

CRISPR/Cas9 在放线菌合成生物学研究中的应用和发展

黄蓉¹⁾, 段燕文^{1),2),3)}, 朱湘成^{1),2),3)}*

(¹⁾中南大学湘雅国际转化医学联合研究院,长沙 410013; ²⁾新药组合生物合成国家地方联合工程研究中心,长沙 410205; ³⁾组合生物合成与天然产物药物湖南省工程研究中心,长沙 410205)

摘要 放线菌是活性天然产物和抗生素药物的重要来源。利用合成生物学高效地开发其中丰富的天然产物资源,将为加速新药开发奠定坚实的基础。CRISPR/Cas9 作为一种多功能基因编辑系统,因其便捷高效而被广泛应用于真核生物的遗传操作。但在原核生物尤其是放线菌中的应用仍处于起步阶段,机遇和挑战并存。本综述总结了目前 CRISPR/Cas9 系统在放线菌基因编辑和调控,以及活性天然产物的产量提升、生物合成机制解析和资源开发等方面的研究进展。同时,也对该系统在实际应用中面临的包括重组修复效率低,以及靶向切割效率不足等关键挑战进行了分析,并提出了相应的优化解决方法。随着 CRISPR/Cas9 在放线菌应用中的不断完善和发展,将极大地推动放线菌的合成生物学研究,促进其中天然产物资源的有效挖掘和应用开发。

关键词 放线菌; CRISPR/Cas9; 合成生物学; 基因编辑和调控; 微生物天然产物

中图分类号 Q78

Applications and Development of CRISPR/Cas9 in Synthetic Biology of Actinomycetes

HUANG Rong¹⁾, DUAN Yan-Wen^{1),2),3)}, ZHU Xiang-Cheng^{1),2),3)}*

(¹⁾ Xiangya International Academy of Translational Medicine, Central South University, Changsha 410013, China;

²⁾ National Engineering Research Center of Combinatorial Biosynthesis for Drug Discovery, Changsha 410205, China;

³⁾ Hunan Engineering Research Center of Combinatorial Biosynthesis and Natural Product Drug Discovery, Changsha 410205, China)

Abstract Actinomycetes are important sources of active natural products and antibiotics. The synthetic biology-guided efficient discovery and development of natural products will lay a solid foundation for accelerating the development of novel drugs. CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR associated) is a multi-functional gene editing system widely applied in eukaryotic cells for genetic manipulation, because of its convenience and efficiency. However, its application in prokaryotic organisms, especially in actinomycetes, is still in the early stage, which provides us both opportunities and challenges. This review summarizes the progresses of CRISPR/Cas9 system in actinomycetes including gene editing and regulation, as well as the yield enhancement, biosynthetic studies and potential resource development of active natural products. Besides, the major practical challenges of the system such as low efficiency of recombination repair and potential off-target effects are discussed in detail, and corresponding solutions are proposed. The future improvement and development of CRISPR/Cas9 in actinomycetes will greatly facilitate the upcoming synthetic biology

收稿日期: 2019-01-21; 修回日期: 2019-03-21; 接受日期: 2019-03-25

中南大学研究生科研创新项目(No. 2017zzts861)资助

* 通讯作者 Tel: 0731-82650539; E-mail: seanzhu1996@aliyun.com

Received: January 21, 2019; Revised: March 21, 2019; Accepted: March 25, 2019

Supported by Postgraduate Research Innovation Project of Central South University(No. 2017zzts861)

