

• 合成生物技术 •

谷氨酸棒杆菌中基于 CRISPR/Cas9 的多位点碱基编辑系统的优化

卢挥^{1,2#}, 张启^{2,4#}, 于思礼^{2,3}, 王钰², 康明⁴, 韩双艳¹, 刘叶², 王猛^{2,3}

1 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510006

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 中国科学院大学 生命科学学院, 北京 100049

4 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002

卢挥, 张启, 于思礼, 王钰, 康明, 韩双艳, 刘叶, 王猛. 谷氨酸棒杆菌中基于 CRISPR/Cas9 的多位点碱基编辑系统的优化. 生物工程学报, 2022, 38(2): 780-795.

LU H, ZHANG Q, YU SL, WANG Y, KANG M, HAN SY, LIU Y, WANG M. Optimization of CRISPR/Cas9-based multiplex base editing in *Corynebacterium glutamicum*. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 780-795.

摘要: 作为新型的基因组编辑工具, 碱基编辑技术结合了 CRISPR/Cas 系统的定位功能和碱基脱氨酶的编辑功能, 可实现特定位点的碱基突变, 具有不产生双链 DNA 断裂, 无需外源模板且不依赖染色体 DNA 同源重组的优势。目前, 研究者们已在重要的工业生产菌株谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中开发了多种碱基编辑工具, 并实现了两基因和三基因的同时编辑。文中针对谷氨酸棒杆菌中基于 CRISPR/Cas9 的多位点碱基编辑系统中存在的不足 (多重 sgRNA 结构烦琐、重复序列干扰、更换靶点困难等), 采用多种策略进行优化, 并比较碱基编辑效率: 首先优化基于单独启动子/终止子的多重 sgRNA 表达框, 通过构建框架质粒, 并结合 Golden Gate 连接方法, 加速靶点更换, 避免重复序列干扰, 虽然该方法 sgRNA 结构烦琐, 但编辑效率最高; 同时, 开发基于 Type II CRISPR crRNA 阵列、tRNA 加工的多重 gRNA 表达框, 这两种形式均只需要一个启动子和一个终止子序列, 极大地简化了表达框结构, 虽然编辑效率均出现下降, 但仍具有一定的实用性。该研究丰富了谷氨酸棒杆菌的基

Received: February 1, 2021; **Accepted:** March 28, 2021; **Published online:** December 27, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0902900); National Natural Science Foundation of China (31970063); Key Project of Chinese Academy of Sciences (QYZDB-SSW-SMC012); International Partnership Program of Chinese Academy of Sciences (153D31KYSB20170121); Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-PTJS-003)

Corresponding author: LIU Ye. Tel: +86-22-24828752; E-mail: liuye@tib.cas.cn

[#]There authors contributed equally to this study.

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0902900); 国家自然科学基金 (31970063); 中国科学院前沿科学重点研究项目 (QYZDB-SSW-SMC012); 中国科学院国际合作局对外合作重点项目 (153D31KYSB20170121); 天津市合成生物技术创新能力提升行动 (TSBICIP-PTJS-003)

基因组编辑工具，为该菌株的遗传改造提供了更多的技术支持。

关键词：碱基编辑；谷氨酸棒杆菌；CRISPR/Cas 系统；多重 gRNA

Optimization of CRISPR/Cas9-based multiplex base editing in *Corynebacterium glutamicum*

LU Hui^{1,2#}, ZHANG Qi^{2,4#}, YU Sili^{2,3}, WANG Yu², KANG Ming⁴, HAN Shuangyan¹, LIU Ye², WANG Meng^{2,3}

1 School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 School of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China

Abstract: As a new CRISPR/Cas-derived genome engineering technology, base editing combines the target specificity of CRISPR/Cas and the catalytic activity of nucleobase deaminase to install point mutations at target loci without generating DSBs, requiring exogenous template, or depending on homologous recombination. Recently, researchers have developed a variety of base editing tools in the important industrial strain *Corynebacterium glutamicum*, and achieved simultaneous editing of two and three genes. However, the multiplex base editing based on CRISPR/Cas9 is still limited by the complexity of multiple sgRNAs, interference of repeated sequence and difficulty of target loci replacement. In this study, multiplex base editing in *C. glutamicum* was optimized by the following strategies. Firstly, the multiple sgRNA expression cassettes based on individual promoters/terminators was optimized. The target loci can be introduced and replaced rapidly by using a template plasmid and Golden Gate method, which also avoids the interference of repeated sequence. Although the multiple sgRNAs structure is still complicated, the editing efficiency of this strategy is the highest. Then, the multiple gRNA expression cassettes based on Type II CRISPR crRNA arrays and tRNA processing were developed. The two strategies only require one single promoter and terminator, and greatly simplify the structure of the expression cassette. Although the editing efficiency has decreased, both methods are still applicable. Taken together, this study provides a powerful addition to the genome editing toolbox of *C. glutamicum* and facilitates genetic modification of this strain.

Keywords: base editing; *Corynebacterium glutamicum*; CRISPR/Cas system; multiple gRNAs

新型的碱基编辑技术结合了 CRISPR/Cas 系统的靶向特异性与碱基脱氨酶的催化活性，可以在引导 RNA (guide RNA, gRNA) 的指引下，使用切割功能受损的 Cas 突变体 (dCas 或

nCas) 与碱基脱氨酶的融合蛋白，在特定位点实现碱基的替换^[1-2]。2016 年，David Liu 研究团队与 Akihiko Kondo 研究团队率先开发 BE^[3] 和 Target-AID^[4]胞嘧啶碱基编辑器，实现了靶点

C 到 T 的碱基转换 (transversion)。近年来, 该技术不断得到完善和补充, 目前已可实现 A 到 G 的碱基转换, 大肠杆菌内 C 到 A 的碱基颠换 (transition) 和哺乳动物细胞内 C 到 G 的碱基颠换^[5-7]。该技术不产生双链切割、不需要外源模板且不依赖染色体 DNA 的同源重组, 成为真核及原核生物中基因组编辑工具的强大补充。

谷氨酸棒杆菌是一株生物安全且具有重要工业应用的底盘微生物, 目前被广泛地应用于生产多种大宗化学品^[8]。在之前的研究工作中, 本研究团队已在谷氨酸棒杆菌中开发了一种多元自动化的碱基编辑方法 MACBETH (multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method)^[9], 实现了靶点 C 到 T 的转换。随后, 通过引入不同 Cas9 突变体、截短或延长靶标序列长度、引入腺苷脱氨酶, 实现了对碱基编辑工具靶标范围、编辑窗口和碱基转化种类的拓展^[10]。同时, 通过构建基于绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 蛋白的检测系统, 并结合流式细胞仪分析技术, 对碱基编辑的培养条件、诱导条件和编辑时间等因素进行了优化, 进一步提升了碱基编辑效率^[11]。此外, 黄华媚等在谷氨酸棒杆菌中开发了 BE 结构的胞嘧啶碱基编辑器^[12], Deng 等则在谷氨酸棒杆菌中结合胞嘧啶与腺嘌呤碱基编辑技术, 开发了双功能碱基编辑器^[13]。

在谷氨酸棒杆菌中, 相较于基于双链断裂的 CRISPR/Cas9 基因编辑方法, 本研究团队开发的碱基编辑技术, 融合只有一条链切割活性的 nCas9(D10A) 蛋白与胞嘧啶脱氨酶, 对细胞产生毒性较小, 不依赖同源重组, 利用该优势, 首次实现了谷氨酸棒杆菌 3 个靶基因的同时编辑, 对基因组多位点改造提供了便利^[9]。目前该多位点编辑方法基于多个单引导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 的转录, 每个 sgRNA 的转

