

丙酮丁醇梭菌的遗传操作系统

董红军, 张延平, 李寅

中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 丙酮丁醇梭菌是极具潜力的替代燃料——生物丁醇的合成菌, 受到各国研究者的普遍关注。丙酮丁醇梭菌菌株改造是生物丁醇产业化进程中的一项重要工作, 其中遗传操作是核心内容之一。以下对丙酮丁醇梭菌的遗传操作系统的发展历史、种类和原理进行了综述, 分析了目前几种遗传操作系统的局限性, 并对其发展进行了展望。

关键词: 丙酮丁醇梭菌, 丁醇, 菌株改造, 遗传操作系统

Genetic modification systems for *Clostridium acetobutylicum*

Hongjun Dong, Yanping Zhang, and Yin Li

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: *Clostridium acetobutylicum*, a biofuel-butanol producer, has attracted worldwide interests. Strain improvement is important for the process of biobutanol industrialization where efficient genetic modification systems are essential. In this review, the history of genetic modification systems of *C. acetobutylicum* was introduced, and the types and principles of these systems and their disadvantages are summarized and analysed. The development of updated genetic modification systems for *C. acetobutylicum* is also proposed.

Keywords: *Clostridium acetobutylicum*, butanol, strain improvement, genetic modification systems

丁醇是一种重要的化工原料, 主要用于制造增塑剂、溶剂、萃取剂等, 全球年需求量超过 140 万 t。丁醇又是一种极具潜力的新型生物燃料, 其热值、辛烷值与汽油相当; 含氧量与汽油中常用的甲基叔丁基醚相近; 不会腐蚀管道、不易吸水, 便于管道输送; 蒸汽压低, 安全性高, 且与汽油有很好的混合性。

生产丁醇有两种方式, 一种是通过化工方法从石油中提炼。这种方法是目前市场上丁醇的主要来源。但随着石油作为不可再生资源, 储备量急

剧减少, 且价格节节攀高, 生物法生产丁醇作为石化法生产的替代方式受到越来越多的关注。产丁醇的微生物包括丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum*、拜氏梭菌 *C. beijerinckii*、*C. saccharoperbutylacetonicum* 和 *C. saccharobutylicum* 等菌株, 其中对丙酮丁醇梭菌 *C. acetobutylicum* 的研究最广泛和深入。微生物生产丁醇的主要问题是产物浓度低、产率低、分离成本高, 因此生物丁醇的生产需要对现有的发酵体系及菌株进行改造, 才有可能满足工业化需求。

Received: June 15, 2010; Accepted: August 15, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z237).

Corresponding author: Yin Li. Tel/Fax: +86-10-64807485; E-mail: yli@im.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA02Z237) 资助。

传统的菌株改造是基于诱变的随机筛选, 工作量大, 而且经过过去长期诱变筛选, 其提升丁醇生产能力的空间已经很小。2001年丙酮丁醇梭菌基因组的测序完成^[1], 为研究者们对丁醇生产进行系统生物学的研究提供了可能。现在转录组学^[2]、蛋白质组学^[3]、代谢网络模型^[4-6]等方面都有广泛的研究报道。虽然现在对丙酮丁醇梭菌产丁醇的认识已经有了很大的进步, 但是通过菌株改造来提升丁醇生产能力的工作却进展不大。主要原因是由于厌氧梭菌的遗传操作比较困难, 转化效率低 ($10^3\sim 10^5$ 转化子/ μg DNA)^[7], 传统的同源重组方法难以进行。虽然目前已经有梭菌遗传操作成功的报道, 但是往往效率不高或使用范围受限, 遗传操作工具的高效性仍是目前产丁醇菌株改造的一个制约因素。本文主要以丙酮丁醇梭菌模式菌株 ATCC824 为介绍对象, 对其遗传操作系统的发展历史及原理进行了总结, 分析了其局限性, 并对未来的发展进行了展望。

