

解淀粉芽胞杆菌关键酶基因过表达对鸟苷积累的影响

何逵夫, 马跃超, 杜姗姗, 谢希贤, 徐庆阳, 陈宁*

天津科技大学生物工程学院, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

摘要: 【目的】研究鸟苷生物合成途径中的 3 个关键酶编码基因 (*prs*, *purF*, *guaB*) 过表达对解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 发酵生产鸟苷的影响。【方法】利用穿梭表达载体 PBE43, 构建含有 *prs*、*purF* 和 *guaB* 基因的单独表达载体和 *prs*、*purF* 基因的串联表达载体, 将它们分别转入鸟苷生产菌 *B. amyloliquefaciens* TA208 后, 通过实时定量 PCR 测定各工程菌株内相关基因的转录水平; 通过酶活检测分析关键酶基因扩增对肌苷酸脱氢酶活性的影响; 通过摇瓶发酵实验考察工程菌株与对照菌株的生长、耗糖和鸟苷积累情况。【结果】转录分析结果表明 *prs*、*purF* 和 *guaB* 基因过表达的同时都伴随着自身转录水平的显著上调。与此同时 *prs* 和 *purF* 基因单独表达均轻微下调了嘌呤操纵子的转录水平, 但是 *guaB* 基因的过表达并不影响嘌呤操纵子和 *prs* 基因的转录。酶活分析结果表明 *prs* 和 *purF* 基因扩增并不影响肌苷酸脱氢酶的活性, *guaB* 基因的扩增使其活性提高了 126%。摇瓶发酵实验发现 *prs* 和 *purF* 基因的单独过表达均未促进宿主菌合成鸟苷, 而含 *guaB* 基因过表达载体的工程菌鸟苷产量较出发菌株提高 20.7%。将 *prs* 和 *purF* 基因串联表达后, 鸟苷产量提高 14.4%, 糖苷转化率增加 6.8%。【结论】过表达 *guaB* 基因能够大幅提高鸟苷产量, 而 *prs* 和 *purF* 基因只有实现协同表达才能对宿主菌积累鸟苷产生积极影响, 为通过代谢工程技术提高鸟苷产量奠定了研究基础。

关键词: 解淀粉芽胞杆菌, 鸟苷, PRPP 合成酶, PRPP 转酰胺酶, 肌苷酸脱氢酶

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012)06-0718-08

由于鸟苷在食品、医药和化工等领域的广泛应用, 其市场前景非常乐观, 鸟苷的年需求增长量一直保持在 10% - 20% 之间。目前国内鸟苷一般使用发酵法生产, 但筛选的菌株产苷能力较弱, 故继续筛选高产菌株对提高鸟苷生产效率, 降低鸟苷生产成本具有重要意义。

传统上核苷类生产株一般采用芽胞杆菌属作为出发菌株, 通过诱变育种技术^[1] 或者基因工程手段^[2] 达到大量积累核苷的目的。本实验室保藏的鸟苷生产菌解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus*

amyloliquefaciens) TA208 即通过多级诱变而成, 但是进一步诱变对产苷影响不大, 并且明显影响菌体的生长。为了进一步提高菌株的鸟苷积累量, 前期实验中我们和合作者已经完成了 *B. amyloliquefaciens* TA208 的全基因组测序工作^[3], 在深入了解菌株遗传背景的基础上采用过表达关键酶等代谢工程技术, 可以避免诱变造成的不良影响, 并可能有效提高菌株的生产性能。

PRPP (phosphoribosyl pyrophosphate) 合成酶、PRPP 转酰胺酶和肌苷酸脱氢酶是芽胞杆菌属内鸟

基金项目: 国家自然科学基金 (31100054)

* 通信作者。Tel: +86-22-60272182; Fax: +86-22-60602298; E-mail: ningch@tust.edu.cn

作者简介: 何逵夫 (1987 -), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 研究方向为代谢控制发酵。E-mail: hkfgwww@sina.com

收稿日期: 2011-11-22; 修回日期: 2012-03-06

苷合成途径的3个关键酶。PRPP合成酶由 *prs* 基因编码,催化磷酸戊糖途径中的5'-磷酸核糖生成PRPP;PRPP转酰胺酶由 *purF* 基因编码,促进胞内的PRPP进入嘌呤(*pur*)合成途径;肌苷酸脱氢酶由 *guaB* 基因编码,负责将 *pur* 合成途径生成的肌苷酸转化成鸟苷酸的前体黄苷酸。它们均受到嘌呤类物质的反馈阻遏与抑制作用,在细菌体内的浓度和活性与嘌呤核苷的积累量密切相关^[4-5]。目前国内外很少有鸟苷工程菌构建的相关研究,并且针对解淀粉芽胞杆菌的代谢改造研究也较少。本文结合过表

