

DOI: 10.13376/j.cbls/2015121

文章编号: 1004-0374(2015)07-0883-09

微生物小基因组细胞工厂研究进展

金凯明*, 周 莲, 蒋海霞, 何亚文*

(上海交通大学生命科学技术学院微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240)

摘 要:通过合理设计简化微生物基因组, 减少细胞内冗余的调控和代谢网络, 使得细胞更精简且便于控制, 也能更高效地应用于工业生产。微生物小基因组细胞工厂只含有用于工业生产目的基因, 是研究组学的重要工具, 也是生物制品工业生产的理想平台。介绍了构建小基因组细胞工厂的整体设计流程, 列举了一些模式生物的相关研究进展, 对微生物小基因组细胞工厂的应用前景进行了评述。

关键词:必需基因; 基因组简化; 小基因组; 细胞工厂

中图分类号: Q81; Q939.7 文献标志码: A

Research progress in microbial minimum genome factory

JIN Kai-Ming*, ZHOU Lian, JIANG Hai-Xia, HE Ya-Wen*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences & Biotechnology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Microbial reduced-genome, which was constructed through rational design, exhibits less redundant regulation and metabolic network. It makes the cell system more simplified and controllable, meanwhile, more efficient for industrial application. Microbial minimum genome factory (MGF) consists of a minimal essential set of necessary and adequate genes for industrial use. It is an important tool for 'omics' research, and would be an ideal platform for biological products. This paper reviewed the overall design process for MGF and related research progress of some industrial model microorganisms, as well as the potential application prospects of the microbial MGF.

Key words: essential genes; genome reduction; minimum genome; cell factory

近年来, 微生物越来越多地参与全球工业生产, 特别是在制药、食品和化学工业^[1]。它可以为人们提供很多有用的物质, 如大分子物质(蛋白质、核酸等)、初级代谢产物(氨基酸、有机酸、多糖、维生素等)和次级代谢产物(抗生素、抗肿瘤化学物)等^[2]。传统的工业微生物改良是采用诱变方式随机选育优良的菌种, 由于诱变育种的有益突变频率较低, 导致菌种选育过程费时费力。随着分子生物学技术、DNA重组技术和遗传学技术的发展, 推动了现代工业微生物育种^[3]。合成、分析和建模方法的快速发展使得合成生物学应运而生, 应用合成生物学可以通过合理的设计, 改造或重构生物分子、代谢网络, 甚至可以是一个新的生物体^[4-5]。基因组工程(genome engineering)可以将合成生物学通过基

因组修饰技术实际应用于提升菌株的生产性能^[6-7]。现代工业微生物育种的热点之一是构建微生物小基因组细胞工厂(minimum genome factory, MGF)。小基因组细胞工厂的冗余代谢和调控更少, 是工业微生物生产的理想工作平台^[8]。

1 小基因组细胞工厂的来源及其特点

一个更易预测和控制的细胞系统称为细胞工厂^[8]。2002年, 美国能源部科学办公室启动了“从

收稿日期: 2015-01-27; 修回日期: 2015-03-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2012AA022107); 上海市教委重点项目(GM0800004)

*通信作者: E-mail: jinkaiming3300@sina.com (金凯明); yawenhe@sjtu.edu.cn (何亚文)

基因组到生命”(Genome To Life, GTL)项目, GTL项目的主要目标是利用合成生物学,在体内和体外创造人工合成的细胞。著名的遗传学家 Venter 和他的同事致力于人工合成小基因组细胞,应用于能源生产和其他领域^[9]。日本新能源和工业技术开发组织发起了小基因组细胞工厂项目,该项目旨在运用基因工程和功能基因组学分析多个模式微生物,构建小基因组微生物。

微生物小基因组细胞工厂并不是指含有最少必需基因的底盘细胞,而是一个细胞只含有用于工业生产目的的基因。这样的小基因组细胞在应用到工业生产的时候,可以更简单,也更容易控制。传统的发酵工业有诸多亟待解决的问题,如发酵菌株的不稳定性,容易突变失去高产的性能;发酵的生产周期长,菌体生长速度比较慢;发酵过程中有诸多副产物,对产物的提取造成很多麻烦,也会增加产品的成本。构建微生物小基因组细胞工厂可以弥补传统发酵工业的弊端。

功能基因组学的的数据可用于设计构建小基因组细胞工厂,在基因组简化过程中,非必需基因被逐步敲除;而小基因组细胞工厂具有清楚的遗传背景,是验证功能基因组学数据的良好宿主。小基因组细胞工厂极大地减少了细胞内冗余的代谢,为获得可预测、可控制的细胞工厂提供了理想的原材料。

