

DOI:10.13350/j.cjpb.220904

• 论著 •

基于 *sacB* 负筛选标记的 Targetron 质粒分析系统构建*崔古贞^{1,2}, 花登雄^{1,2,3}, 鲍江舰^{1,2}, 张馨月^{1,2}, 洪伟^{1,4}, 吴道艳^{1,2}, 向松^{1,2}, 谷俊莹^{3,5}, 陈峥宏^{1,2,*}

(1. 贵州医科大学基础医学院微生物学教研室, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州省病原生物学特色重点实验室; 3. 贵州医科大学医学检验学院; 4. 省部共建地方病与少数民族性疾病重点实验室; 5. 贵州医科大学附属医院)

【摘要】 **目的** 构建基于 *sacB* 负筛选标记的 Targetron 质粒分析系统。 **方法** 构建 *sacB* 毒蛋白诱导表达受体质粒 pACYC-*sacB*(携带 *p15A* 复制子), 分析 *sacB* 毒蛋白对大肠埃希菌的毒性。设计 *sacB* 基因打靶位点, 构建脱水四环素诱导的 Targetron 供体质粒 pSY11-*sacB*(携带 *colE1* 复制子和 *sacB405a* 打靶位点)。双质粒共转化大肠埃希菌 BL21 (DE3), 脱水四环素诱导 Targetron 表达并对 *sacB* 基因进行打靶。涂布含有 5% 蔗糖和 0.1 mmol/L IPTG 的选择培养基, 筛选 *sacB* 基因失活的阳性菌落, 利用菌落 PCR 进一步验证 II 型内含子在靶位点的插入情况。 **结果** *sacB* 基因表达的大肠埃希菌不能在含有 5% 蔗糖的平板中生长; 双质粒共转化后, 脱水四环素诱导 Targetron 表达能够插入到 *sacB405a* 靶位点; *sacB* 基因失活后, 大肠埃希菌能够在含有 5% 蔗糖的平板上生长, 菌落 PCR 验证内含子插入到 DNA 靶位点。 **结论** 建立了基于 *sacB* 负筛选标记的 Targetron 质粒分析系统, 为 II 型内含子功能鉴定、迁移规律分析等奠定了基础。

【关键词】 Targetron; *sacB*; II 型内含子; 打靶平台**【中图分类号】** R392**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)09-1010-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Sep.; 17(9): 1010-1014.]

Construction of Targetron plasmid analysis system based on *sacB* negative screening marker

CUI Gu-zhen^{1,2}, HUA Deng-xiong^{1,2,3}, BAO Jiang-jian^{1,2}, ZHANG Xin-yue^{1,2}, HONG Wei^{1,4}, WU Dao-yan^{1,2}, XIANG Song^{1,2}, GU Jun-ying^{3,5}, CHEN Zhong-hong^{1,2} (1. Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Key Laboratory of Medical Microbiology and Parasitology of Education Department of Guizhou; 3. School of Clinical Laboratory Sciences, Guizhou Medical University; 4. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education; 5. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University)

【Abstract】 **Objective** To construct a Targetron plasmid analysis system based on *sacB* negative screening marker.

Methods Firstly, the recipient plasmid pACYC-*sacB* (carrying *p15A* replicon) was constructed to analyze the toxicity of *sacB* toxin to *E. coli*. Secondly, the *sacB* targeting site was designed and the donor plasmid pSY11-*sacB* (carrying *colE1* replicon and *sacB405a* targeting site) was constructed. Then, the double plasmids were co-transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and the expression of Targetron was induced by anhydrotetracycline. Finally, the selection medium containing 5% sucrose and 0.1 mmol/L IPTG was coated to screen the *sacB* inactivated positive colonies, and the insertion of Group II intron in the target site was further verified by colony PCR. **Results** The *E. coli* expressing *sacB* could not grow on the plate containing 5% sucrose, and the Targetron could be induced by anhydrotetracycline and could insert into the target site of *sacB405a*. After inactivated of *sacB*, the *E. coli* could grow well on the plate containing 5% sucrose, and the colony PCR verified that the intron was inserted into the DNA target site. **Conclusion** The Targetron plasmid analysis system based on *sacB* negative screening marker was established, which laid a foundation for functional identification and migration analysis of Group II intron.

