



CRISPR-CAS 系统介导的新一代基因靶向修饰技术及其在工业微生物中的应用

程妙文, 罗玮*, 杜瑶

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas)是一种广泛存在于细菌和古细菌基因组中含有间隔重复序列的基因结构, 可由 RNA 介导为细菌提供一种特异性免疫保护机制, 抵御外来病毒、噬菌体的二次侵染。通过对 CRISPR/CAS 系统 II 进行改造, 该系统成为了继锌指核酸酶(ZFNs)和 TALE 核酸酶(TALENs)以来的另一种能够对基因组进行高效定点修饰的技术, 具有灵活、高效、廉价且易于操作等优点。目前 CRISPR/Cas 技术已经应用于微生物、哺乳动物细胞、果蝇和水稻等多种生物体中, 在基因修饰方面也取得了一定的成果。本文从 CRISPR/Cas 系统的结构、分类、基因组编辑的分子机制, 以及在工业微生物中的应用和存在问题、前景等方面进行了综述。

关键词: CRISPR/Cas 系统, 特异性免疫, 定点修饰, 基因编辑, 工业微生物

随着新一代基因测序技术的出现和发展, 越来越多物种的全基因组序列将会被快速解析。面对海量的基因组数据, 如何高效进行基因功能的确定和快速进化成为功能基因组学的重要研究内容。基因定点编辑技术是研究基因功能的一种基本策略, 研究人员可以直接编辑或修饰 DNA 序列, 迅速获得基因功能和相关信息, 并使这些生物基因信息得以充分利用^[1]。自 1987 年 Thompsson^[2]构建 ES 细胞基因敲除小鼠模型至今经过近 30 年的发展, 基因组编辑技术日趋成熟从而得以广泛应用, 并

在 2012 年被 Science 评为十大重要科学进展之一。在基因组靶向修饰技术中, 锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFN)以及类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)技术的应用较为广泛, 取得了令人瞩目的成就。然而, 两者在结合结构域的改造筛选以及组装都存在着较高的技术难度, 并且筛选的工作量很大, 成为限制其发展的瓶颈^[3]。

近年来, 广泛存在于细菌和古菌等原核生物中的一种获得性免疫系统 CRISPR 系统受到广泛

基金项目: 国家自然科学基金(21606105); 江苏省自然科学基金(BK20130130)

*通信作者。E-mail: wluo@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-01-24; 修回日期: 2017-05-27; 网络出版日期: 2017-06-29

关注, 该系统能够特异性识别并结合噬菌体 DNA, 通过转录产物 crRNA 介导 Cas 蛋白识别并抵御外源性 DNA^[4]。根据这一原理构建的基因组靶向修饰技术被称为第三代基因组编辑技术, 同 ZFNs 和 TALEs 技术相比, CRISPR/Cas9 系统具有高效性、普适性、低成本, 易操作等多种优点, 将基因靶向修饰技术提高到了新的高度。

1 CRISPR/Cas 系统的结构和分类

1987 年, 科学家在 *Escherichia coli* K-12 的碱性磷酸酶基因附近区域首次发现了成簇的规律间隔的短回文重复^[5], 2002 年将其正式命名为 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)。CRISPR/Cas 系统是细菌针对病毒和噬菌体 DNA 入侵进化形成的一种获得性免疫系统。在人类已知的物种中, 有 40% 细菌和将近 90% 古细菌的基因组或质粒中存在至少一个 CRISPR 位点^[6]。CRISPR 由一系列短的高度保守的正向重复序列 (Repeats) 与长度相似的间隔序列 (Spacers) 间隔排列组成。而 CRISPR 位点的数量存在物种差异性, CRISPR 中重复序列的数量也随着不同物种而有所变化^[7]。CRISPR 位点大多定位在染色体上, 只有个别出现在质粒中^[8]。

一个典型的 CRISPR/Cas 基因座由一个编码 Cas 蛋白的操纵子以及一个重复-间隔 (repeat-spacer) 序列组成。如图 1 所示, CRISPR 位点为 CRISPR 基因座 (CRISPR locus), 基因座中包含有重复序列 (Repeats) 和间隔序列 (Spacers), CRISPR 位点与上游的前导序列 (Leader sequence, LS), CRISPR 功能相关的基因 (CRISPR-associated genes, Cas genes) 以及位于 Cas 蛋白编码基因上游 tracrRNA 编码基因共同构成了 CRISPR 系统。

重复序列 (Repeats) 和间隔序列 (Spacers) 是 CRISPR 序列中的主体, 由简短稳定的同向重复序列 (Direct repeat, DR) 和长度相近的非重复的间隔序列 (Spacer) 间隔排列而成, 称为 R-S 结构。DR 长度为 21–48 个碱基^[6], 在 3' 末端存在 GAAA(C/G) 的保守序列, 能够形成稳定的茎环结构。间隔序列的长度在 26–72 bp, 不同 CRISPR 位点的间区序列数目变化很大, 部分间区序列与噬菌体、大质粒等外源基因组以及同一细菌基因组的其他部分具有高度同源性^[9]。CRISPR 序列的形成来源于外源噬菌体的入侵, 细菌会将一段外源核酸中的特殊片段整合成一段间隔序列, 并在后续的免疫过程中发挥重要作用。除此以外, CRISPR/Cas 系统中另外一种组分 Cas 基因是一类较大的多态

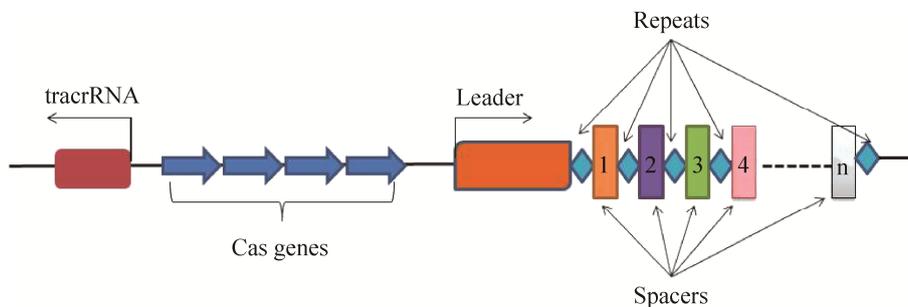


图 1. 典型的 CRISPR/Cas 基因座结构

Figure 1. The structure of a typical CRISPR locus.

