

鲍曼不动杆菌遗传操作系统研究进展

章美琴¹ 孙兵兵² 陈代杰³ 蒋宇⁴ 杨晟^{4*}

(1. 上海师范大学 上海 200234)

(2. 上海交通大学药学院 上海 200240)

(3. 中国医药工业研究总院 上海 201203)

(4. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 中国科学院合成生物学重点实验室 上海 200032)

摘要: 鲍曼不动杆菌作为一种医院内感染的病原菌,因其易于引起各类感染且耐药性强而受到广泛关注。快速改造鲍曼不动杆菌基因组的工具可有效促进其耐药机制的研究。本文就近年来适用于鲍曼不动杆菌的遗传操作方法进行了总结,包括各种外源基因转入方法(电转化、自然转化、接合转移)和基因改造技术(等位基因交换、DNA重组工程、转座突变),并对鲍曼不动杆菌的基因组编辑方法的改进作了初步展望。

关键词: 鲍曼不动杆菌, 基因改造, DNA重组工程, 转座突变

Genetic manipulation system of *Acinetobacter baumannii*

ZHANG Mei-Qin¹ SUN Bing-Bing² CHEN Dai-Jie³ JIANG Yu⁴ YANG Sheng^{4*}

(1. Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

(2. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(3. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China)

(4. CAS Key Laboratory of Synthetic Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai 200032, China)

Abstract: *Acinetobacter baumannii* is a nosocomial pathogen, which garners widespread attention for its infections and drug resistance. Tools to rapidly dissect the *A. baumannii* genome will facilitate the study of its pathogenic mechanism. Here, we summarized genetic manipulation tools for *A. baumannii* genome, including various methods for transformation of exogenous DNA into *A. baumannii* (electroporation, natural transformation, conjugation) and genome modification techniques (allelic exchange, recombineering, transposon mutagenesis), and carried out a preliminary prospect on progress of genome editing tools for *A. baumannii*.

Keywords: *A. baumannii*, Gene modification, Recombineering, Transposon mutagenesis

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81573329, 81273413)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-54924173; E-mail: syang@sibs.ac.cn

Received: December 23, 2016; **Accepted:** February 10, 2017; **Published online** (www.cnki.net): February 24, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81573329, 81273413)

***通讯作者:** Tel: 86-21-54924173; E-mail: syang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2016-12-23; 接受日期: 2017-02-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-24

鲍曼不动杆菌是一种革兰氏阴性球杆菌,自1970年以来,随着广谱抗菌药物的滥用,鲍曼不动杆菌耐药性也随之增强,可引起皮肤表面和软组织的感染以及更严重的疾病(败血症、肺炎等)^[1]。鲍曼不动杆菌之所以成为医院内治疗的难点与它的多重耐药性密切相关。通常不动杆菌属都是自然感受态,可以从外界获取各种基因元素(质粒、插入序列和抗性岛等)而具备耐药性^[2-3]。此外,鲍曼不动杆菌可以在非生命体表面形成生物膜,顽强的抵抗力使其能在干燥物体表面长期存活^[4],较高的定殖率使其能在患者、医护人员内部或之间进行传播^[5]。

随着鲍曼不动杆菌在医院内引起感染的暴发,使其成为一种重要的病原体^[6]。全面理解鲍曼不动杆菌的致病机理和耐药机制是治疗鲍曼不动杆菌感染的关键。目前,虽然已有600多株的鲍曼不动杆菌基因组完成测序,大量的基因组信息可用于研究各种遗传因子在敏感菌株和致病菌株中的作用,但仍由于遗传操作工具的匮乏从而限制了鲍曼不动杆菌的基因功能的进一步研究^[7]。

通常我们通过基因失活或者选择性修饰评估某个基因的功能。对于鲍曼不动杆菌而言,可以采用单交换插入得到重复突变、双交换得到等位基因替换、转座突变得得到基因突变株等遗传操作方法进行基因组编辑。目前, Jacobs 等已经发布了将外源基因导入鲍曼不动杆菌的3种常用方法的精简版实验室实用操作手册^[7],本文在其基础上增加了最佳实验条件,并对鲍曼不动杆菌的遗传操作进行了更新,同时完善了遗传操作质粒的信息,包括复制子、宿主范围以及转移方法。

