

II型内含子及其生物技术应用研究进展

崔古贞^{1,3}, 花登雄^{1,2}, 谷俊莹^{1,2}, 陈峥宏^{1,3}

1 贵州医科大学 基础医学院 微生物学教研室, 贵州 贵阳 550025

2 贵州医科大学 医学检验学院, 贵州 贵阳 550004

3 贵州医科大学 基础医学院 病原生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550025

崔古贞, 花登雄, 谷俊莹, 陈峥宏. II型内含子及其生物技术应用研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(3): 915-924.

CUI GZ, HUA DX, GU JY, CHEN ZH. Group II introns and the application in biotechnology: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(3): 915-924.

摘 要: II型内含子 (group II introns) 是一类具有自我剪接功能的核酶, 能够通过“归巢”(retrohoming) 机制高频插入到 DNA 靶位点。II型内含子对 DNA 靶位点的识别和剪接具有高度专一性和高效性, 这种特性使其在基因工程中具有重要的应用价值。文中首先综述了II型内含子基因打靶原理及其在微生物遗传改造中的应用; 然后, 根据II型内含子“归巢”特点及其依赖高浓度Mg²⁺的特性, 分析了II型内含子在多功能基因编辑及真核生物应用中的局限性; 最后, 以笔者课题组研究工作为基础, 结合II型内含子自身结构特点, 分析了II型内含子在新型基因编辑工具开发方面的潜能, 为II型内含子生物技术应用提供借鉴。

关键词: II型内含子; Targetron; 基因编辑; 生物技术应用

Group II introns and the application in biotechnology: a review

CUI Guzhen^{1,3}, HUA Dengxiong^{1,2}, GU Junying^{1,2}, CHEN Zhenghong^{1,3}

1 Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

3 Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Education Department of Guizhou, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: Group II introns are self-splicing ribozymes, which insert directly into target sites in DNA

Received: March 26, 2021; **Accepted:** June 4, 2021; **Published online:** June 29, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31760318); Natural Science Foundation of Guizhou Province, China ([2019]1441, [2018]5779-17)

Corresponding author: CHEN Zhenghong. Tel: +86-851-88174015; E-mail: chenzhenghong@gmc.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31760318); 贵州省科技计划项目 ([2019]1441, [2018]5779-17)

with high frequency through “retrohoming”. They specifically and efficiently recognize and splice DNA target sites, endowing themselves with great potential in genetic engineering. This paper reviewed the gene targeting principle of group II introns and the application in microbial genetic modification, and then analyzed the limitations of them in multi-functional gene editing and eukaryotes based on the “retrohoming” characteristics and the dependence on high Mg^{2+} concentration. Finally, we dissected the potential of group II introns in the development of novel gene editing tools based on our previous research outcome and the structural characteristics of the introns, hoping to provide a reference for the application of group II introns in biotechnology.

Keywords: group II intron; targetron; gene editing; application in biotechnology

1 II型内含子简介

II型内含子 (group II introns) 是一类由内含子 RNA (intron RNA) 和内含子编码蛋白 (intron-encoded protein, IEP) 组成的具有自我剪接功能的核酶 (ribozymes), 主要存在于原核生物、低等真核生物和高等生物的线粒体和叶绿体中, 与反转录转座子 (retrotransposons)、剪接小体 (spliceosome)、端粒酶 (telomerase)、反转录病毒 (retroviruses) 等具有紧密的亲缘关系, 通常被认为是真核生物剪接体内含子的前身^[1-2]。

第一个被鉴定的II型内含子来源于酵母线粒体 DNA, 随后在细菌、真菌、古菌等多个物种中都发现II型内含子的存在^[3]。在已发现的II型内含子中, 最具有代表性的是来源于革兰氏阳性细菌——乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 的 L1.LtrB 内含子, 该内含子是目前为止结构和功能研究最详尽的一类内含子^[4-5]。基于 L1.LtrB 内含子对靶位点识别特性及其在染色体上的迁移规律, 目前已被开发为高效基因打靶工具——Targetron, 并在革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌等多个物种中得到广泛应用^[6-7]。

