新金色分枝杆菌 CRISPR 基因编辑技术的构建及其初步应用

林 春[1,2]，童丽珍[1,2]，杨套伟[1,2]，邵明龙[1,2]，
张 昱[1,2]，徐美娟[1,2]，廖祥儒[*1,2]，饶志明[1,2]，
（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：新金色分枝杆菌 *Mycobacterium neoaurum* JC-12 是一株用于转化植物甾醇合成甾体激素类药物中间体的重要菌株，传统的基因编辑方法效率低、周期长、操作复杂并且需带入抗性标签。近期 CRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）/Cas9 系统在许多非模式菌株中成功应用为本研究提供了参考。作者结合非同源黏性末端连接（NHEJ）构建了应用于新金色分枝杆菌基因组编辑 CRISPR-Cas 系统，对 *Mycobacterium neoaurum* JC-12 基因组上催化雄甾-4-烯-3,17-二酮（AD）合成雄甾-1,4-二烯-3,17-二酮（ADD）的 3-甾酮-脱氢酶（KSDD）分别设计了敲除和转录激活的靶向 sgRNA。结果显示成功敲除了 *ksdd* 基因并且突变菌株 KSDD 的酶活下降了 80%，突变株发酵 96 h 的 AD 产量比原始菌株提高了 30%，并且突变株未代谢产生 ADD。转录调控结果显示，靶向-29 位点相比于无靶向对照 *ksdd* 的转录水平下降了 38%，而靶向-83 位点和-141 位点则对 *ksdd* 的转录水平分别提升了 2.24 倍和 3.23 倍，同时对应的 AD 和 ADD 的产量在对-29 位点激活时没有显著变化，而 AD 和 ADD 的产量在-83 位点分别提升了 26%和 25%，在-141 位点分别提升了 29.5%和 36%。以上研究为进一步对新金色分枝杆菌基因组水平的代谢工程改造提供了更便捷的方式。

关键字：新金色分枝杆菌；CRISPR；基因编辑；转录激活
中图分类号：Q 812　**文章编号：**1673-1689（2021）07-0050-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.07.006

Construction and Initial Application of Gene Editing Using Type II CRISPR System in *Mycobacterium neoaurum* JC-12

LIN Chun[1,2]，*TONG Lizhen*[1,2]，*YANG Taowei*[1,2]，*SHAO Minglong*[1,2]，
ZHANG Xian[1,2]，*XU Meijuan*[1,2]，*LIAO Xiangru*[*1,2]，*RAO Zhiming*[1,2]
（1.Key Laboratory of Industrial Biotechnology,Ministry of Education,JiangnanUniversity,Wuxi 214122,China；
2. School of Bioengineering,JiangnanUniversity,Wuxi 214122,China）

Abstract：*Mycobacterium neoaurum* JC-12 is an important strain to transform phytosterolsto steroid hormones. Traditional gene editing methods are inefficient, long cycles, complicated to manipulate and resistance labels required. The successful application of CRISPR (clustered regular

收稿日期：2019-02-16
基金项目：国家自然科学基金项目（31570085；31700041）。
* **通信作者：**廖祥儒（1964—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物化学和生物工程方面的研究。E-mail：xrliao@jiangnan.edu.cn

interspaced short palindromic repeats)/Cas9 system in many non-model strains provides a referencefor this study. A CRISPR-Cas system for genome editing of *Mycobacterium neoaurum* JC-12 was constructed by combining non-homologous end joining (NHEJ). Targeted sgRNAs were respectively designed for the knockout and transcriptional activation of anthrone-dehydrogenase (KSDD) synthesizing androst-1,4-diene-3,17-dione (ADD) by catalyzing 4-androstene-3,17-dione (AD)on the *Mycobacterium neoaurum* JC-12 genome. The results showed that the *ksdd* gene was successfully knocked out and the enzyme activity of KSDD decreased by 80%. The AD yield of the mutant strain after 96 h was 30% higher than that of the wild-type strains, and no ADD was produced. Furthermore, the transcriptional regulation results indicated that the transcriptional level of *ksdd* at -29 target site decreased by 38% compared to that of the control, while the transcriptional level of target-83 and-141 increased 2.24 and 3.23 times, respectively. However, the corresponding AD and ADD yields did not change significantly when the -29 site was activated. Notably, there was 26% and 25% increase in the yields of AD and ADD respectively at the -83 site, and 29.5% and 36% increase at the -141 site. This study provides amore extensive and convenient way to further implement genome level metabolic engineering in *Mycobacterium neoaurum*.

Keywords: *Mycobacterium neoaurum*, CRISPR, gene editing, transcriptional activation

近年来,新金色分枝杆菌(*Mycobacterium neoaurum*)已成为甾体激素类药物的生物合成平台之一。甾体药物被广泛应用于治疗风湿、心血管疾病、淋巴性白血病、人体器官移植、抗肿瘤、细菌性脑炎、皮肤病、内分泌失调等疾病[1]。据统计,2011 年甾体激素药物销售额已高于 280 亿美元,约占全球医药总销售额的 6%,成为产量第二大类药物,仅次于抗生素[2-3]。随着甾体药物价格的稳定,采用生物技术生产甾体药物逐渐成为主流。作者所在实验室前期筛选得到了一株甾体药物的高产菌株新金色分枝杆菌,并对该菌株的研究取得了一定的进展,然而进一步调控新金色分枝杆菌甾醇代谢方式急需探索出新的基因编辑技术。

