



专论与综述

铜绿假单胞菌必需基因的研究进展

张明月¹ 胡福泉² 黄广涛^{*3}

1 遵义医科大学第一临床学院 贵州 遵义 563000

2 陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院微生物学教研室 重庆 400038

3 遵义医科大学附属医院烧伤整形外科 贵州省临床(创面修复)研究中心 贵州 遵义 563000

摘要: 铜绿假单胞菌为专性需氧非发酵革兰氏阴性杆菌, 是医院感染的常见条件致病菌之一, 可引起呼吸道、泌尿道、烧伤创面和菌血症等严重感染。铜绿假单胞菌耐药形势日益严峻, 给临床治疗带来困难。必需基因是生长过程中必不可少的看家基因, 对铜绿假单胞菌必需基因进行深入研究, 不仅有助于了解细菌的生长、毒力等基本特性, 也有助于筛选新的抗菌药物靶标。本文针对铜绿假单胞菌及其必需基因进行综述, 首先介绍了铜绿假单胞菌的基本生理特性及目前耐药趋势, 又归纳了必需基因的研究方法, 最后对铜绿假单胞菌必需基因的研究进展进行总结。

关键词: 铜绿假单胞菌, 必需基因, 转座子, 生物信息学, CRISPRi

Progress of essential genes in *Pseudomonas aeruginosa*ZHANG Mingyue¹ HU Fuquan² HUANG Guangtao^{*3}

1 The First Clinical Institute, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China

2 Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing 400038, China

3 Department of Burn Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Clinical (Wound Healing) Research Center, Zunyi, Guizhou 563000, China

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), an obligatory aerobic non-fermented Gram-negative bacterium, is one of the common opportunistic pathogens of nosocomial infection. *P. aeruginosa* can cause severe infection such as respiratory tract, urinary tract, burn wounds and bacteremia. The antibiotic resistance of *P. aeruginosa* spread widely, which brings difficulties to clinical treatment. Essential genes are indispensable genes for organisms to grow. Investigation of *P. aeruginosa* essential genes could help us to understand the basic characteristics of bacteria such as growth and virulence, and could also help us to screen new targets of antibacterial agents. This paper will summary the progress of *P. aeruginosa* essential genes, including basic physiological characteristics of *P. aeruginosa*, the research methods of

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81801916, 81960353); Science and Technology Project of Guizhou Province (2020-4Y003, 2020-1Y332); Zunyi City Science and Technology Bureau Joint Fund (HZ-2019-50)

***Corresponding author:** Tel: 86-851-28637980; E-mail: haitao3140@sina.com

Received: 29-09-2020; **Accepted:** 22-11-2020; **Published online:** 25-02-2021

基金项目: 国家自然科学基金(81801916, 81960353); 贵州省科技计划(2020-4Y003, 2020-1Y332); 遵义市科技局联合基金(HZ-2019-50)

***通信作者:** Tel: 0851-28637980; E-mail: haitao3140@sina.com

收稿日期: 2020-09-29; **接受日期:** 2020-11-22; **网络首发日期:** 2021-02-25

essential genes and the progress and significance of *P. aeruginosa* essential genes.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, essential genes, transposon, bioinformatics, CRISPRi

1 铜绿假单胞菌的生理特点

1.1 铜绿假单胞菌的生理、生化特性

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)又名绿脓杆菌,为革兰氏阴性杆菌,属于专性需氧非发酵菌类假单胞菌属。铜绿假单胞菌能形成生物膜^[1]黏附在生物宿主组织或非生物材料的表面,保护细菌应对不良环境,并在不良环境下进行菌体的散播和定殖。铜绿假单胞菌广泛存在于自然界中,在土壤、空气、水中均可生长,在人工环境中也可以生长繁殖,如医疗器械表面、管道内壁^[2]等。有研究表明铜绿假单胞菌在6–48 °C均可生长^[3],在4 °C不生长,而在42 °C能生长是铜绿假单胞菌最显著的特征之一。铜绿假单胞菌的最适生长温度为35 °C,最适产毒温度为26 °C,在pH 5.0–7.0范围内生长较好,最适pH为7.2^[4]。铜绿假单胞菌携带的毒力因子主要有外毒素A(Exotoxin A)、弹力蛋白酶B(Elastase B)、绿脓菌素(Pyocyanin)、脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、III型分泌系统(Type III Secretion System, T3SS)的效应蛋白等^[5]。目前已报道的铜绿假单胞菌分泌系统有5类,分别为I型分泌系统(T1SS)^[6]、II型分泌系统(T2SS)^[7]、III型分泌系统(T3SS)^[8]、V型分泌系统(T5SS)^[9]、VI型分泌系统(T6SS)^[10]。其中T1SS组成最简单,是由T1SS基因簇编码的3种膜蛋白(ABC-转运蛋白、MFP-膜融合蛋白、OMP-孔蛋白)构成的复合体;T2SS主要涉及12–15种蛋白,由单一基因座中12–16个基因编码;T3SS是单一基因座上15–25个基因编码约20种蛋白组成的针状多蛋白复合体。T5SS是自主转运蛋白系统(Autotransporters, AT),自主转运蛋白大多由单个基因编码,转运过程不需要能量偶联或者辅助因子;T6SS常包括13–25个蛋白构成的核心组件和若干辅助组件,这些蛋白均由T6SS基

因簇编码,其中有13个保守基因对其功能是必不可少的;此外,T1SS和T3SS是一步性分泌系统,不依赖信号肽,将所分泌的效应蛋白直接从胞质运送到细胞表面,而T2SS和T5SS则依赖信号肽,使用两步过程将蛋白输送细胞外部,T6SS分泌机制尚不明确^[11–12]。目前数据库共收录有4 954个铜绿假单胞菌基因组(<https://www.pseudomonas.com/>)。铜绿假单胞菌的基因组比较大,从5–7 Mb不等,具有较高的GC含量(65%–67%)^[13]。研究较多的铜绿假单胞菌标准菌株PAO1基因组大小为6.26 Mb,GC含量为66.6%,包含5 697个基因,编码蛋白数量为5 572个^[14]。此外,铜绿假单胞菌的很大一部分基因参与代谢适应性,是调节网络的一部分,使之在应对环境压力方面具有极大的灵活性^[13]。

