

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53(1):92-98; 4 January 2013  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 钝齿棒杆菌 *argR* 基因缺失株构建及其缺失对精氨酸生物合成途径相关基因转录水平的影响

陈雪岚<sup>1</sup>, 汤立<sup>1</sup>, 焦海涛<sup>1</sup>, 徐峰<sup>2</sup>, 熊勇华<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>江西师范大学功能有机小分子教育部重点实验室, 生命科学学院, 南昌 330022

<sup>2</sup>南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047

**摘要:** 【目的】钝齿棒杆菌 AS 1.542 中 *argR* 基因编码的蛋白 ArgR 在精氨酸生物合成途径中扮演负调控的角色, 但其对相关基因在转录水平的影响还未见报道。因此, 本课题组构建了钝齿棒杆菌 *argR* 基因缺失株, 并在转录水平上比较野生株与缺失株精氨酸生物合成途径相关基因的变化。【方法】采用无痕敲除的方法构建了钝齿棒杆菌 *argR* 基因缺失株, 并采用荧光定量 PCR 方法分析缺失株和野生株精氨酸生物合成途径相关基因在转录水平的变化。【结果】利用 pK18*mobsacB* 质粒中蔗糖致死基因 *sacB* 反向筛选标记及 PCR 方法成功筛选到钝齿棒杆菌 *argR* 基因缺失株; 荧光定量 PCR 结果表明, *argR* 基因缺失株精氨酸生物合成途径中相关基因在转录水平获得大量提高, 平均约上调 162.13 倍。【结论】钝齿棒杆菌精氨酸生物合成途径的相关基因受负调控蛋白 ArgR 的显著调控, 但其基因的敲除并没有引起精氨酸产量发生明显的变化。

**关键词:** 钝齿棒杆菌, *argR* 基因, 无痕敲除技术, 精氨酸, 荧光定量 PCR

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 01-0092-07

钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) 是我国研究者从土壤中分离到的一株革兰氏阳性菌, 其诱变菌及工程菌被广泛应用于氨基酸生产, L-精氨酸 (L-Arg) 也是其中之一<sup>[1]</sup>。L-Arg 是一种具有胍基的碱性氨基酸, 为半必需氨基酸。随着研究的深入, 发现 L-Arg 具有独特的生理和药理作用, 如可以促进机体产生多种免疫活性物质从而阻止癌细胞的生长<sup>[2]</sup>; 同时, 作为一氧化氮的前体, L-Arg 还具有舒张血管等功能<sup>[3]</sup>。因此, L-Arg 在医药和食品工业越来越受到广泛关注<sup>[4]</sup>。

*C. crenatum* 精氨酸生物合成途径中涉及了多个基因, 其中 *argCJBDF-argGH* 为精氨酸生物合成

的主路径, 基因簇 *carAB* (分别编码氨甲酰磷酸合成酶的两个不同亚基) 为精氨酸生物合成的辅路径, *argR* 基因编码的蛋白质在主、辅途径中扮演着负调控因子的角色<sup>[5]</sup>, 但其对精氨酸生物合成途径中各个相关基因在转录水平的影响还未见报道。因此, 本实验拟通过无痕敲除技术构建 *argR* 基因缺失株, 并采用荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术在转录水平研究 *C. crenatum argR* 基因对精氨酸生物合成途径的 *argC*、*argJ*、*argB*、*argD*、*argF*、*argG* 和 *carA* 这 7 个基因的影响; 同时, 观察 *argR* 基因敲除后对精氨酸产量的影响。

基金项目: 国家自然科学基金 (30960012, 31160323)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-791-8333708; E-mail: yhxiongchen@163.com

作者简介: 陈雪岚 (1970-), 女, 江西南昌人, 博士, 副教授, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: xuelanchen14@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-07-19; 修回日期: 2012-09-15

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及质粒:** *C. crenatum* AS 1.542 购买于中国普通微生物菌种保藏管理中心; DH5 $\alpha$  为本实验室保存; 质粒 pMD18-T 购买于 TaKaRa 公司; 质粒 pK18*mobsacB* 由武晓丽博士惠赠。

