



研究报告

解纤维梭菌脱水四环素诱导的 ClosTron 基因打靶系统构建

崔古贞^{1,2} 花登雄^{1,3} 管玉祝¹ 鲍江舰¹ 张馨月¹ 谷俊莹^{3,4} 陈峰宏¹ 洪伟^{*1,2}

1 贵州医科大学基础医学院微生物学教研室 贵州 贵阳 550025

2 地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室 贵州 贵阳 550004

3 贵州医科大学医学检验学院 贵州 贵阳 550004

4 贵州医科大学附属医院 贵州 贵阳 550004

摘要:【背景】解纤维梭菌是发酵木质纤维素生产乙醇的中温模式菌株,构建可控诱导的基因打靶技术是研究解纤维梭菌遗传调控的重要手段。【目的】在解纤维梭菌中构建脱水四环素诱导的 ClosTron 基因打靶系统。【方法】首先,分析解纤维梭菌对脱水四环素的敏感性,筛选合适的诱导剂浓度,并以 β -葡萄糖苷酶为报告基因,检测其在解纤维梭菌中的诱导效果。然后,将脱水四环素诱导型操纵子与 II 型内含子元件组合,构建脱水四环素诱导的 ClosTron 质粒。最后,以解纤维梭菌 *mspI*、*ldh* 和 *ack* 为例,检测其在解纤维梭菌中的打靶效率。【结果】脱水四环素诱导系统在解纤维梭菌中能够诱导 ClosTron 元件表达,在 *mspI*、*ldh* 和 *ack* 这 3 个基因位点的打靶效率分别为 $29.48\% \pm 15.51\%$ 、 $23.61\% \pm 7.08\%$ 和 $28.09\% \pm 6.97\%$ 。【结论】在解纤维梭菌中成功构建脱水四环素诱导的 ClosTron 基因打靶系统,为梭菌基因工程改造奠定了基础。

关键词: 解纤维梭菌,脱水四环素诱导系统, ClosTron, II 型内含子

Construction of anhydrotetracycline-inducible ClosTron system in *Clostridium cellulolyticum*CUI Guzhen^{1,2} HUA Dengxiong^{1,3} GUAN Yuzhu¹ BAO Jiangjian¹ ZHANG Xinyue¹
GU Junying^{3,4} CHEN Zhenghong¹ HONG Wei^{*1,2}

1 Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China

2 Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guiyang, Guizhou 550004, China

3 School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China

4 Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China

Abstract: [Background] *Clostridium cellulolyticum* is a mesophilic model strain for ethanol production from lignocellulose. Constructing the gene targeting technology with controllable induction is an important means to study the genetic regulation of *C. cellulolyticum*. [Objective] To construct an

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31760318); Science and Technology Project of Guizhou Province ([2019] 1441, [2018] 5779-17, [2020] 1Z067)

*Corresponding author: E-mail: hongwei@gmc.edu.cn

Received: 08-12-2020; Accepted: 28-03-2021; Published online: 31-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31760318); 贵州省科技计划项目([2019] 1441, [2018] 5779-17, [2020] 1Z067)

*通信作者: E-mail: hongwei@gmc.edu.cn

收稿日期: 2020-12-08; 接受日期: 2021-03-28; 网络首发日期: 2021-03-31

anhydrotetracycline-inducible ClosTron gene targeting system in *C. cellulolyticum*. **[Methods]** Firstly, we determined the sensitivity of *C. cellulolyticum* to anhydrotetracycline and selected the appropriate inducer concentration, and then tested the inducible effect using β -glucosidase gene as reporter gene. Secondly, we constructed an anhydrotetracycline-induced ClosTron plasmid by combining the anhydrotetracycline-inducible operon with group II intron elements. Finally, the *mspI*, *ldh* and *ack* were selected as targets to determine the targeting efficiency in *C. cellulolyticum*. **[Results]** The anhydrotetracycline-inducible system could induce the ClosTron expression in *C. cellulolyticum*, and the targeting efficiency at *mspI*, *ldh* and *ack* sites were $29.48\% \pm 15.51\%$, $23.61\% \pm 7.08\%$ and $28.09\% \pm 6.97\%$, respectively. **[Conclusion]** The anhydrotetracycline-inducible ClosTron system was successfully constructed in *C. cellulolyticum*, which laid a foundation for genetic engineering of *Clostridium*.

