

特邀专稿

我的厌氧菌研究之路与心得

东秀珠*

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

东秀珠. 我的厌氧菌研究之路与心得[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 4827-4833.

DONG Xiuzhu. My research road and experience on anaerobes[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 4827-4833.

摘要: 厌氧微生物, 尤其是产甲烷古菌, 广泛分布于各种缺氧环境中, 它们具有丰富多样的代谢途径, 在地球碳氮等重要物质循环及维持环境健康中发挥着不可或缺的作用。厌氧菌不仅是人肠道微生物组的主要成分, 而且是将废物降解转化为生物能源——甲烷的驱动者。我从认识厌氧微生物, 尤其是产甲烷古菌, 到毕生对它们的研究, 既有心得又有经验教训, 愿在《微生物学通报》建刊 50 周年之际, 分享给致力于微生物研究的青年才俊们, 希望对你们有所借鉴。

关键词: 厌氧微生物; 产甲烷古菌; 研究心得

My research road and experience on anaerobes

DONG Xiuzhu*

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Anaerobic microorganisms, particularly methanogens, are widely distributed in the anoxic environments of earth. They have diverse metabolic potentials, and play indispensable roles in earth materials cycle and maintaining environmental and human healthy. Anaerobes are not only the main species in human intestinal microbiome, but also are the players converting organic waster to bioenergy, methane. I have been engaged in anaerobes especially in methanogenic archaea for more than 30 years, and would like to share my experience and lessons in the research on anaerobes with the young microbiologists at the time of the 50th anniversary of Microbiology China.

Keywords: anaerobes; methanogenic archaea; research experience

资助项目: 国家自然科学基金重点项目(31430001); 国家自然科学基金重大研究计划(92251302)

This work was supported by the Key Project of National Natural Science Foundation of China (31430001) and the Major Research Program of National Natural Science Foundation of China (92251302).

*Corresponding author. E-mail: dongxz@im.ac.cn

Received: 2024-07-04; Accepted: 2024-07-20; Published online: 2024-08-20

我在 1996 年从国外回到中国科学院微生物研究所工作,不久后加入了《微生物学通报》编委会,目睹了她的发展历程,分享着她的成功与挫折,为她今天取得的成就感到欣喜和自豪。在《微生物学通报》建刊 50 周年且我已退休但尚未离开科研工作一线之际,想将自己 30 多年来在厌氧微生物,尤其是产甲烷古菌方面的研究经历、心得体会和经验教训,分享给致力于微生物研究的青年才俊们,希望对你们有所借鉴。

厌氧微生物,尤其是产甲烷古菌,广泛分布于各种缺氧环境中,它们具有丰富多样的代谢途径,在地球碳氮等重要物质循环及维持环境健康中发挥着不可或缺的作用;它们不仅是人肠道微生物组的主要成分,而且是将有机废物降解转化为生物能源——甲烷的驱动者。我认识厌氧微生物到毕生从事对它们的研究,开始于在荷兰瓦赫宁根大学微生物系作博士论文时的 1989 年。我的博士论文工作是关于厌氧的互营细菌与甲烷古菌协同代谢研究,在美国 15 个月的博士后工作是关于大肠杆菌(*Escherichia coli*)提前且不成熟的转录终止(转录衰减)研究。但 1996 年回国时,受研究经费和研究条件所限,我从厌氧菌资源和分类学开始了独立的研究工作,之后便开展了厌氧菌的生理代谢研究,最近 10 年主要研究产甲烷古菌的转录后调控环境适应性。

1 从厌氧菌资源和分类开始了回国后的研究工作

我在 1996 年回国工作时,正值益生菌的研发和应用兴起之时,如“三株口服液”“昂立一号”等益生菌制剂被广泛用作保健食品。考虑到自己硕士论文是细菌分类研究、博士论文是关于厌氧菌生理代谢的研究以及起始阶段的科研

经费紧缺等问题,我选择被认为是人肠道重要益生菌的双歧杆菌(*Bifidobacterium* spp.)作为研究对象,开展了其资源和分类学研究,并获得了第一个国家自然科学基金面上项目。尽管我的硕士论文是关于醋酸细菌分类研究,但对分类学的内涵是在独立开展研究时才逐步理解。认识到分类、命名和鉴定是认识生物的基础三要素。分类是将所有的生物物种按照亲缘关系归群,并依据类群间的亲缘关系密切程度排列成一个等级系统,每个物种在该系统中均应有正确的分类位置;建立的分类系统为发现新物种提供依据,并确定它们的分类地位。命名赋予属于该分类系统中每个物种唯一被学术界公认的名称,《国际细菌命名法规》^[1]规定使用拉丁文命名细菌,目的是避免语言进化而改变物种的命名。鉴定是确定一个新分离菌株的特征,并将其归属于已存在的分类单位中的过程。