1 外源基因导入鲍曼不动杆菌的方法

将外源 DNA 导入鲍曼不动杆菌是进行鲍曼不动杆菌遗传操作的首要步骤,目前主要包括电转化、自然转化和接合转移3种方法。

1.1 电转化的方法

电转化(Electroporation)主要是利用脉冲电流使细菌外膜瞬间产生小孔,让外界的 DNA、蛋白、DNA-蛋白复合物通过小孔进入胞内。这是一种将

外源 DNA 转入细胞内的常用方法,其转化效率受到电转参数、外源 DNA 量、细胞的密度、缓冲体系和感受态细胞生长阶段的影响, Yildirim 等通过多因素探索实验发现菌体的浓度和镁离子的浓度相较于其他因素对电转化效率的影响最大,其中电转化的效率与菌体浓度成正相关,与镁离子的浓度成负相关。实验证明,在100 Ω 的电阻和17 kV/cm 的电压下,将25 ng 的质粒 DNA 电转入处于稳定生长期($OD_{600}=6.0$)的鲍曼不动杆菌 ATCC 17978 中,可获得最高的转化效率,每微克 DNA 约产生 1.05×10^9 个转化子^[8]。通过电转化的方式,可以快速高效地将自杀质粒或穿梭质粒导入鲍曼不动杆菌,实现基因组的编辑,研究目的基因的功能。通过电转化的方式转入鲍曼不动杆菌的遗传操作质粒见表1。

1.2 自然转化的方法

不动杆菌属都是自然感受态,鲍曼不动杆菌也同样具备较高的自然转化(Natural transformation)能力。与其他菌不同的是鲍曼不动杆菌能够在进入指数生长期后迅速进入自然感受态状态,并于稳定生长期维持一段时间后逐渐降低感受态能力^[22]。鲍曼不动杆菌的自然转化实验的标准流程是将处于稳定生长期与衰亡期之间的50 μL 鲍曼不动杆菌加入到含有100 ng DNA 的 LB 培养基中,然后在37 °C 的摇床中孵育1 h,最后涂布于相应的平板上培养。据文献报道,转化效率与温度、渗透压、以及转入的 DNA 的量、种类无关,主要受到 pH、 Ca^{2+} 浓度以及白蛋白浓度的影响^[23]。

1.3 接合转移的方法

通过3个细菌之间的直接接触转移 DNA 的方法也是鲍曼不动杆菌获取外源 DNA 的主要方法之一。将含有目标基因的质粒从大肠杆菌供体菌转移至鲍曼不动杆菌受体菌中,并让含有能够自我转移的辅助质粒的大肠杆菌辅助菌参与 DNA 转移过程,这是一个复杂的过程:(1) 将辅助质粒(如 pRK 2013、pRK 2073)转至含有供体质粒的大肠杆菌中,使得供体菌具备接合转移(Conjugation)的能力;(2) 含有目标基因的质粒从供体菌转移至鲍曼不动杆菌中。常用于鲍曼不动杆菌接合转移的供体质粒见表1^[7]。

表 1 可用于鲍曼不动杆菌的遗传操作质粒
Table 1 Published plasmids that can be utilized for *A. baumannii* genetic manipulation

