

文章编号: 1004-0374(2011)09-0838-06

微生物基因组简化的研究进展

李 杨^{1,2}, 陈 涛^{1*}, 赵学明¹

(1 天津大学化工学院生物工程系, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津大学-爱丁堡大学系统生物学与合成生物学联合研究中心, 天津 300072; 2 石河子大学生命科学学院, 石河子 832000)

摘 要: 微生物基因组简化是合成生物学研究热点之一。基因组的适度精简可使细胞代谢途径得以优化, 改善细胞对底物、能量的利用效率, 大大提高细胞生理性能的预测性和可控性。基因组简化细胞将为生物技术的应用提供理想的底盘细胞。回顾了构建基因组简化细胞的研究策略、研究方法以及一些模式生物相关研究进展, 总结了基因组简化研究所面临的问题及解决办法, 对基因组减小化研究发展趋势前景进行了展望。

关键词: 简化基因组; 必需基因; 基因敲除

中图分类号: Q813; O621.33

文献标志码: A

Progress in development of microbial reduced genome

LI Yang^{1,2}, CHEN Tao^{1*}, ZHAO Xue-Ming¹

(1 Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Key Laboratory of Systems Bioengineering Ministry of Education, Edinburgh-Tianjin Joint Research Centre for Systems Biology and Synthetic Biology, Tianjin 300072, China; 2 College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: Research on microbial reduced genome is a key focus of synthetic biology. An engineering cell with reduced genome and robust, predictable, controllable physiological traits could be built by rational design and gene manipulation, which could serve as a desired chassis cell for biotechnological applications. In this paper, the research strategies, empirical methods for genome reduction and related research progress of some model microorganisms were reviewed. The difficult problems and solutions when constructing the reduced genome cell, as well as application prospects of the reduced genome cell were discussed.

Key words: reduced genome; essential gene; gene knock out

近年来, 应用合成生物学概念、理论和分子生物学实验方法提升菌株生产性能, 已成为目前工业生物技术领域的研究热点之一。它的主要研究内容是借鉴工程学思想, 利用基因组和基因等基本要素, 通过理性设计, 改造或重构生物分子、生化反应、代谢途径乃至具有生命活力的新细胞或生物个体以实现特定功能^[1]。通过遗传改造, 构建一个具有可预测、可控制表型且生理性状优良的底盘细胞(chassis cell), 将为合成生物学研究及应用奠定理想的工作平台^[2-3]。目前关于底盘细胞的研究工作主要集中于基因组简化方面^[4]。已有相关文章综述了大肠杆菌简化基因组方面的研究进展^[4-6]。本文从构建基因组简化细胞的研究历史、研究策略、实验

方法、模式菌相关研究进展进行回顾、总结, 并就面临的问题和解决办法、发展前景等方面作了探讨。

对众多模式生物的基因组测序、功能基因的研究发现, 在长期进化历程中, 通过基因水平转移等途径, 微生物摄入外源 DNA 序列并将其保留在基因组上, 致使基因组容量增大, 结构组成复杂化;

收稿日期: 2011-05-16

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2007CB707802, 2011CBA00804); 国家自然科学基金项目(20536040)

*通信作者: E-mail: chentao@tju.edu.cn; Tel: 022-27892083

另一方面, 特定环境条件下, 基因组部分序列发生丢失而致使基因组减小^[7-8]。例如, 某些寄生或共生生物通过染色体重组、突变舍弃部分非必需基因序列, 以更好适应特殊生存环境的变化。由此获得启示, 应用特定技术去除基因组上非必需的 DNA 序列, 优化细胞代谢途径, 改善细胞生产性能, 可获得具有生产应用潜力的工程菌菌株。

