

# CRISPR/Cas9 基因编辑技术在肠道厌氧菌研究中的应用



马俊泽, 李静蕾, 路争\*

汕头大学理学院生物系, 广东汕头 515063

**摘要:** 人肠道细菌在机体营养、发育、免疫、甚至心理疾病方面都可能发挥重要作用, 有关这类微生物的研究是近年的热门。新型组学技术对肠道微生物组的探索有极大帮助, 而单个肠道细菌利用环境中的营养物质, 与人体共生、互惠的分子机理则是有别于宏基因组学的必要的研究领域, 这方面工作中的一个重要研究手段是对肠道厌氧菌进行靶向基因编辑, 通过对靶标基因的敲除、替换或插入来验证相关基因的功能及调控机制。传统的细菌基因编辑技术虽然对 DNA 修饰精度较高, 但重组效率低且存在极性突变效应, 这在一定程度上阻碍了肠道细菌的功能研究。近年来出现的 CRISPR/Cas9 技术具有通用性广、设计和操作简单等优势, 已广泛应用于多种生物的基因操作。本文简要介绍了 CRISPR/Cas9 的技术原理, 对该技术在肠道细菌研究中的应用现状进行了总结, 也对其目前存在的问题和未来的发展趋势做了分析和展望。

**关键词:** CRISPR/Cas9; 基因编辑; 肠道细菌; 拟杆菌

**DOI:** [10.57237/j.life.2022.01.002](https://doi.org/10.57237/j.life.2022.01.002)

## Application of CRISPR/Cas9 Gene Editing Technology in Studies of Intestinal Anaerobic Bacteria

Junze Ma, Jinglei Li, Zheng Lu\*

Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China

**Abstract:** Human intestinal bacteria play important roles in the nutrition, development, immunity and even psychological diseases of the host, researches about such microorganisms is prevalent in recent years. New omics technologies are of great help for us to explore new functions and composition of intestinal microbiome, while studies about the molecular mechanisms of the symbiosis and reciprocity between these commensals and host are significant and too, and an important approach in the field is to conduct targeted gene editing for intestinal anaerobes and verify the function of genes by knocking out, replacing or inserting genes. Although the traditional bacterial gene editing technologies show high accuracy for DNA modification, they have low recombination efficiency and a polar mutation effect. This hinders the functional researches of intestinal bacteria. CRISPR/Cas9 technology, which emerged about 10 years ago, has advantages of wide universality, simple design and operation, and has been widely used in gene

基金项目: 国家自然科学基金 (31970101); 广东省自然科学基金 (2019A1515011685).

\*通信作者: 路争, [lzheng09@stu.edu.cn](mailto:lzheng09@stu.edu.cn)

收稿日期: 2022-09-29; 接受日期: 2022-11-07; 在线出版日期: 2022-12-15

<http://www.lifescitech.org>

manipulation of different organisms. This paper briefly introduces the technical principle of CRISPR/Cas9 and summarizes the current application of this technology in researches of intestinal anaerobic bacteria, a few aspects we are concerning and the trends for future development are analyzed as well.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; Gene Editing; Intestinal Bacteria; *Bacteroides*

## 1 引言

肠道菌群是一类存在于人体肠道内,对维持机体健康稳态、生理平衡有重要作用的微生物,它们能够帮助宿主分解多糖、膳食纤维等营养物质,对宿主免疫系统的发育、调节、诱导等至关重要,同时它们与人体的激素系统、大脑(肠-脑轴)及其它代谢通路的功能都有关联,能够以不同方式影响宿主健康[1]。肠道微生物的紊乱也与许多疾病相关,例如肥胖症、肠道炎症、糖尿病、肿瘤和神经退行性疾病等[2]。肠道菌群被称为“人类的第二基因组”,其中,细菌的数量庞大,可达  $10^{14}$  个,而这些细菌 99% 以上都是严格厌氧菌,即只能在无氧或有微量氧气的环境中存活的细菌[3]。

肠道菌群具有高度多样性和复杂性,分离获得肠道厌氧菌纯培养物的工作重要却通常进展缓慢。目前,人体肠道中仍有高达 80% 左右的细菌未被分离培养出来,大多数细菌的功能仍然未知;而对于已分离纯化的肠道菌,相关生理、生化研究也比其他细菌进展迟缓,其中一个重要原因是可用于这类严格厌氧细菌的分子遗传操作技术有局限性[4]。

