

基于 CRISPR/dCpf1 的氧化葡萄糖酸杆菌转录抑制系统的构建与应用

杨宇彤^{1,2,3}, 李宁^{1,2,3}, 周景文^{1,2,3}, 陈坚^{1,2,3}

1 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

杨宇彤, 李宁, 周景文, 陈坚. 基于 CRISPR/dCpf1 的氧化葡萄糖酸杆菌转录抑制系统的构建与应用. 生物工程学报, 2022, 38(2): 719-736.

YANG YT, LI N, ZHOU JW, CHEN J. A CRISPR/dCpf1-based transcriptional repression system for *Gluconobacter oxydans*. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 719-736.

摘要: 氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 因具有快速不完全氧化糖醇化合物的能力而被广泛应用于工业中。然而, 适用于氧化葡萄糖酸杆菌的基因编辑工具较为缺乏, 科研人员对其进行代谢改造受到很大的限制。近年来, 规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 系统在基因组编辑和转录调控中的应用极大地提高了微生物基因组的编辑效率。为了实现氧化葡萄糖酸杆菌的转录调控, 本研究构建了由 CRISPR/dCpf1 介导的基因转录抑制系统。通过在氧化葡萄糖酸杆菌表达失活的 Cpf1 蛋白 (dCpf1) 和含有 19 nt 重复序列的 crRNA, 使得该系统在基因转录中表现出有效的抑制效果, 其对于单基因的抑制水平最高可达 97.9%, 且可同时应用于多基因的抑制并表现出很强的抑制能力。为了验证 dCpf1 介导的 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 系统在代谢工程中的应用效果, 将该系统应用于 L-山梨糖的代谢途径和呼吸链的调控中, 对山梨糖代谢途径关键脱氢酶进行了鉴定, 确定了细胞色素 *bo*₃ 氧化酶对细胞生长的作用。该 CRISPRi 系统的开发有效填补了目前氧化葡萄糖酸杆菌中基因调控方法的短缺, 为代谢工程改造氧化葡萄糖酸杆菌提供了有效的基因调控工具。

关键词: 氧化葡萄糖酸杆菌; L-山梨糖; 基因编辑; CRISPRi

Received: February 22, 2021; **Accepted:** April 2, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904900); National Natural Science Foundation of China (31830068)

Corresponding author: CHEN Jian. Tel/Fax: +86-510-85913660; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0904900); 国家自然科学基金 (31830068)

A CRISPR/dCpf1-based transcriptional repression system for *Gluconobacter oxydans*

YANG Yutong^{1,2,3}, LI Ning^{1,2,3}, ZHOU Jingwen^{1,2,3}, CHEN Jian^{1,2,3}

1 National Engineering Research center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: *Gluconobacter oxydans* are widely used in industrial due to its ability of oxidizing carbohydrate rapidly. However, the limited gene manipulation methods and less of efficient gene editing tools impose restrictions on its application in industrial production. In recent years, the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) system has been widely used in genome editing and transcriptional regulation which improves the efficiency of genome editing greatly. Here we constructed a CRISPR/dCpf1-mediated gene transcriptional repression system, the expression of a nuclease inactivation Cpf1 protein (dCpf1) in *Gluconobacter oxydans* together with a 19 nt direct repeats showed effective repression in gene transcription. This system in single gene repression had strong effect and the relative repression level had been increased to 97.9%. While it could be applied in multiplex gene repression which showed strong repression ability at the same time. Furthermore, this system was used in the metabolic pathway of L-sorbose and the regulatory of respiratory chain. The development of CRISPR transcriptional repression system effectively covered the shortage of current gene regulation methods in *G. oxydans* and provided an efficient gene manipulation tool for metabolic engineering modification in *G. oxydans*.

Keywords: *Gluconobacter oxydans*; L-sorbose; gene editing; CRISPRi

氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 是一种革兰氏阴性菌, 属于醋酸杆菌科 (Acetobacteraceae)、*Gluconobacter* 属^[1], 适合生长在成熟葡萄、苹果、花、啤酒等糖度较高的环境中, 可引起植物的褐变及腐烂^[2]。由于其膜结合脱氢酶系具有快速不完全氧化糖醇的能力, 氧化葡萄糖酸杆菌被广泛应用于葡萄糖酸^[3]、L-山梨糖^[4]、二羟基丙酮^[5]等的工业生产。在微生物两步发酵法工业生产维生素 C 前体物质 2-酮基-L-古龙酸 (2-keto-L-gulonic acid, 2-KLG) 的工艺中^[6], 氧化葡萄糖酸杆菌负责前

一步发酵, 即快速高效地完成 D-山梨醇到 L-山梨糖的转化^[7]。虽然氧化葡萄糖酸杆菌具有巨大的工业生产价值^[8], 但是相对于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等模式菌株^[9], 其基因组编辑工具较为缺乏, 且具有操作方法复杂、耗时长等特点, 大大限制了其更进一步的应用。目前, 基于 5-氟尿嘧啶和同源重组的基因组编辑方法已经应用到氧化葡萄糖酸杆菌的基因组改造中^[10], 但其操作方法复杂、耗时长, 降低了目标菌株的构建效率。

规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered

regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 广泛存在于细菌中, 是一种在长期进化过程中形成的免疫防御系统, 用于抵抗外源 DNA 的入侵^[11]。由于 II 型 CRISPR 系统只需要单一蛋白的表达, 结构较为简单, 因此在微生物中的应用最为广泛, 如大肠杆菌^[12]、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)^[13]、酿酒酵母^[14]等。相比于 Cas9 蛋白^[15], Cpf1 蛋白的分子量更小^[16], 毒性较低, 且可自身加工修饰 pre-crRNA 而不需要结合 tracrRNA, 被应用于特定菌株的基因组编辑中^[17]。Cpf1 蛋白包含 2 个核酸酶结构域^[18], 通过定点突变可获得丧失 DNA 剪切能力的 Cpf1 蛋白 (dead Cpf1, dCpf1)^[19], 后者在 crRNA 的引导下结合至基因组特定定位点可实现基因的转录抑制^[20]。

为了完善氧化葡萄糖酸杆菌的基因抑制工具, 本研究首先失活来自新凶手弗朗西斯菌 (*Francisella novicida* U112)^[21] 的 Cpf1 蛋白而获得 dCpf1 蛋白, 并在氧化葡萄糖酸杆菌中进行表达; 然后对 dCpf1 蛋白的表达量与 crRNA 的长度进行优化, 探究 dCpf1 蛋白对荧光蛋白表达量的抑制效果, 成功构建了适用于氧化葡萄糖酸杆菌的 CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 系统, 实现了对氧化葡萄糖酸杆菌的基因转录抑制。最后, 我们使用该 CRISPR-dCpf1 系统抑制了氧化葡萄糖酸杆菌 L-山梨糖代谢途径与呼吸链中相关基因的表达, 初步探究了这些基因的表达抑制产生的影响。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和引物

氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 作为出发菌株, 用于蛋白表达和转录抑制; 大肠杆菌 JM109 用于质粒扩增; pBBR1MCS-5 用于 dCpf1 蛋白的表达; p2-1 用于 crRNA 和荧光蛋白的表达;

PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司或苏州金唯智生物科技有限公司合成。本文所用质粒、菌株、启动子和引物详见表 1-4。

1.2 培养基

LB 培养基: 10 g/L 氯化钠, 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物。

山梨醇培养基: 80 g/L 山梨醇, 12 g/L 酵母提取物。

固体培养基中额外添加 20 g/L 琼脂粉。

抗生素浓度为: 卡那霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 庆大霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 主要酶及相关试剂盒

一步克隆酶购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; PCR 酶、DNA marker 购自南京诺唯赞 (Vazyme) 生物科技有限公司; 其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司 (分析纯)。

1.4 质粒及菌株构建

以质粒 pBBR1MCS-5 为模板, 以 PB-F/PB-R 为引物, 线性化得到 pBBR1MCS-5 片段; 以合成的 Cpf1 为模板, 以 CPF-F/CPF-R 为引物, 扩增得到 Cpf1 片段; 以氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 基因组为模板, 以 2703-F/2703-R 为引物, 扩增启动子 DNA 片段 p2703; 通过一步克隆试剂盒连接得到质粒 pBBR1MCS-5-p2703-Cpf1。dCpf1、dCpf1(D917A) 和 dCpf1(E1006A) 通过突变引物 917-F/917-R、1006-F/1006-R 构建。以 p2-1 质粒为载体, 以 p21-F/p21-R 为引物, 线性化得到 p2-1 片段。以引物 MCH-F/MCH-R 为引物扩增得到 *mCherry* 基因 DNA 片段。以氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 基因组为模板, 通过引物 0295-F/0295-R、0365-F/0365-R、2564-F/2564-R、2703-F/2703-R、22-F/22-R、49-F/49-R、126-F/126-R、516-F/516-R、1416-F/1416-R、1626-F/1626-R、1837-F/1837-R 和 J23-F/J23-R 扩增得到启动子 DNA 片段 p0295、

