

抗反馈抑制的天冬氨酸激酶基因在钝齿棒杆菌中的表达

赵 智 刘阳剑 王 宇 张英姿 丁久元*

(中国科学院微生物研究所微生物生物技术中心 北京 100080)

摘 要 将来自钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*) CD945 具有 AEC 抗性的天冬氨酸激酶(AK^{fbr})基因克隆到穿梭载体 pJC1 上,构建重组质粒 pLY153。用电击法将质粒 pLY153 转化到野生型菌株 *C. crenatum* AS1.542 及其突变株 *C. crenatum* CD945 中。携带 AK^{fbr} 基因的 *C. crenatum* AS1.542 菌株能抗浓度皆为 12mg/mL 的 AEC 和苏氨酸。 AK^{fbr} 基因在 *C. crenatum* CD945 中得到表达,天冬氨酸激酶活性提高 4 倍。摇瓶发酵实验结果表明,重组菌在对数前期和中期生长正常,不受抑制;与对照菌相比,赖氨酸终产量提高 22%,赖氨酸生产率提高 23%。

关键词 钝齿棒杆菌,天冬氨酸激酶,赖氨酸

中图分类号 :Q786 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2005)04-0530-04

自 1957 年 Kinoshita 等^[1]从土壤中分离到谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)用于生产谷氨酸以来,人们对利用棒杆菌发酵生产氨基酸进行了广泛的研究。由于赖氨酸是人和动物的第一必需氨基酸,在医药、食品、饲料等领域有着广泛的用途,因此利用棒杆菌发酵生产 L-赖氨酸一直是该领域研究的热点之一。天冬氨酸激酶作为赖氨酸生物合成途径中第一个关键酶,对产物积累有至关重要的作用,其活性受途径末端产物赖氨酸和苏氨酸协同反馈抑制^[2]。在细胞内,赖氨酸的结构类似物 S(α -氨基乙基)-D,L-半胱氨酸(AEC)可与 L-苏氨酸协同反馈抑制天冬氨酸激酶活性。因此通过筛选抗 AEC 的菌株,可以得到解除对天冬氨酸激酶反馈抑制的突变株,从而提高天冬氨酸激酶活性,增加产物赖氨酸

的积累。

C. crenatum AS1.542 是我国研究者自行分离得到的棒杆菌,钝齿状,不产芽孢。其突变株 *C. crenatum* CD945 为高丝氨酸缺陷型,具有 AEC 抗性,可积累 L-赖氨酸。本实验室已报道了 *C. crenatum* CD945 天冬氨酸激酶(AK^{fbr})基因的 DNA 序列和该酶在基因水平上的抗反馈抑制机理^[3]。本文报道 AK^{fbr} 基因在 *C. crenatum* AS1.542 和 *C. crenatum* CD945 中的表达,及 AK^{fbr} 基因的表达对重组菌生长和产物赖氨酸积累的影响。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本试验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 实验所用的菌株和质粒

Table 1 The bacteria and plasmids used in this work

Strains or plasmids	Characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	ϕ 80 <i>lacZ</i> ΔM15	This lab
<i>C. crenatum</i>		
AS1.542	Wild type	This lab
CD945	AEC ^{res} , <i>hom</i> ⁻	This lab
Plasmid		
pJC1	6.1kb, shuttle-vector, Km ^r	[4]
pLY152	4.2kb, containing PCR fragment of AK^{fbr} gene in T-vector	[3]
pLY153	7.3kb, containing AK^{fbr} gene in pJC1	This study

* AEC : S(α -Aminoethyl)-D,L-cysteine ; ^{res} fbr : Feed-back resistance.

