



凝结芽孢杆菌磷酸盐响应启动子的研究

祁肖肖^{1,2}, 王丽敏¹, 于波^{1*}

1 中国科学院微生物研究所微生物生理与代谢工程研究室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

祁肖肖, 王丽敏, 于波. 凝结芽孢杆菌磷酸盐响应启动子的研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1538-1549.

QI Xiaoxiao, WANG Limin, YU Bo. Phosphate-responsive promoter region in *Heyndrickxia coagulans*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1538-1549.

摘要: 耐热凝结芽孢杆菌因其对营养要求简单、发酵产物浓度高以及耐高温等特点, 已成为乳酸发酵的主要菌种。在前期的研究中, 我们发现磷酸盐可以激活凝结芽孢杆菌 L-乳酸脱氢酶基因的转录, 从而提高乳酸产量。然而, 磷酸盐如何激活乳酸脱氢酶的基因表达, 目前还不清楚, 也未有类似的研究报道。【目的】对凝结芽孢杆菌响应磷酸盐的调控机制进行研究。【方法】通过 RT-PCR 分析磷酸盐添加时凝结芽孢杆菌乳酸脱氢酶转录水平变化, 确定响应磷酸盐的关键元件区域, 进一步通过分子生物学手段, 分析凝结芽孢杆菌响应磷酸盐的关键基因片段。【结果】确定了响应磷酸盐的关键元件位于乳酸脱氢酶基因上游启动子区, 解析了响应磷酸盐的 L-乳酸脱氢酶启动子核心区, 利用该启动子及核心区能够有效驱动外源 D-乳酸脱氢酶基因的表达, 实现在凝结芽孢杆菌中 D-乳酸的合成。【结论】本研究有望获得一种新的响应磷酸盐的调控元件, 为提高其他生物化学品的合成效率改造提供参考。

关键词: 凝结芽孢杆菌; 磷酸盐响应; 启动子; 乳酸脱氢酶

资助项目: 国家自然科学基金(31970025, 32070026); 内蒙古自治区“揭榜挂帅”项目(2022JBGS0007)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970025, 32070026) and the Inner Mongolia Autonomous Region Research Project of China (2022JBGS0007).

*Corresponding author. E-mail: yub@im.ac.cn

Received: 2023-11-26; Accepted: 2024-02-19; Published online: 2024-02-26

Phosphate-responsive promoter region in *Heyndrickxia coagulans*

QI Xiaoxiao^{1,2}, WANG Limin¹, YU Bo^{1*}

1 Department of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: *Heyndrickxia coagulans* characterized by low nutrient requirements, high titers of fermentation products, and thermal tolerance has become a major microbial species for lactic acid fermentation. We have demonstrated that phosphate stimulates the gene expression of L-lactate dehydrogenase in *H. coagulans* to increase L-lactic acid production, the mechanism of which, however, remains unknown. **[Objective]** To primarily investigated the mechanism of phosphate in stimulating the gene transcription of lactate dehydrogenase in *H. coagulans*. **[Methods]** RT-PCR was employed to analyze the transcriptional level changes of lactate dehydrogenase in *H. coagulans* after phosphate addition. The core promoter region responsive to phosphate stimulation was identified by conventional methods of molecular biology. **[Results]** The key element responsive to phosphate was located in the upstream promoter region of the L-lactate dehydrogenase gene. The core region of the promoter was responsible for phosphate stimulation. The identified promoter was employed to promote D-lactate production with diammonium phosphate addition. **[Conclusion]** This study reported a new phosphate-responsive gene element, providing a theoretical basis for improving the synthesis efficiency of other biochemicals.

Keywords: *Heyndrickxia coagulans*; phosphate-responsive; promoter; lactate dehydrogenase

凝结芽孢杆菌(*Heyndrickxia coagulans*)最初是从腐败的炼乳中分离获得的,属于厚壁菌门,是一种革兰氏阳性菌,其最适生长温度为45–50 °C,最适生长pH值为6.6–7.0^[1]。凝结芽孢杆菌通过糖酵解途径将葡萄糖转化为丙酮酸,进而通过乳酸脱氢酶催化生成乳酸^[2]。与常温乳杆菌相比,凝结芽孢杆菌具有诸多优势,该菌对培养基成分要求比较简单,发酵温度相对较高,在50–60 °C均可快速繁殖生长,因此不易受到杂菌污染,可进行开放式发酵,而且该菌能够以较快的速度生产高光学纯度的L-乳酸,是一种非常理想的工业生产菌株^[3–4]。