**1.1.2 主要试剂及仪器:** EX *Taq* DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 (*Sac* I、*Hind* III)、DNA Marker 均购自 Qiagen 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自赛百盛公司; DNA 质粒提取试剂盒和 Blue plus II protein marker 购自全式金生物技术有限公司; RNA 提取试剂盒 TRIzol<sup>®</sup> Reagent 和反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司; SYBR<sup>®</sup> Premix EX *Taq*<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus) 试剂盒购自 TaKaRa 公司; 引物合成和测序由上海生物工程技术有限公司完成; 其余试剂均为国产分析纯。电转仪和 PCR 仪购自美国 Bioer 公司, 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

### 1.2 培养基及培养条件

*C. crenatum* 种子培养基及摇瓶发酵培养基的配制参照文献 [6]。其中种子培养基 (g/L) 配方为: 葡萄糖 30, 玉米浆 20, 硫酸铵 20, 磷酸二氢钾 1,

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, 尿素 1.5, 调 pH 值至 7.0, 115℃ 灭菌 20 min, 250 mL 三角瓶装 30 mL; 发酵培养基 (g/L) 配方为: 葡萄糖 120, 玉米浆 25, 硫酸铵 45, 磷酸二氢钾 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, CaCO<sub>3</sub> 30, 调 pH 值至 7.0, 115℃ 灭菌 10 min, 250 mL 三角瓶装 20 mL。培养温度均为 30℃, 转速为 200 r/min。

*C. crenatum* 感受态细胞固体培养基 LBHIS: 每升含蛋白胨 5 g, 氯化钠 5 g, 酵母粉 2.5 g, Brain heart infusion powder 18.5 g, 琼脂 15 g, 121℃ 20 min 灭菌, 山梨醇 91 g 分开灭菌后合并; 液体培养基 BHIS: Brain heart infusion powder 37 g, 121℃ 20 min 灭菌, 山梨醇 91 g 分开灭菌后合并。

### 1.3 引物设计与合成

根据 NCBI 中 *C. crenatum* AS 1.542 *argR* 基因 (登录号: AY509864) 的上下游序列, 设计了 4 条引物 (见表 1), 分别为 *argR-up-F* (p1)、*argR-up-R* (p2)、*argR-down-F* (p3) 和 *argR-down-R* (p4), 其中 *argR-up-R* (p2) 和 *argR-down-F* (p3) 引物中单下划线部分表示二者重叠序列; *argR-up-F* (p1) 双下划线序列为 *Xba* I 酶切位点, *argR-down-R* (p4) 双下划线序列为 *Hind* III 酶切位点。用于 RT-qPCR 的引物亦列于表 1 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。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers used in this study

Primer	Sequence of primer (5'→3')
Primers used for marker-less knock out	
<i>argR-up-F</i> (p1)	GCATCTAGAACTTCAACTCGTACTCGCTTCT
<i>argR-up-R</i> (p2)	GTTATAAATTGGAGTGTGAAGGTTATTGCGTGGGATTTAAGTTTTCCGGTCTTG
<i>argR-down-F</i> (p3)	CACGCAATAACCTTCACACTCCAAATTTATAACTCAGCGGGCCACCACCTAAAGC
<i>argR-down-R</i> (p4)	GTCAAGCTTATGACCTCATCTGGACGCTTAC
Primers used for RT-qPCR	
<i>argC-F</i>	CGTTACCTCGCGGAATTCT
<i>argC-R</i>	CATGCACGAAGGTTTCCTGT
<i>argB-F</i>	GTCCGGATTAGTGGTTTGAT
<i>argB-R</i>	GAGGCATCGACATTAATGATGCTCT
<i>argJ-F</i>	GAGAAGGATGCTCGTGAGTCTG
<i>argJ-R</i>	ATCGGAAGCAACTCACCAAT
<i>argD-F</i>	CGGATGTGGCTGCTATCTTC
<i>argD-R</i>	TCTGGACTTCATCGGTGATCAT
<i>argF-F</i>	GCAGAGCAGCCAGAGGTTTTG
<i>argF-R</i>	GTCCAAGGAGAAGCCAGTACG
<i>argG-F</i>	GTTCGAATCGAGCAGTCCGT
<i>argG-R</i>	GCTGGATCCTCGGTGATGC
<i>carA-F</i>	CCATTGAGGATATCAAGCAGT
<i>carA-R</i>	CAGATGCCAAAGAATGGAATGT
16SrRNA-F	AAGAAGCACCGCTAACTAC
16SrRNA-R	CCGGGATTTACAGACGAC