1 丙酮丁醇梭菌的转化

由于丙酮丁醇梭菌不具备自然转化的能力, 所以将外源 DNA 导入到梭菌细胞内就需要采取物理或化学的方法。Truffaut 等^[8]利用制备原生质体的方法对丙酮丁醇梭菌 NI-4081 菌株进行了转化, 其方法是在含蔗糖的培养基中培养细菌, 待生长到一定阶段后利用溶菌酶和青霉素 G 去除细胞壁, 然后在聚乙二醇溶液中进行转化。但原生质体制备、转化和原生质体再生过程比较复杂、耗时, 目前比较常用的仍是操作简单的电转化方法。电转化法是指细胞在瞬间的高压电场中, 细胞膜可以形成空隙, 从而使得外源 DNA 进入到细胞内。Mermelstein 等使用的方法^[7]是目前最为通用的方法, 其主要内容为使用 ETB 溶液 (272 mmol/L 蔗糖溶液 (pH 7.4), 5 mmol/L NaH_2PO_4) 作为电转溶液, 电转参数为电压 25 kV, 电容 25 μF , 电阻 ∞ , 电击杯 0.4 cm, 转化效率最高可达 10^5 个转化子/ μg DNA。由于丙酮丁醇梭菌是严格的厌氧菌, 所以制备感受态细胞的过程是在厌氧条件下 (厌氧箱内) 完成的, 目前还没有在有氧条件下成功转化丙酮丁醇梭菌的报道。

Tyurin 等利用特制的电转仪对丙酮丁醇梭菌进

行了方波高压脉冲 (电压 12 kV; 脉冲持续时间为 22.5 ms, 脉冲频率 100 kHz) 电转化^[9], 使得梭菌的转化效率超过 10^6 个转化子/ μg DNA, 是目前报道的最高转化效率, 然而由于这种特制的电转仪还没有商业化, 所以研究丙酮丁醇梭菌通常使用的还是 Mermelstein 等的方法^[7]。

限制修饰系统 (Restriction-modification system) 是自然界很多细菌中存在的一种细菌免疫系统, 用于降解入侵的外源 DNA, 保护自身 DNA。在丙酮丁醇梭菌的模式菌株 ATCC824 中也存在着一种名为 Cac824I 的二型限制修饰系统, 识别-GCNGC-位点。大多数来自大肠杆菌的质粒由于这个位点上没有甲基化保护且具有多个拷贝, 所以这样的质粒是不能够转化梭菌的。Mermelstein 等利用表达有来自枯草芽胞杆菌噬菌体 $\Phi 3\text{II}$ 甲基化酶的大肠杆菌进行质粒的甲基化修饰, 第一次实现了来自大肠杆菌的质粒的成功转化^[7,10]。作者根据发表的丙酮丁醇梭菌 ATCC824 的基因组信息及 REBASE 网站的预测, 选择 CAC1502 基因, 利用二型内含子的方法对其进行了失活, 得到的突变体菌株 SMB009 转化时质粒不再需要特异的甲基化修饰^[11]。在丙酮丁醇梭菌中, 限制修饰系统可能是不能利用接合方法进行基因转移 (Gene transfer) 的一个关键因素, SMB009 菌株将可能实现梭菌的接合操作。

2 丙酮丁醇梭菌中的复制型质粒及表达质粒

1989年, Truffaut 等最早证明了 pIM13、pT127、pBC16 可以通过电击转化导入 *Clostridium acetobutylicum* NI-4081 中^[12], 并构建了 *E. coli*-*C. acetobutylicum* 穿梭型质粒, Azeddoug 等也利用 pIM13 构建了新的穿梭载体, 使用 PEG 介导的原生质体转化方法转化^[13]。1990年 Williams 等把来自 pAM β 1 (*Enterococcus faecalis*)、pCB101 (*C. butyricum*)、pWV01 (*Streptococcus cremoris*) 的复制子与 RK2 型 *oriT* 片段相连接, 构建可接合的穿梭型质粒, 首次成功地利用了 IncP 型质粒的接合原理, 将质粒导入 *C. acetobutylicum* NCIB 8052 (现定名为 *C. beijerinckii* NCIMB 8052) 中^[14]。但是对于其他的丙酮丁醇梭菌如 ATCC824、DSM1731、DSM792 等

