



钝齿棒杆菌 GlnK 在氮代谢调控及 L-精氨酸合成中的功能

唐蜜, 王晴, 杨套伟, 张显, 徐美娟*, 饶志明*

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】钝齿棒杆菌是重要的氨基酸生产菌株, 本研究针对氮代谢 PII 信号转导蛋白 GlnK 展开相关功能研究, 分析其在钝齿棒杆菌氮代谢调控及 L-精氨酸合成中的作用。【方法】以 GlnK 蛋白为研究对象, 通过基因敲除等遗传方法获得过表达、敲除及敲弱 *glnK* 的重组钝齿棒杆菌, 研究 GlnK 对 NH_4^+ 吸收的影响, 通过 RT-qPCR 和酶活测定, 从转录水平和蛋白水平上揭示 GlnK 对氮代谢和 L-精氨酸合成相关基因表达水平及酶活的影响, 通过 5-L 发酵罐发酵产 L-精氨酸研究 GlnK 对 L-精氨酸合成的影响。【结果】过表达 *glnK* 能明显促进 NH_4^+ 的吸收, 而敲除 *glnK* 后则会抑制 NH_4^+ 的摄取; RT-qPCR 和酶活测定发现, 相比于野生型菌株 Cc5-5, *glnK* 过表达菌株 Cc-glnK 中与铵吸收相关的基因, 表达量平均上调约 4.58 倍, L-精氨酸合成基因簇中基因的表达水平平均上调 1.50 倍。Cc-glnK 中氮代谢相关蛋白的酶活平均提高 46.97%; L-精氨酸合成途径上 7 个关键酶的酶活平均提高 30.00%; 5-L 发酵罐发酵各重组菌株结果表明, Cc-glnK 菌株的产量可达 49.53 g/L, 产率为 0.516 g/(L·h), 相比于出发菌株 Cc5-5, 其 L-精氨酸产量提高了 28.65%。【结论】过表达 GlnK 能促进 NH_4^+ 的吸收及利用, 并通过影响 L-精氨酸合成途径上关键基因的表达水平, 提高关键酶的酶活, 最终提高 L-精氨酸的产量。本研究为后续探索钝齿棒杆菌氮代谢调控机制及代谢工程改造钝齿棒杆菌生产 L-精氨酸提供了一种新的策略。

关键词: L-精氨酸, 钝齿棒杆菌, 氮代谢, PII 信号转导蛋白 GlnK

棒杆菌作为食品级工业生产菌株, 广泛应用于各种氨基酸的生产中, 如 L-谷氨酸、L-赖氨酸和 L-精氨酸等^[1]。L-精氨酸是重要的工业氨基酸, 因其生理生化功能的多样性, 广泛应用于食品、医药及动物饲料等领域。作为天然氨基酸中 N:C

含量最高的一种氨基酸, L-精氨酸合成与氮源吸收和利用效率密切相关^[2]。氮源作为细菌中复杂的生物大分子, 是微生物生长与繁殖所必需的一种营养元素, 参与多种含氮化合物如蛋白质、核酸以及细胞壁等的合成^[3]。为满足细胞对氮源的

基金项目: 国家自然科学基金(31770058, 31570085); 江苏省自然科学基金(BK20181205); 教育部重点研究项目(113033A); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRP51708A); 国家双一流轻工业技术与工程一级学科计划(LITE2018-06)

*通信作者。徐美娟, E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn; 饶志明, Tel/Fax: +86-510-85916881, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn
收稿日期: 2019-12-23; 修回日期: 2020-03-27; 网络出版日期: 2020-04-18

需求以及确保在氮限量时也有足够的氮源供给, 包括谷氨酸棒杆菌在内的微生物已针对不同种类的氮源形成了一套复杂且精细的氮代谢调控网络^[4]。

在谷氨酸棒杆菌中, NH_4^+ 作为最优先利用的氮源, 其吸收及转运主要靠操纵子 *amtB-glnK-glnD* 编码的转运子 AmtB、信号蛋白 GlnK 和腺苷转移酶 (GlnD/ATase) 共同完成, 这个过程不但受到氮全局转录调控因子 AmtR 在转录

水平的调控, 还受到 PII 信号转导蛋白 GlnK 的翻译后修饰调控^[5-6]。如图 1 所示, 当胞内 NH_4^+ 充足时, GlnK 与铵转运蛋白 AmtB 结合形成复合物来控制铵的转运, 此时 AmtB 不能向胞内转运铵; 当胞内 NH_4^+ 限量时, GlnK 被 GlnD 腺苷酰化后形成 GlnK-AMP, 不再与 AmtB 结合形成复合物。同时, AmtR 从 DNA 上释放下来后与 GlnK-AMP 结合, 被 AmtR 抑制的氮代谢相关基因得以转录, 表达量显著提高, 此时 NH_4^+ 通过 AmtB 铵转运通

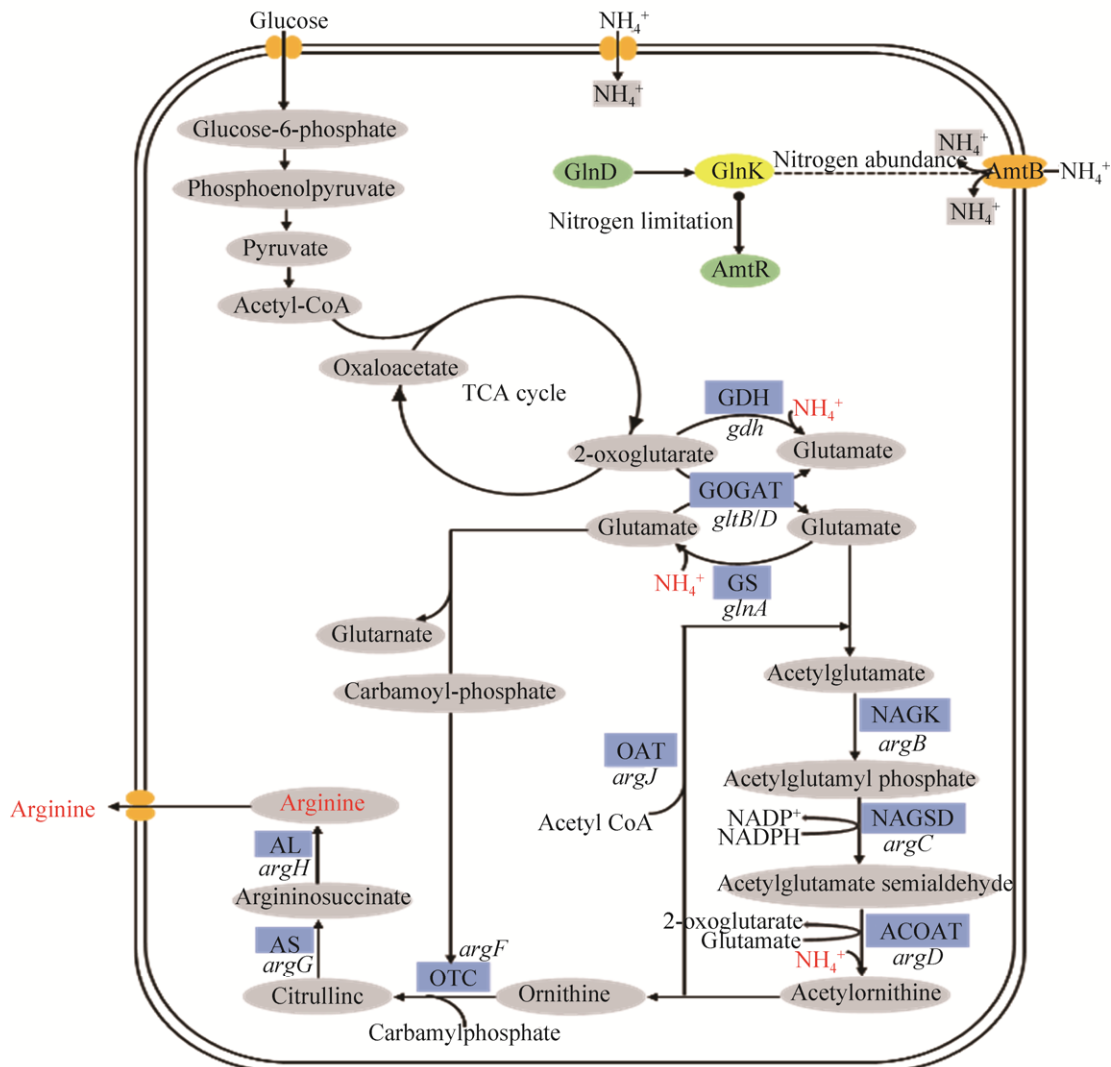


图 1. 棒杆菌中 L-精氨酸合成途径及氮代谢调控概况

Figure 1. Schematic representation of the L-arginine biosynthesis pathway and regulation of nitrogen metabolism in *Corynebacteria*.

