

产溶剂梭菌分子遗传操作技术研究进展

顾阳¹, 杨晟^{1,2}, 姜卫红¹

1 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032

2 上海工业生物技术研发中心, 上海 201201

顾阳, 杨晟, 姜卫红. 产溶剂梭菌分子遗传操作技术研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(8): 1133-1145.

Gu Y, Yang S, Jiang WH. Development in molecular genetic manipulation of solventogenic clostridia. Chin J Biotech, 2013, 29(8): 1133-1145.

摘要: 产溶剂梭菌是一类重要的工业微生物。通过遗传改造以优化产溶剂梭菌的发酵性能一直是溶剂制造技术研究的重要课题, 但长期受限于该类菌并不完善的遗传操作工具, 未见明显突破。近年来, 随着 TargeTron 基因中断、大片段基因整合等新技术和新方法的出现, 其分子遗传改造已取得较大进展。文中对产溶剂梭菌的分子遗传操作工具研究进展进行了总结, 并指出了现有技术在效率及全面性方面的不足。基于此, 今后应进一步优化现有的梭菌基因失活技术, 如建立基于同源重组的基因删除和替换; 同时也应发展新的分子操作技术, 如基因组多位点共编辑、多拷贝定点和随机整合等。

关键词: 产溶剂梭菌, 分子遗传操作, 遗传改造

Received: May 10, 2013; **Accepted:** June 17, 2013

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA00806), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A208), Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-EW-G-1-2), National Key Technology R&D Program (No. 2012BAD32B07), Cooperation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. DJCC-2011-006), State Key Laboratory of Motor Vehicle Biofuel Technology (No. 2013005).

Corresponding author: Sheng Yang. Tel: +86-21-54924173; Fax: +86-21-54924015; E-mail: syang@sibs.ac.cn

Weihong Jiang. Tel: +86-21-54924172; Fax: +86-21-54924015; E-mail: whjiang@sibs.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CBA00806), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A208), 中科院知识创新工程重要方向项目 (No. KSCX2-EW-G-1-2), 国家科技支撑计划 (No. 2012BAD32B07), 中国科学院院地合作项目 (No. DJCC-2011-006), 车用生物燃料技术国家重点实验室开放基金 (No. 2013005) 资助。

Development in molecular genetic manipulation of solventogenic clostridia

Yang Gu¹, Sheng Yang^{1,2}, and Weihong Jiang¹

¹ Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

² Shanghai Research and Development Center of Industrial Biotechnology, Shanghai 201201, China

Abstract: Solventogenic clostridia are important industrial microorganisms. Optimization of the fermentation performance of solventogenic clostridia, through genetic modification, has always been considered as the main topic involved in solvents production. However, due to the incomplete genetic tools, no research breakthroughs have been achieved. In recent years, with the development of new technologies and methods (e.g. TargeTron gene knockout, large DNA fragment integration method), great progresses have been made towards genetic engineering solventogenic clostridia. In this review, we summarize the development of the genetic tools for solventogenic clostridial species, and simultaneously point out the shortages of the existing technologies in efficiency and comprehensiveness. Therefore, optimization of the existing technologies in gene inactivation in clostridia, such as establishing homologous exchange-based gene deletion and exchange, is still imperative; and in parallel, new genetic tools (e.g. multiplex genome editing, targeted or random multi-copy gene integration) should also be timely developed.

Keywords: solventogenic clostridia, molecular genetic manipulation, genetic modification

产溶剂梭菌 (Solventogenic clostridia) 是一类革兰氏阳性、厌氧细菌。它们拥有宽泛的底物谱, 可将多种碳源转化为丙酮 (Acetone)、丁醇 (Butanol)、乙醇 (Ethanol) 等各类化学品, 因此也是一类重要的工业微生物^[1]。根据现有文献报道, 丙酮丁醇梭菌 *Clostridium. acetobutylicum* 和拜氏梭菌 *Clostridium. beijerinckii* 是最受研究者关注的两种产溶剂梭菌^[2]。前者具有较强的淀粉酶合成和分泌系统, 适合淀粉质原料的发酵, 而后者的淀粉酶活力很低, 属于糖-发酵菌株^[3], 它们发酵底物生成溶剂产品的过程亦被称为 ABE (Acetone, Butanol, Ethanol) 发酵。

近年来, 面对石化合成路线的激烈竞争和产业技术革新升级的需求, 开发新一代产溶剂梭菌

以提升 ABE 发酵的经济性和竞争力已成为该研究领域的当务之急。但受限于分子操作技术, 产溶剂梭菌的遗传改造在过去一段时期内进展缓慢。自 2001 年起, 国际上陆续公布了若干种产溶剂梭菌的全基因组序列^[4-7], 使从分子水平深入研究该类微生物成为可能。2007 年起, 产溶剂梭菌中基于二类内含子的基因中断技术见之报道^[8-9], 从而首次提供了一种适用于该类菌的高效基因中断技术。此后的 5 年多, 国内外研究者们对原有的产溶剂梭菌遗传操作系统不断进行优化, 并开发出一些新的基因删除、基因表达技术和方法。基于此, 文中对产溶剂梭菌遗传操作技术的发展进行了梳理和总结, 重点介绍了近年来国内外研究者在该领域的新进展。

