

# CRISPR/Cas 基因编辑技术及其在微藻研究中的应用

陈映丹<sup>1, 2</sup> 张扬<sup>2</sup> 夏婧<sup>1</sup> 孙虹霞<sup>1</sup>

(1. 遵义医科大学珠海校区 免疫与病原生物学教研室, 珠海 519041; 2. 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广州 510301)

**摘要:** 微藻由于在医药、食品、可再生燃料和化学原料等方面的潜力, 受到了研究者越来越多的关注和青睐。然而, 合适基因编辑方法和转化工具的缺乏, 使得微藻基因工程的进展还相对比较缓慢。随着分子生物和基因编辑技术的发展, CRISPR 技术凭借简便、特异和高效的优势, 逐渐成为探讨基因功能、提高植物育种和增加代谢物产物等研究的有力手段。基于此, 本文综述了 CRISPR/Cas 的 2 种主要类型, 重点论述了其在微藻领域中的应用进展, 并总结了 CRISPR 技术在微藻应用中所存在的问题, 期望为以后的研究提供启发和参考。

**关键词:** 基因编辑; CRISPR/Cas; 微藻; Cas9; 转化

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0877

## Gene Editing Technology of CRISPR/Cas and Its Applications in Microalgae Research

CHEN Ying-dan<sup>1, 2</sup> ZHANG Yang<sup>2</sup> XIA Qiang<sup>1</sup> SUN Hong-xia<sup>1</sup>

(1. Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Department of Immunology and Pathogen Biology, Zhuhai 519041; 2. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510301)

**Abstract:** Due to their potentials in medicine, food, renewable fuels and chemical raw materials, microalgae has attracted more and more attentions from current researchers. However, the progress of microalgae in genetic engineering is relatively slow because it is lack of suitable gene editing methods and transformation tools. With the development of molecular biology and gene editing technology, CRISPR technology has emerged as a powerful method for studying gene function, improving plant breeding and increasing metabolite products with its advantages of simplicity, specificity and efficiency. Based on these, we introduced the two main types of CRISPR/Cas, focusing on the application progress of CRISPR in microalgae, and summarized the issues existing in the application of CRISPR technology in microalgae, aiming to provide inspiration and reference for future research.

**Key words:** gene editing; CRISPR/Cas; microalgae; Cas9; transformation

基因编辑技术是指在基因水平上, 对目标基因进行精确插入、删除和修饰, 从而改变基因的结构与功能的生物技术。近年来, 基因编辑技术已从锌指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN) 技术、转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like

effector nucleases, TALEN) 技术, 发展到成簇的规律间隔的短回文重复序列 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated) 核酸酶系统。其中, ZFN 和 TALEN 技术依赖于 DNA 序列与蛋白质模板的特异性结合, 设计

收稿日期: 2021-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860618)

作者简介: 陈映丹, 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子免疫学; E-mail: cydia0505@163.com

通讯作者: 孙虹霞, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 分子免疫学; E-mail: hxsun@zmc.edu.cn;

夏婧, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 分子免疫学; E-mail: xiaqiang1973@126.com

和组装非常繁琐,且成本较高。相比之下,CRISPR/Cas 技术作为一种新兴的基因组编辑工具,能够引导 gRNA 对 DNA 的识别及编辑,具有成本低、设计简单、高效、特异的显著优势。

微藻作为初级生产者<sup>[1]</sup>,种类繁多,约有 5 万余种,且分布广泛,生存条件多样化,甚至可在高温、高盐等极端条件下生存。目前,其在食品、工业、农业、医学等多个领域均有应用<sup>[2]</sup>,具有改善免疫功能、预防心血管疾病、调节土壤理化性能、生产生物柴油、降解重金属等功效<sup>[3-10]</sup>。另一方面,随着人口的增长,资源储备的枯竭,以及土地资源和自然环境资源等的不可再生性,使得人们面临着资源短缺和环境污染的巨大挑战,对微藻进行遗传改良,以寻找可替代的资源,成为了人们应对挑战的重要举措之一。然而,野生微藻因其自身碳固定率、油脂积累率和产氢效率都较低,加之商业成本高昂等原因,严重影响了其大规模应用。因此,寻找并利用一种强大、廉价、精确的基因编辑技术,建立更加经济绿色的生产工艺,是克服这些问题并实现后期大规模生产的重要策略,其中,CRISPR 系统的优越性,无疑可为微藻的遗传改良和应用提供重要的支持。

鉴于此,本文在简要介绍 CRISPR/Cas 基因编辑技术的发展历程的基础上,讨论了在微藻中应用较为成熟的 Cas9 和 Cpf1 两种系统的不同特征,着重阐述了 CRISPR 技术在微藻领域的发展方向和应用,并探讨了 CRISPR 基因编辑技术在微藻生物资源开发利用上的发展前景,以期为 CRISPR/Cas 系统在微藻基因编辑的相关研究提供参考。

## 1 CRISPR/Cas 基因编辑技术概述

### 1.1 CRISPR/Cas 基因编辑技术的发展历程

CRISPR/Cas 可通过特异性 RNA 引导 Csa 蛋白对 DNA 进行靶向切割,是迄今为止已知的原核生物中唯一的适应性免疫系统。自 1987 年, Ishino 等<sup>[11]</sup>在研究大肠杆菌碱性磷酸酶同工酶转化时,发现了串联的、间隔的短回文重复序列,并在其他细菌中得到鉴定<sup>[12-17]</sup>。但直到 2002 年,才正式将存在于细菌和古细菌中的有规律的重复序列命名为成簇的规律间隔的短回文重复序列 CRISPR,并首次发现在

其附近还有 CRISPR 相关基因 Cas<sup>[18]</sup>。之后,西班牙学者 Mojica 等<sup>[19]</sup>发现 CRISPR 间隔序列与噬菌体和外来质粒序列具有同源性,推测 CRISPR 可能与细菌的免疫防御有关联。随后, Barrangou 等<sup>[20]</sup>证明了 CRISPR/Cas 系统参与了细菌对噬菌体免疫防御作用的功效。2008 年和 2010 年, CRISPR 的干扰工作<sup>[21]</sup>及其干扰机制<sup>[22]</sup>分别得到了揭示。此时,科研人员已经对 CRISPR/Cas 系统的作用机制有了基本了解(图 1)。

2012 年,美国 Emmanuelle 和 Jennifer 实验室发现嗜热链球菌 CRISPR/Cas 系统的 Cas9-crRNA 复合物在体外引入了 DNA 特定位点的双链断裂,该断裂序列可与 crRNA 互补,证实 Cas9-crRNA 复合物作为由 RNA 引导的核酸内切酶,具有识别目标序列和切割 DNA 的功能<sup>[23-24]</sup>。2013 年,张锋团队首次使用 CRISPR/Cas9 工具在哺乳动物细胞中进行了有效的基因组编辑<sup>[25]</sup>。自此,使用 CRISPR/Cas9 敲除靶基因逐渐成为生物科技领域的热门研究技术,为基因功能研究、动植物育种和生物量产率增加提供了新的技术支持。

