



研究报告

可控高突变率枯草芽孢杆菌工程菌株的构建及应用

王光路¹ 周忆菲¹ 张帆¹ 王梦园¹ 马科¹ 叶建斌¹ 朱年青² 钟桂芳¹ 杨雪鹏^{*1}¹ 郑州轻工业大学食品与生物工程学院 食品生产与安全河南省协同创新中心 河南 郑州 450001² 泰州学院医药与化学化工学院 江苏省手性医药化学品生物制造重点实验室 江苏 泰州 225300

摘要:【背景】适应性实验室进化是运用于菌株改良的定向进化方法之一。适应性进化已成功应用于扩大底物利用范围和提高底物(产物)耐受性。由于微生物存在错配修复机制,使得菌株自然突变率水平极低,实验室适应性进化周期长,容易导致传代过程染菌而失败。【目的】获得可控高突变率的枯草芽孢杆菌工程菌株。【方法】采用无痕等位基因置换系统,将枯草芽孢杆菌负责错配修复机制的 *MutSL* 操纵子进行启动子置换为严谨表达、可诱导的木糖启动子。【结果】通过向培养基中添加不同浓度诱导物,可控制工程菌株所需突变率水平。将高突变工程菌株应用于苯乙醇耐受性实验,结果表明高突变工程菌株相较于出发菌株,对毒性产物苯乙醇具有更好的适应性,更容易获得突变菌株。将该高突变工程菌株应用于对生长有较大抑制的底物粗甘油的适应性进化实验,筛选得到的进化菌株相比出发菌株具有更短的延滞期、更高的生物量以及更大的比生长速率。【结论】该高突变率工程菌株具有较好的可进化性和适应性,可应用于适应性进化实验,具有广泛的应用前景。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 错配修复系统, 可控高突变率, 适应性进化, 无痕等位基因置换系统

Developing controllable hypermutable *Bacillus subtilis* cells through manipulating their methyl-directed mismatch repair system

WANG Guanglu¹ ZHOU Yifei¹ ZHANG Fan¹ WANG Mengyuan¹ MA Ke¹
YE Jianbin¹ ZHU Nianqing² ZHONG Guifang¹ YANG Xuepeng^{*1}¹ Collaborative Innovation Center of Production and Safety of Henan Province, School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou, Henan 450001, China² Jiangsu Key Laboratory of Chiral Pharmaceuticals Biosynthesis, College of Pharmacy and Chemistry & Chemical Engineering, Taizhou University, Taizhou, Jiangsu 225300, China

Abstract: [Background] Adaptive laboratory evolution is one of directed evolution methods to improve strain fitness. It improves the tolerance to toxic products or rapidly utilizes specific substrates. Due to the rather low mutation rate of native cells caused by the mismatch repair mechanism in the genome, adaptive

Foundation items: Joint Funds of National Natural Science Foundation of China (U1904101); Key Research Projects of Science and Technology Department of Henan Province (202102310021, 182102310607)

***Corresponding author:** E-mail: yangxuepeng@zzuli.edu.cn

Received: 11-08-2020; **Accepted:** 13-09-2020; **Published online:** 18-11-2020

基金项目: 国家自然科学基金联合基金(U1904101); 河南省科技攻关重点研发与推广专项(202102310021, 182102310607)

***通信作者:** E-mail: yangxuepeng@zzuli.edu.cn

收稿日期: 2020-08-11; **接受日期:** 2020-09-13; **网络首发日期:** 2020-11-18

laboratory evolution usually takes a long period to screen desired evolved strains and more likely to fail because of microbial contamination during a long process. **[Objective]** To develop controllable hypermutable cells of *Bacillus subtilis*. **[Methods]** A marker-free mutation delivery system is used to replace the mismatch repair system operon *MutSL* with a rigorous xylose-inducible promoter. **[Results]** The mutation rates of controllable hypermutable *B. subtilis* cells could be regulated by the concentration of inducer (xylose). The phenethyl alcohol tolerance experiment indicated that the hypermutable *B. subtilis* cells had better tolerance than the original strain, suggesting that it is more easily to obtain the mutant with desired trait. The adaptive evolution experiment of growth inhibition by substrate crude glycerol showed that the evolved strain showed the shorter lag time, higher biomass, and greater specific growth rate than the starting strain. **[Conclusion]** The hypermutable *B. subtilis* cells had better evolvability and adaptability, which could have a wide range of applications.

Keywords: *Bacillus subtilis*, mismatch repair system, controllable high mutation rate, adaptive evolution, marker-free mutation delivery system

适应性实验室进化 (Adaptive Laboratory Evolution, ALE) 通过模拟自然进化中的变异和选择过程, 实现对微生物菌株优良性状的选育^[1-3]。近年来, 适应性进化常应用于扩大底物利用范围、提高代谢物产量及提高底物(产物)耐受性^[4-6]。对于适应性实验室进化来说, 突变是其进化的主要动力, 较高的突变率能够提高生物的进化速率。但是在进化过程中, 微生物为保持自身基因组的完整性, 胞内存在严格的错配修复系统, 用来消除复制和重组事件中产生的错配区域, 进而降低了细胞的自然突变率^[7-9]。菌株的自然突变率通常很低(一般 $<10^{-6}$), 这导致许多实验室适应性进化的进化周期较长, 从几个月甚至数年不等, 进化时间越长, 传代培养过程越容易染菌, 从而导致实验失败^[5,10-11]。

错配修复系统 (Mismatch Repair System, MMR)^[12]是细胞复制后的一种修复系统, 能够维持 DNA 复制的高保真度, 并且能抑制基因变异, 通常由基因组上 *MutSHL* 错配修复系统来完成(如 *Bacillus subtilis*、*Escherichia coli* 和 *Salmonella typhimurium*)。Ginetti 等^[13]研究发现, 敲除枯草芽孢杆菌基因组上 *mutS* 和 *mutL* 基因, 可以大幅度地提升菌株的自然突变率; 回复突变结果显示, 和对照菌株相比, *mutSL* 敲除后 R^R 菌株突变率提升了 40–60 倍, Phe^+ 菌株突变率提升了约 16.5 倍, 而 Ile^+ 菌株突变率提升了约 17.4 倍。Luan 等^[14]构

