

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2020-077

酿酒酵母适应性实验室进化工具的最新进展

李祎¹, 林振泉², 刘子鹤¹

(¹北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; ²北京化工大学北京软物质科学与工程高精尖创新中心, 北京 100029)

摘要: 酿酒酵母作为重要的模式生物和微生物细胞工厂已广泛用于代谢工程、系统生物学和合成生物学研究。由于微生物系统代谢和调控网络的复杂性, 通过人工理性设计及基因扰动难以获得鲁棒性较好的表型, 因此进化工程在构建稳定的微生物细胞工厂中发挥着重要作用。微生物适应性实验室进化工程通过模拟自然进化过程, 构建大量遗传多样性的突变库, 经过筛选可快速获得稳定性状的菌株。随着合成生物学和系统生物学的发展, 研究人员开发了多种基因组规模的多位点快速进化工具, 并结合计算机辅助进化系统实现了自动化连续进化技术。本综述着重介绍在酿酒酵母中基因组规模的多位点快速进化, 包括合成型酿酒酵母基因组重排 (SCRaMbLE)、寡核苷酸介导的多位点进化工具 (YOGE 和 eMAGE) 和基于 CRISPR 系统的多位点编辑 (CHAnGE、MAGESTIC、Target-AID 和 yEvolVR) 等基因组规模的进化策略的研究; 以及自动化连续进化技术 (eVOLVER、ICE 和 ACE 等)。利用合成生物学方法通过在基因组水平进行多位点快速编辑或连续进化以产生具有遗传多样性的细胞群体, 并在特定的筛选条件下对目标突变株进行富集, 进而解析其基因型表型关系, 可实现在短期内快速高效识别适应性进化的关键因素和协同作用。最后展望了实验室适应性进化工程与计算机辅助设计、自动化技术有机结合的机遇和在高通量筛选方向的挑战。

关键词: 酿酒酵母; 进化工程; 多位点编辑; 自动化连续进化; 基因组工程

中图分类号: Q-1, Q81 **文献标志码:** A

Advances in yeast based adaptive laboratory evolution

LI Yi¹, LIN Zhenquan², LIU Zihe¹

(¹College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China; ²Beijing Advanced Innovation Center for Soft Matter Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: *Saccharomyces cerevisiae*, as an eukaryotic model organism and microbial cell factory, has been widely used in metabolic engineering, system biology and synthetic biology. However, due to the limited knowledge of the complex cellular metabolism and inherent regulatory networks, it is difficult to obtain desired phenotypes through rational engineering. Among reported engineering strategies, evolutionary engineering plays an important role in the construction of robust microbial cell factories, particularly when optimizing the whole metabolic or genome-scale

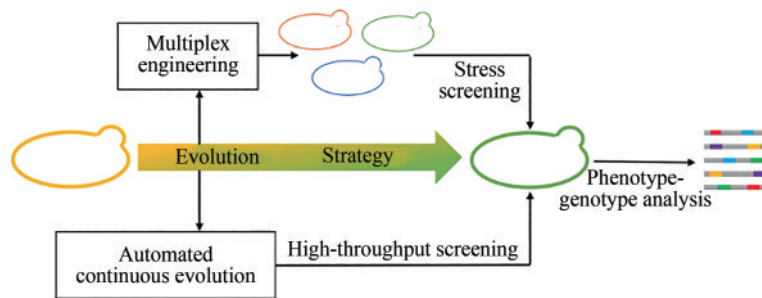
收稿日期: 2020-09-16 修回日期: 2021-02-14

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0900100); 中国博士后科学基金第67批面上项目 (2020M670115)

引用本文: 李祎, 林振泉, 刘子鹤. 酿酒酵母适应性实验室进化工具的最新进展[J]. 合成生物学, 2021, 2(2): 287-301

Citation: LI Yi, LIN Zhenquan, LIU Zihe. Advances in yeast based adaptive laboratory evolution[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(2): 287-301

network. Adaptive laboratory evolution mimics natural evolution in the laboratory *via* iterative cycles of culture and selection to isolate desirable phenotypes, such as tolerance of high salt concentration, low pH, high temperature condition as well as toxicities from substrate at excess and product accumulated to high titers. With recent advances in genome editing, synthetic biology and systems biology, development in evolution engineering has made great progress, including the computer-aided system and automatic continuous evolution technology. This review focuses on recent technological advances in evolution engineering tools for *S. cerevisiae*. Firstly, recently developed genome evolution strategies are discussed, including the recombinase-based genome-scale engineering system SCRaMble (synthetic chromosome rearrangement and modification by loxP-mediated evolution) and SCRaMble-in, oligo-mediated YOGEE (yeast oligo-mediated genome engineering), oligo-based genome-scale engineering eMAGE (eukaryotic multiplex automated genome engineering), CRISPR mediated genome-scale engineering systems CHAnGE (CRISPR/Cas9-and homology-directed-repair-assisted genome-scale engineering), and MAGESTIC (multiplexed accurate genome editing with short, trackable, integrated cellular barcodes), Target-AID (target-activation induced cytidine deaminase). Then, yeast-based automated continuous evolution, such as OrthoRep (orthogonal error-prone replication), ICE (*in vivo* continuous evolution), eVOLVER (a scalable and automated continuous culture device), and ACE (automated continuous evolution, pairs OrthoRep with eVOLVER), are further addressed. These rapid editing strategies at the genome level can generate genetically diverse cell populations to identify key factors and synergies in a short period of time. Finally, we prospect future challenges and opportunities of evolution engineering approaches in advancing yeast-based microbial cell factories. Strategies learned from yeast will also guide the development of other microbial cell factories.



Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; evolutionary engineering; multiplex engineering; automated continuous evolution; genome engineering

自然进化是连续且不断筛选的，具体过程包括遗传多样性的产生、选择压力的胁迫以及适应性后代的繁殖等^[1]。长期以来，人类一直试图加快和控制这一过程，以快速获得具有优良表型的生物体或特定生物分子^[2]。适应性实验室进化（adaptive laboratory evolution, ALE）以特定或逐渐增加的胁迫来筛选性能优良的突变体，即人为复制了自然进化的过程^[3]，并获得在特定条件下鲁棒性较好的突变体^[4]。以特定的亲本菌株出发，在基因组水平上对遗传物质进行突变或者重组，以创建群体多样性文库；将群体文库在特定的培

养条件中进行培养，筛选目标性状的菌株^[5]。根据进化时间的长短可以将ALE技术分为长期模式和短期模式^[6]。长期模式通常经历数百次的传代，而短期模式往往仅需几十次甚至数十小时的传代即可完成^[7]。ALE过程可能会出现权衡（trade-offs）现象，即在选择压力下出现相关变化沿相反方向发生的事件，而此时可通过适当减弱选择压力等方法进行规避^[8]。ALE策略已经广泛应用于构建耐高渗、耐酸性及耐热性等菌株^[9-11]。

多样性文库的质量直接影响实验室适应性进化的效率，传统的实验室进化主要是通过物理/化

学诱变方法^[12-18]、转座子突变^[19-21]、基因重组^[22-25]、易错PCR^[26-28]等方式获得多样性突变文库。近年来,随着系统生物学和合成生物学技术的发展,研究人员开发出多种基于全基因组水平的多位点多样性文库的构建策略。为了适应当前高通量甚至超高通量的研究趋势^[29],同时快速地复制自然进化的全部过程,自动化连续进化策略成为进化工程重要的发展方向。

酿酒酵母具有遗传背景清晰、基因操作手段丰富、可利用碳源广泛等优势^[30-32],已广泛应用于生产生物基化学品和燃料^[33],如类异戊二烯、莽草酸、纤维素乙醇等^[34-38]。本综述将着重介绍近年来在酿酒酵母中基于全基因组水平的多位点快速进化及体内连续进化的研究进展,通过对基因组的编辑,以产生具有遗传多样性的细胞群体,能够在短期内获得目标性状。