2 小基因组细胞工厂的一般构建过程

2.1 必需基因的鉴定和删除区域的确定

必需基因对维持生物体生长起至关重要的作

用,其编码的蛋白质用于维持细胞的中心代谢、DNA 复制和维持基本的细胞结构及调节细胞内外的运输等。在不同的条件下,必需基因的鉴定结果可能会不一致,如通过基本培养基和丰富培养基筛选,同一种细菌的必需基因可能不同。鉴定微生物必需基因的常用方法主要有全局转座插入突变法、单基因敲除法、反义 RNA 干扰法、比较基因组学法、功能基因组学法和代谢网络计算模拟法等^[10]。全局转座插入突变法利用转座子插入突变使基因失活,经过高通量和过饱和地插入突变,确定微生物的必需基因。利用该方法,已经成功鉴定了大肠杆菌、结核分枝杆菌和铜绿假单胞菌等的必需基因^[11-14]。单基因敲除法是通过逐一敲除单个基因,考察突变体的生存能力,从而确定敲除的基因是否为必需基因。这种方法的准确率较高,但是工作量非常大,研究周期长。比较基因组学法则利用已有的基因组序列,通过计算机分析比对保守序列,确定必需基因^[15]。表 1 中列举了多种微生物必需基因的数目及鉴定的方法。在营养丰富的条件下,细菌维持生长所必需的基因在 250~300 个^[3,16]。

在设计微生物小基因组细胞工厂时,首先通过比较基因组学的方法来确定候选删除区域,对不影响细胞生长和基础代谢的区域可以逐步敲除^[8]。

2.2 利用无痕敲除技术简化基因组

以目前的 DNA 合成技术,通过自下而上从头合成微生物小基因组细胞工厂的方法还不太成熟^[8]。比较可行的方法是通过自上而下简化基因组来构建微生物小基因组工厂。在构建过程中,基因组需要

表1 各种微生物中必需基因的数目和鉴定方法

Method	Strains	No. of essential genes /all ORFs (%)	Ref.
Comparative genomics	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	406/4 902 (8%)	[15]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	117/5 697 (2%)	[17]
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi Ty2	358/4 678 (7.6%)	[18]
	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	351/2 872 (12%)	[19]
Global transposition	<i>Escherichia coli</i> MG1655	609/4 497 (13%)	[11]
	<i>Helicobacter pylori</i> 26695	323/1 563 (21%)	[12]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	335/5 977 (5.6%)	[13]
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	614/4 111 (15%)	[14]
Single-gene deletion or knockout	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1110/5 916 (19%)	[20]
	<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	499/3 407 (14.6%)	[21]
	<i>Escherichia coli</i> MG1655	296/4 497 (6.5%)	[22]
Antisense RNAi	<i>Bacillus subtilis</i> 168	271/4 421 (6%)	[23]
	<i>Staphylococcus aureus</i> N315	146/2 648 (5.5%)	[24]

经历多轮敲除过程。因此, 需要通过无痕敲除技术简化基因组。

为了敲除基因组片段后不留下任何冗余的选择性标记基因和外源 DNA 片段, 研究人员开发了一种无痕敲除方法 (图 1), 这种方法联合了 Red 介导的重组和双链断裂 (DSB) 促进重组^[25]。首先通过

PCR 扩增获得一段线性 DNA 片段 (带有实际敲除后的连接序列), 该 DNA 片段通过 Red 重组后会在目标敲除区域的两边产生一对重复序列。然后, 通过 I-SceI 核酸酶对插入 DNA 序列进行双链断裂, 促进分子内部的同源重组。最终, 通过这种 DSB 重组修复后可以产生基因组无痕敲除突变体。