建了一株可控高突变率的丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*), 通过失活基因组上参与细胞错误修复系统的操纵子 *MutSL* 来失活菌株错配修复能力, 进而使得菌株的自然突变率提升了 250 倍左右; 与对照菌株相比, 工程菌株 SMBMutC2 在丁醇耐受性条件下显示出了较高的菌株存活能力, 并且进化速率以及进化适应性均得到了大幅度的提升。结果表明 *MutS* 和 *MutL* 是 DNA 错配修复系统中起关键作用的修复蛋白, 该操纵子的正常表达是维持菌体极低自然突变率的原因, 而通过控制该系统表达水平, 可以大幅度提升自发突变率, 并能够大幅缩短进化周期^[15]。

在可利用底物中, 甘油分子具有较高碳含量 (52.8%) 和高还原性(还原力为葡萄糖 2 倍)的特点, 可作为廉价碳源应用于微生物发酵工业^[16-17]。粗甘油可经过精制提纯为纯甘油进行利用, 但纯化过程烦琐、成本较高, 因此以粗甘油为直接底物的生物转化具有更好的成本优势和应用前景^[18-20]。然而粗甘油中存在诸多杂质, 比如醇类(甲醇等)、脂肪酸类、酯类(未反应的甘油三酯、双甘酯、单甘酯)和脂肪酸盐等对微生物生长具有较强抑制作用, 限制其广泛的生物转化^[21]。高浓度粗甘油会导致菌体生长缓慢、菌体密度不高、终产物浓度偏低等问题, 微生物最大细胞干重、生物量得率以及细胞得率均会下降^[22-24]。因此, 提升菌株对粗甘油的耐受性, 获得粗甘油高效利用的工程菌

株，将大大拓展粗甘油应用范围，显著降低微生物发酵生产成本，已成为研究热点。

本文通过控制枯草芽孢杆菌的错配修复系统表达水平，构建受诱导物浓度控制的高突变率枯草芽孢杆菌工程菌株，以期为适应性实验室进化提供出发菌株，快速获得粗甘油高效利用工程菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

B. subtilis 168 Δupp 、*E. coli* DH5 α 与质粒 pSS、pAX01 均为本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器

酵母抽提物，北京兰伯瑞生物科技有限责任公司；2 \times PrimeSTAR Max DNA Polymerase，宝日医生物技术(北京)有限公司；硫酸卡那霉素、氯霉素和 *Taq* DNA 聚合酶，BBI 生命科学有限公司；细菌 DNA 提取试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒和引物，生工生物工程(上海)股份有限公司；粗甘油，南京鑫旭工贸有限公司；用于配制培养基及理性参数测定的试剂均为国产分析级。

电热恒温鼓风干燥机，上海森信实验仪器有限公司；PCR 仪，Veriti 公司；紫外分光光度计，上海美谱达仪器有限公司；凝胶成像系统，上海天能科技有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基配方见参考文献[20]。

5FU 负筛选培养基配方见参考文献[25]。

M9G 粗甘油基本盐培养基配方见参考文献[26]。每 100 mL 培养基额外加入 1 mL 0.5%色氨酸(过滤除菌)以满足 *B. subtilis* 168 Δupp (色氨酸营养缺陷型)的生长需求。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌感受态细胞的 CaCl_2 转化和质粒提取

大肠杆菌感受态细胞的 CaCl_2 转化和质粒提取方法见参考文献[27]。含质粒 pAX01、pSS 及衍生质粒的工程菌株在添加有 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄抗生素的培养基中 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 12 h。

1.2.2 引物设计

根据同源重组质粒 pSS-*mutSL* 构建流程(图 1)设计引物。引物设计采用软件 Oligo 7.37 完成，引物汇总见表 1。

1.2.3 枯草芽孢杆菌的无痕等位基因置换方法

利用的无痕等位基因置换方法为实验室前期开发，该方法采用了正负筛选系统为核心原理，其中抗生素为正筛选标记(氯霉素)，*upp* 作为负筛选标记。负筛选作用原理^[28]为：*upp* 编码 UPRTase，催化尿嘧啶生成尿苷单磷酸(UMP)，从而利用胞外尿嘧啶，嘧啶类似物 5-氟尿嘧啶(5FU)也能够被 UPRTase 催化生成 5-F-dUMP，而 5-F-dUMP 是枯草芽孢杆菌胸苷酸合成酶的强烈抑

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	酶切位点 Restriction sites	模板 Template
pAX01- <i>mutS</i> -F	TTTAggatccATGGCCGTTATACGCCTAT	<i>Bam</i> H I	<i>B. subtilis</i> 168 Δupp
pAX01- <i>mutS</i> -B	AAAGggatccgaattcTCCTCAAGCTCATACACCTG	<i>Bam</i> H I	
pSS- <i>mutS</i> -F	ATAAagatctGAAGCATTCAAATAACAGC	<i>Bgl</i> II	<i>B. subtilis</i> 168 Δupp
pSS- <i>mutS</i> -B	TTGCctcgagGGAGTTGAGCCTCTTGAAACCTCACTATGTATCAACGTTT	<i>Xho</i> I	
pSS- <i>xyIR</i> -F	ATCCggtaccAAACGTTGATACATAGTGAGGTTTCAAGAGGCTCAACTCC	<i>Kpn</i> I	pAX01- <i>mutS</i>
pSS- <i>xyIR</i> -B	TTCCggtaccTCCTCAAGCTCATACACCT	<i>Kpn</i> I	

制剂, 会导致细胞死亡; *B. subtilis* Δupp 缺失突变株可以在低浓度(10–20 $\mu\text{mol/L}$)的 5FU 负筛选培养基上生长, 可作为无痕等位基因置换出发菌株。该方法实验流程^[28]: 将验证正确的重组质粒利用 *Spizizen* 化学转化法双交换整合至菌株 *B. subtilis* 168 Δupp 基因组, 通过正筛选标记氯霉素抗性来筛选发生双交换基因重组的阳性转化子。将发生双交换基因重组的阳性转化子接种于 LB 液体培养基(不添加抗生素), 37 °C、200 r/min 培养 6 h 后选取合适浓度菌液。将培养菌液 10 000 r/min 离心 1 min 后去上清, 无菌水洗涤, 重复 1 次后取适量菌液涂布 5FU 负筛选平板, 37 °C 培养 24–36 h。在 5FU 平板筛选的细胞会发生基于直接重复(Direct Repeat, DR)序列之间的分子内同源重组, 丢失正筛选标记氯霉素抗性和负筛选标记 *upp*。挑取 5FU 平板单菌落, 分别在含氯霉素 5 $\mu\text{g/mL}$ 和卡那霉素 5 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上进行对照点板, 37 °C 培养 24–36 h。

