



基于CRISPRi的基因干扰文库在微生物代谢工程中的应用

曹家豪¹, 朱晓飞¹, 孙韬^{1,2*}, 陈磊¹, 张卫文^{1,2}

1. 合成生物技术全国重点实验室, 教育部合成生物学前沿科学中心, 天津大学合成生物与生物制造学院, 天津 300072

2. 天津大学生物安全战略研究中心, 天津 300072

* 联系人, E-mail: tsun@tju.edu.cn

收稿日期: 2025-07-03; 接受日期: 2025-08-30; 网络版发表日期: 2025-09-25

国家重点研发计划(批准号: 2024YFA0919700)和国家自然科学基金(批准号: 32371486)资助

摘要 CRISPR是对基因组进行永久性的修饰, 为了避免这种永久性的修饰, CRISPR干扰被开发出来. CRISPR干扰系统(CRISPR interference, CRISPRi)就是利用失活的Cas效应蛋白与指导性RNA(sgRNA)共同作用, 来阻断转录进程, 从而达到抑制基因表达的目的. 通过扩大CRISPRi技术的应用范围, 发现了全基因组的高通量筛选方法. 近年来CRISPRi已被广泛应用于微生物代谢工程、基因功能研究、代谢通路调控及高通量表型筛选. 通过构建CRISPRi文库, 可实现全基因组水平的转录调控, 揭示关键代谢节点、调控因子与生理功能之间的关系. 相比传统敲除文库, CRISPRi具备可逆性、可调控性及适用于必需基因的优势, 尤其适用于对复杂调控网络的系统解析与代谢流优化. 本综述系统梳理了CRISPRi文库的构建策略、在典型微生物中的应用实例, 重点讨论其在产物产量提升、副产物抑制及底物利用效率优化中的贡献, 并展望其在合成生物学与工业菌株开发中的发展趋势与挑战.

关键词 CRISPR/Cas, CRISPRi系统, 高通量筛选, 微生物代谢工程, 合成生物学

微生物代谢工程通过基因改造手段(如基因敲除、抑制或过表达关键代谢基因, 以及引入外源基因), 对微生物的代谢网络进行理性设计和优化, 以重构或增强特定代谢途径, 从而实现目标代谢产物的高效合成^[1]. 自1991年诞生以来, 代谢工程与分子生物学、系统生物学及合成生物学深度融合^[2]. 随着基因组学的发展, 众多微生物的全基因组序列被测定并注释, 极大促进了对代谢网络的理解及定向改造代谢途径的研究. 微生物代谢工程的进展推动了生物技术的广泛应

用. 例如, 2015年, Jakočiūnas等人^[3]通过多重CRISPR/Cas基因编辑技术, 使甲羟戊酸的产量比对照菌株提高41倍. 2015年, Galanie等人^[4]利用Gibson和DNA组装技术, 将药物蒂巴因和氢可酮的合成途径导入酵母, 成功获得了合成该药物的工程菌株. 2019年, Sun等人^[5]采用sRNA-Hfq技术在谷氨酸棒杆菌中将 pyk , $ldhA$ 和 $odhA$ 基因表达下调80%, 使谷氨酸含量增加了3倍. 尽管如此, 微生物代谢工程仍面临许多挑战. 而为了获得合适的靶向基因, 避免构建大量无用的工程菌株, 利用

引用格式: 曹家豪, 朱晓飞, 孙韬, 等. 基于CRISPRi的基因干扰文库在微生物代谢工程中的应用. 中国科学: 生命科学

Cao J H, Zhu X F, Sun T, et al. Applications of CRISPRi-based gene interference libraries in microbial metabolic engineering (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, doi: 10.1360/SSV-2025-0213

高通量筛选出具有最佳的靶向基因成为优异的解决方法。

基于CRISPR/Cas9技术发展而来的CRISPR干扰(CRISPR interference, CRISPRi)就是利用失活的Cas效应蛋白与指导性RNA(sgRNA)共同作用, 来阻断转录进程, 从而达到抑制基因表达的目的。2013年, Qi等人^[6]首次提出CRISPRi(基因表达抑制)技术, 开启了CRISPR在基因“调控”的应用, 并实现了多基因的同时抑制。CRISPRi系统的可逆性、对必需基因的可研究性、技术的简易性及gRNA的可管理性, 使其在高通量筛选中展示了独特优势。自2014年CRISPRi文库首次在人类细胞中应用以来, 文库规模迅速扩大, 并结合高通量筛选平台广泛应用于基因功能研究和初步代谢调控^[7]。CRISPRi系统能够实现多基因精准调控, 广泛应用于代谢流重构、合成生物学及细胞工厂优化, 已成为代谢工程中强大的工具之一。尽管微生物代谢工程已在多个案例中取得成功, 仍面临着代谢网络复杂、细胞生理与代谢平衡相互制约等挑战。未来发展趋势包括整合多组学数据构建更准确的代谢模型, 结合人工智能优化途径设计, 以及推动CRISPRi等调控技术在高通量筛选和产业化中的应用, 从而实现微生物细胞工厂的理性构建与高效转化。

为了深入理解CRISPRi系统在微生物代谢工程中的应用, 本文首先介绍了CRISPRi技术诞生, 然后解析了CRISPRi技术的原理与文库构建策略, 接着讨论了CRISPRi文库在模式微生物中的应用实例及常用的高通量筛选条件和数据分析方法。最后, 总结了CRISPRi文库在代谢工程中的优势与挑战, 并展望未来研究方向, 以推动CRISPRi文库在微生物代谢工程中的进一步应用。

1 CRISPRi技术的起源

1.1 靶向调控技术的演进: 从敲除到CRISPR/Cas系统

微生物代谢网络的重构主要通过基因层面的调控实现, 靶向基因调控的方法多种多样, 包括基因缺失、基因突变、基因沉默和基因过表达等。基因敲除技术起源于20世纪80年代, 其核心原理是通过同源重组技术, 用标记片段或空白片段替代被敲除基因的编码区

域^[8]。在微生物代谢过程中, 基因敲除常通过删除旁路代谢途径, 促进代谢物流向最终产物, 从而减少副产物的生成。例如, Jantama等人^[9]通过敲除大肠杆菌中多个代谢相关基因, 并结合适应性进化, 成功获得了琥珀酸生产量为622~733 mmol/L、苹果酸产量为512 mmol/L的高产工程菌株。然而, 基因敲除存在一些问题。首先, 基因敲除是不可逆的, 这不利于对细胞瞬时表型变化的理解, 且无法探究必需基因的功能。此外, 基因敲除通常使用抗性基因作为标记, 导致多重耐药菌株的出现, 这限制了其应用^[10]。

2012年, CRISPR/Cas9技术的问世彻底改变了基因编辑的方式^[11]。与传统的基因敲除技术相比, CRISPR/Cas9的优势在于, Cas效应蛋白通过RNA引导靶点精确调控, 从而实现基因的敲除、插入和修复。Li等人^[12]基于CRISPR/Cas9开发的大肠杆菌迭代基因编辑方法, 实现了接近100%的基因编辑效率, 并成功引入了三种类型的基因突变。利用该方法, 将 β -胡萝卜素合成途径整合到基因组中, 优化了甲基赤藓糖醇磷酸(MEP)途径和中心代谢途径, 最终使 β -胡萝卜素的产量达到2.0 g/L。

相比于基因敲除, CRISPR基因编辑技术在基因调控中具有更强的靶向性, 且通过全面设计靶向RNA, 可以显著提高基因编辑效率。此外, CRISPR技术能够同时编辑多个基因, 从而简化操作流程。Wang等人^[13]开发了一种高效、通用的酵母多重基因组编辑方法, 并成功在酵母细胞中实现了白藜芦醇、人血清白蛋白和尸胺的生物合成。

