

## 超嗜热古菌遗传操作系统研究进展

王飞雁, 张松涛, 黄奇洪, 申玉龙, 倪金凤\*

(山东大学, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100)

**摘要:** 遗传操作系统, 是研究基因和基因产物功能的一个极为重要的工具。超嗜热古菌遗传操作系统方面的研究落后于甲烷菌及嗜盐古菌中的研究, 主要原因是选择标记的缺乏。然而, 近十年来, 在以硫化叶菌 (*Sulfolobus*) 为代表的超嗜热泉古菌和 *Thermococcus kodakaraensis* 为代表的超嗜热广古菌中, 遗传操作系统研究取得了很大的进展。本文主要对这两种超嗜热古菌的遗传操作系统进展以及应用进行概述。

**关键词:** 超嗜热古菌; 遗传操作系统; *Sulfolobus*; *Thermococcus kodakaraensis*

**中图分类号:** Q933    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1418-06

古菌是和细菌、真核生物并列的 3 种生命形式之一, 可分为四个门: 广古菌、泉古菌、古生古菌和纳米古菌, 其中前两者是较大的两个门, 研究多而广, 后两者发现较晚, 研究相对较少。广古菌主要包括产甲烷古菌、嗜盐古菌、热球菌属和火球菌属等; 泉古菌主要由嗜热古菌组成。超嗜热古菌通常指最适生长温度在 80℃ 以上的古菌。

古菌细胞结构简单, DNA 复制、修复等信息加工机制与真核生物相近, 是研究真核生物的有用模型。超嗜热古菌来源的蛋白质具有极端热稳定性, 在工业生产等方面有潜在的应用价值。在蛋白质的三维结构解析方面, 获得高质量的晶体是研究的前提条件, 而热稳定的重组蛋白结构上的刚性有利于蛋白的纯化和晶体的形成。因此, 超嗜热古菌方面的研究已越来越多地引起人们的关注。

尽管在嗜热蛋白质体外生化性质及三维结构方面取得了令人瞩目的进展, 但是要对生命活动的分子机制做全面的深入的理解还必须借助体内遗传分析与操作。由于抗生素等的限制, 超嗜热古菌遗传操作系统方面的研究落后于甲烷菌及嗜盐菌中的研

究<sup>[1]</sup>。然而, 近十年来, 在以硫化叶菌 (*Sulfolobus*) 为代表的超嗜热泉古菌和 *Thermococcus kodakaraensis* 为代表的超嗜热广古菌中, 遗传操作系统研究取得了很大的进展。本文主要对这两种超嗜热古菌的遗传操作系统进展以及应用进行概述。

### 1 转化方法

一套可靠的转化方法是建立遗传操作系统的前提条件。Schleper 等<sup>[2]</sup> 1992 年首次报道病毒 SSV1 DNA 能通过电击法转入 *Sulfolobus solfataricus*, 在电场强度 1500 V/cm, 电阻 400 Ω, 脉冲时间 9.1 ms 时, 转化效率最高。以后电击法被广泛应用于 *Sulfolobus* 的转化, 但在不同的实验室, 电击条件如电压、电阻、脉冲时间有些差别。Kurosawa<sup>[3]</sup> 详细研究了不同电击条件对 *S. acidocaldarius* 转化效率的影响, 发现最适电击条件是用 1 mm 电转杯, 电压 1250 V/cm、电阻 200 Ω, 电容量 20 μF。另外再生条件也影响转化, 转化后用预热的水或丙氨酸/苹果酸缓冲液比用培养基再生效果好。超嗜热广古菌 *T. kodakaraensis* 的转化相对简单, 一般采用氯化钙-热

基金项目: 国家自然科学基金 (30770050); 微生物技术国家重点实验室探索项目

\* 通信作者。Tel: +86-531-88363323; Fax: +86-531-88362928; E-mail: jinfgni@sdu.edu.cn

作者简介: 王飞雁 (1983 - ), 男, 湖南衡南人, 硕士研究生, 主要进行超嗜热古菌遗传操作系统研究。E-mail: wangfeiyuan83@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-05-06; 修回日期: 2009-06-22

