

CRISPRi/ddCpf1 促进大肠杆菌中 丙二酰辅酶 A 的积累

洪煦琳, 贾笑, 肖毅*

(上海交通大学 生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要: 丙二酰辅酶 A 是多种有价值化合物(包括食品、保健品等)合成的重要前体物质,其合成已成为大肠杆菌中生产目标代谢物的潜在瓶颈。为解决其生物合成的瓶颈问题,作者通过 CRISPR 干扰(CRISPR interference, CRISPRi) 促进丙二酰辅酶 A 的积累。首先,构建了丙二酰辅酶 A 的生物传感器,实现了其快速、可视化的胞内测量。随后,构建了 CRISPRi/ddCpf1 系统,实现了基因转录的抑制,并尝试用 ddCpf1(催化失活的 Cpf1)和 RNA 聚合酶抑制蛋白 Gp2 融合表达(CRISPRi/ddCpf1-Gp2)。结果表明,Gp2 虽然有一定的转录抑制效果,但是严重影响了生长。最后,利用 CRISPRi/ddCpf1 系统进行两组双靶点基因抑制,分别靶向乙醛脱氢酶和 3-氧代酰基-酰基载体蛋白合酶 II 基因,以及 3-氧代酰基-酰基载体蛋白合酶 I 和琥珀酰辅酶 A 合成酶基因,均实现了丙二酰辅酶 A 浓度的提高。

关键词: CRISPR 干扰;ddCpf1;丙二酰辅酶 A;生物传感器

中图分类号:Q 819 文章编号:1673-1689(2021)12-0017-09 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.12.003

Accumulation of Malonyl-CoA in *E. coli* Promoted by CRISPRi/ddCpf1

HONG Xulin, JIA Xiao, XIAO Yi*

(School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Malonyl-CoA is an important precursor for the synthesis of plenty of valuable chemicals such as food and health products. The synthesis of malonyl-CoA has been a potential bottleneck in the production of target metabolites in *E. coli*. To solve this problem, this research aimed to promote accumulation of malonyl-CoA in *E. coli* through CRISPR interference (CRISPRi). Firstly, a malonyl-CoA biosensor was constructed to achieve fast and visible detection of the intracellular malonyl-CoA. Secondly, a CRISPRi/ddCpf1 system was constructed to repress gene transcription via ddCpf1(inactive Cpf1). And we attempted the fusion of Gp2 and ddCpf1(CRISPRi/ddCpf1-Gp2) and RNA polymerase. The results showed that Gp2 contributed a certain transcriptional inhibition effect, however, it seriously affected the growth. Finally, the CRISPRi/ddCpf1 system was applied to inhibit with a dual crRNA array, targeting acetaldehyde dehydrogenase & 3-oxoacyl-acyl carrier

收稿日期: 2021-07-28

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2018YFA0901200, 2019YFA0904800);上海交通大学深蓝计划项目(SL2020MS028)。

* 通信作者: 肖毅(1981—),男,博士,特别研究员,博士研究生导师,主要从事基因编辑、分子开关等生物技术的开发及高附加值产品的生物合成研究。E-mail: yi_xiao@sjtu.edu.cn

protein synthase II genes and 3-oxoacyl-acyl carrier protein synthase I & succinyl-CoA synthetase genes, greatly enhanced malonyl-CoA content in *E. coli*.

Keywords: CRISPR interference, ddCpf1, malonyl-CoA, biosensor

丙二酰辅酶 A (malonyl-CoA) 是食品、保健品等产品中多种有价值化合物合成的重要前体物质, 比如次级代谢产物类黄酮、聚酮化合物和脂肪酸等^[1-2]。大多数宿主中, 丙二酰辅酶 A 通过乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 催化乙酰辅酶 A 羧化合成而来^[3]。由于许多次级代谢产物的天然生产菌株难以大规模培养、基因操作困难, 易遗传操作的大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 已成为次级代谢产物生产的常用微生物细胞工厂。然而, *E. coli* 中的丙二酰辅酶 A 被用于产生脂肪酸和磷脂, 仅留下少量可用于其他次级代谢^[4-5], 是大规模生产目标次级代谢产物的潜在瓶颈^[6]。目前, 通过基因调控提高丙二酰辅酶 A 的含量, 可以促进多种下游目标产物的生物合成, 如白藜芦醇和柚皮苷等类黄酮化合物^[7]。实验表明, 丙二酰辅酶 A 的常规基因敲除会明显影响细胞生长, 导致生长迟缓甚至细胞死亡^[8]。而添加脂肪酸代谢抑制剂浅蓝菌素 (cerulenin) 可以显著提高细胞内丙二酰辅酶 A 的水平^[9], 这表明可以通过调控基因转录来提高丙二酰辅酶 A 水平。

基于成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 是一种适应性免疫系统, 常见于细菌和古细菌中, 可以对外源侵入的核酸进行靶向切割, 从而起到保护自身免受外源核酸侵害的免疫作用。CRISPR 系统由 Cas (CRISPR-associated protein) 蛋白和 crRNA (CRISPR RNA) 相互作用形成核糖核蛋白复合体, 在成熟 crRNA 的指导下, 识别靶向 DNA 序列并进行切割。基因工程中, crRNA 和 tracrRNA 可以人工改造并融合成 sgRNA (single-molecule guide RNA) 用于基因组编辑^[10]。CRISPR 干扰是一种基于 CRISPR 系统的基因转录抑制技术, 利用催化失活的 Cas 蛋白 (dead Cas protein, dCas) 对特定基因转录进行下调^[11]。以 CRISPR/Cas9

