



## 冰岛硫化叶菌遗传操作体系的研究进展

刘涛 王晓婕 李英俊 彭楠\*

华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070

**摘要:** 冰岛硫化叶菌是古菌研究中常用的模式菌株, 为人们研究古菌复制、细胞周期以及 CRISPR-Cas 系统等作出了巨大贡献。冰岛硫化叶菌遗传操作体系的建立与完善对古菌学的全面深入研究起至关重要的作用。本文介绍了冰岛硫化叶菌遗传操作体系所使用的质粒载体、筛选标记和转化方法, 论述了目前广泛使用的两类冰岛硫化叶菌基因敲除体系。最后提出了现有冰岛硫化叶菌基因操作体系存在的主要问题, 并对其发展方向进行了展望。

**关键词:** 冰岛硫化叶菌, 遗传操作, 基因敲除, CRISPR-Cas 系统

## Systems for the genetic manipulation of *Sulfolobus islandicus*

LIU Tao WANG Xiao-Jie LI Ying-Jun PENG Nan\*

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China

**Abstract:** *Sulfolobus islandicus* is a commonly used type strain to study replication, cell cycle and CRISPR-Cas system in archaea. For this reason, it is important to establish a genetic manipulation system in *Sulfolobus islandicus*. Here, we describe the plasmid vector, selection marker and transformation methods, and discuss two currently widely used gene knockout systems. Meanwhile, we also address some major problems in genetic manipulation systems of *Sulfolobus islandicus*, and indicate development prospects.

**Keywords:** *Sulfolobus islandicus*, Genetic manipulation, Gene knockout, CRISPR-Cas system

冰岛硫化叶菌(*Sulfolobus islandicus*)是古菌界泉古菌门的一种嗜酸嗜热微生物<sup>[1-2]</sup>, 因其易于培养且富含病毒和质粒等遗传因子而受到广泛的研究<sup>[3-5]</sup>。该菌最先发现和分离的株系来自冰岛的热泉<sup>[6]</sup>, 随后人们对冰岛硫化叶菌多个株系进行了全基因组测序<sup>[7-8]</sup>, 并鉴定到很多病毒和质粒等遗传元件<sup>[9-10]</sup>。研究人员在此基础上成功构建了适用于冰

岛硫化叶菌的载体和高效的转化方法, 实现了多种策略的基因敲除。近年来冰岛硫化叶菌 CRISPR-Cas 系统被开发成一种高效的基因编辑工具<sup>[11]</sup>, 使其遗传操作体系得到了补充和完善。本文详细介绍了冰岛硫化叶菌遗传操作体系的基本元素, 分析了现有基因编辑方法的优缺点, 为选择合适的方法对冰岛硫化叶菌进行遗传改造提供一定的指导。

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31671291); National Postdoctoral Program for Innovative Talents (BX20180112)

\*Corresponding author: E-mail: nanp@mail.hzau.edu.cn

Received: 26-11-2018; Accepted: 09-01-2019; Published online: 11-01-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31671291); 博士后创新人才支持计划(BX20180112)

\*通信作者: E-mail: nanp@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2018-11-26; 接受日期: 2019-01-09; 网络首发日期: 2019-01-11

## 1 冰岛硫化叶菌遗传操作体系的基本元素

### 1.1 筛选标记

冰岛硫化叶菌中常用的筛选标记包括 *pyrEF* 和 *lacS* 基因。特殊的细胞结构和极端高温酸性培养条件使大部分抗生素基因都不适用于冰岛硫化叶菌, 虽然有研究报道潮霉素抗生素基因 *hph* 可以在硫化叶菌中使用<sup>[12]</sup>, 但是因其难以重复而没有被推广使用。在没有合适抗生素基因的前提下, 研究者们尝试使用营养缺陷型作为筛选标记。

*pyrEF* 基因是硫化叶菌中运用最广泛的一个营养缺陷型筛选标记, 它包含 *pyrE* (Orotate phosphoribosyl-transferase) 和 *pyrF* (Orotidine 5'-phosphate decarboxylase) 两个基因。两个基因共同参与 UMP 合成途径<sup>[13]</sup>, 可以作为一种正筛选标记使细胞在缺少尿嘧啶的培养基中生长。当培养基中添加 5-氟乳清酸(5-FOA)时, *pyrEF* 基因编码的酶也能将无毒的 5-FOA 变成毒性物质 5-氟-dUMP 从而杀死细胞, 因此又是一种负筛选标记。Deng 等在冰岛硫化叶菌 Rey15A 菌株中筛选 5-FOA 抗性菌株, 从而获得了 *pyrEF* 基因缺失突变体 E233。然后通过 PCR 扩增硫磺矿硫化叶菌 P2 (*Sulfolobus solfataricus* P2) 的 *pyrEF* 基因预测序列(启动子、ORF 和终止子)作为筛选标记, 为 *pyrEF* 筛选标记在冰岛硫化叶菌遗传体系中的应用开创了道路<sup>[14]</sup>。值得注意的是, 使用 *pyrEF* 基因作为筛选标记时会因为培养基中含有的微量尿嘧啶而产生非常小的背景菌落<sup>[15-16]</sup>, 所以使用该筛选标记时需要控制菌体量及培养时间。