达关键酶后鸟苷合成相关基因转录量分析和肌苷酸脱氢酶活性分析,首次系统的研究了PRPP合成酶、PRPP转酰胺酶和肌苷酸脱氢酶基因的过表达对 *B. amyloliquefaciens* TA208 生产鸟苷的影响,为构建鸟苷高产菌株奠定了理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:表1为本研究所用菌株和质粒。

表1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Genetic characteristics	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ <i>m_k</i> ⁺), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>relA1</i>	Lab stock
<i>E. coli</i> HST04	F ⁻ , <i>ara</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>) [Φ 80 <i>d</i> <i>lacZ</i> Δ M15], <i>rpsL</i> (<i>str</i>), <i>thi</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ <i>mcrA</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i>	Lab stock
<i>B. amyloliquefaciens</i> TA208	Ade ⁻ , 8-AG ^r , <i>GuaC</i> ⁻ , 6-MP ^r (overproducing guanosine)	Lab stock
Plasmids		
PWB980	ori <i>Bacillus</i> , 3.8 kb, Kana ^r	Lab stock ^[6]
pMD-18T Vector	T-vector, 2.7 kb, Amp ^r , <i>lacZ</i>	Lab stock
PBE2	<i>E. coli-Bacillus</i> shuttle plasmid, 6.3 kb, Amp ^r , Kana ^r	Prof. Lu ^[7]
PBE43	PBE2 derivative containing P43 promoter ^[8]	This study
PBES	PBE43 derivative containing <i>prs</i> gene	This study
PBEF	PBE43 derivative containing <i>purF</i> gene	This study
PBESF	PBE43 derivative containing <i>prs</i> and <i>purF</i> gene	This study
PBEG	PBE43 derivative containing <i>guaB</i> gene	This study

Ade⁻: adenosine monophosphate-auxotrophic, 8-AG^r: 8-azaguanine resistance, *GuaC*⁻: deficient in GMP reductase, 6-MP^r: 6-mercaptopurine resistance, Amp: ampicillin, Kana: kanamycin.

1.1.2 引物:表2为本研究所用引物,均由 Primer Premier 5.0 软件设计。

表2 引物
Table 2 Primers

Primer	Primer sequence(5'→3')	Size, bp	Description
P1	AGAAGGTACCAAAAATCGGAGGTTACCATGTCT	33	<i>Prs</i> amplification (<i>Kpn</i> I)
P2	TAACTCGACGGTTAGCTGAATAAATAGCTGAC	33	<i>Prs</i> amplification (<i>Sal</i> I)
P3	AATGTGCGACCAAACGAAAGAACTTGAGCG	30	<i>PurF</i> amplification (<i>Sal</i> I)
P4	CACA AAGCTTCTCCTCAAAAGCAGAAAGAG	29	<i>PurF</i> amplification (<i>Hind</i> III)
P5	TGAGTCCGACGGTTTCTAGTTGATAATCT	29	<i>GuaB</i> amplification (<i>Sal</i> I)
P6	TGAGCATGCTTCAACTTCAAAAACACAACA	29	<i>GuaB</i> amplification (<i>Sph</i> I)
P7	TTGTTTCACCTGACCACG	18	<i>Prs</i> (real-time quantitative PCR)
P8	CACTTCTACCTCATTCCG	18	<i>Prs</i> (real-time quantitative PCR)
P9	AATGAAGAATGCGGTGTGTTTG	22	<i>PurF</i> (real-time quantitative PCR)
P10	TTTATGAGCCGTCAGTTTTTTGG	22	<i>PurF</i> (real-time quantitative PCR)
P11	ATGGGAAGCACCTCCGATT	19	<i>PurE</i> (real-time quantitative PCR)
P12	ACATCAAATCAGGCGTCCG	19	<i>PurE</i> (real-time quantitative PCR)
P13	ACATTCCAGAGGCGTACTGA	20	<i>GuaB</i> (real-time quantitative PCR)
P14	CAGGTCCGATTCCTCACTTTT	20	<i>GuaB</i> (real-time quantitative PCR)

1.1.3 培养基:种子培养基(g/L):葡萄糖 20,味精 5,酵母粉 10,玉米浆 30 mL,豆饼水解液 20 mL,

NaCl 2.5 ,pH = 6.7。发酵培养基(g/L):葡萄糖 80 ,味精 15 ,酵母粉 10 ,玉米浆 20 mL ,豆饼水解液 15 mL ,(NH₄)₂SO₄ 15 ,MgSO₄ · 7H₂O 4 ,K₂HPO₄ 2 ,MnSO₄ 0.01 ,FeSO₄ 0.01 ,CaCl₂ ,pH = 6.7。其中葡萄糖分灭菌 ,灭菌条件均为 115℃ ,15 min。培养基必要时添加终浓度为 10 μg/mL 的卡那霉素。