Keywords: *Clostridium cellulolyticum*, anhydrotetracycline-inducible system, ClosTron, group II intron

木质纤维素因其环境友好、可再生等特点,成为近年来开发新型绿色能源的主要候选之一^[1-2]。解纤维梭菌(*Clostridium cellulolyticum*)是发酵木质纤维素产乙醇的革兰氏阳性厌氧嗜中温菌,因同时具有纤维素酶生产、纤维素水解糖化和发酵产乙醇的能力,成为木质纤维素整合生物加工的最优秀的模式菌株之一^[3-4]。然而,解纤维梭菌仍存在纤维素酶活性低、乙醇产量低等缺点,因此,代谢工程改造是提高解纤维梭菌性能的重要手段^[5]。

然而,解纤维梭菌属于厚壁难改造的革兰氏阳性厌氧菌,而且存在限制性修饰系统等问题,传统的遗传改造技术非常困难且效率较低^[6]。基于 II 型内含子构建的 Targetron 技术高效的基因打靶特性,尤其适用于难转化微生物的遗传改造^[7-9]。目前,该技术已在解纤维梭菌^[10]、拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)^[11]、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)^[11]、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)^[11-12]、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)^[13]和产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)^[14]等多个梭菌物种获得应用。由于该技术在梭菌物种中的优势,因此 Targetron 技术在梭菌物种也被称为 ClosTron 技术^[13]。

ClosTron 技术在梭菌中应用时存在其固有的缺陷,如脱靶现象、细胞毒性和条件失活等^[5-6,15]。因此,为了提高其打靶精度,在以前的工作中我们构建了阿拉伯糖诱导的 ClosTron 打靶系统 (ARAI-ClosTron),并在解纤维梭菌中实现了高效的可控诱导表达,显著提高了其效率,降低了脱靶现

象^[15]。然而,阿拉伯糖是一种碳源,在多种细菌中可被代谢,其浓度可能会随着时间变化而改变,作为诱导剂使用时,阿拉伯糖并不是最佳选择。因此,为了提高 ClosTron 技术在梭菌中的可操作性,建立多样化的 ClosTron 技术,并进一步拓展 ClosTron 系统的应用范围,本研究以四环素诱导系统为基础构建了脱水四环素诱导型 ClosTron 系统,并以解纤维梭菌为例检测了其打靶效率,以期 ClosTron 技术的应用及梭菌遗传改造奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株、质粒与培养方法

本研究用到的所有菌株及质粒详见表 1。大肠杆菌菌株均使用 LB 肉汤培养基于 37 °C 条件下培养,必要时补充 100 μ g/mL 氨苄青霉素作为筛选条件。构建及筛选重组质粒时使用含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基(含 15 g/L 琼脂)。解纤维梭菌 H10 (本文简称为 H10 菌株)使用 GS-2 厌氧培养基于 34 °C 条件下静置培养,必要时补充 20 μ g/mL 的红霉素作为筛选条件。GS-2 厌氧培养基配方^[10,15]: 尿素 2.1 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.1 g/L, 盐酸半胱氨酸 1.0 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mg/L, 酵母膏 6.0 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.25 mg/L, MOPS-Na 10.0 g/L, 二水合柠檬酸钠 3.0 g/L, 纤维二糖 5.0 g/L, 刃天青 0.1 mg/L, pH 7.4。H10 菌株培养过程中均接种在含有 100 mL 培养基的 250 mL 厌氧瓶中。GS-2 固体培养基含有 15 g/L 琼脂。

表 1 本研究所用到的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant features	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	Clone strain, <i>F' lacZAM15Δ (lacZYA-argF) relA1</i>	TaKaRa
<i>C. cellulolyticum</i> H10	<i>F⁻, ompT, hsdS (rBB-mB), gal, dcm (DE3)</i>	TaKaRa
H10::pGusA2-2tetO1	Derived from <i>C. cellulolyticum</i> H10, carrying plasmid pGusA2-2tetO1	This study
H10::pSY11-mspI	Derived from <i>C. cellulolyticum</i> H10, carrying plasmid pSY11-mspI	This study
H10::pSY11-ldh	Derived from <i>C. cellulolyticum</i> H10, carrying plasmid pSY11-ldh	This study
H10::pSY11-ack	Derived from <i>C. cellulolyticum</i> H10, carrying plasmid pSY11-ack	This study
Plasmids		
pGusA2-2tetO1	Containing anhydrotetracycline-inducible operon and <i>bgl</i>	[16]
pSY6	Targetron vector, <i>ptb</i> promoter, Amp ^r	[12]
pSY6-mspI	Targetron vector, containing <i>mspI</i> intron	[6]
pSY6-ldh	Targetron vector, containing <i>ldh</i> intron	[6]
pSY6-ack	Targetron vector, containing <i>ack</i> intron	[6]
pSY11	Derived from pSY6, carrying anhydrotetracycline-inducible operon	This study
pSY11-mspI	Derived from pSY11, targeting <i>mspI</i> in <i>C. cellulolyticum</i> H10	This study
pSY11-ldh	Derived from pSY11, targeting <i>ldh</i> in <i>C. cellulolyticum</i> H10	This study
pSY11-ack	Derived from pSY11, targeting <i>ack</i> in <i>C. cellulolyticum</i> H10	This study

