

利用 CRISPR-Cas9 和 Cre/loxP 系统删除 34 个非必需基因构建 L-苏氨酸生产菌

丁志祥^{1,2}, 胡晓清^{1,2}, 柳亚迪^{1,2}, 王小元^{*1,2,3}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 国际食品安全联合实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: L-苏氨酸是一种被广泛应用于食品、饲料及医药等领域的必需氨基酸。大肠杆菌以葡萄糖为碳源合成 L-苏氨酸的过程中, 一些非必需基因的转录和翻译会消耗碳源。利用 CRISPR-Cas9 和位点特异性重组系统 Cre/loxP, 敲除了大肠杆菌 MG1655 基因组中 *puuE* 和 *ynal* 区间的 34 个非必需基因(共 30.372 kb), 获得了突变菌 MG003, 然后通过高表达 L-苏氨酸合成途径中关键基因 *thrA**, *thrB* 和 *thrC* 以及 L-苏氨酸转运酶编码基因 *rhtA* 和 *rhtC* 提高 L-苏氨酸产量。与对照菌 MG1655/pFW01-*thrA**BC 相比, MG003/pFW01-*thrA**BC 生长加快, L-苏氨酸产量提高 25.5%; MG003/pFW01-*thrA**BC-*rhtA* 的 L-苏氨酸产量提高了 43.3%; MG003/pFW01-*thrA**BC-*rhtC* 的 L-苏氨酸产量提高了 74.5%。研究结果表明, 大肠杆菌基因组中 34 个非必需基因的删除有利于其提高 L-苏氨酸合成能力。

关键词: 大肠杆菌; L-苏氨酸; CRISPR-Cas9; Cre/loxP; *puuE*; *ynal*

中图分类号: Q 933 文章编号: 1673-1689(2020)11-0071-10 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.11.010

Construction of L-Threonine-Producing *Escherichia coli* by Deleting 34 Non-Essential Genes Using CRISPR-Cas9 and Cre/loxP System

DING Zhixiang^{1,2}, HU Xiaoqing^{1,2}, LIU Yadi^{1,2}, WANG Xiaoyuan^{*1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: L-threonine is an essential amino acid widely used in food, feed and medicine. In the process of L-threonine synthesis from glucose, transcription and translation of some non-essential genes consume carbon source. In this study, CRISPR-Cas9 and site-specific recombination system Cre/loxP were used to delete 34 non-essential genes (30.372 kb) between *puuE* and *ynal* genes in the genome of *E.coli* MG1655, resulting the mutant strain MG003. The genes *thrA**, *thrB* and *thrC*, the key genes in the L-threonine biosynthetic pathway, and the genes *rhtA* and *rhtC* encoding the L-threonine transporters, were then overexpressed in MG003 to increase the L-threonine production. Compared to the control strain MG1655/pFW01-*thrA**BC, MG003/pFW01-*thrA**BC grew faster and

收稿日期: 2019-04-01

基金项目: 国家轻工技术与工程一流学科自主课题项目(LITE2018-10)。

* 通信作者: 王小元(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物代谢工程方面的研究。E-mail: xwang@jiangnan.edu.cn

produced 25.5% more L-threonine, MG003/pFW01-*thrA***BC-rhtA* produced 43.3% more L-threonine, and MG003/pFW01-*thrA***BC-rhtC* produced 74.5% more L-threonine. The results indicate that deletion of the 34 non-essential genes in *E. coli* could improve L-threonine production.

Keywords: *Escherichia coli*, L-threonine, CRISPR-Cas9, Cre/loxP, *puuE*, *ynal*

L-苏氨酸是 8 种必需氨基酸之一,被广泛应用于食品、饲料以及医药等领域,有着广阔的市场前景^[1]。L-苏氨酸的生产方式主要是通过微生物发酵,并且大肠杆菌由于发酵周期短,遗传背景清晰,便于基因改造,而成为了 L-苏氨酸生产的主要菌株^[2]。大肠杆菌生产 L-苏氨酸涉及糖酵解、TCA 循环和 L-苏氨酸生物合成途径,见图 1。利用分子生物学技术来提高 L-苏氨酸的产量已成为热门方向。*thrA*、*thrB* 和 *thrC* 这 3 个基因都位于操纵子 *thrABC* 上,分别编码天冬氨酸激酶、高丝氨酸激酶和苏氨酸合酶。将 *thrA* 的第 1 034 位碱基由 C 突变为 T 可解除苏氨酸对其反馈抑制^[1]。随着操纵子转录水平的提高,ThrA、ThrB 和 ThrC 3 种蛋白质的数量增加,从而使更多的碳流流向 L-苏氨酸合成途径,L-苏氨酸产量得以提高。如将含有诱变操纵子 ThrA*BC 的重组质粒 PVIC40 引入到脱敏大肠杆菌菌株 MG442 中时,L-苏氨酸产量从 8 g/L 增加到 18.4 g/L^[3]。胞内合成的 L-苏氨酸经过由基因 *rhtA*、*rhtB*、*rhtC* 编码的 3 种输出蛋白质运送至胞外,但只有 *rhtC* 编码的 RhtC 对 L-苏氨酸具有专一性^[2]。由于赖氨酸、蛋氨酸或甘氨酸的生物合成被这些突变体阻断,*lysA*、*metA* 或 *tdh* 缺失突变体的 L-苏氨酸产量显著增加^[4]。将糖酵解通量改向戊糖磷酸途径可减少乙酸积累并产生更多的 NADPH,也可以增加 L-苏氨酸产量^[5]。有研究表明,操纵 L-苏氨酸生物合成和旁路代谢途径可提高 L-苏氨酸的产量^[6-8]。在大肠杆菌以葡萄糖为碳源合成 L-苏氨酸的过程中,并不需要所有的基因发挥其功能,而这些基因仍然会利用碳源进行转录,且翻译成相关蛋白质。作者所在实验室有一株从土壤中筛选得到的高产 L-苏氨酸的大肠杆菌 TWF001^[1],其基因组与野生型 MG1655 相比缺少 *puuE* 到 *ynal* 之间的 DNA 分子片段。大肠杆菌基因组上 *puuE* 到 *ynal* 之间的 DNA 分子长度为 30.372 kb,包含 *pspFABCDE*、*ycjMNOPQRSTU*、*ycjWXF* 3 个操纵子和 *puuE*、*ymjB*、*ompG*、*tyrR*、*tpx*、*ycjG*、*mpaA*、*ymiC*、*ycjY*、*ycjZ*、*mppA* 和 *ynal* 12 个单基