1.1.4 主要试剂和仪器:限制性内切酶和 Pfu DNA 聚合酶 ,Fermentas 公司;Solution I 连接酶 ,大连宝生物工程有限公司;质粒快速提取试剂盒和细菌 16S rRNA 通用引物 ,北京博迈德生物技术有限公司;PCR 产物纯化试剂盒和胶回收试剂盒 ,北京天恩泽基因科技有限公司;引物合成与基因测序 ,北京华大基因;RNA 提取试剂盒 ,天津宝瑞生物技术有限公司;两步法实时定量 PCR 试剂盒 ,北京康为世纪生物技术有限公司;电穿孔仪 ,Eppendorf 公司;实时定量 PCR 仪 ,ABI 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 分子生物学操作 感受态的制备及转化

分子生物学操作参见精编分子生物学实验指南。解淀粉芽孢杆菌感受态的制备和转化方法由文献[9]改进而成 转化方法改进如下:首先将构建成功的质粒转化进入甲基化酶缺陷型菌株 *E. coli* HST04 筛选得到阳性转化子后提取质粒进行甲基化修饰^[10] 纯化回收修饰后的质粒进行电转操作。

1.3 遗传稳定性研究

连续传代实验和平板稳定性实验参见文献[11]。修饰如下:细菌生长使用 LB 培养基 ,LB (+) 所带抗性为终浓度 10 μg/mL 的卡那霉素 ,LB (-) 不带任何抗性 ,37℃ 在 LB 平板上培养 16 h 作为 1 代。平板传代稳定性实验时每隔 5 - 10 代将 LB (-) 平板上的菌落接种于 LB (+) 平板上 ,菌落计数并计算该基因工程菌在无选择压力下的遗传稳定性。

1.4 实时定量 PCR 分析

将工程菌株在 LB 培养基上培养至对数生长期 取 1 mL 菌液用适量溶菌酶处理后提取总 RNA 进行逆转录 以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 反应。反应条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 15 s ,60℃ 1 min 40 个循环。反应结束后 ,以细菌 16S rRNA 为参比 根据 2^{-ΔΔCT} 法计算相关基因的转录水平。

1.5 肌苷酸脱氢酶活性检测

粗酶液的制备、蛋白质定量分析和肌苷酸脱氢酶活性分析参见文献[5] 活性分析方法修饰如下:

反应总体积为 500 μL。含有适量粗酶液 ,50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH = 8.0) ,0.2 mmol/L 的肌苷酸 ,5 mmol/L 的 NAD⁺ 40℃ 反应 2 min 后冰浴终止反应。一个肌苷酸脱氢酶活力单位 U 定义为 1 min 内 使反应混合物 OD₃₄₀ 增加 0.001 所需酶量。

1.6 统计学处理

mRNA 相对表达量使用统计分析软件 SPSS 17.0 分析 ,数据使用表示 ,两组之间的数据采用 *t* 检验分析显著性差异。肌苷酸脱氢酶活性和鸟苷产量数据均使用 origin 8.0 软件分析并作出误差线 ,两组之间的显著性差异使用 SPSS 17.0 进行 *t* 检验分析。

1.7 发酵培养及分析方法

培养条件参见文献[1] 500 mL 挡板摇瓶发酵 60 h。发酵过程中 取适量发酵液稀释 20 倍后用紫外分光光度计测定 600 nm 处的吸光度值 监测菌体生长情况。葡萄糖浓度采用 SBA-40C 生物传感仪测定。另取适量发酵液用 1 mol/L 的 NaOH 稀释 10 倍后煮沸离心 取上清后用去离子水稀释 100 倍 将得到的稀释液用高效液相色谱法测定鸟苷含量^[12]。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

以 *E. coli*-*Bacillus* 穿梭质粒 PBE2 为基础 连接 PWB980 质粒上的组成型强启动子 P43 构建穿梭表达质粒 PBE43。将 PCR 扩增得到的 *B. amyloliquefaciens* TA208 *prs*、*purF* 和 *guaB* 基因酶切后分别构建入 PBE43 中 ,分别命名为 PBES、PBEF 和 PBEG。提取构建好的 PBEF 重组质粒 将 *prs* 基因插入至 PBEF 质粒内 P43 启动子和 *purF* 基因中间的多克隆位点处 使其组合为一个由 P43 启动子控制的新型人工操纵子 并将构建成的串联表达质粒称为 PBESF。所有质粒构建过程如图 1 所示。

2.2 基因工程菌的遗传稳定性验证

遗传稳定性实验发现传代过程中 LB (+) 上的菌株长势都较好 说明在抗生素压力下菌株具有良好的稳定性 未发生质粒丢失情况。在无抗生素压力下 LB (-) 上生长的单菌落在连续传代过程中 各工程菌株质粒稳定性相似 传代 30 次左右质粒开始丢失 到第 50 代时 已经约有 18% 的菌落丢失质粒(图 2)。这些说明工程菌株遗传稳定性较好 但最好在传代及培养过程中加入抗生素 这对工业化