1 产溶剂梭菌基因失活技术

目前大多数原核生物体内常用的基因失活技术是基于同源重组原理的基因删除,但受限于较低的同源重组率,这一类方法应用于产溶剂梭菌时已被证明效果不佳。解决这一问题有以下几种可行策略:1) 采用不依赖于同源重组的基因失活方法,如基于二类内含子的基因中断技术等;2) 提高同源重组的频率,如引入归巢内切酶(Homing endonuclease) I-Sce I 等系统;3) 建立高通量的筛选方法以提高对同源重组事件的筛选效率,如在重组质粒上引入合适的负筛选标记。

1.1 基于二类内含子的基因中断

二类内含子是一种特殊的自剪接内含子。它可以通过自我剪切离开 mRNA 前体,并与一种辅助蛋白(Intron-encoded protein, IEP) 形成复合物。在 IEP 蛋白的协助下,内含子可以识别和插入到宿主基因组的特定位点,然后完成反转录及缺口修复,最终在目标基因内部形成一段插入的 DNA 双链。内含子 RNA 识别特定 DNA 序列依靠的是 RNA 上的两个外显子结合位点 EBS1 和 EBS2 以及与 EBS1 临近的 δ 序列,而目标 DNA 序列上与之对应的分别是内含子结合位点 IBS1、IBS2 以及 δ' ^[10-12]。基于此,研究者们开发出了计算方法,搜寻目标基因序列上的可被二类内含子识别的插入位点,并设计出相应的内含子 EBS1、EBS2 和 δ 序列^[13]。这样的人工二类内含子可以特异性地插入到目标位点,实现基因失活(图 1)。

目前,基于二类内含子的基因失活技术已被用于多种微生物^[13-16],而来源于乳酸乳球菌的

ltrB 基因还被 Sigma-Alorich 公司开发成 Targetron™ 试剂盒。2007 年,英国诺丁汉大学和中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所的两个研究组均基于上述原理分别建立了适用于丙酮丁醇梭菌的二类内含子基因失活方法^[8-9]。诺丁汉大学的研究组随后还建立了“Clostron”网站(www.clostron.com),提供免费的内含子序列设计工具。基于该技术,研究者在产溶剂梭菌中进行基因失活的效率得到了显著提高。迄今为止,这种方法已被用于完成产溶剂梭菌中大量的基因中断操作^[17-21],极大地加快了相关研究进度。尽管基于二类内含子的基因失活方法效率较高(2周左右可完成一轮实验),但也存在一定的局限性和不足,主要包括:1) 对于某一个目标基因,软件会提供若干个可能的插入位点以及对应的内含子序列,但这种基于算法

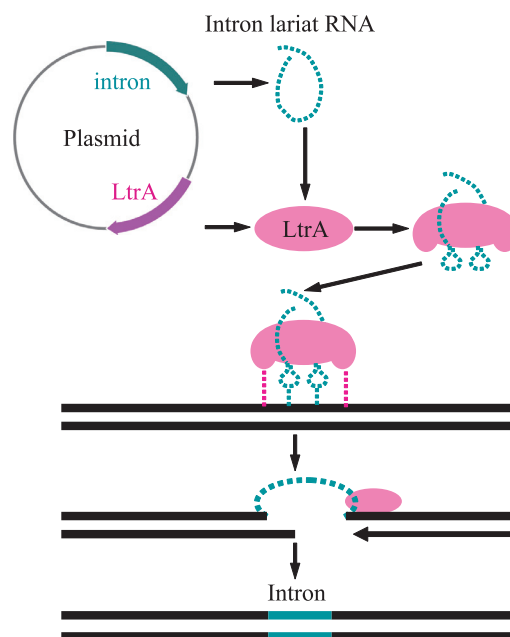


图 1 基于二类内含子的基因失活

Fig. 1 Group II intron-based gene inactivation.

得出的结果不能保证 100% 的成功率, 有时需要进行多个位点的尝试; 2) 对于某些较短的基因序列, 软件可能无法给出内含子的插入位点; 3) 内含子有可能插入到宿主基因组的其他位点, 还需进行进一步的验证; 4) 不能实现基因的删除; 5) 对于一些共转录的基因簇, 采用该技术敲除上游基因可能会引起极性效应, 影响下游基因的表达; 6) 由于内含子是插入到目标基因中, 并没有删除该基因序列。因此对于某些基因, 尤其是编码酶蛋白的基因, 可能无法完全中断其功能; 7) 无法实现对基因的精细操作, 如点突变等。

2011 年, 中国科学院微生物研究所的科研人员对该方法进行了改良: 在内含子内部引入一段目标基因插入位点上游或下游序列的同源臂。当内含子插入到目标基因的内部后, 可再通过一次同源重组即可实现对目标基因部分序列的删除^[22]。显然, 这一新版本方法的功能更为全面, 且由于实现了基因序列的部分删除, 使目的基因功能的缺失更具可靠性。

1.2 基于同源重组的基因删除

尽管产溶剂梭菌的同源重组效率低, 但早期的研究者们仍然在这方面进行了尝试。一种策略是在质粒上构建一段与目标基因内部序列相同的同源序列, 将质粒导入胞内后使其发生同源重组, 通过一次单交换将质粒整合至目标基因内部。借助该方法, 研究者们已经在模式菌——丙酮丁醇梭菌中失活了一些基因: *buk* 和 *pta*^[23]、*aad*^[24]、*solR*^[25]、*spoIIE*^[26]、*sigF*^[27] 以及 *sigE* 和 *sigG*^[28] 等。但显然, 通过一次单交换的同源重组无法实现基因的删除。另一种策略是在质粒上构建目标基因上下游两段同源臂、通过两次单交换

