

URA3 基因影响青蒿酸酿酒酵母工程菌中试发酵产量

郭未蔚¹, 艾丽梅¹, 胡栋², 陈亚军², 耿梦馨¹, 郑玲辉², 白利平¹

- 1 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所 卫健委抗生素生物工程重点实验室/中国医学科学院药物合成生物学重点实验室, 北京 100050
- 2 浙江海正药业股份有限公司 浙江抗菌药物重点实验室, 浙江 台州 318000

郭未蔚, 艾丽梅, 胡栋, 陈亚军, 耿梦馨, 郑玲辉, 白利平. *URA3* 基因影响青蒿酸酿酒酵母工程菌中试发酵产量. 生物工程学报, 2022, 38(2): 737-748.

GUO WW, AI LM, HU D, CHEN YJ, GENG MX, ZHENG LH, BAI LP. *URA3* affects artemisinic acid production by an engineered *Saccharomyces cerevisiae* in pilot-scale fermentation. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 737-748.

摘要: CRISPR/Cas9 基因编辑技术已经被广泛应用于工程酿酒酵母的基因插入、基因替换和基因敲除, 通过使用选择标记进行基因编辑具有简单高效的特点。前期利用 CRISPR/Cas9 系统敲除青蒿酸生产菌株酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 1211 半乳糖代谢负调控基因 *GAL80*, 获得菌株 *S. cerevisiae* 1211-2, 在不添加半乳糖诱导的情况下, 青蒿酸摇瓶发酵产量达到了 740 mg/L。但在 50 L 中试发酵实验中, *S. cerevisiae* 1211-2 很难利用对青蒿酸积累起到决定性作用的碳源-乙醇, 青蒿酸的产量仅为亲本菌株 *S. cerevisiae* 1211 的 20%–25%。我们推测因遗传操作所需的筛选标记 *URA3* 突变, 影响了其生长及青蒿酸产量。随后我们使用重组质粒 pML104-KanMx4-u 连同 90 bp 供体 DNA 成功恢复了 *URA3* 基因, 获得了工程菌株 *S. cerevisiae* 1211-3。*S. cerevisiae* 1211-3 能够在葡萄糖和乙醇分批补料的发酵罐中正常生长, 其青蒿酸产量超过 20 g/L, 与亲本菌株产量相当。研究不但获得了不加半乳糖诱导的青蒿酸生产菌株, 同时首次发现了营养缺陷型标记 *URA3* 基因显著影响乙醇补料的中试发酵中青蒿酸的产生, 也为酵母作为底盘来进行其他天然产物的生产提供了借鉴。

关键词: 工程酿酒酵母; 青蒿酸; CRISPR/Cas9; *URA3*

Received: April 16, 2021; **Accepted:** June 11, 2021; **Published online:** June 23, 2021

Supported by: National Science and Technology Major Project (2017ZX09101002-003-003); National Natural Science Foundation of China (31870059)

Corresponding authors: ZHENG Linghui. Tel: +86-576-88827906; E-mail: zlhferm@163.com
BAI Liping. Tel: +86-10-63013336; E-mail: lipingbai1973@163.com

基金项目: 国家科技重大专项 (2017ZX09101002-003-003); 国家自然科学基金 (31870059)

URA3 affects artemisinin acid production by an engineered *Saccharomyces cerevisiae* in pilot-scale fermentation

GUO Weiwei¹, AI Limei¹, HU Dong², CHEN Yajun², GENG Mengxin¹, ZHENG Linghui², BAI Liping¹

¹ NHC Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, CAMS Key Laboratory of Synthetic Biology for Drug Innovation, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

² Zhejiang Key Laboratory of Antifungal Drugs, Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd., Taizhou 318000, Zhejiang, China

Abstract: CRISPR/Cas9 has been widely used in engineering *Saccharomyces cerevisiae* for gene insertion, replacement and deletion due to its simplicity and high efficiency. The selectable markers of CRISPR/Cas9 systems are particularly useful for genome editing and Cas9-plasmids removing in yeast. In our previous research, *GAL80* gene has been deleted by the plasmid pML104-mediated CRISPR/Cas9 system in an engineered yeast, in order to eliminate the requirement of galactose supplementation for induction. The maximum artemisinin acid production by engineered *S. cerevisiae* 1211-2 (740 mg/L) was comparable to that of the parental strain 1211 without galactose induction. Unfortunately, *S. cerevisiae* 1211-2 was inefficient in the utilization of the carbon source ethanol in the subsequent 50 L pilot fermentation experiment. The artemisinin acid yield in the engineered *S. cerevisiae* 1211-2 was only 20%–25% compared with that of *S. cerevisiae* 1211. The mutation of the selection marker *URA3* was supposed to affect the growth and artemisinin acid production. A *ura3* mutant was successfully restored by a recombinant plasmid pML104-KanMx4-u along with a 90 bp donor DNA, resulting in *S. cerevisiae* 1211-3. This mutant could grow normally in a fed-batch fermentor with mixed glucose and ethanol feeding, and the final artemisinin acid yield (>20 g/L) was comparable to that of the parental strain *S. cerevisiae* 1211. In this study, an engineered yeast strain producing artemisinin acid without galactose induction was obtained. More importantly, it was the first report showing that the auxotrophic marker *URA3* significantly affected artemisinin acid production in a pilot-scale fermentation with ethanol feeding, which provides a reference for the production of other natural products in yeast chassis.

Keywords: engineered *Saccharomyces cerevisiae*; artemisinin acid; CRISPR/Cas9; *URA3*

青蒿素是由屠呦呦教授及其团队最早从菊科植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 叶中提取分离的一类传统中药成分, 在全球范围内被广泛应用于疟疾的治疗^[1-2]。2002年, 世界卫生组织就推荐青蒿素联合甲氟喹 (mefloquine) 等药物作为抗疟疾一线药物^[3-4]。目前, 青蒿素的

生产方法主要有3种, 第一种方法是直接从中药黄花蒿中提取分离得到, 然而这一传统方法受气候条件影响较大, 青蒿素产量不稳定; 第二种方法是通过化学全合成, 然而该方法工艺复杂且成本较高, 无法用于工业大规模生产^[5]; 第三种方法是通过微生物发酵获得青蒿素的