1.2 铜绿假单胞菌的感染和耐药性趋势

铜绿假单胞菌是医院感染的常见条件致病菌之一。铜绿假单胞菌常定植于人体皮肤、黏膜、呼吸道、胃肠道等部位,当患者患有基础疾病或长期住院免疫力低下时,易发生铜绿假单胞菌感染。此外,因治疗需要进行外科手术或侵入性操作,如气管插管、使用呼吸机、留置引流管、导尿管等,均会使感染机会增加。不同病区由于患者疾患不同,感染发生部位也不同,神经外科以呼吸道为主,烧伤科、普通外科则以伤口或创面感染最为多见^[15]。铜绿假单胞菌可引起呼吸道、泌尿道、烧伤创面等局部感染,还可以引起菌血症、败血症和脓毒血症等全身性感染,是导致患者死亡的重要病原菌之一。根据中国细菌耐药检测网2018年调查公布的数据,铜绿假单胞菌在临床中所有的分离病原菌中排第4位,占了9.57%^[16],与2017年占8.69%^[17]、2016年占8.66%^[18]相比,铜绿假单胞菌感染检出率呈现上升趋势。雪上加霜的是,随着第3代头孢菌素、碳青霉烯类等广谱抗菌药的广泛应用,铜绿假

单胞菌的耐药也日益严峻。中国细菌耐药检测网 2018 年数据指出,在中国分离的铜绿假单胞菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 30.7%和 25.8%^[16],耐药率与 2017 年的 23.6%和 20.9%^[17]、2016 年的 28.7%和 25.3%^[18]相比均有所上升。同时,从 2005 年开始,临床上多重耐药铜绿假单胞菌和泛耐药铜绿假单胞菌的出现也逐渐增多,2016 年检出泛耐药铜绿假单胞菌共 278 株,占 2.1%,与 2015 年的 1.7%和 2014 年的 1.6%相比呈现上升趋势^[18]。多重耐药(Multi-Drug Resistant, MDR)菌是指同时对临床使用的三类或三类以上抗菌药物同时呈现耐药的细菌,而泛耐药(Extensively Drug Resistant, XDR)菌是指仅对 1-2 种潜在有抗不动杆菌活性的药物(主要指多黏菌素)敏感的菌株。有文献报道,在中国烧伤研究所,多重耐药铜绿假单胞菌在临床上的分离率为 54.59%,而泛耐药铜绿假单胞菌在临床中的分离率达到 21.42%^[19]。据报道国外铜绿假单胞菌的耐药也同样日益严峻^[20-21],多重耐药和泛耐药铜绿假单胞菌的出现严重威胁患者的生命安全,为临床抗感染治疗带来巨大挑战。抗生素耐药已经成为一个世界性的卫生问题,2008 年,美国感染学会(Infectious Diseases Society of America, IDSA)的抗生素效益评估小组经调查后认为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)及肠杆菌属(*Enterobacter*)等 6 类细菌耐药情况极度严峻,取其各自拉丁文名称首字母而简称“ESKAPE”^[22-23]。2018 年,世界卫生组织使用多标准决策分析方法对抗生素耐药细菌进行优先排序,制定需研发新抗生素的耐药菌优先级列表。以总体死亡率、有效治疗的可行性、医疗负担以及耐药性的增加作为评估优先级的最重要标准,将碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌归为需要投资和研发新抗生素的优先级病原菌^[24]。

2 必需基因的研究方法

必需基因(Essential Genes)是指在一定环境下维持某种生物体生命活动所必不可少的基因。目前基因的必需性已被广泛接受为条件性状^[25],即基因的必需性依赖于对其进行探测的环境背景和自身遗传背景。在对基因必要性进行定义时,不仅要考虑相应突变细胞的生存能力,而且还要考虑对其进行探测的环境和遗传背景等因素^[26]。细菌必需基因大多是细胞生长、分裂过程中染色体复制、转录、翻译、蛋白质折叠所需的持家基因。细菌必需基因研究方法可分为 2 类:第 1 类是通过基因敲除、单基因灭活、快速鸟枪方法反义 RNA、转座子插入突变等技术来确定必需基因的实验方法,此类方法需较长时间且花费巨大,此外还存在条件必要性,即实验方法确定的必需基因都依赖于所采用的实验条件,而实验条件与物种在野外竞争生长的条件不同,导致 2 种条件下确定的必需基因和必需基因数目可能不同;第 2 类是利用测序和生物信息技术比对方法分析多个物种全基因组来预测必需基因,此方法操作简单,方便且高效,但依赖于已测序得到的生物基因组,检测比较全基因组的生物数目和种类不同,所得到的某待测生物必需基因和必需基因数目也可能不同。目前细菌必需基因的鉴定主要通过转座子技术和生物信息技术相结合的方式。首先通过生物信息技术对现有完整基因组进行比对分析,预测待测生物基因组中可能的必需基因,再结合转座子技术验证相应基因的必需性;也可首先通过转座子技术鉴定某条件下基因组必需基因,再利用生物信息技术将不同条件所得的基因组必需基因进行比较分析。两类方法互为补充,大大增加了必需基因研究的可靠性和效率。