#### 1.4 *argR* 基因敲除质粒的构建

提取 *C. crenatum* AS 1.542 的基因组 DNA, 提取方法见参考文献 [7-8]。采用 50  $\mu$ L 反应体系, 利用表 1 中的引物 p1、p2 和 p3、p4 分别扩增 *argR* 基因敲除上下同源臂。PCR 产物经切胶回收, 由于引物 p2 和 p3 的部分互补, 使上下同源臂存在着 33 bp 碱基互补, 因此将回收后的上下同源臂等摩尔加到同一 PCR 反应体系中, 经过重叠 PCR 扩增后能形成包含不完整 *argR* 基因的长片段产物; 将此产物经切胶回收后连接至 pMD18-T 质粒上并测序, 验证正确后用 *Xba* I 和 *Hind* III 从重组 pMD18-T 载体切下目的片段, 然后连接至经同样两种内切酶酶切后的 pK18*mobsacB* 质粒上, 连接产物化转至 DH5 $\alpha$  中, 提取质粒备用。

#### 1.5 *C. crenatum* 电转感受态制备、转化及缺失株的筛选

*C. crenatum* 感受态细胞的制备及转化方法见参考文献 [9]。采用无痕敲除技术<sup>[10]</sup> 将 *argR* 基因缺失, 其缺失株筛选方法如下: 第 1 次重组中利用卡拉霉素进行正向筛选, 以引物 p1 和 p4 采用菌落 PCR 的方法筛选阳性单交换子; 将得到的单交换子单菌落接种于 5 mL BHI + 2% 葡萄糖培养基中 (无抗性), 于 30 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养过夜, 在无抗性的条件下诱导第 2 次重组, 即利用蔗糖致死基因 *sacB* 反向筛选标记进行双交换子的筛选; 将培养过夜的菌液取 5  $\mu$ L 涂布于 LBHIS + 10% 蔗糖平板后, 在 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 利用质粒自身携带的蔗糖致死基因将保持单交换的菌株或插入位置不正确的菌株剔除; 然后根据野生型和敲除子菌落 PCR 产物长度不一样, 利用引物 p1 和 p4 区别双交换子 (*C. crenatum* AS 1.542 $\Delta$ *argR*) 和回复子。

#### 1.6 总 RNA 的提取及其反转录

*C. crenatum* AS 1.542 和 *C. crenatum* AS 1.542 $\Delta$ *argR* 的总 RNA 提取按 RNA 提取试剂盒 TRIzol<sup>®</sup> Reagent 说明书进行。为防止 DNA 污染, 总 RNA 提取后, 用无 RNAase 的 DNAase I 处理, 具体为: 25  $\mu$ L RNA 溶液中加入 1  $\mu$ L DNase I, 再加入 2.5  $\mu$ L 缓冲液 (试剂盒提供), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后加入终浓度为 2.5 mmol/L 的 EDTA, 混匀后置于 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中 10 min 使 DNase I 失活。再重提总 RNA, 除去失活的 DNAase 蛋白。以经过 DNase I 处理过的 RNA 做为模板, 随机选用表 1 中用于 RT-

