

基因敲除技术在多重耐药细菌中的应用研究进展

邢得勋, 谭景轩, 崔金娜, 浩东昊, 刘占英*

内蒙古工业大学化工学院 内蒙古自治区发酵产业节能减排工程技术研究中心 生物发酵绿色制造内蒙古自治区工程研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010051

邢得勋, 谭景轩, 崔金娜, 浩东昊, 刘占英. 基因敲除技术在多重耐药细菌中的应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2301-2311.

XING Dexun, TAN Jingxuan, CUI Jinna, HAO Donghao, LIU Zhanying. Research progress in the application of gene knockout in multidrug-resistant bacteria[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2301-2311.

摘要: 随着抗生素的广泛使用, 多重耐药细菌问题日益严重, 对公共卫生构成了严重威胁。基因敲除技术作为一种精准干预细菌基因的方法, 在解析多重耐药细菌的机制和寻找新的治疗方法方面展现出巨大的潜力。本文旨在综述基因敲除技术在多重耐药细菌研究中的应用进展。通过深入研究, 我们发现基因敲除技术不仅能够帮助研究人员更好地理解多耐药细菌的耐药机制, 还能为发现新的药物靶点提供重要线索。我们还探讨了基因敲除技术的优势和限制, 并提出了一些可行的解决方案。基因敲除技术的进一步优化和与其他生物技术的结合将为解决多耐药细菌问题提供更为有效的策略。同时, 我们也期待着基因敲除技术能在临床实践中得到更广泛的应用, 为多重耐药细菌的治疗提供新的可能。

关键词: 多重耐药细菌; 基因敲除; 同源重组; 锌指核酸酶技术

Research progress in the application of gene knockout in multidrug-resistant bacteria

XING Dexun, TAN Jingxuan, CUI Jinna, HAO Donghao, LIU Zhanying*

Bio-fermentation Green Manufacturing Engineering Research Center of Inner Mongolia Autonomous Region, Inner Mongolia Autonomous Region Fermentation Industry Energy Saving and Emission Reduction Engineering Technology Research Center, School of Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot 010051, Inner Mongolia, China

Abstract: The widespread use of antibiotics has exacerbated the multidrug resistance of

资助项目: 国家自然科学基金(32060017); 内蒙古自治区杰出青年基金(2022JQ10)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060017) and Inner Mongolia Scientific Research Fund for Outstanding Youth Scholar (2022JQ10).

*Corresponding author. E-mail: hgxylyzy2008@imut.edu.cn

Received: 2023-10-12; Accepted: 2024-01-09; Published online: 2024-03-18

bacteria, posing a grave threat to public health. Gene knockout, as a precise method for intervening in bacterial genetics, exhibits immense potential in deciphering the mechanisms of multidrug resistance and exploring novel therapeutic approaches. This paper reviews the advancements in the application of gene knockout in the research on multidrug-resistant bacteria. We discovered that gene knockout not only facilitates the understanding of the drug resistance mechanisms in multidrug-resistant bacteria, but also provides crucial insights into identifying new drug targets. We further discuss the advantages and limitations of this technology and propose potential solutions. The further optimization of gene knockout and the integration of this technology with other biotechnologies will provide more effective strategies for addressing the multidrug-resistance in bacteria. We hope that gene knockout can be applied in a broader scope in clinical practice, offering new possibilities for the treatment of multidrug-resistant bacteria.

Keywords: multidrug-resistance bacteria; gene knockout; homologous recombination; zinc finger nuclease

抗生素耐药性是当前全球公共卫生领域面临的一大挑战,而细菌的天然防御机制是其产生的关键因素^[1-2],探究耐药菌株的耐药机制是开发新型抗菌药物和治疗策略的关键,而基因敲除技术则是研究其耐药机制的重要工具^[3]。

随着分子生物学的发展,基因敲除技术也得到了持续的改进和优化。在早期阶段,基因敲除主要依赖于同源重组机制,通过插入碱基和小片段缺失来破坏基因结构,实现基因敲除的目的^[4]。然而,该方法的效率低、特异性差,且容易导致基因组序列损坏,因此在细菌基因敲除应用中受到限制^[5]。进入20世纪90年代,大片段基因敲除技术的出现,成功克服了传统方法的不足;该技术通过用无义DNA片段替换目标基因片段,以达到基因敲除目的;这种新方法不仅效率更高、特异性更强,还减少了对基因组序列的破坏,因此得到了广泛的应用^[6]。近年来,无痕基因敲除技术的迅速发展,为该领域带来了新的发展方向。此技术通过在基因内部引入特定突变实现基因敲除,避免了传统方法可能产生的遗传缺陷^[7-10]。由于其高效率、高特异性,无痕基因敲除技术在菌株基因编辑中展现出巨大的应用

潜力^[11]。然而基于同源重组的基因敲除技术需要繁复的筛选过程,且抗生素耐药基因常作为标记基因使用,研究表明在多基因敲除过程中可能会导致耐药基因的转移,从而影响筛选效率^[12]。对于多重耐药(multi-drug resistant, MDR)菌株,这种筛选方法会出现大量的假阳性,基因敲除成功率极低。

锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)技术自1985年首次被报道以来^[13],已发展成为一种重要的基因编辑工具。该技术基于锌指蛋白与Fok I限制性核酸酶结合,形成可特异性结合并切割基因组的人工内切酶^[14]。ZFNs技术的核心优势在于其高度的序列特异性和出色的基因编辑能力,它能够通过非同源末端连接或同源重组机制,精确操作特定基因片段,因此被视为第二代基因编辑技术。2009年,Boch等^[15]和Moscou等^[16]报道,发现从黄单胞菌(*Xanthomonas*)中分离出来的类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)可以识别单个DNA碱基,理论上可以靶向任意特定DNA序列,相较于ZFNs技术,TALENs在锌指结构设计方面极大地减少了工

作量。然而, 锌指蛋白设计和优化的复杂性以及潜在的细胞毒性是这项技术面临的主要挑战^[17-19]。近年来, ZFNs 和 TALENs 技术的发展展示了在 MDR 菌株中的应用前景^[20]。

CRISPR-Cas 基因敲除技术的发展可追溯至 20 世纪 90 年代, 科学家们分别发现了 CRISPR 位点和 *cas* 基因^[21]。随后的 RNA 测序发现, 细菌的簇状规则间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 位点包含来自噬菌体和其他细胞外元素的间隔序列, 进而促进了基因编辑技术的开发^[22]。该技术以其高效率、高特异性和简便性而逐渐成为研究热点, 并被认为是目前最先进的基因编辑技术。尽管如此, 它仍存在脱靶效应、细胞毒性和多基因编辑效率低等问题, 为了解决这些问题, 需要寻找新的 Cas 变体以提高在不同序列中识别原型间隔区相邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 效率从而减少脱靶效应^[23]。CRISPR-Cas 系统已广泛应用于菌株基因敲除、定点突变和定向进化等领域^[24-25], 其高效的基因编辑能力在 MDR 菌株基因敲除中发挥着重要作用。

本课题组在前期筛得一株具有纤维降解能力和产氢能力的菌株 *Klebsiella pneumoniae* Y7-3, 能够以秸秆为底物发酵制氢^[26-27], 但其产氢机制尚不明确。因此, 利用基因敲除技术剖析和验证产氢机制对菌株改造和应用至关重要。在实际操作中, 发现该菌株具有多重耐药性, 常规的以耐药基因作为基因敲除筛选标记的方法成功率极低, 迫切需要适用于 MDR 菌株的基因敲除方法。近年来, 研究人员对传统基因敲除方法进行了改进, 不仅提高了基因敲除效率和特异性, 还简化了操作过程^[20,23]。本文通过广泛的文献调研, 总结了适用于耐药菌株的基因敲除方法, 并分析这些方法在耐药菌株中的应用潜力。

1 基于同源重组的基因敲除技术

1.1 自杀质粒基因敲除技术

自 20 世纪 80 年代以来, 科学家便开始利用细菌的同源重组能力结合自杀质粒载体来开发自杀质粒基因敲除技术。该技术涉及两条具有同源区域的 DNA 分子, 在同源重组相关酶系统 (如 RecA、RecBCD 等) 的作用下通过互补配对发生片段交换^[5]。在宿主自身的重组酶协助下, 实现质粒同源区片段与基因组中的目标片段的相互交换, 达到基因替换的目的 (图 1)。此方法已被应用于工业微生物 (如酵母、大肠杆菌等) 的基因组编辑, 以获得高产菌株 (如提高乙醇、氨基酸等产量)^[29]。然而, 由于同源重组在单个细胞内是小概率事件, 需要繁复的筛选过程, 这也是其在基因编辑中效率低的原因之一。

有效的筛选方法是自杀质粒基因敲除技术成功的关键, Wang 等^[30]在谷氨酸棒杆菌 *rpsL* 突变菌株 (具有链霉素抗性) 中应用了含有强启动子 *rpsL* 基因的 *pk18mobrpsL* 质粒, 大幅提升了阳性选择率; 在含有卡那霉素和链霉素平板上进行高效筛选, 仅需一步即可获得突变菌株, 简化了筛选过程。对于 MDR 菌株而言质粒转染宿主菌后利用抗生素筛选往往出现大量的假阳性克隆子。为了提高 MDR 菌株基因敲除的成功率, Ismawati 等^[31]将抗碲酸盐毒性的 *Tel^R* 基因^[32]克隆到自杀质粒中, 构建 *pMo130-Tel^R* 质粒, 有效地避免了多耐药菌株转染后的假阳性克隆现象。Cianfanelli 等^[33]用 *tmp* 基因代替常用的抗生素筛选标记; *tmp* 基因即硫嘌呤-S-甲基转移酶基因 (thiopurine-S-methyltransferase, TPMT), 使细菌在碲酸盐存在的环境中生存; 利用 *I-SceI* 和 *SecB* 基因构建 *pFOKT* 质粒进行双阴性筛选, 筛选效率高达到 100%。在 MDR *Acinetobacter baumannii* 菌株中, Rubén 等^[34]同样用 *tmp* 基因

作为自杀质粒阳性克隆筛选,构建的双质粒基因敲除体系实现 *craA*、*cmlA5* 和耐药岛 2 (resistance island 2, RI2) 等基因的无痕敲除,并验证该基因在耐药方面的作用。由此,可以看出自杀质粒介导的基因敲除技术在微生物工程和工业生产中具有重要的应用价值。通过优化筛选策略,尤其是采用不同的筛选标记基因,显著提高了阳性筛选效率和基因敲除成功率;在多重耐药菌株的基因编辑中,这种策略展现出其独特优势。未来的研究应继续探索新的筛选标记和优化筛选策略,如利用荧光蛋白作为报告基因,结合流式细胞术,进一步提高基因编辑效率^[35-36],为微生物工程和机理研究提供更为高效、可靠的技术支持。