性家族, 编码的蛋白质具有与核酸结合的功能以及核酸酶、聚合酶、解旋酶等结合的活性, Cas 蛋白通过位点特异性切割将入侵的 DNA 切断。CRISPR 位点的第一个重复序列上游有 CRISPR 前导序列(Leader sequence), 该前导序列可以作为启动子启动 CRISPR^[10], 转录产生的非编码 RNA 被命名为 CRISPR RNAs (crRNAs)^[8]。另外, 在 CRISPR 基因座上游有一段保守序列转录生成的 tracrRNA 与 crRNA 的部分双链互补形成复合物, 引导 Cas 蛋白到正确的位点进行靶序列切割, 并且 tracrRNA 可协助 Cas 蛋白复合物剪切 pre-crRNA 形成成熟 crRNA。

在噬菌体侵入的起始阶段, Cas 蛋白复合物靶向裂解噬菌体基因组中短的原型间隔序列, 这些原型间隔序列整合到宿主基因组中 CRISPR 位点的 5'端, 成为宿主基因组中间区序列的一部分, 然后被插入的短间隔序列被转录形成 crRNA。当噬菌体再次感染宿主时, crRNA 和 tracrRNA 形成二元复合体指导 Cas 蛋白剪切靶向基因的特异位点。

根据参与 CRISPR/Cas 系统的 Cas 蛋白差异, 该系统可分为三大类型: I 型、II 型和 III 型。I 型系统广泛分布于细菌和古细菌中^[11], 是 CRISPR/Cas 系统中 Cas 蛋白最多和最复杂的系统, 需要 6 个 Cas 蛋白参与, 其中 Cas3 蛋白对 CRISPR 功能的发挥至关重要, 该蛋白具有解旋酶活性及 DNA 酶活性, 是干扰阶段的主要作用酶^[12]。II 型系统的组成相对较简单, 且只存在于细菌中^[13], 以 Cas9 蛋白为核心。RNaseIII 目前已鉴定出 2 个 III 型系统(III-A 型和 III-B 型)^[14], 在 Cas9 蛋白存在的情况下发挥作用, Cas9 蛋白协助 crRNA (CRISPR RNA) 的成熟, 并参与外源 DNA 的剪切^[15]。在

一些 III 型系统中, Cas6 也参与 crRNA 的成熟, 加工过后的 crRNA 被运送至特殊的 Cas 剪切复合体中发挥导向作用^[16]。Cas6 是 CRISPR 特异性的核糖核酸内切酶, 而 Cas10 则与目标序列的干扰相关^[15]。

2 CRISPR/Cas 系统的作用机制及应用于基因编辑

CRISPR/Cas 是一种防御系统, 用以保护细菌和古细菌不受外来物质的侵害。由于 II 型 CRISPR/Cas 免疫系统只需要 1 个核酸内切酶来切割 DNA 双链, 因此作用机制和过程相对简单。目前只有类型 II 的 CRISPR/Cas 系统应用于基因编辑或基因沉默。如图 2 所示, II 型 CRISPR/Cas 系统发挥作用的流程大致分为 3 个阶段: 获得阶段、表达阶段和干扰阶段。其中获得阶段指的是来源于病毒或质粒的小段 DNA 整合到细菌的 CRISPR 阵列中, 产生一个新的间隔序列-重复序列单元, 整合到 CRISPR 的 5'端的 2 个重复序列之间^[4], 重复单元的获得是产生免疫机制的基础。在新间隔序列的获得过程中, 细菌的 Cas 蛋白复合物识别位于 DNA 序列下游被称为 PAM (Proto-spacer adjacent motifs) 位点的特殊保守序列^[17], 将临近 PAM 的序列作为候选 protospacer, 然后在 CRISPR 基因座的 5'端合成重复序列, 最后新的间隔序列整合到 2 个重复序列之间。不同生物体中 PAM 元件是有差异的, 在哺乳动物细胞中一般为 NGG。PAM 位点并不会被复制插入到间隔序列中, 因此 PAM 位点的存在可能是 CRISPR 系统区分自身 DNA 与外源 DNA 而避免发生自身免疫的机制之一^[18], 同时也是基因编辑时靶序列选择的重要要

求^[19]。在表达阶段, CRISPR 位点在前导序列的驱动下转录出前体 CRISPR RNA (pre-CRISPR RNA), 在核酸内切酶作用下加工成包含不同的间隔序列和部分重复序列短的 CRISPR RNA (crRNA)。干扰过程是 CRISPR/Cas 发挥抵御外源遗传物质入侵最关键的步骤,成熟的 crRNA 以及 tracrRNA 与特异的 Cas9 蛋白形成核糖核蛋白复合物, 再与外源 DNA 结合并扫描外源 DNA, 寻找其上的靶序列, crRNA 的间隔序列与靶序列互补配对, 外源 DNA 在配对的特定位置被核糖核蛋白复合物切割。体外实验证明 Cas9 基因是参与 CRISPR 免疫系统的唯一必需基因^[20], Cas9 是由 1409 个氨基酸组成的多结构域蛋白, 包括氨基端的 RuvC-like 结构域及位于蛋白中间位置的 HNH 核酸酶结构域^[21]。HNH 核酸酶结构域可以切割与 crRNA 互补配对的模板链, 切割位点位于原型间隔序列毗邻基序

(Protospacer adjacent motif, PAM)上游 3 nt 处, RuvC-like 结构域可以对另一条链进行切割, 切割位点位于 PAM 上游 3–8 nt 处^[22]。在 crRNA 与 tracrRNA 形成的双链 RNA 的指导下, Cas9 蛋白对靶位点进行切割。

