

# CRISPR/Cas9 介导的高产谷胱甘肽原养型酵母工程菌的构建

周文龙, 唐亮, 成凯, 刘恣之, 杨燕, 王伟

中国医学科学院 北京协和医学院药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室/国家卫生和计划生育委员会天然药物生物合成重点实验室, 北京 100050

周文龙, 唐亮, 成凯, 等. CRISPR/Cas9 介导的高产谷胱甘肽原养型酵母工程菌的构建. 生物工程学报, 2017, 33(12): 1999–2008.

Zhou WL, Tang L, Cheng K, et al. Construction of prototrophic glutathione-high-producing yeast strain mediated by CRISPR/Cas9. Chin J Biotech, 2017, 33(12): 1999–2008.

**摘要:** 谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 是具有多种生理功能的非蛋白质类巯基化合物, 已广泛应用于药品、食品等行业, 且市场需求量逐年增加。遗传工程育种是提高细胞内 GSH 含量的重要策略, 但在遗传操作过程中使用到的营养缺陷型遗传标记可能会影响菌株的正常生长, 且不利于高密度发酵的进行。为回复工程菌株的营养缺陷型, 利用 gRNA 转录表达框和靶基因同源 DNA 片段直接共转化酵母细胞, 由细胞内表达的 II 型 CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas9) 介导的基因组编辑技术将营养缺陷型 GSH 工程菌株 W303-1b/FGP 回复为原养型菌株。结果显示, 与营养缺陷型菌株相比, 原养型菌株生长周期缩短, 且可以利用简单的合成培养基进行培养, 方便菌株的大规模培养。

**关键词:** CRISPR/Cas9, 谷胱甘肽, 酿酒酵母, 营养缺陷型

**Received:** February 23, 2017; **Accepted:** May 2, 2017

**Supported by:** CAMS Initiative for Innovative Medicine (No. 2016-I2M-3-012), the Peking Union Medical College (PUMC) Youth Fund (No. 3332016057).

**Corresponding author:** Wei Wang. Tel/Fax: +86-10-63165196; E-mail: wwang@imm.ac.cn

中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (No. 2016-I2M-3-012), 北京协和医学院“协和青年基金”项目 (No. 3332016057) 资助。

网络出版时间: 2017-8-24

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170824.0943.001.html>

# Construction of prototrophic glutathione-high-producing yeast strain mediated by CRISPR/Cas9

Wenlong Zhou, Liang Tang, Kai Cheng, Minzhi Liu, Yan Yang, and Wei Wang

State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines & Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products of National Health and Family Planning Commission, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

**Abstract:** Glutathione (GSH), a non-protein thiol product with various biological activities, has been widely used in pharmaceutical and food industries. Recently, genetic engineering becomes an important strategy for obtaining GSH-high-producing strains. However, auxotrophic selection markers used may result in reduced cell growth or GSH production. In the present study, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and Cas9-associated-system (CRISPR-Cas), in which gRNA expression constructs and homologous DNA fragments of target genes were co-transformed into *Saccharomyces cerevisiae* cells, was used for the construction of the prototrophic strain derived from the engineered auxotrophic strain W303-1b/FGP. As a result, the prototrophic strain W303-1b/FGP<sup>PT</sup> showed a significantly shorter culture cycle compared with the auxotrophic strain. Furthermore, chemically defined medium could be used to culture strain W303-1b/FGP<sup>PT</sup> that might have great interests in industrial fermentation.

**Keywords:** CRISPR/Cas9, glutathione, *Saccharomyces cerevisiae*, auxotrophy

谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 是细胞内含量最多的非蛋白质类巯基化合物, 由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸经过酶催化反应合成<sup>[1]</sup>。GSH 因其具有游离的巯基而具有很多生物活性, 如抗氧化<sup>[2]</sup>、脱毒<sup>[3]</sup>、免疫调节<sup>[4]</sup>等。体内 GSH 缺失与多种疾病有关, 如夸休可尔症、癫痫、阿尔茨海默病等<sup>[5]</sup>。因此, GSH 被广泛应用于药品、食品、化妆品等行业。目前, GSH 在国内主要用于药物领域, 作为肝病和癌症治疗后修复损伤的辅助用药, 在国外则以食品添加剂及保健品为主。GSH 市场需求逐年增加, 有人预测至 2019 年, 全球 GSH 需求量将达 200–300 t<sup>[6]</sup>。

目前, GSH 生产的主要方法是酵母发酵法。由于野生型酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和产朊假丝酵母 *Candida utilis* 细胞中 GSH 含量高, 因此, 它们是 GSH 发酵生产的重要菌株。提高 GSH 产量的方法有提高细胞内 GSH 含量、

提高细胞生物量<sup>[7]</sup>、缩短菌株培养周期等。提高细胞内 GSH 含量主要通过遗传育种完成, 目前主要有经典筛选 (Classical selection)、遗传工程育种等方法。提高细胞生物量主要通过优化发酵培养基、优化发酵工艺条件等途径来实现<sup>[7]</sup>。菌株培养周期则与菌株所处环境和菌株自身遗传背景密切相关。

