

运用 CRISPR/Cas 系统敲除大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因及其对脂肪酸代谢的影响

夏军¹ 郑明刚^{2*} 王玲³ 孙承君² 郑立² 祝建波^{1*}

(1. 石河子大学生命科学学院 农业生物技术重点实验室 新疆 石河子 832003)

(2. 国家海洋局第一海洋研究所 海洋生态重点实验室 山东 青岛 266061)

(3. 青岛大学化学化工与环境学院 山东 青岛 266071)

摘要:【目的】CRISPR/Cas 是目前基因编辑的一个重要的新兴技术,拟通过该技术,对大肠杆菌进行快速、高效的基因编辑,获取脂肪酸代谢工程菌。【方法】利用一个二元载体构建出 CRISPR/Cas 偶联 λ -Red 重组酶的系统,重叠 PCR 扩增出敲除的 Donor,最后用电转的方式对 *Escherichia coli* MG1655 脂肪酸代谢相关基因进行快速编辑。同时,采用气相色谱-质谱(GC-MS)对脂肪酸进行定性及定量分析。【结果】获得了大肠杆菌 Δ PEPC(partial)、 Δ PEPC、 Δ PEPC(partial)- Δ FadD、 Δ PEPC- Δ FadD 以及 Δ FadD 突变体菌株。各缺失体菌株脂肪酸含量均比野生型要高,最高的增长了 3.7%,但是敲除 *ppc* 获得的脂肪酸增长量并没有预期的高。同时在脂肪酸组成上,各菌株均含有 11:0、12:0、13:0、14:0、15:0、16:0、17:1、17:0、18:0,并且 16:0、17:0、18:0 占主要组成部分。【结论】运用该技术可以快速、高效地对大肠杆菌基因进行编辑,是大肠杆菌工程菌株构建的一个新思路,对其他工程菌的构建提供了一定的理论基础。

关键词: CRISPR/Cas, 反向 PCR, GC-MS, λ -Red 重组酶, PEPC(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶), 脂肪酸含量

Foundation item: The Basic Scientific Fund for National Public Research Institutes of China (No. 2015T05), Marine Renewable Energy Funds Project (No. GHME2001SW02)

***Corresponding author:** E-mail: ZHENG Ming-Gang: zmg@fio.org.cn; ZHU Jian-Bo: zjbshz@126.com

Received: September 28, 2015; **Accepted:** January 11, 2016; **Published online** (www.cnki.net): February 23, 2016

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(No. 2015T05); 海洋可再生能源专项资金项目(No. GHME2001SW02)

***通讯作者:** E-mail: 郑明刚: zmg@fio.org.cn; 祝建波: zjbshz@126.com

收稿日期: 2015-09-28; **接受日期:** 2016-01-11; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-02-23

Knocking out phosphoenolpyruvate carboxylase gene by CRISPR/Cas and its influence on fatty acid metabolism in *Escherichia coli*

XIA Jun¹ ZHENG Ming-Gang^{2*} WANG Ling³ SUN Cheng-Jun²
ZHENG Li² ZHU Jian-Bo^{1*}

(1. College of Life Sciences, Shihezi University, Key Laboratory of Agricultural, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

(2. The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration of China, Qingdao, Shandong 266061, China)

(3. College of Chemical Engineering, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract: [Objective] To obtain recombinant strain of *Escherichia coli* to study fatty acid metabolism, the newly developed CRISPR/Cas system was used to modify the genome of *E. coli* MG1655. [Methods] A binary vector was constructed with CRISPR/Cas and λ -Red recombinase. Donor genes were then knockout through overlapping PCR. The recombinant vector plasmid was subsequently electro-transformed into *E. coli* MG1655 to edit the gene associated with fatty acid metabolism. Furthermore, fatty acid contents were measured quantitatively by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Results] Six recombinant *E. coli* strains were obtained, including Δ PEPC (partly knock-out), Δ PEPC, Δ PEPC(partly knock-out)- Δ FadD, Δ PEPC- Δ FadD and Δ FadD. Compared to the wild one, all reconstructed strains showed higher yields of total fatty acids with maximum increase of 3.7%, whereas the yield of mutant strain Δ PEPC was lower than expected. The fatty acid of 11:0, 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:1, 17:0, 18:0 were detected in all strains, and 16:0, 17:0, 18:0 were dominant. [Conclusion] The CRISPR/Cas system with Lambda-Red recombinases was an efficient and rapid tool to modify genes of *E. coli*, and opened a new way to construct recombinant *E. coli* strains.