【Key words】 Targetron; *sacB*; Group II intron; Targeting platform

*** II 型内含子 (Group II intron) 是一类由内含子 RNA 和内含子编码蛋白 (intron encoded protein, IEP) 组成的、具有自我剪接功能的、能够在染色体上高频迁移的细菌反转录转座子^[1-3]。II 型内含子在染色体上的迁移机制称为“归巢”(retrohoming), 其内含子 RNA 的核酶活性能够识别并切割 DNA 靶位点, 同时借助 IEP 蛋白的反转录酶活性将内含子 RNA 反转

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 32160015, 32170134); 贵州省自然科学基金项目 (No. [2019]1441, [2020]1Z067); 贵州医科大学培育项目 (No. 20NSP004)。** **【通讯作者】** 陈峥宏, E-mail: chenzhenghong@gmc.edu.cn**【作者简介】** 崔古贞 (1981-), 男, 山东德州人, 博士, 副教授, 研究方向为微生物学与分子生物学。E-mail: cuiguzhen@gmc.edu.cn

录为 cDNA 整合到染色体内部^[4-6]。由于 II 型内含子识别 DNA 靶位点主要是依赖内含子 RNA 与 DNA 的碱基互补配对原则,因此通过简单改变内含子识别序列即可重定向插入位点。将 II 型内含子开发为高效的基因打靶技术-Targetron,该技术具有 DNA 整合效率高、专一性好、易操作等优点,目前已在微生物遗传改造中获得普遍使用^[7-10]。

建立高效、便捷的 II 型内含子打靶平台是研究 II 型内含子功能及迁移规律、开发新型 II 型内含子、构建高效基因打靶技术的前提和基础。基于抗生素筛选标记的双质粒打靶分析系统包含两个受体质粒和供体质粒^[11-12],受体质粒携带不含启动子的四环素抗性基因,供体质粒携带 II 型内含子功能元件,且在 II 型内含子 RNA 元件第 IV 区插入一段 PT7 启动子(即原 IEP 蛋白所在位置,此位置可以插入 1-2kb 外源基因片段),当内含子 RNA 携带 PT7 启动子插入到受体质粒的靶位点后,内含子编码序列携带的 PT7 启动子即可启动下游四环素抗性基因的表达,从而使阳性转化子能够在含有四环素的抗性平板上生长,这种基于质粒及抗生素抗性标记的正向筛选系统为研究 II 型内含子的功能及迁移规律提供了良好的分析平台。

为了丰富 II 型内含子的遗传筛选体系,提高 II 型内含子筛选、鉴定的效率,本研究构建基于 *sacB* 负筛选标记的双诱导型 Targetron 质粒分析系统。来源于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 *sacB* 基因编码果聚蔗糖转移酶(levansucrase, EC2. 4. 1. 10),催化蔗糖生成大分子果聚糖聚合物,*sacB* 基因表达对革兰氏阴性细菌(如大肠埃希菌)是致死型的,因此通常被作为阴性筛选标记^[13-14]。利用 *sacB* 反向筛选标记与 Targetron 系统联合,本研究拟构建 IPTG 诱导的 *sacB* 受体质粒系统和脱水四环素诱导的 Targetron 供体质粒系统,建立基于 *sacB* 负筛选标记的双诱导型 Targetron 质粒分析平台,为 II 型内含子的筛选、鉴定及应用奠定了基础。

材料与方法

1 材料

1.1 主要试剂与仪器 各种限制性内切酶、DNA 连接酶、DNA 聚合酶以及常规分子生物学试剂盒购自北京全式金生物科技公司;抗生素及常规生化试剂购自国药集团,测序由上海生工程完成。PCR 仪和离心机均购于美国 Thermo Fisher 公司;凝胶电泳仪购于北京六一公司;电转化仪购于宁波新芝公司。

