

## 研究报告

## 基于恶臭假单胞菌 F1 的条件性自杀底盘细胞构建

张亚樵<sup>1,2</sup>, 徐凌雪<sup>1</sup>, 许艳红<sup>1,2</sup>, 孙延瑜<sup>1,3</sup>, 胡晓珂<sup>\*1,2,3</sup>

1 中国科学院烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台 264003

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 青岛海洋科技中心 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237

张亚樵, 徐凌雪, 许艳红, 孙延瑜, 胡晓珂. 基于恶臭假单胞菌 F1 的条件性自杀底盘细胞构建[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5026-5036.

ZHANG Yaqiao, XU Lingxue, XU Yanhong, SUN Yanyu, HU Xiaoke. Construction of a chassis cell with conditional suicide from *Pseudomonas putida* F1[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5026-5036.

**摘要:**【背景】恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) F1 营养需求简单、生长迅速以及多样的代谢途径, 被认为是合成生物学领域中最有潜力的底盘细胞之一。然而, 将 *P. putida* F1 的基因组进行精简构建生物降解的底盘细胞的研究鲜有报道。【目的】构建生物安全性较高的底盘细胞。【方法】利用基于同源重组原理的无痕基因编辑技术对 *P. putida* F1 基因组进行精简, 并将条件性自杀系统整合到基因组中。【结果】成功敲除了占基因组大小 1.83% 的 2 个溶源噬菌体基因组岛 PP1 (50.7 kb) 和 PP2 (58.4 kb), 构建了敲除菌株 *P. putida* F1 $\Delta$ PP12, 进一步将由阿拉伯糖启动子控制的条件性自杀系统整合到 *P. putida* F1 $\Delta$ PP12 基因组中的 *upp* 基因位点, 构建了生物安全性更高的底盘细胞 *P. putida* F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>*。【结论】提高了 *P. putida* F1 的现实应用价值, 并为使用其或以其为底盘细胞进一步改造的基因工程菌进行环境原位修复的可能性提供了理论依据。

**关键词:** 恶臭假单胞菌 F1; 底盘细胞; 溶源噬菌体基因组岛; 条件性自杀系统

资助项目: 国家自然科学基金(32070112); 泰山学者攀登计划(Tspd20210317)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070112) and the Taishan Scholar Climbing Program (Tspd20210317).

\*Corresponding author. E-mail: xkhu@yic.ac.cn

Received: 2024-04-24; Accepted: 2024-05-12; Published online: 2024-07-03

# Construction of a chassis cell with conditional suicide from *Pseudomonas putida* F1

ZHANG Yaqiao<sup>1,2</sup>, XU Lingxue<sup>1</sup>, XU Yanhong<sup>1,2</sup>, SUN Yanyu<sup>1,3</sup>, HU Xiaoke<sup>\*1,2,3</sup>

1 Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, Shandong, China

2 University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

3 Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, Shandong, China

**Abstract:** [Background] *Pseudomonas putida* F1 with simple nutritional requirements, rapid growth, and diverse metabolic pathways is regarded as one of the most promising chassis cells in synthetic biology. However, few studies have reported the application of *P. putida* F1 as a biodegradable chassis cell by streamlining the genome. [Objective] To construct a chassis cell with high biosafety. [Methods] We employed scarless genome editing based on homologous recombination principle to streamline the genome of *P. putida* F1 and integrated the conditional suicide system into the genome. [Results] Two lysogenic phage genomic islands PP1 (50.7 kb) and PP2 (58.4 kb), which account for 1.83% of the genome size, were successfully knocked out, and a knockout strain *P. putida* F1 $\Delta$ PP12 was constructed. Furthermore, the conditional suicide system controlled by the arabinose promoter was integrated into the site of *upp* in the genome of *P. putida* F1 $\Delta$ PP12, and thus a chassis cell *P. putida* F1 $\Delta$ PP12-*Para-nuc* with high biosafety was successfully constructed. [Conclusion] This study increases the application value of *P. putida* F1 and provides a theoretical basis for the application of this strain or genetically engineered bacteria from this strain in environment remediation *in situ*.

**Keywords:** *Pseudomonas putida* F1; chassis cells; lysogenic phage genomic island; conditional suicide system

恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的代谢途径多样,生长快速,对极端环境条件表现出较高的抗逆性,并且易于进行遗传分析和操作,是合成生物学领域中理想的底盘细胞之一<sup>[1]</sup>。恶臭假单胞菌的基因工程菌主要用于聚羟基脂肪酸<sup>[2]</sup>、鼠李糖脂、类胡萝卜素和氨基酸衍生物等<sup>[3]</sup>的工业合成,以及芳香族污染物的降解<sup>[4-6]</sup>。因其生长所需底物种类繁多,可以在土壤和水环境中生存,常作为生物修复的模式菌株<sup>[7]</sup>。

基因组精简是构建底盘细胞的主要策略,去除冗杂的基因不仅可以降低基因组的复杂性,还能增强基因组的可预测性和可操作性<sup>[8-9]</sup>。溶

源噬菌体基因组岛在细菌基因组中普遍存在,大多数细菌基因组至少含有一个溶源噬菌体基因组岛<sup>[10]</sup>,是细菌遗传变异和水平基因转移的主要来源<sup>[11]</sup>。敲除溶源噬菌体基因组岛后的 *P. putida* KT2440<sup>[12]</sup>、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032<sup>[13]</sup>、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) NZ9000<sup>[14]</sup>在不同条件下的生长情况优于亲本或与亲本无明显差异,因此,溶源噬菌体基因组岛可作为 *P. putida* F1 基因组精简的理想片段。