表 1 本研究使用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristics	Sources
p2-1	<i>E. coli-G. oxydans</i> shuttle plasmid	Lab storage
pBBR1MCS-5	<i>E. coli-G. oxydans</i> shuttle plasmid	Lab storage
pBBR1MCS-5-p2703-Cpf1	pBBR1MCS-5 with promoter p2703 to express Cpf1	This study
pBBR1MCS-5-p2703-dCas9	pBBR1MCS-5 with promoter p2703 to express dCas9	This study
pBBR1MCS-5-p2703-dCpf1	pBBR1MCS-5 with promoter p2703 to express dCpf1(D917A, E1006A)	This study
pBBR1MCS-5-p2703-dCpf1(D917A)	pBBR1MCS-5 with promoter p2703 to express dCpf1(D917A)	This study
pBBR1MCS-5-p2703-dCpf1(E1006A)	pBBR1MCS-5 with promoter p2703 to express dCpf1(E1006A)	This study
p2-1-p0295-mCherry	p2-1 with promoter p0295 to express mCherry	This study
p2-1-p0365-mCherry	p2-1 with promoter p0365 to express mCherry	This study
p2-1-p2564-mCherry	p2-1 with promoter p2564 to express mCherry	This study
p2-1-p2703-mCherry	p2-1 with promoter p2703 to express mCherry	This study
p2-1-p22-mCherry	p2-1 with promoter p22 to express mCherry	This study
p2-1-p49-mCherry	p2-1 with promoter p49 to express mCherry	This study
p2-1-p126-mCherry	p2-1 with promoter p126 to express mCherry	This study
p2-1-p516-mCherry	p2-1 with promoter p516 to express mCherry	This study
p2-1-p1416-mCherry	p2-1 with promoter p1416 to express mCherry	This study
p2-1-p1626-mCherry	p2-1 with promoter p1626 to express mCherry	This study
p2-1-p1837-mCherry	p2-1 with promoter p1837 to express mCherry	This study
p2-1-p1941-mCherry	p2-1 with promoter p1941 to express mCherry	This study
p2-1-pJ23119-mCherry	p2-1 with promoter pJ23119 to express mCherry	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-19-S7N	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA19 targeting S7N locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-23-S7N	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA23 targeting S7N locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-36-S7N	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA36 targeting S7N locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S1	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S1 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S2	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S2 locus	This study

(待续)

(续表 1)

Plasmids	Characteristics	Sources
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S3	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S3 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S4	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S4 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S5	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S5 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S6	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S6 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S6N	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S6N locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S7 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S7N locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N-23	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA-23 targeting S7N locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N-36	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA-36 targeting S7N locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S8	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S8 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S9	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting S9 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba11	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Sba11 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba12	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Sba12 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba13	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Sba13 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba21	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Sba21 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba22	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Sba22 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba23	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Sba23 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Ss1c1	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Ss1c1 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Ss1c2	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Ss1c2 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Ss1c3	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Ss1c3 locus	This study
p2-1-p2564-mCherry-p3022-EGFP-p2703-CFP	p2-1-p2703-mCherry with promoter p2564 express mCherry, promoter p3022 Lab storage express EGFP and promoter p2703 express CFP	This study
p2-1-p2564-mCherry-p3022-EGFP-p2703-CFP-P-pJ23119-Sm-Se-Sc	p2-1-p2564-mCherry-p3022-EGFP-p2703-CFP with promoter pJ23119 and crRNA targeting Sm、Se、Sc locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba11-Sba21-Ss1c1	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Sba11、Sba21、Ss1c1 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sbo3	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Sbo3 locus	This study
p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sbd	p2-1-p2703-mCherry with promoter pJ23119 and crRNA targeting Sbd locus	This study

表 2 本研究使用的菌株

Table 2 Strains used in this study

Strains	Characteristics	Sources
C0	Industrial strain <i>G. oxydans</i> WSH-003	Lab storage
C1	C0 with plasmid pBBR1MCS-5-p2703-Cpf1	Lab storage
C2	C0 with plasmid pBBR1MCS-5-p2703-dCas9	This study
C3	C0 with plasmid p2-1-p0295-mCherry	This study
C4	C0 with plasmid p2-1-p0365-mCherry	This study
C5	C0 with plasmid p2-1-p2564-mCherry	This study
C6	C0 with plasmid p2-1-p2703-mCherry	This study
C7	C0 with plasmid pBBR1MCS-5-p2703-dCpf1	This study
C8	C0 with plasmid pBBR1MCS-5-p2703-dCpf1(D917A) and p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N	This study
C9	C0 with plasmid pBBR1MCS-5-p2703-dCpf1(E1006A) and p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N	This study
C10	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N	This study
C11	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry	This study
C12	C0 with plasmid p2-1-p22-mCherry	This study
C13	C0 with plasmid p2-1-p49-mCherry	This study
C14	C0 with plasmid p2-1-p126-mCherry	This study
C15	C0 with plasmid p2-1-p516-mCherry	This study
C16	C0 with plasmid p2-1-p1416-mCherry	This study
C17	C0 with plasmid p2-1-p1626-mCherry	This study
C18	C0 with plasmid p2-1-p1837-mCherry	This study
C19	C0 with plasmid p2-1-p1941-mCherry	This study
C20	C0 with plasmid p2-1-pJ23119-mCherry	This study
C21	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N-23	This study
C22	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N-36	This study
C23	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S1	This study
C24	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S2	This study
C25	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S3	This study
C26	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S4	This study
C27	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S5	This study
C28	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S6	This study
C29	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7	This study
C30	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S8	This study
C31	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S9	This study
C32	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S6N	This study
C33	C7 with plasmid p2-1-p2564-mCherry-p3022-EGFP-p2703-CFP-pJ23119-Sm-Se-Sc	This study
C34	C7 with plasmid p2-1-p2564-mCherry-p3022-EGFP-p2703-CFP	This study
C35	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba11	This study
C36	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba12	This study
C37	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba13	This study
C38	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba21	This study
C39	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba22	This study
C40	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba23	This study
C41	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sslc1	This study
C42	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sslc2	This study
C43	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sslc3	This study
C44	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sba11-Sba21-Sslc1	This study
C45	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sbo3	This Study
C46	C7 with plasmid p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-Sbd	This Study