除了目前应用最广泛的 L1.LtrB 内含子 (仅能在嗜中温微生物中应用), 近来科研人员在嗜

热蓝细菌 (*Thermosynechococcus elongatus*) (最适生长温度约 55 °C) 中发现了一类新型的嗜热 II 型内含子^[8]。该嗜热 II 型内含子与中温 II 型内含子具有相似的二级结构和靶位点识别特征, 如: 均由 6 个茎环结构组成 (图 1A), 均是通过内含子结合序列 (intron binding sequence, IBS) 和外显子结合序列 (exon binding sequence, EBS) 的碱基互补配对识别靶位点, 内含子编码蛋白 (intron encoded protein, IEP) 也都具有相似的保守结构域和保守基序 (图 1B), 然而, 嗜热 II 型内含子在 37 °C 生理条件下几乎不具有迁移功能, 而在 45 °C 以上时才具有较好的活性^[8-9]。基于其嗜热的特点, 笔者课题组与美国 Alan 教授课题组合作将其开发为专门应用于嗜热微生物的嗜热基因打靶工具——Themrotargetron, 且已在热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 中获得成功应用^[8,10]。近来, Mohr 等在嗜热脂肪土芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 中发现了另一类新型的嗜热 II 型内含子^[11], 其 IEP 蛋白的反转录酶活性具有耐高温、持续性强、非模板转换等多种新的酶学特性与功能, 在高通量测序、嗜热基因编辑工具开发等领域可能具有重要应用价值^[12-13]。总之, II 型内含子为生物技术开发和应用提供了良好的工具。

2 II型内含子归巢原理

II型内含子的迁移过程称为归巢(retrohoming),即内含子插入到基因(非内含子)的特异位点,归巢过程也称靶向引导的反转录(target-primed reverse transcription),由具有催化活性的内含子RNA和内含子编码蛋白(intron-encoded protein, IEP)共同完成^[14]。内含子RNA和IEP蛋白这两个催化亚单位在每一步催化反应中都是必需的,且研究表明,IEP蛋白单独表达并不影响II型内含子的自我剪切功能,因此,在体外研究及基因打靶载体构建过程中经常将该区域单独构建和表达^[14]。II型内含子在染色体上的归巢主要

包括两个过程,其一是内含子通过自我催化实现在染色体上的切离(图2A),其二是通过内含子对靶位点的识别、切割和反转录实现在染色体上的插入(图2B)^[14]。

(1) 内含子切离:在体内,II型内含子通过分支途径(branching pathway)经过两步连续的酯交换实现内含子RNA在染色体上的自我切离。第一步,内含子RNA的第6区突起腺苷的2'-OH攻击5'剪接位点形成2'-5'磷酸二酯键,释放5'外显子;第二步,5'外显子的3'-OH末端攻击3'剪接位点并与之连接,从而使两侧外显子连接到一起并释放套索内含子(lariat intron)^[15](图2A)。

