

嗜热厌氧杆菌热稳定 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术及在细胞工厂构建中的应用研究进展

乐易林, 何兴, 孙建中

江苏大学 环境与安全工程学院 生物质能源研究院, 江苏 镇江 212013

乐易林, 何兴, 孙建中. 嗜热厌氧杆菌热稳定 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术及在细胞工厂构建中的应用研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1475-1489.

LE YL, HE X, SUN JZ. Thermostable CRISPR/Cas9 genome editing system and its application in construction of cell factories with thermophilic bacteria: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1475-1489.

摘 要: 嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株作为一个高温发酵的细胞工厂, 具有生产生物燃料和化学品的潜力, 已引起了研究者的广泛兴趣。随着嗜热厌氧杆菌属来源的多个菌株全基因组测序的完成以及相关的生理生化实验的开展, 建立一个简便、快捷的基因操作技术将有助于进一步深入理解和认识嗜热厌氧杆菌有关的代谢途径。最近, 成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关系统 (CRISPR/Cas) 的基因编辑技术在嗜热菌中被开发应用。文中综述了嗜热厌氧杆菌的研究进展和热稳定性 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在嗜热厌氧杆菌的发展和建立, 并对该编辑技术在其他嗜热菌未来发展的趋势提出参考意见。嗜热菌热稳定性的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的建立和完善不仅可以促进嗜热菌遗传改造技术的发展, 而且有助于提高嗜热菌遗传育种和代谢工程改造的效率。

关键词: 嗜热厌氧杆菌; 热稳定性 Cas9; 热稳定性 CRISPR/Cas9; 基因编辑

Received: November 7, 2021; **Accepted:** January 7, 2022; **Published online:** January 12, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFE0107100); National Natural Science Foundation of China (31772529)

Corresponding authors: LE Yilin. E-mail: leyilin@ujs.edu.cn

SUN Jianzhong. E-mail: jzsun1002@ujs.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFE0107100); 国家自然科学基金 (31772529)

Thermostable CRISPR/Cas9 genome editing system and its application in construction of cell factories with thermophilic bacteria: a review

LE Yilin, HE Xing, SUN Jianzhong

Biofuels Institute, School of the Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

Abstract: The diverse thermophilic strains of *Thermoanaerobacter*, serving as unique platforms with a broad range of application in biofuels and chemicals, have received wide attention from scholars and practitioners. Although biochemical experiments and genome sequences have been reported for a variety of *Thermoanaerobacter* strains, an efficient genetic manipulation system remains to be established for revealing the biosynthetic pathways of *Thermoanaerobacter*. In line with this demand, the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) systems for editing, regulating and targeting genomes have been well developed in thermophiles. Here, we reviewed and discussed the current status, associated challenges, and future perspectives of the construction of thermostable CRISPR/Cas9 genome editing systems for some representative *Thermoanaerobacter* species. The establishment, optimization, and application of thermostable CRISPR/Cas genome editing systems would potentially provide a foundation for further genetic modification of thermophilic bacteria.

Keywords: *Thermoanaerobacter*; thermostable Cas9; thermostable CRISPR/Cas9; gene editing

嗜热厌氧杆菌具有底物利用范围广、代谢速度快等特点，可以作为良好的细胞工厂生产生物燃料和工业化学品，如发酵产氢、乙醇、固碳和有机酸转化为相应的醇等^[1-2]。嗜热菌高温发酵由于反应速度快，并且可以减少杂菌污染风险等优点，已引起研究者广泛关注^[3]。

嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株属于严格厌氧嗜热菌，具有耐高温、己糖和戊糖共利用等生理特性^[4]。根据已有的基因组测序结果，嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株可以分为 3 个不同的分支 (表 1)^[5]。

表 1 嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株分类^[5]

Table 1 Distinct clades of *Thermoanaerobacter* strains^[5]

Clades	Strains
Clade 1	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X513; <i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514; <i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> 39E; <i>Thermoanaerobacter brockii</i> Ako-1
Clade 2	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i> A3; <i>Thermoanaerobacter italicus</i> AB9
Clade 3	<i>Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus</i> WC1; <i>Thermoanaerobacter wiegelii</i> Rt8; <i>Thermoanaerobacter siderophilus</i> strain SR4; <i>Thermoanaerobacter kivui</i> LKT-1

目前针对嗜热厌氧杆菌的主要研究集中在以下几个方面: 1) 嗜热厌氧杆菌的筛选, 比如从温泉中分离到新的戊糖发酵的嗜热厌氧杆菌, 达到扩大底物利用范围的目的^[6]; 2) 嗜热厌氧菌代谢途径^[5,7-8]以及关键酶的功能特性的研究^[9], 比如从基因组水平解析凯伍嗜热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter kivui*) 能量代谢途径和二氧化碳固定途径^[10]以及该菌的甘露醇代谢途径等^[11]; 3) 全基因组测序研究^[12-13], 比如产乙醇嗜热厌氧杆菌 JW200 在 2019 年公布了全基因组序列^[14], 在 NCBI 数据库中已有多个嗜热厌氧杆菌属来源的菌株全基因组序列已公布; 4) 嗜热厌氧杆菌来源的耐高温酶, 如转移葡萄糖苷酶、环糊精糖基转移酶, 醇脱氢酶和甘露醇-1-磷酸脱氢酶的功能特性以及应用研究^[15-20]; 此外, 通过定向进化方法对嗜热厌氧杆菌来源的葡萄糖异构酶进行改造, 提高酶的催化效率和稳定性^[21]; 5) 嗜热厌氧杆菌的遗传改造研究^[22-23], 比如在凯伍嗜热厌氧杆菌 (*T. kivui*) 中利用乳清酸磷酸核糖转移酶基因 (*pyrE*) 构建遗传操作系统。

嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 多个菌株基因组测序结果以及一些生化实验结果表明: 嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株之间的代谢途径存在差异, 代谢途径中的关键酶的功能特性有待进一步阐明^[5]。因此, 为了深入解析嗜热厌氧杆菌的代谢途径, 首要任务是建立一个简便、快捷的嗜热菌基因操作技术, 如删除编码关键酶的基因或过表达该基因。然而, 与具有成熟的遗传操作系统的常温菌如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 相比, 嗜热厌氧杆菌缺少简便快捷的遗传操作方法。由于嗜热厌氧杆菌 (比如 *Thermoanaerobacter ethanolicus*) 最适生长温度为 69 °C 高温环境, 高温下质粒的稳定性差、

转化效率低等因素造成嗜热厌氧杆菌遗传操作更加困难, 已有的遗传操作技术由于设备要求高, 或步骤烦琐不能被普通研究者所掌握。

成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关系统 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas) 是细菌和古菌抵抗外源病毒和噬菌体入侵的一种适应性免疫机制^[24]。由 RNA 指导的切割 DNA 的适应性免疫系统改造而成的 II 型 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在微生物基因功能的诠释、代谢途径的解析和菌株的改良等方面提供一个简便易行的方案^[25-26]。近几年来, 随着合成生物学的快速发展, 利用 CRISPR/Cas 基因编辑技术构建高效的微生物细胞工厂生产化学品和生物燃料等不断取得新的突破^[25]。

