



精氨酸代谢调控蛋白 ArgR 调控嗜热链球菌胞外多糖合成

潘晖¹, 刘欣欣¹, 孔令慧¹, 夏永军¹, 印伯星², 艾连中¹, 熊智强^{1*}

¹上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海食品微生物工程技术研究中心, 上海 200093

²扬州市扬大康源乳业有限公司, 江苏 扬州 225004

摘要:【目的】研究精氨酸代谢调控蛋白 ArgR 对嗜热链球菌胞外多糖(EPS)合成的调控作用。【方法】利用大肠杆菌异源表达嗜热链球菌 ArgR 蛋白, 通过尿素变性-复性和 Ni²⁺亲和层析纯化。采用凝胶电泳迁移(EMSA)和生物膜层干涉(BLI)分析 ArgR 和 *eps* 基因簇中 P_{epsA} 启动子的相互作用和动力学信息。构建过表达和弱化 *argR* 基因菌株, 利用苯酚-硫酸法测定其合成 EPS 差异。【结果】大肠杆菌异源表达的 ArgR 为包涵体, 使用尿素变性-复性纯化可获得 2.95 mg/mL 可溶性蛋白; EMSA 和 BLI 结果显示 ArgR 和启动子 P_{epsA} 有特异性结合, 且结合因解离水平低而稳定; 过表达 *argR* 基因可显著降低嗜热链球菌 EPS 合成, 而弱化 *argR* 基因则提高 EPS 合成。【结论】本研究表明 ArgR 能特异性结合嗜热链球菌 *eps* 基因簇启动子, 并负调控 EPS 生物合成。

关键词: 嗜热链球菌, ArgR, 胞外多糖生物合成, 转录调控

乳酸菌胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)分为同聚多糖和杂聚多糖^[1], 作为食品稳定剂和增稠剂能显著增加粘度防止乳清沉淀。EPS 不但有利于益生菌肠内定植, 还具有增强机体免疫、抗肿瘤、抗氧化和降血脂等活性功能^[2]。嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)是一种产酸性能优良的乳酸菌, 其代谢合成 EPS 能显著改善食品质地和风味^[3-4], 广泛应用于乳制品发酵。嗜热链球菌 EPS 主要由不同比例的半乳糖和葡萄糖组成, 伴有少量乙酰半乳糖、乙酰半乳糖胺、鼠李糖和岩藻糖

等单糖^[5]。嗜热链球菌 EPS 生物合成由基因组中大小为 15–36 kb 的 *eps* 基因簇控制, 其中 *epsA* 和 *epsB* 编码 EPS 合成调控蛋白, *epsC* 和 *epsD* 决定 EPS 链长, *epsE*、*epsF*、*epsG*、*epsH* 和 *epsI* 是功能性重复糖单元, *epsJ*、*epsK*、*epsL* 和 *epsM* 是聚合和输出单元。功能性重复糖单元中, *epsE* 编码半乳糖基转移酶, 受 *epsD* 调控; *epsF*、*epsG* 和 *epsI* 编码不同的糖基转移酶, *epsH* 编码乙酰转移酶^[6]。

革兰氏阳性菌胞内精氨酸生物合成受 *argCJBDFRGH* 基因簇控制, 其中 *argR* 编码精氨

基金项目: 国家自然科学基金(31871776, 31771956); 上海市自然科学基金(18ZR1426800)

*通信作者。Tel: +86-21-55803272; E-mail: xiongzzq@hotmail.com

收稿日期: 2019-12-31; 修回日期: 2020-02-06; 网络出版日期: 2020-02-29

酸合成代谢的主要调控蛋白 ArgR; 结合 L-精氨酸的 ArgR 能和启动子区域 18 bp 回文结构序列 (ARG boxes) 结合^[7], 强烈抑制操纵子上游启动子活性, 负调控整个精氨酸合成通路^[8]。ArgR 蛋白 N 端含有 Ser-57 和 Arg-58 构成的“SR”序列, 用于 DNA 结合^[8]; C 端保守区域是与 L-精氨酸和部分 DNA 结合的结构域^[9-10], 6 个精氨酸分子结合在 2 个 ArgR 三聚体的 C 端结构域界面, 起到协同调控因子的作用^[11]。ArgR 与 ARG boxes 序列结合引起基因结构的拓扑形变, 诱发调控作用^[12-13]。除调控精氨酸合成, ArgR 在天蓝色链霉菌中直接或间接控制 452 个基因, 涉及氮代谢、嘌呤和嘧啶生物合成、细胞形态和抗生素基因等众多代谢通路^[14]; 在谷氨酸棒状杆菌中 ArgR 已证明调控谷氨酸合成代谢^[15], 而在嗜热栖热菌中还调控赖氨酸合成代谢^[16]。这些研究表明 ArgR 可能是一个全局性调控因子, 对非精氨酸代谢也存在广泛调控, 但目前尚未见对 EPS 合成调控的报道。

嗜热链球菌 S-3 是本实验室筛选的一株具有良好产粘性和口感辅助效果的益生乳酸菌。对 S-3 中 EPS 结构解析, 发现其单糖组成为 N-乙酰半乳

糖胺、半乳糖和葡萄糖, 摩尔比为 1:2:1^[17], 并通过全基因组测序和生物信息学分析完成 *eps* 基因簇功能注释^[6]。目前国内外对 EPS 生物合成的转录调控研究比较欠缺, 而本研究前期使用 S-3 的 *eps* 基因簇启动子结合磁珠后作为诱饵, 通过 Pull-down 方法富集得到 ArgR, 因此本研究首次探究 ArgR 对嗜热链球菌 EPS 合成的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒以及细菌培养条件: 所用菌株与质粒如表 1 所示。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 在 LB 培养基中 37 °C、200 r/min 培养; 嗜热链球菌在 LM17 培养基中 37 °C 厌氧静置培养。本研究根据菌株所含质粒的抗性添加抗生素, 其工作浓度为卡那霉素 100 µg/mL、红霉素 300 µg/MI (大肠杆菌) 和 20 µg/mL (嗜热链球菌)。

