

摘要

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 具有蛋白分泌能力强、胞外酶产量高、发酵条件简单等诸多优良特性, 因此是非常具有应用前景的工业微生物之一。当前菌种选育的主要方式为自然筛选和传统诱变, 但地衣芽孢杆菌过低的内源重组效率极大地限制了对它的遗传改造, 并且由于缺乏高效的基因编辑工具, 地衣芽孢杆菌应用的进一步拓展受到限制。近年来, 噬菌体重组系统已经被应用于提高许多细菌的重组效率, 但目前尚未报道一种可有效应用于地衣芽孢杆菌的噬菌体重组系统。本研究向地衣芽孢杆菌内引入噬菌体来源的 RecT 重组酶, 利用鼠李糖启动子作为表达元件在地衣芽孢杆菌中构建了条件表达的重组系统, 敲除 α -淀粉酶基因验证了该系统的基因编辑功能, 并且通过操作条件的优化在一定程度上提高了该重组系统基因编辑的效率。主要内容和结果如下:

(1) 重组酶及其表达元件的挖掘: 选择芽孢杆菌及其噬菌体来源的重组酶编码基因, 通过氨基酸同源性比对和系统发育进化树的分析, 确定了 5 个既具同源性又具多样性的 RecT 家族重组酶。基于代谢途径的分析发现鼠李糖操纵子, 由 3 个特征基因鼠李糖醛缩酶基因 *yuxG*、鼠李糖激酶基因 *yulC* 及其转录调节因子 *yulB* 组成。挖掘得到鼠李糖操纵子中的启动子 P_{rha} , 以绿色荧光蛋白作为报告基因探究了不同条件下 P_{rha} 启动子转录表达特性, 得出地衣芽孢杆菌内源鼠李糖启动子是由鼠李糖严格控制的诱导型启动子, 并且基因的转录表达随着鼠李糖浓度的升高而增强。

(2) 重组系统的构建及功能验证: 利用鼠李糖表达元件 P_{rha} 和 5 个异源的噬菌体同源重组酶构建重组系统。建立了基于该重组系统的基因编辑方法为以 pHY300-PLK 为载体, 携带重组酶表达盒与目的基因敲除盒构建成敲除质粒。敲除质粒电转化至地衣芽孢杆菌后诱导重组酶的表达以进行同源双交换实现目的基因的敲除, 后续以无抗传代的方式丢失敲除质粒。通过敲除 α -淀粉酶 *amyL* 基因鉴定 5 个重组酶的功能, 发现来自 *Bacillus phage* 049ML001 的 RecT 重组酶在地衣芽孢杆菌中的重组功能较显著, 以其构建的重组系统将地衣芽孢杆菌的重组效率提高至 5.56%。

(3) 重组系统的操作条件优化: 分别优化了鼠李糖添加时间、添加浓度、菌株培养时间以及传代次数等操作条件。得出在敲除 α -淀粉酶基因 *amyL* 时, 生长 8 h 后添加 1.5% 的鼠李糖诱导重组酶 RecT 表达, 继续培养 24 h、传代 3 次后基因编辑效率最高, 达到 16.67%。同时以片段的形式进行重组底物的敲入, 在这一过程中发现地衣芽孢杆菌会发生随机整合事件。

(4) 重组系统的应用: 应用重组系统敲除地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶 *aprE* 基因和磷酸转移酶系统中的关键基因。成功敲除了碱性蛋白酶 *aprE* 基因, 敲除效率为 12.5%; 但磷酸转移酶系统关键基因的敲除仍存在困难。

关键词: 地衣芽孢杆菌; RecT 重组酶; 同源重组; 基因编辑; 鼠李糖启动子

Abstract

Bacillus licheniformis has many excellent characteristics, such as strong protein secretion ability, high extracellular enzyme production, and simple fermentation conditions. Therefore, it is one of the most promising industrial microorganisms. Currently, the main methods of strain selection are natural screening and traditional mutagenesis, but low endogenous recombination efficiency of *B. licheniformis* greatly limits its genetic modification. Moreover, due to lack of efficient gene editing tools, the further expansion of *B. licheniformis* application is restricted. In recent years, bacteriophage recombination systems have been used to improve the recombination efficiency of many bacteria, but no effective bacteriophage recombination system for *B. licheniformis* has been reported. In this study, a phage derived recombinase RecT was introduced into *B. licheniformis*. Using the rhamnose promoter as an expression element, a bacteriophage recombination system for conditional expression was constructed in *B. licheniformis*. The system was validated for the knockout of amylase genes, and the efficiency of gene editing in the system was improved to some extent through optimization of operating conditions. The main content and results are as follows:

(1) Find bacteriophage recombinases and their expression elements. Select recombinase coding genes from *Bacillus* and its phages, and through amino acid homology comparison and phylogenetic tree analysis, identify five recombinases of the RecT family that have both homology and diversity. Based on the metabolic pathway analysis, the rhamnose operon was found to be composed of three characteristic genes, rhamnose almutase gene *yuxG*, rhamnose kinase gene *yulC* and its transcription regulator *yulB*. The promoter P_{rha} in the rhamnose operon was obtained, and the transcription and expression characteristics of P_{rha} promoter under different conditions were explored by using green fluorescent protein as a reporter gene. It was found that the endogenous rhamnose promoter of *B. licheniformis* was an inducible promoter strictly controlled by rhamnose, and the transcription and expression of the gene was enhanced with the increase of rhamnose concentration.

(2) Construction and functional verification of the recombination system. A recombination system was constructed using rhamnose expression element P_{rha} and five heterologous bacteriophage recombinases. The gene editing method based on this recombination system was established as a knockout plasmid using pHY300-PLK as the vector, carrying the recombinase expression cassette and the target gene knockout cassette. The knockout plasmid was introduced into *Bacillus licheniformis* by electroporation to induce the expression of the recombinase for homologous double exchange to achieve the knockout of the target gene, and then the knockout

plasmid was lost in an antibiotic-free manner. The recombinase RecT from *Bacillus* phage 049ML001 showed high recombination activity in *Bacillus licheniformis*. The recombination system constructed with recombinase RecT from *Bacillus* phage 049ML001 increased the recombination efficiency of *Bacillus licheniformis* to 5.56%.

(3) Optimization of the operating conditions of the recombinant system. The operating conditions of rhamnose addition time, concentration, strain culture time, and passage times were optimized. Concluded that when the α -amylase gene *amyL* was knocked out, 1.5% rhamnose was added after 8 h of growth to induce the expression of recombinase RecT, and the gene editing efficiency was the highest after continuous culture for 24 h and passage 3 times, reaching 16.67%. At the same time, the recombination substrate is knocked in in the form of fragments, and found that random integration events occur in *B. licheniformis* in the process.

(4) Application of recombination system. The recombination system was used to knock out the alkaline protease *aprE* gene and the key gene in the phosphotransferase system of *B. licheniformis*, the alkaline protease *aprE* gene was successfully knocked out and the gene editing efficiency was 12.5%, but the knockout of the key gene in the phosphotransferase system was still difficult.

Key words: *Bacillus licheniformis*; recombinase RecT; homologous recombination; gene editing; rhamnose promoter

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 地衣芽孢杆菌基因编辑技术概述	1
1.1.1 基因编辑技术概述.....	1
1.1.2 地衣芽孢杆菌.....	2
1.1.3 地衣芽孢杆菌基因编辑技术研究进展	2
1.2 重组系统概述.....	3
1.2.1 细菌内源重组系统.....	4
1.2.2 噬菌体重组系统.....	4
1.3 表达调控元件启动子概述	6
1.3.1 启动子简介	6
1.3.2 启动子分类.....	6
1.3.3 鼠李糖启动子.....	7
1.4 立题意义与研究内容.....	8
1.4.1 立题意义.....	8
1.4.2 研究内容.....	8
第二章 材料与amp;方法	9
2.1 实验材料.....	9
2.1.1 菌株和质粒.....	9
2.1.2 培养基.....	10
2.1.3 试剂及试剂盒.....	11
2.1.4 仪器设备	12
2.1.5 引物.....	12
2.2 实验方法.....	14
2.2.1 不同碳源条件下地衣芽孢杆菌的生长	14
2.2.2 鼠李糖基因簇表达水平测定.....	14
2.2.3 鼠李糖含量液相检测.....	14
2.2.4 鼠李糖启动子调控 eGFP 表达质粒的构建	15
2.2.5 重组地衣芽孢杆菌的构建.....	16
2.2.6 荧光强度的检测与计算.....	16
2.2.7 基因编辑质粒的构建.....	16
2.2.8 基因的敲除和敲入.....	17
2.2.9 质粒丢失及抗性标记回收.....	18
2.2.10 菌株酶活力测定.....	18
第三章 结果与amp;讨论	19

3.1 重组酶及其表达元件挖掘	19
3.1.1 噬菌体重组酶的挖掘.....	19
3.1.2 地衣芽孢杆菌鼠李糖操纵子的挖掘.....	20
3.1.3 鼠李糖启动子特性分析.....	23
3.1.4 小结.....	24
3.2 重组系统的构建及其功能验证	24
3.2.1 amyL 基因编辑质粒的构建	24
3.2.2 重组系统的基因编辑策略.....	25
3.2.3 重组酶功能的验证.....	26
3.2.4 质粒丢失及抗性回收.....	28
3.2.5 小结.....	29
3.3 重组系统的优化.....	29
3.3.1 诱导剂添加时间对基因敲除效率的影响	29
3.3.2 诱导剂浓度对基因敲除效率的影响.....	30
3.3.3 细菌培养时间对基因敲除效率的影响	31
3.3.4 传代次数对基因敲除效率的影响.....	32
3.3.5 利用双链 DNA 片段进行基因敲入.....	32
3.3.6 小结.....	35
3.4 重组系统的应用.....	36
3.4.1 aprE 基因的敲除	36
3.4.2 PTS 系统关键基因的敲除.....	38
3.4.3 小结.....	39
主要结论与展望	40
主要结论.....	40
展望.....	41
参考文献.....	42