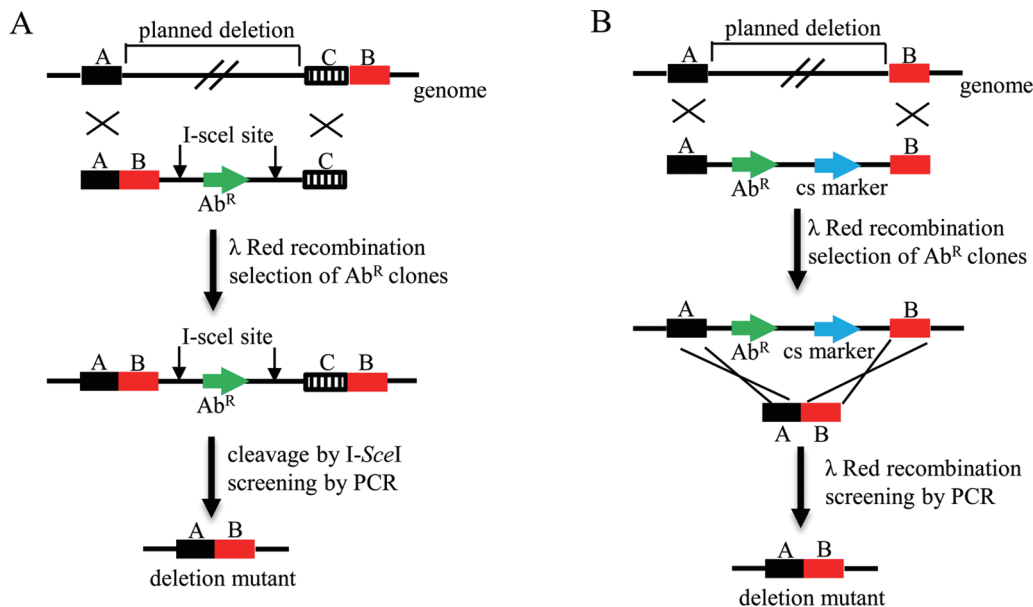


图1 微生物大片段基因无痕敲除系统^[10]

Hashimoto 等^[26]发展了另一种无痕敲除方法, 该方法利用连续两次 Red 介导的重组完成。在第一次重组中, Cm^R -*rpsL*-*sacB* (CRS) 的两边各有一个同源臂, 在 Red 介导下, 同源臂与基因组目标区域发生重组。在这一步骤中, 突变株通过氯霉素抗性 (正向选择标记) 来筛选。在第二次重组中, 通过一段只含有基因组序列的 DNA 片段取代第一步插入的 CRS 组件, 这样就完成了一次无痕敲除。在第二次重组中, *rpsL* 和 *sacB* 作为两个反向选择标记, 筛选对氯霉素敏感的突变株。

除了上述方法, Yu 等^[27]优化了利用线性 DNA 进行无痕敲除的方法。在这种方法中, 整个敲除过程只需要一个辅助质粒 pRED1, 其含有编码 Red 整合酶基因和 I-SceI 核酸酶基因, 这两个基因分别受到阿拉伯糖和鼠李糖启动子诱导调控。基因敲除过程首先是使细菌在含有以阿拉伯糖 (诱导 Red 整合酶的合成, 介导线性 DNA 进入细菌基因组) 为唯一碳源的培养基上生长, 然后使细菌在含有以鼠

李糖 (诱导 I-SceI 核酸酶的表达, 该酶能够产生 DSB 而促进分子内的重组) 为唯一碳源的培养基上生长。整个敲除过程只需要两天且不留任何选择标记基因, 这种方法极大地缩短了敲除所需的时间, 提高了敲除的效率。

Red 重组酶介导的同源重组可以敲除较长的 DNA 片段, 同时不会在基因组上留下任何标记。敲除小片段基因组区域或基因时, 除了线性 DNA 介导的敲除方法外, 也可以结合自杀质粒介导的同源重组方法进行无痕敲除。

2.3 对简化基因组的进一步改造

通过逐轮敲除简化基因组后, 得到简化基因组细胞。对简化基因组细胞进行表型特征分析, 验证其应用于工业生产的优势性。同时, 通过比较基因组学、代谢网络计算模拟等对简化基因组细胞进一步精简, 最终获得小基因组细胞工厂。微生物小基因组细胞工厂应具有以下特性: (1) 细胞内的调节相对更少, 是细胞工厂系统的理想平台; (2) 细

胞更简单, 工业生产时更容易操作; (3) 细胞应用于工业生产时, 对原料的利用率更高, 副产物少, 目的产物更多。微生物小基因组细胞工厂减少了细胞内冗余的调控和代谢网络, 使得细胞更精简, 更

高效。除了用于工业目的外, 微生物小基因组细胞工厂也可用于基础研究, 如可以更深入地了解细胞内的代谢网络, 同时也是构建可预见系统的理想材料。小基因组细胞工厂的整个构建流程如图2所示。