质粒 Plasmids	复制子 Replicons	抗性标记 Resistance marker (s)	宿主范围 Host range	转移方法 Transfer methods	参考文献 References
复制型质粒					
Replicative plasmids					
pCON19-79	RSF1010	Tet ^R (10 mg/L) Kan ^R (50 mg/L)	Broad	Conjugation	[9]
pMMB67EH	RSF1010	Amp ^R (100 mg/L)	Broad	Electroporation	[10]
pWH1266	pBR322, pWH1277	Amp ^R (100 mg/L) Tet ^R (10 mg/L)	<i>A. spp.</i> <i>E. coli</i>	Electroporation	[8]
pBAV1K-T5	RCR	Kan ^R (50 mg/L)	Broad	Electroporation Natural transformation	[11]
pMQ300	pBBR1	Hyg ^R (100 mg/L)	G ⁻	Conjugation	[12]
pNLAC1	pMAC, pBR322	Tet ^R (10 mg/L)	<i>A. spp.</i> <i>E. coli</i>	-	[13]
pBAD18Kan-Ori	p15A, <i>A. baumannii</i>	Kan ^R (50 mg/L)	<i>A. spp.</i> <i>E. coli</i>	Electroporation	[13]
pAT02	RSF1010	Amp ^R (100 mg/L)	Broad	Electroporation	[14]
pAT03	RSF1010	Amp ^R (100 mg/L)	Broad	Electroporation	[14]
pAT04	RSF1010	Tet ^R (10 mg/L)	Broad	Electroporation	[14]
非复制型质粒					
Nonreplicative plasmids					
pEX100T	pMB1	Amp ^R (100 mg/L)	-	Conjugation	[15]
pMo130-Tel ^R	<i>Ori</i>	Tel ^R (6 mg/L) Kan ^R (50 mg/L)	-	Conjugation	[16]
pSSK10	<i>ori_{RK6}</i>	Kan ^R (50 mg/L)	-	Conjugation	[17]
pUC18T-mini-Tn7T-h ph-lux	<i>Ori</i>	Hyg ^R (100 mg/L)	Broad	Electroporation Conjugation	[18]
pABK	<i>Ori</i> , pBL1	Kan ^R (50 mg/L)	-	Conjugation	[19]
pFLP2	pBR322	Amp ^R (100 mg/L)	Broad	Conjugation	[20]
pJQ200	P15A	Gm ^R (20 mg/L)	G ⁻	Conjugation	[21]

注: *Ori*: ColE1 的复制起始位点; *ori_{RK6}*: RK6 的复制起始位点; Tet^R: 四环素抗性; Kan^R: 卡那霉素抗性; Amp^R: 氨苄青霉素抗性; Hyg^R: 潮霉素抗性; Tel^R: 亚碲酸盐抗性; Gm^R: 庆大霉素抗性; *A. spp.*: 不动杆菌属; G⁻: 革兰氏阴性菌。

Note: *Ori*: ColE1 origin of replication; *ori_{RK6}*: RK6 origin of replication; Tet^R: Tetracycline; Kan^R: Kanamycin; Amp^R: Ampicillin; Hyg^R: Hygromycin; Tel^R: Tellurite; Gm^R: Gentamycin; *A. spp.*: *Acinetobacter spp.*; G⁻: Gram-negative bacteria.

2 鲍曼不动杆菌基因组改造技术

尽管鲍曼不动杆菌基因组测序菌株已达 600 多株, 但有相当一部分基因的功能未知, 为了对这些基因的功能进行深入研究, 需要对鲍曼不动杆菌进行基因组改造。目前可使用的基因组改造技术包括等位基因交换、DNA 重组工程和转座子技术 3 种方法。

2.1 等位基因交换

与众多细菌相同, 鲍曼不动杆菌自身具备重组

系统。含有失活基因或者修饰基因的自杀质粒/非复制型质粒(Nonreplicative plasmids)低频率整合入基因组, 然后通过表型筛选可得到发生基因替换的菌株。鲍曼不动杆菌中的常用自杀质粒包括 pMo130-Tel^R、pSSK10、pEX100T、pJQ200 等, 见表 1。但是, 通过自杀质粒导入外源 DNA 发生基因替换的方法存在 3 点不足: (1) 自杀质粒的外源 DNA 也存在部分或者不存在同源性的非合理性重组现象; (2) 构建质粒费时; (3) 通过二次交换重组

还原成野生型。此外,向鲍曼不动杆菌中直接电转入含有抗性的同源线性 DNA 片段,也可以发生同源重组的基因替换,但是重组效率低下并且发生非合理性重组现象更加严重^[24-25]。所以,仅依靠鲍曼不动杆菌自身的重组系统进行等位基因交换的方法已经不再适用于鲍曼不动杆菌的基因组改造,现常用 DNA 重组工程实现其基因组改造。

