

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53 (9) :933 - 942; 4 September 2013  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

## 钝齿棒杆菌溶氧诱导型启动子的筛选及其功能验证

张博慧<sup>1</sup>, 徐美娟<sup>1</sup>, 饶志明<sup>1\*</sup>, 许正宏<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

<sup>2</sup>江南大学药学院制药工程实验室, 无锡 214122

**摘要:** 【目的】筛选钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) SYP A5-5 内源溶氧诱导型启动子, 验证其在不同溶氧条件下受溶氧调控的功能。【方法】以本课题组前期利用双向电泳结合质谱鉴定技术分离鉴定出的高低供氧条件下钝齿棒杆菌 SYP A5-5 胞内的显著差异蛋白 (27 个) 为基础, 结合棒杆菌基因组信息分析高低溶氧状态下显著差异蛋白中单位拷贝的表达量, 以其中单位拷贝表达量高的蛋白为目的蛋白, 克隆目的蛋白编码基因的上游启动子, 分别替换棒杆菌-大肠杆菌穿梭表达质粒 pDXW-8 的外源 *tac* 启动子, 在大肠杆菌和钝齿棒杆菌中表达报告基因 *gfp* 和 *cat*, 并检测其表达效率。【结果】筛选出高溶氧上调蛋白转酮醇酶和延胡索酸水化酶作为目的蛋白, 克隆其启动子区命名为 P-*tkt* 和 P-*fum*。在重组大肠杆菌和重组钝齿棒杆菌中, P-*tkt* 在高溶氧条件下 CAT 活性是低溶氧条件下 CAT 活性的 2.8 和 3.2 倍。该结果在 5 L 发酵罐中得到验证。【结论】启动子 P-*tkt* 为首次筛选到的钝齿棒杆菌内源性高溶氧诱导型启动子, 适用于高溶氧条件发酵生产氨基酸的菌株中, 有利于在高供氧条件下提高棒杆菌中氨基酸的合成代谢能力。

**关键词:** 钝齿棒杆菌, 供氧差异, 诱导型, 启动子

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 09-0933-10

钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) SYP A5-5 是本课题组从土壤中分离、经传统诱变手段改造得到的一株高产 L-精氨酸的突变株, L-精氨酸产量高达 36 g/L<sup>[1-2]</sup>。许虹等考察了高低供氧水平下钝齿棒杆菌 SYP A5-5 发酵产 L-精氨酸的过程, 证明溶氧对于钝齿棒杆菌的生长和精氨酸的形成都具有重要作用<sup>[3]</sup>。陶帅等通过二维电泳 (2-DE) 结合质谱鉴定技术针对高低供氧条件下钝齿棒杆菌 SYP A5-5 胞内的显著差异蛋白 (27 个) 进行了分离鉴定, 并分

析了它们在代谢途径中的地位 and 作用, 进一步验证了溶氧对于钝齿棒杆菌的重要影响<sup>[4]</sup>。

溶氧差异蛋白可能是其编码基因上游启动子在受到不同溶氧条件的刺激而进行的不同调控, 所以针对钝齿棒杆菌对氧的需求问题, 除了控制发酵过程中氧的供应浓度外, 本研究拟通过基因工程手段改造菌株来进行调节, 如筛选对溶氧水平敏感的启动子 (即溶氧诱导型启动子) 来调节受溶氧影响的发酵过程。目前用于棒杆菌表达载体 (如

**基金项目:** 教育部新世纪优秀人才计划 (NCET-10-0459); 国家“973 项目” (2012CB725202); 国家“863 计划” (2012AA022102, 2011AA02A211); 国家自然科学基金 (21276110); 中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP51306A, JUSRP1009); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20110093120001); 江苏高校优势学科建设工程项目

\* 通信作者。Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozm@yahoo.com.cn

**作者简介:** 张博慧 (1987-), 女, 河北沧州人, 硕士研究生, 微生物专业。E-mail: yaoyaozhd@163.com

**收稿日期:** 2013-01-31; **修回日期:** 2013-04-03

pWLQ2<sup>[5]</sup>、pVWEx1<sup>[6]</sup>、pCRC200<sup>[7]</sup>、pECt<sup>[8]</sup>和pBB1<sup>[9]</sup>等)的启动子主要是来源于大肠杆菌受IPTG诱导的启动子P-lac、P-tac、P-trc等。关于棒杆菌内源诱导型启动子的研究也有一些相关报道<sup>[10-13]</sup>,但是在棒杆菌中受溶氧诱导的启动子还未见报道。

本研究通过参照陶帅等<sup>[4]</sup>针对不同供氧条件下*C. crenatum* SYPA5-5可溶性蛋白双向电泳(2-DE)结合质谱技术鉴定出的27种差异蛋白以及棒杆菌基因组信息,分析显著差异蛋白单位拷贝的表达量,以受溶氧水平影响差异显著的蛋白单位拷贝下表达量高的2个蛋白作为目的蛋白研究对象。克隆目的蛋白编码基因的上游启动子区,替换大肠杆菌-棒杆菌穿梭质粒pDXW-8<sup>[14]</sup>中的*tac*启动子,以绿色荧光蛋白GFP(green fluorescent protein)和氯霉素乙酰转移酶CAT(chloramphenicol acetyltransferase)为报告基因,分别考察溶氧对目的启动子表达效率的影响,以期筛选到受溶氧诱导的启动子,为钝齿棒杆菌在发酵生产氨基酸等代谢产物中更好的利用溶氧提供有效的工具。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种与质粒:钝齿棒杆菌*C. crenatum* SYPA

5-5,大肠杆菌*E. coli* JM109均由本实验室保藏。用于提供两个报告基因的质粒pACYCDuet-1和pCAMBIA1302由本实验室保藏;质粒pDXW-8由江南大学国家重点实验室王小元教授惠赠;质粒pMD18-T载体购自TaKaRa公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**各种限制性内切酶、Taq DNA聚合酶及其缓冲体系、T4 DNA连接试剂盒、RNA提取试剂盒、cDNA合成试剂盒等均为TaKaRa公司产品。质粒提取试剂盒和DNA凝胶回收试剂盒购自上海生工生物技术有限公司。PCR仪为Eppendorf 5332、电转化仪为Bio-RAD pulse controller (Gene Pulser™)、荧光显微镜为Nikon ECLIPSE 50i。