qPCR 的 3 对引物进一步验证总 RNA 中是否有 DNA 污染。经验证后的无 DNA 污染的总 RNA 进行逆转录反应, 反应过程按试剂盒说明书进行。

#### 1.7 RT-qPCR

以 *C. crenatum* AS1.542 野生株的 cDNA 为参照, 以 16S rRNA 为内标, 按 SYBR<sup>®</sup> Premix EX Taq<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书进行 RT-qPCR, 反应体系如下: 2  $\times$  SYBR<sup>®</sup> Premix EX Taq<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus) mix 10  $\mu$ L, ROX Reference Dye (50  $\times$ ) 0.4  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, 引物 (Forward + Reverse) 1.6  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L, 总体积 20  $\mu$ L。反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次。每个样品重复 3 次。RT-qPCR 结果采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法<sup>[11]</sup> 对基因的各 Ct 值进行定量分析。

#### 1.8 缺失株 *C. crenatum* AS1.542 $\Delta$ *argR* 产精氨酸测定及菌体生长的测定

从蔗糖平板上挑取单个阳性菌落接种至液体种子培养基, 30 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 活化过夜, 按 1% 接种量转接至 20 mL 发酵培养基。30 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 连续培养 5 d, 每 4 h 取样 1 次, 以 *C. crenatum* AS1.542 为对照, 比较发酵过程中精氨酸的产量。采用坂口试剂法测定精氨酸的量<sup>[12]</sup>。

二株菌的菌体生长情况的监测: 发酵液用 0.25 mol/L 的盐酸 (消除 CaCO<sub>3</sub> 的影响) 稀释至适当倍数, 测定 562 nm 处的光密度。

## 2 结果

### 2.1 *argR* 基因无痕敲除质粒构建

敲除 *argR* 基因的上下同源臂扩增产物 (849bp 和 840bp) 和重叠 PCR 产物 (1719bp, 箭头所指) 检测图谱见图 1; 目的片段 TA 克隆后阳性克隆子经测序验证正确后, 酶切下目的片段连接至 pK18*mobsacB* 质粒转化至 DH5 $\alpha$  中, 采用菌落 PCR 扩增 (引物 p1 和 p4) 的方法筛选阳性菌株并提取质粒进行双酶切鉴定, 酶切结果表明 K18*mobsacB*- $\Delta$ *argR* 无痕敲除质粒构建成功 (图略); 提取此质粒再转化至 *C. crenatum* AS 1.542。

### 2.2 *C. crenatum* AS 1.542 $\Delta$ *argR* 缺失株的筛选

*C. crenatum* AS 1.542 $\Delta$ *argR* 缺失株的筛选经历了二次交换过程。第一次是用引物 p1 和 p4 在卡拉霉素抗性平板上筛选单交换子, 由于只发生了单

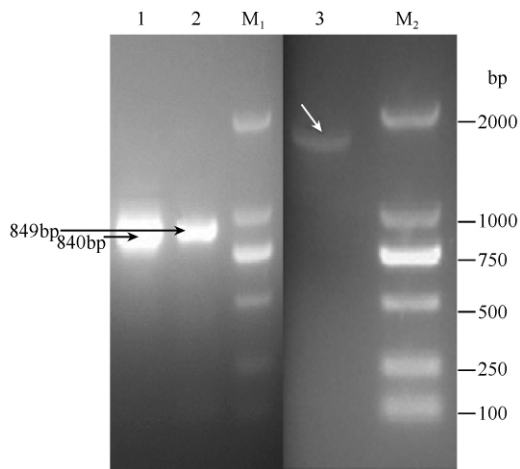


图 1 敲除 *argR* 基因上下同源臂的扩增及其重叠扩增

Fig.1 The amplification and overlap amplification of knockout arms of *argR* gene. M1: DL2000 DNA marker.