在免疫机制中, crRNA 与 tracrRNA 形成二元复合物指导 Cas9 蛋白结合到靶位点然后进行特异性切割是细菌发挥免疫作用的关键。研究人员根据 crRNA 和 tracrRNA 的结构特征, 设计出模拟二者结合后形成的二聚体结构的单链引导 RNA (single guide RNA, sgRNA), sgRNA 具备了 crRNA-tracrRNA 复合物的功能, 能够与 Cas9 核酸内切酶结合并将后者引导至基因组上的靶位点处进行结合与切割。经过改造后的 Cas9-sgRNA 基因靶向修饰系统只需要将 Cas9 和 sgRNA 两种成分导入细胞即可实现基因组的靶向修饰作用^[18]。

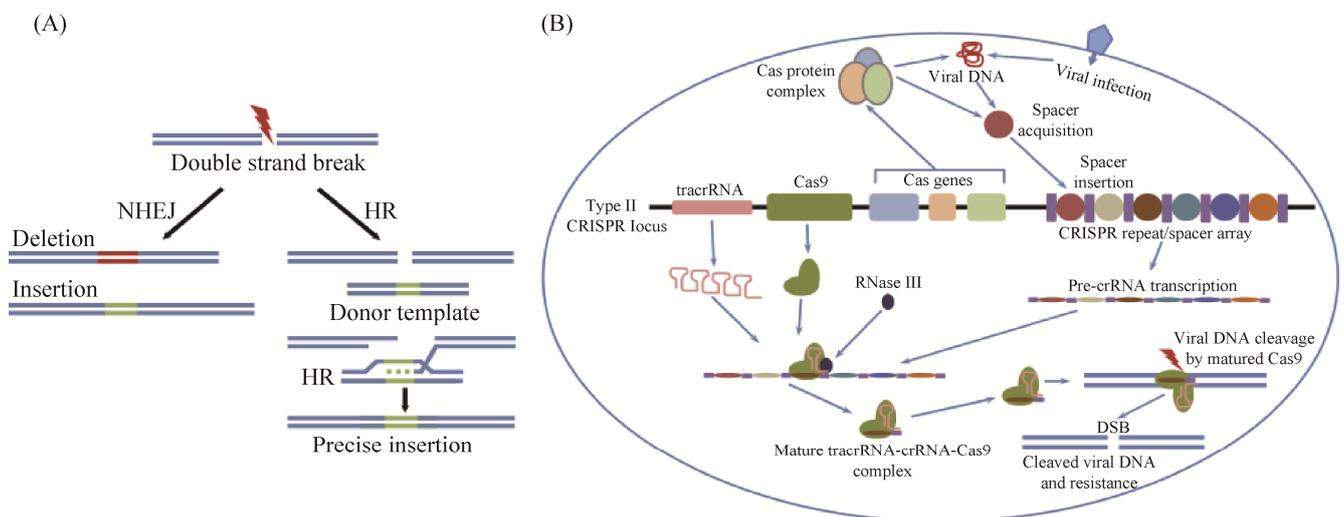


图 2. CRISPR/Cas 的作用机制^[23]

Figure 2. Action mechanism of CRISPR/Cas^[23]. A: DNA double strand breaks (DSB) are repaired by homologous recombination (HR) or nonhomologous end-joining (NHEJ); B: The establishment of CRISPR/Cas9 immune system and three stages of which plays a role, that Cas9 protein shear target gene to produce DSB is the basis for gene editing.

2012年, Jennifer Doudna 和 Emmanuelle Charpentier 以化脓性链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 的 II 型 CRISPR 系统为基础进行的研究工作为促使 CRISPR/Cas 从细菌的天然免疫系统发展成为 DNA 编辑工具奠定了重要基础。Cas9 蛋白在 sgRNA 的引导下导致目标 DNA 双链断裂 (DSB), 在同源重组 (Homologous recombination, HR) 和非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 修复过程中实现对基因组的改造^[24]。在进行同源重组修复时, 细胞以含有同源臂的靶基因片段为基础与断裂双链进行结合, 断裂处以靶基因上的 DNA 序列作为修复模板来恢复断裂前的序列, 因此含有同源臂的外源基因就能整合到靶位点的 DNA 序列上。如果将人工合成的供体 DNA 转入细胞, 那么将以该 DNA 为模板, 可以提高定点修饰基因的效率。而非同源末端连接修复的保真性较弱, 该机制往往导致 DNA 断裂处碱基的突变, 多数情况下发生碱基缺失, 这种错误的修复如果发生在基因的外显子上, 能够引起该基因阅读框的改变, 达到 DNA 定点突变而丧失基因功能的目的^[25]。除了基因的插入和删除, 利用 CRISPR/Cas9 系统还可对靶基因进行激活和抑制。CRISPR/Cas 系统中 Cas9 具有 2 个核酸酶结构域 (Ruv 和 HLH), 如若在其中 D10A 和 H840A 位点发生突变, Cas9 蛋白将会变成失去 DNA 切割活性的 dCas9, 但它依旧保留着与 DNA 结合的能力。在靶向基因 gRNA 同 dCas9 在细胞中共表达时, 则 sgRNA 可以介导二者的结合。如果 dCas9 结合到靶基因的阅读框内, 可阻断 RNA 聚合酶 (RNA polymerase, RNAP) 的延伸作用; 如果 dCas9 结合到靶基因的启动子区域则可阻止基因转录的起始^[26]。除基因抑制, dCas9 蛋白还可以用来进行靶基因的

激活, 将 dCas 蛋白与具有转录激活的蛋白质功能域融合则可构建具有转录激活活性的 CRISPR-on 系统。在 CRISPR 转录激活系统中, 靶序列位置对激活效率有重要影响。当靶序列与启动子的距离合适时, 激活效率较高; 靶序列处于启动子上游较远位置时, 激活效率相对下降; 当靶序列与启动子距离过近, 或处于开放阅读框内时, 则会产生抑制效应。

