

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

49(5):591-596; 4 May 2009

ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

含苏氨酸操纵子重组质粒的构建及其对大肠杆菌 L-苏氨酸积累的影响

张雪^{1,2}, 闫继爱^{1,2}, 于雷², 张国强², 张芸², 陈宁¹, 温廷益^{2*}

(¹天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

(²中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

摘要 【目的】通过分子生物学手段构建重组质粒, 将其转入野生型大肠杆菌 W3110, 分析含苏氨酸操纵子基因的质粒及质粒定点突变解除反馈抑制时, 对 L-苏氨酸积累的影响。【方法】以 W3110 染色体 DNA 为模板, PCR 扩增苏氨酸操纵子基因, 即启动子 *ThrLp*、编码前导肽基因 *thrL* 以及 *thrA*、*thrB*、*thrC* 基因, 通过重叠延伸 PCR 的方法对 *thrA* 基因定点突变, 解除苏氨酸对它的反馈抑制, 构建出重组表达质粒 pWYE112 和 pWYE134。5 L 发酵实验测定 L-苏氨酸的产量。【结果】经 5 L 发酵罐发酵产酸实验, W3110 的 L-苏氨酸产量为 0.036 ± 0.004 g/L, 携带含苏氨酸操纵子质粒的 W3110 菌株 L-苏氨酸产量为 2.590 ± 0.115 g/L, 质粒上 *thrA* 解除反馈抑制后, L-苏氨酸的产量增加到 9.223 ± 1.279 g/L。【结论】过表达苏氨酸操纵子基因可以使 L-苏氨酸积累, 进一步解除 *thrA* 基因的反馈抑制, 可以增强 L-苏氨酸积累的效果, 为 L-苏氨酸工程菌改造的进一步研究奠定了基础。

关键词: L-苏氨酸; 重叠延伸 PCR; 大肠杆菌; 发酵; 定点突变

中图分类号: Q933, Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)05-0591-06

L-苏氨酸是人和动物所必需的 8 种氨基酸之一, 在食品和医药方面都发挥着重要的作用^[1-3]。L-苏氨酸的生产方法主要有蛋白质水解提取法、化学合成法和微生物发酵法^[4]。微生物发酵法以其成本低廉、废弃物排放少成为目前 L-苏氨酸生产的主流方法。目前, L-苏氨酸的主要生产菌株有粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[5], 而 *E. coli* 由于其生长速度快等生理特征成为 L-苏氨酸生产的最常用菌株^[6]。经过传统诱变得到的菌株会产生大量次级突变, 具有菌体生长速

度慢等弱点, 是目前工业生产中难以解决的问题。基因工程技术改造菌株, 如基因敲除、点突变等, 因其无次级突变、改造目的性强、实验周期短等优势逐渐受到人们的重视。

目前生产上所使用的 L-苏氨酸工程菌中大多数都含有基因工程质粒, 质粒上带有 *thrA*、*thrB*、*thrC* 这 3 个基因。*thrA*、*thrB*、*thrC* 基因分别编码大肠杆菌 L-苏氨酸代谢途径中的天冬氨酸激酶 (aspartokinase, AK)、高丝氨酸激酶 (homoserine kinase) 和苏氨酸合成酶 (threonine synthase) 3 个关键酶和编码前导肽的基因 *thrL* 及启动子 *ThrLp* 共同构成了苏氨酸操纵子。其中天冬氨酸激酶是天冬氨

基金项目: 国家 863 计划 (2006AA02Z216)

* 通信作者。Tel: +86-10-62526173; Fax: +86-10-62522397; E-mail: twenty@im.ac.cn

作者简介: 张雪 (1984-), 女, 天津人, 硕士研究生, 从事生物药物合成方面的研究。E-mail: meixiabe@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-01-16; 修回日期: 2009-02-13

酸合成苏氨酸催化第一步反应的酶,具有3个同工酶,分别为AKI、AKII和AKIII。AKI由*thrA*基因编码,受苏氨酸的反馈抑制以及苏氨酸和异亮氨酸的协同反馈阻遏^[1]。高丝氨酸激酶和苏氨酸合成酶是苏氨酸合成过程中的最后两个酶。目前工业生产中所用的L-苏氨酸工程菌所带有的质粒大多是在质粒pAYC32的基础上构建的,分子量较大,不易进一步改造。

