



## 研究报告

## 谷氨酸棒状杆菌 CRISPR-Cpf1 和 Cre/loxP 基因敲除技术的比较

占米林 阚宝军 张辉 董晋军 许国超 韩瑞枝 倪晔\*

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

**摘要:**【背景】谷氨酸棒状杆菌的基因敲除系统较为匮乏且效率不高,难以对其进行代谢工程改造,不利于高性能工业菌株的构建及规模生产。【目的】分别采用 CRISPR-Cpf1 和 Cre/loxP 基因敲除系统对谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032)基因组上的 *argR* 和 *argF* 基因进行敲除,比较两种敲除方法的优缺点,为合理选择敲除系统提供依据。【方法】特异性重组的 Cre/loxP 敲除系统是首先利用同源重组将基因组上的靶基因替换为两端带有重组位点 *loxP* 的 *kan<sup>R</sup>* 片段,然后由重组酶 Cre 识别 *loxP* 位点并发生重组反应,从而去除替换到基因组上的 *kan<sup>R</sup>* 片段,进一步利用质粒的温敏特性将其消除,从而实现靶基因的敲除。CRISPR-Cpf1 敲除系统是利用 Cpf1 对 pre-crRNA 进行加工,形成的成熟 crRNA 引导 Cpf1 识别和结合到靶 DNA 的特定序列上并切割双链 DNA 分子,通过同源重组作用去除靶基因,基于质粒自身的温敏特性将其消除,从而完成基因敲除的整个过程。【结果】Cre/loxP 系统可在 8N+2 d 内完成 N 轮迭代基因敲除,而 CRISPR-Cpf1 系统可在 5N+2 d 内完成 N 轮迭代基因无痕敲除,理论上还可以一次对多个靶位点进行编辑,效率更高,但存在同源重组效率较低、假阳性率高等缺点。【结论】与 Cre/loxP 系统相比,CRISPR-Cpf1 辅助的同源重组基因敲除方法可省时、省力地实现基因的无痕敲除,理论上还可实现多个基因的同时敲除、总体效率更高,然而编辑效率还有提高的空间。

**关键词:** 谷氨酸棒状杆菌, CRISPR-Cpf1, Cre/loxP, 同源重组, 基因敲除

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31601463); National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-07); Six Talent Peaks Project of Jiangsu Province (2015-SWYY-008)

\*Corresponding author: E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

Received: 21-03-2018; Accepted: 08-05-2018; Published online: 05-06-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31601463); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助(LITE2018-07); 江苏省六大人才高峰(2015-SWYY-008)

\*通信作者: E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-03-21; 接受日期: 2018-05-08; 网络首发日期: 2018-06-05

## Comparison of CRISPR-Cpf1 with Cre/loxP for gene knockout in *Corynebacterium glutamicum*

ZHAN Mi-Lin KAN Bao-Jun ZHANG Hui DONG Jin-Jun XU Guo-Chao  
HAN Rui-Zhi NI Ye\*

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

**Abstract:** [Background] *Corynebacterium glutamicum* is an important industrial platform strain. Efficient and convenient genetic manipulation tools is in urgent need for improving *C. glutamicum* strains in commercial applications. [Objective] Gene *argR* and *argF* of *C. glutamicum* ATCC 13032 was deleted by CRISPR-Cpf1-assisted-homologous recombination and Cre/loxP-assisted-homologous recombination knockout system respectively. To provide guidance for reasonable selection of gene knockout systems, the advantages and disadvantages of these two methods are investigated in detail. [Methods] Firstly, Cre/loxP-assisted-homologous recombination replaced the targeted gene in genome with *kan<sup>R</sup>* fragment containing *loxP* sites at 5' and 3' ends. Then recombinase Cre expressed by pDTW109 recognized and bound on the *loxP* sites, and catalyzed the homologous recombination between two *loxP* sites to remove the *kan<sup>R</sup>* fragment. Eventually, the pDTW109 was eliminated by elevating the temperature to 37 °C based on its temperature-sensitive characteristic. In the knockout of targeted gene by CRISPR-Cpf1-assisted genome editing, the pre-crRNA was processed by Cpf1 and the resultant crRNA guided Cpf1 to bind to the specific sequence and cleave the target DNA. The targeted gene was removed by homologous recombination. The recombinant plasmid was also eliminated by elevating the cultivation temperature. [Results] In the genes knockout of *C. glutamicum*, Cre/loxP-assisted system allowed a complete N rounds of iterative gene knockout in 8N+2 d, while CRISPR-Cpf1-assisted system only need 5N+2 d. Theoretically, the latter could achieve the simultaneous knockout of multiple genes, however suffers from disadvantage of low homologous recombination efficiency and high false-positive rates. [Conclusion] In comparison with Cre/loxP system, CRISPR-Cpf1 assisted genome editing is time-saving and labor-saving in gene knockout of *C. glutamicum*, and theoretically it can be employed in knockout of multiple genes at a time. Consequently, CRISPR-Cpf1-assisted system has higher overall efficiency. However, its editing efficiency still has great potentials for improvement.

**Keywords:** *Corynebacterium glutamicum*, CRISPR-Cpf1, Cre/loxP, Homologous recombination, Gene knockout

谷氨酸棒状杆菌是一种非致病性的、革兰氏阳性菌株<sup>[1-2]</sup>, 作为一种重要的底盘微生物广泛用于工业发酵生产氨基酸及有机酸等, 如 L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-赖氨酸、L-缬氨酸和 L-精氨酸<sup>[3-5]</sup>。目前, 通过传统诱变育种的策略可获得生产性能改良的谷氨酸棒状杆菌, 然而由于突变的随机性及传代的不稳定性<sup>[6]</sup>, 需要巨大的筛选和繁琐的菌种复壮工作, 且代谢流向不明确难以实现精细化调控和经济化生产。随着谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 及相关亚种的全基因组测序<sup>[7]</sup>, 科研工作者可以利用代

谢工程或合成生物学的策略对谷氨酸棒状杆菌进行定向改造, 使其具有更高的生产效率。

目前, 谷氨酸棒状杆菌中的基因敲除载体或系统非常有限。其中最经典的敲除系统是基于同源重组及蔗糖致死基因 *sacB* 的反向筛选技术<sup>[8]</sup>, 但该系统存在一些明显不足, 包括筛选转化子费时费力、易发生转座子的插入而使 *sacB* 基因失活的现象等<sup>[9]</sup>。因此, 迫切需要可适用于谷氨酸棒状杆菌的高效基因编辑技术。近些年开发了包括基于同源重组及位点特异性重组的 Cre/loxP 敲除系统和基于 CRISPR-Cpf1

的同源重组敲除系统。Cre/loxP 敲除系统<sup>[10]</sup>通过两次同源重组实现靶向基因的敲除,首先利用同源重组将基因组上的靶向基因替换成两端带有重组位点 *loxP* 的 *kan<sup>R</sup>* 片段,第二步通过 pDTW109 表达的重组酶 Cre 识别重组位点 *loxP* 的序列并发生重组反应<sup>[11-12]</sup>,消除替换到基因组上 *kan<sup>R</sup>* 片段,并利用 pDTW109 温敏特性实现自我消除,最终完成整个基因敲除过程。继大肠杆菌的基因组编辑技术 CRISPR-Cas<sup>[13-14]</sup>的成功构建,最近报道了基于土拉热弗朗西丝菌(*Francisella novicida*) Cpf1 的谷氨酸棒状杆菌基因组编辑方法 CRISPR-Cpf1<sup>[15]</sup>,该系统主要由 FnCpf1、CRISPR RNA 和同源臂组成,在特异性的序列上切割靶 DNA,然后通过同源重组去除靶向基因,同样利用质粒的温敏特性消除自身的存在,最后获得基因敲除菌株。本研究以谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的 *argR* 和 *argF* 两个基因<sup>[16]</sup>的敲除为例,比较研究了 CRISPR-Cpf1 和 Cre/loxP 两种基因敲除系统的优缺点,并对 CRISPR-Cpf1 技术进行了展望。

