

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (6) :635 - 640; 4 June 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.005

钝齿棒杆菌 *FarR* 对精氨酸生物合成基因簇转录水平的影响及其与 *ArgR* 的关系

邵辉峰, 张斌, 王吕, 焦海涛, 汤立, 陈雪岚*

江西师范大学生命科学学院, 功能有机小分子教育部重点实验室, 江西 南昌 330022

摘要:【目的】*FarR* 蛋白可参与棒杆菌精氨酸生物合成途径中相关基因的调控, 但具体机制不清楚。本研究通过比较钝齿棒杆菌 *farR*、*argR* 单敲除株和 *farR* 与 *argR* 双敲除株 *Arg* 生物合成途径中相关基因转录水平的变化来揭示 *FarR* 蛋白功能及其与 *ArgR* 的内在关联性。【方法】采用无痕敲除方法构建了钝齿棒杆菌 *farR* 单敲除株和 *farR* 与 *argR* 双敲除株; 采用荧光定量 PCR 方法分析了 *farR*、*argR* 敲除及其组合敲除后精氨酸生物合成途径相关基因在转录水平的变化。【结果】在 *ArgR* 蛋白缺失的情况下, *FarR* 可能发挥正调控功能; 在 *ArgR* 存在时, 敲除 *farR*, 目标基因的转录水平改变存在不一致性, 表现出上调、下调或无影响。【结论】钝齿棒杆菌中 *FarR* 和 *ArgR* 在精氨酸生物合成途径的调控中存在关联性。

关键词: 钝齿棒杆菌, *farR* 基因, *argR* 基因, 精氨酸, 荧光定量 PCR

中图分类号: Q935 文章编号: 0001-6209(2014)06-0635-06

FarR 是转录调控因子 GntR 家族中的一员, 这个家族的共同特征是 N 端氨基酸序列以螺旋-转角-螺旋 (helix-turn-helix, HTH) 的空间构象形成 DNA 结合结构域, 在 C 末端存在相应配体的结合功能域^[1-2]。有关 *FarR* 的功能研究, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 以及脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) 中报道较多。在大肠杆菌中, *farR* 基因与三羧酸循环 (Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 基因簇毗邻 (*gltA-sdhCDAB-sucABCD-farR*), 其表达蛋白 *FarR* 对 TCA 循环基因簇中的 *gltA*、*sdhCDAB*、*sucABCD* 以及自身基因的转录具有调控作用, 且 *FarR* 是脂肪酸响应蛋白, 环境中长链脂肪

酸可与其 C 末端功能域结合, 导致 *FarR* 与其结合的 DNA 操作子区域解离, 从而实现 *FarR* 的调控功能^[3]。在淋病奈瑟氏菌中, *FarR* 是 *far* 系统的阻遏蛋白, 与该菌在人体宿主中的存活有重要关系^[4-5]。在淋病奈瑟氏菌 *far* 系统中, *FarA* 是膜融合蛋白, *FarB* 是膜转运蛋白; 当宿主微环境产生抗菌物质——长链脂肪酸时, 该脂肪酸可导致 *FarR* 脱离 *farAB* 基因簇操作子, *farAB* 基因簇开始转录, 表达的 *FarA* 及 *FarB* 可联合将长链脂肪酸通过外膜通道输出细胞外, 从而使淋病奈瑟氏菌在宿主微环境中存活。在脑膜炎奈瑟氏菌中, Schielkea 等通过荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 以及电泳迁移率 (electrophoretic mobility shift

基金项目: 国家自然科学基金 (31360219, 30960012)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-791-88120392; E-mail: xuelanchen162@163.com

作者简介: 邵辉峰 (1982 -), 男, 江西九江人, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。E-mail: duwal68@163.com

