

谷氨酸棒杆菌碱基编辑的条件优化

李俊维^{1,2*}, 刘叶^{2,3*}, 王钰^{2,3}, 郁彭¹, 郑平^{2,3}, 王猛^{2,3}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

3 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

李俊维, 刘叶, 王钰, 等. 谷氨酸棒杆菌碱基编辑的条件优化. 生物工程学报, 2020, 36(1): 143–151.

Li JW, Liu Y, Wang Y, et al. Optimization of base editing in *Corynebacterium glutamicum*. Chin J Biotech, 2020, 36(1): 143–151.

摘要:近年来, 基于 CRISPR/Cas9 的碱基编辑技术因其具有不产生 DNA 双链断裂、无需外源 DNA 模板、不依赖宿主同源重组修复的优势, 已经逐渐发展成为一种强大的基因组编辑工具, 在动物、植物、酵母和细菌中得到了开发和应用。研究团队前期已在重要的工业模式菌株谷氨酸棒杆菌中开发了一种多元自动化的碱基编辑技术 MACBETH, 为进一步优化该方法, 提高碱基编辑技术在谷氨酸棒杆菌中的应用效率, 本研究首先在谷氨酸棒杆菌中构建了基于绿色荧光蛋白 (GFP) 的检测系统: 将 GFP 基因的起始密码子 ATG 人工突变为 ACG, GFP 无法正常表达, 当该密码子的 C 经编辑后恢复为 T, 即实现 GFP 蛋白的复活, 结合流式细胞仪分析技术, 可快速衡量编辑效率。然后, 构建针对靶标位点的碱基编辑工具, 经测试, 该位点可成功被编辑, 在初始编辑条件下碱基编辑效率为 (13.11±0.21)%。在此基础上, 通过对不同培养基类型、诱导初始 OD_{600} 、诱导时间、诱导物浓度进行优化, 确定最优编辑条件是: 培养基为 CGXII, 初始 OD_{600} 为 0.05, 诱导时间为 20 h, IPTG 浓度为 0.01 mmol/L。经过优化, 编辑效率达到 (30.35±0.75)%, 较初始条件提高了 1.3 倍。最后, 选取原编辑条件下编辑效率较低的位点, 进行了优化后编辑条件下的编辑效率评估, 结果显示, 不同的位点在最优化编辑条件下的编辑效率提高了 1.7–2.5 倍, 进一步证实该优化条件的有效性及通用性。研究结果为碱基编辑技术在谷氨酸棒杆菌中更好的应用提供了重要的参考价值。

关键词: 碱基编辑, 谷氨酸棒杆菌, CRISPR/Cas 系统, 编辑条件

Received: May 14, 2019; **Accepted:** August 13, 2019

Supported by: Key Project of Chinese Academy of Sciences (No. QYZDB-SSW-SMC012), Biological Resources Programme of Chinese Academy of Sciences (No. KFJ-BRP-009), Key Research Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KFZD-SW-215), International Partnership Program of Chinese Academy of Sciences (No. 153D31KYSB20170121), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31700044, 31870044).

Corresponding author: Meng Wang. Tel: +86-22-24828791; E-mail: wangmeng@tib.cas.cn

*These authors contributed equally to this study.

中国科学院前沿科学重点研究项目 (No. QYZDB-SSW-SMC012), 中国科学院战略生物资源计划 (No. KFJ-BRP-009), 中国科学院重点部署项目 (No. KFZD-SW-215), 中国科学院国际合作局对外合作重点项目 (No. 153D31KYSB20170121), 国家自然科学基金 (Nos. 31700044, 31870044) 资助。

网络出版时间: 2019-09-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190909.1005.004.html>

Optimization of base editing in *Corynebacterium glutamicum*

Junwei Li^{1,2*}, Ye Liu^{2,3*}, Yu Wang^{2,3}, Peng Yu¹, Ping Zheng^{2,3}, and Meng Wang^{2,3}

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: In recent years, CRISPR/Cas9-mediated base editing has been developed to a powerful genome editing tool, providing advantages such as without introducing double-stranded DNA break, a donor template and relying on host homologous recombination repair pathway, and has been widely applied in animals, plants, yeast and bacteria. In previous study, our group developed a multiplex automated base editing method (MACBETH) in the important industrial model strain *Corynebacterium glutamicum*. In this study, to further optimize the method and improve the base editing efficiency in *C. glutamicum*, we first constructed a green fluorescent protein (GFP) reporter-based detection system. The point mutation in the inactivated GFP protein can be edited to restore the GFP fluorescence. By combining with flow cytometry analysis, the base-editing efficiency can be quickly calculated. Then, the base editor with the target gRNA was constructed, and the editing efficiency with the initial editing condition was (13.11±0.21)%. Based on this result, the editing conditions were optimized and the result indicated that the best medium is CGXII, the best initial OD_{600} of induction is 0.05, the best induction time is 20 h, and the best IPTG concentration is 0.01 mmol/L. After optimization, the editing efficiency was improved to (30.35±0.75)%, which was 1.3-fold of that in initial condition. Finally, endogenous genomic loci of *C. glutamicum* were selected to assess if the optimized condition can improve genome editing in other loci. Editing efficiency of different loci in optimized condition were improved to 1.7–2.5 fold of that in original condition, indicating the effectiveness and versatility of the optimized condition. Our research will promote the better application of base editing technology in *C. glutamicum*.

