

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-041

梭菌分子遗传改造工具研究进展

刘佳昕¹, 程驰^{1,2}, 李欣启¹, 汪超俊², 张颖², 薛闯^{1,2}

(¹ 大连理工大学生物工程学院, 大连市合成生物学应用转化工程技术研究中心, 辽宁 大连 116024; ² 大连理工大学宁波研究院, 浙江 宁波 315016)

摘要: 梭状芽孢杆菌是一类革兰氏阳性、可内生孢子的严格厌氧型细菌, 可产生多种化学物质, 包括现如今极具潜力的新型生物燃料丁醇。通过分子改造以提高梭菌发酵的浓度及产率一直是一项亟需突破的重要课题, 但该方向的研究长期受限于梭菌不完善的遗传操作工具。近年来, 随着分子生物学的快速发展, 适用于梭菌的基因编辑工具不断发展, 梭菌中已有反义RNA技术、Targetron、基于同源重组或CRISPR/Cas系统介导的基因编辑技术等多种遗传操作工具, 可以基本实现靶标基因插入、删除、替换、点突变以及表达水平调控等各种操作。文中对上述遗传操作工具研究进展进行了总结, 并着重讨论了以重组酶为代表的新型遗传操作技术及其在梭菌中的应用潜力。今后应进一步优化现有的梭菌分子遗传改造工具, 重点突破梭菌自身同源重组效率低下等技术难点, 同时应大力发展新的基因编辑技术, 如以CRISPR技术为核心的多位点共编辑系统、噬菌体重组酶介导的多拷贝定点和随机整合技术等。

关键词: 梭状芽孢杆菌; 基因编辑工具; 遗传改造; 重组酶; CRISPR

中图分类号: **文献标志码:** A

Recent progress in the molecular genetic modification tools of *Clostridium*LIU Jiaxin¹, CHENG Chi^{1,2}, LI Xinqi¹, WANG Chaojun², ZHANG Ying², XUE Chuang^{1,2}

(¹Engineering Research Center of Application and Transformation for Synthetic Biology Dalian, School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China; ²NingBo Institute of Dalian University of Technology, Ningbo 315016, Zhejiang, China)

Abstract: *Clostridium* are Gram-positive, strictly anaerobic, endospore-forming bacteria that produce a variety of chemicals, including butanol, which is now a promising new biofuel. Improving the fermentation titer and yield of *Clostridium* by genetic modification has always been an important challenge that needs to be broken through, but it has long been hindered by the limitation of genetic manipulation tools of *Clostridium*. In recent years, with the continuous development of molecular biology, gene editing tools for *Clostridium* have been continuously developed. Many genetic

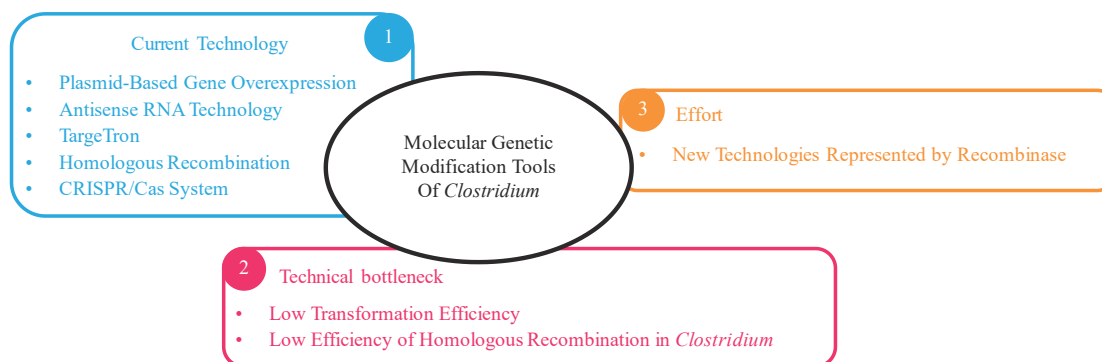
收稿日期: 2022-07-18 修回日期: 2022-08-30

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFC2102500, 2021YFC2101303, 2018YFB1501703); 国家自然科学基金 (21878035, 21808026); 大连市杰出青年科技人才支持计划 (2021RJ03); 大连理工大学基本科研业务费 (DUT21RC (3) 003, DUT22ZD102); 辽宁省“百千万人才工程”经费

引用本文: 刘佳昕, 程驰, 李欣启, 汪超俊, 张颖, 薛闯. 梭菌分子遗传改造工具研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1201-1217

Citation: LIU Jiaxin, CHENG Chi, LI Xinqi, WANG Chaojun, ZHANG Ying, XUE Chuang. Recent progress in the molecular genetic modification tools of *Clostridium*[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1201-1217

manipulation tools such as plasmid-based gene overexpression, antisense RNA technology, transposon-based mutagenesis, group II intron-mediated gene inactivation, and homologous recombination-based or CRISPR/Cas-mediated gene editing technology have been developed. Various operations such as target gene insertion, deletion, substitution, point mutation, and gene expression level regulation have been accomplished in *Clostridium*. In this review, we summarize the research progress in the molecular genetic modification tools of *Clostridium*, and especially discuss the potential application of new technologies, such as recombinase-based gene editing technology. Although the application of the recombinase system in *Clostridium* is rarely reported and discussed, the future application value and significance of this technology should be paid attention to. In the future, optimization of the existing molecular genetic modification technologies in *Clostridium* is still imperative, such as overcoming the low efficiency of homogeneous recombination in *Clostridium*, improving the stability and transformation efficiency of plasmids, solving the off-target problem of antisense RNA technology and type II intron technology, reducing the toxicity of Cas9 protein, and so on. At the same time, new gene editing technologies should be developed, focusing on emerging technologies including CRISPR/Cas-mediated multi-locus editing systems, phage recombinase-mediated multiplex genome editing, targeted or random multi-copy gene integration, and so on. It is believed that with the development and improvement of genetic modification tools, *Clostridium* will be able to fully each its potential biorefinery capacity and make an important contribution to the green biosynthesis of bioenergy and bio-based chemicals.



Keywords: *Clostridium*; gene editing tools; genetic modification; recombinase; CRISPR

由于大量使用化石燃料而产生的过量的温室气体已经给全球气候带来了不可逆转的影响^[1]。开发绿色清洁、高效可再生的生物能源以逐步替代化石燃料已成为全球共识^[2]。2020年我国深入推进能源绿色低碳转型，习近平总书记在第七十五届联合国大会一般性辩论上提出，中国力争于2030年前实现碳达峰、努力争取2060年前实现碳中和的目标，对能源转型提出了更加迫切的要求。利用微生物发酵可再生生物质生产生物基化学品和生物燃料为能源转型提供一个可行方案，生物能源具有来源广泛、清洁高效等优点，科学地开发利用可以有效缓解能源危机，减少温室气体排放，维持碳平衡。

梭状芽孢杆菌 (*Clostridium*) 作为极具潜力的新型生物燃料丁醇的生产菌株，受到各国研究学者的广泛关注。梭菌是一类革兰氏阳性、严格厌氧、可形成芽孢的细菌^[3]。它是一类很大的原核生物属，大约涵盖了200多种细菌^[4]。它们能够形成耐氧、耐高温、耐酸碱和乙醇的芽孢，一旦条件适宜，就能迅速成长，正因如此，梭菌在自然界几乎无处不在^[5]。近年来，梭菌在工业领域和医疗领域受到广泛关注^[3]，例如在纤维素和半纤维素生物质降解、碳固定、生物燃料制备^[6]以及抗癌疗法的研究^[7]等方向都开始出现梭菌的身影。但要进一步挖掘梭菌的生物潜力，尤其在生物炼制方面，就必须依赖于菌株改进。通常菌株改良

有两种途径：一是表达异源的代谢途径；二是改造自身天然的代谢途径^[8-11]。显然，无论哪一种途径都需要高效的基因编辑工具。目前，在梭菌中已经开发的基因编辑技术主要包括以下几种：①基于游离质粒的基因过表达；②基于反义RNA、转座子和II型内含子的基因失活技术；③基于同源重组的基因编辑技术；④基于CRISPR/Cas9系统的基因编辑技术。上述技术各有优缺点，基于质粒的过表达设计简单、易于操作，但受限于质粒的不稳定性；反义RNA和II型内含子技术都存在一定的脱靶概率；同源重组技术可以实现精确编辑，但梭菌中极低的同源重组效率严重限制了该方法的效率；CRISPR技术可以实现在梭菌中插入、敲除、替换等操作，但是由于梭菌中同源重组介导修复效率极低，Cas9蛋白引起的双链断裂很难被修复，因此Cas9蛋白的表达对梭菌的致死性极强^[12]。因此，当前亟需解决的关键问题就是如何改善现有的操作工具以及开发新的编辑工具来突破梭菌自身同源重组效率低下这一技术瓶颈。近几年新兴的以重组酶为核心的基因工程是有希望突破这一技术屏障的技术之一，尤其以Red/ET重组系统为代表，该系统可有效提高同源重组及基因编辑的效率。相较于上述遗传改造工具，Red/ET重组系统具有重组效率高、所需同源臂较短、可操纵的DNA片段较长、不受限制性酶切位点限制以及不容易引入突变等优点。若能在梭菌中构建并优化该系统，对于突破梭菌中基因编辑操作的瓶颈具有重要意义。