因,其中 *pspFABCDE* 操纵子编码的噬菌体休克蛋白 (Psp) 系统负责修复内膜的损坏^[9]; *ycjMNOPQRSTU* 操纵子和 *ompG* 被认为可能是大肠杆菌中的一种未知碳水化合物潜在分解代谢途径。近期也有研究表明,*ycjQRS* 编码的蛋白质可以将 D-古洛糖苷转化为 D-葡萄糖苷^[10];由 *puuE* 基因所编码的 GABA 转氨酶可以将 GABA 转化为琥珀酸半醛,通过敲除 *puuE* 基因可以提高 GABA 的产量^[11]; *tyrR* 编码的 TyrR 蛋白是 L-色氨酸生物合成和转运相关基因的调节因子^[12]; *ycjG*、*mpaA*、*ycjYZ* 和 *mppA* 编码的蛋白质可以降解肽聚糖补充氮源来抵抗氮源饥饿环境^[13];而 *ycjWXF*、*ymjB*、*tpx*、*ymiC* 和 *ynal* 基因的功能尚不清楚。通过对大肠杆菌基因组进行精简,可以达到减少碳源损耗的目的。

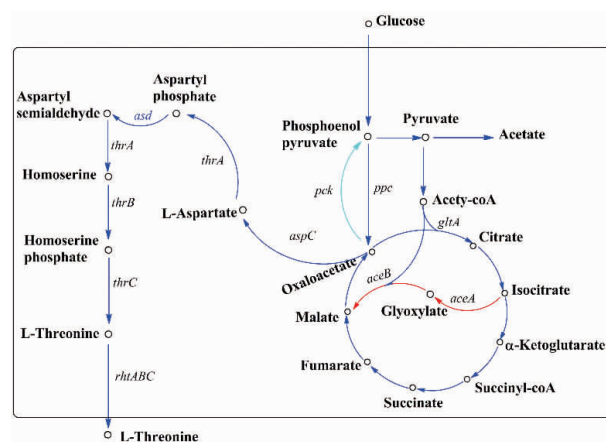


图 1 大肠杆菌中 L-苏氨酸的生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis pathway of L-threonine in *E. coli*

作者以大肠杆菌 MG1655 为出发菌株,结合 CRISPR-Cas9 技术^[14]和位点特异性重组系统 Cre/loxP^[15]进行基因组大片段的敲除,构建了 MG1655Δ*puuE*-*ynal*,将携带 L-苏氨酸操纵子的质粒 pFW01-*thrA***BC* 转入突变株中,进行摇瓶发酵,结果表明缺失 *puuE* 到 *ynal* 之间的 DNA 片段可以有效增加 L-苏氨酸的产量。并且发现在突变株中加强 *rhtC* 的表达,相比于加强 *rhtA* 的表达,L-苏氨酸的增加更为明显。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌株与培养基 出发菌株:大肠杆菌 MG1655,作者所在实验室保藏,相关突变株和质粒见表 1。大肠杆菌细胞在 37 ℃或 30 ℃的 Luria Bertani (LB)培养基(5 g/L 酵母提取物,10 g/L 蛋白胨和 10 g/L 氯化钠)中以 200 r/min 的旋转振荡生长,LB 固体培养基需另加 16 g/L 琼脂粉。在培养和筛选过程中根据需要添加诱导剂或抗生素:异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG:0.5 mmol/L)、阿拉伯糖 (30 mmol/L)、5-氯-2(2',4'-二氯苯氧基苯酚)(100 mg/L)、卡那霉素(50 mg/L)、壮观霉素(50 mg/L)、氨苄霉素(50 mg/L)。L-苏氨酸的生产水平和生长特性通过发酵法进行测定,种子培养基为 LB 培养基。摇瓶发酵培养基:30.0 g/L 葡萄糖,2.0 g/L 酵母粉,25.0 g/L (NH₄)₂SO₄,2.0 g/L 柠檬酸,7.46 g/L KH₂PO₄,2.0 g/L MgSO₄·7H₂O,5 mg/L FeSO₄·7H₂O,5 mg/L MnSO₄·4H₂O,20 g/L CaCO₃,pH 6.8。115 ℃灭菌 15 min^[17],上述试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

表 1 本研究使用的菌株和载体

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株(质粒)	描述	来源
MG1655	Wild-type <i>E. coli</i> K-12	作者所在实验室保藏
MG001	MG1655 <i>puuE::loxP</i>	本研究
MG002	MG1655 <i>puuE::loxP</i> , <i>ynaI::loxP</i>	本研究
MG003	MG1655 Δ <i>puuE-ynaI::loxP</i>	本研究
MG003/ pFW01 - <i>thrA</i> *BC	MG003 harboring pFW01 - <i>thrA</i> *BC	本研究
MG003/ pFW01 - <i>thrA</i> *BC- <i>rhtA</i>	MG003 harboring pFW01 - <i>thrA</i> *BC- <i>rhtA</i>	本研究
MG003/ pFW01 - <i>thrA</i> *BC- <i>rhtC</i>	MG003 harboring pFW01 - <i>thrA</i> *BC- <i>rhtC</i>	本研究
pKD-Cre	ParaBere, Repts, AmpR	[16]
pTargetF	pMB1 <i>aadA</i> sg RNA	[14]
pTargetF - <i>loxP</i> - <i>puuE</i>	pMB1 <i>aadA</i> sg RNA - <i>loxP</i> - <i>puuE</i>	本研究
pTargetF - <i>loxP</i> - <i>ynaI</i>	pMB1 <i>aadA</i> sg RNA - <i>loxP</i> - <i>ynaI</i>	本研究
pFW01- <i>thrA</i> *BC	pFW01 containing <i>thrA</i> *BC	[1]
pFW01- <i>thrA</i> *BC- <i>rhtA</i>	pFW01 containing <i>thrA</i> *BC and <i>rhtA</i>	[1]
pFW01- <i>thrA</i> *BC- <i>rhtC</i>	pFW01 containing <i>thrA</i> *BC and <i>rhtC</i>	[1]

1.1.2 实验设备 回旋式摇床(HYG-A):上海知楚公司;液相色谱仪(Agilent 1260):美国 Agilent 有限公司;核酸蛋白定量仪(GZNOVA):英国 Biochrom 公司;实时荧光定量 PCR 仪 (StepOnePlus):美国 Applied Biosystems 公司;还原糖测定仪(SBA-40):山东科学院生物研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 基因重组菌的构建 本研究所用的引物见表 2。引物主要根据大肠杆菌 MG1655 基因组序列设 MG003 菌株是用 CRISPR-Cas9 和 Cre/loxP 系统相结合的方法敲除基因 *puuE* 到 *ynaI* 之间的整个 DNA 片段。基因编辑进程中所用到的质粒图谱见图2。

