

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-056

电活性微生物基因编辑与转录调控技术进展与应用

陈雅如^{1,2}, 曹英秀^{1,2}, 宋浩^{1,2}

(¹ 天津大学, 化工学院, 天津 300072; ² 天津大学, 合成生物学前沿科学中心, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072)

摘要: 电活性微生物通过胞外电子传递通路与胞外电子受体/供体进行双向电子交换, 产生或吞噬电流。电活性微生物已广泛应用于微生物电化学技术领域, 涵盖了元素的生物地球化学循环、环境污染的生物处理与电能生产、生物传感、微生物冶金以及化学品的微生物电合成等多个领域, 成为全球环境保护和低碳经济的研究热点。然而, 这些微生物在实际应用中仍面临较大局限, 如微生物燃料电池的输出功率密度存在一定的上限、微生物电合成技术中的CO₂还原速率尚未达到理想水平等。为了克服这些限制性因素, 需要通过高效的基因编辑和转录调控策略来改变电活性微生物的遗传特性, 提高其双向电子传递效率。本文首先总结了模式电活性微生物(希瓦氏菌和地杆菌)和其他代表性电活性微生物的基因编辑方法和利用CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) 技术实现转录调控的策略。在基因编辑方面, 涵盖了(CRISPR辅助的)同源重组、碱基编辑等方法; 而在转录调控方面, 包括了CRISPR介导的抑制和激活。此外, 对于多基因编辑和调控的策略也进行了深入探讨。其次, 综述了这些技术在环境、能源领域中的应用, 包括微生物燃料电池、污染物生物处理和修复等。最后, 讨论了目前电活性微生物工程改造所面临的挑战和未来的发展方向。

关键词: 电活性微生物; 基因编辑; 转录调控; CRISPR; 胞外电子传递

中图分类号: Q812 文献标志码: A

Advances and applications of gene editing and transcriptional regulation in electroactive microorganisms

CHEN Yaru^{1,2}, CAO Yingxiu^{1,2}, SONG Hao^{1,2}

(¹School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; ²Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), Frontier Science Center for Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Electroactive microorganisms (EAMs) engage in bidirectional electron exchange with extracellular electron acceptors/donors through the extracellular electron transfer (EET) pathways, resulting in the generation or consumption of electric current. EAMs have been widely applied in many microbial electrochemical technologies, such

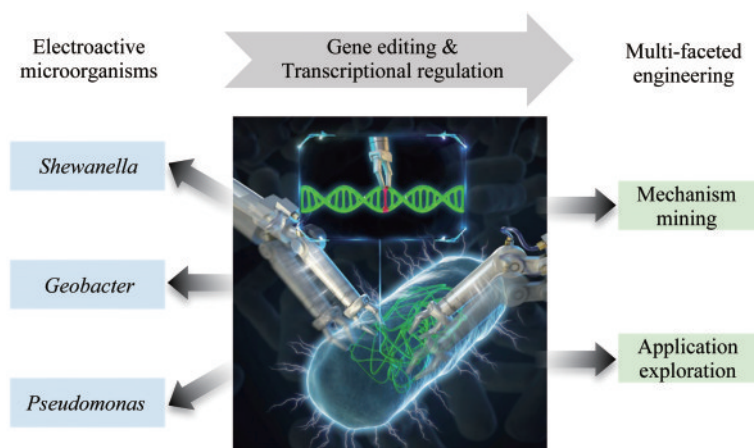
收稿日期: 2023-08-19 修回日期: 2023-09-18

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0901300); 国家自然科学基金 (32071411, 22078240, 21621004)

引用本文: 陈雅如, 曹英秀, 宋浩. 电活性微生物基因编辑与转录调控技术进展与应用[J]. 合成生物学, 2023, 4(6): 1281-1299

Citation: CHEN Yaru, CAO Yingxiu, SONG Hao. Advances and applications of gene editing and transcriptional regulation in electroactive microorganisms[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(6): 1281-1299

as biogeochemical cycling of Earth elements, bioremediation of environmental pollutants, electricity production, biosensing, biomining, and microbial electrosynthesis of chemicals, rendering EAMs a focal point in the global pursuit of environmental conservation and low-carbon economy. However, there are still substantial limitations in the practical applications of EAMs. For example, microbial fuel cells encounter a capped upper limit in power density, and the CO₂ reduction rate in microbial electrosynthesis remains below the desired threshold for practical applications. Overcoming these challenges necessitates enhancement in the bidirectional EET rate of EAMs. Nonetheless, complex phenotypes such as elevated EET efficiency often correlate with the expression of multiple genes. To obtain high-performance EAM strains, a deep comprehension of the genotype-phenotype relationship in EAMs and more nuanced manipulation at the genomic level are imperative. This review provides a comprehensive summary of the latest advances in genome editing and transcriptional regulation in EAMs. The main focus is on the CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-based biotechnologies developed in model EAMs, such as *Shewanella oneidensis* and *Geobacter sulfurreducens*, and a few other representative EAMs. The genome editing techniques to be discussed include (CRISPR-assisted) homologous recombination, CRISPR-associated transposase systems, and base editing. Similarly, transcriptional regulation tools involve CRISPR-based interference (CRISPRi) and activation (CRISPRa) systems. Strategies and advancements related to multiplexed editing and regulation are thoroughly summarized. Subsequently, the review delves into the applications of these technologies in both fundamental and applied scientific domains. On the fundamental science front, efforts are directed toward unveiling factors related to EET and uncovering hidden genotypes. In the realm of application, green electricity-producing microbial fuel cells, bioremediation of nuclear waste, heavy metals, and azo dyes are discussed. Finally, current challenges and future directions in the genetic engineering of EAMs are discussed.



Keywords: electroactive microorganisms; gene editing; transcriptional regulation; CRISPR; extracellular electron transfer

电活性微生物凭借其其在元素的生物地球化学循环、环境污染物的生物处理、可持续能源和化学品生产、化学传感、生物冶金等方面的重要作用，正逐渐成为全球低碳经济和环境保护的焦点^[1]。这些微生物能够与胞外电子供体或受体进行电子交换，通过“产电”和“噬电”，产生或吞噬电流^[2]。胞外电子传递（extracellular electron

transfer, EET）作为电活性微生物与胞外电子供体/受体进行电子交换的过程，是各种基于电活性微生物电化学技术（如微生物燃料电池、微生物电解池、生物传感器、微生物光电合成等）设计和发展的核心原理^[3-6]。近年来，利用电活性微生物产生的纳米导线制作新型电子元器件，如可穿戴电子设备和可持续发电设备等，成为了新的研

究热点^[7]。同时,设计构建“光-电-生物”杂合系统实现从CO₂生产高值化学品和燃料也成为新兴研究领域^[8-9]。

然而,微生物电化学技术在实际应用中的推广仍受到较大限制。以模式电活性微生物希瓦氏菌(*Shewanella*)和地杆菌(*Geobacter*)为基质的微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)的最大功率密度大体已经接近3~7 W/m²^[10-11],微生物电合成技术的CO₂还原速率尚未达到经济可行的水平。此外,目前研究广泛的电活性微生物只能在有限的条件下工作,例如硫还原地杆菌(*Geobacter sulfurreducens*)只能严格厌氧生长^[12]。为了解除这些限制,需要借助新兴合成生物学领域的进展,加强对微生物分子水平的机制理解和调控能力^[13]。其中,高效的基因组编辑和转录调控策略对于阐明核心基因的功能和构建工程菌株至关重要。通过简化遗传操作,开发更简单、可靠和可预测的基因组改造技术,可以满足科研人员电活性细胞多维改造的需求,包括对细胞生理和电生理特性进行重编程,保持细胞活力和遗传稳定性,提高基因突变效率等多种应用场景。

本综述旨在全面介绍电活性微生物领域基因编辑和人工转录调控的最新进展,并探讨这些技术在基础科学原理解析和实际应用方面的潜力。我们聚焦于模式电活性微生物希瓦氏菌和地杆菌,同时涵盖其他具有代表性的电活性微生物,包括铜绿假单胞菌和恶臭假单胞菌。在综述中,新兴的基因编辑方法得到了全面的讨论,包括基因敲除、插入、大片段编辑和碱基编辑,同时深入探讨利用CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)技术实现人工转录调控的方式,重点关注实现多基因编辑和调控的策略。然后,我们概述了这些工具在胞外电子传递机理解析、微生物燃料电池、污染物的生物处理等领域中的应用。最后,讨论了目前电活性微生物基因编辑和人工转录调控的局限性及未来的发展方向。

1 电活性微生物的基因编辑技术

近年来,基于CRISPR的基因编辑系统在电活性微生物领域快速发展,并已成为基因改造的主

流工具。通过利用CRISPR的“基因剪刀”特性,结合多种重组蛋白和转座子等基因元件,研究人员开发出多种工具,实现了对电活性微生物基因组的删除、插入和大片段编辑等功能。此外,通过将失去核酸酶活性但保留靶向功能的Cas(CRISPR associated)蛋白与不同碱基脱氨酶融合,实现碱基间的转换,开发出具有基因沉默和蛋白突变等功能的碱基编辑器。在电活性微生物中,几乎所有层面的基因编辑,从单碱基到大片段的修改,都可以借助CRISPR相关技术来实现。

1.1 高效转化

DNA转化能力是实现基因操作的基础,甚至在一定程度上决定着基因编辑的成败^[14]。目前常用的DNA转化方法包括直接的电穿孔法^[15-17]和间接的接合转移法^[18]。接合转移法利用供体细胞与受体细胞的菌毛接触,从而传递DNA。对电活性微生物而言,它们利用大肠杆菌菌株,如WM3064、S17-1或BW29427,在固体培养基表面^[19-20]及液体培养基^[21]内完成这一过程。这种方法操作简便,且转化效率较高。此外,若需获得更多转化子,只需成倍增加供体和受体细胞的数量,这在基因组规模文库的转化中显得尤为关键。

然而,接合转移法仅能转化具有复制特性(即可遗传)的DNA,例如质粒。对于基因重组所需的关键元件——供体DNA(如PCR产物或单链DNA),接合转移法并不适用。这时,电穿孔技术则更加合适。电穿孔技术的转化效率受到多种条件的影响。为了不同场景的应用,研究人员对感受态制备工艺、电转温度、细胞预处理等方面进行了大量优化,以持续提高电活性微生物的电转效率^[22]。举例来说,Corts等^[23]通过精确调控感受态细胞接种时间、操作温度、细胞洗脱液、电压等参数,成功开发出了高效的转化方法,使得在希瓦氏菌中每微克质粒DNA可获得约10⁸个转化子。该研究还发现,过夜培养的希瓦氏菌细胞可直接用于电穿孔,无需像处理大肠杆菌那样进行细胞亚培养或在冰上操作,从而实现了简便、快速的转化方法。此外,经过电转化的细胞在-80℃下冷冻保存,其高转化效率可至少保持1个月^[23]。

