

CRISPR/Cas9 介导的果糖低消耗 酿酒酵母工程菌的构建

陈红, 赵风光, 李战胜, 杨家明, 韩双艳

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 利用酿酒酵母为宿主, 以果糖为原料合成 D-阿洛酮糖具有食品方面的先天优势。为了减少酿酒酵母宿主本身对果糖的消耗, 对酿酒酵母的己糖激酶同工酶 2 (Hexokinase isoenzyme 2, *hvk2*) 基因进行编辑。本研究采用 CRISPR/Cas9 技术, 构建了 Cas9 和 gRNA 共表达质粒 pYES2-CG- $\Delta hvk2$, 以酿酒酵母 BY4741 为出发菌株, *URA3* 为筛选标记, 采用高效电击转化法和胞内同源重组技术, 获得 *hvk2* 基因缺陷株 BY4741- $\Delta hvk2$ 。在此基础上, 进行果糖发酵实验以评估突变菌株的果糖消耗速率。实验结果显示, 发酵培养 14 h 时, 缺陷株 BY4741- $\Delta hvk2$ 果糖消耗速率为 3.35 mg/h; 与野生型菌株相比其下降了 6.42%。此外, 发酵培养 22 h, BY4741- $\Delta hvk2$ 的 OD_{600nm} 值为 8.65, 相比于野生型提高了 6.40%。研究表明, 己糖激酶 *hvk2* 基因的缺陷编辑可以一定程度降低酿酒酵母对果糖的利用, 同时缺陷株较野生型表现出一定的生长优势, 这为后续以酿酒酵母为宿主生产 D-阿洛酮糖奠定了初步基础。

关键词: CRISPR/Cas9; 酿酒酵母; 己糖激酶同工酶 2; 果糖

文章编号: 1673-9078(2021)02-72-78

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0277

CRISPR/Cas9-assisted Construction of Engineered Low-fructose-utilization *Saccharomyces cerevisiae*

CHEN Hong, ZHAO Feng-guang, LI Zhan-sheng, YANG Jia-ming, HAN Shuang-yan

(Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The production of D-psicose using D-fructose as the raw material and *Saccharomyces cerevisiae* as the host has inherent advantages in food applications. In order to reduce the consumption of fructose by the host *Saccharomyces cerevisiae* itself, the hexokinase isoenzyme 2 (*hvk2*) gene was edited in *Saccharomyces cerevisiae*. In this study, CRISPR/Cas9 technology was used to construct Cas9 and gRNA co-expression plasmid pYES2-CG- $\Delta hvk2$, and using *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 as the starting strain and *URA3* as the selection marker, *hvk2*-deficient strain BY4741- $\Delta hvk2$ was obtained by high-efficiency electroporation-induced transformation and intracellular homologous recombination technology. On this basis, a fructose fermentation experiment was conducted to evaluate the consumption rate of D-fructose in the mutant strain BY4741- $\Delta hvk2$. The experimental results showed that the fructose consumption rate in the BY4741- $\Delta hvk2$ strain after 14 h of fermentation was 3.35 mg/h (which decreased by 6.42% compared with wild strain BY4741). In addition, the OD_{600 nm} of BY4741- $\Delta hvk2$ was 8.65 after 22h of fermentation (which increased by 6.40% compared with BY4741). This research shows that deleting the hexokinase *hvk2* gene can reduce the utilization of fructose by *Saccharomyces cerevisiae* to a certain extent, and the defective strain exhibited advantages in growth compared with the wild type. These findings lay a foundation for the subsequent production of D-psicose by *Saccharomyces cerevisiae* using BY4741- $\Delta hvk2$ as the host.

Key words: CRISPR/Cas9; *Saccharomyces cerevisiae*; Hexokinase isoenzyme 2 (*hvk2*); fructose

引文格式:

陈红, 赵风光, 李战胜, 等. CRISPR/Cas9 介导的果糖低消耗酿酒酵母工程菌的构建[J]. 现代食品科技, 2020, 37(2): 72-78

CHEN Hong, ZHAO Feng-guang, LI Zhan-sheng, et al. CRISPR/Cas9-assisted construction of engineered low-fructose-utilization *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 72-78

收稿日期: 2020-03-24

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2020B020226007)

作者简介: 陈红 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 合成生物学; 通讯作者: 韩双艳 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程