* Corresponding author Tel: 0731-82650539; E-mail: seanzhu1996@aliyun.com

1 CRISPR/Cas9 技术在放线菌中的应用

1.1 CRISPR/Cas9 对放线菌基因组的编辑

自问世以来,CRISPR/Cas9 系统很快在真核生物中得到广泛应用^[4]。相比之下,原核生物只能通过效率不高的同源重组途径来修复致命的双链断裂(double strand break, DSB),因而导致 CRISPR/Cas9 系统的应用受限^[5]。尽管如此,仍有多篇研究报道了 CRISPR/Cas9 系统在放线菌中的成功应用(见 Table 1)。2015 年,CRISPR/Cas9 系统被首次用于对变铅青链霉菌(*Streptomyces lividans*)中十一烷基灵菌红素(undecylprodigiosin, RED)和放线紫红素(actinorhodin, ACT)的 *redN* 和 *actVA-ORF5* 基因分别进行敲除,并通过插入双 sgRNA(single-guide RNA)的策略不仅实现两个基因的同时编辑,还成功地敲除 31 kb 的 *red* 基因簇。此外,在白色链霉菌(*S. albus*)和产绿色链霉菌(*S. viridochromogenes*)中的类似应用,也进一步证明了同时包含 sgRNA 表达盒和 Cas9 蛋白的 pCRISPMycs-2 温敏型质粒的 CRISPR/Cas9 系统在链霉菌中的有效性^[6]。相比于其他放线菌,CRISPR/Cas9 系统在天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)中应用和研究相对较为系统,包括利用 pKCcas9dO 质粒^[7]、pCRISPR-Cas9 质粒^[8]以及 pWHU 系列 CRISPR 质粒^[9],成功对天蓝色链霉菌的相关基因进行了敲除。CRISPR/Cas9 系统可以将异源启动子精确引入链霉菌基因组中,以有效地激活沉默生物合成基因簇,通过将组成型强启动子 *kasO* * *p* 插入到关键酶或途径特异性调控子的编码基因上游,激活白色链霉菌中的靛蓝色素基因簇,以及变铅青链霉菌中的 RED 和 ACT 基因簇;而采取同样的策略激活玫瑰孢链霉菌(*S. roseosporus*)中的多环稠、大环内酰胺类和丙基磷酸类基因簇,委内瑞拉链霉菌(*S. venezuelae*)中的 III 型聚酮化合物(PKS)基因簇,以及产绿色链霉菌(*S. viridochromogenes*)中的 II 型 PKS 基因簇,分别成功获得了抗真菌活性 PTM 类化合物 photocyclized alteramide A 和 dihydromaltophilin、抗疟疾活性的 FR-900098、以及不同的新型色素类化合物^[10]。此外,CRISPR/Cas9 在一些重要的工业放线菌中也获得了应用。在生产 II 型糖尿病药物阿卡波糖的游动放线菌 SE50/110(*Actinoplanes* sp. SE50/110)中敲除酪氨酸酶基因 *melC2*,可以消除副产物优黑素的产生^[11];在龟裂链霉菌(*S. rimosus*)中通

过对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶同工酶基因 *zwf2* 和 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶基因 *devB* 的点突变和碱基缺失等基因编辑,使抗菌药物土霉素的产量增加了 36.8%^[12]。

另一方面,通过 CRISPR/Cas9 系统对基因/基因簇的快速敲除,还高效地鉴定和解析了未知的生物合成途径。例如,从分离自蚂蚁的含有 39 个次级代谢合成基因簇的蚁科链霉菌(*S. formicae*)中,确定新型抗菌聚酮类化合物 formicamycins 由一个 II 型 PKS 基因簇负责合成,并且黄素依赖性卤代酶 ForV 是合成这类化合物的关键后修饰酶^[13]。同样,从红树林沉积物中分离的链霉菌 SD85,含有 52 个次级代谢合成基因簇,通过敲除模块化聚酮合酶基因 *sceN*,确定 I 型 PKS 基因簇 *sce* 负责合成抗真菌多烯大环内酰胺 sceliphrolactam^[14]。对于那些常规遗传操作体系很难建立或效率极低的稀有放线菌,CRISPR/Cas9 系统的应用更是加速了其相关的生物合成研究。通过对旱地小单孢菌(*Micromonospora chersina*)中所有 8 种不同类型 PKS 基因簇的逐一敲除,以及负责合成十元环烯二炔 dynemicin 的 PKS-8 中的 2 个 P₄₅₀ 氧化酶基因的敲除,推断 PKS-8 中的聚酮合酶 DynE8,可能同时负责炔二炔结构单元和蒽醌结构单元的生物合成,使蒽醌骈合型十元环烯二炔的生物合成研究取得了关键突破^[15]。除了在细胞体内的广泛应用,CRISPR/Cas9 系统还能有效地对体外,包括质粒和基因簇在内的各种放线菌生物合成元件进行基因编辑和重构。ICE 系统(*in vitro* CRISPR/Cas9-mediated editing system)在 T4-DNA 聚合酶的协助下,分别对质粒 pYH285 中 tetronate 类基因簇的 3-氧酰基-ACP 合酶基因 *rkD*,粘粒 10A3 中全霉素基因簇的 NRPS 基因 *homE* 进行了高效敲除^[16]。相比于常规 PCR 定向突变体系,ICE 系统避免了非预期重组的前提下,便捷地实现 DNA 体外重构的无缝连接。同时,CRISPR/Cas9 系统还能联合 Gibson 克隆组装技术,实现无需抗性筛选的体外基因同框缺失和启动子更换,在链霉菌次级代谢基因簇的重构和异源表达等方面获得了运用^[17]。综上所述,CRISPR/Cas9 系统在高效基因编辑、沉默基因簇激活、生物合成机制解析、生物合成元件构建和目标化合物产量提升等方面的应用,极大地促进了放线菌的合成生物学研究及其天然产物的开发。

