



## 基因编辑技术对大肠杆菌 *yjjW* 基因点突变的两步法策略

张琦, 梁雅静, 张宇馨, 陈玲慧, 韩钟娆, 李贝贝, 金一, 何晓青\*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

**摘要:**【目的】为了实现对大肠杆菌靶基因的点突变, 本研究将同源重组系统与 CRISPR-Cas9 技术相结合, 探索一种高效、简捷的两步法策略。【方法】将靶基因的上下游同源臂和标记基因(*amp*)与 pKOV 质粒连接, 获得 pKOV-HR 重组质粒。将 pKOV-HR 转化至大肠杆菌, 借助其自身 RecA 重组系统, 介导 DNA 发生同源重组, 获得靶基因敲除菌株。随后, 靶基因的点突变采用 pSGKP-km 和 pCasKP-apr 双质粒系统。首先, 设计与 *amp* 结合具有定向引导作用的 spacer 序列, 并利用 overlap PCR 获得带有靶基因点突变的同源臂, 将 spacer 和同源臂与 pSGKP-km 质粒连接, 获得重组质粒 pSGKP-km-spacer-HR; 接着, 将 pSGKP-km-spacer-HR 和 pCasKP-apr 质粒转化至上述敲除菌株; 最后, 利用质粒表达的 Cas9 切割蛋白和  $\lambda$ -Red 重组蛋白, 发生 DNA 同源重组, 获得靶基因点突变菌株。【结果】利用上述方法, 既成功获得了大肠杆菌 *yjjW* 敲除菌株 D7 $\Delta$ *yjjW::amp<sup>R</sup>*, 又实现了 *yjjW* 第 24 位碱基 T 到 C 的点突变, 获得点突变菌株 D7*yjjW*-24。【结论】本研究建立了一种高效、简捷的大肠杆菌靶基因点突变方法, *amp* 基因的插入提供了有效的筛选标记, 此外该方法建立的重组质粒 pSGKP-km-spacer, 可应用于同种菌株其他靶基因的点突变, 能够缩短后续实验操作, 为基因编辑技术的发展提供了科学理论以及实验操作基础。

**关键词:** CRISPR-Cas9, 大肠杆菌, 同源重组, 点突变

大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为一种常见的模式菌株, 其繁殖迅速, 遗传构造研究详尽, 已被广泛应用于生物工程领域, 用于表达异源蛋白和某些大分子产物等<sup>[1]</sup>, 建立和开发基因编辑方法有助于对大肠杆菌的研究和利用<sup>[2]</sup>。目前对大肠杆菌

进行染色体水平上的改造有如下两种方法: 一是利用其自身 RecA 同源重组系统编码的重组蛋白介导 DNA 发生同源重组; 二是通过引入外源重组酶  $\lambda$ -Red 或 RecET 提高同源重组效率; 其中上述两种均是通过 DNA 分子发生双交换实现对靶基

基金项目: 国家自然科学基金(31971398, 31700633); 中国科学院科技服务网络计划(KFJ-STZ-ZDTP-036); 北京林业大学大学生创新计划(X201910022081)

\*通信作者。Tel: +86-10-62338830; E-mail: lenahe@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2020-03-15; 修回日期: 2020-05-12; 网络出版日期: 2020-07-09

因的编辑<sup>[3]</sup>。这些传统的大肠杆菌基因编辑方法,广泛应用于对靶基因的敲除以及目的基因的插入等,但当对靶基因进行点突变等更加精细的操作时,这些方法存在重组效率低、流程繁琐等缺点,想要大规模应用仍然面临巨大的挑战<sup>[4]</sup>。

CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技术的出现有效促进了上述问题的解决,能够提高对靶基因编辑的准确性和同源重组效率,逐渐发展成为一种强大的基因编辑工具。CRISPR/Cas 系统在微生物中存在广泛,90%的古菌和 50%的细菌拥有该系统,作为细菌和古菌抵御外源入侵的一种适应性免疫防御机制。不同微生物自身所携带的 CRISPR 系统结构有所差异<sup>[5-6]</sup>,根据其前体复合物的类型分为两大类(Class 1 和 2),其中 Class 2 结构相对简单只需单个效应蛋白<sup>[7-9]</sup>。CRISPR-Cas9 系统是目前研究最深入也是应用最多的类型(属于 Class 2),其结构较为简单,主要由 Cas9 蛋白、CRISPR RNA (crRNA)、trans-activating (tracrRNA)三部分组成,其中 Cas9 蛋白是一种核酸内切酶, tracrRNA 和 crRNA 共同结合定向引导 Cas9 蛋白切割靶基因<sup>[10]</sup>。随着研究的深入,目前已经把该系统中的 crRNA 和 tracrRNA 融合为一条单链引导 RNA,即 sgRNA<sup>[11]</sup>,该序列的 5'端含有 20-nt 的 spacer 序列,改变 spacer 序列,可以使 Cas9 蛋白识别基因组上不同的 PAM 序列<sup>[12]</sup>,从而实现对不同靶位点 DNA 双链的特异性切割。CRISPR-Cas 系统中,不同来源的 Cas 蛋白对应的 PAM 序列结构也有所不同,其中来源于酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的 spCas9 其 PAM 序列为 5'-NGG 结构<sup>[13]</sup>。基因组受损的细胞会通过非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)或同源介导的 DNA 双链修复(homology-directed repair, HDR)对损伤 DNA 进行

修复,借助生物的这种特性,成功将 CRISPR-Cas9 系统应用于人类疾病治疗等真核生物的基因组编辑中<sup>[14-16]</sup>,相比于真核生物,该系统在原核生物中也展现出强大的编辑功能,包括一些古菌<sup>[17]</sup>、大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[18]</sup>、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)<sup>[19]</sup>、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)<sup>[20]</sup>、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)<sup>[21-22]</sup>、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella Pneumoniae*)<sup>[23]</sup>等,均成功实现了对靶基因的编辑。