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 凝胶回收试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 纯化试剂盒和质粒提取试剂盒, TaKaRa 公司; *Msp* I 甲基转移酶和限制性内切酶, New England Biolabs 公司; DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 DNA 分子量标准, 北京全式金生物技术有限公司; IPTG、X-Gluc、抗生素及其他常规生化试剂、引物(表 2)合成及测序, 生工生物工程(上海)股份有限公司完成。氨苄青霉素用无

菌水配制成 100 mg/mL 母液备用, 四环素和脱水四环素分别用无水乙醇配制成 2 mg/mL 母液备用。

紫外可见分光光度计、核酸电泳仪和凝胶成像仪, 北京六一生物科技有限公司; PCR 仪、高速冷冻离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; 电转化仪, Bio-Rad 公司; 厌氧工作站 AW400SG, Electrotec 公司; 超声破碎仪, Scientz 生物科技公司。

表 2 本研究所用到的引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
tetR-U	TCGACGGATCCCCGGGAAGCTCGACATCTTGGTTACCG	756
tetR-D	GATAGAGTCCTAGGCCAGGTCGATCGATTATATTGATAAAAATAATAATAGTGG	
Pcm-tetO1-U	CAATATAATCGATCGACCTGGCCTAGGACTCTATCATTGATAGAGTTTGAAACTCTATC	169
Pcm-tetO1-D	GATAATTATCTCGAGCATATGAACCTAACTAGTTACC	
MspI-F	GGATTAATATAGAAATTAAGAAGG	417
MspI-R	CAATACTGGTTTCAGCATCATTAC	
Ldh-F	CAGAGTTATAGGCTCCGGAACAGTTC	322
Ldh-R	GATAGCCTCTACAATTCTTCTTACTGC	
Ack-F	GATTGACAATTCCTTTATAAAGCAATC	245
Ack-R	TAACTCTCTTACTGCATTCATAAC	

1.2 H10 菌株对四环素和脱水四环素的敏感性检测

在 GS-2 固体平板上挑取 H10 单菌落接种在 GS-2 液体培养基中^[6], 34 °C 静置培养过夜至对数期(OD_{600} 约为 0.6)后, 按 1:100 稀释后接种在含四环素和脱水四环素的 GS-2 液体培养基中继续培养, 利用紫外可见分光光度计检测其在 600 nm 处的细胞密度, 粗略计算 H10 对四环素和脱水四环素的敏感性。然后选择毒性较小的脱水四环素作为诱导剂, 绘制 H10 生长曲线。

1.3 质粒构建

pGusA2-2tetO1 由中国科学院微生物研究所惠赠^[16], pSY6 由中国科学院上海植物生理生态研究所惠赠^[12], pSY6-*m*spI/*ldh*/*ack* 由实验室保存^[6]。

pSY11 质粒构建过程如下: 首先, 分别以 P_{cm-tetO1}-U/P_{cm-tetO1}-D 和 tetR-U/tetR-D 为引物(表 2), 以 pGusA2-2tetO1 为模板, 通过 PCR 扩增 P_{2tetO1} 启动子及 P_{thl}-tetR 阻遏蛋白。然后, 以

P_{cm-tetO1}-U/tetR-D 为引物, 以上述 PCR 产物为模板, 通过重叠延伸 PCR^[6]扩增获得四环素操纵子。最后, 利用 *Xma*I/*Xho*I 双酶切上述 PCR 产物及 pSY6 质粒, 利用 T4 DNA 连接酶连接获得 pSY11 质粒。

pSY11-*m*spI 打靶质粒构建过程如下: 利用 *Xho*I/*Bsr*G I 双酶切 pSY6-*m*spI/*ldh*/*ack* 质粒, 回收 0.35 kb 的 Retargetron 片段(II 型内含子识别靶位点的关键区域, 替换该序列, 即可改变识别的靶位点), 然后与经同样双酶切的 pSY11 质粒连接, 构建获得 pSY11-*m*spI 质粒。质粒 pSY11-*ldh* 和 pSY11-*ack* 构建过程同 pSY11-*m*spI, 所有质粒构建过程详见图 1。本文用到的所有质粒和引物见表 1 和表 2。

1.4 电转化

由于 H10 菌株含有限制性修饰系统, 因此, 转化之前, 所有质粒均使用 *Msp*I 甲基转移酶进行甲基化。电转化方案如下^[6,10]: (1) H10 细胞在 GS-2 液体培养基中 34 °C 静置培养至 OD_{600} 约为 0.6, 加入

