

基于 CRISPR/Cas 系统的噬菌体基因组编辑

梁彩娇, 孟繁梅, 艾云灿

中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275

摘要: 对原核生物获得性免疫系统 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated genes) 的研究促进了新一代基因组编辑工具的产生和发展。噬菌体既是原核生物 CRISPR 阵列 (CRISPR array) 进化的原动力, 又是 CRISPR/Cas 系统防御的对象。噬菌体功能基因组学研究的速率却落后于发现新噬菌体和测定基因组序列的速率。基于 CRISPR/Cas 系统的噬菌体基因组编辑, 可为噬菌体功能基因组学研究提供新手段。本文评述了基于 CRISPR/Cas 系统编辑噬菌体基因组的几例开创性研究, 并且比较了多种操作程序的异同点和优缺点。同时, 进一步构建了联合使用 CRISPR/Cas 系统与噬菌体重组系统开展噬菌体基因组编辑的新方案, 讨论了新方案的潜在局限性, 并对如何选择不同方案给予了建议。

关键词: CRISPR/Cas 系统; 噬菌体; 基因组编辑; 同源重组

CRISPR/Cas systems in genome engineering of bacteriophages

Caijiao Liang, Fanmei Meng, Yuncan Ai

State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Researches on CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated genes) systems, that are adaptive immunity systems encoded by prokaryotes, have promoted the development of new genome-editing tools. Bacteriophages are not only the driving elements for the evolution of prokaryotes' CRISPR arrays, but also the targets of the CRISPR/Cas systems. Studies on functional genomics of bacteriophages have been lagging behind the discovery of new phage strains and the sequencing of their genomes. CRISPR/Cas systems-driven genome engineering of bacteriophages provides a novel approach for bacteriophage functional genomics. This review comments on a few profound cases of genome engineering of bacteriophages that employed the CRISPR/Cas systems, and compares multiple procedures illustrating common or distinct features as well as advantages and disadvantages underlying each procedure. We design new applications of the CRISPR/Cas systems coupled with bacteriophage recombination systems, discuss their potential constraints, and offer suggestions for each option.

Keywords: CRISPR/Cas systems; bacteriophage; genome editing; homologous recombination

收稿日期: 2017-12-25; 修回日期: 2018-02-06

基金项目: 国家科技重大专项(编号: 2014ZX0801105B002)和国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号: 2006AA09Z420)资助[Supported by the National Science and Technology Major Project of China (No. 2014ZX0801105B002) and the National High Technology Research & Development Project (863 Project) (No. 2006AA09Z420)]

作者简介: 梁彩娇, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学。E-mail: 515059960@qq.com

通讯作者: 艾云灿, 博士, 教授, 研究方向: 微生物学及遗传学。E-mail: Lssayc@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-419

网络出版时间: 2018/4/6 23:01:03

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180406.2300.001.html>

噬菌体 (bacteriophage) 是地球上独特的生物体^[1~4]。目前 GenBank 数据库中有 2293 条噬菌体基因组序列, 但是大部分开放阅读框 (open reading frame, ORF) 功能未知^[5]。受限于技术等因素, 对噬菌体功能基因组学研究的速率滞后于噬菌体基因组测序速率。

CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated genes) 系统主要存在于原核生物中^[6], 但是在霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 噬菌体中也发现了有活性的 CRISPR/Cas 系统^[7]。根据 *cas* 位点构造及标签 Cas 蛋白类别特征, CRISPR/Cas 系统被划分为 I~VI 类和 22 种亚型^[8,9]。本文涉及其中 4 种亚型, 表 1 简单归纳了其相应的免疫机制。它们的免疫过程大致可以分为 3 步: (1) 适应: Cas1 和 Cas2 等利用外来核酸 (DNA 或 RNA) 形成 CRISPR 阵列中的新间隔 (spacer); (2) 表达: CRISPR 阵列的转录产物 pre-crRNA (precursor CRISPR RNA) 在特定 Cas 蛋白及某些细胞因子加工下形成 crRNAs (CRISPR RNAs)^[10,11]; (3) 干涉: crRNA 与特定 Cas 蛋白组装形成的 crRNP (CRISPR ribonucleoprotein) 复合物, 在外来核酸原间隔 (protospacer) 处切割并降解外来核酸。因此, 基于 CRISPR/Cas 系统的基因组编辑技术主要是利用了该系统干涉过程中的两个特性: (1) crRNAs 与原间隔的碱基互补配对定位靶标

序列; (2) 特定 Cas 蛋白的核酸酶活性切割、降解外来核酸。

CRISPR 阵列中的间隔序列, 大部分与噬菌体的核酸片段同源^[26]。这表明 CRISPR/Cas 系统免疫的主要对象是噬菌体, 又暗示任意 CRISPR/Cas 系统都具有编辑噬菌体基因组的可行性。发展 CRISPR/Cas 基因组编辑技术, 有望提供新手段, 解决噬菌体功能基因组学研究滞后的问题, 促进发展噬菌体基因组工程, 发现分子生物学新工具, 拓展合成生物学范畴。本文主要综述了目前基于 CRISPR/Cas 系统的噬菌体基因组编辑的相关研究, 拓展了该系统与噬菌体重组系统在噬菌体基因组编辑中的联合应用, 并讨论了联合应用中可能存在的问题。

1 基于 CRISPR/Cas 系统的噬菌体基因组编辑

1.1 天然含 CRISPR/Cas 系统宿主细菌中噬菌体的基因组编辑

CRISPR/Cas 系统存在于 45% 细菌和 87% 古生菌中^[6], 这意味着在应用 CRISPR/Cas 系统进行噬菌体基因组编辑时会存在一定便利: 既无需额外设计、购买和构建由 CRISPR/Cas 系统衍生的基因编辑质

表 1 CRISPR/Cas 系统中 4 种亚型的免疫机制

Table 1 Immunity mechanisms of four subtypes of CRISPR/Cas systems

类型	代表	适应	pre-crRNA 加工	crRNP 复合物	干涉	参考文献
I-E	<i>E. coli</i> K12 I-E	RecBCD 和 Cas1-2 参与, 由 Cas1 识别 PAM (CTT)	Cas6 特异加工	Cascade: CasA ₁ B ₂ C ₆ D ₁ E ₁ :61 nt crRNA ₁ (PDB: 4U7U)	Cse1 (CasA) 识别 PAM, Cas3 切割 dsDNA	[12~17]
I-F	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP PA14 I-F	Cas1-3 与 Csy1-4 参与	Cas6 特异加工	缺乏研究	Cas2/3 切割 dsDNA	[18~20]
II-A	<i>S. pyogenes</i> SF370 II-A	tracrRNA-Cas9-Cas1-Cas2-Csn2 参与, 由 Cas9 识别 PAM (NGG)	tracrRNA、RNase III 和 Cas9 参与	SpyCas9:RNA (tracrRNA:crRNA) (EMD-5859)	Cas9 识别 PAM, 并切割 dsDNA	[10, 21, 22]
III-A	<i>S. epidermidis</i> RP62a III-A	缺乏研究	PNPase 参与, Cas6 特异加工	缺乏研究*	非 PAM 依赖, Cas10 切割 dsDNA 有义链, Csm3 切割 RNA	[11, 23~25]