录单元需要单独的启动子与终止子, 常规基于同源重组的质粒构建上仍然存在较大困难。例如, 如果均采用相同的启动子与终止子, 会造成重复序列, 质粒连接困难; 如果采用不同的启动子与终止子, 则会造成每个 sgRNA 转录水平不一致; 另外, 该构建方法不具有通用性, 更换靶点困难。基于上述问题, 本研究尝试多种策略, 对谷氨酸棒杆菌中多位点碱基编辑系统进行优化: 首先优化基于单独启动子/终止子多重 sgRNA 表达框的构建方法, 通过构建框架质粒, 并结合 Golden Gate 连接方法, 避免重复序列干扰, 加速靶点更换; 另外, 构建基于 Type II CRISPR crRNA (CRISPR RNA) 阵列、tRNA 加工的多 gRNA 表达框, 这两种形式均只需要一个启动子和一个终止子序列, 简化多重 gRNA 表达框结构。上述研究的开展不仅为谷氨酸棒杆菌多位点编辑调控奠定了方法基础, 而且也为其他原核菌株基因组改造提供了参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

本研究所用菌株与质粒为所在实验室购买和保存, 详见表 1。

1.1.2 酶、引物及相关试剂盒

Q5 High-Fidelity DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、T4 Polynucleotide Kinase 购自 NEB 公司, 2×Taq Master Mix (Dye) 购自康为世纪有限公司, 大肠杆菌感受态细胞制备试剂盒购自 TaKaRa (大连); 各种限制性内切酶购自 Thermo Fisher 公司; 多片段同源重组试剂盒购自南京诺维赞生物科技股份有限公司 (南京); PCR 引物 (表 2) 由擎科生物 (北京) 有限公司合成; 基因合成由金斯瑞 (南京) 生物科技股份有限公司完成; 质粒小量抽提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA

表 1 本文所用质粒与菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Names	Sources
Plasmids	
pTcmob-gRNA- <i>ccdB</i>	Lab stock
pXMJ19-nCas9(D10A)-AID-gRNA- <i>ccdB</i>	Lab stock
pTcmob- <i>upp-rfp</i> -gRNA	Lab stock
pTcmob- <i>upp-rfp-ald</i> -gRNA	Lab stock
pUC57-TR	This study (gene synthesis)
pET28a-CR	This study (gene synthesis)
pUC57-tracrRNA	This study
pTcmob-gRNA- <i>ccdB</i> -Multis	This study
pET28a-CR- <i>ccdB</i>	This study
pXMJ19-nCas9(D10A)-AID-crRNA- <i>ccdB</i>	This study
pXMJ19-nCas9(D10A)-AID-crRNA- <i>ccdB</i> -tracrRNA	This study
pXMJ19- <i>upp-rfp</i> -gRNA(array)	This study
pXMJ19- <i>upp-rfp-ald</i> -gRNA(array)	This study
pTcmob-tRNA-gRNA- <i>ccdB</i> -Multis	This study
pTcmob- <i>upp-rfp</i> -gRNA-tRNA	This study
pTcmob- <i>upp-rfp-ald</i> -gRNA-tRNA	This study
pTcmob- <i>upp-rfp-ald-citB</i> -gRNA	This study
pTcmob- <i>upp-rfp-ald-Cgl0121</i> -gRNA	This study
Strains	
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Lab stock
<i>E. coli</i> DB3.1	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032- <i>rfp</i>	Lab stock

回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, NaCl 10, 酵母粉 5。制备固体培养基时添加 2%的琼脂。

BHI 培养基(g/L): 脑心浸液 37, (NH₄)₂SO₄ 10, K₂HPO₄ 0.2, NaH₂PO₄ 0.3, MgSO₄·7H₂O 0.5, pH 7.2。

MgSO₄·7H₂O 为 50 g/L 的 100×储液, 于使用前稀释加入。

LBHIS 培养基(g/L): 蛋白胨 5, NaCl 10, 酵母粉 2.5, 脑心浸液 18.5, 山梨醇 91.1。

CGXII 培养基(g/L): 具体配方参见文献[11]。

NCM 培养基(g/L): 具体配方参见文献[14]。

0.9%的生理盐水(g/L): NaCl 9, 配置成溶液, 121 °C 灭菌 20 min。

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU): 100 μmol/L, 配成 100×母液。

1.2 方法

1.2.1 框架质粒构建

框架质粒 pTcmob-gRNA-*ccdB*-Multis 的构建: 以实验室保存的质粒 pTcmob-gRNA-*ccdB* 为模板, 引物 Pgmultis1F 与 Pgmultis1R、Pgmultis2F 与 Pgmultis2R, 分别扩增得到其中 2 个载体框架片段; 另外, 用引物 Pgmultis3F 与 Pgmultis3R, 以实验室已获得质粒 pTcmob-*upp-rfp*-gRNA 为模板扩增得到另一个条带大小约为 445 bp (含

表 2 本文使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Sequences (5'→3')	Size (bp)
Pgmultis1F	AACAGGTACAGTGTAATTCAGGTCTCAGTTTATAGAGCTAGAAATA	45
Pgmultis1R	CACGATAAGCTGCACAAATACCTGA	25
Pgmultis2F	TCAGGTATTTGTGCAGCTTATCGTG	25
Pgmultis2R	GCTATTTCTAGCTCTAAAACTTATATTCCCCAGAACATCAGGTTAATG	48
Pgmultis3F	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	25
Pgmultis3R	TGAATTACACTGTACCTGTTGCG	23
WYgold-urF	CCAGGTCTCTTTCAGCAGCCAGGTGTGGACGCATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	59
WYgold-urR	CCAGGTCTCTAAACTCCCGGAAGGTTTCAAATGGTGAATTACACTGTACCTGTTGC	56
WYgold-ura1F	CCAGGTCTCTTTCAGCAGCCAGGTGTGGACGCATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	59
WYgold-ura1R	CCAGGTCTCTGAAGGTTTCAAATGGTGAATTACACTGTACCTGTTGCG	48
WYgold-ura2F	CCAGGTCTCTTCCGGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	44
WYgold-ura2R	CCAGGTCTCTAAACAGCTTGATGTTCTGAACTCGTGAATTACACTGTACCTGTTGCG	57
WYgold-ura3F	CCAGGTCTCTTTCAGAACATCAAGCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	50
WYgold-ura3R	CCAGGTCTCTAAACCGGCACGCATGGCGCGTCGATGAATTACACTGTACCTGTTGC	56
WYgold-ura4F	CCAGGTCTCTTTCAGAACATCAAGCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	50
WYgold-ura4R	CCAGGTCTCTAAACGCTCATTCTAATGAGTTGCTGAATTACACTGTACCTGTTGC	56
ccdB-Bsa I -F	CACAAAACCTGAGACCACGCGTGATCCGG	29
ccdB-Bsa I -R	TGTGCTAATGAGACCTTATATTCCCCAGA	29
TR-F	CCTCGCGAATGCATCTAGATTTTTCTCCACATAAGCTGGCAA	42
TR-R	CGTTTTATTTGATGCCTGGATTACGAAATCATCTGTGGAGC	42
TR-2*rrnB-F	TCCAGGCATCAAATAAAACGAAA	23
TR-2*rrnB-R	CAGTCGACGGGCCCGGATCCGATTCGAAGCCGCACGTCATCTAGC	46
crRNA-F	TATTTCTTAATAACTAAAAATAT	23
crRNA-R	TCACACTACTCTTCTTTGCT	22
addNot I -F	TTGGGTGCACGAGCGGCCGCGTGGGTTACATCGAACTGGATC	42
p11F-cr-R	TTTTTAGTTATTAAGAAATATGAATTACACTGTACCTGTTGC	42
cx180322-2	CTTGGGTGAGCTGCATGCTA	20
addNot I -R	GCGGCCGCTCGTGCACCCAACCTGATCTT	28
2*rrnB-F	GCAAAAGAAGAGTAGTGTGATCCAGGCATCAAATAAAACGAA	42
cx180322-2R	TAGCATGCAGCTCACCCAAG	20
Not I -TR-F	AGTTGGGTGCACGAGCGGCCTTTTCTCCACATAAGCTGGCAAT	43
Not I -TR-R	TCGATGTAACCCACGCGGCCTCGAAGCCGCACGTCATCTAGCG	43
upp-rfp-1-F	AAACTGCGCTGGTTGCAGCCAGGTGTGGACGCATGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAAT	59
upp-rfp-1-R	GACCATTCAAACAGCATAGCTCTAAAACATGCGTCCACACCTGGCTGCAACCAGCGCA	59
upp-rfp-2-F	GGTCCCAAACCTGGCTCTTACCATTGAAACCTTCCGGGAGTT	44
upp-rfp-2-R	CTAAAACCTCCCGGAAGGTTTCAAATGGTGAAGAGCCAGTTTTGG	44
ura-2-F	GGTCCCAAACCTGGCTCTTACCATTGAAACCTTCCGGGAGTTTTAGAGCTATG	55
ura-2-R	ACAGCATAGCTCTAAAACCTCCCGGAAGGTTTCAAATGGTGAAGAGCCAGTTTTGG	55
ura-3-F	CTGTTTTGAATGGTCCCAAACCTGGCTGAACCGAGTTCAGAACATCAAGCTGTT	55
ura-3-R	CTAAAACAGCTTGATGTTCTGAACTCGGTTTCAGCCACGTTTTGGGACCATTCAA	55
tRNAmultis-1F	GGTCTCAGTTTTAGAGCTAGAAATA	25
tRNAmultis-1R	TTATATTCCCCAGAACATCAGGT	23
tRNAmultis-2F	TGATGTTCTGGGGAATATAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	45
tRNAmultis-2R	CTACATCCGCGGACTAGCCTTATTTAACTTGCT	35
tRNAmultis-3F	GGCTAGTCCGGCGGATGTAGCGCAGTTG	28
tRNAmultis-3R	CTAGCTCTAAAACCTGAGACCTTGAGCGGATGACGAGACTC	40
T-ur-1F	CCAGGTCTCTTTCAGCAGCCAGGTGTGGACGCATGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	59
T-ur-1R	CCAGGTCTCTAAACTCCCGGAAGGTTTCAAATGGTTGAGCGGATGACGAGACTCG	55
T-ura-2F	CCAGGTCTCTTGAACCTTCCGGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT	49
T-ura-2R	CCAGGTCTCTAAACAGCTTGATGTTCTGAACTCGTTGAGCGGATGACGAGAC	52

