



关键酶基因转录水平对重组大肠杆菌合成 NAD⁺的影响

穆晓清^{*}, 杨琳琰, 徐岩

江南大学酿酒科学与酶技术中心, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide)是生物体内一种重要的辅因子,其细胞内含量对于 NAD⁺依赖型氧化还原反应和有关生化合成代谢具有重要意义。为强化辅因子合成,本文通过不同诱导条件下关键酶基因转录水平与产物合成水平的相关性分析,利用增加正向关键酶基因拷贝数策略提高胞内氧化型辅酶 NAD⁺的浓度。【方法】以实验室前期构建的大肠杆菌 NA016 为出发菌株,分别从诱导温度、诱导剂浓度、诱导时机三个方面进行了诱导条件的优化,并利用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术对代谢改造中的有关过表达基因进行了转录水平分析,确定了 NAD⁺含量与这些过表达基因转录水平之间的相关性,增加对 NAD⁺合成代谢具有正向作用的基因拷贝数以进一步提高胞内 NAD⁺水平。【结果】通过诱导条件优化实验确定菌株 NA016 的最适诱导温度,在诱导时机为 OD₆₀₀ 达到 0.6 时加入 0.8 mmol/L 的 IPTG 可使胞内 NAD⁺含量提高 35.37%;转录水平方面分析发现基因 *nadE* 和 *pncB* 的表达对 NAD⁺的合成具有正向调节作用。进一步增加菌株 NA016 中关键酶基因 *nadE* 和 *pncB* 的拷贝数可使辅酶含量再次提高 22.46%,最高可达 41.66 μmol/g DCW。【结论】优化诱导条件和增加关键酶基因拷贝数可以提高氧化型辅酶 NAD⁺的含量,这为促进大肠杆菌胞内 NAD⁺合成的研究提供借鉴意义。

关键词: 大肠杆菌, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 诱导优化, 转录水平, 相关性

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide)是细胞内一种重要的辅酶,存在于所有生物体中^[1-2]。其氧化型 NAD⁺作为主要的氢受体在生物体内参与了众多的生理代谢过程,包括糖酵解、三羧酸循环、呼吸链等代谢途径,为胞

内的氧化还原反应、能量代谢、基因表达调控等提供了能量和氧化还原力^[3]。研究表明,胞内 NAD⁺含量的变化会影响整个代谢网络以及细胞生长特性,这对提高生物催化效率、增加代谢通量、获得目标代谢产物具有重要意义^[4]。

基金项目: 国家重点研发项目(2021YFC2100100); 国家自然科学基金(21336009, 21176103); 高等学校学科创新引智计划(111-2-06)

*通信作者。Tel: +86-510-85918201; E-mail: xqmu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2021-10-13; 修回日期: 2021-10-30; 网络出版日期: 2021-11-03

为定向改变微生物细胞内辅酶浓度，前期已有研究利用 DNA 重组技术加强、削弱或者构建新的与 NAD^+ 代谢相关途径(图 1)从而实现胞内 NAD^+ 含量的调控^[5]。例如，Heuser 等^[6]通过表达 Preiss-Handler 辅酶合成途径中编码烟酸磷酸核糖转移酶基因 *pncB* 和 NAD^+ 合成酶基因 *nadE*，实现了大肠杆菌细胞内 NAD^+ 含量的大幅提高。Han 等^[7]删除了 NADH 焦磷酸酶(由 *nudC* 和 *nudE* 基因编码)以削弱 NAD^+ 的分解代谢途径。周雍进等^[8]敲除了由 *ushA* 编码降解 NAD^+ 的周质酶基因以维持其稳定性。基于对大肠杆菌辅酶代谢途径的认识，我们实验室在前期的研究中利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在基因组上实现了

Preiss-Handler 途径关键合成酶基因 *nadE* 和 *pncB* 的过表达以及辅酶分解代谢相关基因的敲除。同时结合磷酸戊糖途径和腺嘌呤补救途径继续过表达强化了 3 个内源性基因(*zwf*、*gnd*、*prs*)并引入外源基因 *ado1* 来增加 NAD^+ 合成共底物 PRPP 的供给以及提供 ATP 驱动力^[9-10]。这四种策略的结合改造最终获得一株超级菌株 NA016，研究结果显示其与初始菌株 *E. coli* BL21(DE3)相比 NAD^+ 含量提高 734%^[11]。

诱导条件也是影响代谢工程改造菌 NA016 细胞生长和目标代谢物产量的重要因素^[12-13]。诱导条件的差异会导致不同基因在表达水平上存在差异，这种差异使得胞内蛋白表达受到影响进

