

II 型 CRISPR 系统在微生物中的应用

田艾迪, 刘 瑛, 陈叶平, 史海粟, 岳喜庆, 武俊瑞, 洛 雪*
(沈阳农业大学食品学院 沈阳 110866)

摘要 CRISPR 系统是一种新兴的基因编辑技术,是存在于部分细菌中的一种免疫反应系统,利用 *Cas* 基因编码的蛋白对进入细胞中的外源 DNA 进行高效识别并切割,保护细菌自身免受外源基因侵害。CRISPR 系统主要应用于基因的定点敲入和敲除。该系统具有操作简便,适用范围广等优点,已在各类微生物和动植物中广泛应用。在 CRISPR 系统中,II 型 CRISPR 系统是应用最为广泛的系统,是目前的研究热点。它包含 CRISPR/Cas9、CRISPRa 和 CRISPRi 系统,由于 CRISPRa 系统目前应用较少,本文对 CRISPR/Cas9 和 CRISPRi 系统在微生物中的应用研究现状进行综述,并对两种系统未来的发展进行展望。

关键词 CRISPR 系统; 大肠杆菌; 乳酸菌; 芽孢杆菌; 酵母菌

文章编号 1009-7848(2022)12-0345-15 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.12.034

CRISPR/Cas 系统是由成簇的,具有规律间隔的短回文重复序列以及多种 CRISPR 相关基因构成的一种细菌的免疫系统。约 40% 细菌和 90% 古细菌中都存在 CRISPR/Cas 系统^[1]。CRISPR/Cas 系统包含重复间隔单元和多种 *Cas* 基因,细胞通过识别 *Cas* 基因编码的蛋白进行免疫反应,对进入细胞的外源 DNA 进行切割来保护自身^[2]。

CRISPR/Cas 系统根据 *Cas* 蛋白的结构和功能分为三大类型,包含 10 个亚型,6 个 I 型,2 个 II 型和 2 个 III 型。其中,I 型和 III 型 CRISPR/Cas 系统需要多种 CRISPR 相关蛋白(*Cas* 蛋白)共同发挥作用,而 II 型系统只需要一种 *Cas* 蛋白即可,因此 II 型 CRISPR 系统应用最为广泛^[3-4]。

2013 年 2 月,洛杉矶学者们首次发现 CRISPR/Cas 系统^[5]。此后,因 CRISPR/Cas 系统具有操作简便,适用范围广,时间短,单个基因的编辑效率高等优势,近年在不同物种中得以发展应用^[6]。目前研究人员已成功利用 CRISPR/Cas9 系统对斑马鱼^[7-8]、大鼠^[9]、山羊^[10]、大豆^[11]、水稻^[12]、烟草^[13]、芽孢杆菌^[14]、酵母菌^[3]、大肠杆菌^[15]、乳酸菌^[16]、拟南芥^[17]等物种进行基因敲除。研究人员在 CRISPR/Cas 系统的基础上研发了 CRISPR Interference 系统,发现该系统能够仅在 mRNA 的层面上进行基因调控,目前细菌 CRISPRi 系统已发展

较为成熟^[18]。本文主要综述 CRISPR/Cas9 系统及 CRISPRi 系统近年来在芽孢杆菌、酵母菌、乳酸菌等生物的应用。

1 II 型 CRISPR 系统的原理

II 型 CRISPR 系统包括 CRISPR/Cas9 系统、CRISPRi 系统和 CRISPRa 系统,CRISPR/Cas9 系统的工作原理如图 1 所示。

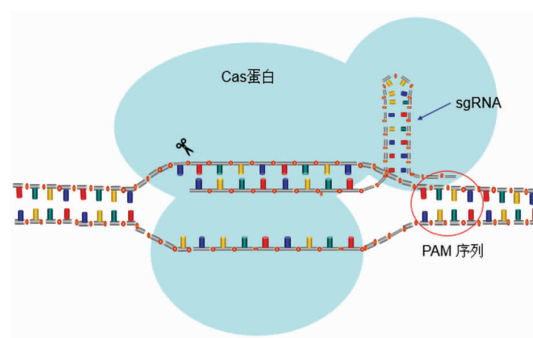


图 1 CRISPR/Cas9 系统原理

Fig.1 Principle of the CRISPR/Cas9 system

CRISPR/Cas9 系统是 crRNA (CRISPR-derived RNA) 通过碱基配对与 tracrRNA (trans-activating RNA) 结合形成 tracrRNA/crRNA 复合物,此复合物引导核酸酶 Cas9 蛋白在 PAM 序列位点处与其结合,形成 RNA-DNA 复合物,进而对 DNA 双链进行切割形成双链断裂 (double-strand break, DSB)^[19-20]。随后激活细胞内的免疫反应,对相应基因进行切割,进而达到使靶向基因失活的目的^[21]。目前该系统主要是通过人工设计这两种 RNA,形

收稿日期: 2021-12-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31701623)

第一作者: 田艾迪,女,硕士生

通信作者: 洛雪 E-mail: luoxue@syau.edu.cn

成具有引导作用的 sgRNA(single guide RNA),引导 Cas9 蛋白对 DNA 进行定点切割,从而引起细胞内 DNA 修复机制的启动^[22-23]。

当使用 II 型 CRISPR 系统时,对于基因组中产生的 DSB,细菌自身会通过两种途径进行修复,一种是非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)途径,一种是基于同源 DNA 片段的同源重组(homology-directed repair, HDR)途径^[24]。

NHEJ 途径可以通过以现有的碱基为原料进行双链两端的修复,可能会对核苷酸产生改变。HDR 途径利用断裂位点两端的同源片段为模板,

进行修复,原理如图 2 所示。

这两种修复模式扩大了 CRISPR/Cas9 系统的适用范围,使得 CRISPR/Cas 系统既可以利用 NHEJ 途径对基因进行定向失活,也可以利用 HDR 途径敲入新基因或者定向替换^[25-26]。CRISPRi 的原理如图 3 所示,首先使 Cas9 蛋白的氨基酸序列发生(D10A/H840A)突变,使 HNH 和 RuvC 两个核酸内切酶活性位点失活,得到催化失活的 Cas9(dCas9)蛋白,该蛋白虽不能切割双链 DNA,但可与 DNA 双链结合。在 gRNA 介导下,dCas9 蛋白与位点结合后,能够阻碍 RNA 聚合酶的通过,有效地抑制下游基因的转录^[27]。

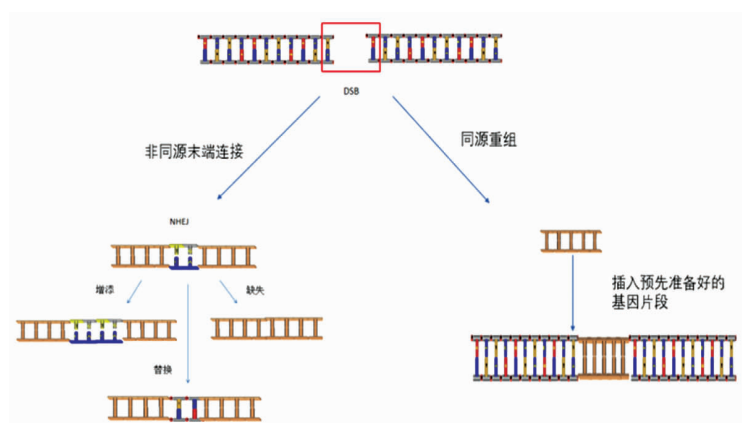


图 2 基因修复原理

Fig.2 Principle of gene repair

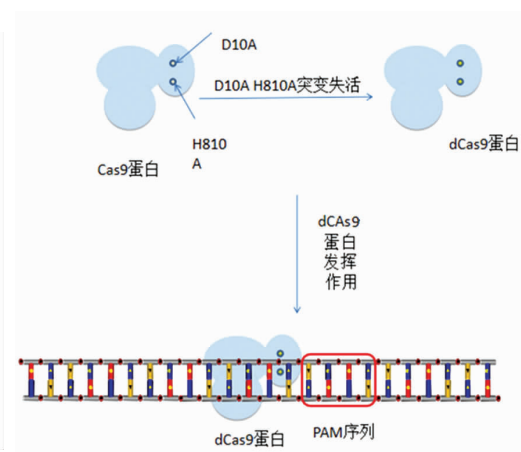


图 3 CRISPRi 系统原理

Fig.3 Principle of the CRISPRi system

2 II 型 CRISPR 系统在大肠杆菌中的应用

大肠杆菌是一种常见的革兰氏阴性菌模式微生物,因具有遗传背景清晰,代谢途径大多已探明,生长速度快,容易进行大规模培养等优点,而通常被选作研究基因的载体。早在 2011 年, Rimaantas 等^[28]就发现 CRISPR/Cas 系统可能起到移动基因盒的作用,可以克服遥远物种之间的障碍。于是,研究人员根据大肠杆菌的这些特点与 CRISPR 系统相结合,进行一些探索。

2.1 CRISPR/Cas9 系统在大肠杆菌中的应用

大肠杆菌是一种在自然界分布广泛的条件性致病菌,在正常情况下不具有致病性,是人和动物正常的肠道菌群,常作为模式菌种在工业生产中应用。研究人员为了提高大肠杆菌在工业上的利

