

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-077

蓝细菌 CRISPRa 系统的开发及其代谢工程应用

王甜甜^{1,2}, 朱虹¹, 杨琛¹

(¹ 中国科学院合成生物学重点实验室, 中国科学院分子植物科学卓越创新中心, 上海 200032; ² 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 蓝细菌是光合作用研究的模式生物之一, 也是构建光能自养细胞工厂的良好底盘。然而目前蓝细菌的遗传操作工具仍然较为缺乏且效率较低, 开发高效的蓝细菌基因调控工具对于蓝细菌系统与合成生物学研究具有重要意义。本研究在模式蓝细菌聚球藻 PCC 7942 中开发了 CRISPR 激活系统, 测试了多个转录激活因子, 将内源的 RNA 聚合酶 ω -亚基 RpoZ 与无 DNA 切割活性的 dCas9 融合表达, 利用高强度启动子表达向导 RNA, 进而敲除内源 rpoZ 基因并优化了 dCas9-RpoZ 的表达及靶向位点。利用建立的 CRISPRa 系统对重要生物燃料——异戊烯醇的生物合成途径进行了工程改造, 该系统不仅能够实现单基因或多基因的高表达, 还可以同时对不同基因进行转录激活和抑制, 将蓝细菌中异戊烯醇的产量提高了 17 倍, 展示了该系统有望成为构建光能自养细胞工厂的有力工具。

关键词: 蓝细菌; CRISPRa; 异戊烯醇

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

Development of CRISPRa for metabolic engineering applications in cyanobacteria

WANG Tiantian^{1,2}, ZHU Hong¹, YANG Chen¹

(¹CAS Key Laboratory of Synthetic Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai 200032, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Cyanobacteria can be used as a model for photosynthesis research and as a chassis for the production of fuels and chemicals from light energy and CO₂. However, the genetic tools of cyanobacteria are still relatively limited. Development of efficient tools for programming gene expression is important for cyanobacterial systems and synthetic biology. Here, we developed a CRISPR transcriptional activation system (CRISPRa) for programming heterologous gene expression in a model cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Among the transcriptional activators tested, endogenous RNA polymerase ω -subunit RpoZ resulted in optimal performance and was chosen for subsequent studies. We established CRISPRa by fusing dCas9 that lost DNA cleavage activity with RpoZ, and expressed single guide RNAs (sgRNAs) under a strong promoter. We further improved heterologous reporter gene expression by deleting

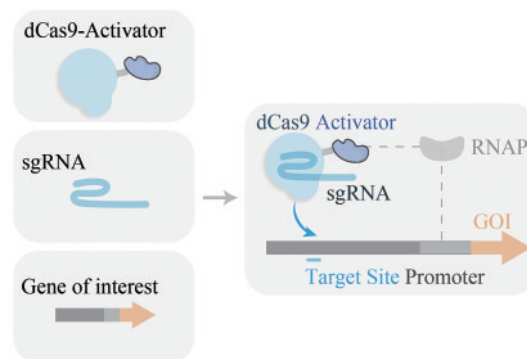
收稿日期: 2022-12-30 修回日期: 2023-02-20

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFA0909702); 国家自然科学基金 (31925001, 31921006); 中国科学院战略性先导科技专项 (XDB27020000)

引用本文: 王甜甜, 朱虹, 杨琛. 蓝细菌 CRISPRa 系统的开发及其代谢工程应用[J]. 合成生物学, 2023, 4(4): 824-839

Citation: WANG Tiantian, ZHU Hong, YANG Chen. Development of CRISPRa for metabolic engineering applications in cyanobacteria [J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(4): 824-839

the *rpoZ* gene in *S. elongatus* PCC 7942, enhancing the expression of dCas9-RpoZ fusion, and optimizing the sgRNA targeting sites. Using this optimized CRISPRa system, we engineered *S. elongatus* PCC 7942 for improved production of isopentenol, an ideal biofuel candidate. Furthermore, we demonstrated that this system was able to simultaneously activate multiple genes of the biosynthetic pathway and repress a gene of the competing pathway, thereby increasing the isopentenol production by 17 times. Thus, this CRISPRa system could serve as a powerful tool for the construction of photoautotrophic cell factories.



Keywords: cyanobacteria; CRISPRa; isopentenol

蓝细菌是光合作用研究的模式生物之一，它们与高等植物一样能够进行产氧光合作用、固定 CO_2 ，为生物圈提供重要的初级生产力。蓝细菌的光合固碳过程，可以将太阳能和 CO_2 直接转化为燃料和化学品，同时起到固碳减排和生物合成的作用，因此引起了重点关注。通过对蓝细菌进行代谢工程改造，已经实现从 CO_2 到数十种燃料及化学品的生物合成，展示出蓝细菌光合生物技术的重要潜力^[1-4]。

近年来蓝细菌遗传操作工具的开发取得了重要进展，包括基因表达调控相关的启动子与核糖体结合位点的挖掘以及核糖开关的应用^[5-9]。然而与大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等模式微生物相比，现有蓝细菌的遗传操作工具仍然较为缺乏且效率较低，因此开发高效的蓝细菌基因调控工具对于蓝细菌系统与合成生物学研究具有重要意义。随着CRISPR技术的发展，它在蓝细菌中的应用也受到了关注。目前在蓝细菌中已建立了基于具有DNA双链切割活性的Cas9或Cas12a的CRISPR基因编辑技术，实现基因的插入、删除及碱基替换^[10-12]。研究者们也利用失去DNA切割功能的dCas9 (dead Cas9) 或dCas12a (dead Cas12a) 在

蓝细菌中建立了抑制基因表达的CRISPR干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 系统^[13-14]，即引导dCas9或dCas12a至目标基因的转录起始位点 (transcription start site, TSS)，则dCas9或dCas12a会物理性阻碍RNA聚合酶的通过，导致基因沉默。Yao等^[13]在集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803中建立了基因组规模的CRISPRi文库，并用于乳酸耐受和高产相关基因的挖掘。然而，蓝细菌中激活基因表达的CRISPR (CRISPR activation, CRISPRa) 系统尚未建立。事实上，细菌中CRISPRa技术的报道仍然较少，目前只有在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 等少数几种模式细菌中建立了该技术，主要是将dCas9和转录激活因子结合，靶向目标基因启动子上游序列，通过招募或稳定RNA聚合酶，从而激活目标基因的转录^[15-17]。对于CRISPRa系统中的转录激活因子，目前已报道的包括RNA聚合酶 ω -亚基RpoZ^[15-16, 18-20]、氧化应激转录调控蛋白SoxS (superoxide response transcriptional regulator)^[21-23]、抗Sigma因子AsiA^[24]以及 σ^{54} 因子依赖型激活蛋白^[17]。本研究在模式蓝细菌聚球藻 (*Synechococcus elongatus*) PCC 7942 (以下简称为

PCC 7942) 中筛选转录激活因子, 建立了CRISPRa系统, 并从靶向位点等多个方面进行测试对该系统进行了优化。

异戊烯醇 (isopentenol) 包括3-甲基-3-丁烯-1-醇 (isoprenol) 和3-甲基-2-丁烯-1-醇 (prenol), 具有高研究法辛烷值 (research octane number, RON) 和良好的燃烧特性, 可作为汽油替代品, 是一种重要的生物燃料。Wither等^[25-30]在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中实现了异戊烯醇的异源合成。本研究以异戊烯醇在PCC 7942中的异源合成为研究对象, 测试了构建的CRISPRa系统能否用于蓝细菌代谢工程, 结果展示了该系统能够用于多基因代谢途径的优化改造, 大幅提高了PCC 7942中异戊烯醇的生物合成。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂

3-甲基-3-丁烯-1-醇、3-甲基-2-丁烯-1-醇、硫酸铁铵、3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒盐酸盐水合物、氨基磺酸、溶菌酶, 均购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; RNA抽提试剂盒, 购自德国Macherey-Nagel公司; RNA反转录试剂盒, 购自TOYOBO; 多片段一步法快速克隆试剂盒、DEPC水、qPCR SYBR Green Master mix, 均购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒、细菌基因组抽提试剂盒, 均购自美国AXYGEN公司; 高保真DNA聚合酶 (2×Phanta Max Master Mix), 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶, 购自纽英伦生物技术 (北京) 有限公司 (New England Biolabs); DH5 α 感受态细胞, 购自深圳康体生命科技有限公司。

1.1.2 仪器

Biometra TAdvanced Twin PCR仪, 购自耶拿分析仪器 (北京) 有限公司; Eppendorf Centrifuge 5417R 冷冻离心机, Eppendorf Centrifuge 5418、5430 高速离心机, 均购自德国艾本德股份公司; BioTek power wave XS2 全波长酶标仪, 购自贝克