Keywords: CRISPR/Cas, Overlapping PCR, GC-MS, λ -Red recombinases, PEPC (Phosphoenolpyruvate carboxylase), Fatty acid

CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas 系统是近年来新兴的一个基因组定点编辑技术^[1-2]。该技术有三大类型(I、II、III)^[3], 而II型 CRISPR/Cas 系统因只需要1个 Cas 9 蛋白作为切割 DNA 双链的工具而获得研究者的青睐。目前该技术已成功应用到大肠杆菌^[4]、斑马鱼^[5]、拟南芥^[6]、酿酒酵母^[7]等物种中。CRISPR/Cas 系统发挥基因编辑的作用建立在以下几方面: (1) 由 CRISPR 转录来的 tracrRNA 与 crRNA 形成一个 tracrRNA-crRNA 复合体, 接着该复合体与 Cas9 蛋白结合, 并在 crRNA 的引导下识别靶位点; (2) 而对目的片段的切割是由 crRNA 上长度为 20 bp 的向导序列(Guiding sequence)与目的 DNA 上的特定序列互补来引导 Cas9 蛋白对目的基因的切割; (3) 除此之外, 在所识别的目的 DNA 上

还必需有一个 3 碱基(NGG)组成的 PAM (Protospacer adjacent motif)区域, 识别区域紧跟 PAM 的 5'-端。

λ -Red 重组酶由 Exo、Beta 和 Gam 等 3 种蛋白质组成, 分别由 *exo*、*bet*、*gam* 等 3 个基因编码。这 3 种蛋白对于 dsDNA 的重组是必需的。首先, Gam 蛋白通过大肠杆菌 RecBCD 和 SbcCD 核酸酶抑制线性 dsDNA 的降解, 然后 Exo 从 5'端到 3'端的方向降解 dsDNA, 产生带 3'末端的双链 DNA, 最后 Beta 蛋白结合在由 Exo 产生的 3'突出端, 防止外源 DNA 片段的降解, 同时介导同源重组片段的退火延伸^[8]。

大肠杆菌作为一种原核模式菌, 因其遗传背景简单, 容易培养, 在基因改造以及获得脂肪酸工程菌的研究中得到很好的应用^[9-13]。*ppc* 基因是与蛋白

质合成相关的基因,其编码的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)可以催化丙酮酸合成草酰乙酸,进而生成天冬氨酸进入蛋白质代谢,而丙酮酸生成乙酰辅酶A后在乙酰辅酶A羧化酶作用下进入脂肪酸合成途径,丙酮酸是两者共同的底物。我们拟通过部分和全部敲除 *ppc* 基因,阻断丙酮酸流向蛋白质合成的方向,来促使其流向脂肪酸合成方向^[14-15]。另外,在大肠杆菌脂肪酸降解途径中,脂肪酸是被酯酰CoA合成酶FadD激活之后开始进入这一途径,阻断脂肪酸代谢途径有助于大肠杆菌对脂肪酸的积累。

本研究是运用CRISPR/Cas偶联 λ -Red重组酶的系统,以一个二元载体pTargetF/pCas系统来敲除 *ppc* 和 *fadD* 基因,可以获得在基因组上无缺刻的基因编辑菌株,然后通过GC-MS来分析这两个基因对脂肪酸代谢的影响,本文中敲除 *ppc* 基因对脂肪酸产量的影响是首次报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *Escherichia coli* MG1655由厦门大学馈赠;大肠杆菌DH5 α 由本实验室保存。质粒pTargetF和pCas由中国科学院上海生命科学研究院馈赠;基因突变株由本实验构建。详见表1。