随着 CRISPR/Cas 系统的出现与应用,使得碱基编辑器开始逐步发展起来,应用于不同领域<sup>[24-26]</sup>,通过对 Cas 蛋白进行改造,保留与 DNA 的结合能力,使其只具有切割 DNA 单链的功能,结合碱基脱氨酶的催化活性,实现核酸链上特定位点碱基的变化<sup>[27]</sup>。目前应用较多的是 DNA 碱基编辑器,分为两类,一类是胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE),实现 C 到 T 的转换<sup>[28]</sup>;另一类是腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE),实现 A 到 G 的转换<sup>[29]</sup>。虽然碱基编辑器操作简单,但是在原核生物中,碱基编辑器的发展与应用尚不成熟,只在少数细菌中得到应用<sup>[19,30-31]</sup>,并且多数研究结果显示,碱基编辑器存在较高的脱靶率,编辑窗口有限,仍需进一步的优化。

本研究以细菌互作遗传机制<sup>[32-33]</sup>得到的显著基因 *yjiW* (T→C)为例,旨在探究一种高效的大肠杆菌靶基因点突变方法。将传统基因编辑方法与 CRISPR-Cas9 技术相结合,首先,利用同源重组将靶基因替换为 *amp* 标记基因;其次,在此基础上设计能够特异性识别 *amp* 的 spacer 序列,利用 CRISPR-Cas9 系统特异性识别切割 *amp* 标记基因,最终获得目的菌株。通过上述两步法,建立一种高效、简捷的靶基因点突变方法。

# 1 材料和方法

## 1.1 菌株和质粒

本研究所使用的菌株和质粒详细信息见表 1。

## 1.2 引物

本研究所用的引物见表 2。

## 1.3 主要试剂和仪器

氯霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、DNA Marker

表 1. 本实验所用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	References
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> D7 (Our laboratory No.)	Original strain	CGMCC ( No.1.128 )
DH5 $\alpha$	For transformation	TransGen Biotech
<b>Plasmids</b>		
pKOV	Chloramphenicol resistance ( <i>chl<sup>R</sup></i> ), levansucrase lethal ( <i>sacB</i> ), temperature- sensitive ( <i>rep101</i> ) replicon	MiaoLing Bio
pMAD	Ampicillin resistance ( <i>amp<sup>R</sup></i> )	MiaoLing Bio
pKOV-HR	pKOV derivative with the repair arms of the <i>yjjW</i> gene	This work
pSGKP-km	Kanamycin resistance ( <i>kan<sup>R</sup></i> ), sgRNA expression cassettes, levansucrase lethal ( <i>sacB</i> )	Kindly provided by Prof. Quanjian Ji
pCasKP-apr	Apramycin resistance ( <i>apr<sup>R</sup></i> ), expression Cas9 and $\lambda$ -Red recombination proteins, temperature- sensitive ( <i>rep101</i> ) replicon	Kindly provided by Prof. Quanjian Ji
pSGKP-km-spacer	pSGKP-km derivative with the spacer of the <i>amp</i> gene	This work
pSGKP-km-spacer-HR	pSGKP-km-spacer derivative with the repair arms of the <i>yjjW</i> gene and the mutant <i>yjjW</i> gene	This work

表 2. 本实验中使用的引物

Table 2. Primers used in this study

Primers name	Primers sequence (5'→3')	Product size/bp
<i>yjjW1</i> -U-F	gtaccggggatcgcgccgcCGGTGGGGGAGATCGGTCTGGA	1053
<i>yjjW1</i> -U-R	aataggggttccgcCATGCCGATACGGCCTACGGT	
<i>amp</i> -F	gccgtatccggcatgCGCGAACCCTATTTGTTTAT	996
<i>amp</i> -R	cgcgctgataagccTTACCAATGCTTAATCAGTGAG	
<i>yjjW1</i> -D-F	attaagcattgtaaGGCTTATCACGCGCGGTGGCG	952
<i>yjjW1</i> -D-R	cggtcagcttagaggatccGGAAGTGGCGAAGAACATCTGT	
Vet1-F	TTCGAAAGCAAATTCGACCCG	3167
Vet1-R	AACGTGGCGAGAAAGGAAGG	
D7-F	GCCGTTTAGTGCGGATGAAG	3155/3053
D7-R	GGTTTCACCGAACCTGACCT	
<i>yjjW2</i> -F	tcctcagccccgggatccCGGTGGGGGAGATCGGTCTGGA	2740
<i>yjjW2</i> -R	gctctagaactagtgatccGGAAGTGGCGAAGAACATCTGT	
mut-F	aaatacagcgggaaataCtaaccggtcaccccg	1797
mut-R	ggggtagccggttaGtattccggcgtgtatt	978
Vet2-F	ACTTGAAAAAGTGGCACCGAG	3039
Vet2-R	TCCGGCTCGTATGTTGTGTG	
spacer-F	TTGACAGCTAGCTCAGTCCT	156
spacer-R	GGGCTGCAGGAATTCGATATC	

In primers *yjjW1*-U-F/R, *amp*-F/R, *yjjW1*-D-F/R, *yjjW2*-F/R, the lowercase bases were part of homologous sequences of the connecting fragment, and the uppercase base sequences were sequences complementary to the PCR template. In primers mut-F/R, the uppercase base was a mutant of the *yjjW*, the lowercase bases were complementary to the PCR template.

购自北京博迈德技术有限公司；细菌基因组 DNA 快速提取等试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司；安普霉素、*Not I* 等内切酶购自北京百灵克生物科技有限公司；引物合成和 PCR 产物测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成；电转仪、PCR 仪，购自 Bio-Rad 公司。

#### 1.4 大肠杆菌靶基因与标记基因替换实验

**1.4.1 重组质粒的构建：**以敲除 *E. coli* D7 (以下简称 D7)基因组的 *yjjW* 为例，该部分实验利用的是同源重组系统，采用 pKOV 质粒进行本阶段实验，该质粒含有蔗糖致死基因(*sacB*)和温度敏感基因(*rep101*)，最适培养温度为 30 °C，pKOV 重组质粒构建方法如下。