1.2 CRISPRi及其在代谢工程中的潜力

CRISPRi就是利用失活的Cas效应蛋白与sgRNA共同作用, 来阻断转录进程, 从而达到抑制基因表达的目的。与CRISPRi抑制基因表达不同, CRISPR激活(CRISPR activation, CRISPRa)可实现基因的可编程激活, 通常通过靶向转录激活因子将dCas蛋白与RNA聚合酶招募至目标启动子区域, 从而增强转录活性^[14]。

基因敲除与CRISPR技术的靶向调控都是不可逆的, 只能实现“全或无”的固定状态。相对而言, CRISPR的动态调控系统——CRISPRi/CRISPRa, 可以通过抑制或激活基因表达, 进行实时控制。这种方法不仅能抑制或激活必需基因, 从而研究基因功能, 还具有可调控性(图1)。

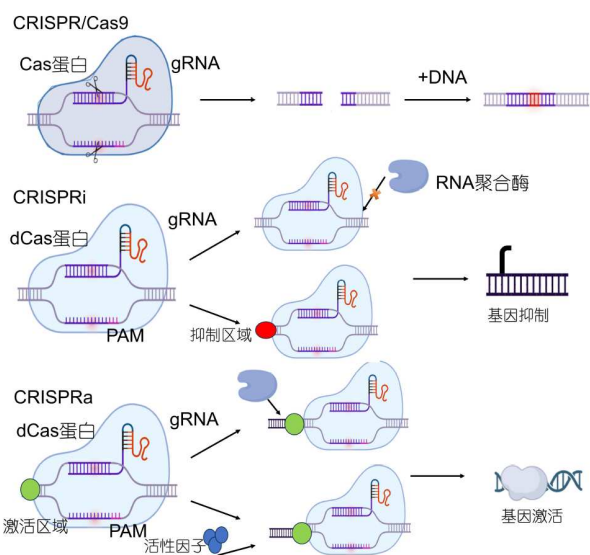


图1 CRISPR/Cas9系统、CRISPRi系统和CRISPRa系统原理图

Figure 1 Schematic diagram of CRISPR/Cas9 system, CRISPRi system, and CRISPRa system

微生物的生物合成是高度协调的代谢与生理过程的结合, 其中代谢过程的多样性为各种商业化化学品的合成提供了基础. 代谢过程的改变最终会影响细胞的生理功能, 而微生物的生理包括细胞结构、细胞生长和抗逆性等, 与代谢过程密切相关. 微生物的生理与代谢保持相对稳态, CRISPRi对这一稳态过程的靶向控制既可逆又精准. 这种时空分辨的精准调控, 使CRISPRi在微生物代谢工程中具有独特的优势. 例如, Ni等人^[15]通过构建多gRNA质粒, 利用CRISPRi技术同时下调 β -香树脂醇合成途径中的7个基因, 实现了 β -香树脂醇0.16 g/L的产量. 由于CRISPRi技术通过表达多个针对不同基因的sgRNA, 可以同时下调多个靶基因, 因此利用此特性可以对全基因组或部分基因组进行文库筛选, 从而大大减少了微生物代谢工程靶向基因获取难度.

2 CRISPRi技术原理与文库构建策略

2.1 dCas9及其转录抑制机制

2014年, CRISPR系统被发现是古菌和细菌用于抵御外来核苷酸序列的天然防御机制, 随后被开发为基因编辑工具^[16]. 天然的CRISPR/Cas防御系统包括三个

主要步骤: 外源遗传物质的入侵, crRNA的记录, 以及CRISPR介导的靶向切割^[17]. CRISPR阵列由重复序列和可变序列组成, 其中可变序列来源于外来遗传物质. 转录产生的CRISPR RNA(crRNA)在CRISPR相关蛋白(Cas蛋白)的协助下, 可识别并切割入侵的遗传物质. 因此, 利用crRNA与Cas效应蛋白的协同作用可以实现细胞内的基因编辑^[18].

根据Cas蛋白的组成和机制, CRISPR/Cas系统被分为两大类: 第一类系统由多个Cas蛋白协同发挥作用, 主要包括I型、III型和IV型; 第二类系统由单一Cas蛋白介导靶向识别和切割, 主要包括II型、V型和VI型^[19]. 其中, II型(如Cas9)和V型(如部分Cas12亚型)因其结构简单且能有效靶向DNA, 被广泛应用于基因编辑领域^[20]. II型和部分V型系统通常需要RNase III(一种与Cas无关的核酸酶)及反式激活的crRNA(tracrRNA)协同作用, 以将前体crRNA加工为成熟的单个crRNA. crRNA与tracrRNA形成杂交结构, 生成功能性向导RNA(gRNA), 该复合体再与Cas9或Cas12结合, 并通过gRNA中的间隔序列引导至靶位点. gRNA设计时还需考虑原间隔区基因序列(proto spacer adjacent motif, PAM), 即靶位点邻近的一段短序列, 且不同Cas蛋白识别的PAM序列各不相同, 是目标识别的必要条件^[21].

CRISPRi系统的关键在于使用“失活”的Cas效应蛋白(dCas), 其保留了对目标基因的识别能力, 但丧失了DNA切割功能. 通过在内切酶结构域引入点突变, 可使Cas蛋白失去核酸酶活性, 从而得到dCas蛋白^[11]. 常用的dCas9需要Cas9蛋白RuvC结构域的第10位天冬氨酸突变为丙氨酸(D10A)以及HNH催化结构域的第840位组氨酸突变为丙氨酸(H840A); 而dCas12仅需Cas12蛋白RuvC结构域的第908位天冬氨酸突变为丙氨酸(D908A). dCas蛋白在gRNA引导下结合至目标基因的启动子区或编码区, 通过空间位阻抑制RNA聚合酶的结合或延伸, 进而阻断转录. 例如, Zhang等人^[22]在解脂耶尔森氏酵母中构建了四种不同的CRISPRi系统, 包括dCpf1, dCas9, dCpf1-KRAB和dCas9-KRAB, 并通过多种gRNA实现了对目标基因*gfp*的高效抑制. 在CRISPRi调控中, 若单个gRNA效果不理想, 可针对目标基因的不同功能区域设计多个gRNA, 从而提高抑制效率.

2.2 gRNA设计原则与覆盖策略

CRISPRi筛选需要将dCas蛋白与gRNA文库结合, dCas蛋白与gRNA库的序列和数量取决于研究物种和实验设置. CRISPRi筛选的流程首先是将dCas蛋白与gRNA库导入目标细胞, 随后进行表型分析. 通常通过施加选择压力进行筛选, 包括使用选择性培养基、特定的外界环境或施加特定药物. 通过对施加选择压力前后CRISPRi突变体的基因丰度进行比较, 最终确定基因与表型之间的关系. 此外, 还可以通过流式细胞术对荧光信号进行选择筛选, 分选出与感兴趣表型相关的细胞^[23].

CRISPRi筛选的常规工作流程包括以下步骤: (i) 设计和创建gRNA; (ii) 构建gRNA文库; (iii) 将dCas和gRNA引入细胞; (iv) 进行表型筛选; (v) 鉴定gRNA丰度及其靶标; (vi) 分析结果^[23]. 在步骤(ii)和(iii)中, 需对gRNA和CRISPRi文库进行质量控制, 确保文库具有足够的代表性, 并在筛选前尽量减少gRNA序列的丰度偏差. 常见的筛选模式有混合模式(将gRNA混合)和阵列模式(将gRNA分开存储).

在CRISPRi高通量筛选过程中, 存在许多挑战, 主要包括选择合适的dCas蛋白、适合的物种、内源性CRISPR系统是否会影响筛选过程, 以及最重要的gRNA设计策略^[24].

首先, gRNA的设计通常基于基因组注释, 因此只适用于拥有全基因组注释的物种. 其次, gRNA的设计受到多种因素的影响, 设计时需要考虑的关键因素包括靶标定位、靶链选择、PAM序列以及GC含量. 在原核生物中, gRNA应靶向目标基因编码区或起始密码子上游最多400 bp的位置, 并且在靶向起始密码子的区域发挥更强的抑制作用^[25]. 在酵母中, dCas-阻遏物融合体可在与转录起始位点(TSS)相对的-200到+50 bp范围内有效抑制表达.