表 3 本研究使用的启动子

Table 3 Promoters used in this study

Promoters	Sequences (5'→3')	Sources
p2703	TGGTAGCAGATGTGGAGAAATATCCGCAGTTCCTGCCATGGTGTGTCAAGGCGACCATCAAG TCCCAGACAGAGCAGGAACTTGTGGCAGAATTGACCATTGGGTTCGGTCTTTTCGGGAAAC CTTACCAGCCGTGTCACACTTGAGCGTCCCTCACGCATTTCGAGTGCCTACGAGAAGGGGC CTTTTCGGTATCTGAACAATGTCTGGACGTTACGCCGGATCCGCGGGGTTCCTGGTAGATT TCTTCGTGGACTTCGAGTTTCGATCCCGTCTGCTGCAGAATGCAATGGGTGTGGTGTTCATG AGGGTGTTCGCTGATGGTCTCCGCTTTCATCAAGCGGGCCCGGGACATTTATGGCGTGCAG ACTGCTCAGAGCCGTACACCCCAACCCGATTATCCTGATCGAAAAGATAAATTCGTAATATG TTATGAACCATTTCGGCGTACGGACCCTTTCAGGCCCAACCACCGAATGGTGTATGAAAGGA TTACGCA	This study
p2564	GATACTGTTGTTTCGCGCTGGCATCCAGAGCCAGTTTGAACAGGGACAACCCTGAAAG CGTGGCTGTTTACAATCCAGAGAAATGCCTTTTACGAACAGCGCAGACGCTCATCCCGTGAA CAGGAGGTCATGCAGGATTTTCAACTCGATATGCCTGTGTCTGCTGAAGCTCCCTCGATGCA AAGCGCCAGGGACGCAGTTACGGATCTTGGTGAATCCTCTGGAAACTGCCTGACCTTCTCC GTGAAGCCATTATCCTGGTGGGAGCACAGGAACTTTCATACGAAGATGCGGCCTGCATCTGT AATGTCCCTCCAGGCACCATGAAAGCCCGTGTTCGAGAGCCCGCAGCCAAGTAGCCGCTTT GACCGAGACGAAAATCTGAGCGAAATTCACATCTAAAAAACTGTTAAATAACGATTTTTTA AAAAATATAAAAAAAGATCCTCTGGATGCAACGATCCTGAAGCCTCGTTCATTGATCCCATG AAACAGGACGAAATCAGGAGTATTTCCC	This study
p0365	GTCACTCAGTCTGGCGATTACATTACGGGGCTGGAGCGTCTCCTGACCCGACAGAACGAAGCC GAACTGGCCGCTCTGGGGTACTGACACAGACTTTTGGGAGTCTTCTGCTGGCTCTCGCGCTG GTCTCGGGTGCCATTGACCAGGAAGAGGCTGTCTCAGTCGCAAATGCGGATGAGCGCAAGCA GCTTCTGGTCTGGGGCAGGGACGATGAACTGTTCCGTGTCATGACCCGCGTGAACAGGATTC GTCCGAAGCAATGACCTTCTGGAGTTTCAAGAGAGATCTGAATTTCCGTGTGAGGCATGAT GTTGCCATATTTCGGGCGCATCTGGCGTGTGACAGAAAGAGATGATTAGTGACTGGCTTCTG AGGGAAGTTAAGGCGCAATTTCCGATCTGTCTGTAACGTCAGAGTCAGAGTCGAGGAAAAT	This study
p0295	ATCTGTGCGAGGCCGAACTTCTTGAAGGCTCGCTTGTATGGCGCTTTCACCCGGCTTGGGCGGC GGCGGTGCATCAAGGGACTGGATCAGTCTTCGAGGGAACCCTCACCGATACGACCCGGCCTTG GGATTGAAGCGATAGATTTTTCATGGGCAAACCTCAAAAAGGCAGGGCTCCCCGACCAGAGGGG AGTACCAGACCGTTAGCGCAAACCCCGGGAGGGGTTGCGTGCTTTATAAGCATCTGCCGTG AGAAAATAACAGGGGTCAGACTCGGCCTTTGATTGACAGAAGAGCTCGAGACCTGTTAGGCG CGGGTCCACTGCCGAAACGAGGACGTACCGGCCGGCCATCATCGCGGGTTTCTGTACCCCG CAGGCTCCGGTTTCTGGGTGCGCGCCCGTCTTTCCAATTTCGGGAAGGGCCTACCGGCGCAA CAAAACGCTCGCCATGCAGCATGGGGCGGGCCTGATGTATGAACAGGGGTTAACCC	This study
p22	CTTGTTTAGGCTCCCGATTTGCCCGTTTGGGACCTTGGATAAGCAGCATGAGACGGGAAAA CGTCTTACCGCAAGAAAAATATCAGTTTTTCTAAAAAAATGGAAATGCCCCCTTGCCTCACT CAGCCGTGATGGGTAAACACCCACTCACCGCT	This study
p49	GAGATATCCTGCCGCTCTGAACACTGTATCGCAGCGTTTCGTGAATCAGCTCTTAATAGCCTG TTCATTCCAAGAAGAAAAATCCTCTTCCGGAGATTGAAATATCTCTTTCGACCAAACGCTCT GAGAGACGATACAGCGCCTGTCTCCCCGA	This study
p126	GGATGTTCTCCGATACGTTGGAGAGCTCCGAAATAAAAGTCCTTGGTTGTATCAGCCAAGGC GCCAGACGATCCTGGAACCTGGAGTTCAAGGCGCGTCAACATATCCCTTCTATATTTTCCC	This study
p516	TAGGCGGAAGACTCCTTAACGAGAGGGGAGGATAGAAAGGTGCGTCAGGTCAGCCCTAACA GATATGACCAATGTGAAAAATGCGAAGACTGAAATCCTTTCATTTCTTCGGATAACGTGTTG ACACTCCGTCGGATCCCCCTTAAAAACCCGCTCAACGCCGGGGCAGCCCGGTGGGAT	This study
p1416	ATCATCGGGCGTTACCATTTGCATGATACGCCAACGACAGTGGGGCGGAAAAGATAATGTTC GGAGATGAAAGTCAAGTGCCTGGAATGAAAATGGCATCATATTTTCATTTCTGACATTTCCCT CTTGCGGTTGCCCGAAAACCTGGAGTATGACACCGGCGACCTAAGG	This study
p1626	AAAAGTGCCTCCTGAAAGGGCGTTGTTCTCTCAGGTTTACGCAGGGTGTGCGAACGGGTTCT CCTGATCGTGTGCATAGCCGCACTGTTTTCTGTTGAATGTTGGCAATTTTCCCTTTTCGGGG CTTGCCAAGAAAAAACGTCGCTAGAACGCGCCTACCTCGATGGGTGC	This study

(待续)

续表 3

Promoters	Sequences (5'→3')	Sources
p1837	GTTTTTCGTTTTTTATGATTTTGTGATTGACGGGTTTCGGTGGGTGGTCTTATAAGCCCGTTCACCG ACGCGGCGGGGCTTCTTGGAGGGCTTGGCGGGGACGGTTGAGACTGTGATCTTTGAAAACCTGAA TATGGAATTGGAAGGGATATGTTGGCGGCGTTTTGGTGTCTGCTGGTTTTGGGATTATTGCTCTGAGAC CTGAGTGTCAATGTTGGACGCTGATGTATCTTTTTGGATGCTTCAATTAAGCCTGACGTTTTTCA TTTGGGTTTAGAG	This study
p1941	GCTGAAAACCTCGTCGGAAATCACGAAAGGCCCGGTGATCGCCGGGCAGGAAAGGGTTTTGTATCT GTCCGGATGGAAGAGGACAACCTCTACTCCGGAACGCTTGACAGAAACAGCCAGCGTAGGAACTAT CAAATTCACCAT	This study
p3022	TGTAGTACACAATACTCTCTCGTGGCGAAAGGGAACGAGTCACGGACAGTTGATACGATTATCAAG TTTCTTCTGTCGGTGAACCTGCGTGAATCAGACAGGCCGACGTTGCACGTCATGTTAAAATGACCC CTTCGGCCTTCTCTAGGCTTTTCCTAAGAGCTACCGGAGACACTTTTACAAGTTTCGTACGTCGGTT GCGCATCAGTCGTGCCTGCGAATCTTGTAAACAACATCAAAGTCAGTTGGTGTGTTGGGGAGCGA AGCAGGGTTTCGGTAACCTGTCGAATTTAATCGTATTTTTTAGATGAAAAGCATATGACACCCGCGC AGTATAGACGCGAAGCAAAAATGGCGCTCAATAAATTAAGTTGCCACATTAATAAAGAAATATT CTATCATGATCACAATAAAAACAACAAGTGATTGGATGGGCTCAATTCGGTGTATATATTAGAGCA TAGAAGAAATAATTTCTTCTTGATGTGTAACCAAGAAAATGAGGTTATCGGCAGTT	This study

表 4 本研究使用的引物

Table 4 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
PB-F	GATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACC
PB-R	GAATTCCTGCAGCCCGG
2703-F	<u>CCCCCGGGCTGCAGGAATTC</u> TGGTAGCAGATGTGGAGAAATATCCGC
2703-R	TGCGTAATCCTTTCATAACACCATTCCG
0295-F	<u>CCCCCGGGCTGCAGGAATTC</u> ATCTGTGCGAGGCCGAACCTCTTG
0295-R	GGGTTAACCCCTGTTTCATAC
0365-F	<u>CCCCCGGGCTGCAGGAATTC</u> GTCACTCAGTCTGGCGATTAC
0365-R	ATTTCCCTCGACTCTGACGTTAC
2564-F	<u>CCCCCGGGCTGCAGGAATTC</u> GATACTGTTGTTTCGCGCGCTGGC
2564-R	GGGAAATACTCCTGATTTTCGTCCTG
CPF-F	<u>TGTTATGAAAGGATTACGCA</u> ATGTCAATTTATCAAGAATTTGTTAATAAATATAAGTTT
CPF-R	<u>GTATCGATAAGCTTGATATC</u> TAGTTATTCCTATTCTGCACGAAC
CAS-F	<u>TGTTATGAAAGGATTACGCA</u> ATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATC
CAS-R	<u>GTATCGATAAGCTTGATATC</u> CAGTCACCTCCTAGCTGACTCAAATC
CPF917-F	TAAGTATAGCTAGAGGTGAAAGACATTTAGCTT
CPF917-R	<u>TCACCTCTAGCTATACTT</u> AATATATGAACATCATTTGCTT
CPF1006-F	<u>GGTTTTTGCTGATTTAAAT</u> TTTTGGATTTAAAAGAGGGCG
CPF1006-R	<u>TTTAAATCAGCAAAAACCACA</u> ATAGCATTATACTCTATAACTAGC
P21-F	<u>AACCGAAGGAGGCGTCCC</u> AAAAGGATGCCTCCTTCTTTTTGAACCTTAGAAATCCACTCCTAATCATGG TCATAGCTGTTTCC
P21-R	<u>TTTCTCCACATCTGCTACC</u> ACTGGGTTAGCTGTTTCGGAGATG
MCH-F	TAATCATGGTCATAGCTGTTTCC
MCH-R	<u>TAGTATTACCTAGGACTGAG</u> CTAGCTGTCAAGGATCCAGTTACTTGTACAGCTCGTCC
22-F	<u>GGTATTCAGATAATTTTTCA</u> AGCTCCTTGTTTAGGCTCCCGATTTGCC
22-R	<u>AACTTGCTATTTCTAGCTC</u> TAAAACCTCTGCGTGATAAGAACACATAGCGGTGAGTGGGTGTTTACC
49-F	<u>AACTTGCTATTTCTAGCTC</u> TAAAACCTCTGCGTGATAAGAACACATTCGGGGAGACAGGCGCTG
49-R	<u>GGTATTCAGATAATTTTTCA</u> AGCTCAGATATCCTGCCCGTCTGAACAC
126-F	<u>GGTATTCAGATAATTTTTCA</u> AGCTCGGATGTTCTCCGATACGTTGGAGAGC
126-R	<u>TATCCTCCTCGCCCTTGCTC</u> ACCATGGGAAAATATAGGAAGGGATATGTTGACGG
516-F	<u>GGTATTCAGATAATTTTTCA</u> AGCTCTAGGCGGAAGACTCCTTAACGAGAGG
516-R	<u>AACTTGCTATTTCTAGCTC</u> TAAAACCTCTGCGTGATAAGAACACATATCCCACCGGGCTGCC
1416-F	<u>GGTATTCAGATAATTTTTCA</u> AGCTCATCATCGGGCGTTACCATTGTC

