

陆琪, 吴静, 陶勇. 基因编辑技术在产溶剂梭菌中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29 (2): 466-473

Lu Q, Wu J, Tao Y. Application of gene-editing technology in solventogenic clostridia [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2023, 29 (2): 466-473

基因编辑技术在产溶剂梭菌中的应用

陆琪^{1,2} 吴静^{1,2} 陶勇¹✉

¹中国科学院成都生物研究所, 中国科学院环境与应用微生物重点实验室, 四川省环境微生物重点实验室 成都 610041

²中国科学院大学 北京 100049

摘要 产溶剂梭菌是一类能够利用碳源产生生物燃料的菌种, 在可再生生物能源发展中具有巨大的应用潜力, 但是目前针对这类菌的遗传操作工具相对匮乏, 是其应用于工业生产的阻碍; 在分子遗传学快速发展的背景之下, 基因编辑技术成为研究微生物代谢调控机制以及遗传改造的首选工具. 本文首先从来源组成、基本原理以及工作机制等方面分别介绍应用于产溶剂梭菌中不同类型的基因编辑技术, 指出各自的优缺点; 接着提出基因编辑技术在产溶剂梭菌中的3大应用前提: (1) 掌握基因组序列信息, (2) 突破自身限制性酶修饰系统的屏障, (3) 建立外源DNA转化方法; 进一步按照时间脉络综述基因编辑技术在产溶剂梭菌中的发展以及编辑工具的不断优化过程, 描述其从随机失活到精准靶向失活、从低的转化效率到高效基因编辑的技术进步. 针对CRISPR目前存在的Cas蛋白毒性问题、HDR的重组效率以及脱靶效应等技术难题, 指出未来在产溶剂梭菌中应尝试探索攻克这些难题的方向, 对产溶剂梭菌进一步的遗传改造, 从而实现更高的工业应用价值. (图2 表1 参57)

关键词 基因编辑; 丙酮丁醇梭菌; 拜氏梭菌; CRISPR-Cas系统; 产溶剂基因功能

Application of gene-editing technology in solventogenic clostridia

LU Qi^{1,2}, WU Jing^{1,2} & TAO Yong¹✉

¹ Key Laboratory of Environmental and Applied Microbiology, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences & Environmental Microbiology Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610041, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Solventogenic clostridia are bacteria that can use carbon sources to produce biofuels, and they have great potential for application in renewable bioenergy. However, few manipulation tools for these bacteria have been developed in recent years, thus hindering their application in industrial production. With the rapid development of molecular genetics, gene-editing technology has become the preferred tool for studying microbial metabolism, regulation mechanisms, and genetic modification. We first introduce various types of gene-editing technologies applied to solventogenic clostridia in terms of source composition, basic principles, and working mechanisms and we highlight their respective advantages and disadvantages. In addition, three prerequisites for the application of gene-editing technology in solventogenic clostridia are proposed: (1) master genome sequence information, (2) breaking the barriers of its own restriction-modification system, and (3) establishment of a method for exogenous DNA transformation. We then review the application of gene-editing technology and the continuous optimization process of editing tools in solventogenic clostridia according to the time context. We describe the technological progress achieved from random inactivation to precisely targeted inactivation and from low transformation efficiency to efficient gene editing. Finally, we propose the current Cas protein toxicity problems, the recombination efficiency of HDR, and off-target effects in CRISPR, highlighting the broad application prospects of CRISPR technology in solventogenic clostridia and the directions that can be attempted in the future, looking forward to furthering genetic modification of solventogenic clostridia to achieve higher industrial application value.

Keywords gene editing; *Clostridium acetobutylicum*; *Clostridium beijerinckii*; CRISPR-Cas system; solvent-generating gene function

收稿日期 Received: 2022-01-06 接受日期 Accepted: 2022-02-17

国家自然科学基金项目(31770090)、四川科技计划项目(2021YJ0022)和四川科技成果转化项目(2021ZHCG0033)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770090), Sichuan Science and Technology Support Program (2021YJ0022), and the Sichuan Scientific and Technological Achievement Transfer and Transformation Project (2021ZHCG0033)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: taoyong@cib.ac.cn)

梭菌属 (*Clostridium*) 是由一类革兰氏阳性、专性厌氧细菌组成的大属, 其中包含许多的工业发酵菌种, 如通过发酵机制利用广泛的碳源物质生成丁醇 (butanol) 等生物燃料的梭菌, 这类菌种被视为工业生产中重要的产溶剂梭菌^[1]。丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 和拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*) 是产溶剂梭菌中最主要的两种微生物^[2], *C. acetobutylicum* 展示出高的淀粉酶活性, 适用于发酵玉米、谷物类淀粉含量高的原料, 而 *C. beijerinckii* 则主要利用糖类物质发酵。这两类梭菌利用碳源生成丁醇等生物燃料这一机制, 是微生物生产燃料替代高污染的石油炼制方法的经典途径, 但截至目前, 针对这类梭菌的遗传操作技术相对匮乏, 使得在过去很长一段时期内对它的研究进展缓慢。随着微生物遗传与分子生物学的不断发展, 利用基因编辑工具, 对产溶剂梭菌的基因功能、溶剂的产生机制等进行阐释, 在分子水平上研究产溶剂梭菌的代谢调控机制以及遗传改造是当前研究的热门内容, 本文综述了产溶剂梭菌中基因编辑技术的发展以及编辑工具的不断优化过程, 描述其从随机失活到精准靶向失活、从低的转化效率到高效基因编辑的技术进步, 这不仅为产溶剂梭菌的工业化发展提供支撑, 也为合成生物学研究奠定了良好基础。

1 产溶剂梭菌中的基因编辑技术

1.1 反义RNA与RNA干扰

反义RNA (antisense RNA, asRNA) 是指通过与mRNA互补结合形成双链后, 抑制和封闭相关基因表达的方法, 因其操作简单, 灵活有效, 成为研究基因下调的一种经典技术。RNA干扰 (RNA interference, RNAi) 是基于反义RNA研究之上而发现的, 1998年, Fire等人发现双链RNA (dsRNA) 在产生干扰方面比单链更有效, 从而掀起了RNAi的研究热潮^[3]。RNA干扰主要分为两种, 一种是通过DNA修饰等方式阻止基因的转录过程, 另一种是干扰转录后的翻译过程, 即通过dsRNA触发细胞自身的防御系统产生核酸内切酶Dicer等一系列酶, 切割降解mRNA以实现了相关基因的表达抑制。由于RNAi的高效特异性, 使得其在探索基因功能、遗传疾病治疗等方面具有重要意义。