首先使用 *Not I* /*BamH I* 对 pKOV 质粒进行双酶切，获得线性化的质粒片段。然后以 D7 基因组为模板，分别以 *yjjW1-U-F*/*yjjW1-U-R* 和 *yjjW1-D-F*/*yjjW1-D-R* 为引物扩增得到 *yjjW* 的上、下游同源臂，其中上游同源臂的 5'端和下游同源臂的 3'端通过引物分别引入线性化质粒两端 (*Not I* , *BamH I* )的一段同源序列，用于与线性化质粒片段的高效连接。以 pMAD 质粒基因组为模板，使用 *amp-F*/*amp-R* 引物扩增 *amp* 片段，*amp* 片段的两端分别含有与上下游同源臂的 3'和 5'端的同源序列，然后利用重组试剂盒将上下游同源臂、*amp* 片段和线性化质粒片段进行连接，通过热激转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞中，30 °C 过夜培养，将长出的单菌落提取质粒基因组，并用 *Vet1-F/R* 进行 PCR 及测序验证，将验证后的重组质粒命名为 pKOV-HR。

**1.4.2 含标记基因菌株的获取：**将上述构建好的重组质粒 pKOV-HR 转化至 D7 感受态细胞中，涂布至含有氨苄青霉素和氯霉素抗性(以下简称双

抗)的平板上，30 °C 过夜培养。随机挑取单菌落涂布至双抗平板，42 °C 过夜培养，由于该质粒具有温度敏感基因 *rep101*，在高温培养条件下，不含有同源修复臂的质粒在宿主体内无法正常复制，而含有同源修复臂的重组质粒会与宿主基因组发生同源重组，使得质粒 DNA 整合至宿主基因组。从 42 °C 培养平板上随机挑取单菌落涂布至含有 5%蔗糖的氨苄青霉素抗性平板上，30 °C 过夜培养，发生二次同源重组，实现 *amp* 标记基因与靶基因的替换，同时 pKOV 质粒消除。采用 96 孔板筛选发生重组的菌株，挑取同一单菌落分别接种至氨苄青霉素抗性和氯霉素抗性的 LB 培养液中，置于 30 °C、150 r/min 摇床中过夜培养。筛选在氨苄青霉素抗性培养基中生长但在氯霉素抗性培养基中不生长的菌落，扩大培养，提基因组验证。使用 *Vet1-F/R* 进行特异性片段扩增，并且交于生工生物工程(上海)股份有限公司测序，进一步进行结果验证，从而获得靶基因敲除同时带有氨苄青霉素抗性的大肠杆菌 D7 $\Delta$ *yjjW::amp*<sup>R</sup>。

#### 1.5 大肠杆菌靶基因点突变实验

本研究的点突变实验，是在上一步实验获得的带有氨苄基因菌株的基础上进行的，采用 CRISPR/Cas9 双质粒体系实现对靶基因的点突变，其中 pSGKP-km 带有 sgRNA 序列以及蔗糖致死基因(*sacB*)，同时作为连接 spacer 和同源修复臂的载体质粒；pCasKP-apr 质粒用于表达 Cas9 蛋白和  $\lambda$ -Red 重组酶，带有温度敏感基因(*rep101*)。

**1.5.1 重组质粒的构建：**以上一步敲除实验获得的大肠杆菌 D7 $\Delta$ *yjjW::amp*<sup>R</sup> 基因组为模板，在 <http://www.rgenome.net/>设计可以识别 *amp* 基因的 20-nt 的 spacer 序列(5'-AAAAGGGAATAAGGGCG ACA-3')，在 spacer 序列的 5'端加上与 pSGKP-km

质粒 *Bsa* I 酶切位点同源的 4 个碱基(5'TAGT-), 用于 spacer 与 pSGKP-km 质粒的连接, 然后将 spacer 序列磷酸化处理, 使用 T4 DNA 连接酶将磷酸化的 spacer 与线性化的(*Bsa* I) pSGKP-km 质粒连接<sup>[23]</sup>, 获得 pSGKP-km-spacer 质粒。采用重叠延伸 PCR 的方法获得含有点突变(T→C)的 *yjjW* 的片段, 同时两端带有该基因的上、下游同源修复臂。将同源修复臂与使用 *Bam*H I 线性化的 pSGKP-km-spacer 质粒连接, 通过热激法转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 涂布于卡那霉素抗性平板, 30 °C 过夜培养获得单菌落, 利用 Vet2-F/R 进行 PCR 验证以及测序验证, 将验证后的重组质粒命名为 pSGKP-km-spacer-HR。

**1.5.2 点突变菌株的获取:** 首先制备已将 pCasKP-apr 质粒电击转化至 D7 $\Delta$ *yjjW*::*amp*<sup>R</sup> 细胞中的大肠杆菌感受态细胞, 在制备感受态细胞的过程中添加阿拉伯糖诱导 Cas9 蛋白和  $\lambda$ -Red 重组酶的表达。将 pSGKP-km-spacer-HR 重组质粒转化

至上述感受态细胞中, 涂布至添加阿拉伯糖的卡那霉素和安普霉素双抗平板, 30 °C 过夜培养。挑取单菌落涂布至含有 5%蔗糖的安普霉素抗性平板, 30 °C 过夜培养。使用 96 孔板, 挑取同一单菌落分别接种至无抗性、氨苄青霉素抗性和卡那霉素抗性三种 LB 培养液中, 筛选在氨苄青霉素和卡那霉素抗生素培养液中均不生长的菌落, 提基因组进行 PCR 和测序验证, 验证结果正确的即为大肠杆菌点突变菌株 D7*yjjW*-24。42 °C 高温过夜培养, 消除 pCasKP-apr 质粒。实验流程如图 1 所示。