1.2 基因的敲除和插入

基因编辑的目标是实现无程序痕迹地删除、插入和替换基因。在电活性微生物中,长期以来使用基于内源 RecA 同源重组 (homologous recombination, HR) 系统的自杀质粒来实现这一目标^[24-26]。尽管这种策略在许多情况下已成功应用于有限数量的基因组编辑,包括大片段的缺失^[27],但它经常出现条件毒性基因失活或靶标突变的问题。一种更有效的依赖于归巢核酸内切酶 I-SceI 的编辑方法首先在大肠杆菌中使用^[28],后来被改进并应用于恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)^[29-30]。然而内源重组系统普遍面临着编辑效率低(通常约为5%)的挑战,同时还受限于编辑位点难以操作。此外,使用这些系统进行编辑的操作颇为复杂,并产生不可忽视的“疤痕”序列。另一种不依赖于同源重组的基于 II 型内含子的 targetron 技术也应用于恶臭假单胞菌的基因编辑,但其编辑能力有限,仅能实现较短片段(约 600 bp)的整合,无法

满足合成生物学对基因改造的需求^[31]。因此,引入表现稳定且功能强大的重组技术成为提升电活性微生物基因编辑能力的必要途径^[32]。

1.2.1 重组基因组工程

20 世纪 90 年代末,研究人员在大肠杆菌中开发了重组技术,利用来源于噬菌体的蛋白质实现了准确的遗传修饰^[33]。其中,噬菌体 λ 的 Red 和大肠杆菌 Rac 原噬菌体 RecET 最广为人知,能够高效催化约 40 个碱基序列的单链或双链 DNA 的同源重组^[34-35]。最近,希瓦氏菌中开发的 iEditing 方法利用了 I-SceI (归巢核酸内切酶)的自剪切活性辅助反筛选,并与 Red 或 RecET 重组系统相结合,极大地提高了基因组编辑的效率,达到近 100% [图 1(a)]^[15]。该方法能够在进行基因组编辑的同时消除编辑装置,避免了两轮筛选,实现了快速高效的基因组工程。

除了引入异源重组系统,电活性微生物基因组中也发现了潜在的重组蛋白^[23, 36]。例如,在丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 中发现了 recTE 基

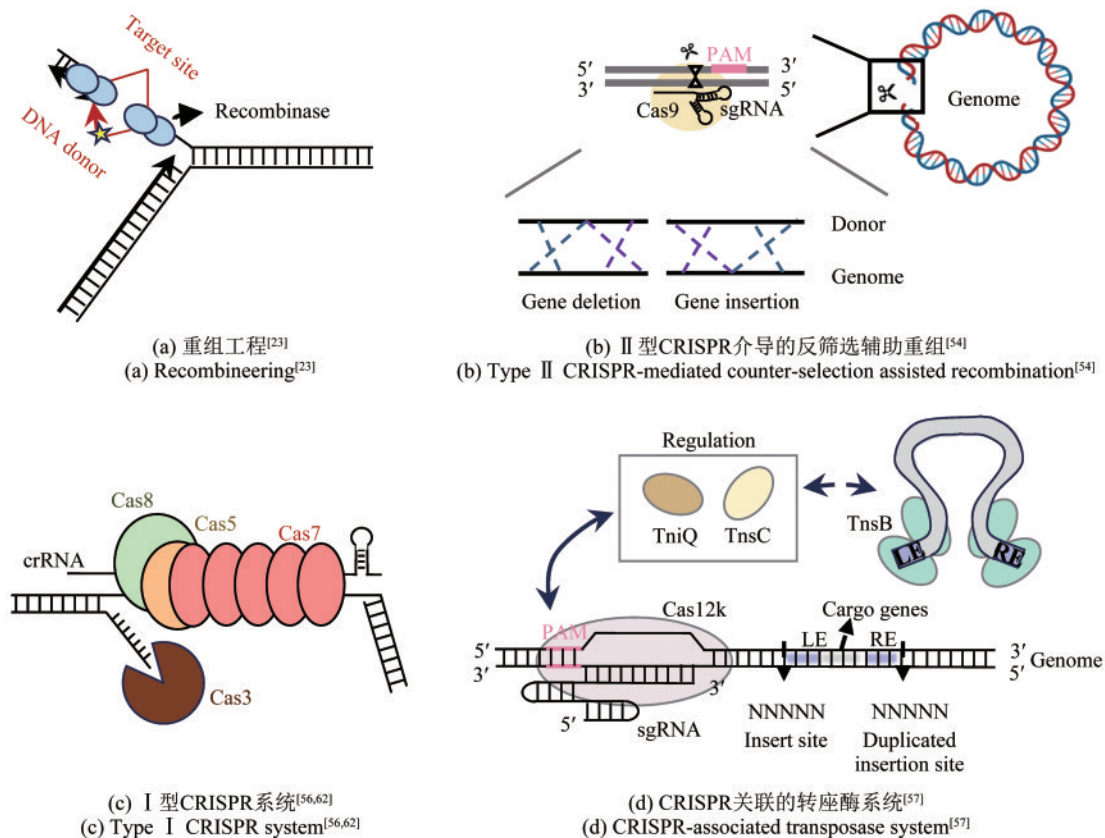


图 1 基因敲除和插入

Fig. 1 Gene deletion and insertion

因, 其编码的蛋白功能类似于 Exo 和 Beta^[36]。进一步的研究表明, RecTE 蛋白能够有效重组双链 DNA, 而仅有 RecT 就足以促进单链 DNA 寡核苷酸的重组^[37]。类似于 Beta 的重组酶也在其他 *Pseudomonas* 菌株中被发现, 并证明其能够促进 *P. putida* KT2440 中的单链 DNA 重组^[38]。在 *Shewanella* sp. W3-18-1 中也发现了 Beta 同源物 W3Beta, 并利用该系统在希瓦氏菌中实现了短至 40 个核苷酸序列的高效同源重组^[23]。目前, 基于单链 DNA 和双链 DNA 的重组工程被认为是最强大的基因组编辑策略之一, 特别是在进行多次循环和自动化的基因组工程 (multiplex automated genome engineering, MAGE)^[39] 等情况下。

1.2.2 II 型 CRISPR 介导的反筛选辅助重组

反筛选手段在重组工程中的主要目的是区分目标重组事件和非特异性或未重组事件, 以提高编辑的准确性和选择性^[40]。近年来, CRISPR/Cas9 在合成生物学领域, 是一种高效的定向反筛选工具^[41]。Cas9 蛋白通过向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 的引导, 定向作用于未编辑基因的染色体区域, 并产生双链断裂^[42]。对大多数细菌而言, 这种断裂是致命的, 因此 CRISPR/Cas9 成为一种高效的逆向筛选工具^[43]。在电话性微生物中, CRISPR 辅助的内源重组系统展现出高效的基因组编辑能力和简便的操作流程^[44-45]。例如, 在希瓦氏菌中, 删除 1 kb 片段的效率超过 80%, 删除 5 kb 片段的效率达到 60%, 且一轮基因编辑只需 4 d 的时间^[44]。这种集成了 CRISPR/Cas9 的精确定向和内源重组系统的方法, 为基因组工程提供了快速且高效的解决方案 [图 1(b)]。

当单链 DNA 重组技术 (例如 W3Beta 蛋白) 和 CRISPR/Cas9 逆向筛选同时使用时, 在希瓦氏菌中可以实现超过 90% 的基因组编辑效率。无论是进行大片段的基因删除、插入还是进行精确的突变修饰, 都能实现高效率的重组^[46]。对于单基因删除而言, 为了获得最高效率, 需要使用 80 个核苷酸的同源臂。而在进行点突变时, 由于宿主错配修复系统 (mismatch repair, MMR) 的存在, 突变 1 个碱基的效率约为 36%。在这种情况下, 使用较长的同源序列可以提高编辑效率^[46]。

CRISPR/Cas9 的引入也能显著提升 RecET 的基

因重组效率^[19]。CRISPR 辅助的 λ Red 重组系统也成功应用于铜绿假单胞菌^[17]、恶臭假单胞菌^[47-49]。这些方法不仅在编辑效率方面有了显著突破, 而且操作方便。无需进行传统的两步整合和标记基因去除等复杂操作, 即可获得无痕迹的突变体。基因删除、基因插入和基因替换的操作周期都可以在一周内完成, 这极大地提高了菌株改造的效率和能力^[47, 50]。由于 CRISPR/Cas9 系统只需要一个短 RNA 序列用于靶向结合, 而基于单链 DNA 的重组技术也只需要寡核苷酸, 因此构建用于特定基因或整个基因组的 sgRNA 和单链 DNA 文库变得简单, 就像在大肠杆菌^[51] 或枯草杆菌^[52] 中所展示的那样。因此, 在未来有望实现电话性微生物的快速高通量基因组工程。

随着编辑效率的提升, CRISPR 介导的反筛选也暴露了其缺点, 即对靶点附近 PAM (protospacer adjacent motif) 识别序列的要求。对于常用的酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9 (*SpCas9*) 而言, 其 PAM 序列为 5'-NGG-3', 这导致在某些富 AT 区域可能难以满足要求, 从而限制了基因组编辑的灵活性和范围。此外, 对于较短目标序列的情况, 如碱基突变或启动子替换, 也会增加向导 RNA 的设计难度。因此, 扩大编辑范围的后续优化重点是采用 PAM 序列限制更小或与 Cas9 识别序列特征互补的 Cas 蛋白。例如, ReScribe 重组工程采用犬链球菌 (*Streptococcus canis*) Cas9 (*ScCas9*, 识别 5'-NNG-3') 代替 *SpCas9*^[53]。此外, CRISPR/Cas12 系统能够识别具有低 GC 含量的 PAM, 与基于 Cas9 的系统形成互补。*AsCas12a* (来源于 *Acidaminococcus* sp., 识别 5'-TTTV-3') 和 *BhCas12b* (来源于 *Bacillus hisashii*, 识别 5'-ATTN-3') 已在希瓦氏菌中应用于内源启动子替换、碱基替换等编辑场景^[54]。CRISPR/*FnCas12a* (来源于 *Francisella novicida*, 识别 5'-YTN-3') 辅助的 λ Red 重组系统在假单胞菌中实现了超过 75% 的编辑效率^[50, 55]。