2.1 转座子技术

转座子(Transposon, Tn)是一种可以通过转座酶介导的复制或“剪切-粘贴”机制在基因组内或基因组之间移动的遗传元件,其结构主要包括双侧末端

重复序列及中间的抗性基因、转座酶读码框等。广泛存在于自然界各种生物的基因组中,自从 20 世纪 40 年代美国科学家 McClintock 首次在玉米中发现转座子并命名为“Ac/Ds”元件^[27]以来,已经成为许多生物细胞基因分析的重要工具。转座子具有 2 个主要特征:一是能够从细胞染色体的一个位点转座到另一个位点引起生物基因组或基因的重组和变异,加速生物多样性和进化速率;二是能够在生物基因组中大量扩增拷贝^[28]。转座子理论的出现改变了以往人们认为遗传物质是固定排列在染色体上的观念。转座子技术即利用转座子特有的转座功能,对生物基因组进行基因突变并研究基因功能,如常利用转座子构建菌株突变体文库。其机制是:所有转座子都携带转座所必需的基因,因而转座作用不依赖于转座子与靶点之间的序列同源性。因转座子插入阻断了转录或翻译过程,导致靶点基因失活,而且插入往往表现出极性效应,即转座子在操纵子上游基因的插入影响到下游基因的表达,原因是转座子序列中含有终止子或终止密码子,造成转录或翻译的终止,因此影响后续基因的表达,进而依靠表型鉴定出突变体^[29-31]。转座子技术的出现使得对基因组进行基因突变更为高效、简便。转座子在细菌基因组中的插入是随机的,如果表征足够多的突变体,则可以鉴定出必需基因,因为细菌必需基因被破坏通常是致死性的,不能产生生活的突变体。然而许多非必需基因,尤其片段较短的基因不会被偶然破坏,因此可能被错误地归类为必需基因,但也可通过增加转座子文库的数量来降低此类错误的发生^[32-33]。

在大规模并行测序出现后,研究者将全基因组转座子诱变与高通量测序相结合,开发了现代转座子插入测序(Transposon-Insertion Sequencing, TIS)^[34]。在 2009 年又发布了 4 个 TIS 变体:转座子测序(Transposon Sequencing, Tn-Seq)^[35]、转座子定向插入位点测序(Transposon Directed Insertion Sequencing, TraDIS)^[36]、插入测序(Insertion Sequencing, INSeq)^[37]

和高通量测序(High Throughput Sequencing, HTS)^[38]。自开发以来, TIS 已应用于一系列体外研究以及体内感染模型中,并在识别与抗生素抗性有关基因、筛查毒力基因、发现必需基因等方面广泛应用^[34]。转座子诱变与 Tn-Seq 的结合实现了鉴定基因的最大速度和通量,但当需建立多个转座子文库、分析上百种样本时,操作繁琐且花费巨大,无法运用于多种细菌的数百种实验条件的基因组测序鉴定。2015 年 Wetmore 等^[39]提出了随机条形码转座子位点测序(Random Bar Code Transposon-Site Sequencing, RB-TnSeq),该方法将转座子诱变与条形码测序(Bar Code Sequencing, BarSeq)结合,可以对不同条件下的突变体池进行批量分析。转座子插入测序作为基于转座子的基因组分析新工具,自开发以后广泛应用于各种条件下分析多种不同细菌生长所需的基因组范围^[40]。如曾先后被运用于伤寒沙门氏菌^[36]、霍乱弧菌^[41]、大肠杆菌^[42]等常见致病菌必需基因研究。近年 Klein 等^[43]用 Tn-Seq 技术确定牙龈卟啉单胞菌的必需基因并鉴定其毒力因子。Goodall 等^[44]运用 TraDIS 的方法鉴定得出大肠杆菌 K-12 的 358 个必需基因,与已有必需基因数据进行比较,确定了 248 个共有必需基因。Ruiz 等^[45]也使用 TraDIS 的方法鉴定短双歧杆菌 UCC2003,分析得出 453 个必需基因。转座子技术的发展使研究者发现细菌必需基因以及了解基因功能变得简单易行,将有助于发现新型抗菌药物靶点、开发新型药物以缓解临床耐药菌抗生素选择压力。

2.2 基因组与生物信息技术

基因组(Genome)的概念由德国汉堡大学的 Winkles 教授于 1920 年首次提出,即基因组是由基因和染色体共同组成,包含生物体全部基因和染色体的总和。大部分物种的基因组由 DNA 组成,有些病毒基因组由 RNA 组成。生物信息基因组比对技术,即通过现代生物信息技术比较不同物种或同一物种不同个体间的全基因组在 DNA 序列、基因、

基因顺序、调控序列以及其他基因组结构标签等方面的差异,揭示物种及个体间在生物学上的异同及进化关系。利用生物信息技术进行基因组比对可以预测生物的核心基因组,进而预测生存必需基因和最小基因组,即通过寻找不同微生物基因组中的保守基因来确定生存必需的基因集合。

在 1995 年 2 个细菌的完整基因组序列发表之后,1996 年 Mushegian 和 Koonin 首次尝试最小基因集合的鉴定,他们对流感嗜血杆菌^[46] (*Haemophilus influenzae*) 和生殖支原体^[47] (*Mycoplasma genitalium*) 进行基因组比较分析,发现两者共有约 256 个保守基因^[48]。鉴于这 2 个细菌属于古老的细菌谱系,系统进化距离较远,分别为革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌,所以认为两者间存在的保守基因极有可能是维持生命所必需的^[49]。此后,肺炎支原体、集胞藻、酿酒酵母、大肠杆菌^[50] 等完整基因组序列相继公布,随着第一代 DNA 测序仪的出现,基因组测序效率得到逐步提高,由于第一代测序的低通量和高成本,商用第二代测序技术于 2005 年出现,通过并行大规模测序 DNA 分子来实现更高的通量,如 Illumina 的 HiSeq、MiSeq、Illumina 测序技术等,二代测序因实现高通量和较低成本而广泛运用,在第一个细菌实现完整基因组测序 10 年后,即到 2006 年已完成 300 多个细菌基因组测序^[51],2014 年已公开提供了 30 000 多个测序细菌基因组^[52],在高通量、DNA 单分子测序技术——第三代测序技术^[53-54] 出现后,基因组测序更是飞速发展,到 2020 年,NCBI 数据库已公开提供了 266 000 多个测序细菌基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/>) 序列数据的积累,是比较基因组技术得以开展的根本条件。然而使用生物信息技术预测必需基因存在固有缺陷,只能识别出对大部分细菌都通用的必需基因,而不能确定某一细菌所特有的必需基因,所以结合转座子技术对细菌进行基因突变发现某一细菌特有必需基因,有助于补充生物信息技术