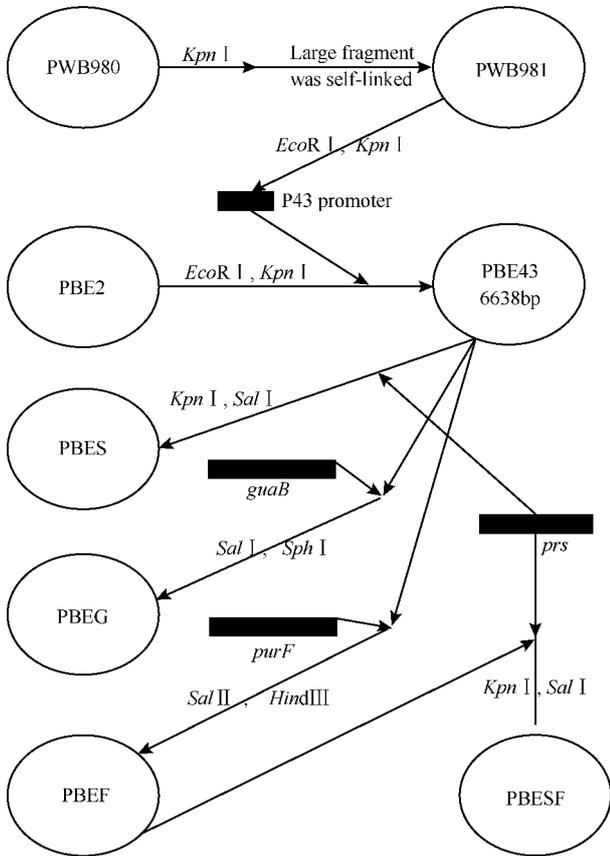


图1 重组质粒的构建
Fig.1 Construction of recombinant plasmids.

生产和菌种保藏均有重要意义。

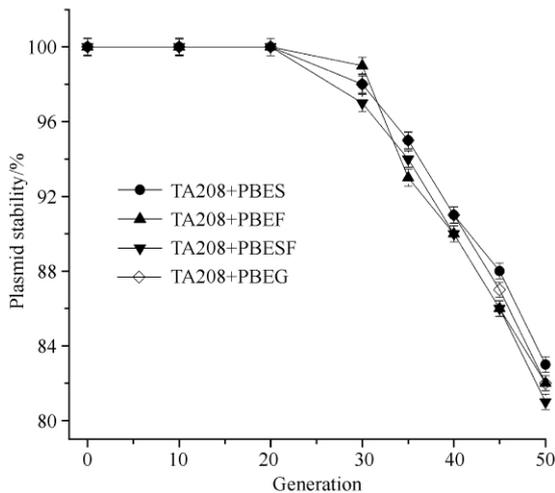


图2 重组菌株的遗传稳定性测定
Fig.2 The test of heredity stability of recombinant strains.

2.3 相关基因的转录分析

Pur 操纵子对解淀粉芽胞杆菌中鸟苷的积累起着至关重要的作用, *purE* 基因作为 *pur* 操纵子上的

第一个编码基因,其 mRNA 含量可反映整个操纵子的转录效果。与鸟苷合成最为密切的基因——*purE* 基因和关键酶编码基因 (*prs*、*purF* 和 *guaB*) 的转录分析结果如表 3 所示。

表3 *Prs*、*purF* 和 *guaB* 基因过表达对转录的影响
Table 3 The effects of overexpression of *prs*, *purF* and *guaB* genes on transcription

Strains	<i>prs</i>	<i>purF</i>	<i>purE</i>	<i>guaB</i>
TA208	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
TA208 + PBES	39.8 ± 2.3	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1
TA208 + PBEF	1.2 ± 0.1	32.1 ± 2.7	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1
TA208 + PBESF	42.7 ± 2.9	31.9 ± 2.3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
TA208 + PBEG	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	36.2 ± 2.0

与出发菌株 *B. amyloliquefaciens* TA208 相比,重组菌内 *prs*、*purF* 和 *guaB* 基因的过表达都伴随自身转录量的提高,可达 35.0 倍左右,说明异源启动子 P43 在 *B. amyloliquefaciens* 中同样能起转录作用。另外, *prs* 基因的扩增使 *pur* 操纵子的转录水平稍有降低; *purF* 基因的扩增使 *prs* 基因转录量提高 20.0% (*t* 检验, $P < 0.05$),并且对 *pur* 操纵子的扰动不大;而 *guaB* 基因的单独表达对 *prs* 基因和 *pur* 操纵子的转录水平影响非常小,同时它自身的转录水平几乎不受到其他基因扩增的干扰 (*guaB* mRNA 含量的组间差值 $P > 0.05$)。与出发菌株 TA208 相比, *prs* 与 *purF* 基因的共表达使 *prs* 基因的转录量提高了 42.7 ($P < 0.01$) 倍, *purF* 基因的转录量提高了 31.9 ($P < 0.01$) 倍,说明在构建的人工操纵子内部二者均能够顺利转录。另外, *prs* 和 *purF* 基因共表达策略对染色体上的 *pur* 操纵子和 *guaB* 基因影响非常小。这说明以 P43 启动子和 *prs*、*purF* 基因为基础构建人工操纵子的策略能够在不影响其他关键基因元件转录的前提下有效增强目的基因的转录。