(待续)

(续表 4)

Primers	Sequences (5'→3')
1416-R	<u>TATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATCCTTAGGTCGCCGGTGTGCATAC</u>
1626-F	<u>GGTATTCAGATAATTTTTCAAGCTCAAAAGTGCCTCCTGAAAGGGCG</u>
1626-R	<u>TATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGCACCCATCGAGGTAGGCGCG</u>
1837-F	<u>GGTATTCAGATAATTTTTCAAGCTCGTTTTTTTCGTTTTTTTATGATTTTGTGATTGACGGG</u>
1837-R	<u>TATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATCTCTAAACCCAAATGAAAAACGTCAGGC</u>
1941-F	<u>GGTATTCAGATAATTTTTCAAGCTCGCTGAAAACCTCGTCGGAAATCAC</u>
1941-R	<u>TATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATATGGTGAATTTGATAGTTCTACGCTGG</u>
J23-F	<u>GGTATTCAGATAATTTTTCAAGCTCTACCGCTCGCCGCAGCC</u>
J23-R	<u>TATCCTCCTCGCCCTTGCTCACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGT</u>
CR-F	<u>AACCGAAGGAGGCGTCCCAA</u>
CR19-R	<u>CTACAACAGTAGAAATTA</u> CTAGTATTATACTAGGACTGAGCT
CR23-R	<u>CTACAACAGTAGAAATTA</u> TTACTAGTATTATACTAGGACTGAGCT
CR36-R	<u>CTACAACAGTAGAAATTA</u> TTAAAGTTCTTAGACACTAGTATTATACTAGGACTGAGCT
CR-1R	<u>GGTTTTCCCGAAAAGGACCGAACCA</u> CTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTATACTAGGACTGGAGCT AGCTGTCAAGGATCCAGTTACTTGTACAGCTCGTCC
CR-2R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> ACTCGAATGCGTGAGGGACGCTATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-3R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> GCCAGACATTGTTTCAGATACCGATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-4R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> ATCGAAACTCGAAGTCCACGAAGATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT TACCTAGGACTG
CR-5R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> GGGATCGAAACTCGAAGTCCACATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT TACCTAGGACTG
CR-6R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> CTCGCCCTTGCTCACCATTGCGATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-6NR	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> CTCCTCGCCCTTGCTCACCATATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-7R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> AGTAGGCCTTGGAGCCGTACATATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-7NR	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-8R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> GATTACGGGGCCGTGCGAGGGATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT TACCTAGGACTG
CR-9R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> AGTGGTCTTGACCTCAGCGTCATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-ba11R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> CCGTCAGAGTCCTATTACCTTATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT CCTAGGACTG
CR-ba12R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> AGCAACCAAGAGGATGCCACAGAATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT TACCTAGGACTG
CR-ba13R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> GGAAGTCGGTTTCAGCCCCATATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-ba21R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> GCAGGGTCTGTTGCGGTTAGATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-ba22R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> AAGCGTGC GGCCCATGAGCATGAATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT TACCTAGGACTG
CR-ba23R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> ATGTGGCGCAGGACCGGGATGGATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT TACCTAGGACTG
CR-slc1R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> CGAAGTGTCTCGTCGCCTCATATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-slc2R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> AGGGCAGCAGACACTTCGAAATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT TACCTAGGACTG
CR-slc3R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> ATTGATCTCACTTCGGTAGGCTGATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT ACCTAGGACTG
CR-bo3R	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> ATCGGTCCTGCTTTCATCATCCATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT CCTAGGACTG
CR-bdR	<u>GGACGCCTCCTTCGGTTC</u> GCGAGAAATAAAGCCGACAGGCCATCTACAACAGTAGAAATTACTAGTATTAT TACCTAGGACTG

*: Underlined letters indicate homologous sequence.

p0365、p2564、p2703、p22、p49、p126、p516、p1416、p1626、p1837 和 pJ23119, 通过一步克隆试剂盒将启动子片段连接 *mCherry* 基因 DNA 片段和线性化 p2-1 片段, 得到荧光蛋白表达质粒。

基因抑制质粒 p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S1 通过引物 CR-F/CR-1R 将 p2-1-p2703-mCherry 质粒线性化连接获得。p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S2 质粒以引物 CR-F/CR-2R 对 p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S1 线性化连接获得。同理, p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S 等对不同位点的基因抑制质粒分别通过引物 CR-F/CR-3R、CR-F/CR-4R、CR-F/CR-5R、CR-F/CR-6R、CR-F/CR-6NR、CR-F/CR-7R、CR-F/CR-7NR、CR-F/CR-8R、CR-F/CR-9R、CR-F/CR-ba11R、CR-F/CR-ba12R、CR-F/CR-ba13R、CR-F/CR-ba21R、CR-F/CR-ba22R、CR-F/CR-ba23R、CR-F/CR-slc1R、CR-F/CR-slc2R、CR-F/CR-slc3R、CR-F/CR-bo3R 和 CR-F/CR-bdR 扩增获得。p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N-23、p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N-36 分别通过引物 CR-F/CR23-R、CR-F/CR36-R 扩增获得。DNA 片段 pJ23119-Sba11-Sba21-Sslc1 和 pJ23119-Sm-Se-Sc 由生工生物工程(上海)股份有限公司基因合成。

1.5 crRNA 设计

为构建高效的 crRNA 基因编辑质粒, 需要对 crRNA 特异序列 23 nt 进行筛选。本研究使用 crRNA 设计网站 <http://www.rgenome.net/>, 在 Cas-Designer 中选择物种: *FnCpf1* from *Francisella novicida*, PAM 类型: 5'-TTN-3', 将靶标基因序列输入 Query Sequence。在得到的一系列 crRNA 的 23 nt 结果中选择 Out-of-frame Score 大于 66、同时 GC content 为 40%–60% 的 RGEN Target 序列, 并保证其中不含连续 TTTT。根据需要对切割位置和切割链

进行选择。

1.6 荧光检测

将构建的基因转录抑制质粒转化氧化葡萄糖杆菌 WSH-003, 涂布山梨醇平板, 30 °C 培养 48 h, 挑取单菌落进行菌落 PCR。将阳性克隆接种至山梨醇液体培养基中培养 48 h。荧光强度和 OD_{600} 使用酶标仪检测, 吸取 200 μ L 菌液置于 96 孔酶标板进行测定。荧光蛋白 mCherry、EGFP 和 CFP 的激发波长和发射波长分别为 580 nm/610 nm, 488 nm/520 nm 和 435 nm/475 nm。荧光图像使用 Leica 激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP8)拍摄获得。

1.7 荧光定量 PCR (qRT-PCR)

总 RNA 的提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司, RNA 定量使用艾本德核酸蛋白测定仪 (Eppendorf, 德国); RNA 反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time) 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; 荧光定量 PCR 仪为 LightCycler 480 II (德国); ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 转录水平测定均以 16S RNA 作为内参。

1.8 发酵条件及 L-山梨糖含量的测定

取置于 -80 °C 中保存的甘油管, 划线于平板上进行活化, 然后挑取单菌落接种于山梨醇培养基中, 30 °C、220 r/min 培养至对数期; 以 10% 的接种量转接至山梨醇培养基, 30 °C、220 r/min 培养 48 h, 每隔 12 h 取样。取 1 mL 发酵液至 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 吸取上清液并用 0.22 μ m 尼龙滤膜过滤。

D-山梨醇和 L-山梨糖使用岛津高效液相色谱仪检测。检测条件: 色谱柱为 Aminex HPX-87H (300 mm \times 7.8 mm; Bio-Rad, Hercules, CA); 柱温为 40 °C, 流动相为 5 mmol/L 稀硫酸; 流速为 0.5 mL/min。

2 结果与分析

2.1 氧化葡萄糖酸杆菌 CRISPRi 系统的创建

为了构建 CRISPRi 系统, 氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 中使用广宿主质粒 pBBR1MCS-5 分别表达了来源于新凶手弗朗西斯菌 (*Francisella*

novicida) 的 Cpf1 蛋白^[21]与产脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 Cas9 蛋白, 并进行氨基酸突变。实验结果发现, 转化 dCpf1 表达质粒的平板能够长出数目较多的转化子, 而转化 dCas9 表达质粒的平板只获得为数不多的转化子, 表明 dCas9 对宿主有较强的毒性 (图 1A)。由此, dCpf1 被用于后续的研究。然后, 以荧

