

Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trong chỉnh sửa gen ở *Bacillus* spp.

Ngô Hồng Dương¹, Hoàng Đăng Hiếu¹, La Việt Hồng^{2,3}, Phạm Bích Ngọc^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Khoa học và Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, đường Nguyễn Văn Linh, phường Xuân Hoà, TP Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

³Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, đường Nguyễn Văn Linh, phường Xuân Hoà, TP Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

Ngày nhận bài 16/9/2022; ngày chuyển phản biện 20/9/2022; ngày nhận phản biện 13/10/2022; ngày chấp nhận đăng 17/10/2022

Tóm tắt:

CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) là một hệ miễn dịch ở sinh vật nhân sơ có vai trò chống lại các yếu tố di truyền ngoại lai, như sự xâm nhập của plasmid và thể thực khuẩn. Khi hệ thống CRISPR/Cas được phát hiện có khả năng chỉnh sửa gen ở người vào năm 2013, ngày càng có nhiều nghiên cứu hoàn thiện hệ thống với mục đích ứng dụng chỉnh sửa gen trên nhiều đối tượng khác nhau bao gồm vi sinh vật, thực vật, động vật và ở người. Từ đó đến nay, hệ thống này ngày càng tối ưu với nhiều ưu điểm dễ dàng thiết kế, sử dụng, độ chính xác cao vượt trội hơn hẳn so với các phương pháp chỉnh sửa gen trước đây. Gần đây, việc chỉnh sửa gen bằng hệ thống này trên *Bacillus* spp. đã và đang nhận được nhiều sự quan tâm do những ứng dụng rộng rãi của *Bacillus* spp. trong nông nghiệp, công nghiệp cũng như y học. Trong bài báo này, chúng tôi cung cấp những hiểu biết về hệ thống CRISPR/Cas9 và các nghiên cứu về việc sử dụng công nghệ CRISPR/Cas9 trong chỉnh sửa gen ở *Bacillus* spp. Những thông tin này góp phần giúp cho các nhà khoa học dễ dàng tiếp cận với hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 và ứng dụng hệ thống này vào nghiên cứu của họ một cách thuận tiện hơn.

Từ khóa: *Bacillus* spp., chỉnh sửa gen, CRISPR/Cas, hệ thống CRISPR/Cas9, plasmid.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Applications of CRISPR/Cas9 systems for gene editing in *Bacillus* spp.

Hong Duong Ngo¹, Dang Hieu Hoang¹, Viet Hong La^{2,3}, Bich Ngoc Pham^{1*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

²The Institute for Science and Application, Hanoi Pedagogical University No. 2, Nguyen Van Linh Street, Xuan Hoa Ward, Phuc Yen City, Vinh Phuc Province, Vietnam

³Faculty of Biology and Agricultural Engineering, Hanoi Pedagogical University No. 2, Nguyen Van Linh Street, Xuan Hoa Ward, Phuc Yen City, Vinh Phuc Province, Vietnam

Received 16 September 2022; revised 13 October 2022; accepted 17 October 2022

Abstract:

CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) is an immune system in prokaryotic organisms that plays a role in defending against foreign genetic elements, such as plasmid invasion and bacteriophage attacks. The key event occurred in 2013 when this technology was identified as capable of editing human genes. When the CRISPR/Cas system was discovered to have the ability to edit human genes in 2013, an increasing number of studies have worked to improve the system with the goal of applying gene editing to a variety of subjects, including microorganisms, plants, animals, and humans. Since then, this system has continuously been optimised, offering many advantages such as ease of design and use, along with superior accuracy compared to previous gene editing methods. Recently, gene editing in *Bacillus* species using this system has attracted a lot of attention because it offers a wide range of applications in agriculture, industry, and medicine. This article presents information on the CRISPR/Cas9 system and its application in the gene editing of *Bacillus* species. This information helps scientists easily access the CRISPR/Cas9 gene-editing system, facilitating its application in their research more effectively and conveniently.

Keywords: *Bacillus* spp., CRISPR/Cas, CRISPR/Cas9 system, gene editing, plasmid.

Classification numbers: 1.4, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: pbngoc@ibt.ac.vn

1. Tổng quan

CRISPR được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1987 bởi một nhóm khoa học gia ở Đại học Osaka, Nhật Bản khi nghiên cứu trên vi khuẩn cổ. Các nhà khoa học đã mô tả trình tự CRISPR là các chuỗi DNA lặp có kích thước ngắn với chức năng chưa được xác định [1]. Sau đó, nó được phát hiện trên các vi sinh vật nhân sơ khác ở các nghiên cứu tiếp theo. Chức năng của chuỗi trình tự CRISPR (CRISPR array) và gen Cas 9 cũng như cơ chế hoạt động của nó được nghiên cứu và làm rõ vào năm 2007 [2]. CRISPR/Cas là hệ thống miễn dịch thích ứng trong nhiều vi khuẩn và hầu hết vi khuẩn cổ [3], cung cấp khả năng miễn dịch chống lại virus và plasmid. Trong hệ thống này, DNA của virus hoặc plasmid xâm nhập sẽ bị phân cắt thành bộ đệm mới và được lưu trữ trong một mảng trong DNA. Khi cùng một loại virus hoặc plasmid xâm nhập trở lại, DNA xâm nhập tương ứng sẽ được xác nhận và can thiệp [3]. Bước ngoặt đột phá trong sử dụng hệ thống CRISPR/Cas được ghi nhận năm 2013 với những thành công trong việc chỉnh sửa hệ gen trên tế bào người [4]. Sau thành công này, hệ thống CRISPR/Cas tiếp tục được mở rộng nghiên cứu trên rất nhiều đối tượng sinh vật khác nhau, bao gồm vi sinh vật, động vật, thực vật... trở thành hệ thống chỉnh sửa hệ gen đơn giản, chính xác và hiệu quả nhất tính tới thời điểm hiện tại.