1.1.2 试剂与仪器: 质粒提取、DNA 和 PCR 纯化回收试剂盒购自 Axygen 公司; 高保真酶、限制

表 1. 本研究使用的菌株和质粒
Table 1. Strains and plasmids in this study

Strains and plasmids	Characterizations	Sources
Strains		
Top10	<i>E. coli</i> K-12, F ⁻ , <i>mcrAΔ</i> (<i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i>), <i>φ80</i> , <i>lacZΔM15</i> , <i>Δlac X74</i> , <i>recA1</i> , <i>araΔ139Δ</i> (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rps</i> , (<i>Strr</i>) <i>endA1</i> , <i>nupG</i> .	Invitrogen
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT hsdS</i> (<i>rB-mB-</i>), <i>gal</i> , <i>λ</i> (DE3)	Invitrogen
S-3	<i>S. thermophilus</i>	Our lab
Plasmids		
pET30α	Expressional vector, Kan ^R , 5.4 kb	Novagen
pIB184	Shuttle vector, Em ^R , containing constitutive promoter P23	BioVector
pPH12	pET30α containing N-6His- <i>argR</i> gene, Kan ^R	This study
pPH13	pET30α containing N,C-6His- <i>argR</i> gene, Kan ^R	This study
pPH14	pET30α containing C-6His- <i>argR</i> gene, Kan ^R	This study
pPH15	pIB184 containing <i>argR</i> gene, Em ^R	This study
pPH16	pIB184 containing antisense <i>argR</i> gene, Em ^R	This study

性内切酶、T4 连接酶和蛋白酶抑制剂购自宝生物工程(大连)有限公司和南京诺唯赞生物科技有限公司; Ni-NTA 琼脂糖树脂购自 QIAGEN 公司; EMSA 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 电泳仪设备及超灵敏凝胶成像仪购自 Bio-Rad 公司; 分子互作仪及链霉亲和素传感器购自 Fortebio 公司。

1.1.3 引物合成及序列测定: 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2), 质粒由华大基因股份有限公司测序。

1.2 质粒构建

以 S-3 基因组为模板, 使用引物 ArgR-1-F/R、ArgR-2-F/R 和 ArgR-3-F/R 扩增 3 种 *argR* 基因片段, 经 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切后通过 T4 连接酶插入质粒 pET30 α , 转化至 *E. coli* Top 10, 在抗性平板筛选阳性转化子, 测序正确的重组质粒分别命名为 pPH12、pPH13 和 pPH14。使用引物 ArgR-pIB-F/R、antiArgR-pIB-F/R 扩增得到目标基因, 质粒 pIB184

经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切, 酶切产物和目标基因连接后转化, 测序正确的质粒分别命名为 pPH15 和 pPH16。

1.3 诱导表达 ArgR

将质粒 pET30 α 、pPH12、pPH13 和 pPH14 分别转化至 *E. coli* BL21 (DE3), 将种子液接种至新鲜培养基, 37 °C 培养至 $OD_{550}=0.6$, 加入终浓度 0.4 mmol/L IPTG 后 20 °C 诱导 8 h。使用磷酸盐缓冲液(PBS)离心洗涤菌体, 加入 1% (V/V)蛋白酶抑制剂, 低温超声破碎(800 W 功率, 5 min), 经离心获得上清液和沉淀。使用 SDS-PAGE 检测菌液、上清液和沉淀悬浮液。

1.4 低温初始诱导 ArgR

E. coli BL21(DE3)/pPH13 种子液接种至新鲜培养基, 分别加入终浓度为 0.2、0.4、0.6 mmol/L 的 IPTG, 20 °C 培养; 分别在 2、4、6、8、10、12 和 24 h 收集菌液, SDS-PAGE 检测蛋白表达, 二喹啉甲酸法测定总蛋白。

表 2. 本研究使用的引物序列
Table 2. Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
ArgR-1-F	GGAATTC <u>CAATATG</u> TTGGAGTTAATCCGAAAGATTGTCC
ArgR-1-R	CCGCTCGAGTTCTTCAACCCACTTGACGATTTG
ArgR-2-F	GGAATTC <u>CAATATGCACCAATCAATCAATCAAT</u> TTGGAGTTAATCCGAAAGATTGTCC
ArgR-2-R	CCGCTCGAGTTCTTCAACCCACTTGACGATTTG
ArgR-3-F	GGAATTC <u>CAATATGCACCAATCAATCAATCAAT</u> TTGGAGTTAATCCGAAAGATTGTCC
ArgR-3-R	CCGCTCGAGCTATTCTTCAACCCACTTGACGATTTG
box-F1	<u>AGCCAGTGGCGATAAAG</u> TTTGTAAGGACGCCATTT
box-R1	<u>AGCCAGTGGCGATAAAGATAAATTGCTCCTAAAAATTA</u> AAATTAGGTATTCCCAT AATACAACCTCATTTCAT
box-R2	ATATCAATCATTAAATATTGTGAACTATCTTTA
box-F2	TTAAATGATTGATATCATAATG
box-R3	<u>AGCCAGTGGCGATAAAGATAAATTGCTCCTAAAAAT</u> T
Biotin-F-R	AGCCAGTGGCGATAAG
ArgR-pIB-F	<u>TATGAATGACAATGATGTTGGATCC</u> ATGTTGGAGTTAATCCGAAAGATTGT
ArgR-pIB-R	<u>CGATAGATCTCGAGCTCTAGAATTC</u> CTATTCTTCAACCCACTTGACGATTTG
antiArgR-pIB-R	<u>TATGAATGACAATGATGTTGGATCC</u> CTATTCTTCAACCCACTTGACGATTTG
antiArgR-pIB-R	<u>CGATAGATCTCGAGCTCTAGAATTC</u> ATGTTGGAGTTAATCCGAAAGATTGT

Underlined parts are restriction sites, underlined parts are His-tag sequences, and underlined parts are homologous arms.