本文首先介绍的是梭菌特有的限制性修饰系统，如何优化并完善外源基因的导入是梭菌代谢改造的必要前提。其次全面概述了目前在梭菌中应用的遗传改造工具的研究进展和技术瓶颈，包括基因过表达、反义RNA、转座子、二型内含子、同源重组、CRISPR以及重组酶系统，其中着重讨论了以噬菌体重组酶为核心的基因重组系统。重组酶介导的基因工程将有希望突破梭菌自身同源重组效率低下的瓶颈，挖掘梭菌生物潜能，为构建高性能梭菌细胞工厂做出重要贡献，对生物能源的开发和利用具有重要意义。外源重组系统在梭菌中的应用也为在工业微生物中开发高效遗传操作工具提供新的思路。目前重组酶系统在梭菌中的应用鲜有报道和讨论，但是该技术的应用价值和重要意义应该得到重视。

1 梭菌的限制修饰系统

对于细菌菌株的遗传操作，通常最关键的步骤是建立一种将外源DNA导入宿主细胞的高效手段，这是菌株遗传改造的前提。目前，梭菌中常用的DNA转移方法主要有两种：电穿孔转化法和接合转移法^[13]。电穿孔转化法是指通过电脉冲在细胞膜上形成小孔，外源DNA分子可以通过这些小孔进入细胞中。接合转移法是指将质粒DNA从一个供体菌株通过细胞与细胞之间的接触而直接转移到受体菌株中。电穿孔转化法技术简单、可靠性高且适用性广，目前在梭菌中更为常用^[14]，但是电转会导致细胞的高死亡率，而且需要根据不同细胞类型来优化电穿孔的实验条件^[13]。接合转移一般广泛应用于非转化细菌的转移，作用温和且效率高，但是高度依赖于供体菌株和高效的质粒转移^[13-14]。

梭菌是一类革兰氏阳性细菌，拥有较厚的细胞壁，且细胞壁上存在大量非特异性核酸酶^[15]，这些都阻碍了外源基因的进入；此外，大部分梭菌自身都含有一套限制性修饰系统（restriction-modification systems, RM system），外源基因在进入梭菌体内后很快就会被降解，无法稳定存在。限制性修饰系统是一种保护生物体免受外源遗传物质侵害的方法，广泛存在于细菌和其他原核生物中，它可以识别和消化特定序列的外源DNA。RM系统分为4种类型（图1），其中II型RM系统数量最多，是外源DNA进入梭菌体内最大的障碍。通过对细胞裂解液进行酶切活性分析，已经确定在丙酮丁醇梭菌（*Clostridium acetobutylicum*）、解纤维素梭菌（*C. cellulolyticum*）、艰难梭菌（*C. difficile*）、巴氏梭菌（*C. pasteurianum*）、热纤维梭菌（*C. thermocellum*）和热解糖梭菌（*C. thermosaccharolyticum*）^[4, 15-19]中均存在II型RM系统。该系统包括1个单独的甲基转移酶和1个内切酶。这两种酶功能不同，但识别相同的DNA序列。例如在*C. acetobutylicum*中识别的序列为5'GCNGC3'，核酸内切酶会在未被甲基化的识别位点处切割DNA，导致外源DNA片段断裂失活，无法发挥作用。因此，严重阻碍了外源基因在梭菌中的稳定存在。

现已探索出多种方法来应对上述问题：首先，

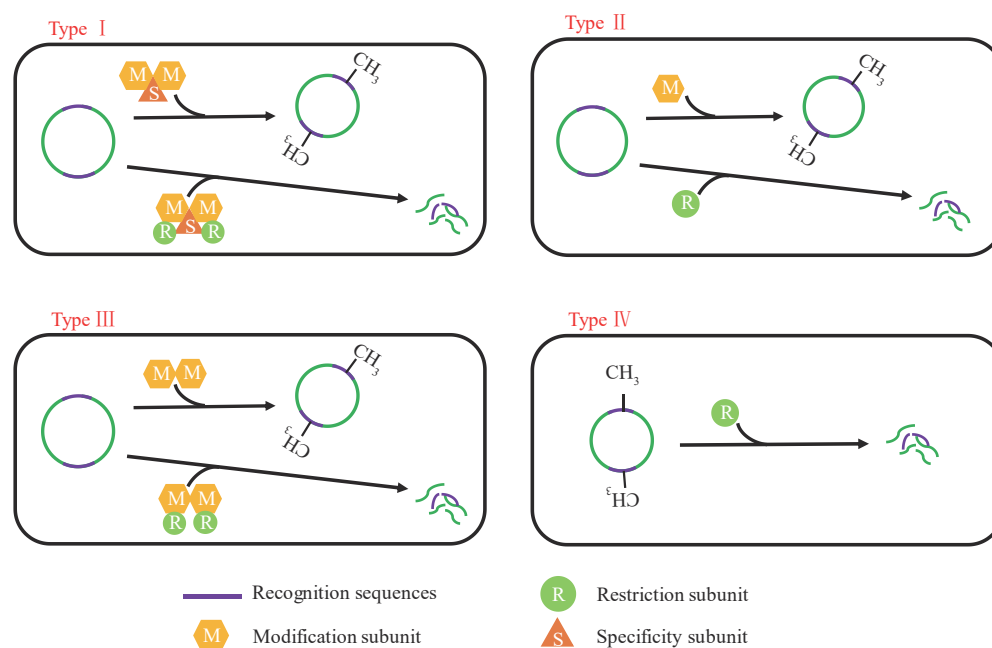


图1 四种限制性修饰系统

Fig. 1 Review of restriction-modification systems

为了让外源基因更容易进入梭菌中，可以通过一些特殊操作来提高转化效率，包括通过添加甘氨酸、苏氨酸或溶菌酶来影响细胞壁的生长；通过添加醇来提高细胞膜的增溶作用；优化电穿孔脉冲、操作温度、菌株复苏生长时间等^[20]。其次，可以通过甲基化质粒来有效规避梭菌体内的II型RM系统^[4]。Mermelstein和Papoutsakis^[21]在1993年首次构建了甲基化质粒PAN1和PAN2，它们含有大肠杆菌(*Escherichia coli*)的复制子和抗性标记，并且表达一种来自于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ϕ 3T I噬菌体的甲基转移酶，可以在*E. coli*体内甲基化质粒，以此保护质粒在转入梭菌后免受II型RM系统限制性内切酶的降解。目前，该甲基化质粒PAN1和PAN2被广泛用于*C. acetobutylicum*和梭菌属其他菌株的代谢工程研究^[22]。再次，可以通过基因编辑的手段在分子水平上改造外源DNA或宿主染色体。如删除质粒上的所有限制酶识别位点基因来规避梭菌的II型RM系统，显而易见，这是一个很难广泛应用的方法，而且在删除了大量小片段后，对基因的表达也会产生很多不可预知的后果；改造并挑选出限制酶缺陷型菌株^[23]，该方法可以彻底解除梭菌RM系

统的限制，但是该改造菌株很难获得。最后，在接合转移过程中，DNA是以单链形式转移，也就是说，理论上接合转移可以规避RM系统^[16]，而且对于某些梭菌而言，如丁酸梭菌(*C. butyricum*)^[24]，已被证明很难使用电转化法，只能通过接合操作实现基因的转移。但接合转移并不能广泛应用，而且也有实验证明接合转移并不能完全规避RM系统^[17]。

目前，在一些模式菌株中，例如*C. acetobutylicum*、杨氏梭菌(*C. ljungdahlii*)、食纤维素梭菌(*C. cellulovorans*)和*C. pasteurianum*^[4]等，已经开发了一些规避限制内切系统的方法，但更多非模式菌株依然面临外源质粒转化效率低甚至无法导入外源DNA的问题，如何在更多梭菌菌株中开发导入外源DNA的方法，是扩大可用的宿主菌范围、提高梭菌转化效率和进一步优化代谢工程的重要前提。

2 梭菌的遗传改造工具

2.1 基于游离质粒的基因过表达

以质粒为载体携带基因在宿主体内实现过量

表达是微生物遗传代谢改造中的常用方法。梭菌通常使用同时含有 *E. coli* 和梭菌的复制子的穿梭型质粒，以便于遗传转化。现如今，基于游离质粒的代谢改造常用的表达载体，是 N. P. Minton 等^[25] 在 2007 年开发的 pMTL 系列质粒，这是一种标准化的 *E. coli* 和梭菌的穿梭质粒。该系列质粒中均含有 1 个革兰氏阳性细菌（肉毒梭菌 *C. botulinum* NCTC2916、*C. butyricum*、*C. difficile* 或 *B. subtilis*）的复制子和 1 个革兰氏阴性细菌（*E. coli*）的复制子、4 个抗性标记基因（甲砒霉素、红霉素/林可霉素、壮观霉素或四环素）、多克隆位点^[25-26]。

自从外源质粒可以被高效转入梭菌后，这种基于质粒的基因过表达手段就成为了梭菌遗传代

谢改造的首选工具。在过去的 20 多年里，有大量基于质粒进行基因表达的研究报道，其中大部分都是关于 *C. acetobutylicum*，其代谢途径中的几个重要的基因，如 *adhE2*（aldehyde/alcohol dehydrogenase，醛/醇脱氢酶）^[27]、*spo0A*（sporulation transcription factor，孢子形成转录因子）^[28] 和 *hydA*（hydrogenase，氢化酶）^[29] 等，都已经成功过表达，并在一定程度上提高了丁醇等溶剂的产量（表 1）。但是，单纯过表达某一代谢途径内的基因可能会对菌体产生一些不可预知的后果，而且质粒的不稳定性以及需要昂贵的抗生素加以维持等原因严重限制了其在工业上的应用。