Bacillus spp. là loài vi khuẩn chủ yếu ở đất và vùng rễ cây. Chúng là một trong những vi khuẩn nội sinh thực vật phổ biến nhất [5]. *Bacillus* spp. là một nhóm vi khuẩn lớn và đa dạng bao gồm cả các vi khuẩn không gây bệnh và gây bệnh. Hầu hết các loài *Bacillus* spp. cũng như các sản phẩm của chúng, được coi là an toàn cho mục đích sử dụng đối với môi trường [6]. Những vi khuẩn này được ứng dụng để thương mại hóa vì khả năng tiết ra một số chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học, tạo ra nội bào tử có khả năng chống lại các điều kiện sinh trưởng bất lợi và phát triển nhanh chóng trong các môi trường khác nhau [7, 8]. Quần thể *Bacillus* spp. có thể tồn tại lâu dài trong đất và rễ cây mà không có bất kỳ ảnh hưởng lâu dài nào đối với các quần thể vi khuẩn khác [9]. Các chế phẩm dựa trên *Bacillus* thương mại được phát triển và phân phối trên toàn thế giới và chứa các chủng có lợi của *Bacillus* bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* [10].

2. Ứng dụng của vi khuẩn *Bacillus* spp.

Bacillus spp. là chi vi khuẩn có mặt ở khắp mọi nơi trong môi trường. Các loài này được sử dụng để sản xuất dược phẩm, sản phẩm trong công nghiệp và trong nông nghiệp (bảng 1) [11]. Alinit là phân bón hữu cơ sinh học đầu tiên được thương mại hóa có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus* spp. Phân bón sinh học có thể được sử dụng thay thế cho phân bón hóa học và thuốc trừ sâu và có thể cung cấp những hiểu biết mới về việc tăng cường sự phát triển và năng suất cây trồng khi đối mặt với dịch bệnh [12]. Các loài/chủng *Bacillus* spp. có lợi cho thực vật thường liên kết với rễ hoặc vùng sinh thái rễ và phát triển màng sinh học để tăng sự phát triển của thực vật [13]. Việc sử dụng phân bón có *Bacillus* vào đất có thể tăng cường các dạng chất dinh dưỡng hữu hiệu cho cây trồng trong vùng sinh thái rễ, kiểm soát vi sinh vật gây bệnh phát triển và tạo ra hệ thống phòng vệ các bệnh dịch hại [14, 15].

Bảng 1. Ảnh hưởng của phân bón sinh học chứa *Bacillus* đến cây trồng.

Loài	Hiệu quả đối với cây trồng	Tham khảo
<i>B. insolitus</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>B. methylotrophicus</i>	Tăng chiều dài và sinh khối của chồi, rễ và lá	[16-18]
<i>B. megaterium</i> ; <i>B. subtilis</i>	Tăng năng suất quả và hạt	[19, 20]
<i>B. pumilus</i> ; <i>B. megaterium</i>	Hòa tan P và cố định N trong đất và tăng vận chuyển của chúng đến rễ	[21, 22]
<i>B. subtilis</i> ; <i>B. methylotrophicus</i>	Tổng hợp các hormone tăng trưởng thực vật (IAA, GAs, cytokinin và spermidines) kích hoạt sự phát triển của thực vật	[18, 23, 24]
<i>B. subtilis</i> ; <i>B. mojavensis</i>	Tiết ACC deaminase để ức chế quá trình già hoá thực vật	[25, 26]
<i>B. megaterium</i> ; <i>B. methylotrophicus</i>	Tăng cường protein nội sinh, axit amin, đường, sắc tố quang hợp và khoáng chất (K, Mg, Na, P, Fe, Zn, và N) trong thực vật	[18, 21]

Những ứng dụng công nghiệp của *Bacillus* spp. đặc biệt là *B. subtilis*, đã phát triển nhanh chóng trong những thập kỷ qua. Nó đã hoạt động như một nhà máy sản xuất tế bào vi sinh vật cho nhiều sản phẩm công nghiệp [27, 28], bao gồm các enzyme [29], protein ngoại lai [30], kháng sinh [31], vitamin [32] và axit amin [33]. Các hợp chất hóa học do *B. subtilis* sản xuất cũng đóng vai trò quan trọng trong các lĩnh vực khác nhau, chẳng hạn như: thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm, hóa chất và dược phẩm. Những sản phẩm từ *B. subtilis* thường được sử dụng để bổ sung vi sinh cải thiện chức năng đường ruột và ngăn ngừa bệnh trong chăn nuôi gia súc và gia cầm [34]. Ngoài ra, nó có thể được sử dụng trong xử lý sinh học nước và ngăn ngừa dịch bệnh cho các sinh vật nuôi trồng thủy sản như tôm và cá [35]. *B. subtilis* có khả năng sản xuất các chất kháng sinh kháng vi khuẩn và nấm, nó cũng có thể tạo ra các chất kháng virus, chống ung thư và ức chế miễn dịch [36].

Là những vi sinh vật an toàn với con người nên *B. amyloliquefaciens* có thể được bổ sung vào thức ăn cũng như nước uống, giúp tăng cường các vi sinh vật có lợi cho đường ruột giúp phòng chống các vấn đề về tiêu hóa, đồng thời cải thiện khả năng dung nạp lactose giúp tăng cường hệ thống miễn dịch [37, 38].