的不足。

DNA 测序和生物信息技术的高速发展,也为微生物学家研究细菌基因功能以及从比较基因组学角度研究细菌中特殊代谢途径、致病性、耐药性以及基因进化提供了有力支持。如,在基因比对技术产生之初,葛兰素史克的研究人员就开始将基因比对技术用于流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌,肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌中鉴定必需基因^[55]。近年来,Fernández-Piñar 等^[56]和 Poulsen 等^[57]的研究团队,先后对多个铜绿假单胞菌转座子文库进行基因比对分析,寻找铜绿假单胞菌核心必需基因。Allen 等也利用基因比对方法,从 100 株临床收集的铜绿假单胞菌中鉴定毒力基因^[58],Kociolek 等^[59]用同样方法分析艰难梭菌的流行菌株 DH/NAP11/106 基因型特征及毒力基因,以及 Bai^[60]等分析呼吸道病人痰标本中溶血不动杆菌分离株致病性和耐药基因。生物信息技术为研究者分析新型或耐药致病菌基因特征以及寻找或筛选致病菌必需基因提供巨大便利。

2.3 CRISPR 相关技术

CRISPR-Cas 系统是细菌的获得性免疫系统,通过特异性识别并剪切噬菌体或质粒的特定序列进而清除外源性核酸的感染^[61-62]。近年来,研究者将 CRISPR-Cas 系统能够特异性识别并剪切双链 DNA 这一特性用于细菌和细胞的基因编辑^[63-64]。进一步开发了 CRISPR-Cas 的衍生技术,CRISPR Activation (CRISPRa) 和 CRISPR Interference (CRISPRi)^[65-66]用于基因表达调控,其原理为 Cas9 蛋白剪切双链 DNA 依赖 2 个核酸酶结构域(HNH 域和 RuvC 域)。Qi 等^[67]突变了 HNH 结构域和 RuvC 域中各一个氨基酸位点(D10A 和 H841A),使得突变后的 Cas9 蛋白失去了剪切 DNA 的能力,即 dCas9 (Nuclease-Deactivated Cas9); dCas9 虽然失去了剪切 DNA 的能力,但是仍能够在 gRNA 的引导下结合到靶序列; dCas9-sgRNA-DNA 的结合能够阻断 RNA 聚合酶的结合、延伸等过程,进而阻断转录过

程, 达到沉默基因表达的功能, 即 CRISPR Interference (CRISPRi)。CRISPRi 技术成为近年来用于研究基因功能, 尤其是必需基因功能的一个高效有力的手段。CRISPRi 系统用于研究细菌必需基因具有以下几个优点: (1) 操作简便, 只需要设计好 sgRNA 的序列, 通过常规分子克隆在 1 周内可以构建完成一个靶基因的 CRISPRi 系统; (2) 可进行高通量研究, 通过设计不同基因的 sgRNA 序列, 可进行多个基因的调控; (3) 效率高, 可诱导控制^[68]。2013 年, Qi 等^[67]在大肠杆菌中成功建立了可诱导的 CRISPRi 系统, 将靶基因的表达水平下调了 300–1 000 倍。近年一些研究者也开始将 CRISPRi 这一新兴技术运用于研究细菌必需基因。2016 年, Peters 等^[69]在枯草芽孢杆菌中成功建立了 CRISPRi 系统, 对细菌必需基因进行系统表型分析, 并表明 CRISPRi 技术适用于对各种细菌必需基因功能进行全面、高通量分析。2018 年, Tan 等^[70]在铜绿假单胞菌中成功建立 CRISPRi 系统, 表明细菌的表型变化与靶基因耗竭一致。2019 年, Peters 等^[71]通过建立可移动的 CRISPRi 研究变形杆菌的必需基因, 寻找潜在的抗生素靶点。目前我们也成功在铜绿假单胞菌中建立了基于 CRISPRi 的基因敲除系统, 并进一步用于对铜绿假单胞菌生存力至关重要的必需基因 *prtR* 的研究^[68]。CRISPRi 因其高度特异性靶向目标基因的特殊优势, 有望成为未来必需基因研究的有力工具。但目前还需努力解决实践操作中存在的如嵌合体、脱靶效应等问题。

3 铜绿假单胞菌的必需基因

有关铜绿假单胞菌必需基因研究可以追溯到 21 世纪初, 2003 年, Jacobs 等^[33]首次使用转座子诱变技术分析铜绿假单胞菌菌株 PAO1 全基因组, 以确定铜绿假单胞菌必需基因数目。Jacobs 等^[33]利用 Tn5IS50L 的衍生物 IS*phoA*/hah、IS*lacZ*/hah 这 2 种不同的转座子产生了共 42 240 个突变体, 对其测序分析发现 PAO1 基因组的所有 ORF 中有 678 个 ORF 无转座子插入, 并预测此