Table 1 Summary of the CRISPR/Cas9 system applications in actinomycetes

Host	System	Function
<i>S. lividans</i> ^[6] , <i>S. albus</i> ^[6] <i>S. viridochromogenes</i> ^[6]	pCRISPomyces	Knock-out
<i>S. lividans</i> ^[10] , <i>S. albus</i> ^[10] <i>S. viridochromogenes</i> ^[10] <i>S. roseosporus</i> ^[10] , <i>S. venezuelae</i> ^[10]	pCRISPomyces	Promoter insertion
<i>S. coelicolor</i> M145 ^[7]	pKCcas9dO	Knock-out, site mutation
<i>S. coelicolor</i> A3(2) ^[8]	pCRISPR-Cas9	Knock-out
<i>S. coelicolor</i> M145 ^[9]	CRISPR/Cas9-CodA (sm)	Knock-out
<i>S. formicae</i> ^[13]	pCRISPomyces	Knock-out
<i>S. sp.</i> SD85 ^[14]	pCRISPR-Cas9	Knock-out
<i>S. rimosus</i> ^[12]	pCRISPomyces	Knock-out, site mutation
<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110 ^[11]	pCRISPomyces	Knock-out
<i>Micromonospora chersina</i> ^[15]	pCRISPR-Cas9	Knock-out
<i>S. lividans</i> ^[16] , <i>S. albus</i> ^[16]	ICE (<i>in vitro</i> editing of vector)	Deletion/insertion, deletion
<i>S. pristinaespiralis</i> ^[17] <i>S. coelicolor</i> ^[17]	CRISPR/Cas9/Gibson assembly (<i>in vitro</i> editing of vector)	Gene cluster refactoring
<i>S. avermitilis</i> ^[18]	ICE (<i>in vitro</i> editing of vector)	Deletion
<i>S. coelicolor</i> A3(2) ^[8]	pCRISPR-Cas9 (CRISPRi)	Repression of single gene
<i>S. coelicolor</i> ^[19]	pSET152/dCas9-based system (CRISPRi)	Repression of single/multiple genes

1.2 CRISPR/Cas9 对放线菌基因的调控

基因转录表达的调控是研究基因功能和构建特定人工合成途径的重要手段^[20]。而 CRISPR/Cas9 系统的靶向特异性也被成功开发为一种重要的基因调控工具^[5]。将 Cas9 中 2 个核酸酶结构域 RuvC 和 HNH 的第 10 位天冬氨酸和第 840 位组氨酸同时分别突变为丙氨酸 (D10A/H840A), 可以获得失去核酸内切酶活性的突变体 dCas9 (dead Cas9)。虽然无法切割 DNA, dCas9 仍能与 sg RNA 形成复合物并靶向结合特定的 DNA 序列, 并且不会造成 DNA 双链断裂从而避免了基因突变的潜在影响^[21]。基于 dCas9 开发的基因转录表达调控系统, 主要分为 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 和 CRISPR 激活 (CRISPR activation, CRISPRa)。

1.2.1 基因转录的抑制-CRISPRi CRISPRi 主要通过 dCas9 阻断 RNA 聚合酶与靶基因启动子的结合, 或是与开放阅读框 (open reading frame, ORF) 直接结合来抑制靶基因的转录延伸。其中, 前者更为有效且与靶基因无关, 因此很快被应用于天蓝色链霉菌中 (见 Table 1)。通过设计靶向 ACT 基因簇中 *actI-ORF1* 启动子和 ORF 区域的多个 sgRNA, 证明启动子区域的 CRISPRi 均能减少或消除 ACT 的产生, 而在 ORF 区域仅有非模板链上的 CRISPRi 能达

到同样的调控效果; 此外, 随着 dCas9 质粒的丢失还能重新恢复 ACT 的合成^[8]。类似的例子, CRISPRi 还被用于功能基因的快速筛选, 对天蓝色链霉菌中 10 个具有 ANTAR (AmiR and NasR transcriptional anti-terminator regulator) 结构域的 RNA 结合蛋白编码基因进行 CRISPRi 筛选, 发现只有反应调节因子基因 *SCO2013* 的转录抑制会影响天蓝色链霉菌的生长, 并进一步通过 *SCO2013* 的同框敲除得到了验证^[19]。相比于其他靶向基因调控技术, CRISPRi 的优势在于其引起的基因沉默不仅可以诱导和逆转, 并且能同时对多个基因进行抑制, 但同时也应该考虑到 CRISPRi 对目标基因下游其他基因 (同一操纵子中) 转录的潜在影响。