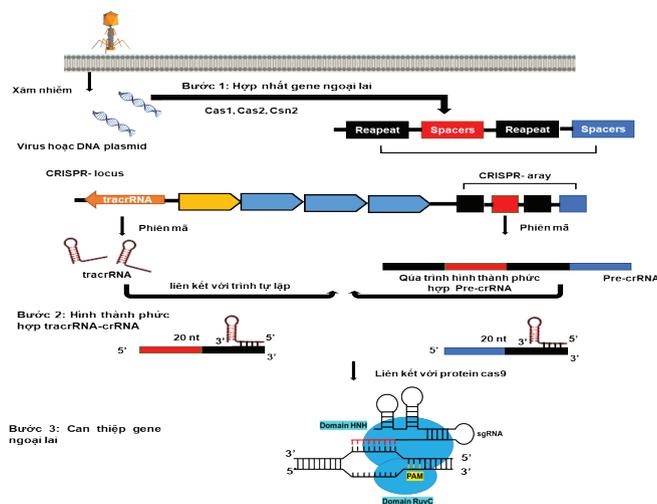
3. Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas

CRISPR/Cas là một họ các trình tự DNA trong bộ gen của các sinh vật nhân sơ như vi khuẩn và vi khuẩn cổ [39]. Những trình tự DNA này được hình thành từ các đoạn DNA ngoại lai (như plasmid, thể thực khuẩn và các phần tử di truyền di động) từng tấn công vào sinh vật nhân sơ đó [2]. Chúng được dùng để phát hiện và phá hủy DNA ngoại lai tương tự trong các lần tấn công về sau. Do đó, chúng được coi là hệ miễn dịch của vi khuẩn và vi khuẩn cổ [39].

Hệ thống CRISPR/Cas lần đầu tiên được phát hiện bởi các nhà khoa học Nhật Bản ở *Escherichia coli* [1], nhưng hiện nay nó đã được tìm thấy trong hàng loạt các loài sinh vật nhân sơ. Trong các loài này, CRISPR/Cas có vùng DNA thể hiện tính di truyền rộng rãi đa dạng, nhưng tất cả chúng đều có một kiến trúc cơ bản chung bao gồm một CRISPR array bao gồm các đoạn lặp lại trực tiếp xen kẽ với các trình tự vùng đệm (spacer), có nguồn gốc từ axit nucleic ngoại lai; CRISPR array này nằm gần Cas operon [40-42]. CRISPR/Cas được phân chia thành ba nhóm chính (Type I, Type II và Type III) [43]. Trong đó, nhóm II (type II) đang được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu chỉnh sửa hệ gen. Nhóm này gồm Cas 9, Cas 1 và Cas 2 [43]. Trong đó, Cas 9 tham gia vào quá trình tổng hợp các CRISPR-RNA (crRNA) [43] và quá trình phá hủy DNA ngoại lai [44]. Cas 9 gồm hai domain chức năng là RuvC-like nuclease và HNH nuclease [45], có vai trò phân cắt các sợi DNA. Mỗi sợi được phân cắt bởi một domain nuclease Cas9 riêng biệt (HNH hoặc RuvC) [46].

4. Cơ chế chỉnh sửa gen của CRISPR/Cas9

Cơ chế hoạt động của hệ thống đáp ứng miễn dịch của vi khuẩn thông qua hệ thống CRISPR/Cas9 được mô tả trên hình 1. Hệ thống đáp ứng miễn dịch được khởi động với việc DNA ngoại lai bị cắt nhỏ và gắn vào các trình tự CRISPR. Tiếp theo, protein Cas được hình thành thông qua quá trình phiên mã và dịch mã của operon Cas, đồng thời là quá trình phiên mã của gen trans-activating RNA và các trình tự CRISPR tạo ra các đơn vị RNA nhỏ còn gọi là CRISPR-RNA (crRNA) và trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA). Sự tương tác giữa crRNA và tracrRNA tạo ra phức hệ cấu trúc giúp xác định các phân tử DNA ngoại lai và xúc tiến quá trình phá hủy hay bất hoạt các đơn vị DNA này thông qua hoạt động của protein Cas 9. Tại vị trí nhận biết trên phân tử DNA ngoại lai (trình tự định hướng), tác động của phức hợp tracrRNA-crRNA hình thành nên cấu trúc kẹp tóc (DNA hairpin structure). Protein Cas 9 gắn vào phức hợp tracrRNA-crRNA tại vị trí kẹp tóc và vào phân tử DNA ngoại lai tại vị trí trình tự ba nucleotide (protospacer adjacent motif - PAM) trước điểm bắt cặp bổ sung của crRNA. Sau khi đã gắn xong, vùng chức năng NHN của protein Cas 9 sẽ cắt sợi đơn DNA có trình tự bổ sung với crRNA, trong khi vùng chức năng RuvC có nhiệm vụ cắt sợi đơn DNA còn lại [43, 47-50]. Ở tế bào nhân thực, các đứt gãy đặc hiệu trên phân tử DNA do phức hệ Cas 9-tracrRNA-crRNA tạo ra sẽ được sửa chữa thông qua hai cơ chế: cơ chế ghép nối của các đầu cắt không tương đồng (Nonhomologous end joining - NHEJ) và cơ chế sửa chữa DNA với sự có mặt của trình tự DNA bổ sung (Homology dependent repair - HDR) [45]. Quá trình sửa chữa sẽ hình thành các thay đổi trong trình tự DNA như chèn thêm đoạn, mất đoạn... [45]. Tuy nhiên, tế bào nhân sơ không có khả năng sửa chữa này (nếu có thì sửa chữa không hiệu quả) [51], do đó, nếu bộ gen bị đứt gãy, tế bào sẽ chết. Việc này có thể được ứng dụng trong chọn dòng vi khuẩn sau khi chỉnh sửa gen vi khuẩn bằng các phương pháp tái tổ hợp tương đồng sử dụng khuôn sửa tổng hợp [52]. Phương pháp chỉnh sửa gen vi khuẩn bằng CRISPR/Cas9 này cho phép tạo ra các đột biến, chèn và xóa đoạn chính xác [51].



