



利用 CRISPRi 挖掘大肠杆菌生物合成 D-泛酸的关键基因

张博^{1,2,3}, 杨玉凤^{1,2}, 贺周霖^{1,2}, 章誉琼^{1,2}, 柳志强^{1,2,3*}, 郑裕国^{1,2,3}

1 浙江工业大学手性生物制造国家地方联合工程研究中心, 浙江 杭州 310014

2 浙江工业大学生物工程学院 浙江省生物有机合成技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310014

3 华东合成生物学产业技术研究院, 浙江 杭州 310014

张博, 杨玉凤, 贺周霖, 章誉琼, 柳志强, 郑裕国. 利用 CRISPRi 挖掘大肠杆菌生物合成 D-泛酸的关键基因[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4625-4643.

ZHANG Bo, YANG Yufeng, HE Zhoulin, ZHANG Yuqiong, LIU Zhiqiang, ZHENG Yugu. Mining key genes for biosynthesis of D-pantothenic acid in *Escherichia coli* by CRISPRi[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4625-4643.

摘要:【目的】D-泛酸(D-pantothenic acid, DPA)是一种重要的功能化合物, 被广泛应用于医疗保健、化妆品、动物食品和饲料等领域, 具有良好的市场前景及应用。本研究以实验室保藏的大肠杆菌菌株 DPAP10 为底盘菌株, 利用 CRISPR 干扰(clustered regularly interspaced palindromic repeats interference, CRISPRi)技术, 筛选影响工程菌株 DPA 生物合成的内源性基因靶点。【方法】构建了 pTarget 和 pCas9 的双质粒 CRISPRi 系统, 可以实现对基因单个或组合表达抑制, 摇瓶发酵检测基因抑制对 DPA 合成的影响; 通过实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测了基因抑制后的转录水平; 通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测了中间代谢物分析代谢通路变化。【结果】成功从 126 个靶基因中筛选得到 5 个显著影响 DPA 合成的关键基因 *pgk*、*gltA*、*ptsH*、*ptsI*、*crp* 和 7 个基因组合 *pgk-gltA*、*pgk-ptsH*、*gltA-ptsH*、*pgk-ptsI*、*gltA-ptsI*、*pgk-crp*、*gltA-crp*, 其中菌株 DPAP10/pCas9+pT-*gltA-ptsH* 相对于原始菌株 DPAP10, 在摇瓶中 DPA 产量提高了 49.5%达到 5.3 g/L, 进一步在基因组上对 *gltA* 和 *ptsH* 的表达进行下调, 得到工程菌株 DPAP10-*gltA*^{TTG}-*ptsH*^{TTG}, 最终在 5 L 罐中 DPA 产量相较于对照菌株 DPAP10 在相同培养条件下提高了 19.5%达到 75.4 g/L。【结论】本研究证实 CRISPRi 筛选可以得到对 DPA 合成有益的基因靶点; 中间代谢物检测分析发现, 改变丙酮酸通量分布和降低三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环速率, 会导致碳流更多流向 DPA 合

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901400); 国家自然科学基金(32070099, 31971342)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901400) and the National Natural Science Foundation of China (32070099, 31971342).

*Corresponding author. E-mail: microliu@zjut.edu.cn

Received: 2023-04-17; Accepted: 2023-07-13; Published online: 2023-08-29

成代谢路径中，从而提高 DPA 的产量，这一发现为构建更高产菌株提供了新思路。

关键词：代谢工程；大肠杆菌；D-泛酸；CRISPRi

Mining key genes for biosynthesis of D-pantothenic acid in *Escherichia coli* by CRISPRi

ZHANG Bo^{1,2,3}, YANG Yufeng^{1,2}, HE Zhoulin^{1,2}, ZHANG Yuqiong^{1,2}, LIU Zhiqiang^{1,2,3*}, ZHENG Yuguo^{1,2,3}

1 The National and Local Joint Engineering Research Center for Biomufacturing of Chiral Chemicals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

2 Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

3 Huadong Industrial Technology Research Institute of Synthetic Biology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] D-pantothenic acid (DPA) is a functional compound widely used in medical care, cosmetics, animal food and feed and other fields, with good market prospects. This study aims to use CRISPRi to mine the endogenous gene targets affecting the biosynthesis of DPA by the lab-stored *Escherichia coli* strain DPAP10. **[Methods]** We constructed a dual-plasmid CRISPRi system with pTarget and pdCas9 to achieve the inhibition of gene expression individually or in combination. Shaking flask fermentation was carried out to validate the effect of gene blocking on DPA production. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was employed to determine the transcription level after gene blocking. The changes of metabolic pathways were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). **[Results]** We screened out 5 key genes (*pgk*, *gltA*, *ptsH*, *ptsI*, and *crp*) and 7 gene combinations (*pgk-gltA*, *pgk-ptsH*, *gltA-ptsH*, *pgk-ptsI*, *gltA-ptsI*, *pgk-crp*, and *gltA-crp*) from 126 target genes. The engineered strain DPAP10/pdCas9+pT-*gltA-ptsH* showed the DPA yield of 5.3 g/L in a shaking flask, which increased by 49.5% compared with that by the start strain DPAP10. Furthermore, we down-regulated the expression of *gltA* and *ptsH* to construct an engineered strain DPAP10-*gltA*^{TTG}-*ptsH*^{TTG}. This strain showed the DPA yield of 75.4g/L in 5 L fermentor which compared with the control strain DPAP10 under the same culture conditions increased by 19.5%. **[Conclusion]** We confirmed that CRISPRi could mine the genes involved in DPA synthesis. Changing the pyruvate flux and reducing the tricarboxylic acid (TCA) cycling rate would promote the carbon flow into the DPA synthesis, thus increasing DPA production. This finding provides a new idea for constructing higher yielding strains.

Keywords: metabolic engineering; *Escherichia coli*; D-pantothenic acid; CRISPRi

D-泛酸(D-pantothenic acid, DPA)又称维生素 B5，作为一种水溶性维生素，自然界中泛酸主要存在两种构型，D型和L型，其中，只有D

型具有生物活性。在生物体内，DPA主要通过参与辅酶A (coenzyme A, CoA)以及酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)的形成，从而在蛋

白质代谢、脂质代谢以及许多次生代谢物的合成过程中发挥着重要作用^[1]。因此 DPA 被广泛应用于制药行业、食品工业以及饲料添加剂。目前,工业上 DPA 主要以泛酸内酯和 β -丙氨酸的钙盐为原料通过化学法结合酶法拆分生产,但过程中存在底物毒性、操作繁琐、催化效率低等缺点,在一定程度上限制了其发展。相较于运用化学法和酶法合成 DPA,微生物发酵在生产 DPA 在过程中则更具安全性,且无需水解和拆分等繁琐过程。当前,用于微生物发酵生产 DPA 得到宿主菌株主要有大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌,且人们围绕上述菌株已进行了相关研究,例如 Zou 等^[2]利用代谢工程结合发酵工程技术构建了一株大肠杆菌 DPA 高产菌株,发酵产量达到了 68.3 g/L; Chassagnole 等^[3]在谷氨酸棒状杆菌中通过对 *ilvE* 启动子突变降低其活性,提高酮异戊酸的积累,并增加关键基因 *panB*、*panC* 的拷贝数,在 pH 调节的分批培养过程中,积累了不到 2 g/L 的 DPA; Yocum 等^[4]通过应用代谢工程策略,构建了以枯草芽孢杆菌为底盘的 DPA 生产菌株 PA824,并在此菌株的基础上,通过强化 *glyA* 提高亚甲基四氢叶酸(methylenetetrahydrofolate, CH₂-THF)供应得到的工程菌株 PA1014-3,在外源添加 β -丙氨酸的条件下,能生产 86 g/L 的 DPA。

途径设计和优化对于构建目标产品的高产菌株至关重要。随着基因工程技术的成熟,研究人员可以迅速对底盘细胞进行一系列改造,以生产新的生物化学物质。近年来本课题组 Zhang 等^[1,5]主要通过敲除、下调和过表达多个基因靶点的代谢工程手段来构建 DPA 高产菌株,但随着对菌株的不断代谢改造,由于缺少对 DPA 生物合成与其他细胞过程之间联系的了解,DPA 产量的进一步提高受到阻碍,因此需要挖掘更多基因靶点来提高 DPA 产量。CRISPR 干

扰(clustered regularly interspaced palindromic repeats interference, CRISPRi)技术可用于高通量的功能基因筛查,CRISPRi 由成簇的规律间隔短回文重复序列及 CRISPR 相关蛋白(clustered regularly interspaced palindromic repeats and CRISPR-associated proteins system, CRISPR-Cas)衍生而来,通过在核酸酶的催化残基中引入点突变(D10A 和 H840A),设计出一种催化活性部分失活的 Cas9 蛋白(dCas9),这些突变使 Cas9 内切酶不能切断双链 DNA,但允许使用 RNA 进行引导^[6-8],在 sgRNA 的作用下,dCas9 蛋白可精确定位目标靶点,空间上阻碍 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)的转录过程,实现特定基因的表达下调。CRISPRi 已经广泛应用于微生物代谢工程,例如 Fang 等^[9]利用该技术在枯草芽孢杆菌中鉴定得到提高游离脂肪酸的有益基因,Li 等^[10]在谷氨酸棒状杆菌通过构建的 CRISPR-dCas9 系统得到高效生产 O-乙酰高丝氨酸的关键基因。本研究以实验室前期构建的 DPA 工程菌 DPAP10 为出发菌株进行 CRISPRi 筛选,目前报道的大肠杆菌 DPA 的最高产菌株 DPA02/pT-ppnk 在摇瓶中积累 DPA 为 6.89 g/L,在 5 L 罐中积累 DPA 产量为 68.3 g/L^[2],但由于该菌株携带质粒限制了其工业化生产。而 DPAP10 菌株则为不带质粒的无抗菌株,在摇瓶中积累 DPA 为 3.57 g/L,在 5 L 罐中积累 DPA 为 63.1 g/L,相比菌株 DPA02/pT-ppnk 更具潜力且更适合于工业生产。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种、质粒和引物

本研究以实验室前期构建的大肠杆菌(*Escherichia coli*) DPAP10 (DPAL6^[11], Trc-*ilvD*/Trc-*panB*/Trc-*panC*/Trc-*alsS*)作为出发菌株,大肠杆菌 DH5 α 为克隆宿主,用于 pTarget 质粒构

建。pTarget 质粒(Addgene Plasmid #62226)由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所杨晟研究员馈赠; pdCas9 质粒由实验室菌种库保存, dCas9 基因表达由 *trc* 启动子控制, 需