1.2.4 菌株突变率的测定

将单克隆菌株接种于 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 培养过夜。将过夜培养液按照 1% 接种量转接至新鲜培养基培养 10 h 后, 取同等量合适浓度的培养液分别涂布于添加有 25 $\mu\text{g/mL}$ 利福霉素的 LB 平板以及不添加利福霉素的 LB 平板, 37 °C 培养 12–16 h 后统计长出的菌落数量, 计算突变率^[13]。突变率(%)=利福霉素抗性菌落数量(Rif^r25^R)/涂布的细胞总数量 $\times 100$ 。

1.2.5 高突变工程菌株的苯乙醇耐受实验验证

将高突变率工程菌株和野生菌株从平板上挑取单菌落, 转接 LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 培养 10 h 至对数生长中后期, 测定菌体密度 OD_{600} , 将大约 10^6 个细胞涂布于添加特定浓度苯乙醇的 LB 平板, 浓度设置为 1、2、3、4 和 5 g/L, 放置培养箱 37 °C 静置培养 24 h, 统计不同苯乙醇浓度下的菌落数量。

1.2.6 粗甘油高耐受菌株的适应性进化筛选

将高突变率工程菌株活化后, 转接入 LB 液体

培养基 37 °C、200 r/min 培养 10 h, 以 1% 接种量接入 50 mL M9G 粗甘油基本盐培养基, 37 °C、200 r/min 培养, 即为甘油耐受驯化第 1 代, 将其记为 Y-1; 随后将 Y-1 培养液以相同接种量转接新鲜 M9G 粗甘油基本盐培养基, 记为 Y-2, 并依次类推。每 7 d 为一个批次, 每批次前 4 天培养时间为 24 h, 后 3 天培养时间缩短为 12 h, 以富集生长较快突变株; 批次间逐步提高培养基中粗甘油浓度, 分别为 30、50、70、90 和 100 g/L, 最终获得粗甘油高耐受进化菌株, 分别命名为 Y30、Y50、Y70、Y90 和 Y100。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌 *MutSL* 操纵子的启动子置换设计

采用枯草芽孢杆菌正负筛选系统对枯草芽孢杆菌 *MutS/L* 操纵子的启动子进行置换。木糖诱导启动子具有较好的严谨性, 诱导物对菌株生长没有毒性且代谢缓慢^[29], 可较长时间保持诱导强度, 因此选择来源于质粒 pAX01 的木糖启动子及其阻遏蛋白进行置换^[30]。该方法需要构建同源重组质粒, 参照 Anagnostopoulos 等的化学转化方法^[31], 将重组质粒整合至枯草芽孢杆菌基因组, 并通过质粒 pSS 所带的正负筛选标记进行两步筛选, 最终获得启动子置换的工程菌株。其质粒构建策略见图 1。

2.2 无痕等位基因置换系统载体的构建

2.2.1 质粒 pAX01-*mutS* 的构建

以 *B. subtilis* 168 基因组为模板, 以引物对 pAX01-*mutS*-F/pAX01-*mutS*-B 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 引物 pAX01-*mutS*-F、pAX01-*mutS*-B 终摩尔浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 模板 *B. subtilis* 168 基因组终摩尔浓度为 20 ng/ μL , 2 \times PrimeSTAR Max DNA Polymerase 25 μL , ddH₂O 补足 50 μL 。PCR 反应条件: 98 °C 10 s; 55 °C 15 s, 72 °C 1 min, 共 35 个循环。后续 PCR 反应均参照此体系和条件。获得包含有 *mutS* 的目的基因片段, 将目的基