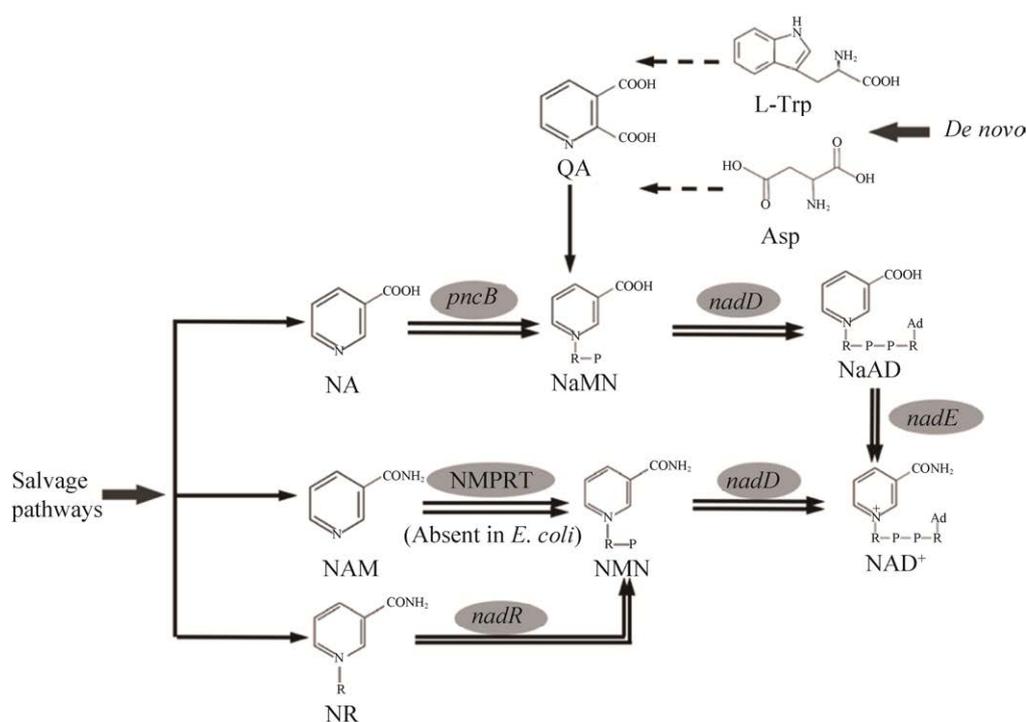


图 1. NAD^+ 的从头合成和补救合成路径

Figure 1. *De novo* and Salvage pathways of NAD^+ synthesis route. L-Trp: L-tryptophane; Asp: aspartic acid; QA: quinolinic acid; NA: nicotinic acid; NaMN: nicotinic acid mononucleotide; NaAD: nicotinic acid adenine dinucleotide (Deamino-NAD); NAD^+ : nicotinamide adenine dinucleotide; NAM: nicotinamide; NR: nicotinamide riboside; NMN: nicotinamide mononucleotide.

而调节目标代谢物的生成。对于目前代谢途径中有关基因的表达调控, 有研究指出基于转录水平上的分析可以从系统生物学的角度集中解读生物代谢与基因表达之间的关系。通过不同诱导条件下对基因转录水平的研究有利于揭示不同基因对目的产物合成贡献上的差异, 从而实现对目标产物产量的直接调控^[14]。

因此, 本研究针对诱导条件优化对菌株 NA016 中的胞内 NAD⁺含量的影响机制进行了初步探索。在不同的优化条件下, 我们同时采用了荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术在转录水平探究重组菌株过表达 *nadE*、*pncB*、*zwf*、*gnd*、*prs* 和 *ado1* 这 6 个基因对 NAD⁺含量的影响, 通过解析上述基因表达与 NAD⁺含量变化的相关性, 获得对辅酶合成具有正向作用效应的基因, 并通过这些正向作用基因

的多拷贝表达验证其功能性, 进一步提高 NAD⁺的合成水平。这为阐明目标代谢产物和基因表达之间的联系、提高胞内辅酶浓度提供了借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物: 本研究所用的相关菌株、质粒详见表 1。

1.1.2 主要试剂及仪器: 氨苄青霉素、卡那霉素、壮观霉素的使用浓度分别为 100、50、50 mg/L, IPTG 的初始条件为 0.1 mmol/L, 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 质粒小量抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、RT-qPCR 实验试剂盒, 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 高保真聚合酶 Primer STAR MAX DNA polymerase、

表 1. 本研究所用的菌株、质粒

Table 1. Strains and plasmids in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Resource
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	The cloning host	Lab stock
NA016	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>ushA::nadE-SD-AS-pncB</i> , gene <i>nadE-SD-AS-pncB</i> with P_{T7} , Δ <i>nudE::prs</i> , gene <i>prs</i> with P_{T7} , Δ <i>mazG::gnd-SD-AS-zwf</i> , gene <i>gnd-SD-AS-zwf</i> with P_{T7} , Δ <i>amn</i> , Δ <i>add::ado1</i> , gene <i>ado1</i> with P_{T7}	Lab stock
NA006	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>ushA::nadE-SD-AS-pncB</i> , gene <i>nadE-SD-AS-pncB</i> with P_{T7}	Lab stock
<i>E. coli</i> BL-1	<i>E. coli</i> BL21(DE3) with pET-21a- <i>nadE-SD-AS-pncB</i> , Amp ^R	Lab stock
NA006, Δ <i>nudC</i>	NA006 with <i>nudC</i> deleted	This study
NA006, Δ <i>nudC::nadE-SD-AS-pncB</i>	NA006 with <i>nadE-SD-AS-pncB</i> integrated into the <i>nudC</i> locus, gene <i>nadE-SD-AS-pncB</i> with P_{T7}	This study
NA016, Δ <i>nudC::nadE-SD-AS-pncB</i>	NA016 with <i>nadE-SD-AS-pncB</i> integrated into the <i>nudC</i> locus, gene <i>nadE-SD-AS-pncB</i> with P_{T7}	This study
Plasmids		
pET21a- <i>nadE-SD-AS-pncB</i>	T_7 promoter, Amp ^R	Lab stock
pCas	<i>repA101(Ts)kan Pcas-cas9 ParaB -Red lacIq</i>	Lab stock
pTargetF	<i>Ptrc-sgRNA-pMB1, Kan^R</i>	Lab stock
pTargetF- <i>nudC</i>	<i>pMB1 aadA sgRNA, Spe^R</i>	Lab stock

RNA 提取试剂, 购自宝生物工程(大连)有限公司; 葡萄糖、酵母膏提取物、胰蛋白胨, 购自国药集团化学试剂有限公司; NAD^+ 、烟酸、腺苷、L-阿拉伯糖等分析生化试剂均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

超高液相色谱仪、高效液相色谱柱, 美国 Waters 公司; 电转仪, 美国 Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; 分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司。

1.1.3 培养基及培养条件: 摇瓶种子培养基及发酵培养基均采用 LB 培养基(氯化钠 10 g/L、胰蛋白胨 10 g/L、酵母膏提取物 5 g/L、pH 7.2); 培养条件为 37 °C、200 r/min, 培养时间为 18 h。初

始条件为诱导温度 25 °C, 在 OD_{600} 为 0.6 左右加入 0.1 mmol/L 的 IPTG。根据重组菌株的代谢途径改造分析, 涉及磷酸戊糖途径的改造需补充添加终浓度为 25 mmol/L 的葡萄糖, 涉及 Preiss-Handler 途径和腺嘌呤补救途径需添加合成路径中的前体物质, 即烟酸、腺苷。烟酸终浓度为 0.1 mmol/L, 腺苷终浓度为 2 mmol/L。