曼库尔特国际贸易 (上海) 有限公司; TECAN Spark 多功能微孔板检测仪, 购自帝肯 Tecan 上海贸易有限公司; Agilent 7890A 气相色谱仪, 购自安捷伦科技 (中国) 有限公司; Bio-Rad MYIQ2 荧光定量PCR仪, 购自伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司; Thermo Scientific NANODROP2000C 微量分光光度计, 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 复日科技 FR-980A 凝胶成像仪, 购自上海复日科技有限公司; GXZ-280C 智能光照培养箱, 购自宁波江南仪器厂。

1.2 基因克隆和质粒的构建

提取集胞藻 PCC 6803 基因组, 设计引物 (P18082-F 与 P18082-R, P18082upstream-F 与 P18082upstream-R) 进行PCR得到启动子P18082及其上游序列, 通过同源重组的方法使用多片段一步法快速克隆试剂盒将其与绿色荧光蛋白基因 *sfGFP* 以及质粒载体 PCL1920-NS II (以 PLC1920 质粒为骨架^[1], 在 *SalI* 与 *SacI* 酶切位点处引入 PCC 7942 中 NS II 中性位点的同源臂序列) 进行连接, 得到质粒 P01, 然后将不同的 sgRNA 基因序列及其启动子 *Pcpc* (sgRNA 及启动子 *Pcpc* 由南京金斯瑞公司合成) 也通过同源重组的方法引入该质粒, 得到含有不同靶位点 sgRNA 的质粒 (P02-P07)。

提取大肠杆菌 *E. coli* 基因组, 以此为模板, 设计引物 (*nudI*-F 与 *nudI*-R) 进行PCR得到 *nudI* (GenBank: UZX07358.1); 使用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *BsrGI* 酶切质粒 P05, 通过同源重组将 *nudI* 连接到酶切后的质粒载体上, 得到质粒 P08; 提取 PCC 7942 基因组, 以此为模板, 设计引物 (*dxs*-F 与 *dxs*-R) 通过PCR得到 *dxs* 片段, 与 *nudI* 连接后将其分别插入 *EcoRI* 和 *BsrGI* 酶切后的质粒 P05 和 P07, 构建得到质粒 P09 和 P10。

以质粒 P09 为基础, 将由南京金斯瑞合成的 crRNA 和 tracrRNA 序列通过同源重组替换 P09 质粒中的 sgRNA, 构建得到质粒 P11~P13。

提取化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 基因组, 以此为模板, 通过设计引物 (dCas9-F 与 dCas9-R) 引入两个突变位点 (D10A 和 H840A) 进行PCR得到 dCas9, 设计引物 (*Pendo*-F 与 *Pendo*-R)

通过 PCR 得到启动子 *Pendo*; *soxS* (GenBank: NP_31307)、RNA 聚合酶 ω -亚基 *rpoZ* (GenBank: ABB57740.1)、 α -亚基 *rpoA* (UniProt/Swiss-Prot: Q31L30.1)、RpoA 的 N 端结构域 (UniProt/Swiss-Prot: Q31L30.1 中第 1~681 位碱基)、Sigma-70 因子 *rpoD* (GenBank: D10973.1)、*dxs* (GenBank: CAD55646.1) 均由南京金斯瑞公司合成。通过同源重组的方法分别与质粒载体 PCL1920-NS III (以 PLC1920 质粒为骨架, 在 *SalI* 与 *SacI* 酶切位点处引入 PCC 7942 中 NS III 中性位点的同源臂序列) 或 PCL1920-RpoZ (以 PLC1920 质粒为骨架, 在 *SalI* 与 *SacI* 酶切位点处引入 PCC 7942 中 *rpoZ* 的同源臂序列) 进行连接, 构建成含有不同转录激活蛋白的质粒 (P14-P25)。

dCas9 相关质粒通过同源重组双交换整合到 PCC 7942 基因组上的 NS III 和 RpoZ 位点, 抗性筛选标记为卡那霉素 (kanamycin, KmR); *sfgfp*、*nudI*、*dxs* 相关质粒通过同源重组双交换整合到 PCC 7942 基因组上的 NS II 位点, 抗性筛选标记为壮观霉素 (spectinomycin, SpeR)。

1.3 菌株转化和培养方法

(1) 蓝细菌的转化方法 取 $OD_{730} \approx 1 \sim 2$ 的菌液 1 mL, 5000 r/min 离心 3 min, 去上清; 加入 500 μ L 的 NaCl 溶液 (10 mmol/L) 重悬后 5000 r/min 离心 3 min, 去上清; 加入 10 μ L 的 BG11^[31] 培养

基重悬菌体, 再加入 1 μ g 质粒, 用移液器混匀后用锡箔纸包裹离心管, 置于摇床, 190 r/min 30 $^{\circ}$ C 过夜培养后涂于相应抗性平板。培养 5~7 d 后, 挑取单克隆在相应抗性的 BG11 固体培养基上进行传代来纯合基因组, 使用验证引物进行 PCR 来确认目标基因是否整合到基因组上。

(2) 蓝细菌摇瓶培养方法 将蓝细菌接种到含有 25 mL BG-11 培养基 (含 100 mmol/L NaHCO_3) 的三角瓶中, 三角瓶用纱布封口, 光照强度 3000 lx, 温度 30 $^{\circ}$ C, 摇床转速 190 r/min。对于异戊烯醇合成菌株的培养, 纱布换成密封性更好的封口膜。

(3) BG-11 培养基 (含 100 mmol/L NaHCO_3) 配制 1.5 g/L NaNO_3 , 0.075 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.036 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.76 g/L HEPES, 1 mL/L 溶液 1, 1 mL/L 溶液 2, 1 mL/L 溶液 3; 加入 8.4 g/L 的 NaHCO_3 , 用 NaOH 调节 pH 至 7.5, 过滤除菌。

溶液 1: 6.567 g/L 一水柠檬酸 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6 g/L 柠檬酸铁铵 $\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_7$, 1.107 g/L $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 过滤除菌。

溶液 2: 2.86 g/L H_3BO_3 , 1.545 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.222 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.391 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0404 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 过滤除菌。

溶液 3: 52 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 20 g/L Na_2CO_3 , 过滤除菌。

本研究工作所用到的蓝细菌菌株、质粒和引物见表 1~表 3。

表 1 本实验所用到的菌株

Table 1 Strains used in this study

菌株 Strain	基因型 Genotype	来源 Source
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942	Wild type	ATCC
PCC 7942-G01	P18082 <i>sfgfp</i> integrated at NS II	This work
PCC 7942-G02	P18082 <i>sfgfp pcpc</i> sgRNA 106 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G03	P18082 <i>sfgfp pcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G09	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at NS III P18082 <i>sfgfpPcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G10	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoA</i> integrated at NS III P18082 <i>sfgfpPcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G11	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoD</i> integrated at NS II P18082 <i>sfgfpPcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G12	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoA</i> NTD integrated at NS III P18082 <i>sfgfpPcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work

续表

菌株 Strain	基因型 Genotype	来源 Source
PCC 7942-G13	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-soxS</i> integrated at NS III <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G14	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at NS III <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H1 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G15	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at NS III <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H2 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G16	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at NS III <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H3 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G17	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at NS III <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H5 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G18	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i>	This work
PCC 7942-G19	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G27	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H1 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G28	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H2 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G29	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H3 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G30	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H5 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G31	<i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H1 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G32	<i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H2 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G33	<i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H3 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G34	<i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G35	<i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H5 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G36	<i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H1 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G37	<i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H2 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G38	<i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H3 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G39	<i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G40	<i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 sfgfp Pcpc</i> sgRNA H5 integrated at NS II	This work
PCC 7942-G45	<i>PJ23108 dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i>	This work
PCC 7942-S01	<i>P18082 nudI Pcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-S02	<i>P18082 nudI dxs Pcpc</i> sgRNA H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-S03	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at NS III <i>P18082 nudI Pcpc</i> sgRNA-H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-S04	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 nudI Pcpc</i> sgRNA-H4 integrated at NS II	This work
PCC 7942-S05	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at NS III <i>P18082 nudI dxs Pcpc</i> sgRNA-H4 integrated at NS II	This work

续表

菌株 Strain	基因型 Genotype	来源 Source
PCC 7942-S06	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 nudI dxs Pcpc sgRNA-H4</i> integrated at NS II	This work
PCC 7942-S07	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 nudI dxs Pcpc sgRNA-106</i> integrated at NS II	This work
PCC 7942-S12	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 nudI dxs Pcpc sgRNA-H4 Ptrc crRNA-g1</i> <i>PJ23119 tracrRNA</i> integrated at NS II	This work
PCC 7942-S13	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 nudI dxs Pcpc sgRNA-H4 Ptrc crRNA-g2</i> <i>PJ23119 tracrRNA</i> integrated at NS II	This work
PCC 7942-S14	<i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i> integrated at <i>rpoZ</i> <i>P18082 nudI dxs Pcpc sgRNA-H4 Ptrc crRNA-106</i> <i>PJ23119 tracrRNA</i> integrated at NS II	This work