大肠杆菌 (*E. coli*), 铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*), 酿脓链球菌 (*S. pyogenes*), 表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*)。原间隔邻近基序 (PAM: protospacer adjacent motif), CRISPR 关联抗病毒复合物 (Cascade: CRISPR-associated complex for antiviral defense), trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA), 多核苷酸磷酸化酶 (PNPase: polynucleotide phosphorylase)。Cse1 为 *E. coli* 亚类 Cas; Csy1-4 为 *Y. pestis* 亚类 Cas; Csn2 为 *N. meningitidis* 亚类 Cas; Csm3 为 *M. tuberculosis* 亚类 Cas。*在嗜热链球菌 DGCC8004 (*S. thermophilus* DGCC8004) III-A 中 crRNP 复合物为 Cas10-Csm (StCsm): Cas10₁-Csm2₃3₅4₁5₁: 40nt crRNA。

粒,也无需担心质粒在宿主细菌中是否复制和表达及质粒对细胞的毒害作用等问题。

1.1.1 基于 II-A 类 CRISPR/Cas 系统的噬菌体基因组编辑

Martel 和 Moineau^[27]在天然含 II-A 类 CRISPR/Cas 系统嗜热链球菌 DGCC7710 (*Streptococcus ther-*

mophilus DGCC7710)中开展了编辑 2972 烈性噬菌体基因组的研究(图 1A)。编辑前,首先解析嗜热链球菌 DGCC7710 CRISPR1 位点及其原间隔邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM) NNAGAAW^[28];其次用 2972 噬菌体侵染 DGCC7710,使 CRISPR1 位点获取系列新间隔从而得到系列噬菌体不敏感突变株,随后,开展两类噬菌体基因组编辑^[27],简述如下:

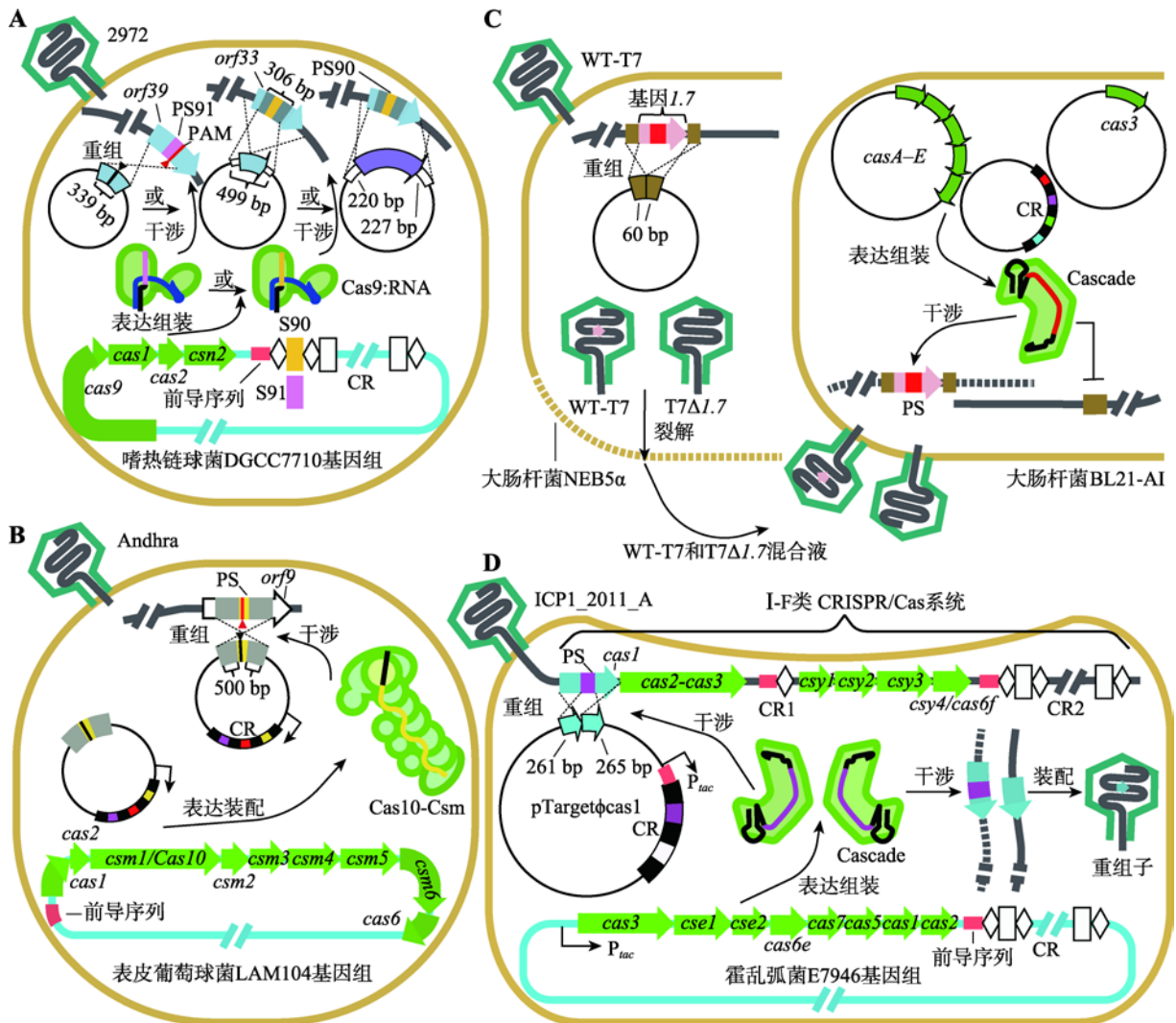


图 1 基于 CRISPR/Cas 系统的噬菌体基因组编辑

Fig. 1 CRISPR/Cas systems in bacteriophage genome editing

A: 采用 II-A 类 CRISPR/Cas 系统编辑 2972 噬菌体基因组。从左到右模板质粒的作用:在原间隔 PS91 旁侧 PAM 处引入无义突变(GAA→TAA, 红色三角形→黑色三角形)、使非必需基因 *orf33* 被删除 306 bp 长的 DNA 片段和使 *orf33* 被基因 *LlaDCHIA* (紫色)替换。B: 采用 III-A 类 CRISPR/Cas 系统编辑 Andhra 噬菌体 *orf9*。三角形标示处为编辑点(沉默突变: ATT→ATA, 红色三角形→黑色三角形)。C: 采用 I-E 类 CRISPR/Cas 系统编辑 T7 噬菌体基因 *1.7*。D: 采用 I-E 类 CRISPR/Cas 系统(位于霍乱弧菌 E7946 基因组上)编辑 ICP1_2011_A 噬菌体(本身含有 I-F 类 CRISPR/Cas 系统)基因 *cas1*。S: 间隔; PS: 原间隔; CR: CRISPR 阵列; WT-T7: 未发生重组的野生型(Wild type) T7 噬菌体; T7Δ1.7: 基因 *1.7* 被删除的 T7 噬菌体; *csn2* 为 Nmeni 亚类 *cas*; *csml*-6 为 Mtube 亚类 *cas*; *csyl*-4 为 Ypest 亚类 *cas*; *cse1*-2 为 Ecoli 亚类 *cas*。Cas9:RNA、Cascade 和 Cas10-Csm 见表 1。图 1B 参考文献^[31,36]修改绘制。