**1.1.3 培养基:**LB培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵母浸出物5,NaCl10,加入20g琼脂粉即为固体LB培养基。LBG培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵母浸出物5,NaCl10,葡萄糖5,加入20g琼脂粉即为固体LBG培养基。感受态培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵母浸出物5,NaCl10,甘氨酸30,吐温801。

### 1.2 引物设计和合成

根据载体pACYCDuet-1的基因序列,分别设计报告基因*cat*普通PCR和RT-PCR所需引物;根据pCAMBIA1302设计*gfp*PCR所需引物;根据GENEBANK公布的基因序列,设计目的启动子的引物序列(表1),由上海生工生物技术有限公司合成。

表1. 用于PCR和RT-PCR扩增的引物

Table 1. Primers used for PCR and RT-PCR

Genes	Primer sequence (5'→3')	Restriction sites
<i>cat</i>	F: ACCCGAATTCGAAAGGACATGAACGATGGAGAAAAAATCACTGG	<i>EcoR</i> I
	R: CGCAAGCTTTCATTCTTCGTCACCTCC	<i>Hind</i> III
<i>gfp</i>	F: CGCGAATTCGAAAGGACATGAACGATGCTAGATCTGACTAG	<i>EcoR</i> I
	R: CGCAAGCTTCCCGATCTAGTAACATAG	<i>Hind</i> III
<i>Ptk1</i>	F: CGCGGATCCTTGCCCTGCTGTTTTTATGC	<i>Bam</i> H I
	R: CGCGAATTCCAATGTGAGACATGAAAC	<i>EcoR</i> I
<i>Pfum</i>	F: CGCGGATCCGGAAGACAGCGCTTTGAC	<i>Bam</i> H I
	R: CGCGAATTCCTAGAACCCGATAAATAAG	<i>EcoR</i> I
16.SrRNA-q	F: GCCCAGGTAAGTTCTTC	-
	R: GGTGTAGCGGTGAAATGC	-
<i>cat</i> -q	F: ATTGTATCCCGCCCTTTTGTAT	-
	R: ACCTTCATCGTCCACAGTCATA	-

Note: The start codon of reporter genes *gfp* and *cat* are in bold face

### 1.3 启动子区域分析

登陆 [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 在线软件 Berkeley Drosophila Genome

Project,输入目标启动子基因片段,选择原核生物类型,检测可能的启动子功能区域,并分析其保守序列。

#### 1.4 目标启动子 DNA 片段的克隆

以 *C. crenatum* SYPA5-5 染色体 DNA 为模板, 分别以表 1 中 *Pkt*、*Pfum* 的上下游引物进行 PCR, 扩增出 2 个目标启动子基因片段。胶回收后用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切, 并用基因纯化试剂盒进行纯化, 送上海生工测序。

#### 1.5 重组探针载体 pDXW-8-*cat* 和 pDXW-8-*gfp* 的构建

分别以 pACYCDuet-1 和 pCAMBIA1302 为模板、表 1 中的 *cat*、*gfp* 上下游引物进行 PCR 扩增出 *cat* 和 *gfp* 的基因片段。胶回收 PCR 产物后连接 pMD18-T 载体上, 酶切验证后得到重组质粒 T-*cat* 和 T-*gfp*。将 T-*cat* 和 T-*gfp* 两质粒分别经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切胶回收纯化, 连接到经过同样酶消化的 pDXW-8 载体, 构建过程如图 1 所示。重组质粒命名为 pDXW-8-*cat* 和 pDXW-8-*gfp*。

#### 1.6 携带启动子片段的重组构建

构建过程如图 1 所示, pDXW-8-*cat* 和 pDXW-8-*gfp* 分别用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切, 胶回收纯化后与 1.4 中的启动子片段用 T4 DNA 连接酶连接, 用 PCR 方法验证是否连接成功。将上述携带启动子片段的重组启动子探测载体分别用热击转化法转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 电击转化法<sup>[15]</sup> 转化 *C. crenatum* SYPA 5-5 感受态细胞。使用卡那霉素抗性平板筛选阳性转化子。

#### 1.7 不同溶氧条件发酵重组菌

挑取在含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素平板上生长的重组 *E. coli* 菌落接种 LB 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养; 挑取在含 10  $\mu$ g/mL 卡那霉素平板上生长的重组 *C. crenatum* 菌落接种于 LBG 培养基中于 30 $^{\circ}$ C 摇床培养。活化后, 将上述两种菌分别按 1% 接种量接种于装有 20 mL/250 mL 培养基的三角瓶中 200 r/min 摇床 (高溶氧) 培养, 以及装有 80 mL/250 mL 培养基的三角瓶中 100 r/min (低溶氧) 培养。

#### 1.8 启动子强度的分析

**1.8.1 绿色荧光蛋白 GFP 的荧光检测:** 取上述培养的含 *gfp* 基因的重组菌发酵液, 离心收集细胞, 用 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) 洗涤 2 次, 悬浮, 稀释 100 倍后取适量置于载玻片中央, 自然晾干后, 在荧光显微镜下观察荧光强度, 通过荧光强度比较启动子的活性。重组大肠杆菌以 *E. coli* JM109 和 *E. coli* JM109/pDXW-8-*gfp* 作为对照, 重组钝齿棒杆菌

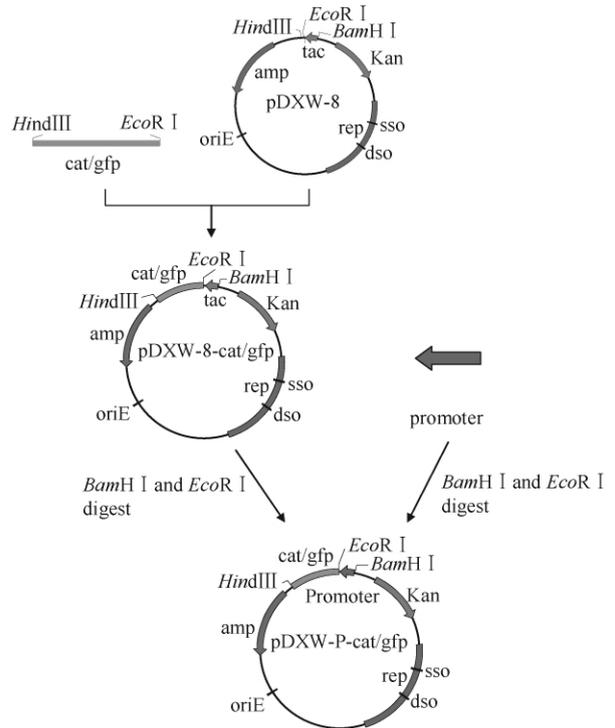


图 1. 携带目标启动子基因片段的重组探测载体的构建示意图

Figure 1. Construction of the recombinant promoter - probe plasmid with target promoter fragments.