表2 本实验所用到的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

质粒 Plasmid	描述 Description	来源 Source
P01	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 sfgfp</i>	This work
P02	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 sfgfp Pcpc sgRNA H1</i>	This work
P03	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 sfgfp Pcpc sgRNA H2</i>	This work
P04	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 sfgfp Pcpc sgRNA H3</i>	This work
P05	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 sfgfp Pcpc sgRNA H4</i>	This work
P06	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 sfgfp Pcpc sgRNA H5</i>	This work
P07	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 sfgfp Pcpc sgRNA 106</i>	This work
P08	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 nudI Pcpc sgRNA H4</i>	This work
P09	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 nudI dxs Pcpc sgRNA H4</i>	This work
P10	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 nudI dxs Pcpc sgRNA 106</i>	This work
P11	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 nudI dxs Pcpc crRNA g1 PJ23119 tracrRNA</i>	This work
P12	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 nudI dxs Pcpc crRNA g2 PJ23119 tracrRNA</i>	This work
P13	PCL1920; Spec ^r ; NS II targeting; <i>P18082 nudI dxs Pcpc crRNA 106 PJ23119 tracrRNA</i>	This work
P14	PCL1920; Kan ^r ; NS III targeting; <i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-soxS</i>	This work
P15	PCL1920; Kan ^r ; NS III targeting; <i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i>	This work
P16	PCL1920; Kan ^r ; NS III targeting; <i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoD</i>	This work
P17	PCL1920; Kan ^r ; NS III targeting; <i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoA</i>	This work
P18	PCL1920; Kan ^r ; NS III targeting; <i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoA NTD</i>	This work
P19	PCL1920; Kan ^r ; RpoZ targeting; <i>Pendo dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i>	This work
P20	PCL1920; Kan ^r ; RpoZ targeting; <i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i>	This work
P21	PCL1920; Kan ^r ; RpoZ targeting; <i>Pendo rpoZ-CAGGGGSGGGGS-dCas9</i>	This work
P22	PCL1920; Kan ^r ; RpoZ targeting; <i>PJ23108 dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i>	This work
P23	PCL1920; Kan ^r ; RpoZ targeting; <i>Pcpc dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i>	This work
P24	PCL1920; Kan ^r ; RpoZ targeting; <i>Pcpc dCas9</i>	This work
P25	PCL1920; Kan ^r ; NS III targeting; <i>Pcpc dCas9-CAGGGGSGGGGS-rpoZ</i>	This work

1.4 RNA提取和实时定量PCR

将蓝细菌培养至 OD₇₃₀ 为 0.7~0.8, 取 5 mL 悬液, 离心收集菌体, 加入 10 mg 溶菌酶进行细胞裂

解。使用 RNA 提取试剂盒 (Macherey-Nagel) 提取总 RNA, 用反转录试剂盒 (TOYOBO) 除去 DNA 污染并进行 RNA 的反转录, 得到的 cDNA 用实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 进行定量分析。

表3 本实验所用到的引物
Table 3 Primers used in this study

引物 Primer	5'-3'序列 Sequences 5'-3'
Pendo-F	GAGACACAACGTGGCTTTCCCGCGCCGCTTACGAAATCATCCTGTGGAGCTTAGTAG
Pendo-R	CTATTGAGTATTCTTATCCATTTTGCCTCCTAAAATAAAAAGTTTAAATTAATC
dCas9-F	ATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAG
dCas9-R	AATGATTTTCTGGTGGCTCATGGAACCGCCACCGCCGGAACCGCCACCGCTGCGCAGTCACCTCCTAGCTGAC TCAA
<i>nudI</i> -F	ATGCGACAACGGACTATTGTATG
<i>nudI</i> -R	GATGGGTAATTTTCGCTGAGATGCATGGTATATCTCCTTCTTACTAGTCTCTCTCTTGTACATTACAGAAGACCTTTC AAACGTAAC
<i>dxs</i> -F	ATGCATCTCAGCGAAATTACCCATC
<i>dxs</i> -R	AGCCGGATTAATAATCTGGCTTTTATATTCTTTAAGCCGAAGCAGCACCAAT
P18082-F	TTAATTAACCTGCCGAG
P18082-R	AGCTCTTCGCCCTTGCTCATGGTACCTTTCTCCTCTTAAATGAATTCGCCTG
P18082 upstream-F	ACCGTTTCAGCTGGTGATTTGGATCCGCATGCCCGATCAACGTCTC
P18082 upstream-R	ACCTCGGCAGGTTAATTAAGACCGGTATGCCTAATGTA
<i>sfgfp</i> -F	ATGAGCAAGGGCGAAGAG
<i>sfgfp</i> -R	AGCCAAGCTGGAGACCGTTTAACTCACTACTTGTACAGTTTCATCCATGCCA
qPCR- <i>nudI</i> -F	ATGGTGCTTATTGCT
qPCR- <i>nudI</i> -R	TGTTCTCCCAGTTCTT
qPCR- <i>dxs</i> -F	ACCCATCCCAACCAGC
qPCR- <i>dxs</i> -R	TTCCACCACGCCAAG
qPCR- <i>gpps</i> -F	GCGGGTGAACGGCTG
qPCR- <i>gpps</i> -R	CCTTGTGATTGGTGGG
NS II -up-F 验证	ACCTTGCCTCGGTGCTGAGTC
<i>dxs</i> -R 验证	TTGCTCAAGCTGAGCAACCGAC
NS III -up-F 验证	GATGCACGAGCGTAATGCTCAC
NS III -del-R 验证	TCTCGCTAATTGTGGGAGAGGAG

1.5 绿色荧光蛋白的检测

菌株的初始 OD_{730} 为0.1, 培养0 h、24 h、48 h、72 h和96 h时分别取菌液100 μ L, 测定 OD_{730} 以及菌体的荧光值。利用多功能微孔板检测仪 (TECAN Spark) 进行荧光强度检测, 激发波长为485 nm, 发射波长为520 nm^[32]。以 OD_{730} 为横坐标、荧光值为纵坐标作标准曲线, 得到 OD_{730} 为1.0时的荧光值, 扣除野生型菌株的荧光值后即为该菌株的荧光值。

1.6 显色法检测异戊烯醇

在酶标板中依次加入20 μ L蓝细菌培养液上清或3-甲基-3-丁烯-1-醇与3-甲基-2-丁烯-1-醇的标准

品、50 μ L硫酸铁铵与氨基磺酸的混合液、10 μ L 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒盐酸盐水合物 (3-methyl-2 benzothiazolinone hydrazine hydrochloride hydrate, MBTH) 及120 μ L水, 室温反应40 min后测定620 nm处的吸光度 A_{620} ^[33]。该方法的标准曲线为: $y = 0.09152x + 0.01406$; y 为 A_{620} 值, x 为异戊烯醇浓度 (0~6 mg/L)。

1.7 气相色谱法检测异戊烯醇

用3-甲基-3-丁烯-1-醇和3-甲基-2-丁烯-1-醇的标准品分别配出不同浓度的标准品。菌株培养液离心后取上清。标准品和样品经气相色谱 (gas chromatography; Agilent 7890A) 连接火焰离子化检测器 (Agilent) 进行检测和定量。使用的气相

色谱柱 (Alltech EC-WAX) 规格为 30 m×0.32 mm。进样量 1 μ L, 柱温 85 $^{\circ}$ C 3.5 min, 150 $^{\circ}$ C 1.325 min, 200 $^{\circ}$ C 6 min。

2 结果

2.1 CRISPRa系统的构建

CRISPR 激活系统由 dCas9、转录激活因子以及具有向导作用的 sgRNA (single guide RNA) 组成 [图 1(a)], 形成的复合体招募或者稳定 RNA 聚合酶于目标基因的启动子区域。将来源于化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 且经过突变得到的 dCas9 与转录激活因子融合表达, 两者之间通过柔性连接肽 (CAGGGGSGGGGS) 连接, 该基因模块插入至 PCC 7942 染色体的中性位点 NS III 上,

由化脓性链球菌 CRISPR/Cas9 系统的天然启动子 *Pendo* 驱动表达 [图 1(b)]。sgRNA 和绿色荧光蛋白 (sfGFP) 基因插入至中性位点 NS II 上, 分别由集胞藻 PCC 6803 藻蓝素合成基因 (sll1577) 的启动子 *Pcpc* 和集胞藻 PCC 6803 50S 核糖体蛋白 L10 (Sll1745) 基因的启动子 *P18082* 驱动表达。

