

· 生物技术与方法 ·

地衣芽胞杆菌 FLP/FRT 基因编辑系统的构建及验证

李宗文^{1,2}, 李由然^{1,2}, 顾正华^{1,2}, 丁重阳^{1,2}, 张梁^{1,2}, 徐沙^{1,2}, 石贵阳^{1,2}

1 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

李宗文, 李由然, 顾正华, 等. 地衣芽胞杆菌 FLP/FRT 基因编辑系统的构建及验证. 生物工程学报, 2019, 35(3): 458-471.

Li ZW, Li YR, Gu ZH, et al. Development and verification of an FLP/FRT system for gene editing in *Bacillus licheniformis*. Chin J Biotech, 2019, 35(3): 458-471.

摘要: 地衣芽胞杆菌有效的基因编辑工具有限, 为了拓展和丰富其基因编辑手段, 在地衣芽胞杆菌中构建一个抗性标记可重复使用的 FLP/FRT 基因编辑系统, 并通过敲除 α -淀粉酶基因 *amyL*、蛋白酶基因 *aprE* 及敲入外源透明颤菌血红蛋白基因 *vgb* 对该系统进行初步验证。首先以温敏质粒 pNZT1 为载体分别构建 *amyL* 和 *aprE* 基因敲除质粒 pNZTT-AFKF 和 pNZTT-EFKF, 两个敲除质粒各自包含针对目标基因的同源臂、抗性基因及同向的 FRT 位点; 将敲除质粒转化地衣芽胞杆菌并经过两次同源交换过程实现目标基因的敲除; 最后导入一个 FLP 重组酶表达质粒通过 FLP/FRT 系统的重组作用介导抗性基因的回收。为进一步验证本系统的实用性及编辑效率, 构建了包含透明颤菌血红蛋白编码基因 *vgb* 表达盒及基因组丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 *pflB* 敲除盒的重组质粒 pNZTK-PFTF-*vgb*, 并以此进行外源基因 *vgb* 在基因组上的定向敲入。结果显示, 成功敲除 *amyL* 及 *aprE* 并回收了抗性标记卡那霉素基因, 敲除后淀粉酶活和蛋白酶活分别减少 95.3% 和 80.4%; *vgb* 基因成功整合入基因组 *pflB* 位点并回收了抗性标记四环素基因, 并利用荧光定量 PCR 技术检测到 *vgb* 的整合表达。文中首次建立了一个适用于地衣芽胞杆菌的、抗性标记可重复使用的 FLP/FRT 基因编辑系统, 并进行了基因敲除及基因敲入验证, 为地衣芽胞杆菌遗传改造提供了良好的方法参考。

关键词: 地衣芽胞杆菌, FLP/FRT, 温敏质粒, 基因敲除, 敲入

Received: August, 12, 2018; **Accepted:** October 8, 2018

Supported by: The Key Research Project of “13th 5-year Plan” of China (No. 2016YFD0401400), National Natural Science Foundation of China Youth Fund (No. 31401674), Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (No. SJCX18_0616), Top-notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions, Science and Technology Project of Jiangsu (No. BE2016628), Cyan Engineering, Jiangsu Fishery Science and Technology Project (No. Y2018-26), Wuxi Science and Technology Development Fund Project (No. CLE02N1713).

Corresponding author: Guiyang Shi. Tel/Fax: +86-510-85918229; E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

十三五国家重点研发计划 (No. 2016YFD0401400), 国家自然科学基金青年基金项目 (No. 31401674), 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (No. SJCX18_0616), 江苏高校品牌专业建设工程项目, 江苏省科技项目 (No. BE2016628), 青蓝工程, 江苏省渔业科技类项目 (No. Y2018-26), 无锡市科技发展资金项目 (No. CLE02N1713) 资助。

网络出版时间: 2018-12-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20181207.0950.001.html>

Development and verification of an FLP/FRT system for gene editing in *Bacillus licheniformis*

Zongwen Li^{1,2}, Youran Li^{1,2}, Zhenghua Gu^{1,2}, Zhongyang Ding^{1,2}, Liang Zhang^{1,2}, Sha Xu^{1,2}, and Guiyang Shi^{1,2}

¹ National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Few tools of gene editing have been developed in *Bacillus licheniformis* at present. In order to enrich the tools, an FLP/FRT gene editing system that can repeatedly use a single selectable marker was constructed in *Bacillus licheniformis*, and the system was verified by knocking out an alpha amylase gene (*amyL*), an protease gene (*aprE*) and knocking in an exogenous *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*). First, knock-out plasmids pNZTT-AFKF of *amyL* and pNZTT-EFKF of *aprE* were constructed using thermosensitive plasmid pNZT1 as a carrier. The two knock-out plasmids contained respective homology arms, resistance genes and FRT sites. Then the knock-out plasmids were transformed into *Bacillus licheniformis* and the target genes were replaced by respective deletion cassette via twice homologous exchange. Finally, an expression plasmid containing FLP recombinase reading frame was introduced and mediated the excision of resistance marker. In order to expand the practicability of the system, knock-in plasmid pNZTK-PFTF-*vgb* was constructed, with which knock-in of *vgb* at *pflB* site was carried out successfully. The results showed that *amyL* and *aprE* were successfully knocked out and the marker kanamycin cassette exactly excised. The activities of amylase and protease of deletion mutants were reduced by 95.3% and 80.4% respectively. *vgb* was successfully knocked in at *pflB* site and the marker tetracycline cassette excised. The expression of integrated *vgb* was verified via real-time PCR. It is the first time to construct an FLP/FRT system for gene editing in *Bacillus licheniformis*, which could provide an effective technical means for genetic modification.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, FLP/FRT, thermosensitive plasmid, knock-out, knock-in

地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis* 是一种常见的革兰氏阳性细菌，具有耐热、酶系丰富、产酶量高和安全等诸多优良特性，是最具应用潜力和价值的芽胞杆菌之一。目前地衣芽胞杆菌被广泛用于各种蛋白质的胞外表达，包括 α -淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、青霉素酶等，产量可达 25 g/L^[1]。此外，地衣芽胞杆菌在饲料添加、医药、环境治理以及农业病害防治等领域也有重要应用^[2]。

当前以基因组序列信息为蓝图，基于人工设计的遗传扰动而进行的代谢工程已成为研究地衣芽胞杆菌复杂代谢途径以及进行菌种改造构建相关表型的有效策略。然而，受限于地衣芽胞杆菌遗传转化效率不高^[3]，对其进行基因操作存在一定困难，目前文献报道的几种基因编辑方法在使用效果上存在多方面的不足。传统的转化敲除盒片段同源替换目标基因的方法是实现微生物基因

敲除的经典策略，主要通过微生物本身的 RecA 重组系统（主要包括 RecA 和 RecBCD 等蛋白）发挥作用^[4]。但是受限于地衣芽胞杆菌遗传转化效率不高，且外源 DNA 受到限制修饰系统的降解^[5]，导致该方法运用到地衣芽胞杆菌中敲除效率非常低，而且得到的阳性转化子残留抗性标记^[6]。CRISPR/Cas9 系统是近年来基因编辑的研究热点，有报道运用 CRISPR/Cas9n (Cas9 的突变体，单链切割) 系统对地衣芽胞杆菌 *yvmC* 基因进行敲除且效率最高可达 100%^[7]。该方法需要将 Cas9n 基因表达盒整合到基因组上。还有文献报道利用温敏质粒介导同源双交换来失活目标基因^[8-10]。Nahrstedt 等^[8]以温敏质粒 pE194 为载体构建敲除质粒敲除了地衣芽胞杆菌 DNA 修复相关基因 *recA* 和芽胞形成关键基因 *spoIV* 来研究解决生物污染问题。该方法的优点是把基因敲除分成转化