2.2 DNA 重组工程

近年来,新发现的 RecET_{ab} 重组工程系统,极大地提高了鲍曼不动杆菌的重组效率。重组工程最初用于大肠杆菌中的基因替换,是一种基于同源重组的原理在基因组上进行基因定点插入、敲除或者序列替换的方法^[26]。线性的双链 DNA (如 PCR 产物)或者单链的寡核苷酸导入胞内作为基因组改造的同源底物,来源于 Rac 噬菌体编码的同源重组蛋白(如 λRed 系统或者 RecET 系统)催化基因重组反应^[27]。基于同源重组原理进行的基因组编辑分为单交换和双交换两种。单交换用于整合质粒插入基因组,使目标基因失活,但基因组上存在整合质粒上的所有原件包括抗性筛选标记^[28]。双交换可实现基因的无痕敲除/敲入。

尽管 λRed 系统在众多革兰氏阴性菌中表现出良好的工作效率,但经 IPTG 诱导的 λRed 系统不仅

无法协助完成鲍曼不动杆菌的基因重组,而且大大降低了鲍曼不动杆菌的生长速度,可能 λRed 系统表达的蛋白对鲍曼不动杆菌具有毒性。RecET 同源序列已经在鲍曼不动杆菌(IS-123)中被鉴定,将 IS-123 克隆入需 IPTG 诱导的 pMMB67EH 质粒, Tucker 等将此系统命名为 RecET_{ab}。该系统已经成功用于 ATCC 17978 和 ATCC 19606 的基因组改造,实现单/双基因的敲除,如氧化压力相关基因(*oxyR*)、外排泵基因(*aceI*)等。但只有当整合片段超过 5 μg 且同源臂序列超过 125 bp 时,鲍曼不动杆菌的基因组才会发生同源重组。如图 1 所示,含有 125 bp 的同源臂的整合片段,在 RecET_{ab} 表达的重组酶的辅助下通过双交换的方式将基因组上的目的基因替换为卡那抗性盒,然后利用 FLP/FRT 系统消除卡那抗性盒,实现目标基因的敲除^[14]。但是,菌株对外源 DNA 的转化效率不高或进入细胞的外源 DNA 量不足都会导致同源重组失败。

2.3 转座子技术

转座子是 DNA 插入因子的一种,可以在基因组上的一个位置跳跃到一个新的位置,依据插入位点的特征,分为特异性插入和随机插入。特异性插入的转座子包括特异位点重组的接合转座子、识别保守的富含 AT 序列的转座子以及唯一识别位点的

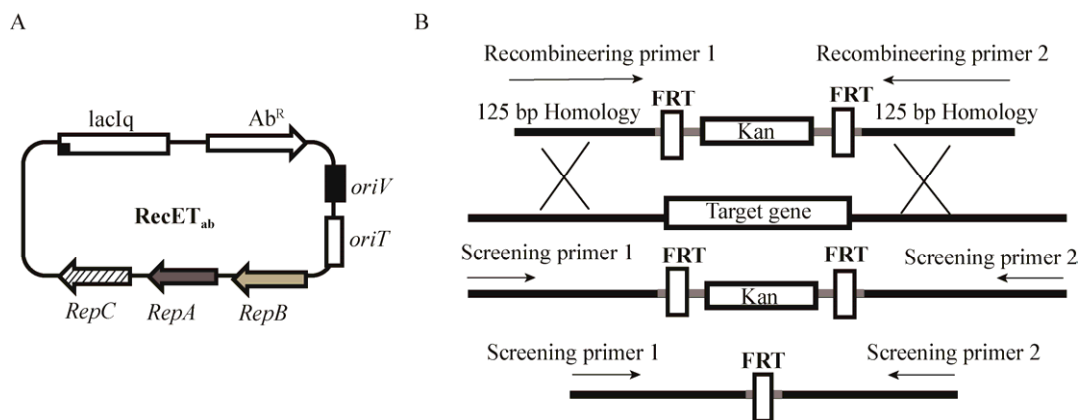


图 1 利用 RecET_{ab} 和 FLP/FRT 系统完成目的基因的敲除

Figure 1 The RecET_{ab} system and FLP/FRT system are used for unmarked gene deletion