表 1 本实验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristic	来源 Source
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> JM109	<i>E. coli</i> cloning strain	TaKaRa
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	<i>C. glutamicum</i> model strain	ATCC
JML01	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032Δ <i>argR</i>	This work
JML02	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032Δ <i>argF</i>	This work
JML03	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032Δ <i>argR</i>	This work
JML04	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032Δ <i>argF</i>	This work
<b>Plasmids</b>		
pJYS3_Δ <i>crtYf</i>	Kanamycin resistance ( <i>kan<sup>R</sup></i> ), shuttle vector	[15]
pJYS3_Δ <i>argR</i>	<i>kan<sup>R</sup></i> , shuttle vector	This work
pJYS3_Δ <i>argF</i>	<i>kan<sup>R</sup></i> , shuttle vector	This work
pBlueScript II SK	Cloning vector, <i>ColE1</i> , <i>lacZ</i> , Ampicillin resistance	[17]
pDTW202	pBlueScript harboring a <i>kan<sup>R</sup></i> gene flanking with <i>loxPLE/loxPRE</i> sites	[17]
pDTW109	pDTW109 harboring a <i>cre</i> gene, Chloramphenicol resistance	[17]
pDTW203	pBlueScript harboring <i>argR</i> gene flanking regions and <i>loxPLE/PRE-kan<sup>R</sup></i>	This work
pDTW204	pBlueScript harboring <i>argF</i> gene flanking regions and <i>loxPLE/PRE-kan<sup>R</sup></i>	This work

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

实验所用菌株和质粒见表 1。

### 1.2 培养条件

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 酵母粉 5.0。

大肠杆菌培养温度为 37 °C, 摇床转速 120 r/min, 抗生素添加浓度: 氯霉素 34 μg/mL, 氨苄青霉素 100 μg/mL, 卡那霉素 50 μg/mL。

BHI 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 脑心浸液 18.5, 酵母粉 5.0, pH 7.2。

感受态细胞培养基为 EPO 培养基(g/L): 甘氨酸 30.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 5.0, 脑心浸液 18.5, 吐温 80 1.0, 异烟肼 0.4。

转化恢复培养基为 LB-HIS 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 脑心浸液 18.5, 酵母粉 5.0, 氯化钠 5.0, D-山梨醇 92.0。

谷氨酸棒状杆菌培养温度为 30 °C, 摇床转速 120 r/min, 抗生素添加浓度: 氯霉素 10 μg/mL, 卡

那霉素 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

如需配制固体培养基,则向上述培养基中加入 18.0 g/L 的琼脂粉。所有培养基于  $1\times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

### 1.3 主要试剂和仪器

IPTG、氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒、DNA Marker, 上海捷瑞生物工程有限公司; 限制性内切酶、*Dpn* I、Primer STAR DNA 聚合酶、 $2\times$ Taq PCR Master Mix, TaKaRa 宝生物工程(大连 TaKaRa)有限公司; 胰蛋白酶、酵母粉、脑心浸液, OXOID 公司; 引物合成和测序服务由苏州泓迅生物科技股份有限公司提供。电转仪, Bio-Rad 公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 Cre/loxP 系统敲除质粒的构建

以敲除谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 基因组

的 *argR* 为例, Cre/loxP 系统敲除质粒的构建步骤如下。首先以谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 基因组为模板, 分别以 *argR*-U-F/*argR*-U-R 和 *argR*-D-F/*argR*-D-R 为引物扩增得到 *argR* 的上、下游同源片段, 其中在上游同源片段的 5'末端和下游同源片段的 3'末端分别引入 *Hind* III 和 *Bam*HI 酶切位点序列。然后以 pDTW202 质粒为模板, 以 *argR*-K-F/*argR*-K-R 为引物, 扩增两端含有 *loxP* 位点的 *kan<sup>R</sup>* 片段。通过融合 PCR 使上述 3 个片段串联融合, 同时 pBlueScript II SK 经过 *Hind* III/*Bam*H I 酶切后即可获得线性化片段, 然后利用 Gibson 法将融合片段与线性化载体进行连接, 并取 5  $\mu\text{L}$  连接液通过化学转化法转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞, 待其长出菌落后进行菌落 PCR 和基因测序验证, 其中验证正确的打靶质粒命名为 pDTW203, 具体流程如图 1 所示。其中引物设计见表 2。

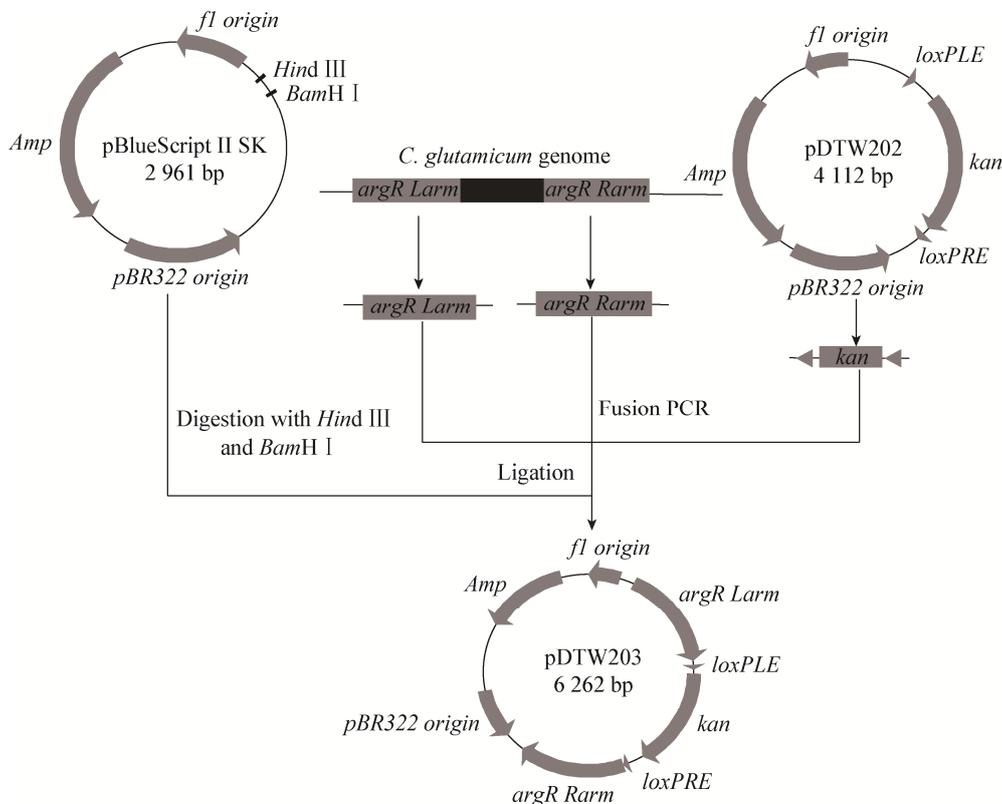


图 1 敲除质粒 pDTW203 的构建

Figure 1 Construction of knockout plasmid pDTW203

表 2 Cre/loxP 系统基因敲除所用的引物

Table 2 Primers used in Cre/loxP gene knockout system

引物 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')
<i>argR</i> -U-F	GTCGACGGTATCGATA <u>AAGCTT</u> AGGACTCAAACCTTATGACTTCACAACCA
<i>argR</i> -U-R	CGCCCTATAGTGAGTCGTATTGGGATTTAAGTTTTCCGGTGTTGACG
<i>argR</i> -K-F	CGTCAACACCCGAAAACCTAAATCCCAATACGACTCACTATAGGGCG
<i>argR</i> -K-R	TGCCTGCATTAACAAGCGATTAACGCGCAATTAACCCTCACTAAAG
<i>argR</i> -D-F	CTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGTTAATCGCTTGTTAATGCAGGCA
<i>argR</i> -D-R	CGCTCTAGAACTAGTGGATCCCAAAGCCTCGTGAGCCTTAATC
<i>argR</i> -F	GTGACTCGCACTGCACGC
<i>argR</i> -R	TAAAGTGGTGCGCCCGCT
A-F	CTATTGCCGAGACAATCGCATA
A-R	CGCTCGATGGTGACATCTTC
<i>argF</i> -U-F	GTCGACGGTATCGATA <u>AAGCTT</u> TGCACGCTTGACTGGTTCGT
<i>argF</i> -U-R	GCCCTATAGTGAGTCGTATTAAGTTTGTAGTCCTTTATGCGATTG
<i>argF</i> -K-F	AATACGACTCACTATAGGGCGAATT
<i>argF</i> -K-R	CTGGGTGATATCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGG
<i>argF</i> -D-F	AATTGCGCGATATCACCCAGGCCACCTTG
<i>argF</i> -D-R	CGCTCTAGAACTAGTGGATCCAGCCGACCTCGAAACGAACC

注：下划线表示限制性酶切位点。

Note: The underlined sequences are the restriction enzymes sites.

