

## 枯草芽孢杆菌无标记遗传操作技术研究进展

朱旭军<sup>1,2</sup> 李一凡<sup>1,2</sup> 李杨<sup>1,2</sup> 付晶<sup>1,2</sup> 王智文<sup>1,2</sup> 陈涛<sup>1,2\*</sup>

(1. 天津大学 化工学院 生物工程系 天津 300072)

(2. 天津大学 教育部系统生物工程重点实验室 天津 300072)

**摘要:** 枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性菌的模式生物, 长期以来在代谢工程和工业微生物领域扮演重要角色。枯草芽孢杆菌无标记遗传操作技术对后基因组时代的基因功能研究和菌株生理特性的改造起着关键作用。综述枯草芽孢杆菌无标记遗传操作所使用的负筛选标记基因, 总结目前主流的无标记遗传操作的策略, 并提出枯草芽孢杆菌无标记遗传操作技术面临的主要问题和发展方向。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌, 无标记遗传操作, 负筛选标记, 同源重组, 位点特异性重组

## Marker-free genetic manipulation technologies in *Bacillus subtilis*

ZHU Xu-Jun<sup>1,2</sup> LI Yi-Fan<sup>1,2</sup> LI Yang<sup>1,2</sup> FU Jing<sup>1,2</sup> WANG Zhi-Wen<sup>1,2</sup> CHEN Tao<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Biological Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

(2. Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** *Bacillus subtilis* has been a model organism for gram-positive bacteria and has played important roles in metabolic engineering and industrial microbiology. Genetic manipulation technologies in *Bacillus subtilis* are critical for investigation of gene functions and modulation of bacteria physiologies in post-genomic era. In this review, we firstly summarize commonly used counter-selection markers for marker-free genetic manipulation. Then, we describe and compare different marker-free genetic manipulation strategies. Finally, we discuss challenges and future trends for developing more efficient tools for genetic manipulation of *Bacillus subtilis*.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, Marker-free genetic manipulation, Counter-selection marker, Homologous recombination, Site-specific recombination

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CBA00804, 2012CB725203); 国家自然科学基金项目(No. 21176182, 21206112)

\*通讯作者: Tel: 86-22-27406770; 信箱: chentao@tju.edu.cn

收稿日期: 2015-03-05; 接受日期: 2015-04-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-14

枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性菌的模式生物, 同时也是一种安全性很高的重要工业微生物<sup>[1]</sup>。多年以来, 枯草芽孢杆菌广泛应用于生物基化学品、维生素和抗菌素等产品的生物转化<sup>[2]</sup>。此外, 枯草芽孢杆菌因其强大的分泌蛋白的能力和无毒副作用的特性已经成为重组蛋白工业生产最重要的微生物<sup>[3-4]</sup>。1997年, 枯草芽孢杆菌基因组测序和注释使研究人员对菌株有了更深入的理解和认识, 同时也对基因的功能研究和表达调控提出了新的要求<sup>[5]</sup>。

遗传操作技术对代谢工程和基因功能研究是必不可少的<sup>[6]</sup>。为了提高目标代谢产品的生产率和得率, 经常需要对一些代谢通路的基因进行敲除, 对产品合成的代谢通路基因进行强表达, 甚至是对某些关键基因的表达强度进行微调。这些都需要对基因组进行多轮修饰和改造。虽然随机突变和定向进化的方法对提高产量和研究基因功能也有很大帮助, 但本文仅讨论理性遗传操作技术。

经典的理性遗传操作是通过正筛选标记基因来筛选重组子的, 每进行一次遗传操作都需要引入一个正筛选标记基因。一些研究仅需要对基因组进行简单的遗传操作, 例如敲除2个基因, 可以直接通过同源重组分别在2个目标基因内部插入不同的标记基因来实现。但是一些代谢工程的研究需要对多个基因靶点进行顺序的操作, 于是利用有限的标记基因在同一菌株中所能进行的操作数量也就非常有限。对于这个问题, 一个有效的解决方法是将引入的标记基因从基因组消除, 从而实现标记基因的循环利用。这样, 一个循环操作不会在基因组上留下任何筛选标记, 因此这种操作手段就叫做无标记遗传操作。最近, 枯草芽孢杆菌的无标记遗传操作技术有了很大的发展, 使我们可以更加快速和高效地对基因组进行编辑<sup>[7]</sup>。在本文中, 我们从负筛选标记基因的选择和无标记遗传操作的策略两个方面对目前常用的枯草芽孢杆菌的无标记遗传操作技术进行总结, 试图为读者选择最合适的策略