1.5 ArgR 包涵体纯化

按照前述方法培养和诱导菌体, 破碎离心后获得包涵体, 使用包涵体溶解液(8 mol/L Urea, 50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl; pH 8.0)将其低温溶解, 经 0.45 μm 滤膜过滤; 用 2 个柱体积洗涤液(5 mmol/L Imidazole, 50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl; pH 8.0)平衡 Ni-NTA 琼脂糖树脂后, 包涵体溶解液以 0.5 mL/min 的流速流过柱体; 用 5 个柱体积平衡液(10 mmol/L Imidazole, 8 mol/L Urea, 50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl; pH 8.0)以 1 mL/min 的流速洗去杂蛋白; 用 2 个柱体积洗脱液(250 mmol/L Imidazole, 8 mol/L Urea, 50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl; pH 8.0)洗脱出目的蛋白。使用 3 kDa 超滤管低温脱盐浓缩, 测定蛋白质浓度, -80 °C 保存备用。

1.6 凝胶迁移检测 ArgR 与 P_{epsA} 启动子结合

使用引物 box-F1/R3 以及 Biotin-F-R 扩增得到两端含有生物素标记的 P_{epsA} 片段, 同时获得未标记片段。凝胶阻滞实验(EMSA, electrophoresis mobility shift assays)如下: 10 μL 反应体系包含 25 ng 标记探针, 不同浓度 ArgR (0–10 μmol/L)和 2 μL 结合缓冲液, 对照组需额外加入 1.25 μg 未标记探针; 25 °C 孵育 20 min 后上样至 4% (W/V)非变性聚丙烯酰胺胶, 使用 Tris-硼酸缓冲液(TBE)电泳; 经电泳迁移的凝胶条带随后转移至尼龙膜, 在紫外交联、封闭后结合 Streptavidin-HRP, 使用化学发光成像。

1.7 ArgR 与 P_{epsA} 启动子结合解离系数

生物素标记的 P_{epsA} 片段使用 DNA 缓冲液(10 mmol/L HEPES, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 200 mmol/L KCl; pH 8.0)溶解, ArgR 溶液中加入终浓度 1% (W/V)BSA 和 2% (V/V) Tween-20

作为母液, 使用蛋白质缓冲液(1% BSA, 2% Tween-20, PBS)稀释至 62.5、125、250、500 和 1000 mg/L。溶液处理后加样至检测孔板, 使用生物膜层干涉仪(BIL)测定: 传感器在 DNA 缓冲液中平衡 10 min, 在生物素标记 DNA 溶液中饱和 10 min, 蛋白质缓冲液中平衡 8 min, 蛋白样品中饱和 10 min, 蛋白质缓冲液解离 15 min。

1.8 ArgR 结合位点突变验证

P_{epsA} 启动子上预测含有 2 个 ArgR 结合位点(ARG-box), 其中 ARG-box1 位于 P_{epsA} 启动子上游 38 bp, ARG-box1 和 ARG-box2 间距 79 bp。为得到 P_{epsA} 上结合位点的突变 DNA, 以 P_{epsA} 启动子为模板, 使用引物 box-F1/R1 扩增得到 ARG-box1 缺失突变 DNA; 以引物 box-F1/R2 及 box-F2/R3 的扩增产物为模板, 用引物 box-F1/R3 扩增得到 ARG-box2 缺失突变 DNA; 以引物 box-F1/R2 及 box-F2/R1 扩增产物为模板, 用引物 box-F1/R1 扩增得到 ARG-box1 及 ARG-box2 缺失突变 DNA。3 种缺失突变 DNA 通过引物 Biotin-F-R 扩增标记生物素, 采用 EMSA 检测 ArgR 与 3 种缺失突变 DNA 的结合情况。10 μL EMSA 反应体系含 25 ng 标记探针和 10 μmol/L ArgR, 对照组不引入蛋白, 竞争探针为 1.25 μg。

1.9 测定 EPS 合成量变化

重组菌株 S-3/pPH15、S-3/pPH16 和 S-3/pIB184 过夜培养的种子液分别以 3%接种量接种于 LM17 培养基, 培养至 6、12、24 h 离心收集上清液。根据已报道方法^[18]纯化 EPS, 上清液经终浓度 6% (W/V)三氯乙酸处理 10–12 h 后离心去除蛋白质, 上清液用纤维素透析袋(8000–1000 Da)透析 3 d, 每 4 h 更换去离子水。定容后采用苯酚硫酸法^[19]测定 EPS 含量, 以半乳糖为标准, 每组 6 个平行,

数据应用 SPSS 软件进行独立样本 *t* 检验分析。

2 结果和分析

2.1 ArgR 异源表达和蛋白纯化

本研究前期将 S-3 中 *eps* 基因簇启动子 P_{epsA} 生物素标记, 结合链霉素亲和素磁珠, 通过 Pull-down 方法捕获到结合蛋白 ArgR。在此基础上, 为探究 ArgR 对嗜热链球菌 EPS 合成的转录调控作用, 我们首先在大肠杆菌中异源表达 ArgR。*argR* 基因为 432 bp, 其蛋白分子量为 16123 Da。采用 TMHMN 在线分析(<http://www.cbs.dtu.dk>)显示其无跨膜结构。pPH12、pPH13 和 pPH14 分别为 C 端、NC 两端和 N 端含有 His 标签的 *argR* 表达质粒(图 1-A)。但将含不同位置 His 标签的 ArgR 表达质粒 pPH12、pPH13 和 pPH14 分别转入大肠杆菌 BL21 (DE3)后, 37 °C 培养, 0.4 mmol/L IPTG 诱导后发现, 3 种工程菌表达的可溶性 ArgR 蛋白含量较低, 主要形成包涵体(图 1-B)。