1.2 ClosTron

早在2001年, Karberg等人描述了一种利用细菌II型内含子实现定向插入失活基因的全新方法, II型内含子主要存在于线粒体中, 内含子RNA自我剪切形成“套索RNA”, 在多功能内含子编码蛋白 (IEP) 的辅助下, 形成复合体, 迁移至靶DNA位点, 实现对靶基因的插入失活, 由于位点的识别依赖碱基互补配对原则, 因此, 可以通过简单地修饰内含子RNA来改变内含子插入位点, 从而实现任意靶位点的插入失活^[4]。Heap等人将来源于乳酸球菌 *ltrB* 基因与二型内含子结合开发出普遍适用于梭菌的基因失活工具ClosTron^[5-6], 研究发现, 利用ClosTron产生突变体十分高效, 只需10-14 d, 且突变体十分稳定, 已用于制造6个丙酮丁醇梭菌突变体和5个艰难梭菌突变体, 也首次失活肉毒梭菌和产孢梭菌中基因, 证明该系统将普遍适用于该属^[7]。Nigel Minton课题组改进了ClosTron原方法, 并为重组质粒的鉴定提供了蓝白色筛选和其他选择, 除此之外, 建立了名为“ClosTron”的网站 (www.clostron.com), 提供在线的内含子序列设计工具^[8], 为形成梭菌突变体提供了便利, 并为研究梭菌的功能基因组提供基础。

1.3 CRISPR-Cas

CRISPR-Cas是存在于大部分细菌和古菌中可遗传的防御系统, 该系统能够利用RNA导向核酸内切酶, 切割外源入侵核酸, 实现细菌的自我保护^[9-10]。CRISPR系统由CRISPR阵列和编码Cas蛋白的基因组成, 其中CRISPR阵列上重复序列 (repeats) 和间隔序列 (spacers) 间隔排列, 重复序列的碱基组成相对保守, 而间隔序列用于锁定目标外源基因, 所以碱基组成差异较大^[11]。CRISPR系统防御免疫机制通常可分为适应、表达和干扰这3个阶段; 在外源DNA入侵时, 通过产生相应的“免疫记忆”保存于间隔序列的方式即被称为适应阶段; 当相应外源遗传元件入侵时, 位于CRISPR前导序列内的启动子驱动CRISPR阵列的转录形成CRISPR RNA (crRNAs), 编码Cas蛋白的基因转录翻译表达相应蛋白, 这一过程为表达阶段; 最后干扰阶段中, 转录形成的crRNA与Cas蛋白结合形成复合体 (crRNP), 识别外源核酸, 干扰降解入侵的外来遗传元件^[12-14]。依据Cas蛋白的不同, CRISPR系统主要可以分为3类, 其中一类和三类由多个Cas蛋白的复合体参与入侵遗传元件的降解; 而二类需要的核糖核蛋白复合物相对简单, 可利用单个大的Cas蛋白干扰降解外源DNA, 是目前应用最为广泛的CRISPR-Cas系统^[15-16]。

1.3.1 CRISPR-Cas9 CRISPR-Cas9属于二类中的II型系统, 由Cas9蛋白和向导RNA (guide RNA, gRNA) 组成, Cas9蛋白包含HNH和RuvC两个结构域, 分别切割目标序列和互补的非目标序列; 向导RNA是由crRNA和反式激活crRNA (tracrRNA) 融合形成的双链结构, 能将Cas9蛋白导向不同的靶位点, 由于CRISPR-Cas9靶向目的基因依赖RNA与DNA的相互作用, 在锚定不同目的基因时只需设计不同的sgRNA即可, 这使得CRISPR-Cas9相比ZFN和TALEN的蛋白设计更为简易^[17]。随着这一系统的研究深入, 可以通过改变Cas9蛋白结构而设计出不同功能的衍生蛋白, 例如突变Cas9蛋白其中一个结构域, 使其形成具有切割单链核酸活性的nCas9^[18], 或将其结构域全部失活得到dCas9, 虽然丧失内切酶活性, 但仍具有与靶位点结合的能力, 在基因抑制干扰方面发挥着重要作用^[19]。由于CRISPR-Cas9系统的机制相对简单, 且更具可编程性, 已经广泛在生物体中实现应用, 例如细菌中, Huang等人利用CRISPR-Cas9编辑扬氏梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*) 的基因组用以改变其代谢途径利用合成气生产乙醇^[20]; Horwitz等人在酵母中使用模块化gRNA传递策略来实现点突变的多重整合, 包括在3个位点同时引入5个精确修饰, 以增强乙醇抗性^[21]; 在Jiang等人的报告中, 证明了由根瘤杆菌或聚乙二醇 (PEG) 介导的Cas9/sgRNA系统在拟南芥、烟草等植物类型中起作用^[22]; Wu等人通过在小鼠体内引入Cas9 mRNA和单导RNA (sgRNA), 成功突变了导致白内障的Crygc基因^[23]; CRISPR系统的功能除了单基因敲除或敲入外, 还包括多重基因组编辑和转录调控, 以及基因表达的抑制和激活等, 现已成为研究应用最为广泛的基因编辑工具。

1.3.2 CRISPR-Cpf1 近年来, 发现来自二类V型系统的Cas蛋白Cpf1也能在gRNA的引导下靶向并切割目标序列, 由此开发出的CRISPR-Cpf1系统, 成为又一被广泛利用的基因编辑器。与CRISPR-Cas9不同的是, Cpf1缺少tracrRNA, 是一种由单链crRNA引导的核酸内切酶, 这有利于简化基因组编辑工具的设计。其次, 与Cas9系统靶向富含G的原间隔物相邻基序 (PAM) 相比, Cpf1-crRNA复合物能有效靶定短的富含T的PAM, 所以CRISPR-Cpf1能够用于编辑CRISPR-Cas9

系统不能识别的高AT含量区,除此之外,Cpf1与Cas9的断裂末端也有所不同,Cas9切割DNA形成平末端,而Cpf1产生黏性末端,这使Cpf1相比Cas9能够引入更大的突变^[24]。目前,根据不同的基因组特点,研究开发了3种CRISPR-Cpf1系统,分别是AsCpf1、LbCpf1和FnCpf1,AsCpf1和LbCpf1已成功在哺乳动物细胞中实现DNA诱导突变^[25-26],AsCpf1和LbCpf1需要一个单独的crRNA,并识别5'-TTTN-3'PAM进行基因组编辑,PAM大小限制了AsCpf1和LbCpf1的编辑范围,而在Tu等人的研究中发现FnCpf1只需要5'-TTN-3'作为PAM,且在人类细胞的多个位点上具有DNA切割活性^[27],这种独有的特征使得FnCpf1解除了PAM的限制,能够靶定更大范围的目的基序,并且展示出作为人类基因组编辑工具的前景。