第一类:CRISPR/Cas 系统对随机突变的选择作用。在Ⅱ-A类 CRISPR/Cas 系统中, crRNP 复合物对外来核酸免疫的前提是: Cas9 对 PAM 的特异性识别^[22]以及 crRNAs 与原间隔之间的碱基互补配对。当外来核酸发生的随机突变为原间隔种子区(seed region)单个或两个碱基的突变、PAM 关键碱基的特定突变、包含种子区或 PAM 在内的序列删除时,往往导致外来核酸对该免疫系统的逃脱^[27,29,30]。由此,采用 2972 噬菌体感染系列噬菌体不敏感突变株,以 1%~22% 比例筛选系列逃逸 CRISPR 噬菌体随机突变株,其中随机突变包括同义突变、非同义突变、PAM 中 GAA 到 TAA 的无义突变和 *orf33* 中 306 bp 长 DNA 片段的删除^[27]。通过大量分析系列逃逸 CRISPR 噬菌体突变株的原间隔及其 PAM 碱基的变化情况,既可以确定原间隔的种子区,又可以确定 PAM 中对靶向噬菌体关键的碱基(AGAA)^[27]。

第二类:CRISPR/Cas 系统联合同源重组介导噬菌体基因组的点突变、移码突变、基因删除与替换。同源重组在噬菌体基因组编辑中的应用受限于缺乏选择压力,而 CRISPR/Cas 系统的定点切割作用恰使它成为一个选择工具。该工具切割野生型噬菌体基因组,保留目的同源重组子,从而提高目的重组子的噬菌斑占总噬菌斑的比例。采用高拷贝数载体 pNZ123 构建系列用于同源重组的模板质粒,获取噬菌体系列重组子:非必需基因 *orf39* 中原间隔 PS91 旁侧 PAM 处的无义突变(GAA→TAA)和移码突变(ACAAGAAT→AC---AAT)、非必需基因 *orf33* 中 306 bp 长 DNA 片段的删除、*orf33* 与基因 *LlaDCHIA* 的交换^[27](图 1A)。该实验结果表明,若菌株内含有模板质粒,则相应的噬菌体成斑率(efficiencies of plaquing, EOP)与对照相比,点突变和基因片段的删除都提高 2~4 个数量级^[27]。成斑率提高的原因是:同源重组产生的目的重组子可逃脱 CRISPR/Cas 系统的靶向^[27]; Cas9 在噬菌体基因组靶标处造成的 DNA 双链断裂(double strand break, DSB)可以诱发同源重组,从而间接提高同源重组的效率^[28]。

然而,此类噬菌体基因组编辑的缺点是:模板质粒作为外来元件,有可能被宿主细菌中天然存在的完整的 CRISPR/Cas 系统捕获间隔,从而使得新导入的质粒成为 CRISPR/Cas 系统免疫的对象,最终导

致质粒丢失。

1.1.2 基于Ⅲ-A类 CRISPR/Cas 系统的噬菌体基因组编辑

Bari 等^[31]在天然含Ⅲ-A类 CRISPR/Cas 系统表皮葡萄球菌 LAM104 (*Staphylococcus epidermidis* LAM104, 即 *S. epidermidis* RP62aΔ*crispr*)中开展了编辑 Andhra 和 ISP 烈性噬菌体基因组的研究^[32](图 1B)。其中,菌株 RP62a CRISPR 阵列的删除,可使新导入的质粒不易被丢失。与Ⅱ-A类 CRISPR/Cas 系统相比,当利用Ⅲ-A类 CRISPR/Cas 系统作为选择压力时,双层平板中具有随机突变的噬菌斑的比例会降低^[27,31]。分析其原因主要是:其一,该类系统不具备 PAM^[23];其二,该类系统既能够以转录依赖的方式靶向 DNA^[25],也能够靶向 RNA,且靶标 RNA 不存在种子区^[33]。

Bari 等^[31]构建了质粒 pcrispr/spcφ-donor,该质粒不仅能够通过同源重组途径在 Andhra 和 ISP 噬菌体的基因组中引入沉默突变,还可以表达特定 crRNA,使形成的 Cas10-Csm 复合物靶向非目的重组子,保留目的重组子(图 1B)。此外,采用Ⅲ-A类 CRISPR/Cas 系统作为选择压力时,crRNA 需要同时满足两个条件^[31]:(1) crRNA 互补于 ORF 的有义链^[25];(2) 5'末端的标签序列不可与原间隔有义链下游的反标签序列互补,以防 Cas10 不切割 DNA^[25,34]。

Martel 和 Moineau^[27]及 Bari 等^[31]为了靶向噬菌体的特定基因,构建加载 CRISPR 位点的质粒 pRS91R 与 pcrispr/spcφ。但是, Hynes 等^[35]创建了一种在天然 CRISPR 阵列中引入特定噬菌体源的间隔的方法:首先,将噬菌体源的特定原间隔及其 PAM 加载于高拷贝数载体 pNZ123,得 pNZCR1 或 pNZCR3;其次,将质粒导入嗜热链球菌 DGCC7710 中;再次,用 2972 噬菌体侵染已经拥有 pNZCR1 或 pNZCR3 的 DGCC-7710;最后,确定在平板上生长的单菌落,大多数对应 CRISPR 阵列内含有特定间隔,并且无质粒的菌株。

1.2 无 CRISPR/Cas 系统宿主细菌中噬菌体的基因组编辑

该类噬菌体基因组编辑的基本思路是:为了编

编辑靶基因,以质粒的方式导入同源重组模板;为了富集噬菌体重组子,将 CRISPR 位点和 *cas* 位点转到无 CRISPR/Cas 系统的宿主细菌中。这类研究尚不多,本文仅对 4 例情形介绍如下。

Kiro 等^[37]在无 CRISPR/Cas 系统大肠杆菌 (*Escherichia coli*) NEB5 α 和 BL21-AI 中对 T7 烈性噬菌体基因组进行了编辑(图 1C)。大肠杆菌 NEB5 α 含同源重组模板质粒(pBAD-1.7₆₀ 或 pUC19-4.3₆₀),而 BL21-AI 含 3 种质粒:pAnti-1.7/4.3 具有靶向相应基因(基因 1.7 或 4.3)的间隔,pWUR400 具有 *casA/B/C/D/E* 系列基因,pWUR397 编码 Cas3^[37]。首先采用 T7 噬菌体感染含模板质粒的大肠杆菌 NEB5 α ,获得同时具有重组子和野生型噬菌体的混合裂解液;然后采用该混合噬菌体感染 BL21-AI^[37]。在 BL21-AI 中,crRNP 复合物首先利用 CasA 亚基识别噬菌体基因组中的 PAM^[16],然后利用 crRNAs 与原间隔的碱基互补配对定位在基因 1.7 或 4.3 中的靶标序列,再召集 Cas3 酶以切割靶标序列^[17,38,39],从而降解野生型噬菌体。应用这种方法编辑基因 1.7 得到的成斑率约为对照的 10 000 倍^[37]。