和重组两个独立事件, 转化成功后首先大量扩增转化子, 之后再进行敲除重组过程, 因此可以克服传统方法因遗传转化效率低导致敲除困难的问题, 不足之处是由于敲除盒上没有设计抗性标记, 会造成筛选工作量很大。因此, 综合上述关于地衣芽胞杆菌基因编辑方法的现状, 主要有三点不足: 一是受限于转化效率不高导致的敲除困难; 二是筛选量大; 三是残留抗性标记。

FLP/*FRT* 重组系统是发现于酿酒酵母 2 μ m 环状质粒上的位点特异性重组 (Site-specific recombination) 系统, 通过 FLP 重组酶 (Flippase recombination enzyme) 特异性识别 *FRT* 位点 (FLP recombination target) 可介导 2 个 *FRT* 位点之间 DNA 片段的删除、倒位与置换等^[11-12]。FLP/*FRT* 重组系统由于具有较高的重组效率和靶向性, 已经被广泛应用于细菌、酵母等微生物以及拟南芥、水稻、小鼠、果蝇、线虫等高等真核模式生物的研究中, 实现了基因敲除、敲入、点突变、缺失突变、染色体组大片段删除等基因工程操作^[13-15]。Sanchez-Martinez 等^[14]应用 FLP/*FRT* 系统实现在白假丝酵母 *Candida albicans* 中删除抗性标记基因 *URA3* 和整合外源基因到基因组上。

本研究借助温敏质粒介导基因敲除的策略, 在地衣芽胞杆菌中构建 FLP/*FRT* 基因编辑系统, 利用温敏质粒介导敲除的方法克服敲除效率低的问题, 敲除盒中间设计抗性标记解决筛选量大的问题, 利用 FLP/*FRT* 系统的特异性重组作用解决抗性标记残留问题, 并以此成功敲除 α -淀粉酶基因 *amyL*、蛋白酶基因 *aprE* 以及敲入外源透明颤菌血红蛋白基因 *vgb*, 为地衣芽胞杆菌的遗传改造提供良好的方法参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

实验所用菌株及质粒见表 1。

1.1.2 主要工具酶、试剂和培养基

文中所用的 2 \times Taq PCR Master Mix、2 \times Pfu PCR Master Mix 购自杭州宝赛公司; Fast DigestedTM 快速限制性内切酶购自美国 Thermo 公司; T4 DNA 连接酶和 pMD19T-simple 购于大连 TaKaRa 公司; 卡那霉素、氨苄青霉素、四环素购自 Sigma 公司; 质粒 DNA 小剂量提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物有限公司; 蛋白胨、酵母粉、琼脂粉购自 OXOID 公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。大肠杆菌和地衣芽胞杆菌生长用 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10。配置固体 LB 时加入 1.5%–2.0% 的琼脂粉。在菌株构建和摇瓶发酵过程中, 培养基中添加的氨苄青霉素、卡那霉素、四环素终浓度分别为 100、30、20 μ g/mL。

1.1.3 引物

实验所用引物见表 2, 引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 敲除及敲入质粒的构建

敲除质粒的构建过程如下所述。本研究选取地衣芽胞杆菌 9945a α -淀粉酶 (α -amylase) 基因 *amyL* (CP005965 REGION: 723302..724840) 和蛋白酶 (Subtilisin Carlsberg) 基因 *aprE* (CP005965 REGION: 1207540..1208679) 为敲除试验基因。以 9945a 基因组为模板, 分别利用引物 *amyL*-*Xho* I-F/*amyL*-*Hind* III-R 及 *aprE*-*Xho* I-F/*aprE*-*Sma* I-R 克隆出 α -淀粉酶基因 *amyL* 及蛋白酶基因 *aprE*, 连接到 pMD19T-simple 上, 得到质粒 19T-*amyL* 及 19T-*aprE*。以质粒 pMA5 为模板, 利用引物 *FRT*-*Kpn* I-*Kan*-F/*FRT*-*Sal* I-*Kan*-R 进行 PCR 扩增, 得到首尾两端含同向 *FRT* 位点的卡那霉素 (Kanamycin, Kan) 抗性基因表达元件并用 *Kpn* I 和 *Sal* I 双酶切, 将酶切产物与经相同双酶切的 19T-*amyL* 大片段连接, 构建得到 19T-AFKF (敲除盒片段 *amyL*-*FRT*-*Kan*-*FRT*-*amyL*, 简称

AFKF), 左右同源臂长分别为 420 bp 和 547 bp。以 19T-*aprE* 为模板, 利用引物 *aprE-Kpn I-F/aprE-Sal I-R* 反向 PCR (引物结合在 *aprE* 基因的中部位置, 反向 PCR 可得到左右同源臂), PCR 产物用 *Kpn I* 和 *Sal I* 酶切纯化后与卡那霉素抗性基因表达元件连接, 构建得到 19T-EFKF (敲除盒片段 *aprE-FRT-Kan-FRT-aprE*, 简称 EFKF), 左右同源臂长分别为 513 bp 和 409 bp。最后用 *Xho I* 和 *Hind III* 酶切 19T-AFKF, 胶回收敲除盒片段 AFKF, 连接到相同酶切的 pNZTT 质粒, 得到 *amyL* 基因的温敏敲除质粒 pNZTT-AFKF; *Xho I* 和 *Sma I* 酶切 19T-EFKF, 胶回收敲除盒片段 EFKF, 连接到相同酶切的 pNZTT 质粒, 得到 *aprE* 基因的温敏敲除质粒 pNZTT-EFKF。

敲入质粒的构建过程如下所述。文中选取了丙酮酸裂解酶 (Putative formate C-acetyltransferase) 基因 *pflB* (CP005965 REGION: 2135016..2137240) 为敲入位点, 整合外源透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla hemoglobin*) 基因 *vgb*。首先以 9945a 基因组为模板, 利用引物 *pflB-Sma I-F/pflB-Xho I-R* 扩增得到 *pflB* 基因, 连接到 pMD19T-simple, 构建质粒 19T-*pflB*。以 19T-*pflB* 为模板, 利用引物 *pflB-Pst I-R/pflB-BamH I-F* 反向 PCR (引物结合在 *pflB* 基因的中部位置, 反向 PCR 可得左右同源臂), 扩增产物经 *Pst I* 和 *BamH I* 酶切后待用; 以 pHY300-PLK 质粒为模板, 利用引物 *FRT-BamH I-Tet-F/FRT-Pst I-Tet-R* 扩增得到两端含同向 *FRT* 位点的四环素 (Tetracycline, Tet) 抗性基因表达元件, 经

表 1 文中所用主要菌株及质粒

Table 1 Main strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Related characteristics	Sources
Strains		
JM109	<i>E. coli</i> , used for gene cloning	This lab
9945a	<i>B. licheniformis</i> , wild type	This lab
9945a.1	9945a ($\Delta amyL::Kan$)	This study
9945a.2	9945a ($\Delta amyL$)	This study
9945a.3	9945a.2 ($\Delta aprE::Kan$)	This study
9945a.4	9945a.2 ($\Delta aprE$)	This study
9945a.5	9945a ($\Delta pflB::FTF:vgb$)	This study
9945a.6	9945a ($\Delta pflB::vgb$)	This study
Plasmids		
pMA5	<i>Bacillus-E. coli</i> shuttle vector, Amp ^r and Kan ^r	This lab
pWB980- <i>vgb</i>	Plasmid carrying <i>vgb</i> in <i>Bacillus</i> , Kan ^r	This lab
pCP20	Plasmid carrying <i>flp</i> in <i>E. coli</i> , Amp ^r	This lab
pMD19T-simple	Cloning plasmid in <i>E. coli</i> , Amp ^r	TaKaRa
pNZT1	The delivery vector of replication thermosensitive and rolling circle amplification, Em ^r	This lab
pNZTT	pNZT1 was inserted a tetracycline gene for Tet ^r at <i>Not I</i> , Em ^r and Tet ^r	This study
pNZTK	pNZT1 was inserted a kanamycin gene for Kan ^r at <i>Not I</i> , Em ^r and Kan ^r	This study
19T- <i>amyL</i>	pMD19T-simple with the <i>amyL</i> fragment of 9945a	This study
19T-AFKF	pMD19T-simple with the deletion cassette of <i>amyL</i>	This study
pNZTT-AFKF	Knock-out vector pNZTT with the deletion cassette of <i>amyL</i>	This study
19T- <i>aprE</i>	pMD19T-simple with the <i>aprE</i> fragment of 9945a	This study
19T-EFKF	pMD19T-simple with the deletion cassette of <i>aprE</i>	This study
pNZTT-EFKF	Knock-out vector pNZTT with the deletion cassette of <i>aprE</i>	This study
19T- <i>pflB</i>	pMD19T-simple with the <i>pflB</i> fragment of 9945a	This study
19T-PFTF- <i>vgb</i>	pMD19T-simple with the knock-in cassette of <i>vgb</i>	This study
pNZTK-PFTF- <i>vgb</i>	Knock-in vector pNZTK with the knock-in cassette of <i>vgb</i>	This study
pNZTT- <i>flp</i>	pNZTT with <i>flp</i> expression cassette	This study
pNZTK- <i>flp</i>	pNZTK with <i>flp</i> expression cassette	This study