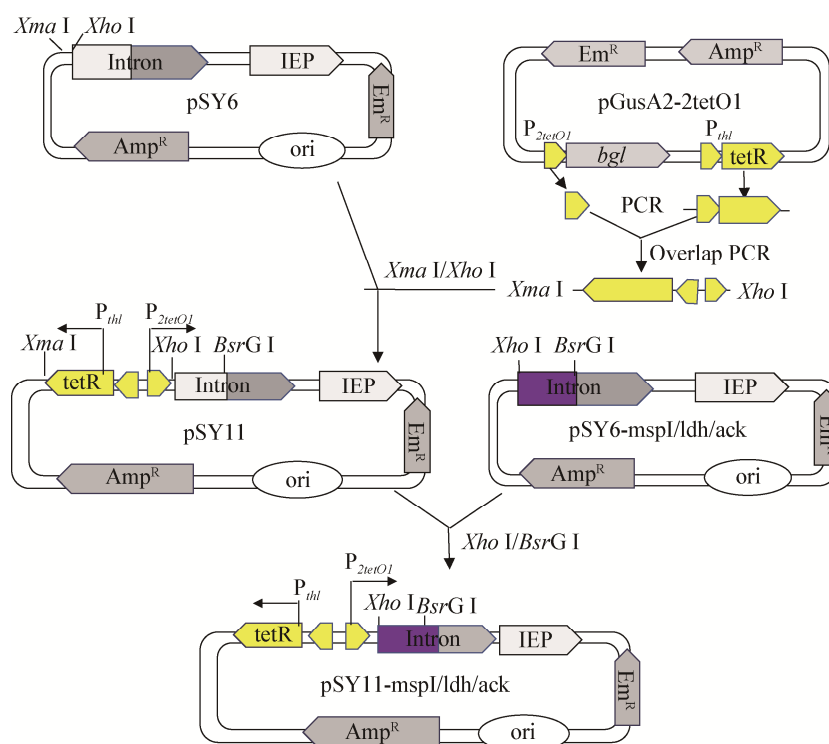


图 1 质粒构建流程图

Figure 1 Construction chart of plasmid

10 mg/mL 甘氨酸继续培养 2–3 h (目的是弱化革兰氏阳性细菌细胞壁), 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集细胞。(2) 利用电转化 Buffer (275 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L K_2HPO_4 , pH 6.5) 洗涤 2 次, 于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集细胞。(3) 吸取 200 μ L 感受态细胞加入 2–3 μ g 甲基化的质粒混匀, 转移至 0.2 cm 电转杯中置于冰上放置 30 min。(4) 利用 Bio-Rad 电转仪进行电转化, 然后转移至 3 mL 新鲜 GS-2 培养基中, 置于 34 °C 静置复苏过夜。最后室温 5 000 r/min 离心 1 min 收集细胞, 重悬后涂布含有 20 μ g/mL 红霉素的 GS-2 固体平板, 倒置于 34 °C 培养 3–4 d。H10 转化所有操作均在无氧条件下进行。

1.5 超声破碎及细胞提取物制备

含有 pGusA2-2tetO1 质粒的 H10 细胞 (H10::pGusA2-2tetO1) 接种于 50 mL 含有 20 μ g/mL 红霉素的 GS-2 液体培养基中 34 °C 静置培养至对数中期 (OD_{600} 约为 0.6), 然后加入 100 ng/mL 脱水四环素诱导 6 h, 预冷 30 min 后于 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集细胞沉淀, 利用 Tris-EDTA Buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 洗涤 2 次, 利用 GusA Buffer (50 mmol/L Na_2HPO_4 , 1 mmol/L EDTA, pH 7.0) 重悬细胞, 超声破碎 (10 s/10 s, 10 min) 后于 4 °C、10 000 $\times g$ 离心 10 min 收集上清, 用于后续酶活分析。Bradford 法测定总蛋白浓度。

1.6 β -葡萄糖苷酶活性分析

利用 X-Gluc 作为底物分析 β -葡萄糖苷酶活性^[15]。 β -葡萄糖苷酶切割 X-Gluc 产生肉眼可见的蓝色产物, 可以直接观测到 β -葡萄糖苷酶的酶活性。20 μ L 粗酶液与 1 mL X-Gluc Buffer (GusA Buffer 含有 0.1 mmol/L X-Gluc) 混合, 37 °C 孵育 1 h 直至可见蓝色产物出现。上述反应中利用 GusA Buffer 代替粗酶液作为阴性对照。

1.7 诱导表达及打靶效率分析

利用无菌牙签挑取电转后的阳性转化子, 接种于 3 mL 含有 20 μ g/mL 红霉素的 GS-2 液体培养基中培养, 置于 34 °C 静置培养过夜。然后, 加入

100 ng/mL 的脱水四环素诱导 2、4、8 h, 分别取 100 μ L 诱导后的培养液稀释后涂布含有 20 μ g/mL 红霉素的 GS-2 固体平板, 34 °C 继续培养 3–4 d。最后, 每个平板分别随机挑取单菌落, 利用菌落 PCR 分析其打靶效率。