本研究利用重叠延伸PCR(gene splicing by overlap extension PCR,简称SOE PCR)技术对连接在pMD19-T质粒上的苏氨酸操纵子*thrA*基因进行了定点突变,在过表达苏氨酸操纵子的同时解除苏氨酸对*thrA*基因的反馈抑制,并将其转入野生型*E. coli* W3110中。5 L发酵研究表明,L-苏氨酸积累有明显提高,为L-苏氨酸基因工程质粒的进一步改造奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*) K12 W3110(NBRC 12713)购自日本技术评价研究所生物资源中心(NITE Biological Resource Center, NBRC),质粒pMD19-T vector购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器:Ex-Taq DNA聚合酶、dNTP、限制性内切酶、DL15000核酸Marker等购自大

连宝生物工程有限公司,酵母粉、胰蛋白胍购自英国Oxoid公司,琼脂粉、DGL4000核酸Marker购自北京鼎国生物技术有限责任公司,染色体DNA提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;其它葡萄糖、无机盐、有机试剂等均为国产分析纯试剂。PCR仪(5332,德国艾本德股份公司(Eppendorf AG));UVP凝胶成像仪(JY04S-3B,北京君意东方电泳设备有限公司);电泳仪(JY300C,北京君意东方电泳设备有限公司);紫外分光光度计(UV-1800,上海美普达仪器有限公司);5L四联离位灭菌发酵罐(BIOTECH系列,上海保兴生物设备工程有限公司);高效液相色谱(Agilent 1200系列,安捷伦科技有限公司)。

1.1.3 培养基:①2-YT液体培养基,②LB固体培养基,③种子及发酵培养基,其中①②培养基见参考文献[7]。种子培养基(g/L):葡萄糖25, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5,酵母粉2, pH值7.0。发酵培养基(g/L):葡萄糖50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, KH_2PO_4 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1,酵母粉2, pH值7.0。

1.1.4 引物的设计:本研究所用引物均为本实验室根据大肠杆菌W3110染色体DNA序列进行设计,在上海Invitrogen公司进行合成的(表1)。下划线部分为重叠延伸PCR引物的重叠区域,重叠碱基数为34个。画框碱基为突变碱基。

表1 本次实验所用引物

Table 1 Primers in this study

Name	Prime(5'→3')
WY165	GCCTTTTAGCAACGAGA
WY166	AACGGCGGTGTATTCTC
WY212	<u>GCGCGTGACATCGCTGCAAAGACGCGCGCCGCA</u> TGCCGACCATCCCTTTCAT
WY213	TGGCGCGCGCTCTTTTCAGCGATGTCACGCGCCGCTATTT T CGTGGTGTCT

1.2 菌体的培养条件

从LB固体斜面上挑取一环菌接入10 mL种子培养基,37℃、220 r/min培养9 h,转接1%到200 mL种子培养基,37℃、220 r/min培养9 h,以3%的接种量转接入5 L发酵罐中,装液量为2 L,37℃发酵38 h(根据我们的前期实验,大肠杆菌发酵L-苏氨酸38 h时,L-苏氨酸有最大的积累量,所以本实验发酵时长均为38 h)。本实验使用5L四联离位灭菌发酵罐,每次发酵做三组平行实验(n=3)。发酵初期溶氧控制在25%~30%之间,对数生长期溶氧控制在50%左右,稳定期溶氧控制在25%~30%^[8]。流加25%的氨水将pH控制在7.0,流加

80%的葡萄糖维持葡萄糖浓度在10~15 g/L。

1.3 L-苏氨酸含量测定

采用高效液相分析系统(HPLC)柱前衍生测定。衍生方法:取发酵液1 mL,12000×g离心20 min,取上清液过膜。取过膜后的发酵液10 μL加入1.5 mL离心管中,加入已经配制好的衍生缓冲溶液(4.2%碳酸氢钠溶液)200 μL,摇匀后再加入衍生试剂溶液(1% 2,4-二硝基氟苯乙腈溶液, DNFB)100 μL,摇匀,将离心管置于60℃水浴中暗处恒温加热60 min后取出,放置待溶液冷却至室温后,加入定容缓冲液(磷酸二氢钾、氢氧化钠水溶液)稀释至1 mL并摇匀,放置15 min后可以开始进行色谱分离。色谱分

