*dld*基因敲除提升大肠杆菌DH5α在微生物燃料电池中的开路电压性能

张琛[abc],刘炳妍[abc],覃粤[d],蒋青青[d],薛璐[abc*]

(中南民族大学 a.生命科学学院; b.医学生物研究所; c.武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室; d.化学与材料科学学院,湖北 武汉 430074)

摘 要 为解决非电活性工程菌株大肠杆菌DH5α电子传递能力不足而导致微生物燃料电池(microbial fuel cells,MFCs)产电效能受限的问题,聚焦丙酮酸代谢途径中编码乳酸脱氢酶的关键基因*dld*,探究其敲除对MFC性能的调控作用.首先,利用NCBI与ChopChop网站设计靶向*dld*基因的特异性sgRNA,构建pEcgRNA-Δ*dld*重组载体;以大肠杆菌DH5α基因组DNA为模板,通过PCR扩增获得上下游同源臂片段,并采用Overlap PCR构建完整的同源臂供体DNA.随后,将pEcgRNA-Δ*dld*重组载体、pEcCas质粒与同源臂供体DNA共转化至DH5α感受态细胞中,利用λ-Red重组系统介导同源重组,实现了*dld*基因的精准敲除,获得敲除菌株DH5α-Δ*dld*.在此基础上,构建了单室MFC装置,结合电化学工作站持续监测开路电压(open-circuit voltage, OCV),并通过SPSS Statistics 25.0软件进行显著性分析,同时测定菌株生长曲线,以排除生长差异对产电性能的潜在影响.结果表明:*dld*基因敲除未显著影响DH5α的基础生长代谢;DH5α-Δ*dld*所构建的MFC开路电压峰值均值达0.5104 V,相较于原始菌株(0.3756 V)提升了35.9%,且两组数据存在极显著差异($P<0.001$).推测*dld*基因敲除阻断了乳酸生成途径,促进胞内NAD(P)H积累,从而提升了电子传递效率.上述结果成功强化了非电活性微生物的产电功能,为MFC的菌株工程改造提供了新的技术思路,也为开发低成本、高稳定性的MFC系统奠定了理论基础与实验依据.

关键词 微生物燃料电池;大肠杆菌DH5α;*dld*基因;丙酮酸代谢;NAD(P)H积累

中图分类号 Q939.99;O69 **文献标志码** A **文章编号** 1672-4321(2026)04-0445-11

doi:10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20260403

Enhancement of open-circuit voltage performance in microbial fuel cells by *dld* gene knockout in *Escherichia coli* DH5α

Zhang Chen[abc], Liu Bingyan[abc], Qin Yue[d], Jiang Qingqing[d], Xue Lu[abc*]

(South-Central Minzu University, a. College of Life Sciences; b. Institute for Medical Biology; c. Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China; d. School of Chemistry and Materials Science, Wuhan 430074, Hubei China)

Abstract To address the limited power generation efficiency of microbial fuel cells (MFCs) caused by insufficient electron transfer in the non-electroactive engineered strain *Escherichia coli* DH5α, the key gene *dld*—encoding lactate dehydrogenase in the pyruvate metabolic pathway—was targeted to examine how its knockout regulates MFC performance. A specific sgRNA targeting *dld* was designed using NCBI and ChopChop, and the recombinant vector pEcgRNA Δ*dld* was constructed. With *E. coli* DH5α genomic DNA as template, upstream and downstream homologous arms were amplified by PCR, and a complete homologous donor DNA was assembled via Overlap PCR. The recombinant vector pEcgRNA Δ*dld*, the pEcCas plasmid, and the donor DNA were then co transformed into DH5α competent cells. Using the λ Red recombination system, homologous recombination was mediated to achieve precise knockout of *dld*, yielding the mutant

收稿日期 2025-08-30

***通信作者** 薛璐(1983-),女,副教授,博士,研究方向:基因编辑,E-mail: 3097910@scuec.edu.cn

基金项目 武汉奔胜网络系统集成有限公司横向研发项目(HZY24031)

strain DH5α Δ*dld*. A single chamber MFC was subsequently constructed. Open circuit voltage (OCV) was continuously monitored with an electrochemical workstation, and statistical analysis was performed using SPSS Statistics 25.0. Bacterial growth curves were also determined to exclude potential effects of growth variation on electricity generation. The results indicated that *dld* knockout did not significantly affect the basic growth metabolism of DH5α. The average peak OCV of the MFC with DH5α Δ*dld* reached 0.5104 V, which was 35.9% higher than that of the wild type strain (0.3756 V), and the difference between the two groups was highly significant (P<0.001). It is inferred that knocking out *dld* blocks lactate synthesis, promotes intracellular NAD (P) H accumulation, and thereby enhances electron transfer efficiency. By successfully conferring electricity-generating capability to a non-electroactive microorganism, the above results presents a novel approach for MFC strain engineering and establishes a theoretical and experimental basis for developing low cost, high stability MFC systems.

Keywords microbial fuel cell; *Escherichia coli* DH5α; *dld* gene; pyruvate metabolism; NAD(P)H accumulation

在全球范围内,化石能源的使用是导致全球气候急剧变化的关键因素.同时,其不可再生的特性也使能源短缺问题日益严峻[1].可再生能源的应用对缓解能源供应短缺、促进电力保障具有重要作用,有助于实现能源可持续发展、提升利用效率并节约资源.目前,将可再生能源转化为电力并应用于工业与生活已日益普遍[2].长远来看,源自可再生能源的电力在能源结构中的比重将持续上升[3].微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)是一种利用微生物将有机物中的化学能直接转化为电能的装置,目前已在生物制氢[4-5]、生物传感器开发[6-7]、生物乙醇制备[8]、废水处理[9-10]、水生沉积物中重金属及有毒化合物的生物修复[11-12]、海水淡化[13]以及远距离供电[14]等多个领域展现出重要应用潜力.

MFC的产电本质基于电子传递机制.在该系统中,阳极微生物通过胞内外电子传递将化学能转化为电能,阴极材料则接收电子并参与氧化还原反应.根据电子传递路径的不同,可分为直接电子转移(direct electron transfer, DET)和介导电子转移(mediated electron transfer, MET)两类:前者指微生物借助细胞表面细胞色素等结构直接附着于电极进行电子传递;后者则依靠游离态微生物通过电子媒介体实现跨膜电子传递.电活性微生物作为MFC的核心,能够以直接或间接方式进行胞内外电子传递,其高效的电子传递能力不仅是其关键生物学特征,也是维持MFC稳定产电的重要基础.

