

## · 综 述 ·

## 微生物大片段 DNA 染色体整合技术研究进展

吴雨薇<sup>1,2</sup>, 姜卫红<sup>1\*</sup>, 顾阳<sup>1\*</sup>

1 中国科学院分子植物科学卓越创新中心 中国科学院合成生物学重点实验室, 上海 200032

2 中国科学院大学, 北京 100049

吴雨薇, 姜卫红, 顾阳. 微生物大片段 DNA 染色体整合技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 842-857.

WU Yuwei, JIANG Weihong, GU Yang. Chromosomal integration of large DNA fragments in microorganisms: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 842-857.

**摘 要:** 现代生物发酵工业聚焦于设计和创制高效的微生物细胞工厂, 以实现原料向目标产品的定向转化。评判微生物细胞工厂性能优劣的主要标准是其合成能力及稳定性。由于质粒系统存在拷贝数不稳定、易于丢失等局限性, 在菌株改造中将基因或产物合成途径整合至染色体上实现稳定表达通常是更优的选择。因此, 染色体的基因整合技术作为实现这一目标的重要手段已受到广泛关注, 并得到快速发展。本综述梳理了近年来微生物大片段 DNA 染色体整合方法的研究进展, 归纳了各种技术的原理和特点, 尤其是新兴的 CRISPR 相关转座系统, 同时对未来的发展重点和方向进行了展望。

**关键词:** 微生物; 大片段 DNA; 染色体整合; 细胞工厂

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103500); 上海市科学技术委员会科研计划(21DZ1209100); 中国科学院洁净能源创新研究院合作基金(DNL202013); 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-KJGG-016-01)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103500), the Science and Technology Commission of the Shanghai Municipality (21DZ1209100), the DNL Cooperation Fund, Chinese Academy of Sciences (DNL202013), and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-016-01).

\*Corresponding authors. GU Yang. Tel: +86-21-54924284, E-mail: ygu@cemps.ac.cn;

JIANG Weihong. Tel: +86-21-54924172, E-mail: wjiang@cemps.ac.cn

Received: 2022-09-14; Accepted: 2022-11-01; Published online: 2022-11-10

# Chromosomal integration of large DNA fragments in microorganisms: a review

WU Yuwei<sup>1,2</sup>, JIANG Weihong<sup>1\*</sup>, GU Yang<sup>1\*</sup>

1 CAS Key Laboratory of Synthetic Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

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

**Abstract:** The modern bio-fermentation industry requires design and creation of efficient microbial cell factories for directed conversion of raw materials to target products. The main criteria for assessing the performance of microbial cell factories are their product synthesis capacity and stability. Due to the deficiencies of plasmids in gene expression such as instability and being easy to lose, integration of genes into chromosome is often a better choice for stable expression in microbial hosts. To this end, chromosomal gene integration technology has received much attention and has developed rapidly. In this review, we summarize the recent research progresses of chromosomal integration of large DNA fragments in microorganisms, illustrate the principles and features of various technologies, highlight the opportunity brought by the CRISPR-associated transposon systems, and prospect future research direction of this technology.

**Keywords:** microorganisms; large DNA fragments; chromosomal integration; cell factories

微生物细胞可通过设计改造被用于合成高附加值的非天然代谢产物。目前已知的利用微生物细胞工厂生产的产品大致包含以下几类：药用蛋白质及其生物衍生物、工业酶类、非蛋白药物及其生物衍生物以及大宗化学品，这些产品每年可以产生上千亿美元的经济价值<sup>[1]</sup>。作为底盘细胞的微生物需要满足大规模生物发酵要求，既能够在工业规模发酵罐中以廉价的培养基为原料高密度快速生长，又能高效地生产目标产物<sup>[2-3]</sup>。鉴于天然的野生型微生物产物种类有限，因此，研究者们聚焦于一些遗传背景较为清楚、遗传操作较为便利的模式生物构建新产物合成途径，如大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[4]</sup>、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[5]</sup>、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)等<sup>[6]</sup>。此外，梭菌属<sup>[7]</sup>、芽孢杆菌属<sup>[8]</sup>、假单胞菌属<sup>[9]</sup>及弧菌属<sup>[10]</sup>的一些微生物因具有生理和代谢上

的特定优势也受到较多关注，被用于细胞工厂的构建。然而，设计和构建优良的微生物底盘细胞就需要发展在体内稳定、高效表达含有生物合成途径的外源大片段 DNA 的分子工具，这也是目前微生物遗传改造的难点。

质粒是目前生命科学研究中不可或缺的工具，是研究功能基因的基本手段，也是最早且最广泛应用于蛋白表达的分子载体，有效助力了生物技术产业生产药用蛋白质、抗体、疫苗、工业酶和分子诊断剂等重要产品<sup>[11]</sup>。然而，依赖质粒系统的工业发酵存在以下缺点：(1) 质粒容量有限；(2) 遗传的不稳定性；(3) 需要额外地选择压力维持质粒在细胞内的表达，不利于大规模工业发酵的过程控制<sup>[12-13]</sup>。因此，将外源基因整合至宿主微生物的染色体进行表达逐渐成为构建微生物细胞工厂的首选<sup>[14]</sup>。近年来，随着细菌基因组编辑技术日新月异，

大片段 DNA 在微生物染色体上的整合技术也得到迅速发展。外源 DNA 在微生物染色体上的整合技术可以通过多种方式实现(图 1), 如利用内源或外源的整合酶、转座酶、重组酶等, 这些技术进一步与成簇规律间隔短回文重复序列及相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas), CRISPR-Cas)体系结合可显著提高效率以及拓展适用场景<sup>[15-21]</sup>。最新的 CRISPR 相关转座系统可以实现在不依赖于宿主同源重组系统和 DNA 双链断裂的条件下将

靶基因插入至宿主菌基因组上, 尤其值得我们关注<sup>[22-27]</sup>。

## 1 基于同源重组的染色体基因整合技术

同源重组(homologous recombination, HR)是一种在两个 DNA 分子的同源序列之间直接进行交换的重组形式<sup>[28]</sup>, 广泛存在于细菌、古菌和真核生物中, 是生物进化的动力及 DNA 修复的一种手段。自然状态下, 细菌中同源重