Hình 1. Cơ chế đáp ứng miễn dịch của vi khuẩn thông qua hệ thống CRISPR/Cas 9. DNA của virus hoặc plasmid sẽ được xử lý thành protospacer và tích hợp vào các trình tự lặp lại để tạo thành chuỗi trình tự CRISPR thông qua Cas 1, Cas 2 và csn 2. Locus CRISPR điển hình (từ *Streptococcus pyogenes*) bao gồm trình tự tracrRNA, một số gen Cas, leader sequence và CRISPR. CRISPR phiên mã thành pre-crRNA. tracrRNA kết hợp pre-crRNA để tạo thành một phức hợp tracrRNA-crRNA trưởng thành được xử lý bởi các nuclease. Trong quá trình can thiệp gen ngoại lai, phức hợp này kích hoạt Cas 9 và nhận biết trình tự bổ sung 20 nucleotide crRNA bên trong gen ngoại lai, trong khi Cas 9 nhận biết trình tự PAM. DNA sợi đôi cuối cùng sẽ được phân cắt ở 3 nucleotides ngược dòng của PAM bởi Cas 9 [52].

5. Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas ở *Bacillus* spp.

Sự xuất hiện của hệ thống CRISPR/Cas9 đã dẫn đến những phát triển mới to lớn trong nhiều lĩnh vực [28, 53, 54]. Các hệ thống CRISPR/Cas9 đã được chứng minh là phù hợp để tạo đột biến điểm, xóa và chèn gen trong *Bacillus* spp. (bảng 2), đã được áp dụng trong các lĩnh vực kỹ thuật trao đổi chất và tổng hợp sinh học.

Ứng dụng CRISPR/Cas9 vào chỉnh sửa gen ở *Bacillus* spp. dựa theo nguyên tắc đã nêu ở tế bào nhân sơ: CRISPR/Cas9 sẽ nhận biết và cắt đứt trình tự DNA ở những dòng chưa được chỉnh sửa thông qua tái tổ hợp tương đồng (bằng một khuôn sửa - đoạn DNA với trình tự hai đầu giống với trình tự trên bộ gen vi khuẩn và trình tự ở giữa khác), ngăn những dòng này phát triển. Nói cách khác, những dòng phát triển được là những dòng đã được chỉnh sửa thành công.

Như vậy, một lần chỉnh sửa gen ở *Bacillus* spp. cần có một khuôn DNA sửa (cho quá trình tái tổ hợp tương đồng), một hay nhiều đoạn trình tự DNA để phiên mã thành phức hệ tracrRNA-crRNA (để nhận biết trình tự DNA cần được chỉnh sửa, phần này có thể được tinh giản bằng cách nối tracrRNA và crRNA thành một đoạn single guide RNA (sgRNA) [47]) và một trình tự biểu hiện Cas 9 (cho quá trình cắt DNA).

Dựa vào cấu trúc và cách tổ chức khuôn sửa, trình tự biểu hiện Cas 9 và trình tự để phiên mã ra sgRNA, ba phương pháp ứng dụng CRISPR/Cas9 khác nhau đã được phát triển cho *Bacillus* spp. là phương pháp sử dụng plasmid, phương pháp sử dụng khuôn sửa riêng biệt và phương pháp duy trì ở bộ gen.

6. Phương pháp sử dụng plasmid

Nhiều công bố đã sử dụng plasmid để chỉnh sửa gen của nhiều loài thuộc chi *Bacillus*. Trong phương pháp này, khuôn sửa, trình tự biểu hiện Cas 9 và trình tự để phiên mã ra sgRNA có thể nằm trên cùng một plasmid (hệ plasmid đơn) hay được phân bố trên hai plasmid khác nhau (hệ plasmid kép).

6.1. Hệ plasmid đơn

pJOE8999 do J. Altenbuchner (2016) [51] phát triển là một ví dụ về hệ plasmid đơn. Plasmid chứa promoter mạnh cho sgRNA và một promoter cảm ứng mannose cho Cas 9 [51]. Tác giả lần đầu tiên sử dụng plasmid pJOE8999 vào chỉnh sửa gen trên *B. subtilis* và đã thành công trong việc đột biến gen trpC2 và xóa bỏ trình tự DNA ở hai gen (*amyE* và gen tham gia tổng hợp pulcherrimin), gồm một trình tự lớn (25,1 kb) và một trình tự nhỏ (4,1 kb) [51].

pJOE8999 sau đó đã được ứng dụng để chỉnh sửa gen ở các loài *Bacillus* khác. Ở *B. licheniformis*, C.W. Song và cs (2021) [55] sử dụng hệ vector này để chỉnh sửa một chủng *B. licheniformis* tự nhiên thành chủng sản xuất 2,3-butanediol không chứa mucoid (để tăng khả năng phát triển và sản xuất các chất trao đổi chất trung gian) và không sản xuất phụ phẩm (lactate, glycerol và ethanol) bằng cách xóa bỏ các gen thuộc operon pgsBCAE mã hóa cho polyglutamate synthase và gen *sacB* gen mã hóa levansucrase, và các gen *ldhA* mã hóa lactate dehydrogenase, *dgp* mã hóa D- α -glycerophosphatase, và *adhE* mã hóa alcohol dehydrogenase. Ở *B. anthracis*, pJOE8999 đã được dùng để xóa bỏ hai trình tự prophage trong genome: xóa bỏ đoạn 50 kb thì hiệu suất là 20%, trong khi đó xóa bỏ đoạn ngắn hơn thì hiệu suất đạt đến 100% [56]. Trong cùng nghiên cứu đó, các tác giả đã sử dụng pJOE8999 thành công để gây đột biến điểm chính xác trên gen *plcR* của *B. cereus* [56].

pJOE8999 cũng đã được cải tiến để ứng dụng cho các loài *Bacillus* khác. P. Hartz và cs (2021) [57] nhận thấy chỉnh sửa gen *B. megaterium* bằng pJOE8999 không hiệu quả. Các tác giả đề xuất promoter cảm ứng mannose của Cas 9 ở pJOE8999 là vấn đề: *B. megaterium* không có gen vận chuyển hay sử dụng mannose như một số loài *Bacillus* khác, nên không thể cảm ứng Cas 9 bằng mannose [58]. Nhóm tác giả đã giải quyết vấn đề này bằng cách thay thế promoter cảm ứng mannose thành promoter cảm ứng xylose và đã thành công trong việc xóa bỏ một đoạn gen β -galactosidase với hiệu suất lên đến 100% [57]. Trước đó, A.A. Toymentse và cs (2019) [58] cũng đã thiết kế các vector mới từ pJOE8999 bằng cách thay đổi promoter của Cas 9 thành promoter cảm ứng xylose, tuy nhiên, ứng dụng của họ mới chỉ dừng lại ở *B. subtilis*.