### 1.2 CRISPR/Cas 基因编辑技术的分类

CRISPR 系统包括一段成簇的短回文重复序列和一系列 Cas 蛋白编码基因,如 Cas 1、Cas 2、Cas 4 和效应蛋白 Cas 9、Cpf 1 等,进一步细化,其可被分为 2 大类、6 种类型和 33 个子类型(图 2)<sup>[26]</sup>。其中,Class I 类系统包括 type I、type III 以及 type IV,依赖于多亚基蛋白质复合物,可利用几种 Cas 蛋白和 crRNA 形成效应复合物;Class II 类系统包括 type II、type V 以及 type VI,仅使用单一效应蛋白,利用大量的单组分 Cas 蛋白与 crRNA 结合以介导干扰过程。目前,由于克隆及在宿主细胞传递的便利性,Class II 类效应子核酸酶应用更为广泛,而 type II 的 CRISPR/Cas9 系统和 type V 的 CRISPR/Cpf 1 系统,是目前研究最深入、应用最广泛的两种类型(表 1)。

1.2.1 依赖于 Cas9 的 CRISPR 基因编辑 化脓性链球菌 Cas9 核酸酶 (SpCas9) 是在植物、动物和微藻中进行基因组编辑最常用的 Cas9 变体。CRISPR/Cas9 免疫防御系统主要包含两部分,引

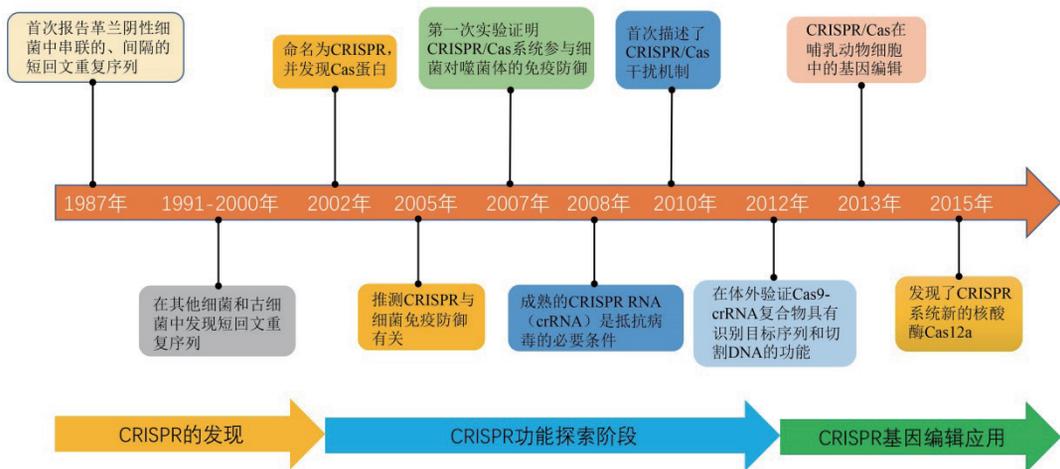


图1 CRISPR 研究发展过程时间线

Fig. 1 The time line of the CRISPR development process

表1 Cas9 和 Cpf1 的不同特征

Table 1 Distinct characteristics of Cas9 and Cpf1

特征	Cas9	Cpf1
Characteristic		
CRISPR 分类	Class 2, type II Class 2, type V	
来源	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Francisella novicida</i> <i>Acidaminococcus</i> sp. <i>Lachnospiraceae bacterium</i> <i>Moraxella bovoculi</i>
核酸酶结构域	HNH、RuvC	RuvC
CRISPR-RNA	crRNA、tracrRNA	crRNA
PAM	NGG	TTTN
切割特点	平末端	黏性末端
RNAase 活性	无	有

导 RNA (gRNA) 和 Cas9 蛋白。gRNA 可结合到一个特定的目标 DNA 序列, 并通过一个简短的 DNA 序列, 邻近原间隔相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 定位, 通常是“NGG”<sup>[27]</sup>。由于 PAM 序列位于外来的 DNA 的原始间隔区旁边, 不在基因组 CRISPR 基因座中的间隔区旁边, 因此 PAM 有助于区分自身和非自身 DNA, 从而防止自身免疫的产生。Cas9 具有核酸酶活性, 负责切割 DNA 双链。当形成 gRNA-Cas9 复杂形式, Cas9 在 PAM 序列前的 3 个碱基点进行双链切割, 主要产生平末端<sup>[24]</sup>; 切割点通常经过非同源端连接 (( non-homologous end

joining, NHEJ) 修复, 这种连接通常容易出错, 导致切割点插入或删除, 而这种突变通常会导致移码突变, 影响蛋白质转录翻译, 从而破坏基因的功能。1.2.2 依赖于 Cpf1 核酸酶的 CRISPR 基因编辑 2015 年, 张峰团队发现了 CRISPR 系统新的核酸酶 Cas12a (后期更改命名为 Cpf1)<sup>[28]</sup>。CRISPR/Cpf1 系统与 Cas9 系统在功能原理上相似, 但与 Cas9 系统相比, 存在着以下差别。首先, Cpf1 相关的 CRISPR 阵列在转录为成熟的 crRNA 的过程中, 无需 tracrRNA 和 RNase III 参与; 其二, Cas12 识别富含 T 的更长的 PAM 序列“TTTN”, Cas9 识别富含 G 的 PAM 序列“NGG”; 其三, Cpf1 蛋白切割产生了黏性末端<sup>[28]</sup>。

与 Cas9 系统相比, CRISPR/Cpf1 系统更具有有一些优势<sup>[29]</sup>, 主要表现 Cpf1 可在不需要 tracrRNA 的特性的条件下更简单地制备指导 RNA, 且 Cpf1 具有的单个核酸酶结构域 (RuvC) 体积比 Cas9 小, 编辑效率更准确有效; Cpf1 蛋白切割产生的黏性末端, 有利于目的基因利用非同源重组的方法插入位点; Cpf1 识别更长的原间隔子相邻基序 (PAM), 减少了其在富含 GC 的基因组上被误读的机会, 从而导致靶标突变效率大大提高<sup>[29]</sup>。在 PAM 识别后, Cpf1 将目标 DNA 切割到 PAM 位点的下游更远的位置, 以使其在非同源末端连接过程中得以保留。而在 Cas9 中, PAM 位点靠近切割位点通常会导致其破坏,

从而排除了之后的编辑工作。CRISPR/Cpf1 基因编辑可将目标基因重新定位以进行重复编辑,从而提高了目标效率。

**1.2.3 CRISPR 基因调控** CRISPR 干扰和 CRISPR 激活 CRISPR/Cas 系统还可通过催化失活的 DNase-dead Cas (dCas) 变体进行基因调控,用于 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 和 CRISPR 激活 (CRISPR activation, CRISPRa)。如果 Cas9 的两个蛋白结构域 (HNH 和 RucV) 失活,即可突变为一个保留了靶向 DNA 结合能力而无催化活性的 Cas9 蛋白 (dCas9)<sup>[30-31]</sup>。dCas9 是调节目标基因转录水平的工具,基因抑制的程度可以通过调节 dCas9 的表达或调节 gRNA 的结合位置来控制。为了提高效率,dCas9 蛋白通常与各种转录抑制因子(如 KRAB)或者转录激活因子(如 VP64)融合,使目标基因在双重效应下受到最大的抑制或上调。此外,与传统的基因组编辑方法相比,使用 CRISPRi 造成的抑制是可逆的过程,甚至可以同时调节多个靶基因的表达。基于此,CRISPRi 具有发展为一种操纵和修饰代谢途径关键基因工具的潜能。