在编码区, gRNA的选择则取决于使用的特定dCas蛋白, 靶向模板链或非模板链. 为了避免“坏种子”效应和脱靶效应, 每种dCas蛋白都偏好特定的PAM序列^[26]. 为了降低脱靶效应, 目前主要采用两类策略, 一类是高保真dCas变体的应用, 另一类是截短sgRNA(tru-sgRNA). 2016年, Kleinstiver等人^[27]首次发现dCas9-HF1(High-Fidelity 1)高保真蛋白, 它通过关键氨基酸突变(如N497A/R661A/Q695A/H969A)显著降

低与非靶标DNA的结合能力, 在保持靶向效率的同时将脱靶效应减少90%以上. 此外, 类似变体eCas9(enhanced specificity)蛋白和Cas9-HF2蛋白也被广泛应用于代谢途径的精准抑制^[28]. 相对于传统sgRNA的20 nt靶向序列易与非完全互补序列结合, tru-sgRNA通过缩短互补区长度(如17-18 nt)或优化二级结构, 可大幅提高特异性^[29]. 此外, gRNA的GC含量不应过高, 以防止gRNA自身形成互补双链结构, 从而影响其稳定性和功能^[30].

最后, gRNA库的序列数量对设计的影响也不容忽视. 在全基因组筛选中, 通常为每个基因设计3~10条gRNA, 以提高命中率; 对于较小的基因库筛选, 每个基因可以使用更多的gRNA, 而在较大的基因库中, 则每个基因使用较少的gRNA^[31]. 对于筛选前后gRNA丰度的计算与对比, 通常参考Zhao等人^[32]关于计算的综述, 以确保筛选结果的准确性和可重复性.

2.3 文库类型: 全基因组、靶向代谢通路、调控因子筛选等

随着CRISPRi系统的发展, gRNA的设计范围得到了极大的扩展. 由gRNA所选择的范围不同可分为全基因组筛选文库、靶向代谢通路筛选文库、调控因子筛选文库等, 例如, Gutmann等人^[33]设计1573条gRNA靶向酿酒酵母的161个转录因子和129个蛋白激酶, 最终增强了酿酒酵母对云杉水解物和木质纤维素毒素的耐受性. McGlincy等人^[34]设计了61094个gRNA保证酵母细胞基因组上每个注释蛋白均有约10个靶向gRNA, 最终揭示了大多数必需基因的适应度缺陷. de Wet等人^[35]对结核分枝杆菌的294个必需基因构建了阵列文库, 最终结合亚细胞染色定位和自动化成像分析的方法绘制基因与细胞形态之间的关系.

2.4 文库构建方法: 质粒库、整合型文库、可诱导系统等

将dCas蛋白与gRNA库导入微生物细胞中时, 可以根据导入方式的不同将其分为质粒型文库和整合型文库^[36]. 质粒型文库是将dCas蛋白和gRNA分别载于外源质粒中, 然后将质粒转入细胞; 而整合型文库则将两个成分或其中一个成分直接整合到微生物的基因组中. 与质粒型文库相比, 基因组型文库提供了更稳定的系统, 且无需添加选择标签, 但整合到基因组的过程

较为繁琐和复杂。

CRISPRi可诱导系统将dCas蛋白与gRNA置于诱导性启动子后,通过诱导型启动子的调控可以构建一个可诱导调控的高通量筛选系统。在细胞生长过程中,必需基因的存在至关重要,而对必需基因的敲除或抑制将影响筛选结果。一个可诱导可调控的CRISPRi系统能够减少克隆及预培养过程中必需基因的丢失,降低文库的偏差,并且可以精确预测在不同生长条件下,必需基因功能丧失对生长和其他表型的影响。相比基因敲除,CRISPRi可诱导系统在研究基因部分抑制的影响方面具有重要优势。诱导型系统能够通过改变启动子或诱导物的浓度灵活控制表达的时间和范围。但是,所有已报道的诱导型启动子都存在一定程度的泄漏,在没有诱导物的情况下,抑制范围通常为10%~30%,因此选择合适的启动子至关重要^[37]。

3 CRISPRi文库在模式微生物中的应用

自从CRISPRi系统被引入大肠杆菌后,该技术已经成功应用于多种微生物,包括细菌、古菌、酵母和原生动物等^[38]。随着技术的发展,CRISPRi基因组学高通量筛选已在小规模基因子集以及全基因组中得到了应用。目前,CRISPRi高通量筛选系统已在细菌和酵母中广泛应用,但在古菌和原生生物中的应用尚未有报道^[39]。

在生物技术领域,微生物通常被作为细胞工厂,用于工业化学品的生产。要提高这些化学品的产量,需要对微生物进行代谢工程改造,将代谢流引导至特定路径,同时最大限度地减少不良副产物的生成^[40]。CRISPRi高通量筛选系统能够有效筛选代谢途径相关基因的子集,从中识别出能够增强工业表型并提高产量的关键基因。常用的筛选压力包括外界环境压力(如温度、氧气含量、渗透压、氮源、碳源等),或通过荧光激活细胞进行分选,最终筛选出具有感兴趣表型的工程菌株。

由于模式微生物具有遗传操作简便、快速生长、培养基适应性强以及可扩展性好的特点,CRISPRi高通量筛选作为一种新兴技术,已在这些微生物中得到广泛应用。模式微生物通常拥有详尽的基因组功能注释,这为CRISPRi技术中的gRNA设计及后续的高通量分析提供了坚实的基础。

3.1 CRISPRi文库在大肠杆菌中的应用

大肠杆菌作为最常见的模式微生物,在CRISPRi筛选领域得到了极大发展。2018年,CRISPRi全基因组筛选首次在大肠杆菌中应用,Cui等人^[41]设计了约92000个gRNA,随机靶向大肠杆菌基因组,最终揭示了gRNA设计的规律,识别了必需基因,并提供了噬菌体抗性相关的关键基因。

随着技术的不断进步,CRISPRi筛选在微生物代谢工程中展示了巨大的优势。通过抑制生长,将碳通量从生长转移到产物生产,实现生产与生长的解耦,这对于微生物的生物基生产至关重要。Li等人^[42]设计了一个覆盖大肠杆菌基因组中12238个基因位点的sgRNA文库,筛选出了能抑制生长同时允许持续蛋白质生产的靶点,最终鉴定了1332个sgRNA,这些基因能够在降低生长的同时,维持或提高GFP的积累。最高靶点*sibB/ibsB*显示,GFP积累提高了5倍以上,生物质形成减少了45%。这一发现为其他微生物的生长与生产解耦提供了理论基础。

在微生物代谢工程中,靶向代谢途径相关靶点的sgRNA设计是一种重要的策略。合适的设计原则和方法能够高效筛选出与目标产物合成相关的靶基因。Wang等人^[43]在大肠杆菌中筛选出56个磷酸酶编码基因,并通过CRISPRi在番茄红素高产菌株中构建了基因敲低文库,最终筛选出56个基因中的28个富集基因。Shen等人^[44]针对80个NADPH消耗型酶编码基因和400个ATP消耗型酶编码基因构建了CRISPRi文库,筛选出了与4-羟基苯乙酸合成相关的6个NADPH消耗酶和19个ATP消耗酶的编码基因。Fang等人^[45]则针对108个与游离脂肪酸(FFA)代谢相关的基因构建了CRISPRi文库,并筛选出了26个与FFA合成相关的有益基因,最终通过*ihfA/aidB/ryfA/gadA*四基因扰动实现了30.0 g/L的FFA产量。Jeong等人^[46]构建了靶向木糖代谢基因的sgRNA文库,之后使用随机sgRNA文库筛选靶基因,从而增强大肠杆菌细胞中紫罗兰素色素的产生。最终通过分析深紫色菌落中sgRNA质粒的冗余性,筛选出了17个靶基因。