1.2.2 基因转录的激活-CRISPRa CRISPRa 主要通过 dCas9 与不同蛋白质的融合来募集转录激活因子, 进而实现可控的基因转录激活。由于有效的激活因子较少^[22], CRISPRa 系统在原核生物中的研究和应用尚处于起步阶段。前期研究表明, 大肠杆菌 RNA 聚合酶 (RNAP) ω 亚基与 λ 噬菌体阻遏蛋白 (λ cI) 的 C 末端融合后, 可以在敲除 ω 亚基基因 *rpoZ* 的大肠杆菌突变菌 (Δ *rpoZ*) 中将 RNAP 束缚在启动子区域, 从而使 β -半乳糖苷酶编码基因 *lacZ* 的转录水平提高 70 倍^[23]。基于此, 将 dCas9 C 末端与 RNAP- ω 亚基融合, 在 Δ *rpoZ* 突变菌中同样也能

通过与弱启动子在合适距离的结合(转录起始位点上游第 96 位碱基处)来提高 *lacZ* 的表达^[20]。利用这一策略,在产酶溶杆菌(*Lysobacter enzymogenes*)中对 *wap* 基因簇 5 个关键基因进行共转录激活,并在强启动子 P_{HSAF} 控制下对 4 个自保护基因进行重构,将环脂肽化合物 WAP-8294A 及其衍生物的产量增加了 4~9 倍^[24]。类似的,通过铜离子诱导型启动子控制的 CRISPRa 系统,可以提高抗肿瘤抗生素埃博霉素的生物合成基因簇在粘球菌(*Mycococcus xanthus*)中的转录表达,导致埃博霉素的异源合成产量大幅提升^[25]。

另一方面,Zalatan 等^[26]在 gRNA 末端增加了 MS2 发夹结构序列来构建支架 RNA(scaffold RNA, scRNA),并将 MS2 外壳蛋白(MCP)分别与不同的激活因子融合,发现 DNA 结合转录因子 SoxS 的转录激活效果最为明显;随后,还通过对 scRNA 发夹结构的去冗改进、MCP 与 SoxS 氨基酸连接链的增长和 SoxS 的定向进化等优化了基于 SoxS 的 CRISPRa 系统,在解耦 SoxS 内源性 DNA 结合活性的前提下,极大地提升了该系统的转录激活效果。由于 SoxS 主要通过与 RNAP- α 亚基的保守位点进行相互作用,而 RNAP- α 亚基在细菌中相对较为保守,因此这一系统很有可能推广应用到大肠杆菌以外的其他细菌中。虽然 CRISPRa 在放线菌中尚未见报道,但完全可以借鉴上述成功范例来建立相关系统,并通过 CRISPRa 和 CRISPRi 系统的联合运用,充分挖掘放线菌复杂的代谢网络和调控机制,加速目标产物产量提升和 Novel 天然产物发现等方面的研究。

2 CRISPR/Cas9 系统在放线菌应用中面临的挑战

2.1 重组修复效率的提高

CRISPR/Cas9 系统在放线菌中的成功应用主要集中于某些模式菌株,而在许多遗传操作效率不高的非模式放线菌中尚无法普及使用,其中重组修复效率低是主要原因之一^[5]。由于同源重组修复(homologous recombination, HR)在放线菌中的效率不高,导致大部分细胞因无法修复 Cas9 切割造成的 DSB 而死亡。因此,如何提高重组修复效率是在放线菌中有效应用 CRISPR/Cas9 系统亟需解决的关键问题。对策之一就是要在放线菌中构建非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复途径(Fig. 2A),通过末端结合蛋白 Ku 使断裂的 DNA 链

彼此靠近,再招募专一性 DNA 连接酶 LigD 修复 DSB 缺口^[27]。生物信息分析发现,2 645 个具有完整基因组数据的原核生物样本中约有 20.2% 的物种含有独特的 Ku 编码基因,但是大多数放线菌尤其是链霉菌中都不含 LigD^[28]。以结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) LigD 为探针,发现了肉色链霉菌(*S. carnes*)中存在 LigD 同源蛋白质,通过将其与 CRISPR/Cas9 系统在天蓝色链霉菌 A3(2)中共表达来对 NHEJ 途径进行优化,将 ACT 基因簇中关键基因 *actIORF1* 和 *actVB* 的敲除效率分别从 45% 和 37% 提高到 77% 和 69%^[8],但编辑位点附近均出现了碱基丢失、替换和插入等随机突变,而 HR 在修复率和准确度上的高效更适合于基因的精准编辑。