对于 CRISPRa 系统中的转录激活因子, 我们分别测试了大肠杆菌来源的转录激活蛋白 SoxS、PCC 7942 来源的 RNA 聚合酶 ω -亚基 RpoZ、 α -亚基 RpoA、RpoA 的 N 端结构域 (N-terminal domain, NTD) 以及 Sigma-70 因子 RpoD, 获得其与 dCas9 融合表达的菌株 G09~G13。荧光检测结果显示这些转录激活因子都能对目标基因的表达起到一定的激活作用, 其中表达 RpoZ 的菌株 G09 的荧光信号值最高, 是对照菌株 G03 (无 dCas9 与转录激活因子模块) 的 3.16 倍 [图 1(c)]。

为了证实 CRISPRa 系统的转录激活作用, 以

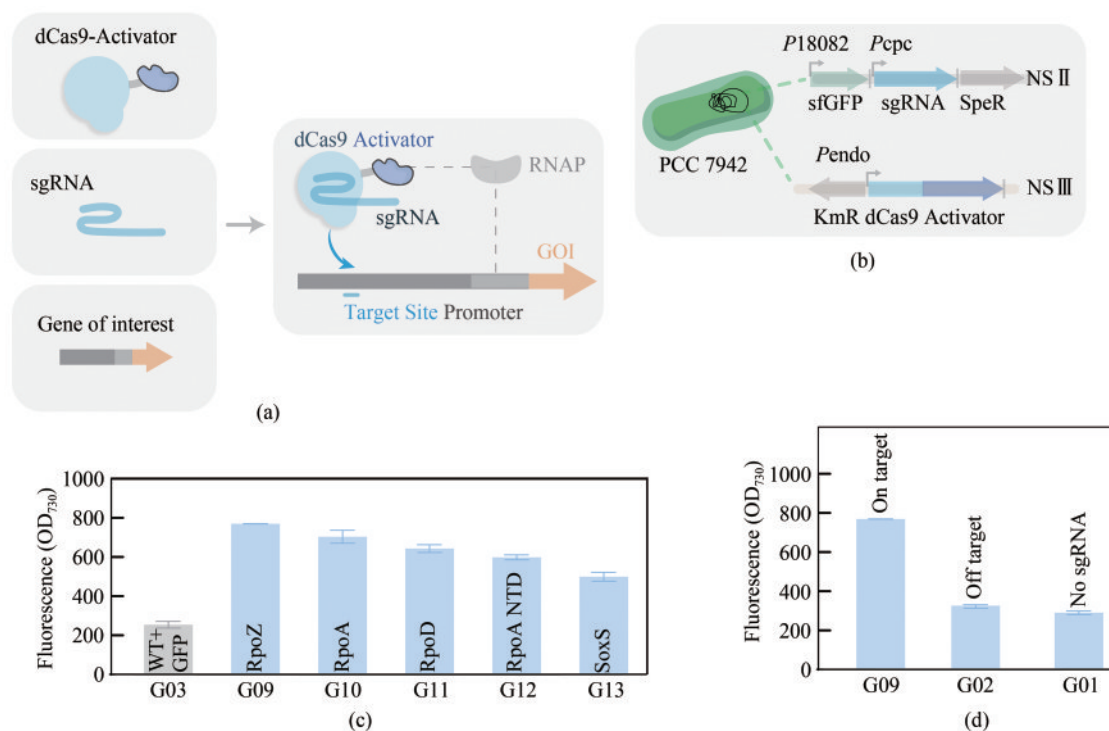


图1 在 PCC 7942 中配置 CRISPRa

(a) CRISPRa 系统的组成元件; (b) dCas9 与转录激活因子的基因模块整合至 PCC 7942 中性位点 NS III, 报告基因 *sfGFP* 与 *sgRNA* 整合至 PCC 7942 中性位点 NS II; (c) 表达不同转录激活因子的菌株的荧光信号值; (d) 以无 sgRNA 及脱靶 RNA 构建的菌株 G01 与 G02 的荧光信号值

Fig. 1 Configuration of CRISPRa in PCC7942

(a) Components of the CRISPRa system. (b) The expression cassette encoding dCas9 and a transcriptional activator fusion protein was inserted into the NS III site of PCC7942, and the report genes *sfGFP* and *sgRNA* were integrated into the NS II site of PCC7942. (c) The fluorescence intensities of strains G03, G09, G10, G11, G12, and G13 with different transcriptional activators. (d) The fluorescence signal level of G01 (control strain without sgRNA) and G02 (control strain with an off target sgRNA 106).

外源 sgRNA 片段 AGGACGCCTTTGGTAACCGC 作为脱靶 (off-target) RNA 构建菌株 G02 以及缺失 sgRNA 的菌株 G01。结果显示 G09 的荧光信号值显著高于 G01 和 G02 菌株, 而后两者的荧光信号值没有明显差别 [图 1(d)]。

2.2 CRISPRa 系统的优化

我们测试了 CRISPRa 系统在目标基因上游不同的靶向位点 [图 2(a)], 即非模板链上转录起始位点 TSS 上游 216 bp、236 bp、273 bp 的 H1、H2 和 H3 位点以及模板链上 TSS 上游 327 bp、397 bp 的 H4 和 H5 位点^[16] (表 4)。结果显示对于 TSS 上游 273~397 bp 范围内的靶点 H3~H5, CRISPRa 系统都具有一定的激活作用, 其中 H4 是最佳的靶点; 靶点 H5 距离 TSS 较远, 与靶点 H4 相比转录激活效果降低; 靶点 H1 距离 TSS 最近, 目标基因的表达受到抑制 [图 2(b)]。这些结果表明该系统可以通过靶向启动子上游不同位点, 达到激活或者抑制目标基因表达的效果。

表 4 本研究用到的 CRISPRa 系统靶位点序列

Table 4 Targeting sequences for the CRISPRa system used in this study

靶点 TargetSites	DNA 序列 (5'→3') DNA Sequences (5'→3')	Target Strand	Distance toTSS/bp
H1	ATGTAACACCGTGCCTGTTG	NT	-216
H2	GAAGATCCGGCCTGCAGCCA	NT	-236
H3	GGCTCGAGTCGACAGTTCAT	NT	-273
H4	CTACGGAAGCTTGTGCGTA	T	-327
H5	GCAAAAGCTCATTCTGAAG	T	-397
g1	CACTCAAAGGATAGACGGGA	NT	+48
g2	TCCATTGCGCTAAGCCCTA	NT	+960

为了提高 CRISPRa 系统的转录激活效果, 我们以 dCas9-RpoZ 基因模块替换 PCC 7942 基因组上的 *rpoZ* 基因, 即敲除内源 *rpoZ* 基因, 得到菌株 G19, 其荧光信号值显著高于 G09 菌株, 达到对照菌株 G03 的 4.19 倍 [图 2(c)]。因此, 敲除内源 *rpoZ* 基因有效提高了 CRISPRa 系统的激活效果。

我们测试了 dCas9 与 RpoZ 融合表达顺序的改变对于 CRISPRa 激活效果的影响。除了 RpoZ 融合在 dCas9 的 C 端 (dCas9-RpoZ), 我们还构建了 RpoZ 融合在 dCas9 的 N 端 (RpoZ-dCas9) 以及 N

端和 C 端 (RpoZ-dCas9-RpoZ)。对于每一种构建方式, 我们测试了不同的靶向位点。荧光检测结果表明这三种融合表达顺序均在靶点 H4 达到最优的激活效果, 其中激活效果最佳的构建方式是 dCas9-RpoZ [图 2(d)]。

我们还测试了增强 dCas9-RpoZ 的表达对于 CRISPRa 激活效果的影响。我们将低强度的启动子 *Pendo* 替换为较高强度的启动子 *PJ23108*, 驱动 dCas9-RpoZ 基因模块的表达, 得到菌株 G45 [图 2(e)]。该菌株的荧光信号值显著高于 G19 菌株, 达到对照菌株 G03 的 5.31 倍 [图 2(f)]。

2.3 CRISPRa 系统应用于异戊烯醇合成途径的优化

我们将构建的 CRISPRa 系统应用于蓝细菌代谢工程, 选择的对象是异戊烯醇 (isopentenol) 在 PCC 7942 中的异源合成。异戊烯醇包括 3-甲基-3-丁烯-1-醇 (isoprenol) 和 3-甲基-2-丁烯-1-醇 (prenol), 这两者可以在 Nudix 水解酶家族的作用下由甲基赤藓糖醇-4-磷酸途径 (methylerythritol phosphate, MEP 途径) 上的异戊烯焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) 分别生成^[30]。PCC 7942 中有 MEP 途径, 但是不能合成异戊烯醇。

