

研究快报

一种大肠杆菌快速连续 CRISPR 基因组编辑的新策略

刘姣^{1,2} 刘伟丰^{1*} 陶勇¹ 马延和^{1*}

(1. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【背景】通过 CRISPR 结合 λ -Red 同源重组技术进行染色体编辑是大肠杆菌遗传改造的重要手段。虽然目前已经有多个以 CRISPR 为基础的大肠杆菌基因组编辑策略,但这些方法往往涉及单独质粒消除、多片段组装等过程,存在效率低、操作繁琐、耗时长等问题。【目的】建立一种基于不同温度敏感程度的多种质粒协同使用的大肠杆菌快速、连续、高效的 CRISPR 基因组编辑方法,提高 CRISPR 在大肠杆菌基因编辑过程中的效率。【方法】将传统 CRISPR 方法中使用的 pTarget 质粒改造为 RK2^{ts} 型温敏型质粒,并采用 pTW-A/S 两种抗性标记质粒交替使用的方法消除假阳性,实现质粒消除与下一步基因组编辑同步进行。【结果】在相同温度下 RK2^{ts} 型质粒先于 pSC101^{ts} 型质粒发生丢失,从而能够选择性缺失 RK2^{ts} 型质粒 pTW-A/S。同时实现 pTW-A/S 质粒的消除和下一轮基因整合过程中质粒与打靶片段的转入。利用该方法基因敲除/整合效率高达 100%。通过对菌株 BP01 基因 *BspanD* 与 *aspA* 进行高效连续整合,构建得到菌株 BP03,成功提升产物 β -丙氨酸的产量。【结论】建立起一种新的高效、方便、灵活的 CRISPR/Cas9 介导的大肠杆菌基因组连续编辑策略。通过这种不同温度敏感程度的多种质粒协同使用方法,一方面解决了传统方法中质粒消除繁琐等问题,另一方面也避免了大质粒多片段连接等步骤,并极大地缩短了实验周期,为代谢工程菌株改造提供有力工具。

关键词: CRISPR, 大肠杆菌, 基因组编辑, 温度敏感型质粒

Novel efficient strategy for continual CRISPR-mediated genome editing in *Escherichia coli*LIU Jiao^{1,2} LIU Wei-Feng^{1*} TAO Yong¹ MA Yan-He^{1*}

(1. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Background] Genome editing method coupling the CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) system with λ -Red recombination technology has become an

Foundation item: Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (ZDRW-ZS-2016-3-1)

***Corresponding authors:** Tel: 86-10-64807798

E-mail: LIU Wei-Feng: liuwfv@163.com; MA Yan-He: mayanhe@im.ac.cn

Received: April 16, 2018; **Accepted:** May 02, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 06, 2018

基金项目: 中国科学院重点部署项目(ZDRW-ZS-2016-3-1)

***通信作者:** Tel: 86-10-64807798

E-mail: 刘伟丰: liuwfv@163.com; 马延和: mayanhe@im.ac.cn

收稿日期: 2018-04-16; **接受日期:** 2018-05-02; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-06-06

important access to *Escherichia coli* genomic editing. Recently, there have been several genomic editing strategies in *E. coli* based on CRISPR system. However, these methods often require many processes, such as the elimination of single plasmid or multi-fragment assembly, and are still inefficient, tedious and time-consuming. **[Objective]** Establish a fast, continuous and efficient CRISPR genome editing method based on several different temperature-sensitive plasmids in *E. coli*, and improve the editing efficiency of CRISPR in *E. coli*. **[Methods]** The pTarget plasmid in traditional CRISPR method was modified to an RK2^{ts}-type plasmid with better temperature sensitivity. Two plasmids with different resistance markers (pTW-A/S) were constructed and used alternately to eliminate false positives. And this realized the elimination of plasmids and next round of gene integration simultaneously. **[Results]** At the same temperature, RK2^{ts}-type plasmid was eliminated more easily than pSC101^{ts}-type plasmid, and could selectively eliminate pTW-A/S plasmid. Moreover, it eliminated pTW-A/S plasmid and transformed other plasmids and target fragments during next round of gene integration simultaneously. The efficiency of gene knock-out/integration reached 100%. Then, we used this method to construct BP03 by modifying gene *BspanD* and *aspA* on strain BP01 continuously, leading to increased production of β -alanine successfully. **[Conclusion]** A novel, efficient, convenient, continuous and flexible CRISPR/Cas9-mediated genome editing strategy has been established in *E. coli*. This coordinate use of multiple temperature-sensitive plasmids method solves the problem of incomplete elimination of pTarget plasmids in traditional CRISPR systems, and it also avoids the low connection efficiency in process of large plasmids construction. Therefore, it shortens the experimental hours and provides a powerful tool for the construction of metabolic engineering strains.

Keywords: CRISPR, *Escherichia coli*, Genome editing, Temperature sensitive plasmids

大肠杆菌是最为常见的一类模式微生物和生物工程领域应用最广泛的宿主菌。在相关基础研究及应用过程中,往往需要对大肠杆菌的遗传性状进行改造^[1]。其中基因组编辑通过在染色体水平上进行靶基因的敲除、插入或替换,可以稳定地实现大肠杆菌的多靶点遗传性状的改变,目前已经成为大肠杆菌代谢工程研究最重要的方法之一^[2]。由于大肠杆菌自身的重组效率低,因此大肠杆菌的基因组编辑需要通过外源 λ -Red 或 RecET 介导的同源重组技术实现^[3-5]。该方法需要两端带有同源臂的线性 DNA 片段,在 λ -Red 或 RecET 重组酶的作用下通过 DNA 分子双交换将靶 DNA 序列替换为带有筛选标记的外源片段,从而实现基因序列的敲除、插入或替换^[6]。

但是传统的大肠杆菌同源重组技术需要辅助质粒、筛选标记消除等过程,多靶点连续编辑时效率低、流程过于繁琐^[7]。近年来,CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技术的引入极大地促进了大肠杆菌同源重组技术的效

