

适应性实验室发展为生物发现和工业生物技术的有效工具

赫尔弗特·雷泽, 安德鲁·帕特尔, 加布里奥拉·卡萨, 阿尔伯特·芬斯

University of Alberta, Calgary HW8N1, Canada

摘要: 因为培养技术、DNA测序、生物信息学和基因工程的进展有所提升, 对于利用自然选择的过程来了解与掌握新的微生物表型的可能性有很大的帮助。因此, 适应性实验室进化(ALE)实验可算是一种很强大的研究, 既可以探讨影响菌株表型、性能和稳定性的进化力量, 又可以获得包含有益突变的生产菌株。在这篇综述中, 我们通过收集强调进化可以促进菌株构建过程的多种方式的案例研究, 总结和分类ALE在与工业生物生产相关的微生物生理学的各个方面的应用。此外, 本文还探讨了为实验设计提供信息的原则、协助高效使用计算建模等候补方式, 以及透过被采用并持续优化在自动化领域里, 在未来以ALE作为一种高效应变设计与构建工具。

关键词: 自适应实验室进化; 突变体; 生物技术; 基因型; 代谢

The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology

Helvert Reize, Andrew Patel, Gabriola Casa, Albert Fenve

University of Alberta, Calgary HW8N1, Canada

Abstract: Harnessing the process of natural selection to obtain and understand new microbial phenotypes has become increasingly possible due to advances in culturing techniques, DNA sequencing, bioinformatics, and genetic engineering. Accordingly, Adaptive Laboratory Evolution (ALE) experiments represent a powerful approach both to investigate the evolutionary forces influencing strain phenotypes, performance, and stability, and to acquire production strains that contain beneficial mutations. In this review, we summarize and categorize the applications of ALE to various aspects of microbial physiology pertinent to industrial bio-production by collecting case studies that highlight the multitude of ways in which evolution can facilitate the strain construction process. Further, we discuss principles that inform experimental design, complementary approaches such as computational modelling that help maximize utility, and the future of ALE as an efficient strain design and build tool driven by growing adoption and improvements in automation.

Keywords: Adaptive Laboratory Evolution, mutants, biotechnology, genotype, metabolism

引言:

自适应实验室进化(ALE)实验是一种越来越流行的改进微生物表型和研究生物现象的技术。ALE实验可以追溯到上世纪初的受控进化研究报告(Atwood等人, 1951年; Bennett和Hughes, 2009年; Novic和Szilard, 1950年), 并且方法简单。以最简单的形式, 实验涉及在选定的环境中长时间培养细胞, 以自然地选择那些获得有益突变的细胞。鉴于产生和修复有益突变的速度, 可以肯定地说, 许多生物学家已经通过细胞培养中不可避免的生长/铺板/冷冻循环“适应性进化”了他们选择的实验室微生物。由于大细胞群(10⁸ - 10¹⁰ 12个细

胞)可以轻松维持快速分裂(20分钟 - <10小时的生成时间), ALE在微生物中工作强劲; 典型的突变率和基因组大小确保了广泛的适应性空间采样提供了足够的遗传多样性, 从中可以自然地富集有益的突变体(Gresham和Dunham, 2014年)。此外, 低成本、高通量DNA测序的日益普及(Shendure等人, 2017年)推动了ALE的越来越多的使用, 当与适当的生物信息学工具配合使用时, 可以帮助促进基因组学的发展。突变识别。ALE过程。同样, 基因组工程是一项关键的补充技术(R. Liu et al., 2015), 能够将所需突变引入感兴趣的菌株中, 以进行因果确定或表型改变。