两端 *Bsa* I 酶切位点、gRNA scaffold、*rrnB* 终止子、 P_{11F} 启动子) 的条带; 将上述获得的 3 个片段通过同源重组连接, 具体操作方法见 ClonExpress[®] MultiS One Step Cloning Kit 说明书, 然后转化至 *E. coli* DB3.1 感受态; 最后, 经过菌落 PCR 以及 *Pst* I、*Bam*H I 和 *Nco* I 进行酶切鉴定, 并对质粒进行 Sanger 测序, 获得正确质粒。

框架质粒 pTrcmob-tRNA-gRNA-*ccdB*-Multis 的构建: 将质粒 pTrcmob-gRNA-*ccdB* 作为模板, 用引物 tRNAmultis-1F 和 tRNAmultis-1R 扩增出大小约为 5 811 bp 的载体片段, 用引物 tRNAmultis-2F 和 tRNAmultis-2R 扩增出第一个大小约为 72 bp (含两端同源臂片段、gRNA scaffold) 的插入片段, 然后以谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 基因组为模板, 用引物 tRNAmultis-3F 和 tRNAmultis-3R 扩增出大小约为 106 bp 的第二个插入片段(含两端同源臂片段、tRNA^{Gly}), 最后将载体片段与两个插入片段进行同源重组后并转化, 挑单克隆培养并测序获得正确质粒 pTrcmob-tRNA-gRNA-*ccdB*-Multis。

框架质粒 pXMJ19-nCas9 (D10A)-AID-crRNA-*ccdB*-tracrRNA 的构建: 分别将 crRNA 序列、tracrRNA 序列进行基因合成, 序列参考文献[15]。首先, 利用含合成基因的质粒 pET28a-CR, 通过 *Bsa* I 酶切获得载体片段, 并利用质粒 pXMJ19-nCas9-AID-gRNA-*ccdB*, PCR 扩增得到 *ccdB* 基因, 然后两片段通过 Golden Gate 连接后获得新质粒 pET28a-CR-*ccdB*; 然后, 利用含合成基因的质粒 pUC57-TR, *Xba* I 和 *Bam* H I 酶切后获得 pUC57 载体框架, 同时 PCR 扩增得到大小约为 341 bp 的 tracrRNA 插入片段, 并且利用质粒 pTrcmob-gRNA-*ccdB* 扩增得到 *rrnB* 终止子序列, 之后将 3 个片段同源重组后获得

新质粒 pUC57-tracrRNA; 然后, 利用上述构建的 pET28a-CR-*ccdB* 扩增出大小约为 1 041 bp (crRNA 片段中插入 *ccdB* 基因) 的第一个插入片段, 以质粒 pXMJ19-nCas9-AID-gRNA-*ccdB* 为模板分别扩增出大小约为 3 720 bp、4 501 bp、3 883 bp 的载体框架片段, 然后通过 4 个片段同源重组获得新质粒 pXMJ19-nCas9(D10A)-AID-crRNA-*ccdB*; 最后, 采用 *Not* I 单酶切 pXMJ19-nCas9(D10A)-AID-crRNA-*ccdB* 质粒获得 13 063 bp 大小的载体框架片段, 同时利用 pUC57-tracrRNA 质粒扩增出 650 bp 的插入片段(含 P_{11F} 启动子、tracrRNA、*rrnB* 终止子以及片段两端同源臂序列), 再经过同源重组的方法即获得最终的质粒 pXMJ19-nCas9(D10A)-AID-crRNA-*ccdB*-tracrRNA。

1.2.2 Golden Gate 连接构建多基因编辑质粒

质粒 pTrcmob-*upp-rfp*-gRNA 的 Golden Gate 构建: 以质粒 pTrcmob-gRNA-*ccdB*-Multis 为模板, 以 WYgold-urF 和 WYgold-urR 为引物扩增得到片段大小约为 513 bp(含两端 *Bsa* I 酶切位点、*upp* 基因 20 bp 的靶标序列、gRNA scaffold、*rrnB* 终止子、 P_{11F} 启动子、*rfp* 基因 20 bp 的靶标序列)的片段; 将该片段与 pTrcmob-gRNA-*ccdB*-Multis 质粒通过 Golden Gate 方法进行连接, 构建得到该质粒, 最后经过菌落 PCR 以及测序验证得到该质粒。具体 Golden Gate 方法可参见文献[9]。质粒 pTrcmob-*upp-rfp-ald*-gRNA、pTrcmob-*upp-rfp-ald-citB*-gRNA 与 pTrcmob-*upp-rfp-ald-Cgl0121*-gRNA 的构建方法与上述类似。

质粒 pXMJ19-*upp-rfp*-gRNA(array) 的构建: 先将引物 *upp-rfp*-1-F 和 *upp-rfp*-1-R, *upp-rfp*-2-F 和 *upp-rfp*-2-R 分别采用 NEB 公司的 T4 Polynucleotide Kinase 进行引物退火与磷酸化反应, 然后将 2 个磷酸化退火后的片段和质粒 pXMJ19-nCas9(D10A)-AID-crRNA-*ccdB*-

tracrRNA 一起进行 Golden Gate, 最后经过转化至 *E. coli* DH5 α , 菌落 PCR 以及测序获得目的质粒 pXMJ19-*upp-rfp-gRNA* (array)。质粒 pXMJ19-*upp-rfp-ald-gRNA* (array) 的构建与上述类似。

质粒 pTrcmob-*upp-rfp-gRNA-tRNA* 的构建:以 T-ur-1F 和 T-ur-1R 为引物,以质粒 pTrcmob-tRNA-gRNA-*ccdB*-Multis 为模板扩增出约 166 bp 的插入片段 (含两端 *Bsa* I 酶切位点、*upp* 基因 20 bp 的靶标序列、gRNA scaffold、tRNA^{Gly}、*rfp* 基因 20 bp 的靶标序列),然后将质粒 pTrcmob-tRNA-gRNA-*ccdB*-Multis 和插入片段用 Golden Gate 方法进行连接,通过菌落 PCR 以及测序得到正确的目的质粒 pTrcmob-*upp-rfp-gRNA-tRNA*。质粒 pTrcmob-*upp-rfp-ald-gRNA-tRNA* 的构建与上述类似。