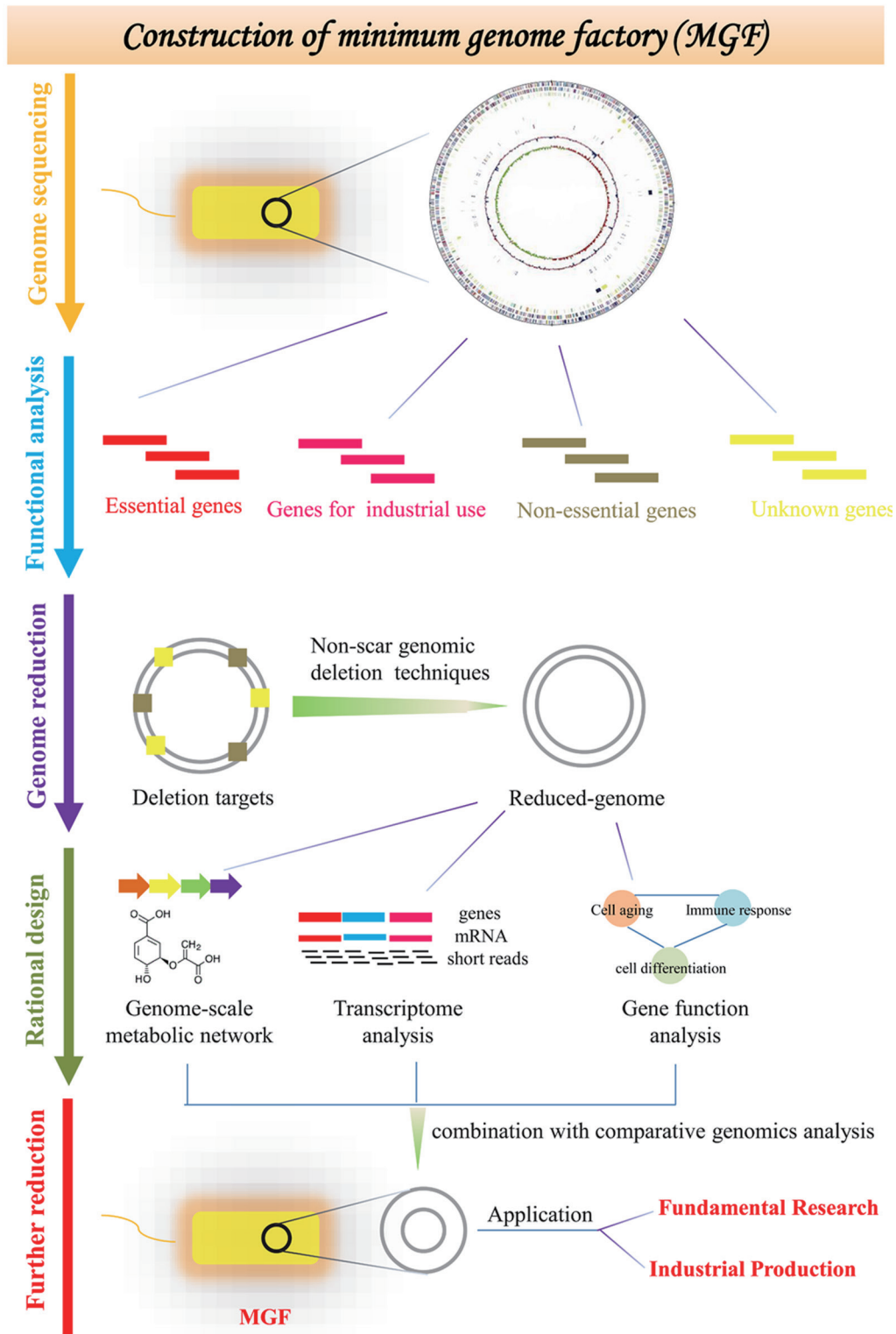


图2 构建微生物小基因组细胞工厂流程的示意图

3 工业模式菌小基因组细胞工厂研究

3.1 大肠杆菌

大肠杆菌是用于基因重组的理想宿主之一。世界上首次利用大肠杆菌重组技术生产重组人胰岛素^[28], 并在1982年投入市场进行销售。从20世纪80年代开始, 大肠杆菌被用于制药和发酵工业来生产各种各样的产品, 如重组蛋白、氨基酸及其他化合物等。1997年, 完整的大肠杆菌基因组测序完成, 它的基因组序列信息促进了大肠杆菌中代谢工程的发展。然而, 仍然有约40%的大肠杆菌基因功能还不清楚^[29]。在大肠杆菌细胞内部的调控和代谢网络非常复杂, 常常会干扰对特定途径的设计和改造。

利用无痕敲除技术, Kolisnychenko等^[25]对大肠杆菌基因组进行大片段序列敲除, 获得了第一个简化的大肠杆菌基因组。在简化的大肠杆菌基因组中, 有12个菌株特异性区域(K-基因岛)被敲除, 整个基因组长度减少了8.1%(376 kb)。随后, Pósfai等^[30]又在简化基因组基础上, 继续进行叠加敲除, 获得了一系列基因组简化株(multiple-deletion series, MDS)。其中MDS43菌株基因组减少了15%(708 kb), 而MDS42菌株则显示了优良的特性, 如极高的电转化效率、稳定的异源表达重组蛋白等。MDS菌株基因组中没有留下任何外源的序列, 可以作为研究高度多重修饰大肠杆菌基因组的理想宿主。

