

色氨酸转运系统改造 对大肠杆菌产 *L*-色氨酸的影响

李晶^{1,2}, 石斌超², 王晨阳², 赵志军², 史吉平^{2,*}

(1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444;

2. 中国科学院上海高等研究院, 上海 201210)

摘要:近年来,转运系统改造已经成为氨基酸菌株菌种改良的重要手段。本研究以工业生产菌 *Escherichia coli* MT-01/pTrp-01 为出发菌株,首先利用 Red 重组技术,在菌株 MT-01/pTrp-01 基因组上敲除了色氨酸吸收基因 *mtr*,发酵结果表明,敲除敲除突变菌的 *L*-色氨酸产量达到 35.87 g/L,与出发菌株 *E.coli* MT-01/pTrp-01 相比提高了 32%;在此基础上,进一步考察了三种不同启动子(Pr, Ptac, PserA)控制下 *L*-色氨酸分泌基因 *yddG* 的差异表达对菌体生长及菌株产 *L*-色氨酸的影响。结果表明,当采用组成型启动子 *tac* 时, *yddG* 基因的过表达菌株 *L*-色氨酸的产量为 41.01 g/L,比 *mtr* 敲除菌株 *E.coli* MT-11/pTrp-01 的产量提高了 14.3%,当采用温度诱导型启动子 Pr 调控 *yddG* 基因表达时, *L*-色氨酸的产量与 *mtr* 敲除菌株 *E.coli* MT-11/pTrp-01 的产量相比提高了 9.3%, *L*-色氨酸的产量达到了 39.22 g/L;而采用基因 *serA* 的天然启动子调控 *yddG* 表达时,菌体的生长受到了明显抑制, *L*-色氨酸产量仅有 27.1 g/L 的色氨酸。综上,大肠杆菌基因 *mtr* 的敲除和基因 *yddG* 的过表达均可以有效提高工程菌株生产色氨酸的能力。

关键词:大肠杆菌, *L*-色氨酸, 转运系统, 基因敲除, 克隆表达

Effect of engineering of *L*-tryptophan transport system on *L*-tryptophan production in *Escherichia coli*

LI Jing^{1,2}, SHI Bin-chao², WANG Chen-yang², ZHAO Zhi-jun², SHI Ji-ping^{2,*}

(1. College of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China;

2. Shanghai Advanced Research Institute of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China)

Abstract: In recent years, the strategy of transport system modification has been widely employed for the development of amino acid production strains. In the present study, the industrial production strain *Escherichia coli* MT-01/pTrp-01 was chosen as the start strain, the *L*-tryptophan uptake gene of *mtr* knockout mutant strain were built by the method of Red homologous recombination, the fermentation results of the *mtr* mutant showed that the production of tryptophan was 35.87 g/L, which was 32% higher than that of the origin strain. Furthermore, the *L*-tryptophan excretion gene of *yddG* was overexpressed at different levels by fusing with three different promoter (Pr, Ptac and PserA), and the *L*-tryptophan yield and the cell growth of gene *yddG* overexpression mutants were studied. The fermentation results showed that the *yddG* overexpression mutant fused with the constitutive promoter of *tac* increased the production of *L*-tryptophan to 41.01 g/L, which was 14.3% higher than that of the gene *mtr* knockout strain, the *yddG* overexpression mutant driven by the temperature inducible promoter Pr produced 39.22 g/L *L*-tryptophan, which was 9.3% higher than that of the gene *mtr* knockout strain. However, the *yddG* overexpression mutant driven by the promoter *serA* only produced 27.1 g/L *L*-tryptophan, and the cell growth of strain got significantly restrained. To sum up, overexpression of gene *yddG* and knockout of gene *mtr* are beneficial to improve the ability of engineering strains to produce *L*-tryptophan.

Key words: *Escherichia coli*; *L*-tryptophan; transport system; gene knockout; cloning and expression

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)15-0157-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.15.030

L-色氨酸 (*L*-tryptophan, *L*-Trp) 作为人体必需的氨基酸之一, 已广泛应用于食品、医药和饲料等行

业^[1]。目前, 微生物发酵法是工业生产 *L*-色氨酸的主要方法; 而易于培养、遗传、操作简单的大肠杆菌

收稿日期: 2017-03-03

作者简介: 李晶(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: 18989875099@126.com。

* 通讯作者: 史吉平(1964-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 生物化工产品生产关键技术研究, E-mail: shijp@sari.ac.cn。

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31300048)。

成为了 *L*-色氨酸的主要生产菌株^[2]。

L-色氨酸生产菌株主要是通过诱变筛选或者基因重组的方式增加 *L*-色氨酸的代谢通量所获得,例如:解除关键酶蛋白 AroG 和 TrpE 的反馈抑制作用,过量表达关键基因 *aroG*、*trpE* 和 *trpBA* 等,阻断 *L*-苯丙氨酸和 *L*-酪氨酸等旁支途径。值得注意的是,转运系统改造同样是提高 *L*-色氨酸产量的重要措施^[3-7]。