收稿日期: 2013-09-18; 修回日期: 2014-01-18

assay, EMSA) 方法证实 FarR 是 *nadA* 基因(编码粘附素,能被宿主的免疫系统识别的抗原)的转录负调控因子^[6-7]。

在棒杆菌属中,*farR* 的文献报道较少。其中谷氨酸棒杆菌 *farR* 的功能研究仅有两篇文献^[8-9],且此两篇文献均已证实 FarR 蛋白可参与棒杆菌 Arg 生物合成途径中相关基因的调控,但具体机制不清楚。本项目拟以钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS1.542 野生株、*farR*、*argR* 单敲除株及 *farR* 和 *argR* 双敲除株为模型,从转录水平研究 FarR 对精氨酸生物合成基因簇 *argCJBDF-argGH* 及旁路基因 *carAB* (分别编码氨基甲酰磷酸合成酶的大小亚基)的影响并进一步探讨 FarR 和 ArgR 调控精氨酸合成途径中相关基因转录的内在关联性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *C. crenatum* AS 1.542 购置于中国普通微生物菌种保藏管理中心; *C. crenatum* Δ *argR* 为本实验构建的 *C. crenatum* AS 1.542 *argR* 基因敲除株^[10];大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室保存;质粒 pMD-18T 购自 TaKaRa 公司;质粒 pK18*mobsacB* 由本院的武晓丽博士赠送。

1.1.2 主要试剂和仪器: EX *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 (*Xba* 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、Blue plus II protein marker 购自全式金生物技术有限公司;引物合成和测序由上海生工完成;其余试剂均为国产分析纯。电转仪 (gene plus xcell)、PCR 仪购自 Bio-Rad 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

大肠杆菌 LB 培养基配制参照分子克隆^[11-12]; *C. crenatum* 种子培养基、摇瓶发酵培养基及感受态细部的制备培养基配方见参考文献 [13-14]。 *C. crenatum* 培养条件为 30℃,大肠杆菌培养温度为 37℃。

1.3 *farR* 基因敲除载体的构建

提取 *C. crenatum* AS 1.542 的基因组 DNA, 50 μ L 反应体系扩增 *farR* 基因敲除的上下同源臂,上下臂扩增的引物见表 1,其中单划线为上下臂的互补序列,双下划线为限制性酶切位点。融合 PCR 获得上下臂连接产物,经切胶回收后连接至 pMD18-T 质粒后测序分析,验证正确后 *Xba* I 和 *Hind* III 从重组 pMD18-T 载体切下目的片段并连接至经同样两种内切酶酶切后的 pK18*mobsacB* 质粒上,连接产物转化至 DH5 α 中,提取质粒备用。

表 1. 引物序列

Table 1. Sequence of primers used in this study

primer	sequence (5'→3')	size/bp	restriction site
<i>farR-up-F</i>	CCTGATCTAGATCAATGATTTTCGTCTTGTGG	831	<i>Xba</i> I
<i>farR-up-R</i>	CCCATCCACTAAACTTAAACAGTGGTTTTGGTGACTGAAGC		
<i>farR-down-F</i>	TGTTTAAAGTTTACTGGATGGGACGCTGAACCCATTTTGGTG	771	<i>Hind</i> III
<i>farR-downR</i>	AGGCAAAGCTTACACCAAGGTTGACTG		

1.4 *farR* 单敲除株和 *farR* 及 *argR* 双敲除株的筛选

将 1.3 获得的 *farR* 基因的敲除质粒分别电转入 *C. crenatum* AS 1.542 和 *C. crenatum* Δ *argR* 中,利用质粒 pK18*mobsacB* 所带卡拉霉素抗性基因进行第 1 次正向筛选获得单交换子,再利用蔗糖致死基因 *sacB* 进行第 2 次反向筛选获得阳性双交换子。具体筛选方法如下:采用菌落 PCR 的方法(引物为上下同源臂两端的引物 *farR-up-F* 和 *farR-down-R*)筛选阳性单交换子;将得到的单交换子单菌落接种