用率,利用 CRISPR 系统对大肠杆菌进行相应的改造。Tan 等^[29]利用 CRISPR/Cas9 系统,通过对 TE10 表达、培养基 pH 值和 C/N 比等条件进行优化,提高了 *Fab* 基因的表达,调节大肠杆菌中的相关代谢网络,最终菌株的生物辛酸产量与野生型相比提高了 82%,且能在最低限度的培养基中生产辛酸。王钦^[30]利用 CRISPR/Cas9 系统对大肠杆菌进行单基因乃至多基因的敲除,确定对 *L*-酪氨酸产量和转化率提高最有效的改造策略,最终得到的菌株 *L*-酪氨酸产量较原始菌株提高了 87.2%。

CRISPR/Cas9 系统具有良好的兼容性,能与其它技术共同使用,对大肠杆菌进一步改良。王茹^[31]将 CRISPR/Cas9 系统与常压室温等离子体诱变技术相结合,敲除了 *cdd* 基因和 *poxB* 基因,阻断大

肠杆菌的胞苷降解途径,减弱乙酸合成途径,达到改造胞苷代谢网络的目的,得到的最终菌株葡萄糖的消耗速率是原始菌株的 82.78%和 88.3%,胞苷浓度是原始菌株的 1.10 倍和 1.25 倍,糖苷转化率提高了 30.95%和 41.18%,最终有效提高大肠杆菌的胞苷产量。然而,由于大肠杆菌中直接应用 CRISPR 系统时存在转化效率低、质粒不稳定等问题,于是研究人员又对大肠杆菌进行二次改造,得到转化效率更高,更适宜工业生产的菌株,如 Wang 等^[32]利用 CRISPR/Cas9 系统对大肠杆菌 MG1655 基因组的一系列位点进行遗传修饰,使 *MCRA*、*endA* 和 *recA* 基因失活,最终转化效率提高 168 倍,获得 1 株具有较高转化效率和质粒稳定性的健壮、通用的宿主菌株 JW128,该菌株在引入相应的合成途径后,生产所需化学物质。

研究人员发现在大肠杆菌中存在部分血清型大肠杆菌,具有致病性且多发现于被污染的食物中,根据临床特点、发病机制以及流行病学等特征分为肠致病性大肠杆菌、肠出血性大肠杆菌、肠产毒性大肠杆菌、肠侵袭性大肠杆菌、肠黏附性大肠杆菌等 5 种类型^[33]。当人类感染这些致病性大肠杆菌后,易引起腹泻,严重者甚至会危及生命^[34]。研究人员目前的研究重点是探索如何降低毒素型大肠杆菌的毒力。檀克勤等^[35]利用 CRISPR/Cas9 系统和 λ -RED 级联的敲除技术共同构建缺陷菌株,探讨 *EPEC K88* 基因在产肠毒素大肠杆菌中发挥的作用。富国文等^[36]利用 CRISPR/Cas9 系统对大肠埃希氏菌的 *Irp2* 基因进行敲除,发现菌株的致病力有所降低,其作用机制尚未明确。

综上所述,研究人员对于非致病性大肠杆菌的研究通常是利用 CRISPR/Cas9 系统敲除或修饰对相应的基因,改变代谢通路,提高相关产物的合成能力,得到更多的代谢产物。在致病性大肠杆菌的研究中,通过对致病基因进行敲除,或对致病基因产物参与的通路进行阻断,最终降低大肠杆菌的毒力。

2.2 CRISPR/Cas9 系统在大肠杆菌中的其它应用

基于 CRISPR/Cas9 系统,CRISPR/Cas9 的核糖核蛋白(RNP)复合物是一种具有多种生物医学应用前景的生物工具。目前仍面临产率低,核酸酶

活性时间短等问题。针对这些问题,研究者对 Cas9 蛋白的生产方法进行了优化。Qiao 等^[37]提出一种简化的方法,通过共表达 Cas9 和靶向特异性的单引导 RNA,从大肠杆菌中直接生产 Cas9 RNPs。利用 CL7/Im7 纯化技术,实现了包括常用的 Cas9 和 Cas12a 在内的自组装 CRISPR/Cas RNPs 的一步纯化,产率比现有方法提高约 4 倍。由此建立了一个成本低、耗时短的生产 CRISPR/Cas RNP 的平台,提高了 Cas 蛋白的产率。面对核酸酶活性时间短的问题,研究者一直在努力实现对 Cas9 核酸酶活性的时间控制,进而解决这个问题。Iwasaki 等^[38]开发了一种连接物,将茶碱和 3 甲基黄嘌呤(3MX)结合的适体与 sgRNA 结合,使大肠杆菌能够进行小分子依赖性编辑。这些可激活的引导 RNA 能够实现体内基因编辑的时间和转录后控制。此外,它们还减少了基因组切割引起的宿主细胞死亡,解除了 CRISPR 介导的细菌重组工程的限制,使大肠杆菌的应用更为广泛。

近年来因抗生素的滥用,故大肠杆菌的耐药性问题逐渐引起人们的关注。有研究表明 CRISPR-Cas 系统与基因转移有关,能帮助细菌适应外部环境。目前二者的关系尚未明确,于是一些研究人员通过 CRISPR-Cas9 系统来探究与耐药性相关的基因。李琳等^[39]和赵霞^[40]通过 CRISPR 系统调查发现鸡源大肠杆菌中广泛存在 CRISPR 系统且大肠杆菌的 CRISPR 还与多重耐药表型相关。然而,多重耐药株 Cas 蛋白表达差异不显著,提示 Cas 蛋白的表达可能与大肠杆菌耐药性不相关,相关部分有待探究。

研究人员根据 CRISPR 系统与细菌之间的关系,探究其能否消除耐药性,这是利用 CRISPR 系统能够特异性识别靶基因并将其切割消除的能力。利用噬菌体将 CRISPR 系统相关基因注入细菌内,通过 CRISPR 系统切割靶质粒,导致质粒丢失,使得细菌恢复对药物的敏感性^[41]。李培思等^[24]利用这个方法建立了一种单质粒介导靶向 *mcr-1* 基因的 CRISPR-Cas9 系统,该系统能够特异性消除黏菌素耐药大肠杆菌中的 *mcr-1* 基因,恢复对黏菌素的敏感性。Otoupal 等^[42]利用 CRISPR/Cas9 系统开发了一种被称为有机体适应受控障碍的方法,系统地干扰基因在大肠杆菌中的表达,结果发

现负上位性多肽核酸干扰增加了临床分离的碳青霉烯耐药大肠杆菌的抗生素敏感性。提示一种新的治疗策略,以限制抗生素耐药性的演变。这些方法证明 CRISPR 系统能够解决大肠杆菌耐药性的问题,为后续研究提供了新思路。

2.3 CRISPRi 系统在大肠杆菌中的应用

CRISPRi 系统能抑制指定目标的编码或非编码的 DNA 片段的转录。它是利用催化失活的 Cas9 (dCas9)能够到达引导 RNA 指定的位点,而不能剪切 DNA,当 dCas9 结合到基因组时阻断转录机器的结合,阻止反应的进行。于是,研究人员利用 CRISPRi 系统对大肠杆菌的代谢通路进行改造,以期提升相关产物的产量。Liu 等^[43]以大肠杆菌 W3110 为目标菌生产 *L*-高丝氨酸,通过敲除 *META* (编码高丝氨酸 *O*-琥珀酰基转移酶)和 *ThrB* (编码高丝氨酸激酶),加强运输以及删除 *I-CLR* (编码异柠檬酸裂解酶调节因子)等来重定向碳流,提高了 *L*-高丝氨酸的产量,最高效价达 37.57 g/L,合理整合了葡萄糖吸收和 *L*-谷氨酸的回收。达到提升产物产量的目的。

CRISPRi 系统也用于改造工业菌株,提高产量等方面。4-羟苯基乙酸(4HPAA)是合成药物、农药和生物化工的一种重要原料,NADPH 和 ATP 等辅因子在 4HPAA 生物合成中起重要作用。为了提高 4HPAA 的产量,Shen 等^[44]开发了一种新的基于 CRISPRi 系统的工程策略(CECRiS)。该策略使大肠杆菌中消耗 NADPH 和 ATP 的所有酶编码基因被抑制。其中,NADPH 消耗酶编码基因 *yahk* 和 ATP 消耗酶编码基因 *fees* 的缺失,使 4HPAA 的产量从 6.32 g/L 增到 7.76 g/L;又利用 *EsaPE-SAS* 群体感应抑制系统自动下调 *PABA* 基因的表达,进一步提高 4HPAA 的产量,最终得到的菌株在 2 L 生物反应器中,经补料分批发酵,4HPAA 产量为 28.57 g/L,产率为 27.64%。效价和得率能达到目前的最高值。

CRISPRi 系统作为一种新兴工具,可用其对菌株进行联合筛查。Stefano 等^[45]利用 CRISPRi 系统对 7 177 个菌株进行联合筛查,发现新陈代谢可缓冲健康缺陷,并阐明 3 种基因特异性的缓冲机制,即:鸟氨酸通过增加 *CarAB* 的活性来缓冲对 *CarAB* 的抑制,*S*-腺苷蛋氨酸通过降低蛋氨酸途