678 个 ORF 为潜在的铜绿假单胞菌必需基因, 进一步使用多个模型对转座子插入结果进行生物信息学分析, 认为铜绿假单胞菌中必需基因的实际数量在 300–400 之间。2006 年, Liberati 等^[72]同样使用转座子诱变技术, 对铜绿假单胞菌菌株 PA14 进行全基因组分析, 与 Jacobs 等不同的是, 他们使用 Himar1 转座子^[73], 在测序分析 30 336 个转座子插入突变体后, 发现 PA14 基因组中有 1 493 个基因无转座子插入, 预测此 1 493 个基因为潜在的铜绿假单胞菌必需基因, 进一步对铜绿假单胞菌菌株 PAO1 和 PA14 转座子突变文库进行比较分析, 最终认为铜绿假单胞菌必需基因数为 335^[72]。2013 年, Skurnik 等^[74]使用特殊设计的转座子(Tn), 通过插入测序(INSeq)技术分析了铜绿假单胞菌菌株 PA14 约 3×10^5 个突变体, 得出铜绿假单胞菌 PA14 必需基因数为 636, 其中有 407 个基因已在先前的 PA14 菌株中被鉴定为必需基因^[72], 198 个也在 PAO1 中认为是必需基因^[33]。2015 年, Turner 等^[75]使用 Tn-Seq 技术分别分析了铜绿假单胞菌菌株 PAO1 和 PA14 在实验室合成培养基、MOPS-痰液培养基 2 种条件下的必需基因数目, 实验得出: 菌株 PAO1 和 PA14 在实验室条件下测序必需基因数分别为 336 和 434, 在囊性纤维化痰液培养条件下必需基因数分别增加了 130 和 122。同年 Lee 等^[76]也使用 Tn-Seq 技术, 进一步加大转座子文库数量, 同时分析了不同培养条件下的铜绿假单胞菌 PAO1 的必需基因, 筛选 100 万个转座子突变体后, 确定了 551 个潜在必需基因, 其中有 352 个在多种条件下均为必需基因, 另外 199 为特定条件下存在的必需基因。2019 年, Poulsen 等^[57]将在 LB 培养基条件下培养的 PA14 菌株测定的必需基因组与其他在 5 种不同生长条件下的 8 种不同铜绿假单胞菌菌株进行比较, 而且 9 个菌株的基因组从 6.34 Mb 到 7.15 Mb 不等, 经 Tn-Seq 测序分析得出 321 个基因为铜绿假单胞菌核心必需基因。归纳总结见表 1。

表 1 已报道的铜绿假单胞菌必需基因

Table 1 Published essential genes of *Pseudomonas aeruginosa*

Author	Methods	Transposon	Strains	Growth conditions	Strain's essential genes count	References
Jacobs et al	Transposon Mutagenesis	Tn5 IS50L derivatives, IS <i>phoA</i> /hah and IS <i>lacZ</i> /hah	PAO1	Plating on LB agar containing tetracycline (60 µg/mL), chloramphenicol (10 µg/mL)	PAO1: 678	[33]
Liberati et al	Transposon Mutagenesis	Himar1 derivative, MAR2xT7	PA14 and two PA14 derivatives, Δ <i>exoU</i> and Δ <i>exoUspcU</i>	LB agar plates containing (15 µg/mL) gentamicin and (1 µg/mL) Irgasan	PA14: 1 493; PAO1 and PA14: 335	[72]
Skurnik et al	INSeq technique and high-throughput sequencing	—	PA14	Murine model of GI tract colonization and systemic dissemination	PA14: 636	[74]
Turner et al	Transposon sequencing (Tn-Seq)	Tn 5 derivative, IS <i>lacZhah</i> -tc	PAO1 and PA14	A complex laboratory medium; MOPS-sputum	Laboratory condition: PAO1: 336; PA14: 434 Sputum condition: PAO1: 466; PA14: 556	[75]
Lee et al	Transposon sequencing (Tn-Seq)	Tn 5 derivative, IS <i>lacZhah</i> -tc	PAO1 (13 strains)	LB nutrient agar; MOPS-pyruvate agar; Media made from cystic fibrosis sputa; High nutrient medium (brain-heart infusion, BHI); A dilute nutrient medium with supplements (0.1×LB); Medium made from human serum	352	[76]
Poulsen et al	Transposon sequencing (Tn-Seq)	Himar1-derived transposon MAR2xT7	PA14, ATCC19660, X13273, BWH005, BWH013, BWH015, BL23, PS75, CF77	LB and M9 minimal agar containing (30 µg/mL) gentamicin and (5 µg/mL) Irgasan; Synthetic cystic fibrosis medium agar (SCFM); Pooled filter-sterilized urine and FBS	321	[57]

注：—：未使用转座子
Note: —: Without transposon

通过对上述铜绿假单胞菌必需基因的研究进行归类、总结，明确了铜绿假单胞菌 PA14 和 PAO1 在 LB 培养条件下共同拥有的 335 个必需基因。含量最多必需基因种类是翻译、翻译后修饰和降解相关基因

有 61 个，功能未知的必需基因有 57 个，辅因子、辅基和载体相关必需基因有 26 个，能量代谢相关必需基因有 25 个，其他还包括细胞壁相关必需基因、小分子转运体相关基因、核苷酸代谢相关基因等(图 1)。