Ngoài pJOE8999 và các dẫn xuất, C. Zhou và cs (2019) [59] phát triển vector CRISPR/Cas9 cho *B. licheniformis* từ pWH1520, thay đổi promoter của Cas 9 và sgRNA. Các tác giả nhận thấy rằng, Cas 9 dưới promoter pS của *B. subtilis* và sgRNA dưới promoter mạnh pLY-2 cho hiệu quả xóa gen *uprT* (mã hóa uracil phosphoribosyltransferase) đến 99,2% [59]. Các nhà khoa học đã phát triển vector CRISPR/Cas9 cho *B. subtilis* từ hệ thống vector CRISPR/Cas9 của *Streptococcus pyogenes*, với promoter α -amylase cho Cas 9 và promoter *B. subtilis* mạnh p43 cho sgRNA: họ thiết kế sáu plasmid (pHYCas9dsrf1, pYHYCas9dsrf2, pYHYCas9dsps, pYHYCas9dnpr, pYHYCas9dapr and pYHYCas9damy) để chèn một đoạn trình tự dài 450-550 bp vào các gen *srfC*, *spoIIAC*, *nprE*, *aprE* và *amyE* của chủng *B. subtilis* công nghiệp (ATCC 6051a) và đã đạt được hiệu quả xóa gen từ 33 đến 55%. Tuy nhiên, khi họ sử dụng vector này để xóa một đoạn 284 bp ở gen *srfC* thì hiệu quả đạt được chỉ là 9,1%.

Hệ plasmid đơn có ưu điểm là chỉ cần một bước biến nạp vào tế bào vi khuẩn, làm tăng khả năng sống sót của vi khuẩn. Tuy nhiên, nhược điểm lớn nhất của hệ thống này là kích thước plasmid to (trong trường hợp khuôn sửa dài), làm hạn chế hiệu quả biến nạp.

6.2. Hệ plasmid kép

Hệ plasmid kép được cho là linh hoạt hơn hệ plasmid đơn K.Q. Hong và cs (2018) [60]. Tuy nhiên, nó mới chỉ được ứng dụng trên *B. subtilis*. Y. So và cs (2017) sử dụng hai plasmid, pHCas9 chứa SpCas9 từ *Streptococcus pyogenes* và pB0A chứa DNA sửa và sgRNA. SpCas9 nằm dưới kiểm soát promoter Pgrac [61] - một promoter cảm ứng IPTG nhưng cho phép biểu hiện protein ở mức cao mà không cần chất cảm ứng [62], còn sgRNA nằm dưới kiểm soát của promoter arabinose Para [61]. Hệ này đã được ứng dụng thành công để xóa gen *spo0A* (hiệu suất 100%), gây đột biến điểm (hiệu suất 68%) và chèn gen *GFP* vào *sigE* (hiệu suất 97%) [61]. Mặc dù hiệu quả chèn gen của hệ plasmid kép này cao hơn hệ plasmid đơn, nhiều plasmid sẽ tạo nên gánh nặng cho tế bào chủ và làm quá trình loại plasmid trở nên tốn thời gian.

7. Phương pháp sử dụng khuôn sửa riêng biệt

Ở phương pháp này, trình tự biểu hiện Cas 9 và phiên mã sgRNA sẽ nằm trên một plasmid, còn khuôn sửa là một đoạn DNA thẳng. M.A. Price và cs (2019) [63] sử dụng plasmid phát triển từ pHT01. Plasmid này chứa Cas 9 dưới kiểm soát của promoter Pgrac và sgRNA dưới kiểm soát của promoter mạnh Pveg và sẽ được biến nạp đồng thời với DNA sửa - là một đoạn DNA mạch đôi thẳng (sản phẩm PCR) [63]. Các tác giả đã thành công trong việc chuyển gen *amyE* mã hóa α -amylase và thay thế ba amino acid của subtilisin E - sản phẩm của gen *aprE* [63]. Ưu điểm của việc sử dụng DNA thẳng làm DNA sửa là giảm thời gian

thiết kế và tích hợp DNA sửa vào plasmid như ở hệ plasmid đơn [63]. Tuy nhiên, cũng như hệ plasmid kép, yêu cầu đưa đồng thời hai plasmid khác nhau vào tế bào ảnh hưởng xấu đến hiệu quả biến nạp [63].

8. Phương pháp duy trì CRISPR/Cas9 ở bộ gen

Ở phương pháp duy trì CRISPR/Cas9 ở genome, gen Cas 9 sẽ được tích hợp vào genome của tế bào chủ. Phương pháp này được A.W. Westbrook và cs (2016) [64] phát triển trên *B. subtilis*, dựa trên việc hệ thống CRISPR/Cas tồn tại ở nhiều vi khuẩn và có vẻ không làm ảnh hưởng đến sự sống còn của chúng. Để chỉnh sửa gen bằng hệ thống này, chỉ cần thiết kế và biến nạp vào tế bào chủ một plasmid chứa sgRNA và khuôn sửa [64].

Đầu tiên, pAW016-2 được sử dụng để đưa gen Cas 9 và *tracrRNA* vào locus *lacA* [64]. Sau khi đã thu được chủng vi khuẩn biến đổi gen, các vector chứa một hay nhiều sgRNA và vector chứa DNA sửa sẽ được duỗi thẳng và biến nạp vào chủng này [64]. sgRNA sẽ được tích hợp vào gen *thrC* trên hệ gen của *B. subtilis* và được biểu hiện để cùng với đoạn chứa DNA sửa tạo ra đột biến ở vị trí mong muốn [64]. Sau khi gây đột biến thành công, sgRNA sẽ được loại bỏ khỏi genome *B. subtilis* bằng cách biến nạp đoạn sửa *thrC*, phục hồi lại gen *thrC* [64]. Chủng biến đổi gen bây giờ lại có thể được dùng để chỉnh sửa tiếp [64]. Sử dụng hệ thống này, đột biến đơn và đôi đã được đưa vào hệ gen *B. subtilis* với hiệu suất lên đến 100 và 85%, còn đưa một đoạn operon tổng hợp hyaluronic acid dài 2,9 kb vào genome thì hiệu suất đạt 69% [64].