*pyrEF* 基因并不能完全满足遗传操作的需求, 所以研究人员尝试使用 *lacS* 基因作为另一种筛选标记。在冰岛硫化叶菌中 *lacS* 基因编码  $\beta$ -糖苷酶 ( $\beta$ -glycosidase), 能使菌株在以乳糖为唯一碳源和能源的培养基中生长<sup>[17]</sup>, 也可以将 X-gal 催化生成深蓝色物质。因此可以利用 *lacS* 基因在乳糖限制性培养基中进行筛选, 或者使用 X-gal 染色进行筛选。Deng 等在 E233 菌株中以 *pyrEF* 基因作为筛选标记成功敲除 *lacS* 基因, 获得 *pyrEF* 和 *lacS* 双基因缺

失突变体 E233S, 并将来源于 *S. solfataricus* P2 的 *lacS* 基因克隆到 pHZ2 质粒进行互补验证, 确定 *lacS* 基因可以作为一种有效的筛选标记<sup>[14]</sup>。由于冰岛硫化叶菌培养周期相对较长, 所以使用 *lacS* 基因作为筛选标记并进行 X-gal 染色时, 需要固体培养基上形成可分辨的转化子后再进行染色。

### 1.2 穿梭质粒

最初的冰岛硫化叶菌-大肠杆菌穿梭质粒是基于从 *S. islandicus* REN1H1 中分离得到的 pRN1 和 pRN2 质粒<sup>[18-19]</sup>。这两个质粒都含有 *repA*、*copG* 和 *plrA* 三个保守基因, *repA* 编码复制蛋白<sup>[20-21]</sup>, *copG* 编码可能参与调节质粒拷贝数的 DNA 结合蛋白<sup>[22]</sup>, 而 *plrA* 编码一类序列特异性 DNA 结合蛋白<sup>[23]</sup>。Berkner 等以 pRN1 质粒为基础构建了含有 *pyrEF* 筛选标记的穿梭质粒, 可以成功进行基因互补<sup>[24]</sup>。但是该质粒转化困难且并不稳定, 所以并没有被广泛使用。pRN2 比 pRN1 的拷贝数高, 所以更适合改造为穿梭质粒。Deng 等将 pRN2 质粒插入到 pHZ1 质粒(含有 *pyrEF* 基因的 pGEM-3Z 质粒)中得到 pHZ2<sup>[14]</sup>, Peng 等基于对 pRN2 质粒的遗传分析, 去除了 pHZ2 的一些非必需序列并加上 *pyrEF* 筛选标记得到 pZC1 质粒<sup>[25]</sup>, 再去除 pZC1 质粒上的 *Pvu* II、*Nde* I 和 *Zra* I 三个多余的酶切位点得到 pDL1, 在 pDL1 上插入阿拉伯糖启动子、两个 His 标签和多克隆位点得到 pEXA, 最终使用含有 SD 序列的阿拉伯糖启动子替换原始的阿拉伯糖启动子得到 pSeSD 质粒<sup>[26]</sup>。现在 pSeSD 是冰岛硫化叶菌中使用最广泛的一个冰岛硫化叶菌-大肠杆菌穿梭质粒(图 1), 该质粒转化效率高达  $10^4$ - $10^6$  CFU/ $\mu$ g DNA 且具有较好的稳定性, 利用该质粒可以进行启动子分析、蛋白表达、遗传互补和基因编辑等一系列研究。

### 1.3 质粒转化方法

在冰岛硫化叶菌中普遍使用的唯一高效的转化方法是电转化法(Electroporation)。Schleper 等在硫化叶菌中最早使用电转化法成功将硫化叶菌病毒 SSV1 的 DNA 导入 *S. solfataricus* P1 中<sup>[27]</sup>, 随后该方法在多种硫化叶菌中推广使用并被不断改进。

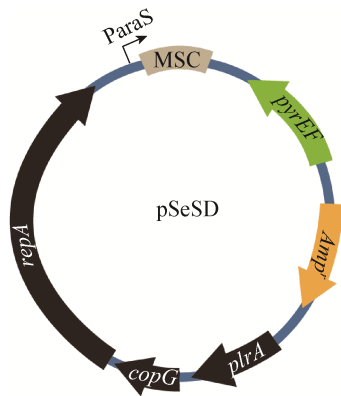


图 1 冰岛硫化叶菌-大肠杆菌穿梭质粒 pSeSD

Figure 1 *Sulfolobus islandicus*-*Escherichia coli* shuttle vector pSeSD

注: pSeSD 质粒图谱, 包含来源于 pRN2 的 3 个保守基因 *repA*、*copG* 和 *plrA*, 阿拉伯糖启动子 *ParaS*, 多克隆位点 *MCS*, 冰岛硫化叶菌筛选标记 *pyrEF*, 大肠杆菌筛选标记 *Amp<sup>r</sup>*。

Note: Plasmid map of pSeSD, which contains three conserved genes of *repA*, *copG* and *plrA* from pRN2, an arabinose-inducible promoter, multiple cloning site, *pyrEF* selection marker of *Sulfolobus islandicus* and *Amp<sup>r</sup>* selection marker of *Escherichia coli*.