1.1.4 引物设计与合成: 根据 NCBI 中 *E. coli* BL21(DE3) *nudC* 基因(ID:948498)的上下游序列设计引物(表 2); 用于 RT-qPCR 的引物亦列于表 2 中, 要求用于 RT-qPCR 的引物特异性好且 PCR 时无引物二聚体产生。引物由天霖生物科技(上海)有限公司合成。

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

Primer	Sequence (5'→3')
<i>nudC</i> -u-F (p1)	GGCGGCGTCAAGCACCAGCAGAATCAGCT
<i>nudC</i> -u-R (p2)	GTCAGGCGGTCAGTGTATCAAGCTCTTGCACTACCTTTGC
<i>nudC</i> -D-F (p3)	GCAAAGGTAGTGCAAGAGCTTGATACTGACCGCCTGAC
<i>nudC</i> -D-R (p4)	GCCGCTTCCACCATGTAGGTCGCCAGC
<i>nudC</i> -u-R/EB (p5)	TATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGCAGCTCTTGCACTACCTTTGC
<i>nudC</i> -D-F/EB (p6)	CCGCATATTAATAAAGCCAGTTAATGATACTGACCGCCTGAC
<i>nadE</i> -u (p7)	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGG
<i>pncB</i> -R (p8)	TTAACTGGCTTTTTTAATATGCGGAAGGTCGAACGCTTTGCG
RT-16sRNA-F	TCGGGAACCGTGAGACAGG
RT-16sRNA-R	CCGCTGGCAACAAAGGATAAG
RT- <i>pncB</i> -F	TGGTTCCAGGCACATCAGCA
RT- <i>pncB</i> -R	TGCAATGCCAAGTTGGTCGG
RT- <i>nadE</i> -F	ATTGCGGGAAGCAGGCATTG
RT- <i>nadE</i> -R	GGCTTCTGCTGCATGATCGG
RT- <i>prs</i> -F	GCGCTATCGCTAAGCTGCTG
RT- <i>prs</i> -R	AGTCACGACCTGCAACGTCA
RT- <i>zwf</i> -F	GGTAACGCAAACAGCCCAGG
RT- <i>zwf</i> -R	ACGCCCTACGCCGATAATCC
RT- <i>gnd</i> -F	AAAGATCAGCGTGTGCGC
RT- <i>gnd</i> -R	CGCACGCAGTTGAGAGAAGC
RT- <i>adol</i> -F	GACGTACGCGCTGAATACCT
RT- <i>adol</i> -R	AGCTCGTCAAAAATAGCCAT

1.2 *nudC* 基因敲除质粒的构建

提取 *E. coli* BL21(DE3)的基因组 DNA, 提取方法参照文献[15]。为了构建敲除基因 *nudC* 的同源臂, 分别以引物 p1/p2 和 p3/p4, 扩增 *nudC* 基因的上下游片段, 然后通过重叠延伸 PCR 将 *nudC* 上下游片段连接起来。为了构建敲除基因 *nudC* 同时敲入基因 *nadE* 和 *pncB* 的同源臂, 分别以引物 p1/p5 和 p6/p4、p7/p8 扩增 *nudC* 基因的上下游片段和基因 *nadE-SD-AS-pncB*, 然后继续通过重叠延伸 PCR 将 *nudC* 的上下游和基因 *nadE-SD-AS-pncB* 分别连接起来形成同源臂 DNA。

1.3 CRISPR/Cas 介导的基因敲除

用于构建突变体菌株的感受态细胞制备方法参见文献[16]。首先将 pCas 转化到改造菌株中, 然后挑取含有 pCas 质粒的单克隆加入到 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.2 时, 向摇瓶中加入终浓度为 30 mmol/L 的阿拉伯糖诱导 pCas 载体上 λ -Red 蛋白的表达, 然后摇至 OD_{600} 约为 0.5–0.6 时回收菌体制备电转感受态。电转化时, 向 100 μ L 的感受态细胞加入 500 ng 的 pTargetF-*nudC* 质粒和 1 μ g 的同源臂 DNA 片段, 轻柔混合后, 加入到预冷的 0.1 cm 电转杯中, 在 2.5 kV 的条件下放入电转仪 (Bio-Rad) 中电转, 电转完后迅速加入 1 mL 的 LB 培养基, 30 °C、200 r/min 培养 2 h 进行复苏, 然后接种菌体于 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 壮观霉素的 LB 双抗固体培养基上, 30 °C 培养过夜, 转化后用菌液或菌落 PCR 进行检测。

1.4 重组菌株的质粒消除

为了消除 pTargetF-*nudC* 和 pCas 质粒, 将重组菌(含有 pTargetF-*nudC* 和 pCas)在 LB 培养基中

(加入 50 mg/L 的卡那霉素, 并补加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导靶向 pTargetF-*nudC* 上的 pMB1 的 sgRNA-pMB1 表达)过夜培养, 并将其涂布于含 50 mg/L 卡那霉素的平板上用于消除 pTargetF-*nudC*, 待平板上长出单克隆, 挑取单克隆在含 50 mg/L 壮观霉素的 LB 试管中培养过夜, 不长即为 pTargetF-*nudC* 消除的重组菌, 然后挑取该重组菌在 42 °C 的环境中培养, 用以消除 pCas 质粒。

1.5 RNA 的提取和 cDNA 第一链合成

参照 TaKaRa RNAiso Plus Total RNA 提取试剂盒说明书提取大肠杆菌总 RNA, 对总 RNA 进行浓度、完整性等质量检验后于 -80 °C 保存备用。采用 HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)合成 cDNA 第一链。

1.6 RT-qPCR

以大肠杆菌 16S rRNA 为内标, 按 ChamQ[™] Universal SYBR[®] qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行 RT-qPCR 实验。反应程序如下: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 循环 40 次。每个样品重复 3 次。RT-qPCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对基因各 C_t 值进行定量分析^[17]。