表 2 文中所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>amyL-Xho</i> I-F	AATCTACGCTCGAGACGGCTTTATGCCCGATTGC	34
<i>amyL-Hind</i> III-R	AGTCACCGA <u>AGCTT</u> CGATCCGCCGTTTACGTGAAAC	36
<i>FRT-Kpn</i> I-Kan-F	CGAGGTACCGAAGTTTCTATTCCGAAGTTTCTATTCTCTAGAAAGTATAGGA ACTTCGGCCAGTTTGTGAAGATTAGA	79
<i>FRT-Sal</i> I-Kan-R	AGT <u>TCGAC</u> CGAAGTTTCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGA ACTTCCACGCATAAAATCCCCTTTC	77
<i>amyL</i> -F	AGGCTGAAAGCAAAGGGCTATC	22
<i>amyL</i> -M-R	AAGGGCACAAATCGCATCGTG	21
<i>amyL</i> -M-F	CACGATGCGATTTGTGCCCTT	21
<i>amyL</i> -R	ACGCCGCCTTACCTATACGATTC	23
<i>aprE-Xho</i> I-F	CCG <u>CTCGAG</u> TTATTGAGCGGCAGCTTCGACATTGA	35
<i>aprE-Sma</i> I-R	TCC <u>CCCGGG</u> TTCATGCTCGTGTTACGATGGCATT	35
<i>aprE-Sal</i> I-F	GCG <u>TCGAC</u> AATGCATATGCAAAGGGGTTGTC	32
<i>aprE-Kpn</i> I-R	GG <u>GTACCT</u> TACACCCGTTGTATTGTCAAGC	30
<i>aprE</i> -F	ATGCAGCGGTTTCGACGTTTCAAG	24
<i>aprE</i> -M-R	CACGATGCGATTTGTGCCCTT	21
<i>aprE</i> -M-F	GAAGCGCTCGTCGTATAACAGATG	24
<i>aprE</i> -R	CAGGCTGAAGCGGTCTATTCATAC	24
<i>pflB-Sma</i> I-F	TCC <u>CCCGGG</u> GGAATGGAACAATGGAAAGGTTTCAC	35
<i>PflB-Xho</i> I-R	CC <u>CTCGAG</u> GGCTACATCGATTCATGGAAGGTACG	34
<i>pflB-BamH</i> I-F	ACGGGATCCTTGTAGTCAGGTGTGCGTGCAA	31
<i>pflB-Pst</i> I-R	AACTGCAGGCAATGGCAATCGGCAAACA	28
<i>FRT-BamH</i> I-Tet-F	ACGGGATCCGAAGTTTCTATTCCGAAGTTTCTATTCTCTAGAAAGTATAGGA ACTTCGGATCAATTTTGAACCTCTCTCC	79
<i>FRT-Pst</i> I-Tet-R	AACTGCAGGAAGTTTCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGA ACTTCGGGCCATATTGTTGTATAAG	76
<i>vgb-BamH</i> I-F	CGGGATCCGCACCTGAATTCGAGCTCaGCATTA	32
<i>vgb-BamH</i> I-R	CGGGATCCAAACTCATTCCCTGATCTCGACTTCG	34
<i>pflB</i> -F	CGCGATGTTCAAAGAACTTTCT	22
<i>pflB</i> -M-R	GCATTTGGTCTTATTGGATCGATAG	25
<i>pflB</i> -M-F	CTATCGATCCAATAAGACCAAATGC	25
<i>pflB</i> -R	GAAACCGTCATTTGTTTTCCGGTT	24
<i>flp-Sma</i> I-F	ATCC <u>CCCGGG</u> TTATATGCGTCTATTTATGTAG	32
<i>flp-Sma</i> I-R	TCC <u>CCCGGG</u> ATGCCACAATTTGATATATTATG	32
<i>flp-pMA-Sma</i> I-F	AATCC <u>CCCGGGG</u> GAGGCAAGGGTTTAAAGGTGGAGATT	38
<i>flp-pMA-Xho</i> I-R	CCG <u>CTCGAG</u> CGGGTATCGGTTTATCAGCTTGCTTTTCG	37

Generated restriction sites are underlined and indicated in the primer names.

BamH I 和 *Pst* I 酶切后与上面的反向 PCR 产物连接, 构建质粒 19T-PFTF。以 pWB980-*vgb* 为模板, 利用引物 *vgb-BamH* I-F/*vgb-BamH* I-R 扩增得到含 *P43* 启动子的 *vgb* 表达盒, *BamH* I 单酶切后连接到相同单酶切的 19T-PFTF, 构建得到质粒

19T-PFTF-*vgb* (敲入盒片段 *pflB-vgb-FRT-Tet-FRT-pflB*, 简称 PFTF-*vgb*), 左右同源臂长分别为 935 bp 和 1 003 bp。最后用 *Sma* I 和 *Xho* I 酶切 19T-PFTF-*vgb* 得到敲入盒 PFTF-*vgb*, 连接到相同酶切的 pNZTK 质粒, 得到温敏敲入质粒 pNZTK-

PFTF-*vgb*。

1.2.2 FLP 重组酶表达质粒的构建

以质粒 pCP20 为模板,利用引物 *flp-Sma I-F/flp-Sma I-R* 扩增出 FLP 重组酶结构基因 *flp*,扩增产物 *flp* 经 *Sma I* 单酶切后纯化待用。质粒 pMA5 经 *Nde I* 酶切纯化后用等量的 $2\times Pfu$ DNA 聚合酶 72 °C 孵育 15 min 补平粘性末端,然后与 *flp* 连接,构建中间质粒 pMA5-*flp*。以 pMA5-*flp* 为模板,利用引物 *flp-pMA-Sma I-F/flp-pMA-Xho I-R* 扩增得到含 *Hpa II* 启动子的 *flp* 表达盒,*flp* 表达盒与 pNZTT 经过相同的 *Sma I* 和 *Xho I* 酶切后连接得到 pNZTT-*flp*,与 pNZTK 经相同的 *Sma I* 和 *Xho I* 酶切后连接得到 pNZTK-*flp*。为行文方便,称 pNZTT-*flp* 为敲除消抗质粒,称 pNZTK-*flp* 为敲入消抗质粒。