肥胖、糖尿病等代谢疾病已经成为全球性危机, 热量高的蔗糖等甜味剂的过多摄入造成能量过剩是其中一个重要原因^[1]。D-阿洛酮糖 (D-psicose) 是近年发现的一种具有特殊保健作用的功能性甜味剂, 甜度相当于蔗糖的 70%, 热量只有蔗糖的 0.3%^[2,3]。有研究报道, D-阿洛酮糖可以通过抑制关于脂质合成的酶活性而减轻腹部肥胖 (Abdominal obesity), 因此 D-阿洛酮糖可用作减肥食品 (diet food) 的有效成分^[4]。

当前的研究报道, 大多集中在大肠杆菌中表达酮糖 3-差向异构酶, 然后用重组酶催化果糖生产 D-阿洛酮糖^[5,6]。就食品安全性来说, 重组大肠杆菌进行 D-阿洛酮糖生产并不太适合 D-阿洛酮糖主要用于食品添加的需求。酿酒酵母一直被美国 FDA (Food and Drug Administration) 认为是 GRAS (Generally Recognized As Safe) 生产菌株, 具备安全无致病性、遗传背景清晰、培养简单和繁殖迅速等优势, 是功能性甜味剂 D-阿洛酮糖的理想生产菌株^[2,7]。

在酿酒酵母体内, 己糖激酶同工酶 2HXK2 (hexokinase isoenzyme 2, GenBank: CAA96973.1) 可以将果糖磷酸化形成果糖-6-磷酸, 从而进入糖酵解代谢^[8]。因此, 有必要将 *hvk2* 基因敲除或功能弱化, 从而降低宿主酿酒酵母对果糖消耗且改善目的产物 D-阿洛酮糖的生产。在酿酒酵母中, 利用蔗糖为底物生产果糖和乙醇时, HXK2 的缺陷可以抑制细胞对果

糖的消耗^[9]。另外, 通过利用分泌菊粉酶的酿酒酵母将菊芋转化为果糖的生产中, HXK2 的缺失在减少酵母对果糖利用中发挥重要作用^[10]。

CRISPR/Cas9 技术被誉为第三代基因组编辑技术, 2013 年首次应用在酿酒酵母中^[11], 随后因其具有低成本、易操作、普适性和高效性等多种优点^[12], 在酿酒酵母中迅速得到推广应用^[13-15]。目前, II 型 CRISPR/Cas9 系统应用广泛; 在该系统中, gRNA 由 crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA (trans-activating crRNA) 组成, 更换 20 bp 靶序列即可对不同基因进行编辑^[16]; Cas9 核酸酶介导形成的 DNA 双链断裂通过 donor DNA 可修复, 进而实现基因的定向编辑。本研究尝试开发 CRISPR/Cas9 共表达系统, 对酿酒酵母 *hvk2* 基因进行无痕编辑, 以期降低酿酒酵母作为宿主菌对果糖的消耗, 为后续在酿酒酵母体内以 D-果糖为原料转化生产 D-阿洛酮糖提供可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 Top10 为本实验室收藏, 用于质粒的构建和扩增; 酿酒酵母 BY4741 为本实验室收藏和保存。实验中所使用和构建的质粒见表 1。

表 1 本实验所用质粒

Table 1 All the plasmids used in this study

质粒	注释	来源
pYES2	Amp ^r , URA3, 用于扩增载体片段	本实验室
rDNA-P _{PGK1} -Cas9-T _{CYC1}	Kan ^r , 用于扩增 Cas9 表达盒	本实验室
gRNA- <i>trp</i> -HYB	Amp ^r , Hyg ^r , 用于扩增 gRNA 表达盒	本实验室
pYES2-P _{PGK1} -Cas9-T _{CYC1}	Amp ^r , URA3, 作为载体连接 gRNA 表达盒	本研究构建
pYES2-CG- Δ <i>hvk2</i>	Amp ^r , URA3, 用于编辑 <i>hvk2</i>	本研究构建

1.1.2 培养基

Luria-Bertani (LB) 培养基: 用于大肠杆菌的生长 (5 g/L 酵母提取物、10 g/L 蛋白胨和 10 g/L NaCl), 固体培养基则还需要添加琼脂粉 2 g/L; 转化子筛选时需要添加氨苄青霉素至浓度 100 μ g/mL。YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) 培养基: 用于酿酒酵母的生长 (10 g/L 酵母提取物、20 g/L 蛋白胨和 20 g/L 葡萄糖), 固体培养基则还需要添加琼脂粉 2 g/L。SD-U 培养基: 用于筛选酿酒酵母转化子 (6.7 g/L 酵母氮源 YNB、0.66 g/L Δ Ura DO Supplement 和 20 g/L 葡萄糖)。YPF 培养基: 含果糖培养基 (10 g/L 酵母提取物、20 g/L 蛋白胨和 20 g/L 果糖), 用于评估酿酒酵母对果糖的消耗情况。