基因编辑,是指对基因通过敲除、插入或单碱基的删除、插入和替换等操作进行靶向修饰的过程。传统的细菌基因编辑技术往往基于细菌内源 DNA 同源重组的机制,虽然同源重组介导的靶向 DNA 修饰精度较高,但重组效率很低,并且存在极性突变效应(在多顺反子基因结构中,位于前面的结构基因发生无义突变(nonsense mutation),致使翻译终止,使多顺反子中突变位点下游的基因不表达的现象)等缺陷[5]。

总的来说,针对肠道细菌的基因重组策略类似于经典的细菌 RecA 同源重组系统,即靶标 DNA 的同源片段被克隆至自杀性质粒载体上,该质粒需先转入供体菌,之后通过细菌性菌毛的接合作用转移到受体菌中。自杀性质粒不能在受体菌内独立复制,只能通过重组整合到受体菌的染色体基因组或质粒上才能维持存在,这样使包含外源 DNA 片段的自杀质粒整个插入

到与靶标 DNA 片段同源的位置。自杀质粒脱离染色体则需要通过第二次重组,质粒上携带的反向选择标记形成反向选择压力,只有发生第二轮重组、靶 DNA 片段缺失的细菌才能长出菌落[6-7]。这类重组技术的缺点主要有几点:重组效率低、敲除靶基因所需同源臂片段长、反向选择标记在不同菌属间不能通用等[7]。因此,对于肠道细菌研究来说,寻求高效、简便的基因操作技术,能使研究人员快速分析特定基因和调控元件的功能,同时多重基因编辑可以大规模地构建核酸互作,使核酸同蛋白质互作网络研究成为可能。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是从 2012 年开始得到应用的,在随后的几年内围绕该技术的开发和应用研究成为热点,相关报道爆发性增加[8]。该技术作为一种新型基因编辑工具,具有设计和操作简单、成本低、高效准确、通用性广等优势,近年来已广泛应用于动植物和微生物的基因编辑[9]。这项技术是以 RNA 导向的 DNA 识别系统,可在不同生物体中进行高效和特异性的基因编辑和调控,也可进行多重编辑、高通量筛选,具有较强的可扩展性[10]。这些特点使其成为生物医学研究革命性的新工具,而利用 CRISPR/Cas9 技术的优点来实现肠道细菌的基因编辑则将推动这类细菌相关研究的发展。本文简要介绍了 CRISPR/Cas9 技术的原理,对该技术在肠道细菌领域的应用现状进行了总结,也对目前存在的优缺点和未来发展的趋势做了分析。

## 2 CRISPR/Cas 系统的发现与研究历史

CRISPR/Cas 系统是广泛存在于细菌、古菌等的一种获得性免疫系统,是这些生物防御病毒、质粒等入侵自身基因组的“武器”[11]。1987 年,日本学者 Ishino 等在研究大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的碱性磷酸酶基因时首次发现 CRISPR 序列[12],由于当时匮乏的基

基因组信息，并未发现这种序列结构和功能的普遍性及其生物学意义。2002年，荷兰科学家 Jansen 等通过生物信息学分析，发现 CRISPR 序列仅存在于细菌和古菌中，不存在于真核生物或病毒中，并首次提出 CRISPR-associated protein 的概念[13]。2005年，西班牙的 Mojica 以及法国的 Pourcel 和 Bolotin 课题组等首次预测 CRISPR/Cas 的生物学功能可能通过保存病毒（或质粒）的序列信息并获得抵御此类遗传元件再次入侵。该预测于 2007 年被法国科学家 Barrango 等通过实验证实[14]。2011年，Charpentier 团队在酿脓链球菌（*Streptococcus pyogenes*）中鉴定到了 tracrRNA（trans-activating CRISPR RNA），且证实 tracrRNA 既帮助 crRNA 成熟，又是 CRISPR/Cas9 系统抵抗外源核酸所必需[15]。之后，法国科学家 Charpentier 和美国加州大学的 Doudna 团队合作，于 2012 年证实 Cas9-crRNA-tracrRNA 复合物（即 CRISPR/Cas9 系统）可以实现 DNA 的体外精确切割[16]。2013年，张锋团队首次利用 CRISPR/Cas9 系统实现了对人类细胞的基因组编辑[17]。此后，CRISPR/Cas9 作为一种高效的基因组编辑技术，被应用于多种生物的基因编辑，随着研究人员的不懈努力以及科学技术的快速发展，目前这项技术已在应用方面有诸多成果。