然而, 早期的 CRISPR/Cas9 系统来源的 Cas9 蛋白 (如 SpCas9) 不耐高温, 已建立的 CRISPR/Cas9 系统还不能运用到极端嗜热菌中。最近, 热稳定性的 Cas9 核酸酶被开发并开始应用于嗜热菌的遗传改造^[27-32]。热稳定性的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在嗜热厌氧杆菌中成功建立^[31]。因此, 热稳定性的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的建立为嗜热厌氧杆菌细胞工厂的构建提供了一个简便可行的遗传操作技术方案。我们对嗜热厌氧杆菌的研究进展和热稳定性 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在嗜热厌氧杆菌中的应用进行总结, 并对该基因组编辑技术在其他嗜热菌中的发展、应用以及该技术的改进进行了展望。

1 嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 作为高温发酵平台生产生物燃料与化学品

1.1 产氢与乙醇

嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来

源的菌株用于高温发酵生产生物燃料是当前的研究方向之一。目前已分离和筛选到的嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的一些菌株具有发酵产氢和乙醇的特性。常用来研究发酵产乙醇的菌株主要有: 嗜热厌氧杆菌 39E (*Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* 39E)、嗜热厌氧杆菌 X514 (*Thermoanaerobacter* sp. strain X514)、嗜热厌氧杆菌 JW200 (*Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200)、麻氏嗜热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter mathranii* BG1) 等^[33]。发酵产氢的嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株有: 嗜热厌氧杆菌 GHL15 (*Thermoanaerobacter* GHL15)^[34]和腾冲嗜热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter tengcongensis* JCM11007)^[35]等。

1.2 固定二氧化碳

通过微生物将 CO_2 转化为燃料或化学品, 实现 CO_2 的资源化利用是当前研究热点之一^[36]。产乙酸菌 (acetogens) 可以通过 Wood-Ljungdahl 途径将 2 个 CO_2 分子转化为醋酸。Wood-Ljungdahl 途径的关键酶之一是 CO 脱氢酶/乙酰辅酶 A 合酶 (CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, CODH/ACS)^[2]。值得注意的是, 凯伍嗜热厌氧杆菌 (*T. kivui*) 是目前已知的嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 中唯一含有 Wood-Ljungdahl 途径和固定 CO_2 功能的菌种^[7]。

1.3 转化多碳醇

多碳醇 (higher alcohols) 可以作为化石燃料的重要补充与替代品, 通常是指含有两个以上碳原子的醇类, 具有比乙醇更优良的燃料性能, 利用微生物将生物质废弃物转化为高级醇已成为绿色生物制造的发展方向之一^[37]。嗜热厌氧杆菌属来源的菌株, 如嗜热厌氧杆菌 X514 (*Thermoanaerobacter* sp. strain X514) 和嗜热厌

氧杆菌 (*Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*) 可以将有机酸还原为相应的醇^[38-40]。以支链氨基酸为底物时, 嗜热厌氧杆菌 (*T. pseudoethanolicus*) 能够将其转化为支链脂肪酸和相应的支链醇^[41]。

2 嗜热厌氧杆菌代谢途径及关键酶研究进展

2.1 嗜热厌氧杆菌能量代谢途径及关键酶

嗜热厌氧杆菌胞内能量代谢是影响细胞发酵水平的重要因素之一。NADH 和 NAD^+ 是细胞能量代谢所必需的辅酶, NADH/ NAD^+ 的比率反映胞内的氧化还原水平, 氧化还原水平的调节直接影响细胞的生理代谢和发酵产物。研究表明, 胞内氧化还原水平受转录因子的调控, 其中 Rex 转录因子 (redox regulation, Rex), 广泛存在于革兰氏阳性菌中, 是一个直接响应胞内氧化还原势能 (NADH/ NAD^+ 比率) 同时调控能量代谢的转录因子^[42]。Rex 转录因子可以结合到调控序列上, 通过结合靶基因位点实现阻遏相关基因的转录, 达到调控相关酶的表达水平, 从而平衡胞内氧化还原水平。最近研究人员在产乙醇嗜热厌氧杆菌 (*T. ethanolicus*) 中鉴定了一个 Rex 转录因子: 氧化还原感应蛋白 RSP^[43]。体外实验表明 RSP 与调控序列的结合能力受 NADH 浓度的影响。RSP 与配体 NAD^+ 、NADH 和 NAD^+ /DNA 三种复合体结构得到解析。RSP 参与阻遏调控的分子机制表明, 当 RSP 结合 NAD^+ 分子时, 采用开放构象 (open conformation) 可以结合到调控序列上, 从而抑制该基因的转录表达; 当 RSP 与 NADH 分子结合时, 采用封闭构象 (closed conformation), 调控序列不能结合 RSP 蛋白, 相关基因可以进行转录表达^[44]。我们通过删除 *rsp* 基因, 验证

了 RSP 蛋白参与调控发酵产物，包括氢、乙醇和有机酸等^[31]。

由于 NADH/NAD⁺的比率反映胞内的氧化还原水平，嗜热厌氧杆菌辅酶 NADH/NAD⁺参与的能量代谢途径如图 1 所示^[14,43]，其中能量代谢途径关键酶有 Ferredoxin: NAD(P)H 氧化还原酶 (FNOR 酶)，FNOR 酶包括 NADH-FNOR 和 NfnAB，醇脱氢酶 AdhE、AdhB、AdhA，对能量代谢起到调控作用的 Rex 转录因子——氧化还原感应蛋白 RSP 等。

起到桥梁作用的酶包括丙酮酸铁氧化还原蛋白酶 (PFOR)、铁氧还蛋白 (Fd) 等。嗜热厌氧杆菌存在糖酵解途径，该途径关键酶包括葡萄糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶等，在此过程中可以将 ADP 转化为 ATP。此外，嗜热厌氧杆菌代谢产物包括乙酸，乙酸激酶 (Ack) 是该过程的关键酶，在乙酸生成过程中伴随着 ADP 转化为 ATP。

根据目前已有的全基因组测序结果表明，嗜热厌氧菌杆属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株与能量代谢有关的关键酶基因存在一些差异^[2]。大部分嗜热厌氧杆菌属

(*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株含有双功能的醛/醇脱氢酶基因和醇脱氢酶基因 (表 2)^[2]。但是，一些菌株基因组中还发现含有醛:铁氧还蛋白氧化还原酶 (aldehyde:Fd oxidoreductase, AOR) 基因，例如：Clade 1 分支的嗜热厌氧杆菌 39E (*T. pseudethanolicus* 39E)、布氏热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter brockii* Ako-1) 和嗜热厌氧杆菌 X514 (*Thermoanaerobacter* sp. X514)。

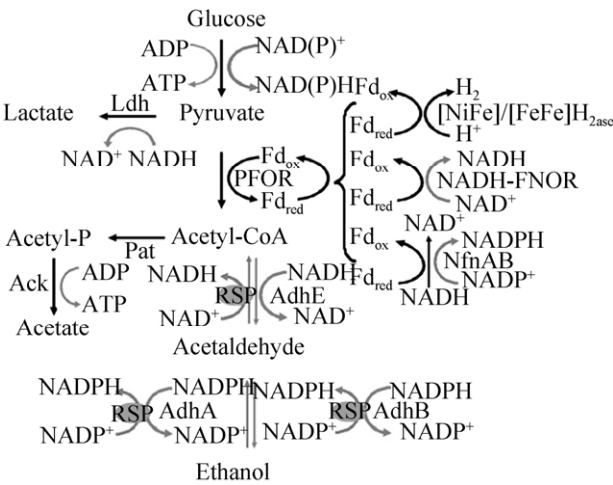


图 1 嗜热厌氧杆菌能量代谢途径示意图^[14,43]
Figure 1 Key enzymes involved in energy metabolism of *Thermoanaerobacter ethanolicus*^[14,43].