尽管目前 DNA 测序技术的发展使得细菌的基因组系统发育学研究成为可能,但在 20 世纪 90 年代,对细菌的分类研究主要基于生理表型和 16S rRNA 基因序列同源性分析。而基于 16S rRNA 基因的系统发育关系,病原细菌加德纳氏菌总是与双歧杆菌聚为同一个分支,这对区分和鉴定常用于益生菌的双歧杆菌造成混淆。我理解一个用于系统发育学研究的好的基因标识应是:在物种演化中垂直遗传的直向同源基因(ortholog)、序列保守、单拷贝等,因此建立了热休克蛋白 HSP60 的系统发育关系。在 HSP60 系统发育树中,双歧杆菌和加德纳氏菌(*Gardnerella* sp.)聚为不同的系统发育分支,而且与划分物种的 G+C 含量和 DNA/DNA 杂交相关性一致^[2]。在分类学研究中,我逐渐意识到认识细菌和古菌的特异生物学功能对建立其分类系统的重要性,因为这可将一个物种的系统发育学地位与其生物学功能相偶联,并可根据一个

物种的已知功能推演同一系统学分支其他物种的功能, 而从 16S rRNA 基因这种不编码蛋白产物系统发育的分子标识无法推测物种的功能。正如我们发现了首个古菌的转录终止因子 aCPSF1 是古菌中广泛分布的必需功能蛋白, 并且与古菌物种和 RNA 聚合酶趋同进化, 可作为古菌的系统发育分子标识。通过比较基于古菌 aCPSF1 蛋白序列与 16S rRNA 基因同源性系统发育关系, 以及基于古菌 122 个保守蛋白的基因组系统发育关系的一致性后, 我们建立了古菌 aCPSF1 的系统发育关系, 该系统不仅优于 122 个保守蛋白分析系统发育关系时的计算耗时, 而且具有比 16S rRNA 基因更高的分辨率, 尤其在古菌种水平的分辨率^[3]。

2 研究产甲烷古菌的生理学, 认识这群产甲烷生物的功能

甲烷是第二温室气体, 又是可再生能源, 因此控制甲烷排放是实现“双碳”目标的任务之一。据估计全球 70% 以上的甲烷由生物产生, 而甲烷古菌是目前已知的唯一产生大量甲烷的生物。它们属于古菌域, 尽管与细菌同属原核生物, 同样具有无性繁殖的单细胞、基因密集排列的单一基因组等, 但是细胞壁、膜的组成成分及其他生物学特征与细菌差异很大, 尤其古菌使用与真核生物同源的遗传机器, 因此无法从对细菌的认识中了解古菌, 于是我们从 2008 年开始了对甲烷古菌的生理学研究。

2.1 报道了首个古菌的群感效应调控系统及其提高厌氧处理有机废水效率的功能

甲烷鬃菌属 (*Methanosaeta*) 的甲烷古菌只利用乙酸产甲烷, 细胞长丝状、与颗粒污泥形成相关, 是污水处理中重要的功能菌。我们从清华大学啤酒废水 UASB 反应器中分离到一个甲烷

鬃菌新种——竹节状甲烷鬃菌 (*Mehtanosaeta harundinacea*) 6AC^[4]。在实验室多次传代后, 菌株 6AC 从长丝状变成短杆菌, 但用高浓度乙酸培养时又变成长丝状, 这暗示细胞形态与细胞密度相关, 即可能受“群感效应”调控。但届时古菌是否存在“群感效应”尚未可知。我们采用生理生化、质谱及核磁共振等方法, 发现甲烷鬃菌 6AC 使用革兰氏阴性细菌的群感效应信号分子类似物——羧基高丝氨酸内酯调控细胞的形态变化和碳代谢流的分配, 长丝细胞将乙酸更多流向甲烷合成, 而短杆细胞将乙酸更多流向细胞碳合成, 同位素示踪技术证明, 短杆细胞启动“休眠”的甲基氧化分支产生更多的还原当量, 可用于合成细胞碳^[5]。分子生物学研究证明甲烷鬃菌 6AC 中的双组分调控系统 FilI-FilRs 参与群感效应信号分子合成, 并参与调控乙酸产甲烷途径关键酶的基因表达^[6]。