虽然 CRISPR/Cas 系统在近几年才开始被应用, 但其发展却十分迅速, 已经广泛运用于各种生物体中, 它在基因编辑中也将有着更加广阔的发展空间。

3 CRISPR/Cas 与 ZFNs、TALENs 的比较

锌指核酸酶 (Zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子效应物核酸酶 (Transcription activator like effector nucleases, TALENs) 以及 CRISPR/Cas 系统都是目前能够进行基因编辑的工具。ZFNs 和 TALENs 均是通过蛋白质的 DNA 结合域和 FokI 切割结构域形成二聚体来切割靶基因。ZFNs 是将多个锌指串联形成的 ZFP 结构域与 II 型限制性内切酶 FokI^[27] 的切割结构域相连接来实现对靶序列的切割。增加串连锌指的数目可识别更长的靶序列, 同时也就增强了 DNA 靶向修饰的特异性。但由于锌指结构 α 螺旋中碱基存在相互作用, ZFn 也存在上下文依赖效应, 且大多数研究者并不公布其 ZF 序列, 导致对 ZF 识别的核苷酸序列研究不是完全明了, 所以 ZFn 在构建、组装以及筛选方面难度很大。TALE 核酸酶 (TALEN) 是由 TALE 代替了 ZF 作为 DNA 结合域与 FokI 切割结构域连接成核酸酶。通过 TALE 识别特异的 DNA 序列,

FokI 二聚化产生核酸内切酶活性, 与 ZFn 一样在特异的靶 DNA 序列上产生双链断裂以实现精确的基因编辑^[28]。TALE 核酸酶比 ZFNs 切割的效率高, 但其蛋白质的分子量较大, 在模型的构建过程中存在不必要结构以及序列长度的影响, 且分子操作的难度比较大, 因此模型构建比较繁杂, 可操控性较低, 实验成本较昂贵。与前两种基因编辑工具相比, CRISPR/Cas 系统只需设计针对靶基因序列互补的 RNA 以及向宿主细胞中导入编码 Cas9 蛋白的基因即可。CRISPR/Cas 系统对靶序列的识别是 RNA 与 DNA 的碱基配对过程, 对靶基因序列的识别更为精确, 在切割时间以及空间的调节上也更为便利, 并且识别位点多样化, 不需形成二元复合物。而 Cas9 蛋白即可完成与 FokI 酶相似的功能, 而且多个位点可一次性断裂, 成功率高, 对细胞毒性小^[6,11], 这大大提高了基因操作的效率及简便性。因此, CRISPR/Cas 系统与 ZFNs 和 TALENs 相比更为高效、简单和廉价, 普通的实验室也可以自行完成构建, 使得 CRISPR/Cas 系统具有更好的应用前景。

4 CRISPR/Cas 基因编辑技术在工业微生物中的应用

基于 CRISPR/Cas 系统的基因编辑技术在最

近几年日益成熟, 这也促进了各国科学工作者将该技术应用于从原核生物到真核生物等各种生物基因组的改造之中。在哺乳动物细胞中, CRISPR/Cas 技术和生物学结合在一起, 在人类遗传疾病、病毒感染和癌症治疗方面取得了重大突破。如在艾滋病治疗方面, 将 LTR-targeting CRISPR/Cas9 复合物导入 HIV 病毒或者已经诱导的 T 细胞中, 可以有效剪切或者突变 LTR 位点, 从而导致 HIV 无法致病; 更重要的是, LTR-targeting CRISPR/Cas9 甚至能够剪切已经插入宿主染色体上的病毒基因。为了抑制 HIV-1 前病毒表达, TAR 位点是最理想的靶基因, CRISPR/Cas 系统的特异性很强, 靶基因的 1 个碱基发生突变都有可能无法识别, 而 TAR 位点相对比较保守而且在不同的 HIV 病毒亚类中也基本一致^[29-31]。在植物以及光合微生物中, Myat T^[32] 利用 CRISPR/Cas 技术将烟草(*Nicotiana tabacum*) 中原有的 *RuBisCo* 用细长集球藻(*Synechococcus elongates*) 中的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(*RuBisCo*) 进行替换, 为进一步在植物体内引入蓝细菌的二氧化碳富集机制, 提高作物产量打下了基础。而在工业微生物领域, CRISPR/Cas 系统已经广泛应用于微生物代谢工程, 如改造菌株、解析基因功能或者改变代谢流。表 1 列出了 CRISPR/Cas9 系统在各种模式生物中的应用。

表 1. CRISPR/Cas 系统介导的基因编辑在模式生物中的应用

Table 1. CRISPR/Cas9 system demonstrated for genome editing in model organisms

Species	Materials	Target genes	Repair approaches	References
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α , JM109	<i>rpsL</i> , <i>aroA</i>	NHEJ, HR	[33]
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>CAN1</i> , <i>LYP1</i>	NHEJ, HR	[34–35]
Yeast	<i>Pichia pastoris</i>	<i>PMTs</i>	NHEJ, HR	[36]
Flamentous fungi	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>URA5</i>	HR	[37]
Flamentous fungi	<i>Neurospora crassa</i>	<i>clr-2</i> promoter	HR	[38]
Fungus	<i>Ustilago maydis</i>	<i>bE1</i> , <i>bW2</i>	NHEJ	[39]