率。CRISPR 来源于细菌和古菌的微生物免疫防御系统^[8]。在天然条件下,CRISPR 系统利用具有核酸酶活性的 Cas9 蛋白,在一段 RNA 指导下特异性识别目标 DNA 序列,然后将该序列进行切除。目前应用最为广泛的 CRISPR 是 II 型 CRISPR/Cas9 系统,该系统只需要设计一段包含有基因组特定位点附近的 PAM 区(Protospacer adjacent motif)序列作为导向 RNA (SgRNA),用于引导 Cas9 识别靶向序列。CRISPR/Cas9 系统已成功应用于原核生物^[9]、真核生物^[10]、人类^[11]、小鼠^[12]、斑马鱼^[13]等生物体中目标基因组编辑工作。

2015 年, Jiang 等^[14]通过将 CRISPR/Cas9 与 λ -Red 同源系统结合,成功实现了利用 CRISPR 系统对大肠杆菌多靶点基因组的连续编辑。在该系统中,他们将 Cas9 蛋白与 λ -Red 同源重组系统中介导同源重组的 3 个蛋白 Exo、Bet、Gam 的表达单元共同构建在同一个温敏型质粒 pCas9 上,同时利用另外一个质粒 pTarget 表达能够特异性识别靶位点的 sgRNA 序列(双质粒策略)。当存在同源打靶片段

的情况下, Cas9 首先在 sgRNA 的介导下在靶位点特异性切断基因组 DNA, 然后通过 λ -Red 重组蛋白的作用实现同源片段的整合。该系统不需要筛选标记, 整合效率可以达到 100%, 并能实现 2 个靶位点的敲除/整合, 但完成敲除/整合后仍然需要单独的步骤利用 Cas9 的作用消除 pTarget 质粒。每一轮操作需要 4 d 的时间。

2016 年, Zhao 等^[15]对上述 CRISPR/Cas9 辅助 λ -Red 同源重组系统进行了改造, 采用了单质粒系统代替了双质粒系统: 在每一轮操作过程中, 通过 Golden Gate 介导的多片段连接一步构建了含有 sgRNA、Cas9 蛋白、 λ -Red 重组蛋白表达单元、打靶片段的单一质粒, 然后通过诱导 λ -Red 重组蛋白实现 sgRNA 介导的基因敲除过程。该策略可以将一轮基因敲除的周期缩短到 3 d, 但在实验过程中需要过表达 RecA 并延长同源臂长度以提高敲除效率, 操作仍然很繁琐。特别是在基因敲除过程中, 大质粒的多片段连接存在连接效率低、假阳性等问题, 实验缺乏灵活性。

为此, 本研究采用多个不同温度敏感程度的质粒对原有系统进行改造, 从而在大肠杆菌中建立一种更为高效、灵活的 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑策略。通常采用的温度敏感型质粒均是基于 pSC101 复制起始位点的突变(pSC101^{ts}型质粒)。当 pSC101 复制起始位点中的 Rep 蛋白特定氨基酸位点发生突变(H289Y)时, Rep 蛋白在高温条件下失活导致质粒无法复制, 造成质粒丢失^[16]。与 pSC101 复制起始位点相类似, RK2 复制起始位点包含介导质粒复制的 TrfA 蛋白^[17], TrfA 蛋白存在多个突变位点能够导致 RK2 复制起始位点发生温度敏感型突变。例如在 TrfA 蛋白编码 DNA 序列末端的 1 122–1 124 三个碱基发生缺失时, 会导致质粒在 37 °C 也无法正常复制(RK2^{ts}型质粒)^[18]。因此相较于 pSC101^{ts}型质粒, 在相同温度下 RK2^{ts}型质粒更容易丢失。利用 pSC101^{ts}型质粒与 RK2^{ts}型质粒之

间的温度敏感性差异, 可以通过对温度及筛选标记的控制实现质粒的选择性缺失。我们通过对传统 CRISPR 方法中 pTarget 质粒进行改造, 将其替换为 RK2^{ts}型温度敏感型质粒; 同时选择 2 种抗性标记进行交替使用, 一步实现 pTarget 质粒的消除和下一轮基因敲除过程中的质粒与打靶片段的转入。这一方法既避免了单质粒策略中多片段组装的繁琐操作, 又改进了双质粒策略中 pTarget 质粒消除过程, 实现了实验操作周期的缩短。该方法提供了一种快速、易操作的新型大肠杆菌 CRISPR 系统。我们采用这种优化的 CRISPR/Cas9 策略成功实现在短时间内对大肠杆菌基因组 *aspA* 基因强启动子 CPA1 的替换, 以及 *BspanD* 外源基因的整合, 并成功实现了对大肠杆菌合成 β -丙氨酸相关靶点的测试与优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 BP01、BW25113、T1 由本实验室保存, 相关质粒见表 1。

1.1.2 培养基

LB 培养基、自诱导培养基、M9 盐按照分子克隆或精编分子生物学指南配制。卡那霉素(Kan)和链霉素(Str)的工作浓度为 50 μ g/mL, 氨苄青霉素(Amp)的工作浓度为 100 μ g/mL。

1.1.3 主要试剂和仪器

Gibson Assembly Kit、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 New England BioLabs 公司; Fast fly *Pfu* 聚合酶购自全式金公司; DNA 纯化及凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司; 引物由睿博兴科生物工程有限公司合成; L-阿拉伯糖购自上海宏邦医药科技有限公司; 乙腈(色谱级)购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