道进入胞内以维持氮平衡^[7]。由此可知, GlnK 作为谷氨酸棒杆菌氮代谢中主要的信号转导蛋白, 在氮代谢调控网络中起着不可或缺的作用^[8]。但 GlnK 在钝齿棒杆菌中与氮代谢间的关系却未见报道。同时, 谷氨酸和谷氨酰胺作为生物合成反应中关键 NH_4^+ 受体, 棒杆菌可以通过谷氨酸脱氢酶(GDH)和谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶(GS/GOGAT)两条途径将 NH_4^+ 转变为谷氨酸和谷氨酰胺^[4]。当氮源过量时, 即胞内 NH_4^+ 浓度大于 5 mmol/L 时, NH_4^+ 优先被谷氨酸脱氢酶同化, 每摩尔 NH_4^+ 的吸收消耗 1 mol/L 的 2-酮戊二酸以及氧化 1 mol/L 的 NADPH^[9]。当氮源限量时, 即胞内 NH_4^+ 浓度小于 1 mmol/L 时, NH_4^+ 通过谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合成酶的同化作用形成谷氨酸^[10]。而谷氨酸又作为前体物质在 L-精氨酸的合成中发挥重要作用, 说明氮代谢调控蛋白 GlnK 可能在 L-精氨酸的合成中起着关键作用。但目前有关 GlnK 在 L-精氨酸合成中所起作用的研究却未见报道。

钝齿棒杆菌 SYPA5-5 (*Corynebacterium crenatum* SYPA5-5, Cc5-5), 为本实验室经传统诱变手段改造得到的一株高产 L-精氨酸菌株, L-精氨酸产量达 36.1 g/L^[11]。但是, 目前关于该菌中氮代谢 PII 信号转导蛋白 GlnK 在 L-精氨酸合成中的调控功能理解依然有限。本研究以 GlnK 为研究对象, 利用基因敲除等遗传方法构建得到 *glnK* 过表达 (Cc-*glnK*)、敲除 (Cc- Δ *glnK*) 及敲弱菌株 (Cc-*kd/glnK*), 发现 GlnK 正调控钝齿棒杆菌对 NH_4^+ 的摄取和 L-精氨酸的合成。通过 GST pull-down 实验及检测胞外 NH_4^+ 的残留量, 证实 GlnK 很有可能通过与 AmtR 结合, 影响钝齿棒杆菌对 NH_4^+ 的摄取; 进一步结合 RT-qPCR 分析和酶活测定发现, GlnK 通过影响 L-精氨酸代谢途径关

键基因表达水平进而影响关键酶的酶活, 最终影响 L-精氨酸的产量。该研究为探索钝齿棒杆菌氮代谢调控机制及代谢工程改造生产 L-精氨酸提供了一种新的策略。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) SYPA5-5 由本实验室保藏^[12-13]; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 和 BL21(DE3)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 重组质粒 pXMJ19-*glnK*、pGEX-6P-1-*glnK* 等由本研究构建。本研究使用的菌株、质粒和引物见表 1、表 2。

1.2 试剂

质粒 DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒和细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit、2×Phanta[®] Max Master Mix、HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (R223-01)和 ChamQ[™] Universal SYBR[®] qPCR Master Mix (Q711-02/03)购自南京诺唯赞生物科技有限公司; RNAPrep Pure Cell/Bacteria Kit (DP430)购自天根生化科技(北京)有限公司; Glutathione MagBeads 购自南京金斯瑞生物科技有限公司; Pierce[™] GST Protein Interaction Pull-Down Kit 及 Pierce[™] Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit 均购自赛默飞世尔科技有限公司; *EcoR* I、*Bam*H I 和 *Hind* III 等限制性内切核酸酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 氯霉素、氨苄霉素等购自上海阿拉丁生化科技有限公司; 其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

表 1. 本实验所用的菌株及质粒
Table 1. Strains and plasmids used in this study

| Strains/Plasmids | Characteristics | Source |
|----------------------------|---|------------|
| Strains | | |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | Host for gene expression | Invitrogen |
| <i>C. crenatum</i> SYPA5-5 | A paradigm strain of amino acid production | Our lab |
| Plasmids | | |
| pXMJ19 | Shuttle vector, His-tag, Chl^R | Our lab |
| pXMJ19- <i>glnK</i> | A derivative of pXMJ19, harboring the wild-type <i>glnK</i> gene | This study |
| pXMJ19-dCas9 | A derivative of pXMJ19, harboring the <i>dCas9</i> gene | This study |
| pDXW10 | Shuttle vector, His-tag, Km^R | This study |
| pDXW10-sgRNA | A derivative of pDXW10, harboring sgRNA | This study |
| pK18 <i>mobsacB</i> | Suicide plasmid carrying <i>sacB</i> for selecting double crossover in <i>C. crenatum</i> , Km^R | Our lab |
| pK18- <i>glnKarm</i> | Construct used for in-frame deletion of <i>glnK</i> | This study |
| pGEX-6p-1 | Expression vector, GST-tag, Amp^R | Our lab |
| pGEX-6p-1-cc/ <i>cglnK</i> | A derivative of pGEX-6P-1, harboring the <i>C. crenatum/C. glutamicum glnK</i> gene, respectively | This study |
| pET28a-cc/ <i>cgamtR</i> | A derivative of pET28a, harboring the <i>C. crenatum/C. glutamicum amtR</i> gene, respectively | Our lab |

Chl^R indicates resistance to chloromycetin; Km^R indicates resistance to kanamycin; Amp^R indicates resistance to ampicillin.

表 2. 本研究所用到的引物
Table 2. Primers used in this study

| Primers | Primer sequences (5'→3') |
|------------------------|--|
| PXMJ19- <i>glnK</i> F1 | CCC <u>AAGCTT</u> AAAGGAGGACAACC ATGAAACTCATCACCGCAATTGTCAAG |
| PXMJ19- <i>glnK</i> R2 | GCT <u>CTAGA</u> TTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAAGGGCTGCTTCGCCG |
| PK18- <i>glnK</i> F1 | CGCGGATCCTCGGCAAGCGAAAAGACGTTTG |
| PK18- <i>glnK</i> R1 | GCTGGATTATTATAAGTTTGATCGTCTCCTTCAAAAAGACATTCGG |
| PK18- <i>glnK</i> F2 | TCTTTTTGAAGGAGACGATCAAACCTTATGAATAATCCAGCCCAGCTG |
| PK18- <i>glnK</i> R2 | CGCA <u>AAGCTT</u> TTTCCTGAATGCAAAACCTGTGCG |
| Pdcas9-F1 | AAGTATTCCATTGGCCTGGCTATCGGCACCAATTCTGTGGGT |
| Pdcas9-R1 | GAAAGACTGAGGGACGATGGCGTCCACATCGTAATCAGAGAGACGG |
| Pdcas9-F2 | ATCGTCCCTCAGTCTTTCCTGAAAG |
| Pdcas9-R2 | CAGGCCAATGGAATACTTTTTATCCATTAGTTG |
| P6p-1- <i>glnK</i> F1 | CGCGGATCCATGAAACTCATCACCGCAATTGTCAAG |
| P6p-1- <i>glnK</i> R2 | CGCGAATTC <u>T</u> AAAGGGCTGCTTCGCCG |
| SigA-RT F/R | GCGTCGTCTGTGAAATCCCG/CGCCATTGGTGTTCCTCCTG |
| GlnA-RT F/R | CGAGCATCACTGAAAACGCC/GCAACCTGGGGTGTATCTAATCG |
| GltD-RT F/R | GTTGTCATCATCGGTGGCGG/GTGCAGGAAGAGGTTGGGGTA |
| GltB-RT F/R | TGGCTTCTGAATCGGGAGTGT/AGTACGCTTTACGACGCTCTCC |
| GDH-RT F/R | TGGTCATCAACCCAAGGCAC/GGAAAAGGACCCTCATTACGCT |
| AmtR-RT F/R | CTCGTCAAAAGTCCGTGCTCAA/GCGATTGATTGGGTTCCATAAGA |
| GlnD-RT F/R | CCAGCACTTGGGATAACAGCC/TTCTGAGCAGGGCAAAAATAGC |
| AmtB-RT-F/R | TTCGGAACCTTGGGTGTCGT/GCAAAGATACCTGCGATGGACTG |
| GlnK-RT-F/R | ACCGCTATCGTCAAGCCGTT/CCAAATCCCTGGGTTTCGCTG |
| ArgC-RT-F/R | GCGTTACCGCAGAACAGGCT/ACTGCTTGGGTTTGTGGCTGT |
| ArgJ-RT-F/R | GACTGTCGGCGGAATGGG/ACGGTGTCAATTGGTGGAGTT |
| ArgB-RT-F/R | CAAGGGTGGTTTCCGTGTGAC/CGGAGGTTCCACAGCGTAA |
| ArgD-RT-F/R | ATGCCAAGCGGTGTGGAGTT/AAGATAGCAGCCACATCCGTTG |
| ArgF-RT-F/R | TCACAGATGGGTAAGGGCGAG/GAGTTCACCAGCGGCACAGT |
| ArgG-RT-F/R | GGTTGAGGACCGTCTCGTGG/TTGTCCAGGTCACGGATACGA |
| ArgH-RT-F/R | CAGGCAAGACCCACTTCCAG/TTGTCCAGGTCACGGATACGA |

Restriction sites are shown in underlined parts.

1.3 培养基与培养条件

大肠杆菌采用 LB 培养基 (蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 7.0) 于 37 °C 下 180 r/min 进行培养; 钝齿棒杆菌采用 LBG 培养基 (蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 葡萄糖 7 g/L, pH 7.0) 于 30 °C 下 180 r/min 进行培养; 发酵罐发酵种子培养基(葡萄糖 120 g/L, 酵母提取物 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.04 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.02 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.02 g/L, MnSO₄ 0.02 g/L, CaCO₃ 20 g/L, pH 7.0) 用于 5-L 发酵罐发酵时种子的培养。发酵培养基(葡萄糖 150 g/L, 玉米浆 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.04 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.02 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.02 g/L, MnSO₄ 0.02 g/L, pH 7.0) 用于 5-L 发酵罐发酵产 L-精氨酸, 5-L 发酵罐培养方法参照文献[14]。酶活测定及 RT-qPCR 分析所用培养基为 CGXII 基本培养基(葡萄糖 50 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L, 尿素 5 g/L, MnSO₄·H₂O 0.01 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.001 g/L, CuSO₄ 0.0002 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L, NiCl₂·7H₂O 0.0002 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.04 g/L, 3-丙磺酸 42 g/L, 生物素 0.0002 g/L, CaCl₂ 0.01 g/L, 原儿茶酸 0.0003 g/L, pH 7.0)。

1.4 钝齿棒杆菌 SYP A5-5 *glnK* 过表达菌株的构建

以钝齿棒杆菌 SYP A5-5 基因组 DNA 为模板, 用引物 PXMJ19-*glnK* F1/R1 对基因 *glnK* 进行扩增 (表 2)。使用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 对扩增产物和载体 pXMJ19 进行酶切, 然后将回收后的 *glnK* 片段与 pXMJ19 载体进行连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, LB 培养基 (含氯霉素 50 mg/mL) 中培养 12 h。重组质粒 pXMJ19-*glnK*

经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切验证后, 与质粒 pXMJ19 分别电转入 SYP A5-5 感受态细胞中, 从平板上挑选阳性转化子并用 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达, 诱导结束后于 4 °C 离心收集菌体, 并用 0.1 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤重悬后, 利用超声破碎仪破碎后离心取上清, 处理样品并对其进行 SDS-PAGE 分析以验证 *glnK* 过表达菌株 Cc-*glnK* 构建成功。