近来,冷冻电镜技术的发展进一步阐述了II型内含子的切离过程及其催化机制^[16-17]。内

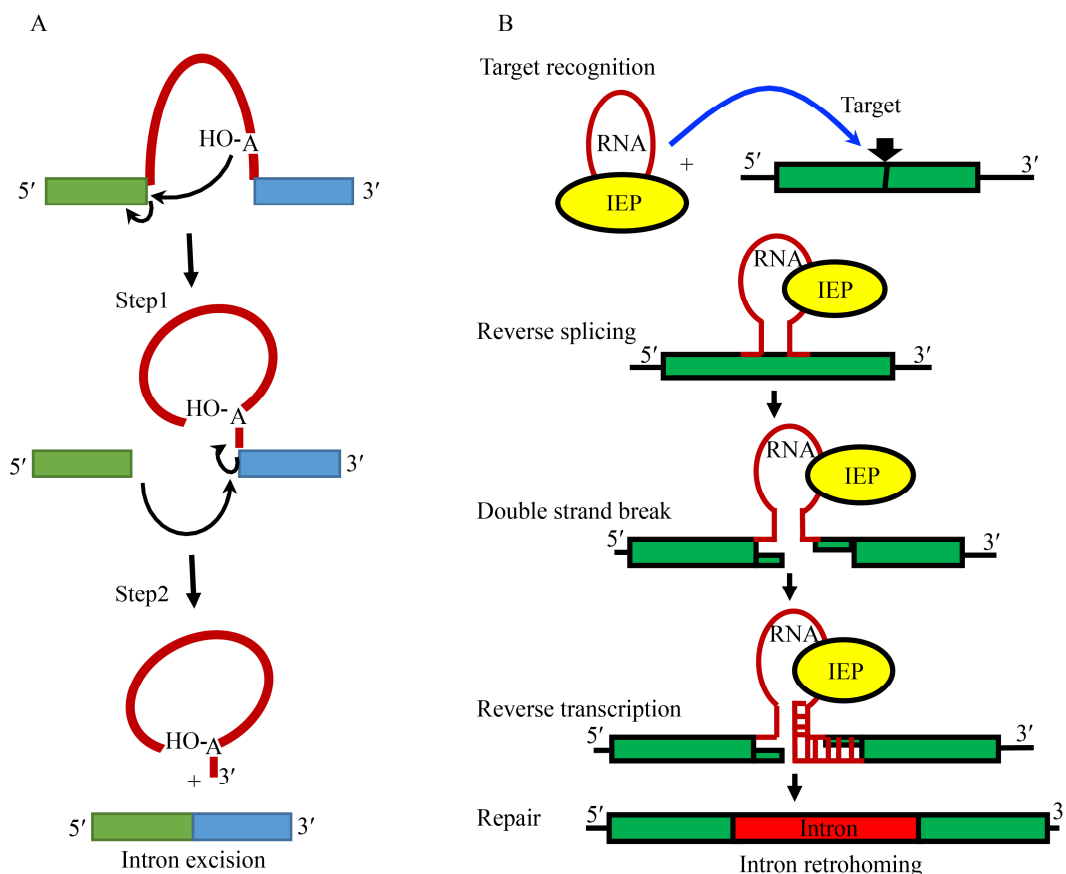


图2 内含子切离及归巢示意图^[14]

Figure 2 Intron excision and retrohoming^[14]. (A) Intron excision. (B) Intron retrohomin.

含子 RNA 第 6 区分支位点处的剪接是一个动态变化过程, 涉及内含子 RNA 结构的重排、内含子 RNA 第 5 区拓扑结构的改变、内含子 RNA 和 IEP 蛋白之间相互作用等多个过程, 且首次揭示了 IEP 蛋白成熟酶结构域在内含子 RNA 套索结构形成过程中的重要作用^[16]。

(2) 内含子归巢: 即内含子插入到宿主染色体靶位点的过程, 此过程可通过 II 型内含子的反向剪接来实现, 其详细的归巢过程如图 2B 所示。首先, 内含子 RNA 与 IEP 蛋白结合形成具有催化活性的核糖核蛋白 (ribonucleoprotein, RNP) 复合物, 此过程涉及内含子 RNA 与 IEP 蛋白的相互作用。近来利用冷冻电镜技术获得了前催化状态下的 RNP 前体空间结构, 与之前的 RNP 复合物比较, 揭示 IEP 蛋白与内含子 RNA 的相互作用是一个十分复杂的动态过程, 在 II 型内含子归巢过程中发挥关键作用^[18-19]。然后, 内含子 RNA 的外显子结合序列 EBS 通过碱基互补配对识别靶位点的内含子结合序列 IBS, 识别之后, 内含子 RNA 通过反向剪接 (reverse splicing) 切割靶位点 DNA 有义链。靶位点识别过程中, IEP 蛋白辅助内含子 RNA 的识别和切割, IEP 蛋白的核酸内切酶活性切割靶位点反义链, 并以切开的反义链的 3' 末端作为反转录的引物、以内含子 RNA 为模板合成 cDNA。然后, 利用宿主 RNase H 活性消化 RNA 模板, 再以 5' 外显子的 3' 末端为引物, 以新合成的 cDNA 为模板合成第二条互补链。最后, 利用宿主的 DNA 修复机制完成 II 型内含子在染色体上的归巢^[2,14] (图 2B)。

3 II型内含子在生物技术中的应用

由于 II 型内含子对 DNA 靶位点的识别主要是通过内含子 RNA 与靶位点的碱基互补配对来实现的, 而且 II 型内含子在 DNA 靶位点

的插入具有高度专一性和高效性, 因此, 利用 II 型内含子的上述特性, 通过修饰内含子 RNA 的碱基识别序列即可构建基因打靶载体, 实现 II 型内含子在基因工程中的应用^[20]。

基因打靶载体构建如图 3 所示, 首先, 根据打靶位点的序列特征设计 4 条特异性引物 (IBS12、EBSU、EBS2、EBS1a), 然后利用两轮 PCR 扩增获得约 0.35 kb 的 retargetron 区域, 最后通过酶切连接将 retargetron 片段与 Targetron 载体连接即可完成打靶载体的构建^[21]。根据 II 型