为增加可溶性蛋白表达, 我们采用低温诱导降低 ArgR 蛋白合成速度, 减少包涵体形成。在 20 °C 使用不同 IPTG 浓度和诱导时间表达 ArgR,

分析条带灰度值的结果表明与其他两种 IPTG 浓度相比, 在 0.4 mmol/L IPTG 浓度下 ArgR 可溶性表达量最高, 在 12 h 时 ArgR 占比总蛋白达到 82% (图 2-A); 在此条件下, 可溶性蛋白浓度达到 0.15 mg/mL (图 2-B)。尽管低温诱导获得更多的可溶性 ArgR, 但对于蛋白纯化而言, 其浓度仍然过低, 而包涵体含量较高。因此, 我们选择 Ni^{2+} 柱结合效率最高的 *E. coli* BL21(DE3)/pPH13 包涵体, 在尿素溶解后纯化获得可溶性 ArgR (图 2-C), 通过超滤管脱盐浓缩后浓度达到 2.95 mg/mL, 满足后续实验要求。

2.2 ArgR 与 P_{epsA} 启动子的结合

为研究 ArgR 对 *eps* 基因簇的调控, 采用 EMSA 和 BIL 实验分别检测 ArgR 对 *eps* 基因簇 P_{epsA} 启动子的结合特异性和结合亲和力(图 3), P_{epsA} 启动子 DNA 结合 ArgR 蛋白后发生阻滞迁移, 在 8 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时达到饱和; 加入竞争探针后标记探针的阻滞迁移基本消失, 说明结合具有特异性(图 3-A)。ArgR 与 P_{epsA} 启动子的 BIL 分析表明, 结合系数(K_a)为 $1.45 \times 10^3 \pm 1.10 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, 解离系数(K_d)为 $2.57 \times 10^{-5} \pm 4.83 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$, 亲和力系数

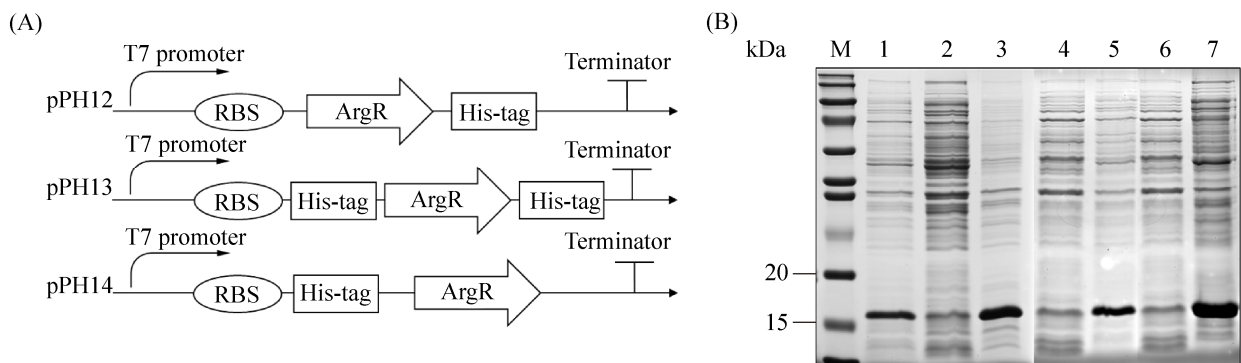


图 1. 质粒示意图以及 ArgR 表达和纯化

Figure 1. Plasmid structure and protein expression of ArgR. A: Structures of plasmid pPH12, pPH13 and pPH14. B: ArgR expression in *E. coli* by SDS-PAGE. M: protein marker; lane 1, 2, 3: bacterial culture, supernatant and precipitation from the plasmid pPH12; lane 4, 5: supernatant and precipitation from pPH13; lane 6, 7: supernatant and precipitation from pPH14.

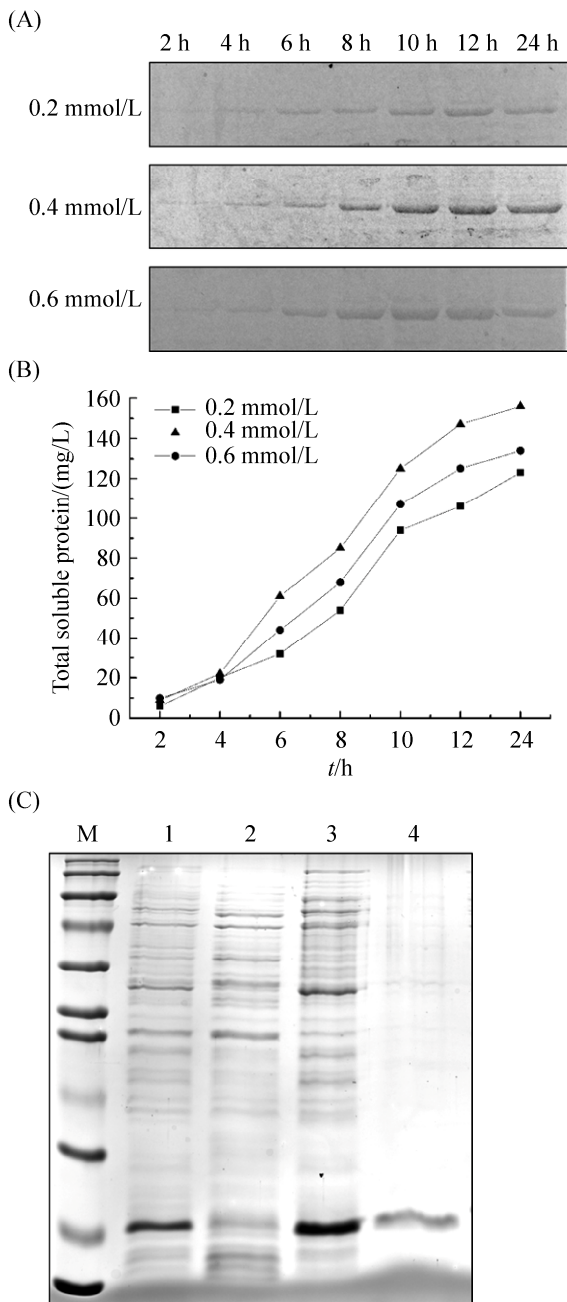


图 2. 不同诱导条件的 ArgR 蛋白表达及尿素变性纯化包涵体

Figure 2. ArgR expression and purification using urea. A: SDS-PAGE of ArgR expression at different IPTG concentrations and induction time. B: total soluble protein content under different induction conditions. C: purification of inclusion body protein of ArgR by urea. M: protein marker; lane 1: bacterial culture; lane 2, 3: supernatant and precipitation after fragmentation and centrifugation; lane 4: purified protein by urea.