1.4 单碱基编辑技术

CRISPR-Cas技术在切割双链时激活非同源性末端接合(non-homologous end joining, NHEJ)或同源介导的双链DNA修复(homology directed repair, HDR),引发碱基的随机丢失和插入,这一机制使得其在精准的点修复上存在限制,基因编辑要想应用于临床,则必须具有精准的编辑效率。Komor等人在CRISPR-Cas9基础上研究设计了一种用于单个碱基编辑的精准编辑技术,主要包括两种:一种是介导靶序列上碱基C向T转换的胞嘧啶单碱基编辑技术(CBE),另一种是介导靶序列上的A转换为肌苷(inosine, I)的腺嘌呤单碱基编辑技术(ABE)^[28]。CBE由蛋白复合物和sgRNA组成,蛋白复合物包括无内切酶活性的dCas9、胞嘧啶脱氨酶和尿嘧啶糖基化酶抑制子,这种融合蛋白在sgRNA引导下,诱导双链解旋但不发生双链DNA断裂,能够介导靶序列上C向T的转换以及互补序列上G到A的转换;ABE系统和CBE类似,也是由蛋白复合物和sgRNA组成,蛋白复合物包括腺苷脱氨酶和dCas9,在sgRNA的引导下,靶向目的序列,介导靶序列上的A转换为I, I在DNA复制环节被聚合酶识别为G,从而实现靶序列上由A向G的转换以及互补序列上T向C的转换^[29]。尽管单碱基编辑技术已经展示出相较于CRISPR-Cas9更高的特异性,但CBE系统中胞嘧啶脱氨酶的酶活窗口较大,窗口中的C都有可能被替换成T,这给精准编辑单一碱基增加了难度,因此,有必要根据不同目的优化CBE系统,目前,通过改造胞嘧啶脱氨酶结构,已成功实现将编辑窗口宽度从5个核苷酸缩小到1-2个核苷酸,是精准基因编辑中的一大进步^[30]。由于单碱基技术具有精准高效的编辑特点,使其在遗传修复、临床治疗方面具有广阔的应用前景。

2 基因编辑技术在产溶剂梭菌中的应用

2.1 基因编辑技术在产溶剂梭菌中的应用前提

产溶剂梭菌因其独特的产溶剂特性,被视为工业产生生物燃料的重要菌种,开发产溶剂梭菌的基因编辑工具,是其应用于工业的研究基础,实现产溶剂梭菌中的基因编辑,需满足以下前提条件:

(1) 掌握基因组序列信息,基因组信息包括全基因组序列、基因注释、基因排列方式等;在生物信息学的发展背景之下,现代生命科学研究进入了全新的时代,全基因组测序成为开启细胞分子水平研究的第一步,通过生物信息手段,分析基因组信息,是研究细胞复杂的代谢调控机制、从基因水平上对菌种进行遗传改造的基础。Nolling等人完成了*C. acetobutylicum* ATCC 824的全基因组测序,鉴定出了一系列参与溶剂生成的基因^[31];完整的基因组序列为阐明利用碳源发酵生成溶剂的

代谢过程以及通过基因改造提高溶剂产量等提供了基础信息。

(2) 突破自身限制性酶修饰系统(restriction-modification system, RM系统)的屏障,RM系统是微生物抵御外源DNA入侵的自我保护机制,要实现外源DNA的转入,突破RM系统的限制,有正反两个思路可以参考,一是通过突变外源DNA上的限制性内切酶识别位点,躲避RM的识别和清除;二是失活体内RM系统,如失活*C. acetobutylicum* ATCC 824和DSM 1731菌株中编码II型限制性内切酶基因(CA_1502),能够明显提高外源质粒的转化效率^[32-33]。

(3) 建立外源DNA转化方法,目前常用于产溶剂梭菌的转化方法主要有两种,一是接合转移,即通过细菌之间的接合作用将供体菌株中的质粒转移到受体内的方法,在Zhang等人的研究中将携带重组质粒的供体大肠杆菌CA434与酪氨酸梭菌共培养,成功将外源质粒转入其中^[34];二是电转化,一种通过瞬间电击细胞,使细胞壁疏松,转入外源质粒的方法,Wang等人利用电转化方法转入基因编辑质粒,在*C. beijerinckii*中实现了基因缺失和整合^[35]。

2.2 基因编辑技术在丙酮丁醇梭菌中的应用

2.2.1 丙酮丁醇梭菌的代谢途径 丙酮丁醇梭菌是一类重要的产溶剂梭菌,能够利用碳源生成丁醇、丙酮等重要的生物燃料,具有开发应用于工业生产生物燃料的巨大潜力。*C. acetobutylicum*常利用葡萄糖为碳源,通过糖酵解途径生成丙酮酸从而进入中心碳代谢途径产生丁醇、丙酮等有机溶剂以及有机酸副产物等,Ventura等人发现,在*C. acetobutylicum* ATCC 824中同时过表达糖酵解途径中两个关键基因,即6-磷酸果糖激酶基因(*pfkA*)和丙酮酸激酶基因(*pykA*),能够提高了细胞内ATP和NADH的浓度,增加其对丁醇毒性的抗性;在葡萄糖分批发酵过程中,过表达*C. acetobutylicum* ATCC 824/*pfkA* + *pykA*发酵的丁醇和乙醇浓度分别比野生型菌株高29.4%和85.5%,丁醇和总溶剂(丙酮、丁醇和乙醇)浓度分别高达19.12 g/L和28.02 g/L^[36]。

糖酵解产生的丙酮酸进入中心代谢途径主要分为两个阶段,即产酸期和产溶剂期,详细代谢过程如图1所示;在产酸阶段,主要产生乙酸和丁酸,并形成ATP用以供给细胞生长所必需的能量,但有机酸的积累会阻碍菌体生长以及有机溶剂的生成,通过敲除或抑制产酸途径相关基因的表达从而降低有机酸产量,使得中间代谢产物更多地流入产溶剂途径(图1),是优化代谢途径的良好方式;总的来说,对产酸途径和产溶剂途径的相关基因进行基因编辑是改变菌种代谢相关性、优化代谢途径最直接的方式^[37-38]。

2.2.2 丙酮丁醇梭菌的基因编辑发展进程 随着分子生物学的发展,不断开发新的遗传操作工具,成为研究*C. acetobutylicum*的产溶剂机制并对其进行遗传改造的有效途径,利用这些基因编辑技术,*C. acetobutylicum*中的大部分基因功能被阐释,发酵代谢产溶剂的过程也逐渐明晰。研究者们对该菌中遗传操作的探索研究进程整理如图2所示,同时在表1中归纳总结了各遗传操作的技术进步及其优缺点。

早在1996年,Green等利用自杀质粒同源重组,成功敲除了*C. acetobutylicum*中的编码乙醛脱氢酶(*aad*)、编码磷酸转乙酰酶(*pta*)和编码丁酸激酶基因(*buk*)等,发现当失活*aad*基因时,溶剂的产生大幅度减少,*pta*基因的失活显著降低了乙酸产量,*buk*基因的失活显著降低了丁酸产量,增加了丁醇产量^[39-40],但因该方法重组效率很低,

