

工业微生物代谢途径调控的基因敲除策略

于慧敏¹, 马玉超²

1 清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084

2 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

摘要: 基因敲除技术是一项重要的分子生物学技术, 在工业微生物代谢工程中具有广泛应用。以下从基因敲除技术的遗传重组原理出发, 总结了基因敲除策略的类型、特征和应用, 重点介绍了采用线性双链 DNA 的 λ Red 同源重组系统、使用环状质粒载体介导的单交换或双交换同源重组策略以及采用转座酶介导的转座重组等几种主要的基因敲除方法, 进一步展望了基因敲除技术的发展前景和应用前景。

关键词: 基因敲除, λ Red 重组系统, 单交换和双交换, 同源重组, 转座重组

Gene knockout strategies for metabolic pathway regulation in industrial microbes

Huimin Yu¹, and Yuchao Ma²

1 Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2 College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Gene knockout, an important technology in molecular biology, has been broadly applied in industrial microbial metabolic engineering. From the basic mechanism of DNA recombination, we summarized and compared in this review different gene knockout strategies. Three most hot and important approaches, including the λ Red recombination system using the linear dsDNA as recombination substrate, the single or double crossover homologous recombination using the circular plasmid DNA as substrate, and the transposase mediated transposition recombination, were summarized in detail. Developing frontiers and application prospects of gene knockout were further discussed.

Keywords: gene knockout, λ Red recombination system, single or double crossover, homologous recombination, transposition recombination

生命的代谢活动是通过活细胞和细胞群的代谢网络进行的, 后者由一系列酶催化反应以及特异性的膜转移系统构成。然而, 细胞自身固有的这种代谢网络相对于实际应用而言, 其遗传特性通

常并非最佳, 这就需要对细胞的代谢途径进行有目的的修饰与调控。1991年, Bailey 和 Stephanopoulos 在 Science 上分别发表重要文章^[1-2], 提出了“Metabolic Engineering”的概念, 综述了代谢工程的应用实例,

Received: May 11, 2010; **Accepted:** August 2, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2007AA02Z201), National Basic Research Program (973 Program) (No. 2007CB714304), National Natural Science Foundation of China (No. 20976094).

Corresponding author: Huimin Yu. Tel: +86-10-62795492; E-mail: yuhm@tsinghua.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA02Z201), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB714304), 国家自然科学基金 (No. 20976094) 资助。

指出了存在的问题及发展的方向,被认为是代谢工程向一门系统的学科发展的起点。

简单地说,代谢工程就是“一种理解并利用代谢过程的方法”^[3];具体而言,代谢工程就是利用基因工程技术或其他物理、化学方法对细胞的代谢途径进行精确地修饰与改造,对细胞内目标物质的代谢流进行扩展、减小、阻断或构建新的代谢途径,从而有目的、有理性地改变微生物原有代谢特性,改进或者构建新的微生物表型,并与微生物基因调控、代谢调控及生化工程相结合,提高目的代谢产物活性或产量、或合成新的代谢产物的工程技术科学^[1-2]。

由于生物系统的复杂性以及大量生物学数据的未知性,这种以理论为基础的系统代谢工程方法的应用有时会受到限制。在此条件下,以基因组规模的分子生物学实验工具为基础的反向代谢工程方法进一步发展起来。反向代谢工程 (Inverse metabolic engineering, IME) 的概念最初由 Jay Bailey 于 1996 年提出^[4]。首先,识别、构建或计算一种目标表型;其次,确定形成该表型的基因或环境因子;最后,通过直接的基因操作或环境调控将该表型转而赋予其他菌株或生物体^[5]。简单而言,反向代谢工程就是从表型到基因型、再从基因型到表型的基因重组策略。

无论是代谢工程还是反向代谢工程研究,基因敲除都是代谢途径调控的主要方法之一。基因敲除技术是 20 世纪 80 年代发展起来的一项重要的分子生物学技术,是通过一定的方法使细胞中特定的基因失活或缺失的技术。它具有定位性强、插入基因随染色体 DNA 稳定遗传等优点。利用基因敲除技术,不仅可以研究被敲除基因的生物学功能,还可以进行功能基因的插入及染色体基因的替换,进而可以阻断微生物细胞的代谢旁路,减弱毒/副作用,强化目标产物的产量或质量,从而成为具有重要工业应用价值的微生物细胞工厂研究中的重要内容。

1 基因敲除技术的基本原理

遗传重组是指不同 DNA 配对后的交换和重排过程^[6],包括同源重组、位点特异性重组和转座重

组(或异常重组)等。其中,同源重组是指两个 DNA 分子之间,通过精确地相互交换片段达到序列重排的目的。通常意义上的基因敲除主要是应用 DNA 同源重组 (Homologous recombination) 原理,利用限制性内切酶、连接酶以及 PCR 技术等对线性 DNA 片段或质粒等基因工程载体进行改造,并导入目标宿主中,使宿主完成对目的基因或基因簇的诸如片段缺失、插入突变、定点突变等一系列的修饰操作。

关于同源重组的分子机制,目前普遍接受的有 3 种模型,即 Holliday 双链侵入模型、Meselson-Radding 单链侵入模型和 Szostak 双链断裂修复模型^[6-7]。其中, Holliday 模型中提出的 Holliday 连接体 (Holliday junction) 结构是 3 个模型所共有的重组中间体。越来越多的研究证明,这 3 种模型实际上是相互联系和相互补充的,而双链断裂引发的同源重组是生物体内更为普遍的遗传现象^[6]。