1.2.3 谷氨酸棒杆菌的转化

1) 感受态制备:首先将-80 °C 保存的谷氨酸棒杆菌取出后,取少量菌液于固体培养基 LBHIS 上进行划线培养,然后再挑取适量菌转接至 BHI 液体培养基中,30 °C、220 r/min 过夜培养。将过夜培养的菌液以初始 OD_{600} 为 0.3 转接到含异烟肼、Tween 80、DL-苏氨酸、甘氨酸的 NCM 培养基中,30 °C 摇床培养。当 OD_{600} 在 0.8-1 时,制备感受态细胞,具体方法参见文献[14]。

2) 质粒转化:取 1 μ g 左右的不同多位点碱基编辑质粒分别添加至 80 μ L 感受态细胞中,混匀后转移至 1 mm 电击杯中,1.8 kV 电转后立即加入至含 1 mL BHI 培养基 (46 °C 预热) 的 1.5 mL EP 管中,并转移至金属浴锅 46 °C 温浴 6 min。最后,摇床 30 °C 培养 1-2 h 后,取适量涂布于含相应抗性的 LBHIS 固体培养基平板上,30 °C 静置培养 2-3 d,直至长出单菌落。

1.2.4 谷氨酸棒杆菌的培养及多位点碱基编辑

1) 种子培养:挑取生长良好的单菌落接种

于每孔装有 0.6 mL LBHIS 液体培养基及相应抗生素的 96 孔深孔板中,30 °C、800 r/min 培养 24 h。

2) 诱导培养:将种子培养液按初始 OD_{600} 为 0.2-0.3 的接种量转接至新的每孔装有 0.6 mL 的 LBHIS 液体培养基 (含相应抗生素及终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG) 的 96 孔深孔板中。然后,30 °C 高通量摇床 800 r/min 培养 24 h。

本文所有多位点编辑实验均按上述步骤操作,没有进行后续传代。

1.2.5 编辑比例分析与克隆挑选

分别取 200 μ L 左右上述诱导培养结束的菌液,4 000 r/min 离心 1 min,去除上清液后用 1 mL 左右 0.9% 的生理盐水清洗两遍,去除残留的 IPTG。再用 0.9% 的生理盐水稀释 10^5 - 10^6 倍后涂布于相应抗性的 BHI 固体培养基平板上,30 °C 培养箱静置培养 1-2 d,直至长出大小合适的单菌落。最后,分别将上述 BHI 固体培养基中的菌随机挑选 24 个单克隆接种于含对应抗性的 LBHIS 液体培养基中,800 r/min 培养 16 h。每种编辑系统均设置 3 个平行实验。

利用上述得到的单克隆菌液,分别验证多基因编辑中各个基因的失活效率。

upp 基因:将各个单克隆分别在添加/不添加 5-氟尿嘧啶的 CGXII 固体培养基上划线,*upp* 基因失活后才能在添加 5-氟尿嘧啶的 CGXII 固体培养基平板上生长,以此快速衡量 *upp* 基因失活效率。

rfp 基因:使用酶标仪,以野生菌 *C. glutamicum* ATCC 13032 为阴性对照,*C. glutamicum* ATCC 13032-*rfp* 为阳性对照,通过比较荧光值的大小即可快速验证 *rfp* 基因失活效率 (激发波长为 560 nm,发射波长为 607 nm)。

其他基因的失活均通过菌落 PCR、Sanger 测序分析得到。

2 结果与分析

2.1 优化基于单独启动子/终止子的多重 sgRNA 表达框

基于单独启动子/终止子的多重 sgRNA 表达框结构烦琐,传统的构建方法需要将启动子、sgRNA scaffold、终止子等元件单独 PCR,然后再通过同源重组等方法进行组装,该方法容易受重复序列影响,难以构建成功,并且更换靶点时需要再重复以上过程。针对上述问题,首先,本研究通过构建双功能的框架质粒,再结合 Golden Gate 方法,简化该形式的质粒构建,加速靶点的替换。

2.1.1 基于单独启动子/终止形式的框架质粒构建及 Golden Gate 连接

基于单独启动子/终止形式的框架质粒结构如图 1 所示,一方面,质粒上包含 *Bsa* I 限制性内

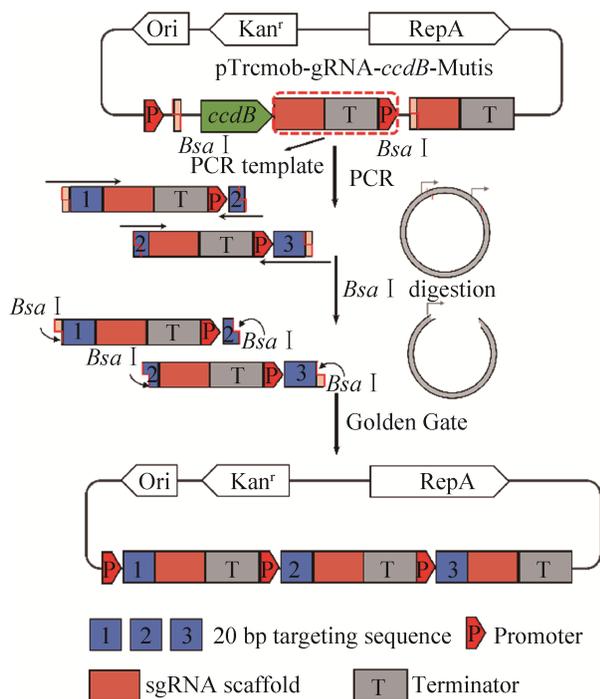


图 1 基于单独启动子/终止子形式的框架质粒构建及 Golden Gate 连接

Figure 1 The template plasmid construction based on individual promoters/terminators and Golden Gate assembly.

切酶识别位点及 *ccdB* 致死基因,用于 Golden Gate 连接及阳性克隆筛选;另一方面,质粒上包含模板序列(含 sgRNA scaffold、*rrnB* 终止子、 P_{11F} 启动子),该部分用于引入不同 20 bp 靶标序列时的 PCR 扩增。在对模板序列扩增时,引物中除了包含与模板序列的结合部分,同时在 5'端还依次包含 *Bsa* I 识别序列、要引入的 20 bp 靶标序列。将 PCR 获得的片段与框架质粒再通过 Golden Gate 连接,框架质粒与插入片段会相应地形成匹配的黏性末端,连接后得到目标质粒。

2.1.2 基因组上多基因编辑测试

利用上述框架质粒,分别构建靶向失活 *upp*、*rfp* 双基因的质粒,及 *upp*、*rfp*、*ald* 三基因失活的质粒(上述 2 个质粒与之前已报道的 2 个质粒序列^[9]一致,只是构建方法得到优化),所用 sgRNA 靶标序列如表 3 所示,通过表达 nCas9-AID 融合蛋白,使编辑框内靶标 C 转换为 T,提前形成终止密码子,失活目的基因。相比于已报道的培养条件,本研究将培养基更换为营养更为丰富的 LBHIS 培养基,经过编辑后,实现了两基因和三基因的同时失活,并提高了效率,两基因失活的效率高达 $(93.05 \pm 4.81)\%$ (图 2A);三基因同时失活的效率为 $(69.40 \pm 10.49)\%$ (图 2B),推测效率提高较高的原因可能为丰富培养基成分更利于细胞生长、nCas9-AID 蛋白的表达或编辑过程中形成单链切口的修复等。由于三基因同时失活的效率仍然较高,本研究尝试对 4 个基因同时编辑,分别选用 *citB* 及 *Cgl10121* 基因作为第 4 个靶点。补充 *citB* 后,四基因同时失活的效率为 $(50.00 \pm 11.02)\%$ 。而补充 *Cgl10121* 基因后,四基因同时失活的效率仅为 $(16.67 \pm 11.03)\%$,此处失活效率下降主要为 *Cgl10121* 基因靶标 C 位点部分被编辑为 G 或 A,这部分编辑未被统计到失活效率中,经统计, *Cgl10121* 基因总编辑效率为 100%。由图 2C-2D 可以看出,增加第 4 个基因后,对 *upp*、*rfp*、