从研究现状看,国内外关于MFC性能优化的研究方向存在明显差异:国内研究侧重应用需求,聚焦于技术优化与成本控制,主要包括电极材料的低成本复合改性(如三维石墨烯基复合材料[15]、生物炭复合电极[16]等)、电活性微生物的接种策略优化[17]与定向驯化技术[18],以及一体化、模块化反应器构型创新[19];国际研究则更注重高端功能电极材料的研发,如MXene/聚苯胺复合电极[20]等,同时兼顾电子受体体系优化[21]与电极多孔结构[22]精准调控等关键技术.值得注意的是,目前利用基因工程对电活性微生物进行功能改造,或赋予非电活性微生物电子传递能力的研究仍较为有限.大肠杆菌作为典型的非电活性工程菌株,具有来源广泛、遗传操作便捷、代谢途径清晰等优势,但因其电子传递能力较弱,因此以其作为MFC工程菌株的研究尚处于起步阶段.针对上述研究空白,本文聚焦于丙酮酸代谢途径中的关键酶——由*dld*基因编码的乳酸脱氢酶,利用pEcCas/pEcgRNA系统[23-24]实现对*dld*基因的精准敲除.后续通过MFC装置验证基因编辑菌株的产电性能提升效果,以期为MFC的菌株改造与性能优化提供新的技术思路与理论支持.

1 材料与方法

1.1 实验试剂

pEcCas/pEcgRNA微生物基因编辑系统购自南京金斯瑞生物科技有限公司;大肠杆菌DH5α感受态细胞、氨苄青霉素、壮观霉素、卡那霉素、DNA Marker(2000 bp和10000 bp)均购自北京擎科生物科技有限公司;胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、琼脂、葡萄糖、蔗糖、鼠李糖、阿拉伯糖均为分析纯(Analytical Reagent, AR)级,购自国药集团化学试剂有限公司;T4 DNA连接酶及配套10×T4 DNA连接酶缓冲液购自SibEnzyme; *Bsa* Ⅰ限制性内切酶及配套10× *Bsa* Ⅰ酶切缓冲液购自Med Chem Express;T载体及相应缓冲液购自Takara Bio Inc.

1.2 实验仪器

电子天平(BSA224S,德国赛多利斯);高压灭菌

锅（GI80DP，厦门致微仪器）；PCR 仪（C1000，BIO-RAD）；高速冷冻离心机（Sorvall Legend Micro 21R，赛默飞世尔科技）；恒温振荡摇床（L-ST20，北京兰杰柯科技）；超净工作台（SW-CJ-1CU，苏净集团）；紫外分光光度计（NanoDrop™ One/OneC，赛默飞世尔科技）；水平电泳仪与电泳槽（DYY-6C，北京六一生物科技）；凝胶成像分析系统（JS-M6，上海培清实验设备）；石墨棒电极、铂片电极、单室微生物燃料电池（MFC）装置（MF100-S，上海华宇仪器）；电化学工作站（CHI660E，上海辰华仪器）.

1.3　sgRNA 设计与引物合成

sgRNA 设计：进入 NCBI 网站，在下拉菜单“gene”中搜索“*dld*”基因并复制 *dld* 基因序列．然后进入 ChopChop 基因编辑网站，点击“paste target”，将 *dld* 基因序列复制到“target”栏，种类选择“*E.coli* K12”，方法选择“CRISPR/Cas9”，目的选择“knock-out”，点击查找 sgRNA 序列，并在 sgRNA 的两端连上接头用以和 pEcgRNA 载体连接．同源臂构建：在 sgRNA 编辑序列的上下游 500 bp 左右分别设计两对引物以构建同源臂．设计引物序列及溶解温度（T_m 值）见表 1.

表 1　实验所用相关引物

Tab. 1　Relevant primers used in the experiment

引物名称	基因序列	预期产物长度/bp	T_m 值/℃
dld -UP	5′-tagtCCGCCGTCATATTCTGGCTAACT-3′	27	64.06
dld -DN	5′-aaacAGTTAGCCAGAATATGACGGCGG-3′		63.85
dld HA1-UP	5′-TTTCAGGCGGCTTAATTC-3′	500	51.70
dld HA1-DN	5′-ATACTCTGCCATCCGTAATTTTTTTCCACTCCTTGTGGTG-3′		68.07
dld HA2-UP	5′-CACCACAAGGAGTGGAAAAAAATTACGGATGGCAGAGTAT-3′	500	68.07
dld HA2-DN	5′-ATCGCTCGGAATGAACAA-3′		52.93

1.4　pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体的构建及验证

构建线性化 pEcgRNA 载体：建立酶切反应体系，包含 pEcgRNA 质粒（具壮观霉素抗性）、*Bsa* Ⅰ限制性内切酶、10× *Bsa* Ⅰ酶切缓冲液及超纯水．将反应体系置于 37 ℃孵育 25 min 以完成酶切反应，随后于 70 ℃热激 10 min 灭活酶活性，获得线性化 pEcgRNA 载体．再使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对酶切产物进行分离，并切胶回收 2000 bp 目标片段．

构建并验证 pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体：将纯化后的线性化 pEcgRNA 载体、退火后的双链 DNA 片段、T4 DNA 连接酶及 10× T4 连接缓冲液充分混匀后置于 16 ℃恒温孵育 1 h，获得 pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体．采用热激法将该重组载体转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，取适量复苏菌液均匀涂布于含壮观霉素的 LB 固体培养基上，37 ℃倒置培养 12 h 以筛选阳性单菌落．挑取阳性单菌落，以引物 CX-pEcgRNA（5′-CAGGTATCCGGTAAGC-3′）和 *dld*-DN（5′-AGTTAGCCAGAATATGACGGCGG-3′）进行菌落 PCR 验证，预期扩增片段约 500 bp．将验证正确的菌落扩大培养并送交测序，测序结果正确的菌株于−20 ℃保存备用．

1.5　同源臂供体 DNA 的构建及验证

以大肠杆菌 DH5α 基因组 DNA 为模板，分别使用两对特异性引物（HA1：*dld* HA1-UP/*dld* HA1-DN；HA2：*dld* HA2-UP/*dld* HA2-DN）进行 PCR 扩增，获得目标同源臂片段 HA1 和 HA2．反应体系包含 2× Taqplus PCR MasterMix、模板 DNA 及超纯水，PCR 程序如下：94 ℃预变性 3 min；随后进行 30 个循环（94 ℃变性 30 s、55 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s）；最后 72 ℃终延伸 10 min．PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离，切取约 500 bp 的目标条带进行回收纯化，得到高纯度的 HA1 和 HA2 片段．

以纯化后的 HA1 和 HA2 片段为混合模板，采用重叠延伸 PCR（Overlap PCR）技术进行搭桥连接．反应体系与上述相同，PCR 程序不变，最终扩增获得长度约 1000 bp 的完整同源臂供体 DNA 片段．该片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后，切取 1000 bp 的目标条带进行回收纯化．