## 2 结果和分析

### 2.1 大肠杆菌靶基因与标记基因替换实验

**2.1.1 重组质粒的构建:** 按方法部分所述引物 PCR 扩增, 获得两端带有同源序列的上、下游同源臂和 *amp* 片段(图 2-A、2-B), 通过重组克隆试剂盒将这 3 条片段与线性化的 pKOV 质粒相连,

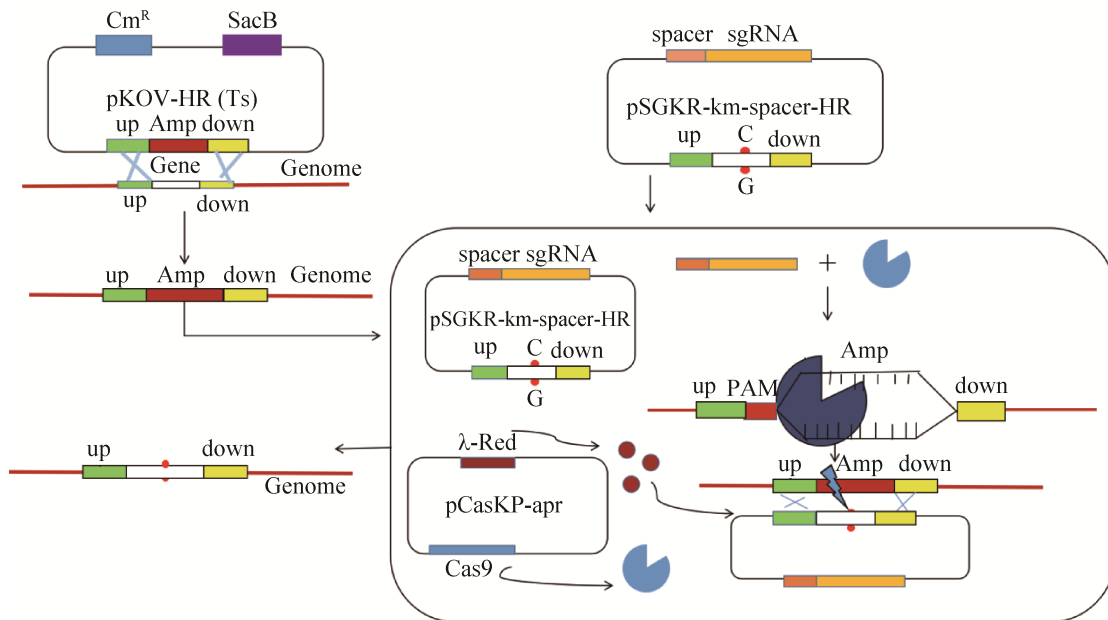


图 1. 实验流程图

Figure 1. Flow chart of experiment.

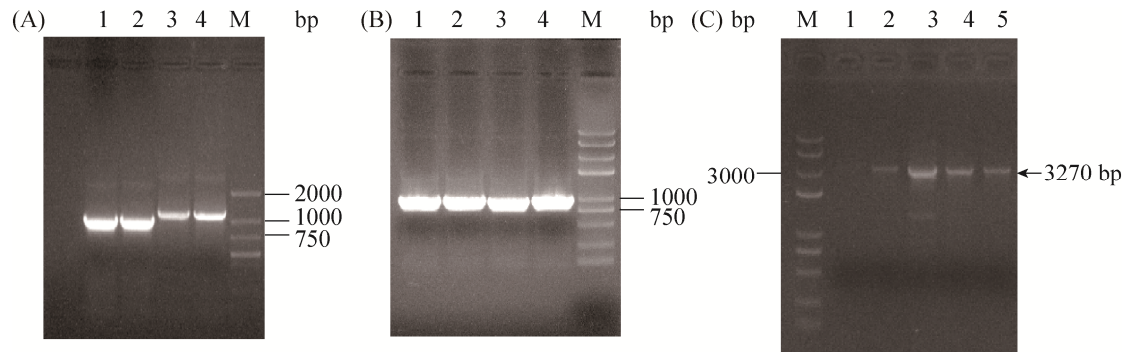


图 2. pKOV-HR 重组质粒构建及验证琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2. The construction and validation of pKOV-HR recombinant plasmid. M: marker. A: amplification of upstream and downstream homologous fragments of *yjjW* gene by PCR; 1–2: downstream homologous arms of *yjjW*, 3–4: upstream homologous arms of *yjjW*. B: amplification of *amp<sup>R</sup>* fragment by PCR; 1–4: *amp* gene fragment. C: the PCR validation of upstream and downstream homologous arms and *amp<sup>R</sup>* three fragments connection with linearized pKOV plasmid; 1–5: fusion fragment.

获得重组质粒 pKOV-HR。使用 Vet1-F/Vet1-R 引物对重组质粒进行 PCR 扩增，如图 2-C 所示，产物(3270 bp)条带在 3000 bp 左右，随机挑选了 3 个无非特异性条带且条带较亮的 PCR 产物送测序，结果显示 3 片段已成功与质粒相连，重组质粒 pKOV-HR 构建成功。

**2.1.2 含标记基因菌株的获取：**将 pKOV-HR 质粒转化至 D7 感受态细胞中，经 30 °C→42 °C→30 °C，一系列温度培养之后，重组质粒与宿主基因组发生同源重组，将 *yjjW* 替换为 *amp<sup>R</sup>* 基因，随机挑选 44 个单菌落分别接种至氨苄青霉素和氯霉素抗性培养基中，其中有 24 个菌落在氨苄青霉素培养基中生长，但在氯霉素培养基中不生长，提取 24 株菌的基因组使用 D7-F/*amp*-R 引物 PCR 验证，结果显示 22 株菌成功扩增出目的条带 (2255 bp)，部分菌株的 PCR 结果如图 3 所示，说明这些菌株已经成功完成了 *amp* 标记基因的插入，同时实现了目的基因的敲除，测序结果如图 4 所示，表明已成功获得了带有 *amp<sup>R</sup>* 的敲除菌株。

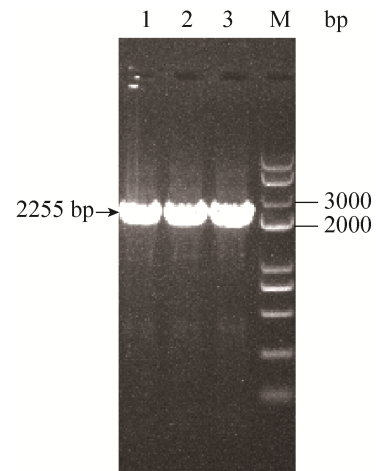


图 3. 敲除菌株 PCR 验证

Figure 3. PCR validation of knockout strains. M: marker; 1–3: validation of *E. coli* D7Δ*yjjW*::*amp<sup>R</sup>* with primers D7-F/*amp*-R.