目前,关于凝结芽孢杆菌的遗传操作研究相对较少,仅有少量文献报道了在凝结芽孢杆菌

中可自主复制的质粒,但是该菌的电转化效率和基因敲除效率均较低^[5]。Rhee等从凝结芽孢杆菌P4-102B中提取质粒pMSR0,并以其为骨架,构建了能在凝结芽孢杆菌和大肠杆菌中表达的穿梭质粒pMSR10,并成功通过电转化转入凝结芽孢杆菌P4-102B,但并不能在其他凝结芽孢杆菌中重复该结果^[6]。Kovács等利用Cre-lox系统敲除了凝结芽孢杆菌DSM1中的*ldhL*和*sigF*基因^[7]。Wang等通过基因敲除技术,获得了凝结芽孢杆菌QZ19Δ*ldhL*Δ*als*突变株,但是敲除效率只有1:5 000^[8]。目前,仅有DSM1、QZ19及P4-102B这3株凝结芽孢杆菌菌株被报道可以实现遗传操作,但其遗传操作系统还需进一步改进。受制于遗传操作,目前

对凝结芽孢杆菌的研究主要集中在 L-乳酸的发酵工艺上，对代谢机理解析方面的研究较少。

我们前期发现 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 具有激活凝结芽孢杆菌 L-乳酸脱氢酶基因转录的功能，从而提高乳酸发酵水平，而其他包括各种铵盐类的无机氮源并无上述激活功能^[9]。在该过程中，起主要作用的因素是磷酸盐，而非铵根离子^[9]。通过广泛的文献检索，截至目前，仅乳酸乳杆菌(*Lactobacillus lactis*) RM2-24 中有报道过类似现象^[10]。Singhvi 等报道添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 可以激活菌株 RM2-24 的 D-乳酸脱氢酶的基因表达^[10]。在后续的研究中，Singhvi 等进一步发现，相较于原始菌株 *L. lactis* NCIM2368，突变株 RM2-24 的 L-乳酸脱氢酶基因表达可以被 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 激活，而其他无机氮源则无法产生相同效果，然而作者并未深入解析相关机制^[11]。目前，关于凝结芽孢杆菌对磷酸盐响应机制的研究尚处于空白状态。本研究对凝结芽孢

杆菌 36D1 菌株 L-乳酸脱氢酶基因上游启动子区域开展了分析，尝试解析凝结芽孢杆菌中可响应磷酸盐激活并提高 L-乳酸脱氢酶基因转录水平的关键区域。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

Escherichia coli Top10 购自北京擎科生物科技股份有限公司。野生型菌株 *Heyndrickxia coagulans* 36D1 和 *H. coagulans* DSM1 (GenBank 登录号: CP009709.1) 由本实验室保藏。L-乳酸脱氢酶双基因敲除菌株 *H. coagulans* DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 由本课题组前期构建，详见文献[12]。表达载体 pNW33N 和基因敲除载体 pMH77 由本实验室保藏，其质粒信息详见文献[7]。本研究使用的菌株和质粒信息详见表 1 和表 2。

表 1 本研究使用的菌株

Table 1 The strains used in this study

菌株名称 Strain name	用途 Usage	来源 Source
<i>Escherichia coli</i> S17-1	The donor strain for conjugation transfer	Keep in our laboratory
<i>Heyndrickxia coagulans</i> DSM1	The wild strain	Keep in our laboratory
<i>Heyndrickxia coagulans</i> 36D1	The wild strain	Keep in our laboratory
DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2	Two lactate dehydrogenase genes were knocked out in DSM1	[12]
DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 Δ P _{DSM1-1182}	The experimental chassis strain was further knocked out the promoter	Constructed in this study
DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 Δ P _{DSM1-1182} -36D1-P _G +ldhL	DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 Δ P _{DSM1-1182} with pNW33N-TraJ-36D1-P _G +ldhL	Constructed in this study
DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 Δ P _{DSM1-1182} -36D1-P _G +ldhD	DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 Δ P _{DSM1-1182} with pNW33N-TraJ-36D1-P _G +ldhD	Constructed in this study
DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 Δ P _{DSM1-1182} -36D1-P _L +ldhL	DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 Δ P _{DSM1-1182} with pNW33N-TraJ-36D1-P _L +ldhL	Constructed in this study
DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 Δ P _{DSM1-1182} -36D1-P ₁₁₈₂ +ldhL	DSM1 Δ ldhL1 Δ ldhL2 Δ P _{DSM1-1182} with pNW33N-TraJ-36D1-P ₁₁₈₂ +ldhL	Constructed in this study
<i>E. coli</i> Top10-36D1-P ₁₁₈₂ +sfGFP	<i>E. coli</i> Top10 with pRG-36D1-P ₁₁₈₂ +sfGFP	Constructed in this study
<i>E. coli</i> Top10-36D1-P _G +sfGFP	<i>E. coli</i> Top10 with pRG-36D1-P _G +sfGFP	Constructed in this study
<i>E. coli</i> Top10-36D1-P _L +sfGFP	<i>E. coli</i> Top10 with pRG-36D1-P _L +sfGFP	Constructed in this study
<i>E. coli</i> Top10-36D1-P _J +sfGFP	<i>E. coli</i> Top10 with pRG-36D1-P _J +sfGFP	Constructed in this study
<i>E. coli</i> Top10-36D1-P _I +sfGFP	<i>E. coli</i> Top10 with pRG-36D1-P _I +sfGFP	Constructed in this study