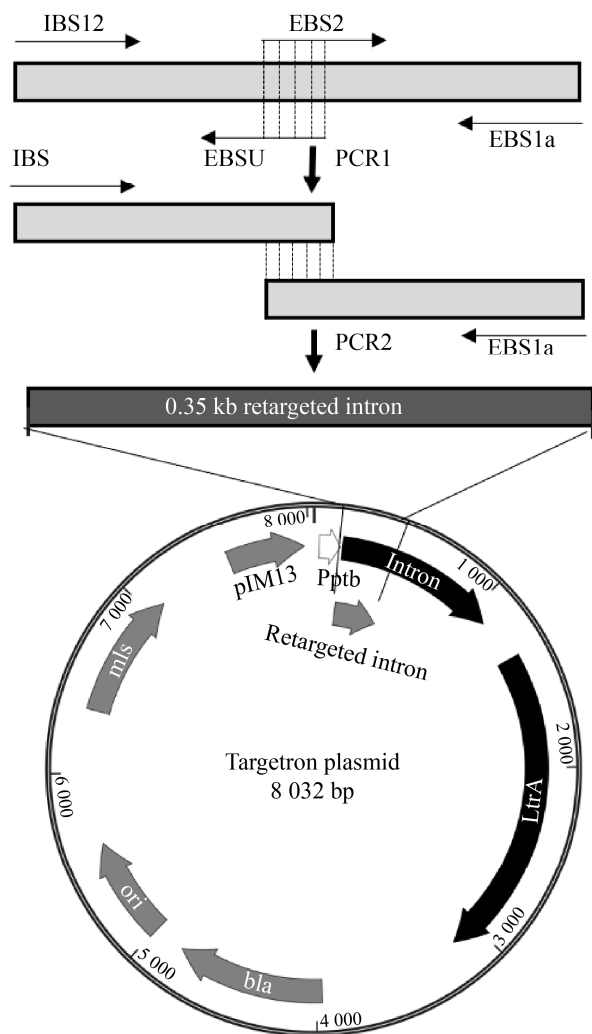


图 3 Targetron 打靶载体构建示意图
Figure 3 Targetron vector construction.

内含子识别靶位点的原理,目前已建立了自动化的打靶引入设计软件,并可以免费在线使用(www.clostron.com),只要输入靶基因序列,该软件即可自动设计打靶位点和打靶引物,极大地提高了操作效率。

目前,科研人员已将来源于乳酸乳球菌的 LI.LtrB 内含子和来源于嗜热蓝细菌的 Tel3c/4c 内含子分别开发为高效的基因打靶工具——Targetron 和 Themrotargetron,并在多种微生物中获得成功应用(表 1)。此外,由于梭菌属主要由革兰氏阳性厌氧细菌组成,细胞壁厚,遗传改造较为困难,因此,为了提高 Targetron 技术在梭菌中的应用,Heap 等设计了专门用于梭菌的基因打靶技术——ClosTron^[22],并已在丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)、解纤

维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*) 等多个梭菌物种中获得成功应用。Enyeart 等将 Targetron 技术与 Cre/lox 系统联合,构建了新型的基因编辑工具 (genome editing via Targetrons and recombinases, GETR),在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中实现了大片段基因的删除、插入与重定位等多种功能^[23]。

此外,来源于嗜热 II 型内含子的反转录酶,因具有热稳定性好、保真度高、持续合成能力强及特殊的模板转换特性 (直接连接 RNA 测序接头与 cDNA),在 qRT-PCR 及下一代 RNA 测序中具有重要的潜在应用价值^[2,24]。目前,Targetron 技术在分析致病性决定子^[25]、鉴定新型抗生素靶点^[26]、构建减毒疫苗菌株^[27]、提高工业微生物及化合物产量^[28]等多方面均获得成