## 2.2 点突变实验

**2.2.1 重组质粒的构建：**spacer-F/spacer-R 引物的 PCR 产物及测序结果显示(图 5-A、图 6)，spacer 已经成功连接在载体质粒上，获得 pSGKP-km-spacer 质粒，重叠延伸 PCR 获得带有上、下游同源臂的 *yjjW* 点突变片段(图 5-C、5-D)，

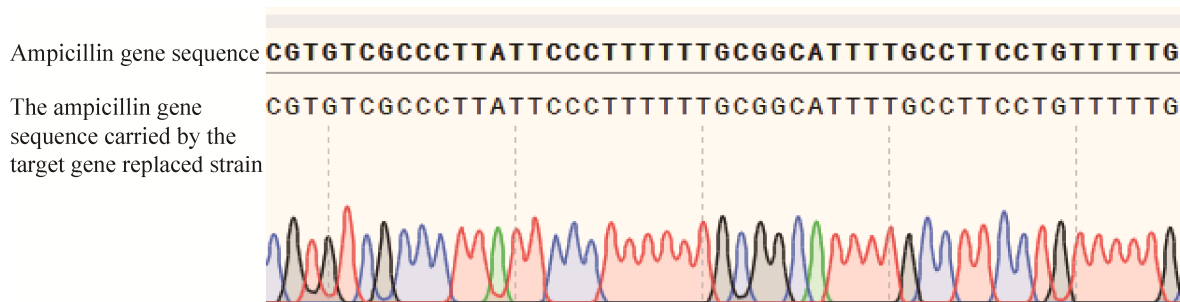


图 4. 敲除菌株测序结果

Figure 4. The sequence validation of knockout strain.

使用重组试剂盒将该片段(图 5-D)与线性化的 pSGKP-km-spacer 质粒相连, 如图 5-B 所示, Vet2-F/Vet2-R 引物 PCR 产物的条带在 3000 bp 左右, 说明同源修复臂与载体质粒已经相连, 同时

测序结果也显示重叠延伸 PCR 成功实现了 *yjjW* 基因的点突变。结果表明已成功获得带有识别 *amp* 基因序列的 spacer 及同源修复臂的重组载体质粒 pSGKP-km-spacer-HR。

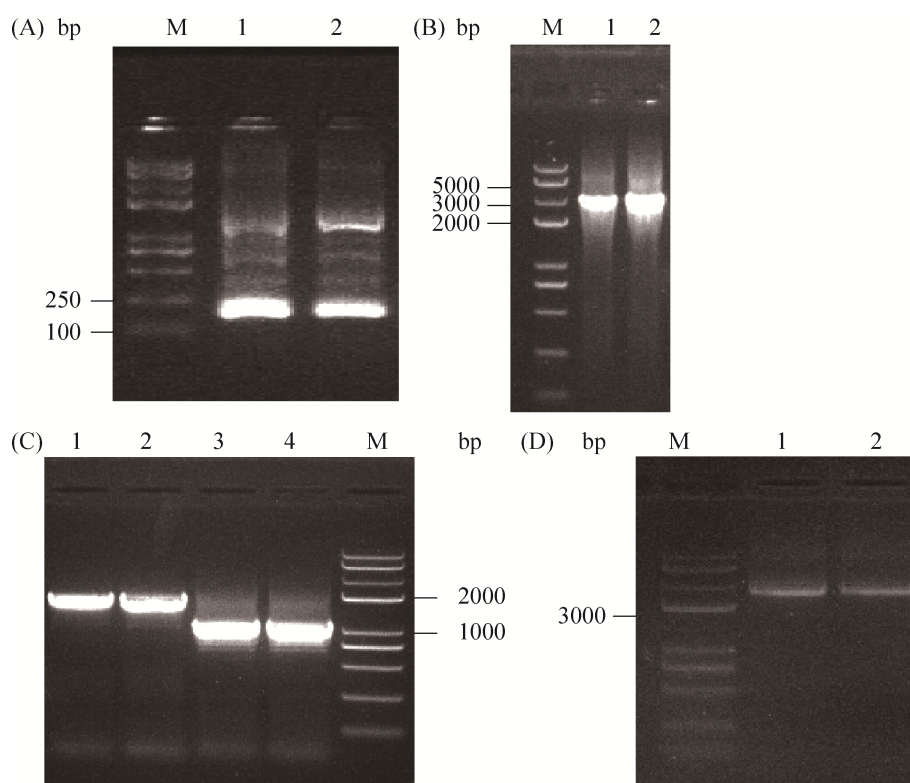


图 5. 重组质粒 pSGKP-km-spacer-HR 构建及验证琼脂糖凝胶电泳图

Figure 5. The construction and validation of recombinant plasmid pSGKP-km-spacer-HR; M: marker. A: validation of spacer fragment; 1–2: PCR product of pSGGP-km-spacer with primers spacer-F/R; B: validation of homologous repair arm connections with pSGGP-km-spacer; 1–2: PCR product of pSGGP-km-spacer-HR with primers Vet2-F/R PCR; C: overlap PCR of *yjjW* gene site-directed mutation; 1–2: PCR product with primers *yjjW2-F/mut-R* PCR; 3–4: PCR product with primers *mut-F/yjjW2-R*; D: overlap PCR of *yjjW* gene site-directed mutation; 1–2: PCR product with primers *yjjW2-F/R*.

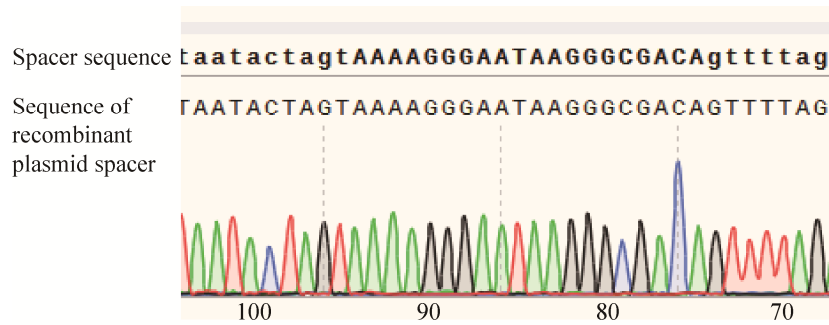


图 6. Spacer 测序结果

Figure 6. The sequence validation of spacer.