2.3.1 异戊烯醇合成基因的表达

我们在 PCC 7942 中引入大肠杆菌来源编码核苷三磷酸酶 (nucleoside triphosphatase) 的 *nudI* 基因。CRISPRa 靶向位点为 *nudI* 上游 H4 位点。sgRNA 和 *nudI* 插入至 PCC 7942 染色体的中性位点 NS II 上, 分别由 *Pcpc* 和 *P18082* 驱动表达。dCas9-RpoZ 基因模块替换基因组上的 *rpoZ* 基因或者插入至中性位点 NS III, 分别得到菌株 S03 和 S04 [图 3(a)]。将菌株在含有 NaHCO_3 的无机盐培养基中光照培养 96 h, 利用 qRT-PCR 检测菌株中 *nudI* 的转录水平, 利用显色反应检测培养液上清中异戊烯醇的含量 (A_{620})。结果显示与对照菌株 S01 (无 dCas9-RpoZ 模块) 相比, 菌株 S03 和 S04 中 *nudI* 表达水平分别提高 12.7 倍和 13.4 倍, 异戊烯醇的生成明显增加 [图 3(b)、(c)]。

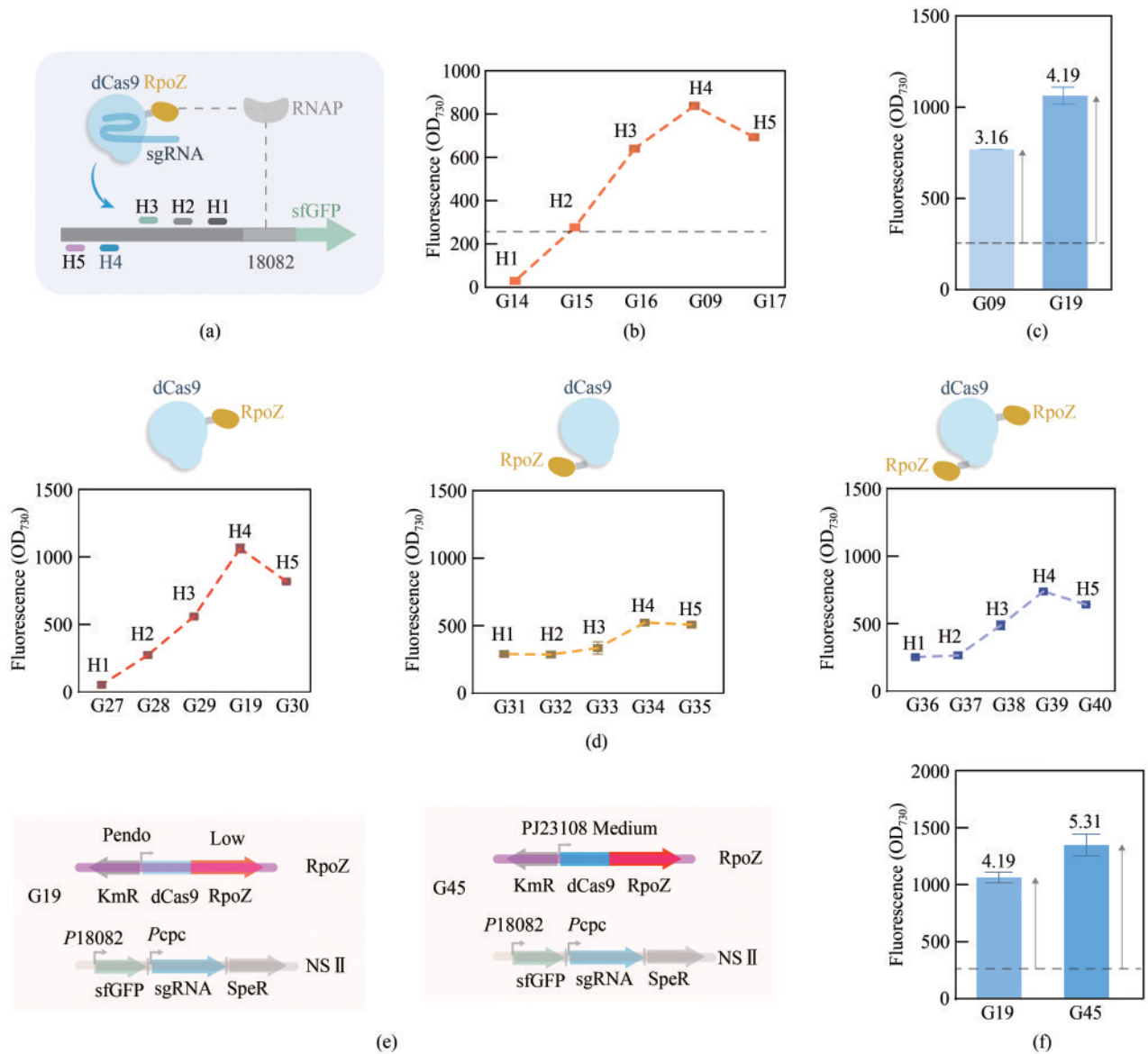


图2 CRISPRa系统的优化

(a) 目标基因上游不同靶向位点的位置示意图；(b) CRISPRa靶向不同位点的菌株的荧光信号值；(c) 内源 *rpoZ* 被敲除的 G19 菌株的荧光信号值；(d) *dCas9* 与 *RpoZ* 融合表达顺序的改变对于 CRISPRa 激活效果的影响；(e) 以强启动子 *PJ23108* 替换弱启动子 *Pendo*，构建 *dCas9*-*RpoZ* 表达增强的菌株 G45；(f) 菌株 G45 的荧光信号值

Fig. 2 Optimization of the CRISPRa system

(a) Scheme of different targeting sites for CRISPRa. (b) The fluorescence intensities of strains G09, G14, G15, G16, and G17 with different targeting sites. (c) The fluorescence intensity of G19 strain with genetic knockout of endogenous *rpoZ*. (d) Effect of different orientations of the *dCas9* and *RpoZ* fusion on CRISPRa performance. (e) Expression of *dCas9*-*RpoZ* was increased in G45 strain by replacing the promoter *Pendo* with *PJ23108*. (f) The fluorescence intensity of G45 strain.

2.3.2 激活合成途径上两个基因

由 *dxs* 基因编码的脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase) 是 MEP 途径的限速步骤 [图 4(a)]。我们利用 CRISPRa 对 *nudI* 和 *dxs* 进行同时激活，得到菌株 S05 和 S06，其中 S06 缺失 *rpoZ* 基因，另外用脱靶 RNA 构建了

菌株 S07 [图 4(b)]。我们检测了这些菌株中 *nudI* 和 *dxs* 的转录水平以及异戊烯醇的生成。结果显示与对照菌株 S02 (无 *dCas9*-*RpoZ* 模块) 相比，菌株 S05 和 S06 的异戊烯醇产量显著提高，其中 S06 的产量更高，而菌株 S07 的产量无明显变化 [图 4(c)]。菌株 S05 和 S06 的 *nudI* 和 *dxs* 的表达被明显激活。

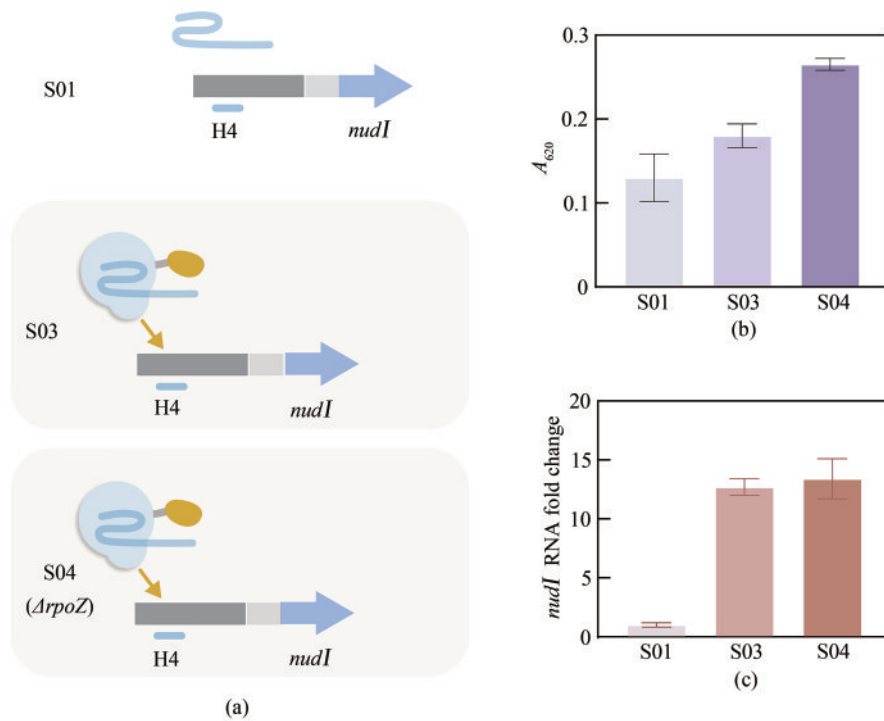


图3 CRISPRa 激活 *nudI*

(a) sgRNA (靶位点 H4) 与 *nudI* 基因整合至 PCC 7942 中性位点 NS II, dCas9-RpoZ 基因模块整合至 PCC 7942 中性位点 NS III 或替换内源 *rpoZ* 基因, 分别得到菌株 S03 和 S04, S01 为没有 dCas9-RpoZ 模块的对照菌株; (b) 菌株 S01、S03 和 S04 培养 96 h 后利用显色反应检测的上清液中异戊烯醇含量; (c) 菌株 S01、S03 和 S04 培养 72 h 后 *nudI* 的转录水平