系统为例, dCas9 是 Cas9 的催化失活突变体, dCas9-sgRNA 复合体能够与 DNA 特异性结合而不进行核酸切割, 通过空间阻碍 RNA 聚合酶 (RNA polymerase, RNAP) 的转录过程, 从而抑制目标基因的转录^[11]。代谢工程中, CRISPRi 技术可用于下调代谢竞争途径、抑制转运蛋白的活性等, 从而提高目标产物的产量、减少毒性中间体和副产物^[12]。目前, CRISPRi 已经被用于多种代谢工程宿主, 包括 *Escherichia*^[13]、*Mycobacterium*^[14]、*Clostridium*^[15]、*Corynebacterium*^[16]、*Pseudomonas*^[17]。Cpf1 是 II 类 V-A 型 CRISPR 系统, 具有和 Cas9 同源的类 RuvC 内切酶结构域^[18]。由于其具有组成简单、特异性高、能同时作用多靶点、脱靶效应更低^[19]等优势, 被视为常用基因编辑技术 CRISPR-Cas9 的替代品, 已经被开发成为多重基因编辑、基因调控的工具, 应用于代谢工程^[20-22]。Ji 等用 ddCpf1 替代化学抑制剂用于下调 *fabI* 基因的表达, 将丁烯酸的产量提高了 6 倍^[22]。Li 等在谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中应用 CRISPR/dCpf1 抑制 *gltA*、*pck*、*pgi* 和 *hom* 基因 (参与赖氨酸合成) 表达, 将赖氨酸产量提高了 4 倍以上^[23]。

噬菌体 T7 的基因 2 编码的一种大肠杆菌 RNA 聚合酶抑制剂 Gp2 蛋白, 可以干扰 DNA 在 RNAP 下游的正确定位, 有效抑制 E- σ^{70} 转录起始^[24], 表现了其在抑制基因转录中的调控潜力。另外, 小分子化合物可以通过生物分子传感器进行胞内实时检测和分析^[25]。

作者首先构建了丙二酰辅酶 A 的生物传感器, 实现了丙二酰辅酶 A 的快速、可视化检测。随后在大肠杆菌中构建了 CRISPRi/ddCpf1 系统, 并尝试将 ddCpf1 和 Gp2 蛋白融合。最终通过 CRISPRi/ddCpf1 多靶点下调脂肪酸等代谢途径, 实现了丙二酰辅酶 A 的积累, 为解决其下游目标产物生物合成的瓶颈问题提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5 α 用于载体构建,大肠杆菌 BL21(DE3)用于生物传感器实验,由作者所在实验室保藏;Stable Competent *E. coli* 购于美国 New England Biolabs 公司,用于 CRISPRi/ddCpf1 系统功能验证和优化;pS7a-*acc*、pBVSC 为作者所在实验室保存质粒,pAJK-RFP 质粒为作者构建。

1.1.2 实验试剂 胰蛋白胨、酵母提取物:英国 Oxoid 公司产品;GeneRuler 1kb DNA Ladder、琼脂糖凝胶回收试剂盒、Phusion Polymerase:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;10 $\times$ TAE buffer:大连美仑生物技术有限公司产品;卡那霉素、甘油、氯霉素:生工生物工程上海(股份)有限公司产品;L-阿拉伯糖:上海麦克林生化科技有限公司产品;氯化钠、琼脂粉、葡萄糖:国药集团化学试剂有限公司产品;2 $\times$ ES Taq Mastermix(Dye):北京康为世纪生物科技有限公司产品;GeneRed 核酸染料、质粒小提试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司产品;10 $\times$ DNA Loading buffer:南京诺唯赞生物科技有限公司产品;BSA(牛血清白蛋白):德国 Sigma 公司产品;T4 连接酶、*Dpn* I、*Bsa* I 限制性核酸内切酶:美国 New England Biolabs 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制 10 g/L 氯霉素(Cm)溶液:称取 0.1 g Cm 粉末溶于 10 mL 的无水乙醇中,于-20 $^{\circ}$ C 避光保存备用。

100 g/L 氨苄青霉素(Amp)溶液:称取 0.2 g 粉末溶于 2 mL 的 ddH₂O 中,过滤除菌,于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

50 g/L 卡那霉素(Kan)溶液:称取 0.1 g Kan 粉末溶于 2 mL 的 ddH₂O 中,过滤除菌,于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

0.5 mol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)溶液:称取 1.19 g IPTG 加入适量的灭菌 ddH₂O,定容至 10 mL,过滤除菌,于-20 $^{\circ}$ C 避光保存。

LB 培养基:5 g 酵母提取物、10 g NaCl、10 g 胰蛋白胨,加入去离子水搅拌均匀,用量杯定容至 1 L,高温高压灭菌 20 min。添加 12 g/L 琼脂粉的 LB 培养基即为固体培养基。

1 mol/L 阿拉伯糖(Ara)溶液:称取 0.75 g Ara 粉末,加终体积为 5 mL 的 ddH₂O 溶解,过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 低温保存。

1.2.2 载体、引物和菌株构建 载体采用 Oligo anneal 和 Golden-gate 克隆方法进行构建,构建模板来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、BglBrick 系列质粒^[26]和 Addgene 网站购买质粒。引物合成于北京擎科生物科技有限公司上海分公司。采用电转化法将构建好的载体转入大肠杆菌,挑取单克隆,获得目的菌株。