以大肠杆菌为例,大肠杆菌同源重组过程可分为 4 个主要阶段:起始、同源配对和链交换、异源双链扩展(分支迁移)以及 Holliday 连接体的解离^[6-7]。在这一过程中,至少有 25 种不同的蛋白质参与作用。其中,除最基本的 DNA 解旋酶、DNA 拓扑异构酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶等之外,具有特殊作用的包括 RecBCD、RecA、SSB、RuvAB、RuvC 以及顺式作用重组热点 χ , 也叫 Chi 位点等,最重要的是 RecBCD 和 RecA 蛋白。

同源重组的起始最突出的特点就是单链 DNA 的产生,它是同源重组的底物。RecBCD 酶是一种多功能的酶,它同时具有解旋酶、外切核酸酶、单链内切酶活性,并能以相当高的频率启动含有 Chi 位点的 DNA 重组。Chi 位点 (5'-GCTGGTGG-3') 天然存在于大肠杆菌的染色体 DNA 中,约 5 kb 长的序列中出现一次。这些 Chi 位点与 RecBCD 酶作用,能够促进具有 3'-OH 末端的单链 DNA 的产生。如图 1 所示,由 RecA 蛋白促进的同源配对和链交换是同源重组的核心。RecA 蛋白是单链结合蛋白,是同源重组过程中最重要的蛋白质之一,它大量地结合于单链 DNA 上 (SSB 蛋白辅助),并迅速启动与之结合的单链 DNA 寻找同源双链 DNA,实现同源配对。该过程也称为联会 (Synapsis)。同源配对后,

单链 DNA 便能侵入双链 DNA 将其中的同源单链置换出来, 自己与互补链进行碱基配对, 并产生 D-环, 最终形成 Holliday 连接体; 继而产生异构化, 形成异源双链。在 RuvA、RuvB 以及 RuvC 等蛋白的参与下, 异源双链的扩展以及 Holliday 连接体的解离顺利完成, 通常会产生两侧基因有交换以及两侧基因无交换这两种结果。

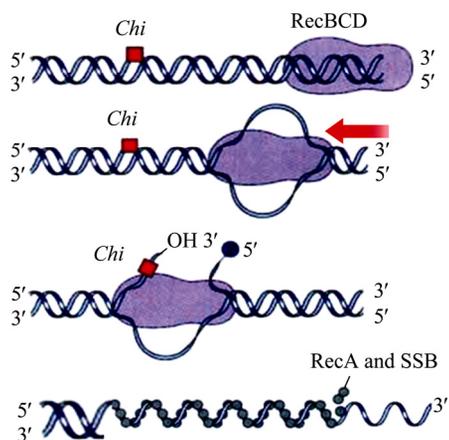


图 1 大肠杆菌同源重组过程中 RecBCD、RecA 和 SSB 蛋白的功能^[8]

Fig. 1 Function of RecBCD, RecA and SSB during the homologous recombination in *Escherichia coli*^[8]. RecBCD enzyme has helicase and nuclease activities. Unwinding of DNA ahead of the moving RecBCD and slower rewinding behind create single-stranded bubbles. One strand is cleaved when the enzyme encounters a Chi site, forming a single-stranded tail. RecA and SSB coat the tail and promote invasion of another DNA duplex, initiating the homologous recombination.

经典的基因敲除策略正是利用上述同源重组基本原理, 通过体外改造一定长度/形式的基因, 与细胞染色体上的靶基因发生同源重组 (插入或置换), 从而改变细胞的遗传特性。

2 基因敲除策略的类型、特征和应用

从上述同源重组的基本原理出发, 分别针对同源重组的底物类型 (单链/双链、线性/环状)、重要蛋白 (RecA 酶、RecBCD 酶等及噬菌体中具有相似功能的酶) 和功能位点 (Chi 位点) 等进行分子设计, 即可开发出各种不同的基因敲除方法, 如表 1 所示。根据同源重组载体的不同, 可以把基因敲除方法分为线性单链 DNA (ssDNA)、线性双链 DNA (dsDNA) 以及环状双链 DNA (质粒载体) 等 3 类。

表 1 基于同源重组的基因敲除策略

Table 1 Homologous recombination based gene knockout strategies

Target substrates	Strategies	References
Linear ssDNA	Using single-stranded oligonucleotide directly as target recombination sequence	[9]
Linear dsDNA	1) RecA dependent and Chi stimulated recombination: introducing Chi site at the end of the linear dsDNA as recombination substrate for not being degraded by RecBCD, also improving the RecBCD function	[10-11]
	2) Red/ET recombination: introducing red recombinase of lambda phage or RecET of RAC phage to perform the recombination without RecA	[12-14]
	3) RecA-assisted lambda red recombination	[15]
Circular dsDNA	1) Non-replicated suicide plasmid or unstable plasmid recombination	[16-17]
	2) Temperature sensitive plasmid recombination	[18]
	3) Antibiotics/SacB mediated single or double crossover recombination	[19-21]

线性单链 DNA 敲除策略不但打靶载体易于构建, 且其重组效率是双链 DNA 的 10~100 倍^[9,11]。

采用线性双链 DNA 进行同源重组, 是近年来基因敲除方法的热点之一。其优点是可以避免较为繁琐的基因克隆和质粒载体构建步骤, 而直接采用 PCR 方法扩增获得目标同源重组片段。然而, 线性双链 DNA 易于被细胞内的 RecBCD 酶降解, 为了解决上述问题, 可以在线性双链 DNA 的两侧引入 Chi 位点, 保护 DNA 不被 RecBCD 消耗, 并能强化 RecBCD 介导的同源重组效率^[10-11]。在应用越来越广泛的 Red/ET 重组系统中, Gam (γ) 蛋白的引入同样是为了抑制宿主菌的重组蛋白 RecBCD 的线性双链 DNA 外切酶活性, 从而协助 Exo 和 Beta 蛋白完成同源重组^[14]。RecA 辅助的 λ Red 重组则可进一步提高重组效率^[15]。