1.2 菌株、质粒及引物 本研究用到所有菌株、质粒及引物详见表 1。

表 1 本文用到的引物、菌株及质粒

引物 菌株 质粒 Primers, strain and plasmid	特征 Characteristics
Primers	
EBSU	CGAAATTAGAACTTGCCTCAGTAAAC
IBS	AAAACCTCGAGATAATTATCCTTAAGCGTCT TTCCAGTGCGCCAGATAGGGTG (<i>Xho</i> I)
EBS1d	CAGAT TGTACA AATGTGGTGATAACAGATAAG TCTTTCCAGCTAACTTACCTTTCTTTGT (<i>Bsr</i> G D)
EBS2	TGAACGCAAGTTTCTAATTTCGATTACGC TTCGATAGAGGAAAGTGTCT
SacB-F	GATATA CATATG ATGAACATCAAAAAGTTTGC (<i>Nde</i> D)
SacB-R	CAGACTCGAGTTATTGTGTAACGTGTAATTGTC (<i>Xho</i> I)
Strains	
<i>E. coli</i> DH5a	Clone strain, F- <i>lacZ</i> ΔM15Δ (<i>lacZYA</i> -argF) relA1
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Expression strain, F ⁺ , ompT, hsdS (rBB-mB), gal, dcm (DE3)
<i>Bacillus subtilis</i>	Wild type
BL21::pACYC	Derived from BL21 (DE3), carrying plasmid pACYC, Cm ^R
BL21::pSY11	Derived from BL21 (DE3), carrying plasmid pSY11, Amp ^R
BL21::pSY11::pACYC	Derived from BL21 (DE3), carrying plasmid pSY11 and pACYC, Amp ^R and Cm ^R
BL21::pSY11-sacB::pACYC-sacB	Derived from BL21 (DE3), carrying two plasmids: pSY11-sacB and pACYC-sacB, Amp ^R and Cm ^R
Plasmids	
pACYC	Expression vector, p15A replicon, T7 promoter, Cm ^R
pACYC-sacB	Derived from pACYC, carrying <i>sacB</i> gene from <i>Bacillus subtilis</i> , T7 promoter, Cm ^R
pSY11	Derived from pSY6, P2tetO1 promoter, Amp ^R
pSY11-sacB	Derived from pSY11, targeting the antisense strand 405a site of <i>sacB</i> , Amp ^R

2 方法

2.1 培养基及培养方法 大肠埃希菌 DH5a 及 BL21 (DE3) 利用 LB 肉汤培养基在 37 °C、180 rpm 摇床中培养,平板筛选时利用含 1.5% 琼脂的 LB 固体培养基置于 37 °C 培养箱中静置培养。载体构建及筛选时加入终浓度为 100 μg/mL 的氨苄青霉素或 25 μg/mL 的氯霉素;利用 *sacB* 标签筛选时在 LB 固体培养基中加入 5% 蔗糖。必要时补充诱导剂终浓度为 0.1 mmol/L IPTG、0.3 mmol/L 脱水四环素。

2.2 引物设计 以枯草芽孢杆菌 *sacB* 基因为靶基因,利用在线免费 Targetron 引物设计软件(www. Clostron. com)设计打靶引物,选择 *sacB* 基因反义链 405a 位点作为打靶位点,利用系统算法设计四条重叠延伸 PCR 引物(表 1)。

2.3 质粒构建 Targetron 供体质粒构建:以 IBS/EBSU 和 EBS2/EBS1d 为引物,以 pSY11 质粒为模板扩增 intron 特异性区域,然后以 IBS/EBS1d 为引物,以上述扩增产物为模板,利用重叠延伸 PCR 扩增内含子 retargetron 区,利用 *Xho*I/*Bsr*GI 双酶切上述产物