1.2.3 基因敲除与基因敲入

基因敲除步骤如下所示。以敲除 *amyL* 为例,把构建好的敲除质粒 pNZTT-AFKF 通过电转的方法转入地衣芽胞杆菌 9945a 细胞中。电转方法参考李由然^[16],特别地,种子需经 LB 平板活化,菌体要充分洗涤 4 次以尽可能除去离子以及质粒加入量不少于 200 ng。转化成功的 9945a/pNZTT-AFKF 首先在 30 °C、200 r/min 下增殖活化,形成足够的新鲜菌液;转接 300 μ L 菌液至新的 15 mL LB 培养基,42 °C、250 r/min 无抗培养 1 代,培养时间约 14–20 h;用接种环蘸取菌液在卡那霉素抗性平板上划线,平板置于 37 °C 培养箱至长出单菌落,经 PCR 验证得到单交换菌株;单交换菌株先在 37 °C 摇瓶扩增,后转接 150 μ L 单交换菌液至新的 15 mL LB 培养基,30 °C、200 r/min 无抗培养 2 代,每代培养时间约 24–30 h;最后用无菌水稀释 10^{-5} – 10^{-6} 涂布卡那霉素抗性平板,平板置于 37 °C 培养箱培养至长出单菌落。挑取一定数量的单菌落在卡那霉素抗性平板上划线扩增,然后一一对应划线至四环素抗性平板,在四环素抗性平板上不长的单菌落符合敲除重组

子抗性特征,用敲除验证引物 *amyL-F/amyL-M-R*、*amyL-M-F/amyL-R* 进行菌落 PCR 验证。同样的流程用温敏敲除质粒 pNZTT-EFKF 对蛋白酶基因 *aprE* 进行敲除。

基因敲入的原理是在敲除质粒的基础上在同源臂和同侧 *FRT* 位点之间插入外源基因,然后经过与敲除相同的操作流程,可实现外源基因整合至基因组。具体为:把构建好的敲入质粒 pNZTK-PFTF-*vgb* 通过电转的方法转入地衣芽胞杆菌 9945a 中,然后经过与敲除相同的变温传代过程,最后抗性平板筛选出具有卡那霉素抗性,同时对四环素敏感的,并用敲入验证引物 *pflB-F/pflB-M-R*、*pflB-M-F/pflB-R* 进行菌落 PCR 验证。

1.2.4 抗性回收

前面得到的敲除重组子与敲入重组子基因组上都插入了抗性标记基因,使得菌体带有抗性。抗性回收策略是通过电转的方法向重组子中导入一个 FLP 重组酶表达质粒,表达的 FLP 重组酶特异性识别 *FRT* 位点并介导 2 个 *FRT* 位点之间抗性基因的删除。其中敲除重组子导入 pNZTT-*flp*,敲入重组子导入 pNZTK-*flp*,然后在 30 °C、200 r/min 条件下培养 2 代,最后抗性平板负筛出抗性丢失的重组菌,并用相应引物进行菌落 PCR 鉴定并测序验证。

抗性回收后携带消抗质粒的重组菌在 37 °C 下无抗摇瓶传代 2 次即可丢失质粒。

1.2.5 α -淀粉酶及蛋白酶酶活检测

淀粉酶酶活的测定参照 Kim 等^[17]的方法进行。酶活单位 (U) 定义为:在 40 °C、pH 6.5 的反应条件下,1 mL 酶液每小时分解可溶性淀粉生成麦芽糖的 μ mol 数。

蛋白酶酶活采用 Folin 酚法^[18]测定。酶活单位 (U) 定义为:在 40 °C、pH 10.0 条件下,1 mL 酶液每分钟水解酪素产生 1 μ g 酪氨酸为一个酶活单位。

1.2.6 *vgb* 整合表达检测

运用细菌总 RNA 提取试剂盒提取 9945a.4 总

RNA, 然后逆转录成 cDNA, 再设计 *vgb* 特异性引物进行荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 分析检测, 以核糖体 S5 蛋白基因 *rpsE*^[19-20] 为内参, 根据基因达到荧光阈值的循环数 (C_t 值), 采用 $2^{-\Delta C_t}$ 法计算 *vgb* 基于内参基因 *rpsE* 的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 敲除质粒及敲入质粒的构建

将构建得到的敲除质粒 pNZTT-AFKF 用 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切, 结果如图 1A 所示, 所得条带大小与理论值 2 209 bp 和 5 672 bp 相符, 表明质粒构建正确; pNZTT-EFKF 用 *Sma* I 和 *Xho* I 酶切并进行核酸胶电泳, 结果如图 1B 所示, 两条带大小与理论值 2 175 bp 和 5 329 bp 相符, 表明质粒构建正确。

类似地, 将构建得到的敲入质粒 pNZTK-PFTF-*vgb* 用 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切, 结果如图 1C 所示, 目的条带大小与理论值 3 320 bp 和 6 183 bp 相符, 表明质粒构建正确。

所有构建得到的重组质粒经测序验证无序列突变。

2.2 FLP 重组酶表达质粒的构建

构建得到的 FLP 重组酶表达质粒 pNZTT-*flp*

经 *Sma* I 和 *Xho* I 酶切, 结果如图 2A 所示, 条带大小与理论值 1 760 bp 和 5 329 bp 相符, 表明敲除消抗质粒 pNZTT-*flp* 构建正确。 *flp* 表达盒经测序验证无序列突变。

同理, pNZTK-*flp* 用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Xho* I 酶切, 结果如图 2B 所示, 两条带大小与理论值 1 760 bp 和 4 852 bp 相符, 表明敲入消抗质粒 pNZTK-*flp* 构建正确。 *flp* 表达盒经测序验证无序列突变。

2.3 *amyL* 及 *aprE* 基因的敲除及抗性回收

文中所用的 pNZT1 质粒是温度敏感型滚环复制质粒, 属于大肠杆菌-芽胞杆菌穿梭质粒, 培养温度在 30 °C 及以下时可稳定复制, 37 °C 及以上质粒丢失^[21]。 pNZT1 携带有红霉素抗性基因, 但由于红霉素对文中宿主菌实际应用效果不好, 因此在多克隆位点的 *Not* I 处插入卡那霉素抗性基因表达盒得到 pNZTK 质粒, 插入四环素抗性基因表达盒得到 pNZTT 质粒。插入的抗性基因作为载体自身的抗性使用。

基因敲除原理是两步同源重组作用^[9,21-22]。以敲除 *amyL* 为例, 9945a/pNZTT-AFKF 首先在 30 °C 下增殖活化, 目的是为了获得生长旺盛的含敲除质粒的菌液及足够的菌浓; 菌液转接到 42 °C 无抗培养, 此温度下质粒无法复制, 敲除质粒携带的

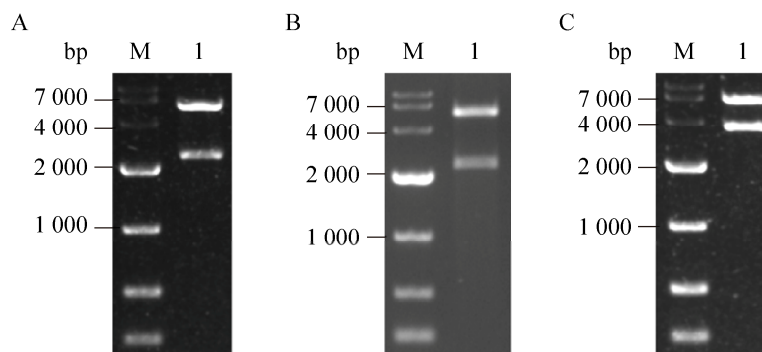


图 1 敲除质粒 pNZTT-AFKF (A)、pNZTT-EFKF (B) 及敲入质粒 pNZTK-PFTF-*vgb* (C) 的酶切验证
Fig. 1 Identification of knock-out vector pNZTT-AFKF (A), pNZTT-EFKF (B) and knock-in vector pNZTK-PFTF-*vgb* (C). (A) M: DL 10 000 DNA marker; lane 1: digested by *Xho* I and *Hind* III. (B) M: DL 10 000 DNA marker; lane 1: digested by *Sma* I and *Xho* I. (C) M: DL 10 000 DNA marker; lane 1: digested by *Xho* I and *Hind* III.

