

## 研究报告

## 构建 CRISPR-Cas9 介导的耻垢分枝杆菌基因组高效删除系统

邢述永<sup>1</sup> 路志群<sup>1</sup> 夏海洋<sup>2</sup> 邓自发<sup>1</sup> 王兆慧<sup>1</sup> 周蓉<sup>1</sup> 陈艳红<sup>1\*</sup>

(1. 南通大学生命科学学院 江苏 南通 226019)

(2. 台州学院生命科学学院 浙江 台州 318000)

**摘要:**【背景】耻垢分枝杆菌具有生长迅速和非致病性的特点,可作为结核分枝杆菌致病机理研究替代菌株和类固醇激素生产的工程菌,但目前耻垢分枝杆菌中缺乏高效率的基因组敲除方法。【目的】基于 CRISPR-Cas9 介导的定点、高效的 DNA 切割能力,构建耻垢分枝杆菌染色体 DNA 片段无痕敲除系统。【方法】构建了包含四环素诱导型启动子驱动的密码子优化的 *cas9* 基础载体 pCas9101,在双侧同源臂长度约为 1 kb 条件下选用合适的 gRNA 表达模块,分别测试了对耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 染色体上的 3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶基因(*MSMEG\_5228*, 1 071 bp)和胆固醇降解基因簇(*MSMEG\_5990-MSMEG\_6043*, 约 48 kb)敲除效率,使用相同大小的同源臂以经典 p2NIL-pGOAL 方法进行对照,并计算效率。【结果】使用 CRISPR-Cas9 方法对耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 的 3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶基因敲除效率为 22%,胆固醇降解基因簇敲除效率也达到 18%,两者连续敲除效率为 4%。但对照 p2NIL-pGOAL 方法未能获得目标 DNA 片段敲除的菌株。【结论】本文建立的基于 CRISPR-Cas9 的耻垢分枝杆菌基因组无痕敲除系统显示出较高的敲除效率,该方法可为耻垢分枝杆菌后续研究提供快速高效的基因组操作方法。

**关键词:** CRISPR-Cas9, 耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155, DNA 无痕敲除

## CRISPR-Cas9-assisting efficient and sequential genome deletions in *Mycobacterium smegmatis*

XING Shu-Yong<sup>1</sup> LU Zhi-Qun<sup>1</sup> XIA Hai-Yang<sup>2</sup> DENG Zi-Fa<sup>1</sup> WANG Zhao-Hui<sup>1</sup>  
ZHOU Rong<sup>1</sup> CHEN Yan-Hong<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Sciences, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019, China)

(2. School of Life Science, Taizhou University, Taizhou, Zhejiang 318000, China)

**Abstract:** [Background] For its fast growing and non-pathogenic property, *Mycobacterium smegmatis* is used as a model strain for pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* and a workhorse to produce steroid hormones. But it lacks efficient genome deletion system. [Objective] In this study, we established a high efficiency genome deletion system in *M. smegmatis* assisted by CRISPR-Cas9.

**Foundation item:** The Key University Science Research Project of Jiangsu Province (16KJB180026)

\*Corresponding author: Tel: 86-513-85012813; E-mail: chenyh@ntu.edu.cn

**Received:** February 06, 2018; **Accepted:** May 14, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 11, 2018

**基金项目:** 江苏省高等学校自然科学研究项目(16KJB180026)

\*通信作者: Tel: 86-513-85012813; E-mail: chenyh@ntu.edu.cn

**收稿日期:** 2018-02-06; **接受日期:** 2018-05-14; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-06-11

**[Methods]** The Cas9 backbone plasmid pCas9101 was constructed with a tetracycline-inducible codon-optimized *cas9* expression operon. Approximate 1 kb flanked homologous arms and proper gRNA operon were used to construct vectors to study the deletion efficiency on 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (*MSMEG\_5228*, 1 071 bp) encoding gene and cholesterol degradation gene cluster (*MSMEG\_5990-MSMEG\_6043*, about 48 kb) in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. The classical p2NIL-pGOAL method with same homologous arms was used as the control to delete the two same DNA segments in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Their deletion efficiency were calculated and compared. **[Results]** When using CRISPR-Cas9 assisted method, 22% and 18% clones showed the expected deletions in *MSMEG\_5228* gene and cholesterol-degrading gene cluster, respectively. Even the sequential deletion efficiency on both segments can reach 4%. However, no expected deletion mutants were obtained in our experiments with p2NIL-pGOAL method. **[Conclusion]** This CRISPR-Cas9 assisted system can facilitate genome deletion in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, and provide a fast and efficient genome manipulation approach for *Mycobacterium* in the future.

**Keywords:** CRISPR-Cas9, *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155, Genome manipulation

结核病是高致死率感染性疾病, 每年造成约 200 万人死亡<sup>[1-2]</sup>。研究结核分枝杆菌致病的分子机理是当前结核病防治研究的重要方向<sup>[3-4]</sup>。实验室培养结核分枝杆菌的倍增时间为 24 h, 对其操作需要专用设备且改造方法单一<sup>[5]</sup>。耻垢分枝杆菌是快速生长的非致病菌(倍增时间 3–4 h), 1885 年由 Alvarez 和 Tavel 分离自人的包皮垢<sup>[6]</sup>。耻垢分枝杆菌基因组大小为结核分枝杆菌的 1.7 倍, 拥有 19 个已知结核分枝杆菌毒力基因中的 12 个, 是研究结核分枝杆菌致病机理的理想替代菌株<sup>[7]</sup>。同时耻垢分枝杆菌具有胆固醇降解能力, 改造后可降解甾醇侧链, 为激素药物(如脱氢表雄酮)及其中间体提供合适的生产菌株<sup>[5]</sup>。

对分枝杆菌基因组敲除至今仍然广泛使用 p2NIL-pGOAL 方法<sup>[8]</sup>。该方法原理上基于传统 DNA 同源重组敲除技术: pGOAL 质粒提供多重筛选标记, p2NIL 质粒提供多克隆位点以方便克隆重组交换臂及筛选标记的装配。由于分枝杆菌同源重组效率较低, 约为 10<sup>-6</sup>–10<sup>-5</sup>, 导致该方法在操作中相对耗时<sup>[9-10]</sup>。此外, 分枝杆菌容易对筛选标记产生耐受而出现较多比例的假阳性, 进一步增加了后续筛选双交换的工作量<sup>[10-11]</sup>。

CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas 系统是微生物在自然进化过程中所获得的用于对抗外源病毒和 DNA 侵染的

自身免疫系统, 可分为 I 型、II 型和 III 型<sup>[12-14]</sup>。I 型、III 型 CRISPR-Cas 系统需多个 Cas 蛋白形成复合物, 在 crRNA 的引导下进行靶向 DNA 的识别和切割; II 型 CRISPR-Cas9 系统仅需单个蛋白即可在 gRNA 引导下进行靶向 DNA 的识别和切割<sup>[12-15]</sup>, 因而经改进后的 II 型 CRISPR-Cas9 系统被广泛应用。应用传统方法进行 DNA 片段的敲除过程中, 其敲除效率对于同源交换臂的长度具有很大的依赖性。由于分枝杆菌自身转化重组效率低, 通常将经过碱处理或紫外线照射处理后的自杀质粒电转化导入受体, 以提高转化重组效率<sup>[16]</sup>。Cas9 通过 gRNA 识别 DNA 靶位点发生定向切割造成双链断裂, 宿主系统可以在断裂位置进行高效修复, 从而大幅提高了对 DNA 操作的效率。通过 CRISPR-Cas9 系统造成的 DNA 双链断裂可通过非同源末端重组连接(Non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(Homology-directed repair, HDR)两种方式达成目标位置的 DNA 编辑<sup>[12]</sup>。目前, 基于不同来源微生物的 CRISPR-Cas 所开发的系统被广泛用于对动物和植物基因组 DNA 进行编辑<sup>[17-20]</sup>。当前应用最为广泛的 CRISPR 基因组编辑手段是来自于经改进后的酿脓链球菌的 II 型 CRISPR-Cas9 系统。研究表明, 经过改造后的 II 型 CRISPR-Cas9 系统可以对大肠杆菌、芽孢杆菌、天蓝色链霉菌和酿酒酵母等<sup>[21-25]</sup>微生物的基因组进