目前在冰岛硫化叶菌中使用的电转参数为: 1 200 V, 600  $\Omega$ , 25  $\mu$ F, 1 mm 电转杯, 电击后需加入预热至 75  $^{\circ}$ C 的孵育培养基, 并于 75  $^{\circ}$ C 条件下静置孵育 2–3 h。电转参数的设置并不是绝对的, 最早的电转参数为 1 500 V 和 800  $\Omega$ , Albers 等采用 2 mm 电转杯进行转化也得到了很高的转化效率<sup>[28]</sup>, Auceili 等在转化时连续电击两次也能取得较好的转化结

果<sup>[29]</sup>, 因此在一个较广的范围内改变电转参数都可以成功转化, 可以针对不同的 DNA 进行一定的参数优化以取得理想的转化效率, 同时孵育时间的长短也会影响最终的转化效率。

## 2 冰岛硫化叶菌遗传操作体系的应用

### 2.1 基于常规同源重组的基因敲除体系

基因敲除策略是遗传操作体系的重要组成部分, 冰岛硫化叶菌最初的基因敲除策略是基于同源重组的原理构建的。

“质粒整合分离”(Plasmid integration and segregation, PIS)是在很多古菌中已经成功运用的最简单的一种敲除策略。Deng 等最先在冰岛硫化叶菌中尝试使用该方法敲除 *lacS* 基因<sup>[14]</sup>, 通过在以 *pyrEF* 基因作为筛选标记的 pHZ1 质粒上克隆目的基因的左臂和右臂得到 pPIS 敲除质粒。该质粒以环状的形式转入冰岛硫化叶菌后, 质粒上的左臂或右臂与基因组上对应位置发生一次同源单交换将 *pyrEF*、左臂和右臂插入基因组。然后使用 5-FOA 进行负筛选促使基因组上两个左臂或两个右臂发生同源重组, 从而使 *pyrEF* 单独环出或者 *pyrEF* 和目的基因同时环出, 理论上两种环出方式的概率相同, 因此最终得到的转化子中敲除菌株和野生型各占 50%。敲除质粒的构建及策略如图 2 所示, 因为

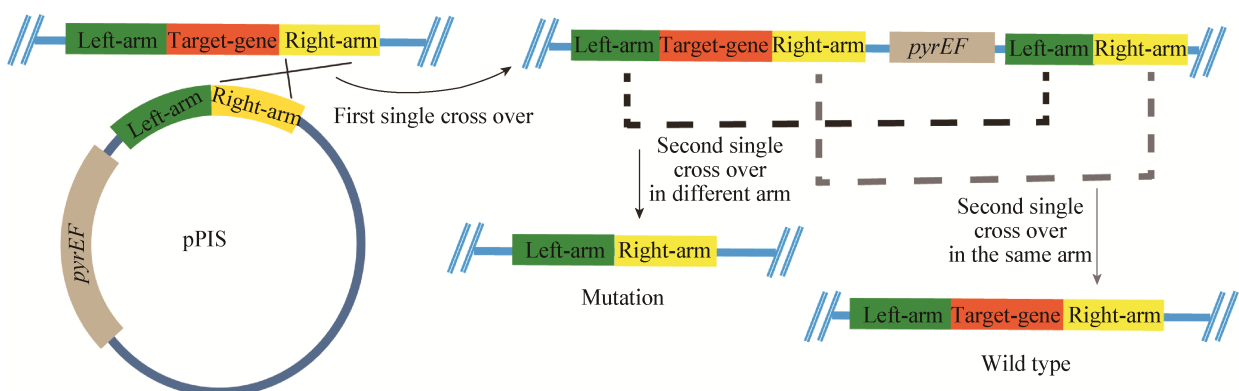


图 2 质粒整合分离法

Figure 2 The method of plasmid integration and segregation

注: 质粒 pPIS 含有筛选标记 *pyrEF* 和用于单交换的左臂和右臂, 第一次单交换将 *pyrEF*、左臂和右臂插入基因组, 在筛选压力下发生第二次单交换得到突变体和野生型。

Note: The plasmid pPIS contains *pyrEF* selection marker and the left-arm and right-arm for single cross over, *pyrEF*, left-arm and right-arm are inserted into genome by the first single cross over, and then the second single cross over results in both mutant and wild type under the pressure of selection.

此方法转化效率较低, 只能得到很少的几个转化子, 所以现在很少使用该方法进行基因敲除。

“标记替换及环出法”(Marker replacement and looping out, MRL)是对 PIS 策略进行优化而发展出的一种敲除策略。Deng 等最先利用该策略在冰岛硫化叶菌中敲除 *lacS* 基因。pMRL 敲除质粒经过线性化后转入细胞, 左臂和右臂与基因组发生一次同源双交换将目的基因替换为 *pyrEF* 筛选标记和一个左臂, 再使用 5-FOA 进行负筛选促使 2 个左臂发生同源重组将 *pyrEF* 和一个左臂环出。敲除质粒的构建及策略如图 3 所示, 该方法得到的转化子理论上都是敲除菌株, 并且转化效率可以达到  $10^2$  CFU/ $\mu\text{g}$  DNA<sup>[14]</sup>。但是因为第一步同源双交换会破坏基因组上目的基因, 因此使用此方法需注意敲除片段不影响相邻基因的转录与表达。

然而 Zhang 等用以上两种敲除策略进行基因敲除时遇到了一些问题, 使用质粒整合分离的方法敲除增殖细胞核抗原基因 (Proliferating cell nuclear antigen, *pcna*) 时, 多次重复转化都没有得到任何转化子, 而使用标记替换及环出法可以得到转化子, 但最终验证发现都是野生型。因此他推测在敲除某些与 DNA 复制、修复和细胞生长相关基因时, 这