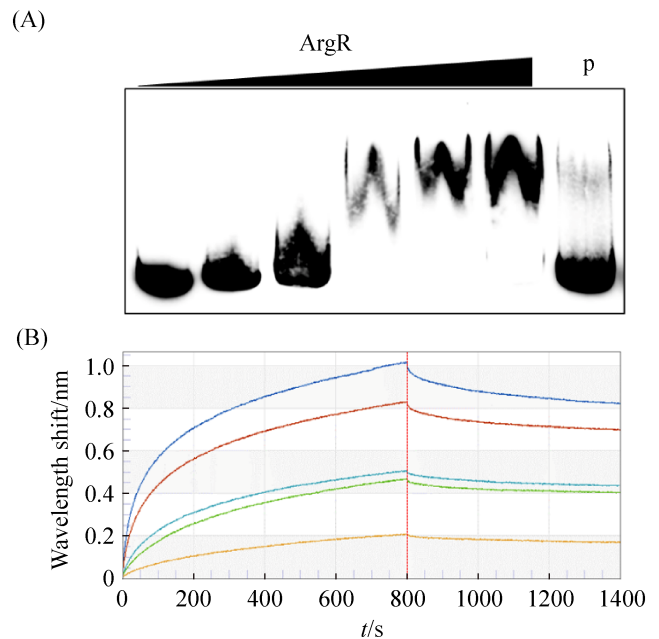


图 3. ArgR 和 P_{epsA} 启动子的相互作用

Figure 3. Interaction between ArgR and Promoter P_{epsA}. A: The interaction by EMSA; Increasing amount of ArgR concentrations (0, 2, 4, 6, 8, 10 μmol/L) were used with the biotin-labeled probe at 25 ng; lane P: 1.25 μg unlabeled probe was added as the control. B: Kinetic curves measured by BLI with ArgR concentrations from 1 mg/mL to 0.0625 mg/mL, and all baselines leveled when balance and dissociation.

(KD)为 $1.78 \times 10^{-8} \pm 3.60 \times 10^{-10}$ M, 数据拟合度 0.978 (图 3-B), 说明 ArgR 与 P_{epsA} 的解离水平低, 分子间结合稳定。上述两种检测结果都显示 ArgR 可稳定结合 P_{epsA}, 说明 ArgR 可以调控 eps 基因簇。

为进一步证明 DNA 结合位点对 ArgR 结合的影响, 我们将 P_{epsA} 中 2 个预测的 ArgR 结合位点 ARG-box1 和 ARG-box2 进行缺失突变后, 与 ArgR 进行 EMSA 结合验证(图 4)。泳道 1,2,3 显示 P_{epsA} 可特异性结合 ArgR; ARG-box1 缺失突变(泳道 5)和 ARG-box2 缺失突变(泳道 7)DNA 仍能结合 ArgR, 但在相同蛋白浓度条件下, 与泳道 2 相比出现略微拖尾现象, ARG-box 单缺失突变可能表

现为结合作用的减弱; ARG-box1 和 ARG-box2 双缺失突变 DNA (泳道 9) 无法与同浓度 ArgR 产生阻滞迁移。突变结果直接证明 ArgR 结合在 P_{epsA} 的 ARG-box 上。

2.3 过表达和弱化 *argR* 基因对 EPS 合成的影响

为进一步证明 *eps* 基因簇受 AgrR 调控, 我们测定 *argR* 基因过表达或弱化后对 EPS 合成的影响 (图 4-B)。与含空质粒 pIB184 菌株(对照)相比, *argR* 基因过表达或弱化菌株生长延迟期和倍增时间并无显著性差异(图 5-A), 说明细菌初级代谢可能未受较大影响。培养到 6 h 时这 3 种菌株的 EPS 产量均无显著差别, 但培养 12 h 时过表达 *argR* 菌株 EPS 产量仅为 0.089 g/L, 24 h 时 0.116 g/L, 与对照相比均显著降低; 而采用反义 RNA 弱化 *argR* 菌株, EPS 产量在 12 h 与对照组无显著性差异, 而在 24 h 时与对照相比显著上升, 达到 0.152 g/L (图 5-B)。上述结果表明 EPS 合成受 AgrR 负调控。

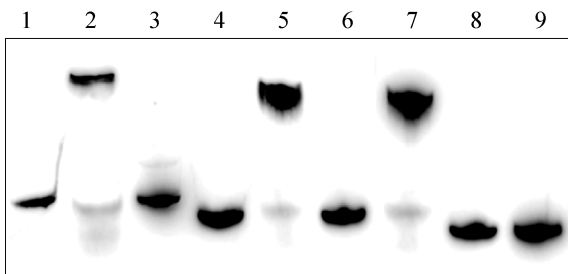


图 4. P_{epsA} 中 ARG-box 缺失突变对结合 ArgR 的影响
Figure 4. Effects of ARG-box mutation of P_{epsA} on ArgR binding. Lane 1: original P_{epsA} without ArgR; lane 2: original P_{epsA} with ArgR; lane 3: original P_{epsA} with ArgR and competitive DNA; lane 4: ARG-box1 deleted P_{epsA} without ArgR; lane 5: ARG-box1 deleted P_{epsA} with ArgR and competitive DNA; lane 6: ARG-box2 deleted P_{epsA} without ArgR; lane 7: ARG-box2 deleted P_{epsA} with ArgR and competitive DNA; lane 8: ARG-box1 and ARG-box2 deleted P_{epsA} without ArgR; lane 9: ARG-box1 and ARG-box2 deleted P_{epsA} with ArgR and competitive DNA.