1.5 钝齿棒杆菌 SYP A5-5 *glnK* 敲除菌株的构建

提取钝齿棒杆菌 SYP A5-5 基因组 DNA, 并以该基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到 *glnK* 基因上下游同源臂。上游同源臂扩增所用引物为 PK18-*glnK* F1 和 PK18-*glnK* R1, 下游同源臂扩增所用引物为 PK18-*glnK* F2 和 PK18-*glnK* R2 (表 2)。然后以上下游同源臂为模板, PK18-*glnK* F1 和 PK18-*glnK* R2 为引物, 通过重叠延伸 PCR 获得中间缺失 *glnK* 基因的 DNA 片段 *glnKarm*。将获得的 *glnKarm* 片段与基因敲除载体 pK18*mobsacB* 连接, 转化至大肠杆菌 JM109 感受态中, 提取质粒酶切验证重组质粒 pK18-*glnKarm* 是否构建成功。经验证构建成功的重组质粒 pK18-*glnKarm* 随后被转化至钝齿棒杆菌 SYP A5-5 中, 在含卡那霉素的培养基中进行第一次筛选, 然后以 LBGS 培养基 (蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 蔗糖 100 g/L, pH 7.0) 进行再次筛选, 最终筛选得到 *glnK* 缺失突变株钝齿棒杆菌 Cc-Δ*glnK*。将 *glnK* 基因敲除成功的菌株提取基因组后进行 PCR 验证并测序, 以证实基因 *glnK* 敲除成功。

1.6 离子色谱检测 NH₄⁺ 的浓度

采用赛默飞 ICS-5000⁺ 离子色谱检测各菌株培养过程中胞外 NH₄⁺ 残留量, 具体参数为: IonPac

CS12A 分离柱(4 mm×250 mm)与 IonPac CG12A 保护柱(4 mm×50 mm), 流动相 20 mol/L 甲基磺酸, 流速 1 mL/min, 时间 15 min, 柱箱温度 30 °C, 进样体积 25 μL。样品预处理方式为: 每隔 4 h 取 800 μL 菌体培养液, 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清液后用 0.22 μm 滤膜过滤^[15]。

1.7 RNA 的提取和 RT-qPCR

将钝齿棒杆菌 *glnK* 过表达菌株 Cc-*glnK*、敲除菌株 Cc-Δ*glnK*、弱化菌株 Cc-kd/*glnK* 和出发菌株 Cc5-5 分别接种于 CGXII 基本培养基中 30 °C、180 r/min 培养 12 h 后, 取 2 mL 样品, 用 RNAPrep Pure Cell/Bacteria Kit (DP430) 试剂盒 (Tiangen Biotech, China) 提取细菌总 RNA, 利用 HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (R223-01) 试剂盒 (Vazyme Biotech, China) 进行反转录获得单链 cDNA, 再利用 StepOnePlus 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 进行 RT-qPCR 分析, 并选取 *sigA* 基因作为内参基因进行定量。具体操作参照 ChamQ™ Universal SYBR® qPCR Master Mix (Q311) 试剂盒说明书进行, 反应条件为: 95°C 30 s; 95°C 10 s, 60°C 30 s, 40 个循环; 然后 95°C 15 s, 60°C 60 s, 95°C 15 s。每个目的基因均进行了 3 次生物学重复, 计算平均阈值循环。最后使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达水平。本研究中所用的 RT-qPCR 引物如表 2 所示。

1.8 氮吸收及 L-精氨酸合成相关酶酶活测定

钝齿棒杆菌 *glnK* 过表达菌株 Cc-*glnK*、敲除菌株 Cc-Δ*glnK*、弱化菌株 Cc-kd/*glnK* 和出发菌株 Cc5-5 经平板活化后接种至 10 mL 的 LBG 培养基中, 于 30 °C 恒温摇床中 180 r/min 培养 18 h 后以 1% 的接种量转接至 50 mL 的 CGXII 培养基中培养 5 h 后, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 后于

30 °C 恒温摇床中 180 r/min 诱导 10 h, 诱导结束后 4 °C 下收集并破碎细胞。收集上清测定 GDH、GS 和 GOGAT 的酶活以及 L-精氨酸合成途径上关键酶 (NAGSD^[16]、OAT^[17]、NAGK^[18]、ACOAT^[19]、OTC^[20]、AS^[21]、AL^[10]) 的酶活 (图 1), 测定方法参照文献。谷氨酸脱氢酶和谷氨酰胺合成酶酶活测定的实验步骤参照索莱宝公司的试剂盒说明书; 谷氨酸合成酶的酶活测定方法参照文献[22]。

1.9 蛋白质体外结合 GST Pull-Down 实验的鉴定

GST Pull-Down 实验的具体操作步骤参照 Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit (Thermo Scientific, China) 说明书进行。首先参照上述 1.4 中的方法构建 GST-*GlnK* 融合蛋白, 将纯化后的 GST-*GlnK* 和 His-*AmtR* 蛋白在 TBS 缓冲液 (25 mmol Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.2) 中于 4°C 过夜透析以分别去除其中的还原型谷胱甘肽及咪唑。利用 Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific, China) 完成纯化后 GST-*GlnK* 和 His-*AmtR* 蛋白浓度的测定。体外结合实验具体操作为: 将 150 μg 的 GST-*GlnK* 蛋白与预先处理好的 50 μL 的谷胱甘肽琼脂糖凝胶树脂混合后置于垂直混合器上于 4 °C 孵育 2 h。随后再向 GST-*GlnK* 蛋白与谷胱甘肽琼脂糖凝胶树脂的混合物中加入 150 μg 的 His-*AmtR* 蛋白继续孵育 2 h。孵育结束后用 TBS 缓冲液反复清洗蛋白-树脂复合物 5 次以除去非特异性结合, 再将与树脂结合的蛋白质洗脱下来, 取 10 μL GST pull-down 洗脱液进行蛋白电泳分析, 电泳得到的蛋白胶用于后续 Western blotting 分析检测 GST-*GlnK* 与 His-*AmtR* 的结合情况, 具体实验方法参考文献[23]。

1.10 钝齿棒杆菌发酵产 L-精氨酸能力分析及发酵参数的测定

1.10.1 菌体生物量的测定: 收集发酵液, 测定在紫外分光光度计 (UNICOTM-UV2000) 的吸光度为 562 nm 处的吸光值, 细菌 *OD* 值和菌体干重之间的关系为 $OD_{562}=0.375 \text{ g/L DCW}^{[24]}$ 。

1.10.2 葡萄糖含量的测定: 收集发酵液, 离心后取上清, 采用生物传感器 SBA-40C (山东省科学院生物研究院) 测定葡萄糖的含量。

1.10.3 L-精氨酸含量的测定: 收集发酵液离心后取上清, 采用改良坂口显色反应测定 L-精氨酸的产量, 反应液含 (g/L): NaOH 40, 甲萘酚-正丙醇 80, 双乙酰 0.5 mL, 取以上 3 种试剂各 1 mL 至离心管中, 再加入 100 μL 稀释后的发酵液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min 后于 A_{520} 处测定吸光值。

2 结果和分析

2.1 谷氨酸棒杆菌与钝齿棒杆菌氮代谢相关基因 *amtR*、*amtB*、*glnK* 和 *glnD* 同源性分析

先前研究表明, 谷氨酸棒杆菌中, PII 信号转导蛋白 GlnK (CgGlnK) 通过与同一操纵子上的转运子 AmtB (CgAmtB) 和腺苷转移酶 GlnD (CgGlnD) 共同作用, 参与调节胞内氮平衡, 这个过程还受到转录调控因子 AmtR (CgAmtR) 的调控^[6]。为研究在钝齿棒杆菌中, PII 信号转导蛋白 GlnK (CcGlnK) 对氮代谢及 L-精氨酸合成的影响。本研究首先对谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 和钝齿棒杆菌 *C. crenatum* SYPA5-5 操纵子 *amtB-glnK-glnD* 编码的基因以及 *amtR* 基因的同源性进行了分析(图 2)。如表 3 所示, 通过同源比对发现, 核苷酸水平上,

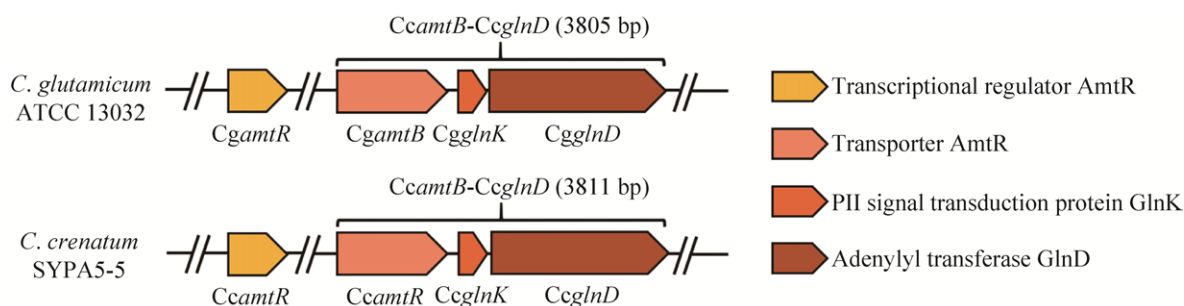


图 2. 谷氨酸棒杆菌与钝齿棒杆菌氮代谢相关基因 *amtR*、*amtB*、*glnK* 和 *glnD* 的结构分析
Figure 2. Structure analysis of *amtR*, *amtB*, *glnK* and *glnD* between *C. glutamicum* and *C. crenatum*.

表 3. 谷氨酸棒杆菌与钝齿棒杆菌氮代谢相关基因 *amtR*、*amtB*、*glnK* 和 *glnD* 的同源性分析
Table 3. Homology analysis of *amtR*, *amtB*, *glnK* and *glnD* between *C. glutamicum* and *C. crenatum*

| Gene | Gene size/bp | Protein | Homologous gene | Homologous protein |
|---------------|--------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------|
| <i>CcamtR</i> | 669 | CcAmtR (22.66 kDa) | <i>CgamtR</i> (669 bp, 98.80%) | CgAmtR (22.64 kDa, 99.02%) |
| <i>CcamtB</i> | 1317 | CcAmtB (45.59 kDa) | <i>CgamtB</i> (1317 bp, 80.79%) | CgAmtB (45.41 kDa, 81.00%) |
| <i>CcglnK</i> | 339 | CcGlnK (12.11 kDa) | <i>CgglnK</i> (339 bp, 83.78%) | CgGlnK (12.25 kDa, 92.86%) |
| <i>CglnD</i> | 2079 | CcGlnD (76.10 kDa) | <i>CgglnD</i> (2079 bp, 73.26%) | CgGlnD (75.98 kDa, 82.07%) |

The percentages in "Homologous gene" and "Homologous protein" indicated the homology between *CcamtR*, *CcamtB*, *CcglnK*, and *CglnD* and *CgamtR*, *CgamtB*, *CgglnK*, and *CgglnD* at the nucleotide and amino acid levels, respectively.