2 结果与分析

2.1 解纤维梭菌 H10 对四环素及脱水四环素敏感性分析

四环素和脱水四环素具有相似的结构和功能, 为了筛选合适的诱导剂, 首先分析了 H10 在不同浓度的四环素和脱水四环素培养基中的生长情况。表 3 结果显示, 当四环素浓度大于 300 ng/mL 时 H10 不能生长, 而脱水四环素浓度大于 500 ng/mL 时 H10 不能生长, 表明脱水四环素的毒性低于四环素, 因此选择脱水四环素作为诱导剂。随后, 我们详细分析了 H10 在含不同浓度脱水四环素培养基中的生长曲线。如图 2 所示, 当脱水四环素浓度低于 100 ng/mL 时基本不影响 H10 细胞的生长, 因此选择 100 ng/mL 的脱水四环素浓度作为后续实验的诱导剂浓度。

表 3 解纤维梭菌 H10 对四环素和脱水四环素的耐受性
Table 3 Tolerance of *C. cellulolyticum* H10 to tetracycline and anhydrotetracycline

Concentration (ng/mL)	Tetracycline	Anhydrotetracycline
0	+++	+++
20	+++	+++
50	+++	+++
100	+++	+++
200	++	++
300	+	+
500	–	+
1 000	–	–
2 000	–	–

注: 表中数据表示 H10 在 GS-2 液体培养基中培养 48 h 后的生长状况。+++ : $OD_{600}>0.8$, 与对照相比细胞浓度没有显著变化, 即细胞生长正常; ++ : $0.8>OD_{600}>0.5$; + : $0.5>OD_{600}>0.1$; – : $OD_{600}<0.1$

Note: The data in the table showed the growth status of H10 after 48 hours in GS-2 liquid medium. +++ : $OD_{600}>0.8$, the cell concentration has no significant change compared with control; ++ : $0.8>OD_{600}>0.5$; + : $0.5>OD_{600}>0.1$; – : $OD_{600}<0.1$

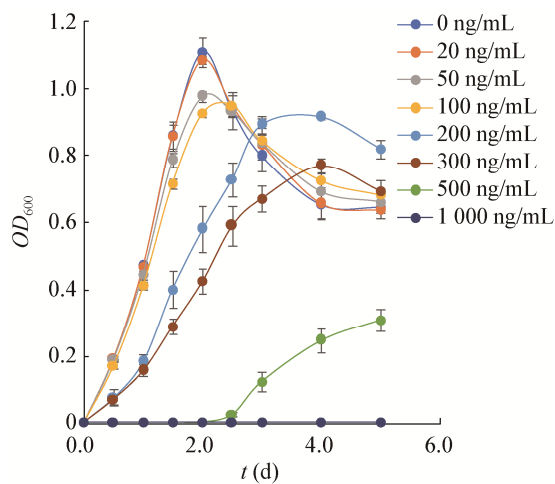
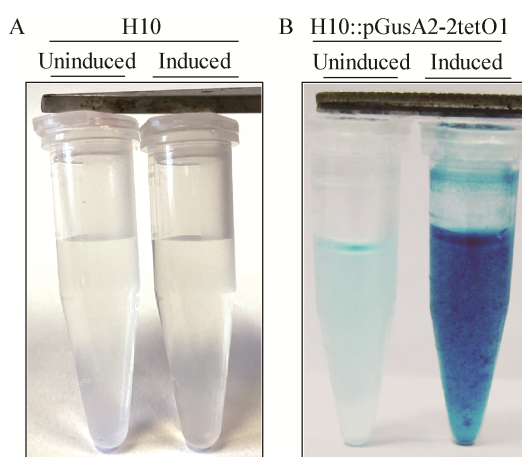


图2 解纤维梭菌 H10 生长曲线

Figure 2 Growth curves of *C. cellulolyticum* H10

2.2 脱水四环素能够高效诱导 β -葡萄糖苷酶基因表达

为了检测四环素诱导操纵子是否可以在解纤维梭菌中发挥功能, 首先利用 pGusA2-2tetO1 质粒(β -葡萄糖苷酶基因位于四环素操纵子控制之下)转化 H10, 构建了 β -葡萄糖苷酶基因诱导表达菌株。利用脱水四环素诱导后超声破碎提取细胞提取物, 以 X-Gluc 为底物检测 β -葡萄糖苷酶表达情况。如图 3 所示, 不含质粒的 H10 空白菌株其脱水四环素诱导前后没有颜色变化, 而

图3 脱水四环素诱导 β -葡萄糖苷酶表达检测Figure 3 Anhydrotetracycline induced β -glucosidase expression detection

转化菌株 H10::pGusA2-2tetO1 在脱水四环素诱导前后具有显著的颜色变化, 表明 β -葡萄糖苷酶基因在 H10 菌株中正常表达, 四环素诱导型操纵子能够在 H10 菌株中诱导靶基因表达。此外, 我们也发现未诱导菌株存在一定的本底表达, 如图 3 所示。