目前应用于分枝杆菌基因编辑的技术主要依赖于等位基因交换、同源重组和非黏性末端修复。等位基因交换是两步重组过程:第一步,使用抗生素抗性标记分离携带整合到宿主基因组中的整个递送载体的单交换;第二步,分离双交换,其可以具有两个基因等位基因中的任一个,以去除标记[4]。通过同源重组获得目的基因敲除突变株也是对分枝杆菌进行基因编辑的有力工具。但是,分枝杆菌同源重组的发生率比其他细菌明显低很多,仅为 10^{-6}~10^{-5}。利用广泛的自杀式载体 pNIL/pGOAL 系列质粒用于构建无标记缺失突变菌株也可以实现目的基因的阻断或者敲除[5]。NHEJ 是 DNA 双链断裂(DSB)的主要修复途径,它往往容易在连接位点插入或缺失突变,并产生破坏靶基因的移码突变。与同源重组相比,NHEJ 系统不依赖于重组蛋白质或同源 DNA 模板,它是高等生物维持基因组稳定性的主要 DNA 修复系统[6]。Gupta 等报道了 NHEJ 介导的染色体 I-Sce I 诱导的 DSB 的修复,修复效率为 25%。然而,双 I-Sce I 位点首先必须置于靶基因内,并且 I-Sce I 引入编码质粒以产 DSB,总基因组编辑周期约为 15 d[7]。

近年来随着基因编辑的新型魔术刀——CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)编辑技术的问世,为微生物的基因工程改造提供了新手段,CRISPR/Cas 系统的主要功能元件有两部分:其一是用于切割目标靶点 DNA 的 Cas 核酸酶;另一个是能与标靶 DNA 互补配对的小型向导 RNA (sgRNA)[9]。其中基于Ⅱ型 CRISPR/Cas 系统研发作为切割 DNA 双链的工具已经获得研究者们的青睐,并且已经成功应用于大肠杆菌、斑马鱼、拟南芥、酿酒酵母等物种的基因编辑中[8]。Cas 是一种 DNA 核酸酶,位于 CRISPR 序列旁边,RNA 引导的核酸酶可以识别和切割靶基因以产生 DNA 断裂。在没有 DNA 模板的情况下,可以通过在相应的同源模板或 NHEJ 存在下的同源重组来修复断裂[10]。最近,研究者已经证明 CRISPR/dCas9 (失活的Cas 蛋白)可以控制耻垢分枝杆菌和结核分

枝杆菌中的基因表达[11-12]。有研究表明,CRISPR-Cas12a 辅助的同源重组系统进行耻垢分枝杆菌的基因组编辑时,引入位点直接突变的效率高达80%,而结合双链模板 DNA 的重组、删除或者插入效率可达到 37%~75%[11,13]。

本研究是自主构建 CRISPR/Cas 系统,通过多方式的改进以两质粒体系构建用于新金色分枝杆菌的基因编辑。为确保质粒在分枝杆菌中能稳定复制和遗传,采用了含有分枝杆菌来源的复制子 OriM 的表达载体 pMV261 作为骨架结构;并对 3 种不同性质的 Caseffactor 蛋白质进行比较分析,使用了和新金色分枝杆菌同源性较高的谷氨酸棒杆菌基因组优化的 spCas9cg 作为 Caseffactor,其 GC 含量为 53%,与新金色分枝杆菌基因组的 GC 含量 62%相近。作者选取了 *Mycobacterium neoaurum* JC-12 菌株甾醇代谢途径的关键基因 *ksdd* 作为实现基因组水平的基因编辑目标位点,首先通过 PCR 验证以及测序验证初步测定了基因的敲除,再通过 RT-qPCR、HPLC 以及酶活检测定量评价了此编辑系统。结果显示,经初步优化后的 CRISPR/Cas9 系统可应用于新金色分枝杆菌的基因组编辑,该系统也显示出在非模式菌株中应用的潜力,为诸多野生型菌株提供了代谢工程改造的参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

M.neoaurum JC-12:作者所在实验室筛选并保存;大肠杆菌 JM109 和 DE3 以及分枝杆菌表达载体 pMV261:作者所在实验室保存;其余菌株及实验中所用的质粒:见表 1。

1.2 菌株的培养

1.2.1 *大肠杆菌的培养* LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母提取物 5,NaCl 10;如需固体培养基,加入质量分数 2%的琼脂。旋转式摇床 180 r/min、37 ℃。转化子筛选条件:加入卡那霉素至终质量浓度为 50 μg/mL,氯霉素为 10 μg/mL,链霉素为 100 μg/mL。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株及质粒	特征	来源
菌株		
E.coli DH5α	F-,φ80dlacZΔM15,Δ(lacZYA-argF)U169,deoR,recA1,endA1,hsdR17(rk-,mk+),phoA,supE44,λ-,thi-1,gyrA96,relA1,deoR,recA1,hsdR17(rk-,mk+),phoA,supE44,	Trans Gen
M.neoaurum JC-12	High-yield ADD strain	作者所在实验室保存
JC-12ΔKSDD	JC-12Δ*ksdd*	本研究
JC-12 CRISPRa-Ksdd	Transcriptional activation *ksdd* gene	本研究
质粒		
pCas9	rep A101(Ts) kan Pcas-Cas9wt λ-Red araCLacIq	Ph.D Sheng Yang
pMV261	OriM hsp60 promoter pMB1 kan	本研究
pFSC	pBL1 pUC cat lacIq Ptac-Cas9cg	Ph.D Zhonghu Bai
pJYS1tac	Cpf1 recTkan rep101(Ts) pMB1	Addgene
pML-spCas9wt	OriM Cas9:Wild type pMB1 KanR	本研究
pML-spCas9cg	OriM hsp60-cas9 pMB1 KanR	本研究
pML-FnCpf1cg	OriM hsp60-cpf1 pMB1 KanR	本研究
pMJ-sgRNA1	aadAOriM pMB1 Pj23119-sgRNA	本研究
pdCas9	Cas9 by introducing point mutationsat the D10A and H840A	本研究
pdCas9-α	α transcriptional activator was coupled to the end of dCas9	本研究
pML-Cas9cg	pML-spCas9cg;add Pj23119-LigD-mku Box	本研究