高相液相色谱仪、高效液相色谱柱, Agilent 公司; 电转仪, Bio-Rad 公司。

表 1 本研究相关质粒

Table 1 Plasmids used in this study

质粒 Plasmids	质粒特征 Characteristics	来源 Sources
pCas	Kan ^r ; ParaBAD-λ-Red recombinase; Pcas-cas9; Ptrc-pMBI-sgRNA; pSC101 ^{ts} origin	Kindly provided by Pro. Yang Sheng
pTarget	Str ^r ; Pj123119-sgRNA; pMBI origin	Kindly provided by Pro. Yang Sheng
pSA1	Amp ^r ; pSC101 ^{ts} origin	Our lab
pSK1	Kan ^r ; pSC101 ^{ts} origin	Our lab
pWA4	Amp ^r ; RK2 ^{ts} origin	Our lab
pWS4	Str ^r ; RK2 ^{ts} origin	Our lab
pTW-A	Amp ^r ; Pj123119-sgRNA; RK2 ^{ts} origin	This study
pTW-S	Str ^r ; Pj123119-sgRNA; RK2 ^{ts} origin	This study
pCas1	Kan ^r ; ParaBAD-λ-Red recombinase; Pcas-cas9; pSC101 ^{ts} origin	This study
pTW-Ai	Amp ^r ; Pj123119-sgRNA; RK2 ^{ts} origin	This study
pTW-Sa	Str ^r ; Pj123119-sgRNA; RK2 ^{ts} origin	This study
pCPA1	Str ^r ; PCPA1 promoter fragment	This study
pS9Bs	Str ^r ; P119 promoter- <i>B. subtilis panD</i> fragment	This study

1.2 方法

1.2.1 分子生物学操作

pTW-A、pTW-S 质粒采用 Gibson 组装方法构建。pCas1 通过 PCR 扩增 pCas 质粒后，再用 *Bgl* II 酶切自连获得。pTW-Ai 和 pTW-Sa 利用 PCR 扩增自连获得。全部分子生物学操作按照分子克隆实验指南进行。基因测序由睿博兴科生物技术有限公司进行。所涉及引物见表 2。

(1) 打靶片段的制备。以实验室构建的带有枯草芽孢杆菌脱羧酶基因的质粒 pS9Bs 为模板，利用引物 *iclRBspanD-F* 与 *iclRBspanD-R* 扩增带有大肠杆菌基因 *iclR* 位点上、下游同源臂及 *BspanD* 基因部分，制备得到 *BspanD* 打靶片段。以质粒 pCPA1 为模板，利用引物 *aspACPA1-F* 与 *aspACPA1-R* 扩增带有基因组 *aspA* 位点上、下游同源臂及 CPA1 启动子的部分，制备得到 CPA1 打靶片段。PCR 产物分别通过 PCR 产物纯化试剂盒或凝胶回收试剂盒进行纯化(必要时纯化后以 *Dpn* I 限制性内切酶 37 °C 处理 6 h 以去除模板质粒，并再次通过 PCR 产物纯化试剂盒回收打靶片段)。

(2) Red 基因的诱导表达及电转感受态细胞的制备。质粒 pCas9 利用 CaCl_2 法转化进入宿主菌

BW25113，于含有氨苄青霉素的 LB 培养基中 30 °C、200 r/min 培养过夜，次日按 1:100 接种至 100 mL LB 培养基，30 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.2，加入 L-阿拉伯糖至终浓度 30 mmol/L，诱导 1 h (OD_{600} 不超过 0.6)，使 Red α 、Red β 和 Red γ 3 种蛋白质表达。诱导后的菌体于冰上预冷 30 min，然后 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min，用预冷的无菌水洗涤 1 次，然后用预冷的 10%甘油洗涤 3 次，浓缩成 500 μL 感受态细胞，取 50 μL 感受态用于电转化。

(3) 电转化。将处理过的打靶 DNA 片段与感受态细胞混匀，转入预冷的 0.1 cm 电击杯，然后进行电击，电击条件为电压 1.8 kV，电击时间 5 ms，电击完成后立即加入预热的 LB 培养基，30 °C 复苏 2 h，涂布卡那霉素+氨苄青霉素抗性平板，30 °C 培养过夜。

1.2.2 微生物培养

实验所需菌株为甘油冻存管保存，使用前取甘油菌在相应抗性平板上划线，温度敏感型菌株平板置于 30 °C 恒温培养箱中，BP 相关菌株置于 37 °C 恒温培养箱中。第 2 天挑取单克隆于液体 LB (含相应抗生素)中，在所需温度条件下 200 r/min 振荡培养。