1.2 基于 Red 同源重组基因敲除

Red 同源重组系统通过 3 种独特蛋白——Exo 蛋白、Beta 蛋白和 Gam 蛋白的协同作用,表现出了强大的基因重组能力,这为基因编辑技术的进一步发展提供新的理论支持。Exo 蛋白呈漏斗状的同源三聚体环型结构,能与双链 DNA

(double-strand DNA, dsDNA) 末端结合,将其消化成单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 后从另一端释放; Beta 蛋白能与 Exo 蛋白处理的 ssDNA 的 3' 端相结合,一方面防止 ssDNA 被水解;另一方面它可以引导其与同源互补的 ssDNA 退火^[9]; Gam 蛋白能够抵抗 RecBCD 蛋白对外源 dsDNA 的降解^[37]。Red 重组系统包括 RecA 依赖途径和 RecA 非依赖途径。在 RecA 依赖途径中,外源 dsDNA 被 Exo 酶处理成 ssDNA,与 Beta 蛋白相结合确保不会被水解,在 RecA 的协助下,通过链入侵的方式与宿主基因组 DNA 相结合,激活宿主 DNA 损伤修复机制,将外源 DNA 整合到宿主基因组中(图 2A)。在 RecA 非依赖途径中,含有同源片段的 2 个 DNA 经 Exo 酶处理,在 Beta 蛋白的引导下退火连接成一条 DNA 链(图 2B)。Red 同源重组系统经过不断的深入研究,已发展成为一种强大的基因编辑工具,可以用于基因的替换、插入和删除等操作^[10]。

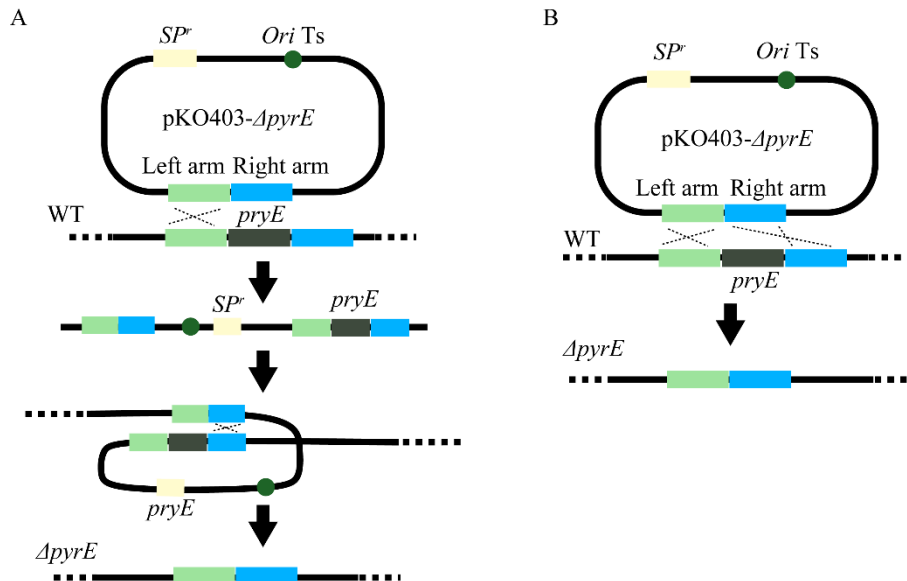


图 1 自杀质粒介导的同源重组基因敲除技术原理图^[28] A: 自杀质粒两步同源重组基因敲除原理。B: 自杀质粒一步同源重组基因敲除原理

Figure 1 Schematic diagram of the principle of gene knockout mediated by suicide plasmid homologous recombination^[28]. A: The principle of two-step homologous recombination gene knockout by suicide plasmid. B: The principle of one-step homologous recombination gene knockout by suicide plasmid.

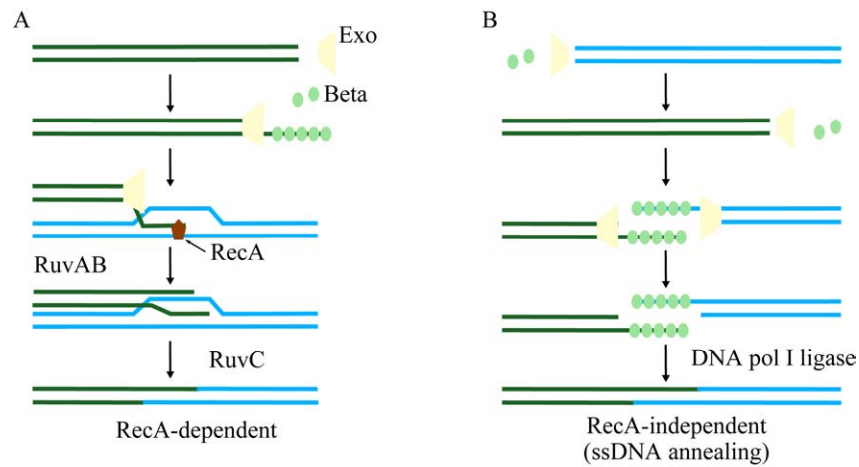


图2 Lambda Red 重组的两种经典途径^[38] A: RecA 依赖途径. Beta 在 RecA 的帮助下促进 ssDNA 侵入一个同源双链 DNA 中. B: RecA 非依赖途径. Beta 蛋白促进重叠的单链 DNA 末端之间的退火,在 DNA 聚合酶 I 作用下形成重组体

Figure 2 Two classic pathways of lambda Red recombination^[38]. A: The RecA-dependent pathway. Beta facilitates the invasion of ssDNA into a homologous dsDNA under the assistance of RecA. B: The RecA-independent pathway. The Beta protein promotes the annealing of overlapping ssDNA ends, leading to the formation of a recombinant through the action of DNA polymerase I.