#### 1.4.2 CRISPR-Cpf1 系统敲除质粒的构建

以敲除谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 基因组的 *argR* 为例, CRISPR-Cpf1 系统敲除质粒的构建步骤如下。首先以 pJYS3\_Δ*crtYf* 质粒为模板, 以 *crtYf*-F-1/*crtYf*-R-1 为引物进行定点突变, 通过全质粒 PCR 将 *crtYf* 基因的 crRNA 序列(5'-GAATTTCTACTGTTGTAGATCAGGCAACCATAGGGCAGGA A-3')替换为 *argR* 基因的 crRNA 序列(5'-GAATTTCTACTGTTGTAGATTACAGATCATTCCGGCAACA TCGC-3')以及 *argF* 的 crRNA 序列(5'-GAATTTCTA CTGTTGTAGATGTCCCTCGAGTGGACGCTCCG-3'), 然后用 *Dpn* I 限制性内切酶消化母本质粒。取 3 μL 消化后的 PCR 产物通过化学转化法转化到 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 待其长出菌落进行 PCR 验证并测序验证, 得到质粒 pJYS3\_Δ*crtYf*-1。再以 pJYS3\_Δ*crtYf*-1 为模板, 以 crRNA\_ *argR*-F/crRNA\_ *argR*-R 为引物, 通过 PCR 扩增得到除去 *crtYf* 基因上下游同源臂的 A 片段。再以谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 基因组为模板, 分别以 *argR*-F-F/*argR*-F-R 和 *argR*-R-F/*argR*-R-R 为引物扩增 *argR* 的上游和下

游同源片段, 并将 A 片段、*argR* 的上游和下游同源片段进行连接, 取 5 μL 连接液热转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞, 待其长出菌落后, 以 *argR*-F-F/*argR*-F-R 为引物进行菌落 PCR 和基因测序验证, 其中验证正确的打靶质粒命名为 pJYS3\_Δ*argR*。具体构建流程如图 2 所示。其中引物设计见表 3。

#### 1.4.3 Cre/loxP 系统敲除方法

以敲除谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 基因组的 *argR* 为例, Cre/loxP 系统敲除菌株的构建步骤如图 3 所示。首先将敲除质粒 pDTW203 电转入谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的感受态细胞进行基因打靶, 在同源重组的作用下原始菌株的 *argR* 基因被替换为两端含有 *loxP* 位点的 *kan<sup>R</sup>* 片段, 获得菌株谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032Δ*argR*::*kan<sup>R</sup>*。然后将 Cre 重组酶表达载体 pDTW109 电转化到突变株的感受态细胞中, 涂布于含有氯霉素的恢复培养基平板, 在 Cre 重组酶的作用下, *kan<sup>R</sup>* 基因两端的 *loxP* 相互识别并发生重组, 从而将 *kan<sup>R</sup>* 片段消除, 只留下一个 34 bp 左右的小片段 *loxPLR*, 挑选转化子进

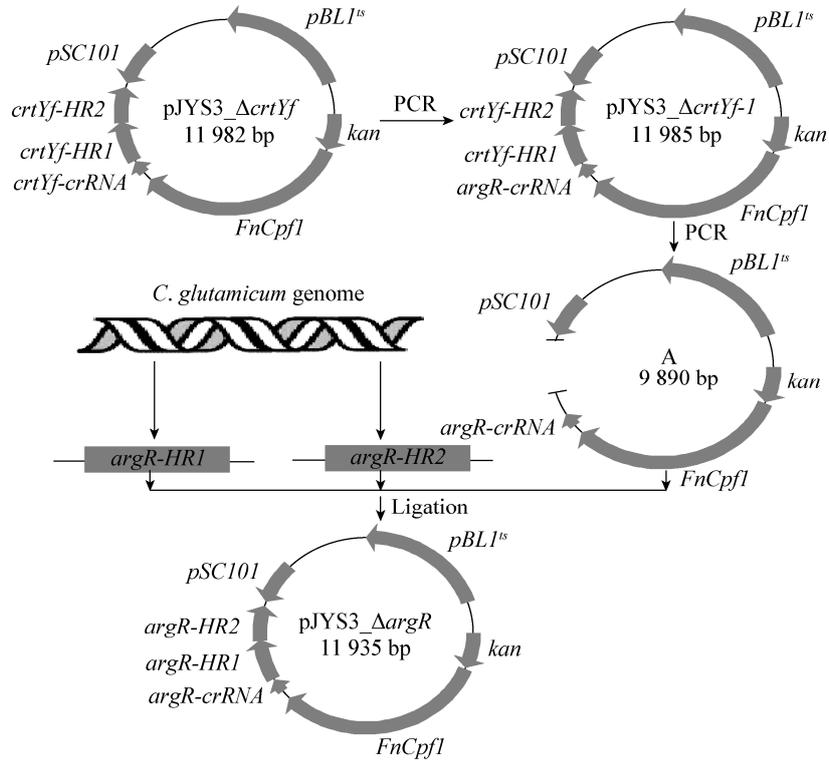


图 2 敲除质粒 pJYS3\_ΔargR 的构建

Figure 2 Construction of knockout plasmid pJYS3\_ΔargR

表 3 CRISPR-Cpf1 系统基因敲除所用的引物

Table 3 Primers used in CRISPR-Cpf1 gene knockout system

引物 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')
crtYf-F-1	CATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAATCTAGCCTATCCAGCAGTCTTCCTGTC
crtYf-R-1	CTAACAAACAAAAGTAGAACAACCTGTTACCCGGGCCCGTGGGTGGCTAGGCAAGTTAC
crRNA_argR-R	CGTCAACACCCGAAAACCTTAAATCCCAATACGACTCACTATAGGGCG
crRNA_argR-F	TGCTGCATTAACAAGCGATTAACGCGCAATTAACCCTCACTAAAG
argR-F-R	GGGATTTAAGTTTTCCGGTGT
argR-F-F	CTAACAAACAAAAGTAGAACAACCTGTTACCCGGGCCGACTCAAACCTATGACTTCACAACC
argR-R-F	TCAACCCCGTCAACACCCGAAAACCTTAAATCCAGCGCCCTAGTTCAAGGCTT
argR-R-R	CATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAATCTAGCAAAGCCTCGTGAGCCTTAATC
crtYf-F-2	GTTGTAGATGTCCCTCGAGTGGACGCTCCGATTTAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGA
crtYf-R-2	CCACTCGAGG GACATCTACAACAGTAGAAATTCGGATCCATTA
crRNA_argF-R	GGCCCGGTGAACAGTTGTT
crRNA_argF-F	CTAGATTGACAGCTAGCTCAGTCTTAG
argF-F-F	GGCCTGGGTGATATCAAGTTTGTAGTCTTTTATGCGATTG
argF-F-R	TGAGCTAGCTGTCAATCTAGTGCACGCTTGACTGGTTCGT
argF-R-F	GAACAACCTGTTACCCGGGCCAGCCGACCTCGAAACGAACC
argF-R-R	AACTTGATATCACCCAGGCCACCTTG
F-F	GTTTGGATCGGTGTCCATGA
F-R	ACGAGGCTGCTTTCAAGAT