将纯化的完整同源臂片段与 pMD18-T Vector 载体及 Solution Ⅰ 2×连接酶混合物混合，构建 T 载体连接体系，于 16 ℃孵育 2 h．之后通过热激转化至 DH5α 感受态细胞，复苏后涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基，37 ℃倒置培养 12 h 筛选阳性单菌落．随机挑选阳性单菌落扩大培养并送交测序，测序正确的菌株于−20 ℃保存备用．

1.6　DH5α-Δ*dld* 的构建及验证

制备含 3 g·L^{-1} L-阿拉伯糖的 LB 液体培养基，经 121 ℃高压灭菌 20 min，冷却至 50 ℃以下后添加卡那霉素和壮观霉素（终浓度均为 50 μg·mL^{-1}），该培养基用于后续共转化后 λ-Red 重组系统的诱导表达．

取1 μL pEcCas质粒(卡那霉素抗性)、1 μL pEcgRNA-Δ*dld*重组载体(壮观霉素抗性)及5 μL同源臂供体DNA,混匀后通过热激转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中.向转化体系中加入800 μL预温至37 ℃的上述阿拉伯糖及双抗的LB培养基,于37 ℃、220 r·min^{-1}恒温振荡培养30 min.在此过程中,L-阿拉伯糖诱导pEcCas质粒上的λ-Red重组酶基因(*Exo*、*Beta*、*Gam*)及Cas9蛋白表达,从而介导同源臂与宿主基因组*dld*靶位点的同源重组.

取适量复苏菌液涂布于含卡那霉素和壮观霉素的LB固体培养基,37 ℃倒置培养12 h,通过双抗性筛选获得阳性单菌落.随机挑取单菌落接种于LB液体培养基,37 ℃、220 r·min^{-1}振荡培养12 h后提取基因组DNA.以此基因组DNA为模板,使用引物*dld* HA1-UP与*dld* HA2-DN进行PCR验证.判定标准如下:若基因敲除成功,PCR产物仅为同源臂拼接片段(约1000 bp);若敲除失败,则产物同时包含同源臂及*dld*基因编码序列(约2000 bp).对PCR验证正确的菌落,随机选取若干扩大培养,提取基因组并送交测序,测序结果正确的菌株于-20 ℃保存备用.

1.7 质粒固化及验证

制备含终浓度1.7 g·L^{-1} L-鼠李糖及50 μg·mL^{-1}的卡那霉素的LB液体培养基(经121 ℃高压灭菌20 min,冷却至37 ℃后于超净工作台内添加).其中,L-鼠李糖用于诱导pEcgRNA载体复制终止元件,以促进该质粒其丢失;卡那霉素则用于在诱导期间临时维持pEcCas质粒的稳定性.

取1 mL经测序验证的DH5α-Δ*dld*菌液,转接至10 mL无抗性LB液体培养基,于37 ℃、220 r·min^{-1}振荡培养2 h,使菌体脱离抗性压力并快速增殖.随后,在4 ℃、10000 r·min^{-1}离心1 min收集菌体,用50 μL无菌LB液体培养基重悬沉淀.取5 μL重悬液均匀涂布于含蔗糖的LB固体培养基,37 ℃倒置培养12 h,筛选蔗糖耐受型单菌落(即pEcCas质粒已被消除的菌株).

分别配制无抗性、含50 μg·mL^{-1}卡那霉素以及含50 μg·mL^{-1}壮观霉素的LB固体培养基.用无菌接种环挑取蔗糖平板上生长的单菌落,依次点种于三种平板的对应位置,37 ℃倒置培养12 h.通过观察菌落生长情况,筛选在无抗性平板正常生长,而在卡那霉素和壮观霉素平板上均不生长的菌株,即可确认pEcCas与pEcgRNA-Δ*dld*双质粒已完全消除,从而排除外源质粒对后续实验的潜在干扰.将经上述验证的双质粒菌株于-20 ℃保存备用.

1.8 微生物燃料电池装置的搭建及产电性能检测

将石墨棒电极(阳极)依次按如下步骤预处理:(1)用1 mol·L^{-1} HCl溶液浸泡2 h,去除表面氧化物及杂质;(2)转移至丙酮中,超声清洗15 min以除去有机残留;(3)用无菌超纯水冲洗3次,于60 ℃烘箱中干燥至恒重,备用.

将铂片电极(阴极)依次按如下步骤预处理:(1)使用超纯水超声清洗15 min;(2)用无菌超纯水冲洗3次,于60 ℃烘箱中干燥至恒重,备用.

制备250 mL无菌MFC反应液,以无菌超纯水为溶剂,依次加入25 mL LB液体培养基、37.5 mL 0.1 mol·L^{-1}磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)及1.35 g葡萄糖(终浓度5.4 g·L^{-1}),最后用无菌超纯水定容至250 mL.

在超净工作台内无菌组装100 mL单室MFC系统:(1)将预处理后的石墨棒阳极与铂片阴极分别固定于反应腔体预设接口,确保电极与反应液充分接触且彼此绝缘;(2)依次向腔体中加入65 mL无菌反应液与25 mL扩大培养的菌液,轻轻混匀,将体系初始OD_{600}调至0.3.

将组装完毕的MFC系统连接至电化学工作站,设置检测程序:以开路电压为检测指标,采集频率为0.1 s·次$^{-1}$,持续监测30000 s(约8.33 h),记录实时开路电压变化曲线.

1.9 数据处理与分析

为建立MFC产电性能与菌株生长特性的关联分析,选取与MFC接种菌同批次扩大培养的菌液,在与MFC运行一致的环境条件下独立进行菌株生长曲线测定.具体为在预设时间点取样,采用紫外分光光度计在600 nm波长下测定样品吸光度(OD_{600}值),以培养时间为横坐标、OD_{600}值为纵坐标绘制菌株生长曲线.

MFC开路电压监测结束后,导出电化学工作站记录的原始数据.以测量时间(s)为横坐标、开路电压(V)为纵坐标,利用Origin 2024软件分别绘制两组菌株的开路电压动态变化曲线,并生成峰值对比图.采用SPSS Statistics 25.0软件,设定显著性水平α=0.001,对两组菌株全程的开路电压数据进行差异显著性分析.