研究表明, Red 重组技术在重组效率上比 RecBCD 缺陷型的大肠杆菌高出 30–130 倍^[39]。在这一发现的基础上, Datsenko 等^[7]运用含有识别特异位点重组酶基因的温敏型质粒,成功实现了目标基因的完全敲除。然而,对于 MDR 菌株的重组筛选,抗生素筛选压力下标记可能失效,导致大量假阳性。此外,实验过程中涉及两个质粒的转染,使得筛选过程复杂烦琐。为了提高筛选效率,可以构建营养缺陷型菌株,将关键酶基因作为筛选标记^[40]。例如,在 *Halorubrum lacusprofundi* 中,研究人员利用尿嘧啶营养缺陷型突变体成功建立了一套用于基因敲除的遗传操作体系^[41]。

2 锌指核酸酶(ZFNs)技术与类转录激活因子效应物核酸酶(TALENs)技术

在基因编辑技术的发展初期,科学家不断探

索和研究多种基因编辑工具,以期找到更高效、准确的基因操作方法。在这一探索过程中,ZFNs 和 TALENs 技术逐渐展现出其独特的价值和潜力。ZFNs 技术源于对非洲爪蟾 5S RNA 基因及其转录因子的深入研究,而 TALENs 技术则是基于黄单胞菌 (*Xanthomonas*) 中分离出来的 TALE^[13,15-16]。这 2 种技术通过不同的机制和应用途径为基因编辑技术进步提供了新的视角和方法。ZFNs 技术通过结合限制内切酶 *Fok I* 的切割模块和锌指酶,实现了基因特定序列的精确编辑^[14]。TALE 中心靶向区域由 30–35 个氨基酸组成,理论上有效地设计这些序列可以靶向特定的 DNA 序列^[16],在工具设计上相较 ZFNs 技术大幅降低工作量。然而,ZFNs 技术和 TALENs 技术需要复杂的设计、计算机模拟和后续蛋白质合成,因此未被广泛应用。在耐药菌株中,利用 ZFNs 技术特异性地靶向并破坏质粒编码的 β -内酰胺酶基因,以克服 β -内酰胺抗生素抗性,从而阻止了耐药细菌中耐药

基因的转移^[42]。

近年来,关于 ZFNs 和 TALEN 技术的应用已不再局限于基因编辑。例如,在探讨抗生素耐药基因的检测方法中,将锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)与氧化石墨烯(graphene oxide, GO)相结合,构建了一个简单且快速的检测平台;这一基于荧光共振能量转移的方法,仅 10 min 的孵育,便能实现对特异性双链 DNA (如四环素抗性基因 *tet^R*)的检测。这种方法不仅实现了耐药基因的快速和定量检测,还展示出作为一种快速、可靠的筛查和检测方法对耐药细菌控制的巨大潜力^[43]。

3 基于 CRISPR-Cas 基因敲除技术

随着基因编辑技术的不断发展和优化,CRISPR-Cas 系统已成为该领域的重要技术平台,其中 CRISPR-Cas9 系统以其间接性和高效率,在基因敲除和基因功能研究中扮演了关键角色。CRISPR-Cas9 系统(属于 2 类 II 型)是目前使用最广泛的敲除方法。其特点在于仅含有 Cas9 效应蛋白,包含两个核酸酶结构域:HNH 结构域切割互补 DNA 链 PAM 上游 3-4 个核苷酸,而 RuvC 切割非互补 DNA 链 PAM 上游 3-8 个核苷酸^[22],在两条 RNA 引导下(crRNA 和 tracrRNA)作用于目标 DNA 切割成有平末端的双链断裂(double-strand break, DSB)。基因编辑应用中,将 tracrRNA 和 crRNA 结合为一条嵌合的单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA),使 CRISPR-Cas9 系统简化为仅含 sgRNA 和 Cas9 两种组分,极大提高了其实用性^[44]。技术的核心在于通过 CRISPR-Cas 系统切除特定的核酸序列,实现基因敲除。CRISPR 和其相关酶 Cas 构成了一种简单且便捷的基因编辑工具,这在各种