1.2.2 *新金色分枝杆菌的培养* 种子培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 5,牛肉膏 5,甘油 15,NaCl 15,pH 7.0;摇瓶发酵培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 10,$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3,$MnCl_2$ 0.000 5,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2,植物甾醇 10,环糊精 30,pH 7.0(250 mL 三角瓶,装液量 50 mL);感受态制备培养基:种子培养

基+体积分数 0.2% Tween 80。旋转式摇床转速为 180 r/min、30 ℃。转化子筛选条件:加入卡那霉素终质量浓度为 30 μg/mL,氯霉素为 10 μg/mL,链霉素为 30 μg/mL。

1.2.3 甾醇产量的测定 新金色分枝杆菌 JC-12 降解植物甾醇的主要产物是 AD 和 ADD,AD 和 ADD 在 254 nm 处均有吸收峰,因此可采用高效液相色谱(HPLC)检测,具体测定方式参照文献[14]。

1.2.4 KSDD 酶活的测定 采用 PMS-DCPIP 法测定 KSDD 酶活[14]。KSDD 脱去底物 AD 的两个氢生成 ADD,蛋白质自身的 FAD 接受脱去的 $2H^+$和 $2e^-$成 FADH2,然后 FADH2 将 DCPIP 还原,DCPIP 在 600 nm 处有吸收峰。3 mL 反应混合物由 100 μL 粗酶液、50 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 7.0)、40 μmol/L 的 DCPIP、1.5 mmol/L 的 PMS、500 μmol/L AD(溶于体积分数 2%的甲醇)所组成,检测 600 nm 处的吸光值变化。酶活单位定义:将在 1 min 内还原 1 μmol DCPIP 所需的酶量定义为一个酶活单位(U)。

1.3 主要试剂与仪器

基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒:购自上海捷瑞生物工程有限公司;抗生素、阿拉伯糖、2,6-二氯酚靛酚(DCPIP)及吩嗪硫酸甲酯(PMS)等:购自阿拉丁试剂公司;Taq 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等:购自 TaKaRa 公司;植物甾醇(大豆甾醇质量分数≥95%):购自礼来生物技术(湖州)有限公司;ADD 及 AD 标准样品:购自 Sigma 公司;一步法克隆试剂盒、RT-qPCR 试剂盒及相关用品:购自南京诺唯赞生物科技有限公司;PCR 仪:购自 Eppendorf Mastercycler nexus X2;电转化仪:购自 BIO-RAD pulse controller(Gene Pulser);荧光定量 PCR 仪:购自 StepOnePlus;HPLC 高效液相色谱仪:购自岛津 LC-20AB。

1.4 质粒的构建与基因的克隆

1.4.1 CasEffactor 的选择与表达载体的构建 以 pCas9 为模板,P1/P2 为引物克隆出 wtCas9;以 pC 为模板,P3/P4 为引物克隆出 Sp-Cas9cg(为谷氨酸棒杆菌密码子优化的 Cas9 基因);以 pJYS1 为模板,P5/P6 为引物克隆出 Fn-Cpf1cg 基因;以上基因的克隆均用高保真酶 Phanta Max Master Mix(购自南京 Vazyme),再将 *Bam*H I 线性化 pMV261 载体与 Cas Factor 表达框架通过 ClonExpress II One Step Cloning Kit(购自南京 Vazyme)构建组成型的表达 Cas 效应蛋白质的载体 pMV261-spCas9wt、pMV261-spCas9cg、pMV261-FnCpf1。通过苏州金唯智生物科技有限公司合成了 *LigD* 和 *mku* 基因。通过 P7/P8 和 P9/P10 引物将 *LigD* 和 *mku* 基因融合成 Pj23119-LigD-mku-rrnB 表达框架,再通过 ClonExpress II One Step Cloning Kit 将 NHEJ 表达框架构建到 Cas 表达载体上得到 pML-Cas9。

1.4.2 sgRNA 载体的构建 以 ptrc99A-Spc 载体为基本骨架,以 P11/P12 从 pMV261 载体上克隆得到 OriM,以 P13/P14 克隆得到 sgRNA 框架 168 bp,ClonExpressMultiS One Step Cloning Kit 将 OriM、sgRNA 连接得到 pMJ-sgRNA。通过根据靶序列 sgRNA 软件 CRISPR/Cas9 gRNA Finder 设计靶向 *ksdd* 基因 CDS 区的 sgRNA 以及靶向启动子区域的 sgRNA。通过 P15/P16 引物以 pMJ-sgRNA 为模板克隆出靶向 *ksdd* 编码区的 pMJ-sgRNA,命名为 pMJ-sgRNA1-*ksdd*,通过 P17/P18 引物 pMJ-sgRNA 为模板克隆出靶向 *ksdd* 启动子区的 pMJ-sgRNA,命名为 pMJ-sgRNA2-*ksdd*。将纯化后的 PCR 产物通过 Solution I(Takara,上海)连接后转化到 *E.coli* DH5α 中,并通过测序鉴定 sgRNA 的 N20 序列,所用引物见表 2。