转运系统改造是指通过提高胞内氨基酸的分泌速率或者降低胞外氨基酸的吸收速率,从而加速氨基酸积累的一种重要方法。近年来,氨基酸转运系统工程已经成功应用于色氨酸、苏氨酸、缬氨酸和半胱氨酸等氨基酸育种研究中。例如:2007年, Lee KH 等在菌株 TH27C (pBRThrABC) 中敲除了苏氨酸的吸收基因 *tdcC*, 研究结果表明苏氨酸的发酵产量提高了 15.6%, 在此基础上过量表达苏氨酸分泌基因 *rhtC*, 苏氨酸产量进一步提高至 11.1 g/L, 提高了 50.2%。Park JH 等 2007 年则通过过量表达缬氨酸分泌基因 *ygaZH*, 使缬氨酸产量提高了 47.1%, 达到 5.25 g/L。梁媛等在 2014 年对大肠杆菌苏氨酸转运蛋白 SstT 和 RhtC 进行了研究, 构建了菌株基因 *sstT* 敲除菌株并在其基础上过表达了基因 *rhtC*, 发酵结果基因 *sstT* 敲除菌的 *L*-苏氨酸产量与原菌相比提高了 4%, 基因 *rhtC* 过表达菌株的 *L*-苏氨酸产量提高了 18.16%。2016 年, 崔云凤等分别敲除了大肠杆菌中 *L*-丝氨酸转运吸收系统的四个基因 (*sdaC*, *cycA*, *sstT* 和 *tdcC*), 发酵结果表明, *sdaC* 敲除菌与 *cycA* 敲除菌 *L*-丝氨酸的产量都得到了提高, 分别达到 16.3 g/L 与 14.1 g/L, 与出发菌株相比分别提高了 43% 与 25%^[8-11]。

大肠杆菌色氨酸转运系统分为吸收系统和分泌系统, 其中 *L*-Trp 的吸收主要是由 *mtr*, *tnaB* 和 *arop* 三个基因编码的通透酶所调控; *Mtr* 和 *TnaB* 通透酶分别是高亲和性的和低亲和性的色氨酸专用通透酶, 而 *Arop* 通透酶是芳香族氨基酸的共用通透酶。大肠杆菌中由 *yddG* 编码的一种内膜蛋白调控着芳香族氨基酸的胞外分泌。近年来, Wang J、Liu Q、GU P、Zhao Z 等均对 *L*-色氨酸的基因工程菌进行了转运系统的改造, *L*-色氨酸的发酵产量分别提高了 12%~35% 不等。本实验室保藏的 *L*-色氨酸生产菌 *E.coli* MT-01/pT-01, 其宿主经历了数轮的诱变筛选, 测序表明在其基因组上 *tnaB* 基因序列发生了诱变缺失, 但 *mtr*、*arop* 和 *yddG* 的基因序列仍然完整。本研究以菌株 *E.coli* MT-01/pT-01 为出发菌株, 考察了色氨酸吸收基因 *mtr* 的敲除和分泌基因 *yddG* 在不同启动子调控下的过量表达对菌体生长及其发酵生产色氨酸的影响^[12-18]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株和质粒 出发菌株为色氨酸工业生产菌株 *E.coli* MT-01/pTrp-01, 其宿主菌 MT-01 是 *E.coli* W3110 的抗色氨酸结构类似物反馈抑制作用的化学诱变突变菌。质粒 pTrp-01 是携带色氨酸合成关键

酶基因 *aroG^{thr}*、*trpE^{thr}* DCBA 和 *serA*, 且 *aroG^{thr}* 和 *trpE^{thr}* D 为 *aroG* 和 *trpED* 的抗反馈调节突变基因, 具有 *tac* 启动子和 *tet* 抗性的原核表达质粒, 为实验室保藏。本研究以 *E.coli* MT-01/pTrp-01 为出发菌株, 构建了色氨酸吸收基因 *mtr* 的敲除突变菌 *E.coli* MT-11 和 *yddG* 的表达质粒 (PACYC177-Pr-*yddG*, PACYC177-Ptac-*yddG*, PACYC177-PserA-*yddG*), 从而获得了基因工程菌 *E.coli* MT-11/pTrp-01 和 *E.coli* MT-11/pTrp-01。敲除所需的工具质粒 pKD13、pKD46 和 pCP20 购自美国耶鲁大学大肠杆菌菌株库 (*E.coli* Genetic Stock Center, New Haven, USA)^[19]。

yddG 过表达所需质粒有 pACYC177, pMD19-Pr, pMD19-Ptac 和 pMD19-PserA 皆为实验室保存, 其中 pACYC177 是一个复制起点为 p15A 的低拷贝质粒, 可以与包含 pMB1 或 ColE1 复制子的质粒共存, 比如 pTrp-01, pMD19-T 等质粒, pMD19-Pr, pMD19-Ptac pMD19-PserA 为实验室保存的分别带有启动子 Pr, Ptac, PserA 序列的质粒, pMD19-Pr 质粒中除了 Pr 启动子序列外, 还带有 Pr 启动子的温度调控序列 *clts857*。启动子 Pr 为温敏型启动子, 受温度调控, 启动子 PserA 为基因 *serA* 的天然启动子, 基因 *serA* 是 *L*-丝氨酸合成途径中关键酶磷酸甘油酸脱氢酶的编码基因, Ptac 是一种由乳糖启动子和色氨酸启动子人工构建的杂合启动子, 是一种强启动子^[20-23]。