1.1.2 试剂和仪器: 2 \times Primer STAR[®] Max SuperMix,宝生物(大连)有限公司; 2 \times EasyTaq PCR SuperMix,北京全式金生物技术有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒和胶回收试剂盒, Omega公司;氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、壮观霉素(Spec)和氯霉素(Chl)的使用浓度分别为100、50、50和25 mg/L,购自索莱宝生物科技有限公司;十九烷酸(C19:0)、37种脂肪酸甲酯标准品购自Sigma-aldrich公司;引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。基因导入仪(GenePulser Xcell),美国伯乐有限公司;电子分析天平(FA2104N),上海

表1 菌株及质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株及质粒 Strains or plasmids	特征 Characteristics	来源 Source
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	F-endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96deoRnupG Φ 80dlacZAM15 Δ (lacZYA-argF)U169 hsdR17 (rK ⁻ mK ⁻) λ ⁻	Trans Gen
<i>E. coli</i> MG1655	K-12; F ⁻ λ ⁻ rph-1	
1655 Δ FadD	MG1655 Δ fadD	This study
1655 Δ PEPC ^a	MG1655 Δ ppc ^a	This study
1655 Δ PEPC ^b	MG1655 Δ ppc ^b	This study
1655 Δ PEPC ^a : Δ FadD	MG1655 Δ ppc ^a Δ fadD	This study
1655 Δ PEPC ^b : Δ FadD	MG1655 Δ ppc ^b Δ fadD	Donor
Plasmids		
pCas	repA101(Ts) kan Pcas-cas9 ParaB-Red lacIq Ptrc-sgRNA-pMB	Donor
pTargetF	pMB1 aadA sgRNA	This study
pTargetF-FadD	pMB1 aadA sgRNA-fadD	This study
pTargetF-PEPC ^a	pMB1 aadA sgRNA-ppc ^a	
pTargetF-PEPC ^b	pMB1 aadA sgRNA-ppc ^b	

注: ^a: 敲除 *ppc* 基因的部分片段; ^b: 敲除 *ppc* 基因。

Note: ^a: Knock-out partial of *ppc* gene; ^b: Knock-out complete *ppc* gene.

民桥精密科学仪器有限公司; 酶标仪, Tecan 公司。

1.1.3 培养基: 大肠杆菌均用 LB^[12]培养基进行培养(37 °C 或者 30 °C)。

1.2 质粒构建和基因克隆

为了获得带有与基因组中目的片段 20 bp 碱基互补的 sgRNA, 分别以 P1/P2 和 P3/P4 为引物对, 以质粒 pTargetF 为模板扩增出可以识别 *fadD* 和 *ppc* 基因的 pTargetF, 分别命名为 sgRNA-*fadD* 和 sgRNA-*ppc*, 然后将扩增的 PCR 产物转化至 *E. coli* DH5 α , 分别利用引物 P13/P14 和 P15/P16 进行 PCR 鉴定, 将鉴定正确的阳性克隆分别命名为 pTargetF-sgRNA-*fadD* 和 pTargetF-sgRNA-*ppc*。以 *E. coli* MG1655 为材料, 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 MG1655 基因组。分别以引物 P5/P6 和

P7/P8、P9/P10 和 P11/P12 扩增用于同源重组的 *fadD* 和 *ppc* 基因的上下游同源臂片段 *fadD* 上/下和 *ppc* 上/下, 然后通过 SOEing PCR 将 *fadD* 上/下和 *ppc* 上/下分别连接起来, 将电泳条带正确的分别命名为 *fadD* 同和 *ppc* 同。引物见表 2。

1.3 CRISPR/Cas 介导的基因敲除

E. coli MG1655 用于构建突变体菌株, 感受态细胞的制备参见文献[16]。首先将 pCas 转化到 *E. coli* MG1655 中, 然后挑取含有 pCas 的 MG1655 的单克隆, 在加入 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 30 °C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.2 时, 向摇瓶中加入终浓度为 10 mmol/L 的阿拉伯糖诱导 pCas 载体上 λ -Red 蛋白的表达, 然后摇至 OD₆₀₀ 约为 0.4–0.5 时回收菌体制备电转感受态。电转化时, 向