Keywords: base editing, *Corynebacterium glutamicum*, CRISPR/Cas system, editing condition

碱基编辑技术是近两年发展起来的新型基因组编辑技术,它结合了 CRISPR/Cas 系统的定位功能与碱基脱氨酶的编辑功能,可以实现在特定位点的碱基替换。相比较于 CRISPR/Cas 介导的基因组编辑,碱基编辑技术不产生双链 DNA 断裂 (Double-stranded DNA break, DSB),不需要外源模板且不依赖于宿主的同源重组修复,能够实现原核生物多位点编辑,极大地丰富了原核生物的基因组编辑^[1]。David Liu 研究团队率先将鼠源胞嘧啶脱氨酶 APOBEC1 与 d/nCas9 蛋白进行融合,开发了碱基编辑工具 BE (Base editor),实现了在哺乳动物细胞中胞嘧啶 (Cytosine, C) 到胸腺嘧啶 (Thymine, T) 的单碱基转换^[2];与此同时, Akihiko Kondo 研究团队则采用七鳃鳗来源的胞嘧啶脱氨酶 PmCDA1 与 d/nCas9 蛋白进行结合,开发了适用于酵母与哺乳动物细胞的碱基编辑工具 Target-AID (Activation-induced cytidine

deaminase)^[3]。随后多个实验室分别在不同的动植物和微生物中进行了碱基编辑系统的开发与优化^[4-7]。之前的研究工作中,本研究团队已在重要的工业模式菌株谷氨酸棒杆菌中首次开发了一种多元自动化的碱基编辑方法 MACBETH (Multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method),实现在 *C. glutamicum* 基因组靶标位点 C 到 T 的转化^[8]。MACBETH 技术与谷氨酸棒杆菌中已建立的基于 CRISPR/Cas9 或 Cpf1 的基因组编辑技术^[9-10]相比,具有诸多优势 (表 1),不仅高效、简便、易于高通量操作,还可以实现 2 个或 3 个靶基因的同时编辑,同时,MACBETH 技术实现了从质粒构建、基因组编辑、获取正确突变株和表型验证的全流程自动化操作。

目前,碱基编辑工具的开发与优化仅侧重于基因层面的改造^[11-13],而编辑过程中的培养条件、诱导条件、编辑时间等因素的研究对于优化融合

蛋白的表达、提高编辑效率同样至关重要。因此,为进一步提高 MACBETH 技术在谷氨酸棒杆菌中的编辑效率,本研究首先在谷氨酸棒杆菌中构建了基于绿色荧光蛋白 (GFP) 的检测系统,通过碱基编辑工具编辑,人工沉默的 GFP 蛋白可以重新被激活,通过流式细胞仪分析表达 GFP 蛋白的细胞的比例,以此快速衡量编辑效率;在此基础上,通过对培养基种类、诱导时初始 OD_{600} 、编辑时间、诱导剂浓度进行优化,得到碱基编辑工具最优编辑条件;最后,选取基因组中其他位点进行编辑,进一步对该最优编辑条件进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

本研究所用菌株和质粒均为笔者实验室购买和保存,详见表 2。

1.1.2 酶、引物及相关试剂盒

Q5 高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司,大肠杆菌感受态细胞制备试剂盒购自 TaKaRa (大连);各种限制性内切酶购自 Thermo 公司;多片段同源重组试剂盒购自诺唯赞 (南京);PCR 引物 (表 3) 由擎科生物 (北京) 有限

表 1 谷氨酸棒杆菌中 CRISPR/Cas 编辑技术与 MACBETH 技术的比较

Table 1 Comparison between CRISPR/Cas system and MACBETH in *C. glutamicum*

Property	CRISPR/Cas	MACBETH (base editing)
Double-stranded DNA break (DSB)	Yes	No
Gene editing	Depends on donor DNA templates and host homologous recombination repair pathway	Point mutations (without donor DNA templates and host homologous recombination repair pathway)
Efficiency	Low to Moderate	Moderate to high
Target sites	Depends on PAM motif	Depends on PAM motif and editing window
Multiplex editing	Achieves single-, double-locus editing	Achieves single-, double-, and triple-locus editing
Library construction	Difficult	Easy
Iterative operation	Yes (plasmid curing firstly)	Yes (plasmid curing firstly)
Operation time for one round editing	About two weeks	About two weeks

