

谷氨酸棒杆菌严谨调控系统的构建 及其在合成基因组重排中的应用

蔡瑶瑶, 张灵, 叶燕锐*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 合成生物学技术可以在全基因组范围内调控和改造谷氨酸棒杆菌的代谢网络, 但需要一个严谨调控系统来控制 Cre 重组酶的表达。该研究构建了 Cumate-ATc 与门诱导系统, 使其未诱导时的相对荧光表达量 (14.28) 显著低于传统 IPTG 诱导系统 (4 238.54)。将进一步结构优化后的诱导系统用于 Cre 重组酶的可控表达, 实现了半合成型谷氨酸棒杆菌 *semi-synCG-A1-A2* (含有 111.35 kb 合成基因组片段和 40 个 loxPsym 位点) 的 SCRaMbLE。通过 PCRTags 验证发现, 32 个重排菌株的位点删除具有偏好性。基因组测序结果显示, 重排菌株合成基因组片段长度变为 64.50 kb 至 165.31 kb, 其中, 重排菌株 *S-sCG-H* 同时发生了 15 个重排事件。结合生长曲线测试和抗逆表型测试, 分析了重排菌株基因型和表型之间的相关性。该研究开发了一种严谨调控系统, 并成功在含有 40 个 loxPsym 位点的半合成型谷氨酸棒杆菌中实现 SCRaMbLE。这为谷氨酸棒杆菌的精准育种提供了改造靶点, 也为其他菌株的进化研究提供了参考。

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 严谨调控; 与门诱导系统; 基因组重排

文章编号: 1673-9078(2025)11-89-98

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.11.1122

Design and Application of A Tightly Controlled System in *Corynebacterium glutamicum* for Synthetic Genome Rearrangement

CAI Yaoyao, ZHANG Ling, YE Yanrui*

(School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: At the genome-wide level, the metabolic network of *Corynebacterium glutamicum* can be regulated and modified using synthetic biological approaches. However, Cre recombinase expression requires a tightly controlled system. To achieve this, a Cumate-ATc AND-gate inducible system was constructed, exhibiting a markedly lower uninduced relative fluorescence expression (14.28) compared to the traditional IPTG-inducible system (4 238.54). Cre recombinase was used to perform SCRaMbLE on the semi-synthetic *C. glutamicum* strain *semi-syn CG-A1-A2* (containing 40 loxPsym sites within a 111.35 kb synthetic genome) under the control of an inducible system with additional structural optimization. Thirty-two SCRaMbLEd strains with specific site deletion preferences were verified using PCRTags. Genome sequencing revealed that the synthetic genome length of these SCRaMbLEd strains ranged from 64.50 kb to 165.31 kb. Among them, the SCRaMbLEd strain *S-sCG-H* underwent 15 simultaneous rearrangement events. The correlation between the genotype and phenotype of the SCRaMbLEd strains was analyzed in conjunction with growth curve and resistance phenotype assessments. The findings highlight that SCRaMbLE was successfully executed in a

引文格式:

蔡瑶瑶,张灵,叶燕锐.谷氨酸棒杆菌严谨调控系统的构建及其在合成基因组重排中的应用[J].现代食品科技,2025,41(11):89-98.

CAI Yaoyao, ZHANG Ling, YE Yanrui. Design and application of a tightly controlled system in *Corynebacterium glutamicum* for synthetic genome rearrangement [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(11): 89-98.

收稿日期: 2024-08-02 ; 修回日期: 2024-08-25 ; 接受日期: 2024-08-29

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2023A1515012643)

作者简介: 蔡瑶瑶 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 合成生物学, E-mail : yoyo_cyy@foxmail.com

通讯作者: 叶燕锐 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 合成生物学与微生物基因组工程, E-mail : esyanruiye@scut.edu.cn

semi-synthetic *C. glutamicum* strain containing 40 loxPsym sites using the proposed system, providing modification targets for the precise breeding of *C. glutamicum* and serving as a reference for evolutionary studies in other strains.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; tightly controlled system; AND-gate inducible system; SCRaMbLE

谷氨酸棒杆菌作为一种被普遍认为安全 (Generally Recognized as Safe, GRAS) 且可发酵生产各种氨基酸的工业菌株, 被广泛应用于食品、农业和医药领域^[1]。为满足工业生产需求, 亟需改良谷氨酸棒杆菌使其具备高产量、快速生长、耐酸和耐高温等多种工业生产特性^[2,3]。然而这些特性涉及全基因组的多个基因, 无论是传统诱变技术, 还是基因工程和代谢工程技术, 目前都难以满足菌种改造需求。从头合成微生物基因组并引入标准重组元件 (如 loxPsym), 可以增加基因组可塑性, 并在合成基因组上进行自动、连续的人工重排, 即合成染色体重排与修饰技术 (SCRaMbLE, Synthetic Chromosome Rearrangement and Modification by LoxP-mediated Evolution), 从而获得微生物遗传多样性并促进菌种进化^[4,5]。此技术首先由 Jef D. Boeke 提出, 并在酵母合成基因组计划中实现, 成功提高外源代谢途径产量, 如 β -胡萝卜素^[6]和原脱氧紫色杆菌素 (PDV)^[7], 或增强菌株耐受性, 如耐乙醇^[8]、耐碱^[9]、耐盐^[10]、耐咖啡因^[11]和潮霉素 B 抗性^[12]等。本课题组首次将 SCRaMbLE 技术应用于原核生物, 并成功获得了具有多种基因型的新型谷氨酸棒杆菌, 然而在含有 20 个 loxPsym 位点的半合成型谷氨酸棒杆菌的 SCRaMbLE 过程中发现, Cre 重组酶的泄漏表达会抑制菌株生长^[13]。随着合成基因组片段的增加, loxPsym 位点数量的增加, Cre 重组酶的泄漏表达可能会导致菌株发生剧烈重排甚至死亡。因此, 我们需要开发一种严谨调控系统, 以便将 SCRaMbLE 技术应用于谷氨酸棒杆菌工业生产育种的研究中。

严谨调控系统要求未诱导时目的基因几乎不表达, 而诱导后能够迅速响应并显著提高表达水平, 且受诱导剂浓度精确控制。目前, P_{lac} 启动子是谷氨酸棒杆菌最常用的诱导型启动子, 但存在泄漏表达问题^[14]。 P_{BAD} 启动子调控较为严格, 但常用碳源葡萄糖会干扰诱导剂阿拉伯糖, 抑制 P_{BAD} 启动子表达。其它碳源诱导系统也存在类似干扰问题^[15,16]。Lausberg 等^[14]利用大肠杆菌 Tn10 编码的 ATc (四环素) 诱导系统在谷氨酸棒杆菌中严谨调控 GFP 的表达。Seo 等^[17]在枯草芽孢杆菌中开发了 Cumate (4-对异丙基苯甲酸) 诱导系统, 添加诱导剂 cumate 能启动 *sfGFP* 表达, 并且表达量受 cumate 浓度调控。