2 结果与讨论

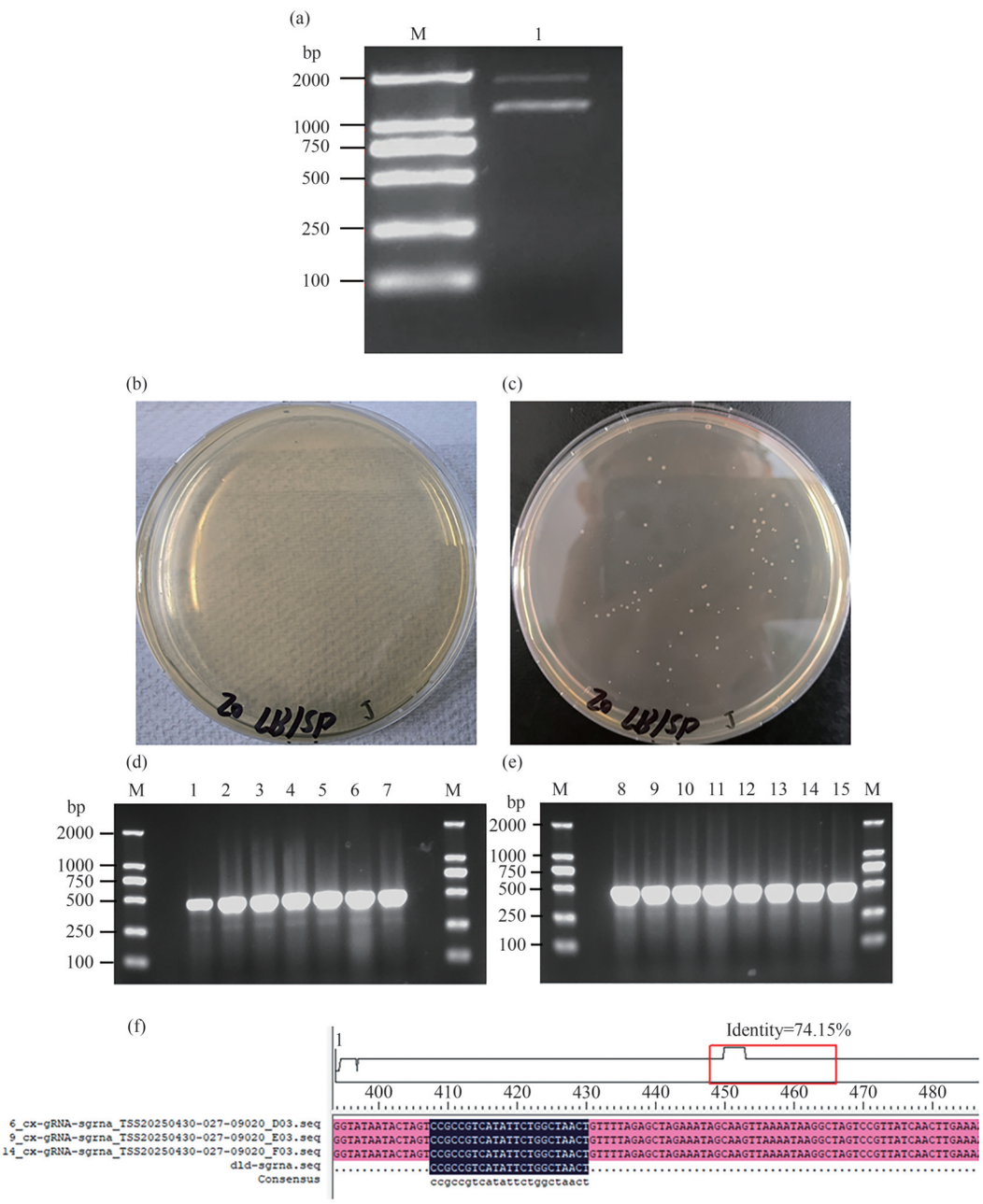
2.1 pEcgRNA-Δ*dld*重组载体的构建与验证

为构建pEcgRNA-Δ*dld*重组载体,依次进行了限

制性酶切、抗性筛选、菌落 PCR 鉴定及测序验证，结果如图 1 所示．图 1(a)显示，pEcgRNA 质粒经 *Bsa* Ⅰ酶切后，电泳图谱在约 2000 bp 和 1000 bp 处各出现一条清晰条带，无非特异性杂带，表明酶切完全．按实验设计，回收 2000 bp 处的条带，获得纯化 pEcgRNA 载体．

图 1(b)、(c)分别为 pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体热激转化后培养 0、12 h 的壮观霉素抗性平板生长情况．0 h 平板无菌落生长(对照)，12 h 平板可见大量形态均一、饱满的单菌落，表明转化效率较高，且壮观霉素抗性筛选体系可有效排除非转化子，为后续阳性克隆的菌落 PCR 筛选提供了可靠材料．

菌落 PCR 验证结果[图 1(d)、(e)]显示，随机挑取的 15 个单菌落均扩增出与目标 sgRNA 大小相符的条带(约 500 bp)，条带清晰，无非特异性扩增，初步表明 sgRNA 已成功插入载体．为进一步确认，选



(a) *Bsa* Ⅰ酶切 pEcgRNA 质粒(M：DL 2000 marker，1：pEcgRNA 质粒)；(b) pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体筛选(培养 0 h)；(c) pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体筛选(培养 12 h)；(d) pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体菌落 PCR 验证(M：DL 2000 marker，1-7：样本)；(e) pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体菌落 PCR 验证(M：DL 2000 marker，8-15：样本)；(f) pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体测序(选择 4、9、14 号样本为测序对象)