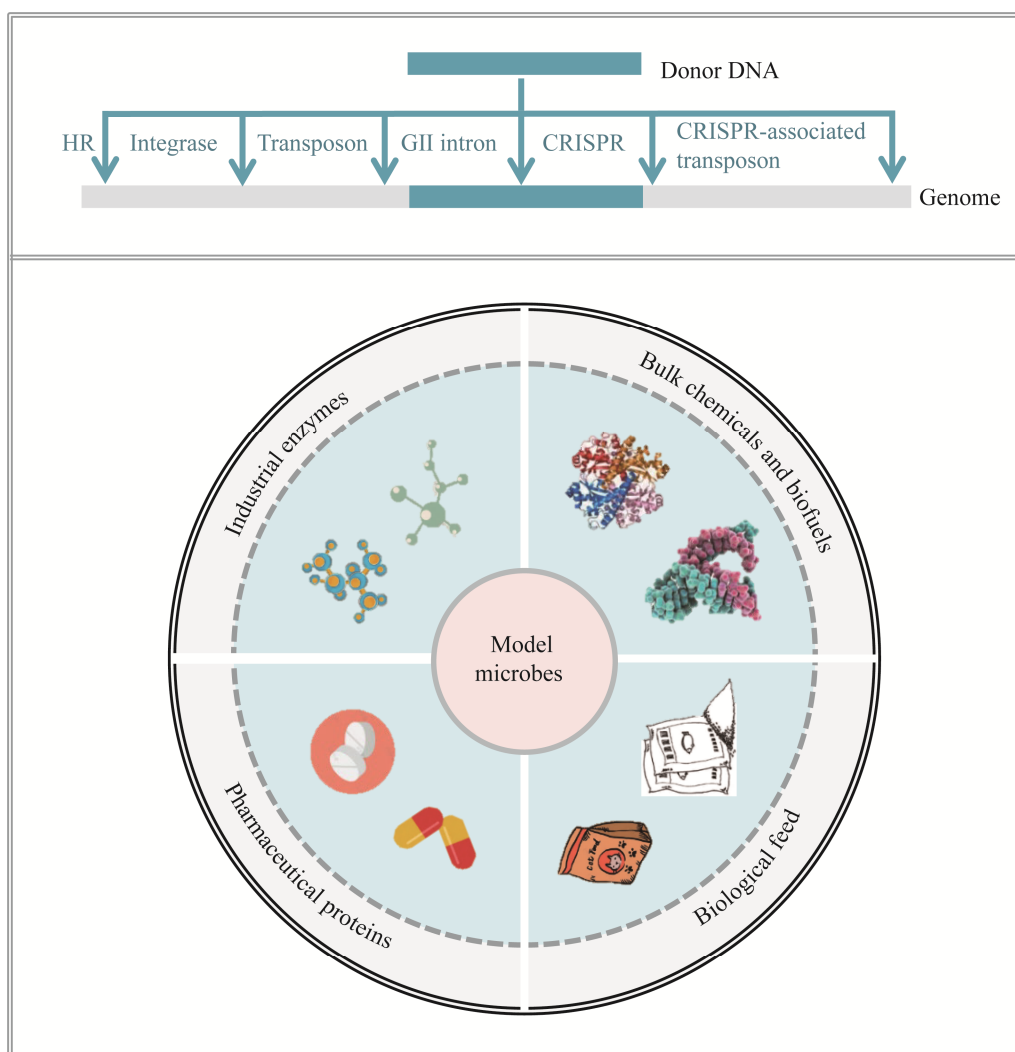


图 1 大片段 DNA 整合技术在微生物细胞工厂构建中的作用

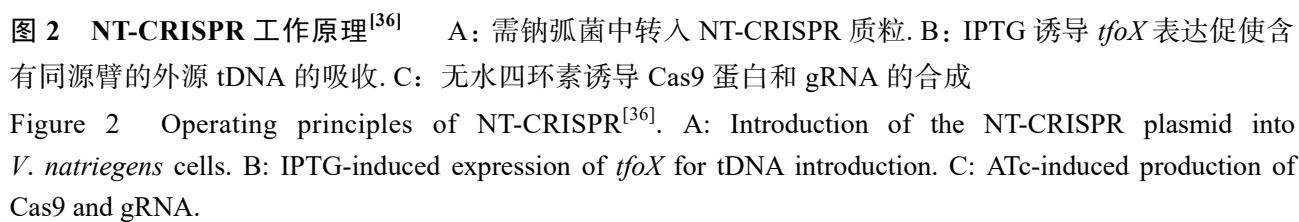
Figure 1 The role of chromosome integration of large DNA fragments in developing microbial cell factories.

组的发生涉及到多个蛋白的协同作用,包括 RecBCD 复合体识别基因组上的 *Chi* 位点并切割, RecA 识别和结合 DNA 单链末端,并搜索同源序列完成链入侵实现单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 置换,以及 DNA 聚合酶修补缺口完成同源重组<sup>[29]</sup>。在实际操作中,通过对两端同源臂的设计,在细菌细胞中引入含有同源臂和抗性筛选标签的线性 dsDNA (double-stranded DNA, dsDNA) 片段就可以筛选到外源 DNA 在宿主染色体上成功整合的阳性克隆。但是,细菌内源性 RecBCD 不仅可以催化同源重组,还可以降解线性 dsDNA。因此,当利用大肠杆菌的重组系统进行基因编辑时,需导入足够多的 dsDNA 片段,同时还必须抑制内源性重组系统对 dsDNA 的降解。

研究者早期主要是通过同源重组方式实现外源 DNA 片段在染色体上的整合。例如,在 1979 年的一项研究中,科研人员通过同源定向修复(homology-directed repair, HDR)在酿酒酵母的基因组上整合了大约 1 kb 的 DNA 片段,但自然状态下的微生物同源重组效率通常较低(小于  $1/10^3$ – $1/10^4$ )<sup>[30]</sup>,因此研究者又发展了一系列提高同源重组效率或重组事件筛选通量的方法,例如引入抗性基因标签、引入序列特异性双链断裂或外源重组系统等<sup>[12,25,30]</sup>。2000 年, Datsenko 等将  $\lambda$  噬菌体的重组系统( $\lambda$ Red 操纵子)在大肠杆菌细胞中表达,显著提高了大肠杆菌的同源重组效率<sup>[31]</sup>。Rac 前噬菌体来源的 RecET 也可以显著提高同源重组的效率。RecE 为外切核酸酶, RecT 为单链退火蛋白。目前,  $\lambda$ Red 系统和 RecET 系统已经被广泛应用于微生物菌种的改造中<sup>[31–33]</sup>。2009 年, Wang 等开发了多重自动化基因组工程(multiple automated genome engineering, MAGE),可以同时靶向基因组的不同位置,在单个细胞或整个细胞群中

进行修饰以产生组合基因组多样性<sup>[34]</sup>。MAGE 系统利用  $\lambda$ -Red 系统的单链退火蛋白 Beta,在大肠杆菌 DNA 复制的过程中将 ssDNA 或寡核苷酸引导至复制叉的滞后链,从而实现等位基因置换。近年来,需钠弧菌(*Vibrio natriegens*)因其极短的倍增时间(<10 min)而受到广泛关注。在自然状态下,需钠弧菌能够吸收环境中游离的 DNA 片段并通过同源重组整合到基因组中<sup>[35]</sup>。2022 年,研究者建立了一套适用于需钠弧菌的高效 DNA 编辑技术,称为 NT-CRISPR (natural transformation with a CRISPR-Cas9-based counter selection strategy)。该方法基于同源重组,借助 CRISPR/Cas 系统作为筛选工具,能够在没有抗生素作为筛选压力的条件下以接近 100% 的效率进行需钠弧菌的基因缺失、整合和点突变(图 2)<sup>[36]</sup>。

值得一提的是,除同源重组外,生物体内还有两种修复 DNA 双链断裂的方式——非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ)和微同源介导的末端连接(microhomology-mediated end-joining, MMEJ)。这两种修复机制也被研究者开发成分子工具用于染色体上的 DNA 片段整合。非同源末端连接不需要同源序列,是一种依赖于多功能酶(核酸酶、聚合酶、连接酶) ligase D (LigD) 和 DNA 结合蛋白 Ku 的双组分系统。Ku 蛋白以同二聚体化的形式结合 DNA 末端,招募 LigD,催化 DNA 末端的加工和连接<sup>[37]</sup>。目前,研究者已利用 NHEJ 在多种微生物如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolitica*)和某些丝状真菌的染色体上成功整合了外源 DNA 片段<sup>[38–40]</sup>。这一方法的不足是可能会产生双链断裂连接处的小片段的插入或者缺失<sup>[37]</sup>。微同源介导的末端连接主要是应用于哺乳动物细胞中,在细菌中极少使用,在此就不作详细阐述了。