提供一些帮助。168菌株作为枯草芽孢杆菌的模式菌株, 应用最广泛, 研究最深入; 而且168菌株经过了长期的驯化, 相比野生的菌株具有更高的转化效率和生长速度, 也更容易进行遗传操作<sup>[8]</sup>。因此, 本文综述的遗传操作技术主要针对168菌株。

## 1 无标记遗传操作的负筛选标记基因

将正筛选标记从基因组上消除通常需要负筛选标记的参与。负筛选标记基因是在特定的条件下将菌株杀死的基因。将负筛选标记与正筛选标记连在一起使用进行遗传操作, 再利用负筛选标记对菌株致死的特性, 就可以将标记基因从基因组上消除。常用的负筛选标记基因包括特定条件下的毒性基因和正筛选标记的抑制子。

### 1.1 毒性基因作为负筛选标记

枯草芽孢杆菌中常用的, 作为负筛选标记的毒性基因包括 *upp*<sup>[9]</sup>、*mazF*<sup>[10-11]</sup>和 *hewl* 基因<sup>[12]</sup>。枯草芽孢杆菌的 *upp* 基因编码尿嘧啶磷酸核糖转移酶 (UPRTase), 它可以催化尿嘧啶生成尿苷单磷酸, 使细胞利用胞外尿嘧啶。5-氟尿嘧啶是嘧啶类似物, 可以被 UPRTase 催化反应生成枯草芽孢杆菌胸苷酸合成酶的强烈抑制剂 5-F-dUMP, 它的存在会导致枯草芽孢杆菌细胞的死亡。Fabret 等最早利用 *upp* 基因作为负筛选标记在枯草芽孢杆菌中实现无标记的遗传操作<sup>[9]</sup>。该基因也适用于多种革兰氏阳性菌, 包括谷氨酸棒状杆菌<sup>[13]</sup>、解淀粉芽孢杆菌<sup>[14]</sup>等。

大肠杆菌的 *mazF* 基因表达一个核酸内切酶, 切割 mRNA 的 ACA 序列, 从而对细胞产生毒性。Zhang 等利用 IPTG 诱导型启动子 Pspac 控制 *mazF* 的表达, 在含有 IPTG 的培养基中, *mazF* 表达使细胞致死, 从而筛选出 *mazF* 基因片段弹出的菌株<sup>[10]</sup>。

鸡卵溶菌酶基因 *hewl* 对芽孢杆菌属有很好的杀灭效果。它的抑菌作用不仅仅是由溶菌酶效果导致的, 还与它的强阳离子性和疏水性有关系。Wang 等使用一个温敏性启动子 PR 控制 *hewl* 的表达<sup>[12]</sup>。在 30 °C PR 启动子受 CI857 蛋白的阻遏; 在 42 °C

阻遏关系被解除。这样就可以通过温度来开启或关闭 *hewl* 的毒性作用。

## 1.2 正筛选标记的抑制子作为负筛选标记

另外一类常用的负筛方法是通过一个启动子和其配套的抑制子, 将正筛选标记转变成负筛选标记(图 1)。具体来说, 将一个正筛选标记(比如新霉素抗性基因 *neo*)置于启动子(Pro)的控制之下, 启动子 Pro 的起始转录可以被蛋白 R 所抑制。这样, 如果 R 的表达基因 *reg* 在基因组上表达, R 就会抑制 *neo* 的表达, 从而使菌株丧失特定的抗性。这样, *reg* 就成为了这种抗性中的负筛选标记基因。常用的抑制基因/启动子的组合包括 *blaI/PblaP*、*araR/Para*、*lacI/Pspac* 和 *cI857/PR*。

地衣芽孢杆菌中的 *blaI* 基因在  $\beta$ -内酰胺酶调控中发挥作用, 它的表达蛋白 BlaI 在转录水平抑制 *blaP* 基因的表达。Brans 等<sup>[15]</sup>将枯草芽孢杆菌赖氨酸合成关键基因 *lysA* 的启动子替换成 PblaP。于是在 *blaI* 基因表达的情况下, *lysA* 表达受抑制, 菌株呈现赖氨酸缺陷型。这样 *blaI* 基因就成为了缺少赖氨酸的培养基中的负筛选基因。同样是利用对 *lysA* 表达的控制, Zhang 等<sup>[16]</sup>使用 Pspac 和 *lacI* 的启动子/抑制子组合, 将 *lacI* 转换成了负筛选标记。

阿拉伯糖的诱导调控系统广泛应用于对细菌基因表达的控制。蛋白 AraR 抑制 Para 启动子的转录, 在添加阿拉伯糖的情况下才可以解除抑制。Liu 等用 Para 控制新霉素基因 *neo* 的表达。当基因组存在 *araR* 的情况下, *neo* 表达被抑制。于是通过对培