进化依赖于自然选择来丰富具有更高适应性的突变体,从而允许在不事先了解影响这些变化所需的遗传变化的情况下进行菌株优化。有了关于生物体基因型到表型映射的完美信息,就可以简单地设计所需的性状而不是进化它,但是生物系统令人难以置信的复杂性使得我们目前的知识库不足以为这种合理的设计提供信息。因此,ALE 可以用作强大的菌株构建技术,以补充甚至替代通常会导致对表型产生负面影响的压力细胞状态的合理设计方法。值得注意的是,尽管这些术语可以互换使用,但 ALE 与“定向进化”领域不同(Packer 和 Liu, 2015; Arnold, 2018)——ALE 发现任何全基因组突变都有助于适应积极生长的文化、定向进化另一方面,通常通过诱变靶向特定基因,然后针对感兴趣的表型筛选产生的变体,通常与适应度效应无关。然而,这两种方法都属于“进化工程”的范畴(Sauer, 2001; Shepelin 等, 2018),因为它们通过随机突变然后选择或筛选产生新的表型。

ALE 实验成功的关键是适应性突变赋予的适应性优势,使突变菌株在竞争中胜过它们的祖先并在种群中占主导地位。然而,重要的是要注意“适应度”不是一个定义明确的术语,而是取决于 ALE 实验中采用的生长环境。例如,如果分批培养在恒定指数阶段保持繁殖并且营养过剩,则适应度基本上等同于生长速率(Sandberg 等人, 2014 年)。相反,如果指数增长不可持续,适应度会扩大到包括增长率以外的因素,例如静止期的存活率或减少的滞后(Wiser 和 Lenski, 2015 年)。因此,适应度的这种敏感的环境依赖性允许根据 ALE 程序的具体情况选择不同的特征。除了分批培养,最流行的替代生长方法是连续培养(例如恒化器或浊度计)(Gresham 和 Dunham, 2014 年)。其他 ALE 培养方法也已针对特定目的实施,但尚未广泛使用。

本综述将通过汇编相关研究的综合集合、分析它们的集体贡献并突出几个重要的案例研究,重点关注 ALE 在工业生物技术和相关领域的使用。将包括对用于 ALE 的最常用方法和菌株的分析。该审查还将讨论该领域自动化和生物信息学的出现及其影响。先前与 ALE 相关的评论已经解决了适应性进化实验的潜在遗传和代谢基础,系统发育生物学和计算进化的作用(Hansen et al., 2017; Hindr é et al., 2012; Papp et al., 2011),提高代谢性能的一般策略和公差(Peabody et al., 2014),以及其他与行业相关的应变特性。这项工作提供了对代谢工程有用的研究的更新回顾和分类,以及使用与工业生物技术相关的实验室进化的其他选定基础研究。因此,关注使用 ALE 来了解抗菌素耐药性和进化生物学的其他基本原理的研究将不会在这里讨论,因为它们已经在其他地方进

行了审查。

利用遗传多样性改善表型

除了在进化种群中创造、可视化和量化多样性之外,最近还给予了额外的关注,以帮助利用这种多样性来加速适应性进化。降低进化实验有效性的一个障碍是克隆干扰,这是由遗传上不同的突变体与种群竞争引起的。减少这种影响的一种方法是允许谱系之间的基因交换(即性别)。这个过程允许适应性突变在不断进化的种群中传播,并可能来自竞争突变体的不同突变组合成一个单一的遗传背景。在无性繁殖中,需要顺序获得的多个独立突变来组合多个有益突变,从而显着增加在有性人群中达到相同水平改善所需的时间。此外,适应性突变体中存在的任何有害突变都不能在无性进化中轻易去除(称为穆勒棘轮),这可以通过有性重组来缓解。经典的重组方法包括通过原生质体融合进行基因组改组和利用一些实验室物种(酿酒酵母)的有性周期。这些方法虽然普遍成功地实现了增加多样性和允许基因跨克隆流动的既定目标,但吞吐量低且效率低,使其难以应用于高度并行的进化工程项目。

实验室进程的并行化和自动化

限制适应性实验室进化效用的因素之一是所需的资本支出和劳动力。根据我们的经验,在执行必要的维护和量化程序(例如,档案存储、污染测试、选择压力调整、表型改进分析等)的同时,可以实际处理由 24-30 批重复培养组成的实验。这个规模相当有限,因为很难从少数复制文化中得出关于应变改善或潜在适应机制的统计结论。所需的人工干预量也可能在实验中引入偏见因素,尤其是在尝试以一致的方式调整选择压力时,随着种群适应度的增加。