击法<sup>[4]</sup>,但实际上不经氯化钙处理 *T. kodakaraensis* 也能吸收 DNA。氯化钙-热击法也成功用于 *S. acidocaldarius* 和 *Pyrococcus furiosus* 中<sup>[5]</sup>。2002 年 Lucas 等<sup>[6]</sup>曾用聚乙二醇介导的方法成功地转化 *P. abyssi*,但这一转化方法需要制备原生质体,这在一定程度上限制了该方法的应用。

## 2 选择标记

古菌的转化率一般比较低,在  $10^2 - 10^6/\mu\text{g}$  DNA 之间,在低转化效率情况下,只有通过有效的选择才能将少量的转化细胞从大多数未转化的细胞群体中筛选出来。已报道用于古菌的选择方法主要可划分为两类:一是抗性标记;二是营养缺陷型标记,包括尿嘧啶、乳糖、色氨酸选择标记。

### 2.1 抗性标记

在细菌遗传操作研究中,抗生素作为主要的抗性标记被广泛应用。由于古菌细胞壁不同于细菌,绝大多数细菌抗生素对古菌没有作用;对于超嗜热古菌而言,在 80℃ 以上的培养温度下,需要具有非常高的热稳定性的抗生素以及抗性基因,这无疑给抗生素应用于古菌又增加了难度。

迄今,在 *Sulfolobus* 中报道过两种穿梭载体 (pAG21<sup>[7]</sup> 和 pEXSs<sup>[8]</sup>) 用抗性基因作为选择标记。载体 pAG21 采用来源于 *S. solfataricus* 的乙醇脱氢酶 (Adh) 基因作为选择标记, Adh 基因的表达可以使转化细胞耐受丁醇及苯甲醇。在载体 pEXSs 中,选择标记采用了来源于大肠杆菌,通过易错 PCR 技术获得的热稳定性潮霉素磷酸转移酶基因,转化子能够抗 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的潮霉素,而未转化细胞只能抗 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的潮霉素。遗憾的是,上述报道中的选择标记并没有得到广泛应用,其原因主要是重复性不好,在一个实验室适用的条件并不适合于其它实验室。这可能是由于培养方法、条件、培养基成分、抗生素批次以及操作的差别等因素造成。

对于广古菌 *T. kodakaraensis*, 2007 年 Matsumi 等<sup>[9]</sup>报道了利用抗生素辛伐他汀 (simvastatin) 和 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGR) 基因作为标记基因构建的基因敲除系统。在古菌的细胞膜磷脂生物合成过程中, HMGR 是一个关键性的酶,而作为莫维诺林 (mevinolin) 同系物之一的辛伐他汀是 HMGR 的竞争性抑制剂<sup>[10]</sup>。在他们所构建的载体中, HMGR 上游添加了一段谷氨酸脱氢酶的启动子序列。因为他们前期的研究表明谷氨酸脱氢酶在细

胞中的丰度非常高,推测该酶处于强启动子控制之下。这样,在转化细胞中,通过 HMGR 的过量表达来消除辛伐他汀对细胞生长的抑制作用。2008 年 Santangelo 等<sup>[11]</sup>最新报道的穿梭载体 pLC70,采用了两种选择标记,即 *trpE* (能互补色氨酸营养缺陷型菌株 *T. kodakaraensis* KW128) 和 HMGR。因此,将 pLC70 转化 *T. kodakaraensis* KW128 后既可以根据细胞不依赖于色氨酸的生长来筛选,也可以根据对莫维诺林的抗性来筛选。

由于古菌本身具有 HMGR 基因,所以不需要考虑标记基因产物的热稳定性问题。所有的古菌被认为需要 HMGR 作为细胞膜磷脂的生物合成,因此莫维诺林或辛伐他汀这类抗生素的筛选方法有望在其它超嗜热古菌如硫化叶菌中应用,但该方法的不足之处是抗生素的抗性依赖于 HMGR 的过量表达。我们研究室通过实验证明 15  $\mu\text{M}$  的辛伐他汀在 7 天内能完全抑制超嗜热古菌 *S. tokodaii* 的生长,表明辛伐他汀可以作为 *S. tokodaii* 的抗生素并可能被应用于该古菌遗传操作系统的构建。