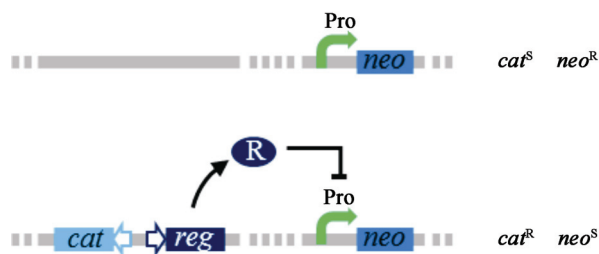


图 1 利用新霉素抗性基因的抑制子作为负筛选标记  
Figure 1 Using the repressor of a neomycin resistance gene as counter-selectable marker

培养基添加新霉素可以对含有 *araR* 的片段进行负筛选<sup>[17]</sup>。类似的, Tanaka 等用噬菌体的 Pr 启动子控制 *neo* 的表达, 将 Pr 启动子的抑制基因 *cI857* 转换成了负筛选标记<sup>[18]</sup>。

## 2 无标记遗传操作的策略

### 2.1 依赖枯草芽孢杆菌内源重组系统的策略

枯草芽孢杆菌的内源重组是一个十分复杂的过程, 有大约 40 个蛋白的参与<sup>[19]</sup>。RecA 蛋白在枯草芽孢杆菌的重组过程中起核心作用。在枯草芽孢杆菌感受态形成的过程中, RecA 蛋白的表达被有效地激活, 与进入细胞的 DNA 相互作用并结合成聚合物。如果 DNA 与基因组有同源区域, 就可以发生同源重组。

枯草芽孢杆菌内源重组机制包括环状质粒介导的单交换重组和线性片段介导的双交换重组。Duncan 等最早发现了环状质粒可以通过单交换的方式整合到枯草芽孢杆菌的基因组中<sup>[20]</sup>。而 Haldenwang 等利用这种单交换重组机制, 将一个氯霉素抗性基因整合在了基因组上, 从而实现了对一个短片段的定位<sup>[21]</sup>。实现单交换的重组质粒在受体菌中不能复制而是整合到基因组上, 所以又被叫做整合载体。单交换重组广泛应用于基因失活和基因突变中。例如, Vagner 等建立了一套整合载体, 仅需将一段靶向基因的片段克隆进入整合载体, 就能系统地对枯草芽孢杆菌中的基因进行失活<sup>[22]</sup>。相比单交换重组, 双交换重组机制的发现稍晚一些<sup>[23]</sup>, 而且重组效率要低一些, 因此通常需要更长的同源臂(通常 500 bp 左右)。实现双交换重组的供体 DNA 可以是线性化的质粒 DNA 或者 PCR 片段。利用线性化质粒作为供体 DNA 需要额外地构建质粒克隆, 但该过程不过分依赖 PCR, 因此不容易引入随机突变。使用融合 PCR 构建重组盒子不需要构建质粒克隆, 但是由于双交换重组需要较长的同源臂, 所以构建重组盒子的过程需要两轮甚至更多轮的融合 PCR, 因此更容易在 PCR 过程中引入突变。

单交换重组和双交换重组均可以用来介导无

标记的遗传操作(图 2)。对于单交换重组, Zakataeva 等<sup>[24]</sup>和 Zhang 等<sup>[16]</sup>使用的方法是一个典型的策略(图 2A)。该策略将需要插入或者替换的片段插入上下游同源臂之间, 再将他们连接进入一个整合载体。这样, 上游同源臂或者下游同源臂介导的单交换重组就可以将这个载体整合进入基因组的特定位置。获得整合片段的菌株有天然的正向重复(Direct repeat, DR)序列, 相邻的 DR 序列之间会发生第二次重组, 从而将抗性标记弹出。本实验室代谢工程生产 2,3-丁二醇、乙偶姻和核黄素的研究中就大量运用了这种单交换重组介导无标记的遗传操作<sup>[25-27]</sup>。但是在利用这种方法消除抗性标记时, 其中一对 DR 序列的重组会形成野生型的菌株, 而另一对 DR 序列的重组形成突变型的菌株。两种重组发生的概率理论上各占 50%。但是如果突变型有一定的生长缺陷, 那么将其从野生型菌株中分离出来将会比较困难。