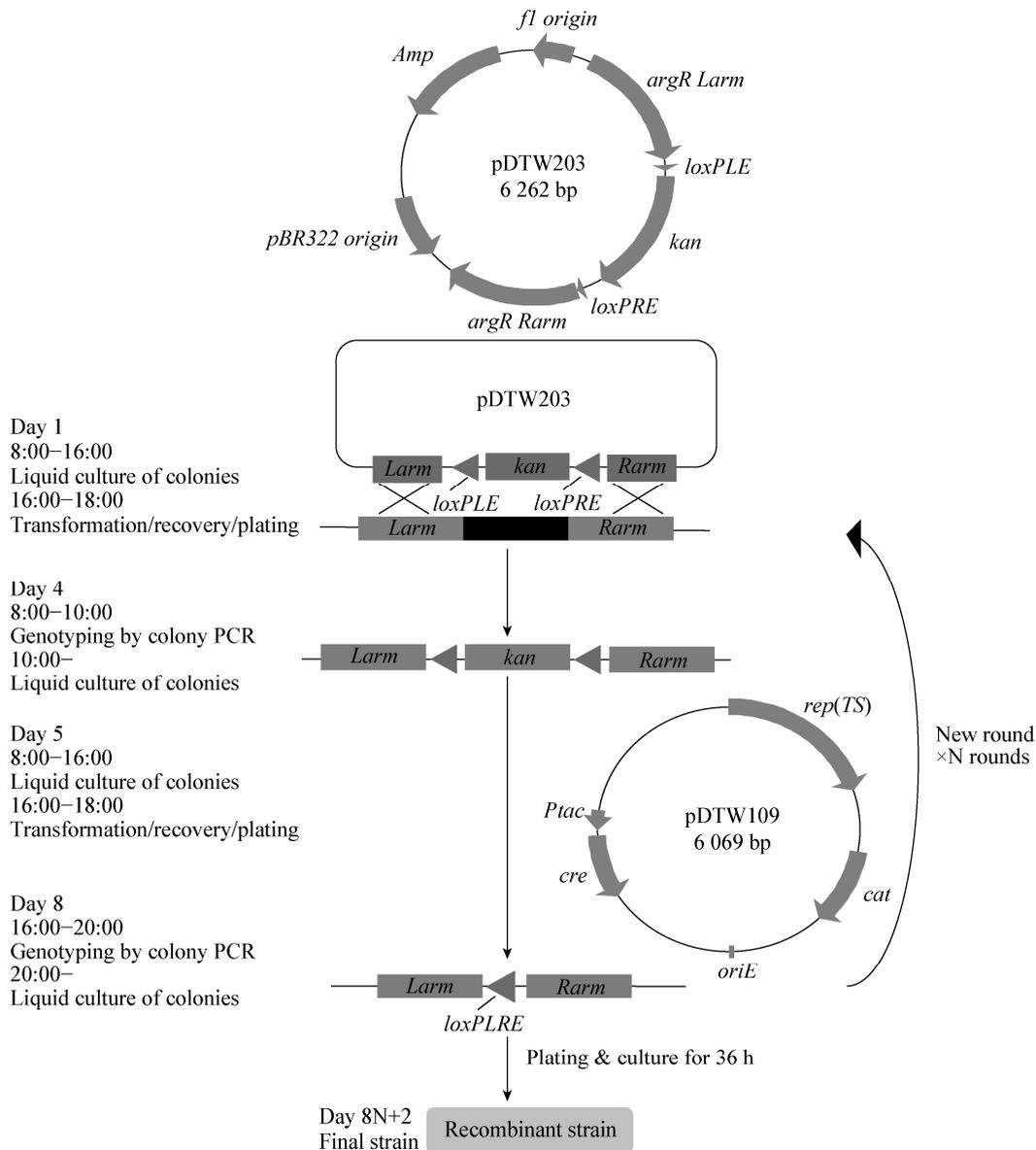


图3 Cre/loxP 辅助的谷氨酸棒状杆菌基因敲除的流程图

Figure 3 Flow chart of Cre/loxP assisted gene knockout in *C. glutamicum*

行菌落 PCR 验证。由于 pDTW109 质粒复制子的温敏特性，在 37 °C 条件下培养即可消除质粒。为了确保菌株的正确性，最后还需要验证其抗性，将 PCR 验证正确的菌株分别转接到含有 30 μg/mL 卡那霉素的 LB-HIS 平板、10 μg/mL 氯霉素的 LB-HIS 平板和 LB-HIS 平板上，其中能在 LB-HIS 平板上生长，但对卡那霉素和氯霉素敏感的菌株即是基因被敲除成功的菌株。

#### 1.4.4 CRISPR-Cpf1 系统敲除方法

以敲除谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 基因组的 *argR* 为例，CRISPR-Cpf1 系统敲除菌株的构建步骤如图 4 所示。首先将敲除质粒 pJYS3\_Δ*argR* 电转入谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的感受态细胞进行基因打靶，然后 Cpf1 对 crRNA 进行加工，成熟的 crRNA 引导 Cpf1 结合到 DNA 的特异位点上切割靶 DNA，在菌体内重组酶的作用下，通过同源重组实

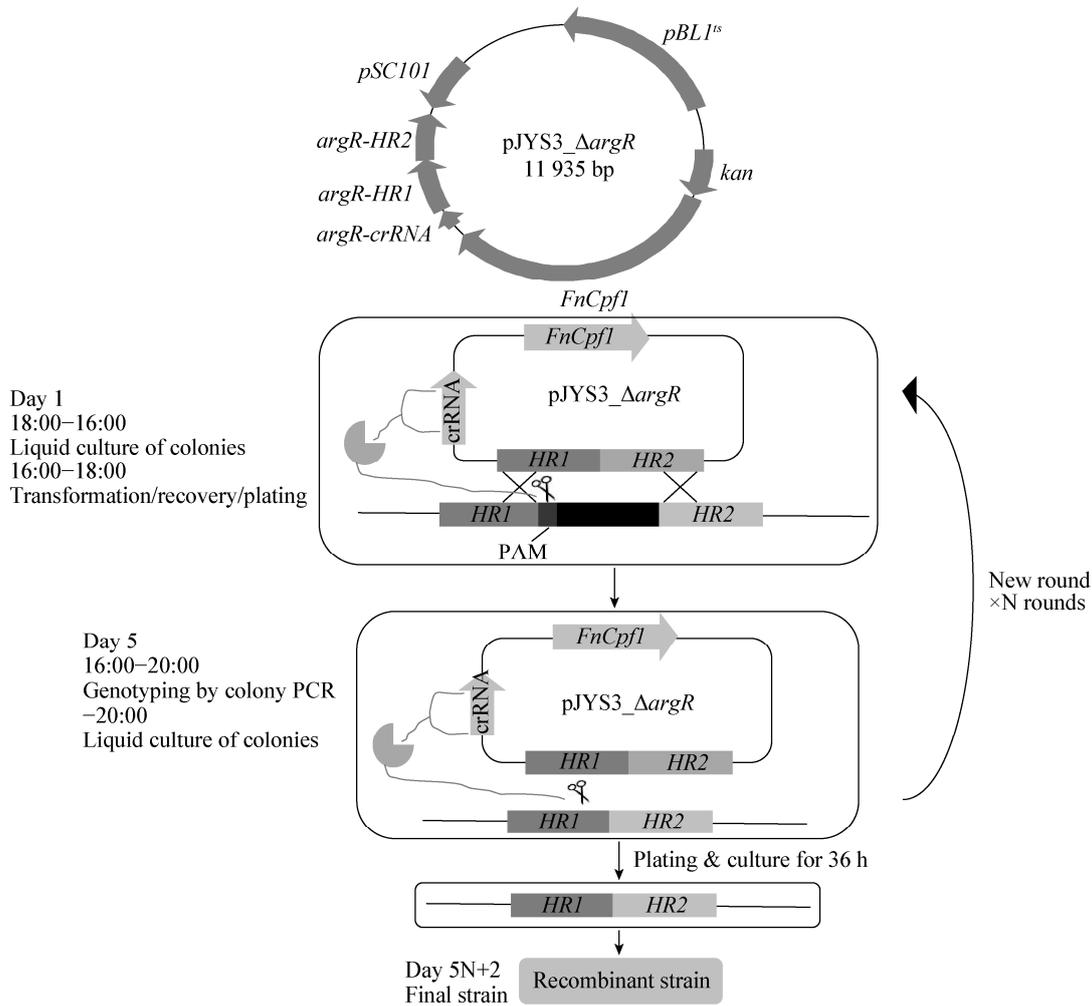


图4 CRISPR-Cpf1 辅助的谷氨酸棒状杆菌基因编辑的流程

Figure 4 Flow chart of CRISPR-Cpf1 assisted gene knockout in *C. glutamicum*

现基因 *argR* 的缺失, 菌落 PCR 验证选出正确的突变株。然后利用质粒 *pJYS3\_ΔargR* 自身的温敏特性, 34 °C 条件下培养即可将敲除质粒消除。为了确保突变株的正确性, 还需要验证其抗性, 分别将转化子转接到含有 30 μg/mL 卡那霉素的 LB-HIS 平板和 LB-HIS 平板上, 其中能在 LB-HIS 平板上生长, 但对卡那霉素敏感的菌株即敲除成功的菌株。