均未见有利用接合方法导入质粒的报道, 所以这种方法可能只适用于 *C. beijerinckii*。上述复制型质粒都是来自非梭菌的菌株, 1990年 Yoshino 等首次将分离自 *C. acetobutylicum* strain No. 86 的质粒 pCS86 (3.0 kb) 改造成了可与 *E. coli* 穿梭的质粒, 成功转化了不含质粒的 *C. acetobutylicum* strain No. 220^[15]。1992年 Lee 等利用来自链球菌的质粒 pMU1328, 来自丁酸梭菌的 pCBU2, 来自 *C. perfringens* 的 pJC4、pJU22, 来自 *Streptococcus faecalis* 的 pAMβ1, 来自 *Bacillus subtilis* 的 pIM13 质粒构建了 pSYL2、pSYL7、pSYL9、pSYL14 四个穿梭质粒, 由于 ATCC824 中限制修饰系统的限制, 只有 pSYL2 可以成功转化, 而这 4 个质粒都可以以 $8 \times 10^2 \sim 6 \times 10^3$ 个转化子/μg DNA 的效率转化 NCIMB8052^[16]。目前在

ATCC824 菌株使用的大多数质粒是衍生自 pIM13 或 pAMβ1。

3 丙酮丁醇梭菌中的基因失活策略

基于 Mermelstein 等报道的丙酮丁醇梭菌电转化方法^[7], Green 等首次利用自杀质粒成功地在梭菌中实现了基因敲除^[17]。然而由于梭菌的转化效率较低, 利用自杀质粒进行同源重组的成功率极低, 所以后来发展出了以复制型质粒为基础的反义 RNA 抑制、复制型质粒同源重组及二型内含子基因敲除技术。2010年作者构建的限制修饰系统缺陷型菌株 SMB009 使得这些操作都可以使用非甲基化的 DNA 来进行。丙酮丁醇梭菌遗传操作系统发展历史上的重要事件总结见图 1。

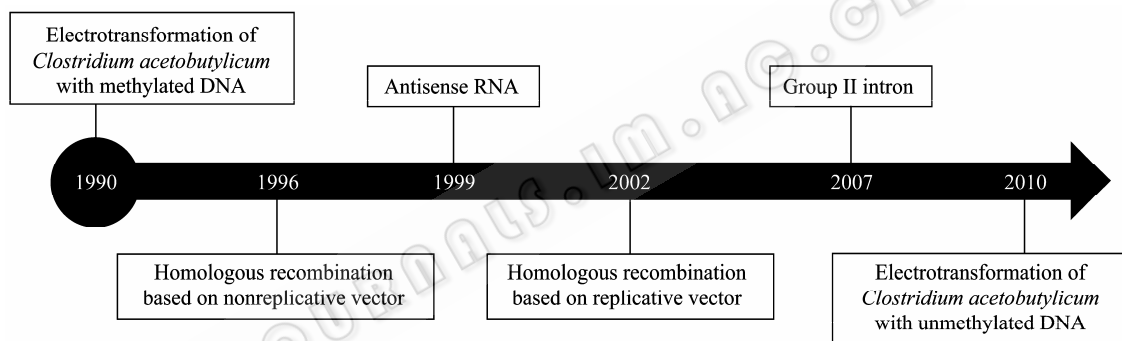


图 1 丙酮丁醇梭菌的遗传操作系统发展历史

Fig. 1 History of genetic modification systems of *Clostridium acetobutylicum*.

3.1 基于非复制型质粒的同源重组

Green 和 Bennett 使用电转化方法将非复制型质粒导入到 *C. acetobutylicum* 中, 通过同源重组单交换方法将丁酸激酶基因 *buk*、磷酸转乙酰酶基因 *pta*、醇/醛脱氢酶基因 *aad*、调控因子编码基因 *solR* 成功敲除^[17-19]。由于该方法成功率较低, 在过去十多年的发展中, 使用非复制型质粒通过同源交换的方法敲除基因的成功例子只有这几个。

