

CRISPR/Cas9 基因编辑系统及其在微藻中的应用

刘丽娴, 郭 栗, 杨官品

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 微藻是单细胞光合原生动物的统称。微藻富含高价值的产物, 如蛋白质、DHA、虾青素等, 广泛用于食品、保健品、化妆品和饲料生产。基因编辑技术是微藻遗传学研究和遗传改良的新工具。目前, 广泛使用的基因编辑技术有锌指蛋白-核酸酶系统(zinc-finger nucleases system, ZFN)、转录激活样效应蛋白-核酸酶系统(transcription activator-like effector nucleases system, TALEN)和成簇规则间隔短回文重复(CRISPR)-CRISPR 合作蛋白系统[clustered regularly interspaced short palindromic repeats(CRISPR)/CRISPR-associated(Cas) system], 简称 CRISPR/Cas 系统。ZFN 和 TALEN 融合了 DNA 特定序列识别蛋白和核酸内切酶, 需要根据拟识别 DNA 序列修改识别蛋白氨基酸序列, 过程繁琐, 效率低, 而 CRISPR/Cas 系统操作简便, 只需设计拟识别 DNA 序列小引导 RNA 即可, 编辑效率高, 可同步编辑多个基因。目前, 已有编辑干扰、编辑激活、编辑敲除、编辑插入等衍生系统, 还有引导编辑、碱基编辑等, 也可以编辑 RNA 分子。CRISPR/Cas 在微藻中应用广泛。本文综述了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在微藻中的应用现状。

关键词: 微藻; 基因编辑; CRISPR/Cas9 系统

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2023)8-0101-11

DOI: 10.11759/hyxx20221014001

成簇规则间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)于 1987 年在大肠杆菌中首次被发现^[1-4]。之后陆续在许多细菌中也发现了 CRISPR 序列, 并逐渐阐明了其生物学意义。CRISPR/Cas 系统广泛用于动植物遗传育种, 微生物工程, 合成生物学等研究, 并在不断改进, 以满足多样化的研究和应用需求。近年来, CRISPR/Cas9 系统在微藻中的应用越来越多。本文简要介绍了 CRISPR/Cas 系统, 重点综述了 CRISPR/Cas9 系统在微藻中的应用, 以为微藻的相关研究提供参考。

1 CRISPR/Cas 系统

成簇规则间隔短回文重复序列由前导、重复和间隔序列构成。前导序列长 20~534 bp, 腺嘌呤和胸腺嘧啶含量高, 是 CRISPR 的启动子^[5-6]。重复序列长 21~48 bp, 其转录本可形成发夹结构^[7-8]。间隔序列各异, 长 26~72 bp, 是免疫外源 DNA 的效应序列。病毒或外源 DNA 的部分序列可插入到 CRISPR 引导序列端, 形成新的间隔序列。当相应的病毒或外源 DNA 再次入侵时, CRISPR 便会发挥免疫作用^[5, 7, 9-11]。

CRISPR 合作蛋白 Cas 的编码基因位于 CRISPR 基因附近^[5]。CRISPR 和 Cas 协同发挥作用, 使细菌免疫

有特定间隔序列的病毒或外源 DNA 的效应序列, 防止入侵。CRISPR/Cas 系统介导的免疫过程分为适应、表达和干扰 3 步, 参与的蛋白各异。表 1 列出适应过程 Cas1 和 Cas2 将入侵的 DNA 片段整合到 CRISPR 基因座中, 进入表达步骤, CRISPR 被转录成前体 crRNA (pre-crRNA), 前体 crRNA 结合到 Cas 蛋白上并经 RNase 切割, 最终形成成熟的 crRNA (CRISPR RNA)。当外源 DNA 再次侵入时, 干扰步骤发挥作用, crRNA 与外源 DNA 互补, Cas 蛋白行使核酸酶功能切割外源 DNA^[1, 12-14], 实现免疫。CRISPR/Cas 系统存在于约一半已测序细菌基因组和几乎所有的古细菌基因组中。但在真核生物和病毒中却不存在^[5, 8, 11, 15-16]。

收稿日期: 2022-10-14; 修回日期: 2022-11-08

基金项目: 山东省重点研发计划(2022LZGC004), 国家重点研发计划(2022YFF1102300), 中央高校基本科研业务费专项(202262001)资助
[Foundation: Supported by Key R&D Program of Shandong Province, China, No. 2022LZGC004, National Key R&D Program of China, No. 2022YFF1102300 and the Fundamental Research Funds for the Central Universities, No. 202262001]

作者简介: 刘丽娴(1998—), 女, 山东青岛人, 硕士, 主要从事海洋微藻遗传学研究, E-mail: liulixou@163.com; 杨官品(1963—), 通信作者, 男, 湖北荆州人, 主要从事海洋生物方面的研究 E-mail: yguanpin@ouc.edu.cn

表 1 CRISPR/Cas 系统分类及其特征^[17-18]

Tab. 1 Classification and characteristics of CRISPR/Cas systems

类型	CRISPR 适应	CRISPR 表达	CRISPR 干扰	分布
I、III、IV型	用 Cas1(核酸酶活性)和 Cas2 等蛋白获得免疫记忆	多蛋白效应复合物介导 crRNA 成熟	多蛋白效应复合物介导靶 DNA 切割	90%, 广泛存在于细菌和古菌门中
II、V、VI型	用 Cas1 和 Cas2 等蛋白质获得免疫记忆	单个的多结构域蛋白介导 crRNA 成熟	单个多结构域蛋白介导靶 DNA 切割	10%, 古菌中几乎不存在

2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

Sapranauskas 等^[19]证明嗜热链球菌 CRISPR/Cas 系统可转移到大肠杆菌中发挥免疫作用, 保护转化的质粒和转染的噬菌体。2012 年, 双 RNA 分子被发现可引导 Cas9 切割细菌基因组任意位置^[20], Cas9 的可操纵性和编辑功能在许多生物中通用, 仅需改变与靶 DNA 互补结合的引导 RNA 分子。这种高效、通用的系统迅速获得许多研究者的青睐, 他们也因此获得 2020 年诺贝尔化学奖。这一划时代的发现推动了各种生物的基因编辑进程。