注: A: 质粒 RecET_{ab} 的图谱, 该质粒可以表达同源重组蛋白; B: 联合运用 RecET_{ab} 系统和 FLP/FRT 系统进行基因无痕敲除的流程。

Note: A: Plasmid RecET_{ab} map, this plasmid can express homologous recombination proteins; B: Strategies for unmarked gene deletion with RecET_{ab} system and FLP/FRT system.

转座子, 如 Tn7。随机插入的转座子包括来源于果蝇的 Mariner 转座子, 来源于噬菌体的 Mu 转座子以及来源于细菌的 Tn 系列转座子。转座突变首先在大肠杆菌、铜绿假单胞菌和霍乱弧菌等革兰氏阴性菌中被发现, 后来发现在鲍曼不动杆菌中也可以得到较好的应用^[29-30], 目前鲍曼不动杆菌中常用的随机插入转座子见表 2。转座子在基因组上的插入突变或分子标记为探究基因功能提供了新方法。Tn5 和 *Himar1* 是鲍曼不动杆菌中最常用的两个转座突变系统^[31,37]。

来源于 Tn5 的 EZ::TN<R6K γ ori/KAN-2>转座系统, 比野生型 Tn5 转座系统的转座效率提高了 1 000 倍, 已经被普遍应用于鲍曼不动杆菌和其他的不动杆菌中^[38]。EZ::TN 转座子是一核酸蛋白复合物, 其转座酶末端一定要有反向重复序列存在, 此转座子可直接电转入鲍曼不动杆菌中, 在无抗生

素压力筛选下, 只有 2% 的回复突变。此外, EZ::TN 转座系统介导的转座插入位点定位较简单, 可利用“拯救”克隆的方法直接定位 EZ::TN<R6K γ ori/KAN-2>转座系统的基因插入位点^[39]。另外, 直接 PCR 扩增和随机末端 PCR 扩增基因组 DNA 也是两种非常适用的快速定位转座插入位点的方法。

来源于铜绿假单胞菌的 *MAR2xT7* 是一种基于 *Himar1* 的转座系统^[31-32], 可以在辅助质粒 pRK2013 的帮助下通过接合的方式将转座子 *MAR2xT7* 导入鲍曼不动杆菌中, 发挥较好的转座效果。相较于其他转座系统, *MAR2xT7* 转座系统能够利用转座位点杂交分析(TraSH)方法进行突变株的基因印迹追踪, 检测出突变库中的突变株。

尽管转座系统操作简单高效, 但目前适用于鲍曼不动杆菌的转座系统十分有限, 有待进一步完善。

表 2 适用于鲍曼不动杆菌的转座子
Table 2 Transposons used in *A. baumannii*

转座子 Transposons	特征 Properties	参考文献 References
▶ <i>Himar1</i> mariner ▶Two <i>Himar1</i> derivatives (<i>MAR2xT7</i> , <i>HimarBP</i>)	▶Cut-and-paste transposition ▶TA target site duplication ▶No requirement of species-specific host factor ▶Broad-host range	[31-33]
▶Tn5	▶Cut-and-paste transposition ▶A 9-bp target site duplication ▶Mostly utilized for random mutagenesis	[31,33]
▶Tn10	▶Cut-and-paste transposition ▶Requirement of a 6-bp unique target sequence ▶A 9-bp target site duplication	[33-34]
▶Tn7	▶Single, unique sites (attTn7) ▶generally located downstream of <i>glmS</i>	[35]
▶mini-Tn10PtKm	▶Single, unique sites	[30]
▶Tn3171	▶“Hot-spot” for insertion in agene Governing arginine biosynthesis	[36]

注: 表中的特征表示该转座子随机插入基因组的方法及插入位置的偏好性。

Note: Properties means the methods of transposons randomly insert into genome and insert location preferences.