表 2 本文所用的质粒与菌株

Table 2 Plasmids and strains used in this study

Name	Source
Plasmids	
pK18mobsacB- Δ ldhA::gfp	Lab stock
pK18mobsacB-gfp _{off}	This study
pK18mobsacB-gfp _{on}	This study
pXMJ19 ^{TS} -nCas9(D10A)-AID-gRNA::ccdB	Lab stock
pXMJ19 ^{TS} -nCas9(D10A)-AID-gRNA(gfp)	This study
Strains	
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> 13032	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> 13032 Δ ldhA::gfp _{off}	This study
<i>C. glutamicum</i> 13032 Δ ldhA::gfp _{on}	This study
<i>C. glutamicum</i> 13032/nCas9(D10A)-AID-Cgl0025 gRNA	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> 13032/nCas9(D10A)-AID-Cgl0369 gRNA	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> 13032/nCas9(D10A)-AID-Cgl1314 gRNA	Lab stock

表 3 本文使用到的引物

Table 3 Primers used in this study

Primer name	Sequences (5'-3')	Size (bp)
GFP-ACG-TGG-F	ACGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTGGACTGGAGTTG	34
GFP-ATG-TGG-F	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTGGACTGGAGTTG	34
GFP-ACG-TGG-R	AAGTTCTTCTCCTTTACTCGTTCTC	25
GFP-ATG-TGG-R	AAGTTCTTCTCCTTTACTCATTCTC	25
SacB-R	CAAATTCAGAACTTGATATTTT	23
SacB-F	AAAATATCAAGTTTCTGAATTTG	23
GFP-C-F	TTCTCCACATAAGCTGGCAATG	22
GFP-C-R	ATGTGCTGCAAGGCGATT	18
GFP2C-R	ATCTCGAAAGCATTGAAGACC	22
GFP2C-F	GTCCGGTTAGGGAAATCAGGAA	22
GFP-gF	TTCACGAGTAAAGGAGAAGAAGCTT	24
GFP-gR	AAACAAGTTCTTCTCCTTACTCG	24
9sgCX-F	AGACTATTCTTCGCACCCAC	20

公司合成；质粒小量抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母粉 5。制备固体培养基时添加 2% 的琼脂。

LBG 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母粉 5, 葡萄糖 5。制备固体培养基时添加 2% 的琼脂。

LAS 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 蔗糖 150。制备固体培养基时添加 2% 的琼脂。

BHI 培养基 (g/L): BHI 37, (NH₄)₂SO₄ 10, K₂HPO₄ 0.2, NaH₂PO₄ 0.3, MgSO₄·7H₂O 终浓度 0.5 g/L, pH 7.2。

MgSO₄·7H₂O 为 50 g/L 的 100× 储液, 于使用前稀释加入。

LBHIS 培养基 (g/L): 蛋白胨 5, 氯化钠 10, 酵母粉 2.5, BHI 18.5, 山梨醇 91。

CGXII^[14] 培养基 (g/L): (NH₄)₂SO₄ 20, 尿素 5, MOPS 42, KH₂PO₄ 1, K₂HPO₄·3H₂O 1.3, 上述成分配成水溶液, 调 pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

MgSO₄·7H₂O 0.25, FeSO₄·7H₂O 0.01, MnSO₄·H₂O 0.01, ZnSO₄·7H₂O 0.001, CuSO₄ 0.2 mg/L, NiCl₂·6H₂O 0.02 mg/L, 上述成分配成 100× 混合母液, 过滤除菌, 于使用前稀释加入。

CaCl₂ 0.01, 原儿茶酸 0.03, 生物素 0.2 mg/L, VB1 0.1 mg/L, 上述 4 种成分单独配成 100× 母液, 过滤除菌, 于使用前稀释加入。

葡萄糖 5, 配成 100× 母液, 115 °C 灭菌 15 min, 于使用前稀释加入。

1.2 方法

1.2.1 谷氨酸棒杆菌 GFP 基因的整合

质粒 pK18mobsacB-*ldhA*::*gfp* 为模板, 利用引物对 GFP-ACG-TGG-F/SacB-R 和 GFP-ATG-TGG-F/SacB-R 分别扩增含 M1T、F8W 双位点突变和 F8W 单位点突变的 *gfp* 基因, 利用引物对 SacB-F/GFP-ACG-TGG-R 和 SacB-F/GFP-ATG-TGG-R 扩增对应的含 *sacB* 蔗糖致死基因的 pK18mobsacB 质粒载体。通过多片段同源重组获得 pK18mobsacB-*gfp*_{off} 和 pK18mobsacB-*gfp*_{on} 质粒。