表 2 扩增及鉴定引物序列
Table 2 Primers sequence used for amplification and identification

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	用途 Purpose	模板 Template
Amplification primers			
Tar-Amp-R	GAGCTAGCTGTCAAGGATCCGATTATCAAAAAGGATC TTC	Cosntruction of pTW-A (Amplification of RK2 ^{ts} -origin-Amp ^r fragment)	pWA4 (with Tar-RK2-F primer)
Tar-Str-R	GAGCTAGCTGTCAAGGATCCCTGAAACCTCAGGCATT TGAGA	Construction of pTW-S (Amplification of RK2 ^{ts} -origin-Str ^r fragment)	pWS4 (with Tar-RK2-F primer)
Tar-RK2-F	CCTGTTATCCCTACTCGAGTGGGCCGCCGCGTTGTG GATACCAC	Construction of pTW-A/pTW-S (Amplification of RK2 ^{ts} -origin-Amp ^r fragment and RK2 ^{ts} -origin-Str ^r fragment)	pWA4 and pWS4
Target-F	GGATCCTTGACAGCTAGCTCAGTCC	Cosntruction of pTW-A/pTW-S (Amplification of sgRNA fragment)	pTargetF
Target-R	ACTCGAGTAGGGATAACAGGGTAAT		
Cas-F	CTCAGAACATGTAACGTAATGCATGCCGCTTCGCCTT	Cosntruction of pCas1	pCas
Cas-R	CTCAGAACATGTCCCATGGATTCTTCGTCTGTTTCTAC		
N20iclR-F	GTCCTAGGTATAATACTAGTGCACCCATTCCCGCGAAAC GGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	Cosntruction of pTW-Ai	
N20iclR-R	GCTATTTCTAGCTCTAAAACCGTTTCGCGGGAATGGGTG CACTAGTATTATACCTAGGAC		
N20aspA-F	GTCCTAGGTATAATACTAGTCCGCCCTGGTAGACGTCTA CGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	Cosntruction of pTW-Sa	
N20aspA-R	GCTATTTCTAGCTCTAAAACGTAGACGTCTACCAGGGCG GACTAGTATTATACCTAGGAC		
iclRBspanD-F	TAACTATTGCATTAGCTAACAATAAAAATGAAAATGATT TCCACGATACAGAAAAAAGAGACTGTCCACAGCTAACA CCACGTCGT	Amplification of <i>BspanD</i> fragments with homologous arm of gene <i>iclR</i>	pS9Bs
iclRBspanD-R	GACACCCTTATTCTATTGCCACTCAGGTATGATGGGCAG AATATTGCCTCTGCCCCGCCAGAAAAAGTTACAGGATGG TGCGAGCCG		
aspACPA1-F	GGGTTGCGAATCGCGTTTAGCTTATATTGTGGTCATTAG CAAAATTCAAGATGTTTGCGCAACTATTATCAAAAAGA GTATTGAC	Amplification of CPA1 fragments with homologous arm of native promoter of gene <i>aspA</i>	pCPA1
aspACPA1-R	GTAGGCATCAGCTGGAACCTTCCTGGTACCCAACAGAT CTTCTTCGATACGAATGTTGTTTGACATAAGGCCCAGTC TTTCGACTG		
Identification primers			
iclR-F100	CGACCACCACGCAACATGAG	Identification of insertion of <i>BspanD</i> gene at the site of <i>iclR</i>	
BspanD-R500	CAGGATGGTGCGAGCCGGTT		
CPA1-F	TTATCAAAAAGAGTATTGAC	Identification of replace the native promoter of <i>aspA</i> gene with CPA1	
aspA-R	TTACTGTTTCGCTTTCATCAG		

1.2.3 生物转化及产物测试

生物转化：将测试菌株自甘油冻存管中划线接种到平板，挑取单克隆于液体 LB 培养基中活化过夜，以 1:100 转接至含诱导物 L-阿拉伯糖的 ZYM 自诱导培养基中，30 °C、200 r/min 蛋白诱导表达 14 h，第 2 天 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌

体，加入 M9-Glc 转化液重悬菌体，37 °C、200 r/min 底物转化 4 h 后留取样品测定氨基酸含量。M9-Glc 转化液成分：葡萄糖 10 g/L，M9 缓冲盐溶液(稀释至 1×M9)，NH₄Cl 10 g/L。

β-丙氨酸的衍生及 HPLC 测定：取样品 300 μL，10 000 r/min 离心 10 min，分别取上清液、0.5 mol/L

NaHCO₃、衍生试剂 DNFB (1:100 配于乙腈溶液中) 各 100 μ L, 摇匀, 置于 60 $^{\circ}$ C 水浴中避光反应 1 h, 加入 700 μ L 0.01 mol/L KH₂PO₄ (pH 7.0), 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.45 μ m 滤膜过滤后进行 HPLC 测定。

HPLC 测定方法: 色谱柱 Zorbax SB C18 (5 μ m, 4 mm \times 250 mm); 流动相 A: 0.02 mol/L NaAc (pH 6.2); 流动相 B: 乙腈。线性梯度洗脱程序: 时间 0–20 min, B: 5%–33% 线性梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 紫外检测器, 检测波长 360 nm, 参比波长 600 nm, 进样量 10 μ L。

2 结果与分析

2.1 温度敏感型复制位点的验证

为了验证 pSC101^{ts} 与 RK2^{ts} 复制起始位点对温度敏感性的差异, 将分别含有 2 种复制起始位点的 pSA1 质粒(含有 pSC101^{ts} 复制起始位点)及 pWA4 质粒(含有 RK2^{ts} 复制起始位点)转化进入 BW25113 中, 获得菌株 SA1 及 WA4。经 30 $^{\circ}$ C 含有羧苄青霉素抗性的液体 LB 培养基培养活化后转入无抗生素的液体 LB 培养基, 继续在 40 $^{\circ}$ C 培养 6 h。然后稀释 1 000 倍后涂布于无抗性固体 LB 平板或羧苄青霉素平板上, 40 $^{\circ}$ C 培养过夜。结果发现(图 1), WA4 在羧苄青霉素平板上无菌落, 证明 pWA4 质粒在这一条件下能够很好地被消除, 质粒遗传丢失率 100%。而 SA1 在羧苄青霉素平板上有明显的菌落克隆生成, PCR 验证该克隆仍然含有 pSA1 质粒。以上结果表明含有 RK2^{ts} 复制起始位点质粒具有更强的温度敏感性。

为了验证当含有 2 种温度敏感型复制起始位点的质粒共存时能够选择性地丢失 RK2^{ts} 复制起始位点质粒, 将含有卡那霉素抗性的 pSC101^{ts} 复制起始位点质粒 pSK1 与 pWA4 共转化入 BW25113 菌株中, 在含有卡那霉素及羧苄青霉素抗性的液体 LB 培养基活化后, 转入含有卡那霉素抗性的液体 LB 培养基中 40 $^{\circ}$ C 培养 6 h。然后稀释 1 000 倍后涂布于卡那霉素平板或卡那霉素与羧苄青霉素双抗平

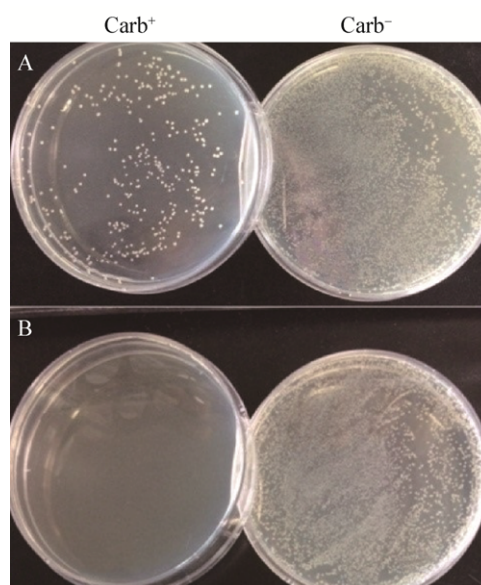


图 1 温度敏感型质粒的丢失情况

Figure 1 Plasmids curing of different temperature sensitive plasmids

注: A: SA1 菌株中质粒 pSA1 高温情况下丢失不彻底; B: WA4 菌株中质粒 pWA4 高温情况下可丢失彻底。

Note: A: Plasmids pSA1 in strain SA1 still exist after cultivating under high-temperature; B: High temperature can eliminate plasmids pWA4 in strain WA4 absolutely.