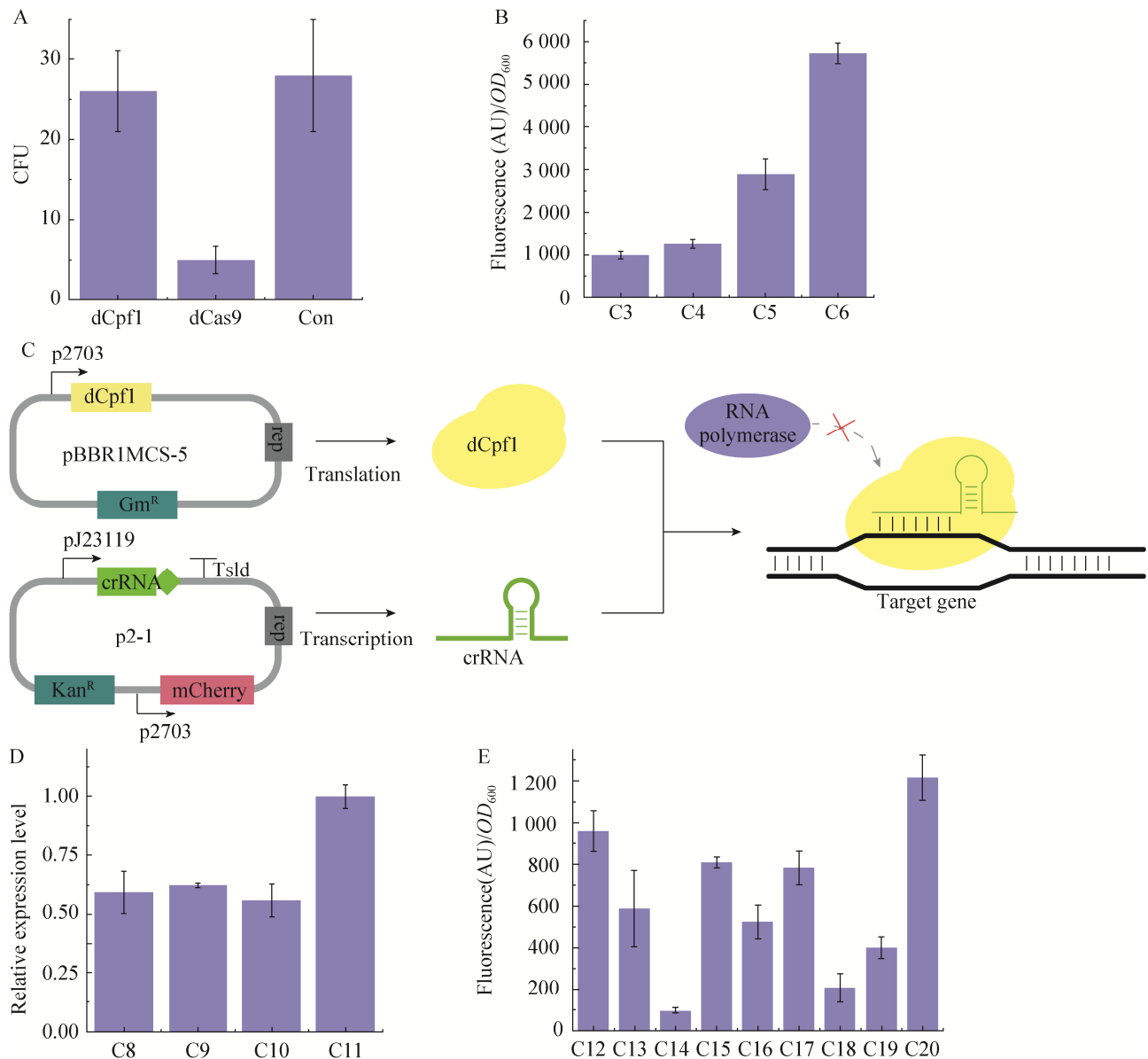


图 1 氧化葡萄糖酸杆菌 CRISPRi 系统的开发

Figure 1 Development of CRISPRi system in *Gluconobacter oxydans*. (A) Toxic between dCpf1 and dCas9. (B) Promoter of dCpf1. (C) Mechanism of dCpf1 and crRNA. (D) Inactivation of different Cpf1 domain influencing on gene repression. (E) Screening of strong promoter.

光蛋白的荧光强度为表征比较了 4 种内源启动子 (p0295、p0365、p2564、p2703) 在氧化葡萄糖杆菌 WSH-003 中的表达强度, 最终选择表达强度最高的 p2703 作为 dCpf1 蛋白的表达启动子 (图 1B), 且使用该启动子表达 dCpf1 蛋白对菌体生长没有较大影响。

为了评价 CRISPRi 系统在氧化葡萄糖杆菌中的抑制效果, 我们构建了一系列表达 dCpf1 与 crRNA 的质粒。成熟的 crRNA 与 dCpf1 结合形成效应复合物靶向基因特定位点, 阻断 RNA 聚合酶的转录, 从而抑制基因转录 (图 1C)。Cpf1 蛋白存在 2 个结构域 RuvC 和 Nuc, 对 917 位和 1 006 位氨基酸的突变均能造成 Cpf1 蛋白的失活^[18]。设计构建质粒 pBBR1MCS-5-p2703-dCpf1(D917A)、pBBR1MCS-5-p2703-dCpf1(E1006A) 和双位点突变的 pBBR1MCS-5-p2703-dCpf1, 通过与质粒 p2-1-p2703-mCherry-S7N 共同转化氧化葡萄糖杆菌, 对 *mCherry* 荧光蛋白基因 S7N 位点的抑制进行测试。在全部 Cpf1 蛋白突变体中, 双位点同时突变的 dCpf1(D917A, E1006A) 蛋白对 *mCherry* 的抑制效果最强, 菌株 C10 相对荧光强度为 53% (图 1D)。

为了构建打靶特定位点转录抑制质粒的 crRNA 表达框, 实验对 crRNA 的转录水平进行

了优化。通过对基因组进行分析, 选择来自氧化葡萄糖杆菌 WSH-003 的内源 RNA 启动子与核糖体结合序列 (RBS) 表达荧光蛋白的方法, 测定内源 RNA 启动子的表达强度, 实验还使用来源于大肠杆菌 CRISPR 表达系统的人工合成启动子 pJ23119^[22] 表达荧光蛋白。如图 1E 所示, 启动子 pJ23119 在氧化葡萄糖杆菌中可以引导基因的表达, 且相对于内源启动子, 转化质粒 p2-1-pJ23119-mCherry 的菌株 C20 表现出更强的荧光, 这表明 pJ23119 启动子表达强度高于本研究选择的内源 RNA 启动子。研究表明, 增加 crRNA 重复序列可有效提高基因编辑效率^[23]。为了探索在 CRISPRi 系统中, crRNA 长度的增长是否对抑制效果有影响, 我们设计了 3 种不同长度的 crRNA 序列 (19 nt、23 nt 和 36 nt^[20]) (图 2A), 成功构建含有不同长度 crRNA 的基因抑制质粒 p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N、p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N-23、p2-1-p2703-mCherry-pJ23119-S7N-36, 这些质粒转录出的 crRNA 均靶向 *mCherry* 荧光蛋白 S7N 靶点, 转化氧化葡萄糖杆菌后得到菌株 C10、C21、C22。如图 2B 所示, 3 种不同长度的 crRNA 固定重复序列对荧光蛋白的抑制强度差别较小, 即 crRNA 固定部分长度对于 CRISPRi 系统的抑制

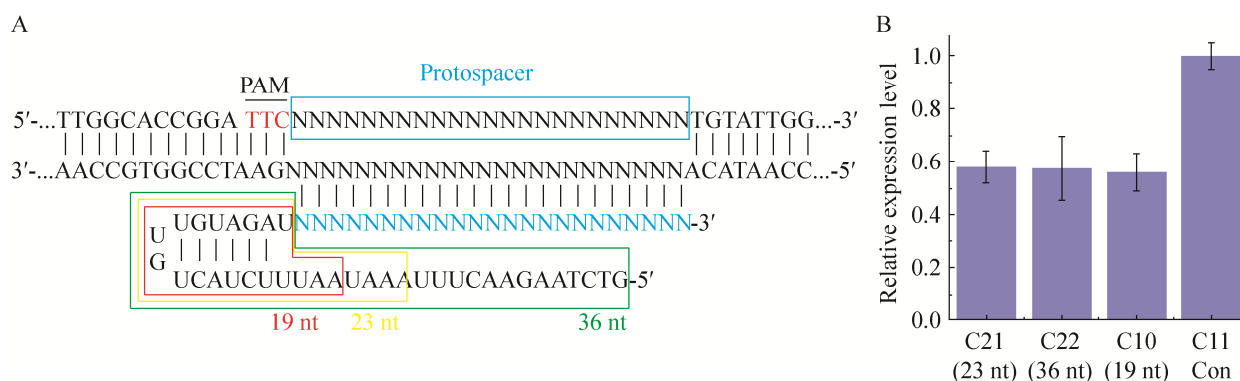


图 2 CRISPRi 系统 crRNA 长度对基因抑制的影响

Figure 2 Influence of crRNA length in CRISPRi system. (A) Different length of crRNA. (B) Different length influencing on gene repression.