ald 三基因的失活效率影响并不大, 造成上述两种情况差异较大的原因, 主要为 *citB* 及 *Cgl0121*

基因单独失活效率差异较大, 由此推断, 不同基因的单独编辑效率对多基因编辑效率影响较大。

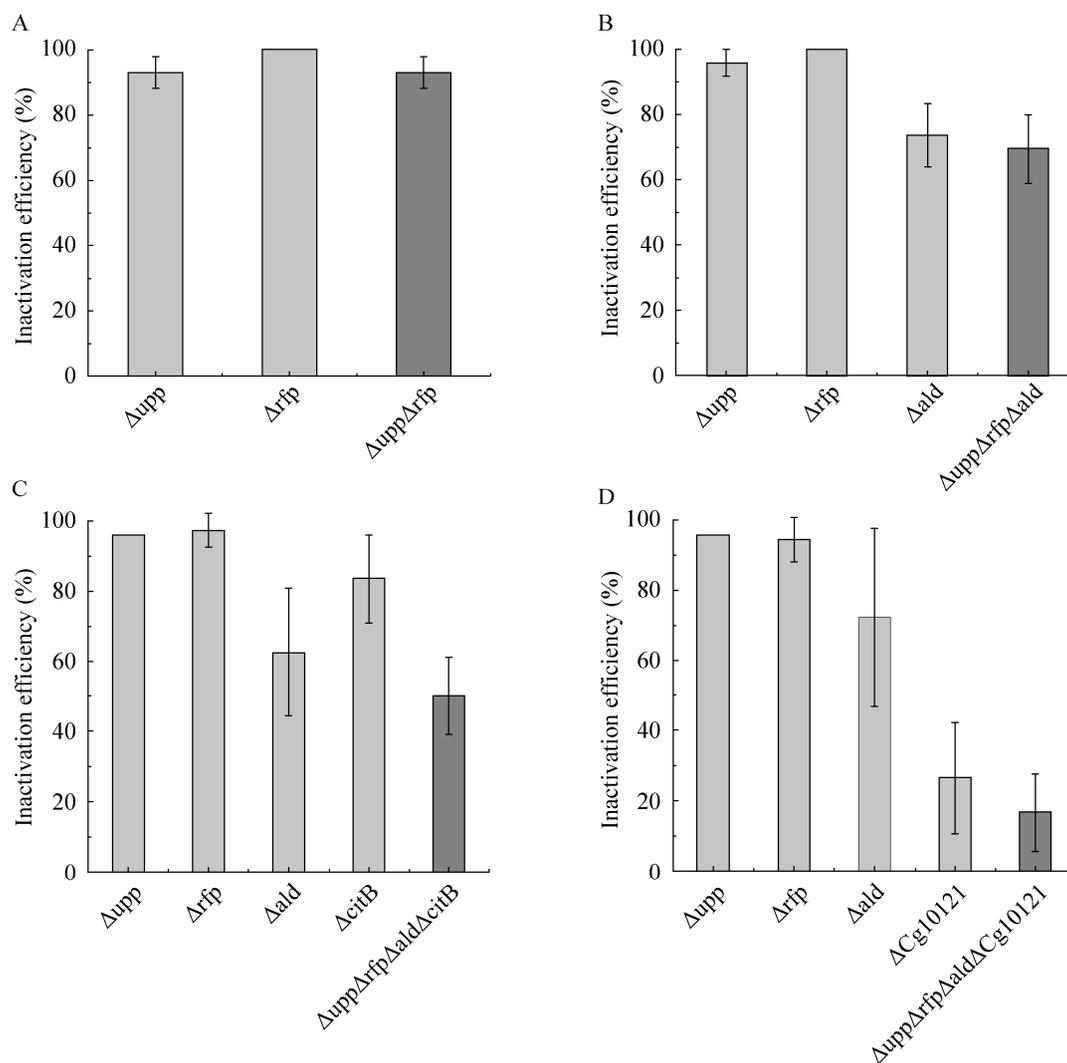


图 2 基于单独启动子/终止子形式的多基因失活效率

Figure 2 Multiplex-gene inactivation efficiency based on individual promoters/terminators. (A) Double-gene. (B) Triple-gene. (C, D) Quadruple-gene.

表 3 本文所编辑的基因及靶点

Table 3 Genes and 20 bp targeting sequence used in this study

Genes	20 bp targeting sequences	PAM	Type of early stop codons
<i>upp</i>	<u>GC</u> AGCCAGGTGTGGACGCAT	TGG	TAG
<i>rfp</i>	<u>CC</u> ATTGAAACCTTCCGGA	AGG	TAA/TAG
<i>ald</i>	<u>CG</u> AGTTCAGAACATCAAGCT	GGG	TGA
<i>citB</i>	<u>T</u> CGACGCGCCATGCGTGCCG	GGG	TGA
<i>Cgl0121</i>	<u>G</u> CAACTCATTAGAAATGAGC	TGG	TAA

Note: the underlined Cs in 20 bp targeting sequence indicate the target editing sites.

2.2 建立基于 Type II CRISPR crRNA 阵列的多重 gRNA 表达框

上述优化能够有效地简化质粒的构建过程, 但并没有优化多重 gRNA 烦琐的结构。建立基于 Type II CRISPR crRNA 阵列的多重 gRNA 表达框能有效解决该问题。在 CRISPR/Cas9 系统中, crRNA 阵列由一系列高度保守的约为 36 bp 的同向重复序列 (direct repeat) 与序列特异的约为 30 bp 间隔序列 (spacer) 串联交替组成。在 crRNA 成熟过程中, crRNA 阵列会转录形成前体 CRISPR RNA (precursor crRNA, pre-crRNA), 同时转录出与 pre-crRNA 中重复序列互补配对的反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA), pre-crRNA 与 tracrRNA 的互补配对能够触发体内核酸酶 RNase III 的切割机制, 产生一系列定位不同靶点的双引导 RNA^[16]。目前所用的 sgRNA 即通过融合 crRNA 的 3'端与 tracrRNA 的 5'端得到的序列。由于 crRNA 阵列中同向重复序列与间隔序列长度均较短, 将该策略应用于多位点编辑时, 将省去靶标序列的 PCR 过程, 既简化了质粒构建过程, 又节省了成本。目前该策略在大肠杆菌、酿酒酵母等中已有应用^[17-18], 在谷氨酸棒杆菌中为首次研究。

2.2.1 框架质粒构建及 Golden Gate 连接

首先, 对已报道的 crRNA 阵列及 tracrRNA 序列进行合成, 分别用组成型启动子 P_{11F} 启动子及 rrnB 终止子表达 2 个元件。为方便不同间隔序列的快速插入, 在 crRNA 阵列中插入 *Bsa* I 识别序列及 *ccdB* 致死基因, 方便后续 Golden Gate 构建 (图 3)。对于不同间隔序列和重复序列的插入, 只需要通过合成约 50 bp 长度的引物, 在引物两端引入相互匹配的黏性末端, 通过引物磷酸化、退火结合形成双链, 再与框架质粒进行 Golden Gate 连接, 得到目标质粒。该

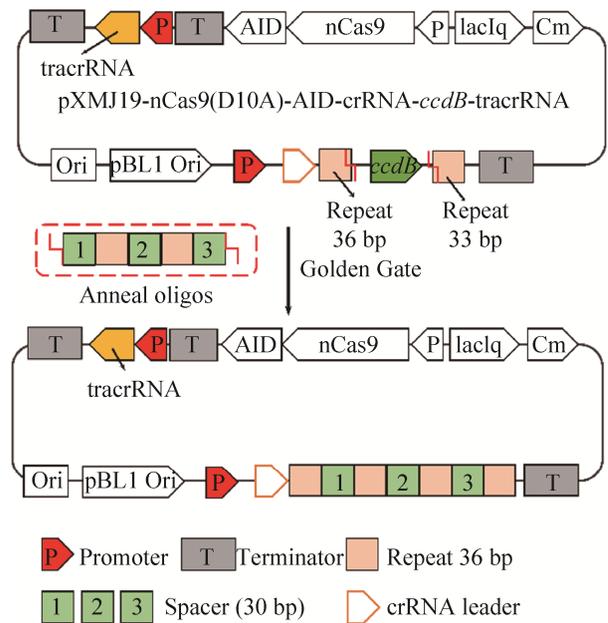


图 3 基于 Type II CRISPR crRNA 阵列的框架质粒构建及 Golden Gate 连接

Figure 3 The template plasmid construction based on Type II CRISPR crRNA array and Golden Gate assembly.