行高效编辑。

四环素诱导型启动子(Tetracycline-inducible promoter,  $P_{TetRs}$ )是分枝杆菌中严谨型本底表达极低的强启动子<sup>[26]</sup>,可精确控制 *cas9* 的表达。本研究使用优化后的CRISPR-Cas9系统对3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶基因(*MSMEG\_5228*)和大片段胆固醇利用基因簇(*MSMEG\_5990-MSMEG\_6043*)进行单独和连续敲除;并以经典的 p2NIL-pGOAL<sup>[8]</sup>分枝杆菌无痕敲除方法进行对照,对这两套敲除方法效率进行了比较。最终在耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 中构建了CRISPR-Cas9系统,可以为分枝杆菌的基因组DNA遗传操作提供更好的选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和引物

实验所使用的菌株和质粒见表1;实验中用到的引物由赛默飞世尔科技(中国)有限公司合成,引物名称与相应序列见表2。

#### 1.1.2 培养基、培养条件

LB培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 5.0;用于培养大肠杆菌。LBG 固体培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 5.0,甘油 2.0,琼脂粉 20.0;用于培养耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155。F培养基(g/L):三水磷酸氢二钾 0.500,磷酸二氢钾 0.500,磷酸氢二铵 1.500,七水硫酸镁 0.200,七水硫酸亚铁 0.005,七水硫酸锌 0.002,甘油 10.0,酵母粉 10.0,吐温-80 1.0;用于5 mL液体摇床培养耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155。Lemco-Tw液体培养基(g/L):胰蛋白胨 5.0,牛肉浸膏 5.0,氯化钠 5.0,10%(质量体积比)吐温-80 5.0;用于100 mL液体摇床培养耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155。胆固醇基本培养基(g/L):磷酸氢二钾 1.52,磷酸氢二钠 2.44,硫酸铵 0.50,七水硫酸镁 0.20,氯化钙 0.05,胆固醇 5.00,琼脂粉 20.0;用于鉴定培养胆固醇基因簇缺失突变株。大肠杆菌的培养温度为37℃;耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 的培养温度为37℃,摇床培养温度为30℃。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

实验所用抗生素及其相应终浓度:50  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素,50  $\mu$ g/mL 阿泊拉霉素,50  $\mu$ g/mL 卡那霉素,30–100 ng/mL 脱水四环素盐酸盐(ATC),20  $\mu$ g/mL 5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷(X-gal)。实验所使用的抗生素购自生工生物工程(上海)股份有限公司;限制性内切酶、DNA连接酶、DNA聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司。

PCR扩增仪,应用生物系统公司;全自动数码凝胶图像分析系统,上海天能科技有限公司;恒温培养振荡器、十段编程电热恒温培养箱,上海智诚分析仪器制造公司;电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;全自动高压灭菌锅,三洋公司;冷冻离心机、常温离心机、电转化仪,艾本德公司。

### 1.2 质粒构建

#### 1.2.1 CRISPR-Cas9 重组质粒 pCas9101 的构建

在线密码子偏好数据库([www.kazusa.or.jp/codon/](http://www.kazusa.or.jp/codon/))显示耻垢分枝杆菌(G+C mol%为67.26%)与酿脓链球菌(G+C mol%为39.16%)的密码子使用偏好存在较大差异,与天蓝色链霉菌(G+C mol%为72.30%)一致。酿脓链球菌 *cas9* 基因中高频使用的密码子(如亮氨酸密码子偏好使用 TTA 和 CTA)在耻垢分枝杆菌中为稀有密码子。本研究使用了基于天蓝色链霉菌密码子优化后的 *cas9*,具体构建流程如下:*Bgl* II 和 *Nhe* I 双酶切 pEN41A-T10M 质粒得到  $P_{imyc-tetR}$ ; *Bam* HI 和 *Xba* I 双酶切 pBlueScript II SK(-)质粒与  $P_{imyc-tetR}$  连接得到 pKS-Pimyc-tetR 质粒。*Pst* I 和 *Eco* R I 双酶切 pLU101 质粒,得到  $P_{tipA-sceM}$ ; *Pst* I 和 *Eco* R I 双酶切 pKS-Pimyc-tetR 质粒,连接  $P_{tipA-sceM}$  后得到 pKS-Pimyc-tetR-PtipA-sceM 质粒。使用引物 *teto\_F* 和 *teto\_R*,以质粒 pEN12A-P1 为模板,PCR 得到  $P_{mycl-tetO}$  启动子,使用 *Pst* I 和 *Nde* I 双酶切,得到  $P_{mycl-tetO}$  启动子酶切片段;使用 *Pst* I 和 *Nde* I 双酶切质粒 pKS-Pimyc-tetR-PtipA-sceM,去除  $P_{tipA}$  启动子,接入  $P_{mycl-tetO}$ ,得到质粒 pMK101。使用 *Eco* R I