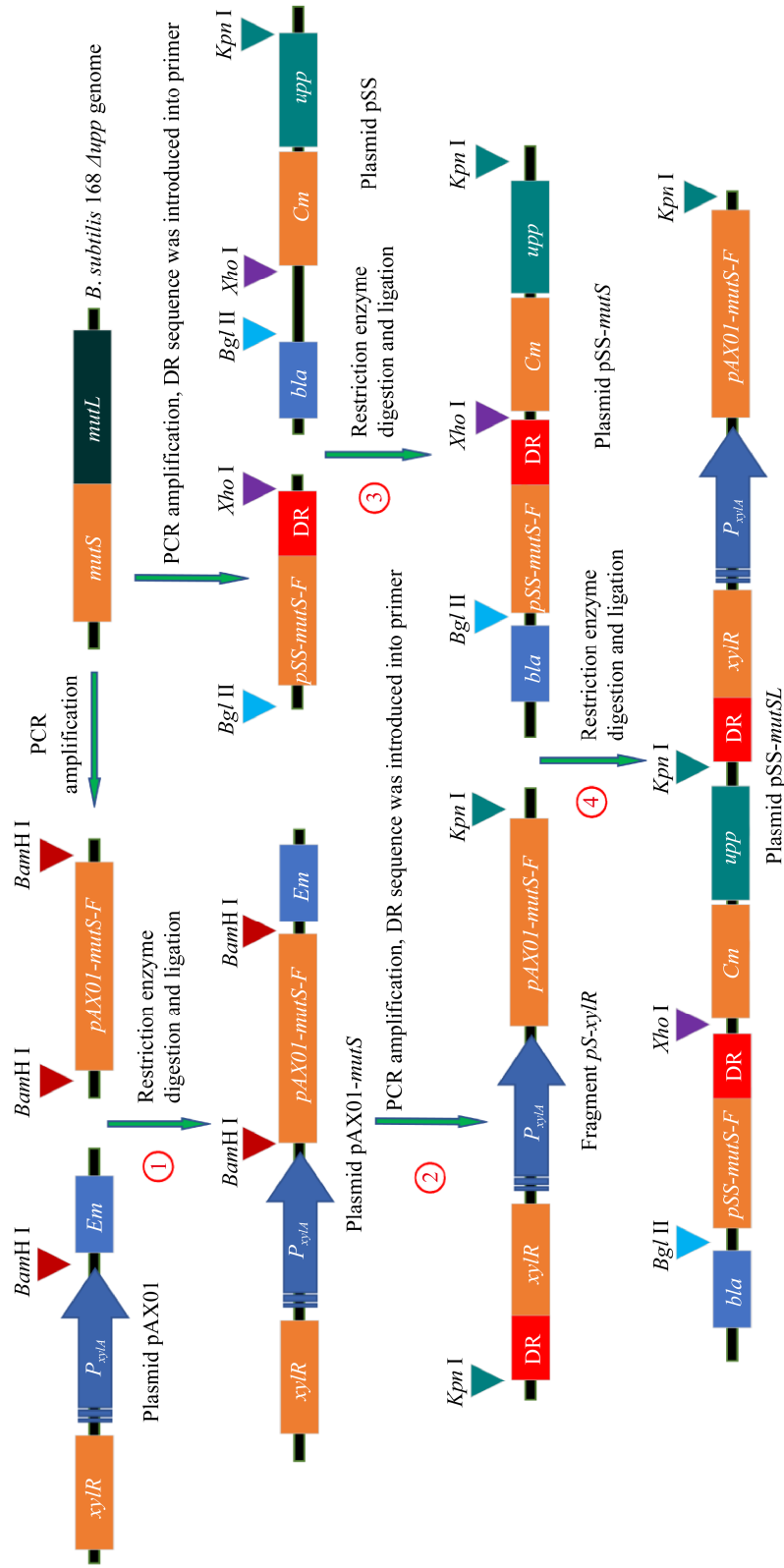


图 1 同源重组质粒 pSS-mutSL 构建流程图

Figure 1 Scheme for construction of plasmid pSS-mutSL procedure

注：步骤1：以*B. subtilis* 168基因组为模板，使用pAX01-mutS-F/pAX01-mutS-B引物对进行PCR扩增，获得含有操纵子*MutSL*下游同源区*mutS-B*的目的片段，将该基因片段与pAX01质粒经*BamH I*单酶切、连接、转化、验证等操作后，得到质粒pAX01-mutS；步骤2：以pAX01-mutS质粒为模板，在pSS-xyI-R-F/pSS-xyI-R-B引物对中引入DR序列，通过PCR扩增获得片段pS-xyI-R；步骤3：以*B. subtilis* 168基因组为模板，使用pSS-mutS-F/pSS-mutS-B引物对进行PCR扩增，获得含有操纵子*MutSL*上游同源区*mutS-F*的目的片段，将目的片段与质粒pSS-mutS；步骤4：将目的片段pSS-xyI-R与质粒pSS-mutS经酶切、酶连、转化、验证后，得到质粒pSS-mutSL

Note: Step 1: The downstream homologous region *mutS-B* of the operon *MutSL* was amplified from *B. subtilis* 168 genome using primer pair pAX01-mutS-F/pAX01-mutS-B and cloned in *BamH I* site of pAX01, forming pAX01-mutS; Step 2: The PCR fragment pS-xyI-R was amplified from pAX01-mutS using primer pair pSS-xyI-R-F/pSS-xyI-R-B; Step 3: The upstream homologous region *mutS-F* of the operon *MutSL* was amplified from *B. subtilis* 168 genome using primer pair pSS-mutS-F/pSS-mutS-B and cloned in *Bgl II* and *Xho I* sites of pSS, forming vector pSS-mutS; Step 4: The PCR fragment pS-xyI-R was cloned in *Kpn I* site of pSS-mutS, forming vector pSS-mutSL

因片段与 pAX01 质粒(图 2A)经酶切、连接、转化、验证后, 得到质粒 pAX01-*mutS*, 大小为 8 524 bp。电泳结果显示目标质粒大约为 8.5 kb, 表明质粒构建成功。

2.2.2 质粒 pSS-*mutS* 的构建

以 *B. subtilis* 168 基因组为模板, 以引物对 pSS-*mutS*-F/pSS-*mutS*-B 进行 PCR 扩增。获得含有操纵子 *MutSL* 上游同源区 *mutS*-F 的目的片

段。将目的片段与质粒 pSS (图 2B)经酶切、酶连、转化、验证后, 得到质粒 pSS-*mutS*。电泳结果显示目标质粒大约为 5.2 kb, 表明质粒构建成功。

2.2.3 重组质粒 pSS-*mutSL* 的构建

以 pAX01-*mutS* 质粒为模板, 以引物对 pSS-*xyIR*-F/pSS-*xyIR*-B 进行 PCR 扩增。将 PCR 产物进行电泳, 目标产物大约 2.3 kb, 成功获得目的片段