4.1 CRISPR/Cas 技术在大肠杆菌中的应用

大肠杆菌是工业生物技术中的主要工程菌之一, 并常常用于生产各种有价值的化学品、药物和生物燃料。有研究曾将内源性大肠杆菌 DNA 修复组分 RecA、RecT 和 RecBCD 应用于基因组工程, 然而此内源性系统效率低下, 需要较长的同源区并且不适用于对多位点进行重组^[40]。在 CRISPR/Cas 系统^[41]发现之后, 将插入了可诱导的 λ -Red 重组酶基因的移动质粒与含有 Cas 蛋白编码基因以及供体模板基因的质粒导入大肠杆菌, 可实现靶向多重基因组工程。随后对质粒进行不断构建筛选和优化, Zhao 等通过一个质粒的构建和一步转化实现了对多基因位点的高效编辑^[42]。夏军等利用二元载体构建 CRISPR/Cas 偶联 λ -Red 重组酶的系统, 敲除大肠杆菌中的 *ppc* 和 *fad D* 基因, 分别阻断了丙酮酸流向蛋白质合成的方向以及阻遏脂肪酸进入降解途径, 使得大肠杆菌在脂肪酸工业生产中得到了更好的应用, 并为构建其他工程菌提供了一定的理论基础。Li 等将 CRISPR/Cas 技术作为基因编辑的工具运用到大肠杆菌中, 通过插入 β -胡萝卜素合成途径的通路相关基因以及优化 2-C-甲基-赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径和中心代谢途径实现了 β -胡萝卜素的高量生产。与构建质粒介导过表达相比, 这种基因整合方法稳定性更高且减少了代谢途径中的负担^[43]。除在体外进行基因组装配外, Qi 等^[44]在大肠杆菌中对 Cas9 两个核酸酶结构域进行定点突变, 得到仅保留有与 DNA 结合功能的 dCas9 蛋白, 在 sgRNA 的引导下, 使得 dCas9 结合在开放阅读框内, 阻止了 RNA 聚合酶与 DNA 的结合, 干扰转录的正常进行, 导致基因沉默, 调节基因表达。

在大肠杆菌中, 余深翼^[33]等利用 CRISPR/Cas

系统技术构建 *aroA* 基因的敲除系统, 并分析其对不同大肠杆菌 *aroA* 基因敲除、修复的差异。构建靶向 *aroA* 基因且含有人工设计同源修复供体基因序列的 CRISPR/Cas9 载体, 将该系统分别应用到大肠杆菌 DH10B、DH5 α 和 JM109 细胞中, 结果表明该系统能有效敲除 3 种大肠杆菌的 *aroA* 基因, 敲除效率达到 46%–58%。致病菌 *aroA* 基因缺失后, 无法正常合成芳香类化合物, 当其感染哺乳动物细胞后, 生长受到限制且毒力下降。大肠杆菌 *aroA* 基因 CRISPR/Cas9 敲除系统的成功构建, 不仅能让我们了解 *aroA* 基因的功能, 还能为开发减毒大肠杆菌疫苗提供新型、有效的基因敲除工具。

4.2 CRISPR/Cas 技术在酵母中的应用

酿酒酵母、毕赤酵母是工业微生物代谢工程中使用较为密集的模式生物体之一, 且因为与细胞周期、功能基因组学、蛋白质相互作用、癌症和其他重大疾病等研究密切相关从而成为优选模式生物体。DiCarlo 等^[45]首次在酿酒酵母中采用 CRISPR-Cas9 系统, 他们在 CAN1 位点(编码精氨酸透过酶)重组 90 bp 寡肽 DNA (包含上下游同源臂及终止密码子)及 1.4 kb 包含同源臂的 Kan MX 敲除盒, 从而实现高效率的定点基因敲除(约 100%), 开启了 CRISPR-Cas9 系统在酵母领域应用新时代。随后, Zhang 等^[35]运用相同的系统在多倍体工业酵母 ATCC 4124 中逐步敲除 *LEU2*、*TRP1*、*URA3* 和 *HIS3*, 且效率达到 15%–60%, 最终成功构建四重缺陷菌株(Δ ura3, Δ trp1, Δ leu2, Δ his3)。前期的研究为 CRISPR-Cas9 系统在酿酒酵母中的应用奠定了基础, 但随着研究的发现, 当把 CRISPR-Cas9 系统运用在独立单个基因编辑时, 无法展现其独特优势。因此, 利用该系统提

高酿酒酵母多位点的同源重组效率开始得到广泛研究；同时，针对多个位点进行基因敲除的 CRISPR-Cas9 系统改造也应运而生。

在酿酒酵母中，Bao 等^[34]借助原始 CRISPR 阵列结构并整合供体 DNA 序列，构建了一步实现多基因位点敲除的 CRISPR-Cas 系统——HI-CRISPR (Homology-Integrated CRISPR—Cas)，并成功在 4 天时间里同时敲除 CAN1、ADE2 及 LYP1 基因，敲除效率达到 27%–87%，由此验证了此系统的有效性。CRISPR/Cas9 系统在酿酒酵母中除了用于基因敲除外，还可以用于基因整合。Jakočiunas 等^[46]利用 CRISPR-Cas9 系统构建 gRNA 载体及重组元件(靶基因上下游同源区、启动子、终止子及待整合基因)，在酿酒酵母的 *ADE2*、*HIS3*、*URA3* 位点分别整合了 *crtYB*、*crtI*、*crtE*，利用新的 Cas EMBL 的同源重组方法重新构建类胡萝卜素合成途径，且重组效率达 30.6%，这种方法随后也应用于细菌中来高量生产芳香族类氨基酸。

2015 年，毛银平^[36]在毕赤酵母表达系统糖基化修饰改造的研究中，为解决酵母过度 O-糖基化修饰的问题引入了 dCas9 蛋白。常规的基因敲除方式虽然可以阻断 O-糖基转移酶基因 *PMTs* 的表达，但该基因对酵母生长是必不可少的，敲除致死将对酵母的生长产生影响。根据 CRISPR/Cas9 系统可对靶基因进行激活和抑制的优点，将 Cas9 蛋白突变成失去 DNA 切割活性却依旧保留着与 DNA 结合能力的 dCas9，并由诱导型启动子 D6 控制诱导表达，结果表明该方式融合的 CRISPR-dCas9 靶向阻遏系统无抑制 O-糖基化的作用，但在一定程度上抑制了毕赤酵母的过度 O-糖基化修饰。