两种方法都不适用。因此 Zhang 等对标记替换及环出法进行改进, 建立了一种新的敲除策略“选择标记插入/无选择标记的基因缺失法”(Marker insertion and unmarked target gene deletion, MID), 该方法将标记替换及环出法中的一个同源臂变为基因臂 Tg-arm, 两个同源臂也变为将标记基因交换到基因组上的 In-arm 和将标记基因 Marker 及目的基因环出的 Out-arm。In-arm 和 Tg-arm 与基因组发生同源双交换将标记基因和 Out-arm 插入基因组, 用不含尿嘧啶的培养基和 X-gal 染色两种方法筛选正确转化子。然后再用含有尿嘧啶和 5-FOA 的平板进行负筛选, 基因组上两个 Out-arm 发生单交换将筛选标记和目的基因环出从而得到缺失突变菌株(图 4)。该方法在第一步双交换时不会破坏目的基因, 第二步筛选时如果目的基因是必需基因则得不到正确转化子, 即使有少量转化子也是发生回复突变或筛选标记自发突变的转化子, 所以可以使用该方法鉴定基因的必需性<sup>[30-31]</sup>。使用此方法需要注意的是要确保第一步同源双交换以后目的基因及其两侧基因可以正常表达, 同时要尽可能减少 In-arm 和 Tg-arm 之间的重复序列以避免其发生重组。

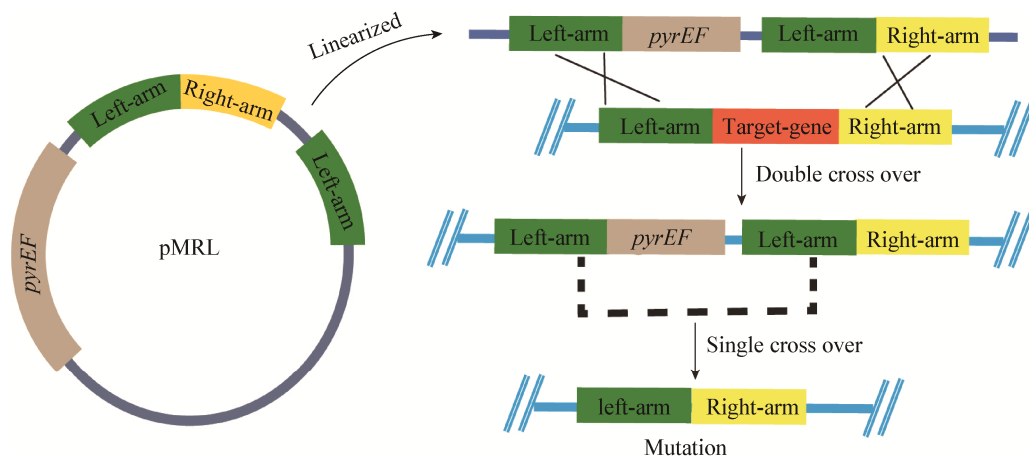


图 3 标记替换及环出法

Figure 3 The method of marker replacement and looping out

注: 在 pPIS 上增加一个左臂得到 pMRL 质粒, 质粒线性化后经同源双交换将 *pyrEF* 和左臂与目标基因进行替换, 在筛选压力下两个左臂单交换得到突变体。

Note: The plasmid pMRL is the pPIS with another added left-arm and is linearized, then *pyrEF* selection marker and the left-arm replace the target gene by double cross over, and the single cross over with two left-arm results in mutant under the pressure of selection.

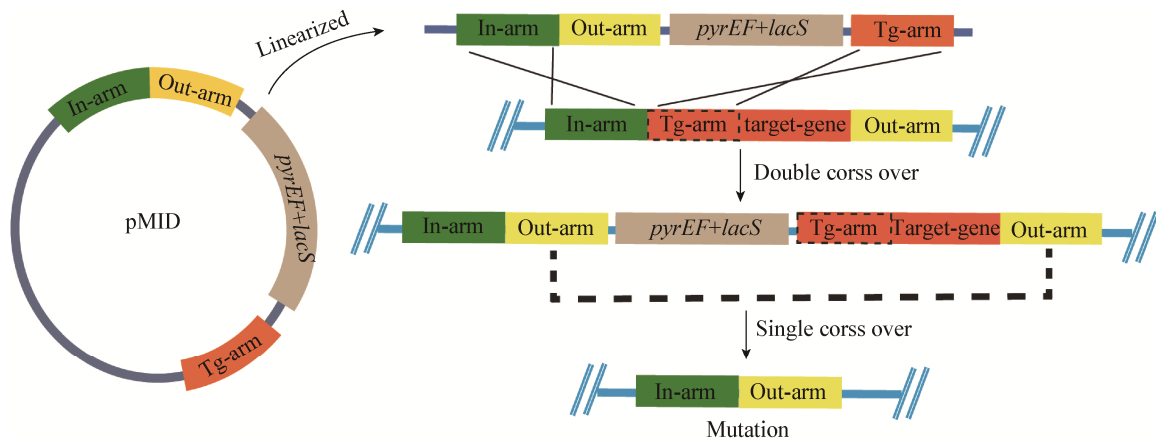


图 4 选择标记插入/无选择标记的基因缺失法

Figure 4 The method of marker insertion and unmarked target gene deletion

注: pMID 质粒包含 *pyrEF* 和 *lacS* 双筛选标记, In-arm, Out-arm 和 Tg-arm, 线性化后通过同源双交换将筛选标记和 Out-arm 插入 In-arm 与目标基因之间, 然后在筛选压力下两个 Out-arm 单交换得到突变体。

Note: The plasmid pMID contains *pyrEF* and *lacS* double selection marker, In-arm, Out-arm and Tg-arm. After it is linearized, selection marker and Out-arm insert between In-arm and the target gene in the genome by double cross over, and the single cross over with two Out-arms results in mutant under the pressure of selection.