1 基于基因组水平的多位点进化策略

由于细胞代谢过程受到高度的调控及生物系统的复杂性,许多遗传表型不仅需要目标途径进行有效的调控,还需要在基因组水平进行多位点的编辑调控^[39]。因此,基于基因组规模的多位点进化策略

能够有效提高目标性状,减少进化所需的时间和成本,是进化工程重要的研究热点之一。

本节将介绍3类在酿酒酵母中基于基因组的多位点快速进化工具(表1):重组酶介导的进化工程、基于寡核苷酸的多位点进化工具和CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, 规律间隔成簇短回文重复序列)介导的多位点编辑。

1.1 基于重组酶介导的进化工程

随着基因组测序和基因合成技术的发展,基因组规模的分析为微生物进化的深度研究提供了有效工具,实现可在碱基对水平和基因组规模上对DNA序列进行“读”和“写”^[46]。合成酵母基因组计划(Sc2.0)是世界上首个真核基因组合成项目,旨在合成一个高适应性及通用性的人工合成酵母基因组^[47]。Sc2.0人工合成基因组中添加了loxPsym位点^[48],Cre重组酶能够特异性识别并介导不同loxPsym位点(对称的loxP序列)之间进行重组,建立合成型酿酒酵母基因组重排(synthetic chromosome rearrangement and modification by loxP-mediated evolution, SCRaMble)^[49]。SCRaMble系统(图1)通过非必需基因终止密码子后3 bp处

表1 酿酒酵母中基因组的多位点快速进化工具

Tab. 1 Multi-site rapid evolution tools for genome in *S. cerevisiae*

分类	进化策略	进化原理	优点	缺点	应用
重组酶介导的进化工程	SCRaMble	通过基因组重构,加入多个loxPsym位点,并利用Cre重组酶特异性识别loxPsym位点并介导位点之间重组	可同时实现缺失、倒置、重复和异位等重组事件	需提前构建具有多个loxPsym位点的基因组序列	提高紫堇素和青霉素的生物合成 ^[40]
	SCRaMble-in		快速优化宿主以有效提高异源途径的表达;是SCRaMble技术的继承和发展		提高 β -胡萝卜素的产量 ^[41]
基于寡核苷酸的多位点进化工具	eMAGE	突变的ssODN与复制叉的后随链结合并整合到基因组上引入突变点	较高的等位基因替换效率(40%)	突变效率随单链DNA寡核苷酸突变序列的增加而降低	提高类胡萝卜素的产量 ^[42]
CRISPR系统介导的多位点编辑	CHAnGE	通过gRNA介导的同源修复促进了基因组编辑的精确性和有效性	通过对gRNA的测序进行突变位点的靶向定位	依赖于gRNA和供体DNA的协同,突变效率随着片段长度的增加而降低	提高酿酒酵母对糠醛和乙酸的耐受性 ^[43]
	Targeted-AID	将胞嘧啶脱氨酶与CRISPR/Cas9系统融合,实现基因组DNA上胞嘧啶的靶向编辑	可在目标位点进行精确的碱基编辑	突变率较低	对ADE1和CAN1基因进行同时编辑突变率达到31% ^[44]
	yEvolvR	由nCas9-gRNA引导的在目标基因座上形成缺口,PolI-5M以低保真度合成新链并切割置换的链	在切割位点上游20 bp到下游40 bp的区域内进行编辑;靶标突变率提高12 434倍	酿酒酵母整体突变率较低	提高内源基因的多样性,即还原URA3*中无义突变的同时使CAN1失活 ^[45]

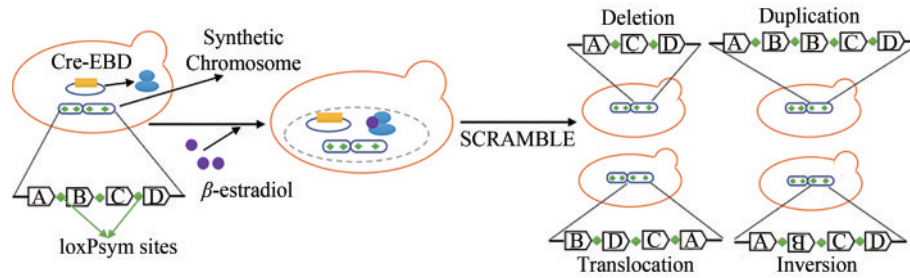


图1 SCRaMbLE技术

Fig. 1 Schematic for SCRaMbLE technology

添加 loxPsym 序列, 实现全基因组范围内 loxPsym 位点间的 DNA 片段缺失、倒置、重复和异位, 以产生大量不同基因型-表型的酵母菌株, 快速获得大量的酵母多样性文库^[33, 40]。

1.1.1 精准控制与筛选 SCRaMbLE 的重排策略

通过 β -雌二醇诱导 Cre 重组酶表达激活 SCRaMbLE 系统, Cre 重组酶的泄露表达会影响人工合成染色体的稳定性甚至致死, 因此需要对 Cre 重组酶的表达进行严谨的调控^[50]。Jia 等^[51] 构建了逻辑“与”门开关控制 Cre 的表达, 通过半乳糖诱导 Cre-EBD 表达, 再将 Cre-EBD 结合雌二醇以形成有活性的 Cre 重组酶, 可在转录和细胞定位水平上调节单、双倍体酵母中的 SCRaMbLE。除此之外, Hochrein 等^[52] 将 Cre 的 N 末端和 C 末端分裂, 再分别与光敏色素 B 和作用因子 PIF3 相融合构建 L-SCRaMbLE 系统, 未激活时两端处于分离状态, 经红光照射后光敏色素 B 和作用因子 PIF3 相互作用以重构 Cre 重组酶使其恢复功能。L-SCRaMbLE 策略可有效控制 Cre 重组酶泄露表达, 并通过诱导时间、光剂量和感受器浓度控制 Cre 重组酶的活性, 实现精准控制基因组重排。

SCRaMbLE 系统利用染色体重排产生了多种基因型的菌株, 高效的筛选方法是获得目标菌株的必要途径。Luo 等^[53] 通过在 loxP 位点的两翼设计对向排列且不携带起始密码子的营养缺陷型标记“*URA3 Δ ATG-LEU2 Δ ATG*”模块, 构建了高效筛选重组细胞的 ReSCuES 系统 (SCRaMbLEd cells using efficient selection)。由于模块的侧面是两个相对的 loxP 位点, 其中 loxP 位点与 loxPsym 位点之间不会进行重组, 只有当 Cre 重组酶诱导基因组重排时, 模块才会发生翻转 (*LEU2* 表达的同时会关闭 *URA3* 的表达), 导致两个标记分别处于

“开”和“关”的状态, 通过缺陷型培养基即可筛选出发生基因组重排的突变株。利用以上策略精准控制和筛选 SCRaMbLE 菌株, 大大缩短了试验时间并减少了烦琐的操作, 加速全基因组规模的进化。

1.1.2 基于 SCRaMbLE 系统的基因组工程

Wu 等^[54] 开发了一个基于结构变异的体外 SCRaMbLE 系统, 并提出“自上而下”和“自下而上”两种策略。“自上而下”策略 [图 2 (a)] 利用纯化的 DNA 重组酶在体外对人工合成环形 synV 染色体的 loxPsym 位点间的序列进行修饰, 在 Cre 重组酶的诱导下, 随机地删除、倒置、异位或重复 loxPsym 位点相邻的转录单元 (transcription unit, TU)。“自下而上”策略 [图 2 (b)] 由载体和供体片段构成, 且演化出两种独立的模式: 第 1 个模式的载体具有两个 loxPsym 位点, 供体片段每个都带有 TU 和 *URA3* 基因 (阳性选择标记); 第 2 个模式的载体只含有一个 loxPsym 位点, 一个或多个供体片段的重组模式进入该位点可将 *URA3* 启动子和编码序列物理分离。载体、供体库与 Cre 重组酶在体外混合使 TU 随机插入 loxPsym 位点, 通过 TU 复制数量和方向的变化实现基因重排。