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
sgRNA- <i>puuE</i> -F	CATCGAAGCGAAGCAGGTGGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC
T- <i>puuE</i> -F	CATCGAAGCGAAGCAGGTGG
T-sgRNA-R	TCAAAAAAAGCACCAGACTCGG
<i>loxP</i> - <i>puuE</i> f1	GACCTGTACTCATCTAGCCG
<i>loxP</i> - <i>puuE</i> f2	ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATAAGACGACGCTGATGGAAT
<i>loxP</i> - <i>puuE</i> r1	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCGACGACGCGGTATT
<i>loxP</i> - <i>puuE</i> r2	CGCAGAGTGATTCTTTTGTCG
sgRNA- <i>ynaI</i> -F	CATGCCGGAACCCCTGGCGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC
T- <i>ynaI</i> -F	CATGCCGGAACCCCTGGCGG
<i>loxP</i> - <i>ynaI</i> f1	TTTAGCGACCCTGTTCCG
<i>loxP</i> - <i>ynaI</i> f2	ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCGCATTACCACGACCATT
<i>loxP</i> - <i>ynaI</i> r1	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAAGTGCGGAACAAGTCCC
<i>loxP</i> - <i>ynaI</i> r2	CAATGCTGCATGCAGTGAAT
<i>loxP</i> f	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
RT- <i>ppc</i> -F	CCTGAACCTGGCCAACACCG
RT- <i>ppc</i> -R	GATTCCACTGCTTTTTTGATG
RT- <i>pck</i> -F	CGTTGCTGAGAAAGCGGATG
RT- <i>pck</i> -R	GACAGCTTGATAGTTTTTGC
RT- <i>aspC</i> -F	ACCGCATATACGCCAAACTC
RT- <i>aspC</i> -R	GTTGCCACCATCCTGAGC
RT- <i>gltA</i> -F	CCGTCTGTCCATGCTTTCC
RT- <i>gltA</i> -R	CACATCGCGGCCATGGTCGG
RT- <i>aceA</i> -F	GCGTCAGTGAAGAAATGCG
RT- <i>aceA</i> -R	GCTGTCATACGGGTCGCAAT
RT- <i>aceB</i> -F	CAACCGATGAACGGCTTTC
RT- <i>aceB</i> -R	AGTTTATTGCGTTGTGGCGT

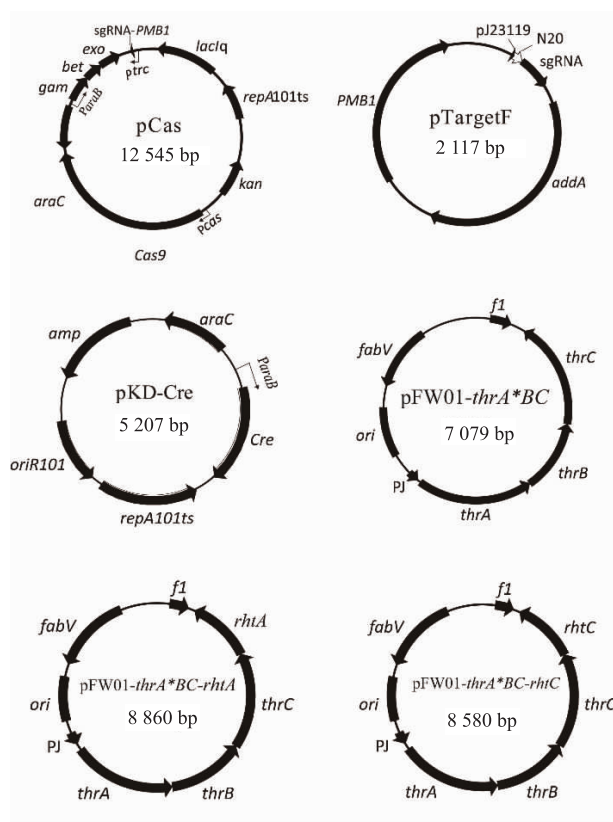


图2 本研究所用到的质粒 pCas、pTargetF、pKD-Cre、pFW01-*thrA*BC*、pFW01-*thrA*BC-rhtA* 和 pFW01-*thrA*BC-rhtC* 的图谱

Fig. 2 Maps of different plasmids pCas, pTargetF, pKD-Cre, pFW01-*thrA*BC*, pFW01-*thrA*BC-rhtA* and pFW01-*thrA*BC-rhtC* used in this study

1)MG001 (MG1655 *puuE*::*loxP*) 的构建 将 *loxP* 位点的 13 bp 反向重复序列设计在上下游同源臂的引物重叠区。利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术首先在 *puuE* 的上游区插入 *loxP* 位点, 上游同源臂和下游同源臂分别用引物 *loxP-puuE*f1/ *loxP-puuE*f2 和 *loxP-puuE*r1/ *loxP-puuE*r2 进行扩增, 然后将上下游同源臂通过重叠 PCR 的方法连接成 *loxP-puuE* 打靶片段。质粒 pTargetF-*loxP-puuE* 是以原始质粒 pTargetF 为模板, 用引物 sgRNA-*puuE*-F 和 T-sgRNA-R 扩增得到线状的 pTargetF-*loxP-puuE* 片段, 再通过自连成环状质粒 pTargetF-*loxP-puuE*, 引物 T-*puuE*-F 和 T-sgRNA-R 用来验证质粒的正确性。然后将构建好的 100 ng 质粒 pTargetF-*loxP-puuE* 和 500 ng 打靶片段 *loxP-puuE* 电转化到 80 μ L 的含有 pCas 的 MG1655 的感受态

中, 转化子通过含有卡那霉素和壮观霉素的 LB 双抗平板进行筛选(pCas 和 pTargetF 分别含有对卡那霉素和壮观霉素具有抗性的基因), 当在 30 $^{\circ}$ C 烘箱中培养 4 h 后, 用引物 *loxP*f 和 *loxP-puuE*r2 验证重组菌株的正确性, pTargetF-*loxP-puuE* 通过加入 IPTG 去除, 因为 IPTG 可以激活质粒 pCas 中控制 sgRNA-PMB1 表达的 *lacIq* 启动子, sgRNA-PMB1 可以切割质粒 pTargetF-*loxP-puuE* 的 PMB1 片段。通过在 42 $^{\circ}$ C 下过夜培养去除温敏型质粒 pCas。

