

# 钝齿棒杆菌 N-乙酰谷氨酸激酶基因的克隆、序列分析及表达

郝 宁<sup>1,2</sup> 赵 智<sup>1</sup> 王 宇<sup>1</sup> 张英姿<sup>1</sup> 丁久元<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup>中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘 要** :以钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)野生株 AS 1.542 及产精氨酸突变株 971.1 的基因组为模板,用 PCR 方法扩增出 N-乙酰谷氨酸激酶基因(*argB*)片段。核酸序列分析结果表明,该片段全长 1505bp,包含一个 ORF,推测此 ORF 区编码一条 317 个氨基酸的多肽,分子量为 33.6kDa。*C. crenatum* 野生株 AS 1.542 与突变株 971.1 的 *argB* 基因序列比较,发现只在结构区有一个核苷酸的差别但没有引起氨基酸变化。野生株 AS 1.542 *argB* 基因的编码区核苷酸序列与 *C. glutamicum* ATCC 13032、*Corynebacterium efficiens* YS-314 和 *Escherichia coli* k12 的同源性分别是 99.89%、76.62% 和 37.94%,而氨基酸同源性分别是 100%、78.55% 和 25.25%。在 *C. crenatum argB* 基因上游存在启动子区域。经 IPTG 诱导该基因在棒杆菌中得到有效表达,野生株 AS 1.542 为宿主的重组子酶活明显提高。突变株 971.1 为宿主的重组菌酶活提高一倍,精氨酸积累提高约 25%。

**关键词** :钝齿棒杆菌 ;N-乙酰谷氨酸激酶 ;克隆 ;表达

中图分类号 :Q78 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2006)01-0090-05

L-精氨酸(L-Arginine)是一种具有胍基的碱性氨基酸,为谷氨酸族氨基酸。作为一种半必需氨基酸,对于某些幼年动物,L-精氨酸是其达到最佳生长所必需的,作为尿素循环的中间体,L-精氨酸在肝内参与尿素生成过程,在机体的物质代谢方面起着重要的作用。随着精氨酸-一氧化氮(NO)途径在临床上研究的不断深入,发现L-精氨酸还具有抗动脉粥样硬化、防治高血压及心力衰竭等作用<sup>[1]</sup>。

N-乙酰谷氨酸激酶(N-Acetylglutamate kinase EC 2.7.2.8 NAGK)是精氨酸合成途径的第二个酶。L-精氨酸的合成是由谷氨酸开始的,其合成途径分为线性途径和经济循环途径两种。大肠杆菌<sup>[2]</sup>(*Escherichia coli*)、古菌硫化裂片菌<sup>[3]</sup>(*Sulfolobus solfataricus*)等采用线性途径,催化第一步反应的乙酰谷氨酸合成酶受到终产物精氨酸的反馈抑制<sup>[4]</sup>。而谷氨酸棒杆菌<sup>[5]</sup>(*Corynebacterium glutamicum*)、奈瑟氏淋球菌<sup>[6]</sup>(*Neisseria gonorrhoeae*)等采用经济循环途径合成精氨酸,催化第二步反应的NAGK受到精氨酸的反馈抑制和反馈阻遏,是其合成途径的关键酶<sup>[5]</sup>。

钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)是我国研究者分离到的一种钝齿状、无芽孢的革兰氏阳性菌<sup>[7]</sup>,其突变株在国内氨基酸生产中广泛应用,但对其生理学和生物化学的研究还比较少。本文首次报

道了产精氨酸钝齿棒杆菌 971.1<sup>[8]</sup>的 NAGK 的基因序列,并对其积累精氨酸的原因进行初步分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** :本试验所用菌株和质粒见表 1。  
**1.1.2 仪器和试剂** :所有分子生物学试剂包括 *LA Taq* DNA 聚合酶、内切酶和 DNA 连接酶等均购自 TaKaRa 公司;生化药品为进口或国产分析纯试剂;基因扩增仪为 MJ 公司产品;BIO-RAD MicroPulser<sup>TM</sup> 电击仪;721 分光光度计及 BeckmanDU-7 紫外分光光度计。