为了优化异源表达中的途径和底盘适配性等问题, Liu 等^[41] 开发了一种基于 SCRaMbLE 的组合策略 SCRaMbLE-in [图 2 (c)]。首先在体外使用纯化的重组酶将调控元件整合到目标途径中, 使目标基因表达多样化; 再通过 SCRaMbLE 将组装的途径随机整合到合成酵母染色体中, 诱导基因组重排获得基因表达多样化和底盘优化的菌群文库, 实现了快速的基因组进化。由于染色体的拓扑结构对染色体重排起着重要作用, Wang 等^[55] 应用 SCRaMbLE 技术对环状 synV 染色体进行基因

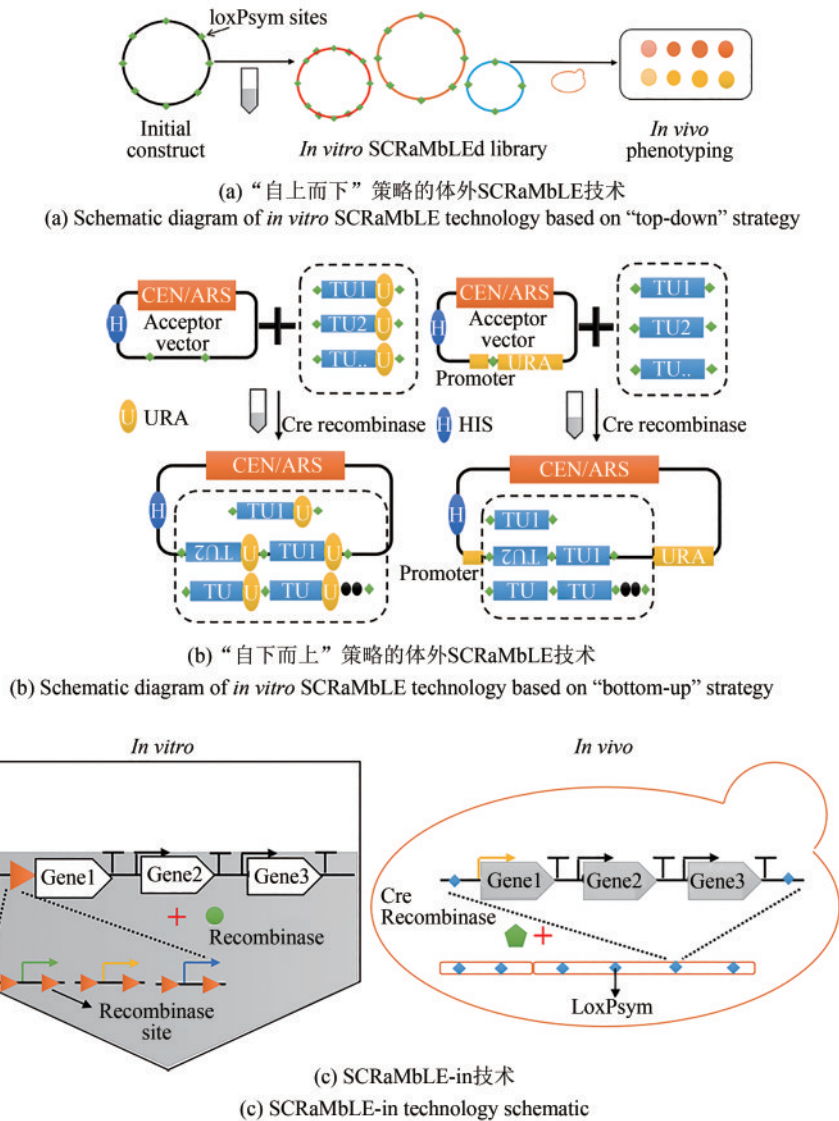


图2 体外SCRaMbLE^[54]与SCRaMbLE-in技术

Fig. 2 Schematic for *in vitro* SCRaMbLE^[54] and SCRaMbLE-in technology

组重排，发生了特定染色体的非整倍性重复，与线性synV相比，SCRaMbLEd的环状染色体出现大量的重复现象。因此，通过对环状染色体进行基因重排可连续地产生复杂的基因型和表型，深入探索了染色体结构对生物表型多样性的重要影响。

SCRaMbLE系统已经成功应用于提升类胡萝卜素、青霉素等产量^[41, 51, 55-56]，以及提高底盘细胞对酸、碱和高渗等耐受性^[53, 56-58]。由于染色体结构改变和非整数倍的研究往往基于单个基因组的静态对比，SCRaMbLE系统提供了一个强大的平台，通过生成大量的基因组结构变异库，为深入认识染色体性状提供了有效手段^[59]。

1.2 基于寡核苷酸的多位点进化工具

可以利用生物体自身同源重组介导的修复机制引入突变位点，通过引入含碱基突变的寡核苷酸建立突变文库^[60]。2013年，DiCarlo等^[61]报告了一种在酿酒酵母中以寡核苷酸介导的基因组多位点编辑技术YOGE (yeast oligo-mediated genome engineering)。通过敲除错配修复相关的基因*Mlh1*和*Msh2*、过表达DNA重组酶Rad51和Rad54以及优化寡核苷酸的设计和转化量，将寡核苷酸的错配率提高到0.2%~2.0%。通过迭代循环YOGE的方式可以逐步富集所需基因型，从而在每个循环

中获得更高的频率。等位基因替换效率 (allelic replacement frequencies, ARF) 2% 仍不足以进行多位点、规模化的基因组编辑^[39]。

2017年, Barbieri等^[62]利用羟基脲减慢复制叉移动速度、敲除 *Rad51* 基因以提高ARF, 在酿酒酵母DNA复制过程中建立了基于滞后链上退火合成寡核苷酸的多重基因组工程技术 eMAGE (eukaryotic MAGE)。在DNA复制起始阶段, 错配的 ssODN (single-stranded DNA oligodeoxynucleotides) 由 ssDNA 退火蛋白 (ssDNA annealing protein) 介导, 在复制叉的后随链上退火并整合到基因组上引起突变。单个碱基对的错配、插入或缺失的ARF>40%, 对于30 bp错配和100 bp缺失的ARF只有10%。利用多轮 eMAGE 循环可提高大片段或多个寡核苷酸的ARF, 在酵母中引入异源 β -胡萝卜素途径, 并设计了74个精确靶向启动子、开放阅读框和终止子的 ssODNs 库, 经过一轮 eMAGE 循环获得大量具有不同基因型-表型的菌株。此外, eMAGE 可以实现自动化, 为酿酒酵母多位点快速编辑提供了一种高效的编辑策略。

1.3 基于CRISPR系统介导的多位点编辑

同源定向修复 (homology directed repair, HDR) 和非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 是双链断裂 (double strand breaks, DSB) 修复的两种方式, HDR是酿酒酵母中DSB的主要修复方式^[63]。近年来, 酿酒酵母中CRISPR系统介导的基因组编辑工具得到了快速发展, 其中利用CRISPR系统介导的多位点基因编辑技术构建高通量多样性文库以进行多位点快速进化取得极大发展^[64-66]。

1.3.1 基于CRISPR系统的基因组编辑

CRISPR系统的靶向性取决于目标DNA与gRNA的互补配对, 以及对PAM (protospacer adjacent motif) 位点的特异识别, 可实现基因组规模的编辑^[67]。2017年, Bao等^[43]构建了一种基于CRISPR-Cas9和HDR辅助修复的基因组规模工程 (CRISPR-Cas9 and homology directed repair assisted genome scale engineering, CHAnGE), 能够在基因组尺度上快速编辑酿酒酵母, 并实现精确且可追踪的编辑。CHAnGE技术 [图3 (a)] 需要将

