

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-110

CRISPR/Cas9 编辑系统在微生物天然产物研究中的应用

惠真^{1,2}, 唐啸宇²

(¹ 香港科技大学理学院化学系, 清水湾校区, 香港 999077; ² 深圳湾实验室, 化学生物学研究所, 广东 深圳 518132)

摘要: 微生物作为天然产物的巨大宝库, 一直以来都是研究人员挖掘和开发新的活性化合物的重要来源。目前, 利用基因编辑工具发现、生物合成和代谢调控天然产物的研究方法受到该领域研究者的广泛关注。CRISPR/Cas9 遗传编辑系统以其独特的灵活靶向优势克服了其他遗传编辑方法常见的对序列同源或位点限制, 简化了实验步骤, 提高了实验效率, 促进了天然产物研究领域的发展。本文主要介绍 CRISPR/Cas9 系统在微生物天然产物发现、生物合成和工程改造方面的应用, 分别从 CRISPR/Cas9 系统的发展、天然产物生物合成基因簇的克隆和遗传编辑、天然产物结构衍生化和代谢调节、沉默天然产物基因簇的激活这几个方面阐述 CRISPR/Cas9 系统在微生物天然产物研究领域的优势。最后, 针对 CRISPR/Cas9 系统无法克服的重组效率和宿主适应性问题提供了可行的解决思路。相信随着合成生物学和信息技术的发展, 越来越多的与 CRISPR/Cas9 系统相关的遗传操作工具和方法会被开发, 将不断推动天然产物领域的发展进步。

关键词: CRISPR/Cas9; 天然产物; 微生物; 合成生物学; 异源表达; 结构衍生化; 启动子工程; 代谢工程

中图分类号: Q812 文献标志码: A

Applications of the CRISPR/Cas9 editing system in the study of microbial natural products

HUI Zhen^{1,2}, TANG Xiaoyu²

(¹ Department of Chemistry, School of Science, The Hong Kong University of Science and Technology, Clearwater Bay Campus, Hong Kong 999077, China; ² Institute of Chemical Biology, Shenzhen Bay Laboratory, Shenzhen 518132, Guangdong, China)

Abstract: Microorganisms have consistently been a crucial source for researchers to explore and develop new natural products. Currently, research methods involving gene editing tools for the discovery, biosynthesis, and metabolic engineering of natural products have garnered broad attention in this field. However, traditional methods for gene editing usually rely on the recombination ability of the host or introduced proteins. It's difficult to establish a general platform for all bacteria mainly because of their complicated genetic background. This genetic diversity often causes laborious experimental operations with low efficiency. The CRISPR/Cas9 gene editing system, with its unique and

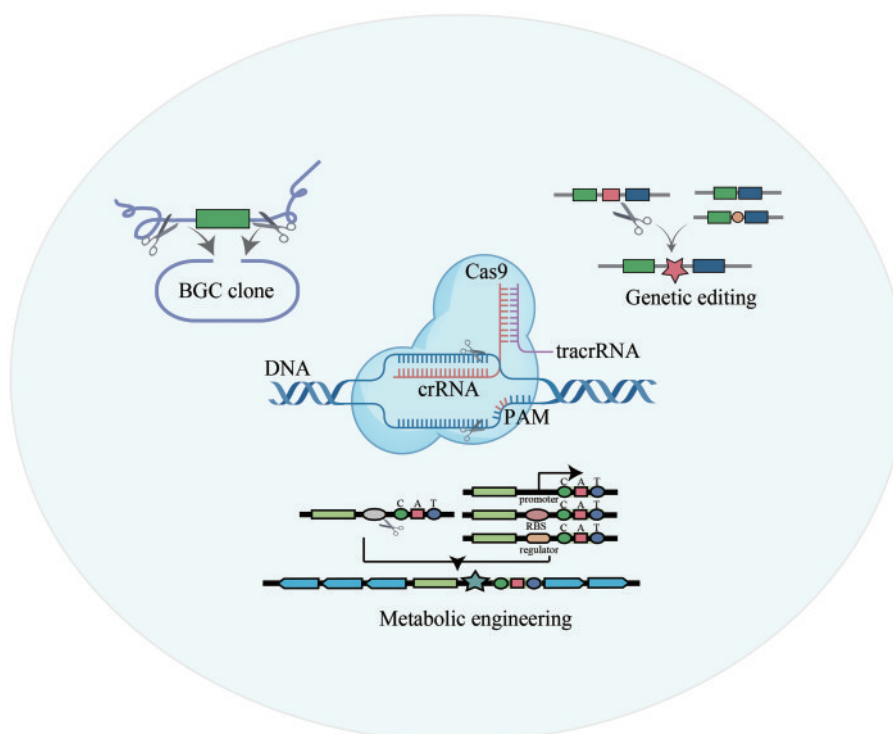
收稿日期: 2023-12-26 修回日期: 2024-03-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173719)

引用本文: 惠真, 唐啸宇. CRISPR/Cas9 编辑系统在微生物天然产物研究中的应用[J]. 合成生物学, 2024, 5(3): 658-671

Citation: HUI Zhen, TANG Xiaoyu. Applications of the CRISPR/Cas9 editing system in the study of microbial natural products [J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(3): 658-671

flexible targeting advantages, overcomes common limitations such as sequence homology or site constraint in other gene editing methods and thus is more likely to function in diverse bacteria species. This simplifies experimental procedures, enhances work efficiency, and promotes the development of natural product research. This article introduces the applications of the CRISPR/Cas9 system for the discovery, biosynthesis, and metabolic engineering of natural products in microorganisms. It covers the development of the CRISPR/Cas9 system, cloning and genetic editing of natural product biosynthetic gene clusters, structural derivatization and metabolic engineering of natural products, and the activation of silenced natural product biosynthetic gene clusters. These aspects highlight the advantages of the CRISPR/Cas9 system in the research of natural products with microorganisms. Finally, solutions are proposed for addressing challenges that the CRISPR/Cas9 system currently faces in overcoming low recombination efficiency and host adaptability issues. Especially the CRISPR/Cas12a system which has broadened applications of the CRISPR/Cas9 system by preferring different PAM sites. In addition to functions that CRISPR/Cas9 system has realized, its potent multiple targeting ability further enhances the efficiency of target editing. It is believed that with the development of synthetic biology and information technology, an increasing number of genetic manipulation tools and methods related to the CRISPR/Cas9 system will be developed, continually driving progress in the research of natural products.



Keywords: CRISPR/Cas9; natural products; microorganisms; synthetic biology; heterologous expression; structure derivative; promoter engineering; metabolism engineering

微生物是地球上最丰富多样的物种，它们是开发新型抗生素、抗癌剂和农药等生物活性化合物的重要来源^[1-3]。微生物染色体上编码着大量的用于合成天然产物的遗传单元，它们被称为生物合成基因簇（biosynthetic gene cluster）。随着测序

技术的快速发展，人们已经通过大规模测序在公共数据库中积累了大量的微生物基因组和宏基因组数据。而越来越多天然产物生物合成基因簇的解析和生物信息学分析工具的开发，使得人们发现了大量未知的生物合成基因簇“暗物质”^[4-5]。如

何将这些“一维”的基因信息转化成为“三维”的化学结构，已经成为天然产物基因组挖掘领域的一个重要研究问题。

来自细菌和古菌适应性免疫的 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 和 Cas 蛋白 (CRISPR-associated proteins) 系统，借助 CRISPR 相关的 RNA 引导核酸酶 Cas 切割双链 DNA，在微生物天然产物的研究中发挥了卓越功能。其中，来自酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 II 型 CRISPR/Cas9 系统已被广泛应用于基因组的编辑。Cas9 蛋白在 20 个核苷酸组成的 guide RNA (gRNA) 的引导下，利用 HNH 和 RuvC 核酸酶结构域切割靶向位点^[6]。这一特征启发研究人员开发了多种针对天然产物 (natural product) 生物合成基因簇的研究策略，例如基因编辑激活沉默生物合成基因簇、发现新的生物合成基因簇、生物合成基因簇的异源表达。本文主要介绍借助 CRISPR/Cas9 系统研究天然产物生物合成基因簇的策略，关注 CRISPR/Cas9 系统给天然产物领域研究带来的便利及其可能的应用。