1.2.3 长片段删除/插入

尽管 10 000 以下小片段的基因敲除和插入可以通过上述的同源重组技术实现, 但是针对大片段基因编辑的挑战一直存在, 这也是微生物基因编辑的共同难题。在电话性微生物中已经出现了两条解决这个问题的途径: 一种是基于 I 型 CRISPR

的重组技术^[56] [图1(c)]; 另一种是利用CRISPR关联的转座酶系统^[57] [图1(d)]。

I型CRISPR/Cas系统的定向“基因剪刀”功能是由多个蛋白(DNA干扰复合物,称为Cascade)共同发挥作用^[58]。在电活性微生物中已经发现了内源的I型CRISPR系统,例如地杆菌^[58]、铜绿假单胞菌^[59]、腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*)^[60]。特别是来源于铜绿假单胞菌的I-F型CRISPR系统已被成功应用于多个物种^[56, 61-62],成为I型CRISPR研究的范本[图1(c)]。研究人员发现,与现有的Cas9系统相比,I型CRISPR表现出更高的编辑能力,在铜绿假单胞菌中,几乎以100%的效率实现了大片的删除(7~424 kb),而Cas9只能实现小片段的删除和点突变^[56]。通过Cas3的双向删除特性,还可以在铜绿假单胞菌基因组中实现长达837 kb的删除,相当于基因组长度的13.5%,是电活性微生物基因编辑领域的重大突破^[56]。在该系统基础上引入λRed系统进一步提高了编辑能力^[63]。

在涉及大片段基因组整合的情况下,转座酶往往是首选^[64]。例如,来源于霍式双歧藻(*Scytonema hofmanni*)的CRISPR关联转座酶(*Scytonema hofmanni* CRISPR-associated transposase, *ShCAST*)系统被应用于希瓦氏菌的大片段插入^[57] [图1(d)]。*ShCAST*由V-K型CRISPR效应器(Cas12k)和类Tn7转座酶亚基(TnsB、TnsC和TniQ)组成,通过在PAM序列下游60~66个碱基对的位置插入DNA来实现RNA引导的DNA转座^[65]。该系统能够以约100%的效率在细菌染色体上以单一方向实现可编程的RNA引导转座,使超长DNA序列

(30 kb)成功插入细菌染色体上^[57]。这项研究不仅对于电活性微生物具有借鉴意义,其中的优化策略还可以轻松推广到其他细菌,以更好地控制各种微生物细胞活动。

1.3 碱基编辑

除了基因的敲除、插入和替换,CRISPR技术的革新也发展出了碱基编辑器(base editor, BE)^[66]。在电活性微生物领域,已经开发了胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE),可将胞嘧啶(C)转化为胸腺嘧啶(T)^[67]及腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE),可将腺嘌呤(A)转化为鸟嘌呤(G)^[68]。这些碱基编辑器在基因失活和蛋白突变的研究中得到广泛应用^[69]。

1.3.1 胞嘧啶碱基编辑器

CBE是通过将切口酶nCas9(D10A)或核酸酶失活的dCas9(D10A, H840A)与胞嘧啶脱氨酶进行融合,将胞嘧啶脱氨转化尿嘧啶(U),经过DNA复制或修复最终转化为胸腺嘧啶[图2(a)]^[70]。有些系统还进一步融合尿嘧啶-DNA糖苷酶抑制蛋白以抑制碱基修复途径^[71]。C到T的转变主要应用于基因失活,通过将编码区域内CAG、CAA、CGA和TGG密码子突变为终止密码子TAA、TAG和TGA,提前终止翻译来实现^[72]。与前面介绍的重组工程相比,单碱基编辑介导的基因失活避免了DNA双链断裂,可以获得更多转化子,且无需提供DNA供体,操作简便^[73]。例如,希瓦氏菌内,仅需3 d即可完成一轮编辑^[74]。在地杆菌、假

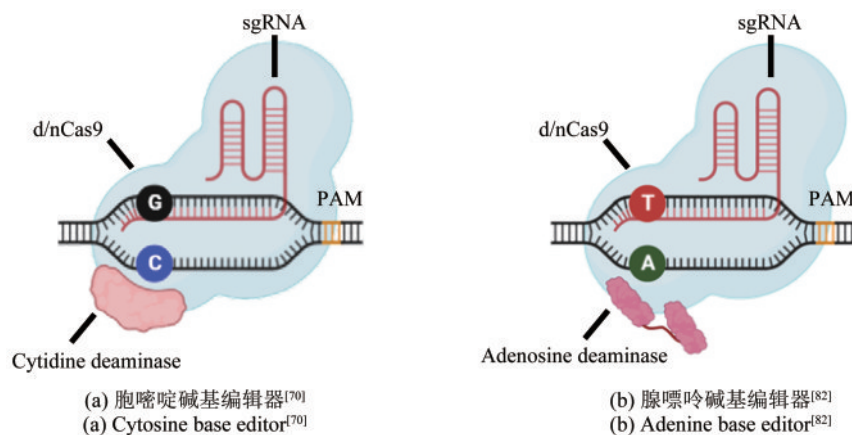


图2 碱基编辑

Fig. 2 Base editing

单胞菌和希瓦氏菌中，CBE展现出极高的编辑效率^[17, 67, 75-76]。

然而，依赖于CRISPR的碱基编辑也受到PAM序列的限制。此外，碱基编辑具有固定的编辑窗口，而该窗口必须与目标密码子相匹配。且过早终止密码子应尽可能靠近起始密码子，最好位于ORF的前半部分。这些条件限制了碱基编辑在微生物中的应用^[66]。例如，在希瓦氏菌中只有89%的基因可被编辑^[74]，而在9个模型*Geobacter*物种中，可以编辑87.7%~93.4%的基因^[75]。

为了扩大CBE的编辑范围，研究者从两个方面进行了优化，即拓宽PAM识别范围^[68, 74, 77]和扩展编辑窗口^[74]。例如，在希瓦氏菌中，引入了Cas9的突变体*SpCas9-NG*、*xCas9*、*SpG*和*SpRY*，将PAM序列拓宽为5'-NNN-3'，并通过改造sgRNA，将编辑窗口PAM上游的“-20到-15”扩展到“-22到-9”的范围^[74]。

除了编辑范围的限制，碱基编辑的高脱靶效应也引起研究人员的关注^[78]。在假单胞菌中，可通过引入高特异性的Cas9切口酶（*eSpCas9pp^{D10A}*）和编辑窗口更小的胞嘧啶脱氨酶突变体APOBEC1（W90Y, R126E）来缓解这一问题^[76-77]。当谈及CRISPR技术的脱靶问题时，我们必须承认这是合成生物学基因编辑领域共同面临的挑战。迄今为止，尽管研究人员取得了一些进展，但仍未找到完全解决这个问题的方法。因此科研人员不断努力降低CRISPR系统的脱靶概率^[79]，并致力于开发不易产生脱靶效应的基因编辑系统^[80]。相信在不久的将来，这一问题将会得以解决，使得生命重编程变得更加精确。

1.3.2 腺嘌呤碱基编辑器

ABE可以有针对性地将A转换为G（或T转换为C）。由于自然界中不存在直接作用于DNA的腺嘌呤脱氨酶，研究人员对大肠杆菌中的一种tRNA腺嘌呤脱氨酶*TadA*进行了多代进化，成功获得了一种能够作用于DNA的突变型腺嘌呤脱氨酶^[81]。通过将两个串联的*TadA*（一个野生型，另一个突变型）与*nCas9*（D10A）融合，产生了腺苷碱基编辑器ABE7.10* [图2(b)]^[82]。具体的编辑过程如下：腺嘌呤脱氨酶将A转化为次黄嘌呤（I），再经过DNA复制转化为G。通过使用ABE将起始密

码子ATG转换为ACG（编辑发生在非编码链上），起始密码子被破坏，导致核糖体无法识别，从而完全阻断了翻译的起始^[83]。除了破坏起始密码子，对蛋白质关键氨基酸位点进行突变也可以实现基因失活^[84]。值得一提的是，在假单胞菌属中，将sgRNA设计与氨基酸突变后的蛋白质活性预测相结合，用于设计能够实现基因失活的sgRNA^[68]。与CBE相似，ABE的开发优化中，也使用PAM范围更广的Cas9突变体来扩大可编辑范围^[68, 85]。

为了进一步扩展编辑能力，研究人员将ABE与CBE的功能进一步融合，以获得更多的可变性^[86]。在希瓦氏菌中开发的双功能碱基编辑系统*iSpider*通过将*nCas9*的N端与胞嘧啶脱氨酶相连接，C端与腺嘌呤脱氨酶相连接，实现了C到T、A到G的同时转换^[85]。通过削弱DNA糖基酶修复途径和串联两个腺嘌呤脱氨酶，显著提高了A到G转化的编辑效率^[85]。

1.4 多基因/位点编辑

在微生物工程改造过程中，单个基因的改造只是一个起点，进一步追求多个基因甚至基因路线网络的重构是必然趋势。这对于电话性微生物基因编辑的通量提出了更高的要求。然而，对于将Cas蛋白作为反筛选引起DNA双链断裂的重组工程来说，实现一步法的多基因编辑确实具有一定的挑战。因为单点编辑已经无法获得大量的转化子，而同时多个DNA双链断裂对于细胞来说具有更高的致命性^[53]。一些研究采用先质粒消除的方法，然后进行逐轮的编辑操作 [图3(a)]^[44, 55, 87]。一种巧妙的方法是通过靶向多拷贝位点，例如插入序列元件（insertion sequence elements），实现单步多重基因插入^[57]。另外一种非常有效的方法是通过多轮诱导重组，并在此之后诱导CRISPR/Cas系统进行反向筛选。这种方法可以实现同时引入3个基因的点突变，达到了95%的编辑效率^[53]。这些策略为实现高效的多基因编辑提供了有效途径。

相比于重组技术，不产生DNA双链断裂的碱基编辑更容易实现多基因编辑^[67]。通过同时表达两个gRNA，无需额外设计，电话性微生物的双位点碱基编辑效率就可达85%以上^[67, 77]。然而，当