尝试将不同的降解元件、转运元件、趋化元件和抗逆元件等整合到底盘细胞中构建基因

工程菌,并将其应用到生物修复领域是近些年的关注焦点<sup>[15]</sup>,但实现原位修复的前提是确保基因工程菌的可控性。因此,构建一个人为控制菌体存活情况的条件性自杀系统显得尤为重要<sup>[16]</sup>。条件性自杀系统的设计和实施关键在于诱导型启动子和致死基因的选择与组合,本文选择对诱导底物特异性强且本底表达量低的阿拉伯糖启动子  $P_{ara}$ ,与沙雷氏菌属(*Serratia*)的胞外核酸酶 *nuc* 基因(去除其信号肽部分)构建条件性自杀系统。阿拉伯糖启动子保证菌体在未诱导时条件性自杀系统中的致死基因沉默;去除信号肽部分的沙雷氏菌属胞外核酸酶 *nuc* 基因在菌体内表达后,可以非特异性降解核酸导致菌体死亡<sup>[17]</sup>。*upp* 基因可编码尿嘧啶磷酸核糖转移酶,使细胞可利用胞外尿嘧啶,敲除 *upp* 基因后对菌体的生理活动未产生不利影响<sup>[18]</sup>,因此尝试将该位点作为条件性自杀系统的敲入位点。

本研究以 *P. putida* F1 基因组中的溶源噬

菌体基因组岛作为目标敲除片段构建精简基因组的底盘细胞,将由阿拉伯糖启动子控制的条件性自杀系统整合到基因组中,以获得具有生物安全性的底盘细胞,以期为使用基因工程菌进行生物修复提供新的策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

*P. putida* F1 通常在 LB 培养基或 M9 培养基中 30 °C 培养,用 M9 培养基培养时加入 25 mg/L 的苯酚。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)在 LB 培养基中 37 °C 培养,并添加相应的抗生素。抗生素添加终浓度:卡那霉素(kanamycin sulfate, Kan)为 50 μg/mL,链霉素(streptomycin sulfate, Sm)为 10 μg/mL。

本文所用的菌株和质粒如表 1 所示,引物如表 2 所示。*E. coli* DH5α 感受态细胞,南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

表 1 本文所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Relevant genotype or characteristic
Strain	
<i>Pseudomonas putida</i>	
F1	Wild type
F1ΔPP1	F1 with in-frame deletion of PP1
F1ΔPP2	F1 with in-frame deletion of PP2
F1ΔPP12	F1 with in-frame deletion of PP1 and PP2
F1ΔPP12- $P_{ara}$ - <i>nuc</i>	F1 with <i>nuc</i> under control of $P_{ara}$ promoter integrated into intergenic region of <i>upp</i>
<i>Escherichia coli</i>	
DH5α	<i>supE44 lacU169 (φ80lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>
S17-1 λpir	<i>thi pro hsdR hsdM<sup>+</sup> recA R<sup>-</sup> M<sup>+</sup> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>
Plasmid	
pK18 <i>mobsacB</i>	Plasmid for allelic exchange in <i>P. putida</i> derived from plasmid pK18; Mob <sup>+</sup> sacB <sup>+</sup> Kan <sup>r</sup>
pK18 <i>mobsacB</i> -ΔPP1	pK18 <i>mobsacB</i> containing two DNA fragments homologous of PP1
pK18 <i>mobsacB</i> -ΔPP2	pK18 <i>mobsacB</i> containing two DNA fragments homologous of PP2
pK18 <i>mobsacB</i> -int- $P_{ara}$ - <i>nuc</i>	plasmid for integration of $P_{ara}$ - <i>nuc</i> into intergenic region of <i>upp</i>

表 2 本文所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
PP1upFXbaI	ggtaccggggatcctctagaCGGCAGCGCCTTGAGTTC
PP1upR	tgggccgattcgaatgtgaatGCTGTCATAACTCTGTGTG
PP1dnF	acacagagttatgacagcATTACATTGGAATCGGCCCA
PP1dnRNheI	ttgcgcgagcgtgaagctagcTGGCGCAGGTGATGATGGCC
PP2upFXbaI	ggtaccggggatcctctagaCGTTCTCCAGCTGCTGGTAG
PP2upR	caggccgtcgttaggaTACGGTGGCGGCTGCGGCG
PP2dnF	ccgcagccgccaccgtaTCCTACGACGGCCTGCGCCC
PP2dnRNheI	ttgcgcgagcgtgaagctagcAGTTCAACCAGATCGGCTCG
PP1DJF927	GCAAAGTGGCCGACCGCAACGA
PP1DJR927	GTGTGCTCAAGGACGACTC
PP2DJF1758	TCTTCATCCGCAAGCTGTTC
PP2DJR1758	AAGTGACCGAACTGAAGCA
UppF 737	TCTGTTCGCCGACTTTGG
UppR 737	ATGGCCGTCTTGTATGGC

小写字母表示同源臂

Minuscules represent homologous fragments.

## 1.2 培养基

LB 培养基参考文献[19]配制, M9 培养基参考文献[18]配制, M9 培养基另加入 1 mmol/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  和 0.5 mmol/L  $CaCl_2$ 。

固体培养基: 在上述培养基中添加 20 g/L 琼脂; 半固体培养基: 在 M9 培养基中加入 25 g/L 琼脂糖。

## 1.3 主要试剂和仪器

苯酚, 天津永大化学试剂有限公司。将 500 mg 苯酚溶于 10 mL 去离子水后经 0.22  $\mu m$  滤膜过滤除菌得苯酚母液, 备用。卡那霉素和链霉素, 北京索莱宝科技有限公司; L-阿拉伯糖, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 酵母提取物和胰蛋白胨, Oxoid 公司; 琼脂, BioFroxx 公司; 琼脂糖、DNA Marker 和 *Taq* Mix, 北京睿博兴科生物技术有限公司; 其余化学试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒及质粒小提中量试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 胶回收试剂盒、高保真酶和无缝克隆试剂盒, 南