**2.2.2 点突变菌株的获取：**将重组质粒 pSGKP-km-spacer-HR 转化至事先制备好的含有 pCasKP-apr 质粒的 D7 $\Delta$ yjjW::amp<sup>R</sup> 感受态细胞中，如上述方法操作，最后成功从 36 个单菌落中筛选到 27 株菌在相应抗性培养基中不生长，说明 pSGKP-km-spacer-HR 重组质粒已成功消除，提取 27 株菌的基因组进行 PCR 验证，结果显示，这 27 株菌使用 D7-F/amp-R 引物均未扩增出任何条带，表明这些菌株均发生了同源重组修复并且已经失去了氨苄青霉素抗性，此外有 17 株菌使用 D7-F/D7-R 引物成功扩增出了目的条带(3053 bp)，部分菌株 PCR 结果如图 7 所示，从这 17 株菌中随机挑选 4 株菌的 PCR 产物进行测序，部分测序结果如图 8 所示，结果显示，这 4 株菌的 yjjW 基因均实现了预期的点突变，成功获得了我们所需的突变株，并且成功将 pCasKP-apr 消除，提取基

因组进行 PCR 测序验证，结果显示该突变株未发生回复突变，表明该实验条件稳定，突变株不易发生回复突变。

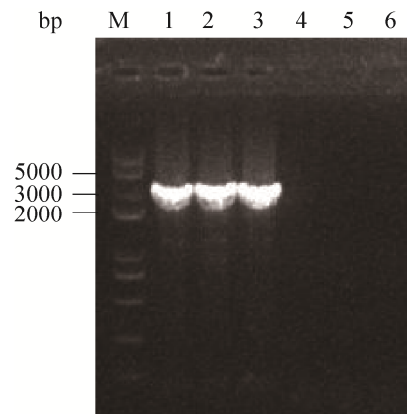


图 7. 点突变菌株验证 PCR

Figure 7. The validation of point mutant strains. M: marker; 1-3: PCR product of *E. coli* D7yjjW-24 with primers D7-F/R; 4-6: PCR product of *E. coli* D7yjjW-24 with primers D7-F/amp-R.

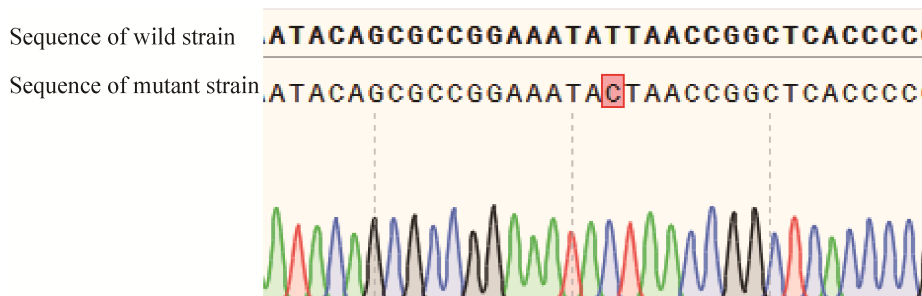


图 8. yjjW 点突变菌株测序结果

Figure 8. The sequence validation of point mutant strain.



### 3 讨论

CRISPR/Cas9 基因编辑技术作为一种新型编辑技术, 与传统方法相比具有编辑效率高、操作简便、能完成定点编辑等优点<sup>[7]</sup>。目前, 该方法不断发展与创新, 已经成为一种成熟的基因编辑技术, 在细菌领域应用广泛, 季泉江等运用该方法成功对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌等致病菌实现了基因敲除以及基因表达调控, 深入了解一些致病菌的耐药性和致病机制<sup>[19-20]</sup>。CRISPR/Cas9 进行基因编辑主要有两种方式, 一种是利用质粒载体引入外源 CRISPR/Cas9 系统; 另一种是利用菌体自身所带有的 CRISPR/Cas 系统进行编辑<sup>[34]</sup>, 本研究利用的是第一种方式。

以大肠杆菌 *yjyW* 为例, 结合 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的优点, 探究出一个适用于大肠杆菌靶基因点突变的方法。最初, 我们对大肠杆菌靶基因的点突变利用的只是同源重组系统, 但结果显示其重组效率低, 不能高效筛选到所需菌株。因此, 在此基础上结合了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 利用 pSGKP-km/pCasKP-apr 双质粒进行靶基因的点突变, 结果显示, 结合该技术大大提高了获得目的菌株的效率。此外, 实验中构建带有可以识别 *amp* spacer 序列的 pSGKP-km-spacer 质粒, 还可以快速实现对其他带有 *amp* 基因菌株的基因编辑, 只需改变同源修复片段, 避免了 spacer 序列的重新设计, 同时抗性基因的引入为最后阳性克隆的获取提供了简单的筛选标记, 可以快速实现对大肠杆菌其他靶基因的点突变, 有效提高了实验效率。

随着研究人员对 CRISPR 系统的深入研究, 发现一些细菌含有 Cpf1 蛋白, 该蛋白与 Cas9 蛋白相比, 具有分子量小, 结构简单, 能进行多重

编辑的优点, 并且具有独特的双重切割酶活性, 表明该系统未来具有很广的应用前景, 未来可能成为与 Cas9 蛋白功能互补的基因编辑工具<sup>[35-37]</sup>。虽然 CRISPR/Cas 系统是目前研究热点之一, 但是该系统的研究与应用仍然存在一定的问题, 脱靶效应以及 PAM 序列的识别限制了其广泛应用<sup>[38]</sup>, 需要更全面深入的探究其机制才能更好地将该技术应用于各项研究中。

综上所述, 我们建立了一种 CRISPR/Cas9 系统介导的快速、简单和高效的大肠杆菌基因点突变方法, 为大肠杆菌基因编辑的研究提供了有效的工具, 为本实验室后续验证大肠杆菌互作基因奠定了科学理论和实践基础。同时, 该方法的建立, 对一些其他生物统计学分析结果的验证提供了参考价值, 例如当利用遗传统计模型探究影响微生物某种性状遗传机制时, 会获得大量的显著基因(往往是单个碱基的变化), 参考该方法的建立, 可以快速实现对 SNP 位点的编辑。