2)MG002 (MG1655 *puuE*::*loxP*, *ynal*::*loxP*) 的构建 采用 1.2.1 的方法在 *ynal* 的下游区插入 *loxP* 位点, 上游同源臂和下游同源臂分别用引物 *loxP-ynalf*1/ *loxP-ynalf*2 和 *loxP-ynalr*1/ *loxP-ynalr*2 进行扩增, 然后将上下游同源臂通过重叠 PCR 的方法连接成 *loxP-ynal* 打靶片段。质粒 pTargetF-*loxP-ynal* 是以原始质粒 pTargetF 为模板, 用引物 sgRNA-*ynal*-F 和 T-sgRNA-R 扩增得到线状的 pTargetF-*loxP-ynal* 片段, 再通过自连成环状质粒 pTargetF-*loxP-ynal*, 引物 T-*ynal*-F 和 T-sgRNA-R 用来验证质粒的正确性, 后续的步骤与 1.2.1 相同。

3)MG003 (MG1655 Δ *puuE-ynal*::*loxP*) 的构建 通过 1.2.2 的方法, 成功构建了含有两个同向 *loxP* 位点的 MG002 菌株, 将质粒 pKD-Cre46 电转入 MG002 的感受态中, 用含有氨苄抗性的 LB 平板进行筛选, 转化子再通过加入阿拉伯糖诱导 Cre 重组酶的表达, 使两个 *loxP* 位点之间发生重组, *loxP-puuE*f1 和 *loxP-ynalr*2 引物用来验证转化子的正确性。再通过 42 $^{\circ}$ C 过夜培养去除 pKD-Cre46 得到所需的目的菌株 MG003, 菌株构建示意图见图 3。UpuuE 和 DpuuE 分别表示 *puuE* 基因的上下游同源臂, Uynal 和 Dynal 分别表示 *ynal* 基因的上下游同源臂。

1.2.2 摇瓶发酵 先将冻干管菌液划线于无抗的 LB 固体培养基上活化菌株, 置于 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中过夜培养, 再用接种环挑菌接种于装有 5 mL LB 液体培养基的试管中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 4 h, 接着转接到二级种子摇瓶培养基中, 初始 OD₆₀₀ 为 0.1, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 4 h, 最后将上述培养液转接到发酵培养基中, 初始 OD 为 0.2, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 36 h, 每隔 6 h 取一次样。

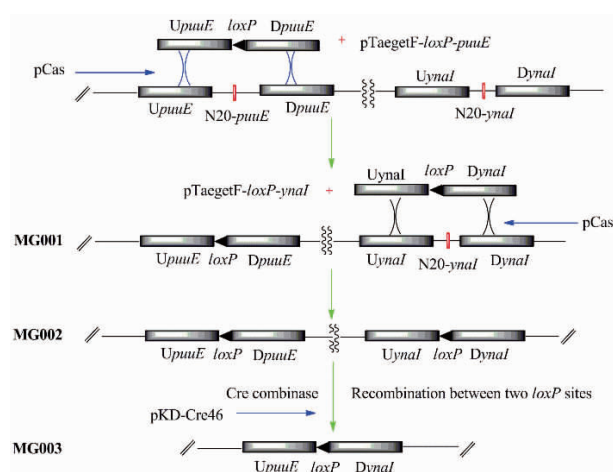


图 3 大片段 *puuE-ynaIDNA* 片段敲除策略

Fig. 3 A strategy for generating deletion of large *puuE-ynaIDNA* fragment

1.2.3 发酵参数的测定

1) 生物量的测定 发酵菌株的生物量通过紫外分光光度计进行测定,用 1 mol/L 的盐酸稀释至 $OD_{600}=0.1\sim 1$ 之间。

2) 葡萄糖质量浓度的测定 葡萄糖质量浓度通过 SBA-40 还原糖测定仪进行测定,待仪器定标以后,取 1 mL 发酵液在 12 000 r/min 转速下离心 2 min,将上清液用去离子水稀释 100 倍,混匀,测定葡萄糖质量浓度。

3) pH 的测定 取 1 mL 发酵液在 12 000 r/min 离心 2 min,将上清液置于 pH 计探头下,显示数值即为发酵液的 pH。

4) 氨基酸质量浓度的测定 样品的前处理:取 1 mL 发酵液在 12 000 r/min 下离心 2 min,取上清液 50 μ L 与 950 μ L 5% 的三氯乙酸混匀,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 2 h 以上,待上清液蛋白质沉淀后,12 000 r/min 离心 15 min,然后用 0.22 μ m 的水相针式滤膜过滤上清液,过滤后的上清液即为处理好的待测样品。

使用高效液相色谱法测定氨基酸的质量浓度,方法为邻苯二甲醛柱前衍生化法^[18]。仪器为 Agilent1200 超高效液相色谱仪,色谱柱为 Thermo ODS-2 HYPERSIL C18 column (250 mm $\times$ 4.0 mm, USA)。流动相:水相(3.01 g 无水乙酸钠溶解于超纯水中,200 μ L 三乙胺,5 mL 四氢呋喃,用水定容至 1 L,调 pH 至 7.2)和有机相(3.01 g 无水

乙酸钠溶解于 200 mL 超纯水中,调 pH 至 7.2,400 mL HPLC 乙腈,400 mL HPLC 甲醇)。UV 检测波长 338 nm,流速 1 mL/min,柱温 40 $^{\circ}$ C。

5) 乙酸质量浓度的测定 样品的前处理:取 1 mL 的发酵液在 12 000 r/min 下离心 2 min,取上清液 300 μ L 与 300 μ L 的去离子水混合均匀,12 000 r/min 离心 30 s,置于 80 $^{\circ}$ C 水浴锅 15 min 以上,待上清液蛋白质变性后,12 000 r/min 再离心 15 min,然后用 0.22 μ m 的水相针式滤膜过滤上清液,过滤后的上清液即为处理好的待测样品。

采用高效液相色谱法测定乙酸质量浓度,仪器为 Agilent1200 超高效液相色谱仪,色谱柱为 aminex HPX-87H column (300 mm $\times$ 7.8 mm),流动相为 0.005 mol/L 的稀硫酸,流量设置为 0.6 mL/min,柱温维持在 50 $^{\circ}$ C,紫外检测波长为 210 nm。