1.2.3 荧光值的测定 将菌种置于 3 mL 的 LB 液体培养基(20 mg/L Kan 溶液、25 mg/L Cm 溶液、100 mg/L Amp 溶液,抗生素添加种类根据具体菌株调整)中 220 r/min 条件下 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日,将体积分数 2%的种子液转接于 3 mL 的 LB 液体培养基(含相应的抗生素),振荡培养,在 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6 加入诱导剂,一定时间内吸取 150 μ L 或 200 μ L 培养液于酶标仪中进行荧光值和 OD₆₀₀ 的测量。对于 ddCpf1 功能验证,OD₆₀₀ 为 0.6 时加入 10 mmol/L Ara 溶液,2 h 后加入 0.3 mmol/L IPTG,振荡培养 4.5 h,吸取 200 μ L 的培养液于酶标仪中进行测定。酶标仪设定程序:发射波长 612 nm,激发波长 560 nm。相对荧光值的计算公式如下:

$$F/OD_{600} = \frac{F_m - F_b}{OD_m - OD_b} \quad (1)$$

式中: F/OD_{600} 为相对荧光值; F_m 为实验组荧光值;OD_m 为实验组 OD₆₀₀; F_b 为 LB 液体培养基的荧光值;OD_b 为 LB 液体培养基的 OD₆₀₀。

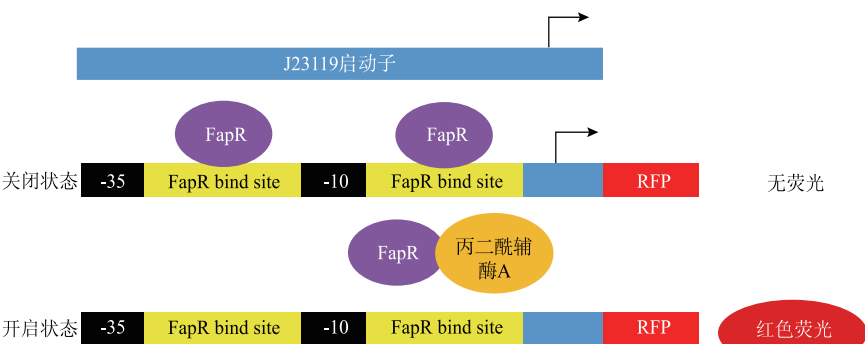
2 结果与分析

2.1 丙二酰辅酶 A 生物传感器的设计与构建

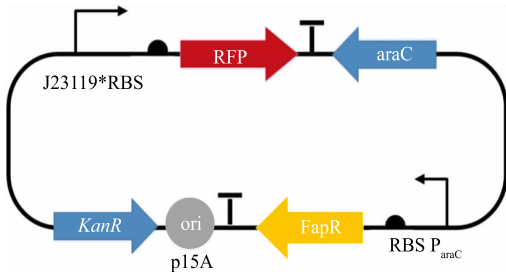
为了对大肠杆菌内的丙二酰辅酶 A 进行方便检测,设计构建丙二酰辅酶 A 生物传感器,通过红色荧光测量评估丙二酰辅酶 A 的胞内浓度。FapR 蛋白来自枯草芽孢杆菌,可以特异性结合丙二酰辅酶 A^[25]。如图 1(a)所示,以 J23119 启动子为改造基础,在-35、-10 区域前后插入 FapR 蛋白结合位点,设计响应丙二酰辅酶 A 浓度的启动子。当胞内丙二酰辅酶 A 浓度较低时,FapR 蛋白结合启动子,阻碍红色荧光蛋白(red fluorescent protein,RFP)表达;当胞内丙二酰辅酶 A 浓度较高时,FapR 蛋白结合游离的丙二酰辅酶 A,RFP 正常表达,可检测到显著

红色荧光。在此,设计了 7 种不同 FapR 蛋白结合位点的插入组合,见表 1。随后,构建丙二酰辅酶 A 生物传感器(pAJK-RFP 质粒),用阿拉伯糖启动子控

制 FapR 蛋白组成型表达,用丙二酰辅酶 A 响应启动子控制 RFP 表达,见图 1(b)。



(a) 响应丙二酰辅酶A浓度的启动子原理及设计



(b) pAJk-RFP质粒

RFP:红色荧光蛋白;RBS:核糖体结合位点;ori:复制起点;KanR:卡那霉素抗性基因;araC:阿拉伯糖启动子元件;P_{araC}:阿拉伯糖启动子;J23119*:表 1 中的丙二酰辅酶 A 响应启动子。

图 1 丙二酰辅酶 A 生物传感器原理图及质粒

Fig. 1 Diagram and the plasmid of malonyl-CoA biosensor

表 1 丙二酰辅酶 A 响应启动子的序列

Table 1 Sequences of malonyl-CoA responsive promoters

启动子	序列 (5'-3')
J231	<u>TTGACATTAGTACCTGATACTAATATAAT</u> ATTAGTACCTGATACTAACTAGT
J232	<u>TTGACATTAGTACCTGATACTAATATAAT</u> ACTTAGTACCTGATACTAATAGT
J233	<u>TTGACATTAGTACCTGATACTAATATAAT</u> ACTTTAGTACCTGATACTAAAGT
J234	<u>TTGACATTAGTACCTGATACTAATATAAT</u> ACTATTAGTACCTGATACTAAAGT
J12	TTAGTACCTGATACTAA <u>TTGACATTAGTACCTGATACTAATATAAT</u> ACTAGT
J24	<u>TTGACATTAGTACCTGATACTAATATAAT</u> ACTAGTTTAGTACCTGATACTAA
J2	<u>TTGACATTAGTACCTGATACTAATATAAT</u> ACTAGT