表 2 不同菌株来源的醛:铁氧还蛋白氧化还原酶和醇脱氢酶基因
Table 2 Aldehyde:ferredoxin oxidoreductase and alcohol dehydrogenase genes from *Thermoanaerobacter* species

Clades	Strains	Aldehyde:Fd oxidoreductase gene	Aldehyde/Alcohol dehydrogenase gene	Alcohol dehydrogenase gene
Clade 1	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> 39E	<i>Teth39_0850</i>	<i>Teth39_0206</i>	<i>Teth39_0220</i> <i>Teth39_0218</i>
	<i>Thermoanaerobacter brockii</i> Ako-1	<i>Thebr_0872</i>	<i>Thebr_0212</i>	<i>Thebr_0226</i> <i>Thebr_0224</i>
	<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514	<i>Teth514_1380</i>	<i>Teth514_0627</i>	<i>Teth514_0654</i> <i>Teth514_0653</i>
Clade 3	<i>Thermoanaerobacter wiegelii</i> Rt8	<i>Thewi_0375</i>	<i>Thewi_2535</i>	<i>Thewi_2518</i> <i>Thewi_1975</i>
Clade 2	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i> A3	Not found	<i>Tmath_2110</i>	<i>Tmath_2094</i> <i>Tmath_2093</i>
Clade 3	<i>Thermoanaerobacter kivui</i> LKT-1	Not found	Not found	<i>TKV_c02600</i>

Clade 3 分支的魏氏嗜热厌氧杆菌 (*T. wiegelii* Rt8) 的基因组中也含有醛:铁氧还蛋白氧化还原酶 (AOR) 基因。但是,有关醛:铁氧还蛋白氧化还原酶 (AOR) 的功能特性还不太清楚。以往的研究结果表明:将嗜热厌氧杆菌 X514 (*Thermoanaerobacter* sp. X514) 来源的醇脱氢酶基因 (*adhA*) 在嗜热古菌激烈火球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 中异源表达后,可以通过 AOR-Adh 途径发酵产乙醇。其作用机理是激烈火球菌 (*P. furiosus*) 来源的醛:铁氧还蛋白氧化还原酶 (AOR) 将醋酸转化为乙醛,乙醛被异源表达的醇脱氢酶 (AdhA) 还原为乙醇^[45]。因此,针对嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的醛:铁氧还蛋白氧化还原酶 (AOR) 进行基因操作,阐明其功能特性非常有必要。

2.2 二氧化碳固定途径及其关键酶

研究人员对自然界中已发现的固碳途径进行了总结,共有 6 种:卡尔文循环、3-羟基丙酸双循环、Wood-Ljungdahl 途径、还原性 (逆向) 三羧酸循环、二羧酸/4-羟基丁酸循环和 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环^[36]。其中 Wood-Ljungdahl 途径主要存在于产乙酸的厌氧菌中,该途径是 6 种天然固碳途径最短的一个固碳途径。

凯伍嗜热厌氧杆菌 (*T. kivui*) 可以利用 Wood-Ljungdahl 途径固定 CO_2 ^[7]。全基因组分析结果表明,凯伍嗜热厌氧杆菌 (*T. kivui*) 含有 Wood-Ljungdahl 途径关键酶 CO 脱氢酶/乙酰辅酶 A 合酶 (CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, CODH/ACS) 基因 (*TKV_c19820*),但是该菌株既没有双功能的醛/醇脱氢酶 (aldehyde/alcohol dehydrogenase) 基因,也没有醛:铁氧还蛋白氧化还原酶 (aldehyde:Fd oxidoreductase, AOR) 基因^[7]。凯伍嗜热厌氧杆菌 (*T. kivui*) 是嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 中唯一一个不产乙醇的

嗜热厌氧杆菌。有趣的是嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 其他的菌株一般都是以乙醇、醋酸、氢和二氧化碳为发酵产物。

凯伍嗜热厌氧杆菌 (*T. kivui*) 既可以 H_2 和 CO_2 进行自养生长,也可以葡萄糖、果糖、甘露糖和丙酮酸为底物进行异养生长,其代谢途径如图 2 所示^[7]。Wood-Ljungdahl 途径关键酶之一是 CO 脱氢酶/乙酰辅酶 A 合酶,其功能特性目前还未阐明^[7]。此外,丙酮酸和乙酰辅酶 A 之间的转化主要通过丙酮酸铁氧化还原酶 (pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, PFOR) 催化。凯伍嗜热厌氧杆菌 (*T. kivui*) 基因组测序结果表明包含 3 个 PFOR 酶^[46],这些 PFOR 酶的生理功能目前还不清楚,需深入研究。

3 嗜热厌氧杆菌遗传操作技术的建立与发展

3.1 依赖抗性基因和营养缺陷型菌株进行遗传操作策略

嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来

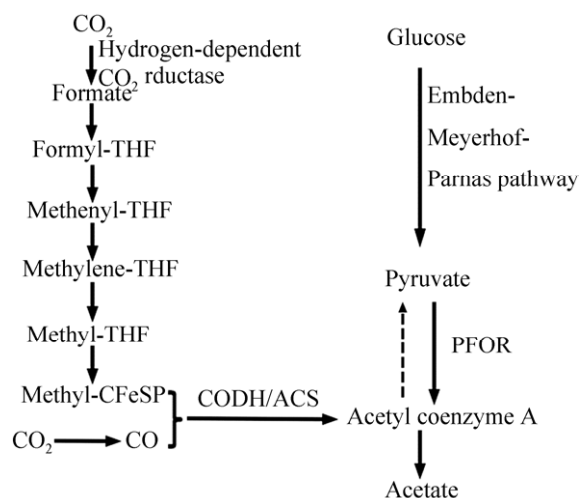


图 2 凯伍嗜热厌氧杆菌 (*T. kivui*) 代谢途径示意图^[7]

Figure 2 Metabolic pathway in *Thermoanaerobacter kivui*^[7].