京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性核酸内切酶 *Xba* I 和 *Nhe* I, New England Biolabs 公司。

UHPLC 高效液相色谱, 赛默飞世尔科技公司; PCR 仪和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 离心机, Eppendorf AG 公司; 电泳仪和电泳槽, 北京六一生物技术有限公司。

## 1.4 基因组 DNA 的提取和 PCR

将 *P. putida* F1 在 LB 液体培养基中于 30  $^{\circ}C$ 、180 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 1.0 左右, 按细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA, 目的基因的 PCR 使用诺唯赞高保真酶 P501 进行。反应体系(25  $\mu L$ ): 5 $\times$ SF Buffer (with 10 mmol/L  $MgSO_4$ ) 5  $\mu L$ , dNTP Mix (10 mmol/L each) 0.5  $\mu L$ , DNA 20 ng, 正、反向引物(10  $\mu mol/L$ ) 各 1  $\mu L$ , Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5  $\mu L$ , ddH<sub>2</sub>O 补足 25  $\mu L$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}C$  3 min; 95  $^{\circ}C$  8 s, 59  $^{\circ}C$ /55  $^{\circ}C$  15 s, 72  $^{\circ}C$  50 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}C$  5 min, 降温至 12  $^{\circ}C$  后进行琼脂糖凝胶电泳。菌落 PCR 使用睿博 *Taq* Mix 进行。反应体系(15  $\mu L$ ): *Taq* Mix 7.5  $\mu L$ , 正、反向

引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.3  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 6.9  $\mu\text{L}$ , 将单菌落挑至体系中混匀。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 降温至 12  $^{\circ}\text{C}$  后进行琼脂糖凝胶电泳。

### 1.5 重组载体的构建

以 *P. putida* F1 的基因组为模板, 引物对 PP1upFXbaI/PP1upR、PP1dnF/PP1dnRNheI、PP2upFXbaI/PP2upR、PP2dnF/PP2dnRNheI 分别用高保真酶 P501 扩增溶源噬菌体基因组岛 PP1/PP2 上、下游片段各 1 500 bp, 采用 Xba I 和 Nhe I 将质粒 pK18mobsacB 双酶切线性化, 各片段胶回收后将上、下游片段通过无缝克隆试剂盒 C116 与线性化载体连接, 得到无痕敲除载体 pK18mobsacB- $\Delta$ PP1 和 pK18mobsacB- $\Delta$ PP2。

### 1.6 溶源噬菌体基因组岛的敲除

分别使用载体 pK18mobsacB- $\Delta$ PP1 和 pK18mobsacB- $\Delta$ PP2 进行 *P. putida* F1 溶源噬菌体基因组岛 PP1、PP2 的敲除, 其中蔗糖敏感基因 *sacB* 作为负筛选标记。以 *E. coli* S17-1  $\lambda\text{pir}$  作为双亲结合的质粒供体菌, 将敲除载体转化至 *P. putida* F1 中, 使用含 20% 蔗糖的 LB 培养基诱导, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养, 传代 3 次后稀释涂布于 LB 平板, 菌落 PCR 进行双交换筛选。

使用 Taq Mix 对诱导双交换后的菌落进行 PCR 验证, *P. putida* F1 溶源噬菌体基因组岛 PP1 的敲除验证使用引物对 PP1DJF927/PP1DJR927, 溶源噬菌体基因组岛 PP2 的敲除使用引物对 PP2DJF1758/PP2DJR1758, 双敲除菌株使用上述引物同时验证, 并将敲除菌株分别命名为 F1 $\Delta$ PP1、F1 $\Delta$ PP2 和 F1 $\Delta$ PP12。

### 1.7 条件性自杀系统基因组整合

将 *P. putida* F1 基因组中 *upp* 基因上游 355 bp 片段、阿拉伯糖启动子及其调控蛋白、去除信号肽部分的 *nuc* 基因片段<sup>[20]</sup>, 以及 *upp* 基因下

游 321 bp 片段依次连接至质粒 pK18mobsacB [生工生物工程(上海)股份有限公司合成], 命名为 pK18mobsacB-int-P<sub>ara</sub>-nuc, 以 *E. coli* S17-1  $\lambda\text{pir}$  作为双亲结合的质粒供体菌, 将敲入载体转化至 *P. putida* F1 中, 经含 20% 蔗糖的 LB 培养基 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养, 传代 3 次后稀释涂布于 LB 平板, 使用引物对 UppF/UppR 进行菌落 PCR 筛选双敲除菌株, 并将其命名为 F1 $\Delta$ PP12-P<sub>ara</sub>-nuc。

### 1.8 条件性自杀系统研究

将 *P. putida* F1、F1 $\Delta$ PP12、F1 $\Delta$ PP12-P<sub>ara</sub>-nuc 分别接种于 100 mL LB 液体培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养, 待 OD<sub>600</sub> 值为 0.6 时, 分别吸取 50 mL 菌悬液转移至 250 mL 锥形瓶中并加入 1% 阿拉伯糖诱导, 剩余未诱导菌液作为对照, 继续于 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h, 每 2 h 测定 OD<sub>600</sub> 值, 稀释至 OD<sub>600</sub> 为 0.2 后再次稀释 10<sup>4</sup> 倍涂布于 LB 平板上, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜后对菌落进行计数。

### 1.9 生理特性评价

将活化至 OD<sub>600</sub> 为 0.8 的 *P. putida* F1、F1 $\Delta$ PP1、F1 $\Delta$ PP2、F1 $\Delta$ PP12、F1 $\Delta$ PP12-P<sub>ara</sub>-nuc 分别接种于 100 mL 的 LB 液体培养基和含 3% NaCl 的 100 mL LB 液体培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养, 每 2 h 取样, 测定菌液 OD<sub>600</sub>。