## 2.2 基于 CRISPR-Cas 系统的基因编辑体系

CRISPR-Cas 系统是原核生物的一种获得性免疫系统<sup>[32]</sup>, 近年来被开发为一种新的基因编辑方法, 在动植物基因编辑等方面的研究中展现了独特的科学魅力<sup>[33-35]</sup>。冰岛硫化叶菌含有一个 I-A 型和两个 III-B 型 CRISPR-Cas 系统, 迄今为止关于其核酸干涉机制的研究已经较为清楚。Gudbergsdottir 等使用含有 CRISPR 簇中的间隔序列的质粒进行转化实验证实冰岛硫化叶菌 I-A 型系统是依赖于识别“CCN”的 PAM (Protospacer adjacent motif) 序列发挥 DNA 干涉活性<sup>[36]</sup>。Deng 等将含有不能被 I-A 型系统干涉的间隔序列的质粒转化冰岛硫化叶菌, 证实 III-B 型 Cmr- $\alpha$  具有依赖于转录的 DNA 干涉活性<sup>[37]</sup>。Peng 等分别敲除 III-B 型系统中 Cmr- $\alpha$  和 Cmr- $\beta$  的相关基因, 再用干涉质粒和报告基因两种方法证实 Cmr- $\alpha$  和 Cmr- $\beta$  都具有 RNA 干涉活性<sup>[38]</sup>。

冰岛硫化叶菌 III-B 型系统的 RNA 干涉活性最先被开发应用为一种基因沉默的工具, 为研究必需基因的功能开创了新的思路和方法。Peng 等在 pSeSD 质粒的多克隆位点插入被 2 个 *BspM* I 内切酶隔开的 2 个 CRISPR 簇重复序列(Repeat), 得到原

始基因沉默质粒 pSe-Rp。然后针对需要沉默的基因在其编码链上选取 5'-GAAAG-3'或 5'-CAGAG-3'后面 40 bp 作为 Spacer, 该 Spacer 转录加工得到的 crRNA 的 5'端可以与编码链的 5'-GAAAG-3'或 5'-CAGAG-3'形成互补配对以避免 III-B 型系统依赖于转录的 DNA 干涉活性, 又因缺少有活性的 PAM 序列可以避免 I-A 型系统依赖于 PAM 的 DNA 干涉活性, 但该 Spacer 仍具有 RNA 干涉活性。设计引物时在编码链的引物 5'端加上 5'-TAGC-3', 在非编码链的引物 5'端加上 5'-AAAG-3', 2 条引物直接经过退火形成带 5'端突出的双链短片段, 短片段与 *BspM* I 酶切以后的质粒通过酶连插入两个 Repeat 之间形成 mini-CRISPR, 最终得到人工干涉质粒 pAC。pAC 上 mini-CRISPR 转录的 crRNA 可以介导 III 型核酸干涉符合物特异性切割目的基因转录的 mRNA, 从而降低目的基因的表达水平(图 5)。Spacer 在基因上的位置会影响基因沉默的效率, 同时 Spacer 上的 25-28 位和 29-32 位碱基突变也会大大降低 RNA 干涉活性, mRNA 水平与蛋白质表达水平也不一定呈正相关, 因此还需要通过 RT-qPCR 和 Western blot 对基因沉默的水平进行验证和定量<sup>[38]</sup>。

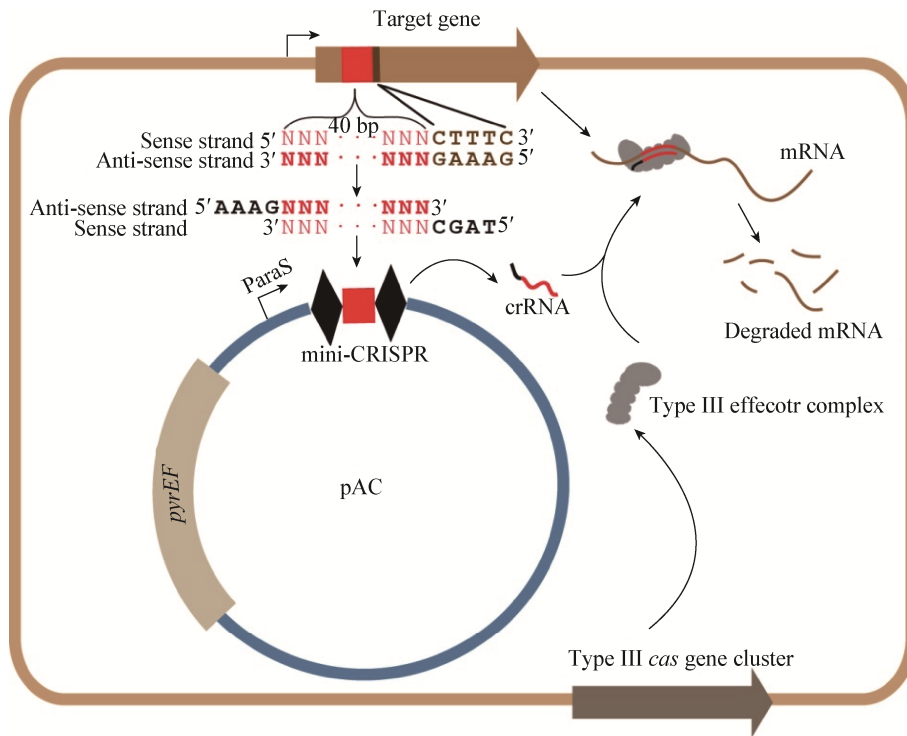


图 5 基于 CRISPR-Cas 系统的基因沉默方法  
Figure 5 Method of gene silencing based on CRISPR-Cas system