构建环状质粒载体进行目标基因敲除的方法, 是实现微生物基因敲除的经典策略, 主要通过微生物本身的 RecA 重组系统 (主要包括 RecA 和 RecBCD 等蛋白) 发挥作用。RecA 蛋白是单链结合蛋白, 促进各类 DNA 分子间的同源联会、配对、链交换和分支迁移。RecBCD 是由 RecB、RecC 和 RecD 三个蛋白组成的复合体, 它能与双链切口结合使 DNA 链解开, 并在 Chi 位点形成单链, 然后由 RecA

蛋白促进同源重组。由于 RecBCD 具有核酸外切酶 V 的活性,所以线性 DNA 分子在细菌体内会被降解。因此,必须通过环状质粒载体克隆来完成同源重组片段的分子设计和构建。通常情况下,实现同源重组的同源臂长度都在数百 bp 或更长。插入型敲除可以通过同源单交换实现,而置换型敲除则需要通过同源双交换来实现。在上述过程中,为了强化同源重组发生的效率,良好区分单交换和双交换型重组菌株,并使发生交换后的质粒从宿主菌中快速去除,可以采用在质粒载体上相应设计两个不同的正负筛选标记及构建自杀型或温度敏感型质粒载体等策略^[16-21]。

随着基因敲除技术的发展,除了同源重组外,位点特异性重组和转座重组引起的基因插入突变也逐渐受到重视。下面就细菌、放线菌等工业微生物中应用的 3 种重要的基因敲除策略进行详细的介绍和讨论。

3 几种高效的基因敲除策略

3.1 采用线性双链 DNA 的 Red/ET 重组系统

Red 重组系统原来是属于 λ 噬菌体的重组系统,其编码基因 *exo* 和 *bet* 置于 PL 操纵子的控制之下。*exo* 基因的产物 Exo 蛋白(也称为 Red α 蛋白)是 λ 核酸外切酶,它可将 dsDNA 的 5'端切开,产生 3'突出端。*bet* 基因编码的 β 蛋白,是具有退火和链侵入功能的单链结合蛋白。当发生同源重组时,带有同源臂的供体 DNA 分子首先经 Exo 蛋白 (Red α) 作用而使其两端形成单链悬突;之后 β 蛋白形成环形结构并结合到 3'突出末端,对 ssDNA 进行保护,并依靠被结合的同源臂进行配对重组。为起到这一作用, β 蛋白只需要结合 35 bp 的单链核苷酸即可。与传统的大肠杆菌同源重组系统相比,Red α 蛋白的功能类似于 RecBCD,而 Red β 蛋白的功能类似于 RecA^[22]。因此,Red 重组系统可以不依赖于 RecA 蛋白而完成同源重组。但是,缺失 RecA 不仅使重组效率下降,而且载体稳定性也会有所下降^[15]。

另外,Stewart 等在 1998 年还报道了一种通过在大肠杆菌中诱导表达 λ 噬菌体的 RecE 和 RecT 蛋白来介导同源重组的 ET 重组系统^[23]。其中 RecE 和 Red α 蛋白的作用相似,RecT 和 Red β 蛋白的作

用相似,所以经常和 Red 重组一起被称为 Red/ET 重组系统。

Datsenko 和 Wanner 等以 Red 重组系统为核心开发了一套辅助质粒基因敲除程序,以其诸多优点和较为广泛的普适性被大量运用到基因敲除的研究中^[13,24]。他们运用这套基因敲除程序在大肠杆菌中完成了 40 个以上不同染色体基因的敲除而未产生任何差错。以 β -xylosidase 基因 *yagH* 的敲除为例,应用 λ Red 质粒重组系统进行基因敲除的基本流程如图 2 所示,其中,使用的辅助质粒共有 3 个,一个是带有两个 FRT 片段及中间嵌入抗性片段的抗性片段模板质粒 pKD13;一个是可以表达 Red 重组酶的同源重组辅助质粒 pKD46;另外一个是有 FLP 酶表达系统的抗性去除辅助质粒 pCP20。其中,pKD46 和 pCP20 辅助质粒都是温敏型复制子,在 42°C 下质粒复制被抑制并在传代过程中丢失。

由图 2 可见,使用辅助质粒的 Red 重组系统一般包括 4 个主要步骤。第 1 步,是以 pKD13 为模板的基因扩增,通过 PCR 引物设计,引入待敲除目标基因两侧的延伸同源序列(约 50 bp),获得中间为 Kan 抗性基因和 FRT 标记、两侧为短同源臂的线性同源重组片段。第 2 步是核心的同源重组,包括将携带 Red 重组酶的质粒 pKD46 转入目标细胞、表达了 Red 重组酶的感受态细胞的制备、同源片段的电转化导入及同源重组发生等几个关键步骤。其中,感受态细胞的制备一定要在阿拉伯糖诱导质粒 pKD46 的 P_{araB} 启动子高效表达 γ 、 β 和 α 蛋白之后;而质粒 pKD46 的去除则采用 42°C 热激偶合氨苄青霉素抗性负筛选的策略。同源重组之后,Kan 抗性基因即成功插入染色体,并替代原 *yagH* 基因。第 3 步是成功敲除目标基因的阳性重组子的菌落 PCR 筛选和验证。最后一步,是在阳性重组子的细胞中转入表达 FLP 重组酶的辅助质粒 pCP20,FLP 重组酶直接作用于抗性基因外延两端的两个对应 FRT 区(FLP 的识别目标)并再次发生同源重组,用一个 FRT 片段代替原有的两个 FRT 片段及中间的抗性基因,从而达到去除抗性基因的目的。质粒 pCP20 的去除则同样采用 42°C 热激偶合抗生素抗性负筛选的策略。