将活化至 OD<sub>600</sub> 为 0.8 的 *P. putida* F1、F1 $\Delta$ PP1、F1 $\Delta$ PP2、F1 $\Delta$ PP12、F1 $\Delta$ PP12-P<sub>ara</sub>-nuc 转接于 100 mL 的 LB 液体培养基中, 并加入浓度为 25 mg/L 的苯酚诱导至 OD<sub>600</sub> 为 0.8, 收菌, 用 M9 液体培养基清洗 2 次, 以 0.1 的初始 OD<sub>600</sub> 转接于含 25 mg/L 苯酚的 100 mL M9 液体培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养, 每 8 h 取样进行 HPLC 分析。

将 *P. putida* F1、F1 $\Delta$ PP1、F1 $\Delta$ PP2、F1 $\Delta$ PP12 和 F1 $\Delta$ PP12-P<sub>ara</sub>-nuc 在 5 mL 含 25 mg/L 苯酚的 LB 培养基中诱导培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.8 并于

20 °C、5 000 r/min 离心 10 min, M9 液体培养基洗 2 次后用 50  $\mu$ L 的 M9 液体培养基重悬, 取 10  $\mu$ L 重悬的菌液点在含 25 mg/L 苯酚的 M9 半固体培养基的中间, 30 °C 培养 48 h 后测量趋化圈的大小。

### 1.10 化学检测方法

HPLC 在 Thermo UHPLC 3000 系统进行, 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 column 色谱柱(250 $\times$ 4.6 mm ID, 5  $\mu$ m particle size)。流动相组成为水和甲醇, 梯度洗脱程序: 0–5 min, 30%甲醇线性增加至 90%甲醇, 并保持 10 min; 然后在 0.1 min 内回到 30%甲醇, 保持 3 min。流速为 1.0 mL/min, 柱温保持在 30 °C, 进样量为 20  $\mu$ L。DAD 检测器波长为 270 nm。在上述条件下, 苯酚的保留时间为 16.5 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变菌株的构建

*P. putida* F1 基因组的大小为 5 959 964 bp (GenBank: CP000712.1), 使用 PHASTER 互联网服务器<sup>[21]</sup>预测 *P. putida* F1 基因组中共有 2 个溶源噬菌体基因组岛 PP1 (3778059–3828832) 和 PP2 (4600889–4659308)。图 1 总结了菌株 F1 基因组中溶源噬菌体基因组岛的定位, 以及其所包含的开放阅读框和噬菌体相关基因占比情况。PP1 与 PP2 的 G+C 含量无明显差异, 与菌株 F1 的基因组 G+C 含量(62%)相差无几, 这或许暗示了 PP1 与 PP2 已在其基因组中稳定存在了相当长的时间, 它们的结构和组成可能已经逐渐与宿主菌同化。

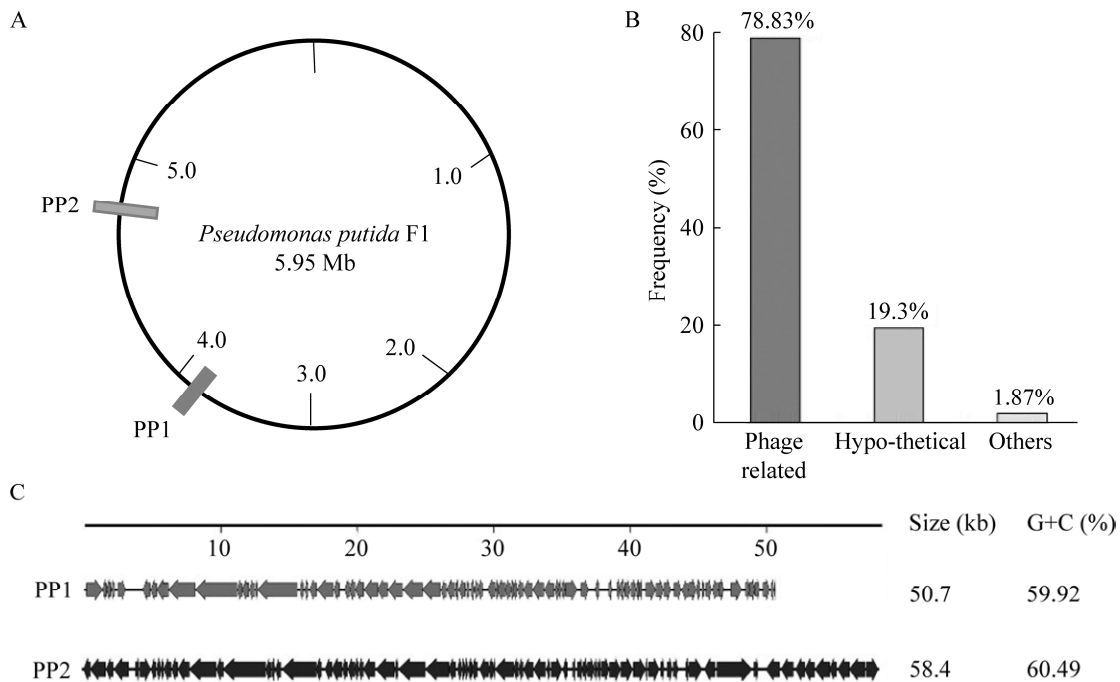


图 1 菌株 F1 中溶源噬菌体基因组岛 A: 溶源噬菌体基因组岛在 F1 基因组中的定位. B: 溶源噬菌体基因组岛的蛋白质种类. C: 溶源噬菌体基因组岛总长度、G+C 含量及开放阅读框

Figure 1 Lysogenic phage genomic islands in *P. putida* F1. A: Circular map of the *P. putida* F1 chromosome showing the physical location of the prophages in the genome. B: The protein species of lysogenic phage genomic islands. C: The total length and the G+C content and open reading frames.