本研究中使用的菌株和质粒的具体特性见表 1。

1.1.2 试剂和溶液 各种限制性内切酶、PrimerSTAR HS DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶 (Mix) 大连宝生物有限公司; DNA Ladder Mix Fementas 公司; 氨苄青霉素、硫酸卡那霉素, 盐酸四环素 上海捷倍思基因技术有限公司; 质粒小量制备试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、PCR 清洁试剂盒购自 AxyPrep 公司; *L*-色氨酸标准品 Sigma 公司; 其他化学试剂 国药集团化学试剂有限公司; 常规试剂 采用国产分析纯; 引物合成和测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.1.3 仪器 Gel Dox XR + 凝胶成像系统、电转仪 Micro Pulser、S1000 PCR 仪 美国 BIO-RAD 公司; DU730 型紫外分光光度计 德国 Beckman 公司; SBA 生物传感分析仪 山东省科学院生物研究所; ZHWY-2102C 恒温培养振荡器 上海智城仪器制造有限公司; Centrifuge 5430 低温离心机 德国 Eppendorf 公司; MLS-3780 型高压蒸汽灭菌锅 日本三洋公司; 高效液相色谱仪 RID-10A/SPD-20A 日本岛津公司; Inertsil ODS-SP 色谱柱 日本 GL science 公司; DELTA 320 型 pH 计 瑞士梅特勒公司; PYX-DHS-40X50-S 恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂; 台式高速离心机 德国 Eppendorf 公司; Biostat A Plus 发酵罐 德国 Sartorius 公司。

1.1.4 培养基和培养条件 种子培养基为 LB 培养基: 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 氯化钠。发酵培养基: 7.5 g/L 葡萄糖, 1.5 g/L 酵母粉, 2 g/L 七水合硫酸镁, 1 g/L 硫酸铵, 2 g/L 柠檬酸, 3 g/L 磷酸氢二铵, 5 g/L 氯化钾, 1 mL/L 微量元素液母液 (7 g/L

表1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株与质粒	特征	来源
<i>E.coli</i>		
MT-01	来源于大肠杆菌 W3110	存于实验室
MT-11	在菌株 MT-01 的基因组上敲除了基因 <i>mtr</i>	本研究
MT-21	菌株 MT-11 包含有质粒 pTrp-01 和 pACYC177-Pr-yddG	本研究
MT-22	MT-11 包含有质粒 pTrp-01 和 pACYC177-Ptac-yddG	本研究
MT-23	MT-11 包含有质粒 pTrp-01 和 pACYC177-PserA-yddG	本研究
Plasmid		
pKD13	氨苄和卡纳抗性筛选标记	[19]
pKD46	氨苄抗性筛选标记, 辅助质粒	[19]
pCP20	氨苄和氯霉素抗性筛选标记, 辅助质粒	[19]
pMD19-T	大小为 2.7kb 的 T 载体包含有氨苄抗性筛选标记与 lacZ 基因筛选标记	购自于宝生物有限公司
pACYC177	复制起始点为 p15A 的质粒, 氨苄和卡纳抗性筛选标记	存于实验室
pTrp-01	复制起始点为 pMB1 的质粒, 四环素抗性筛选标记, 并带有 <i>aroG^{trp}</i> , <i>trpE^{trp}</i> DCBA 和 <i>serA</i> 等基因。	存于实验室
pMD19-Pr	质粒 pMD19-T 包含有 1.8 kb 大小的片段, 片段为 <i>pr</i> 启动子序列与其调控序列 <i>clts857</i>	存于实验室
pMD19-Ptac	质粒 pMD19-T 包含有 638 bp 大小的片段, 片段为 <i>tac</i> 启动子序列	存于实验室
pMD19-PserA	质粒 pMD19-T 包含有 1.1 kb 大小的片段, 片段为 <i>serA</i> 启动子序列	存于实验室
pACYC177-Pr-yddG	质粒 pACYC177 包含有 2.8 kb 大小的片段, 片段为 <i>pr</i> 启动子序列与其调控序列 <i>clts857</i> 和基因 <i>yddG</i> 。	存于实验室
pACYC177-Ptac-yddG	质粒 pACYC177 包含有 2 kb 大小的片段, 片段为 <i>tac</i> 启动子序列和基因 <i>yddG</i> 。	存于实验室
pACYC177-PserA-yddG	质粒 pACYC177 包含有 2.2 kb 大小的片段, 片段为 <i>serA</i> 启动子序列和基因 <i>yddG</i> 。	存于实验室

六水合氯化钴, 2.5 g/L 五水合硫酸铜, 25 g/L 硼酸, 16 g/L 四水合氯化锰, 1.5 g/L 二水合钼酸钠, 3 g/L 七水合硫酸锌)。种子培养: 于 LB 平板挑取单菌落至装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C, 200 r/min, 培养 8~10 h。

发酵罐培养: 以 10% [v/v] 比例转接种子培养液至装有 2.5 L 发酵培养基中进行发酵。含有温敏型启动子 Pr 的工程菌株初始发酵温度为 32 °C, 当菌株 OD 达到 20 以上时将发酵温度提高至 35 °C, 其余工程菌株在发酵周期内的发酵温度始终为 35 °C, 当发酵液中初始葡萄糖基本耗尽时, 开始流加 600 g/L 的葡萄糖溶液, 并调控流速使发酵液中的葡萄糖浓度小于 5 g/L。发酵过程中, 通过流加浓氨水使培养基 pH 保持在 pH6.8~pH7.0^[16]。

1.1.5 引物 基因敲除方面, 根据 *E.coli* MT-01 的基因组序列, 设计引物 *mtr_fw* 和 *mtr_rv*, 其中下划线部分为 *mtr* 基因上下游各 50 bp 的同源臂序列, 以 pKD13 DNA 为模板, 扩增 *mtr* 基因的打靶 DNA 片段。三对引物 *mtr_v1* 和 k1, k2 和 *mtr_v2*, *mtr_v1* 和 *mtr_v2* 分别用于鉴定 *mtr* 基因的敲除, 其中引物 *mtr_v1* 和 *mtr_v2* 分别是基因组中 *mtr* 基因上游和下游的 DNA 序列, 引物 k1 和 k2 分别为质粒 pKD13 中 Kan 基因内部序列。