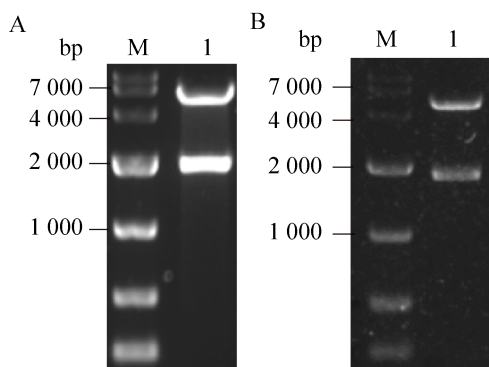


图 2 敲除质粒 pNZTT-*flp* (A) 及敲入质粒 pNZTK-*flp* (B) 的酶切验证

Fig. 2 Identification of marker recycling vectors pNZTT-*flp* (A) and pNZTK-*flp* (B). M: DL 10 000 DNA marker; lane 1: digested by *Xho* I and *Sma* I.

一侧同源臂和 *amyL* 基因的同源序列之间发生同源重组,使得整个敲除质粒线性整合到基因组上,此过程称为单交换,单交换菌株具有卡那霉素和四环素双重抗性。实验结果显示此步骤也有可能直接得到双交换菌株。得到的单交换菌株转接至

30 °C下无抗培养,此时低温诱导复制子发生滚环复制使质粒部分从基因组上切下,同时敲除盒的另一侧同源臂和 *amyL* 基因的同源序列之间发生同源重组,此过程称为双交换,双交换菌株只有卡那霉素抗性。通过两次同源交换,*amyL* 基因被敲除质粒 pNZTT-AFKF 上的敲除盒同源替换,导致 *amyL* 缺失及插入失活。敲除原理^[21]及抗性回收示意图见图 3。

实验结果显示,敲除质粒 pNZTT-AFKF 通过单交换方式线性整合至 9945a 基因组上属于高概率事件,效率高达 90%以上。取低温培养后的双交换菌液用无菌水稀释 10^{-6} 涂卡那霉素抗性平板,从长出的单菌落中均匀挑取 28 个单菌落,四环素抗性平板负筛到 22 株对四环素敏感,表明双交换的效率为 78.6% (图 4)。从中任意挑 8 株用敲除验证引物 *amyL*-F/*amyL*-M-R 和 *amyL*-M-F/*amyL*-R 进行菌落 PCR 验证,结果如图 5A 所示,PCR 条带大小均

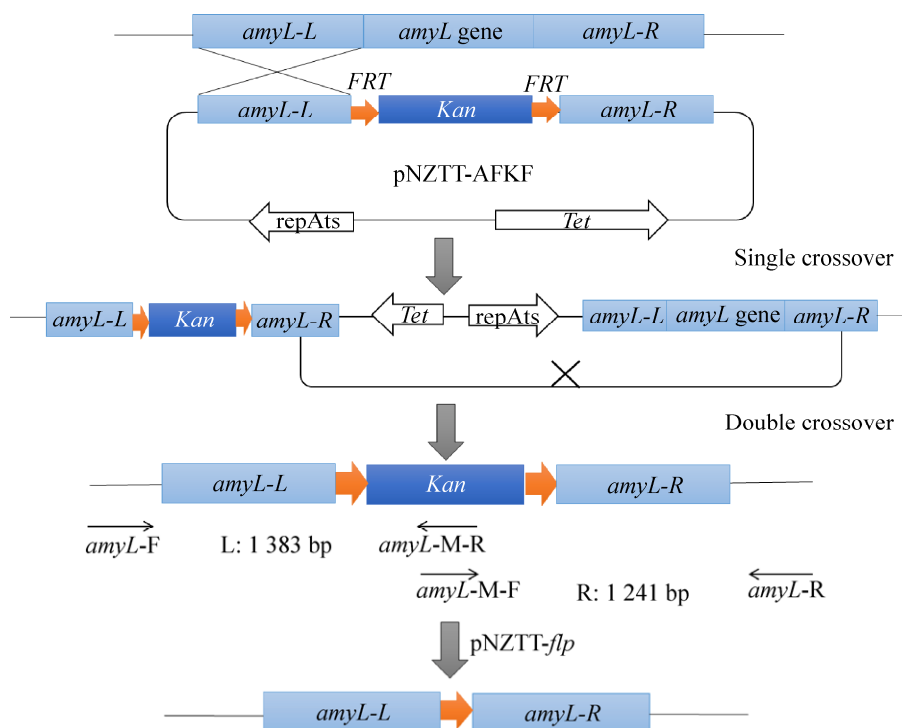


图 3 *amyL* 敲除原理^[21]及 *FLP/FRT* 系统介导的抗性回收示意图

Fig. 3 Scheme of deletion *amyL*^[21] and marker recycling by *FLP/FRT* system. Note that the initial recombination can occur either in the upstream portion of the target gene as shown here, or at the downstream portion. In both cases the final structure of the chromosome is the same.

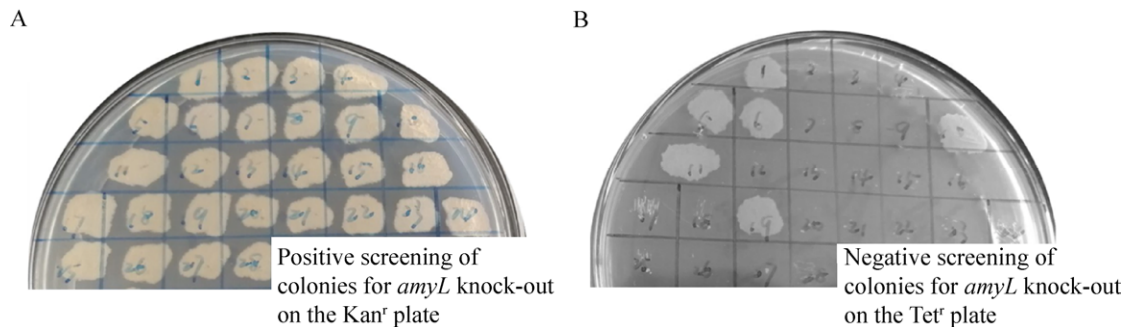


图4 *amyL* 敲除双交换抗性筛选

Fig. 4 The resistance screening of double crossover for *amyL* knock-out. (A) Kan^r plate. (B) Tet^r plate. The colonies between plate A and plate B are corresponding one by one.

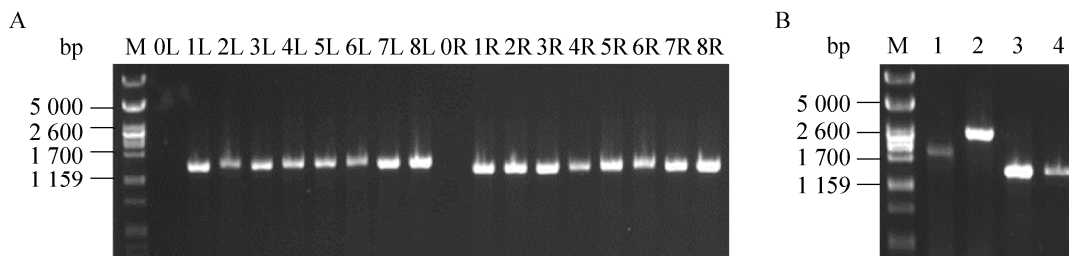


图5 *amyL* 突变株 9945a.1 和 9945a.2 的菌落 PCR 验证

Fig. 5 Identification of the 9945a.1 and 9945a.2 by colony PCR. (A) M: molecular mass marker; 0L–8L: PCR products using primers *amyL*-F/*amyL*-M-R; 0R–8R: PCR products using primers *amyL*-M-F/*amyL*-R. Among the lanes, 1L–8L and 1R–8R took genome of 9945a.1 as a template, 0L and 0R act the contrast whose templates were 9945a. The sizes of PCR products are shown in Fig. 3. (B) M: molecular mass marker; lane 1: PCR product of 9945a using primers *amyL*-F/*amyL*-R, 1 901 bp; lane 2: PCR product of 9945a.1 using primers *amyL*-F/*amyL*-R, 2 603 bp; lane 3 and lane 4: PCR products of 9945a.2 using primers *amyL*-F/*amyL*-R, 1 417 bp.