根据甲烷鬃菌在污水处理的核心功能 UASB 反应器的颗粒污泥中占优势, 我们在污水处理器运行起始时添加甲烷鬃菌 6AC, 并在反应器运转周期中连续添加其群感效应信号分子, 结果发现添加信号分子显著提高了反应器化学需氧量 (chemical oxygen demand, COD) 去除率, 并产生性能良好的颗粒污泥, 颗粒中的甲烷鬃菌 6AC 呈长丝状, 使得颗粒污泥的菌群多样性显著提高^[7]。该工作提示我们在利用新的微生物资源时需先认识它们的生物学特征, 即解析生物学机制是有效应用微生物功能的前提。但遗憾的是该项发现未应用到生产中。

2.2 发现新的产甲烷途径——甲基砷脱甲基产甲烷及其功能甲烷古菌

南京农业大学赵方杰研究团队前期证明水稻二甲砷 (dimethyl arsenate, DMA) 可导致水稻直穗病、水稻严重减产及稻粒中砷残留, 而抑制产甲烷过程可导致水稻土积累 DMA, 表

明甲烷古菌参与 DMA 代谢^[8]。我们合作研究发现水稻土壤样品可将 $^{13}\text{CH}_3\text{-DMA(V)}$ 转化为 $^{13}\text{CH}_4$ ，证明甲烷古菌参与二甲基砷脱甲基过程^[7]。之后我们从稻田土的甲醇产甲烷富集物中分离到卢米尼甲烷马赛球菌(*Methanomassiliicoccus luminyensis*) CZDD1，它能够将 DMA 脱甲基产生单甲基砷(monomethylarsenic acid, MMA)。该菌不能从五价的 DMA(V)产甲烷，但能大大提高稻田土的 DMA 脱甲基的速率，说明其需要其他微生物协同将 DMA 脱甲基；根据 DMA(V)的化学稳定性及甲烷马赛球菌能够从三价 DMA(III)产甲烷的特征，我们分离了与之伴生的厌氧细菌，结果发现 3 株厌氧细菌将 DMA(V)还原为 DMA(III)。于是我们构建了甲烷马赛球菌 CZDD1 和恶名梭菌(*Clostridium malenominatum*) CZB5 人工共培养物，其能将 $^{13}\text{CH}_3\text{-DMA(V)}$ 转化为 $^{13}\text{CH}_4$ 。我们将该共培养物加入盆栽水稻的土壤中，结果与对照相比减少了稻壳中 78.2%的 DMA(V)，病态稻壳从对照的 74%降低到 24%^[9]。该研究证明应用甲烷马赛球菌可能具有减缓水稻砷病害的潜力。这个发现鼓励我们：尽管甲烷古菌的能量代谢途径单一，即产甲烷代谢，但蕴含着生产应用潜力。

3 转录后调控甲烷古菌的环境适应性

同其他生物相似，古菌也需要适应环境的变化。已知细菌多通过转录调控环境适应性，而甲烷古菌只编码少数转录因子和转录调控蛋白，因此我们着重研究转录后调控甲烷古菌的环境适应性。

3.1 发现古菌在转录组水平发生 RNA 加工并调控核糖体蛋白的表达

转录后调控主要通过 mRNA 降解、加工和

蛋白翻译效率实现基因表达调控。已知原核生物的 mRNA 5'端通常有一段不翻译序列(5'UTR)，其中包含核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)。由于不被翻译且裸露，5'UTR 容易形成“发夹”结构，而且是 sRNA 作用及核酸酶攻击的区段。如果 RBS 被包在发夹中则会阻止核糖体结合，该 mRNA 则不能被翻译。因此，5'UTR 是转录后调控的重要靶区域。我们采用差异 RNA 测序(dRNA-Seq)技术，检测到甲烷古菌的多个转录子，尤其是编码核糖体蛋白等持家基因 mRNA 的 5'UTR 存在大量加工切割位点。这与一直认为的原核生物 mRNA 不存在加工的理论相悖。分子生物学实验证明 5'UTR 加工提高了该 mRNA 的稳定性和翻译效率，操纵子内基因间隔区的加工调控核糖体亚基的分子计量比，实现大亚基 L12:L10 为 4:1 的比例^[10]。同时发现 mRNA 的 5'UTR 加工是甲醇产甲烷途径低温活跃的分子机制^[11]。该发现不仅修正了原核生物细胞中的 mRNA 以 all-or-none 而无加工的认识，而且也提示我们微生物丰富的生物学多样性蕴含着未知的生物学过程。