基因的克隆表达方面, 根据质粒 pMD19-Pr 及基因 *yddG* 序列设计引物 BglIII-*yddG*-F 和 KpnI-*yddG*-R, 根

据质粒 pMD19-Ptac pMD19-PserA 和基因 *yddG* 序列设计 SacI-*yddG*-F 和 AvrII-*yddG*-R。引物 BglIII-*yddG*-F 和 KpnI-*yddG*-R 用于从 w3110 基因组上扩至基因片段 *yddG*, 并使其两端分别带有酶切位点 BglIII 和 KpnI, 通过酶切位点 BglIII 和 KpnI 可以将基因 *yddG* 组装到质粒 pMD19-Pr 的启动子 Pr 序列之后, 用于验证基因 *yddG* 及启动子 Pr 的效率, 同理利用酶切位点 SacI 和 AvrII 可以分别考察基因 *yddG* 和启动子 Ptac 及基因 *yddG* 和启动子 PserA 的效率。本研究中所用引物的合成及相应的 DNA 序列测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

因为基因工程菌 MT-21, MT-22 和 MT-23 中除了质粒 pTrp-01, 还存在重组质粒 pACYC177, pACYC177 是一个可以与 pTrp-01 共存的低拷贝质粒, pTrp-01 为四环素抗性, pacyc177 为氨苄抗性, 且两者的 ori 序列不同, 故设计验证引物 177-F 与 177-R, 其中 177-F 与 pacycy 的 ori 序列同源。本研究所用引物的 DNA 序列见表 2。本研究中所用引物的合成及相应的 DNA 序列测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 *mtr* 基因的敲除 *mtr* 基因的敲除参照文献 [19, 24]。

1.2.2 *yddG* 克隆与表达 首先, 通过 PCR 的手段, 用引物 BglIII-*yddG*-F 和 KpnI-*yddG*-R 从大肠杆菌

表2 本章研究中使用的引物
Table 2 Oligonucleotide primers used in this study

基因	引物名称	引物序列 5'→3'	酶切位点
<i>mtr</i>	<i>mtr_fw</i>	<u>ACACGCATCACTGCGTAGATCAAAAAACAACCACC</u> <u>GCACGAGGTTTCATGATTCCGGGGATCCGTCGACC</u>	/
	<i>mtr_rv</i>	<u>AGCAGAAATGTCGGATAAGGCACCCGCTGATTACTGA</u> <u>TACACCGGCAGTAATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>	/
	<i>mtr_v1</i>	TGATGTTGGCGATATGCAGCTGTAC	/
	<i>mtr_v2</i>	GTCGTCATATGACGGCGGATATTG	/
	k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	/
	k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	/
<i>yddG</i>	177-F	GCCCTCTCACTTCCCTGTTAAGTATCTTC	/
	177-R	AGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTTTATAAAC	/
	BglII- <i>yddG</i> -F	AGATCTAAGAAGGAGATATACCTGACACGACAAAAAGCAACG	BglII
	KpnI- <i>yddG</i> -R	GCCGGTACCGATGAAATAATATTATTATTCG	KpnI
	SacI- <i>yddG</i> -F	TAGAGCTCATGACACGACAAAAAGCAACG	SacI
	AvrII- <i>yddG</i> -R	CGCGCCTAGGGATGAAATAATATTATTATTCG	AvrII

注:下划线序列为目标敲除基因的50个同源臂序列;斜体序列为限制性酶核苷序列。

w3110 的基因组中扩增基因 *yddG* 片段,片段两端带有酶切位点 BglII 和 KpnI,之后利用限制性内切酶 BglII 和 KpnI 双酶切基因 *yddG* 和质粒 pMD19-Pr,切胶回收酶切后的片段,利用 T4 连接酶进行过夜连接,再将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 中,提取转化子中的质粒进行 PCR 验证及测序验证,获得正确的质粒 pMD19-Pr-ry;同理,通过 PCR 的手段,以大肠杆菌 w3110 的基因组为模板,用引物 SacI-*yddG*-F 和 AvrII-*yddG*-R 扩增基因片段 *yddG*,片段两端带有酶切位点 SacI 和 AvrII,利用限制性内切酶 SacI 和 AvrII 双酶切基因 *yddG* 和载体质粒 pMD19-Ptac 及 pMD19-PserA,将酶切的 *yddG* 片段分别于载体质粒 pMD19-Ptac 和 pMD19-PserA 的酶切产物进行连接,经过连接、转化、PCR 验证和测序验证,获得正确的重组质粒 pMD19-Ptac-ty 及 pMD19-PserA-sy;最后使用限制内切酶 stuI 酶切质粒 pMD19-Pr-ry, pMD19-Ptac-ty, pMD19-PserA-sy 和质粒 Pacyc177,经过上述手段,将片段 Pr-ry, Ptac-ty, PserA-sy 重组到质粒 Pacyc177 上,分别得到重组质粒 pACYC177-Pr-*yddG*, pACYC177-Ptac-*yddG* 与 pACYC177-PserA-*yddG*^[25-26]。