图2为 *P. putida* F1 中基因编辑操作顺序及突变菌株 PCR 验证结果。构建 F1 $\Delta$ PP1 和 F1 $\Delta$ PP2 的敲除率相对较低, 分别为 21% 和 15%。在敲除菌株 F1 $\Delta$ PP1 中的 PP2 区域时未获得双敲除菌株, 然而在敲除菌株 F1 $\Delta$ PP2 中的 PP1 区域时, 得到双敲除菌株 F1 $\Delta$ PP12 的概率高达 78%。F1 $\Delta$ PP12 缺失的基因组区域累积约 109.1 kb, 占菌株 F1 基因组的 1.83%。

## 2.2 条件性自杀系统研究结果

添加 1% 阿拉伯糖后 F1、F1 $\Delta$ PP12 和 F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 的生长速度均受到一定程度的抑制, 其中菌株 F1 和 F1 $\Delta$ PP12 的最大  $OD_{600}$

值分别为 2.754 7 和 2.726 7, F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 在 4 h 起基本不再生长, 最大  $OD_{600}$  值为 1.742 9, 与未诱导的 F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 菌株最大  $OD_{600}$  值差值约为 0.8, 6 h 后其  $OD_{600}$  值逐渐降低 (图 3)。说明 F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 的条件性自杀系统在 1% 的阿拉伯糖的诱导下具有较好的致死效果。

由表 3 可知, 添加 1% 的阿拉伯糖诱导条件性自杀系统致死效率结果显著, 且随着诱导时间的增加而增加, 在 8 h 后平板未见 F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 菌落的出现。该趋势与 F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 菌株诱导后的生长曲线相符。

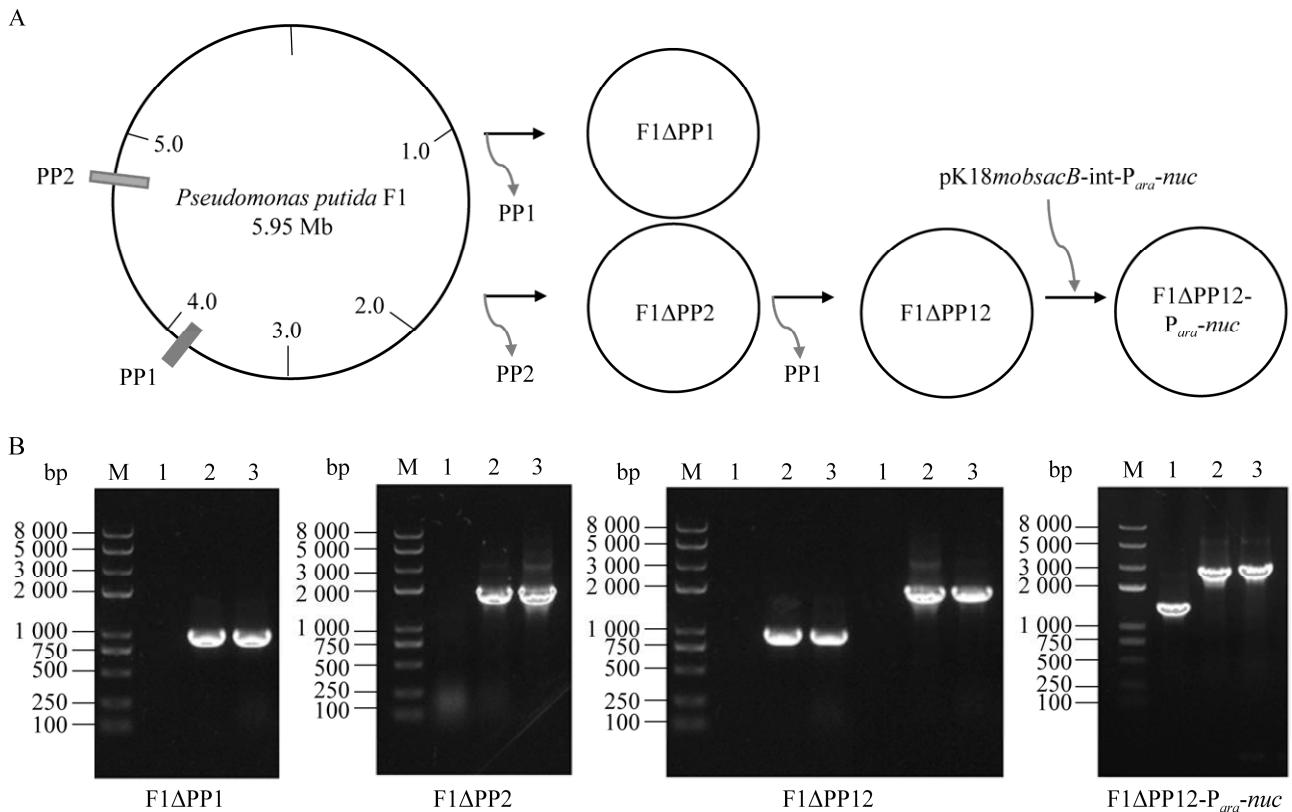


图2 菌株 F1 遗传操作示意图(A)与 PCR 验证结果(B) M: 8 000 bp DNA Marker; 1: 以 F1 基因组为模板; 2: 以 F1 突变株基因组为模板; 3: 敲除/敲入载体为模板

Figure 2 Genetic operation diagram (A) of strain F1 and PCR verification (B). M: 8 000 bp DNA Marker; 1: The use of the genomic DNA of the control strain *P. putida* F1 as the template; 2: The use of the genomic DNA of the *P. putida* mutants as the template; 3: The use of the plasmid DNA as the template.