## 2 CRISPR/Cas 基因编辑技术在微藻中的应用

作为一种新兴的生物技术工具,CRISPR 基因编辑技术在生物的基因功能研究,以及动植物品种如水稻、高粱、小麦、大豆和玉米等的遗传改造等方面展现出了广阔的应用前景<sup>[32-37]</sup>。随着技术的成熟和基因组测序成本的降低,CRISPR 技术在微藻上的应用也得到了快速发展。据报道,CRISPR 技术在微藻中的应用最早是在模式生物莱茵衣藻中实现的<sup>[38]</sup>,随着莱茵衣藻<sup>[39]</sup>和小球藻<sup>[40]</sup>等藻类基因组测序的完成,明确的遗传背景更有力地推动了其在衣藻、蓝藻等多种微藻基因工程中的研究和应用。将 CRISPR 技术应用于微藻中,不仅可证明特定基因的功能,开发具有工业性状的菌株,而且与其他工程核酸酶相比,还具有高效率,高准确性和简便性的特性。

### 2.1 衣藻

对模式藻莱茵衣藻的基因工程研究早在几十年前就开始了<sup>[41]</sup>。莱茵衣藻具有单细胞形态,培养条

件简单,可自养、异养、混合营养生长等特征,是首批对其线粒体和叶绿体基因组进行测序的藻类之一<sup>[42]</sup>。同时,许多异源转基因已在衣藻中表达,包括许多抗生素抗性标记、报告基因等,这些工具的开发对研究基因表达和筛选转化细胞至关重要。这些特征使得其作为早期研究基因编辑技术的模型藻类。

自 2014 年 CRISPR/Cas9 系统首次被应用在莱茵衣藻的基因编辑中,Jiang 等<sup>[43]</sup>也成功将 Cas9 和 sgRNA 转入衣藻细胞进行了短暂表达,并成功敲除了莱茵衣藻中内源的雷帕霉素敏感性基因 *FKB12*。然而,在超过  $10^9$  个细胞的 16 次独立转化实验中,仅有一个带有雷帕霉素抗性的突变体菌落产生,表现出极低的转化效率,并提示 Cas9 潜在毒性的存在。为了避免 Cas9 载体引起的细胞毒性和脱靶效应,2016 年,Shin 等<sup>[44]</sup>在体外合成 Cas9-gRNA 核糖核蛋白复合物 (RNP),并通过电穿孔方法直接将其转化至莱茵衣藻中,成功在 *MAA7*, *CpSRP43* 和 *Ch1M* 三个不同基因座上获得 CRISPR/Cas9 诱导的突变,与载体驱动转化相比,RNP 方法对基因沉默的效率提高了 100 倍,而且无非靶向效应。

作为具有多种代谢工程技术和工具的模式生物,莱茵衣藻可用于黄斑色素的工业生产。叶黄素和玉米黄质是膳食类胡萝卜素,可降低年龄相关性黄斑变性,在维持眼睛健康方面发挥着关键作用。Baek 等<sup>[45]</sup>使用预组装的 RNP 递送方法敲除玉米黄质环氧化酶 (zeaxanthin epoxidase, *ZEP*) 基因,发现 *ZEP* 敲除突变体可持续产生玉米黄质,光合产量也得到了大幅度提高<sup>[46]</sup>。再者,由于 Cas9 蛋白只具有瞬时活性并随后被细胞内源蛋白酶降解,因此 RNP 也减少了脱靶效应和细胞毒性。

2017 年,Cpf1 核酸酶第一次在莱茵衣藻进行了试验,通过将 Cpf1 RNP 与单链寡聚脱氧核苷酸 (ssODNs) 作为 DNA 修复模板,在莱茵衣藻中实现了同源定向的 DNA 替代,其共转染可达到 10% 的精确效率,且 Cpf1 RNP 单独转化 *FKB12* 基因的靶向效率与 Cas9 RNP 相似。同年,研究人员首次使用 CRISPRi 系统用于莱茵衣藻中脂质的基因调控<sup>[47]</sup>。磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate

carboxylase, PEPC) 是脱羧酶家族中的一种关键酶, 它与磷酸烯醇丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate, PEP) 形成草酰乙酸直接相关, 草酰乙酸流入三羧酸循环以进行蛋白质合成。通过下调 *PEPC1* 编码蛋白的表达, 调节碳在脂质中的流向, 成功提高了莱茵衣藻的生物量和脂质积累速率。*MAA7* 是编码色氨酸合酶  $\beta$ -亚基的基因, 无功能的 *MAA7* 突变体可以在含有 5-FI 色氨酸类似物的培养基上进行营养缺陷型选择。为解决低下的基因编辑效率, 2020 年, 研究者选择研究 *MAA7* 基因, 使用预先组装的 RNP 复合物, 成功靶向敲除莱茵衣藻 *MAA7* 基因<sup>[48]</sup>, 通过 *MAA7* 突变体的选择和鉴定, 评估 *MAA7* 的基因编辑效率<sup>[44]</sup>; 通过在 RNP 上添加双链 HDR 模板, 评估靶向 *MAA7* 的 HDR 敲入效率, 阐明了优化 RNP 复合物的浓度和转化方案对于实现高效率的靶向敲除的重要性; 同样的, 重组位点和 HDR 模板的浓度的优化对于实现高效率的 HDR 介导的敲入也至关重要<sup>[48]</sup>。同时, 该优化方法也可以扩展到其他具有工业潜力的藻类。

## 2.2 蓝藻

蓝藻以其能利用太阳光和  $\text{CO}_2$ , 且遗传操作适应性好的特性, 成为了生产生物燃料和生物衍生化学品的理想底盘生物<sup>[49-50]</sup>。然而, 蓝藻基因组的修饰由于部分蓝藻是寡倍体或多倍体而变得耗时和复杂。直到 CRISPR/Cas 技术对基因组编辑方式的改变, 使得蓝藻的代谢工程有了新的突破。

2016 年, 研究者第一次在蓝藻中使用了 CRISPR/Cas9 系统。*nblA* 基因是聚球藻 2973 中藻胆体降解的必需元素。野生型聚球藻 2973 菌株在缺乏硝酸盐的培养基中生长时表现出黄色漂白效果, 但 *nblA* 删除菌株具有明显的非漂白表型, 并在相同条件下保持绿色。通过选择敲除 *nblA* 基因, 可观地表明了蓝藻中瞬时 Cas9 表达可以实现基因编辑, 并且 Cas9 的存在提高了编辑效率<sup>[51]</sup>。随后, Li 及其同事通过敲除 *glgC* 基因, 使蓝藻中的大部分碳通量从糖原转移到琥珀酸酯, 从而产生更高水平琥珀酸酯的 *glgC* 缺失突变体<sup>[52]</sup>。但也发现高浓度的 Cas9 具有毒性, 可降低蓝藻细胞的生存力, 从而促使人们探索通过使用新的 Cpf1 核酸酶来克服这一障碍。2016 年, Ungerer 研究团队<sup>[53]</sup> 对 Cpf1 和 Cas9 两