CRISPR/Cas9 系统在非传统酵母中也有一定

的应用，解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是研究最广泛的非常规酵母之一，它能够将糖分子转化为人工难以合成制造的脂质和碳氢化合物，但如何高效改造其基因组受到有限的基因编辑工具的制约。而 CRISPR-Cas9 基因编辑系统的开发为挖掘其生物制造潜力提供了一种新的工具。Schwartz 等^[47]对 CRISPR-Cas9 加以改造，并利用这个改造的系统成功地在解脂耶氏酵母中进行基因敲除以及将新的基因导入此酵母体内。CRISPR-Cas9 系统的应用使得研究人员成功走出了在酵母体内制造长链碳氢化合物的第一步，为利用活的有机体生产生物燃料分子前体和专用聚合物奠定了基础。

4.3 CRISPR/Cas 技术在丝状真菌中的应用

除了酵母，CRISPR/Cas9 技术在霉菌中也有一定的应用。Liu 等^[37]首次针对丝状真菌里氏木霉(*Trichoderma reesei*)改造了 CRISPR-Cas9 系统，与酿酒酵母不同，人类细胞的密码子优化的 Cas9 基因在组成型启动子 Ppdc (pdc 的启动子，编码丙酮酸脱羧酶的基因，参与葡萄糖的基因^[48])或诱导型启动子 Pcbh1 (cbh1 的启动子，编码纤维二糖水解酶 I 的基因，受葡萄糖抑制，由一系列低聚糖或纤维素诱导^[49])的控制下在里氏木霉 Qm6a 或 Rut-C30 中不起代谢作用。所以要采用 Cas9 密码子优化、体外转录 gRNA 及改造 Cas9 的组成型启动子为诱导性启动子，实现 CRISPR-Cas9 系统在丝状真菌中的可调控基因编辑。2015 年，Liu 等^[37]将带有 SV40 核定位信号序列的酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 基因经过密码子优化，通过农杆菌介导的真菌转化，得到表达 Cas9 的菌株，再将体外合成 gRNA 装配到 Cas9 表达菌株中，同时转化携带与靶基因 5'和 3'侧翼序列同

源的供体 DNA, 通过同源重组, 达到基因置换的目的。研究中已经能够同时转化 3 个供体 DNA, 虽然同源重组率仅 4.2%, 但是能够说明 CRISPR/Cas9 同时定点插入多基因的可行性。2017 年, Liu 等^[50]将 CRISPR/Cas 技术首次应用于可生产纤维素酶的真菌嗜热毁丝菌中, 该研究首先利用此技术将 *amdS* 基因插入到野生型菌株中并利用筛选培养基来验证该体系在嗜热真菌中的有效性。随后, 以嗜热毁丝菌中纤维素酶生产途径基因(*cre-1*、*res-1*、*ghl-1* 和 *alp-1*)作为靶向目标分别进行单基因以及多基因的敲除, 得到高效生产纤维素酶的多种菌株, 与亲本菌株相比, 突变菌株细胞外分泌的蛋白质和木质纤维素酶活性显著增加(分别高达 5 和 13 倍)。此研究中 CRISPR/Cas9 系统的开发可优化嗜热真菌菌丝体物种的全基因组学代谢工程来高效生产木质纤维素酶和生物基燃料以及相关化学产品。

随后, 利用 CRISPR-Cas9 系统在丝状真菌链孢霉(*Neurospora crassa*)中进行启动子替换及基因插入也得到广泛研究。在 Matsu-Ura^[38]等的研究中, 运用 CRISPR/Cas9 系统在模式生物脉孢菌中进行有效基因的替换, 利用 Cas9 核酸内切酶和单 crRNA:tracrRNA 嵌合指导 RNA (gRNA), 用 β -微管蛋白启动子代替内源性 *clr-2* 启动子, 显著增加了多种纤维素酶的表达。Nødvig 等在进行野生棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)的基因编辑中, 应用体外组装的办法对 6 个曲霉种(*A. nidulans*、*A. aculeatus*、*A. niger*、*A. carbonarius*、*A. luchuensis*、*A. brasiliensis*)进行了改造, 验证了利用 CRISPR/Cas 系统进行基因编辑的高效性。

在探索丝状真菌的类胡萝卜素光诱导合成的分子遗传学机制时, 本课题组利用 split-marker 策

略敲除该基因, 但与 CRISPR/Cas9 技术相比, 该策略效率较低且分离纯合子较为繁琐, 通过利用 CRISPR/Cas9 技术对该基因及光受体蛋白基因进行编辑将能有效解决上述问题。

除应用于工业微生物外, CRISPR/Cas 系统还可用于构建模式生物以及进行生物信息学检索。在 CRISPR/Cas 系统中, 细菌从入侵者那里捕获的 DNA 序列插入到自身重复序列之间形成间隔序列时, 总是被整合到宿主基因组 CRISPR 位点的 5'端。因此通过分析 CRISPR 位点中间隔序列的组成和排列顺序, 可以用来对细菌分型。细菌的进化历程也可以反映在 CRISPR 位点间隔序列的多态性中, 方便研究不同细菌之间的亲缘关系。此外, CRISPR/Cas 系统还可以和现代分子生物学技术如高通量 DNA 测序结合来展开更为广阔的研究。

5 问题及展望

基于 CRISPR/Cas9 系统的新型基因编辑技术的飞速发展给分子生物学的研究带来了无限的可能, 然而其脱靶效应依旧是一个不容忽视的问题。CRISPR/Cas 系统的特异性是由 PAM 前 20 bp 的 RNA-DNA 相互作用决定的, 理论上 CRISPR/Cas 系统脱靶的概率会较高。虽然在细菌中 CRISPR/Cas 系统特异性很高, 但研究表明利用 CRISPR/Cas9 系统对水稻的 OsMPK2 进行基因定点编辑时, 发现了较多碱基的删除, 经分析发现是 sgRNA 介导的 CRISPR/Cas9 系统分别对靶位点 (On-target) 以及与靶位点高度相似的序列 (Off-target) 分别进行了切割导致的^[51]。因此, 提高 CRISPR/Cas 系统的特异性来降低脱靶效应是大规模应用该技术的前提。脱靶效应主要与核酸酶结