表2 本研究中用到的引物
Table 2 Primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequence (5'→3')	大小 Size (bp)
P1	CCCTGACCGTTATCAATCTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	40
P2	GAGATTGATAACGGTCAGGGACTAGTATTATACCTAGGAC	40
P3	CAGTATGCTCGGCAAAGTGCCTTTAGAGCTAGAAATAGC	40
P4	GCACTTTGCCGAGCATACTGACTAGTATTATACCTAGGAC	40
P5	CACGCCGCAACAAGATTTAG	20
P6	AGTGGGCGTCAAAAAAAAAACGGCGAAGCGCGTCACTATTTA	40
P7	TAAATAGTGACGCGCTTCGCCGTTTTTTTTTGACGCCCACT	40
P8	TAACAGTTGCAGACAGGCCA	20
P9	CATCCGTATTCAGGGCCAGT	20
P10	ATTGCCAGCGCAGCAAACGAATAAATAGCAGGA	33
P11	TCGTTTGCTGCGCTGGCAATGATGCTAACC	30
P12	TCAATACGGACCAGCGGTAC	20
P13	CGACCTACACCGAACTGAGA	20
P14	GAGATTGATAACGGTCAGGG	20
P15	CGACCTACACCGAACTGAGA	20
P16	GCACTTTGCCGAGCATACTG	20
P17	TGTTACTTGGGGCGATTTTT	20
P18	CAGCGATTCCACTGCTTTTT	20
P19	AAGCGTCGTGAATTTAATGA	20
P20	GCCGAATGTAACGACAATTC	20

40 μL 的感受态细胞加入 80 ng 的 pTargetF 质粒和 400 ng 的同源臂 DNA 片段, 轻柔混合后, 加入到预冷的 1 mm 电转杯中, 在 1.8 kV 的条件下放入电转仪(Bio-Rad)中电转, 电转完后迅速加入 1 mL 的 LB 培养基(室温), 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 1 h 进行复苏, 然后接种菌体于 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 壮观霉素的 LB 双抗固体培养基上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。转化子用 PCR 进行检测。

1.4 总酯提取及脂肪酸甲酯化

1.4.1 总酯的提取: 挑各突变株及野生菌株单克隆, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养到 OD_{600} 为 1.4 左右, 取 200 mL 菌液, 8 000 r/min 离心 10 min 回收菌体, 吸取上清后, 冷冻干燥菌体, 然后向干燥的菌粉中加入 4 mL ddH₂O, 漩涡振荡, 悬浮菌体, 然后沸水浴 15 min, 分别向冷却的悬浮液中加入 20 mL 的氯仿/甲醇(2:1, 体积比), 漩涡振荡 3 min 后, 过夜, 次日, 离心后取下相(氯仿相), 氮气吹干, 即为总酯。

1.4.2 脂肪酸甲酯化: 挑各突变体菌株及野生菌株单克隆, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养到 OD_{600} 为 1.4 左右, 取 50 mL 菌液回收菌体, 冷冻干燥菌体后, 各取 20 mg 干菌粉, 用 1 mL 的 ddH₂O 漩涡振荡, 悬浮菌体, 然后沸水浴 15 min, 待悬浮冷却后, 加入 100 μL 0.5 g/L 的 C19 作为内标, 后续操作采用曲璟秋等^[17]的方法。

1.5 GC-MS 分析

甲酯化后的脂肪酸利用安捷伦 7890/5975C-GC/MSD 进行分析, 检测条件为: 进样器温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 检测器温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管色谱柱(HP, 30 m \times 0.25 mm, Film thickness of 0.25 μm), 氮气为载气, 线速度为 1 mL/min, 程序升温条件为 75 $^{\circ}\text{C}$ (2 min), 以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升至 250 $^{\circ}\text{C}$, 最后 250 $^{\circ}\text{C}$ (2 min), 离子源温度 220 $^{\circ}\text{C}$, EI 离子源 70 eV。

1.6 重组菌中质粒的消除

为了消除 pCas 和 pTargetF 质粒, 将重组菌(含有 pCas 和 pTargetF)培养在 LB 培养基中(补加 50 mg/L 的卡那霉素, 并加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG

诱导靶向 pTargetF 上的 pMB1 的 sgRNA-pMB1 的表达)培养过夜, 并将其涂布于含 50 mg/L 卡那霉素的平板上用于消除 pTargetF, 待平板上长出单克隆, 挑菌落在含 50 mg/L 壮观霉素的液体 LB 中培养过夜, 不长即为 pTargetF 消除的工程菌, 然后挑取该工程菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中培养过夜, 用以消除 pCas。