直接前体青蒿酸,进一步通过化学合成青蒿素,该方法绿色环保且产量稳定,有望替代传统的植物提取方法^[6-7]。我们前期通过质粒 pML104 介导的 CRISPR/Cas9 系统成功敲除酿酒酵母工程菌 (*Saccharomyces cerevisiae* 1211) 中 *GAL80* 基因,以消除半乳糖诱导,得到改造菌株 *S. cerevisiae* 1211-2。在不加半乳糖诱导的摇瓶培养下,其最大青蒿酸产量可达 740 mg/L,与亲本菌株 *S. cerevisiae* 1211 产量相当。然而在 50 L 中试发酵实验中, *S. cerevisiae* 1211-2 无法有效利用补充碳源乙醇,其青蒿酸产量仅为 *S. cerevisiae* 1211 的 20%–25%。

CRISPR/Cas9 质粒 pML104 携带乳清苷-5'-磷酸脱羧酶基因 *URA3*,可用作选择性标记,前期我们已经通过突变 *URA3* 和敲除 *GAL80* 基因分别获得工程菌 *S. cerevisiae* 1211-1 和 1211-2^[8]。*URA3* 基因位于酵母的 V 染色体上,该酶催化酵母 RNA 嘧啶核苷酸合成中的关键反应。在失活 *URA3* 后,如果培养基中不添加尿苷或尿嘧啶酵母则无法生长^[9]。相反,酵母细胞中 Ura3 蛋白可将 5-氟乳清酸 (5-fluoroorotic acid, 5-FOA) 转化为 5-氟尿嘧啶,后者是毒性物质会引起细胞死亡可作为反选择标记。综上, *URA3* 可同时被用作选择标记和反选择标记,因此已成为酵母基因工程中最重要遗传标记之一^[10-12]。然而 *URA3* 是否影响酵母发酵和次级代谢仍未可知。据报道 *URA3* 可能是酵母最大乙醇积累能力的特殊诱导基因^[13],我们继而推测 *URA3* 突变菌株 *S. cerevisiae* 1211-2 的青蒿酸产量会受到影响。在前期研究基础上本研究通过 CRISPR/Cas9 技术成功回补 *URA3* 从而获得一种改良的工程菌 *S. cerevisiae* 1211-3,并从摇瓶发酵和 50 L 中试发酵 2 个水平对 *S. cerevisiae* 1211 和 *S. cerevisiae* 1211-3 进行发酵,分析不同工程菌株发酵液中青蒿酸的产量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 1211 由浙江海正药业有限公司提供。*S. cerevisiae* 1211-2 ($\Delta gal80, \Delta ura3$) 是本课题组前期构建的尿嘧啶缺陷型菌株^[8]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans5 α 和 Trans110 购自北京全式金生物技术有限公司 (北京,中国), pML104-KanMx4 质粒购自 Addgene 公司 (美国)。

1.1.2 主要试剂和培养基

卡那霉素 (Kan) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司,限制性内切酶 *Swa* I 和 *Bcl* I 购自 New England Biolabs 公司 (美国), YPAD、SD-URA 培养基购自北京酷来搏科技有限公司。

无机盐溶液: 52 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 24.5 g/L K_2SO_4 , 2.9 g/L Na_2SO_4 , 40 g/L KH_2PO_4 , 0.25 g/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 。

维生素溶液: 0.05 g/L 生物素, 1 g/L 泛酸钙, 1 g/L 烟酸, 25 g/L 肌醇, 1 g/L 硫胺, 1 g/L 吡哆醛, 0.2 g/L 对氨基苯甲酸。

微量元素溶液: 5.75 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.325 g/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.475 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.475 g/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 3 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2.75 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 11.75 g/L EDTA。

种子培养基 I: 22 g/L 葡萄糖, 6.7 g/L 酵母氮碱, 5 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 22.4 g/L KH_2PO_4 , 4.2 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 20 mg/L 尿嘧啶 (用于 *S. cerevisiae* 1211-2 发酵)。

种子培养基 II: 15 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 8 g/L KH_2PO_4 , 6.2 g/L $MgSO_4$, 19.5 g/L 葡萄糖, 5.9 g/L 琥珀酸, 添加 12 mL/L 维生素溶液, 10 mL/L 微量元素溶液, 0.004 g/L $Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$, 10.0 g/L 酵

母提取物粉末, 20 mg/L 尿嘧啶 (用于 *S. cerevisiae* 1211-2 发酵)。

摇瓶发酵培养基 (pH 5.0): 75 g/L 蔗糖, 10 g/L 蛋白胨, 2 g/L 谷氨酸钠, 15 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 g/L KH_2PO_4 , 0.72 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11 g/L 琥珀酸钠, 10 g/L 肉豆蔻酸异丙酯 (isopropyl myristate, IPM), 0.02 g/L 尿嘧啶, 0.15 g/L 蛋氨酸, 12 mL/L 维生素溶液, 10 mL/L 微量元素溶液, 10 mL/L 液体石蜡, 5 mL/L 甘油。

10 L 发酵培养基 (pH 5.0): 40 g/L 葡萄糖, 15 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 g/L KH_2PO_4 , 6.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12 mL/L 维生素溶液, 10 mL/L 微量元素溶液, 4 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 5.9 g/L 琥珀酸, 10 g/L 蛋氨酸, 200 mg/L 叶酸钠, 4 g/L 酵母提取粉。

50 L 发酵培养基: 25 g/L 葡萄糖, 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.5 g/L KH_2PO_4 , 6.15 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L IPM, 0.5 g/L 消泡剂, 10 g/L 半乳糖 (用于 *S. cerevisiae* 1211 发酵)。

1.2 摇瓶发酵

挑取单克隆至种子培养基 I 中, 30 °C 振荡孵育 16–24 h。取 5 mL 转移至 50 mL 摇瓶发酵培养基中, 30 °C 振荡孵育 84 h, 其中需分别向 *S. cerevisiae* 1211 和 *S. cerevisiae* 1211-2 的培养基中添加半乳糖和尿嘧啶。HPLC-DAD 测定不同菌株发酵液中青蒿酸的含量。

1.3 50 L 中试发酵

将 1 mL 甘油储备液接种到 2 瓶 50 mL 种子培养基中于 30 °C 孵育 24 h。将获得的 100 mL 发酵液添加到已蒸汽灭菌的 10 L 发酵培养基中于 30 °C 孵育, 至发酵液 OD_{600} 达到约 10.0。将得到的发酵液以 5% 接种量转移到 50 L 无菌发酵培养基中, 30 °C 连续培养 84 h。期间将灭菌