离条件:柱长为 250 mm,柱温为 33℃,检测波长为 360 nm,流动相总流量为 1 mL/min^[9]。

1.4 L-苏氨酸产量数据的统计学分析

本文中 L-苏氨酸产量数据的统计学分析采用 SAS 9.0 软件,其中:菌株 W3110 与 W3110 (pWYE112) L-苏氨酸产量差异的统计学意义检验采用 Cochran 检验方法分析比较;菌株 W3110 (pWYE112)与 W3110 (pWYE134) L-苏氨酸产量差异的统计学意义检验采用 Wilcoxon 秩和检验方法分析比较。 $P < 0.05$ 时结果具有统计学意义。

1.5 表达载体 pWYE112 的构建

以 *E. coli* W3110 染色体 DNA 为模板, WY165、WY166 为引物 PCR 扩增出苏氨酸操纵子基因。采用 50 μ L PCR 反应体系:10 \times Ex PCR buffer 5 μ L, 染色体 DNA 0.5 μ L, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, 引物 (20 μ mol/L) 各 1 μ L, Ex Taq 酶 0.25 μ L, 加去离子水到 50 μ L。反应条件为:94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 4 min 30 s, 循环 30 次; 72℃ 5 min 30 s。将 PCR 产物切胶纯化后连接到 pMD19 T-vector 上, 构建出质粒 pWYE112 (图 1)。

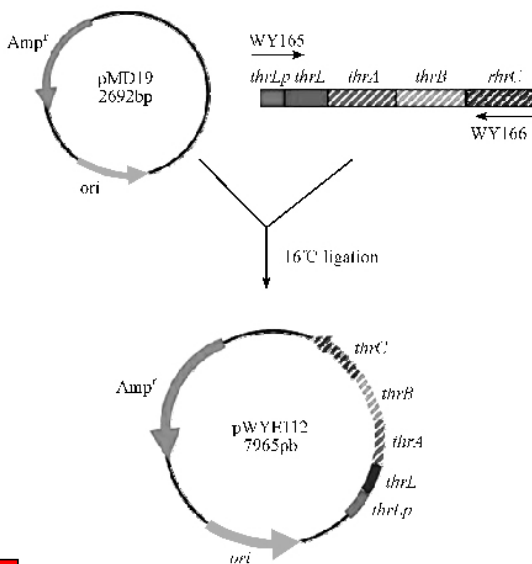


图 1 质粒 pWYE112 的构建

Fig. 1 Construction of plasmid pWYE112.

1.6 表达载体 pWYE134 的构建

利用重叠延伸 PCR 对 *thrA* 基因的第 1034 位碱基进行定点突变 (C 变为 T), 即编码蛋白 THRA 的第 345 位的丝氨酸变为苯丙氨酸。以 *E. coli* W3110 染色体 DNA 为模板, WY165、WY212 和 WY213、WY166 分别为引物 PCR 扩增出苏氨酸操纵子基因的前段 (*thrABC-1*) 和后段 (*thrABC-2*)。将 *thrABC-1* 和 *thrABC-2* 切胶纯化后作为模板, 以 WY165 和

WY166 为引物进行重叠延伸 PCR (图 2)。采用 50 μ L PCR 反应体系:10 \times Ex PCR buffer 5 μ L, *thrABC-1* 和 *thrABC-2* DNA 各 0.5 μ L, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, 引物 (20 μ mol/L) 各 1 μ L, Ex Taq 酶 0.25 μ L, 加去离子水到 50 μ L。反应条件为:94℃ 2 min; 94℃ 30 s; 53℃ 30 s; 72℃ 4 min 30 s, 循环 30 次; 72℃ 5 min 30 s。将 DNA 产物切胶纯化后连接到 pMD19 T-vector 上, 构建出质粒 pWYE134。

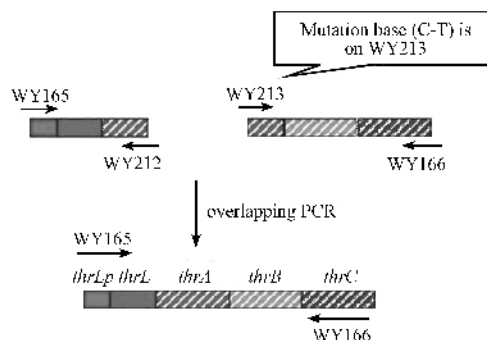


图 2 重叠 PCR 示意图

Fig. 2 Gene splicing by overlap extension PCR.