常用的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术属于 II 型 CRISPR/Cas 系统。参与 CRISPR/Cas 作用的各组分如下: (1) crRNA。crRNA 5' 端的 20 个核苷酸各不相同, 结合不同的靶 DNA。该部分由外源的 DNA 序列插入 CRISPR 序列的间隔区, 先转录形成 pre-crRNA, 再切割成 crRNA^[12, 21]。(2) tracrRNA(*trans-activating crRNA*)。tracrRNA 通过 RNase III 触发 pre-crRNA 加工, 随后通

过 Cas9 激活 crRNA 引导的靶 DNA 切割^[20-21](图 1a)。(3) sgRNA(*single guide RNA*)。crRNA 和 tracrRNA 连接, 形成长约 100 bp 的单分子引导 RNA^[22], GC 含量约 40%~60%^[23](图 1b)。(4) Cas9 蛋白。Cas9 蛋白是 2 个 RNA 引导的 DNA 核酸内切酶。Cas9 有 2 个结构域。HNH 结构域切割与 crRNA 互补的 DNA 链, RuvC 结构域切割非互补 DNA 链^[20]。Cas9 识别 crRNA 互补的 20 bp DNA 序列和三核苷酸^[12]。(5) PAM(*protospacer-adjacent motif*)序列。PAM 序列与目的基因常为 NGG, 是 Cas9 核酸酶特异性识别位点。PAM 序列对间隔区的选择有 CRISPR 类型特异性^[24]。质粒 DNA 会在 PAM 序列上游 3 个碱基对的位置切割并产生平末端。而短线型双链 DNA, 与 crRNA 序列互补的目的基因 DNA 链在 PAM 序列上游 3 个碱基对的位置被切割, 非互补 DNA 链在 PAM 上游的 3~8 个碱基对内的 1 个或多个位点被切割。非互补 DNA 链首先被核酸内切酶切割, 随后被 3'-5'端的外切核酸酶切割^[20]。PAM 序列在平均每 16 个碱基中出现 1 次, 限制了可以建立的目标数量^[25]。

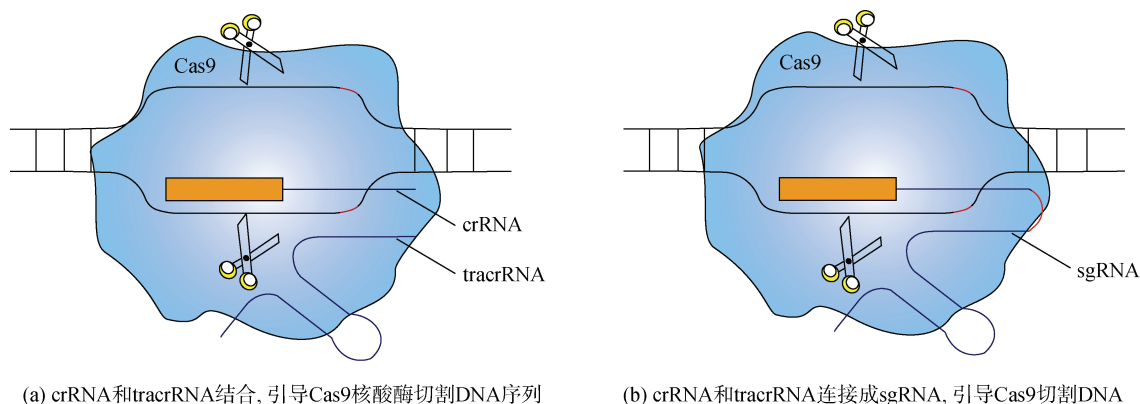


图 1 CRISPR/Cas9 系统切割原理

Fig. 1 Functional mechanism of CRISPR/Cas9

3 微藻中 CRISPR/Cas9 系统的应用

2014 年, CRISPR/Cas9 技术首次微藻中成功应用。Jiang 等^[26]将 sgRNA 和 Cas9 基因转入莱茵衣藻, 证明 Cas9 和 sgRNA 在莱茵衣藻中能正常发挥作用, 介导

靶向基因修饰。表达 CRISPR/Cas9 系统的构建物转化进藻细胞后, sgRNA 与目标 DNA 结合, 引导 Cas9 切割 DNA, 产生双链 DNA 断裂(double strand break, DSB)。DSB 经过非同源末端连接(non-homologous end joining,

NHEJ)或同源重组修复(homologous recombination, HR), 引入插入或缺失, 敲除基因(基因失活)。若外源 DNA 和表达 CRISPR/Cas 构建物同时转化, 则可插入编辑的基因^[27]。可根据不同目的设计特定的 sgRNA, 获得编辑藻株或转化藻株。Cas9 和 sgRNA 也可以纯化后融合成复合物, 转化进细胞, 实现编辑。

实现 CRISPR/Cas9 基因编辑的微藻越来越多。表 2 根据 Cas9 的表达位置, 可以将微藻 CRISPR/Cas9 基

因编辑的方式可以分为 3 类: (1) Cas9 基因整合到微藻基因组中发挥功能, 常用细菌质粒为构建物进行转化。(2) Cas9 以游离蛋白方式在微藻基因组中发挥功能, 通常是先形成核糖核蛋白复合物(Cas9-gRNA ribonucleoprotein)再导入微藻细胞。(3) 构建游离的附加体(episome)转入微藻细胞。附加体上 Cas9 和 gRNA 表达后发挥功能, 但附加体不整合进基因组, 去除抗生素选择压后, 附加体因生物稀释而消失, 如图 2 所示。