以 *C. crenatum* SYPA 5-5 和 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-8-*gfp* 作为对照。

**1.8.2 氯霉素乙酰转移酶 CAT 活性的测定:** 取上述培养的含 *cat* 的重组菌发酵液离心收集细胞, 用 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) 洗涤 2 次, 悬浮。超声波破碎细胞, 离心, 取上清即为用于测定的粗酶液。分别以带有 pDXW-8-*cat* 和 pDXW-8-*gfp* 的 *E. coli* JM109 和 *C. crenatum* SYPA5-5 为对照, 进行同样的实验。采用考马斯亮蓝法<sup>[16]</sup> 测定总蛋白含量。CAT 酶活的测定方法参照文献<sup>[17]</sup> 方法, 反应体系含 100 mmol/L Tris-HCL (pH 7.8), 0.1 mmol/L acetyl-CoA, 0.4 mg/mL 5',5'-二硫 (2-硝基苯甲酸) [DTNB], 适量的粗酶液; 将反应混合物在水浴中加热到 37 $^{\circ}$ C, 加入氯霉素至浓度为 0.1 mmol/L, 混匀, 立即测定光吸收值  $A_{412}$ ; 以未加氯霉素的反应液为对照。

#### 1.9 RT-PCR 实验

选择在高低不同溶氧条件下发酵至对数生长后期的重组菌 *C. crenatum* SYPA5-5/pDXW-*Pkt*-*cat*, 参照 RNA 提取试剂盒说明书提取样品的总 RNA,

选取  $A_{260/280}$  比值在 1.8 - 2.0 的产物进行逆转录。按 cDNA 第一链合成试剂盒说明书操作, 反应混合物包含总 RNA <500 ng、PrimeScript Buffer 2  $\mu$ L、PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5  $\mu$ L、Oligo dT Primer 0.5  $\mu$ L、Random 6 mers 0.5  $\mu$ L、RNase Free dH<sub>2</sub>O 补齐至 10  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵化 15 min, 85 $^{\circ}$ C 孵化 5 s, 即为反转录的 cDNA。RNA 和 cDNA 样本 -20 $^{\circ}$ C 保存。将 cDNA 送上海钰森生物技术有限公司进行 RT-PCR 实验, 以 *16S rRNA* 作为内参基因, 所有反应设定 3 个重复。

### 1.10 5 L 发酵罐验证 P-*tkt* 在 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-P*tkt-cat* 中的功能

将重组菌 *C. crenatum* SYPA5-5/pDXW-P*tkt-cat* 和 *C. crenatum* SYPA5-5/pDXW-8-*cat* 活化后, 采用 LBG 培养基在 5 L 发酵罐中发酵培养, 设定搅拌桨转速分别为 300 r/min 和 600 r/min, 建立两种差异供氧模型, 每隔 4 h 取样, 发酵 48 h, 测定两组样品各个发酵时间点的溶氧浓度 (DO%)、菌体浓度 ( $OD_{562}$ ) 及

CAT 酶活力等参数进行对比分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 受溶氧水平影响显著差异蛋白的筛选与鉴定

本课题组前期实验中, 陶帅等针对不同供氧条件下钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 的可溶性蛋白二维电泳分析中, 共筛选到 32 个差异显著 (V% 的差值  $\geq$  2.5) 的蛋白点, 经过 MALDI-TOF-MS 及 MS/MS 质谱鉴定, 成功鉴定出 27 种蛋白。根据棒杆菌基因组信息, 这些蛋白编码基因在棒杆菌基因组中的拷贝数是不同的, 计算显著差异蛋白单位拷贝的表达量, 得到受溶氧水平影响差异显著的蛋白单位拷贝下表达量高的 2 个蛋白 (表 2), 分别为转酮醇酶 (Transketolase) 和延胡索酸水化酶 (Fumarate hydratase)。转酮醇酶和延胡索酸水化酶为高溶氧上调蛋白, 主要参与糖类代谢和能量代谢。

表 2. 目标蛋白的筛选

Table 2. Screening of target proteins

Protein name	V%	Copy number (CN)	V% /CN
Transketolase	3.277112	1	3.277112
Methionyl-tRNA synthetase	0.510306	1	0.510306
Putative DTDP-Glucose 4,6-dehydratase	0.967706	1	0.967706
Putative ZINC-type alcohol dehydrogenase transmemB	0.719739	1	0.719739
Tryptophanyl-tRNA synthetase	0.641047	1	0.641047
Thiosulfate sulfurtransferase	0.218458	2	0.109229
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	0.729272	1	0.729272
Polyphosphate glucokinase	0.797344	1	0.797344
Acetylmithine aminotransferase	0.441573	1	0.441573
Inositol-5-monophosphate dehydrogenase	0.218458	3	0.072819
Fumarate hydratase	6.60038	1	6.60038
L-2,3-butanediol dehydrogenase/acetoin reductase	2.11403	1	2.11403
Succinate dehydrogenase	0.365271	3	0.121757
L-lactate dehydrogenase	0.451753	3	0.150584
Predicted GTPase	0.218458	2	0.109229

### 2.2 溶氧调控表达型蛋白编码基因上游启动子区域功能分析及其重组构建

**2.2.1 启动子区域功能分析及其克隆:** 在 GenBank 网站上检索到 2.1 所述两种蛋白的基因序列, 根据其上游序列设计启动子引物 (表 1), 以 *C. crenatum* SYPA 5-5 染色体 DNA 为模板进行 PCR, 分别得到大小约为 180 bp 和 200 bp 目的片段, 将其分别命名为 P-*tkt*、P-*fum*。胶回收后用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切, 用 DNA 纯化试剂盒进行纯化后经上海生