来删除基因。但由于产溶剂梭菌的低同源重组率以及缺乏合适的辅助元件 (如反筛选标记、温敏型复制子等), 该方法的效率极低, 在早期的研究报道中成功删除的基因仅有 *spo0A*^[29]。

在提高产溶剂梭菌的同源重组效率方面, 美国特拉华大学 Papoutsakis 教授课题组在丙酮丁醇梭菌中引入了来源于枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 的解旋酶 (Derevolase) 编码基因 *recU*, 期望促进同源重组的发生几率。他们通过一次单交换将质粒整合至丙酮丁醇梭菌的目标基因内部, 实现了基因的失活^[26-27]。但需指出的是, 其研究报道中并没有提供数据证明 RecU 的表达确实促进了丙酮丁醇梭菌同源重组效率的提高。2012 年, 该课题组又报道了将大肠杆菌来源的毒性基因 *mazF* 作为反筛选因子用于丙酮丁醇梭菌中基因删除的操作。他们以乳糖诱导型启动子表达 *mazF*, 可在含乳糖和抗生素的固体培养基上直接筛选出目标基因被删除的突变株^[30]; 同时, 该方法还参考 FLP-FRT 位点特异性重组系统^[31-32], 在质粒上下游同源臂内的抗性标记基因两侧加上了 FRT 序列, 当重组完成后, 通过在突变株中表达 FLP 重组酶剔除抗性基因, 以便该抗性基因可被继续用作筛选标记。该方法的不足之处在于: 1) 会在删除基因的位置留下一段 FRT 疤痕 (Scar), 并没有真正实现基因无痕删除; 2) 随着基因删除数量的增加, 染色体上的 FRT 疤痕也会随之增多, 当有 FLP 重组酶存在时, 有可能引起这些 FRT 短序列之间的重组, 造成非预期的基因序列缺失。

为了提高梭菌中重组事件的筛选效率, Heap 和 Cartman 等在筛选方法上做了改进, 引进了反

筛选因子。他们在 2009 年和 2010 年的两项专利中提出如下几种改进策略：1) 利用宿主细胞中的乳清酸核苷-5-磷酸脱羧酶基因 *pyrF* 作为反筛选因子，以尿嘧啶 (Uracil) 和 5-氟乳清酸 (5-FOA) 两种成分作为筛选压力，可有效提高对同源重组的筛选效率，该方法适用于产溶剂梭菌^[33]；2) 在质粒携带的目标基因上下游同源臂之间加入不含启动子的抗性基因，当质粒处于游离状态时，抗性基因不发挥作用；而当发生同源重组，抗性基因被整合到染色体上，此时抗性基因借助靶基因的启动子进行表达，使得重组菌表现出抗性，便于筛选^[33]；3) 将来自 *E. coli* 的编码胞嘧啶脱氨酶的 *codA* 基因引入梭菌中作为反筛选因子(图 2)。该基因可将 5-氟胞嘧啶 (5-fluorocytosine) 催化为有毒的 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)。因此，利用 5-氟胞嘧啶作为筛选压力即可帮助鉴定重组子^[34]。

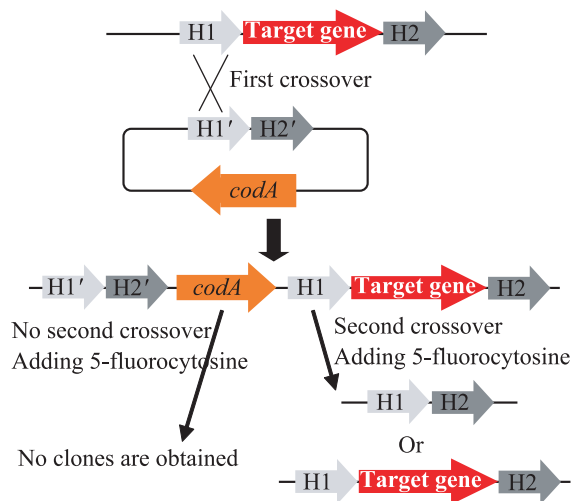


图 2 *codA* 作为反筛选因子用于鉴定重组子 (H1、H1' 和 H2、H2': 上下游同源臂)

Fig. 2 Identification of recombinants using *codA* as a counter marker. H1, H1' and H2, H2': homologous arms.

此外，归巢内切酶 (Homing endonuclease) I-Sce I 系统也是提高同源重组率的有效手段。I-Sce I 是酿酒酵母线粒体基因中内含子编码的一种限制性内切酶，它能识别并切割特定的 18 个碱基非对称序列，产生一个双链缺口，在有等位基因存在的条件下诱发同源重组的修复机制，进而提高同源重组效率。该系统的主要优点是适用范围广，在革兰氏阳性和阴性菌中均可使用，对宿主的选择无特别要求。自 1999 年该方法首次在大肠杆菌中使用之后^[35]，已被成功应用在其他原核生物中^[36-38]。作者所在课题组前期亦在丙酮丁醇梭菌中尝试了该方法，已成功删除了若干基因 (未发表数据)，证明了该方法在梭菌基因删除中的可行性 (图 3)。