板上, 40 $^{\circ}$ C 培养过夜。结果表明, 菌体在双抗平板上不能生长, 而仅在卡那霉素平板上生长, 证明菌体可以选择性消除 pWA4 质粒(图 2)。挑取卡那霉素平板上的克隆转接后, 在无抗液体 LB 培养基 40 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 涂布于无抗性培养基平板上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑选克隆转接卡那霉素培养基中, 发现全部克隆无法生长, 该结果证明 pSK1

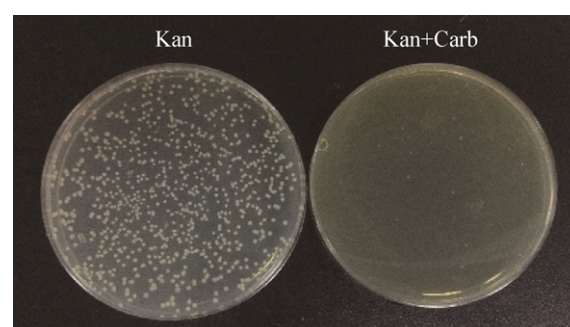


图 2 通过控制温度和抗性实现 RK2^{ts} 型质粒选择性消除

Figure 2 RK2^{ts} plasmids can be eliminated selectively by control of temperature and resistance

仍然具有正常的温度敏感特性, 但与 pWA4 共存时能够实现选择性丢失。

2.2 pTW 质粒及 pCas1 质粒的构建

基于 RK2^{ts} 复制起始位点对 pTarget 质粒进行了改造。将 pTarget 质粒中的 pMB1 复制起始位点替换为 RK2^{ts} 复制起始位点。同时, 为了提高多轮次整合的转化与筛选效率, 分别构建了含有氨苄青霉素抗性基因的 pTW-A 及含有链霉素抗性基因的 pTW-S。同时对 pCas 质粒进行改造, 去除 P_{trc}-pMB1 单元, 获得 pCas1 质粒(图 3)。

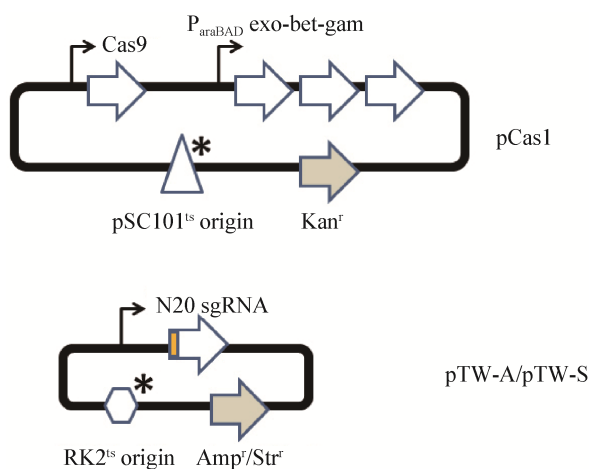


图 3 pTW 及 pCas1 质粒的构建

Figure 3 Construction of pTW plasmids and pCas1 plasmids

2.3 利用 pTW-A 质粒整合 BspanD 基因

将特异性识别 *iclR* 位点的 N20 序列构建到 pTW-A 中获得质粒 pTW-Ai。扩增两端含有 *iclR* 位点同源臂的枯草芽孢杆菌 L-天冬氨酸 α 脱羧酶 *BspanD* 表达框的打靶片段(*BspanD* 片段)。BP01 为本实验室通过进化获得初级代谢途径改造的 K-12 菌株, 以 BP01 菌株为基础, 将 pTW-Ai 及 *BspanD* 片段电转化进入经阿拉伯糖诱导的 BP01(pCas)菌中, 在卡那霉素+羧苄青霉素平板上 30 °C 培养过夜, 挑取 10 个单克隆进行鉴定。使用 *iclR*-F100 与 *BspanD*-R500 引物验证, 阳性菌株大小应为 600 bp。结果表明所有克隆均为阳性, *BspanD* 基因片段的整合效率为 100% (图 4)。取阳性克隆命名 BP02 用于下一步敲除。

2.4 利用 pTW-S 质粒替换 AspA 启动子

将特异性识别 *aspA* 位点的 N20 序列构建到 pTW-S 中获得质粒 pTW-Sa。扩增带有同源臂的 CPA1 强启动子打靶片段(CPA1 片段)。将上一轮获得的含有 pCas 和 pTW-Ai 质粒的 BP02 在仅含有卡那霉素的液体 LB 培养基中 40 °C 培养 6 h, 以消除 pTW-Ai 质粒。然后转接 30 °C 培养基中加入阿拉伯糖诱导物后继续培养 OD_{600} 为 0.5 后制备感受态