2.4 肌苷酸脱氢酶活性分析

肌苷酸脱氢酶催化 NAD^+ 和肌苷酸氧化合成 $NADH$ 和黄苷酸,该反应是鸟苷酸合成分支的第一个反应,也是鸟苷合成的限速反应,因此肌苷酸脱氢酶的活力大小直接决定了终产物鸟苷的合成量。酶活分析结果 (图 3) 表明 *prs* 和 *purF* 基因扩增对于肌苷酸脱氢酶的活力无明显影响。与此同时, *guaB* 基因的过表达使宿主菌内肌苷酸脱氢酶的活力达到 29.4 U/mg,较出发菌株提高 126% ($P < 0.01$)。这说明使用重组质粒过表达 *guaB* 基因在一定程度上解除了肌苷酸脱氢酶所受的反馈阻遏,菌体内肌苷酸脱氢酶的含量和催化活性有所提高。

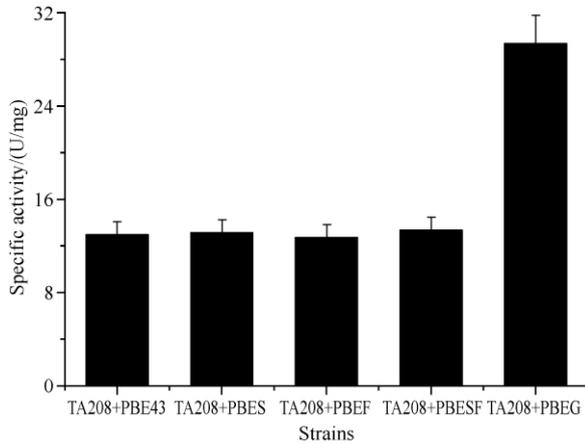


图3 *Prs*、*purF* 和 *guaB* 基因过表达对肌苷酸脱氢酶活性的影响

Fig. 3 The effects of overexpression of *prs*, *purF* and *guaB* genes on the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase.

2.5 关键酶基因过表达对鸟苷合成的影响

摇瓶发酵比较各重组菌与出发菌 *B. amyloliquefaciens* TA208 + PBE43 的鸟苷积累、生长和耗糖情况。结果如图 4 所示。与出发菌株相比,各重组菌株发酵 50 h 鸟苷产量和糖苷转化率分析结果如图 5 所示。

从图 4 可以看出,出发菌株和重组菌株在 50 h 鸟苷产量均达到最大值,鸟苷的积累与菌株的生长呈现偶联型。单独过表达 *prs* 与 *purF* 基因均没有影响鸟苷积累量 ($P > 0.05$),但是共表达 *prs* 与 *purF* 基因可使鸟苷产量达到 12.8 g/L,较出发菌株的 11.2 g/L 提高了 14.4% ($P < 0.05$)。这说明与单独表达策略相比,共表达策略能够更加有效的将碳代谢流转入 *pur* 合成途径,增加终产物鸟苷的积累量。然而与上述两个关键酶基因的单独表达不同, *guaB* 基因的单独过表达能使鸟苷产量提高 20.7% ($P < 0.05$)。在耗糖方面, *prs* 与 *purF* 基因单独过表达和共表达都能使宿主菌耗糖速率降低,糖苷转化率分别提高 6.9%、4.9%、6.8% (图 5)。但是过表达 *guaB* 基因后耗糖速率没有变化。另外 *prs* 与 *purF* 基因的过表达都轻微的抑制了工程菌株的生长,而过表达 *guaB* 基因并未影响菌株生长速率。