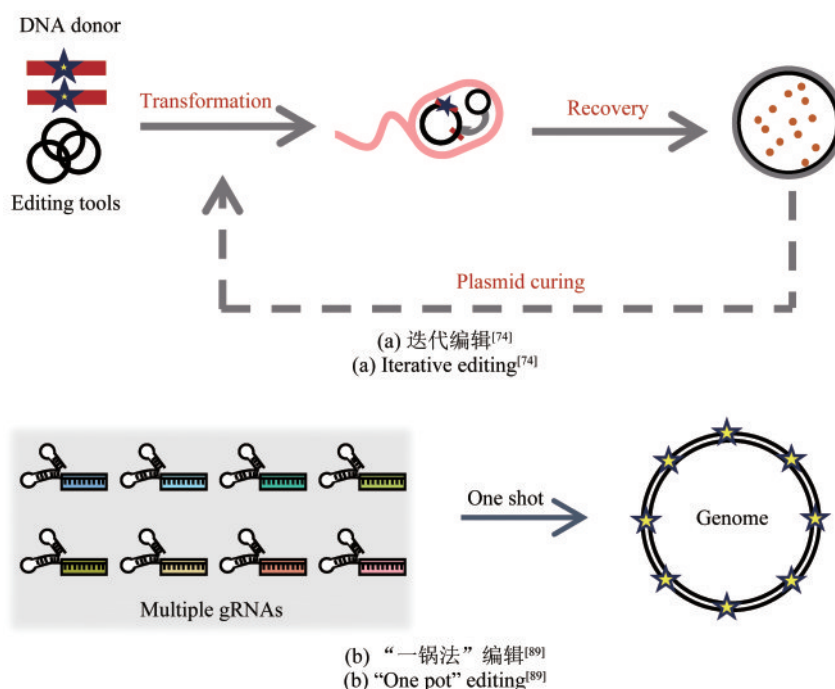


图3 多基因/位点编辑

Fig. 3 Multiplexed editing

位点数量超过3个时，编辑效率会显著降低^[77]。要提高多位点编辑的效率，关键在于多gRNA的表达方式^[88]。

在电活性微生物中，单顺反子和多顺反子的表达方式均被设计用于实现高效的多位点碱基编辑。在希瓦氏菌内，通过单顺反子表达gRNA，编辑5个基因的效率达到了100%^[89]。采用多顺反子的表达方式，并利用内切核糖核酸酶csy4对gRNA进行拆分，在恶臭假单胞菌和铜绿假单胞菌中编辑5个基因的效率均达到了90%^[90]。此外，多个gRNA的组装对于实际应用也至关重要，采用简便快速的组装方法能够快速升级改造菌株。例如，我们课题组开发了一种智能组装多个gRNA的一锅法，在希瓦氏菌中成功实现了对8个基因的同时编辑[图3(b)]^[89]。

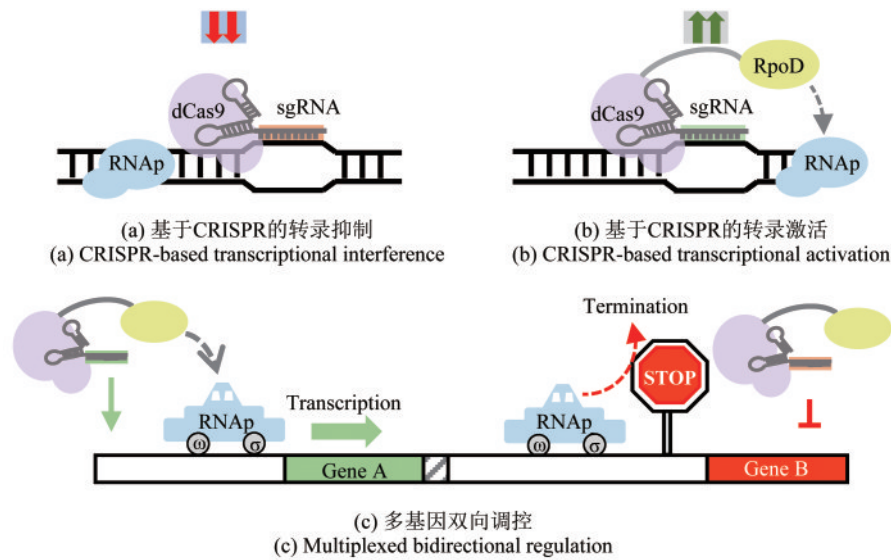
2 电活性微生物的转录调控技术

在CRISPR衍生技术得到广泛应用之前，电活性微生物的基因调控方法主要限于基因敲除和过表达，缺乏针对内源基因的原位调控通用手段^[32]。而近年来电活性微生物内涌现出多种人工转录调

控工具。其中，CRISPRi (CRISPR interference) 技术利用无催化活性的Cas (dCas) 蛋白通过位阻效应干扰基因表达^[91-92]，而CRISPRa (CRISPR activation) 技术则通过将dCas与转录激活因子融合来上调基因表达^[93]。这些技术的出现为电活性微生物的基因调控提供了新的选择。

2.1 基于CRISPR的转录抑制

CRISPRi技术的原理是利用dCas蛋白的DNA结合功能，在存在crRNA (CRISPR RNA) 的情况下，dCas蛋白结合到目标基因上，并阻止RNA聚合酶对该基因的转录^[94]。类似于基因编辑，最早开发的电活性微生物抑制系统是基于dCas9的[图4(a)]^[92]。在希瓦氏菌、恶臭假单胞菌和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas. hydrophila*) 等电活性微生物中，成功利用CRISPRi技术实现了内源基因的表达下调^[50, 91-92]。在以GFP为报告基因的实验中，相对于对照组，GFP的表达强度在希瓦氏菌中降低到0.6%^[92]、恶臭假单胞菌中降低到28.5%^[50]、嗜水气单胞菌中降低到0.2%^[91]。使用多个gRNA在目标基因的不同位置结合还可以增强dCas9的抑制活性^[92]。特别值得注意的是，基

图4 电活性微生物的转录调控技^[93]Fig. 4 Transcriptional regulation tools for electroactive microorganisms^[93]

于 Cpf1 的 CRISPR-ddAsCpf1 系统在基因抑制方面表现出了极高的效率，几乎可以实现 100% 的抑制率^[95]。

在希瓦氏菌中，gRNA 与目标基因结合的位置对于实现最大的抑制效果至关重要^[92]，当 gRNA 靠近转录起始位点和靶向非模板链时，抑制效率最高，这与在大肠杆菌中的观察结果相似^[96]。相比之下，I 型 CRISPR 介导的转录抑制对于靶向位置的要求较为宽松^[61]。当 crRNA 靶向开放阅读框时，基因抑制几乎没有位置偏好，这使得 crRNA 的设计更加简单灵活^[61]。这种灵活性使得 I 型 CRISPR 系统在电活性微生物中实现基因转录抑制时具备更强的适用性。I 型 CRISPR 系统也展示出高效的转录抑制活性，可将基因表达水平降低至 2%^[63]。这些涵盖 I、II 型的 CRISPRi 工具可以针对富含 GC 或富含 AT 序列的 PAM 识别位点，实现对基因的靶向调控，为实现全基因组水平基因表达的精确调控提供了有力工具。

2.2 基于 CRISPR 的转录激活

CRISPRa 技术利用融合了转录激活因子的 dCas 蛋白来实现对基因表达的上调^[97]。转录激活因子通常与 RNA 聚合酶复合物的特定组分结合，并将该复合物定向引导到目标启动子区域^[98]。然而，细菌中许多转录激活结构域的功能以及与

DNA 结合的能力尚未被充分研究和证明，因此实现人工转录激活被认为是一项具有挑战性的任务。对于电活性微生物而言更是如此，CRISPRa 工具仅在模式菌希瓦氏菌内有一些展示 [图4(b)]^[61, 93]。

我们课题组通过将 dCas9 与不同转录激活因子结合，从中筛选出 RpoD (σ^{70}) 作为最佳激活因子，并确定了有效激活的靶点范围为转录起始位点上游的 190~216 碱基位置^[93]。有研究表明组合多个激活因子可以增强激活效力^[99]，因此，我们尝试将 RpoD 进行串联融合，但其效果并不显著。考虑到 I 型系统中 Cas 蛋白复合物内 Cas7 存在 6 个拷贝，这可能对于转录激活具有优势。因此，我们转向 I-F 型 CRISPR 系统，将 RpoD 与 Cas7 融合，成功实现了 3.8 倍的转录激活效果^[61]。与大肠杆菌 200 多倍的转录激活水平相比^[100]，电活性微生物的 CRISPRa 技术开发仍需探索和提升。

2.3 多基因双向调控

与多基因编辑相似，通过 sgRNA 的串联在希瓦氏菌、嗜水气单胞菌和恶臭假单胞菌内实现了多基因的抑制^[91-92, 101]。在改造菌株的过程中，仅仅对多个基因进行抑制或激活是不够的，因为提高胞外电子传递速率需要对多个基因进行双向调节^[102]。由于 CRISPRa 的有效范围在基因上游的特

定区域, 如果招募转录激活因子到不适当的位置, 仍然会产生位阻效应^[103]。利用这一特点, 通过同时表达两个 crRNA, 可以实现对一个基因的上调和另一个基因的下调 [图4(c)]^[61, 93]。例如, 在希瓦氏菌内开发的 I-F 型 CRISPR-PAIR (CRISPR/PaeCascade-RpoD-mediated activation and inhibition regulation) 平台。虽然这些研究目前只是初步探索的结果, 但多个 crRNA 的表达已经可以有效实现^[89], 因此实现对更多基因的精确调控以重构代谢网络是完全可行的。

3 电活性微生物基因编辑/转录调控的应用

在电活性微生物的研究中, 基因编辑和人工转录调控技术被广泛应用于解析 EET 相关机制^[104]。这些技术的应用不仅限于科学研究领域, 还涉及微生物燃料电池^[105]、生物修复^[95]等各种实际应用领域 (图5)。

3.1 在胞外电子传递机理研究中的应用

EET 通路及其相关的旁路解析是电活性微生物应用于生物电化学装置的基础, 也是指导电活性微生物改造的依据^[106]。高效、高通量的基因编辑和人工转录调控技术显著促进了对电活性微生物在复杂表型下基因型的解构及基因-基因关联的揭示^[25, 90]。