1.2.3 发酵参数的测定 发酵液中的菌体密度以 600 nm 波长下分光光度计检测的吸光值 (OD₆₀₀) 表示,细胞干重根据前期构建的经验公式获得 (1OD = 0.5 g/L 细胞干重),OD 值的读数在 0.2~0.8 范围内是可靠的,当 OD 值超出这一范围,进行稀释后再进行测定。发酵液中的葡萄糖浓度通过 SBA 生物传感仪检测。发酵液中的 L-色氨酸浓度通过 Agilent 1200 HPLC 系统 RP-HPLC 测定。采用的色谱柱为: Inertsil ODS-SP 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μ m)。流动相为: 甲醇和 0.05% 磷酸,流速为 0.8 mL/min。梯度洗脱程序为: 0~3 min, 2% 甲醇; 3~22 min, 甲醇由 2% 升至 80%; 甲醇浓度保持 80% 至 25 min; 25~26 min, 甲醇浓度由 80% 降低至 2%; 回到初始条件。使用紫外检测器检测标样及样品中

L-色氨酸在 210 nm 的吸收峰值^[3]。

1.2.4 数据处理方法 每个实验重复三次,实验数据取平均值,采用 Origin 7.0 软件作图。

2 结果与分析

在大肠杆菌中 L-色氨酸的生物合成途径可以分为两部分,由葡萄糖生成分支酸的途径 (包括中心代谢途径与芳香族氨基酸合成的共同途径) 和由分支酸最终生成 L-色氨酸的途径。L-色氨酸的生物合成的中心代谢途径起始于葡萄糖,通过糖酵解 (EMP) 途径得到的磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 与通过磷酸戊糖途径 (HMP) 得到的 4-磷酸赤藓糖 (E4P) 进行缩合,形成 3-脱氧- α -阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸 (DAHP); 从 DAHP 开始经莽草酸 (SHIK) 最终合成分支酸 (CHA) 的过程是芳香族氨基酸合成的共同途径; 色氨酸是芳香族氨基酸三条分支途径中的一支,从分支酸开始经邻氨基苯甲酸 (ANTA) 最终合成色氨酸。大肠杆菌中 L-色氨酸的代谢合成通路如图 1^[6]。

2.1 *mtr* 基因敲除菌的构建

通过电转化的手段,首先将质粒 pKD46 转化到 *E. coli* MT-01 感受态细胞中,之后利用引物 *mtr_fw* 和 *mtr_rv* 从质粒 pKD13 上扩增打靶 PCR 片段 *mtrD50-kan-mtrD50*,将打靶片段转化至含有质粒 pKD46 的 *E. coli* MT-01 感受态细胞中,在 kan 平板上初步筛选同源重组的 *mtr* 基因的敲除突变株。以筛选到的菌株为模板,分别利用引物 *mtr_v1* 和 k1, k2 和 *mtr_v2* 对初选的菌株进行菌落 PCR 鉴定,根据序列分析, *mtr* 敲除菌经扩增后分别可得到大小为 1063 bp 和 1343 bp 的 PCR 片段, DNA 凝胶电泳的结果与理论值相符 (图 1), 表明 *mtr* 基因敲除成功。最后,利用质粒 pCP20 消除 *mtr* 基因敲除菌的 kan 抗性基因,将质粒 pCP20 转化至 *mtr* 基因敲除菌中后,在无抗平板上初步筛选 kan 抗性消除的 *mtr* 基因的敲除突变株,以筛选到的菌株为模板利用引物 *mtr_v1* 和 *mtr_v2* 进行菌落 PCR 鉴定,根据序列分析, *mtr* 敲除菌消抗

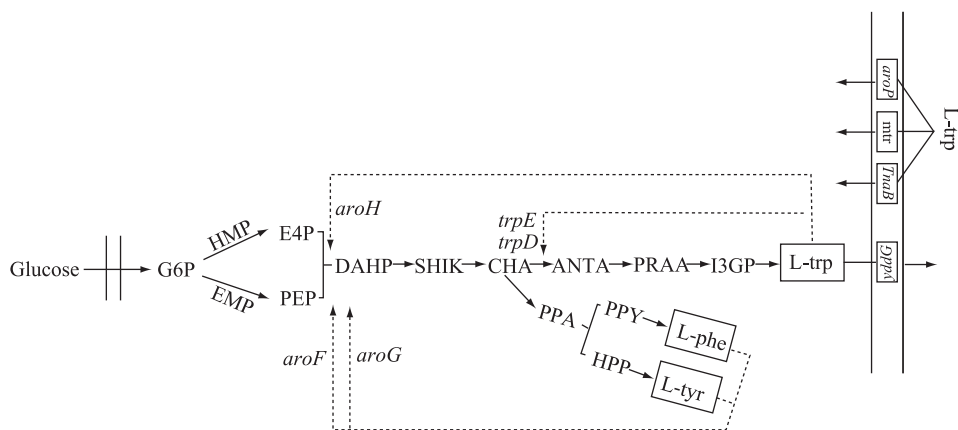


图1 大肠杆菌中L-Trp的合成代谢途径及相关调控

Fig.1 Metabolic pathways and regulation for biosynthesis of L-Trp in *E.coli*

注:虚线表示芳香族氨基酸反馈抑制。缩写分别表示:G6P,6-磷酸葡萄糖;HMP,磷酸戊糖途径;EMP,糖酵解途径;E4P,4-磷酸赤藓糖;PEP,磷酸烯醇丙酮酸;DAHP,3-脱氧- α -阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸;SHIK,莽草酸;CHA,分支酸;ANTA,邻氨基苯甲酸;PPA,预苯酸;PPY,苯丙酮酸;PRAA,磷酸核糖邻氨基苯甲酸;HPP,4-羧苯基丙酮酸;I3GP,吡啶-3-磷酸甘油;L-Phe,L-苯丙氨酸;L-Trp,L-色氨酸;L-Tyr,L-酪氨酸。