2 结果

2.1 目的基因的扩增

以 *E. coli* W3110 染色体 DNA 为模板, WY165、WY166 为引物 PCR 扩增出 *E. coli* W3110 染色体上的苏氨酸操纵子基因。经琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 在约 5300 bp 处有目的条带。通过重叠延伸 PCR 在 *thrA* 基因上做定点突变, 首先用 PCR 扩增出 *thrABC-1* 和 *thrABC-2*, 再通过重叠延伸 PCR 延伸出含有目的点突变的苏氨酸操纵子片段。电泳结果表明, 在约 1500 bp 和 3800 bp 处有目的条带, 为 *thrABC-1* 和 *thrABC-2*。重叠延伸之后在约 5300 bp 处有条带, 为完整的苏氨酸操纵子片段。

2.2 质粒 pWYE112 的构建及其酶切验证

将 PCR 扩增出的苏氨酸操纵子片段连接到质粒 pMD19 T-vector 上, 构建出质粒 pWYE112。用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切验证, 经琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 在约 5300 bp 和 2600 bp 处均有目的条带, 表明质粒构建成功。

2.3 质粒 pWYE134 的构建及其酶切验证

以 *E. coli* W3110 染色体 DNA 为模板, 分别 PCR 扩增出 *thrABC-1* 和 *thrABC-2*, 将这两个片段切胶纯化后作为模板进行重叠延伸 PCR。扩增出的产物经纯化后连接在 pMD19 T-vector 上, 构建出质粒 pWYE134。用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Sal* I 双

酶切验证,经琼脂糖凝胶电泳,结果表明,在约5300 bp和2600 bp处有目的条带,表明质粒构建成功。质粒 WYE134 上的 *thrA* 基因片段经测序在目的碱基上发生定点突变, *thrA* 第 1034 位碱基 C 变为 T,即第 345 位的丝氨酸变为苯丙氨酸。

2.4 过表达苏氨酸操纵子对大肠杆菌 L-苏氨酸积累的影响

在重组质粒 pWYE112 上过表达苏氨酸操纵子基因之后转化进 *E. coli* W3110 中,在 5 L 发酵罐中进行发酵产酸实验,结果表明,L-苏氨酸有一定的积累,产量由 W3110 的 0.036 ± 0.004 g/L 增加到 2.590 ± 0.115 g/L(图 3),最高一次发酵产量可达到 2.721 g/L(图 4-A)。说明过表达苏氨酸操纵子基因,可以使 L-苏氨酸有所积累($P = 0.007$)。

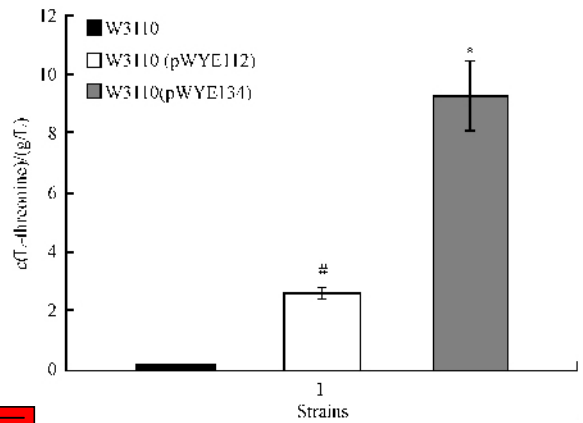


图3 L-苏氨酸发酵 38 h 产量图

Fig.3 Production of 38 h fermentation of L-threonine. Each bar was the mean \pm SD from different strains (W3110 $n = 3$; W3110(pWYE112) $n = 3$; W3110(pWYE134) $n = 3$. n represented numbers of fermentation). # $P < 0.05$ compared with W3110; * $P < 0.05$ compared with W3110 (pWYE112).