表 2 本研究中所用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物	序列	长度/bp
P1	CAGAATTCGAAGCTTAAGAAGTATAACACAGGGGTTTTTTTTATATGGATAAGAAATACTCAATAGGC	68
P2	TAACTACGTCGACATCGATTCAGTCACCTCCTAGCTGACT	40
P3	TTGTAGTGCTTGTGGTGGCATATGAATTCGTCTCGCTCAAGGCG	44
P4	GATCCGCAATTGTCTTTCTAGAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCAT	50
P5	TGCAGAATTCGAAGCTTATGTCCATCTACCAAGAGTTTGTGA	42
P6	ACTACGTCGACATCGATTTAGTTATTGCGGTTCTGGACAAAT	42
P7	TCTAGATTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCTACTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGG TTCGGCGTCGGAGCA	87

续表 2

引物	序列	长度/bp
P8	CTAGTATTCTCCTCTTTAATCTCTAGTATCATTCGCGCACCACCTCACTGG	51
P9	ATTAAAGAGGAGAATACTAGATGCGAGCCATTTGGACGGGTTCGATCGCCT	51
P10	TTCGAATTCTGCAGCTTCACGGAGGCGTTGGGACGTTTGAGTTGGCCT	48
P11	TGTTATCCCTACTCGAGCGTGAGCCCACCAGCTCC	35
P12	ATGGAGCTGCACATGAACCACAACCACCGATTCTGGCG	38
P13	TTTCACACCGCATATGCTGGATCCTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTA	49
P14	GTAGGGATAACAGGGTAATAGATCTAAGCTTCTGCAGGTCGACTCTAGAG	50
P15	TTCATGTGCAGCTCCATCAGCAAAAGGGGATGATAAGTTT	40
P16	CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCAT	44
P17	GGCGGTTCCACGGCGCGATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAG	58
P18	GATCGCGCCGTGGAACCGCCACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGC	49
P19	GAGCATGTTGGTGAATTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAG	56
P20	GCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATACTAGTACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGC	58
P21	ACAATCGCAACACTCAACTTCTCAGCCATA	30
P22	ACGCCCGACACAGCCTTTCACCGCC	25
P23	CAGCTGGGTGGCGACGGTGGCGGAGGGTCAGGTGGCGGAATGCTGATCTCACAGCGTCC	60
P24	CAGCCAAGCTGAATTCTCAGAGCTGCTCGGTCTCGG	36

1.5 运用 CRISPR 技术介导的基因编辑

1.5.1 CRISPR/Cas 介导的分枝杆菌基因组基因的敲除 新金色分枝杆菌 JC-12 用于构建突变菌株，其感受态的制作方法以及电转方法见文献[14]。首先将构建完整的 pMLcas9 载体转化到新金色分枝杆菌 JC-12 中，通过 PCR 验证挑取含有 pMLcas9 的转化子，将其转接到含有 3 μg/mL 卡那霉素的分枝杆菌感受态种子培养基中，30 ℃、180 r/min 培养 48 h，再转接到分枝杆菌感受态培养基中培养 6~8 h 至 OD 为 0.6~0.8，回收菌体制备电转感受态。电转时将 300 ng 的 pMJ-sgRNA1 载体加到感受态细胞中，轻柔混匀，冰上放置 30 min 后加到预冷的 1 mm 电转杯中，在 2.2 kV 的条件下放入电转仪（Bio-Rad）中电转，向电击杯中加入 900 μL 液体培养基，混匀并全部转移至 EP 管中，30 ℃摇床复苏 4~6 h；离心收集细胞，去除部分上清液，涂布于含 30 μg/mL 卡那霉素和 30 μg/mL 链霉素抗性的固体平板上，30 ℃培养箱倒置培养 5~7 d，转化子用 PCR 验证。

1.5.2 利用 CRISPR-activate 调控分枝杆菌基因组水平的表达 Cas9 核酸酶剪切活性取决于结构域 RuvC 和 HNH。这两个结构域分别负责切割 DNA 链的两条链，通过对这两个位点定点突变，即得到 dCas9(D10A&H840A)，命名为 pdCas9。从新金色分枝杆菌中用 P23/P24 克隆得到转录激活因子 α 亚基，然后利用 Gibson 组装通过 linker(GGTGGCGGAGGGT CAGGTGGCGGA)将转录激活因子 α 亚基偶联到 dCas9 末端，得到 pdCas9-α 载体。

2 结果与分析

2.1 CRISPR-Cas 系统质粒的构建

按照上述方法将扩增得到的基因片段进行融合连接转化，挑取转化子提取质粒后，将质粒进行 PCR 验证，出现特异性条带，大小正确，后续的重组质粒测序结果正确，见图 1。

2.2 CRISPR-Cas 系统在新金色分枝杆菌中的表达与稳定性分析

将上述构建完整的 pML-SpCas9$_{wt}$、pML-SpCas9$_{cg}$ 和 pML-FnCpf1$_{cg}$ 载体分别电转到新金色分枝杆菌 JC-12 中，通过抗性平板筛选出转化子进行菌落 PCR 验证，分别对 Caseffactor 表达框架用相应的引物进行验证，见图 2。电泳结果证明，上述质粒均已成功转入新金色分枝杆菌中，进一步通过 RT-qPCR 验证了 Caseffactor 和 sgRNA 的转录。研究发现，野生型 Cas9 质粒在新金色分枝杆菌中不能稳定遗传。为进一步探索不同 Caseffactor 对新金色分枝杆菌的菌株的影响，作者分析了同等条件下对新金色分枝杆菌生长的影响，结果见图 3。发现spCas9$_{wt}$ 对新金色分枝杆菌的生长是有影响的，而 spCas9$_{cg}$ 和