3.2 发现首个古菌冷休克蛋白 TRAM 的功能及应用潜力

在分析分离自青藏高原低温湿地少见的嗜冷甲烷古菌的低温适应性中，我们发现一个编码 7 kDa 小蛋白 TRAM 的基因在低温下显著高表达，而且该蛋白可替代 *E. coli* 的冷休克蛋白保护细菌在低温下存活，因此是首个发现的古菌冷休克蛋白^[12]。在对具有遗传操作系统的沼泽甲烷球菌敲除 TRAM 基因后，发现 TRAM 失活菌株在最适生长温度 37 °C 的生长速率显著下降，而且约 1/4 基因下调表达。RNA-IP 实验和 rEMSA 证明 TRAM 蛋白结合大多数 mRNA，且无序列特异性，并且能解开 RNA 发夹结构，因此证明 TRAM 蛋白具有 RNA 伴侣蛋白功能；

通过 dRNA-Seq 分析发现 TRAM 失活株的下调基因多数具有 20–60 nt 的 5'UTR, 通过 mCherry 荧光报告基因证明 TRAM 蛋白通过解开 5'UTR 的二级结构促进下游序列的转录, 即发挥抗转录终止作用^[13]。中国科学院微生物研究所的邱金龙研究团队将 TRAM 异源表达在水稻中, 结果提高了水稻的耐干旱和耐盐功能^[14]。说明古菌的 RNA 伴侣蛋白具有提高植物抗逆的作用, 具有生产应用潜力。

3.3 发现首个古菌的转录终止因子及其基因元件, 展示了其在古菌合成生物学中的应用前景

尽管我们发现了古菌存在组学水平的转录本 5'UTR 加工过程, 但对加工的 RNA 内切酶尚未知。已知 aCPSF1 是广泛分布于所有古菌的保守的核酸内切酶, 而且是必需功能蛋白。我们只能敲低了甲烷球菌的 aCPSF1 基因表达, 结果确实导致其总 RNA 的半衰期延长一倍, 证明它是甲烷古菌中重要的核酸酶, 但也意外发现该核酸酶水平降低后转录组发生紊乱, 并且通过转录组 3'端测序(Term-Seq)发现, 其发生了组学水平的转录通读, 即转录终止缺陷^[15]。已知细菌可通过依赖和不依赖 Rho 蛋白的 2 种方式终止转录, 而真核生物则依赖终止蛋白终止转录, 但古菌如何终止转录一直未知。为了证明 aCPSF1 蛋白参与古菌的转录终止, 我们突变了 aCPSF1 的核酸酶活性中心, 结果同样导致转录终止缺陷; 酶活实验证明 aCPSF1 切割转录子 3'端序列^[16]。因此证明 aCPSF1 通过切割转录子 3'端介导转录终止, 这与真核生物的转录终止模式相似。异源表达阿斯加德古菌和奇古菌的 aCPSF1 可终止甲烷古菌的转录, 表明 aCPSF1 是古菌通用的转录终止因子^[15]。我们通过 Term-Seq 发现甲烷古菌的多数转录本 3'端具有多个 U 碱基串, 突变 U 串也导致转录

通读^[16]。rEMSA 证明 aCPSF1 识别并结合 U 串序列, 确切地说是 aCPSF1 蛋白 N 端的 2 个 KH 域结合 U 串序列^[17]。因此证明 aCPSF1 一个蛋白即可实现古菌的转录终止, KH 域结合终止子 U 串, 核酸酶域切割 U 串下游触发转录终止, 这与真核生物使用复杂的蛋白复合体终止转录不同, 这也说明古菌使用真核生物样但简化的转录终止模式, 这提供了又一个真核生物起源于古菌的遗传学证据。