的盐溶液 2 L、200 mL 维生素溶液和 200 mL 微量金属溶液混合, 在发酵 16 h 时添加 0.4 L, 40 h 时添加 0.75 L, 64 h 时补充剩余 0.75 L; 在发酵过程中, 需要连续监测发酵液中乙醇和葡萄糖的浓度, 以将其浓度控制在 2 g/L 以下, 在发酵第 12–15 h 后, 开始流加 60% 葡萄糖溶液 (50 mL/h), 发酵 24 h 后, 将流速提高至 100 mL/h, 发酵至 44–48 h 后, 葡萄糖流速降至 50 mL/h; 在发酵 18 h 后, 开始以 30 mL/h 的速度流加无水乙醇, 之后根据发酵液中乙醇的浓度范围, 每 3 h 流速增加 10 mL/h, 直到乙醇进料速度增加至 120 mL/h, 至发酵结束^[7]。发酵过程中每 12 h 取 50 mL 发酵液样品, 以检测葡萄糖、乙醇和青蒿酸的浓度以及发酵液的 OD_{600} 。

1.4 引物合成

根据 *S. cerevisiae* 1211 中 *URA3* 的 cDNA 序列设计识别其 PAM 位点的 sgRNA oligo (表 1)。序列片段和引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表 2)。

1.5 *S. cerevisiae* 1211-3 工程菌的构建

1.5.1 pML104-KanMx4-u 质粒的构建

质粒的提取、酶切、连接、转化、凝胶电泳、基因的诱导表达等实验操作均按照《分子克隆实验指南》^[14]进行。DNA 胶回收按照胶回收试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 说明书进行。将包含预测 sgRNA 的两条引物 Oligo u-1a 和 Oligo u-1b 直接退火连接到 *Swa* I 和 *Bcl* I 酶切后的 pML104-KanMx4 质粒的大片段上, 构建带有 *URA3*-sgRNA 的重组质粒 pML104-KanMx4-u。将重组质粒转化到大肠杆菌 Trans5 α 中, 提取质粒并使用 Fc 和 Rc 引物进行 PCR 验证和测序确证。90 bp 的单链核苷酸修复供体片段由华大基因科技服务有限公司合成。

表 1 *URA3* 基因中 sgRNA 的靶点Table 1 The target site for sgRNA in *URA3*

sgRNA and oligonucleotides (5'→3')	<i>URA3</i> sequences
sgRNA matches <i>URA3</i> at position 192 within ORF	> <i>URA3</i> _position_192 ATGTCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGCTGCTACTCATCCTAGTCCTGTTG CTGCCAAGCTATTTAATATCATGCACGAAAAGCAAACAAACTTGTGTGCTT >chrV_116358 CATTGGATGTTCTGACCACCAAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAG GTCCCAAATTTGTTTACTAAAAACACATGTGGATATCTTGACTGATTTTTC gRNA sequence: <u>CTTGACTGATTTTTCCATGGAGG</u> TTTACTCTTCGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTGGTAATACAGTCAAATTTG CAGTACTCTGCGGGTGTATACAGAATAGCAGAATGGGCAGACATTACGAAT GCACACGGTGTGGTGGGCCAGGTATTGTTAGCGGTTTGAAGCAGGCGGC Oligo u-1a: GATCCTTGACTGATTTTTCCATGG GTTTTAGAGCTAG CATGCAAGGGCTCCCTAGCTACTGGAGAATATACTAAGGGTACTGTTGACAT TGCGAAGAGCGACAAAGATTTTGTATCGGCTTTATTGCTCAAAGAGACAT GGGTGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTTGATTATGACACCCGGTGTGGG Oligo u-1b: CTAGCTCTAAAACCCATGGAAAA TCAGTCAAG TTTAGATGACAAGGGAGACGCATTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGGATGA TGTGGTCTCTACAGGATCTGACATTATTATTGTTGGAAGAGGACTATTTGCA AAGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACGTTACAGAAAAGCAGGCT GGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAACCTAA

PAM sequence is indicated as bold text and sgRNA sequence is shown as the underlined text.

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Primers used in this study

Names	Oligonucleotides (5'→3')	Purposes
Oligo u-1a	GATCCTTGACTGATTTTTCCATGGGTTTTAGAGCTAG	For the construction of sgRNA plasmid for the disruption of <i>URA3</i>
Oligo u-1b	CTAGCTCTAAAACCCATGGAAAAATCAGTCAAG	
Fc	TCAAGTTGATAACGGACTAGCC	For confirmation of <i>URA3</i> sgRNA sequences insertion into pML104-KanMx4
Rc	TCAAACGCTGTAGAAGTAAAAG	
U3-F	GTCGACATGTCGAAAGCTACATATAAGGA	For the sequencing of <i>URA3</i>
U3-R	TCTAGATTAGTTTTGCTGGCCGCATC	

1.5.2 转化和筛选

使用 EX-酵母转化试剂盒 (北京庄盟国际生物基因科技有限公司), 通过标准醋酸锂法^[15-16]将构建的质粒 pML104-KanMx4-u 和 90 bp 的供体 DNA 共同转化到 100 μ L *S. cerevisiae* 1211-2 中, 在 SD-URA 培养基上进行筛选, 通过 PCR 和测序进一步验证。使用酵母基因组 DNA 提取试剂盒 (北京庄盟国际生物基因科技有限公司) 提取阳性克隆的基因组, 用 U3-F/R 引物进行 PCR 检测并测序。

1.6 HPLC 定量方法

将 1 mL 发酵液加入 4 mL 含 0.1% 甲酸的甲醇中, 连续振荡超声 20 min 后, 涡旋混匀, 10 000 \times g 离心 5 min, 取上清液用 0.45 μ m 滤膜过滤, 10 μ L 滤液上样进行 HPLC 检测。HPLC 分析条件: LC-20A HPLC 仪 (Shimadzu 公司); 色谱柱: Agilent SB-C18 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 95% (V/V) 乙腈/水 (B) 和 0.03% 磷酸的水/乙腈 (1:2, V/V) (A); 梯度洗脱: 0–6 min 35% B, 6–7 min 35%–95% B, 7–9 min

95% B; 流速 1.5 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 212 nm。使用 SHIMADZU LCsolution 修订版 1.24 SP1 软件处理数据。