1.7 重组菌株最终生长状态和 NAD⁺含量的测定

细胞培养结束后, 利用分光光度计测定在 600 nm 波长下的吸光值 OD_{600} 。胞内 NAD⁺的提取采用超声破碎, 具体步骤参照文献[18–19]。NAD⁺ 超高液相色谱检测的条件: 流动相为 10 mmol/L 乙酸铵和乙腈梯度洗脱; 流速为 0.3 mL/min, 洗脱时间 12 min。在 0–5 min, 流动相中乙酸铵溶液与乙腈的比例由 99.5 : 0.5 降低到 95 : 5, 接下来 1.4 min 内, 流动相比比例由 95 : 5 变化为 30 : 70, 在第 9 分钟时流动相重新回到初始状态并持续保

持 3 min。紫外检测波长 254 nm，柱温 30 °C，进样量 2 μ L。NAD⁺的液相洗脱图谱如图 1-D 所示。

2 结果和分析

2.1 诱导条件优化对重组菌株 NAD⁺合成的影响

研究表明，包括诱导温度、诱导剂浓度以及诱导时机在内的诱导条件对目的蛋白的表达具有重要影响。为了探究不同诱导条件对重组菌株胞内 NAD⁺合成的影响，首先考察了菌株 NA016

在不同诱导温度下胞内 NAD⁺含量的变化以及发酵培养结束时的菌体生长状态。由图 2-A 可以看出，菌体 OD_{600} 随着诱导温度的升高而升高，表明诱导温度的变化影响了菌体繁殖和代谢。研究表明在较低的诱导温度下，虽然微生物细胞生长速度慢，但低温有利于菌株 NA016 多个异源蛋白的表达和正确折叠，从而促进胞内辅酶的积累。当诱导温度为 17 °C 时，胞内 NAD⁺浓度最高达 27.33 μ mol/g DCW，比初始条件 25 °C 诱导提高 8.75%。

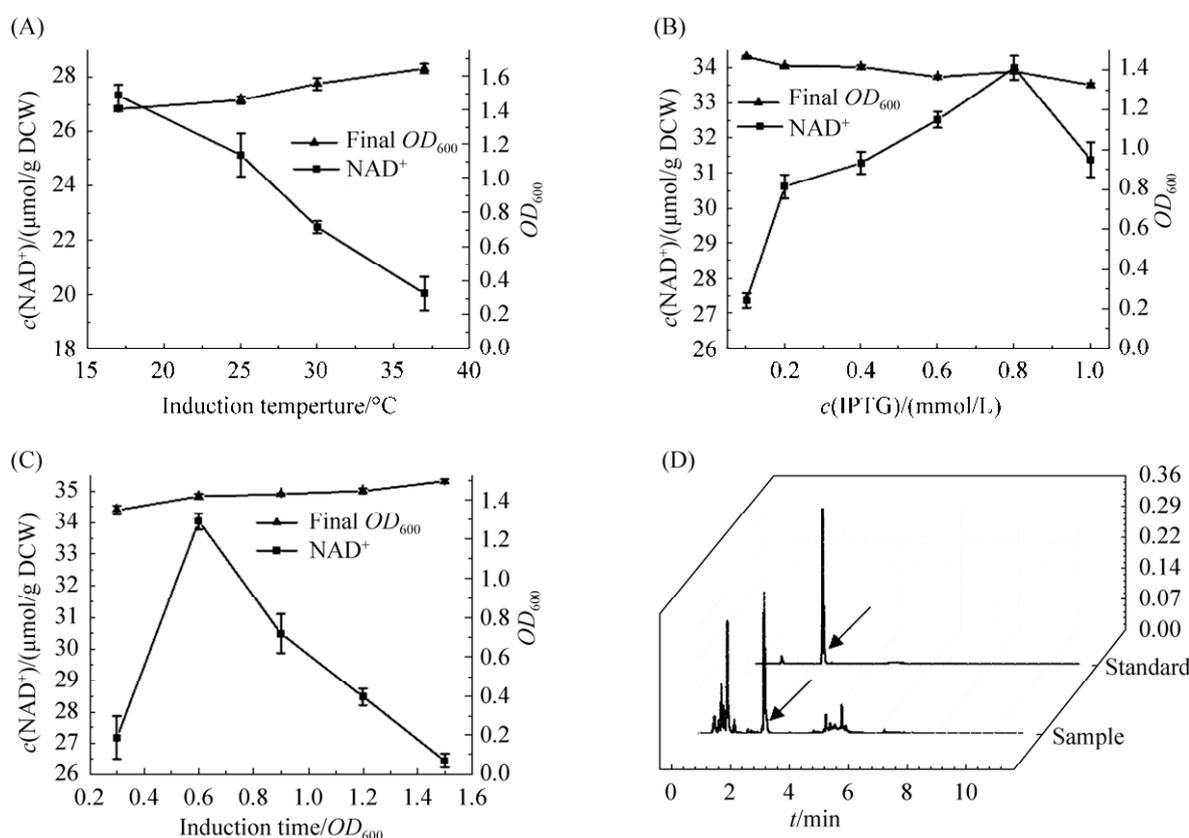


图 2. 诱导温度(A)、诱导剂浓度(B)和诱导时间(C)等对 NAD⁺合成的影响及 NAD⁺液相色谱图(D)

Figure 2. Effect of inducing conditions optimization on the content of NAD⁺ and UPLC map of intracellular NAD⁺ detection. A: Effect of inducing temperature optimization on the content of NAD⁺; B: Effect of IPTG concentration optimization on the content of NAD⁺; C: Effect of inducing time optimization on the content of NAD⁺; D: UPLC map of intracellular NAD⁺ detection. Standard deviation is the dispersion degree of 3 parallel experimental data relative to mean value. Data in A, B and C are the mean \pm S.D. of triplicate samples.