种蛋白的毒性评估结果显示, Cpf1 的毒性显著低于 Cas9, Cpf1 是蓝藻基因组编辑的较为合适的核酸酶, 并首次通过 2 种蓝藻的缺失突变、点突变以及插入突变, 研究了 Cpf1 系统的多功能性<sup>[53]</sup>。

基因的敲除或敲入有时会损害宿主生物的生存力, 但 CRISPRi 为蓝藻工程学提供了另一种可行的方法, 该方法依赖于无酶活性的 dCas9, 这对不能删除而只能降低其表达的必需基因的研究尤其重要。Yao 等<sup>[54]</sup> 首次在蓝细菌中引入了 CRISPRi 系统通过下调 *phaE* 和 *glgC* 基因, 降低多羟基丁酸酯和糖原的产生, 抑制 *phaE* 基因有效消除了集胞藻属中的聚羟基丁酸酯 (polyhydroxybutyrate, PHB) 的合成, 抑制 *glgC* 基因可使糖原合成大幅度降低。同样的, Huang 等<sup>[55]</sup> 通过抑制 *glgC*、*sdhA* 和 *sdhB* 基因, 下调糖原合成, 使琥珀酸水平提高了 12.5 倍。Higo 及其同事采用 CRISPRi 技术, 通过抑制鱼腥藻 *glnA* 基因不仅可高效生产铵盐, 还可控制细胞以诱导剂依赖的方式开启和关闭铵的产生<sup>[56]</sup>。然而, 研究人员在 2018 年发现 dCas9 可改变大肠杆菌的形态, 使其成异常的丝状形态, 推测 dCas9 影响了细菌的细胞分裂, 并对细胞膜的结构产生了影响<sup>[57]</sup>。这促使了研究者对不同 Cas 蛋白 CRISPR 干扰系统开展了进一步的研究。甲基-赤藓糖醇-4-磷酸 (methyl-erythritol-4-phosphate, MEP) 途径中关键酶的过度表达和融合导致蓝藻光合角鲨烯的大量生产, 首次蓝藻中使用 CRISPR/dCpf1 系统, 有效阻止了转录启动, 通过抑制 *acnB*、*cpcB2* 关键基因, 提高了光合角鲨烯的产量<sup>[58]</sup>。由此可见, dCpf1 介导的 CRISPRi 系统极大地促进了蓝藻代谢工程的研究, 是提高蓝藻生物量切实可行的技术和方法。

CRISPR 的另一个功效是多路复用, 即多个基因可以并行编辑而不是单独靶向。Kaczmarzyk 等<sup>[59]</sup> 的研究中运用 CRISPR 多路复用的作用, 将脂肪酰基重新定向至脂肪醇合成, 同时抑制了 6 个编码消耗酰基 ACP 途径的酶的天然基因, 使 C18 脂肪醇生产率提高了 3 倍左右。多路复用开辟了应用组合方法优化蓝藻的可能性, 反过来又使蓝藻代谢过程得到更大更广的覆盖。总之, CRISPR 技术的出现及广泛应用无疑加速了蓝藻代谢工程的研究和进展。

### 2.3 硅藻

硅藻是单细胞真核生物,在全球海洋中碳和硅的循环利用中起着至关重要的作用。同时,由于脂质的高水平积累,硅藻被认为是生物燃料生产的重要候选者,在药物,化妆品,营养补充剂和生物燃料中具有潜在应用价值。因此,了解 CRISPR 技术在硅藻工业上的开发应用也极为必要。

2016年, Nymark 等<sup>[60]</sup>首次在硅藻中报道了基于 Cas9 的基因组编辑技术,通过转化 Cas9-gRNA 质粒,对 8 个突变体的高光敏性生长测定和 qRT PCR 进行了表征,获得了生长缓慢,对高光的敏感性增强的 *CpSRP54* 突变菌株。同年, Hopes 等<sup>[61]</sup>使用两个 sgRNAs 诱导脲酶基因的精确删除,证明在硅藻 *Thalassiosira pseudonana* 进行基因编辑的可行性。

然而, CRISPR / Cas9 技术在硅藻中的优化改进仍在进行中,以求突变型菌株的生产不被时间、步骤、脱靶等限制住。2018年, Stukenberg 等<sup>[62]</sup>通过优化 CRISPR/Cas9 载体构建,简化了筛选步骤,并诱导了单等位基因和双等位基因突变。此外,通过 CRISPR / Cas9 切口酶进行基因组编辑是另一种改良方法。2020年,在海洋硅藻中使用 Cas9 切口酶进行基因组编辑诱变,靶向 *TpθCA3* 基因编辑<sup>[63]</sup>。通过这种修饰,使得 Cas9 诱变中潜在的脱靶频率被最小化。同样的, Moosburner 等<sup>[64]</sup>通过将 Cas9 转录融合到 2A 肽的选择标记上,为 Cas9 基因选择抗生素,减少了生产和验证突变细胞系的时间。然而, Cas9 切口酶仅适用于少数几种模式生物,在微藻的应用报道较少。

### 2.4 其他

微藻具有巨大的物种多样性,在生态系统、水产养殖以及生物能源,粮食和饲料部门中都发挥着重要作用。除了上述藻类,CRISPR 技术也在不断地探索性地应用在其他非模式藻类上。2016年,以工业产油微藻 *Nannochloropsis oceanica* 菌株 IMET1 为模型,建立了一种有效的基于 CRISPR / Cas 的微藻靶向基因敲除方法<sup>[65]</sup>,从靶向基因敲除的突变菌株中获得了大约 1/1 000–1/100 的成功率,比之前报道的<sup>[43]</sup>编辑效率高了几个数量级。2017年, Ajjawi 等<sup>[66]</sup>通过删除在脂质生物合成中充当负调节剂的

转录因子,使 *Nannochloropsis gaditana* 脂质产量增加了一倍。2019年, CRISPR / Cas9 系统首次应用于小球藻 FSP-E 中,通过编辑 *fad3* 基因,达到脂质积累增加的结果<sup>[67]</sup>。尽管目前应用在非模式藻类的种类还不够多,但随着研究的深入,相信在不久的将来,CRISPR/Cas 技术在藻类的潜力将得到更充分的发挥和利用(表 2)。

## 3 转化方法

植物的转化技术滞后于动物,而微藻的转化又是在植物转化技术基础上实现的。正如 Altpeter 所指出的,成功的基因编辑是基于生物体的转化技术的<sup>[68]</sup>。因此,此部分总结了微藻的转化技术。