工测序确认序列未发生突变。经过 Berkeley Drosophila Genome Project 分析, 得到 P-*tkt* 和 P-*fum* 具有启动子功能的区域 (表 3), 其中 P-*tkt* 的启动子区位于克隆片段的 2 - 47 bp, P-*fum* 启动子区则位于 38 - 83 bp。Paitek 等<sup>[10]</sup> 认为与大肠杆菌和枯草芽胞杆菌相比, 棒杆菌的启动子不具有明显的 -35 区, 仅 -10 区有较高的保守性, 其保守序列为 TGnTATAATnG。分析上述启动子功能区 DNA 序列可能的 -10 区和转录起始位点 (Transcriptional start

sites, TS sites) (表 3 黑体), 启动子 P-*tk* 的可能-10 区序列为 TATGAT, 与共同序列仅有一个碱基的差别; 启动子 P-*fum* 的可能-10 区序列为 TCTGAT, 与

共同序列差别较大。保守序列越接近共同序列, 启动子活性可能越高。

表 3. 目标启动子的 DNA 序列分析

Table 3. DNA sequence analysis of 2 target promoters

Promoter name	Start	End	Score	Promoter sequence
P- <i>tk</i>	2	47	0.74	CTGCTGTTTTAGCTTCAACCCGGGGCAAT <b>TATG</b> ATTCTCCGGAATTTTAT
P- <i>fum</i>	38	83	0.68	ATCGGCATTGAGTGCGCCAGATCCG <b>TATCTG</b> ATGGAGCGCCTCCAACA
				-10 region <span style="float: right;">TS site<sup>①</sup></span>

① Transcriptional start (TS) sites and the presumed -10 regions are in bold face

### 2.2.2 重组载体 pDXW-8-*gfp* 和 pDXW-8-*cat* 的

构建: 分别以 pACYCDuet-1 和 pCAMBIA1302 为模板, *cat* 和 *gfp* 上下游引物进行 PCR 扩增得到了 654 bp 的 *cat* 片段和约 1154 bp 的 *gfp* 片段, 分别双酶切与经相同酶消化的 pDXW-8 载体连接, 得到含报告基因 *cat* 的重组质粒 pDXW-8-*cat* 和含 *gfp* 的重组质粒 pDXW-8-*gfp*。经酶切验证 (图 2-A), 可以看出 pDXW-8-*cat* 用 *EcoR* I 酶切后得到约 9 kb 的片段, 与 pDXW-8 和 *cat* 之和相同; 而 pDXW-8-*cat* 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 得到一个约 8350 bp 和一个 650 bp 片段, 分别与 pDXW-8 经 *EcoR* I 酶切和 *cat* PCR 扩增出的片段大小相同, 说明 pDXW-8-*cat* 连接成功。同样地, pDXW-8-*gfp* 经酶切验证连接成功 (图 2-B)。

### 2.2.3 携带启动子片段的重组探测载体的构建:

将 pDXW-8-*gfp* 进行 *Bam*H I 和 *EcoR* I 酶切, 得到 8.7 kb 的大片段和约 250 bp 的 *tac* 启动子片段, 回收大片段, 与 2.2.1 所述启动子酶切产物连接, 用 PCR 方法进行验证证明连接成功 (图 3)。同样的, 携带目标启动子片段的 pDXW-P-*cat* 的构建过程如上所述。

## 2.3 启动子的活性分析

### 2.3.1 GFP 的荧光检测: 将重组菌在不同溶氧条件

下发酵后, 取适量菌液洗涤后涂布在载玻片上, 用荧光显微镜观察荧光亮度, 结果见图 4 和图 5。图中结果显示, 原始菌 *E. coli* JM109 无荧光; *E. coli* JM109/pDXW-8-*gfp* 和 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-8-*gfp* 都有荧光亮度, 但是在高溶氧条件和低溶氧条件下荧光亮度差别不大, 说明溶氧高低对 *tac* 启动子的活性无影响; *E. coli* JM109/pDXW-P-*tk*t-*gfp* 和 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-P-*tk*t-*gfp* 都有荧光亮度, 而且在高溶氧条件下其荧光亮度高于低溶氧

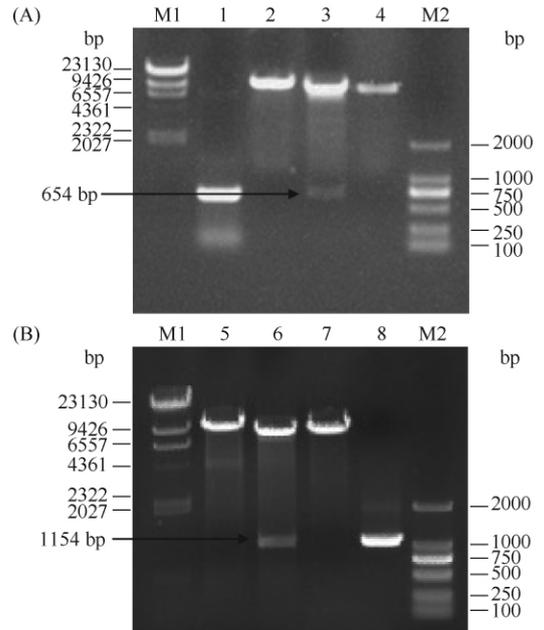


图 2. 质粒 pDXW-8-*cat* (*gfp*) 的酶切验证

Figure 2. Restriction analysis of plasmid pDXW-8-*cat* (*gfp*). A: pDXW-8-*cat*; B: pDXW-8-*gfp*; M1:  $\lambda$ DNA/*Hind* III Markers; M2: DL2000 Markers; lane 1: PCR product of *cat* gene; lane 2: pDXW-8-*cat*/*EcoR* I; lane 3: pDXW-8-*cat*/*EcoR* I and *Hind* III; lane 4: pDXW-8/*EcoR* I; lane 5: pDXW-8-*gfp*/*EcoR* I; lane 6: pDXW-8-*gfp*/*EcoR* I and *Hind* III; lane 7: pDXW-8/*EcoR* I; lane 8: PCR product of *gfp* gene.