### 1.2 培养基和培养条件

LB 培养基<sup>[11]</sup>用于细菌培养。LB 培养基中加入 4% 甘氨酸<sup>[12]</sup>用于电击转化用棒杆菌的培养。LB 培养基加入 1% 的葡萄糖作为酶活测定用菌体培养的种子培养基。基本培养基 I<sup>[13]</sup>用于带 *argB* 基因的重组菌株筛选。基本培养基 II 和基本培养基 III<sup>[14]</sup>用于精氨酸对 N-乙酰谷氨酸激酶的反馈阻遏实验及重组棒杆菌发酵实验。抗生素使用浓度分别为氯霉素 100 $\mu$ g/mL,卡那霉素 50 $\mu$ g/mL,氯霉素 10 $\mu$ g/mL。大肠杆菌在 37 $^{\circ}$ C 培养,钝齿棒杆菌在 30 $^{\circ}$ C 培养。

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

作者简介 郝 宁(1979 - )男,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向为氨基酸代谢工程。E-mail : haoning@mails.gucas.ac.cn

其他作者 曹 芹<sup>1,2</sup>

收稿日期 2005-05-23 ;接受日期 2005-06-15 ;修回日期 2005-11-16

表 1 菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this work

Strain and plasmid	Characteristics	Source
Strain		
<i>E. coli</i>		
MA1013	<i>lacZ</i> ( $\lambda$ F $\phi$ ), <i>relA1</i> , <i>argB62</i> , <i>thi-1</i>	<i>E. coli</i> Stock center, Yale university
<i>Corynebacteria</i>		
<i>Corynebacterium crenatum</i> AS 1.542	Wild type	Stored in this lab
<i>Corynebacterium crenatum</i> 971.1	<i>His</i> <sup>-</sup> <i>SG</i> <sup>R</sup>	Stored in this lab
Plasmid		
pMD18-T	T-vector, 2.7kb, Amp <sup>R</sup> , <i>lacZ</i>	TaKaRa
pJC1	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector, Km <sup>R</sup>	Cremer, et al. <sup>[9]</sup>
pXMJ19	<i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> shuttle vector, <i>plac</i> , <i>lacI</i> <sup>P</sup> , Cm <sup>R</sup>	Jakoby MJ <sup>[10]</sup>
pHK1	1.5kb PCR fragment containing AS 1.542 <i>argB</i> gene in pMD18-T	This study
pHK3	1.5kb PCR fragment containing 971.1 <i>argB</i> gene in pMD18-T	This study
pJK1	1.5kb fragment containing AS 1.542 <i>argB</i> gene in pJC1	This study
pJK3	1.5kb fragment containing 971.1 <i>argB</i> gene in pJC1	This study
pHSK1	1.0kb PCR fragment containing AS 1.542 <i>argB</i> gene in pMD18-T	This study
pXSK1	1.0kb fragment containing AS 1.542 <i>argB</i> gene in pXMJ19	This study

### 1.3 DNA 操作

大肠杆菌 DNA 操作参照文献 [11] 棒杆菌 DNA 操作参照文献 [12, 15]。大肠杆菌转化采用 CaCl<sub>2</sub> 法, 棒杆菌采用电击转化。

### 1.4 PCR 扩增

根据同源性, 参考 *C. glutamicum* ATCC 13032 *argB* 基因序列 (GenBank No. X86157), 设计以下特异引物: P1: 5'-TTGGATCCTATCGCAGCGAAGCTTCAG-3'; P2: 5'-GGCCAAGCTTACAGCCATGAATCAC-3'; P3: 5'-TCTCTAGACATCAGTGACGGTTGCG-3'。下划线处依次为 *Bam*H I、*Hind* III、*Xba* I 酶切位点。引物对 P1/P2 用于扩增 *C. crenatum* AS 1.542 和 971.1 *argB* 结构基因及两侧部分序列; 引物对 P1/P3 用于扩增 *C. crenatum* AS 1.542 *argB* 结构基因及下游部分序列。扩增条件: 94°C 3min, 94°C 40s, 56°C 1min, 72°C 2min, 共 30 个循环, 72°C 10min。