微藻转化技术的滞后,可能与藻体细胞较小,以及存在保护细胞的细胞壁阻碍有关。藻类细胞壁是阻止外来 DNA 通过细胞膜进入的物理屏障,因此,许多转化的方案依赖于细胞壁缺陷的衣藻细胞。目前,微藻常用的核转化方法有粒子枪介导的生物转化、玻璃珠方法和电穿孔等 3 种。1988 年首次使用包被 DNA 的钨微粒轰击莱茵衣藻细胞叶绿体<sup>[69]</sup>。粒子枪介导的生物转化是利用微粒输送系统,将含有外源基因的金属微粒输送整合到藻类细胞中,从而越过了细胞壁的生理屏障。但这种方法效率低下,获得的转化体少且需要专门的设备。玻璃珠核转化是一种借助质粒和玻璃珠的存在,搅动细胞壁缺陷的衣藻细胞的方法<sup>[70]</sup>。玻璃珠方法仅适用于没有细胞壁的菌株,否则会限制转入细胞核的 DNA 量。虽然玻璃珠方法操作简单,不需要专门的设备,但它的限制性是需要转化前用自溶素处理以去除菌株的细胞壁,使这种缺陷的衣藻细胞很难杂交,进而增加了遗传分析的困难。尽管后期改良的玻璃珠技术(碳化硅代替玻璃珠)可以转化具有细胞壁的微藻<sup>[71]</sup>,但这种技术形成的毒副产物仍需谨慎处理。

电穿孔是使用最广泛的转染方法之一,因为它具有很高的效率和便利性。电穿孔转化方法,可以用一个或几个 DNA 分子将具有完整壁的细胞瞬时或稳定转化,不需要特殊的细胞壁缺陷菌株或去除细胞壁的处理方法<sup>[72]</sup>,也不会产生有毒的副产物。电脉冲在细胞的质膜上形成瞬时孔后,紧邻质膜的带电分子被嵌入膜中,几小时后,带电分子会完全穿

表 2 CRISPR 技术在微藻中的应用研究

Table 2 Research on the application of CRISPR technology in microalgae

类别	微藻类型	方法	目标基因	相关内容	参考文献
Category	Types of microalgae	Method	Target gene	Related information	Reference
衣藻	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC503	CRISPR/Cas9	<i>FKB12</i>	CRISPR/Cas9 系统首次应用在微藻	[ 40 ]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	CRISPR/Cas9、RNP	<i>MAA7</i> 、 <i>CpSRP43</i> 、 <i>ChLM</i>	靶向敲除或敲入, 并通过 NHEJ 修复	[ 41 ]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-4349	CRISPR/Cas9、RNP	<i>ZEP</i> 、 <i>CpFTSY</i>	实现了双基因敲除, 产生突变体	[ 42 ]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-4349	CRISPR/Cas9、RNP	<i>ZEP</i>	<i>ZEP</i> 敲除突变体能够产生大量的叶黄素和玉米黄质	[ 43 ]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-2931	CRISPR / Cpfl、RNP	<i>FKB12</i> 、 <i>CpFTSY</i> 、 <i>CpSRP43</i> 、 <i>PHT7</i>	Cpfl 核酸酶首次应用于莱茵衣藻	[ 44 ]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-1883	CRISPR/dCas9	<i>PEPC1</i> 、 <i>RFP</i>	CRISPRi 系统首次应用在莱茵衣藻	[ 45 ]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-125	CRISPR/Cas9、RNP	<i>MAA7</i>	优化 CRISPR RNP 流程, 提高基因编辑效率	[ 46 ]
蓝藻	<i>Synechococcus elongatus</i> UTEX 2973	CRISPR/Cas9	<i>nblA</i>	这是在蓝藻中使用 CRISPR / Cas9 基因组编辑的第一份报告	[ 49 ]
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	CRISPR/Cas9	<i>glgC</i>	<i>glgC</i> 缺失突变体产生更高水平的琥珀酸酯	[ 50 ]
	<i>Synechococcus</i> UTEX 2973	CRISPR/Cpfl	<i>psbA1</i> 、 <i>nblA</i>	比较 Cpfl 和 Cas9 的毒性; Cpfl 是蓝藻基因组编辑的合适核酸酶	[ 51 ]
	<i>Synechocystis</i> 6803 <i>Anabaena</i> 7120	CRISPR/Cpfl	<i>nblA</i> 、 <i>nifH</i>	缺失突变、点突变以及插入突变, 研究了 Cpfl 的多功能性	[ 51 ]
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	CRISPR/dCas9	<i>phaE</i> 、 <i>glgC</i>	抑制碳存储化合物聚羟基丁酸酯 (PHB) 和糖原的形成。	[ 52 ]
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	CRISPR/dCas9	<i>glgC</i> 、 <i>sdhA</i> 、 <i>sdhB</i>	增加了琥珀酸产量	[ 53 ]
	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	CRISPR/dCas9	<i>glnA</i>	成功微调 <i>glnA</i> 的表达水平; 控制铵的生产。	[ 54 ]
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	CRISPR/dCas9	<i>PlsX</i>	抑制必需的酰基转移酶 <i>PlsX</i> 可将脂肪醇滴度提高 3 倍。	[ 57 ]
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	CRISPR/dCpfl	<i>nblA</i> 、 <i>acnB</i> 、 <i>cpcB2</i>	使用 CRISPR-dCas12a 改善光合角鲨烯的生产	[ 56 ]
	硅藻	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	CRISPR/Cas9	<i>CpSRP54</i>	CRISPR/Cas9 首次在硅藻的应用
<i>Thalassiosira pseudonana</i>		CRISPR/Cas9	<i>urease</i>	脲酶基因的精确删除	[ 59 ]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		CRISPR/Cas9	<i>vtc2</i> 、 <i>pho4</i>	优化方法, 产生单等位基因突变和双等位基因突变	[ 60 ]
<i>Thalassiosira pseudonana</i>		CRISPR/Cas9	<i>TpθCA3</i>	使用 Cas9 切口酶介导的基因组编辑, 获得了海洋硅藻突变体	[ 61 ]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		CRISPR/Cas9	<i>NR</i> 、 <i>GS-2</i> 、 <i>cGOGAT</i>	新的 Cas9 附加体设计减少了生产和筛选突变菌株的时间	[ 62 ]
其他	<i>Nannochloropsis oceanica</i> IMET1	CRISPR/Cas9	<i>Nitrate reductase gene</i> 、 <i>HygR</i>	含油微藻的基因编辑, 突变菌株敲除效率提高	[ 63 ]
	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	CRISPR/Cas9	<i>ZnCys</i>	微调 <i>ZnCys</i> 表达, 优化脂质生产	[ 64 ]
	<i>Chlorella vulgaris</i> FSP-E	CRISPR/Cas9	<i>fud3</i>	CRISPR / Cas9 系统是首次应用于小球藻 FSP-E	[ 65 ]