最小基因组 (minimum genome) 概念的提出^[9]是基于一种理想假设, 即假设细胞在含有一套最少的基因集合 (minimal gene set) 的情况下足以维持正常生命功能。最小基因组研究对生命起源、基因组进化、细胞代谢等理论研究有重要意义, 有助于加深对细胞功能及生命进化规律的研究认识。然而, 由于对必需基因 (essential gene) 的鉴别以及技术手段方面的局限, 构建最小基因组细胞难以一步实现, 一般要通过分步操作以剔除染色体上非必需基因序列, 在所获得一系列基因组简化 (reduced genome) 细胞的基础上, 循序渐进地改造, 最终获得最小基因组或最小化基因组 (minimized genome) 细胞。然而, 从实际角度看, 只含有必需基因的最小基因组细胞, 仅能维持细胞基本代谢, 并不一定具有生长快、抗逆性强等有利性状及实际应用潜力。对基因组简化细胞而言, 由于降低了基因组的复杂度, 去除或减小了非必需代谢途径的干扰, 优化了细胞生化代谢网络, 提高细胞对底物和能量的利用效率, 细胞遗传稳定性以及生理表型的可控制性、可预测性、可操作性将大大增加^[2-3], 可作为高效表达外源基因的理想宿主细胞, 而且对简化基因组及最小基因组的研究也将为系统生物学、基因组尺度代谢网络建立、验证、修正算法以及计算模拟提供生物模型基础^[8-9]。

1 研究技术路线

构建简化基因组或最小化基因组细胞, 一般可采用自下而上 (bottom-up) 和自上而下 (top-down) 两条技术路线^[10]。

1.1 自下而上路线

自下而上的策略是通过理性设计, 采用从头合成路线, 利用标准化元件逐步组装构建遗传线路、功能基因模块以至合成基因组。由于 DNA 合成技术、测序技术快速发展, 截至目前, 脊髓灰质炎病毒、ΦX-174 噬菌体、生殖道支原体等物种的基因组人工合成已陆续完成。Venter 等^[11-13]将合成、组装的支原体基因组移植入另一株已剔除基因组的近缘支

原体细胞中, 细胞能正常生长, 表明人工合成基因组也能表现生物活性。Gibson 等^[14]设计、组装合成了蕈状支原体基因组 (1.08 Mb), 将其移植至山羊支原体细胞中, 构建了新的蕈状支原体细胞, 研究发现, 仅含有合成基因组的细胞能表现连续自我复制等生理性状。

虽然以从头合成路线构建最小基因组细胞技术日益成熟, 但也面临着许多困难和挑战。目前对基因必需性、生物系统结构及代谢途径、调控网络复杂性和功能基因还缺乏足够深入研究和认识。基于现有研究分析方法和技术, 基因组中必需基因的数目及组成尚难以精准预测和确定^[15-16]。此外, 目前在将大 DNA 片段 (全基因组) 转移至细胞群体中以及正常表达功能也存在困难。例如, 移植基因组及基因活性会受宿主细胞基因组 DNA 甲基化及组蛋白修饰作用的影响。随着对基因组结构、功能基因以及必需基因的研究认识深入, 采用从头合成路线构建最小基因组细胞将成为可能^[17-18]。

1.2 自上而下路线

自上而下的技术路线是对遗传背景已知的基因组进行对基因组染色体大片段删减操作, 尽可能去除非必需基因 DNA 序列, 逐步缩减基因组的规模, 构建简化或最小化基因组细胞。与自下而上路线相比, 此技术路线因大片段序列敲除技术成熟、简单可行, 因而较多的研究工作是采用删减策略构建简化基因组或最小化基因组工程菌细胞^[4]。下文主要侧重综述这方面的研究进展。

2 研究方法

2.1 敲除靶点选择和确定

通过基因组删减构建基因组简化细胞, 首要面临确定敲除基因目标区段的问题。在对基因必需性充分认识的基础上, 合理选择非必需基因所在核酸序列区段作为删除操作的靶点。必需基因及非必需基因的识别目前主要利用比较基因组学、功能基因组学和代谢网络计算模拟等方法初步预测、分析确定, 并结合单基因或多基因组合敲除试验加以确定。结合干试验、湿试验的研究结果, 确定细胞含有必需基因数目及其组成^[2-3, 19]。Mushegian 和 Koonin^[20]对生殖道支原体和流感嗜血杆菌基因组序列比较分析, 推断独立生活细胞的基因组至少含 256 个必需基因。Hutchison 等^[21]利用转座子随机诱变的单基因分步敲除或失活试验, 推断生殖道支原体的必需基因数目约 265~350 个。Glass 等^[22]通过基因随机