### 1.5 引物合成及序列测定

引物合成由奥科公司完成。DNA 序列测定由上海博亚公司完成。引物设计用 Primer Premier 5.0。DNA 及蛋白序列分析采用 DNAMAN 5.0。

### 1.6 NAGK 活性测定

**1.6.1 粗酶液制备:** 将 *C. crenatum* 接于种子培养基 30°C 摇床培养 18h 后, 接种于 LB 培养基, 培养 9h 后离心收集菌体, 用 200mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 洗涤两次, 适量 Tris-HCl (pH8.0, 含 20% 甘油) 悬浮, 置冰浴中超声波处理, 离心, 上清液用于酶活测定。

**1.6.2 NAGK 活性测定<sup>[3]</sup>:** 酶反应体系: 0.5mL 反应液中含 200mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 40mmol/L N-乙酰谷氨酸, 40mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 40mmol/L ATP 二钠盐, 400mmol/L NH<sub>2</sub>OH·HCl 及适量粗酶液。37°C 反应 1h

后加入 1mL 反应终止液 (1.0mol/L HCl 含 5% FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 4% 三氯乙酸) 终止反应。离心, 取上清测定 N-乙酰谷氨酸氧肟酸的光吸收值 A<sub>540</sub>。N-乙酰谷氨酸氧肟酸的摩尔消光系数  $\epsilon = 456 \text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [16]。活力单位定义: 一个活力单位 (U) 为在上述反应条件下, 每分钟生成 1 $\mu$ mol N-乙酰谷氨酸氧肟酸所需的酶量。

**1.6.3 粗酶液中蛋白含量测定:** 参考文献 [17] 的方法进行。

### 1.7 精氨酸对 NAGK 的反馈阻遏和反馈抑制实验

将 *C. crenatum* AS 1.542 和 971.1 在基本培养基 II 中培养 18h 后, 接入添加不同浓度精氨酸的基本培养基 III 中, 培养 12h 后收集菌体测定酶活力。在酶活测定反应体系中加入不同浓度精氨酸, 测定精氨酸对 NAGK 活性的抑制作用。

### 1.8 质粒稳定性测定

从发酵摇瓶中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 LB 平板, 置于 30°C 培养 24h。挑取单菌落分别接到含有 10 $\mu$ g/mL 氯霉素抗性的 LB 平板和不含氯霉素抗性的 LB 平板, 培养 24h 后, 分别计数平板长出菌落数。质粒保持率定义为在含有氯霉素抗性的 LB 平板上长出菌落数与不含氯霉素抗性的 LB 平板上长出菌落数的百分比。每一试验随机挑选菌落数大于 100 个。

## 2 结果和分析

### 2.1 *C. crenatum* AS 1.542 和 971.1 NAGK 基因的 PCR 扩增及重组子鉴定

分别提取 *C. crenatum* AS 1.542 和 971.1 的染色体 DNA 作为模板, 采用引物对 P1/P2, 各扩增出一条约 1.5kb 大小的 DNA 片段。回收 PCR 产物与载

体 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 *argB* 基因缺陷型 *E. coli* MA1013, 涂布在加有氨苄青霉素的基本培养基 I 平板上, 异源互补, 挑取转化子, 碱法提取质粒。用 *Bam*H I 和 *Xba* I 进行双酶切, 酶切片段与预期相符。重组质粒分别命名为 pHK1 和 pHK3。

采用引物对 P1/P3, 以 *C. crenatum* AS 1.542 染色体 DNA 为模板 PCR 扩增出一条约 1.0kb 大小的 DNA 片段, 同上操作, 得到的重组质粒命名为 pHSK1。

## 2.2 NAGK 基因序列的分析

分别随机挑取 pHK1 和 pHK3 各两个阳性克隆, 对插入片段进行测序, 结果一致。两个阳性克隆的插入片段均长为 1505bp, 序列分析显示, 仅含有一个 ORF (954bp), 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA。在起始密码子上游 -8bp 有一个典型的核糖体结合位点 AGG。推测此 ORF 编码一条 317 个氨基酸的多肽, 分子量 33.6kDa。