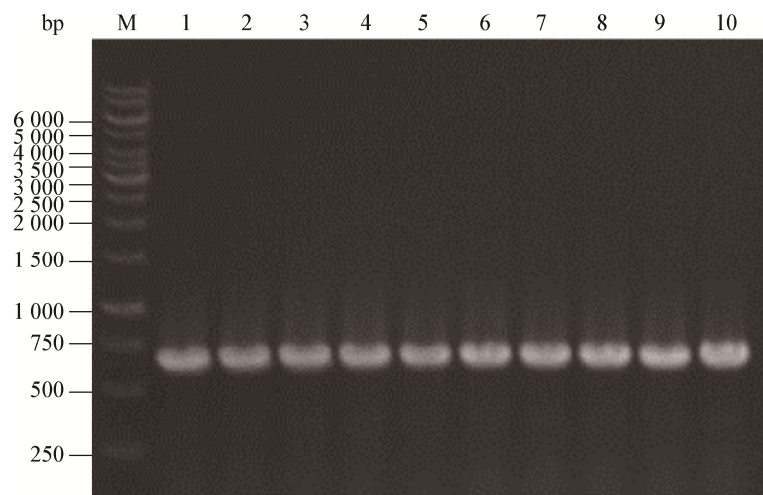


图 4 菌落 PCR 验证 *iclR* 位点整合 *BspanD* 基因核酸电泳图

Figure 4 Agarose gel electrophoresis of colony PCR for inserting gene *BspanD* at the site of *iclR*

注: M: DNA marker; 1-10: 随机挑选的重组子。

Note: M: DNA marker; 1-10: Randomly selected recombinants.

细胞。电转化 pTW-Sa 及 CPA1 片段, 在卡纳霉素+链霉素平板上 30 °C 培养过夜。由于 pTW-Sa 和 pTW-Ai 具有相同的复制起始位点, 根据质粒不相容性, 理论上转入了 pTW-Sa 的菌株在链霉素筛选压力下, pTW-Ai 不会共存, 从而进一步确保了 pTW-Ai 的缺失。从平板上随机挑取 10 个单克隆进行鉴定, 使用引物 CPA1-F 与 aspA-R 进行 PCR 验证, 片段大小为 2 000 bp, 与预期相符, CPA1 启动

子片段的整合效率为 100% (图 5)。同时 PCR 验证 *BspanD* 位点没有发生回复突变(图 6)。取阳性克隆命名 BP03, 42 °C 培养过夜后涂布无抗性平板, 37 °C 培养过夜并挑取单菌落, 抗性验证全部遗传操作作用质粒已经丢失。

2.5 BP02 BP03 菌株功能的验证

上述改造从以下几个方面提高大肠杆菌 β -丙氨酸的合成水平: (1) 大肠杆菌自身具有 L-天冬氨

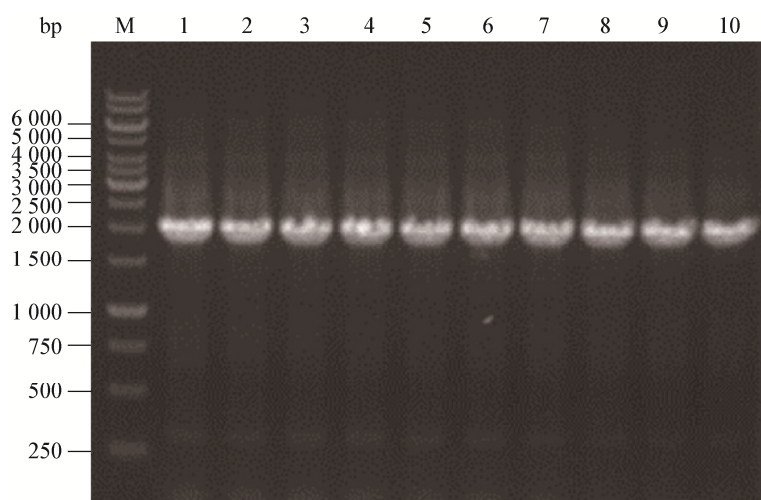


图 5 菌落 PCR 验证 *AspA* 启动子替换为 CPA1 核酸电泳图

Figure 5 Agarose gel electrophoresis of colony PCR for replacing the native promoter of gene *AspA* with CPA1

注: M: DNA marker; 1–10: 随机挑选的重组子.

Note: M: DNA marker; 1–10: Randomly selected recombinants.

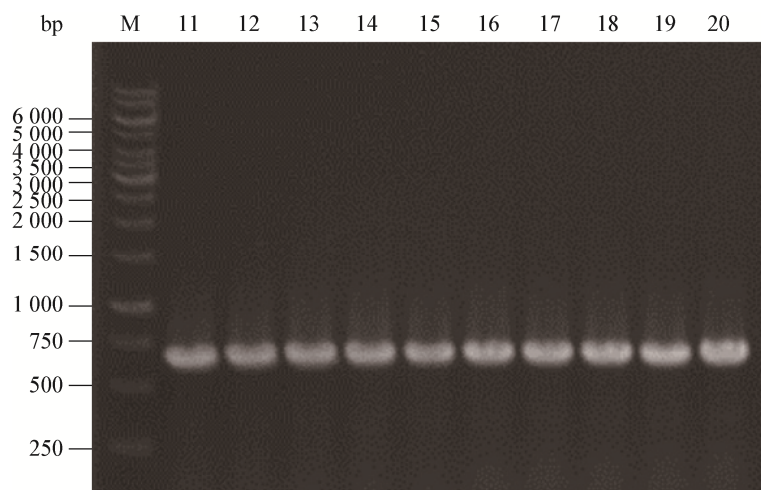


图 6 菌落 PCR 验证 10 个重组子 *BspanD* 位点未回复突变

Figure 6 Agarose gel electrophoresis of colony PCR to identify *BspanD* site didn't occur reverse mutation in 10 recombinants

注: M: DNA marker; 11–20: 挑选的 10 个重组子.

Note: M: DNA marker; 11–20: 10 Recombinants.