表 1 本研究中所用的菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

| Strains/plasmids                        | Genotype/characteristics   | Reference/source                  |
|---|--|-----------------------------------|
| <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 | <i>ept-1</i> ; mc26 mutant efficient for electroporation   | [27]                              |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$             | <i>F</i> <sup>-</sup> ; <i>deoR</i> ; <i>recA1</i> ; <i>endA1</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>thi</i> ; <i>relA1</i> ; <i>hsdR17</i> ( <i>rk</i> <sup>-</sup> , <i>mk</i> <sup>+</sup> ); <i>phoA</i> ; <i>supE44</i> ; $\lambda$ -; <i>thi-1</i> | Life Technologies (Carlsbad, USA) |
| pBluescript II SK(-)                    | <i>bal</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS  | This lab                          |
| pIJ773                                  | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; <i>oriT</i>   | This lab                          |
| pEN41A-T10M                             | <i>bal</i> ; P <sub>imyc-tetR</sub>  | Addgene plasmid # 27365           |
| pEN12A-P1                               | <i>bal</i> ; P <sub>mycl-tetO</sub> ; <i>ori</i>   | Addgene plasmid # 27366           |
| pKCcas9d6424                            | <i>acc(3)IV</i> ; <i>pSG5</i> ; P <sub>tipA-cas9</sub> ; j23119; <i>actII-orf4</i> gRNA  | [22]                              |
| pGOAL19                                 | <i>bal</i> ; pGOAL19 cassette ( <i>hyg-lacZ-sacB</i> )   | [8]                               |
| p2NIL                                   | <i>bal</i> ; <i>ahpII</i>  | [8]                               |
| pLU101                                  | <i>bal</i> ; <i>tsr</i> ; P <sub>tipA-sceM</sub> ; $\Phi$ C31int   | [28]                              |
| pKS-apra                                | <i>bal</i> ; <i>acc(3)IV</i> ; MCS; <i>colEI ori</i>   | This work                         |
| pKS-Pimyc-tetR                          | <i>bal</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub>  | This work                         |
| pKS-Pimyc-tetR-PtipA-sceM               | <i>bal</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>tipA-sceM</sub>   | This work                         |
| pKS-gRNA                                | <i>bal</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; j23119; synthetic gRNA  | This work                         |
| pMK101                                  | <i>bal</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-sceM</sub>  | This work                         |
| pMKCas9101                              | <i>bal</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub>  | This work                         |
| pCas9101                                | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub>   | This work                         |
| pCas91011                               | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub> ; 5228-guide-RNA  | This work                         |
| pCas91012                               | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub> ; 5990-guide-RNA  | This work                         |
| pCas91013                               | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub> ; j23119; 6017-guide-RNA  | This work                         |
| pCas91021                               | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub> ; j23119; 5228-guide-RNA; homologous region flanking <i>MSMEG_5228</i> gene   | This work                         |
| pCas91022                               | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub> ; j23119; 5990-guide-RNA; homologous region flanking <i>MSMEG_5990-MSMEG_6043</i> cluster   | This work                         |
| pCas91023                               | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub> ; j23119; 6017-guide-RNA; homologous region flanking <i>MSMEG_5990-MSMEG_6043</i> cluster   | This work                         |
| pCas95228                               | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub> ; j23119; 5228-guide-RNA; homologous region flanking <i>MSMEG_5228</i> gene; pGOAL19 cassette ( <i>hyg-lacZ-sacB</i> )                      | This work                         |
| Pcas95990                               | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub> ; j23119; 5990-guide-RNA; homologous region flanking <i>MSMEG_5990-MSMEG_6043</i> cluster; pGOAL19 cassette ( <i>hyg-lacZ-sacB</i> )        | This work                         |
| pCas96017                               | <i>acc(3)IV</i> ; <i>colEI ori</i> ; MCS; P <sub>imyc-tetR</sub> ; P <sub>mycl-tetO-cas9</sub> ; j23119; 6017-guide-RNA; homologous region flanking <i>MSMEG_5990-MSMEG_6043</i> cluster; pGOAL19 cassette ( <i>hyg-lacZ-sacB</i> )        | This work                         |
| pTMK101                                 | <i>bal</i> ; <i>colEI ori</i> ; <i>ahpII</i> ; homologous region flanking <i>MSMEG_5228</i> gene   | This work                         |
| pTMK102                                 | <i>bal</i> ; <i>colEI ori</i> ; <i>ahpII</i> ; homologous region flanking <i>MSMEG_5990-MSMEG_6043</i> cluster   | This work                         |
| pTMK5228                                | <i>bal</i> ; <i>colEI ori</i> ; <i>ahpII</i> ; homologous region flanking <i>MSMEG_5228</i> gene; pGOAL19 cassette ( <i>hyg-lacZ-sacB</i> )  | This work                         |
| pTMK90-43                               | <i>bal</i> ; <i>colEI ori</i> ; <i>ahpII</i> ; homologous region flanking <i>MSMEG_5990-MSMEG_6043</i> cluster; pGOAL19 cassette ( <i>hyg-lacZ-sacB</i> )  | This work                         |

表 2 本研究所使用的引物序列

Table 2 Primers used in this study

| Primers   | Sequences (5'→3')  | Size (bp) |
|-----------|--|-----------|
| teto_F    | TTT <u>ACTGCAG</u> ATTGGATCGTCGGCACCGTCA   | 31        |
| teto_R    | TTT <u>ACATATG</u> GCGGATCGTGCTCATTTCCG  | 30        |
| pks_UF    | CTA <u>GCTAGCG</u> TAATACGACTCACTATAGGGCGA   | 33        |
| pks_DR    | CTA <u>GCTAGC</u> CTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATAC                                     | 37        |
| tet_UF    | TGCT <u>CTAGA</u> TTAGGAGCCGCTCTCGCAC  | 28        |
| cas_DR    | TGCT <u>CTAGAT</u> CAGTCGCCGCCAGCT   | 26        |
| SC_U_F    | TTT <u>AGAATT</u> CGAGCAGCACCATCTCGACCA  | 30        |
| SC_U_R    | ATCGCAGATGTCGCCCGTG  | 19        |
| CT_U_F    | TTTAA <u>AGCTT</u> GAGCAGCACCATCTCGACCA  | 30        |
| CT_U_R    | TTT <u>AGAATT</u> CATCGCAGATGTCGCCCGTG   | 29        |
| SC_D_F    | CCGCTGCTGGAACCGCTT   | 18        |
| SC_D_F1   | CACGGGCGACATCTGCGATCCGCTGCTGGAACCGCTT  | 37        |
| SC_D_R1   | ACCCTGTTATCCCTAGGGTTCTGCGAGGACGACA   | 34        |
| SC_D_R2   | TTTAA <u>AGCTTTTAA</u> TTAAAT <u>CTAGA</u> ATTACCCTGTTATCCCTAGGGTTCTG              | 53        |
| CT_D_F    | TTT <u>AGAATT</u> CCCGCTGCTGGAACCGCTT  | 28        |
| CT_D_R    | TTTAA <u>AGATCT</u> GGGTTCTGCGAGGACGACA  | 29        |
| Gma_F     | CCG <u>GAAT</u> TCGCAGATCTCAAAAAAAGCAC   | 29        |
| Gma_R     | TGCT <u>CTAGAT</u> CGCGCGCG  | 18        |
| Gma_R1    | GG <u>ACTAGT</u> CCGGATCGAGCACGTCAGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG             | 61        |
| 3bt_F     | GAAGGCACTGAGGACGACGA   | 20        |
| 3bt_R     | TCGACGTAGTACGGCAGGCA   | 20        |
| 5990_SF   | TTT <u>AGAATT</u> CTGTTGGCAGTCCGTGCACA   | 30        |
| 5990_CF   | TTTAA <u>AGCTTT</u> TGTTGGCAGTCCGTGCACA  | 30        |
| 5990_R    | GGCTCGATGACCGGGGTG   | 18        |
| 33-43F    | ATCGACATCCACTCGGCCGA   | 20        |
| 33-43F1   | CAGTCCGGCGGTTTCCTGTGTATCGACATCCACTCGGCCGA  | 40        |
| 90-43F1   | CACCCCGGTCATCGAGCCATCGACATCCACTCGGCCGA   | 38        |
| 6043_SR   | TTTAA <u>AGCTTTTAA</u> TTAAAT <u>CTAGA</u> ATTACCCTGTTATCCCTAGGTTGCTGAGGCGGTGAATGA | 66        |
| 6043_CR   | TTTAA <u>AGATCT</u> GTTGCTGAGGCGGTGAATGA   | 33        |
| 6017_gRNA | GG <u>ACTAGT</u> GCGTCGGATGTGTGCGGTTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG             | 61        |
| 5990_gRNA | GG <u>ACTAGT</u> GATCCTGTACACCGTGGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG             | 61        |
| Yz_UP     | GAGCACCACATCGAGATCCT   | 20        |
| Yz_D      | CACACCGACCACGTAGAAGA   | 20        |
| 5228_yz1  | CGTCGACACGGTGTTCCACA   | 20        |
| 5228_yz2  | CCGTCGTTGATGAAGTACGCCT   | 22        |
| 6017_yz1  | ACGCTCTGGACTTCCTGGATG  | 21        |
| 6017_yz2  | CGCCTCGAGATCGGAAACGT   | 20        |

注: 加下划线序列为限制性内切酶位点。

Note: The underlined base sequence is a restriction enzyme site.