*C. crenatum* 野生株 AS 1.542 与突变株 971.1 的 *argB* 基因的核酸序列仅存在一个核苷酸的差别, 推测的氨基酸序列完全相同, 进一步验证插入片段包含有 *argB* 基因序列。来源于 *C. crenatum* 野生株 AS 1.542 *argB* 基因的编码区核苷酸序列与 *C. glutamicum* ATCC 13032 (GenBank No. X86157), *Corynebacterium efficiens* YS-314 (GenBank No. NC004369) 和 *Escherichia coli* k12 (GenBank No. NC000931) 的同源性分别是 99.89%, 76.62%, 38.05% 而氨基酸同源性分别是 100%、88.33% 和 24.38%。这说明虽然属于相同的棒杆菌属, 但是其 *argB* 基因序列也存在有一定的差别。相对而言, *C. crenatum* 与 *C. glutamicum* 有更近的亲缘关系。*E. coli* 与 *C. crenatum* 的序列同源性相差较大。*C. crenatum* 野生株 AS 1.542 与突变株 971.1 的 *argB* 基因的核酸序列已提交 GenBank 登记, 序列号分别是 DQ067606 和 DQ067607。

## 2.3 带有 NAGK 酶基因的重组质粒构建

用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切 pHK1 和 pHK3 重组质粒, 回收 1.5kb 片段与用相同酶切 pJC1 得到的大片段相连, 转化 *E. coli* MA1013, 涂布在加有卡那霉素的 LB 培养基平板上, 挑取转化子。酶切鉴定重组子。结果与预期一致。将携有 *argB* 基因的重组质粒命名为 pJK1 和 pJK3。用 *Hind*III 与 *Xba* I 双酶切 pHSK1 重组质粒, 回收 1.0kb 片段与用相同酶切 pXMJ19 得到的大片段相连, 将此结构基因置于 Lac 启动子控制下, 转化 *E. coli* MA1013。涂布在加有

氯霉素的基本培养基 I 平板上。挑取转化子。酶切鉴定, 重组质粒命名为 pXSK1。将该重组质粒电击转化 *C. crenatum* AS 1.542 和 971.1, 得到重组子 AS 1.542 (pXSK1) 和 971.1 (pXSK1)。

## 2.4 NAGK 基因在 *E. coli* MA1013 中的表达

将 *E. coli* MA1013、带有空载体 pJC1 和重组质粒 pJK1、pHK3 的 *E. coli* MA1013 接种于 LB 培养基平板、含有卡那霉素的 LB 培养基平板和基本培养基 I 平板上, 37°C 培养。*E. coli* MA1013 为 *argB* 基因缺陷型, 只能在 LB 培养基平板生长, 而不能在基本培养基平板生长。带有空载体 pJC1 的 *E. coli* MA1013 能在 LB 培养基平板和含有卡那霉素的 LB 培养基平板生长, 不能在基本培养基 I 平板上生长。只有带有重组质粒 pJK1、pJK3 的 *E. coli* MA1013 能在所有的平板上生长 (图 1)。此结果表明来自 *C. crenatum* 的 *argB* 在 *E. coli* MA1013 中得到表达, 实现了异源互补。由于 pJC1 载体无自身启动子, *argB* 基因的表达表明其结构上游序列确实存在启动子, 该启动子也可以被 *E. coli* 的 RNA 聚合酶所识别。通过 M.G. Reese 法在线分析预测启动子序列, 发现上游序列 -287bp 到 -332bp 共 46 个核苷酸为可能的启动子序列, 可能性达到 92%。