敲除实验确定生殖道支原体必需基因由 382 个蛋白基因及 43 个 RNA 基因构成,某些基因的缺失突变能使菌株加速生长。关于最小基因组必需基因数量的研究为简化基因组、最小基因组的研究提供基本信息。Martelli 等^[23]利用大肠杆菌代谢网络模型,采用基于限制的模拟方法进行菌体生长模拟的试验,模拟结果和实验数据高度一致,研究发现,由必需基因所编码的酶催化的反应通量通常波动很小,必需基因与代谢通量波动之间的相关性为基因必需性的预测提供了一种新思路。

2.2 敲除实验方法

染色体片段敲除有定点敲除和随机敲除两类。定点敲除是利用自杀性质粒介导、线性 DNA 介导的同源重组对目标区域进行精确敲除^[4-5,24]。而随机敲除是利用转座子随机插入或切离引发的重组实现 DNA 片段的敲除。与随机敲除相比,采用定点敲除方法,后续的缺失突变体筛选、鉴定等工作量可大大减少。在基因组必需基因信息认识不够清楚的情况下,较适合采用随机敲除方法。需要注意的是,一些敲除操作或多或少会在基因组上遗留某些“外源核酸”序列,对基因组稳定性、基因功能,以及后续遗传操作可能产生不利影响。

3 模式菌基因组简化研究

自 20 世纪末,日本、美国等先后启动了“最小基因组工厂”、“从基因组到生命”等研究计划。截至目前,关于支原体、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌、酿酒酵母等模式生物最小化基因组的研究已相继报道。其中,关于大肠杆菌的研究工作相对较多。

3.1 大肠杆菌

Yu 等^[25-26]利用两种携带不同选择标记的 Tn5 转座子分别构建两个独立的转座子突变库,转座子在突变株基因组中精确定位,通过 P1 噬菌体转导将两个库突变株的不同转座子整合到一个基因组中,利用 loxP 位点重组删除两个转座子之间的 DNA 片段,获得一系列基因组简化菌株(删除 59~117 kb),在实验室培养条件下,基因组删除了 287 个 ORF(总计 313.7 kb)的一菌株能正常生长。Kolisnychenko 等^[27]敲除了包括前噬菌体、转座子和未知功能基因的 12 个 K 岛片段,获得菌株 MDS12(基因组减小了 8.1%)。在无机盐培养基上,菌株生长速率与野生型菌相似。Hashimoto 等^[28]构建了基因组简化菌株(删除了 2.4%~29.7%),细胞

形状和类核体组织有明显变化。Posfai 等^[29]基于比较基因组分析,选择 100 个候选敲除区域(包括基因重组和转移相关及前噬菌体等基因区域),以 MDS12 菌株为出发菌株,构建多重敲除菌株(基因组缩减了 15%),菌株生长、蛋白质表达特性正常,其电转化效率、基因复制、质粒稳定性等性状比野生株好。Mizoguchi 等^[30-31]比较分析了大肠杆菌和 *Buchnera sp.* 基因组序列,选择大肠杆菌特有基因作为敲除区域(包含 103 个基因),通过单基因敲除试验,发现其中 84 个基因的敲除不影响细胞生长速率,继续进行多基因组合敲除,获得菌株 MGF-01(敲除 1.03 Mb),其生长速率与野生株相同,且最高菌体浓度为野生株的 1.5 倍。利用此菌株表达生产 L-苏氨酸, L-苏氨酸产量比以野生株为宿主构建的细胞高 2.4 倍。Sharma 等^[32-33]利用基因组简化菌株表达重组蛋白氯霉素乙酰转移酶,菌株生长速率和重组蛋白产量均与野生菌类似,由于乙酸积累致使菌体终浓度有所降低。Lee 等^[34]在基因组减小菌株 MDS42(基因组删除 14.3%)中导入 L-苏氨酸高产相关基因,菌株 L-苏氨酸产量比对照菌株高 83%。与野生型菌株相比,基因组简化菌株生理特性变化小,遗传稳定,显示出了较好的生产应用潜力。