图 1　pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体的构建与验证

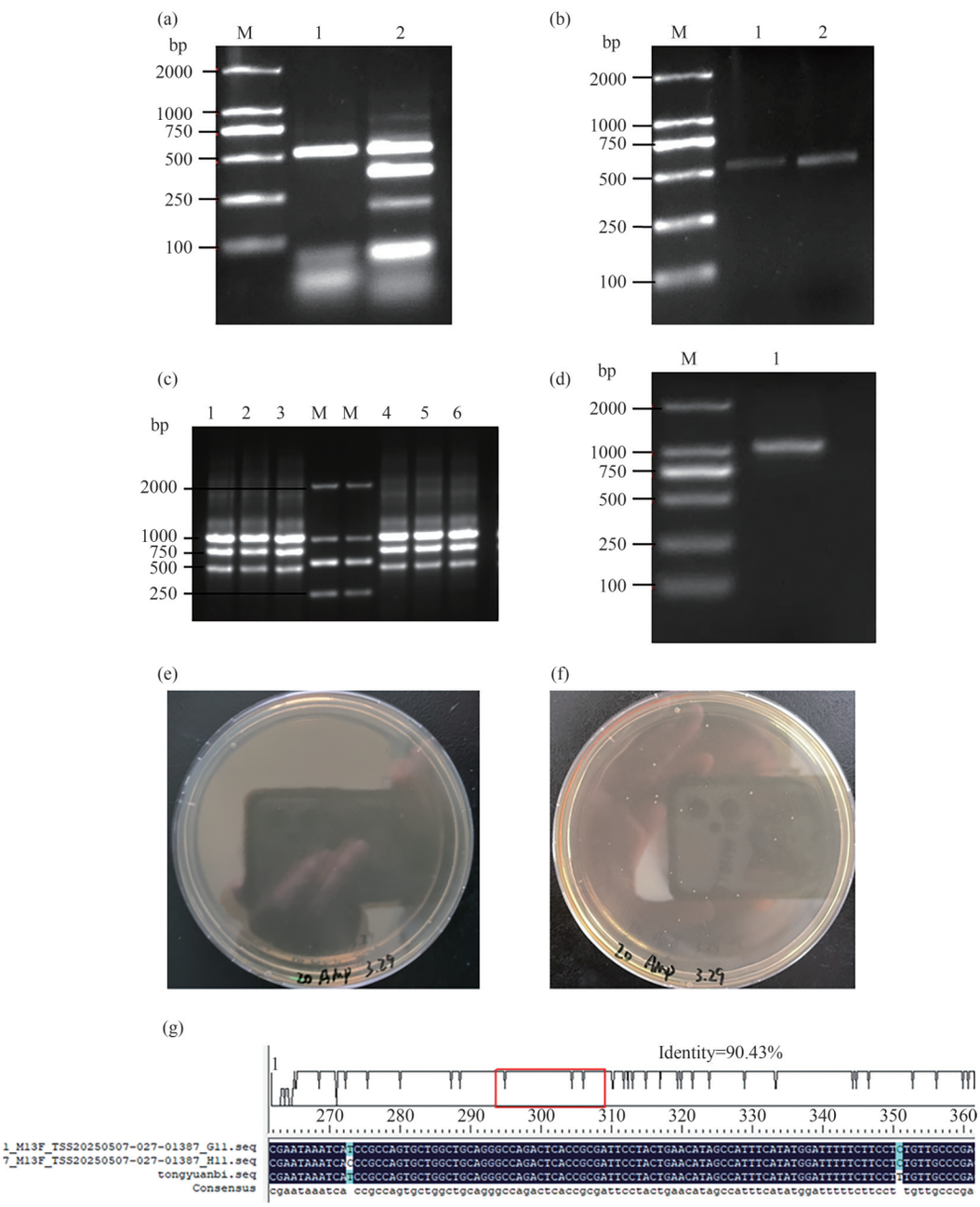
Fig. 1　Construction and identification of the pEcgRNA-Δ*dld* recombinant vector

取4、9、14号单菌落扩大培养并送交测序[图1(f)],测序结果与预期序列高度一致,证明sgRNA片段已准确插入pEcgRNA载体的预期位点,pEcgRNA-Δ*dld*重组载体构建成功.

2.2 同源臂供体DNA的构建与验证

同源臂供体DNA的构建直接关系到同源重组的效率,其有效性经系统验证,结果如图2所示.图2(a)为上游同源臂(HA1)和下游同源臂(HA2)的PCR扩增产物电泳图谱,其中泳道2(HA1)与泳道3(HA2)在500 bp处均呈现清晰条带,与预设长度一致,表明以大肠杆菌DH5α基因组DNA为模板成功扩增出特异性良好的目的片段.

将HA1与HA2的PCR产物切胶回收后,电泳检测结果如图2(b)所示:回收产物条带纯净,无残留



(a)同源臂 fragment电泳(M:DL 2000 marker,1:fragment 1,2:fragment 2);(b)同源臂 fragment切胶回收纯度检测(M:DL 2000 marker,1:fragment 1,2:fragment 2);(c)同源臂 Overlap电泳(1-3:Overlap产物,M:DL 2000 marker,6-8:Overlap产物);(d)同源臂 Overlap切胶回收纯度检测(M:DL 2000 marker,1:Overlap切胶回收产物);(e)同源臂连接T载体筛选(培养0 h);(f) 同源臂连接T载体筛选(培养12 h);(g)同源臂测序验证

图2 同源臂供体DNA的构建与验证

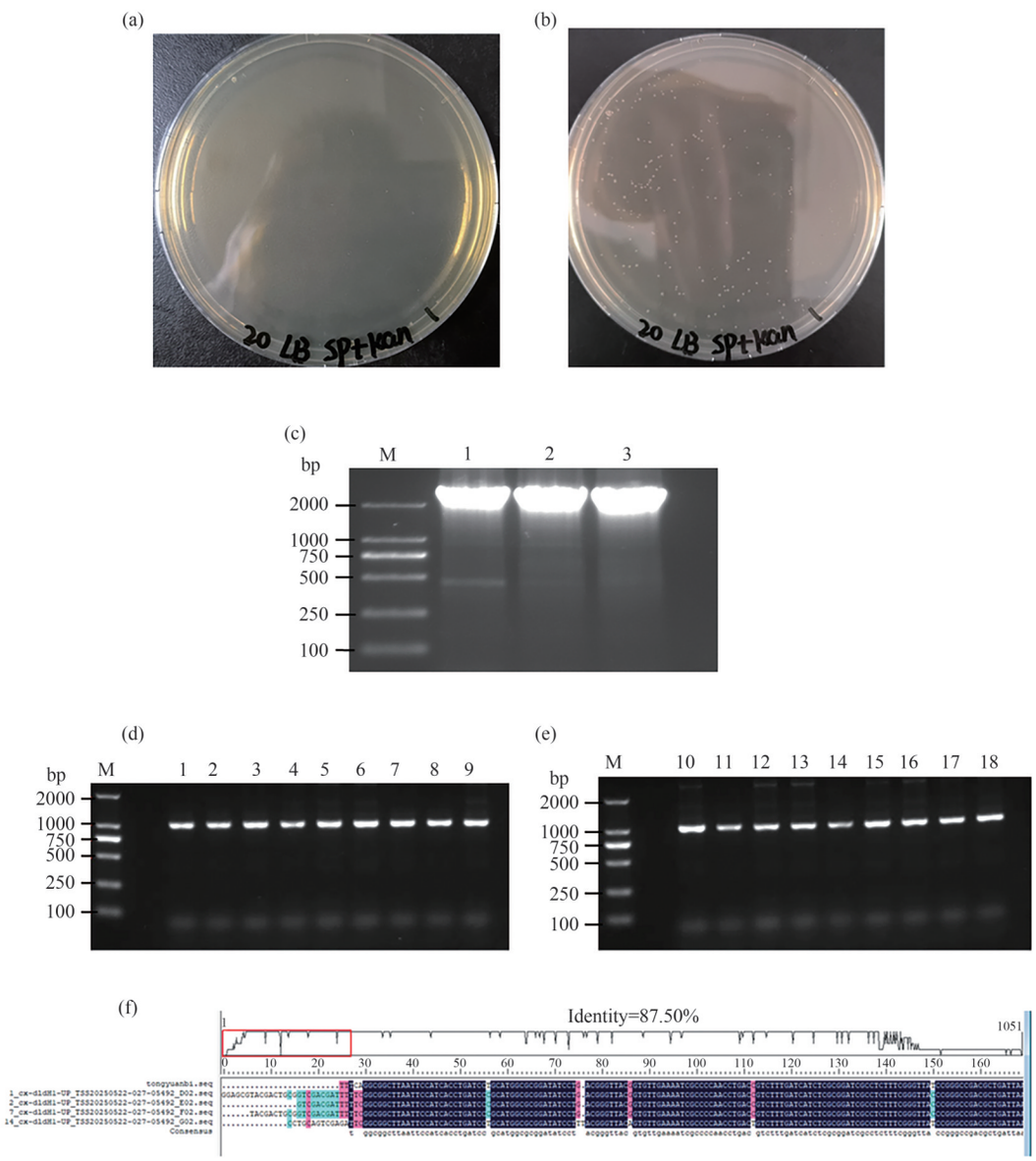
Fig. 2 Construction and identification of homologous arm donor DNA