与经同样双酶切的 pSY11 质粒连接构建供体质粒 pSY11-sacB(表 1)。Targetron 受体质粒构建:以枯草芽胞杆菌基因组为模板,以 sacB-F/sacB-R 为引物,PCR 扩增 sacB 完整基因序列,利用 *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切上述 PCR 产物后与经同样双酶切的 pACYC 载体连接,构建 pACYC-sacB 受体质粒(表 1)。

2.4 重叠延伸 PCR 扩增体系 为 50 μL , 包括: ddH₂O 40 μL , 10 \times buffer 5 μL , 高保真 DNA 聚合酶 1 μL , 正向引物 1.0 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 反向引物 1.0 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 上游模板 0.5 μL (~1 ng), 下游模板 0.5 μL (~1 ng), dNTP 1 μL (1 mmol/L)。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min、56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 0.5 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 0.5 min, 共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min。

2.5 SacB 毒蛋白诱导表达及大肠埃希菌敏感性分析 将 SacB 表达质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 转化产物涂布含有不同浓度 IPTG、25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、5% 蔗糖 (W/V) 的 LB 平板, 将平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜培养, 检测 IPTG 诱导严谨性及大肠埃希菌对 SacB 毒蛋白的敏感性。

2.6 质粒兼容性分析 将供体质粒 pSY11(含 *colE1* 复制子)和受体质粒 pACYC(含 *p15A* 复制子)共转化 *E. coli* BL21(DE3), 转化产物分别涂布氨苄青霉素平板(100 $\mu\text{g/mL}$)、氯霉素平板(25 $\mu\text{g/mL}$)、双抗平板(100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素和 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养过夜, 检测供体质粒和受体质粒的在大肠埃希菌中的兼容性。

2.7 双质粒打靶系统筛选与检测 将 Targetron 供体质粒 pSY11-sacB 和受体质粒 pACYC-sacB 共转化 *E. coli* BL21(DE3), 涂布含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素和 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 LB 双抗平板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养过夜, 然后挑取单菌落接种到含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素和 25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的 LB 肉汤培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 rpm 培养箱中振荡培养 A₆₀₀ 为 0.2 左右时, 加入 0.3 $\mu\text{g/mL}$ 脱水四环素诱导 3~5 h, 稀释后涂布含有 5% 蔗糖 (W/V)、25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素和 0.1 mmol/L IPTG 的 LB 固体平板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 12~16 h。

2.8 菌落 PCR 从双抗平板上挑取单菌落, 利用 sacB-F/sacB-R 引物检测 Targetron 打靶效率。菌落 PCR 条件如下:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 1 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s; 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min; 共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min。PCR 扩增体系为 20 μL , 包括:2 \times Taq DNA 聚合酶 10 μL , 正向引物 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 反向引物 0.5 μL (10 \times mol/L), ddH₂O 9 μL 。

结果

1 受体质粒和供体质粒构建及鉴定

PCR 扩增 sacB 基因, 琼脂糖凝胶电泳检测得到约 1.4 kb 条带(图 1A), 与预期条带大小一致, 表明成功获得 sacB 目的基因。受体质粒 pACYC-sacB 经双酶切后电泳检测可见约 4.0 kb 质粒条带和 1.4 kb 目的条带(图 1B), 且测序后与预期结果一致, 表明受体质粒构建成功。供体质粒 pSY11-sacB 经双酶切后电泳检测可见约 8.0 kb 质粒条带和 0.35 kb 目的条带(图 1C), 且测序后与预期结果一致, 表明供体质粒构建成功。