表 1 II 型内含子在微生物基因打靶方面的应用

Table 1 Application of group II introns in microbial gene targeting

Strains	Insertion sites	Vectors	Targeting frequency (%)	References
<i>E. coli</i>	<i>lacZ-635s</i>	pSY7	91	[21,29]
	<i>lacZ-1063a</i>	pSY7	93	
<i>P. aeruginosa</i>	<i>pqsA-621a</i>	pBL1	47/58*	[30]
	<i>pqsH-108s</i>	pBL1	1	
<i>A. tumefaciens</i>	<i>aopB-567a</i>	pBL1	12/8*	[30]
	<i>chvI-609a</i>	pBL1	15	
<i>S. aureus</i>	<i>hsa-24s</i>	pNL9161	100	[31]
	<i>seb-123a</i>	pNL9162	37	
<i>C. perfringens</i>	<i>plc-50s</i>	pACD3	0.5	[32]
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>spo0A-242a</i>	pMTL007	100	[33]
<i>C. beijerinck II</i>	<i>spo0A-407a</i>	pMTL007	25	[33]
<i>C. difficile</i>	<i>spo0A-178a</i>	pMTL007	100	[33-34]
	<i>CD0552-75a</i>	pMTL007	90	
<i>C. botulinum</i>	<i>CBO0339-47a</i>	pMTL007	60	[34]
	<i>CBO0340-690s</i>	pMTL007	75	
<i>C. sporogenes</i>	<i>spo0A-249s</i>	pMTL007	100	[34]
	<i>pyrF-595s</i>	pMTL007	100	
<i>C. cellulolyticum</i>	<i>mspI-297s</i>	pSY6	100	[35]
	<i>ldh-516s</i>	pSY6	100	
<i>C. cellulolyticum</i>	<i>cipC-117a</i>	pSY6	100	[36]
	<i>cel48F-235s</i>	pSY6	100	
<i>C. thermocellum</i> (Themrotargetron)	<i>cipA1827s</i>	pHK-TT1A	67	[8]
	<i>hfat165s</i>	pHK-TT1A	100	
	<i>pta318a</i>	pHK-TT1A	100	

Note: to the insertion sites, 'a' represents the antisense strand of DNA, 's' represents the sense strand of DNA. *The percentage in front of the slash indicates the insertion frequency using the electric-transformation methods, and the percentage after the slash indicates the insertion frequency using the conjugation methods.

功应用。表1总结了II型内含子在微生物中应用的部分实例,可见II型内含子在微生物基因工程领域具有十分重要的应用价值。

4 II型内含子在生物技术应用中的局限性

4.1 Targetron 技术不能实现任意基因编辑

能够实现基因的任意编辑(包括基因敲除、敲入、点突变等)是优秀基因组编辑工具应具有的特点^[37-38]。然而,基于II型内含子构建的Targetron基因打靶技术,其根本原理是通过内含子在靶位点的插入实现靶基因的插入失活,因此不能实现诸如点突变、基因插入、基因无痕敲除等功能。尽管II型内含子RNA的IV区可以携带1-2 kb目的基因随同内含子一同插入到靶位点,然而,该区域携带的基因大小受到限制,超过2 kb则影响内含子的打靶效率及功能,无法实现较大基因及多个基因的插入^[39]。为了实现基因的无痕连续删除,中国科学院微生物研究所李寅研究员团队开发了一种II型内含子铆钉的基因删除技术,该技术在内含子RNA的IV区插入一段染色体上的同源序列,内含子插入靶基因后,其携带的同源序列可以与染色体上同源序列发生同源重组,可实现基因的无痕删除及连续敲除^[39],然而,上述改进仍无法实现基因的点突变和基因插入等功能。

4.2 Targetron 技术在高等生物中应用受到限制

目前,II型内含子的应用主要局限于原核生物,在高等生物体中应用Targetron技术实现基因打靶的实例并不多。2000年Guo等首次在I型人类免疫缺陷病毒(HIV-1)的前病毒DNA和人类CCR5基因中使用Targetron,然

而,II型内含子在真核细胞内的活性远低于原核细胞,如在CCR5-759a、CCR5-24s和HIV1-2654a位点的打靶效率分别为(0.27±0.01)%、(4.4±2.7)%和(7.6±2.4)%,其最高效率也仅为53%左右^[40]。Zhuang等利用显微注射技术,在非洲爪蟾卵细胞核和果蝇胚胎中注射内含子RNA元件,虽然能够实现内含子在靶位点的“归巢”,然而其效率仍远低于原核生物^[41]。上述实验表明,II型内含子虽然能够有效地插入到高等生物的DNA靶位点且保持活性,但其效率较低。

原因在于,真核细胞核内Mg²⁺浓度较低,限制了II型内含子的功能。II型内含子发挥催化功能需要较高浓度的自由Mg²⁺,Mg²⁺可以辅助II型内含子的碱基配对、确定切割位点和维持催化区域的高级结构^[42]。研究表明,II型内含子利用反向剪接机制实现归巢反应的最佳Mg²⁺浓度为5-10 mmol/L,细菌细胞内Mg²⁺浓度为1-4 mmol/L,而哺乳动物细胞核内Mg²⁺浓度为0.2-1.0 mmol/L^[43]。实验证实,通过突变酵母线粒体Mg²⁺转运蛋白,可以完全抑制II型内含子在线粒体内的活性,而通过向爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞、果蝇(*Drosophila melanogaster*)及斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎细胞中注射高浓度Mg²⁺,可以有效提高II型内含子在真核细胞中的活性^[44]。此外,当利用Mg²⁺转运蛋白MgtA失活的大肠杆菌作为宿主时,II型内含子的归巢效率受到极大的抑制^[45];当对II型内含子Mg²⁺结合位点进行突变后,II型内含子活性几乎完全丧失^[46],上述实验进一步验证了II型内含子对Mg²⁺的依赖性。因此,如果能够降低II型内含子对Mg²⁺浓度的依赖,就可以提高其在真核生物中的活性,拓宽II型内含子的应用范围。