1.2.4 基因的转录水平分析 采用实时逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)对不同大肠杆菌株中 *ppc*、*pck*、*gltA*、*aspC*、*aceA* 和 *aceB* 基因的 mRNA 进行定量分析。采用 RNA 提取试剂盒(中国北京, BioFlux)从对数生长中期的大肠杆菌细胞中提取总 RNA。用核酸定量仪测定 RNA 的浓度,用 4 $\times$ gDNAwiper Mix (中国南京, Vazyme) 从 RNA 样品中去除残留的 DNA。再用 5 $\times$ HiScript II qRTSuperMix II (中国南京, Vazyme) 将 RNA 反转录成 cDNA。采用 ABI Step One RT-PCR 系统(美国加利福尼亚州圣马特奥市应用生物系统)和 ChamQTM Universal SYBR[®] qPCR Mastet Mix(中国南京, Vazyme)进行 RT-PCR。表 2 列出了本研究中使用的引物,采用 RT-PCR 程序为:95 $^{\circ}$ C, 30 s; 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 40 个循环。根据周期阈值定量目标 mRNAs 的相对丰度,该阈值定义为获得背景以上荧光信号所需的周期数,并根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式进行计算^[19]。为了使结果标准化,采用 16S rRNA 相对丰度作为内部标准控制。

1.2.5 数据分析方法 本研究中单项方差分析(one-way analysis of variance)被应用于数据分析^[20]。单项方差分析也是一种最简单的方差分析方法,以 Excel 为分析工具, OD_{600} 、葡萄糖消耗速率、L-苏氨酸的合成、乙酸的形成和基因的转录水平之间的差异用单项方差分析得出 *p* 值, *p* 小于 0.05,表明显著的差异。

2 结果与讨论

2.1 大肠杆菌 MG655 基因组中 34 个非必需基因的删除对菌株生长无明显影响

从基因 *puuE* 的起始密码子到 *ynal* 的终止密码子共有 30.372 kb, 用传统的 Red 同源重组的基因编辑方法无法敲除, 已有文献报道位点特异性重组系统 Cre/loxP 可以进行大片段的敲除^[21], 但通过普通的 Red 同源重组在基因组中引入两个 *loxP* 位点并不容易。作者第一次将 CRISPR-Cas9 技术和位点特异性重组系统 Cre/loxP 结合进行大肠杆菌大片段 DNA 分子的敲除, 因为 CRISPR-Cas9 基因编辑技术相对于传统的 Red 同源重组有着更高的编辑效率。首先利用 CRISPR-Cas9 技术在 *puuE* 的上游区插入第一个 *loxP* 位点, 采用 1.2.1(1) 验证方法, 正确插入 *loxP* 位点条带大小为 313 bp, 见图 4 泳道 1。野生型无 *loxP* 结合位点, 见泳道 2。然后在 *ynal* 的下游区插入第二个 *loxP* 位点, 采用 1.2.1 中(2)验证方法, 正确插入 *loxP* 位点条带大小为 306 bp, 见泳道 3, 野生型见泳道 4。最后转入质粒 pKD-Cre46, 使两个 *loxP* 位点之间发生重组, 采用 1.2.1 中(3)的验证方法, 突变株条带大小为 554 bp(见泳道 5), 野生型有 30 kb 左右, 无法 PCR 出条带。待 DNA 测序分析正确后, 我们成功构建了 MG003 突变株。

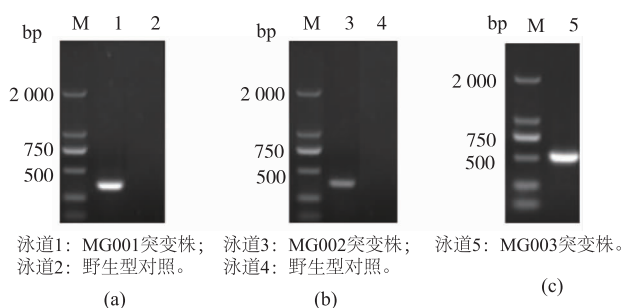


图 4 MG001、MG002 和 MG003 突变菌株构建验证

Fig. 4 Verification of MG001, MG002 and MG003 mutant strains by PCR

为了研究大片段 *puuE-ynal* 的缺失对菌株的生长特性的影响, 我们以 MG1655 为对照菌, 将 MG003 在 LB 培养基中进行生长曲线的测定。如图 5 所示, 在 6 h 前, MG003 的生长一直优于野生型 MG1655, 但 6 h 后, 生长变慢。在培养 14 h 后,

MG003 的 OD_{600} 达到 4.78, 而野生型 MG1655 的 OD_{600} 为 5.03。两菌株的 pH 变化趋势并无明显区别, 都是 3 h 之前下降, 3 h 之后逐步上升。结果表明, 大片段 *puuE-ynal* 的缺失会略微影响菌株的生长, 而不会影响生长过程中的 pH。对数期生长的加快且最终 OD_{600} 的降低有利于发酵生产 L-苏氨酸, 因为对数期的加快可以缩短发酵周期, 并且在不影响菌株活力的情况下, OD_{600} 的降低可以使更多的碳源合成我们所需要的目标产物。

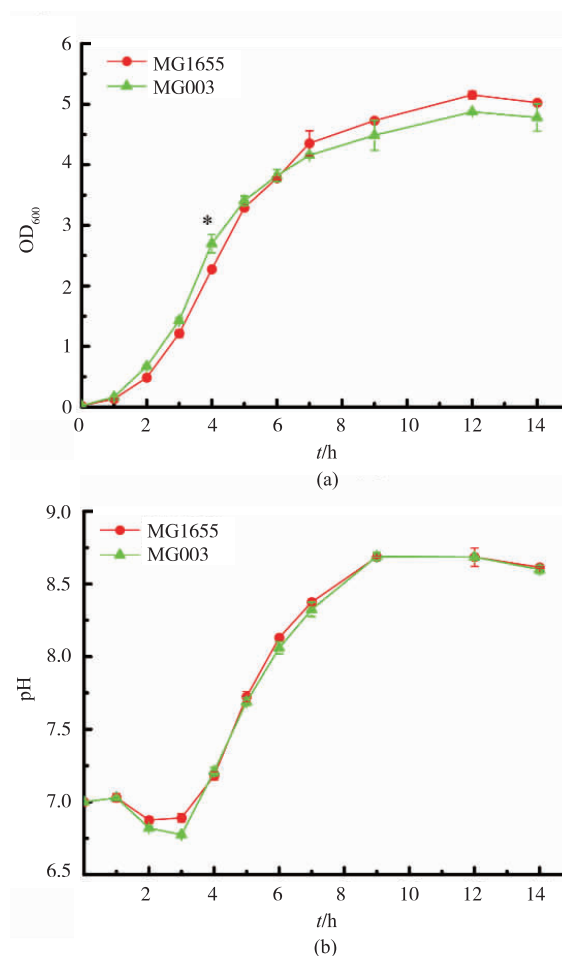


图 5 MG003 的生长曲线测定

Fig. 5 Measurement of growth curve of MG003

2.2 大肠杆菌基因组中 34 个非必需基因的删除有利于 L-苏氨酸合成

基因 *puuE* 到 *ynal* 之间的 DNA 分子含有操纵子 *pspFABCDE* 和 *ycjMNOPQRSTU*, 还包括 *ymjB*、*ycjG* 等单基因片段。为了研究大片段 *puuE-ynal* 对 L-苏氨酸发酵的影响, 质粒 pFW01-*thrA**BC 分别转入到野生型 MG1655 和突变株 MG003 中。摇瓶发