于 5 mL 试管 BHI + 2% 葡萄糖(无抗性)培养液中,30℃ 200 r/min 培养过夜,在无抗性的条件下诱导二次交换;将培养过夜的菌液稀释 2000 倍后取 200 μ L 涂布于 LBHIS + 10% 蔗糖平板上,然后在 30℃ 培养 24h,利用质粒自身携带的蔗糖致死基因将维持单交换子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,用 *farR-up-F* 和 *farR-down-R* 引物筛选正确的双交换子,分别获得 *C. crenatum* Δ *farR* 单敲除株和 *C. crenatum* Δ *argR* Δ *farR* 双敲除株。

1.5 总 RNA 的提取及 RT-qPCR

为分析 FarR 和 ArgR 对 *C. crenatum* 精氨酸生物合成基因簇转录水平的影响, 本课题组采用 TRIzol® Reagent (Invitrogen 公司) 提取试剂盒分别提取了 *C. crenatum* AS 1.542、*C. crenatum* $\Delta argR$ 单敲除株、*C. crenatum* $\Delta farR$ 单敲除株和 *C. crenatum* $\Delta argR$ $\Delta farR$ 双敲除株的总 RNA。各总 RNA 提取后, 为防止污染, 分别用 DNase I 进行了处理并随机选用前期实验设计的 3 对引物^[10] PCR 进一步验证有无 DNA 污染。经验证无 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。RT-qPCR 以 *C. crenatum* AS 1.542 为对照, 以 16S rRNA 为内标, 按 SYBR® Premix EX Taq™ (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa 公司) 试剂盒说明书进行, 反应程序如下: 95°C 30 s; 95°C 3 s, 60°C 30 s, 循环 40 次。qPCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[15] 对基因的各 Ct 值进行定量分析, 每个样品重复 3 次。实验所用引物见本课题组前期工作^[10]。

2 结果

2.1 farR 基因无痕敲除质粒构建

泳道 1, 2 为敲除 *farR* 基因的上下同源臂扩增产物 (831bp 和 771bp), 泳道 3 为融合 PCR 扩增产物 (1581bp, 其中介于 750 - 1000bp 的条带是未融合臂, 具体见图 1); 融合片段经 TA 克隆后的阳性克隆子测序验证正确后, 酶切目的片段连接至 pK18mobsacB 质粒并转化至 DH5 α 中, 采用菌落 PCR 方法筛选阳性菌株并提取质粒进行双酶切鉴定, 酶切结果显示 pK18mobsacB- $\Delta argR$ 无痕敲除质粒构建成功; 提取此质粒分别电转至 *C. crenatum* AS 1.542 和 *C. crenatum* $\Delta argR$ 。

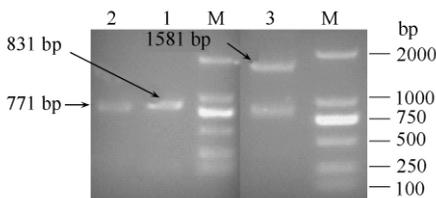


图 1. *farR* 基因上下臂的扩增及其融合 PCR 产物

Figure 1. The amplification of deletion arms of *farR* gene and overlap PCR. M, DL2000 DNA Marker; lane 1, the deletion lower arm; lane 2, the deletion upper arm; lane 3, the production of overlap PCR.

2.2 C. crenatum $\Delta farR$ 单敲除株和 C. crenatum $\Delta argR$ $\Delta farR$ 双敲除株的筛选

C. crenatum $\Delta farR$ 单敲除株和 *C. crenatum* $\Delta argR$ $\Delta farR$ 双敲除株的筛选均经历了二次交换过程。第一次交换由于只发生了单臂交换, 整个质粒都插入在基因组序列中, 此时基因组中既有完整的 *farR* 基因又有构建的敲除 *farR* 基因的上下臂, 因此用引物 *farR-up-F* 和 *farR-down-R* 扩增则产物出现了两条条带; 第二次交换在无抗性条件下单交换子发生二次同源重组, 同时利用质粒的蔗糖致死基因 *sacB* 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株。依然使用引物 *farR-up-F* 和 *farR-down-R* 筛选, 此时敲除子的扩增产物只有一条且其长度与图 1 中 3 泳道产物的长度一致。图 2 结果显示成功获得了 *C. crenatum* $\Delta farR$ 单敲除株以及 *C. crenatum* $\Delta argR$ $\Delta farR$ 双敲除株。