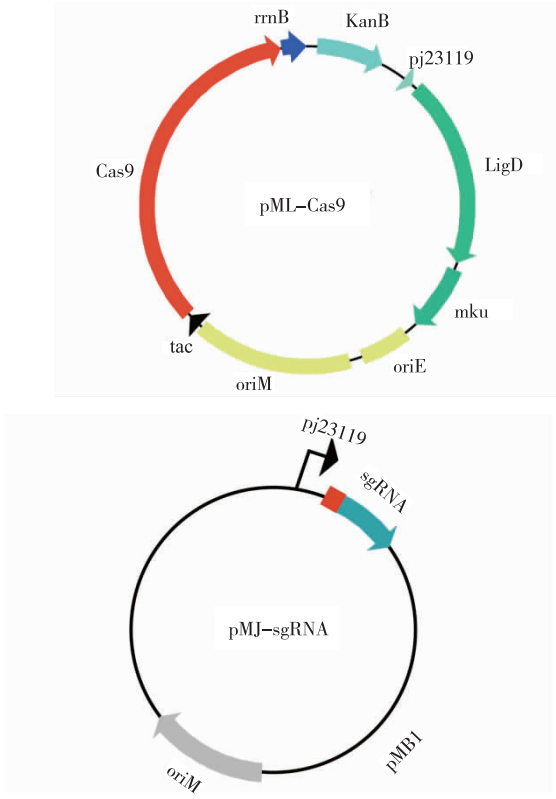


图 1　新金色分枝杆菌 CRISPR-Cas 双质粒基因编辑系统

Fig. 1　CRISPR-Cas double plasmid system of *Mycobacterium neoaurum*

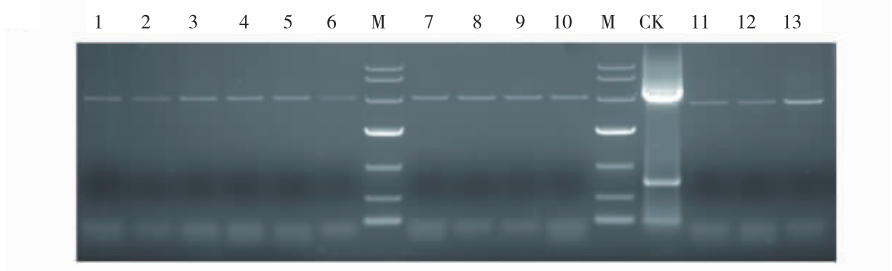
$FnCpf1_{cg}$ 对生长的影响相对较小，因而后期实验中采用 $spCas9_{cg}$ 作为本研究的 Caseffactor。

2.3　基因突变菌株的鉴定

将上述构建好的 Caseffactor 表达载体和 sgRNA 载体按 1.5.1 的方法转入到新金色分枝杆菌中，筛选得到转化子后，挑取对应的单菌落并用 P27/P28 引物进行 PCR 验证，初步判定敲除了 *ksdd* 基因，然后挑取单克隆于 30 ℃、180 r/min 培养 5 d，用细菌 DNA 提取试剂盒对突变株提取基因组 DNA，以突变株基因组 DNA 为模板，同样用上述引物进行扩增，获得了敲除 *ksdd* 基因成功的菌株，并将 PCR 产物送至金维智生物科技有限公司测序，结果见图 4。

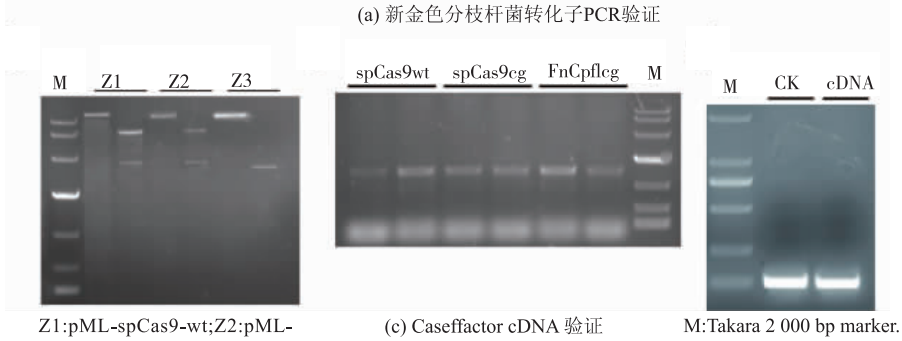
2.4　突变菌株的生长与甾醇转化效率及酶活的分析

对上述验证正确的敲除菌株转接至种子培养基中培养 5 d，测定菌株的生长曲线变化。如图 5 所示，突变型和野生型新金色分枝杆菌在生长上无显著差异。将 KSDD 突变菌株转接到摇瓶发酵培养基中发酵培养 5 d，在 48 h 和 96 h 取样测定 ADD 和 AD 的产量，结果见图 6—7。*ksdd* 敲除菌株已经完全不产 ADD，而且 AD 的产量相比于野生型菌株提高了 25%左右。突变株的发酵结果也间接反映了 CRISPR/Cas9 系统在新金色分枝杆菌中成功应用于



1-6:JC-12/pML-spCas9-wt;7-10:JC-12/pML-spCas9-cg;11-13:JC-12/pML-FnCpf1-cg;M:Takara 10 000 bp marker.