2 结果与分析

2.1 亲本 *S. cerevisiae* 1211 和工程菌 *S. cerevisiae* 1211-2 的中试发酵

我们前期对 *S. cerevisiae* 1211 和 *S. cerevisiae* 1211-2 ($\Delta gal80\Delta ura3$) 进行摇瓶发酵^[8], 其中 *S. cerevisiae* 1211 需要在培养基中添加半乳糖诱导, 结果两者的青蒿酸产量无显著差异。在此基础上, 我们试着将 2 株菌进行 50 L 工业中试发酵, 以进一步验证 *S. cerevisiae* 1211-2 的青蒿酸产量。结果出人意料, *S. cerevisiae* 1211-2 生长缓慢, 96 h 青蒿酸产量仅为 *S. cerevisiae* 1211 的 20%–25% (图 1)。在发酵过程中发现, 亲本菌株 *S. cerevisiae* 1211 能够有效利用发酵罐中分批补料的乙醇, *S. cerevisiae* 1211-2 则未然, 推测 *URA3* 基因突变导致该菌株乙醇利用减弱。

由于 *URA3* 基因是酵母基因工程中最常见的选择标记, 最初在敲除 *S. cerevisiae* 1211

GAL80 的过程中, 需要首先失活 *URA3*。而发酵罐发酵和摇瓶发酵相比最大的区别在于发酵过程中需要分批补料, 乙醇作为青蒿酸积累中的碳源其补料尤其重要。Pais 等^[13]报道 *URA3* 基因与菌株的乙醇耐受性有关, *URA3* 营养缺陷型菌株的最大乙醇积累减少, 进一步提示 *S. cerevisiae* 1211-2 发酵过程中的乙醇利用受限和青蒿酸产量降低可能与 *URA3* 失活相关。

2.2 *URA3* 基因回补

前期我们用 5-FOA 筛选出 *URA3* 基因突变菌株, 进而构建 *GAL80* 敲除菌株 *S. cerevisiae* 1211-2。为了确定 *S. cerevisiae* 1211-2 基因组中 *URA3* 基因的特异性变异, 使用 U3-F/U3-R 为引物扩增 *URA3* 基因片段并进行测序, 结果如图 2 所示, 在 *URA3* 的 CDS 区插入了 2 个鸟嘌呤碱基。为恢复 *S. cerevisiae* 1211-2 的 *URA3* 基因功能, 首先构建插入靶向 *URA3* 的 sgRNA 的 CRISPR/Cas9 质粒 pML104-KanMx4-u, 转化后获得 10 个阳性克隆, 通过菌落 PCR 使用 Fc 和 Rc 引物确认 sgRNA 是否成功插入。如图 3 所示, 阳性克隆的扩增子为 150 bp, 阴性克隆为 132 bp, 测序结果也显示阳性率为 100%。

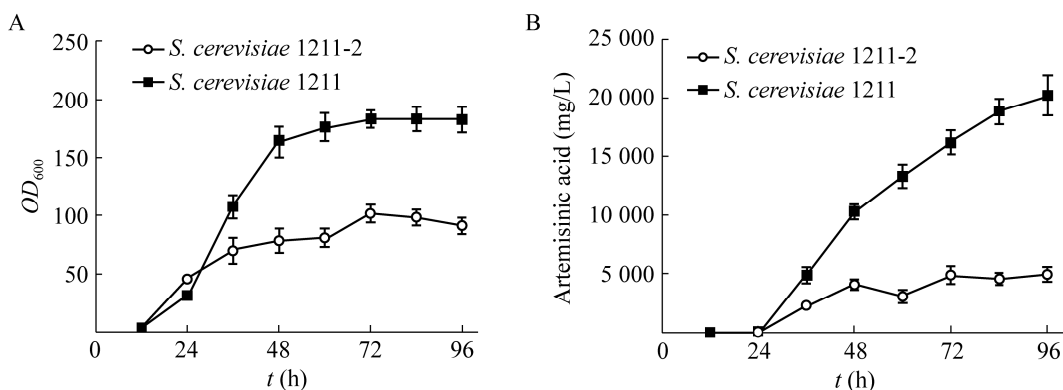


图 1 *S. cerevisiae* 1211 和 *S. cerevisiae* 1211-2 的 50 L 中试发酵结果

Figure 1 50 L pilot-scale fermentation of *S. cerevisiae* 1211 and *S. cerevisiae* 1211-2. The fermentation broth was collected every 12 hours for testing. (A) Growth curve. (B) Production of artemisinic acid.

S1211-2	216	ATGTGGAAAGCTACATATAAGGAACGCTGCTACTCATCTACTCTGTTGCTGCCAAGCTATTTAATATCATGCACGAAAAGCAAACTTGTGCTTCATTGGATGTTGCTACC	335
S1211	1	ATGTGGAAAGCTACATATAAGGAACGCTGCTACTCATCTACTCTGTTGCTGCCAAGCTATTTAATATCATGCACGAAAAGCAAACTTGTGCTTCATTGGATGTTGCTACC	120
S1211-2	336	ACCAAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCAAAATTTGTTTACTAAAACACATCTGGATATCTTGACTGATTTTCCATGGAGGGGGACAGTTAAGCCGCTAAAGGCAT	455
S1211	121	ACCAAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCAAAATTTGTTTACTAAAACACATCTGGATATCTTGACTGATTTTCCATGGA—GGGACAGTTAAGCCGCTAAAGGCAT	238
S1211-2	456	TATCCGCCAAGTACAATTTTTACTCTTCGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTGTAATACAGTCAAATTCGAGTACTCTGCGGGTGTATACAGAATAGCAGAATGGGCAGACATTACGA	575
S1211	239	TATCCGCCAAGTACAATTTTTACTCTTCGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTGTAATACAGTCAAATTCGAGTACTCTGCGGGTGTATACAGAATAGCAGAATGGGCAGACATTACGA	358
S1211-2	576	ATCCACACCGCTGTGGTGGCCACGCTATTGTTAGCCGTTTGAAGCAGCCGGGCAAGCACTAACAAAGCAACCTAGAGCCCTTTTGATGTTAGCAGAATTCATCCAAAGGCTCCCTAG	695
S1211	359	ATCCACACCGCTGTGGTGGCCACGCTATTGTTAGCCGTTTGAAGCAGCCGGGCAAGCACTAACAAAGCAACCTAGAGCCCTTTTGATGTTAGCAGAATTCATCCAAAGGCTCCCTAG	478
S1211-2	696	CTACTGGAGAATATACTAAGGCTACTCTTGACATTGCCAAGAGCAGCAAAAGATTTTGTATGCGCTTTATTGCTCAAAGAGACATGCGTGAAGAGATGAAGCTTACGATTGGTTGATTA	815
S1211	479	CTACTGGAGAATATACTAAGGCTACTCTTGACATTGCCAAGAGCAGCAAAAGATTTTGTATGCGCTTTATTGCTCAAAGAGACATGCGTGAAGAGATGAAGCTTACGATTGGTTGATTA	598
S1211-2	816	TGACACCCGCTGTGGTTTGTAGATGACAAGGAGACGCAATGGGTCAACAGTATAGAACCCTGGATGATGCTGCTCTACAGGATCTGACATTATTATTGTTGGAAGAGGACTATTTCGAA	935
S1211	599	TGACACCCGCTGTGGTTTGTAGATGACAAGGAGACGCAATGGGTCAACAGTATAGAACCCTGGATGATGCTGCTCTACAGGATCTGACATTATTATTGTTGGAAGAGGACTATTTCGAA	718
S1211-2	936	AGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACGTTACAGAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAACTAA	1 021
S1211	719	AGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACGTTACAGAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAACTAA	804

