

结核分枝杆菌基因敲除技术的研究进展

王海宁¹,金珊珊¹,徐正中^{1,2},王 蕾¹,焦新安^{1,2},陈 祥^{1,2}

摘要:结核分枝杆菌是十分重要的人兽共患病原菌,基因缺失株的构建在该菌致病与免疫机制、基因功能解析和防控技术中意义重大,而该菌特有的复杂结构和生理生化特性也给缺失株的构建带来难度,为此有关结核分枝杆菌基因敲除技术的研究一直是重要课题。本文重点介绍了结核分枝杆菌基于特异性转导噬菌体、线性DNA片段、反选择标记、CRISPR技术以及ORBIT系统的基因敲除方法,同时对分枝杆菌的分子遗传操作发展进行了展望。

关键词:结核分枝杆菌;基因敲除;特异性转导;线性DNA片段;反选择标记;CRISPR;ORBIT

中图分类号:R378.91 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2020)11-0928-06

Reviews of gene knockout technology in *Mycobacterium tuberculosis*

WANG Hai-ning¹, JIN Shan-shan¹, XU Zheng-zhong^{1,2}, WANG Lei¹, JIAO Xin-an^{1,2}, CHEN Xiang^{1,2}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: *Mycobacterium tuberculosis* is an extremely important pathogenic bacterium, and the construction of mycobacterial mutants is highly important for assessing its pathogenicity and immune mechanisms, gene function, and prevention and control technologies. Genetic methods including mutation technologies in mycobacteria are difficult to perform, owing to the bacterium's complex physiological characteristics and mechanisms. Therefore, research on gene mutations in mycobacteria has long been an important issue. For better understanding of current methods, targeted gene deletion methods in mycobacteria based on a specialized transduction method, linear DNA fragment method, anti-selection marker method, CRISPR technology and the ORBIT system are summarized, and the development of molecular genetic manipulation of *Mycobacterium* is also described.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; gene deletion; specialized transduction; linear DNA fragment; counter selectable marker; CRISPR; ORBIT

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0500300), the Science and Technology Program of Jiangsu (BK20171285), the Six Talent Peaks Project (SWYY-083) and Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

国家重点研发计划(2017YFD0500300);江苏省自然科学基金(BK20171285);江苏“六大人才高峰”(SWYY-083)和优势学科建设工程项目(PAPD)联合资助。

通讯作者:陈祥,Email:chenxiang@yzu.edu.cn;

ORCID:0000-0002-9736-8180

焦新安,Email:jiao@yzu.edu.cn;

ORCID:0000-0002-2214-3358

作者单位:1.扬州大学,江苏省人兽共患病学重点实验室/江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,扬州225009;
2.扬州大学,农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室,扬州 225009

Corresponding authors: Chen Xiang, Email: chenxiang@yzu.edu.cn; Jiao Xin-an, Email: jiao@yzu.edu.cn

结核病是由结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC)感染引起的全球十大传染病之一,据世界卫生组织WHO发布的《2020年全球结核病报告》显示,2019年全球约有1 000万人患结核病,140万人死亡^[1]。此外,结核分枝杆菌多重耐药(MDR)、广泛耐药(XDR)和完全耐药(TDR)菌株的出现和传播,使得结核病的治疗和防控愈加艰难。因此,研究结核分枝杆菌的生理

生化特性以及毒力相关基因的功能十分必要^[2],其中缺失株的构建则是关键环节之一。

但是结核分枝杆菌的生长十分缓慢,其倍增时间大约需要 24 h,单菌落形成需要 3 到 4 周,这意味着多步遗传操作中每一步耗时至少需要 1 个月,严重影响了结核病致病机制的深入研究。目前,基因

敲除技术可以分为依赖于较长同源序列的同源重组、依赖于短同源序列的位点特异性重组以及不依赖于同源序列的转座敲除等 3 种主要类型^[3]。本文着重介绍了应用于结核分枝杆菌基因敲除的研究方法,并对几种敲除技术进行了比较,见表 1 所示。