方法省去了靶标序列的 PCR 过程, 极大地简化了质粒的构建。对于 RNase III, 则采用谷氨酸棒杆菌的内源基因 (*Cgl2074*) 表达。

2.2.2 两基因及三基因编辑

应用上述框架质粒, 分别构建靶向失活 *upp*、*rfp* 双基因的质粒, 及 *upp*、*rfp*、*ald* 三基因失活的质粒, 转化到谷氨酸棒杆菌中进行碱基编辑。如图 4 所示, 该策略可实现每个基因的单独失活及 2 个基因的同时失活, 但相比于单独启动子/终止子 sgRNA 表达框的形式, 失活效率下降明显, 两基因同时失活效率仅为 (23.20±9.20)%, 三基因同时失活效率仅为 (2.80±2.42)%。我们猜测以下两方面都可能对编辑效率产生明显影响: 首先, pre-crRNA 中的重复序列与 tracrRNA 结合形成发卡结构是 crRNA 成熟过程中的重要环节, 最新的研究表明, 如果重复序列位于 pre-crRNA 二级结构的

复杂结构区, 将影响 crRNA 的形成^[18]。本研究对靶向两基因和三基因的 pre-crRNA 通过 NUPACK 软件 (www.nupack.org) 进行二级结构预测 (图 5), 发现重复序列均位于复杂结构区, 尤其是三基因序列, 因此推测, 该方面原因可能是导致编辑效率下降的原因。另外, RNase III 对 pre-crRNA 与 tracrRNA 复合体的切割也是 crRNA 成熟过程中的重要一步, 本研究尝试过表达谷氨酸棒杆菌内源 RNase III 来提高编辑效率, 但并没有效果 (数据未展示)。

2.3 建立基于 tRNA 加工的多重 sgRNA 表达框

建立基于 Type II CRISPR crRNA 阵列的多重 gRNA 表达框能够有效地简化质粒构建, 但编辑效率下降明显, 本部分尝试建立基于 tRNA 加工的多重 sgRNA 表达框, 进一步优化多重 gRNA 结构。该策略将菌体中内源性的 tRNA 加工系统与多个 sgRNA 结构相结合, 采用一个启动子和终止子, 转录形成一条 RNA 序列, 在含不同靶点的 sgRNA 之间插入 tRNA 序

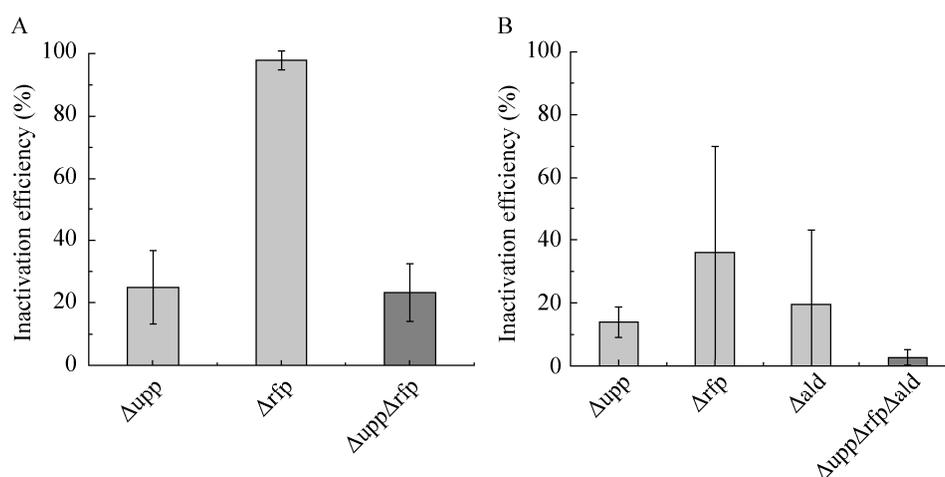


图 4 基于 Type II CRISPR crRNA 阵列形式两基因与三基因失活效率

Figure 4 Double-gene (A) and triple-gene (B) inactivation efficiency based on Type II CRISPR crRNA array.

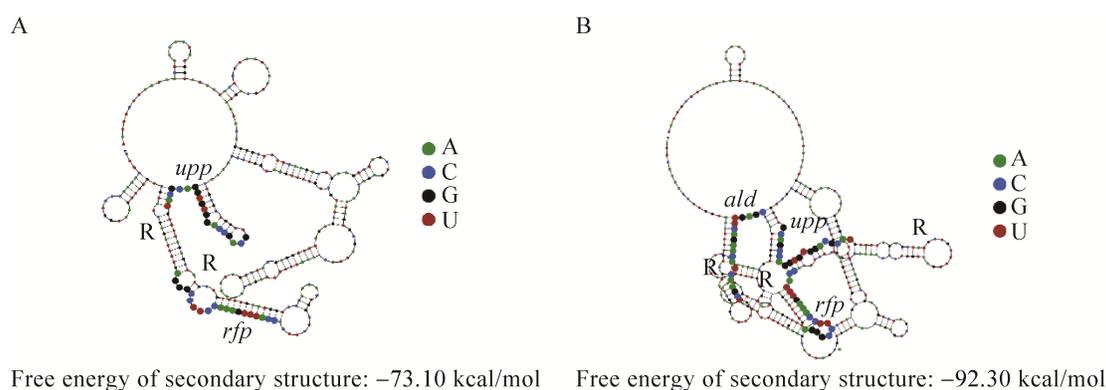


图 5 pre-crRNA 二级结构预测

Figure 5 Predicted secondary structure of pre-crRNA. (A) Double-gene. (B) Triple-gene. R presents the direct repeat sequence. The 20 bp targeting sequences are highlighted in bold.

列，内源性的 RNase 会特异性地识别 tRNA 序列，并进行切割，从而释放不同的 sgRNA。该方法不需要引入外源蛋白，同时 tRNA 序列较小 (约 70 bp)，不仅可以简化质粒结构，同时能实现质粒的快速高效构建。目前该策略已在酿酒酵母、水稻、果蝇等真核生物中应用^[19-21]，据笔者所知，在谷氨酸棒杆菌中为首次研究。

2.3.1 基于 tRNA 加工形式的框架质粒构建及 Golden Gate 连接

在质粒构建时，选用 P_{11F} 启动子与 *rrnB* 终止子，实现 RNA 序列的转录，tRNA 则选用常用且序列较短 (76 bp) 的内源 tRNA^{Gly}。该质粒不仅包含用于 Golden Gate 连接的元件 (*ccdB* 基因、*Bsa* I 酶切位点)，同时也包含 PCR 扩增靶点序列时的模板序列 (sgRNA scaffold、tRNA^{Gly} 序列)，如图 6 所示。通过设计引物，

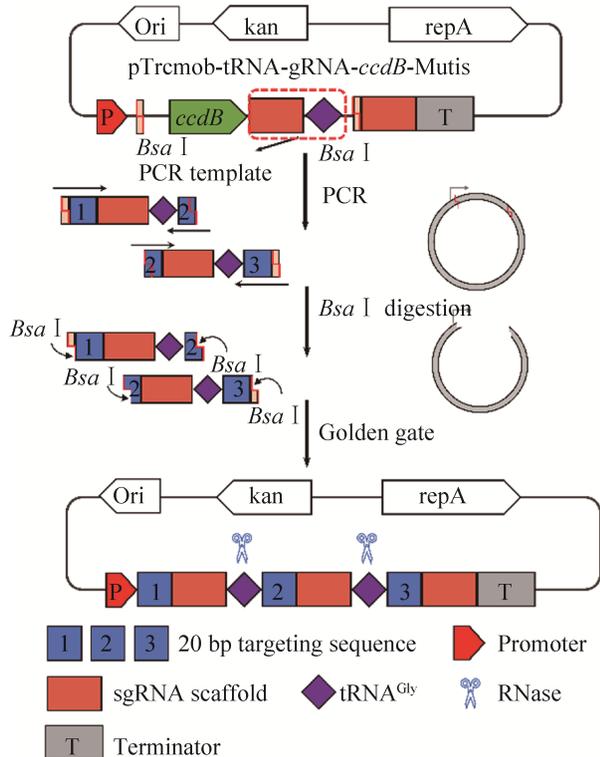


图 6 基于 tRNA 加工形式的框架质粒构建及 Golden Gate 连接

Figure 6 The template plasmid construction based on tRNA processing and Golden Gate assembly.