酵结果见图 6。MG003/pFW01-*thrA**BC 的生长明显优于对照菌 MG1655/pFW01-*thrA**BC, 并且葡萄糖消耗速率有略微提高。可能是由于基因组的精简, 导致更多的碳源用于生长。在发酵 36 h 后, L-苏氨酸在 MG003/pFW01-*thrA**BC 中的产量达到 0.64 g/L, 相较于对照菌 MG1655/pFW01-*thrA**BC 提高了 25.5%。这些数据表明, 大片段 *puuE-ynaI* 的缺失可以促进菌株的生长和提高 L-苏氨酸的产量。为了探究胞内代谢水平变化, 发酵 36 h 后, 我们也对副产物乙酸和中间代谢物丙酮酸进行了测定。如图 6(c) 所示, 与对照菌 MG1655/pFW01-*thrA**BC 相比, MG003/pFW01-*thrA**BC 乙酸质量浓度下降 7.5%, 丙酮酸质量浓度上升 9.3%。表明大片段 *puuE-ynaI* 的缺失降低了丙酮酸向乙酸的转化率。

为了更好地解释发酵过程中 OD₆₀₀、葡萄糖消耗、L-苏氨酸和有机酸的质量浓度在 MG1655/pFW01-*thrA**BC 和 MG003/pFW01-*thrA**BC 的不同, 对与 L-苏氨酸代谢的相关基因 *ppc*、*pck*、*gltA*、*aspC*、*aceA* 和 *aceB* 的转录水平进行了测定。基因 *ppc* 的转录水平显著上调, 而 *pck* 略微上调, 表明从磷酸烯醇式丙酮酸到草酰乙酸路径被加强, 而草酰乙酸是 L-苏氨酸合成的前体物质, *aspC* 基因的略微上调可以将草酰乙酸更多的转向 L-天冬氨酸^[2], 这正好解释 L-苏氨酸的产量在 MG003/pFW01-*thrA**BC 菌株中的增加。另一方面, 基因 *gltA* 的转录水平上调可以促进更多的碳流从丙酮酸转向 TCA 循环, 而不是合成副产物乙酸^[23]。基因 *aceA* 和 *aceB* 的转录水平有略微下调, 表明乙醛酸循环并没有由于大片段 *puuE-ynaI* 的缺失而激活。在大片段 *puuE-ynaI* 之间的 DNA 分子中, 基因 *puuE* 和 *tyrR* 被分别报道与 GABA 和 L-色氨酸合成相关^[11-12]; 基因 *ycjG*、*mpaA*、*ycjYZ* 和 *mppA* 都与肽聚糖的降解相关^[13]。操纵子 *pspFABCDE* 与内膜修复相关^[9], 操纵子 *ycjMNOPQRSTU* 被认为作用于未知碳水化合物的分解代谢^[10], 这些已知的功能与 L-苏氨酸的合成并无直接联系。而 *ycjWXF*、*ymjB*、*tpx*、*ymiC* 和 *ynaI* 基因的功能尚未被完全揭开。在本研究中, 我们证明了大片段 *puuE-ynaI* 的缺失并不会损害菌株的生长性能, 反而能提高 L-苏氨酸的合成能力。

2.3 通过加强 L-苏氨酸的外转运进一步提高 L-苏氨酸产量

为了进一步增加 L-苏氨酸的产量, 在 MG003

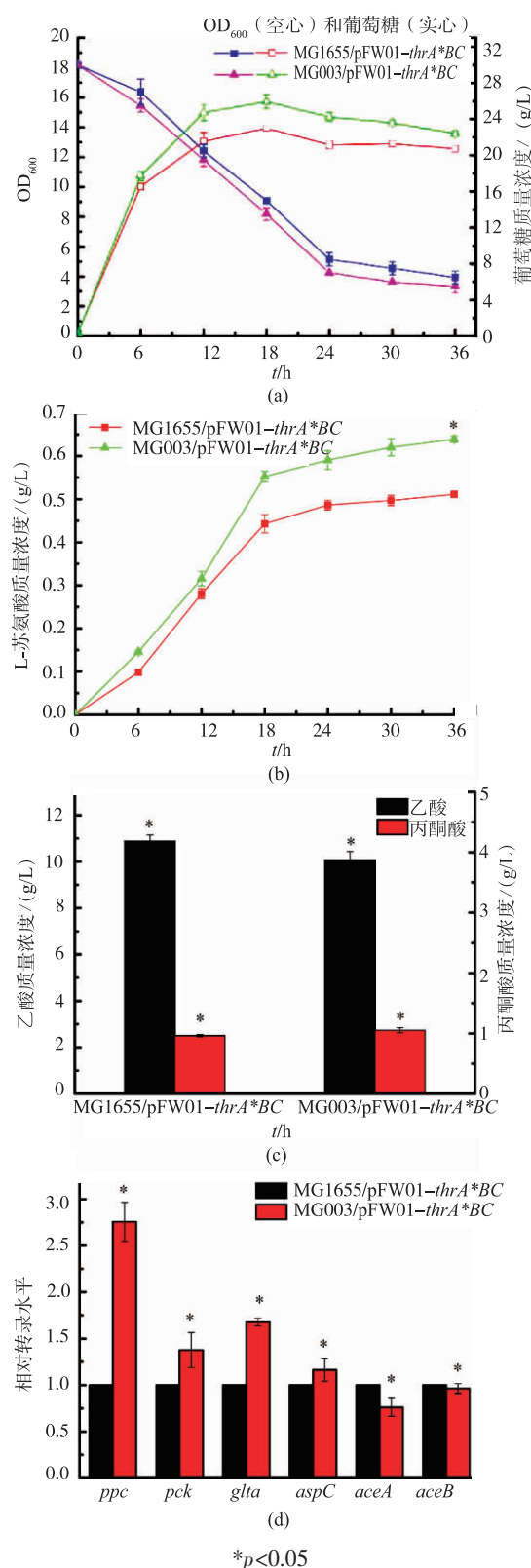


图 6 MG1655/pFW01-*thrA**BC 和 MG003/pFW01-*thrA**BC 的摇瓶发酵

Fig. 6 Flask cultivation of MG1655/pFW01-*thrA**BC and MG003/pFW01-*thrA**BC strains