基因组模板或引物二聚体等杂带干扰，满足后续 Overlap PCR 对模板纯度的要求．图 2(c)为 Overlap PCR 连接产物的电泳结果，泳道 1-3 及泳道 6-8 均在约 1000 bp 处出现特异性条带，与 HA1 和 HA2 拼接后完整同源臂的预期大小相符，表明同源臂供体 DNA 已成功构建．图 2(d)显示，回收后的完整同源臂供体 DNA 条带清晰、浓度均匀，可用于后续与 pMD18-T 载体的连接．

为验证序列准确性，将完整同源臂与 pMD18-T 载体连接并转化，通过抗性筛选与测序进一步确认．图 2(e)、(f)分别为连接转化后培养 0、12 h 的氨苄青霉素抗性平板的菌落生长情况：0 h 平板无菌落(对照)，12 h 平板长出大量形态均一的菌落，说明转化效率良好且抗性筛选体系有效．测序验证结果[图 2(g)]显示，所构建的同源臂序列与设计序列高度一致，，确认为后续基因敲除提供了准确可靠的同源重组模板．

2.3　DH5α-Δ*dld* 敲除菌株的构建与验证

DH5α-Δ*dld* 敲除菌株通过将 pEcCas 质粒、pEcgRNA-Δ*dld* 重组载体与同源臂供体 DNA 共转化至宿主菌，并利用 λ-Red 重组系统介导同源重组而构建，其构建过程的有效性验证结果如图 3 所示．



(a) DH5α-Δ*dld* 筛选(培养 0 h)；(b) DH5α-Δ*dld* 筛选(培养 12 h)；(c) DH5α 基因组菌落 PCR 验证(M：DL 2000 Marker，1-3：DH5α 样本)；(d) DH5α-Δ*dld* 基因组菌落 PCR 验证(M：DL 2000 Marker，1-9：DH5α-Δ*dld* 样本)；(e) DH5α-Δ*dld* 基因组菌落 PCR 验证(M：DL 2000 Marker，10-18：DH5α-Δ*dld* 样本)；(f) DH5α-Δ*dld* 基因组测序验证(选择 1、2、7、14 号样本为测序对象)

图 3　DH5α-Δ*dld* 敲除菌株的构建与验证

Fig. 3　Construction and Identification of the Gene Knockout System

图3(a)、(b)分别为共转化后0、12 h在双抗性(卡那霉素+壮观霉素)LB固体平板上的菌落生长情况.0 h平板作为对照无菌落生长,12 h平板出现密集、形态规则的单菌落,表明共转化体系有效、转化效率良好,且双抗性筛选可特异性富集同时携带两种质粒的阳性克隆.

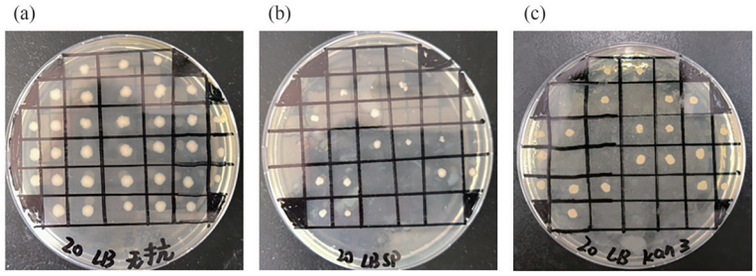
菌落PCR验证结果见图3(c)-(e).以原始DH5α菌株基因组DNA为模板的阳性对照扩增出约2000 bp的条带[图3(c)];而以18株DH5α-Δ*dld*候选菌株基因组DNA为模板的扩增产物[图3(d)、(e)],均出现约1000 bp的特异性条带,大小与*dld*基因敲除后同源重组区域的预期片段完全一致.该结果表明同源臂供体DNA已在*dld*基因位点实现精准同源重组,*dld*基因被成功敲除.

为最终确认敲除准确性,选取第1、2、7、14号阳性菌株,对其基因组靶标区域进行测序验证[图3(f)].测序结果显示,该区域已整合同源臂序列,且*dld*基因编码区完全缺失,进一步证实DH5α-Δ*dld*敲除菌株构建正确.

2.4 质粒固化的构建与验证

为消除pEcCas质粒与pEcgRNA-Δ*dld*重组载体对后续MFC产电性能检测的干扰,采用诱导质粒丢失策略对DH5α-Δ*dld*菌株进行纯化,验证结果如图4所示.图4(a)显示,经质粒消除处理后,DH5α-Δ*dld*菌株在无抗性LB固体培养基上生长状态良好,表明该菌株在脱离抗性选择压力后仍具有稳定的增殖能力,且未因质粒消除过程而丧失正常生理活性.

根据抗性验证结果[图4(b)、(c)],选择在无抗性平板正常生长、但在双抗性平板不生长的菌株,即表明pEcCas质粒与pEcgRNA-Δ*dld*重组载体已完全消除,无残留质粒干扰,成功获得纯化的DH5α-Δ*dld*敲除菌株,可用于后续MFC产电性能检测实验.