3 讨论

本研究发现,单独扩增 *prs* 基因不能有效提高鸟苷产量,这可能是由于随着 PRPP 合成酶活性的

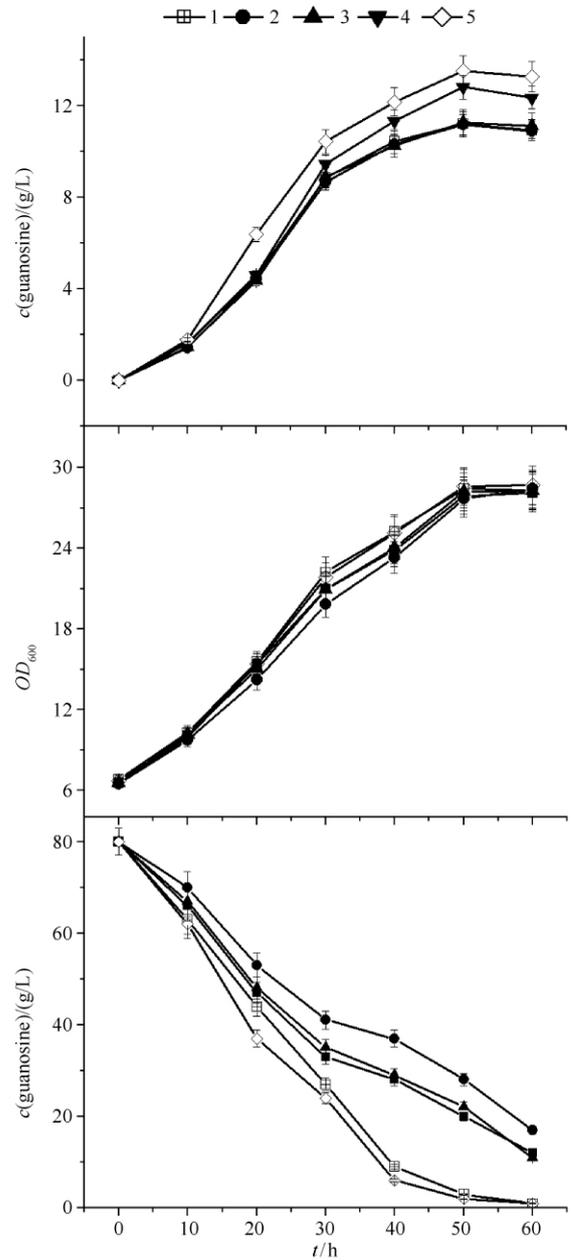


图4 *Prs*、*purF* 和 *guaB* 基因过表达对鸟苷积累、生长和耗糖情况的影响

Fig. 4 The effects of overexpression of *prs*, *purF* and *guaB* genes on guanosine accumulation, growth and glucose consumption. 1: TA208 + PBE43; 2: TA208 + PBES; 3: TA208 + PBEF; 4: TA208 + PBESF; 5: TA208 + PBEG.

增强,菌体内增加的 PRPP 量对后续嘌呤合成酶系尤其是 PRPP 转酰胺酶已经饱和,不能进一步有效转化生成鸟苷。另外通过转录分析,单独扩增 *prs* 基因对 *pur* 操纵子的转录有抑制作用,这也进一步解释了这一结果。单独扩增 *purF* 基因同样没有促

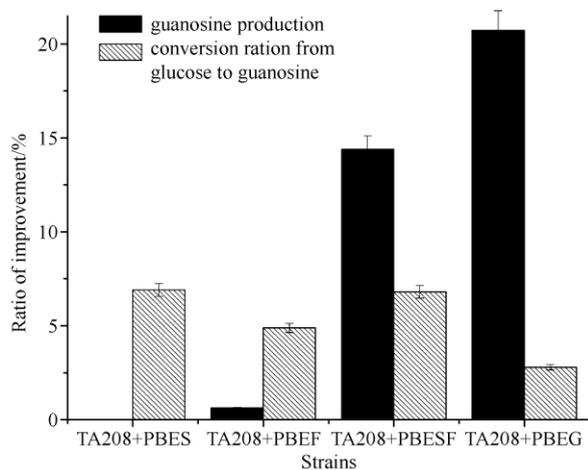


图5 重组菌株内鸟苷产量提高百分比和糖苷转化率提高量

Fig.5 The improvement ratio for guanosine production and the conversion ratio from glucose to guanosine in recombinant strains

进鸟苷积累,这可能是由于随着PRPP转酰胺酶含量的增加导致胞内PRPP浓度降低,PRPP作为胞内许多物质例如组氨酸、色氨酸、硫胺素和核苷类物质的前体,它的供应不足会影响菌体的生长代谢情况^[13],从而间接影响终产物鸟苷的积累量。转录分析结果也发现嘌呤合成途径的转录活性受到了轻微的干扰,这也部分解释了鸟苷产量没有明显改变的原因。另外,许多研究^[14]表明单独过表达某个基因可能会造成胞内代谢通量的比例失衡,使终产物合成途径中的某种中间产物积累过多而对细胞造成毒性,最终影响终产物的合成。这一方面可归咎于这个酶较小的代谢流控制系数。另一方面是因为改造会较大程度的扰动胞内代谢物质的稳态。许多时候需要通过基因的协调表达来避免这种现象^[15]。本研究通过PRPP合成酶和PRPP转酰胺酶基因共表达系统的构建,发现二者转录量显著增加的同时没有影响*pur*操纵子和*guaB*基因的转录,鸟苷产量较出发菌株提高了14.4%,糖苷转化率提高了6.8%,菌株的生长速率有轻微的降低。这可能是由于PRPP合成酶和PRPP转酰胺酶基因的过表达增强了氧化磷酸戊糖途径的代谢流^[16],使之产生更多的NADPH,从而三羧酸循环途径受到部分抑制^[17],菌株耗糖速率和生长速率均有不同程度的降低。*guaB*基因的单独过表达使鸟苷产量提高20.7%,并且大于上述二者串联表达后鸟苷产量的提高幅度(14.4%),推测可能原因是一方面*guaB*基因的过