后可得到大小为1253 bp的DNA片段,DNA凝胶电泳的结果与理论值相符(图2),将PCR片段送至公司测序,测序结果验证mtr基因敲除正确。命名mtr敲除菌为MT-11。

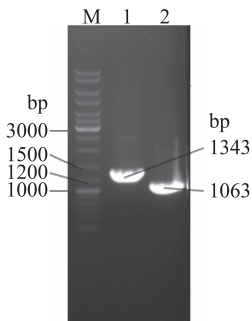


图2 大肠杆菌MT-01吸收系统mtr基因敲除的PCR分析

Fig.2 PCR analysis of mtr knockout of L-Trp uptake system in *E.coli* MT-01

注:Lane 1:mtr_v1→k1;Lane 2:k2→mtr_v2。

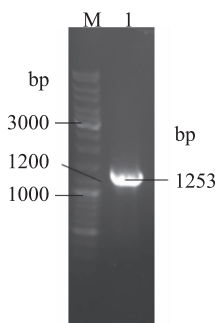


图3 消除mtr敲除菌中kan抗性基因的PCR验证

Fig.3 PCR verification of the elimination of Kan-resistant gene of mtr knockout mutant

注:Lane 1:mtr_v1→mtr_v2。

2.2 mtr基因敲除菌的分批补料发酵

将含有色氨酸合成关键酶基因的质粒pTrp-01转化至mtr基因敲除菌中,构建色氨酸基因工程菌

E.coli MT-11/pTrp-01。

在5 L发酵罐中对mtr基因敲除菌*E.coli* MT-11/pTrp-01及出发菌株*E.coli* MT-01/pTrp-01进行了补料分批发酵实验。在色氨酸生产方面,菌株*E.coli* MT-11/pTrp-01的发酵液中最高可以积累35.87 g/L色氨酸,与出发菌株*E.coli* MT-01/pTrp-01相比提高了32%。研究结果表明色氨酸转运系统mtr基因的敲除对菌体发酵生产色氨酸是有利的。此外,如图4所示,发酵罐中菌株*E.coli* MT-01/pTrp-01与*E.coli* MT-11/pTrp-01的菌体生长水平相仿,说明基因mtr的敲除并没有影响菌株的生长。

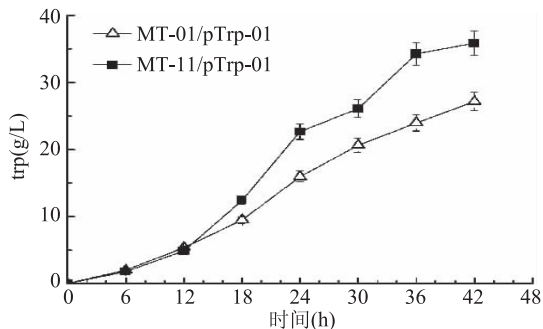
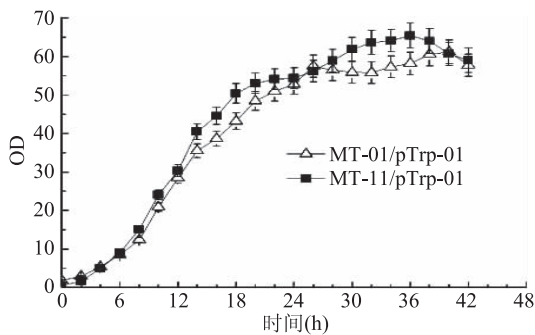


图4 mtr敲除菌产L-色氨酸情况

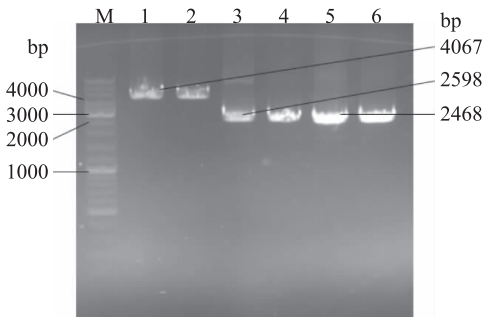
Fig.4 The L-tryptophan yield of gene mtr deletion mutant

2.3 yddG过表达基因工程菌的构建

将PCR获得的yddG片段,与pMD19-T载体连接后送测序,测序结果证明,yddG片段序列正确。经过酶切酶连、转化、PCR验证和测序验证等过程,将基因yddG重组到质粒pACYC177上,获得重组质粒pACYC177-Pr-yddG,pACYC177-Ptac-yddG和pACYC177-PserA-yddG,分别将重组质粒pACYC177-Pr-yddG,pACYC177-Ptac-yddG与pACYC177-PserA-yddG通过电转化的方式转化至大肠杆菌MT-11/pTrp01中,在氨苄与四环素双抗平板上挑取单菌落于5 mL LB液体培养基,过夜,取菌液,使用

图5 *mtr* 敲除菌生长情况Fig.5 The cell growth of gene *mtr* deletion mutant

质粒小量制备试剂盒抽提质粒,分别以所提质粒为模板,使用验证引物 177-F 和 177-R 进行 PCR 扩增,经过序列分析,应分别得到大小为 4067, 2468, 2598 bp 的条带,通过 DNA 电泳,所得条带与理论值相符合,将 PCR 片段送至公司测序,测序结果证明 pACYC177-Pr-*yddG*, pACYC177-Ptac-*yddG* 与 pACYC177-PserA-*yddG* 皆转化成功,分别得到基因工程菌 MT-11/pTrp01/pACYC177-Pr-*yddG*, MT-11/pTrp01/pACYC177-Ptac-*yddG* 和 MT-11/pTrp01/pACYC177-PserA-*yddG*, 分别记为 MT-21, MT-22 和 MT-23。