1.3 转座子介导的基因组随机突变

转座子随机突变是反向代谢工程研究中的重要技术手段之一。即利用转座子对基因组进行高覆盖率的随机敲除，获得一个容量大且随机性

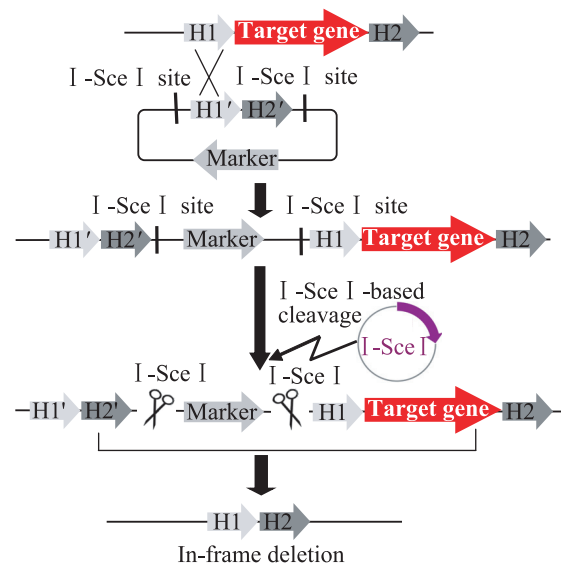


图 3 I-Sce I 介导的基因删除

Fig. 3 I-Sce I-based gene deletion.

好的突变株库。这样的突变库可以用于大尺度范围内的目标菌株筛选,并且便于后续对功能基因的定位。

对于梭菌属而言,前期的转座子随机突变技术研究主要针对的是致病菌—产气荚膜梭菌 *C. perfringens* 和艰难梭菌 *C. difficile*。研究者在 *C. perfringens* 中建立了 Mu 和 EZ-Tn5 介导的随机突变系统^[39-40],这两种方法均是在体外将转座子 DNA 和转座酶形成转座复合体 (Transposome),然后将该复合体转化至宿主菌内实施对基因组的随机突变。在 *C. difficile* 中,先期建立的则是 Tn916 和 Tn5397 转座子突变系统^[41-42]。但上述几种方法均存在转座子插入时的热点选择问题,例如, Mu 和 EZ-Tn5 系统中转座子插入时对编码 rRNA 的基因具有偏好性^[39-40],随机性不佳; Tn916 和 Tn5397 系统也被发现存在热点插入和多拷贝插入的问题^[43-44]。

早期也有研究者尝试将来源于链球菌的 Tn925、Tn1545 转座子以及肠球菌的 Tn926 转座子应用于产溶剂梭菌^[45-46]。研究结果表明这些转座子系统确实可以在产溶剂梭菌基因组上实现插入失活,但均存在热点插入和多拷贝插入的问题,随机性不佳,不适合建立高质量的单基因随机突变体库。

近年来, *mariner* 转座子受到研究者的关注,并在微生物中得到广泛应用^[47]。*mariner* 转座子属于 DNA 介导的转座元件,遵循“剪切-粘贴”的转座机制,转座作用只与转座酶有关,而与宿主因素无关^[47]。国外研究者于 2010 年和 2013 年先后在致病型艰难梭菌和产气荚膜梭菌中建立了 *mariner* 转座子介导的随机突变方法^[48-49],

转座子对基因组的插入显示出很好的随机性。由于 *mariner* 转座子识别的插入位点是 TA 碱基,且出现 1 个以上拷贝插入的几率极低,因此理论上非常适合用于在低 GC 含量的产溶剂梭菌中建立单基因突变体库。作者所在课题组前期亦尝试在丙酮丁醇梭菌中建立 *mariner* 转座子介导的突变方法,初步结果表明转座子在基因组上的插入具有很好的随机性 (未发表数据),适合建立高质量的随机突变库。

2 产溶剂梭菌基因表达技术

基因过量表达是微生物代谢工程中重要的技术手段之一。1990 年和 1993 年, Williams 和 Mermelstein 等分别建立了拜氏梭菌的接合转移方法和丙酮丁醇梭菌的电转化方法^[50-51]。自此,外源质粒 DNA 可以被高效地导入这两种主要的产溶剂梭菌中,以实现目标基因的过量表达。

2.1 依赖于质粒系统的基因表达

2.1.1 载体及复制子

以质粒为载体携带基因实现过量表达的方法简单有效,在微生物代谢工程中被普遍采用。产溶剂梭菌主要使用穿梭型质粒,即同时含有 *E. coli* 和梭菌的复制子,以便于遗传转化。穿梭质粒中常用的 *E. coli* 复制子有高拷贝数的 *ColE1* 和低拷贝数的 *p15a*;而产溶剂梭菌使用的复制子则有较多选择,例如, Williams 等构建了同时包含来源于 IncP 型质粒 RK2 的 *oriT* 元件以及复制子 pAM β 1 (*Enterococcus faecalis*)、pCB101 (*Clostridium butyricum*)、pWV01 (*Streptococcus cremoris*) 三者中之一的穿梭载体 (表 1),实现了载体从 *E. coli* 向拜氏梭菌 *C. beijerinckii*

NCIMB 8052 中的转移; 而对于丙酮丁醇梭菌, 复制子的来源更为广泛, 在表 1 中亦列出了迄今报道的可用于丙酮丁醇梭菌的复制子。当然, 不同复制子的转化率和稳定性差别较大。例如, Heap 等将包含 pBP1、pCB102、pCD6、pIM13 复制子的质粒电转化丙酮丁醇梭菌, 转化率分别为 1.38×10^2 、 2.45×10^2 、 8.47×10^1 、 2.92×10^2 , 质粒在宿主细胞中的分裂稳定性 (Segregational stability) 则分别为 99.4%、76.5%、82.4% 和 81.6%^[52]。