源的菌株作为高温发酵的细胞工厂备受研究者关注。嗜热厌氧杆菌可以利用生物质废弃物为底物合成生物燃料或化学品^[34,38]。采用遗传改造策略构建的嗜热厌氧杆菌工程菌可以进一步提高产物发酵水平^[9]。在为数不多的几个嗜热菌基因操作技术中,研究人员主要通过抗性基因或营养缺陷型基因对嗜热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacter*)的一些菌株进行基因操作^[47]。敲除凯伍嗜热厌氧杆菌(*T. kivui*)基因组中的乳清酸磷酸核糖转移酶基因(*pyrE*),获得一个营养缺陷型菌株^[23]。对产乙醇嗜热厌氧杆菌(*T. ethanolicus*)基因组中胸腺嘧啶激酶基因(*tdk*)进行敲除,获得一个营养缺陷型菌株^[48]。此外,在嗜热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacter*)中常用到的抗性筛选标记是高温卡那霉素抗性基因(*htk*)^[48]。从解糖嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI)中分离到的质粒含有热稳定复制子,该复制子被广泛应用于嗜热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacter*)来源的菌株穿梭质粒的构建^[48]。

3.2 热稳定性 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术的建立

由 RNA 指导的切割 DNA 的适应性免疫系统改造而成的 II 型 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,具有操作简单、效率高等优点,不仅可以用于阐明微生物基因功能、解析代谢途径,而且为微生物功能基因的挖掘、菌株改良、基因定点突变以及创制新的种质资源提供一个简便易行的方案^[25-26]。

由化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)来源的 SpCas9 核酸酶发展而来的 CRISPR/SpCas9 基因组编辑系统已广泛应用于微生物改造中^[49-52]。此外,II 类 V 型 CRISPR 效应蛋白 Cas12a (也称作 Cpf1) 也被广泛应用于基因组编辑

中^[53-56]。然而,上述 SpCas9 和 Cas12a 蛋白都不耐高温,CRISPR/SpCas9 和 CRISPR/Cas12a 系统还不能运用到极端嗜热菌中。尽管研究人员利用 SpCas9 核酸酶在嗜中温菌中进行了基因编辑,但是该方法不适用于生长温度在 65 °C 以上的极端嗜热菌^[57]。此外,利用内源性 CRISPR/Cas 系统,研究人员成功地在冰岛硫化叶菌(*Sulfolobus islandicus*)^[58]和热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)^[30]中建立了内源性 CRISPR-Cas 基因组编辑系统。然而,内源性 Type I CRISPR/Cas 系统中 crRNA 需要与多个 Cas 蛋白组成复合体与靶 DNA 相结合来切割 DNA 链,这限制了该系统在其他菌株中的应用。

3.2.1 热稳定性 Cas9 核酸酶的功能特性

II 型 CRISPR 系统中 crRNA 只需要与 Cas9 单个蛋白组成复合体来进行 DNA 链切割,更适合进行异源表达操作,II 型 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统得到更为广泛的应用^[59]。为了实现极端嗜热菌的基因编辑,挖掘热稳定性 Cas9 核酸酶成为研究的关键点。研究人员通过分析微生物基因组数据库 (IMG),发现嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)^[27]来源的热稳定性 Cas9 和化脓性链球菌(*S. pyogenes*)来源的 SpCas9 具有高度同源性。此外,嗜热脱氮芽孢杆菌(*Geobacillus thermodenitrificans*)^[28]、解纤维酸热菌(*Acidothermus cellulolyticus*)^[29]、嗜热土芽孢杆菌(*Geobacillus* sp. strain LC300)^[32]来源的热稳定性的 Cas9 核酸酶的功能特性也得到解析。目前已鉴定的热稳定性的 Cas9 蛋白共有 4 个,表 3 总结了这些热稳定性 Cas9 蛋白的功能特性。

嗜热脂肪芽孢杆菌(*G. stearothermophilus*)来源的热稳定性的 GeoCas9 蛋白最高作用温度可以达到 70 °C。GeoCas9 蛋白由 1 087 个氨基酸组成,比 SpCas9 蛋白分子量小,GeoCas9 能

表 3 热稳定性 Cas9 蛋白的功能特性比较

Table 3 Characterization of thermostable Cas9

Cas9 variants	Isolated from strain	Size of protein	Nuclease activity at temperatures (°C)	PAM sequence (5'→3')	Spacer length (nt)	References
GeoCas9	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1 087 amino acids	≤ 70	NNNNCNAA	21–22	[27]
CaldoCas9	<i>Geobacillus</i> LC300	1 087 amino acids	35–65	NNNNGNAA	30	[32]
ThermoCas9	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> T12	1 082 amino acids	20–70	NNNNCNAA	19–23	[28]
AceCas9	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> strain 11B	1 157 amino acids	25–60	NNNCC	20–24	[29]

够识别的原间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 是 5'-NNNNCNAA-3'^[27], 而 SpCas9 蛋白识别的 PAM 序列为 5'-NGG-3'。嗜热脱氮芽孢杆菌 (*G. thermodenitrificans*) 来源的热稳定性 ThermoCas9 蛋白在 20–70 °C 范围内都有切割活性, 其最高作用温度可以达到 70 °C。ThermoCas9 蛋白由 1 082 个氨基酸组成, 同样比 SpCas9 蛋白分子量小, ThermoCas9 能够识别的 PAM 序列也是 5'-NNNNCNAA-3'^[28]。嗜热土芽孢杆菌 (*Geobacillus* sp. strain LC300) 来源的热稳定性 CaldoCas9 蛋白在 35–65 °C 范围内都有切割活性。CaldoCas9 蛋白由 1 087 个氨基酸组成, CaldoCas9 能够识别的 PAM 序列是 5'-NNNNGNAA-3'^[32]。解纤维酸热菌 (*Acidothermus cellulolyticus*) 来源的热稳定性 AceCas9 蛋白在 25–60 °C 范围内有切割活性, 其最高作用温度可以达到 60 °C。AceCas9 蛋白由 1 157 个氨基酸组成, 比 GeoCas9 和 ThermoCas9 蛋白分子量稍大, AceCas9 蛋白能够识别的 PAM 序列是 5'-NNNCC-3'^[29]。

3.2.2 嗜热厌氧杆菌 (*T. ethanolicus*) 热稳定性 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的建立

随着热稳定性 Cas9 蛋白的发现, 研究人员开始在嗜热菌中建立热稳定性 CRISPR/Cas9

基因编辑系统。2017 年 11 月, 利用热稳定性的 ThermoCas9 蛋白, 研究人员在 55 °C 培养环境中, 对嗜中温菌史氏芽孢杆菌 (*Bacillus smithii*) 进行了基因编辑^[28]。2020 年初, 利用热稳定性的 GeoCas9 蛋白在 55 °C 条件下, 对嗜热厌氧菌热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 进行了基因编辑^[30]。

尽管之前报道了利用热稳定性 Cas9 对嗜中温菌进行了基因编辑, 但是热稳定性的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统在极端嗜热菌中未见报道。2020 年 12 月, 我们报道了利用热稳定性的 GeoCas9 蛋白在 65 °C 条件下, 对极端嗜热厌氧杆菌 (*T. ethanolicus* JW200) 进行了基因编辑^[31]。随后 2021 年 5 月, 研究人员报道了在 65 °C 培养环境中, 对极端嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus* HB27) 进行了基因编辑^[32]。

由于嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株具有发酵产氢和乙醇、固碳以及将有机酸转化为相应的醇等特性, 嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株作为一个细胞工厂生产生物燃料和化学品具有巨大的潜力。发展和建立一个嗜热厌氧杆菌简便快捷的基因编辑系统成为当前研究的首要目标。为了实现极端嗜热厌氧杆菌基因编辑, 我们首先构

建了一个大肠杆菌-嗜热厌氧杆菌穿梭表达载体 pBlu10-Htk (GenBank: MN843970)。该穿梭表达载体包含: 来源于解糖嗜热厌氧杆菌 (*T. saccharolyticum* B6A-RI) 的热稳定性复制子、热稳定性卡纳霉素抗性基因片段、嗜热厌氧杆菌识别的启动子序列、SD 序列、多克隆位点和终止子序列以及大肠杆菌质粒 pBlueScript II SK(+) 来源的 pUC 复制子和氨苄抗性基因序列^[31]。