表 2 本研究使用的质粒

Table 2 The plasmids used in this study

质粒名称 Plasmid name	用途 Usage	来源 Source
pNW33N	Plasmid, Cm ^R	[7]
pNW33N-TraJ	Plasmid for conjugation transfer, Cm ^R	Constructed in this study
pNW33N-TraJ-36D1-P _G + <i>ldhL</i>	<i>ldhL</i> was expressed with P _G as promoter, Cm ^R	Constructed in this study
pNW33N-TraJ-36D1-P _G + <i>ldhD</i>	<i>ldhD</i> was expressed with P _G as promoter, Cm ^R	Constructed in this study
pNW33N-TraJ-36D1-P _L + <i>ldhL</i>	<i>ldhL</i> was expressed with P _L as promoter, Cm ^R	Constructed in this study
pNW33N-TraJ-36D1-P ₁₁₈₂ + <i>ldhL</i>	<i>ldhL</i> was expressed with P ₁₁₈₂ as promoter, Cm ^R	Constructed in this study
pRG-36D1-P ₁₁₈₂ +sfGFP	sfGFP was expressed with P ₁₁₈₂ as promoter, Amp ^R	Constructed in this study
pRG-36D1-P _G +sfGFP	sfGFP was expressed with P _G as promoter, Amp ^R	Constructed in this study
pRG-36D1-P _L +sfGFP	sfGFP was expressed with P _L as promoter, Amp ^R	Constructed in this study
pRG-36D1-P _B +sfGFP	sfGFP was expressed with P _B as promoter, Amp ^R	Constructed in this study
pRG-36D1-P _E +sfGFP	sfGFP was expressed with P _E as promoter, Amp ^R	Constructed in this study
pRG-36D1-P _J +sfGFP	sfGFP was expressed with P _J as promoter, Amp ^R	Constructed in this study
pRG-36D1-P _I +sfGFP	sfGFP was expressed with P _I as promoter, Amp ^R	Constructed in this study
pMH77	Knockout vector, Cm ^R	[7]
pMH77-P _{DSM1-1182}	The vector to knockout P _{DSM1-1182} , Cm ^R	Constructed in this study

1.1.2 培养基

乳酸发酵 513 培养基(g/L): 葡萄糖 50.0, 酵母粉 10.0, CaCO₃ 30.0, 115 °C 灭菌 20 min。

无机盐发酵培养基 H (g/L): 葡萄糖 60.0, 酵母粉 0.9, (NH₄)₂HPO₄ 3.0, 甜菜碱 0.2, CaCO₃ 72.0, 115 °C 灭菌 20 min。

对照无机盐发酵培养基 Cl (g/L): 葡萄糖 60.0, 酵母粉 0.9, NH₄Cl 2.43, 甜菜碱 0.2, CaCO₃ 72.0, 115 °C 灭菌 20 min。

BC 培养基(g/L): 蔗糖 50.0, 酵母粉 10.0, (NH₄)₂HPO₄ 2.0, (NH₄)₂SO₄ 3.5, Bis-Tris 10.0, pH 6.6–6.7, 115 °C 灭菌 20 min。培养基在使用之前按量加入过滤除菌的微量元素浓缩混合液, 各微量元素的终浓度及种类(g/L): CaCl₂ 0.003, MgCl₂ 0.005, CoCl₂·6H₂O 0.2×10⁻³, CuCl₂·2H₂O 0.1×10⁻⁴, H₃BO₃ 0.3×10⁻³, Na₂MoO₄·2H₂O 0.3×10⁻⁴, NiSO₄·6H₂O 0.2×10⁻⁴, MnCl₂·4H₂O 0.3×10⁻⁴, ZnCl₂ 0.5×10⁻⁴, 固体培养基灭菌后加 1 g/L MgCl₂。