Murata 等分别在 1981 年和 1983 年克隆并测序了编码 GSH 生物合成的两个酶即  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GSH I) 和 GSH 合成酶 (GSH II) 的基因 *gshA* 和 *gshB*<sup>[1]</sup>, 之后科学家们又在一些革兰氏阳性菌中发现了能够独立完成 GSH 生物合成的双功能酶 GshF (由 *gshF* 编码)<sup>[8-9]</sup>。随着参与 GSH 代谢酶的编码基因不断被分离和鉴定, 科学家们利用多种遗传工程策略提高模式微生物细胞内 GSH 的产量, 在这些遗传操作过程中需要用到抗性或者营养缺陷型等遗传标记筛选阳性克隆。

其中营养缺陷型菌株为初级代谢途径阻断变异型,仅能在一些特定的培养基中正常生长。

近年来,串联间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及 RNA 靶向内切酶 Cas9 (CRISPR-Cas9)介导的基因组编辑技术发展迅速并得以广泛应用。该技术通过一段短的引导 RNA (Guide RNA, gRNA) 识别特定的 DNA 序列,通过改变 gRNA 序列即可使 Cas9 定位到新的 DNA 序列。目前该技术已广泛应用于多种生物如人、小鼠、斑马鱼等的基因编辑<sup>[10]</sup>。

本研究旨在通过在酿酒酵母中建立 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术,回复突变工程菌株 W303-1b/FGP 为原养型菌株,使其能够自主合成生命活动中必需的小分子化合物,能在简单的无机盐培养基中生长,方便大规模培养。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与培养基

大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans1-T1 (TransGen 公司)用于重组 DNA 的扩增与构建。酿酒酵母工程菌株 W303-1b/FGP (*MATa ade2-1 leu 2-3, 112 his3-11, 15 ura3-1 trp1-1*) (表 1)<sup>[11]</sup>为出发菌株。

YPD 培养基:酵母提取物 10 g/L,蛋白胨 20 g/L,葡萄糖 20 g/L。

### 1.2 质粒构建与酵母转化

#### 1.2.1 Cas9 表达载体的构建

以质粒 pGADT7 (Clontech)为基础构建含有编码 Cas9 基因的表达载体,首先用以酵母基因组 DNA 为模板和引物 PGK1\_Sph/PGK1\_Nde 扩增 3-磷酸甘油酸激酶基因启动子 (*PGK1*),此后用限制性内切酶位点 *Sph* I 和 *Nde* I 定向亚克隆到质粒 pGADT7 中,即得到 pGAD-PGK1。由于编

码 Cas9 的基因较长,分 2 步进行亚克隆到质粒 pGAD-PGK1 中。先用质粒模板 pX260 (Addgene)和引物 X260\_1/X260\_2 扩增 2.2 kb 片段,用限制性内切酶 *Nde* I 和 *EcoR* I 亚克隆到 pGAD-PGK1;然后再用 X260\_2/X260\_4 扩增 1.8 kb 片段,用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xho* I 亚克隆,即得到含有 Cas9 编码框的质粒 pGAD-Cas9。为消除质粒 pGAD-Cas9 的筛选标记 *leu2*,利用引物 GADT7\_H3/GADT7\_Nhe 和质粒 pGAD-Cas9 为模板扩增 *ADH1* 终止子,再用相同的内切酶 *Hind* III 和 *Nhe* I 置换相应的 DNA 区段,消除长度为 1.9 kb 的筛选标记 *Leu2* 基因,并保留原始终止子 *ADH1* 序列不变,最后利用引物 *Bla*\_Nhe/*Bla*\_Not 和 pPIC6 (Invitrogen 公司)质粒为模板扩增含有杀稻瘟菌素 (Blasticidin) 抗性筛选标记的基因片段,用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Not* I 亚克隆到消除筛选标记 *Leu2* 的 pGAD-Cas9 质粒中,即获得含有抗性筛选标记 (*Bla*) 并组成型表达 Cas9 的表达载体 pGAD-Cas9-*Bla*。

#### 1.2.2 gRNA 转录表达框的构建

以 DiCarlo 等报道的方法<sup>[13]</sup>,利用引物 (表 2)

表 1 工程菌株 W303-1b/FGP 基因型

Table 1 W303-1b/FGP genotype

Allele	nt position	Alteration	aa change
<i>ade2-1</i>	190	Gaa>Taa	Glu>ochre
	301	Aga>Gga	Arg>Gly
<i>Leu2-3,112</i>	249	G insertion	+1 frameshift
	792	G insertion	+1 frameshift
<i>ura3-1</i>	701	Gga>gAa	Gly>Glu
<i>trp1-1</i>	247	Gag>Tag	Glu>amber
<i>his3-11,15</i>	208	G deletion	-1 frameshift
	319	G deletion	-1 frameshift

The engineered strain W303-1b/FGP was constructed based on the strain w303-1b, an  $\alpha$  mating type of original W303 which has the allelic mutations listed in Table 1. Ralser et al had sequenced the genome of its variant W303-K6001 and confirmed these mutant sites<sup>[12]</sup>.