径的表达来缓冲同型半胱氨酸转甲基酶(MEE)的抑制,6-磷酸葡萄糖酸通过抑制 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的表达来缓冲对 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶)的抑制。CRISPRi 筛查可以揭示代谢稳健性的全球来源,识别缓冲特定酶减少的局部调节机制。综上,CRISPRi 系统作为新兴技术,在大肠杆菌中的应用较为深入,然而,与发现较早的 CRISPR/Cas9 系统相比,仍有较大的发展空间。

3 II 型 CRISPR 系统在乳酸菌中的应用

3.1 CRISPR/Cas9 系统在乳酸菌中的应用

乳酸菌是一类与人类身体健康密切相连的微生物,广泛存在于人体肠道。然而,乳酸菌中 CRISPR 系统的应用并不多,原因是乳酸菌作为革兰氏阳性菌,细胞壁较厚,遗传转化困难,目前发现的可用抗生素和载体较少,转化效率较低,因此 CRISPR 系统在乳酸菌中的应用受到限制。目前大部分针对乳酸菌中的基因编辑的研究停留在初级阶段。祁敏^[46]建立了用于植物乳杆菌 WCFS1 的 CRISPR-Cas9 系统,优化了 Cas 蛋白和质粒,为乳酸菌的 CRISPR 系统提供一些思路。Yang 等^[46]对 NCBI GenBank 数据库中的 68 株干酪乳杆菌进行研究,发现所有的直接重复序列能形成很好的 RNA 二级结构,而且大量的 CRISPR 间隔区与噬菌体和质粒序列有很好的同源性。Jia 等^[47]首次预测在黏液乳杆菌中有完整的 EPS 操纵子,并发现了 IIIA 型 CRISPR-Cas 系统。Anderson 等^[48]对加瑟氏菌的 CRISPR-Cas9 系统进行鉴定,发现它在无细胞裂解试验中有适度的活性,表明了它们移植到真核生物中作为基因编辑工具的重要性。Brandt 等^[49]使用模式菌株 DSM 20052 作为该物种的典型代表来描述发酵乳杆菌的基因组特征,揭示 9 个分支的遗传多样性,内容可变,包括可移动的遗传元件、CRISPR-CAS 免疫系统和基因组岛以及大量的基因组重排。其在 72%的基因组中发现 I、II 和 III 型 CRISPR-Cas 系统高频率出现,具有高度的菌株变异性。CRISPR/Cas9 系统在不同乳酸菌中的应用,大多停留在发现阶段,并未得到很好的利用。

针对 CRISPR/Cas9 在乳酸菌中的转化效率低

的问题, Ding 等^[50]发现化脓性链球菌 Cas9 融合了高迁移率组蛋白 HMG1 和 HMGB1、组蛋白 H1 和染色质调节肽(CMPS) 3 类蛋白, 可将化脓性链球菌 Cas9 蛋白的活性提高数倍, 在多个目标的情况下优势更为突出, 如在 12 个目标中甚至提高 5 倍。进一步试验发现 CMP 融合策略也能有效提高其它 Cas9 核酸酶的活性。这项研究为 Cas9 基因修饰提供了新的方法。

目前的 CRISPR 系统直接在乳酸菌中应用的案例较少。Production 等^[51]在植物乳杆菌 WCFS1 中建立了 CRISPR/Cas9 辅助的双链 DNA (DsDNA) 和单链 DNA (SsDNA) 重组工程, 成功地在植物乳杆菌中敲除了 *NAGB* 基因, 进而消除 6-磷酸果糖(F6P)与 6-磷酸氨基葡萄糖(GlcN-6P)的反向反应。在 *glmS1* 基因中引入核糖开关替换和点突变来缓解反馈抑制, 最终使得工程菌以葡萄糖为唯一碳源, 生产 797.3 mg/L 的 GlcNAc。

乳酸菌不仅存在于自然界中, 还存在于人体中。对于在人体中的乳酸菌来说, 需克服噬菌体带来的威胁, 人们发现口腔中的加瑟氏乳杆菌为了克服噬菌体捕食带来的影响而产生几种防御系统, 其中就包括 CRISPR/Cas9 系统。虽然乳酸菌中具有多种 CRISPR 系统, 但是 MGES 偶尔可以逃脱 CRISPR-CAS 系统的定位。于是, Stout 等^[52]利用质粒干扰试验研究了 CRISPR-CAS 的靶向和逃逸机制, 这项研究将有助于更好地理解 II 型 CRISPR-CAS 系统偶尔失败的原因, 更好地实现 CRISPR 系统在乳酸菌中的应用。

总体而言, CRISPR/Cas9 系统在乳酸菌中的应用仍处于起步阶段, 面临许多问题。

3.2 CRISPRi 系统在乳酸菌中的应用

CRISPRi 系统作为新兴技术, 在乳酸菌中的应用并不多见, 仅有少数研究作为参考。Myrbraten 等^[53]利用 CRISPRi 系统敲除植物乳杆菌中的基因。在双质粒系统中, 将 dCas9 和 sgRNA 分别在不同的质粒上表达, 发现可有效抑制任何目的基因的表达, 了解了植物乳杆菌细胞周期关键基因的功能。Crawley 等^[54]对 1 262 个已公开的乳酸菌基因组进行采样, 发现它们富含 CRISPR-Cas 适应性免疫。然而, II-A 型系统在其天然宿主中是自然活跃的, 能够表达并有效靶向侵袭性 DNA 和基

因组 DNA。这些系统增加了 Cas9 的靶向空间, 并在本地宿主和异源基因组编辑目的中提供更多的可能, 提高了 CRISPR 系统在乳酸菌中使用的可能性。田开仁等^[55]利用 CRISPRi 系统, 构建用于基因筛选以及基因功能验证的 CRISPRi 系统, 并验证其在乳酸乳球菌 F44 中的作用, 发现当 sgRNA 在靶向 *nisA* 基因编码链中的 D1 位置时, 基因转录量仅为原始菌株的一半, 表明乳酸乳球菌中 CRISPRi 系统的成功构建并能对细胞中的特定基因进行转录调控。同年, Berlec 等^[56]在乳酸乳球菌中开发了一种新型质粒, 该质粒使两种重组蛋白在乳酸乳杆菌中共表达, 并通过模型蛋白的表达来评估重组蛋白的有效性。

Kong 等^[57]证明了 CRISPRi 系统具有在浓度梯度中微调、增量基因调控的潜力。这项研究中, 研究人员利用 CRISPRi 系统开发一种新的微流控平台, 使细胞暴露在浓度梯度的代谢物中, 加入琼脂糖膜作为休眠底物, 加上一个温度控制的环境小室, 可以在稳定的生长或抑制条件下培养细胞超过 10 h。这项研究证实当 CRISPRi 系统与一些低成本的工具(如利用双面胶带、透明膜、琼脂糖膜和盖片制作的三维成像设备,) 结合使用时, 有助于发现新的抗生素敏感性的决定因素, 具有在浓度梯度中微调、增量基因调控的潜力, 并能够评估抗生素在细菌培养中的长期有效性。这项研究为 CRISPRi 系统开启了一个新的应用方向。

综上, CRISPRi 系统已被证实可应用于乳酸菌的基因编辑中, 然而目前的应用较少。

4 II 型 CRISPR 系统在芽孢杆菌中的应用

芽孢杆菌是一种生长快, 发酵周期短且易于培养的菌种, 与其它原核细菌相比, 芽孢杆菌有较强的分泌表达能力, 能有效避免细胞内蛋白质的积累和不溶性包涵体的形成, 而且芽孢杆菌的遗传背景清晰, 具有开发成细胞工厂的潜力。鉴于 CRISPR 系统在基因工程领域中的作用, 研究人员将其用于芽孢杆菌中^[58]。Marcus 等^[59]就利用 *Inscripta*(CO) 发布的一种的 CRISPR 核酸酶 MAD7 在枯草芽孢杆菌中进行基因编辑, 证实了基于 CRISPR 的编辑模式可在枯草芽孢杆菌中应用。

4.1 CRISPR/Cas9 系统在芽孢杆菌中的应用

CRISPR/Cas9 系统作为一种新型的基因敲除工具,在芽孢杆菌中的利用,能够提高芽孢杆菌在逆境中的抗性,或者通过对其代谢通路中的相关基因进行工业化改良,使该菌更适用于工业生产。García 等^[60]通过删除在产孢过程中起重要作用的 *spoIIA C* 基因,并利用双质粒策略,使新培育的枯草芽孢杆菌菌株从表达 htp 蛋白快速转变为生产 htp 蛋白,最终验证了 CRISPR 工具的有效性。檀瑞婷^[61]利用 CRISPR/Cas9 系统对枯草芽孢杆菌进行改良,将来源于嗜热菌的伴侣蛋白基因插入宿主中,与伴侣蛋白 Pfoldin γ 和 PPlase 的基因分别结合,得到的重组菌胞外酶活较初始酶活提升约 7.94 倍和 8.55 倍。再结合超高温酶的相关特性进行发酵条件的优化,最终得到菌株的胞外酶活较初始酶活提高约 71.08 倍,有效提升了 α -淀粉酶的产量和抗性。李由然等^[62]利用 CRISPR/Cas9 系统对枯草芽孢杆菌进行改良,将来源于嗜热菌的伴侣蛋白基因插入宿主中,与伴侣蛋白 Pfoldin γ 和 PPlase 的基因分别结合,得到的重组菌胞外酶活较初始酶活提升约 7.94 倍和 8.55 倍。再结合超高温酶的相关特性进行发酵条件的优化,最终菌株的胞外酶活较初始酶活提高约 71.08 倍,有效提升了 α -淀粉酶的产量和抗性。李由然等^[63]构建了诱导型表达 Cas9 蛋白的重组质粒,成功实现了地衣芽孢杆菌淀粉酶编码基因 *amy L* 的敲除,为改造发酵地衣芽孢杆菌提供了新的方向。