为了在谷氨酸棒杆菌中开发严谨调控系统, 本研究构建了 Cumate 和 ATc 诱导系统, 发现在未诱导时

相对荧光表达量均显著低于 IPTG 诱导系统。在组合成 Cumate-ATc 与门诱导系统后, 进一步降低了本底表达量。将诱导系统结构优化和表征后, 成功实现了 Cre 重组酶的可控表达, 完成了合成基因组的大规模重排工作。通过基因组测序分析、生长曲线测试和抗逆表型测试, 剖析了谷氨酸棒杆菌基因型和表型之间的相关性。本研究为谷氨酸棒杆菌 SCRaMbLE 和其他应用中严谨调控系统的开发提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Spe I、*Nde I*、*Nco I*、*EcoR I* 等 DNA 限制性内切酶, Q5 DNA 聚合酶, 纽英伦生物技术有限公司; KOD FX 聚合酶, 东洋纺生物科技有限公司; DNA marker, 日本 TaKaRa 公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), cumate, 西格玛奥德里奇贸易有限公司; 无水四环素 (anhydrotetracycline, aTc), 宝日医生物技术有限公司; 凝胶 DNA 小量回收试剂盒, 广州美基生物科技有限公司; 质粒小提试剂盒, 天根生化科技有限公司。

本研究使用的菌株和质粒见表 1 和表 2。

1.2 培养基和溶液的配制

LB 培养基 (L^{-1}): 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g。BHI 培养基 (L^{-1}): BHI 38.5 g。BHIS 培养基 (L^{-1}): BHI 38.5 g, D-山梨醇 91.1 g。CG XII 培养基 (L^{-1}): 硫酸铵 20 g、尿素 5 g、磷酸二氢钾 1 g、磷酸氢二钾 1 g、七水硫酸镁 0.25 g, 使用时, 加入已过滤除菌的 500 g/L 葡萄糖溶液 2 mL, 200 mg/L 生物素 100 mL, 5 mg/L 原儿茶酸溶液 1 mL, 10 g/L 无水氯化钙溶液 2 mL, 微量金属母液 0.1 mL。BHIS+1 mol/L 山梨醇培养基 (L^{-1}): D-山梨醇 182.18 g, BHIS 培养基 1 L。BHIS+2 mol/L 山梨醇培养基 (L^{-1}): D-山梨醇 364.36 g, BHIS 培养基 1 L。CG XII +10 g/L 葡萄糖培养基 (L^{-1}): 将 1 L CG XII 培养基中的 2 mL 500 g/L 葡萄糖溶液换为 20 mL 500 g/L 葡萄糖溶液, 配置 CG XII +10g/L 蔗糖、麦芽糖、山梨醇培养基则换成 20 mL 500 g/L 的蔗糖、麦芽糖、山梨醇溶液。所有固体培养基添加质量分数 1.5% 的琼脂粉。176.5 mmol/L IPTG 溶液: 500 mg IPTG, 纯水 10 mL。50 mmol/L cumate 溶液: cumate 0.0821 g, 无水乙醇 10 mL。0.48 mmol/L aTc 溶液: 无水四环素 10 μ L, 无水乙醇 90 μ L。

表 1 本研究所用的菌株

Table 1 Strains used in this study

菌株	相关特性	来源
<i>E. coli</i> DH5α	质粒构建克隆宿主大肠杆菌, <i>F</i> ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi</i> -1, λ -, <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , Δ <i>lacU169</i> (<i>p80lacZ</i> Δ <i>M15</i>)	TaKaRa
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	野生型谷氨酸棒杆菌	ATCC
<i>semi-synCG</i> -A1-A2	ATCC 13032-rpsLK43R/ET 菌株, 基因组被 111.35 kb 合成型序列替换	实验室保存
<i>CG</i> /pI	ATCC13032 菌株, 携带 pI 质粒, Kan ^R	本文构建
<i>CG</i> /pI- <i>sfGFP</i>	ATCC13032 菌株, 携带 pI- <i>sfGFP</i> 质粒, Kan ^R	本文构建
<i>CG</i> /pT	ATCC13032 菌株, 携带 pT 质粒, Kan ^R	本文构建
<i>CG</i> /pT- <i>sfGFP</i>	ATCC13032 菌株, 携带 pT- <i>sfGFP</i> 质粒, Kan ^R	本文构建
<i>CG</i> /pC	ATCC13032 菌株, 携带 pC 质粒, Kan ^R	本文构建
<i>CG</i> /pC- <i>sfGFP</i>	ATCC13032 菌株, 携带 pC- <i>sfGFP</i> 质粒, Kan ^R	本文构建
<i>CG</i> /pTC	ATCC13032 菌株, 携带 pTC 质粒, Kan ^R	本文构建
<i>CG</i> /pTC- <i>sfGFP</i>	ATCC13032 菌株, 携带 pTC- <i>sfGFP</i> 质粒, Kan ^R	本文构建
<i>sCG</i> /pT4C- <i>Cre</i>	<i>semi-synCG</i> -A1-A2 菌株, 携带 pT4C- <i>Cre</i> 质粒, Kan ^R	本文构建
<i>S-sCG</i> -C	SCRaMbLE 后的 <i>semi-synCG</i> -A1-A2 菌株 C	本文构建
<i>S-sCG</i> -D	SCRaMbLE 后的 <i>semi-synCG</i> -A1-A2 菌株 D	本文构建
<i>S-sCG</i> -E	SCRaMbLE 后的 <i>semi-synCG</i> -A1-A2 菌株 E	本文构建
<i>S-sCG</i> -F	SCRaMbLE 后的 <i>semi-synCG</i> -A1-A2 菌株 F	本文构建
<i>S-sCG</i> -G	SCRaMbLE 后的 <i>semi-synCG</i> -A1-A2 菌株 G	本文构建
<i>S-sCG</i> -H	SCRaMbLE 后的 <i>semi-synCG</i> -A1-A2 菌株 H	本文构建
<i>S-sCG</i> -I	SCRaMbLE 后的 <i>semi-synCG</i> -A1-A2 菌株 I	本文构建
<i>S-sCG</i> -J	SCRaMbLE 后的 <i>semi-synCG</i> -A1-A2 菌株 J	本文构建

表 2 本研究所用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

质粒	相关特性	来源
pJYS1Ptac	大肠杆菌 - 谷氨酸棒杆菌穿梭载体, 含谷氨酸棒杆菌温敏型复制子, P _{tac} 启动子, LacIq 蛋白, Kan ^R	Addgene
pUC57-P _{tetR/tetA} - <i>tetR</i>	P _{tetR/tetA} 启动子表达阻遏蛋白 TetR, Amp ^R	实验室保存
pUC57-CuO- <i>cymR</i>	P _{hom} 启动子表达阻遏蛋白 CymR, P _{tac} 启动子表达操纵位点 CuO, Amp ^R	实验室保存
pACYC-pJ23100- <i>sfGFP</i>	含荧光蛋白 sfGFP, Cm ^R	实验室保存
pCre	pXMJ19 骨架, P _{BAD} 启动子表达 Cre 重组酶, Kan ^R	实验室保存
pI	pJYS1 骨架, P _{tac} 启动子, LacIq 蛋白, Kan ^R	本文构建
pI- <i>sfGFP</i>	pJYS1 骨架, P _{tac} 启动子表达 sfGFP, Kan ^R	本文构建
pT	pJYS1 骨架, P _{tetR/tetA} 启动子, TetR 阻遏蛋白, Kan ^R	本文构建
pT- <i>sfGFP</i>	pJYS1 骨架, P _{tetR/tetA} 启动子表达 TetR 和 sfGFP, Kan ^R	本文构建
pC	pJYS1 骨架, P _{trf} 启动子表达 CymR, P _{tac} 启动子表达 CuO, Kan ^R	本文构建
pC- <i>sfGFP</i>	pJYS1 骨架, P _{trf} 启动子表达 CymR, P _{tac} 启动子表达 CuO 和 sfGFP, Kan ^R	本文构建
pTC	pJYS1 骨架, Cumate-ATc 诱导系统, Kan ^R	本文构建
pTC- <i>sfGFP</i>	pJYS1 骨架, Cumate-ATc 诱导系统表达 sfGFP, Kan ^R	本文构建
pTC- <i>Cre</i>	pJYS1 骨架, Cumate-ATc 诱导系统表达 Cre 重组酶, Kan ^R	本文构建
pT4C- <i>Cre</i>	pJYS1 骨架, Cumate-ATc-4 × CuO 诱导系统表达 Cre 重组酶; Kan ^R	本文构建