操纵子 *amtB-glnK-glnD* 上基因 *CcamtB*、*CcglnK* 和 *Ccglnd* 与 *CgamtB*、*CgglnK* 和 *Cgglnd* 的同源性分别为 80.79%、83.78% 和 73.26%，*CcamtR* 与 *CgamtR* 的同源性为 98.80%。氨基酸水平上 *CcAmtB* (45.59 kDa)、*CcGlnK* (12.11 kDa)、*CcGlnD* (76.10 kDa) 和 *CcAmtR* (22.66 kDa) 与 *CgAmtB* (45.41 kDa)、*CgGlnK* (12.25 kDa)、*CgGlnD* (75.98 kDa) 和 *CgAmtR* (22.64 kDa) 的同源性分别高达 81.00%、92.86%、82.07% 和 99.02%。结果表明，在钝齿棒杆菌中，操纵子 *amtB-glnK-glnD* 和转录调控因子 *CcAmtR* 可能同样参与调节氮源的吸收及利用，尤其 PII 信号转导蛋白 *CcGlnK* 和转录调控因子 *CcAmtR* 可能作为感应胞内氮源浓度变化的关键因子在调控钝齿棒杆菌氮代谢方面起重要作用。本实验室先前已通过实验证实，*CcAmtR* 参与调节钝齿棒杆菌 *C. crenatum* SYPA5-5 氮代谢及 L-精氨酸的合成^[26]。因此，该研究将以 *CcGlnK* 为研究对象，研究其在钝齿棒杆菌 *C. crenatum* SYPA5-5 氮代谢及 L-精氨酸合成中的作用。

2.2 CcGlnK 与 CcAmtR 结合能力分析

谷氨酸棒杆菌中，*GlnK* 通过与氮代谢全局转录调控因子 *AmtR* 结合，从而解除 *AmtR* 对氮代谢相关基因的转录抑制，进而促进谷氨酸棒杆菌对 NH_4^+ 的摄取^[5]。进一步验证钝齿棒杆菌 SYPA5-5 中 *GlnK* 蛋白对氮代谢的影响。本研究采用 GST pull-down 蛋白互作的方法体外验证了 GST-*CcGlnK* 与 His-*CcAmtR* 的结合，并与谷氨酸棒杆菌中 GST-*CgGlnK* 与 His-*CgAmtR* 的结合情况进行比较。如图 3-A、B、C 和 D 所示，参照上述 1.4 的方法将钝齿棒杆菌 SYPA5-5 和谷氨酸棒杆菌

ATCC13032 来源的 *glnK* 分别与带有 GST 标签的 pGEX-6p-1 载体连接转化。将获得的重组菌 BL21 (DE3)/pGEX-6p-1-*ccglnK* 和 BL21 (DE3)/pGEX-6p-1-*cglnK* 及本实验室现有的重组菌 BL21 (DE3)/pET28a-*ccamtR* 和 BL21 (DE3)/pET28a-*cgamtR* 活化后培养至菌液 OD 约为 0.6–0.8 再加入 0.5 mmol/L IPTG 于 16 °C 进行诱导，收集并破碎细胞后进行 SDS-PAGE 分析。分别检测到分子量为 36.41-kDa 和 23.48-kDa 的特异性条带，说明融合有 GST 标签的 *cc/cglnK* 基因以及带有 His 标签的 *cc/cgmtR* 基因在大肠杆菌中成功过表达。随后分别对 GST-*Cc/CgGlnK* 和 His-*Cc/CgAmtR* 四种蛋白进行纯化(图 3-C 和 3-D)及浓度测定，体外结合实验时 GST-*Cc/CgGlnK* 和 His-*Cc/CgAmtR* 两种蛋白的加入量均为 150 μg ，确保 GST-*Cc/CgGlnK* 与 His-*Cc/CgAmtR* 实验时质量比为 1:1。采用仅带有 GST 标签的 pGEX-6p-1 空载作为对照。从图 3-E 和 3-F 可知，GST-*CcGlnK* 蛋白能与 His-*CcAmtR* 蛋白特异性结合，说明在 *Cc5-5* 中氮转录调控因子 *AmtR* 仍是 *GlnK* 蛋白的调控靶点。但其结合强度要弱于模式菌中 *CgGlnK* 与 *CgAmtR* 结合的强度，分析原因可能是由于 *CcGlnK* 中氨基酸的突变导致其与 *CcAmtR* 间的结合强度减弱，但不至于使 *CcGlnK* 与 *CcAmtR* 的结合能力丧失。该结果表明，钝齿棒杆菌中，*GlnK* 很有可能通过与 *AmtR* 结合，调控氮代谢相关基因的转录水平，最终达到调控氮代谢的目的。同时，由于 NH_4^+ 是精氨酸合成前体物质谷氨酸的重要供体，*GlnK* 很有可能也参与调控钝齿棒杆菌中 L-精氨酸的合成。

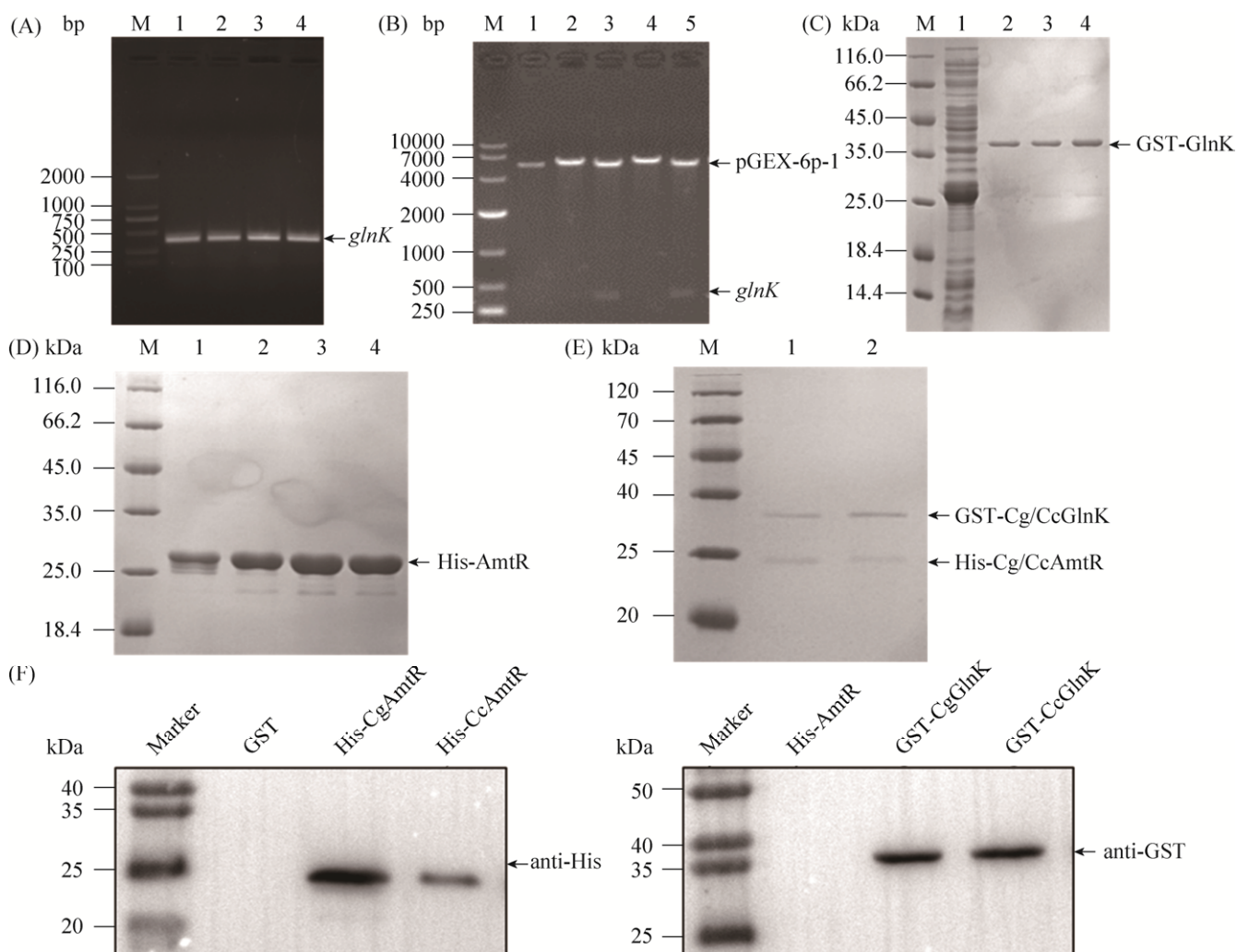


图 3. GST pull-down 验证棒杆菌中 GlnK 与 AmtR 间的相互作用

Figure 3. Detection of the interaction between GlnK and AmtR by GST pull-down assays. A: PCR results of *glnK* gene amplification. M: DL2000 marker; lane 1,2: *ccglnK*; lane 3,4: *cgglNk*. B: Identification of pGEX-6p-1-*ccglnK* plasmids by single and double enzyme digestion. M: DL10000 marker; lane 1: Results of single enzyme digestion of pGEX-6p-1; lane 2,3: Results of single and double enzyme digestion of pGEX-6p-1-*ccglnK*; lane 4,5: Results of single and double enzyme digestion of pGEX-6p-1-*cgglNk*. C: SDS-PAGE analysis of crude proteins and GST-GlnK purification. M: Unstained protein ladder; lane 1: Crude enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pGEX-6p-1; lane 2,3: Purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pGEX-6p-1-*ccglnK*; lane 4: Purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pGEX-6p-1-*cgglNk*. D: SDS-PAGE analysis of crude proteins and His-AmtR purification. M: Unstained protein ladder; lane 1,2: Purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pET28a-*ccamtR*; lane 3,4: Purified enzyme of *E. coli* BL21 with plasmid pET28a-*cgamtR*. E: SDS-PAGE analysis of the interaction between Cg/CcGlnK and Cg/CcAmtR detected by GST pull-down assays. M: marker; lane 1: Interaction of CgGlnK-CgAmtR detected by GST pull-down assays; lane 2: Interaction of CcGlnK-CcAmtR detected by GST pull-down assays. F: Direct binding of Cg/CcGlnK to Cg/CcAmtR detected via Western-blotting. The left panel indicated the detection of CgAmtR and CcAmtR in the eluent of the GST pull-down assays; The right panel indicated the detection of CgGlnK and CcGlnK in the eluent of the GST pull-down assays.