图 2 *S. cerevisiae* 1211 和 *S. cerevisiae* 1211-2 中 *URA3* 基因序列的比对结果

Figure 2 Sequence alignment of *URA3* gene of *S. cerevisiae* 1211 and *S. cerevisiae* 1211-2. The different bases between two strains are indicated with a red circle.

将重组质粒 pML104-KanMx4-u 和 90 bp 供体 DNA 一起转化到尿嘧啶营养缺陷型 *S. cerevisiae* 1211-2 中, 如图 3 所示, 使用 SD-URA 平板筛选获得 5 个阳性克隆, 提取基因组 DNA, 采用 U3-F/R 引物扩增了 *URA3* 基因并测序。结果表明 *URA3* 被成功修复, 将该工程菌株命名为 *S. cerevisiae* 1211-3。

2.3 尿嘧啶回复菌株的摇瓶发酵

使用摇瓶发酵培养基对亲本菌株 *S. cerevisiae* 1211、尿嘧啶营养缺陷型菌株 *S. cerevisiae* 1211-2 和 *URA3* 恢复菌株 *S. cerevisiae* 1211-3 进行摇瓶发酵。与我们前期研究结果一致, 青蒿酸于该液相条件下约在 5.8 min 出峰 (图 4A-a), 可见 *S. cerevisiae* 1211 在未添加半乳糖的发酵培养基中不产青蒿酸 (图 4A-b), 而在半乳糖诱导下可正常产生 (图 4A-c); *S. cerevisiae* 1211-2 虽然不需半乳糖诱导, 但在未添加尿嘧啶的培养基中无法正常生长且无青蒿酸积累 (图 4A-d), 向培养基中添加尿嘧啶后能恢复青

蒿酸的产生, 且青蒿酸产量与前期研究结果一致 (图 4A-e); 而尿嘧啶恢复菌株 *S. cerevisiae* 1211-3 能够在未添加尿嘧啶和半乳糖的培养基中产青蒿酸 (图 4A-f), 在最佳发酵条件下的青蒿酸产量可达 1 200 mg/L 左右 (图 4B), 与半乳糖诱导的亲本菌株 *S. cerevisiae* 1211 的青蒿酸产量相当, 且明显高于 *S. cerevisiae* 1211-2。

2.4 尿嘧啶回复菌株的 50 L 中试发酵

对亲本菌株 *S. cerevisiae* 1211 和 *URA3* 恢复菌株 *S. cerevisiae* 1211-3 进行 50 L 发酵罐发酵, 期间每 12 h 收集一次发酵液, 用以制作显微样本、测定菌株生长情况以及测定青蒿酸产量。显微样本结果显示 *S. cerevisiae* 1211-3 在 60 h 后生长明显快于 *S. cerevisiae* 1211, 84 h 时出现大部分菌体破裂 (图 5A)。 *S. cerevisiae* 1211-3 在分批添加葡萄糖和乙醇的发酵罐发酵中正常生长, 其菌株生长浓度几乎平行于 *S. cerevisiae* 1211 (图 5B)。HPLC 分析发酵液中青蒿酸的含