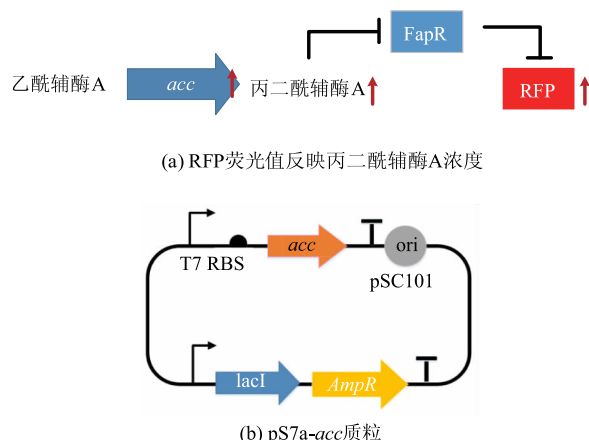
注:粗体序列代表 FapR 结合位点,-35 和-10 区域由下划线标出。

2.2 丙二酰辅酶 A 生物传感器的评估

为了验证丙二酰辅酶 A 生物传感器的功能,采用 pS7a-acc 质粒过表达 acc 基因促进丙二酰辅酶 A 的积累,见图 2。将 pAJK-RFP、pS7a-acc 质粒(见图 1(b)和图 2(b))转化 *E. coli* BL21(DE3),分别采用 0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L、

1 mmol/L、10 mmol/L 的 IPTG 诱导 ACC 过表达,逐步使胞内的丙二酰辅酶 A 浓度增加,从而开启生物传感器的荧光信号。通过检测红色荧光值和 OD₆₀₀,计算生物传感器在不同 IPTG 诱导浓度下的相对荧光值,获得丙二酰辅酶 A 生物传感器的响应曲线(见图 3)。J12 生物传感器渗漏控制较好,在没有

IPTG 的时候无显著荧光,在 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上的 IPTG 存在时,可检测到显著的红色荧光,相对荧光值提高了 3.26 倍;J233 生物传感器的荧光响应较为明显,在 10 mmol/L IPTG 存在时,相对荧光值提高了 5.83 倍。后续实验选择 J233 生物传感器进行。



RBS:核糖体结合位点;ori:复制起点;acc:乙酰辅酶 A 羧化酶基因;AmpR:氨苄青霉素抗性基因;lacI:T7 启动子元件。

图 2 丙二酰辅酶 A 生物传感器的功能验证

Fig. 2 Functional verification of malonyl-CoA biosensor

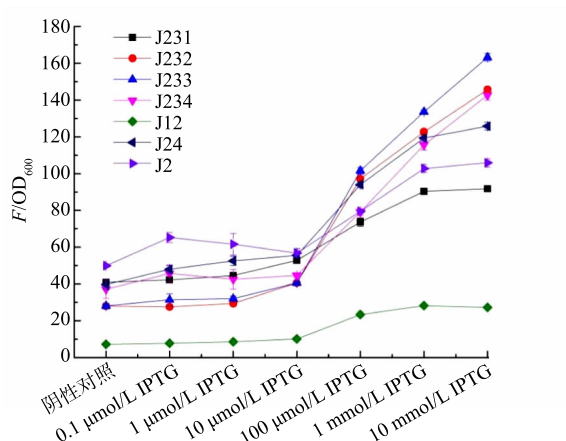


图 3 不同丙二酰辅酶 A 生物传感器的响应曲线

Fig. 3 Response curves of different malonyl-CoA biosensors

2.3 CRISPRi/ddCpf1 系统的构建

为了构建催化失活的 Cpf1, 构建了来自 *Francisella novicida* 的 Cpf1 效应蛋白的 3 个突变体, 分别是 D917A 单突变、E1006A 单突变和 D917A-E1006A 双突变。为了验证 CRISPRi/ddCpf1 系统的功能及特点, 针对 $P_{T_{ac}}$ 启动子诱导型表达的

RFP 基因设计了 4 个 crRNA (见图 4): p-T、p-NT、R-T、R-NT, 并分别靶向 $P_{T_{ac}}$ 启动子的模板链、非模板链和靶向 RFP 基因的模板链、非模板链。以荧光数值来判断 CRISPRi/ddCpf1 系统的效果。

结果显示, 当 crRNA 靶向启动子区域时, p-T1、p-NT1 的相对荧光值在 ddCpf1-M1 实验组中分别下降了 89.7% 和 88.0%, 在 ddCpf1-M2 实验组中分别下降了 79.7% 和 87.8%, 在 ddCpf1-M1-M2 实验组中分别下降了 91.8% 和 87.0% (见图 5)。可见, 突变效应蛋白 ddCpf1-M1、ddCpf1-M2 和 ddCpf1-M1-M2 对于 p-T1、p-NT1 有较为明显的基因下调效果, 且无论靶向模板链或非模板链均能得到较好的抑制效果, 这与以前报道的研究结果一致^[20]。当 crRNA 靶向 RFP 基因, R-T1、R-NT1 的相对荧光值在 ddCpf1-M1 实验组中分别下降了 47.6% 和 2.2%, R-T1 的相对荧光值在 ddCpf1-M1-M2 实验组中下降了 57.4% (见图 5)。可见, 靶向 RFP 基因时 ddCpf1 的下调效率均小于靶向启动子区域时的下调效率。对于 CRISPRi/ddCpf1 系统, crRNA 靶向基因表达的启动子区域可以获得较好的基因下调效果。