表 2 本实验所使用 PCR 扩增引物

Table 2 PCR primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
PGK1_Sph	TTCGAAGCATGCGAAGTACCTTCAAAGAATG	31
PGK1_Nde	CGACCGTACGTCTGGATCCGTTTAAACGCATATGTTTGTGTTTATATTTGTTGTAAAA	57
X260_1	AACTCCCATATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTG	36
X260_2	CTATATCGAATTCGAGCTCGTCCACCACCTTC	32
X260_3	TGGTGGACGAGCTCGTGAAA	20
X260_4	GAATTCCTCGAGTCACACCTTCTTCTTCTTGGGGTCGTCGCCTCCCAGCTGAGAC	58
SNR_G1	TTGCTTGCATGCTCTTTGAAAAGATAATGTATGATTATGCTTTCACTCATATTTATACA	59
SNR_G2	TTTCACTCATATTTATACA <u>GAAACTTGATGTTTTCTTT</u> CGAGTATATACAAGGTGATTA	59
SNR_G3	GTATATACAAGGTGATT <u>CATGTACGTTTGAAGTACA</u> ACTCTAGATTTTGTAGTGCCCT	59
SNR_G4	GTAGGGTGTGAAAAATGCGCACCTTTACCGCTAGCCCAAGAGGGCACTACAAAATCTA	59
SNR_G5	ACTTCTACAGCGTTTGACCAAAATCTTTTGAACAGAACATTGTAGGGTGTGAAAAAATG	59
SNR_G6	GCGGAGAAGTTTCGAACGCCGAAACATGCGCACCAACTTTCACTTCTACAGCGTTTGAC	59
SNR_G7	GATCATTTATCTTTCACTGCGGAGAAGTTTCGAACGCCG	39
Ade_G1	<u>TTAACGTGGTCAATTGGAGTTGATCATTTATCTTTC</u> ACT	38
ADE_G2	<u>AACTCCAATGACCACGTTAA</u> GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT	45
SNR_G8	GAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA <u>ACTTG</u> AAAAAGTGGCAC	59
SNR_G9	AATCTGTAAACAAAAAACAACAAAAAAGCACCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTT	59
GADT7_H3	TTACGAGGGCTTATTCAGAAGCTT	24
GADT7_Nhe	TCGACCTGCAGCCAAGCTAGCGGCCGGTAGAGGTGTGGTCA	41
Bla_Nhe	TGACCACACCTCTACCGGCCGCTAGCCCCACACACCATAGCTTCAA	46
Bla_Not	TTATATTAAGGGTCCGGATCGCGGCCGAGCTTGCAAATTAAGCCTT	49
Ura_G1	<u>GTAGAGACCACATCATCCACGATCATTTATCTTTC</u> ACT	38
Ura_G2	<u>GTGGATGATGTGGTCTCTACGTTTTAGAGCTAGAA</u> ATA	38
Leu_G1	<u>TCACCATCGTCTTCTTTCT</u> GATCATTTATCTTTCACT	38
Leu_G2	<u>AGAAAGGAAGACGATGGTGA</u> GTTTTAGAGCTAGAAATA	38
Trp_G1	<u>ACCAAGTATTTCCGAGTGCCGATCATTTATCTTTC</u> ACT	38
Trp_G2	<u>GGCACTCCGAAATACTTGGT</u> GTTTTAGAGCTAGAAATA	38
His_G1	<u>ATGCACTCAACGATTAGCGAGATCATTTATCTTTC</u> ACT	38
His_G2	<u>TCGCTAATCGTTGAGTGCAT</u> GTTTTAGAGCTAGAAATA	38
Ade1	ATGGATTCTAGAACAGTTGGTATA	24
Ade2	CATTCAATAGGGACGTCTCACTGGC	25
URA1	ATGTCGAAAGCTACATATAAGGAAC	25
URA2	TTTGTGAGTTTAGTATACATGCATTTAC	28
Leu1	ATGTCTGCCCTAAGAAGATCGTC	24
Leu2	TTAAGCAAGGATTTTCTTAACTTCT	25
Trp1	ATGTCTGTTATTAATTTACAGGT	24
Trp2	CTATTTCTTAGCATTTTGGACGAAA	25
His1	ATGACAGAGCAGAAAGCCCTAGTAA	25
His2	CTACATAAGAACACCTTTGGTGGAG	25
Ade3	GACAATTGGGACGTATGATTGT	22
Ura3	GATGTTAGCAGAATTGTCATGC	22
Leu3	CAGGTGACCACGTTGGTCAAGA	22
Leu4	CTTAACTTCTTCGGCGACAGCA	22
Trp3	GTAGTTCTGGTCCATTGGTGAA	22
His3	GCGTATTACAAATGAAACCAAG	22

Sequence of genes encoding gRNA were underlined.