3.2 基于复制型质粒的同源重组

由于自杀质粒同源重组的低效率, 有研究者开发出了复制型质粒进行基因敲除的方法。这种方法理论上将会比较容易得到突变体, 因为含同源片段的质粒可以在细胞内复制, 可以在几代中存在, 这样就增加了同源交换片段间接触的频率和时间。

pLHKO 即是应用于梭菌的这样一个质粒^[20], 它含氯霉素抗性基因, 有来自 pIM13 的复制子保证其在梭菌内的复制。在实际应用中, 将目的基因两侧的同源片段连入载体, 中间再引入一个红霉素抗性基因, 将质粒转入菌体。得到的阳性转化子在无抗平板上培养, 通过印模的方法连续转板几次, 最后将其转印到只含红霉素的平板上筛选, 得到的红霉素抗性克隆再进行验证。*spo0A* 基因的敲除是成功使用这种方法的例子^[20]。

Souaille 等在 2006 年对基于复制型质粒的同源重组的方法在梭菌中应用申请了专利^[21], 并在质粒上引入了负筛选 Marker 尿嘧啶磷酸核糖转移酶基因 (由 *upp* 基因编码, 其存在可使菌体对 5-氟尿嘧啶敏感) 用于双交换的筛选。Heap 等在 2009 年申请

的专利中对复制型质粒同源重组方法引入了新的策略^[22]: 在同源片段后面连入一段不含启动子的抗性基因, 当质粒呈游离状态时, 该抗性基因不表达, 当质粒通过同源重组整合到染色体上时, 该抗性可以利用靶基因的启动子表达自身, 从而表现出抗性(图 2)。由于前面介绍的复制型质粒同源重组方法筛选整合子时, 需要筛选大量的克隆, 工作量很大, 这个策略可以有效地解决这个问题。

3.3 反义 RNA 技术

Desai 和 Papoutsakis 尝试使用了反义 RNA 技术对菌株进行代谢改造。他们针对 *buk* 和 *ptb* 的 mRNA 的靶点设计了 2 个反义 RNA 表达载体 pRD4 和 pRD1, 结果使得含 pRD4 的菌株中丁酸激酶酶活下降 85%, 丁醇和丙酮的产量分别上升 50% 和 30%。含 pRD1 的菌株中磷酸丁酰转移酶活性下降 70%, 同时丙酮和丁醇产量下降 96% 和 75%。这与 *buk* 基因敲除菌株得到的结果和推论相符^[23]。Tummala 利用反义 RNA 技术下调了丙酮途径中的 *adc* 和 *ctfA/B* 的表达。结果发现虽然靶标酶的酶活都有下降, 但是 *adc* 的下调不影响丙酮的形成。下调 *ctfA/B* 却可使丙酮和丁醇的产量明显下降。这说明丙酮途径中 *adc* 不是关键的, 而 *ctfA/B* 是关键基因^[24]。

3.4 二型内含子基因失活技术

2007 年有研究者发展了一种适用于梭菌的内含子插入失活方法。内含子插入法失活基因的主要原理是来自乳酸菌的 *ltrB* 基因的 II 型内含子在特定宿

主中由宿主启动子表达, 并从 mRNA 前体自剪接下来, 形成特定结构的 RNA, 在多功能蛋白 LtrA 的辅助下, 可以识别 DNA 上特定的序列, 并且插入到特定的位点中, 通过反转录合成互补链, 最终以双链形式插入到特定的 DNA 序列中(图 3)。由于内含子插入 DNA 的识别位点主要由内含子的 EBS1d 和 EBS2 两个位置的短序列来识别, 因此根据一定的机制和算法改造内含子, 则内含子就会识别特定的位点^[25]。英国 Nottingham 大学 Minton 教授领导的研究组和中国科学院上海植物生理研究所姜卫红研究组都基于这种原理开发出了适合梭菌中使用的内含子插入型基因失活质粒^[26-27]。研究者们已经使用这种方法成功敲除了 *buk*、*spo0A* 等基因。作者对 Minton 开发出的 Clostron 系统进行了改进, 构建出了 pMTL008 和 pMTL099 载体^[11]。目前已报道的二型内含子载体特点见表 1。特定位点插入内含子的设计是基于一种特定的算法, 这个方法目前已被 Sigma-Aldrich 公司商品化, 并且只有购买其产品时才有限定次数的使用权。另外由于内含子的插入识别机理目前还没完全得到解析, 现在所认识到的规律是结合一些统计学分析及结构预测而得到的, 所以内含子会以一定的概率插入到非靶位点。染色体 DNA 的插入位点也要符合特定的结构要求才能使得内含子能够插入, 因此对于任意 DNA 位点的操作有一定限制。这种方法目前主要用于基因的插入型失活, 对于缺失型失活不太适合或是比较麻烦。