Mizoguchi等^[31]则以大肠杆菌K-12 W3110为出发菌株, 选择不影响生长和基础代谢的区域进行敲除, 构建基因组简化菌株。首先, 比对大肠杆菌和内共生菌*Buchnera* sp的共同基因, 这些基因是不可或缺的。因为内共生菌含有简化的基因组, 同时与大肠杆菌在进化过程中含有共同的保守基因。其次, 在基础培养基上, 大肠杆菌生长所必需的基因也不能敲除。如果在必需基因之间有超过10个非必需基因, 那么这些区域是可以敲除的区域。按照这样的标准, 选择了83个区域作为候选的敲除区域。最终, 经过28轮敲除后, 获得简化的基因组MGF-01菌株。MGF-01的基因组减少了22%(1.03 Mb), 在M9培养基中, 它的最终细胞密度比野生型提高1.5倍; 作为生产的宿主, 其苏氨酸产量增加2.4倍。另外, MGF-01可以作为小基因组细胞工厂的原材料, 用于进一步提升细胞的生长和代谢。

在MGF-01的基础上, Hirokawa等^[32]敲除所有的插入序列, 最终获得了简化基因组DSF-327和DSF-298菌株, 他们的基因组分别减少了30%(1.38

Mb)和36%(1.67 Mb)。基因组精简后, DSF-327和DSF-298显示了更优良的特性, 如: 没有营养缺陷, 且比出发菌株生长得更好(尤其是在生长的起始阶段); 在丰富的培养基上, 比野生型菌株有更高的细胞产率。

3.2 枯草芽孢杆菌

枯草芽孢杆菌能够分泌大量的蛋白质(酶类)和抗生素, 且菌株安全性较高。因此, 其可以作为蛋白质生产的微生物宿主, 在工业和医药领域起到非常重要的作用^[33]。另外, 根据环境条件的不同, 枯草芽孢杆菌可以通过两种细胞分化模式而具有不同的生长周期, 可以作为研究细胞分化的模型。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)168的基因组全长为4.2 Mb, 含有4 100多个基因, 其中有42%的基因功能未知^[34]。Kobayashi等^[23]通过基因失活的方法鉴定了*B. subtilis* 168中的必需基因和非必需基因, 其中有271个必需基因对于维持细胞生长和蛋白质合成与分泌是必不可少的; 除了271个必需基因外, 其他基因的功能对细胞合成和分泌蛋白质是否有影响还未知。随后, Ara等^[33]通过单基因敲除或失活的方法构建了*B. subtilis* 168突变体库, 分析了2 494个基因对*B. subtilis* 168碱性纤维素酶合成能力的影响。其中, 有92个基因在敲除或失活后, 可以提高碱性纤维素酶合成和分泌; 另有69个基因在敲除或失活后, 降低了碱性纤维素酶的合成和分泌。

在工业生产上, 枯草芽孢杆菌常用来生产多种有用的酶类如 α -淀粉酶、中性蛋白酶等。构建枯草芽孢杆菌小基因组细胞工厂, 可以减少细胞内冗余的代谢, 提高蛋白质合成和分泌的效率, 提高工业生产的经济效益等。Westers等^[35]通过敲除枯草芽孢杆菌中前噬菌体和AT-富集的区域, 构建了基因组简化的枯草芽孢杆菌 $\Delta 6$, 其基因组减少了7.7%(320 kb)。菌株 $\Delta 6$ 的胞外蛋白表达与野生型相比有很大的变化: 在菌株 $\Delta 6$ 的胞外蛋白质组中没有胞浆蛋白, 这说明菌株 $\Delta 6$ 没有增加细胞裂解的趋势; 另外, 菌株 $\Delta 6$ 异源淀粉酶的分泌量比野生型高。Ara等^[33]对枯草芽孢杆菌基因组进行高度简化, 获得的菌株MG1M基因组减小了24%(991 kb)。在产酶培养基中, MG1M的生长相比野生型有略微的减弱, 但是没有明显的形态学变化; 另外, MG1M菌株产生纤维素酶和蛋白酶的量与野生型相当。2008年, Morimoto等^[36]构建了一株新的基因组简化的枯草芽孢杆菌MBG874, 其基因组减少了20%(874

kb), 并且是第一株已经实际应用于工业生产的简化基因组细菌; 对纤维素和蛋白酶的生产能力比野生型分别提高 1.7 倍和 2.5 倍。在 MBG874 的基础上, Manabe 等^[37] 对其进行进一步改造, 敲除谷氨酸脱氢酶基因 *rocG* 后, MBG874 Δ *rocG* 的碱性纤维素酶 Egl-237 产量比出发菌株有明显的提高。

3.3 链霉菌

链霉菌属的微生物能产生多种具有生物活性的次级代谢产物。这些化学结构多样的次级代谢产物不仅具有抗菌活性、抗真菌活性、抗病毒和抗肿瘤活性, 也具有抗高血压和免疫抑制剂的作用^[38]。因此, 链霉菌作为重要的工业微生物, 在医药领域发挥着重大作用。