电活性微生物纳米线 (nanowire) 是解构复杂表型的一个典型例子, 它们提供了一条细菌呼吸链与外部表面 (包括环境中的氧化金属和可再生能源设备中的工程电极) 之间的 EET 途径^[107]。尽管纳米线的组成究竟是什么这一问题到今天依然未得到统一答案^[7, 108-110], 但在地杆菌和希瓦氏菌的研究中, 利用基因敲除方法提供了有关纳米线组成的一些线索^[111-112]。例如, 针对希瓦氏菌纳米线的组成、生理相关性和电子传递机制, Pirbadian 等^[112]进行了深入的研究。他们通过分别敲除纤毛蛋白基因 (*pilA*) 和细胞色素蛋白基因 (*mtrC*), 以及进行活体荧光测量、免疫标记和定量基因表

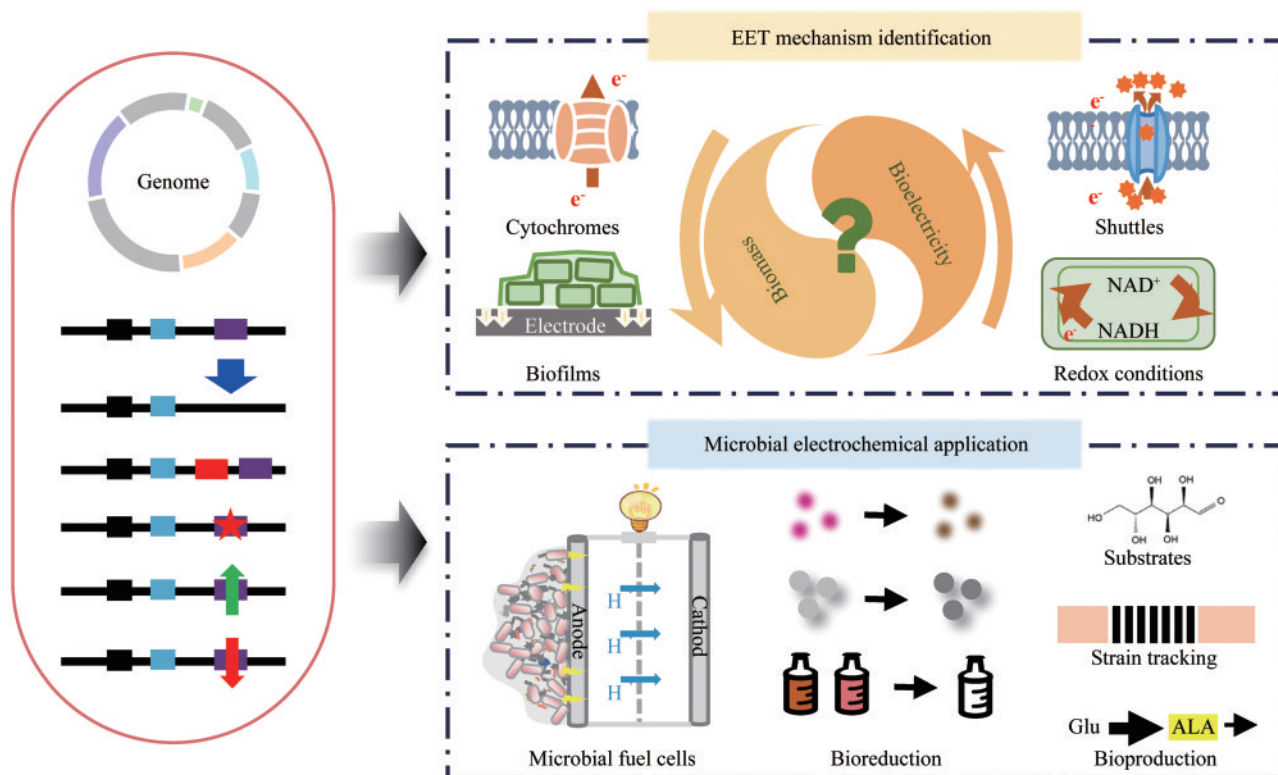


图5 电活性微生物基因编辑/转录调控的应用

Fig. 5 Applications of gene editing and transcriptional regulation in electroactive microorganisms

达分析, 在希瓦氏菌中观察到了纳米线形成的体内效应。研究表明, 希瓦氏菌的纳米线是由外膜和胞外质的延伸组成, 镶嵌负责EET的多铁细胞色素, 而不是基于纤毛蛋白的结构。得出氧化还原功能化膜延伸可能代表了一种通用的微生物电子传输和能量分配策略的结论^[112]。这些膜延伸与外膜囊泡 (outer membrane vesicle, OMV) 相关, 我们课题组进一步对OMV形成的调控机制及其EET的影响进行了探索^[105]。该研究利用CRISPRi技术减少了肽聚糖层和外膜之间的交联, 从而促进了OMV的形成。为了阐明OMV形成对EET的具体影响, 研究人员进行了OMV的分离, 并进行了紫外可见光谱和血红素染色的定量分析。结果显示, OMV的表面或内部富含外膜c型细胞色素 (c-Cyts), 包括MtrC、OmcA以及胞内c型细胞色素, 这些组分是负责EET的重要成分。此外, 研究人员还发现, 过量产生的OMV能够促进生物膜的形成并增强生物膜的导电性^[105]。

另一个对EET至关重要的生物学现象是电活性生物膜的形成。电活性生物膜与外部电极直接接触, 其厚度、形态、内部基质均对EET效率产生影响^[113-114]。在固体电子受体表面, 电活性生物膜会自发地经历黏附、生长、成熟和溃散的过程^[102]。然而, 生物膜内部的物质非常复杂, 与微生物状态紧密相关, 因此该过程的具体调控机制仍然是谜题。基因编辑技术在电活性生物膜研究中发挥重要作用。例如, 通过缺失全局转录调控因子*arcA*和*crp*的突变体, 研究人员发现突变菌株的生物膜会出现脱落现象, 表明这些基因在调控生物膜形成和稳定过程中起重要作用^[25]。

同样地, 通过碱基编辑技术的运用, 揭示了菌毛和外膜c型细胞色素在长距离EET中的重要作用, 并提供了重要的证据, 从而消除了围绕它们特定功能的长期争议。此外, 研究还发现菌毛参与了铀的胞外还原, 并明确了在亚硒酸盐还原过程中, ExtHIJKL通道复合物和外膜c型细胞色素发挥了关键作用^[75]。

复杂的EET活动与细胞内多个过程直接或间接相关, 因此理解不同基因之间的相互作用对于提升EET效率具有重要价值。在琥珀酸还原酶FccA作为瞬时电子储存蛋白的研究基础之上^[104],

研究人员通过本底基因敲除及回补, 证明了小四血红素细胞色素 (small tetraheme cytochrome, STC) 和FccA具有重叠活性, 形成相互关联的电子传递链^[115]。双敲除突变体显示在铁、硝酸盐、二甲基亚砷或琥珀酸盐作为电子受体时, 要么生长延迟, 要么根本无法生长。基于这些观察结果, 研究人员得出结论, 一个无论热力学层次如何都会产生的电子传递机制不仅使得微生物能够快速释放催化电子给各种环境电子受体, 还在氧化还原分层环境中提供了适应性优势^[115]。

通过基因编辑技术, 研究人员可以有针对性地敲除与EET相关的基因, 从而揭示其在电子传递过程中的具体功能。对于必需基因, 利用CRISPRi技术进行转录下调可以更全面地揭示其在生物学过程中的作用。这些基因编辑和人工转录调控的方法为我们提供了深入理解EET机理的工具, 对进一步探索电活性微生物在可持续能源生产、废水处理和环境修复等领域的应用潜力具有重要的指导意义。

3.2 在微生物电化学系统的应用研究

基因编辑和人工转录调控技术的迅速发展为电活性微生物的改造能力带来了显著提升, 加快改造速度并深化改造程度。这些先进技术的引入使得研究人员能够更加精准地操控细胞的遗传信息, 实现对代谢途径、信号传导和基因表达的精确控制。在微生物电化学技术的各个领域, 这些技术被广泛应用, 并展现出了巨大的潜力。

3.2.1 在微生物燃料电池中的应用

微生物燃料电池是一种利用电活性微生物将有机废弃物、污水或其他可降解废料作为燃料源, 并通过氧化过程释放的电子来转化为电能的技术。微生物燃料电池具有可持续性和环保性的优势, 它为废弃物处理和能源生产提供了一种创新的解决方案, 同时也为微生物电化学研究提供了重要的平台。通过基因编辑和人工转录调控等技术的应用, 可以进一步提升微生物燃料电池的效率和稳定性, 推动其在能源领域的应用和发展。

编程并行的EET通路是一种有效增强电子传递能力的方法, 这需要在基因组内插入大片段的

DNA。研究人员在希瓦氏菌内引入了来自地杆菌和铜绿假单胞菌的细胞色素蛋白和电子传递载体吩嗪-1-羧酸的合成通路，实现了细胞的“赋能”。经过改造，最终产生的工程菌株展示出显著增强的电子输出能力^[15]。

全基因组规模的胞嘧啶脱氨酶基因编辑工具箱 (WGcBE) 已成功应用于调控细胞长度和生物膜形态，从而将 EET 效率提高了 6.7 倍^[74]。通过多基因碱基编辑工具的应用，本课题组成功地在希瓦氏菌中同时失活了 8 个基因^[89]。这些基因在电子传递载体核黄素过表达菌株与对照菌株的转录组分析中显示出显著下调的表达水平^[116]。经过多基因编辑改造的工程菌株在 MFC 中表现出最大功率密度为 1108.1 mW/m²，比野生型菌株高出 21.67 倍^[89]。此外，双功能碱基编辑系统 iSpider 被应用于改进参与 EET 的内膜组分 CymA 的性能，并且能够快速鉴定出促进电子传递的有益突变体^[85]。这些研究展示了碱基编辑技术在提升电活性微生物性能和电子输出能力方面的潜力和应用前景。