2.1.2 启动子

启动子是基因表达及调控的重要顺式元件, 其强度的高低直接影响着基因的表达水平。根据启动基因表达方式的不同, 启动子一般可以分为组成型启动子和诱导型启动子, 它们通过不同的方式在基因表达中发挥作用。

组成型启动子的强度由自身的序列特征决定, 启动子的-10 区和-35 区两个保守区域上下游、间区的序列和长度的变化都影响着启动子

表 1 已报道的产溶剂梭菌复制子

Table 1 Reported replicons of solventogenic clostridia

Replicon	Source and reference
pUB110	<i>Staphylococcus aureus</i> ^[53]
pIM13	<i>Bacillus subtilis</i> ^[54]
pT127	<i>Staphylococcus aureus</i> ^[54]
pBC16Δ1	<i>Bacillus cereus</i> ^[54]
pCS86	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ^[55]
pAMβ1	<i>Streptococcus Lactis</i> ^[56]
pCB101、pCB102、pCB103	<i>Clostridium butyricum</i> ^[50]
pWV01	<i>Streptococcus cremoris</i> ^[50]
pBP1	<i>Clostridium botulinum</i> ^[52]
pMU1328	<i>Streptococcus sanguis</i> ^[57]
pCBU2	<i>Clostridium butyricum</i> ^[57]

的效率^[58]。表 2 列举了丙酮丁醇梭菌中已被鉴定的一些启动子。但根据已有报道, 其中比较常见的用于基因过量表达的启动子为 P_{ptb} 、 P_{adc} 和 P_{thl} ^[18-19,59-62]。

表 2 已报道的丙酮丁醇梭菌启动子

Table 2 Reported available promoters of *C. acetobutylicum*

Promoter	Gene name
P_{glnA}	<i>glnA</i> ^[63]
P_{adc}	<i>adc</i> ^[64]
P_{groESL}	<i>groESL</i> ^[65]
P_{ptb}	<i>ptb-buk</i> ^[66]
P_{sol}	<i>adhE-ctfA-ctfB</i> ^[67]
P_{thl}	<i>thl</i> ^[68]
P_{hydA}	<i>hydA</i> ^[69]
P_{pta}	<i>pta-ack</i> ^[70]
$P_{abrB310}$	<i>abrB310</i> ^[71]
P_{sinR}	<i>sinR</i> ^[71]

诱导型启动子在微生物代谢工程和代谢调控研究中具有重要价值。但根据现有文献报道, 已发现和鉴定的可用于产溶剂梭菌的诱导型启动子较少。2003 年, Girbal 等以 *Staphylococcus xylosus* 中木糖操纵子为基础在丙酮丁醇梭菌中建立了受木糖诱导的基因表达系统, 该系统在以木糖为唯一碳源条件下, *gusA* 报告基因的表达量显著提高^[72]; 2012 年, 董红军等在丙酮丁醇梭菌建立了四环素诱导的基因表达系统。该系统在不添加四环素的条件下, TetR 蛋白结合含有 *tetO* 序列的启动子, 抑制下游基因的表达, 当添加四环素后, TetR 与四环素结合, 使含有 *tetO* 序列的启动子强度提高了 40 倍^[73]; 2012 年, Mohab 等以 *C. perfringens* 来源的乳糖诱导型启

动子 P_{bgal} 驱动毒性基因 *mazF* 作为反向筛选标记,用于建立丙酮丁醇梭菌中基于同源重组的基因删除和敲入系统^[30]。

2.2 整合至染色体的基因表达技术

依赖于复制型质粒的基因表达在稳定性上存在先天不足,因而在实际应用中受到限制。将外源基因片段通过同源重组整合至宿主菌的染色体上是实现稳定表达的必要手段,但受限於产溶剂梭菌极低的同源重组效率,这一策略在该类微生物中长期未得以实现。

2012年,英国诺丁汉大学的 Heap 等在丙酮丁醇梭菌中建立了高效的基因整合至染色体的 ACE (Allele-coupled exchange) 技术方法^[74]。他们利用丙酮丁醇梭菌的 *pyrE* (编码乳清酸磷酸核糖转移酶) 基因座通过两次双交换实现了外源基因在该位置的插入;在此基础上,借助染色体上 *thl* (编码硫解酶) 基因的启动子,并以 *pyrE* 和 *ermB* 基因 (红霉素抗性基因) 作为选择标记交替使用,实现了外源基因在 *thl* 基因座的连续插入,最终他们将 λ 噬菌体 46.5 kb 的基因组 DNA 整合到丙酮丁醇梭菌的染色体上。

此外,如上所述,美国特拉华大学的 AI-Hinai 等在丙酮丁醇梭菌中建立的基于 MazF 的基因删除技术亦可实现外源基因在染色体上的敲入。利用该方法,他们将来源于 *Clostridium ljungdahlii* 的甲酸脱氢酶基因 *fdh* 整合至丙酮丁醇梭菌的染色体上^[30]。

上述两项研究在产溶剂梭菌中实现了比较高效的染色体基因敲入,保证了目的基因过量表达时的稳定性,这对于该类工业微生物的遗传改造至关重要。尤其是 ACE 方法可实现数十 kb 的