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-galactothioglycoside, IPTG) 诱导。PCR 引物由北京擎科生物科技有限公司合成。本文所用 pTarget 突变引物详见表 1。

表 1 构建 pTarget 系列质粒所用的引物

Table 1 The primers used for constructing pTarget

Primers	Sequences (5'→3')
pT- <i>avtA</i> -F	TAATACTAGTGATGCACTGTGTAACACTACGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>avtA</i> -R	GCTCTAAAACCTCGTAGTTACACAGTGCATCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>fadR</i> -F	TAATACTAGTCATTAAGGCGCAAAGCCCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>fadR</i> -R	GCTCTAAAACCCGGGCTTTCGCGCTTAATGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>fabR</i> -F	TAATACTAGTTATAGTGCCAGCAGTACTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>fabR</i> -R	GCTCTAAAACAAAGTACTGCTGGCACTATAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>mdh</i> -F	TAATACTAGTGATATCGCTCCAGTGACTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>mdh</i> -R	GCTCTAAAACGGAGTCACTGGAGCGATATCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ihfA</i> -F	TAATACTAGTATAAGCTTGGGCTTAGCAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ihfA</i> -R	GCTCTAAAACCTTGCTAAGCCCAAGCTTATACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ihfB</i> -F	TAATACTAGTATCGCACATCCCCGCCAAGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ihfB</i> -R	GCTCTAAAACCTTGGCGGGAATGTGCGATACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>gapC</i> -F	TAATACTAGTCTGAAACATGATTCAAACCTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>gapC</i> -R	GCTCTAAAACCTAGTTTTGAATCATGTTTCAGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>adiY</i> -F	TAATACTAGTATGTCTGGATAAGGGTGAATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>adiY</i> -R	GCTCTAAAACATTCACCCCTATCCAGACATACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>deoR</i> -F	TAATACTAGTACACGTCGCGAAGAGCGTATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>deoR</i> -R	GCTCTAAAACATACGCTCTTCGCGACGTGTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>asnC</i> -F	TAATACTAGTCTGATCGACAATCTGGACCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>asnC</i> -R	GCTCTAAAACCGGTCCAGATTGTCGATCAGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ilvY</i> -F	TAATACTAGTGAAAACCTTCCTGCATCTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ilvY</i> -R	GCTCTAAAACCCAGATGCAGGAAGGTTTTCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>crp</i> -F	TAATACTAGTAAACAGACCCGACTCTCGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>crp</i> -R	GCTCTAAAACCTCGAGAGTCGGGTCTGTTTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>narL</i> -F	TAATACTAGTGATCACCCGATGCTGCGAACGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>narL</i> -R	GCTCTAAAACGTTTCGAGCATCGGGTGATCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>metJ</i> -F	TAATACTAGTATCAGCCCATACGCTGAGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>metJ</i> -R	GCTCTAAAACCTGCTCAGCGTATGGGCTGATACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>lrp</i> -F	TAATACTAGTGTAGATAGCAAGAAGCGCCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>lrp</i> -R	GCTCTAAAACGGGCGCTTCTTGCTATCTACACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>nac</i> -F	TAATACTAGTAGATATTGGTAGCCTGACCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>nac</i> -R	GCTCTAAAACGGGTCAGGCTACCAATATCTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>nsrR</i> -F	TAATACTAGTTTAAACGAGTTTCACTGATTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>nsrR</i> -R	GCTCTAAAACCTAATCAGTGAACCTCGTTAAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>rbsB</i> -F	TAATACTAGTCAACGTCAGTGCGAATGCGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rbsB</i> -R	GCTCTAAAACCTCGCATTCGCACTGACGGTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>rob</i> -F	TAATACTAGTTCGCGACCTTTTAACTCTGGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rob</i> -R	GCTCTAAAACGCCAGATTAAGGTCGCGAAGTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>lexA</i> -F	TAATACTAGTGTTAACGGCCAGGCAACAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>lexA</i> -R	GCTCTAAAACCTTGTTGCCTGGCCGTTAACTAGTATTATACCTAGGAC

(待续)

(续表 1)

Primers	Sequences (5'→3')
pT- <i>soxS</i> -F	TAATACTAGTGTCCCATCAGAAAATTATTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>soxS</i> -R	GCTCTAAAACGAATAATTTTCTGATGGGACACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>phoP</i> -F	TAATACTAGTCCACCTTAAAGTTTCAGATTTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>phoP</i> -R	GCTCTAAAACGAATCTGAACTTTAAGGTGGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>lysC</i> -F	TAATACTAGTGCGCGCTTTGAGAAGGTGATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>lysC</i> -R	GCTCTAAAACATCACCTTCTCAAAGCGCGCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>tktA</i> -F	TAATACTAGTGAAAGCCAAATCCGGTCACCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>tktA</i> -R	GCTCTAAAACGGTGACCGGATTTGGCTTTCCTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>tktB</i> -F	TAATACTAGTAAAGCCAACCTCTGGTCATCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>tktB</i> -R	GCTCTAAAACGGATGACCAGAGTTGGCTTTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>talA</i> -F	TAATACTAGTTCGCTGTTACTCAAAGCTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>talA</i> -R	GCTCTAAAACGCAGCTTTGAGTAACAGCGAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>talB</i> -F	TAATACTAGTTCCTAACGCAGCGCAGATTTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>talB</i> -R	GCTCTAAAACGAATCTGCGCTGCGTTAAGAAGTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ptsI</i> -F	TAATACTAGTTTCAGGCATTTTAGCATCCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ptsI</i> -R	GCTCTAAAACGGGATGCTAAAATGCCTGAAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ptsH</i> -F	TAATACTAGTGTTACCATTACCGCTCCGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ptsH</i> -R	GCTCTAAAACGGGATGCTAAAATGCCTGAAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>rpe</i> -F	TAATACTAGTGATTGCCCCCTCAATTCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rpe</i> -R	GCTCTAAAACACAGAATTGAGGGGGCAATCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>pgk</i> -F	TAATACTAGTCTGAACGTACCAGTAAAAGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>pgk</i> -R	GCTCTAAAACCTTTTTACTGGTACGTTTCAGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>gnd</i> -F	TAATACTAGTCAACCGTTCCTGAGAAAGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>gnd</i> -R	GCTCTAAAACCTTCTCACGGGAACGGTTGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>zwf</i> -F	TAATACTAGTGCCTGTGACCTGGTCATTTTGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>zwf</i> -R	GCTCTAAAACAAAATGACCAGGTCACAGGCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>gapA</i> -F	TAATACTAGTCTGAAATATGACTCCACTCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>gapA</i> -R	GCTCTAAAACCTGAGTGGAGTCATATTCAGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>rpiA</i> -F	TAATACTAGTGAAAAAAGCAGTAGGATGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rpiA</i> -R	GCTCTAAAACCCCATCCTACTGCTTTTTTCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>rpiB</i> -F	TAATACTAGTGCATTTGGCTGTGATCATGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rpiB</i> -R	GCTCTAAAACACATGATCACAGCCAAAGTCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>crr</i> -F	TAATACTAGTTCGACGACAAGAAGGATACGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>crr</i> -R	GCTCTAAAACGTATCCTTCTTGTGCTCGGAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>serA</i> -F	TAATACTAGTAGACAAGATTAAGTTTCTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>serA</i> -R	GCTCTAAAACGCAGAACTTAATCTTGTCTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>serB</i> -F	GCTCTAAAACGCAGAACTTAATCTTGTCTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>serB</i> -R	GCTCTAAAACCTAAAGAGACATCTTCAGGCAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>serC</i> -F	TAATACTAGTCTTCAATTTTAGTTCTGGTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>serC</i> -R	GCTCTAAAACGACCAGAATAAAATTGAAGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>leuA</i> -F	TAATACTAGTTCGATACCACATTCGCGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>leuA</i> -R	GCTCTAAAACCTCGCGCAATGTGGTATCGAAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>leuB</i> -F	TAATACTAGTGCCGGGGGACGGTATTGGTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>leuB</i> -R	GCTCTAAAACGACCAATACCGTCCCCGGCACTAGTATTATACCTAGGAC

(待续)

(续表 1)

Primers	Sequences (5'→3')
pT- <i>leuC</i> -F	TAATACTAGTTTCGATGGTCTGCGCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>leuC</i> -R	GCTCTAAAACCTGGGCGCGCAGACCATCGAAAACCTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>leuD</i> -F	TAATACTAGTTTTGCAGAAAGTGACCCGTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>leuD</i> -R	GCTCTAAAACCTACGGGTCACTTTCTGCAAAAACCTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ilvI</i> -F	TAATACTAGTCAGGGCGTTAAACAAGTATTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ilvI</i> -R	GCTCTAAAACAATACTTGTTTAACGCCCTGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ilvH</i> -F	TAATACTAGTGGCGCGTTATCCCGCGTGATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ilvH</i> -R	GCTCTAAAACATCACGCGGGATAACGCGCCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ilvB</i> -F	TAATACTAGTTCGACGCGTAAGCGCTTACGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ilvB</i> -R	GCTCTAAAACGTAAGCGCTTACGCGTCGAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ilvN</i> -F	TAATACTAGTGCTCACCGTTCGCAACCATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ilvN</i> -R	GCTCTAAAACGATGGTTGCGAACGGTGAGCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ilvG</i> -F	TAATACTAGTAGTGGGTGGTACATGCGTTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ilvG</i> -R	GCTCTAAAACCAACGCATGTACCACCCACTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ilvM</i> -F	TAATACTAGTGCAACATCAGGTCAATGTATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ilvM</i> -R	GCTCTAAAACATACATTGACCTGATGTTGCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ilvE</i> -F	TAATACTAGTCGCGCTGCACTATGGCACTTGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ilvE</i> -R	GCTCTAAAACAAGTGCCATAGTGCAGCGCGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ilvC</i> -F	TAATACTAGTGGTAAAAAAGTAGTCATCGTGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ilvC</i> -R	GCTCTAAAACACGATGACTACTTTTTTACCCTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ilvD</i> -F	TAATACTAGTCACTCATGGTCGTAATATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ilvD</i> -R	GCTCTAAAACCCATATTACGACCATGAGTGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>yfbQ</i> -F	TAATACTAGTCTGTTATGACATCCGTGGTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>yfbQ</i> -R	GCTCTAAAACGACCACGGATGTCATAACAGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>lpd</i> -F	TAATACTAGTGAACGTTACAACACCCCTTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>lpd</i> -R	GCTCTAAAACCCAAGGGTGTGTAACGTTCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>gcvP</i> -F	TAATACTAGTTTTAAGCCAGCTTGAAAAACAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>gcvP</i> -R	GCTCTAAAACCTGTTTTCAAGCTGGCTTAAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>gcvT</i> -F	TAATACTAGTTACGAACAACACACGCTTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>gcvT</i> -R	GCTCTAAAACCAAAGCGTGTGTTGTTTCGTAACCTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>puuE</i> -F	TAATACTAGTCGTCTTCTGCCACTCCGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>puuE</i> -R	GCTCTAAAACCGCGGAGTGGCAGAAAGACGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>metL</i> -F	TAATACTAGTGAAGTGTTATTTGCGTGTCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>metL</i> -R	GCTCTAAAACCGACACGCAATAACACTTCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>gadA</i> -F	TAATACTAGTAAAGGCCATTTCTACTATCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>gadA</i> -R	GCTCTAAAACCGATAGTAGAAATGGCCTTTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>gadB</i> -F	TAATACTAGTGCAAGTAAACGGATTTAAGGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>gadB</i> -R	GCTCTAAAACACCTTAAATCCGTTACTTGCCTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>gabT</i> -F	TAATACTAGTCCCGATTTTCGCTGACCGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>gabT</i> -R	GCTCTAAAACCGCGGTCAGCGAAAATCGGGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>sad</i> -F	TAATACTAGTAATTTTCGATAAATCCTGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>sad</i> -R	GCTCTAAAACCTGGCAGGATTTATCGAAATTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>thrA</i> -F	TAATACTAGTATGCGAGTGTTGAAGTTTCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>thrA</i> -R	GCTCTAAAACCCGAACCTCAACACTCGCATACTAGTATTATACCTAGGAC