在人工转录调控方面，利用 CRISPRi 技术下调与肽聚糖完整性相关的青霉素结合蛋白编码基因 *pbpC* 和参与脂多糖合成的 *N*-乙酰-D-甘露糖胺脱氢酶编码基因 *wbpP*，可以减少肽聚糖层与外膜之间的交联，促进 OMV 的形成，并显著提高电子输出功率密度。研究结果显示，经过基因调控后的希瓦氏菌株的最大功率密度分别提高了 6.33 倍和 6.96 倍^[105]。此外，CRISPR-PAIR 平台被应用于上调细胞色素合成、电子传递载体合成以及生物膜调控相关基因，下调影响生物膜厚度和细胞分裂周期的基因表达，以提高 EET 效率^[61]。通过 dCas9-RpoD 介导的双向调控，实现了细胞分裂基因 *minCDE* 的激活和细胞毒性基因 *SO_3166* 的抑制，从而使电活性菌株的功率密度提高了 2.5 倍^[93]。基因编辑和人工转录调控技术在加速菌株改造和优化以提升微生物电化学活性、优化生物膜结构和功能等方面展现出巨大的潜力，为微生物燃料电池的性能提升和应用拓展提供了有力的工具。

3.2.2 在污染物生物处理和修复中的应用

生物修复利用微生物的代谢能力来分解有机物或转化有毒物质为无毒或较低毒的物质，从而实现环境的处理和修复。与传统的物理或化学方

法相比，生物修复具有低成本、高效性、可持续性和对环境产生较少二次污染等许多优势。它在土壤和水体污染、废水处理、石油泄漏等领域广泛应用，在环境保护和污染治理中发挥重要作用。电活性微生物在放射性核污染、常见有机污染物和重金属的生物处理和修复中扮演着不可或缺的中心角色^[117]。

提高生物处理和修复效率需要提高 EET 效率。针对铀 [U(VI)] 污染地下环境的生物修复，通过生物还原将六价铀沉淀为较低毒性形式具有巨大潜力。在多重基因组编辑平台的支持下，研究人员对细胞色素产生、电子传递载体黄素合成及 NADH 再生等关键环节进行了全面优化。经过基因编辑的菌株在铀生物还原方面相比对照组提高了 3.62 倍^[44]。此外，研究人员利用 CRISPR-ddAsCpf1 系统下调了潜在竞争性电子转移蛋白编码基因 *cctA* 和 *so2930* 的表达水平，这不仅增加了 L-乳酸代谢基因的转录水平，还影响了直接和间接参与 EET 的基因，并观察到了核黄素的产量增加。这些调控措施显著提高了希瓦氏菌对甲基橙（一种有机污染物）和铬（典型重金属）的生物还原速率^[95]。另外，通过 dCas9-RpoD 介导的双向调控，使希瓦氏菌株降解甲基橙的速率提高了 2.9 倍^[93]。这些研究结果表明，通过精确调控关键基因网络和代谢途径，研究人员能够提高微生物的还原能力。

3.2.3 其他应用

除了提升 EET 效率外，基因编辑和人工转录调控在电活性微生物中还可以用于其他个性化的改造。例如，在希瓦氏菌中，通过碱基编辑鉴定了与葡萄糖代谢相关的关键基因，并构建了一个工程菌株，使其能够以葡萄糖为唯一碳源生长和输出电子^[67]。在铜绿假单胞菌中，利用 ScCas9 系统进行基因编辑，通过替换关键代谢基因的 TAG 终止密码子为同义的 TAA，创造了一个最小重编码菌株^[53]。这种基因组重编码能够在微生物的 DNA 中引入新的功能，通过重新分配密码子以编码非传统氨基酸，从而产生新的蛋白质，为提高底盘细胞的多样性提供机会。此外，利用 targetron 方法将小型 DNA 片段整合到基因组的特定位置，并使用短序列条形码标记恶臭假单胞菌，从而实

现在生物技术环境中对该微生物进行追踪^[31]。

另一个例子是利用希瓦氏菌出色的血红素合成能力，将其作为前体，用于生产高值化合物5-氨基乙酰丙酸（5-aminolevulinic acid, ALA）^[118]。ALA已经获得FDA批准，用于癌症的光动力疗法。通过CRISPRi靶向基因，微调TCA循环中的碳通量，并对血红素下游碳流重新定向，显著提高了ALA的产量。进一步整合ALA合成基因簇，ALA产量显著提高了145倍^[118]。

基因编辑和人工转录调控产生的应用还相对较少，主要用于概念验证以证明工具的有效性。随着对电活性微生物及其电子传递机制的深入研究，我们相信这些强大的工具将会在微生物电化学领域找到更广泛的应用场景。通过进一步优化和改进，这些工具有望在微生物燃料电池、污染物生物处理和修复及其他领域中发挥更重要的作用，带来更多的机遇和前景。

4 总结与展望

自CRISPR问世以来，该技术及其衍生技术在电活性微生物领域内得到了广泛的应用和发展，包括CRISPR辅助的重组工程、转座子、碱基编辑、转录抑制、转录激活、双向转录调控等。这些技术在提高电活性微生物改造速度、深度方面产生了显著影响。

基因编辑在电活性微生物中的发展与大肠杆菌、酿酒酵母等模式微生物相比在通量和精确性上仍存在一些差距。例如，在基因编辑的通量方面，目前尚缺乏类似文库筛选形式的CRISPR技术。而转录调控的通量也有限，当位点增加时，抑制效率会受到一定影响^[93]。但我们有理由相信，随着技术的不断发展和改进，这些工具将在电活性微生物领域产生更多的应用和突破。下面，我们将对未来研究的重点方向作一些思考：

(1) 基因组水平基因扰动 通过进行全局的功能丧失和功能增强筛选，我们可以获得大量生物信息，并深入理解代谢网络，从而有助于构建工程菌株^[119]。在研究模式微生物过程中，研究人员已经开发了一系列全局扰动技术，例如全局转录机器工程（global transcription machinery engineering,

gTME）^[120]、多重自动基因组工程（multiplex automated genome engineering, MAGE）^[39]以及可追踪多重重组工程（trackable multiplex recombineering, TRMR）^[121]。由于CRISPR系统易于编程和具有多种衍生工具的优势，它成为了当前最常用的全局扰动工具。其中，CRISPR敲除（CRISPR knockout）^[122]和CRISPRi^[123-124]文库用于功能丧失筛选。在酿酒酵母中，能够精确调控基因表达水平的多功能CRISPR文库也被开发出来^[125]。由于电活性微生物的代谢复杂性和我们对其了解的局限性，对基因型-表型关联的研究变得尤为重要。因此，开发具有不同扰动方式的基因组文库是未来的关键发展方向，旨在识别必需基因、创建具有改进耐受性的变异体以及调控代谢流。我们还面临另一个关键问题，即高EET效率的关注点无法建立在数以万计的独立细胞筛选上。尽管存在一些出色的筛选方法，但它们主要基于96孔细胞培养板^[126-127]，与基因组水平文库的高通量不匹配。因此亟需开发更高通量的筛选方法以评估单个细胞的EET水平。

(2) 精细化人工转录调控 目前电活性微生物的基因编辑技术已经能够实现对基因组的精确写入，而人工转录调控技术目前仍面临一些限制。主要问题包括位点受PAM限制和激活强度不足。CRISPRi和CRISPRa都受到位点的PAM限制，这意味着精确的转录调控较为困难。特别是对于CRISPRa技术，目标位点处于目的基因转录起始位点上游限定的位置，这给crRNA的设计带来了挑战，甚至有些基因无法找到符合的位点。虽然一些方法也可以从侧面解决该问题，例如通过替换启动子实现激活，但这种方法比较烦琐。幸运的是，已经在电活性微生物中应用过一些PAM需求更宽容的Cas蛋白，这些蛋白可能有助于解决CRISPR转录调控PAM限制的问题。针对另一个难题即激活强度不足，需要在电活性微生物内挖掘或引入更多具有高激活能力和广泛适应性的激活蛋白。这方面的研究目前还处于“道阻且长”的状态，需要我们对原核生物转录机制进行探索。

(3) 可预测编辑和调控 目前，尽管基因编辑和转录调控的效率有了显著提升，但要获得特

定的表型仍需要进行多次测试。在基因编辑方面,可能需要测试多个位点或获取具有不同基因拷贝数的基因型,并通过表型筛选来选择所需的基因型。对于转录调控来说,设计多个 crRNA 来靶向多个位置,首先,不同位置的调控水平难以预测;其次,我们对于哪种调控水平能实现高效 EET 也没有明确了解,需要设计多个 crRNA 来靶向多个位置。因此,不可预测性无疑为科研工作者增加了试错成本。通过预测不同基因编辑和调控策略对细胞的影响并进行优化设计,可以使得菌株产生更可控的表型变化,评估不同方案的潜在结果,并选择最有效的策略进行实验验证。这种精确控制细胞功能和代谢的能力对于构建定制化的电活性微生物非常重要,因为不同的生态位和应用领域对细胞功能和代谢的要求各不相同。通过预测和优化基因编辑和转录调控的效果,我们可以获得更适应特定生态位和应用需求的工程电活性微生物,从而提高其性能和应用潜力。为了实现这一目标,我们需要建立准确的预测模型。先进的人工智能技术如机器学习在预测结果和功能方面具有巨大潜力,但需要大量数据的支持。因此,需要进一步发展高通量分子克隆和菌株转化装置,并结合人工智能的方法来收集和分析数据。通过循环的“喂养-预测-喂养”过程,可以不断改进预测模型,提高预测的准确性,从而指导和优化基因编辑和转录调控的实验设计。

参 考 文 献

- [1] LOVLEY D R, HOLMES D E. Electromicrobiology: the ecophysiology of phylogenetically diverse electroactive microorganisms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(1): 5-19.
- [2] JIANG Y, ZENG R J. Bidirectional extracellular electron transfers of electrode-biofilm: mechanism and application[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271: 439-448.
- [3] LOGAN B E, ROSSI R, RAGAB A, et al. Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(5): 307-319.
- [4] CHU N, LIANG Q J, HAO W, et al. Microbial electrochemical sensor for water biotoxicity monitoring[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 404: 127053.
- [5] LIU C J, YU H, ZHANG B C, et al. Engineering whole-cell microbial biosensors: design principles and applications in monitoring and treatment of heavy metals and organic pollutants[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 60: 108019.
- [6] LÜ J, REN G P, HU Q C, et al. Microbial biofilm-based hydrovoltaic technology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(9): 1155-1167.
- [7] LOVLEY D R, HOLMES D E. Protein nanowires: the electrification of the microbial world and maybe our own[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(20): e00331-20.
- [8] CHEN H, DONG F Y, MINTEER S D. The progress and outlook of bioelectrocatalysis for the production of chemicals, fuels and materials[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 225-244.
- [9] CESTELLOS-BLANCO S, ZHANG H, KIM J M, et al. Photosynthetic semiconductor biohybrids for solar-driven biocatalysis[J]. *Nature Catalysis*, 2020, 3(3): 245-255.
- [10] CAO B C, ZHAO Z P, PENG L L, et al. Silver nanoparticles boost charge-extraction efficiency in *Shewanella* microbial fuel cells[J]. *Science*, 2021, 373(6561): 1336-1340.
- [11] YU Y Y, WANG Y Z, FANG Z, et al. Single cell electron collectors for highly efficient wiring-up electronic abiotic/biotic interfaces[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 4087.
- [12] TABARES M, DULAY H, REGUERA G. *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(4): 327-328.
- [13] MENG F K, ELLIS T. The second decade of synthetic biology: 2010-2020[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5174.
- [14] SHARAN S K, THOMASON L C, KUZNETSOV S G, et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(2): 206-223.
- [15] FAN Y Y, TANG Q A, LI Y, et al. Rapid and highly efficient genomic engineering with a novel iEditing device for programming versatile extracellular electron transfer of electroactive bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(2): 1238-1255.
- [16] COPPI M V, LEANG C, SANDLER S J, et al. Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3180-3187.
- [17] CHEN W Z, ZHANG Y, ZHANG Y F, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas* species[J]. *iScience*, 2018, 6: 222-231.
- [18] LI Y, LI Y Y, CHEN Y R, et al. Coupling riboflavin *de novo* biosynthesis and cytochrome expression for improving extracellular electron transfer efficiency in *Shewanella oneidensis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(10): 2806-2818.