表 1 分枝杆菌基因敲除技术的方法比较

Tab.1 Comparison of methods of gene knockout in mycobacteria

方法	优势	劣势	应用效果
特异性转导法	提高转化率、敲除效率	操作繁琐耗时、重组率低(重组频率在 10 ⁻⁶ 范围内 ^[6])	广泛适用于耻垢分枝杆菌、牛分枝杆菌和各种结核分枝杆菌 ^[6]
线性 DNA 片段法	提高重组率	高错配率	突变效率随着同源 DNA 片段长度的增加而增加 ^[13]
反选择标记法	在特定基因中实现突变	高失活率(60%~70% 的蔗糖抗性细胞是由于 <i>sacB</i> 失活 ^[29])	蔗糖选择在分枝杆菌中普遍适用 ^[23]
CRISPR 基因敲除法	简化步骤、高突变率(直接突变效率高达 80% ^[42])	条件性突变	缺失效率为 45%~80% ^[42] ; 基因编辑效率高达 70% ^[45]
ORBIT 法	同时创建缺失、插入或融合的文库	选择标记过剩、载体自发重组 ^[50]	在耻垢分枝杆菌和结核分枝杆菌中共完成 54 个基因的缺失 ^[48]

1 特异性转导法

为了提高分枝杆菌同源重组效率和降低非特异性重组,引入了分枝杆菌穿梭噬菌体这一遗传操作。噬菌体递送系统的一个重要优点是细菌群体中的每个单菌落基本都可以被携带转座子的噬菌体感染,产生大量独立的突变体。1987 年, Jacobs 等首次提出了构建重组穿梭噬菌体的方法,该噬菌粒插入了分枝杆菌噬菌体 DNA 和大肠杆菌质粒,可以在分枝杆菌中作为噬菌体复制以及在大肠杆菌中作为质粒复制,并且可以将 DNA 在这两种属间转移^[4]。Snapper 等利用噬菌体将外源 DNA 导入到分枝杆菌中,可产生能够在大肠杆菌、耻垢分枝杆菌和卡介苗之间的穿梭质粒^[5]。

随后,Bardarov 等^[6]首次提出,特异性转导是一种非常有效的分枝杆菌遗传操作技术。其主要步骤为:首先,构建表达同源重组区的质粒。该质粒包含目的基因的同源区域、潮霉素抗性标记、识别位点、还包含一个 *PacI* 限制性酶切位点,λcos 位点和大肠杆菌(OriE)的复制起点。其次,两个载体通过 *PacI* 同时消化,将等位交换底物连接在含有温敏型分枝杆菌噬菌体元件的穿梭载体上。成功连接的产物以耻垢分枝杆菌作为宿主细胞,经电转在 30 ℃ 下形成噬菌斑,从而获得噬菌体。随后将噬菌体转导到目标分枝杆菌菌株中,在 37 ℃ 下进行双交换。最

后,通过潮霉素筛选出阳性克隆子并鉴定得到突变株。Bardarov 等分别在耻垢分枝杆菌、牛分枝杆菌 BCG 和结核分枝杆菌中构建突变株而证明了其实用性和可重复性^[6]。Tufariello 等^[7]通过同样的方法实现了结核分枝杆菌 *rpf* 样基因的敲除。2014 年,Jain 等^[8]改进了一些限速操作并构建了穿梭质粒 phAE159,使其能够容纳更大的目的片段,通过改进的方法和质粒工具已经产生上百个靶向突变株。2017 年,Yang 等^[9]通过改良的特异性转导策略成功构建了结核分枝杆菌 H37Ra 的 *sigB* 基因敲除株。Vanunu 等^[10]则使用基于 phAE87 的温度敏感的特异性转导噬菌体,在 39 ℃ 下感染 BCG 6 h 后成功敲除 *fmt* 基因。尽管特异性转导方法成功率高,但也存在操作繁琐复杂这一主要缺点。

2 线性 DNA 片段法

通过线性 DNA 片段同源重组法获得基因缺失株是常见的分子遗传方法,已经被广泛应用于分枝杆菌和其他细菌中目的基因敲除的研究。其原理是将携带含有选择标记的靶基因线性片段通过电转法转入到分枝杆菌中,从而破坏目标基因来获得基因突变株。自 20 世纪 90 年代起,多篇文章相继报道了使用该方法获得分枝杆菌突变体的实例,例如,应用于编码支原体转移酶(mycolyl transferase)和纤