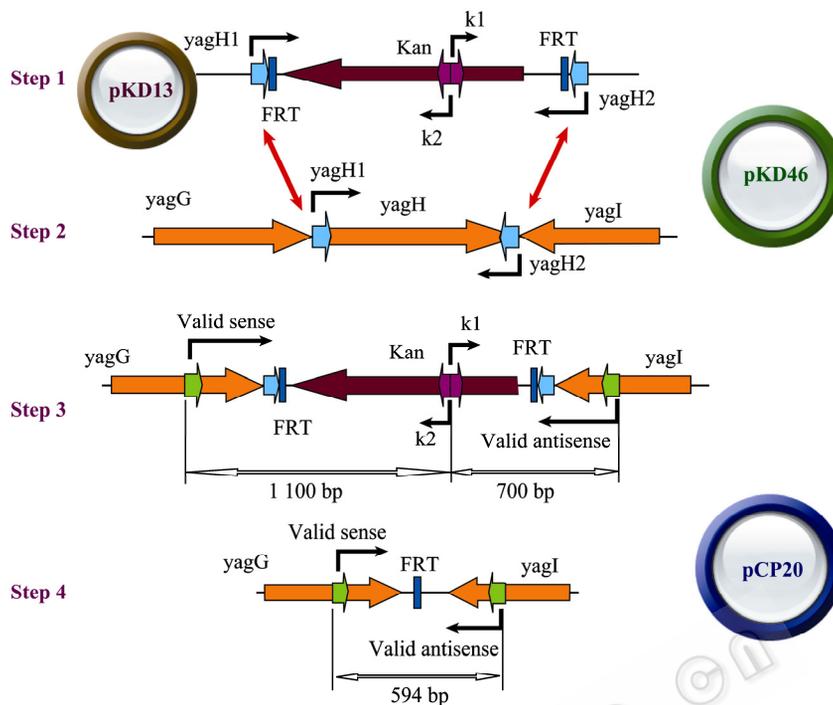


图2 应用 λ Red质粒重组系统进行*yagH*基因敲除的流程示意图

Fig. 2 Steps of *yagH* gene knockout using the plasmid-assisted λ Red recombination. Step 1: preparation of PCR recombination product using pKD13 as template and yagH1/yagH2 as primers. pKD13: Template plasmid. FRT: FLP recombinase recognition target. yagH1, yagH2: *yagH* extension primers around 50 bp. k1, k2: Kanamycin (Kan) test primers. Step 2: gene knock-out by homologous recombination via electroporation, transforming the purified PCR product from step 1 into competent cells of the target strain expressed the Red recombinase (Red α , β and γ proteins) by plasmid pKD46 (Amp). *yagG*: upstream gene of *yagH* in chromosome. *yagI*: downstream gene of *yagH* in chromosome. Step 3: colony PCR verification of the target recombinant with inserted Kan resistance. Primer-pairs of "Valid sense-k2" and "k1-Valid antisense" were used for target identification. Step 4: removal of the flanked Kan resistance cassette via helper plasmid pCP20 (Amp, Cm). Primer pairs of "Valid sense-k2" and "Valid sense-valid antisense" were used for target strain identification. The positive recombinant with removed Kan gene would show no band via primers "Valid sense-k2", and 600 bp band via primers "Valid sense-valid antisense".

这套质粒辅助 λ Red重组酶基因敲除系统有如下优点:操作过程简便,无须构建重组自杀质粒,直接通过线性片段转化实现同源重组,避免了繁琐的酶切及连接过程;可去除抗性筛选基因,用同一套抗性辅助质粒系统可进行多基因叠加敲除;只需很短的同源片段(30~50 bp)即可完成同源重组,节省了人力物力,尤其是在基因序列不很清楚的情况下,可根据有限的基因序列信息设计同源片段实施基因敲除;同源重组效率高,准确度高。目前,这套系统已经广泛应用于大肠杆菌、痢疾杆菌、链霉菌等多种微生物的基因敲除中^[25-26]。

3.2 使用环状质粒载体介导的同源单交换和双交换策略

使用环状质粒载体进行基因敲除的首要条件是要选择宿主细胞的自杀质粒载体来携带目标基因的

同源序列。在实施目标基因敲除过程中,只发生一次同源重组的,称为同源单交换。该方法简单、易行,单交换发生后整个质粒载体插入到目标基因内部,同时产生两个拷贝的无活性目标基因。其示意图如图3A所示。

在具体实施过程中,需要注意的是构建同源重组载体时,目标基因片段要选择中间一段,即不含有起始密码子ATG和终止密码子TGA。一般情况下,单交换比较稳定,回复突变的概率仅为 10^{-4} ~ 10^{-5} /代^[20]。马玉超等利用此法成功敲除了丙烯酸胺生产菌株红色红球菌的副产物基因^[27]。

顾名思义,同源重组双交换就是要通过两次单交换才能达到敲除目标基因的目的,又分为缺失突变和插入突变两种类型,如图3B和图3C所示。缺失突变是指基因敲除后使基因组上的目标基因缺失

编码区中的某一段而达到失活目标基因的目的；插入突变则是指基因敲除后使基因组上的目标基因内部插入额外一个基因而达到目标基因失活的目的。为了便于后期筛选双交换重组子，额外插入的基因通常为抗生素抗性基因。