1.3 仪器与设备

C1000 Touch 梯度 PCR 仪, Green Pulser Xcell 电穿孔仪, Bio-Rad 公司; NanoDrop2000 超微量分光光度计, 赛默飞世尔科技有限公司; 5200 Multi 全自动化学发光荧光图像分析系统, Tanon 公司; Infinite M2000 PRO 光栅型多功能酶标仪, TECAN 公司; Bioscreen C 全自动生长曲线分析仪, 100 孔 Honeycomb 2 培养板, 芬兰 Oy Growth Curves Ab 公司。

1.4 方法

1.4.1 诱导型启动子系统质粒的构建与鉴定

使用 Q5 DNA 聚合酶对以下质粒进行扩增: pUC57-P_{tetR/tetA}-*tetR*、pUC57-CuO-*cymR*、pACYC-pJ23100-*sfGFP*、pCre 中的 P_{tetR/tetA} 和 *tetR* 片段、*cymR* 和 CuO 片段、*sfGFP* 片段和 *Cre* 片段。随后, 通过 DNA 凝胶回收的方法, 将上述片段采用 Gibson 组装技术与质粒 pJYS1Ptac 连接, 并转化至 *E. coli* DH5α 中。通过菌落 PCR 对转化获得的克隆进行阳性筛选, 提取阳性克隆的质粒进行酶切验证和测序, 最终得到诱导型启动子质粒 pI-*sfGFP*、pT-*sfGFP*、pC-*sfGFP* 和 pTC-*sfGFP* (I 代表 IPTG 诱导系统, T 代表 ATc 诱导系统, C 代表 Cumate 诱导系统, TC 代表 Cumate-ATc 与门诱导系统)。

1.4.2 谷氨酸棒杆菌荧光测定

挑取含荧光质粒的谷氨酸棒杆菌接种于 10 mL 含抗生素的 BHI 液体培养基中, 在 30 ℃、220 r/min 下培养 12 h。将菌液接种至新鲜的含抗生素 BHI 培养基中, 起始 OD₆₀₀ 约为 0.3, 继续培养 3~5 h 至 OD₆₀₀ 约为 1。根据实验方案, 向菌液中添加或不添加诱导剂后继续培养。诱导后, 取 1 mL 菌液在 5 000 r/min 离心 2 分钟, 用 30 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 8.0) 缓冲液洗涤菌体沉淀一次, 再用新缓冲液重悬至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.7。将 200 μL 重悬液置于 96 孔板中, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 8.0) 作为空白对照。使用多功能光栅酶标仪在 478 nm 激发和 515 nm 发射波长下测定荧光强度。每 OD 的荧光强度用于表示 sfGFP 单位表达水平, 计算方法见公式 (1)^[18]。

$$F = \frac{F_e - F_c}{OD_e - OD_c} - \frac{F_b - F_c}{OD_b - OD_c} \quad (1)$$

式中:

F ——每 OD 的荧光强度;

F_e ——实验组荧光值, 含 sfGFP 的菌株的荧光值;

F_b ——背景组荧光值, 不含 sfGFP 的菌株的荧光值;

F_c ——空白组荧光值, 30 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 8.0)

缓冲液的荧光值;

OD_e ——实验组的 OD₆₀₀ 值;

OD_b ——背景组的 OD₆₀₀ 值;

OD_c ——空白组的 OD₆₀₀ 值。

1.4.3 Cre重组酶介导重组

将含 Cre 质粒的谷氨酸棒杆菌接种于 10 mL 含抗生素的 BHIS 液体培养基中, 30 ℃、220 r/min 过夜培养。转接过夜菌液至 20 mL BHIS 液体培养基中, 起始 OD₆₀₀ 约为 0.1, 加入 Cre 质粒的抗生素和诱导剂, 在 30 ℃、220 r/min 下诱导培养相应时间。诱导后, 取 1 mL 菌液在 5 000 r/min 离心 3 min, 重悬于 1 mL 新鲜 BHIS 液体培养基中, 重复此操作一次以去除诱导剂残留。梯度稀释菌液后, 取 100 μL 适当稀释度 (如 10⁻⁶) 菌液涂布于平板上, 30 ℃ 培养 48 h。

1.4.4 PCRTags验证

PCRTags 是一段重新编码的、能区分于野生型或合成型基因组的特定基因序列。*semi-synCG-A1-A2* 基因组含有 85 对 PCRTags 和 40 个 loxPsym 位点。这些 loxPsym 位点将合成基因组切割成 39 个片段, 因此在每两个 loxPsym 位点之间, 选择一对 PCRTags 以设计引物, 共计验证 39 对 PCRTags, 可初步分析 loxPsym 位点之间的重排情况。

使用 KOD FX 聚合酶和 PCRTags 引物扩增 *semi-synCG-A1-A2* 上的 39 对 PCRTags。扩增条带的出现表明该片段存在, 且两端的 loxPsym 位点未发生删除型重排; 无条带则表明该片段已被删除, 且 loxPsym 位点发生了重组。PCRTags 验证无法检测重复、翻转和易位的重排类型。

1.4.5 基因组测序

使用 CTAB/NaCl 法提取细菌全基因组^[19]。利用深圳华大基因股份有限公司的 DNBSEQ-T7 二代测序平台完成基因组测序工作, 测序读长 PE150。重排菌株的基因组分析工作由深圳华大基因股份有限公司完成^[20]。

1.4.6 生长测试

将菌株接种于 10 mL BHIS 液体培养基中, 30 ℃、220 r/min 过夜培养。转接过夜菌液至 10 mL BHIS 中, 过夜摇菌, 以减少菌株活力差异对生长曲线的影响。取 1 mL 过夜菌液, 用 CG XII 培养基洗涤两次以去除 BHIS 培养基。取 50 μL 菌液加入新鲜 CG XII 培养基中稀释至 OD₆₀₀=0.5。将 290 μL CG XII 培养基和 10 μL OD₆₀₀=0.5 的稀释菌液加入 Honeycomb 2 培养板的 100 孔中, 使初始 OD₆₀₀ 约为 0.01。将 Honeycomb 2 培养板置于全自动生长分析仪中, 设定参数为 30 ℃、振荡培养 48 h, 每 60 min 检测 OD₆₀₀ 值, 重复三次。