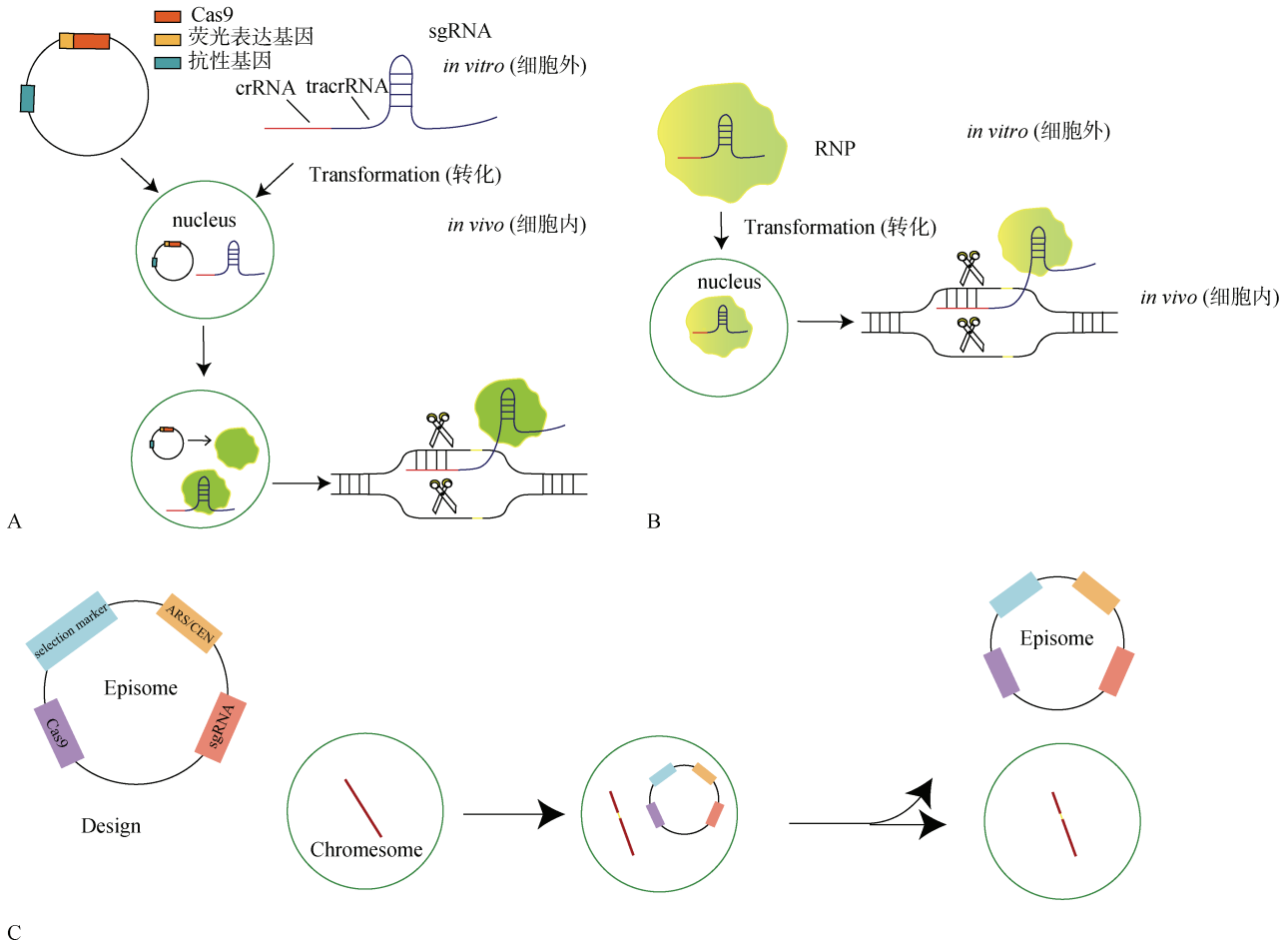


图 2 CRISPR/Cas9 技术的不同应用方式

Fig. 2 Different functional mechanisms of CRISPR/Cas9 system

注: A, 以细菌质粒为扩增方法构建 Cas9 基因和 gRNA 表达构建物, 整合进微藻基因组, 组成型表达; B, 合成和纯化 Cas9 和 gRNA, 形成核糖核蛋白复合物, 瞬时发挥功能; C, 以 episome 为载体构建 Cas9 和 gRNA 表达构建物转入微藻, 但不整合进基因组, 基因表达后瞬时发挥作用, 去除抗生素选择压, 附加体因生物稀释而消失。

3.1 CRISPR/Cas9 系统基因组整合-细菌质粒载体构建物转化

细菌质粒是常用的表达 Cas9-gRNA 基因的构建物。质粒是细菌体系, 构建方便, 分子量小, 在植物、动物等的基因工程研究中使用广泛。在微藻中应用 CRISPR/Cas 系统, 要用细菌质粒为框架,

构建 Cas9-gRNA 基因表达构建物, 把 Cas9 基因和 sgRNA 单元表达元件集中在同一质粒或不同质粒上, 用合适的转化方法, 将细菌质粒构建物(重组质粒)转入微藻细胞并整合在微藻基因组 DNA 中, 实现 Cas9 蛋白基因和 sgRNA 的组成型表达(图 2A)。

2014年, Jiang等^[26]构建 CRISPR/Cas9 细菌质粒构建物, 实现莱茵衣藻内源 *FKB12* 基因靶向敲除。这是 CRISPR/Cas9 技术在微藻中的首次应用。虽然获得了突变体, 但是莱茵衣藻的编辑效率并不很高。为了提高莱茵衣藻的编辑效率, 2017年, 该研究团队又将 sgRNA 表达组件插入 Cas9 基因的内含子中, 实现两个成员共享一套表达控制元件, 使莱茵衣藻的编辑效率提高 50 倍^[28]。

在微藻中, CRISPR/Cas9 技术是新兴的技术, 需要通过对已知基因的编辑, 证明其可行性。Lin 等^[29]首次在小球藻中实现 CRISPR/Cas9 技术应用, 他们把表达 Cas9 和 sgRNA 的细菌质粒构建物转化进小球藻 (*Chlorella vulgaris*), 敲除其 *fad3*(omega-3 fatty acid desaturase, ω -3 脂肪酸去饱和酶)基因, 突变株与野生型相比, 染色后脂质积累荧光增加了 67%。Ortega-Escalante 等^[30]将表达 sgRNA 和 Cas9 基因的细菌质粒构建物首次转入团藻 (*Volvox carteri*) 细胞, 获得了发育基因 *glsA*(gonidialess A, 无性腺 A)基因缺陷突变株, 验证了 CRISPR/Cas9 技术在团藻基因编辑中的可行性。三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 是硅藻的研究模式藻。Nymark 等^[31]构建含 CRISPR/Cas9 系统的细菌质粒构建物并转化进三角褐指藻, 是 CRISPR/Cas9 在硅藻中的首次尝试, 获得 *CpSRP54*(chloroplast signal recognition particle 54, 叶绿体信号识别因子 54) 基因缺陷的突变藻株, 突变体对强光敏感。