2.3 钝齿棒杆菌 *glnK* 过表达、敲除及弱化菌株的构建

为探究 GlnK 在钝齿棒杆菌氮代谢和 L-精氨酸合成中的作用,本研究通过基因敲除等遗传方法,分别构建得到了钝齿棒杆菌 *glnK* 过表达菌株 Cc-*glnK*、*glnK* 敲除菌株 Cc- Δ *glnK* 和 *glnK* 弱化菌株 Cc-kd/*glnK*。

2.3.1 钝齿棒杆菌 *glnK* 过表达菌株的构建: 按照材料与方法 1.4 中所述方法,PCR 扩增得到目的基因 *glnK* (339 bp,图 4-A),并整合至载体 pXMJ19 中,得到重组质粒 pXMJ19-*glnK* (图 4-B)。再将质粒 pXMJ19 和 pXMJ19-*glnK* 分别电转入钝齿棒杆菌 SYPA5-5 中获得重组菌株 Cc-pXMJ19 和 Cc-*glnK*,诱导表达后利用超声破碎仪破碎后离心取上清,处理样品并对其进行 SDS-PAGE 分析。如图 4-C 所示,Cc-*glnK* 中 GlnK 的表达量明显高于对照菌株 Cc-pXMJ19,说明 GlnK 在钝齿棒杆菌 SYPA5-5 中成功过表达。

2.3.2 钝齿棒杆菌 *glnK* 敲除菌株的构建: 按照材料与方法 1.5 中所述方法,PCR 扩增得到 *glnK* 长为 800 bp 和 750 bp 的上下游同源臂后,通过重叠延伸 PCR 获得中间缺失 *glnK* 基因的 DNA 片段 *glnKarm*,并整合至载体 pK18*mobsacB*,得到重组质粒 pK18-*glnKarm* (图 5-A)。重组质粒 pK18-*glnKarm* 构建成功后转化至钝齿棒杆菌 SYPA5-5 中,在含卡那霉素的培养基中进行第一次筛选,然后以 LBGS 培养基进行再次筛选,筛选得到候选 *glnK* 缺失突变株。提取突变株基因组 DNA,进行 PCR 验证并测序,最终成功筛选得到 *glnK* 缺失突变株 Cc- Δ *glnK* (图 5-B)。

2.3.3 钝齿棒杆菌中 CRISPR/dCas9 系统的构建及 *glnK* 弱化菌株的构建: 本研究在先前 CRISPR/Cas9 系统的基础上进行改造^[26],获得了适用于棒杆菌中基因弱化的 CRISPR/dCas9 系统。如图 6-A、C、D 和 E 所示,以质粒 pXMJ19-Cas9 为模板,反向 PCR 扩增得到 pXMJ19-Cas9 质粒骨

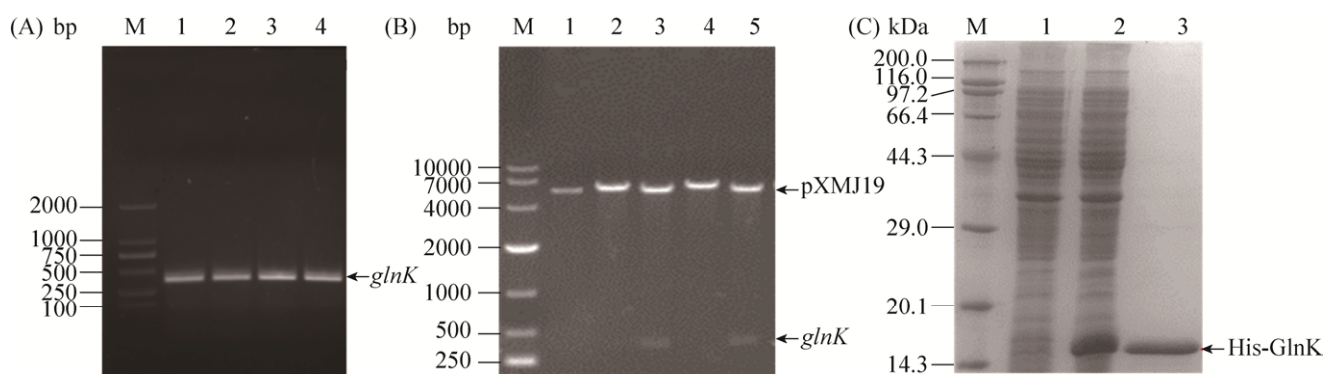


图 4. 钝齿棒杆菌 *glnK* 过表达菌株的构建与验证

Figure 4. Construction and verification of the *glnK* overexpression strain in *C. crenatum*. A: PCR results of *glnK* gene amplification. M: DL2000 marker; lane 1–4: *glnK*. B: Identification of pXMJ19-*glnK* plasmids by single and double enzyme digestion. M: DL10000 marker; lane 1–5: Results of single and double enzyme digestion of pXMJ19-*glnK*. C: SDS-PAGE analysis of crude proteins and His-GlnK purification. M: Unstained protein ladder; lane 1: Crude enzyme of *C. crenatum* SYPA5-5 with plasmid pXMJ19; lane 2: Crude enzyme of *C. crenatum* SYPA5-5 with plasmid pXMJ19-*glnK*; lane 3: Purified enzyme of *C. crenatum* SYPA5-5 with plasmid pXMJ19-*glnK*.

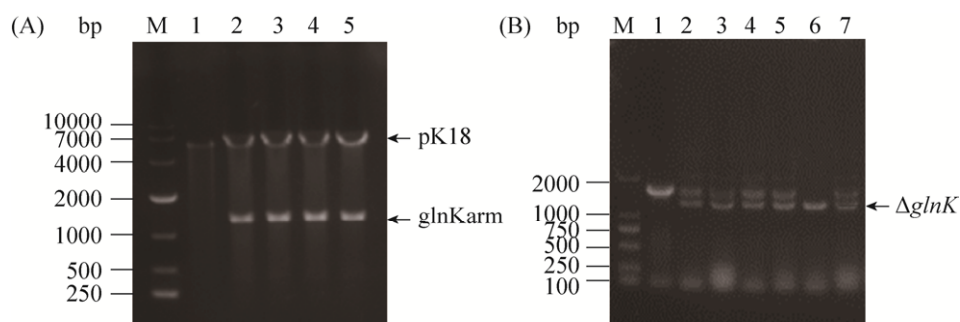


图 5 钝齿棒杆菌 *glnK* 敲除菌株的构建与验证

Figure 5. Construction and verification of the *glnK* deletion strain in *C. crenatum*. A: Identification of pK18-*glnKarm* plasmid by single and double enzyme digestion. M: DL10000 marker; lane 1–5: Results of single and double enzyme digestion of pK18-*glnKarm*. B: Identification of the *glnK* deletion strain by colony PCR. M: DL2000 marker; lane 1–7: Results of screening of the *glnK* deletion strain.

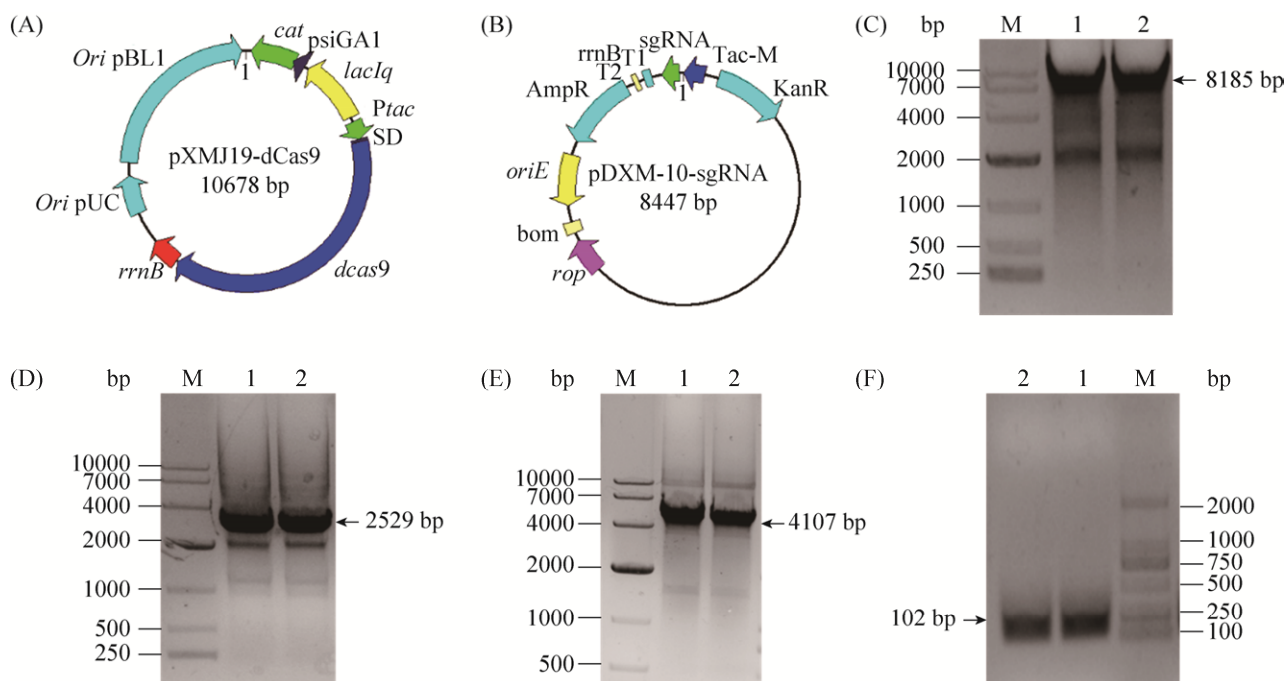


图 6. 钝齿棒杆菌 CRISPR/dCas9 系统的构建

Figure 6. Design of the CRISPR/dCas9 system for gene knock down in *C. crenatum*. A: Strategy for construction of pXMJ19-dCas9. B: Strategy for construction of pDXW10-sgRNA. C: Reverse PCR amplification of backbone of pXMJ19-dCas9 vector. D: Reverse PCR amplification of dCas9 fragment. E: PCR verification of pXMJ19-dCas9 plasmid. F: PCR results of sgRNA amplification.