2 结果

2.1 基因缺失菌株的构建结果

2.1.1 *FadD* 和 *ppc* 基因同源片段的扩增: 以 *E. coli* MG1655 基因组 DNA 为模板, 分别扩增用于敲除 *fadD* 和 *ppc* 基因的上/下同源臂片段, 电泳结果显示产物大小与预期片段大小一致。

2.1.2 缺失突变菌的鉴定: 将消除了质粒 pTargetF 和 pCas 的菌株, 挑其单克隆, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 2 h, 回收菌体, 菌体沉淀用 1 mL 的 ddH₂O 洗涤 2 次, 取 20 μL 菌液破菌, 利用引物 P17/P18 和 P19/P20 (分别在敲除位点的上下游设计)经菌液 PCR 鉴定, 初步判定敲除了 *fadD* 和 *ppc* 基因, 然后挑取单克隆, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜, 用细菌 DNA 提取试剂盒分别对各突变株提取基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, 同样利用上述引物进行扩增, 获得了敲除 *fadD* 和 *ppc* 基因成功的菌株, 结果见图 1。

2.2 缺失体及野生型菌株生长情况

从图 2 中可以看出, 无论是 *fadD* 和 *ppc* 基因分别敲除的菌株还是两个基因同时敲除的菌株, 在生长情况下与野生型菌株相比, 均没有很大的变化, 说明在大肠杆菌体内, 可能存在其他途径可以对这两个基因的作用进行补充, 以弥补其缺失带来的生长缺陷, 尤其是 *ppc* 基因, 该基因的缺失会影响大肠杆菌蛋白质的合成, 但并没有影响大肠杆菌的正常生长, 这一发现需要后面作进一步探讨。

2.3 菌株的脂肪酸定性及定量

提取重组菌株及野生菌株的总脂, 发现重组菌株与野生型菌株相比, 各重组菌株中脂肪酸的含量均有一定程度的提高, 最高的增加了 3.7% (表 3)。

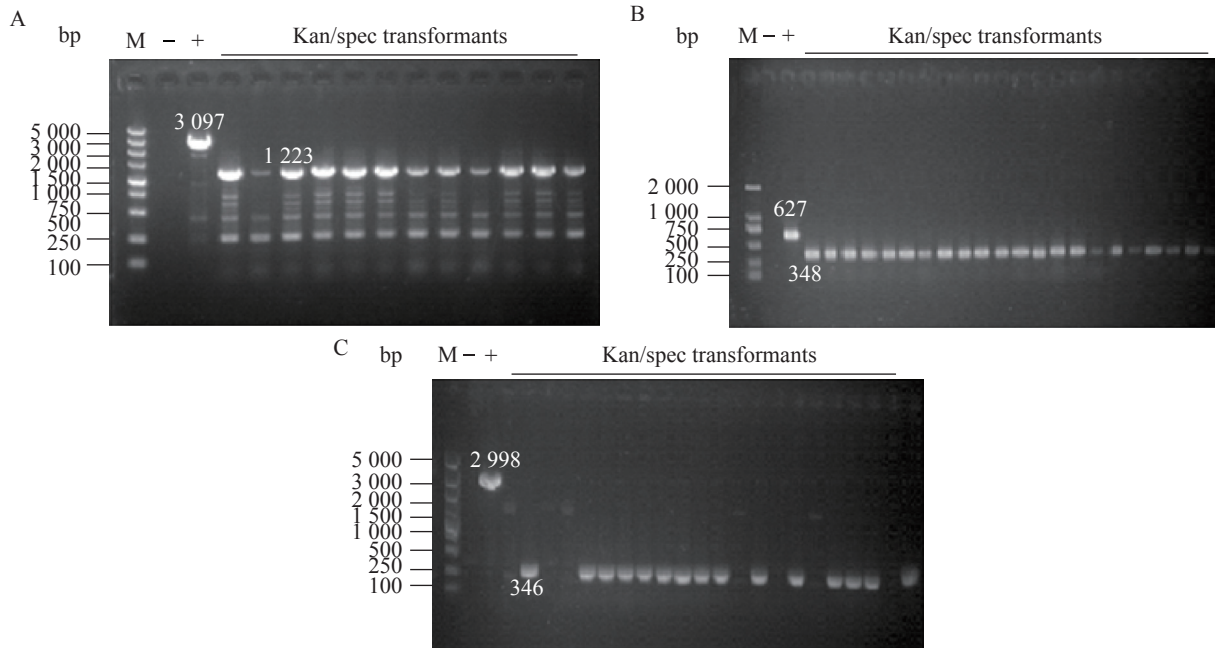


图 1 突变体菌株的鉴定

Figure 1 Identification of mutants by PCR.