5 II型内含子是否具有开发为新型基因组编辑工具的潜能

目前广泛应用的 3 大基因组编辑技术 (ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9), 其基本原理均是利用非特异性的核酸内切酶在“向导”引导下切割 DNA 靶位点, 造成 DNA 双链断裂 (double strand break, DSB), 从而激发 DNA 的修复机制, 然后利用非同源末端连接或同源定向修复实现基因编辑功能^[47-49]。以 CRISPR-Cas9 为例, 其“向导”为 gRNA, 可通过碱基互补配对原则识别 DNA 靶位点, 在 gRNA 引导下, Cas9 核酸内切酶切割 DNA 双链, 在没有供体 DNA 存在时, 细胞利用非同源末端链接机制实现 DNA 修复, 产生移码突变; 在有供体 DNA 存在时, 细胞利用同源定向修复机制实现 DNA 的置换、敲除、敲入等功能^[38]。因此, 理论上只要能够引入 DNA 定点损伤的元件都具有开发为基因组编辑工具的潜能。

II 型内含子由内含子 RNA 和内含子编码蛋白组成, 其中内含子 RNA 具有核酶活性, 能够通过碱基互补配对原则识别并切割 DNA 靶位点。然而, 野生型 II 型内含子在识别切割 DNA 靶位点之后, IEP 蛋白携带的反转录酶活性将内含子 RNA 通过反转录插入到 DNA 靶位点, 实现内含子在染色体上的归巢^[2,50]。因此, 如果 IEP 蛋白的反转录酶失活, 内含子 RNA 在切割 DNA 靶位点后就不能通过反转录插入到 DNA 靶位点, 就会在靶位点造成 DNA 损伤, 从而具备了开发为基因组编辑工具的潜能。

结构分析表明, IEP 蛋白由 4 个相对独立的结构域组成 (图 1B), 包括: 位于 N 端的反转录酶结构域 (RT)、成熟酶结构域 (X)、DNA 结合结构域 (D) 和位于 C 端的核酸内切酶结构域 (En)。其中, RT 结构域具有反转录酶活

性, 能够以内含子 RNA 为模板通过反转录将内含子 RNA 插入到 DNA 靶位点^[51]。因此, 如果失活 RT 结构域的反转录功能, 就有可能利用 II 型内含子实现 DNA 靶向损伤, 从而实现基因组编辑功能。在笔者前期工作中, 课题组初步构建了 IEP 蛋白 RT 结构域突变体, 发现 C164A、G214、D308、D309 位点突变后, IEP 蛋白完全失去反转录活性, II 型内含子不能插入到 DNA 靶位点, 且能够在靶位点引入 DNA 损伤^[29,46,52], 表明 II 型内含子具有开发为基因组编辑工具的潜能。然而, RT 结构域失活后对 IEP 蛋白其他结构域活性的影响以及对 II 型内含子识别和切割靶位点的效率的影响仍需进一步验证。总之, 基于 II 型内含子识别切割 DNA 靶位点的特性及 IEP 蛋白的结构组成特点, II 型内含子有可能被开发为一种新型的基因组编辑技术, 为生命科学基础研究和应用研究提供工具。

REFERENCES

- [1] Dong XL, Qu GS, Piazza CL, et al. Group II intron as cold sensor for self-preservation and bacterial conjugation. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(11): 6198-6209.
- [2] Belfort M, Lambowitz AM. Group II intron RNPs and reverse transcriptases: from retroelements to research tools. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(4): a032375.
- [3] Zimmerly S, Semper C. Evolution of group II introns. *Mob DNA*, 2015, 6: 7.
- [4] Monat C, Cousineau B. The circle to lariat ratio of the Ll.LtrB group II intron from *Lactococcus lactis* is greatly influenced by a variety of biological determinants *in vivo*. *PLoS One*, 2020, 15(8): e0237367.
- [5] Costa M, Walbott H, Monachello D, et al. Crystal structures of a group II intron lariat primed for reverse splicing. *Science*, 2016, 354(6316): aaf9258.
- [6] Kwon SW, Paari KA, Malaviya A, et al. Synthetic biology tools for genome and transcriptome