和 *Nde* I 双酶切质粒 pKCcas9d6424 得到编码 *cas9* ; *Eco*R I 和 *Nde* I 双酶切 pMK101 质粒去掉 *sceM* 基因, 与 *cas9* 连接得到 pMKCas9101 质粒。使用 *Xba* I 单酶切质粒 pIJ773 得到阿泊拉霉素抗性基因片段, 克隆入质粒 pBlueScript II SK(-), 得到 pKS-apra 质粒; 使用引物 pks\_UF 和 pks\_DR, 以 pKS-apra 质粒为模板 PCR 得到 *colEI ori-MCS-acc(3)IV* 片段, *Nhe* I 单酶切; 使用引物 tet\_UF 和 cas\_DR, 以 pMKCas9101 为模板 PCR 得到 *P<sub>imyc</sub>-tetR-P<sub>mycl</sub>-cas9*, *Xba* I 单酶切后连接 *colEI ori-MCS-acc(3)IV* (*Nhe* I 单酶切)得到 CRISPR-Cas9 系统重组载体基础质粒 pCas9101 (图 1A)。

### 1.2.2 耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 *MSMEG*\_5228 基因敲除质粒 pCas95228 构建

以 pKCcas9d6424 质粒为模板, 使用引物 Grna\_F 和 Grna\_R PCR 得到带有 j23119 启动子、gRNA 目的片段, *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切克隆入 pBlueScript II SK(-)质粒, 得到 pKS-gRNA 质粒。以 pKS-gRNA 质粒为模板, 使用引物 Grna\_F 和 Grna\_R1 PCR 得到用于识别 *MSMEG*\_5228 基因靶位点的 sgRNA, *Eco*R I 和 *Spe* I 双酶切克隆入质粒 pCas9101 中得到质粒 pCas91011; 使用引物 SC\_U\_F、SC\_U\_R、SC\_D\_F、SC\_D\_F1、SC\_D\_R1 和 SC\_D\_R2 以耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 基因组 DNA 为模板 PCR 获得 *MSMEG*\_5228 基因上、下游分别为 820 bp 和 946 bp 的敲除重组交换臂, *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切后克隆入 pCas91011 获得质粒 pCas91021; *Pac* I 酶切 pGOAL19 质粒, 得到 *hyg-lacZ-sacB* 片段, 同样以 *Pac* I 酶切质粒 pCas91021, 将 *hyg-lacZ-sacB* 片段克隆入 pCas91021, 得到最终 *MSMEG*\_5228 基因敲除质粒 pCas95228 (图 1B)。

### 1.2.3 耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 *MSMEG*\_5990-*MSMEG*\_6043 基因簇敲除质粒 pCas95990、pCas96017 的构建

对于 *MSMEG*\_5990-*MSMEG*\_6043 基因簇的敲除, 本实验设计了 2 个不同 sgRNA, 识别靶位点分别位于 *MSMEG*\_5990 基因和 *MSMEG*\_6017

基因内, 用以考察不同靶点对于敲除效率的影响。以 pKS-gRNA 质粒为模板, 使用引物 Grna\_F、5990\_gRNA 和 Grna\_F、6017\_gRNA 分别 PCR 得到用于识别 *MSMEG*\_5990 和 *MSMEG*\_6017 靶位点的 sgRNA; 使用引物 5990\_SF、5990\_R、33-43F、33-43F1、90-43F1 和 6043\_SR PCR 得到 *MSMEG*\_5990-*MSMEG*\_6043 基因簇上、下游分别为 865 bp 和 938 bp 的敲除重组交换臂, 遵照 pCas95228 质粒的构建流程顺序组装 sgRNA、重组交换臂和 *hyg-lacZ-sacB*, 分别得到敲除质粒 pCas95990 和 pCas96017 (图 1C、D)。

### 1.2.4 传统 p2NIL 系列重组敲除质粒构建

*MSMEG*\_5228 单基因敲除质粒构建: 使用引物 CT\_U\_F、CT\_U\_R、CT\_D\_F 和 CT\_D\_R 分别进行 PCR 扩增获得 *MSMEG*\_5228 上、下游大小分别为 820 bp 和 946 bp 的重组交换臂, 将重组交换臂 *Hind* III、*Bgl* II 酶切后克隆入 p2NIL 质粒的 *Hind* III、*Bam*H I 位点, 获得质粒 pTMK101。 *Pac* I 酶切 pGOAL19 质粒, 获得 *hyg-lacZ-sacB* 片段。同样以 *Pac* I 酶切质粒 pTMK101 与 *hyg-lacZ-sacB* 片段连接, 最终获得 *MSMEG*\_5228 基因的敲除质粒 pTMK5228 (图 2A)。 *MSMEG*\_5990-*MSMEG*\_6043 基因簇敲除质粒构建: 使用引物 5990\_CF、5990\_R、90-43F1 和 6043\_CR PCR 得到 *MSMEG*\_5990-*MSMEG*\_6043 基因簇上、下游分别为 865 bp 和 938 bp 的敲除重组交换臂, 遵照 pTMK5228 质粒构建步骤, 获得 DNA 大片段敲除质粒 pTMK90-43 (图 2B)。

## 1.3 敲除质粒的导入与重组子的筛选

### 1.3.1 CRISPR-Cas9 敲除质粒的导入与突变株的筛选

挑取生长在固体培养基上的耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 单菌落接入 5 mL 液体 F 培养基, 37 °C、200 r/min 培养 24 h。转接 1 mL 菌体至 100 mL 液体 Lemco-Tw 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 12 h 至 *OD*<sub>600</sub> 值为 0.8–1.0。5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 重复加入 25 mL 预冷的 10%甘油洗涤菌体