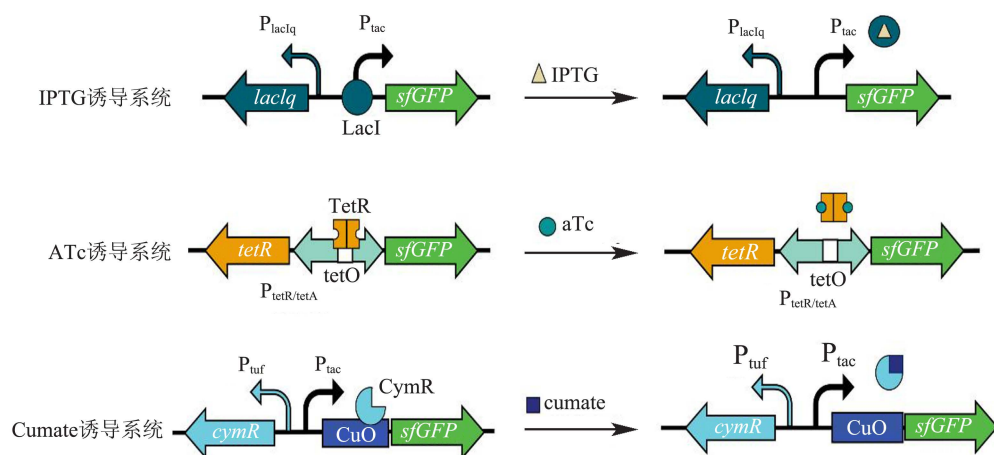


图 1 IPTG、ATc 和 Cumate 诱导系统示意图

Fig.1 Schematic diagram of the IPTG-, ATc- and Cumate-inducible system

注：IPTG 诱导系统中，*lacIq*：*lacI* 基因发生变异后大量表达 LacI 阻遏蛋白；*sfGFP*：绿色荧光蛋白基因。ATc 诱导系统中，*tetR*：阻遏蛋白基因；TetR：阻遏蛋白；tetO：阻遏蛋白 TetR 结合位点，在双向启动子 $P_{tetR/tetA}$ 内部。阻遏蛋白 TetR 会识别并结合到 tetO 操纵元件上，抑制下游基因的转录。当 aTc 存在时，TetR 与其结合后从 tetO 位点上解离，允许下游基因表达。Cumate 诱导系统中，*cymR*：阻遏蛋白基因；CuO：CymR 阻遏蛋白结合位点。由于不含 *lacIq* 基因序列，所以启动子 P_{tac} 组成型表达。当诱导剂 cumate 存在时，阻遏蛋白 CymR 从操纵序列 CuO 上解离，启动下游基因表达。

1.4.7 抗逆表型测试

梯度稀释点板法：取 1 mL 方法 1.4.6 中第二次过夜菌液，用 CG XII 培养基洗涤两次并稀释至 $OD_{600} = 0.3$ ，作为梯度 1。用 CG XII 培养基对梯度 1 菌液进行十倍梯度稀释至梯度 6。每个梯度稀释液中取 5 μ L，均匀点在不同胁迫条件的平板上，30 $^{\circ}$ C 培养至梯度 6 出现单克隆。

1.4.8 数据分析

采用 SPSS 29.0 在线软件进行数据分析，采用 Origin 2021 软件进行图表的绘制。

2 结果与讨论

2.1 诱导系统的构建

Lausberg 等^[14]在谷氨酸棒杆菌中构建的 ATc 诱导系统包括启动子 P_{gap} 控制阻遏蛋白 TetR 的表达盒，以及控制目的基因表达的含有 2 个操纵位点 tetO 的启动子 P_{tet} 。在此基础上，本研究选择含有 1 个操纵位点 tetO 的双向启动子 $P_{tetR/tetA}$ 来控制目的基因的表达，以减弱质粒过大对电转效率和菌株生长带来的负面影响^[21]。由于 Seo 等^[17]报导在枯草芽孢杆菌中，Cumate 诱导系统不诱导时本底表达水平低，且比 IPTG 诱导系统更为经济、可控，因此本研究也在谷氨酸棒杆菌中构建和测试 Cumate 诱导系统，使用 P_{tac} 启动子表达操纵位点 CuO 和目的基因， P_{tuf} 组成型启动子表达阻遏蛋白 CymR^[22]（图 1）。

本研究使用荧光报告系统测试诱导型启动子系统

的本底表达和诱导表达水平。在构建过程中，以质粒 pJYS1Ptac 为骨架，克隆超折叠荧光蛋白 *sfGFP* 序列、 P_{tac} 和 *lacIq* 序列、 $P_{tetR/tetA}$ 双向启动子和 *tetR* 序列^[23]和 *cymR* 和 CuO 序列，以分别构建含 IPTG 诱导系统的对照质粒 pI-*sfGFP*、ATc 诱导系统质粒 pT-*sfGFP* 和 Cumate 诱导系统质粒 pC-*sfGFP* 以及不含 *sfGFP* 序列的对应背景对照质粒 pI、pT 和 pC。

为了测试三种诱导型启动子系统在谷氨酸棒杆菌中的调控严谨性，将三种含荧光报告系统的质粒分别电转化至谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 中，并以对应背景质粒作为对照。根据不同浓度的诱导剂（1 mmol/L IPTG、0.6 μ mol/L aTc、50 μ mol/L Cumate）和 4 h 的诱导时间，对三种诱导系统中的 *sfGFP* 进行诱导表达。荧光结果显示，IPTG 诱导系统能在诱导 4 h 后，相对荧光强度达到 7 226.45 左右，但在不添加诱导剂时，仍能检测到 4 238.54 的相对荧光强度（图 2），与 Asensio-Calavia 等^[24]报道的 IPTG 诱导系统具有严重泄漏现象相符合。虽然 ATc 诱导系统在诱导后的相对荧光强度比 IPTG 诱导系统降低很多，但在未诱导条件下，其相对荧光强度只有 26.51，说明 ATc 诱导系统在谷氨酸棒杆菌中是一种严谨控制的表达系统。Cumate 诱导系统在不添加诱导剂时，相对荧光强度仅为 100.09，但在诱导后可显著提高至 2 849.04，表明 Cumate 诱导系统具有严谨的调控性能、高诱导水平和高诱导率。因此，相较于传统的 IPTG 诱导系统，ATc 诱导系统和

Cumate 诱导系统均能够在谷氨酸棒杆菌中实现目的基因的严谨调控。

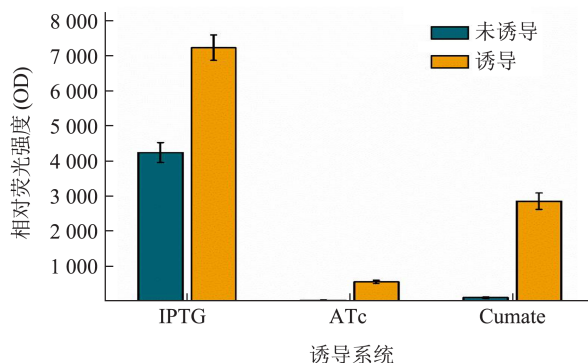


图2 IPTG、ATc 和 Cumate 诱导系统诱导前后的荧光强度

Fig.2 Fluorescence intensity of IPTG-, ATc-, Cumate-inducible system with or without inducer

注：所有数据均为三项独立实验的平均值 ($n=3$), 以平均值 $\pm$ SD (标准偏差) 表示。

2.2 Cumate-ATc诱导系统的建立

与门诱导系统由两个诱导型启动子嵌合组成, 需要两个启动子同时被诱导才能启动目的基因的表达, 这样就可以显著降低诱导系统的非调控表达或泄漏表达^[25, 26]。因此我们在谷氨酸棒杆菌中构建一个与门诱导系统, 以进一步降低诱导系统的泄漏表达。我们在 ATc 诱导系统和 Cumate 诱导系统的基础上, 把 Cumate 诱导系统中目的基因的启动子替换为 ATc 诱导启动子 $P_{tetR/tetA}$ 和 $tetR$ 序列, 构建出一种需要 cumate 和 aTc 同时存在才能启动表达的和门诱导系统, 命名为 Cumate-ATc 诱导系统 (图 3a)。将 $tetR$ 和 $P_{tetR/tetA}$ 序列替换掉质粒 pC-sfGFP 和 pC 的 P_{tac} 和 $lacIq$ 序列, 获得 Cumate-ATc 诱导系统质粒 pTC-sfGFP 及其背景质粒 pTC。通过菌落 PCR、酶切验证和测序验证证明质粒构建成功 (图 3b)。