阿维菌素是由阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 发酵产生的具有杀虫活性的大环内酯类化合物。在商业上, 阿维菌素可以作为抗寄生虫药物应用于人类健康、兽医和农业用杀虫^[39]。2010 年, Komatsu 等^[40] 通过基因组简化, 获得了一系列大片段敲除突变株, 基因组减少了 16.88%~18.54% (>1.4 Mb)。这些基因组简化菌株不产生亲本菌株中主要的内源次级代谢产物, 能够高效地异源表达链霉素和头孢霉素 C, 显示了良好的特性。2013 年, Komatsu 等^[38] 克隆了 20 个完整的次级代谢合成基因簇, 并成功转化至简化基因组菌株 *S. avermitilis* SUKA17 或 SUKA22。绝大部分转化株 (带有完整合成基因簇) 能够异源表达相应的代谢产物, 且其产量要比内源菌株高, 只有少部分转化株需要通过替换启动子或者表达一个调控基因后, 才能够成功地异源表达。

3.4 酵母菌

粟酒裂殖酵母与多细胞高等生物在分子、遗传和生化特征方面有很多相似之处, 如它的很多基因与人类的基因互补, 它的转录起始机制与高等真核生物相似, 它的剪接机制、信号转导系统和翻译后修饰机制与高等动物相似。因此, 粟酒裂殖酵母可以用于表达具有复杂结构的分子, 如来源于高等动物的糖基化蛋白质等^[41]。酵母工业发酵具有优良的特点: 细胞密度高、发酵周期短、发酵培养基原料要求低等。以粟酒裂殖酵母为宿主, 发展了多个系统用于生产蛋白质, 其中一些已经应用于商业生产。2003 年, 美国的 Verenum 公司成功地通过粟酒裂殖酵母发酵生产动物饲料添加剂 BD006 植酸酶^[42]。植酸酶可以将植物原料中的植酸分解产生无机磷酸

盐, 从而提高植物原料的营养价值。尽管利用粟酒裂殖酵母表达系统可以进行商业化生产, 仍然有必要进行改造以便生产成本更低的化学品和日用品。构建粟酒裂殖酵母小基因组细胞工厂, 可以达到改造的目的, 相比化学合成目的产物, 原料通过生物发酵转化生产有用的商品对环境更加友好, 更有利于可持续发展。

粟酒裂殖酵母基因组测序于 2002 年完成, 单倍体粟酒裂殖酵母基因组大小 12.6 Mb, 由 3 个染色体组成, 长度分别为 5.6 Mb、4.5 Mb 和 2.5 Mb^[43]。Kim 等^[44] 构建和分析了 4 836 个粟酒裂殖酵母杂合二倍体敲除突变体, 覆盖了 98.4% 的粟酒裂殖酵母基因组。分析敲除突变体的生存能力, 表明 26.1% (1 260/4 836) 的粟酒裂殖酵母基因是必需基因; 而在酿酒酵母基因组中, 只有 17.8% (1 033/5 766) 的基因对其生长是必需的。粟酒裂殖酵母基因组中重复基因比酿酒酵母少, 这可能是粟酒裂殖酵母中必需基因更多的原因。

在粟酒裂殖酵母中, 可以利用 Cre-*loxP* 系统准确敲除单个基因或者大片段 DNA。但是, 通过该系统会在基因组上留下一个 *loxP* 序列, 经过多轮敲除后, 基因组上会存在多个 *loxP* 序列, 导致基因组变得不稳定。为了克服上述缺陷, Hirashima 等^[45] 发展了一种无痕敲除方法 “Latour”。在单轮敲除中, 利用 “Latour” 方法可以有效地敲除 100 kb DNA 片段, 同时不会留下任何外来的标记序列。Idiris 等^[46] 构建了多蛋白酶缺陷菌株 A7-2, 其中敲除了 7 个蛋白酶基因, 这些基因的敲除减少了粟酒裂殖酵母对外源蛋白的降解。对蛋白酶敏感的人体生长激素 (hGH) 在 A7-2 中的表达量增加 30 倍, 但是在 A7-2 菌株的细胞内仍然可以检测到 hGH。为了使得 hGH 更多地分泌到胞外, Idiris 等^[46] 在 A7-2 的基础上敲除液泡蛋白质分拣基因 *vps10*, 获得 A8-*vps10* Δ 菌株, 其 hGH 的分泌量增加 2 倍。2013 年, Sasaki 等^[47] 通过大规模基因无痕敲除技术成功构建了基因组简化的粟酒裂殖酵母 IGF-742。IGF-742 是目前含有基因数量最少的真核模式微生物, 它的基因组减少了 5.2% (657.3 kb), 对葡萄糖和一些氨基酸的吸收能力相比野生型有所减弱。在 IGF-742 中, 胞内的 ATP 浓度上升 2.7 倍; 异源蛋白质表达量, 如绿色荧光蛋白 (GFP) 和 hGH 分别增加 1.7 和 1.8 倍。