## 2 整合酶介导的染色体基因定点整合

温和性噬菌体感染新宿主后会在适当的条件下将自身核酸整合至宿主的染色体中,该过程由噬菌体编码的整合酶介导。根据序列的同源性和作用机制的不同,噬菌体编码的整合酶被分为两大类,丝氨酸整合酶(DNA 断裂和重新连接的过程中形成磷酸丝氨酰键)和酪氨酸整合酶(DNA 断裂和重新连接的过程中形成磷酸酪氨酰键)<sup>[41]</sup>。酪氨酸整合酶家族中最为人们熟知的是来自 P1 噬菌体的 Cre 蛋白和其识别位点 *loxP*。*loxP* 是一段 34 bp 的两端含有 13 bp 反向重复的且具有方向性的特殊序列。Cre 蛋白分别与 *loxP* 上的反向重复序列结合形成二聚体,然后和另一个结合有 *loxP* 的 Cre 蛋白结合形成四聚体,通过 Cre 的催化和基团之间的相互取代,形成一个类似于 Holliday 的接头并完成链置换<sup>[42]</sup>。当一个环形双链 DNA 分子上含有一个 *loxP* 且菌株基因组上也含有一个 *loxP* 时,环形分子上的 DNA 片段就能够整合到基

因组 DNA 上。在宿主微生物的染色体上引入 *loxP*, 并对 *loxP* 的方向进行设计,还可以实现特定 DNA 片段的剪切、易位和倒位<sup>[43]</sup>。绝大多数酪氨酸整合酶的重组机制都和 Cre-*loxP* 类似,但  $\lambda$  Int (来源于  $\lambda$  噬菌体的酪氨酸整合酶)发挥功能还需要宿主菌的 IHF 蛋白参与<sup>[44]</sup>。

丝氨酸整合酶发挥功能不需要宿主菌蛋白的参与,能完全独立地催化重组反应。该整合酶识别病毒 DNA 的 *attP* 位点和宿主菌染色体上 *attB* 位点中一段特异性 DNA 序列(两个位点发生交叉的地方都含有一个 TT 二核苷酸),进而通过催化 *attP* 和 *attB* 位点的重组将噬菌体核酸整合到宿主染色体中。在整合过程中,丝氨酸整合酶与 *attP* 和 *attB* 结合形成两个二聚体,引导两个位点之间结合形成四聚体,催化丝氨酸残基进攻 DNA 链,催化链置换并形成两个新的附着位点 *attL* 和 *attR* (图 3A)。此外,在噬菌体编码的重组方向因子(recombination directionality factor, RDF)的帮助下,整合上去的原噬菌体核酸也可通过 *attL* 和 *attR* 序列之间的位点特异性重组被重新切割下来<sup>[45]</sup>。 $\phi$ C31 是一种来源于

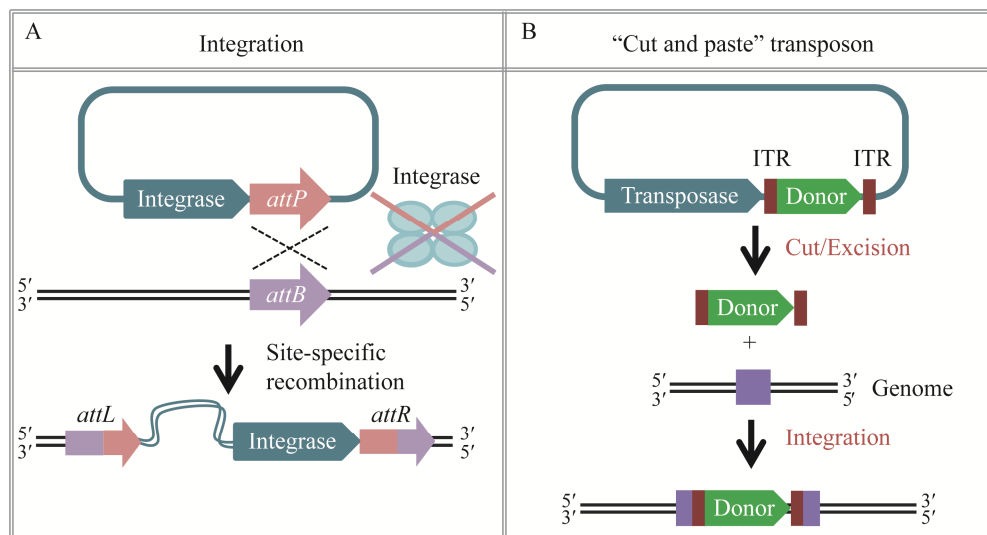


图 3 整合酶和“剪切-粘贴”型转座子的工作原理

Figure 3 Integrases and the “cut-and-paste” transposon system.

链霉菌噬菌体的比较有代表性的丝氨酸整合酶,能介导 *attP* 和 *attB* 之间的位点特异性整合,有研究报道  $\phi$ C31 还能介导外源 DNA 在某些真核生物细胞基因组的“假 *attP*”位点的整合<sup>[46]</sup>。2012 年,研究者利用  $\phi$ C31 和新型细菌人工染色体(bacteria artificial chromosome, BAC)在链霉菌中构建了 BAC 文库,将大小超过 100 kb 的 BAC 质粒引入宿主菌中实现功能基因的表达<sup>[47]</sup>。此外,研究者利用丝氨酸重组酶介导的位点特异性整合,成功将天然产物合成基因簇整合到了放线菌的基因组中<sup>[48]</sup>。

除了噬菌体编码的酪氨酸整合酶和丝氨酸整合酶外,在细菌中还广泛存在一类特殊的整合和接合元件(integrative and conjugative element, ICE)。ICE 是一大类可移动遗传元件,能够像接合质粒一样通过接合转移到新的宿主中,并被整合到受体细胞染色体中,通过宿主复制和细胞分裂被动繁殖<sup>[49-50]</sup>。不同菌株来源的 ICE 的大小差异很大(20–500 kb),通常含有抗生素抗性基因,共生或毒力相关基因,因此其整合到受体菌株中后能够促进受体菌的进化<sup>[51-52]</sup>。2018 年,Christopher A. Voigt 团队利用枯草芽孢杆菌来源的 ICE Bs1 构建了一个工程菌株 XPORT,该菌株能够将含有异源 DNA 的 mini-ICE 转移到来源于土壤、肠道和皮肤的几十种细菌中,并整合至受体菌株的染色体上。即使在非标准的实验条件下,例如直接将 XPORT 和受体菌株一起添加到无菌土壤中共孵育,一周后也能在受体菌株中检测到整合事件的发生<sup>[53]</sup>。

### 3 转座子介导的染色体基因随机整合

转座子(transposon)最早被称为跳跃基因,广泛分布于真核生物和原核生物中,是一段特

殊的 DNA 序列,能够通过自我切除或单独复制得到一个与自身完全相同的 DNA 序列,在转座酶的作用下插入宿主基因组内的新位置或插入同一细胞中存在的其他 DNA 分子中。作为一种遗传工具,转座子广泛被用于插入失活、基因标记、大片段整合和测序<sup>[54]</sup>。

转座子主要由转座酶和转座序列两部分组成。根据转座机制的不同,转座子大致可以分为通过“剪切-粘贴”机制进行复制的 DNA 转座子和通过“复制-粘贴”机制进行转座的逆转座子。而根据插入位点的偏好性,转座子又可分为随机插入型转座子和位点特异插入型转座子。随机插入型转座子没有特异的识别位点,倾向于在基因组的任意位置随机插入,位点特异插入型转座子需要基因组上存在特异的识别序列,在识别位点上或识别位点附近进行整合。随机插入型转座子主要包括有来自于果蝇的 Mariner 转座子、来源于噬菌体的 Mu 转座子和来源于细菌的 Tn 系列转座子(如 Tn5)等。位点特异性转座子主要包括识别保守序列的转座子 Is605 等<sup>[55]</sup>和识别专一位点的转座子 Tn7 等<sup>[20]</sup>。