(待续)

(续表 1)

Primers	Sequences (5'→3')
pT- <i>thrB</i> -F	TAATACTAGTTCAGTGCCAATATGAGCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>thrB</i> -R	GCTCTAAAACACGCTCATATTGGCACTGGAAGTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>thrC</i> -F	TAATACTAGTGTTTTTCCGCACGACCTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>thrC</i> -R	GCTCTAAAACGCAGGTTCGTGCGGAAAAAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>aceE</i> -F	TAATACTAGTCTGGCTCCAGGCGATCGAATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>aceE</i> -R	GCTCTAAAACATTTCGATCGCCTGGAGCCAGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>sucC</i> -F	TAATACTAGTCCGCTATGGCTTACCAGCACGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>sucC</i> -R	GCTCTAAAACGTGCTGGTAAGCCATAGCGGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>asd</i> -F	TAATACTAGTGTGGTTTTATCGGCTGGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>asd</i> -R	GCTCTAAAACCGCCAGCCGATAAAACCAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>fumA</i> -F	TAATACTAGTTGCGTCGTTTCATGCTGCGTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>fumA</i> -R	GCTCTAAAACGACGCAGCATGAACGACGCAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>fumC</i> -F	TAATACTAGTGATGGGGGCGATTGATGTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>fumC</i> -R	GCTCTAAAACGACATCAATCGCCCCATCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>argG</i> -F	TAATACTAGTGACGATTCTCAAGCATCTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>argG</i> -R	GCTCTAAAACGGAGATGCTTGAGAATCGTCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>argH</i> -F	TAATACTAGTTTACCCAGGCAGCAGATCAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>argH</i> -R	GCTCTAAAACCTTGATCTGCTGCCTGGGTAAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>ftsZ</i> -F	TAATACTAGTCAGACGATTCAAATCGGTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>ftsZ</i> -R	GCTCTAAAACCTACCGATTTGAATCGTCTGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>sulA</i> -F	TAATACTAGTTAAAATTGCGCGTGTCTCTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>sulA</i> -R	GCTCTAAAACCTAGAGACACGCGCAATTTAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>rssB</i> -F	TAATACTAGTATCGCGATGCCACGAATGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rssB</i> -R	GCTCTAAAACCTTCATTTCGTGGCATCGCGATACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>rodZ</i> -F	TAATACTAGTCTTGCTTCAACATTCCTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rodZ</i> -R	GCTCTAAAACCGCAGGAATGTTGAAGCAAGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>rpoS</i> -F	TAATACTAGTTGGTTATTCACCACTGTTAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rpoS</i> -R	GCTCTAAAACCTTAACAGTGGTGAATAACCAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>minC</i> -F	TAATACTAGTCTGGTCAGCGATGCATAAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>minC</i> -R	GCTCTAAAACCTTATGCATCGCTGACCAGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>fnr</i> -F	TAATACTAGTATACGGCGCATTCAGTCTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>fnr</i> -R	GCTCTAAAACCCAGACTGAATGCGCCGTATACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>nadR</i> -F	TAATACTAGTCAGCAGGTAGCTGATGCCAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>nadR</i> -R	GCTCTAAAACCTGGCATCAGCTACCTGCTGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>recQ</i> -F	TAATACTAGTATTATCGACACTGTGCTTTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>recQ</i> -R	GCTCTAAAACGAAAGCACAGTGTGATAATACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>groC</i> -F	TAATACTAGTGTAGTTCTGGATAAATCTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>groC</i> -R	GCTCTAAAACAAAGATTTATCCAGAACTACACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>cysK</i> -F	TAATACTAGTCGCCTGAATCGCATCGGTAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>cysK</i> -R	GCTCTAAAACCTTACCGATGCGATTCAGGCGACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>glnA</i> -F	TAATACTAGTGAAGAAGGCAAATGTTTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>glnA</i> -R	GCTCTAAAACCTCAAACATTTGCTTCTTCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>proB</i> -F	TAATACTAGTTGCGCGCAGTTACATGCCGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>proB</i> -R	GCTCTAAAACGCGCATGTAACCTGCGCGCAACTAGTATTATACCTAGGAC

(待续)

(续表 1)

Primers	Sequences (5'→3')
pT- <i>gltB</i> -F	TAATACTAGTATTCTCGCCGATGGTAAAACGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>gltB</i> -R	GCTCTAAAACGTTTTACCATCGGCGAGAATACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>pfkA</i> -F	TAATACTAGTCGTATCAAATGGAAAATGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>pfkA</i> -R	GCTCTAAAACCGAATTGCGGCGTTCATGCCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>pfkB</i> -F	TAATACTAGTAAAACCTGCGCTGTACCGCACGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>pfkB</i> -R	GCTCTAAAACGTGCGGTACAGCGCAGTTTTACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>pykA</i> -F	TAATACTAGTTAATCTTGAAAAAGTTATCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>pykA</i> -R	GCTCTAAAACCGATAACTTTTTCAAGATTAAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>acnA</i> -F	TAATACTAGTGCCTGGCAGGATGGTAACTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>acnA</i> -R	GCTCTAAAACAGTTACCATCCTGCCAGCGCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>acnB</i> -F	TAATACTAGTGCTGCTGAAAAACCCGCCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>acnB</i> -R	GCTCTAAAACCGGGCGGGTTTTTCAGCAGCACTAGTATTATACCTAGGAC
Pt- <i>rpoE</i> -F	TAATACTAGTGGTTTTCCCGCTATGTGCCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rpoE</i> -R	GCTCTAAAACACGGCACATAGCGGGAAACCACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>rpoH</i> -F	TAATACTAGTTAACGCGTGGCCGATGTTGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rpoH</i> -R	GCTCTAAAACACAACATCGGCCACGCGTTAACTAGTATTATACCTAGGAC
pT- <i>rpoD</i> -F	TAATACTAGTCGAGGTCAATGACCATCTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
pT- <i>rpoD</i> -R	GCTCTAAAACGCAGATGGTCATTGACCTCGACTAGTATTATACCTAGGAC

1.2 培养基

低盐 LB 液体培养基(low salt Luria Bertani, LLB, g/L): 酵母粉 5, 氯化钠 5, 蛋白胨 10。固体培养基另添加 20 g/L 琼脂, 高压蒸汽灭菌 121 °C、20 min。

MS1 发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L, 硫酸铵 16 g/L, 酵母粉 2 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 盐溶液 1 mL/L, (盐溶液母液: CuCl₂ 10 g/L、FeSO₄·7H₂O 10 g/L、ZnSO₄·7H₂O 10 g/L、CuSO₄ 0.2 g/L、NiCl₂·7H₂O 0.02 g/L), 500 mL 摇瓶装液量 50 mL, 高压蒸汽灭菌 115 °C、30 min。

5 L 发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L, 硫酸铵 16 g/L, 酵母粉 2 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 甜菜碱 2 g/L, β-丙氨酸 1.5 g/L, 盐溶液 1 mL/L (盐溶液母液: CuCl₂ 10 g/L、FeSO₄·7H₂O 10 g/L、ZnSO₄·7H₂O 10 g/L、CuSO₄ 0.2 g/L、NiCl₂·7H₂O 0.02 g/L), 消泡剂

2.5 mL/L, 加蒸馏水定容至 1.8 L (发酵总体积为 2 L), 高压蒸汽灭菌 115 °C、30 min。

5 L 发酵补料培养基: 葡萄糖 500 g/L、磷酸二氢钾 14 g/L、甜菜碱 4 g/L、酵母粉 2 g/L、硫酸铵 10 g/L、硫酸镁 8 g/L、盐溶液 2 mL/L、β-丙氨酸 40 g/L, 高压蒸汽灭菌 115 °C、30 min。

抗生素浓度为: 盐酸壮观霉素(spectinomycin hydrochloride, SD) 50 mg/L; 氯霉素(chloramphenicol, CM) 30 mg/L。

1.3 质粒和菌株构建

pTarget 突变质粒 pT-gene 构建: 以构建 pT-*avtA* 为例, 在基因 *avtA* 上确定紧邻前间区序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)位点(NGG)位置, 以 PAM 位点前 20 bp 作为突变序列, 设计突变引物 pT-*avtA*-F/pT-*avtA*-R, 以实验室保藏原始 pTarget 为模板, 通过 Phanta Max (P505)试剂盒 PCR 获得线性化突变质粒 pT-*avtA*。

pdCas9 质粒为本实验室保藏。

抑制菌株构建：首先制备底盘菌株 DPAP10 的感受态，其次转化 pdCas9 质粒得到重组菌株 DPAP10/pdCas9，最后制备 DPAP10/pdCas9 的电转感受态，电转突变 pTarget 质粒得到最终抑制菌株 DPAP10/pdCas9+pT-gene。