中分别转入 pFW01-*thrA*BC-rhtA* 和 pFW01-*thrA*BC-rhtC*, 构建菌株 MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtA* 和 MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtC*。以 MG003/pFW01-*thrA*BC* 为对照, 将 MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtA* 和 MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtC* 进行摇瓶发酵。如图 7 所示, MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtA* 的生长和糖耗与对照菌 MG003/pFW01-*thrA*BC* 无明显区别, 而 MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtC* 在发酵前中期生长慢于 MG003/pFW01-*thrA*BC*, 葡萄糖消耗速率也随之降低。但是发酵 36 h 后, L-苏氨酸在 MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtA* 和 MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtC* 分别达到了 0.73、0.89 g/L。较 MG003/pFW01-*thrA*BC* 分别提高了 15.8% 和 36.5%。这些结果表明, *rhtA* 和 *rhtC* 的加强都可以增加 L-苏氨酸的产量, 但 *rhtC* 增加的效果更明显, *RhtA* 并不是特异性 L-苏氨酸输出蛋白质, 它还可以向胞外转运 L-丝氨酸, 而 *RhtC* 底物专一性更好, 只能转运 L-苏氨酸^[24]。为了进一步探究加强 *rhtA* 和 *rhtC* 的表达对胞内代谢水平的影响, 发酵 36 h 后, 对副产物乙酸和中间代谢物丙酮酸进行了测定。与对照菌 MG003/pFW01-*thrA*BC* 相比, MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtA* 乙酸质量浓度无明显变化, 丙酮酸略微降低; 而 MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtC* 中乙酸和丙酮酸质量浓度都显著降低, 分别为 8.49、0.34 g/L, 下降了 15.5% 和 67.6%。表明加强 *rhtC* 的表达更能促进碳流从丙酮酸转向 TCA 循环来积累 L-苏氨酸, 而不是合成副产物乙酸。

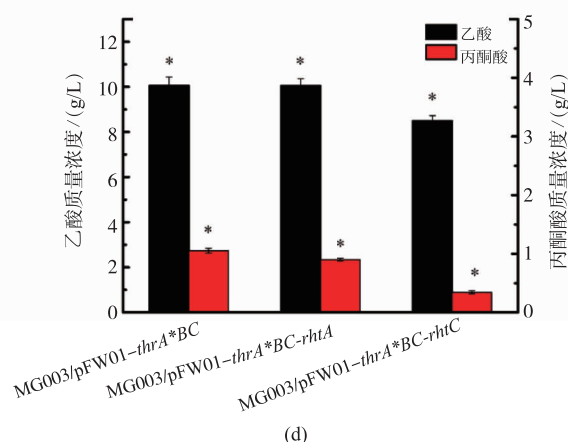
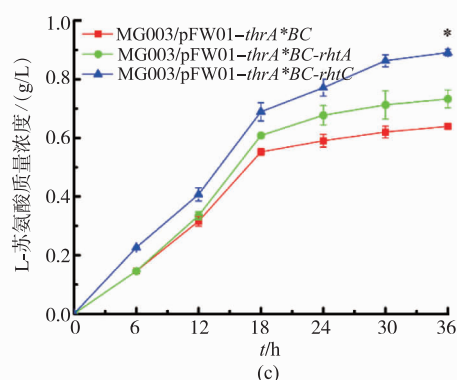
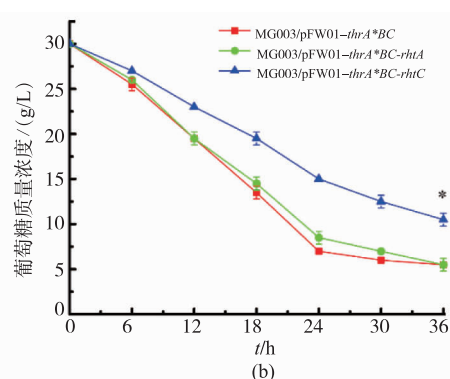
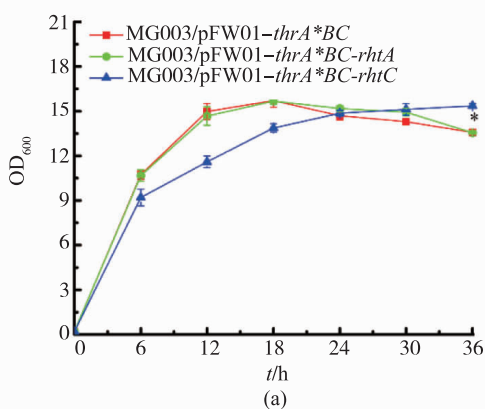
**p* < 0.05

图 7 MG003/pFW01-*thrA*BC*, MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtA* 和 MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtC* 的摇瓶发酵
Fig. 7 Flask cultivation of MG003/pFW01-*thrA*BC*, MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtA* and MG003/pFW01-*thrA*BC-rhtC* strains

3 结语

通过利用 CRISPR-Cas9 和系统 Cre/loxP 系统对大肠杆菌 *puuE-ynal* 之间 34 个非必需基因进行敲除, 构建了菌株 MG003。通过高表达 L-苏氨酸合

成途径中关键基因 *thrA*、*thrB* 和 *thrC* 以及 L-苏氨酸转运酶编码基因 *rhtA* 和 *rhtC* 提高 L-苏氨酸产量。与对照菌 MG1655/pFW01-*thrA**BC 相比, MG003/pFW01-*thrA**BC 生长加快, L-苏氨酸产量提高 25.5%; MG003/pFW01-*thrA**BC-*rhtA* 的 L-苏氨酸产量提高了 43.3%; MG003/pFW01-*thrA**BC-*rhtC* 的 L-苏氨酸产量提高了 74.5%。研究发现, 大片段 *puuE-ynaI* 的缺失可以增强 *ppc* 和 *gluA* 基因的转录水平, 基因 *ppc* 转录水平的提高可以增加 L-苏氨酸的前体物质草酰乙酸的质量浓度, 基因 *gluA* 的转录水平提高可以增加 TCA 循环通量, 从而促进