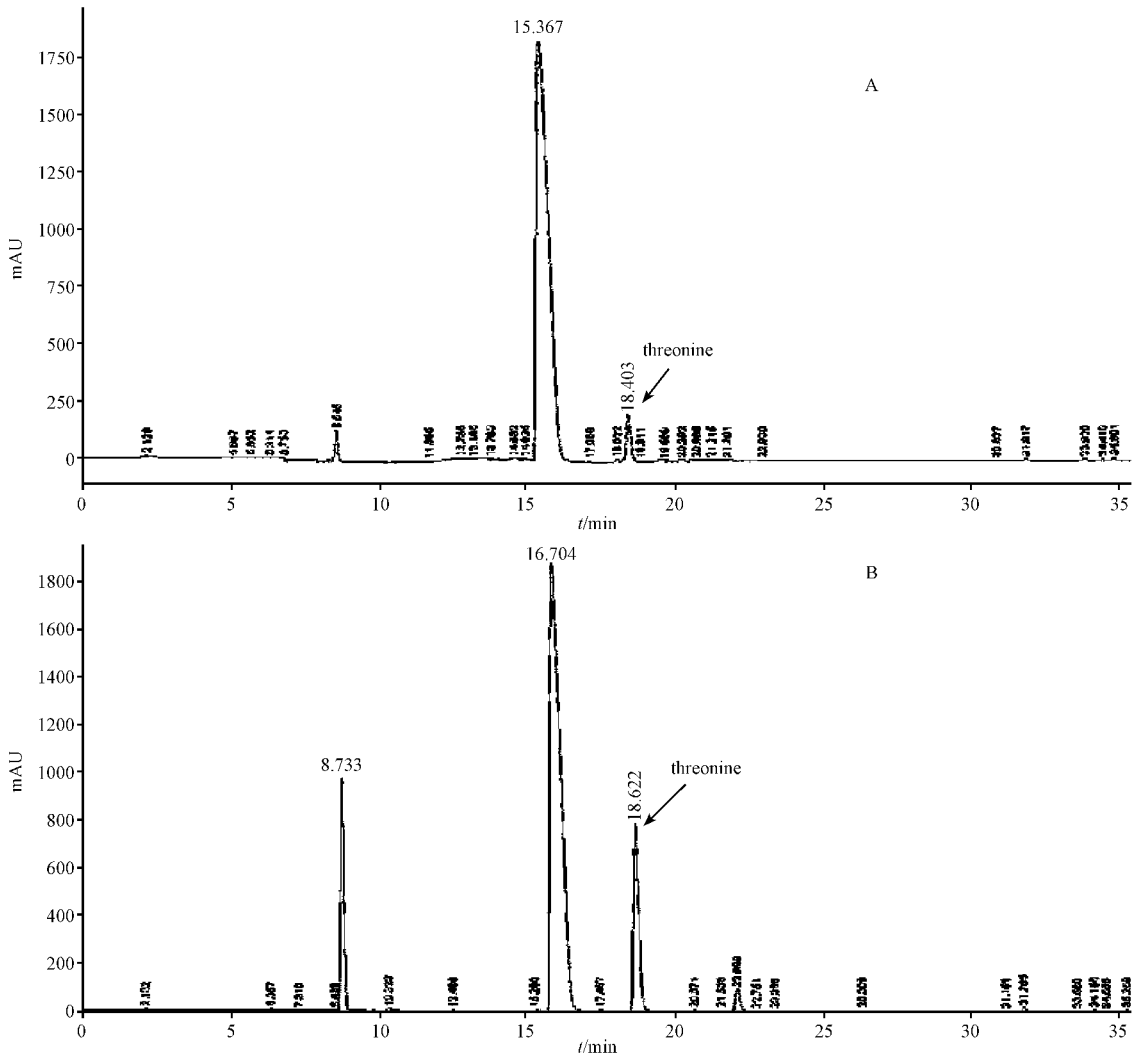


图4 高效液相测定苏氨酸浓度色谱图

Fig.4 Concentration of threonine by HPLC. A:Concentration of threonine of W3110(pWYE112); B:Concentration of threonine of W3110 (pWYE134).