SNR\_G1 到 SNR\_G7 和 Ade\_G1 经过连续 PCR 的方法获得含有酿酒酵母 snoRNA SNR52 启动子和一个靶向 *ade2* 的 gRNA 序列的 295 bp DNA 片段；同时以引物 Ade\_G2 和 SNR\_G8 到 SNR\_G9 经连续 PCR 方法获得含有 gRNA 结构片段和酿酒酵母 *SUP4* 终止子 3' 区的 120 bp DNA 片段；上述 2 个片段进行 DNA 变性和退火补平反应，再利用引物 SNR\_G1 和 SNR\_G9 进行 PCR 扩增，即得到能转录表达靶向 *ade2* 的 gRNA 结构片段 (gRNA (Ade))。最后将该片段进行“TA”克隆到载体 EZ-T (北京康润科技有限公司)，得到质粒 EZ-gRNA-Ade。其余靶向酿酒酵母 *ura3*、*leu2*、*trp1*、*his3* 基因的 gRNA 表达框分别用引物 Ura\_G1、Leu\_G1、Trp\_G1、His\_G1 与 M13<sup>+</sup> 和引物 Ura\_G2、Leu\_G2、Trp\_G2、His\_G2 与 M13<sup>-</sup> 为引物配对，以 EZ-gRNA-Ade 为模板，进行 PCR 反应，然后以上轮 PCR 扩增得到的 2 个 DNA 片段进行补平反应，再以补平后的 DNA 片段为模板，再利用引物 SNR\_G1 和 SNR\_G9 进行 PCR 扩增，即得到能转录表达 gRNA 的 DNA 结构片段，即 gRNA (Ura3)、gRNA (Leu2)、gRNA (Trp1)、gRNA (His3)。

### 1.2.3 目的基因 DNA 片段的扩增、回复突变及阳性克隆的鉴定

分别以野生型酿酒酵母 S288C 基因组 DNA 或含有目的基因的质粒为模板，以 Ade1/Ade2、Ura1/Ura2、Leu1/Leu2、Trp1/Trp2、His1/His2 为引物对，利用 PCR 扩增分别编码 *ade2*、*ura3*、*leu2* (pGADT7)、*trp1* (pGBKT7) 和 *his3* 的目的基因片段，电泳定量观察。回复突变实验分为 3 个阶段进行：首先利用醋酸锂法<sup>[14]</sup>将表达 Cas9 的质粒载体 pGAD-Cas9-*Bla* 转化 W303-1b/FGP，用 75 μg/mL 杀稻瘟菌素进行筛选；用转录表达

gRNA (Ade2)、gRNA (Ura3) 的结构 DNA 片段各 1 μg 和用于回复突变 *ade2*、*ura3* 所对应的基因片段各 5 μg 共转化表达 Cas9 的感受态细胞，用含有杀稻瘟菌素和不添加 Ade 和 Ura 合成培养基进行筛选，获得的阳性克隆即为回复突变了 *ade2*、*ura3* 这 2 个基因的阳性克隆；然后在此基础上进行第 2 次回复突变 *leu2*、*trp1* 位点；最后回复突变 *his3* 位点，即获得了回复突变 5 个营养缺陷筛选标记 (*ade2*、*ura3*、*leu2*、*trp1* 和 *his3*) 的原养型工程菌 W303-1b/FGP<sup>PT</sup>。

提取原养型工程菌 W303-1b/FGP<sup>PT</sup> 的基因组 DNA，分别利用引物对 Ade1/Ade2、URA1/URA2、Leu1/Leu2、Trp1/Trp2、His1/His2 进行 PCR 扩增，然后纯化 PCR 扩增的 DNA 片段；为确保回复突变位点测序结果的准确性，分别合成测序引物 Ade3、Ura3、Leu3、Leu4、Trp3、His3 进行测序验证，使得回复突变位于每个测序引物所测得的图谱最准确的 150–600 bp 之间。

### 1.3 酿酒酵母工程菌株摇瓶培养

挑取回复突变的工程菌株 3 个阳性克隆于 20 mL YPD 液体培养基中，30 °C、250 r/min 培养 18–24 h 作为种子液，转接适当体积种子至 50 mL 新鲜的 YPD 培养基中，使得培养液初始 *OD*<sub>600</sub> 为 0.2，30 °C、220 r/min 条件下培养。

### 1.4 分析方法

#### 1.4.1 细胞干重的测量

收集 5 mL 菌液，灭菌双蒸水漂洗 2 次，100 °C 下烘干 24 h。

#### 1.4.2 浊度测量

将培养一段时间的培养液稀释至适当浓度，利用紫外分光光度计测定 600 nm 下的吸光度值 (*OD*<sub>600</sub>)。

### 1.4.3 细胞内 GSH 的萃取

利用 40%乙醇萃取的方法萃取酿酒酵母细胞内的 GSH<sup>[11]</sup>。

### 1.4.4 细胞内 GSH 的产量

利用 4-(氨磺酰)-7-氟 2,1,3-苯并恶二唑 (ABD-F) 衍生法测定萃取液中 GSH 的浓度<sup>[15]</sup>。分析柱为 YMC-Pack ODS-A 250 mm×4.6 mm, D.S-5 μm, 30 nm。梯度洗脱条件为: 0–14 min, 8% B 相; 15–18 min, 8%–90% B 相; 19–22 min, 90% B 相; 23–26 min, 90%–8% B 相; 27–30 min, 8% B 相; 流速 1 mL/min, 检测波长为 390 nm, 以 GSH 浓度与峰面积形成的曲线为标准曲线。

### 1.5 原养型菌株 GSH 产量稳定性分析

挑取 3 个原养型单克隆于 10 mL 液体 WMVIII 培养基<sup>[16]</sup>中, 30 °C、250 r/min 条件下培养至  $OD_{600}$  为 15–30 转接至新鲜的 10 mL 液体 WMVIII 培养基中, 并使初始  $OD_{600}=0.5$ , 再培养至  $OD_{600}$  为 15–30, 重新转接, 共转接 20 次, 每转接 5 次