将质粒 pTC-sfGFP 和 pTC 分别电转进谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 中进行 sfGFP 表达量测定。结果表明, 当均不添加诱导剂 cumate 和 aTc 时, 菌株的相对荧光强度为 14.28。当只添加一种诱导剂 cumate 或 aTc 时, 虽然菌株的荧光强度有所提高, 但不会产生显著性差异 ($P>0.05$)。而在同时使用两种诱导剂后, 菌株的荧光强度显著提高 ($P<0.01$), 诱导 6 h 的相对荧光强度达到 438.88 (图 4), 说明 Cumate-ATc 诱导系统在只存在一种诱导剂时仍能较好地抑制目的基因的表达, 在谷氨酸棒杆菌中是一种调控严谨的诱导系统。通过表征诱导剂浓度和诱导时间, 最终确定 Cumate-ATc 诱导系统的诱导剂浓度为 cumate 25 $\mu\text{mol/L}$ 、aTc 0.12 $\mu\text{mol/L}$, 诱导时间为 8 h。

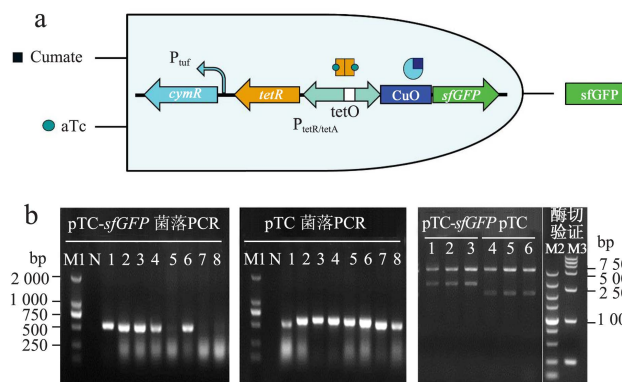


图3 Cumate-ATc 诱导系统的构建

Fig.3 Construction of Cumate-ATc-inducible system

注: a 为 Cumate-ATc 诱导系统示意图, 启动子 P_{tut} 表达 $cymR$ 阻遏蛋白基因, 双向启动子 $P_{tetR/tetA}$ 表达 $tetR$ 基因和 $sfGFP$ 基因; 诱导剂 cumate 和 aTc 添加后, 分别结合 CymR 和 TetR 阻遏蛋白, 使其从 CuO 位点和 tetO 位点解离, 从而启动 $sfGFP$ 的表达。b 为 Cumate-ATc 诱导系统质粒构建结果 (M1 为 DL 2 000 DNA marker; M2 为 DL 5 000 DNA marker; M3 为 DL 15 000 DNA marker; N 为阴性对照野生型大肠杆菌; 菌落 PCR 结果中, 泳道 1~8 为质粒 pTC-sfGFP 或质粒 pTC 的转化子 PCR 产物, 理论目的条带分别为 536、550 bp; 酶切验证结果中, 泳道 1~3 为质粒 pTC-sfGFP 的酶切产物, 理论目的条带是 5 312 和 2 825 bp; 泳道 4~6 为质粒 pTC 的酶切产物, 理论目的条带是 5 312 和 2 101 bp)。

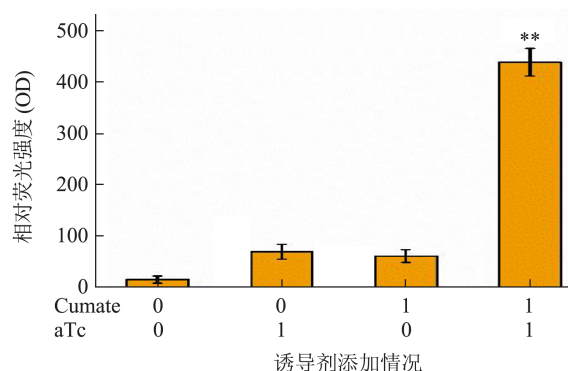


图4 Cumate-ATc 诱导系统的荧光强度

Fig.4 Fluorescence intensity of Cumate-ATc induction system

注: 诱导剂浓度为 cumate 25 $\mu\text{mol/L}$ 、aTc 0.12 $\mu\text{mol/L}$; 横坐标中的“1”表示添加该诱导剂、“0”表示不添加该诱导剂。数据分析采用添加一种诱导剂或两种诱导剂的实验组与未添加诱导剂的对照组进行样本配对 t 检验 (** $P<0.01$)。

2.3 半合成型谷氨酸棒杆菌的基因组重排

合成基因组中会插入多个对称的 loxP 位点 (loxPsym), 当 Cre 重组酶存在时, loxPsym 位点之间的重组会导致中间的 DNA 片段发生相同频率的删除、

翻转、重复或易位,使合成基因组发生通过 loxP 介导的合成染色体重排和修饰 (SCRaMbLE)。通过基因组重排,可以快速获得具有复杂多样基因型和表型的新型菌株,进而研究基因组多样性^[20]、分析基因必需性^[27]、提高外源代谢途径产量^[7, 28]以及增强菌株耐受性^[8-10]等。为满足谷氨酸棒杆菌多种工业生产需求,实验室前期人工合成和替换了谷氨酸棒杆菌基因组中的 111.35 kb,获得了半成型谷氨酸棒杆菌 *semi-synCG-A1-A2*。该菌株解耦 12 对基因,含有 85 对 PCRTags 和 40 个 loxPsym 位点。在 Cre 重组酶的诱导下,这些 loxPsym 位点之间会发生重组,使合成基因组发生大规模重排,进而快速得到具有新基因型的谷氨酸棒杆菌,这些新型菌株在抗逆条件下可能表现出优良的发酵效果。由于 Cre 重组酶专一性重组 loxPsym 位点,因此随着 loxPsym 位点的增加,对 Cre 重组酶表达调控严谨性的要求也会提高。鉴于 Cumate-ATc 诱导系统具有优异的调控性能,本研究将其应用于 *semi-synCG-A1-A2* 中,以调控 Cre 重组酶的表达。

将 pTC-*sfGFP* 质粒中的 *sfGFP* 序列替换为 Cre 重组酶序列,构建得到 Cumate-ATc 诱导的 Cre 重组酶表达质粒 pTC-Cre。将质粒 pTC-Cre 电转入 *semi-synCG-A1-A2* 后,未能获得转化子。我们推测,这可能是由于 Cumate-ATc 诱导的 Cre 重组酶发生了低于荧光检测下限的泄漏表达,导致合成基因组片段发生剧烈重排,从而引起菌株死亡。由于诱导系统需要阻遏蛋白结合到操纵序列来抑制基因表达,我们推测,增加阻遏蛋白的结合位点可能会增强诱导系统的阻遏效果。经过进一步优化和表征,我们建立了 Cumate-ATc-4×CuO 诱导系统,通过将操纵序列 CuO 的数量增加到 4 个后(图 5),大大降低了未诱导状态下的泄漏表达(数据未发表)。将该诱导系统的表达质粒 pT4C-Cre 电转入 *semi-synCG-A1-A2* 中,成功获得了转化子,从而能够进行 SCRaMbLE 研究。