2.3 脱水四环素诱导的 ClosTron 基因打靶载体构建

为了在梭菌中构建脱水四环素诱导的 ClosTron 系统, 我们以 pSY6 和 pGusA2-2tetO1 质粒为基础, 将 Targetron 元件置于四环素操纵子控制之下, 构建了脱水四环素诱导型 ClosTron 载体; 并以解纤维梭菌的 *mspI* (Ccel_2866, 编码 *MspI* 限制性内切酶, 打靶位点 *mspI297s*)、*ldh* (Ccel_2485, 编码乳酸脱氢酶基因, 打靶位点 *ldh516s*) 和 *ack* (Ccel_2136, 编码乙酸激酶基因, 打靶位点 *ack195s*) 为例, 构建了 3 种基因打靶载体, 分别命名为 pSY11-*mspI*、pSY11-*ldh* 和 pSY11-*ack*, 详细构建流程如图 1 所示。

2.4 脱水四环素诱导的 ClosTron 系统基因打靶功能检测

为了分析脱水四环素诱导的 ClosTron 系统在解纤维梭菌中的打靶状况, 将上述 3 个质粒分别转化 H10 菌株, 构建了 3 种工程菌株, 分别命名为 H10::pSY11-*mspI*、H10::pSY11-*ldh* 和 H10::pSY11-*ack*, 诱导 8 h 后涂布 GS-2 琼脂平板, 利用菌落 PCR 分析 Intron 在靶位点的插入情况。

利用 *MspI*-F/*MspI*-R、*Ldh*-F/*Ldh*-R 和 *Ack*-F/*Ack*-R 引物组分别对 H10::pSY11-*mspI*、H10::pSY11-*ldh* 和 H10::pSY11-*ack* 菌株进行菌落 PCR, 然后利用琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 4 所示, 野生型 H10 菌株在 *mspI297s*、*ldh516s* 和 *ack195s* 这 3 个位点的扩增条带大小分别为 0.4、0.3 和 0.2 kb, 而阳性突变菌株在上述 3 个位点的扩增条带大小分别为 1.3、1.2 和 1.1 kb, 条带大小与预期结果一致, 表明脱水四环素诱导的 ClosTron 基因打靶系统构建成功(图 4)。

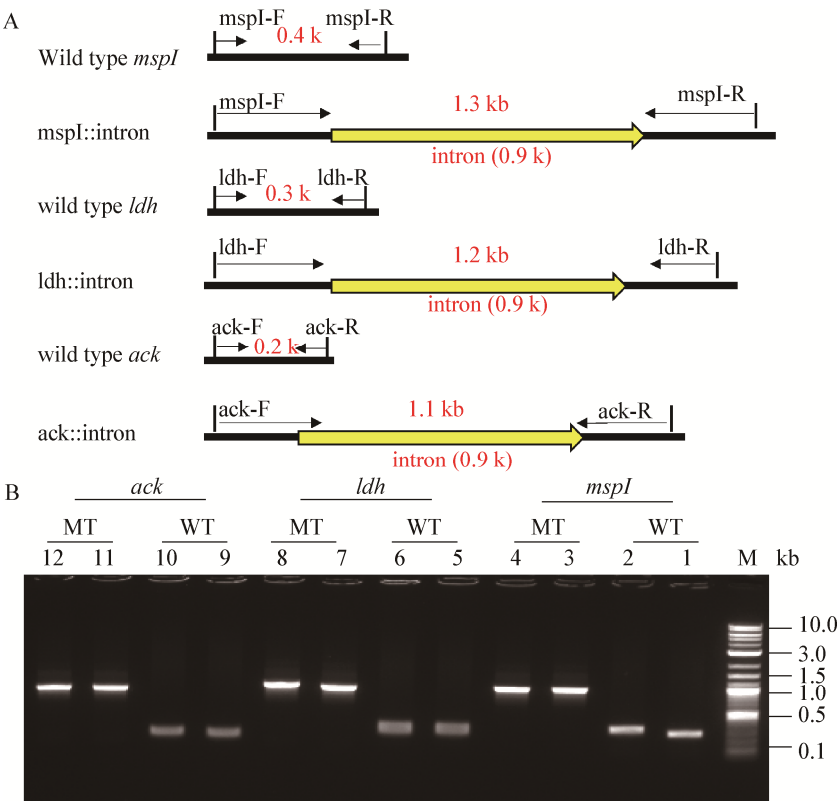


图 4 Targetron 基因打靶菌落 PCR 检测
Figure 4 Colony PCR verification of Targetron gene targeting

注：A：功能验证示意图；B：菌落 PCR 验证。WT：野生型对照，MT：Targetron 突变型
Note: A: Schematic diagram of functional verification; B: Colony PCR verification. WT: Wild type, MT: Targetron mutation

2.5 打靶效率分析

为了分析脱水四环素诱导的 ClosTron 基因打靶系统在 H10 中的打靶效率，选择上述 3 个位点，诱导不同时间后涂布 GS-2 平板，随机挑取 24 个单菌落，通过菌落 PCR 计算其打靶效率。如表 4 所示，

表 4 脱水四环素诱导的 ClosTron 打靶效率分析
Table 4 Analysis of Targetron gene targeting efficiency induced by anhydrotetracycline