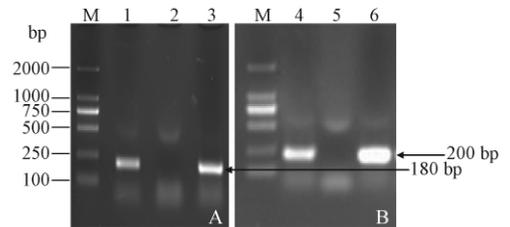


图 3. 携带启动子片段重组探测载体的 PCR 验证

Figure 3. PCR identification of recombinant promoter-probe vector with promoter gene. A: promoter gene P-*tk*t, B: P-*fum*. M: DL2000 Markers; lane 1-4: PCR product by *C. crenatum* SYPA5-5 gene; lane 2-5: PCR product by plasmid pDXW-8-*gfp*; lane 3-6: PCR product by plasmid pDXW-P-*tk*t/P-*fum*.

条件,说明该启动子在高溶氧条件下的活性高于低溶氧条件;*E. coli* JM109/pDXW-Pf<sub>um</sub>-gfp 和 *C.*

*crenatum* SYPA 5-5/pDXW-Pf<sub>um</sub>-gfp 无明显荧光亮度。

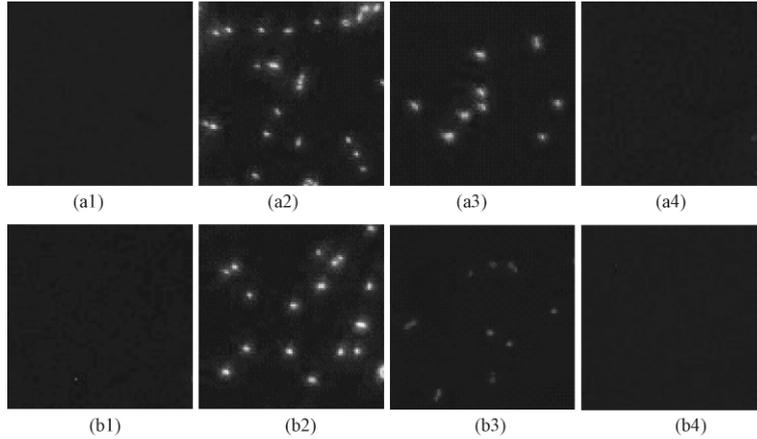


图 4. 大肠杆菌 JM109 细胞中绿色荧光蛋白的检测

Figure 4. Observation of GFP in *E. coli* JM109 and the recombinants. (a) Cultured in high dissolved oxygen level; (b) Cultured in low dissolved oxygen level; (a1), (b1): *E. coli* JM109; (a2), (b2): *E. coli* JM109/pDXW-8-gfp; (a3), (b3): *E. coli* JM109/pDXW-Ptk-gfp; (a4), (b4): *E. coli* JM109/pDXW-Pfum-gfp.

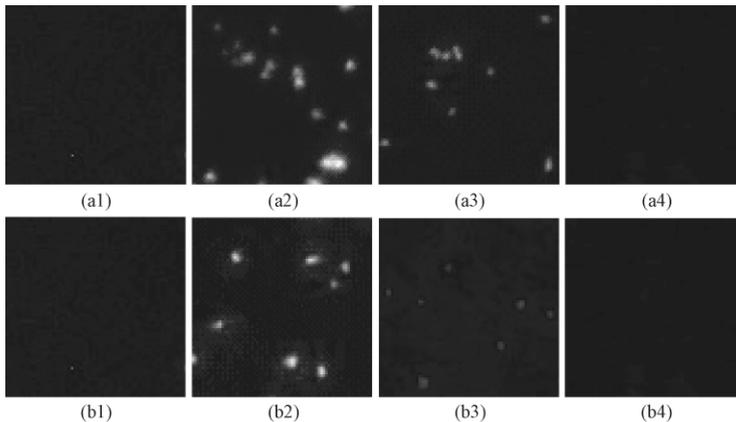


图 5. 钝齿棒杆菌 SYPA5-5 细胞中绿色荧光蛋白的检测

Figure 5. Observation of GFP in *C. crenatum* SYPA5-5 and the recombinants. (a) Cultured in high dissolved oxygen level; (b) Cultured in low dissolved oxygen level; (a1), (b1): *C. crenatum* SYPA5-5; (a2), (b2): *C. crenatum* SYPA5-5/pDXW-8-gfp; (a3), (b3): *C. crenatum* SYPA5-5/pDXW-Ptk-gfp; (a4), (b4): *C. crenatum* SYPA5-5/pDXW-Pfum-gfp.

**2.3.2 CAT 酶活的测定:**携带启动子片段的重组菌经不同溶氧条件发酵后,进行超声波细胞破碎,得到粗酶液,用 CAT 酶活测定方法测定粗酶液中 CAT 的酶活力,结果见图 6-A(重组 *E. coli* JM109)和图 6-B(重组 *C. crenatum* SYPA 5-5)。

*E. coli* JM109/pDXW-8-cat 在高低溶氧条件下 CAT 活力分别为 3.501 U/mg、3.497 U/mg,无明显差别,*C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-8-cat 在高低溶氧条件下 CAT 活力也无明显差别,说明 *tac* 启动子

活性不受溶氧条件影响。*E. coli* JM109/pDXW-Ptk-cat 在高溶氧条件下 CAT 活力为 3.032 U/mg,在低溶氧条件下为 1.083 U/mg,高溶氧条件下 CAT 活力是低溶氧条件下 CAT 活力的 2.8 倍,*C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-Ptk-cat 在高低溶氧条件下 CAT 活力分别为 1.987 U/mg、0.621 U/mg,高溶氧条件下 CAT 酶活力是低溶氧条件下的 3.2 倍,说明 *P<sub>tk</sub>* 启动子活性受高溶氧条件诱导。*E. coli* JM109/pDXW-Pfum-cat 和 *C. crenatum* SYPA5-5/

pDXW-Pfum-cat 的 CAT 活力都很低(表 4)。

表 4. CAT 酶活的测定

Table 4. The screening of CAT activity

Strains	Enzyme activity/(U/mg)	
	High dissolved oxygen level	Low dissolved oxygen level
<i>E. coli</i> JM109	0.00	0.00
<i>E. coli</i> JM109/pDXW-8-cat	3.501	3.497
<i>E. coli</i> JM109/pDXW-Ptkt-cat	3.032	1.083
<i>E. coli</i> JM109/pDXW-Pfum-cat	0.026	0.022
<i>C. crenatum</i> SYPA5-5	0.00	0.00
<i>C. crenatum</i> SYPA5-5/pDXW-8-cat	2.223	2.224
<i>C. crenatum</i> SYPA5-5/pDXW-Ptkt-cat	1.987	0.621
<i>C. crenatum</i> SYPA5-5/pDXW-Pfum-cat	0.0032	0.0026