Mariner 转座子和 Tn7 转座子是目前研究得较为清楚的两个转座子。Mariner 转座子最早在毛里求斯果蝇中被发现,后来发现在脊椎动物、节肢动物、线虫中也广泛分布,是自然界中分布最广的转座子家族之一<sup>[56-57]</sup>。Mariner 转座子家族是 DNA 转座子,遵循“剪切-粘贴”的转座模式,转座发生时,转座酶会特异性识别转座子两侧正向或反向重复序列形成同源二聚体,将重复序列和中间的 DNA 序列精确切除下来,携带着整合到基因组上任意 TA 二核苷酸中间,此过程不需要任何除了复制、修复、翻译以外的其他宿主因子的参与(图 3B)。Mariner 转座子作为一种遗传工具,具有广泛的适用性,在细菌、真菌甚至哺乳细胞中都能



发挥作用,且该转座子可携带较大的 DNA 片段在染色体上实现插入<sup>[58]</sup>。但催化该转座系统的 Himar1 转座酶的效率较低。通过对 Himar1 转座酶的突变,科学家得到了一个转座效率提高 50 倍的 Himar1 突变体——Himar1C9<sup>[59]</sup>,极大地提升了 Mariner 转座子的工作效率。

Tn7 转座子是一个比较特殊的转座子,它是一个位点特异插入型转座子但同时也包含有“随机”转座的相关机制。Tn7 转座子含有转座序列和 5 个转座相关蛋白: TnsA、TnsB、TnsC、TnsD、TnsE<sup>[60]</sup>。TnsA 和 TnsB 是核酸内切酶,负责将转座元件从原位点切割下来并将其连接到目标位点; TnsC 是一种调控蛋白 ATPase; TnsD 是 TniQ 蛋白家族成员,能够特异性识别 *glms* 基因下游的保守 *attTn7* 位点,引导的转座事件在此发生; TnsE 识别质粒和丝状噬菌体中特定的 DNA 结构,如滞后链合成过程

中冈崎片段上出现的 3'凹陷末端<sup>[61-64]</sup>。简言之, Tn7 转座事件的发生包括两条途径: 一条途径利用 TnsD 识别宿主的保守附着位点 (*attTn7*), 将目标基因整合在该识别位点的下游序列中; 另一条途径利用 TnsE 优先将转座靶向移动质粒和丝状噬菌体, 促进这些元件转移到新的宿主。由于大多数菌株都含有 *glms* 基因, Tn7 转座子被广泛应用于革兰氏阴性菌的染色体整合<sup>[65-66]</sup>。有些细菌(如伯克氏菌属)还含有多个 *glms* 基因, 当向这些菌株中转入 Tn7 系统时, 可以整合到目标菌株染色体的多个位点, 转座效率超过 90%<sup>[67]</sup>。

此外, 国外研究者最近报道了一种将转座酶与 Cre 重组酶结合使用的正交系统, 即底盘非依赖性重组酶辅助基因组工程(chassis-independent recombinase-assisted genome engineering, CRAGE) (图 4)。CRAGE 首先利用转座子将 Cre 重组酶的

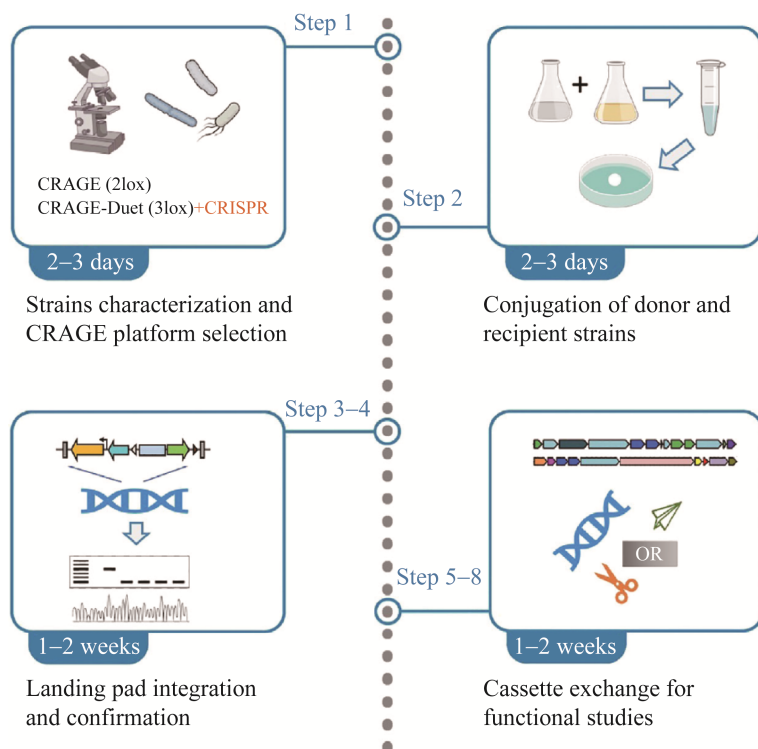


图 4 CRAGE 的基本工作流程<sup>[68]</sup>

Figure 4 The basic process of CRAGE<sup>[68]</sup>.



编码基因和抗性基因整合至宿主菌的基因组上,并引入两个可被重组酶识别的 *lox* 位点(*lox5171*、*loxP*),使得后续包含对应 *loxP* 位点的基因片段可在 Cre 重组酶的作用下替换 *cre* 基因和抗性基因,实现在染色体上的整合。在 CRAGE 基础上,研究者又通过转座在宿主菌染色体上同时引入了 3 个 *lox* 位点(*lox5171*、*loxP*、*lox2272*),建立了可进行两轮次整合的 CRAGE-Duet 系统<sup>[68]</sup>。

## 4 II类内含子介导的染色体基因整合

II类内含子又称为逆转录转座子,是一类可移动遗传元件,存在于细菌、古菌及某些真核生物的线粒体和叶绿体 DNA 中,尤其在细菌中比较普遍<sup>[69-70]</sup>。II类内含子中包含编码自剪接核酶和逆转录酶的开放阅读框。逆转录酶可与内含子 RNA 结合,并促进内含子 RNA 自剪切,由此产生内含子 RNA 和逆转录酶结合的核糖蛋白质复合物 RNP。稳定的 RNP 复合物通过 RNA 中的特定碱基序列识别 DNA 上的靶点,实现内含子 RNA 在 DNA 上的整合。插入的内含子 RNA 序列可作为模板被逆转录酶转录成 cDNA,并通过后续的 DNA 重组或修复机制被整合到宿主的基因组中(图 5)<sup>[71]</sup>。II类内含子根据识别目标位点的方式不同,可进一步细分为 IIA、IIB、IIC。其中最常用的是来自于乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的 IIA 类内含子 L1.LtrB,其具有很高的靶标特异性。内含子 RNA 由 6 个结构域组成,最大的结构域 I 包含有 3 个序列基序 EBS1、EBS2 和  $\delta$ ,通过与外显子中的 IBS1、IBS2、 $\delta'$  互补碱基序列配对识别 DNA 靶位点<sup>[70,72]</sup>。