1.4 发酵培养

从固体平板上挑取单菌落接种于 LLB 试管中，37 °C、180 r/min 培养 12 h。取 1.5 mL 种子液接种于装液量 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中，加入 0.5 g 灭菌过的 CaCO₃，同时额外添加(每 50 mL)：VB1 (2 g/L) 50 μL，VB12 (5 g/L) 50 μL，IPTG (1 mol/L) 10 μL，SD (50 g/L) 50 μL，CM (30 g/L) 50 μL，β-丙氨酸 (250 g/L) 450 μL，异亮氨酸(isoleucine, Ile) (40 g/L) 50 μL，30 °C 摇床 180 r/min 振荡培养 48 h。

1.5 发酵液处理

摇瓶发酵结束后，取发酵液 1 mL 置于 2 mL EP 管中，12 000 r/min 离心 2 min，分离沉淀与上清，上清用于后续产物检测。沉淀用于检测生物量，吸取 1 mL 去离子水对其吹打混匀，12 000 r/min 离心 2 min，去除上清；再次吸取 800 μL 去离子水对 EP 管中的沉淀物进行吹打混匀，并加入 200 μL 乙酸溶液用以中和沉淀中残余碳酸钙，过程中需不定时上下翻转 EP 管，待 EP 管中无气泡产生后，吸取部分溶液稀释 10–20 倍，控制 OD₆₀₀ 在 0.2–0.8 间，使用紫外分光光度计对其进行检测，根据最终 OD₆₀₀ 检测值乘以相应稀释倍数即为发酵液中所含菌体生物量。

1.6 高效液相色谱分析

发酵液中 DPA 含量使用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)进行检测。发酵液上清液处理，使用去离子水将 1.5 mL 所得上清液稀释一定倍数后，使用 0.22 μm 无机滤膜过膜除杂或置于高速离心机 12 000 r/min 离心 15 min，吸取 200 μL 上清置于液相瓶中。

流动相准备，C 泵：93% (1 000 mL 超纯水+1 mL 磷酸)使用 0.20 μm 微孔水系滤膜过膜；A 泵：7% (纯乙腈)，使用 0.20 μm 微孔有机系滤膜过膜，并超声除去气泡。

色谱柱型号：ACQUITYUPLC BEHC18 column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, Waters)。

检测仪：赛默飞 UltiMate 3 000。

参数设置：样品进样量 10 μL，液相柱柱温度 30 °C，流速 0.75 mL/min，检测波长 200 nm。

1.7 实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

用核酸提取试剂盒提取所有样本的 RNA，检测提取的总 RNA 的浓度，然后用逆转录试剂盒按照说明书的要求将 RNA 逆转录成 cDNA，产物立即用于 RT-qPCR，最后以 16S RNA 为内参基因，根据采集的数据进行相对定量，计算出 2^{-ΔΔCt} 值。关于 RT-qPCR 的引物如表 2 所示。

所需试剂盒均购置于南京诺唯赞生物科技股份有限公司，实时荧光定量 PCR 仪型号为赛默飞 StepOne Plus，荧光染料 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix。

表 2 RT-qPCR 所用的引物

Table 2 The primers used for RT-qPCR

Primers	Sequences (5'→3')
16S-F	CCTTACGACCAGGGCTACAC
16S-R	CAATCCGGACTACGACGC
RT- <i>gltA</i> -F	CGGTGAACATGGAAGACGGA
RT- <i>gltA</i> -R	AAAACATCGCGCTGAACGAC
RT- <i>pgk</i> -F	TAGCCACCTTCGTCAACCAAC
RT- <i>pgk</i> -R	TGGCGCGAAAACGTGAAAG
RT- <i>ptsH</i> -F	ACTGTGACTTCCAACGGCAA
RT- <i>ptsH</i> -R	TTTCTGCTCGTCTTCGCCTT
RT- <i>ptsI</i> -F	GAAGAGAACCCGTTCCCTCGG
RT- <i>ptsI</i> -R	TGCGCAATTTACCGAAAGCC
RT- <i>crp</i> -F	CAGACCCGACTCTCGAATGG
RT- <i>crp</i> -R	AGCGTTTCCGCTTTTTTACC

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌 CRISPRi 系统的构建与功能验证

利用本实验室保藏的 pTarget 质粒和 pdCas9 质粒构建 CRISPRi 双质粒系统(图 1A)。pTarget 质粒为 sgRNA 的表达载体, pdCas9 质粒在 *trc* 启动子控制下转录 dCas9 基因, 其表达产物 dCas9 为 Cas9 核酸酶的催化失活突变体。首先将 dCas9 的表达载体整合到出发菌株 DPAP10 中, 得到重组菌株 DPAP10/pdCas9; 随后将 sgRNA 的表达载体整合到重组菌株 DPAP10/pdCas9 中得到抑制菌株 DPAP10/pdCas9+pT-gene。CRISPRi 系统的使用需注意对照组的选择及 dCas9 蛋白对产量的影响, 由于 DPAP10 基因组上已经敲除了 *avtA* 基因, pT-*avtA* 表达的 sgRNA 无法引导 dCas9 与基因组结合, 因此选择菌株 DPAP10/ pdCas9+pT-*avtA* 为对照菌株。分别对 DPAP10、DPAP10/pdCas9、DPAP10/pdCas9+pT-*avtA* 菌株进行摇瓶发酵, 结果表明 pdCas9 导入使得菌株的产量下降 1.55%, pdCas9 和 pT-*avtA* 双质粒的导入使得菌株的产量下降 4.19% (图 1B), 说明 CRISPRi 系统的引入会对宿主细胞造成一定的代谢压力, 但对 DPA 的合成影响是有限的, 适用于大

肠杆菌宿主合成途径系统优化的筛选实验。

2.2 sgRNA 表达质粒文库的构建

在大肠杆菌中, DPA 的合成途径可分为 β -丙氨酸模块和 D-泛解酸模块, 以葡萄糖作为碳源, 经磷酸烯醇式丙酮酸糖磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)或非磷酸烯醇丙酮酸糖磷酸转移酶系统(no-PTS)转运系统进入细胞, 在糖酵解途径(Embden-Meyerhof-Parnas, EMP)作用下生成磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)以及丙酮酸(pyruvic acid, PYR), 其中 PEP 通过磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC, 由 *ppc* 编码)直接转化为草酰乙酸, 在天冬氨酸转氨酶(由 *aspC* 编码)作用下形成天冬氨酸, 然后在天冬氨酸脱羧酶(由 *panD* 编码)作用下发生脱羧反应生成 β -丙氨酸; PYR 是 D-泛解酸合成的重要前体, 在乙酰乳酸合酶(由 *ilvGM1HBN* 编码)催化下生成乙酰乳酸, 再经酮醇酸还原异构酶(*ilvC* 基因编码)、二羟基酸脱水酶(*ilvD* 基因编码)生成 α -酮异戊酸(α -ketoisovaleric acid, 2-KIV), 2-KIV 在 3-甲基-2-氧代丁酸羟甲基转移酶(*panB* 基因编码)和 2-脱氢泛酸 2-还原酶(由 *panE* 和 *ilvC* 基因编码)作用下生成 D-泛解酸, 最后 D-泛解酸和 β -丙氨酸通过泛酸合成酶(*panC* 编码)缩合反应形成 DPA。

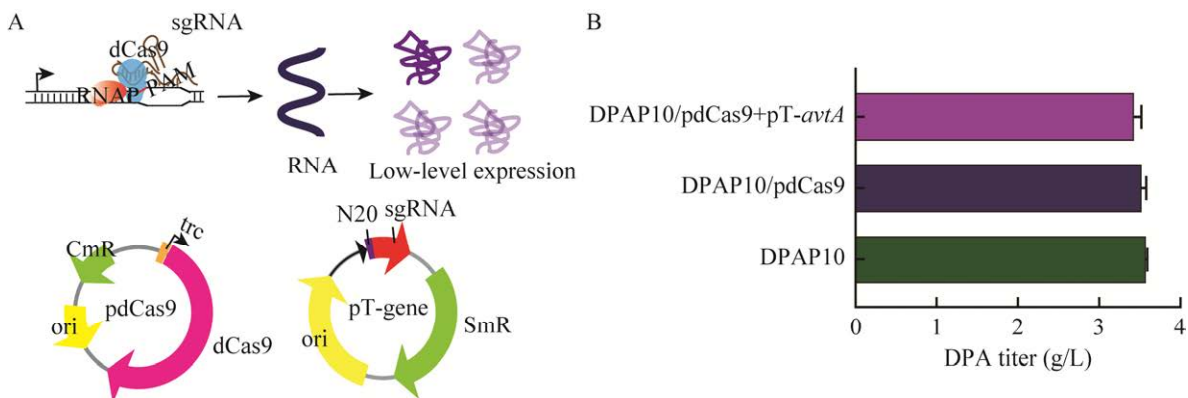


图 1 CRISPRi 系统构建(A)、CRISPRi 系统功能验证(B)

Figure 1 Construction of CRISPRi system (A), functional verification of the CRISPRi system (B).

DPA 合成过程中的中间体同时也参与了其他代谢途径, 为了进一步强化 DPA 合成途径, 寻找影响 D-泛酸合成的潜在基因靶点, 选择了与 DPA 合成直接或间接相关的 126 个基因靶点, 构建 sgRNA 质粒表达文库, 基因靶点包括糖分解代谢(糖酵解、磷酸戊糖途径、三羧酸循环)中的 38 个基因、氨基酸代谢中的 39 个基因、一碳单位合成中的 9 个基因、辅因子代谢中的 26 个基因、 σ 因子中的 4 个基因, 以及与细胞生长形态控制相关的 10 个基因, 选点分布如图 2 所示。

2.3 CRISPRi 抑制单基因表达对 DPA 生产的影响

将上述 126 个选点构建相应的 sgRNA 表达质粒 pT-gene, 分别导入 DPAP10/pdCas9 菌株得到相应基因的抑制菌株, 摇瓶发酵 48 h, 测定 DPA 产量, 发酵结果显示(图 3A), 抑制氨基酸合成途径、干扰一碳单位循环和阻断 σ 因子、抑制细胞生长形态相关基因的表达不利于 DPA 的合成。在氨基酸代谢模块中, 干扰后导致 DPA 产量大幅降低 40%以上的基因(*serA*、*serC*、*yfbQ*、*ilvHGM*、*leuD*、*ilvE*)主要集中在以 EMP 途径中间产物 3-磷酸甘油酸(3PG)、PYR 为前体的氨基酸合成路径上, 3PG 同时也会转化为 PYR 进入 TCA 循环, 为菌体生长提供必需的物质和能量^[12], 当这些基因被抑制后, 代谢流从 3PG 和 PYR 大量进入 TCA 循环可能是 DPA 产量降低的原因之一, 其次氨基酸是细胞存活所必需的, 受到 CRISPRi 抑制后, 减少的氨基酸数量不足以维持正常的细胞生理也会造成 DPA 合成减弱。研究表明^[13], 通向 DPA 生产通量受到途径中间体 5,10-亚甲基四氢叶酸(5,10-CH₂-THF)再生速度的限制, L-丝氨酸转化为甘氨酸是 L-丝氨酸的主要降解途径, 该