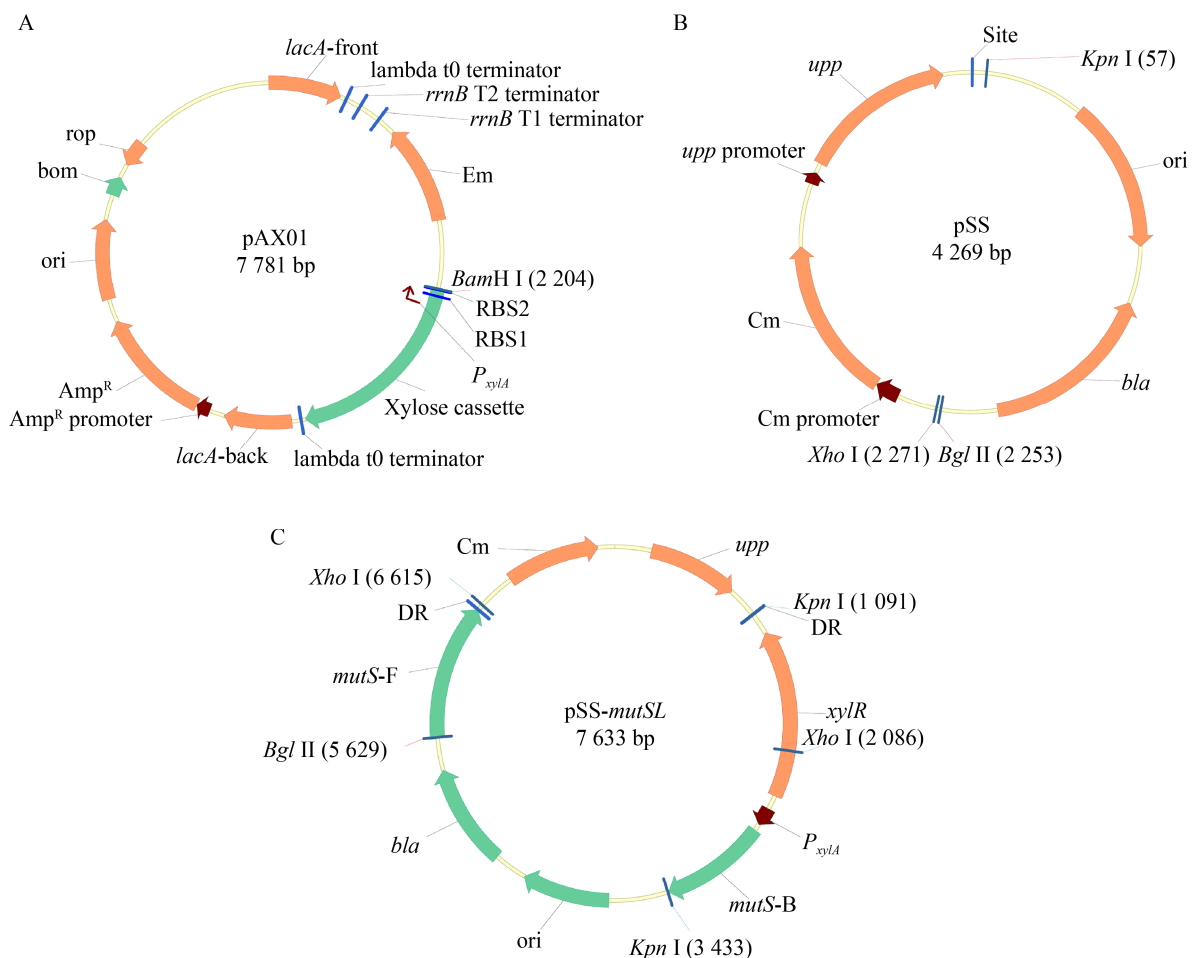


图 2 枯草芽孢杆菌错配修复系统 *MutSL* 的基因修饰质粒

Figure 2 Plasmids for genetic modification of mismatch repair system *MutSL* in *B. subtilis*

注: A: pAX01 质粒包含木糖启动子 P_{xylA} 、编码 XylR 阻遏蛋白的 *xylR* 基因; B: pSS 质粒包含氯霉素抗性基因、UPRTase 编码基因; C: pSS-*mutSL* 质粒包含木糖启动子 P_{xylA} 、编码 XylR 阻遏蛋白的 *xylR* 基因、操纵子 *MutSL* 的上游同源区 *mutS*-F, 操纵子 *MutSL* 的下游同源区 *mutS*-B, 以及用于负筛选步骤中的分子内同源重组 DR 序列

Note: A: pAX01 contains the xylose promoter P_{xylA} and the *xylR* gene encoding the XylR repressor protein; B: pSS contains chloramphenicol resistance gene (*cat*), UPRTase encoding gene (*upp*); C: pSS-*mutSL* contains the xylose promoter P_{xylA} , the *xylR* gene encoding the XylR repressor protein, the upstream homologous region *mutS*-F of the operon *MutSL*, the downstream homologous region *mutS*-B of the operon *MutSL*, and DR sequence used for intramolecular single-crossover homologous recombination event

pSS-*xyIR*, 该片段含有木糖启动子 P_{xyIA} 、编码 XylR 阻遏蛋白的 *xyIR* 基因。将目的片段 pSS-*xyIR* 与质粒 pSS-*mutS* 经酶切、酶连、转化、验证后, 得到质粒 pSS-*mutSL*, 大小为 7 633 bp。电泳结果显示目标质粒大约为 7.5 kb, 表明质粒构建成功, 重组质粒完整图谱如图 2C 所示。

2.3 构建高突变率工程菌株

2.3.1 正筛选

将验证正确的重组质粒利用 Anagnostopoulos 等^[31]化学转化法双交换整合至菌株 *B. subtilis* 168 Δupp 基因组, 通过正筛选标记氯霉素抗性来筛选发生双交换基因重组的阳性转化子。挑取转化后的单菌落, 37 °C、200 r/min 培养 12 h, 提取基因组。分别以提取的转化子基因组和质粒 pSS-*mutSL* (阳性对照)为模板, 以 pSS-*xyIR*-F/pSS-*xyIR*-B 为引物对进行 PCR 扩增, 电泳结果如图 3 所示。目标产物约 5.4 kb, 说明转化子 3、5、7 和 8 均为阳性克隆。

2.3.2 负筛选

将发生双交换基因重组的阳性转化子 3 号菌

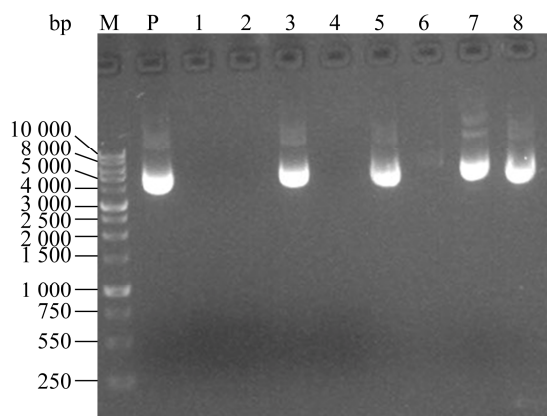


图 3 PCR 鉴定正筛选阳性菌落

Figure 3 Screening of positive colonies by PCR

注: M: RealBand 1 kb DNA Ladder; P: 阳性对照: 以 pSS-*xyIR*-F/pSS-*xyIR*-B 为引物扩增质粒 pSS-*mutSL*; 1-8: 以 pSS-*xyIR*-F/pSS-*xyIR*-B 为引物扩增转化子基因组

Note: M: RealBand 1 kb DNA Ladder, 250 bp–10 kb; P: Positive control: pSS-*mutSL* was used as template; 1–8: The genome of transformants were used as template fragments were amplified using pSS-*xyIR*-F/pSS-*xyIR*-B as primers

进行 5FU 负筛选后, 挑选 5FU 负筛选平板生长的单菌落在含氯霉素 5 $\mu\text{g/mL}$ 和卡那霉素 5 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上进行对照点板。筛选结果如图 4 所示, 氯霉素抗性平板上不生长, 而在卡那霉素平板生长的菌落 10、28、39 和 45 为阳性克隆。通过进一步使用引物 pSS-*mutS*-F 和 pSS-*xyIR*-B 对阳性克隆进行 PCR 和测序验证, 验证正确的菌株即为目的工程菌株, 命名为 *B. subtilis* MutSL。

2.4 高突变率工程菌株突变率分析

以 *B. subtilis* 168 Δupp 为对照菌株在其培养基中不添加木糖的突变率为参照, 以高突变率工程菌株 *B. subtilis* MutSL 在不同木糖诱导浓度的培养基中的突变率为对比, 比较其相对突变率。

由表 2 可知, 在不添加诱导物木糖时 *B. subtilis* MutSL 菌株与 *B. subtilis* 168 Δupp 菌株相比相对突变率提高了 58.4 倍, 而在木糖诱导物浓度分别为 0.5%、1.0% 和 2.0% 时, 菌株的相对突变率分别提高了 27.1、4.2 和 0.8 倍。这说明 *B. subtilis* MutSL 菌株在木糖诱导浓度越高的情况下其相对突变率越低, 即相对突变率与木糖诱导浓度成反比。木糖诱导物浓度越低, 错配修复操纵子表达水平越低, DNA 错配修复的水平越弱, 从而导致突变率的提高。