1 CRISPR/Cas9 系统的介绍及其在基因编辑领域应用的基本原理

CRISPR 是大多数细菌和古菌基因组中的特殊基因单元，同与之相关的 Cas 蛋白一起防御外源遗传物质的侵入，是微生物的一种“适应性免疫”能力。当外源遗传物质（如质粒和噬菌体）侵入细胞时，CRISPR 系统首先将外源的且具有特殊结构特征的 DNA 序列整合到 CRISPR loci 中。然后，这些位于 CRISPR loci 的外源的 DNA 序列经过转录加工形成成熟的 gRNA，进而引导 Cas 蛋白在特定位置剪切外源双链 DNA。更重要的是，这种适应性免疫能力可以经载体构建并引入到不同的细胞中，使不同宿主获得特异性的免疫能力^[7-9]。

随后，在众多研究团队的努力下，研究者揭示并阐明了该系统的最小基本单元组成、靶点特异性决定因素以及加工剪切过程 [图 1(a)]。简而言之，由 CRISPR loci 转录得到的 pre-crRNA，在部分互补的 tracrRNA (trans-encoded small RNA)、

宿主 RNase III 以及 Cas9 蛋白的帮助下完成 gRNA 的成熟。然后，Cas9 蛋白和 gRNA 组成的复合物对外源 DNA 进行匹配，Cas9 在特异性识别 PAM (protospacer-adjacent motif) 位点后解开 DNA 双链，进行 gRNA 互补配对。最后，在正确配对情况下，Cas9 蛋白通过其 HNH 和 RuvC 核酸内切酶结构域在非互补链的 PAM 位点上游 3 bp 处切割 DNA 双链^[10-11]。CRISPR/Cas9 系统高效且特异性的双链切割能力促使研究人员开发了多种灵活多样的基因编辑工具，通过质粒表达 CRISPR/Cas9 系统实现体内双链剪切，或通过 Cas9 蛋白和 gRNA 实现体外靶向位点切割。其中以借助 CRISPR/Cas9 系统的靶向切割实现同源重组菌株的高效筛选被广泛使用^[12-15]。

CRISPRi 系统 (CRISPR inference, CRISPRi) 是建立在 dCas9 (catalytically dead Cas9) 的基础之上的基因表达调控工具。通过人工突变 Cas9 的两个保守核酸酶结构域 (D10A of RuvC, H840A of HNH) 实现其内切酶催化活性的丧失，但 dCas9 仍保留了靶向 DNA 的结合能力。因此，可以通过 gRNA 将 dCas9 蛋白定向引入到启动子或编码序列区域以实现靶向基因转录干扰^[16]。随后，根据原核 RNA 聚合酶 (RNA polymerase, RNAP) 的 ω 亚基可用于转录激活这一特征，通过融合 dCas9 和 RNAP 的 ω 亚基开发了靶向转录激活系统 CRISPRa (CRISPR-mediated activation)。通过 gRNA 指引，将 dCas9- ω 亚基复合体结合到目标启动子区域上游，从而实现转录表达的持续激活^[17-18]。

尽管通过 CRISPR/Cas9 系统引入的双链断裂可以显著提高依赖同源重组修复 (homology-directed repair, HDR) 的基因编辑成功率，但是在 DNA 双链断裂的过程中细胞会通过非同源末端连接 (error-prone nonhomologous end joining, NHEJ) 的方式带来不必要的随机插入和缺失^[19]。“碱基编辑” (base editing, BE) 技术是依赖 CRISPR/Cas9 系统靶向特性实现基因编辑的革新，通过 CRISPR/dCas9 和胞嘧啶脱氨酶的共同作用，完成靶向位点胞嘧啶到尿嘧啶的转化，并最终实现胞嘧啶到胸腺嘧啶 (或鸟嘌呤到腺嘌呤) 的转化 (CBE)^[20]。接着，采用类似的设计思路研究人员开发了另一种可编辑的“碱基编辑”方法。该方法开发的灵