2.4 CRISPRi/ddCpf1-Gp2 系统的构建

在应用中, 将 dCas 蛋白融合其他功能蛋白是一个常见的改进策略。有研究者利用 dCas9 融合蛋白构建的 CRISPRoff 蛋白可以持久且特异性地沉默基因表达^[27]; 也有研究者融合 dCas9 和转录抑制子 (如 Kox1 的 KRAB 结构域), 在人类和酵母细胞中实现稳定有效的转录抑制, 揭示了 dCas 融合蛋白在 CRISPR 功能优化中的潜力^[28]。作者尝试将功能蛋白和 ddCpf1 蛋白融合, 优化 CRISPRi/ddCpf1 系统的调控功能。

研究发现, 噬菌体基因 2 编码的 Gp2 蛋白可以降低 RNA 聚合酶对启动子区域的 DNA 亲和力, 实现转录抑制^[29]。受此启发, 为了进一步提高转录抑制效率, 将 ddCpf1-M1 和 Gp2 抑制蛋白进行融合表达 (见图 6(a))。选择来自 *Enterobacter phage* BA14、*Enterobacter phage* T3、*Enterobacter phage* K1F 和 *Klebsiella phage* K11^[30] 的 Gp2 蛋白, 通过连接子 (Ala-Ala, AA), 分别在 ddCpf1-M1 的 N 端和 C 端进行融合表达 (CRISPRi/ddCpf1-Gp2), 见图 6(b)。

结果表明, 对于 *Enterobacter phage* BA14 的 Gp2 蛋白, 连接顺序为 Gp2-AA-ddcpgf1-M1 的实验组的相对荧光值下降了 36.1%、OD₆₀₀ 下降了

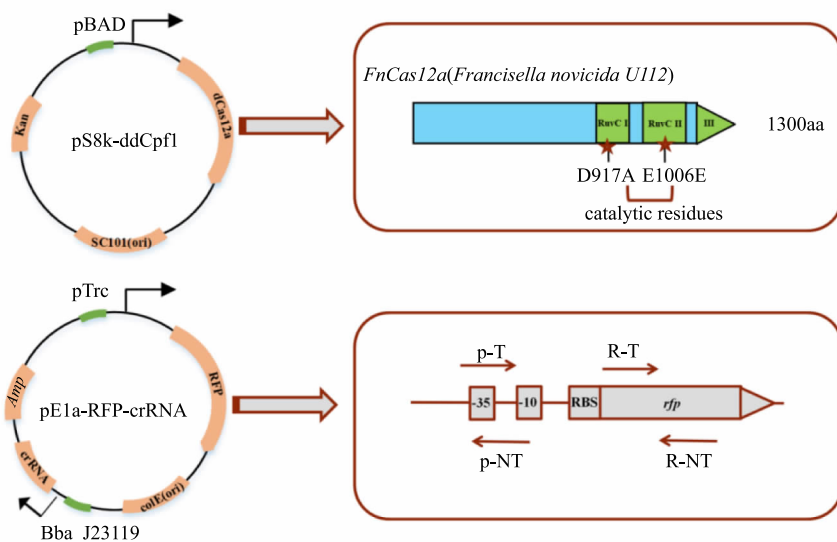
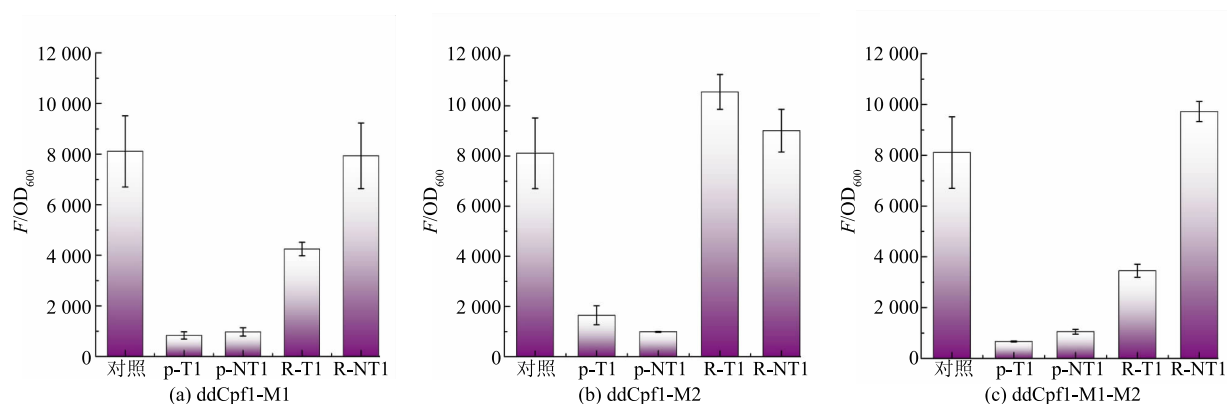


图 4 基于 CRISPRi/ddCpf1 的基因抑制设计

Fig. 4 Design of gene inhibition based on CRISPRi/ddCpf1



p-T1:pTrc-模板链;p-NT1:pTrc-非模板链;R-T1;RFP-模板链;R-NT1;RFP-非模板链;图中数值为3次重复实验的平均值,误差棒为标准误差。