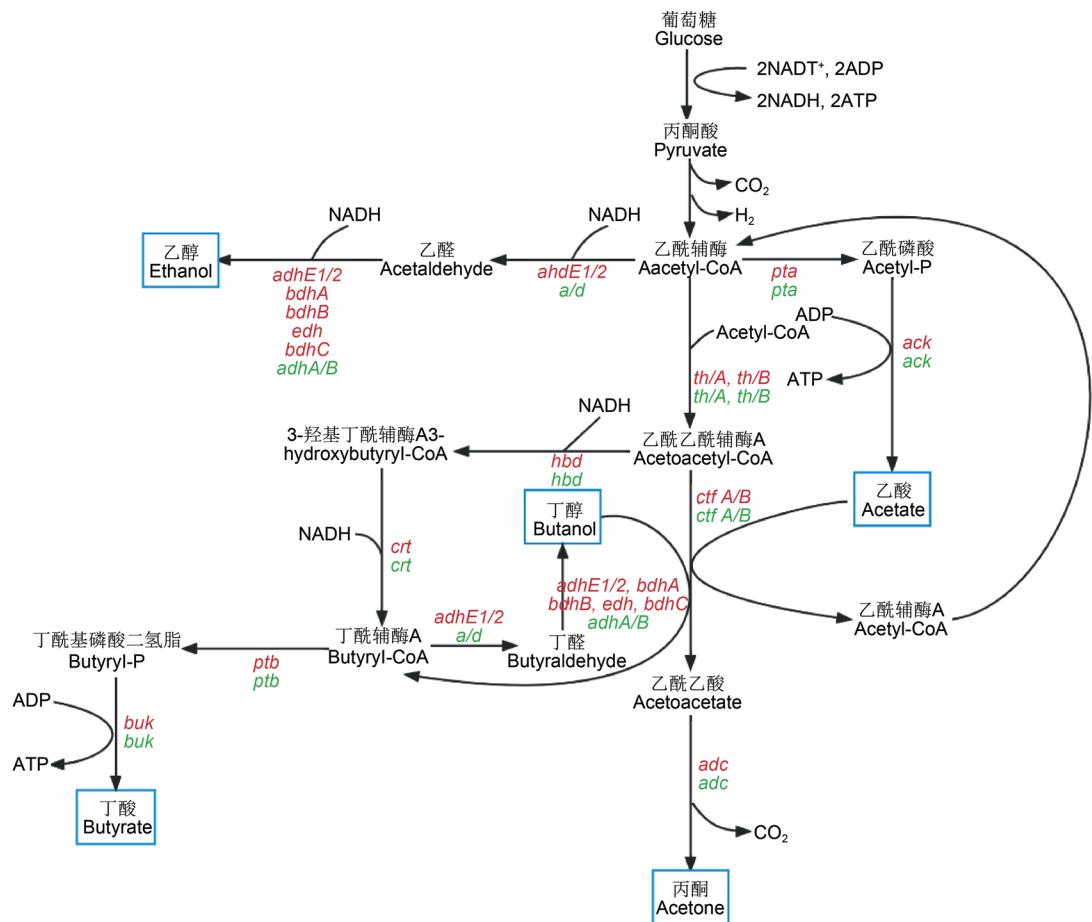


图1 丙酮丁醇梭菌及拜氏梭菌产溶剂途径。丙酮丁醇梭菌及拜氏梭菌相关基因分别用红色和绿色表示。adhE1/2, 乙醛/乙醇脱氢酶; bdhA/B, 丁醇脱氢酶; bdhC, NADPH依赖性乙醇脱氢酶; edh, 乙醇脱氢酶; adhA/B, 乙醇脱氢酶; ald, 醛脱氢酶; pta, 磷酸转乙酰酶; ack, 乙酸激酶; thl, 乙酰辅酶A乙酰转移酶; crt, 巴豆酶; hbd, β -羟基丁酰辅酶A脱氢酶; ctf, 丁酸-乙酰乙酸COA-转移酶; adc, 乙酰乙酸脱羧酶; ptb, 磷酸丁酰转移酶; buk, 丁酸激酶。

Fig. 1 The solvent-forming pathway of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. The solvent-forming genes in *C. acetobutylicum* and *C. beijerinckii* are highlighted in red and green respectively. adhE1/2, acetaldehyde/ethanol dehydrogenase; bdhA/B, butanol dehydrogenase; bdhC, NADPH-dependent alcohol dehydrogenase; edh, alcohol dehydrogenase; adhA/B, alcohol dehydrogenase; ald, aldehyde dehydrogenase; pta, phosphotransacetylase; ack, acetate kinase; thl, acetyl-CoA acetyltransferase; crt, crotonase; hbd, beta-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; ctf, butyrate-acetoacetate COA-transferase; adc, acetoacetate decarboxylase; ptb, phosphate butyryltransferase; buk, butyrate kinase.

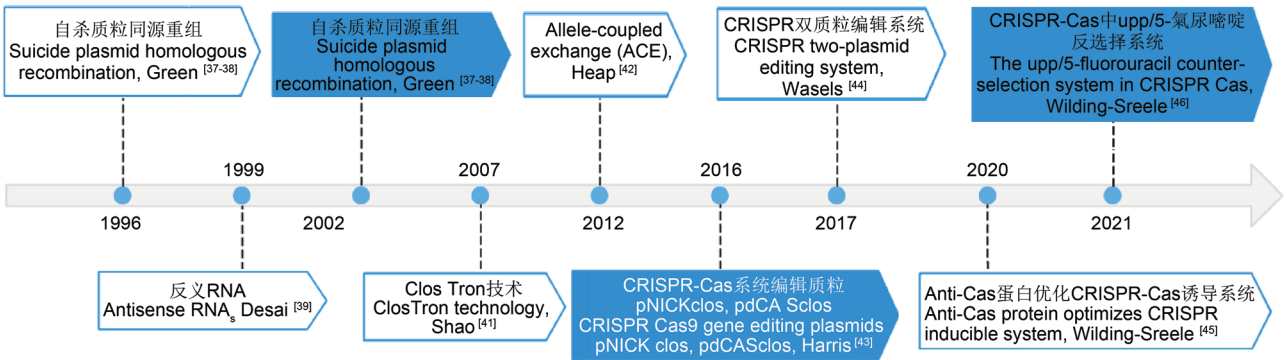


图2 丙酮丁醇梭菌中基因编辑工具的发展及优化进程。
Fig. 2 Development and optimization of gene editing tools in *Clostridium acetobutylicum*.

实现广泛应用存在困难; 1999年, Desai等人研究asRNA策略在*C. acetobutylicum*代谢工程中的有效性, 利用反义RNA技术开发菌株ATCC 824 (pRD1), 产生一个与磷酸丁酰转移酶 (*ptb*) 基因有96%互补性的asRNA, 弱化了*C. acetobutylicum*中*ptb*的表达, 使其活性相比对照下降了70%, 从而证明了*ptb*在产溶剂机制中的基因功能^[41]; 2002年,

Harris等选用具有双交叉染色体整合能力的复制质粒来提高菌体内发生同源重组的概率, 成功构建了*spo0A*失活株, 使得菌株在溶剂形成方面具有严重缺陷, 和野生型对照产生的92 mmol/L丙酮和172 mmol/L丁醇相比, *spo0A*失活株仅产生2 mmol/L丙酮和13 mmol/L丁醇, 由此阐明了*spo0A*作为控制孢子和溶剂产生的转录调节因子的基因功能^[42], 但此种方法构