### 3 CRISPR/Cas 系统的分类、组成及工作原理

#### 3.1 CRISPR/Cas 系统的分类

CRISPR/Cas 系统依 Cas 蛋白的区别分为 2 个大类，5 个亚型。其中 I、III、IV 为第 1 类，II、V 为第 2 类[18]。

#### 3.2 CRISPR/Cas 系统的组成

CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 序列和与之相关联的 Cas 基因组成。CRISPR 序列是一段 DNA 序列，由多个重复的单元构成，每个单元由一段长度为 24~48 bp 的高度保守的重复序列和长度为 26~72 bp 的间隔序列组成。间隔序列是与外源 DNA 同源的序列，通过转录 CRISPR-derived RNA（crRNA）指导 Cas 蛋白对目的序列的匹配。另一部分是 Cas 蛋白家族和 crRNA 与 Trans-activating crRNA（tracrRNA）形成的复合物，Cas 蛋白家族的基因序列位于 CRISPR 序列上游与之相邻，

每一个类型的 CRISPR/Cas 系统所含的蛋白不同，功能也不同[19]。虽然大部分的 CRISPR 系统需要多种 Cas 蛋白参与，但是 II 型 CRISPR 系统只需要 1 种 Cas9 蛋白即可发挥相应的免疫功能，因此被科研人员改造和应用最多，是目前使用最多的编辑技术。CRISPR 位点由启动子、重复序列同重复序列间的间隔序列构成。在同一 CRISPR 序列中，重复序列是相同的，但间隔序列可以是不同的外源 DNA，并在噬菌体或其他病毒初次入侵时整合至 CRISPR 位点[20]。

#### 3.3 CRISPR/Cas 系统的工作原理

CRISPR 靶向特异性是由两部分决定的，一部分是 RNA 嵌合体和靶 DNA 之间的碱基配对，另一部分是 Cas9 蛋白复合体和一个短 DNA 序列，这个短的 DNA 序列通常在靶 DNA 的 3' 末端作用，被称为 protospacer adjacent motif（PAM）。CRISPR/Cas9 系统的工作原理是以 crRNA 通过碱基的互补配对，与 tracrRNA 特异性结合形成 tracrRNA/crRNA 复合物，然后通过此过程中所形成的复合物来引导核酸酶 Cas9 蛋白，再与 crRNA 配对的序列靶位点剪切双链 DNA。可以通过人为设计这 2 种 RNA，改造形成具有引导作用的 sgRNA（single-guide RNA），引导 Cas9 对 DNA 的定点切割[21]，工作原理见图 1。

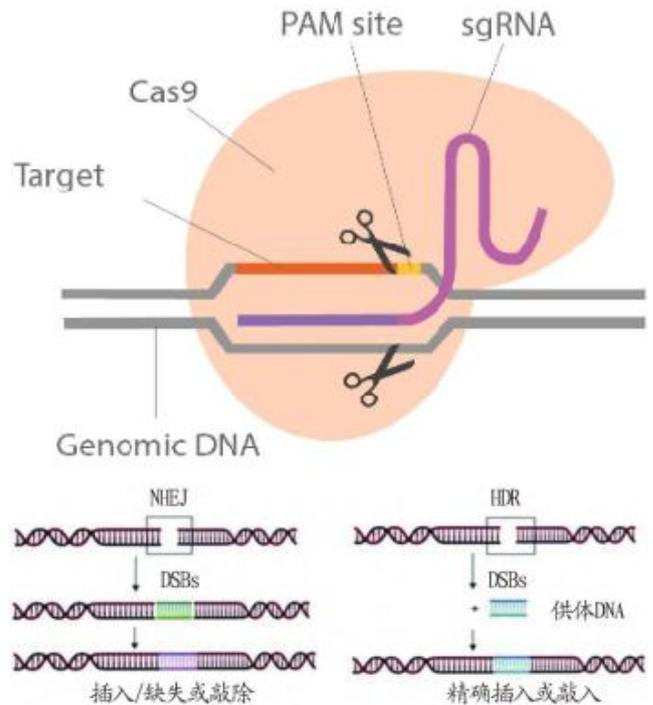


图 1 CRISPR/Cas9 系统原理示意图

Figure 1 Schematic model of CRISPR/Cas9 system

核酸酶 Cas9 的两把剪刀: 表示 Cas9 蛋白含有两个有切割活性的结构域: HNH 结构域和 RuvC 结构域, 其中 HNH 结构域切割与 crRNA 互补的 DNA 链, 而 RuvC 结构域切割非互补链。