臂交换, 整个质粒都插入在基因组序列中, 此时基因组中即有完整的 *argR* 基因又有构建的不完整的、包括上下同源臂的 *argR* 基因, 因此扩增产物出现了两条条带 (见图 2 中 3 泳道红箭头所指); 第二次交换是在无抗性的条件下单交换子会发生二次同源重组, 同时利用质粒上的蔗糖致死基因剔除单交换子和错位插入突变株, 只留下敲除子和回复突变子。依然用引物 p1 和 p4 筛选, 此时扩增产物只有一条且其长度应与 2.1 中重叠扩增产物长度一致, 图 2 中 2 泳道显示此结果, 表明成功获得无痕敲除的 *C. crenatum* AS 1.542  $\Delta argR$  缺失株。

### 2.3 总 RNA 的提取结果

参照 RNA 提取试剂盒说明书, 用新鲜制备的菌液样品提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测提取结果, 图 3 显示 RNA 完整性良好, 纯度较高。总 RNA 经 DNAase I 处理, 逆转录为 cDNA 后进行 RT-qPCR。

### 2.4 RT-qPCR 结果

将 cDNA 稀释适当倍数后进行 RT-qPCR 检测。以 16S rRNA 为内参基因, 对上述 7 个基因进行转录水平的分析。从 RT-qPCR 的扩增曲线图和溶解曲线图 (略) 可以看出, 各基因的扩增出的产物溶解曲线峰值单一且温度比引物二聚体高, 说明产物单一、无非特异性扩增和引物二聚体形成, 进一步说明引物的特异性良好。扩增结果经  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式处理, 以野生株为对照, 数据比较结果见图 4。从图 4 可以

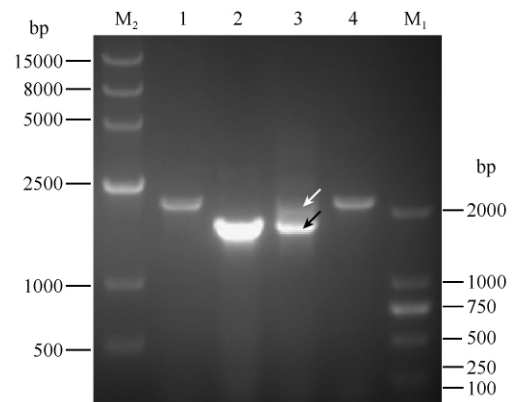


图 2 *argR* 基因敲除子筛选

Fig.2 Screening for the strain of *argR* gene knockout. M<sub>1</sub>: DL2000 DNA marker; 1: PCR products from revertant; 2: PCR products from *C. crenatum* AS 1.542  $\Delta argR$ ; 3: Single crossover mutant; 4: PCR products from wild type strain; M<sub>2</sub>: Wide range DNA marker.

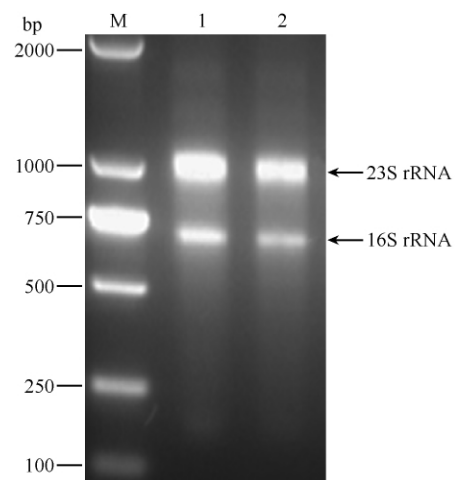


图 3 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Total RNA determined by agarose gel electrophoresis. M: DL2000 DNA marker. 1: The total RNA of *C. crenatum* AS 1.542; 2: The total RNA of *C. crenatum* AS 1.542  $\Delta argR$ .