构以及靶基因的复杂性有关,因此通过改造其系统元件或采用不同策略能增加基因组编辑的特异性^[52]。例如, Cas9-D10A 切口酶配合一对 sgRNA 使用,可以减少意外的脱靶基因修饰,它分别在相对的两条 DNA 链上产生切口,从而形成功能性的双链断裂。这种设计能最大限度降低脱靶效应,同时保持高效而又特异的基因修饰。同时在设计 sgRNA 时,对于靶向基因特异性起决定性作用的 12 bp 可以含有 2 个碱基的错配^[53]。此外, Cas9 蛋白活性的时效性控制以及 Cas9 与 sgRNA 的比例也需要进一步的研究。在体外组装的质粒导入宿主菌株后,需平衡 Cas9 蛋白的活性和表达 Cas9 质粒的拷贝数。Cas9 蛋白的高表达不仅将对细胞造成负担,并可能引起不希望看到的 DSBs 的脱靶效应,不论是在基因敲除还是基因插入中 Cas9 蛋白的高表达会影响转化后宿主菌的生长和恢复速率,在大多数情况下将对细胞造成致命的危害。另一方面, sgRNA 的表达调节也会影响基因编辑的效率,因为 Ryan 等^[54]曾报道了工业酵母菌株中启动子依赖性对基因编辑效率的影响。因此,我们在追求基因编辑的最优化时需要考虑宿主菌株的倍性水平,单倍体中获得的效率可能偏离多倍体菌株中的高水平表达。除脱靶效应以及表达量的控制外,CRISPR/Cas 系统的许多分子机制尚不明确,如 Cas 蛋白是通过何种机制将获取的外源基因序列整合到自身基因座的 5'端。且 CRISPR/Cas9 来源于细菌,对其研究依旧处于细胞阶段,且大部分都是应用于微生物中,那么当它应用于哺乳动物细胞时,是否会产生毒性或是否会诱发哺乳动物细胞或个体的免疫反应?

总之,CRISPR-Cas 系统研究时间虽短,但是发展速度迅猛。相信在不久的将来,能发展成为

一种操作方便、特异性强、切割效率高并能应用于各种生物的基因组定点修饰技术。

参 考 文 献

- [1] Pu Q, Luo J, Shen LY, Li Q, Zhang Y, Zhang SH, Zhu L. The advance and application of CRISPR/Cas9 mediated genome editing technique. *China Biotechnology*, 2015, 35(11): 77–84. (in Chinese)
蒲强, 罗嘉, 沈林园, 李强, 张谊, 张顺华, 朱砾. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的研究进展及其应用. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(11): 77–84.
- [2] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51(3): 503–512.
- [3] Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7): 397–405.
- [4] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [5] Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu JK. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(6): 2623–2628.
- [6] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 172.
- [7] Wei CX, Liu JY, Yu ZS, Zhang B, Gao GJ, Jiao RJ. TALEN or Cas9-rapid, efficient and specific choices for genome modifications. *Journal of Genetics and Genomics*, 2013, 40(6): 281–289.
- [8] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 181–186.
- [9] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 60(2): 174–182.
- [10] Li TM, Du B. CRISPR-Cas system and coevolution of bacteria and phages. *Hereditas*, 2011, 33(3): 213–218. (in Chinese)

- 李铁民, 杜波. CRISPR-Cas 系统与细菌和噬菌体的共进化. 遗传, 2011, 33(3): 213–218.
- [11] Gesner EM, Schellenberg MJ, Garside EL, George MM, Macmillan AM. Recognition and maturation of effector RNAs in a CRISPR interference pathway. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 18(6): 688–692.
- [12] Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *The EMBO Journal*, 2011, 30(7): 1335–1342.
- [13] Wiedenheft B, Lander GC, Zhou KH, Jore MM, Brouns SJJ, van der Oost J, Doudna JA, Nogales E. Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature*, 2011, 477(7365): 486–489.
- [14] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(6): 467–477.
- [15] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao YJ, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607.
- [16] Wang RY, Preamplume G, Terns MP, Terns RM, Li H. Interaction of the Cas6 ribonuclease with CRISPR RNAs: recognition and cleavage. *Structure*, 2011, 19(2): 257–264.
- [17] Heidelberg JF, Nelson WC, Schoenfeld T, Bhaya D. Germ warfare in a microbial mat community: CRISPRs provide insights into the co-evolution of host and viral genomes. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4169.
- [18] Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, 507(7490): 62–67.
- [19] Semenova E, Nagornykh M, Pyatnitskiy M, Artamonova II, Severinov K. Analysis of CRISPR system function in plant pathogen *Xanthomonas oryzae*. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 296(1): 110–116.
- [20] Sapranuskas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(21): 9275–9282.
- [21] Westra ER, van Erp PBG, Künne T, Wong SP, Staals RHJ, Seegers CLC, Bollen S, Jore MM, Semenova E, Severinov K, de Vos WM, Dame RT, de Vries R, Brouns SJJ, van der Oost J. CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. *Molecular Cell*, 2012, 46(5): 595–605.
- [22] Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiácovo MP, Church GM, Calarco JA. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nature Methods*, 2013, 10(8): 741–743.
- [23] Jakociunas T, Jensen MK, Keasling JD. CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories. *Metab Eng*, 2016, 34: 44–59.
- [24] Barrangou R. RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(9): 836–838.
- [25] Wang X, Zhang ZQ, Zhang ZY. Genome targeting modification technology based on TALE nucleases engineering. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 28(3): 211–216. (in Chinese)
王昕, 张志强, 张智英. TALE 核酸酶介导的基因组定点修饰技术. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(3): 211–216.
- [26] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2012, 2(2): e00471.
- [27] Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, Schildkraut I. FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(18): 10570–10575.
- [28] Li T, Huang S, Zhao XF, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(14): 6315–6325.
- [29] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2510.
- [30] Goren M, Yosef I, Edgar R, Qimron U. The bacterial CRISPR/Cas system as analog of the mammalian adaptive immune system. *RNA Biology*, 2012, 9(5): 549–554.
- [31] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, Dicarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [32] Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Parry MAJ, Hanson MR. A faster Rubisco with potential to increase photosynthesis in crops. *Nature*, 2014, 513(7519): 547–550.
- [33] Yu SY, Zhao JR, Zheng LH, Zhu EP, Zhou WD, Wu BC. The application of CRISPR/Cas9 technology for *aroA* gene knockout in *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(4): 762–770. (in Chinese)
余深翼, 赵金荣, 郑玲红, 朱二鹏, 周五朵, 吴宝成. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建大肠杆菌 *aroA* 基因的敲除系统及其