基于以上的研究结果, Li 等<sup>[1]</sup>开发了一种基于冰岛硫化叶菌 I-A 型和 III-B 型 CRISPR-Cas 系统的基因编辑技术。该方法在基因沉默质粒 pSe-Rp 基础上用相同方法克隆具有 DNA 干涉活性的 Spacer 到 2 个 Repeat 之间组成 mini-CRISPR, 再将经 SOE 得到的供体 DNA (Donor DNA) 用 *Sal I* 和 *Not I* 两个酶切位点克隆到该质粒上, 最终得到目的基因编辑

质粒 pGE。pGE 上 mini-CRISPR 转录的 crRNA 可以介导 CRISPR-Cas 核酸干涉复合物特异性切割目的基因, 供体 DNA 上可以设计缺失、插入和点突变, 用于与基因组上编辑位点发生同源重组从而使细胞存活(图 6)。该方法质粒构建十分简便, 而且转化效率可以高达  $10^2-10^3$  CFU/ $\mu\text{g}$  DNA。与基因沉默不同的是 Spacer 需要“CCN”或“TCN”的 PAM 序列

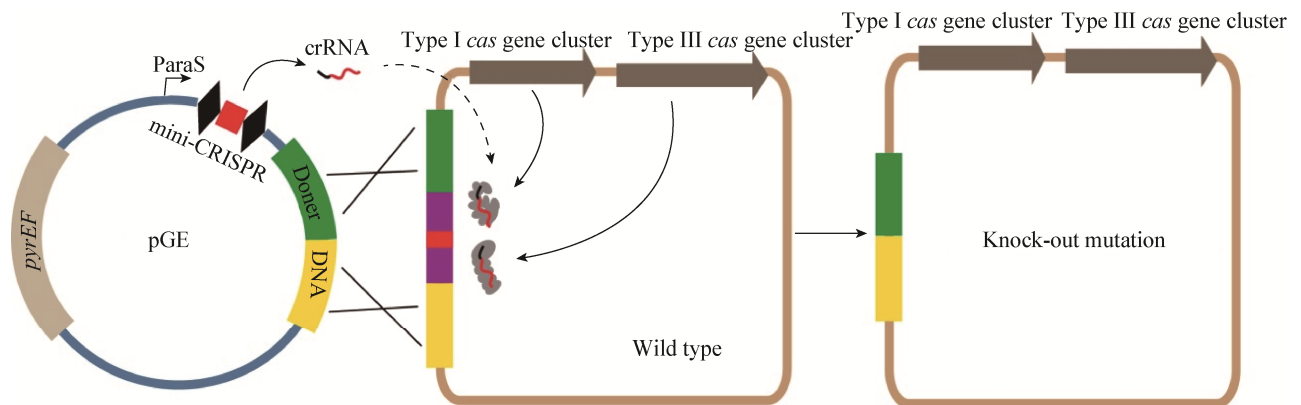


图 6 基于 CRISPR-Cas 系统的基因编辑方法  
Figure 6 Method of gene editing based on CRISPR-Cas system

才能发挥 I-A 型系统 DNA 干涉活性, 而 III-B 型系统需要 Spacer 位于编码链, 且与 Spacer 互补的非编码链的 mRNA 的 3'端序列与 mini-CRISPR 转录的 crRNA 的 5'端序列错配。在 *cmr2α* 上开展的点突变实验证实在 10 bp 左右的 DNA 片段间可以发生同源重组, 所以尤其需要注意的是, 设计点突变时突变位点应尽量选取在 Spacer 上或者靠近 Spacer 的位置以确保同源重组时突变位点可以重组到基因组上, 另外利用 I-A 型 DNA 干涉活性需要将 PAM 进行同义突变, 利用 III-B 型 DNA 干涉活性需要将 Spacer 的 3'端序列进行同义突变, 以保护突变以后的序列不会再次被编辑质粒干涉<sup>[11]</sup>。

### 3 小结与展望

冰岛硫化叶菌作为嗜酸热古菌的一种模式菌株, 研究者们越来越关注其 DNA 复制及修复<sup>[39]</sup>、CRISPR-Cas 系统<sup>[40-46]</sup>和蛋白修饰<sup>[47]</sup>等机制的研究, 方便成熟的遗传操作体系将对这些研究起巨大推动作用。得益于对冰岛硫化叶菌分子机制的研究, 其遗传操作系统日趋完善和便捷, 但是也待进一步改进和优化。

本文介绍了目前在冰岛硫化叶菌中取得成功应用的几种基因操作策略。PIS 法实验设计最简单, 质粒构建也最简便, 但是此方法转化效率最低, 负筛选得到含有野生型和敲除菌株的混合转化子, 因此具有很大的不确定性。MRL 法在 PIS 的基础上进行优化, 一定程度提高了转化效率, 且最终负筛选得到的都是敲除菌株, 但是因为第一步同源双交换破坏了原始基因, 所以当得不到任何转化子时无法确定该基因是否为必需基因还是实验设计及操作存在问题。MID 法是 MRL 的改进方法, 克服了之前方法的所有缺点, 但是质粒构建较复杂, 也存在质粒自身发生环化整合到宿主染色体上, 进而在负筛选时环出得到野生型转化子的问题。基于 CRISPR-Cas 系统的基因编辑方法是目前效率最高、使用最多且操作最简便的策略, 可以满足突变、缺失和插入等多种研究需求, 但会出现编辑质粒成功