图 5 CRISPRi/ddCpf1 的基因抑制

Fig. 5 Gene inhibition by CRISPRi/ddCpf1

47.4%, ddcpf1-M1-AA-Gp2 实验组的相对荧光值下降了 30.3%、OD₆₀₀ 下降了 57.3%；对于 *Enterobacteria phage* T3 的 Gp2 蛋白, ddcpf1-M1-AA-Gp2 实验组的相对荧光值下降了 19.5%、OD₆₀₀ 下降了 63.5%；对于 *Enterobacteria phage* K1F 的 Gp2 蛋白, Gp2-AA-ddcpf1-M1 实验组的相对荧光值下降了 37.4%、OD₆₀₀ 下降了 44.9%, ddcpf1-M1-AA-Gp2 实验组的相对荧光值下降了 24.2%、OD₆₀₀ 下降了 34.2%；对于 *Klebsiella phage* K11 的 Gp2 蛋白, Gp2-AA-ddcpf1-M1 实验组的相对荧光值下降了 21.0%、OD₆₀₀ 下降了 51.9%, ddcpf1-M1-AA-Gp2 实验组的相对荧光值下降了 30.8%、OD₆₀₀ 下降了

65.1%(见图 7)。可见,4 种 Gp2 蛋白均有一定抑制基因转录的功能,但表达 Gp2 蛋白的实验组中,OD₆₀₀ 均显著降低。这可能是因为 Gp2 蛋白的表达产生了毒性,在一定程度上干扰了大肠杆菌的生长和代谢,导致 CRISPRi 的低效。

2.5 通过 CRISPRi/ddCpf1 技术促进大肠杆菌中丙二酰辅酶 A 的积累

CRISPR 干扰可以下调基因的转录,从而调控基因表达。为了促进大肠杆菌中丙二酰辅酶 A 的合成,利用 ddCpf1 双突变体(D917A-E1006A)构建了 CRISPRi/ddCpf1 双靶点系统,设计了 CRISPR array (见表 2) 同时靶向两个基因: *adhE* (编码

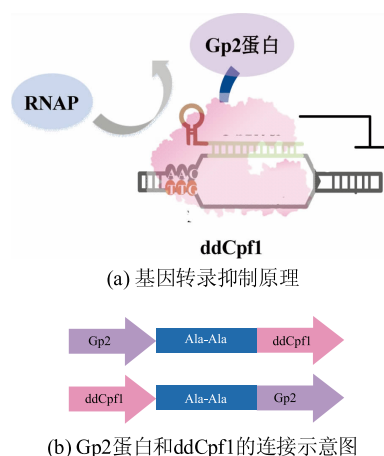
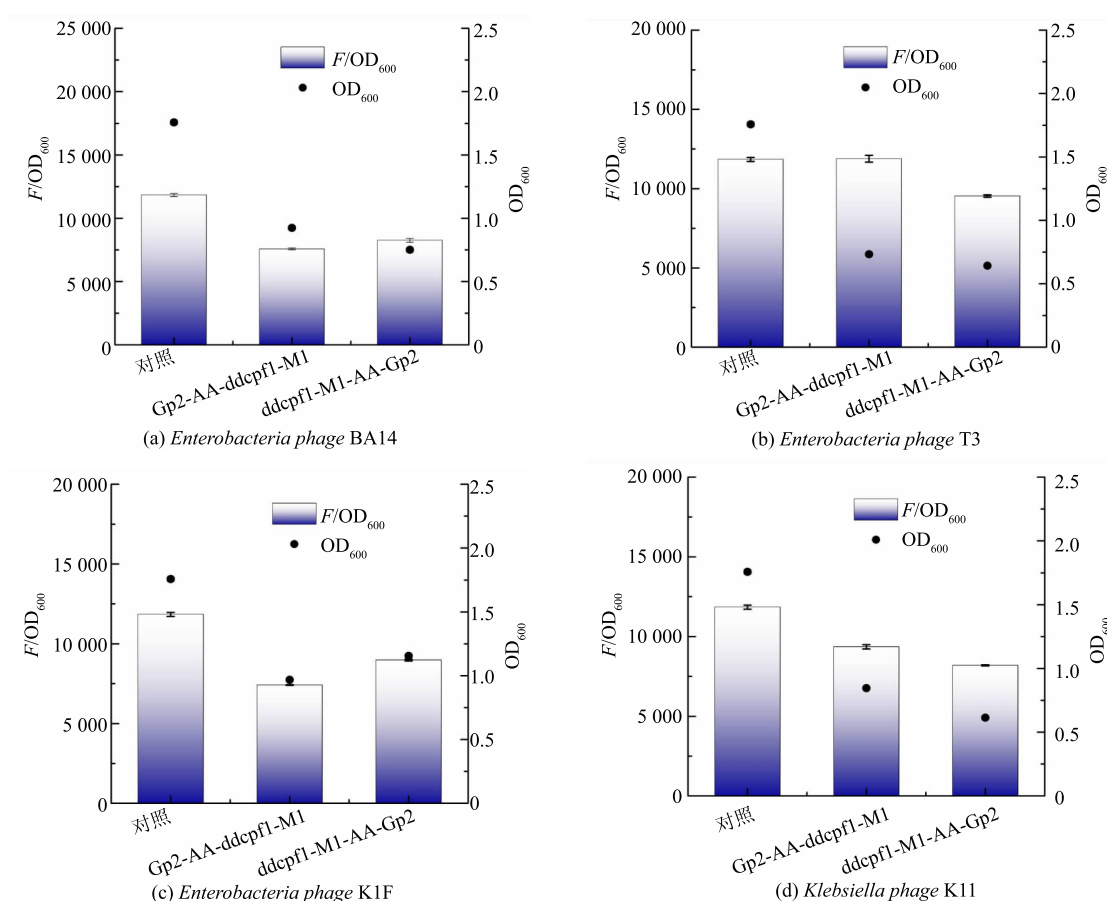