考虑到高致死性 DSB 是限制 CRISPR/Cas9 应用于放线菌的重要原因,相对而言,DNA 单链断裂(single strand break, SSB)对细胞的影响远低于 DSB^[29]。因此,对核酸内切酶结构域的选择性突变可以将 Cas9 转变为单链切口酶(Cas9 nickase, Cas9n),从而降低其对细胞的毒性(Fig. 2B)。在大肠杆菌中^[30],CRISPR 导向的 Cas9^{D10A} 和 Cas9^{H840A} 两种不同切口酶系统,均能在基因组上精确地制造非致死的 SSB,而 SSB 诱导的同源修复与转录相关,其中转录链切口(Cas9^{D10A})诱发的 HR 效率要明显高于非转录链切口,并且能利用产生的双靶点缺口对长达 133 kb 的大片段基因进行有效地缺失。与此类似,CRISPR/Cas9^{D10A} 系统只需 0.2 kb 的同源模板,便可高效地(>95%)对解纤维梭菌(*Clostridium cellulolyticum*)基因组进行精确的一步编辑^[31],而在干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)^[32]和地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)^[33]中,进行基因敲除或插入的突变效率也分别接近 65% 和 80%。虽然基于 Cas9 切口酶的应用在放线菌中尚未见报道,但对那些存在 DSB 修复缺陷或 HR 效率低的放线菌而言,仍不失为一种提高 CRISPR 系统重组修复效率的可行策略。

2.2 靶向切割效率的优化

CRISPR/Cas9 系统的脱靶风险同样限制了其在放线菌中的推广应用。在哺乳动物细胞中的大量研究表明,sgRNA 的序列和长度、PAM(proto-spacer adjacent motif)位点的长度以及 Cas9 蛋白的表达量和活性等因素,都会影响 CRISPR/Cas9 系统的特异性。sgRNA 的选择对于降低脱靶效应非常重要,其靠近 PAM 位点的种子序列(10 个碱基左右)主要决

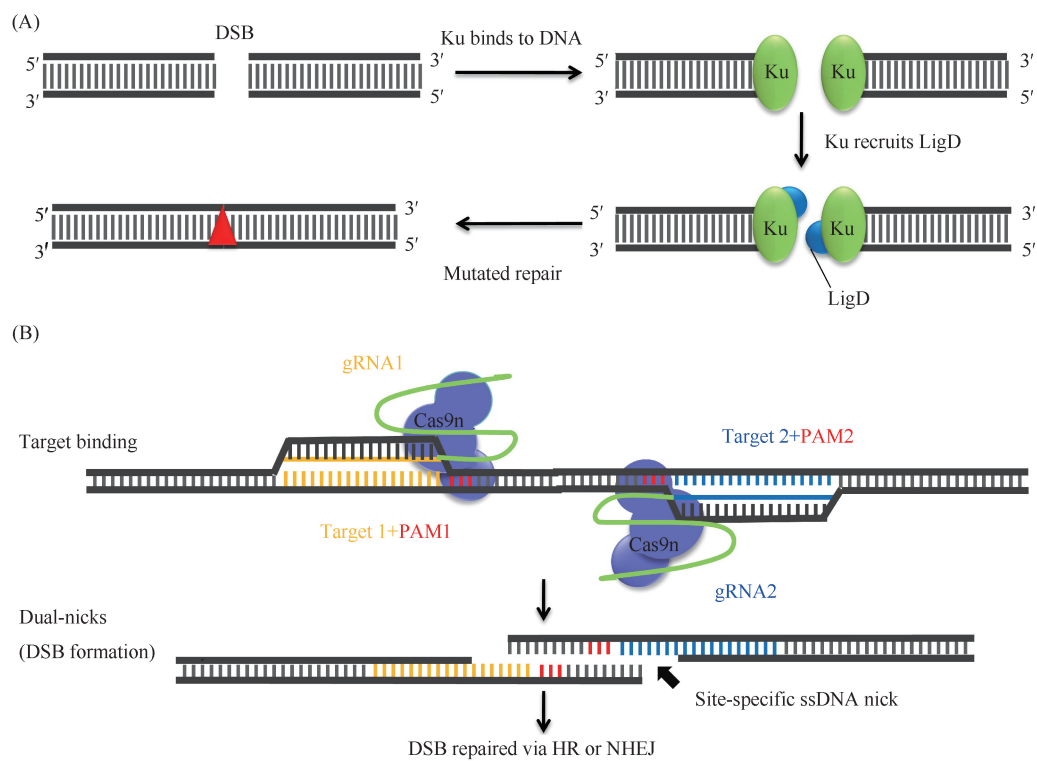


Fig.2 The action mechanisms of NHEJ repair (A) and CRISPR/Cas9 nickase (B) (A) The site-specific DSB is generated via sgRNA-directed Cas9 cleavage, then Ku proteins recognize and stabilize the DNA end. Next, the DNA ligase LigD is recruited to the DNA ends and imprecisely repair DSBs. (B) The use of paired nickases can introduce DSBs and produce long overhangs on each of the cleaved ends instead of blunt ends