Time (h)	<i>mspI</i>	<i>ldh</i>	<i>ack</i>
0	0	0	0
2	0	2.78%±3.93%	5.56%±5.2%
4	24.38%±7.57%	19.44%±8.56%	12.5%±9.0%
8	29.48%±15.51%	23.61%±7.08%	28.09%±6.97%

注：每个时间点随机挑取 24 个单菌落进行 PCR 验证，PCR 条带为阳性的代表阳性菌株，3 次重复
Note: At each time point, 24 single colonies were randomly selected for PCR verification. The positive PCR bands were representative of positive strains, repeat for 3 times

诱导 8 h 后，*mspI297s*、*ldh516s* 和 *ack195s* 这 3 个位点的打靶效率分别达到 29.48%±15.51%、23.61%±7.08%和 28.09%±6.97% (表 4 和图 5)。上述结果表明，脱水四环素诱导的 ClosTron 系统在解纤维梭菌中具有较好的诱导效果。

3 讨论

本研究在解纤维梭菌中建立了基于脱水四环素诱导的新型 ClosTron 基因打靶系统，实现了 ClosTron 在梭菌中的诱导表达。然而，II 型内含子是通过碱基互补配对原则识别靶位点，具有碱基偏好性和依赖性^[11,17-18]，因此，可能会导致不同位点的识别与切割效率不同，如表 4 所示，*mspI297s*、*ldh516s* 和 *ack195s* 这 3 个位点的打靶效率并不一致，这可能与 II 型内含子识别靶位点的规律有关^[8]。

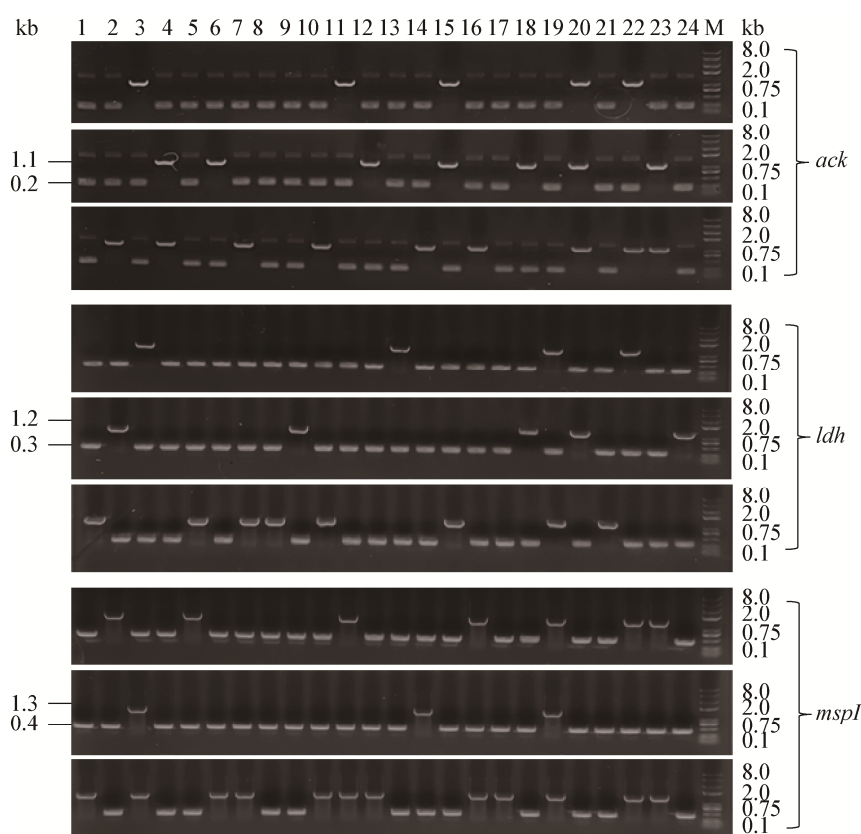


图5 脱水四环素诱导的基因打靶效率分析

Figure 5 Analysis of targeting efficiency induced by anhydrotetracycline

此外,与以前我们课题组构建的组成型表达的 ClosTron 基因打靶系统相比^[6],本研究构建的脱水四环素诱导型 ClosTron 基因打靶系统,其打靶效率显著低于组成型 ClosTron 系统。以前我们构建的组成型 ClosTron 系统的打靶效率接近 100%,而本研究构建的诱导型 ClosTron 系统的打靶效率最高不到 30%。我们推测,这可能与 Intron 功能元件的表达及其在细胞中的浓度有关。此前构建的组成型 ClosTron 系统利用组成型的磷酸丁酰转移酶基因启动子(*ptb* 启动子)表达 II 型内含子的 Intron 元件,本文构建的脱水四环素诱导型 ClosTron 系统利用四环素操纵子表达 II 型内含子的 Intron 元件。因为 H10 细胞生长速度较慢,在平板中生长至少 3 d 才能得到肉眼可见的单菌落,这意味着转化后组成型 ClosTron 系统可以在细胞中作用至少 3 d,而诱导型 ClosTron 系统只在细胞中发挥几个小时作用,因此,其功能