建的突变体稳定性较差;为实现构建稳定突变体,2007年,Shao等人利用ClosTron技术成功构建*C. acetobutylicum*突变株,通过克隆乳酸球菌*LtrB* II型内含子片段,整合到一种含有*ptb*启动子的*Escherichia coli*-*C. acetobutylicum*穿梭载体pIMP1-*ptb*质粒上,构建了质粒 pSY6,通过转化pSY6-*buk*和pSY6-*solR*质粒进*C. acetobutylicum* ATCC 824,成功构建了

*buk*突变体和编码溶剂生成抑制因子的*solR*突变体,发现*buk*突变体和*solR*突变体相比野生型,分别提高了44%和37%的丁醇产量,且突变体转化率高,稳定性好^[43];2012年,研究者基于*C. acetobutylicum*的乳清酸磷酸核糖转移酶(*pyrE*)突变株和非等长同源臂偶联等位交换建立了高效的基因编辑方法ACE (allele-coupled exchange),通过非等长同源臂精确

表1 丙酮丁醇梭菌中基因编辑工具的基本原理及技术进步

Table 1 Basic principles and technological progress of gene editing tools in *Clostridium acetobutylicum*

丙酮丁醇梭菌中的基因编辑技术 Gene editing technology in <i>C. acetobutylicum</i>	基本原理 Basic principle	优缺点及技术进步 Advantages and disadvantages and technological progress
自杀质粒同源重组 Suicide plasmid homologous recombination	自杀性质粒载体所携带的突变基因与宿主染色体发生同源重组,产生了带有突变的突变株 ^[50] The mutant gene carried by the suicide plasmid vector undergoes homologous recombination with the host chromosome, resulting in a mutant strain with mutation ^[50]	成功敲除了 <i>C. acetobutylicum</i> 中的产溶剂相关基因,但重组效率低,稳定性差,实现广泛应用存在困难 ^[39-40] Successfully knocked out solvent-related genes in <i>C. acetobutylicum</i> , but the recombination efficiency is low and the stability is poor, making it difficult to achieve wide application ^[39-40]
反义RNA Antisense RNA	通过与mRNA互补结合形成双链后,抑制和封闭相关基因表达的方法 ^[3] A method for inhibiting and blocking the expression of related genes after forming a double-strand by complementary binding to mRNA ^[3]	成功弱化了 <i>C. acetobutylicum</i> 中 <i>buk</i> 基因的表达,但需根据不同的mRNA设计不同的反义RNA,工作量大 ^[41] The expression of <i>buk</i> gene in <i>C. acetobutylicum</i> was successfully weakened, but different antisense RNAs need to be designed according to different mRNAs, and this work is tedious ^[41]
复制型质粒同源重组 Replicative plasmid homologous recombination	利用具有双交叉染色体整合能力的复制质粒靶向并失活基因 ^[51] Targeting and inactivating genes using replicating plasmids capable of double-crossover chromosomal integration ^[51]	提高了 <i>C. acetobutylicum</i> 中发生同源重组的概率并成功构建了 <i>spo0A</i> 失活株,使得菌株在溶剂形成方面具有严重缺陷,但突变体稳定性较差 ^[42] Increased the probability of homologous recombination in <i>C. acetobutylicum</i> and successfully constructed a <i>spo0A</i> inactivated strain, resulting in a strain with severe defects in solvent formation but poor mutant stability ^[42]
ClosTron技术 ClosTron technology	细菌内含子RNA自我剪切形成“套索RNA”,在IEP的辅助下,形成复合体,迁移至靶DNA位点,实现对靶基因的插入失活 ^[4] Bacterial intronic RNA self-cleaves to form “lasso RNA”, then forms a complex with the assistance of IEP, and migrates to the target DNA site to achieve insertional inactivation of target genes ^[4]	可通过简单修饰内含子RNA实现任意靶位点的插入失活,成功在 <i>C. acetobutylicum</i> 中构建了 <i>buk</i> 和 <i>solR</i> 的突变体,该突变体相比野生型,分别提高了44%和37%的丁醇产量,且突变体转化率高,稳定性好 ^[43] The insertion inactivation of any target site can be achieved by simply modifying the intron RNA. The mutants of <i>buk</i> and <i>solR</i> were successfully constructed in <i>C. acetobutylicum</i> . Compared with the wild type, the mutant increased the butanol production by 44% and 37% respectively, and the mutant had high transformation rate and good stability ^[43]
等位基因偶联交换 Allele-coupled exchange (ACE)	基于Δ <i>pyrE</i> 突变株与非等长同源臂偶联等位交换,可通过不同长度同源臂精确控制单、双交换次序,从而实现高效的基因敲除 ^[6] Based on the coupled allelic exchange between Δ <i>pyrE</i> mutants and non-isometric homology arms, single and double exchange sequences can be precisely controlled by homology arms of different lengths, thereby achieving efficient gene knockout ^[6]	适用于难以进行遗传改造的菌株,避免了ClosTron技术引发的基因组极性问题,提高了突变体筛选速率并增加了突变体的稳定性 ^[6] This technology is suitable for strains that are difficult to genetically modify, avoids genome polarity problems caused by ClosTron technology and improves mutant screening rate and increases mutant stability ^[6]
CRISPR-Cas9基因编辑质粒 pNICKclos, pdCASclos CRISPR-Cas9 gene editing plasmids pNICKclos, pdCASclos	gRNA导向Cas9蛋白靶定于目标基因,切割DNA并引发HDR修复以实现基因插入或缺失 ^[17] The gRNA guides the Cas9 protein to target genes, cleaves DNA and initiates HDR repair for gene insertion or deletion ^[17]	该方法在 <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824中的编辑效率达6.7%-100%,并成功抑制了 <i>C. acetobutylicum</i> 中 <i>spo0A</i> 的表达 ^[45] The editing efficiency of this method in <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 reached 6.7%-100%, and the expression of <i>spo0A</i> in <i>C. acetobutylicum</i> was successfully inhibited ^[45]
CRISPR双质粒编辑系统 CRISPR two-plasmid editing system	将来自化脓性链球菌的Cas9置于无水四环素诱导启动子的控制下构建第一个质粒,第二个质粒则携带gRNA表达盒和编辑模板,将两质粒依次导入细胞中进行编辑 ^[46] The Cas9 from <i>Streptococcus pyogenes</i> was placed under the control of an anhydrous tetracycline-inducible promoter to construct the first plasmid, and the second plasmid carried the gRNA expression cassette and editing template, and the two plasmids were sequentially introduced into cells for editing ^[46]	成功在 <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824中实现了高度精确的基因编辑,提高了载体转化效率,但无水四环素诱导系统控制不够严密,易发生基因泄漏表达 ^[46] This method successfully achieved highly accurate gene editing in <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 and improved the efficiency of vector transformation, but the control of the anhydrotetracycline inducible system was not tight enough, and gene leak expression was prone to occur ^[46]
Anti-Cas蛋白优化 CRISPR诱导系统 Anti-Cas protein optimizes CRISPR inducible system	在乳糖诱导启动子控制下,克隆一个编码 <i>AcrIIA4</i> 抗Cas9蛋白的基因,参与翻译后水平中调控Cas核酸酶的过程 ^[47] Cloning a gene encoding the anti-Cas9 protein of <i>AcrIIA4</i> under the control of a lactose-inducible promoter, involved in the regulation of Cas nucleases at the post-translational level ^[47]	提高了CRISPR-Cas诱导系统严密性 Improved stringency of the CRISPR-Cas inducible system
CRISPR-Cas中 <i>upp5</i> -氟尿嘧啶反选择系统 The <i>upp5</i> -fluorouracil counter-selection system in CRISPR-Cas	将化脓性链球菌的Cas9基因整合到基因组中,得到编辑质粒,并在质粒中加入 <i>upp</i> 基因,以使用 <i>upp5</i> -氟尿嘧啶反选择系统快速删除编辑质粒 ^[48] Integrate the Cas9 gene of <i>Streptococcus pyogenes</i> into the genome to obtain an editing plasmid, and add the <i>upp</i> gene in it to rapidly delete the editing plasmid using the <i>upp5</i> -fluorouracil counter-selection system ^[48]	该系统具有高效的基因编辑效率,删除 <i>ldhA</i> 和 <i>ptb-buk</i> 操纵子的效率分别高达100%和93% ^[48] The system has high gene editing efficiency and the efficiency of deleting <i>ldhA</i> and <i>ptb-buk</i> operons is as high as 100% and 93%, respectively ^[48]