随着人们生活水平的提高,绿色食品的概念逐渐深入人心,生物农药成为一种常见的化学农药替代品。苏云金芽孢杆菌为一种生物农药,在产生芽孢过程中产生一种杀虫蛋白,当害虫取食含有该细菌的食物时,该菌能够在害虫的肠道内产生内源毒素和外源毒素,最终达到杀虫的效果。然而,随着这款农药的使用,一些害虫对其产生抗药性,因此,研究人员利用 CRISPR/Cas9 系统对苏云金芽孢杆菌进行改良,来消减这种抗药性。Wang 等^[64]利用 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除来测试 APNs 在 Bt 毒素表达过程中的作用。Wang 等^[65]也通过 CRISPR/Cas9 方法成功获得 1 株 ABCC2 缺失突变的纯合菌株(Ofc2-KO)。敲除菌株 Ofc2-KO 对 Cry1Fa 的抗性超过 300 倍,对 Cry1Ab 和

Cry1Ac 的抗性较低(<10 倍),而对 Cry1Aa 和两种化学杀虫剂(阿维菌素和氯氰异丙醇)的毒力没有显著影响。

CRISPR/Cas9 系统有利于提高苏云金芽孢杆菌中杀虫蛋白的应用,提高杀虫效果。

4.2 CRISPRi 系统在芽孢杆菌中的应用

CRISPRi 系统作为一种新型的基因工具,在研究下调基因的方面有良好的效果,CRISPRi 系统应用于枯草芽孢杆菌中取得一定成果。早在 2016 年,Zhao 等^[66]就利用 CRISPRi 系统证明脂质循环中两种 UPP 磷酸酶的冗余。

2018 年 Wu 等^[67]开发了一个基于木糖诱导的 CRISPRi 的枯草芽孢杆菌基因抑制系统,目的是下调 3 个基因(*zwf*,*pfkA*,*glmM*)的表达,这 3 个基因控制 GlcNAc 合成的主要竞争反应[戊糖磷酸途径(HMP)、糖酵解和肽聚糖合成途径(PSP)],实现葡萄糖和木糖的共同利用。通过 CRISPRi 同时抑制这 3 个基因,使 GlcNAc 滴度提高了 13.2%,达(17.4 \pm 0.47)g/L,其中葡萄糖和木糖的产量提高了 84.1%,达(0.42 \pm 0.036)g/g。为进一步实现葡萄糖和木糖的协同利用,针对这 3 个基因的不同 sgRNA 阵列,建立一种组合方法。对发酵体系的时间控制进行优化,发现接种 6 h 后添加 15g/L 木糖,菌株 BNX122 在摇瓶培养条件下可合成(20.5 \pm 0.85)g/L 的葡萄糖和木糖,产量为(0.46 \pm 0.010)g/g 葡萄糖和木糖。这些发现表明,CRISPRi 激活的调控方法为促进微生物细胞工厂协同利用多种碳源提供了一种简单、高效和通用的方法。

2019 年,Wang 等^[68]利用 CRISPRi 系统,通过抑制氨基酸合成分支代谢途径上的基因,提高枯草芽孢杆菌表面活性物质的产量,从氨基酸的分支代谢途径中筛选出 20 个基因进行单基因 CRISPRi 抑制,在得到的重组菌株中,有 16 株获得较高的表面蛋白产量。其中 *yrcC*、*RACE* 和 *MurC3* 菌株表现最为明显,其表面蛋白产量分别提高到 0.54,0.41g/L 和 0.42g/L。之后,又对 3 个基因进行多基因抑制,构建了 *yrcC* 和 *RACE*、*yrcC* 和 *MurC* 或 *RACE* 和 *MurC* 的双基因敲除菌株,使表面素产量分别增到 0.75,0.57 g/L 和 0.48 g/L,提高了产量。

CRISPRi 系统作为一种新型基因干扰技术,

在芽孢杆菌中取得一定成果。

5 II 型 CRISPR 系统在其它细菌中的应用

5.1 CRISPR/Cas9 系统在其它细菌中的应用

CRISPR/Cas9 系统因具有效率高, 操作简便等特点, 在微生物研究中得到广泛应用。球菌、梭菌、弧菌等是自然界中常见的细菌种类, 在工业生产中应用广泛。研究人员利用 CRISPR/Cas9 系统对这些细菌进行改良, 来适应社会生产的需要。Tan 等^[69]在不影响靶标效率的情况下, 利用 CRISPR/Cas9 系统在具有高度特异性全基因组活性的人类细胞中设计一种基于测序 (GUIDE-SEQ) 方法和定向深度测序分析的双链断裂识别 SaCas9 的工程变体, 这极大地提高了全基因组靶向的准确性。陈相好等^[70]成功在艰难梭菌中构建了 *rsb V* (编码 anti-anti-sigma 因子)、*rsb W* (编码 anti-sigma 因子) 及 *sig B* 基因 (编码 sigma-B 因子) 的 CRISPR-Cas9 敲除载体。张大炜等^[71]应用 CRISPR/Cas9 系统对艰难梭菌的主要毒力因子 *tdcB* 基因进行切割, 最终达到特异性抑制致病艰难梭菌生长的效果。刘永等^[72]在红色糖多孢菌基因组中应用 CRISPR/Cas9 系统, 在工业菌株 Ab (HP) 中敲除 *eryBGC* 基因, 阻断了红霉素的生物合成, 激活红色糖多孢菌中原有的沉默生物合成基因簇, 重构次级代谢途径, 使红霉素产量增加, 最终构建了有效的红色糖多孢菌的 CRISPR/Cas9 的基因编辑系统, 提高了红霉素的产量。尹畅等^[73]以裂殖壶菌为研究对象, 构建了相应 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 对裂殖壶菌中与脂肪酸合成相关的基因进行敲除, 并替换为 Zeocin 抗性基因片段, 说明 *Pks D* 基因的敲除影响脂肪酸的合成。

综上所述, CRISPR/Cas9 系统具有适用范围广, 操作简单等优势, 在很多细菌中都有广泛应用。

5.2 CRISPRi 系统在其它细菌中的应用

CRISPRi 系统是由 CRISPR/Cas9 系统中发展而来, 具有 CRISPR/Cas9 系统应用范围广, 操作简单等优点。Tan 等^[74]建立了针对假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) 基因抑制的 CRISPRi 系统, 发现另外两个 PAM 位点 NNGCGA 和 NNGTAA, 扩大了巴氏杆菌 dCas9 的可能靶标数量。刘永等^[72]在 CRISPR/Cas9 系统应用的基础上用 CRISPRi 系统

干扰基因表达。利用定点突变的 dCas9 构建的 CRISPRi 系统抑制靶基因的表达, 结合温度调控的抑制强度, 使红霉素产量增加。运动发酵单胞菌是一种很有前途的生物燃料生产菌种, 它能高效将糖转化为乙醇且, 具有很高的酒精耐受性。Amy 等^[75]通过靶向在细菌中普遍保守的必需基因, 来证明运动链球菌中 CRISPRi 系统的有效性。最终确定运动发酵单胞菌与生长、糖发酵成乙醇和异丁醇抗性有关的基因特征。建立的 *Zmobilis* CRISPRi 系统可直接定义基因功能, 并可应用于改进菌种工程和提高生物燃料产量, 为合理设计产量更高的生物燃料生产菌株开辟一条道路。

据目前研究现状, 基因的传递条件限制了 CRISPRi 靶向基因表达的能力。现有构建的传递物太大, 不适合一些病毒的包装。研究人员对 CRISPRi 组分进行优化, 生成一个包含所有功能元件的单一 AAV 载体, 并有效下调了内源基因在体内的表达。Jon 等^[76]利用螺旋接头和 c-Myc 核定位信号, 将失活的金黄色葡萄球菌 Cas9 (SadCas9) 的核靶向性提高 4 倍。之后, 发现氨基末端 Krüppel 关联盒 (KRAB) 在体外有效降低靶基因的表达。最后, 优化了 GUIDE RNA 的启动子, 并对 KRAB-SadCas9 在肝细胞中表达的微型启动子进行评价。构建的重组质粒在体外可使 (PCSK9) mRNA 和分泌蛋白减少 5 倍。相应的 AAV2/8 载体定位于肝细胞核内, 体内 PCSK9mRNA 和血清蛋白水平降低 30%。