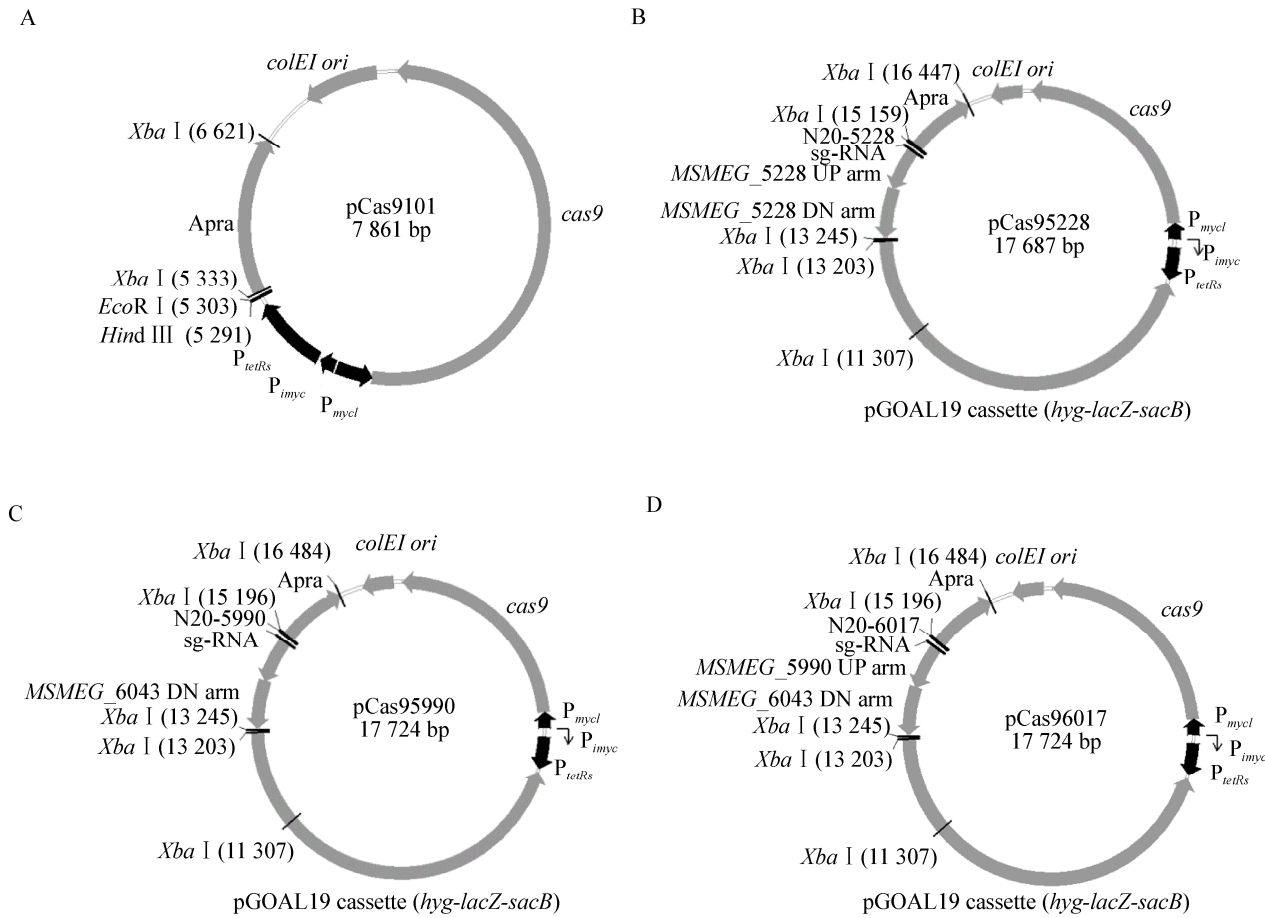


图 1 基于耻垢分枝杆菌 CRISPR-Cas9 系统构建的敲除质粒  
Figure 1 Plasmids constructed for CRISPR-Cas9 assisted deletion system in *M. smegmatis*

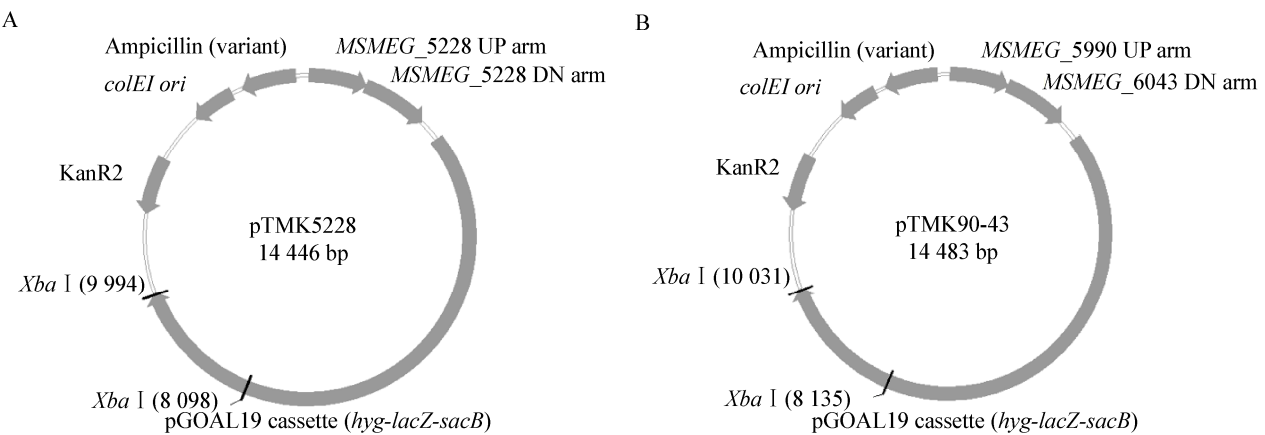


图 2 基于耻垢分枝杆菌 p2NIL-pGOAL 方法构建的敲除质粒  
Figure 2 Plasmids constructed for p2NIL-pGOAL method deletion in *M. smegmatis*

3–4 次。4 °C、5 000 r/min 离心 5 min (此过程重复 3 次)后用 200  $\mu$ L 10%甘油重悬, 加入 10–100 ng 质粒后置于冰上 10 min。将质粒与菌体混合物加入预冷电转化杯, 1 250 V/cm 条件下电转后加入 1 mL Lemco-Tw 培养基放置于 37 °C、200 r/min 复苏培养 2–3 h, 随后涂布于含有阿泊拉霉素(终浓度为 50  $\mu$ g/mL)和 X-gal (终浓度为 20  $\mu$ g/mL)的 LBG 固体培养平板, 37 °C 培养箱培养 3–5 d 后观察; 待平板上长出蓝色菌落后, 挑选蓝色菌落划线于含有 ATC (终浓度为 30 ng/mL)的 LBG 固体培养基平板上进行诱导培养, 放于 37 °C 培养箱培养 3–5 d; 平板上长出单菌落后随机挑取 2–3 株单菌落划线于含有 X-gal (终浓度为 20  $\mu$ g/mL)的 LBG 蔗糖固体培养平板(其中蔗糖浓度为 10%, 且该培养基中去掉了 NaCl 成分)放于 37 °C 培养箱培养 3–5 d; 待平板上长出蓝白分明的单菌落后, 随机挑选平板上的 33 株白色菌落分别划线于含有阿泊拉霉素(终浓度为 50  $\mu$ g/mL)的 LBG 抗性平板和不含有抗生素的 LBG 固体培养基平板上进行抗性对照, 37 °C 条件下培养 2–3 d 观察; 挑选抗性平板上不长的菌株接种于液体 5 mL F 培养基中 37 °C、200 r/min 培养 1–2 d, 分别提取基因组 DNA 后使用引物进行 PCR 验证: *MSMEG\_5228* 基因缺失突变株使用引物 3bt\_F 和 3bt\_R 进行验证; *MSMEG\_5990-MSMEG\_6043* 突变株验证引物为 Yz\_UP 和 Yz\_D。挑选目的区段缺失的 PCR 条带送测序以进一步验证。

### 1.3.2 基于 p2NIL 构建的重组敲除质粒的导入与突变株的筛选

通过与 CRISPR-Cas9 敲除质粒相同的电转化方法导入到耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 中, 涂布于含有卡那霉素(终浓度为 50  $\mu$ g/mL)和 X-gal (终浓度为 20  $\mu$ g/mL)的 LBG 固体培养基上, 37 °C 培养箱培养 3–5 d 后观察; 待平板上长出蓝色菌落后, 挑选蓝色菌落划线于 LBG 固体培养基平板上进行诱导培养, 37 °C 培养箱培养 3–5 d 后观察; 待平板上长出单菌落后随机挑取 2–3 株单菌落划线于含有

X-gal (终浓度为 20  $\mu$ g/mL)的 LBG 蔗糖固体培养平板(其中蔗糖浓度为 10%, 且该培养基中去掉了 NaCl 成分)放于 37 °C 培养箱培养 3–5 d; 待平板上长出蓝白分明的单菌落后, 随机挑选平板上的 33 株白色菌落划线于含有卡那霉素(终浓度为 50  $\mu$ g/mL)的 LBG 抗性平板和不含有抗生素的 LBG 固体培养基平板上进行抗性对照, 37 °C 条件下培养 2–3 d 观察; 挑选抗性平板上不长的菌株接种于液体 F 培养基中提取其基因组 DNA 进行 PCR 验证(验证引物与“方法 1.3.1”所述相同)其目的区段是否敲除, 并挑选目的区段缺失的 PCR 条带送测序以进一步验证。

### 1.3.3 耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 胆固醇利用基因簇敲除突变子的表型鉴定

对耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 胆固醇基因簇基因 *MSMEG\_5990-MSMEG\_6043* 进行无痕敲除后, 将此突变株和耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155、耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5228*)菌株分别同时划线至胆固醇基本培养基和 LBG 丰富培养基培养 3–5 d, 观察生长状况。

