

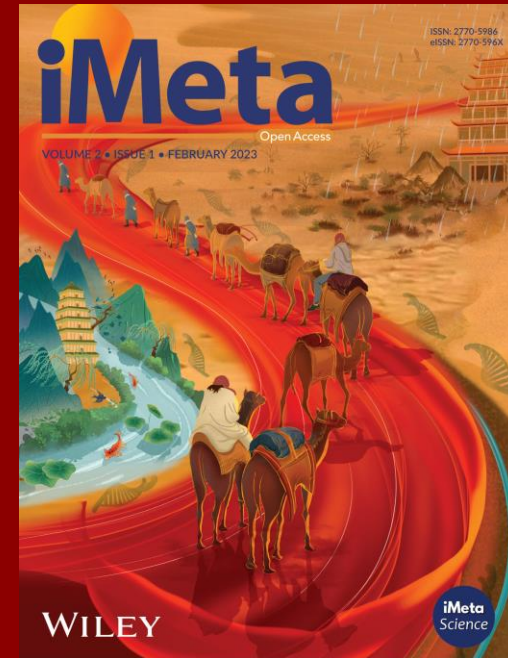


非模式肠道菌基因编辑工具

金文兵^{1,2*}, 郭春君^{1,2,3,4,5*}

¹康乃尔大学医学院 吉尔·罗伯茨炎症性肠病研究所

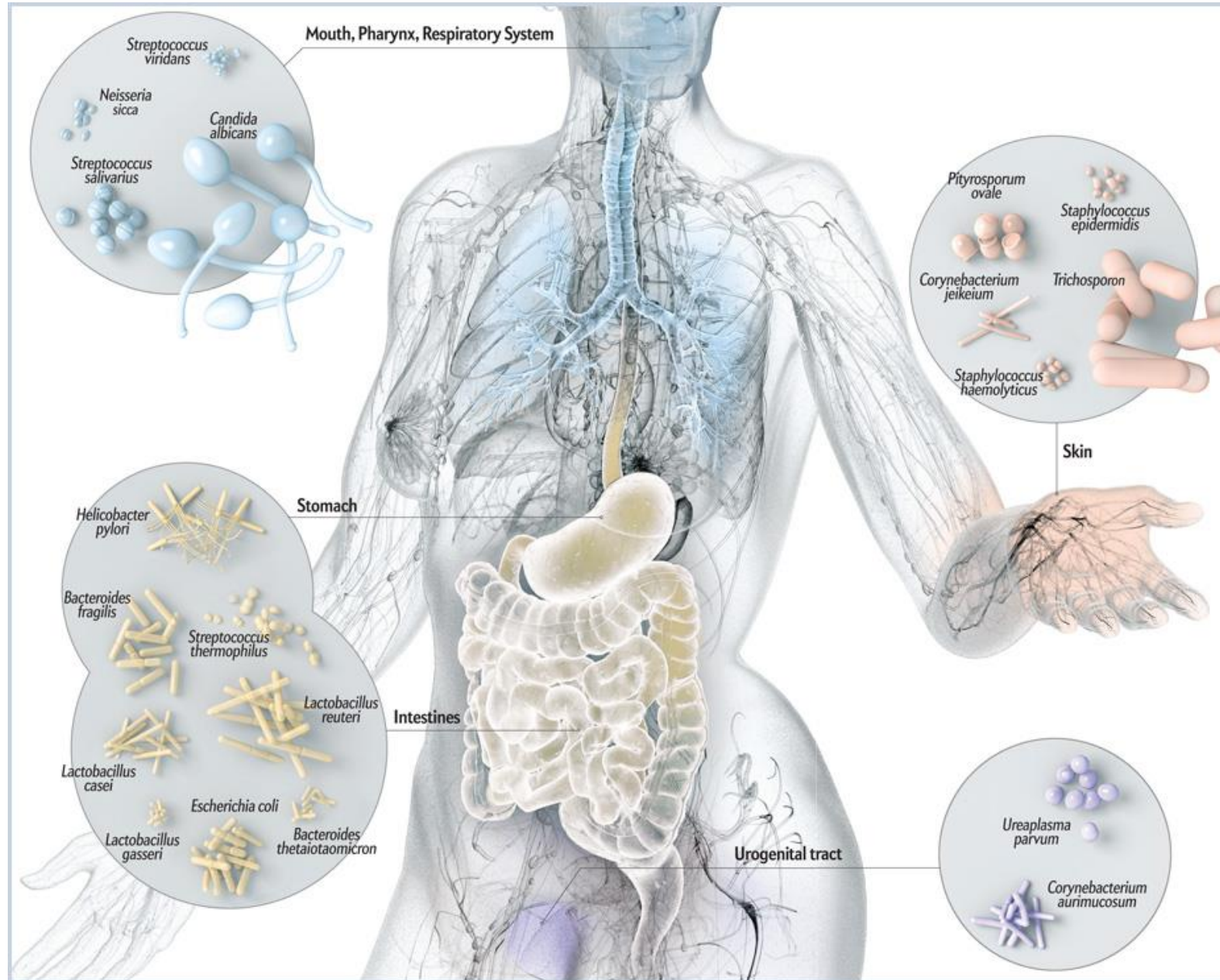
²康乃尔大学医学院 弗里德曼营养和炎症中心



Wen-Bing Jin and Chun-Jun Guo. 2024. Genetic manipulations of nonmodel gut microbes.