作用影响不大。当固定长度为 19 nt 时表现出稍强的抑制效果,但更长的 crRNA 没有较大程度地增强抑制效果,因此后续实验选择 19 nt 的固定重复序列构建 crRNA 表达框。

2.2 氧化葡萄糖酸杆菌 CRISPRi 系统对单一位点的抑制效果

为了探究 CRISPRi 系统对单一位点的抑制作用,在荧光蛋白基因 *mCherry* 及其启动子区域 DNA 序列上,设计不同的结合靶点构建 crRNA 基因抑制质粒评估抑制效果。由于 CRISPRi 在不同位点会表现出不同的抑制效果,且在同一位点具有链偏好性^[24],因此实验设计了如图 3A 所示的针对靶基因和启动子区不同位点的 crRNA,构建 p2-1-p2703-*mCherry*-pJ23119-S 系列基因抑制质粒转化氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003。crRNA 在基因不同位点表现出极大差异的抑制效果,相对荧光表达水平在 17.5%–99%之间。在启动子区域,不同靶位点

对荧光蛋白的抑制并不相同,距离转录起始位点 TSS 较近的 S5 位点的抑制效果较强,可能是由于 crRNA 将 dCpf1 蛋白引导至 TSS 位点附近,阻断了 RNA 聚合酶的结合,影响了基因转录,因此菌株 C27 的相对荧光强度约为 17.5%。对于靶向距离 TSS 最远的 S1 位点,菌株 C23 的荧光强度几乎没有降低,crRNA 靶向 S2、S3、S4 位点均表现出不同的抑制效果(图 3B)。

在 *mCherry* 红色荧光蛋白基因编码区选择的 crRNA 位点,距离起始密码子越近的靶位点具有更强的抑制效果。结果如图 3C 所示,dCpf1 结合在编码链上的 S6、S7、S8 和 S9 位点均有不同程度的抑制作用,荧光蛋白的相对表达水平分别为对照的 18%、28%、69%和 90%。为了验证 CRISPRi 系统的链偏好性,选择对应于 S6、S7 位点的非编码链 S6N、S7N 位点为研究对象,结果显示相对于 S6、S7 位点均有较弱的抑制效果(图 3D)。

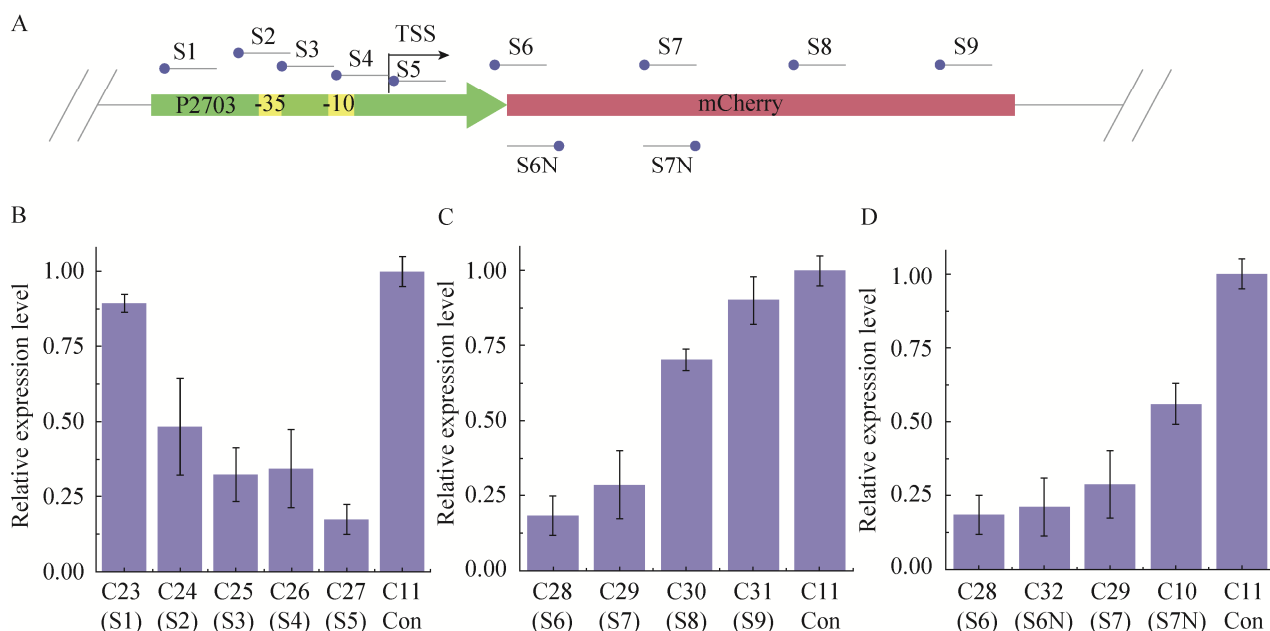


图 3 氧化葡萄糖酸杆菌 CRISPRi 系统介导的单一位点的抑制

Figure 3 CRISPRi-directed single gene repression in *Gluconobacter oxydans*. (A) Chosen of repression target. (B) Different repression in promoter. (C) Different repression in coding gene. (D) Different repression in different template.

2.3 氧化葡萄糖酸杆菌 CRISPRi 系统对多基因的抑制效果

为了探究 CRISPRi 系统对多个位点的同时抑制效果, 构建多基因抑制质粒 p2-1-p2564-mCherry-p3022-EGFP-p2703-CFP-pJ23119-Sm-Se-Sc (图 4A) 同时表达 3 个光谱分离的荧光蛋白和 3 个对应的 crRNA。如图 4B 所示, 与对照相比, 3 种荧光蛋白的表达均受到不同程度的抑制, 相对荧光强度全部低于 30%, 表明 CRISPRi 系统在氧化葡萄糖酸杆菌中的有效性。共激光扫描聚焦显微镜图像 (图 4C) 可见直观

的荧光强度差异, 基因抑制菌株 C33 相对于对照菌株 C34 表现出较弱的荧光。这些结果证实了 CRISPRi 系统在氧化葡萄糖酸杆菌中对于单一位点和多基因的同时抑制均有良好的表现, 可进一步应用于体内复杂代谢网络的调控。

2.4 CRISPRi 系统对山梨醇脱氢酶和呼吸链中关键酶的抑制效果

氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 中可将 D-山梨醇转化为 L-山梨糖, 该反应发生的场所位于胞内及周质空间^[25], 其细胞膜上的山梨醇脱氢酶 (sorbitol dehydrogenase, SLDH) 偶联呼吸链

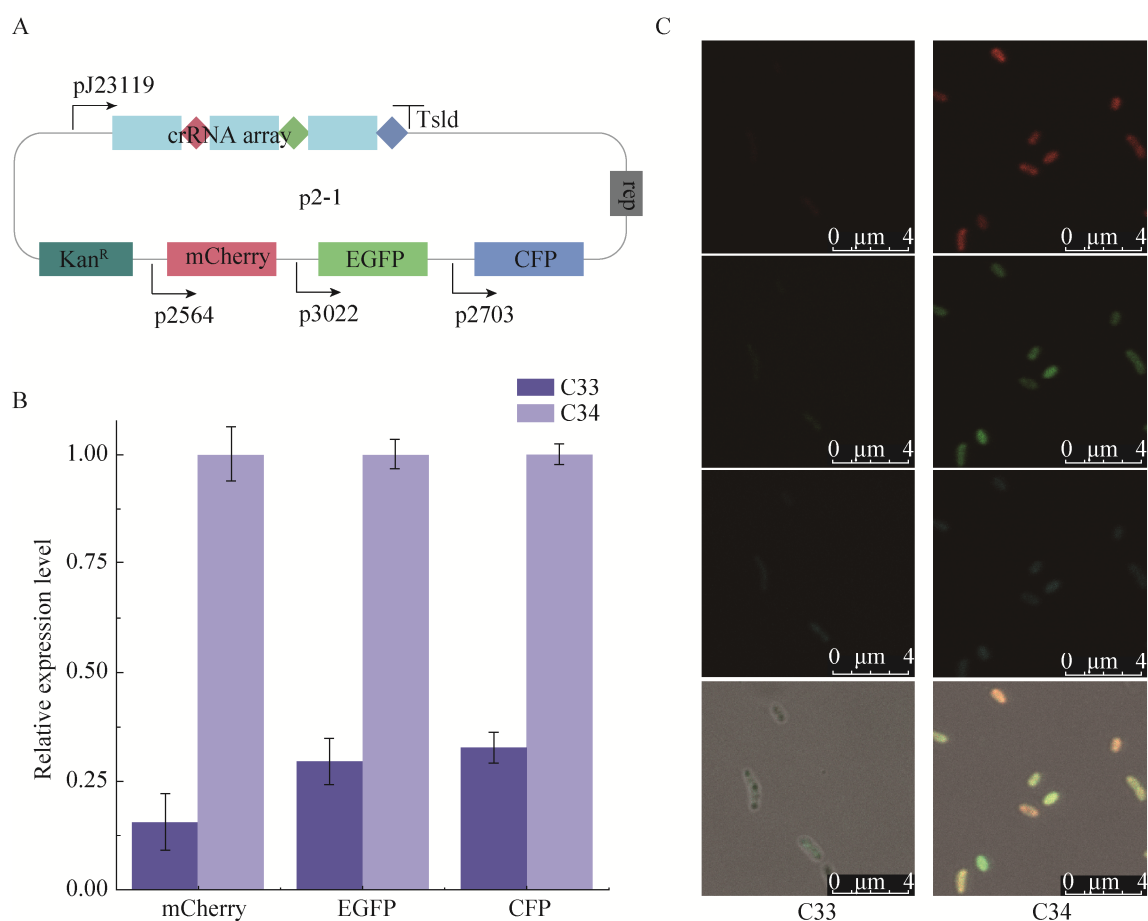


图 4 氧化葡萄糖酸杆菌 CRISPRi 系统介导的多基因抑制

Figure 4 CRISPRi-directed multiplex gene repression in *Gluconobacter oxydans*. (A) Plasmid used in CRISPRi-directed multiplex gene repression. (B) Different repression towards different protein. (C) Fluorescence of repression strain C33.