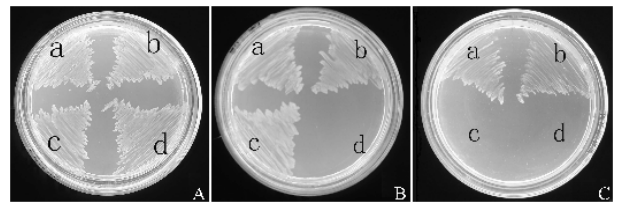


图 1 N-乙酰谷氨酸激酶基因的异源互补实验

Fig.1 Heterogeneous complementation of *argB* gene

A: LB Medium; B: LB Medium containing 50µg/mL Kanamycin; C: Medium I. a: *E. coli* MA1013 harboring pJK1; b: *E. coli* MA1013 harboring pJK3; c: *E. coli* MA1013 harboring pJC1; d: *E. coli* MA1013.

## 2.5 NAGK 活性

*C. crenatum* 经活化后, 接种于 LB 培养基中培养 4h 后加入 0.6mmol/L IPTG, 诱导培养 5h 后离心收集细胞, 按照“材料与方法”中所述步骤制备粗酶液, 取适量粗酶液检测酶活。结果表明, 在 AS 1.542 (pXMJ19) 中检测不到 NAGK 活力, 而 AS 1.542 (pHSK1) 菌株可以明显检测到酶活力, 酶比活力达到 4.4U/mg, 这表明克隆到的 *argB* 基因在 *C. crenatum* AS 1.542 中得到了有效表达。同样 971.1 (pHSK1) 菌株 NAGK 比对照菌 971.1 (pXMJ19) 提高了近一倍, 达到 8.6U/mg, 说明 *argB* 基因在精氨酸

产生菌 *C. crenatum* 971.1 中同样得到了有效表达。

## 2.6 过表达 NAGK 基因对 L-精氨酸积累的影响及质粒稳定性

为研究 NAGK 活性的增加对重组菌株 *C. crenatum* 971.1 L-精氨酸积累的影响,我们进行了摇瓶发酵实验。分别将带有 pXMJ19 质粒和重组质粒 pHSK1 的 *C. crenatum* 971.1 在基本培养基 II 中 30℃ 培养 18h, 10% 接种量接入基本培养基 III。培养 24h 后,加入 0.6mmol/L IPTG 诱导表达。至 96h 收集发酵液,测定其精氨酸量。对照菌 *C. crenatum* 971.1 (pXMJ19) 产酸 9.75g/L, 重组菌 *C. crenatum* 971.1 (pHSK1) 产酸 12.15g/L, 比对照菌产酸水平提高约 25%。这表明通过增加 *argB* 基因剂量, 强化表达, 对 *C. crenatum* 971.1 菌株精氨酸的积累有一定的促进作用。

分别对带有 pXMJ19 质粒和重组质粒 pHSK1 的 *C. crenatum* 971.1 进行质粒稳定性测定, 每隔 24h 取样直到发酵结束, 试验结果表明质粒稳定性均为 100%, 没有质粒丢失现象。

## 2.7 精氨酸对 NAGK 的反馈阻遏和反馈抑制作用

分别在添加 0~200mmol/L 不同浓度精氨酸的基本培养基 III 中对 NAGK 活性进行了测定。结果表明在无精氨酸存在下, 野生株 *C. crenatum* AS 1.542 检测不到 NAGK 的活性, 而突变株 *C. crenatum* 971.1 的 NAGK 酶比活力在精氨酸浓度达到 50mmol/L 时下降 50%, 从无精氨酸时的 4.50U/mg 下降到 2.2U/mg, 这说明精氨酸对突变株 *C. crenatum* 971.1 NAGK 酶活力有明显的阻遏作用。

对不同浓度精氨酸对 NAGK 的抑制作用进行了测定, 酶反应体系中分别加入从 0~1.3mmol/L 不同浓度的精氨酸, 结果表明精氨酸浓度达到 1mmol/L 时, 971.1 菌株的酶比活力降低 50%, 从最初的 4.50U/mg 下降到 2.16U/mg, 这表明精氨酸对突变株的酶活力仍有明显的抑制作用。