液体处理机器人和微流体也越来越多地用于显着提高实验吞吐量。Horinouchi 及其同事最近引入了一种全自动进化系统,用于在微孔板中繁殖微生物培养物,并成功地利用它进化出提高对一系列行业相关压力源耐受性的菌株。其他基于微量滴定板批量生长的自动化系统也已在其他地方使用。虽然这些方法依靠机器人来处理液体转移和接种,但也引入了基于维持液滴内种群的微恒化器系统,可能允许同时维持数千个种群。液体处理机器人和微流体设备的成本下降将促进未来高通量方法的发展。值得注意的是,典型的基于板块的高通量进化系统所施加的小种群规模可能并非在所有情况下都是可取的,因为遗传多样性和进化轨迹更加有限。然而,广泛复制和自动化的优点很多:它有助于检测不同或对抗的适应途径,并且可以为进化动力学、克隆干扰或群体遗传学的其他方面的理论分析提供数据。这些新的高通量培养工具结合了 NGS 和遗传分析的进步,有望简化和

简化进化工程的过程, 同时提供有关平行适应路线的大量信息。从产生的适应性突变体中获得的知识可用于改进现有的工业菌株。

了解进化的基因型

尽管在其他领域取得了进展, 但进化菌株的表征仍然是一个费力且低通量的过程。揭示基因型-表型联系的最常见方法包括将每个潜在的适应性突变重构为未进化的亲本菌株, 然后进行适当的表型表征(生长速率、耐受性等)以确认其推定效果。传统的重组技术, 例如选择-反选择盒替换、转导、定点诱变等, 虽然功能强大, 但需要大量时间来生成单个重组突变体。当每个菌株的突变数量很大时, 或者当需要检查适应性突变(正或负上位性)之间的相互作用时, 重建很快成为理解进化突变体的限制步骤。除了针对大肠杆菌的 ASKA 过表达质粒集合之外, 引入针对大肠杆菌和酿酒酵母的定义缺失菌株集合显着提高了研究人员更快速地分析某些类型的进化突变(例如基因突变)的能力。失活突变或导致基因表达增加的突变)。然而, 对于那些发生在非模式生物中的突变或那些不会导致基因破坏或表达增加的突变, 必须使用适当的工具手动重建每个潜在的适应性突变。

Quandt 及其同事介绍了一种称为 REGRES (递归全基因组重组和测序) 的新方法, 可以减少细菌菌株重建和基因型-表型分析所需的时间。REGRES 基于 F 结合系统, 其中包含感兴趣突变的菌株使用整合的 F 质粒转化为 Hfr (高频重组) 菌株, 然后与 F 受体交配。然后选择不使用抗生素的供体以生成包含供体和受体 DNA 的杂交基因组的转导文库。可以针对所寻求的表型重新筛选或选择这些转导子, 然后进行 NGS 或 Sanger 测序以确定观察到的表型背后的致病突变。该方法用于识别 Lenski 实验室长期进化实验中产生的好氧柠檬酸盐利用性状的遗传基础, 无需手动重建菌株, 因为经过 50, 000 多代进化后分离。重组工具的进一步改进, 包括同时快速破坏多个基因, 也将有助于减轻未来菌株分析的负担。

新陈代谢的演变

所有合理的代谢工程努力都受到以下事实的限制: 给定生物体的基因组已经进化以执行生存和增殖功能。从早期生物圈的第一个化学信息系统到今天极其复杂的现代基因组, 生命一直被复制和生存的需要所支配。最好的代谢工程努力使靶向化学生产成为正常生长代谢的主要副产品。代谢工程的最终目标是使目标化合物的生产成为生物体的主要功能。但目前还缺乏对进化的生物学复杂性的基本了解, 所以这不可能。然而, 利用进化本身来实现工程目标是将合成生物学与其他工程学科区分开来的强大资产。