定与靶点识别的特异性,而远端序列则通过引起 Cas9 构像改变来影响非特异性结合。此外,虽然有报道称序列较长、结合活性高的 sgRNA 会引起脱靶,但缩短 sgRNA 长度对特异性的影响仍有待验证,并且可能降低编辑效率^[34]。由于鸟嘌呤富集的 sgRNA 更易折叠形成稳定结构而降低脱靶效应,因此在其 5'末端添加 2 个鸟嘌呤可以显著减小脱靶几率(高达 5 000 倍)^[35]。最近,通过在大肠杆菌中建立的 sgRNA 文库和系统分析,成功开发了一种专门针对细菌的综合算法来高效预测 sgRNA,并发现通过哺乳动物细胞模型和软件来预测细菌 sgRNA 存在明显的局限和偏差^[36]。这一细菌 sgRNA 开发系统的建立,将极大地促进 CRISPR/Cas9 系统在放线菌中的应用并提升其靶向编辑效率。

作为核心功能蛋白质,Cas9 中基于其 PAM 序列兼容性和 DNA 结合效率的优化,对于靶向切割效率的提高也至关重要。例如,以 Cas9 与 PAM 位点相互作用的氨基酸区域(第 1 097~1 368 位)为目标,构建随机突变文库进行组合分析,筛选到的 VRER 变异体可以识别非标准 PAM 序列 NGCG 或 NGAN^[37];而通过噬菌体辅助的连续进化所获得的

突变体 xCas9,可以识别 NG、GAA 和 GAT 等特征序列^[38],这些优化的 Cas9 在扩展有效编辑位点的基础上,更增加了编辑的靶向特异性。此外,嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) Cas9 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) Cas9,也各自具有不同 PAM 位点,其中尺寸较小的金黄色葡萄球菌 Cas9,因其明显增长的 PAM 位点 NNGRRT 而极大地提高了特异性,但基因组上的可编辑位点也同样显著减少^[39]。除了 PAM 位点,Cas9 与 sgRNA/DNA 复合体的晶体结构研究也揭示了许多与 DNA 靶向或非特异性结合有关的结构要素。在 HNH、RuvC 和 PAM 作用功能域之间的带正电沟槽与非特异性结合有关,而用丙氨酸对其中 32 个带正电氨基酸进行单一和组合替换,筛选到脱靶效应被削弱的突变体 eSpCas9 (1.1)^[40];同样,突变体 SpCas9-HF1, evoCas9 也能进一步提高特异性。另一方面,科学家们针对 sgRNA/Cas9 蛋白复合体高表达引起的脱靶效应,采取将 Cas9 突变为单链切口酶^[41],或是引入诱导型启动子来控制 Cas9 表达^[42],或是将 dCas9 与 FokI 核酸酶融合形成 fCas9 后再基于 fCas9 二聚体来诱导 DNA 裂解^[43, 44]等策略,均能不同程度地

降低脱靶效应。

基于 Cas9 结构的作用机制研究表明,Cas9 对靶位点的识别和结合会引起 HNH 的构象改变,同时触发 RuvC 的催化活性以确保对 DNA 双链的协同切割,而许多非靶点 DNA 序列虽然可以与 Cas9 结合,但却无法驱动 HNH 从中间构象到活性构象的过渡,从而避免了因错配导致的 DNA 断裂。因此,除了 PAM 识别和 RNA-DNA 碱基配对等校对机制,HNH 在 DNA 结合与裂解之间的构象转换也成为 Cas9 切割 DNA 双链之前最后的特异性检查点,可以有效地防止非靶位点的切割^[45]。随后的分子动力学模拟计算,揭示了 Cas9 从 apo 蛋白到与 DNA 结合再到最终催化状态的构象动力学,并进一步解释了 HNH 结构域如何对 DNA 裂解施加构象控制^[46]。这些分子机制研究将促进 Cas9 合理的工程化设计和构建,以提高其靶向编辑效率或实现可控活性,进而开发更为高效的基因编辑工具。