细胞工厂和新兴的合成生物学领域中得到了应用。

基因敲除仅依赖于 sgRNA 和 Cas9 蛋白对基因组切割形成 DSB,对于多拷贝基因细胞是致死的。Jinek 等^[45]将同源重组修复技术与 CRISPR-Cas9 应用于基因组编辑(图 3A)。哈佛大学 Komor 等^[46]首次将 CRISPR/Cas9 系统中无催化活性的 Cas9 (nuclease-dead mutants of Cas9, dCas9)和胞苷脱氨酶融合,实现了在不产生 DSB 的情况下通过 sgRNA 引导对目标 DNA 特定位点碱基替换 C→T (或 G→A),开发了胞嘧啶脱氨酶的碱基编辑器(cytosine base editor, CBE) (图 3B)。此外,基于 CRISPR/Cas9 系统的腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)实现 T→C (或 A→G)的转换。无论是 CBE 还是 ABE 都可以通过单碱基转换,将特定密码子转换成终止密码子(TGA、TAG 及 TAA),从而在特定位点引入终止密码子来失活蛋白质编码基因。除此之外,Zheng 等^[49]则采用成对的 sgRNA 引导 Cas9 蛋白切割目标基因两端,在依赖于菌株自身的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)系统或引入外源 NHEJ 系统相关基因的情况下,将形成的 DSB 修复连接,实现基因大片的删除。

在 MDR 菌株中,为了实现高效精准的碱基编辑和基因敲除,需要将携带 CRISPR 组件的质粒固化于菌株中,但这往往面临假阳性筛选的问题。然而,在 *Klebsiella pneumoniae* 的多耐药性研究中,利用共轭内源性 CRISPR/Cas3 系统,成功恢复了 MDR *Klebsiella pneumoniae* 对抗生素的敏感性^[50];同样地,在 MDR *Pseudomonas aeruginosa* 中,利用内源性 I-F 型 CRISPR-Cas 系统,建立了一种适用于临床和环境分离的 MDR 病原体 *P. aeruginosa* 的高效原位基因敲除技术^[51],这为 MDR 菌株基因敲除提供了新思路。

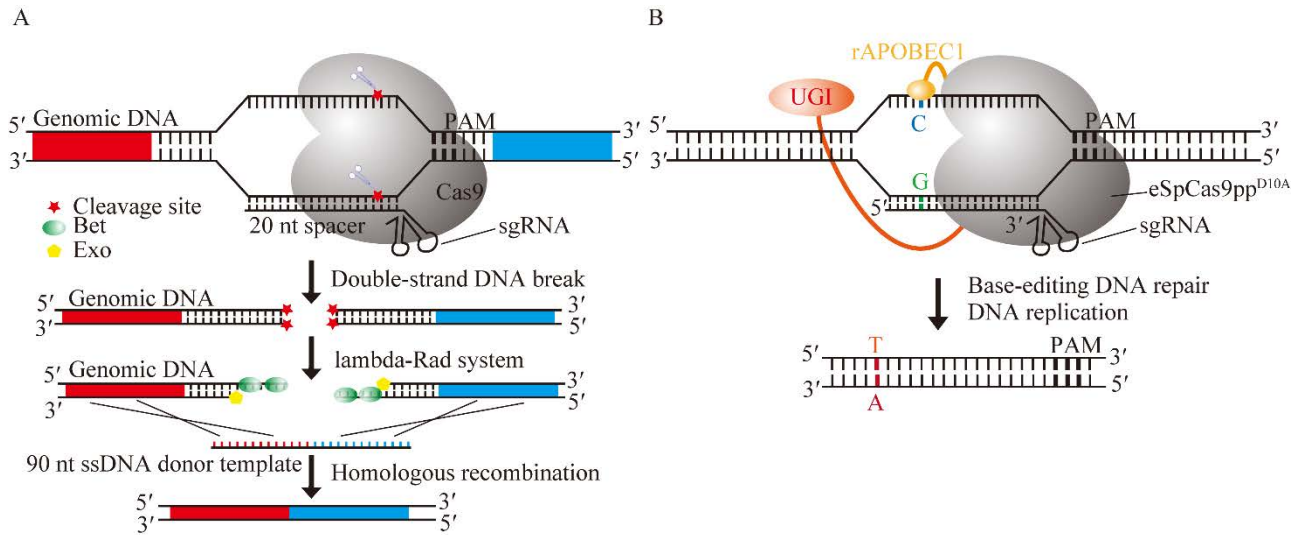


图3 基于 CRISPR/Cas 的基因编辑技术原理 A: CRISPR-Cas9 和 lambda Red 重组介导的基因组编辑方法。sgRNA-Cas9 复合物切割靠近 PAM 位点的双链 DNA，产生的 DSB 通过 lambda Red 介导的同源重组修复^[47]。B: CRISPR 辅助碱基编辑器工具由与胞嘧啶脱氨酶(rAPOBEC1，催化 C→T 转化)融合的 Cas9 切口酶(eSpCas9pp^{D10A})和尿嘧啶 DNA 糖基化酶抑制剂(UGI)组成，通过 sgRNA 定向至目标 DNA^[48]。Figure 3 Principles of gene editing technology based on CRISPR/Cas. A CRISPR-Cas9 and lambda Red recombination-mediated genome editing method: The sgRNA-Cas9 complex cleaves double-stranded DNA near the PAM site, generating a DSB that is repaired through lambda Red-mediated homologous recombination^[47]. (B) CRISPR-assisted base-editing comprises a Cas9 nickase (eSpCas9pp^{D10A}) fused with cytidine deaminase (rAPOBEC1, catalyzing C→T conversion) and a uracil DNA glycosylase inhibitor (UGI), targeting DNA through sgRNA guidance^[48].