iMeta 3: e216. <https://doi.org/10.1002/imt2.216>

人体微生物

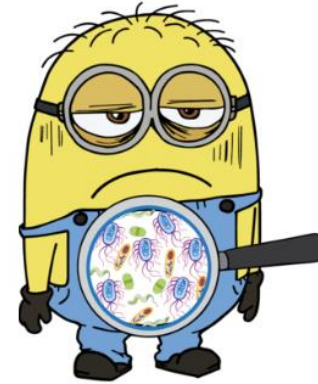




肠道微生物基因-代谢物-宿主生理功能



- 隐形器官/虚拟器官
- 占人体体重很少部分 (~2 kg)
- 拥有将近三百万个基因，
是人体基因的**150**倍



- ❖ 炎症性肠病，结肠癌
- ❖ 肥胖，II型糖尿病，代谢性肝病，
心脏代谢疾病
- ❖ 肠-脑轴

肠道微生物基因



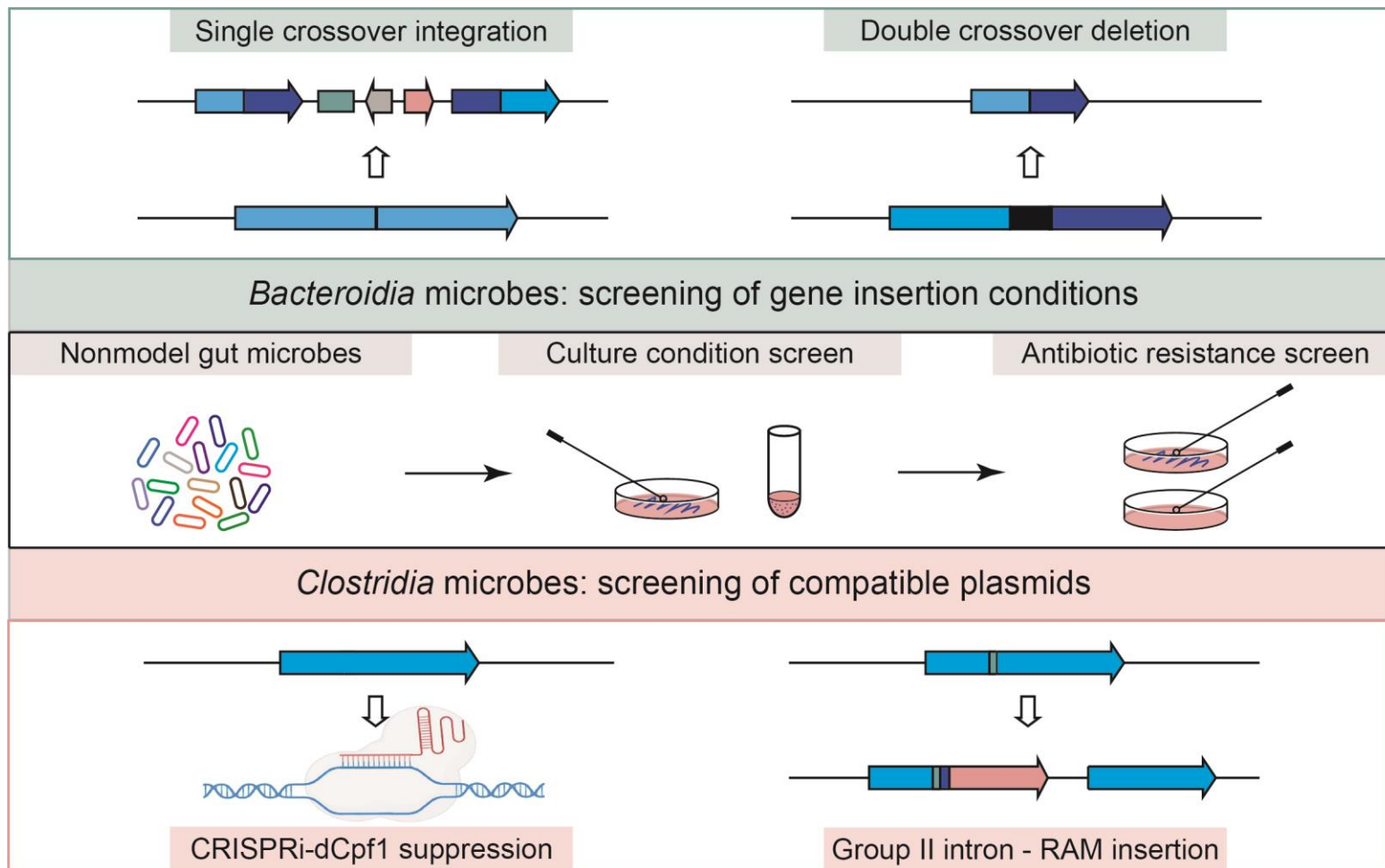
代谢物



宿主生理功能

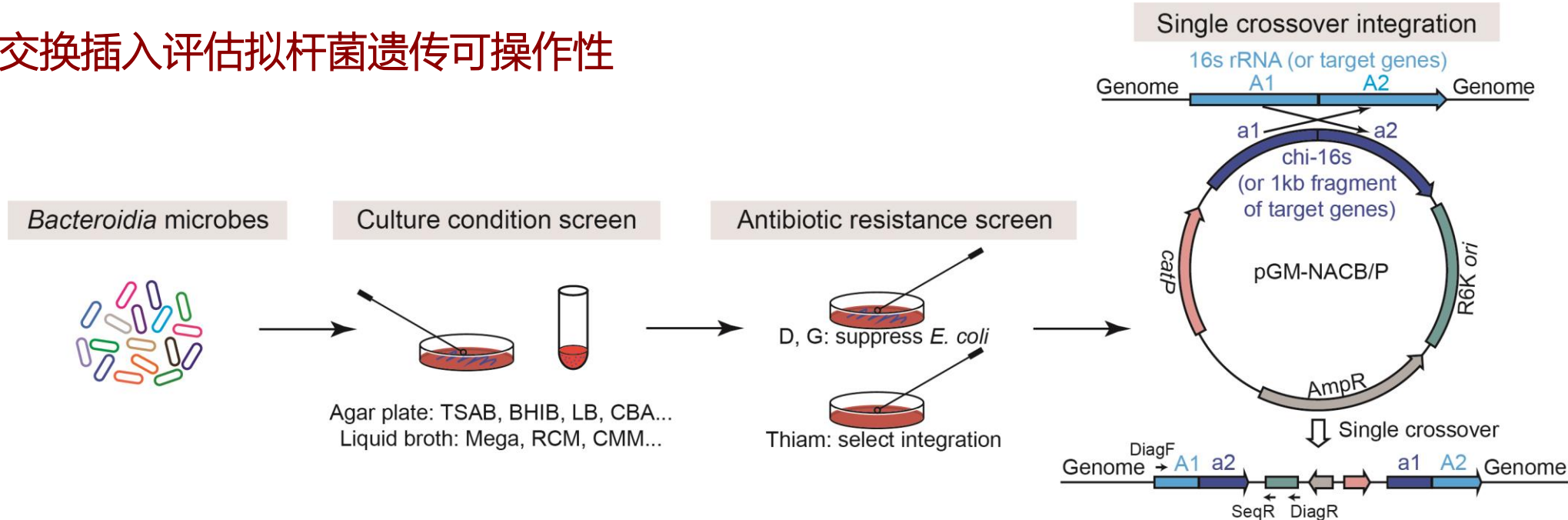
亮点

- ✓ 此实验方案介绍了一系列详细的基因编辑工具相关的实验步骤，助力研究非模式肠道共生菌所编码基因的功能
- ✓ 此方案可在基因组信息未知的情况下，在非模式肠道拟杆菌和梭菌属中建立基因编辑工具