对于CRISPRi高通量筛选,除基础的产量作为筛选方式外,还可以结合生物传感器进行筛选,从而识别与微生物代谢过程相关的基因。Wang等人^[47]设计了一个可编程的双错配CRISPRi系统,并优化了基于

PadR的生物传感器, 将目标产物作为诱导剂、PadR作为转录阻遏物、 P_{PadC} 作为启动子、eGFP作为表达强度信号, 成功建立了生物传感器辅助的可滴定CRISPRi高通量筛选方法. 最终, 通过使用sgRNA变体组合敲低 $pfkA$ 和 $ptsI$, 香豆酸的滴度提高了40.6%, 达到1.31 g/L. 同样地, 基于丁酸作为生物传感器的诱导剂, 使用靶向 $sucA$ 和 $ldhA$ 的sgRNA变体, 丁酸的滴度分别提高了19.0%和25.2%. 生物传感器与CRISPRi筛选相结合, 为实现代谢通量的多层次调节和高产表型的高通量筛选奠定了基础. 通过将产物产量与荧光强度相结合, CRISPRi高通量筛选可以通过荧光强度作为筛选标签, 极大地简化实验流程, 并实现高效的量化筛选. Fang等人^[48]结合荧光激活细胞分选(FACS)和二代测序(NGS), 采用基因组规模的CRISPRi方法, 确定了靶基因 $pcnB$ 对游离脂肪酸生产的影响. 随后, 在 $pcnB$ 抑制的基础上, 进一步抑制 $acrD$ 以增强FFA外排, 最终实现了35.1 g/L的最大FFA生产.

CRISPRi筛选为微生物代谢工程提供了一个高效、便捷的新方法, 不仅加速了代谢路径的优化和代谢产物产量的提高, 还提升了代谢工程中的精准调控能力, 拓宽了微生物代谢工程的应用范围.

3.2 CRISPRi文库在酿酒酵母中的应用

酿酒酵母作为模式微生物, 是第一个全基因组测序完成的真核生物, 有基因操作简单、生长迅速、工业应用广泛、真核细胞器可用于生产蛋白的优点^[49]. 但是在构建高通量筛选系统方面, 酿酒酵母的转化效率较低导致如下问题: 文库覆盖度低, 高通量编辑中存在位点差异问题, 代谢调控网络复杂可能导致表型不明显, 对于荧光等报告信息读取不明显不利于荧光流式分选且不如细菌耐受pH、温度、压力变化等问题^[50]. 通过实验方法的调整可以减弱上述不足, 最终达到使用CRISPRi高通量筛选的目的.

为了更好地反映酵母细胞基因型与表型之间的关系, 以及构建一个覆盖全基因组的高通量筛选方法, 最终深刻理解酿酒酵母的整个基因调控网络, Lian等人^[51]开发了一个多功能全基因组CRISPR(MAGIC)系统, 用于高通量基因型-表型定位, 通过结合CRISPR-AID和阵列合成的寡核苷酸库, 构建了基因组规模的功能获得、功能减弱和功能丧失的基因组文库. 由于酿酒酵母生长生产过程中会产生大量代谢废物, 最终

阻止发酵正常进行^[52]. 酿酒酵母CRISPRi高通量筛选最初的应用多体现在对外界抗逆性(阻碍代谢的生长条件)上, 例如, 由于酿酒酵母生物质水解会释放乙酸, 以乙酸作为筛选环境, Mukherjee等人^[53]构建了全基因组CRISPRi文库, 配合Scanomatic平台进行高分辨率固体培养筛选, 最终鉴定多个与乙酸耐受性相关的蛋白酶体调控基因, 其抑制能显著改善酵母对乙酸的耐受性, 为提高微生物生物燃料或化工生产中对抑制性副产物的耐受性提供了系统策略. 酿酒酵母可以把生物传感器用在CRISPRi筛选中, Mormino等人^[54]基于酿酒酵母转录因子 $Haa1$ 的乙酸生物传感器用于筛选CRISPRi酵母菌株文库, 荧光分选细胞将更高乙酸保留率的细胞群富集最终筛选出5个靶向基因. 对于代谢通路的筛选, Momen-Roknabadi等人^[55]构建了可诱导的全基因组CRISPRi文库, 最终准确发现单倍体不足基因以及鉴定参与腺嘌呤和精氨酸生物合成的酶和调控基因. 酿酒酵母由于其拥有真核细胞结构, 在重组蛋白的生产以及分泌拥有很大的优势, Johansson等人^[56]通过将液滴微流体筛选与扰乱酿酒酵母中大多数编码和非编码基因表达的大规模CRISPR文库相结合, 最终鉴定出345个基因的表达或增加会导致 α 蛋白酶的分泌增加, 基于CRISPR的干扰技术在精度和速度方面的优势使其能够对新菌株进行迭代测试, 以增加蛋白质的分泌. CRISPRi高通量筛选在酿酒酵母中推动了从基因功能发现到代谢流优化的全面升级, 其精准、可调、可逆的表达抑制特性使其成为现代代谢工程的关键工具.

3.3 CRISPRi文库在光合微生物中的应用

模式光合微生物具有固定 CO_2 的能力, 非常适合研究 CO_2 固定、电子传递、光调控等功能, 且因其基因组较小、结构清晰、易于编辑等特点, 成为理想的研究对象^[57]. 然而, 由于光合微生物中染色体多拷贝的存在, CRISPRi在这类微生物中的抑制效率容易受到限制. 2020年, CRISPRi筛选首次在集胞藻PCC 6803中得到应用, Yao等人^[58]构建了一个可诱导的全基因抑制文库, 并揭示了几个有助于生长的靶基因, 这些基因均与循环电子流相关. 在产物生产方面, 研究人员利用乳酸进行环境抗逆性筛选, 并结合液滴微流体技术筛选出乳酸产量最高的菌株.

目前, CRISPRi筛选在光合微生物中的应用仍较

少, 现有研究多集中在光合生长、碳代谢等领域^[59,60]. 然而, 通过将CRISPRi与“代谢开关”结合, 能够将代谢流从生长转移到产物合成, 提高微生物的生产效率. 此外, 结合CRISPRi文库与荧光测定技术, 能够进一步筛选出潜在的基因敲低点, 从而提升产率, 为光合微生物在代谢工程中的应用潜力开辟了新的方向.

3.4 CRISPRi文库在其他模式微生物中的应用

除了大肠杆菌、酿酒酵母和光合微生物, CRISPRi筛选系统在其他微生物中也有着广泛的应用. 例如, Liu等人^[61]优化并结合CRISPR辅助编辑与CRISPRi筛选方法, 将野生型谷氨酸棒状杆菌转化为L-脯氨酸的超生产者, 最终实现了142.4 g/L的L-脯氨酸产量. Yu等人^[62]开发了一个CRISPRi-微流体筛选平台, 系统地识别出可增加谷氨酸棒状杆菌重组蛋白(r-蛋白)分泌的靶点, 并且构建了一个包含46549条sgRNA的抑制文库, 并结合FIAsH-四半胱氨酸测定法的微流体检测系统, 通过组合工程改造氧化还原反应转录因子, 构建了多蛋白高产的工程菌株. 该微流体筛选平台为CRISPRi筛选在多种微生物中的应用扩展提供了新方法, 并为微生物代谢工程的研究提供了通用的技术方案. Peng等人^[63]使用基于LldR的宽动态范围d-乳酸生物传感器, 筛选出具有强GFP荧光的突变菌株, 随后, 将该生物传感器与靶向全基因组的CRISPRi文库结合, 构建了数千个gRNA突变体, 最终筛选出与d-乳酸产量增加相关的ZMO1323和ZMO1530两个基因靶点.