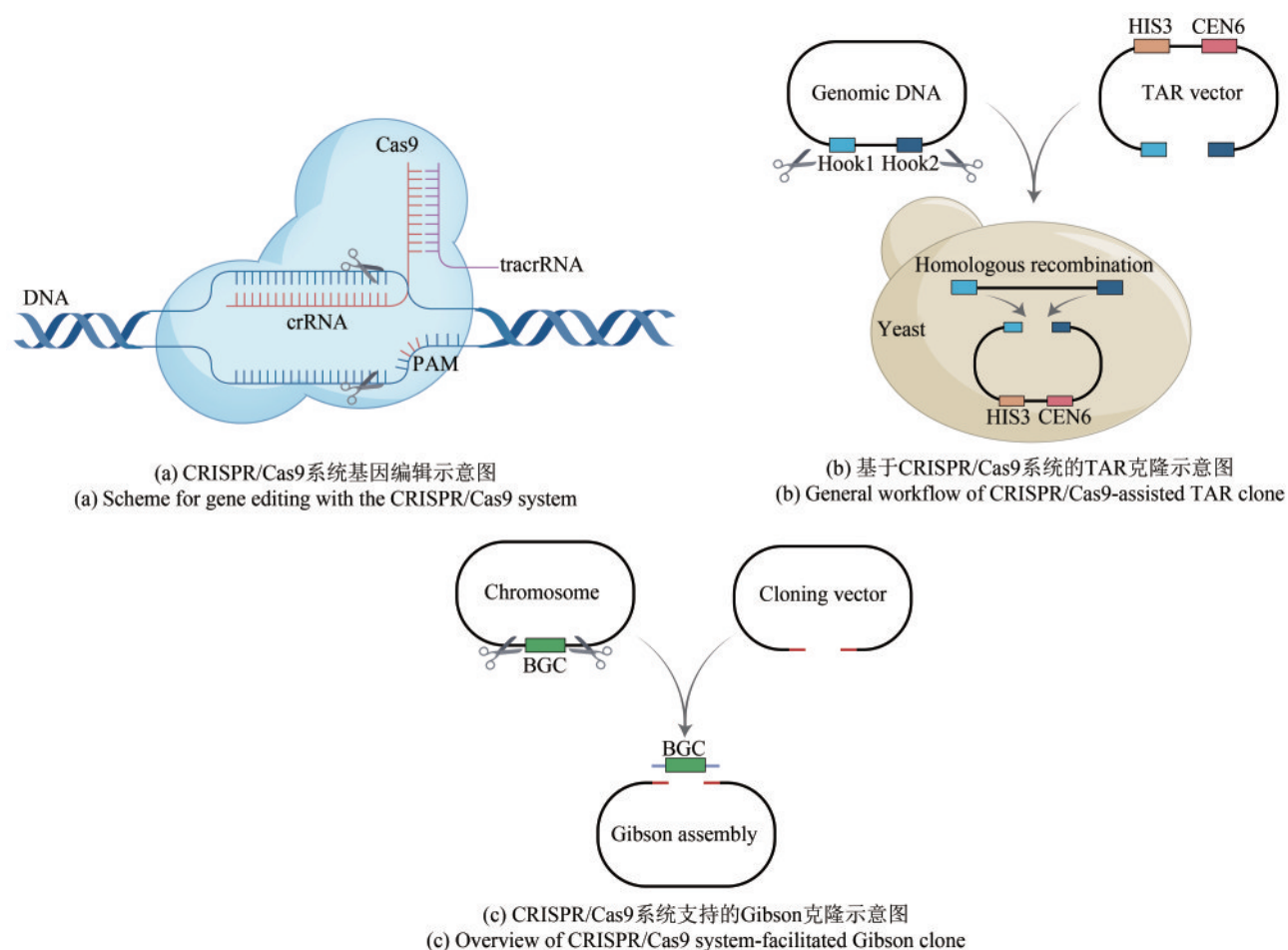


图1 CRISPR/Cas9系统在生物合成基因簇克隆中的应用

Fig. 1 CRISPR/Cas9-assisted directly cloning of biosynthetic gene clusters

感来自 *E. coli* 工程化的 TadA 脱氨酶对腺嘌呤的脱氨作用而产生的次黄嘌呤，随后产生的次黄嘌呤在复制过程中被聚合酶视为鸟嘌呤，从而实现从腺嘌呤到鸟嘌呤的转化 (ABE)^[21]。至此，上述 CRISPR/Cas9 的独特优势，包括靶向剪切、转录调控和单碱基编辑，已成功地应用于许多天然产物的研究中，如天然产物生物合成基因簇的克隆、基因组编辑和激活等。

2 CRISPR/Cas9系统在天然产物生物合成基因簇克隆中的应用

作为天然产物生物合成基因簇传统的遗传操作平台，异源表达在识别和发现新的天然产物方面具有重要优势。随着高通量测序技术的广泛应

用，越来越多的基因组数据得以公开，异源表达为在原始宿主难以获取或难以培养的情况下获得新的天然产物提供了途径。此外，天然产物合成所需的必需遗传单元和其特殊结构单元的生物合成途径都可以通过异源表达得以阐明。而大片的生物合成基因簇的克隆是实现异源表达的常见难题。目前，研究人员开发了多种方法来实现大的基因组片段的克隆。

传统克隆技术多依赖宿主的同源重组能力或借助外源蛋白促进重组发生，其中广泛使用的克隆技术包括细菌人工染色体技术、TAR (transformation-associated recombination) 克隆和 LLHR (linear-plus-linear homologous recombination) 克隆。多功能的大肠杆菌-链霉菌细菌人工染色体穿梭质粒 (*E. coli*: *Streptomyces* shuttle bacterial artificial chromosomal, BAC) pSBAC 被开发用于生物合

成基因簇的克隆。该系统通过限制性内切酶消化连接,位置特异性重组,以及 *attP-int* 系统实现了 pSBAC 和目的生物合成基因簇在链霉菌染色体特异性 *attB* 位点的整合^[22-23]。TAR 克隆是一种高效的同源重组技术,凭借酵母细胞高效的同源重组特性,通过末端同源序列,实现了来自环境的 DNA 和细菌基因组中的生物合成基因簇的直接克隆^[24-25]。LLHR 是一种在大肠杆菌胞内实现的强大克隆技术。该技术借助了来自 *Rac* 噬菌体的 RecE 蛋白和 RecT 蛋白,以及 λ 噬菌体的 Red Gam 蛋白,分别利用 Red Gam 蛋白对 RecBCD 复合体的抑制、

RecE 对双链 DNA 的消化、RecT 促进的同源单链 DNA 互补,最终实现对生物合成基因簇的直接克隆^[26-28]。

然而,这些传统的克隆技术严重依赖于对生物合成基因簇序列两端的恰当切割,以获得同源末端序列供连接重组使用。CRISPR/Cas9 系统的靶向切割能力完美解决了该限制,通过 gRNA 引导的靶向剪切,可显著提高传统方法的克隆效率。根据该设计思路,许多团队通过结合 CRISPR/Cas9 系统开发了多种克隆技术,实现了生物合成基因簇的灵活高效克隆(表 1)。

表 1 CRISPR/Cas 相关的生物合成基因簇编辑策略

Table 1 CRISPR/Cas-assisted biosynthetic gene cluster editing strategies

	策略	生物合成基因簇	功能	生物合成基因簇来源/宿主	参考文献	
基因簇克隆	CATCH	Bacillaene	基因簇线性化	<i>Bacillus subtilis</i> str. 168	[29]	
		Jadomycin		<i>Streptomyces venezuelae</i> ISP52030		
		Chlortetracycline		<i>S. aureofaciens</i> ATCC 10762		
		Pentaminomycins A-H		<i>S. cacaoi</i> CA-170360		
		BH-18257 A-C				
	ICE & λ packaging system	Tu3010	<i>S. thiolactonus</i> NRRL 15439	[31]		
		Sisomicin	<i>Micromonospora inyonensis</i> DSM 46123			
	CAPTURE	43 uncharacterized BGCs		<i>Streptomyces, Bacillus</i>	[32]	
	CAT-FISHING	Marinolactam A		<i>Micromonospora</i> sp. 181	[33]	
	基因簇遗传编辑	ICE	Tetronate RK-682	遗传突变	<i>Streptomyces</i> sp. Strain 88-682	[34]
Holomycin			<i>S. clavuligerus</i> TK24			
pCRISPOmyces		Undecylprodigiosin, Actinorhodin	<i>S. lividans</i> 66		[35]	
		Phosphinothricin tripeptide	<i>S. viridochromogenes</i> DSM 40736			
		Macrolactam, Lanthipeptide	<i>S. albus</i> J1074			
CRISPR/Cas9		Actinorhodin, Undecylprodigiosin	<i>S. coelicolor</i> M14		[36]	
		CRISPR/Cas9-LigD	Actinorhodin			<i>S. coelicolor</i> A3(2)
CRISPRi						
CRISPR/Cas9-CodA(sm)		Actinorhodin	<i>S. coelicolor</i> M145		[38]	
CRISPR/Cas9		Violaecin	<i>E. coli</i> HME68		[39]	
	Thalassospiramides	<i>Pseudomonas putida</i> EM383				
CBE/ABE	Undecylprodigiosin, Actinorhodin	<i>S. coelicolor</i> M145	[40]			
	Avermectin	<i>S. avermitilis</i> MA4680				
	Rapamycin	<i>S. avermitilis</i> SUKA				
产物衍生化	CRISPR/Cas9 & Gibson Assembly		组装模块编辑		[41]	
	CRISPR/Cas9	Enduracidin		<i>Streptomyces fungicidicus</i> ATCC 21013		[42]

续表

	策略	生物合成基因簇	功能	生物合成基因簇来源/宿主	参考文献	
产物代谢 调节	CRISPR/Cas9 & TAR	Actinorhodin	启动子工程	<i>S. albus</i> J1074	[43]	
	MSGE	Pristinamycin II, Chloramphenicol, YM-216391	多拷贝	<i>S. pristinaespiralis</i> HCCB10218 <i>S. coelicolor</i> M145	[44]	
	CRISPR/Cas9	Amorphadiene	启动子工程,遗传突变,多拷贝	<i>Bacillus subtilis</i>	[45]	
	CCTL	Actinorhodin	启动子工程	<i>Streptomyces</i> sp. 4F	[46]	
基因簇 激活	CRISPR/Cas9	Alteramide A, Macrolactam 2, FR-900098	启动子工程	<i>S. roseosporus</i> NRRL15998	[47]	
	mCRISTAR	Tetarimycin, Lazarimide, AB1210		<i>S. albus</i>	[48]	
	mpCRISTAR	Actinorhodin		<i>S. cerevisiae</i> BY4727	[49]	
	miCASTAR	Atolypene		<i>Amycolatopsis tolypomycina</i> NRRL B-24205	[50]	
	CRISPR/Cas9-LigD	Amicetin	Thiolactomycin, 5-chloro-3-formylindole	遗传突变	<i>Streptomyces</i> WAC6237	[51]
					<i>Streptomyces</i> WAC5374	
	CRISPRi/CRISPRa	Jadomycinb		转录调控	<i>Streptomyces venezuelae</i>	[52]