控制单、双交换,实现高效的基因敲除或敲入^[44],该方法适用于难以进行遗传改造的菌株,攻克了ClosTron技术引发的基因组极性效应问题,提高了突变体筛选速率并增加了突变体的稳定性^[6]。

随着CRISPR-Cas系统的发现,基因编辑领域实现全新的变革,2016年, Li等人基于CRISPR开发了一种全功能基因组编辑质粒pNICKclos, 适用于*C. acetobutylicum* ATCC 824, 编辑效率达6.7%-100%, 除此之外, 还利用dCas9构建编辑质粒pdCASclos, 并将其用于CRISPR干扰中, 成功抑制了*C. acetobutylicum*中*spo0A*的表达^[45], 尽管CRISPR-Cas技术颠覆了梭菌中的基因编辑方法, 但在质粒转化上仍存在一定技术难度, 由于Cas9基因加上编辑模板通常会产生大于10 kb的大质粒, 从而导致低的转化效率, 基于这一难题, Wasels等人于2017年开发出一种双质粒系统, 将来自化脓性链球菌的Cas9置于无水四环素诱导启动子的控制下构建第一个质粒, 第二个质粒则携带gRNA表达盒和编辑模板, 将质粒载体依次导入细胞中, 在产溶剂菌株*C. acetobutylicum* ATCC 824中实现了高度精确的基因编辑^[46], 双质粒编辑系统不仅提高载体转化效率, 也为其他梭状芽孢杆菌的基因编辑提供了策略; 但无水四环素诱导系统控制不够严密, 在没有核酸酶和gRNA诱导物的情况下, 出现了基础泄漏表达。面对这一问题, 2020年, Wasels等人从抗Cas9蛋白思路出发, 探索改进Cas9诱导系统, 在乳糖诱导启动子控制下, 克隆一个编码抗CRISPR蛋白AcrIIA4基因, 参与翻译后水平中调控Cas核酸酶的过程^[47]; 2021年, Wilding-Steele等人利用艰难梭菌木糖诱导系统, 成功将化脓性链球菌的Cas9基因整合到基因组中, 并确定了所需的最小同源臂长度, 得到一个小规模的编辑质粒, 还在质粒中加入编码尿嘧啶磷酸核糖转移酶的*upp*基因, 以使用*upp15*-氟尿嘧啶反选择系统快速删除编辑质粒, 这些优化使该系统删除编码乳酸脱氢酶A基因(*ldhA*)和*ptb-buk*操纵子的效率分别高达100%和93%^[48]。在面临Cas9核酸内切酶表达引发细胞毒性的这一难题, 研究者们探索了利用菌株内源性CRISPR-Cas机制进行基因组编辑的前景, 利用梭状芽孢杆菌的原生CRISPR-Cas机制进行基因组编辑, Pyne等人研究了破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*)和产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)的内源性CRISPR系统并鉴定了它们的PAM序列, 这是利用梭菌自身CRISPR-Cas机制进行基因组编辑的第一篇报道^[49], 然而, 并不是所有梭菌中都天然存在CRISPR-Cas系统, 研究者并未在*C. acetobutylicum*中发现内源性CRISPR系统, 表明利用自身CRISPR系统进行基因编辑在*C. acetobutylicum*中不具有可行性。总的来说, CRISPR-Cas系统*C. acetobutylicum*中的研究报道相对较少, 要想优化CRISPR编辑工具或探索新的基因编辑途径以实现*C. acetobutylicum*的遗传改造, 有待进一步的研究深入。

2.3 基因编辑技术在拜氏梭菌中的应用

拜氏梭菌是另一种研究较为广泛的产溶剂梭菌, 被认为是产生丁醇等生物燃料的理想菌株^[52]。其产溶剂途径和*C. acetobutylicum*类似, 已通过图1展示并用绿色标记出代谢相关基因; *C. beijerinckii*中的基因编辑研究思路同*C. acetobutylicum*类似, 如利用ClosTron失活基因或利用等位基因偶联交换(ACE)与*pyrE*等位基因作为反选择标记进行基因缺失。2016年, Minton提出一种在梭菌中进行基因组修改的路线图, 即最初使用自杀质粒或*pyrE*突变体(尿嘧啶营养缺

陷), 并由ClosTron技术辅助, 后来使用一种称为ACE的特殊等位基因交换形式这一路径^[53], 为了验证这一路线的实用性, Little等人在一株新筛选到的*C. beijerinckii* NCIMB 14988中, 测定其全基因组序列, 并设计了高效质粒转化方案, 通过ClosTron和等位基因交换完成了反向遗传操作; 除了基因失活, 还利用ACE在染色体上实现了点突变^[54]。但ACE法筛选工作量较大, 周期较长, 效率仍有待提升。