测定菌株 GSH 产量。

## 2 结果

### 2.1 CRISPR/Cas9 系统的建立

目前文献报道用于酿酒酵母的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统都是使用含有营养缺陷型筛选标记如 *ura3* 的质粒载体<sup>[13,17]</sup>, 与本研究所要获得的原养型工程菌株相矛盾, 于是以质粒 pGADT7 为骨架, 构建了含有抗性筛选标记 *Bla* 并使用转录活性较弱的启动子 *PGK1* 表达 Cas9 的质粒载体 (图 1A); gRNA 的转录直接通过 PCR 方法构建融合表达框。

### 2.2 原养型工程菌株的构建

将质粒 pGAD-Cas9-*Bla* 转化进入酿酒酵母工程菌株 W303-1b/FGP 中, 将阳性克隆命名为 W303-1b/FGP/Cas9。然后, 分 3 次进行原养型回复突变, 依次是 *ade2* 和 *ura3*、*leu2* 和 *trp1*、*his3* 基因。其操作过程主要是把野生型的目的

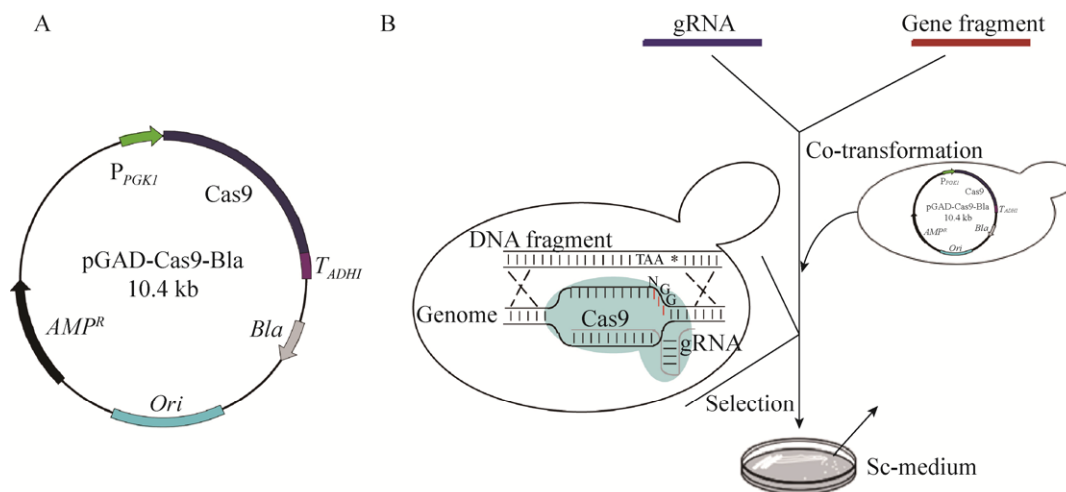


图 1 酿酒酵母原养型菌株构建示意图 (A: Cas9 表达载体 pGAD-Cas9-*Bla* 示意图; B: CRISPR/Cas9 介导的酿酒酵母营养缺陷型的回复突变)

Fig. 1 Schematic diagram of the reversion of the auxotrophic strain. (A) Schematic diagram of pGAD-Cas9-*Bla*. (B) The reversion of the auxotrophic strain mediated by CRISPR/Cas9.

基因片段和转录合成靶向相应基因的 gRNA 结构 DNA 片段按 5 : 1 的比例共转化进入菌株 W303-1b/FGP/Cas9 中, 其中利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术同时进行多个基因的编辑操作已得到实验证实<sup>[17-18]</sup>; 利用不添加相应的营养因

子的 SC 合成培养基进行阳性克隆筛选, 最终获得回复为原养型的工程菌株 W303-1b/FGP<sup>PT</sup>, 基本过程见图 1B。在正向选择压力下, 获得阳性克隆率为 100%, 利用 PCR 方法扩增阳性克隆的靶基因 DNA 片段并测序验证 (图 2)。