Box 等^[40]在无 CRISPR/Cas 系统霍乱弧菌 E7946 中编辑 ICP1_2011_A 烈性噬菌体基因组(图 1D)。首先,采用自然转化(natural transformation),将霍乱弧菌 O395 的基因组岛 GI-24 (含 I-E 类 CRISPR/Cas 系统)转入霍乱弧菌 E7946 中,使得 E7946 具备 CRISPR/Cas 系统;其次,设计系列质粒,如 pTarget ϕ cas1 (图 1D, 左下角),使它们既可用于同源重组,又可编码靶向 ICP1_2011_A 噬菌体 I-F 类 CRISPR/Cas 系统基因 *cas1* 或 *cas2-3* (图 1D, 顶部)的 crRNAs^[7];最后,实施对各个基因的编辑^[40]。其中,对 *cas1* 中原间隔的删除实验获得理想的实验结果:成斑率是对照的 10 倍^[40]。但是,Box 等^[40]的方法(图 1D)与 Martel 和 Moineau^[27]的(图 1A)都存在相同的缺点:导入的外来质粒容易被 CRISPR/Cas 系统所免疫。

Kiro 等^[37]方法(图 1C)和 Box 等^[40]方法(图 1D)的最大不同点在于同源重组模板、CRISPR 位点和 *cas* 位点三者之间的搭配方式。Kiro 等^[37]将三者分别加载于不同的质粒载体;Box 等^[40]则将同源重组模板和 CRISPR 位点加载于同一质粒载体,利用

霍乱弧菌自然转化的特性将 *cas* 位点整合到宿主细菌染色体中。显然,无 CRISPR/Cas 系统宿主细菌中噬菌体的基因组编辑方案会因菌种不同而有所改变。

酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) II-A 类 CRISPR/Cas 系统衍生出来的基因编辑工具的成份简单、应用成熟,在无 CRISPR/Cas 系统的宿主细菌中编辑噬菌体基因组时,可优先考虑利用该系统作为选择压力。Lemay 等^[41]和 Tao 等^[30]采用电转化方式将质粒(加载酿脓链球菌 II-A 类 CRISPR/Cas 系统)导入待编辑噬菌体的特定宿主细菌中。其中,*cas9*、tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA)和 CRISPR 位点共同加载于一种质粒载体(如 pTRK2 或 cloD-F13-aadA)上,同源重组模板则单独加载于另一种质粒载体(如 pNZ123 或 pET28b)上^[30,41]。Lemay 等^[41]利用这类方法,对乳酸乳球菌 MG163 (*Lactococcus lactis* MG163)的 p2 烈性噬菌体基因组实施基因删除、点突变和 His₆ 序列插入系列操作。Tao 等^[30]采用该方案,对大肠杆菌野生型 T4 或 T4(C) (此类 T4 噬菌体的胞嘧啶在大肠杆菌 B834 中不被修饰)烈性噬菌体基因组实施无义突变、沉默突变和基因片段删除系列操作。

2 CRISPR/Cas 系统在噬菌体基因组编辑中的拓展应用

2.1 联合使用 CRISPR/Cas 系统与噬菌体重组系统

前述的噬菌体基因组编辑实例都有一个共同点:宿主细菌本身具有的重组系统(如 RecA/RecBCD)介导了质粒模板与靶基因之间的重组。然而,细菌的重组系统利用寡核苷酸来编辑自身基因组中的靶基因的能力不足,而这种不足可由宿主细菌特异的噬菌体重组系统来弥补^[42,43]。例如,利用寡核苷酸在大肠杆菌 *gal* 基因中引入点突变时,选择菌株 SIMD (含 *bet* 基因)作为编辑对象要比 HME75 (无 Red 与 Rac 系统)效果好,前者得到的重组子是后者的 6×10^4 倍^[42];大肠杆菌 MG1655 天然重组系统介导寡核苷酸与靶基因之间的重组效率要低于 HME63 (含缺陷 λ 原噬菌体)^[43]。

λ 噬菌体的 Red 系统和 Rac 原噬菌体的 RecE/T 系统, 具有相近的重组原理, 且重组过程都独立于 RecA^[44,45]。利用这两个系统实施重组的优点是: 以 PCR 扩增所得的 dsDNA 及寡核苷酸为模板时, 要比以质粒为模板更容易设计。Red 和 RecE/T 系统不仅可以应用于其他物种的基因组编辑, 还可以用于噬菌体本身的基因组编辑。比如, Oppenheim 等^[46]采用 Red 系统编辑裂解性 λ 噬菌体基因组; Marinelli 等^[47]采用分枝杆菌噬菌体 Che9c (Mycobacteriophage Che9c) RecE/T 类蛋白 gp60-61 编辑分枝杆菌噬菌体基因组。下面以 Oppenheim 等^[46]、Marinelli 等^[47]及 Jiang 等^[43]研究为参考, 对联合使用 CRISPR/Cas 系统及 Red 系统或 BRED (Bacteriophage Recombinering of Electroporated DNA) 策略编辑噬菌体基因组的实验方案做介绍。

第一类: 联合使用 CRISPR/Cas 系统及 Red 系统在大肠杆菌内编辑裂解性 λ 噬菌体的基因组^[46]。Oppenheim 等^[46]所用系列大肠杆菌的染色体上整合有缺陷 λ 原噬菌体, 原噬菌体上的 *cI* 857 温敏抑制子用来调节 *red* 操纵子 P_L 启动子的开与关(图 2)。该实验的操作过程简化为: 首先, 用噬菌体感染宿主细菌; 其次, 42 °C 热击细胞, 致使 *cI* 857 表达的温敏阻遏物失效、*red* 操纵子表达; 再次, 将 PCR 扩增所得的 dsDNA 或寡核苷酸模板电转化进入细胞内, 使模板和噬菌体靶基因可以在 Exo 外切酶、Beta 重组酶和 Gam 蛋白的作用下发生重组; 最后, 根据噬菌斑形态特征、测序结果、裂解液重感染所得溶源菌的抗生素抗性情况和 PCR 来判定重组子。该方法虽然可以对 λ 噬菌体的基因组进行基因的无义突变、删除和替换系列操作(图 2), 但是重组子的噬菌斑占总噬菌斑的百分比并不高, 仅为 1%~13%。为了提高重组子比例, 可以利用 CRISPR/Cas 系统制造选择压力, 留下已发生重组的噬菌体, 淘汰未发生重组的噬菌体。若选择酿脓链球菌 II-A 类 CRISPR/Cas 系统作为选择压力, 则具体操作是: 首先, 将加载了 *cas9* 和 *tracrRNA* 的质粒 pCas9-1、加载了 CRISPR 位点的质粒 pRSnR 导入宿主细菌(染色体上整合缺陷 λ 原噬菌体); 其次, 诱导质粒表达 *Cas9*、*tracrRNA* 和 CRISPR 阵列, 诱导时间根据具体情况而定; 最后, 后续实验保持和前述一致, 即噬菌体