2.5 高突变率工程菌株对毒性产物苯乙醇的耐受性实验

高浓度苯乙醇对微生物具有较强的生长抑制作用。为评估高突变率工程菌株的可进化性和适应性, 比较 *B. subtilis* MutSL 和 *B. subtilis* 168 Δupp 对毒性产物苯乙醇的耐受差异, 结果如图 5 所示。实验结果表明, 在 1 g/L 和 2 g/L 浓度下, *B. subtilis* MutSL 和 *B. subtilis* 168 Δupp 的生长没有差异; 当浓度达到 3 g/L 时, 苯乙醇对 *B. subtilis* 168 Δupp 的生长显示出较强抑制, 但 *B. subtilis* MutSL 却可生长出大量菌落; 当浓度达到 4 g/L 时, *B. subtilis* 168 Δupp 已不能生长, 但 *B. subtilis* MutSL 仍可生长出不少菌落; 当浓度达到 5 g/L 时, 二者均不能生长。这个实验结果反映了高突变工程菌株具有较好的可进化性和适应性。

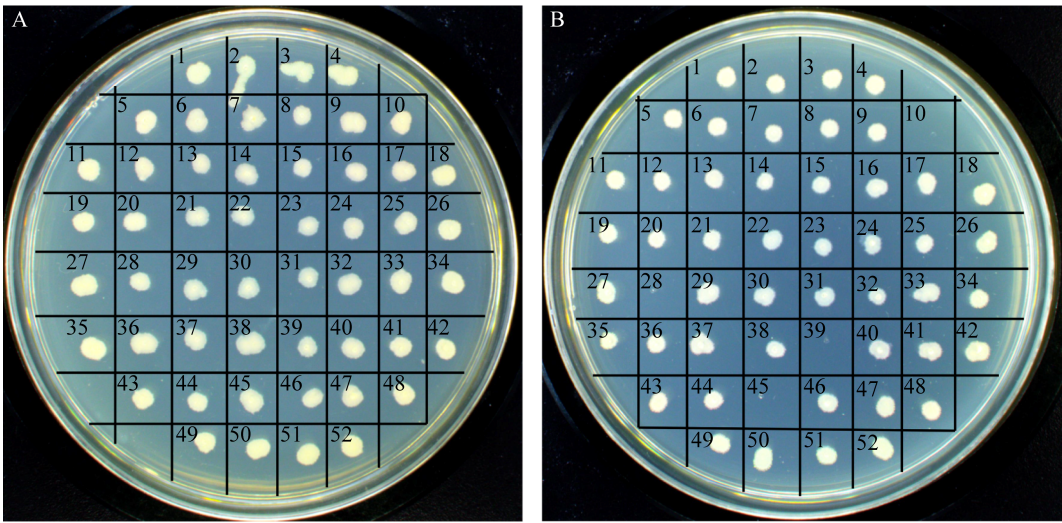


图 4 对照点板验证 5FU 负筛选阳性菌落

Figure 4 Screening of positive counter-selection colonies in 5FU medium

注: 发生分子内同源重组的细胞会丢失氯霉素抗性, 因此卡纳霉素平板生长(A)而氯霉素抗性平板(B)不生长的菌落即为负筛选阳性菌落(5FU^R Cm^S)

Note: A: Transformants were selected on LB plates containing 5 µg/mL kanamycin; B: Transformants were selected on LB plates containing 5 µg/mL chloramphenicol. Excision of *upp*-cassette by the single-crossover event via intramolecular recombination between DR sequences generates 5FU^R Cm^S cells which lost chloramphenicol resistance was supposed as positive counter-selection colonies

表 2 工程菌株突变率和木糖诱导浓度关系

菌株	木糖诱导浓度	突变率	相对突变率
Strains	Induced concentration of xylose (%)	Mutation rate	Relative mutation rate
<i>B. subtilis</i> 168 <i>Δupp</i>	0	$(0.12 \pm 0.04) \times 10^{-6}$	1.0
<i>B. subtilis</i> MutSL(<i>P_{xyIA}::mutSL</i>)	0	$(5.84 \pm 3.24) \times 10^{-6}$	48.7
<i>B. subtilis</i> MutSL(<i>P_{xyIA}::mutSL</i>)	0.5	$(2.71 \pm 1.32) \times 10^{-6}$	22.6
<i>B. subtilis</i> MutSL(<i>P_{xyIA}::mutSL</i>)	1.0	$(0.42 \pm 0.13) \times 10^{-6}$	3.5
<i>B. subtilis</i> MutSL(<i>P_{xyIA}::mutSL</i>)	2.0	$(0.10 \pm 0.03) \times 10^{-6}$	0.8

注: 相对突变率: 以 *B. subtilis* 168 *Δupp* 的菌株突变率为参照, 设定为 1

Note: Relative mutation rate: Take the mutation rate of *B. subtilis* 168 *Δupp* as a reference and set it to 1

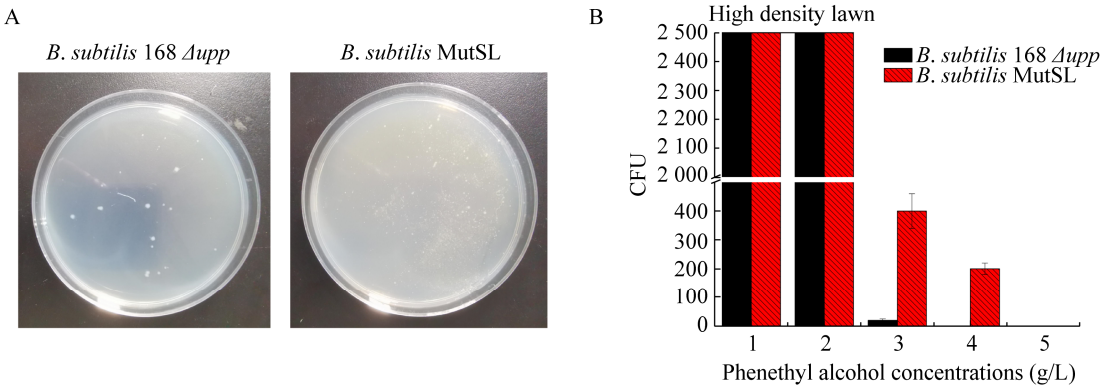


图 5 苯乙醇耐受实验

Figure 5 Phenethyl alcohol challenge of the *B. subtilis* MutSL and *B. subtilis* 168 *Δupp*