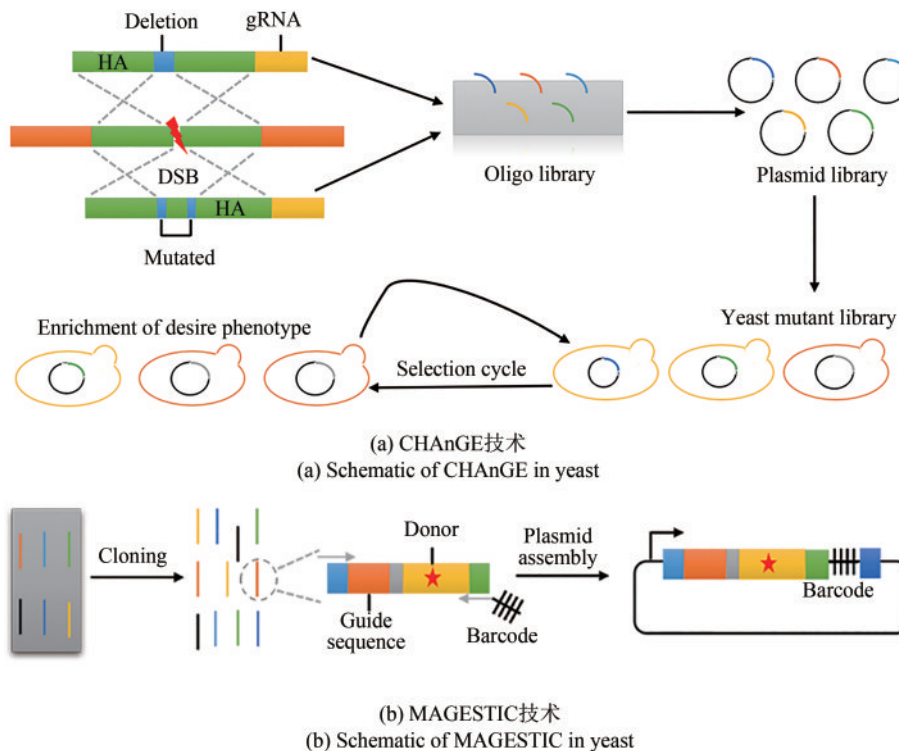


图3 CHAnGE与MAGESTIC技术

Fig. 3 Schematic of CHAnGE and MAGESTIC in yeast

gRNA 和 HDR 供体组装到一个 gRNA 表达盒中, 该盒分别结合 24 765 个特异序列, 覆盖酿酒酵母中约 97.8% 的 ORF (open reading frame, 开放阅读框) 以进行全基因组进化, 并将此表达盒用作唯一条形码可通过高通量测序跟踪每个突变体。利用该技术获得了对糠醛和醋酸耐受性分别提高了 42 倍和 20 倍的突变株。通过对 gRNA 的测序, 鉴定出敲除 *SIZ1* 可提高酵母的糠醛耐受性, 同时敲除 *SIZ1* 和 *LCB3* 基因可进一步提高糠醛的耐受性。

另外, Roy 等^[68] 在 CRISPR/Cas9 系统的基础上开发了利用短的、可追踪、可基因组整合的条形码策略 MAGESTIC (multiplexed accurate genome editing with short, trackable, integrated cellular barcodes) [图 3 (b)], 实现了基因组规模多位点精确编辑。利用寡核苷酸芯片技术合成了 gRNA-同源片段的引导-供体对, 质粒组装后将一个短条形码 (31mer) 作为标记, 此标记具有基因组条形码整合功能, 可防止质粒条形码丢失以实现可靠的表型分析。此外, 利用 LexA-Fkh1p 融合蛋白将供体 DNA 募集到断裂位点, 可以将基因组编辑效率提高 5 倍以上。

1.3.2 基于 CRISPR 系统的基因组规模单碱基修饰

胞嘧啶脱氨酶 (activation-induced cytidine deaminase, AID) 通过脱氨作用将 R-loop 中单链 DNA 中的胞嘧啶 (C) 转化为尿嘧啶 (U), U-G (鸟嘌呤) 错配通过 DNA 复制和修复途径实现^[69]。因此, AID 可对转录过程中形成的单链 DNA 区域进行可诱导突变。Nishida 等^[44] 将来自海鳗的胞嘧啶脱氨酶 PmCDA1 (petromyzon marinus cytidine deaminase 1) 连接到 d/nCas9 蛋白 C 端构建 Target-AID 编辑系统 [图 4 (a)], 可实现对 gRNA 非互补链中 PAM 序列上游 -16~-20 区域内胞嘧啶的突变。利用 Target-AID 编辑器对 *ADE1* 和 *CAN1* 基因进行同时编辑, 两种基因的独立突变频率分别为 54% 和 51%, 双表型突变的频率达到 31%^[44, 70]。

在此基础上, 2018 年, Després 等^[71] 通过 pDYSCO 表达靶向目标基因 (例如 *YFG*) 和负筛选标记 (例如 *CAN1*) 的 gRNA, 利用半乳糖诱导 Target-AID 载体上 Cas9 不同变体的表达构建了 Target-AID 双筛选系统 [图 4 (b)]。添加刀豆

酸进行筛选, 单、双倍体的基因突变率分别提高 3 倍和 4.2 倍, 表明双筛选策略可以富集成功编辑的细胞群。2020 年, Després 等^[72] 构建基于 Target-AID 诱变和多位点基因组编辑的方法, 根据酿酒酵母的必需基因设计合成大量可预测的 gRNA, 并将其作为突变效应的标签, 对酵母必需基因进行系统的修饰, 完成了 1500 多个基因中的大约 17 000 个位点的编辑, 并确定了 700 多个位点的突变对底盘适应性的重大影响。

此外, 将大肠杆菌的高突变率 DNA 聚合酶 PolII 融合到 nCas9 蛋白的 N 端, 也可实现在特定区域的碱基编辑。Halperin 等^[73] 在大肠杆菌中建立了一种通过 CRISPR 系统突变靶基因的 EvolvR 技术, 由 gRNA 引导的 nCas9 在目标基因座上形成缺口, 再由融合的 PolII 以低保真度合成新链并切割置换的链。2020 年, Tou 等^[45] 使用 PolII-5M 在酿酒酵母中建立了 yEvolvR (yeast EvolvR system) 系统 [图 4 (c)], 将目标位点的突变率提高了 12 434 倍。yEvolvR 技术另一个优势是能够有效提高内源基因的多样性, 当 gRNA 双重靶向 *URA3** 和 *CAN1* 的条件下, 可还原 *URA3** 中的无义突变并使 *CAN1* 失活。

2 自动化连续进化技术的发展

传统的适应性实验室进化大都只针对自然进化中每个步骤的频繁干预, 这往往限制了进化过程的多样性和扩展性。因此, 近年来研究人员利用自动化技术与连续进化相结合, 无需人工干预^[74], 并保持宿主细胞的稳定及样本的多样性^[75]。本节将重点介绍酿酒酵母的自动化连续进化技术和连续自动化培养工具 (表 2)。

2.1 连续自动化进化策略

在 DNA 的复制过程中, DNA 聚合酶的校对和错配修复对保持生物基因组的稳定起着关键作用。研究人员在酵母中发现与基因组复制正交的质粒复制系统, 通过改变正交质粒的 DNA 聚合酶校对和错配修复的效率能够有效提高正交质粒上 DNA 序列的突变效率, 通过连续培养能够快速获得大量多样性群体^[77, 80]。正交易错复制系统 (orthogonal error-