而在 MDR *Staphylococcus aureus* 中，Gu 等^[52]将 Cas9 切口酶和胞嘧啶脱氨酶融合，在金黄色葡萄球菌中实现了高效基因失活和点突变。综上所述，CRISPR 基因敲除技术已成为该领域的核心技术，特别是在多重耐药菌株的研究中，该技术的应用为我们提供了新的视角和方法，以期找到解决 MDR 问题的有效途径。然而，该技术也存在明显的不足。例如，在进行基因敲除的过程中，如何确保目标基因的精准编辑而避免对非目标基因的意外修改、降低脱靶效应和细胞毒性，利用巧妙的调控手段控制基因敲除进程和多基因

4 总结与展望

尽管基因敲除技术已取得了显著的进展，但

在多耐药细菌中的应用仍面临着许多挑战。基于同源重组的基因敲除技术虽然操作简单、成本低，但效率不高且筛选过程复杂，易产生大量的假阳性克隆。通过改变筛选条件，如在培养基中加入亚硝酸盐与携带其抗性基因质粒来提高成功率^[30,32-33]；或者构建营养缺陷菌株提高质粒感染效率^[40]。ZFNs 和 TALENs 技术具有较高的特异性和敲除效率，但设计和合成成本较高，且存在脱靶效应和细胞毒性；AI 技术的进步可用于分子模型设计，为该技术的研究和应用提供新方向^[54-55]。CRISPR/Cas 基因敲除技术因其操作简单、效率高、脱靶效应低等优点，已成为目前最为广泛应用的基因敲除技术，该技术与同源重组基因编辑技术联用带来了更便捷的基因编辑工具，然而 Cas 蛋白基因的大片段可能不适合野生

菌株,寻找新的 Cas 效应蛋白以降低脱靶效应和提高编辑效率是近年来的研究热点^[56-58],同时借助先进的机器学习对 Cas 蛋白进行定向设计改造也许是未来更高效的研究手段。

随着科学技术的快速发展,基因敲除技术预计未来变得更加成熟和多样化。未来研究可能会集中在开发更先进、准确和高效的基因敲除方法,特别是针对多耐药细菌的应用。为了提高基因敲除的成功率并减少耐药基因的转移,研究人员可能会探索新的筛选策略。此外,与计算机技术相结合,特别是机器学习和人工智能的应用,可能会为基因敲除技术的优化提供新的可能性。例如,通过数据分析和模型预测来指导实验设计和结果解释,可以更全面地解析多耐药细菌的生物学机制^[59]。

REFERENCES

- [1] SMITH WPJ, WUCHER BR, NADELL CD, FOSTER KR. Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, 21: 519-534.
- [2] THOMPSON T. The staggering death toll of drug-resistant bacteria[J]. *Nature*, 2022. DOI: 10.1038/d41586-022-00228-x
- [3] SUN QL, WANG Y, DONG N, SHEN LW, ZHOU HW, HU YY, GU DX, CHEN S, ZHANG R, JI QJ. Application of CRISPR/Cas9-based genome editing in studying the mechanism of pandrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019, 63(7): e00113-19.
- [4] STEINMETZ M, Le COQ D, DJEMIA HB, GAY P. Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg[J]. *Molecular & General Genetics: MGG*, 1983, 191(1): 138-144.
- [5] JASIN M, SCHIMMEL P. Deletion of an essential gene in *Escherichia coli* by site-specific recombination with linear DNA fragments[J]. *Journal of Bacteriology*, 1984, 159(2): 783-786.
- [6] MA YC, YU HM, PAN WY, LIU CC, ZHANG SL, SHEN ZY. Identification of nitrile hydratase-producing *Rhodococcus ruber* TH and characterization of an *amiE*-negative mutant[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(1): 285-291.
- [7] DATSENKO KA, WANNER BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [8] KORN D, WEISSBACH A. Purification and properties of a deoxyribonucleic acid exonuclease associated with the formation of phage 434[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1964, 239: 3849-3857.
- [9] CALDWELL BJ, ZAKHAROVA E, FILSINGER GT, WANNIER TM, HEMPFLING JP, CHUN-DER L, PEI DH, CHURCH GM, BELL CE. Crystal structure of the Red β C-terminal domain in complex with λ exonuclease reveals an unexpected homology with λ Orf and an interaction with *Escherichia coli* single stranded DNA binding protein[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(4): 1950-1963.
- [10] YUAN LZ, ROUVIÈRE PE, LAROSSA RA, SUH W. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(1): 79-90.
- [11] KOLISNYCHENKO V, PLUNKETT G III, HERRING CD, FEHÉR T, PÓSFAL J, BLATTNER FR, PÓSFAL G. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome[J]. *Genome Research*, 2002, 12(4): 640-647.
- [12] 凤梓涵, 王静, 金虹, 辛文文, 康琳, 王菁, 高姗, 李岩伟, 袁媛, 王景林. 基于 pDS132 的基因敲除中创伤弧菌氯霉素的耐药性变化及影响[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(8): 2632-2642.
- [13] FENG ZH, WANG J, JIN H, XIN WW, KANG L, WANG J, GAO S, LI YW, YUAN Y, WANG JL. Changes and effects of chloramphenicol resistance of *Vibrio vulnificus* in gene knockout with pDS132[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(8): 2632-2642 (in Chinese).
- [14] KLUG A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation[J]. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2010, 43(1): 1-21.
- [14] KIM YG, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I