双交换重组介导的无标记的遗传操作应用更

广泛一些<sup>[9-11,15]</sup>(图 2B)。实现双交换的重组盒子通常包含 4 个组成部分: 正负筛选标记基因、需要引入的突变、方便标记基因消除的 DR 序列和连在盒子两端的上下游同源臂。将重组盒子转化进入细胞, 经过双交换重组就可以将筛选标记插入基因组, 同时引入需要的突变。之后, 借助于 DR 序列之间的重组, 通过负筛选标记的致死效果, 就可以筛选到抗性标记消除的菌株。在这种方法中, 获得重组盒子的菌株只有一对 DR 序列, 所以理论上所有消除抗性标记的菌株都是突变型菌株。

本实验室利用双交换重组的策略对枯草芽孢杆菌进行基因组最小化的研究, 使用的大片段敲除方法如图 2C 所示。设计供体 DNA, 利用双交换重组将 *cat-upp* 以及 C 片段整合进入基因组上的特定靶点。C 片段与基因组上另一个位置的序列具有同源性, 借助于 2 个 C 片段的重组, 就可以将它们之间的区域敲除, 同时消除抗性标记。利用这种方法, 我们已经成功敲除了 12 个基因组大片段, 总计 745 kb。

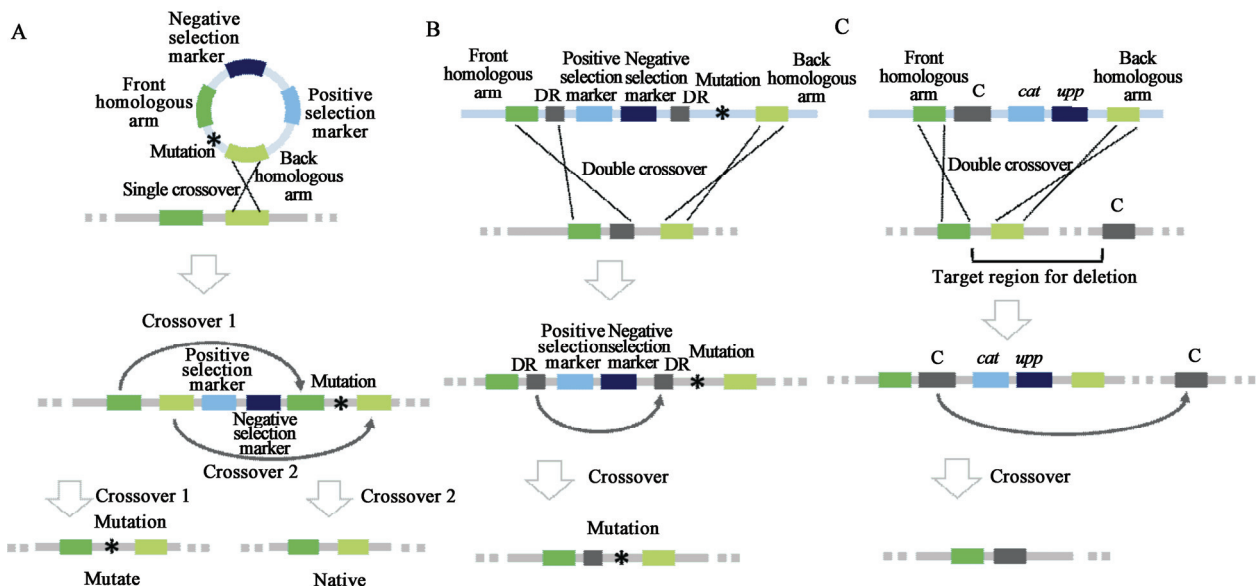


图 2 利用枯草芽孢杆菌内源重组系统进行无标记遗传操作

Figure 2 Using *Bacillus subtilis* endogenesis recombination system for marker-free genetic manipulation

注: A: 利用单交换重组引入突变点; B: 利用双交换重组引入突变点; C: 利用双交换重组敲除大片段。

Note: A: Using single crossover recombination to introduce a point mutation; B: Using double crossover recombination to introduce a point mutation; C: Using double crossover recombination to delete large sequence.

## 2.2 依赖位点特异性重组的策略

位点特异性重组不依赖于DNA序列的同源性。相反地,其重组酶会催化有特定序列的DNA链的断裂和重新连接,从而实现位点特异性重组作用。目前最常用的位点特异性重组系统是来自于P1噬菌体的Cre/*loxP*系统、来自于Lambda噬菌体的Xis/*attP*系统和来自于酿酒酵母中的FLP/*fRT*系统。以Cre/*loxP*系统为例,Cre蛋白可以介导2个*loxP*位点之间的位点特异性重组。如果2个*loxP*位点是同向的,重组就会将位点之间的序列消除;如果2个*loxP*位点是反向的,重组就会将位点之间的序列倒置。位点特异性重组的效率非常高,通常不需要筛选标记就可以筛选到重组子。位点特异性重组在枯草芽孢杆菌的遗传操作中主要应用于抗性标记的消除。其中Cre/*loxP*系统和Xer/*dif*系统都已经被用来开发抗性标记消除系统。例如,Yan等<sup>[28]</sup>就利用Cre/*loxP*系统来实现无抗性遗传操作(图3A)。作者构建的重组盒子包含2个*loxP*识别位点和加在