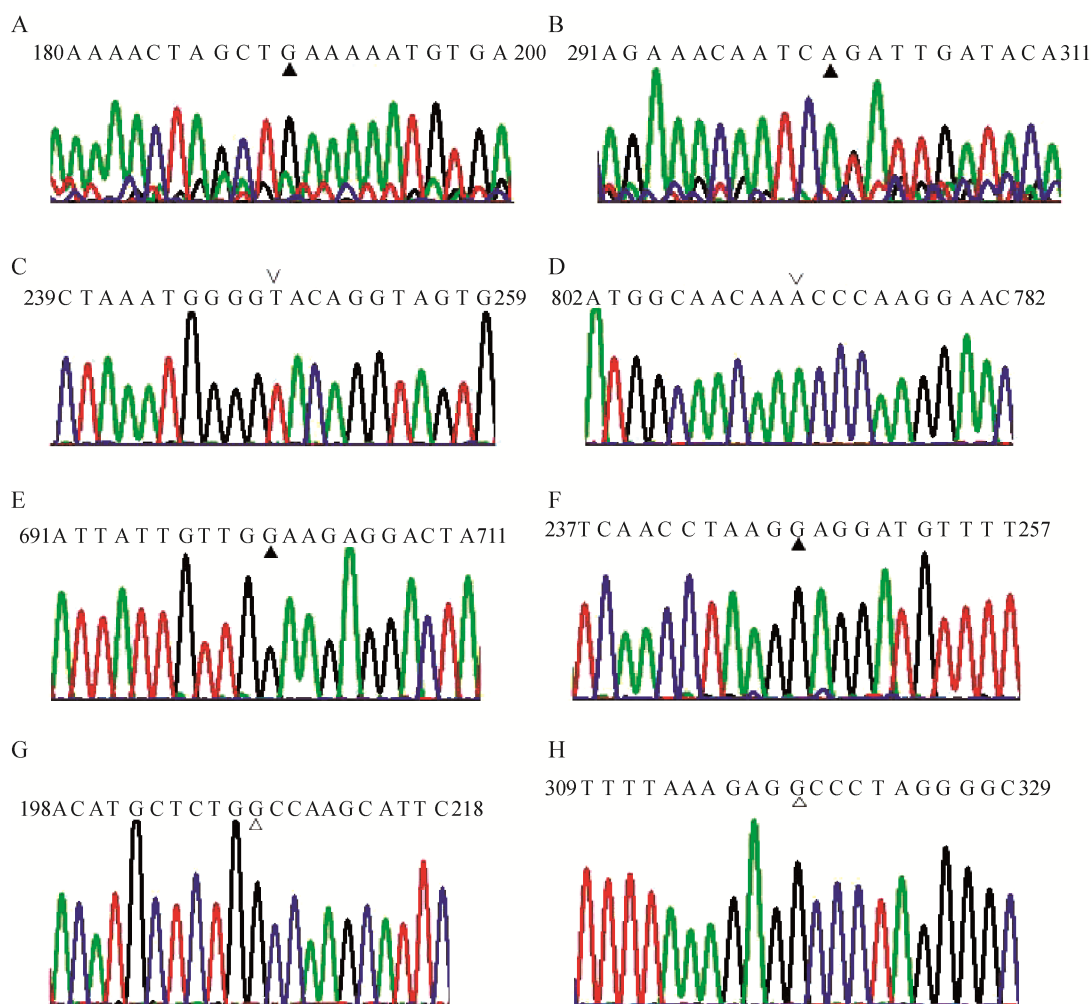


图 2 酿酒酵母原养型菌株回复突变位点的测序结果 (▲: 回复的突变位点; ∇: 回复的插入突变位点; △: 缺失突变位点。A: *ade2-1* T190G, 赭石突变位点的回复; B: *ade2-1* G301A, Gly>Arg 的回复突变; C: *Leu2-3,112*, T249 插入的 G 缺失回复; D: *Leu2-3,112*, A792 插入的 G 缺失回复; E: *ura3-1* A701G, Glu>Gly 的回复突变; F: *trp1-1* T190G, 琥珀突变位点的回复; G: *his3-11,15* G208 的缺失回复; H: *his3-11,15* G319 的缺失回复)

Fig. 2 The sequencing results of reverse allelic sites. ▲: reverse mutation. ∇: reverse insertion; △: reverse deletion. (A) *ade2-1* T190G, reverse ochre mutation. (B) *ade2-1* G301A, Gly>Arg reverse mutation. (C) *Leu2-3,112*, G249 reverse an insertion. (D) *Leu2-3,112*, G792 reverse an insertion. (E) *ura3-1* A701G, Glu>Gly reverse mutation. (F) *trp1-1* T190G, reverse amber mutation. (G) *his3-11,15* G208 reverse deletion. (H) *his3-11,15* G319 reverse deletion.

### 2.3 营养缺陷型菌株与原养型菌株的培养周期

为观察营养缺陷型酿酒酵母工程菌株 W303-1b/FGP 与原养型工程菌株 W303-1b/FGP<sup>PT</sup> GSH 产量及生物量的差别,将两种菌株同时在 YPD 培养基中培养,在不同时间内测定两种菌株的细胞内 GSH 产量及生物量。结果如图 3 所示。由图 3A 可知,营养缺陷型菌株 W303-1b/FGP 与原养型工程菌株 W303-1b/FGP<sup>PT</sup> 的 GSH 最大产量均为 216 mg/L 左右。由图 3B 可知,二者的最高生物量 (DCW) 为 9.3 g/L。但是菌株 W303-1b/FGP 的生物量在培养 96 h 时达到最大,而菌株 W303-1b/FGP<sup>PT</sup> 在培养 48 h 时即达到最大生物量。