第一章 绪论

1.1 地衣芽孢杆菌基因编辑技术概述

1.1.1 基因编辑技术概述

随着生物技术的快速发展，人们能做到的不只有获取生物体的遗传信息，而是进一步设想对生物体的基因组序列进行定向改造，使之能具备人们所期望的表型或表达某种特定产物，于是基因编辑技术应运而生。基因编辑技术（Gene editing technology）也称为基因组编辑，用于在目标基因序列中设计特定的修饰，实现特定 DNA 片段的插入、删除，特定 DNA 碱基的缺失、替换等，以实现特定调控元件的序列、目的基因表达量或功能的各种改造^[1]。传统的基因编辑依靠双链断裂（Double-strand breaks, DSBs），它是细胞在自然生长代谢过程中面对外界某些不利因素如紫外线或氧化应激等所产生的 DNA 损伤现象^[2]。一旦基因组产生双链断裂，细胞会利用其自身特有的机制修复病变，主要使用非同源末端连接（Non-homologous end-joining, NHEJ）或同源重组（Homologous recombination, HR）的方式进行修复避免细胞死亡^[3]。因此自然、物理或化学诱变和随机插入转基因 DNA 是用于在目标细胞内产生突变的经典方法。

然而，因为双链断裂的随机性，这些方法都不能在特定的期望位点上实现基因编辑，并且效率低、投入大。因此衍生出利用特殊工程核酸酶在基因组的特定位置引入双链断裂，再通过修复机制实现基因组的定向改造，以实现代谢途径的改造、某些基因的生物学功能验证或外源基因的整合表达等^[4]。近年来，多种特殊工程核酸酶被发掘并研究，随之发展的基因编辑工具主要有锌指核酸酶（Zinc Finger Nucleases, ZFNs）技术、转录激活因子样效应物核酸酶（Transcriptional Activator Effector Nucleases, TALENs）技术和 CRISPR（成簇的规律间隔短回文重复序列，Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats）系统^[5]。然而，ZFN 技术和 TALEN 技术都存在结构复杂、目标识别率低、成本高、脱靶概率高等问题，而且这两代技术主要用于研究转基因动植物，较少地应用于细菌等微生物领域。CRISPR/Cas 系统源自细菌中的适应性免疫系统，目前应用最广泛的 CRISPR 系统是 II 型 CRISPR/Cas9 系统^[6]。Cas9 是一种与 sgRNA 结合的核酸酶，它通过 sgRNA 中存在的 20 bp 核苷酸序列激活并将 Cas9 靶向到特定的基因组位点（Protospacer Adjacent Motif, PAM 位点），Cas9 随之开展 PAM 位点附近的剪切，产生 DNA 双链断裂^[7,8]。随后，细胞通过自身损伤修复机制避免死亡。CRISPR/Cas9 系统自被发现以来，因其低成本、简便性和高效性，使其在动植物和微生物领域都有非常广泛的应用^[9]。

1.1.2 地衣芽孢杆菌

地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 是一种革兰氏阳性兼性厌氧菌, 在高温、酸碱和干燥等极端的条件下能产生抗逆性内生孢子^[10]。地衣芽孢杆菌菌株在自然界中广泛分布, 常见于大多数的沼泽地、沙漠等贫瘠的土壤; 谷物等天然农产品以及动物肠道等环境中^[11]。地衣芽孢杆菌具有耐高温、适中的生长速率、完整的蛋白结构、丰富的酶系和高产酶量等诸多优良特性。地衣芽孢杆菌可在较高温度 40-50°C 中生长, 并且生长过程中能分泌细菌素抑制其他微生物的生长^[12]; 适中的生长速率使得跨膜过程中的蛋白质可以充分折叠; 丰富的酶系使其自身能够合成诸多胞外酶如蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶等。地衣芽孢杆菌分泌胞外蛋白的能力较强, 是工业常用菌株枯草芽孢杆菌胞外蛋白分泌量的两倍^[13]。除了生产多种酶类, 地衣芽孢杆菌也被广泛应用于工业中生产有机酸及多聚氨基酸如柠檬酸、肌苷酸和聚谷氨酸^[14]。此外, 地衣芽孢杆菌在 40 多年前即被认定为食品安全级菌株 (Generally Recognized As Safe, GRAS), 是一种非常安全的宿主菌, 可用于生产无毒无害的工业产品^[15]。

由于地衣芽孢杆菌的诸多优良特性和巨大工业潜力, 使其在畜牧业、农业、食品、生物等领域均有重要应用^[16]。在畜牧业中, 地衣芽孢杆菌被广泛用作益生菌, 其通过降低 pH 值和改善肠道屏障功能来调节肠道菌群环境, 达到刺激动物食欲、促进消化、增加营养物质的保留和吸收的效果^[17]。在农业生产中, 地衣芽孢杆菌可以对土壤中的金属污染物如镍和汞等进行吸收、降解和固定, 促进水稻和小麦等农作物的生长; 一些地衣芽孢杆菌分离物可以降低农作物感染真菌的风险^[18, 19]。在食品行业, 地衣芽孢杆菌与酿酒酵母可以联合使用以生产传统发酵食品^[20, 21]; 同时在白酒风味物质的形成过程地衣芽孢杆菌也能发挥积极的作用^[22]。在生物方面, 地衣芽孢杆菌具有丰富的次级代谢产物和胞外抗真菌、抗菌物质, 并且表现出优异的广谱抗菌活性^[23, 24]。特定的地衣芽孢杆菌可用于生产多肽类抗生素和抗真菌蛋白等, 其中地衣素 (lichenin) 和杆菌素 (bacillocin) 等物质具有广泛的应用前景^[25, 26]。

1.1.3 地衣芽孢杆菌基因编辑技术研究进展

地衣芽孢杆菌在各领域广泛的实际应用基于对其进行的理性改造, 包括对地衣芽孢杆菌的基因组进行编辑或者对代谢途径进行改造。目前在地衣芽孢杆菌中所应用的基因编辑策略主要有以下三个方面。

首先出现的基因编辑策略是从温敏型质粒出发, 以其为载体构建携带基因敲除盒的质粒, 利用该敲除质粒在细胞中介导同源双交换来失活目标基因^[27]。Nahrstedt 等人首次利用温敏质粒的策略, 以温敏质粒 pE194 为载体构建敲除质粒, 成功地敲除了地衣芽孢杆菌内的芽孢形成基因 *spoIV* 和 DNA 修复相关基因 *recA*^[28]。Wang 等人从温敏质粒 pGK12 出发构建敲除质粒, 通过不同温度下两次同源交换机制成功地获得了不残留抗性标记的 *ldh* 基因缺失突变菌株^[29]。李宗文等人从温敏质粒 PNZT1 出发构建敲除质粒,

成功失活了 α -淀粉酶基因 *amyL* 和碱性蛋白酶基因 *aprE*，后续通过 FLP/FRT 重组酶删除用作筛选的抗性标记基因^[30]。Zhou 团队从温敏质粒 pKSVT 出发构建敲除质粒，同时以 *upp* 基因作为反选标记，成功实现了地衣芽孢杆菌 2709 基因组中与起泡相关的原生 *lchAC* 基因的敲除和失活了编码胞外粘多糖基因簇中的关键基因 *esa*^[31]。温敏质粒技术可以将基因敲除分为两个独立的步骤：转化和重组，首先提高了遗传转化效率，因此可以有效地避免因为转化子数量不足而导致敲除困难的问题。使用温度敏感载体构建基因敲除质粒是基于这样一个事实，即敲除盒和靶基因之间的碰撞概率增加了敲除盒与靶基因之间同源重组的机会。这是因为敲除盒连接到穿梭质粒后，每个转化的细菌内都会含有几个拷贝的敲除质粒，并且敲除质粒也存在于之后繁殖的细菌体内，庞大的细菌数使得同源重组的发生不可避免^[32]。温度敏感载体使得细菌中敲除质粒的存在与否可人为控制，极大地提高了后续筛选基因敲除菌株的效率。

另外，也有从线性 DNA 出发，直接将敲除盒片段电转化到地衣芽孢杆菌细胞中，依赖细菌自身的同源重组机制敲除内源靶基因的策略。范如意通过将线性 DNA 直接电转化到地衣芽孢杆菌细胞中，依靠细菌自身重组机制实现同源重组成功获得了淀粉酶基因与碱性蛋白酶基因双基因敲除菌株^[33]。刘冰南也直接利用敲除盒片段同源替换目标基因，成功敲除了地衣芽孢杆菌基因组中的 *bglC* 基因和 *bglH* 基因^[34]。然而，线性 DNA 片段的转化效率很低，并且在电转化过程中会出现筛选标记的随机插入，以致出现大量的假阳性，于是只能通过大量的重复实验加上原始的筛选方式获得阳性转化子，很大程度上降低了基因编辑的效率。