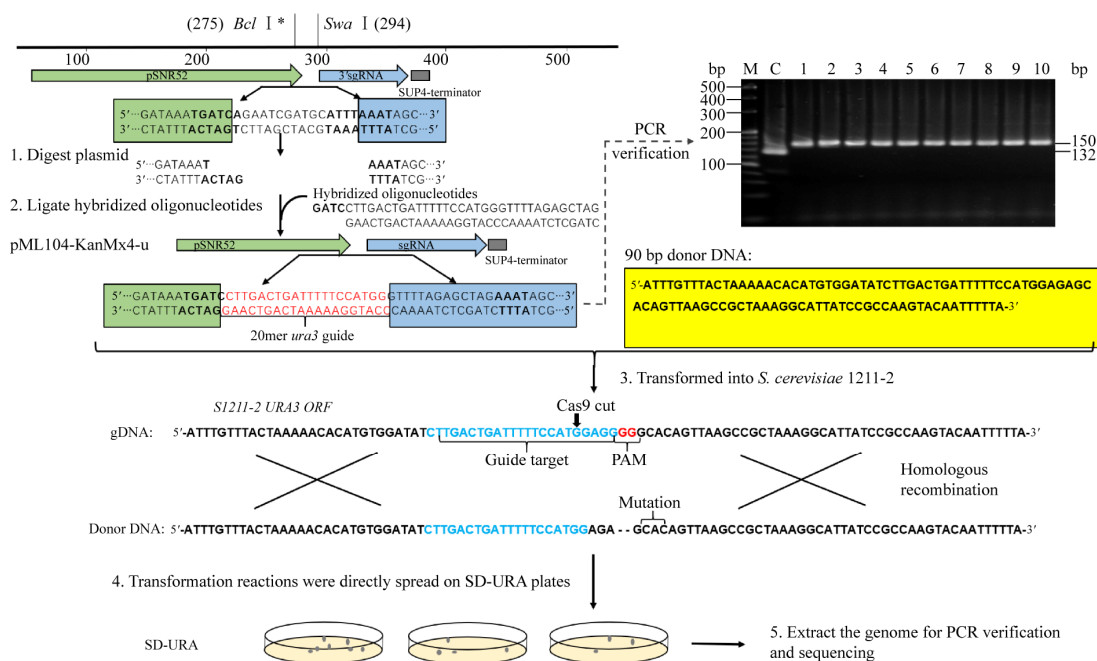


图3 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑回复 *URA3* 基因

Figure 3 Recovery of the *URA3* gene by CRISPR/Cas9 gene editing. 1: pML104-KanMx4 was digested by *Swa* I and *Bcl* I. 2: two oligos (Oligo u-1a and Oligo u-1b) including the designed sgRNA spacer sequences were annealed and directly ligated into the linearized pML104-KanMx4 vector. 3: pML104-KanMx4-u was transformed into *S. cerevisiae* 1211-2. The genomic DNA (gDNA) region targeted by the sgRNA is indicated, along with the location of the Cas9 cutting site. A portion of the 90mer oligonucleotide template with the targeted *URA3* mutation is shown. Recombination between the gDNA and template eliminates the PAM sequence adjacent to the Cas9 cutting site and introduces an early frame shift in the *URA3* gene. 4: transformation mixtures were directly spread on SD-URA plates. 5: genomic DNAs were extracted from positive clones and tested by PCR.

量,在未添加半乳糖和尿嘧啶的发酵条件下,*S. cerevisiae* 1211-3 的青蒿酸产量超过 20 g/L,与半乳糖诱导的 *S. cerevisiae* 1211 相当(图 5C)。由于 *S. cerevisiae* 1211-3 发酵不需要半乳糖诱导,能够降低 10%–15% 的青蒿酸发酵成本,此外 *S. cerevisiae* 1211-3 产青蒿酸达最高积累量的时间较 *S. cerevisiae* 1211 提前了近 12 h,提前结束发酵可进一步降低发酵成本,具有更高的工业应用价值。

3 讨论

随着合成生物学的飞速发展,许多非酵母

合成的化合物完全突破了生物制造的界限,实现了体外设计和跨物种体内合成^[7,17-20]。酿酒酵母作为转化和生物合成的重要细胞工厂,已经实现了其他物种所产化合物(生物能、精细化学品、天然产物等)的生物合成途径的重建^[7,21-24]。近年来,如何有效地将目标化合物的外源合成途径整合到酵母中已成为建立细胞工厂的关键问题^[25]。受有限的选择标记和邻近基因作用的影响,传统的基因整合技术在酿酒酵母中的应用仍然受到限制^[26],然而,CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以有效地解决以上问题^[27-30]。CRISPR 干扰技术 (CRISPRi) 能够影响酵母

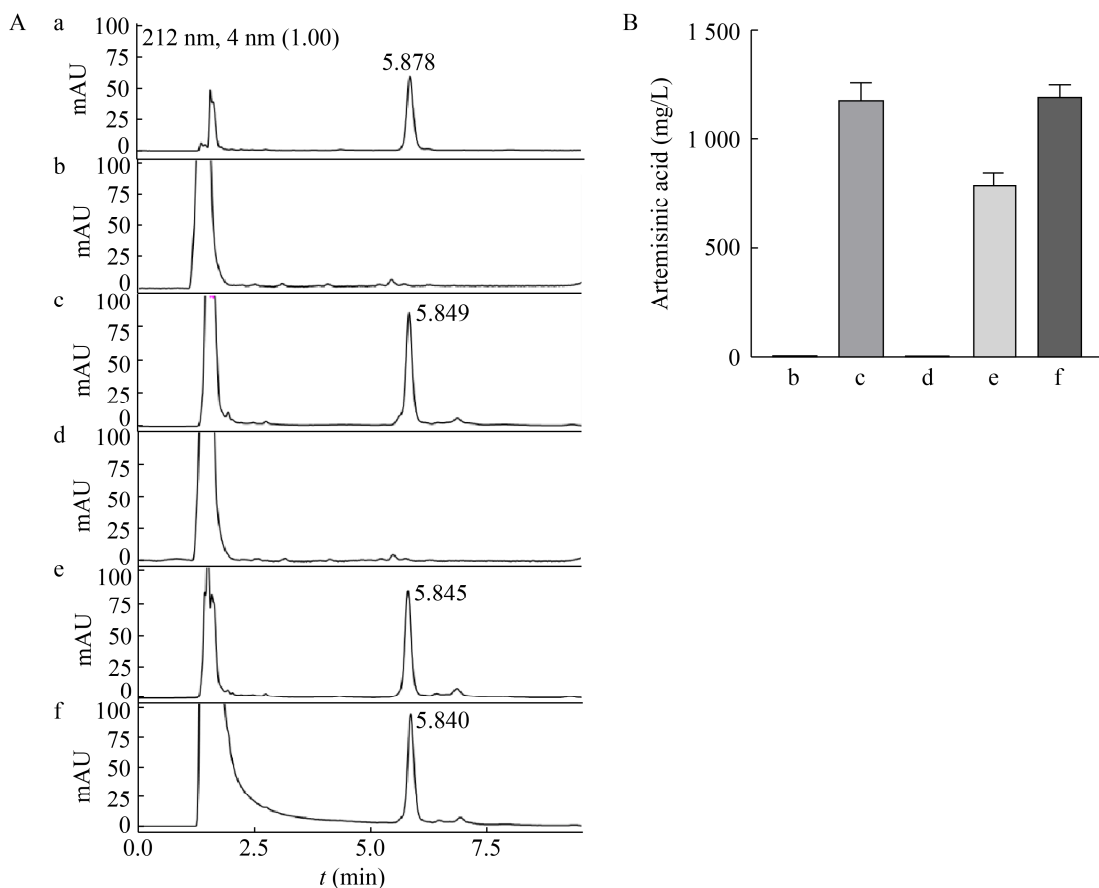


图4 不同菌株摇瓶发酵青蒿酸产量的测定

Figure 4 Quantification of artemisinic acid in the parent and engineered strains in shake flask fermentation. All the strains were cultured in fermentation medium with (+) or without (-) the addition of galactose and/or uracil. (A) HPLC analysis of artemisinic acid production in the parent strain *S. cerevisiae* 1211, the *GAL80* mutant strain *S. cerevisiae* 1211-2 and the *URA3* recovered strain *S. cerevisiae* 1211-3. a: artemisinic acid standard; b: *S. cerevisiae* 1211-galactose (-)-uracil (-); c: *S. cerevisiae* 1211-galactose (+)-uracil (-); d: *S. cerevisiae* 1211-2-galactose (-)-uracil (-); e: *S. cerevisiae* 1211-2-galactose (-)-uracil (+); f: *S. cerevisiae* 1211-3-galactose (-)-uracil (-). (B) Histogram of artemisinic acid production in the parent strain *S. cerevisiae* 1211, the *GAL80* mutant strain *S. cerevisiae* 1211-2 and the *URA3* recovered strain *S. cerevisiae* 1211-3.