表 1 梭菌遗传操作工具比较

Tab. 1 Comparison of different genetic tools applicable in *Clostridium*

遗传操作工具	优点	缺点	梭菌菌株	基因	文献
基于游离质粒的基因过表达	设计简单,易于操作	质粒不稳定,需靠抗生素维持	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>C. acetobutylicum</i> DSM 792 <i>C. paraputrificum</i> M-21 <i>C. tyrobutyricum</i> JM1 <i>C. tyrobutyricum</i> ATCC 25755 <i>C. perfringens</i> SM101 <i>C. cellulolyticum</i> H10	<i>spo0A</i> , <i>hydA</i> , <i>adhE2</i> , <i>adC</i> , <i>groESL</i> , <i>txeR</i> , <i>tcdC</i> , <i>pdC-adhII</i>	[28-38]
反义 RNA 技术	致死率低,易于筛选	仅在转录水平调控	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>ptb</i> , <i>buk</i> , <i>CoAT</i>	[39-41]
转座子突变技术	可用于建立突变体库	难以控制插入位点	<i>C. difficile</i> CD37 <i>C. perfringens</i> Strain 13	random	[42-43]
二型内含子技术	操作简单,几乎适用于所有梭菌	脱靶概率较大,存在极性效应	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	<i>glcG</i> , <i>cbei2385</i> , <i>xylR</i> , <i>bdhA</i> , <i>bdhB</i> , <i>ptb</i> , <i>ack</i> , <i>adc</i>	[44-47]
同源重组	可精确进行基因编辑	同源重组效率很低	<i>C. acetobutylicum</i> NCIMB 8052	<i>gutD</i> , <i>spo0A</i>	[48]
反筛标记介导的等位基因替换	相比纯粹的等位基因替换,效率有所提升	受制于第一次单交换效率	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>adh</i>	[49]
I-Sce I 归巢内切酶介导的等位基因替换	适用范围广,在革兰氏阳性和阴性菌中均可使用	设计复杂,操作烦琐,周期长	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	<i>adc</i> , <i>glcG</i> , <i>xylR</i>	[50]
噬菌体丝氨酸重组酶介导的位点特异性基因编辑技术	适用于大片段 DNA 快速整合到宿主染色体上	受限于附着位点 attb/p,应用范围小	<i>C. ljungdahlii</i> DSM 13528	<i>thl</i> , <i>crt</i> , <i>bcd</i> , <i>etfB</i> , <i>etfA</i> , <i>hbd</i> , <i>ptb</i> , <i>buk</i>	[51]
Red/ET 重组酶介导的同源重组	所需同源臂较短、不受限制性酶切位点限制	尚不完善	<i>C. acetobutylicum</i> SMB009	<i>ermC</i>	[52]
CRISPR/Cas9 系统介导的基因编辑	提高同源重组效率,可实现精确编辑	毒性大,很难获得转化子	<i>C. acetobutylicum</i> DSM792 <i>C. saccharoperbutylaceticum</i> N1-4 <i>C. cellulovorans</i> <i>C. autoethanogenum</i> DSM10061	<i>hprK</i> , <i>cac1502</i> , <i>pta</i> , <i>buk</i> , <i>cloce12243</i> , <i>adhE1</i> , <i>ctf</i> , <i>pyrE</i> , <i>2,3-bdh</i>	[53-57]
CRISPR/Cas9n 系统介导的基因编辑	相比于 CRISPR/Cas9 毒性有所降低,转化子数目增加	仍有毒性,转化子依然偏少	<i>C. cellulolyticum</i> H10 <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052	<i>pyrF</i> , <i>spo0A</i>	[58-59]
CRISPR/dCas9 系统介导的基因表达下调	相比于 CRISPR/Cas9 毒性大大降低,易于得到转化子	依赖于 sgRNA 和基因;仅在转录水平调控	<i>C. pasteurianum</i> ATCC 6013 <i>C. acetobutylicum</i> DSM792	<i>hprK</i> , <i>glpX</i>	[53]

2.2 反义RNA

反义RNA (antisense RNA) 技术是指通过信使RNA (mRNA) 在体内非共价结合目标RNA从而沉默基因表达来达到使基因失活的目的。通常, mRNA结合靶标RNA后, 或通过封闭核糖体结合位点, 即阻碍目标RNA与核糖体的相互作用以阻止靶标RNA翻译; 或通过改变靶标RNA的结构, 使得RNA酶可以降解靶标RNA。

在基于II型内含子的基因敲除技术取得重大进展之前, 反义RNA技术是梭菌代谢工程中最常用的工具。1999年反义RNA被首次应用在*C. acetobutylicum*中^[39], 利用该技术失活*ptb* (phosphotransbutyrylase, 磷酸转丁酰酶) 和*buk* (butyrate kinase, 丁酸激酶) 两个基因, 实验证明该策略成功降低了各自的酶活。2003年Tummala等^[40]利用反义RNA来下调*CoAT* (coenzyme A-transferase, 辅酶A转移酶) 基因的表达, 成功降低了丙酮的产量。2009年Sillers团队^[41]通过联合反义RNA技术与质粒过表达成功实现了丁醇和乙醇产量的同时提升。因此, 反义RNA技术可以与过表达方法一起用于梭菌代谢工程。

对于遗传工具十分有限的梭菌来说, 反义RNA是最简单的遗传操作技术。它只需要一个穿梭载体、一个组成型或诱导型启动子、一套可行的质粒转移方法以及靶基因的序列数据。而且因为反义RNA只是将基因下调, 并不会完全敲除基因, 所以致死性并不高^[60], 也更容易筛选出可靠的突变体。但反义RNA技术仅在转录水平调控, 而且存在一定的脱靶概率。另外, 该技术和基于游离质粒的基因过表达存在共同的缺点, 就是都需要抗生素来维持质粒, 这样改造后的菌株并不适合工业应用。

2.3 转座子和II型内含子

转座子, 又称跳跃基因, 是一段能够自主复制和移位的DNA序列。当其从原位上复制或脱离而插入到某个基因时, 就可能引起基因突变或失活^[61]。基于此原理, 转座子随机诱变技术应运而生, 即利用转座子随机插入诱变某些基因, 获得大量的突变菌株, 从中筛选目标菌株。目前, 该

技术在梭菌属中的应用主要集中在两类致病菌: 产气荚膜梭菌 (*C. perfringens*) 和艰难梭菌 (*C. difficile*)^[62]。研究学者已经在*C. perfringens*中先后建立了Mu、EZ-Tn5以及mariner介导的转座子突变系统^[42, 63-64]; 在*C. difficile*中先后建立了Tn916、Tn5397和mariner转座子随机突变系统^[43, 65-66]。另外, 近年来也有研究者在工业梭菌中建立相应的突变体库, 如2016年Zhang等^[67]在*C. acetobutylicum* ATCC 824中建立了一套基于mariner转座子随机突变系统, 并成功在200多个筛选分离得到*spoOA*突变菌株。转座子随机诱变技术适合建立高质量的随机突变库, 但是该技术并不能进行靶向敲除, 无法实现定点编辑, 与其他技术联合使用将有望解决这一问题。

II型内含子是一类主要存在于线粒体中的内含子, 具有酶催化功能。当转录成RNA后, 它通过自我剪接离开mRNA前体, 并与内含子编码蛋白 (introns encode proteins, IEP) 形成复合体。在IEP的帮助下, 内含子RNA可以插入到宿主染色体的特定位点中, 经过反转录, 在目的基因内部插入一段DNA序列, 使目的基因失活^[11, 68]。基于此, TargeTron技术应运而生^[25, 69]。由于TargeTron依赖的是II型内含子的特异性位点插入而不是同源重组, 因此非常适合梭菌的基因失活, 而且该项技术并不具有宿主特异性, 几乎可以应用于所有的梭菌^[70]。

目前, TargeTron技术已经被广泛应用到各种梭菌中^[44-47]。例如2014年, Hönicke等^[71]利用该技术分别在*C. acetobutylicum*中敲除*pta* (phosphotransacetylase, 磷酸转乙酰酶)、*ptb*和*adc* (acetoacetate decarboxylase, 乙酰乙酸脱羧酶) 这三个基因。2016年, 刘俊等^[72]利用该技术来下调*Cbei_4110*基因的表达以提高拜氏梭菌 (*C. beijerinckii*) 的NADH和ATP水平来最终增强丁醇的产量。

尽管TargeTron技术在梭菌中已证明其实用性^[73], 但是II型内含子介导的基因敲除仍存在一定的固有局限性。例如小于400 bp的基因序列在设计时很难找到插入位点; 有一定的脱靶概率, 内含子可能会插入到宿主基因组的其他位点; 该技术是通过内含子的定点插入而使目的基因失活,

根据内含子 RNA 插入的具体位点的不同, TargeTron 引起的基因失活可以分为条件性和非条件性失活^[74], 所以在条件性失活的情况下, 靶基因的功能可能不会完全被消除, 甚至可能恢复^[75]; 可能造成极性效应, 即可能影响插入位点下游基因的表达^[76]。

2.4 同源重组

同源重组, 即通过单/双交换过程进行等位基因交换, 是一种经典的遗传操作工具。在 1994 年就已经有研究报道^[48]。它可以实现靶基因无痕的点突变、定点插入或精确删除等操作。但是由于梭菌 DNA 修复能力较弱、质粒转化效率低, 导致同源重组效率极低, 获得阳性单交换突变株或阳性双交换突变体的概率非常低^[77], 需要经过多次重复传代以及大量的验证。