过质膜并进入细胞, 是一种快速简便的方法。此外, 电穿孔技术也是建立筛选目标表型的突变体文库的

简便方法, 其产生的突变体数量比玻璃珠方法高 100 倍左右, 这是其他方法无法比拟的。然而, 其

所需的设备也比较昂贵。

#### 4 编辑效率的提高

合成生物学时代,依赖于藻类基因工程有望生产如色素、油和脂类、甾醇、淀粉、多糖化合物等新型代谢物,在其中,CRISPR/Cas 系统已逐渐成为主要的基因组编辑工具。目前,提高微藻基因编辑效率可从两方面入手:(1)合适的转化方法;(2)CRISPR/Cas 系统引入微藻的模式。

在藻类物种中利用 CRISPR/Cas 的主要限制之一是缺乏高效和稳健的转化系统。转化方法的选择极大地影响了目标宿主工程策略的整体有效性。电穿孔是首选方法,其增加了 DNA 传递的数量,缺点在于由于机械损伤导致细胞死亡率较高。除了上述 3 种传统的转化方法,另一种克服细胞壁障碍的策略是利用农杆菌或者细菌结合来介导转化使 DNA 转移通过细胞壁。将环状自我复制附加型质粒转移到硅藻中,细菌结合方法显示出在某些微藻物种中进行染色体整合的前景<sup>[73]</sup>。此外,蓝藻在没有表面活性剂的情况下可从周围环境中自然吸收 DNA<sup>[74]</sup>。除了这些经典方法之外,基于细胞穿透肽、细胞穿透聚合物、金属有机框架、脂质体介导的转化已在非藻类宿主中得到证实<sup>[75]</sup>,这些尚未广泛应用于藻类的新兴转化技术可能为 DNA 表达构建体传递到藻类基因组开辟新的途径。总体而言,DNA 递送和细胞壁透化的方法根据宿主生物体和目标细胞区室(细胞器或细胞核)而异,不存在一刀切的转化策略。每个宿主生物都有自己的特性,尤其是细胞壁的存在与否的情况。大多数藻类系统的主要限制是在转化中提供多组转基因,而这些新型转化技术是否有助于在单个转化步骤中稳定转化包含多基因途径的较大 DNA 片段还有待观察。

另一个决定编辑效率的重要因素是 CRISPR/Cas 系统引入微藻的模式。最常用的方法是基于载体的传递,Cas9 与 sgRNA 一起置于启动子和终止子的控制之下。生物之间缺乏相容性是合成生物学工具扩展受限的原因之一,尤其是密码子优化。尽管外源基因整合到微藻中,但转基因表达通常很弱,根据目标藻体的密码子偏好性,对 Cas 基因进行密码子优化,以确保有效表达。另外,有报道称 Cas9

组成型表达对衣藻细胞有毒性,可利用诱导型的启动子和终止子来解决<sup>[43, 60]</sup>。另一种方法是 Cas9 和 sgRNA 的附加体递送<sup>[76]</sup>。附加体,即自我复制且不整合到染色体中的环状质粒。附加体避免了非目标位置的插入和敲除,并独立于染色体进行复制,使用附加体表达载体的优势是,一旦去除选择压力,转化细胞就会逐渐摆脱附加体。与电穿孔、微粒轰击和玻璃珠搅拌相比,通过细菌结合转化方法在递送更大的 DNA 片段方面具有优势。细菌结合转化微藻的附加型载体提供了多基因途径转移的有效手段。第三种 Cas 递送方法是通过 Cas9 核酸酶蛋白和 sgRNA 形成的核糖核蛋白复合物(RNP)。将纯化的 Cas9 和体外合成的 sgRNA 孵育以促进复合物的形成并引入靶细胞。RNP 复合物执行 DNA 切割的功能,并在进入细胞后数小时内降解。由于在细胞内的停留时间较短,其具有较小的脱靶率<sup>[77]</sup>。

#### 5 挑战与展望

采用 CRISPR/Cas 的编辑系统是一种新兴的绿色微藻技术。对 CRISPR/Cas 的理解和优化使这种生物技术成为一个有前途的手段,可以操纵一些淡水和海洋微藻的基因组。在两种不同类别和 6 种不同类型的 CRISPR 系统中,以 Cas9 驱动的 II 型系统在微藻的 CRISPR 研究中使用最多。本文除了回顾 CRISPR 的机制分类、一些经典的转化方法外,还重点总结了 CRISPR 技术在藻类的应用,以期这些新兴的转化方法和不同的递送方式,为提高转化效率和转基因的表达水平提供一些思路和方法。

从目前的报道来看,虽然 CRISPR 技术已经在藻类的研究中取得了一定成效,但其在应用过程中也存在诸多问题:(1)由于藻类存在细胞壁结构,很难将遗传物质转化到微藻中。藻类电穿孔转化应用最广泛,但转化效率还有待进一步的提升。而目前脂质转染与电穿孔相结合是提高转化效率的较好选择。(2) Cas9 RNP 的方法虽比载体驱动 Cas9 更有效率,但高质量的无毒的重组 Cas9 蛋白不容易制备,购买成本也较为高昂。(3)微藻可能存在沉默系统<sup>[78]</sup>,在转录之后的水平上对抗遗传物质。沉默组件的暂时关闭可能会提高转换效率。(4)精确的基因组编辑技术需要精确的诱变而不会产生脱靶

事件,这在微藻类中尚未建立良好的诱变体系。总体而言,CRISPR 技术还存在一定的局限性,仍需后期的改进,以在微藻进行精准基因编辑。

与其他基因编辑技术相比,CRISPR 技术在微藻中的应用进展较缓。随着全基因组测序技术的更新,CRISPR 技术有望加深我们对微藻基因功能和代谢机制的认识,提高对微藻生物燃料和其化学品的开发,为解决能源短缺和环境污染等问题提供了新思路。同时,应警惕基因突变带来不可预知的风险和潜在的生物安全危机<sup>[79]</sup>,在将 CRISPR 技术应用于商业用途之前,须考虑 CRISPR 转基因产品对环境和生物遏制问题的影响。