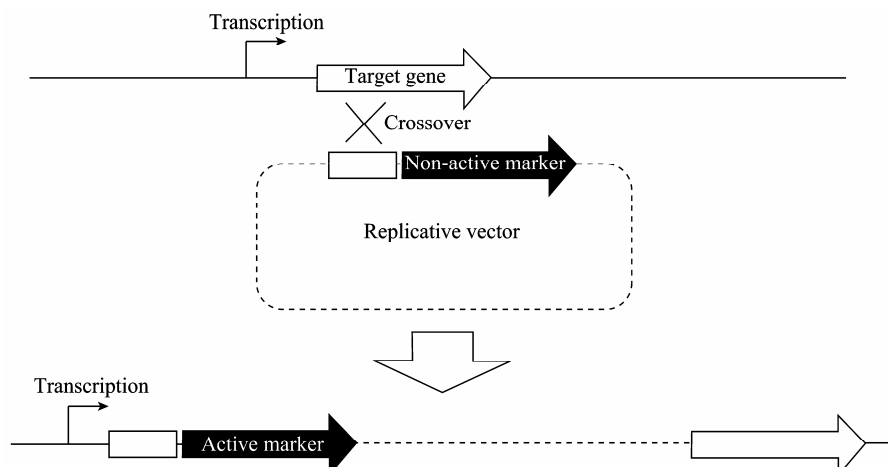


图 2 Heap 法基因敲除策略示意图

Fig. 2 Heap strategy for gene knockout.

表 1 四种二型内含子载体特点比较

Table 1 Characteristics of four vectors bearing group II intron

Vector	Replicon	Promoter	Resistance	RAM	Reference
pSY6	pIM13	Pptb	Erythromycin	-	[27]
pMTL007	pAM β 1	Pfac	Chloramphenicol	ErmBtdRAM2	[26]
pMTL008	pAM β 1	Pthl	Chloramphenicol	ErmBtdRAM2	[11]
pMTL009	pAM β 1	Pthl	Chloramphenicol	-	[11]

Pptb: phosphotransbutyrylase promoter; Pfac: artificial promoter; Pthl: thiolase promoter; RAM: retrotransposition-activated selectable marker.

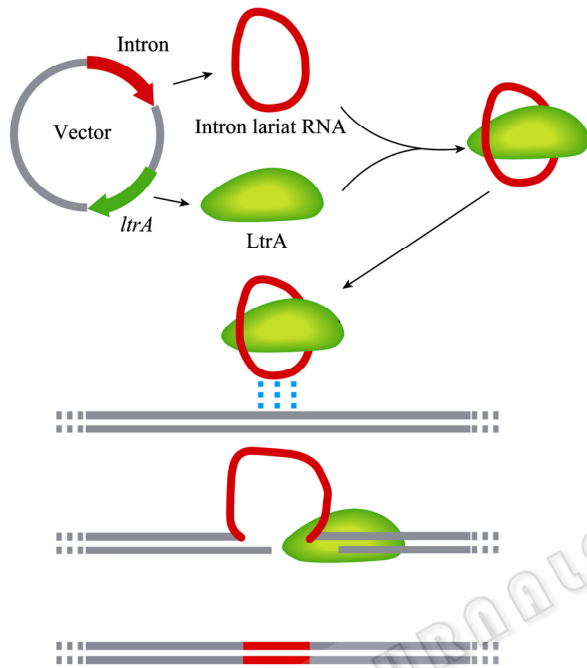
图 3 *ltrB* 二型内含子基因敲除策略示意图

Fig. 3 The process of gene knockout using *ltrB* group II intron.