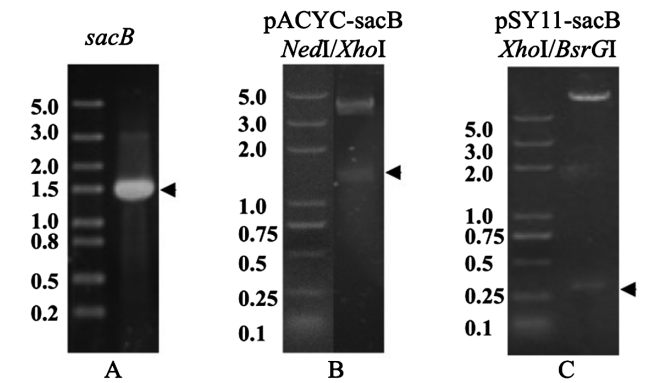


图 1 受体质粒和供体质粒构建及鉴定
A *sacB* 基因 PCR 扩增 B 受体质粒 pACYC-sacB 经 *NdeI/XhoI* 双酶切验证 C 供体质粒 pSY11-sacB 经 *XhoI/BsrGI* 双酶切验证

图 1 受体质粒和供体质粒构建及鉴定
A *SacB* gene was amplified by PCR B The recipient plasmid pACYC-SACB was verified by *NdeI/XhoI* double digestion C pSY11-sacB was confirmed by *XhoI/BsrGI* double digestion.

Fig. 1 Construction and identification for recipient and donor plasmid

2 IPTG 诱导严谨性及 SacB 毒性分析

分析结果表明, *E. coli* BL21(DE3)::pACYC-sacB 在不含 IPTG 的蔗糖平板上能够正常生长, 但在含 5% 蔗糖、3 种 IPTG 浓度 (0.1、0.2 和 0.5 mol/L) 的平板上均不能生长(图 2), 表明 IPTG 能够诱导 sacB 基因表达, 且表达 SacB 毒蛋白的大肠埃希菌不能在蔗糖平板上生长, sacB 基因可以作为大肠埃希菌的阴性筛选标记(图 2)。

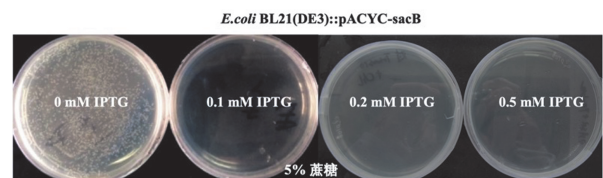


图 2 *E. coli* BL21(DE3)::pACYC-sacB 对蔗糖敏感性分析
Fig. 2 Sensitivity assay of *E. coli* BL21(DE3)::pACYC-sacB to sucrose

3 双质粒兼容性分析

含有双质粒 pSY11 和 pACYC 的大肠埃希菌, 以及含有双质粒 pSY11-sacB 和 pACYC-sacB 的大肠埃

希菌,能在含有氨苄青霉素单抗平板(Amp)和氯霉素单抗平板(Chl)生长,也在能含有氨苄青霉素和氯霉素双抗平板(Amp+Chl)生长,且 *sacB* 基因(诱导前)及内含子的表达不影响双质粒共存情况,表明受体质粒和供体质粒在大肠埃希菌中有良好的兼容性(图3)。

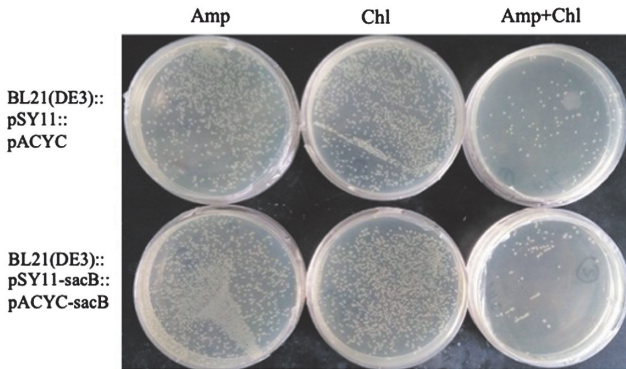
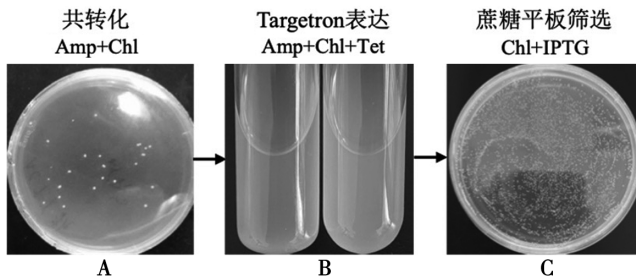