感染宿主细菌、*red* 操纵子诱导表达等(图 2)。

因为大肠杆菌天然存在的 CRISPR/Cas 系统可能都为 I 类, 所以从 CRISPR/Cas 系统与细胞契合度高低的角度看, 也许选择 I 类系统作为选择压力比 II 类更佳。目前尚缺少专门比较这两类系统在提高噬菌体重组子比例方面的研究。此外, 当有意选择具有 I-E 类 CRISPR/Cas 系统的细菌作为宿主时, 虽然该系统可以直接作为选择压力, 但是为了防止 *Cas1* 和 *Cas2* 形成的复合物从噬菌体和导入的质粒中获取新闻隔来免疫外来元件^[12~14], 应当采用同源重组等方法将“*cas1* 和 *cas2*”或 CRISPR 位点敲除。

第二类: 联合使用 CRISPR/Cas 系统及 BRED 在耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)内编辑分枝杆菌烈性噬菌体的基因组^[47,48]。其中, BRED 操作分 3 步: 第一, 诱导耻垢分枝杆菌 mc²155:pJV53, 使得质粒 pJV53 表达外切酶 gp60 和重组酶 gp61 之后, 制备感受态细胞^[48], 并将噬菌体 DNA 与 PCR 扩增所得的 dsDNA 底物同时电转化进入细胞, 铺平板; 第二, 挑选平板上多个噬菌斑, 采用引物 P1/2 或 P2/3 开展常规 PCR 或选择性 PCR(图 3), 电泳(若电泳条带不单一, 则相应的噬菌斑是重组子与非重组子混合的噬菌斑); 第三, 将混合噬菌斑的裂解液混合, 实施双层平板实验, 经过挑斑与 PCR 扩增后, 电泳检测纯合重组子^[47]。这样, 与 CRISPR/Cas 系统和 Red 系统联合类似, 将 CRISPR/Cas 系统与 BRED 联合使用, 有望提高第二步混合斑和第三步重组子斑的比例。

联合使用 CRISPR/Cas 系统与噬菌体重组系统实施噬菌体基因组编辑时, 可以将两类系统独立地转入到宿主细菌内(在第一类中, Red 系统存在于缺陷 λ 原噬菌体上, 而 CRISPR/Cas 系统加载于质粒中^[46]; 在第二类中, 表达外切酶 gp60 和重组酶 gp61 的基因 60-61 与 CRISPR/Cas 系统加载于不同的质粒中^[47,48]), 也可以将两类系统进行搭配。第一类可以采用同源重组使 *cas9* 和 *tracrRNA* 整合于缺陷 λ 原噬菌体上^[49]; 第二类可以考虑利用宿主细菌已知的温和噬菌体, 构建包含 *cas9* 和 *tracrRNA*、基因 60-61、与温和噬菌体包装相关基因的噬粒^[50]。

2.2 拓展应用中的潜在问题

联合 CRISPR/Cas 系统与噬菌体重组系统 构建

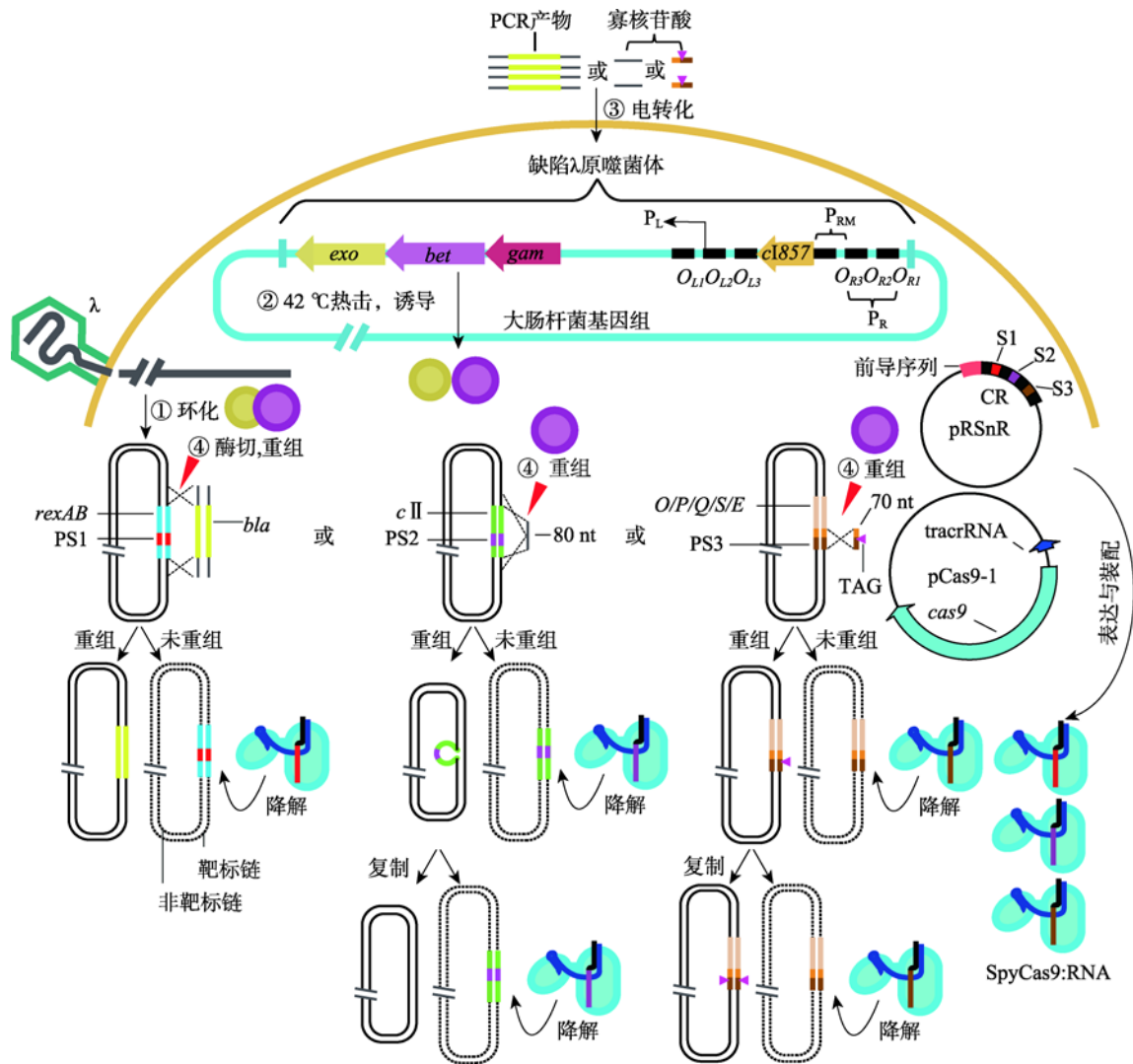


图 2 CRISPR/Cas 系统联合 Red 系统对 λ 噬菌体基因组的编辑

Fig. 2 Editing of the bacteriophage λ genome with CRISPR/Cas and Red systems

S1、S2 和 S3 分别为间隔 1、间隔 2 和间隔 3 ;PS1、PS2 和 PS3 则分别为原间隔 1、原间隔 2 和原间隔 3 ;CR :CRISPR 阵列 ;SpyCas9:RNA 见表 1。