### 参考文献

- [1] Zerbini F, Zanella I, Fraccascia D, König E, Irene C, Frattini LF, Tomasi M, Fantappiè L, Ganfini L, Caproni E, Parri M, Grandi A, Grandi G. Large scale validation of an efficient CRISPR/Cas-based multi gene editing protocol in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16: 68.
- [2] Li Q, Wu MX, Guo QH, Shao YR, Yang JJ, Jiang Y, Yang S. Advances in bacterial genome editing techniques. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2019, 31(5): 473-492. (in Chinese) 李琦, 武美贤, 郭清华, 邵悠然, 杨俊杰, 蒋宇, 杨晟. 细菌基因组编辑技术进展. *生命科学*, 2019, 31(5): 473-492.
- [3] Liu J, Liu WF, Tao Y, Ma YH. Novel efficient strategy for continual CRISPR-mediated genome editing in *Escherichia coli*. *Microbiology China*, 2018, 45(8): 1621-1631. (in Chinese) 刘姣, 刘伟丰, 陶勇, 马延和. 一种大肠杆菌快速连续 CRISPR 基因组编辑的新策略. *微生物学通报*, 2018, 45(8): 1621-1631.

- [4] Bao AK, Bai TH, Zhao TX, Su JH. CRISPR/Cas9: a gene targeting technology and its application in the study of plant genetic function. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(7): 190–200. (in Chinese)  
包爱科, 白天惠, 赵天璇, 苏家豪. CRISPR/Cas9 系统: 基因组定点编辑技术及其在植物基因功能研究中的应用. *草业学报*, 2017, 26(7): 190–200.
- [5] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Topkar VV, Zheng ZL, Joung JK. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(12): 1293–1298.
- [6] Qu DF, Shen Y, Zhang CC, Han JZ. Genomics comparison between CRISPR loci and plasmid in *Salmonella enteric*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(2): 209–218. (in Chinese)  
曲道峰, 沈杨, 张聪聪, 韩剑众. 沙门氏菌 CRISPR 位点的结构特征比较. *微生物学报*, 2018, 58(2): 209–218.
- [7] Hu L, Chen S. Research progress of CRISPR-Cas system in bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(11): 1643–1652. (in Chinese)  
胡丽, 陈实. 细菌 CRISPR-Cas 系统的研究进展. *微生物学报*, 2017, 57(11): 1643–1652.
- [8] Zhu YW, Huang ZW. Recent advances in structural studies of the CRISPR-Cas-mediated genome editing tools. *National Science Review*, 2019, 6(3): 438–451.
- [9] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(11): 722–736.
- [10] 王思涵. *S. pyogenes* Cas9 的表达纯化及其活性抑制剂筛选的研究. 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2018.
- [11] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183.
- [12] Guo MH, Ren K, Zhu YW, Tang ZY, Wang YH, Zhang BL, Huang ZW. Structural insights into a high fidelity variant of SpCas9. *Cell Research*, 2019, 29: 183–192.
- [13] Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system//Pruett-Miller SM. Chromosomal Mutagenesis. New York: Humana Press, 2015: 197–217.
- [14] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-Scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2013, 343(6166): 84–87.
- [15] Yan W, Xiang R, Xiang H, Wang XH. Application of CRISPR-Cas9 system in disease treatment. *Immunological Journal*, 2016, 32(10): 907–911. (in Chinese)  
颜雯, 向蓉, 向华, 王晓虎. CRISPR-Cas9 技术在疾病治疗中的应用. *免疫学杂志*, 2016, 32(10): 907–911.
- [16] Zhang S, Wang Z, Lin YP, Rong QQ, Wang LX, Qi XN, Liu H, Wang QH. DNA lesions and repair response caused by genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, doi: 10.13343/j.cnki.wsx.20190431. (in Chinese)  
张首, 王震, 蔺玉萍, 戎倩倩, 王丽贤, 齐显尼, 刘浩, 王钦宏. 基因组编辑对酿酒酵母 DNA 的损伤作用及修复响应. *微生物学报*, 2020, doi: 10.13343/j.cnki.wsx.20190431.
- [17] Liu T, Wang XJ, Li YJ, Peng N. Systems for the genetic manipulation of *Sulfolobus islandicus*. *Microbiology China*, 2019, 46(2): 398–406. (in Chinese)  
刘涛, 王晓婕, 李英俊, 彭楠. 冰岛硫化叶菌遗传操作体系的研究进展. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 398–406.
- [18] Zhao DD, Feng X, Zhu XN, Wu T, Zhang XL, Bi CH. CRISPR/Cas9-assisted gRNA-free one-step genome editing with no sequence limitations and improved targeting efficiency. *Scientific Reports*, 2017, 7: 16624.
- [19] Chen WZ, Zhang Y, Zhang YF, Pi YS, Gu TN, Song LQ, Wang Y, Ji QJ. CRISPR/Cas9-based Genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas* species. *iScience*, 2018, 6: 222–231.
- [20] Chen WZ, Zhang YF, Yeo WS, Bae T, Ji QJ. Rapid and efficient genome editing in *Staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(10): 3790–3795.
- [21] Zhan ML, Kan BJ, Zhang H, Dong JJ, Xu GC, Han RZ, Ni Y. Comparison of CRISPR-Cpf1 with Cre/loxP for gene knockout in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology China*, 2019, 46(2): 278–291. (in Chinese)  
占米林, 阚宝军, 张辉, 董晋军, 许国超, 韩瑞枝, 倪晔. 谷氨酸棒状杆菌 CRISPR-Cpf1 和 Cre/loxP 基因敲除技术的比较. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 278–291.
- [22] Peng F, Wang XY, Sun Y, Dong GB, Yang YK, Liu XX, Bai ZH. Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum*