注: A: 3 g/L 苯乙醇 LB 培养基菌落生长情况; B: 不同浓度苯乙醇情况下菌落数量统计

Note: A: Colony growth on LB medium with 3 g/L phenethyl alcohol; B: Colony count statistics under different concentrations of phenethyl alcohol

2.6 高突变率工程菌株对底物粗甘油利用的实验室进化

选择突变率工程菌株 *B. subtilis* MutSL 为适应性进化出发菌株进行适应性进化, 筛选粗甘油高耐受进化菌株。为更贴近实际应用, 与文献[22]报道不同, 本实验所用粗甘油不经过活性炭吸附等处理, 直接稀释降低黏度后灭菌, 用于配制 M9G 基本盐培养基。根据表 2 的结果, 进化实验选择不添加诱导物木糖以获得最大的突变速率, 缩短进化周期。

进化实验共传代 35 d, 成功筛选得到可耐受 100 g/L 粗甘油的进化菌株 Y100。将驯化各代次菌株 Y30、Y50、Y70、Y90 和 Y100 与出发菌株在粗甘油浓度为 100 g/L 的 M9G 粗甘油培养基中的生长曲线进行比较, 结果见图 6。与出发菌株相比, 经过驯化的菌株可以更快地进入对数生长期, 而且生长速率更高。驯化到 50 代以后的 Y50、Y70、Y90 和 Y100 这 4 株菌大幅缩短了延迟期, 生长明显优于原始菌株。其中, 进化菌株 Y100 相较于出发菌株, 延迟期缩短了 10 h 以上, 稳定期更长, 最大生物量提升了 17% (由 1.210 ± 0.062 提升至 1.416 ± 0.015), 比生长速率提升 13% (由 0.233 ± 0.004 提升至 0.264 ± 0.017), 说明

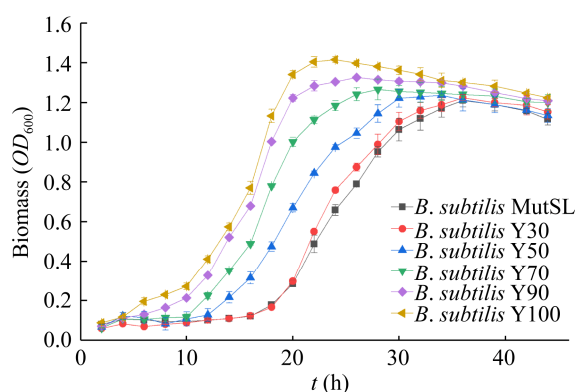


图 6 进化菌株在 M9G 粗甘油培养基(100 g/L)中的生长曲线

Figure 6 Growth curves of evolved strains in M9G medium containing 100 g/L crude glycerol

进化菌株具有更好的生长特性, 实验结果表明该突变工程菌株可应用于底物的快速利用进化实验。

3 讨论与结论

在先前研究中, 与 DNA 复制准确性相关的突变基因或抗突变基因成为基因操作靶点^[32]。但大多数突变率提升是通过灭活、过表达或修饰特定突变基因或抗突变基因的方式来实现, 这导致了单开关的控制模式或恒定的突变率水平^[14]。本研究通过正负筛选系统成功筛选出置换 *MutSL* 启动子的工程菌株 *B. subtilis* MutSL, 该菌株在不同木糖诱导浓度条件下, 具有不同的突变速率。与其他微生物中开发的高突变系统^[33-34]相比, 通过无痕等位基因置换系统筛选出置换 *MutSL* 启动子的工程菌株 *B. subtilis* MutSL 具有一些优势。本文选择的诱导物木糖对菌株生长没有毒性且不容易被代谢, 可较长时间保持诱导强度^[29], 更有效地调节细胞突变率。相较于前人通过直接敲除或质粒过表达等方式控制突变率的实现方式^[13], 本文使用的方法可使细胞突变率持续增强且人工可控。我们采用的无痕等位基因置换系统^[28], 在不引入任何外源基因序列(如抗性标记)的情况下, 对目标启动子进行了置换, 有利于后续的基因改造。在不添加木糖诱导物时 *B. subtilis* MutSL 菌株与出发菌株相比突变率提高了 58.4 倍, 而在木糖诱导物浓度分别为 0.5%、1.0% 和 2.0% 时, 菌株的相对突变率分别提高了 27.1、4.2 和 0.8 倍, 所以通过合适的木糖浓度可将菌株维持在所需的突变率水平。毒性产物苯乙醇耐受实验的结果表明, 该高突变率工程菌株具有较好的进化性和适应性。对底物粗甘油的实验室进化实验筛选, 获得了具有优异生长特性的 Y100 菌株, 相较于出发菌株, 进化菌株延迟期缩短了 10 h 以上, 稳定期更长, 最大生物量提升了 17% (由 1.210 ± 0.062 提升至 1.416 ± 0.015), 比生长速率提升 13% (由 0.233 ± 0.004 提升至 0.264 ± 0.017), 说明进化菌株具有更好的生长特性, 结果表明该突变工程菌株

可应用于底物的快速利用相关进化实验, 也为后续的高耐受分子机制提供了良好的研究对象。该菌株具有广泛的应用前景, 如扩大底物利用范围, 提高代谢物产量及提高底物(产物)耐受性等方面。