4 展望

目前, 多种适用于丙酮丁醇梭菌的遗传操作方

法已经被开发出来, 使得研究者能够进行在梭菌细胞中进行遗传学基础研究和菌株改造工作。然而, 这些遗传操作方法也同时存在着不同的局限性 (表 2)。由于丙酮丁醇梭菌的转化效率不高, 所以利用非复制型质粒进行同源重组的成功率非常低, 而利用复制型质粒进行同源重组的方法虽然增加了载体上同源片段与染色体上的同源片段的交换机会, 但是筛选时的工作量比较大。Heap 的方法是解决这种筛选时大工作量的一个好方法, 然而, 它不适用于那些在筛选条件下弱表达或不表达的基因。反义 RNA 技术已被成功应用于梭菌中一些基因的下调表达, 但是它的下调程度是不容易控制的, 而且利用该方法很难实现完全失活某个基因。二型内含子法是目前梭菌中最为有效的基因敲除方法, 但是它的特点是插入位点满足一定的碱基组成才能够被插入, 所以对于一些不含这样的插入位点的基因是不适用的, 另外内含子插入位点识别算法是基于大肠杆菌的识别序列统计出来的, 对于梭菌可能还需要一定的调整, 且 1 个内含子可能识别多个插入识别位点, 所以有时不能确保准确插入到靶位点中。

表 2 现有丙酮丁醇梭菌中遗传操作系统局限性分析

Table 2 The disadvantages of current genetic modification systems of *C. acetobutylicum*

Methods	Principles	Disadvantages
Homologous recombination based on nonreplicative vector ^[17-19]	Homologous recombination	Low efficient
Homologous recombination based on replicative vector	Homologous recombination	
Harris strategy ^[20]	Replicative vector containing homologous fragment	Labourious
Soucaille strategy ^[21]	Counter selectable marker for double crossover	Labourious
Heap strategy ^[22]	Marker gene without promoter, expressed by the chromosomal promoter after integration	Not fit for non-constitutively expressed genes
Antisense RNA ^[23]	Depression by antisense RNA	Not easy to control the depression strength
Group II intron ^[26,27]	Disruption by group II intron insertion	Insertion at specific sites

基于以上的分析, 我们认为丙酮丁醇梭菌的遗传操作系统还有很大的提升空间, 主要包括以下几个方面: 第一, 提高转化效率。对于基于非复制型质粒的同源重组方法, 需要配合高效的转化方法才可能得以实现, 所以提高转化效率是该方法的突破口。开发梭菌在空气中 (非厌氧条件) 进行转化的方法将会有利于简化操作, 并且可以使得大规模的优化操作或特殊仪器的使用提供条件。第二, 发展新策略。对于目前转化效率不高的情况下, 复制型质粒的同源重组方法应该是最有潜力的方法, 对于双交换而言, Heap 法解决了第一步交换的筛选问题, Soucaille 法解决第二步交换的筛选问题, 那么两种方法的结合将会是一种理想的敲除策略。第三, 引入成熟的方法。将在大肠杆菌或是芽胞杆菌等模式生物中发展起来的方法或策略 (如基于 lambda 噬菌体 Red 重组酶的重组工程) 应用到丙酮丁醇梭菌中, 将会实现梭菌的高效遗传操作。