元件在细胞中的浓度和作用时间较短,这可能是造成诱导型 ClosTron 打靶效率较低的原因之一。其次,脱水四环素是一种细菌抗生素,可以抑制细菌的生长,可能会影响细菌的代谢或 ClosTron 元件的功能,这可能也是造成打靶效率降低的原因之一。

总之,基于 II 型内含子建立的基因打靶技术,由于其效率高、操作简单等特点,是目前梭菌改造的主要遗传工具之一^[9,19]。本研究在解纤维梭菌 H10 中成功构建了脱水四环素诱导的 ClosTron 基因打靶系统,丰富了梭菌遗传改造工具。

4 结论

本研究以四环素操纵子和 II 型内含子系统为基础,在解纤维梭菌中成功构建了脱水四环素诱导的 ClosTron 基因打靶系统,为梭菌基因工程研究奠定了基础。

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所李寅课题组提供 pGusA2-2tetO1 质粒, 感谢中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所姜卫红课题组提供 pSY6 质粒。

REFERENCES

- [1] Devi A, Niazi A, Ramteke M, Upadhyayula S. Techno-economic analysis of ethanol production from lignocellulosic biomass: a comparison of fermentation, thermo catalytic, and chemocatalytic technologies[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(6): 1093-1107
- [2] Boboescu IZ, Damay J, Chang JKW, Beigbeder JB, Duret X, Beauchemin S, Lalonde O, Lavoie JM. Ethanol production from residual lignocellulosic fibers generated through the steam treatment of whole *Sorghum* biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 292: 121975
- [3] Gaida SM, Liedtke A, Jentges AHW, Engels B, Jennewein S. Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for the production of n-butanol from crystalline cellulose[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 6
- [4] Higashide W, Li YC, Yang YF, Liao JC. Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for production of isobutanol from cellulose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(8): 2727-2733
- [5] Li YC, Tschaplinski TJ, Engle NL, Hamilton CY, Rodriguez M, Liao JC, Schadt CW, Guss AM, Yang YF, Graham DE. Combined inactivation of the *Clostridium cellulolyticum* lactate and malate dehydrogenase genes substantially increases ethanol yield from cellulose and switchgrass fermentations[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 2
- [6] Cui GZ, Hong W, Zhang J, Li WL, Feng YG, Liu YJ, Cui Q. Targeted gene engineering in *Clostridium cellulolyticum* H10 without methylation[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 89(3): 201-208
- [7] Wen ZQ, Lu MR, Ledesma-Amaro R, Li Q, Jin MJ, Yang S. TargeTron technology applicable in solventogenic clostridia: Revisiting 12 years' advances[J]. *Biotechnology Journal*, 2020, 15(1): e1900284
- [8] Belfort M, Lambowitz AM. Group II intron RNPs and reverse transcriptases: from retroelements to research tools[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2019, 11(4): a032375
- [9] Liu YJ, Zhang J, Cui GZ, Cui Q. Current progress of targetron technology: development, improvement and application in metabolic engineering[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(6): 855-865
- [10] Cui GZ, Zhang J, Hong W, Xu CG, Feng YG, Cui Q, Liu YJ. Improvement of ClosTron for successive gene disruption in *Clostridium cellulolyticum* using a pyrF-based screening system[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 313-323
- [11] Heap JT, Kuehne SA, Ehsaan M, Cartman ST, Cooksley CM, Scott JC, Minton NP. The ClosTron: mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 80(1): 49-55
- [12] Shao LJ, Hu SY, Yang Y, Gu Y, Chen J, Yang YL, Jiang WH, Yang S. Targeted gene disruption by use of a group II intron (targetron) vector in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Cell Research*, 2007, 17(11): 963-965
- [13] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP, Minton NP. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(3): 452-464
- [14] Chen Y, McClane BA, Fisher DJ, Rood JJ, Gupta P. Construction of an alpha toxin gene knockout mutant of *Clostridium perfringens* type A by use of a mobile group II intron[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 7542-7547
- [15] Zhang J, Liu YJ, Cui GZ, Cui Q. A novel arabinose-inducible genetic operation system developed for *Clostridium cellulolyticum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 36
- [16] Dong HJ, Tao WW, Zhang YP, Li Y. Development of an anhydrotetracycline-inducible gene expression system for solvent-producing *Clostridium acetobutylicum*: a useful tool for strain engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(1): 59-67
- [17] Lambowitz AM, Zimmerly S. Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2011, 3(8): a003616
- [18] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, 78(1): 79-85
- [19] Kwon SW, Paari KA, Malaviya A, Jang YS. Synthetic biology tools for genome and transcriptome engineering of solventogenic *Clostridium*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 282