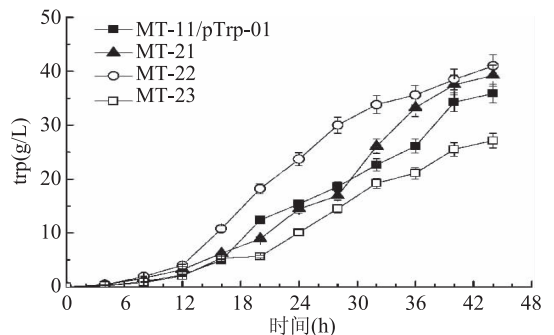
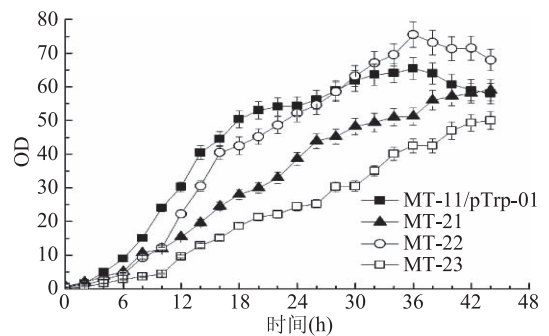
图6 大肠杆菌分泌系统 *yddG* 基因过表达的 PCR 分析Fig.6 PCR analysis of *yddG* overexpression of L-Trp secretory system.

注:1,2:177-F→177-R pACYC177-Pr-*yddG*;
3,4:177-F→177-R pACYC177-PserA-*yddG*;
5,6:177-F→177-R pACYC177-Ptac-*yddG*。

2.4 *yddG* 基因工程菌的发酵

在 5 L 发酵罐中对 *yddG* 过表达菌株 (MT-21, MT-22 和 MT-23) 以及 *mtr* 基因敲除菌 *E.coli* MT-11/pTrp-01 进行了补料分批发酵实验。如图 7 所示,三株 *yddG* 基因工程菌生产色氨酸的能力不尽相同,在 tac 启动子调控下的 *yddG* 过表达菌株 MT-22 生产色氨酸的能力最强,产量达到了 41.01 g/L,比 *mtr* 敲除菌株 *E.coli* MT-11/pTrp-01 的产量提高了 14.3%;当采用 Pr 启动子时发酵液中最高可以积累 39.22 g/L 色氨酸,与 *mtr* 敲除菌株 *E.coli* MT-11/pTrp-01 的产量相比提高了 9.3%;在基因 *serA* 天然启动子调控下的 *yddG* 过表达菌株 MT-23 的产量较低产量只有 27.1 g/L,比 *mtr* 敲除菌株 *E.coli* MT-11/pTrp-01 产量相比减少了 24%,此外,从菌株的生长情况来看,如图 8 所示,在 tac 启动子调控下的 *yddG*

过表达菌株的生长与 *mtr* 基因敲除菌 *E.coli* MT-11/pTrp-01 相比必无较大差距,而 Pr 启动子调控下的 *yddG* 过表达菌株在 36 h 前的生长要弱于 *E.coli* MT-11/pTrp-01,但采用基因 *serA* 天然启动子的生长则受到了严重的影响。*serA* 启动子调控下的 *yddG* 过表达菌株的色氨酸产量较低,因为菌株 MT-23 的生长状况弱于其他两种 *yddG* 过表达菌株,生长状况的差异可能主要归因于三种启动子自身的性质不同,三种不同启动子调控下的 *yddG* 的转录水平存在差异,可能影响了菌株自身的代谢,进而影响菌株的生长及色氨酸的生产,具体机理还需进一步实验进行验证;此外,Pr 启动子为温敏型启动子,因此 Pr 启动子调控下的 *yddG* 过表达菌株的发酵方式也与其他两种启动子调控下的菌株存在不同,采用 Pr 启动子时,初始发酵温度为 32 °C,当菌株 OD 达到 20 以上时才将发酵温度提高至 35 °C,而其他两种启动子的发酵过程中温度一直保持在 35 °C,因此菌株在前期的生长不如 *mtr* 基因敲除菌,后期当温度提高后,生长逐渐与 *mtr* 基因敲除菌趋同。

图7 *yddG* 过表达菌株产 L-色氨酸情况Fig.7 The L-tryptophan yield of gene *yddG* overexpression mutants图8 *yddG* 过表达菌株生长情况Fig.8 The cell growth of gene *yddG* overexpression mutants

3 讨论与结论

在色氨酸合成途径得到充分改造之后,色氨酸转运途径工程同样获得了研究者的广泛关注。与其它研究相比,本研究出发菌株 *E.coli* MT-01/pTrp-01 的宿主经历了多轮的物理化学诱变,其基因组上存在众多的随机突变位点,本研究尝试考察在这种独特基因组背景下,转运系统改造对菌株生长和产 L-色氨酸的影响。基因组信息表明,出发菌株基因组上的 *tnaB* 基因已经发生了多数序列缺失突变;而