CRISPR系统的出现, 改变了梭菌传统的基因编辑方式, 避免了ClosTron技术引起基因的极性反应, 也无需经历ACE方法回补*pyrE*的复杂过程^[6], 在梭菌的基因编辑中具有相对广泛的运用。Wang等人基于CRISPR系统将诱导表达Cas9以及质粒携带的编辑模板相结合构建基因编辑质粒, 成功实现了对*C. beijerinckii*的基因突变、缺失、整合和单核苷酸修饰^[55]; Li等基于CRISPR系统开发的质粒pNICKclos, 对*C. beijerinckii* NCIMB 8052的编辑效率达18.8%-100%; 通过突变Cas9蛋白的两个结构域而得到的dCas9, 虽然丢失了内切酶活性, 但仍能与靶位点结合, 常被设计用于有效的基因转录抑制, Li等开发的用于CRISPR干扰的质粒pdCASclos, 成功抑制了*C. beijerinckii*中*spo0A*的表达^[45]; Wang等人发现经CRISPR-dCas9转化的*C. beijerinckii*菌株的淀粉酶活性受到显著抑制^[55]; 2019年, Diallo等人改进梭菌中CRISPR编辑技术, 采用双质粒工具编辑*C. beijerinckii* DSM 6423的基因组, 首先删除了具有硫霉素抗性的*catB*基因, 使该菌株与设计的双质粒编辑系统兼容, 随后双质粒工具被用于*C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ 中, 去除了内源性pNF2质粒, 使得转化效率大幅度提高^[56], 除此之外, 为了实现精准高效的基因编辑, Li等人利用胞苷脱氨酶(Apobec1)、Cas9^{D10A}蛋白和尿嘧啶DNA糖基化酶抑制剂(UGI)开发出pCBEclos质粒, 实现碱基C-G到T-A的替换, 提高了基因编辑的精准度^[57], 对于研究*C. beijerinckii*中产溶剂机制相关核心基因的关键位点具有重要意义。这些策略不仅加快了产溶剂梭菌中基因编辑的发展步伐, 加速其在工业生生产物燃料方面的应用研究, 也为研究其他梭菌的基因编辑提供思路和方法。

3 总结与展望

本文第一部分从来源、组成以及工作机制等方面介绍了不同类型的基因编辑技术, 并指出不同技术的优缺点; 第二部分则按照时间脉络综述基因编辑技术在产溶剂梭菌中的应用, 随着基因编辑的发展, 实现了从随机失活到精准靶向失活、从低的转化效率到高效基因编辑的技术进步, 通过逐步开发完善的基因编辑工具, 产溶剂梭菌中的基因功能、ABE发酵的分子机制等逐渐被阐明, 由此可见, 基因编辑在产溶剂梭菌的生理生化特征、代谢调控、遗传改造等方面起到了核心作用, 特别是CRISPR技术的发展, 展示出应用于梭菌的广阔前景。

虽然CRISPR-Cas系统作为一种颠覆性技术, 已经被开发为强大的基因组编辑工具, 并加速了产溶剂梭菌遗传操作技术发展的进程, 但仍存在诸多问题, 在实际应用中常受到限制, 主要有以下几点:

(1) Cas蛋白引发严重的细胞毒性, 面对这一问题, 研究者利用细菌内源性CRISPR-Cas系统开发出新的基因编辑工具, Zhang等人报道了酪氨酸梭菌(*C. tyrobutyricum*) I-B型CRISPR-Cas基因工程的开发, 利用乳糖诱导CRISPR基因阵列表达启动子, 显著降低了CRISPR-Cas的毒性^[34], 提高了转

化效率,这一研究为其他具有内源性CRISPR-Cas系统的梭菌进行分子水平遗传改造提供了参考;然而,并不是所有梭菌中都天然存在CRISPR-Cas系统,例如在*C. acetobutylicum*中研究者们并未发现存在内源性CRISPR系统,面对此类梭菌,降低其Cas核酸酶的细胞毒性还将从其他研究角度进入深入探索。

(2) 同源重组效率低,大多数研究中,CRISPR基因编辑的实现依赖于NHEJ或HDR修复,但HDR的重组效率低下是CRISPR应用的一大阻碍,而NHEJ又极易出现错配,导致碱基的随机插入和失活,无法实现精准高效的基因编辑,而Gaudelli等人研究的单碱基编辑技术则可以在不造成DNA断裂的情况下,实现碱基的替换,避免了依赖HDR重组的效

率^[29];在产溶剂梭菌*C. beijerinckii*中,运用单碱基编辑技术成功构建了*pyrE*、*xylR*、*spo0A*以及*araR*的突变株^[57],实现基因精准编辑,这显示出单碱基编辑技术在产溶剂梭菌中的应用潜力,也是未来研究中重点之一。

(3) 除了Cas蛋白的毒性问题、HDR的重组效率问题,CRISPR仍面临着极具风险的脱靶问题,这也是CRISPR应用于遗传治疗方面的一大阻碍,但在产溶剂梭菌中,CRISPR的脱靶问题鲜见报道,需借鉴其他物种克服脱靶问题的研究经验,这也是产溶剂梭菌中未来的重要研究方向;总之,在面临CRISPR的诸多问题,研究者们不断优化编辑工具,开发探索新的基因编辑方式,正在为实现快速、精准、高效的基因编辑做出努力。

参考文献 [References]

- Dürre P. New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **49** (6): 639-648
- Sang YL, Jin HP, Jang SH, Nielsen LK, Kim J, Jung KS. Fermentative butanol production by clostridia [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, **101** (2): 209-228
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, **391** (6669): 806-811
- Karberg M, Guo H, Zhong J, Coon R, Perutka J, Lambowitz AM. Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, **19** (12): 1162-1167
- Heap JT, Cartman ST, Kuehne SA, Cooksley C, Minton NP. ClosTron-targeted mutagenesis [M]. Springer. 2010: 165-182.
- 洪伟, 万雯, 崔古贞, 官志忠, 齐晓岚, 禹文峰. 艰难梭菌基因编辑技术研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2020, **36** (2): 210-225 [Hong W, Wan W, Cui GZ, Guang ZZ, Qi XL, Yu WF. Advances in *Clostridiales difficile* genome editing [J]. *Chin J Biotechnol*, 2020, **36** (2): 210-225]
- Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP, Minton NP. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium* [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, **70** (3): 452-464
- Heap JT, Kuehne SA, Ehsaan M, Cartman ST, Cooksley CM, Scott JC, Minton NP. The ClosTron: mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined [J]. *J Microbiol Methods*, 2010, **80** (1): 49-55
- Terns MP, Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2011, **14** (3): 321-327
- Westra ER, Swarts DC, Staals RH, Jore MM, Brouns SJ, Van Der Oost J. The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity [J]. *Annu Rev Genet*, 2012, **46**: 311-339
- Westra ER, Dowling AJ, Broniewski JM, Van Houte S. Evolution and ecology of CRISPR [J]. *Annual Rev Ecol Evol System*, 2016, **47**: 307-331
- Amitai G, Sorek R. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, **14** (2): 67-76
- Charpentier E, Richter H, Van Der Oost J, White MF. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2015, **39** (3): 428-441
- Van Der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, **12** (7): 479-492
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, **13** (11): 722-736
- Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems [J]. *Cell*, 2017, **168** (1): 321-328
- Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, **32** (12): 1262-1267
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [J]. *Cell*, 2013, **154** (6): 1380-1389
- Calvo-Villamañán A, Ng JW, Planel R, Ménager H, Chen A, Cui L, Bikard D. On-target activity predictions enable improved CRISPR-dCas9 screens in bacteria [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48** (11): e64
- Huang H, Chai C, Li N, Rowe P, Minton NP, Yang S, Jiang W, Gu Y. CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Clostridium ljungdahlii*, an autotrophic gas-fermenting bacterium [J]. *ACS Synth Biol*, 2016, **5** (12): 1355-1361
- Horwitz AA, Walter JM, Schubert MG, Kung SH, Hawkins K, Platt DM, Hernday AD, Mahatdejkul-Meadows T, Szeto W, Chandran SS. Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-Cas [J]. *Cell systems*, 2015, **1** (1): 88-96
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41** (20): e188
- Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, Yan Z, Li D, Li J. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9 [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, **13** (6): 659-662
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, Van Der Oost J, Regev A. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. *Cell*, 2015, **163** (3): 759-771
- Hur JK, Kim K, Been KW, Baek G, Ye S, Hur JW, Ryu SM, Lee YS, Kim JS. Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleoproteins [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, **34** (8): 807-808