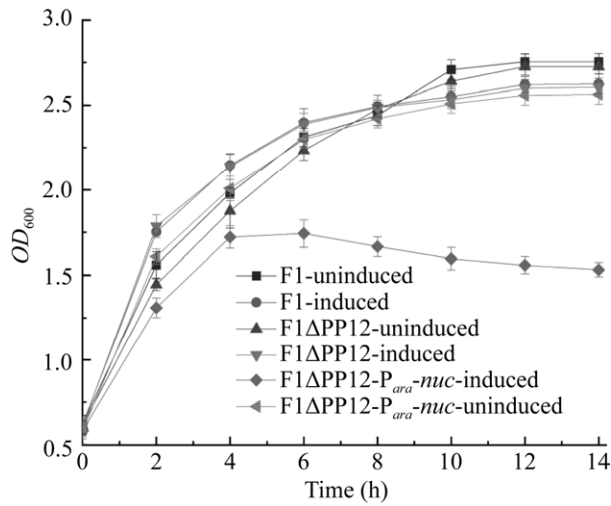


图 3 F1 野生株与突变株经 1%阿拉伯糖诱导生长曲线

Figure 3 Growth curves of wild and mutant types of *P. putida* F1 induced by 1% arabinose concentration.

表 3 F1ΔPP12、F1ΔPP12-P<sub>ara-nuc</sub> 诱导与非诱导不同时间的存活菌落数比较

Table 3 Comparison of the number of surviving colonies at different times between F1ΔPP12 and F1ΔPP12-P<sub>ara-nuc</sub> induced and uninduced

Induction time (h)	F1ΔPP12 (in)	F1ΔPP12-P <sub>ara-nuc</sub> (un)	F1ΔPP12-P <sub>ara-nuc</sub> (in)
2	>700	>700	295±22
4	>700	>700	83±23
6	>700	>700	2±1
8	>700	>700	0±0
10	>700	>700	0±0
12	>700	>700	0±0
14	>700	>700	0±0

### 2.3 生理特性评价结果

在 LB 液体培养基中，野生株与突变株的迟缓期较短，约 2 h 后进入对数期，在 3–6 h 间生长速率均达到最大值，12 h 后进入稳定期，且最大 OD<sub>600</sub> 均在 2.5 左右，如图 4 所示，生长曲线反映出突变菌株与野生菌株生长速率未表现出明显差异。

如图 5 所示，在含 3% NaCl 的 LB 液体培养基中突变菌株与野生株的生长曲线未表现出

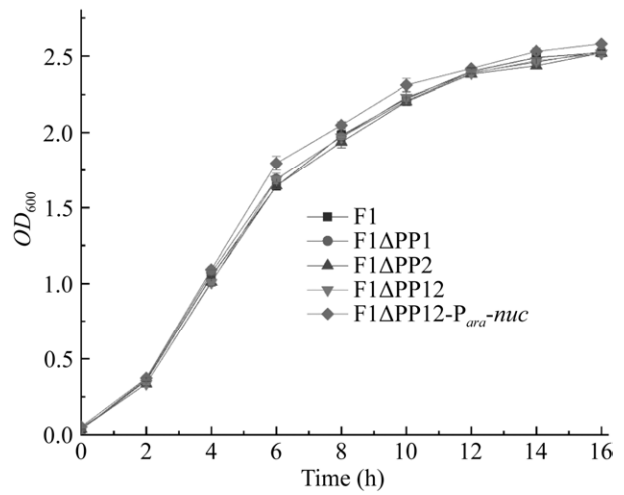


图 4 F1 野生株与突变株在 LB 培养基中的生长曲线

Figure 4 Growth curves of wild and mutant types of *P. putida* F1 in LB medium.

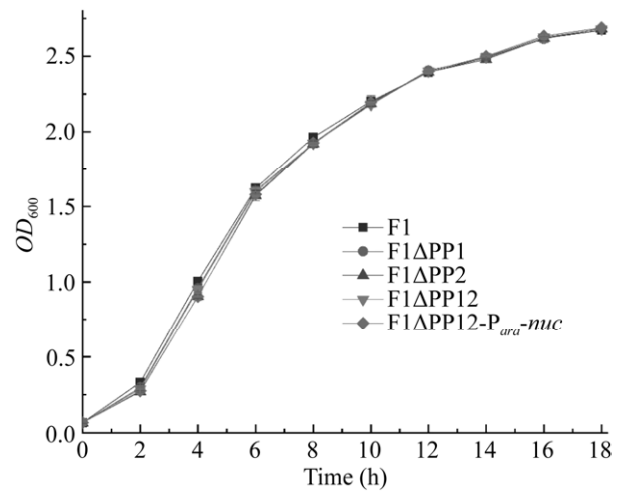


图 5 F1 野生株与突变株在 3% NaCl 的 LB 培养基中的生长曲线

Figure 5 Growth curves of wild and mutant types of *P. putida* F1 in LB medium with 3% NaCl.

明显差异，各菌株的耐受性基本无区别，表明溶源噬菌体基因组岛的敲除和条件性自杀系统的敲入对于 *P. putida* F1 在高盐环境下的生长无影响，这一发现为 *P. putida* F1 底盘细胞在盐碱土壤等高盐浓度环境中实施原位修复提供了强有力的证据。



图6展示了野生株与突变株的苯酚降解对比曲线,将诱导过的各菌株以0.1的初始 $OD_{600}$ 转接于苯酚为唯一碳源的M9培养基中,所有菌株均显示出高效的苯酚降解能力。诱导过的各菌株在降解时基本无迟缓期,40 h时苯酚被完全降解。另外,突变菌株与野生菌株在苯酚降解速率上并无显著性差异,这一结果表明,菌株F1的突变并未对*P. putida* F1以苯酚为唯一碳源的降解造成影响。