位点中间的新霉素抗性基因(*lox71-neo-lox66*)。在重组盒子整合在染色体上之后,利用温敏型质粒表达Cre酶,促使2个同向的*loxP*识别位点发生重组,从而将标记基因移除。每一次利用位点特异性重组都会在基因组上留下一个*loxP*识别位点的疤痕,因此如果对基因组进行多轮的操作,留下的多个识别位点之间可能会发生重组,降低基因组的稳定性。为了避免这种情况,作者使用了一对突变型的*loxP*识别位点:*lox71*和*lox66*位点,分别在位点的左半部分和右半部分有突变。这些突变单独存在并不会影响他们的重组功能,但是*lox71*和*lox66*位点发生重组之后形成的*lox72*位点同时含有左右两部分的突变,与Cre酶亲和力很低,从而提高遗传稳定性,不会妨碍后续的操作。Bloor等<sup>[29]</sup>开发了基于Xer/*dif*的抗性标记消除系统,整体的设计与Yan使用的Cre/*loxP*系统类似。不同的是,Xer/*dif*系统的重组酶可以由枯草芽孢杆菌的RipX和CodV蛋白代替,所以不需要引入外源的重组酶表达系统。

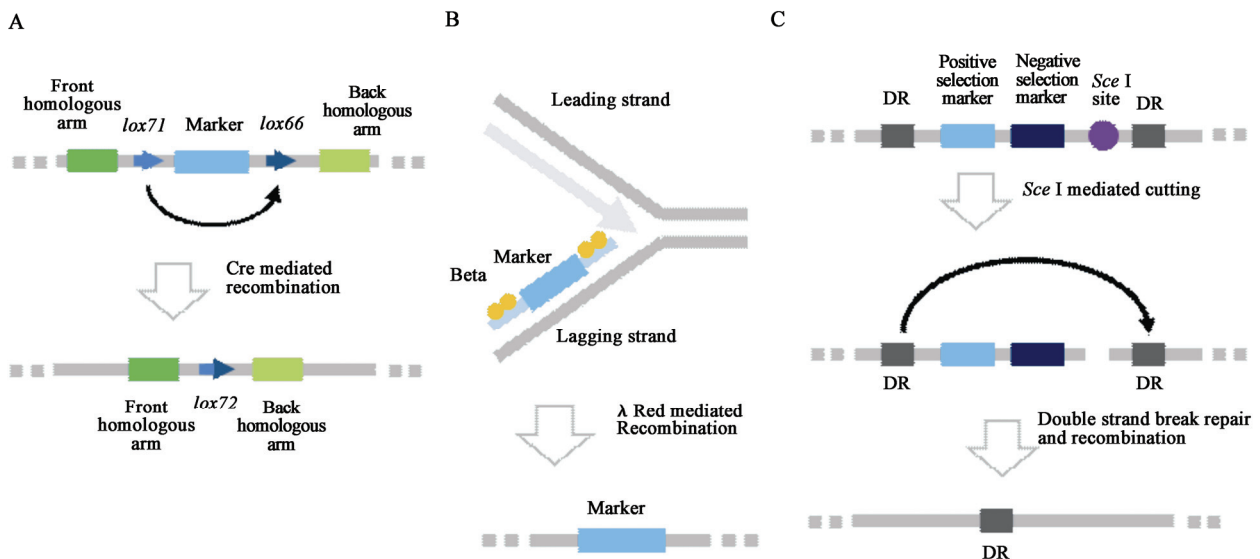


图3 依赖位点特异性重组、 $\lambda$  Red重组或者Sce I内切酶的无标记遗传操作

Figure 3 Marker-free genetic manipulation based on site specific recombination,  $\lambda$  Red recombination, or Sce I endonuclease

注: A: 利用位点特异性重组消除抗性标记; B:  $\lambda$  Red重组系统介导的ssDNA重组; C: Sce I内切酶介导的抗性标记的消除。

Note: A: Cre/*loxP* site specific recombination mediated selectable marker eviction; B:  $\lambda$  Red mediated ssDNA recombination; C: Sce I endonuclease mediated selectable marker eviction.