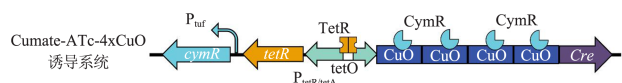


图 5 Cumate-ATc-4×CuO 诱导系统示意图

Fig.5 Schematic diagram of the Cumate-ATc-4×CuO-inducible system

注: Cre 基因的上游含有 4 个串联重复的 CuO 位点序列。当诱导剂 cumate 和 aTc 同时添加后, CymR 和 TetR 阻遏蛋白从 4 个 CuO 位点和 tetO 位点解离,从而启动 Cre 重组酶的表达。

对转化子进行菌落 PCR 验证 39 对 PCRTags 发现, loxPsym 位点之间未发生删除类型的重排事件(图 6a),说明该诱导系统在含有 40 个 loxPsym 位点

的菌株中仍能保持严谨的调控性能。通过添加 cumate 和 aTc 诱导不同时间后,对重排菌株进行 PCRTags 验证(图 6b)。从时间上看, SCRaMbLE 后 PCRTags 的删除程度随诱导时间的增长而逐渐增多。在诱导 24 h 后, PCRTags 的删除程度反而降低,可能是由于长时间诱导积累的重排导致大部分菌株死亡,剩余重排程度较低的菌株得以存活并富集。从位点上看,部分合成基因组片段表现出删除偏好性。例如,在 32 个重排菌株中, 87.5%~100% 的菌株删除了片段 24 和片段 37~39, 这些片段上存在的一些辅酶、无机离子的运输和代谢基因, 以及一些功能未知的假定蛋白基因^[29], 可能与非必需基因相关。而片段 1、2、14、17 和 25 均存在, 这些片段上含有核糖体蛋白、ssDNA 结合蛋白、转录调控因子和膜蛋白等与微生物重要生命活动相关的基因。

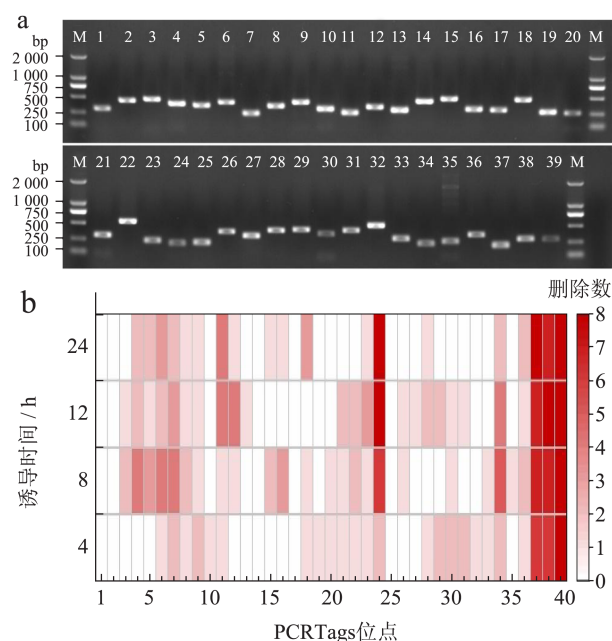


图 6 SCRaMbLE 中的 PCRTags 验证

Fig.6 Verification of PCRTags in SCRaMbLE

注: a 为 *semi-synCG-A1-A2*/pT4C-Cre 转化子的验证结果(M 为 DL 2 000 DNA marker; 泳道 1~20 和 21~39 为合成基因组上 39 对 PCRTags 的扩增产物)。b 为 SCRaMbLE 后得到的菌株的验证结果(横坐标为 39 对 PCRTags, 纵坐标为诱导时间 4、8、12 和 24 h, 每个时间点验证 8 个菌株, 一共 32 个菌株, 红色越深表示该位点所在的 DNA 片段发生删除的菌株数量越多)。

在 32 个重排菌株中随机挑取 8 个采用 CTAB/NaCl 法提取基因组并进行全基因组测序(图 7), 发现每个重排菌株具有独特的基因组结构, 证实 SCRaMbLE 技术通过 loxPsym 位点之间的随机重组可以产生基因组多样性。其中, 菌株 *S-sCG-D*、*S-sCG-F*

和 *S-sCG-H* 经过 SCRaMbLE 后, 111.35 kb 的合成基因组片段缩短至 65 kb 左右, 接近 41% 的片段被删除; 菌株 *S-sCG-E* 由于发生了 21 个基因组片段的串联重复, 导致合成基因组片段总长度增加至 165.31 kb, 具体增长量为 53.96 kb。除此之外, 菌株 *S-sCG-H* 的重排程度最为复杂, 共发生了 2 个删除、5 个翻转、4 个易位和 4 个重复事件。相比本课题组先前报道的 20 个 loxPsym 位点的 SCRaMbLE 工作^[13], 本研究进一步实现了含有 40 个 loxPsym 位点的合成基因组的大规模重排, 迅速获得了具有多样基因型的新型谷氨酸棒杆菌, 体现了谷氨酸棒杆菌基因组的灵活性, 为后续工业应用菌株表征和筛选提供了原材料。同时, 这也提示我们, SCRaMbLE 技术可以作为一种快速有效的基因组精简方法, 降低基因组复杂性, 适用于谷氨酸棒杆菌或其他工业生产菌株的基因组最小化研究^[25]。

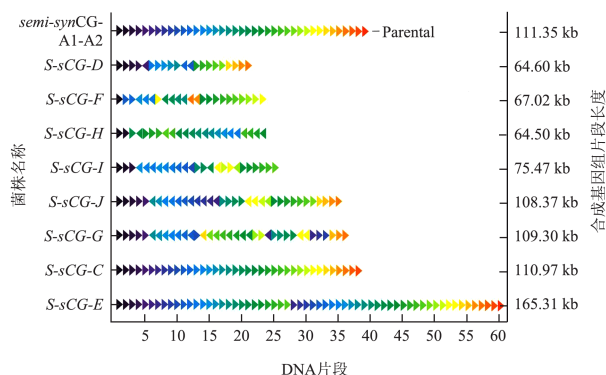


图7 重排菌株的基因组测序结果

Fig.7 Genome sequencing results of SCRaMbLEd strains

注: 横坐标表示 loxPsym 位点之间的 DNA 片段数, 纵坐标表示重排菌株的名称和重排后合成基因组片段的长度。每个重排菌株的合成 DNA 片段用一系列箭头表示。箭头颜色表示 DNA 片段编号, 箭头方向表示 DNA 片段方向。semi-synCG-A1-A2 作为对照, 由深紫色到红色的箭头表示 DNA 片段 1 到 39。

为了检测这些重排菌株的基因组改变是否会影响其生长表型, 本研究对这 8 株重排菌株、野生型谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 和 semi-synCG-A1-A2 进行 CG XII 液体培养基的 48 h 生长曲线测定。结果显示, 大部分重排菌株的生长情况与野生型菌株 ATCC 13032 和 semi-synCG-A1-A2 无显著差异, 平台期 OD₆₀₀ 值稳定在 0.6 左右 (图 8)。然而, 三株重排菌株 *S-sCG-D*、*S-sCG-F* 和 *S-sCG-H* 的生长速度有所减缓, 并存在不同程度的生长抑制。在生长后期, 菌株 *S-sCG-H* 和 *S-sCG-F* 的 OD₆₀₀ 值分别为 0.34 和 0.23, 而菌株 *S-sCG-D* 表现出严重生长缺陷, 平台期 OD₆₀₀ 值仅有 0.16。结合基因组测序结果, 重排菌株 *S-sCG-D*、*S-sCG-F* 和 *S-sCG-H* 出现生长缺陷可能是由于大量基因被删除, 而共同删除的片段上分