### 2.2 尿嘧啶选择

对于超嗜热古菌,由于抗生素筛选还存在一些问题,目前应用较多的筛选方法是尿嘧啶筛选。在 *Sulfolobus* 菌株中 *pyrE* 和 *pyrF* 基因分别编码乳清酸磷酸核糖转移酶和乳清核苷单磷酸脱羧酶,这两个酶参与催化单磷酸尿苷从头合成的最后两步,它们的突变导致 *Sulfolobus* 菌株在缺少尿嘧啶培养基上不能生长。尿嘧啶营养缺陷型菌株可以通过紫外诱变结合 5-氟乳清酸 (5-FOA) 筛选获得。利用 5-FOA 进行筛选,1991 年 Kondo 等<sup>[12]</sup>及 Grogan 等<sup>[13]</sup>分别从 *S. acidocaldarius* 中筛选到尿嘧啶营养缺陷型,2000 年 Martusewitsch 等报道从 *S. solfataricus* 中筛选到尿嘧啶营养缺陷型<sup>[14]</sup>。最近我们研究室利用菌株自发突变和紫外诱变的方法,获得了 *S. tokodaii* 的尿嘧啶营养缺陷型菌株<sup>[15]</sup>,通过对这些突变株稳定性及遗传方面特征的进一步分析, *S. tokodaii* 的尿嘧啶营养缺陷型有望作为受体菌株应用于遗传操作系统研究中。

2003 年 Jonuscheit 等报道<sup>[16]</sup>以 *S. solfataricus* P2 中的 *pyrEF* 为标记基因构建穿梭载体 pMJ03,成功电转到尿嘧啶营养缺陷型菌株 *S. solfataricus* PH1-16 (*pyrEF* 转座插入突变菌株),并在无尿嘧啶的培养基上得到转化子。2007 年 Berkner 等<sup>[17]</sup>报道的基于质粒 pRN1 的穿梭载体 pA-N 也采用了 *pyrEF* 作为标记基因,不同的是,利用该载体转化 *S.*

*sofataricus* PH1-16 以及属于点突变的尿嘧啶缺陷型菌株 *S. islandicus* 时容易出现背景生长的现象,而在尿嘧啶缺失突变体 *S. acidocaldarius* MR31 中不会发生这种现象,其原因可能是 *S. acidocaldarius* MR31 菌株中缺少胞嘧啶、尿嘧啶等透性酶,从而避免在低含量的尿嘧啶培养基上生长。

尽管尿嘧啶选择有很多优势,它也存在一定的问题。用于嗜嗜热古菌固体培养的凝固剂 Gelrite 被认为有痕量的尿嘧啶残留,干扰尿嘧啶选择<sup>[4,18]</sup>;另外, Berkner 等<sup>[18]</sup>发现 *Sulfolobus* 培养基成分之一的蛋白胨也含有痕量尿嘧啶,从而导致尿嘧啶缺陷型菌株的背景生长。不过,可以采用 NZAmine 或各种混合氨基酸来代替蛋白胨<sup>[18]</sup>。

### 2.3 乳糖选择

$\beta$ -半乳糖苷酶基因 *lacS* 的失活或缺失可导致细胞不能在以乳糖为唯一碳源和能量来源的培养基中生长。乳糖选择现已成功地应用于 *S. solfataricus* 基因敲除系统<sup>[19-21]</sup>及穿梭载体 pJlacS 中<sup>[17]</sup>。然而,乳糖选择也有一定的局限性,那些不能利用乳糖作为唯一碳源及能量来源的古菌就不能采用这种选择,如 *S. acidocaldarius*。另外,由于 *Sulfolobus* 首先需要适应乳糖培养基,而且在这种培养基中生长比在蛋白胨培养基中要缓慢,故电转化细胞后无法通过直接涂布平板进行筛选,而只能在液体乳糖培养基中进行筛选,这样筛选的周期较长,至少需要 7~12 d<sup>[21]</sup>。

### 2.4 色氨酸选择

在嗜嗜热古菌中,色氨酸选择仅在 *T. kodakaraensis* 中报道。2003 年 Sato 等<sup>[4]</sup>报道通过构建载体进行同源重组破坏色氨酸合成途径的一个基因(*trpE*)来获得色氨酸营养缺陷型,得到的突变体 *T. kodakaraensis* KW4 在液体及固体培养基中均表现出严格的色氨酸营养缺陷型。利用同样方法,该研究组以 *trpE* 缺失突变体为宿主菌,用完整的 *trpE* 基因作为选择标记,又成功地敲除了组氨酸脱氢酶基因(*hisD*)<sup>[22]</sup>。