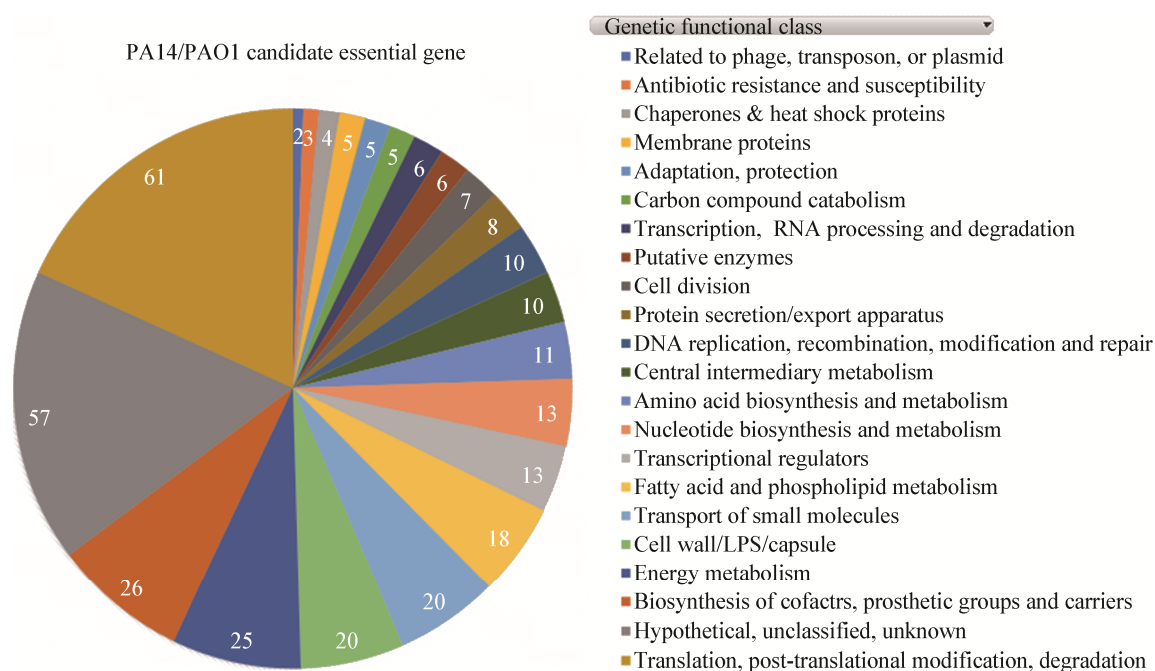


图1 铜绿假单胞菌 PA14 和 PAO1 共有必需基因的功能分类

Figure 1 Genetic functional class for essential genes of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 and PAO1

注：数字：必需基因的数目

Note: Numbers: Number of essential genes

总结从 2000 年初到现在有关对铜绿假单胞菌全基因组测序确定必需基因的实验，我们发现：(1) 确定铜绿假单胞菌必需基因数目受实验方法、选择菌株种类、实验条件等多因素影响，符合上述基因的必需性依赖于对其进行探测的环境背景和自身遗传背景观点^[25]。(2) 不同菌株之间必需基因数目存在很大差别，普遍实验结果均表明铜绿假单胞菌 PA14 必需基因数目较 PAO1 多。(3) 同一菌株在不同实验条件下确定的必需基因数目也存在巨大差异。此结论与近年 Blazier 等^[77]对已发表的铜绿假单胞菌必需基因数据的大规模比较分析结果相同，他们还提出可以通过重建基因组代谢网络方法来识别条件非依赖和条件依赖的必需基因，这对研发新型有效抗生素至关重要。

4 铜绿假单胞菌必需基因的意义

铜绿假单胞菌是 ICU、老年患者和烧伤患者局部感染和全身感染的常见病原菌。近年来，铜绿

假单胞菌的感染率呈现上升趋势，同时耐药性也日益严峻，多重耐药和泛耐药铜绿假单胞菌的出现严重威胁患者的生命安全，在当前可选择的有效抗生素变得越来越少的情况下，我们急需努力研究并开发铜绿假单胞菌的新型抗生素。

截至目前，当前所有的抗生素都靶向细菌细胞中的基本功能，所以正确精准地确定铜绿假单胞菌必需基因是筛选、开发新型抗生素的关键；此外，明确生物必需基因有助于促进我们对细胞生命原理的理解，了解生命起源及进化。目前研究细菌必需基因的最好方式是现代转座子插入技术与生物信息基因组比对技术的结合，已有许多研究者使用此类方法进行铜绿假单胞菌必需基因的研究，但由于基因的条件必需性使得不同研究者测得的必需基因各有差异，尚未得出明确的铜绿假单胞菌必需基因。

结合课题组前期在铜绿假单胞菌中建立的 CRISPR-dCas9 系统，我们正在构建一个能够靶向

PAO1 所有必需基因的 CRISPRi 文库, 以期为铜绿假单胞菌必需基因功能研究提供帮助。除了 CRISPR 相关技术外, 合成生物学技术、高通量技术、组学技术和生物信息技术的快速发展也有助于铜绿假单胞菌必需基因的研究, 这些新技术有望突破目前铜绿假单胞菌必需基因研究的瓶颈, 推动其研究进入一个新的阶段。铜绿假单胞菌必需基因的研究除了应用于抗生素靶点的筛选外, 在疫苗靶点筛选、快速病原学诊断等临床应用领域也有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 913
- [2] Bédard E, Prévost M, Déziel E. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings[J]. *MicrobiologyOpen*, 2016, 5(6): 937-956
- [3] Zhu L, Zhang AJ, Wang PJ, Li LQ, Gao YL. The effects of temperature on the growth *Pseudomonas aeruginosa* and its prediction[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(11): 1-10 (in Chinese)
朱蕾, 张爱静, 王鹏杰, 李琳琼, 高瑀珑. 温度对铜绿假单胞菌生长的影响及其预测研究[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(11): 1-10
- [4] Dong QL, Yao Y, Zhao Y, Chen H. Modelling establishment of the cardinal parameters model as a function of temperature, pH value and sodium lactate for *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(1): 197-202 (in Chinese)
董庆利, 姚远, 赵勇, 陈浩. 铜绿假单胞菌的温度、pH 值和乳酸钠主参数模型构建[J]. *农业机械学报*, 2014, 45(1): 197-202
- [5] Khalifa ABH, Moissenet D, Thien HV, Khedher M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation[J]. *Annales de Biologie Clinique*, 2011, 69(4): 393-403
- [6] Thomas S, Holland IB, Schmitt L. The type 1 secretion pathway: the hemolysin system and beyond[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2014, 1843(8): 1629-1641
- [7] Korotkov KV, Sandkvist M. Architecture, function, and substrates of the type II secretion system[J]. *EcoSal Plus*, 2019, 8(2): 227-244
- [8] Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(9): 654-665
- [9] Meuskens I, Saragliadis A, Leo JC, Linke D. Type V secretion systems: an overview of passenger domain functions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1163
- [10] Jani AJ, Cotter PA. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore[J]. *Cell Host & Microbe*, 2010, 8(1): 2-6
- [11] Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GPF, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(8): 534-543
- [12] Filloux A. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution, and function[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 155
- [13] Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 39
- [14] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen[J]. *Nature*, 2000, 406(6799): 959-964
- [15] Zhang B, Fu WL, Zhang XB, Liao Y. Commonly encountered bacteria isolated from nosocomial infection in surgery ward: supervision and drug-resistance analysis[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2005, 15(4): 458-461 (in Chinese)
张波, 府伟灵, 张晓兵, 廖扬. 外科病房医院感染常见病原菌监测及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2005, 15(4): 458-461
- [16] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, Wang F, Jiang XF, Xu YC, Zhang XJ, Zhang ZX, Ji P, Xie Y, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance in China: 2018 report[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2020, 20(1): 1-10 (in Chinese)
胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 等. 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(1): 1-10
- [17] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, Wang F, Jiang XF, Xu YC, Zhang XJ, Zhang ZX, Ji P, Xie Y, et al. Antimicrobial resistance profile of clinical isolates in hospitals across China: report from the CHINET Surveillance Program, 2017[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2018, 18(3): 241-251 (in Chinese)
胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2018, 18(3): 241-251
- [18] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, Wang F, Jiang XF, Xu YC, Zhang