- cleavage domain[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [15] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, LANDGRAF A, HAHN S, KAY S, LAHAYE T, NICKSTADT A, BONAS U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors[J]. Science, 2009, 326(5959): 1509-1512.
- [16] MOSCOU MJ, BOGDANOVA AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors[J]. Science, 2009, 326(5959): 1501.
- [17] SZCZEPEK M, BRONDANI V, BÜCHEL J, SERRANO L, SEGAL DJ, CATHOMEN T. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25: 786-793.
- [18] PATTANAYAK V, RAMIREZ CL, JOUNG JK, LIU DR. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection[J]. Nature Methods, 2011, 8(9): 765-770.
- [19] SHIMIZU Y, BHAKTA MS, SEGAL DJ. Restricted spacer tolerance of a zinc finger nuclease with a six amino acid linker[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, 19(14): 3970-3972.
- [20] TONG CY, LIANG YM, ZHANG ZL, WANG S, ZHENG XH, LIU Q, SONG BC. Review of knockout technology approaches in bacterial drug resistance research[J]. PeerJ, 2023, 11: e15790.
- [21] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, AMEMURA M, NAKATA A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [22] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.
- [23] KIM D, LIM K, KIM DE, KIM JS. Genome-wide specificity of dCpf1 cytidine base editors[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4072.
- [24] ARROYO-OLARTE RD, BRAVO RODRÍGUEZ R, MORALES-RÍOS E. Genome editing in bacteria: CRISPR-cas and beyond[J]. Microorganisms, 2021, 9(4): 844.
- [25] JIN JK, XU Y, HUO LF, MA L, SCOTT AW, PIZZI MP, LI Y, WANG Y, YAO XD, SONG SM, AJANI JA. An improved strategy for CRISPR/Cas9 gene knockout and subsequent wildtype and mutant gene rescue[J]. PLoS One, 2020, 15(2): e0228910.
- [26] PANG J, LIU ZY, HAO M, ZHANG YF, QI QS. An isolated cellulolytic *Escherichia coli* from bovine rumen produces ethanol and hydrogen from corn straw[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 165.
- [27] LIU W, PANG J, WU D, ZHANG L, XING DX, HU JH, LI YL, LIU ZY. Hydrogen production by a novel *Klebsiella pneumoniae* strain from sheep rumen uses corn straw as substrate[J]. Energy, 2023, 282: 128210.
- [28] SAKAGUCHI K, HE JL, TANI SR, KANO Y, SUZUKI T. A targeted gene knockout method using a newly constructed temperature-sensitive plasmid mediated homologous recombination in *Bifidobacterium longum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(2): 499-509.
- [29] 刘孟炎, 黎秋玲, 李志, 张庆华, 周智友, 李汉广. 不同育种技术在乙醇及丁醇高产菌株选育中的应用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(3): 976-983.
- LIU MY, LI QL, LI Z, ZHANG QH, ZHOU ZY, LI HG. Applications of different breeding technologies to obtain high ethanol and butanol producing strains[J]. Microbiology China, 2020, 47(3): 976-983 (in Chinese).
- [30] WANG T, LI YJ, LI J, ZHANG DZ, CAI NY, ZHAO GH, MA HK, SHANG C, MA Q, XU QY, CHEN N. An update of the suicide plasmid-mediated genome editing system in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbial Biotechnology, 2019, 12(5): 907-919.
- [31] ISMAWATI MA, RICHMOND GE, SEN P, KOH TH, PIDDOCK LJV, CHUA KL. A method for generating marker-less gene deletions in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 158.
- [32] SANCHEZ-ROMERO JM, DIAZ-OREJAS R, de LORENZO V. Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulations of *Pseudomonas* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 4040-4046.
- [33] CIANFANELLI FR, CUNRATH O, BUMANN D. Efficient dual-negative selection for bacterial genome