- ✓ 此方法为人体肠道菌的基因编辑工具提供高通量的筛选和建立方案

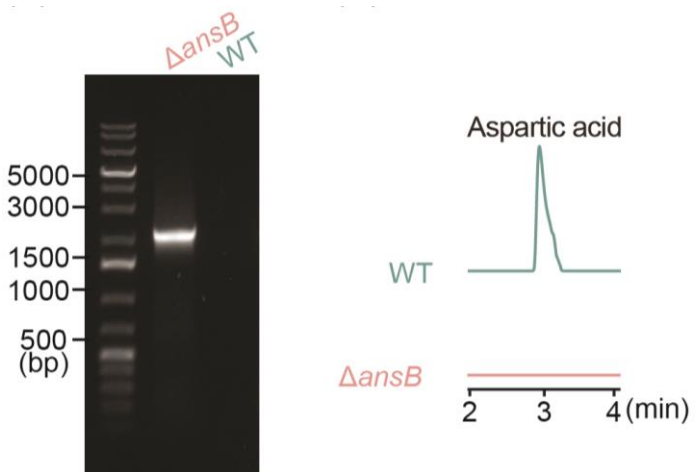


针对拟杆菌建立基因转移方法并开发基因编辑系统

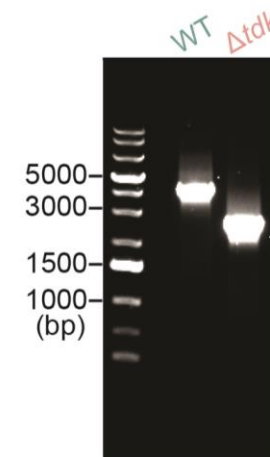
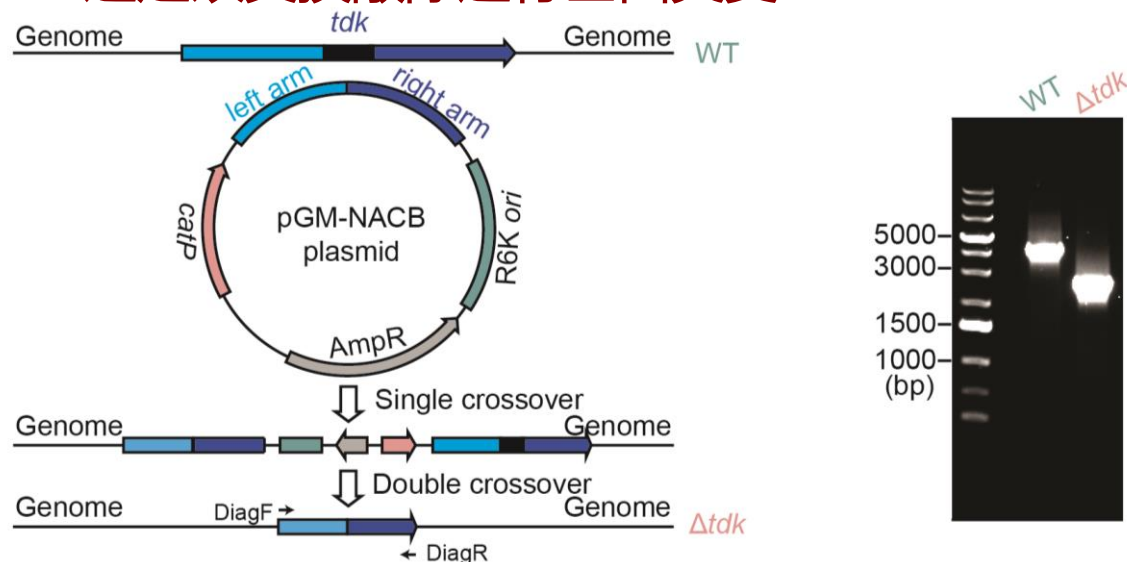
通过单交换插入评估拟杆菌遗传可操作性