和理论相符，而原始菌没有条带，说明 *amyL* 基因被成功敲除，敲除重组子命名为 9945a.1。从中任意挑选一株 9945a.1 提基因组作为模板，用引物 *amyL*-F/*amyL*-R 进行 PCR 扩增，扩增产物测序，测序结果和理论相符。

对 9945a.1 进行抗性回收，在四环素抗性平板上挑选了 30 个单菌落，一一对应划线至卡那霉素平板上筛选到 24 株卡那霉素抗性丢失，抗性回收效率高达 80%。任意挑选 2 株对卡那霉素敏感的菌落用引物 *amyL*-F/*amyL*-R 进行 PCR 验证，结果见图 5B，抗性回收后条带大小为 1 417 bp，明显小于原始菌的 1 901 bp 和抗性回收前的 2 603 bp，说明抗性回收成功。抗性回收后的敲除重组菌命名

为 9945a.2。任意挑取 1 株 9945a.2 提基因组作为模板，用引物 *amyL*-F/*amyL*-R 进行 PCR 扩增，扩增产物测序，测序结果和理论相符。

9945a.2 含有质粒 pNZTT-*flp*，经过 37 °C 无抗传代 2 次可得到质粒丢失的无抗单菌落。

为了进一步验证敲除系统的可行性及敲除效率，还对 9945a.2 进行了蛋白酶基因 *aprE* 的敲除。*aprE* 的敲除原理和操作流程与 *amyL* 相同，第一步高温培养下 pNZTT-EFKF 通过单交换方式线性整合至基因组，此步骤效率高于 50%；第二步低温培养诱导单交换菌株发生双交换，从挑选的 18 株单菌落中筛选到 14 株具有卡那霉素抗性而对四环素敏感 (图 6A 和 6B)，表明双交换效率为

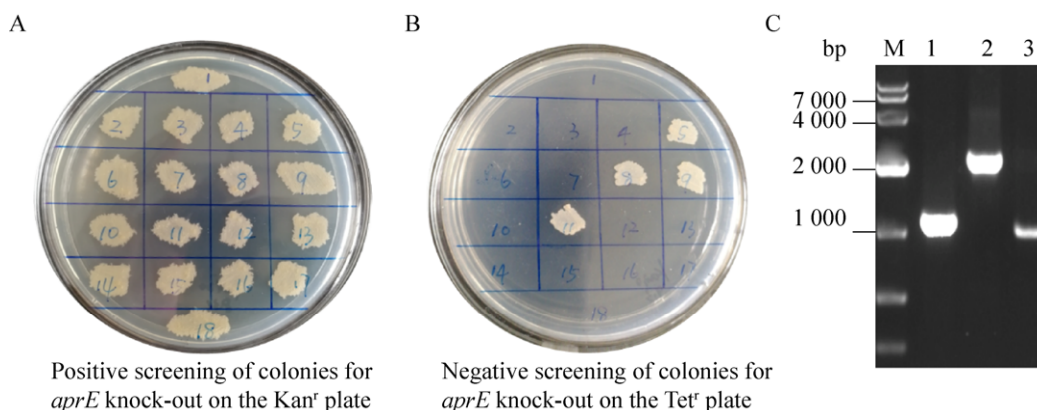


图 6 *aprE* 敲除双交换抗性筛选及抗性回收 PCR 验证

Fig. 6 The resistance screening of double crossover for *aprE* knock-out and identification of marker recycling by PCR. (A) Kan^r plate. (B) Tet^r plate. The colonies between plate A and plate B are corresponding one by one. (C) M: DL 10 000 DNA marker; lane 1: PCR product of 9945a, 1 116 bp; lane 2: PCR product of 9945a.3, 2 185 bp; lane 3: PCR product of 9945a.4, 999 bp. All PCR products used primers *aprE*-Xho I-F/*aprE*-Sma I-R.

77.7%。对双交换成功的 *aprE* 敲除重组子命名为 9945a.3。同样地，对 9945a.3 通过电转方法导入消抗质粒 pNZTT-*flp* 进行了抗性回收，并用引物 *aprE*-Xho I-F/*aprE*-Sma I-R 进行菌落 PCR 鉴定，结果如图 6C 所示，原始菌条带大小为 1 116 bp，消抗前为 2 185 bp，抗性回收后为 999 bp。抗性回收后的重组菌命名为 9945a.4。

2.4 *vgb* 基因的敲入及抗性回收

基因敲入的原理是在敲除质粒的基础上在

同源臂和同侧 *FRT* 位点之间插入外源基因，然后经过与敲除相同的重组过程，最后可实现外源基因在基因组上的定点敲入。结果显示，敲入质粒 pNZTK-PFTF-*vgb* 通过单交换线性整合至 9945a 基因组的概率高达 95% 以上，属于非限速步骤。取低温培养后的双交换菌液稀释 10^{-6} 涂四环素平板，从长出的单菌落中均匀挑取了 30 个单菌落，经筛选有 27 株对卡那霉素敏感，如图 7 所示，双交换的效率为 90%。从中任意挑 8 株用

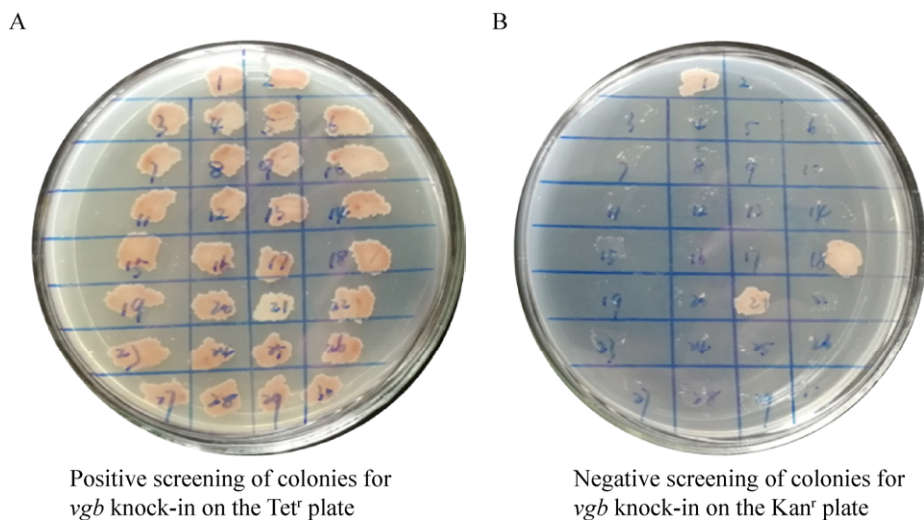


图 7 *vgb* 敲入双交换抗性筛选

Fig. 7 The resistance screening of double crossover for *vgb* knock-in. (A) Tet^r plate. (B) Kan^r plate.