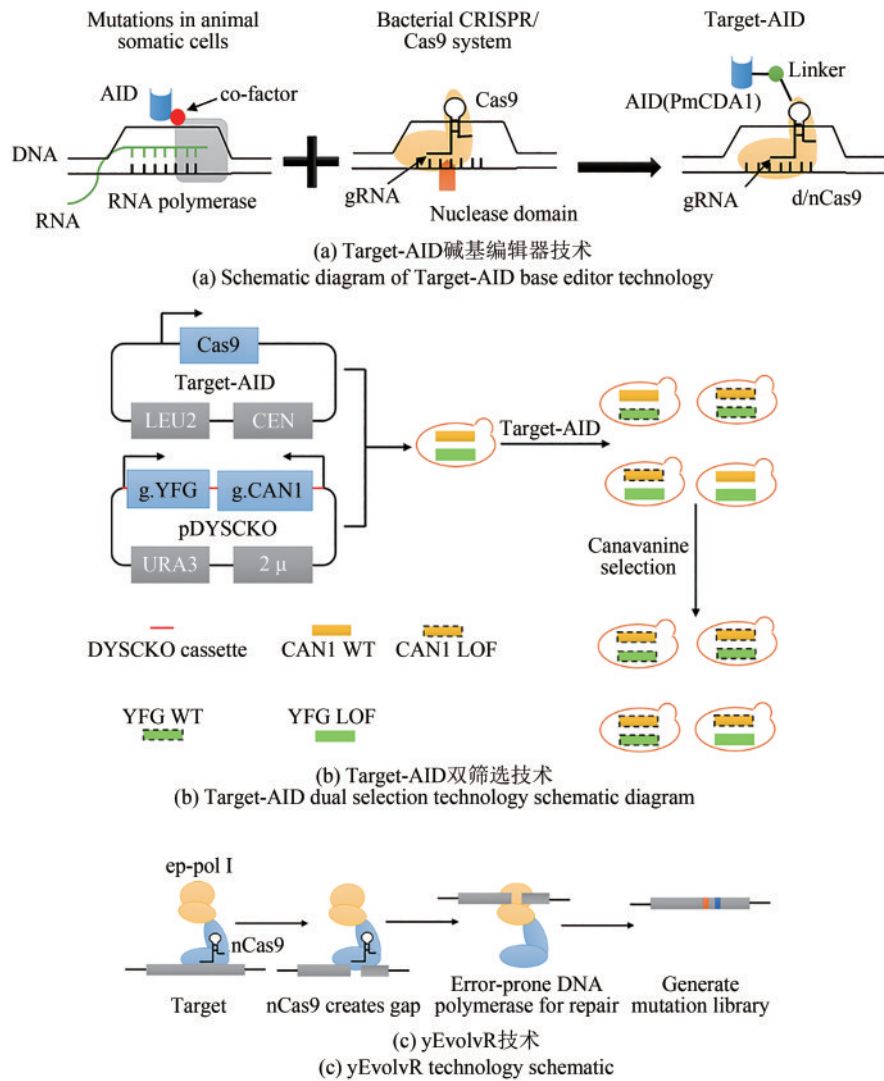


图4 Target-AID 碱基编辑器、Target-AID 双筛选^[71]和 yEvolvR 技术
 Fig. 4 Schematic for target-AID base editor, double screening selection^[71]and yEvolvR technology

表2 用于酿酒酵母的自动化连续进化工具

Tab. 2 Automated continuous evolution tools for *S. cerevisiae*

进化策略	进化原理	优点	缺点	应用
OrthoRep	利用游离质粒上的复制机制和宿主 DNA 复制的正交性,提高游离载体 DNA 聚合酶的突变率	可在不改变宿主基因组突变率的情况下,对正交质粒上的目标基因进行突变	需要特殊设计正交 DNA 复制系统并将其整合到酵母	提高酿酒酵母对乙胺嘧啶的耐受性 ^[76-77]
ICE	高突变率的 Ty1 逆转录酶将目标基因的 mRNA 逆转录为 cDNA, Ty1 整合酶再将其整合至 Ty1 识别位点以进行下一轮突变	ICE 技术可以扩展到含有 LTR 逆转录座子的真核生物中	突变效率受到同源重组的限制	提高酿酒酵母对 1-丁醇的耐受性 ^[78]
eVOLVER	通过实时控制反应器中各种培养参数,从而获得种群的进化参数图	对培养程序的自主编程,培养参数的实时监控	复杂的系统组装和应用计算机语言设计培养程序	构建了在温度和盐度二维应力梯度下酿酒酵母遗传变异的适应性图 ^[79]
ACE	将 OrthoRep 和 eVOLVER 系统相结合	进化速度快、可伸缩性强	效率受体内 OrthoRep 系统的突变率和体外 eVOLVER 系统复杂组装的双重影响	提高酿酒酵母对 3 mol/L 乙胺嘧啶的耐受性 ^[80]

prone replication system, OrthoRep) [图5 (a)] 是由细胞质中的线性DNA质粒pGKL1 (p1) 及相应的DNA聚合酶TP-DNAP1组成, p1质粒的复制受到TP-DNAP1严格控制且不依赖于宿主DNA聚合酶^[81]。通过对TP-DNAP1进行突变, 提高了TP-DNAP1依赖p1质粒复制过程中的突变率, 并使正交质粒上目标靶点的单碱基突变率 (substitutions per base, s.p.b.) 提高到 4×10^{-8} ^[77]。Ravikumar等^[82]将Rd3突变体与核酸外切酶结构域部分基序的突变体

杂交构建了突变体TP-DNAP1-4-2, 其s.p.b.提高了1000倍 (约 10^{-5})。在酿酒酵母中利用OrthoRep系统对二氢叶酸还原酶进行连续进化, 将其针对乙胺嘧啶的耐受性提高了4万倍。2018年, Arzumanyan等^[76]发现了pGKL2/TP-DNAP2的质粒/DNA聚合酶与pGKL1质粒/TP-DNAP1正交[图5 (a)], 研究人员将pGKL1质粒/TP-DNAP1与pGKL2质粒/TP-DNAP2两套正交的DNA复制系统成功导入酿酒酵母中, 利用正交DNA复制系统