位点特异性重组通常有非常高的重组效率, 所以其介导的抗性标记消除通常不需要使用负筛选标记就可以筛选到抗性消除的克隆。而且重组酶的认识序列比较短, 对 Cre/*loxP* 系统和 FLP/*frt* 系统都是 34 bp。这些因素都会减少重组盒子的长度, 提高重组的效率。但是由于位点特异性重组需要特定的重组酶识别序列, 所以通常会在靶点位置留下疤痕。

利用位点特异性重组也可以直接进行遗传操作。例如, Enyeart 等<sup>[30]</sup>开发了 GETR (Genome editing via targetrons and recombinases)系统。他们利用 II 型移动内含子(Mobile group II intron)将 34 bp 的 *loxP* 识别位点插入到基因组的特定区域, 插入效率可达 30%以上。也就是说, 可以不通过筛选标记, 仅仅利用 PCR 的方法就可以筛选到 *loxP* 位点插入的克隆。然后再利用 Cre/*loxP* 系统实现对特定序列的插入、敲除和翻转。为了证明这个系统广泛的适用性, 作者对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和希瓦氏菌都进行了操作。

### 2.3 $\lambda$ Red 重组系统介导的 ssDNA 重组

$\lambda$  Red 重组系统被广泛应用于大肠杆菌的基因组工程操作中<sup>[31]</sup>。它包含 Exo、Beta 和 Gam 三个蛋白质, 既可以介导双链 DNA (dsDNA)的重组, 也可以介导单链 DNA (ssDNA)的重组。ssDNA 的重组仅需要 Beta 蛋白的参与, 在理想状态下重组效率可以达到约 30%<sup>[32]</sup>。Wang 等首次将 Beta 蛋白引入枯草芽孢杆菌中, 通过电转化的方法导入 ssDNA, 实现了对目标基因的敲除<sup>[12]</sup> (图 3B)。Red 重组系统介导的 ssDNA 重组最大的优势是, 利用长度仅为 70 bp 的短同源臂就能实现高效重组, 因此同源臂可以通过 DNA 合成的方法直接制备, 而不需要 PCR 过程。同时, 其对细菌的转化是通过电转化实现的, 这就为一些不容易形成感受态的菌株的工程操作提供了可能性。Wang 等还发现, ssDNA 重组靶向基因组的后随链, 以及在重组引物中加入硫代修饰可以显著地提高重组率, 这些结论与  $\lambda$  Red 系统在

大肠杆菌中的表现类似。Wang 等在工作中也尝试了  $\lambda$  Red 系统介导的 dsDNA 重组, 但是没有成功。一个可能的原因是 Gam 蛋白无法有效地抑制枯草芽孢杆菌的 AddAB 核酸酶系统。

### 2.4 通过 *Sce* I 内切酶提高抗性消除的效率

*Sce* I 内切酶识别一段 18 bp 的序列, 并切割序列形成双链断裂(DSB)。DSB 一方面会激活细菌的断裂修复系统, 提高 DR 区之间的重组率, 从而提高抗性基因消除的效率。另一方面, DSB 会杀死没有发生重组修复的细胞, 帮助筛选消除抗性的克隆。本实验室首先在枯草芽孢杆菌中开发了基于 *Sce* I 内切酶的抗性标记消除系统<sup>[33]</sup>。Shi 等将一个 *Sce* I 内切酶的识别位点与正负筛选标记以及 DR 序列连在一起(DR-*cat-upp-Sce* I site-DR), 作为重组盒子整合到基因组上, 同时引入所需要的突变点(图 3C)。在宿主菌内表达 *Sce* I 内切酶切断基因组。再借助 *upp* 基因作为负筛选标记, 筛选到抗性基因消除的克隆<sup>[33]</sup>。这种方法中仅需要 30 bp 的 DR 序列, 因此可以通过引物合成而不是通过 PCR 的方法加入到重组盒子中, 方便其构建并且缩短其长度。

## 3 结论与展望

作为革兰氏阳性菌株, 枯草芽孢杆菌的遗传操作工具没有大肠杆菌和酿酒酵母高效<sup>[7]</sup>。但是近几年开发的新方法和新技术也大大提高了对枯草芽孢杆菌基因组改造的效率。正如本文所介绍, 这些方法各自有其技术原理及特点。没有一种方法是普遍适用的, 针对不同的工程目标和规模或许需要选择不同的技术来进行操作(表 1)。

为了开发更高效的枯草芽孢杆菌的无标记遗传操作技术, 笔者认为有以下几个方向可以尝试:

(1) 开发更加高效的转化系统。在这方面, Zhang 等<sup>[34]</sup>和 Shi 等<sup>[33]</sup>通过强表达 ComK 蛋白提高转化效率就是一个很好的尝试。(2) 开发更加高效的重组系统。例如 Wang 等<sup>[12]</sup>成功地将  $\lambda$  Red 重组系统引入到对枯草芽孢杆菌改造中来, 实现了高效的 ssDNA 重组。(3) 引入或开发其他的遗传操作工具。