表4所示的突变菌株与野生菌株在以苯酚为唯一碳源的M9半固体培养基中的趋化圈大

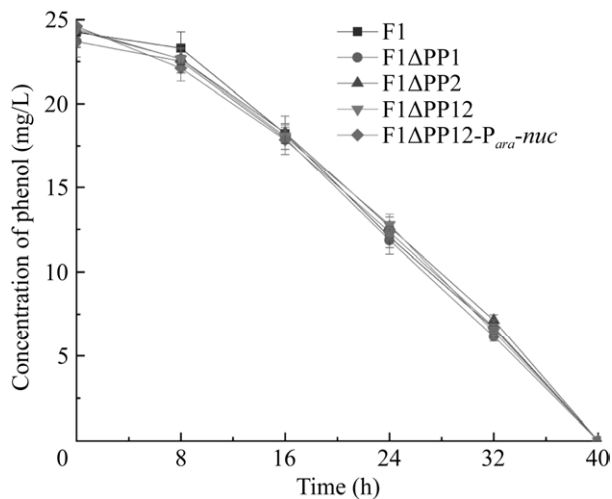


图6 F1野生株与突变株以苯酚为唯一碳源的降解曲线

Figure 6 Degradation curves of wild and mutant types of *P. putida* F1 using phenol as the only carbon source.

表4 野生株与突变株以苯酚为唯一碳源的趋化圈

Table 4 Chemotactic circle size of wild and mutant types of strain F1 using phenol as the sole carbon source

Strain	Chemotactic zone (cm)
F1	1.363±0.015
F1ΔPP1	1.352±0.027
F1ΔPP2	1.357±0.035
F1ΔPP12	1.361±0.015
F1ΔPP12-P <sub>ara</sub> -nuc	1.359±0.038

小,在培养48 h后,各菌株的趋化圈大小无显著差异( $P>0.5$ ),菌株的突变对于*P. putida* F1以苯酚为唯一碳源的趋化性反应不会造成影响。

### 3 讨论

本文选择模式菌株*P. putida* F1作为底盘细胞,采用基于同源重组原理的无痕基因编辑技术,成功敲除2个溶源噬菌体基因组岛,敲除片段占基因组1.83%,本实验构建的3株敲除菌株F1ΔPP1、F1ΔPP2和F1ΔPP12,在标准和高盐环境下的生长状况、对以苯酚为唯一碳源的降解及趋化能力的验证结果表明,溶源噬菌体基因组岛的敲除不会影响菌株F1对标准环境的生长和高盐环境的耐受度,并且当苯酚作为唯一碳源条件下其降解和趋化能力均不受影响。敲除*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032基因组中的3个占基因组6%的溶源噬菌体基因组岛后,敲除菌株在各种标准和压力条件下未表现出不利特性<sup>[13]</sup>;Zhu等<sup>[14]</sup>构建了溶源噬菌体基因组岛敲除菌株*Lactococcus lactis* NZ9k-4,其不仅在多个生理特性上优于野生菌株,而且作为异源蛋白生产的底盘细胞也显示出优异的性能。

为了强化本研究所构建的F1ΔPP12底盘细胞的生物安全性,使用本底表达量很低且对诱导底物特异性强的阿拉伯糖启动子P<sub>ara</sub>和沙雷氏菌属的胞外核酸酶nuc基因(去除信号肽部分)构建条件性自杀系统并将其整合到*P. putida* F1ΔPP12的基因组中,成功构建了突变菌株*P. putida* F1ΔPP12-P<sub>ara</sub>-nuc。将沙雷氏菌属的胞外核酸酶nuc基因去除信号肽部分后,在细菌中表达的核酸酶可以非特异性降解核酸导致细胞死亡<sup>[17]</sup>,从而最大程度降低基因工程菌携带的外源基因发生水平转移并逸散到环境中的潜在风险,将条件性自杀系统整合至菌株的基

基因组中保证了其表达稳定性和遗传稳定性。*P. putida* F1 可以代谢己糖(如葡萄糖和果糖)但不能代谢戊糖(如木糖和阿拉伯糖)<sup>[22]</sup>, 这保证阿拉伯糖在诱导 *P. putida* F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 时始终保持有效诱导浓度。在 1%阿拉伯糖的诱导下, F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 的自杀效率较为理想, 在诱导 8 h 后全部死亡, 并且 *P. putida* F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 仍具有高盐环境耐受性, 以及苯酚作为唯一碳源时的降解和趋化能力。Molin 等<sup>[23]</sup>在 1987 年设计的第一个含有由大肠杆菌的色氨酸启动子和 *hok* 致死基因构成的条件性自杀系统的质粒模型用于控制细菌生长, 在缺乏色氨酸的情况下, 阻遏蛋白表达受到抑制, 从而 *hok* 致死基因表达导致菌体死亡; Knudsen 等<sup>[24]</sup>还尝试将 *relF* 和 *hok* 基因连接到 *P<sub>lac</sub>* 启动子下游, 在 IPTG 的诱导下, 导致菌株自杀效应的发生; Ahrenholtz 等<sup>[25]</sup>尝试将 *nuc* 基因连接至对温度敏感的 *P<sub>L</sub>* 启动子下游, 通过调整环境温度, 可以精确地控制 *nuc* 基因的表达, 进而控制菌群的自杀行为; Li 等<sup>[20]</sup>构建了含条件性自杀系统的 *E. coli* BL21AI-DS, 诱导后其表现出良好的自杀效应, 上述研究使用质粒模型构建条件性自杀系统无法保证质粒中抗生素抗性基因的传播对环境微生物的影响, 此外, 质粒的丢失会降低菌体诱导自杀的预期效果。Recorbet 等<sup>[26]</sup>将 *sacB* 基因作为致死基因构建条件性自杀系统并将其整合到 *E. coli* EL1026 的基因组中, 显著提升了自杀盒的稳定性, 但 *sacB* 基因在诱导自杀时常出现假阳性, 并且诱导所用浓度较高。相比之下, 本文构建的突变菌株 *P. putida* F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 阿拉伯糖诱导所需浓度较低, 对环境友好。