随着 CRISPR/Cas9 系统的飞速发展，利用该系统在地衣芽孢杆菌中所开发的基因编辑策略也被证实是行之有效的。李由然等人利用由木糖严格控制的 CRISPR/Cas9 系统成功使地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因失活。其将 Cas9 蛋白表达框、sgRNA 和同源修复片段构建在同一个质粒 pHY300-PLK 上，通过木糖诱导型启动子控制 Cas9 蛋白的表达，实现目的基因的剪切^[35]。随后依靠细菌的修复机制利用所提供的同源修复片段实现基因的敲除。华中农业大学陈守文团队则是利用 Cas9 的蛋白突变体 CRISPR/cas9n 系统实现了基因编辑。将 Cas9n 蛋白表达盒整合到了地衣芽孢杆菌基因组上后，实现了敲除基因 *yvmC*、大片段 *bacABC*；并且将外源基因 *aprN* 插入到地衣芽孢杆菌染色体^[36]。可见 CRISPR 系统是地衣芽孢杆菌定向改造过程中的一个极具潜力的基因编辑工具^[37]。但是 Cas9 蛋白的编码基因长达 4 kb，携带 Cas9 蛋白编码基因的质粒常因体积过大难以转化至地衣芽孢杆菌中，降低了质粒转化效率。而将 Cas9n 蛋白表达盒整合到基因组上以减小质粒体积的操作，也存在整合过程费时费力的情况^[38]。

1.2 重组系统概述

无论是现存的基因编辑技术或是在地衣芽孢杆菌中成功应用的基因编辑策略，其原理都是细胞自身双链断裂或利用核酸工程酶剪切基因组产生双链断裂后，再依靠细菌自

身的修复机制避免细胞死亡，同时实现特定基因片段的敲除或整合。真核生物主要进行非同源末端连接直接修复断裂，而大多数原核生物包括地衣芽孢杆菌产生断裂后则主要利用同源序列模板通过同源重组系统进行修复。同源重组在噬菌体、细菌、真核生物和古生菌中无处不在。随着分子生物学和基因组学的飞速进步，越来越多的同源重组系统已经被揭示出来，而其中的重组机理也变得更加清晰明了^[39]。

1.2.1 细菌内源重组系统

RecA 重组系统是最先被发现的细菌内源性重组系统，来源于大肠杆菌，在 1965 年通过筛选重组功能缺陷的突变体时被发现。该系统由 RecA 蛋白和具有相关辅助功能的一系列蛋白 RecBCD、RecFOR 等共同催化^[40]。当同源重组机制启动时，RecA 蛋白会沿着从 5'到 3'的方向通过右手螺旋的形式与双链断裂处的一条 DNA 链相结合，形成 RecA-DNA 纤维细丝结构，且随着 RecA 蛋白单体的增加纤维细丝结构不断延长^[41]。RecA 蛋白在该结构的协助下进行全基因组搜索，寻找双链 DNA 中的同源片段作为修复断裂的元件。发现同源的 DNA 序列后，两同源片段根据碱基互补配对原则形成 Holliday 交叉结构，同源重组伴随着 ATP 的水解作用而进行，最终双链断裂修复并产生异源双链 DNA 分子。ATP 水解同样会促进链交换完成后 RecA-DNA 纤维细丝结构的分解^[42, 43]。

辅助蛋白的存在则是组成复杂的复合体参与重组，使重组更加精确稳定地按照细胞的需求进行。辅助蛋白 RecBCD 具有 DNA 解旋酶和 ATP 依赖性的核酸外切酶功能，它结合在 DNA 双链断裂的切口处，沿着 DNA 链 5'到 3'的方向进行切割，暴露 DNA 单链以便 RecA 蛋白的结合^[44]。RecBCD 主要存在于双链断裂修复 (Double-strand break repair, DSBR) 中，而 RecFOR 蛋白则主要存在于单链间隙修复 (Single-strand gap repair, SSGR) 中。在大肠杆菌中，单链结合蛋白 (Single-stranded DNA-binding protein, SSB) 会包裹并稳定单链 DNA，这样的竞争性结合会抑制 RecA-DNA 纤维细丝的形成。于是，辅助蛋白 RecFOR 蛋白便负责移除单链 DNA 上结合的 SSB，协助 RecA 蛋白与 DNA 单链的结合^[45]。可见细菌内源重组机制是一个极其复杂的过程，它通过内源重组酶来重组相似的基因组，从而形成新的基因个体，这对于保持生物的遗传多样性和推动其进化至关重要。

1.2.2 噬菌体重组系统

然而，细菌内源重组系统普遍存在重组效率低的情况，于是研究人员采用向细菌内引入异源重组系统即噬菌体同源重组系统的策略，基于噬菌体同源重组系统的遗传改造工具逐渐被开发出来，并且可显著提高细菌的重组效率^[46]。

噬菌体是感染细菌细胞并利用宿主细胞机制产生子代的病毒，分为两大类：“烈性”和“温和”。在感染敏感的宿主细胞后，烈性噬菌体立即利用宿主细胞的分子机制进行自我繁殖，在杀死被感染的细胞后释放数千个新的噬菌体颗粒到环境中。温和噬菌体则具备一种特殊机制即溶源性，这是一种潜伏状态，噬菌体的遗传物质会整合到宿主细胞的基因组上被动复制，成为前噬菌体^[47, 48]。前噬菌体编码的同源重组酶在细菌的生长繁殖

和进化中以特有的机制发挥着重要的作用，称为噬菌体同源重组系统^[49]。在目前的噬菌体同源重组系统中，RecET 重组系统能够较大规模地实现基因组的直接克隆，是目前进行微生物定向遗传改造的重要技术之一。

1.2.2.1 RecET 重组酶

RecET 重组系统由研究人员 1998 年在大肠杆菌的 Rac 前噬菌体中发现，由具有同源重组功能的重组酶 RecE 和 RecT 组成^[50]。重组酶 RecE 由 866 个氨基酸组成，蛋白分子大小为 96.4 kD^[51]。RecE 被定义为 ExoVIII DNA 核酸外切酶，因为它可以与双链 DNA 的断裂末端结合，并沿着 5'到 3'的方向快速地切割双链，形成 3'单链突出端^[52]。重组酶 RecT 分子量为 29.7 kD，是一种单链 DNA 退火蛋白。它既可以与单链 DNA 结合，也可以与双链 DNA 稳定地结合，介导同源的单链 DNA 或者是双链 DNA 的线性同源末端入侵超螺旋 DNA^[53]。

1.2.2.2 RecET 重组酶作用机制

RecET 重组酶的具体重组机制为：首先具有核酸外切酶活性的 RecE 从双链 DNA 分子的断裂末端沿着 5'到 3'的方向从 5'端进行切割，使双链 DNA 产生 3'单链突出端，或者直接将较短的双链 DNA 底物从 5'端开始切割，降解为单链 DNA。随后，单链 DNA 退火蛋白 RecT 会结合在被降解的 3'单链突出端或者较短的单链 DNA 上，形成牢固的复合物，有效地阻止了单链 DNA 的分解。同时在该 RecT-DNA 复合物的协助下 RecT 开始进行全基因组搜索，寻找双链 DNA 中的同源片段作为修复断裂的元件，发现同源的 DNA 序列后，两同源片段根据碱基互补配对原则形成 Holliday 交叉结构，最终实现 DNA 的同源重组并修复断裂^[54]。

1.2.2.3 RecT 重组酶的应用

值得注意的是，在 RecET 重组系统中，RecT 的过表达可以更显著地提高同源重组效率，这说明 RecT 是系统中起主要作用的酶^[55]。基于 RecT 家族蛋白的重组技术已经很好地建立起来，并已被用于在基因组水平上开发先进的菌株工程策略^[56]，在大肠杆菌中，Wang 等人基于 RecT 家族蛋白，构建了用于大规模编程和细胞进化的多重自动化基因组工程，针对染色体上的许多位置进行单个细胞或跨细胞群的修饰，从而产生多样性组合基因组^[57]。此外，耻垢分枝杆菌、结核分枝杆菌、罗伊氏乳杆菌、乳酸乳球菌和丁香假单胞菌中相关的重组技术也均得到了实际的应用^[58]。除了以上报道的许多革兰氏阴性细菌，某些革兰氏阳性细菌也被验证在 RecT 家族重组酶介导下的基因编辑方法是有效的。重组酶 GP35 在枯草芽孢杆菌中将单链 DNA 片段重组效率提高到 1.71×10^{-1} ；显著提高了其重组效率^[59]。重组酶 Beta 结合 Cre-lox 所构建的系统可用于枯草芽孢杆菌的多个基因组修饰^[60]。可见，基于噬菌体的重组技术在细菌中进行基因工程、基因组操纵、载体学以及细胞治疗方面的开发应用是非常具有前景的研究领域。

但是，重组酶并没有进化到具有优化的活性，而是在不同的代谢过程和基因组稳定

性之间保持平衡。事实上，重组基因的过度活性会对细胞产生有害影响，不受控制的重组会干扰其他生物过程，甚至会导致基因组片段的异常消除进而引起遗传损伤^[61]。简单来说，重组酶在细胞中的表达是具有弱毒性的。因此，一个合适的重组酶表达元件是非常必要的。

1.3 表达调控元件启动子概述

1.3.1 启动子简介

从基因表达调控到代谢工程的改造应用都依赖于有效启动子的发现和表征^[62]。启动子是位于相对转录单元上游的特殊 DNA 序列，具有募集 RNA 聚合酶启动转录过程的功能。启动子的结构、稳定性、可弯曲性以及 RNA 聚合酶的亲和性很大程度上影响着最终的基因表达^[63]。在大肠杆菌等原核生物中，启动子的一致结构包括-35 区（TTGACA）和-10 区（TATAAT），中间由间隔区分开，两边也是可变的区域^[64]。启动子中的一致序列在转录中起着重要作用，RNA 聚合酶会识别-35 区的序列，然后弯曲-10 区以松解双链并启动转录。在整个转录过程中，双链 DNA 的裂解是瓶颈步骤^[65]。