溶氧条件, 而 CAT 活力同样高于低溶氧条件其活力, 这与钝齿棒杆菌在不同溶氧条件下该启动子启动的转酮醇酶蛋白的表达高低结果一致, 因此 P-tkt 受高溶氧条件诱导。而 P-fum 活性不高。

## 2.4 不同溶氧条件下 P-tkt 对转录水平的影响

为了比较在不同溶氧条件下启动子 P-tkt 对转录水平的影响, 提取重组钝齿棒杆菌对数生长后期的总 RNA, 逆转录成 cDNA 进行 RT-PCR 分析, 以 *16SrRNA* 作为内参基因。结果(表 5)表明, 样品各重复间的  $C_T$  值基本相同, 说明样品重复性良好; 在不同溶氧条件下样品的内参基因 *16SrRNA* 的  $C_T$  值水平相当, 而 *cat* 基因的  $C_T$  值存在明显差别, 说明 *cat* 基因在不同溶氧条件下存在转录水平上的差别。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算出 *cat* 基因的相对表达量, 如图 7 所示, 高溶氧条件下 *cat* 的表达量约为低溶氧条件下的 2.0 倍, 这一结果证明在高溶氧条件下 *cat* 基因的转录水平高于低溶氧条件, 即 P-tkt 启动子在高溶氧条件下启动转录的活性更高。

表 5. 不同溶氧条件样品 *16SrRNA* 和 *cat* 的  $C_T$  值

Table 5. The  $C_T$  values of *16SrRNA* and *cat* of samples in different dissolved oxygen level

Gene	Replicate	$C_T$ values	
		High dissolved oxygen level	Low dissolved oxygen level
<i>16SrRNA</i>	A	17.6321	17.7112
	B	17.7415	17.7951
	C	17.7214	17.6948
<i>cat</i>	A	22.5763	23.2556
	B	22.4638	23.2748
	C	22.5947	23.1361

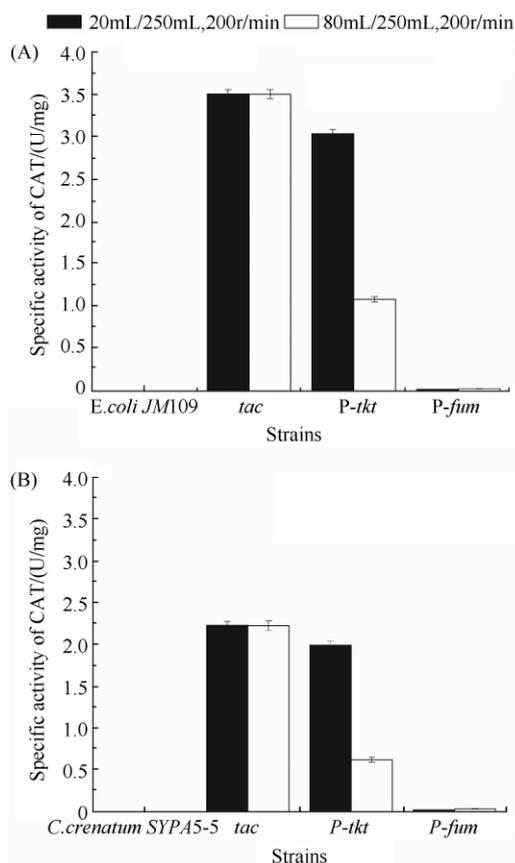


图 6. 重组 *E. coli* JM109 (A) 和 *C. crenatum* SYPA 5-5 (B) CAT 酶活力的测定

Figure 6. CAT enzyme activity assay in recombinant *E. coli* JM109 (A) and *C. crenatum* SYPA 5-5 (B).

以上结果表明, 在重组 *E. coli* JM109 和重组 *C. crenatum* SYPA 5-5 的 GFP 荧光检测和 CAT 酶活力的测定结果相一致。P-tkt 在大肠杆菌 JM109 和钝齿棒杆菌 SYPA 5-5 中, GFP 和 CAT 都表现出了较高的活性, 并且在高溶氧条件下的 GFP 亮度高于低

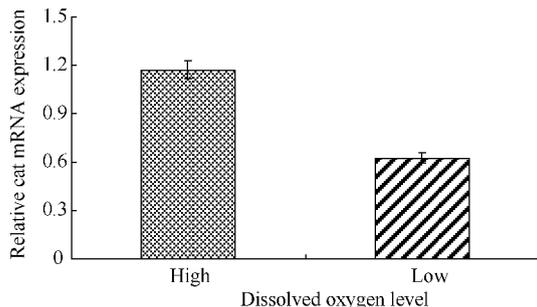


图 7. 不同供氧条件下 *cat* 基因 mRNA 相对表达量

Figure 7. Relative *cat* mRNA expression in different dissolved oxygen level.