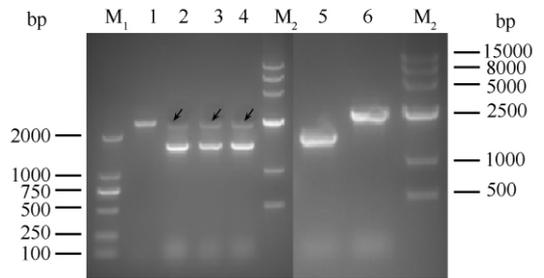


图 2. *C. crenatum* $\Delta farR$ 单敲除株和 *C. crenatum* $\Delta argR$ $\Delta farR$ 双敲除株的筛选

Figure 2. Screening of *farR* deletion, and both *farR* and *argR* deletion mutants. M1, DL2000 marker; lane 1, PCR products from wild strain; lane 2 - 4, PCR products from middle status (*C. crenatum* $\Delta farR$ and *C. crenatum* $\Delta argR$ $\Delta farR$); lane 5, PCR products from mutant (*C. crenatum* $\Delta farR$ and *C. crenatum* $\Delta argR$ $\Delta farR$); lane 6, PCR products from revertant; M2: Wild range DNA marker.

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 DNase 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 qPCR 检测, 以 16S rRNA 为内参, 对精氨酸生物合成途径的 7 个基因 *argC*、*argJ*、*argB*、*argD*、*argF*、*argG* 及 *carA* 进行了转录水平的分析。从 RT-qPCR 的扩增曲线及溶解曲线图 (略) 可以看出, 各基因扩增的产物溶解曲线峰值单一且温度比引物二聚体高, 说明引物特异性

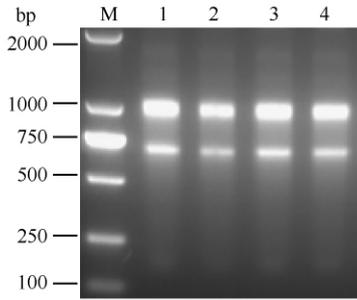


图 3. 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3. Total RNA determined by agarose gel electrophoresis. M, Marker; lane 1, *C. crenatum* AS1.542; lane 2, *C. crenatum* $\Delta argR$; lane 3, *C. crenatum* $\Delta farR$; lane 4, *C. crenatum* $\Delta argR \Delta farR$.

好,无引物二聚体及非特异性产物产生。扩增结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行处理,以野生株 *C. crenatum* AS 1.542 的 RT-qPCR 数据为基线,具体结果见图 4。从图 4 可以看出,*farR* 基因单独敲除后,与野生株相比,*carA*、*argG* 的转录水平分别下调了 69.44% 和 52.47%;*argF* 转录水平与野生株相比基本没有变化(仅下调了 3.96%);而 *argB*、*argC*、*argD* 及 *argJ* 转录水平分别上调了 55.45%、17.63%、28.00% 和 17.63%。*C. crenatum* $\Delta argR$ 敲除株与野生株相比,*argC*、*argJ*、*argB*、*argD*、*argF*、*argG* 及 *carA* 的转录水平全部出现显著的上调,分别提高了 1410%、2037%、3033%、1481% 倍、1509%、764.7% 和 2314%。在缺失 *argR* 基础上进一步敲除 *farR* 后,以上 7 个基因的转录水平与 *C. crenatum* $\Delta argR$ 敲除株相比出现了显著的下调,下调幅度分别为 269.23%、557.34%、796.44%、532.31%、276.05%、350.16% 和 461.19%。