图 6 CRISPRi/ddCpf1 关于 Gp2 蛋白的基因转录抑制
Fig. 6 Transcriptional inhibition of CRISPRi/ddCpf1-Gp2

acetaldehyde dehydrogenase, 乙醛脱氢酶) 基因、*fabF* (编码 3-oxoacyl-acyl carrier protein synthase II, 3-氧代酰基-酰基载体蛋白合酶 II) 基因和 *fabB* (编码 3-oxoacyl-acyl carrier protein synthase I, 3-氧代酰基-酰基载体蛋白合酶 I) 基因、*sucC* (编码 succinyl-CoA synthetase, 琥珀酰辅酶 A 合成酶) 基因^[1], 并进行 CRISPR 干扰。通过检测 RFP 相对荧光值, 对胞内丙二酰辅酶 A 进行测量, 见图 8(a)。其中, CRISPRi/ddCpf1 系统由载体 pBVSC 表达, 丙二酰辅酶 A 生物传感器由载体 pAJK-J233 表达。

如图 8(b) 所示, 相对于对照组 (丙二酰辅酶 A 生物传感器菌株, 不加诱导剂), CRISPRi/ddCpf1 系统靶向 *adhE/fabF* 基因时相对荧光值增加了 46.2%, 靶向 *fabB/sucC* 基因时相对荧光值增加了 149.5%。可见, CRISPRi/ddCpf1 多重靶向策略显著促进了丙二酰辅酶 A 的积累。



图中的数值为 3 次重复实验的平均值, 误差棒为标准误差。

图 7 4 种 Gp2 蛋白的基因抑制结果
Fig. 7 Gene suppression of four Gp2 proteins

表 2 CRISPRi/ddCpf1 基因转录抑制系统的 CRISPR array 序列

Table 2 Sequences of CRISPR array in CRISPRi/ddCpf1 gene transcriptional inhibition system

实验组	CRISPR array 序列(5'-3')
<i>adhE/fabF</i>	AATTTCTACTGTTGTAGATAGCGACATTAGTAACAGCCATAATTTCTACTGTTGTAGATTGACCGGACTGG GCATGTTGT
<i>fabB/sucC</i>	AATTTCTACTGTTGTAGATAATGAAACGTGCAGTGATTACAATTTCTACTGTTGTAGATCCTGATATTTCATG TAAGTTCA

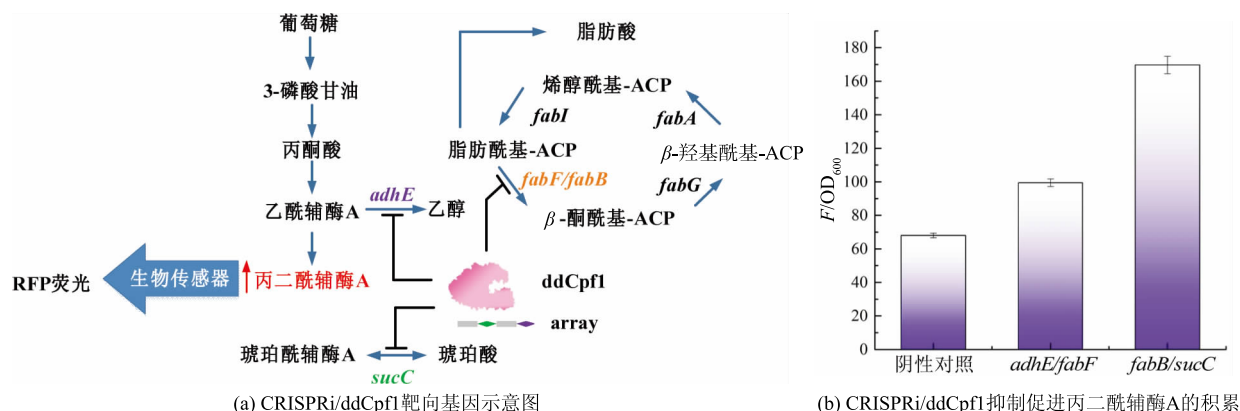


图 8 CRISPRi/ddCpf1 促进丙二酰辅酶 A 的积累

Fig. 8 CRISPRi/ddCpf1 promotes the accumulation of malonyl-CoA

3 结 语

丙二酰辅酶 A 是重要的前体物质,其合成被认为是大规模生产目标次级代谢产物的潜在瓶颈。研究表明,其常规基因敲除会影响细胞生长。因此,利用 CRISPR 干扰技术实现基因转录下调,从而促进丙二酰辅酶 A 的积累。为了比较丙二酰辅酶 A 的浓度,作者以 J23119 启动子为改造基础,构建了 7 个不同的丙二酰辅酶 A 生物传感器,通过红色荧光值的测定实现了丙二酰辅酶 A 的快速、可视化测量。然后,构建了 CRISPRi/ddCpf1 基因干扰系统,成功

实现了目的基因的基因沉默,并比较了不同 ddCpf1 突变体、不同 crRNA 靶向位置对基因沉默的影响。随后,尝试融合 Gp2 和 ddCpf1 效应蛋白对该 CRISPRi/ddCpf1 系统进行优化,但基因转录下调效率没有显著提升。最后,利用 CRISPRi/ddCpf1 技术同时靶向两个基因(*adhE/fabF* 和 *fabB/sucC*)进行 CRISPR 干扰,显著促进了丙二酰辅酶 A 的积累,为其下游目的产物的高效合成提供了技术参考。在后续研究中,需要尝试融合其他蛋白、设计 CRISPR array 进行多重基因抑制等,实现对基因转录下调效率的控制。

参考文献:

- [1] WU J, DU G, CHEN J, et al. Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*[J]. **Scientific Reports**, 2015, 1(5): 134-177.
- [2] WU J, ZHANG X, ZHOU J, et al. Efficient biosynthesis of (2s)-pinocembrin from D-glucose by integrating engineering central metabolic pathways with a pH-shift control strategy[J]. **Bioresource Technology**, 2016, 218: 999-1007.
- [3] MILKE L, MARIENHAGEN J. Engineering intracellular malonyl-coa availability in microbial hosts and its impact on polyketide and fatty acid synthesis[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020, 104(14): 6057-6065.
- [4] TAKAMURA Y, NOMURA G. Changes in the intracellular concentration of acetyl-coa and malonyl-coa in relation to the carbon and energy metabolism of *Escherichia coli* K12[J]. **Journal of General Microbiology**, 1988, 134(8): 2249-2253.
- [5] XU P, RANGANATHAN S, FOWLER Z L, et al. Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA[J]. **Metabolic Engineering**, 2011, 13(5): 578-587.
- [6] DEMIDENKO A, AKBERDIN I R, ALLEMANN M, et al. Fatty acid biosynthesis pathways in *Methylobacterium buryatense* 5G (B1)[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2016, 10(7): 1-11.

- [7] YAN D, KIM W J, YOO S M, et al. Repurposing type III polyketide synthase as a malonyl-coa biosensor for metabolic engineering in bacteria[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2018, 115(40): 9835-9844.
- [8] MAGNUSON K, JACKOWSKI S, ROCK C O, et al. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. **Microbiological Reviews**, 1993, 57(3): 522-542.
- [9] CAO W, MA W, ZHANG B, et al. Improved pinocembrin production in *Escherichia coli* by engineering fatty acid synthesis[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2016, 43(4): 557-566.
- [10] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. **Science**, 2012, 337(6096): 816-821.
- [11] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. **Cell**, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [12] CHO S, SHIN J, CHO B K. Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018, 19(4): 1-19.
- [13] WU J, ZHANG X, ZHU Y, et al. Rational modular design of metabolic network for efficient production of plant polyphenol pinosylvin[J]. **Scientific Reports**, 2017, 7(1): 1-15.
- [14] ROCK J M, HOPKINS F F, CHAVEZ A, et al. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform[J]. **Nature Microbiology**, 2017, 6(2): 162-174.
- [15] WANG Y, ZHANG Z T, SEO S O, et al. Gene transcription repression in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR-dCas9 [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2016, 113(12): 2739-2743.
- [16] PARK J, SHIN H, LEE S M, et al. RNA-guided single/double gene repressions in *Corynebacterium glutamicum* using an efficient CRISPR interference and its application to industrial strain[J]. **Microbial Cell Factories**, 2018, 17(1): 1-10.
- [17] TAN S Z, REISCH C R, PRATHER K L J. A robust CRISPR interference gene repression system in *Pseudomonas* [J]. **Journal of Bacteriology**, 2018, 200(7): 1-12.
- [18] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNABASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. **Nature Reviews Microbiology**, 2015, 13(11): 722-736.
- [19] HAHN F, NEKRASOV V. CRISPR/Cas precision; do we need to worry about off-targeting in plants? [J]. **Plant Cell Reports**, 2019, 38(4): 437-441.
- [20] ZHANG X, WANG J, CHENG Q, et al. Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1 [J]. **Cell Discovery**, 2017, 6(3): 1-9.
- [21] SCHILLING C, KOFFAS M A G, SIEBER V, et al. Novel prokaryotic CRISPR-Cas12a-based tool for programmable transcriptional activation and repression[J]. **ACS Synthetic Biology**, 2020, 9(12): 3353-3363.
- [22] JI X, ZHAO H, ZHU H, et al. CRISPRi/dCpf1-mediated dynamic metabolic switch to enhance butenoic acid production in *Escherichia coli* [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020, 104(12): 5385-5393.
- [23] LI M, CHEN J, WANG Y, et al. Efficient multiplex gene repression by CRISPR-dCpf1 in *Corynebacterium glutamicum* [J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020, 24(8): 1-9.
- [24] BAE B, DAVIS E, BROWN D, et al. Phage T7 Gp2 inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase involves misappropriation of σ^{70} domain 1.1 [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2013, 110(49): 19772-19777.
- [25] LIU D, XIAO Y, EVANS B S, et al. Negative feedback regulation of fatty acid production based on a malonyl-coa sensor-actuator [J]. **ACS Synthetic Biology**, 2015, 4(2): 132-140.
- [26] LEE T S, KRUPA R A, ZHANG F, et al. Bglbrick vectors and datasheets: a synthetic biology platform for gene expression [J]. **Journal of Biological Engineering**, 2011, 5(1): 1-14.
- [27] NUNEZ J K, CHEN J, POMMIER G C, et al. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing [J]. **Cell**, 2021, 184(9): 2503-2519.
- [28] GILBERT L A, LARSON M H, MORSUT L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes [J]. **Cell**, 2013, 154(2): 442-451.
- [29] MEKLER V, MINAKHIN L, SHEPPARD C, et al. Molecular mechanism of transcription inhibition by phage T7 Gp2 protein [J]. **Journal of Molecular Biology**, 2011, 413(5): 1016-1027.
- [30] SHEPPARD C, CAMARA B, SHADRIN A, et al. Reprint of: inhibition of *Escherichia coli* RNAP by T7 Gp2 protein; role of negatively charged strip of amino acid residues in Gp2 [J]. **Journal of Molecular Biology**, 2011, 412(5): 832-841.