(a) 新金色分枝杆菌转化子PCR验证



Z1:pML-spCas9-wt;Z2:pML-spCas9-cg;Z3:pML-FnCpf1-cg;M:Takara 10 000 bp marker.

(b) 转化子酶切验证

(c) Caseffactor cDNA 验证

M:Takara 2 000 bp marker.

(d) pMJ-sgRNA cDNA验证

图 2　新金色分枝杆菌 Caseffactor 转化子验证与 RT-PCR 验证

Fig. 2　Caseffactor transformant validation and RT-PCR validation of *Mycobacterium neoaurum*

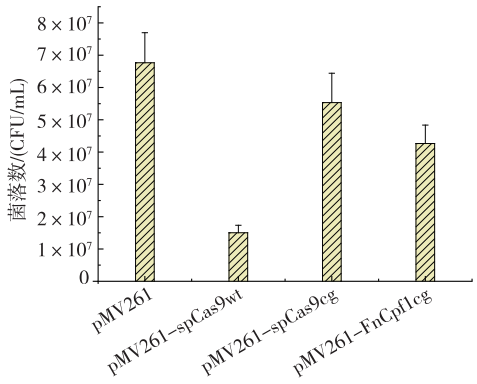
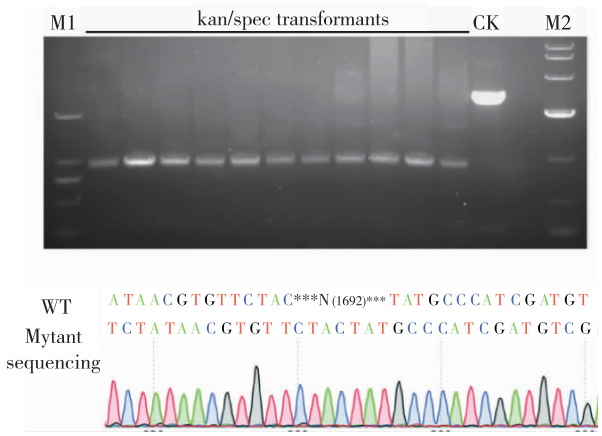