## 4 CRISPR/Cas 系统在肠道菌研究中的应用

### 4.1 CRISPR/Cas 系统在大肠杆菌(*E. coli*)研究中的应用

大肠杆菌种类繁多, 是人体肠道中的主要细菌。Jiang 等人在 2013 年将含有 Cas9, dual-RNAs (tracrRNA and crRNA),  $\lambda$ -Red 蛋白和线性 ssDNA 的 CRISPR/Cas9 系统用于在 *E. coli* 的基因组中引入精确突变, 使之效率达到约 65%。该方法的局限性是存在逃逸突变体, 可能是由于靶标物两侧重复序列的重组引起的[22]。之后, Jiang 等人在 2015 年在含有 Cas9, sgRNA,  $\lambda$ -Red 蛋白和线性或环状供体 DNA 的 CRISPR/Cas9 系统中实现了高达 100% 的效率[23]。Reisch 等在 Cas9 的 C 端构建了一个带有 SsrA 标签的 CRISPR/Cas9 系统, 系统中还含有 sgRNA,  $\lambda$ -Red 蛋白和线性供体 DNA。SsrA 标签可被 ClpP 蛋白酶识别, 以降解由于转录泄漏而产生的 Cas9[24]。上述构建的三种 CRISPR 系统和  $\lambda$ -Red 重组系统的共同表达载体可用于在大肠杆菌基因组中引入基因敲除、替换或插入, 且不需要可选择的标记基因, 省略了删除标记所需的工作, 大大缩短了所需的编辑时间。为了扩大 CRISPR/Cas9 系统的应用范围, Zhao 等人在大肠杆菌中开发了一种 CRISPR/Cas9 辅助的无 gRNA 的一步法 (CAGO) 技术, 该技术使用线性供体 DNA 盒和含有 cas9 的 pCAGO 质粒, 靶向通用 N20 序列的 sgRNA 和  $\lambda$ -Red 系统。该技术不需要特定的 sgRNA, 但应通过 HR 将具有最佳靶向效率的通用 N20PAM 序列整合到大肠杆菌染色体中。然后通过 CRISPR/Cas9 靶向该 N20 序列以产生 DSB 并诱导染色体内重组[25]。

CRISPR/Cas 系统广泛用于肠道大肠杆菌的基因遗传操作, 促进了这类细菌的基因功能、调控机制及与人疾病关系相关研究工作的发展。

### 4.2 CRISPR/Cas 系统在拟杆菌 (*Bacteroides sp.*)研究中的应用

拟杆菌属是人类肠道菌中数量最丰富的菌属之一, 约占肠道菌群的 25%, 对肠道功能的维持有重要作用[26]。与大肠杆菌不同, 拟杆菌属于严格厌氧型细菌, 生长环境对低氧条件要求严格, 其功能研究相对来说并不成熟, 若能开发高效的基因编辑工具, 对于探究这类共生菌如何辅助肠道消化膳食纤维、多糖等营养物质, 进而维护肠道健康具有重要价值[27]。

Zheng 等人针对肠道拟杆菌属开发了一种基于 CRISPR/Cas 的无标记基因组编辑工具, 并系统评估了三种不同 CRISPR/Cas 系统的基因组编辑效率, 即 FnCas12a、SpRY 和 SpCas9 在多形拟杆菌 (*B. thetaiotaomicron*) 中的基因组编辑效率, 结论是 CRISPR/FnCas12a 系统的基因组编辑效率最高[28]。研究者成功删除了 *B. thetaiotaomicron* 基因簇的大基因组片段 (50 kb), 表明 CRISPR/FnCas12a 系统不仅可以用于较短的靶标基因敲除, 也适用于长片段基因簇的遗传操作; 此外, 该系统对多种拟杆菌属都能进行有效的基因编辑, 具有通用性, 这一点相比传统的基因编辑技术来说是一大优势[28]。Tajkarimi M. 等通过系统发育分析发现多个 *B. fragilis* 菌株含有天然的 CRISPR/Cas 系统, 认为该系统参与这类细菌通过基因平行转移的方式获得抗生素耐药基因、毒力基因的过程; 此外, *B. fragilis* 是严格厌氧菌, 细胞对氧气环境极其敏感, 胞内的 DNA 容易遭到氧自由基攻击而产生损伤, Tajkarimi M. 等认为 I 型 CRISPR/Cas 对该菌 DNA 的氧化损伤修复非常重要[26]。