反应为细胞生长提供了大部分的 C1 单位, 对于大肠杆菌, 甘氨酸裂解(glycine cleavage, GCV)系统将甘氨酸转化为 5,10-CH₂-THF, 该系统在维持细胞内甘氨酸和 C1 单位浓度之间的动态平衡方面起着重要作用, 因此干扰一碳循环后, 5,10-CH₂-THF 再生速度降低, 同时也削弱了 DPA 合成能力。 σ 因子是原核生物 RNA 聚合酶的一个亚基, *rpoD* 编码 σ^{70} 、*rpoS* 编码 σ^{38} 、*rpoE* 编码 σ^{24} 和 *rpoH* 编码 σ^{32} , 都是转录所必需的因子, 阻断 σ 因子影响 RNA 聚合酶对转录起始位点的正确识别, 阻碍细胞全基因组转录, 从而影响了 DPA 的生物合成。工业菌株的细胞大小对微生物细胞工厂的效率发挥重要作用, 已有文章报道为了提高目标产物的效价, 已经开发了一系列的形态工程策略, 包括过表达参与细胞分裂的基因, 如 *ftsZ*, 参与二进分裂的基因的过度表达, *sulA* 和 *minCD*, 调节肽聚糖细胞壁和类肌动蛋白 *mreB* 细胞骨架结构, 以加速生长, 可以增加细胞密度^[14], DPA 生产与细胞生长成正相关, 细胞生长受抑制导致 DPA 产量降低。而对 DPA 合成具有促进作用基因主要分布在糖代谢途径(*gapA*、*pgk*、*crr*、*ptsI*、*ptsH*、*aceE* 和 *gltA*), 调控辅因子(*ilvY*、*crp*、*nac*)模块中, 说明减少其他物质对碳源葡萄糖的竞争有助于提高 DPA 的产量。受益于基因表达的全局调控, 减少一些转录因子的表达也在一定程度上加强了 DPA 的合成。综上, 最终确定了抑制后对 DPA 产量提高 10%以上的基因(图 3B): *pgk* (29.5%)、*gltA* (22.1%)、*ptsH* (24.6%)、*ptsI* (10.9%)和 *crp* (15.4%), 上述基因的 RT-qPCR 结果显示(图 3C), 相比于对照菌株 DPAP10, 所有干扰基因的转录水平都显著降低, 证明了 CRISPRi 能够正常工作并用于后续研究。

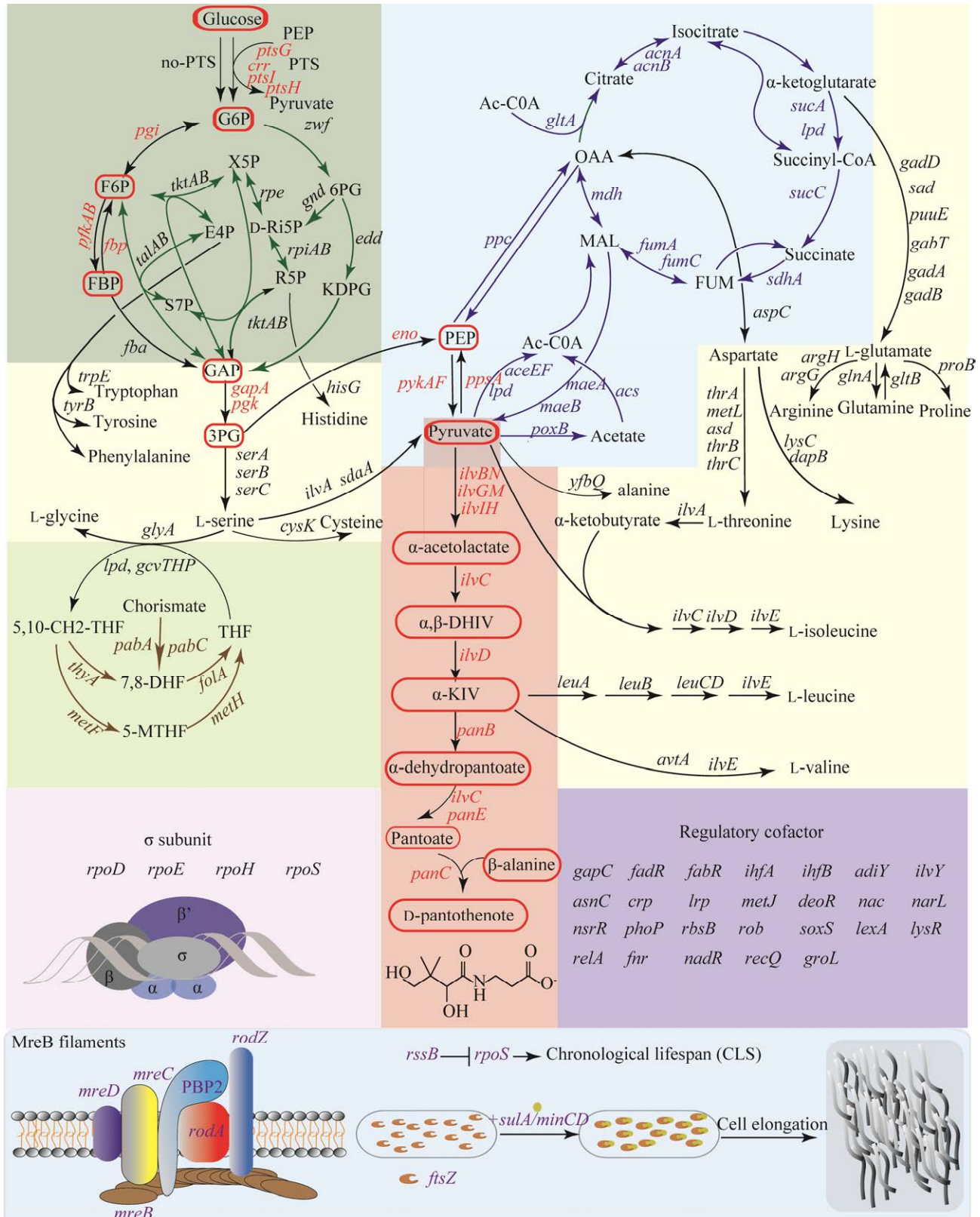


图 2 基于 CRISPRi 筛选 DPA 代谢相关靶基因位点图

Figure 2 Screening of DPA metabolism related target gene loci based on CRISPRi.

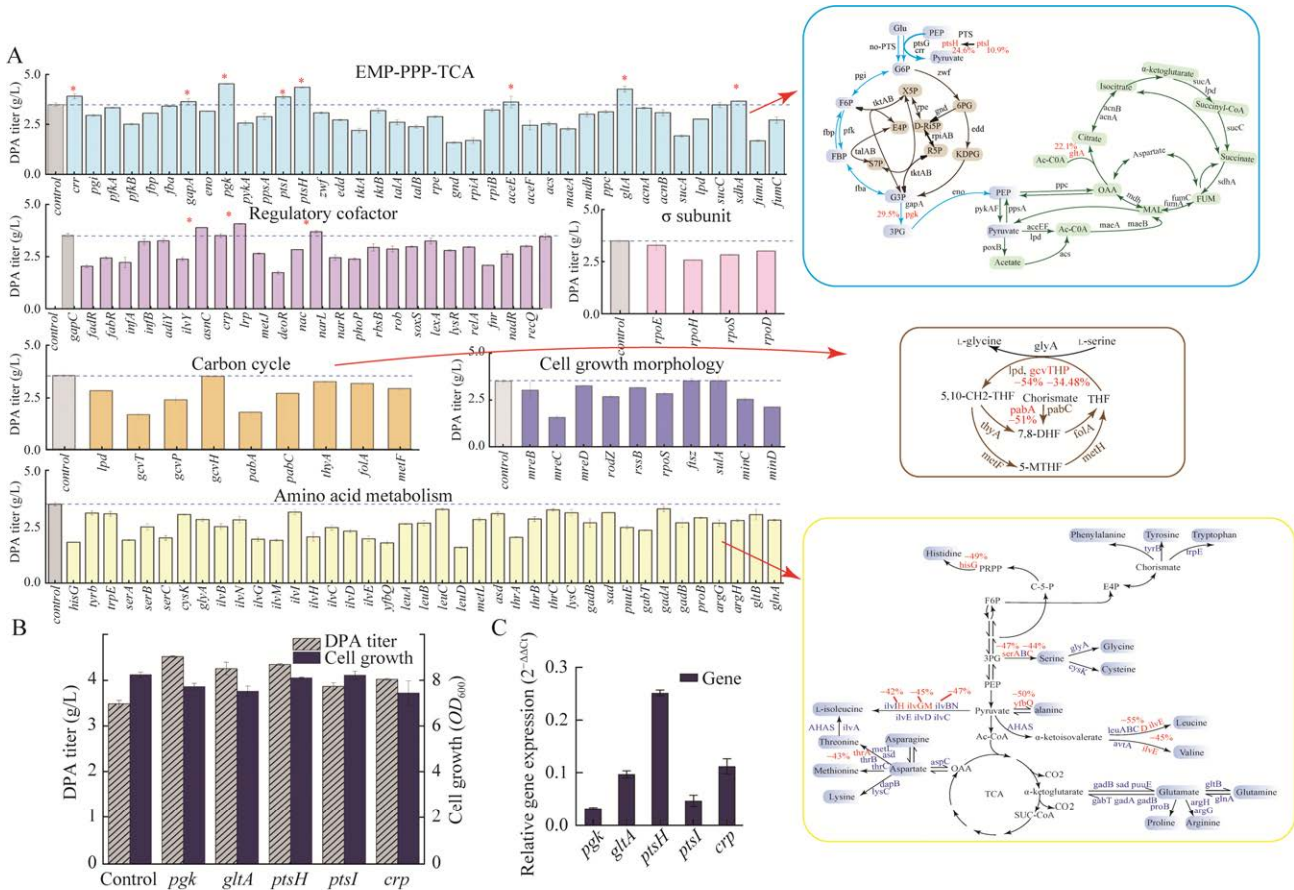


图 3 基于 CRISPRi 的 DPA 生产有益基因的筛选(A)、产量提高 10%以上的抑制菌株(B)、RT-qPCR 验证产量提高 10%以上的抑制菌株中 *pgk*、*gltA*、*ptsH*、*ptsI* 和 *crp* 的转录水平强度变化(C)

Figure 3 CRISPRi-based identification of beneficial genes for DPA production (A), inhibition strains that increased yield by more than 10% (B), transcriptional intensity changes of *pgk*, *gltA*, *ptsH*, *ptsI* and *crp* in inhibited strains whose yield was increased by more than 10% were verified by RT-qPCR (C). Error bars represent the deviation of the standard from the triplicate experiment.