在最近的研究中, 研究人员开始研究抗 CRISPR 系统, 该系统对水平基因的转移起到一定的促进作用。研究的主要方向是 ACRs, 它是一种能抑制 RNA 引导的 CRISPR-Cas 酶的 DNA 靶向活性的小蛋白。ACRs 由噬菌体和噬菌体衍生的细菌基因编码, 可以阻止 CRISPR 介导的噬菌体感染抑制, 也可阻止 CRISPR-Cas 介导的真核细胞基因组编辑。Watters 等^[77]为了鉴定能够抑制金黄色葡萄球菌 Cas9 (SauCas9) 的 ACR, 使用自靶 CRISPR 筛选和内疚关联基因组搜索的策略。结果证实了一种新的发现 ACR 的方法, 并将 AcrI-IA13-AcrIIA15 确立为 SauCas9 的独特双功能抑制剂。

利用 CRISPRi 系统, 能够对细菌的代谢通路

做出一些调整,增加需求物质产量,具有操作简便,应用范围广的优点。

6 CRISPR 系统在酵母菌中的应用

6.1 CRISPR/Cas9 系统在酵母菌中的应用

利用 CRISPR/Cas9 系统对于酵母的研究主要集中在两个方面:1)从基础代谢等方面与 CRISPR 系统相结合并进行改良。2)结合 CRISPR 系统对现有菌种进行改良,提高相关产品产量。

酵母菌作为一种常用的真菌型模式微生物,具有完整的细胞内膜系统,对于一些体内物质合成(如萜类物质等)具有明显优势,常用来作为底盘宿主。其中,酿酒酵母是在工业中运用广泛的菌种。路曼等^[78]利用 CRISPR-Cas9 系统在酿酒酵母中抑制了 *IDH2* 和 *PGII* 两个基因,提高了脂肪酸通路中乙酰辅酶 A 以及 NADPH 的供应量,得到的最佳工程菌的脂肪酸产率相较于原始菌株提高了 22%。利用 CRISPR/Cas9 系统在删除了合成磷脂酶途径、磷脂走向三酰基甘油途径、脂肪酸分解代谢的 β 氧化途径和促进甾醇合成途径中的关键酶基因后,使碳流向脂肪酸的合成和积累路径发生改变,从而增加了脂肪酸的产量。酵母菌具有完整的细胞内膜系统,有利于对酵母细胞中的基因功能进行判断,也同样适合代谢通路的研究。陆海燕等^[79]利用 CRISPR-Cas9 系统对安琪酵母工业菌株衍生菌株 K-a 进行基因修饰,失活靶向基因,得到的目的菌株比例高达 74.4%。初步建立了适于利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因修饰的工业菌株宿主平台和相应的基因修饰的操作系统流程。贡小芸^[80]用 CRISPR/Cas9 系统对酿酒酵母 WAT11 内源 MVA 途径的萜类通路相关基因 *tHMGR1*、*ERG20*、*ERG9*、*BTS1* 进行调控,利用角鲨烯作为标志物,引入肠沙门氏菌乙酰辅酶 A 合成酶基因 *SeACSL641P*、大肠杆菌 *IDII* 基因、枯草芽孢杆菌 *IDI2* 基因,进而观察酿酒酵母细胞内的萜类化合物代谢流向,找出最优菌株,成功构建高效合成 α -香树脂醇(α -amyrin)的酵母工程菌,为 α -香树脂醇及其衍生物的生物合成奠定基础,也为后期 CYPs、UTGs 的功能鉴定搭建了平台。谢文娟等^[81]利用 CRISPR/Cas9 系统,通过改造代谢工程,减少黄酒发酵液中尿素的含量及氨基甲酸

乙酯(ethyl carbamate, EC)的形成,提高了其构造的酿酒酵母工业化应用的可能性。这些研究都是利用 CRISPR/Cas9 系统对相关基因进行敲除,进而影响酵母菌的代谢通路来对酵母进行改良。酵母菌作为一种工业用模式菌株,当人们对新产品产生需求时,采用 CRISPR 系统对酵母菌株进行改造,得到新型的酵母菌株。李梦琦等^[82]在 Lager 型啤酒酵母中构建 CRISPR-Cas9 基因敲除系统。Zool 等^[83]从油棕榈堆肥中分离到 1 株能利用长链脂肪酸为唯一碳源的脂肪分解酵母 *Candida aaseri* SH14。之后,利用 CRISPR-Cas9 系统构建一个遗传操作系统,开发该菌株作为以可再生植物油为原料生产生物基化学品的平台酵母。利用 CRISPR-CAS9 系统,效率达到 60%,最终证明这一基因组工程工具可以加速红曲霉 SH14 的工业化应用。陈红^[84]利用 CRISPR 系统敲除了己糖激酶同工酶 2,降低了酿酒酵母对果糖的代谢,成功实现以酿酒酵母为宿主,以果糖为底物,高附加值 D-阿洛糖的生产。刘磊等^[85]利用 CRISPR/Cas9 系统敲除了酿酒酵母甘油-3-磷酸脱氢酶基因(*gpd2*),甘油和 2,3-丁二醇产量下降,乙醇产量提高。为进一步探究酿酒酵母其它代谢产物与 2,3-丁二醇合成之间的关系具有借鉴意义。基于对美好环境的需求,人们倡导绿色能源,生物燃油成为人们的研究热点。研究人员利用酵母和 CRISPR 系统的结合,对生物燃油进行了研究。黄河浪等^[86]利用 CRISPR 系统在酿酒酵母中导入植物乳杆菌的阿拉伯糖代谢途径,构建 1 株能有效利用阿拉伯糖并能将木糖转化为木糖醇的重组酿酒酵母菌株 KAX3-2,为以秸秆等木质纤维素类生物质为原料生产液体生物燃料——乙醇的研究提供了一些参考。如 Li 等^[87]利用 CRISPR 系统和耐压酵母创建一个带有重构莽草酸途径的菌株文库,用于生物合成 2-PE。CRISPR/Cas9 系统对单个基因的敲除十分方便、快捷,然而,同时对多个基因进行靶向敲除,步骤繁琐,效率降低。研究人员对系统进行了改进,如汪娟^[88]利用 CRISPR/Cas9 系统构建新的 gRNA-tRNA 阵列 CRISPR 系统(gRNA-tRNA-array Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9),简称 GTR-CRISPR,该系统可快速实现酿酒酵母对 1 对多靶点基因的

敲除。Zhang 等^[89]利用 gRNA,使 GTR-CRISPR 以 87% 的效率同时破坏 8 个基因。其还研究一种 Lightning GTR-CRISPR 系统,该系统删除了在大肠杆菌中克隆的步骤。此方法将 GTR-CRISPR 系统用于简化酵母脂质网络,10 d 内使游离脂肪酸的产量增加 30 倍。

gRNA 的高效表达对 CRISPR 系统的应用具有重要意义。这种改良的 CRISPR 系统能够提高多基因编辑的效率,大大缩短了操作时间,降低操作难度。Larroude 等^[90]构建 6 个 CRISPR/Cas9 载体,创建一套通用的、模块化的 CRISPR/Cas9 载体,可快速编辑任何溶脂耶尔森氏菌菌株;该工具有助于对任何有研究意义的原生菌野生型菌株进行试验,加快了 CRISPR/Cas9 系统的速率。

6.2 CRISPRi 系统在酵母菌中的应用

CRISPRi 作为以 CRISPR/Cas9 为基础的基因组编辑系统,极大地促进了工业酵母菌株的基因工程。Elena 等^[91]报道了一个多倍体工业酵母菌株 CRISPR 激活和干扰工具箱 (CRISPRa/I) 的构建。在高拷贝和低拷贝变体中获得的 CRISPRa/i 质粒中,dCas9 单独表达,或与激活或抑制结构域 VP64、VPR 或 Mxi1 融合表达。通过体内同源定向修复将 sgRNA 从双链寡核苷酸导入 CRISPRa/I 质粒,无需克隆就可以快速转录调控新的靶基因。CRISPRa/I 工具箱的特征是荧光蛋白编码基因在两个不同启动子的作用下表达发生改变,使表达改变达到原来的 2.5 倍。CRISPRa/i 工具包利用新型的基因干扰系统对酵母菌的改良是研究热点。CRISPRi 系统可广泛用于评估菌株改良的程度,进而加快对新的工业用菌株的开发与使用。

7 结语

II 型 CRISPR 系统作为目前应用最广泛、最频繁的基因编辑技术,相较于之前使用的,如锌指核酸酶系统、ZEN 系统等,具有编辑效率高,操作简单等优势。未来 CRISPR 系统仍是热门的基因编辑系统,在乳酸菌、芽孢杆菌等模式生物中有很大的操作空间。

目前 CRISPR/Cas9 系统通常用于对一些不明基因进行功能鉴定,通过对代谢通路上的相关基因进行敲除或替换来增加产品产量,或减少毒性,

或通过敲入新基因使原有的宿主产生新的功能或特质,进而成功应用于工业生产。

CRISPRi 系统作为新兴的基因干扰系统,相较于 CRISPR/Cas9 系统,更适用于分析耐药性,研究长链非编码 RNA 等方面。与传统的 RNAi 系统相比具有脱靶风险低,干扰效率高等优点,缺点是操作复杂,目前应用范围较窄。