接着将嗜热脂肪芽孢杆菌 (*G. stearothermophilus*) 来源的热稳定性 GeoCas9 核酸酶基因序列通过全基因合成的策略合成全长基因。再将 GeoCas9 蛋白的基因序列插入到穿梭表达载体 pBlu10-Htk 的多克隆位点中。由于目前在嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 中没有找到合适的诱导型启动子, 于是我们尝试了多个组成型启动子表达 GeoCas9 蛋白。将含有 GeoCas9 蛋白的基因序列的穿梭表达载体 (pBlu10-Slay-Cas9) 和对照组不含 GeoCas9 蛋白的基因序列的 pBlu10-Htk 质粒, 分别转化嗜热厌氧杆菌后, 两者的转化效率存在明显的差异。含有 GeoCas9 基因的质粒转化嗜热厌氧杆菌获得的转化子个数明显少于对照组获得的转化子个数。一个可能的原因是 GeoCas9 表达后对宿主产生毒性^[31]。

此外, 通过全基因合成手段将 crRNA、tracrRNA 和 21 nt 的间隔序列连接在一起得到 sgRNA (small guide RNA), 并尝试不同的启动子表达 sgRNA, 构建含有 sgRNA 表达框的质粒 (pBlu10-P-sgT)。进一步将 sgRNA 表达框序列插入到含有 GeoCas9 表达框的穿梭表达载体中, 得到含有 GeoCas9 表达框和 sgRNA 表达框的质粒 (pBlu10-S-P-sgT)。质粒转化实验表明, 与质粒 pBlu10-Slay-Cas9 相比, 质粒 pBlu10-S-P-sgT 转化嗜热厌氧杆菌后, 转化效率更低^[31]。转化效率进一步下降的原因可能是

表达的 Cas9 蛋白和 sgRNA 组成的复合体与 DNA 链发生双链断裂, 没有得到及时修复造成的致命伤害。于是我们通过同源重组 (homologous recombination, HR) 修复的策略将双链断裂的 DNA 进行修复, 在质粒 pBlu10-S-P-sgT 中插入上下游同源臂, 构建含有同源修复臂的质粒。以嗜热厌氧杆菌 (*T. ethanolicus* JW200) 为编辑实例, 针对该菌的能量代谢途径关键酶基因 *adhE* 和氧化还原感应蛋白基因 *rsp* 进行基因编辑, 成功地获得了突变株 $\Delta adhE$ 和 Δrsp ^[31]。

4 总结与展望

大肠杆菌和酵母菌等模式生物是最常用的细胞工厂, 具有遗传背景清晰、遗传操作技术成熟等特点。此外, 枯草芽孢杆菌、运动发酵单胞菌、谷氨酸棒杆菌、乳酸菌等作为细胞工厂也被广泛应用于化学品和天然产物的合成领域^[60]。当前, 研究人员利用合成生物学技术, 对这些常温菌进行代谢途径设计、合成途径构建以及细胞优化, 极大地提高了这些细胞工厂合成化学品的生产速率和产量^[61]。

嗜热菌作为一个生产生物燃料和化学品潜在的细胞工厂, 具有底物利用范围广、反应速度快、减少杂菌污染的风险以及降低能耗等优点。一些嗜热菌 (如 *T. saccharolyticum*^[62]、*C. thermocellum*^[63]、*P. furiosus*^[45]) 通过代谢途径改造后具有生产丁醇和乙醇的能力。通过代谢工程改造嗜热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 来源的菌株提高代谢产物产量的研究备受研究者关注 (表 4)。由于嗜热菌在高温环境中培养, 筛选标记较少、质粒的稳定性差、转化效率低等因素造成嗜热菌遗传改造效率低。嗜热厌氧杆菌的代谢工程改造技术在不断发展, 最初的基因敲除策略由于在基因组中仍然保留抗

表 4 通过代谢工程改造的嗜热厌氧杆菌发酵生产生物燃料

Table 4 Engineered strains of *Thermoanaerobacter* for biofuel

Strains	Genetic tools	Description	Production	References
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i> Δ ldh	Gene integration based on an antibiotics selection	Gene <i>ldh</i> deletion, but retained the resistance gene	Ethanol yields of Δ ldh strain were increased by 30.5%	[33]
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> Δ adhA or Δ adhB	A markerless gene deletion system based on an antibiotics selection and nutritional selection	Gene <i>adhA</i> or <i>adhB</i> deletion, using kanamycin for positive selection and 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR) for negative selection	Ethanol yields of Δ adhA or Δ adhB strain were increased by 60%–70%	[9]
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> Δ rsp	Thermostable Cas9 mediated genome editing	Gene <i>rsp</i> deletion, less than 10% genome editing efficiency	Ethanol yields of the Δ rsp strain was increased by 17.9%	[31]
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> Δ adhE	Thermostable Cas9 mediated genome editing	Gene <i>adhE</i> deletion, about 77% genome editing efficiency through extending the time for cells to perform homologous recombination	Hydrogen yields of the Δ adhE strain were increased by 184.2%	[31]

性基因,使得多基因敲除受到限制;而之后发展的抗生素正筛选和营养物负筛选的无痕基因敲除技术,一方面步骤烦琐,另一方面有的嗜热厌氧杆菌的生长需要添加酵母粉,使得营养物筛选的策略受到限制;最近发展的热稳定性 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术具有简便和快捷的优势。

嗜热菌遗传操作技术的发展,特别是热稳定性 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的建立和完善,将有助于进一步阐明嗜热菌代谢途径及其关键酶的功能,为将来嗜热菌的遗传改造提供新的思路和策略。嗜热厌氧杆菌作为基底菌株,将嗜热菌来源的功能元件,如丁醇合成途径^[64]等引入到嗜热厌氧菌中,可以将废弃原料转化为工业化学品。由于嗜热菌代谢产物合成途径是一个复杂的过程,受多基因调控,因此发展热稳定性的 CRISPR 干扰技术以及引入非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 修复途径可以实现多基因操作,从全基因组的角度去认识与代谢相关的基因和调控因子。

此外,尽管热稳定性 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术已经在嗜热菌,如史氏芽胞杆菌 (*B. smithii*)^[28]、热纤梭菌 (*C. thermocellum*)^[30]、产乙醇嗜热厌氧杆菌 (*T. ethanolicus*)^[31]和嗜热栖热菌 (*T. thermophilus*)^[32]中成功地建立,但是嗜热菌的基因组编辑策略还处于初始发展阶段,嗜热菌的基因组编辑效率还有待提高。对于嗜热菌,特别是极端嗜热菌遗传操作技术较少,可用的诱导型启动子不多,嗜热菌转化效率低,高温条件下质粒不稳定,以及同源重组修复效率低等,都直接影响嗜热厌氧杆菌基因编辑效率。未来可以从以下几个方面对热稳定性 CRISPR/Cas9 基因编辑技术进行优化和完善。

(1) 筛选嗜热菌来源的启动子

针对 Cas9 核酸酶的异源表达对宿主产生的毒性作用,一个常用的策略是采用诱导型启动子诱导表达 Cas9 蛋白^[65]。因此,分析鉴定嗜热厌氧杆菌来源的启动子将有助于进一步提高热稳定性 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的效率。研究人员在热纤梭菌 (*C. thermocellum*)、