1.1.3 主要试剂和仪器

KOD DNA 聚合酶购自 TOYOBO 公司; 限制性内切酶 *BcuI* 和 *SacII* 及 T4 DNA 连接酶购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 2 $\times$ UTaq PCR MasterMix 及 DNA marker 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 琼脂糖凝胶片段回收试剂盒以及质粒抽提试剂盒购自美基生物; Seamless Assembly Cloning Kit 无缝重组试剂盒购自美国 Clone smarter; 引物合成由擎科生物技术有限公司完成; 序列测定由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。主要仪器有: 紫外分光光度计, 美国 Unico 公司; PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 恒温培养箱, 广东环凯微生物科技有限公司; Mini-Beadbeater 研磨珠均质器, 美国 Biospec 公司。

表 2 实验所用引物

Table 2 Primers used in this study

名称	序列 (5'→3')	目的
F1	CTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGG	扩增 pYES2 载体片段
R1	AAGCTGGAGACCAACATGGCGGCCGCGCATGCCCGCGGACTAGTATT GCGAATACCGCTTCCAC	
F2	CTCCAGCTTGCAAATTAAGCCTTCGAGCGT	扩增 Cas9 基因片段
R2	GGCCGATTCATTAATGCAGGAAGTACCTTCAAAGAATGGGGT	
F3	TGTGGATTGCGCATACTTTG	鉴定质粒 pYES2-P _{PGK1} -Cas9-T _{CYC1}
R3	TATGTCACGCTTACATTACG	
F4	TGGAAGCGGTATTCGCAATACTAGTTCTTTGAAAAGATAATGTATG	扩增启动子 P _{SNR52}
R4	GATCATTTATCTTTCCTGCGGA	
F5	CAGTGAAAGATAAATGATCTTCCTTTGGCACATCGGCCAGTTTATAGAG CTAGAAATAGC	扩增 20 bp <i>hvk2</i> 靶序列的 gRNA 结构序列
R5	AACATGGCGGCCGCGCATGCCCGCGGAGACATAAAAAACAAAAAA GCACCACC	
F6	TTCCTTTGGCACATCGGCCA	鉴定 pYES2-CG-Δ <i>hvk2</i>
F7	ATGGTTCATTTAGGTCCAAAAAACCACAAGCCAGAAAGGGTTAATG GCC	Donor DNA 序列
R7	CAAAATTCTCAATTTGTTGCATCAATTCCTTTGGCACATCGGCCATTAA CCCTTT	
F8	ACGAAACACCTTTGATTGCG	鉴定 BY4741-Δ <i>hvk2</i>
R8	GCTTTCAAAGAGTCGGCAAT	