架及第 10 位天冬氨酸和第 840 位组氨酸同时突变成丙氨酸的 dCas9 蛋白后, 通过同源重组的方式构建得到带有无核酸内切酶活性的 dCas9 蛋白的 pXMJ19-dCas9 质粒。重组质粒 pXMJ19-dCas9 经酶切验证成功后转化至钝齿棒杆菌 SYPA5-5 中。

随后根据网站 (<https://crispy.secondarymetabolites.org/#/input>)所提供的数据, 选取最适的 PAM 位点和 sgRNA 设计引物 *glnk*-sgRNAF1/R1 用于扩增靶向 *glnK* 基因的 sgRNA, 并将其整合至载体 pDXW-10 上, 经 PCR 验证成功获得重组质粒

pDXW10-sgRNA (图 6-B 和 6-F)。转化重组质粒 pDXW10-sgRNA 到含有 pXMJ19-dCas9 质粒的感受态中, 涂布于含氯霉素和卡那霉素的双抗平板上筛选 *glnK* 弱化突变株 Cc-kd/*glnK*。

进一步验证 *glnK* 基因成功在重组菌株 Cc-kd/*glnK* 中被弱化。本研究通过 RT-qPCR 比较分析了菌株 Cc-*glnK*、Cc- Δ *glnK*、Cc-kd/*glnK* 和 Cc5-5 中 *glnK* 基因的表达差异。如图 7 所示, 与出发菌株 Cc5-5 中 *glnK* 的表达水平相比, *glnK* 过表达菌株 Cc-*glnK* 中 *glnK* 的表达水平提高了约 50 倍, *glnK* 缺失突变株 Cc- Δ *glnK* 中未检测到 *glnK* 的表达, 这些结果也进一步证明菌株 Cc-*glnK* 中 *glnK* 基因被成功过表达, 而菌株 Cc- Δ *glnK* 中 *glnK* 基因被成功敲除。而在 *glnK* 弱化菌株 Cc-kd/*glnK* 中 *glnK* 的表达水平下调约 5.26 倍, 表明较出发菌株 Cc5-5 相比, 重组菌株 Cc-kd/*glnK* 中 *glnK* 基因被成功弱化。

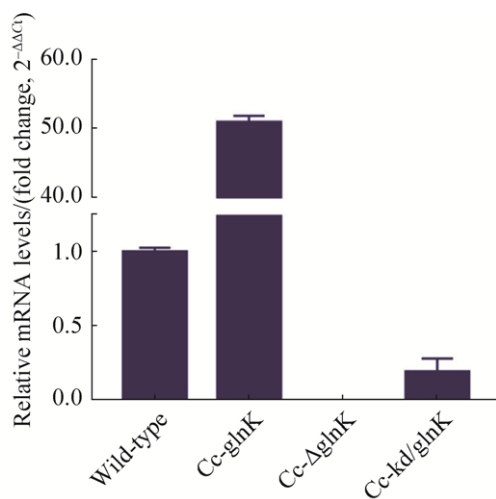


图 7. RT-qPCR 分析 *glnK* 在菌株 Cc-*glnK*、Cc- Δ *glnK* 及 Cc-kd/*glnK* 中的相对表达水平

Figure 7. RT-qPCR analysis of the expression levels of *glnK* in Cc-*glnK*, Cc- Δ *glnK* and Cc-kd/*glnK* strains. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

2.4 GlnK 对钝齿棒杆菌 NH_4^+ 吸收的影响

为研究 GlnK 对钝齿棒杆菌氮代谢的调控作用, 我们首先测定了 GlnK 对 NH_4^+ 吸收的影响, 将各重组钝齿棒杆菌 Cc-*glnK*、Cc- Δ *glnK*、Cc-kd/*glnK* 以及出发菌株 Cc5-5 在含 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的基本培养基中培养, 每隔 4 h 取 800 μL 样品检测胞外 NH_4^+ 的残留量。由图 8 所示, Cc-*glnK* 菌株中 NH_4^+ 残留量明显低于 Cc- Δ *glnK*、Cc-kd/*glnK* 及原始菌株 Cc5-5, Cc- Δ *glnK* 菌株中 NH_4^+ 的残留量明显高于 Cc-kd/*glnK* 和原始菌株 Cc5-5, Cc-kd/*glnK* 中 NH_4^+ 的残留量微高于原始菌株 Cc5-5。结果表明, PII 信号转导蛋白 GlnK 正调控钝齿棒杆菌对 NH_4^+ 的吸收利用。

2.5 PII 信号转导蛋白 GlnK 对氮代谢及 L-精氨酸合成关键基因转录的影响

进一步解析 GlnK 在钝齿棒杆菌氮代谢和 L-精氨酸合成中的作用, 本研究通过 RT-qPCR 分析

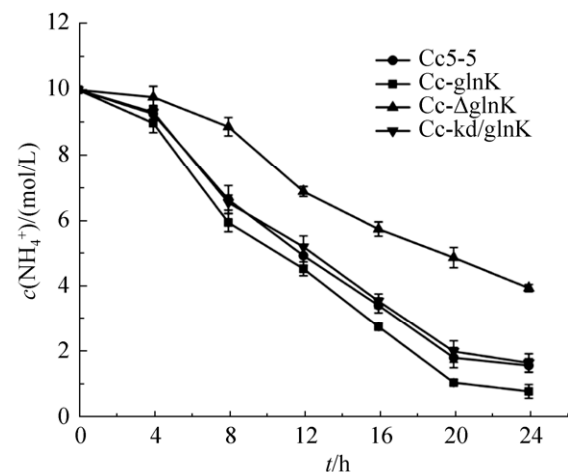


图 8. 比较菌株 Cc-*glnK*、Cc- Δ *glnK*、Cc-kd/*GlnK* 和 Cc5-5 培养基中 NH_4^+ 的残留量

Figure 8. Comparison of residual NH_4^+ concentrations of Cc-*glnK*, Cc- Δ *glnK*, Cc-kd/*GlnK* and Cc5-5 strains. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

了菌株 Cc5-5、Cc-glnK、Cc-ΔglnK 和 Cc-kd/glnK 中, 氮代谢相关基因 *amtR*、*glnD*、*amtB*、*glnA*、*gdh* 和 *gltBD* 以及 L-精氨酸合成途径关键基因 *argC*、*argJ*、*argB*、*argD*、*argF*、*argG* 和 *argH* 的转录水平 (图 1)。如图 9 所示, 相比于出发菌株 Cc5-5, *glnK* 过表达菌株 Cc-glnK 中, 铵吸收相关基因 *glnA*、*gltD* 和 *gdh* 的表达量上调最为显著, 分别为出发菌株 Cc5-5 表达量的 5.35 倍、5.06 倍和 3.33 倍; 铵转运蛋白 AmtB 和腺苷酰转移酶 GlnD 编码基因 *amtB* 和 *glnD* 的表达水平分别上调 1.75 倍和 3.21 倍; L-精氨酸合成基因簇中各基因的表达水平也平均上调 1.50 倍。而 *glnK* 缺失突变株 Cc-ΔglnK 中基因的表达水平则呈现相反的趋势, 即氮代谢相关基因及 L-精氨酸合成相关基因的表达量显著下调 (图 9)。RT-qPCR 实验结果表明, PII 信号转导蛋白 GlnK 正调控氮代谢和 L-精氨酸合成关键基因的转录水平。这些基因表达水平的上调, 可能影响氮代谢及 L-精氨酸合成途径上关键酶的酶活, 进一步达到影响氮代谢以及

L-精氨酸合成的目的。

2.6 PII 信号转导蛋白 GlnK 对氮代谢及 L-精氨酸合成关键酶活的影响

棒杆菌中氮源吸收是通过铵转运蛋白 AmtB 进入胞内, 并依赖于谷氨酸脱氢酶 (GDH)、谷氨酰胺合成酶 (GS) 及谷氨酸合成酶 (GOGAT) 进行同化作用^[10], 进而维持胞内氮平衡以及为 L-精氨酸的合成提供前体物质。进一步验证 GlnK 对氮同化和 L-精氨酸合成的影响, 本研究在菌株 Cc5-5、Cc-glnK、Cc-ΔglnK 和 Cc-kd/glnK 中分别测定了 GDH、GS 和 GOGAT 以及 L-精氨酸合成途径中乙酰谷氨酸激酶 (NAGSD)、鸟氨酸乙酰转移酶 (OAT)、乙酰谷氨酸激酶 (NAGK)、乙酰鸟氨酸转氨酶 (ACOAT)、鸟氨酸转氨甲酰酶 (OTC)、精氨酸琥珀酸合成酶 (AS) 和精氨酸琥珀酸酶 (AL) 7 个关键酶的酶活 (图 1)。如图 10 所示, 与出发菌株 Cc5-5 相比, Cc-ΔglnK 菌株中各酶酶活均下降, 而过表达 *glnK* 后对酶活有明显促进作用。其中 GS、GDH 和 GOGAT 的酶活分别提高 55.15%、