注: M: DNA ladder marker; +: 阳性克隆; -: 阴性克隆. A 和 B 分别为敲除 *fadD* 和 *ppc* (部分敲除) 基因的 PCR 鉴定, 敲除效率为 100%; C: 敲除 *ppc* 基因的 PCR 鉴定, 效率为 $68\% \pm 2\%$. Kan/spec transformants: 在含有卡那霉素和壮观霉素双抗平板上挑取单克隆分别用引物 P17/P18、P19/P20 对其进行 PCR 鉴定.

Note: M: DNA ladder marker; +: Positive control; -: Negative control. A and B: The strains, which successfully deleted *fadD* and *ppc* (Partly knock-out), showed 100% mutation rate respectively. C: The Δ PEPC strain showed $68\% \pm 2\%$ mutation rate. Kan/spec transformants: Identified the colonies by P17 and P18, P19 and P20 on the plate, which contains Kan and Spec resistance.

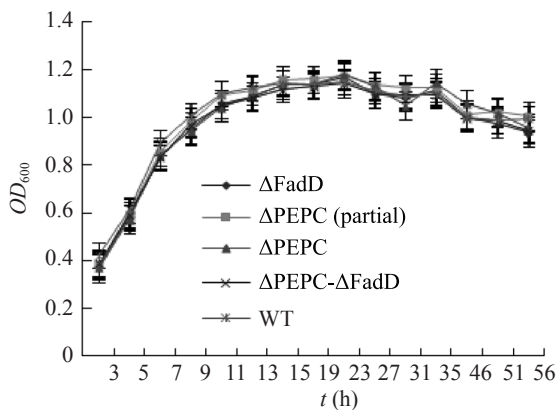


图 2 突变株及野生株的生长曲线

Figure 2 The growth curve of MG1655 and mutants

注: Δ PEPC (partial) 是指敲除部分 *ppc* 基因.

Note: Δ PEPC (partial) represent knock-out partial *ppc* gene.

但是, 敲除 *ppc* 基因菌株总脂含量比敲除 *fadD* 的低, 同时部分敲除和全部敲除 *ppc* 基因的菌株在脂肪酸含量上几乎没有差别, 说明只要敲除基因的开放阅读框的核心区, 该基因就会失去作用. 对于 *ppc* 和 *fadD* 基因双敲除的菌株, 脂肪酸含量比单敲除 *ppc* 基因的含量要高 3.1%。

为了进一步了解各菌株脂肪酸组成的成分变化, 利用 GC-MS 对各菌株中的组分进行了定量分析. 从图 3 中可以看出, 与敲除前相比, 无论是 *ppc* 和 *fadD* 基因单敲除菌株还是 *ppc* 和 *fadD* 基因同时敲除的菌株, 脂肪酸的组成都没有发生变化, 都含有 11:0、12:0、13:0、14:0、15:0、16:0、17:1、17:0 和 18:0, 并且 16:0、17:1 和 18:0 占脂肪酸的主要

表3 各菌株总脂含量
Table 3 Lipid contents in recombinant and wild type *E. coli*

菌株 Strains	湿重 DCW (g/L)	干重 DLW (mg/L)	脂含量 Lipid content (%)
<i>E. coli</i> MG1655	1.45±0.09	103±4.2	7.1%±0.2%
1655ΔFadD	1.47±0.11	160±2.3	10.8%±0.3%*
1655ΔPEPC ^a	1.36±0.06	108±4.5	7.6%±0.1%*
1655ΔPEPC ^b	1.38±0.06	106±6.7	7.7%±0.2%*
1655ΔPEPC ^a :ΔFadD	1.46±0.09	153±11.0	10.5%±0.2%*
1655ΔPEPC:ΔFadD	1.37±0.06	115±15.2	10.7%±0.3%*

注: ^a: 敲除 *ppc* 基因的部分片段; ^b: 敲除 *ppc* 基因; *: 对重组菌株脂肪酸含量与野生型菌株脂肪酸含量进行差异显著性分析表明差异显著($P=0.033<0.05$).