为了进一步探究 *pgk*、*gltA*、*ptsH*、*ptsI* 和 *crp* 基因被抑制后造成 DPA 合成增强的原因，对菌株的关键中间体 PEP 和 PYR 含量进行测定，发现在发酵液中几乎没有检测到 PYR 和 PEP 的残留，PYR 是各种化合物和有机酸合成的重要节点，PEP 可通过磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶直接转化为草酰乙酸进入 TCA 循环，于是继续检测了 PYR 分支途径中的有机酸(甲酸、乙酸和乳酸)以及 TCA 循环中的琥珀酸、草酰乙酸和 α -酮戊二酸的含量。结果显示(图 4①②③)，相较于对照组，抑制菌株中 PYR 流向 3 种

有机酸的通量分布发生了变化，抑制菌株中乳酸含量增加且多于甲酸含量(图 4①③)，已有报道证明，PYR 节点的甲酸裂解酶(PYR formate lyase, PFL)活力比乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)高^[15]，上述基因抑制后，可能由于 PYR 节点附近的代谢通量发生变化，从而促进了乳酸的合成。乙酸含量除了在 *ptsH* 抑制菌株中降低，在其他基因抑制菌株中含量均有不同程度增加，尤其在 *gltA* 抑制菌株中乙酸增加最为显著(图 4②)。研究表明^[16]，当大肠杆菌在以葡萄糖为碳源的培养基中生长时，

PTS 能消耗 50%的有效 PEP 生成丙酮酸。此时, PTS 对葡萄糖的高摄取率结合 EMP 途径的葡萄糖分解代谢使乙酰辅酶 A (Ac-CoA)的合成速度超过 TCA 循环的消耗能力, 最终导致过量的 Ac-CoA 生成乙酸, 因此抑制 *ptsH* 会导致乙酸合成速率下降。草酰乙酸和 Ac-CoA 是柠檬酸合成酶 *gltA* 的底物, 抑制 *gltA* 表达后, 进入 TCA 循环的 Ac-CoA 减少, 于是更多 Ac-CoA 转移到乙酸生产途径。不同于 PYR 节点通量或

增或减的变化, TCA 循环中的琥珀酸、草酰乙酸和 α -酮戊二酸的含量都有不同程度的降低(图 4④⑤⑥), 有研究证明, 3-磷酸甘油酸激酶 *pgk* 的过度表达将磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)的通量导向 EMP 途径^[17], 而 EMP 的产物 PYR 是 TCA 循环的基础, 抑制 *pgk* 后, 进入 TCA 循环的碳流减少, 因此 *pgk* 抑制菌株中, 草酰乙酸和琥珀酸含量大幅降低(图 4④⑤⑥); 结果显示 *gltA* 抑制

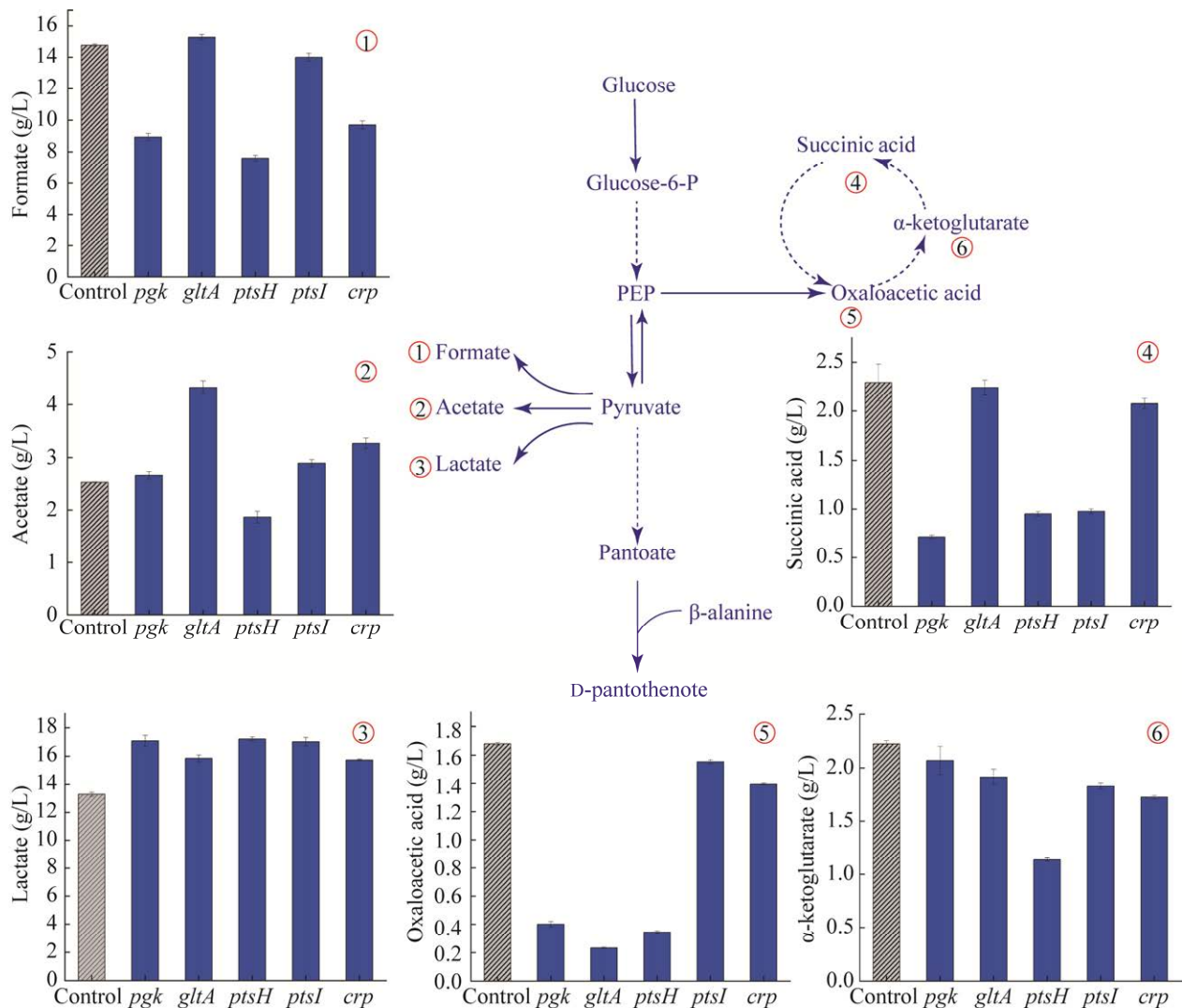


图 4 DPA 合成中间代谢物变化

Figure 4 Accumulation of intermediate metabolites in DPA biosynthesis. Error bars represent the deviation of the standard from the triplicate experiment. ①: Formate. ②: Acetate. ③: Lactate. ④: Succinic acid. ⑤: Oxaloacetic acid. ⑥: α -ketoglutarate.

菌株中草酰乙酸含量最低(图 4⑤), 原因是 *gltA* 的表达水平决定了 TCA 循环速率^[10], *gltA* 转录水平降低, 减缓 TCA 代谢速率, 进入 TCA 循环的草酰乙酸减少; PTS 组分的修饰或消除将对中心代谢中的碳通量分布产生重大影响^[16], 考虑到 *ptsHI* 的抑制导致葡萄糖消耗速率降低, 在大多数情况下葡萄糖是 TCA 循环的主要营养来源^[18], 并且图中结果表明, *ptsH* 的抑制对 TCA 循环的影响大于 *ptsI* 抑制, 3 种 TCA 循环中间体含量都显著降低; 全局调控因子 *crp* 在整个碳源的选择性运输中起着关键的调节作用^[19], 在稳定期, *crp*-cAMP 浓度随游离 *crp* 浓度的升高而升高, *crp*-cAMP 的降低抑制了 TCA 循环的代谢基因^[20]。综上, 抑制 *pgk*、*gltA*、*ptsH*、*ptsI* 和 *crp* 基因后, 改变了 PYR 的通量同时降低了 TCA 循环速率, 进而促进了 DPA 的生物合成。

2.4 CRISPRi 抑制双基因表达对 DPA 生产的影响

在对单基因的干扰实验中, 成功筛选得到了 5 个对 DPA 合成具有促进作用的基因: *pgk*、*gltA*、*ptsH*、*ptsI* 和 *crp*, 为了进一步加强 DPA 合成能力, 利用 CRISPRi 系统同时对双基因进行干扰。分别构建了多种基因组合 *pgk-gltA*、*pgk-ptsH*、*gltA-ptsH*、*pgk-ptsI*、*gltA-ptsI*、*pgk-crp* 和 *gltA-crp*, 将构建好的 pTarget-sg-1-2 质粒导入菌株 DPAP10/pdCas9 得到双基因抑制菌株 DPAP10/pdCas9+pT-sg-1-2。以 DPAP10/pdCas9+pT-*avtA* 菌株为对照, 对 DPAP10/pdCas9+pT-sg-1-2 菌株中被抑制的双基因进行了 RT-qPCR 检测, 以验证相关基因的转录水平, 结果表明, 基因组合抑制的转录水平(图 5B)与基因单独抑制的转录水平(图 3C)有较大差异, 2.3 中结果表明这 5 个基因的单