图 3　不同 Caseffector 对新金色分枝杆菌生长的影响

Fig. 3　Effect of different caseffector on the growth of *Mycobacterium neoaurum*



M1:Takara 2 000 bp marker;M2:Takara 10 000 bp marker

图 4　突变菌株的 PCR 验证图与测序结果

Fig. 4　Verification and sequencing results of mutant strains

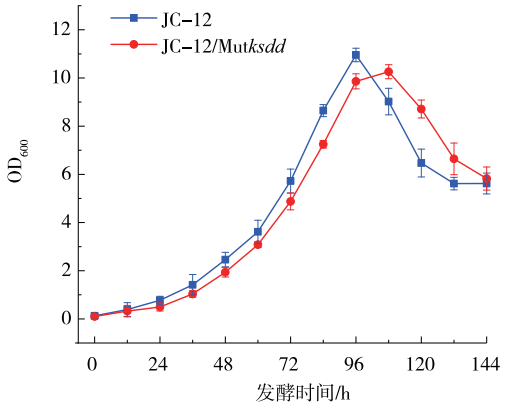


图 5　突变菌株生长曲线

Fig. 5　Growth curve of mutant strain

基因组的敲除。同时对突变株的 KSDD 的酶活进行了测定,结果见图 8。突变株 Mut*ksdd* 的酶活下降了 80%左右。

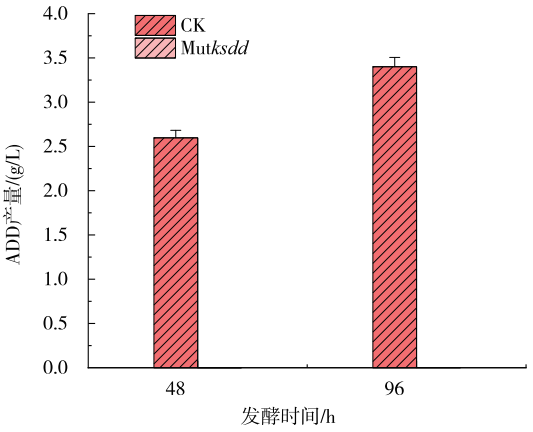


图 6　ADD 产量对比

Fig. 6　Comparison with the production yield of ADD

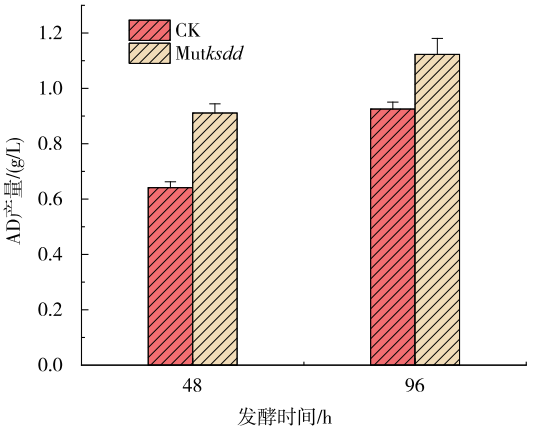


图 7　AD 产量对比

Fig. 7　Comparison with the production yield of AD

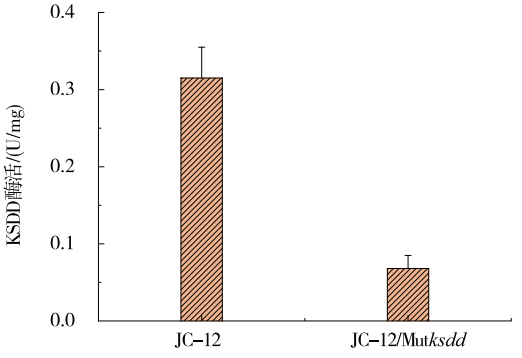


图 8　KSDD 酶活的对比

Fig. 8　Comparison of the KSDD activity

2.5　*ksdd* 在不同转录激活因子下的表达调控分析

将突变后的 dCas9 与 RNA 聚合酶 α 亚基偶联后转入到新金色分枝杆菌中,针对 *ksdd* 起始密码子

前-29、-83、-141 位置的设计 3 个 sgRNA，分别命名为 Ca-g1、Ca-g2、Ca-g3,并将其转入到含 dCas9-α 质粒的新金色分枝杆菌中。筛选得到转化子后将转化子接种到种子培养基中培养 5 d，取样用于 RT-qPCR 实验,RT-qPCR 实验结果见图 9。dCas9-α 对 *ksdd* 转录水平的调控有显著的影响，其中靶向于-29 位点对转录产生了一定程度的抑制,而靶向-83 位点和-141 位点则对 *ksdd* 的转录水平有了显著提升。同时对不同调控位点对甾醇产物的变化进行了 96 h 发酵分析，对 *ksdd* 的转录调控使得 AD 和 ADD 的产量在-83 位点分别提升了 26%和 25%，在-141 位点分别提升了 29.5%和 36%，而靶向-29 位点却无显著变化,这与不同靶点的 *ksdd* 的表达水平也是吻合的,见图 10。但总体而言,对 *ksdd* 的调控未达到理想效果,具体原因可能需进一步优化和改进此 CRISPRa 体系。

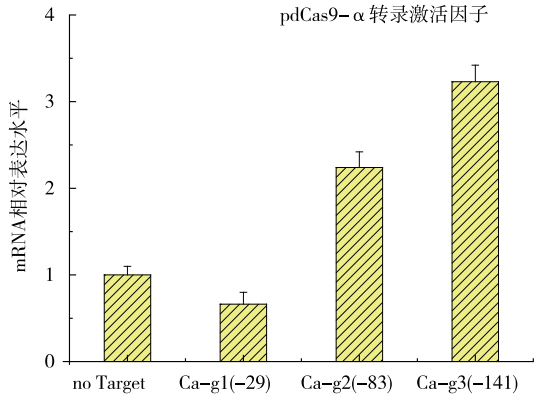


图 9　CRISPRa 对 *ksdd* 的转录水平的变化

Fig. 9　Transcription changes of *ksdd* regulated by CRISPRa

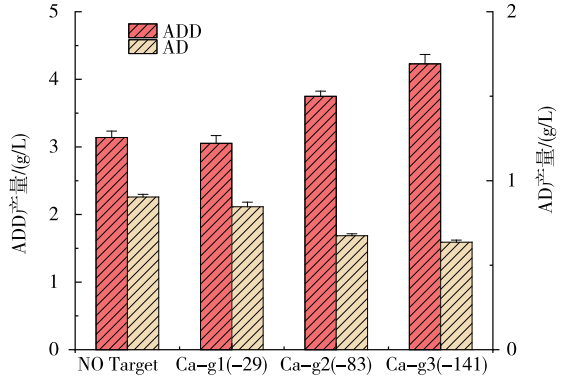


图 10　CRISPRa 对甾醇产物的变化

Fig. 10　Transcription changes of sterol products regulated by CRISPRa

3 结　语

作者构建了可在新金色分枝杆菌这一重要甾醇药物合成微生物基因组中实现敲除和插入等编辑功能的 CRISPR/Cas9 系统,基于该系统实现了对新金色分枝杆菌甾醇药物代谢途径中的重要中间体 AD 和 ADD 合成的关键基因 *ksdd* 的单基因敲除与基因组水平的表达调控,该系统参考相关类似的研究[15-16],以分枝杆菌表达载体 pMV261,该载体含有一个分枝杆菌复制原点 OriM 和大肠杆菌复制原点 OriE,能够在大肠杆菌和分枝杆菌中稳定复制和表达；以此载体为骨架分别用 Pj23119 和 tac 启动子表达了 NHEJ 修复框架和 Cas9 表达框架,并重新构建了一个含有 OriM 的在强启动子下 sgRNA 表达载体。将双质粒体系导入到新金色分枝杆菌中,表达产生的 Cas9 和转录形成的目标靶向 sgRNA 结合靶向目标靶点对其进行切割,致使基因组形成双链 DNA 断裂(Double strand breakage,DSB),绝大多数细胞因此死亡。由于介入了 NHEJ 修复从而激活 NHEJ 的修复,Ku 蛋白复合物识别结合到 DSBs 末端，再招募 DNAligase4（LigD）将 DSB 末端连接。NHEJ 虽能高效连接修复断裂 DNA，但是也能造成不确定性的缺失从而导致基因的缺失。而转录激活是参考 CRISPR-Cas9 的这种形式引入转录激活因子，从而招募更多的 RNA 聚合酶使得靶向基因的表达水平提高[17]。作者构建的 CRISPR-Cas9 系统初步实现了新金色分枝杆菌的基因编辑,开拓了新金色分枝杆菌的基因编辑方式,从而为进一步探索和提升分枝杆菌甾醇代谢途径和相关基因提供了依据。