CRISPR/Cas9 技术编辑微藻已知基因成功后, 就可以用来研究微藻未知基因功能, 获得有益突变株。Vogler 等^[32]将编码 Cas9-GFP 融合蛋白基因的细菌质粒构建物转入微拟球藻 (*Nannochloropsis gaditana*) 细胞, 获得了 β -葡萄糖合成酶和糖基化酶基因缺陷的突变株, 突变株中不溶于甲醇的水溶性碳水化合物积累减少但无生长缺陷, β -葡聚糖合酶基因的敲除可导致细胞自发荧光显著变化。Slattery 等^[33]和 Hopes 等^[34]分别利用 CRISPR/Cas 技术靶向敲除三角褐指藻和假微型海链藻的 *urease*(脲酶)基因, 突变株无法利用尿素作为生长的氮源, 藻细胞生长量降低, 藻细胞尺寸减小。

另外, 因 Cas9 组成型表达对某些藻类, 如莱茵衣藻, 有毒性。因此, 诱导型启动子的应用可解决 Cas9 的毒性问题^[26, 35]。

3.2 Cas9 蛋白基因和 sgRNA 瞬时表达

附加体(episome)类似质粒, 通常比细菌质粒大,

在微藻中有一定程度的自我复制能力, 是真核生物染色体外遗传结构。与细菌质粒构建物的最大区别是, episome 不整合到基因组中。在微藻中转化含 CRISPR/Cas9 系统的 episome 构建物, 可发挥编辑作用但不整合到宿主基因组中, 在去除抗生素选择压后, 因生物稀释作用, 附加体随微藻繁殖而逐渐消失^[36](图 2C)。目前, 在微拟球藻和三角褐指藻中, 微藻附加体构建物均有应用。

Wang 等^[37]通过构建含有 CRISPR/Cas9 系统的附加体, 实现微拟球藻 30 号染色体中精确连续切除约 10 kb 的大片段。缺失大片段的突变株生长与野生型相比没有显著变化。因此, 用此方法可得到最小的微拟球藻功能基因组(底盘基因组)。Poliner 等^[38]构建有抗生素选择标记和有 CRISPR 系统的附加体构建物, CRISPR/Cas9 系统可精确地在微拟球藻目标位置产生双链 DNA 断裂, 引入插入突变, 去除抗生素选择压力后, 消除附加体, 从而产生无标记的非转基因藻株。Moosburner 等^[39]将人工构建的 episome(Cas9-ShBle:sgRNA)转化到含有 Pta-MOB 质粒的大肠杆菌中, 再通过细菌转染将 episome 转入三角褐指藻, 实现单基因和多基因敲除, 效率分别是 48%和 25%。

利用构建附加体方式进行 CRISPR/Cas9 基因编辑, 不整合到基因组中, 能产生定点突变并可以避免 Cas9 基因对藻细胞的长期毒害。但是, 构建附加体方式在微藻中应用不多, 大多都是在模式微藻中进行的。

3.3 核糖核蛋白复合体(Ribonucleoproteins, RNP)直接导入

RNP 直接导入是将 Cas9 蛋白体外表达纯化并与 sgRNA 融合形成 RNP 复合物后, 将 RNP 共同导入细胞(图 2B)。复合物的直接导入需充分考虑半衰期、转化效率等问题^[40]。对于低等植物和单细胞生物, RNP 直接导入成功率高。微藻是单细胞低等生物, RNP 直接导入非常适合在微藻中使用。有研究表明, 莱茵衣藻转化 Cas9 基因表达靶向敲除低效率可能是载体驱动的 Cas9 基因长期在细胞内表达诱导的毒性造成的^[41]。RNP 直接转入瞬时表达, 可以避免 Cas9 基因表达相关的细胞毒性效应和脱靶效应。

2016年, Shin 等^[41]将 Cas9 蛋白和 sgRNA 复合体导入莱茵衣藻, 证明这种方法显著提高了 CRISPR/Cas9 系统在衣藻中的诱变效率和特异性, 与转化含 Cas9 基因的质粒相比, 靶向突变效率提高了 100 倍, 能最大限度减少脱靶, 同时降低 Cas9 蛋白毒性。

同步敲除莱茵衣藻已知功能的 *MAA7*(色氨酸合酶 β 亚基基因)、*CpSRP43*(叶绿体 SRP43 触角组装基因)和 *ChlM*(叶绿素生物合成基因), 可建立基于 5-氟吡啶和利用菌落颜色的筛选方法^[41]。将 RNP 导入胶球藻(*Coccomyxa* sp.), 敲除了 *FTSY*(叶绿体信号识别因子基因), 藻落呈淡绿色^[42]。靶向敲除微绿藻(*Picochlorum celeri*)*NR*(硝酸还原酶基因)和 *CrtISO*(类胡萝卜素异构酶基因), 获得基因“功能丧失”敲除藻株^[43], 突变株不能利用硝酸盐作为氮源。Serif 等^[44]鉴定并用 RNP 敲除了三角褐指藻 2 个内源性标记基因和光感受器转录因子, 实现了多基因同步敲除, 证明了 RNP 直接导入可实现硅藻的基因编辑; Kim 等^[45]选择同时使用质粒表达 Cas9 的方法和 RNP 方法转化小球藻, 分别敲除其 *NR* 和 *APT*(腺嘌呤磷酸核糖转移酶基因)。

进行科学研究的最终目的是要能够应用到实际生产中, RNP 直接导入可编辑筛选高生产力藻株。Baek 等^[46]用 RNP 敲除莱茵衣藻 *CpFTSY*(叶绿体信号

识别因子基因), 光合效率大幅提升, 生产力提高。后又敲除 *ZEP*(玉米黄质环氧化酶基因), 实现莱茵衣藻黄斑色素光合自养生产, 并用做蛋鸡饲料^[47]。Shin 等^[48]用 RNP 敲除莱茵衣藻 *PLA2*(磷脂酶 A2)基因, 提高了莱茵衣藻脂质生产力。Chang 等^[49]用 RNP 编辑扁藻(*Tetraselmis* sp.)*AGP*(ADP 葡萄糖焦磷酸化酶)基因, 提高了脂质生产力。Hu 等^[40]用 RNP 编辑杜氏盐藻(*Dunaliella salina*) β -胡萝卜素羟化基因, 使 β -胡萝卜素含量比野生株提高 2.2 倍。Nomura 等^[50]用 RNP 编辑细小裸藻(*Euglena gracilis*)*EgGSL2*(葡聚糖合酶基因), 实现单链寡核苷酸精准敲入, 使裸藻储存更少但更大的副淀粉颗粒。