3 问题与展望

CRISPR/Cas9 系统作为多功能性、操作简便的高效率基因编辑工具,在放线菌中的应用仍处于起步阶段,充满了机遇和挑战。本课题组在对 TNM 产生菌链霉菌 CB03234 的研究中发现,CRISPR/Cas9 系统的建立并不像在模式菌天蓝色链霉菌中那样顺利,并且不同的 CRISPR 质粒对基因编辑的有效性存在显著差异,所以 CRISPR/Cas9 在不同种属放线菌中的构建都需要进行系统地优化。此外,由于放线菌的线性染色体同源修复效率低和高 GC 含量等特性,以 NGG 为 PAM 位点的 Cas9 所造成的 DSB,不仅毒性较大且有可能引起大范围的基因组缺失或重排,而且更容易发生脱靶,因此限制了 CRISPR/Cas9 系统在放线菌中的推广和应用。此外,研究表明,在约 50% 的细菌和约 87% 的古细菌基因组中均发现了 CRISPR 位点^[47],因此开发和利用放线菌中的内源性 CRISPR/Cas 系统,或者如何有效地避免内源性 CRISPR/Cas 系统对 CRISPR/Cas9 的干扰,也是将来的一个发展方向。近年来,CRISPR/Cas9 系统在其他种属细菌中的应用和优化,也为其在放线菌中的推广应用提供了宝贵的借鉴。例如,在金黄色葡萄球菌中通过寡核苷酸单链与 CRISPR/Cas9 介导的反筛选系统进行了大规模基因突变^[48],为放线菌基因组突变和基因功能研究,以及潜在天然产物资源的挖掘提供了一种高通量方法。

放线菌作为新型抗生素的重要来源^[1],如何有

效地开发其中蕴含的天然产物资源,一直都是新药开发面临的主要挑战,而合成生物学驱动的基因组工程改造和重构,以及代谢网络的理性调控则是解决上述问题的有效捷径。CRISPR/Cas9 系统可以不依赖各种筛选基因对同一目标菌进行重复累加的基因编辑,在通过合成生物学构建放线菌的人工调控和高效生物合成体系等方面拥有无可比拟的巨大优势。CRISPR/Cas9 系统及其相关衍生工具在放线菌中的不断发展和完善,将极大地促进面向基因组编辑、沉默基因簇激活、生物合成机制解析和可编程转录调控等领域的合成生物学研究,加速其中活性天然产物资源的开发和应用。

参考文献 (References)

[1] Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics [J]. Nat Prod Rep, 2017, **34**(10): 1203-1232

[2] Hug JJ, Bader CD, Remškar M, et al. Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes [J]. Antibiotics (Basel), 2018, **7**(2).pii:E 44

[3] 岳雪, 聂少振, 王素珍, 等. 合成生物学在天然药物和微生物药物开发中的应用[J]. 中国抗生素杂志 (Yue X, Nie SZ, Wang SZ, et al. Application of synthetic biology in natural and microbial drug's research and development [J]. Chin J Antibiotics), 2016, **41**(8): 568-576

[4] 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[J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Wang MY, Yang YN, Bian HW. New genome targeting modification technology using a CRISPR-Cas system[J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2014, **30**(5): 426-433

[5] Luo ML, Leenay RT, Beisel CL. Current and future prospects for CRISPR-based tools in bacteria[J]. Biotechnol Bioeng, 2016, **113**(5): 930-943

[6] Cobb RE, Wang YJ, Zhao HM. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system[J]. ACS Synth Biol, 2015, **4**(6): 723-728

[7] Huang H, Zheng G, Jiang W, et al. One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015, **47**(4): 231-243

[8] Tong Y, Charusanti P, Zhang L, et al. CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes [J]. ACS Synth Biol, 2015, **4**(9): 1020-1029

[9] Zeng H, Wen 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]. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, **99**(24): 10575-10585

[10] Zhang MM, Wong FT, Wang Y, et al. CRISPR - Cas9 strategy for activation of silent Streptomyces biosynthetic gene clusters[J]. Nat Chem Biol, 2017.doi:10. 1038/nchembio.2341.[Epub ahead of print]

[11] 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]. J Biotechnol, 2016, **231**: 122-128

[12] Jia H, Zhang L, Wang T, et al. Development of a CRISPR/Cas9-mediated gene-editing tool in *Streptomyces rimosus* [J]. Microbiology, 2017, **163**(8): 1148-1155

[13] Qin Z, Munnoch JT, Devine R, et al. Formicamycins, antibacterial polyketides produced by *Streptomyces formicace* isolated from African Tetraponera plant-ants[J].Chem Sci,2017, **8**(4): 3218- 3227