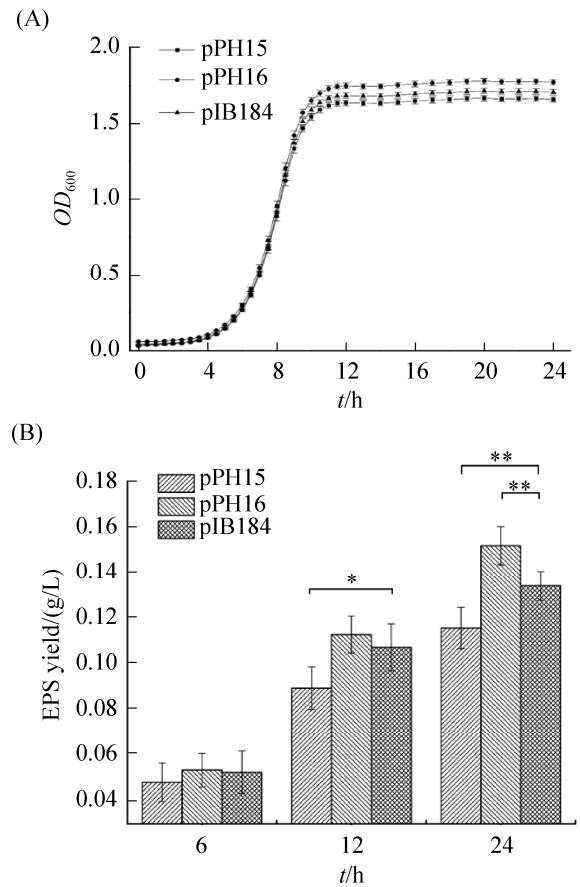


图 5. 过表达和弱化 *argR* 对生长和 EPS 合成的影响
Figure 5. Effects on cell growth and EPS yield by overexpressed or weakened *argR*. A: Growth of engineered strains containing plasmids pPH15 (overexpressed), pPH16 (weakened), and pIB184 (the control), respectively. B: EPS yield of engineered strains containing plasmids pPH15, pPH16, and pIB184 (the control), respectively. *: $0.01 < P \leq 0.05$.

3 讨论

本实验采用 *E. coli* BL21(DE3)/pET 系统异源表达 ArgR, 但主要形成包涵体, 这可能是由于多肽合成时速率较高, 缺乏有效折叠^[20], 导致异源表达 ArgR 蛋白溶解度低, 形成有利于避免蛋白酶降解的包涵体。我们通过尿素变性复性后纯化获得高浓度可溶性蛋白, 可能是由于尿素可破坏蛋白质氢键, 打开肽链, 使亲水基团暴露, 提高可

溶性; 尿素变性蛋白一般不破坏一级结构, 当其除去或浓度降低后可复性^[21]。此外, 也可使用对二级结构更温和的溶解剂取代尿素和盐酸胍^[22]。本实验中 ArgR 经变复性以及超滤脱盐浓缩处理, 在 SDS-PAGE 检测中尽管出现微弱的杂条带, 但并不干扰后续的特异性结合实验。文献报道利用本研究相同的系统表达嗜热栖热菌 ArgR 时, 并未形成包涵体^[16, 23]; 使用 *E. coli* M15/pQE30 系统同样表达出嗜链球菌可溶性 ArgR^[24], 与本研究结果不同。通过 NCBI 数据库对嗜热链球菌与其他链球菌属和嗜热菌属的 ArgR 进行序列比对, 发现它们的相似度仅为 40%–60%, 这可能是嗜热链球菌 ArgR 主要以包涵体形成表达的重要因素。

乳酸菌存在 CodY、ArgR、GlnR、AhrC、FhuR 等众多氮代谢调控蛋白, 其中大多数调控因子受生长介质影响, 例如 CodY 在嗜热链球菌中调控作用受支链氨基酸浓度影响^[25]。精氨酸代谢调控蛋白 ArgR 通过与 ARG-box 靶序列结合, 参与精氨酸合成代谢, 在结构和 DNA 结合位点与 AhrC 高度相似^[26]; ArgR 与启动子区域存在 2–3 个 ARG-box 的结构结合更紧密^[27]。本研究中, EMSA 结果显示加入 50 倍浓度竞争探针后, 标记探针的阻滞迁移消失, 表明 P_{epsA} 与 ArgR 存在特异性结

合; 通过 BIL 检测 P_{epsA} 与 ArgR 结合情况显示, 两者解离系数低, 结合稳定, 两种检测结果都与先前 Pull-down 方法得到的结果一致。为寻找 ArgR 结合启动子的 DNA 序列, 基于公布在 Regprecise 网站 (<http://regprecise.lbl.gov>) 上嗜热链球菌 CNRZ1066 的 ArgR 结合序列, 使用 WebLogo 在线服务器 (<http://weblogo.berkeley.edu>) 生成 motif 信息: 5'-WwTdWATAAWwATAvAdW-3'(图 6); 同时综合嗜热栖热菌已报道的 ARG-box^[23]: 5'-nkTGyATAnTtTTnCNNG-3', 大肠杆菌的 ARG-box^[28]: 5'-WnTGnATWWWATnCANW-3', 以及乳酸乳球菌的 ARG-box^[29]: 5'-AwwGwATAAWWATrCWnw-3', 通过 MEME 网站 (<http://meme-suite.org/>) 对 *eps* 基因簇中 P_{epsA} 启动子中 ARG-box 位点进行预测 (表 3), 分析结果表明 P_{epsA} 上可能存在 2 个 ArgR 结合位点, 分别为 ARG-box1: TTATTATTATTAT AACAT 和 ARG-box2: TTTATATCATTTTCCATT。ARG-box 缺失突变实验 (图 4) 表明 P_{epsA} 仅缺失 1 个 ARG-box 仍与 ArgR 有结合作用, 但缺失上述 2 个 ARG-box 时结合阻滞现象消失, 证明了预测的准确性。存在 2 个结合位点可能使 ArgR 与 P_{epsA} 有更强的结合效果, 具有显著影响嗜热链球菌 *eps* 基因簇转录调控的潜力。

```
>sequence 1: AAAATATAAAAATAAAAA
>sequence 2: TATGAATAAATATTCAAT
>sequence 3: AATGTATAATAATACATT
>sequence 4: AGTTAATAAATATAGAAA
>sequence 5: AATTAATAAAAATAAAAA
>sequence 6: TTATAAGAAAATACTTT
>sequence 7: ACTTTATTATTATACAGT
>sequence 8: AATGAATAAAAACACAAT
>sequence 9: AATGAATTTTAATACAAA
>sequence 10: TTTGAATAATCATAAAAA
```