- engineering of solventogenic *Clostridium*. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 282.
- [7] Kuehne SA, Minton NP. ClosTron-mediated engineering of *Clostridium*. Bioengineered, 2012, 3(4): 247-254.
- [8] Mohr G, Hong W, Zhang J, et al. A targetron system for gene targeting in thermophiles and its application in *Clostridium thermocellum*. PLoS One, 2013, 8(7): e69032.
- [9] Mohr S, Ghanem E, Smith W, et al. Thermostable group II intron reverse transcriptase fusion proteins and their use in cDNA synthesis and next-generation RNA sequencing. RNA, 2013, 19(7): 958-970.
- [10] Hong W, Zhang J, Feng Y, et al. The contribution of cellulosomal scaffoldins to cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum* analyzed by using thermotargetrons. Biotechnol Biofuels, 2014, 7: 80.
- [11] Mohr G, Kang SY, Park SK, et al. A highly proliferative group IIC intron from *Geobacillus stearothermophilus* reveals new features of group II intron mobility and splicing. J Mol Biol, 2018, 430(17): 2760-2783.
- [12] Lentzsch AM, Yao J, Russell R, et al. Template-switching mechanism of a group II intron-encoded reverse transcriptase and its implications for biological function and RNA-Seq. J Biol Chem, 2019, 294(51): 19764-19784.
- [13] Stamos JL, Lentzsch AM, Lambowitz AM. Structure of a thermostable group II intron reverse transcriptase with template-primer and its functional and evolutionary implications. Mol Cell, 2017, 68(5): 926-939.e4.
- [14] Pyle AM. Group II intron self-splicing. Annu Rev Biophys, 2016, 45: 183-205.
- [15] Lambowitz AM, Belfort M. Mobile bacterial group II introns at the crux of eukaryotic evolution. Microbiol Spectr, 2015, 3(1): MDNA3-0050-2014.
- [16] Haack DB, Yan X, Zhang C, et al. Cryo-EM structures of a group II intron reverse splicing into DNA. Cell, 2019, 178(3): 612-623.e12.
- [17] Haack DB, Toor N. Retroelement origins of pre-mRNA splicing. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2020, 11(4): e1589.
- [18] Liu N, Dong X, Hu C, et al. Exon and protein positioning in a pre-catalytic group II intron RNP primed for splicing. Nucleic Acids Res, 2020, 48(19): 11185-11198.
- [19] Chan RT, Peters JK, Robart AR, et al. Structural basis for the second step of group II intron splicing. Nat Commun, 2018, 9(1): 4676.
- [20] Wen Z, Lu M, Ledesma-Amaro R, et al. TargeTron technology applicable in solventogenic clostridia: revisiting 12 years' advances. Biotechnol J, 2020, 15(1): e1900284.
- [21] 陈相好, 刘芳, 王彩霞, 等. 高效严谨型大肠杆菌 Targetron 基因打靶系统的构建. 生物技术通报, 2019, 35(6): 213-220.
- Chen XH, Liu F, Wang CX, et al. Construction of highly efficient and rigorous targetron system in *Escherichia coli*. Biotechnol Bull, 2019, 35(6): 213-220 (in Chinese).
- [22] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, et al. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. J Microbiol Methods, 2009, 78(1): 79-85.
- [23] Enyeart PJ, Chirieleison SM, Dao MN, et al. Generalized bacterial genome editing using mobile group II introns and Cre-lox. Mol Syst Biol, 2013, 9: 685.
- [24] Enyeart PJ, Mohr G, Ellington AD, et al. Biotechnological applications of mobile group II introns and their reverse transcriptases: gene targeting, RNA-seq, and non-coding RNA analysis. Mob DNA, 2014, 5(1): 2.
- [25] Kint N, Janoir C, Monot M, et al. The alternative *Sigma factor* σ_B plays a crucial role in adaptive strategies of *Clostridium difficile* during gut infection. Environ Microbiol, 2017, 19(5): 1933-1958.
- [26] Donnelly ML, Li W, Li YQ, et al. A *Clostridium difficile*-specific, gel-forming protein required for optimal spore germination. mBio, 2017, 8(1): e02085-e02016.
- [27] Harper M, John M, Edmunds M, et al. Protective efficacy afforded by live *Pasteurella multocida* vaccines in chickens is independent of lipopolysaccharide outer core structure. Vaccine, 2016, 34(14): 1696-1703.
- [28] Dai Z, Dong H, Zhang Y, et al. Elucidating the contributions of multiple aldehyde/alcohol dehydrogenases to butanol and ethanol production in *Clostridium acetobutylicum*. Sci Rep, 2016, 6: 28189.
- [29] 陈相好, 张峥嵘, 刘芳, 等. L1.LtrB 内含子编码蛋白反转录结构域关键催化位点分析及功能验证. 微生物学报, 2019, 59(12): 2357-2366.
- Chen XH, Zhang ZR, Liu F, et al. Key catalytic sites in the reverse transcription domain of L1.LtrB intron encoded protein. Acta Microbiol Sin, 2019, 59(12):