值得注意的是,即使针对同一物种的研究工作,各个研究者选择的敲除目标区段不同,选用的敲除技术、敲除操作先后次序也有差异,敲除靶点、敲除方法及敲除操作步骤的差异是否对最终获得的基因组简化菌株的生理性状有影响,还没有相关研究,值得关注。

3.2 枯草芽孢杆菌

Kobayashi 等^[35]根据前人研究及预测,并结合单基因敲除试验,最终确定 271 个基因是枯草芽孢杆菌在丰富培养环境生长所必需的,在必需基因中,功能未知的基因占 4%,为基因组简化的研究奠定了基础。Westers 等^[36]分步敲除了基因组上前噬菌体区(SP β 、PBSX)、类前噬菌体区(skin、pro1、pro3)及 pks 操纵子,获得了基因组删除了 7.7%(包括 332 个基因)的 $\Delta 6$ 菌株。与野生株相比, $\Delta 6$ 菌株在代谢通量、感受态和芽胞形成特性等方面无显著变化,但蛋白质组、蛋白质分泌及细胞运动性有明显差异。 $\Delta 6$ 菌株缺少导致转化效率降低和质粒不稳定的 BsuM 限制修饰系统,对后续的遗传改造十分有利。Ara 等^[37]依次敲除了前噬菌体区 SP β 、PBSX、pro1-6、skin 及编码次生产物的 pks、

pps 操纵子, 构建了基因组简化菌株 MGB469, 细胞生长基本正常, 外源重组蛋白表达无预期的明显优势特性。对此菌株进一步敲除操作, 获得菌株 MG1M(删减 0.99 Mb), 但是菌株继代培养后生长速率、细胞形态、重组蛋白产量等性状不稳定。研究表明, 基因组过多删除可能对菌株保持某些生理性状是不利的。Morimoto 等^[38]分析确定了不编码 RNA 或基本蛋白质的连续序列片段(大于 10 kb), 排除了部分涉及初级代谢的基因, 以基因组简化菌株 MGB469 为出发株, 采用 upp 选择标记的无痕敲除操作获得基因组简化菌株 MBG874(敲除 20.7% 基因组), MBG874 菌株生长速率比野生株有所降低, 细胞形态和染色体分布变化小。利用此菌株表达碱性纤维素酶及碱性蛋白酶活性分别比野生株提高 1.7 和 2.5 倍。虽然 MBG874 菌株基因组删减量(0.874 Mb)比此前构建的 MG1M 菌株(0.99 Mb)少, 但是该菌株生长速率、细胞形态、外源蛋白表达却相对较为稳定, 至于基因组较多删减为何会导致某些不利生理性状的产生, 还有待于进一步研究。

3.3 其他原核生物

Tsuge 等^[39]采用转座子和 Cre/loxP 重组酶系统组合敲除 0.2~186 kb, 获得了 42 株突变株, 实验确定占基因组 11.9% 的 393.6 kb 的序列片段是实验室培养条件下非必需的, 为基因组删减操作提供了依据。Suzuki 等^[40]利用 Cre/loxP 重组系统删除谷氨酸棒杆菌包括 188 个开放阅读框的 DNA 序列片段(190 kb), 所得基因组简化菌株在实验室培养条件下能正常生长。

Komatsu 等^[41]利用 Cre/loxP 重组系统分步删除了大于 1.4 Mb 染色体区段, 获得一系列阿维链霉菌基因组简化菌株(删除 83.12%~81.46% 基因组)。将链霉素、头孢霉素 C 及大环内酯类抗生素 pladienolide 合成相关基因簇基因分别导入突变株细胞中并检测产物表达, 基因组简化菌株链霉素和头孢霉素 C 产量高于天然生产菌株; 基因组简化菌株本身不能合成 pladienolide, 在导入调控基因 *pldR* 后, 菌株能合成 pladienolide, 导入的外源基因使某些突变株能有效生产植物萜类合成中间前体——紫穗槐-4,11-二烯。研究表明, 与阿维链霉菌野生菌株相比, 基因组简化菌株在抗生素等天然或非天然次生代谢产物生产方面优势明显。