2012 年, Heap 等^[49]建立了适用于筛选分离双交换突变体的体系, 即等位基因偶联交换 (allele-coupled exchange, ACE), 可以实现在不使用质粒编码的反选择的情况下对双交叉突变体进行有效选择。他们利用乳清酸磷酸核糖基转移酶基因 *pyrE* 作为一种反筛选因子, 并以尿嘧啶 (uracil) 和 5-氟乳清酸 (5-fluoroorotic acid, 5-FOA) 两种成分作为筛选压力, 通过两次双交换实现了外源基因的定点插入; 在此基础上, 加入红霉素抗性基因 *ermB*, 通过两种筛选标记的轮替使用, 实现了外源基因在目标靶点的连续插入, 最终将来自于 λ 噬菌体的约 46 kb 的基因组 DNA 整合到 *C. acetobutylicum* 染色体上。该方法有效提高了同源重组的筛选效率, 并且基于 *pyrE* 的筛选方法也为分离双交换染色体提供了新思路。

另外, 也可以通过在梭菌中引入归巢内切酶 I-Sce I 系统, 来提高同源重组效率。I-Sce I 是啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 线粒体中的 I 型内含子编码的一种限制性内切酶, 它能识别并切割特定的序列, 并产生一个双链缺口 (double-stranded break, DSB), 在有同源序列存在的条件下, 会迫使梭菌启动 DNA 修复机制, 从而提高同源重组效率。2015 年, Zhang 等^[50]利用 I-Sce I 归巢内切酶介导的等位基因替换技术成功实

现了梭菌中的基因敲除和点突变。该系统具有适用范围广的特点, 在革兰氏阳性和阴性菌中均可使用, 对宿主的选择并无特别要求; 而且该系统可以实现无痕操作, 不会在删除基因的位置留下疤痕 (scar)。但是该系统存在设计复杂、操作烦琐的问题, 根据文献报道, 基于内含子的 TargeTron 技术可以在两周内获得突变菌株^[69], 而 I-Sce I 归巢内切酶介导的系统则最少需要 1 个月的时间。

虽然通过引入反向筛选标记或者归巢内切酶 I-Sce I 的方法可以帮助筛选出双交换突变株, 提高同源重组效率。但仍然面临着较长的操作周期和第 1 次单交换效率较低等问题, 该技术瓶颈的突破寄希望于新的基因编辑工具^[52, 78]。

2.5 CRISPR/Cas 系统

CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins system), 是原核生物中的一种适应性免疫系统, 原核生物使用该系统抵抗病毒等外源遗传物质的入侵^[79]。自 2002 年被正式命名为 CRISPR/Cas 之后^[80], 经过各国研究学者多年的探索, CRISPR/Cas 系统的结构、功能等特点日渐清晰, 该系统于 2013 年被 Mail 等^[81]和 Cong 等^[82]率先应用于人类和哺乳动物小鼠胚胎干细胞的基因编辑中, 从此 CRISPR/Cas 系统作为一种新的基因编辑工具被广泛应用。由于目前 CRISPR/Cas 系统中最常用的核酸内切酶是 Cas9 蛋白, 所以该系统也被称为 CRISPR/Cas9 系统。到目前为止, CRISPR/Cas9 系统已经应用于许多梭菌的遗传改造, 如 *C. acetobutylicum*、*C. beijerinckii*、产乙醇梭菌 (*C. autoethanogenum*)、*C. difficile*、*C. cellulolyticum*、*C. pasteurianum*、*C. ljungdahlii* 和糖乙酸多丁醇梭菌 (*C. saccharoperbutylacetonicum*)^[53-57]。

最初在梭菌中引入 CRISPR/Cas9 系统是为了提高筛选重组菌株的效率, 因为在向导 RNA 的引导下, Cas9 蛋白可以精确定位在梭菌基因组的某个目标序列上, 并剪切 DNA 双链 [图 2(a)], 迫使梭菌不得不启用 DNA 修复系统以完成同源重组, 而未能完成同源重组的菌株将被淘汰, 这大

大加快了获得第1次单交换阳性突变株的进程^[58, 83-84]。然而问题是,在梭菌体内,Cas9蛋白的强表达会产生一定毒性,导致梭菌死亡。因为被Cas9蛋白剪断的DNA需要通过同源重组(homologous recombination, HR)或者非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)来恢复^[85-86],然而,大部分的梭菌没有NHEJ的机制,并且自身同源重组的效率也很低^[87],这就导致在梭菌中断裂的DNA很难完成修复,即Cas9蛋白对梭菌的杀伤性太大,很难长出转化子。

为了改善这个问题,有研究学者提出用Cas9n(Cas9 nickase, Cas9刻痕酶)替代Cas9进行基因编辑。Cas9n是Cas9的突变体,只能切割DNA的1条链[图2(b)],所以对细胞的毒性较小。DNA单链断裂不仅可以降低Cas9蛋白对梭菌的致死性,而且也更容易通过同源重组得到修复。这种策略有效提升了CRISPR/Cas9系统在梭菌中的基因编辑效率。例如Xu等^[59]首次在*C. cellulolyticum*中使用Cas9n系统,实现了*pyrF*(乳清苷-5'-单磷酸脱羧酶, orotidine-5'-monophosphate decarboxylase)基因敲除,基因编辑效率高达100%。

dCas9(deficient Cas9)是Cas9蛋白的另一种

突变体,它可以结合到特定的DNA序列上,但是缺乏内切酶活性不能切割DNA序列[图2(c)],所以它可以用来抑制基因表达。基于此原理,开发出了CRISPR干扰系统(CRISPR interfere, CRISPRi),该系统已经成功应用于*C. acetobutylicum*和*C. beijerinckii*^[53, 55, 58, 84],它为下调基因表达提供了另一种途径。2016年,中国科学院杨晟团队^[58]开发了dCas9介导的基因调控系统,成功抑制了*spo0A*在*C. acetobutylicum* ATCC 824和*C. beijerinckii* NCIMB 8052中的表达,抑制效率分别为45%和84%。

另一种可以降低Cas9蛋白对细胞毒性的方法是使用诱导型启动子,该方法在细胞生长中后期诱导Cas9蛋白表达,可以有效降低致死率和提高转化率。近几年,不断有人在梭菌中应用各种诱导型启动子来表达Cas9蛋白,如2016年,Wang等^[84]在*C. beijerinckii*中用诱导型*spoIIIE*启动子和乳糖启动子表达Cas9蛋白,将转化率提高到 1.05×10^2 cfu/ μ g DNA;同年,Nagaraju团队^[57]在*C. autoethanogenum*中用四环素诱导型启动子表达Cas9蛋白,使得CRISPR/Cas9介导的基因敲除效率提高到50%以上。

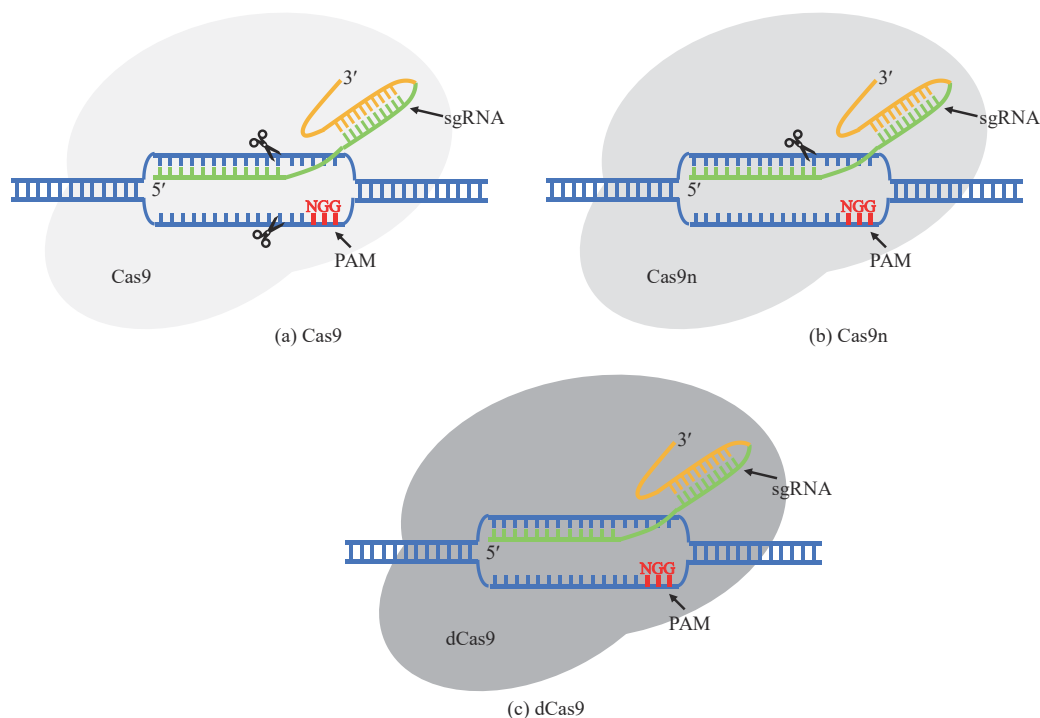


图2 CRISPR/Cas系统原理示意图

Fig. 2 Review of CRISPR/Cas genetic modification systems

CRISPR/Cas 系统也有望与其他基因编辑工具结合使用。例如, Xu 等^[59, 88]在 2017 年开发了 Cas9n 辅助的 RNA 抑制系统, 即将 CRISPR/Cas 系统和反义 RNA 结合使用, 实现了对靶基因的高效抑制。另外, 2019 年, Strecker 等^[89]在 *Science* 发表了一篇文章, 创造性地将 CRISPR/Cas 系统与转座子技术相结合, 通过 CRISPR RNA (crRNA) 的靶向引导, Tn7 样转座子被定向到目标位点, 并将约 60 bp 的 DNA 片段插入到原间隔区的下游, 编辑效率高达 80%。该研究扩展了 CRISPR/Cas 系统的功能多样性, 并挖掘了利用 Tn7 样转座子进行基因组编辑的潜力; 此外该技术不需要依靠同源重组技术, 也不需要正向筛选, 就可以实现外源基因在宿主染色体上的定点整合。但是目前梭菌中还没有开发该系统, 若能补充相关元件, 如 CRISPR 相关转座酶, 该系统有望被引入梭菌中以解决自身同源重组效率低下的技术瓶颈^[70]。