嗜热栖热菌 (*T. thermophilus*) 等嗜热菌中已开展了启动子筛选工作。最近, 研究人员在嗜热栖热菌 (*T. thermophilus*) 中鉴定了一个诱导型启动子 (sip promoter) 并建立了一个诱导型表达系统^[66]。

(2) 提高嗜热菌的修复效率

CRISPR/Cas9 基因组编辑系统中 Cas9 蛋白与 sgRNA 组成的复合体可以对基因组产生双链断裂, 嗜热菌一般采用同源重组修复途径进行修复。为了提高同源重组效率, 在嗜热菌中异源表达重组酶是一个可行的办法。例如: 在热纤梭菌 (*C. thermocellum*) 中表达热稳定性的重组酶可以进一步提高编辑效率^[30]。此外, 在嗜热厌氧杆菌中通过引入异源的非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 修复途径也是一个可尝试的策略。

(3) 优化 sgRNA 结构

为了提高基因组编辑的特异性和效率, 合理设计 sgRNA 结构是一个有效的方法^[67-68]。对于热稳定性 Cas9 核酸酶, 体外实验结果表明 tracrRNA 序列长度显著影响切割活性^[27]。由于热稳定性 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统是在高温环境下运行, 非常有必要探讨 sgRNA 在高温环境中的稳定性与切割活性之间的关系。

(4) 建立热稳定性的 CRISPR 干扰技术

在嗜热厌氧杆菌中进一步发展热稳定性的 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 技术非常有必要^[28]。通过定点突变改造热稳定性 Cas9 核酸酶获得热稳定性的 dCas9 核酸酶 (dead Cas9)^[28]。热稳定性的 dCas9 核酸酶不具有 DNA 切割活性, 但具有 DNA 结合能力, sgRNA-dCas9 复合体可以阻碍 RNA 聚合酶的通过, 导致特定基因的转录受到影响。

CRISPR 干扰技术介导的基因调节, 可以方便对基因的功能进行研究, 该技术在阐明基因表达调控机理等方面具有优势^[69]。

(5) 构建嗜热厌氧杆菌内源性 CRISPR/Cas 基因组编辑系统

在一些嗜热菌中已证实存在 Type I 型 CRISPR/Cas 系统^[30]。利用嗜热菌内源性的 Type I 型 CRISPR/Cas 发展的基因组编辑系统也可以有效进行基因组编辑^[30]。在嗜热厌氧杆菌中分析和鉴定内源性 CRISPR/Cas 系统并开发相应的基因组编辑系统可以发展和完善嗜热菌遗传改造技术。

“细胞工厂”的设计包括最优合成途径的设计, 合成途径的创建与优化以及细胞性能的优化^[70]。因此, 解析嗜热菌相关合成途径, 阐明合成途径关键酶的功能特性, 以及明晰嗜热菌代谢途径的调控机制为下一步构建嗜热菌细胞工厂奠定了基础。热稳定性的 CRISPR/Cas 基因组编辑技术为嗜热菌细胞工厂的构建提供了一个简便可行的操作工具。利用热稳定性的 CRISPR/Cas 基因组编辑技术和基于抗性筛选基因和营养缺陷型基因发展的遗传操作技术改造的嗜热菌工程菌不仅可以用来生产生物燃料和工业化学品, 而且可以强化环境修复以及开发合适的异源蛋白表达宿主 (图 3)。

总之, 热稳定性 CRISPR/Cas 基因组编辑技术在嗜热菌中的建立和完善, 为深入理解嗜热菌的代谢调控网络以及构建设计与组装嗜热菌“细胞工厂”提供了可靠的研究工具。随着嗜热菌遗传操作技术的发展, 我们可以利用合成生物学的方法, 充分发掘和理解嗜热菌来源的功能模块, 重新设计和改造嗜热菌的代谢途径, 构建新的高温发酵细胞工厂。

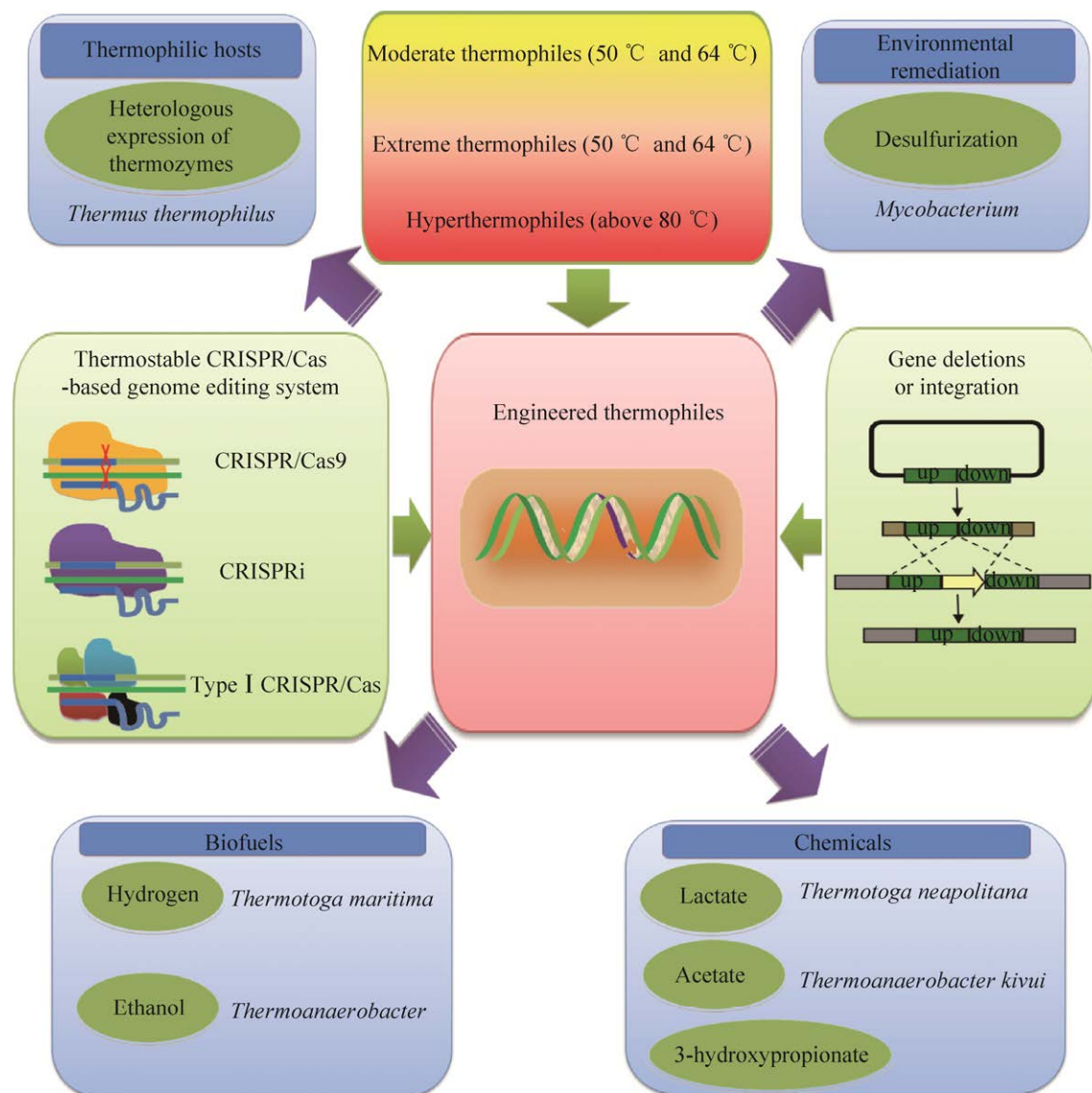


图3 嗜热菌细胞工厂的构建路线图与潜在应用

Figure 3 A proposed schematic roadmap for metabolic engineering of thermophiles and its potential applications.