真核启动子比原核启动子更复杂。在真核生物中，有三种 RNA 聚合酶调节基因表达。聚合酶 I 调节核糖体 RNA 前体的表达、聚合酶 II 调节蛋白质编码基因和一些小核 RNA（snRNA）基因的表达、聚合酶 III 调节 5S 和 tRNA 基因的表达^[66]。被 RNA 聚合酶 II 识别的启动子是最常见的形式，可以分为两部分：核心元件和上游增强子元件^[67]。核心元件是启动转录的区域，上游增强子元件具有与转录因子（Transcription factors, TFs）结合的功能，以实现多种启动子功能。不同基因的核心元件结构可能有很大不同，一些常见的保守结构包含在核心元件中，如 TATA 区（共识 TATAAA）、启动元件和转录因子 IIB（Transcription factors IIB, TFIIB）识别元件^[68]。真核生物启动子的上游增强子元件包含各种转录因子，它们募集激活子或抑制子以协助下游基因表达^[69]。

1.3.2 启动子分类

根据转录水平的控制强度，启动子可以分为强启动子和弱启动子。而参照转录开启的模式，启动子又可以分为三大类：组成型启动子、诱导型启动子和自诱导型启动子。组成型启动子在不需要经过诱导的情况下就可以驱动基因的持续表达，并且可以调控结构基因的表达维持在一定的水平上，不容易受到时间、空间和外界环境因素的影响。因此，其也被称为非特异性表达启动子^[70]。

典型的组成型启动子有 T7 启动子、P43 启动子等。但是，组成型启动子不能人为控制基因的表达量，不适合用于表达对于宿主细胞具有毒性的相关基因^[71]。诱导型启动子是指在某种特定的刺激下，开始调控基因开启转录的一类启动子。这种刺激可以是物理方面的条件变化，比如热诱导、光诱导等，也可以是化学信号的刺激，比如微生物发酵过程中常常添加一些化学诱导剂，进行启动子的诱导以提高目的基因的转录水平^[72]。

常用的诱导型启动子有受 IPTG (异丙基硫代半乳糖苷, Isopropyl β -D-Thiogalactoside) 诱导的启动子 P_{spac} 和 P_{grac} 、受木糖诱导的启动子 P_{xyI} 等^[73]。诱导型启动子也有它们的不足之处, IPTG 等化学诱导剂具有毒性, 不可在食品发酵工业中使用; 有的诱导型启动子在发酵过程中会受到竞争性发酵底物的抑制, 从而影响目的基因的正常表达水平。比如木糖诱导启动子会受到葡萄糖碳源的抑制^[74]。自诱导型启动子是一类不添加诱导剂, 在特定的条件下由自诱导因子调控开启基因转录的启动子, 这类启动子有启动子 P_{srfA} 和 P_{ble} 等^[75, 76]。

目前地衣芽孢杆菌表达外源蛋白时应用比较广泛的组成型启动子有 P_{43} 、 $P_{\text{shuttle09}}$ 。但是组成型启动子不可以用于毒性蛋白的表达。诱导型启动子有甘露醇诱导型启动子 P_{mtlA} 和木糖诱导型启动子 P_{xyI} ^[70], 但是它们都具有相应的缺点。启动子 P_{mtlA} 是以甘露醇作为诱导剂的启动子, 在地衣芽孢杆菌电转化恢复培养的过程中, 因复苏培养基中含有甘露醇成分, 此时 P_{mtlA} 便受到诱导致使重组酶基因泄露表达。启动子 P_{xyI} 则是受到葡萄糖的抑制, 并且诱导剂木糖的价格较贵^[74]。于是挖掘一个新的严谨的诱导型启动子来控制重组酶的表达是非常必要的。

1.3.3 鼠李糖启动子

现有研究的表达元件中, 鼠李糖代谢基因的启动子是迄今为止报道的最严格的分解代谢基因的启动子之一。鼠李糖代谢是一个复杂而协调的过程, 涉及多种酶促反应, 相关基因不是随机分布在基因组中, 而是成簇存在, 基因表达受到调控因子的严格调控^[77]。其中大肠杆菌鼠李糖代谢相关基因研究得最为详尽, 大肠杆菌鼠李糖操纵系统基因簇由一个鼠李糖运输蛋白 RhaT, 三个鼠李糖代谢酶: 异构酶 RhaB、激酶 RhaA、醛缩酶 RhaD 以及两个调节蛋白: RhaS、RhaR 编码的基因构成, 它们分工协作控制鼠李糖转运、代谢及调控^[78]。

大肠杆菌内源鼠李糖启动子已被成功应用在大肠杆菌表达系统中, 基于鼠李糖启动子的表达体系和系统优化方式也在不断涌现。Wilms 等人利用大肠杆菌鼠李糖启动子的表达系统高水平表达了外源蛋白 N-氨甲酰氨基酸水解酶, 达到 $3.85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[79]。Wagner 和其他研究者利用鼠李糖启动子, 开发出一种能够有效地抑制噬菌体 T7 RNA 聚合酶 (T7RNAP) 蛋白表达的载体, 通过调节诱导剂鼠李糖的浓度, 可以有效地影响 T7RNAP 的活性, 进而使许多原本无法在大肠杆菌中表达的膜蛋白获得成功的表达^[80]。2012 年, Lucigen 公司以大肠杆菌为宿主菌株, 基于鼠李糖启动子开发了 Expresso Rhamnose 表达系统, 该系统表达强度较弱, 适用于表达易于聚集或弱毒性的蛋白^[81]。此外, 在革兰氏阳性细菌如枯草芽孢杆菌中, Kazutake 等人通过改造及优化枯草芽孢杆菌 rhaEWRBMA 操纵子的调控区 PrhaEW, 在枯草芽孢杆菌中实现了鼠李糖诱导绿色荧光蛋白高效表达^[82]。可见, 利用鼠李糖诱导型启动子开发相应的表达系统可根据需求人为调控目的基因的表达, 在基因功能的表征、高表达系统的构建以及细胞毒性物质的表达调控上均有良好应用。

1.4 立题意义与研究内容

1.4.1 立题意义

地衣芽孢杆菌作为极具工业应用价值和潜力的芽孢杆菌之一，已广泛应用于工业酶生产、食品加工、农业畜牧业、环境污染控制等各个领域，其相关研究和应用层出不穷。然而野生菌株的性能在应用研究方面和实际生产需求中表现出一些不足之处，因此对地衣芽孢杆菌的遗传改造是很有必要的。但是地衣芽孢杆菌具有内源重组效率低这一特点，这给菌种的理性改造带来较大的困难。

目前地衣芽孢杆菌的遗传改造方法有温敏载体敲除法、线性片段敲除法以及 CRISPR/Cas9 系统法。前两种方法依靠细胞自身产生双链断裂，再通过细菌内源重组系统实现目的基因的敲除或整合。CRISPR/Cas9 系统则利用 Cas9 蛋白对靶基因进行剪切产生断裂，随后依靠细菌内源重组机制利用所提供的同源修复片段实现基因的敲除或整合。可见，现存的方法均需要依靠同源重组机制实现基因的编辑，因此提高同源重组效率是现有基因编辑技术成功的关键，而大量研究表明利用噬菌体重组酶提高细菌同源重组效率的方法是行之有效的，目前未报道一种可应用于地衣芽孢杆菌的噬菌体重组系统。

于是本研究拟在现有遗传改造技术的基础上，挖掘芽孢杆菌噬菌体同源重组酶，同时挖掘适用于调控重组酶表达的元件鼠李糖启动子，首次利用鼠李糖启动子在地衣芽孢杆菌内构建噬菌体重组酶条件表达的重组系统，提高地衣芽孢杆菌重组效率进而提高遗传改造效率，为地衣芽孢杆菌提供新的基因编辑方法，拓展地衣芽孢杆菌的遗传改造工具，并且给未来微生物尤其是许多革兰氏阳性细菌包括其他芽孢杆菌菌株的分子研究和理性改造提供了一定的参考。

1.4.2 研究内容

本研究主要内容有如下几个方面：

(1) 通过 NCBI 挖掘芽孢杆菌及其噬菌体来源的 RecT 重组酶，进行氨基酸同源性比对和系统发育进化树的分析。基于地衣芽孢杆菌内源代谢途径分析鼠李糖代谢相关基因，挖掘重组酶表达元件鼠李糖启动子 P_{rha} ，以绿色荧光蛋白作为报告基因，探究不同条件下鼠李糖启动子转录表达特性。

(2) 利用鼠李糖表达元件 P_{rha} 和噬菌体重组酶 RecT 在地衣芽孢杆菌中构建条件表达的重组系统，建立新的基因编辑方法。以 α -淀粉酶基因 *amyL* 为敲除验证基因，鉴定 5 个噬菌体重组酶的重组能力并验证该重组系统的功能。

(3) 考察鼠李糖诱导浓度、添加时间、菌株培养时间、传代次数及底物形式对噬菌体重组系统在地衣芽孢杆菌中基因编辑效率的影响，确定该重组系统的最适操作条件。

(4) 应用该重组系统在地衣芽孢杆菌中敲除碱性蛋白酶 *aprE* 基因、磷酸转移酶系统中的关键基因，进一步考察该系统在地衣芽孢杆菌中进行基因编辑操作的能力和效率。