根据 II 类内含子的基本特性,通过设计 EBS1、EBS2 和  $\delta$  的序列,可以驱使内含子 RNA 插入到不同的 DNA 链,由此衍生了 Targetron

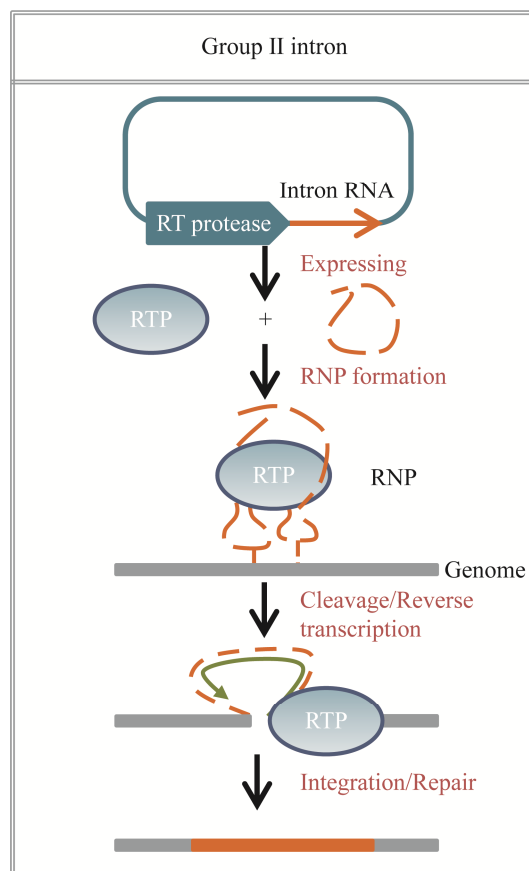


图 5 II类内含子的基本工作原理

Figure 5 Operating principle of group II introns.

基因敲除技术,并被用于在细菌中进行基因的插入失活<sup>[73-75]</sup>。Targetron 技术也被用于传递染色体上的基因整合。例如,研究者利用乳球菌修饰后的 II 类内含子将绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 基因插入至乳球菌的转座酶编码基因 *tra904* 中。由于 *tra904* 在乳球菌染色体上具有多个拷贝,因此实现了 *gfp* 基因的多位点整合<sup>[69]</sup>。

除此之外,研究者还利用修饰后的 L1.LtrB 在乳球菌基因组上成功整合了噬菌体抗性基因、四环素标记基因等,均能在菌体细胞内稳定表达<sup>[76]</sup>。然而,在用于基因传递时,修饰后 II 类内含子的插入效率不稳定,且 II 类内含子可装载的货物基因大小有限,最大 1.8 kb,很

难进行更大片段的整合<sup>[74]</sup>。

## 5 结合 CRISPR-Cas 系统的染色体基因定向整合

上述的染色体 DNA 整合技术各有特点,但在效率、精准度以及便利性方面均存在不足。基于 CRISPR-Cas 的基因组编辑技术的出现为这一类遗传操作提供了全新的选择。2019 年,研究者将来源于噬菌体的丝氨酸整合酶和 CRISPR-Cas9 系统联用,利用两套整合酶体系在永达尔梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)的染色体上引入了丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)来源的丁酸合成途径(8.5 kb),得到了一个能够发酵合成气生产丁酸的工业菌株<sup>[18]</sup>。同年,研究者将 dCas9 与转座酶 Hsmar1 或 Himar1C9 融合表达,利用合成的转座酶-dCas9 融合蛋白在无细胞反应体系中实现定向转座;此外,这套系统也被证明在大肠杆菌中能靶向质粒实现 DNA 的定向整合<sup>[16,19]</sup>。

2017 年,有研究者进行了一项对细菌和古菌基因组的生物信息学调查,发现许多类似 Tn7 的转座子,其包含由 Cas8f、Cas5f、Cas7f 和 Cas6f 组成的最小 I-F 型 Cas 蛋白和一个 CRISPR 短序列,或者包含类似截短的 I-B 型 Cas 蛋白和 CRISPR 短序列。在这些类似 Tn7 的转座子中,CRISPR 基因座(cascade)替代了 Tn7 转座子中具有随机靶向功能的转座酶 TnsE,充当了一种基因补体的功能。这种转座子相关的 CRISPR-Cas 系统的特殊组成意味着它们能够进行前体 CRISPR RNA (pre-crRNA)的加工,产生成熟的 crRNA 和靶标结合,但不能完成对外源 DNA 所需的靶标切割<sup>[24]</sup>。2019 年,另一项生物信息学的研究结果显示,上述类似 Tn7 的转座子捕获了 3 种能够识别靶位点但没有切割活性的

Cas 变体,包括更小的 I-F 和 I-B 型 Cas 蛋白以及 1 个无核酸酶活性的 II 类 Cas 蛋白(V-K 型)<sup>[77]</sup>。研究者发现这些 CRISPR-cas 变体不参与宿主抵御外源 DNA,推测其可能介导遗传元件的传播,由此也提出了 CRISPR 系统的新功能及其与移动遗传元件之间的进化关系,即前者可能通过与后者的整合为其发挥功能提供优势,例如增强转座子的可移动性<sup>[78]</sup>。

2019 年, Sternberg 团队和张锋团队分别发表文章,利用上述 CRISPR-Cas 系统指导相关转座酶可实现目标基因的定点插入(图 6)。Sternberg 团队关注的是霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*) CRISPR 相关转座系统(VchCAST)。VchCAST 包含 3 个质粒,即 pDonor、pTnsABC 和 pQCascade。其中 pTnsABC 编码 3 个转座酶相关基因 TnsA、TnsB、TnsC; pQCascade 编码 TniQ 和 I-F 型 DNA 靶向复合物 cascade。TniQ 既可以和 cascade

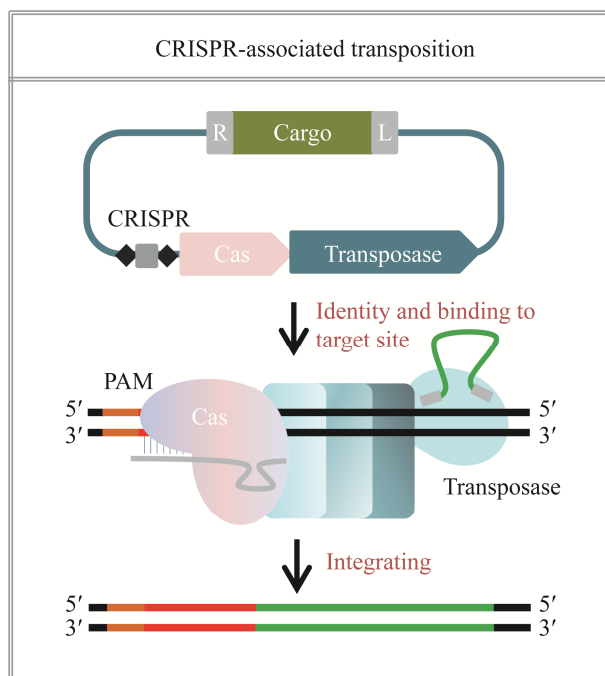


图 6 CRISPR 相关转座

Figure 6 CRISPR-associated transposition.