## 2.5 5 L 发酵罐验证 P-tkt 在 *C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-Ptkt-cat 中的功能

在 5 L 发酵罐中, 设定搅拌桨转速分别为

300 r/min和600 r/min, 建立两种差异供氧模型, 每隔4 h取样, 测定不同供氧条件下的发酵参数(图8)。根据溶氧电极测定的溶氧浓度(图8-A)可知, 高供氧条件下溶氧在起始会迅速下降, 而后回升至90%左右维持恒定, 低供氧条件下罐内溶氧下降至接近0而不再明显变化; 根据菌体量的测定(图8-A)可知, 在高供氧条件下菌体更早进入稳定期, 菌体 $OD_{562}$ 维持恒定, 而低供氧条件下菌体保持缓慢增长; 根据CAT酶活力的测定(图8-B)可知, 重组菌*C. crenatum* SYPA 5-5/pDXW-Ptkat-cat在高溶氧条件下的比酶活始终高于低溶氧条件, 并且在32-36 h左右达到最大值约为3.59 U/mg, 约为低溶氧条件比酶活的3.2倍, 精确的验证了启动子P-tkt受高溶氧调控的特性。

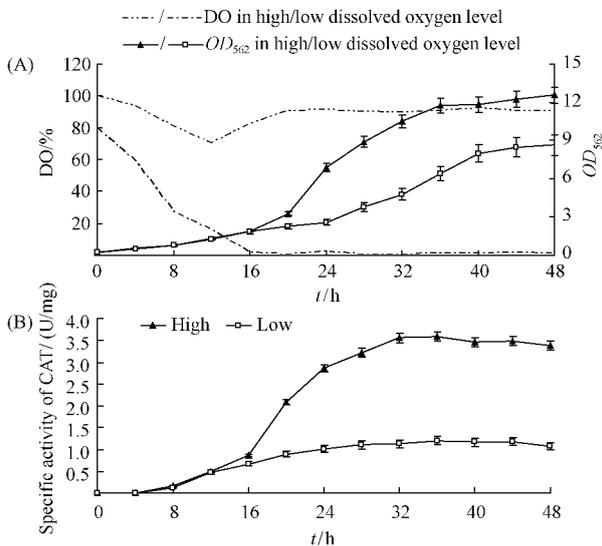


图8. 不同供氧条件下溶氧、菌体生长(A)及CAT酶活力(B)过程曲线

Figure. 8. Time-courses of DO, cell growth (A) and CAT activity (B) at different oxygen supply levels.

### 3 讨论

高溶氧是发酵钝齿棒杆菌生产L-精氨酸的前提, 溶氧对于钝齿棒杆菌的生长以及精氨酸的合成都具有重要的作用。利用基因工程手段解决钝齿棒杆菌对溶氧的需求问题, 是本课题研究的主要目的, 其中受溶氧诱导的启动子是一个重要的研究方向。本课题组前期实验中陶帅等针对高产L-精氨酸的钝齿棒杆菌SYPA5-5在高低不同溶氧条件下可溶性蛋白进行了2-DE分析和质谱鉴定, 根据其研究

结果选择了单位拷贝下表达量最高的2种蛋白作为目标蛋白, 分别为转酮醇酶(Transketolase)和延胡索酸水化酶(Fumarate hydratase)。这两种蛋白为高溶氧上调蛋白, 主要参与糖类代谢和能量代谢, 与溶氧水平有着直接的关系, 因为溶氧浓度的高低影响TCA循环的强度, 改变转录水平的相关基因与葡萄糖和乙酸代谢<sup>[18]</sup>。

pDXW-8是江南大学国家重点实验室王小元教授惠赠的一个大肠杆菌-棒杆菌穿梭载体, 前期已验证其在大肠杆菌和棒杆菌中均具有一定的活性。基于该载体构建了启动子探测载体pDXW-P-gfp和pDXW-P-cat, 将克隆得到的P-tkt和P-fum基因分别替换探测载体上的tac启动子, 并将各个携带启动子基因片段的探测载体成功地转化到了大肠杆菌JM109和钝齿棒杆菌SYPA5-5中。将重组菌在高低不同溶氧条件下培养发酵, 通过GFP荧光强度的检测和CAT酶活的测定, 发现启动子P-fum的活性很低, 这可能与它的-10区序列与共同序列相差较大有关, 需要在后续的实验中对该启动子进行碱基定点突变等优化, 并验证其与溶氧条件的关系。而启动子P-tkt在高溶氧条件下的荧光强度和CAT酶活力明显高于低溶氧条件, 因此该启动子是受高溶氧诱导的。

报告基因在重组菌中的表达不仅取决于转录启动的频率, 而且在很大程度上还与mRNA的翻译起始效率密切相关。mRNA翻译的起始效率主要由其5'端的结构序列所决定, 称为核糖体结合位点(RBS), 而RBS主要包括四个特征结构要素: 位于翻译起始密码子上游的6-8个核苷酸序列即Shine-Dalgarno(SD)序列、翻译起始密码子、SD序列与翻译起始密码子之间的距离及碱基组成、基因编码区5'端若干密码子的碱基序列<sup>[19]</sup>。本实验应用RT-PCR技术证明了不同溶氧条件下P-tkt启动子对cat转录水平影响不同, 并且本研究前期实验中在筛选P-tkt启动子时, 以转酮醇酶(Transketolase)编码基因的起始密码子为基点, 向上游选取了不同长度(180 bp、115 bp)的启动子基因片段, 结果显示只有本文所述长度(180 bp)的启动子片段具有受高溶氧条件诱导的性质, 而短片段(115 bp)未检测到该特性, 这两段启动子基因片段具有相同的核糖体结合位点(RBS), 但是只有长片段具有受溶氧影响转录水平的特性, 另外由于目标启动子序列中不具有明显的SD序列, 所以在报告基因中引入了相同的SD序列, 因此可以说明报告基因在不同溶氧条

件下的差异表达并不是 RBS 对其翻译过程产生的影响。

溶氧对启动子的调节机制还不清楚, 可能是直接作用于与转录相关的元件, 也可能是通过影响细胞的生理状态而对启动子进行控制, 这需要进一步的实验探索和验证。文中所构建的表达载体 pDXW-P1kt 为大肠杆菌-棒杆菌高溶氧诱导型穿梭表达载体, 课题组拟将高溶氧诱导启动子及其诱导型表达载体应用于高溶氧条件发酵生产氨基酸的菌株中, 在高供氧条件下提高棒杆菌中氨基酸的合成代谢能力。