2.5 解除 *thrA* 基因反馈抑制对大肠杆菌 L-苏氨酸发酵的影响

我们在重组质粒 pWYE134 上对苏氨酸操纵子 *thrA* 基因进行定点突变,使其上第 345 位的丝氨酸变为苯丙氨酸。将质粒 pWYE134 转化进 *E. coli* W3110 中,在 5 L 发酵罐中进行发酵产酸实验,结果表明,解除苏氨酸对 *thrA* 的反馈抑制后,L-苏氨酸的产量明显提高,达到 9.223 ± 1.279 g/L(图 3),最高一次发酵产量达到了 10.702 g/L(图 4-B)。说明解除苏氨酸对 *thrA* 基因的反馈抑制,可以使 L-苏氨酸进一步积累($P = 0.0404$)。

2.6 加入质粒 pWYE112 和 pWYE134 后对 W3110 菌株生长的影响

将 pWYE112 和 pWYE134 分别转入 *E. coli* W3110 中,在 5 L 发酵罐中通过补料连续发酵 38 h。其生长曲线见图 5 所示,结果表明,质粒 pWYE112 和 pWYE134 对 W3110 的生长无明显影响。

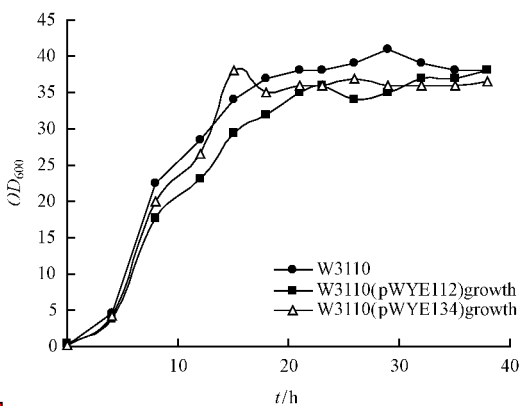


图 5 大肠杆菌 W3110、W3110(pWYE112) 和 W3110(pWYE134) 的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of *Escherichia coli* W3110, W3110(pWYE112) and W3110(pWYE134).

3 讨论

苏氨酸操纵子中的 3 个基因 *thrA*、*thrB*、*thrC* 是天冬氨酸到苏氨酸代谢途径的重要基因,对 L-苏氨酸的积累起了重要作用。目前工业生产中所使用的 L-苏氨酸生产菌普遍携带含有苏氨酸操纵子基因的质粒,这些质粒多由 pAYC32 构建而来,一般在 15 kb 左右,不易进行分子生物学操作,使质粒的研究及进一步改造受到了限制。本研究将包括启动子在内的 *thrL*、*thrA*、*thrB*、*thrC* 基因连接在质粒 pMD19-T 上,构建出分子量较小并表达苏氨酸操纵子的质粒,有利于质粒的进一步改造,如在质粒上连接其它基因(例如苏氨酸外排泵基因 *rhtA*、*rhtB*、*rhtC* 等)以研

究这些基因对 L-苏氨酸积累的作用。将质粒 pWYE112 转化进 W3110 中,经 5L 发酵罐发酵产酸,可使 W3110 的 L-苏氨酸产量由原来的 0.036 ± 0.004 g/L 增加到 2.590 ± 0.115 g/L,证明过表达苏氨酸操纵子基因可以积累 L-苏氨酸。

thrA 基因编码大肠杆菌苏氨酸代谢途径中的天冬氨酸激酶 AKI,其受苏氨酸的反馈抑制以及苏氨酸和异亮氨酸的协同反馈阻遏。Lee KH^[10] 等以大肠杆菌 WL3110 为出发菌株,在 WL3110 染色体上对 *thrA* 基因进行定点突变,使其第 1034 位碱基由 C 变为 T,解除 *thrA* 对苏氨酸的反馈抑制。我们根据 Lee KH 等人的报导,通过重叠延伸 PCR 的方法在质粒上将 *thrA* 的第 1034 位碱基由 C 变为 T,即第 345 位氨基酸由丝氨酸变为苯丙氨酸,解除了苏氨酸对 *thrA* 的反馈抑制,构建出质粒 pWYE134。将其转化进 W3110 中,经 5 L 发酵罐发酵产酸,结果表明 L-苏氨酸得到了进一步积累,说明解除 *thrA* 基因的反馈抑制可以使 L-苏氨酸积累。根据实验结果,我们推测第 345 位丝氨酸突变为苯丙氨酸,导致苏氨酸与天冬氨酸激酶的反馈抑制位点的结合能力减弱,从而解除了苏氨酸对该酶的反馈抑制作用。