菌株的生长。基因 *aspC* 的转录水平也略微提高, 这些正好可以解释在突变株 MG003 中 L-苏氨酸的产量的增加。加强 *rhtA* 和 *rhtC* 的表达都可以进一步增加 L-苏氨酸的产量, 但 *rhtC* 增加更为明显, 并且乙酸和丙酮酸质量浓度都显著降低, 更加有利于 L-苏氨酸的积累。作者通过敲除 34 个非必需基因提高了 L-苏氨酸的产量, 此外在大肠杆菌基因组中还有很多非必需基因簇, 通过大肠杆菌基因组精简, 减少碳源的非必需消耗, 也可以用来提高其他目标代谢产物的产量, 并且对工业化菌株的改造具有指导意义。

参考文献:

- [1] ZHAO H, FANG Y, WANG X, et al. Increasing L-threonine production in *Escherichia coli* by engineering the glyoxylate shunt and the L-threonine biosynthesis pathway[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2018, 102(13): 5505-5518.
- [2] DONG X, QUINN P J, WANG X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine[J]. **Biotechnol Adv**, 2011, 29(1): 11-23.
- [3] LIVSHITS V A, ZAKATAEVA N P, ALESHIN V V, et al. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*[J]. **Research in Microbiology**, 2003, 154(2): 123-135.
- [4] LEE K H, PARK J H, KIM T, Y, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. **Mol Syst Biol**, 2007, 149(3): 1744-4294.
- [5] XIE X, LIANG Y, LIU H, et al. Modification of glycolysis and its effect on the production of L-threonine in *Escherichia coli*[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2014, 41(6): 1007-1015.
- [6] DONG X, ZHAO Y, HU J, et al. Attenuating l-lysine production by deletion of *ddh* and *lysE* and their effect on l-threonine and l-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Enzyme Microb Technol**, 2016, 93-94: 70-78.
- [7] KRUSE D, KR MER R, EGDELING L, et al. Influence of threonine exporters on threonine production in *Escherichia coli*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2002, 59(2): 205-210.
- [8] ZHANG Y, MENG Q, MA H, et al. Determination of key enzymes for threonine synthesis through in vitro metabolic pathway analysis[J]. **Microb Cell Fact**, 2015, 14: 86.
- [9] ANH LE T T, THUPTIMDANG P, MCEVOY J, et al. Phage shock protein and gene responses of *Escherichia coli* exposed to carbon nanotubes[J]. **Chemosphere**, 2019, 224: 461-469.
- [10] MUKHERJEE K, HUDDLESTON J P, NARINDOSHVILI T, et al. Functional characterization of the *ycjQRS* gene cluster from *Escherichia coli*: a novel pathway for the transformation of d-Gulosides to d-Glucosides[J]. **Biochemistry**, 2019, 58(10): 1388-1399.
- [11] ZHAO A, HU X, WANG X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce gamma-aminobutyric acid using xylose[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2017, 101(9): 3587-3603.
- [12] NIU H, LI R, LIANG Q, et al. Metabolic engineering for improving L-tryptophan production in *Escherichia coli* [J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2019, 46(1): 55-65.
- [13] CHOI U, PARK Y H, KIM Y R, et al. Increased expression of genes involved in uptake and degradation of murein tripeptide under nitrogen starvation in *Escherichia coli*[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2016, 363(14): 136.
- [14] JIANG Y, CHEN B, DUAN C, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [15] FUKIYA S, MIZOGUCHI H, MORI H. An improved method for deleting large regions of *Escherichia coli* K-12 chromosome using a combination of Cre/loxP and Lambda Red[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2004, 234(2): 325-331.
- [16] HAN Y, LI Y, CHEN J, et al. Construction of monophosphoryl lipid A producing *Escherichia coli* mutants and comparison of

- immuno-stimulatory activities of their lipopolysaccharides[J]. **Mar Drugs**, 2013, 11(2):363-376.
- [17] LEE J H, SUNG B H, KIM M S, et al. Metabolic engineering of a reduced-genome strain of *Escherichia coli* for L-threonine production[J]. **Microb Cell Fact**, 2009, 8(1):2-10.
- [18] KOR S A, VARGA Z, MOLN R-PERL I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography[J]. **Journal of Chromatography A**, 2008, 1203(2):146-152.
- [19] NOLDEN L, FARWICK M, KR MER R, et al. Glutamine synthetases of *Corynebacterium glutamicum*; transcriptional control and regulation of activity[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2001, 201(1):91-98.
- [20] LIU J, LI H, XIONG H, et al. Two-stage carbon distribution and cofactor generation for improving L-threonine production of *Escherichia coli*[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2019, 116(1):110-120.
- [21] YANG Y J, SINGH R P, LAN X, et al. Genome editing in model strain myxococcus xanthus DK1622 by a site-specific Cre/loxP recombination system[J]. **Biomolecules**, 2018, 8(4):137.
- [22] LEE J H, LEE D E, LEE B U, et al. Global analyses of transcriptomes and proteomes of a parent strain and an L-threonine-overproducing mutant strain[J]. **Journal of Bacteriology**, 2003, 185(18):5442-5451.
- [23] DE MEY M, DE MAESENEIRE S, SOETAERT W, et al. Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2007, 34(11):689-700.
- [24] DIESVELD R, TIETZE N, F RST O, et al. Activity of exporters of *Escherichia coli* in corynebacterium glutamicum, and their use to increase L-threonine production[J]. **J Mol Microbiol Biotechnol**, 2009, 16(3/4):198-207.

科技信息

欧盟重新评估聚乙烯吡咯烷酮(E1201)和聚乙烯聚吡咯烷酮(E1202)作为食品添加剂的安全性

2020年8月10日,据欧盟食品安全局(EFSA)消息,欧盟食品添加剂和调味剂小组(FAF)重新评估了聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone)(E1201)和聚乙烯聚吡咯烷酮(polyvinylpolypyrrolidone)(E1202)作为食品添加剂的安全性并扩大聚乙烯吡咯烷酮(E1201)的使用范围。

经过评估,专家小组认为报告的聚乙烯吡咯烷酮(E1201)和聚乙烯聚吡咯烷酮(E1202)用作食品添加剂的用途和使用水平没有安全问题。在建议的最大允许水平和建议的消费水平下,预期的扩展使用范围不会对安全造成影响。

[信息来源]食品伙伴网.欧盟重新评估聚乙烯吡咯烷酮(E1201)和聚乙烯聚吡咯烷酮(E1202)作为食品添加剂的安全性[EB/OL]. (2020-08-11).<http://news.foodmate.net/2020/08/568770.html>