Fig. 3 Activation of *nudI* by CRISPRa

(a) Scheme of *nudI* activation by CRISPRa. The sgRNA H4 and *nudI* were inserted into the NS II site. The DNA fragment encoding dCas9-RpoZ was inserted into the NS III site or to replace endogenous *rpoZ*, generating strains S03 and S04, respectively. The control strain S01 lacked dCas9-RpoZ. (b) Isopentenol production by strains S01, S03, and S04. Cells were cultivated for 96 h, and isopentenol in the culture supernatant was detected by a colorimetric assay. (c) Transcriptional level of *nudI* in strains S01, S03, and S04. RNA was isolated from cells cultivated for 72 h.

与 S02 相比, 菌株 S05 中 *nudI* 和 *dxs* 的转录水平分别提升了 5.96 倍和 2.14 倍, 菌株 S06 中 *nudI* 和 *dxs* 的转录水平分别提升了 7.66 倍和 2.80 倍; 而菌株 S07 中基因表达水平没有明显改变 [图 4(d)]. 因此, 该 CRISPRa 系统不仅能够高效激活单个基因的表达, 而且能同时激活两个基因的表达。

2.3.3 激活合成途径基因及抑制竞争途径基因

异戊烯醇合成的前体代谢物 IPP 和 DMAPP 在香叶基焦磷酸合成酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPS) 的作用下生成 GPP, 进而合成类胡萝卜素和叶绿素等复杂萜类化合物^[34], 因此 GGPS 是影响异戊烯醇合成的竞争途径上的关键酶 [图 5(a)]. 我们利用建立的 CRISPR 系统对 *nudI* 和 *dxs* 进行激活, 同时也对 *gpps* 基因的转录进行抑制。在 PCC7942 的基因组上 *gpps* (Synpcc7942_0776) 位于一个操纵子的中间 [图 5(b)]. 我们在

该操纵子的 TSS 以及 *gpps* 基因的起始密码子附近各选了一个靶向位点 (g1 与 g2, 见表 2), *nudI* 和 *dxs* 的上游靶向位点为 H4 位点, 这样得到菌株 S12 和 S13, 另外用脱靶 RNA 构建了菌株 S14, S12~S14 都缺失 *rpoZ* 基因 [图 5(c)].

我们检测了上述菌株中 *nudI*、*dxs* 及 *gpps* 的转录水平以及菌株的生长与异戊烯醇的生成。结果显示与菌株 S06 相比, 菌株 S13 中 *gpps* 的转录水平降低了 85%, 而菌株 S12 和 S14 中 *gpps* 的表达水平没有明显改变; 菌株 S13 中 *nudI* 与 *dxs* 的转录水平与菌株 S06 相比降低了 25%~30%, 但是与对照菌株 S02 相比仍然提高了 5.33 倍和 2.09 倍 [图 5(d)]. 菌株 S13 的异戊烯醇产量明显高于菌株 S06, 在光照培养第 8 天达到最高值 [图 5(e)]. 菌株 S13 的生长明显变慢 [图 5(f)], 可能是由于 *gpps* 基因受到强烈抑制而导致光合作用相关的叶绿素和类胡萝卜素合成下降。除了显色法以外, 我们还利用

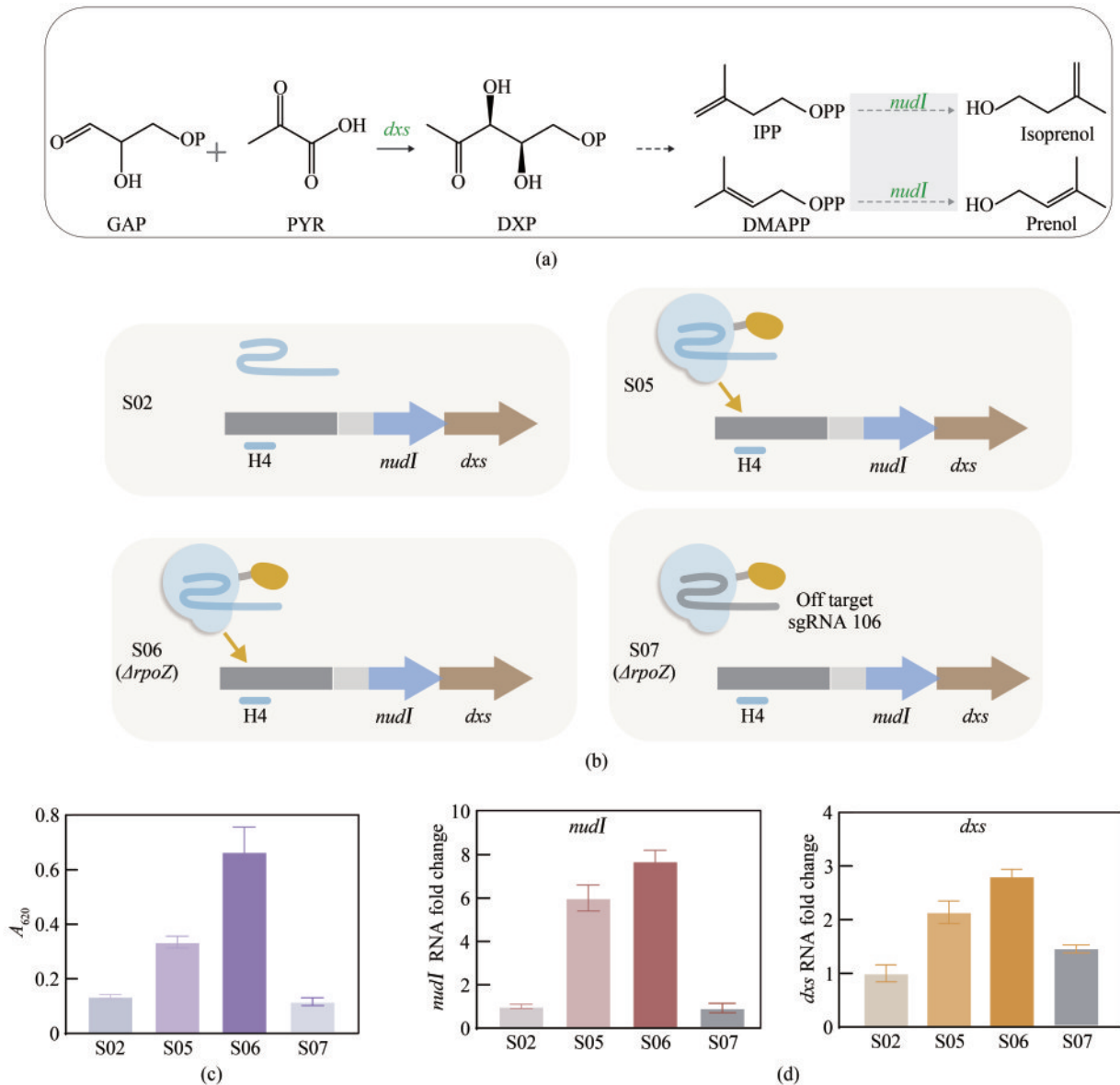


图4 CRISPRa同时激活 *nudI* 与 *dxs*

(a) *dxs* 编码的脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶催化 MEP 途径的第一步反应；(b) sgRNA (靶位点 H4)、*nudI* 及 *dxs* 整合至 PCC 7942 中性位点 NS II，dCas9-RpoZ 基因模块整合至 PCC 7942 中性位点 NS III 或替换内源 *rpoZ* 基因，分别得到菌株 S05 和 S06，S02 为没有 dCas9-RpoZ 模块的对照菌株，S07 为整合了脱靶 RNA (off target) 的菌株；(c) 菌株 S02、S05、S06、S07 培养 96 h 后利用显色反应检测的上清液中异戊烯醇含量；(d) 菌株 S02、S05、S06、S07 培养 72 h 后 *nudI* 与 *dxs* 的转录水平

Fig. 4 Simultaneous activation of *nudI* and *dxs* by CRISPRa

(a) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase encoded by *dxs* catalyzes the first reaction of the MEP pathway. (b) Scheme of *nudI* and *dxs* activation by CRISPRa. The sgRNA H4, *nudI*, and *dxs* were inserted into the NS II site. The DNA fragment encoding dCas9-RpoZ was inserted into the NS III site or to replace endogenous *rpoZ*, generating strains S05 and S06, respectively. S02 (without dCas9-RpoZ) and S07 (with an off target sgRNA 106) are the control strains. (c) Isopentenol production by strains S02, S05, S06, and S07. Cells were cultivated for 96 h, and isopentenol in the culture supernatant was detected by a colorimetric assay. (f) Transcriptional levels of *nudI* and *dxs* in strains S02, S05, S06, and S07. RNA was isolated from cells cultivated for 72 h.