相互作用,也可以与调控蛋白 TnsC 相互作用,后者可招募 TnsA 和 TnsB 转座酶,因此可携带转座子至目标位点实现基因插入。研究者发现插入事件通常发生在目标序列下游 47–51 bp 的位置,存在 2 个插入方向,遗留 5 bp 的 Tn7 转座疤痕,这是 Tn7 转座事件发生的标志性特征<sup>[22]</sup>。2021 年, Sternberg 团队采用质粒骨架 pBBR1 装载所有的转座相关原件,单启动子 T7 驱动所有元件表达,构建了 CRISPR 相关转座系统 INTEGRATE (insert transposable elements by guide RNA-assisted targeting),使转座效率比原先的三质粒系统提高了近 1 倍,所携带的基因大小也提高到 10 kb 以上<sup>[25]</sup>。单质粒系统的整合具有方向性偏好,更便于后续的基因型检测。同时,通过整合酶和重组酶的正交结合使用,这一系统还可以在基因组上实现同步的多重基因插入或缺失<sup>[25]</sup>。INTEGRATE 系统的不足之处在于组分较多、载体较大,从而影响了可操作性,并在实际应用中会对插入的 DNA 片段大小有较大限制。

张锋团队聚焦一种来自于蓝藻(*Scytonema hofmanni*)的 CRISPR 相关转座系统(ShCAST),其由 V-K 型 CRISPR 效应复合物和 3 个转座酶 TnsB、TnsC、TniQ 组成。CRISPR 效应复合物将转座酶引导至目标位点,ShCAST 则通过在原间隔体下游 60–66 个碱基对的位置单向插入 DNA 片段,从而实现 RNA 引导的 DNA 转座。在没有使用抗生素进行筛选的情况下,ShCAST 整合 DNA 片段至大肠杆菌染色体的频率高达 80%<sup>[23]</sup>。2021 年,又有研究者从结构生物学和生化的角度解析了 V 型 CRISPR 转座子系统的具体作用机制,为后续进一步优化 CRISPR 相关转座子系统作为位点特异性整合工具提供了有价值的信息<sup>[79]</sup>。与 INTEGRATE

相比,shCAST 的质粒元件更小,理论上可以整合更大的 DNA 片段。2022 年,国内的俞汉青团队利用优化的 shCAST 系统在奥奈达希瓦氏菌(*Shewanella oneidensis*) MR-1 的染色体上成功整合了 >30 kb 的 DNA 片段,拓宽了该菌的底物谱<sup>[80]</sup>。

自上述两种 CRISPR 相关转座系统被开发成大片段 DNA 染色体整合工具以来,更多的研究者开始拓展该系统的应用范围。例如,国内的杨晟团队也基于 VchCAST 开发了多重染色体整合工具,设计了 CRISPR 相关转座子靶向细菌基因组中的多拷贝 IS 位点,可获得染色体上插入 10 个目标基因拷贝的菌株<sup>[27]</sup>。2021 年,该研究团队还发现了一种来源于透明假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas translucida*) KMM520 的新型 CAST (PtrCAST) 系统。PtrCAST 最大的特点和优势是没有原间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 序列的偏好性,相较于 VchCAST 能够携带更大的基因片段进行整合。通过将 PtrCAST 与 VchCAST 联合使用,可以将基因片段插入各自的靶位点而不会互相干扰<sup>[26]</sup>。Jennifer A. Doudan 研究团队则将 CRISPR 相关转座系统直接靶向菌群,利用这种方式在微生物群落中快速筛选出可以进行遗传改造的菌株<sup>[81]</sup>。总体来讲,CRISPR 相关转座系统不依赖同源重组,能够以 RNA 为导向靶向插入到基因组的不同位置,转座效率较高,可携带的基因片段较大,同时具备高效、精确、可编程的优势,有很广泛的应用前景。

综上所述,现有的大片段 DNA 染色体整合方式存在着各自的优势及不足(表 1)。研究者们可以根据不同的研究需要以及不同底盘细胞的特性采用最适的技术方法。

表 1 大片段 DNA 染色体整合技术的比较

Table 1 Comparison of the technologies for chromosomal integration of large DNA fragments

Tools	Efficiency	Insertion sites on the chromosome	Operability
Homologous recombination	Host-dependent	Any position, dependent on homologous arms	Easy
Integrase-mediated site-specific recombination	High	Based on the integrase recognition sites	Moderate
Transposase-mediated insertion	High	Site-specific or random, based on the transposon insertions	Easy
CRISPR-Cas system	Host-dependent	Dependent on the PAM sequences and homologous arms	Moderate
Group II intron	High	Dependent on the intron RNA recognition sites	Complicated
CRISPR-associated transposition	High	Dependent on the targeting of CRISPR-associated transposition systems	Complicated

## 6 展望

在过去的几十年里, 研究者们相继开发了一系列大片段基因簇在微生物染色体上整合的方法, 推动了技术的发展, 但也不同程度地存在整合效率低、整合位点不可控、难于实现多位点整合等问题。随着 CRISPR 相关转座系统的发现和研究, 这种状况已经得到较大改善。CRISPR 相关转座系统兼具 CRISPR-Cas 元件的可编程性和转座酶的整合活性, 能够以极高的效率在宿主细菌的染色体中整合大片段 DNA, 在构建微生物细胞工厂方面极具应用价值。然而, 这一系统目前在实际应用中也存在着一些局限性。例如, 在基因组上插入 DNA 的片段大小受限, 会遗留转座疤痕等; 只在少量的革兰氏阴性细菌如大肠杆菌中进行了测试, 其是否能够在更多的重要工业细菌(如谷氨酸棒杆菌、梭菌属等)及真菌(如酵母等)中发挥功能尚未可知; 这一技术虽然可以实现在细菌染色体上进行 DNA 片段的多位点整合, 但各个位点的插入效率差异较大, 尚不能进行有效控制。这些不足都有待后续研究和改进。

此外, 需要指出的一点是, 我们在对目标菌株进行染色体上的大片段 DNA 整合时, 除了需要考虑整合效率和拷贝数, 对于整合靶位点

的选择也是值得关注的一个重要方面。同样的基因簇整合在染色体上的不同位置, 其表达情况和产生的表型往往存在较大差别。目前, 我们尚只能通过前期筛查来预先挑选出一些合适的整合位点, 但费时费力。因此, 进一步深入理解和阐明影响染色体上大片段 DNA 表达效率的机制以及规律对于设计和优化这一技术体系至关重要, 这方面的研究亟待加强。

## REFERENCES

- [1] DAVY AM, KILDEGAARD HF, ANDERSEN MR. Cell factory engineering[J]. Cell Systems, 2017, 4(3): 262-275.
- [2] MALCI K, WALLS LE, RIOS-SOLIS L. Multiplex genome engineering methods for yeast cell factory development[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 589468.
- [3] GUSTAVSSON M, LEE SY. Prospects of microbial cell factories developed through systems metabolic engineering[J]. Microbial Biotechnology, 2016, 9(5): 610-617.
- [4] PONTRELLI S, CHIU TY, LAN EI, CHEN FYH, CHANG P, LIAO JC. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 16-46.
- [5] NIELSEN J. Yeast systems biology: model organism and cell factory[J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(9): e1800421.
- [6] YU SZ, ZHENG B, CHEN ZY, HUO YX. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for