维连接蛋白结合活性的 *fbpA* 和 *fbpB* 基因的靶向性断裂, 以及编码超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)蛋白等影响分枝杆菌毒性的独立相关基因^[11-12]。其中短线性 DNA 片段(<5 kb)已经被广泛应用于不同分枝杆菌中基因突变株的构建^[13-15], 而 Balasubramanian 等^[16]则使用长线性片段进行同源重组。该策略是在结核分枝杆菌中利用长线性重组底物通过等位基因交换获得重组子, 产生长度约为 40~50 kb 的突变体。研究人员通过结果推测, 相对于短线性 DNA, 长线性底物降解更慢, 具有长线性重组底物的转化频率足够高, 可能更有利于同源重组。

目前, 基于分枝杆菌噬菌体重组酶的重组系统因操作简便具有较大的研究前景。尤其是基于分枝杆菌噬菌体 Che9c 重组酶 gp60、gp61 所构建的分枝杆菌重组工程体系, 只需表达分枝杆菌噬菌体重组酶, 无需繁琐的体外操作。gp60 和 gp61 基因的表达促进了耻垢分枝杆菌和结核分枝杆菌重组水平的提高^[17], 使分枝杆菌突变株的构建更为方便。Tufariello 等^[18]通过利用噬菌体重组蛋白改进了该方法, 在含有 pJV53 的 CDC1551 菌株中, 观察到了噬菌体 Che9c 重组蛋白的表达大大提高了噬菌体 DNA 与宿主染色体的同源重组效率。ssDNA 重组可以促进分枝杆菌中各种不同的基因操作^[19]。该方法可以有效地将已定义的点突变引入到耻垢分枝杆菌和结核分枝杆菌染色体中。Che9c gp61 介导的 ssDNA 重组效率是分枝杆菌 dsDNA 重组效率的 100~1 000 倍。利用重组的各种技术已在大肠杆菌中得到证明^[20-21], 而且这些技术中的大多数似乎适用于分枝杆菌。

通过长短线性化片段进行同源重组的方法为深入研究结核分枝杆菌提供了重要的技术支撑, 但是同源重组率低以及较高的错配率仍是该技术应用无法避免的局限性。

3 反选择标记法

由于等位基因的双交换发生频率较低且存在非特异性重组, 这种方法可能仅仅只能构建和鉴定出小部分等位基因交换突变体。因此, 反选择标记法通常有助于在一些遗传学方案仍不完善的微生物菌株中构建突变株。目前可用于分枝杆菌的反选择标记有 *pyrF*^[22]、*sacB*^[23]、*katG*^[24] 和 *rpsL*^[25]。*rpsL* 同源重组系统是基于在链霉素抗性宿主中编码核糖体蛋白 S12 的野生型 *rpsL* 基因的表达, 使用卡那抗性基因和 *rpsL* 的链霉素敏感等位基因进行选

择^[25]。但是 *rpsL* 同源重组系统受限于需要菌株背景为链霉素抗性。

目前最常用的是 *sacB* 同源重组系统, 其原理是基于在 10% 蔗糖浓度的情况下 *sacB*(编码果聚糖蔗糖酶的枯草芽孢杆菌基因)的表达对分枝杆菌是致命的^[26]。带有 *sacB* 基因的载体进行蔗糖选择的效率为 100%, 使等位基因交换突变体的选择成为可能, 同样适用于两步法选择^[23]。例如使用蔗糖反选择载体将编码分枝杆菌脲酶的 *ureC* 基因的灭活拷贝基因递送到牛分枝杆菌 BCG 基因组中, 通过两步法在 2% 蔗糖中选择进行等位基因交换的阳性突变株^[27]。因此, 该技术对于致病性分枝杆菌的遗传分析非常有用。*ts-sacB* 载体由于结合了 *sacB* 基因的反选择性质和分枝杆菌热敏复制起点, 可在 39 °C 下有效地进行蔗糖反选择^[28]。2011 年 Barkan 等的研究指出^[29], 大肠杆菌半乳糖激酶基因(*galK*)可作为耻垢分枝杆菌和结核分枝杆菌的可选择标记物, 其片段只有 1.3 kb 长, 相比于 *sacB* 更容易进行克隆和基因操作。而 *galK* 与 *sacB* 联合使用, 无需对潮霉素进行反筛选, 节约了时间和人工成本。最重要的是, 研究证明结合 *sacB*/蔗糖和 *galK*/2-脱氧半乳糖(0.2%)的策略在选择重组事件时是 100% 有效的。该系统进一步扩展了分枝杆菌遗传操作的有效工具。