第二章 材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株和质粒

本研究所使用的主要菌株如表 2-1 所示，质粒如表 2-2 所示。

表 2-1 本研究所用菌株

Tab. 2-1 Strains used in this study

菌株	特性或用途	来源
<i>Escherichia coli</i> JM109	简称 JM109，分子克隆宿主	本实验室
<i>Bacillus licheniformis</i> CICIM B1391	简称 B1391，野生型	本实验室
BLKAK	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391($\Delta amyL::kan$)	本研究构建
BLKA	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391($\Delta amyL$)	本研究构建
BLKE	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391($\Delta aprE$)	本研究构建
BLPE	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391 带有重组质粒 pHY300-P _{rha} -eGFP	本研究构建
BLA	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391 带有重组质粒 pKA	本研究构建
BLAR	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391 带有重组质粒 pKAR1	本研究构建
BLAR2	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391 带有重组质粒 pKAR2	本研究构建
BLAR3	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391 带有重组质粒 pKAR3	本研究构建
BLAR4	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391 带有重组质粒 pKAR4	本研究构建
BLAR5	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391 带有重组质粒 pKAR5	本研究构建
BLRB	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391 带有重组质粒 pRB	本研究构建
BLER	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391 带有重组质粒 pKER	本研究构建
BLPR	<i>B. licheniformis</i> CICIM B1391 带有重组质粒 pKPR	本研究构建

表 2-2 本研究所用质粒

Tab. 2-2 Plasmids used in this study

质粒	特性或用途	来源
pHY300-PLK	大肠杆菌/枯草芽孢杆菌穿梭载体,氨苄/四环素	本实验室
pNZTT-AFKF	<i>amyL</i> 敲除质粒, pNZTT 携带 <i>amyL</i> 基因敲除盒	本实验室
pNZTT-EFKF	<i>aprE</i> 敲除质粒, pNZTT 携带 <i>aprE</i> 基因敲除盒	本实验室
pHY300-P2- <i>eGFP</i>	含有 P2 的 pHY300-PLK-- <i>eGFP</i> 载体	本实验室
pHY300-P _{rha} - <i>eGFP</i>	含有 P _{rha} 的 pHY300-PLK-- <i>eGFP</i> 载体	本研究构建
pKA	pHY-PLK300, 带有 <i>amyL</i> 敲除盒	本研究构建
pKAR1	pKA, 带有重组酶 BPR1 表达盒	本研究构建
pKAR2	pKA, 带有重组酶 BPR2 表达盒	本研究构建
pKAR3	pKA, 带有重组酶 BPR3 表达盒	本研究构建
pKAR4	pKA, 带有重组酶 BPR4 表达盒	本研究构建
pKAR5	pKA, 带有重组酶 BPR5 表达盒	本研究构建
pRB	pHY-PLK300, 带有重组酶 BPR1 表达盒	本研究构建
pMD19-T simple vector	大肠杆菌克隆载体	本实验室
pSGT	pHY-PLK300, 带有果糖异构酶表达盒	本实验室
T-KG	pMD19-T, 带有果糖异构酶敲入盒	本研究构建
pKER	pHY-PLK300, 带有 <i>aprE</i> 敲除盒和重组酶 BPR1 表达盒	本研究构建
pKPR	pHY-PLK300, 带有 PTS 敲除盒和重组酶 BPR1 表达盒	本研究构建

2.1.2 培养基

大肠杆菌和地衣芽孢杆菌生长用培养基见表 2-3, 发酵培养基见表 2-4; 地衣芽孢杆菌电转化用洗涤缓冲液见表 2-5; 抗生素添加终浓度见表 2-6。

表 2-3 LB 培养基

Tab. 2-3 Luria-Bertani medium

试剂	用量 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	来源
NaCl	10	国药集团化学试剂有限公司
蛋白胨	10	Oxoid 公司
酵母粉	5	

LBR 培养基: 上述 LB 培养基中添加终浓度为 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 鼠李糖。

LBG 培养基: 上述 LB 培养基中添加终浓度为 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖。

培养基I: LB 培养基加 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨醇。

恢复培养基 BR: LB 培养基加 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 山梨醇, $0.38 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇。

表 2-4 TB 培养基

Tab. 2-4 Terrific Broth medium

试剂	用量 (g·L ⁻¹)	来源
蛋白胨	10	Oxoid 公司
酵母粉	5	
NaCl	10	国药集团化学试剂有限公司
K ₂ HPO ₄	12.54	
KH ₂ PO ₄	2.3	
甘油	5	

表 2-5 洗涤缓冲液 BW

Tab. 2-5 Washing buffer BW

试剂	终浓度	来源
山梨醇	0.5 mol·L ⁻¹	上海源叶生物科技有限公司
甘露醇	0.5 mol·L ⁻¹	
甘油	10%	国药集团化学试剂有限公司

表 2-6 抗生素终浓度

Tab. 2-6 Antibiotic final concentration

抗生素	终浓度 (μg·mL ⁻¹)	来源
氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp)	100	Thermo Fisher Scientific 公司
卡那霉素 (Kanamycin, Kan)	30	
四环素 (Tetracycline, Tet)	20	

2.1.3 试剂及试剂盒

本研究所用试剂及试剂盒见表 2-7。

表 2-7 试剂及试剂盒

Tab. 2-7 Reagents and kits

试剂及试剂盒	来源
2× <i>Phanta</i> Max Master Mix	南京诺维赞生物科技股份有限公司
质粒 DNA 提取试剂盒	
DNA 纯化试剂盒	
一步克隆连接试剂盒	
2× <i>Taq</i> PCR Master Mix	杭州宝赛生物科技有限公司
快速限制性内切酶	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
T4 DNA 连接酶	

续表 2-7

试剂及试剂盒	来源
BioFlux SimplyP 总 RNA 提取试剂盒	北京博迈斯生物科技有限公司
DNA Marker	宝生物工程（大连）有限公司

2.1.4 仪器设备

本研究所使用的主要仪器设备及厂家情况见表 2-8。

表 2-8 仪器和厂家情况

Tab. 2-8 Instruments and manufactures

仪器	厂家
BSP-150 恒温培养箱	上海博讯实业有限公司
HYL-C 型组合式摇床	太仓市实验设备厂
全自动高压蒸汽灭菌锅	日本 SANYO 公司
超净工作台	大连宝生物工程有限公司
V-1200 可见分光光度计	上海美谱达仪器有限公司
紫外分光光度计 (UV-1200)	上海美谱达仪器有限公司
S100D 型 PCR 仪	美国 BIO-RAD 公司
DYY-6C 核酸电泳仪	北京六一厂
Chemi Doc XRS ⁺ 型凝胶成像仪	美国 BIO-RAD 公司
恒温金属浴	上海一恒科技有限公司
PICO17 型高速离心机	美国 Thermo 公司
CF16RX II型冷冻离心机	日本 HITACHI 公司
SPARK 多功能酶标仪	上海帝肯贸易有限公司
FiveEasy Plus pH 计	梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司
CF×96 实时荧光定量基因扩增仪	美国 BIO-RAD 公司
超声波清洗仪	宁波新枝生物科技股份有限公司

2.1.5 引物

本研究所用的引物如表 2-9 所示，引物设计使用 SnapGene 软件。引物的合成及 DNA 测序由公司完成。

表 2-9 本研究 DNA 片段扩增所用引物

Tab. 2-9 Primers used in DNA fragment amplification in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')
P _{rha} -eGFP-F	AAAACGCTTTGCCCAAGCTTTCCTGACCCCTCCTTTTAAAAACATGAG
P _{rha} -eGFP-R	ACCATGGATCCGCGACCCATACGTATCACTCCGTTTTTGTGTTT