虽然已经实现了对新金色分枝杆菌的基因敲除,但是未达到理想效果。首先未对 Cas9 的表达在新金色分枝杆菌中做相对的优化以及对 NHEJ 的修复效率做进一步的提升,初期实验筛选过程中出现未敲除菌株和敲除菌株的混合菌落,有其他研究者也出现过类似情况[18],究其原因是大多数原核微生物缺乏 DSB 断裂修复方式导致产生 DNA 断裂的菌株不能修复而死亡,使得脱靶的菌株能够以优势菌存活,通过引入 HDR 或者 NHEJ 修复可以显著提升敲除菌株的存活;其次对于 sgRNA 的脱靶率是该领域一直探索的问题,本研究中为降低脱靶效应带来的影响,参考了相关的研究[19],在设计靶向目标靶点

区域的序列设计多个 sgRNA。

近年来随着研究者在 Cas 蛋白的功能与新型 Cas 蛋白的研究中发现，研究者 Choudhary. Eira 等人通过对化脓性链球菌原始 dCas9 中的 191 个密码子进行修饰以及采用四环素诱导型启动子 Pmyctet0，使得 dCas9 稳定表达同时降低了 dCas9 对菌体生长的影响[11]。Jeremy M. Rock 等人通过对 11 种不同来源的 Cas9 蛋白的筛选，鉴定出其中 4 种对分枝杆菌靶向基因敲除是广泛适用的，而来自嗜热链球菌（*Streptococcus thermophilus*）的 CRISPR1 Cas9(dCas9Sth1)介导的基因敲除率低，是稳定的且具有最小的蛋白质毒性[13]。2015 年张锋团队发掘了 CRISPR 家族的新成员—Cas12a(Cpf1)，随后 Mei-Yi Yan 等人使用 CRISPR-Cas12a 辅助的同源重组系统进行耻垢分枝杆菌的基因组编辑时发现，通过四环素诱导表达的 Cpf1 蛋白对耻垢分枝杆菌的生长并无显著影响[12]。这些研究也将为进一步完善新金色分枝杆菌 CRISPR/Cas 系统提供参考依据，进一步改进和应用其他编辑效率更高的 Cas 蛋白，完善以及提升新金色分枝杆菌的 CRISPR/Cas 基因编辑工具，为新金色分枝杆菌的基因组水平的研究和功能探索提供高效的方法。

参考文献：

[1] 张裕卿，王东青. 植物甾醇微生物转化制备甾体药物中间体的研究进展[J]. 微生物学通报，2006，33(2)：142-146.
[2] 刘夺，张莹，周晓，等. 合成生物技术生产甾体激素中间体的研究展望[J]. 生命科学，2013，25(10)：958-965.
[3] 姚韧辉. 甾体类药物的研究现状与进展[J]. 科技风，2016(18)：260-261.
[4] MUTTUCUMARU D，PARISH T. The molecular biology of recombination in *Mycobacteria*：what do weknow and how can we use it?[J]. **Current Issues in Molecular Biology**，2004，6(2)：145-157.
[5] PARISH T，STOKER N G.Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosistly* AplcABC mutant by gene replacement[J]. **Microbiology**，2000，146(8)：1969-1975.
[6] MAO Z，BOZZELLA M，SELUANOV A，et al. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells[J]. **Cell Cycle**，2008，7(18)：2902-2906.
[7] GUPTA R，BARKAN D，REDELMAN-SIDI G，et al. Mycobacteria exploit three genetically distinct DNA double-strand break repair pathways[J]. **Molecular Microbiology**，2011，79(2)：316-330.
[8] CHOI K R，LEE S Y. CRISPR technologies for bacterial systems：current achievements and future directions[J]. **Biotechnology Advances**，2016，34(7)：1180-1209.
[9] 张玲，王武. DNA 技术中的设计进展[J]. 食品与生物技术学报，2016，35(11)：1121-1128.
[10] MA M，Ye A Y，ZHENG W，et al. A guide RNA sequence design platform for the CRISPR/Cas9 system for model organism genomes[J]. **Bio Med Research International**，2013(5)：805-811.
[11] CHOUDHARY E，THAKUR P，PAREEK M，et al. Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria[J]. **Nature Communications**，2015(6)：267-278.
[12] YAN M Y，YAN H Q，REN G X，et al. CRISPR-Cas12a-assisted recombineering in bacteria[J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2017，83(17)：17-31.
[13] ROCK J M，HOPKINS F F，CHAVEZ A，et al. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform[J]. **Nature Microbiology**，2017(2)：16274.
[14] 张乐乐，张显，邵明龙，等.表达 3- 甾酮 -Δ1- 脱氢酶降解植物甾醇合成雄甾 -1，4- 二烯 -3，17- 二酮[J].生物工程学报，2015，31(11)：1589-1600.
[15] JIANG Y，QIAN F，YANG J，et al.CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Nature Communications**，2017(8)：15179.
[16] ZHANG K，DUAN X，WU J. Multigene disruption in undomesticated *Bacillus subtilis* ATCC 6051a using the CRISPR/Cas9 system[J]. **Scientific Reports**，2016(6)：27943.
[17] BIKARD D，JIANG W，SAMAI P，et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. **Nucleic Acids Research**，2013，41(15)：7429-7437.
[18] 邢述永，路志群，夏海洋，等. 构建 CRISPR-Cas9 介导的耻垢分枝杆菌基因组高效删除系统[J]. 微生物学通报，2018，45(12)：2738-2750.
[19] DOENCH J G，HARTENIAN E，GRAHAM D B，et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation[J]. **Nature Biotechnology**，2014，32(12)：1262-1267.