Note: ^a: Knock-out partial of *ppc* gene; ^b: Knock-out complete *ppc* gene; *: The fatty acid contents of recombinant strains and wild type strain indicates significant difference ($P=0.033<0.05$).

组成部分。

3 讨论

通过一个二元载体介导的 CRISPR/Cas 系统可以高效地构建大肠杆菌突变体菌株, 相较于 λ -Red 重组系统, 该系统也构建并表达了 λ -Red 重组酶, 并且该系统只需要在 PTargetF 载体上构建一个与宿

主目的基因 NGG 上游的 20 个碱基互补配对的寡核苷酸序列, 然后与 PCas 共同发挥作用, 就可以对宿主的基因进行编辑, 从而快速而高效地获得突变体菌株, 而且相较于 Red 重组系统会在菌株基因组上留下一段外源的碱基序列(包括 FRT 位点), CRISPR/Cas 系统只会按照设计敲除或者插入目的基因, 不会有其他基因被敲除或者插入, 这样更有利于验证某些基因的作用, 可以很好地控制实验结果。之前应用到大肠杆菌的 CRISPR/Cas 效率都很低^[4], 几乎无法获得阳性克隆。本系统的优势之处是利用了 λ -Red 重组酶与 CRISPR/Cas 系统结合, 大大提高了重组效率, 也很好发挥了两者的优势。但是在多位点敲除并进行多位点的基因重组上还存在一定风险。

根据陈锦清^[18]的底物竞争假说: 在生物体的新陈代谢过程中, 葡萄糖酵解产物丙酮酸有两个去向: (1) 在 PEPC 的催化下合成草酰乙酸, 进而生成天冬氨酸进入蛋白质代谢; (2) 在丙酮酸脱氢酶的作用下合成乙酰辅酶 A, 然后在乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCase)的催化下生成丙二酸单酰辅酶 A 进入脂类代谢。如果抑制了 PEPC 的表达, 将会有更多的丙酮酸用于合成脂类, 蛋白质的合成即会减少。而本实验的结果却发现在敲除 *ppc* 基因时, 菌株的脂肪酸含量相较于野生型并没有明显的变化, 同时突变体菌株的生长状况与野生型相比也没有明显的变化, 说明在大肠杆菌体内通过单独敲除控制蛋白质途径的基因并不能很好地促进前体物质流向脂肪酸合成的代谢途径。并且, 脂肪酸和蛋白质存在一定的物质和能量的交流, 蛋白质可以转化成脂肪, 脂肪在特殊情况下也可以转化为蛋白质, 所以控制这两种物质含量的比例或者控制这两个物质合成途径中的某些酶的相对活性可能才是脂肪酸合成的关键调控点^[19]。

我们利用表达 λ -Red 重组酶的 CRISPR/Cas 系统, 选取与脂肪酸合成途径相关和脂肪酸降解途径中的关键基因进行基因敲除, 阐述这些基因与脂肪

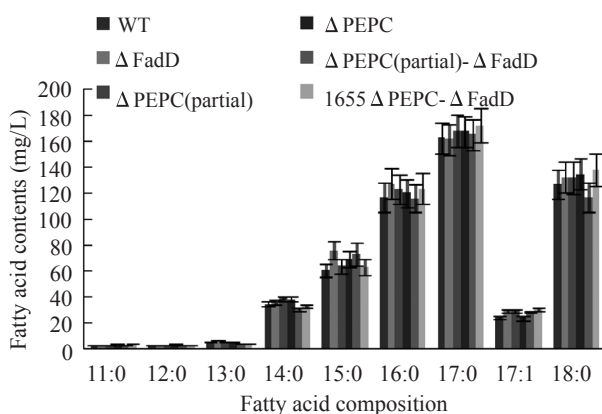


图3 脂肪酸组成变化

Figure 3 The change of fatty acid composition

注: ΔPEPC(partial)是指敲除部分 *ppc* 基因.