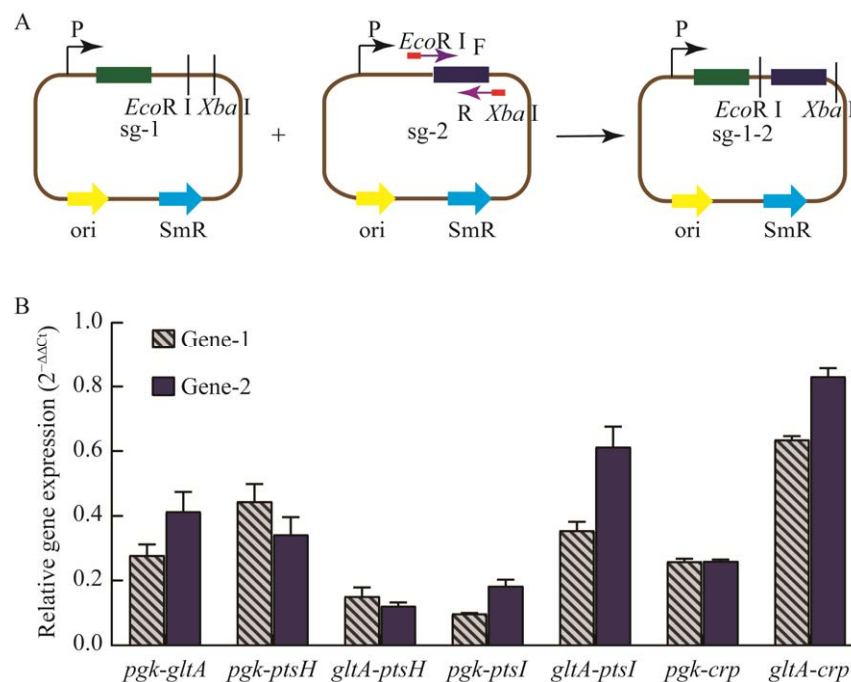


图 5 双基因抑制质粒构建(A)、RT-qPCR 验证 *pgk-gltA*、*pgk-ptsH*、*gltA-ptsH*、*pgk-ptsI*、*gltA-ptsI*、*pgk-crp* 和 *gltA-crp* 的转录水平强度变化(B)

Figure 5 Construction of double gene inhibitory plasmid (A), RT-qPCR verified the transcription levels of *pgk-gltA*, *pgk-ptsH*, *gltA-ptsH*, *pgk-ptsI*, *gltA-ptsI*, *pgk-crp*, *gltA-crp* (B). Error bars represent the deviation of the standard from the triplicate experiment.

抑制会改变 DPA 合成代谢网络，由于生物体内复杂的代谢网络，导致了双基因抑制后的转录水平与单基因抑制差别较大。图 5B 显示，相比于对照菌株，抑制菌株中的两个基因转录水平均降低，并且同一个菌株中的两个基因被抑制水平相近，证明质粒 pTarget-sg-1-2 在 CRISPRi 系统中可以同时发挥两个 sgRNA 作用，从而指导 dCas9 蛋白实现对双基因的抑制。

在接下来的研究中，利用构建的双基因抑

制 CRISPRi 系统，验证其对 DPA 合成的影响。结果显示(图 6A)，相较于对照菌株(3.50 g/L)，DPAP10/pdCas9+pT-*pgk-gltA* 产量提高了 25.5%，DPAP10/pdCas9+pT-*pgk-ptsH* 产量提高了 40.5%，DPAP10/pdCas9+pT-*gltA-ptsH* 产量提高了 49.5%，DPAP10/pdCas9+pT-*pgk-ptsI* 产量提高了 35.3%，DPAP10/pdCas9+pT-*gltA-ptsI* 产量提高了 24.2%，DPAP10/pdCas9+pT-*pgk-crp* 产量提高了 11.9%，DPAP10/pdCas9+pT-*gltA-crp*

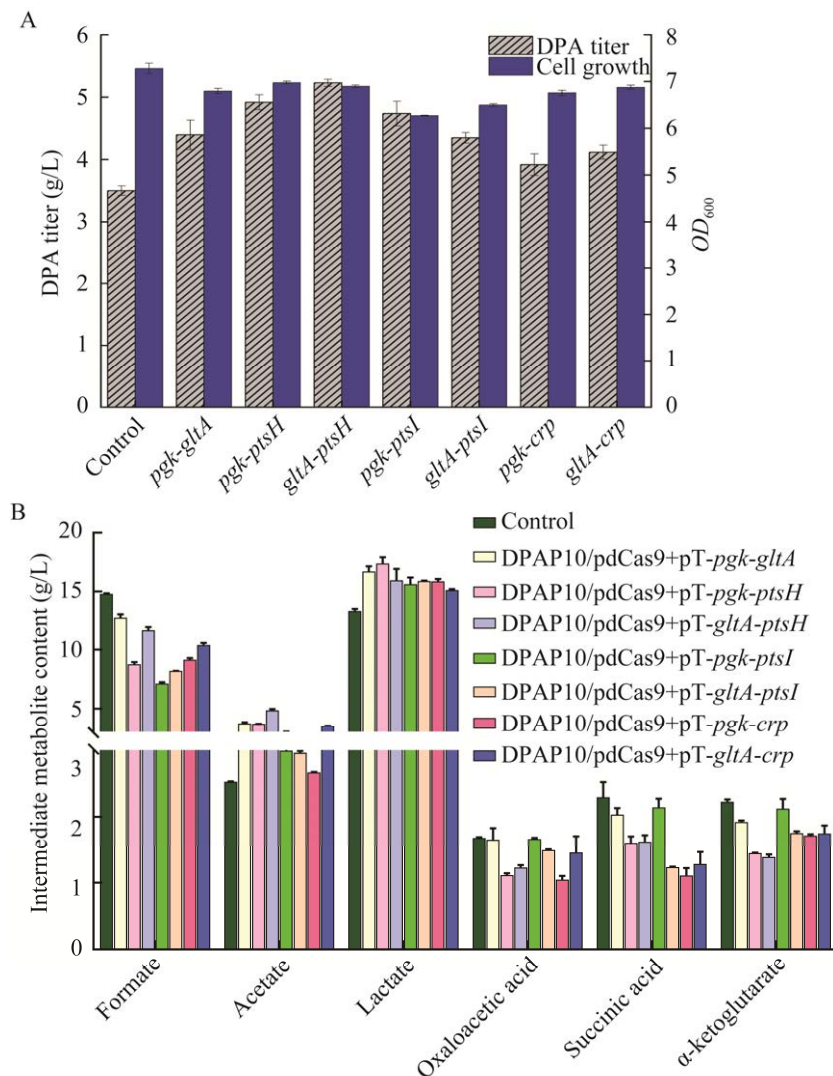


图 6 双位点阻断对 DPA 产量的影响(A)、双位点抑制菌株中间代谢物变化(B)

Figure 6 Effect of two-site blockade on the yield of DPA (A), inhibition of intermediate metabolites by double blocking (B). Error bars represent the deviation of the standard from the triplicate experiment.

产量提高了 17.6%。对比单基因的抑制, 双基因组合抑制对 DPA 生物合成更为有益。对双基因抑制菌株同单基因抑制菌株测定相同的中间代谢物, 结果显示(图 6B), 双基因抑制同样改变了 PYR 流向 3 种有机酸的通量分布, 降低了 TCA 循环速率。与单基因抑制不同的是, 双基因抑制菌株中有机酸含量变化更加统一, 都表现为甲酸含量减少, 乙酸和乳酸含量增加; TCA 循环中的琥珀酸、草酰乙酸和 α -酮戊二酸的含量的降低程度要低于单基因抑制, 当进行双基因抑制后, TCA 循环速率发生变化, PYR 节点通量更多的流向泛解酸路径, 促进了 DPA 的生物合成。本研究得到的最优双基因抑制组合是 *gltA-ptsH*, 该组合抑制有效提升了 DPA 生产能力, 摇瓶总产量提高 49.5%达到了 5.3 g/L。

2.5 5 L 罐发酵验证

为了进一步提高 DPA 的产量, 利用 5 L 发酵罐进行分批补料发酵实验。本研究通过 CRISPRi 确定了当 *gltA* 和 *ptsH* 基因受到组合抑制后, 能够有效提高 DPA 的合成。但抑制菌株 DPAP10/pdCas9+pT-*gltA-ptsH* 由于含有双质粒会造成代谢压力^[21], 不适用于罐上放大发酵生

产, 于是在基因组上通过起始密码子替换实现基因的下调表达。*gltA* 和 *ptsH* 基因的起始密码子都是 ATG, 起始密码子强度由大到小依次为 ATG、GTG、TTG^[22]。CRISPRi 系统中, 基因表达的抑制水平与转录起始点的靶点距离一般呈负相关, 设计 sgRNA 分别在前端、中端、末端与非模板 DNA 链结合, 分别对应基因抑制的高、中、低效率^[9]。本研究中设计的 sgRNA 都在靠近转录起始位点处对基因进行高效抑制, 为了在基因组上下调基因的表达水平更接近 CRISPRi 抑制效率, 选择最低强度的 TTG 起始密码子替换 ATG, 从而下调基因 *ptsH* 和 *gltA* 的表达, 得到无质粒菌株 DPAP10-*gltA*^{TTG}-*ptsH*^{TTG}。

以出发菌株 DPAP10 作为对照, DPAP10 是异亮氨酸缺陷型菌株, 在发酵过程中需要回补异亮氨酸(Ile)维持细胞生长, 发酵结果显示(图 7), DPA 产量随菌株的生长同步提高, DPAP10 菌株在 87 h 产量最高, 达到 63.1 g/L, DPAP10-*gltA*^{TTG}-*ptsH*^{TTG} 在 83 h 产量最高, 达到 75.4 g/L, 提高了 19.5%。可以看出, 在 5 L 发酵罐的放大过程中, 对照菌株前期生长速率快, 70 h 细胞生长进入衰退期, DPA 产量增长

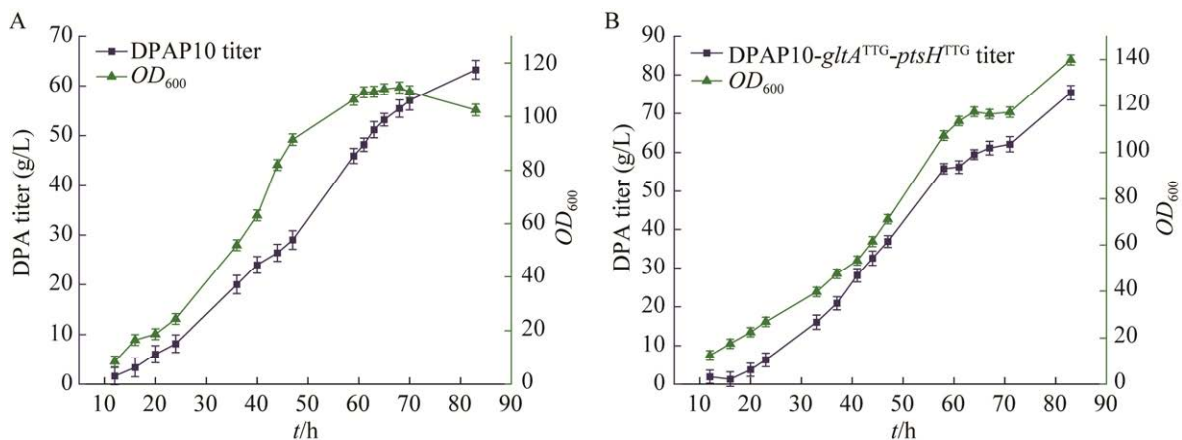


图 7 DPAP10 (A)与 DPAP10-*gltA*^{TTG}-*ptsH*^{TTG} (B)的分批补料发酵过程的比较

Figure 7 Comparison of DPAP10 (A) and DPAP10-*gltA*^{TTG}-*ptsH*^{TTG} (B) in a batch replenishment fermentation process. Error bars represent the deviation of the standard from the triplicate experiment.