裂解性噬菌体重组子，需要注意以下几个问题。

第一，噬菌体重组系统的选择问题。当利用寡核苷酸在耻垢分枝杆菌基因组中引入点突变时，重组酶来源不同，它在该菌中所体现的活性亦不同，活性大小分别为 Che9c gp61>Rac RecT>Halo gp43>Giles gp53 \approx λ Beta^[51]。显然，分枝杆菌噬菌体 Che9c 来源的重组酶活性最高。反之，当利用寡核苷酸在大肠杆菌基因组中引入突变时，不宜使用 Che9c gp61，但是可以用大肠杆菌 λ 噬菌体的 Beta 重组酶^[42]。这些意味着噬菌体重组酶在其专一性寄生的宿主细菌中才可能达到较佳活性状态，从而有利于发生重组

(这可能是宿主细菌的细胞内液体环境更有利于自身噬菌体的重组酶基因的表达、酶活性的稳定或维持^[51]，还可能与宿主细菌的基因序列或者 GC 含量等特征有关)。为此，在编辑噬菌体基因组时，应该选择来自该噬菌体(或近缘的噬菌体)的重组系统。

第二，CRISPR/Cas 系统类型的选择问题。正如噬菌体重组酶活性在其专一性寄生的宿主细菌(及其近缘的细菌)中表现较佳，选择该噬菌体的宿主细菌(或与其近缘的菌株)所具有 CRISPR/Cas 系统，实施噬菌体基因组编辑，可能更为恰当。Kiro 等^[37]就采用了大肠杆菌 K12 所具有的 I-E 类 CRISPR/Cas

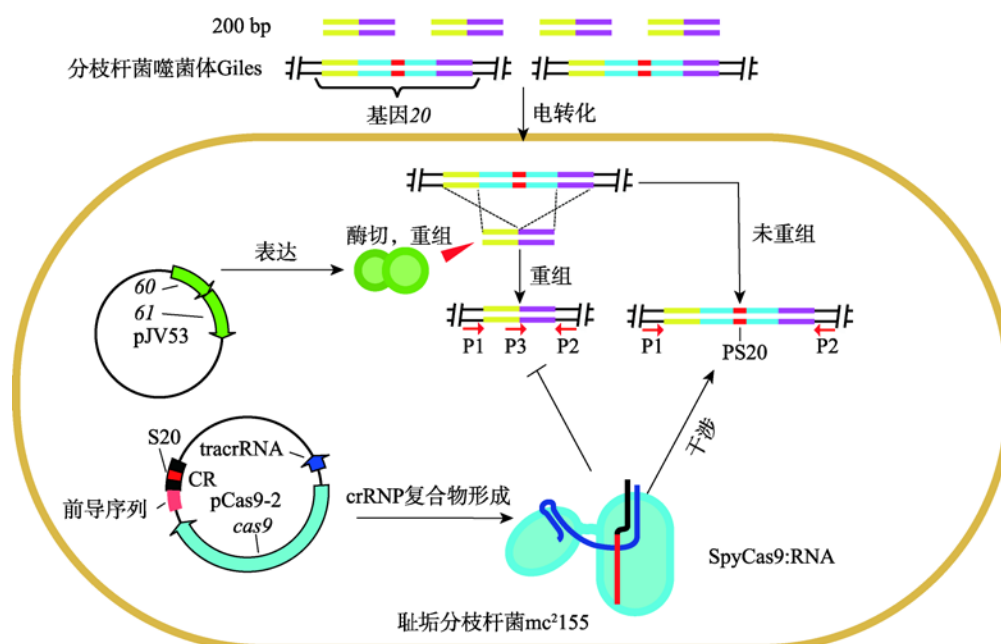


图 3 CRISPR/Cas 系统联合 BRED 对分枝杆菌噬菌体基因的编辑

Fig. 3 Editing of the mycobacteriophage gene with CRISPR/Cas systems and BRED

S20: 间隔 20; PS20; 原间隔 20; CR: CRISPR 阵列; P1、P2 和 P3 分别为引物 1 (primer1)、引物 2 和引物 3; SpyCas9:RNA 见表 1。

参考文献[47,48]修改绘制。

系统在 BL21-AI 中进行 T7 噬菌体基因的删除实验; 类似地, Box 等^[40]则采用了霍乱弧菌 O395 I -E 类 CRISPR/Cas 系统在 E7946 中进行 ICP1_2011_A 噬菌体基因组的编辑。

第三, 质粒载体选择问题。首先, 考虑质粒拷贝数高低, 质粒必须在特定宿主细菌中复制, 并表达 Cas 蛋白及 CRISPR 阵列等。该质粒一般来源于相应宿主细菌。Lemay 等^[41]研究发现高拷贝数质粒 pCas9^[43]不能在乳酸乳球菌 MG1363 中克隆, 高拷贝数质粒 pNZCas9 不能转入乳酸乳球菌 MG1363 中。Lemay 等^[41]推测造成这一现象的原因是: 高拷贝数质粒过量表达的 Cas9, 毒害了宿主细胞。其次, 考虑不同质粒具有不同复制系统(避免质粒不相容性)及不同抗性标记基因。Kiro 等^[37]采用 3 种质粒 pWUR397、pWUR400 和 pAnti-1.7/pAnti-4.3, 分别具备卡那霉素、链霉素和氯霉素抗性, 质粒载体则分别为 pRSF-1b、pCDF-1b 和 pACYCDuet-1^[15]。此外, 还应该考虑质粒不能含原间隔、质粒不能含与噬菌体或细菌基因组发生重组的序列等问题。

第四, 模板底物问题。应考虑底物单双链及底物同源臂的合适长度等问题。Marinelli 等^[47]对 Giles

基因 20 实施片段删除的实验中, 发现 dsDNA 底物比 ssDNA 好, 而 200 bp dsDNA 又比 100 bp dsDNA 重组效率高。此外, 应用“Red 系列蛋白或重组酶 gp61”和 ssDNA, 在宿主细菌基因组中引入点突变时, 基因后随链的互补 ssDNA 比前导链的互补 ssDNA 更容易获得高的重组效率^[42,44,51]。因此, 在应用类似的方法对噬菌体的基因组进行编辑时, 应该考虑 ssDNA 与靶基因单链的互补性问题。

第五, 宿主细菌的防御与噬菌体的反防御问题。由于 III-A 类 CRISPR/Cas 系统以转录依赖的方式切割 DNA 有义链, 使得这类系统不易免疫原噬菌体^[24,25]。但是, I-E 类 CRISPR/Cas 系统不同, 只要原噬菌体上存在原间隔及其 PAM, 就会发生免疫^[52]。据推测, II 类 CRISPR/Cas 系统与 I-E 类 CRISPR/Cas 系统具有相似的机制免疫原噬菌体^[53]。如同某些噬菌体可以通过限制性内切酶酶切位点修饰等策略来避免宿主细菌的限制—修饰系统^[54], 原噬菌体中存在着类似机制: 采用抗 CRISPR 蛋白来阻止 CRISPR/Cas 系统对于原噬菌体的免疫防御。例如, 铜绿假单胞菌 PA14 (*Pseudomonas aeruginosa* PA14) (含有 I-F 类 CRISPR/Cas 系统) 的溶源性噬菌