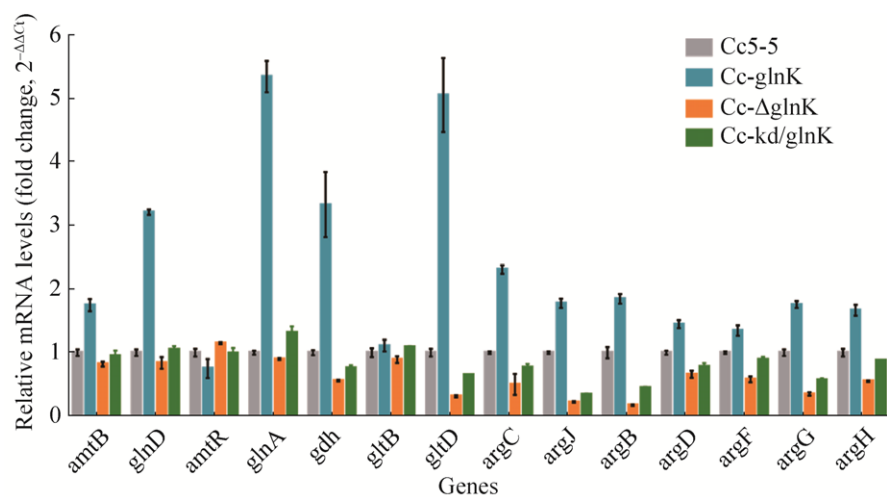


图 9. RT-qPCR 分析 GlnK 对氮代谢和 L-精氨酸合成关键基因转录水平的影响

Figure 9. RT-qPCR analysis of the effect of GlnK on the transcription levels of key genes in nitrogen metabolism and L-arginine biosynthesis. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

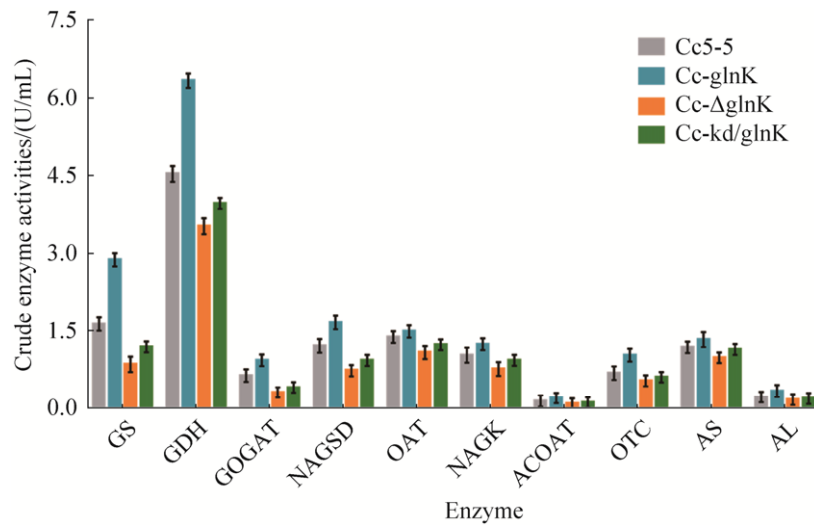


图 10. 重组钝齿棒杆菌粗酶液中氮代谢及 L-精氨酸合成关键酶酶活比较

Figure 10. Crude enzyme activities of key enzymes of nitrogen metabolism-related and L-arginine biosynthesis in recombinant strains. GS, GDH, GOGAT, NAGSD, OAT, NAGK, ACOAT, OTC, AS and AL were encoded by *glnA*, *gdh*, *gltB/D*, *argC*, *argJ*, *argB*, *argD*, *argF*, *argG* and *argH*, respectively. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

39.56%和 46.20%，L-精氨酸合成途径上关键酶的酶活平均提高 30.00%左右。其中 NAGSD、ACOAT 以及 OTC 酶活增加最为显著，分别提高了 36.59%、40.00%和 50.02%。这些结果表明，PII 信号转导蛋白 GlnK 正调控氮代谢和 L-精氨酸合成关键酶酶活，可能最终影响 L-精氨酸的合成。

2.7 PII 信号转导蛋白 GlnK 对钝齿棒杆菌发酵产 L-精氨酸的影响

进一步验证 GlnK 对钝齿棒杆菌产 L-精氨酸的影响，本研究通过 5-L 发酵罐分析了出发菌株 Cc5-5、*glnK* 过表达菌株 Cc-glnK、*glnK* 敲除菌株 Cc-Δ*glnK* 和 *glnK* 弱化菌株 Cc-kd/GlnK 发酵产 L-精氨酸过程中各参数的变化。如图 11-A 所示，各重组菌株与出发菌株 Cc5-5 生长基本一致，说明 GlnK 不会对钝齿棒杆菌菌体生长造成影响。与出发菌株 Cc5-5 相比，发酵前 36 h，各重组菌株葡萄糖的消耗量基本一致，L-精氨酸的产量及生产效率之间的差异较小。此后 Cc-glnK 产 L-精氨酸

的能力显著增强，而 Cc-Δ*glnK* 和 Cc-kd/GlnK 菌株中 L-精氨酸生产强度增加较为缓慢。如图 11-B 所示，发酵结束时，Cc5-5 的 L-精氨酸产量为 38.50 g/L，产率为 0.410 g/(L·h)，Cc-glnK 菌株的 L-精氨酸产量为 49.53 g/L，产率为 0.516 g/(L·h)，相比于出发菌株，其产量提高 28.65%。此外，Cc-glnK 比 Cc5-5 多消耗约 12 g 葡萄糖。Cc-Δ*glnK* 和 Cc-kd/GlnK 菌株中 L-精氨酸的产量分别为 28.90 g/L 和 32.70 g/L，较出发菌株 Cc5-5 相比，其 L-精氨酸合成能力分别下降 24.94%和 15.07%。这些结果表明，GlnK 正调控钝齿棒杆菌 L-精氨酸的合成。分析 GlnK 正调控 L-精氨酸合成的原因可能是 GlnK 通过正调控 L-精氨酸合成途径中关键基因的转录水平，进而影响酶活，最终使得 L-精氨酸产量提高；或是由于钝齿棒杆菌中腺苷酰转移酶 GlnD 表达水平本身较高，GlnK 被修饰后与 AmtR 结合，解除 AmtR 对氮代谢相关基因的抑制，NH₄⁺持续转运进胞内，从而促进 L-精氨酸的合成。

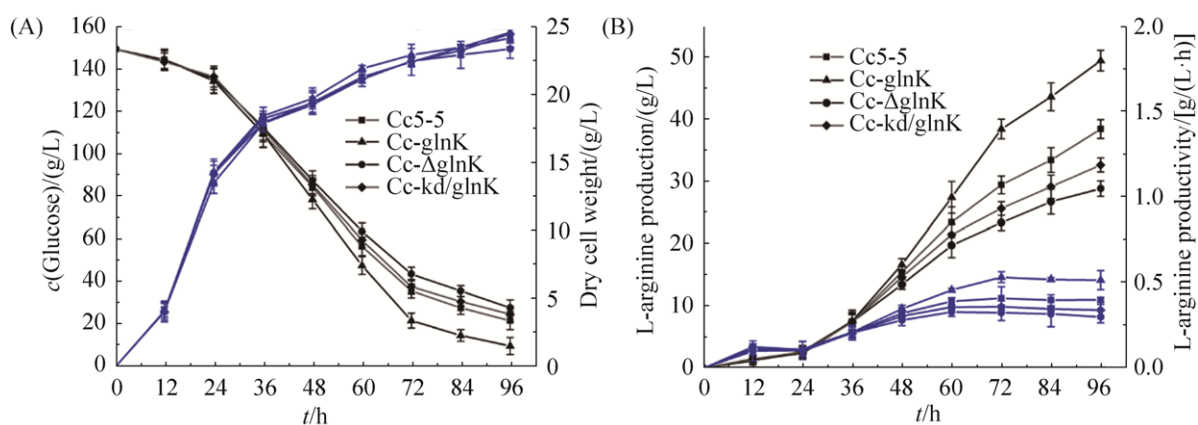


图 11. 重组菌株 *Cc-glnK*、*Cc-ΔglnK*、*Cc-kd/GlnK* 与出发菌株 *Cc5-5* 的发酵曲线测定

Figure 11. Comparison of L-arginine production among *Cc-glnK*, *Cc-ΔglnK*, *Cc-kd/GlnK* and *Cc5-5* strains. A: Glucose concentration and dry cell weight. B: L-arginine production and L-arginine productivity; *Cc5-5* (filled squares), *Cc-glnK* (filled triangles), *Cc-ΔglnK* (filled circles), *Cc-kd/GlnK* (filled rhombus); The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

3 讨论

PII 信号转导蛋白是生物界分布最广泛的信号转导蛋白之一, 广泛存在于细菌、古细菌和植物中^[8, 27]。现已鉴定出多种类型的 PII 信号转导蛋白, 包括 GlnK 型和 NifI 调节因子型, 这些蛋白通过感知胞内碳源、氮源和能量的变化, 自身被共价修饰或诱导后构象改变从而与多种酶、转录调控因子或转运蛋白结合以调节其余蛋白的功能, 进而对氮代谢进行调控^[28]。但是目前关于钝齿棒杆菌 GlnK 的功能尚不清楚。本文以钝齿棒杆菌 PII 信号转导蛋白 GlnK 为研究对象, 研究 GlnK 蛋白对氮代谢调控及 L-精氨酸合成的影响, 发现钝齿棒杆菌 GlnK 正调控氮代谢和 L-精氨酸的合成 (图 8 和图 11)。本研究为深入研究钝齿棒杆菌的氮代谢调控机制及构建 L-精氨酸高产菌株奠定了基础。

本研究证实钝齿棒杆菌 GlnK 正调控 NH_4^+ 的摄取。研究显示在含 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的基本

培养基中培养时, 同一时间点过表达 *glnK* 基因的菌株 *Cc-glnK* 培养液中 NH_4^+ 的残留量明显低于出发菌株, 而敲除 *glnK* 基因的菌株 *Cc-ΔglnK* 培养液中 NH_4^+ 的残留量明显高于出发菌株 (图 8)。谷氨酸棒杆菌 GlnK 对 NH_4^+ 的吸收与利用与氮全局转录调控因子 *AmtR* 相关, 氮饥饿条件下, 被腺苷酰化的 GlnK 将与 *AmtR* 结合解除 *AmtR* 对氮代谢相关基因的抑制作用^[25]。本研究显示, 钝齿棒杆菌 PII 信号转导蛋白 GlnK 也能与 *AmtR* 结合, 并且通过 RT-qPCR 及酶活实验证实 GlnK 对氮代谢相关基因的表达水平和关键酶酶活有显著的促进作用 (图 9 和图 10), 说明钝齿棒杆菌中, PII 信号转导蛋白 GlnK 很有可能通过与 *AmtR* 结合, 从而解除 *AmtR* 对氮代谢相关基因的抑制作用, 使得氮代谢相关基因的表达量和相关酶的酶活提高, 最终增强钝齿棒杆菌对 NH_4^+ 的摄取。