参 考 文 献

- [1] 田荣臻,刘延峰,李江华,等. 典型模式微生物基因表达精细调控工具的研究进展[J]. 合成生物学, 2020, 1(4): 454-469.
TIAN R Z, LIU Y F, LI J H, et al. Advances in the fine regulation of gene expression in typical model microorganisms[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(4): 454-469.
- [2] 李世宇. CRISPR/Cas9 技术在毕赤酵母和枯草芽孢杆菌中研究[D]. 武汉: 湖北大学, 2016.
LI S Y. CRISPR/Cas9 technology in *Bacillus subtilis* and *Bacillus subtilis*[D]. Wuhan: Hubei University, 2016.
- [3] RAINHA J, RODRIGUES J L, RODRIGUES L R. CRISPR-Cas9: A powerful tool to efficiently engineer *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Life, 2020, 11(1): 13.
- [4] 薛永国,刘鑫磊,唐晓飞,等. CRISPR-Cas9 系统在作物中研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2020(2): 125-130.
XUE Y G, LIU X L, TANG X F, et al. Advances in CRISPR-Cas9 system research in crops [J]. Heilongjiang Agricultural Science, 2020(2): 125-130.
- [5] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. Cell, 2021, 184(3): 844.
- [6] 程文焕,伏广好,陈晓妮,等. 基因编辑技术在工业微生物育种中的应用进展[J]. 发酵科技通讯, 2020, 49(4): 236-242.
CHEN W H, FU G H, CHEN X N, et al. Advances in the application of gene editing technology in industrial microbial breeding[J]. Fermentation Science and Technology Letters, 2020, 49(4): 236-242.
- [7] PETRI K, ZHANG W T, MA J Y, et al. Author correction: CRISPR prime editing with ribonucleo-

- protein complexes in Zebrafish and primary human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 40(2): 273.
- [8] 吴雅慧, 张浩然, 晁青何, 等. CRISPR/Cas9 技术及其在水生生物基因功能研究中的进展[J/OL]. *基因组学与应用生物学*, (2020-12-08)[2021-07-21]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20201207.1514.004.html>.
- WU Y H, ZHANG H R, CHAO Q H, et al. CRISPR/Cas9 technology and its progress in the study of gene function in aquatic organisms[J/OL]. *Genomics and Applied Biology*, (2020-12-08)[2021-07-21]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20201207.1514.004.html>.
- [9] SINGH K, CORNELL C, S JACKSON R, et al. CRISPR/Cas9 generated knockout mice lacking phenylalanine hydroxylase protein as a novel pre clinical model for human phenylketonuria [J/OL]. *Scientific Reports*, (2021-03-01)[2021-07-21]. https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=1r180g20en6e00804b3002n05h446428&site=xueshu_se&hitarticle=1.
- [10] 宋绍征, 张婷, 潘生强, 等. CRISPR/Cas9 系统介导的人乳铁蛋白基因在山羊 β -乳球蛋白基因座定点敲入[J]. *中国农业大学学报*, 2020, 25(7): 111-119.
- SONG S Z, ZHANG T, PAN S Q, et al. CRISPR/Cas9 system-mediated targeted knock-in of the human lactoferrin gene at the goat β -lactoglobulin locus[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(7): 111-119.
- [11] CARRIJO J, ILLABERENGUER E, LAFAYETTE P, et al. Two efficient CRISPR/Cas9 systems for gene editing in soybean. [J]. *Transgenic Research*, 2021, 30(3): 239-249
- [12] 蔡梦颖, 张平, 宋炜涵, 等. 通过 CRISPR/Cas9 技术靶向编辑 *SSS II b* 基因改良稻米品质[J]. *南京农业大学学报*, 2021, 44(1): 18-26.
- CAI M Y, ZHANG P, SONG W H, et al. Targeted editing of *SSSIIb* gene by CRISPR/Cas9 technology to improve rice quality[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2021, 44(1): 18-26.
- [13] TIAN Y S, CHEN K, LI X, et al. Design of high-oleic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seed oil by CRISPR-Cas9-mediated knockout of *NtFAD2-2*[J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 1.
- [14] WANG X J, LYA Y F, WANG S Y, et al. Application of CRISPR/Cas9 system for plasmid elimination and bacterial killing of *Bacillus cereus* group strains[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 17.
- [15] 邵梦瑶, 路福平, 朱欣娜, 等. 优化大肠杆菌 *CRISPR/Cas9* 基因编辑系统及应用[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 106-110, 114.
- SHAO M Y, LU F P, ZHU X N, et al. Optimization of the *E. coli* *CRISPR/Cas9* gene editing system and applications[J]. *Journal of Biology*, 2020, 37(4): 106-110, 114.
- [16] 祁敏. 应用 CRISPR/Cas9 技术在植物乳杆菌中进行基因编辑的研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2019.
- QI M. Application of CRISPR/Cas9 technology for gene editing in *Lactobacillus plantarum*[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2019.
- [17] NICK V, TOM B, ROOT L. Initiation and the analysis of gene function using genome editing with CRISPR in arabidopsis. [J]. *Genes*, 2021, 12(6): 884.
- [18] 李清扬. CRISPR 系统对大肠杆菌 I 类整合子的敲除、抑制及基因重组工具的开发[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- LI Q Y, Engineering CRISPR systems for deletion and repression of a Class I Integron and development of integron-based recombination tool in *Escherichia coli*[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.
- [19] 苏文英, 杨和川, 谭一罗, 等. *CRISPR/Cas9* 基因编辑技术在真菌中的应用[J]. *江西农业学报*, 2019, 31(3): 23-29.
- SU W Y, YANG H C, TAN Y L, et al. Application of *CRISPR/Cas9* gene editing technology in fungi [J]. *Jiangxi Journal of Agriculture*, 2019, 31(3): 23-29.
- [20] 白祥慧. *CRISPR/Cas9* 基因敲除研究进展[J]. *现代畜牧兽医*, 2021(1): 90-92.
- BAI X H. Advances in *CRISPR/Cas9* gene knockout research[J]. *Modern Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2021(1): 90-92.
- [21] 信欣, 陈丽杰, 薛闯. CRISPR-Cas9 技术在细菌中的研究进展及应用[J]. *微生物学杂志*, 2018, 38(6): 97-102.
- XIN X, CHEN L J, XUE C. Advances and applications of CRISPR-Cas9 technology in bacteria [J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(6): 97-102.
- [22] 孙明尧, 白玮, 梁宏玉, 等. CRISPR-Cas9 技术在医药领域中的应用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2019,

- 36(12): 1145–1154.
- SUN M Y, BAI W, LIANG H Y, et al. Application of CRISPR–Cas9 technology in the field of medicine[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2019, 36(12): 1145–1154.
- [23] 潘馨玥. CRISPR/Cas9 系统介导的基因组编辑技术研究进展[J]. 凯里学院学报, 2020, 38(6): 74–78.
- PAN X Y. Advances in CRISPR/Cas9 system-mediated genome editing technology[J]. Journal of Kerry College, 2020, 38(6): 74–78.
- [24] 李培思, 万鹏, 李小申, 等. CRISPR–Cas9 技术在细菌耐药性防控研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(8): 2161–2171.
- LI P S, WAN P, LI X S, et al. Advances in CRISPR–Cas9 technology for the prevention and control of bacterial drug resistance[J]. Journal of Microbiology, 2021, 61(8): 2161–2171.
- [25] 杨先碧. 2020 年诺贝尔化学奖解读“基因剪刀”改写生命密码[J]. 科学大众(中学生), 2020(12): 10–11.
- YANG X B. The Nobel Prize in Chemistry 2020: ‘Gene scissors’rewrites the code of life[J]. Science in general(Secondary school students), 2020(12): 10–11.
- [26] 赵山山, 邸一桓, 郝光飞. CRISPR–Cas9 基因编辑技术在基因功能和作物育种中的研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(21): 7087–7093.
- ZHAO S S, DI Y H, HAO G F. Advances in CRISPR–Cas9 gene editing technology in gene function and crop breeding[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(21): 7087–7093.
- [27] LIU Z Q, DONG H N, CUI Y L, et al. Application of different types of CRISPR/Cas–based systems in bacteria[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 172.
- [28] RIMANTAS S, GIEDRIUS G, CHRISTOPHE F, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(21): 9275–9282.
- [29] TAN Z G, YOON J, CHOWDHURY A, et al. Engineering of *E. coli* inherent fatty acid biosynthesis capacity to increase octanoic acid production[J]. BioMed Central, 2018, 11(1): 1.
- [30] 王钦. 代谢工程改造大肠杆菌积累 L-酪氨酸与发酵条件优化[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- WANG Q. Metabolic engineering of *E. coli* to accumulate L-tyrosine and optimization of fermentation conditions[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [31] 王茹. 常压室温等离子体诱变技术结合 CRISPR/Cas9 系统选育胞苷高产菌株的研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2020.
- WANG R. Atmospheric pressure room temperature plasma mutagenesis combined with CRISPR/Cas9 system for the selection of high cytosine-producing strains[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2020.
- [32] WANG J G, HUANG C Y, GUO K, et al. Converting *Escherichia coli* MG1655 into a chemical overproducer through inactivating defense system against exogenous DNA [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2020, 5(4): 333–342.
- [33] 杨春利, 张顺先, 艾琳, 等. 昆明市腹泻人群肠致病性大肠杆菌流行特征研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(4): 321–325.
- YANG C L, ZHANG S X, AI L, et al. Study on the epidemiological characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* in the diarrhea population in Kunming[J]. Chinese Journal of Human and Animal Diseases, 2017, 33(4): 321–325.
- [34] 陆金丹, 陈飞龙, 侯军沛, 等. 致病性大肠杆菌现状分析及检测技术研究进展[J]. 广东化工, 2019, 46(3): 137, 126.
- LU J D, CHEN F L, HOU J P, et al. Analysis of the current situation of pathogenic *Escherichia coli* and research progress of detection technology [J]. Guangdong Chemical Industry, 2019, 46(3): 137, 126.
- [35] 檀克勤, 马现永, 崔艺燕, 等. 利用 CRISPR/Cas9 和 λ -Red 级联技术构建产肠毒素大肠杆菌 LT 敲除菌株[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(3): 666–675.
- TAN K L, MA X Y, CUI Y Y, et al. Construction of enterotoxin-producing *Escherichia coli* LT knock-out strains using CRISPR/Cas9 and λ -Red cascade technology [J]. China Veterinary Animal Husbandry, 2020, 47(3): 666–675.
- [36] 富国文, 单春兰, 敖平星, 等. 应用 CRISPR/Cas9 系统构建大肠埃希氏菌 *irp2* 基因缺失株[J]. 动物医学进展, 2021, 42(1): 50–55.
- FU G W, SHAN C L, AO X P, et al. Application of CRISPR/Cas9 system to construct an *irp2* gene deletion strain of *Escherichia coli*[J]. Advances in Animal Medicine, 2021, 42(1): 50–55.
- [37] QIAO J, LI W Q, LIN S Y, et al. Erratum: Author correction: co-expression of Cas9 and single-