在对模板序列扩增时引入 20 bp 的靶标序列及 *Bsa* I 识别序列，再与框架质粒进行 Golden Gate 连接，得到目标质粒。

2.3.2 两基因及三基因编辑

应用该策略，分别构建靶向失活 *upp*、*rfp* 双基因的质粒，及 *upp*、*rfp*、*ald* 三基因失活的质粒，然后转化至谷氨酸棒杆菌中进行碱基编辑。如图 7 所示，该策略可实现两基因和三基因的同时失活，相比于单独启动子/终止子 sgRNA 表达框的形式，两基因的失活效率相近，高达 (91.67±4.15)%，三基因同时失活的效率则有所下降，为 (33.33±7.22)%。后续将深入研究谷氨酸

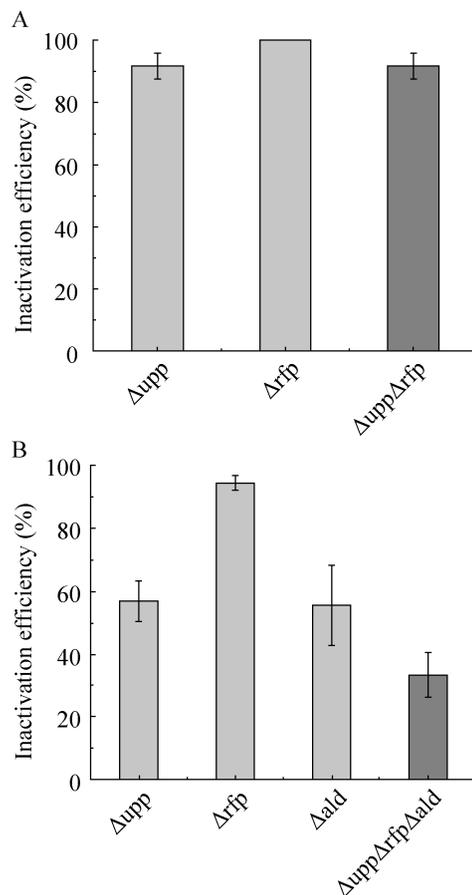


图 7 基于 tRNA 加工形式的两基因与三基因失活效率

Figure 7 Double-gene (A) and triple-gene (B) inactivation efficiency based on tRNA processing.

棒杆菌中 tRNA^{Gly} 的成熟机制, 结合 cRT-PCR (circularized reverse transcription PCR)^[21] 及测序技术, 明确 tRNA^{Gly} 序列的切割位点, 评估单个 sgRNA 的释放水平, 或尝试其他种类 tRNA 序列, 进一步提高编辑效率。

3 讨论

由于谷氨酸棒杆菌具有重要的工业应用价值, 针对该菌株的遗传改造技术也日新月异, 从传统的自杀质粒介导的同源重组、Cre/loxP 介导的位点特异性重组、RecT 介导的单链重组等编辑技术, 到现阶段强大的 CRISPR 技术, 这些均在该菌株中得到开发并推动了菌株的基础与应用研究。目前, CRISPR 技术在谷氨酸棒杆菌中的应用主要分为 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi)、基因敲除与插入、碱基编辑等方面^[22-23]。基于双链断裂的 CRISPR 技术由于对菌体产生的毒性较大, 在多位点编辑方面较困难, 目前仅有报道通过结合 CRISPR/Cas9 与单链 DNA 重组技术, 实现了双基因的同时编辑, 效率为 40%, 但是, 双基因编辑显著降低了获得的克隆数 (约 10 个), 未能获得更多位点的编辑^[24]。相比于基于双链断裂的 CRISPR 技术, 碱基编辑方法不产生双链断裂、不依赖染色体 DNA 同源重组、结构简单、操作方便, 并且解决了传统 CRISPR 技术难以实现多于 2 个靶点同时编辑的问题。

针对多位点编辑技术, 多种多重 gRNA 的表达策略已被开发^[25], 主要分为以下 3 类: 第一类为每个 sgRNA 转录单元都需要单独启动子/终止子, 目前绝大多数微生物中多位点碱基编辑方法均采用该形式。Banno 等应用该形式已实现大肠杆菌内 6 个基因同时编辑 (碱基编辑), 效率高达 87.5%^[26]; Zhong 等在阿维链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 中实现 5 个基因

(效率为 60%) 和 9 个基因 (效率未显示) 的同时编辑 (碱基编辑)^[27]; Yu 等则在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中实现 3-4 个基因同时编辑 (碱基编辑), 效率分别为 100% 和 50%^[28]。由此可见, 该方法在多位点编辑中效率较高, 应用较广, 但结构较大, 存在重复序列, 质粒不稳定; 第二类基于原始 CRISPR/Cas 系统中的 crRNA 阵列, 通过一个启动子和一个终止子, 实现对多个间隔序列及重复序列的转录, 其中 Cas12a 及 Cas13a 可以自行加工 crRNA 阵列, 释放单个成熟的 gRNA, 而 Cas9 则需要 tracrRNA 及 RNase III 的参与。Li 等在谷氨酸棒杆菌中应用 CRISPR/dCas12a 及 crRNA 阵列实现对 4 个赖氨酸合成途径基因的同时抑制 (CRISPRi), 4 个基因抑制效率均高于 90%^[29]; Bao 等在酿酒酵母中应用 CRISPR/Cas9 及 crRNA 阵列实现对 3 个基因的同时编辑 (disruption), 效率高达 100%^[30]。而 crRNA 阵列在多位点碱基编辑方面, 尚未有该方面的报道。该方法结构简单, 方便快速构建, 但在本文的应用中, 效率较低, 后续需要进一步优化; 第三类为多个 sgRNA 结构由一个启动子和一个终止子转录, 在每个 sgRNA 结构之间加入 RNA 切割位点, 该切割方式可以基于内源的核糖酶、tRNA 加工及外源的 Csy4 蛋白。Tong 等在天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor* 中应用 CRISPR-BEST 及基于 Csy4 蛋白的多重 sgRNA, 实现了 3 个基因的同时编辑 (碱基编辑), 效率为 33.3%^[31]; Zhang 等在酿酒酵母中应用 CRISPR/Cas9 及基于 tRNA 加工系统的多重 sgRNA, 实现了对 8 个基因的同时编辑 (disruption), 效率高达 87%^[21]。与其他两种方法相比, 本研究选用的 tRNA 加工系统具有不需要引入可能对菌体有毒的外源蛋白、序列较短 (约 70 bp)、在多位点编辑中更稳定的优势^[32]。并且, 在真核生物的应用中, tRNA 序列可被内源性的 RNase P 及 RNase Z 特异性地识别, 切割位点较明

确, 释放的单个 sgRNA 只在 3'端有 1-4 个碱基的残留, 对 sgRNA 结构影响小, tRNA 也可以增加 Pol II/Pol III 启动子的转录效率^[20]。而在原核生物中, tRNA 成熟机制研究相对较少, 涉及的内源性的酶等略有不同^[33]。后续将深化研究谷氨酸棒杆菌中的 tRNA 成熟及切割机制, 为进一步提高效率提供参考。

本研究对谷氨酸棒杆菌中多位点碱基编辑系统进行了优化, 对不同的多重 gRNA 表达策略进行构建并比较(表 4)。首先, 优化基于单独启动子/终止子的多重 sgRNA 表达框, 通过构建框架质粒, 并结合 Golden Gate 连接方法, 避免了重复序列的干扰, 加速质粒构建及靶点更换, 该形式编辑效率最高, 但并没有简化多重 sgRNA 的烦琐结构; 其次, 建立基于 Type II CRISPR crRNA 阵列的多重 gRNA 表达框, 该策略能有效简化多重 gRNA 表达框, 简化质粒的构建过程, 降低成本, 但两基因及三基因同时编辑效率下降明显; 最后, 建立基于 tRNA