- producing branched chain amino acids[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 230.
- [7] CHARUBIN K, BENNETT RK, FAST AG, PAPOUTSAKIS ET. Engineering *Clostridium* organisms as microbial cell-factories: challenges & opportunities[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 173-191.
- [8] PRAMASTYA H, SONG Y, ELFAHMI EY, SUKRASNO S, QUAX WJ. Positioning *Bacillus subtilis* as terpenoid cell factory[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(6): 1839-1856.
- [9] SCHWANEMANN T, OTTO M, WIERCKX N, WYNANDS B. *Pseudomonas* as versatile aromatics cell factory[J]. Biotechnology Journal, 2020, 15(11): e1900569.
- [10] XU JQ, YANG S, YANG LR. *Vibrio natriegens* as a host for rapid biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2022, 40(4): 381-384.
- [11] PRAZERES DMF, MONTEIRO GA. Plasmid biopharmaceuticals[J]. Microbiology Spectrum, 2014, 2.6.02.
- [12] LI L, LIU XC, WEI KK, LU YH, JIANG WH. Synthetic biology approaches for chromosomal integration of genes and pathways in industrial microbial systems[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(5): 730-745.
- [13] ZHU YQ, PAN MY, WANG CF, YE LD, XIA CM, YU HW. Enhanced CoQ10 production by genome modification of *Rhodobacter sphaeroides* via Tn7 transposition[J]. FEMS Microbiology Letters, 2022, 369(1): fnab160.
- [14] WANG ZK, GONG JS, QIN JF, LI H, LU ZM, SHI JS, XU ZH. Improving the intensity of integrated expression for microbial production[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(11): 2796-2807..
- [15] 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.
- [16] CHEN SP, WANG HH. An engineered cas-transposon system for programmable and site-directed DNA transpositions[J]. The CRISPR Journal, 2019, 2(6): 376-394.
- [17] STANDAGE-BEIER K, BROOKHOUSER N, BALACHANDRAN P, Zhang Q, Brafman DA, Wang X. RNA-guided recombinase-Cas9 fusion targets genomic DNA deletion and integration[J]. The CRISPR Journal, 2019, 2(4): 209-222.
- [18] HUANG H, CHAI CS, YANG S, JIANG WH, GU Y. Phage serine integrase-mediated genome engineering for efficient expression of chemical biosynthetic pathway in gas-fermenting *Clostridium ljungdahlii*[J]. Metabolic Engineering, 2019, 52: 293-302.
- [19] BHATT S, CHALMERS R. Targeted DNA transposition *in vitro* using a dCas9-transposase fusion protein[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(15): 8126-8135.
- [20] CRAIG NL. Tn7: a target site-specific transposon[J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(11): 2569-2573.
- [21] MERRICK CA, ZHAO J, ROSSER SJ. Serine integrases: advancing synthetic biology[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(2): 299-310.
- [22] KLOMPE SE, VO PLH, HALPIN-HEALY TS, STERNBERG SH. Transposon-encoded CRISPR-Cas systems direct RNA-guided DNA integration[J]. Nature, 2019, 571(7764): 219-225.
- [23] STRECKER J, LADHA A, GARDNER Z, SCHMID-BURGK JL, MAKAROVA KS, KOONIN EV, ZHANG F. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases[J]. Science, 2019, 365(6448): 48-53.
- [24] PETERS JE, MAKAROVA KS, SHMAKOV S, KOONIN EV. Recruitment of CRISPR-cas systems by Tn7-like transposons[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(35): E7358-E7366.
- [25] VO PLH, RONDA C, KLOMPE SE, CHEN EE, ACREE C, WANG HH, STERNBERG SH. CRISPR RNA-guided integrases for high-efficiency, multiplexed bacterial genome engineering[J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(4): 480-489.
- [26] YANG SQ, ZHANG YW, XU JQ, ZHANG J, ZHANG JZ, YANG JJ, JIANG Y, YANG S. Orthogonal CRISPR-associated transposases for parallel and multiplexed chromosomal integration[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(17): 10192-10202.
- [27] ZHANG YW, SUN XM, WANG QZ, XU JQ, DONG F, YANG SQ, YANG JW, ZHANG ZX, QIAN Y, CHEN J, ZHANG J, LIU YM, TAO RS, JIANG Y, YANG JJ, YANG S. Multicopy chromosomal integration using CRISPR-associated transposases[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(8): 1998-2008.
- [28] WRIGHT WD, SHAH SS, HEYER WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018,

- 293(27): 10524-10535.
- [29] BULJUBAŠIĆ M, HLEVNJAK A, REPAR J, ĐERMIĆ D, FILIĆ V, WEBER I, ZAHRAĐKA K, ZAHRAĐKA D. RecBCD- RecFOR-independent pathway of homologous recombination in *Escherichia coli*[J]. DNA Repair, 2019, 83: 102670.
- [30] SCHERER S, DAVIS RW. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10): 4951-4955.
- [31] 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.
- [32] WANG B, HU QT, ZHANG Y, SHI RL, CHAI X, LIU Z, SHANG XL, ZHANG Y, WEN TY. A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 63.
- [33] SHARAN SK, THOMASON LC, KUZNETSOV SG, COURT DL. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering[J]. Nature Protocols, 2009, 4(2): 206-223.
- [34] WANG HH, ISAACS FJ, CARR PA, SUN ZZ, XU G, FOREST CR, CHURCH GM. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. Nature, 2009, 460(7257): 894-898.
- [35] DALIA TN, HAYES CA, STOLYAR S, MARX CJ, MCKINLAY JB, DALIA AB. Multiplex genome editing by natural transformation (MuGENT) for synthetic biology in *Vibrio natriegens*[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(9): 1650-1655.
- [36] STUKENBERG D, HOFF J, FABER A, BECKER A. NT-CRISPR, combining natural transformation and CRISPR-Cas9 counterselection for markerless and scarless genome editing in *Vibrio natriegens*[J]. Communications Biology, 2022, 5: 265.
- [37] DUPUY P, SAUVIAC L, BRUAND C. Stress-inducible NHEJ in bacteria: function in DNA repair and acquisition of heterologous DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(3): 1335-1349.
- [38] SHI TQ, LIU GN, JI RY, SHI K, SONG P, REN LJ, HUANG H, JI XJ. CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: the state of the art[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(20): 7435-7443.
- [39] CUI ZY, JIANG X, ZHENG HH, QI QS, HOU J. Homology-independent genome integration enables rapid library construction for enzyme expression and pathway optimization in *Yarrowia lipolytica*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(2): 354-363.
- [40] AYORA S, CARRASCO B, CÁRDENAS PP, CÉSAR CE, CAÑAS C, YADAV T, MARCHISONE C, ALONSO JC. Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(6): 1055-1081.
- [41] FOGG PCM, COLLOMS S, ROSSER S, STARK M, SMITH MCM. New applications for phage integrases[J]. Journal of Molecular Biology, 2014, 426(15): 2703-2716.
- [42] BISWAS T, AIHARA H, RADMAN-LIVAJA M, FILMAN D, LANDY A, ELLENBERGER T. A structural basis for allosteric control of DNA recombination by  $\lambda$  integrase[J]. Nature, 2005, 435(7045): 1059-1066.
- [43] van DUYNE GD. Cre recombinase[J]. Microbiology Spectrum, 2015, 3(1): MDNA3-MDNA0014-2014.
- [44] GRINDLEY NDF, WHITESON KL, RICE PA. Mechanisms of site-specific recombination[J]. Annual Review of Biochemistry, 2006, 75: 567-605.
- [45] RUTHERFORD K, YUAN P, PERRY K, SHARP R, van DUYNE GD. Attachment site recognition and regulation of directionality by the serine integrases[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(17): 8341-8356.
- [46] PFEIFFER BD, NGO TT B, HIBBARD KL, MURPHY C, JENETT A, TRUMAN JW, RUBIN GM. Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*[J]. Genetics, 2010, 186(2): 735-755.
- [47] HUANG S, LI N, ZHOU J, HE J. Construction of a new bacterial artificial chromosome (BAC) vector for cloning of large DNA fragments and heterologous expression in *Streptomyces*[J]. Wei Sheng Wu Xue Bao=Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(1): 30-37.
- [48] LI L, WEI KK, LIU XC, WU YJ, ZHENG GS, CHEN SX, JIANG WH, LU YH. aMSGE: advanced multiplex site-specific genome engineering with orthogonal modular recombinases in actinomycetes[J]. Metabolic Engineering, 2019, 52: 153-167.
- [49] LEE CA, AUCTION JM, MONSON RE, GROSSMAN AD. Identification and characterization of int (integrase), xis (excisionase) and chromosomal attachment sites of the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*[J]. Molecular