RNP 直接导入已成功应用于许多微藻的基因标记, 瞬时存在的 Cas9 蛋白, 不会对目标微藻产生长期毒害。这种方式也有局限性, RNP 复合物的形成需要 Cas9 纯度较高, 但其获得较为困难。因此, 选择用细菌质粒为框架, 构建 Cas9 基因和 gRNA 单元表达构建物会更加简便。

表 2 Cas9 蛋白在微藻中的应用
Tab. 2 Application of the Cas9 protein in microalgae

CRISPR/Cas9 合成方式	构建物	藻名	编辑的基因	表现型	参考文献
整合进基因组, 组成型表达	细菌质粒 构建物	莱茵衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	<i>FKB12</i>	雷帕霉素抗性	[21, 28]
		困藻 (<i>Volvox carteri</i>)	<i>glsA/regA/invA</i>	无性腺(Gls A)表型	[30]
		小球藻 (<i>Chlorella vulgaris</i>)	<i>Fad3; NR/APT</i>	脂质升高; 不能利用硝酸盐/2-氟腺嘌呤抗性	[29, 45]
		微拟球藻 (<i>Nannochloropsis</i>)	<i>BGS/TGS</i> ; 光捕获复合基因	脂质积累增多; 光捕获天线尺寸减小	[32, 35]
		三角褐指藻 (<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>)	<i>CpSRP54</i> ; 脲酶基因;	不能在含尿素培养基上生长	[31, 33]
		假微型海链藻 (<i>Thalassiosira pseudonana</i>)	脲酶基因	不能在含尿素培养基上生长	[34]
不整合, 瞬时表达	真核附加体构建物	三角褐指藻 (<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>)	<i>NR</i>	不能在硝酸盐培养基上生长	[39]
		微拟球藻 (<i>Nannochloropsis</i>)	Chr30 染色体; <i>NR</i>	精确和连续切除 100kb 大片段; NR-KO 突变株	[37-38]
		莱茵衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	<i>Cpftsyl</i> ; <i>MAA7/CpRP43/ChlM</i> ; <i>ZEP; PLA2</i>	淡绿色; 浅绿色; 玉米黄质升高; 脂质生产力提高; 突变体生长劣势	[27, 41, 45-47]
	RNP 核糖核蛋白复合物	杜氏盐藻 (<i>Dunaliella salina</i>)	<i>Dschyb</i>	β -胡萝卜素升高, 玉米黄质降低	[40]

续表

CRISPR/Cas9 合成方式	构建物	藻名	编辑的基因	表现型	参考文献
不整合, 瞬时表达	RNP 核糖 核蛋白 复合物	扁藻 (<i>Tetraselmis</i> sp.)	<i>AGP</i>	脂质生产力提高	[48]
		胶球藻 (<i>Coccomyxa</i> sp.)	<i>FTSY</i>	淡绿色	[42]
		微绿藻 (<i>Picochlorum celeri</i>)	<i>CrtISO</i>	多等位基因功能丧失	[43]
		小球藻 (<i>Chlorella vulgaris</i>)	<i>NR/APT</i> ;	不能利用硝酸盐/ 2-氟腺嘌呤抗性	[45]
		三角褐指藻 (<i>Phaeodactylum tricornutum</i>)	<i>PtAureola</i>	叶绿素荧光的 非光化学猝灭降低	[44]
		裸藻 (<i>Euglena gracilis</i>)	<i>EgGSL2</i>	少而大的副淀粉颗粒	[49]

4 应用于微藻的其他 CRISPR/Cas 系统

与 Cas9 核酸酶有相同作用的 Cas12a(Cpf1)也是被单 RNA 引导的酶。与 Cas9 识别 PAM 序列不同, Cpf1 内切酶识别富含胸腺嘧啶的 DNA 序列, 如 5'-TTTN-3', 产生黏性双链断裂^[51]。Cas12a(Cpf1)核酸内切酶在距 PAM 18~23 bp 的位置切开 DNA, 引入 DSB。因此, 非同源末端修复可能不影响 Cas9 需要的 PAM 和识别序列, Cas12a 可再次切割同一位点^[52]。用 CRISPR/Cpf1 系统的 RNP 复合物和单链寡核苷酸高效编辑莱茵衣藻 *CpFTSY*(叶绿体信号识别因子基因)、*CpSRP43*(参与叶绿素捕光复合物的组装)和 *PHT7*(磷酸盐转运蛋白基因) 3 个基因, 获得淡绿色、小型化、生长慢的藻株^[53]。Naduthodi 等^[52]纯化 *Francisella novicida* 的 Cas12a (FnCas12a)蛋白(Cpf1), 将 crRNA 与 Cas12a 组合成 RNP 复合物, 实现了海洋微拟球藻硝酸还原酶基因敲除。

除了 Cpf1 和 Cas9 外, 还有其他 Cas9 变体, 如 Cas9n(Cas9 nickase)可以造成单链 DNA 的断裂, 类似限制性核酸酶功能, 产生一个切口, 减少脱靶效应的发生。

5 CRISPR/Cas9 系统的验证

CRISPR/Cas9 系统每一个元件都是基因编辑不可或缺的。表达 Cas9 的重组质粒常有整合失败的情况, Cas9 基因成功表达需要验证。与 Cas9 基因共表达一个报告基因, 如 *Nlux*、*tdTomato* 基因等, 通过荧

光可初步确定 Cas9 的成功表达^[36, 38]。Jiang 等^[26]设计的 Cas9 基因表达构建物上有一个 20 bp 位点, 可被 ApaL I 酶切消化。如果 Cas9 基因成功整合, PCR 扩增产物不含这段序列, 因而抗 ApaL I 消化。Wang 等^[54]对转化后的微藻基因组 DNA 进行巢式 PCR 扩增片段, 用限制酶 Pvu II 处理。Pvu II 可将野生型 PCR 片段消化成 2 条带, 而突变型无限制酶位点, 抗限制酶消化。