- XJ, Zhang ZX, Ji P, Xie Y, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance across China: report of the results in 2016[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2017, 17(5): 481-491(in Chinese)
胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(5): 481-491
- [19] Yin SP, Chen P, You B, Zhang YL, Jiang B, Huang GT, Yang ZC, Chen Y, Chen J, Yuan ZQ, et al. Molecular typing and carbapenem resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Chinese burn center from 2011 to 2016[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1135
- [20] Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, Montero MM, Sorlí L, Tubau F, Gómez-Zorrilla S, et al. Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(11): e01589-17
- [21] Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones[J]. Drug Resistance Updates, 2015, 21/22: 41-59
- [22] Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2008, 197(8): 1079-1081
- [23] Adler A, Friedman ND, Marchaim D. Multidrug-resistant Gram-negative bacilli: infection control implications[J]. Infectious Disease Clinics of North America, 2016, 30(4): 967-997
- [24] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2018, 18(3): 318-327
- [25] D'Elia MA, Pereira MP, Brown ED. Are essential genes really essential?[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(10): 433-438
- [26] Rancati G, Moffat J, Typas A, Pavelka N. Emerging and evolving concepts in gene essentiality[J]. Nature Reviews Genetics, 2018, 19(1): 34-49
- [27] McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge[J]. Science, 1984, 226(4676): 792-801
- [28] Bourque G, Burns KH, Gehring M, Gorbunova V, Seluanov A, Hammell M, Imbeault M, Izsvák Z, Levin HL, Macfarlan TS, et al. Ten things you should know about transposable elements[J]. Genome Biology, 2018, 19(1): 199
- [29] Lisch D. Mutator and MULE transposons[J]. Microbiology Spectrum, 2015, 3(2): MDNA3-0032-2014
- [30] Hamer L, DeZwaan TM, Montenegro-Chamorro MV, Frank SA, Hamer JE. Recent advances in large-scale transposon mutagenesis[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2001, 5(1): 67-73
- [31] Kawakami K, Largaespada DA, Ivics Z. Transposons as tools for functional genomics in vertebrate models[J]. Trends in Genetics, 2017, 33(11): 784-801
- [32] Gerdes SY, Scholle MD, D'Souza M, Bernal A, Baev MV, Farrell M, Kurnasov OV, Daugherty MD, Mseeh F, Polanuyer BM, et al. From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: examples in cofactor biosynthetic pathways[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(16): 4555-4572
- [33] Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, et al. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(24): 14339-14344
- [34] Cain AK, Barquist L, Goodman AL, Paulsen IT, Parkhill J, Van Opijnen T. A decade of advances in transposon-insertion sequencing[J]. Nature Reviews Genetics, 2020, 21(9): 526-540
- [35] Van Opijnen T, Bodi KL, Camilli A. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms[J]. Nature Methods, 2009, 6(10): 767-772
- [36] Langridge GC, Phan MD, Turner DJ, Perkins TT, Parts L, Haase J, Charles I, Maskell DJ, Peters SE, Dougan G, et al. Simultaneous assay of every *Salmonella* Typhi gene using one million transposon mutants[J]. Genome Research, 2009, 19(12): 2308-2316
- [37] Goodman AL, McNulty NP, Zhao Y, Leip D, Mitra RD, Lozupone CA, Knight R, Gordon JI. Identifying genetic determinants needed to establish a human gut symbiont in its habitat[J]. Cell Host & Microbe, 2009, 6(3): 279-289
- [38] Gawronski JD, Wong SMS, Giannoukos G, Ward DV, Akerley BJ. Tracking insertion mutants within libraries by deep sequencing and a genome-wide screen for *Haemophilus* genes required in the lung[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(38): 16422-16427
- [39] Wetmore KM, Price MN, Waters RJ, Lamson JS, He J, Hoover CA, Blow MJ, Bristow J, Butland G, Arkin AP, et al. Rapid quantification of mutant fitness in diverse bacteria by sequencing randomly bar-coded transposons[J]. mBio, 2015, 6(3): e00306-15
- [40] Chao MC, Abel S, Davis BM, Waldor MK. The design and analysis of transposon insertion sequencing experiments[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(2): 119-128
- [41] Chao MC, Pritchard JR, Zhang YJ, Rubin EJ, Livny J, Davis BM, Waldor MK. High-resolution definition of the *Vibrio cholerae* essential gene set with hidden Markov model-based analyses of transposon-insertion sequencing data[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(19): 9033-9048
- [42] Subashchandrabose S, Smith SN, Spurbeck RR, Kole MM, Mobley HL. Genome-wide detection of fitness genes in