Richard F. Lockey 团队和 Natalay Kouprina 团队分别利用 CRISPR/Cas9 系统辅助了 Gibson 组装和 TAR 克隆。前者通过 Cas9 和 gRNA 的体外反应实现质粒的靶向切割, 随后和一个末端同切割后质粒同源的目的序列退火连接, 最终实现 Gibson 组装^[53]。后者则利用体内对目的基因组的靶向切割, 借助酵母的高效同源重组能力, 从而实现了靶向基因序列的高效 TAR 克隆^[54] [图 1(b)]。这些研究为利用 CRISPR/Cas9 系统实现任意目的基因序列的大片段克隆提供了可能。清华大学的朱昕团队^[29]开发了 CATCH (Cas9-assisted targeting of chromosome segments) 系统靶向大的生物合成基因簇 [图 1(c)]。借助靶向 DNA 序列末端同源的线性化质粒, 通过 gRNA 实现 Cas9 蛋白对靶向 DNA 序列特异性切割从而暴露出和线性化质粒末端同源的序列, 最终实现 Gibson 组装。该团队同时测试了来自不同菌株的不同长度片段, 高阳性率证实了该捕获技术可实现 50 kb 到 150 kb 序列的克隆。此外, Olga Genilloud 团队^[30]借助 CATCH 技术从 *Streptomyces cacaoi* CA-170360 菌株中成功地克隆了 *cpp* 基因

簇, 并验证了该串联基因簇是两个环肽的生物合成来源。

中国科学院上海生命科学研究院的覃重军团队^[55]开发了 CasHRA (Cas9-facilitated homologous recombination assembly) 系统并实现了 TAR 克隆在多重 DNA 片段组装上的应用。通过将 3 个大的环状 DNA、gRNA 和线性化质粒同时引入携带 Cas9 表达质粒的酵母细胞, 一步反应即实现了 3 个插入片段的 TAR 克隆组装。该团队借助该系统同时完成了 1.03 Mb MGE-syn 1.0 基因组的组装, 展现了大片段 DNA 克隆和重组的另一种策略。

与 Gibson 组装、TAR 克隆和 RecE/T 重组相比, 体外包装避免了特异性载体构建, 故其是一种更方便的天然产物生物合成基因簇克隆方法^[56]。武汉大学孙宇辉团队^[31]开发了一种体外噬菌体包装 (λ packaging) 系统。该团队借助 CRISPR/Cas9 系统特异性地从去磷酸化的基因组 DNA 中释放天然产物生物合成基因簇, 完成生物合成基因簇和线性化的质粒连接, 接着将得到的重组质粒进一步包装进入噬菌体颗粒再用于大肠杆菌转染, 最终实

现异源表达。该团队凭借该技术成功将来自 *Streptomyces thiolactonus* NRRL 15439 的 *stu* (Tu3010) 基因簇和来自 *Micromonospora inyoensis* DSM 46123 的 *sis* (sisomicin) 基因簇捕获。该体外包装过程不仅可以激活潜在通路, 还有助于合成通路的编辑和研究。

3 CRISPR/Cas9 系统在天然产物生物合成基因簇遗传编辑中的应用

3.1 CRISPR/Cas9 及相关系统介导的天然产物生物合成基因簇遗传编辑

基因组编辑常常被用来探究天然产物生物合成路径的结构、组成和功能。此外, 一些克隆捕获的天然产物生物合成基因簇也需要加入额外的遗传修饰以后才能成功异源表达。目前, 借助大肠杆菌的 λ Red 重组系统实现的菌内遗传编辑已经被学界和工业界广泛使用。该重组系统包含 3 个蛋白——Gam、Bet 和 Exo, 其中 Gam 蛋白抑制宿主的 RecBCD 外切酶 V, Exo 蛋白从 5'→3' 方向消化 dsDNA 从而暴露 3' ssDNA 片段, 最后 ssDNA 片段会在 Bet 蛋白的帮助下实现同源互补。联合 Flp-FRT 重组系统, 单步实现的 Red 重组即可完成目的基因的失活和抗性选择标志物的清除。通过在大肠杆菌内的两轮重组, I-SceI 内切酶的裂解作用可进一步优化 λ Red 介导的重组, 实现高效无痕的 DNA 编辑^[57-58]。此外, I-SceI 作为一个 homing 内切酶已经在链霉菌中实现了无痕迹的基因置换^[59]。另外, SSR (site-specific recombination) 系统已经被广泛用于细菌的遗传工程且展现出了强大的功能。在放线菌中, 借助 Cre/loxP 系统已经实现了大的基因组片段删除。同时, Cre 整合酶还实现了外源 DNA 在链霉菌染色体上的整合^[60]。

与上面这些较为复杂的基因组编辑手段相比, 现在广泛使用的 CRISPR/Cas9 系统可通过靶向编辑技术直接完成上述复杂重组过程。此外, 该系统可实现多位点同时编辑, Cas9 蛋白的靶向剪切又能帮助阳性克隆的筛选 (表 1)。武汉大学孙宇辉团队^[34]开发了高效体外 ICE (*In vitro* CRISPR/Cas9-mediated editing) 编辑系统, 通过额外的

T4 DNA 连接酶修复体外 Cas9/sgRNA 反应带来的黏性末端, 进而实现了精准无缝的靶向编辑。随后, 该团队借助 ICE 系统分别成功地敲除了来自 tetrionate RK-682 和 dithiopyrrolone holomycin 生物合成基因簇的 *rkD* 和 *homE* 基因。美国伊利诺伊大学香槟分校 (UIUC) 赵惠民团队^[35]使用温敏型质粒表达来自酿脓链球菌的 CRISPR/Cas9 系统, 并在链霉菌属中实现了多个基因组的靶向编辑。该团队构建的 pCRISPomyces 质粒可通过 Golden Gate 组装和等温组装 (或传统的消化连接) 插入 spacer 和修复模板, 满足快速灵活的基因组编辑。而后通过多重靶向能力成功实现了 *Streptomyces lividans* 内 31 kb *red* 基因簇的删除。此外, 他们还证实该系统适用于多种链霉菌菌株的基因编辑。类似的 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑也被多个团队报道, 其中丹麦技术大学 Sang Yup Lee 团队还证实了在没有引入修复模板时, NHEJ 修复通路会在靶向位点周围引入不同大小的缺失突变^[36-37, 61] [图 2(a)]。

为实现更快捷的双交联同源重组, 在获得含有目的突变克隆的同时去除载体质粒, 武汉大学孙宇辉团队^[38]通过引入额外的 5FC (5-fluorocytosine) 反向筛选基因 *codA* (*sm*), 构建了 CRISPR/Cas9-CodA (*sm*) 系统。该突变的胞嘧啶脱氨酶 (CodA) 可将 5FC 转换为致死性的毒素 5-FU (5-fluorouracil)。通过对来自链霉菌基因组的 *actI-ORF2* 的敲除证实了 *codA* (*sm*) 基因带来的反向筛选极大地增加了质粒的清除率和基因敲除率。随后, 加州大学圣地亚哥分校的 Bradley S. Moore 团队^[39]开发并借助 violacein 生物合成基因簇 *vio* 验证了 CRISPR/Cas9 介导的快速点突变能力, 他们发现当选择后随链 (lagging-strand) 和更长的单链 DNA 为修复模板时同源重组率更高。为了在实现更高突变率的同时省去修复模板, 武汉大学孙宇辉团队^[40]将 CBE 和 ABE 分别与 CRISPR/nCas9 (high fidelity nickCas9) 系统相连, 前者完成了对来自 *S. coelicolor* 和 *S. avermitilis* 的生物合成基因簇的多重位点同时突变, 后者通过突变 *actVB* 的起始密码子证实了该系统在突变腺嘌呤到鸟嘌呤方面的应用 [图 2(b)]。此外, 中国科学院天津工业生物技术研究所王猛团队^[62]借助反义 RNA 干扰技术