## 4 结论

本研究成功构建了含有条件性自杀系统的精

简基因组的底盘细胞 *P. putida* F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>*, 同时保留了模式菌株 *P. putida* F1 对高盐环境的耐受度, 并且当苯酚作为唯一碳源的条件其降解和趋化能力均不受影响, 可控条件性自杀系统的敲入提高了其生物安全性, 提高了其现实应用价值, 并且为使用 *P. putida* F1 $\Delta$ PP12-*P<sub>ara-nuc</sub>* 或以其为底盘细胞进一步改造的基因工程菌进行环境原位修复提供了理论依据。

## REFERENCES

- [1] MARTÍNEZ-GARCÍA E, de LORENZO V. *Pseudomonas putida* as a synthetic biology chassis and a metabolic engineering platform[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2024, 85: 103025.
- [2] ADAMS BL. The next generation of synthetic biology chassis: moving synthetic biology from the laboratory to the field[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(12): 1328-1330.
- [3] MEZZINA MP, MANOLI MT, PRIETO MA, NIKEL PI. Engineering native and synthetic pathways in *Pseudomonas putida* for the production of tailored polyhydroxyalkanoates[J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(3): e2000165.
- [4] ALONSO S, BARTOLOMÉ-MARTÍN D, del ÁLAMO M, DÍAZ E, PERERA J. Genetic characterization of the styrene lower catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain Y2[J]. *Gene*, 2003, 319: 71-83.
- [5] HALLIER-SOULIER S, DUCROCQ V, TRUFFAUT N. Conjugal transfer of a TOL-like plasmid and extension of the catabolic potential of *Pseudomonas putida* F1[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1999, 45(11): 898-904.
- [6] GOMES NCM, KOSHELEVA IA, ABRAHAM WR, SMALLA K. Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54(1): 21-33.
- [7] SRIDHAR S, AJO-FRANKLIN CM, MASIELLO CA. A framework for the systematic selection of biosensor chassis for environmental synthetic biology[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(9): 2909-2916.
- [8] CHI HT, WANG XL, SHAO Y, QIN Y, DENG ZX, WANG LR, CHEN S. Engineering and modification of microbial chassis for systems and synthetic biology[J].

- Synthetic and Systems Biotechnology, 2019, 4(1): 25-33.
- [9] SUNG BH, CHOE D, KIM SC, CHO BK. Construction of a minimal genome as a chassis for synthetic biology[J]. Essays in Biochemistry, 2016, 60(4): 337-346.
- [10] BOBAY LM, TOUCHON M, ROCHA EPC. Pervasive domestication of defective prophages by bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(33): 12127-12132.
- [11] CANCHAYA C, FOURNOUS G, BRÜSSOW H. The impact of prophages on bacterial chromosomes[J]. Molecular Microbiology, 2004, 53(1): 9-18.
- [12] LIANG PX, ZHANG YT, XU B, ZHAO YX, LIU XS, GAO WX, MA T, YANG C, WANG SF, LIU RH. Deletion of genomic islands in the *Pseudomonas putida* KT2440 genome can create an optimal chassis for synthetic biology applications[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 70.
- [13] BAUMGART M, UNTHAN S, RÜCKERT C, SIVALINGAM J, GRÜNBERGER A, KALINOWSKI J, BOTT M, NOACK S, FRUNZKE J. Construction of a prophage-free variant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 for use as a platform strain for basic research and industrial biotechnology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 6006-6015.
- [14] ZHU DL, FU YX, LIU FL, XU HJ, SARIS PEJ, QIAO MQ. Enhanced heterologous protein productivity by genome reduction in *Lactococcus lactis* NZ9000[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 1.
- [15] 唐鸿志, 王伟伟, 张莉鸽, 黄玲, 陆歆毓, 许平. 合成生物学在环境修复中的应用[J]. 生物工程学报, 2017, 33(3): 506-515.  
TANG HZ, WANG WW, ZHANG LG, HUANG L, LU XY, XU P. Application of synthetic biology in environmental remediation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(3): 506-515 (in Chinese).
- [16] GÓMEZ-TATAY L, HERNÁNDEZ-ANDREU JM. Biosafety and biosecurity in Synthetic Biology: a review[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2019, 49(17): 1587-1621.
- [17] LI Q, WU YJ. A fluorescent, genetically engineered microorganism that degrades organophosphates and commits suicide when required[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 82(4): 749-756.
- [18] GRAF N, ALTENBUCHNER J. Development of a method for markerless gene deletion in *Pseudomonas putida*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(15): 5549-5552.
- [19] BERTANI, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1951, 62(3): 293-300.
- [20] LI Q, LI J, KANG KL, WU YJ. A safety type of genetically engineered bacterium that degrades chemical pesticides[J]. AMB Express, 2020, 10(1): 33.
- [21] ARNDT D, GRANT JR, MARCU A, SAJED T, PON A, LIANG YJ, WISHART DS. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(W1): W16-W21.
- [22] FUHRER T, FISCHER E, SAUER U. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(5): 1581-1590.
- [23] MOLIN S, KLEMM P, POULSEN LK, BIEHL H, GERDES K, ANDERSSON P. Conditional suicide system for containment of bacteria and plasmids[J]. Nature Biotechnology, 1987, 5(12): 1315-1318.
- [24] KNUDSEN SM, KARLSTRÖM OH. Development of efficient suicide mechanisms for biological containment of bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(1): 85-92.
- [25] AHRENHOLTZ I, LORENZ MG, WACKERNAGEL W. A conditional suicide system in *Escherichia coli* based on the intracellular degradation of DNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(10): 3746-3751.
- [26] RECORBET G, ROBERT C, GIVAUDAN A, KUDLA B, NORMAND P, FAURIE G. Conditional suicide system of *Escherichia coli* released into soil that uses the *Bacillus subtilis* *sacB* gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(5): 1361-1366.