- uropathogenic *Escherichia coli* during systemic infection[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(12): e1003788
- [43] Klein BA, Duncan MJ, Hu LT. Defining essential genes and identifying virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* by massively parallel sequencing of transposon libraries (Tn-seq)[A]//Methods in Molecular Biology[M]. New York: Humana Press, 2015, 1279: 25-43
- [44] Goodall ECA, Robinson A, Johnston IG, Jabbari S, Turner KA, Cunningham AF, Lund PA, Cole JA, Henderson IR. The essential genome of *Escherichia coli* K-12[J]. mBio, 2018, 9(1): e02096-17
- [45] Ruiz L, Bottacini F, Boinett CJ, Cain AK, O'Connell-Motherway M, Lawley TD, Van Sinderen D. The essential genomic landscape of the commensal *Bifidobacterium breve* UCC2003[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 5648
- [46] Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd[J]. Science, 1995, 269(5223): 496-512
- [47] Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM, et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*[J]. Science, 1995, 270(5235): 397-403
- [48] Maniloff J. The minimal cell genome: "on being the right size"[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(19): 10004-10006
- [49] Mushegian AR, Koonin EV. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(19): 10268-10273
- [50] Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12[J]. Science, 1997, 277(5331): 1453-1462
- [51] Binnewies TT, Motro Y, Hallin PF, Lund O, Dunn D, La T, Hampson DJ, Bellgard M, Wassenaar TM, Ussery DW. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries[J]. Functional & Integrative Genomics, 2006, 6(3): 165-185
- [52] Land M, Hauser L, Jun SR, Nookaew I, Leuze MR, Ahn TH, Karpins T, Lund O, Kora G, Wassenaar T, et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing[J]. Functional & Integrative Genomics, 2015, 15(2): 141-161
- [53] Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing[J]. Journal of Applied Genetics, 2011, 52(4): 413-435
- [54] Mikheyev AS, Tin MMY. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(6): 1097-1102
- [55] Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2007, 6(1): 29-40
- [56] Fernández-Piñar R, Lo Sciuto A, Rossi A, Ranucci S, Bragonzi A, Imperi F. *In vitro* and *in vivo* screening for novel essential cell-envelope proteins in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 17593
- [57] Poulsen BE, Yang R, Clatworthy AE, White T, Osmulski SJ, Li L, Penaranda C, Lander ES, Shores N, Hung DT. Defining the core essential genome of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(20): 10072-10080
- [58] Allen JP, Ozer EA, Minasov G, Shuvalova L, Kiryukhina O, Satchell KJF, Hauser AR. A comparative genomics approach identifies contact-dependent growth inhibition as a virulence determinant[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(12): 6811-6821
- [59] Kociolek LK, Gerding DN, Hecht DW, Ozer EA. Comparative genomics analysis of *Clostridium difficile* epidemic strain DH/NAP11/106[J]. Microbes and Infection, 2018, 20(4): 245-253
- [60] Bai L, Zhang SC, Deng Y, Song CC, Kang GB, Dong Y, Wang Y, Gao F, Huang H. Comparative genomics analysis of *Acinetobacter haemolyticus* isolates from sputum samples of respiratory patients[J]. Genomics, 2020, 112(4): 2784-2793
- [61] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 60(2): 174-182
- [62] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C. The on-off switch of CRISPR immunity against phages in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 2010, 77(6): 1341-1345
- [63] Lander ES. The Heroes of CRISPR[J]. Cell, 2016, 164(1/2): 18-28
- [64] Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes[J]. Nature, 2015, 526(7571): 55-61
- [65] Coil D, Jospin G, Darling AE. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data[J]. Bioinformatics, 2015, 31(4): 587-589
- [66] Nir-Paz R, Gelman D, Khouri A, Sisson BM, Fackler J, Alkalay-Oren S, Khalifa L, Rimon A, Yerushalmy O, Bader R, et al. Successful treatment of antibiotic-resistant, poly-microbial bone infection with bacteriophages and antibiotics combination[J]. Clinical Infectious Diseases, 2019, 69(11): 2015-2018
- [67] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. Cell, 2013, 152(5): 1173-1183
- [68] Xiang L, Qi F, Jiang L, Tan J, Deng C, Wei Z, Jin S, Huang G. CRISPR-dCas9-mediated knockdown of *prtR*, an

- essential gene in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2020, 71(4): 386-393
- [69] Peters JM, Colavin A, Shi HD, Czarny TL, Larson MH, Wong S, Hawkins JS, Lu CHS, Koo BM, Marta E, et al. A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria[J]. Cell, 2016, 165(6): 1493-1506
- [70] Tan SZ, Reisch CR, Prather KLJ. A robust CRISPR interference gene repression system in *Pseudomonas*[J]. Journal of Bacteriology, 2018, 200(7): e00575-17
- [71] Peters JM, Koo BM, Patino R, Heussler GE, Hearne CC, Qu JX, Inclan YF, Hawkins JS, Lu CHS, Silvis MR, et al. Enabling genetic analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi[J]. Nature Microbiology, 2019, 4(2): 244-250
- [72] Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T, Ausubel FM. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(8): 2833-2838
- [73] Rubin EJ, Akerley BJ, Novik VN, Lampe DJ, Husson RN, Mekalanos JJ. *In vivo* transposition of *mariner*-based elements in enteric bacteria and mycobacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(4): 1645-1650
- [74] Skurnik D, Roux D, Aschard H, Cattoir V, Yoder-Himes D, Lory S, Pier GB. A comprehensive analysis of *in vitro* and *in vivo* genetic fitness of *Pseudomonas aeruginosa* using high-throughput sequencing of transposon libraries[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(9): e1003582
- [75] Turner KH, Wessel AK, Palmer GC, Murray JL, Whiteley M. Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(13): 4110-4115
- [76] Lee SA, Gallagher LA, Thongdee M, Staudinger BJ, Lippman S, Singh PK, Manoil C. General and condition-specific essential functions of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(16): 5189-5194
- [77] Blazier AS, Papin JA. Reconciling high-throughput gene essentiality data with metabolic network reconstructions[J]. PLoS Computational Biology, 2019, 15(4): e1006507