通过单交换插入进行基因突变



通过双交换敲除进行基因突变



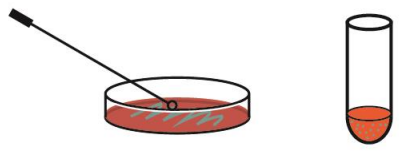


针对梭菌建立基因转移方法

Clostridia microbes

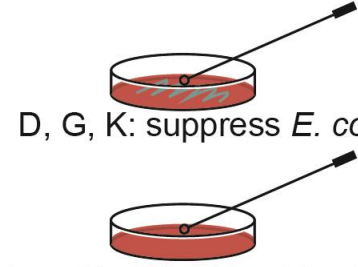


Culture condition screen



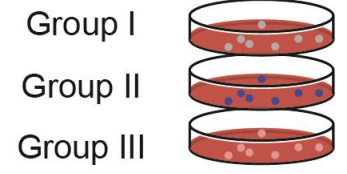
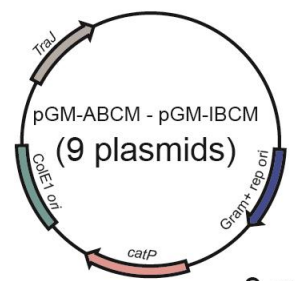
Agar plate: TSAB, BHIB, LB, CBA...
Liquid broth: Mega, RCM, CMM...

Antibiotic resistance screen



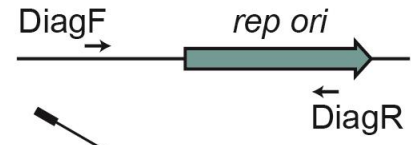
D, G, K: suppress *E. coli*
Thiam: identify plasmid uptake