编辑微藻肉眼或显微镜可辨表型的对应基因就是验证 CRISPR/Cas9 系统的直接方法。莱茵衣藻 *CpSRP43* 和 *ChlM* 基因分别编码叶绿体 SRP43 触角组装和 Mg-原卟啉 IXS-腺苷甲硫氨酸 O-甲基转移酶编辑成功后获得肉眼可辨的浅绿色、黄色或棕色藻落^[41]。常用的 *NR* 和 *NIR* 分别编码硝酸还原酶和亚硝酸还原酶, 敲除后藻株无法利用硝酸盐或亚硝酸盐氮源, 肉眼上识别藻落呈黄色, 但能在含铵盐的 f/2 培养基中正常生长, 藻落呈正常绿色^[45, 55]。

因此, 通过验证可辨表型的基因编辑方法, 在很大程度上减少了抗生素的使用, 不仅可以节省实验成本, 而且可以减少对环境的污染。

6 微藻中 CRISPR 介导的表达干扰 (CRISPR-interference, CRISPRi)

CRISPRi 仍用 gRNA 引导突变的 Cas9(deficient Cas9, dCas9)识别和结合 DNA, 干扰基因转录和基因表达^[56]。dCas9 的 RuvC 和 HNH2 个核酸酶结构域沉默突变, D10A 和 H840A, 失去内切酶活性, 但保留了 DNA 识别和结合活性, 与 sgRNA 共表达时可形成

DNA 识别复合体, 特异性干扰基因转录^[20, 56-57]。CRISPRi 可以同时干扰多个靶基因转录, 干扰作用可逆^[56, 58]。CRISPRi 在蓝细菌中较早运用。Gordon 等^[59]用 CRISPRi 实现了蓝藻中心碳代谢动态调节和通量操控。Huang 等^[60]用 CRISPRi 调控蓝藻基因表达, 增加了琥珀酸合成。成功应用 CRISPRi 的第一个真核微藻是三角褐指藻。Nymark 等^[31]构建含 dCas9 基因的质粒构建物, 转化三角褐指藻, 实现了 *CpSRP*(叶绿体信号识别因子基因)基因沉默, 突变藻株对强光敏感。Kao 等^[61]在莱茵衣藻中用 CRISPRi 干扰了 *PEPC*(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因)表达, 降低了叶绿素含量, 提高了脂质积累。Ajjawi 等^[62]用 CRISPR/Cas9 系统引入反向遗传学插入突变, 调控微拟球藻(*Nannochloropsis gaditana*)*ZnCys* 基因表达, 在半连续生长条件下, 使脂质含量较野生型提高 2 倍, 但突变株生长缓慢。Stukenberg 等^[63]构建编码 dCas9 基因的细菌质粒构建物, 转化三角褐指藻, 沉默了 *Vtc2*(液泡转运伴侣复合体基因, vacuolar transport chaperone complex gene)和 *Pho4*(假定存在的磷酸盐转运蛋白基因, putative phosphate transporter gene), 突变体在磷限制的条件下, *Vtc2* 基因表达上调 10 倍, 而 *Pho4* 基因表达下调 2 倍。

dCas9 仍具有结合 sgRNA 的功能, 而不具备剪切功能。sgRNA 结合至基因的转录起始位点会沉默基因功能, sgRNA 结合至转录抑制物或活化物, 会激活或抑制基因的转录。因此, 可以根据需要设计不同的 sgRNA 实现研究目的。CRISPRi 和 CRISPRa(转录激活, CRISPR activation)均是可逆的, 不会对基因组 DNA 产生永久性的改变。

7 讨论和展望

在微藻中, 研究目标基因的功能, 在不影响其生长的情况下, 最优的方法是实现基因的完全敲除, 再进行表型或生化指标的后续验证。利用同源重组方法可以实现这种目的, 但是真核生物同源重组受非同源性末端修复抑制, 仅存在于细胞周期的特定阶段。我们可以通过干扰非同源性末端修复的特异 DNA 连接酶, 或在细胞周期同源重组特定阶段进行转化, 来提高同源重组效率。在设计同源重组敲除基因过程中有 RNP 参与, 定点切割可提高转化效率^[27]。有证据表明 ZFN 在莱茵衣藻中 HDR(homology-directed repair)效率高于 CRISPR/Cas9 系统^[64]。ZFN 和 Cas9 定点敲除可实现目标微藻同源敲除验证微藻中绝大多数基因的功能,

将有益基因过表达, 可获得高生产力的藻株。同样, 组合使用 Cas9 和 Cre 重组酶, 在微拟球藻中已实现连续敲除内源基因和敲入新基因^[35], 敲除生化过程中的酶基因, 可增加上游产物的积累。

在 CRISPR/Cas9 设计的过程中 gRNA 侧翼增加有核酶(ribozyme)HH 和 HDV, 可以更加精确切割^[37], 用内源核定位信号(nuclear located signals, NLSs)替代哺乳动物 NLSs 提高 Cas9 靶向精度^[54], 在设计 sgRNA 时提高特异性, 降低 Cas 蛋白与其它类似 sgRNA 分子结合, 避免非特异性切割^[51], 选择 GC 含量低于 70%的靶序列可降低脱靶效应^[65]。模式微藻莱茵衣藻, 化脓性链球菌 Cas9(*SpCas9*)对其毒性较强, 而金黄色葡萄球菌 Cas9(*SaCas9*)毒性较弱, 因此更适合莱茵衣藻的基因编辑^[30]。但是, *SaCas9* 的精确靶向度不如 *SpCas9*。最新鉴定出的 *SaCas9*-HF 是 *SaCas9* 的变体, 提高了 *SaCas9* 的精确度, 应用于人体细胞, 将脱靶活性降低了大约 90%^[66], 而 *SpCas9* 的变体 MiCas9 也显著提高单链寡核苷酸介导的精确编辑, 提高长片段基因插入效率, 减少缺失突变的产生^[67]。在微藻中我们也可以利用这些高精度靶向的 Cas9 蛋白, 获得更高的编辑效率。

Cas9n(Cas9 nickase)与修饰单碱基酶连用构成 CRISPR 碱基编辑系统, 可以避免转化过程中引入缺失突变, 精确地对单链 DNA 中的碱基进行编辑^[68]。此系统可检验微藻单碱基改变对微藻性状的影响。Cas9n(Cas9 nickase)和反转录酶连用构成引导编辑(CRISPR prime edition)系统, 可打断特定 DNA 位点的一条链, 引入一段序列, 高效造成插入突变。Cas9n 是单链内切酶, 不产生双链 DNA 断裂, 最高只能精确插入约 40 bp, 删除最高约 80 bp^[68-69]。