看到, *argR* 基因缺失株的精氨酸相关基因的转录水平获得了大量的提高, 其中 *argC* 提高了 304.27 倍, *argB* 提高了 204.74 倍, *argJ* 提高了约 232.39 倍, *argD* 提高了约 149.05 倍, *argF* 提高了约 151.89 倍, *argG* 提高了约 77.49 倍, *carA* 提高了约 15.11 倍, 平均提高了约 162.13 倍。

### 2.5 缺失株 *C. crenatum* AS 1.542 $\Delta argR$ 产精氨酸及菌体生长的测定

为了探讨 *C. crenatum* AS1.542 中的调控蛋白缺失的情况下精氨酸产量的变化, 参照材料与方法

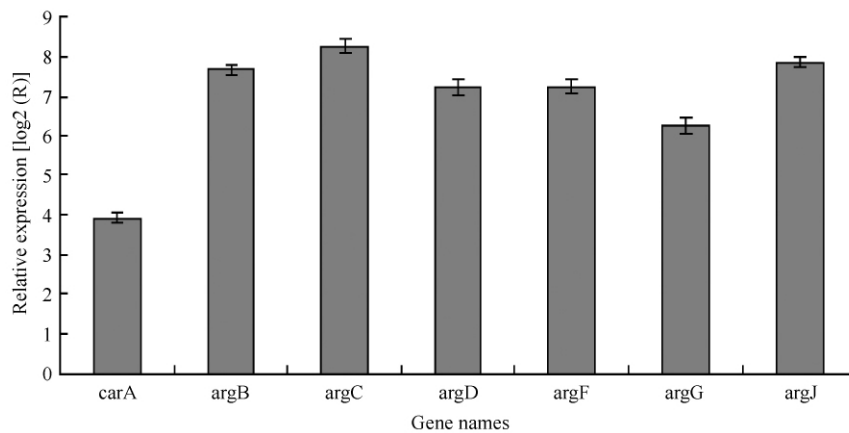


图4 突变株中各基因转录水平的变化

Fig. 4 Changes of *arg* genes transcriptional level in mutant strain compared with the wild-type strain.

中的培养基和发酵条件,以野生型菌株为对照,比较精氨酸产量的变化。结果显示,缺失株与野生株相比产精氨酸的量没有明显的变化。生长曲线显示,缺失株的生长初期较野生株生长要慢,但后期二株菌的菌体总量趋于一致(图略)。

### 3 讨论

*argR* 基因是 *C. crenatum* 精氨酸生物合成途径中的一个重要的负调控蛋白编码基因,但其对精氨酸合成途径中相关基因的转录水平的影响未见报道。因此,本实验室采用无痕敲除技术构建了一株 *C. crenatum* AS 1.542  $\Delta$ *argR* 缺失株并采用 RT-qPCR 方法对相关基因在转录水平的变化进行了监测。

本研究在构建 *C. crenatum* AS 1.542 $\Delta$ *argR* 缺失株时,利用重叠 PCR 的方法<sup>[13]</sup> 成功地把两个上下同源臂连接起来,省去了诸多的酶切连接的过程,缩短了操作时间和操作难度;实验中所用到的 pK18*mobsacB* 质粒是个自杀质粒,彻底消除了来源于质粒的基因(包括抗性基因)对研究基因敲除后菌株性状的干扰<sup>[14]</sup>,能真实地反映内部的变化。

本实验的 RT-qPCR 结果显示,与野生株相比,突变株中精氨酸生物合成途径中的 7 个基因的转录水平获得了大量的提高,但提高的水平有较大的差异,其中 *carA* 基因的转录水平仅仅上调了约 15.11 倍,而 *argC* 基因的转录水平上调了 304.27 倍,约是 *carA* 基因的 20 倍。这种差异表明,*argR* 基因编码的 ArgR 蛋白对 *argC* 基因的调控是最强的,对 *carA*