- guided RNAs in *Escherichia coli* streamlines production of Cas9 ribonucleoproteins[J]. *Communications Biology*, 2019, 2(1): 1.
- [38] IWASAKI R S, OZDILEK B A, GARST A D, et al. Small molecule regulated sgrRNAs enable control of genome editing in *E. coli* by Cas9[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 7.
- [39] 李琳, 赵霞, 王磊, 等. 鸡源大肠杆菌 CRISPR 特征及其与耐药性的关系[J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2018, 46(5): 30–36.
- LI L, ZHAO X, WANG L, et al. CRISPR characteristics of chicken-derived *Escherichia coli* and its relationship with drug resistance[J]. *Journal of Northwest Agriculture and Forestry University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2018, 46(5): 30–36.
- [40] 赵霞. 大肠杆菌 CRISPR/Cas 与耐药性的关系研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019.
- ZHAO X. Study on the relationship between CRISPR/Cas and drug resistance in *Escherichia coli* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2019.
- [41] 姚文晔, 曾洁, 薛云新, 等. 细菌耐药性及新型抗菌疗法研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(5): 321–327.
- YAO W Y, ZENG J, XUE Y X, et al. Advances in research on bacterial drug resistance and novel antibacterial therapies[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2017, 42(5): 321–327.
- [42] OTOUPAL, P B, CORDELL, W T, BACHU, V et al. Multiplexed deactivated CRISPR–Cas9 gene expression perturbations deter bacterial adaptation by inducing negative epistasis[J/OL]. *Communications Biology*, (2018–09–03)[2021–07–21]. <https://www.nature.com/articles/s42003-018-0135-2>.
- [43] LIU P, ZHANG B, YAO Z H, et al. Multiplex design of metabolic network for production of L-homoserine in *Escherichia coli* [J/OL]. *Applied and Environmental Microbiology*, (2020–10–01)[2021–07–21]. <https://doi.org/10.1128/AEM.01477-20>.
- [44] SHEN Y P, LIAO Y L, LU Q, et al. ATP and NADPH engineering of *Escherichia coli* to improve the production of 4-hydroxyphenylacetic acid using CRISPRi[J]. *Biotechnology for biofuels*, 2021, 14(1): 1.
- [45] STEFANO D, MICHELLE K, VANESSA P, et al. Multi-omics analysis of CRISPRi–knockdowns identifies mechanisms that buffer decreases of enzymes in *E. coli* Metabolism[J]. *Cell Systems*, 2020, 12(1): 56–67.
- [46] YANG L, LI W X, UJIROGHENE O J, et al. Occurrence and diversity of CRISPR loci in *Lactobacillus casei* group[J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, (2020–04–08)[2021–07–21]. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.00832>.
- [47] JIA Y, YANG B, ROSS P, et al. Comparative genomics analysis of *Lactobacillus mucosae* from different niches[J/OL]. *Genes*, (2020–01–14)[2021–07–21]. <https://pubs.ncbi.nlm.nih.gov/patent/13290t50hq550jf0rs3w0x80ts316000>.
- [48] ANDERSON E M, MCCLELLAND S, MAKSIMOVA E, et al. *Lactobacillus gasseri* CRISPR–Cas9 characterization *in vitro* reveals a flexible mode of protospacer–adjacent motif recognition[J]. *PloS one*, 2018, 13(2): e0192181.
- [49] BRANDT K, MATTHEW A, N, SARAH O, et al. Genomic characterization of *Lactobacillus fermentum* DSM 20052[J/OL]. *BMC Genomics*, (2020–12–01)[2021–07–21]. <https://pubs.ncbi.nlm.nih.gov/patent/1d0r06101v3r0ea00u790tp080360681>.
- [50] DING X, SEEBECK T, FENG Y M, et al. Improving CRISPR–Cas9 genome editing efficiency by fusion with chromatin–modulating peptides[J]. *The CRISPR Journal*, 2019, 2(1): 51–63.
- [51] ZHOU D, JIANG Z N, PANG Q X, et al. CRISPR/Cas9–assisted seamless genome editing in *Lactobacillus plantarum* and its application in *N*-acetylglucosamine production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(21): 1.
- [52] STOUT E A, SANOSKY–DAWES R, GOH Y J, et al. Deletion–based escape of CRISPR–Cas9 targeting in *Lactobacillus gasseri*[J]. *Microbiology*, 2018, 164(9): 1098–1111.
- [53] MYRBRATEN I S, WIULL K, SALEHIAN Z, et al. CRISPR interference for rapid knockdown of essential cell cycle genes in *Lactobacillus plantarum*[J]. *mSphere*, 2019, 4(2): 1.
- [54] CRAWLEY A B, HENRIKSEN E D, STOUT E, et al. Characterizing the activity of abundant, diverse and active CRISPR–Cas systems in *Lactobacilli* [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 12.
- [55] 田开仁. 重组乳酸乳球菌耐酸机制挖掘及基因功能

- 分析[D]. 天津: 天津大学, 2018.
- TIAN K R. Acid tolerance mechanism mining and gene function analysis of recombinant *Lactococcus lactis*[D]. Tianjin: Tianjin University, 2018.
- [56] BERLEC A, ŠKRLEC K, KOCJAN J, et al. Single plasmid systems for inducible dual protein expression and for CRISPR-Cas9/CRISPRi gene regulation in lactic acid bacterium *Lactococcus lactis*[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 7754.
- [57] KONG T, BACKES N, KALWA U et al. Adhesive tape microfluidics with an autofocusing module that incorporates CRISPR interference: applications to long-term bacterial antibiotic studies[J]. ACS sensors, 2019, 4(10): 2638-2645.
- [58] 张维娇, 金学荣, 徐雅晴, 等. 枯草芽孢杆菌表达与调控工具相关研究进展[J]. 生物系统通报, 2020, 36(4): 26-33.
- ZHANG W J, JIN X R, XU Y Q, et al. Advances in research related to expression and regulatory tools in *Bacillus subtilis*[J]. Biosystems Bulletin, 2020, 36(4): 26-33.
- [59] MARCUS A, PRICE R C, JAMES B, et al Expanding and understanding the CRISPR toolbox for *Bacillus subtilis* with MAD7 and dMAD7 [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(6): 1805-1816.
- [60] GARCÍA M, ANTONIO L, ØIVIND G S, et al Fragment exchange plasmid tools for CRISPR/Cas9-mediated gene integration and protease production in *Bacillus subtilis* [J]. Applied and environmental microbiology, 2020, 87(1): 1.
- [61] 檀瑞婷. *Pyrococcus furiosus* 超高温 α -淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的表达研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- TAN R T. Expression study of *Pyrococcus furiosus* ultra-high temperature α -amylase in *Bacillus subtilis* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [62] LI Y R, WANG H R, ZHANG L, et al. Efficient genome editing in *Bacillus licheniformis* mediated by a conditional CRISPR/Cas9 system [J]. Microorganisms, 2020, 8(5): 754.
- [63] 李由然, 顾正华, 张梁, 等. CRISPR/Cas9 系统介导的地衣芽孢杆菌基因敲除[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(10): 4188-4196.
- LI Y R, GU Z H, ZHANG L, et al. CRISPR/Cas9 system-mediated gene knockout in *Bacillus licheniformis*[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(10): 4188-4196.
- [64] WANG J, ZUO Y Y, LI L L, et al. Knockout of three aminopeptidase N genes does not affect susceptibility of *Helicoverpa armigera* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1A and Cry2A toxins[J]. Insect Science, 2020, 27(3): 440-448.
- [65] WANG X, XU Y, HUANG J, et al. CRISPR-mediated knockout of the *ABCC2* gene in *Ostrinia furnacalis* confers high-level resistance to the *Bacillus thuringiensis* Cry1Fa toxin[J]. Toxins, 2020, 12(4): 1.
- [66] ZHAO H, SUN Y J, PETERS J M, et al. Depletion of undecaprenyl pyrophosphate phosphatases disrupts cell envelope biogenesis in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(21): 2925-2935.
- [67] WU Y K, CHEN T C, LIU Y F, et al. CRISPRi allows optimal temporal control of *N*-acetylglucosamine bioproduction by a dynamic coordination of glucose and xylose metabolism in *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 232-241.
- [68] WANG C, CAO Y X, WANG Y P, et al. Enhancing surfactin production by using systematic CRISPRi repression to screen amino acid biosynthesis genes in *Bacillus subtilis*[J]. BioMed Central, 2019, 18(1): 13.
- [69] TAN Y Y, CHU A H Y, BAO S Y, et al. Rationally engineered *Staphylococcus aureus* Cas9 nucleases with high genome-wide specificity.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(42): 20969-20976.
- [70] 陈相好, 蔡梦迪, 陈峥宏, 等. 艰难梭菌 *sigB* 基因簇CRISPR-Cas9 敲除载体的构建及验证[J]. 贵州医科大学学报, 2019, 44(7): 751-756.
- CHEN X H, CAI M D, CHEN Z H, et al. Construction and validation of CRISPR-Cas9 knockout vector for *Clostridium difficile sigB* gene cluster[J]. Journal of Guizhou Medical University, 2019, 44(7): 751-756.
- [71] 张大炜, 夏云, 赵靳鑫, 等. CRISPR 靶向切割毒力因子 *tdcB* 基因抑制致病艰难梭菌生长[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(24): 3036-3040.
- ZHANG D W, XIA Y, CAI J X, et al. CRISPR-targeted cleavage of virulence factor *tdcB* gene inhibits the growth of pathogenic *Clostridium difficile* [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2019, 40(24): 3036-3040.