#### 1.4.5 构建重组菌

谷氨酸棒状杆菌感受态细胞的制备采用电转化方法<sup>[18]</sup>, 取约 1-2 μg 打靶质粒与 100 μL 感受态细胞轻轻混匀, 加入电击杯中, 连续电击 2 次(电击条件为 2.5 kV/cm 电压、5.9 ms、25 mF 电容、2 mm 电击杯)。然后置于合适温度下、100 r/min 培养 3 h,

涂布于含有相对应的抗生素固体培养基, 培养至长出较大的单菌落时, 挑取单菌落进行验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 Cre/loxP 系统敲除质粒的构建

参考实验方法 1.4.1, 分别以谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 基因组、pDTW202 质粒为模板, 通过 PCR 扩增出 *argR* 基因上下同源片段和两端含有 *loxP* 位点的 *kan<sup>R</sup>* 片段, 再利用融合 PCR 技术获得目的片段, 最后与线性化载体 pBlueScript II SK 连接, 得到敲除质粒 pDTW203。以 *argR-U-F/argR-D-R* 为引物对重组菌株进行 PCR 验证, 如图 5D 所示, 融合片段(3 377 bp)已经成功连接到载体 pBlueScript

II SK 上, 说明敲除质粒 pDTW203 构建成功。

## 2.2 Cre/loxP 系统敲除菌株的构建

参考实验方法 1.4.3, 将 pDTW203 质粒电转化至谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 感受态细胞中, 通过菌落 PCR 验证阳性克隆, 其中基因组上 *argR* 基因被替换为两端带有 *loxP* 位点的 *kan<sup>R</sup>*

基因的正确转化子命名为谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 $\Delta$ *argR::kan<sup>R</sup>*。制作突变株的感受态细胞, 并将 *kan<sup>R</sup>* 消除质粒 pDTW109 电转入其感受态细胞中, 菌落 PCR 验证结果如图 6 所示。然后通过提高温度使质粒 pDTW109 丢失, 验证抗性无误后的菌株命名为 JML01。

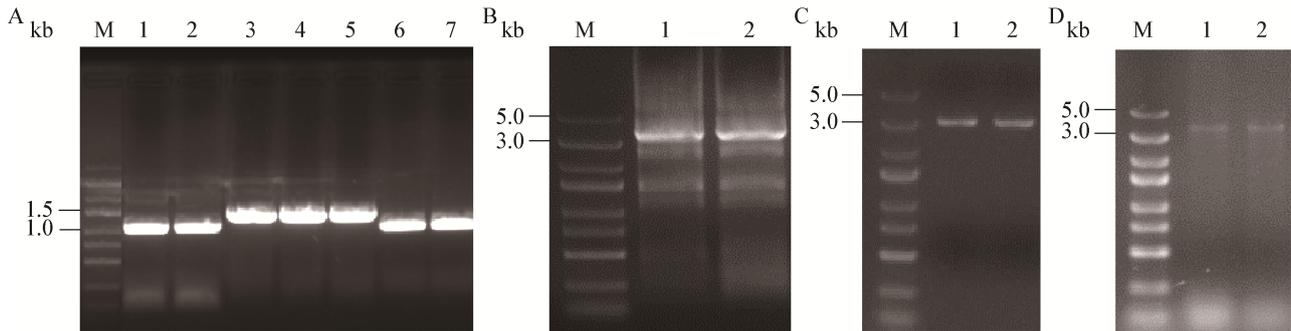


图 5 质粒 pDTW203 琼脂糖凝胶电泳验证

### Figure 5 Construction and verification of plasmid pDTW203

注: M: Marker. A: PCR 扩增 *argR* 基因的上游、下游同源片段和 *kan<sup>R</sup>* 盒; 1-2: *argR* 基因的上游同源片段; 3-5: *kan<sup>R</sup>* 盒; 6-7: *argR* 基因的下游同源片段. B: *argR* 基因的上游、下游同源片段和 *kan<sup>R</sup>* 盒的融合 PCR; 1-2: 融合片段. C: pBlueScript II SK 的 *Bam*H I/*Hind* III 酶切; 1-2: 线性化 pBlueScript II SK. D: 转化子的菌落 PCR 验证; 1-2: 融合片段.

Note: M: Marker. A: Amplification of upstream and downstream homologous fragments of *argR* gene and *kan<sup>R</sup>* cassette by PCR; 1-2: Upstream homology arms of *argR* gene; 3-5: *kan<sup>R</sup>* cassette; 6-7: Downstream homologous arms of *argR* gene. B: Fusion PCR of upstream and downstream homology arms and *kan<sup>R</sup>* box of *argR* gene; 1-2: Fusion fragment. C: Digestion of pBlueScript II SK with *Bam*H I and *Hind* III; 1-2: Linearized pBlueScript II SK. D: Validation of transformants by colony PCR; 1-2: Fusion fragment.

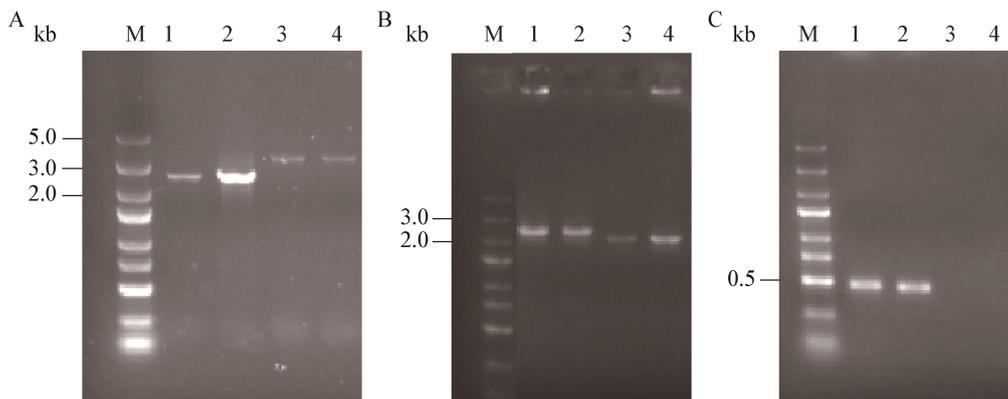


图 6 JML01 的菌落 PCR 验证

### Figure 6 Verification of JML01 by colony PCR

注: M: Marker. A: 谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 $\Delta$ *argR::kan<sup>R</sup>* 的菌落 PCR 验证; 1-2: 以 A-F/A-R 为引物谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的菌落 PCR; 3-4: 以 A-F/A-R 为引物谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 $\Delta$ *argR::kan<sup>R</sup>* 的菌落 PCR. B: JML01 菌株的菌落 PCR 验证; 1-2: 以 A-F/A-R 为引物谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的菌落 PCR; 3-4: 以 A-F/A-R 为引物 JML01 的菌落 PCR. C: JML01 菌株的菌落 PCR 验证; 1-2: 以 *argR-F/argR-R* 为引物谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的菌落 PCR; 3-4: 以 *argR-F/argR-R* 为引物 JML01 的菌落 PCR.