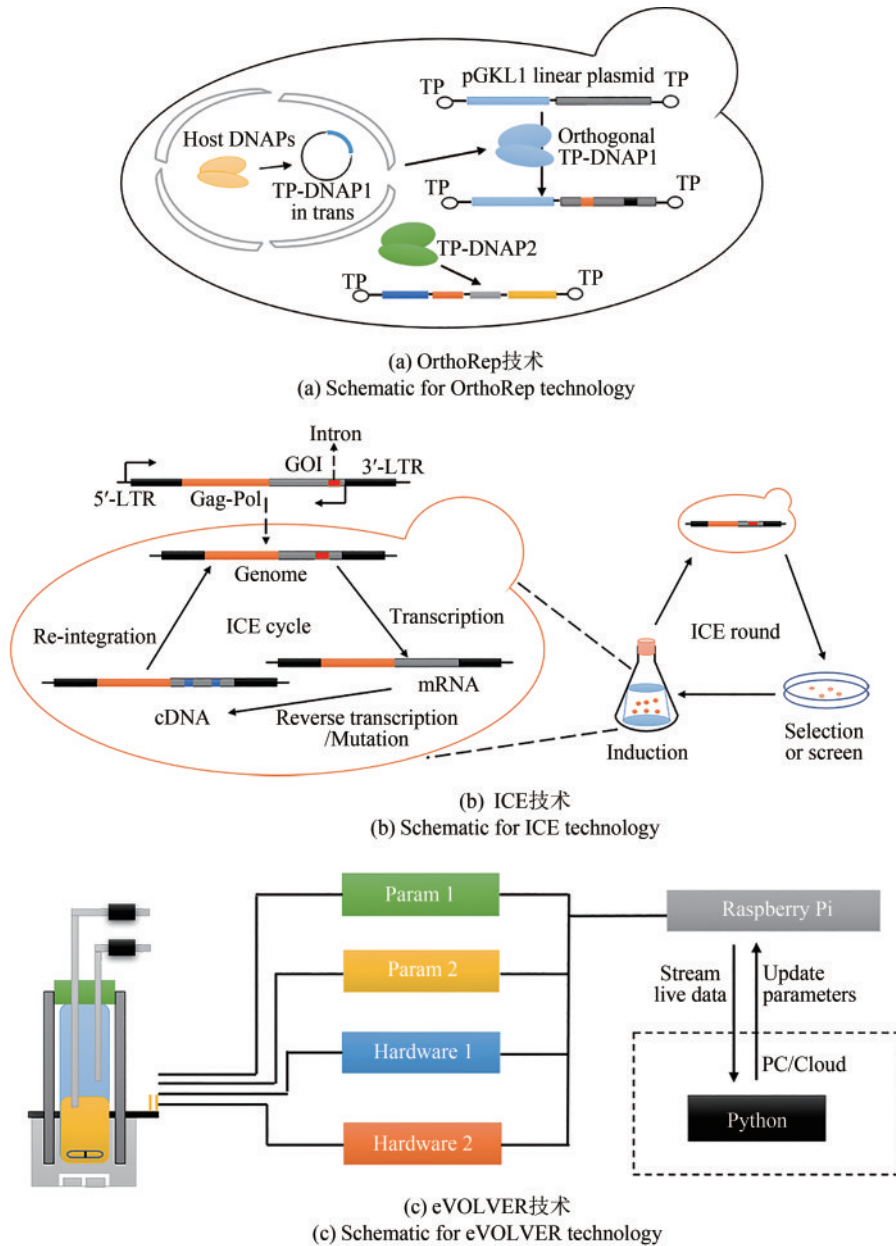


图5 OrthoRep、ICE 和 eVOLVER 技术

Fig. 5 Schematic diagram of OrthoRep, ICE and eVOLVER technology

中不同DNA聚合酶的突变率实现同时针对多基因进行不同突变频率的进化。利用OrthoRep中两个正交的DNA复制系统,能够在多种酿酒酵母(如BY4741、W303-1A、CEN.PK2-1C和BY4743等)进行进化^[83]。由此可见,OrthoRep可在不同的酿酒酵母中实现生物分子和细胞功能的高通量进化,为构建高效生物细胞工厂提供了新方法。

与DNA聚合酶相比较,生物体内逆转录酶没有高效的校对活性,从而导致逆转录过程低保真复制。Crook等^[78]基于逆转录过程引起的突变开发出体内连续进化技术ICE(*in vivo continuous evolution*) [图5(b)]。Ty1逆转录酶可将Ty1识别区域的mRNA逆转录为cDNA,再通过Ty1整合酶整合到Ty1识别位点以进行下一轮突变,通过多轮迭代可产生大量突变的基因。使用中等强度的pTEF1启动子控制逆转录元件的转录、敲除*rrm3*基因并过表达tRNA^{Met}可以优化连续进化系统并将目标靶点的突变率提高50倍。利用ICE技术在酵母中生成Spt15文库,两次迭代后获得了在3.5% 1-丁醇中耐受性提高2倍的突变株。ICE技术可以扩展到含有LTR(long terminal repeat)逆转录转座子的真核生物中,并随着细胞数量而扩展,但该技术依赖于逆转录的转座频率在连续的进化中定向位点的使用可能会对基因组的稳定性造成影响;依赖特定的逆转录机制限制了该技术的应用。

2.2 连续自动化培养平台

连续培养是一种定量表征工程菌株^[84]以及跟踪适应性实验室进化中遗传变化的方法^[85],可实现在精确控制的培养参数下进行连续进化^[1]。因此,为了加速模拟自然进化的进程,连续自动化培养技术的开发在适应性实验室进化中显得尤为重要。

2018年,Wong等^[86]搭建可扩展的高通量自动化细胞培养的集成平台(eVOLVER) [图5(c)],此平台利用Python自主编程控制系统可将多个智能套管并联,通过流体控制阀门、LED+二极管进行光密度监控,比例积分微分(proportional integral derivative, PID)控制加热器用来调节温度,调整磁力控制搅拌速率,实现了实时检测光

密度、温度等各种培养参数及参数的自动控制。利用eVOLVER系统将菌体浓度维持在恒定区域内(设定光吸收的上下阈值),通过改变78个酵母菌种群的OD值上限和下限,可获得酵母种群的进化参数图,包括种群增长率-平均基因组复制与光密度-增长率的关系。eVOLVER系统作为自动化连续进化工具有极强的吸引力,但该系统复杂的组装和应用计算机语言设计培养程序对初学者是很大的挑战^[79]。

2020年,Zhong等^[80]将OrthoRep系统和eVOLVER系统结合起来搭建了连续进化(automated continuous evolution, ACE)平台,该平台将eVOLVER系统的严格选择性、实时反馈和控制,与OrthoRep系统对目标基因连续突变的特性相结合。通过ACE平台对二氢叶酸还原酶进行连续进化,在3 mmol/L乙胺嘧啶中只经过550 h的连续进化就达到与Ravikumar等^[82]相同的试验结果。ACE为酿酒酵母自动化连续进化提供了前所未有的速度、深度和可扩展性,由此可见体内连续进化与体外自动化连续进化系统相结合,大大提高进化的速度。连续自动化培养平台的构建改变了适应性实验室进化的方式,通过翻译、突变、选择和复制的连续循环促进了复杂途径的进化,同时在研究适应性进化机制等方面具有广阔的前景^[87]。

3 小结与展望

适应性实验室进化加速了自然进化的过程,释放出微生物在生物技术应用中的巨大潜能,并可有效改善目标表型,极大推动合成生物学细胞工厂的构建,在解决资源紧缺、生命健康、环境污染等重大难题方面提供强大的技术支撑^[88]。酿酒酵母各种表型受到复杂代谢网络调控,结合系统生物学和反向代谢工程分析手段,解析酿酒酵母鲁棒性和适应性的分子基础,加深对复杂基因型-表型相互作用的理解并提高网络模型准确性,设计出符合人类需求的工程化酿酒酵母,已成为合成生物学重要的发展方向^[89]。随着适应性实验室进化新策略和新工具的发展,适应性实验室进化大大加速了改造代谢途径及细胞耐受性的效率,

在提高目标产物合成水平、拓展底物利用范围、提升底盘细胞的耐受性等方面得到广泛应用。由传统单一碱基、单一基因的随机进化模式到多基因、多途径的全基因组进化策略,如合成型酿酒酵母基因组重排(SCRaMbLE)、寡核苷酸介导的多位点进化工具(YOGE、eMAGE)和基于CRISPR系统的多位点编辑(CHAnGE、Targeted-AID等);利用正交复制系统和逆转录系统构建体内连续进化系统,减少人为干预并加快进化速度。随着合成生物学技术与其他学科进行深度交叉融合,将基因组连续进化技术与其自动化技术相结合(eVOLVER和ACE),加速代谢工程改造过程,实现对酿酒酵母可预测、可调控的系统性工程改造,加深了对细胞代谢网络调控及其生物过程的认知。

随着适应性试验进化技术的发展,细胞工厂的构建与筛选往往受限于目标表型的测定,研究人员还需不断改进和优化现有的技术,如利用生物传感器(转录调控因子、蛋白质传感器、核糖开关等)将难以检测的表型转化为可快速测定的表型^[90-92],将连续进化技术与微流控技术、自动化技术相结合建立高通量的筛选平台^[92-96],进一步优化自动连续进化系统提高其实用性,不断拓展适应性试验进化的应用。除此之外,适应性实验室进化获得的性状优良菌株往往含有大量的突变位点,其中与目标表型强关联的突变点比较有限,开发更为高效精确的生物信息学算法,降低了遗传机理解析的难度。

总之,适应性实验室进化为细胞工厂的构建提供了强大的工具,在未来的发展中将连续进化技术与先进的计算机辅助设计、自动化技术及高通量筛选技术有机结合起来,将极大促进复杂生命现象的解析,推动代谢工程、系统生物学、合成生物学快速发展。