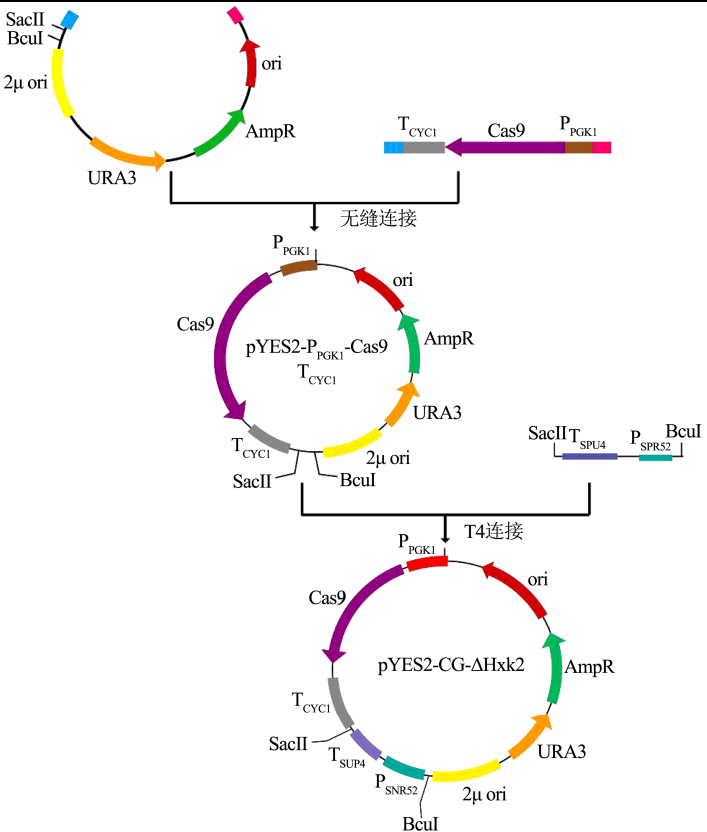


图 1 CRISPR/Cas9 共表达质粒 pYES2-CG-Δ*hvk2* 的构建

Fig.1 The construction of pYES2-CG-Δ*hvk2*

1.1.4 引物

实验中用到的引物见表2。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒构建

CRISPR/Cas9 共表达质粒 pYES2-CG- $\Delta h x k 2$ 的构建流程如图1所示。主要分为两步:

1) 以 pYES2 和 rDNA-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 为出发材料, 构建得到游离型 Cas9 蛋白表达载体 pYES2-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1}。基本过程是:(1)制备 pYES2 载体片段: 以 pYES2 质粒为模板, 使用引物对 F1/R1 扩增, 获得带有多克隆位点的 pYES2 载体片段, 预期片段大小 4499 bp; (2)制备 Cas9 基因片段: 使用引物对 F2/R2, 以 rDNA-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 质粒为模板, 获 P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 表达盒, 预期片段大小 5428 bp; (3)连接和转化: 上述两个片段用 clone smarter 无缝重组试剂盒进行连接, 转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 在含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB (LBA) 平板上筛选; (4)转化子鉴定: 从 LBA 平板挑选转化子, 利用引物对 F3/R3 进行菌落 PCR, 确定阳性克隆, 抽提质粒送生工测序。

2) 以 pYES2-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 和 gRNA-trp-HYB 为出发材料构建得到 pYES2-CG- $\Delta h x k 2$ 。基本过程是:

(1)制备靶向 $h x k 2$ 的 P_{SNR52}-gRNA-T_{SUP4} 表达盒: 以 gRNA-trp-HYB 为模板, 利用引物对 F4/R4 和 F5/R5, 扩增启动子 P_{SNR52} 和含 20 bp $h x k 2$ 靶序列 (5'TTCCTTTGGCACATCGGCCA3') 的 gRNA 结构序列; 随后使用引物对 F4/R5, 经融合 PCR 获得 P_{SNR52}-gRNA-T_{SUP4} 表达盒, 预期大小为 439 bp; (2)酶切和连接: 使用限制性内切酶 *BcuI* 和 *SacII*, 对 pYES2-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 和 P_{SNR52}-gRNA-T_{SUP4} 进行双酶切, 对切胶回收后片段进行连接; (3)转化: 将上述连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 在含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB (LBA) 平板筛选; (4)转化子鉴定: 从 LBA 平板挑选转化子, 利用引物对 F6/R5 进行菌落 PCR, 确定阳性克隆, 抽提质粒送生工测序。

1.2.2 Donor DNA 的构建

设计带有 15 bp 重叠区的引物对 F7/R7, 进行重叠 PCR 反应, 切胶回收, 获得 Donor DNA 片段, 用于酿酒酵母转化。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 12 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.3 电转化酿酒酵母以及转化子的鉴定

根据文献^[17]中的电击转化方法制备感受态细胞并进行转化, 具体如下: 制备酿酒酵母 BY4741 的感受态细胞, 将质粒 pYES2-CG- $\Delta h x k 2$ 和 donor DNA 片段共转化, 涂布 SD-U 平板培养 2~3 d。在超净台挑取转化子, 利用引物对 F8/R8 进行 PCR 鉴定, 预期片段大小 683 bp, 随后将所得 PCR 产物交由生工测序。

工程菌 BY4741- $\Delta h x k 2$ 的摇瓶发酵: 挑取工程菌 BY4741- $\Delta h x k 2$ 单克隆, 于 10 mL YPD 培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 24 h; 然后转接于 25 mL YPD 中, 控制起始 OD₆₀₀ 为 0.2, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 22 h。