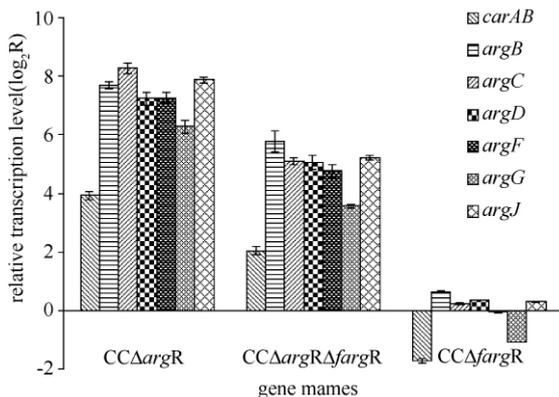


图 4. 三株敲除株中精氨酸合成基因转录水平的变化

Figure 4. The change of transcription levels of *arg* genes in three mutants compared with the wild-type strain, $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3 讨论

本文为了探究调控蛋白 FarR 对 *C. crenatum* AS 1.542 精氨酸合成相关基因转录水平的影响及其与负调控蛋白 ArgR 的内在关联性,将前期构建的 *C. crenatum* $\Delta argR$ 敲除株和本文构建的 *C. crenatum* $\Delta farR$ 敲除株及 *C. crenatum* $\Delta argR \Delta farR$ 双敲除株进行了荧光定量 PCR 分析,以期从转录水平分析 FarR 调控蛋白对精氨酸生物合成途径相关基因的调控功能以及与负调控蛋白 ArgR 之间可能的内在关联性。图 4 结果显示, FarR 蛋白的功能较复杂。当单独敲除 *farR* 基因时,被检测基因的转录出现不同程度的上调和下调。其中 *carA* 和 *argG* 转录水平发生了明显的下调;*argC*、*argB*、*argJ* 和 *argD* 的转录水平都有适当的上调;而 *argF* 的转录水平与野生株基本相当。Hänbler 等^[8]采用 DNA 微阵列技术比较了谷氨酸棒杆菌 *farR* 敲除株与野生株在转录水平上的差异,结果显示 *farR* 敲除株有 13 个基因在转录水平出现了下调,38 个基因出现了上调。其中精氨酸生物合成途径中的 4 个主要基因 *argJ*、*argB*、*argD* 和 *argF* 出现明显上调,而本研究中 *farR* 敲除株 *argF* 的转录水平与野生株基本相当,该结果与文献报道不完全吻合。当单独敲除钝齿棒杆菌负调控基因 *argR* 时,精氨酸生物合成途径中相关基因的转录水平与野生株相比均发生了上调,平均上调率为 1792%;但是当进一步敲除 *farR* 时,所检基因的转录水平发生了明显的下调,平均下调率为 463%。Lee 等曾采用 EMSA 以及染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 方法证实 FarR 可与谷氨酸棒杆菌中 *argB* 上游的操作子区域结合,且推测 FarR 与 Arg 合成途径的负调控蛋白 ArgR 存在竞争关系,即当 ArgR 先占据该操作子 -57 至 -77 区域时, FarR 则不能再与该操作子区域结合;反之, FarR 先占据该操作子区域,则 ArgR 的结合位点变为该操作子 -49 至 -25 区域^[9]。本文实验结果显示,在钝齿棒杆菌中,当 *argR* 存在时, *farR* 仅能参与精氨酸生物合成途径的部分基因的调控,且调控强度不显著;而当 *argR* 基因缺失时, *farR* 基因对精氨酸生物合成途径的调控效果显著,且可能扮演了正调控的角色。因此,本课题组根据以上结果,推测 ArgR 和 FarR 之间可能存在如图 5 所示的模型图关系。如图 5 所示, Case A 表示当 ArgR 缺失, FarR 存在时,精氨