气相色谱检测了菌株的异戊烯醇生成。结果显示菌株 S13 的异戊烯醇产量达到 22.1 mg/L，相比菌株 S06 和 S02 分别提高了 2 倍和 17 倍 [图 5(g)]。

因此，该 CRISPRa 系统能够激活 *nudI* 与 *dxs* 的转录并同时抑制 *gpps* 基因的转录，大幅提高了蓝细菌中异戊烯醇的合成。

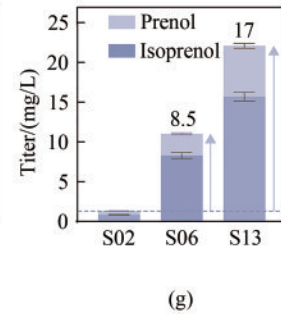
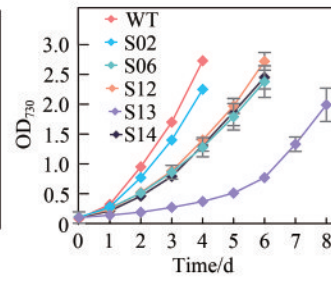
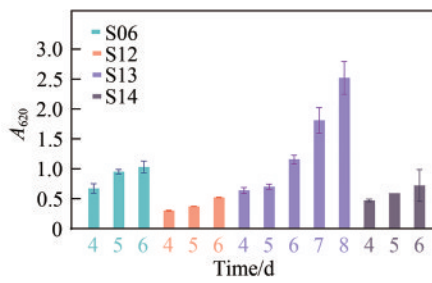
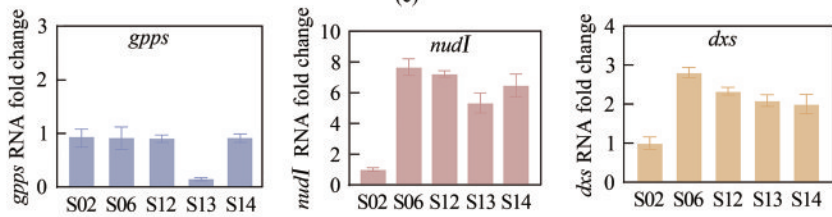
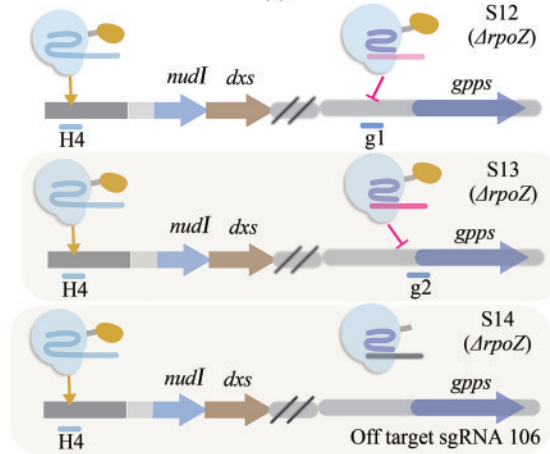
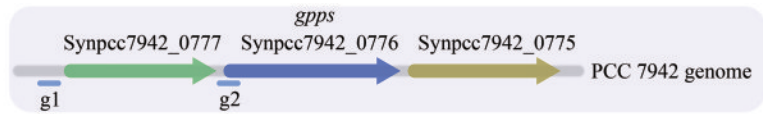
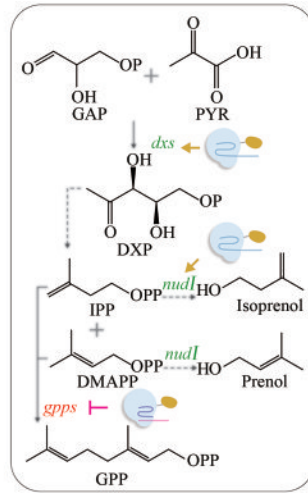


图5 CRISPRa 同时激活 *nudI* 与 *dxs* 并抑制 *gpps*

(a) *gpps* 编码的香叶基焦磷酸合成酶是影响异戊烯醇合成的竞争途径上的关键酶；(b) *gpps* (Synpcc7942_0776) 基因在 PCC 7942 基因组上的位置示意图；(c) 在 S06 菌株 *gpps* 所在操纵子的转录起始位点以及 *gpps* 基因起始密码子附近各选了一个靶向位点 (g1 与 g2)，分别得到菌株 S12 和 S13，S14 为整合了脱靶 RNA 的对照菌株；(d) 菌株 S12、S13、S14 及 S02、S06 在 OD₇₃₀ 约为 0.7 时 *gpps*、*nudI* 和 *dxs* 的转录水平；(e) 菌株 S06、S12、S13 与 S14 培养 4~8 天时利用显色反应检测的上清液中异戊烯醇含量；(f) 野生型菌株 WT 与 S02、S06、S12、S13、S14 菌株的生长曲线；(g) 菌株 S02、S06 与 S13 在 OD₇₃₀ 约为 2.0 时利用气相色谱检测的培养上清液中异戊烯醇的含量

Fig. 5 Simultaneous activation of *nudI* and *dxs* and repression of *gpps* by CRISPRa

(a) *gpps* catalyzes a key competing reaction for isopentenol biosynthesis; (b) Location of the *gpps* gene and the targeting sites g1 and g2 on the PCC 7942 genome; (c) The g1 and g2 sites of *gpps* in strain S06 were targeted, generating strains S12 and S13, respectively. S14 (with an off target sgRNA 106) is a control strain. (d) Transcriptional levels of *gpps*, *nudI* and *dxs* in strains S02, S06, S12, S13, and S14. RNA was isolated from cells grown to OD₇₃₀ of about 0.7. (e) Isopentenol production by strains S02, S06, S13, and S14. Isopentenol in the culture supernatant was detected by a colorimetric assay. (f) Isopentenol production by strains S02, S06, and S13. Culture supernatants were collected at OD₇₃₀ of about 2.0, and isopentenol was detected by gas chromatography.

3 总结与讨论

本研究以光合作用模式生物、光能自养细胞工厂底盘——蓝细菌为研究对象，开发了 CRISPR 激活系统。利用高强度启动子表达 sgRNA，将 dCas9 与多个不同的转录激活因子融合表达，发现 RpoZ 是较好的转录激活因子。进而通过内源 *rpoZ* 基因敲除以及 dCas9-RpoZ 靶向位点优化与表达增强，对该 CRISPRa 系统进行了优化。利用建立的 CRISPRa 系统对重要生物燃料——异戊烯醇的合成途径进行了工程改造，该系统能够实现单基因的高表达、多基因的同时激活以及不同基因的同时激活和抑制，大幅提高了蓝细菌中异戊烯醇的合成，展示了该系统能够有效地用于多基因代谢途径的优化改造，有望成为光能自养细胞工厂构建的有力工具。

除了代谢工程应用以外，该 CRISPRa 系统的另一个潜在应用是通过建立 gRNA 文库，构建蓝细菌基因组规模的基因表达扰动文库，进行功能获得性的遗传筛选 (gain-of-function screening)，用于挖掘能够赋予特定细胞表型的基因，比如促进生长、增强耐受性和化学品生产相关的基因等。在此之前，需要测试该 CRISPRa 系统在基因组原位调控目标基因的表达。建立 CRISPRa 文库，高通量地进行功能基因组学研究和功能元件挖掘，这是 CRISPRa 技术与非 CRISPR 的基因调控技术相比较的一大优势。哺乳动物细胞中的 CRISPRa 文库已有报道^[35-41]，被用于功能获得型筛选，如耐药机制研究。然而，细菌中的 CRISPRa 文库尚未被报道。