尽管CRISPRi大大缩短了获取代谢工程关键靶点基因的时间, 生物传感器等鉴定方法的缺乏仍然限制了其在微生物代谢工程中的广泛应用. 随着各种鉴定

方法与CRISPRi筛选的结合, CRISPRi将在微生物代谢工程中展示出巨大的潜力.

4 高通量筛选与数据分析方法

4.1 表型筛选平台

表型筛选平台是CRISPRi高通量筛选流程中的关键环节, 负责筛选或分选不同的sgRNA, 并最终富集(或反筛)出影响特定生理特性(如生长、药物抗性、产物产量等)的细胞. 常见的表型筛选平台包括竞争培养、靶向富集、FACS分选、微流控/液滴筛选^[64]、细胞成像平台和生物传感器耦合平台. 每种平台具有不同的优缺点(表1).

CRISPRi筛选常与FACS分选、微流控/液滴筛选、生物传感器耦合平台相结合, 能够直观且清晰地筛选出目标sgRNA, 经过生物信息学分析获得靶向基因.

4.2 与多组学数据相结合

CRISPRi筛选与多组学数据相结合, 能够显著增强对代谢调控网络、功能基因及系统反应机制的全面解析^[65]. CRISPRi筛选的核心是通过功能扰动和表型筛查共同探究, 然而, 仅依赖于sgRNA丰度和富集倍数的分析无法深入揭示代谢或转录响应机制. 与组学数据相结合, 可以实现从表型到机制的推断, 进行跨层级建模(基因→转录本→蛋白→代谢物), 识别冗余或互补的代谢路径(例如通过代谢流或转录补偿机制), 进而提高筛选靶标的可信度和解释力.

CRISPRi筛选与转录组数据结合可以验证靶向基因敲除后是否影响下游通路, 从而识别转录调控网络

表 1 常见表型筛选平台及优缺点

Table 1 Common phenotypic screening platforms: advantages and limitations

平台类型	原理	适用表型	优点	缺点
竞争培养	共同培养, 比较sgRNA丰度变化	生长、抗逆性	简单, 适用于负向筛选	表型分辨率低
FACS分选	按荧光强度筛选高/低表达群体	报告基因/代谢传感器相关表型	单细胞分辨率, 适用于正向筛选	需荧光指标
靶向富集	培养基选择	生存能力	快速富集阳性表型	仅适用于极端表型
微流控/液滴筛选	单细胞封装+代谢产物检测+分选	分泌产物、酶活性	精准选出高产菌	技术复杂、成本高
细胞成像平台	拍摄细胞形态、荧光、定位等	表型变化复杂的哺乳动物细胞	多表型联合判断	低通量、图像处理复杂
生物传感器耦合平台	报告基因响应代谢物	代谢产量、底物浓度	实时监控、动态范围大	需要构建有效传感器

响应. 与代谢组相结合通过LC-MS与GC-MS可以检测产物积累或消耗, 最终分析产物变化与代谢瓶颈, 建立基因与代谢关联. 与蛋白质组学相结合可以验证转录层调控是否传递至蛋白水平且识别反馈机制. 与表观组/染色质可及性相结合可以探索靶点选择失败的原因是否为染色质结构变化^[66]. 例如, Anglada-Girotto等人^[67]在大肠杆菌中构建了一个包含352个必需基因的CRISPRi寡核苷酸库, 并通过LC-MS非靶向代谢组学获得约1000种代谢物的调控过程. 通过比对化合物处理引起的代谢变化, 实现了化合物作用机制(MoA)的推断, 成功挖掘出抗菌剂的作用靶点, 充分展示了CRISPRi与代谢组联合平台在靶点识别与机制解析方面的高通量能力. 此外, Donati等人^[68]在对7177个靶向CRISPRi载体进行混合筛选后, 针对30个代表性敲低菌株开展了代谢组和蛋白质组分析, 发现了多种“缓冲机制”. 这一过程展示了CRISPRi与代谢组学和蛋白质组学相结合在揭示代谢网络鲁棒性机制方面的优势.

总之, CRISPRi筛选与多组学数据的结合, 是探究基因与转录、蛋白质、代谢物之间网络机制的重要方法, 并为微生物代谢工程提供了深度解析和优化的途径.

4.3 生物信息学与机器学习在靶点识别中的作用

在CRISPRi高通量筛选中, 生物信息学和机器学习在靶点识别过程中发挥着核心作用, 不仅用于数据预处理和显著性统计, 还扩展到特征提取、功能预测、通路建模, 甚至因果推断等多个层面. CRISPRi筛选得到的基础数据主要包括sgRNA筛选前后的丰度变化, 而之后需运用先进的计算方法进一步识别有效靶点、构建调控网络并筛选组合干扰靶点^[69].

Yu等人^[70]为了提升CRISPRi中sgRNA设计的效率与预测能力, 利用混合效应模型结合sgRNA序列特征(如GC含量、二级结构)、基因表达水平以及实验频次批次等变量, 训练了Random Forest/Gradient Boost模型, 最终通过输出预测得分显著减少了低效sgRNA的比例, 提升了靶点识别的准确率. Zhao等人^[32]总结了在CRISPRi筛选中可用的一系列算法, 包括: 对sgRNA计数进行质量控制(QC)和归一化(如使用RPM或median-ratio方法), 使用MAGeCK, edgeR, DESeq2等工具评估sgRNA与基因效应的关联; 对于单细胞筛选(如Perturbseq), 则采用PCA、聚类分析以及混合模型来

识别扰动后表达簇的变化.

这些生物信息学和机器学习方法不仅优化了CRISPRi高通量筛选的靶点识别过程, 也为进一步的代谢工程和基因调控网络的构建提供了强有力的工具支持.

5 CRISPRi文库在代谢工程中的优势与挑战

5.1 CRISPRi文库在代谢工程中的优势

CRISPRi系统引入高通量筛选技术, 主要得益于其克服了其他基因扰动手段的诸多局限, 并凭借其自身独特的机制优势, 在微生物代谢工程中展现出广阔的应用潜力^[51]. 相比传统方法, CRISPRi具备可逆调控、表达精确调节、靶点组合筛选、操作简便及跨物种通用性等特点, 具体表现如下:

(1) 可控性强. CRISPRi通过阻断转录而非切割DNA, 实现对基因表达的可控、可逆抑制, 避免了必需基因敲除对细胞生长的影响.

(2) 表达可调控. 通过优化sgRNA设计或调节dCas蛋白的表达水平, 可实现不同程度的基因抑制, 有助于精细调控代谢通量, 平衡代谢网络.

(3) 支持多靶点筛选. 多sgRNA共表达可实现双靶点或多靶点组合干扰, 有助于识别合成致死、协同调控等复杂关系, 提升代谢工程的系统设计效率.

(4) 适用于工业菌株. 该系统不涉及DNA双链断裂和同源重组, 亦不依赖DNA修复机制, 因此适合应用于DNA修复能力较弱的工业微生物中.

(5) 跨物种适用性强. CRISPRi已在大肠杆菌、酿酒酵母、乳酸菌、放线菌和蓝藻等多种微生物中成功应用, 具备良好的系统可迁移性, 可推广至非模式工业菌株.

5.2 CRISPRi文库在代谢工程中的挑战

尽管CRISPRi在微生物代谢工程中展现出显著优势, 其实际应用仍面临一系列内在挑战. 在CRISPRi文库的设计与实施过程中, 需重点关注脱靶效应、sgRNA的特异性与抑制效率, 以及调控强度的一致性. 此外, 文库构建的质量控制, 以及该技术在工业菌株中的适配性问题, 均对其在工业化应用中的广泛推广构成重要限制^[25]. 具体问题包括:

(1) 效率与特异性存在变异性. sgRNA的干扰效率受靶位序列特征、基因表达水平及染色质可及性的影响显著, 导致作用效果具有较大变异性, 因此需进行额外的sgRNA优化与筛选.

(2) 脱靶效应. 尽管CRISPRi不造成DNA剪切, 其sgRNA仍可能结合非靶位点, 从而引发非特异性基因调控或扰乱调控网络, 影响结果准确性.