图3 受体质粒与供体质粒兼容性分析
Fig. 3 Plasmid compatibility assay of recipient and donor

4 Targetron 诱导表达及筛选

利用 0.3 μg/mL 脱水四环素诱导 II 型内含子表达,并对 *sacB* 基因进行打靶,IPTG 诱导 *sacB* 基因表达后仍在能在蔗糖平板上正常生长,表明 *sacB* 基因功能已经失活(图4)。脱水四环素能够诱导 Targetron 表达并失活了 *sacB* 基因。



A 共转化 B Targetron 表达 C 蔗糖平板筛选
图4 Targetron 诱导表达及在蔗糖平板上的筛选
A Cotransform B Targetron expression C Sucrose plate screening
Fig. 4 Targetron induced expression and screening on sucrose plate

5 菌落 PCR 验证及打靶效率分析

在蔗糖平板上随机选择了 13 个单菌落进行菌落 PCR 检测,内含子插入型 PCR 产物条带大小约为 2.3 kb,野生型对照 PCR 产物条带大小约为 1.4 kb,空白对照不能获得任何 PCR 条带,表明随机挑取的 13 个单菌落均为内含子插入型阳性菌落(图5)。基于 *sacB* 负筛选标记的双质粒诱导型 Targetron 分析系统具有 100% 的筛选效率,可以作为 II 型内含子筛选与鉴定的分析平台。

讨论

本研究构建的基于 *sacB* 负筛选标记的双质粒诱导型 Targetron 分析平台,与 Morh 等^[11-12] 构建的基

于四环素正向筛选标记的 Targetron 分析平台具有不同的原理和使用特点。利用 *sacB* 作为阴性筛选标记,利用 IPTG 诱导毒蛋白表达,可方便的通过蔗糖平板检测 *sacB* 基因的活性。此外,蔗糖筛选标记不受温度的限制,可以在高温条件作为良好的筛选标记,而抗生素在高温条件不稳定、极易失活,不适用于嗜热 II 型内含子的筛选和功能鉴定。在嗜热微生物中发现具有多种特殊功能及应用前景的嗜热 II 型内含子^[2,17-19],以建立的基于四环素筛选标记的遗传检测平台,在大肠埃希菌中分析 48 °C 条件下的打靶规律(48 °C 已是大肠埃希菌生长耐受的极限条件)^[11],获得了较高温条件下的靶位点识别规律,但并不代表真实条件下的结果。近年来发现并鉴定了多种热稳定的 *sacB* 基因^[20-21],如果将热稳定 *sacB* 基因与嗜热 II 型内含子联合,利用蔗糖平板筛选鉴定将可以极大提高嗜热 II 型内含子的筛选效率。因此,建立的基于 *sacB* 阴性筛选标记的中温 Targetron 也为嗜热 II 型内含子的筛选与鉴定提供了借鉴。

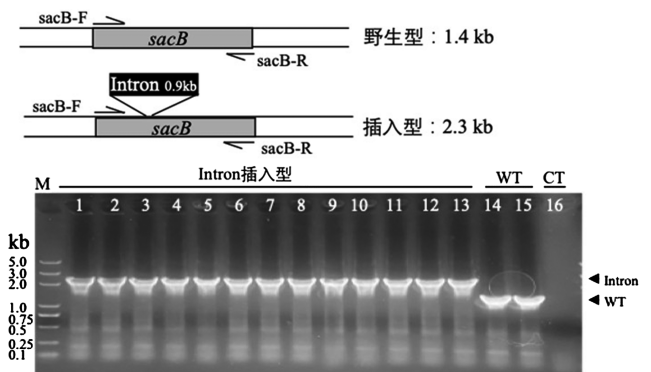


图5 菌落 PCR 验证
Fig. 5 Colony PCR verification

本研究成功构建了基于 *sacB* 负筛选标记的双质粒诱导型 Targetron 分析系统,该系统具有可控诱导、筛选高效、操作简单等特点,为 II 型内含子筛选、功能鉴定及机理分析提供理论基础。