表 1 无标记遗传操作的策略的比较  
Table 1 Comparison of marker-free genetic manipulation strategies

| 无标记遗传操作策略<br>Marker-free genetic manipulation strategies   | 特点<br>Characteristics   | 参考文献<br>References |
|--|---|--------------------|
| 枯草芽孢杆菌内源重组系统介导的单交换重组<br><i>Bacillus subtilis</i> endogenesis recombination system based single crossover | 重组效率相对双交换重组较高; 获得整合片段的重组菌株有天然的 DR 序列; 抗性基因消除理论上 有 50% 的概率获得野生型菌株      | [16,24-27]         |
| 枯草芽孢杆菌内源重组系统介导的双交换重组<br><i>Bacillus subtilis</i> endogenesis recombination system based double crossover | 需要较长的同源臂; 供体 DNA 的设计比较复杂; 可以通过融合 PCR 的方法构建供体 DNA, 不需要构建质粒克隆           | [9,11-15]          |
| 依赖位点特异性重组的策略<br>Strategies based on site specific recombination  | 重组效率高, 不需要筛选标记; 在靶向序列附近留下疤痕   | [28-30]            |
| $\lambda$ Red 重组系统介导的 ssDNA 重组<br>$\lambda$ Red mediated ssDNA recombination                             | 转化 ssDNA 作为供体 DNA, 而不是 dsDNA; 仅需要 70 bp 的同源臂, 可以合成在引物中; 利用电转化导入供体 DNA | [12]               |
| 基于 <i>Sce</i> I 内切酶的策略<br>Strategies based on <i>Sce</i> I endonuclease                                  | 消除抗性标记仅需要 30 bp 的 DR 序列, 可以合成在引物中; 抗性标记消除效率较高                         | [33]               |

比如近两年, CRISPR 技术被证实可以在很多物种当中实现基因组改造, 其中也包括大肠杆菌<sup>[35]</sup>和酿酒酵母<sup>[36]</sup>。CRISPR 系统并不依赖 *Sce* I 内切酶所需要的特定的识别序列, 而是通过表达一段 gRNA, 引导 Cas9 内切酶在基因组的任意位置切割形成一个 DSB, 杀死野生型的细胞, 并且大大提高同源重组的效率。(4) 开发多元的基因组操作技术。在大肠杆菌中, 已有 MAGE<sup>[37]</sup>和 TRMR<sup>[38]</sup>等多元重组技术可以对基因组多个靶点同时进行突变, 然而在枯草芽孢杆菌中尚没有开发出类似的技术。一个最可能的原因是枯草芽孢杆菌的转化效率和重组效率相对大肠杆菌来说比较低。笔者认为一个可行的解决方法是: 先在细胞中引入含有供体 DNA 的质粒, 再通过 *Sce* I 内切酶或者 CRISPR 系统将质粒切断, 释放供体 DNA 介导重组。这种方法已经有效地在大肠杆菌中提高了大片段插入的效率<sup>[39]</sup>, 而且 CRISPR 系统在很多高等动物细胞中都可以介导多个位点的同时修饰, 因此利用这个工程思路可能在枯草芽孢杆菌中实现多元的重组。(5) 开发基因调控技术。比如 Na 等开发了基于 sRNA 基因的调节技术, 可以在不改变基因组序列的情况下对基因的

表达强度进行微调<sup>[40]</sup>。这类基因调控技术虽然不属于遗传操作技术, 但是他们是遗传操作技术很好的补充, 可以降低大规模基因组改造的压力, 提高探索代谢工程基因靶点的效率。

## 参 考 文 献

- [1] Earl AM, Losick R, Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(6): 269-275
- [2] Liu L, Liu YF, Shin HD, et al. Developing *Bacillus* spp. as a cell factory for production of microbial enzymes and industrially important biochemicals in the context of systems and synthetic biology[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(14): 6113-6127
- [3] Schumann W. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*[J]. Advances in Applied Microbiology, 2007, 62(62): 137-189
- [4] van Dijk JM, Hecker M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12(1): 352-353
- [5] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*[J]. Nature, 1997, 390(6657): 249-256
- [6] Song CW, Lee J, Lee SY. Genome engineering and gene expression control for bacterial strain development[J]. Biotechnology Journal, 2015, 10(1): 56-68
- [7] Dong HN, Zhang DW. Current development in genetic engineering strategies of *Bacillus* species[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(5): 597-610
- [8] Zeigler DR, Prágai Z, Rodriguez S, et al. The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(21): 6983-6995
- [9] Fabret C, Ehrlich SD, Noirot P. A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(1): 25-36
- [10] Zhang XZ, Yan X, Cui ZL, et al. *mazF*, a novel counter-selectable marker for unmarked chromosomal