#### 参考文献

- [ 1 ] Singh A, Nigam PS, Murphy JD. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels [ J ] . *Bioresour Technol*, 2011, 102 ( 1 ) : 26-34.
- [ 2 ] Rizwan M, Mujtaba G, Memon SA, et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond : a review [ J ] . *Renew Sustain Energy Rev*, 2018, 92 : 394-404.
- [ 3 ] Sharma K, Dhruv S, Mani U, et al. Therapeutic utility of *Spirulina* [ M ] // *Spirulina in Human Nutrition and Health*. Boca Raton : CRC Press, 2007 : 71-99.
- [ 4 ] Yaakob Z, Ali E, Zainal A, et al. An overview : biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture [ J ] . *J Biol Res : Thessalon*, 2014, 21 ( 1 ) : 6.
- [ 5 ] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, et al. Commercial applications of microalgae [ J ] . *J Biosci Bioeng*, 2006, 101 ( 2 ) : 87-96.
- [ 6 ] Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications : a review [ J ] . *Renew Sustain Energy Rev*, 2010, 14 ( 1 ) : 217-232.
- [ 7 ] Abdel-Raouf N. Agricultural importance of algae [ J ] . *Afr J Biotechnol*, 2012, 11 ( 54 ) : 11648-11658.
- [ 8 ] Renuka N, Guldhe A, Prasanna R, et al. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture : current trends, prospects and challenges [ J ] . *Biotechnol Adv*, 2018, 36 ( 4 ) : 1255-1273.
- [ 9 ] Muñoz R, Guieysse B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants : a review [ J ] . *Water Res*, 2006, 40 ( 15 ) : 2799-2815.
- [ 10 ] Wilde EW, Benemann JR. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae [ J ] . *Biotechnol Adv*, 1993, 11 ( 4 ) : 781-812.
- [ 11 ] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. 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 ( 12 ) : 5429-5433.
- [ 12 ] Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, et al. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains [ J ] . *Infect Immun*, 1991, 59 ( 8 ) : 2695-2705.
- [ 13 ] Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferox mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites [ J ] . *Mol Microbiol*, 1993, 9 ( 3 ) : 613-621.
- [ 14 ] Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, et al. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferox mediterranei* and *Haloferox volcanii* and could be involved in replicon partitioning [ J ] . *Mol Microbiol*, 1995, 17 ( 1 ) : 85-93.
- [ 15 ] Bult CJ, White O, Olsen GJ, et al. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii* [ J ] . *Science*, 1996, 273 ( 5278 ) : 1058-1073.
- [ 16 ] Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, et al. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima* [ J ] . *Nature*, 1999, 399 ( 6734 ) : 323-329.
- [ 17 ] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria [ J ] . *Mol Microbiol*, 2000, 36 ( 1 ) : 244-246.
- [ 18 ] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [ J ] . *Mol Microbiol*, 2002, 43 ( 6 ) : 1565-1575.
- [ 19 ] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [ J ] . *J Mol Evol*, 2005, 60 ( 2 ) : 174-182.
- [ 20 ] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [ J ] . *Science*, 2007, 315 ( 5819 ) : 1709-1712.
- [ 21 ] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide

- antiviral defense in prokaryotes [ J ] . *Science*, 2008, 321 ( 5891 ) : 960-964.
- [ 22 ] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [ J ] . *Nature*, 2010, 468 ( 7320 ) : 67-71.
- [ 23 ] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [ J ] . *PNAS*, 2012, 109 ( 39 ) : E2579-E2586.
- [ 24 ] 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.
- [ 25 ] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [ J ] . *Science*, 2013, 339 ( 6121 ) : 819-823.
- [ 26 ] Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems : a burst of class 2 and derived variants [ J ] . *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18 ( 2 ) : 67-83.
- [ 27 ] Anders C, Niewoehner O, Duerst A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease [ J ] . *Nature*, 2014, 513 ( 7519 ) : 569-573.
- [ 28 ] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [ J ] . *Cell*, 2015, 163 ( 3 ) : 759-771.
- [ 29 ] Swarts DC, Jinek M. Cas9 versus Cas12a/Cpf1 : Structure-function comparisons and implications for genome editing [ J ] . *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018 : e1481.
- [ 30 ] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [ J ] . *Cell*, 2013, 152 ( 5 ) : 1173-1183.
- [ 31 ] Cleto S, Jensen JV, Wendisch VF, et al. *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference ( CRISPRi ) [ J ] . *ACS Synth Biol*, 2016, 5 ( 5 ) : 375-385.
- [ 32 ] Feng Z, Zhang B, Ding W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system [ J ] . *Cell Res*, 2013, 23 ( 10 ) : 1229-1232.
- [ 33 ] Jiang W, Zhou H, Bi H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, *Sorghum* and rice [ J ] . *Nucleic Acids Res*, 2013, 41( 20 ) : e188.
- [ 34 ] Upadhyay SK, Kumar J, Alok A, et al. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat [ J ] . *G3 : Bethesda*, 2013, 3 ( 12 ) : 2233-2238.
- [ 35 ] Jacobs TB, LaFayette PR, Schmitz RJ, et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 [ J ] . *BMC Biotechnol*, 2015, 15 : 16.
- [ 36 ] 杨柳, 李晓峰, 祝万万, 等. 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术获得水稻 *OsmADS56* 基因突变体 [ J ] . *分子植物育种*, 2020, 18 ( 11 ) : 3571-3578.
- Yang L, Li XF, Zhu WW, et al. Generation of *OsmADS56* mutants in rice using CRISPR/Cas9 editing approach [ J ] . *Mol Plant Breed*, 2020, 18 ( 11 ) : 3571-3578.
- [ 37 ] 林萌萌, 李春娟, 闫彩霞, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在作物中的应用 [ J ] . *核农学报*, 2021, 35 ( 6 ) : 1329-1339.
- Lin MM, Li CJ, Yan CX, et al. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in crops [ J ] . *J Nucl Agric Sci*, 2021, 35 ( 6 ) : 1329-1339.
- [ 38 ] 涂文凤, 王月, 杨文强. 基因编辑技术在莱茵衣藻中的应用进展 [ J ] . *生命科学*, 2018, 30 ( 9 ) : 987-993.
- Tu WF, Wang Y, Yang WQ. Progress in the application of genome editing in *Chlamydomonas reinhardtii* [ J ] . *Chin Bull Life Sci*, 2018, 30 ( 9 ) : 987-993.
- [ 39 ] Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions [ J ] . *Science*, 2007, 318 ( 5848 ) : 245-250.
- [ 40 ] Arriola MB, Velmurugan N, Zhang Y, et al. Genome sequences of *Chlorella sorokiniana* UTEX 1602 and *Micractinium conductrix* SAG 241. 80 : implications to maltose excretion by a green alga [ J ] . *Plant J*, 2018, 93 ( 3 ) : 566-586.
- [ 41 ] Kindle KL, Schnell RA, Fernández E, et al. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase [ J ] . *J Cell Biol*, 1989, 109 ( 6 pt 1 ) : 2589-2601.
- [ 42 ] Mussgnug JH. Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii* [ J ] . *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99 ( 13 ) : 5407-5418.
- [ 43 ] Jiang W, Brueggeman AJ, Horken KM, et al. Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii* [ J ] . *Eukaryot Cell*, 2014, 13 ( 11 ) : 1465-1469.
- [ 44 ] Shin SE, Lim JM, Koh HG, et al. CRISPR/Cas9-induced knockout