将以上两质粒分别电转化至谷氨酸棒杆菌 13032 中, 利用蔗糖致死筛选迫使质粒上下游同源臂和基因组 *ldhA* 基因对应位置发生双交换 (图 1A), 从而使 *gfp*_{off} 和 *gfp*_{on} 基因整合到谷氨酸棒杆菌基因组中。具体双交换筛选方法可参见文献[15]。

因 pK18mobsacB 质粒无法在谷氨酸棒杆菌 13032 中复制, 电转后将复苏时间延长至 6 h, 提高质粒上的同源臂与基因组重组的概率。转化子进行菌落 PCR 验证质粒与基因组在上游同源臂处

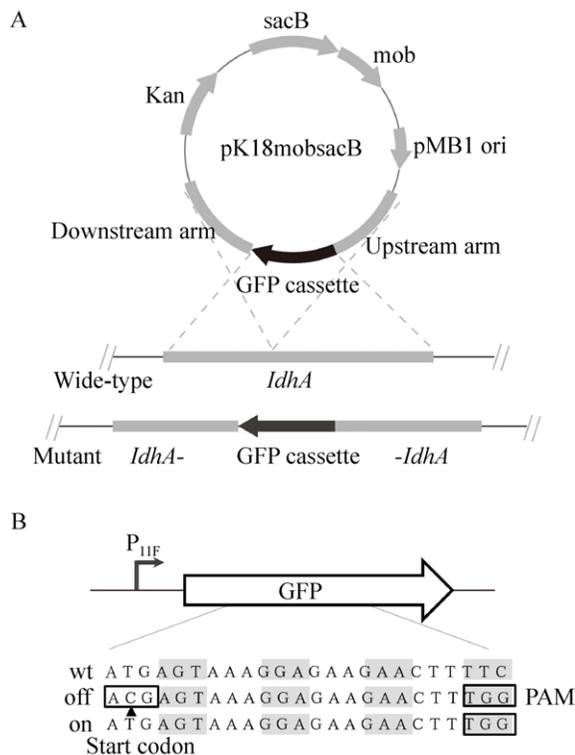


图1 谷氨酸棒杆菌 GFP 荧光检测系统示意图
Fig. 1 Schematic representation of GFP reporter-based detection system in *C. glutamicum*.

发生单交换。单交换验证的上游引物在基因组上游同源臂的上游，下游引物在质粒下游同源臂的下游。挑取验证正确的单交换菌株至 LBG 液体培养基中，30 °C、220 r/min 过夜培养。移取 100 μ L 至 5 mL LAS 液体培养基中，25 °C 培养 16 h，适当稀释后涂布 LAS 平板，25 °C 培养。挑取 LAS 平板上的单菌落，分别接种于 LBG 平板和补充有 25 μ g/mL Kan 抗性的 LBG 平板。挑选无法在抗性平板上生长的单菌落，进行菌落 PCR 验证获得正确的 *gfp* 插入菌株 *C. glutamicum* 13032 Δ *ldhA*::*gfp*_{off} 和 *C. glutamicum* 13032 Δ *ldhA*::*gfp*_{on}。

1.2.2 靶标 GFP 基因的碱基编辑工具的构建

含 GFP gRNA 的质粒 pXMJ19^{TS}-nCas9 (D10A)-AID-gRNA(*gfp*)，下文简称 pXMJ19-CAG，具体构建方法可参见文献[8]，以互补上下游引物形式合成含有 GFP gRNA 的 N20 靶标序列，通过 95 °C 高温 2 min，并缓慢降至室温，使上下游引物退火

结合，使用 *Bsa* I 和 T4 DNA 连接酶将其与 pXMJ19^{TS}-nCas9(D10A)-AID-gRNA::*ccdB* 质粒通过 Golden Gate 方法进行组装，构建得到该质粒。

1.2.3 谷氨酸棒杆菌的转化

取 0.5 μ g pXMJ19-CAG 质粒电转化至 80 μ L *C. glutamicum* 13032 Δ *ldhA*::*gfp*_{off} 感受态细胞中，具体电转化参数参见文献[16]报道。转化后细胞经 30 °C 后培养 1 h 后，涂布于含 5 μ g/mL Cm 抗性的 LBHIS 固体培养基平板上，30 °C 静置培养 2–3 d，直至长出单菌落。

1.2.4 谷氨酸棒杆菌的培养及碱基编辑

1) 种子培养

挑取生长良好的单菌落接种于每孔装有 0.35 mL LBG 液体培养基 (含有 5 μ g/mL Cm) 的 96 孔深孔板中，30 °C、800 r/min 培养 24 h。