## 3 穿梭载体

近 20 年来,在 *Sulfolobus* 中发现了为数不少的病毒、质粒等染色体外遗传元件<sup>[23]</sup>,但以此些遗传元件构建遗传系统的报道远远滞后于甲烷菌及嗜盐菌中相应的研究<sup>[1]</sup>。

1995 年 Aagaard 等<sup>[24]</sup>报道了第一个 *Sulfolobus-E. coli* 穿梭载体。他们将 *Desulfurococcus mobilis* 来

源的可移动 rDNA 的内含子与大肠杆菌载体 pUC18 相连构建成载体 pDM1。后来, Aravalli 等<sup>[7]</sup>将 *P. abyssi* 来源的滚环复制型质粒 pGT5 以及来源于 *S. solfataricus* 的乙醇脱氢酶基因(作为筛选标记)克隆进 pBR322 中构建了穿梭载体 pAG21,这一载体能在 *S. acidocaldarius* 和 *P. furiosus* 中复制。1998 年 Cannio 等<sup>[8]</sup>构建了另一个 *Sulfolobus-E. coli* 穿梭载体 pEXSs。为了确保能在 *Sulfolobus* 中复制,此载体含有分离于 *S. shibatae* 中的纺锤型病毒 SSV1 推测的复制起点。另外,该载体以来源于 *E. coli* 中的通过易错 PCR 获得的热稳定的潮霉素磷酸转移酶基因作为筛选标记。pEXSs 曾被用来在 *S. solfataricus* 中表达 *Bacillus stearothermophilus* 来源的乙醇脱氢酶,另外还被用来互补 *S. solfataricus* G0W 中  $\beta$ -半乳糖苷酶的缺失。

1999 年 Stedman 等<sup>[25]</sup>以 SSV1 的全基因组序列构建了穿梭载体 pKMSD48,该载体在细胞内的拷贝数高达 20~40。由于 SSV1 能通过感染的方式在菌液中进行传播,故该载体没有采用筛选标记。然而,在 *Sulfolobus* 所构建的穿梭载体中,目前得到广泛应用的是 2003 年 Jonuscheit 等<sup>[16]</sup>以 SSV1 为基础构建的一系列质粒穿梭载体,其中 pMJ03 最为常用。质粒 pMJ03 含有 *pyrEF* 筛选标记基因,用于互补尿嘧啶营养缺陷型受体菌株,另外,还以处于热击启动子(*tf55 $\alpha$* )控制之下的  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 *lacS* 作为报道基因。该载体在选择条件下(培养基中不含尿嘧啶)能稳定整合于 *S. solfataricus* 基因组中。由于采用 *tf55 $\alpha$*  启动子,在诱导蛋白质表达时需要将培养温度上调到 88 $^{\circ}\text{C}$ ,这一温度接近 *S. solfataricus* 的生长温度上限,因而对细胞可能产生不良影响。鉴于此,2006 年 Albers 等<sup>[26]</sup>对 pMJ03 做了优化,采用阿拉伯糖诱导型启动子替换 *tf55 $\alpha$* 。我们研究室利用 Albers 等构建的病毒载体在 *S. solfataricus* 表达了解旋酶 HerA 的点突变体 D175A,并分离到可能与 HerA 关联的蛋白(待发表)。

最近, Berkner 等<sup>[17]</sup>报道了一系列基于质粒 pRN1 的 *Sulfolobus-E. coli* 穿梭载体(pA-pN 和 pJlacS),这些穿梭载体均能稳定地以附加体的形式存在于 *S. acidocaldarius* MR31 中,pJlacS 能成功转化 *S. solfataricus* PBL2025。然而,尽管这些载体均采用了 *pyrEF* 筛选标记基因,但似乎在尿嘧啶营养缺陷型菌 *S. solfataricus* PH1-16,以及属于点突变或插入突变的尿嘧啶营养缺陷型 *S. islandicus* 菌中不太稳定。我们研究室在质粒载体 pJ 的基础上构建