Note: M: Marker. A: Verification of *C. glutamicum* ATCC 13032 $\Delta$ *argR::kan<sup>R</sup>* by colony PCR; 1-2: Colony PCR product of *C. glutamicum* ATCC 13032 with primers A-F/A-R; 3-4: Colony PCR product of *C. glutamicum* ATCC 13032 $\Delta$ *argR::kan<sup>R</sup>* with primers A-F/A-R. B: Verification of JML01 by colony PCR; 1-2: Colony PCR product of *C. glutamicum* ATCC 13032 with primers A-F/A-R; 3-4: Colony PCR product of JML01 with primers A-F/A-R. C: Verification of JML01 by colony PCR; 1-2: Colony PCR product of *C. glutamicum* ATCC 13032 with primers *argR-F/argR-R*; 3-4: Colony PCR product of JML01 with primers *argR-F/argR-R*.

以 A-F/A-R 为引物进行菌落 PCR 验证, 其中图 6A 中泳道 1-2 是用谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 为模板, 泳道 3-4 是用谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 $\Delta$ argR::kan<sup>R</sup> 的基因组为模板, 可以发现 kan<sup>R</sup> 盒已成功替换基因组的 argR 基因。然后以 A-F/A-R 为引物进行菌落 PCR 验证, 其中图 6B 中泳道 1-2 是用谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 菌株为模板, 泳道 3-4 是用 JML01 菌株为模板, 并以 argR-F/argR-R 为引物进行菌落 PCR 验证, 其中图 6C 中泳道 1-2 是用谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 菌株为模板, 泳道 3-4 是用 JML01 菌株为模板, 可以发现 kan<sup>R</sup> 基因被成功消除。挑取单菌落分别验证其卡那霉素及氯霉素抗性, 其中有些菌株可以在无抗 LB-HIS 平板能够生长(图 7A), 而在卡那霉素(图 7B)和氯霉素抗性 LB-HIS 平板(图 7C)不能生长的即是目的菌株。以上结果显示, 成功构建了敲除菌株 JML01。同理, 按照同样的方法构建了 argF 的敲除菌株 JML02, 此处不在赘述。

在同源重组 Cre/loxP 系统中, 敲除质粒是由 pBlueScript II SK 构建而来, 其中 pBlueScript II SK 在 *E. coli* 中是高拷贝的, 质粒大小只有 2 961 bp 左右, 容易提取出纯净且高浓度的质粒, 有利于同源重组的进行。由图 6 可看出, 构建的 JML01 菌落 PCR 结果无误。pDTW109 是 Cre 重组酶高效表达的温敏型载体, 具有双复制子可以在大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌中穿梭复制, 还有和敲除质粒不同的抗性标记氯霉素抗性, 这些都有利于质粒的转化。由于质粒的温敏特性, 提高培养温度即可使质粒

pDTW109 丢失<sup>[19]</sup>, 由图 7 可知, 少数菌株还具有卡那霉素抗性(3/16), 氯霉素抗性已被消除。由此可以看出 pDTW109 可以高效表达 Cre 重组酶, 并除去滞留在基因组上的 kan<sup>R</sup> 片段, 同时温敏载体 pDTW109 也容易通过提高培养温度使其丢失。最终, 根据实验统计, 将 1  $\mu$ g 敲除质粒导入到感受态细胞中, 长出的转化子约 100 个。再经过 kan<sup>R</sup> 片段消除后, 随机挑取 40 个转化子, 以 A-F/A-R 为引物经过 PCR 验证有 25% 的转化子是 argR 成功敲除的菌株(图 8A)。在敲除 argF 的过程中长出的转化子约 150 个, 随机挑取 40 个转化子, 以 F-F/F-R 为引物经过 PCR 验证有 33% 的转化子是 argF 成功敲除的菌株(图 8B)。然而, 其周期相对较长, 成功敲除一个基因需要 10 d。

### 2.3 CRISPR-Cpf1 系统敲除质粒的构建

参考实验方法 1.4.2, 首先以 pJYS3\_ $\Delta$ crtYf 质粒进行定点突变, 通过全质粒 PCR 将 crtYf 基因的 crRNA 替换为 argR 基因的 crRNA, 并转化到 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 经验证后得到质粒 pJYS3\_ $\Delta$ crtYf-1。再以质粒 pJYS3\_ $\Delta$ crtYf-1 为模板通过 PCR 扩增得到片段 A, 同时以谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 基因组为模板扩增出 argR 基因的上下游同源片段, 通过 Gibson 法将 3 个片段进行组装, 并转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞, 最后以 argR-F-F/argR-F-R 为引物进行菌落 PCR 验证并测序验证, 如图 9E 所示, 3 个片段已经成功连接, 说明敲除质粒 pJYS3\_ $\Delta$ argR 构建成功。

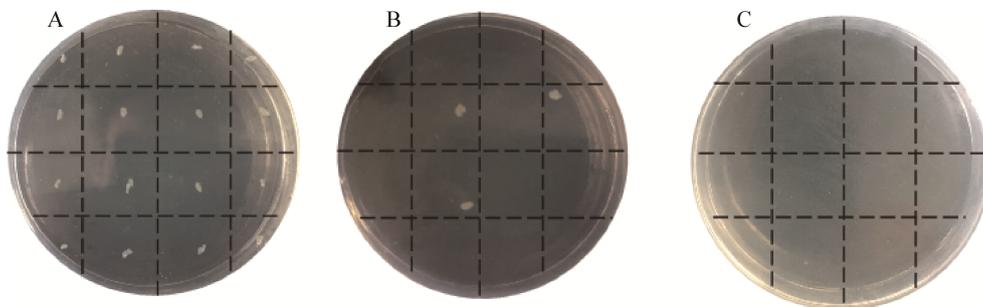


图 7 JML01 菌株的抗性验证

Figure 7 Antibiotic verification of JML01 strain

注: A: LB-HIS; B: 携带卡那霉素的 LB-HIS; C: 携带氯霉素的 LB-HIS.

Note: A: LB-HIS; B: LB-HIS with kanamycin; C: LB-HIS with chloramphenicol.

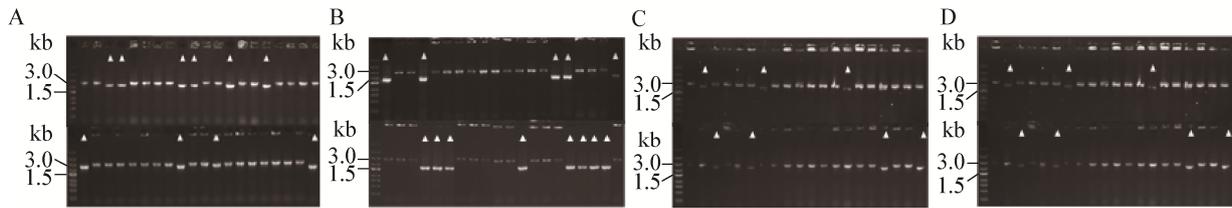


图8 通过 Cre/loxP 敲除系统和 CRISPR-Cpf1 敲除系统获得的转化子的 PCR 验证

Figure 8 PCR validation of colonies obtained by Cre/loxP assisted system and CRISPR-Cpf1 assisted system

注: A: Cre/loxP 系统敲除 *argR* 获得的转化子; B: Cre/loxP 系统敲除 *argF* 获得的转化子; C: CRISPR-Cpf1 系统敲除 *argR* 获得的转化子; D: CRISPR-Cpf1 系统敲除 *argF* 获得的转化子. *argR* 和 *argF* 缺失的阳性转化子在琼脂糖凝胶上用三角形标记.

Note: A: Transformants for the deletion of *argR* by Cre/loxP assisted system; B: Transformants for the deletion of *argF* by Cre/loxP assisted system; C: Transformants for the deletion of *argR* by CRISPR-Cpf1 assisted system; D: Transformants for the deletion of *argF* by CRISPR-Cpf1 assisted system. The editing-positive transformants for the deletion of *argR* and *argF* were marked with triangles in agarose gel.