在梭菌中, 除了可以利用来自于链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的外源 CRISPR/Cas 系统进行遗传操作, 还可以基于内源性 CRISPR/Cas 系统进行基因编辑。研究发现 74% 的梭菌中存在有 CRISPR/Cas 位点^[90], 目前, 已经在 *C. pasteurianum*^[90]、酪丁酸梭菌 (*C. tyrobutyricum*)^[91]、*C. saccharoperbutylacetonicum*^[54]、*C. butyricum*^[92]、*C. botulinum*^[93]、产孢梭菌 (*C. sporogenes*)^[93] 和 *C. thermocellum*^[94] 中, 开发出基于各自内源性 CRISPR/Cas 系统的基因编辑工具。例如: 2016 年, Pyne 等^[90]在 *C. pasteurianum* 中分别开发基于外源性和内源性的 CRISPR/Cas 系统, 研究发现表达外源 Cas9 蛋白的质粒很难转入 *C. pasteurianum* 中, 而且外源 CRISPR/Cas 系统的编辑效率只有 25%; 相比之下, 内源性 CRISPR/Cas 系统的效率高达 100%。在此之后, 2018 年, 张杰等^[91]在 *C. tyrobutyricum* 中也开发了基于内源 I-B 型 CRISPR/Cas 系统的基因组编辑工具。首先, 利用该系统成功敲除了孢子形成相关基因 *spoOA*, 编辑效率高达 100%; 其次, 通过利用乳糖诱导型启动子驱动向导 RNA 转录, 实现了多重基因组编辑 (同时敲除

spoOA 和 *pyrF* 两个基因), 编辑效率同样高达 100%; 最后, 利用该系统重新设计 *C. tyrobutyricum*, 通过敲入 *adhE2* 和敲除 *cat1*, 使其高效生产丁醇, 获得的改造菌株在批次发酵中丁醇产量高达 26.2 g/L, 创历史新高。2021 年, Zhou 等^[92]在开发 *C. butyricum* 的基因编辑工具时发现, 与在 *C. butyricum* 中开发的异源 II 型 CRISPR/Cas9 系统相比, 内源性 CRISPR/Cas 系统具有较大的优势。首先, 内源性 CRISPR/Cas 系统不需要表达 Cas9 蛋白, 可以减小载体的大小, 降低该系统对细胞的毒性。该实验表明, 携带有 4.1 kb 的 Cas9 的大质粒导致接合效率降低了约 100 倍。其次, 内源性 CRISPR/Cas 系统的向导 RNA 更加紧凑, 这将简化质粒构建过程, 尤其是在使用多重编辑策略时。最后, 内源性 CRISPR/Cas 系统中用于基因靶向的间隔序列 (34~37 nt) 比异源 CRISPR/Cas9 系统中使用的间隔序列 (20 nt) 长得多, 这可以降低脱靶概率, 但实验表明用于基因编辑的间隔区的大小可能具有菌株特异性^[91]。上述研究结果为在梭菌中利用内源性 CRISPR/Cas 系统进行基因编辑提供了必要的参考和有价值的指导。

到目前为止, 基于 CRISPR/Cas 系统的基因编辑工具为梭菌属的遗传改造做出了重大贡献, 成为现如今最热门的遗传改造工具。这种颠覆性的技术极大丰富了梭菌的遗传改造工具, 并且加速了梭菌的代谢工程的研究。但是在梭菌中, 利用 Cas9 蛋白切割 DNA 双链后, 仍需依赖梭菌自身进行同源重组, 即梭菌天然的同源重组能力仍然是该技术的瓶颈。为突破这一技术障碍, 近几年, 有研究学者尝试在梭菌中引入外源重组酶的方法来进一步提高梭菌的基因编辑效率。

2.6 基于噬菌体重组酶的基因编辑技术

梭菌的真正生物价值在于它们能够生产多种化学品和生物燃料, 而不仅仅是其有限的内源性产物。这就需要一套高效简便的遗传改造工具, 能够在梭菌体内构建全新的代谢途径。到目前为止, 梭菌可用的遗传操作工具有基于游离质粒的基因过表达、反义 RNA 技术、二型内含子技术、

基于同源重组和 CRISPR/Cas 系统的基因编辑技术。上述方法均能在一定程度上对梭菌进行遗传改造,至于引入外源大片段 DNA 以构建新的代谢途径,仅有基于游离质粒的基因过表达和基于同源重组基因编辑技术比较成熟。但是,对于前者,游离质粒的不稳定性严重限制了改造菌株在工业上的应用;而后者设计复杂,操作烦琐,费时费力,也不是一个理想的基因编辑工具。此外,最近几年在梭菌体内开发使用的 CRISPR/Cas 系统,在基因敲除、定点突变以及反向筛选等方面被证明是有效的,如 2018 年, Hong 等^[95]利用 CRISPR 系统首次在 *C. difficile* 中实现了多重基因组编辑(同时敲除 *cwp66* 和 *tcdA* 两个基因)和长达 49.2 kb 的超大基因敲除。但是目前利用该系统将大片段 DNA 整合到染色体上还很难做到,因为梭菌自身的同源重组效率极低。总之,对梭菌而言,目前仍缺少可以高效稳定地整合大片段 DNA 的方法。为突破这一技术瓶颈,更好地实现将大片段外源 DNA 整合进梭菌染色体中,研究人员尝试将重组酶导入到梭菌中,试图在梭菌中构建一套外源重组系统,以期无需依赖梭菌体内效率低下的自然重组。

2019 年,中国科学院上海植物生理生态研究所姜卫红团队^[51]开发了一种噬菌体丝氨酸重组酶介导的位点特异性基因组工程技术。这一技术的核心是附着/整合(attachment/integration, Att/Int)系统,由噬菌体丝氨酸重组酶(bacteriophage serine integrases)介导,通过噬菌体附着位点(attP)和梭菌染色体附着位点(attB)在染色体上进行精确的 DNA 重排^[96]。与同源重组不同,基于丝氨酸整合酶的位点特异性重组不需要额外的同源臂、内源性修复机制或辅因子,而且它十分稳定且易于操作,尤其适用于大 DNA 片段的快速整合到宿主染色体上^[97-98]。

该团队首先在 *C. ljungdahlii* 中构建了一套附着/整合(Att/Int)系统。为了验证这个系统,他们将来自于 *C. acetobutylicum* 的丁酸合成途径(butyric acid production pathway, BAPP)整合进 *C. ljungdahlii* 染色体中,并在发酵产物中成功检测到了丁酸。该系统丰富了可用于 *C. ljungdahlii* 的基

因编辑工具,在一定程度上克服了 *C. ljungdahlii* 在大片段 DNA 染色体整合方面的不足。但是也存在一些问题,如交叉重组时会不可避免地将额外的质粒骨架整合进染色体中;此外,到目前为止,能使用该技术的梭菌还是少数,大部分的梭菌也没有鉴定过的噬菌体附着位点 attP 和染色体附着位点 attB。所以 Att/Int 系统是否可以在更多梭菌菌株中作为遗传改造工具仍有待探索。

经研究发现,一些噬菌体可以帮助细菌实现高效的基因重组,其中发挥关键作用的是一类特殊的重组酶^[99],它们由来自于 *E. coli* λ 噬菌体的 Red α/β 蛋白,或 Rac 前噬菌体的重组蛋白 RecE/T 组成。其中, RecE 和 Red α 具有 5'-3' 端的核酸外切酶活性, RecT 和 Red β 是单链退火蛋白。其主要原理是在重组酶的帮助下,异源 DNA 可以整合到新合成的 DNA 中,从而将突变引入后代细胞。大致过程如下(图 3):对于外源双链 DNA,首先由 RecE 或者 Red α 从 5' 端酶切双链 DNA 分子,产生局部的 3' 端单链末端并立刻与单链退火蛋白 RecT 或者 Red β 结合,防止单链被降解,并在 RecT 或者 Red β 的帮助下找到同源序列,完成同源重组。当外源单链 DNA 分子作为重组底物时,则只需要单链退火蛋白 RecT 或者 Red β 就可完成基因重组^[100]。