加工的多重 sgRNA 表达框, 该策略简化了多重 sgRNA 的结构, 方便质粒构建, 并且, 相比于单独启动子/终止子的多重 sgRNA 表达形式, 该策略两基因编辑效率相差不大, 三基因编辑效率有所下降, 后续将深化研究谷氨酸棒杆菌中 tRNA 加工过程, 评估释放的单个 sgRNA 水平, 进一步对该方法进行优化。基于不同策略构建工作量及多位点编辑效率的综合考虑, 谷氨酸棒杆菌中两位点同时编辑可以优先选择基于 tRNA 加工的多重 sgRNA 表达框, 而更多位点的编辑可以优先选择优化后的基于单独启动子/终止子的多重 sgRNA 表达框构建形式。上述建议主要基于本文的研究结果, 由于不同位点编辑效率的差异以及技术的不断革新, 实验者需要依据自己的实验目的进行选择。综上所述, 本研究对谷氨酸棒杆菌中基于 CRISPR/Cas9 的多位点碱基编辑系统的优化, 丰富了该菌株的遗传改造方法, 为代谢工程和合成生物学研究提供技术支持。

表 4 本文所用多重 gRNA 表达策略的比较

Table 4 Comparison of multiple gRNA expression cassettes based on different methods

Methods of gRNA processing	Targeting genes	Inactivation efficiency (one passage)	Construction methods/efficiency
sgRNA cassettes with individual promoters/terminators (previous study ^[9])	<i>upp, rfp</i>	(41.70±6.90)%	Homologous recombination/low
	<i>upp, rfp, ald</i>	16.67%	Homologous recombination/low
sgRNA cassettes with individual promoters/terminators (this study)	<i>upp, rfp</i>	(93.05±4.81)%	Golden Gate/high
	<i>upp, rfp, ald</i>	(69.40±10.49)%	Golden Gate/high
	<i>upp, rfp, ald, citB</i>	(50.00±11.02)%	Golden Gate/high
	<i>upp, rfp, ald, Cgl0121</i>	(16.67±11.03)%	Golden Gate/high
gRNA cassettes based on Type II CRISPR crRNA arrays	<i>upp, rfp</i>	(23.20±9.20)%	Golden Gate/high
	<i>upp, rfp, ald</i>	(2.80±2.42)%	Golden Gate/high
sgRNA cassettes based on tRNA processing	<i>upp, rfp</i>	(91.67±4.15)%	Golden Gate/high
	<i>upp, rfp, ald</i>	(33.33±7.22)%	Golden Gate/high

REFERENCES

[1] Wang Y, Liu Y, Zheng P, et al. Microbial base editing: a powerful emerging technology for microbial genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2021, 39(2): 165-180.

[2] 曹中正, 张心怡, 徐艺源, 等. 基因组编辑技术及其在合成生物学中的应用. *合成生物学*, 2020, 1(4): 413-426.

Cao ZZ, Zhang XY, Xu YY, et al. Genome editing technology and its applications in synthetic biology.

- Syn Bio J, 2020, 1(4): 413-426 (in Chinese).
- [3] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [4] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729.
- [5] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [6] Kurt IC, Zhou RH, Iyer S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 41-46.
- [7] Zhao DD, Li J, Li SW, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(1): 35-40.
- [8] Zhao NN, Qian L, Luo GJ, et al. Synthetic biology approaches to access renewable carbon source utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(22): 9517-9529.
- [9] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metab Eng*, 2018, 47: 200-210.
- [10] Wang Y, Liu Y, Li JW, et al. Expanding targeting scope, editing window, and base transition capability of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(11): 3016-3029.
- [11] 李俊维, 刘叶, 王钰, 等. 谷氨酸棒杆菌碱基编辑的条件优化. *生物工程学报*, 2020, 36(1): 143-151.
Li JW, Liu Y, Wang Y, et al. Optimization of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Chin J Biotech*, 2020, 36(1): 143-151 (in Chinese).
- [12] 黄华媚, 白立宽, 刘叶, 等. BE3 型胞嘧啶碱基编辑器在谷氨酸棒杆菌中的开发及应用. *生物技术通报*, 2020, 36(3): 95-101.
Huang HM, Bai LK, Liu Y, et al. Development and application of BE3 cytidine base editor in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Bull*, 2020, 36(3): 95-101 (in Chinese).
- [13] Deng C, Lv XQ, Li JH, et al. Development of a DNA double-strand break-free base editing tool in *Corynebacterium glutamicum* for genome editing and metabolic engineering. *Metab Eng Commun*, 2020, 11: e00135.
- [14] Ruan YL, Zhu LJ, Li Q. Improving the electro-transformation efficiency of *Corynebacterium glutamicum* by weakening its cell wall and increasing the cytoplasmic membrane fluidity. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(12): 2445-2452.
- [15] Jiang WY, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233-239.
- [16] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607.
- [17] Cress BF, Toparlak ÖD, Guleria S, et al. CRISPathBrick: modular combinatorial assembly of type II-A CRISPR arrays for dCas9-mediated multiplex transcriptional repression in *E. coli*. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(9): 987-1000.
- [18] Liao CY, Ttofali F, Slotkowski RA, et al. Modular one-pot assembly of CRISPR arrays enables library generation and reveals factors influencing crRNA biogenesis. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2948.
- [19] Port F, Bullock SL. Augmenting CRISPR applications in *Drosophila* with tRNA-flanked sgRNAs. *Nat Methods*, 2016, 13(10): 852-854.
- [20] Xie KB, Minkenberg B, Yang YN. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *PNAS*, 2015, 112(11): 3570-3575.
- [21] Zhang YP, Wang J, Wang ZB, et al. A gRNA-tRNA array for CRISPR-Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1053.
- [22] 王钰, 郑平, 孙际宾. 谷氨酸棒杆菌的代谢工程使能技术研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1-16.
Wang Y, Zheng P, Sun JB. Recent advances in developing enabling technologies for *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering. *Chin J Biotech*, 2021, 37(5): 1-16 (in Chinese).
- [23] 杨娟娟, 马晓雨, 王晓蕊, 等. 谷氨酸棒杆菌基因编辑的研究进展. *生物工程学报*, 2020, 36(5): 820-828.
Yang JJ, Ma XY, Wang XR, et al. Advances in gene editing of *Corynebacterium glutamate*. *Chin J Biotech*, 2020, 36(5): 820-828 (in Chinese).
- [24] Liu J, Wang Y, Lu YJ, et al. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2017,

- 16(1): 205.
- [25] McCarty NS, Graham AE, Studená L, et al. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1281.
- [26] Banno S, Nishida K, Arazoe T, et al. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol*, 2018, 3(4): 423-429.
- [27] Zhong ZY, Guo JH, Deng L et al. Base editing in *Streptomyces* with Cas9-deaminase fusions. *BioRxiv*, 2019, 630137. DOI: 10.1101/630137.
- [28] Yu SL, Price MA, Wang Y, et al. CRISPR-dCas9 mediated cytosine deaminase base editing in *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(7): 1781-1789.
- [29] Li MY, Chen JZ, Wang Y, et al. Efficient multiplex gene repression by CRISPR-dCpf1 in *Corynebacterium glutamicum*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 357.
- [30] Bao ZH, Xiao H, Ligng J, et al. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(5): 585-594.
- [31] Tong YJ, Whitford CM, Robertsen HL, et al. Highly efficient DSB-free base editing for *streptomyces* with CRISPR-BEST. *PNAS*, 2019, 116(41): 20366-20375.
- [32] Minkenberg B, Wheatley M, Yang YN. CRISPR/Cas9-enabled multiplex genome editing and its application. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 149: 111-132.
- [33] Li ZW, Deutscher MP. RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA*, 2002, 8(1): 97-109.

(本文责编 陈宏宇)