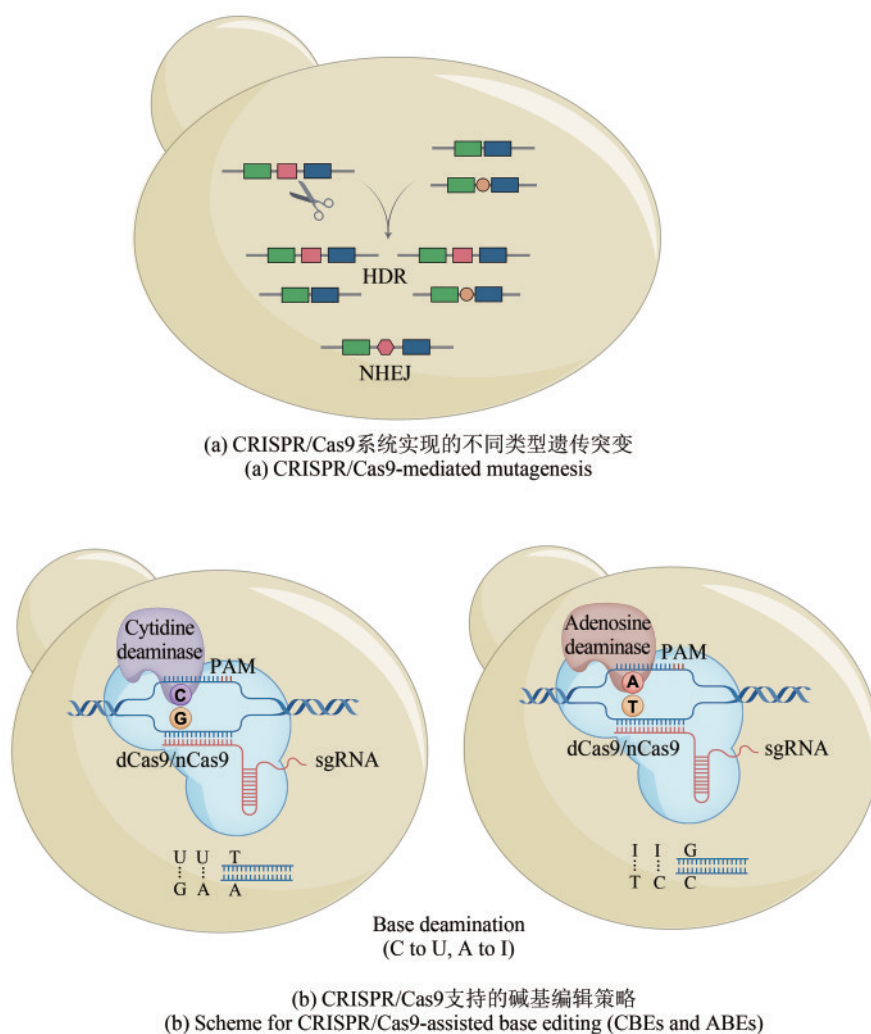


图2 CRISPR/Cas9及其相关系统介导的生物合成基因簇遗传突变
Fig. 2 CRISPR/Cas9-mediated genetic editing of biosynthetic gene clusters

同时抑制 *Streptomyces lividans* 66 的尿嘧啶 DNA 糖苷酶的表达，进一步提高了 CBE 效率。

3.2 CRISPR/Cas9 及相关系统介导的天然产物生物合成基因簇衍生化和代谢调控

CRISPR/Cas9 在基因编辑方面展现出强大的可拓展的能力，因此很多研究人员开始借助该系统来产生新颖天然产物衍生物、调控天然产物产量和激活沉默的天然产物生物合成基因簇（表 1）。天然产物药物的衍生化是优化先导化合物的主要和关键步骤。将生物合成基因簇作为天然产物的遗传单元进行修改，为研究天然产物药物衍生物提供了一个易于操作的平台。日本 AIST 研究所的

Kazuo Shin-ya 团队^[41]通过体外 Cas9 反应和 Gibson 组装在 rapamycin 生物合成基因簇上成功地实现了不同 AT 结构域（acyltransferase domain）的替换并对应获得了多个不同的 rapamycin 衍生物 [图 3(a)]。此外，该团队进一步通过模块删除插入、结构域的编辑和交换也获得了对应的 rapamycin 衍生物。该研究表明 CRISPR/Cas9 可帮助实现模块化天然产物生物合成基因簇的编辑，并实现目的天然产物的衍生化。基于蛋白结构活性位点的突变策略，针对合成脂肽类抗生素 enduracidin 的生物合成基因簇，Jason Micklefield 团队^[42]通过替换存在于 A 结构域（adenylation domain）中的高度保守的类黄素氧还蛋白单元实现了 A 结构域底物选择性靶向突变，从而合成了多个新的脂肽类抗生素。

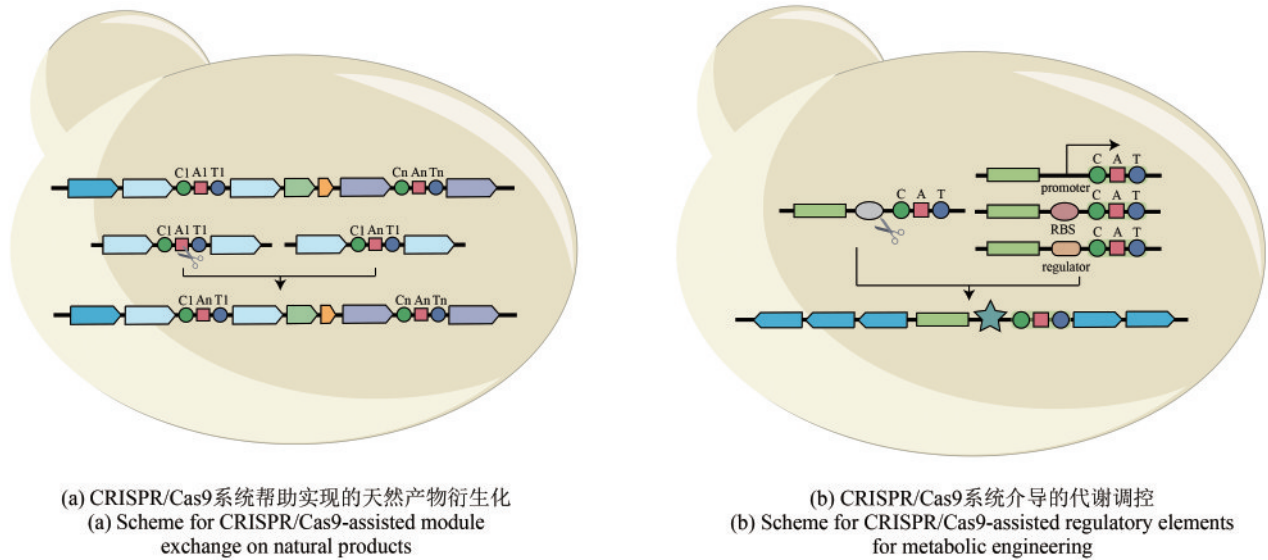


图3 CRISPR/Cas9及相关系统参与实现的生物合成基因簇衍生化和代谢工程调控

Fig. 3 CRISPR/Cas9-related methods for assembly and genetic engineering of biosynthetic gene clusters