- manipulation in *Bacillus subtilis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(9): e71
- [11] Yu HJ, Yan X, Shen WL, et al. Efficient and precise construction of markerless manipulations in the *Bacillus subtilis* genome[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(1): 45-53
- [12] Wang Y, Weng J, Waseem R, et al. *Bacillus subtilis* genome editing using ssDNA with short homology regions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(12): e91
- [13] Ma WW, Wang XY, Mao YF, et al. Development of a markerless gene replacement system in *Corynebacterium glutamicum* using *upp* as a counter-selection marker[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(3): 609-617
- [14] Zhang W, Gao WX, Feng J, et al. A markerless gene replacement method for *B. amyloliquefaciens* LL3 and its use in genome reduction and improvement of poly- $\gamma$ -glutamic acid production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(21): 8963-8973
- [15] Brans A, Filée P, Chevigné A, et al. New integrative method to generate *Bacillus subtilis* recombinant strains free of selection markers[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7241-7250
- [16] Zhang C, Zhang XH, Yao ZY, et al. A new method for multiple gene inactivations in *Bacillus subtilis* 168, producing a strain free of selectable markers[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2011, 57(5): 427-436
- [17] Liu SC, Endo K, Ara K, et al. Introduction of marker-free deletions in *Bacillus subtilis* using the AraR repressor and the *ara* promoter[J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 9): 2562-2570
- [18] Tanaka K, Henry CS, Zinner JF, et al. Building the repertoire of dispensable chromosome regions in *Bacillus subtilis* entails major refinement of cognate large-scale metabolic model[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1): 687-699
- [19] Fernández S, Ayora S, Alonso JC. *Bacillus subtilis* homologous recombination: genes and products[J]. *Research in Microbiology*, 2000, 151(6): 481-486
- [20] Duncan CH, Wilson GA, Young FE. Mechanism of integrating foreign DNA during transformation of *Bacillus subtilis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1978, 75(8): 3664-3668
- [21] Haldenwang WG, Banner CD, Ollington JF, et al. Mapping a cloned gene under sporulation control by insertion of a drug resistance marker into the *Bacillus subtilis* chromosome[J]. *Journal of Bacteriology*, 1980, 142(1): 90-98
- [22] Vagner V, Dervyn E, Ehrlich SD. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiology*, 1998, 144(Pt 11): 3097-3104
- [23] Niaudet B, Goze A, Ehrlich SD. Insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis*: mechanism and use in gene cloning[J]. *Gene*, 1982, 19(3): 277-284
- [24] Zakataeva NP, Nikitina OV, Gronskiy SV, et al. A simple method to introduce marker-free genetic modifications into the chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 1201-1209
- [25] Fu J, Wang ZW, Chen T, et al. NADH plays the vital role for chiral pure D-(-)-2,3-butanediol production in *Bacillus subtilis* under limited oxygen conditions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(10): 2126-2131
- [26] Chen T, Liu WX, Fu J, et al. Engineering *Bacillus subtilis* for acetoin production from glucose and xylose mixtures[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 168(4): 499-505
- [27] Wang ZW, Chen T, Ma XH, et al. Enhancement of riboflavin production with *Bacillus subtilis* by expression and site-directed mutagenesis of *zwf* and *gnd* gene from *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(4): 3934-3940
- [28] Yan X, Yu HJ, Hong Q, et al. Cre/*lox* system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17): 5556-5562
- [29] Bloor AE, Cranenburgh RM. An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(4): 2520-2525
- [30] Enyeart PJ, Chirieleison SM, Dao MN, et al. Generalized bacterial genome editing using mobile group II introns and Cre-*lox*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2013, 9(1): 345-350
- [31] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645
- [32] Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(2): 206-223
- [33] Shi T, Wang GL, Wang ZW, et al. Establishment of a markerless mutation delivery system in *Bacillus subtilis* stimulated by a double-strand break in the chromosome[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81370
- [34] Zhang XZ, Zhang YHP. Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(1): 98-105
- [35] Jiang WY, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239
- [36] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): 4336-4343
- [37] Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. *Nature*, 2009, 460(7257): 894-898
- [38] Warner JR, Reeder PJ, Karimpour-Fard A, et al. Rapid profiling of a microbial genome using mixtures of barcoded oligonucleotides[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(8): 856-862
- [39] Kuhlman TE, Cox EC. Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(6): e92
- [40] Na D, Yoo SM, Chung H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(2): 170-174