### 4.3 CRISPR/Cas 系统在梭菌 (*Clostridium sp.*)领域的研究进展

艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 与拟杆菌类似, 同属于严格厌氧菌, 不同的是, 它们是革兰氏阳性菌, 梭状、产毒芽孢杆菌, 是与抗生素治疗相关的主要梭菌病原体之一[29]。

Soutourina 等人在 2013 年首次发现艰难梭菌中存在 CRISPR/Cas 系统[30]。Hargreaves 和 Andersen 等人对 200 多个艰难梭菌基因组进行生物信息学分析证明了艰难梭菌 CRISPR/Cas 系统属于 I-B 亚型[31]。艰难梭菌的 CRISPR/Cas 系统的特点是具有一组不寻常的

大量 CRISPR 阵列。这些 CRISPR 阵列被定向到染色体复制的方向, 正如观察到的高表达细菌基因一样, 并可能确保它们的最佳转录[32]。Sorek 等人发现在大多数测序的艰难梭菌菌株中, 几个 CRISPR 阵列位于前噬细胞中。其中来自位于前噬菌体中的阵列的 crRNA 被发现是表达得最多的, 并且 R20291 株主动表达的 CRISPR 阵列的预噬定位可能通过靶向其 DNA 在预防相关竞争噬菌体的感染中发挥作用[33]。Hargreaves 等人对与已知序列匹配的艰难梭菌 CRISPR 阵列进行生物信息学分析发现, 它们中的大多数靶向梭状芽孢杆菌噬菌体和前噬菌体区域。这表明这种动脉粥样硬化病原体与噬菌体积极相互作用, 并且 CRISPR/Cas 积极调节这种相互作用[31]。

#### 4.4 CRISPR/Cas 系统在乳酸菌 (*Lactic acid bacteria*) 上的应用

目前 CRISPR/Cas 基因编辑技术在乳酸菌基因组中的应用主要集中在点突变、基因敲入、敲除等, 实现大片段缺失、等位基因替换仍然具有较大挑战性。Oh 等人开发并优化了 CRISPR/Cas9 技术, 对 *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 中的 3 个靶标基因 *lacL*、*srtA* 和 *sdp6* 进行基因敲除, 使其突变率可以达到 90%-100%, 首次实现了 CRISPR/Cas9 技术在乳酸菌这类肠道细菌中的应用, 并证实了 CRISPR/SpCas9 结合 ssDNA 重组是一种高效且切实可行的编辑方法[34]。乳酸菌内源性 CRISPR/Cas 系统编辑工具具有其独特的优势, 能够在一些难以遗传操作的其他乳酸菌中得到复用。Barrangou 等人利用卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*, *L. crispatus*) 中的内源 I-E 型 CRISPR/Cas 系统, 实现编辑 *L. crispatus* 的自身基因组, 敲除了 *p-gtf* 基因和原噬菌体 DNA 包装基因 *Nu1*, 插入了绿色荧光蛋白报告基因。在 *p-gtf* 基因内实现了包括单核苷酸替换和终止密码子插入等在内的多种突变, 首次成功利用内源性 CRISPR/Cas 系统在乳杆菌中完成基因编辑[35]。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统和乳酸菌内源性同源重组修复系统, 研究者在实验室环境下敲除了 *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* 基因组上的四环素抗性基因 *tet-W*, 对解决益生菌日益严重的耐药性问题提出了新的方法[36]。通过向 *Bifidobacterium longum subsp. longum* 基因组上敲入新型寡糖水解酶基因  $\beta$ -Gal, 使其能够利用宿主难以消化吸收的复杂多糖

如果寡糖和  $\beta$ -低聚半乳糖, 赋予其定殖宿主肠道的竞争性优势[37]。

未来, 当多重基因编辑技术和合成生物学相结合时, 利用乳酸菌作为底盘生物按需设计优良的发酵性能, 实现相应的健康和治疗功能以及出色的宿主定殖能力, 将对整个社会的生活、生产方式产生巨大影响[38]。