细胞中参与功能代谢途径关键基因，CRISPR 激活技术 (CRISPRa) 可促进靶基因转录，通过抑制基因表达以减少副产物的形成，因而被用于酵母的基因编辑^[31-32]。

用于酵母的 CRISPR/Cas9 系统通常会结合几种抗生素选择标记 (*kanMX*、*natMX*、*hphMX* 等) 和营养缺陷型标记 (*ura3*、*his3*、*trp1*、*leu2*

等)^[33-34]。特别是对于具有多种抗生素选择标记的工程酵母而言，营养缺陷型标记更适用于其基因组编辑。例如，具有 *URA3* 选择标记的 CRISPR/Cas9 系统在成功进行基因组编辑后，可使用 5-FOA 反筛从而轻松移除 Cas9 系统^[35]。但是，鲜有关于营养缺陷型标记与酵母发酵和次生代谢相关的报道。

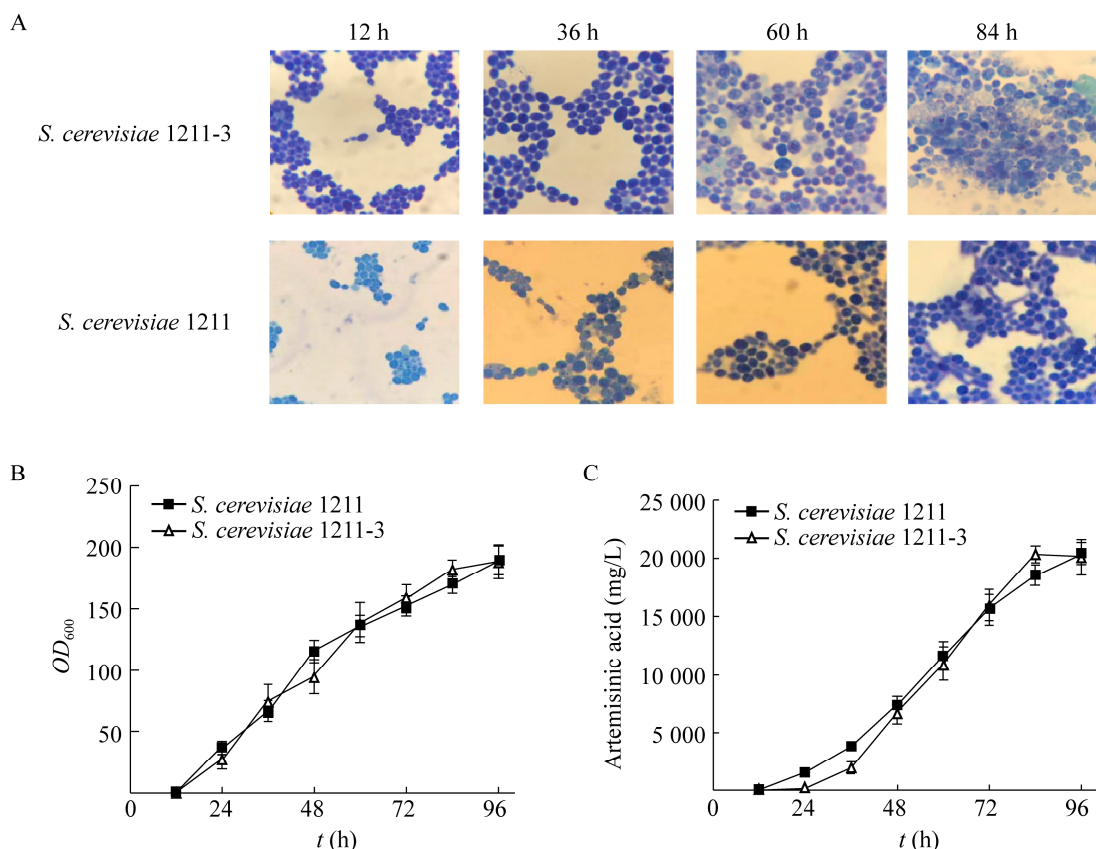


图5 *S. cerevisiae* 1211 和 *S. cerevisiae* 1211-3 菌株 50 L 中试发酵青蒿酸产量的测定

Figure 5 50 L pilot-scale fermentation of *S. cerevisiae* 1211 and 1211-3. Fermentation broth was collected every 12 hours for testing. (A) Morphology analysis of *S. cerevisiae* 1211 and *S. cerevisiae* 1211-3 at the time of 12, 36, 60 and 84 h, respectively. (B) Growth curve. (C) Production of artemisinic acid.

我们前期利用带有 *URA3* 营养缺陷型标记的 CRISPR/Cas9 质粒 pML104 成功敲除 *S. cerevisiae* 1211 的 *GAL80* 基因,再通过 5-FOA 反筛去除重组质粒 pML104-1,从而获得工程菌 *S. cerevisiae* 1211-2 ($\Delta gal80$, $\Delta ura3$)。摇瓶发酵结果显示, *S. cerevisiae* 1211-2 在无半乳糖诱导时青蒿酸产量可达 740 mg/L,与 *S. cerevisiae* 1211 相当。但在发酵罐发酵条件下 *S. cerevisiae* 1211-2 青蒿酸产量显著降低,结合文献[13]和[36]分析,我们合理推测 *URA3* 的缺失可能影响青蒿酸的产生,为证明这一假设,我们进一步使用 pML104-KanMx4 介导的 CRISPR/Cas9 回复了