原核生物的生物合成基因簇通常组织为一个多顺反子操纵子，其表达水平主要由一组共同的调控元件所控制。根据原核生物这一转录翻译特征可知，同一操纵子下的编码序列会同时转录并受相同的调控单元控制，但各个编码序列的翻译会受到其自身核糖体结合位点（ribosome binding site）的调控^[63]。启动子工程作为一类可靠的调节方法，可实现不同强度的基因表达调控。许多研究已经利用该技术实现了天然产物的多样化和产量优化^[64]。然而天然产物的生物合成是一个非常复杂的过程，通常需要多基因协作完成。所以仅仅通过强的组成型启动子来调节整个生物合成基因簇或限速酶的表达，尚不能实现最佳的产物产量。因此，Hahk-Soo Kang团队^[43]设计并优化了一个生物合成的诱导调节系统，该团队将该系统拆分成3个独立的功能模块，经过一系列筛选和综合评估，获得了包含CMT模块（cumate, CymR/cmtO）和A26_{RS}的最优组合，并用于优化act生物合成基因簇的表达。在CRISPR/Cas9系统的帮助下，将组成型RS（promoter/RBS）替换为CMT模块，同时通过更强的RS优化了抑制子表达模块SF14 RS。该系统对三株*S. albus*菌株的异源表达能力的调节完全超过了阳性对照，表明这种可诱导调节系统和模块化设计方法在生物合成基因簇的启动子工程中具有潜在的应用价值[图3(b)]。

除了启动子工程外，中国科学院芦银华和姜卫红团队^[44]借助噬菌体整合酶系统，通过CRISPR/Cas9系统在宿主染色体上引入多个attB（attachment site）位点，从而实现生物合成基因簇的多拷贝整合，最终实现次级代谢产物pristinamycin II在*S. pristinaespirali*中的高产量表达。Will J. Quax团队^[45]借助精准高效的CRISPR/Cas9系统，通过多拷贝核心基因，遗传突变弱化旁路通路，利用启动子工程调节三羧酸循环和MEP（2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate）通路，最终在枯草芽孢杆菌内实现了萜类前体Amorphadiene的最高产量。

中国科学院马延和团队^[65]开发了一种不依赖修复模板的靶向碱基编辑的策略（base editor-targeted and template-free expression regulation, BETTER），用于代谢系统编辑。该团队采用CBE系统实现了RBS、5'-UTR和启动子序列的修改，通过一系列体外条件诱导实现了调节区域的有效碱基序列组合。该系统展示了对代谢水平编辑的高效策略，同时可在特定条件下用于生物合成基因簇产量的优化。

3.3 CRISPR/Cas9系统介导的沉默生物合成基因簇的激活

大量生物信息分析已经显示，一些微生物染色体携带有大量天然产物生物合成基因簇，但大

多数生物合成基因簇在实验室培养条件下表达水平很低甚至不表达。研究人员通常采用多种方法克服这一难题。针对原核生物,通常采用两种方式激活沉默的生物合成基因簇:第一种是为多效性策略,包括利用共培养微生物来诱导交叉反应,同时也可以通过筛选得到利福平(rifampicin)耐受的RNA聚合酶 β -亚基H437R突变株,从而增加RNA聚合酶对生物合成通路启动子的亲和力而实现激活;第二种为通路特异性策略,包括通路特异性激活蛋白基因的过表达和抑制基因的去表达,以及通过组成型或诱导型启动子控制宿主调节单元的表达^[66]。

由于CRISPR/Cas9系统带来的特异性的靶向编辑和高效的同源重组,很多借助CRISPR/Cas9系统的策略被开发用于沉默生物合成基因簇的激活(表1)。赵惠民团队^[47]通过CRISPR/Cas9介导的敲入技术简单地在沉默生物合成基因簇的第一个基因上游引入单向或双向启动子,进而激活了该沉默生物合成基因簇。经过*kasO***p*和双向启动子*P8-kasO***p*的敲入,位于*S. roseosporus*的24号基因簇被成功激活并合成了2个polycyclic tetramate macrolactam类的化合物,同时10号基因簇被激活合成了化合物FR-900098。此外,该团队又在不同的链霉菌的不同生物合成基因簇上验证了该策略,成功获得了新的天然产物。洛克菲勒大学的Sean F. Brady团队^[48]开发了包含多重CRISPR/Cas9编辑和TAR克隆的启动子工程系统(multiplexed CRISPR/Cas9- and TAR-mediated promoter engineering method, mCRISTAR)。该系统包含两个质粒——pCRCT: Tam (包含了CRISPR/Cas9系统)和pTARa: Tam [包含Tam (tetarimycin)基因簇的大肠杆菌:酵母:链霉菌穿梭质粒],最后同携带Tam特异性启动子的基因一同转入酵母细胞完成启动子替换。在单筛选标志物存在的情况下,该系统通过一次反应同时完成了4个启动子的替换。此外,经过2轮mCRISTAR反应步骤,该团队成功实现了8个启动子的替换,证实了该系统的灵活和可拓展性。韩国建国大学的Hahk-Soo Kang团队^[49]进一步优化了mCRISTAR系统,通过多个质粒分别表达gRNA提高了反应效率。利用优化后的mpCRISTAR (multiple plasmid-based CRISPR/

Cas9- and TAR-mediated promoter engineering method)系统,该团队凭借4个质粒单次反应成功完成了acinorhodin生物合成基因簇8个启动子的同时替换。随后,在mCRISTAR系统的基础上,Sean F. Brady团队^[50]又开发了可拓展的生物合成基因簇激活方法,miCASTAR (multiplexed CRISPR TAR)。该方法将CRISPR/Cas9系统拆分得到的基因簇和PCR扩增得到的合成启动子一起转入酵母细胞完成TAR克隆。凭借该方法,该团队成功激活了atolypene生物合成基因簇并得到两个新的细菌环状二倍半萜天然产物。

考虑到实验室培养条件下沉默生物合成基因簇的低水平表达或者不表达,这些潜在的表达产物常常被组成型表达的生物合成基因簇所掩盖。加拿大麦克马斯特大学Gerard D. Wright团队^[51]采用CRISPR/Cas9基因编辑技术破坏常见的抗生素抗性生物合成基因簇,从而为发现低水平表达的基因簇产物带来可能。他们设计了pCRISPRomyces-2和pCRISPR-Cas9-LigD系统,借助同源重组或非同源末端修复的方式突变基因,选择性地破坏放线菌中最常见的steptothricin和steptomycin抗生素基因簇。通过抗菌活性筛选,他们从steptothricin失活的链霉菌WAC6237中发现了罕见的抗生素amicetin家族化合物,从链霉菌WAC8241中发现了thiolactomycin和5-chloro-3-formylindole,从链霉菌WAC8241中发现了phenanthroviridin aglycone。James Chappell团队^[52]针对*Streptomyces*开发了CRISPRi和CRISPRa系统,通过转录抑制和转录激活均在*Streptomyces venezuelae*中成功激活了沉默的jadomycinb生物合成基因簇。

4 总结与展望

大量的研究已经证实,CRISPR/Cas9系统具有强大的遗传编辑能力以及高度的特异性,可以通过基因编辑和重构基因序列实现天然产物生物合成基因簇的调控。然而,非特异性重组和非同源末端修复往往会带来许多副产物,尤其当靶向序列高度同源时,细胞内反应效率取决于宿主的同源重组能力。实际应用中,研究人员可以通过选择非同源的gRNA、更长的同源修复模板,或将生