敲入验证引物 *pflB*-F/*pflB*-M-R 和 *pflB*-M-F/*pflB*-R 进行菌落 PCR 验证, 结果如图 8A 所示, 8 株菌均成功敲入, 即 *pflB* 基因被敲除, 同时 *vgb* 整合至 *pflB* 位点。*vgb* 基因敲入重组子命名为 9945a.5。

任意挑选 1 株 9945a.5 导入消抗质粒 pNZTK-*flp* 进行抗性回收, 筛选得到对四环素敏感的单菌落, 用引物 *pflB*-F/*pflB*-R 进行菌落 PCR, 结果如

图 8B 所示。抗性回收前扩增产物长 5 101 bp, 回收后为 3 525 bp, 图 8B 条带小于 4 000 bp, 表明抗性回收成功, 抗性回收后的重组菌命名为 9945a.6。

2.5 α -淀粉酶及蛋白酶酶活检测

amyL 突变株 9945a.2 α -淀粉酶酶活检测以地衣芽胞杆菌 9945a 原始菌为对照, 结果如图 9A 所示, 9945.2 的淀粉酶比酶活只有原始菌的 4.7%

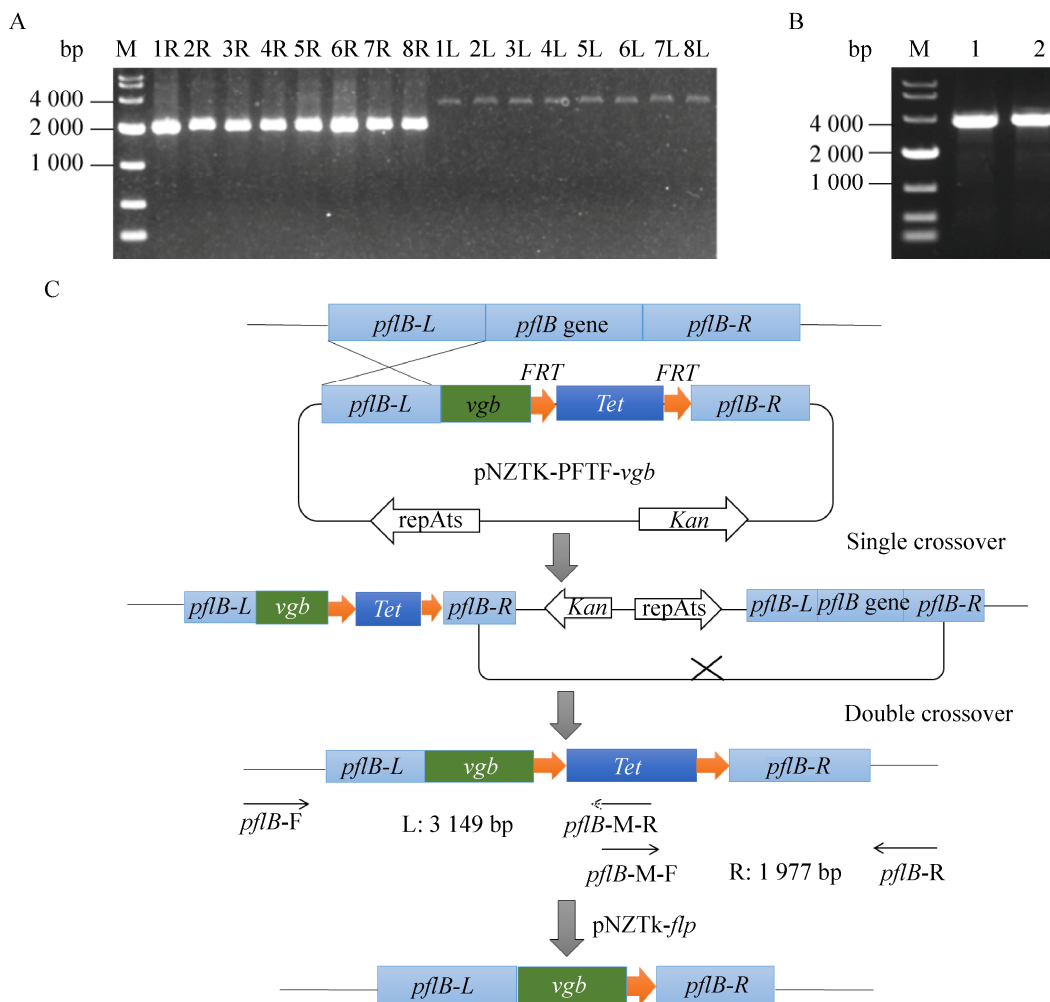


图 8 *vgb* 敲入突变株 PCR 验证及敲入策略示意图

Fig. 8 Identification of the 9945a.5 and 9945a.6 by PCR and the strategy of knocking in *vgb*. (A) M: DL 10 000 DNA marker; 1L–8L: PCR products of 9945a.5 using primers *pflB*-F/*pflB*-M-R; 1R–8R: PCR products of 9945a.5 using primers *pflB*-M-F/*pflB*-R. The sizes of PCR products are shown in Fig. 8C. (B) M: DL 10 000 DNA marker; lane 1 and lane 2: PCR products of 9945a.6 using primers *pflB*-F/*pflB*-R, 3 525 bp. (C) Brief scheme of knocking in *vgb* and marker recycling by FLP/FRT system. Note that basic principle of knocking in a heterogenous gene is the same with deletion a gene like *amyL*, except for carrying a heterogenous gene between a homology arm and the same side FRT.

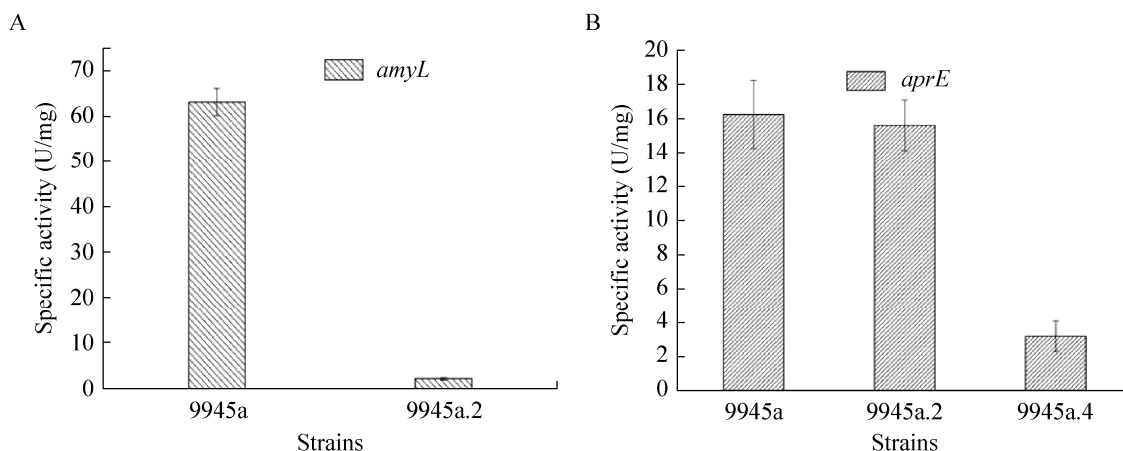


图9 敲除突变株 α -淀粉酶 (A) 及蛋白酶 (B) 酶活检测

Fig. 9 Activities of α -amylase (A) and protease (B) of the knock-out mutants and wide type.

左右, 酶活大幅度减少, 这也证实了 *amyL* 基因被敲除。据文献分析, 残余的酶活可能是来自其他淀粉酶比如 Taka-淀粉酶 (Taka-amylase)^[23] 或普鲁兰酶^[16]。*aprE* 敲除后蛋白酶比酶活由原始菌的 16.3 U/mg 减少到 3.2 U/mg, 减少了 80.4%; 淀粉酶基因的敲除对菌株产蛋白酶几乎无影响。

2.6 *vgb* 表达检测

vgb 基因编码透明颤菌血红蛋白 VHB, VHB 受氧浓度调控, 在贫氧条件下可维持菌的生长。*vgb* 的 RT-PCR 检测结果如表 3 所示, 9945a.6 中检测到 *vgb* 的表达, 且相对 *rpsE* 的表达量为 1.23, 表达水平相对较高, 这可能是由于 *vgb* 的启动子 *P43* 是组成型的强启动子, 而原始菌 9945a 中未检测到 *vgb* 的表达, 说明外源的 *vgb* 成功整合至基因组且得到表达。

表3 *vgb* 敲入菌株 9945a.6 及原始菌 *rpsE* 和 *vgb* 表达水平分析

Table 3 Relative mRNA abundance of *rpsE* and *vgb* in 9945a.6 and the wide type

Strains	<i>rpsE</i>	<i>vgb</i>
9945a.6	1.000±0.122	1.230±0.140
9945a	1.000±0.134	ND

ND indicates that gene expression is not detected.