- and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* [ J ] . Sci Rep, 2016, 6 : 27810.
- [ 45 ] Baek K, Kim DH, Jeong J, et al. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins [ J ] . Sci Rep, 2016, 6 : 30620.
- [ 46 ] Baek K, Yu J, Jeong J, et al. Photoautotrophic production of macular pigment in a *Chlamydomonas reinhardtii* strain generated by using DNA-free CRISPR-Cas9 RNP-mediated mutagenesis [ J ] . Biotechnol Bioeng, 2018, 115 ( 3 ) : 719-728.
- [ 47 ] Kao PH, Ng IS. CRISPRi mediated phosphoenolpyruvate carboxylase regulation to enhance the production of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii* [ J ] . Bioresour Technol, 2017, 245 ( pt b ) : 1527-1537.
- [ 48 ] Dhokane D, Bhadra B, Dasgupta S. CRISPR based targeted genome editing of *Chlamydomonas reinhardtii* using programmed Cas9-gRNA ribonucleoprotein [ J ] . Mol Biol Rep, 2020, 47 ( 11 ) : 8747-8755.
- [ 49 ] Bižić M, Klintzsch T, Ionescu D, et al. Aquatic and terrestrial cyanobacteria produce methane [ J ] . Sci Adv, 2020, 6 ( 3 ) : eaax5343.
- [ 50 ] Wang L, Chen L, Yang S, et al. Photosynthetic conversion of carbon dioxide to oleochemicals by cyanobacteria : recent advances and future perspectives [ J ] . Front Microbiol, 2020, 11 : 634.
- [ 51 ] Wendt KE, Ungerer J, Cobb RE, et al. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 [ J ] . Microb Cell Fact, 2016, 15 ( 1 ) : 115.
- [ 52 ] Li H, Shen CR, Huang CH, et al. CRISPR-Cas9 for the genome engineering of cyanobacteria and succinate production [ J ] . Metab Eng, 2016, 38 : 293-302.
- [ 53 ] Ungerer J, Pakrasi HB. Cpf1 is A versatile tool for CRISPR genome editing across diverse species of cyanobacteria [ J ] . Sci Rep, 2016, 6 : 39681.
- [ 54 ] Yao L, Cengic I, Anfelt J, et al. Multiple gene repression in cyanobacteria using CRISPRi [ J ] . ACS Synth Biol, 2016, 5 ( 3 ) : 207-212.
- [ 55 ] Huang CH, Shen CR, Li H, et al. CRISPR interference ( CRISPRi ) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium *S. elongatus* PCC 7942 [ J ] . Microb Cell Fact, 2016, 15 ( 1 ) : 196.
- [ 56 ] Higo A, Isu A, Fukaya Y, et al. Application of CRISPR interference for metabolic engineering of the heterocyst-forming multicellular cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 [ J ] . Plant Cell Physiol, 2018, 59 ( 1 ) : 119-127.
- [ 57 ] Cho S, Choe D, Lee E, et al. High-level dCas9 expression induces abnormal cell morphology in *Escherichia coli* [ J ] . ACS Synth Biol, 2018, 7 ( 4 ) : 1085-1094.
- [ 58 ] Choi SY, Woo HM. CRISPRi-dCas12a : a dCas12a-mediated CRISPR interference for repression of multiple genes and metabolic engineering in cyanobacteria [ J ] . ACS Synth Biol, 2020, 9 ( 9 ) : 2351-2361.
- [ 59 ] Kaczmarzyk D, Cengic I, Yao L, et al. Diversion of the long-chain acyl-ACP pool in *Synechocystis* to fatty alcohols through CRISPRi repression of the essential phosphate acyltransferase PlsX [ J ] . Metab Eng, 2018, 45 : 59-66.
- [ 60 ] Nymark M, Sharma AK, Sparstad T, et al. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae [ J ] . Sci Rep, 2016, 6 : 24951.
- [ 61 ] Hopes A, Nekrasov V, Kamoun S, et al. Editing of the urease gene by CRISPR-Cas in the diatom *Thalassiosira pseudonana* [ J ] . Plant Methods, 2016, 12 : 49.
- [ 62 ] Stukenberg D, Zauner S, Dell' Aquila G, et al. Optimizing CRISPR/Cas9 for the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [ J ] . Front Plant Sci, 2018, 9 : 740.
- [ 63 ] Nawaly H, Tsuji Y, Matsuda Y. Rapid and precise genome editing in a marine diatom, *Thalassiosira pseudonana* by Cas9 nickase ( D10A ) [ J ] . Algal Res, 2020, 47 : 101855.
- [ 64 ] Moosburner MA, Gholami P, McCarthy JK, et al. Multiplexed knockouts in the model diatom *Phaeodactylum* by episomal delivery of a selectable Cas9 [ J ] . Front Microbiol, 2020, 11 : 5.
- [ 65 ] Wang Q, Lu Y, Xin Y, et al. Genome editing of model oleaginous microalgae *Nannochloropsis* spp. by CRISPR/Cas9 [ J ] . Plant J, 2016, 88 ( 6 ) : 1071-1081.
- [ 66 ] Ajjawi I, Verruto J, Aqai M, et al. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator [ J ] . Nat Biotechnol, 2017, 35 ( 7 ) : 647-652.
- [ 67 ] Lin WR, Ng IS. Development of CRISPR/Cas9 system in *Chlorella vulgaris* FSP-E to enhance lipid accumulation [ J ] . Enzyme Microb Technol, 2020, 133 : 109458.
- [ 68 ] Altpeter F, Springer NM, Bartley LE, et al. Advancing crop

- transformation in the era of genome editing [ J ] . *Plant Cell*, 2016, 28 ( 7 ) : 1510-1520.
- [ 69 ] Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles [ J ] . *Science*, 1988, 240 ( 4858 ) : 1534-1538.
- [ 70 ] Kindle KL. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* [ J ] . *PNAS*, 1990, 87 ( 3 ) : 1228-1232.
- [ 71 ] Dunahay TG, Adler SA, Jarvik JW. Transformation of microalgae using silicon carbide whiskers [ M ] // Rocky S. Tuan. Recombinant gene expression protocols, Totowa : Humana Press, 1997 : pp 503-509.
- [ 72 ] Yamano T, Iguchi H, Fukuzawa H. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal [ J ] . *J Biosci Bioeng*, 2013, 115 ( 6 ) : 691-694.
- [ 73 ] Fabris M, George J, Kuzhiumparambil U, et al. Extrachromosomal genetic engineering of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* enables the heterologous production of monoterpenoids [ J ] . *ACS Synth Biol*, 2020, 9 ( 3 ) : 598-612.
- [ 74 ] Porter RD. Transformation in cyanobacteria [ J ] . *Crit Rev Microbiol*, 1986, 13 ( 2 ) : 111-132.
- [ 75 ] Lanigan TM, Kopera HC, Saunders TL. Principles of genetic engineering [ J ] . *Genes*, 2020, 11 ( 3 ) : 291.
- [ 76 ] Slattery SS, Diamond A, Wang H, et al. An expanded plasmid-based genetic toolbox enables Cas9 genome editing and stable maintenance of synthetic pathways in *Phaeodactylum tricorutum* [ J ] . *ACS Synth Biol*, 2018, 7 ( 2 ) : 328-338.
- [ 77 ] Kim S, Kim D, Cho SW, et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins [ J ] . *Genome Res*, 2014, 24 ( 6 ) : 1012-1019.
- [ 78 ] Wu-Scharf D, Jeong B, Zhang C, et al. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase [ J ] . *Science*, 2000, 290 ( 5494 ) : 1159-1162.
- [ 79 ] 姜涛. 基因编辑之刑法规制及其限度 [ J ] . *东方法学*, 2021 ( 2 ) : 69-85.
- Jiang T. Criminal regulation of gene editing and its limits [ J ] . *Orient Law*, 2021 ( 2 ) : 69-85.

( 责任编辑 朱琳峰 )