(3) 高表达基因难以实现完全抑制. 对于高丰度转录本的目标基因, 可能无法实现充分抑制, 限制其在某些基因验证中的适用性.

(4) 在工业菌株中的适应性仍待提升. 许多非模式工业微生物在转化效率、表达控制与遗传操作等方面存在瓶颈, 当前CRISPRi系统在这些菌株中的适配仍具挑战性.

为了解决这些局限性, 需要从多个层面协同作用, 通过大规模sgRNA库筛选与机器学习提升靶点预测准确性; 结合多组学数据解析间接效应; 构建稳定表达载体或进行染色体整合; 发展低脱靶、高效表达系统; 并优化在工业菌中的转化与调控策略, 以提升系统通用性与工程稳定性.

5.3 CRISPRi文库与CRISPRa等工具互补

为进一步提升大规模研究基因与表型关系的能力, 解决CRISPRi文库的不足, 近年来引入了CRISPRa, 作为CRISPRi的功能互补手段^[71]. CRISPRa继承了CRISPRi可逆、可控、无DNA切割等优势, 同时还具备比启动子工程更高的可扩展性, 以及比传统过表达质粒更强的灵活性和通用性.

与CRISPRi类似, CRISPRa同样能够实现多基因并行调控, 适用于高通量表型筛选. 但相较而言, CRISPRa的系统设计更为复杂, 对激活结构域的选择、宿主适配性以及靶位点定位等均提出了更高要求. 此外, CRISPRa尤其适合用于激活处于沉默或低表达状态的代谢基因, 从而显著拓展其在微生物代谢工程中的潜力. 例如, Baumschabl等人^[72]在甲基营养型酵母中利用CRISPRa系统过表达*RIB1*基因, 成功实现核黄素产量的大幅提升, 其水平超过了基于强启动子*P_{GAP}*的传统过表达策略. Li等人^[73]在酿酒酵母中构建dCas9-VP64融合蛋白与52个基因的CRISPRa的gRNA文库, 最终鉴定出靶向*OLE1*启动子区域的sgRNA. 过表达*OLE1*能够提高脂肪酸不饱和度, 从而

增强酵母的耐热性, 显著缓解高温条件下的脂质过氧化应激.

更进一步, CRISPRi与CRISPRa的联合应用也已在微生物代谢产物提升中取得进展. Chen等人^[74]在酿酒酵母中基于蛋白质分泌模型pcSecYeast, 预测了在分泌限制条件下影响 α -淀粉酶生产的可调控靶点, 并通过构建包含双重调控元件的CRISPRi/a文库进行液滴微流控高通量筛选. 最终, 通过协同调控中心碳代谢中的*LPD1*, *MDH1*和*ACSI*三个基因, 显著提高了碳通量与 α -淀粉酶产量, 验证了CRISPRi/a系统在多基因精准调控中的强大潜力.

尽管CRISPRa已经取得了一些进展, 但是该系统仍然存在着极大的限制^[75]. 与CRISPRi相比, CRISPRa系统的设计更加复杂且难以推广, 因为不同的激活子针对不同的dCas分子具有不同作用, 激活结构域因生物体甚至启动子而异, 并且靶向窗口要窄得多. 此外, 其他细胞机制对转录扰动的补偿、表型掩盖或并非所有基因都会对扰动作出反应^[76]. 某些基因需要强烈的激活才能观察到表型, 因此必须开发一个优化且强大的系统. 对于CRISPRa脱靶效应的并未进行研究, 但由于与CRISPRi系统原理相同, 脱靶效应与坏种子是难以避免的.

6 结论与展望

随着CRISPRi技术的不断成熟, 结合高通量筛选平台的应用已在大肠杆菌、酿酒酵母、枯草芽孢杆菌、放线菌等模式与工业微生物中取得显著进展. 研究者已借助该技术实现了代谢瓶颈识别、副产物通路抑制、调控网络解析、多靶点组合优化与多组学辅助靶点挖掘, 极大地推动了微生物代谢工程中靶点识别、底盘优化和高产株构建的规模化与自动化发展. 尽管如此, CRISPRi高通量筛选仍有多方面值得进一步拓展与深化的应用前景(图2).

6.1 CRISPRi高通量筛选与合成生物学的模块化设计深度融合

CRISPRi的可编程性和系统性调控能力, 为合成生物学中的模块化构建与功能验证提供了理想的技术平台. 例如, Yu等人^[77]开发了一个独立于特定通路的可编程CRISPRi系统, 用于在枯草芽孢杆菌中实现多

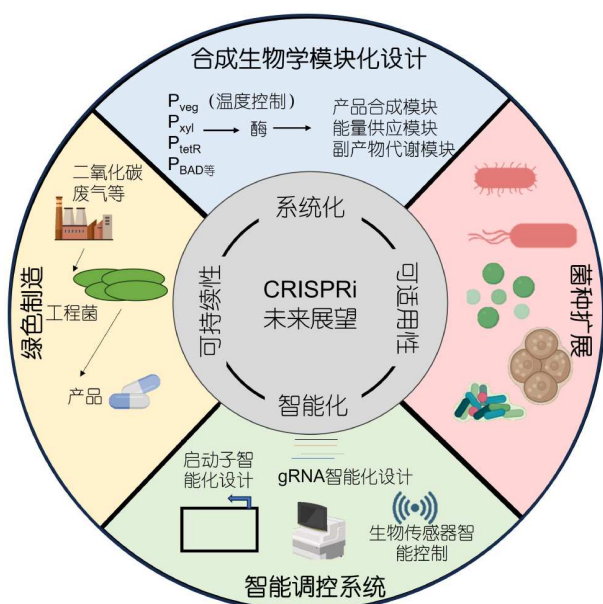


图2 CRISPRi高通量筛选应用前景

Figure 2 Application prospects of CRISPRi high-throughput screening

个代谢模块的有序调控,成功提高了2'-岩藻糖基乳糖(2'-FL)的产量.未来,CRISPRi可进一步嵌入合成生物学中的“设计-建造-测试-学习(DBTL)”循环,快速实现功能模块筛选、基因互作解析及敏感基因的精细调控,从而加速复杂合成路径的构建与优化迭代.

6.2 智能调控系统与动态响应网络

得益于其可逆性与高通量特征,CRISPRi在智能调控系统与动态网络调节方面展现出巨大潜力. Byun等人^[78]构建了一个基于重复序列及其变体的sgRNA库,实现了基因表达强度的梯度化控制,为模块化调控提供了新策略.未来,CRISPRi可与光敏、化学诱导、自反馈系统等元件集成,构建响应环境信号与细胞代

谢状态的动态调控网络,最终实现智能调控CRISPRi系统.

6.3 CRISPRi高通量筛选拓展至新型底物与非模式菌株的应用

在绿色制造日益受到关注的背景下,CRISPRi高通量筛选正逐步拓展至新型底物(如CO₂、甲醇、合成气等)及非模式微生物(如产甲烷菌、放线菌、光合细菌等)的研究中. Volke等人^[79]根据不断扩展的CRISPR-Cas领域的最新进展,总结了CRISPR-Cas促进了非模型细菌的工程化,适用于嗜极生物和自养细菌,并且提出了驯化新分离物种的途径,为CRISPRi在新菌株的应用奠定了基础.

通过系统性筛选与调控,可以识别与碳固定、电子传递与产物合成密切相关的关键因子,进而助力高效碳源转化菌株的开发.随着多宿主兼容型CRISPRi工具、高效诱导系统及自动化表型筛选平台的发展,未来该技术将在极端环境微生物、厌氧菌与光合菌中得到更广泛的应用,为实现碳中和与可持续制造提供新策略.