为细胞提供能量^[26]。由于氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 基因组中存在 3 个山梨醇脱氢酶 *sldBA1*、*sldBA2*、*sldSLC*，因此为了探究在发酵生产 L-山梨糖过程中的关键脱氢酶，同时避免由于选择的 crRNA 位点打靶启动子而造成的对基因组上临近基因的抑制情况发生，我们选择了 3 个山梨醇脱氢酶编码基因的 5'端，对 3 个脱氢酶分别设计 3 个不同的 crRNA 打靶位点。如图 5A 所示，3 个基因的转录水平均受到了不同程度的抑制，由于菌株 C35、C38 和 C41 的 crRNA 抑制位点选择更靠近起始密码子，因此 3 个山梨醇脱氢酶 *sldBA1*、*sldBA2* 和 *sldSLC* 的相对表达量更低。对 9 个位点的单独抑制虽

然具有不同的抑制效果，但菌株生长并未受到较大的影响，发酵 48 h 的 L-山梨糖产量与对照菌株相比无明显降低 (图 5B)。这可能是因为，D-山梨醇转化为 L-山梨糖的过程是受到多个山梨醇脱氢酶的共同作用。因此我们对 3 个山梨醇脱氢酶基因进行同时抑制，多基因抑制菌株 C44 的 3 个山梨醇脱氢酶 *sldBA1*、*sldBA2* 和 *sldSLC* 的相对表达水平均明显低于对照菌株 (图 5C)。菌株 C44 的生长情况与对照菌株差异不大 (图 5D)，而 L-山梨糖的产量有明显降低 (图 5E)。我们推测，氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 以 D-山梨醇为底物发酵产 L-山梨糖的过程可能受到了多个脱氢酶的共同影响。

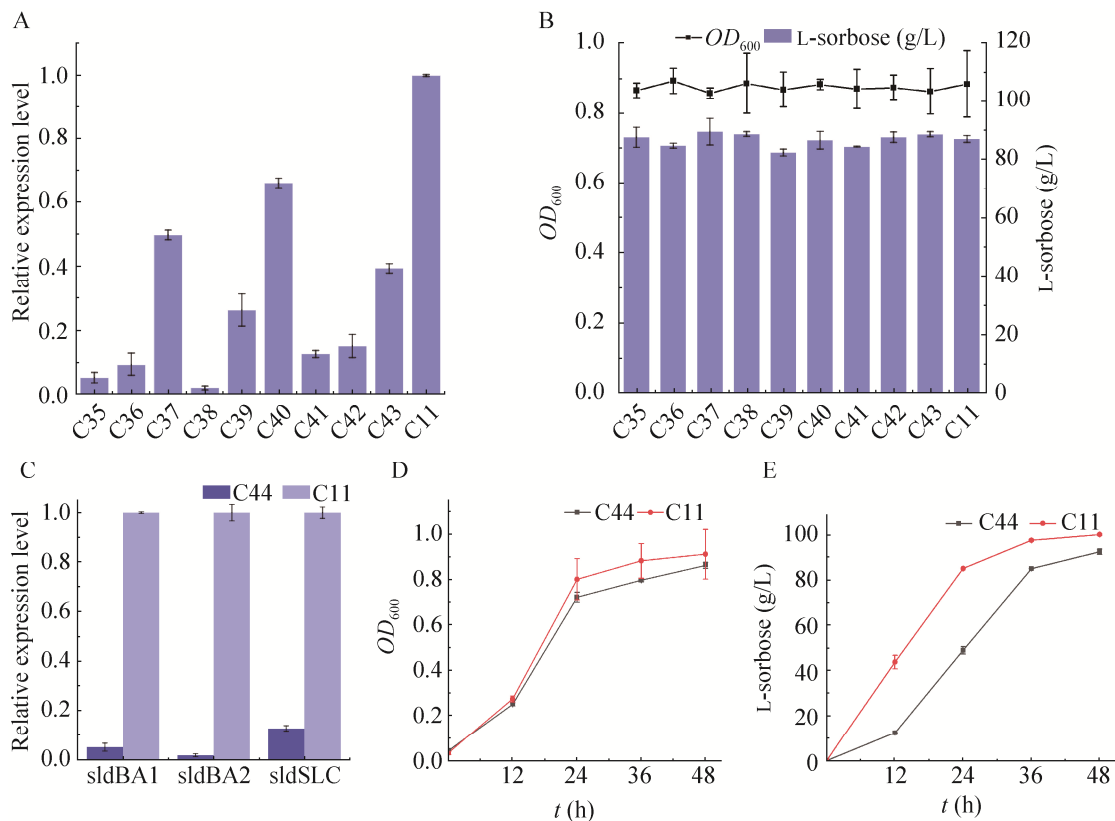


图 5 CRISPRi 系统应用于山梨醇脱氢酶的抑制

Figure 5 Application of CRISPRi system in repressing sorbitol dehydrogenase. (A) Single gene repression on *sldBA1*, *sldBA2*, *sldSLC*. All the three genes expression level in strain C11 had been measured as control. (B) OD_{600} and yield of L-sorbose in repression strain. (C) Multiplex gene repression on *sldBA1*, *sldBA2* and *sldSLC*. (D) Growth of multiplex gene repression strain. (E) Yield of L-sorbose in multiplex gene repression strains.

研究表明, 氧化葡萄糖酸杆菌 IFO 12528 中的细胞色素 bo_3 泛醌氧化酶属于血红素-铜氧化还原酶超家族^[27], 可催化电子从泛醌转移到氧分子。细胞色素 bd 氧化酶作为氰化物不敏感氧化酶^[28], 可在周质空间中通过氧化泛醌为质子传递提供动力, 而不能主动传递质子^[29]。基因组测序结果表明, 氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 基因组上存在 *cydAB* 和 *cyoBACD* 两个基因(图 6A), 分别编码细胞色素 bo_3 氧化酶和细胞色素 bd 氧化酶^[29]。因此, 分别构建针对 *cyoBACD* 和 *cydAB* 的转录抑制菌株 C45 和 C46。荧光定量 PCR 结果表明, 细胞色素 bo_3 氧化酶和细胞色素 bd 氧化酶表达量分别降低至 2% 和 5% (图 6B)。实验结果发现, 相较于对照菌株 C11, 基因抑制菌株 C45 的生长表现出明显的抑制现象(图 6C), 导致其对底物 D-山梨醇的氧化速率变低(图 6D)。此结果表明, 细胞色素 bo_3 氧化酶

对氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 菌株的生长具有重要的作用。同时, 对编码细胞色素 bd 氧化酶基因 *cydAB* 的抑制对菌体生长及产糖速率的影响较小。因此, 细胞色素 bo_3 氧化酶可能作为氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 呼吸链中的限速因素, 对菌体生长有重要作用。

3 讨论

氧化葡萄糖酸杆菌广泛应用于食品、药品的工业生产, 具有良好的工业应用前景^[30], 因此构建高效的基因转录抑制系统有助于研究人员对氧化葡萄糖酸杆菌进行更深入地探索, 对于代谢工程的研究具有重要意义。在本研究中, 通过对来自新凶手弗朗西斯菌的 Cpf1 蛋白进行氨基酸突变及启动子优化, 同时对 crRNA 的结构和表达量进行优化, 构建了适用于氧化葡萄糖酸杆菌的 CRISPR 转录抑制系统。对 *mCherry*

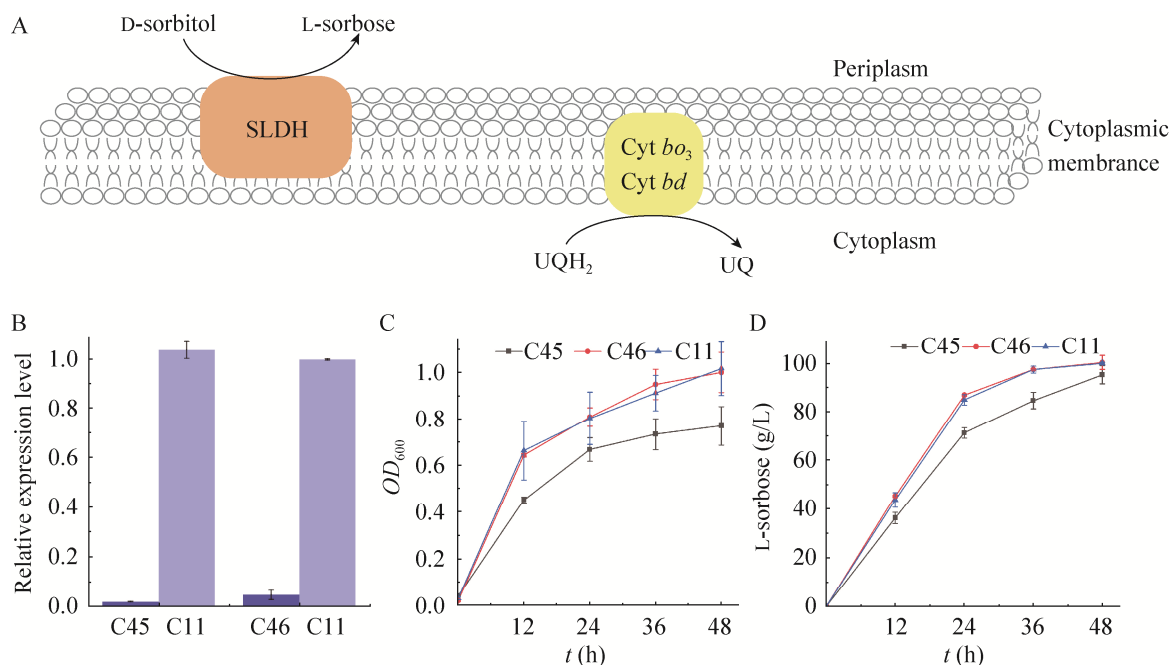


图 6 CRISPRi 系统应用于呼吸链重要氧化酶的抑制

Figure 6 Application of CRISPRi system in respiratory chain for repressing vital oxidase. (A) Schematic of respiratory chain in *Gluconobacter oxydans*. (B) Single gene repression on bo_3 and bd . (C) Growth of repression strain. (D) Yield of L-sorbose in repression strain.