续表 2-9

引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>amyL</i> -EcoR I-R	GAATTCGGATCCGCCGTTTACGTGAA
<i>P_{rha}</i> -EcoR I-F	GAATTCTCCTGACCCCTCCTTTTAAAAAACAT
<i>P_{rha}</i> -R-1	TTTTTTCGTCGCCATACGTATCACTCCGTTTTTGTGTTT
BPR1-F	AACGGAGTGATACGTATGGCGACGAAAAACAAGAAGAAC
BPR1-EcoR I-R	GAATTCCTTATTCGTTGGTTTCGCCGC
<i>P_{rha}</i> -R-2	CCGGCCCGTATCCATACGTATCACTCCGTTTTTGTGTTT
BPR2-F	AACGGAGTGATACGTATGGACACCGGCAGGAAG
BPR2-EcoR I-R	GAATTCCTCGTTGGTCTCGCCGC
<i>P_{rha}</i> -R-3	TTTTTTCGTCGTCATACGTATCACTCCGTTTTTGTGTTT
BPR3-F	AACGGAGTGATACGTATGACCACCAAGAAGCAGAGC
BPR3-EcoR I-R	GAATTCCTCGTTGTCCTTCACCTCCAG
<i>P_{rha}</i> -R-4	TTCGTTTTTCGCCATACGTATCACTCCGTTTTTGTGTTT
BPR4-F	AACGGAGTGATACGTATGGCCACCGAGAAGCAG
BPR4-EcoR I-R	GAATTCCTGCTCGTCCACCACCTC
<i>P_{rha}</i> -R-5	TTTTTCCGTCGCCATACGTATCACTCCGTTTTTGTGTTT
BPR5-F	AACGGAGTGATACGTATGGCCAAGAACGAGGACATCA
BPR5-EcoR I-R	GAATTCGTCGAAGGGCAGGTCGTC
<i>amyL</i> -YZ-F	CAGAAGCGGCGGAAGAGATT
<i>amyL</i> -YZ-R	ACGTTGCCATTTTCATCCCG
<i>Kpn</i> I-GT-F	GGTACCAGTTTATGTATAGATATTTTCGAATATTTAAC
<i>Kpn</i> I-GT-R	GGTACCGGGTAAAAACCATTCACTCTAAATAAATCCT
Kan-F	GTGAATGGACCAATAATAATGACTAGAGAA
Kan-R	AAATGGTATGCGTTTTGACACATCCAC
PKR- <i>Sma</i> I-R	CCCGGGTCCTGACCCCTCCTTTTAAAAAACATG
PKR- <i>Xho</i> I-R	CTCGAGGGGCAAAGCGTTTTTCCATAGG
<i>aprE</i> -F	CTCGAGAATGCATATGCAAAGGGGTTGTC
<i>aprE</i> -R	CCCGGGTACACCCGTTGTATTGTCAAGC
<i>aprE</i> -YZ-F	ATGCAGCGGTTTCGACGTTTCAAG
<i>aprE</i> -YZ-R	CAGGCTGAAGCGGTCTATTTCATAC
<i>BamH</i> I-PTS-F	GGATCCACAACGGAACACGAGCGG
PK-R	CGGAATAGGAACCTTCTCACAGACCTCCTCAAAAAATTGC
PKP-F	GAGGAGGTCTGTGAAGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTAT
PKP-R	TCTTTCAGGAGGCAGAAGTTCCTATACTTCTAGAGAATAGGAACTTCG

续表 2-9

引物名称	引物序列 (5'→3')
KP-F	AAGTATAGGAACCTTCTGCCTCCTGCAAAGAACCTC
<i>EcoR</i> I-PTS-R	GAATTCTAATCCCTTTTCTTCAGCGGCGTGAA
PTS-YZ-F	TACGTATGCTTCCGAGCCCC
PTS-YZ-R	GGCCGCCCCGAGTTTTTCATTG
<i>yuxG</i> -F	GCGATGTCGGCGGGATAAAT
<i>yuxG</i> -R	ATCCGCGTGAATTCAGTGCT
<i>yulC</i> -F	GCCTCCCACGCTTCTGTATCT
<i>yulC</i> -R	CACGGCGAATGTACTGGCCA
<i>yulB</i> -F	CCGACGATCGTGATGGTCTCT
<i>yulB</i> -R	ACGGATGATCGAGATTGCGGA
<i>rpsE</i> -F	TGGTCGTCGTTTCCGCTTCG
<i>rpsE</i> -R	TCGCTTCTGGTACTTCTTGTGCTT

2.2 实验方法

2.2.1 不同碳源条件下地衣芽孢杆菌的生长

将地衣芽孢杆菌种子液按 1% 体积比分别接种到添加不同碳源的 30 mL LB 液体培养基中，鼠李糖、葡萄糖、木糖、山梨醇、甘露醇的添加终浓度均为 2%，置于 37°C 摇床培养，连续取样测量不同碳源培养基中地衣芽孢杆菌的 OD₆₀₀，监测细菌生物量状况。

2.2.2 鼠李糖基因簇表达水平测定

使用试剂盒提取目标菌株总 RNA，提取出来的 RNA 中可能残存的基因组 DNA，利用反转录试剂 gDNA Eraser 进行消除。反转录 cDNA 后测定浓度，浓度约 100 ng·μL⁻¹ 左右时最佳。以 cDNA 为模板，内参基因选择基因 *rspE*，测定目的基因 *yuxG*，*yulC*，*yulB* 的转录特性。之后通过荧光定量 PCR 仪进行 qPCR，检测系统为 CFX96。qPCR 的具体条件是 95°C、30 s 进行 1 次循环，95°C、5 s→60°C、30 s 的程序进行 39 次循环。qPCR 后数据采用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算^[94]，分析 3 个鼠李糖特征基因的相对表达量。

2.2.3 鼠李糖含量液相检测

取重组菌株发酵液 300 μL，12000 rpm 离心 1 min。取 200 μL 上清液加入等体积的 10% 三氯乙酸溶液 4°C 反应 1 h，12000 rpm 离心 20 min 后取上清液用有机膜过滤。色谱柱采用 Dikma CarboPac H⁺ 糖柱，以 0.5% 的稀硫酸为流动相，流速为 0.80 mL·min⁻¹，柱温 50°C。

2.2.4 鼠李糖启动子调控 *eGFP* 表达质粒的构建

以 *B. licheniformis* CICIM B1391 为模板, 使用引物 P_{rha-eGFP-F} 和 P_{rha-eGFP-R} 通过 PCR 技术扩增鼠李糖启动子片段, 然后采用 DNA 纯化试剂盒进行纯化。PCR 扩增具体体系 (100 μ L) 见表 2-10; 扩增条件见表 2-11, 其中变性至延伸进行 30 次循环。

从本实验室质粒 pHY300-P2-*eGFP* 出发, 利用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xho* I 切除质粒上启动子 P2 的基因片段, 胶回收纯化之后得到线性化的 pHY300-*eGFP* 载体。鼠李糖启动子片段通过一步克隆连接酶同源重组连接至线性化载体 pHY300-*eGFP* 上, 连接反应的体系、反应条件和具体操作参照一步克隆试剂盒说明书。连接产物转化至 *E. coli* JM109 感受态, 涂布 Amp 抗性平板, 37°C 培养至长出单菌落后菌落 PCR 验证。菌落 PCR 的体系 (100 μ L) 见表 2-12, 菌落 PCR 的条件见表 2-13, 其中变性至延伸进行 25 次循环。

菌落 PCR 后挑取阳性转化子接种到 15 mL LB 培养基培养 12 h 左右后提取质粒, 测序结果正确后即得到 *eGFP* 表达质粒 pHY300-P_{rha-eGFP}。

相关分子生物学操作如质粒提取、PCR 产物纯化、酶切操作、核酸凝胶回收等一律参照试剂相关试剂或试剂盒所携带的说明书操作。

表 2-10 PCR 扩增体系

Tab. 2-10 The system of PCR amplification

试剂	用量 (μ L)
模板	1
上游引物	2
下游引物	2
2 \times Phanta Max Master Mix (Dye Plus)	50
dd H ₂ O	45

表 2-11 PCR 扩增条件

Tab. 2-11 The condition of PCR amplification

程序	温度 ($^{\circ}$ C)	时间
预变性	95	3 min
变性	95	15 s
退火	55	15 s
延伸	72	60 s/1000 bp
再延伸	72	5 min

表 2-12 菌落 PCR 扩增体系

Tab. 2-12 The system of colony PCR amplification

试剂	用量 (μL)
模板	-
上游引物	2
下游引物	2
2×Rapid <i>Taq</i> Master Mix	50
dd H ₂ O	45

表 2-13 菌落 PCR 扩增条件

Tab. 2-13 The condition of colony PCR amplification

程序	温度	时间
预变性	95	5 min
变性	95	30 s
退火	55	30 s
延伸	72	30 s/1000 bp
再延伸	72	10 min

2.2.5 重组地衣芽孢杆菌的构建

重组质粒通过电转化的方式导入地衣芽孢杆菌感受态细胞（地衣芽孢杆菌感受态细胞的制作参照赵鑫馨^[70]的实验方法）。电转化操作为将 8-10 μL 重组质粒加入 1.5 mL 离心管中所保存的感受态内，然后吸取感受态与质粒混合液转移到电转杯中，冰浴 3-5 min。电转化仪设置 1800-2100 V 的电压，电击感受态一次，电击后立即加入 800-900 μL 的复苏培养基 BR，37°C、200 rpm 复苏培养 3 h，然后涂布 Tet 抗性的固体 LB 平板，37°C 的条件下培养至长出单菌落。菌落 PCR 验证正确后的阳性转化子，即为重组地衣芽孢杆菌。

2.2.6 荧光强度的检测与计算

总荧光强度测量方法：取在摇瓶中培养到特定的时间点的菌株培养液，一定转速离心后使菌体沉降，舍去上清液。使用生理盐水洗涤并离心菌体，操作两次后再次使用生理盐水重悬菌体。然后吸取 200 μL 菌体重悬液至黑色透明平底 96 孔板，在酶标仪上选择 485 nm 的激发光，535 nm 的发射光作为条件进行检测，增益值设定为 100，得到相应的荧光强度和 OD₆₀₀。单位荧光强度=总荧光强度/OD₆₀₀。

2.2.7 基因编辑质粒的构建

amyL 基因敲除质粒：以本实验室的质粒 pNZTT-AFKF 为模板，利用引物 *amyL-Hind*

III-F、*amyL-EcoRI-R* 扩增 *amyL* 敲除盒片段，纯化后用 *Hind* III和 *EcoR* I双酶切，将酶切产物与经相同双酶切的 pHY300-PLK 载体连接，构建得到质粒 pKA。

含重组酶表达盒的 *amyL* 基因敲除质粒：5 个不同来源的 *RecT* 重组酶基因序列均由上海生工生物工程有限公司合成，利用引物 BPR1-F、BPR1-*EcoR* I-R 扩增重组酶 BPR1 基因片段；以 *B. licheniformis* CICIM B1391 为模板，利用引物 *P_{rha}-EcoR* I-F、*P_{rha}-R-1* 扩增鼠李糖启动子片段，两个片段通过重叠延伸 PCR 得到重组酶 BPR1 表达盒，纯化后用 *EcoR* I单酶切，连接到经相同单酶切的质粒 pKA 上得到质粒 pKAR1。质粒 pKAR2-5 以相同的方法构建完成。