REFERENCES

- [1] Crosby JR, Laemthong T, Lewis AM, et al. Extreme thermophiles as emerging metabolic engineering platforms. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 59: 55-64.
- [2] Basen M, Müller V. "Hot" acetogenesis. *Extremophiles*, 2017, 21(1): 15-26.
- [3] Zeldes BM, Keller MW, Loder AJ, et al. Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1209.
- [4] Lin L, Song H, Tu Q, et al. The *Thermoanaerobacter* glycomiome reveals mechanisms of pentose and hexose co-utilization in bacteria. *PLoS Genet*, 2011, 7(10): e1002318.
- [5] Verbeke TJ, Zhang XL, Henrissat B, et al. Genomic evaluation of *Thermoanaerobacter* spp. for the construction of designer co-cultures to improve lignocellulosic biofuel production. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59362.

- [6] Singh N, Puri M, Tuli DK, et al. Bioethanol production potential of a novel thermophilic isolate *Thermoanaerobacter* sp. DBT-IOC-X2 isolated from Chumathang hot spring. *Biomass Bioenergy*, 2018, 116: 122-130.
- [7] Hess V, Poehlein A, Weghoff MC, et al. A genome-guided analysis of energy conservation in the thermophilic, cytochrome-free acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1139.
- [8] Schoelmerich MC, Müller V. Energy conservation by a hydrogenase-dependent chemiosmotic mechanism in an ancient metabolic pathway. *PNAS*, 2019, 116(13): 6329-6334.
- [9] Zhou J, Shao X, Olson DG, et al. Determining the roles of the three alcohol dehydrogenases (AdhA, AdhB and AdhE) in *Thermoanaerobacter ethanolicus* during ethanol formation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2017, 44(4/5): 745-757.
- [10] Katsyv A, Jain S, Basen M, et al. Electron carriers involved in autotrophic and heterotrophic acetogenesis in the thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. *Extremophiles*, 2021, 25(5/6): 513-526.
- [11] Moon J, Jain S, Müller V, et al. Homoacetogenic conversion of mannitol by the thermophilic acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui* requires external CO₂. *Front Microbiol*, 2020, 11: 571736.
- [12] Li DM, Greenfield P, Rosewarne CP, et al. Draft genome sequence of *Thermoanaerobacter* sp. strain A7A, reconstructed from a metagenome obtained from a high-temperature hydrocarbon reservoir in the bass strait, Australia. *Genome Announc*, 2013, 1(5): e00701.
- [13] Bhattacharya P, Barnebey A, Zemla M, et al. Complete genome sequence of the chromate-reducing bacterium *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* strain BSB-33. *Stand Genomic Sci*, 2015, 10: 74.
- [14] Tennant RK, Ayine ML, Power AL, et al. A hybrid sequencing approach completes the genome sequence of *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW 200. *Microbiol Resour Announc*, 2019, 8(3): e01530.
- [15] Lin FP, Leu KL. Cloning, expression, and characterization of thermostable region of amylopullulanase gene from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, 97(1): 33-44.
- [16] Scully SM, Örlýgsson J. Thermostable *Thermoanaerobacter* alcohol dehydrogenases and their use in organic synthesis// *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. Amsterdam: Elsevier, 2020: 183-193.
- [17] Musa MM, Vieille C, Phillips RS. Secondary alcohol dehydrogenases from *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* and *Thermoanaerobacter brockii* as robust catalysts. *Chembiochem*, 2021, 22(11): 1884-1893.
- [18] Gonzalez-Alfonso JL, Leemans L, Poveda A, et al. Efficient α -glucosylation of epigallocatechin gallate catalyzed by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* species. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(28): 7402-7408.
- [19] Park BR, Park JY, Lee SH, et al. Synthesis of improved long-chain isomaltooligosaccharide, using a novel glucosyltransferase derived from *Thermoanaerobacter thermocopriae*, with maltodextrin. *Enzyme Microb Technol*, 2021, 147: 109788.
- [20] Moon J, Henke L, Merz N, et al. A thermostable mannitol-1-phosphate dehydrogenase is required in mannitol metabolism of the thermophilic acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. *Environ Microbiol*, 2019, 21(10): 3728-3736.
- [21] Jin LQ, Jin YT, Zhang JW, et al. Enhanced catalytic efficiency and thermostability of glucose isomerase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* via site-directed mutagenesis. *Enzyme Microb Technol*, 2021, 152: 109931.
- [22] Liu B, Wang C, Yang H, et al. Establishment of a genetic transformation system and its application in *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *J Genet Genomics*, 2012, 39(10): 561-570.
- [23] Basen M, Geiger I, Henke L, et al. A genetic system for the thermophilic acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(3): e02210.
- [24] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [25] 孟娇, 刘丁玉, 黄灿, 等. CRISPR/Cas 基因组编辑系统在原核微生物细胞工厂构建中的开发与应用. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2730-2742.
- Meng J, Liu DY, Huang C, et al. Development and application of CRISPR/Cas genome editing system in the construction of prokaryotic microbial cell factories. *Microbiol China*, 2019, 46(10): 2730-2742 (in Chinese).