- editing[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 129.
- [34] Rubén DD, GADAR K, McCARTHY RR. A high-efficiency scar-free genome-editing toolkit for *Acinetobacter baumannii*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2022, 77(12): 3390-3398.
- [35] ZULKIFLY NAH, SELAS CASTIÑEIRAS T, OVERTON TW. Optimisation of recombinant TNF α production in *Escherichia coli* using GFP fusions and flow cytometry[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1171823.
- [36] LANDETE JM, LANGA S, REVILLA C, MARGOLLES A, MEDINA M, ARQUÉS JL. Use of anaerobic green fluorescent protein versus green fluorescent protein as reporter in lactic acid bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(16): 6865-6877.
- [37] MURPHY KC. Lambda Gam protein inhibits the helicase and Chi-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(18): 5808-5821.
- [38] MURPHY KC. λ recombination and recombinering[J]. *EcoSal Plus*, 2016. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0011-2015.
- [39] MURPHY KC. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(8): 2063-2071.
- [40] AHMAD M, WINKLER CM, KOLMBAUER M, PICHLER H, SCHWAB H, EMMERSTORFER-AUGUSTIN A. *Pichia pastoris* protease-deficient and auxotrophic strains generated by a novel, user-friendly vector toolbox for gene deletion[J]. *Yeast*, 2019, 36(9): 557-570.
- [41] GEBHARD LJ, DUGGIN IG, ERDMANN S. Improving the genetic system for *Halorubrum lacusprofundi* to allow in-frame deletions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1095621.
- [42] SHAHBAZI DASTJERDEH M, KOUHPAYEH S, SABZEHEI F, KHANAHMAD H, SALEHI M, MOHAMMADI Z, SHARIATI L, HEJAZI Z, RABIEI P, MANIAN M. Zinc finger nuclease: a new approach to overcome beta-lactam antibiotic resistance[J]. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2016, 9(1): e29384.
- [43] HA DT, NGUYEN VT, KIM MS. Graphene oxide-based simple and rapid detection of antibiotic resistance gene via quantum dot-labeled zinc finger proteins[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(24): 8459-8466.
- [44] JINEK M, JIANG FG, TAYLOR DW, STERNBERG SH, KAYA E, MA EB, ANDERS C, HAUER M, ZHOU KH, LIN S, KAPLAN M, IAVARONE AT, CHARPENTIER E, NOGALES E, DOUDNA JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation[J]. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997.
- [45] JINEK M, EAST A, CHENG A, LIN S, MA E, DOUDNA J. RNA-programmed genome editing in human cells[J]. *eLife*, 2013, 2: e00471.
- [46] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [47] WANG Y, WANG SS, CHEN WZ, SONG LQ, ZHANG YF, SHEN Z, YU FY, LI M, JI QJ. CRISPR-Cas9 and CRISPR-assisted cytidine deaminase enable precise and efficient genome editing in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(23): e01834-18.
- [48] YUE SJ, HUANG P, LI S, CAI YY, WANG W, ZHANG XH, NIKEL PI, HU HB. Developing a CRISPR-assisted base-editing system for genome engineering of *Pseudomonas chlororaphis*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(9): 2324-2336.
- [49] ZHENG X, LI SY, ZHAO GP, WANG J. An efficient system for deletion of large DNA fragments in *Escherichia coli* via introduction of both Cas9 and the non-homologous end joining system from *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 485(4): 768-774.
- [50] ZHOU Y, YANG Y, LI XB, TIAN DX, AI WX, WANG WW, WANG BJ, KREISWIRTH BN, YU FY, CHEN L, JIANG XF. Exploiting a conjugative endogenous CRISPR-Cas3 system to tackle multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *EBioMedicine*, 2023, 88: 104445.
- [51] XU ZL, LI M, LI YR, CAO HL, MIAO L, XU ZC, HIGUCHI Y, YAMASAKI S, NISHINO K, WOO PCY, XIANG H, YAN AX. Native

- CRISPR-cas-mediated genome editing enables dissecting and sensitizing clinical multidrug-resistant *P. aeruginosa*[J]. *Cell Reports*, 2019, 29(6): 1707-1717.e3.
- [52] GU TN, ZHAO SQ, PI YS, CHEN WZ, CHEN CY, LIU Q, LI M, HAN DL, JI QJ. Highly efficient base editing in *Staphylococcus aureus* using an engineered CRISPR RNA-guided cytidine deaminase[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(12): 3248-3253.
- [53] GAUTTAM R, SEIBOLD GM, MUELLER P, WEIL T, WEIB T, HANDRICK R, EIKMANNS BJ. A simple dual-inducible CRISPR interference system for multiple gene targeting in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Plasmid*, 2019, 103: 25-35.
- [54] LIU XH, ZHANG W, TONG XC, ZHONG FS, LI ZJ, XIONG ZP, XIONG JC, WU XL, FU ZY, TAN XQ, LIU ZG, ZHANG SL, JIANG HL, LI XT, ZHENG MY. MolFilterGAN: a progressively augmented generative adversarial network for triaging AI-designed molecules[J]. *Journal of Cheminformatics*, 2023, 15(1): 42.
- [55] IVANENKOV YA, POLYKOVSKIY D, BEZRUKOV D, ZAGRIBELNYY B, ALADINSKIY V, KAMYA P, ALIPER A, REN F, ZHAVORONKOV A. Chemistry42: an AI-driven platform for molecular design and optimization[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2023, 63(3): 695-701.
- [56] DARCY J, WANG CH, LUNDH M, SHAMSI F, LYNES M, EMANUELLI B, TSENG YH. Identification of novel transcriptional regulators of uncoupling protein 1 using a modified CRISPR-Cas9 methodology[J]. *Diabetes*, 2018, 67(Supplement_1): 2022-P.
- [57] CARUSILLO A, HAIDER S, SCHÄFER R, RHIEL M, TÜRK D, CHMIELEWSKI KO, KLERMUND J, MOSTI L, ANDRIEUX G, SCHÄFER R, CORNU TI, CATHOMEN T, MUSSOLINO C. A novel Cas9 fusion protein promotes targeted genome editing with reduced mutational burden in primary human cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(9): 4660-4673.
- [58] MAHATA T, QIMRON U. Thou shalt not cleave DNA-only repress transcription: a compact Cas protein representing a new CRISPR-Cas subtype[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(23): 4403-4404.
- [59] STOKES JM, YANG K, SWANSON K, JIN WG, CUBILLOS-RUIZ A, DONGHIA NM, MacNAIR CR, FRENCH S, CARFRAE LA, BLOOM-ACKERMANN Z, TRAN VM, CHIAPPINO-PEPE A, BADRAN AH, ANDREWS IW, CHORY EJ, CHURCH GM, BROWN ED, JAAKKOLA TS, BARZILAY R, COLLINS JJ. A deep learning approach to antibiotic discovery[J]. *Cell*, 2020, 180(4): 688-702.e13.