【参考文献】

- [1] Dong X, Qu G, Piazza CL, et al. Group II intron as cold sensor for self-preservation and bacterial conjugation[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(11): 6198-6209.
- [2] Belfort M, Lambowitz AM. Group II Intron RNPs and reverse transcriptases: from retroelements to research tools[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11(4): a032375.
- [3] Mcneil BA, Semper C, Zimmerly S. Group II introns: versatile ribozymes and retroelements[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2016, 7(3): 341-355.
- [4] Haack DB, Toor N. Retroelement origins of pre-mRNA splicing[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2020, 11(4): e1589.
- [5] Liu N, Dong X, Hu C, et al. Exon and protein positioning in a pre-catalytic group II intron RNP primed for splicing[J]. Nucleic

- Acids Res. 2020, 7(19):11185-11198.
- [6] Toro N, Molina-sanchez MD. DNA cleavage and reverse splicing of ribonucleoprotein particles reconstituted in vitro with linear RmInt1 RNA[J]. RNA Biol, 2019, 16(7):930-939.
- [7] Wen Z, Lu M, Ledesma-amaro R, et al. TargeTron technology applicable in solventogenic clostridia: revisiting 12 years' advances [J]. Biotechnol J, 2020, 15(1):e1900284.
- [8] Kwon SW, Paari KA, Malaviya A, et al. Synthetic biology tools for genome and transcriptome engineering of solventogenic *Clostridium* [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020(8):282.
- [9] Dai Z, Dong H, Zhang Y, et al. Elucidating the contributions of multiple aldehyde/alcohol dehydrogenases to butanol and ethanol production in *Clostridium acetobutylicum* [J]. Sci Rep, 2016(6):28189.
- [10] 崔古贞, 陈相好, 洪伟, 等. 内含子编码蛋白 Mg²⁺ 结合位点功能分析及验证[J]. 生物技术通报, 2020, 36(10):165-172.
- [11] Morh G, Hong W, Zhang J, et al. A targetron system for gene targeting in thermophiles and its application in *Clostridium thermocellum* [J]. Plos One, 2013, 8(7):e69032.
- [12] Karberg M, Guo H, Zhong J, et al. Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria [J]. Nature Biotech, 2001, 19(12):1162-1167.
- [13] Liu Y, Miao J, Traore S, et al. SacB-SacR gene cassette as the negative selection marker to suppress agrobacterium overgrowth in agrobacterium-mediated plant transformation [J]. Front Mol Biosci, 2016(3):70.
- [14] Marx CJ. Development of a broad-host-range sacB-based vector for unmarked allelic exchange [J]. BMC Res Notes, 2008(1):1.
- [15] 崔古贞, 花登雄, 管玉祝, 等. 解纤维梭菌脱水四环素诱导的 ClosTron 基因打靶系统构建 [J]. 微生物学通报, 2021, 48(9):2982-2990.
- [16] Shao L, Hu S, Yang Y, et al. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum* [J]. Cell Res, 2007(17):963-965.
- [17] Mohr S, Ghanem E, Smith W, et al. Thermostable group II intron reverse transcriptase fusion proteins and their use in cDNA synthesis and next-generation RNA sequencing [J]. RNA, 2013, 19(7):958-970.
- [18] Hong W, Zhang J, Feng Y, et al. The contribution of cellulosomal scaffoldins to cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum* analyzed by using thermotargetrons [J]. Biotechnol Biofuels, 2014(7):80.
- [19] Stamos JL, Lentzsch AM, Lambowitz AM. Structure of a thermostable group II Intron reverse transcriptase with template-primer and its functional and evolutionary implications [J]. Mol Cell, 2017, 68(5):926-939.
- [20] Xu W, Peng J, Zhang W, et al. Enhancement of the *Brenneria sp.* levansucrase thermostability by site-directed mutagenesis at Glu⁴⁰⁴ located at the "-TEAP-" residue motif [J]. J Biotechnol, 2019(290):1-9.
- [21] Inthanavong L, Tian F, Khodadadi M, et al. Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides [J]. Biotechnol Prog, 2013, 29(6):1405-1415.