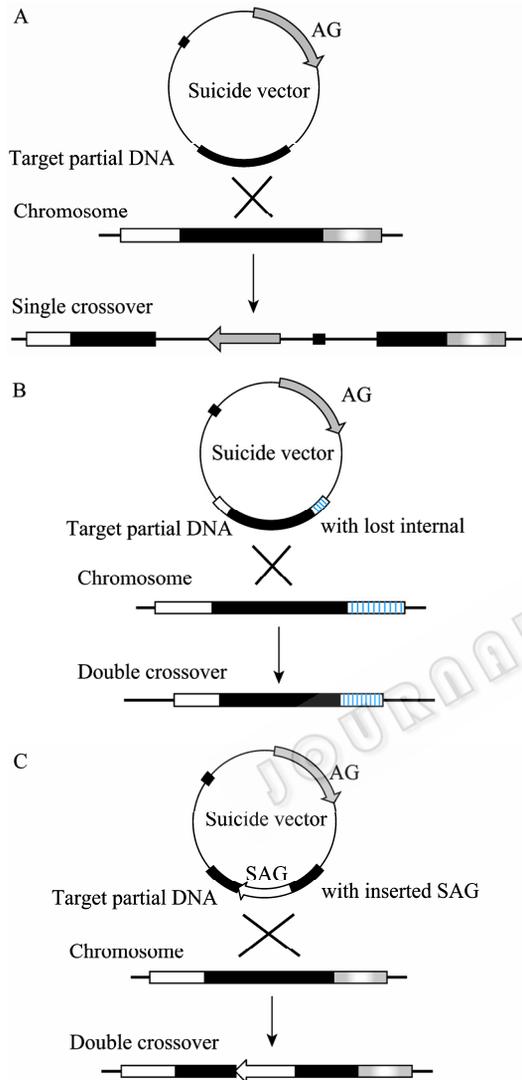


图3 应用环状质粒载体的同源单交换和双交换策略
 Fig. 3 Homologous single crossover and double crossover strategies using circular plasmid vector. (A) Gene knockout by homologous single crossover. (B) Gene knockout by homologous double crossover with lost internal sequence of target gene. (C) Gene knockout by homologous double crossover with inserted SAG marker. AG: antibiotic gene. SAG: second antibiotic gene.

同源双交换的难点之一是如何提高第二次同源重组的效率。针对该问题，可以采用合适的负筛选标记，使含载体序列的细胞对某些特殊的培养条件

敏感，从而促进同源重组的发生和载体序列丢失，极大地提高筛选效率。SacB 是 *Bacillus subtilis* 的果聚糖蔗糖酶^[28]，可转化蔗糖产生果糖并合成果聚糖，在革兰氏阴性菌中，果聚糖在细胞周质空间大量积累，会堵塞周质空间而使细菌致死。当以 SacB 为负筛选标记时，在添加蔗糖条件下，只有发生同源重组双交换的细胞才能够存活。由于较为普遍的适用性和筛选方法的简单性，许多革兰氏阴性细菌均采用 *sacB* 基因作为负筛选标记。另外，也有此系统成功应用于革兰氏阳性菌的报道^[29]，此系统的优点是在不引入抗生素抗性的基础上连续高效地敲除多个基因。

目前，除了大肠杆菌、酵母菌等一些模式菌株的遗传转化效率较高、方法简便外，其他一些菌株的遗传背景不是很清楚，需要用电转化仪才能将质粒导入宿主细胞。所以，同源重组的另一个难点是如何用简便的方法将质粒导入目标基因的宿主细胞。针对该难点，研究者可以将可移动原件 *mob* 引入载体，从而使载体能够通过简单的细菌接合实验高效地导入细胞中。

3.3 采用转座酶介导的转座重组

基因转座子 (Transposon, Tn) 是一种 DNA 序列单元。它能够随机插入到细菌染色体的许多位点上，使得插入位置的基因失活或突变^[6-7]。转座子能够启动不同类型的重组事件发生，还可从插入位点脱落下来。在脱落时，可携带宿主基因组的一部分 DNA 片段，造成基因缺失。利用该特性，转座子被广泛应用于基因敲除研究中，成为改良菌种的新技术。典型的转座子其两端多为两个颠倒重复序列 (IS 序列)，在重复序列之间有编码抗生素的基因及转座酶。常见的转座子有 Tn5、Tn10、Tn916 等。其中，Tn916 具备广泛的寄主范围，可以应用于多种革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌。转座子插入后稳定性好，不容易发生回复突变。

采用基因转座子对目标基因组进行随机敲除，构建基因敲除突变库，然后对目标突变库进行高通量筛选，获得所需要的表型，是近来反向代谢工程的研究热点之一，其示意图如图 4 所示^[30]。

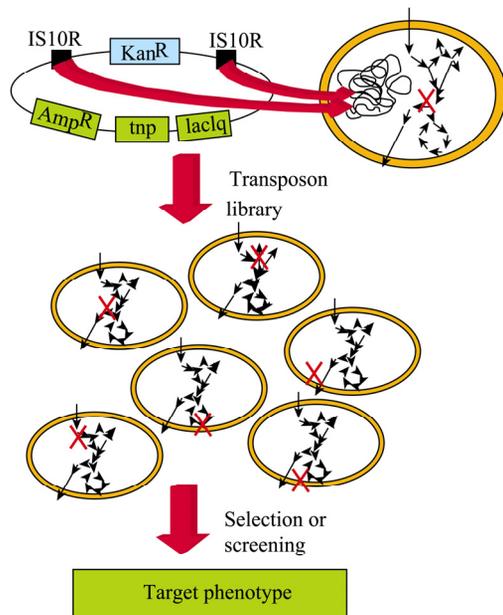


图 4 采用基因转座子进行基因组随机敲除突变库构建和目标表型筛选示意图^[30]

Fig. 4 Construction of the transposon random gene knockout library and selection or screening of the target phenotype^[30].