Bảng 2. Tổng hợp các phương pháp chỉnh sửa gen ở *Bacillus* spp. bằng CRISPR/Cas 9.

Phương pháp	Loài	Tên vector	Promoter điều khiển		Hiệu suất chỉnh sửa	Tham khảo
			Cas 9	sgRNA		
	<i>B. subtilis</i>	Vector có nguồn gốc từ pWH1520	PamyQ	P43	33-56% với chèn đoạn DNA 450-550; 9,1% với xóa đoạn 284 bp.	[65]
Sử dụng plasmid đơn	<i>B. licheniformis</i>	pJOE8999	PmanP - promoter cảm ứng Mannose	Promoter cấu trúc bán tổng hợp biểu hiện mạnh	89% với mất đoạn 25,1 kb; 97% với mất đoạn 4,1 kb	[51]
	<i>B. anthracis</i>				60% với xóa gen	[55]
	<i>B. cereus</i>				20% với đoạn 50 kb; 100% với đoạn nhỏ hơn	[56]
	<i>B. megaterium</i>	pJOE8999 sửa đổi	PxylA - promoter cảm ứng xylose		100% với xóa gen	[57]
Sử dụng plasmid kép			Pgrac - promoter cảm ứng IPTG	Para - promoter cảm ứng arabinose	68% với đột biến điểm; 100% với xóa gen và 97% với chèn đoạn DNA	[61]
Sử dụng khuôn sửa riêng biệt	<i>B. subtilis</i>		Pgrac	Pveg	76% hiệu suất chỉnh sửa gen	[63]
Duy trì CRISPR/Cas 9 ở genome			PCas từ <i>S. pyogenes</i>	Promoter có nguồn gốc từ <i>S. pyogenes</i>	100% và 85% cho đột biến đơn và đôi; 69% với chèn thêm một đoạn 2,9 kb	[64]

Hệ thống này đã giải quyết được nhược điểm của hệ thống plasmid đơn hay kép ở chỗ làm giảm gánh nặng cho tế bào chủ và giảm thiểu yêu cầu phải loại bỏ plasmid sau chỉnh sửa. Tuy nhiên, việc tích hợp sgRNA vào genome tế bào chủ dẫn đến việc bắt buộc phải loại bỏ nó trước khi chỉnh sửa tiếp.

9. Kết luận

Công nghệ CRISPR/Cas9 ngày càng được sử dụng rộng rãi hơn trong việc chỉnh sửa bộ gen của sinh vật. Kỹ thuật này mang lại hiệu quả cao, xác định được vị trí can thiệp cụ thể, dễ dàng sử dụng, chi phí thấp, do đó đã sử dụng trong việc chỉnh sửa gen trên nhiều đối tượng khác nhau. Trong bài tổng quan này, chúng tôi đã trình bày những hiểu biết cơ bản về hệ thống chỉnh sửa CRISPR/Cas9 và những hệ thống CRISPR/Cas9 đã được sử dụng trên vi khuẩn *Bacillus* spp.. Với những ứng dụng rộng rãi trên nhiều lĩnh vực cuộc sống, việc sử dụng kỹ thuật chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 trên đối tượng *Bacillus* spp. hứa hẹn sẽ mang lại nhiều lợi ích hơn nữa cho các nghiên cứu mang tính ứng dụng trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện bằng kinh phí hỗ trợ hoạt động nghiên cứu khoa học của Đề tài mã số NVCC08.12/22-22, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, et al. (1987), "Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product", *J. Bacteriol.*, **169**(12), pp.5429-5433, DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- [2] R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, et al. (2007), "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes", *Science*, **315**(5819), pp.1709-1712, DOI: 10.1126/science.1138140
- [3] P. Horvath, R. Barrangou (2010), "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea", *Science*, **327**(5962), pp.167-170, DOI: 10.1126/science.1179555.
- [4] L. Cong, F.A. Ran, D. Cox, et al. (2013), "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems", *Science*, **339**(6121), pp.819-823, DOI: 10.1126/science.1231143.
- [5] N.I.D. Silva, S. Brooks, S. Lumyong, et al. (2019), "Use of endophytes as biocontrol agents", *Fungal Biol. Rev.*, **33**(2), pp.133-148, DOI: 10.1016/j.fbr.2018.10.001.
- [6] P.N. Bhattacharyya, M.P. Goswami, L.H. Bhattacharyya (2016), "Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review", *J. Phytol.*, **8**, DOI: 10.19071/jp.2016.v8.3022.
- [7] L. Wu, H.J. Wu, J. Qiao, et al. (2015), "Novel routes for Improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants", *Front. Microbiol.*, **6**, DOI: 10.3389/fmicb.2015.01395.
- [8] K. Czaja, K. Góralczyk, P. Struciński, et al. (2015), "Biopesticides - towards increased consumer safety in the European Union: Biopesticides and consumer safety", *Pest Manag. Sci.*, **71**(1), pp.3-6, DOI: 10.1002/ps.3829.
- [9] R. Radhakrishnan, A. Hashem, E.F.A. Allah (2017), "Bacillus: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments", *Front. Physiol.*, **8**, DOI: 10.3389/fphys.2017.00667.
- [10] M. Mazzola, S. Freilich (2017), "Prospects for biological soilborne disease control: Application of indigenous versus synthetic microbiomes", *Phytopathology*®, **107**(3), pp.256-263, DOI: 10.1094/PHYTO-09-16-0330-RVW.
- [11] S. Joshi, N. Lyngwi (2014), "Economically important bacillus and related genera: A mini review", *Biology of Useful Plants and Microbes*, pp.33-43.