了重组载体 pJ-StoHerA,并在 *S. solfataricus* 中表达了解旋酶 HerA。然而,我们发现重组载体似乎在 *S. solfataricus* 中不能稳定的存在,该载体上阿拉伯糖启动子基因和 StoHerA 基因似乎整合至染色体上(未发表)。2008 年底 Samson 等报道<sup>[27]</sup>用 *S. acidocaldarius* 的 *pyrEF* 代替载体 pJ 中 *S. solfataricus* 来源的 *pyrEF* 可以有效避免 *pyrEF* 基因在 *S. solfataricus* PH1-16 中可能发生的重组。采用阿拉伯糖启动子诱导目的基因表达,以此构建的穿梭载体能成功地在 *S. solfataricus* PH1-16 中表达目的基因。因此,基于质粒 pRN1 的 pJ 系列的穿梭载体有望在不久的将来得到更为广泛的应用。

对于超嗜热广古菌而言,有关构建穿梭载体的报道非常匮乏,这主要是广古菌中发现的染色体外遗传元件很少。2008 年 Santangelo 等<sup>[11]</sup>首次在 *T. kodakaraensis* 构建了穿梭载体,他们将来源于 *Thermococcus nautilis* 中的质粒 pTN1 插入到商业化质粒 pCR2.1-TOPO 中,并采用了两种筛选方法,即色氨酸筛选和抗生素莫维诺林筛选,成功地在 *T. kodakaraensis* 中同源表达了带有血凝素表位标签的 RNA 聚合酶 L 亚基(RpoL-HA)。

## 4 基因敲除

2003 年 Worthington 等<sup>[19]</sup>首次在 *S. solfataricus* 建立了基因敲除系统。他们采用乳糖进行选择,以 *S. solfataricus* 98/2 的 *lacS* 插入序列突变体作为宿主菌。而 2004 年 Schelert 等<sup>[20]</sup>采用了另一宿主菌,即缺失包括 *lacS* 在内的近 50 个基因的 *S. solfataricus* PBL2025 菌株。在后来的有关 *S. solfataricus* 基因敲除的报道中,无一例外都采用乳糖选择以及 *S. solfataricus* PBL2025 作为宿主菌。现在,*S. solfataricus* 基因敲除技术较为成熟,并广泛应用于基因功能的研究。研究者已利用基因敲除技术探索了 *S. solfataricus* 中  $\alpha$ -淀粉酶基因功能<sup>[19]</sup>,汞抗性的调节机制<sup>[20, 28]</sup>,苏氨酰基 tRNA 合成酶(threonyl-tRNA synthetase)编辑结构域(editing domain)的功能<sup>[29]</sup>,结合体装配系统(bindosome assembly system)在糖结合蛋白的细胞表面定位中的作用<sup>[30]</sup>,鞭毛辅助基因 *flaJ* 在鞭毛生物合成中的功能<sup>[31]</sup>以及菌毛(pili)生物合成操纵子中的 ATP 酶基因功能<sup>[32]</sup>。我们利用这一系统构建了 *S. solfataricus* 解旋酶 HerA 以及 SSO0959(DNA 修复蛋白 XPB 同源物)的基因敲除载体,并进行了载体的电转化和突变体的筛选,已初步获得了缺失突变体,

分子水平上的鉴定正在进行中(未发表)。此外,我们研究室还利用辛伐他汀筛选的方法进行了 *S. tokodaii* 基因敲除系统构建的探索,然而,尚未获得基因敲除菌株,分析可能有以下几方面的原因:第一,选择标记 HMGR 的表达量不够,因而未能消除辛伐他汀对细胞的抑制作用;第二,*S. tokodaii* 存在限制/修饰系统;第三,*S. tokodaii* 本身同源重组效率低。第四,采用的 *S. tokodaii* 电转化方法完全参照 *S. solfataricus* 的电转化方法,可能需要对这一方法进行适当的改进。