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-62554588 ; E-mail : dingjy@sun.im.ac.cn

作者简介 赵 智(1978 -),女,吉林人,硕士研究生,主要从事氨基酸代谢研究。E-mail :zyuz02@yahoo.com.cn

其他作者 曹 芹,郝 宁

收稿日期 2004-11-25,修回日期 2005-04-15

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 培养基:LB 培养基用于细菌培养;LB 培养基中加入 4% 甘氨酸^[4]用于制备电击转化用棒杆菌细胞;AEC 抗性检测用合成培养基^[5],每升含葡萄糖 10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g, K_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02g, 生物素 60 μg , 硫胺素 100 μg , 琼脂粉 13g。种子培养基和用于培养细胞制备粗酶液的培养基^[6],每升含葡萄糖 20g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, K_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 0.5g, CaCO_3 9g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02g, Yeast extract 1g, 生物素、硫胺素各 400 μg , 调 pH 7.0。发酵培养基,每升含葡萄糖 40g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20g, CaCO_3 30g, 其它成分同种子培养基。

1.2.2 培养条件:大肠杆菌在 37℃ 培养,棒杆菌在 30℃ 培养。抗生素的使用浓度为:氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 DNA 操作

大肠杆菌质粒提取、酶切、电泳和转化均参照文献^[7]进行。棒杆菌质粒提取采用改进碱法^[8],棒杆菌 DNA 转化采用电击转化法^[4,9]。

1.4 天冬氨酸激酶活性测定

1.4.1 粗酶液的制备^[10]:将活化后的 *C. crenatum* CD945 于 30℃ 摇床培养 7~9h,离心收集细胞,用 100mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 洗涤两遍,悬浮。超声波破碎细胞,离心取上清液用于测定。

1.4.2 天冬氨酸激酶活性测定^[9]:0.5mL 反应体系含 400mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1mmol/L DTT, 100mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 40mmol/L ATP, 20mmol/L MgCl_2 , 300mmol/L L-Asp, 400mmol/L $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, 适量的粗酶液,混匀后,37℃ 反应 30min,加入 0.75mL 反应终止液,终止液为 10% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -3.3% 三氯乙酸-0.7mol/L HCl;离心,取上清液测定光吸收值 A_{540} 。对照为不加底物天冬氨酸的反应液。一个酶活力单位(U)定义为:反应体系中每分钟催化形成 1nmol 天冬氨酰肼氨酸所需的酶量。

1.4.3 粗酶液中蛋白测定:采用考马斯亮蓝法^[11]。

1.5 发酵试验

将经过适当培养的种子液接入发酵培养基中,于 30℃ 摇床培养,定时取适量发酵液进行分析。在波长 600nm 下测定菌体生长,酸性茚三酮法测定发酵液中赖氨酸含量^[12];DNS 法测定发酵液中糖含量^[13]。发酵实验重复 3 次。

1.6 质粒稳定性测定

从发酵摇瓶中吸取一定量的混合均匀的发酵液,用生理盐水稀释到合适的浓度,取适量涂布到 LB 平板上,于 30℃ 培养 24h。挑取单菌落到不含抗性的 LB 平板上和含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素抗性的 LB 平板上,培养 24h,计数。质粒保持率定义为在抗性平板上长出菌落数与在非抗性平板上长出菌落数的百分比值。每一试验随机挑取菌落数大于 100 个。

2 结果和讨论

2.1 携带抗反馈抑制天冬氨酸激酶(AK^{thr})基因的重组质粒的构建

以 *C. crenatum* CD945 菌株染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物与 pMD18-T Vector 相连,转化 *E. coli* DH5 α 得到阳性克隆 pLY152^[3]。从质粒 pLY152 上用 *Bam*H I 和 *Bst*E II 双酶切下 AK^{thr} 基因,凝胶电泳回收后,连接到穿梭载体 pJC1 的 *Bgl* II - *Bst*E II 大片段上,转化 *E. coli* DH5 α 。对 *E. coli* DH5 α 中的重组质粒进行酶切图谱分析,结果与预期一致。将该重组质粒命名为 pLY153。质粒 pLY153 经电击转化到 *C. crenatum* AS1.542 和 *C. crenatum* CD945 中。对得到的 *C. crenatum* 转化子中的质粒进行酶切鉴定,结果亦与预期一致,为 pLY153。