1.2.4 果糖含量的测定

取 1 mL 发酵液转入含 0.74 g 玻璃珠的破碎管中, 利用均质仪进行间歇机械破碎, 每破壁 1 min 之后放在冰上 1 min, 重复 8 次。破壁结束后, 于 8000 r/min 离心 5 min, 将上清通过 0.22 μm 滤膜过滤, 随后进行 HPLC 分析。检测条件为: Waters 2695 型高效液相色谱仪, Shodex SP-0810 色谱柱, 柱温为 65 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为超纯水, 流速为 1 mL/min, Waters 2424 ELSD 检测器。

果糖消耗速率的计算公式如下:

$$\text{果糖消耗速率}(\text{mg/h}) = \frac{M1 - M0}{T}$$

式中: M1 是发酵培养 14 h 时果糖含量, M0 是起始培养基中的果糖含量; T 是 14 h。

1.2.5 数据处理

运用 Microsoft Excel 2010 进行数据平均值处理以及计算标准偏差, 采用 Origin 8.0 软件作图, 利用 SPSS 17.0 进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 游离型 CRISPR/Cas9 共表达质粒的构建与鉴定

2.1.1 质粒 pYES2-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 的构建

PCR 扩增 pYES2 载体片段 (4499 bp) 和含强启动子 PGK1 的 Cas9 表达盒 P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} (5428 bp), 相关 PCR 片段经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 电泳结果见图 2a、b。将上述两步获得的载体和 P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 表达盒无缝连接, 转化 TOP10 感受态, 挑选转化子进行菌落 PCR, 菌落 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定 (图 2c), 与理论值 631 bp 相符。随后阳性转化子摇瓶培养后抽提质粒送生工测序, 测序结果证明质粒 pYES2-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 构建成功, 符合预期。

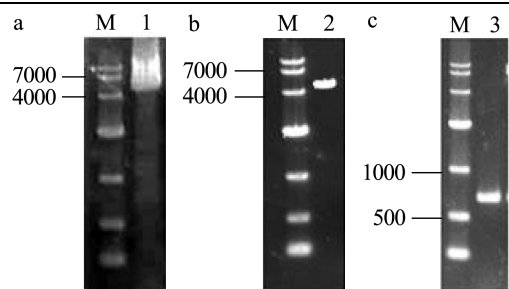


图2 质粒 pYES2-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 构建过程中 PCR 产物鉴定电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments for pYES2-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} construction

注: (a) M: 10000 DNA Marker; 1: pYES2 载体片段; (b) M: 10000 DNA Marker; 1: P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 表达盒; (c) M: 10000 DNA Marker; 1: 重组大肠杆菌 TOP10/pYES2-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1}。

2.1.2 靶向 *hvk2* 的 gRNA 构建

利用在线工具 CRISPRdirect(<http://crispr.dbcls.jp/>)^[18], 设计了用于靶向 *hvk2* 基因的 20 bp 序列 (5'TTCCTTTGGCACATCGGCCA3')。设计含有该 20 bp 在内的引物 F5, 该引物 5'端与启动子 SNR52 的 5'端具有 19 bp 重叠区域。利用引物对 F5/R5 对质粒 gRNA-trp-HYB 扩增得出终止子 T_{SUP4}, 利用引物对 F4/R4 对质粒 gRNA-trp-HYB 扩增得出启动子 P_{SNR52}, 最后对这两个片段进行融合, 获得含启动子 P_{SNR52} 的靶向 *hvk2* 基因 gRNA 结构序列, 命名为 gRNA-Δ*hvk2*。经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 确认融合片段的长度与预期结果相符见图 3。

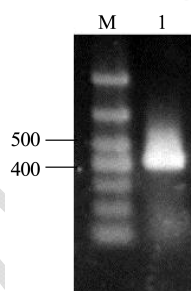


图3 表达组件 gRNA-Δ*hvk2* 的扩增

Fig.3 Amplification of expression components gRNA-Δ*hvk2*

注: M: 1000 DNA Marker; 1: 表达组件 gRNA-Δ*hvk2*。

2.1.3 靶向 *hvk2* 的 CRISPR/Cas9 共表达质粒的构建

经限制性内切酶 *BcuI* 和 *SacII* 处理的 pYES2-P_{PGK1}-Cas9-T_{CYC1} 与相同双酶切处理过的 gRNA-Δ*hvk2* 片段体外连接, 连接产物转化 TOP10 感受态, 挑选转化子进行菌落 PCR 来确定阳性克隆, 菌落 PCR 产物大小与理论值 147 bp 较符合 (见图 4)。随后转化子培养后抽提质粒送生工测序, 测序结果证