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所的朱岩帮助绘制图 3。

REFERENCES

- [1] Nolling J, Breton G, Omelchenko MV, *et al.* Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 2001, **183**(16): 4823–4838.
- [2] Tomas CA, Alsaker KV, Bonarius HPJ, *et al.* DNA array-based transcriptional analysis of asporogenous, nonsolventogenic *Clostridium acetobutylicum* strains SKO1 and M5. *J Bacteriol*, 2003, **185**(15): 4539–4547.
- [3] Sullivan L, Bennett G. Proteome analysis and comparison of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Spo0A strain variants. *J Ind Microbiol Biot*, 2006, **33**(4): 298–308.
- [4] Ryan S, Senger ETP. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part I. Metabolic network resolution and analysis. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **101**(5): 1036–1052.
- [5] Ryan S, Senger ETP. Genome-scale model for *Clostridium acetobutylicum*: Part II. Development of specific proton flux states and numerically determined sub-systems. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **101**(5): 1053–1071.
- [6] Lee J, Yun H, Feist A, *et al.* Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. *Appl Microbiol Biot*, 2008, **80**(5): 849–862.
- [7] Mermelstein LD, Papoutsakis ET. *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(4): 1077–1081.
- [8] Truffaut N, Hubert J, Reysset G. Construction of shuttle vectors useful for transforming *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **58**(1): 15–19.
- [9] Tyurin M, Padda R, Huang K, *et al.* Electrotransformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using high-voltage radio frequency modulated square pulses. *J Appl Microbiol*, 2000, **88**(2): 220–227.
- [10] Mermelstein LD, Welker NE, Bennett GN, *et al.* Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Nat Biotech*, 1992, **10**(2): 190–195.
- [11] Dong H, Zhang Y, Dai Z, *et al.* Engineering *Clostridium* strain to accept unmethylated DNA. *PLoS ONE*, 2010, **5**(2), e9038.
- [12] Truffaut N, Hubert J, Reysset G. Construction of shuttle vectors useful for transforming *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **49**(1): 15–20.
- [13] Azeddoug H, Hubert J, Reysset G. Stable inheritance of shuttle vectors based on plasmid pIM13 in a mutant strain of *Clostridium acetobutylicum*. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**(7): 1371–1378.
- [14] Williams D, Young D, Young M. Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiol*, 1990, **136**(5): 819.
- [15] Yoshino S, Yoshino T, Hara S, *et al.* Construction of shuttle vector plasmid between *Clostridium acetobutylicum* and *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem*, 1990, **54**(2): 437–441.
- [16] Lee SY, Mermelstein LD, Bennett GN, *et al.* Vector construction, transformation, and gene amplification in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Ann N Y Acad Sci*, 1992, **665**: 39–51.
- [17] Green EM, Bennett GN. Genetic manipulation of acid and solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58**(2/3): 215–221.
- [18] Green EM, Boynton ZL, Harris LM, *et al.* Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiol*, 1996, **142**: 2079–2086.
- [19] Green EM, Bennett GN. Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Biochem Biotechnol*,

- 1996, **57/58**: 213–221.
- [20] Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET. Northern, morphological, and fermentation analysis of spo0A inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol*, 2002, **184**(13): 3586–3597.
- [21] Soucaille P, Figue R, Croux C. Process for chromosomal integration and DNA sequence replacement in clostridia. PCT/EP06/66997, 2006.
- [22] Heap JT, Minton NP. Methods: WO/2009/101400, 2009-08-20.
- [23] Desai RP, Papoutsakis ET. Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(3): 936–945.
- [24] Tummala SB, Junne SG, Papoutsakis ET. Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcohologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *J Bacteriol*, 2003, **185**(12): 3644–3653.
- [25] Mills DA, Manias DA, McKay LL, *et al.* Homing of a group II intron from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3. *J Bacteriol*, 1997, **179**(19): 6107–6111.
- [26] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, *et al.* The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Meth*, 2007, **70**(3): 452–464.
- [27] Shao L, Hu S, Yang Y, *et al.* Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*. *Cell Res*, 2007, **17**(11): 963–965.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

微生物资源学（第二版）

研究生创新教育系列丛书

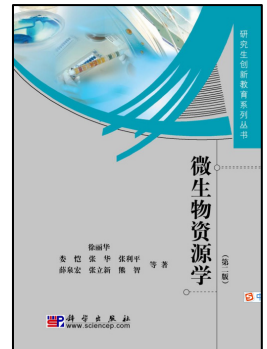
徐丽华 娄恺 张华 等著

978-7-03-029002-1 ¥ 88.00 2010年9月出版

内容简介

微生物资源学是研究微生物资源的种类和分布、微生物资源与环境的关系、微生物资源合理开发利用的战略和策略、微生物资源有效保护的措施等的科学。本书在第1版的基础上，汇集了最近10多年国内外本领域的新进展、新思想、新技术、新成就，其内容更加丰富。

本书可供微生物学及相关学科的研究人员，大专院校教师、学生、研究生及工程技术人员和管理人员学习参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：周文字 (010-64031535)

网上订购：www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目