[12] D.K. Choudhary (2011), "Plant growth-promotion (PGP) activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants against charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*", *Biotechnol. Lett.*, **33**(11), pp.2287-2295, DOI: 10.1007/s10529-011-0699-0.

[13] P.B. Beauregard, Y. Chai, H. Vlamakis, et al. (2013), "Bacillus subtilis biofilm induction by plant polysaccharides", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**(17), DOI: 10.1073/pnas.1218984110.

[14] P.G. Fraile, E. Menéndez, R. Rivas (2015), "Laboratory of fungal genetics and metabolism", Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, **2**(3), pp.183-205, DOI: 10.3934/bioeng.2015.3.183.

[15] S.M. Kang, R. Radhakrishnan, I.J. Lee (2015), "Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum GR53, a potent biocontrol agent resists Rhizoctonia disease on Chinese cabbage through hormonal and antioxidants regulation", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **31**(10), pp.1517-1527, DOI: 10.1007/s11274-015-1896-0.

[16] M. Ashraf, S. Hasnain, O. Berge, et al. (2004), "Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress", *Biol. Fertil. Soils*, **40**(3), DOI: 10.1007/s00374-004-0766-y.

[17] D. Barnawal, D. Maji, N. Bharti, et al. (2013), "ACC deaminase-containing *Bacillus subtilis* reduces stress ethylene-induced damage and improves mycorrhizal colonization and rhizobial nodulation in trigonella foenum-graecum under drought stress", *J. Plant Growth Regul.*, **32**(4), pp.809-822, DOI: 10.1007/s00344-013-9347-3.

[18] R. Radhakrishnan, I.J. Lee (2016), "Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce", *Plant Physiol. Biochem.*, **109**, pp.181-189, DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.09.018.

[19] A. Dursun, M. Ekinici, M.F. Dönmez (2010), "Effects of foliar application of plant growth promoting bacterium on chemical contents, yield and growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.)", *Pak. J. Bot.*, **42**, pp.3349-3356.

[20] M. Kilian, U. Steiner, B. Krebs (2000), "FZB24 *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality", *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, **1**, pp.72-93.

[21] S.M. Kang, R. Radhakrishnan, Y.H. You, et al. (2014), "Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mjl212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth", *Indian J. Microbiol.*, **54**(4), pp.427-433, DOI: 10.1007/s12088-014-0476-6.

[22] K.B. Kuan, R. Othman, K.A. Rahim, et al. (2016), "Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions", *PLOS ONE*, **11**(3), DOI: 10.1371/journal.pone.0152478.

[23] T.N. Arkhipova, S.U. Veselov, A.I. Melentiev, et al. (2005), "Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants", *Plant Soil*, **272**(1-2), pp.201-209, DOI: 10.1007/s11104-004-5047-x.

[24] S.S. Xie, H.J. Wu, H.Y. Zang, et al. (2014), "Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105", *Mol. Plant-Microbe Interactions*, **27**(7), pp.655-663, DOI: 10.1094/MPMI-01-14-0010-R.

[25] A. Pourbabae, E. Bahmani, H. Alikhani, et al. (2016), "Promotion of wheat growth under salt stress by halotolerant bacteria containing acc deaminase", *J. Agric. Sci. Technol.*, **18**, pp.855-864.

[26] M. Xu, J. Sheng, L. Chen, et al. (2014), "Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **30**(3), pp.835-845, DOI: 10.1007/s11274-013-1486-y.

[27] Y. Liu, L. Li, G. Du, et al. (2017), "Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: Recent advances and future directions", *Biotechnol Adv.*, **35**(1), pp.20-30, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.003.