【收稿日期】 2022-04-14 【修回日期】 2022-07-01

(上接 1009 页)

- [5] Huang Q, Zhou B, Cai D, et al. Rapid turnover of hepatitis B virus covalently closed circular DNA indicated by monitoring emergence and reversion of signature-mutation in treated chronic hepatitis B patients [J]. Hepatology, 2021, 73(1):41-52.
- [6] Guo F, Han Y, Zhao X, et al. STING agonists induce an innate antiviral immune response against hepatitis B virus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(2):1273-1281.
- [7] 罗轩, 田烁冉, 李秋妹, 等. AMPK 通过抑制 STING 调节干扰素免疫应答通路的研究 [J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(1):32-39.
- [8] Dansako H, Imai H, Ueda Y, et al. High-level expression of STING restricts susceptibility to HBV by mediating type III IFN induction [J]. FASEB Bioadv, 2018, 1(2):67-80.
- [9] Li Y, He M, Wang Z, et al. STING signaling activation inhibits HBV replication and attenuates the severity of liver injury and HBV-induced fibrosis [J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(1):92-107.
- [10] Zheng B, Yu Y, Pan Z, et al. HBsAg Dampened STING associated activation of NK cells in HBeAg-negative CHB patients [J]. Int J Mol Sci, 2022, 22(14):7643.
- [11] Tsai TY, Huang MT, Sung PS, et al. SIGLEC-3 (CD33) serves as an immune checkpoint receptor for HBV infection [J]. J Clin Invest, 2021, 131(11):e141965.
- [12] 常佳佳, 侯石, 同心林, 等. 干扰素基因刺激因子(STING)及其激动剂的研究进展 [J]. 药学报, 2021, 56(7):1880-1892.
- [13] Redelsperger F, Lekbaby B, Mandouri Y, et al. Production of hepatitis B defective particles is dependent on liver status [J]. Virology, 2012, 431(1-2):21-28.
- [14] Zhang Z, Trippler M, Real CI, et al. Hepatitis B virus particles activate toll-like receptor 2 signaling initially upon infection of primary human hepatocytes [J]. Hepatology, 2020, 72(3):829-844.
- [15] Lan P, Zhang C, Han Q, et al. Therapeutic recovery of hepatitis B virus (HBV)-induced hepatocyte-intrinsic immune defect reverses systemic adaptive immune tolerance [J]. Hepatology, 2013, 58(1):73-85.
- [16] Sekiba K, Otsuka M, Funato K, et al. HBx-induced degradation of Smc5/6 complex impairs homologous recombination-mediated repair of damaged DNA [J]. J Hepatol, 2022, 76(1):53-62.
- [17] Yuan H, Zhao L, Yuan Y, et al. HBx represses WDR77 to enhance HBV replication by DDB1-mediated WDR77 degradation in the liver [J]. Theranostics, 2021, 11(17):8362-8378.
- [18] Tcherpakov M, Delaunay A, Toth J, et al. Regulation of endoplasmic reticulum-associated degradation by RNF5-dependent ubiquitination of JNK-associated membrane protein (JAMP) [J]. J Biol Chem, 2009, 284(18):12099-12109.
- [19] Zhong B, Zhang L, Lei C, et al. The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MTA [J]. Immunity, 2009, 30(3):397-407.
- [20] Kaplan A, Lee MW, Wolf AJ, et al. Direct antimicrobial activity of IFN-beta [J]. J Immunol, 2017, 198(10):4036-4045.

【收稿日期】 2022-04-15 【修回日期】 2022-07-01