### 1.3.4 耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 基因连续敲除与鉴定

基因组 DNA 操作的焦点在于能否高效、精准、无痕和连续地完成操作。为验证能否利用 CRISPR-Cas9 系统对分枝杆菌基因组基因进行连续敲除, 在对耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 的 *MSMEG\_5228* 基因敲除的基础上, 再对其 *MSMEG\_5990-MSMEG\_6043* 基因簇基因进行无痕敲除。将 *MSMEG\_5990-MSMEG\_6043* 基因簇敲除质粒通过电转化导入到耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5228*)中, 按照 1.3.1 的方法筛选得到可能突变株, 使用引物 3bt\_F、3bt\_R 和 Yz\_UP、Yz\_D 进行 PCR 验证其目的区段是否敲除, 并挑选目的区段缺失的 PCR 条带送测序进一步验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 基因敲除策略及相关质粒的构建

设计耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 基于 CRISPR-Cas9



系统基因敲除策略如图 3 所示。重组质粒经电转化导入分枝杆菌,同源臂将自杀质粒单交换整合入分枝杆菌基因组(图 3)。挑选转化子划线到含有 ATC 的固体平板上以诱导 *cas9* 基因表达。Cas9 在 sgRNA 引导下靶向切割染色体,造成特异性双链断裂(DSB),诱导分枝杆菌重组修复系统,通过同源重组修复来实现基因或基因组 DNA 大片的无痕敲除(图 3)。

构建完成 CRISPR-Cas9 系统重组载体基础质粒 pCas9101 (7 861 bp)和 3 个 CRISPR-Cas9 衍生敲除质粒载体 pCas95228 (17 688 bp)、pCas95990 (17 724 bp)和 pCas96017 (17 724 bp);以 p2NIL-pGOAL 系统敲除质粒 pTMK5228 (14 446 bp)和 pTMK90-43 (14 483 bp)为相应对照。所有质粒进行

酶切电泳验证,并对同源重组交换臂序列和 sgRNA 序列经过测序验证。

## 2.2 使用分枝杆菌 CRISPR-Cas9 系统敲除 3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶基因(*MSMEG\_5228*)

将质粒 pCas95228 导入耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155,针对基因组上的 3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶基因 *MSMEG\_5228* 进行无痕敲除,筛选得到 *MSMEG\_5228* 单基因缺失突变株。对随机挑选的 33 株阿泊拉霉素抗性缺失菌株进行 PCR 扩增和凝胶电泳检测验证(图 4):观察到 32 个有预期大小条带,PCR 测序确认成功敲除 *MSMEG\_5228* 的菌株 7 个,敲除效率约为 21.88% (未敲除菌株 PCR 验证条带大小为 1 300 bp,敲除突变株约为 500 bp)。

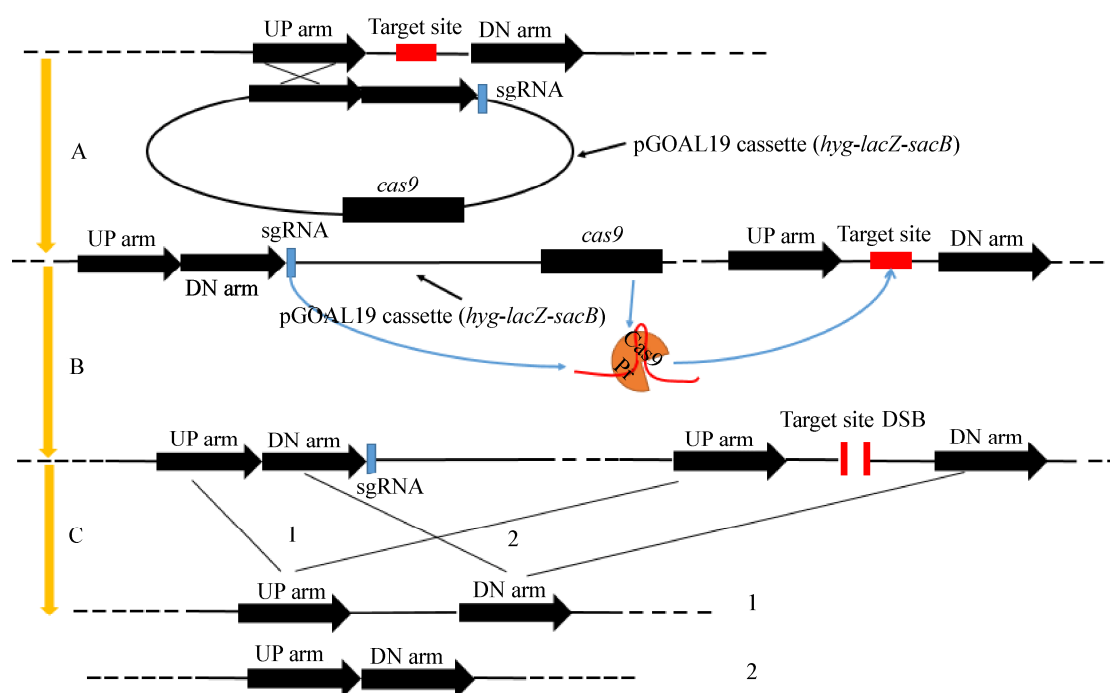


图 3 耻垢分枝杆菌 CRISPR-Cas9 系统 DNA 无痕敲除流程图

Figure 3 Flow chart of *M. smegmatis* CRISPR-Cas9 system used in DNA scarless deletion

注: A: 质粒单交换整合入染色体; B: 表达 Cas9 酶识别 sgRNA 并切割与 sgRNA 互补配对靶位点造成双链断裂; C: 在目标质粒携带 2 个同源臂区域完成染色体同源重组修复导致的两种结果(1, 2), 2 是预计的敲除。

Note: A: The target plasmid with sgRNA and *cas9* gene integrated in *M. smegmatis* *mc*<sup>2</sup>155 chromosome (single cross-over); B: Cas9 cleaves the chromosome at the specific site recognized by sgRNA targets the complementary strand; C: The two homologous recombination repairing results caused by each DNA arm containing in the target plasmid (1, 2), 2 would be the proposed deletion.

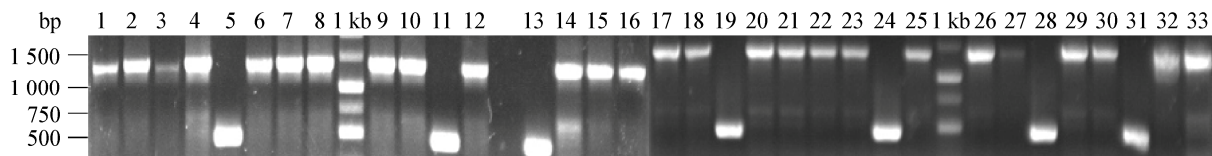


图 4 pCas95228 质粒敲除 *MSMEG\_5228* 片段 PCR 验证图

Figure 4 Identification of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5228*)

注: 1 kb: GeneRuler 1 kb marker; 1-32: 不同 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5228*) 菌落 PCR 产物; 33: *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 PCR 产物。

Note: 1 kb: GeneRuler 1 kb marker; 1-32: PCR products of different *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5228*) colonies; 33: PCR product of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

p2NIL-pGOAL 系统敲除质粒 pTMK5228 利用相同程序测试对 *MSMEG\_5228* 单基因缺失, 挑选 33 株进行检测, 结果显示均未能实现 *MSMEG\_5228* 的缺失。