转入但目的基因并未敲除的现象, 出现此现象的原因可能是目的基因是必需基因或者 CRISPR-Cas 系统功能异常。此方法不适用于在 CRISPR-Cas 系统 crRNA 加工和干涉相关功能缺失突变菌株中进行基因编辑, 也不适用于编辑基因组上的重复序列。另外, 可能存在类似于 Cas9 系统的脱靶现象。综上所述, 不同敲除策略有各自的特点与适用性, 研究者需要根据实际情况和目的进行选择。

本文所述的遗传操作系统也同样适用于某些与冰岛硫化叶菌生存环境十分相似的, 如: 硫磺矿硫化叶菌 (*S. solfataricus*) 和嗜酸热硫化叶菌 (*S. acidocaldarius*)。研究者可以使用相同的筛选标记、质粒载体和转化方法, 通过相同的基因敲除策略对这两种硫化叶菌进行遗传改造。但是对于东工大硫化叶菌 (*S. tokodaii*), 人们目前只对其进行了全基因组测序和分析, 并没有建立十分稳定有效的遗传操作体系。

鉴于现有冰岛硫化叶菌遗传操作体系存在的一些问题, 未来可以从以下几个方向对其进行补充和完善: (1) 开发更多适用于冰岛硫化叶菌的筛选标记, 如氨基酸营养缺陷型标记。(2) 开发多位点编辑方法, 目前基于 CRISPR-Cas 系统的基因编辑方法只含有一个 mini-CRISPR, 所以只能对单一位点进行编辑, 可以构建含有多个 Spacer 的 mini-CRISPR 并在质粒上引入多个供体 DNA, 从而同时对多个基因进行编辑。(3) 开发全基因组范围的基因调控技术。Koneremann 等将 CRISPR-Cas9 系统开发成一种全基因组水平转录激活的新方法<sup>[48]</sup>, 对于这方面工作冰岛硫化叶菌内源 CRISPR-Cas 系统具有独特的优势, 只需将核酸干涉蛋白进行一定改造, 就可以利用其 CRISPR-Cas 系统免疫适应获取的间隔序列完成全基因组水平的基因表达调控。基于内源 CRISPR-Cas 系统的冰岛硫化叶菌遗传操作体系已经成为当下主流的基因编辑方法, 在该方法基础上进行不断优化将大大提高对冰岛硫化叶菌遗传改造的效率和准确性。