## 参考文献

- [1] Xu H, Dou WF, Xu HY, Zhang XM, Rao ZM, Shi ZP, Xu ZH. A two-stage oxygen supply strategy for enhanced L-arginine production by *Corynebacterium crenatum* based on metabolic fluxes analysis. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 43 (1): 41-51.
- [2] Chen XL, Xu ZH, Tao WY. Analysis the Key Enzymes Producing Arginine from *Corynebacterium crenatum*. *Food Science*, 2005, 26 (3): 35-38. (in Chinese)  
陈雪岚, 许正宏, 陶文沂. 钝齿棒杆菌产精氨酸关键酶分析. *食品科学*, 2005, 26 (3): 35-38.
- [3] Xu H, Dou WF, Zhang XM, Xu HY, Rao ZM, Xu ZH. Effect of different oxygen supply levels on L-arginine batch fermentation process. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2008, 59: 2795-2801. (in Chinese)  
许虹, 窦文芳, 张晓梅, 许泓瑜, 饶志明, 许正宏. 不同供氧水平对 L-精氨酸分批发酵过程的影响. *化工学报*, 2008, 59: 2795-2801.
- [4] Tao S, Dou WF, Zhang XM, Xu HY, Rao ZM, Xu ZH. A preliminary study on differential proteomics of *Corynebacterium crenatum* in two oxygen supply models. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2011, 62 (6): 1649-1655. (in Chinese)  
陶帅, 窦文芳, 张晓梅, 许泓瑜, 饶志明, 许正宏. 高产精氨酸的钝齿棒杆菌在高低供氧条件下的差异蛋白质组学初步研究. *化工学报*, 2011, 62 (6): 1649-1655.
- [5] Liebl W, Sinskey AJ, Schleifer KH. Expression, secretion, and processing of staphylococcal nuclease by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174 (6): 1854-1861.
- [6] Peters-Wendisch PG, Schiel B, Wendisch VF, Katsoulidis E, Möckel B, Sahn H, Eikmanns BJ. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2001, 3: 295-300.
- [7] Yasuda K, Jojima T, Suda M, Okino S, Inui M, Yukawa H. Analyses of the acetate-producing pathways in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 77 (4): 853-860.
- [8] Sato H, Orishimo K, Shirai T, Hirasawa T, Nagahisa K, Shimizu H, Wachi M. Distinct roles of two anaerobic pathways in glutamate production induced by biotin limitation in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106 (1): 51-58.
- [9] Krause FS, Henrich A, Blombach B, Krämer R, Eikmanns BJ, Seibold GM. Increased glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by use of maltose, and its application for the improvement of L-valine productivity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 119 (1): 370-374.
- [10] Pařtek M, Nesřvera J, Guyonvarch A, Reyes O, Leblon G. Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*. 2003, 104 (1-3): 311-323.
- [11] Pařtek M, Muth G, Wohlleben W. Function of *Corynebacterium glutamicum* promoters in *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans*, and *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, 2003, 104: 325-334.
- [12] Okibe N, Suzuki N, Inui M, Yukawa H. Isolation, evaluation and use of two strong, carbon source-inducible promoters from *Corynebacterium glutamicum*. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 22 (2): 173-80.
- [13] Liu GM, Zhao Z, Zhang YZ, Wang Y, Ding JY. Cloning and analysis of promoter-active fragments from *Corynebacterium glutamicum* 10147. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (7): 972-977. (in Chinese)  
刘桂明, 赵智, 张英姿, 王宇, 丁久元. 谷氨酸棒杆菌 10147 基因组中启动子活性片段的克隆与分析. *微生物学报*, 2009, 49 (7): 972-977.
- [14] Xu DQ, Tan YZ, Shi F, Wang XY. An improved shuttle vector constructed for metabolic engineering research in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, 2010, 64 (2): 85-91.
- [15] Liebl W, Bayerl A, Schein B, Stillner U, Schleifer KH. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, 65 (3): 299-303.
- [16] Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1-2): 248-254.
- [17] Shaw WV. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods in Enzymology*, 1975, 43: 737-792.

- [18] Phue JN, Shiloach J. Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. *Metabolic Engineering*, 2005, 7: 353.
- [19] Li M, Ma XK. Effect of ribosome binding site sequence

on the expression level of *HBcAg* in *E. coli*. *Journal of Genetics & Genomics*, 1992, 19 (2): 186-197. (in Chinese)

李满, 马贤凯. 核糖体结合位点序列对大肠杆菌中 *HBcAg* 重组质粒表达的影响. *遗传学报*, 1992, 19 (2): 186-191.

## Screening of dissolved oxygen induced promoters in *Corynebacterium crenatum* and functional verification

Bohui Zhang<sup>1</sup>, Meijuan Xu<sup>1</sup>, Zhiming Rao<sup>1\*</sup>, Zhenghong Xu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

<sup>2</sup> School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** [Objective] Purpose of this work was to screen promoters which were induced by dissolved oxygen in *Corynebacterium crenatum* SYPA5-5. [Methods] Based on the genomic information of *Corynebacterium*, we identified target proteins which were the highest expression level of one copy of 27 known proteins from our earlier study. Based on the upstream sequence of the coding gene sequences, we amplified two promoters, named P-*tkt* and P-*fum*. The *tac* promoter of recombinant pDXW-8-*cat* and pDXW-8-*gfp* were replaced by the new promoters, and the recombinant plasmids were transformed into *E. coli* JM109 and *C. crenatum* SYPA5-5 respectively. At different dissolved oxygen level, we compared the function of promoters by the expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) and green fluorescent protein (GFP). [Results] Results show that we identified 2 target proteins, which were transketolase and fumarate hydratase. At the high dissolved oxygen level the CAT activity of *E. coli* JM109/pDXW-P*tkt*-*cat* and *C. crenatum* SYPA5-5/pDXW-P*tkt*-*cat* were 3.032 U/mg and 1.987 U/mg, which were 2.8-fold and 3.2-fold than that in the low dissolved oxygen, respectively. We got similar results by using a 5-L fermentor. [Conclusion] The P-*tkt* promoter induced by high dissolved oxygen was suitable for fermentation to produce amino acids and beneficial to improve ability of synthesis and metabolism of amino acids at high dissolved oxygen level.

**Keywords:** *Corynebacterium crenatum*, oxygen supply, induction, promoter

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-10-0459), by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB725202), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA022102, 2011AA02A211), by the National Natural Science Foundation of China (21276110), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51306A, JUSRP1009), by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20110093120001) and by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

\* Corresponding author. Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozm@yahoo.com.cn

Received: 31 January 2013/Revised: 3 April 2013