表达大幅提高了决定鸟苷合成量的肌苷酸脱氢酶活性。另一方面也可能与它在代谢途径上更接近终产物有关,过表达*guaB*基因能够使*pur*操纵子的产物肌苷酸更有效的转化生成鸟苷,并可能降低生成副产物如肌苷、腺苷的代谢流(实际发酵50h,肌苷含量从出发菌株的550mg/L降至工程菌株的320mg/L,但无显著性差异 $P > 0.05$;两菌株的腺苷含量均未测出;肌苷酸含量均在100mg/L以下)。并且Miyagawa等也证明在一株肌苷高产株内过表达异源*guaB*基因,能够有效提高鸟苷产量^[5]。另外,转录分析和肌苷酸脱氢酶活性分析也表明过表达*guaB*基因在没有影响其他基因转录的前提下不仅提高了自身转录量,并且大幅度提高了肌苷酸脱氢酶的催化活性,这些都促使工程菌株内鸟苷产量得到提高。

芽胞杆菌属内,PRPP合成酶受ADP(二磷酸腺苷)强反馈抑制;PRPP转酰胺酶主要受到腺苷酸的反馈抑制;肌苷酸脱氢酶主要受到鸟苷酸的反馈抑制。根据TA208全基因组序列分析,与不积累核苷的标准株*B. amyloliquefaciens* DSM7相比,关键酶编码基因存在的突变碱基对编码氨基酸序列影响极小,这说明这3个关键酶可能均未解除反馈抑制。但是过表达策略能使鸟苷产量提高,这可能与胞内的核苷酸浓度很低以至于反馈抑制没有形成有关。以往的育种过程中也出现过类似的现象,Takayuki等^[18]以*Bacillus subtilis* 168为出发菌株,在没有修饰任何关键酶的基础上通过优化启动子,敲除代谢支路等构建了一株肌苷生产菌。Shi等^[19]在具有嘌呤结构类似物抗性的*B. subtilis*内共表达野生型的*prs*与*ywlF*基因,有效克服了胞内的代谢失衡问题,提高了终产物核黄素(前体为鸟苷酸)的产量。另外,鸟苷生产菌TA208在构建的过程中经过了大量诱变而具有嘌呤结构类似物抗性,核苷的输入输出系统得到良好改造^[3],这也可能是其反馈抑制现象消失的原因^[2]。

共表达系统可采用兼容性质粒^[20]或者构建串联表达系统^[21]。本实验针对单独表达PRPP合成酶和PRPP转酰胺酶基因没有促进鸟苷积累的问题,采用串联表达策略使其编码基因由P43启动子控制,构建一个新型的P43-*prs-purF*人工操纵子,最终提高了相关基因的转录量和鸟苷产量。另外发现肌苷酸脱氢酶基因的单独表达也能促进鸟苷积累,

