ZHANG Feng. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33: 139-142.
- [115] POLSTEIN L R, GERSBACH C A. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation [J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11: 198-200.
- [116] NIHONGAKI Y, YAMAMOTO S, KAWANO F, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system [J]. *Chemistry and Biology*, 2015, 22: 169-174.
- [117] GAO Yuchen, XIONG Xin, WONG S, et al. Complex transcriptional modulation with orthogonal and inducible dCas9 regulators [J]. *Nature Methods*, 2016, 13: 1043-1049.
- [118] LIAO Hsin-Kai, HATANAKA F, ARAOKA T, et al. *In vivo* target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation [J]. *Cell*, 2017, 171: 1495-1507.
- [119] LIU X S, WU Hao, KRZISCH M, et al. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the *FMR1* gene [J]. *Cell*, 2018, 172: 979-992 e976.
- [120] MORENO A M, FU Xin, ZHU Jie, et al. *In situ* gene therapy via AAV-CRISPR-Cas9-mediated targeted gene regulation [J]. *Molecular Therapy*, 2018, 26: 1818-1827.
- [121] YE Wei, ZHANG Weimin, LIU Taomei, et al. Improvement of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by high-efficient disruption of the *ADH2* gene using a novel recombinant TALEN vector [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1067.
- [122] YE Wei, LIU Taomei, ZHU Muzi, et al. An easy and efficient strategy for the enhancement of epothilone production mediated by TALE-TF and CRISPR/dcas9 systems in *Sorangium cellulosum* [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 334.
- [123] LINDNER S N, PETROV D P, HAGMANN C T, et al. Phosphotransferase system-mediated glucose uptake is repressed in phosphoglucosomerase-deficient *Corynebacterium glutamicum* strains [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79: 2588-2595.
- [124] SAWADA K, ZEN-IN S, WADA M, et al. Metabolic changes in a pyruvate kinase gene deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12: 401-407.
- [125] WU Junjun, DU Guocheng, CHEN Jian, et al. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13477.
- [126] SCHWARTZ C, CURTIS N, LOBS A K, et al. Multiplexed CRISPR activation of cryptic sugar metabolism enables *Yarrowia lipolytica* growth on cellobiose [J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 13: e1700584.
- [127] COBB R E, WANG Yajie, ZHAO Huimin. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4: 723-728.
- [128] JIA Haiyan, ZHANG Longmei, WANG Tongtong, et al. Development of a CRISPR/Cas9-mediated gene-editing tool in *Streptomyces rimosus* [J]. *Microbiology*, 2017, 163: 1148-1155.
- [129] ZHANG Yueping, WANG Juan, WANG Zibai, et al. A gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 1053.
- [130] LI Lei, WEI Keke, ZHENG Guosong, et al. CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84.

- [131] TONG Y J, WHITFORD C M, ROBERTSEN H L, et al. 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: 20366-20375.
- [132] COHEN D R, TOWNSEND C A. A dual role for a polyketide synthase in dynemicin enediyne and anthraquinone biosynthesis [J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10: 231-236.
- [133] ZHANG M M, WONG Fongtian, WANG Yajie, et al. CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters [J]. *Nature Chemical Biology*, 2017. doi:10.1038/nchembio.2341.
- [134] FARZADFARD F, LU T K. Emerging applications for DNA writers and molecular recorders [J]. *Science*, 2018, 361: 870-875.
- [135] TANG Weixin, LIU D R. Rewritable multi-event analog recording in bacterial and mammalian cells [J]. *Science*, 2018, 360: eaap8992.
- [136] FARZADFARD F, GHARAEI N, HIGASHIKUNI Y, et al. Single-nucleotide-resolution computing and memory in living cells [J]. *Molecular Cell*, 2019, 75: 769-780.
- [137] MCKENNA A, FINDLAY G M, GAGNON J A, et al. Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing [J]. *Science*, 2016, 353: aaf7907.
- [138] FRIEDA K L, LINTON J M, HORMOZ S, et al. Synthetic recording and in situ readout of lineage information in single cells [J]. *Nature*, 2017, 541: 107-111.
- [139] KALHOR R, MALI P, CHURCH G M. Rapidly evolving homing CRISPR barcodes [J]. *Nature Methods*, 2017, 14: 195-200.
- [140] PERLI S D, CUI C H, LU T K. Continuous genetic recording with self-targeting CRISPR-Cas in human cells [J]. *Science*, 2016: 353.
- [141] SHIPMAN S L, NIVALA J, MACKLIS J D, et al. Molecular recordings by directed CRISPR spacer acquisition [J]. *Science*, 2016, 353: aaf1175.
- [142] SHIPMAN S L, NIVALA J, MACKLIS J D, et al. CRISPR-Cas encoding of a digital movie into the genomes of a population of living bacteria [J]. *Nature*, 2017, 547: 345-349.
- [143] SHETH R U, YIM Sung Sun, WU F L, et al. Multiplex recording of cellular events over time on CRISPR biological tape [J]. *Science*, 2017, 358: 1457-1461.
- [144] HU J H, MILLER S M, GEURTS M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity [J]. *Nature*, 2018, 556: 57-63.
- [145] KLEINSTIVER B P, PREW M S, TSAI S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities [J]. *Nature*, 2015, 523: 481-485.
- [146] MILLER S M, WANG T, RANDOLPH P B, et al. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 471-481.
- [147] NISHIMASU H, SHI Xi, ISHIGURO S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space [J]. *Science*, 2018, 361: 1259-1262.
- [148] WALTON R T, CHRISTIE K A, WHITTAKER M N, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants [J]. *Science*, 2020.
- [149] CHEN J S, DAGDAS Y S, KLEINSTIVER B P, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy [J]. *Nature*, 2017, 550: 407-410.
- [150] KLEINSTIVER B P, PATTANAYAK V, PREW M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [J]. *Nature*, 2016, 529: 490-495.
- [151] SLAYMAKER I M, GAO Linyi, ZETSCHKE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity [J]. *Science*, 2016, 351: 84-88.
- [152] BURSTEIN D, HARRINGTON L B, STRUTT S C, et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes [J]. *Nature*, 2017, 542: 237-241.
- [153] KIM Eunji, KOO Taeyoung, PARK Sung Wook, et al. *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni* [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14500.
- [154] MA Dacheng, PENG Shuguang, HUANG Weiren, et al. Rational design of mini-Cas9 for transcriptional activation [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7: 978-985.
- [155] LUO M L, LEENAY R T, BEISEL C L. Current and future prospects for CRISPR-based tools in bacteria [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113: 930-943.



通讯作者: 魏文胜(1969—),男,博士,教授,研究方向为基因组编辑与功能性基因组学。
E-mail: wswei@pku.edu.cn



第一作者: 曹中正(1992—),男,博士研究生,专业方向为生物化学与分子生物学。
E-mail: czz949290@aliyun.com