大片段基因在染色体上的整合,为今后产溶剂梭菌的合成生物学研究提供了有效的遗传操作工具。

3 总结与展望

产溶剂梭菌的研究长期受限於其不完善的分子操作工具。近年来,这方面的研究取得了较大进展,开发出了一系列用于基因中断和删除、基因表达、基因整合的新方法和新工具。利用这些方法和工具,目前研究者们已经可以较方便地对这类厌氧微生物进行分子水平的改造以及遗传学方面的基础性研究。但需要指出的是,相比于一些遗传操作手段多样且高效的模式微生物 (如大肠杆菌、枯草芽胞杆菌等) 而言,产溶剂梭菌在这方面还有极大的提升空间。仅就基因无痕删除而言,产溶剂梭菌极低的同源重组率目前仍然是实际操作中的不利因素,使得相关的实验过程费时费力。此外,随着近年来“合成生物学”的逐步兴起,人们也认识到全面高效的遗传操作工具和丰富多样的分子元件是有效开展合成生物学研究的基础,因此,产溶剂梭菌的研究在工具和元件开发方面也面临着新的机遇和挑战。

基于以上分析,产溶剂梭菌遗传操作技术仍需在以下几方面进行升级和拓展: 1) 进一步优化现有基于同源重组的基因删除方法。可引进其他微生物中一些比较成熟的技术平台,在产溶剂梭菌中进行整合和改良,提高同源重组效率。例如,可挖掘噬菌体重组元件^[75], 构建梭菌版的 PCR-targeting 系统; 以及发掘适用于产溶剂梭菌的条件型复制元件 (如温敏型复制子等) 用于目前仍依赖于复制型质粒的同源重组操作,减少筛选第一步单交换事件的工作量; 2) 发展更为高

效的外源基因在染色体上的整合技术,用于基因表达。本文前述的 ACE 方法虽然已经实现大片断基因在丙酮丁醇梭菌染色体上的整合及表达,但筛选工作量较大,周期较长,因此在效率方面仍有较大提升空间;3) 开发功能更为强大的分子操作工具,如类似 CRISPER-Cas 的多位点共编辑系统^[76],以及类似 CiCHE 和 Mu 噬菌体 mini-Mu 介导的多拷贝定点和随机整合技术等^[77-78];4) 设计和合成适用于产溶剂梭菌的各类生物元件、基因开关和功能模块,实现在这类重要工业微生物中开展更为精细的分子遗传操作,从而为开展合成生物学研究奠定基础。

致谢:中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所杨蕴刘研究员对综述的撰写提出了许多宝贵的建议,在此表示感谢。

REFERENCES

- [1] Durre P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49(6): 639–648.
- [2] Lee SY, Park JH, Jang SH, et al. Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(2): 209–228.
- [3] Gu Y, Jiang Y, Wu H, et al. Current status and prospects of biobutanol manufacturing technology. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 914–923 (in Chinese). 顾阳, 蒋宇, 吴辉, 等. 生物丁醇制造技术现状和展望. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 914–923.
- [4] Nolling J, Breton G, Omelchenko MV, et al. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 2001, 183(16): 4823–4838.
- [5] Bao G, Wang R, Zhu Y, et al. Complete genome sequence of *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731, a solvent-producing strain with multireplicon genome architecture. *J Bacteriol*, 2011, 193(18): 5007–5008.
- [6] Hu S, Zheng H, Gu Y, et al. Comparative genomic and transcriptomic analysis revealed genetic characteristics related to solvent formation and xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* EA 2018. *BMC Genomics*, 2011, 12: 93–110.
- [7] Wu YR, Li Y, Yang KL, et al. Draft genome sequence of butanol-acetone-producing *Clostridium beijerinckii* strain G117. *J Bacteriol*, 2012, 194(19): 5470–5471.
- [8] Shao L, Hu S, Yang Y, et al. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*. *Cell Res*, 2007, 17(11): 963–965.
- [9] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, et al. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods*, 2007, 70(3): 452–464.
- [10] Guo HT, Zimmerly S, Perlman PS, et al. Group II intron endonucleases use both RNA and protein subunits for recognition of specific sequences in double-stranded DNA. *EMBO J*, 1997, 16(22): 6835–6848.
- [11] Guo HT, Karberg M, Long M, et al. Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells. *Science* 2000, 289(5478): 452–457.
- [12] Mohr G, Smith D, Belfort M, et al. Rules for DNA target-site recognition by a lactococcal group II intron enable retargeting of the intron to specific DNA sequences. *Genes Dev*, 2000, 14(5): 559–573.
- [13] Perutka J, Wang WJ, Goerlitz D, et al. Use of computer-designed group II introns to disrupt *Escherichia coli* DExH/D-box protein and DNA helicase genes. *J Mol Biol*, 2004, 336(2): 421–439.
- [14] Karberg M, Guo HT, Zhong J, et al. Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(12): 1162–1167.
- [15] Frazier CL, San Filippo J, Lambowitz AM, et al.