速率减慢(图 7A), 改造菌株前期缓慢生长, 70 h 后反而出现一个快速生长和生产的趋势(图 7B), 改造菌株中下调了 *gltA* 和 *ptsH* 基因的表达, 造成 TCA 循环速率降低, 草酰乙酸减少, Ile 的供应更加不足, 于是在发酵后期添加了 40 mg/L Ile 后, 改造菌株刚好得到 Ile 补给, 于是出现了一个快速生长和生产的趋势, 尽管对照菌株后期也添加了同样的异亮氨酸, 但并没有出现快速生长和生产的趋势, 说明 Ile 的补给需要适时适量, 当菌株并不缺乏 Ile 时, 增加 Ile 并不能提高菌株产能。

3 讨论与结论

本研究通过 CRISPRi 技术, 根据与 DPA 合成直接或间接相关代谢途径, 在糖分解代谢(糖酵解、磷酸戊糖途径、三羧酸循环)模块、氨基酸代谢模块、调控辅因子模块、 σ 因子以及细胞生长形态模块共 126 个基因靶点中, 最终筛选得到 DPA 产量提高 10%以上的基因: *pgk* (29.5%)、*gltA* (22.1%)、*ptsH* (24.6%)、*ptsI* (10.9%)和 *crp* (15.4%); 在此基础上, 构建了 CRISPRi 双基因抑制系统, 同时干扰双基因 *pgk-gltA*、*pgk-ptsH*、*gltA-ptsH*、*pgk-ptsI*、*gltA-ptsI*、*pgk-crp* 和 *gltA-crp*, 组合抑制后得到菌株 DPAP10/pdCas9+pT-*gltA-ptsH* 的 DPA 产量最高, 达到了 5.3 g/L, 是对照菌株 DPAP10/pdCas9+pT-*avtA* 产量的 1.5 倍; 最后依据筛选结果, 在基因组上下调基因 *ptsH* 和 *gltA* 的表达, 得到工程菌株 DPAP10-*gltA*^{TTG}-*ptsH*^{TTG}, 在 5 L 发酵罐中放大培养, 最终产量达到 75.4 g/L, 相比于出发菌株 DPAP10 (63.1 g/L)提高了 19.5%。

根据上文单基因抑制的结果与分析, 发现 PYR 和 TCA 循环是影响 DPA 合成的关键节点, 于是对以 PYR 为节点的 DPA 合成竞争支路的有机酸和 TCA 循环的关键中间体进行检测, 根据

这些中间代谢物发生的变化来反映代谢通路的变化, 本研究中间代谢物检测结果表明, 无论是单基因抑制菌株还是双基因抑制菌株, 在改变了 PYR 通量分布的同时降低了 TCA 循环速率, 从而导致了更加高效的 DPA 合成, 这一结果也说明通过重新分配代谢通量可以实现目标产物的高效合成, 利用体外模块化工程与体内 CRISPRi 技术相结合可以调控多基因表达从而协调路径通量分布^[23], 受此启发, 在未来的研究中, 使用 CRISPRi 干扰, 为 DPA 合成的通路模块合理分配基因表达来消除约束, 最大限度提高产量。

在大规模筛选 DPA 生长关键基因方面, CRISPRi 抑制方法显然比基因敲除方法更有优势。基因敲除更适合操作少量基因和对生长不关键的基因, CRISPRi 抑制不能完全去除基因功能, 残留功能可能会导致对结果的误解。此外, 多拷贝质粒的存在给细胞带来代谢负担, 这是由于质粒复制和质粒基因翻译对核苷酸的需求增加。本研究描述的 DPA 生产实验中, 使用了基因抑制, 但对少数不是生长关键的基因, 没有进行敲除。然而, 根据实验目的, 结合 CRISPRi 抑制和基因敲除是必要的。在之后的研究中, 应继续扩大 DPA 的筛选基因文库, 对从中确定的非关键基因但对产量有提高的基因进行敲除, 对确定的关键基因进行单基因的精细调控以及多基因的组合优化以实现代谢通量的合理分配。另外, 利用筛选得到的 DPA 合成有益基因在基因组上进一步进行代谢改造, 构建无质粒的工程菌, 并对发酵条件进行优化, 以实现产物合成的最优策略。

参考文献

- [1] ZHANG B, ZHANG XM, WANG W, LIU ZQ, ZHENG YG. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for D-pantothenic acid production[J]. *Food Chemistry*, 2019, 294: 267-275.

- [2] ZOU SP, ZHAO K, WANG ZJ, ZHANG B, LIU ZQ, ZHENG YG. Overproduction of D-pantothenic acid via fermentation conditions optimization and isoleucine feeding from recombinant *Escherichia coli* W3110[J]. 3 Biotech, 2021, 11(6): 295.
- [3] CHASSAGNOLE C, DIANO A, LÉTISSE F, LINDLEY, ND. Metabolic network analysis during fed-batch cultivation of *Corynebacterium glutamicum* for pantothenic acid production: first quantitative data and analysis of by-product formation[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 104(1/2/3): 261-272.
- [4] YOCUM RR, PATTERSON TA, PERO JG, HERMANN T. Microorganisms and processes for enhanced production of pantothenate[P]. US: 7989187B2. 2011-08-02.
- [5] ZHANG B, CHEN L, JIN JY, ZHONG N, CAI X, ZOU SP, ZHOU HY, LIU ZQ, ZHENG YG. Strengthening the (R)-pantoate pathway to produce D-pantothenic acid based on systematic metabolic analysis[J]. Food Bioscience, 2021, 43: 101283.
- [6] 田开仁, 薛二淑, 宋倩倩, 乔建军, 李艳妮. CRISPR-dCas9 调控基因转录的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(7): 94-101.
- TIAN KR, XUE ES, SONG QQ, QIAO JJ, LI YN. The research progress of CRISPR-dCas9 in transcriptional regulation[J]. China Biotechnology, 2018, 38(7): 94-101 (in Chinese).
- [7] STACHLER AE, SCHWARZ TS, SCHREIBER S, MARCHFELDER A. CRISPRi as an efficient tool for gene repression in archaea[J]. Methods, 2020, 172: 76-85.
- [8] BATIANIS C, KOZAEVA E, DAMALAS SG, MARTÍN-PASCUAL M, VOLKE DC, NIKEL PI, MARTINS DOS SANTOS VAP. An expanded CRISPRi toolbox for tunable control of gene expression in *Pseudomonas putida*[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(2): 368-385.
- [9] FANG LX, FAN J, LUO SL, CHEN YR, WANG CY, CAO YX, SONG H. Genome-scale target identification in *Escherichia coli* for high-titer production of free fatty acids[J]. Nature Communications, 2021, 12: 4976.
- [10] LI N, SHAN XY, ZHOU JW, YU SQ. Identification of key genes through the constructed CRISPR-dcas9 to facilitate the efficient production of O-acetylhomoserine in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 978686.
- [11] LI B, ZHANG B, WANG P, CAI X, TANG YQ, JIN JY, LIANG JX, LIU ZQ, ZHENG YG. Targeting metabolic driving and minimization of by-products synthesis for high-yield production of D-pantothenate in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Journal, 2022, 17(1): e2100431.
- [12] 罗玉常, 窦文芳, 张晓梅, 史劲松, 许正宏. 谷氨酸棒杆菌 *ilvE* 基因的敲除对相关氨基酸合成的影响[J]. 生物技术通报, 2012(11): 185-191.
- LUO YC, DOU WF, ZHANG XM, SHI JS, XU ZH. Effect of *ilvE* gene knockout on amino acids synthesis of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(11): 185-191 (in Chinese).
- [13] STAUFFER LT, STAUFFER GV. Role for the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) as a structural protein in regulating the *Escherichia coli* *gcvTHP* operon[J]. Microbiology, 1999, 145(3): 569-576.
- [14] GUO L, DIAO WW, GAO C, HU GP, DING Q, YE C, CHEN XL, LIU J, LIU LM. Engineering *Escherichia coli* lifespan for enhancing chemical production[J]. Nature Catalysis, 2020, 3(3): 307-318.
- [15] YANG YT, BENNETT GN, SAN KY. The effects of feed and intracellular pyruvate levels on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2001, 3(2): 115-123.
- [16] GOSSET G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system[J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4(1): 14.
- [17] LAI SJ, ZHANG Y, LIU SW, LIANG Y, SHANG XL, CHAI X, WEN TY. Metabolic engineering and flux analysis of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production[J]. Science China Life Sciences, 2012, 55(4): 283-290.
- [18] LIU SY, DAI ZW, COOPER DE, KIRSCH DG, LOCASALE JW. Quantitative analysis of the physiological contributions of glucose to the TCA cycle[J]. Cell Metabolism, 2020, 32(4): 619-628.e21.
- [19] SHIMADA T, FUJITA N, YAMAMOTO K, ISHIHAMA A. Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20081.
- [20] JAHAN N, MAEDA K, MATSUOKA Y, SUGIMOTO Y, KURATA H. Development of an accurate kinetic model for the central carbon metabolism of *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 112.
- [21] SINGHA TK, GULATI P, MOHANTY A, KHASA YP, KAPOOR RK, KUMAR S. Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: a review[J]. Process Biochemistry, 2017, 55: 17-31.
- [22] HECHT A, GLASGOW J, JASCHKE PR, BAWAZER LA, MUNSON MS, COCHRAN JR, ENDY D, SALIT M. Measurements of translation initiation from all 64 codons in *E. coli*[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(7): 3615-3626.
- [23] GAO C, WANG SH, HU GP, GUO L, CHEN XL, XU P, LIU LM. Engineering *Escherichia coli* for malate production by integrating modular pathway characterization with CRISPRi-guided multiplexed metabolic tuning[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(3): 661-672.