- [72] 刘永. 应用 CRISPR-Cas9 在红色糖多孢菌进行基因编辑重构生物合成基因簇的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2019.
LIU Y. CRISPR-Cas9-mediated genome-editing and reconstruction of biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*[D]. Shanghai: South China University of Technology, 2019.
- [73] 尹畅. 裂殖壶菌 CRISPR/Cas9 体系的建立及应用于脂肪酸代谢研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
YIN C. Establishment of a CRISPR/Cas9 system in *Schizosaccharomyces pombe* and its application to the study of fatty acid metabolism [D]. Qingdao: Qingdao University, 2017.
- [74] TAN S Z, REISCH C R, PRATHER K L J. A robust CRISPR interference gene repression system in *Pseudomonas*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(7): e00575-1.
- [75] AMY B, BANTA A L, ENRIGHT C S, et al. A high-efficacy CRISPR interference system for gene function discovery in *Zymomonas mobilis* [J/OL]. *Applied and Environmental Microbiology*, (2020-09-25) [2021-07-21]. https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=1c2b0ad057160rp08d2w0ew0hc649400&site=xueshu_se.
- [76] JON R B, SHENG J S, WANG M C. et al. Optimization of *S. aureus* dCas9 and CRISPRi elements for a single adeno-associated virus that targets an endogenous gene[J]. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 2020, 19: 139-148.
- [77] WATTERS K E, SHIVRAM H, FELLMANN C, et al. Potent CRISPR-Cas9 inhibitors from *Staphylococcus* genomes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(12): 6531-6539.
- [78] 路曼. CRISPR/Cas9 技术在酿酒酵母脂类代谢通路中的应用以及提高脂肪酸产量的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2019.
LU M. Application of CRISPR/Cas9 technology in lipid metabolic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* and the study of improving fatty acid production[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2019.
- [79] 陆海燕, 李佳蔓, 孙思凡, 等. CRISPR-Cas9 系统介导的工业酵母营养缺陷型菌株构建[J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(10): 67-74.
LU H Y, LI J M, SUN S F, et al. CRISPR-Cas9 system-mediated construction of a nutrient-deficient strain of industrial yeast[J]. *Chinese Journal of Biological Engineering*, 2019, 39(10): 67-74.
- [80] 贡小芸. CRISPR/Cas9 改造酿酒酵母萜类合成通路以提高 α -香树脂醇的产量[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
YUN X Y. CRISPR/Cas9 modifies the terpene synthesis pathway in brewer's yeast to enhance α -avian resinol production [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [81] 谢文娟, 吴殿辉, 李晓敏, 等. CRISPR/Cas9 介导的低产尿素黄酒酵母工程菌的构建[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(13): 45-51.
XIE W J, WU D H, LI X M, et al. CRISPR/Cas9-mediated construction of low urea-yielding yellow wine yeast engineering[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2019, 45(13): 45-51.
- [82] 李梦琦, 张可心, 郑飞云, 等. Lager 酵母中 CRISPR-Cas9 基因敲除系统的构建[J]. *东北农业大学学报*, 2020, 51(3): 36-44, 96.
LI M Q, ZHANG K X, ZHENG F Y, et al. Construction of CRISPR-Cas9 knockout system in Lager yeast[J]. *Journal of Northeastern Agricultural University*, 2020, 51(3): 36-44, 96.
- [83] ZOOL H I, BAE J H, LEE S H, et al. Genetic manipulation of a lipolytic yeast *Candida aaseri* SH14 using CRISPR-Cas9 system [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(4): 1.
- [84] 陈红. 基于 CRISPR/Cas9 技术改造酿酒酵母合成 D-阿洛糖的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
CHEN H. Synthesis of D-allose in *Saccharomyces cerevisiae* based on CRISPR/Cas9 technology [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.
- [85] 刘磊, 李娜, 姜雪雍, 等. CRISPR/Cas9 技术敲除酿酒酵母 *gpd2* 基因对产 2,3-丁二醇的影响[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(29): 69-77.
LIU L, LI N, JIANG X Y, et al. Effect of CRISPR/Cas9 technology knockdown of brewer's yeast *gpd2* gene on 2,3-butanediol production [J]. *China Agronomy Bulletin*, 2020, 36(29): 69-77.
- [86] 黄河浪, 刁于真, 杨白雪等. 可同化阿拉伯糖的木糖还原酿酒酵母菌株构建[J]. *微生物学报*, 2020, 60(12): 2705-2716.
HUANG H L, DIAO Y Z, YANG B X, et al. Construction of a xylose-reducing brewer's yeast strain that can assimilate arabinose [J]. *Journal of*

- Microbiology, 2020, 60(12): 2705–2716.
- [87] LI M W, LANG X Y, MORAN C.M. et al. CRISPR –mediated multigene integration enables Shikimate pathway refactoring for enhanced 2 – phenylethanol biosynthesis in *Kluyveromyces marxianus*[J/OL]. *Biotechnology for Biofuels*, (2021–01–06) [2022–11–28]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?FileName=SJDJ43CC7533F4F3C54868BA0DAD8533ECB8&DbName=GARJ2019>.
- [88] 汪娟. CRISPR–Cas9 系统: 应用于酿酒酵母的一步多靶点基因编辑技术[D]. 北京: 北京化工大学, 2019.
- WANG J. CRISPR–Cas9 system: a one–step multi–target gene editing technology applied to brewer’s yeast [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2019.
- [89] ZHANG Y P, WANG J, WANG Z B, et al. A gRNA –tRNA array for CRISPR –Cas9 based rapid multiplexed genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 10.
- [90] LARROUDE M. TRABELSI H. NICAUD J. et al. A set of *Yarrowia lipolytica* CRISPR/Cas9 vectors for exploiting wild–type strain diversity[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(1): 773–785.
- [91] ELENA C, IBAI L, YVONNE N. A CRISPR activation and interference toolkit for industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain KE6–12[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 7–15.

The Application of Type II CRISPR System in Microbes

Tian Aidi, Liu Ying, Chen Yeping, Shi Haisu, Yue Xiqing, Wu Junrui, Luo Xue*
(College of Food, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866)

Abstract The CRISPR system is an emerging gene editing technology. It is an immune response system that exists in some bacteria. It uses the protein encoded by the *Cas* gene to efficiently recognize and cut the foreign DNA that enters the cell, protecting the bacteria themselves from Exogenous gene infringement. The CRISPR system is mainly used for targeted knock–in and knock–out of genes. The system has the advantages of simple operation and wide application range, and has been widely used in various microorganisms, animals and plants. Among CRISPR systems, type II CRISPR system is the most widely used system and is currently a research hotspot. It includes CRISPR/Cas9, CRISPRa and CRISPRi technologies. Since CRISPRa technology is currently less used, this article reviews the current research status of CRISPR/Cas9 and CRISPRi technologies in microorganisms, and prospects the future development of the two technologies.

Keywords CRISPR system; *E. coli*; *Lactobacillus*; *Bacillus*; *Saccharomyces*