尽管这些方法已经很好地用于构建结核分枝杆菌突变株, 但是由于低水平的整合以及冗长的两步法使得缺失株的构建在实际操作中很难成功实现。因此引入了序列特异性重组酶来提高切除标签的效率。目前, 在分枝杆菌中成功应用的特异性重组系统有来自于细菌噬菌体 P1 的 Cre/loxP 系统^[30]、转座子 $\gamma\delta$ 的 TnpR/res 系统^[31]、酿酒酵母的 Flp/FRT 系统^[32], 以及基于内源 Xer 重组酶(Xer-cise)的序列特异性重组酶系统。通过噬菌体重组蛋白与 Cre/loxP 系统的结合, 得到双交换突变株的效率为 25%~62.5%, 从双交换突变株得到无痕缺失突变株的效率为 100%^[33]。而 Xer-cise 重组酶系统已应用到分枝杆菌中, 构建未标记的缺失突变体和相关遗传操作^[34]。该方法依赖于内源性重组酶, 不需要引入和随后去除携带外源基因的复制质粒, 操作简单实用, 可以高效率地得到稳定的无选择标记突变株, 值得进一步研究推广。同样是基于 Xer-cise 系统, Mao 等^[35]通过引入 *gfp* 基因修饰质粒, 构建了含有多个限制性内切酶位点的 *dif-Zeo-dif* 和 *dif-Hyg-dif* 表达盒, 成功地敲除了耻垢分枝杆菌的四对毒素-抗毒素基因, 实现了快速连续多基因敲除的

技术手段,为分枝杆菌敲除株的构建提供了新的遗传技术。

4 CRISPR 基因敲除法

尽管分枝杆菌中的基因敲除和调控基因表达方面取得了一定的进展,但是其必须基因的直接失活仍然艰难。尤其是靶向单个基因或多个基因耗时久且难度较大。成簇规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPR) 技术则有可能克服其中的一些限制。生物信息学分析结果表明,在 14 个分枝杆菌中存在 CRISPR 结构且 CRISPR-Cas(成簇的规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白)系统仅在结核分枝杆菌和牛分枝杆菌中发现^[36]。2013 年 Qi 等首次提出 CRISPRi(CRISPR interference) 技术并被开发应用于大肠杆菌中,基因抑制水平高达 99.9%^[37],该技术已广泛应用于抑制结核分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、卡介苗等菌株的基因表达^[38-41]。

Yan 等^[42] 在 2017 年首次使用 CRISPR-Cas12a (Cpf1) 系统成功地在耻垢分枝杆菌中产生无标记物和无痕缺失。Cas12a 是 CRISPR-Cas 系统中的一种 V-a 型内切酶,是一种参与 CRISPR RNA (crRNA) 处理、靶位识别和 DNA 切割的双核酸酶^[43-44]。Cas12a 和 Cas9 识别不同的靶位点,这使得能够更精确地选择切割靶点并引入所需的突变。研究通过构建一个表达土拉热弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*) 的 CRISPR 结合蛋白 Cpf1 (FnCpf1) 和重组蛋白 gp60 和 gp61 的双质粒系统,利用 Cpf1 辅助的 ssDNA 重组,有效地将点突变引入到耻垢分枝杆菌的原间隔序列邻近基序 (Protospacer Adjacent Motif,PAM) 和 crRNA 靶向区域,引入位点直接突变的效率高达 80%,而敲除效率为 45%~80%。Van Kessel 等的研究表明,Cpf1 辅助重组比无 Cpf1 的无标记重组(只有 5%~10% 的效率)具有明显的优势^[47]。

Sun 等^[45]首次报道了使用 CRISPR-FnCpf1 辅助非同源性末端接合(NHEJ)技术对耻垢分枝杆菌进行基因组编辑,谷氨酸棒状杆菌密码子优化的 FnCpf1(FnCpf1_cg)作为一种 Cas 效应蛋白经检测并不影响细胞生长,而 NHEJ 修复途径是一种错误倾向修复机制,用于在缺少修复模板的情况下修复断裂的双链 DNA,易在连接位点发生插入和缺失突变^[46]。研究基于一个质粒的 CRISPR-FnCpf1 辅助的 NHEJ 系统可以在 7N+2 d 内进行 N 轮重复的基因组编辑,编辑效率高达 70%。最近,Yan 等^[47]