3.4 发现原核生物操纵子内基因间转录终止调控蛋白复合体亚基化学计量比

我们在甲烷古菌 Term-Seq 的 3'端测序文库中发现了多个操纵子内基因间的转录终止位点(ioTTS), 其生理学意义有待探究。已知原核生物中功能相关的基因多组成操纵子, 并从一个启动子起始转录, 从而实现这些基因的等量表达。但也发现一些重要的蛋白复合体含有不等量的亚基, 如核糖体蛋白、ATP 合酶、细菌分泌系统和抗病毒防御系统等, 但对同一个操纵子中不同基因的不等量表达的调控机制尚未知。我们采用多组学测序确定海沼甲烷球菌(*Methanococcus maripaludis*)的 38%多基因操纵子中具有 ioTTS, 发现 72% ioTTS 上游基因的转录显著高于下游基因, 表明内部转录终止与操纵子基因的不等量表达有关^[16]。然后我们采用 CRISPR 点突变一些操纵子 ioTTS, 结果缩小了上下游基因的转录及蛋白丰度差异, 但使菌株生长减缓, 这证明 ioTTS 终止控制的操纵子基因差异表达具有生理重要性^[16]。甲烷球菌的一些核糖体蛋白(ribosomal protein, RP)基因与 RNA 聚合酶(RNAP)亚基基因组成操纵子, 两类基因间区普遍存在 ioTTS, 同样 ioTTS 上游的 RP 比下游的 RNAP 亚基转录本和蛋白均高; 突变 RP-RNAP 操纵子的 ioTTS 虽然提高了 RNAP 基因的转录和翻译效率, 但突变株中组

装的 RNAP 复合物减少, 同时降低了细胞的转录和翻译, 导致菌株生长减缓^[16]。RP-RNAP 操纵子广泛分布于古菌中, 表明古菌可能普遍采用这种调控机制^[16]。突变大肠杆菌的 RP-RNAP 操纵子 ioTTS, 同样导致下游 RNAP 亚基表达升高、突变菌株对利福平更敏感、生长也变缓, 表明 ioTTS 终止是原核生物基因调控的普遍模式, 这揭示了一种新的基因调控模式, 即操纵子内部转录终止^[16]。该模式广泛调节原核生物操纵子基因的差异表达, 包括核糖体蛋白和 RNA 聚合酶基因, 并且该调控机制具有生理重要性。

我们同时利用基础研究中发现的古菌基因元件, 包括强启动子、强 RBS 等, 建立了可以利用 CO₂ 合成甲烷古菌的 CRISPR 基因组编辑工具^[18-19], 为发展古菌底盘细胞和古菌合成生物学提供了可能。

4 我的科研心得

自硕士论文研究至今, 我已在微生物学研究中走过了 40 多年的历程, 不仅深深融入这个学科, 也意识到这个传统学科面临的机遇和挑战。微生物不仅作为研究模式揭示了诸多生物学的基本科学问题, 同时作为地球上最早出现且进化历史最久的生物类群, 携带着生物进化的信息。而且在与地球共进化过程中, 演化出其他生物类群不可媲美的生物多样性、代谢多样性及遗传多样性, 尤其是生活在极端环境的微生物具有强大的环境适应性。因此, 从微生物的生物学特征中不仅可以找到解决人类面临的可持续发展问题的策略, 而且它们具有的遗传多样性及其丰富的遗传元件使之成为目前合成生物学的主力。但不可否认的是, 随着研究技术的发展使得高等生物的研究变得容易, 致使微生物作为模式的功能式微。但在生物技术

发展中, 微生物仍具有不可替代的作用。只是我们应意识到, 微生物进化出的代谢功能、遗传多样性及其环境适应力, 主观上应是为了满足自己的生存, 而不是为人类服务。因此, 欲利用微生物的功能解决人类面临的环境、健康等问题, 前提是要透视微生物、认识它们的功能及实现功能的生物学机制和环境需求。另外, 尽管大数据甚至人工智能的出现和发明拓展了我们的算力, 使得我们的研究模式也在转变。现在“大数据”的基础来自先前的研究结果, 如果没有对生物学功能和机制的持续积累, “大数据”岂不成无源之水; 而且我们目前对微生物的生物多样性和功能多样性仍知之有限, 基于大数据的“相关性研究范式”的结论仍需“机制解析”。唯有认识了微生物功能及机制, 方可有效、精准、灵活地利用它们, 从而为人类服务。