3.4 真核微生物

关于酿酒酵母、粟酒裂殖酵母基因组简化研究相对较少。Murakami 等^[42]通过软件分析, 排除了

已知必需基因及某些因删除可能致死或有不利性状的基因, 利用 PCR 介导染色体分裂技术, 经过多步操作敲除了酿酒酵母染色体目标片段区域, 获得了缺失 5% (531.5 kb) 的基因组简化菌株, 与野生型相比, 此菌株乙醇产量增加至 1.8 倍, 甘油生产增加至 2 倍, 在含 7.5% 乙醇、1 mol/L NaCl 或 1.5 mol/L 山梨醇培养基中, 对热、酸、碱、抗压能力与野生型相似。结果显示, 对基因组的删减操作一定程度上改善了菌株生产乙醇的性能, 并且提高了对环境的适应能力。Kim 等^[43]对粟酒裂殖酵母与芽殖酵母基因组进行了比较分析, 研究发现, 在两类酵母基因组中, 83% 的单拷贝基因同源, 涉及线粒体蛋白翻译、细胞周期调控点等途径的必需基因有差异, 裂殖酵母的必需基因数量比芽殖酵母多, 为基因组简化研究奠定了基础。Hirashima 等^[44]利用染色体和线性 DNA 的同源重组对粟酒裂殖酵母基因组进行大片段 DNA 敲除。Giga-Hama 等^[45]对粟酒裂殖酵母基因组序列分析确定必需基因, 利用 Latour 改良方法进行逐步敲除操作, 获得基因组删减了 500 kb 的突变菌株, 继续敲除了菌株蛋白酶基因, 利用最终获得的基因组简化菌株表达生产人生长激素, 结果显示, 基因组简化菌株表达的外源蛋白产量比对照野生株高。通过构建基因组简化菌株, 可获得高效表达外源目的基因的宿主细胞。

目前关于基因组简化的研究主要集中于少数模式菌株, 由于功能基因组研究、遗传转化系统等方面的欠缺和局限, 关于其他微生物的相关研究还很少见报道。

4 存在问题及展望

从理论上讲, 基因组最大程度地简化可以优化代谢网络, 提升细胞生产性能。基因组中非必需基因比例较大, 因此, 基因组简化还有进一步操作的可能。然而, 研究发现, 某些基因组高度精简的突变株生长速率也无优势, 对培养环境的适应能力差, 遗传稳定性差^[38-39], 由此可见, 忽视基因组中各基因之间可能存在的相互作用, 片面追求基因组最小化, 对基因组过多地删减操作也可能对菌株生长、代谢以及后续遗传改造有不利影响。因此, 应根据具体研究目的合理选择敲除靶区域, 进行适度删减, 才可能保证菌株在人为控制环境下表现快速生长、高效生产等优良性状。

研究发现, 在特定培养条件下, 某些必需基因是细胞生存所必需的, 如果环境条件改变, 某些基

因可能并不是细胞生存所必需的。因此,为了获得具有鲁棒性、应用潜力的基因组简化菌株,在选择敲除目标区域时,需要保留必需基因及条件必需基因(conditionally essential gene,即在特定环境生存所必需的基因)^[46],同时,还要结合多样化的环境加以筛选。通过培养基以及培养条件的进一步优化,促进基因组简化菌株的生产效能的提高和实际应用。

必需基因的准确全面预测是构建基因组最小化菌株的基础。目前关于必需基因的预测方法还存在某些缺陷^[47]。比较基因组分析所获得预测结果的准确性与分析选取的参照物种基因组有关,研究发现,基于近缘物种基因组的比较获得非必需基因信息较准确^[29];基因敲除试验的结果不一定准确反映基因必需性。有关研究发现,某些毒性基因与其对应的拮抗基因的组合敲除并不会对细胞有致死效应^[28],如果只敲除此拮抗基因则可能使细胞致死。此外,某些非必需基因的组合敲除也可能导致细胞死亡。基于系统生物学的模拟预测结果也可能由于代谢网络模型的精度及完善程度等原因而与实际结果有差异。需要在逐步完善基因组尺度代谢网络模型基础上,将基于计算系统生物学的模拟预测方法与基因敲除方法相结合,提高对必需基因的识别和鉴定的可靠性^[8,48]。综合运用多种方法预测分析基因必需性将是今后相关研究的重要发展趋势。