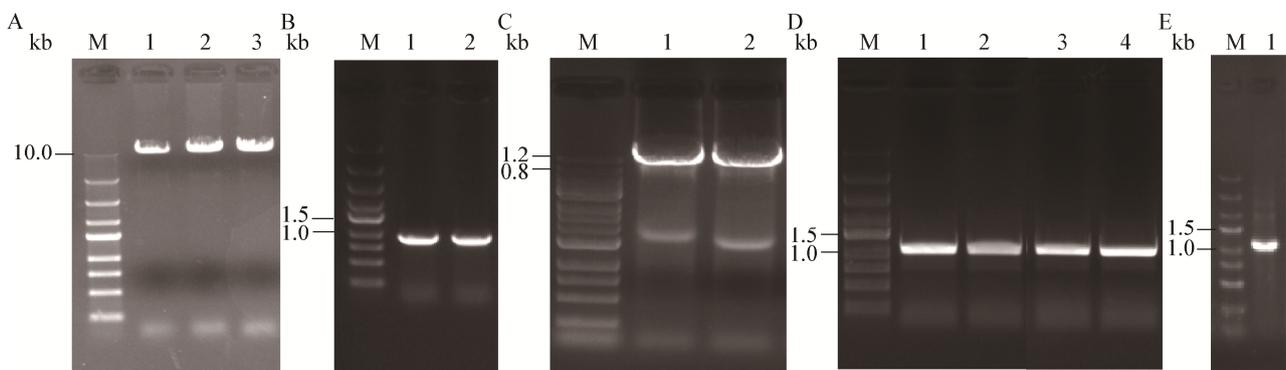


图9 质粒 pJYS3\_ΔargR 琼脂糖凝胶电泳验证

Figure 9 Construction and verification of plasmid pJYS3\_ΔargR

注: M: Marker. A: pJYS3\_ΔcrtYf 全质粒 PCR; 1-3: pJYS3\_ΔcrtYf-1. B: 转化子的菌落 PCR 验证; 1-2: pJYS3\_ΔcrtYf-1 突变后的片段. C: 片段 A 的扩增; 1-2: 片段 A. D: 转化子的菌落 PCR 验证; 1-2: *argR* 基因的上游同源片段; 3-4: *argR* 基因的下游同源片段. E: 转化子的菌落 PCR 验证; 1: 上游同源片段(1 020 bp).

Note: M: Marker. A: Full-plasmid of pJYS3\_ΔcrtYf PCR; 1-3: pJYS3\_ΔcrtYf-1. B: Validation of transformants by colony PCR; 1-2: Fragments of the pJYS3\_ΔcrtYf-1 mutation. C: Amplification of fragment A; 1-2: Fragment A. D: Validation of transformants by colony PCR; 1-2: Upstream homology arm of *argR*; 3-4: Downstream homologous arm of the *argR*. E: Validation of transformants by Colony PCR; 1: Upstream homology fragment (1 020 bp).

## 2.4 CRISPR-Cpf1 系统敲除菌体的构建

参考实验方法 1.4.4, 通过电转化法将 pJYS3\_ΔargR 敲除质粒转入谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的感受态细胞进行基因打靶, 在胞内重组酶的作用下通过同源重组反应实现基因 *argR* 的敲除. 挑出转化子进行菌落 PCR 验证, 结果如图 10 所示. 以 A-F/A-R 为引物进行菌落 PCR 验证, 其中泳道 1-2 是用谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 菌株为模板, 泳道 3-6 是用 JML03 菌株为模板. 并

以 *argR-F/argR-R* 为引物进行菌落 PCR 验证, 泳道 7-8 是用谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 菌株为模板, 泳道 9-12 是用 JML03 菌株为模板, 均显示敲除成功. 再挑取平板上单菌落验证其卡那霉素抗性, 由图 11 可以发现有部分菌株可以在无抗 LB-HIS 平板生长, 而对卡那霉素抗性敏感, 这部分菌株的 *argR* 被成功敲除, 命名为 JML03. 同理, 按照同样的方法构建了 *argF* 的敲除菌株 JML04, 此处不在赘述.

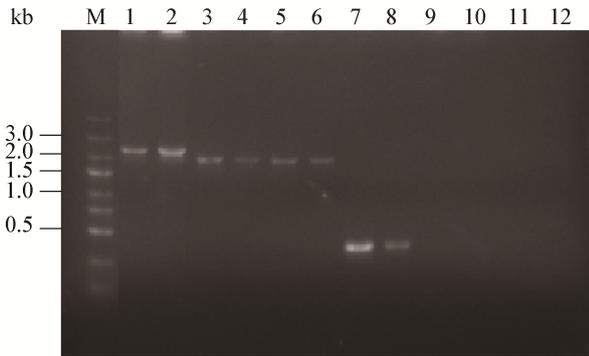


图 10 JML03 菌株的菌落 PCR 验证

**Figure 10 Verification of JML03 strain by colony PCR**

注: M: Marker; 1-2: 以 A-F/A-R 为引物谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的菌落 PCR; 3-6: 以 A-F/A-R 为引物 JML03 的菌落 PCR; 7-8: 以 *argR*-F/*argR*-R 为引物谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的菌落 PCR; 9-12: 以 *argR*-F/*argR*-R 为引物 JML03 的菌落 PCR.  
Note: M: Marker; 1-2: Colony PCR product of *C. glutamicum* ATCC 13032 with primers A-F/A-R; 3-6: Colony PCR product of JML03 with primers A-F/A-R; 7-8: Colony PCR product of *C. glutamicum* ATCC 13032 with primers *argR*-F/*argR*-R; 9-12: Colony PCR product of JML03 with primers *argR*-F/*argR*-R.

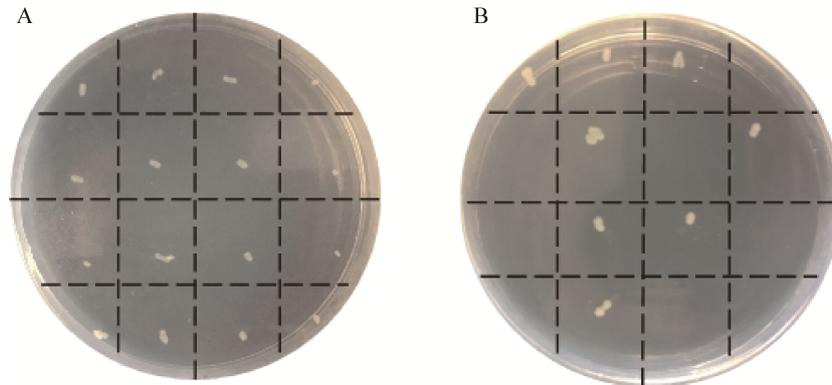


图 11 JML02 菌株的抗性验证

**Figure 11 Antibiotic verification of JML02 strain**

注: A: LB-HIS; B: 携带卡那霉素的 LB-HIS.  
Note: A: LB-HIS; B: LB-HIS with kanamycin.

18%的转化子是 *argF* 成功敲除的菌株(图 8D)。对于 CRISPR-Cpf1 敲除系统, 仅需要 7 d 即可完成单个基因的无痕敲除, 与 Cre/loxP 系统相比具有明显优势。

### 3 结论与讨论

本研究立足于谷氨酸棒状杆菌代谢工程领域的最新研究进展, 以谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032

在 CRISPR-Cpf1 敲除系统中, 打靶质粒 pJYS3\_Δ*argR* 是由 pJYS3\_Δ*crtYf* 构建而来, 其基本结构如图 4 所示。该质粒主要包括 FnCpf1、crRNA、上下游同源臂和两个复制子<sup>[20]</sup>。质粒 pJYS3\_Δ*argR* 大小超过 10 000 bp, 质粒过大对细胞负荷较高, 因而拷贝数较低。将敲除质粒导入细胞后发现, 其基因编辑效率较低, 有些菌株基因组上仍然含有 *argR* 基因。在利用 pJYS3\_Δ*argR* 自身的温敏特性消除抗生素标记时, 还有较多菌株具有卡那霉素抗性 (8/16), 这些不利因素都严重影响了该敲除系统的效率(图 11)。据统计, 将 1 μg 敲除质粒导入到感受态细胞中, 约产生 300 个转化子, 随机挑取 40 个转化子, 以 A-F/A-R 为引物经过 PCR 验证有 18% 的转化子是 *argR* 成功敲除的菌株(图 8C)。在敲除 *argF* 的过程中, 约产生 300 个转化子, 随机挑取 40 个转化子, 以 F-F/F-R 为引物经过 PCR 验证有