[14] Low ZJ, Pang LM, Ding Y, et al. Identification of a biosynthetic

- gene cluster for the polyene macrolactam sceliphrolactam in a *Streptomyces* strain isolated from mangrove sediment[J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 1594
- [15] Cohen DR, Townsend CA. A dual role for a polyketide synthase in dynemicin enediyne and anthraquinone biosynthesis[J]. *Nat Chem*, 2018, **10**(2): 231-236
- [16] Liu Y, Tao W, Wen S, *et al.* In vitro CRISPR/Cas9 system for efficient targeted DNA editing[J]. *MBio*, 2015, **6**(6): e01714-15
- [17] Li L, Zheng G, Chen J, *et al.* Multiplexed site-specific genome engineering for overproducing bioactive secondary metabolites in actinomycetes[J]. *Metab Eng*, 2017, **40**: 80-92
- [18] Tao W, Yurkovich ME, Wen S, *et al.* A genomics-led approach to deciphering the mechanism of thiotetronate antibiotic biosynthesis[J]. *Chem Sci*, 2016, **7**(1): 376-385
- [19] Zhao Y, Li L, Zheng G, *et al.* CRISPR/dCas9-mediated multiplex gene repression in *Streptomyces* [J]. *Biotechnol J*, 2018, **13**(9): e1800121
- [20] Bikard D, Jiang W, Samai P, *et al.* Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(15): 7429-7437
- [21] 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
- [22] Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR - Cas9 for precision genome regulation and interrogation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, **17**(1): 5-15
- [23] Dove SL, Hochschild A. Conversion of the ω subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target[J]. *Genes Dev*, 1998, **12**(5): 745-754
- [24] Yu L, Su W, Fey PD, *et al.* Yield improvement of the anti-MRSA antibiotics WAP-8294A by CRISPR/dCas9 combined with refactoring self-protection genes in *Lysobacter enzymogenes* OH11 [J]. *ACS Synth Biol*, 2018, **7**(1): 258-266
- [25] Peng R, Wang Y, Feng WW, *et al.* CRISPR/dCas9-mediated transcriptional improvement of the biosynthetic gene cluster for the epothilone production in *Myxococcus xanthus* [J]. *Microb Cell Fact*, 2018, **17**(1): 15
- [26] Dong C, Fontana J, Patel A, *et al.* Synthetic CRISPR-Cas gene activators for transcriptional reprogramming in bacteria [J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 2489
- [27] Shuman S, Glickman MS. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, **5**(11): 852-861
- [28] McGovern S, Baconnais S, Roblin P, *et al.* C-terminal region of bacterial Ku controls DNA bridging, DNA threading and recruitment of DNA ligase D for double strand breaks repair[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016.pii: gkw149.[Epub ahead of print]
- [29] Metzger MJ, McConnell-Smith A, Stoddard BL, *et al.* Single-strand nicks induce homologous recombination with less toxicity than double-strand breaks using an AAV vector template [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, **39**(3): 926-935
- [30] Standage-Beier K, Zhang Q, Wang X. Targeted large-scale deletion of bacterial genomes using CRISPR-nickases[J]. *ACS Synth Biol*, 2015, **4**(11): 1217-1225
- [31] Xu T, Li Y, Shi Z, *et al.* Efficient genome editing in *Clostridium cellulosyticum* via CRISPR-Cas9 nickase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, **81**(13): 4423-4431
- [32] Song X, Huang H, Xiong ZQ, *et al.* CRISPR-Cas9^{D10A} nickase-assisted genome editing in *Lactobacillus casei* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, **83**(22): e01259-17
- [33] Li K, Cai D, Wang Z, *et al.* Development of an efficient genome editing tool in *Bacillus licheniformis* using CRISPR-Cas9 nickase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2018, **84**(6).pii: e02608-17
- [34] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, *et al.* High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, **31**(9): 839-843
- [35] Fu Y, Sander JD, Reyon D, *et al.* Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat Biotechnol*. 2014, **32**(3): 279-284
- [36] Guo J, Wang T, Guan C, *et al.* Improved sgRNA design in bacteria via genome-wide activity profiling [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, **46**(14): 7052-7069
- [37] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities[J]. *Nature*, 2015, **523**(7561): 481-485
- [38] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, *et al.* Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. *Nature*, 2018, **556**(7699): 57-63
- [39] Ran FA, Cong L, Yan WX, *et al.* In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. *Nature*, 2015, **520**(7546): 186-191
- [40] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J]. *Science*, 2016, **351**(6268): 84-88
- [41] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. *Cell*, 2013, **154**(6): 1380-1389
- [42] Yang YJ, Wang Y, Li ZF, *et al.* Increasing on-target cleavage efficiency for CRISPR/Cas9-induced large fragment deletion in *Myxococcus xanthus* [J]. *Microb Cell Fact*, 2017, **16**(1): 142
- [43] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(6): 577-582
- [44] Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, *et al.* Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(6): 569-576
- [45] Sternberg SH, LaFrance B, Kaplan M, *et al.* Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR - Cas9[J]. *Nature*, 2015, **527**(7576): 110-113
- [46] Palermo G, Miao Y, Walker RC, *et al.* CRISPR-Cas9 conformational activation as elucidated from enhanced molecular simulations[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, **114**(28): 7260-7265
- [47] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR - Cas systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, **13**(11): 722-736
- [48] Penewit K, Holmes EA, McLean K, *et al.* Efficient and scalable precision genome editing in *Staphylococcus aureus* through conditional recombineering and CRISPR/Cas9-mediated counterselection [J]. *MBio*, 2018, **9**(1).pii: e00067-18