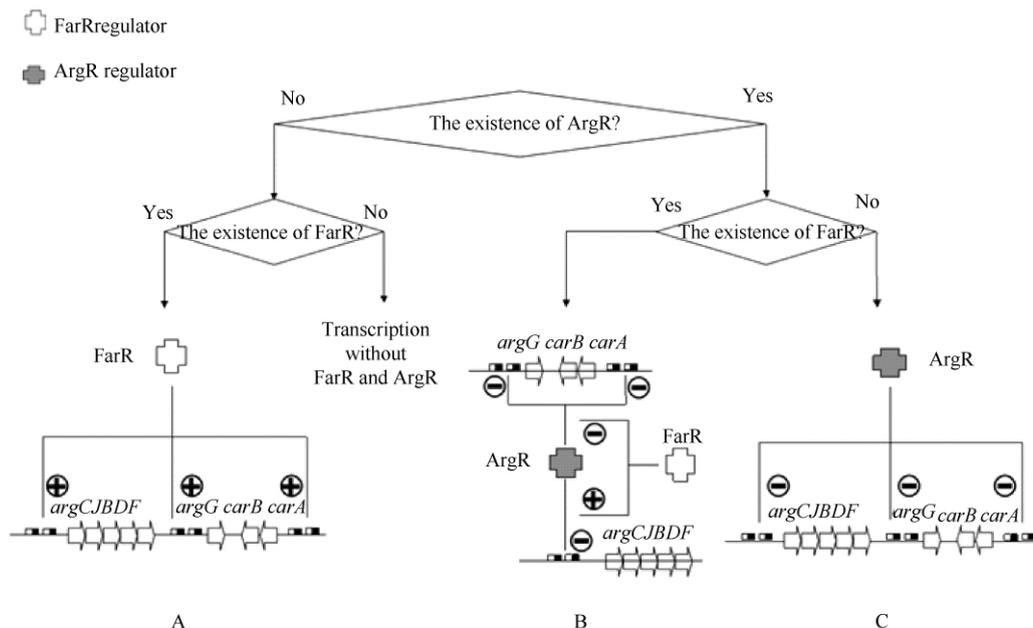


图 5. 钝齿棒杆菌 ArgR 和 FarR 调控机制的模型图

Figure 5. Regulatory profiles of arginine operon with FarR and ArgR in *C. crenatum*, based on the results presented in this and previous studies. Signs of plus in cycle indicate positive regulatory effects, and signs of minus in cycle indicate negative/inhibitory regulatory effects. ARG operator sites are shown as black and white boxes, in the promoter regions of the arginine biosynthetic *argCJBDF*, *argGH* and *carAB*.

酸合成途径的基因, 包括旁路基因转录均受 FarR 正调控; Case C 表示当 FarR 不存在而 ArgR 存在时, 所测基因均处于被 ArgR 负调控状态; Case B 则相对复杂, FarR 和 ArgR 均存在时, 推测 ArgR 可与 FarR 蛋白竞争结合 *argCJBDF* 基因簇操作子区域, 实现对 *argCJBDF* 的负调控作用, 导致 *argCJBDF* 表达被下调, 同时 FarR 可与 ArgR 蛋白竞争结合 *argG* 和 *carA* 的操作子区域实现对 *argG* 和 *carA* 的正调控作用, 导致 *argG* 和 *carA* 的表达被上调。

以上仅为根据 RT-qPCR 结果进行的推测, 对 FarR 蛋白在精氨酸生物合成途径的功能研究以及 FarR 与 ArgR 之间的内在联系还需要进一步的实验来揭示。