2) 诱导培养

将种子培养液按初始 OD_{600} 为 0.2 的接种量转接至新的每孔装有 0.35 mL 含 IPTG (0.05 mmol/L) 及 Cm (5 μ g/mL) 的 LBG 液体培养基的 96 深孔板中，30 °C、800 r/min 培养 16 h。单因素条件优化后应用最优条件。诱导后的菌体经流式细胞仪分析 GFP 复活比例。

1.2.5 流式细胞仪分析 GFP 蛋白复活比例

将收集到的菌体，用 PBS 缓冲液洗 2–3 次，然后重悬至 PBS 缓冲液中，并将样品进行稀释，使得菌体 OD_{600} 为 0.1 左右，为防止菌体黏连，将样品超声 5 min。采用 MoFlo XDP 流式细胞仪 (Beckman Coulter, 德国) 进行分析。采用 488 nm 激发通道，利用带通 530/40 检测 GFP 荧光信号。检测编辑后菌体的荧光强度，记录有荧光的细胞占有所有细胞的比例，即编辑效率。单个样品检测细胞总数为 100 000 个。

1.2.6 碱基编辑条件的优化

种子培养条件同 1.2.3 部分，诱导培养时，分别优化以下条件。

最优培养基的确定：分别测试 LBG、BHI、CGXII、LBHIS 四种培养基对编辑效率的影响。

种子培养后以初始 OD_{600} 0.2 转接至相应培养基中, Cm 终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加入终浓度 0.05 mmol/L 的 IPTG, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 诱导培养 16 h。收集菌体, 通过流式细胞仪分析编辑比例。

最优初始 OD_{600} 的确定: 种子培养后, 分别以初始 OD_{600} 为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1 转接至最优培养基中, Cm 终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加入终浓度 0.05 mmol/L 的 IPTG, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 诱导培养 16 h。收集菌体, 通过流式细胞仪分析 GFP 复活比例。

最优诱导时间的确定: 种子培养后, 以最优初始 OD_{600} 转接至最优培养基中, Cm 终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加入终浓度 0.05 mmol/L 的 IPTG, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 诱导 8、12、16、20、24 h。收集菌体, 通过流式细胞仪分析 GFP 复活比例。

IPTG 最优诱导浓度的确定: 种子培养后, 以最优初始 OD_{600} 转接至最优培养基中, Cm 终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分别加入终浓度 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1 mmol/L 的 IPTG, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min, 诱导时间为最优时间。收集菌体, 通过流式细胞仪分析 GFP 复活比例。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸棒杆菌 GFP 荧光检测系统的构建

为方便谷氨酸棒杆菌中碱基编辑效率的快速测定与比较, 本实验选择绿色荧光蛋白 (GFP) 作为报告蛋白, 通过编辑失活 GFP 蛋白中的靶标位点, 实现 GFP 蛋白的复活, 结合流式细胞仪分析技术, 快速衡量编辑效率。为实现上述目标, 本实验首先突变原始 *gfp* 基因, 通过突变起始密码子, 使得 GFP 蛋白无法正常表达; 然后引入 F8W 突变, 人为创造 PAM 位点, 使得 ACG 中的碱基 C 位于碱基编辑工具的编辑框内, 成为靶标编辑位点, 该基因命名为 *gfp_{off}*。若靶标位点 C 被编辑为 T, 则恢复 ATG 的起始密码子功能, 但 F8W 突变仍存在, 该基因命名为 *gfp_{on}* (图 1B)。将 *gfp_{off}* 基因通过自杀式质粒等位基因交换的方法 (图 1A),

整合到谷氨酸棒杆菌 13032 基因组中, 得到 *C. glutamicum* 13032 Δ *ldhA::gfp_{off}* 菌株; 作为对照, 同时将 *gfp_{on}* 基因整合至 13032 基因组中, 得到 *C. glutamicum* 13032 Δ *ldhA::gfp_{on}* 菌株。经测试, *C. glutamicum* 13032 Δ *ldhA::gfp_{off}* 检测不到荧光, 成功失活 GFP 蛋白; 而 *C. glutamicum* 13032 Δ *ldhA::gfp_{on}* 则未受 F8W 突变点影响, 可以检测到荧光。该结果表明若 *gfp_{off}* 基因中的靶标位点 C 被成功编辑, 则失活 GFP 蛋白将重新复活, 该检测系统可以应用于后序的实验。