2.2 重组菌株的 AEC 抗性

将 *C. crenatum* AS1.542 和带有空载体 pJC1 或质粒 pLY153 的重组菌 *C. crenatum* AS1.542 分别接种到不含(图 1-A)或含有(图 1-B 和图 1-C)一定量 AEC 和苏氨酸的抗性检测培养基上,30℃ 培养 24h。

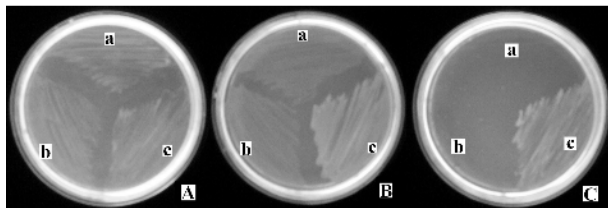


图 1 AEC 抗性实验

Fig.1 Detection of AEC-resistant ability

A: Defined medium; B: Defined medium containing 5mg/mL both of AEC and L-threonine respectively; C: Defined medium containing 12mg/mL both of AEC and L-threonine respectively.

a: *C. crenatum* AS1.542; b: *C. crenatum* AS1.542 harboring pJC1; c: *C. crenatum* AS1.542 harboring pLY153.

C. crenatum AS1.542 是野生型菌株,可以在抗性检测培养基上良好生长(图 1-A);当在培养基中补加少量 AEC 和苏氨酸时(图 1-B),*C. crenatum* AS1.542 和带有空载体的 *C. crenatum* AS1.542 仍可

以生长,但与带有质粒 pLY153 的 *C. crenatum* AS1.542 相比,生长较弱;当 AEC 和苏氨酸浓度达到 12mg/mL 时(图 1-C),*C. crenatum* AS1.542 和带有空载体的 *C. crenatum* AS1.542 不能生长,而带有质粒 pLY153 的 *C. crenatum* AS1.542 仍生长良好。由此推断质粒 pLY153 上的外源基因(*ak^{thr}*)赋予了 *C. crenatum* AS1.542 具有抗高浓度 AEC 和苏氨酸协同反馈抑制的特性。这直接证明了从 *C. crenatum* CD945 上克隆到的 *AK^{thr}* 基因是具有 AEC 抗性的天冬氨酸激酶基因。

2.3 天冬氨酸激酶活性的测定

将 *C. crenatum* CD945 培养至对数中期,收获细胞,超声波破碎后,离心取上清液检测天冬氨酸激酶活性。结果表明,*C. crenatum* CD945 和携有空载体 pJC1 的 *C. crenatum* CD945 的天冬氨酸激酶活性差别不大,分别为 45 U/mg 蛋白和 43 U/mg 蛋白;而带有质粒 pLY153 的 *C. crenatum* CD945 天冬氨酸激酶活性为 239U/mg 蛋白。与对照菌相比,带有质粒 pLY153 的 *C. crenatum* CD945 天冬氨酸激酶活性提高了 4 倍。此结果表明,质粒 pLY153 携带的 *AK^{thr}* 基因能在 *C. crenatum* CD945 中有效表达。

到目前为止,很多研究者将天冬氨酸激酶基因转入不同的棒杆菌中进行表达,酶活性提高 4~28 倍不等^[14~19],如 Cremer 等^[14]在 *C. glutamicum* ATCC13032 和 *C. glutamicum* DG52-5 中表达,酶活分别提高 19 倍和 28 倍。本试验酶活提高了 4 倍,一方面可能与 *C. crenatum* CD945 具体生理特性以及所用载体的特性相关;另一方面可能与 *C. crenatum* CD945 天冬氨酸激酶基因的启动子上游序列和其它菌株来源的该基因启动子上游序列有很大差异有关,*C. crenatum* CD945AK 基因的启动子上游序列富含 GC,而其它棒杆菌如 *C. glutamicum*、*C. flavum* N13、*B. flavum* 的启动子上游序列则富含 AT^[3]。