#### 4.5 CRISPR/Cas 系统在其他肠道菌中的应用

肠道菌群与宿主处于共生状态, 这是自然进化的结果。不同肠道细菌会产生不同的代谢产物, 如短链脂肪酸、多胺类、维生素等, 这些代谢物对宿主健康的影响可能有益, 也或许有害, 而相关机理研究仰仗于高效、便捷的基因操作手段。除了上述细菌种属外, CRISPR/Cas9 技术也已在其他肠道菌群开展应用。例如, 在酵母菌 (*Yeast*) 领域, 刘磊等利用 CRISPR/Cas9 敲除了基因 *gpd2*, 构建了适用于酿酒酵母的基因敲除系统[39]。李梦琦等成功地在 *Lager* 酵母中构建了基因敲除系统[40]。Huang 等在杜邦嗜热菌中开发了嗜热和嗜温两个 CRISPR/Cas9 系统, 并表征了真菌适应和热内酯生物合成中的关键基因功能[41]。

近年来, 化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 CRISPR/Cas9 系统作为基因组修饰工具被广泛应用, SpCas9 的 RuvC 和 HNH 核酸酶结构域都可以通过点突变 (SpCas9 中的 D10A 和 H840A) 转变为无切割活性但有靶标结合活性的 dCas9 (dead Cas9), dCas9 基于 sgRNA 靶向序列与靶 DNA 结合[42]。Xu 等人则研发了更先进的嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) CRISPR/Cas9 系统 (StCas9), 该技术脱靶效率低、特异性好, 所使用的 Cas9 蛋白片段也更小[16]。

利用 CRISPR/Cas 技术也可用来研究肠道细菌中转录调控因子对于基因功能的转录调控。Aleš Berlec 等实现了乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 中的基因转录抑制, 其研究仅用一个工作质粒 pNZCRISPRi 就实现了转录抑制, 但由于 sgRNA 也受到诱导型启动子 PnisA 的调控, 所以其表达水平处于较低的水平, 对转录抑制效率也有一定影响[43]。

CRISPR/Cas9 基因编辑系统通过基因操纵肠道菌的能力对于理解肠道菌和其新陈代谢至关重要。该技术提供了简单、快速和高效的方法对于各种肠道菌的

基因功能、代谢调控等的研究。随着以后 CRISPR/Cas9 技术的改进和不断完善, 该技术在肠道菌上的应用也将越来越广[44]。

## 5 CRISPR/Cas 系统在肠道细菌上的研究展望

肠道菌群相关的基础和转化研究的领域目前处于蓬勃发展的时期, 要解读肠道菌群对代谢的整体作用, 仍需解决诸多问题, 例如, 如何确认代谢物的来源、如何注释代谢组学研究中成百上千未知代谢物等。肠道微生物群具有高度复杂性, 基于测序和培养的肠道微生物检测, 结合肠道菌群、噬菌体组、古菌群、病毒组和分枝菌群的机理研究, 将极大地提升我们对肠道微生物群落相互作用的认识。此外, 肠道微生物组产生的多种化学物质会对宿主生理学和多种病理学产生影响, 有关这些化学物质的新知识可能会为我们开辟出新的有效解决代谢性疾病的干预途径, 为预防或对抗常见的人类代谢疾病, 稳定全人类的代谢健康, 提供更多的治疗依据[45]。

基于 CRISPR/Cas 的基因编辑技术已经在原核生物中得到广泛应用。利用不断发展的 CRISPR/Cas 基因编辑工具箱对肠道细菌进行基因修饰, 以增强其维持人类健康及调节宿主免疫反应的能力, 或者降低某些肠道细菌引起人体疾病的风险, 这都将具有广泛的应用前景。得益于某些乳酸菌对人体肠道的独特适应性和安全性, 有研究表明几种乳杆菌已被用作黏膜递送疫苗和生物抗菌剂的底盘生物[46]。不断探索基因编辑工具也说明我们对细菌生物学系统的理解不断加深。当未来合成生物学和多基因编辑技术相结合时, 利用安全的基因编辑的肠道细菌去定制健康和治疗疾病, 这将为整个社会生活生产方式产生巨大的影响[38]。CRISPR/Cas9 技术在微生物代谢工程、系统生物学、合成生物学等领域的应用, 能使我们更好地获得对生命机制的认知, 同时其在有益目的产物的获得、有害基因的清除以及微生物育种等领域的应用也将有无限可能。我们有理由相信, CRISPR/Cas9 基因编辑技术将会在现有技术手段下进一步改进医学、遗传学、生物信息学以及胚胎学等领域的发展, 对研究各种遗传疾病的病理生理机制和生物学机制起到巨大的推动作用, 对人类健康发展带来更多的福音[47]。