对于敲除基因的筛选与鉴定, Badarinarayana 在 2001 年报道了一种应用转座子和自杀质粒进行基因插入敲除的新方法^[31]。Hal Alper 等利用类似的方法, 成功筛选并鉴定了在重组大肠杆菌中高产番茄红素所必须敲除的 3 个负调控基因; 将这 3 个基因与理论预测的 4 个基因偶合起来进行不同组合突变, 获得了 64 株敲除不同基因的突变株。全局最优突变株的番茄红素的产率较原始菌株提高了 9 倍^[30]。

然而, 由于转座子自身编码转座酶, 从而遗传稳定性存在问题; 转座子片段过大, 插入后对受体菌株带来负担, 以及需要构建自杀质粒作为载体等问题, 近年来进一步发展了 EZ-Tn5™ Insertion Kits 转座敲除系统^[32]。可以通过体外反应, 使得 Tn5 转座酶与线性 DNA 形成联合复合体, 继而电转化进入宿主细胞, 进行高效的基因随机插入敲除。线性 DNA 联合复合体的中间部分是抗生素抗性基因, 两端各含有 19 bp 的反向重复序列 (ME), 是 Tn5 转座酶的结合位点。研究表明, 上述转座体系在多种革兰氏阴性或阳性细菌中均适用。

采用 TAIL-PCR (Thermal asymmetric interlaced PCR) 方法^[33]或 EZ-Tn5™ Insertion Kits 中专门设计的测序定位引物, 还可特异性地扩增转座子 IS 序列的侧翼被敲除基因, 从而鉴别或发现与目标表型特征相关的功能基因, 并构建或重构基因敲除前后各表型相关的代谢途径。根据这些新的基因型和代谢途径信息, 反过来又可进一步提出理性设计策略, 构建性能更加优越的重组菌株。

转座子基因敲除系统的缺陷是, 基因插入过程基本上是随机的, 一般不能用于某一特定基因的敲除, 也很难在基因组范围内突变所有的基因。因此, 通常将转座子突变系统与直接突变的方法进行互补。

4 基因敲除技术的发展及展望

综上所述, 根据重组位点特征的不同, 基因敲除技术可以分为依赖于较长同源序列的同源重组、依赖于短同源序列的位点特异性重组以及不依赖于同源序列的转座敲除等 3 种主要类型。其中, 位点特异性重组主要在酵母菌等真核生物中应用。

随着遗传学和分子生物学理论的发展, 新的基因敲除原理也在不断的发掘和发现。最具代表性的就是 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术^[34]。RNAi 是指通过利用短片段的短链 RNA 促使特定基因的 mRNA 降解来高效、特异地阻断特定基因的表达, 诱使细胞表现出特定基因沉默的表型。由于少量的双链 RNA 就能阻断基因的表达, 并且这种效应可以传递到子代细胞中, 所以 RNAi 的反应过程也可以用于基因敲除。到目前为止, RNAi 技术作为基因沉默的工具, 被研究人员广泛应用到真核生物细胞的功能基因组学、药物靶点筛选、细胞信号传导通路分析、疾病治疗等研究领域^[34]。与传统的基因敲除技术相比, RNAi 技术具有投入少、周期短、操作简单等优势, 具有良好的发展前景。

总结了细菌、放线菌、酵母菌和霉菌等几种重要工业微生物中已经成功应用的基因敲除策略, 见表 2。

表 2 几种重要工业微生物中成功应用的基因敲除策略
Table 2 Feasible gene knockout strategies applied in some important industrial microbes

Microbe	Inheritance	Strategy
Bacteria	Prokaryotes; single-celled; asexual replication only; peptidoglycan cell walls; ribosomes 70S; may contain plasmids	Homologous recombination [19-21]: Red/ET; linear ssDNA as substrate; RecA dependent/ <i>Chi</i> stimulated; plasmid-based single or double crossover, etc. Transposition [31-32]: Transposon Tn3, Tn5, Tn10, Tn916, etc.; EZ-Tn5 transposome
Actino-bacteria	Prokaryotes; single-celled; Gram positive; high GC content in DNA; may contain plasmids; spores or mycelium break asexual replication	Homologous recombination [27,29,35]: Red/ET; PCR-based linear dsDNA recombination; plasmid based single or double crossover, etc. Transposition [36]: Transposon Tn916; EZ-Tn5 transposome
Yeast	Eukaryotes; single-celled; facultative anaerobic; asexual and sexual replications; ribosomes mainly 80S; polysaccharide cell walls; may contain plasmids	Homologous recombination [37-39]: PCR-based linear dsDNA recombination; plasmid based crossover (positive-negative marker selection) Site-specific recombination [40]: pSR1 plasmid Transposition [41]: Transposon tagging RNAi [42]
Mold	Filamentous fungi; heterotrophic eukaryotic; asexual or sexual spores replication; ribosomes mainly 80S; mycelium forms; not contain plasmids	Homologous recombination [26,43-45]: Red/ET; one-step PCR-based gene targeting; linear minimal element (LME); plasmid-based recombination with special genetic tags (positive-negative selection) Transposition [46]: Transposon arrayed gene knockout (TAGKO) RNAi [47] Others [48,26]: Efficient host construction, etc.