## REFERENCES

- [1] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(12): 4576-4579
- [2] Brock TD, Brock KM, Belly RT, et al. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature[J]. Archiv Fur Mikrobiologie, 1972, 84(1): 54-68
- [3] Zillig W, Arnold HP, Holz I, et al. Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*[J]. Extremophiles, 1998, 2(3): 131-140
- [4] Lipps G. Plasmids and viruses of the thermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus*[J]. Extremophiles, 2006, 10(1): 17-28
- [5] Prangishvili D, Stedman K, Zillig W. Viruses of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*[J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(1): 39-43
- [6] Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea[J]. Science, 2003, 301(5635): 976-978
- [7] Guo L, Brügger K, Liu C, et al. Genome analyses of icelandic strains of *Sulfolobus islandicus*, model organisms for genetic and virus-host interaction studies[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(7): 1672-1680
- [8] Reno ML, Held NL, Fields CJ, et al. Biogeography of the *Sulfolobus islandicus* pan-genome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(21): 8605-8610
- [9] Redder P, Peng X, Brügger K, et al. Four newly isolated fuselloviruses from extreme geothermal environments reveal unusual morphologies and a possible interviral recombination mechanism[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(11): 2849-2862
- [10] Contursi P, Jensen S, Aucelli T, et al. Characterization of the *Sulfolobus* host-SSV2 virus interaction[J]. Extremophiles, 2006, 10(6): 615-627
- [11] Li YJ, Pan SF, Zhang Y, et al. Harnessing Type I and Type III CRISPR-Cas systems for genome editing[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(4): e34
- [12] Cannio R, Contursi P, Rossi M, et al. An autonomously replicating transforming vector for *Sulfolobus solfataricus*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(12): 3237-3240
- [13] Thia-Toong TL, Roovers M, Durbecq V, et al. Genes of *de novo* pyrimidine biosynthesis from the hyperthermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*: novel organization in a bipolar operon[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(16): 4430-4441
- [14] Deng L, Zhu HJ, Chen ZJ, et al. Unmarked gene deletion and host-vector system for the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus islandicus*[J]. Extremophiles, 2009, 13(4): 735-746
- [15] Berkner S, Lipps G. Mutation and reversion frequencies of different *Sulfolobus* species and strains[J]. Extremophiles, 2008, 12(2): 263-270
- [16] Jonuscheit M, Martusewitsch E, Stedman KM, et al. A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector[J]. Molecular Microbiology, 2003, 48(5): 1241-1252
- [17] Grogan DW. Evidence that  $\beta$ -galactosidase of *Sulfolobus solfataricus* is only one of several activities of a thermostable  $\beta$ -D-glycosidase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(6): 1644-1649
- [18] Keeling PJ, Klenk HP, Singh RK, et al. *Sulfolobus islandicus* plasmids pRN1 and pRN2 share distant but common evolutionary ancestry[J]. Extremophiles, 1998, 2(4): 391-393
- [19] Purschke WG, Schäfer G. Independent replication of the plasmids pRN1 and pRN2 in the archaeon *Sulfolobus islandicus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 200(1): 97-102
- [20] Lipps G. The replication protein of the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1[J]. Biochemical Society Transactions, 2004, 32: 240-244
- [21] Lipps G, Röther S, Hart C, et al. A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity[J]. The EMBO Journal, 2003, 22(10): 2516-2525
- [22] Lipps G, Stegert M, Krauss G. Thermostable and site-specific DNA binding of the gene product ORF56 from the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1, a putative archaeal plasmid copy control protein[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(4): 904-913
- [23] Lipps G, Ibanez P, Stroessenreuther T, et al. The protein ORF80 from the acidophilic and thermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* binds highly site-specifically to double-stranded DNA and represents a novel type of basic leucine zipper protein[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(24): 4973-4982
- [24] Berkner S, Grogan D, Albers SV, et al. Small multicopy, non-integrative shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-)archaea[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(12): e88
- [25] Peng N, Xia Q, Chen ZJ, et al. An upstream activation element exerting differential transcriptional activation on an archaeal promoter[J]. Molecular Microbiology, 2009, 74(4): 928-939
- [26] Peng N, Deng L, Mei YX, et al. A synthetic arabinose-inducible promoter confers high levels of recombinant protein expression in hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5630-5637
- [27] Schleper C, Kubo K, Zillig W. The particle SSV1 from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* is a virus: demonstration of infectivity and of transfection with viral DNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(16): 7645-7649
- [28] Albers SV, Driessen AJM. Conditions for gene disruption by homologous recombination of exogenous DNA into the *Sulfolobus solfataricus* genome[J]. Archaea, 2008, 2(3): 145-149
- [29] Aucelli T, Contursi P, Girfoglio M, et al. A spreadable, non-integrative and high copy number shuttle vector for *Sulfolobus solfataricus* based on the genetic element pSSVx from *Sulfolobus islandicus*[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(17): e114
- [30] Zhang CY, Tian B, Li SM, et al. Genetic manipulation in *Sulfolobus islandicus* and functional analysis of DNA repair genes[J]. Biochemical Society Transactions, 2013, 41(1): 405-410
- [31] Zhang CY, Guo L, Deng L, et al. Revealing the essentiality of multiple archaeal *pcna* genes using a mutant propagation assay based on an improved knockout method[J]. Microbiology, 2010, 156: 3386-3397
- [32] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its



- role in phage-bacteria interactions[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64: 475-493
- [33] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826
- [34] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823
- [35] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821
- [36] Gudbergdottir S, Deng L, Chen ZJ, et al. Dynamic properties of the *Sulfolobus* CRISPR/Cas and CRISPR/Cmr systems when challenged with vector-borne viral and plasmid genes and protospacers[J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(1): 35-49
- [37] Deng L, Garrett RA, Shah SA, et al. A novel interference mechanism by a type IIIB CRISPR-Cmr module in *Sulfolobus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 87(5): 1088-1099
- [38] Peng WF, Feng MX, Feng X, et al. An archaeal CRISPR type III-B system exhibiting distinctive RNA targeting features and mediating dual RNA and DNA interference[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(1): 406-417
- [39] Liu JF, Gao RX, Li CT, et al. Functional assignment of multiple ESCRT-III homologs in cell division and budding in *Sulfolobus islandicus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 105(4): 540-553
- [40] Liu T, Liu ZZ, Ye Q, et al. Coupling transcriptional activation of CRISPR-Cas system and DNA repair genes by Csa3a in *Sulfolobus islandicus*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(15): 8978-8992
- [41] Li YJ, Zhang Y, Lin JZ, et al. Cmr1 enables efficient RNA and DNA interference of a III-B CRISPR-Cas system by binding to target RNA and crRNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(19): 11305-11314
- [42] He F, Vestergaard G, Peng WF, et al. CRISPR-Cas type I-A Cascade complex couples viral infection surveillance to host transcriptional regulation in the dependence of Csa3b[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(4): 1902-1913
- [43] Han WY, Li YJ, Deng L, et al. A type III-B CRISPR-Cas effector complex mediating massive target DNA destruction[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(4): 1983-1993
- [44] León-Sobrinó C, Kot WP, Garrett RA. Transcriptome changes in STSV2-infected *Sulfolobus islandicus* REY15A undergoing continuous CRISPR spacer acquisition[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 99(4): 719-728
- [45] Liu T, Li YJ, Wang XD, et al. Transcriptional regulator-mediated activation of adaptation genes triggers CRISPR *de novo* spacer acquisition[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(2): 1044-1055
- [46] Peng WF, Li H, Hallstrom S, et al. Genetic determinants of PAM-dependent DNA targeting and pre-crRNA processing in *Sulfolobus islandicus*[J]. *RNA Biology*, 2013, 10(5): 738-748
- [47] Cao JJ, Wang Q, Liu T, et al. Insights into the post-translational modifications of archaeal Sis10b (Alba): lysine-16 is methylated, not acetylated, and this does not regulate transcription or growth[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 109(2): 192-208
- [48] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex[J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588