REFERENCES

- [1] Conrad TM, Lewis NE, Palsson BØ. Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science[J]. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7(1): 509
- [2] Elena SF, Lenski RE. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4(6): 457-469
- [3] Huang D, Wang R, Du WJ, Wang GY, Xia ML. Activation of glycerol metabolic pathway by evolutionary engineering of *Rhizopus oryzae* to strengthen the fumaric acid biosynthesis from crude glycerol[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 196: 263-272
- [4] Fletcher E, Feizi A, Bisschops MMM, Hallström BM, Khoomrung S, Siewers V, Nielsen J. Evolutionary engineering reveals divergent paths when yeast is adapted to different acidic environments[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 19-28
- [5] Palsson B. Adaptive laboratory evolution[J]. *Microbe Magazine*, 2011, 6(2): 69-74
- [6] Maughan H, Nicholson WL. Increased fitness and alteration of metabolic pathways during *Bacillus subtilis* evolution in the laboratory[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(12): 4105-4118
- [7] Zhu CY, Zhu MZ, Li S. Research progress in microbial laboratory evolution[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2019, 17(1): 8-14,22 (in Chinese)
朱晁谊, 朱牧孜, 李爽. 微生物实验室进化的研究进展[J]. *生物加工过程*, 2019, 17(1): 8-14,22
- [8] Mans R, Daran JMG, Pronk JT. Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 50: 47-56
- [9] Durnin G, Clomburg J, Yeates Z, Alvarez PJJ, Zygorakis K, Campbell P, Gonzalez R. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103(1): 148-161
- [10] Lee DH, Feist AM, Barrett CL, Palsson BØ. Cumulative number of cell divisions as a meaningful timescale for adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26172
- [11] Jarboe LR, Liu P, Royce LA. Engineering inhibitor tolerance for the production of biorenewable fuels and chemicals[J]. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 2011, 1(1): 38-42
- [12] Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair[J]. *Annual Review of Genetics*, 1991, 25(1): 229-253
- [13] Ginetti F, Perego M, Albertini AM, Galizzi A. *Bacillus subtilis* *mutS* *mutL* operon: Identification, nucleotide sequence and mutagenesis[J]. *Microbiology*, 1996, 142(8): 2021-2029
- [14] Luan GD, Cai Z, Gong FY, Dong HJ, Lin Z, Zhang YP, Li Y. Developing controllable hypermutable *Clostridium* cells through manipulating its methyl-directed mismatch repair system[J]. *Protein & Cell*, 2013, 4(11): 854-862
- [15] Bi LJ, Zhang XE, Zhou YF, Zhang ZP. Observation of the interaction between MutS and MutL mismatch repair proteins by fusion protein systems[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2005, 32(12): 1178-1184 (in Chinese)
毕利军, 张先恩, 周亚凤, 张治平. DNA 错配修复蛋白 MutS 和 MutL 的相互作用研究(英文)[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(12): 1178-1184
- [16] Gholami Z, Abdullah AZ, Lee KT. Dealing with the surplus of glycerol production from biodiesel industry through catalytic upgrading to polyglycerols and other value-added products[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014, 39: 327-341
- [17] Zhao YN, Chen G, Yao SJ. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 32(2): 93-99
- [18] Yang TW, Rao ZM, Zhang X, Xu MJ, Xu ZH. Effects of pH and oxygen supply on production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(12): 1860-1864 (in Chinese)
杨套伟, 饶志明, 张显, 徐美娟, 许正宏. pH 与溶氧控制对解淀粉芽孢杆菌发酵粗甘油生产 2,3-丁二醇的影响[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(12): 1860-1864
- [19] Yang H, Ji XJ, Nie ZK, Huang H. Production of acetoin by *Paenibacillus polymyxa* from biodiesel derived glycerol[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2014, 12(4): 11-15 (in Chinese)
杨晗, 纪晓俊, 聂志奎, 黄和. 多粘类芽孢杆菌利用生物柴油副产物粗甘油生产乙偶姻[J]. *生物加工过程*, 2014, 12(4): 11-15
- [20] Kumar P, Ray S, Patel SKS, Lee JK, Kalia VC. Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 78: 9-16
- [21] Zheng XJ, Sun Y, Chen WH, Jin KQ, Pan L, Liu YP. Dihydroxyacetone produced by biodiesel-derived crude glycerol[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2014, 12(4): 7-10,42 (in Chinese)
郑小娟, 孙杨, 陈万河, 靳魁奇, 潘龙, 刘宇鹏. 利用生

- 物柴油副产物粗甘油生产二羟基丙酮[J]. 生物加工过程, 2014, 12(4): 7-10,42
- [22] Wang SZ, Yan ZP, Qiu LH, Fang BS. Metabolic evolution of *Lactobacillus pentosus* for lactic acid production from raw glycerol[J]. CIESC Journal, 2015, 66(8): 3195-3203 (in Chinese)
王世珍, 严正平, 邱隆辉, 方柏山. 发酵粗甘油产乳酸的戊糖乳杆菌代谢进化[J]. 化工学报, 2015, 66(8): 3195-3203
- [23] Pereira SL, Leonard AE, Huang YS, Chuang LT, Mukerji P. Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the ω 3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid[J]. The Biochemical Journal, 2004, 384(Pt 2): 357-366
- [24] Pyle D. Use of biodiesel-derived crude glycerol for the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids by the microalga *Schizochytrium limacinum*[D]. Blacksburg, VA: Master's Thesis of Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, 2008
- [25] Wang GL, Shi T, Chen T, Wang XY, Wang YC, Liu DY, Guo JX, Fu J, Feng LL, Wang ZW, et al. Integrated whole-genome and transcriptome sequence analysis reveals the genetic characteristics of a riboflavin-overproducing *Bacillus subtilis*[J]. Metabolic Engineering, 2018, 48: 138-149
- [26] Liu SY, Yin ZM. Induced expression of recombinant *Bacillus subtilis* glutamine synthetase in optimized M9 medium[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition), 2007, 30(4): 74-79
刘顺谊, 殷志敏. 重组枯草芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶蛋白在改良 M9 培养基中的诱导表达[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2007, 30(4): 74-79
- [27] Green MR, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. He FC, trans. Beijing: Science Press, 2017: 126 (in Chinese)
M.R. 格林, J. 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 贺福初, 译. 北京: 科学出版社, 2017: 126
- [28] Shi T, Wang GL, Wang ZW, Fu J, Chen T, Zhao XM. Establishment of a markerless mutation delivery system in *Bacillus subtilis* stimulated by a double-strand break in the chromosome[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81370
- [29] Zhang B, Li N, Wang ZW, Tang YJ, Chen T, Zhao XM. Inverse metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for xylose utilization based on adaptive evolution and whole-genome sequencing[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(2): 885-896
- [30] Härtl B, Wehrl W, Wiegert T, Homuth G, Schumann W. Development of a new integration site within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction of compatible expression cassettes[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(8): 2696-2699
- [31] Anagnostopoulos C, Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1961, 81(5): 741-746
- [32] Yang HJ, Wolff E, Kim M, Diep A, Miller JH. Identification of mutator genes and mutational pathways in *Escherichia coli* using a multicopy cloning approach[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(1): 283-295
- [33] Selifonova O, Valle F, Schellenberger V. Rapid evolution of novel traits in microorganisms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(8): 3645-3649
- [34] Shimoda C, Itadani A, Sugino A, Furusawa M. Isolation of thermotolerant mutants by using proofreading-deficient DNA polymerase δ as an effective mutator in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genes & Genetic Systems, 2006, 81(6): 391-397