(a) DH5α-Δ*dld*在LB平板(无抗性)培养12 h后的生长状态;(b) DH5α-Δ*dld*在LB平板(含壮观霉素)培养12 h后的生长状态;(c) DH5α-Δ*dld*在LB平板(含卡那霉素)培养12 h后的生长状态

图4 质粒固化的构建与验证

Fig. 4 Construction and identification of plasmid stabilization

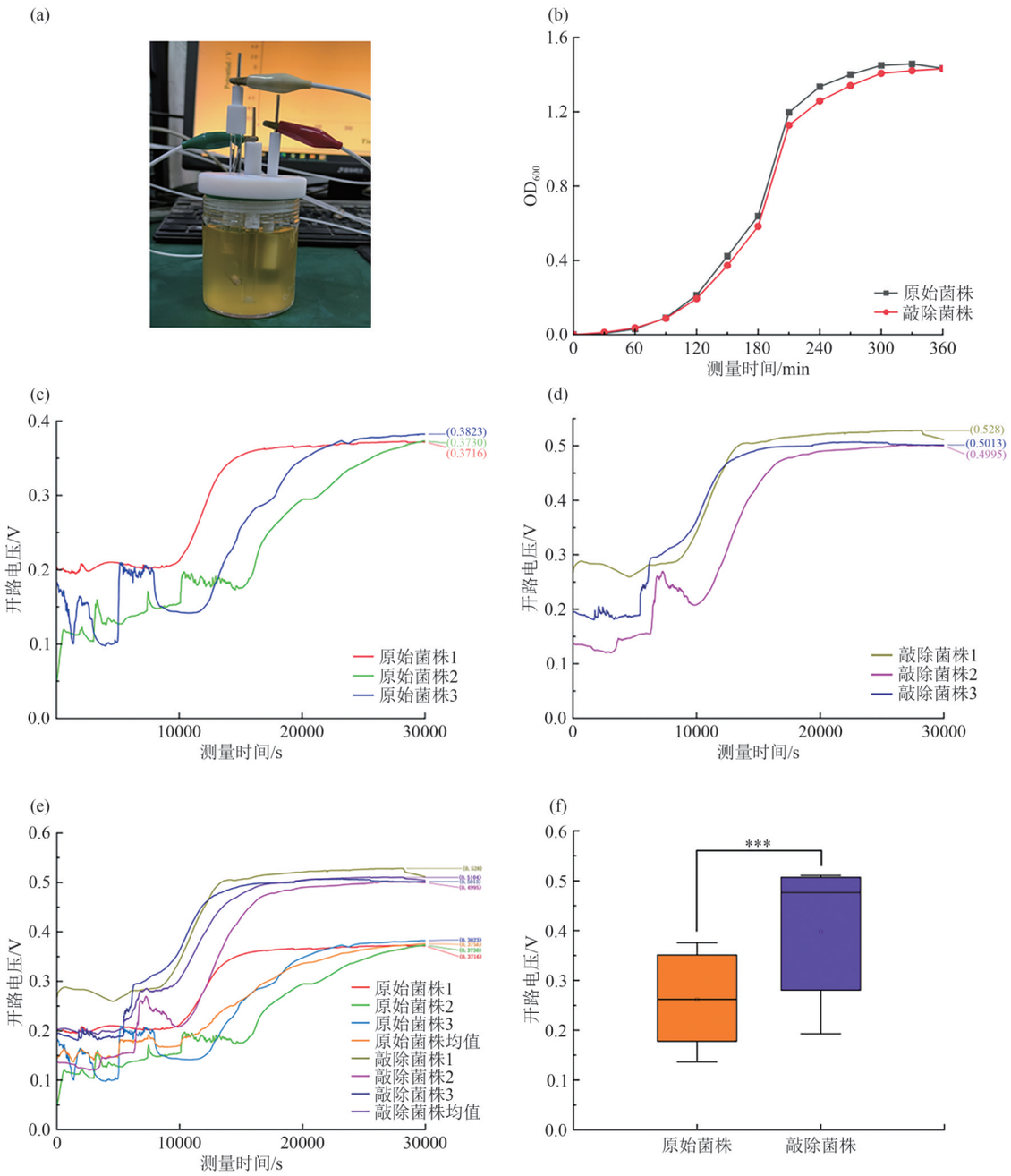
2.5 微生物燃料电池装置的搭建及产电性能检测

开路电压的动态变化及峰值差异可直接反映菌株的电子传递效率与产电潜力,检测结果如图5及表2所示.图5(a)展示了MFC装置的组装及电极连接.

菌株生长曲线[图5(b)]显示,原始菌株(DH5α)与敲除菌株(DH5α-Δ*dld*)在相同培养条件下的生长趋势基本一致,OD_{600}值随培养时间的变化无显著差异,表明*dld*基因敲除未对大肠杆菌DH5α的基础生长代谢产生明显抑制,从而排除了因生长状态差异引起的产电性能波动,确保了产电对比的可靠性.

开路电压动态监测结果[图5(c)、(d)]显示,两种菌株的MFC开路电压均呈现先快速上升至峰值后逐渐稳定的趋势,且三次重复实验的电压曲线重合度较高,说明检测体系稳定,实验结果具有良好的可重复性.图5(e)的综合对比曲线清晰表明,敲除菌株(DH5α-Δ*dld*)的开路电压全程显著高于原始菌株(DH5α),说明*dld*基因敲除后菌株的电子传递启动效率及最大电子传递能力均得到提升.

显著性分析结果[图5(f)]显示,运用SPSS Statistics 25.0软件对原始菌株(DH5α)与敲除菌株(DH5α-Δ*dld*)的开路电压数据进行检验(α=0.001),二者呈现极显著差异(P<0.001),证明产电性能的提升并非随机现象,而是*dld*基因敲除后所产生的特异性生物学效应.结合表2数据可知,原始菌株(DH5α)开路电压峰值的均值为0.3756 V,敲除菌株(DH5α-Δ*dld*)的峰值均值则为0.5104 V,相较于原始菌株提高了35.9%,进一步量化了*dld*基因敲除对MFC产电性能的促进作用.



（a）MFC装置的搭建及连接；（b）原始菌株（DH5α）和敲除菌株（DH5α-Δ*dld*）的生长曲线；（c）原始菌株（DH5α）开路电压（三次重复）；（d）敲除菌株（DH5α-Δ*dld*）开路电压（三次重复）；（e）原始菌株（DH5α）和敲除菌株（DH5α-Δ*dld*）开路电压综合数据；（f）原始菌株（DH5α）和敲除菌株（DH5α-Δ*dld*）显著性水平分析（***P<0.001）

图5　微生物燃料电池装置的搭建及产电性能检测

Fig. 5　Construction of the microbial fuel cell device and measurement of its electricity generation performance

表2　开路电压峰值

Tab. 2　Peak Open-Circuit Voltage Data

菌株	开路电压峰值/V	开路电压均值/V
原始菌株平行样品1	0.3716	
原始菌株平行样品2	0.3730	0.3756±0.00002
原始菌株平行样品3	0.3823	
敲除菌株平行样品1	0.5280	
敲除菌株平行样品2	0.4995	0.5104±0.00017
敲除菌株平行样品3	0.5013	