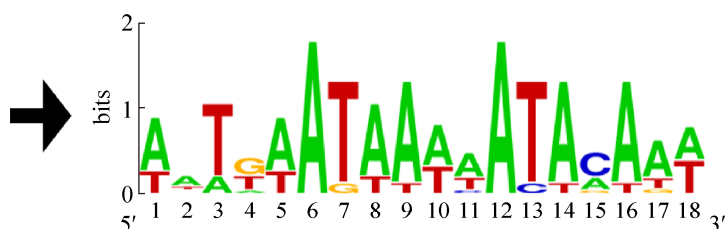


图 6. 嗜热链球菌 CNRZ1066 的 ARG-box motif

Figure 6. The motif of ARG-box generated based on *S. thermophilus* CNRZ1066.

表 3. *eps* 基因簇 ArgR 结合位点分析Table 3. Analysis of ArgR binding sites on *eps* biosynthetic gene cluster

Strains	Site (in S-3)	P-value	Sequence (5'→3')	Motif (5'→3')
<i>Streptococcus thermophilus</i> CNRZ1066	16471–16488	2.2×10^{-5}	TTATTATTATTATAACAT	WwTdWATAAWwATAvAdW
	16568–16585	3.9×10^{-5}	TTTATATCATTTCATT	
<i>Escherichia coli</i>	16568–16585	9.8×10^{-5}	TTTATATCATTTCATT	WnTGnATWWWWATnCANW
<i>Thermus thermophilus</i>	16568–16585	4.8×10^{-5}	TTTATATCATTTCATT	nkTGyATAnTtTnCNNG
	16600–16617	4.8×10^{-5}	CTTTTACATTTTGTAGTAG	
<i>Lactococcus lactis</i>	16471–16488	1.4×10^{-4}	TTATTATTATTATAACAT	AwwGwATAAWWATrCWnw
	16568–16585	5.0×10^{-4}	TTTATATCATTTCATT	

ArgR 蛋白作为转录调控因子在不同代谢途径中调控作用不同。例如,在嗜热链球菌中 ArgR 蛋白作为转录激活因子,激活精氨酸合成代谢中 *arc* 操纵子的结构基因表达^[24];而在嗜热栖热菌、谷氨酸棒杆菌和乳酸乳球菌等细菌中作为转录抑制子,结合操纵子上不同启动子,负调控精氨酸合成与分解代谢。在嗜热栖热菌中 ArgR 通过结合 *argG* 启动子,负调控精氨酸合成代谢^[23];在谷氨酸棒杆菌中 ArgR 并非结合 *argG* 启动子,而是通过结合 *argC* 启动子,负调控精氨酸合成代谢^[8];在乳酸乳球菌中 ArgR 结合 *argC*、*argG* 和 *arcA* 启动子,负调控精氨酸代谢^[26]。本研究为进一步证实 ArgR 功能,我们采用基因弱化策略来替代 *argR* 基因敲除,通过反义 RNA 和正常 RNA 碱基互补来弱化基因表达^[30];反义 RNA 对基因表达抑制效果受多重因素影响,同一区域不同组合的反义序列在嗜热链球菌中效果也差异明显^[31]。通过导入 *argR* 反义序列弱化 *argR* 基因表达,弱化后的 EPS 产量在 12 h 未变化,在 24 h 显著提高;而过表达 *argR* 使 EPS 合成显著减少,证实 ArgR 作为一个转录抑制子,负调控嗜热链球菌 EPS 合成。本研究表明 ArgR 通过结合 *eps* 基因簇中 P_{epsA} 启动子的 ARG-box 位点,负调控嗜热链球菌 EPS 合成,为阐明嗜热链球菌 EPS 生物合成的转录调控奠定基础。

参考文献

- [1] Cui YH, Xu TT, Qu XJ, Hu T, Jiang X, Zhao CY. New insights into various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(10): 1701.
- [2] Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 2002, 12(2/3): 163–171.
- [3] Dan T, Jin RL, Ren WY, Li T, Chen HY, Sun TS. Characteristics of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* MGA45-4 and the profiles of associated volatile compounds during fermentation and storage. *Molecules*, 2018, 23(4): 878.
- [4] Li YH, Zhang LW, Wang WJ, Zhang LL, Han X, Jiao YH. The flavor property of soft cheese fermented by two stains of *Streptococcus thermophilus* and made of reconstituted milk. *Advanced Materials Research*, 2012, 396–398: 1536–1540.
- [5] Stingle F, Neeser JR, Mollet B. Identification and characterization of the *eps* (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(6): 1680–1690.
- [6] Xiong ZQ, Kong LH, Lai PFH, Xia YJ, Liu JC, Li QY, Ai LZ. Genomic and phenotypic analyses of exopolysaccharide biosynthesis in *Streptococcus thermophilus* S-3. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(6): 4925–4934.
- [7] Cho S, Cho YB, Kang TJ, Kim SC, Palsson B, Cho BK. The architecture of ArgR-DNA complexes at the genome-scale in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(6): 3079–3088.
- [8] Yim SH, Jung S, Lee SK, Cheon CI, Song E, Lee SS, Shin J, Lee MS. Purification and characterization of an arginine regulatory protein, ArgR, in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(12): 1911–1920.
- [9] Tian G, Maas WK. Mutational analysis of the arginine