6.4 加速人工细胞工厂与绿色制造体系构建

CRISPRi高通量筛选系统已成为构建人工细胞工厂和推进绿色制造的重要支撑技术.其在多基因并行调控、资源分配优化与通路瓶颈识别方面展现出独特优势^[80].在人工细胞工厂中,CRISPRi可用于动态调节核心代谢与产物合成模块的表达平衡,显著提升底物利用率和产物收率.通过结合多组学分析,可系统挖掘影响细胞稳态、耐受性及产能的调控因子,推动高性能菌株的快速筛选与定向优化.未来,CRISPRi将进一步融合机器学习、建模预测与自动化工程平台,助力构建智能、高效、可持续的绿色生物制造体系.

参考文献

- 1 Xu C, Liu L, Zhang Z, et al. Genome-scale metabolic model in guiding metabolic engineering of microbial improvement. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 519–539
- 2 Bailey J E. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, 252: 1668–1675
- 3 Jakočiūnas T, Bonde I, Herrgård M, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2015, 28: 213–222
- 4 Galanie S, Thodey K, Trenchard I J, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 2015, 349: 1095–1100

- 5 Sun D, Chen J, Wang Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* by synthetic small regulatory RNAs. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46: 203–208
- 6 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. *Cell*, 2013, 152: 1173–1183
- 7 Gilbert L A, Horlbeck M A, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159: 647–661
- 8 Winzler E A, Shoemaker D D, Astromoff A, et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 1999, 285: 901–906
- 9 Jantama K, Haupt M J, Svoronos S A, et al. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotech Bioeng*, 2008, 99: 1140–1153
- 10 Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74: 417–433
- 11 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 12 Li C, Swofford C A, Sinskey A J. Modular engineering for microbial production of carotenoids. *Metab Eng Commun*, 2020, 10: e00118
- 13 Wang L, Deng A, Zhang Y, et al. Efficient CRISPR-Cas9 mediated multiplex genome editing in yeasts. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 277
- 14 Cheng A W, Wang H, Yang H, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*, 2013, 23: 1163–1171
- 15 Ni J, Zhang G, Qin L, et al. Simultaneously down-regulation of multiplex branch pathways using CRISPRi and fermentation optimization for enhancing β -amyrin production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Synth Syst Biotechnol*, 2019, 4: 79–85
- 16 Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346: 1258096
- 17 Carter J, Wiedenheft B. SnapShot: CRISPR-RNA-guided adaptive immune systems. *Cell*, 2015, 163: 260–260.e1
- 18 Barrangou R, Marraffini L A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*, 2014, 54: 234–244
- 19 Deng X S T, Wang J Y, Wang Y L. Discovery of *acr* genes for class 2 CRISPR-Cas systems and the distinct inhibition mechanisms of Acr proteins (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2024, 54: 409–427 [邓谢淑婷, 王久宇, 王艳丽. 针对第2大类CRISPR-Cas系统的 acr 基因的发现及Acr蛋白多样化的抑制机制. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 409–427]
- 20 Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 722–736
- 21 Zhao Z Y, Peng J P. Research progress of CRISPR/Cas systems in nucleic acid detection (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 1101–1119 [赵子渊, 彭俊平. CRISPR/Cas核酸检测技术的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1101–1119]
- 22 Zhang J, Peng Y Z, Liu D, et al. Gene repression via multiplex gRNA strategy in *Y. lipolytica*. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 62
- 23 Sun L, Zheng P, Sun J, et al. Genome-scale CRISPRi screening: a powerful tool in engineering microbiology. *Eng Microbiol*, 2023, 3: 100089
- 24 Vercauteren S, Fiesack S, Maroc L, et al. The rise and future of CRISPR-based approaches for high-throughput genomics. *FEMS Microbiol Rev*, 2024, 48: fuae020
- 25 Doench J G, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 184–191
- 26 Sanson K R, Hanna R E, Hegde M, et al. Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities. *Nat Commun*, 2018, 9: 5416
- 27 Kleinstiver B P, Pattanayak V, Prew M S, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, 529: 490–495
- 28 Slaymaker I M, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351: 84–88
- 29 Fu Y, Sander J D, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 279–284
- 30 Cui L, Vigouroux A, Rousset F, et al. A CRISPRi screen in *E. coli* reveals sequence-specific toxicity of dCas9. *Nat Commun*, 2018, 9: 1912
- 31 Horlbeck M A, Gilbert L A, Villalta J E, et al. Compact and highly active next-generation libraries for CRISPR-mediated gene repression and activation. *eLife*, 2016, 5: e19760
- 32 Zhao Y, Zhang M, Yang D. Bioinformatics approaches to analyzing CRISPR screen data: from dropout screens to single-cell CRISPR screens. *Quant Biol*, 2022, 10: 307–320

- 33 Gutmann F, Jann C, Pereira F, et al. CRISPRi screens reveal genes modulating yeast growth in lignocellulose hydrolysate. *Biotechnol Biofuels*, 2021, 14: 1–4
- 34 McGlincy N J, Meacham Z A, Reynaud K K, et al. A genome-scale CRISPR interference guide library enables comprehensive phenotypic profiling in yeast. *BMC Genomics*, 2021, 22: 1–7
- 35 de Wet T J, Winkler K R, Mhlanga M, et al. Arrayed CRISPRi and quantitative imaging describe the morphotypic landscape of essential mycobacterial genes. *eLife*, 2020, 9: e60083
- 36 Bock C, Datlinger P, Chardon F, et al. High-content CRISPR screening. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, 2: 1–23
- 37 Batianis C, Kozaeva E, Damalas S G, et al. An expanded CRISPRi toolbox for tunable control of gene expression in *Pseudomonas putida*. *Microb Biotechnol*, 2020, 13: 368–385
- 38 Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442–451
- 39 Pickar-Oliver A, Gersbach C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 490–507
- 40 Wang L, Wang H J, Luo Y Z. Applications of CRISPR technology in microbial synthetic biology (in Chinese). *Chin Bull Life Sci*, 2019, 31: 493–507 [汪莲, 王浩君, 罗云孜. CRISPR技术在微生物合成生物学中的应用. *生命科学*, 2019, 31: 493–507]
- 41 Replogle J M, Bonnar J L, Pogson A N, et al. Maximizing CRISPRi efficacy and accessibility with dual-sgRNA libraries and optimal effectors. *eLife*, 2022, 11: e81856
- 42 Li S, Jendresen C B, Landberg J, et al. Genome-wide CRISPRi-based identification of targets for decoupling growth from production. *ACS Synth Biol*, 2020, 9: 1030–1040
- 43 Wang T, Guo J, Liu Y, et al. Genome-wide screening identifies promiscuous phosphatases impairing terpenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 9771–9780
- 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. *Biotechnol Biofuels*, 2021, 14: 1
- 45 Fang L, Fan J, Luo S, et al. Genome-scale target identification in *Escherichia coli* for high-titer production of free fatty acids. *Nat Commun*, 2021, 12: 4976
- 46 Jeong S H, Kim H J, Lee S J. New target gene screening using shortened and random sgRNA libraries in microbial CRISPR interference. *ACS Synth Biol*, 2023, 12: 800–808
- 47 Wang J, Li C, Jiang T, et al. Biosensor-assisted titratable CRISPRi high-throughput (BATCH) screening for over-production phenotypes. *Metab Eng*, 2023, 75: 58–67
- 48 Fang L, Hao X, Fan J, et al. Genome-scale CRISPRi screen identifies *pcnB* repression conferring improved physiology for overproduction of free fatty acids in *Escherichia coli*. *Nat Commun*, 2025, 16: 3060
- 49 Goffeau A, Barrell B G, Bussey H, et al. Life with 6000 genes. *Science*, 1996, 274: 546–567
- 50 Smith J D, Suresh S, Schlecht U, et al. Quantitative CRISPR interference screens in yeast identify chemical-genetic interactions and new rules for guide RNA design. *Genome Biol*, 2016, 17: 1–6
- 51 Lian J, Schultz C, Cao M, et al. Multi-functional genome-wide CRISPR system for high throughput genotype-phenotype mapping. *Nat Commun*, 2019, 10: 5794
- 52 Ni J P, Li J, Li C. Application of CRISPR gene editing technology in *Saccharomyces cerevisiae* cell factories (in Chinese). *Chin Bull Life Sci*, 2019, 31: 508–515 [倪江萍, 李珺, 李春. CRISPR基因编辑技术在酿酒酵母细胞工厂中的应用. *生命科学*, 2019, 31: 508–515]
- 53 Mukherjee V, Lind U, St. Onge R P, et al. A CRISPR interference screen of essential genes reveals that proteasome regulation dictates acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *mSystems*, 2021, 6: 10.1128/mSystems.00418-21
- 54 Mormino M, Lenitz I, Siewers V, et al. Identification of acetic acid sensitive strains through biosensor-based screening of a *Saccharomyces cerevisiae* CRISPRi library. *Microb Cell Fact*, 2022, 21: 214
- 55 Momen-Roknabadi A, Oikonomou P, Zegans M, et al. An inducible CRISPR interference library for genetic interrogation of *Saccharomyces cerevisiae* biology. *Commun Biol*, 2020, 3: 723
- 56 Johansson S A, Dulermo T, Jann C, et al. Large scale microfluidic CRISPR screening for increased amylase secretion in yeast. *Lab Chip*, 2023, 23: 3704–3715
- 57 Berla B M, Saha R, Immethun C M, et al. Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities. *Front Microbiol*, 2013, 4: 246