此外,我们还比较了 W3110 在转入重组质粒前后生长状态的差异。将重组质粒 pWYE112 和 pWYE134 分别转入 W3110 中,5 L 发酵罐发酵 38 h,其生长曲线与未转入质粒的野生型大肠杆菌 W3110 基本一致,其到达对数生长期与进入稳定期的时间无明显差别,即在未明显改变大肠杆菌 W3110 生长的前提下,进行了 L-苏氨酸积累的改造。

本研究将构建的重组质粒转入 W3110 使其产 L-苏氨酸,对于发酵条件并未做进一步优化,在后续的研究中,将根据“进”“通”“节”“堵”“出”的代谢工程原理,通过分子生物学手段进行改造,以提高 L-苏氨酸产量,降低副产物,这对 L-苏氨酸积累的研究具有重要的意义。

参考文献

- [1] Debabov VG. The threonine story. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 2003 79:113-136.
- [2] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Apply Microbiology and Biotechnology* 2005 69(1):1-8.
- [3] Debabov. Method for preparing strains which produce amino acids. U. S. A patent A278765, 1981-07-14.

- [4] 冯美卿, 瞿超进. L-苏氨酸制备方法评述. 河北工业科技(*HeiBei Journal of Industrial Science & Technology*), 1999, 16(4):15-18.
- [5] Kim YH, Park JS, Cho JY, et al. Proteomic response analysis of a threonine-overproducing mutant of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 2004, 381(3):823-829.
- [6] Lee MH, Lee HW, Park JH, et al. Improved L-threonine production of *Escherichia coli* mutant by optimization of culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2006, 101(2):127-130.
- [7] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版, 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] 徐庆阳, 冯志彬, 孙玉华, 等. 溶氧对 L-苏氨酸发酵的影响. 微生物学通报(*Microbiology*), 2007, 34(2):312-314.
- [9] 黄金, 黄磊, 谢希贤, 等. 利用响应面法优化 L-苏氨酸发酵条件. 食品与发酵工业(*Food and Fermentation Industries*) 2008, 34(1):39-42.
- [10] Lee KH, Park JH, Kim TY, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. *Molecular Systems Biology* 2007, 3:149-156.

Construction of recombinant plasmids containing threonine operon and their effects on L-threonine accumulation

Xue Zhang^{1,2}, Ji'ai Yan^{1,2}, Lei Yu², Guoqiang Zhang², Yun Zhang², Ning Chen¹, Tingyi Wen^{2*}

(¹ College of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract [**Objective**] We reconstructed two recombinant plasmids and studied their effects on L-threonine accumulation of *Escherichia coli* W3110. [**Methods**] We amplified the threonine operon containing ThrLp promoter, leader peptide *thrL*, *thrA*, *thrB* and *thrC* genes by PCR from *E. coli* W3110 chromosome and ligated it into the pMD19 T-vector. Site-directed mutation were carried out by gene splicing by overlap extension PCR to release the feedback inhibition of aspartokinase I (*thrA*). Two recombinant plasmids pWYE112 and pWYE134 were transformed into *E. coli* W3110 by electroporation. Fed-batch cultures of *E. coli* W3110 were carried out in 5-Liter fermentors and the L-threonine concentration was measured by HPLC. [**Results**] Fed-batch fermentation results showed that *E. coli* W3110 could accumulate little L-threonine (0.036 ± 0.004 g/L) but recombinant *E. coli* W3110 harboring the plasmid pWYE112 containing a threonine operon exhibited a L-threonine production of 2.590 ± 0.115 g/L. Furthermore, L-threonine production reached 9.223 ± 1.279 g/L when the feedback inhibition of *thrA* was released. [**Conclusion**] Overexpression of threonine operon can lead to the accumulation of L-threonine. Further release of feedback inhibition of aspartokinase I can enhance its accumulation.

Keywords : L-threonine ; gene splicing by overlap extension PCR ; *Escherichia coli* ; fermentation ; site-directed mutation

(本文责编 : 王晋芳)