- 初步应用. 畜牧兽医学报, 2016, 47(4): 762–770.
- [34] Bao ZH, Xiao H, Liang J, Zhang L, Xiong X, Sun N, Si T, Zhao HM. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(5): 585–594.
- [35] Zhang GC, Kong II, Kim H, Liu JJ, Cate JHD, Jin YS. Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7694–7701.
- [36] Mao YP. Research of the glycosylation modification in *Pichia pastoris* expression system. Master Dissertation of Anhui University, 2015. (in Chinese)
毛银平. 毕赤酵母表达系统糖基化修饰改造研究. 安徽大学硕士学位论文, 2015.
- [37] Liu R, Chen L, Jiang YP, Zhou ZH, Zou G. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discovery*, 2015, 1: 15007.
- [38] Matsu-Ura T, Baek M, Kwon J, Hong C. Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2015, 2(1): 4.
- [39] Schuster M, Schweizer G, Reissmann S, Kahmann R. Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 89: 3–9.
- [40] He AS, Rohatgi PR, Hersh MN, Rosenberg SM. Roles of *E. coli* double-strand-break-repair proteins in stress-induced mutation. *DNA Repair*, 2006, 5(2): 258–273.
- [41] Jiang Y, Chen B, Duan CL, Sun BB, Yang JJ, Yang S. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506–2514.
- [42] Zhao DD, Yuan SL, Xiong B, Sun HN, Ye LJ, Li J, Zhang XL, Bi CH. Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 205.
- [43] Li YF, Lin ZQ, Huang C, Zhang Y, Wang ZW, Tang YJ, Chen T, Zhao XM. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Metabolic Engineering*, 2015, 31: 13–21.
- [44] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183.
- [45] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): 4336–4343.
- [46] Jakočiūnas T, Rajkumar AS, Zhang J, Arsovska D, Rodriguez A, Jendresen CB, Skjødt ML, Nielsen AT, Borodina I, Jensen MK, Keasling JD. CasEMBLR: Cas9-facilitated multilocus genomic integration of *in vivo* assembled DNA parts in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(11): 1226–1234.
- [47] Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, Wheeldon I. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(4): 356–359.
- [48] Li JX, Wang J, Wang SW, Xing M, Yu SW, Liu G. Achieving efficient protein expression in *Trichoderma reesei* by using strong constitutive promoters. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 84.
- [49] Ilmén M, Onnela ML, Klemsdal S, Keränen S, Penttilä M. Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Molecular and General Genetics MGG*, 1996, 253(3): 303–314.
- [50] Liu Q, Gao RR, Li JG, Lin LC, Zhao JQ, Sun WL, Tian CG. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 165.
- [51] Shan QW, Wang YP, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JJ, Qiu JL, Gao CX. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 686–688.
- [52] Shen B, Zhang WS, Zhang J, Zhou JK, Wang JY, Chen L, Wang L, Hodgkins A, Iyer V, Huang XX, Skarnes WS. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods*, 2014, 11(4): 399–402.
- [53] Wang MY, Yang YN, Bian HW. New genome targeting modification technology using a CRISPR-Cas system. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 30(5): 426–433. (in Chinese)
王梦瑶, 杨亦农, 边红武. 基于 CRISPR-Cas 系统的基因组定点修饰新技术. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(5): 426–433.
- [54] Ryan OW, Skerker JM, Maurer MJ, Li X, Tsai JC, Poddar S, Lee ME, Deloache W, Dueber JE, Arkin AP, Cate JH. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *eLife Sciences*, 2014, 3: e03703.

A new generation of targeted gene modification technology guided by CRISPR/CAS system and the application in industrial microorganism

Miaowen Cheng, Wei Luo^{*}, Yao Du

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) is a kind of genetic structure containing interval repeat sequences and is widespread in bacteria and archaea genome. CRISPR/CAS system mediated by RNA can provide bacteria with a specific immune protection mechanism to resist the invasion of the virus or phage. Through the transformation of CRISPR/CAS system II, it has become another efficient technology for targeted gene modification after the zinc finger nuclease (ZFNs) and TALE nucleases (TALENs), which is of flexibility, efficiency, cheapness and easy-operating. At present, CRISPR/Cas technology has been applied to many organisms such as microorganism, mammalian cells, fruit flies, rice and some research achievements in genetic modification have been obtained. The structure, classification, molecular mechanism of genome editing, application prospect in industrial microorganism and problems of CRISPR/Cas system are reviewed in this paper.

Keywords: CRISPR/Cas system, specific immune, gene modification, genome editing, industrial microorganism

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21606105) and by the Jiangsu Province Natural Science Fund (BK20130130)

*Corresponding author. E-mail: wluo@jiangnan.edu.cn

Received: 24 January 2017; Revised: 27 May 2017; Published online: 29 June 2017

罗玮, 博士, 江南大学生物工程学院副教授。在工业微生物育种和发酵、代谢工程和合成生物学方面开展研究工作, 内容涉及氨基酸、药物中间体和功能性食品的生物制造。近五年承担省部级以上课题3项、企业委托课题3项, 在国内外主流期刊发表论文(含专利)40多篇, SCI收录20余篇。具体信息详见 <http://biotech.jiangnan.edu.cn/info/1016/1090.htm>。