2.2 碱基编辑工具复活 GFP 荧光蛋白

如图 2A 所示, 构建靶标 *gfp_{off}* 基因目标位点的质粒 pXMJ19-CAG, 该质粒包括含 Tac 诱导型启动子的 nCas9(D10A)-AID 融合蛋白表达框和含组成型启动子 P11F 的 gRNA 表达框, 将该质粒转化到菌株 *C. glutamicum* 13032 Δ *ldhA::gfp_{off}* 中, 得到重组菌株 *C. glutamicum* 13032 *gfp_{off}*/CAG。将重组菌种子培养 24 h 后, 以初始 OD_{600} 为 0.2 转接至新的含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm 抗性及 0.05 mmol/L IPTG 的 LBG 培养基中, 诱导 16 h, 收集菌体。以菌株 13032 Δ *ldhA::gfp_{on}* 作为阳性对照, 13032 Δ *ldhA::gfp_{off}* 作为阴性对照 (图 2B), 通过流式细胞仪分析诱导后菌体 GFP 复活比例。如图 2C 所示, 经 nCas9(D10A)-AID-gRNA 碱基编辑系统编辑后, 部分 *C. glutamicum* 13032 *gfp_{off}*/CAG 菌株成功获得荧光, 即 *gfp_{off}* 中靶标位点 ACG 成功被编辑为 ATG。经分析, 初始编辑条件下, 平均编辑效率为 (13.11 \pm 0.21)%。

2.3 碱基编辑条件优化

为进一步优化碱基编辑条件、提高碱基编辑效率, 本研究采用上述基于 GFP 荧光蛋白的检测系统, 分别对培养基类型、诱导时初始 OD_{600} 、诱导时间、诱导剂浓度进行了优化。

2.3.1 培养基类型的优化

不同类型的培养基因其营养物质的组分不同, 对细胞生长及蛋白表达的影响也不尽相同。分别测试 LBG、BHI、CGXII、LBHIS 四种培养

基对编辑效率的影响。结果如图 3 所示：相比于其他 3 种培养基，CGXII 培养基中编辑效率最高，达到 $(17.63 \pm 0.25)\%$ 。相比其他几种培养基，CGXII 培养基为无机盐培养基，所含无机盐成分复杂，推测原因可能为某种无机盐成分对于 nCas9(D10A)-AID 融合蛋白的转录表达机制有影响，从而导致编辑效果最好。

2.3.2 诱导时初始 OD_{600} 的优化

在不同初始 OD_{600} 的条件下，添加诱导剂会

影响融合蛋白 nCas9(D10A)-AID 的表达量，从而影响碱基编辑效率。种子培养后，采用上述最优培养基 CGXII，分别以初始 OD_{600} 为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1 转接，经诱导后。检测编辑效率如图 4 所示，当初始 OD_{600} 在 0.01–0.05 之间时，编辑效率随着初始 OD_{600} 增长而增加；当初始 OD_{600} 为 0.05 时编辑效率最高，达到 $(28.28 \pm 3.01)\%$ ；当初始 OD_{600} 高于 0.05 时编辑效率呈现下降趋势。因此，将 0.05 作为最佳诱导时初始 OD_{600} 。

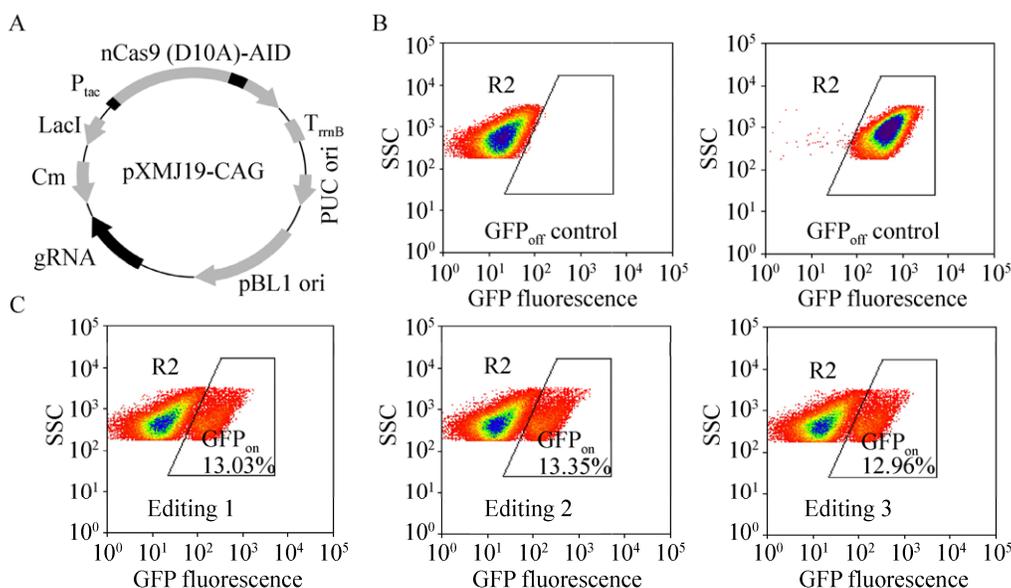


图 2 pXMJ19-CAG 质粒示意图以及流式细胞仪分析碱基编辑结果

Fig. 2 pXMJ19-CAG plasmid schematic representation (A) and base editing results by flow cytometry analysis (B, C).