参考文献

- [1] Aravind L, Anantharaman V. HutC/FarR-like bacterial transcription factors of the GntR family contain a small molecule-binding domain of the chorismate lyase fold. *FEMS Microbiology Letter*, 2003, 222: 17-22.
- [2] Riga S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacteria regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 12507-12515.
- [3] Quail MA, Dempsey CE, Guest JR. Identification of a fatty acyl responsive regulator (FarR) in *Escherichia coli*. *FEBS Letter*, 1994, 356: 183-187.
- [4] Lee E, Loughlin C, Folster J, Shafer W. FarR regulates the *farAB*-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* via an MtrR regulatory mechanism. *Journal of Bacteriology*, 2003, 12: 7145-7152.
- [5] Schielke S, Schmitt C, Spatz C, Frosch M, Unkmeir A, Kurzai O. The transcriptional repressor FarR is not involved in meningococcal fatty acid resistance mediated by the FarAB efflux pump and dependent on lipopolysaccharide structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 3: 3160-3169.
- [6] Schielke S, Huebner C, Spatz C, Nagele V, Ackermann N, Frosch M, Kurzai O, Unkmeir A. Expression of the meningococcal adhesin NadA is controlled by a transcriptional regulator of the MarR family. *Molecular Microbiology*, 2009, 72: 1054-1067.
- [7] Schielke S, Spatz C, Schwarz R, Josepha B, Schoena C, Schulza S, Huberta K, Froscha M, Unkmeira A, Kurzaia O. Characterization of FarR as a highly specialized, growth phase-dependent transcriptional regulator in *Neisseria meningitidis*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2011, 301: 325-333.
- [8] Hänbler E, Müller T, Jeßberger N, Völzke A, Plassmeier J, Kalinowski J, Krämer R, Burkovski A. FarR, a

- putative regulator of amino acid metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76: 625-632.
- [9] Lee S, Park J, Lee J, Chang S, Park J, Kim Y, Min J. Interaction of transcriptional repressor ArgR with transcriptional regulator FarR at the *argB* promoter region in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 4: 711-718.
- [10] Chen X, Tang L, Jiao H, Xu F, Xiong Y. Construction of *Corynebacterium crenatum* AS1.542 *argR* and analysis of transcriptional levels of the related genes of arginine biosynthetic pathway. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(1): 92-98. (in Chinese)
陈雪岚, 汤立, 焦海涛, 徐峰, 熊勇华. 钝齿棒杆菌 *argR* 基因缺失株的构建及其对精氨酸生物合成途径相关基因转录水平的影响. *微生物学报*, 2013, 53(1): 92-98.
- [11] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manua*. 3rd eds. New York: Cold Spring Laboratory Press, 2001.
- [12] 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, 2012.
- [13] Xu Z, Dou W, Wang X. Effects of nitrogen source and its supply manner on production of *L-arginine* by *Corynebacterium crenatum* JDN28-75. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(3): 381-385. (in Chinese)
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. *应用与环境微生物学报*, 2006, 12(3): 381-385.
- [14] van der Rest ME, Lang 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.
- [15] Livak KJ, Thomas DS. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

Effect of FarR on transcriptional levels of arginine biosynthetic genes in *Corynebacterium crenatum* AS 1.542 and its relationship with ArgR

Huifeng Shao, Bin Zhang, Lv Wang, Haitao Jiao, Li Tang, Xuelan Chen*

College of Life Science, Key Laboratory of Functional Small Organic Molecular, Ministry of Education, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi Province, China

Abstract: [Objective] The FarR protein was involved in the regulation of arginine biosynthetic pathway in corynebacterium, but the regulation mechanism of FarR protein and its relationship with the negative regulator ArgR have never been reported. In this work, we constructed two deletion mutants: *C. crenatum* $\Delta farR$ and *C. crenatum* $\Delta argR \Delta farR$, and investigated the FarR function and its relationship with ArgR through the determination of transcriptional levels of arginine biosynthetic genes in four strains, including *C. crenatum* $\Delta argR$ constructed in previous work.

[Methods] We used marker-less knockout technology to construct *C. crenatum* $\Delta farR$ and *C. crenatum* $\Delta argR \Delta farR$, and compared the transcriptional levels of the arginine biosynthetic genes in three mutant strains with those of the wild type strain using real-time fluorescence quantitative PCR. [Results] The results of RT-qPCR indicate that, in the absence of ArgR, FarR acted as a positive regulator. When *farR* gene was knockout alone, the transcriptional levels of arginine biosynthetic genes appeared up-regulated, down-regulated or no influence. [Conclusion] FarR and ArgR are involved together in the regulation of arginine biosynthetic pathway of *C. crenatum*.

Keywords: *Corynebacterium crenatum*, *farR* gene, *argR* gene, arginine, real-time fluorescence quantitative PCR

(本文责编:王晋芳)