相较于其他的遗传改造工具,基于 Red α/β 或 RecE/T 开发的 Red/ET 重组系统具有所需同源臂较短、不受限制性酶切位点限制、不容易引入突变等优点。现如今, Red/ET 重组技术已被广泛应用于各种分子遗传改造。包括:①基因敲除、敲入和替换,利用 Red/ET 重组系统通过一步重组就可以将带有同源臂的 DNA 片段插入到质粒或宿主染色体中;或者可以将同源序列之间的序列替换成外源的目的序列。2009 年 Sharan 等^[101]利用 λ 噬菌体的 Red 重组系统成功在 *E. coli* 中实现了基因敲除、缺失和点突变,这些重组菌大约在 1 周的时间就可以构建完成,充分体现了该重组技术的简单快捷。②直接克隆或者亚克隆,其中直接克隆是应用更为广泛的一种基因操作,其基本的流程就是将 1 个带有复制起点、标记基因以及同源序列的 DNA 载体片段,与 1 个用内切酶处理过的基因组 DNA 片段共同转化进含有 RecE/T 的 *E. coli* 中,在

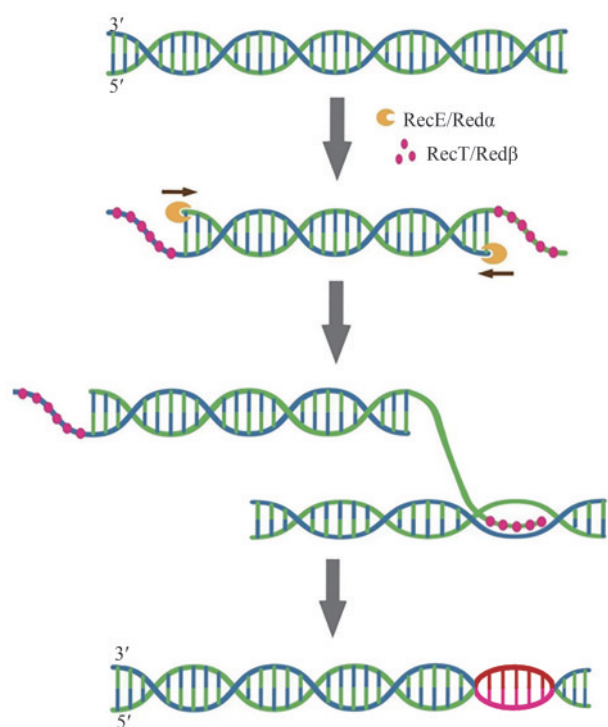


图3 RecET/Red $\alpha\beta$ 重组酶介导的同源重组过程

Fig. 3 RecET/Red $\alpha\beta$ recombinase-mediated homologous recombination process

E. coli 内完成连接，形成能够稳定复制、具有一定抗性的质粒。最后通过筛选得到重组转化子。

由于 Red/ET 重组系统能够精确、便捷、快速地对 DNA 进行修饰，除了上述单纯使用该重组系统进行遗传改造以外，还可以与其他分子生物学技术联合使用，可以实现质粒或染色体的无痕修饰、模块替换或者单个碱基的修饰。2015 年，Reisch 等^[102]首次在 *E. coli* 中实现了 Red 重组系统与 CRISPR/Cas 技术的联合使用，开发了无痕 Cas9 辅助重组工程 (scarless Cas9 assisted recombineering, no-SCAR)。该重组工程可以在没有染色体标记的情况下编辑 *E. coli* 基因组，它利用 λ -Red 重组酶将外源 DNA 片段整合到宿主染色体上，并利用 Cas9 蛋白切割双链 DNA 的特点进行筛选。实验证明，该系统可以成功 *E. coli* 染色体上进行点突变、基因缺失和短序列插入等基因操作，并且不会留下标记。另外，在 *E. coli* 中，也已经开发了基于 RecT 家族蛋白可大规模应用的基因重组工程，例如 MAGE^[103-104] (multiplex automated genome engineering) 和 TRMR (trackable multiplex recombineering)。除 *E.*

coli 外，在耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*)、结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 和丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 中也先后建立了以该重组酶为核心的基因重组工程技术^[105-107]。

近年来，Red/ET 重组系统在梭菌中的应用也逐渐受到关注。2014 年，中国科学院微生物研究所张延平等^[52]成功证明了来自 *C. perfringens* 的单链退火蛋白 RecT 可以在 *C. acetobutylicum* 中发挥作用，使 *C. acetobutylicum* 可以对外源单链 DNA 进行重组，这有效证实了 Red/ET 重组系统在梭菌中的应用潜力，该工作将有助于后续开发梭菌的重组工程。探究核酸外切酶 RecE 或者 Red α 在梭菌中的表达情况，以及利用该系统在梭菌中实现双链 DNA 重组的可能性应是今后努力的方向。2019 年，Walker 等^[94]在 *C. thermocellum* 中分别建立了基于内源性 I-B 型和异源 II 型 CRISPR/Cas 系统，研究发现，这两种系统都受限于修复模板和宿主基因组之间的同源重组效率。研究者试图通过引入外源重组酶来突破这一限制，从 3 种重组酶中，研究者最终确定来自于喜温嗜酸硫杆菌 (*Acidithiobacillus caldus*) 的 Red α 和 Red β 可以在 *C. thermocellum* 正常发挥作用。当在 *C. thermocellum* 体内表达重组酶时，I-B 型 CRISPR/Cas 系统的编辑效率从 40% 提高到 71%；II 型 CRISPR/Cas 系统从 12.5% 到 94%。该研究通过将 CRISPR 系统与重组酶联合使用，实现了在 *C. thermocellum* 中的高效编辑，这充分表明了重组酶有望突破梭菌自身同源重组限制的巨大潜力。

3 展望

梭菌在工业、食品、生命健康等领域具有重要的研究及应用价值，然而对于梭菌的研究一直受限于其不完善的遗传改造工具，目前梭菌的分子改造工具无法充分挖掘这一类重要微生物所拥有的生物潜力。近年来，随着基因组学和分子生物学的快速发展，针对梭菌遗传工具的研究取得

了较大进展^[3], 开发出了一系列用于基因失活、删除、表达和重组的新工具。

如上文所述, 梭菌的分子遗传改造技术经历了质粒过表达、反义RNA、转座子、II型内含子、同源重组以及CRISPR/Cas技术等不同阶段, 已经实现了从随机突变到精准靶向改造、从低的转化效率到高效基因编辑的重大突破, 梭菌的生理、生化以及代谢机制等方面得以阐明。对于如*C. acetobutylicum*、*C. beijerinckii*、*C. tyrobutyricum*等极具潜力的工业菌株而言, 逐步开发并完善的遗传改造工具在抗逆菌株的选育、产物合成途径的改造、发酵过程的优化以及高效细胞工厂的打造等方面起到了核心作用; 对于*C. perfringens*和*C. difficile*等病原微生物而言, 简便高效的基因编辑工具在其致病机制的阐明、防止措施的制定等方面起到了重要作用。虽然近年来梭菌分子改造技术已经取得了长足的进步, 但仍存在一些问题, 完善现有的技术并积极开发先进的技术应用于梭菌中仍是今后努力的方向。

基于此, 下文对梭菌遗传工具存在的问题以及改进建议作进一步讨论。①由于大部分梭菌中都含有限制性修饰系统, 这严重阻碍了外源基因的表达。如何规避RM系统以降低梭菌的转化难度是优化梭菌基因编辑工具的首要问题。借助基因组学, 确定RM系统相关基因, 并加以改造, 筛选得到限制性修饰系统存在缺陷的突变菌株, 这将极大简化后续遗传改造的操作过程。②由于梭菌极低的同源重组率, 导致重组实验过程费时费力。通过引进一些其他微生物中比较成熟的技术方法, 如上文中提到的噬菌体重组酶技术, 在梭菌中进行整合和改良, 以期不依赖于梭菌自身极低的同源重组效率。我们可以进一步挖掘并优化噬菌体重组元件, 在更多梭菌菌株中构建位点特异性重组及Red/ET重组系统。③梭菌自身的代谢途径并不能满足工业化生产的要求, 必须要依靠于大片段DNA整合到宿主染色体上以实现外源途径的异体表达, 所以必须发展简单高效的染色体整合技术。上文中提到的Red/ET重组系统有望实现大片段外源基因的定点整合并且有望于解决梭菌自身同源重组低下等的瓶颈问题, 但目前梭菌

中该重组工程的研究很少, 需要进一步探索与优化。④加强CRISPR/Cas基因编辑技术在梭菌中的使用, 例如开发以CRISPR/Cas技术为核心的多位点共编辑系统以及加强CRISPR/Cas技术与其他分子工具的联合使用。⑤挖掘新的更强大的分子操作工具, 如噬菌体重组酶介导的多拷贝定点和随机整合技术、位点特异性重组系统在梭菌中的应用等。⑥随着合成生物学的兴起, 我们应该重视合成生物学在梭菌中的应用, 设计和合成适用于梭菌的各类生物元件, 在梭菌中开展更为精确的代谢改造, 为开展合成生物学研究奠定基础。

可以预期, 随着分子生物学和合成生物学的进一步发展, 可用于梭菌的基因编辑工具一定可以更加丰富和完善, 梭菌必将能充分发挥其潜在的生物炼制能力, 开创属于梭菌的发酵时代, 为生物能源、生物基化学品的绿色生物合成做出重要贡献。