在超嗜热广古菌中,有关基因敲除的报道仅限于 *T. kodakaraensis*。2003 年 Sato 等首次报道<sup>[4]</sup>利用紫外诱变得到的尿嘧啶营养缺陷型菌株 KU25 为宿主菌,以 *pyrF* 为标记基因成功地敲除了 *trpE* 基因。由于菌株 KU25 是通过紫外诱变得到的,因此在诱变的过程其他基因有可能也发生了不可预知的突变;另外,基因敲除载体中的标记基因 *pyrF* 还有可能和宿主染色体中的等位基因发生同源重组。基于这些考虑,2005 年 Sato 等<sup>[22]</sup>利用同源重组构建了 *pyrF* 几乎完全缺失的尿嘧啶营养缺陷型菌株 KU216。另外,他们还通过同源重组获得了 *trpE* 基因缺失的突变体菌株 KW128,并以 *trpE* 基因为选择标记建立了新的“宿主-标记”系统。更为重要的是,他们还建立了能重复利用选择标记 *pyrF* 的系统,此系统能实现多重遗传操作方便进行更为深入的基因体内功能研究。与 *Sulfolobus* 中基因敲除系统均采用乳糖进行筛选不同的是,2007 年 Matsumi 等在 *T. kodakaraensis* 中建立了用抗生素辛伐他汀进行筛选的基因敲除系统。采用这一系统,可以直接在营养丰富的培养基中进行筛选。此抗生素筛选方法有望应用于其它超嗜热古菌(如 *Sulfolobus*)。

## 5 总结和展望

近 10 年来,有关超嗜热古菌遗传操作系统的研究已经取得了长足的进展并极大地促进了基因的体内功能研究。然而,尚存在一些有待改进或完善的地方。例如,迄今所报道的 *E. coli-Sulfolobus* 穿梭载体,只采用过两种诱导型强启动子,即热击启动子 *tf55 $\alpha$*  和阿拉伯糖诱导型启动子 *araS*。前者有较强的本底活性,而后者只适应于 *S. solfataricus*。因此,有必要寻找一些本底活性非常低而又比较通用的启动子。另外,*Sulfolobus* 中的基因敲除系统均采用乳糖进行选择,但如前所述,乳糖选择费时费力。尝试采用尿嘧啶选择或抗生素辛伐他汀选择很有必要。

再者,不论是穿梭载体还是基因敲除系统均集中于超嗜热泉古菌 *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* 及广古菌 *T. kodakaraensis*, 鲜有其它超嗜热古菌遗传操作系统报道。为了对生命现象获得更为广泛的认识,极有必要在其他超嗜热古菌中开展遗传操作相关研究。

## 参考文献

- [ 1 ] Allers T, Mevarech M. Archaeal genetics-the third way. *Nature reviews genetics*, 2005, 6: 58 – 73.
- [ 2 ] Schleper C, Kubo K, Zillig W. The particle SSV1 from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* is a virus: demonstration of infectivity and of transfection with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 1992, 89: 7645 – 7649.
- [ 3 ] Kurosawa N, Grogan DW. Homologous recombination of exogenous DNA with the *Sulfolobus acidocaldarius* genome: properties and uses. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 253: 141 – 149.
- [ 4 ] Sato T, Fukui T, Atomi H, et al. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Bacteriology* 2003, 185: 210 – 220.
- [ 5 ] Aagaard C, Leviev I, Aravalli RN, et al. General vectors for archaeal hyperthermophiles: strategies based on a mobile intron and a plasmid. *FEMS Microbiology Reviews*, 1996, 18: 93 – 104.
- [ 6 ] Lucas S, Toffin L, Zivanovic Y, et al. Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 5528 – 5536.
- [ 7 ] Aravalli RN, Garrett RA. Shuttle vectors for hyperthermophilic archaea. *Extremophiles*, 1997, 1: 183 – 191.
- [ 8 ] Cannio R, Contursi P, Rossi M, et al. An autonomously replicating transforming vector for *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180: 3237 – 3240.
- [ 9 ] Matsumi R, Manabe K, Fukui T, et al. Disruption of a sugar transporter gene cluster in a hyperthermophilic archaeon using a host-marker system based on antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189: 2683 – 2691.
- [10] Cabrera JA, Bolds J, Shields PE, et al. Isoprenoid synthesis in *Halobacterium halobium*. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a concentration in response to mevalonate availability. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261: 3578 – 3583.
- [11] Santangelo TJ, Cubonova L, Reeve JN. Shuttle vector expression in *Thermococcus kodakaraensis*: contributions of cis elements to protein synthesis in a hyperthermophilic archaeon. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74: 3099 – 3104.
- [12] Kondo S, Yamagishi A, Oshima T. Positive selection for uracil auxotrophs of the sulfur-dependent thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* by use of 5-fluoroorotic acid. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173: 7698 – 7700.
- [13] Grogan DW. Selectable mutant phenotypes of the extremely thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173: 7725 – 7727.
- [14] Martusewitsch E, Sensen CW, Schleper. High spontaneous mutation rate in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by transposable elements. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 2574 – 2581.
- [15] 黄奇洪, 申玉龙, 倪金凤. 超嗜热古菌尿嘧啶营养缺陷型筛选条件的最优化及初步筛选. 山东大学学报 (*Journal of Shandong University*), 2008, 43: 6 – 10.
- [16] Jonuscheit M, Martusewitsch E, Stedman KM, et al. A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. *Molecular Microbiology* 2003, 48: 1241 – 1252.
- [17] Berkner S, Grogan D, Albers SV, et al. Small multicopy, non-integrative shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-) archaea. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: 1 – 12.
- [18] Berkner S, Lipps G. Mutation and reversion frequencies of different *Sulfolobus* species and strains. *Extremophiles*, 2008, 12: 263 – 270.
- [19] Worthington P, Hoang V, Perez-Pomares F, et al. Targeted disruption of the alpha – amylase gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185: 482 – 488.
- [20] Schelert J, Dixit V, Hoang V, et al. Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186: 427 – 437.
- [21] Albers SV, Driessen AJ. Conditions for gene disruption by homologous recombination of exogenous DNA into the *Sulfolobus solfataricus* genome. *Archaea*, 2008, 2: 145 – 149.
- [22] Sato T, Fukui T, Atomi H, et al. Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 3889 – 3899.