### 2.3 使用分枝杆菌 CRISPR-Cas9 系统敲除胆固醇生物利用基因簇(*MSMEG\_5990-MSMEG\_6043*)

选取耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 中的胆固醇生物利用基因簇作为敲除对象, 考虑到不同的 gRNA 可能导致的脱靶问题的出现<sup>[29]</sup>, 同时设计 2 个不同 sgRNA (分别靶向 *MSMEG\_5990* 和 *MSMEG\_6017*), 构建了 pCas95990 和 pCas96017 质粒。转化耻垢分枝杆菌随机挑选 33 株突变株进行 PCR 验证: 其中使用 pCas95990 敲除质粒所得到的 33 个菌株在阿泊拉霉素抗性平板上有 1 株生长, 实验选取剩下 32 株在阿泊拉霉素抗性平板上未生长菌株, 接种到 F 液体培养基培养后抽提染色体, PCR 验证均未发现目的基因成功敲除; 使用 pCas96017 敲除质粒所得到的 33 株菌株在阿泊拉霉素抗性平板上有 5 株生长, 实验选取剩下

的 28 个菌株抽提染色体进行 PCR 验证(片段大小为 728 bp), 确认成功敲除 *MSMEG\_5990-MSMEG\_6043* 的菌株有 5 个(图 5), 敲除效率约为 17.85%。p2NIL-pGOAL 系统敲除质粒 pTMK90-43 敲除 *MSMEG\_5990-MSMEG\_6043* 也未获得阳性敲除。

分别将耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155、耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5228*) 和耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5990-MSMEG\_6043*) 划线至 LBG 丰富培养基和胆固醇基本培养基上培养 3-5 d, 观察生长状况(图 6)。结果显示 3 株菌在 LBG 丰富培养基上生长良好, 无可见表型变化, 而在胆固醇基本培养基上可以看到 *MSMEG\_5990-MSMEG\_6043* 缺失菌株基本无法正常生长, 进一步表明其体内胆固醇利用基因簇得到正确敲除。

### 2.4 耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 多基因连续敲除筛选与鉴定

为验证分枝杆菌 CRISPR-Cas9 系统能否用于基因组 DNA 进行连续敲除, 在耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5228*) 突变株中进一步利用

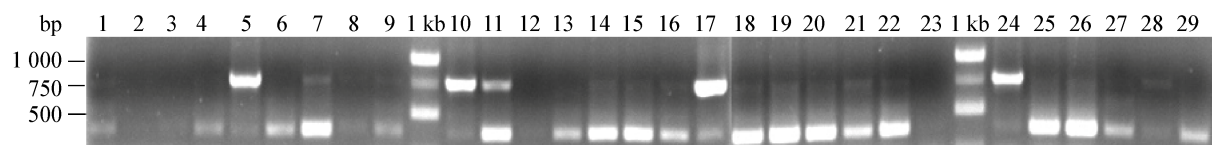


图 5 pCas96017 质粒敲除 *MSMEG\_5990-MSMEG\_6043* PCR 验证结果

Figure 5 Identification of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5990-MSMEG\_6043*)

注: 1 kb: GeneRuler 1 kb marker; 1-28: 不同 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5990-MSMEG\_6043*) 菌落 PCR 产物; 29: *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 PCR 产物。

Note: 1 kb: GeneRuler 1 kb marker; 1-28: PCR products of different *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (*AMSMEG\_5990-MSMEG\_6043*) colonies; 29: PCR product of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

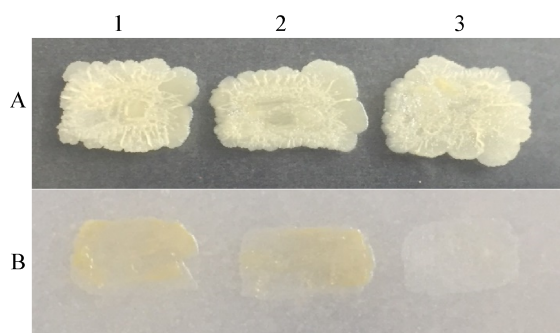


图6 菌株表型验证

Figure 6 Phenotypes of strains

注：1： *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155；2： *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( $\Delta$ MSMEG\_5228)；3： *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( $\Delta$ MSMEG\_5990-MSMEG\_6043)。A：LBG 培养基；B：胆固醇基本培养基。

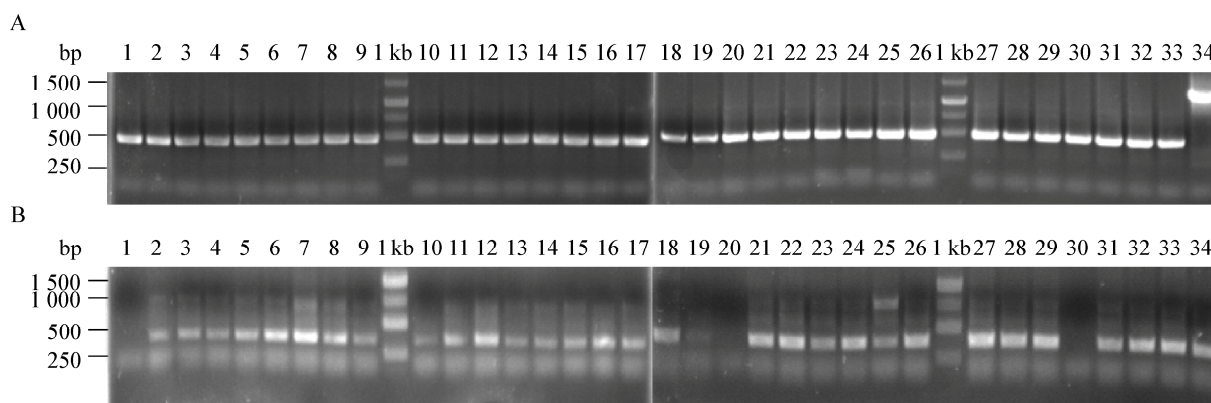
Note: 1: *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; 2: *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( $\Delta$ MSMEG\_5228); 3: *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( $\Delta$ MSMEG\_5990-MSMEG\_6043). A: LBG medium; B: Cholesterol minimal medium.

pCas96017 敲除 MSMEG\_5990-MSMEG\_6043 基因簇。对随机挑选的 33 株阿泊拉霉素抗性缺失菌株进行 PCR 验证，结果如图 7 所示：A 为 MSMEG\_5228 敲除验证结果；B 为 MSMEG\_5990-MSMEG\_6043 基因簇敲除验证结果。25 号为 MSMEG\_5990-MSMEG\_6043 和 MSMEG\_5228 双缺失突变子，通过测序验证，成功获得 MSMEG\_

5990-MSMEG\_6043 基因簇敲除菌株。应用 CRISPR-Cas9 敲除系统对耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 多基因连续敲除效率为 4%。

### 3 讨论与结论

本研究使用基于分枝杆菌改造的 CRISPR-Cas9 系统成功实现对耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155) 基因组上的 3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶基因 MSMEG\_5228 单基因敲除，并且也能对胆固醇降解基因簇 (MSMEG\_5990-MSMEG\_6043) DNA 大片段无痕敲除。统计显示对单基因无痕敲除效率为 21.88%，对基因簇大片段无痕敲除效率为 17.85%，而在 p2NIL-pGOAL 方法中使用相同的重组交换臂，未能检测到期望的敲除突变子，显示基于 CRISPR-Cas9 系统能够高效地用于分枝杆菌的基因无痕敲除。此外，针对图 3 显示的 Cas9 酶切染色体断裂后的修复情况 1，分别设计引物 5228\_yz1、5228\_yz2 和 6017\_yz1、6017\_yz2 进行了验证 (其中 MSMEG\_5228 敲除过程中随机 PCR 验证了 13 个此类菌株，MSMEG\_5990-MSMEG\_6043 敲除过程中验证了 14 个此类菌株)，未能检测到位点处有碱基序列的改变。

图7 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( $\Delta$ MSMEG\_5228 &  $\Delta$ MSMEG\_5990-MSMEG\_6043) PCR 验证结果Figure 7 Identification of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( $\Delta$ MSMEG\_5228 &  $\Delta$ MSMEG\_5990-MSMEG\_6043)