- 2357-2366 (in Chinese).
- [30] Yao J, Lambowitz AM. Gene targeting in gram-negative bacteria by use of a mobile group II intron ("Targetron") expressed from a broad-host-range vector. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(8): 2735-2743.
- [31] 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.
- [32] Chen Y, McClane BA, Fisher DJ, et al. Construction of an alpha toxin gene knockout mutant of *Clostridium perfringens* type A by use of a mobile group II intron. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 7542-7547.
- [33] Heap JT, Kuehne SA, Ehsaan M, et al. The ClosTron: mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *J Microbiol Methods*, 2010, 80(1): 49-55.
- [34] 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.
- [35] Cui GZ, Hong W, Zhang J, et al. Targeted gene engineering in *Clostridium cellulolyticum* H10 without methylation. *J Microbiol Methods*, 2012, 89(3): 201-208.
- [36] Cui GZ, Zhang J, Hong W, et al. Improvement of ClosTron for successive gene disruption in *Clostridium cellulolyticum* using a pyrF-based screening system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1): 313-323.
- [37] Zhang C, Quan R, Wang J. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(r2): R79-R88.
- [38] Shivram H, Cress BF, Knott GJ, et al. Controlling and enhancing CRISPR systems. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(1): 10-19.
- [39] Jia K, Zhu Y, Zhang Y, et al. Group II intron-anchored gene deletion in *Clostridium*. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16693.
- [40] Guo H, 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.
- [41] Zhuang F, Mastroianni M, White TB, et al. Linear group II intron RNAs can retrohome in eukaryotes and may use nonhomologous end-joining for cDNA ligation. *PNAS*, 2009, 106(43): 18189-18194.
- [42] Sigel RKO, Vaidya A, Pyle AM. Metal ion binding sites in a group II intron core. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(12): 1111-1116.
- [43] Günther T. Concentration, compartmentation and metabolic function of intracellular free Mg^{2+} . *Magnes Res*, 2006, 19(4): 225-236.
- [44] Mastroianni M, Watanabe K, White TB, et al. Group II intron-based gene targeting reactions in eukaryotes. *PLoS One*, 2008, 3(9): e3121.
- [45] Truong DM, Sidote DJ, Russell R, et al. Enhanced group II intron retrohoming in magnesium-deficient *Escherichia coli* via selection of mutations in the ribozyme core. *PNAS*, 2013, 110(40): E3800-E3809.
- [46] 崔古贞, 陈相好, 洪伟, 等. 内含子编码蛋白 Mg^{2+} 结合位点功能分析及验证. *生物技术通报*, 2020, 36(10): 165-172.
- Cui GZ, Chen XH, Hong W, et al. Functional analysis and validation of Mg^{2+} binding sites of intron-encoded protein. *Biotechnol Bull*, 2020, 36(10): 165-172 (in Chinese).
- [47] Hirakawa MP, Krishnakumar R, Timlin JA, et al. Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives. *Biosci Rep*, 2020, 40(4): BSR20200127.
- [48] Zhang HX, Zhang Y, Yin H. Genome editing with mRNA encoding ZFN, TALEN, and Cas9. *Mol Ther*, 2019, 27(4): 735-746.
- [49] Khalil AM. The genome editing revolution: review. *J Genet Eng Biotechnol*, 2020, 18(1): 68.
- [50] Molina-Sánchez MD, Toro N. DNA cleavage and reverse splicing of ribonucleoprotein particles reconstituted *in vitro* with linear RmInt1 RNA. *RNA Biol*, 2019, 16(7): 930-939.
- [51] Lambowitz AM, Zimmerly S. Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(8): a003616.
- [52] 崔古贞, 陈峥宏, 陈相好, 等. 一种基于 II 型内含子的基因编辑方法: CN109136249B[P]. 2021-04-20.
- Cui GZ, Chen ZH, Chen XH, et al. A gene editing method based on group II introns: CN109136249B[P]. 2021-04-20 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)