明连接成功, 获得可用于己糖激酶 *hvk2* 编辑的质粒 pYES2-CG-Δ*hvk2*。

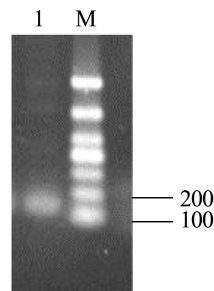


图4 重组大肠杆菌 TOP10/pYES2-CG-Δ*hvk2* 鉴定

Fig.4 Diagnostic of TOP10/pYES2-CG-Δ*hvk2*

注: M: 1000 DNA Marker; 1: 转化子 TOP10-pYES2-CG-Δ*hvk2*。

2.1.4 donor DNA 片段的构建

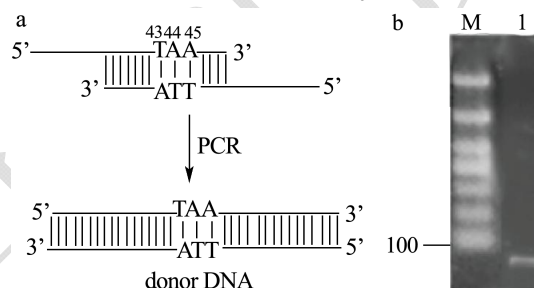


图5 donor DNA 构建的 PCR 产物凝胶电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of donor DNA

注: M: 1000 DNA Marker; 1: donor DNA。

引物 F7 的 3'端含有 15 bp 序列与引物 R7 的 3'端重叠 (图 5a), 通过 PCR 直接将引物融合, 构建得到含有 *hvk2* PAM 位点上下游的同源臂片段 donor DNA (90 bp), 该片段第 43 为 T, 第 44 位为 A, 第 45 位为 A, 可以在后续 Cas9 介导的同源修复中将 *hvk2* 基因位点的第 44 位 C 突变为 A, 45C 被删除, 46A 移码至 45 位置, 实现己糖激酶同工酶 2 移码突变及提前终止。经琼脂糖凝胶电泳鉴定, PCR 产物大小与理论值相符 (图 5b)。

2.2 己糖激酶 2 HXK2 缺陷株的建立

将 pYES2-CG-Δ*hvk2* 和 donor DNA 共转化酿酒酵母 BY4741 感受态细胞, 涂布 SD-U 筛选平板。转化子用 F8/R8 为引物对菌落 PCR, 产物预期大小为 683 bp, 与电泳结果相一致 (图 6a); 随后将 PCR 产物送上海生工测序, 结果证明工程菌中第 44 位 C 突变为 A, 同时缺失了 *hvk2* 基因 ORF 的第 45 位碱基序列, 使第 46 位 A 移码, 从而形成 TAA, 造成了移码突变及提前终止 (图 6b)。酿酒酵母的 *hvk2* 全长 1461 bp^[19], 因而在上游第 45 位开始的移码突变, 完全可能引起整个蛋白失活。因而酿酒酵母缺陷株 BY4741-Δ*hvk2* 构

建成功。相比于两步法依次将 Cas9 和 gRNA 表达质粒转化至酿酒酵母体内进行基因编辑^[20,21], 该共表达

质粒一定程度上缩短了实验操作过程以及减少了筛选标记的使用。

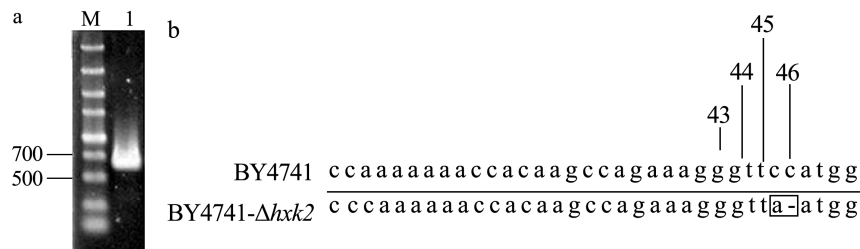


图6 突变菌株 BY4741-Δhvk2 构建

Fig.6 Construction of mutant BY4741-Δhvk2

注: (a) BY4741-Δhvk2 工程菌的鉴定; M: 5000 DNA Marker; 1: 转化子 BY4741-Δhvk2; (b) BY4741-Δhvk2 测序结果比对。