- [26] Choi KR, Lee SY. CRISPR technologies for bacterial systems: current achievements and future directions. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(7): 1180-1209.
- [27] Harrington LB, Paez-Espino D, Staahl BT, et al. A thermostable Cas9 with increased lifetime in human plasma. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1424.
- [28] Mougiakos I, Mohanraju P, Bosma EF, et al. Characterizing a thermostable Cas9 for bacterial genome editing and silencing. *Nat Commun*, 2017, 8: 1647.
- [29] Tsui TKM, Hand TH, Duboy EC, et al. The impact of DNA topology and guide length on target selection by a cytosine-specific Cas9. *ACS Synth Biol*, 2017, 6(6): 1103-1113.
- [30] Walker JE, Lanahan AA, Zheng TY, et al. Development of both type I-B and type II CRISPR/Cas genome editing systems in the cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum*. *Metab Eng Commun*, 2020, 10: e00116.
- [31] Le YL, Fu Y, Sun JZ. Genome editing of the anaerobic thermophile *Thermoanaerobacter ethanolicus* using thermostable Cas9. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 87(1): e01773.
- [32] Adalsteinsson BT, Kristjansdottir T, Merre W, et al. Efficient genome editing of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, using a thermostable Cas9 variant. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 9586.
- [33] Yao S, Mikkelsen MJ. Metabolic engineering to improve ethanol production in *Thermoanaerobacter mathranii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(1): 199-208.
- [34] Brynjarsdottir H, Scully SM, Orlygsson J. Production of biohydrogen from sugars and lignocellulosic biomass using *Thermoanaerobacter* GH15. *Int J Hydrog Energy*, 2013, 38(34): 14467-14475.
- [35] Verhaart MR, Bielen AA, Van Der Oost J, et al. Hydrogen production by hyperthermophilic and extremely thermophilic bacteria and archaea: mechanisms for reductant disposal. *Environ Technol*, 2010, 31(8/9): 993-1003.
- [36] 巩伏雨, 蔡真, 李寅. CO₂ 固定的合成生物学. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45(10): 993-1002.
Gong FY, Cai Z, Li Y. Synthetic biology for CO₂ fixation. *Sci Sin Vitae*, 2015, 45(10): 993-1002 (in Chinese).
- [37] 刘增然, 张光一. 合成高级醇的微生物细胞工厂研究进展. *生物工程学报*, 2013, 29(10): 1421-1430.
Liu ZR, Zhang GY. Advance in producing higher alcohols by microbial cell factories. *Chin J Biotech*, 2013, 29(10): 1421-1430 (in Chinese).
- [38] Hitschler L, Kuntz M, Langschieff F, et al. *Thermoanaerobacter* species differ in their potential to reduce organic acids to their corresponding alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(19): 8465-8476.
- [39] Scully SM, Brown AE, Mueller-Hilger Y, et al. Influence of culture conditions on the bioreduction of organic acids to alcohols by *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 162.
- [40] Scully SM, Brown A, Ross AB, et al. Biotransformation of organic acids to their corresponding alcohols by *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*. *Anaerobe*, 2019, 57: 28-31.
- [41] Scully SM, Orlygsson J. Branched-chain amino acid catabolism of *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* reveals potential route to branched-chain alcohol formation. *Extremophiles*, 2020, 24(1): 121-133.
- [42] Ravcheev DA, Li X, Latif H, et al. Transcriptional regulation of central carbon and energy metabolism in bacteria by redox-responsive repressor Rex. *J Bacteriol*, 2012, 194(5): 1145-1157.
- [43] Pei JJ, Zhou Q, Jing QQ, et al. The mechanism for regulating ethanol fermentation by redox levels in *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Metab Eng*, 2011, 13(2): 186-193.
- [44] Zheng Y, Ko TP, Sun H, et al. Distinct structural features of Rex-family repressors to sense redox levels in anaerobes and aerobes. *J Struct Biol*, 2014, 188(3): 195-204.
- [45] Basen M, Schut GJ, Nguyen DM, et al. Single gene insertion drives bioalcohol production by a thermophilic archaeon. *PNAS*, 2014, 111(49): 17618-17623.
- [46] Katsyv A, Schoelmerich MC, Basen M, et al. The pyruvate: ferredoxin oxidoreductase of the thermophilic acetogen, *Thermoanaerobacter kivui*. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(5): 1332-1342.
- [47] Shao X, Zhou J, Olson DG, et al. A markerless gene deletion and integration system for *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 100.
- [48] Shaw AJ, Hogsett DA, Lynd LR. Natural competence in *Thermoanaerobacter* and *Thermoanaerobacterium* species. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(14): 4713-4719.
- [49] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat*

- Biotechnol, 2013, 31(3): 233-239.
- [50] Chen WZ, Zhang YF, Yeo WS, et al. Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. J Am Chem Soc, 2017, 139(10): 3790-3795.
- [51] Liu J, Wang Y, Lu Y, et al. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. Microb Cell Fact, 2017, 16(1): 205.
- [52] Liu Z, Dong H, Cui Y, et al. Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. Microb Cell Fact, 2020, 19(1): 172.
- [53] Swarts DC, Jinek M. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: structure-function comparisons and implications for genome editing. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018, 9(5): e1481.
- [54] Jiang Y, Qian F, Yang J, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. Nat Commun, 2017, 8: 15179.
- [55] Ao X, Yao Y, Li T, et al. A multiplex genome editing method for *Escherichia coli* based on CRISPR-Cas12a. Front Microbiol, 2018, 9: 2307.
- [56] Shen W, Zhang J, Geng B, et al. Establishment and application of a CRISPR-Cas12a assisted genome-editing system in *Zymomonas mobilis*. Microb Cell Fact, 2019, 18(1): 162.
- [57] Mougiakos I, Bosma EF, Weenink K, et al. Efficient genome editing of a facultative thermophile using mesophilic spCas9. ACS Synth Biol, 2017, 6(5): 849-861.
- [58] Li Y, Pan S, Zhang Y, et al. Harnessing Type I and Type III CRISPR-Cas systems for genome editing. Nucleic Acids Res, 2016, 44(4): e34.
- [59] Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. Nat Commun, 2018, 9(1): 1911.
- [60] 杨永富, 耿碧男, 宋皓月, 等. 合成生物学时代基于非模式细菌的工业底盘细胞研究现状与展望. 生物工程学报, 2021, 37(3): 874-910.
- Yang YF, Geng BN, Song HY, et al. Progress and perspective on development of non-model industrial bacteria as chassis cells for biochemical production in the synthetic biology era. Chin J Biotech, 2021, 37(3): 874-910 (in Chinese).
- [61] 于勇, 朱欣娜, 毕昌昊, 等. 大肠杆菌细胞工厂的构建技术. 生物工程学报, 2021, 37(5): 1564-1577.
- Yu Y, Zhu XN, Bi CH, et al. Construction of *Escherichia coli* cell factories. Chin J Biotech, 2021, 37(5): 1564-1577 (in Chinese).
- [62] Bhandiwad A, Shaw AJ, Guss A, et al. Metabolic engineering of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* for *n*-butanol production. Metab Eng, 2014, 21: 17-25.
- [63] Tian L, Conway PM, Cervenka ND, et al. Metabolic engineering of *Clostridium thermocellum* for *n*-butanol production from cellulose. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 186.
- [64] Loder AJ, Zeldes BM, Garrison GD, et al. Alcohol selectivity in a synthetic thermophilic *n*-butanol pathway is driven by biocatalytic and thermostability characteristics of constituent enzymes. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(20): 7187-7200.
- [65] Nagaraju S, Davies NK, Walker DJF, et al. Genome editing of *Clostridium autoethanogenum* using CRISPR/Cas9. Biotechnol Biofuels, 2016, 9(1): 1-8.
- [66] Fujino Y, Goda S, Suematsu Y, et al. Development of a new gene expression vector for *Thermus thermophilus* using a silica-inducible promoter. Microb Cell Fact, 2020, 19(1): 126.
- [67] Dang Y, Jia G, Choi J, et al. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. Genome Biol, 2015, 16: 280.
- [68] Matson AW, Hosny N, Swanson ZA, et al. Optimizing sgRNA length to improve target specificity and efficiency for the *GGTA1* gene using the CRISPR/Cas9 gene editing system. PLoS One, 2019, 14(12): e0226107.
- [69] Larson MH, Gilbert LA, Wang X, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. Nat Protoc, 2013, 8(11): 2180-2196.
- [70] 戴住波, 朱欣娜, 张学礼. 合成生物学在微生物细胞工厂构建中的应用. 生命科学, 2013, 25(10): 943-951.
- Dai ZB, Zhu XN, Zhang XL. Synthetic biology for construction of microbial cell factories. Chin Bull Life Sci, 2013, 25(10): 943-951 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)