酸脱羧酶 PanDEc, 但酶活较低, 且 PanDEc 需要在蛋白 PanZ 的辅助下才能在常温下发生自剪切, 得到有活性的 π -蛋白。而来源于枯草芽孢杆菌的脱羧酶 BspanD 不需要任何辅助因子即可完成自剪切, 比酶活约为 PanDEc 的 8.6 倍, 反应速度快;

(2) 大肠杆菌的 *iclR* 为全局调控因子, 它具有对乙醛酸循环的抑制作用, 敲除后可解除乙醛酸循环抑制, 由此增加 TCA 循环中四碳化合物的回补, 通过第一次基因组编辑实现了(1)和(2)的改造;

(3) 在第 2 次基因组编辑过程中, 进一步对前体 L-Asp 的合成路径进行强化。将基因 *aspA* 的自身启动子替换为组成型强启动子 CPA1, 可以强化 AspA 通过延胡索酸合成 L-Asp 的转氨反应, 从而增加 β -丙氨酸的前体供应。为了验证上述改造靶点的效果, 对所获得菌株 BP02 及 BP03 的 β -丙氨酸合成水平进行测试。结果表明, 菌株 BP02 的 β -丙氨酸成功得到积累, 产量达到 1.52 g/L; 而 BP03 的 β -丙氨酸的产量进一步由 1.52 g/L 提高至 1.91 g/L, 产量提高近 25.66% (图 7)。

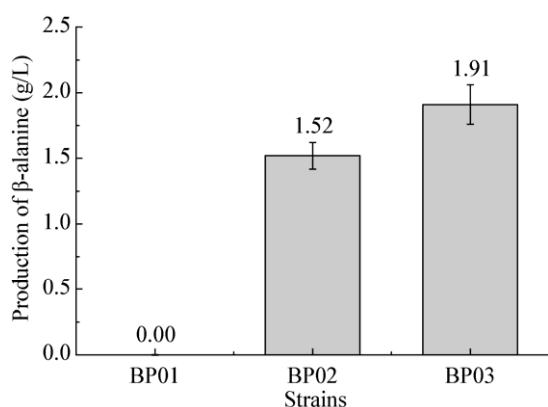


图 7 对 BP01 菌株进行 2 次连续基因组编辑改造提高 β -丙氨酸产量

Figure 7 Two continuous genomic editing of BP01 strain to improve β -alanine production

注: BP01: 实验室进化所得初级代谢改造菌株, 无 β -丙氨酸积累; BP02: 菌株 BP01 染色体整合 BspanD 菌株; BP03: 使用质粒 pTW-S 替换 AspA 启动子菌株。

Note: BP01: Strain enhanced glycolytic pathway in our laboratory, has no β -alanine accumulation; BP02: Strain inserted gene *BspanD* on BP01; BP03: Strain replaced promoter of *AspA* with CPA1 on BP02.

2.6 利用 pTW 质粒的 CRISPR 连续基因组编辑

通过以上研究, 确定了以交替使用 2 种抗性标记的 RK2^{ts} 复制起始位点为基础, 简化了质粒消除步骤的新型 CRISPR 连续基因组编辑策略。在这一策略中, 原料以 pMBI 为复制起始位点的 pTarget 被 pTW 质粒取代。pTW 质粒具有更强的温度敏感性, 可以在保持 pCas1 的情况下快速消除, 实现质粒消除与下一步整合同步(图 8)。每轮基因编辑的时间缩短至 2–3 d, 并省去单质粒整合策略中多片段连接的步骤。

3 讨论与结论

在 CRISPR 介导的大肠杆菌基因组编辑过程中, 需要 Cas9 蛋白、 λ -Red 重组酶、sgRNA 的协同表达, 并在含有同源臂的打靶片段存在的条件下才能实现。而为了实现下一轮次的基因组编辑, pTarget 辅助质粒的消除步骤成为限制时间效率的关键环节。我们通过测试多种温度敏感型质粒, 发现不同复制起始位点对温度敏感性能具有差异, RK2^{ts} 型质粒温敏效果优于 pSC101^{ts} 质粒。利用这种差异我们对已有的 CRISPR 体系进行改造, 将 pTarget 质粒改造为温敏性能更好的 RK2^{ts} 型温度敏感型质粒, 同时构建 2 种抗性标记交替使用, 利用与 RK2^{ts} 型质粒之间的温度敏感性差异, 通过对温度及筛选标记的控制实现质粒的选择性消除。

在这一改造中, 我们实现了质粒消除与下一步基因编辑同步进行, 4 d 内可完成 2 轮基因组编辑工作, 基因编辑阳性率高达 100%。虽然该方法的质粒数量仍为 2 个, 但是却避免了构建多模块大质粒的繁琐步骤。此外, pTW-A/S 质粒在发挥功能的同时, 不需要额外进行质粒消除, 而以 Jiang 等^[14]和 Zhao 等^[15]为代表的 CRISPR 方法中都需要确保 pTarget 完全消除后方可进行下一轮整合工作, 极大地影响了连续整合效率。对于单质粒策略, 虽然在质粒数量上有所减少, 但是由于所有功能模块均集中在同一大质粒上, 造成编辑效率的降低, 因此在实际操作中为了取得更高的编辑效率, 需要延长同源臂长度。因此, 与其他改进策略相比, 该方法在操作简易程度和实验周期时长等多方面均具有较大优势(表 3)。