基因的调控最弱,这亦与 *carA* 基因参与精氨酸合成的辅途径而 *argC* 基因参与精氨酸合成的主途径是相符的。有报道表明,本实验研究的这 7 个基因分别分布在三个操纵元中,其中 *argC*、*argJ*、*argB*、*argD*、*argF* 这 5 个基因在同一操纵元 *argCJBDF* 中<sup>[15]</sup>,虽然位于同一操纵元中的基因转录水平上调的幅度都超过 149 倍,但也表现出有差异,其中 *argC* 基因的上调倍数约是 *argD* 和 *argF* 的 2 倍,表明同一操纵元的基因转录后没有形成仅一条多顺反子 mRNA,这可能是由于这个操纵元中含有内部启动子所致。*C. crenatum* 与谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*) 亲缘关系密切<sup>[15]</sup>, Sakanyan 等<sup>[16]</sup> 报道用启动子探针质粒检测到在 *C. glutamicum argB* 基因上游有一内部启动子; Lee 等<sup>[17]</sup> 采用染色质免疫共沉淀实验 (Chromatin Immunoprecipitation Assay, ChIP) 观察到 *C. glutamicum* ArgR 蛋白能与 *argC*、*argB*、*argF* 和 *argG* 基因上游序列发生结合反应,与 *argJ* 及 *argH* (与 *argG* 基因位于同一操纵元中) 基因上游序列无结合现象,其实验未对 *argD* 基因的上游序列进行观察。上述报道与本实验的推测是相符的,即 *argCJBDF* 这个操纵元中有多个内部启动子,从而导致各基因的转录水平表现出差异。*argG* 基因紧邻于 *argCJBDF* 操纵元,其转录水平在 *argR* 基因缺失后提高了约 77.49 倍,虽然比 *argC* 低约 4 倍,但也表明 *argG* 基因受 ArgR 调控。此结果与上述 Lee 等<sup>[16]</sup> ChIP 结果一致,与 Yim 等<sup>[18]</sup> 研究的结果不一致。Yim 等采用电泳迁移实验 (Electrophoretic Mobility Shift Assays, EMSA) 研究 *C. glutamicum* ArgR 与 *argG* 基因上游序列的结合情

况,发现二者没有结合反应。这可能是研究方法不同所致,EMSA 是一种体外研究蛋白质与 DNA 相互作用的方法,而 ChIP 和 RT-qPCR 是基于体内的分析方法。

本实验筛选到的缺失株 *C. crenatum* AS 1.542 $\Delta$ *argR* 未能观察到精氨酸产量与野生株相比有明显的差异。这个结果与 Ikeda 等<sup>[19]</sup>报道的结果是一致的,即仅通过缺失负调控因子并不能改善精氨酸的产量,虽然精氨酸生物合成途径中相关基因的转录水平发生了上调。因此,本文所研究的 *C. crenatum* 要实现精氨酸产量上的突破,除了要使负调控因子缺失外,还要在此基础上打开遏制精氨酸大量产生的其他瓶颈。