目前只有在大肠杆菌等少数几种模式细菌中建

立了 CRISPRa 技术，本研究可以为其他非模式菌株中 CRISPRa 系统的开发提供思路。对于系统中的转录激活因子，本研究主要测试了蓝细菌的 RNA 聚合酶亚基等。为了提高该 CRISPRa 系统的激活效果，需要测试更多的蓝细菌内源或外源的转录激活因子，dCas9 以外的其他 CRISPR 蛋白 (比如 dCpf1)，还需要测试目标基因上游更多的靶向位点，结合生物信息学分析等实现最优靶点的预测。

参 考 文 献

- [1] GAO X, GAO F, LIU D, et al. Engineering the methylerythritol phosphate pathway in cyanobacteria for photosynthetic isoprene production from CO₂[J]. Energy & Environmental Science, 2016, 9(4): 1400-1411.
- [2] NI J, TAO F, XU P, et al. Engineering cyanobacteria for photosynthetic production of C3 platform chemicals and terpenoids from CO₂[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2018, 1080: 239-259.
- [3] ROUSSOU S, ALBERGATI A, LIANG F Y, et al. Engineered cyanobacteria with additional overexpression of selected Calvin-Benson-Bassham enzymes show further increased ethanol production[J]. Metabolic Engineering Communications, 2021, 12: e00161.
- [4] KOBAYASHI S, ATSUMI S, IKEBUKURO K, et al. Light-induced production of isobutanol and 3-methyl-1-butanol by metabolically engineered cyanobacteria[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 7.
- [5] WANG B, ECKERT C, MANESS P C, et al. A genetic toolbox for modulating the expression of heterologous genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(1): 276-286.
- [6] CHI X T, ZHANG S S, SUN H L, et al. Adopting a theophyll-

- line-responsive riboswitch for flexible regulation and understanding of glycogen metabolism in *Synechococcus elongatus* PCC 7942[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 551.
- [7] CAICEDO-BURBANO P, SMIT T, PINEDA HERNÁNDEZ H, et al. Construction of fully segregated genomic libraries in polyploid organisms such as *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(10): 2632-2638.
- [8] BEHLE A, SAAKE P, GERMANN A T, et al. Comparative dose-response analysis of inducible promoters in cyanobacteria [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(4): 843-855.
- [9] YUNUS I S, ANFELT J, SPORRE E, et al. Synthetic metabolic pathways for conversion of CO₂ into secreted short-to medium-chain hydrocarbons using cyanobacteria[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 72: 14-23.
- [10] WENDT K E, UNGERER J, COBB R E, et al. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 115.
- [11] SENGUPTA A, PRITAM P, JAISWAL D, et al. Photosynthetic co-production of succinate and ethylene in a fast-growing cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 11801[J]. *Metabolites*, 2020, 10(6): 250.
- [12] LI H, SHEN C R, HUANG C H, et al. CRISPR-Cas9 for the genome engineering of cyanobacteria and succinate production [J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 38: 293-302.
- [13] YAO L, SHABESTARY K, BJÖRK S M, et al. Pooled CRISPRi screening of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 for enhanced industrial phenotypes[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1666.
- [14] CHOI S Y, WOO H M. CRISPRi-dCas12a: A dCas12a-mediated CRISPR interference for repression of multiple genes and metabolic engineering in cyanobacteria[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(9): 2351-2361.
- [15] HU J H, MILLER S M, GEURTS M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 57-63.
- [16] LU Z H, YANG S H, YUAN X, et al. CRISPR-assisted multi-dimensional regulation for fine-tuning gene expression in *Bacillus subtilis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(7): e40.
- [17] LIU Y, WAN X Y, WANG B J. Engineered CRISPRa enables programmable eukaryote-like gene activation in bacteria[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3693.
- [18] BIKARD D, JIANG W Y, SAMAI P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(15): 7429-7437.
- [19] YU L J, SU W, FEY P D, et al. Yield improvement of the anti-MRSA antibiotics WAP-8294A by CRISPR/dCas9 combined with refactoring self-protection genes in *Lysobacter enzymogenes* OH11[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 258-266.
- [20] PENG R, WANG Y, FENG W W, et al. CRISPR/dCas9-mediated transcriptional improvement of the biosynthetic gene cluster for the epothilone production in *Myxococcus xanthus*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 15.
- [21] DONG C, FONTANA J, PATEL A, et al. Synthetic CRISPR-Cas gene activators for transcriptional reprogramming in bacteria[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 2489.
- [22] NIU F X, HUANG Y B, JI L N, et al. Genomic and transcriptional changes in response to pinene tolerance and overproduction in evolved *Escherichia coli*[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2019, 4(3): 113-119.
- [23] FONTANA J, DONG C, KIATTISEWEE C, et al. Effective CRISPRa-mediated control of gene expression in bacteria must overcome strict target site requirements[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1618.
- [24] HO H I, FANG J R, CHEUNG J, et al. Programmable CRISPR-Cas transcriptional activation in bacteria[J]. *Molecular Systems Biology*, 2020, 16(7): e9427.
- [25] WITHERS S T, GOTTLIEB S S, LIEU B, et al. Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(19): 6277-6283.
- [26] FOO J L, JENSEN H M, DAHL R H, et al. Improving microbial biogasoline production in *Escherichia coli* using tolerance engineering[J]. *mBio*, 2014, 5(6): e01932.
- [27] GEORGE K W, THOMPSON M G, KANG A, et al. Metabolic engineering for the high-yield production of isoprenoid-based C5 alcohols in *E. coli*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11128.
- [28] KANG A, GEORGE K W, WANG G, et al. Isopentenyl diphosphate (IPP)-bypass mevalonate pathways for isopentenol production[J]. *Metabolic Engineering*, 2016, 34: 25-35.
- [29] TIAN T, KANG J W, KANG A, et al. Redirecting metabolic flux via combinatorial multiplex CRISPRi-mediated repression for isopentenol production in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(2): 391-402.
- [30] CHOU H H, KEASLING J D. Synthetic pathway for production of five-carbon alcohols from isopentenyl diphosphate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(22): 7849-

- 7855.
- [31] RIPPKA R, DERUELLES J, WATERBURY J B, et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria[J]. *Microbiology*, 1979, 111(1): 1-61.
- [32] PÉDELACQ J D, CABANTOUS S, TRAN T, et al. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(1): 79-88.
- [33] LINSHIZ G, JENSEN E, STAWSKI N, et al. End-to-end automated microfluidic platform for synthetic biology: from design to functional analysis[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2016, 10: 3.
- [34] ORLOVA I, NAGEGOWDA D A, KISH C M, et al. The small subunit of snapdragon geranyl diphosphate synthase modifies the chain length specificity of tobacco geranylgeranyl diphosphate synthase in planta[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(12): 4002-4017.
- [35] GILBERT L A, HORLBECK M A, ADAMSON B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation[J]. *Cell*, 2014, 159(3): 647-661.
- [36] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex[J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588.
- [37] JOUNG J, KONERMANN S, GOOTENBERG J S, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(4): 828-863.
- [38] HORLBECK M A, GILBERT L A, VILLALTA J E, et al. Compact and highly active next-generation libraries for CRISPR-mediated gene repression and activation[J]. *eLife*, 2016, 5: e19760.
- [39] WANG G C, CHOW R D, BAI Z G, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPRa elicits potent antitumor immunity[J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(11): 1494-1505.
- [40] VAN DER WEYDEN L, OFFORD V, TURNER G, et al. Membrane protein regulators of melanoma pulmonary colonization identified using a CRISPRa screen and spontaneous metastasis assay in mice[J]. *G3 Genes Genomes Genetics*, 2021, 11(7): jkab157.
- [41] SIEPE D H, HENNEBERG L T, WILSON S C, et al. Identification of orphan ligand-receptor relationships using a cell-based CRISPRa enrichment screening platform[J]. *eLife*, 2022, 11: e81398.



通讯作者: 杨琛(1974—),女,研究员,博士,博士生导师。研究方向为:①开发代谢流量分析与代谢组分析技术;②研究重要模式及工业微生物代谢网络调控的分子机制,揭示各种调节机制对代谢流量的调控机理,为合理改造细胞代谢、优化微生物生产提供理论依据;③开展光合微生物的代谢工程与合成生物学研究,建立萜类化合物的光合自养细胞工厂。

E-mail: cyang@cemps.ac.cn



第一作者: 王甜甜(1992—),女,博士研究生。研究方向为蓝细菌基因组编辑及萜类化合物代谢工程。

E-mail: wangtiantian@cemps.ac.cn



第一作者: 朱虹(1983—),女,硕士研究生。研究方向为微生物代谢工程。

E-mail: zhuhong@cemps.ac.cn