致谢

感谢李洁研究员、李凌燕博士、祁磊博士、岳雷博士、张文婷博士、张波博士、贾佳硕士等, 以及美国 Georgia 大学 William Whitman 教授的帮助。

REFERENCES

- [1] SP Lapage, PHA Sneath, EF Lessel, VBD Skerman, HPR Seeliger, WA Clark. International Code of Nomenclature of Bacteria[M]. Washington (DC): ASM Press, 1992.
- [2] JIAN W, ZHU L, DONG X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(Pt 5): 1633-1638.
- [3] LI J, ZHENG XW, LI LY, ZHANG SJ, REN MF, HUANG L, DONG XZ. The archaeal transcription termination factor aCPSF1 is a robust phylogenetic marker for archaeal taxonomy[J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(3): e0153921.
- [4] ZHANG GS, ZHANG F, DING G, LI J, GUO XP, ZHU JX, ZHOU LG, CAI SC, LIU XL, LUO YM, ZHANG

- GF, SHI WY, DONG XZ. Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in a methanogenic archaeon[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(7): 1336-1344.
- [5] MA K, LIU XL, DONG XZ. *Methanosaeta harundinacea*, sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor[J]. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 127-131.
- [6] LI J, ZHENG X, GUO XP, QI L, DONG XZ. Characterization of an archaeal two-component system that regulates methanogenesis in *Methanosaeta harundinacea*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95502.
- [7] LI LY, ZHENG MY, MA HL, GONG SF, AI GM, LIU XL, LI J, WANG KJ, DONG XZ. Significant performance enhancement of a UASB reactor by using acyl homoserine lactones to facilitate the long filaments of *Methanosaeta harundinacea* 6Ac[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(15): 6471-6480.
- [8] CHEN C, LI LY, HUANG K, ZHANG J, XIE WY, LU YH, DONG XZ, ZHAO FJ. Sulfate-reducing bacteria and methanogens are involved in arsenic methylation and demethylation in paddy soils[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(10): 2523-2535.
- [9] CHEN C, LI LY, WANG YF, DONG XZ, ZHAO FJ. Methylotrophic methanogens and bacteria synergistically demethylate dimethylarsenate in paddy soil and alleviate rice straighthead disease[J]. *The ISME Journal*, 2023, 17(11): 1851-1861.
- [10] QI L, YUE L, FENG DQ, QI FX, LI J, DONG XZ. Genome-wide mRNA processing in methanogenic Archaea reveals post-transcriptional regulation of ribosomal protein synthesis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(12): 7285-7298.
- [11] JIA J, LI J, QI L, LI LY, YUE L, DONG XZ. Post-transcriptional regulation is involved in the cold-active methanol-based methanogenic pathway of a psychrophilic methanogen[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(7): 3773-3788.
- [12] ZHANG B, YUE L, ZHOU LG, QI L, LI J, DONG XZ. Conserved TRAM domain functions as an archaeal cold shock protein via RNA chaperone activity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1597.
- [13] LI J, ZHANG B, ZHOU LG, QI L, YUE L, ZHANG WT, CHENG HC, WHITMAN WB, DONG XZ. The archaeal RNA chaperone TRAM0076 shapes the transcriptome and optimizes the growth of *Methanococcus maripaludis*[J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(8): e1008328.
- [14] 陈巍, 李华丽, 邱金龙. 异源表达古菌 TRAM 基因增强水稻的耐旱性[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(9): 1676-1685.
- CHEN W, LI HL, QIU JL. Ectopic expression of archaeal TRAM-encoding genes in rice improves its drought-tolerance[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(9): 1676-1685 (in Chinese).
- [15] YUE L, LI J, ZHANG B, QI L, LI ZH, ZHAO FQ, LI LY, ZHENG XW, DONG XZ. The conserved ribonuclease aCPSF1 triggers genome-wide transcription termination of Archaea via a 3'-end cleavage mode[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(17): 9589-9605.
- [16] ZHANG WT, REN DR, LI ZH, YUE L, WHITMAN WB, DONG XZ, LI J. Internal transcription termination widely regulates differential expression of operon-organized genes including ribosomal protein and RNA polymerase genes in an archaeon[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(15): 7851-7867.
- [17] LI J, YUE L, LI ZH, ZHANG WT, ZHANG B, ZHAO FQ, DONG XZ. aCPSF1 cooperates with *Terminator* U-tract to dictate archaeal transcription termination efficacy[J]. *eLife*, 2021, 10: e70464.
- [18] XU Q, DU Q, GAO J, CHEN L, DONG XZ, LI J. A robust genetic toolbox for fine-tuning gene expression in the CO₂-Fixing methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 79: 130-145.
- [19] DU Q, BAI LP, DONG XZ, LI J. An improved CRISPR and CRISPR interference (CRISPRi) toolkit for engineering the model methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024. DOI: doi.org/10.1186/s12934-024-02492-0.