进化过程不仅可以用来产生优越的菌株, 还可以用来指导合理的设计。通过对从进化种群中分离出来的细胞的基因和基因组进行测序, 现在可以确定有利的突变何时出现。通过使用转录组学、蛋白质组学和代谢组学等工具探索进化突变的性质, 现在可以以前所未有的清晰程度理解基因型-表型关系。这种方法已被用于研究工业微生物中各种耐压表型的机制, 并开始用于代谢生产基因组的进化。

用生物传感器控制实验室进化

自适应实验室进化 (ALE) 是代谢工程中广泛使用且高效的工具, 可用于创建具有优异性能的工业菌株。如果 ALE 可用于提高代谢生产力, 则可以克服传统代谢工程的许多挑战。生产菌株可以简单地进化, 从而减少目前实现商业产量所需的大量时间和成本。最重要的是, 可以使用全基因组测序和生物系统工具记录进化过程。然后可以使用对进化菌株中基因型-表型关系的询问来为具有全新工程原理的合理设计提供信息。例如, 目前被认为与代谢生产力无关的细胞过程中涉及的基因突变可能非常重要。核糖体生物发生、细胞周期、细胞形态或细胞膜组成等细胞过程/特征可能会极大地影响朝向特定化合物的代谢通量。合成进化的过程将揭示这种现象。

与使用生物传感器进化生产基因组相关的最直接挑战在于将所需化合物的浓度转化为细胞存活的输出。许多合成生物学都专注于对生物信号的定制响应工程, 而小分子生物传感器具有实现这些目标的巨大潜力。细胞存活与目标代谢物浓度的耦合开始采用体内生物传感器的形式, 这些传感器现在被用于选择新的高产微生物基因和基因组。

潜在的生物技术价值

耐受进化菌株的因果突变很容易通过 DNA 测序鉴定, 但破译突变表型效应背后的分子因果关系通常更具挑战性。Caspeta 等人的一项研究。作为阐明适应分子机制的 ALE 结果的一个成功例子 - 酵母进化为增加耐热性, 导致菌株在 40°C 时的生长速度提高了 50% 以上 (Caspeta 等人, 2014 年)。独立进化复制中的突变收敛表明基因失活将细胞的甾醇组成从麦角甾醇改变为 fecosterol, 从而优化了升高的生长温度下的膜流动性。ALE 还可用于同时提高对多种压力源的耐受性, 正如一项研究所证明的, 在该研究中进化出一种工业酵母菌株以提高对生物质水解物抑制剂和高温的耐受性, 从而通过同时糖化和发酵 (Wallace-Salinas 和 Gorwa-格劳斯伦德, 2013)。然而, 应该注意的是, 对一种胁迫的耐受性通常伴随着仅在生长环境中的权衡, 这取决于获得的特定适应性突变——尽管进化到高温的菌株通常会在低温

下失去适应性, 但一个 ALE 识别的突变设法避免了这种权衡 (Rodriguez-Verdugo 等人, 2014)。

提高压力耐受性的进化工程是代谢工程和工业生物技术的主要 ALE 应用。如前所述, 野生型细胞很少处理由具有高浓度非典型但理想的生物生产化学品的生长环境造成的负担。由于缺乏必要的知识, 合理的工程方法可能会失败, 而 ALE 可以对具有工业价值的应变特性进行机械简单但可靠的改进。然后, ALE 实验的突变结果可用于为进一步的菌株设计尝试提供信息, 同时也阐明生物系统的基本租户。此外, 为特定表型合理设计菌株的尝试通常会导致适应性缺陷, 而进化可以抵消这些缺陷。即使可以将特定的耐受机制合理地设计到菌株中, 也很难推断出必要的基因表达水平。相比之下, 在单个实验中, ALE 可以找到适应缺陷的潜在机制和实现稳健表型所需的基因表达水平。ALE 还能够适应具有复杂压力源组合的生长环境, 鉴于我们现有的生物学知识库, 这些压力源目前无法通过合理的设计来解决。重要的是, 当菌株被 ALE 减少时, 其结果通常不仅是提高了生长速度, 而且还提高了工业相关性状的表型, 例如产量或可降解性。