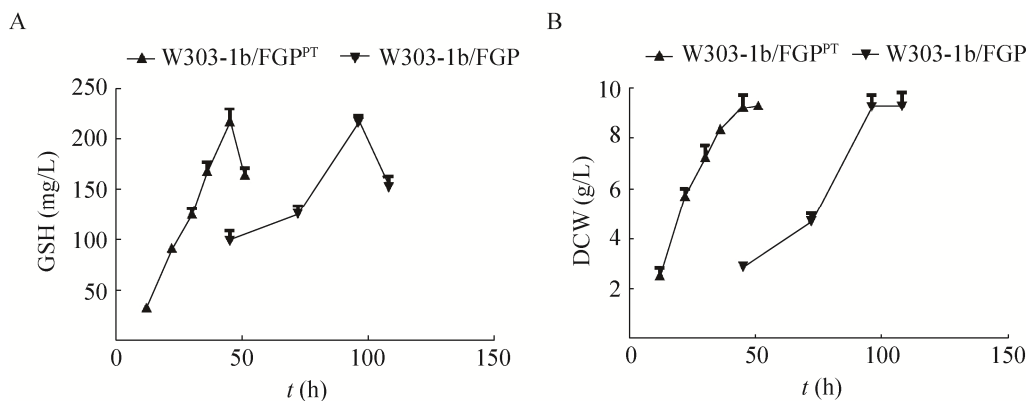


图 3 YPD 培养基中工程菌株 W303-1b/FGP<sup>PT</sup> 和 W303-1b/FGP 的 GSH 产量 (A) 及生物量 (B) 随时间的变化  
Fig. 3 GSH production (A) and cell growth (B) of W303-1b/FGP<sup>PT</sup> and W303-1b/FGP in YPD medium.

表 3 原养型菌株连续培养 100 代 GSH 产量

Table 3 GSH production of the prototrophic strain in 100 generations

Generations	GSH (mg/L)			P value
0	110.19	106.25	107.76	
25	102.54	107.91	104.52	0.19
50	101.34	116.68	113.84	0.35
75	105.17	108.43	106.67	0.30
100	103.87	113.07	115.29	0.31

### 2.4 原养型菌株的 GSH 产量稳定性

为考察工程菌株回复为原养型后 GSH 产量的稳定性,将菌株 W303-1b/FGP<sup>PT</sup> 在无机盐培养基 WMVIII 中进行连续培养,最初培养液 OD<sub>600</sub> 为 0.5,当 OD<sub>600</sub> 达到 15-30 时转移至新鲜的培养基中进行培养,每转接 5 次观察一下菌株最大生物量及 GSH 产量是否发生变化,共转接 20 次,结果如表 3 和图 4 所示,连续培养过程中菌株 GSH 产量与连续培养前的比较采用 T 检验,比较结果  $P > 0.05$ ,认为没有统计学差异。由表 3 和图 4 的结果可知,菌株 W303-1b/FGP<sup>PT</sup> 在 WMVIII 培养基中连续培养 100 代后,菌株 GSH 产量没有改变。

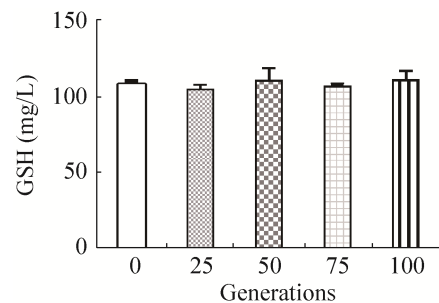


图 4 工程菌株 W303-1b/FGP<sup>PT</sup> 合成 GSH 的稳定性  
Fig. 4 The stability of GSH production of W303-1b/FGP<sup>PT</sup> strain.



### 3 讨论

近年来,基因组编辑技术快速发展,其中 CRISPR/Cas9 技术因设计操作简便、编辑高效与通用性广等优点而备受关注<sup>[10]</sup>,在酿酒酵母中也同样有文献报道<sup>[13,17-19]</sup>。但这些研究都使用了酵母细胞自身的营养缺陷型筛选标记如 *trp1*、*leu2*、*ura3* 等,并且还使用了双质粒表达系统或单个质粒同时表达 Cas9 和 gRNA;实验操作过程复杂,花费时间长。尽管也有文献报道一步多基因编辑的成功操作,但也需要构建多个 gRNA 表达框串联的质粒表达载体<sup>[17-18]</sup>。本研究为简化实验操作,首次成功地直接利用 gRNA 融合表达框转录表达目的 gRNA,同时还探索研究了 2 个基因同时进行基因编辑的可行性并在正向选择压力情况下获得成功,这为更多基因座位的编辑提供实验借鉴。

2013 年酵母产品的全球市场已达到 58 亿美元,预计 2019 年将达到 92 亿美元<sup>[20]</sup>,GSH 就是其中一个具有广泛使用范围的产品。在大多数原核和真核细胞中,GSH 是含量最丰富的非蛋白质类巯基化合物,浓度可达 0.2–10 mmol/L<sup>[21]</sup>。细胞内还原型 GSH 与氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 比例可达到 30:1–100:1,形成氧化还原电势为  $E_0 = -240$  mV,此电势对维持细胞内适宜的氧化还原状态非常重要,如清除细胞内多余的自由基和重金属等<sup>[22]</sup>。因此,GSH 可以用于治疗 GSH 缺失的疾病以及化妆品行业。另外,含 GSH 丰富的酵母物质因其特殊的 kokimi 风味而被用于食品工业<sup>[23]</sup>。

目前生产 GSH 所用的菌株主要为酿酒酵母和产朊假丝酵母,其中产朊假丝酵母中 GSH 最高产量可达 2.45 g/L<sup>[24]</sup>。利用基因工程改造的微生物也有可能得到 GSH 产量极高的菌株,例如在大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 (pTrc99A-gshF)

中,GSH 产量可达 11.30 g/L<sup>[25]</sup>。为提高 GSH 产量,科学家们做了一系列研究,其中两个主要的方法是提高生物量和细胞内 GSH 含量<sup>[7]</sup>。