改进了基于 CRISPR 切割和 NHEJ 的修复途径,来增加其修复活性,有效地在结核分枝杆菌中产生敲除突变体。更重要的是,这个系统在结核分枝杆菌中可以同时产生双突变和大规模的遗传突变。此外,在现有的方法很难对分枝杆菌进行基因编辑时,该方法可以很容易地产生基因敲除突变体。尽管 CRISPR 技术仍存在脱靶效应等缺点,但其对于研究未知功能的靶基因十分有效。

5 ORBIT 法

2018 年报道的 ORBIT (oligonucleotide-mediated recombineering followed by Bxb1 integrase targeting) 技术已成功运用于耻垢分枝杆菌基因敲除突变体的构建^[48],该技术结合了两种高效的噬菌体重组系统——Che9-RecT 重组系统^[17,19] 和 Bxb1 噬菌体整合酶系统^[49]。首先,表达质粒包含 Che9-RecT 重组系统和 Bxb1 噬菌体整合酶系统,该质粒需要转化到菌株中以制备靶向寡核苷酸 ssDNA 和非复制有效载荷质粒。然后,Che9c RecT 退火酶通过同源重组将合成的靶向寡核苷酸(ssDNA)整合到染色体中,从而在染色体中的精确位置引入 attP 位点。Bxb1 整合酶通过 attP-attB 位点特异性重组将有效载荷质粒整合到基因组中,在整合的有效载荷质粒的两侧创建 attL 和 attR 位点。在这个系统中,寡聚物的序列决定了插入位点的位置,质粒传递有效载荷。根据靶向寡核苷酸和运载质粒的特征,可以实现基因的缺失,插入或替换。如进行基因敲除,可设计寡核苷酸用 attP 位点替代靶基因。而对于 C 末端标签,寡核苷酸设计为在基因的终止密码子之前插入 attP 位点,然后使用运载质粒引入标签。该系统已成功在耻垢分枝杆菌和结核分枝杆菌中高效地产生 100 多个基因的敲除及融合。

ORBIT 系统在分子克隆构建方面具有相当大的优势^[50]。首先,该系统只需设计一种化学合成的寡核苷酸,相比基于等位基因交换生成突变体的方法,不需要设计多对 dsDNA 底物,因此该方法非常适合构建突变体文库。其次,该系统可通过在靶向寡核苷酸中设计唯一的 DNA 特异性序列来标记每个产生的突变体。此外,该系统可以利用不同运载质粒进行的多种修饰为功能筛选突变体文库提供了新的可能性。但该系统也存在一定局限性,不适用于缓慢生长的分枝杆菌以及需要通过电转引入靶向寡核苷酸和运载质粒等,进一步限制了其整体效率。

6 小结与展望

目前,分枝杆菌缺失株构建的方法涉及到了基于同源重组的长短线性底物、反选择标记、特异性转导等技术,而CRISPR技术及ORBIT系统在分枝杆菌研究中有巨大潜力。本文基于分子遗传学,着重介绍了与转座子文库、反义RNA等引起分枝杆菌基因沉默有本质区别的基因敲除技术,并对几种敲除技术进行了比较。

至今为止,结核病仍然严重威胁着人类的健康,其研究意义巨大,尤其是在分枝杆菌中进行基因突变来反向验证基因的功能。虽然近年来分枝杆菌的基因敲除技术取得了一定成就,但是其效率相比于传统细菌的遗传操作仍有较大的提升空间,在今后的遗传操作中仍需要开发更简便快捷的敲除技术。

利益冲突:无

引用本文格式:王海宁,金珊珊,徐正中,等.结核分枝杆菌基因敲除技术的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2020,36(11):928-933. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2020.00.154

参 考 文 献:

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2020[EB/OL]. (2020-10-14) [2020-10-17]. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html.
- [2] Machowski EE, Dawes S, Mizrahi V. TB tools to tell the tale-molecular genetic methods for mycobacterial research [J]. Int J Biochem Cell B, 2005, 37(1): 54-68. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.06.012
- [3] 于慧敏,马玉超.工业微生物代谢途径调控的基因敲除策略[J].生物工程学报,2010,26(9): 1199-1208. DOI: 10.13345/j.cjb.2010.09.013
- [4] Jacobs WR, Tuckman M, Bloom BR. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid [J]. Nature, 1987,327(6122): 532-535. DOI: 10.1038/327532a0
- [5] Snapper SB, LuGosI L, Jekkel A, et al. Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988,85(18): 6987-6991. DOI: 10.1073/pnas.85.18.6987
- [6] Bardarov S, Bardarov Jr S, Pavelka Jr MS, et al. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis* [J]. Microbiology, 2002, 148(10): 3007-3017. DOI: 10.1099/00221287-148-10-3007
- [7] Tufariello JM, Mi K, Xu J, et al. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor Rv1009 gene results in delayed reactivation from chronic tuberculosis [J]. Infect Immun, 2006, 74(5): 2985-2995. DOI: 10.1128/IAI.74.5.2985-2995.2006
- [8] Jain P, Hsu T, Arai M, et al. Specialized transduction designed for precise high-throughput unmarked deletions in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. mBio, 2014, 5(3): e01245-01214. DOI: 10.1128/mBio.01245-14
- [9] Yang SS, Hu YB, Wang XD, et al. Deletion of SigB causes increased sensitivity to *para*-aminosalicylic acid and sulfamethoxazole in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(10): e00551-00517. DOI: 10.1128/aac.00551-17
- [10] Vanunu M, Lang Z, Barkan D. The gene *fmt*, encoding tRNA^{Met} formyl transferase, is essential for normal growth of *M. bovis*, but not for viability [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15161. DOI: 10.1038/s41598-017-15618-9
- [11] Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, et al. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages [J]. Infect Immun, 2000, 68(2): 767-778. DOI: 10.1128/iai.68.2.767-778.2000
- [12] Piddington DL, Fang FC, Laessig T, et al. Cu, Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst [J]. Infect Immun, 2001, 69(8): 4980-4987. DOI: 10.1128/IAI.69.8.4980-4987.2001
- [13] Azad AK, Sirakova TD, Rogers LM, et al. Targeted replacement of the mycocerosic acid synthase gene in *Mycobacterium bovis* BCG produces a mutant that lacks mycosides [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(10): 4787-4792. DOI: 10.2307/38854
- [14] Buchmeier N, Blanc-Potard A, Ehrt S, et al. A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica* [J]. Mol Microbiol, 2000, 35(6): 1375-1382. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01797.x
- [15] Reyrat JM, Berthet FX, Gicquel B. The urease locus of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(19): 8768-8772. DOI: 10.1073/pnas.92.19.8768
- [16] Balasubramanian V, Pavelka MS, Jr., Bardarov SS, et al. Allelic exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear recombination substrates [J]. J Bacteriol, 1996, 178(1): 273-279. DOI: 10.1128/jb.178.1.273-279.1996
- [17] Van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Nat Methods, 2007, 4(2): 147-152. DOI: 10.1038/nmeth996
- [18] Tufariello JM, Malek AA, Vilchez C, et al. Enhanced specialized transduction using recombineering in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. mBio, 2014, 5(3): e01179-01114. DOI: 10.1128/mBio.01179-14
- [19] Van Kessel JC, Hatfull GF. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets [J]. Mol Microbiol, 2008, 67(5): 1094-1107. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06109.x
- [20] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination [J]. Annu Rev Genet, 2002, 33: 361-388. DOI: 10.1146/annurev.genet.33.061102.093104
- [21] Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, et al. Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond [J]. Methods Enzymol, 2007, 421: 171-199. DOI: 10.1016/j.0028-3182(07)01211-2