- Genetic manipulation of *Lactococcus lactis* by using targeted group II introns: generation of stable insertions without selection. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(2): 1121–1128.
- [16] Yao J, Zhong J, Fang Y, et al. Use of targetrons to disrupt essential and nonessential genes in *Staphylococcus aureus* reveals temperature sensitivity of Ll.LtrB group II intron splicing. *RNA*, 2006, 12(7): 1271–1281.
- [17] Ren C, Gu Y, Hu S, et al. Identification and inactivation of pleiotropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*. *Metab Eng*, 2010, 12(5): 446–454.
- [18] Xiao H, Gu Y, Ning Y, et al. Confirmation and elimination of xylose metabolism bottlenecks in glucose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system-deficient *Clostridium acetobutylicum* for simultaneous utilization of glucose, xylose, and arabinose. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(22): 7886–7895.
- [19] Xiao H, Li Z, Jiang Y, et al. Metabolic engineering of D-xylose pathway in *Clostridium beijerinckii* to optimize solvent production from xylose mother liquid. *Metab Eng*, 2012, 14(5): 569–578.
- [20] Gu Y, Ding Y, Ren C, et al. Reconstruction of xylose utilization pathway and regulons in Firmicutes. *BMC Genomics*, 2010, 11: 255–268.
- [21] Cooksley CM, Zhang Y, Wang H, et al. Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway. *Metab Eng*, 2012, 14(6): 630–641.
- [22] Jia K, Zhu Y, Zhang Y, et al. Group II intron-anchored gene deletion in *Clostridium*. *PLoS ONE*, 2011, 6(1): e16693.
- [23] Green EM, Boynton ZL, Harris LM, et al. Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiology*, 1996, 142 (8): 2079–2086.
- [24] Green EM, Bennett GN. Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, 57-58: 213–221.
- [25] Nair RV, Green EM, Watson DE, et al. Regulation of the *sol* locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor. *J Bacteriol*, 1999, 181(1): 319–330.
- [26] Bi CH, Jones SW, Hess DR, et al. SpoIIE is necessary for asymmetric division, sporulation, and expression of σ^F , σ^E , and σ^G but does not control solvent production in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol*, 2011, 193(19): 5130–5137.
- [27] Jones SW, Tracy BP, Gaida SM, et al. Inactivation of σ^F in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 blocks sporulation prior to asymmetric division and abolishes σ^E and σ^G protein expression but does not block solvent formation. *J Bacteriol*, 2011, 193(10): 2429–2440.
- [28] Tracy BP, Jones SW, Papoutsakis ET. Inactivation of σ^E and σ^G in *Clostridium acetobutylicum* illuminates their roles in clostridial-cell-form biogenesis, granule synthesis, solventogenesis, and spore morphogenesis. *J Bacteriol*, 2011, 193(6): 1414–1426.
- [29] Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET. Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol*, 2002, 184(13): 3586–3597.
- [30] Al-Hinai MA, Fast AG, Papoutsakis ET. Novel system for efficient isolation of *Clostridium* double-crossover allelic exchange mutants enabling markerless chromosomal gene deletions and DNA integration. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(22): 8112–8121.
- [31] Schlake T, Bode J. Use of mutated FLP recognition target (Frt) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry*, 1994, 33(43): 12746–12751.
- [32] Zhu XD, Sadowski PD. Cleavage-dependent ligation by the FLP recombinase. Characterization of a mutant FLP protein with an alteration in a catalytic amino acid. *J Biol Chem*, 1995, 270(39):

- 23044–23054.
- [33] Heap JT, Minton NP. Methods: WO 2009/101400. 2009-08-20.
- [34] Cartman ST, Minton NP. Method of double crossover homologous recombination in *Clostridia*: WO 2010/084349. 2010-07-29.
- [35] Posfai G, Kolisnychenko V, Bereczki Z, et al. Markerless gene replacement in *Escherichia coli* stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(22): 4409–4415.
- [36] Janes BK, Stibitz S. Routine markerless gene replacement in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun*, 2006, 74(3): 1949–1953.
- [37] Suzuki N, Nonaka H, Tsuge Y, et al. Multiple large segment deletion method for *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 69(2): 151–161.
- [38] Flannagan RS, Linn T, Valvano MA. A system for the construction of targeted unmarked gene deletions in the genus *Burkholderia*. *Environ Microbiol*, 2008, 10(6): 1652–1660.
- [39] Lanckriet A, Timbermont L, Happonen LJ, et al. Generation of single-copy transposon insertions in *Clostridium perfringens* by electroporation of phage mu DNA transposition complexes. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(9): 2638–2642.
- [40] Vidal JE, Chen JM, Li JH, et al. Use of an EZ-Tn5-based random mutagenesis system to identify a novel toxin regulatory locus in *Clostridium perfringens* strain 13. *PLoS ONE*, 2009, 4(7): e6232.
- [41] Mullany P, Wilks M, Tabaqchali S. Transfer of Tn916 and Tn916ΔE into *Clostridium difficile*: demonstration of a hot-spot for these elements in the *C. difficile* genome. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 79(2-3): 191–194.
- [42] Wang H, Roberts AP, Lyras D, et al. Characterization of the ends and target sites of the novel conjugative transposon Tn5397 from *Clostridium difficile*: excision and circularization is mediated by the large resolvase, TndX. *J Bacteriol*, 2000, 182(13): 3775–3783.
- [43] Hussain HA, Roberts AP, Mullany P. Generation of an erythromycin-sensitive derivative of *Clostridium difficile* strain 630 (630Δ*erm*) and demonstration that the conjugative transposon Tn916ΔE enters the genome of this strain at multiple sites. *J Med Microbiol*, 2005, 54(2): 137–141.
- [44] Wang HM, Smith MCM, Mullany P. The conjugative transposon Tn5397 has a strong preference for integration into its *Clostridium difficile* target site. *J Bacteriol*, 2006, 188(13): 4871–4878.
- [45] Babb BL, Collett HJ, Reid SJ, et al. Transposon mutagenesis of *Clostridium acetobutylicum* P262: isolation and characterization of solvent deficient and metronidazole resistant mutants. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 114(3): 343–348.
- [46] Woolley RC, Pennock A, Ashton RJ, et al. Transfer of Tn1545 and Tn916 to *Clostridium acetobutylicum*. *Plasmid*, 1989, 22(2): 169–174.
- [47] Choi KH, Kim KJ. Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(3): 217–228.
- [48] Cartman ST, Minton NP. A mariner-based transposon system for in vivo random mutagenesis of *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(4): 1103–1109.
- [49] Liu HL, Bouillaut L, Sonenshein AL, et al. Use of a mariner-based transposon mutagenesis system to isolate *Clostridium perfringens* mutants deficient in gliding motility. *J Bacteriol*, 2013, 195(3): 629–636.
- [50] Williams DR, Young DI, Young M. Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Clostridium acetobutylicum*. *J Gen Microbiol*, 1990, 136(5): 819–826.
- [51] Mermelstein LD, Papoutsakis ET. In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(4): 1077–1081.