前期实验发现菌株 *E.coli* MT-01/pTrp-01 在发酵过程中会少量积累 *L*-苯丙氨酸和 *L*-酪氨酸, 这种情况下 Arop 透酶将优先吸收 *L*-苯丙氨酸和 *L*-酪氨酸, 因此本研究着重研究了吸收基因 *mtr* 敲除以及分泌基因 *yddG* 过表达对菌体生长和产酸的影响。结果表明, *mtr* 基因的敲除可以使菌株 *L*-色氨酸产量提高 32%; 此外, 本研究还首次考察了不同启动子调控下分泌基因 *yddG* 过量表达对菌株 *L*-色氨酸产量的影响, 发现当采用 *tac* 启动子时最有利于菌株积累 *L*-色氨酸, 而当采用基因 *serA* 天然启动子时, 菌体的产酸能力最差, 且菌体的生长也受到了影响。上述结果表明, 吸收基因 *mtr* 敲除还是大幅提升了菌株产 *L*-色氨酸的能力; 而分泌基因 *yddG* 因启动子不同而导致转录强度存在差异时, 菌体的产 *L*-色氨酸能力以及生长能力同样表现出较大差异性^[16]。

参考文献

- [1] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives; current status and prospects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69(1):1-8.
- [2] Bongaerts J, Mer M K, Müller U, et al. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds[J]. Metabolic Engineering, 2001.
- [3] Zhao Z, Zou C, Zhu Y, et al. Development of *L*-tryptophan production strains by defined genetic modification in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(12):1921-1929.
- [4] Liu L, Duan X, Wu J. *L*-tryptophan production in *Escherichia coli* improved by weakening the *pta*-*ackA* pathway[J]. PLOS ONE, 2016, 11(6):e158200.
- [5] Chen L, Zeng A. Rational design and metabolic analysis of *Escherichia coli* for effective production of *L*-tryptophan at high concentration[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(2):559-568.
- [6] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing *L*-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69(6):615-626.
- [7] Rodriguez A, Martinez J A, Flores N, et al. Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds[J]. Microbial Cell Factories, 2014.
- [8] Lee K H, Park J H, Kim T Y, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for *L*-threonine production[J]. Mol Syst Biol, 2007, 3:149.
- [9] Park J H, Lee K H, Kim T Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of *L*-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(19):7797-7802.

(上接第 156 页)

- 能性分析[J].中国食品学报, 2013(4):219-224.
- [22] 左茜, 张士康, 王彬, 等. 乳酸菌发酵法制备茶渣可溶性膳食纤维的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5):138-141.

- [10] 崔云凤, 石斌超, 李晶, 等. 大肠杆菌丝氨酸转运系统单基因敲除对丝氨酸生产的影响[J]. 食品工业科技, 2016(14):191-195.
- [11] 梁媛, 杨书尧, 刘宏亮, 等. 大肠杆菌转运蛋白 SstT 和 RhtC 的改造对 *L*-苏氨酸产量的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 4(4):99-103.
- [12] Doroshenko, Airich V, Vitushkina L, et al. *yddG* from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids[J]. Fems Microbiology Letters, 2007.
- [13] Liu Q, Cheng Y, Xie X, et al. Modification of tryptophan transport system and its impact on production of *L*-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2012.
- [14] Wang J, Cheng L K, Wang J, et al. Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of *L*-tryptophan [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013.
- [15] Ikeda M, Katsumata R. Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1995.
- [16] Zhao Z, Chen S, Wu D, et al. Effect of gene knockouts of *L*-tryptophan uptake system on the production of *L*-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2012.
- [17] Gu P, Yang F, Kang J, et al. One-step of tryptophan attenuator inactivation and promoter swapping to improve the production of *L*-tryptophan in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1):30.
- [18] Gu P, Yang F, Li F, et al. Knocking out analysis of tryptophan permeases in *Escherichia coli* for improving *L*-tryptophan production. [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(15):6677-6683.
- [19] Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection[J]. Molecular Systems Biology, 2006, 2:2006-2008.
- [20] 董洪亮, 韩先干, 白灏, 等. λ pL/pR-cl857 温控系统的改造及其对大肠杆菌菌液制备的影响[J]. 生物工程学报, 2012(12):1423-1430.
- [21] 周丽, 邓璨, 崔文璟, 等. 温度调节基因开关调控大肠杆菌发酵合成 *L*-丙氨酸[J]. 微生物学通报, 2015(11):2272-2281.
- [22] 张大军, 冯博, 皇甫永穆. 双 *Tac* 启动子的构建及其对入白细胞介素 2 在大肠杆菌中表达的影响[J]. 同济医科大学学报, 1993(4):226-229.
- [23] 唐玮, 李键, 陈军, 等. 大肠杆菌异源生产丁醇途径组装及启动子优化[J]. 生物工程学报, 2012(11):1328-1336.
- [24] 张雪, 温廷益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2008(12):89-93.
- [25] 张绪梅, 郭长江, 刘云, 等. 大肠杆菌 *trpBA* 基因的克隆表达[J]. 生物技术通讯, 2006(1):12-14.
- [26] 郑丽娟, 陈少云, 徐刚, 等. 利用双启动子载体构建产异丁醇大肠杆菌[J]. 中国生物工程杂志, 2013(8):66-72.

- [23] 吴荣荣, 马静, 裴家伟, 等. 保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌相互作用的研究[J]. 中国乳品工业, 2003(4):9-13.
- [24] 申瑞玲, 王英. 膳食纤维的改性及其对功能特性的影响[J]. 农产品加工: 学刊, 2009(3):17-20.