- 1016/S0076-6879(06)21015-2
- [22] Husson RN, James BE, Young RA. Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria [J]. *J Bacteriol*, 1990, 172(2): 519-524. DOI: 10.1128/jb.172.2.519-524.1990
- [23] Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria, using sucrose counter-selectable suicide vectors [J]. *Mol Microbiol*, 1996, 20(5): 919-925. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02533.x
- [24] Norman E, Dellagostin OA, Mcfadden J, et al. Gene replacement by homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 16(4): 755-760. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02436.x
- [25] Sander P, Meier Albrecht, Böttger Erikc. *rpsL* +: a dominant selectable marker for gene replacement in mycobacteria [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 16(5): 991-1000. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02324.x
- [26] Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(4): 1197-1199. DOI: 10.1128/jb.178.4.1197-1199.1996
- [27] Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Positive selection of allelic exchange mutants in *Mycobacterium bovis* BCG [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, 144(2/3): 161-166. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08524.x
- [28] Pelicic V, Jackson M, Reyrat JM, et al. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(20): 10955-10960. DOI: 10.1073/pnas.94.20.10955
- [29] Barkan D, Stallings CL, Glickman MS. An improved counterselectable marker system for mycobacterial recombination using *galK* and 2-deoxy-galactose [J]. *Gene*, 2011, 470(1/2): 31-36. DOI: 10.1016/j.gene.2010.09.005
- [30] Hasan N, Koob M, Szybalsk W. *Escherichia coli* genome targeting, I. Cre-lox-mediated *in vitro* generation of ori plasmids and their *in vivo* chromosomal integration and retrieval [J]. *Gene*, 1994, 150(1): 51-56. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90856-7
- [31] Tsuda M. Use of a transposon-encoded site-specific resolution system for construction of large and defined deletion mutations in bacterial chromosome [J]. *Gene*, 1998, 207(1): 33-41. DOI: 10.1016/s0378-1119(97)00601-x
- [32] Merlin C, McAtee S, Masters M. Tools for characterization of *Escherichia coli* genes of unknown function [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184(16): 4573-4581. DOI: 10.1128/jb.184.16.4573-4581.2002
- [33] 武晓林,方维焕,俞盈,等. 结核分枝杆菌同源重组基因敲除系统的构建和应用[J]. 微生物学报,2012,52(9): 1151-1159. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8312.2014.13.032
- [34] Bloor AE, Cranenburgh RM. An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes [J]. *Appl Environ Microb*, 2006, 72(4): 2520-2525. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2520-2525.2006
- [35] Mao XJ, Yan MY, Zhu H, et al. Efficient and simple generation of multiple unmarked gene deletions in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 22922. DOI: 10.1038/srep22922
- [36] He L, Fan X, Xie J. Comparative genomic structures of *Mycobacterium* CRISPR-Cas [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(7): 2464-2473. DOI: 10.1002/jcb.24121
- [37] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022
- [38] Choudhary E, Thakur P, Pareek M, et al. Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6267. DOI: 10.1038/ncomms7267
- [39] McNeil MB, Cook GM. Utilization of CRISPR interference to validate MmpL3 as a drug target in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(8): e00629-00619. DOI: 10.1128/AAC.00629-19
- [40] Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, et al. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform [J]. *Nat Microbiol*, 2017, 2: 16274. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.274
- [41] Xiao J, Jia H, Pan L, et al. Application of the CRISPRi system to repress *sepF* expression in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 72: 183-190. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.033
- [42] Yan MY, Yan HQ, Ren GX, et al. CRISPR-Cas12a-assisted recombineering in bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(17): e00947-00917. DOI: 10.1128/AEM.00947-17
- [43] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038
- [44] Fonfara I, Richter H, Bratovic M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA [J]. *Nature*, 2016, 532(7600): 517-521. DOI: 10.1038/nature17945
- [45] Sun B, Yang J, Yang S, et al. A CRISPR-Cpf1-assisted non-homologous end joining genome editing system of *Mycobacterium smegmatis* [J]. *Biotechnol J*, 2018, 13(9): e1700588. DOI: 10.1002/biot.201700588
- [46] Shuman S, Glickman MS. Bacterial DNA repair by non-homologous end joining [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(11): 852-861. DOI: 10.1038/nrmicro1768
- [47] Yan MY, Li SS, Ding XY, et al. A CRISPR-assisted nonhomologous end-joining strategy for efficient genome editing in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *mBio*, 2020, 11(1): e02364-02319. DOI: 10.1128/mBio.02364-19
- [48] Murphy KC, Nelson SJ, Nambi S, et al. ORBIT: a new paradigm for genetic engineering of mycobacterial chromosomes [J]. *Microbiology*, 2018, 9(6): e01467-01418. DOI: 10.1101/249292
- [49] Ghosh P, Wasil LR, Hatfull GF. Control of phage Bxb1 excision by a novel recombination directionality factor [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(6): e186. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040186
- [50] Borgers K, Vandewalle K, Festjens N, et al. A guide to *Mycobacterium* mutagenesis [J]. *The FEBS Journal*, 2019, 286(19): 3757-3774. DOI: 10.1111/febs.15041