2.3 酿酒酵母工程菌对果糖消耗情况

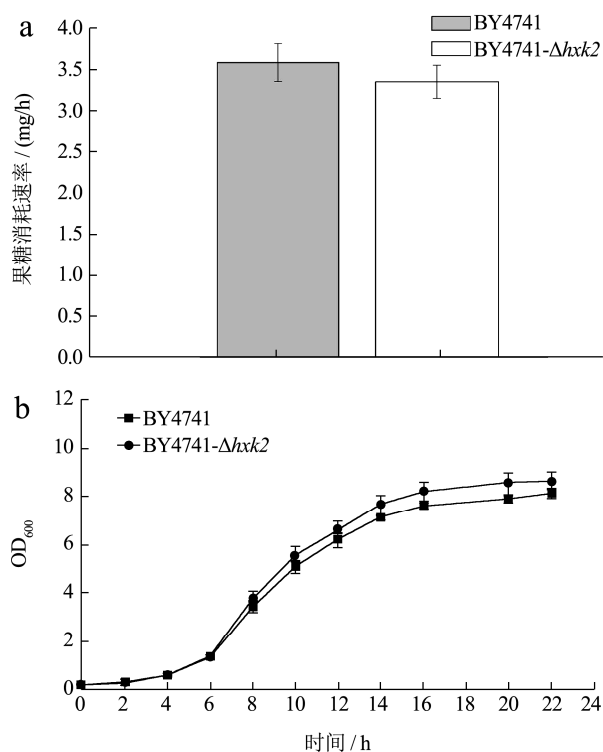


图7 酿酒酵母突变菌株 BY4741-Δhvk2 发酵性能测定

Fig.7 Fermentation properties of original strains and mutant strains BY4741-Δhvk2

使用 YPF 培养基对菌株 BY4741-Δhvk2 进行培养, 评估己糖激酶 *hvk2* 缺陷工程菌对果糖的消耗情况, 结果见图 7a。在 14 h 培养期间 (14 h 之后果糖彻底消耗), 缺陷株 BY4741-Δhvk2 和野生型 BY4741 对果糖的消耗速率分别为 3.35 mg/h 和 3.58 mg/h, 二者存在显著差异 ($p < 0.05$)。同野生型相比, 己糖激酶 *hvk2* 缺陷株的果糖消耗降低了 6.42%, Yu^[10]曾通过对 *hvk2* 基因进行敲除实现酵母对果糖的消耗降低。初步实现了我们的预期目的: 通过缺陷己糖激酶 *hvk2*, 阻断果糖磷酸化进入糖酵解代谢被酵母作为碳源利用。有意思的是, 继续发酵培养到 22 h 后, 缺陷株

BY4741-Δhvk2 和对照 BY4741 的 OD₆₀₀ 分别为 8.65 和 8.13, 两者有显著差异 ($p < 0.05$), 如图 7b 所示; 相比于野生型 BY4741, BY4741-Δhvk2 具有较高的 OD₆₀₀, 且提高了 6.40%。而且从培养 8 h 后, 缺陷株细胞生长量一直在野生型之上, 显示出来较好的生长优势。前期研究表明^[10,22], *hvk2* 敲除菌的生长情况同样优于野生型。Diderich^[22]指出己糖激酶 2 (HXK2) 的缺失会增强细胞的呼吸作用, 从而可以避免发酵代谢中产生的乙醇抑制, 因此推测 *hvk2* 敲除菌细胞生长量得以提高。结合缺陷株果糖消耗慢、生长性能好的优势, 可以考虑将缺陷株 BY4741-Δhvk2 作为出发菌株, 进一步构建利用果糖生产 D-阿洛酮糖的新型酿酒酵母工程菌。

2.4 讨论

在过去的几年中, CRISPR/Cas9 技术在基因组编辑方面经历了快速的发展, 并且在不同的生物体中被广泛应用, 以操纵 DNA 序列^[14]。本实验采用 CRISPR/Cas9 系统, 构建了以 *URA3* 标记, Cas9 和 gRNA 共表达游离型质粒 pYES2-CG-Δhvk2, 成功编辑了酿酒酵母己糖激酶 *hvk2*, 得到了预期的 *hvk2* 缺陷株 BY4741-Δhvk2。相比于众多将 Cas9 和 gRNA 单独表达的文献报道^[21,22], 这种共表达质粒的应用有效地减少了筛选阳性转化子时所用的标记, 缩短了基因编辑所需的实验周期, 但就是是否能够同时实现多个基因编辑, 有待进一步实验研究。菌株发酵培养过程显示, 相比于野生型 BY4741, 缺陷株 BY4741-Δhvk2 果糖消耗速率下降了 6.42%, 说明 *hvk2* 基因的功能缺失对酿酒酵母利用果糖有一定的抑制作用, 这与之前的相关报道结论也一致^[10]。但是, 值得一提的是, 相比于野生型, BY4741-Δhvk2 的细胞数量 (OD) 提高了 6.40%, 表现出一定的生长性能优势。为后期, 在缺陷株基础上开发新的 D-阿洛酮糖生产菌株提供了可能。