3　讨论与结论

（1）*dld* 基因敲除对大肠杆菌 DH5α 介导微生物燃料电池效能具有显著强化作用，其核心机制在于通过基因编辑驱动代谢通路重构与电子传递效率定向优化 .*dld* 基因编码的乳酸脱氢酶是丙酮酸代谢网络中的关键限速酶，其功能缺失直接阻断了丙酮

酸向乳酸的还原反应,同时终止了该反应所偶联的NAD(P)H氧化消耗过程.这促使原本流向乳酸合成的碳代谢流发生定向重分配,使丙酮酸更多地分流至产能代谢途径,从而推动胞内NAD(P)H的高效特异性积累.作为微生物电子传递链的核心电子供体,NAD(P)H胞内储备量的显著提升,为MFC中胞内外电子传递过程(包括直接电子转移DET与介导电子转移MET)提供了充足的电子供体底物,有效降低了电子传递过程中的能量耗散,显著提高了电子从胞内向电极表面的传递效率.

(2)在相同培养条件下,原始菌株DH5α与敲除菌株DH5α-Δ*dld*的生长特性无显著差异,OD_{600}值随培养时间的变化趋势高度一致,表明*dld*基因敲除未显著影响大肠杆菌DH5α的基础生长代谢.该结果排除了生长状态差异对产电性能的可能干扰,保障了产电性能对比的科学性与可靠性.本文成功构建了*dld*基因敲除菌株DH5α-Δ*dld*,并明确其可显著强化MFC产电性能,使MFC开路电压较原始菌株提升35.9%.

(3)本文为拓展MFC的微生物资源库奠定了理论基础与技术支撑,为非电活性微生物的定向工程改造提供了可行的技术范式,同时为低成本、高稳定性MFC系统的研发提供了新的思路,具有潜在的实际应用价值.

参 考 文 献

[1] Liu Z, Wang K, Chen Y, et al. Third-generation biorefineries as the means to produce fuels and chemicals from CO2[J]. Nature Catalysis, 2020, 3(3): 274-288.

[2] 姚砺强.绿色建筑暖通空调设计中节能技术的应用研究[J].城市建设理论研究(电子版),2025,(13):205-207.

[3] Chen H, Dong F, Minteer S D. The progress and outlook of bioelectrocatalysis for the production of chemicals, fuels and materials[J]. Nature Catalysis, 2020, 3(3): 225-244.

[4] Kadier A, Jain P, Lai B, et al. Biorefinery perspectives of microbial electrolysis cells (MECs) for hydrogen and valuable chemicals production through wastewater treatment[J]. Biofuel Research Journal, 2020, 7(1): 1128-1142.

[5] Moradian M J, Xu Z, Shi Y, et al. Efficient biohydrogen and bioelectricity production from xylose by microbial fuel cell with newly isolated yeast of Cystobasidium slooffiae[J]. International Journal of Energy Research, 2020, 44(1):325-333.

[6] Wang J, Dong B, Shen Z, et al. An innovative fast-start aerobic anode microbial fuel cell biosensor for copper ion detection [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2024, 12(3): 112876.

[7] 李一苇, 宋瑾, 厉运周, 等.用于海水微生物燃料电池原位监测的新型伏安式pH传感器[J].山东科学, 2025, 38(3): 72-83.

[8] Xie R, Wang S, Wang K, et al. Improved energy efficiency in microbial fuel cells by bioethanol and electricity co-generation[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2022, 15(1): 84.

[9] 唐方毅, 薛溢涵, 贾律伦, 等.厌氧氨氧化污泥耦合小球藻的双生物微生物燃料电池处理养殖废水研究[J].华南农业大学学报, 2025, 46(2): 222-229.

[10] 包朋飞, 武旭洋, 侯彬, 等.微生物燃料电池降解RDX废水的性能和机理研究[J].火工品, 2025(4): 52-59.

[11] Klyushin G S, Gogov A S, Kolonskii A E, et al. Low CO2 footprint remediation of oil-contaminated soil in a sediment microbial fuel cell[J]. Microbiology, 2025, 94(2): 181-198.

[12] 刘海华, 李瑞娟, 吴奇, 等.微生物燃料电池修复重金属Cr(Ⅵ)污染水体的研究进展[J].化工新型材料, 2022, 50(6): 302-306, 312.

[13] 张宇, 王琳.人工湿地微生物燃料电池处理海水淡化浓盐水研究进展[J].现代化工, 2023, 43(12): 64-68.

[14] Bataillou G, Ondel O, Haddour N. 900-Days long term study of plant microbial fuel cells and complete application for powering wireless sensors[J]. Journal of Power Sources, 2024, 593: 233965.

[15] 刘煜.三维石墨烯基复合材料的电极设计及储钾机理研究[D].绵阳: 西南科技大学, 2023.

[16] 王岩.生物质与微藻共热解制备超级电容器碳基电极材料及其性能调控研究[D].重庆: 重庆大学, 2024.

[17] 刘超.分层接种实现厌氧氨氧化反应器快速启动[J].

净水技术，2024，43(7)：119-125.

[18] 刘鑫燃，高文钰，唐美怡，等. 电位调控定向富集反硝化生物膜及脱氮效能研究[J]. 北京工业大学学报，2024，50(12)：1477-1485.

[19] 王昭宇. 电极填料一体化人工湿地微生物燃料电池系统构建及其运行优化[D]. 天津：河北工业大学，2023.

[20] Lu D，Li J，Zhang D，et al. Layer-by-layer-assembled polyaniline/MXene thin film and device for improved electrochromic and energy storage capabilities[J]. ACS Applied Polymer Materials，2024，6(20)：12492-12502.

[21] Kazama I，Hirose N，Aso Y，et al. Cellulose-fueled microbial fuel cells equipped with a bipolar membrane using hydrogen phosphate as the final electron acceptor[J]. Biotechnology Letters，2023，45(11)：1467-1476.

[22] Pan Q R，Ouyang Y Q，Jiang H H，et al. Bifunctional electrode materials：Enhancing microbial fuel cell efficiency with 3D hierarchical porous Fe3O4/Fe-N-C structures[J]. Bioelectrochemistry，2025，161：108829.

[23] Shukal S，Lim X H，Zhang C，et al. Metabolic engineering of Escherichia coli BL21 strain using simplified CRISPR-Cas9 and asymmetric homology arms recombineering [J]. Microbial Cell Factories，2022，21(1)：19.

[24] Li Q，Sun B，Chen J，et al. A modified pCas/pTargetF system for CRISPR-Cas9-assisted genome editing in *Escherichia coli* [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica，2021，53(5)：620-627.

（责编&校对　刘钊）