物合成基因簇转移到更适宜遗传编辑的宿主内来克服以上不足。众所周知,广泛成熟应用的来自酿脓链球菌的CRISPR/Cas9系统识别靶向序列时需要提前满足合适的PAM位点(5'-NGG-3')。该条件限制了它在富含AT序列上的应用。此外,早期研究报告显示,基于*SpCas9*的编辑质粒无法在几种工业链霉菌中使用。CRISPR/Cpf1系统又称CRISPR/Cas12a系统,和CRISPR/Cas9系统类似,但CRISPR/Cpf1系统使用更小的Cpf1内切酶在富含T的PAM位点下游裂解gRNA靶向位置并得到黏性末端,同时Cpf1内切酶自身足以实现前体CRISPR RNA的成熟加工,该系统还可以对多个靶点同时编辑^[67-69]。中国科学院芦银华团队^[70]借助CRISPR/Cpf1系统在链霉菌中同样实现了同源重组突变、非同源末端突变和CRISPRi实验,进而证实了CRISPR/Cpf1系统是一种可替代CRISPR/Cas9的强大基因编辑工具,尤其是当CRISPR/Cas9系统无法很好地发挥作用时。Jochen Schmid团队^[71]也开发了基于CRISPR/dCas12a的转录激活和转录抑制系统,并在*Paenibacillus polymyxa*和*Escherichia coli*上得以验证。同CRISPR/Cas9系统,多个借助CRISPR/Cas12a系统的基因簇克隆技术相继被开发。赵惠民团队^[32]联合Cas12a的靶向剪切、DNA聚合酶体外连接和Cre-lox重组系统体内环化,开发了CAPTURE(Cas12a-assisted precise targeted cloning using *in vivo* Cre-lox recombination)策略,凭借该策略成功地从放线菌和芽孢杆菌中克隆了43个基因簇,并得到了7个成功异源表达基因簇。华东理工大学谭高翼团队^[33]同样借助CRISPR/Cas12a的高效靶向剪切能力,结合细菌人工染色体文库构建,开发了CAT-FISHING技术,成功地从多个放线菌基因组DNA样本中克隆得到多个生物合成基因簇,并通过异源表达获得一个新的大环内酰胺类化合物Marinolactam A。由于不同长度的gRNA序列将指导Cpf1切割得到不同长度的黏性末端^[46],上海师范大学王金团队^[72]根据这一特征,先后利用不同长度的gRNA序列开发了C-Brick DNA组装标准元件,借助4个标准接口序列实现表达模块的灵活替换和CCTL(Cpf1-assisted Cutting and Taq DNA ligase-mediated Ligation)方法,联合Taq DNA连接酶实现了*act*基因簇启动子

的高效替换。

随着测序技术和生物信息分析技术的发展,越来越多的原核生物基因数据及其潜在的天然产物生物合成基因簇分析,使得天然产物的研究方法逐步从传统的发酵分离走向靶向挖掘^[73]。应对该过程中最具挑战的大片段生物合成基因簇克隆和异源表达,传统方法往往需要根据不同的原核生物选择对应的遗传操作系统,此过程繁复且效率不高,常常耗费研究人员大量时间和精力。基于CRISPR/Cas9系统开发的多种针对大片段生物合成基因簇的克隆方法很大程度上克服了上述传统方法不足,同时本文中介绍的克隆方法可适用于绝大多数原核生物。

众所周知,天然产物是抗生素和其他多种药物的重要来源,这些活性化合物的生物合成、结构衍生化对于药物研发不可或缺。同生物合成基因簇克隆一样,传统研究方法也需要根据宿主选择对应的遗传编辑方法,需要构建多个质粒,经历多轮实验筛选。CRISPR/Cas9系统独特的靶向编辑优势很大程度上简化了上述烦琐步骤,同时提高了阳性率。此外,天然产物生物合成通路的代谢研究对于高效合成活性天然产物具有重要意义,基于该系统的研究策略同样简化了研究思路,提高了代谢通路优化的效率。

综上所述,CRISPR/Cas9系统为天然产物领域研究带来了极大的便利和强大的支撑。作为迅速发展和广泛应用的遗传编辑技术,尽管该系统针对少量菌种无法使用,但是通过对该系统的进化研究和与其他重组系统的组合,相信这一问题将会得到解决,同时也将会涌现出更多更高效的遗传编辑系统,为天然产物领域研究提供强大技术支持。

参 考 文 献

- [1] BAKER D D, CHU M, OZA U, et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery[J]. *Natural Product Reports*, 2007, 24(6): 1225-1244.
- [2] NEWMAN D J, CRAIG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(3): 629-661.
- [3] MOLONEY M G. Natural products as a source for novel antibiotics[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2016, 37(8): 689-701.

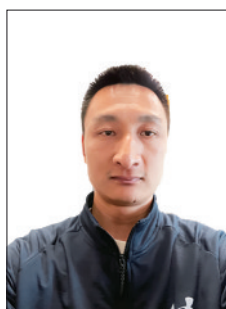
- [4] KIM H U, BLIN K, LEE S Y, et al. Recent development of computational resources for new antibiotics discovery[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 39: 113-120.
- [5] TRACANNA V, JONG A D, MEDEMA M H, et al. Mining prokaryotes for antimicrobial compounds: from diversity to function[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(3): 417-429.
- [6] JIANG F G, DOUDNA J A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2017, 46: 505-529.
- [7] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [8] MOJICA F J M, DÍEZ-VILLASEÑOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 3): 733-740.
- [9] 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(21): 9275-9282.
- [10] 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(7340): 602-607.
- [11] 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.
- [12] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [13] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(39): E2579-E2586.
- [14] JIANG W Y, BIKARD D, COX D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239.
- [15] THOMASON L C, COSTANTINO N, LI X T, et al. Recombineering: genetic engineering in *Escherichia coli* using homologous recombination[J]. *Current Protocols*, 2023, 3(2): e656.
- [16] 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(5): 1173-1183.
- [17] BIKARD D, JIANG W Y, SAMAI P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(15): 7429-7437.
- [18] DOVE S L, HOCHSCHILD A. Conversion of the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(5): 745-754.
- [19] HILTON I B, GERSBACH C A. Enabling functional genomics with genome engineering[J]. *Genome Research*, 2015, 25(10): 1442-1455.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] LIU H B, JIANG H, HALTLI B, et al. Rapid cloning and heterologous expression of the meridamycin biosynthetic gene cluster using a versatile *Escherichia coli-Streptomyces* artificial chromosome vector, pSBAC[J]. *Journal of Natural Products*, 2009, 72(3): 389-395.
- [23] NAH H J, WOO M W, CHOI S S, et al. Precise cloning and tandem integration of large polyketide biosynthetic gene cluster using *Streptomyces* artificial chromosome system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 140.
- [24] KIM J H, FENG Z Y, BAUER J D, et al. Cloning large natural product gene clusters from the environment: piecing environmental DNA gene clusters back together with TAR[J]. *Biopolymers*, 2010, 93(9): 833-844.
- [25] KOUPRINA N, LARIONOV V. Transformation-associated recombination (TAR) cloning for genomics studies and synthetic biology[J]. *Chromosoma*, 2016, 125(4): 621-632.
- [26] BIAN X Y, HUANG F, STEWART F A, et al. Direct cloning, genetic engineering, and heterologous expression of the syringolin biosynthetic gene cluster in *E. coli* through Red/ET recombineering[J]. *Chembiochem*, 2012, 13(13): 1946-1952.
- [27] FU J, BIAN X Y, HU S B, et al. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 440-446.
- [28] MURPHY K C. Phage recombinases and their applications[J]. *Advances in Virus Research*, 2012, 83: 367-414.
- [29] JIANG W J, ZHAO X J, GABRIELI T, et al. Cas9-Assisted targeting of chromosome segments CATCH enables one-step targeted cloning of large gene clusters[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8101.
- [30] ROMÁN-HURTADO F, SÁNCHEZ-HIDALGO M, MARTÍN J, et al. One pathway, two cyclic non-ribosomal pentapeptides: heterologous expression of BE-18257 antibiotics and pentaminomycins from *Streptomyces cacaoi* CA-170360[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 135.