- repressor of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 1994, 13(4): 599–608.
- [10] Burke M, Merican AF, Sherratt DJ. Mutant *Escherichia coli* arginine repressor proteins that fail to bind L-arginine, yet retain the ability to bind their normal DNA-binding sites. *Molecular Microbiology*, 1994, 13(4): 609–618.
- [11] Van Duyne GD, Ghosh G, Maas WK, Sigler PB. Structure of the oligomerization and L-arginine binding domain of the arginine repressor of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 256(2): 377–391.
- [12] Lu CD, Houghton JE, Abdelal AT. Characterization of the arginine repressor from *Salmonella typhimurium* and its interactions with the carAB operator. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 225(1): 11–24.
- [13] Thompson JF, Landy A. Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to λ site-specific recombination complexes. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(20): 9687–9705.
- [14] Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Botas A, Santamarta I, Martín JF, Liras P. ArgR of *Streptomyces coelicolor* is a versatile regulator. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32697.
- [15] Lee SY, Kim YH, Min J. Conversion of phenol to glutamate and proline in *Corynebacterium glutamicum* is regulated by transcriptional regulator ArgR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 713–720.
- [16] Fujiwara K, Tsubouchi T, Kuzuyama T, Nishiyama M. Involvement of the arginine repressor in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*. *Microbiology*, 2006, 152(12): 3585–3594.
- [17] Xu ZY, Guo QB, Zhang H, Wu Y, Hang XM, Ai LZ. Exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S-3: Molecular, partial structural and rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 194: 132–138.
- [18] Ai LZ, Zhang H, Guo BH, Chen W, Wu ZJ, Wu Y. Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74(3): 353–357.
- [19] Cuesta G, Suarez N, Bessio MI, Ferreira F, Massaldi H. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 52(1): 69–73.
- [20] Sunitha K, Chung BH, Jang KH, Song KB, Kim CH, Rhee SK. Refolding and purification of Zymomonas mobilis levansucrase produced as inclusion bodies in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression & Purification*, 2000, 18(3): 388–393.
- [21] Smith VR, Walker JE. Purification and folding of recombinant bovine oxoglutarate/malate carrier by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expression & Purification*, 2003, 29(2): 209–216.
- [22] Puri NK, Crivelli E, Cardamone M, Fiddes R, Bertolini J, Ninham B, Brandon MR. Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies by using a cationic surfactant. *The Biochemical Journal*, 1992, 285(3): 871–879.
- [23] Iwanaga N, Ide K, Nagashima T, Tomita T, Agari Y, Shinkai A, Kuramitsu S, Okada-Hatakeyama M, Kuzuyama T, Nishiyama M. Genome-wide comprehensive analysis of transcriptional regulation by ArgR in *Thermus thermophilus*. *Extremophiles*, 2014, 18(6): 995–1008.
- [24] Fulde M, Willenborg J, de Greeff A, Benga L, Smith HE, Valentin-Weigand P, Goethe R. ArgR is an essential local transcriptional regulator of the arcABC operon in *Streptococcus suis* and is crucial for biological fitness in an acidic environment. *Microbiology*, 2011, 157(2): 572–582.
- [25] Qi MX, Mei F, Wang H, Sun M, Wang GJ, Yu ZN, Je Y, Li MS. Function of global regulator CodY in *Bacillus thuringiensis* BMB171 by comparative proteomic analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(2): 152–161.
- [26] Larsen R, Buist G, Kuipers OP, Kok J. ArgR and AhrC are both required for regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(4): 1147–1157.
- [27] Cunin R, Eckhardt T, Piette J, Boyen A, Pièrard A, Glansdorff N. Molecular basis for modulated regulation of gene expression in the arginine regulon of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 1983, 11(15): 5007–5019.
- [28] Maas WK. The arginine repressor of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 1994, 58(4): 631–640.
- [29] Larsen R, Van Hijum SAFT, Martinussen J, Kuipers OP, Kok J. Transcriptome analysis of the *Lactococcus lactis* ArgR and AhrC regulons. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(15): 4768–4771.
- [30] Schmiedel JM, Klemm SL, Zheng YN, Sahay A, Blüthgen N, Marks DS, Van Oudenaarden A. Gene expression. MicroRNA control of protein expression noise. *Science*, 2015, 348(6230): 128–132.
- [31] Sturino JM, Klaenhammer TR. Antisense RNA targeting of primase interferes with bacteriophage replication in *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(3): 1735–1743.

Arginine regulator ArgR regulates exopolysaccharides biosynthesis of *Streptococcus thermophilus*

Hui Pan¹, Xinxin Liu¹, Linghui Kong¹, Yongjun Xia¹, Boxing Yin², Lianzhong Ai¹, Zhiqiang Xiong^{1*}

¹ Shanghai Engineering Research Center of Food Microbiology, School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

² Kangyuan Dairy Co. Ltd., Yangzhou University, Yangzhou 225004, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The regulatory effect of arginine regulator ArgR on the biosynthesis of exopolysaccharides (EPS) was studied in *Streptococcus thermophilus*. [Methods] ArgR from *S. thermophilus* was heterologously expressed by *Escherichia coli*, and purified by urea denaturation refolding and Ni²⁺ affinity chromatography. The interaction and kinetic information between ArgR and *eps* promoter P_{epsA} were detected by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and biolayer interferometry (BLI). The yield alteration of EPS was determined by phenol-sulfuric acid assay when the gene *argR* overexpressed or repressed. [Results] Heterologous expression of ArgR was formed inclusion body, and 2.95 mg/mL of soluble protein was achieved by urea denaturation refolding. EMSA and BLI analysis showed that ArgR can specifically bind with the promoter P_{epsA} and their affinity was high because of the low dissociation. Increased expression of *argR* gene reduced EPS synthesis and the suppression raised. [Conclusion] It is the first time to report that ArgR can specifically bind the promoter of *eps* gene cluster and negatively regulate EPS synthesis in *S. thermophilus*.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, ArgR, exopolysaccharide biosynthesis, transcriptional regulation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31871776, 31771956) and by the Natural Science Foundation of Shanghai (18ZR1426800)

*Corresponding author. Tel: +86-21-55803272; E-mail: xiongzq@hotmail.com

Received: 31 December 2019; Revised: 6 February 2020; Published online: 29 February 2020