注：1 kb：GeneRuler 1 kb marker；A：1-33：不同 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( $\Delta$ MSMEG\_5228) 菌落 PCR 结果；34： *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 PCR 产物；B：1-33：不同 *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( $\Delta$ MSMEG\_5990-MSMEG\_6043) 菌落 PCR 产物；34： *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 PCR 产物。

Note: 1 kb: GeneRuler 1 kb marker; A: 1-33: PCR products of different *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( $\Delta$ MSMEG\_5228) colonies; 34: PCR product of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; B: 1-33: PCR products of different *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ( $\Delta$ MSMEG\_5990-MSMEG\_6043) colonies; 34: PCR product of *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

分枝杆菌对筛选标记易产生耐受性,筛选过程中会产生假阳性。为了有效筛选双交换重组子,在 p2NIL-pGOAL 方法中使用了潮霉素抗性基因(*hyg*)、蓝白斑筛选标记基因(*lacZ*)和编码分泌型果糖酶基因的负向筛选基因(*sacB*)组成的三重筛选标记,但假阳性菌株依然大量存在<sup>[11]</sup>。为了降低假阳性,本工作在耻垢分枝杆菌中评估了应用于不同微生物筛选的抗性基因,发现来源于链霉菌的阿泊拉霉素抗性基因[*acc(3)IV*]可以有效用于耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 的重组子筛选。为了实现基因组 DNA 片段快速、连续、无痕和精准的敲除,实验选择了使用单质粒方案。该方案需采用诱导型本底表达极低的启动子控制对 Cas9 蛋白的表达,防止 Cas9 在胞内的持续高水平存在对耻垢分枝杆菌基因组 DNA 及实验结果可能造成的影响;在诱导时能高效表达 Cas9,保证基因组 DNA 的切割效率促进重组修复的效率。本文选择的四环素诱导型启动子(*P<sub>TetRS</sub>*)最后证明可以较好地用于构建 CRISPR-Cas9 介导的耻垢分枝杆菌染色体 DNA 片段无痕敲除系统。分枝杆菌含有分枝菌酸的较厚的细胞壁<sup>[1]</sup>,液体培养过程中容易结团,实验在筛选过程中容易出现敲除和未敲除重组子的混合菌落,从而在克隆鉴定时会出现图 5 中的情况,这种情况需要进一步分离纯化得到单克隆。本文基于 CRISPR-Cas9 构建的敲除系统将为分枝杆菌的研究提供更高效便捷的基因组 DNA 操作方法。

致谢:感谢中国科学院植物生理生态研究所的覃重军研究员、芦银华研究员对本工作的无私帮助。

## REFERENCES

- [1] Jamet S, Quentin Y, Coudray C, et al. Evolution of mycolic acid biosynthesis genes and their regulation during starvation in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(24): 3797-3811
- [2] Ma JY, Huang HB, Xie YC, et al. Biosynthesis of ilamycins featuring unusual building blocks and engineered production of enhanced anti-tuberculosis agents[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 391
- [3] van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(2): 147-152
- [4] Choudhary E, Lunge A, Agarwal N. Strategies of genome editing in *mycobacteria*: Achievements and challenges[J]. *Tuberculosis*, 2016, 98: 132-138
- [5] Galán B, Uhía I, García-Fernández E, et al. *Mycobacterium smegmatis* is a suitable cell factory for the production of steroidal synthons[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(1): 138-150
- [6] Alvarez E, Tavel E. Recherches sur le bacille de Lustgarten[J]. *Archives de Physiologie Normale et Pathologique*, 1885, (6): 303-321
- [7] Reyat JM, Kahn D. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis?[J]. *Trends in Microbiology*, 2001, 9(10): 472-474
- [8] Parish T, Stoker NG. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* *tlyA plcABC* mutant by gene replacement[J]. *Microbiology*, 2000, 146(8): 1969-1975
- [9] Du QL, Fan XY, Mao JX, et al. Progression on genetic knockout tools in *Mycobacterium*[J]. *Hereditas*, 2012, 34(7): 857-862 (in Chinese)  
杜庆林,樊祥宇,毛金校,等.分枝杆菌中基因敲除操作工具研究进展[J]. *遗传*, 2012, 34(7): 857-862
- [10] Malaga W, Perez E, Guilhot C. Production of unmarked mutations in *mycobacteria* using site-specific recombination[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 219(2): 261-268
- [11] Yao K. Investigation into the molecular mechanism of microbial sterol degradation and its metabolic engineering for the production of steroid pharmaceutical precursors[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of East China University of Science and Technology, 2014 (in Chinese)  
姚抗.分枝杆菌甾醇代谢机制的解析以及其代谢工程改造应用于制备重要甾药中间体的研究[D].上海:华东理工大学博士学位论文,2014
- [12] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096
- [13] Xiong BB, Zeng H, Liu YK, et al. New era of gene editing driven by CRISPR-Cas9[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(1): 178-185 (in Chinese)  
熊彬彬,曾虎,刘云坤,等. CRISPR-Cas9 驱动基因编辑新纪元[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(1): 178-185
- [14] Li SY, Zhao GP, Wang J. Enabling technologies in synthetic biology—DNA synthesis, assembly and editing[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(3): 343-360 (in Chinese)  
李诗渊,赵国屏,王金.合成生物学技术的研究进展——DNA 合成、组装与基因组编辑[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(3): 343-360
- [15] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308
- [16] Song CW, Lee J, Lee SY. Genome engineering and gene expression control for bacterial strain development[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(1): 56-68
- [17] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for

- engineering biology[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 957-963
- [18] Kennedy EM, Cullen BR. Bacterial CRISPR-Cas DNA endonucleases: A revolutionary technology that could dramatically impact viral research and treatment[J]. *Virology*, 2015, 479-480: 213-220
- [19] Jiang Y, Qian FH, Yang JJ, et al. CRISPR-CpfI assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15179
- [20] Liu DY, Qiu T, Ding XH, et al. Rapid construction of multiple sgRNA vectors and knockout of the *Arabidopsis LAA2* gene using the CRISPR-Cas9 genomic editing technology[J]. *Hereditas*, 2016, 38(8): 756-764 (in Chinese)  
刘丁源, 邱婷, 丁晓辉, 等. 快速构建多重 sgRNA 载体利用 CRISPR-Cas9 技术敲除拟南芥 *LAA2* 基因[J]. *遗传*, 2016, 38(8): 756-764
- [21] Cobb RE, Wang YJ, Zhao HM. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces species* using an engineered CRISPR/Cas system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(6): 723-728
- [22] Huang H, Zheng GS, Jiang WH, et al. One-step high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2015, 47(4): 231-243
- [23] Jiang Y, Chen B, Duan CL, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2015, 81(7): 2506-2514
- [24] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): 4336-4343
- [25] Wu YZ, Xu HJ, Bai YL, et al. Comparison of CRISPR-Cas9 system and *mazF*-mediated method for large deletions in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(11): 1604-1611 (in Chinese)  
吴玉珍, 徐海津, 白艳玲, 等. CRISPR-Cas9 系统与 *mazF* 介导的大片段删减法在酿酒酵母染色体大片段删减中的比较[J]. *微生物学报*, 2017, 57(11): 1604-1611
- [26] Guo XV, Monteleone M, Klotzsche M, et al. Silencing essential protein secretion in *Mycobacterium smegmatis* by using tetracycline repressors[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(13): 4614-4623
- [27] Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, et al. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Molecular Microbiology*, 1990, 4(11): 1911-1919
- [28] Lu ZQ, Xie PF, Qin ZJ. Promotion of markerless deletion of the actinorhodin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2010, 42(10): 717-721
- [29] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(9): 839-843