为了避免某些基因敲除方法可能导致染色体上遗留“污染”序列,有学者在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌基因组简化研究中应用无痕敲除方法^[38,49,50]。然而,适用于其他微生物的无痕敲除技术还有待于研究探索。

基因组简化细胞有助于构建具有实际用途的精巧、个性化生物引擎^[3,51],可为医药、化学品、再生能源生产以及环境污染治理提供理想的表达宿主细胞。在基因组简化或最小化菌株平台基础上,根据具体的研究目的,添加特定功能基因模块,使之在细胞中稳定表达,用于药物蛋白、基因疫苗、蛋白酶、维生素、聚羟链烷酸酯等医药产品、大宗化学品、生物材料和生物能源等生物基化学品的大规模生产,具有重要而广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

[1] Liang J, Luo Y, Zhao H. Synthetic biology: putting synthesis into biology. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2011, 3(1):7-20

[2] Foley PL, Shuler ML. Considerations for the design and construction of a synthetic platform cell for biotechnological applications. Biotechnol Bioeng, 2010, 105: 26-36

[3] Vickers CE, Blank LM, Krömer JO. Grand challenge commentary: Chassis cells for industrial biochemical production. Nat Chem Biol, 2010, 6(12): 875-7

[4] Lee SY. Systems biology and biotechnology of *Escherichia coli* [M]// Sung BH, Lee JH, Kim SC. *Escherichia coli* genome engineering and minimization for the construction of a bioengine. Germany: Springer, 2009:19-40

[5] 方宏清, 陈惠鹏. 大肠杆菌基因组减小研究进展. 生物技术通讯, 2009, 20(4): 564-7

[6] Zhang LY, Chang SH, Wang J. Synthetic biology: From the first synthetic cell to see its current situation and future development. Chn Sci Bull, 2011, 56(3): 229-37

[7] Zhou JZ, Thompson DK, Xu Y, et al. Microbial functional genomics[M]// Zhou JZ, Thompson DK. Microbial evolution from a genomics perspective. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004 : 67-111

[8] Pál C, Papp B, Lercher MJ, et al. Chance and necessity in the evolution of minimal metabolic networks. Nature, 2006, 440(7084): 667-70

[9] Klasson L, Andersson SG. Research on small genomes: implications for synthetic biology. Bioessays, 2010, 32(4): 288-95

[10] Szathmáry E. Life: In search of the simplest cell. Nature, 2005, 433: 469-70

[11] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. Science, 2008, 319: 1215-20

[12] Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, et al. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 20404-9

[13] Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, et al. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. Science, 2007, 317 (5838): 632-8

[14] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science, 2010, 329: 52-6

[15] Moya A, Gil R, Latorre A, et al. Toward minimal bacterial cells: evolution vs design. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(1): 225-35

[16] Forster AC, Church GM. Towards synthesis of a minimal cell. Mol Syst Biol, 2006, 2: 45

[17] Zhang LY, Chang SH, Wang J. How to make a minimal genome for synthetic minimal cell. Protein Cell, 2010, 1(5): 427-34

[18] Wang HH. Synthetic genomes for synthetic biology. J Mol Cell Biol, 2010, 2: 178-9

[19] Gil R, Silva FJ, Peretó J, et al. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(3): 518-37

[20] Mushegian AR, Koonin EV. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial

- genomes. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(19): 10268-73
- [21] Hutchison CA, Peterson SN, Gill SR, et al. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. Science, 1999, 286: 2165-9
- [22] Glass JI, Assad-Garcia N, Alperovich N, et al. Essential genes of a minimal bacterium. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 425-30
- [23] Martelli C, De Martino A, Marinari E, et al. Identifying essential genes in *Escherichia coli* from a metabolic optimization principle. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(8): 2607-11
- [24] 谢承佳, 何冰芳, 李霜. 基因敲除技术及其在微生物代谢工程方面的应用. 生物加工过程, 2007, 5(3): 10-4
- [25] Yu BJ, Sung BH, Koob MD, et al. Minimization of the *Escherichia coli* genome using a Tn5-targeted Cre/loxP excision system. Nat Biotechnol, 2002, 20(10): 1018-23
- [26] Yu BJ, Kim C. Minimization of the *Escherichia coli* genome using the Tn5-targeted Cre/loxP excision system. Methods Mol Biol, 2008, 416: 261-77
- [27] Kolisnychenko V, Plunkett G 3rd, Herring CD, et al. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. Genome Res, 2002, 12(4): 640-7
- [28] Hashimoto M, Ichimura T, Mizoguchi H, et al. Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. Mol Microbiol, 2005, 55(1): 137-49
- [29] Pósfai G, Plunkett G 3rd, Fehér T, et al. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. Science, 2006, 312(5776): 1044-6
- [30] Mizoguchi H, Mori H, Fujio T. *Escherichia coli* minimum genome factory. Biotechnol Appl Biochem, 2007, 46(3): 157-67
- [31] Mizoguchi H, Sawano Y, Kato J, et al. Superpositioning of deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a reduced genome. DNA Res, 2008, 15(5): 277-84
- [32] Sharma SS, Campbell JW, Blattner FR, et al. Expression of two recombinant chloramphenicol acetyltransferase variants in highly reduced genome *Escherichia coli* strains. Biotechnol Bioeng, 2007, 98(5): 1056-70
- [33] Sharma SS, Blattner FR, Harcum SW. Recombinant protein production in an *Escherichia coli* reduced genome strain. Metab Eng, 2007, 9(2): 133-41
- [34] Lee JH, Sung BH, Kim MS, et al. Metabolic engineering of a reduced-genome strain of *Escherichia coli* for L-threonine production. Microb Cell Fact, 2009, 8: 2
- [35] Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, et al. Essential *Bacillus subtilis* genes. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(8): 4678-83
- [36] Westers H, Dorenbos R, van Dijl JM, et al. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. Mol Biol Evol, 2003, 20(12): 2076-90
- [37] Ara K, Ozaki K, Nakamura K. *Bacillus* minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information. Biotechnol Appl Biochem, 2007, 46: 169-78
- [38] Morimoto T, Kadoya R, Endo K, et al. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. DNA Res, 2008, 15(2): 73-81
- [39] Tsuge Y, Suzuki N, Inui M, et al. Random segment deletion based on IS31831 and Cre/loxP excision system in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(6): 1333-41
- [40] Suzuki N, Tsuge Y, Inui M, et al. Cre/loxP-mediated deletion system for large genome rearrangements in *Corinebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67(2): 225-33
- [41] Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 2646-51
- [42] Murakami K, Tao E, Ito Y, et al. Large scale deletions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome create strains with altered regulation of carbon metabolism. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 75(3): 589-97
- [43] Kim DU, Hayles J, Kim D, et al. Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Nat Biotechnol, 2010, 28(6): 617-25
- [44] Hirashima K, Iwaki T, Takegawa K, et al. A simple and effective chromosome modification method for large-scale deletion of genome sequences and identification of essential genes in fission yeast. Nucleic Acid Res, 2006, 34(2): 11
- [45] Giga-Hama Y, Tohda H, Takegawa K, et al. *Schizosaccharomyces pombe* minimum genome factory. Biotechnol Appl Biochem, 2007, 46(3): 147-55
- [46] Joyce AR, Reed JL, White A, et al. Experimental and computational assessment of conditionally essential genes in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 2006, 188(23): 8259-71
- [47] Fehér T, Papp B, Pal C, et al. Systematic genome reductions: theoretical and experimental approaches. Chem Rev, 2007, 107(8): 3498-513
- [48] Koonin EV. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. Nat Rev Microbiol, 2003, 1(2): 127-36
- [49] Morimoto T, Ara K, Ozaki K, et al. A new simple method to introduce marker-free deletions in the *Bacillus subtilis* genome. Genes Genet Syst, 2009, 84(4): 315-8
- [50] Zakataeva NP, Nikitina OV, Gronskiy SV, et al. A simple method to introduce marker-free genetic modifications into the chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85(4): 1201-9
- [51] Gao H, Zhuo Y, Ashforth E, et al. Engineering of a genome-reduced host: practical application of synthetic biology in the overproduction of desired secondary metabolites. Protein Cell, 2010, 1(7): 621-6