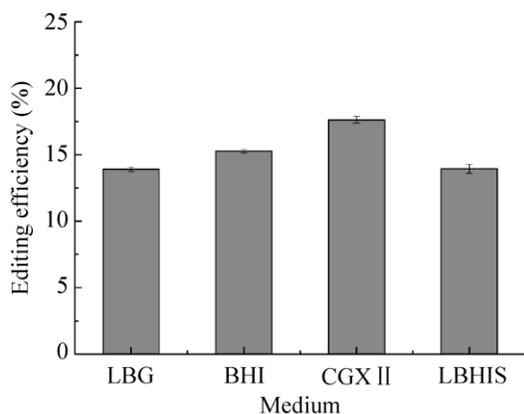


图 3 不同培养基对编辑效率的影响

Fig. 3 Effect of different medium on editing efficiency.

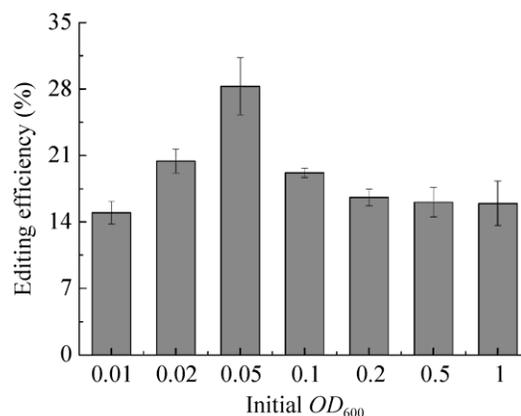


图 4 不同初始 OD_{600} 对编辑效率的影响

Fig. 4 The effect of different initial OD_{600} on editing efficiency.

2.3.3 诱导时间的优化

种子培养后,采用上述最优培养基 CGXII,并以最优初始 OD_{600} 为 0.05 转接,分别于诱导后 8、12、16、20、24 h 取样。测得编辑效率如图 5 所示。随着诱导时间的增长,编辑效率不断提高。当诱导时间 20 h 后编辑效率达到最大且之后趋于稳定,编辑效率为 $(29.28 \pm 0.27)\%$ 。因此,最优诱导时间确定为 20 h。一般情况下,诱导时间过短,蛋白表达量较少,随着诱导时间的延长,蛋白表达量提高,导致编辑效率提高,但是诱导时间过长时 (>20 h),菌体生长已处于稳定期,菌体不再分裂复制,蛋白的表达量也不再提高,所以导致编辑效率趋于平稳。

2.3.4 诱导剂浓度的优化

不同浓度的诱导剂 IPTG 会对融合蛋白 nCas9(D10A)-AID 的表达量产生影响,从而影响编辑效率。分别测试终浓度为 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1 mmol/L 的 IPTG 对编辑效率的影响。流式分析编辑效率如图 6 所示,当 IPTG 浓度为 0.001–0.01 mmol/L 时,编辑效率随着 IPTG

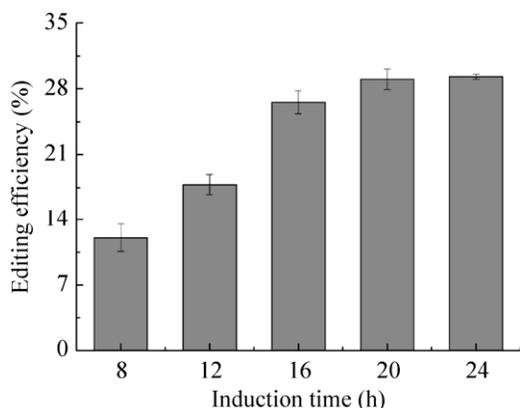


图 5 诱导时间对编辑效率的影响

Fig. 5 Effect of induction time on editing efficiency.

表 4 不同编辑条件下基因组位点编辑比例比较

Table 4 Editing ratio comparison of genomic loci in different conditions

Gene	Protospacer sequence	PAM	Editing ratio (original condition)	Editing ratio (optimized condition)
Cgl0025	ACCAGTTATCGTCTGTTCCA	AGG	3/10	5/10
Cgl0369	CCAAGACGTCATGCTGGACC	GGG	2/10	5/10
Cgl1314	GGGACAGCAAGAAATTATCG	AGG	4/10	8/10

The underlined Cs in protospacer sequences indicate the target editing sites.