布有 NCgl2897~NCgl2909 基因和 NCgl2960 基因, 分别为饥饿诱导蛋白基因、DNA 修复降解相关基因、毒素外排渗透酶基因以及一些与中心碳代谢有关的基因和一个假定分泌蛋白基因。

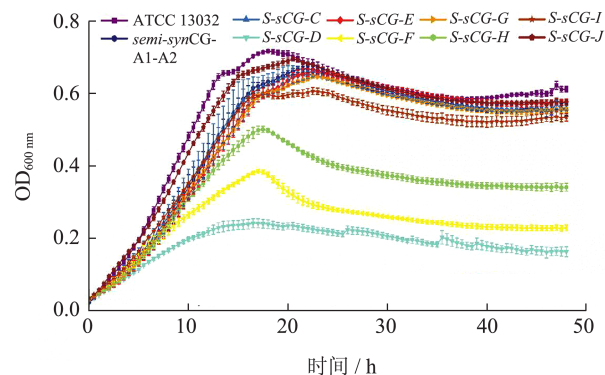


图8 重排菌株的生长曲线

Fig.8 Growth curves of SCRaMbLEd strains

本研究进一步采用梯度稀释点板法, 观察重排菌株在不同胁迫条件下的耐受性 (图 9)。根据发酵条件, 选择的胁迫条件包括高低温、氧化应激、酸碱度变化、渗透压和碳源变化。在高低温测试中, semi-synCG-A1-A2 菌株表现出两个数量级的生长缺陷, 而这种抑制作用在基因组重排后得到明显改善 (图 9a)。即使部分菌株经过重排后删除了一些编码氧化还原酶的基因, 但在经过 2 h 的 H₂O₂ 冲击处理后, 与野生型菌株无明显生长差异 (图 9b)。谷氨酸棒杆菌的细胞质 pH 值为 7.0~8.0, 外部 pH 值维持在 6.0~9.0^[30], 因此无法在 pH 值为 4.5 的固体培养基上生长, 但也没有发现能够生长的重排菌株。并且, 在 pH 值为 5.0 的平板上, 菌株 *S-sCG-D*、*S-sCG-F* 和 *S-sCG-H* 表现出不同程度的酸性适应缺陷 (图 9c)。在渗透压测试中, 仅有重排菌株 *S-sCG-D* 对山梨醇表现出生长缺陷 (图 9d)。当使用合成培养基 CG XII 进行表征时, 不管添加何种碳源, 重排菌株 *S-sCG-D* 均表现出明显的生长缺陷, 与生长曲线测试结果一致。这可能是由于 *S-sCG-D* 菌株相较于其他重排菌株, 删除了多个涉及中心碳代谢途径的基因, 导致其在唯一碳源的 CG XII 培养基中代谢紊乱 (图 9e)。尽管未观察到重排菌株在胁迫条件下表现出显著的抗性, 但是在基因型与表型分析中仍识别出相关重要功能基因。这些基因片段在定位后, 可以通过结合代谢网络分析、基因敲除或过表达实验, 以及改造后重检表型来进一步评估其作为菌株改造靶点的有效性。这也提示我们, SCRaMbLE 技术可以提供一个高效的研究基因型和表型相关性的平台, 但要定向筛选出对某种胁迫压力具有抗性的新型菌株, 需要在基因组重排过程中施加胁迫压力。

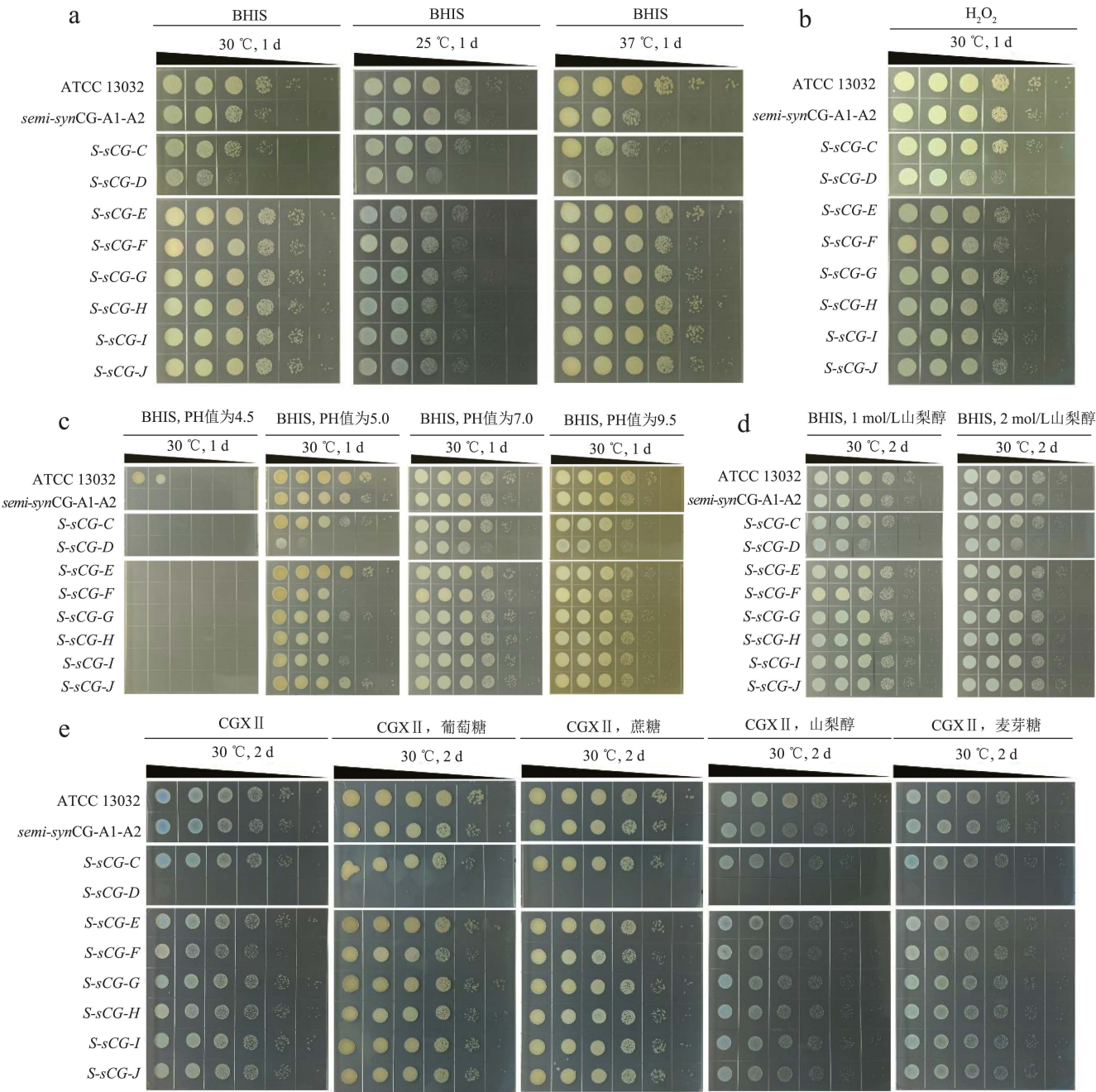


图9 重排菌株的抗逆表型测试

Fig.9 Phenotypic tests for stress resistance of SCRaMbLEd strains

注：a 为高低温测试，谷氨酸棒杆菌最适生长温度为 30 ℃；b 为氧化应激测试；c 为酸碱度变化测试；d 为渗透压测试；e 为碳源变化测试。稀释梯度从左到右为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶。