## 6 结论

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是新型生物技术的代表, 自该技术发现以来, 其应用和研究便不断地深化, 在基因工程育种、农作物品种改良、植物基因功能的研究等多个领域都有了重要突破。近年来研究人员利用 CRISPR/Cas9 系统进行精准基因编辑, 取得了令人瞩目的研究成果, 也展示了该技术巨大的应用潜力。尽管 CRISPR/Cas9 系统仍有如靶专一性不强、打靶效率低等技术局限, 系统还需进一步完善, 仍有极大的研究空间需要探索。但我们相信随着生物技术的发展, CRISPR/Cas9 系统在实际应用中存在的技术壁垒终将被攻克, 它作为新一代基因编辑系统将在医学、生物、农业等各领域发挥更重要的作用。

## 参考文献

- [1] 陈卫, 田培郡, 张程程, 翟齐啸. 肠道菌群与人体健康的研究热点与进展 [J]. 中国食品学报, 2017, 17 (02): 1-9.
- [2] 王文娟, 孙冬岩, 孙笑非. 肠道菌群的组成、调节及其对宿主健康的影响 [J]. 饲料研究, 2017 (21): 25-27.
- [3] 潘杰, 刘来浩, 牟建伟. 肠道菌群与人类健康研究进展 [J]. 山东师范大学学报 (自然科学版), 2021, 36 (04): 337-365.
- [4] 陈晓娇. 人体肠道可培养细菌的初步探索及一株肠道细菌新种的分类鉴定 [D]. 南方医科大学, 2019.
- [5] 李伟勋, 芦晶, 张书文, 逢晓阳, 吕加平. CRISPR/Cas 基因组编辑技术在乳酸菌中的应用及研究展望 [J]. 微生物学报, 2021, 61 (10): 2971-2985.
- [6] 杨晓炼, 李涵, 朱书. 肠道菌群调控宿主天然免疫的机制研究 [J]. 中国动物传染病学报, 2021, 29 (04): 16-30.
- [7] 田雨顺, 罗鹏, 刘秋婷, 胡超群. 细菌重组系统及其应用研究进展 [J]. 微生物学通报, 2017, 44 (02): 473-482.
- [8] 姜奇彦, 胡正, 孙现军, 张辉. CRISPR-Cas9 基因编辑的历史 [J]. 科技传播, 2020, 12 (20): 1-5.
- [9] 邓名, 丁俊美. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在微生物细胞中的应用研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28 (03): 787-795.
- [10] 谭磊, 陈明月, 沈彬. 基因编辑研究进展与展望 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2021, 41 (11): 1689-1694.
- [11] 李迪. CRISPR/Cas 基因编辑技术及应用 [J]. 科技风, 2018 (21): 84-85.