Note: ΔPEPC(partial) represent knock-out partial *ppc* gene.

酸产量的关系。通过研究发现, 阻断脂肪酸 β -氧化途径的基因 *fadD* 可以明显地提高菌体脂肪酸的含量, 说明敲除这一基因对脂肪酸的积累起到了一个积极的作用。阻断了控制丙酮酸流向蛋白质方向的 *ppc* 基因, 使丙酮酸流向脂肪酸合成途径并没有引起菌体中脂肪酸的明显变化, 表明生物体中合成的脂肪酸转化为了部分蛋白质, 以补充蛋白质缺失对菌体的影响。

参考文献

- [1] Terns MP, Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(3): 321-327
- [2] Richter C, Chang JT, Fineran PC. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) systems[J]. *Viruses*, 2012, 4(10): 2291-2311
- [3] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338
- [4] Jiang WY, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233-239
- [5] Chang NN, Sun CH, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in *Zebrafish* embryos[J]. *Cell Research*, 2013, 23(4): 465-472
- [6] Feng ZY, Zhang BT, Ding WN, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system[J]. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1229-1232
- [7] Si T. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Urbana-Champaign: Doctoral Dissertation of University of Illinois at Urbana-Champaign, 2015
- [8] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination I[J]. *Annual Review of Genetics*, 2002, 36(1): 361-388
- [9] Steen EJ, Kang YS, Bokinsky G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass[J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 559-562
- [10] Lu XF, Vora H, Khosla C. Overproduction of free fatty acids in *E. coli*: implications for biodiesel production[J]. *Metabolic Engineering*, 2008, 10(6): 333-339
- [11] Youngquist JT, Lennen RM, Ranatunga DR, et al. Kinetic modeling of free fatty acid production in *Escherichia coli* based on continuous cultivation of a plasmid free strain[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(6): 1518-1527
- [12] Jeon E, Lee S, Won J-I, et al. Development of *Escherichia coli* MG1655 strains to produce long chain fatty acids by engineering fatty acid synthesis (FAS) metabolism[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 49(1): 44-51
- [13] Liu H, Yu C, Feng DX, et al. Production of extracellular fatty acid using engineered *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1): 41-54
- [14] Li JQ, Zheng SX, Yu ZN, et al. Acetyl-coenzyme A Carboxylase: A key metabolic enzyme of fatty acid and progress of its gene clone[J]. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 2011, 17(5): 753-758 (in Chinese)
李洁琼, 郑世学, 喻子牛, 等. 乙酰辅酶 A 羧化酶: 脂肪酸代谢的关键酶及其基因克隆研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(5): 753-758
- [15] Hou LJ, Shi DJ, Cai ZF, et al. Regulation of lipid synthesis in transgenic *Escherichia coli* by inserting *Cyanobacterial* sense and antisense *pepcA* gene[J]. *Chinese Biotechnology*, 2008, 28(5): 52-58 (in Chinese)
侯李君, 施定基, 蔡泽富, 等. 蓝藻正反义 *pepcA* 基因导入对大肠杆菌中脂类合成的调控[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(5): 52-58
- [16] Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(2): 206-223
- [17] Qu JQ, Liu CH, Liu WF, et al. Construction of *Escherichia coli* gene knock-out mutants for engineering of fatty acid metabolism[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(6): 608-614 (in Chinese)
曲璟秋, 刘翠花, 刘伟丰, 等. 应用基因敲除快速构建大肠杆菌突变体改造脂肪酸代谢途径[J]. *微生物学报*, 2013, 53(6): 608-614
- [18] Chen JQ, Lang CX, Hu ZH, et al. Antisense PEP gene regulates to ration of protein and lipid content in *Brassica napus* seeds[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1999, 7(4): 316-320 (in Chinese)
陈锦清, 郎春秀, 胡张华, 等. 反义 PEP 基因调控油菜籽粒蛋白质/油脂含量比率的研究[J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(4): 316-320
- [19] Kubis SE, Pike MJ, Everett CJ, et al. The import of phosphoenolpyruvate by plastids from developing embryos of oilseed rape, *Brassica napus* (L.), and its potential as a substrate for fatty acid synthesis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(402): 1455-1462