微藻生长快, 易培养, 基因组相对简单。莱茵衣藻、三角褐指藻、微拟球藻、小球藻等许多微藻都是基因工程研究常用微藻藻种。优秀藻种是高效生产多种多样物质的基础。基因编辑技术就是微藻藻种遗传改良的技术之一。CRISPR/Cas9 技术成功率高、易操作、成本低, 比 TALEN、ZFN 等应用更广泛。目前, 以 CRISPR/Cas9 系统为基础而衍生出的多种基因调控, 例如 CRISPR 激活、CRISPR prime 编辑、CRISPR 碱基编辑、编辑组蛋白标记、甲基化编辑等, 都可以成为日后进行微藻基因编辑的有力工具。因此, 如何整合现有编辑技术、修饰现有编辑技术、阐明微藻经济性状遗传基础、培育优质微藻藻种是重要的研究领域之一。

参考文献:

- [1] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170.
- [2] JANSEN R, VAN EMBDEN J, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43: 1565-1575.
- [3] 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]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [4] MOJICA F J, 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]. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(1): 244-246.
- [5] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [6] HORVATH P, ROMERO D A, COÛTÉ-MONVOISIN A C, et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(4): 1401-1412.
- [7] DEVEAU H, GARNEAU J E, MOINEAU S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64: 475-493.
- [8] AL-ATTAR S, WESTRA E R, VAN DER OOST J, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes[J]. *Biological Chemistry*, 2011, 392(4): 277-289.
- [9] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [10] MOJICA F J, DÍEZ-VILLASEÑOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 60(2): 174-182.
- [11] GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats[J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 172.
- [12] HOWARD J A, DELMAS S, IVANČIĆ-BAĆE I, et al. Helicase dissociation and annealing of RNA-DNA hybrids by *Escherichia coli* Cas3 protein[J]. *Biochemical Journal*, 2011, 439(1): 85-95.
- [13] BROUNS S J, JORE M M, LUNDGREN M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964.
- [14] HALE C R, ZHAO P, OLSON S, et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 945-956.
- [15] SOREK R, KUNIN V, HUGENHOLTZ P. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 181-186.
- [16] KARGINOV F V, HANNON G J. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea[J]. *Molecular Cell*, 2010, 37(1): 7-19.
- [17] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(6): 467-477.
- [18] MAKAROVA K S, ZHANG F, KOONIN E V. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems[J]. *Cell*, 2017, 168(5): 946-946, e941.
- [19] SAPRANAUSKAS R, GASIUNAS G, FREMAUX C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(21): 9275-9282.
- [20] 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.
- [21] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607.
- [22] SHOJAEI S, GARDANOVA Z R, ZEKIY A O, et al. Optimizing sgRNA to improve CRISPR/Cas9 knockout efficiency: Special focus on human and animal cell[J]. *Frontiers in Bioengineering & Biotechnology*, 2021, 9: 775309.
- [23] LIU X X, HOMMA A, SAYADI J, et al. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19675.
- [24] MOJICA F J M, DÍEZ-VILLASEÑOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 3): 733-740.
- [25] SCOLLAN M E. Chapter 2 - CRISPR-Cas orthologs and variants[C]//TSANG STEPHEN H. CRISPR genome surgery in stem cells and disease tissues. United States: Academic Press, 2022: 7-38.
- [26] JIANG W Z, BRUEGGEMAN A J, HORKEN K M, et al. Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Eukaryot Cell*, 2014, 13(11): 1465-1469.

- [27] ANGSTENBERGER M, DE SIGNORI F, VECCHI V, et al. Cell synchronization enhances nuclear transformation and genome editing via Cas9 enabling homologous recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(10): 2840-2850.
- [28] JIANG W Z, WEEKS D P. A gene-within-a-gene Cas9/sgRNA hybrid construct enables gene editing and gene replacement strategies in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Algal Research, 2017, 26: 474-480.
- [29] LIN W R, NG I S. Development of CRISPR/Cas9 system in *Chlorella vulgaris* FSP-E to enhance lipid accumulation[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2020, 133: 109458.
- [30] ORTEGA-ESCALANTE J A, JASPER R, MILLER S M. CRISPR/Cas9 mutagenesis in *Volvox carteri*[J]. Plant Journal, 2019, 97(4): 661-672.
- [31] NYMARK M, SHARMA A K, SPARSTAD T, et al. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24951.
- [32] VOGLER B W, ASHFORD A, POSEWITZ M C. CRISPR/Cas9 disruption of glucan synthase in *Nannochloropsis gaditana* attenuates accumulation of β -1,3-glucose oligomers[J]. Algal Research, 2021, 58: 102385.
- [33] SLATTERY S S, DIAMOND A, WANG H, et al. An expanded plasmid-based genetic toolbox enables Cas9 genome editing and stable maintenance of synthetic pathways in *Phaeodactylum tricornutum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(2): 328-338.
- [34] 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.
- [35] VERRUTO J, FRANCIS K, WANG Y, et al. Unrestrained markerless trait stacking in *Nannochloropsis gaditana* through combined genome editing and marker recycling technologies[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 115(30): E7015.
- [36] NADUTHODI M I S, SÜDFELD C, AVITZIGIANNIS E K, et al. Comprehensive genome engineering toolbox for microalgae *Nannochloropsis oceanica* based on CRISPR-Cas systems[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(12): 3369-3378.
- [37] WANG Q T, GONG Y H, HE Y H, et al. Genome engineering of *Nannochloropsis* with hundred-kilobase fragment deletions by Cas9 cleavages[J]. Plant Journal, 2021, 106(4): 1148-1162.
- [38] POLINER E, TAKEUCHI T, DU Z Y, et al. Nontransgenic marker-free gene disruption by an episomal CRISPR system in the oleaginous microalga, *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(4): 962-968.
- [39] MOOSBURNER M A, GHOLAMI P, MCCARTHY J K, et al. Multiplexed knockouts in the model diatom *Phaeodactylum* by episomal delivery of a selectable Cas9[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 5. doi: 10.3389/fmicb.2020.00005.
- [40] HU L N, FENG S Y, LIANG G F, et al. CRISPR/Cas9-induced β -carotene hydroxylase mutation in *Dunaliella salina* CCAP19/18[J]. AMB Express, 2021, 11(1): 83.
- [41] SHIN S E, LIM J M, KOH H G, et al. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 27810.
- [42] YOSHIMITSU Y, ABE J, HARAYAMA S. Cas9-guide RNA ribonucleoprotein-induced genome editing in the industrial green alga *Coccomyxa* sp. strain KJ[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11(1): 326.
- [43] KRISHNAN A, CANO M, BURCH T A, et al. Genome editing using Cas9-RNA ribonucleoprotein complexes in the high-productivity marine alga *Picochlorum celeri*[J]. Algal Research, 2020, 49: 101944.
- [44] SERIF M, DUBOIS G, FINOUX A L, et al. One-step generation of multiple gene knock-outs in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by DNA-free genome editing[J]. Nature Communication, 2018, 9(1): 3924.
- [45] KIM J, CHANG K S, LEE S, et al. Establishment of a genome editing tool using CRISPR-Cas9 in *Chlorella vulgaris* UTEX395[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2): 480.
- [46] BAEK K, KIM D H, JEONG J, et al. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 30620.
- [47] 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]. Biotechnology Bioengineering, 2018, 115(3): 719-728.
- [48] SHIN Y S, JEONG J, NGUYEN T H T, et al. Targeted knockout of phospholipase A(2) to increase lipid productivity in *Chlamydomonas reinhardtii* for biodiesel production[J]. Bioresource Technology, 2019, 271: 368-374.
- [49] CHANG K S, KIM J, PARK H, et al. Enhanced lipid productivity in AGP knockout marine microalga *Tetraselmis* sp. using a DNA-free CRISPR-Cas9 RNP method[J]. Bioresource Technology, 2020, 303: 122932.
- [50] NOMURA T, INOUE K, UEHARA-YAMAGUCHI Y, et al. Highly efficient transgene-free targeted mutagenesis and single-stranded oligodeoxynucleotide-mediated precise knock-in in the industrial microalga *Euglena gracilis* using Cas9 ribonucleoproteins[J]. Plant Bio-