参 考 文 献

- [1] D' OELS NITZ S, ELLINGTON A. Continuous directed evolution for strain and protein engineering [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 53: 158-163.
- [2] CSÖRGŐ B, NYERGES A, PÁL C. Targeted mutagenesis of multiple chromosomal regions in microbes [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2020, 57: 22-30.
- [3] WANG Zhikun, GAO Cuijuan, WANG Qian, et al. Production of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* through adaptive evolution and rational cofactor metabolic engineering [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 67: 126-131.
- [4] REYES L H, GOMEZ J M, KAO K C. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution [J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 21(1): 26-33.
- [5] DRAGOSITS M, MATTANOVICH D. Adaptive laboratory evolution-principles and applications for biotechnology [J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1): 64.
- [6] STRUCKO T, ZIRNGIBL K, PEREIRA F, et al. Laboratory evolution reveals regulatory and metabolic trade-offs of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 73-82.
- [7] GIBSON B, DAHABIEH M, KROGERUS K, et al. Adaptive laboratory evolution of ale and lager yeasts for improved brewing efficiency and beer quality [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2020, 11(1): 23-44.
- [8] KAWAI K, KANESAKI Y, YOSHIKAWA H, et al. Identification of metabolic engineering targets for improving glycerol assimilation ability of *Saccharomyces cerevisiae* based on adaptive laboratory evolution and transcriptome analysis [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(2): 162-169.
- [9] CASPETA L, CHEN Yun, GHIACI P, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant [J]. *Science*, 2014, 346(6205): 75-78.
- [10] PEREIRA R, WEI Yongjun, MOHAMED E, et al. Adaptive laboratory evolution of tolerance to dicarboxylic acids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 130-141.
- [11] ZHU Guoxing, YIN Nannan, LUO Qiuling, et al. Enhancement of sphingolipids synthesis improves osmotic tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(8): 2911-2919.
- [12] ZHANG Chao, QIN Jiufu, DAI Yiwei, et al. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis enables xyloitol over-production with yeast *Candida tropicalis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 296: 7-13.
- [13] EL-HUSSINIENY N I, BAKRI M M, GANASH M, et al. Chemical mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae* for enhancing bioethanol production with fermentation at very high sugar concentration [J]. *BioResources*, 2020, 15(1): 16.
- [14] ZHANG Chaolei, SHEN Hongwei, ZHANG Xibin, et al. Combined mutagenesis of *Rhodospiridium toruloides* for improved

- production of carotenoids and lipids [J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(10): 1733-1738.
- [15] YIN Nannan, ZHU Guoxing, LUO Qiuling, et al. Engineering of membrane phospholipid component enhances salt stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(3): 710-720.
- [16] VOORDECKERS K, COLDING C, GRASSO L, et al. Ethanol exposure increases mutation rate through error-prone polymerases [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 3664.
- [17] YAMADA R, KASHIHARA T, OGINO H. Improvement of lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* through UV mutagenesis [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 33(5): 99.
- [18] GUO Minrui, CHENG Shaobo, CHEN Guogang, et al. Improvement of lipid production in oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* by ultraviolet mutagenesis [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2019, 19(8): 548-556.
- [19] PARK Won-Kun, YANG Ji-Won, KIM Hyun-Soo. Identification of novel genes responsible for salt tolerance by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(4): 567-575.
- [20] KUMAR A, SERINGHAUS M, BIERY M, et al. Large-scale mutagenesis of the yeast genome using a Tn7-derived multipurpose transposon [J]. *Genome Research*, 2004, 14(10A): 1975-1986.
- [21] NI Haiying, LAPLAZA J M, JEFFRIES T W. Transposon mutagenesis to improve the growth of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on D-xylose [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(7): 2061-2066.
- [22] PINEL D, COLATRIANO D, JIANG Heng, et al. Deconstructing the genetic basis of spent sulphite liquor tolerance using deep sequencing of genome-shuffled yeast [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 53.
- [23] YIN Hua, MA Yanlin, DENG Yang, et al. Genome shuffling of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced glutathione yield and relative gene expression analysis using fluorescent quantitation reverse transcription polymerase chain reaction [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, 127: 188-192.
- [24] MAGOCHA T A, ZABED H, YANG Miaomiao, et al. Improvement of industrially important microbial strains by genome shuffling: current status and future prospects [J]. *Biore-source Technology*, 2018, 257: 281-289.
- [25] SNOEK T, NICOLINO M P, VAN DEN BREMT S, et al. Large-scale robot-assisted genome shuffling yields industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with increased ethanol tolerance [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 32.
- [26] CIRINO P C, MAYER K M, UMENO D. Generating mutant libraries using error-prone PCR [M]// ARNOLD F H, GEORGIOU G. *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press Inc, 2003: 3-9.
- [27] TANG Zizhong, JIN Weiqiong, SUN Rong, et al. Improved thermostability and enzyme activity of a recombinant phyA mutant phytase from *Aspergillus niger* N25 by directed evolution and site-directed mutagenesis [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 108: 74-81.
- [28] GŁÓD D. Modification of fatty acid selectivity of *Candida antarctica* lipase A by error-prone PCR [J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(5): 767-773.
- [29] MARKEL U, ESSANI K D, BESIRLIOGLU V, et al. Advances in ultrahigh-throughput screening for directed enzyme evolution [J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(1): 233-262.
- [30] GOFFEAU A, BARRELL B G, BUSSEY H, et al. Life with 6000 Genes [J]. *Science*, 1996, 274(5287): 546.
- [31] PORRO D, GASSER B, FOSSATI T, et al. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(4): 939-948.
- [32] NEVOIGT E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, 72(3): 379-412.
- [33] SHEN Yue, STRACQUADANIO G, WANG Yun, et al. SCRaMble generates designed combinatorial stochastic diversity in synthetic chromosomes [J]. *Genome Research*, 2015, 26(1): 36-49.
- [34] HAMA S, KIHARA M, NODA H, et al. Development of cell recycle technology incorporating nutrient supplementation for lignocellulosic ethanol fermentation using industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 137: 23-29.
- [35] ZAHOOR A, KÜTTNER F T F, BLANK L M, et al. Evaluation of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of succinic acid [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2019, 19(10): 711-720.
- [36] SUÁSTEGUI M, NG Chiam Yu, CHOWDHURY A, et al. Multilevel engineering of the upstream module of aromatic amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* for high production of polymer and drug precursors [J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 134-44.

- [37] MEADOWS A L, HAWKINS K M, TSEGAYE Y, et al. Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production [J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 694-697.
- [38] PROMDONKOY P, SIRIPONG W, DOWNES J J, et al. Systematic improvement of isobutanol production from D-xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 160.
- [39] JIANG Shuangying, SI Tong, DAI Junbiao. Whole-genome regulation for yeast metabolic engineering [J]. *Small Methods*, 2020, 4(2): 1900640.
- [40] DYMOND J S, RICHARDSON S M, COOMBES C E, et al. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design [J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 471-476.
- [41] LIU Wei, LUO Zhouqing, WANG Yun, et al. Rapid pathway prototyping and engineering using *in vitro* and *in vivo* synthetic genome SCRaMble-in methods [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1936.
- [42] JONES S. MAGE in yeast is a go [J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(12): 1147-1148.
- [43] BAO Zehua, HAMEDIRAD M, XUE Pu, et al. Genome-scale engineering of *Saccharomyces cerevisiae* with single-nucleotide precision [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(6): 505-508.
- [44] NISHIDA K, ARAZOE T, YACHIE N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems [J]. *Science*, 2016, 353: 6305.
- [45] TOU C J, SCHAFFER D V, DUEBER J E. Targeted diversification in the *S. cerevisiae* genome with CRISPR-guided DNA polymerase I [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(7): 1911-1916.
- [46] DYMOND J, BOEKE J. The *Saccharomyces cerevisiae* SCRaMble system and genome minimization [J]. *Bioengineered*, 2012, 3(3): 170-173.
- [47] ZHANG Weimin, MITCHELL L A, BADER J S, et al. Synthetic genomes [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2020, 89(1): 77-101.
- [48] PRETORIUS I S, BOEKE J D. Yeast 2.0-connecting the dots in the construction of the world's first functional synthetic eukaryotic genome [J]. *FEMS Yeast Research*, 2018, 18(4): 32.
- [49] NAGY A. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring [J]. *Genesis*, 2000, 26(2): 99-109.
- [50] STEENSELS J, GORKOVSKIY A, VERSTREPEN K J. SCRaMbleing to understand and exploit structural variation in genomes [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1937.
- [51] JIA Bin, WU Yi, LI Bingzhi, et al. Precise control of SCRaMble in synthetic haploid and diploid yeast [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1933.
- [52] HOCHREIN L, MITCHELL L A, SCHULZ K, et al. L-SCRaMble as a tool for light-controlled Cre-mediated recombination in yeast [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1931.
- [53] LUO Zhouqing, WANG Lihui, WANG Yun, et al. Identifying and characterizing SCRaMbled synthetic yeast using ReS-CuES [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1930.
- [54] WU Yi, ZHU Ruiying, MITCHELL L A, et al. *In vitro* DNA SCRaMble [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1935.
- [55] WANG Juan, XIE Zexiong, MA Yuan, et al. Ring synthetic chromosome V SCRaMble [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3783.
- [56] BLOUNT B A, GOWERS G O F, HO J C H, et al. Rapid host strain improvement by *in vivo* rearrangement of a synthetic yeast chromosome [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1932.
- [57] SHEN M J, WU Yi, YANG Kun, et al. Heterozygous diploid and interspecies SCRaMbleing [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1934.
- [58] MA Lu, LI Yunxiang, CHEN Xinyu, et al. SCRaMble generates evolved yeasts with increased alkali tolerance [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 52.
- [59] LI Yunxiang, WU Yi, MA Lu, et al. Loss of heterozygosity by SCRaMbleing [J]. *Science China Life Sciences*, 2019, 62(03): 381-393.
- [60] AUXILLOS J Y, GARCIA-RUIZ E, JONES S, et al. Multiplex genome engineering for optimizing bioproduction in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biochemistry*, 2019, 58(11): 1492-1500.
- [61] DICARLO J, CONLEY A, PENTTILÄ M, et al. Yeast oligo-mediated genome engineering (YOGE) [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(12): 741-749.
- [62] BARBIERI E M, MUIR P, AKHUETIE-ONI B O, et al. Precise editing at DNA replication forks enables multiplex genome engineering in eukaryotes [J]. *Cell*, 2017, 171(6): 1453-1467.
- [63] LIEBER M. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79: 181-211.
- [64] RONDA C, MAURY J, JAKOČIŪNAS T, et al. CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 97.