目前实验室正在利用温敏型 PKS1 质粒将这 3 个关键酶编码基因同时整合在染色体上进行过表达,这样既可以减少宿主菌的代谢负担,又可能进一步提高鸟苷产量。

致谢 感谢天津科技大学生物工程学院路福平教授提供 PBE2 质粒。

参考文献

- [1] 张蓓, 马雷, 武改红, 张克旭, 陈宁. 鸟苷生产菌的选育及其发酵条件优化. *食品与发酵工业 (Food and Fermentation Industries)*, 2004, 30(7): 48-51.
- [2] Sheremet AS, Gronskiy SV, Akhmadysheva RA, Novikova AE, Livshits VA, Shakulov RS, Zakataeva NP. Enhancement of extracellular purine nucleoside accumulation by *Bacillus* strains through genetic modifications of genes involved in nucleoside export. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011, 38(1): 65-70.
- [3] Zhang GQ, Deng AH, Xu QY, Liang Y, Chen N, Wen TY. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* TA208, a strain for industrial production of guanosine and ribavirin. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(12): 3142-3143.
- [4] 宋勇波, 蔡显鹏, 储炬, 庄英萍, 张嗣良. 肌苷合成关键酶活性与肌苷积累之间的关系. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43(3): 361-365.
- [5] Miyagawa KI, Kimura H, Nakahama K, Kikuchi M, Doi M, Akiyama S, Nakao Y. Cloning of the *Bacillus subtilis* IMP dehydrogenase gene and its application to increased production of guanosine. *Nature Biotechnology*, 1986, 4(3): 225-228.
- [6] Wu SC, Wong SL. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, 1999, 72(3): 185-195.
- [7] 郭兴华, 熊占, 周民, 贾士芳, 许怡. 枯草杆菌-大肠杆菌多功能穿梭载体的构建. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 1991, 7(3): 224-229.
- [8] Wang P, Roy H. Overlapping promoters transcribed by *Bacillus subtilis* σ^{55} and σ^{37} RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phases. *The Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259(13): 8619-8625.
- [9] Zakataeva NP, Nikitina OV, Gronskiy SV, Romanenkov DV, Livshits VA. A simple method to introduce marker-free genetic modifications into the chromosome of naturally nontransformable *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 1201-1209.
- [10] Alegre MT, Rodríguez MC, Mesas JM. Transformation of *Lactobacillus plantarum* by electroporation with in vitro modified plasmid DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 241(1): 73-77.
- [11] 苟兴华, 王卫, 刘达玉, 郭秀兰, 张佳敏, 唐仁勇, 李德华, 胡海洋. 麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因在巴斯德酵母中的表达及遗传稳定性. *应用与环境生物学报 (Chinese Journal of Applied & Environmental Biology)*, 2010, 16(3): 408-411.
- [12] 夏俊刚, 何逢夫, 谢希贤, 徐庆阳, 陈宁. 枯草芽孢杆菌嘌呤核苷磷酸化酶学性质研究及在利巴韦林酶法合成中的应用. *中国生物工程杂志 (China Biotechnology)*, 2010, 30(12): 53-59.
- [13] Bjarne HJ. Mutation in the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase gene (*prs*) that results in simultaneous requirements for purine and pyrimidine nucleosides, nicotinamide nucleotide, histidine, and tryptophan in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(3): 1148-1152.
- [14] Bailey. Lessons from metabolic engineering for functional genomics and drug discovery. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(7): 616-618.
- [15] Koffas MA, Jung GY, Stephanopoulos G. Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression. *Metabolic Engineering*, 2003, (5): 32-41.
- [16] Chen XC, Song H, Fang T, Cao JM, Ren HJ, Bai JX, Xiong J, Ouyang PK, Ying HJ. Enhanced cyclic adenosine monophosphate production by *Arthrobacter A302* through rational redistribution of metabolic flux. *Bioresource Technology*, 2010, 101(9): 3159-3163.
- [17] Lim SJ, Jung YM, Shin HD, Lee YH. Amplification of the NADPH-related genes *zuf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(6): 543-549.
- [18] Asahara T, Mori Y, Zakataeva NP, Livshits VA, Yoshida K, Matsuno K. Accumulation of gene-targeted *Bacillus subtilis* mutations that enhance fermentative inosine production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(6): 2195-2207.

- [19] Shi SB, Chen T, Zhang ZG, Chen X, Zhao XM. Transcriptome analysis guided metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for riboflavin production. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(4-5): 243-252.
- [20] Shimaoka M, Takenaka Y, Kurahashi O, Kawasakib H, Matsui H. Effect of amplification of desensitized *purF* and *prs* on inosine accumulation in *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 103(3): 255-261.
- [21] 范长胜, 曾小冰, 柴运嵘, 江培翊, 黄伟达. 苯丙氨酸合成的关键酶基因 *aroG* 与 *pheA* 串联表达. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 1999, 39(5): 430-43.

Effects of overexpression of key enzyme genes on guanosine accumulation in *Bacillus amyloliquefaciens*

Kuifu He, Yuechao Ma, Shanshan Du, Xixian Xie, Qingyang Xu, Ning Chen*

College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300457, China

Abstract: [Objective] To study the effects of overexpression of key enzyme genes (*prs*, *purF* and *guaB*) on guanosine production in *Bacillus amyloliquefaciens* TA208. [Methods] The *prs*, *purF*, *guaB* and *prs-purF* genes were inserted into constructed expression plasmid PBE43. All these constructed plasmids were electroporated into *B. amyloliquefaciens* TA208. The transcriptional level of various genes in the resulting strains was tested by real-time quantitative PCR. The activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in the resulting strains was detected. Finally, cell growth, glucose consumption and guanosine production of 4 engineering strains along with control strain were examined. [Results] The transcriptional analysis showed that overexpression of *prs*, *purF* and *guaB* gene accompanied by their own transcription level up-regulated. Overexpression of *prs* or *purF* genes alone slightly down-regulated the transcriptional level of purine operon, but overexpression of *guaB* gene independently did not disturb the transcription of *prs* gene and purine operon. Enzyme activity analysis showed that overexpression of *prs* or *purF* gene did not change the activity of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and its activity increased by 126% through overexpression of *guaB* gene. Finally, by fermentation flask test, we found that overexpression of *prs* and *purF* gene alone could not promote guanosine accumulation. However, overexpression of *guaB* gene resulted in an increase in the production of guanosine, which was 20.7% higher than the control strain. The guanosine concentration and the conversion ratio from glucose to guanosine in the host strain containing co-expression plasmid were 14.4% and 6.8% higher than the control strain. [Conclusion] Overexpression of *guaB* gene could enhance the guanosine yield in the culture broth. However, for *prs* and *purF* gene, only co-expression of them could lead to a significant improvement of guanosine production in *B. amyloliquefaciens*. It should provide a valuable insight into the construction of industrially important strains for guanosine production by metabolic engineering.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, guanosine, ribose-phosphate pyrophosphokinase, amidophosphoribosyl transferase, inosine 5'-monophosphate dehydrogenase

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2010CB126500)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87281685; Fax: +86-27-87280670; E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

Received: 27 April 2010/Revised: 19 June 2010