- [19] WU Z Y, HUANG Y T, CHAO W C, et al. Reversal of carbapenem-resistance in *Shewanella algae* by CRISPR/Cas9 genome editing[J]. Journal of Advanced Research, 2019, 18: 61-69.
- [20] LIU T, YU Y Y, DENG X P, et al. Enhanced *Shewanella* biofilm promotes bioelectricity generation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(10): 2051-2059.
- [21] LI F, LI Y X, CAO Y X, et al. Modular engineering to increase intracellular NAD(H⁺) promotes rate of extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis*[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3637.
- [22] ZHENG W T, XIA Y D, WANG X E, et al. Precise genome engineering in *Pseudomonas* using phage-encoded homologous recombination and the Cascade-Cas3 system[J]. Nature Protocols, 2023, 18(9): 2642-2670.
- [23] CORTS A D, THOMASON L C, GILL R T, et al. A new recombineering system for precise genome-editing in *Shewanella oneidensis* strain MR-1 using single-stranded oligonucleotides[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 39.
- [24] HMELO L R, BORLEE B R, ALMBLAD H, et al. Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange[J]. Nature Protocols, 2015, 10(11): 1820-1841.
- [25] THORMANN K M, SAVILLE R M, SHUKLA S, et al. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(3): 1014-1021.
- [26] CHAN C H, LEVAR C E, ZACHAROFF L, et al. Scarless genome editing and stable inducible expression vectors for *Geobacter sulfurreducens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(20): 7178-7186.
- [27] GRAF N, ALTENBUCHNER J. Development of a method for markerless gene deletion in *Pseudomonas putida*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(15): 5549-5552.
- [28] PÓSFAI G, KOLISNYCHENKO V, BEREZKI Z, et al. Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(22): 4409-4415.
- [29] MARTÍNEZ-GARCÍA E, DE LORENZO V. Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(10): 2702-2716.
- [30] LUO X, YANG Y W, LING W, et al. *Pseudomonas putida* KT2440 markerless gene deletion using a combination of λ Red recombineering and Cre/*loxP* site-specific recombination [J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(4): fnw014.
- [31] VELÁZQUEZ E, AL-RAMAHI Y, TELLECHEA-LUZARDO J, et al. Targetron-assisted delivery of exogenous DNA sequences into *Pseudomonas putida* through CRISPR-aided counterselection[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(10): 2552-2565.
- [32] BIRD L J, KUNDU B B, TSCHIRHART T, et al. Engineering wired life: synthetic biology for electroactive bacteria[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(11): 2808-2823.
- [33] MURPHY K C. Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(8): 2063-2071.
- [34] SAWITZKE J A, THOMASON L C, COSTANTINO N, et al. Recombineering: *in vivo* genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond[J]. Methods in Enzymology, 2007, 421: 171-199.
- [35] PINES G, FREED E F, WINKLER J D, et al. Bacterial recombineering: genome engineering *via* phage-based homologous recombination[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(11): 1176-1185.
- [36] SWINGLE B, BAO Z M, MARKEL E, et al. Recombineering using RecTE from *Pseudomonas syringae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(15): 4960-4968.
- [37] BAO Z M, CARTINHO S, SWINGLE B. Substrate and target sequence length influence RecTE_{psy} recombineering efficiency in *Pseudomonas syringae*[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50617.
- [38] APARICIO T, JENSEN S I, NIELSEN A T, et al. The Ssr protein (T1E_1405) from *Pseudomonas putida* DOT-T1E enables oligonucleotide-based recombineering in platform strain *P. putida* EM42[J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(10): 1309-1319.
- [39] WANG H H, ISAACS F J, CARR P A, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. Nature, 2009, 460(7257): 894-898.
- [40] CARROLL D. Genome engineering with targetable nucleases [J]. Annual Review of Biochemistry, 2014, 83: 409-439.
- [41] RAN F A, HSU P D, WRIGHT J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nature Protocols, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [42] STERNBERG S H, REDDING S, JINEK M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 [J]. Nature, 2014, 507(7490): 62-67.
- [43] PETERS J M, COLAVIN A, SHI H D, et al. A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria [J]. Cell, 2016, 165(6): 1493-1506.
- [44] FAN Y Y, TANG Q A, LI F H, et al. Enhanced bioreduction of radionuclides by driving microbial extracellular electron pumping with an engineered CRISPR platform[J].

- Environmental Science & Technology, 2021, 55(17): 11997-12008.
- [45] WIRTH N T, KOZAEVA E, NIKEL P I. Accelerated genome engineering of *Pseudomonas putida* by I-Sce I-mediated recombination and CRISPR-Cas9 counterselection[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(1): 233-249.
- [46] CORTS A D, THOMASON L C, GILL R T, et al. Efficient and precise genome editing in *Shewanella* with recombineering and CRISPR/Cas9-mediated counter-selection[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(8): 1877-1889.
- [47] COOK T B, RAND J M, NURANI W, et al. Genetic tools for reliable gene expression and recombineering in *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(7): 517-527.
- [48] WU Z X, CHEN Z Q, GAO X Y, et al. Combination of ssDNA recombineering and CRISPR-Cas9 for *Pseudomonas putida* KT2440 genome editing[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(6): 2783-2795.
- [49] ZHOU Y Y, LIN L, WANG H, et al. Development of a CRISPR/Cas9n-based tool for metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for ferulic acid-to-polyhydroxyalkanoate bioconversion[J]. Communications Biology, 2020, 3: 98.
- [50] SUN J, WANG Q Z, JIANG Y, et al. Genome editing and transcriptional repression in *Pseudomonas putida* KT2440 via the type II CRISPR system[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 41.
- [51] GARST A D, BASSALO M C, PINES G, et al. Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(1): 48-55.
- [52] PETERS J E, MAKAROVA K S, SHMAKOV S, et al. Recruitment of CRISPR-Cas systems by Tn7-like transposons [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(35): E7358-E7366.
- [53] ASIN-GARCIA E, MARTIN-PASCUAL M, GARCIA-MORALES L, et al. ReScribe: an unrestrained tool combining multiplex recombineering and minimal-PAM ScCas9 for genome recoding *Pseudomonas putida*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(10): 2672-2688.
- [54] CHEN Y R, CHENG M J, FENG X R, et al. Genome editing by CRISPR/Cas12 recognizing AT-rich PAMs in *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(9): 2947-2955.
- [55] LIN Z L, LI H H, HE L, et al. Efficient genome editing for *Pseudomonas aeruginosa* using CRISPR-Cas12a[J]. Gene, 2021, 790: 145693.
- [56] CSÖRGŐ B, LEÓN L M, CHAU-LY I J, et al. A compact Cascade-Cas3 system for targeted genome engineering[J]. Nature Methods, 2020, 17(12): 1183-1190.
- [57] CHENG Z H, WU J, LIU J Q, et al. Repurposing CRISPR RNA-guided integrases system for one-step, efficient genomic integration of ultra-long DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(13): 7739-7750.
- [58] MAKAROVA K S, WOLF Y I, IRANZO J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(2): 67-83.
- [59] XU Z L, LI M, LI Y R, et al. Native CRISPR-cas-mediated genome editing enables dissecting and sensitizing clinical multidrug-resistant *P. aeruginosa*[J]. Cell Reports, 2019, 29(6): 1707-1717.e3.
- [60] DWARAKANATH S, BREZINGER S, GLEDITZSCH D, et al. Interference activity of a minimal Type I CRISPR-Cas system from *Shewanella putrefaciens*[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(18): 8913-8923.
- [61] CHEN Y R, CHENG M J, SONG H, et al. Type I-F CRISPR-PAIR platform for multi-mode regulation to boost extracellular electron transfer in *Shewanella oneidensis*[J]. iScience, 2022, 25(6): 104491.
- [62] CHEN Y X, LIU J Q, ZHI S Y, et al. Repurposing type I-F CRISPR-Cas system as a transcriptional activation tool in human cells[J]. Nature Communications, 2020, 11: 3136.
- [63] XU Z L, LI Y R, CAO H L, et al. A transferrable and integrative type I-F Cascade for heterologous genome editing and transcription modulation[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(16): e94.
- [64] KLOMPE S E, VO P L H, HALPIN-HEALY T S, et al. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration[J]. Nature, 2019, 571(7764): 219-225.
- [65] STRECKER J, LADHA A, GARDNER Z, et al. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases[J]. Science, 2019, 365(6448): 48-53.
- [66] WANG Y, LIU Y, ZHENG P, et al. Microbial base editing: a powerful emerging technology for microbial genome engineering[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(2): 165-180.
- [67] CHENG L, MIN D, HE R L, et al. Developing a base-editing system to expand the carbon source utilization spectra of *Shewanella oneidensis* MR-1 for enhanced pollutant degradation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(8): 2389-2400.
- [68] ABDULLAH, WANG P J, HAN T R, et al. Adenine base editing system for *Pseudomonas* and prediction workflow for protein dysfunction via ABE[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(4): 1650-1657.