- [65] ANDREW A H, JESSICA M W, MAX G S, et al. Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts *via* CRISPR-Cas [J]. *Cell Systems*, 2015, 1(1): 88-96.
- [66] BAO Zehua, XIAO Han, LIANG Jing, et al. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multi-gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(5): 585-594.
- [67] HILLE F, RICHTER H, WONG Shi Pey, et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward [J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-1259.
- [68] ROY K R, SMITH J D, VONESCH S C, et al. Multiplexed precision genome editing with trackable genomic barcodes in yeast [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(6): 512-520.
- [69] 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.
- [70] KUSCU C, ADLI M. CRISPR-Cas9-AID base editor is a powerful gain-of-function screening tool [J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 983-984.
- [71] DESPRÉS P, DUBÉ A, NIELLY-THIBAUT L, et al. Double selection enhances the efficiency of Target-AID and Cas9-based genome editing in yeast [J]. *Genes Genomes Genetics*, 2018, 8(10): 3163-3171.
- [72] DESPRÉS P C, DUBÉ A K, SEKI M, et al. Perturbing proteomes at single residue resolution using base editing [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1871.
- [73] HALPERIN S O, TOU C J, WONG E B, et al. CRISPR-guided DNA polymerases enable diversification of all nucleotides in a tunable window [J]. *Nature*, 2018, 560(7717): 248-252.
- [74] ZHONG Ziwei, LIU Chang C. Probing pathways of adaptation with continuous evolution [J]. *Current Opinion in Systems Biology*, 2019, 14: 18-24.
- [75] JANG Sungho, KIM Minsun, HWANG Jaeseong, et al. Tools and systems for evolutionary engineering of biomolecules and microorganisms [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(9): 1313-1326.
- [76] ARZUMANYAN G A, GABRIEL K N, RAVIKUMAR A, et al. Mutually orthogonal DNA replication systems *in vivo* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(7): 1722-1729.
- [77] RAVIKUMAR A, ARRIETA A, LIU Chang C. An orthogonal DNA replication system in yeast [J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(3): 175-177.
- [78] CROOK N, ABATEMARCO J, SUN Jie, et al. *In vivo* continuous evolution of genes and pathways in yeast [J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 13051.
- [79] HEINS Z J, MANCUSO C P, KIRIAKOV S, et al. Designing automated, high-throughput, continuous cell growth experiments using eVOLVER [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2019, 147: 59652.
- [80] ZHONG Ziwei, WONG B G, RAVIKUMAR A, et al. Automated continuous evolution of proteins *in vivo* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(6): 1270-1276.
- [81] RIX G, WATKINS-DULANEY E J, ALMHJELL P J, et al. Scalable, continuous evolution for the generation of diverse enzyme variants encompassing promiscuous activities [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5644.
- [82] RAVIKUMAR A, ARZUMANYAN G A, OBADI M K A, et al. Scalable continuous evolution of genes at mutation rates above genomic error thresholds [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1946-1957.
- [83] JAVANPOUR A A, LIU Chang C. Genetic compatibility and extensibility of orthogonal replication [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(6): 1249-1256.
- [84] MOSER F, BROERS N J, HARTMANS S, et al. Genetic circuit performance under conditions relevant for industrial bioreactors [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(11): 555-564.
- [85] HOPE E A, AMOROSI C J, MILLER A W, et al. Experimental evolution reveals favored adaptive routes to cell aggregation in yeast [J]. *Genetics*, 2017, 206(2): 1153.
- [86] WONG B G, MANCUSO C P, KIRIAKOV S, et al. Precise, automated control of conditions for high-throughput growth of yeast and bacteria with eVOLVER [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(7): 614-623.
- [87] TAN Zhenglin, ZHENG Xiang, WU Yinan, et al. *In vivo* continuous evolution of metabolic pathways for chemical production [J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 82.
- [88] CAO Mingfeng, TRAN V G, ZHAO Huimin. Unlocking nature's biosynthetic potential by directed genome evolution [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 66: 95-104.
- [89] DIKICIOGLU D, PIR P, OLIVER S G. Predicting complex phenotype-genotype interactions to enable yeast engineering: *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism and a cell factory [J]. *Biotechnology Journal*, 2013, 8(9): 1017-1034.
- [90] CARRASCO-LÓPEZ C, GARCÍA-ECHAURI S A, KICHUK T, et al. Optogenetics and biosensors set the stage for metabolic cybergenetics [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 65: 296-309.

- [91] MITCHLER M M, GARCIA J M, MONTERO N E, et al. Transcription factor-based biosensors: a molecular-guided approach for natural product engineering [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 69: 172-181.
- [92] 夏思杨, 江丽红, 蔡谨, 等. 酿酒酵母基因组进化的研究进展[J]. *合成生物学*, 2020, 1(5): 556-569.
XIA Siyang, JIANG Lihong, CAI Jin, et al. Advances in genome evolution of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(5): 556-569.
- [93] KIM N M, SINNOTT R W, SANDOVAL N R. Transcription factor-based biosensors and inducible systems in non-model bacteria: current progress and future directions [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 64: 39-46.
- [94] LEAVELL M D, SINGH A H, KAUFMANN-MALAGA B B. High-throughput screening for improved microbial cell factories, perspective and promise [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 62: 22-28.
- [95] PRANGEMEIER T, LEHR F-X, SCHOEMAN R M, et al. Microfluidic platforms for the dynamic characterisation of synthetic circuitry [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2020, 63: 167-176.
- [96] ZHANG Jianzhi, CHEN Yongcan, FU Lihao, et al. Accelerating strain engineering in biofuel research *via* build and test automation of synthetic biology [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 67: 88-98.



通讯作者: 刘子鹤(1984—),女,副教授,硕士生导师,研究方向为代谢工程和合成生物学。
E-mail: zihe@mail.buct.edu.cn



通讯作者: 林振泉(1987—),男,博士后,研究方向为代谢工程、合成生物学和生物基化学品。
E-mail: linzq2@126.com



第一作者: 李伟(1994—),男,硕士研究生,研究方向为合成生物学和天然产物。
E-mail: 2019210667@mail.buct.edu.cn

广告索引:武汉国家生物产业基地(后彩一)/Cell Signaling Technology(后彩二)/诚志生命科技有限公司(封三)