Mixed-conjugation strategy



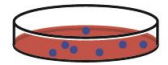
9 replication origins

Diag PCR, 16s seq and aerobic restreak



Compatible *rep ori*

Single strain verification

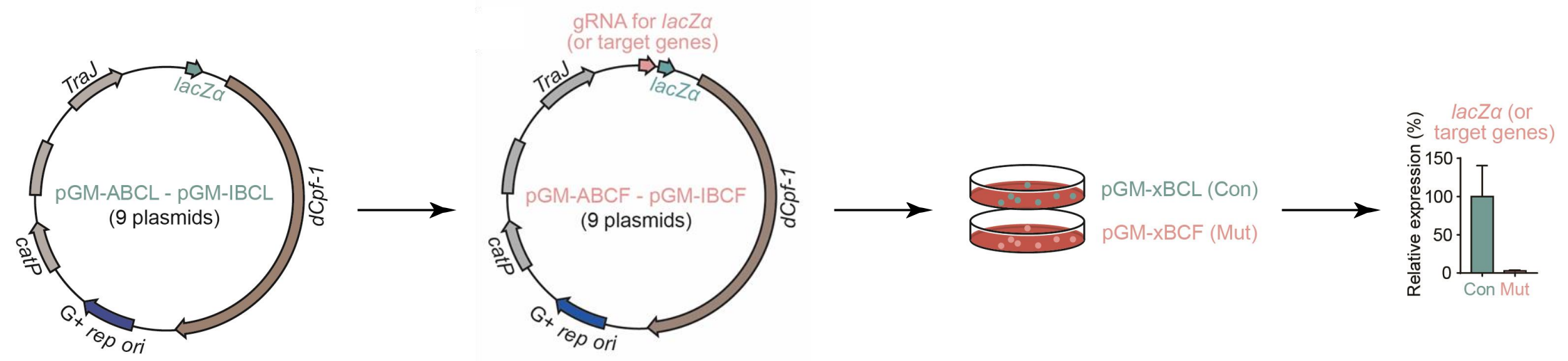


One *Clostridia* recipient +
one compatible *rep ori*



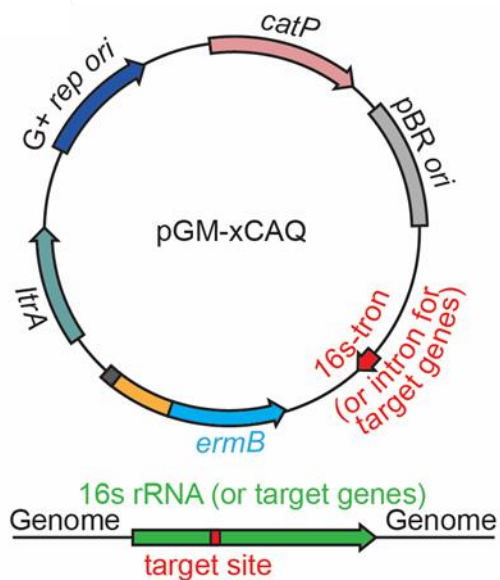
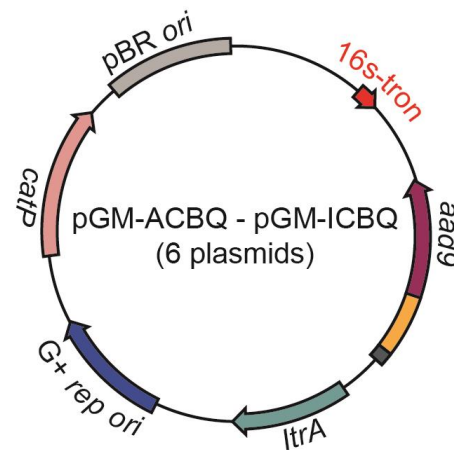
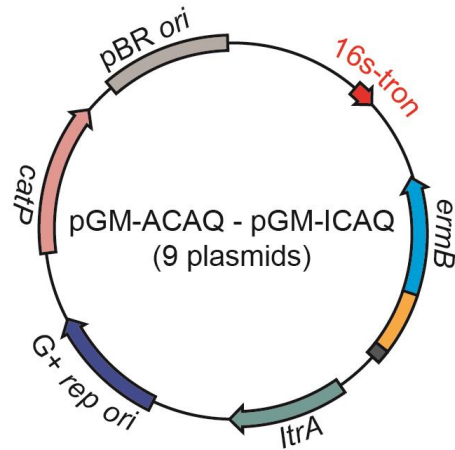
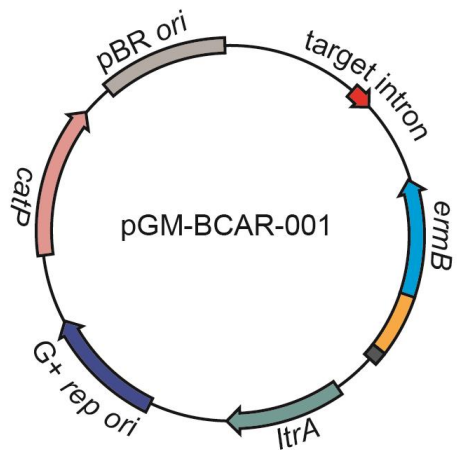
针对梭菌开发CRISPRi-dCpf1基因编辑系统