荧光蛋白编码基因及启动子区选择不同靶位点进行抑制,证实了 CRISPRi 系统的位置偏好性和链偏好性,其相对荧光蛋白表达水平最大程度降低至 17%,同时对 *mCherry*、*EGFP* 和 *CFP* 三种荧光蛋白基因的抑制,表明该系统也具有多基因的抑制能力。

氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 可将 D-山梨醇转化为 L-山梨糖^[31],该过程可能受到 3 个膜结合的山梨醇脱氢酶 *sldBA1*、*sldBA2* 和 *sldSLC* 的影响。单一山梨醇脱氢酶的抑制对 L-山梨糖产量没有影响,而 3 个脱氢酶的同时抑制可使底物转化速率大幅度降低,表明 D-山梨醇转化为 L-山梨糖需要多个山梨醇脱氢酶的作用。细胞色素 *bo₃* 氧化酶是氧化葡萄糖酸杆菌呼吸链中的关键酶,可促进 PQQ 的再生,利用 CRISPRi 系统对其编码基因 *cyoBACD* 进行抑制,细胞色素 *bo₃* 氧化酶的表达量可降低至野生型的 2%,使抑制菌株的生长速率明显降低,但抑制细胞色素 *bd* 氧化酶 *cydAB* 基因的表达对菌株生长影响较小。

CRISPRi 系统作为简单高效的基因调控工具,现已广泛应用于多种微生物的代谢工程改造中^[32]。本研究在氧化葡萄糖酸杆菌中构建了 CRISPRi 系统,对基因转录进行抑制。通过荧光蛋白测试了该系统的抑制效果,并应用于代谢网络的调控,为氧化葡萄糖酸杆菌体内复杂脱氢酶系的研究提供简单高效的基因操作方法。然而氧化葡萄糖酸杆菌基因操作工具依然稀缺,为促进代谢工程的改造,进一步开发适用于氧化葡萄糖酸杆菌的基因组编辑工具具有重要的意义。

REFERENCES

- [1] De Muynck C, Pereira CS, Naessens M, et al. The genus *Gluconobacter oxydans*: comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2007, 27(3): 147-171.
- [2] De Roos J, De Vuyst L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 49: 115-119.
- [3] Zhou XL, Shen Y, Xu Y, et al. Directing cell catalysis of glucose to 2-keto-D-gluconic acid using *Gluconobacter oxydans* NL71. *Process Biochem*, 2020, 94: 365-369.
- [4] Fang J, Wan H, Zeng W, et al. Transcriptome analysis of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 exposed to elevated 2-keto-L-gulononic acid reveals the responses to osmotic and oxidative stress. *Appl Biochem Biotechnol*, 2021, 193(1): 128-141.
- [5] Hekmat D, Bauer R, Fricke J. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2003, 26(2): 109-116.
- [6] Wang P, Zeng W, Xu S, et al. Current challenges facing one-step production of L-ascorbic acid. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(7): 1882-1899.
- [7] Ge X, Zhao Y, Hou W, et al. Complete genome sequence of the industrial strain *Gluconobacter oxydans* H24. *Genome Announc*, 2013, 1(1): 3-13.
- [8] Gupta A, Singh VK, Qazi GN, et al. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, 3(3): 445-456.
- [9] 王雪, 黄建忠, 李力. 基因敲除技术在微生物中的应用. *微生物学杂志*, 2019, 39(4): 100-106.
Wang X, Huang JZ, Li L. Advances in gene knockout techniques in microbiology. *J Microbiol*, 2019, 39(4): 100-106 (in Chinese).
- [10] Kostner D, Peters B, Mientus M, et al. Importance of *codB* for new *codA*-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(18): 8341-8349.
- [11] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1077.
- [12] Ji X, Zhao H, Zhu H, et al. CRISPRi/dCpfI-mediated dynamic metabolic switch to enhance butenoic acid production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(12): 5385-5393.
- [13] Li M, Chen J, Wang Y, et al. Efficient multiplex gene repression by CRISPR-dCpfI in *Corynebacterium*

- glutamicum*. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 357.
- [14] Cámara E, Lenitz I, Nygård Y. A CRISPR activation and interference toolkit for industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain KE6-12. Sci Rep, 2020, 10(1): 14605.
- [15] 杨明辉, 陶景丽, 柴孟龙, 等. 基于 CRISPR 系统基因编辑与基因调控技术的发展. 农业生物技术学报, 2018, 26(2): 183-193.
Yang MH, Tao JL, Chai ML, et al. Development of genome editing and gene regulation using CRISPR system. J Agric Biotechnol, 2018, 26(2): 183-193 (in Chinese).
- [16] Fagerlund RD, Staals RH, Fineran PC. The Cpf1 CRISPR-Cas protein expands genome-editing tools. Genome Biol, 2015, 16: 251.
- [17] 郭婷, 安新民. 多重基因组编辑中 CRISPR-Cas9 系统和 CRISPR-Cpf1 系统的应用和比较. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(11): 2234-2244.
Guo T, An XM. Application and comparison of CRISPR-Cas9 system and CRISPR-Cpf1 system in multigenome editing. Chin J Cell Biol, 2019, 41(11): 2234-2244 (in Chinese).
- [18] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell, 2015, 163(3): 759-771.
- [19] Zheng Y, Su TY, Qi QS. Microbial CRISPRi and CRISPRa systems for metabolic engineering. Biotechnol Bioprocess Eng, 2019, 24(4): 579-591.
- [20] Choi SY, Woo HM. CRISPRi-dCas12a: a dCas12a-mediated CRISPR interference for repression of multiple genes and metabolic engineering in cyanobacteria. ACS Synth Biol, 2020, 9(9): 2351-2361.
- [21] Alcon P, Montoya G, Stella S. Assembly of Francisella novicida Cpf1 endonuclease in complex with guide RNA and target DNA. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2017, 73: 409-415.
- [22] Jiang Y, Chen B, Duan C, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [23] Park HM, Liu H, Wu J, et al. Extension of the crRNA enhances Cpf1 gene editing *in vitro* and *in vivo*. Nat Commun, 2018, 9(1): 3313.
- [24] Rath D, Amlinger L, Hoekzema M, et al. Efficient programmable gene silencing by cascade. Nucleic Acids Res, 2015, 43(1): 237-246.
- [25] Wang EX, Liu Y, Ma Q, et al. Synthetic cell-cell communication in a three-species consortium for one-step vitamin C fermentation. Biotechnol Lett, 2019, 41(8/9): 951-961.
- [26] Chen Y, Liu L, Shan X, et al. High-throughput screening of a 2-keto-L-gulononic acid-producing *Gluconobacter oxydans* strain based on related dehydrogenases. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7: 385.
- [27] Matsushita K, Patel L, Kaback HR. Purification and reconstitution of the cytochrome o-type oxidase from *Escherichia coli*. Methods Enzymol, 1986, 126: 113-122.
- [28] Mogi T, Ano Y, Nakatsuka T, et al. Biochemical and spectroscopic properties of cyanide-insensitive quinol oxidase from *Gluconobacter oxydans*. J Biochem, 2009, 146(2): 263-271.
- [29] Richhardt J, Luchterhand B, Bringer S, et al. Evidence for a key role of cytochrome bo3 oxidase in respiratory energy metabolism of *Gluconobacter oxydans*. J Bacteriol, 2013, 195(18): 4210-4220.
- [30] Gao LL, Hu YD, Liu J, et al. Stepwise metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* WSH-003 for the direct production of 2-keto-L-gulononic acid from D-sorbitol. Metab Eng, 2014, 24: 30-37.
- [31] Ke X, Pan-Hong Y, Hu ZC, et al. Synergistic improvement of PQQ-dependent D-sorbitol dehydrogenase activity from *Gluconobacter oxydans* for the biosynthesis of miglitol precursor 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -L-sorbofuranose. J Biotechnol, 2019, 300: 55-62.
- [32] 钟成, 黄龙辉, 刘其敬, 等. CRISPR/dCas9 在细菌转录调控中的应用及展望. 天津科技大学学报, 2019, 34(2): 1-5, 11.
Zhong C, Huang LH, Liu QJ, et al. Application prospect of CRISPR/dCas9 in bacterial transcriptional regulation. J Tianjin Univ Sci Technol, 2019, 34(2): 1-5, 11 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)