- [23] Lipps G. Plasmids and viruses of the thermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus*. *Extremophiles*, 2006, 10: 17 – 28.
- [24] Aagaard C, Dalgaard JZ, Garrett RA. Intercellular mobility and homing of an archaeal rDNA intron confers a selective advantage over intron- cells of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 1995, 92: 12285 – 12289.
- [25] Stedman KM, Schleper C, Rumpf E, et al. Genetic requirements for the function of the archaeal virus SSV1 in *Sulfolobus solfataricus*: construction and testing of viral shuttle vectors. *Genetics*, 1999, 152: 1397 – 1405.
- [26] Albers SV, Jonuscheit M, Dinkelaker S, et al. Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 102 – 111.
- [27] Samson RY, Obita T, Freund SM, et al. A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science*, 2008, 322: 1710 – 1713.
- [28] Schelert J, Drozda M, Dixit V, et al. Regulation of mercury resistance in the crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188: 7141 – 7150.
- [29] Korencic D, Ahel I, Schelert J, et al. A freestanding proofreading domain is required for protein synthesis quality control in Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 2004, 101: 10260 – 10265.
- [30] Zolghadr B, Weber S, Szabo Z, et al. Identification of a system required for the functional surface localization of sugar binding proteins with class III signal peptides in *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular Microbiology*, 2007, 64: 795 – 806.
- [31] Szabo Z, Sani M, Groeneveld M, et al. Flagellar motility and structure in the hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189: 4305 – 4309.
- [32] Frols S, Ajon M, Wagner M, et al. UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Molecular Microbiology*, 2008, 70: 938 – 952.

## Advance in genetic manipulation systems of Hyperthermophilic archaea-A review

Feiyan Wang, Songtao Zhang, Qihong Huang, Yulong Shen, Jinfeng Ni\*

(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** Genetic manipulation systems play an important role in the functional analysis of genes and gene products. The development of genetic system in hyperthermophilic archaea is lagging behind those in methanogenic and halophilic archaea. The main problem is the unavailability of efficient selective markers. However, in the past 10 years, researchers have made great progress in the development of genetic systems in the genus *Sulfolobus* and *Thermococcus kodakaraensis*, representatives of hyperthermophilic archaea. Here we summarize the latest progress in genetic systems and their application for hyperthermophilic archaea.

**Keywords:** Hyperthermophilic archaea; genetic manipulation system; *Sulfolobus*; *Thermococcus kodakaraensis*

( 本文责编: 王晋芳 )