重组酶表达质粒：利用引物 *P_{rha}-Hind* III-F、BPR1-*EcoR* I-R 扩增重组酶 BPR1 表达盒，纯化后用 *Hind* III和 *EcoR* I双酶切，将酶切产物与经相同双酶切的 pHY300-PLK 载体连接，构建得到质粒 pRB。

果糖异构酶敲入片段：从质粒 pSGT 出发以 *Kpn* I-GT-F、*Kpn* I-GT-R 扩增果糖异构酶表达盒，将 *amyL* 敲除盒片段经 TA 克隆连接至 T 载上，利用 *Kpn* I单酶切线性化该质粒后，与同样经 *Kpn* I单酶切纯化后的果糖异构酶基因表达盒连接，得到连接在 T 载上的果糖异构酶敲入片段。敲入片段通过 *Hind* III和 *EcoR* I双酶切获得。

aprE 基因敲除质粒：从质粒 pKAR 出发，利用引物 PKR-*Sma* I-F、PKR-*Xho* I-R 反向 PCR 扩增得到线性化载体，纯化后用 *Xho* I和 *Sma* I酶切。从本实验室的质粒 pNZTT-EFKF 出发，利用 *Xho* I和 *Sma* I双酶切得到 *aprE* 基因敲除盒，再连接到经相同双酶切的线性载体上，得到 *aprE* 基因敲除质粒 pKER。

PTS 关键基因敲除质粒：以地衣芽孢杆菌为模板用 *BamH* I-PTS-F、PK-R 和 KP-F、*EcoR* I-PTS-R 分别扩增 PTS 的左右同源臂，用 PKP-F、PKP-R 扩增卡那抗性盒，PTS 的左右同源臂通过重叠延伸 PCR 与卡那抗性盒连接后得到 PTS 敲除盒，载体由质粒 pRB 经 *BamH* I和 *EcoR* I双酶切获得，与经同样双酶切的 PTS 敲除盒连接得到质粒 pKPR。

2.2.8 基因的敲除和敲入

以敲除 *amyL* 基因为例，将构建好的敲除质粒 pKAR 通过电转化的方法分别转入 *B. licheniformis* CICIM B1391 得到菌株 BLAR，电转质粒浓度不低于 $200 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。转化成功的菌株 BLAR 转接到添加四环素抗性的 15 mL LB 培养基，在 37°C 、200 rpm 的条件下培养后加入鼠李糖诱导 *P_{rha}* 表达，继续培养一段时间，取培养液无菌水稀释 10^{-5} - 10^{-7} 后涂布卡那霉素抗性平板，平板置于 37°C 培养箱培养至长出单菌落；同时取 500 μL 培养液至新的添加四环素抗性的 15 mL LB 培养基，以相同的条件传代培养，稀释后涂布平板。挑取单菌落，利用引物 *amyL*-YZ-F、*amyL*-YZ-R 进行菌落 PCR 验证。

果糖异构酶基因的敲入方法如下。先平板活化菌株 BLRB，后接种单菌落至 15 mL 的 LB 培养基中， 37°C 、250 rpm 培养 16 h 左右获得种子液。向 30 mL 专用培养基 I 中接种 1 mL 的种子液， 37°C 、250 rpm 培养至 OD_{600} 为 0.25-0.35 时，在培养液中添加 1.5% 的鼠李糖诱导重组酶 *RecT* 表达，继续培养细胞至 OD_{600} 为 0.85-0.95 后取出冰浴 30 min，

6000-8000 rpm 离心 5-10 min 收集菌体。使用 BW 缓冲液洗涤菌体，重复洗涤 3-4 次，最后一次离心沉淀的菌体用 800 μL 缓冲液重悬，按照 80 μL 的体积分装至 1.5 mL 离心管， -80°C 低温保存。将敲入片段（浓度不低于 $200\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ）电转化至 BLRB 中。条件为 1800-2100 V 的电压，电击 1 次，电击后立即加入 800-900 μL 的恢复培养基 BR， 37°C 、200 rpm 复苏培养 3 h，然后涂布 Kan 抗性的固体 LB 平板， 37°C 培养至长出单菌落。单菌落重新一一划线至新的 Kan 抗性平板，再利用引物 *amyL*-YZ-F、*amyL*-YZ-R 进行菌落 PCR 验证。

重组效率参照 Sun 等人的方法进行计算^[59]。基因编辑效率的计算方式为成功敲除目标基因的菌落数量除以挑选的菌落数量。

2.2.9 质粒丢失及抗性标记回收

敲除质粒通过无抗传代进行丢失。以质粒 pKAR1 为例，成功敲除 *amyL* 基因的菌株接种到不添加任何抗性的 15 mL LB 培养基中， 37°C 、200 rpm 培养 12 h，取培养液稀释 10^{-5} - 10^{-7} 后涂布卡那霉素抗性平板，同时取 1 mL 菌液接种至新的 15 mL LB 培养基中，如此进行传代。涂布的平板放置在 37°C 培养直至长出单菌落，从卡那霉素抗性平板中选取一定数量的单菌落划线至四环素抗性平板，注意一一对应。在卡那霉素抗性平板上生长而在四环素抗性平板上不能生长的菌株即为成功丢失质粒 pKAR 的 *amyL* 基因敲除菌株。基因组上引入的卡那霉素抗性基因利用质粒 pNZTT-*flp* 进行回收，具体步骤参照李宗文^[30]的实验方法。

2.2.10 菌株酶活力测定

α -淀粉酶酶活力测定：用 TB 培养基发酵原始菌株及 *amyL* 基因敲除菌株， 37°C 、250 rpm 发酵 24 h 后取菌液离心，上清液即为 α -淀粉酶酶液。接着采用 DNS 法测定 α -淀粉酶酶活力。 α -淀粉酶酶活力单位 (U) 定义为：在 pH 6.5、 40°C 的反应条件下，1 mL 酶液每小时水解可溶性淀粉生成还原糖的 μmol 数。

碱性蛋白酶酶活力测定：用 TB 培养基发酵原始菌株及 *aprE* 基因敲除菌株， 37°C 、250 rpm 发酵 24 h 后取菌液离心，上清液即为粗酶液。蛋白酶酶活采用 Folin-酚试剂法测定。酶活单位 (U) 定义为：在 pH 10.0、 40°C 的反应条件下，1 min 内 1 mL 酶液水解酪素生成 1 μg 酪氨酸作为一个酶活单位。

第三章 结果与讨论

3.1 重组酶及其表达元件挖掘

3.1.1 噬菌体重组酶的挖掘

通过 NCBI 挖掘芽孢杆菌及其噬菌体来源的 RecT 重组酶编码基因, 得到 5 个 RecT 家族的重组酶 (表 3-1), 暂时将它们命名为 BPR1-5。利用 DNAMAN 对重组酶进行氨基酸序列比对 (图 3-1 a), 5 个不同来源的重组酶具有高度同源性, BPR1 与 BPR2 的相似性为 84.67%、与 BPR3 的相似性为 61.54%、与 BPR4 的相似性为 54.55%、与 BPR5 的相似性为 41.37%。同时, 采用 MEGA 7.0 近邻相接法构建重组酶的系统发育进化树 (图 3-1 b), 由进化树分析可知重组酶在进化上具有一定的距离。序列的相似性使蛋白质具有类似的生物学功能^[83], 因此预测 5 个重组酶在地衣芽孢杆菌中均具有同源重组活性; 进化上的距离说明重组酶之间具有一定的差异, 为重组酶的研究提供了多样性。本研究将以这 5 个重组酶作为研究对象, 鉴定它们在地衣芽孢杆菌中的同源重组活性, 以期构建一个可进行高效基因编辑的同源重组系统。

表 3-1 5 种不同来源的 RecT 重组酶

Tab. 3-1 Five recombinases from different sources

名称	GenBank 登录号	来源
BPR1	QFR56352.1	<i>Bacillus</i> phage 049ML001
BPR2	QEG13505.1	<i>Bacillus</i> phage vB_BspS_SplendidRed
BPR3	YP_009010510.1	<i>Geobacillus</i> phage GBK2
BPR4	QIQ61250.1	<i>Bacillus</i> phage vB_BcM_Sam46
BPR5	WP_115997067.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