- [28] M. Schallmeyer, A. Singh, O.P. Ward (2004), "Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production", *Can. J. Microbiol.*, **50(1)**, pp.1-17, DOI: 10.1139/w03-076.
- [29] J.M.V. Dijn, M. Hecker (2013), "*Bacillus subtilis*: From soil bacterium to super-secreting cell factory", *Microb. Cell Factories*, **12(1)**, DOI: 10.1186/1475-2859-12-3.
- [30] W. Cui, L. Han, F. Suo, et al. (2018), "Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **34(10)**, DOI: 10.1007/s11274-018-2531-7.
- [31] P.K. Cherukuri, P. Songkiatiasak, F. Ding, et al. (2020), "Antibiotic drug nanocarriers for probing of multidrug ABC membrane transporter of *Bacillus subtilis*", *ACS Omega*, **5(3)**, pp.1625-1633, DOI: 10.1021/acsomega.9b03698.
- [32] C.G.A. Rocha, L.S. Gronenberg, M. Mack, et al. (2019), "Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins", *Curr. Opin. Biotechnol.*, **56**, pp.18-29, DOI: 10.1016/j.copbio.2018.07.006.
- [33] C. Wang, Y. Cao, Y. Wang, et al. (2019), "Enhancing surfactin production by using systematic CRISPRi repression to screen amino acid biosynthesis genes in *Bacillus subtilis*", *Microb. Cell Factories*, **18(1)**, pp.1-13.
- [34] N.K. Lee, W.S. Kim, H.D. Paik (2019), "Bacillus strains as human probiotics: Characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier", *Food Sci. Biotechnol.*, **28(5)**, pp.1297-1305, DOI: 10.1007/s10068-019-00691-9.
- [35] J. Olmos, M. Acosta, G. Mendoza, et al. (2020), "*Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution", *Arch Microbiol.*, **202(3)**, pp.427-435, DOI: 10.1007/s00203-019-01757-2.
- [36] E. Sansinenea, A. Ortiz (2011), "Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp.", *Biotechnol. Lett.*, **33(8)**, pp.1523-1538, DOI: 10.1007/s10529-011-0617-5.
- [37] M.E. Sanders (2008), "Probiotics: Definition, sources, selection, and uses", *Clin. Infect. Dis.*, **46(s2)**, pp.S58-S61, DOI: 10.1086/523341.
- [38] M. Saxelin (2008), "Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: A European perspective", *Clin. Infect. Dis.*, **46(s2)**, pp.S76-S79, DOI: 10.1086/523337.
- [39] R. Barrangou (2015), "The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond", *Curr. Opin. Immunol.*, **32**, pp.36-41, DOI: 10.1016/j.coi.2014.12.008.
- [40] A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin, et al. (2005), "Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin", *Microbiology*, **151(8)**, pp.2551-2561, DOI: 10.1099/mic.0.28048-0.
- [41] J. Ruud, J.D.A.V. Embden, G. Wim, et al. (2002), "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes", *Mol. Microbiol.*, **43(6)**, pp.1565-1575, DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- [42] C. Pourcel, G. Salvignol, G. Vergnaud (2005), "CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies", *Microbiology*, **151(3)**, pp.653-663, DOI: 10.1099/mic.0.27437-0.
- [43] K.S. Makarova, D.H. Haft, R. Barrangou, et al. (2011), "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems", *Nat. Rev. Microbiol.*, **9(6)**, pp.467-477, DOI: 10.1038/nrmicro2577.
- [44] J.E. Garneau, M.E. Dupuis, M. Villion, et al. (2010), "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA", *Nature*, **468(7320)**, pp.67-71, DOI: 10.1038/nature09523.
- [45] P.D. Hsu, E.S. Lander, F. Zhang (2014), "Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering", *Cell*, **157(6)**, pp.1262-1278, DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010.
- [46] L. Bortesi, R. Fischer (2015), "The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond", *Biotechnol. Adv.*, **33(1)**, pp.41-52, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006.
- [47] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, (2012), "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", *Science*, **337(6096)**, pp.816-821, DOI: 10.1126/science.1225829.
- [48] R. Sorek, C.M. Lawrence, B. Wiedenheft (2013), "CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea", *Annu. Rev. Biochem.*, **82(1)**, pp.237-266, DOI: 10.1146/annurev-biochem-072911-172315.
- [49] H. Wei, B. Zhou, F. Zhang, et al. (2013), "Profiling and identification of small rDNA-derived RNAs and their potential biological functions", *PLOS ONE*, **8(2)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0056842.
- [50] B. Wiedenheft, S.H. Sternberg, J.A. Doudna (2012), "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea", *Nature*, **482(7385)**, pp.331-338, DOI: 10.1038/nature10886.
- [51] J. Altenbuchner (2016), "Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system", *Appl. Environ. Microbiol.*, **82(17)**, pp.5421-5427, DOI: 10.1128/AEM.01453-16.
- [52] L. Arora, A. Narula (2017), "Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system", *Front. Plant Sci.*, **8**, DOI: 10.3389/fpls.2017.01932.
- [53] L. Westers, H. Westers, W.J. Quax (2004), "*Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, **1694(1-3)**, pp.299-310, DOI: 10.1016/j.bbamer.2004.02.011.
- [54] B. Widner, R. Behr, S.V. Dollen, et al. (2005), "Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **71(7)**, pp.3747-3752, DOI: 10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005.
- [55] C.W. Song, C. Rathnasingh, J.M. Park, (2021), "CRISPR-Cas9 mediated engineering of *Bacillus licheniformis* for industrial production of (2R,3S)-butanediol", *Biotechnol. Prog.*, **37(1)**, DOI: 10.1002/btpr.3072.
- [56] Y. Wang, D. Wang, X. Wang, et al. (2019), "Highly efficient genome engineering in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* using the CRISPR/Cas9 system", *Front. Microbiol.*, **10**, DOI: 10.3389/fmicb.2019.01932.
- [57] P. Hartz, M. Gehl, L. König, et al. (2021), "Development and application of a highly efficient CRISPR-Cas9 system for genome engineering in *Bacillus megaterium*", *J. Biotechnol.*, **329**, pp.170-179, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2021.02.006.
- [58] A.A. Toymentseva, J. Altenbuchner (2019), "New CRISPR-Cas9 vectors for genetic modifications of *Bacillus* species", *FEMS Microbiol. Lett.*, **366(1)**, DOI: 10.1093/femsle/fny284.
- [59] C. Zhou, H. Liu, F. Yuan, et al. (2019), "Development and application of a CRISPR/Cas9 system for *Bacillus licheniformis* genome editing", *Int. J. Biol. Macromol.*, **122**, pp.329-337, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.170.
- [60] K.Q. Hong, D.Y. Liu, T. Chen, et al. (2018), "Recent advances in CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Bacillus subtilis*", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **34(10)**, DOI: 10.1007/s11274-018-2537-1.
- [61] Y. So, S.Y. Park, E.H. Park, et al. (2017), "A highly efficient CRISPR-Cas9-mediated large genomic deletion in *Bacillus subtilis*", *Front. Microbiol.*, **8**, DOI: 10.3389/fmicb.2017.01167.
- [62] D.T.M. Tran, T.T.P. Phan, T.T.N. Doan, et al. (2020), "Integrative expression vectors with *Pgrac* promoters for inducer-free overproduction of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*", *Biotechnol. Rep.*, **28**, DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00540.
- [63] M.A. Price, R. Cruz, S. Baxter, et al. (2019), "CRISPR-Cas9 *in situ* engineering of subtilisin E in *Bacillus subtilis*", *PLOS ONE*, **14(1)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0210121.
- [64] A.W. Westbrook, M.M. Young, C.P. Chou (2016), "Development of a CRISPR-Cas9 tool kit for comprehensive engineering of *Bacillus subtilis*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **82(16)**, pp.4876-4895, DOI: 10.1128/AEM.01159-16.
- [65] K. Zhang, X. Duan, J. Wu (2016), "Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system", *Sci. Rep.*, **6(1)**, DOI: 10.1038/srep27943.