另外, 酿酒酵母是用于酒精发酵工业的重要生

产菌株。Giaever 等^[20]利用单基因敲除方法, 成功构建了近乎完整的酿酒酵母单基因突变体库(大约96%的基因), 系统分析了维持酿酒酵母生长的必需基因。Murakami 等^[48]通过 PCR 介导的染色体分裂技术, 大规模缺失酿酒酵母的基因组, 获得了简化基因组菌株, 其基因组减少了5%(531 kb)。基因组简化不仅改变了酿酒酵母细胞内的碳代谢, 简化株 MFY1162 的酒精和甘油的产量分别是野生型的1.8倍和2倍, 同时也提高了对环境的适应能力。

4 展望

通过自上而下的技术路线缩减基因组, 目前已有多个简化基因组细胞构建完成^[32,37,40,47-51]。这些菌株都表现出优良的特性, 其中枯草芽孢杆菌 MBG874 已经用于商业化生产。这些简化基因组细胞为基因组的进一步缩减提供了很好的原材料^[52]。借助转录组数据、基因功能信息、功能基因组学以及比较基因组学, 合理设计简化基因组的进一步缩减, 最终获得含有预定功能基因的更简单和可预测的细胞工厂用于工业化生产。片面地追求基因组最小化, 容易对菌株的生长、代谢和遗传等造成不利的影响。因此, 在构建小基因组细胞工厂的过程中, 不能忽视基因与基因之间的相互作用, 同时要兼顾微生物细胞对环境的适应能力和大规模培养的潜力。小基因组细胞工厂的研究也属于合成生物学范畴, 在众多合成生物学方法中, 通过自上而下的技术路线简化基因组是较为简便且研究周期较短的方法之一。

另外, 随着 DNA 合成和测序技术的飞速发展, 通过自下而上的途径获得小基因组细胞工厂并不是没有可能。Gibson 等^[53-54]已经成功化学合成了具有自我复制和对数生长特性的丝状支原体 JCVI-syn1.0 和长度为 16.3 kb 的实验鼠线粒体基因组。相信在不久的将来, 可以通过化学合成的方式获得只含有用于工业生产目的基因的微生物基因组。

微生物小基因组细胞工厂减少了细胞内冗余的代谢网络, 使得细胞更加简单, 可以作为研究细胞代谢网络的理想材料。更为重要的是, 微生物小基因组细胞工厂在工业应用方面具有很强的优势, 能够为我们高效生产所需商品(蛋白质、酶、抗生素等)。相比工业化学合成, 其对环境更友好, 符合世界各国可持续发展的要求, 具有更重要和广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Rajasekaran R. Microbial biotechnology rapid advances in an area of massive impact. *Advanced Biotech*, 2008, 7(5): 19-25
- [2] Parekh S, Vinci VA, Strobel RJ. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 54(3): 287-301
- [3] Demain AL, Adrio JL. Strain improvement for production of pharmaceuticals and other microbial metabolites by fermentation. *Prog Drug Res*, 2008, 65: 251, 253-89
- [4] Khalil AS, Collins JJ. Synthetic biology: applications come of age. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(5): 367-79
- [5] Liang J, Luo Y, Zhao H. Synthetic biology: putting synthesis into biology. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2011, 3(1): 7-20
- [6] Cobb RE, Si T, Zhao H. Directed evolution: an evolving and enabling synthetic biology tool. *Curr Opin Chem Biol*, 2012, 16(3-4): 285-91
- [7] Esvelt KM, Wang HH. Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol Syst Biol*, 2013, 9: 641
- [8] Mizoguchi H, Mori H, Fujio T. *Escherichia coli* minimum genome factory. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 46(Pt 3): 157-67
- [9] Check E. Venter aims for maximum impact with minimal genome. *Nature*, 2002, 420(6914): 350
- [10] Sung BH, Lee JH, Kim SC. *Escherichia coli* genome engineering and minimization for the construction of a bioengine [M]. Netherlands: Springer Press, 2009
- [11] Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW, et al. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol*, 2003, 185(19): 5673-84
- [12] Salama NR, Shepherd B, Falkow S. Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, 2004, 186(23): 7926-35
- [13] Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, et al. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2833-8
- [14] Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol*, 2003, 48(1): 77-84
- [15] Baugh L, Gallagher LA, Patrapuvich R, et al. Combining functional and structural genomics to sample the essential *Burkholderia* structome. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53851
- [16] Zhang R, Lin Y. DEG 5.0, a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Database issue): D455-8
- [17] Gallagher LA, Shendure J, Manoil C. Genome-scale identification of resistance functions in *Pseudomonas aeruginosa* using Tn-seq. *MBio*, 2011, 2(1): e00315-10
- [18] Barquist L, Langridge GC, Turner DJ, et al. A comparison of dense transposon insertion libraries in the *Salmonella serovars* Typhi and Typhimurium. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(8): 4549-64