3 讨论

地衣芽胞杆菌作为极具应用潜力的工业菌种之一, 限制其应用进一步拓展的因素之一就是基因操作困难。转化敲除盒片段直接进行双交换的一步法在转化效率不高的条件下很难得到阳性转化子。本研究借鉴了温度敏感型质粒进行基因敲除的成功案例, 首次结合运用 FLP/FRT 重组系统, 构建出一套适用于地衣芽胞杆菌的、更加实用的基因编辑系统。运用该系统高效敲除了地衣芽胞杆菌 α -淀粉酶基因 *amyL* 及蛋白酶基因 *aprE*; 实现了外源基因 *vgb* 在基因组上的成功敲入与表达。本方法是对已有温敏质粒介导基因敲除技术的有机延伸与拓展。原技术由于插入位点不带抗性标记, 需要多步传代富集阳性转化子, 且依靠无抗平板初筛, 工作量大。本方法在预先引入 FRT 重组位点的前提下, 利用设计于插入位点的抗性标记, 显著缩短了阳性转化子筛选周期及减少筛选工作量; 结合 FLP 重组酶介导的高效率抗性回收, 同样达到了无抗性标记残留的基因编辑。在地衣芽胞杆菌常用抗生素有限的背景下, 仅需单一抗性标记即可实现多基因连续敲除。

另一方面, 该系统还存在一个 *Cre-loxP* 和

FLP/FRT 系统普遍存在的问题, 即每一次运用该系统进行基因敲除, 都会在基因组上留下 1 个 FRT 识别位点的疤痕, 因此如果对基因组进行多轮操作, 留下的多个识别位点之间可能会发生重组, 降低基因组的稳定性。为了避免这种情况, 后续可参考 Yan 等^[24]使用突变型的 FRT 位点^[25], 从而提高遗传稳定性。

总体来说, 文中构建的 FLP/FRT 基因编辑系统能够有效地在地衣芽孢杆菌中敲除目标基因以及敲入外源基因, 为地衣芽孢杆菌的代谢改造及基因功能研究提供了良好的实验方法。有文献表明^[21-22], 温敏质粒介导的基因敲除方法也可运用到遗传转化困难的其他芽孢杆菌中, 因此可推测本研究成果在芽孢杆菌中具有一定的通用性。

REFERENCES

- [1] Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol*, 2004, 50(1): 1–17.
- [2] Mo JY. Preparation, regeneration and genetic transformation of *Bacillus licheniformis* protoplasts[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009 (in Chinese). 莫静燕. 地衣芽孢杆菌原生质体的制备、再生及转化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [3] Waschkau B, Waldeck J, Wieland S, et al. Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(1): 181–188.
- [4] Yu HM, Ma YC. Gene knockout strategies for metabolic pathway regulation in industrial microbes. *Chin J Biotech*, 2010, 26(9): 1199–1208 (in Chinese). 于慧敏, 马玉超. 工业微生物代谢途径调控的基因敲除策略. *生物工程学报*, 2010, 26(9): 1199–1208.
- [5] Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol*, 2004, 5(10): R77.
- [6] Liu BN. Effects of *Bacillus licheniformis* in converting potato starch waste and its mechanism of metabolism[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2015 (in Chinese). 刘冰南. 地衣芽孢杆菌转化薯渣与汁水效能及其代谢机理研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2015.
- [7] Li KF, Cai DB, Wang ZQ, et al. Development of an efficient genome editing tool in *Bacillus licheniformis* using CRISPR-Cas9 nickase. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84(6): e02608–17.
- [8] Nahrstedt H, Waldeck J, Gröne M, et al. Strain development in *Bacillus licheniformis*: construction of biologically contained mutants deficient in sporulation and DNA repair. *J Biotechnol*, 2005, 119(3): 245–254.
- [9] Wang QZ, Tao C, Zhao XM, et al. Metabolic engineering of thermophilic *Bacillus licheniformis* for chiral pure D-2,3-butanediol production. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(7): 1610–1621.
- [10] Qi GF, Kang YF, Li L, et al. Deletion of *meso*-2, 3-butanediol dehydrogenase gene *budC* for enhanced D-2,3-butanediol production in *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 16.
- [11] Meyer-Leon L, Senecoff JF, Bruckner RC, et al. Site-specific genetic recombination promoted by the FLP protein of the yeast 2-micron plasmid *in vitro*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1984, 49: 797–804.
- [12] Sadowski PD. The FLP recombinase of the 2- μ m plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1995, 51: 53–91.
- [13] Teng Y, Yang X. Gene targeting: the beginning of a new era in genetics. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29(11): 1291–1298 (in Chinese). 滕艳, 杨晓. 基因打靶技术: 开启遗传学新纪元. *遗传*, 2007, 29(11): 1291–1298.
- [14] Sánchez-Martínez C, Pérez-Martín J. Site-specific targeting of exogenous DNA into the genome of *Candida albicans* using the FLP recombinase. *Mol Genet Genomics*, 2002, 268(3): 418–424.
- [15] Tan XM, Liang FY, Cai K, et al. Application of the FLP/FRT recombination system in *cyanobacteria* for construction of markerless mutants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(4): 6373–6382.
- [16] Li YR, Gu ZH, Zhang L, et al. Gene Knockout of *Bacillus licheniformis* mediated by CRISPR/Cas9 system. *Genomics Appl Biol*, 2017, 36(10): 4188–4196 (in Chinese). 李由然, 顾正华, 张梁, 等. CRISPR/Cas9 系统介导的地衣芽孢杆菌基因敲除. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(10): 4188–4196.

- [17] Kim IC, Cha JH, Kim JR, et al. Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. *J Biol Chem*, 1992, 267(31): 22108–22114.
- [18] Ministry of Light Industry of PRC. QB/T 1803-1993 General methods of determination for industrial enzymes. Beijing: China Light Industry Press, 1994 (in Chinese). 中华人民共和国轻工业部. QB/T 1803-1993 工业酶制剂通用试验方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [19] Hoffmann K, Wollherr A, Larsen M, et al. Facilitation of direct conditional knockout of essential genes in *Bacillus licheniformis* DSM13 by comparative genetic analysis and manipulation of genetic competence. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(15): 5046–5057.
- [20] Jakobs M, Hoffmann K, Grabke A, et al. Unravelling the genetic basis for competence development of auxotrophic *Bacillus licheniformis* 9945A strains. *Microbiology*, 2014, 160: 2136–2147.
- [21] Zakataeva NP, Nikitina OV, Gronskiy SV, et al. A simple method to introduce marker-free genetic modifications into the chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(4): 1201–1209.
- [22] Shatalin KY, Neyfakh AA. Efficient gene inactivation in *Bacillus anthracis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 245(2): 315–319.
- [23] Li YR. Gene cloning, identification and expression of isoamylase from *Bacillus lentus* CICIM3Q4[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013 (in Chinese). 李由然. *Bacillus lentus* CICIM304 异淀粉酶的基因克隆、鉴定与表达[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [24] Yan X, Yu HJ, Hong Q, et al. Cre/loxP system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(17): 5556–5562.
- [25] Zhao AC, Long DP, Tan B, et al. Progress in research of FLP/FRT site-specific recombination system in higher eukaryotes. *Sci Agric Sin*, 2011, 44(15): 3252–3263 (in Chinese). 赵爱春, 龙定沛, 谭兵, 等. FLP/FRT 位点特异性重组系统在高等真核生物中的研究进展. *中国农业科学*, 2011, 44(15): 3252–3263.

(本文责编 陈宏宇)