体 JBD30 等, 可编码抗 CRISPR 蛋白。该类蛋白通过与特定 Cas 蛋白互作来抑制宿主细菌 I-F 类 CRISPR/Cas 系统的免疫活性, 从而维持 JBD30 等的溶源性^[55,56]。又例如, 单核细胞李斯特菌 1043s (*Listeria monocytogenes* 1043s) (含有 II-A 类 CRISPR/Cas 系统) 的原噬菌体 ϕ J0161a, 可编码抗 CRISPR 蛋白 AcrIIA1 和 AcrIIA2。AcrIIA1 和 AcrIIA2 蛋白可以使得含有靶标序列的质粒 pT 成功转化过量表达 Cas9 的单核细胞李斯特菌 1043s:: ϕ J0161a^[57]。此外, Hynes 等^[58]发现, 嗜热链球菌 DGCC7854 的烈性噬菌体 D4276 可表达抗 CRISPR 蛋白 AcrIIA5; Seed 等^[7]在霍乱弧菌 ICP1_2011_A 噬菌体中发现具免疫活性的 I-F 类 CRISPR/Cas 系统; Tao 等^[30]发现, T4 噬菌体基因组修饰对于 Cas9 活性的抑制强度因为原间隔序列的不同而不同。因此, 分析噬菌体基因组中是否存在抗 CRISPR 基因、有活性的 CRISPR/Cas 系统及碱基修饰等, 对于选择 CRISPR/Cas 系统开展噬菌体基因组编辑是十分重要的环节。

第六, 重组子的筛选问题。除利用互补实验以外, 必需基因被敲除的纯重组子难以获得, 因为这类重组子可能不形成噬菌斑, 或者本就无法产生病毒颗粒。即使假设有噬菌斑的产生, 也尚缺少一个从众多斑中准确挑取重组子噬菌斑的方法。此外, 噬菌体基因组编辑中存在着选择标记缺乏的问题, 而 CRISPR/Cas 系统仅在一定程度上弥补了这个问题: 作为选择压力来富集重组子并间接提高重组效率。无疑, 重组子筛选与选择标记缺乏是噬菌体研究领域需要攻克的问题。这些问题的解决有助于利用 CRISPR/Cas 系统将噬菌体基因组的基因按生命周期关键程度划分等级, 从而更有利于噬菌体功能基因组学的研究与利用。

3 结语与展望

噬菌体入侵, 使细菌进化出 CRISPR/Cas 获得性免疫系统。细菌的 I、II、III 和 VI 类 CRISPR/Cas 系统作为防御武器可降解入侵的噬菌体^[15,23,59,60]。随着揭示 CRISPR/Cas 系统作用机制及其各亚型用于基因组编辑案例的积累, 各类系统(尤其是占 60% 的 I 类^[8])都有望用于编辑噬菌体基因组。CRISPR/Cas

系统与噬菌体重组系统(如 Red 系统及 RecE/T 系统)的联合使用, 可能促进编辑噬菌体基因组。

对噬菌体近百年来的研究, 奠定了其在分子遗传学、合成生物学、纳米生物技术(如噬菌体展示技术^[61])、细菌性疾病致病机制和食品安全等领域不可替代的基础作用^[62]。下一个百年研究有望带来更多惊喜, 噬菌体基因组编辑技术可能成为剖析及利用噬菌体资源的有力工具。例如, 基于 CRISPR/Cas 系统编辑噬菌体基因组, 从头合成噬菌体基因组、在酵母体内进行噬菌体 DNA 片段组装等^[63], 还可以考虑将某种噬菌体基因组 DNA 构建成噬粒, 统一在大肠杆菌中进行修饰、编辑后, 将噬菌体突变株导入相应宿主细菌中, 分析相应基因功能等, 由此可促进噬菌体基因组编辑在合成生物学中的潜在应用。

参考文献(References):

- [1] Bergh O, Børsheim KY, Bratbak G, Haldal M. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 1989, 340(6233): 467–468. [DOI]
- [2] Danovaro R, Dell'Anno A, Trucco A, Serresi M, Vanucci S. Determination of virus abundance in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(3): 1384–1387. [DOI]
- [3] Williamson KE, Radosevich M, Wommack KE. Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(6): 3119–3125. [DOI]
- [4] Rohwer F. Global phage diversity. *Cell*, 2003, 113(2): 141. [DOI]
- [5] Pope WH, Bowman CA, Russell DA, Jacobs-Sera D, Asai DJ, Cresawn SG, Jacobs WR, Hendrix RW, Lawrence JG, Hatfull GF. Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity. *eLife*, 2015, 4: e06416. [DOI]
- [6] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8(1): 172. [DOI]
- [7] Seed KD, Lazinski DW, Calderwood SB, Camilli A. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature*, 2013, 494(7438): 489–491. [DOI]
- [8] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM,

- Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, Van Der Oost J, Backofen R, Koonin EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722–736. [DOI]
- [9] Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(3): 169–182. [DOI]
- [10] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao YJ, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607. [DOI]
- [11] Walker FC, Chou-Zheng L, Dunkle JA, Hatoum-Aslan A. Molecular determinants for CRISPR RNA maturation in the Cas10-Csm complex and roles for non-Cas nucleases. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(4): 2112–2123. [DOI]
- [12] Levy A, Goren MG, Yosef I, Auster O, Manor M, Amitai G, Edgar R, Qimron U, Sorek R. CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature*, 2015, 520(7548): 505–510. [DOI]
- [13] Wang JY, Li JZ, Zhao HT, Sheng G, Wang M, Yin ML, Wang YL. Structural and mechanistic basis of PAM-dependent spacer acquisition in CRISPR-Cas systems. *Cell*, 2015, 163(4): 840–853. [DOI]
- [14] Nuñez JK, Lee ASY, Engelman A, Doudna JA. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature*, 2015, 519(7542): 193–198. [DOI]
- [15] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, Van Der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891): 960–964. [DOI]
- [16] Hayes RP, Xiao YB, Ding F, Van Erp PBG, Rajashankar K, Bailey S, Wiedenheft B, Ke AL. Structural basis for promiscuous PAM recognition in type I-E Cascade from *E. coli*. *Nature*, 2016, 530(7591): 499–503. [DOI]
- [17] Hochstrasser ML, Taylor DW, Bhat P, Guegler CK, Sternberg SH, Nogales E, Doudna JA. CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(18): 6618–6623. [DOI]
- [18] Vorontsova D, Datsenko KA, Medvedeva S, Bondy-Denomy J, Savitskaya EE, Pougach K, Logacheva M, Wiedenheft B, Davidson AR, Severinov K, Semenova E. Foreign DNA acquisition by the I-F CRISPR-Cas system requires all components of the interference machinery. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(22): 10848–10860. [DOI]
- [19] Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou KL, Doudna JA. Sequence-and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 2010, 329(5997): 1355–1358. [DOI]
- [20] Rollins MF, Chowdhury S, Carter J, Golden SM, Wilkinson RA, Bondy-Denomy J, Lander GC, Wiedenheft B. Cas1 and the Csy complex are opposing regulators of Cas2/3 nuclease activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(26): E5113–E5121. [DOI]
- [21] Heler R, Samai P, Modell JW, Weiner C, Goldberg GW, Bikard D, Marraffini LA. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. *Nature*, 2015, 519(7542): 199–202. [DOI]
- [22] Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 2014, 513(7519): 569–573. [DOI]
- [23] Tamulaitis G, Kazlauskienė M, Manakova E, Venclovas C, Nwokeoji AO, Dickman MJ, Horvath P, Siksnys V. Programmable RNA shredding by the type III-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus thermophilus*. *Mol Cell*, 2014, 56(4): 506–517. [DOI]
- [24] Goldberg GW, Jiang WY, Bikard D, Marraffini LA. Conditional tolerance of temperate phages via transcription-dependent CRISPR-Cas targeting. *Nature*, 2014, 514(7524): 633–637. [DOI]
- [25] Samai P, Pyenson N, Jiang WY, Goldberg GW, Hatoum-Aslan A, Marraffini LA. Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-Cas immunity. *Cell*, 2015, 161(5): 1164–1174. [DOI]
- [26] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, 60(2): 174–182. [DOI]
- [27] Martel B, Moineau S. CRISPR-Cas: an efficient tool for genome engineering of virulent bacteriophages. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(14): 9504–9513. [DOI]
- [28] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71. [DOI]
- [29] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [DOI]