S. cerevisiae 1211-2 的 *URA3*, 获得的改造菌株 *S. cerevisiae* 1211-3, 在未添加半乳糖的发酵罐中,青蒿酸产量超过 20 g/L,与 *S. cerevisiae* 1211 相当,并且其菌体生长提前达到平稳期,使得产物合成能提前达到最大值。尽管该产量尚未达到已报道的 25 g/L 最大产量^[22,37-38],但通过经典诱变和优化发酵条件将可以实现 *S. cerevisiae* 1211-3 更高的青蒿酸产量,是具有更高工业应用价值的菌株。此外,本研究首次报道了在乙醇补料的发酵中营养缺陷型标记基因 *URA3* 显著影响青蒿酸的产生,可为酵母基因编辑和天然产物相关研究提供了借鉴。

REFERENCES

- [1] Tu Y. Artemisinin—a gift from traditional Chinese medicine to the world (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(35): 10210-10226.
- [2] Tu YY. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1217-1220.
- [3] Khan MA, Smego RA, Razi ST, et al. Emerging drug—resistance and guidelines for treatment of malaria. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2004, 14(5): 319-324.
- [4] Kumari A, Karnatak M, Singh D, et al. Current scenario of artemisinin and its analogues for antimalarial activity. *Eur J Med Chem*, 2019, 163: 804-829.
- [5] Schmid G, Hofheinz W. Total synthesis of qinghaosu. *J Am Chem Soc*, 1983, 105(3): 624-625.
- [6] Lévesque F, Seeberger PH. Continuous-flow synthesis of the anti-malaria drug artemisinin. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(7): 1706-1709.
- [7] 艾丽梅. 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的青蒿酸及制霉菌素工程菌合成生物学改造[D]. 北京: 北京协和医学院, 中国医学科学院医药生物技术研究所, 2020.
- Ai LM. CRISPR/Cas9 based biosynthetic engineering of an artemisinic acid producing strain and a nystatin producing strain[D]. Beijing: Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 2020 (in Chinese).
- [8] Ai LM, Guo WW, Chen W, et al. The *gal80* deletion by CRISPR-Cas9 in engineered *Saccharomyces cerevisiae* produces artemisinic acid without galactose induction. *Curr Microbiol*, 2019, 76(11): 1313-1319.
- [9] Wang Q, Cobine PA, Coleman JJ. Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Fungal Genet Biol*, 2018, 117: 21-29.
- [10] Kumar A. Multipurpose transposon-insertion libraries in yeast. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, 2016(6): 499-502.
- [11] Peck RF, DasSarma S, Krebs MP. Homologous gene knockout in the archaeon *Halobacterium salinarum* with *ura3* as a counterselectable marker. *Mol Microbiol*, 2000, 35(3): 667-676.
- [12] Staab JF, Sundstrom P. *URA3* as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol*, 2003, 11(2): 69-73.
- [13] Pais TM, Foulquié-Moreno MR, Hubmann G, et al. Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast. *PLoS Genet*, 2013, 9(6): e1003548.
- [14] Sambrook J, William D, Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 99-125
- [15] Gietz RD, Schiestl RH. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2007, 2(1): 35-37.
- [16] Paradise EM, Kirby J, Chan R, et al. Redirection of flux through the FPP branch-point in *Saccharomyces cerevisiae* by down-regulating squalene synthase. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(2): 371-378.
- [17] Ansarypour Z, Shahpiri A. Heterologous expression of a rice metallothionein isoform (OsMTI-1b) in *Saccharomyces cerevisiae* enhances cadmium, hydrogen peroxide and ethanol tolerance. *Braz J Microbiol*, 2017, 48(3): 537-543.
- [18] Bertheleme N, Singh S, Dowell S, et al. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors in yeast. *Methods Enzymol*, 2015, 556: 141-164.
- [19] Nielsen KH. Protein expression-yeast. *Methods Enzymol*, 2014, 536: 133-147.
- [20] Robertson A, Schaltz K, Neimanis K, et al. Heterologous expression of the *Crassostrea gigas* (Pacific oyster) alternative oxidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bioenerg Biomembr*, 2016, 48(5): 509-520.
- [21] Eid R, Zhou DR, Arab NTT, et al. Heterologous expression of anti-apoptotic human 14-3-3 β/α enhances iron-mediated programmed cell death in yeast. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0184151.
- [22] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [23] Shi S, Liang Y, Zhang MM, et al. A highly efficient single-step, markerless strategy for multi-copy chromosomal integration of large biochemical pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2016, 33: 19-27.
- [24] Tindall SM, Vallières C, Lakhani DH, et al. Heterologous expression of a novel drug transporter from the malaria parasite alters resistance to quinoline antimalarials. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2464.
- [25] Kavšček M, Stražar M, Curk T, et al. Yeast as a cell factory: current state and perspectives. *Microb Cell*

- Fact, 2015, 14: 94.
- [26] Soreanu I, Hendler A, Dahan D, et al. Marker-free genetic manipulations in yeast using CRISPR/Cas9 system. *Curr Genet*, 2018, 64(5): 1129-1139.
- [27] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(7): 4336-4343.
- [28] Horwitz AA, Walter JM, Schubert MG, et al. Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-Cas. *Cell Syst*, 2015, 1(1): 88-96.
- [29] Jacobs JZ, Ciccaglione KM, Tournier V, et al. Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast. *Nat Commun*, 2014, 5: 5344.
- [30] Schwartz CM, Hussain MS, Blenner M, et al. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(4): 356-359.
- [31] Lee SW, Lee BY, Oh MK. Combination of three methods to reduce glucose metabolic rate for improving N-acetylglucosamine production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(50): 13191-13198.
- [32] Ni J, Zhang G, Qin L, et al. Simultaneously down-regulation of multiplex branch pathways using CRISPRi and fermentation optimization for enhancing β -amyrin production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Synth Syst Biotechnol*, 2019, 4(2): 79-85.
- [33] Kaneko S, Tanaka T, Noda H, et al. Marker-disruptive gene integration and URA3 recycling for multiple gene manipulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(4): 783-789.
- [34] Stovicek V, Holkenbrink C, Borodina I. CRISPR/Cas system for yeast genome engineering: advances and applications. *FEMS Yeast Res*, 2017, 17(5): fox030.
- [35] Laughery MF, Hunter T, Brown A, et al. New vectors for simple and streamlined CRISPR-Cas9 genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2015, 32(12): 711-720.
- [36] Breunig JS, Hackett SR, Rabinowitz JD, et al. Genetic basis of metabolome variation in yeast. *PLoS Genet*, 2014, 10(3): e1004142.
- [37] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.
- [38] Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, et al. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *PNAS*, 2012, 109(3): E111-E118.

(本文责编 陈宏宇)