- using the CRISPR/Cas9 system. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16: 201.
- [23] Wang Y, Wang SS, Chen WZ, Song LQ, Zhang YF, Shen Z, Yu FY, Li M, Ji QJ. CRISPR-Cas9 and CRISPR-assisted cytidine deaminase enable precise and efficient genome editing in *Klebsiella pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(23): e01834–18.
- [24] Hess GT, Tycko J, Yao D, Bassik MC. Methods and applications of CRISPR-Mediated base editing in Eukaryotic genomes. *Molecular Cell*, 2017, 68(1): 26–43.
- [25] Seo H, Kim JS. Towards therapeutic base editing. *Nature Medicine*, 2018, 24(10): 1493–1495.
- [26] Wang Y, Liu Y, Liu J, Guo YM, Fan LW, Ni XM, Zheng XM, Wang M, Zheng P, Sun JB, Ma YH. MACBETH: multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metabolic Engineering*, 2018, 47: 200–210.
- [27] Zhao YW, Jiang WH, Deng ZX, Wang ZJ, Lu YH. Development and application of base editors in bacterial genome editing. *Microbiology China*, 2019, 46(2): 319–331. (in Chinese)  
赵亚伟, 姜卫红, 邓子新, 汪志军, 芦银华. 碱基编辑器的开发及其在细菌基因组编辑中的应用. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 319–331.
- [28] Zheng K, Wang Y, Li N, Jiang FF, Wu CX, Liu F, Chen HC, Liu ZF. Highly efficient base editing in bacteria using a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Communications Biology*, 2018, 1: 32.
- [29] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2018, 559(7714): E8.
- [30] Gu TN, Zhao SQ, Pi YS, Chen WZ, Chen CY, Liu Q, Li M, Han DL, Ji QJ. Highly efficient base editing in *Staphylococcus aureus* using an engineered CRISPR RNA-guided Cytidine deaminase. *Chemical Science*, 2018, 9(12): 3248–3253.
- [31] Arazoe T, Kondo A, Nishida K. Targeted nucleotide editing technologies for microbial metabolic engineering. *Biotechnology Journal*, 2018, 13(9): 1700596.
- [32] Zhang ZR, Li JT, Liang YJ, Zhang Q, Ji Y, He XQ. Analysis of interaction mode between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by systems mapping. *Microbiology China*, 2019, 46(2): 292–300. (in Chinese)  
张佐然, 李金婷, 梁雅静, 张琦, 金一, 何晓青. 利用系统作图(Systems mapping)研究大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的互作遗传机制. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 292–300.
- [33] Chen N, Zhu J, Ye MX, Jin Y, He XQ, Wu RL. Interactions between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* determined by genome-wide association analysis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(4): 526–538. (in Chinese)  
陈南, 朱璟, 叶梅霞, 金一, 何晓青, 邹荣领. GWAS 研究大肠杆菌和金黄色葡萄球菌种间互作进化机制. *微生物学报*, 2017, 57(4): 526–538.
- [34] Pyne ME, Bruder MR, Moo-Young M, Chung DA, Chou CP. Harnessing heterologous and endogenous CRISPR-Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25666.
- [35] 杨建争. Cpf1 的小分子抑制剂的筛选与复合物结晶的研究. 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2018.
- [36] Guo T, An XM. Application and comparison of CRISPR-Cas9 system and CRISPR-Cpf1 system in multigenome editing. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2019, 41(11): 2234–2244. (in Chinese)  
郭婷, 安新民. 多重基因组编辑中 CRISPR-Cas9 系统和 CRISPR-Cpf1 系统的应用和比较. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(11): 2234–2244.
- [37] Adiego-Pérez B, Randazzo P, Daran JM, Verwaal R, Roubos JA, Daran-Lapujade P, van der Oost J. Multiplex genome editing of microorganisms using CRISPR-Cas. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(8): fnz086.
- [38] Fu JH, Yang FY, Xie HH, Gu F. Application and optimization of CRISPR/Cas system in bacteria. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(3): 341–350. (in Chinese)  
傅俊豪, 杨发誉, 谢海华, 谷峰. 细菌中 CRISPR/Cas 系统的应用和优化. *生物工程学报*, 2019, 35(3): 341–350.

## Two-step strategy for point mutation of *yjjW* in *Escherichia coli* by gene editing

Qi Zhang, Yajing Liang, Yuxin Zhang, Linghui Chen, Zhongrao Han, Beibei Li, Yi Jin, Xiaoqing He\*

College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract:** [Objective] In order to investigate the target genes in *Escherichia coli*, we used the CRISPR-Cas9 tool combining with homologous recombination to develop a two-step strategy for point mutation. [Methods] First, we assembled the up- and down-stream homologous arms of a gene and the *amp* gene with the pKOV plasmid to construct the pKOV-HR plasmid. Then the pKOV-HR plasmid was transformed into *E. coli* and the gene knock-out mutants were obtained by the RecA recombination system of *E. coli* itself. Subsequently, we applied two plasmids system (pSGKP-km and pCasKP-apr) to handle the point mutations of the target gene. Firstly, we designed a spacer sequence of the *amp* gene which was able to guide Cas9 proteins. The overlap PCR was used to produce the homologous arm containing point mutations of the target gene. Then the spacer and homologous arm were connected by pSGKP-km plasmid and the plasmid pSGKP-km-spacer-HR was obtained. Next, we transformed this plasmid and pCasKP-apr plasmid into the above-mentioned knock-out mutants. Finally, we got the point mutants by the DNA-cleaving of Cas9 proteins and  $\lambda$ -Red recombinant proteins which were produced by the two plasmids. [Results] By this two-step strategy, we obtained *yjjW* knockout strains named D7 $\Delta$ *yjjW*::*amp*<sup>R</sup>, and point mutants named D7*yjjW*-24 (from T to C the 24th base) successfully. [Conclusion] The study established an efficient method for point mutations of target genes in *E. coli*. The insertion of *amp* gene provided an effective screening marker. The recombinant plasmid pSGKP-km-spacer established in this process can be applied to point mutations of other target genes, which will greatly shorten experimental processes. It contributes the scientific theory and practice for the development of gene editing technology.

**Keywords:** CRISPR-Cas9, *Escherichia coli*, homologous recombination, point mutation

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31971398, 31700633), by the Science and Technology Service Network Initiative (KFJ-STZ-ZDTP-036) and by the Innovation Program for Under-graduate Students in Beijing Forestry University (X201910022081)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-62338830; E-mail: lenahe@bjfu.edu.cn

Received: 15 March 2020; Revised: 12 May 2020; Published online: 9 July 2020