- [30] Tao P, Wu XR, Tang WC, Zhu JG, Rao V. Engineering of bacteriophage T4 genome using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(10): 1952–1961. [DOI]
- [31] Bari SMN, Walker FC, Cater K, Aslan B, Hatoum-Aslan A. Strategies for editing virulent staphylococcal phages using CRISPR-Cas10. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(12): 2316–2325. [DOI]
- [32] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 2008, 322(5909): 1843–1845. [DOI]
- [33] Staals RH, Zhu YF, Taylor DW, Kornfeld JE, Sharma K, Barendregt A, Koehorst JJ, Vlot M, Neupane N, Varossieau K, Sakamoto K, Suzuki T, Dohmae N, Yokoyama S, Schaap PJ, Urlaub H, Heck AJR, Nogales E, Doudna JA, Shinkai A, Van Der Oost J. RNA targeting by the type III-A CRISPR-Cas Csm complex of *Thermus thermophilus*. *Mol Cell*, 2014, 56(4): 518–530. [DOI]
- [34] Marraffini LA, Sontheimer EJ. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 2010, 463(7280): 568–571. [DOI]
- [35] Hynes AP, Labrie SJ, Moineau S. Programming native CRISPR arrays for the generation of targeted immunity. *mBio*, 2016, 7(3): e00202–16. [DOI]
- [36] Tamulaitis G, Venclovas Č, Siksnys V. Type III CRISPR-Cas immunity: major differences brushed aside. *Trends Microbiol*, 2017, 25(1): 49–61. [DOI]
- [37] Kiro R, Shitrit D, Qimron U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biol*, 2014, 11(1): 42–44. [DOI]
- [38] Huo YW, Nam KH, Ding F, Lee H, Wu LJ, Xiao YB, Farchione MD, Jr, Zhou S, Rajashankar K, Kurinov I, Zhang RG, Ke AL. Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(9): 771–777. [DOI]
- [39] Westra ER, Van Erp PB, Künne T, Wong SP, Staals RH, Seegers CLC, Bollen S, Jore MM, Semenova E, Severinov K, De Vos WM, Dame RT, De Vries R, Brouns SJ, Van Der Oost J. CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. *Mol Cell*, 2012, 46(5): 595–605. [DOI]
- [40] Box AM, McGuffie MJ, O'Hara BJ, Seed KD. Functional analysis of bacteriophage immunity through a type I-E CRISPR-Cas system in *Vibrio cholerae* and its application in bacteriophage genome engineering. *J Bacteriol*, 2015, 198(3): 578–590. [DOI]
- [41] Lemay ML, Tremblay DM, Moineau S. Genome engineering of virulent lactococcal phages using CRISPR-Cas9. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(7): 1351–1358. [DOI]
- [42] Datta S, Costantino N, Zhou XM, Court DL. Identification and analysis of recombineering functions from Gram-negative and Gram-positive bacteria and their phages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(5): 1626–1631. [DOI]
- [43] Jiang WY, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233–239. [DOI]
- [44] Costantino N, Court DL. Enhanced levels of λ Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15748–15753. [DOI]
- [45] Muylers JPP, Zhang YM, Buchholz F, Stewart AF. RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev*, 2000, 14(15): 1971–1982. [DOI]
- [46] Oppenheim AB, Rattray AJ, Bubunenkov M, Thomason LC, Court DL. In vivo recombineering of bacteriophage λ by PCR fragments and single-strand oligonucleotides. *Virology*, 2004, 319(2): 185–189. [DOI]
- [47] Marinelli LJ, Piuri M, Swigoňová Z, Balachandran A, Oldfield LM, Van Kessel JC, Hatfull GF. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS One*, 2008, 3(12): e3957. [DOI]
- [48] Van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. Recombineering mycobacteria and their phages. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(11): 851–857. [DOI]
- [49] Park JY, Moon BY, Park JW, Thornton JA, Park YH, Seo KS. Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 2017, 7: 44929. [DOI]
- [50] Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(11): 1146–1150. [DOI]
- [51] Van Kessel JC, Hatfull GF. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets. *Mol Microbiol*, 2008, 67(5): 1094–1107. [DOI]
- [52] Edgar R, Qimron U. The *Escherichia coli* CRISPR system protects from λ lysogenization, lysogens, and prophage induction. *J Bacteriol*, 2010, 192(23): 6291–6294. [DOI]
- [53] Nozawa T, Furukawa N, Aikawa C, Watanabe T, Haobam B, Kurokawa K, Maruyama F, Nakagawa I. CRISPR inhi-

- bition of prophage acquisition in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19543. [DOI]
- [54] Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(10): 675–687. [DOI]
- [55] Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, 2013, 493(7432): 429–432. [DOI]
- [56] Bondy-Denomy J, Garcia B, Strum S, Du MJ, Rollins MF, Hidalgo-Reyes Y, Wiedenheft B, Maxwell KL, Davidson AR. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature*, 2015, 526(7571): 136–139. [DOI]
- [57] Rauch BJ, Silvis MR, Hultquist JF, Waters CS, McGregor MJ, Krogan NJ, Bondy-Denomy J. Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins. *Cell*, 2017, 168(1–2): 150–158.e10. [DOI]
- [58] Hynes AP, Rousseau GM, Lemay ML, Horvath P, Romero DA, Fremaux C, Moineau S. An anti-CRISPR from a virulent streptococcal phage inhibits *Streptococcus pyogenes* Cas9. *Nat Microbiol*, 2017, 2(10): 1374–1380. [DOI]
- [59] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712. [DOI]
- [60] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung JJ, Slaymaker IM, Cox DB, Shmakov S, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573. [DOI]
- [61] Meng FM, Zhang CH, Ai YC. Advances of development of phage display systems. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(10): 1113–1120.
孟繁梅, 张朝辉, 艾云灿. 噬菌体展示技术系统发展进展. *遗传*, 2011, 33(10): 1113–1120. [DOI]
- [62] Salmond GPC, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(12): 777–786. [DOI]
- [63] Pires DP, Cleto S, Sillankorva S, Azeredo J, Lu TK. Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 523–543. [DOI]

(责任编辑: 张天宇)