参 考 文 献

- [1] 刘朝全, 姜学峰, 戴家权, 等. 疫情促变局 转型谋发展——2020年国内外油气行业发展概述及2021年展望[J]. 国际石油经济, 2021, 29(1): 28-37.
LIU C Q, JIANG X F, DAI J Q, et al. Overview of the domestic and foreign oil and gas industry development in 2020 and outlook for 2021[J]. International Petroleum Economics, 2021, 29(1): 28-37.
- [2] 史硕博, 孟琼宇, 乔玮博, 等. 塑造低碳经济的第三代固碳生物炼制[J]. 合成生物学, 2020, 1(1): 44-59.
SHI S B, MENG Q Y, QIAO W B, et al. Establishing carbon dioxide-based third-generation biorefinery for a sustainable low-carbon economy[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(1): 44-59.
- [3] PAPOUTSAKIS E T. Engineering solventogenic clostridia[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(5): 420-429.
- [4] PYNE M E, BRUDER M, MOO-YOUNG M, et al. Technical guide for genetic advancement of underdeveloped and intractable *Clostridium*[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(3): 623-641.
- [5] JONES D T, WOODS D R. Acetone-butanol fermentation revisited[J]. Microbiological Reviews, 1986, 50(4): 484-524.
- [6] TRACY B P, JONES S W, FAST A G, et al. Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications[J]. Current Opinion in

- Biotechnology, 2012, 23(3): 364-381.
- [7] VAN MELLAERT L, BARBÉ S, ANNÉ J. *Clostridium spores* as anti-tumour agents[J]. Trends in Microbiology, 2006, 14(4): 190-196.
- [8] ARORA R, BEHERA S, SHARMA N K, et al. Evaluating the pathway for co-fermentation of glucose and xylose for enhanced bioethanol production using flux balance analysis[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2019, 24(6): 924-933.
- [9] BANERJEE S, MISHRA G, ROY A. Metabolic engineering of bacteria for renewable bioethanol production from cellulosic biomass[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2019, 24(5): 713-733.
- [10] CHOI Y Y, HONG M E, CHANG W S, et al. Autotrophic biodiesel production from the thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* by enhancing the carbon availability with temperature adjustment[J]. Biotechnology & Bioprocess Engineering, 2019, 24(1): 223-231.
- [11] KWON S W, PAARI K A, MALAVIYA A, et al. Synthetic biology tools for genome and transcriptome engineering of solventogenic *Clostridium*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 282.
- [12] ALEXANDRO E T, ZHANG F. Genome editing using Cas9 nickases[M]. Methods in Enzymology. Volume 546. Elsevier, 2014: 161-174.
- [13] 刘家宇, 杨智晗, 杨蕾, 等. 合成生物技术驱动酪丁酸梭菌细胞工厂开发的研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1174.
LIU J Y, YANG Z H, YANG L, et al. Advances in the development of *Clostridium tyrobutyricum* cell factories driven by synthetic biotechnologies[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1174.
- [14] PYNE M E, MOO-YOUNG M, CHUNG D A, et al. Development of an electrotransformation protocol for genetic manipulation of *Clostridium pasteurianum*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 50.
- [15] MERMELSTEIN L D, WELKER N E, BENNETT G N, et al. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. Nature Biotechnology, 1992, 10(2): 190-195.
- [16] JENNERT K C B, TARDIF C, YOUNG D I, et al. Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319[J]. Microbiology, 2000, 146 (12): 3071-3080.
- [17] PURDY D, O'KEEFFE T A T, ELMORE M, et al. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(2): 439-452.
- [18] RICHARDS D F, LINNETT P E, OULTRAM J D, et al. Restriction endonucleases in *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 and *Clostridium thermohydrosulfuricum* DSM 568[J]. Journal of general microbiology, 1988, 134(12): 3151-3157.
- [19] KLAPATCH T R, DEMAİN A L, LYND L R. Restriction endonuclease activity in *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum*[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1996, 45(1/2): 127-131.
- [20] XUE C, CHENG C. Butanol production by *Clostridium*[M]. Advances in Bioenergy. Volume 4. Amsterdam: Elsevier, 2019: 35-77.
- [21] MERMELSTEIN L D, PAPOUTSAKIS E T. *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage-phi-3T-I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1993, 59(4): 1077-1081.
- [22] MOLITOR B, KIRCHNER K, HENRICH A W, et al. Expanding the molecular toolkit for the homoacetogen *Clostridium ljungdahlii*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31518.
- [23] DONG H J, ZHANG Y P, DAI Z J, et al. Engineering *Clostridium* strain to accept unmethylated DNA[J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9038.
- [24] GONZÁLEZ-PAJUELO M, MEYNIAL-SALLES I, MENDES F, et al. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(1): 96-101.
- [25] HEAP J T, PENNINGTON O J, CARTMAN S T, et al. The Clostron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(3): 452-464.
- [26] LÜTKE-EVERSLOH T. Application of new metabolic engineering tools for *Clostridium acetobutylicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(13): 5823-5837.
- [27] SILLERS R, CHOW A, TRACY B, et al. Metabolic engineering of the non-sporulating, non-solventogenic *Clostridium acetobutylicum* strain M5 to produce butanol without acetone demonstrate the robustness of the acid-formation pathways and the importance of the electron balance[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10(6): 321-332.
- [28] ALSAKER K V, SPITZER T R, PAPOUTSAKIS E T. Transcriptional analysis of *spo0A* overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the cell's response to butanol stress[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(7): 1959-1971.
- [29] GIRBAL L, VON ABENDROTH G, WINKLER M, et al. Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and al-

- gal Fe-only hydrogenases with high specific activities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(5): 2777-2781.
- [30] TOMAS C A, WELKER N E, PAPOUTSAKIS E T. Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4951-4965.
- [31] YU M R, ZHANG Y L, TANG I C, et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for *n*-butanol production[J]. Metabolic Engineering, 2011, 13(4): 373-382.
- [32] KOVÁCS K, WILLSON B J, SCHWARZ K, et al. Secretion and assembly of functional mini-cellulosomes from synthetic chromosomal operons in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 117.
- [33] YU M R, DU Y M, JIANG W Y, et al. Effects of different replicons in conjugative plasmids on transformation efficiency, plasmid stability, gene expression and *n*-butanol biosynthesis in *Clostridium tyrobutyricum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 881-889.
- [34] MANI N, DUPUY B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(10): 5844-5849.
- [35] MANI N, LYRAS D, BARROSO L, et al. Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(21): 5971-5978.
- [36] LEE J Y, JANG Y S, LEE J, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* M5 for highly selective butanol production[J]. Biotechnology Journal, 2009, 4(10): 1432-1440.
- [37] MATAMOUROS S, ENGLAND P, DUPUY B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator *TcdC*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 64(5): 1274-1288.
- [38] GUEDON E, DESVAUX M, PETITDEMANGE H. Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(1): 53-58.
- [39] DESAI R P, PAPOUTSAKIS E T. Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 936-945.
- [40] TUMMALA S B, WELKER N E, PAPOUTSAKIS E T. Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(6): 1923-1934.
- [41] SILLERS R, AL-HINAI M A, PAPOUTSAKIS E T. Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(1): 38-49.
- [42] VIDAL J E, CHEN J M, LI J H, et al. Use of an EZ-Tn5-based random mutagenesis system to identify a novel toxin regulatory locus in *Clostridium perfringens* strain 13[J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6232.
- [43] MULLANY P, WILKS M, TABAQCHALI S. Transfer of Tn916 and Tn916 ΔE into *Clostridium difficile*: demonstration of a hot-spot for these elements in the *C. difficile* genome[J]. FEMS Microbiology Letters, 1991, 63(2/3): 191-194.
- [44] XIAO H, GU Y, NING Y Y, et al. Confirmation and elimination of xylose metabolism bottlenecks in glucose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system-deficient *Clostridium acetobutylicum* for simultaneous utilization of glucose, xylose, and arabinose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(22): 7886-7895.
- [45] XIAO H, LI Z L, JIANG Y, et al. Metabolic engineering of D-xylose pathway in *Clostridium beijerinckii* to optimize solvent production from xylose mother liquid[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(5): 569-578.
- [46] GU Y, DING Y, REN C, et al. Reconstruction of xylose utilization pathway and regulons in firmicutes[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 255.
- [47] COOKSLEY C M, ZHANG Y, WANG H Z, et al. Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(6): 630-641.
- [48] WILKINSON S R, YOUNG M. Targeted integration of genes into the *Clostridium acetobutylicum* chromosome[J]. Microbiology, 1994, 140(1): 89-95.
- [49] HEAP J T, EHSAAN M, COOKSLEY C M, et al. Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(8): e59.
- [50] ZHANG N, SHAO L J, JIANG Y, et al. I-SceI-mediated scarless gene modification via allelic exchange in *Clostridium*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 108: 49-60.
- [51] HUANG H, CHAI C S, YANG S, et al. Phage serine integrase-mediated genome engineering for efficient expression of chemical biosynthetic pathway in gas-fermenting *Clostridium ljungdahlii*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 52: 293-302.
- [52] DONG H J, TAO W W, GONG F Y, et al. A functional *recT* gene for recombineering of *Clostridium*[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 173: 65-67.