作为出发菌株, 选取了两个靶基因 *argR* 和 *argF*, 分别利用 CRISPR-Cpf1 和 Cre/loxP 两种基因编辑系统成功敲除了这两个靶基因。其中, Cre/loxP 敲除系统基因敲除的重组率略高, 在诸多报道中也得到广泛的应用<sup>[21-22]</sup>。经过同源置换和 *loxP* 位点重组后, 仅在靶基因位置残留 34 bp 的 *loxPLR* 位点。当再次敲除时, Cre 重组酶并不识别残留的 *loxPLR* 位

点<sup>[23]</sup>, 不影响基于 *loxP* 位点的新一轮重组, 因此可实现谷氨酸棒状杆菌基因连续敲除。可能由于培养基中添加的卡那霉素浓度不高, 且抗性筛选所需的时间较长(至少需要 3 d, 如图 3 所示), 培养基中卡那霉素的抗性作用减弱, 因而容易产生假阳性菌株。经过数据统计发现, *argR* 和 *argF* 敲除阳性率分别达到 25%和 33%。综上, 在 Cre/*loxP* 敲除系统中通过两步同源重组过程可实现基因的敲除, 其基因编辑效率略低于 *sacB* 的反向筛选技术<sup>[19]</sup>, 需要经过  $8N+2$  d 才可完成  $N$  轮迭代基因敲除, 而后者仅需 8 d 即可完成一轮敲除。

由于 Cre/*loxP* 系统并不是一种无痕敲除技术, 可能会对宿主细胞产生一定的影响, 且周期较长, 仍然需要开发更加高效和无痕的敲除技术。CRISPR 是最新开发的基因组编辑技术, 可以实现对多种原核和真核生物基因组 DNA 的定向敲除和整合, 并于 2017 年首次在谷氨酸棒状杆菌得以应用<sup>[15]</sup>。与 Cre/*loxP* 敲除系统相比, CRISPR-Cpf1 系统可以实现基因的无痕敲除, 不会留下任何辅助识别位点, 同时该敲除系统的操作周期比较短, 正如相关报道所示 CRISPR-Cpf1 敲除系统是迄今为止发现的一种最简单的 CRISPR 免疫系统<sup>[24]</sup>, 仅需一次同源重组即可完成靶基因的敲除。理论上, 采用该系统可在  $5N+2$  d 内完成  $N$  轮迭代基因敲除(图 4), 比 Cre/*loxP* 敲除系统和 *sacB* 反向筛选技术更加简单、快捷。除此之外, CRISPR-Cpf1 敲除系统还可一次作用于多个靶位点, 实现多重编辑, 这将大大提高多基因的敲除效率。然而可能由于 Cpf1 表达不足或 crRNA 转录盒突变导致假阳性, 因此 CRISPR/Cpf1 敲除系统的 *argR* 和 *argF* 阳性敲除率略低于 Cre/*loxP* 敲除系统。

综上所述, CRISPR-Cpf1 系统在谷氨酸棒状杆菌的基因敲除中更具优势, 仅需一次同源重组即可实现基因的无痕敲除, 缩短时间和降低工作量。尽管如此, CRISPR-Cpf1 系统在某些方面也有待进一步完善, 如敲除质粒偏大、假阳性菌株数目较多,

给质粒构建和菌株筛选工作带来一定的压力。因而, 在 CRISPR-Cpf1 同源重组敲除系统的后续研究中, 应从提高 Cpf1 的表达、减少 crRNA 转录盒突变以及优化同源臂的长度等方面入手, 使该基因编辑系统的效率更高。

## REFERENCES

- [1] Siebert D, Wendisch VF. Metabolic pathway engineering for production of 1,2-propanediol and 1-propanol by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 91
- [2] Shi AQ, Zhu XN, Lu J, et al. Activating transhydrogenase and NAD kinase in combination for improving isobutanol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 16: 1-10
- [3] Lindner SN, Niederholtmeyer H, Schmitz K, et al. Polyphosphate/ATP-dependent NAD kinase of *Corynebacterium glutamicum*: biochemical properties and impact of *ppnK* overexpression on lysine production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 583-593
- [4] Park SH, Kim HU, Kim TY, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4618
- [5] Kim SY, Lee J, Lee SY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(2): 416-421
- [6] Man ZW, Xu MJ, Rao ZM, et al. Systems pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* for improved L-arginine production[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28629
- [7] Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, et al. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins[J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 104(1/3): 5-25
- [8] Jäger W, Schäfer A, Pühler A, et al. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(16): 5462-5465
- [9] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Gene*, 1994, 145(1): 69-73
- [10] Hu JY, Tan YZ, Li YY, et al. Construction and application of an efficient multiple-gene-deletion system in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Plasmid*, 2013, 70(3): 303-313
- [11] Xu DQ, Tan YZ, Huan XJ, et al. Construction of a novel shuttle vector for use in *Brevibacterium flavum*, an industrial amino acid producer[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 80(1): 86-92
- [12] Xu DQ, Tan YZ, Shi F, et al. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in

- Corynebacterium glutamicum*[J]. Plasmid, 2010, 64(2): 85-91
- [13] Pyne ME, Moo-Young M, Chung DA, et al. Coupling the CRISPR/Cas9 system with lambda red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(15): 5103-5114
- [14] Jiang WY, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(3): 233-239
- [15] Jiang Y, Qian FH, Yang JJ, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Nature Communications, 2017, 8: 15179
- [16] Theron G, Reid SJ. ArgR-promoter interactions in *Corynebacterium glutamicum* arginine biosynthesis[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2011, 58(2): 119-127
- [17] Chen C, Li YY, Hu JY, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 for L-valine production[J]. Metabolic Engineering, 2015, 29: 66-75
- [18] van der Rest ME, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(4): 541-545
- [19] Okibe N, Suzuki N, Inui M, et al. Efficient markerless gene replacement in *Corynebacterium glutamicum* using a new temperature-sensitive plasmid[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 85(2): 155-163
- [20] Nakamura J, Kanno S, Kimura E, et al. Temperature-sensitive cloning vector for *Corynebacterium glutamicum*[J]. Plasmid, 2006, 56(3): 179-186
- [21] Huang YY, Li L, Xie S, et al. Recombineering using RecET in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 via a self-excisable cassette[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 7916
- [22] Tsuge Y, Suzuki N, Inui M, et al. Random segment deletion based on IS31831 and *Cre/loxP* excision system in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(6): 1333-1341
- [23] Suzuki N, Inui M, Yukawa H. Site-directed integration system using a combination of mutant *lox* sites for *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(4): 871-878
- [24] Hur JK, Kim K, Been KW, et al. Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleoproteins[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(8): 807-808

### 2019 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-1)

序号	活动名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	海洋微生物药物创新论坛	中国微生物学会海洋微生物专业委员会	1 月	60	福建 厦门	林厚文 13801985620
2	生物信息学培训班	中国微生物学会病毒学专业委员会	3 月	50	山东 泰安	吴莹 1590145568
3	第四届国际休克与脓毒症学术会议	中国微生物学会微生物毒素	3 月 29-31 日	1200	广东 广州	刘志锋 13711598120
4	人兽共患病学术交流研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	4 月	200	岳阳/ 浙江莫干山	蒋毅 13520419382
5	生物安全培训	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	4 月	100	北京	贾晓娟 010-64806013
6	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会第五次学术交流会	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	4 月	100	山东 梁山	贾晓娟 010-64806013
7	第六届中国微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物专业委员会	5 月	200	湖北 宜昌	胡育骄 010-53218310
8	2019 年人兽共患病国际研讨会暨中国狂犬病年会	中国微生物学会	5 月 10-11 日	2000	安徽 合肥	娜日莎, 刘霞 010-84039863