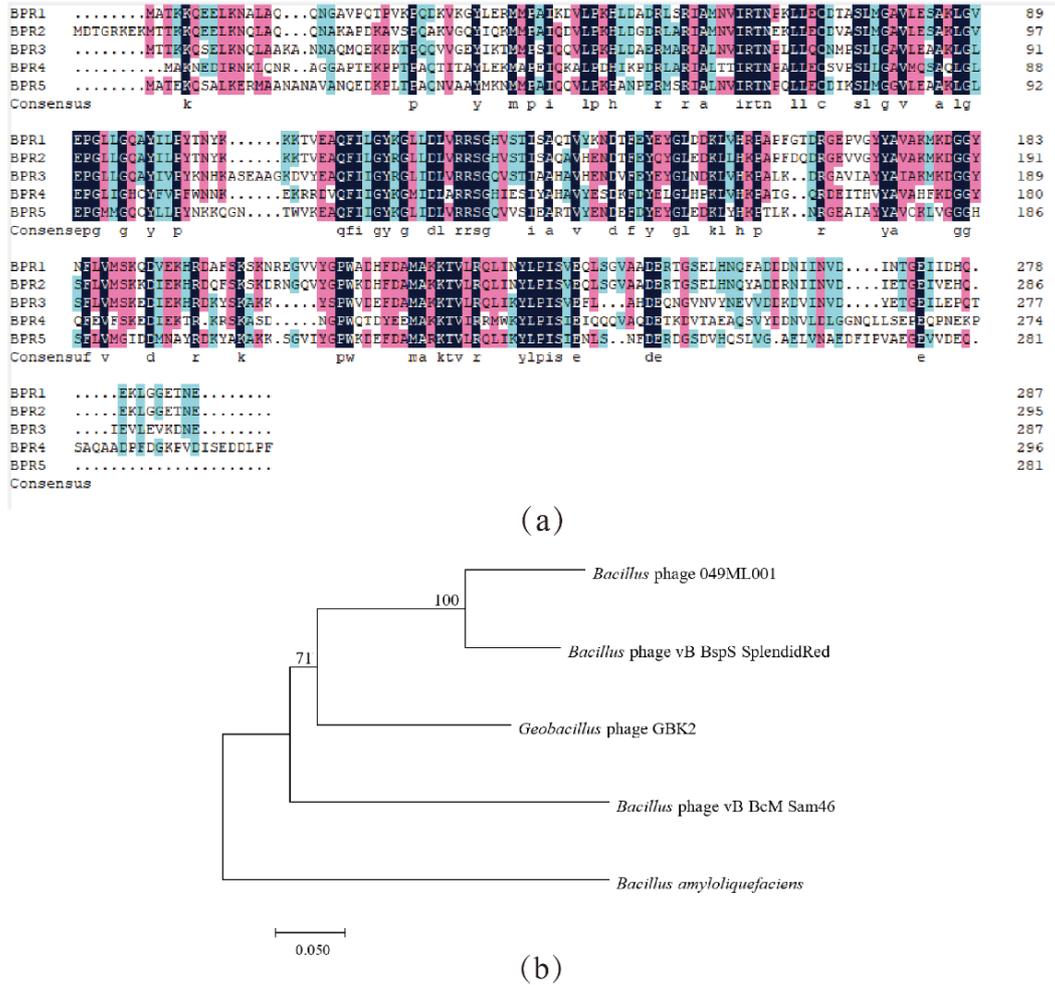


图 3-1 重组酶氨基酸序列比对及系统发育进化树

Fig. 3-1 The amino acid sequence alignment and phylogenetic tree of recombinases

(a) 重组酶氨基酸序列比对；(b) 重组酶系统发育进化树

3.1.2 地衣芽孢杆菌鼠李糖操纵子的挖掘

3.1.2.1 鼠李糖对地衣芽孢杆菌生长的影响

用 LB 培养基和添加了鼠李糖的 LBR 培养基分别培养地衣芽孢杆菌，同时检测鼠李糖的消耗。地衣芽孢杆菌生长曲线及鼠李糖消耗曲线如图 3-2 所示，地衣芽孢杆菌在 LB 培养基中停止生长后，在 LBR 培养基中生物量继续增长，持续消耗鼠李糖。说明地衣芽孢杆菌可以利用鼠李糖作为唯一碳源进行生长，其基因组中应该含有鼠李糖代谢途径。此外，地衣芽孢杆菌在培养基 LBR 中生长时，对鼠李糖的消耗速度十分缓慢。发酵时间约为第 12 h 时鼠李糖开始消耗，并且持续消耗至第 72 h，结合原始菌株生长曲线图可知，鼠李糖消耗过程可持续约 60 h 直至菌株停止生长。

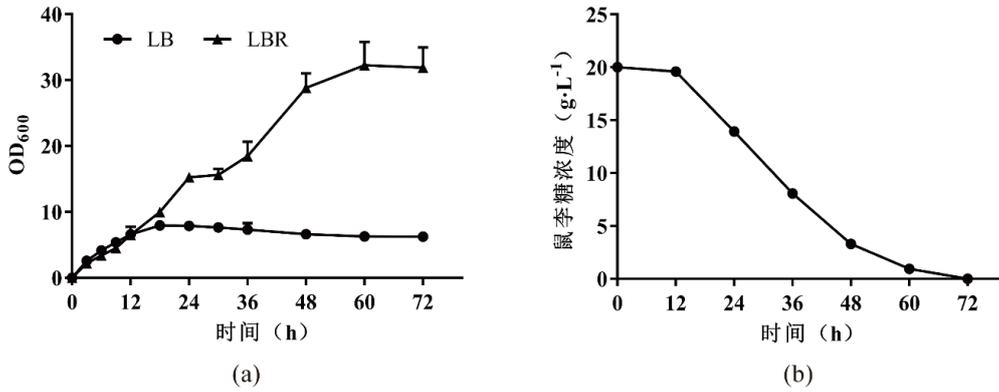


图 3-2 地衣芽孢杆菌原始菌株生长曲线与鼠李糖消耗曲线

Fig. 3-2 Growth curve and rhamnose-consumption curve of *B. licheniformis*

(a) 地衣芽孢杆菌原始菌株生长曲线；(b) 地衣芽孢杆菌原始菌株鼠李糖消耗曲线

3.1.2.2 鼠李糖操纵子挖掘

通过对地衣芽孢杆菌基因组进行分析，发现 3 个与鼠李糖代谢相关的基因。它们分别为：鼠李糖醛缩酶基因 *yuxG* (序列号：AGN37940.1)、鼠李糖激酶基因 *yulC* (序列号：AGN37938.1) 及其转录调节因子 *yulB* (序列号：AGN37936.1)。将地衣芽孢杆菌鼠李糖基因簇提交 NCBI 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 鼠李糖基因簇进行比对，结果显示，与 *B. subtilis* 鼠李糖操纵系统中的 3 个特征基因 *rhaE*、*rhaB*、*rhaR* 相比，地衣芽孢杆菌中 *yuxG* 与 *rhaE* 具有 75.76% 的相似性，*yulC* 与 *rhaB* 具有 38.34% 的相似性，*yulB* 与 *rhaR* 具有 69.38% 的相似性 (图 3-3)。

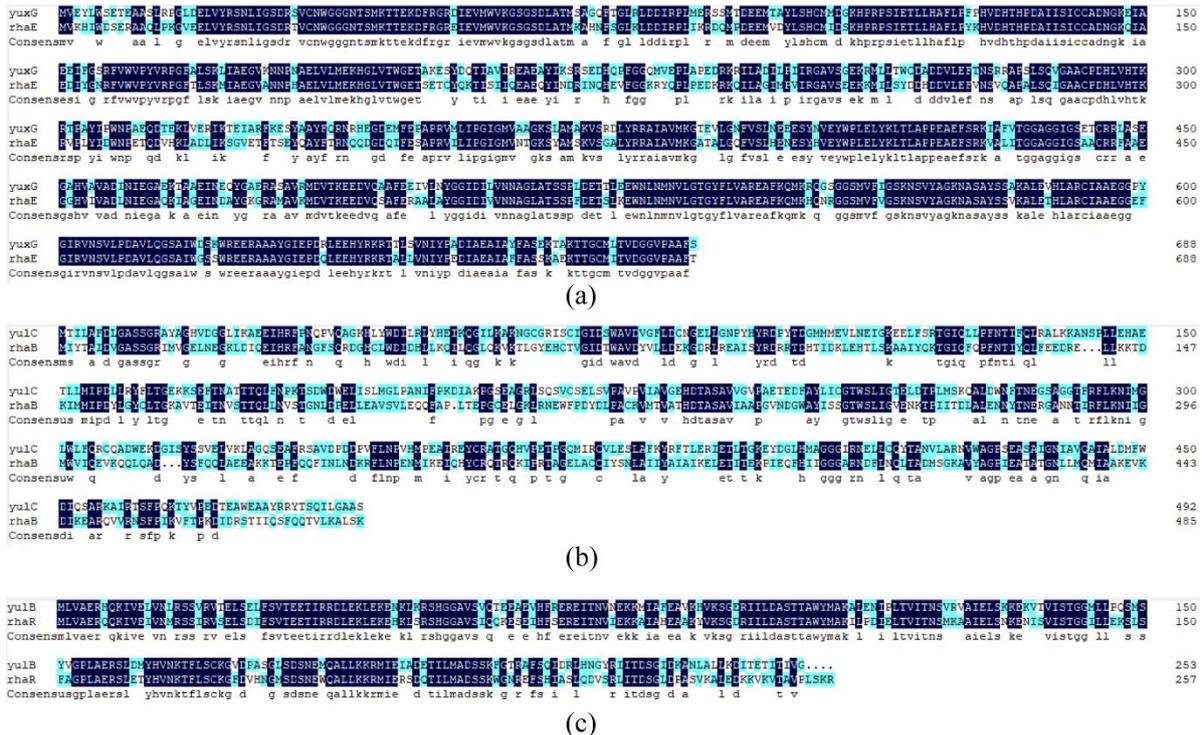


图 3-3 *B. licheniformis* 与 *B. subtilis* 鼠李糖特征基因比对

Fig. 3-3 *B. licheniformis* and *B. Subtilis* rhamnose characteristic gene alignment

(a) *yuxG* 与 *rhaE* 序列比对；(b) *yulC* 与 *rhaB* 序列比对；(c) *yulB* 与 *rhaR* 序列比对

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/057121152026006046>