其次考察诱导剂浓度优化对胞内 NAD⁺合成的影响。不同诱导剂浓度对基因的表达会产生影响, 较低的诱导浓度不利于外源蛋白的高效表达, 过高的诱导剂浓度则会抑制微生物的生长, 从而间接影响 NAD⁺合成。图 2-B 实验结果表明, 随着 IPTG 添加量增加, NAD⁺含量变化趋势呈现先增后降, 当 IPTG 浓度达 0.8 mmol/L 时, NAD⁺含量达到最大值 33.95 μmol/g DCW, 相比于原有 17 °C、0.1 mmol/L 诱导剂诱导, NAD⁺含量提高 24.22%。

不同诱导时机也会改变胞内 NAD⁺含量以及菌体生长状态。图 2-C 考察了在大肠杆菌对数生长期的不同诱导时间对胞内 NAD⁺含量的影响。结果表明在 *OD*₆₀₀ 达 0.6 时添加诱导剂, 胞内 NAD⁺的积累能达最大。而当 *OD*₆₀₀ 超过 0.6 时, NAD⁺的浓度会随着诱导时机的推移而下降。根据细胞生长特点, 诱导时机过于提前可能会增加菌体代谢负担而使生长受到影响, 诱导时机太晚则不利于胞内蛋白表达从而导致 NAD⁺含量下降。

总结上述实验结果可知, 不同诱导条件下的胞内 NAD⁺含量存在明显差异。根据研究分析, 这些诱导条件的改变是通过影响基因的表达水

平从而实现辅酶合成代谢途径的调控, 因此对相关基因转录规律的研究对于进一步提高胞内 NAD⁺浓度具有重要意义。

2.2 诱导条件优化过程重组菌株代谢途径关键基因的相关性分析

为探究不同诱导条件下基因表达调控的影响, 对菌株 NA016 中 6 个过表达基因进行相对转录水平分析。在诱导温度优化时, 以最适诱导温度 17 °C 的转录水平作为对照, 分析图 3-A 可知辅酶 Preiss-Handler 合成途径中的关键合成酶基因 *nadE* 和 *pncB* 的相对转录水平都是随着温度的升高而降低。这与图 2-A 中 NAD⁺含量随温度变化具有相同规律。基因 *prs*、*zwf*、*gnd* 整体呈现高于对照组的转录水平, 推测这是由于诱导温度升高促进菌体的生长以及细胞对葡萄糖的利用, 从而使得磷酸戊糖途径中的有关基因表达得到加强。腺嘌呤补救合成途径中的基因 *adoI* 也大致呈现类似规律, 随着诱导温度的升高, 转录水平上调。

除诱导温度之外, 诱导剂浓度和诱导时机的变化也会造成基因表达的差异。但由图 3-B 和 3-C 的实验结果可知, 无论是以最佳诱导剂浓度还是最佳

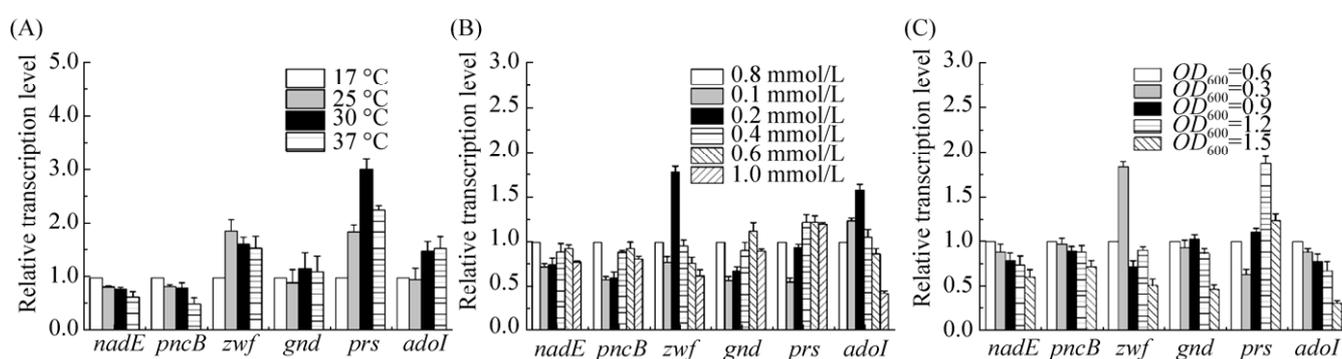


图 3. 温度(A)、诱导剂浓度(B)和诱导时间(C)对 NAD⁺合成关键基因转录水平的影响

Figure 3. The effect of induction conditions on the transcription level of key genes involved NAD⁺ synthesis. A: Effect of inducing temperature optimization on the transcriptional level of key genes involved NAD⁺ synthesis; B: Effect of IPTG concentration on the transcriptional level of key genes involved NAD⁺ synthesis; C: Effect of inducing time on the transcriptional level of key genes involved NAD⁺ synthesis. Standard deviation is the dispersion degree of 3 parallel experimental data relative to mean value. Data in A, B and C are the mean±S.D. of triplicate samples.

诱导时机条件下的转录水平作为对照, 基因 *nadE* 和 *pncB* 在最适条件下都具有最大的相对转录水平。

为了探究不同基因表达与目的产物合成之间的联系, 利用 SPASS 24.0 软件对 6 个过表达基因的转录水平和 NAD⁺含量进行了相关性分析, 结果如表 3 所示。研究发现, 来自 Preiss-Handler 合成途径中的基因 *nadE* 和 *pncB* 的表达与 NAD⁺合成存在正相关, 而来自磷酸戊糖途径中的基因 *zwf*、*gnd*、*prs*, 只有 *prs* 与 NAD⁺合成呈现负相关。对于腺嘌呤补救途径中基因 *ado1* 的表达水平, 由于其与 NAD⁺含量的相关系数并不具有显著性, 根据实验结果不能判断其对 NAD⁺合成的影响。类似结果也存在于对 *zwf*、*gnd* 基因表达的相关性分析。

2.3 增加关键合成酶基因 *nadE* 和 *pncB* 的拷贝数对 NAD⁺合成的影响

在 *nudC* 位点再次引入基因 *nadE*-SD-AS-*pncB* 以研究增加关键合成酶基因的拷贝数对 NAD⁺合成的影响, 命名新的重组菌株为 NA006, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB*。利用上游同源臂的上游引物 p1 和下游同源臂的下游引物 p4 进行菌液 PCR 验证。根据序列分析可知, 基因 *nudC* 敲除同时基因 *nadE*-SD-AS-*pncB* 在该位点敲入的阳性克隆菌株经 PCR 扩增后可获得 3263 bp 的 DNA 片段。与此同时, 为了排除单敲除基因 *nudC* 对 NAD⁺合成的影响, 我们也构建了菌株 NA006, $\Delta nudC$ 。