- 58 Yao L, Shabestary K, Björk S M, et al. Pooled CRISPRi screening of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 for enhanced industrial phenotypes. *Nat Commun*, 2020, 11: 1666
- 59 Miao R, Jahn M, Shabestary K, et al. CRISPR interference screens reveal growth-robustness tradeoffs in *Synechocystis* sp. PCC 6803 across growth conditions. *Plant Cell*, 2023, 35: 3937–3956
- 60 Hren A, Lollini N, Carper D L, et al. High-density CRISPRi screens reveal diverse routes to improved acclimation in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, 122: e2412625122
- 61 Liu J, Liu M, Shi T, et al. CRISPR-assisted rational flux-tuning and arrayed CRISPRi screening of an l-proline exporter for l-proline hyperproduction. *Nat Commun*, 2022, 13: 891
- 62 Yu X, Li S, Feng H, et al. CRISPRi-microfluidics screening enables genome-scale target identification for high-titer protein production and secretion. *Metab Eng*, 2023, 75: 192–204
- 63 Peng Q, Bao W, Geng B, et al. Biosensor-assisted CRISPRi high-throughput screening to identify genetic targets in *Zymomonas mobilis* for high d-lactate production. *Synth Syst Biotechnol*, 2024, 9: 242–249
- 64 Tran T M, Lan F, Thompson C S, et al. From tubes to drops: droplet-based microfluidics for ultrahigh-throughput biology. *J Phys D-Appl Phys*, 2013, 46: 114004
- 65 Przybyla L, Gilbert L A. A new era in functional genomics screens. *Nat Rev Genet*, 2022, 23: 89–103
- 66 Cheng J, Lin G, Wang T, et al. Massively parallel CRISPR-based genetic perturbation screening at single-cell resolution. *Adv Sci*, 2023, 10: 2204484
- 67 Anglada-Girotto M, Handschin G, Ortmayr K, et al. Combining CRISPRi and metabolomics for functional annotation of compound libraries. *Nat Chem Biol*, 2022, 18: 482–491
- 68 Donati S, Kuntz M, Pahl V, et al. Multi-omics analysis of CRISPRi-knockdowns identifies mechanisms that buffer decreases of enzymes in *E. coli* metabolism. *Cell Syst*, 2021, 12: 56–67.e6
- 69 Graham J P, Zhang Y, He L, et al. CRISPR-GEM: a novel machine learning model for CRISPR genetic target discovery and evaluation. *ACS Synth Biol*, 2024, 13: 3413–3429
- 70 Yu Y, Gawlitt S, de Andrade e Sousa L B, et al. Improved prediction of bacterial CRISPRi guide efficiency from depletion screens through mixed-effect machine learning and data integration. *Genome Biol*, 2024, 25: 13
- 71 Wang Z, Pan H, Ni S, et al. Establishing CRISPRi for programmable gene repression and genome evolution in *Cupriavidus necator*. *ACS Synth Biol*, 2024, 13: 851–861
- 72 Baumschabl M, Prielhofer R, Mattanovich D, et al. Fine-tuning of transcription in *Pichia pastoris* using dCas9 and RNA scaffolds. *ACS Synth Biol*, 2020, 9: 3202–3209
- 73 Li P, Fu X, Zhang L, et al. CRISPR/Cas-based screening of a gene activation library in *Saccharomyces cerevisiae* identifies a crucial role of *OLE1* in thermotolerance. *Microb Biotechnol*, 2019, 12: 1154–1163
- 74 Chen X, Li F, Li X, et al. Model-assisted CRISPRi/a library screening reveals central carbon metabolic targets for enhanced recombinant protein production in yeast. *Metab Eng*, 2025, 88: 1–13
- 75 Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517: 583–588
- 76 Chavez A, Scheiman J, Vora S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 2015, 12: 326–328
- 77 Yu W, Jin K, Wu Y, et al. A pathway independent multi-modular ordered control system based on thermosensors and CRISPRi improves bioproduction in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: 6587–6600
- 78 Byun G, Yang J, Seo S W. CRISPRi-mediated tunable control of gene expression level with engineered single-guide RNA in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51: 4650–4659
- 79 Volke D C, Orsi E, Nikel P I. Emergent CRISPR-Cas-based technologies for engineering non-model bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2023, 75: 102353
- 80 Zhao M, Li Y, Wang F, et al. A CRISPRi mediated self-inducible system for dynamic regulation of TCA cycle and improvement of itaconic acid production in *Escherichia coli*. *Synth Syst Biotechnol*, 2022, 7: 982–988

Applications of CRISPRi-based gene interference libraries in microbial metabolic engineering

CAO JiaHao¹, ZHU XiaoFei¹, SUN Tao^{1,2*}, CHEN Lei¹ & ZHANG WeiWen^{1,2}

¹ State Key Laboratory of Synthetic Biology, Frontiers Science Center for Synthetic Biology (Ministry of Education), School of Synthetic Biology and Biomanufacturing, Tianjin University, Tianjin 300072, China

² Center for Biosafety Research and Strategy, Tianjin University, Tianjin 300072, China

* Corresponding author; E-mail: tsun@tju.edu.cn

The CRISPR enables permanent modifications to the genome. To avoid such irreversible changes, CRISPR interference (CRISPRi) was developed. CRISPRi utilizes a catalytically inactive Cas protein (dCas) guided by a single guide RNA (sgRNA) to block transcription, thereby repressing gene expression without altering the DNA sequence. The expansion of CRISPRi applications has led to the development of genome-scale, high-throughput screening approaches. In recent years, CRISPRi has been widely applied in microbial metabolic engineering, gene function analysis, metabolic pathway regulation, and high-throughput phenotypic screening. Construction of CRISPRi libraries allows genome-wide transcriptional regulation, enabling the identification of key metabolic nodes, regulatory factors, and their physiological roles. Compared with traditional gene knockout libraries, CRISPRi offers advantages such as reversibility, tunability, and applicability to essential genes, making it particularly suitable for dissecting complex regulatory networks and optimizing metabolic flux. This review systematically summarizes strategies for constructing CRISPRi libraries and highlights representative applications in model microorganisms. It focuses on the contributions of CRISPRi to improving product yields, suppressing by-product formation, and enhancing substrate utilization. Finally, it discusses directions and challenges for CRISPRi-based approaches in synthetic biology and the development of industrial microbial strains.

CRISPR/Cas, CRISPRi system, high-throughput screening, microbial metabolic engineering, synthetic biology

doi: [10.1360/SSV-2025-0213](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0213)