- technology Journal, 2019, 17(11): 2032-2034.
- [51] KIM D, KIM J, HUR J K, et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(8): 863-868.
- [52] NADUTHODI M I S, MOHANRAJU P, SÜDFELD C, et al. CRISPR-Cas ribonucleoprotein mediated homology-directed repair for efficient targeted genome editing in microalgae *Nannochloropsis oceanica* IMET1[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 66.
- [53] FERENCZI A, PYOTT D E, XIPNITOU A, et al. Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, 114(51): 13567.
- [54] WANG Q T, LU Y D, XIN Y, et al. Genome editing of model oleaginous microalgae *Nannochloropsis* spp. by CRISPR/Cas9[J]. Plant Journal, 2016, 88(6): 1071-1081.
- [55] KILIAN O, BENEMANN C S E, NIYOGI K K, et al. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(52): 21265.
- [56] 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, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [57] BIKARD D, JIANG W Y, SAMAI P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(15): 7429-7437.
- [58] LV L, REN Y L, CHEN J C, et al. Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: Controllable P(3HB-co-4HB) biosynthesis[J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 160-168.
- [59] GORDON G C, KOROSH T C, CAMERON J C, et al. CRISPR interference as a titratable, trans-acting regulatory tool for metabolic engineering in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002[J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 170-179.
- [60] HUANG C H, SHEN C R, LI H, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium *S. elongatus* PCC 7942[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 196.
- [61] KAO P H, NG I S. CRISPRi mediated phosphoenolpyruvate carboxylase regulation to enhance the production of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biore-source Technology, 2017, 245: 1527-1537.
- [62] AJJAWI I, VERRUTO J, AQUI M, et al. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(7): 647-652.
- [63] STUKENBERG D, ZAUNER S, DELL'AQUILA G, et al. Optimizing CRISPR/Cas9 for the diatom *Phaeodactylum tricorutum*[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 740.
- [64] GREINER A, KELTERBORN S, EVERS H, et al. Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9[J]. Plant Cell, 2017, 29(10): 2498-2518.
- [65] RUSSO M T, AIESE CIGLIANO R, SANSEVERINO W, et al. Assessment of genomic changes in a CRISPR/Cas9 *Phaeodactylum tricorutum* mutant through whole genome resequencing[J]. PeerJ, 2018, 6: e5507.
- [66] TAN Y, CHU A H Y, BAO S, et al. Rationally engineered *Staphylococcus aureus* Cas9 nucleases with high genome-wide specificity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116(42): 20969-20976.
- [67] MA L Y, RUAN J X, SONG J, et al. MiCas9 increases large size gene knock-in rates and reduces undesirable on-target and off-target indel edits[J]. Nature Communication, 2020, 11(1): 6082.
- [68] KIM H K, YU G, PARK J, et al. Predicting the efficiency of prime editing guide RNAs in human cells[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(2): 198-206.
- [69] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. Nature, 2019, 576(7785): 149-157.

Application of the CRISPR/Cas9 gene editing system in microalgae

LIU Li-xian, GUO Li, YANG Guan-pin

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Oct. 14, 2022

Key words: microalgae; gene editing; CRISPR/Cas9

Abstract: Microalgae are a group of photosynthetic protists. They synthesize diverse high value-added materials, such as protein, docosahexaenoic acid, and astaxanthin, which are widely used as food additives and in health products, cosmetics, and animal feeds. Gene editing may serve as a novel tool for microalgal genetic studies and genetic improvement. The currently available gene editing tools include zinc-finger nucleases (ZFNs) system, transcription activator-like effector nucleases (TALENs) system, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) system (CRISPR/Cas). ZFN and TALEN are fusion proteins, which include an effector (DNA sequence recognizer) and an endonuclease. They target a specific region of DNA and cut the surrounding sequence. This editing system is tedious as the effector must be modified for diverse editing sites. In comparison, the newly emerging CRISPR/Cas technology is easy to operate and highly efficient. It requires only a small guide RNA to be designed for each site. It can simultaneously knock out a single or a set of genes, mediate the insertion of a DNA fragment into a specific site, and its variants can interfere, activate, or switch off and switch on the expression of a gene. Prime editing and RNA editing have been developed, and diverse editing tools are being established for microalgae. In this paper, we reviewed the current status and application of the CRISPR/Cas9 editing system in microalgae.

(本文编辑: 赵卫红)