2.4 过表达天冬氨酸激酶(*AK^{thr}*)基因对生长和 L-赖氨酸积累的影响

为研究抗反馈抑制天冬氨酸激酶活性的增加对重组菌株 *C. crenatum* CD945 的生长和 L-赖氨酸生产的影响,我们进行了摇瓶发酵试验,并对携有 *AK^{thr}* 基因的质粒 pLY153 进行了质粒稳定性测定。发酵结果表明,在对数生长中期以前携有 *AK^{thr}* 基因的 *C. crenatum* CD945 的生长与产酸情况与对照菌相似,而在对数生长后期,对照菌利用葡萄糖同时进行生长和产酸,但是携有 *AK^{thr}* 基因的 *C. crenatum*

CD945 主要将葡萄糖用于产物合成(图 2-A、B)。带有 *AK^{thr}* 基因的 *C. crenatum* CD945 L-赖氨酸终产量为 9.5g/L(图 2-B),与对照菌相比,产量提高 22%,生产率提高 23%(表 2)。质粒稳定性的试验结果表明,发酵进行到 36h 和 60h 时,质粒保持率分别为 92% 和 86%。

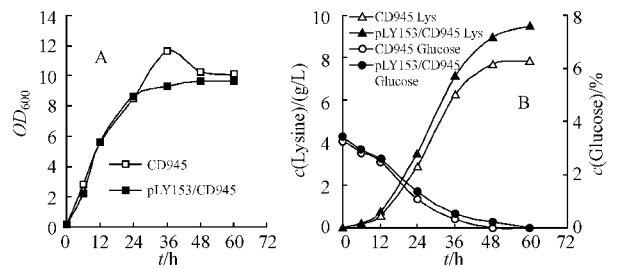


图 2 L-赖氨酸发酵过程
Fig.2 Time course of fermentation of L-lysine
A : The cell growth profiles of different strains ; B : The lysine production and glucose consumption profiles of different strains.

表 2 不同菌株 L-赖氨酸生产		
Table 2 L-lysine production of different strains		
Strain/Plasmid	Maximum L-lysine production(g/L)	L-lysine productivity (g/L·h)
CD945	7.8	0.13
CD945/pLY153	9.5	0.16

Hua 等^[19]曾报道能够过量表达天冬氨酸激酶的重组菌在合成培养基中培养,赖氨酸产量提高,但生长受到影响(减弱);Jetten 等^[17]的研究结果与其相似,而 Koffas 等^[18]的工作表明重组菌不能在以葡萄糖为碳源的合成培养基上生长。综合以上结果,Koffas 等^[18]认为这可能是由于较高的天冬氨酸激酶活性与回补途径中回补酶的活性不平衡造成的。本文结果表明,重组菌株的生长在对数中期以前并未受到明显影响,且最终菌体生物量与对照菌相似,而产物对底物的转化率明显高于对照菌,这无疑是有益的。此结果一方面可能与 *C. crenatum* CD945 自身的生理特性有关,另一方面也可能是由于 *C. crenatum* CD945 具有较高的回补酶活性。对 *C. crenatum* CD945 回补酶活性的相关研究正在进行中。重组菌株的发酵试验结果表明,质粒保持率在 90% 左右,因此可以采用更稳定的表达载体或其它手段如将基因整合到染色体上等方法,以实现天冬氨酸激酶稳定的高水平表达,从而提高菌株的产酸水平。