## 3 讨论

由 *C. crenatum* AS 1.542 和 971.1 NAGK 基因片段推导出的氨基酸序列与 *C. glutamicum* ATCC 13032 该酶序列完全一致, 表明它们在进化上有很高的亲缘关系。Sakanyan 等<sup>[5]</sup>的工作表明 *C. glutamicum* ATCC 13032 精氨酸合成途径中的 5 个相关基因 *argC*、*argJ*、*argB*、*argD* 和 *argF* 依次存在一个基因簇中, 这一基因簇是否受单一操纵子调控尚不清楚。但在 *argB* 基因上游, *argJ* 结构基因内部

存在一个内部启动子。本文结果表明这样一个内部启动子结构在 *C. crenatum* 的 *argB* 基因上游同样存在。由于 NAGK 是精氨酸生物合成途径的关键酶, 这种内部启动子的存在可能有助于精氨酸合成的精细调节。*C. crenatum* 971.1 是经过多次诱变获得的精氨酸产生菌, 其产物积累的机制还没有深入研究。该菌精氨酸合成途径 NAGK 活性与其亲本菌株 *C. crenatum* AS 1.542 相比明显提高, 说明其精氨酸积累特性可能与此酶活提高有关。但是精氨酸对该酶的反馈抑制和反馈阻遏作用并没有完全解除。对突变株和野生株 *argB* 结构基因上游序列进行分析, 发现结构基因上游序列 -287bp 到 -332bp 的位置为可能的启动子序列, 可能性达到 92%。序列分析比对结果表明, 野生株与突变株之间并没有核苷酸的改变, 所以推测在这两个宿主中 NAGK 表达的差别并不是由于这个内源启动子的影响。此外, 野生株 *C. crenatum* AS 1.542 中没有检测到 NAGK 活性, 可能是由于在基本培养基条件下, 其 N-乙酰谷氨酸激酶活力较低缘故。

对带有质粒 pHSK1 的 *C. crenatum* AS 1.542 重组菌产酸进行了研究, 发现其并无精氨酸的积累, 这表明在精氨酸合成途径中有其它酶对精氨酸的积累也起到了作用, 对野生型菌株只单纯提高 NAGK 表达量, 可能无法起到促进精氨酸积累的作用。而对带有质粒 pHSK1 的 *C. crenatum* 971.1 重组菌产酸研究发现, 其精氨酸积累可以提高约 25%。*C. crenatum* 971.1 精氨酸合成途径中的相关基因可能也构成一个基因簇, 与 *C. glutamicum* ATCC 13032 中的 *argCJBDF* 相似, 经过多次诱变, 可能造成此基因簇的调控序列或阻遏蛋白发生了变化, 部分解除了阻遏, 使包括 NAGK 在内的若干相关酶基因得到高表达, 从而使精氨酸得到积累。所以在此基础上进一步提高 NAGK 基因表达量, 对精氨酸的积累也有一定的作用。

本文初步分析了 *C. crenatum* 971.1 的产酸原因, 为进一步提高精氨酸积累提供了信息。精氨酸对钝齿棒杆菌 NAGK 具有反馈抑制和反馈阻遏作用, 说明在钝齿棒杆菌中 NAGK 为关键酶, 受到末端产物的反馈调节, 为我们进一步了解钝齿棒杆菌的精氨酸合成途径提供了可能。