- Microbiology, 2007, 66(6): 1356-1369.
- [50] ROBERTS AP, MULLANY P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(6): 251-258.
- [51] MULLANY P, ROBERTS AP, WANG H. Mechanism of integration and excision in conjugative transposons[J]. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2002, 59(12): 2017-2022.
- [52] BURRUS V, WALDOR MK. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements[J]. Research in Microbiology, 2004, 155(5): 376-386.
- [53] BROPHY JAN, TRIASSI AJ, ADAMS BL, RENBERG RL, STRATIS-CULLUM DN, GROSSMAN AD, VOIGT CA. Engineered integrative and conjugative elements for efficient and inducible DNA transfer to undomesticated bacteria[J]. Nature Microbiology, 2018, 3(9): 1043-1053.
- [54] GREEN B, BOUCHIER C, FAIRHEAD C, CRAIG NL, CORMACK BP. Insertion site preference of Mu, Tn5, and Tn7 transposons[J]. Mobile DNA, 2012, 3(1): 3.
- [55] SADLER M, MORMILE MR, FRANK RL. Characterization of the IS200/IS605 insertion sequence family in *Halanaerobium hydrogeniformans*[J]. Genes, 2020, 11(5): 484.
- [56] PLASTERK RH. The Tc1/mariner transposon family[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 1996, 204: 125-143.
- [57] TELLIER M, BOUUAERT CC, CHALMERS R. Mariner and the ITm superfamily of transposons[J]. Microbiology Spectrum, 2015, 3(2): MDNA3-MDNA0033-2014.
- [58] DING QF, TAN KS. *Himar1* transposon for efficient random mutagenesis in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1842.
- [59] LAMPE DJ, AKERLEY BJ, RUBIN EJ, MEKALANOS JJ, ROBERTSON HM. Hyperactive transposase mutants of the Himar1 mariner transposon[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(20): 11428-11433.
- [60] WADDELL CS, CRAIG NL. Tn7 transposition: two transposition pathways directed by five Tn7-encoded genes[J]. Genes & Development, 1988, 2(2): 137-149.
- [61] PETERS JE. Tn7[J]. Microbiology Spectrum, 2014, 2(5): 2569-2573.
- [62] CHOI KY, LI Y, SARNOVSKY R, CRAIG NL. Direct interaction between the TnsA and TnsB subunits controls the heteromeric Tn7 transposase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(22): E2038-E2045.
- [63] FINN JA, PARKS AR, PETERS JE. Transposon Tn7 directs transposition into the genome of filamentous bacteriophage M13 using the element-encoded TnsE protein[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(24): 9122-9125.
- [64] MITRA R, MCKENZIE GJ, YI L, LEE CA, CRAIG NL. Characterization of the TnsD-attTn7 complex that promotes site-specific insertion of Tn7[J]. Mobile DNA, 2010, 1(1): 18.
- [65] KUMAR A, DALTON C, CORTEZ-CORDOVA J, SCHWEIZER HP. Mini-Tn7 vectors as genetic tools for single copy gene cloning in *Acinetobacter baumannii*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 82(3): 296-300.
- [66] ROMERO-JIMÉNEZ L, RODRÍGUEZ-CARBONELL D, GALLEGOS MT, SANJUÁN J, PÉREZ-MENDOZA D. Mini-Tn7 vectors for stable expression of diguanylate cyclase PleD\* in Gram-negative bacteria[J]. BMC Microbiology, 2015, 15: 190.
- [67] CHOI KH, DESHAZER D, SCHWEIZER HP. Mini-Tn7 insertion in bacteria with multiple glmS-linked attTn7 sites: example *Burkholderia mallei* ATCC 23344[J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 162-169.
- [68] ZHAO ZY, CHENG JF, YOSHIKUNI Y. Chromosomal integration of complex DNA constructs using CRAGE and CRAGE-Duet systems[J]. STAR Protocols, 2022, 3(3): 101546.
- [69] RAWSTHORNE H, TURNER KN, MILLS DA. Multicopy integration of heterologous genes, using the lactococcal group II intron targeted to bacterial insertion sequences[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 6088-6093.
- [70] VALLÈS Y, HALANYCH KM, BOORE JL. Group II introns break new boundaries: presence in a bilaterian's genome[J]. PLoS One, 2008, 3(1): e1488.
- [71] CANDALES MA, DUONG A, HOOD KS, LI T, NEUFELD RAE, SUN RD, MCNEIL BA, WU L, JARDING AM, ZIMMERLY S. Database for bacterial group II introns[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(Database issue): D187-D190.
- [72] LAMBOWITZ AM, ZIMMERLY S. Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011, 3(8): a003616.



- [73] HEAP JT, PENNINGTON OJ, CARTMAN ST, CARTER GP, MINTON NP. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(3): 452-464.
- [74] KARBERG M, GUO HT, ZHONG J, COON R, PERUTKA J, LAMBOWITZ AM. Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(12): 1162-1167.
- [75] PERUTKA J, WANG WJ, GOERLITZ D, LAMBOWITZ AM. Use of computer-designed group II introns to disrupt *Escherichia coli* DExH/D-box protein and DNA helicase genes[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 336(2): 421-439.
- [76] FRAZIER CL, SAN FILIPPO J, LAMBOWITZ AM, MILLS DA. Genetic manipulation of *Lactococcus lactis* by using targeted group II introns: generation of stable insertions without selection[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1121-1128.
- [77] FAURE G, SHMAKOV SA, YAN WX, CHENG DR, SCOTT DA, PETERS JE, MAKAROVA KS, KOONIN EV. CRISPR-Cas in mobile genetic elements: counter-defence and beyond[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(8): 513-525.
- [78] DIMITRIU T, ASHBY B, WESTRA ER. Transposition: a CRISPR way to get around[J]. Current Biology, 2019, 29(18): R886-R889.
- [79] QUERQUES I, SCHMITZ M, OBERLI S, CHANEZ C, JINEK M. Target site selection and remodelling by type V CRISPR-transposon systems[J]. Nature, 2021, 599(7885): 497-502.
- [80] CHENG ZH, WU J, LIU JQ, MIN D, LIU DF, LI WW, YU HQ. Repurposing CRISPR RNA-guided integrases system for one-step, efficient genomic integration of ultra-long DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(13): 7739-7750.
- [81] RUBIN BE, DIAMOND S, CRESS BF, CRITS-CHRISTOPH A, LOU YC, BORGES AL, SHIVRAM H, HE C, XU M, ZHOU ZY, SMITH SJ, ROVINSKY R, SMOCK DCJ, TANG K, OWENS TK, KRISHNAPPA N, SACHDEVA R, BARRANGOU R, DEUTSCHBAUER AM, BANFIELD JF, et al. Species- and site-specific genome editing in complex bacterial communities[J]. Nature Microbiology, 2022, 7(1): 34-47.

(本文责编 陈宏宇)