- 26 Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorova I, Kneppers J, Degennaro EM, Winblad N, Choudhury SR, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, **35** (1): 31-34
- 27 Tu M, Lin L, Cheng Y, He X, Sun H, Xie H, Fu J, Liu C, Li J, Chen D. A 'new lease of life': FncP1 possesses DNA cleavage activity for genome editing in human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017: e42
- 28 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
- 29 Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, **551** (7681): 464-471
- 30 Kim YB, Komor AC, Levy JM, Packer MS, Zhao KT, Liu DR. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, **35** (4): 371-376
- 31 Nolling J, Breton G, Omelchenko MV, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, Lee HM, Dubois J, Qiu D, Hitti J. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum* [J]. *J Bacteriol*, 2001, **183** (16): 4823-4838
- 32 Croux C, Lee J, Raynaud C, Saint-Prix F, Gonzalez-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Soucaille P. Construction of a restriction-less, marker-less mutant useful for functional genomic and metabolic engineering of the biofuel producer *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2016, **9** (1): 1-13
- 33 Dong H, Zhang Y, Dai Z, Li Y. Engineering *Clostridium* strain to accept unmethylated DNA [J]. *PLoS ONE*, 2010, **5** (2): e9038
- 34 Zhang J, Zong W, Hong W, Zhang ZT, Wang Y. Exploiting endogenous CRISPR-Cas system for multiplex genome editing in *Clostridium tyrobutyricum* and engineer the strain for high-level butanol production [J]. *Metab Eng*, 2018, **47**: 49-59
- 35 Wang Y, Zhang ZT, Seo SO, Lynn P, Lu T, Jin YS, Blaschek HP. Bacterial genome editing with CRISPR-Cas9: deletion, integration, single nucleotide modification, and desirable "clean" mutant selection in *Clostridium beijerinckii* as an example [J]. *ACS Synth Biol*, 2016, **5** (7): 721-732
- 36 Ventura JRS, Hu H, Jahng D. Enhanced butanol production in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by double overexpression of 6-phosphofructokinase and pyruvate kinase genes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, **97** (16): 7505-7516
- 37 Cooksley CM, Zhang Y, Wang H, Redl S, Winzer K, Minton NP. Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway [J]. *Metab Eng*, 2012, **14** (6): 630-641
- 38 Yang Y, Nie X, Jiang Y, Yang C, Gu Y, Jiang W. Metabolic regulation in solventogenic clostridia: regulators, mechanisms and engineering [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, **36** (4): 905-914
- 39 Green EM, Bennett GN. Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **57** (1): 213-221
- 40 Green EM, Boynton ZL, Harris LM, Rudolph FB, Papoutsakis ET, Bennett GN. Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. *Microbiology*, 1996, **142** (8): 2079-2086
- 41 Desai RP, Papoutsakis ET. Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (3): 936-945
- 42 Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET. Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [J]. *J Bacteriol*, 2002, **184** (13): 3586-3597
- 43 Shao L, Hu S, Yang Y, Gu Y, Chen J, Yang Y, Jiang W, Yang S. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Cell Res*, 2007, **17** (11): 963-965
- 44 Heap JT, Ehsaan M, Cooksley CM, Ng YK, Cartman ST, Winzer K, Minton NP. Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40** (8): e59
- 45 Li Q, Chen J, Minton NP, Zhang Y, Wen Z, Liu J, Yang H, Zeng Z, Ren X, Yang J. CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii* [J]. *Biotechnol J*, 2016, **11** (7): 961-972
- 46 Wasels F, Jean-Marie J, Collas F, López-Contreras AM, Ferreira NL. A two-plasmid inducible CRISPR/Cas9 genome editing tool for *Clostridium acetobutylicum* [J]. *J Microbiol Methods*, 2017, **140**: 5-11
- 47 Wasels F, Chartier G, Hocq R, Lopes Ferreira N. A CRISPR/anti-CRISPR genome editing approach underlines the synergy of butanol dehydrogenases in *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, **86** (13): 408-420
- 48 Wilding-Steele T, Ramette Q, Jacottin P, Soucaille P. Improved CRISPR/Cas9 tools for the rapid metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22** (7): 3704
- 49 Pyne ME, Bruder MR, Moo-Young M, Chung DA, Chou CP. Harnessing heterologous and endogenous CRISPR-Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium* [J]. *Sci Rep*, 2016, **6** (1): 1-15
- 50 Campbell AM. Episomes [J]. *Adv Genet*, 1963, **11**: 101-145
- 51 Wilkinson SR, Young M. Targeted integration of genes into the *Clostridium acetobutylicum* chromosome [J]. *Microbiology*, 1994, **140** (1): 89-95
- 52 Bellido C, Pinto ML, Coca M, González-Benito G, García-Cubero MT. Acetone-butanol-ethanol (ABE) production by *Clostridium beijerinckii* from wheat straw hydrolysates: efficient use of penta and hexa carbohydrates [J]. *Bioresour Technol*, 2014, **167**: 198-205
- 53 Minton NP, Ehsaan M, Humphreys CM, Little GT, Baker J, Henstra AM, Liew F, Kelly ML, Sheng L, Schwarz K. A roadmap for gene system development in *Clostridium* [J]. *Anaerobe*, 2016, **41**: 104-112
- 54 Little GT, Willson BJ, Heap JT, Winzer K, Minton NP. The butanol producing microbe *Clostridium beijerinckii* NCIMB 14988 manipulated using forward and reverse genetic tools [J]. *Biotechnol J*, 2018, **13** (11): 1700711
- 55 Wang Y, Zhang ZT, Seo SO, Lynn P, Lu T, Jin YS, Blaschek HP. Gene transcription repression in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR-dCas9 [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, **113** (12): 2739-2743
- 56 Diallo M, Hocq R, Collas F, Chartier G, Wasels F, Wijaya HS, Werten MW, Wolbert EJ, Kengen SW, Van Der Oost J. Adaptation and application of a two-plasmid inducible CRISPR-Cas9 system in *Clostridium beijerinckii* [J]. *Methods*, 2020, **172**: 51-60
- 57 Li Q, Seys FM, Minton NP, Yang J, Jiang Y, Jiang W, Yang S. CRISPR-Cas9D10A nickase-assisted base editing in the solvent producer *Clostridium beijerinckii* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019, **116** (6): 1475-1483