然而, 尽管基因敲除技术的原理在发展, 应用越来越广泛, 但基因敲除技术始终存在着一个难以克服的缺点, 即敲掉一个基因并不一定就能获知该基因的功能, 也不一定能够显著改变细胞的代谢途径, 从而获得预期的表型。这是由于, 一方面, 许多基因在功能上经常是冗余的, 敲掉一个在功能上冗余的基因, 并不能造成容易识别的表型, 因为基因家族的其他成员也可以提供同样的功能; 另一方面, 对于某些必需基因, 敲除后又会造成细胞的致死性, 也就无法对这些必需基因进行相应的研究了。此外, 对于一个目标产物合成的代谢途径, 产物 (或副产物) 的增多 (或减少) 通常需要众多基因的协同作用, 只针对单个基因的敲除研究有时不容易获得很好的结果。

针对这一现象, Hal Alper 等提出了全局转录机器工程 (Global transcriptional machinery engineering, gTME) 的新思路^[49-51]。以基因转录机器——RNA 聚合酶 (RNA polymerase, RNAP) 为对象, 可以同时实现众多不同基因的转录抑制、转录强化以及转录不变, 进而在细胞水平上实现目标表型的全局优化。

2009 年, Wang 等进一步报道了运用多元自动基因组工程 (Multiplex automated genome engineering, MAGE) 加速进化重组细胞的新方法^[52]。他们通过 λ -Red β 蛋白辅助重组, 在单链寡核苷酸中大规模引入番茄红素合成途径的 24 个目标基因的插入和敲除突变, 建立了多元复合基因突变库, 实现多个目标位点的同时定位、突变。进而通过自动化装置的设计和构建, 实现了细胞代谢途径的连续、自动控制改造。在 3 d 之内, Wang 等就筛选得到了番茄红素产量提高 5 倍的重组突变株。

综上所述, 微生物基因敲除技术是遗传工程研究的重大飞跃之一。它为定向改造细菌、放线菌、酵母菌、霉菌等工业微生物、培育微生物新品种提供了重要的技术支持。随着后基因组时代的到来以及各种生物学实验方法的日益进步, 基因敲除技术作为一种强而有力的工具, 必将继续在生物能源、生物材料、生物法化学品以及环境保护等重要领域作出重大贡献。

REFERENCES

- [1] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, **252**(5013): 1668-1674.
- [2] Stephanopoulos G, Vallino JJ. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science*, 1991, **252**(5013): 1675-1681.
- [3] Li Y, Cao ZA. Microbial metabolic engineering: gateway to develop blueprints for cell factories. *J Chem Indust Eng*, 2004, **55**(10): 1573-1580.
李寅, 曹竹安. 微生物代谢工程: 绘制细胞工厂的蓝图. *化工学报*, 2004, **55**(10): 1573-1580.
- [4] Bailey J, Sburlati A, Hatzimanikatis V, et al. Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **52**: 109-121.
- [5] Gill RT. Enabling inverse metabolic engineering through

- genomics. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**: 484–490.
- [6] Chen SF, Liu DH. *Modern Microbial Genetics*. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 272–288.
陈三凤, 刘德虎, 编著. 现代微生物遗传学. 北京: 化学工业出版社, 2003: 272–288.
- [7] Weaver RF. *Molecular Biology*. Beijing: Science Press, 2002: 697–736.
- [8] Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers, 1992.
- [9] Ellis HM, Yu D, Di Tizio T, *et al*. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 6742–6746.
- [10] Smith GR. Homologous recombination in *E. coli*: multiple pathways for multiple reasons. *Cell*, 1989, **58**(5): 807–809.
- [11] Tan XH, Cheng X, Yang X. Advances in gene targeting system of microbe. *Lett Biotech*, 2004, **15**(3): 263–266.
谭晓红, 程萱, 杨晓. 微生物基因打靶系统的研究进展. 生物技术通讯, 2004, **15**(3): 263–266.
- [12] Wang JP, Zhang YM. Red/ET Recombination and its biomedical applications. *Chin J Biotechnol*, 2005, **21**(3): 502–506.
王军平, 张友明. Red/ET 重组及其子生物学中的应用. 生物工程学报, 2005, **21**(3): 502–506.
- [13] Datsenko A, Wanner B. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(12): 6640–6645.
- [14] Murphy KC. λ gam protein inhibits the helicase and M-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme. *J Bacteriol*, 1991, **173**(19): 5808–5821.
- [15] Wang J, Zhang YM, Stewart AF. An improved recombineering approach by adding RecA to lambda Red recombination. *Mol Biotechnol*, 2006, **32**(1): 43–53.
- [16] Xie CJ, He BF, Li S. Gene knockout and its applications in microbe metabolic engineering. *Chin J Bioproc Eng*, 2007, **5**(3): 10–14.
谢承佳, 何冰芳, 李霜. 基因敲除技术及其在微生物代谢工程方面的应用. 生物加工过程, 2007, **5**(3): 10–14.
- [17] Ding XM, Zhang N, Tian YQ, *et al*. Establishment of gene replacement/disruption system through homologous recombination in *Amycolatopsis mediterranei* U32. *Chin J Biotech*, 2002, **18**(4): 431–437.
丁晓明, 张霓, 田永强, 等. 利用同源重组建立地中海拟无枝菌酸菌 U32 染色体的基因置换/中断系统. 生物工程学报, 2002, **18**(4): 431–437.
- [18] Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, *et al*. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, 1993, **175**(11): 3628–3635.
- [19] Steinmetz M, Le Coq D, Aymerich S, *et al*. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol Gen Genet*, 1985, **200**: 220–228.
- [20] Fernandez S, Ayora S, Alonso JC. *Bacillus subtilis* homologous recombination: genes and products. *Res Microbiol*, 2000, **151**: 481–486.
- [21] Hübner P, Masepohl B, Klipp W, *et al*. Nif gene expression studies in *Rhodobacter capsulatus*: ntrC-independent repression by high ammonium concentrations. *Mol Microbiol*, 1993, **10**: 123–132.
- [22] Xu F, Zhang YP, Xi T. The research development of Red/ET system and its application to microbiology research. *Chin J Pharm Biotechnol*, 2007, **14**(3): 221–224.
徐飞, 张宜平, 奚涛. Red/ET 系统研究进展及在微生物研究中的应用. 药物生物技术, 2007, **14**(3): 221–224.
- [23] Zhang Y, Buchholz F, Muylers JPP, *et al*. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, 1998, **20**(1): 123–128.
- [24] Yu D, Ellis HM, Lee EC, *et al*. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(11): 5678–5983.
- [25] Fu XH, Gao YF, Hao SJ, *et al*. Knockout of aroL gene in *Escherichia coli* Top10F' and its effects on the shikimic acid biosynthesis. *J Fudan Univ*, 2007, **46**(3): 366–370.
付小花, 高益范, 郝思捷, 等. 大肠杆菌基因敲除及其对莽草酸合成的影响. 复旦学报 (自然科学版), 2007, **46**(3): 366–370.
- [26] Xu Y, Tu Z. Application and progress of filamentous fungi gene targeting. *J Food Sci Biotechnol*, 2007, **26**(1): 120–126.
许杨, 涂追. 丝状真菌基因敲除技术研究进展. 食品与生物技术学报, 2007, **26**(1): 120–126.
- [27] Ma YC, Yu HM, Pan WY, *et al*. Identification of nitrile hydratase-producing *Rhodococcus ruber* TH and characterization of an *amiE*-negative mutant. *Bioresource Technol*, 2010, **101**: 285–291.
- [28] Steinmetz M, Le Coq D, Djemia HB, *et al*. Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet*, 1983, **191**: 138–144.
- [29] Ishikawa J, Chiba K, Kurita H, *et al*. Contribution of rpoB2 RNA polymerase β subunit gene to rifampin resistance in *Nocardia* species. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 2006, **50**(4): 1342–1346.
- [30] Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining

- systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nat biotechnol*, 2005, **23**: 612–616.
- [31] Badarinarayana V, Estep PW, Shendure J, *et al*. Selection analyses of insertional mutants using subgenic-resolution arrays. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 1060–1065.
- [32] Shevchenko Y, Bouffard GG, Butterfield YS, *et al*. Systematic sequencing of cDNA clones using the transposon Tn5. *Nucl Acids Res*, 2002, **30**: 2469–2477.
- [33] Liu YG. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 1995, **25**: 674–681.
- [34] He S, Zhang DC. Methods and applications of gene knockout. *Chin J Microbiol*, 2009, **21**(2): 181–184.
贺松, 张德纯. 基因敲除方法及其应用. 中国微生物学杂志, 2009, **21**(2): 181–184.
- [35] Eustaquio AS, Gust B, Li SM, *et al*. Production of 8'-halogenated and 8'-unsubstituted novobiocin derivatives in genetically engineered streptomyces coelicolor strains. *Chem Biol*, 2004, **11**(11): 1561–1572.
- [36] Sun YP. Improving cell tolerance of *Rhodococcus ruber* by transposome knockout and plasma mutation [D]. Tsinghua University, 2010.
孙云鹏. 转座体插入突变与等离子体诱变强化红球菌耐受性的研究[D]. 清华大学, 2010.
- [37] Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, *et al*. A simple and efficient method for direct gene deletion in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**(14): 3329–3330.
- [38] Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, *et al*. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 1999, **285**(5429): 901–906.
- [39] Noskov V, Kouprina N, Leem SH, *et al*. A genetic system for direct selection of gene-positive clones during recombinational cloning in yeast. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(2): e8.
- [40] Matsuzaki H, Nakajima R, Nishiyama J, *et al*. Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid. *J Bacteriol*, 1990, **172**(2): 610–618.
- [41] Ross-MacDonald P, Coelho PS, Roemer T, *et al*. Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature*, 1999, **402**: 413.
- [42] Drinnenberg IA, Weinberg DE, Xie KT, *et al*. RNAi in budding yeast. *Science*, 2009, **326**(5952): 544–550.
- [43] Chaverroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(22): e97.
- [44] El-Khoury R, Sellem CH, Coppin E, *et al*. Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Curr Genet*, 2008, **53**(4): 249–258.
- [45] Yu JH, Hamari Z, Han KH. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, 2004, **41**(11): 973–981.
- [46] Hamer L, Adachi K, Montenegro-Chamorro MV, *et al*. Gene discovery and gene function assignment in filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(9): 5110–5115.
- [47] Yamada O, Ikeda R, Ohkita Y, *et al*. Gene silencing by RNA interference in the Koji Mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, **71**: 138–144.
- [48] Takahashi T, Masuda T, Koyama Y. Enhanced gene targeting frequency in ku70 and ku80 disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *Mol Genet Genomics*, 2006, **275**(5): 460–470.
- [49] Alper H, Stephanopoulos G. Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab Eng*, 2007, **9**: 258–267.
- [50] Yu HM, Wang Y. Global transcription machinery engineering—new technology for industrial biotechnology. *Biotechnol Business*, 2009, **4**: 42–46.
于慧敏, 王勇. 全局转录机器工程——工业生物技术新方法. 生物产业技术, 2009, **4**: 42–46.
- [51] Zhao XQ, Jiang RJ, Bai FW. Directed evolution of promoter and cellular transcription machinery and its application in microbial metabolic engineering—a review. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(9): 1312–1315.
赵心清, 姜如娇, 白凤武. 启动子和细胞全局转录机制的定向进化在微生物代谢工程中的应用. 生物工程学报, 2009, **25**(9): 1312–1315.
- [52] Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, *et al*. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, **460**: 894–898.