- [12] Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5429-5433.
- [13] Jansen R., Embden JD., Gaastra W., Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43: 1565-1575.
- [14] Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero DA., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315: 1709-1712.
- [15] Deltcheva E., Chylinski K., Sharma CM., Gonzales K., Chao YJ., Pirzada ZA., Eckert MR., Vogel J., Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471: 602-607.
- [16] Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna JA., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337: 816-821.
- [17] Cong L., Ran FA., Cox D., Lin S. L., Barretto R., Habib N., Hsu PD., Wu XB., Jiang WY., Marraffini LA., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339: 819-823.
- [18] Smargon Aaron A., Shi Yilan J., Yeo Gene W. RNA-targeting CRISPR systems from metagenomic discovery to transcriptomic engineering [J]. *N at Cell Biol*, 2020, 22 (2): 143-150.
- [19] 冯江浩, 魏思昂, 闫丽欢, 崔洁, 冯焱. CRISPR/Cas9 基因编辑技术及应用研究概述 [J]. *动物医学进展*, 2021, 42 (03): 123-126.
- [20] 欧阳乐军, 李莉梅, 马铭赛, 王玉涛, 尹爱国. CRISPR/Cas9 技术发展及其应用进展 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2019, 47 (10): 34-40.
- [21] 李晓开, 龙科任, 麦苗苗, 等. CRISPR-Cas9 技术的原理及其在猪研究中的应用 [J]. *生命科学*, 2018, 30 (6): 690-700.
- [22] Jiang W, Bikard D., Cox D., Zhang F, Marraffini L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [J]. *Nat. Biotechnol.* 31 (3): 233-239.
- [23] Jiang Y, Chen B, Duan C, Sun B, Yang J, Yang S. (2015). Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (7): 2506-2514.
- [24] Reisch C. R., Prather K. L. J. (2015). The No-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in *Escherichia coli* [J]. *Sci. Rep.* 5, 15096. 10.1038.
- [25] Zhao D, Feng X, Zhu X, Wu T, Zhang X, Bi C. (2017). CRISPR/Cas9-assisted gRNA-free one-step genome editing with no sequence limitations and improved targeting efficiency [J]. *Sci. Rep.* 7 (1), 16624. 10.1038.
- [26] Tajkarimi M., Wexler HM. CRISPR-Cas systems in *Bacteroides fragilis*, an important pathobiont in the human gut microbiome [J]. *Front Microbiol.* 2017 Nov 23; 8: 2234.
- [27] Lu Z, Sethu R., Imlay JA. Endogenous superoxide is a key effector of the oxygen sensitivity of a model obligate anaerobe [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Apr 3; 115 (14): E3266-E3275.
- [28] Zheng L, Tan Y, Hu Y, Shen J, Qu Z, Chen X, Ho CL, Leung EL, Zhao W, Dai L. CRISPR/Cas-Based genome editing for human gut commensal *Bacteroides species* [J]. *ACS Synth Biol.* 2022 Jan 21; 11 (1): 464-472.
- [29] Abt M. C., McKenney P. T., Pamer E. G. (2016). *Clostridium difficile colitis*: pathogenesis and host defence [J]. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 609-620.
- [30] Soutourina O. A., Monot M., Boudry P., Saujet L., Pichon C., Sismeiro O., et al. (2013). Genome-wide identification of regulatory RNAs in the human pathogen *Clostridium difficile* [J]. *PLoS Genet.* 9: e1003493. 10.1371.
- [31] Hargreaves K. R., Flores C. O., Lawley T. D., Clokie R. J., Trevor D., Hargreaves K. R., et al. (2014). Abundant and diverse clustered regularly interspaced short palindromic repeat spacers in *Clostridium difficile* strains and prophages target multiple phage types within this pathogen [J]. *mBio* 5: e01045-13. 10.1128.
- [32] Arakawa K., Tomita M. (2007). Selection effects on the positioning of genes and gene structures from the interplay of replication and transcription in bacterial genomes [J]. *Evol. Bioinform. Online* 3: 279-286.
- [33] Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. (2008). CRISPR — a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea [J]. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 181-186.
- [34] Oh JH., Van Pijkeren JP. CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42 (17): e131.
- [35] Hidalgo-Cantabrana C., Goh YJ., Pan M., Sanozky-Dawes R., Barrangou R. Genome editing using the endogenous type I CRISPR-Cas system in *Lactobacillus crispatus* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116 (32): 15774.
- [36] Hidalgo-Cantabrana C., O'Flaherty S., Barrangou R. CRISPR-based engineering of next-generation lactic acid bacteria [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37: 79-87.

- [37] Goh YJ., Klaenhammer TR. Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in *probiotic microbes* [J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2015, 6 (1): 137-156.
- [38] Du RX, Guo MZ, Xie ZX, He XY, Huang KL, Xu WT. Application and prospects of synthetic biology in improving intestinal health [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34 (1): 49-59.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] HUANG W P, DU Y J, YANG Y, et al. Two CRISPR/Cas9 systems developed in *Thermomyces dupontii* and characterization of key gene functions in thermolide biosynthesis and fungal adaptation [J/OL]. Applied and environmental microbiology, 2020, 86 (20).
- [42] Xu K, Ren C., Liu Z, Zhang T, Zhang T, Li D, et al. (2015). Efficient genome engineering in eukaryotes using Cas9 from *Streptococcus thermophilus* [J]. Cell. Mol. Life Sci. 72: 383-399.
- [43] Berlec A., Skrlec K., Kocjan J., Olenic M., Strukelj B. 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): 1009.
- [44] 张家翔, 韩佃刚, 杨云庆, 周思佳, 杨妮, 信吉阁. CRISPR/Cas9 技术及其应用于基因敲除研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2022, 50 (03): 16-18.
- [45] Fan Y. Pedersen, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease [J]. Nat Rev Microbiol 19, 55-71 (2021).
- [46] LeCureux JS., Dean GA. *Lactobacillus mucosal vaccine vectors*: Immune responses against bacterial and viral antigens [J]. mSphere, 2018, 3 (3): e00061-18.
- [47] 张思桐, 黄妙惠. CRISPR/Cas9 系统在基因编辑和疾病治疗中的应用 [J]. 福建轻纺, 2021 (02): 12-17.