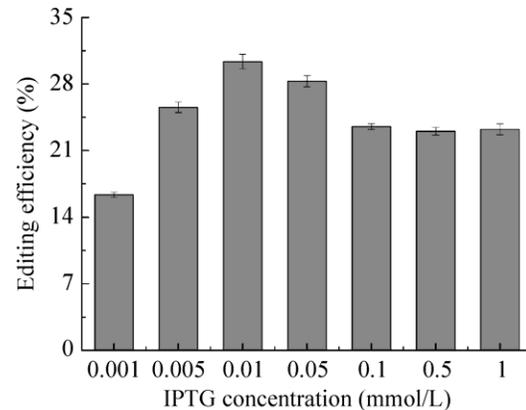


图 6 诱导剂浓度对编辑效率的影响

Fig. 6 Effect of inducer concentration on editing efficiency.

浓度的增加而增加, IPTG 浓度为 0.01 mmol/L 编辑效率最高,达 $(30.35 \pm 0.75)\%$ 。当 IPTG 浓度继续增大时,编辑效率呈现降低趋势,因此,将 0.01 mmol/L 作为 IPTG 的最优诱导浓度。

2.4 最优碱基编辑条件的进一步验证

为了进一步验证上述最优碱基编辑条件适用于谷氨酸棒杆菌基因组其他位点,选取实验室前期已构建、含 nCas9(D10A)-AID 融合蛋白且 gRNA 靶标不同基因 (Cgl0025、Cgl0369、Cgl1314) 的 3 株菌,分别在初始编辑条件与最优编辑条件下对靶标位点进行编辑。编辑结束后,两种不同编辑条件下,每种菌株各挑取 10 个单克隆,对靶标位点进行测序。gRNA 序列中任意一个靶标 C 位点被编辑即视为该单克隆得到编辑,以编辑的单克隆数所占比例来衡量编辑效率。如表 4 所示,通过比较,3 株菌在最优碱基编辑条件下的编辑比例提高了 1.7–2.5 倍,证明了上述优化结果的有效性及其通用性。

3 讨论

碱基编辑技术由于具有简单、高效、高特异性以及低脱靶率等优势,在原核生物中的应用越来越广泛。为进一步提高谷氨酸棒杆菌中碱基编辑工具的编辑效率,优化碱基编辑条件,本研究在谷氨酸棒杆菌中成功构建了基于GFP荧光蛋白的快速检测系统,并成功编辑靶标位点,将失活的GFP蛋白重新复活,初始编辑条件下编辑效率为 $(13.11\pm 0.21)\%$ 。通过单因素条件优化,确定了最优碱基编辑条件:初始 OD_{600} 为0.05, IPTG浓度为0.01 mmol/L,培养基为CGXII,诱导时间为20 h。经过优化,编辑效率提高到了 $(30.35\pm 0.75)\%$,相较于初始条件,提高了约1.3倍。选取原编辑条件下编辑效率较低的位点,进行了优化后编辑条件下的编辑效率评估,不同的位点在最优化条件下的编辑效率提高了1.7–2.5倍,证明了该优化结果的有效性及其通用性。该实验的成功进行,为碱基编辑技术在谷氨酸棒杆菌中更广泛高效的应用奠定了基础。为进一步扩展碱基编辑技术的应用,今后的研究重点将集中于扩展靶标位点以及降低脱靶效率等方面。

REFERENCES

- [1] Zhao YW, Jiang WH, Deng ZX, et al. Development and application of base editors in bacterial genome editing. *Microbiol China*, 2019, 46(2): 319–331 (in Chinese).
赵亚伟, 姜卫红, 邓子新, 等. 碱基编辑器的开发及其在细菌基因组编辑中的应用. *微生物学通报*, 2019, 46(2): 319–331.
- [2] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424.
- [3] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353(6305): aaf8729.
- [4] Kim YB, Komor AC, Levy JM, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnology*, 2017, 35(4): 371–376.
- [5] Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 441–443.
- [6] Zhang YH, Qin W, Lu XC, et al. Programmable base editing of zebrafish genome using a modified CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 118.
- [7] Zong Y, Wang YP, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 438–440.
- [8] Wang Y, Liu Y, Liu J, et al. MACBETH: Multiplex automated *Corynebacterium glutamicum* base editing method. *Metabol Eng*, 2018, 47: 200–210.
- [9] Jiang Y, Qian FH, Yang JJ, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun*, 2017, 8: 15179.
- [10] Liu J, Wang Y, Lu YJ, et al. Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factor*, 2017, 16: 205.
- [11] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551(7681): 464–471.
- [12] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556(7699): 57–63.
- [13] Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 2018, 361(6408): 1259–1262.
- [14] Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol*, 1993, 175(17): 5595–5603.
- [15] Schäfer A, Tauch A, Jäger W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 1994, 145(1): 69–73.
- [16] Ruan YL, Zhu LJ, Li Q. Improving the electro-transformation efficiency of *Corynebacterium glutamicum* by weakening its cell wall and increasing the cytoplasmic membrane fluidity. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(12): 2445–2452.

(本文责编 郝丽芳)