致谢 中国科学院微生物研究所刘双江研究员为本工作提供了部分实验材料, 特此致谢。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 泽洋太郎. 不可缺少的氨基酸-精氨酸. 日本医学介绍, 1996, 17(1) 9 - 10.
- [ 2 ] Vogel HJ, MacLellan WL. Acetylornithinase ( *E. coli* ). *Methods Enzymol*, 1970, 17A 265 - 269.
- [ 3 ] Van de Castele M, Demarez M, Legrain C, *et al.* Pathway of arginine biosynthesis in extreme thermophilic archaeo- and eubacteria. *J Gen Microbiol*, 1990, 136 :1177 - 1183.
- [ 4 ] Cunin R, Glansdorff N, Piérard A, *et al.* Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev*, 1986, 50(3) :314 - 352.
- [ 5 ] Sakanyan V, Petrosyan P, Lecocq M, *et al.* Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway. *Microbiology*, 1996, 142 99 - 108.
- [ 6 ] Shinnors EN, Catlin BW. Arginine biosynthesis in *Neisseria gonorrhoeae*: enzymes catalyzing the formation of ornithine and citrulline. *J Bacteriol*, 1978, 136(1) :131 - 135.
- [ 7 ] 陈琦, 李玲阁. 产 L-谷氨酸钝齿棒杆菌 AS1542 菌株的研究. 微生物学报, 1975, 2(2) :119 - 124.
- [ 8 ] 路志强, 龚建华, 丁久元, 等. L-精氨酸产生菌诱变育种的研究. 微生物学报, 1988, 28(2) :131 - 135.
- [ 9 ] Cremer J, Eggeling L, Sahn H. Cloning of the *dapA dapB* cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet*, 1990, 220 :478 - 480.
- [ 10 ] Jakoby MJ, Ngouto-Nkili C E, Burkovski A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *BioTechniques*, 1999, 13 :437 - 441.
- [ 11 ] Sambrook J, Fritsch EF, 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, 1992.
- [ 12 ] 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, 13(3) :245 - 249.
- [ 13 ] Glansdorff N. Topography of cotransducible arginine mutations in *Escherichia coli* K-12. *Genetics*, 1965, 51 :167 - 179.
- [ 14 ] 龚建华, 丁久元, 陆志强, 等. L-精氨酸发酵条件的研究. 微生物学报, 1988, 28(3) :257 - 264.
- [ 15 ] Lieb W, Bayerl A, Schein B, *et al.* High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, 65 :299 - 304.
- [ 16 ] Haas D, Leisinger T. N-acetylglutamate 5-phosphotransferase of *Pseudomonas*. Catalytic and regulatory properties. *Eur J Biochem*, 1975, 52(2) :377 - 393.
- [ 17 ] Bradford MM. 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.

Cloning sequence analysis and expression of N-acetylglutamate kinase gene in *Corynebacterium crenatum*HAO Ning<sup>1,2</sup>, ZHAO Zhi<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, ZHANG Ying-zi<sup>1</sup>, DING Jiu-yuan<sup>1\*</sup><sup>(1)</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)<sup>(2)</sup> Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract**: N-Acetylglutamate kinase (EC 2.7.2.8; NAGK) genes from wild-type *Corynebacterium crenatum* AS 1.542 and a L-arginine-producing mutant *C. crenatum* 971.1 were cloned and sequenced. Analysis of *argB* sequences revealed that only one ORF existed, which used ATG as the initiation codon and coded a peptide of 317 amino acids with a calculated molecular weight of 33.6kDa. Only one nucleotide difference was found in the structure gene and the difference did not cause a change of amino acid by comparison of the gene sequences between the wild type *C. crenatum* AS 1.542 and the mutant 971.1. The ORF sequence of *argB* from *C. crenatum* AS 1.542 showed homologies of 99.89%, 76.62%, 37.94% to those from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium efficiens* YS-314 and *Escherichia coli* k12. And the amino acid sequence deduced from ORF displayed homologies of 100%, 78.55%, 25.25% to those from microorganisms above, respectively. An internal promoter was found in the upstream of the *argB* gene from *C. crenatum*. The *argB* gene from *C. crenatum* AS 1.542 was expressed both in *C. crenatum* AS 1.542 and 971.1. The NAGK activity of transformed *C. crenatum* AS 1.542 was greatly increased by the induction of IPTG. The NAGK activity of transformed *C. crenatum* 971.1 was almost twice as much as that of *C. crenatum* 971.1 under the same induction. The amplification of the NAGK activity yielded 25% increase of L-arginine production in *C. crenatum* 971.1.

**Keywords**: *Corynebacterium crenatum*; N-Acetylglutamate kinase; Cloning; Expression

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

Other author: CAO Qin<sup>1,2</sup>

Received 23 May 2005/Accepted 15 June 2005/Revised 16 November 2005