研究组前期获得了组合表达 3 条 GSH 合成途径的酵母工程菌 W303-1b/FGP<sup>[11]</sup>,但该工程菌株存在多个营养缺陷型基因,难以实现在无机盐培养基的发酵培养。为消除这些营养缺陷型基因导致的严重不足,利用 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术,将营养缺陷型酿酒酵母菌株 W303-1b/FGP 回复为原养型 W303-1b/FGP<sup>PT</sup>后,在摇瓶水平下达到 GSH 产量最高所需的时间由 96 h 缩短为 48 h,发酵周期大大缩短,单位时间 GSH 产量提高 1 倍。

与营养缺陷型菌株相比,原养型菌株一个很大的优点是可以自身合成 Trp 等必需小分子,这就使得原养型菌株可以在简单的、化学成分确定的无机盐培养基 (Chemical defined medium, CDM) 中正常生长,而不需要额外添加昂贵的氨基酸。利用 CDM 进行培养有从实验室摇瓶培养向规模化放大生产转化更快、过程再现强以及下游操作简单等优点<sup>[26]</sup>。

原养型菌株在 WMVIII 培养基中连续培养 100 代 GSH 产量不发生明显变化,说明该菌株 GSH 生产能力稳定,上游基因改造不会在长时间培养过程中发生丢失,有利于菌株更深入的工程改造和放大培养。

### REFERENCES

- [1] Murata K, Kimura A. Cloning of a gene responsible for the biosynthesis of glutathione in *Escherichia coli* B. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 44(6): 1444–1448.
- [2] Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9/10): 1865–1879.
- [3] Bock KW, Lilienblum W, Fischer G, et al. The role

- of conjugation reactions in detoxication. Arch Toxicol, 1987, 60(1/3): 22–29.
- [4] Dröge W, Breitkreutz R. Glutathione and immune function. Proc Nutr Soc, 2000, 59(4): 595–600.
- [5] Wu GY, Fang YZ, Yang S, et al. Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr, 2004, 134(3): 489–492.
- [6] Lorenz E, Schmacht M, Stahl U, et al. Enhanced incorporation yield of cysteine for glutathione overproduction by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biotechnol, 2015, 216: 131–139.
- [7] Li Y, Wei GY, Chen J, et al. Glutathione: a review on biotechnological production. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 66(3): 233–242.
- [8] Gopal S, Borovok I, Ofer A, et al. A multidomain fusion protein in *Listeria monocytogenes* catalyzes the two primary activities for glutathione biosynthesis. J Bacteriol, 2005, 187(11): 3839–3847.
- [9] Janowiak BE, Griffith OW. Glutathione synthesis in *Streptococcus agalactiae* one protein accounts for  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activities. J Biol Chem, 2005, 280(12): 11829–11839.
- [10] Harrison MM, Jenkins BV, O'Connor-Giles KM, et al. A CRISPR view of development. Genes Dev, 2014, 28(17): 1859–1872.
- [11] Tang L, Wang WW, Zhou WL, et al. Three-pathway combination for glutathione biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microb Cell Fact, 2015, 14(1): 139.
- [12] Ralser M, Kuhl H, Ralser M, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. Open Biol, 2012, 2(8): 120093.
- [13] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res, 2013, 41(7): 4336–4343.
- [14] Schiestl RH, Gietz RD. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. Curr Genet, 1989, 16(5/6): 339–346.
- [15] Steele ML, Ooi L, Münch G. Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantitation of glutathione and related thiols. Anal Biochem, 2012, 429(1): 45–52.
- [16] Patzschke A, Steiger MG, Holz C, et al. Enhanced glutathione production by evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* strains. Biotechnol J, 2015, 10(11): 1719–1726.
- [17] Jakočiūnas T, Bonde I, Herrgård M, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab Eng, 2015, 28: 213–222.
- [18] Bao ZH, Xiao H, Liang J, et al. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Synth Biol, 2015, 4(5): 585–594.
- [19] Xu K, Ren CH, Liu ZT, et al. Efficient genome engineering in eukaryotes using Cas9 from *Streptococcus thermophilus*. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(2): 383–399.
- [20] Marz U. Yeasts, Yeast Extracts, Autolysates and Related Products: the Global Market. BCC Research Report Code: CHM053B, Wellesley, MA: BCC Research, 2014.
- [21] Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chem Biol Interact, 1998, 111–112: 1–14.
- [22] Ayer A, Gourlay CW, Dawes IW. Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res, 2014, 14(1): 60–72.
- [23] Ueda Y, Yonemitsu M, Tsubuku T, et al. Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61(12): 1977–1980.
- [24] Wang B, Liang GB, Zhou QF, et al. Combined amino acids modulation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress for glutathione overproduction in *Candida utilis*. Afr J Biotechnol, 2010, 9(33): 5399–5406.
- [25] Wang DZ, Wang C, Wu H, et al. Glutathione production by recombinant *Escherichia coli* expressing bifunctional glutathione synthetase. J Ind Microbiol Biotechnol, 2016, 43(1): 45–53.
- [26] Zhang J, Greasham R. Chemically defined media for commercial fermentations. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 51: 407–421.

(本文责编 郝丽芳)