3 结论

本研究通过构建 Cas9 和 gRNA 共表达单质粒 pYES2-CG- $\Delta h x k 2$, 采用一步法转化, 实现了酿酒酵母中 $h x k 2$ 基因的敲除, 获得对果糖代谢较缓慢的突变株 BY4741- $\Delta h x k 2$ 。相比于传统两步法转化筛选, 本方法缩短了实验所需时间, 为 CRISPR 技术的进一步升级改良提供了思路。同时, 研究获得了果糖低消耗、生长性能优良的缺陷株酿酒酵母 BY4741- $\Delta h x k 2$, 为符合 GRAS 的酿酒酵母细胞以果糖为原料生产阿洛酮糖奠定了基础。

参考文献

- [1] 沈雪梅,王靖,张媛,等.D-阿洛酮糖的功能及其生物合成研究进展[J].生物工程学报,2018,34(9):1419-1431
SHEN Xue-mei, WANG Jing, ZHANG Yuan, et al. Research progress of D-psicose: function and its biosynthesis [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(9): 1419-1431
- [2] Zhang W, Yu S, Zhang T, et al. Recent advances in D-allulose: Physiological functionalities, applications, and biological production [J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 54: 127-137
- [3] Mu W, Zhang W, Feng Y, et al. Recent advances on applications and biotechnological production of D-psicose [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(6): 1461-1467
- [4] Matsuo, Baba Y, Hashiguchi M, et al. Dietary D-psicose, a C-3 epimer of D-fructose, suppresses the activity of hepatic lipogenic enzymes in rats [J]. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2001, 10(3): 233-237
- [5] Park C, Park C, Shin K, et al. Production of D-psicose from D-fructose by whole recombinant cells with high-level expression of D-psicose 3-epimerase from *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 121(2): 186-190
- [6] Zhang W, Li H, Zhang T, et al. Characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Dorea* sp. CAG317 with an acidic pH optimum and a high specific activity [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 120: 68-74
- [7] 王珂雯,尹雪,王宇,等.启动子的选择及优化在酿酒酵母代谢工程中的应用[J].生物技术通报,2018,34(6):38-47
WANG Ke-wen, YIN Xue, WANG Yu, et al. Application of selection and optimization of promoter in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(6): 38-47
- [8] Herrero P, Galindez J, Ruiz N, et al. Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXK1*, *HXK2* and *GLK1* genes [J]. Yeast, 1995, 11(2): 137-144
- [9] Carvalho R S, Gomes L H, Gonzaga D P F L, et al. Obtaining and selection of hexokinases-less strains of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ethanol and fructose from sucrose [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 77(5): 1131-1137
- [10] Yu J, Jiang J, Ji W, et al. Glucose-free fructose production from Jerusalem artichoke using a recombinant inulinase-secreting *Saccharomyces cerevisiae* strain [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(1): 147-152
- [11] Dicarlo J E, Norville J E, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(7): 4336-4343
- [12] 程妙文,罗玮,杜瑶.CRISPR-CAS系统介导的新一代基因靶向修饰技术及其在工业微生物中的应用[J].微生物学报, 2017, 57(11): 1621-1633
CHENG Miao-wen, LUO Wei, DU Yao. CRISPR-CAS system-mediated new-generation gene-targeted modification technology and its application in industrial microorganisms [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(11): 1621-1633
- [13] Zhang G, Kong II, Kim H, et al. Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7694-7701
- [14] Bao Z, Xiao H, Liang J, et al. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 4(5): 585-594
- [15] Jakóčiūnas T, Jensen M K, Keasling J D. CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories [J]. Metabolic Engineering, 2016, 34: 44-59
- [16] Sander J D, Joung J K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(4): 347-355
- [17] Xu Z W, Zhang Y, Wang Z X, et al. A highly efficient protocol for transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* by electroporation [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2010, 49(3): 98-101

(下转第27页)