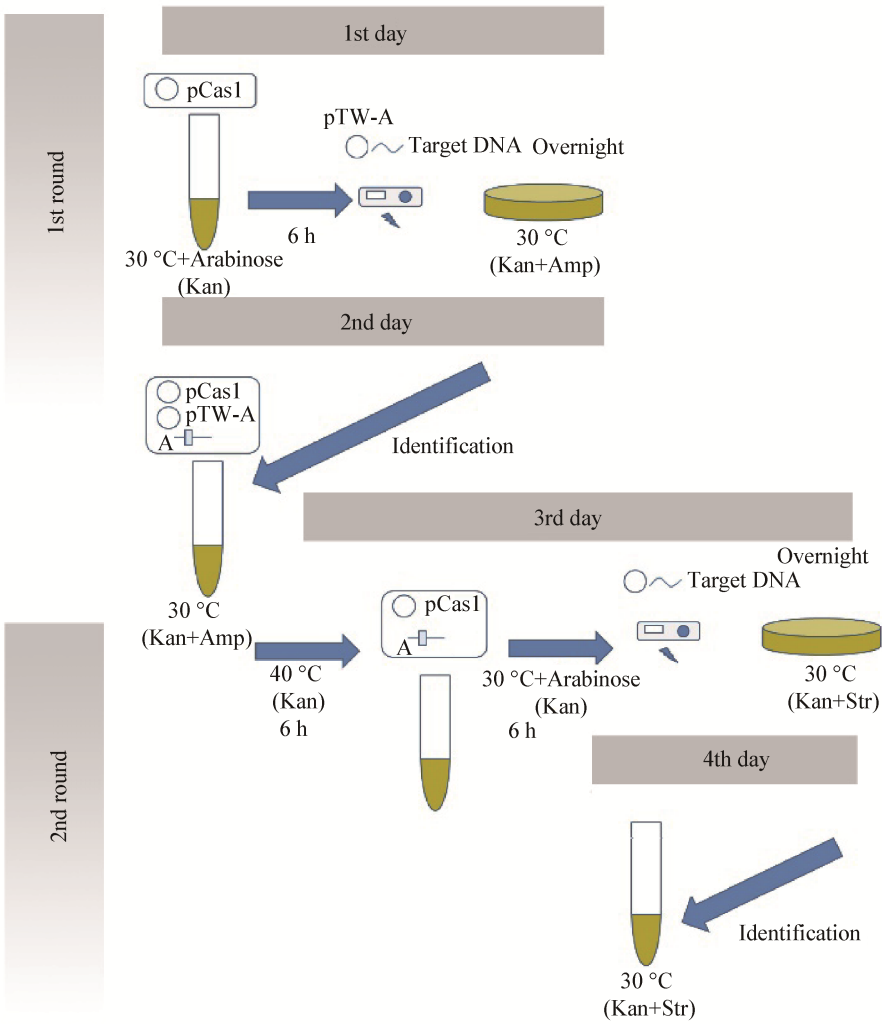


图 8 利用 pTW 质粒 4 d 实现 CRISPR 两轮连续基因组编辑示意图
Figure 8 Methods for CRISPR continuous two-round genome editing using plasmid pTW within 4 days

表 3 不同 CRISPR/Cas9 系统方法的比较
Table 3 Comparison of different CRISPR/Cas9 system methods

方法 Methods	策略描述 Strategy description	质粒数量 Plasmids	周期 Experimental time cost (d)	编辑效率 Editing efficiency (%)	是否需要多片段组装 Multi-fragments assembly	是否需消除质粒 Plasmids elimination
This study	使用温敏性能更好的 RK2 [®] 型质粒 pTW-A/S, 实现质粒消除与整合同步进行	2	2-3	100	不需要	不需要(整合过程可消除)
Jiang et al ^[14]	pCas 质粒与 pTarget 质粒介导	2	4	Around 100	不需要	需要
Zhao et al ^[15]	所有功能模块构建在同一质粒	1	3	13.8±7.9 (41 bp 同源臂) 100 (同源臂大于 300 bp)	需要	需要

我们利用这一策略,对实验室菌株 BP01 进行快速连续整合获得了 BP03,使得最终产量得到大幅提升。

综上所述,我们建立了一种新的高效、灵活、快速的 CRISPR/Cas9 介导的大肠杆菌基因组连续编辑策略,缩短了实验周期,为大肠杆菌基因组编辑的研究和代谢工程菌株改造提供了有力的工具^[19-20]。

REFERENCES

- [1] Lee JW, Na D, Park JM, et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals[J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(6): 536-546
- [2] Li YF, Lin ZQ, Huang C, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 31: 13-21
- [3] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645
- [4] Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection[J]. *Molecular Systems Biology*, 2006, 2(1): 2006.0008
- [5] Tuntufye HN, Goddeeris BM. Use of lambda Red-mediated recombineering and Cre/lox for generation of markerless chromosomal deletions in avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 325(2): 140-147
- [6] Yu DG, Ellis HM, Lee EC, et al. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(11): 5978-5983
- [7] Bai GX, Sun ZW, Huang Y, et al. Deletion of *clpP* in chromosome of *E. coli* by Red recombination[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 21(1): 35-38 (in Chinese)
白光兴, 孙志伟, 黄莺, 等. 利用 Red 重组系统对大肠杆菌 ClpP 基因的敲除[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2005, 21(1): 35-38
- [8] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170
- [9] Jiang WY, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239
- [10] Jakočiūnas T, Bonde I, Herrgård M, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 28: 213-222
- [11] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87
- [12] Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, et al. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(20): e187
- [13] Chang NN, Sun CH, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos[J]. *Cell Research*, 2013, 23(4): 465-472
- [14] Jiang Y, Chen B, Duan CL, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506-2514
- [15] Zhao DD, Yuan SL, Xiong B, et al. Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 205
- [16] Hashimoto-Gotoh T, Sekiguchi M. Mutations of temperature sensitivity in R plasmid pSC101[J]. *Journal of Bacteriology*, 1977, 131(2): 405-412
- [17] Shingler V, Thomas CM. Analysis of the *trfA* region of broad host-range plasmid RK2 by transposon mutagenesis and identification of polypeptide products[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1984, 175(3): 229-249
- [18] Valla S, Haugan K, Durland R, et al. Isolation and properties of temperature-sensitive mutants of the *trfA* gene of the broad host range plasmid RK2[J]. *Plasmid*, 1991, 25(2): 131-136
- [19] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering[J]. *Science*, 1991, 252(5013): 1668-1675
- [20] Li Y, Cao ZA. Microbial metabolic engineering: gateway to develop blueprints for cell factories[J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)*, 2004, 55(10): 1573-1580 (in Chinese)
李寅, 曹竹安. 微生物代谢工程: 绘制细胞工厂的蓝图[J]. *化工学报*, 2004, 55(10): 1573-1580