3 总结与展望

基于临床研究的需要, 研究者们越来越关注鲍曼不动杆菌多重耐药性机制的研究, 并不断探索基因与表型之间的关系。目前利用电转化、自然转化和接合转移的方式向鲍曼不动杆菌中转入外源基因的实验条件已经非常成熟, 但是在基因组层面对于鲍曼不动杆菌的定点基因改造技术有待进一步发展。由于耐药菌株获取困难, 常用转座突变系统建立突变库获取耐药菌株研究样本, 如在 ATCC 17978 中构建的一个约有 15 万个单插入位点的突变库, 已经被用于鲍曼不动杆菌持续耐药的新的毒性因子的研究^[40]。针对抗性标记种类稀少的问题, 采用来自酵母菌中的 FLP/FRT 系统^[41]和来自噬菌体的 Cre/loxP 系统^[42]进行抗性标记消除, 实现了鲍曼不动杆菌基因组的多基因的改造。

此外, CRISPR/Cas9 系统自 2012 年发布以来, 由于其操作简单、成本低廉、作用高效的特点, 得到广泛的应用^[43]。Cas9 作为一种核酸内切酶蛋白, 能够在 gRNA 的指引下结合到基因组的靶序列位置, 实现定点切割, 再利用同源重组的方式将 Donor DNA 导入切割位点, 实现基因的敲除/敲入^[44-46], 能够有效避免多重抗性标记的使用, 未来也有望应用于鲍曼不动杆菌的基因改造。

参考文献

- [1] Liu QQ, Li WZ, Feng YL, et al. Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98091
- [2] Xia JJ, Zhang DC, Xu YP, et al. A retrospective analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*-mediated nosocomial pneumonia and the in vitro therapeutic benefit of cefoperazone/sulbactam[J]. International Journal for Infectious Diseases, 2014, 23: 90-93
- [3] McGann P, Courvalin P, Snesrud E, et al. Amplification of aminoglycoside resistance gene *aphA1* in *Acinetobacter baumannii* results in tobramycin therapy failure[J]. American Society for Microbiology, 2014, 5(2): e00915
- [4] Jacobs AC, Blanchard CE, Catherman SC, et al. An ribonuclease T2 family protein modulates *Acinetobacter baumannii* abiotic surface colonization[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85729
- [5] Ye D, Shan JL, Huang YB, et al. A gloves-associated outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in Guangdong, China[J]. BMC Infectious Diseases, 2015, 15: 179
- [6] Biswas I. Genetic tools for manipulating *Acinetobacter baumannii* genome: an overview[J]. Journal of Medical Microbiology, 2015, 64(7): 657-669
- [7] Jacobs AC, Thompson MG, Gebhardt M, et al. Genetic manipulation of *Acinetobacter baumannii*[J]. Current Protocols in Microbiology, 2014, 35: 6G.2.1-6G.2.11
- [8] Yildirim S, Thompson MG, Jacobs AC, et al. Evaluation of parameters for high efficiency transformation of *Acinetobacter baumannii*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 22110
- [9] Shankar R, He LK, Szilagy A, et al. A novel antibacterial gene transfer treatment for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-induced burn sepsis[J]. Journal of Burn Care & Research, 2007, 28(1): 6-12
- [10] Maseda H, Yoneyama H, Nakae T. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(3): 658-664
- [11] Bryksin AV, Matsumura I. Rational design of a plasmid origin that replicates efficiently in both Gram-positive and Gram-negative bacteria[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13244
- [12] Kalivoda EJ, Horzempa J, Stella NA, et al. New vector tools with a hygromycin resistance marker for use with opportunistic pathogens[J]. Molecular Biotechnology, 2011, 48(1): 7-14
- [13] Luke NR, Sauberan SL, Russo TA, et al. Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(5): 2017-2023
- [14] Tucker AT, Nowicki EM, Boll JM, et al. Defining gene-phenotype relationships in *Acinetobacter baumannii* through one-step chromosomal gene inactivation[J]. mBio, 2014, 5(4): e01313
- [15] Schweizer HP, Hoang TT. An improved system for gene replacement and *xylE* fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Gene, 1995, 158(1): 15-22
- [16] Hamad MA, Zajdowicz SL, Holmes RK, et al. An allelic exchange system for compliant genetic manipulation of the select agents *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*[J]. Gene, 2009, 430(1/2): 123-131
- [17] Choi AHK, Slamti L, Avci FY, et al. The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-β-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(19): 5953-5963
- [18] Jacobs AC, Thompson MG, Black CC, et al. AB5075, a highly virulent isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a model strain for the evaluation of pathogenesis and antimicrobial treatments[J]. mBio, 2014, 5(3): e01076
- [19] Valbuena N, Letek M, Ramos A, et al. Morphological changes and proteome response of *Corynebacterium glutamicum* to a partial depletion of FtsI[J]. Microbiology, 2006, 152(8): 2491-2503
- [20] Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, et al. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants[J]. Gene, 1998, 212(1): 77-86
- [21] Quandt J, Hynes MF. Versatile suicide vectors which allow direct selection for genereplacement in Gram-negative bacteria[J]. Gene, 1993, 127(1): 15-21
- [22] Palmén R, Vosman B, Kok R, et al. Characterization of transformation-deficient mutants of *Acinetobacter calcoaceticus*[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(13): 1747-1754
- [23] Traglia GM, Quinn B, Schramm STJ, et al. Serum albumin and Ca²⁺ are natural competence inducers in the human pathogen *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 60: 4920-4929
- [24] Amin IM, Richmond GE, Sen P, et al. A method for generating marker-less gene deletions in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 158
- [25] Aranda J, Poza M, Pardo BG, et al. A rapid and simple method for constructing stable mutants of *Acinetobacter baumannii*[J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 279
- [26] Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, et al. Recombineering:

- a homologous recombination-based method of genetic engineering[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(2): 206-223
- [27] Murray NE. The impact of phage lambda: from restriction to recombineering[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2006, 34: 203-207
- [28] Campbell A. Phage integration and chromosome structure. A personal history[J]. *Annual Review of Genetics*, 2007, 41: 1-11
- [29] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(3): 538-582
- [30] Leahy JG, Jonesmeehan JM. Transposon mutagenesis in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(6): 1838-1840
- [31] Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, et al. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(8): 2833-2838
- [32] Peleg AY, Tampakakis E, Fuchs BB, et al. Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(38): 14585-14590
- [33] Choi KH, Kim KJ. Applications of transposon-based gene delivery system in bacteria[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(3): 217-228
- [34] Ely B. Vectors for transposon mutagenesis of non-enteric bacteria[J]. *Molecular and General Genetics*, 1985, 200(2): 302-304
- [35] Kumar A, Dalton C, Cortez-Cordova J, et al. Mini-Tn7 vectors as genetic tools for single copy gene cloning in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 82(3): 296-300
- [36] Towner KJ. Transposon-directed mutagenesis and chromosome mobilization in *Acinetobacter calcoaceticus* EBF65/65[J]. *Genetical Research*, 1983, 41(1): 97-102
- [37] Singer JT, Finnerty WR. Insertional specificity of transposon Tn5 in *Acinetobacter* sp.[J]. *Journal of Bacteriology*, 1984, 157(2): 607-611
- [38] Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Microbiology*, 2011, 157(9): 2534-2544
- [39] Martínez-García E, Calles B, Arévalo-Rodríguez M, et al. pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes[J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 38
- [40] Wang ND, Ozer EA, Mandel MJ, et al. Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung[J]. *American Society for Microbiology*, 2014, 5(3): e01163-14
- [41] Kopke K, Hoff B, Kück U. Application of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP/FRT recombination system in filamentous fungi for marker recycling and construction of knockout strains devoid of heterologous genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(14): 4664-4674
- [42] Lambert JM, Bongers RS, Kleerebezem M. Cre-*lox*-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4): 1126-1135
- [43] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096
- [44] Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(11): 1141-1145
- [45] Li Q, Chen J, Minton NP, et al. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*[J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(7): 961-972
- [46] Jiang Y, Chen B, Duan CL, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506-2514