结论

运输燃料、工业化学品和药品的可持续生产对于建立环境可持续经济至关重要。合成生物学和代谢工程工具将在这一转变中发挥主导作用, 因为它们可用于制造微生物菌株, 将可再生碳源转化为燃料、化学品和药物。重新设计微生物代谢以实现有意义的生产水平充满了生物系统固有的复杂性带来的挑战。然而, 生物圈中存在的惊人多样性和功能暗示了如果可以利用进化的力量, 合成生物学可以实现什么 (见开放式问题)。这种“合成进化”方法开始出现在合成生物学和代谢工程领域之间的交叉点, 其中小分子生物传感器用于进化代谢生产力。理想情况下, 与行业相关的代谢物生产力的发展将能够替代化石燃料和石化产品, 同时为合成生物学的合理设计和提高生物学知识提供信息。

尽管从科学和工程的角度来看, 进化工程技术的这些改进都非常有益, 但它们主要集中在相同实验程序的改进上。事实上, 尽管生物技术的其他领域发生了巨大变化, 但科学家在 1950 年代或 2000 年代进化大肠杆菌以获得改进的表型在实际进化实验中将具有非常相似的工作流程。在单一条件下, 仅使用进化来改善生物体的表型已不再足够; 鉴于大多数工业环境涉及使用不同微生物种类和菌株的一系列压力源 (温度、渗透压等), 我们必须能够快速进化以表征它们, 剖析它们的耐受机制, 然后将这些发现转移到其他生物体以增加其工业效用。虽然在可预见的未来, 适应性实验室进化可能会以大致

相同的方式继续下去, 但我们推测, 随着可用工具和方法的不断改进, 进化工程最终将能够实现这一开创性目标。进化工程师。

参考文献:

- [1]Schallmeyer, M. et al. (2014) Looking for the pick of the bunch: highthroughput screening of producing microorganisms with biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 148 - 154
- [2]Marin, A.M. et al. (2013) Naringenin degradation by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. *Microbiology* 159, 167 - 175
- [3]Vrljic, M. et al. (1996) A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* 22, 815 - 826
- [4]Wright, J., Bellissimi, E., de Hulster, E., Wagner, A., Pronk, J.T., van Maris, A.J.A., 2011. Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 11, 299 - 306.
- [5]Stella, R.G., Wiechert, J., Noack, S., Frunzke, J., 2019. Evolutionary engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. J.* e1800444. <https://doi.org/10.1002/biot.201800444>
- [6]Papp, B., Notebaart, R.A., Pál, C., 2011. Systems-biology approaches for predicting genomic evolution. *Nat. Rev. Genet.* 12, 591 - 602. <https://doi.org/10.1038/nrg3033>
- [7]Mundhada, H., Schneider, K., Christensen, H.B., Nielsen, A.T., 2016. Engineering of high yield production of L-serine in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 807 - 816.
- [8]Kaemwich Jantama, M.J. Haupt, Spyros A. Svoronos, Xueli Zhang, J.C. Moore, K.T.474 Shanmugam, L.O. Ingram, Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate, *Biotechnol. Bioeng.* 99 (5) (2008) 1140 - 1153.
- [9]Valeria Wallace-Salinas, Marie F. Gorwa-Grauslund, Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature, *Biotechnol. Biofuels* 6 (1) (2013).
- [10]James D. Winkler, Carlos Garcia, Michelle Olson, Emily Callaway, Katy C. Kao, Evolved osmotolerant *Escherichia coli* mutants frequently exhibit defective N-acetylglucosamine catabolism and point mutations in cell shape-regulating protein MreB, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (12) (2014) 3729 - 3740.