- [53] BRUDER M R, PYNE M E, MOO-YOUNG M, et al. Extending CRISPR-Cas9 technology from genome editing to transcriptional engineering in the genus *Clostridium*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(20): 6109-6119.
- [54] WANG S H, DONG S, WANG P X, et al. Genome editing in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 with the CRISPR-Cas9 system[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2017, 83(10): e00233-e00217.
- [55] WEN Z Q, MINTON N P, ZHANG Y, et al. Enhanced solvent production by metabolic engineering of a twin-clostridial consortium[J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 38-48.
- [56] HUANG H, CHAI C S, LI N, et al. CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Clostridium ljungdahlii*, an autotrophic gas-fermenting bacterium[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(12): 1355-1361.
- [57] NAGARAJU S, DAVIES N K, WALKER D J F, et al. Genome editing of *Clostridium autoethanogenum* using CRISPR/Cas9[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 219.
- [58] LI Q, CHEN J, MINTON N P, et al. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*[J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(7): 961-972.
- [59] XU T, LI Y C, SHI Z, et al. Efficient genome editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 nickase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(13): 4423-4431.
- [60] DORNENBURG J E, DEVITA A M, PALUMBO M J, et al. Widespread antisense transcription in *Escherichia coli*[J]. mBio, 2010, 1(1): e00024-e00010.
- [61] 马欣, 高学文. 转座子随机突变芽孢杆菌的研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(3): 394-403.
MA X, GAO X W. Research progress of random mutagenesis of bacillus by use of transposon[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(3): 394-403.
- [62] 顾阳, 杨晟, 姜卫红. 产溶剂梭菌分子遗传操作技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2013, 29(8): 1133-1145.
GU Y, YANG S, JIANG W H. Development in molecular genetic manipulation of solventogenic clostridia[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(8): 1133-1145.
- [63] LIU H L, BOUILLAUT L, SONENSHEIN A L, et al. Use of a mariner-based transposon mutagenesis system to isolate *Clostridium perfringens* mutants deficient in gliding motility[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(3): 629-636.
- [64] LANCKRIET A, TIMBERMONT L, HAPPONEN L J, et al. Generation of single-copy transposon insertions in *Clostridium perfringens* by electroporation of phage mu DNA transposition complexes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(9): 2638-2642.
- [65] CARTMAN S T, MINTON N P. A mariner-based transposon system for *in vivo* random mutagenesis of *Clostridium difficile*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(4): 1103-1109.
- [66] WANG H, ROBERTS A P, LYRAS D, et al. Characterization of the ends and target sites of the novel conjugative transposon Tn5397 from *Clostridium difficile*: excision and circularization is mediated by the large resolvase, TndX[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(13): 3775-3783.
- [67] ZHANG Y, XU S, CHAI C S, et al. Development of an inducible transposon system for efficient random mutagenesis in *Clostridium acetobutylicum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(8): fnw065.
- [68] KUEHNE S A, MINTON N P. ClosTron-mediated engineering of *Clostridium*[J]. Bioengineered, 2012, 3(4): 247-254.
- [69] SHAO L J, HU S Y, YANG Y, et al. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*[J]. Cell Research, 2007, 17(11): 963-965.
- [70] 闻志强, 孙小曼, 汪庆卓, 等. 梭菌正丁醇代谢工程研究进展[J]. 合成生物学, 2021, 2(2): 194-221.
WEN Z Q, SUN X M, WANG Q Z, et al. Recent advances in metabolic engineering of clostridia for *n*-butanol production[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(2): 194-221.
- [71] HÖNICKE D, LÜTKE-EVERSLOH T, LIU Z Y, et al. Chemostat cultivation and transcriptional analyses of *Clostridium acetobutylicum* mutants with defects in the acid and acetone biosynthetic pathways[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(23): 9777-9794.
- [72] LIU J, GUO T, WANG D, et al. Enhanced butanol production by increasing NADH and ATP levels in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 by insertional inactivation of *Cbei_4110*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(11): 4985-4996.
- [73] JANG Y S, IM J A, CHOI S Y, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for butyric acid production with high butyric acid selectivity[J]. Metabolic Engineering, 2014, 23: 165-174.
- [74] WEN Z Q, LU M R, LEDESMA-AMARO R, et al. TargeTron technology applicable in solventogenic clostridia: revisiting 12 years' advances[J]. Biotechnology Journal, 2020, 15(11): 1900284.
- [75] LAMBOWITZ A M, ZIMMERLY S. Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA[J]. Cold Spring Harbor Perspec-

- tives in Biology, 2011, 3(8): a003616.
- [76] HEAP J T, KUEHNE S A, EHSAN M, et al. The ClosTron: mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 80(1): 49-55.
- [77] ARGYROS D A, TRIPATHI S A, BARRETT T F, et al. High ethanol titers from cellulose by using metabolically engineered thermophilic, anaerobic microbes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(23): 8288-8294.
- [78] KOHJI K, NORIKO K T, HIROSHI Y, et al. Involvement of RecE exonuclease and RecT annealing protein in DNA double-strand break repair by homologous recombination[J]. Gene, 1994, 138(1/2): 17-25.
- [79] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. Science, 2010, 327(5962): 167-170.
- [80] JANSEN R, VAN EMBDEN J D A, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [81] MALI P, YANG L H, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.
- [82] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [83] WANG Y, ZHANG Z T, SEO S O, et al. Markerless chromosomal gene deletion in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR/Cas9 system[J]. Journal of Biotechnology, 2015, 200: 1-5.
- [84] WANG Y, ZHANG Z T, SEO S O, et al. Bacterial genome editing with CRISPR-Cas9: deletion, integration, single nucleotide modification, and desirable "clean" mutant selection in *Clostridium beijerinckii* as an example[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(7): 721-732.
- [85] BERNHEIM A, CALVO-VILLAMAÑÁN A, BASIER C, et al. Inhibition of NHEJ repair by type II-A CRISPR-Cas systems in bacteria[J]. Nature Communications, 2017, 8: 2094.
- [86] CUI L, BIKARD D. Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(9): 4243-4251.
- [87] SHUMAN S, GLICKMAN M S. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(11): 852-861.
- [88] XU T, LI Y C, HE Z L, et al. Cas9 nickase-assisted RNA repression enables stable and efficient manipulation of essential metabolic genes in *Clostridium cellulolyticum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1744.
- [89] STRECKER J, LADHA A, GARDNER Z, et al. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases[J]. Science, 2019, 365(6448): 48-53.
- [90] PYNE M E, BRUDER M R, MOO-YOUNG M, et al. Harnessing heterologous and endogenous CRISPR-Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 25666.
- [91] ZHANG J, ZONG W M, HONG W, et al. Exploiting endogenous CRISPR-Cas system for multiplex genome editing in *Clostridium tyrobutyricum* and engineer the strain for high-level butanol production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 47: 49-59.
- [92] ZHOU X Q, WANG X L, LUO H Y, et al. Exploiting heterologous and endogenous CRISPR-Cas systems for genome editing in the probiotic *Clostridium butyricum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(7): 2448-2459.
- [93] WENTZ T G, TREMBLAY B J M, BRADSHAW M, et al. Endogenous CRISPR-Cas systems in group I *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* do not directly target the botulinum neurotoxin gene cluster[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 787726.
- [94] WALKER J E, LANAHAN A A, ZHENG T Y, et al. Development of both type I-B and type II CRISPR/Cas genome editing systems in the cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum*[J]. Metabolic Engineering Communications, 2019, 10: e00116.
- [95] HONG W, ZHANG J, CUI G Z, et al. Multiplexed CRISPR-CpfI-mediated genome editing in *Clostridium difficile* toward the understanding of pathogenesis of *C. difficile* infection[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(6): 1588-1600.
- [96] MERRICK C A, ZHAO J, ROSSER S J. Serine integrases: advancing synthetic biology[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(2): 299-310.
- [97] BAI H, SUN M X, GHOSH P, et al. Single-molecule analysis reveals the molecular bearing mechanism of DNA strand exchange by a serine recombinase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(18): 7419-7424.
- [98] 田雨顺, 罗鹏, 刘秋婷, 等. 细菌重组系统及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 473-482.
- TIAN Y S, LUO P, LIU Q T, et al. Progress on bacterial recombination systems and their application[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 473-482.
- [99] IYER L M, KOONIN E V, ARAVIND L. Classification and evolutionary history of the single-strand annealing proteins, RecT, Red β , ERF and RAD52[J]. BMC Genomics, 2002, 3: 8.
- [100] 王雪. 伯克氏菌重组系统的研究与应用[D]. 济南: 山东大学,

2018.

WANG X. The research and application of recombineering system in *Burkholderiales* species[D]. Jinan: Shandong University, 2018.

- [101] SHARAN S K, THOMASON L C, KUZNETSOV S G, et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(2): 206-223.
- [102] REISCH C R, PRATHER K L J. The no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15096.
- [103] WANG H H, ISAACS F J, CARR P A, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. *Nature*, 2009, 460(7257): 894-898.
- [104] WARNER J R, REEDER P J, KARIMPOUR-FARD A, et al. Rapid profiling of a microbial genome using mixtures of bar-coded oligonucleotides[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(8): 856-862.
- [105] VAN KESSEL J C, HATFULL G F. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(2): 147-152.
- [106] VAN KESSEL J C, HATFULL G F. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 67(5): 1094-1107.
- [107] VAN PIJKEREN J P, BRITTON R A. High efficiency recombineering in lactic acid bacteria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(10): e76.



通讯作者: 薛闯(1982—),男,教授,博士生导师。主要从事生物质新能源的生产、分离纯化以及高效代谢菌株构建的研究:①生物法生产燃料乙醇及酵母菌的代谢网络研究;②微生物发酵法生产丁醇;③生物基化学品的高效分离;④有机膜的制备及分离技术;⑤先进能源生产菌株的构建及代谢途径信号转导;⑥激酶的生物信息分析。

E-mail: xue.l@dlut.edu.cn



通讯作者: 程驰(1990—),女,副教授,研究生导师。主要研究领域为:①能源微生物遗传操作工具开发及代谢改造;②化学-生物耦合的CO₂固定。

E-mail: cheng.chi@dlut.edu.cn



第一作者: 刘佳昕(1998—),女,硕士研究生。主要进行生物学研究。

E-mail: ljx123456@mail.dlut.edu.cn