图 4-B 的实验结果比较了重组菌株与对照菌株 NA006 相应基因的转录水平差异(设定对照菌

株 NA006 基因转录水平为 1)。从图中可以看出, 重组菌株 NA006 $\Delta nudC$ 由于只是敲除 *nudC*, 所以其基因 *nadE* 和 *pncB* 的相对转录水平与对照相比没有明显差异, 图 4-A 中的 NAD⁺含量变化也差异不大。相反, 重组菌株 NA006, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB* 由于再次增加基因 *nadE* 和 *pncB* 的拷贝数, 其 *nadE* 和 *pncB* 的相对转录水平分别上调 1.89 倍和 1.43 倍, 且 NAD⁺含量达到 15.90 $\mu\text{mol/g}$ DCW, 相比于对照菌株提高 16.06%。

2.4 增加正向调控基因 *nadE* 和 *pncB* 拷贝数对菌株 NA016 中 NAD⁺合成的影响

由前述实验结果可知, 菌株 NA016 经诱导条件优化胞内 NAD⁺浓度最高可达 34.02 $\mu\text{mol/g}$ DCW。为进一步促进胞内 NAD⁺的合成, 重组菌株 NA016 在其 *nudC* 位点实现了正向调控基因基因 *nadE* 和 *pncB* 拷贝数的增加, 命名新的重组菌株为 NA016, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB*。根据图 5-A 所示, 菌株 NA016, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB* 的 NAD⁺含量相对于菌株 NA016, NAD⁺浓度再次提高 22.46%, 最高可达 41.66 $\mu\text{mol/g}$ DCW。同时, NADH 浓度也由 5.63 $\mu\text{mol/g}$ DCW 提高至 8.28 $\mu\text{mol/g}$ DCW, 表明正向调控基因能够同时提高细胞内 NAD⁺及 NADH 的浓度。荧光定量 PCR 实验结果也表明, 基因 *nadE* 和 *pncB* 的相对转录水平分别较 NA016 上调了 2.58 倍和 0.51 倍, 再次验证 *nadE* 和 *pncB* 的过量表达使 NAD⁺的 Preiss-Handler 合成途径得到加强从而使辅酶含量进一步提高。

表 3. NAD⁺含量与相关基因表达量的相关性分析

Table 3. Pearson's correlation analysis between NAD⁺ content and expression levels of related genes

Gene name	<i>nadE</i>	<i>pncB</i>	<i>zwf</i>	<i>gnd</i>	<i>prs</i>	<i>ado1</i>
Correlation coefficient R with NAD ⁺	0.609*	0.558*	-0.464	-0.048	-0.637*	-0.352
Significance P	0.016	0.031	0.082	0.865	0.011	0.198

*: significant correlation ($P < 0.05$).

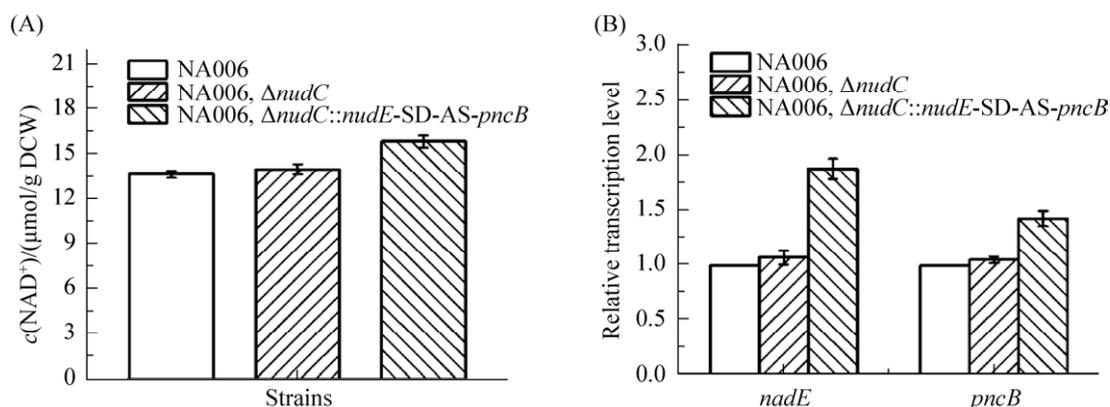


图 4. 菌株 NA006、菌株 NA006, $\Delta nudC$ 和菌株 NA006, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB* 的 NAD⁺含量(A)及相关基因 *nadE*、*pncB* 的转录水平分析(B)

Figure 4. Analysis of NAD⁺ content and transcription level of related genes in strain NA006, strain NA006, $\Delta nudC$ and strain NA006, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB*. A: The determination of NAD⁺ content of strain NA006, strain NA006, $\Delta nudC$ and strain NA006, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB*; B: Analysis of relative transcriptional levels of *nadE* and *pncB* of strain NA006, strain NA006, $\Delta nudC$ and strain NA006, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB*. Standard deviation is the dispersion degree of 3 parallel experimental data relative to mean value. Data in A and B are the mean±S.D. of triplicate samples.