➤ CRISPRi-dCpf1系统结合报告基因*lacZα*

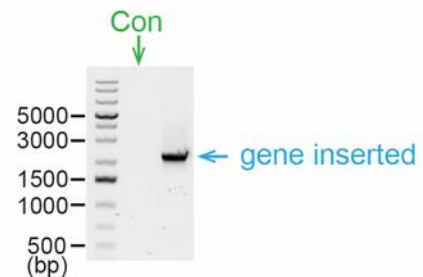


针对梭菌开发二型内含子基因编辑系统

二型内含子系统介导基因插入



RAM selection
→



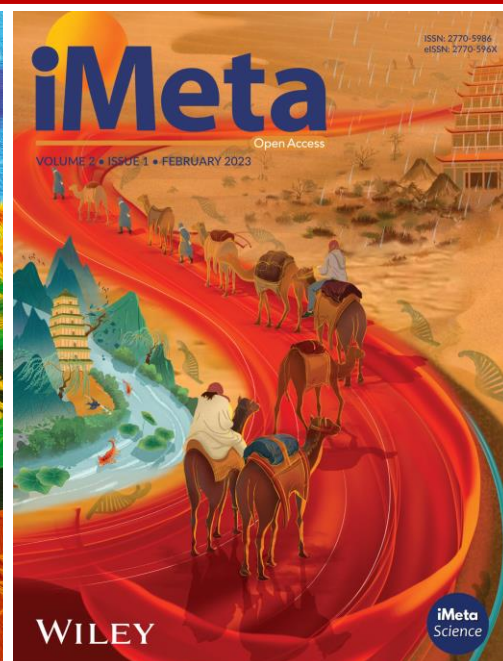
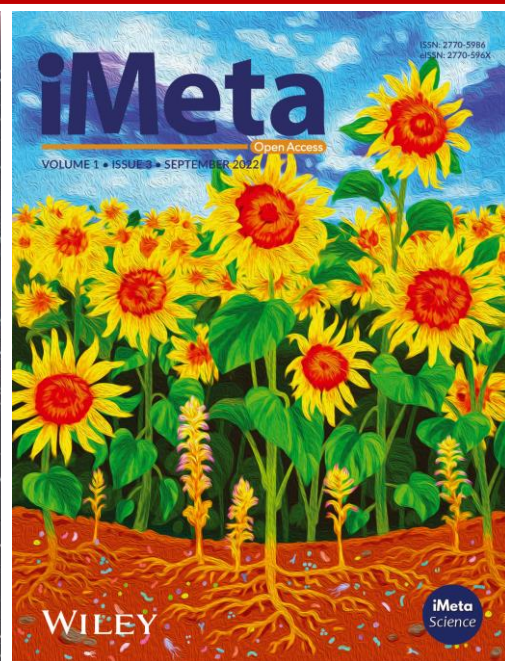
Diag PCR and sequencing





总结

- 我们在此介绍的方法提供了一种高效且普适的肠道微生物基因编辑工具筛选流程，旨在助力非模式肠道共生菌基因编辑工具的开发及其对宿主生理功能影响的研究
- 对于拟杆菌，我们通过单交换插入进行遗传可操作性评估，并基于此利用单交换插入或者开发双交换敲除的方式进行基因突变
- 对于梭菌，我们首先通过筛选确定了其可兼容的复制起点，并在此基础上建立了CRISPRi-dCpf1介导基因表达抑制和二型内含子介导基因插入的基因编辑系统



“**iMeta**”(IF 23.7)由威立、肠菌分会和数千名华人科学家出版的期刊，主编刘双江和傅静远教授。

收稿范围：任何领域高影响力的研究、方法和综述，重点关注微生物组、生物信息、大数据和多组学等；

影响力：[ESCI](#)、[PubMed](#)、[Google](#)、[Scopus](#)收录，IF 23.7位列微生物学研究期刊全球第一；

时效性：外审平均21天；投稿至发表中位数66天；

“**iMetaomics**”主编赵方庆和于君教授，定位IF>10的高水平交叉学科综合期刊，欢迎投稿！



主页: <http://www.imeta.science>

出版社: <https://wileyonlinelibrary.com/journal/imeta>



office@imeta.science



投稿: <https://wiley.atyponrex.com/journal/IMT2>

<https://wiley.atyponrex.com/journal/IMO2>



宣传片



[iMeta](#)