- [52] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, et al. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *J Microbiol methods*, 2009, 78(1): 79–85.
- [53] Lin YL, Blaschek HP. Transformation of heat-treated *Clostridium acetobutylicum* protoplasts with pUB110 plasmid DNA. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 48(4): 737–742.
- [54] Truffaut N, Hubert J, Reysset G. Construction of shuttle vectors useful for transforming *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, 49(1): 15–20.
- [55] Yoshino S, Yoshino T, Hara S, et al. Construction of shuttle vector plasmid between *Clostridium acetobutylicum* and *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(2): 437–441.
- [56] Oultram JD, Young M. Conjugal Transfer of plasmid pAMβ1 from *Streptococcus Lactis* and *Bacillus subtilis* to *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett*, 1985, 27(1): 129–134.
- [57] Lee SY, Bennett GN, Papoutsakis ET. Construction of *Escherichia coli*-*Clostridium acetobutylicum* shuttle vectors and transformation of *Clostridium acetobutylicum* strains. *Biotechnol Lett*, 1992, 14(5): 427–432.
- [58] Blazeck J, Alper HS. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnol J*, 2013, 8(1): 46–58.
- [59] Sillers R, Al-Hinai MA, Papoutsakis ET. Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(1): 38–49.
- [60] Zhao Y, Hindorff LA, Chuang A, et al. Expression of a cloned cyclopropane fatty acid synthase gene reduces solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(5): 2831–2841.
- [61] Dusseaux S, Croux C, Soucaille P, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol/butanol/ethanol mixture. *Metab Eng*, 2013, 18C: 1–8.
- [62] Siemerink MA, Kuit W, Lopez Contreras AM, et al. D-2, 3-butanediol production due to heterologous expression of an acetoin reductase in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(8): 2582–2588.
- [63] Janssen PJ, Jones DT, Woods DR. Studies on *Clostridium acetobutylicum* *glnA* promoters and antisense RNA. *Mol Microbiol*, 1990, 4(9): 1575–1583.
- [64] Gerischer U, Durre P. mRNA analysis of the *adc* gene region of *Clostridium acetobutylicum* during the shift to solventogenesis. *J Bacteriol*, 1992, 174(2): 426–433.
- [65] Narberhaus F, Bahl H. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *groESL* operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 1992, 174(10): 3282–3289.
- [66] Walter KA, Nair RV, Cary JW, et al. Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene*, 1993, 134(1): 107–111.
- [67] Fischer RJ, Helms J, Durre P. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *sol* operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis. *J Bacteriol*, 1993, 175(21): 6959–6969.
- [68] Stim-Herndon KP, Petersen DJ, Bennett GN. Characterization of an acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase) gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene*, 1995, 154(1): 81–85.
- [69] Gorwa MF, Croux C, Soucaille P. Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol*, 1996, 178(9): 2668–2675.
- [70] Boynton ZL, Bennett GN, Rudolph FB. Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl*

- Environ Microbiol, 1996, 62(8): 2758–2766.
- [71] Scotcher MC, Rudolph FB, Bennett GN. Expression of *abrB310* and SinR, and effects of decreased *abrB310* expression on the transition from acidogenesis to solventogenesis, in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(4): 1987–1995.
- [72] Girbal L, Mortier-Barriere I, Raynaud F, et al. Development of a sensitive gene expression reporter system and an inducible promoter-repressor system for *Clostridium acetobutylicum*. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(8): 4985–4988.
- [73] Dong H, Tao W, Zhang Y, et al. Development of an anhydrotetracycline-inducible gene expression system for solvent-producing *Clostridium acetobutylicum*: A useful tool for strain engineering. Metab Eng, 2012, 14(1): 59–67.
- [74] Heap JT, Ehsaan M, Cooksley CM, et al. Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. Nucleic Acids Res, 2012, 40(8): e59.
- [75] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [76] 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.
- [77] Tyo KE, Ajikumar PK, Stephanopoulos G. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. Nat Biotechnol, 2009, 27(8): 760–765.
- [78] Akhverdyan VZ, Gak ER, Tokmakova IL, et al. Application of the bacteriophage Mu-driven system for the integration/amplification of target genes in the chromosomes of engineered Gram-negative bacteria—mini review. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91(4): 857–871.

(本文责编 郝丽芳)