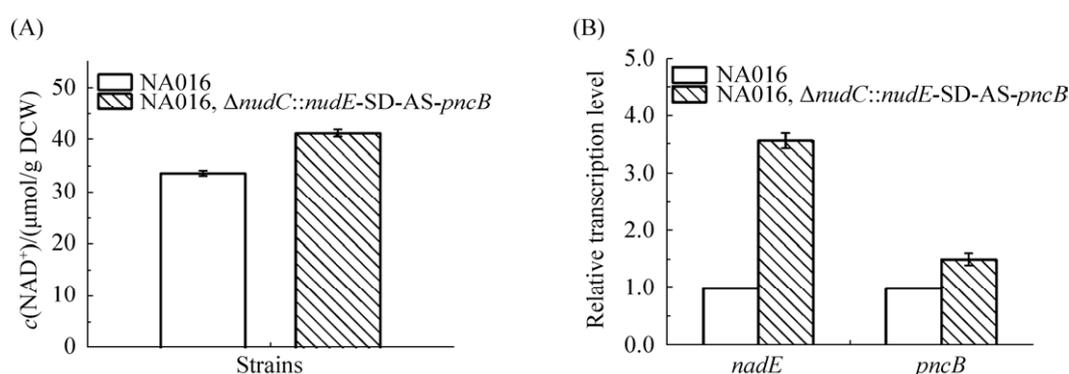


图 5. 菌株 NA016 和菌株 NA016, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB* 的 NAD⁺含量(A)及相关基因 *nadE*、*pncB* 的转录水平分析(B)

Figure 5. Analysis of NAD⁺ content and transcription level of related genes in strain NA016 and strain NA016, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB*. A: The determination of NAD⁺ content of train NA016 and strain NA016, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB*; B: Analysis of relative transcriptional levels of *nadE* and *pncB* of train NA016 and strain NA016, $\Delta nudC::nadE$ -SD-AS-*pncB*. Standard deviation is the dispersion degree of 3 parallel experimental data relative to mean value. Data in A and B are the mean±S.D. of triplicate samples.

3 讨论

NAD⁺作为生物体内一种重要的辅因子, 对

于维持各种生理生化反应具有重要意义。此前, 为了提高胞内 NAD⁺含量, 利用代谢工程手段已经对 NAD⁺的相关代谢途径进行了大量研究^[3]。

但是大部分研究仅针对单一代谢途径的改造,为了探究多种代谢途径改造对 NAD⁺合成的影响,我们在之前的实验中构建了重组菌株 NA016,分别从 NAD⁺的 Preiss-Handler 合成途径、磷酸戊糖途径、腺嘌呤补救途径实现了部分基因的过表达。由于这些基因参与了与辅酶合成有关的代谢,它们的过表达对 NAD⁺生成都有一定程度的促进作用。

研究表明,诱导条件优化是改善目标代谢产物含量的重要手段。因此,本研究通过系列诱导优化实验确定了培养的最适诱导温度、诱导剂浓度以及诱导时机,使重组菌株 NA016 的 NAD⁺浓度进一步提高 35.37%,最高可达 34.02 μmol/g DCW。与此同时,测定不同诱导条件下基因转录与 NAD⁺含量之间的关系可知,代谢途径中的基因表达对目的产物合成影响各异。由于微生物代谢是一个复杂过程,涉及多个代谢流的分配与调整,因此有些关键酶基因的表达可能存在正向叠加效应,增加这些正向调控基因的表达能够维持目的产物长久合成。相反,有些基因因为位于代谢流中的关键节点,过量表达虽能一定程度促进目的产物合成,但一旦超过该基因表达调控的最大值,则可能改变产物合成的代谢流从而影响目的产物产量^[20]。对于本实验菌株 NA016 中过表达的 6 个基因,相关性分析结果显示烟酸磷酸核糖转移酶基因 *pncB* 和 NAD⁺合成酶基因 *nadE* 的表达水平与 NAD⁺合成存在正相关。此前,*nadE* 和 *pncB* 已被证实是辅酶 Preiss-Handler 合成途径中的关键酶^[4],由此推测对于胞内 NAD⁺的合成代谢,Preiss-Handler 途径的过表达相比于其他代谢途径具有更重要的促进意义。对于磷酸戊糖途径中的基因 *prs*,相关系数显示其具有负调控作

用,原因可能是基因 *prs* 直接参与 NAD⁺合成共底物 PRPP 的生成,作为众多核苷酸合成的前体,PRPP 合成太多可能会影响胞内其他核苷酸的代谢通量进而影响 NAD⁺的合成^[10]。而有关基因 *zwf*、*gnd* 和 *ado1* 过量表达对辅酶合成的影响作用,由于代谢调控具有复杂性所以还需进一步的实验验证。

基于对基因表达调控的认识,我们在菌株 NA006 中的 *nudC* 位点再次提高基因 *nadE* 和 *pncB* 的拷贝数,验证正向调控基因拷贝数增加对 NAD⁺合成代谢的影响。与 NA006 相比,重组菌株 NAD⁺的含量提高 16.06%,符合 *nadE* 和 *pncB* 正向调节 NAD⁺合成的推论。与此同时,为了实现 NAD⁺含量上的突破,在菌株 NA016 中也采用了类似的改造手段。RT-qPCR 结果显示,*nadE* 和 *pncB* 的转录水平分别提高了 2.58 倍和 0.51 倍,转录水平的上调使得辅酶含量再次提高 22.46%,最高可达 41.66 μmol/g DCW。根据之前的报道,微生物代谢流的分配在生长过程中并非一成不变,而是随着胞内代谢物水平及环境的变化发生动态调整。在本实验中,我们通过增加代谢途径中正向调节基因的拷贝数,保证了目的产物的高效合成。这种将基因转录水平调节与 NAD⁺合成代谢途径的结合应用可以更加有针对性地对目标途径进行动态调控及机制解析。

参考文献

- [1] Liu Y, Clement J, Grant R, Sachdev P, Braidy N. Quantitation of NAD⁺: Why do we need to measure it? *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - General Subjects*, 2018, 1862(12): 2527–2532.
- [2] Yaku K, Okabe K, Nakagawa T. NAD metabolism: Implications in aging and longevity. *Ageing Research Reviews*, 2018, 47: 1–17.