- [31] TAO W X, CHEN L, ZHAO C H, et al. *In vitro* packaging mediated one-step targeted cloning of natural product pathway [J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(9): 1991-1997.
- [32] ENGHAD B, HUANG C S, GUO F, et al. Cas12a-assisted precise targeted cloning using *in vivo* Cre-lox recombination [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 1171.
- [33] LIANG M D, LIU L S, XU F, et al. Activating cryptic biosynthetic gene cluster through a CRISPR-Cas12a-mediated direct cloning approach[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(6): 3581-3592.
- [34] LIU Y K, TAO W X, WEN S S, et al. *In vitro* CRISPR/Cas9 system for efficient targeted DNA editing[J]. mBio, 2015, 6(6): e01714-15.
- [35] COBB R E, WANG Y J, ZHAO H M. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(6): 723-728.
- [36] HUANG H, ZHENG G S, JIANG W H, et al. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2015, 47(4): 231-243.
- [37] TONG Y J, CHARUSANTI P, ZHANG L X, et al. CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(9): 1020-1029.
- [38] ZENG H, WEN S S, XU W, et al. Highly efficient editing of the actinorhodin polyketide chain length factor gene in *Streptomyces coelicolor* M145 using CRISPR/Cas9-CodA(sm) combined system[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(24): 10575-10585.
- [39] ZHANG J J, MOORE B S. Site-directed mutagenesis of large biosynthetic gene clusters *via* oligonucleotide recombineering and CRISPR/Cas9 targeting[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(7): 1917-1922.
- [40] ZHONG Z Y, GUO J H, DENG L, et al. Base editing in *Streptomyces* with Cas9-deaminase fusions[EB/OL]. bioRxiv. (2019-05-07) [2023-11-01]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/630137v1>.
- [41] KUDO K, HASHIMOTO T, HASHIMOTO J, et al. *In vitro* Cas9-assisted editing of modular polyketide synthase genes to produce desired natural product derivatives[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 4022.
- [42] THONG W L, ZHANG Y X, ZHUO Y, et al. Gene editing enables rapid engineering of complex antibiotic assembly lines [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 6872.
- [43] JI C H, KIM H, KANG H S. Synthetic inducible regulatory systems optimized for the modulation of secondary metabolite production in *Streptomyces*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(3): 577-586.
- [44] LI L, ZHENG G S, CHEN J, et al. Multiplexed site-specific genome engineering for overproducing bioactive secondary metabolites in actinomycetes[J]. Metabolic Engineering, 2017, 40: 80-92.
- [45] SONG Y F, HE S Q, ABDALLAH I I, et al. Engineering of multiple modules to improve amorphanthene production in *Bacillus subtilis* using CRISPR-Cas9[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(16): 4785-4794.
- [46] LEI C, LI S Y, LIU J K, et al. The CCTL (Cpf1-assisted cutting and Taq DNA ligase-assisted ligation) method for efficient editing of large DNA constructs *in vitro*[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(9): e74.
- [47] ZHANG M M, WONG F T, WANG Y J, et al. CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters[J]. Nature Chemical Biology, 2017, 13: 607-609.
- [48] KANG H S, CHARLOP-POWERS Z, BRADY S F. Multiplexed CRISPR/Cas9- and TAR-mediated promoter engineering of natural product biosynthetic gene clusters in yeast[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(9): 1002-1010.
- [49] KIM H Y, JI C H, JE H W, et al. mpCRISTAR: multiple plasmid approach for CRISPR/Cas9 and TAR-mediated multiplexed refactoring of natural product biosynthetic gene clusters[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(1): 175-180.
- [50] KIM S H, LU W L, AHMADI M K, et al. Atolypenes, tricyclic bacterial sesterterpenes discovered using a multiplexed *in vitro* Cas9-TAR gene cluster refactoring approach[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(1): 109-118.
- [51] CULP E J, YIM G, WAGLECHNER N, et al. Hidden antibiotics in actinomycetes can be identified by inactivation of gene clusters for common antibiotics[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(10): 1149-1154.
- [52] AMERUOSO A, VILLEGAS KCAM M C, COHEN K P, et al. Activating natural product synthesis using CRISPR interference and activation systems in *Streptomyces*[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(13): 7751-7760.
- [53] WANG J W, WANG A, LI K Y, et al. CRISPR/Cas9 nuclease cleavage combined with Gibson assembly for seamless cloning [J]. BioTechniques, 2015, 58(4): 161-170.
- [54] LEE N C O, LARIONOV V, KOUPRINA N. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated TAR cloning of genes and chromosomal loci from complex genomes in yeast[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(8): e55.
- [55] ZHOU J T, WU R H, XUE X L, et al. CasHRA (Cas9-facilitated homologous recombination assembly) method of constructing megabase-sized DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(14): e124.
- [56] HOHN B, WURTZ M, KLEIN B, et al. Phage lambda DNA packaging, *in vitro*[J]. Journal of Supramolecular Structure, 1974, 2(2-4): 302-317.

- [57] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [58] TISCHER B K, VON EINEM J, KAUFER B, et al. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in *Escherichia coli*[J]. BioTechniques, 2006, 40(2): 191-197.
- [59] SIEGL T, PETZKE L, WELLE E, et al. I-SceI endonuclease: a new tool for DNA repair studies and genetic manipulations in *Streptomyces*[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2010, 87(4): 1525-1532.
- [60] HERRMANN S, SIEGL T, LUZHETSKA M, et al. Site-specific recombination strategies for engineering actinomycete genomes[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(6): 1804-1812.
- [61] WOLF T, GREN T, THIEME E, et al. Targeted genome editing in the rare actinomycete *Actinoplanes* sp. SE50/110 by using the CRISPR/Cas9 System[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 231: 122-128.
- [62] ZHANG Y, YUN K Y, HUANG H M, et al. Antisense RNA interference-enhanced CRISPR/Cas9 base editing method for improving base editing efficiency in *Streptomyces lividans* 66[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(5): 1053-1063.
- [63] SHAFEE T, LOWE R. Eukaryotic and prokaryotic gene structure[J]. WikiJournal of Medicine, 2017, 4(1): 2.
- [64] JIN L Q, JIN W R, MA Z C, et al. Promoter engineering strategies for the overproduction of valuable metabolites in microbes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(21-22): 8725-8736.
- [65] WANG Y, CHENG H J, LIU Y, et al. *In-situ* generation of large numbers of genetic combinations for metabolic reprogramming via CRISPR-guided base editing[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 678.
- [66] RUTLEDGE P J, CHALLIS G L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(8): 509-523.
- [67] ZETSCHKE 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(3): 759-771.
- [68] FONFARA I, RICHTER H, BRATOVIĆ M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA[J]. Nature, 2016, 532(7600): 517-521.
- [69] ZETSCHKE B, HEIDENREICH M, MOHANRAJU P, et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35: 31-34.
- [70] LI L, WEI K K, ZHENG G S, et al. CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(18): e00827-18.
- [71] SCHILLING C, KOFFAS M A G, SIEBER V, et al. Novel prokaryotic CRISPR-Cas12a-based tool for programmable transcriptional activation and repression[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(12): 3353-3363.
- [72] LI S Y, ZHAO G P, WANG J. C-brick: a new standard for assembly of biological parts using Cpf1[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(12): 1383-1388.
- [73] BAUMAN K D, BUTLER K S, MOORE B S, et al. Genome mining methods to discover bioactive natural products[J]. Natural Product Reports, 2021, 38(11): 2100-2129.



通讯作者：唐啸宇(1984—)，男，博士，研究员，博士生导师。研究方向为微生物天然产物化学生物学。
E-mail: xtang@szbl.ac.cn



第一作者：惠真(1989—)，男，博士研究生。研究方向为微生物天然产物基因挖掘和生物合成。
E-mail: zhuiaa@connect.ust.hk