## 参考文献

- [1] Xu M, Rao Z, Yang J, Xu ZH. Heterologous and homologous expression of the arginine biosynthetic *argC* ~ *H* cluster from *Corynebacterium crenatum* for improvement of (L)-arginine production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2012, 39 (3):495-502.
- [2] Gonzaga Silva LF, Odorico de MM, Santos Dias Soares F, Mota Moura Fé D, Cavalcante JL, Anselmo JN, Leitao Vasconcelos PR. Effects of l-arginine-enriched total enteral nutrition on body weight gain, tumor growth, and in vivo concentrations of blood and tissue metabolites in rats inoculated with Walker tumor in the kidney. *Nutrition*, 2004, 20: 225-229.
- [3] Haynes J, Baliga BS, Obiako B, Soo OA, Pace B. Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-Arginine-nitric oxide signaling pathway. *Blood*, 2004, 103: 3945-3950.
- [4] Appleton J. Arginine: clinical potential of a semi-essential amino acid. *Alternative Medicine Review*, 2002, 7: 512-522.
- [5] 焦海涛, 袁永, 徐峰, 杨伟, 熊勇华, 陈雪岚. 钝齿棒杆菌 *argR* 基因克隆、表达及其重组菌发酵产精氨酸研究. 中国生物工程杂志 (*China Biotechnology*), 2011, 31 (10): 57-62.
- [6] 许正宏, 窦文芳, 王霞. 氮源及其添加模式对钝齿棒杆菌 JDN28-75 合成 L-精氨酸的影响. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*), 2006, 12 (3):381-385.
- [7] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Laboratory Press, 2001.
- [8] 陈雪岚, 秦红霞, 肖波, 吴杨. 基因工程实验. 北京: 中国科学出版社 (*China Science Press*), 2012.
- [9] van der Rest ME, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 52 (4):541-545.
- [10] Steyert SR and Pineiro SA. Development of a novel genetic system to create markerless deletion mutants of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 73 (15): 4717-4724.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C (T)</sup>. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408.
- [12] Tuchman M, Rajagopal, Mccann BS, Malamy MH. Enhanced production of arginine and urea by genetically engineered *Escherichia coli* K-12 strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 33-38.
- [13] 赵莹, 张丽仪, 刘昌政, 周晓红. 植物偏爱密码子优化 HPV18L1 全长基因的重叠 PCR 合成. 南方医科大学学报 (*Journal of Southern Medical University*), 2009, 29 (3): 387-392.
- [14] Young L, Dong Q. Two-step total synthesis method. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32 (7): 59-65.
- [15] Jiao HT, Yuan Y, Xiong YH, Chen XL. Analysis of the arginine biosynthetic gene cluster *argCJBDFR* of *Corynebacterium crenatum*. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2011, 4 (1):70-75.
- [16] Sakanyan V, Petrosyan P, Lecocq M, Boyen A, Legrain C, Demarez M, Hallet JN, Glansdorff N. 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 (1):99-108.
- [17] Lee SY, Shin HS, Park JS, Kim YH, Min J. Proline reduces the binding of transcriptional regulator ArgR to upstream of *argB* in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 86:235-242.
- [18] Yim SH, Jung S, Lee Sk, Cheon C-HI, Song E, Lee SS, Shin J, Myeong-Sok Lee. Purification and characterization of an arginine regulatory protein, ArgR, in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011, 38 (12): 1911-1920.
- [19] Ikeda M, Mitsuhashi S, Tanaka K, Hayashi M.

Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-Arginine and L-Citrulline Producer. *Applied and*

*Environmental Microbiology*, 2009, 75(6):1635-1641.

## Construction of *Corynebacterium crenatum* AS 1.542 $\Delta$ *argR* and analysis of transcriptional levels of the related genes of arginine biosynthetic pathway

Xuelan Chen<sup>1</sup>, Li Tang<sup>1</sup>, Haitao Jiao<sup>1</sup>, Feng Xu<sup>2</sup>, Yonghua Xiong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Functional Small organic molecule, Ministry of Education, College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

**Abstract:** [Objective] ArgR, coded by the *argR* gene from *Corynebacterium crenatum* AS 1.542, acts as a negative regulator in arginine biosynthetic pathway. However, the effect of *argR* on transcriptional levels of the related biosynthetic genes has not been reported. Here, we constructed a deletion mutant of *argR* gene: *C. crenatum* AS 1.542 $\Delta$ *argR* using marker-less knockout technology, and compared the changes of transcriptional levels of the arginine biosynthetic genes between the mutant strain and the wild-type strain. [Methods] We used marker-less knockout technology to construct *C. crenatum* AS 1.542 $\Delta$ *argR* and analyzed the changes of the relate genes at the transcriptional level using real-time fluorescence quantitative PCR. [Results] *C. crenatum* AS 1.542 $\Delta$ *argR* was successfully obtained and the transcriptional level of arginine biosynthetic genes in this mutant increased significantly with an average of about 162.1 folds. [Conclusion] The arginine biosynthetic genes in *C. crenatum* are clearly controlled by the negative regulator ArgR. However, the deletion of this regulator does not result in a clear change in arginine production in the bacteria.

**Keywords:** *Corynebacterium crenatum*, *argR* gene, marker-less knock-out technology, arginine, real-time quantitative PCR

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30960012,31160323)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-791-8333708; E-mail: yhxiongchen@163.com

Received: 19 July 2012/Revised: 15 September 2012