- [69] MOLLA K A, YANG Y N. CRISPR/cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(10): 1121-1142.
- [70] 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(7603): 420-424.
- [71] NISHIDA K, ARAZOE T, YACHIE N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems[J]. Science, 2016, 353(6305): aaf8729.
- [72] KUSCU C, PARLAK M, TUFAN T R, et al. CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations[J]. Nature Methods, 2017, 14(7): 710-712.
- [73] WANG Y, LIU Y, LIU J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method [J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 200-210.
- [74] CHEN Y R, FANG L X, YING X A, et al. Development of whole genome-scale base editing toolbox to promote efficiency of extracellular electron transfer in *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Advanced Biology, 2022, 6(3): 2101296.
- [75] HE R L, WU J E, CHENG Z H, et al. Biomolecular insights into extracellular pollutant reduction pathways of *Geobacter sulfurreducens* using a base editor system[J]. Environmental Science & Technology, 2022, 56(17): 12247-12256.
- [76] YUE S J, HUANG P, LI S, et al. Developing a CRISPR-assisted base-editing system for genome engineering of *Pseudomonas chlororaphis*[J]. Microbial Biotechnology, 2022, 15(9): 2324-2336.
- [77] SUN J, LU L B, LIANG T X, et al. CRISPR-assisted multiplex base editing system in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 905.
- [78] WEGRZYN R D, LEE A H, JENKINS A L, et al. Genome editing: insights from chemical biology to support safe and transformative therapeutic applications[J]. ACS Chemical Biology, 2018, 13(2): 333-342.
- [79] JAIN S, XUN G H, ABESTE H S, et al. Precise regulation of Cas9-mediated genome engineering by anti-CRISPR-based inducible CRISPR controllers[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(6): 1320-1327.
- [80] SAITO M, XU P Y, FAURE G, et al. Fanzor is a eukaryotic programmable RNA-guided endonuclease[J]. Nature, 2023, 620(7974): 660-668.
- [81] MATSOUKAS I G. Commentary: programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. Frontiers in Genetics, 2018, 9: 21.
- [82] 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(7681): 464-471.
- [83] WANG X J, LIU Z W, LI G L, et al. Efficient gene silencing by adenine base editor-mediated start codon mutation[J]. Molecular Therapy, 2020, 28(2): 431-440.
- [84] ZHANG Y, ZHANG H Y, WANG Z P, et al. Programmable adenine deamination in bacteria using a Cas9-adenine-deaminase fusion[J]. Chemical Science, 2020, 11(6): 1657-1664.
- [85] WANG T L, ZHANG J W, WEI L, et al. Developing a PAM-flexible CRISPR-mediated dual-deaminase base editor to regulate extracellular electron transport in *Shewanella oneidensis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(6): 1727-1738.
- [86] LI C, ZHANG R, MENG X B, et al. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(7): 875-882.
- [87] APARICIO T, DE LORENZO V, MARTÍNEZ-GARCÍA E. CRISPR/Cas9-enhanced ssDNA recombineering for *Pseudomonas putida*[J]. Microbial Biotechnology, 2019, 12(5): 1076-1089.
- [88] MCCARTY N S, GRAHAM A E, STUDENÁ L, et al. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation[J]. Nature Communications, 2020, 11: 1281.
- [89] CHEN Y R, CHENG M J, LI Y, et al. Highly efficient multiplex base editing: one-shot deactivation of eight genes in *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2023, 8(1): 1-10.
- [90] VOLKE D C, MARTINO R A, KOZAEVA E, et al. Modular (de)construction of complex bacterial phenotypes by CRISPR/nCas9-assisted, multiplex cytidine base-editing[J]. Nature Communications, 2022, 13: 3026.
- [91] WU J, CHENG Z H, MIN D, et al. CRISPRi system as an efficient, simple platform for rapid identification of genes involved in pollutant transformation by *Aeromonas hydrophila* [J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(6): 3306-3315.
- [92] CAO Y X, LI X F, LI F, et al. CRISPRi-sRNA: transcriptional-regulation of extracellular electron transfer in *Shewanella oneidensis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(9): 1679-1690.
- [93] CHEN Y R, NIU X L, CHENG M J, et al. CRISPR/dCas9-RpoD-mediated simultaneous transcriptional activation and repression in *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(6): 2184-2192.
- [94] LARSON M H, GILBERT L A, WANG X W, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression[J]. Nature Protocols, 2013, 8(11): 2180-2196.

- [95] LI J E, TANG Q A, LI Y, et al. Redirecting electron flux with an engineered CRISPR-ddAsCpfI system to enhance the pollutant degradation capacity of *Shewanella oneidensis*[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(6): 3599-3608.
- [96] 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(5): 1173-1183.
- [97] LIU Y, WAN X Y, WANG B J. Engineered CRISPRa enables programmable eukaryote-like gene activation in bacteria[J]. Nature Communications, 2019, 10: 3693.
- [98] BROWNING D F, BUSBY S J W. Local and global regulation of transcription initiation in bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(10): 638-650.
- [99] 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(3): 635-646.
- [100] HO H I, FANG J R, CHEUNG J, et al. Programmable CRISPR-Cas transcriptional activation in bacteria[J]. Molecular Systems Biology, 2020, 16(7): e9427.
- [101] CZAJKA J J, BANERJEE D, ENG T, et al. Tuning a high performing multiplexed-CRISPRi *Pseudomonas putida* strain to further enhance indigoidine production[J]. Metabolic Engineering Communications, 2022, 15: e00206.
- [102] LI F, TANG R, ZHANG B C, et al. Systematic full-cycle engineering microbial biofilms to boost electricity production in *Shewanella oneidensis*[J]. Research, 2023, 6: 81.
- [103] BHOKISHAM N, VANARSDALE E, STEPHENS K T, et al. A redox-based electrogenetic CRISPR system to connect with and control biological information networks[J]. Nature Communications, 2020, 11: 2427.
- [104] SCHUETZ B, SCHICKLBERGER M, KUERMANN J, et al. Periplasmic electron transfer via the c-type cytochromes MtrA and FccA of *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(24): 7789-7796.
- [105] YU H, LU Y J, LAN F, et al. Engineering outer membrane vesicles to increase extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(6): 1645-1656.
- [106] SHI L, DONG H L, REGUERA G, et al. Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(10): 651-662.
- [107] THANASSI D G, BLISKA J B, CHRISTIE P J. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(6): 1046-1082.
- [108] WANG F B, GU Y Q, O'BRIEN J P, et al. Structure of microbial nanowires reveals stacked hemes that transport electrons over micrometers[J]. Cell, 2019, 177(2): 361-369.e10.
- [109] YALCIN S E, MALVANKAR N S. The blind men and the filament: understanding structures and functions of microbial nanowires[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2020, 59: 193-201.
- [110] LOVLEY D R, WALKER D J F. Geobacter protein nanowires [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2078.
- [111] LEANG C, MALVANKAR N S, FRANKS A E, et al. Engineering *Geobacter sulfurreducens* to produce a highly cohesive conductive matrix with enhanced capacity for current production[J]. Energy & Environmental Science, 2013, 6(6): 1901-1908.
- [112] PIRBADIAN S, BARCHINGER S E, LEUNG K M, et al. *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(35): 12883-12888.
- [113] CATANIA C, KARBELKAR A A, FURST A L. Engineering the interface between electroactive bacteria and electrodes[J]. Joule, 2021, 5(4): 743-747.
- [114] TER HEIJNE A, PEREIRA M A, PEREIRA J, et al. Electron storage in electroactive biofilms[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(1): 34-42.
- [115] STURM G, RICHTER K, DOETSCH A, et al. A dynamic periplasmic electron transfer network enables respiratory flexibility beyond a thermodynamic regulatory regime[J]. The ISME Journal, 2015, 9(8): 1802-1811.
- [116] FANG L X, LI Y Y, LI Y, et al. Transcriptome analysis to identify crucial genes for reinforcing flavins-mediated extracellular electron transfer in *Shewanella oneidensis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 852527.
- [117] MIN D, CHENG L, ZHANG F, et al. Enhancing extracellular electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 through coupling improved flavin synthesis and metal-reducing conduit for pollutant degradation[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(9): 5082-5089.
- [118] YI Y C, NG I S. Redirection of metabolic flux in *Shewanella oneidensis* MR-1 by CRISPRi and modular design for 5-aminolevulinic acid production[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2021, 8: 13.
- [119] SCHUSTER A, ERASIMUS H, FRITAH S, et al. RNAi/CRISPR screens: from a pool to a valid hit[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(1): 38-55.
- [120] ALPER H, MOXLEY J, NEVOIGT E, et al. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production[J]. Science, 2006, 314(5805): 1565-1568.

- [121] WARNER J R, REEDER P J, KARIMPOUR-FARD A, et al. Rapid profiling of a microbial genome using mixtures of barcoded oligonucleotides[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28 (8): 856-862.
- [122] BAO Z H, HAMEDIRAD M, XUE P, et al. Genome-scale engineering of *Saccharomyces cerevisiae* with single-nucleotide precision[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(6): 505-508.
- [123] YAO L, SHABESTARY K, BJÖRK S M, et al. Pooled CRISPRi screening of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 for enhanced industrial phenotypes[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1666.
- [124] WANG T M, GUAN C G, GUO J H, et al. Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2475.
- [125] LIAN J Z, SCHULTZ C, CAO M F, et al. Multi-functional genome-wide CRISPR system for high throughput genotype-phenotype mapping[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 5794.
- [126] XIAO X, LIU Q Y, LI T T, et al. A high-throughput dye-reducing photometric assay for evaluating microbial exoelectrogenic ability[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241: 743-749.
- [127] YANG Z C, CHENG Y Y, ZHANG F, et al. Rapid detection and enumeration of exoelectrogenic bacteria in lake sediments and a wastewater treatment plant using a coupled WO_3 nanoclusters and most probable number method[J].

Environmental Science & Technology Letters, 2016, 3(4): 133-137.



通讯作者: 宋浩(1973—),男,教授,博士生导师。研究方向为电能细胞合成生物学,微生物光/电合成。

E-mail: hsong@tju.edu.cn



通讯作者: 曹英秀(1986—),女,副教授,博士生导师。研究方向为高性能生物燃料电池工厂设计与重构。

E-mail: caoyingxiu@tju.edu.cn



第一作者: 陈雅如(1995—),女,博士研究生。研究方向为电活性微生物,基因编辑与调控。

E-mail: yaruchen2018207303@tju.edu.cn