3 结论

本研究在谷氨酸棒杆菌中构建了一种低泄漏表达的严谨调控系统，Cumate-ATc 与门诱导系统。该系统在未诱导条件下的相对荧光表达量降至 14.28，仅为传统 IPTG 诱导系统（4 238.54）的 0.33%。该系统的开发为谷氨酸棒杆菌的研究提供了更加严谨的调控工具，并为其他菌株在代谢工程、基因工程和合成生物学研究中的精确调控提供了新思路。此外，该系统的低表

达特性使其还适用于减轻有毒产物表达带来的生长负担和避免多基因网络中的拮抗效应等研究，但并不适用于有高表达量需求的应用场景。在其他微生物物种的应用中，仍需进一步评估 Cumate-ATc 与门诱导系统的有效性。进一步优化后的与门诱导系统在复杂基因组背景下仍能保持较强的调控能力，成功介导 Cre 重组酶在含有 40 个 loxPsym 位点的半合成型谷氨酸棒杆菌中完成了 SCRaMbLE 工作。该过程使得 111.35 kb 的合成基因组通过删除、翻转、重复或易位形成 64.50 kb

至 165.31 kb 的新型基因组,充分体现了谷氨酸棒杆菌基因组的潜在遗传灵活性和多样性。生长曲线分析及抗逆表型测试进一步揭示了谷氨酸棒杆菌基因型与表型之间的相关性,从而促进了对其代谢网络和调控机制的深入理解,并为菌种改造提供了潜在的靶点。此外,对 SCRaMbLE 技术所产生的微生物文库进行筛选,有助于提高获得具有高产量与高耐受性的工业发酵新型菌株的概率。目前谷氨酸棒杆菌的合成基因组长度仅为 111.35 kb,所开发的严谨调控系统可以在 40 个 loxPsym 位点中介导 SCRaMbLE。然而,随着基因组合成工作的不断推进,loxPsym 位点的数量会不断增多,该调控系统能否继续有效使用,还需要更多实验来验证。本研究为在含有更长合成基因组片段的谷氨酸棒杆菌中实现 SCRaMbLE 奠定基础,也为其它工业生产菌株的高效进化提供参考。

参考文献

- [1] LIU X, ZHANG W, ZHAO Z, et al. Protein secretion in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(4): 541-551.
- [2] 黄君丽,王逸初,关福豪,等.谷氨酸棒杆菌发酵过程的酸/碱胁迫及其响应的分子机制[J].延安大学学报(自然科学版),2023, 42(3):50-57.
- [3] 李魏东.谷氨酸棒杆菌抗高温解析和元件鉴定[D].长春:吉林大学,2022.
- [4] 田敬东.从DNA合成技术角度阐述合成生物学[J].生命科学, 2011,23(9):931-934.
- [5] DYMOND J S, RICHARDSON S M, COOMBES C E, et al. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design [J]. Nature, 2011, 477(7365): 471-476.
- [6] LIU W, LUO Z, WANG Y, et al. Rapid pathway prototyping and engineering using *in vitro* and *in vivo* synthetic genome SCRaMbLE-in methods [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1936.
- [7] WANG J J B X. Improving prodeoxyviolacein production via multiplex SCRaMbLE iterative cycles [J]. Frontiers of Chemical Science and Engineering, 2018, 12(4): 806-814.
- [8] LUO Z, WANG L, WANG Y, et al. Identifying and characterizing SCRaMbLEd synthetic yeast using ReSCuES [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1930.
- [9] MA L, LI Y, CHEN X, et al. SCRaMbLE generates evolved yeasts with increased alkali tolerance [J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 52.
- [10] KANG J, LI J, GUO Z, et al. Enhancement and mapping of tolerance to salt stress and 5-fluorocytosine in synthetic yeast strains via SCRaMbLE [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 7(3): 869-877.
- [11] CHEN S, XIE Z X, YUAN Y J. Discovering and genotyping genomic structural variations by yeast genome synthesis and inducible evolution [J]. FEMS Yeast Research, 2020, 20(2): foaa012.
- [12] ONG J Y, SWIDAH R, MONTI M, et al. SCRaMbLE: a study of its robustness and challenges through enhancement of hygromycin B resistance in a semi-synthetic yeast [J]. Bioengineering, 2021, 8(3): 42.
- [13] YE Y, ZHONG M, ZHANG Z, et al. Genomic iterative replacements of large synthetic DNA fragments in *Corynebacterium glutamicum* [J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(4): 1588-1599.
- [14] LAUSBERG F, CHATTOPADHYAY A R, HEYER A, et al. A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression [J]. Plasmid, 2012, 68(2): 142-147.
- [15] ZHANG Y, SHANG X, LAI S, et al. Development and application of an arabinose-inducible expression system by facilitating inducer uptake in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5831-5838.
- [16] GUZMAN L M, BELIN D, CARSON M J, et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter [J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(14): 4121-4130.
- [17] SEO S, SCHMIDT-DANNERT C. Development of a synthetic cumate-inducible gene expression system for *Bacillus* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(1): 303-313.
- [18] 张灵.谷氨酸棒杆菌严格调控的启动子系统的建立[D].广州:华南理工大学,2021.
- [19] WILSON K. Preparation of genomic DNA from bacteria [J]. Current Protocols in Molecular Biology, 2001, 56: 2-4.
- [20] SHEN Y, STRACQUADANIO G, WANG Y, et al. SCRaMbLE generates designed combinatorial stochastic diversity in synthetic chromosomes [J]. Genome Research, 2016, 26(1): 36-49.
- [21] CHYLINSKI K, HUBMANN M, HANNA R E, et al. CRISPR-Switch regulates sgRNA activity by Cre recombination for sequential editing of two loci [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 5454.
- [22] EGGELING L, BOTT M. Handbook of *Corynebacterium glutamicum* [M]. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- [23] MOLLER T S, OVERGAARD M, NIELSEN S S, et al. Relation between tetR and tetA expression in tetracycline resistant *Escherichia coli* [J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 39.
- [24] ASENSIO-CALAVIA A, CEBALLOS-MUNUERA A, MENDEZ-PEREZ A, et al. A tuneable genetic switch for tight control of tac promoters in *Escherichia coli* boosts expression of synthetic injectisomes [J]. Microbial Biotechnology, 2024, 17(1): e14328.
- [25] JIA B, WU Y, LI B, et al. Precise control of SCRaMbLE in synthetic haploid and diploid yeast [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1933.
- [26] HOCHREIN L, MITCHELL L A, SCHULZ K, et al. L-SCRaMbLE as a tool for light-controlled Cre-mediated recombination in yeast [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1931.
- [27] WANG P, XU H, LI H, et al. SCRaMbLEing of a synthetic yeast chromosome with clustered essential genes reveals synthetic lethal interactions [J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(5): 1181-1189.
- [28] WU Y, ZHU R, MITCHELL L A, et al. *In vitro* DNA SCRaMbLE [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1935.
- [29] 蔡瑶瑶.基于枯茗酸诱导系统的谷氨酸棒杆菌合成基因组重排[D].广州:华南理工大学,2022.
- [30] GUO J, MA Z, GAO J, et al. Recent advances of pH homeostasis mechanisms in *Corynebacterium glutamicum* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(12): 192.