与目前赖氨酸工业发酵的水平相比,本工作中赖氨酸积累水平相对较低,但是前者是在对发酵过程进行充分优化的条件下达到的。本工作进行的探

索,为菌种改良并在工业规模上提高赖氨酸的生产率提供了可能。

参 考 文 献

- [1] Kinoshita S , Udaoka S , Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* , 1957 , **3** :193.
- [2] Shioo I , Miyajima R. Concerted inhibition and its reversal by end-products of aspartokinase in *Brevibacterium flavum*. *J Biochem* , 1969 , **65** :849 – 855.
- [3] 刘阳剑,张英姿,王 绛,等.钝齿棒杆菌天冬氨酸激酶基因的克隆和序列分析.微生物学报,2002,**42**(4):395 – 399.
- [4] Cremer J , Eggeling L , Sahn H. Cloning of the *dapA dapB* cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet* , 1990 , **220** :478 – 480.
- [5] 沈天翔,那淑敏,肖文中,等.棒状类细菌电击转化中多种条件对转化效率的影响.生物工程学报,1995,**11**(3):245 – 249.
- [6] 陈 琦,李玲阁.产L-谷氨酸细菌AS1542菌株的研究,Ⅱ钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)AS1542的生长必需因子与积累L-谷氨酸的关系.微生物学报,1976,**16**(1):37 – 40.
- [7] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T.分子克隆实验指南.金冬雁,黎孟枫,等译.第二版.北京:科学出版社,1996.
- [8] 沈天翔,贾盘兴,那淑敏,等.质粒pXZ10145核苷酸序列测定和分析.生物工程学报,1993,**9**(3):216 – 222.
- [9] Thierbach G , Halinoski J , Bachmann B. Cloning of a DNA fragment from *Corynebacterium glutamicum* conferring aminoethyl cysteine resistance and feedback resistance to aspartokinase. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1990 , **32** :443 – 448.

- [10] O'Regan M , Thierbach G , Bachmann B. Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenol pyruvate carboxylase coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Gene* , 1989 , **77** :237 – 251.
- [11] Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* , 1976 , **72** :248 – 254.
- [12] 石渡昭男. 特许公报 昭和 50-20874, 1975.
- [13] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术.第二版.北京:高等教育出版社,1997.
- [14] Cremer J , Eggeling L , Sahn H. Control of the lysine biosynthetic sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl Environ Microbiol* , 1991 , **57** :1746 – 1752.
- [15] Lu J , Chen J , Liao C. Molecular breeding of a *Brevibacterium flavum* L-lysine producer using a cloned aspartokinase gene. *Biotechnol Lett* , 1994 , **16**(5):449 – 454.
- [16] Kalinowski J , Crème J , Bachmann B , et al. Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* , 1991 , **5** :1197 – 1204.
- [17] Jetten M , Follettie M , Sinskey A. Effect of different levels of aspartokinase on the lysine production of *Corynebacterium lactofermentum*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1995 , **41** :76 – 82.
- [18] Koffas M A , Jung G Y , Stephanopoulos G. Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression. *Metab Eng* , 2003 , **5**(1):32 – 41.
- [19] Qiang H , Chen Y , Kazuyuki S. Metabolic control analysis for lysine synthesis using *Corynebacterium glutamicum* and experimental verification. *J Biosci Bioeng* , 2000 , **90**(2):184 – 192.

Expression of feedback-resistant aspartate kinase gene in *Corynebacterium crenatum*

ZHAO Zhi LIU Yang-jian WANG Yu ZHANG Ying-zi DING Jiu-yuan*

(Microbial Biotechnology Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract : The AEC-resistant aspartate kinase gene from *C. crenatum* CD945 was cloned into vector pJC1. Its expression was investigated both in the wild type *C. crenatum* AS1.542 and its mutant *C. crenatum* CD945. The result showed that *C. crenatum* AS1.542 harboring AK^{thr} gene could grow on the defined medium with the co-existence of 12mg/mL both of AEC and L-threonine respectively. Overexpression of AK^{thr} gene in *C. crenatum* CD945 results in a 4-fold increase of specific enzyme activity than the parental strain. The amplification of the activity of aspartate kinase yields 22% increase of L-lysine production and 23% increase of L-lysine productivity without affecting the growth rate.

Key words : *Corynebacterium crenatum* , Aspartate kinase , L-Lysine

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-62554588 ; E-mail : dingjy@sun.im.ac.cn

Other authors : CAO Qin , HAO Ning

Received date : 11-25-2004