- [3] Chen XL, Liu J, Luo QL, Liu LM. Manipulation of cofactor balance in microorganisms. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(1): 16–26. (in Chinese)
陈修来, 刘佳, 罗秋玲, 刘立明. 微生物辅因子平衡的代谢调控. *生物工程学报*, 2017, 33(1): 16–26.
- [4] Shi H, Mu XQ, Yang XL, Zhan SB, Tian RZ, Nie Y, Xu Y. Cloning and expression of key enzymes for NAD⁺ synthesis and optimization of fermentation in *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(7): 1112–1125. (in Chinese)
施慧, 穆晓清, 杨兴龙, 战绍斌, 田荣臻, 聂尧, 徐岩. 大肠杆菌 NAD⁺合成关键酶的克隆表达及发酵优化. *微生物学报*, 2017, 57(7): 1112–1125.
- [5] Qin Y, Dong ZY, Liu LM, Chen J. Manipulation of NADH metabolism in industrial strains. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(2): 161–169. (in Chinese)
秦义, 董志姚, 刘立明, 陈坚. 工业微生物中 NADH 的代谢调控. *生物工程学报*, 2009, 25(2): 161–169.
- [6] Heuser F, Schroer K, Lütz S, Bringer-Meyer S, Sahm H. Enhancement of the NAD(P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation. *Engineering in Life Sciences*, 2007, 7(4): 343–353.
- [7] Han Q, Eiteman MA. Enhancement of NAD(H) pool for formation of oxidized biochemicals in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(11): 939–950.
- [8] Wang L, Zhou YJ, Ji DB, Lin XP, Liu YX, Zhang YX, Liu WJ, Zhao ZK. Identification of UshA as a major enzyme for NAD degradation in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 58/59: 75–79.
- [9] Fang HT, Xie XX, Xu QY, Zhang CL, Chen N. Enhancement of cytidine production by coexpression of *gnd*, *zwf*, and *prs* genes in recombinant *Escherichia coli* CYT15. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(2): 245–251.
- [10] Zhang J, Wang CX, Shi HB, Wu DH, Ying WH. Extracellular degradation into adenosine and the activities of adenosine kinase and AMPK mediate extracellular NAD⁺-produced increases in the adenylate pool of BV₂ microglia under basal conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018, 12: 343.
- [11] Yang LY, Mu XQ, Nie Y, Xu Y. Improving the production of NAD⁺ via multi-strategy metabolic engineering in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2021, 64: 122–133.
- [12] Hu XY, Xu MJ, Bu XL, Xu J. Medium optimization and biosynthetic gene cluster doubling enhance xiamenmycin yield. *Microbiology China*, 2017, 44(3): 680–688. (in Chinese)
胡晓艳, 徐岷涓, 步绪亮, 徐俊. 发酵条件优化及基因簇加倍对厦门霉素生物合成的影响. *微生物学通报*, 2017, 44(3): 680–688.
- [13] Jiang JP, Wu XR, Chen YJ. Strategy to solve cofactor issues in oxidoreductase catalyzed biocatalytic applications. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(4): 410–419. (in Chinese)
江金鹏, 吴旭日, 陈依军. 解决氧化还原酶反应体系中辅酶问题的策略及其应用. *生物工程学报*, 2012, 28(4): 410–419.
- [14] Cao P, Hu D, Zhang J, Zhang BQ, Gao Q. Enhanced avermectin production by rational feeding strategies based on comparative metabolomics. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(2): 281–292. (in Chinese)
曹鹏, 胡栋, 张君, 张变强, 高强. 基于比较代谢组学的理性优化方法提高阿维菌素产量. *微生物学报*, 2017, 57(2): 281–292.
- [15] Huang RZ. A mass extraction method of bacterial DNA. *Microbiology*, 1991, 18(1): 47–50. (in Chinese)
黄锐之. 细菌 DNA 的一种大量提取方法. *微生物学通报*, 1991, 18(1): 47–50.
- [16] Sharan SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nature Protocols*, 2009, 4(2): 206–223.
- [17] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [18] Yamada K, Hara N, Shibata T, Osago H, Tsuchiya M. The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 2006, 352(2): 282–285.
- [19] Li HP, Zhao MM, Yu ZM, Lei HJ, Zhao HF. Simultaneous determination of adenosine phosphate and coenzyme I in cells of *saccharomyces cerevisiae* by RP-HPLC. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2012, 31(5): 492–498. (in Chinese)

李会品, 赵谋明, 俞志敏, 雷宏杰, 赵海锋. RP-HPLC 法同时测定酿酒酵母胞内磷酸腺苷和辅酶 I. 食品与生物技术学报, 2012, 31(5): 492–498.

[20] Zhang WJ, Jin XR, Xu YQ, Li JH, Du GC, Kang Z. Advances in the development of expression and regulation

systems for *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(4): 26–33. (in Chinese)

张维娇, 金学荣, 徐雅晴, 李江华, 堵国成, 康振, 枯草芽孢杆菌表达与调控工具相关研究进展. 生物技术通报, 2020, 36(4): 26–33.

Effects of transcription levels of key enzyme genes on NAD⁺ production in recombinant *Escherichia coli*

Xiaoqing Mu^{*}, Linyan Yang, Yan Xu

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) is an important cofactor in organisms, and its intracellular concentration plays an important role in NAD⁺-dependent redox reaction and related biochemical synthesis. In order to strengthen the synthesis of cofactors, we optimized the induction conditions and increased the copies of key enzyme genes to elevate the intracellular NAD⁺ concentration. [Methods] First, the induction temperature, inducer concentration, and induction time were optimized for the starting strain NA016 of *Escherichia coli*. Meanwhile, the transcriptional levels of overexpressed genes in metabolic modification were determined by real-time fluorescence quantitative PCR. Subsequently, the correlations between NAD⁺ content and the transcription levels of these overexpressed genes were explored. Finally, the copies of the genes positively regulating NAD⁺ production were up-regulated to improve the intracellular NAD⁺ concentration. [Results] At the optimized induction conditions, the NAD⁺ concentration in NA016 increased by 35.37%. The genes *nadE* and *pncB* positively regulated the production of NAD⁺, and up-regulating the copies of these two genes in NA016 increased the NAD⁺ concentration by 22.46% to 41.66 μmol/g DCW. [Conclusion] Optimizing the induction conditions and up-regulating the copy number of key enzyme genes can increase the NAD⁺ concentration. These research findings provide reference for the study of NAD⁺ synthesis.

Keywords: *Escherichia coli*, NAD⁺, optimization of induction conditions, transcription level, correlation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100100), by the National Natural Science Foundation of China (21336009, 21176103) and by the Overseas Expertise Introduction Project for Discipline Innovation, China (112-2-06)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85918201; E-mail: xqmu@jiangnan.edu.cn

Received: 13 October 2021; Revised: 30 October 2021; Published online: 3 November 2021