- [19] Chaudhuri RR, Allen AG, Owen PJ, et al. Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using transposon-mediated differential hybridisation (TMDH). *BMC Genomics*, 2009, 10: 291
- [20] Giaever G, Chu AM, Ni L, et al. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 2002, 418(6896): 387-91
- [21] de Berardinis V, Vallenet D, Castelli V, et al. A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol Syst Biol*, 2008, 4: 174
- [22] Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2006, 2: 2006.0008
- [23] Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, et al. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4678-83
- [24] Ji Y, Zhang B, Van SF, et al. Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science*, 2001, 293(5538): 2266-9
- [25] Kolisnychenko V, Plunkett G 3rd, Herring CD, et al. Engineering a reduced *Escherichia coli* genome. *Genome Res*, 2002, 12(4): 640-7
- [26] Hashimoto M, Ichimura T, Mizoguchi H, et al. Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol Microbiol*, 2005, 55(1): 137-49
- [27] Yu BJ, Kang KH, Lee JH, et al. Rapid and efficient construction of markerless deletions in the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(14): e84
- [28] Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, et al. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(1): 106-10
- [29] Riley M, Abe T, Arnaud MB, et al. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot-2005. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(1): 1-9
- [30] Pósfai G, Plunkett G 3rd, Feher T, et al. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*, 2006, 312(5776): 1044-6
- [31] Mizoguchi H, Sawano Y, Kato J, et al. Superpositioning of deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a reduced genome. *DNA Res*, 2008, 15(5): 277-84
- [32] Hirokawa Y, Kawano H, Tanaka-Masuda K, et al. Genetic manipulations restored the growth fitness of reduced-genome *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*, 2013, 116(1): 52-8
- [33] Ara K, Ozaki K, Nakamura K, et al. *Bacillus* minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 46(Pt 3): 169-78
- [34] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, 390(6657): 249-56
- [35] Westers H, Dorenbos R, van Dijl JM, et al. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(12): 2076-90
- [36] Morimoto T, Kadoya R, Endo K, et al. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Res*, 2008, 15(2): 73-81
- [37] Manabe K, Kageyama Y, Morimoto T, et al. Improved production of secreted heterologous enzyme in *Bacillus subtilis* strain MGB874 via modification of glutamate metabolism and growth conditions. *Microb Cell Fact*, 2013, 12: 18
- [38] Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, et al. Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth Biol*, 2013, 2(7): 384-96
- [39] Ikeda H, Kazuo SY, Omura S. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(2): 233-50
- [40] Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, et al. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(6): 2646-51
- [41] Giga-Hama Y, Tohda H, Takegawa K, et al. *Schizosaccharomyces pombe* minimum genome factory. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 46(Pt 3): 147-55
- [42] Ciofalo V, Barton N, Kretz K, et al. Safety evaluation of a phytase, expressed in *Schizosaccharomyces pombe*, intended for use in animal feed. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2003, 37(2): 286-92
- [43] Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 2002, 415(6874): 871-80
- [44] Kim DU, Hayles J, Kim D, et al. Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(6): 617-23
- [45] Hirashima K, Iwaki T, Takegawa K, et al. A simple and effective chromosome modification method for large-scale deletion of genome sequences and identification of essential genes in fission yeast. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2): e11
- [46] Idiris A, Tohda H, Sasaki M, et al. Enhanced protein secretion from multiprotease-deficient fission yeast by modification of its vacuolar protein sorting pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(3): 667-77
- [47] Sasaki M, Kumagai H, Takegawa K, et al. Characterization of genome-reduced fission yeast strains. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(10): 5382-99
- [48] Murakami K, Tao E, Ito Y, et al. Large scale deletions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome create strains with altered regulation of carbon metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(3): 589-97
- [49] Akeno Y, Ying BW, Tsuru S, et al. A reduced genome decreases the host carrying capacity for foreign DNA. *Microb Cell Fact*, 2014, 13(1): 49
- [50] Miyamoto KT, Komatsu M, Ikeda H. Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from

- Actinomycetales* microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(16): 5028-36
- [51] Toya Y, Hirasawa T, Morimoto T, et al. 13 C-metabolic flux analysis in heterologous cellulase production by *Bacillus subtilis* genome-reduced strain. *J Biotechnol*, 2014, 179: 42-9
- [52] Fisher AK, Freedman BG, Bevan DR, et al. A review of metabolic and enzymatic engineering strategies for designing and optimizing performance of microbial cell factories. *Comput Struct Biotechnol J*, 2014, 11(18): 91-9
- [53] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, 329(5987): 52-6
- [54] Gibson DG, Smith HO, Hutchison CA 3rd, et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nat Methods*, 2010, 7(11): 901-3