氮源作为有机体内一种必不可少的营养元素, 在细胞生长和繁殖过程中起着非常关键的作用。L-精氨酸分子式: $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$, 氮(N)元素占量

高达 32.10%, 其合成过程中需要大量的氮源供给。课题组前期从氮代谢的角度对钝齿棒杆菌进行一系列系统代谢工程改造研究发现, 钝齿棒杆菌对氮源的吸收与钝齿棒杆菌 L-精氨酸的合成正相关。在敲除氮全局转录调控因子 AmtR 的菌株中, 整合表达 *tacM* 启动子和铵转运蛋白 AmtB 以提高氮源的摄取与吸收, 最终 L-精氨酸产量较出发菌株相比提高 35.14%^[25]; 对双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD 进行整合突变, 减弱尿苷酰去除酶的活性, 增强 NH₄⁺ 的吸收和同化作用, 最终重组菌株产 L-精氨酸的能力较野生型菌株提高了 25.30%^[29]。本研究中发现, GlnK 正调控 L-精氨酸的合成, *glnK* 过表达菌株 Cc-*glnK* 最终产 L-精氨酸为 49.53 g/L, 产率为 0.516 g/(L·h), 相比于出发菌株, 其 L-精氨酸产量提高了 28.65% (图 11)。组合 RT-qPCR 及酶活实验证实 GlnK 对 L-精氨酸合成基因簇的表达水平和关键酶酶活有显著的促进作用, 这或许也就是 GlnK 正调控 L-精氨酸合成的原因。后期我们将进一步研究 GlnK 在 L-精氨酸合成中调控的分子机制, 解析 GlnK 蛋白具体的调控靶点及其中关键的作用位点, 为调控钝齿棒杆菌氮代谢及 L-精氨酸合成提供新的思路及理论基础。

参考文献

- [1] Burkovski A. Nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*: proteins, mechanisms, signals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(2): 187–194.
- [2] Sahn H, Eggeling L, De Graaf AA. Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biological Chemistry*, 2000, 381(9/10): 899–910.
- [3] Brown DR, Barton G, Pan ZS, Buck M, Wigneshweraraj S. Nitrogen stress response and stringent response are coupled in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 4115.
- [4] Rehm N, Burkovski A. Engineering of nitrogen metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: influence on amino acid pools and production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(2): 239–248.
- [5] Jakoby M, Nolden L, Meier-Wagner J, Krämer R, Burkovski A. AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology*, 2000, 37(4): 964–977.
- [6] Hasselt K, Rankl S, Worsch S, Burkovski A. Adaptation of AmtR-controlled gene expression by modulation of AmtR binding activity in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 2011, 154(2/3): 156–162.
- [7] Hasselt K, Sevvana M, Burkovski A, Müller YA. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the global nitrogen regulator AmtR from *Corynebacterium glutamicum*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 2009, 65(11): 1123–1127.
- [8] Forchhammer K. P_{II} signal transducers: novel functional and structural insights. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(2): 65–72.
- [9] Lu PL, Ma D, Chen YL, Guo YY, Chen GQ, Deng HT, Shi YG. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia. *Cell Research*, 2013, 23(5): 635–644.
- [10] Schulz AA, Collett HJ, Reid SJ. Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 205(2): 361–367.
- [11] Zhang JJ, Xu MJ, Ge XX, Zhang X, Yang TW, Xu ZH, Rao ZM. Reengineering of the feedback-inhibition enzyme N-acetyl-L-glutamate kinase to enhance L-arginine production in *Corynebacterium crenatum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(2): 271–283.
- [12] Zhao QQ, Luo YC, Dou WF, Zhang X, Zhang XM, Zhang WW, Xu MJ, Geng Y, Rao ZM, Xu ZH. Controlling the transcription levels of *argGH* redistributed L-arginine metabolic flux in N-acetylglutamate kinase and ArgR-deregulated *Corynebacterium crenatum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(1): 55–66.
- [13] Xu MJ, Rao ZM, Yang J, Xia HF, Dou WF, Jin 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 & Biotechnology*, 2012, 39(3): 495–502.
- [14] Xu MJ, Zhang X, Rao ZM, Yang J, Dou WF, Jin J, Xu ZH. Cloning, expression and characterization of N-acetylornithine aminotransferase from *Corynebacterium crenatum* and its effects on L-arginine fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27(7): 1013–1023. (in Chinese)
徐美娟, 张显, 饶志明, 杨娟, 窦文芳, 金坚, 许正宏. 钝齿棒杆菌 N-乙酰鸟氨酸转氨酶的克隆表达分析及其重组菌的精氨酸发酵. *生物工程学报*, 2011, 27(7): 1013–1023.
- [15] Zhu Y, Guo YY, Ye ML, James FS. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1085(1): 143–146.
- [16] Takahara K, Akashi K, Yokota A. Continuous spectrophotometric assays for three regulatory enzymes of the arginine biosynthetic pathway. *Analytical Biochemistry*, 2007, 368(2): 138–147.
- [17] Shinnors EN, Catlin BW. Arginine biosynthesis in *Neisseria gonorrhoeae*: enzymes catalyzing the formation of ornithine and citrulline. *Journal of Bacteriology*, 1978, 136(1): 131–135.
- [18] Wolf EC, Weiss RL. Acetylglutamate kinase. A mitochondrial feedback-sensitive enzyme of arginine biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255(19): 9189–9195.
- [19] Friedrich B, Friedrich CG, Magasanik B. Catabolic *N*²-acetylornithine 5-aminotransferase of *Klebsiella aerogenes*: control of synthesis by induction, catabolite repression, and activation by glutamine synthetase. *Journal of Bacteriology*, 1978, 133(2): 686–691.
- [20] Kumar A, Vij N, Randhawa GS. Isolation and symbiotic characterization of transposon Tn5-induced arginine auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2003, 41(10): 1198–1204.
- [21] Xu Y, Glansdorff N, Labedan B. Bioinformatic analysis of an unusual gene-enzyme relationship in the arginine biosynthetic pathway among marine gamma proteobacteria: implications concerning the formation of N-acetylated intermediates in prokaryotes. *BMC Genomics*, 2006, 7(1): 4.
- [22] Tesch M, de Graaf AA, Sahn H. *In vivo* fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by ¹⁵N nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 1099–1109.
- [23] Si MR, Zhao C, Burkinshaw B, Zhang B, Wei DW, Wang Y, Dong TG, Shen XH. Manganese scavenging and oxidative stress response mediated by type VI secretion system in *Burkholderia thailandensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(11): E2233–E2242.
- [24] Xu MJ, Rao ZM, Dou WF, Yang J, Jin J, Xu ZH. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production. *Amino Acids*, 2012, 43(1): 255–266.
- [25] Xu MJ, Li J, Shu QF, Tang M, Zhang X, Yang TW, Xu ZH, Rao ZM. Enhancement of L-arginine production by increasing ammonium uptake in an AmtR-deficient *Corynebacterium crenatum* mutant. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2019, 46(8): 1155–1166.
- [26] Peng F, Wang XY, Sun Y, Dong GB, Yang YK, Liu XX, Bai ZH. Efficient gene editing in *Corynebacterium glutamicum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 201.
- [27] Arcondéguy T, Jack R, Merrick M. P_{II} Signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(1): 80–105.
- [28] Zhao MX, Jiang YL, Xu BY, et al. Crystal structure of the cyanobacterial signal transduction protein P_{II} in complex with PipX. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 402(3): 552–559.
- [29] Li J, Xu MJ, Shu QF, Zhao YW, Tang M, Zhang X, Yang TW, Xu ZH, Rao ZM. Function of uridylyltransferase and uridylyl-removing enzyme GlnD in *Corynebacterium glutamicum* JNR. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(11): 2206–2217. (in Chinese)
李静, 徐美娟, 舒群峰, 赵雅雯, 唐蜜, 张显, 杨套伟, 许正宏, 饶志明. 双功能尿苷酰转移/去除酶 GlnD 在谷氨酸棒杆菌 JNR 中的功能. *微生物学报*, 2019, 59(11): 2206–2217.

Role of GlnK in regulating nitrogen metabolism and L-arginine synthesis in *Corynebacterium crenatum*

Mi Tang, Qing Wang, Taowei Yang, Xian Zhang, Meijuan Xu^{*}, Zhiming Rao^{*}

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] In this study, we analyzed the roles of PII signal transduction protein GlnK in nitrogen metabolism regulation and L-arginine biosynthesis in *Corynebacterium crenatum*. [Methods] The *glnK* overexpressed, *glnK* deletion and *glnK* knock-down strains were constructed. RT-qPCR and determination of enzyme activities were carried out to reveal the effects of GlnK on the expression levels and enzyme activities of nitrogen metabolism-related and L-arginine biosynthesis-related genes and enzymes. The changes of various parameters during the fermentation of recombinant strains were also investigated. [Results] Overexpression of GlnK protein had a significant effect on the absorption of NH_4^+ . The expression levels and enzyme activities of nitrogen metabolism-related and L-arginine biosynthesis-related genes and proteins have generally been up-regulated in Cc-glnK strain. Among them, genes encoding ammonium absorption-related enzymes, such as *glnA*, *gltD* and *gdh*, were significantly up-regulated with an average increase about 4.58 times. The L-arginine yield and productivity of Cc-glnK reached 49.53 g/L and 0.516 g/(L·h), respectively, at the end of fermentation. [Conclusion] Overexpression of GlnK could promote the absorption of NH_4^+ , increase the expression levels of genes and enzymes activities on the L-arginine biosynthesis pathway, ultimately increase the yield of L-arginine. It provided guidance for the subsequent exploration of the nitrogen regulation mechanism and metabolic modification of *C. crenatum* in the production of nitrogen-containing compounds.

Keywords: L-arginine, *C. crenatum*, nitrogen metabolism, PII signal transduction protein GlnK

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770058, 31570085), by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20181205), by the Research Project of the Chinese Ministry of Education (113033A), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51708A) and by the National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-06)

^{*}Corresponding authors. Meijuan Xu, E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn; Zhiming Rao, Tel/Fax: +86-510-85916881, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Received: 23 December 2019; Revised: 27 March 2020; Published online: 18 April 2020