RG 培养基: BC 培养基中加入 17.11 g/L 蔗糖, 1.1 g/L 葡萄糖, pH 6.6–6.7, 115 °C 灭菌 20 min, 使用之前加入终浓度分别为 0.41 g/L 的 MgCl₂ 和 0.01 g/L 的 CaCl₂。

1.2 凝结芽孢杆菌基因敲除

采用同源重组方法敲除凝结芽孢杆菌 DSM1 菌株 L-乳酸脱氢酶基因上游 1 182 bp 基因。首先将含有待敲除基因同源臂的敲除载体 pMH77-P_{DSM1-1182} 电转化入 DSM1Δ*ldhL*1Δ*ldhL*2 菌种中, 挑选转化菌株接入含 7 μg/mL 氯霉素 BC 液体培养基中, 45 °C、120 r/min 培养 12 h。然后, 将菌株依照 10% 的接种量接入新的含 7 μg/mL 氯霉素的 BC 液体培养基中, 45 °C、120 r/min 连续传 3 代; 将第 3 代的菌株在 45 °C、120 r/min 培养 12 h 后再放入 60 °C、120 r/min 培养 12 h; 取菌液涂布于含有氯霉素抗性的平板, 55 °C 培养 20 h, 筛选发生第一次同源重组的菌株; 挑取发生一次同源重组的菌株接入无抗的 BC 培养基中, 连续传代后涂布于不含抗生素的 BC 平板

上, 筛选基因敲除菌株。并通过 PCR 验证和测序正确后, 获得凝结芽孢杆菌 1 182 敲除菌株。

1.3 基因转录测定

野生菌株 *H. coagulans* 36D1 在 513 培养基 (100 mL 摇瓶中加入 50 mL 培养基) 中 50 °C、120 r/min 培养 12 h 并连续活化 3 代, 分别接种于无机盐发酵培养基 H、对照无机盐发酵培养基 C1 使其初始 OD_{600} 达到 0.35, 然后在 50 °C、120 r/min 条件下培养 5–6 h。含有表达质粒的工程菌在含有 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 513 培养基 (100 mL 摇瓶中加入 50 mL 培养基) 中 50 °C、120 r/min 活化 3 代, 分别接种于含有 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的发酵培养基 H 和对照发酵培养基 C1, 初始 OD_{600} 值为 0.2, 50 °C、120 r/min 条件下培养 7–9 h, 收集细胞提取总 RNA。使用 E.Z.N.A. 细菌 RNA 试剂盒 (Omega 公司) 提取总 RNA。总 RNA 浓度通过 260 nm 处的吸光度测定。参考 FastQuant RT Kit (With gDNase) [天根生化科技(北京)有限公司] 的方法合成 cDNA 拷贝, 使用 SYBR Cycler 96 RT-PCR 检测系统 (SYBR Premix *Ex Taq*, TaKaRa 公司) 扩增。将 2 μL cDNA 作为模板, 加入 20 μL 实时 PCR 混合物, 加入 10 pmol 的基因特异性引物, 测定不同 cDNA 浓度的每个 PCR 的阈值周期 (C_t), 并与内参 DNA (16S rRNA 基因) 的阈值周期进行比较。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法测定 mRNA 水平。每组数据重复 4 次, 结果为不同 cDNA 样品的相对表达量。

1.4 乳酸含量的测定

使用 HPLC 测定发酵液中乳酸的含量, 色谱柱为有机酸柱 (Aminex HPX-87H; Bio-Rad 公司)。流动相为 6 mmol/L H_2SO_4 , 流速为 0.5 mL/min, 柱温 55 °C, 进样体积为 10 μL 。

1.5 接合转移质粒构建及转化

使用来源于穿梭质粒 pKV12 (GenBank 登录号: JQ679011.1) 的 TraJ 蛋白基因构建接合转移

质粒^[13-14]。采用 Gibson Assembly 将 TraJ 蛋白基因插入大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭载体 pNW33N 的大肠杆菌复制起点 *ori* 和 *repB* 之间, 构建接合转移重组质粒 pNW33N-TraJ。将构建好的 pNW33N-TraJ 质粒转入大肠杆菌 S17-1 中, LB 培养基 37 °C、200 r/min 活化含有 pNW33N-TraJ 质粒的 S17-1 菌株; 使用含有 10 g/L 葡萄糖的 BC 培养基 50 °C、120 r/min 活化凝结芽孢杆菌 DSM1; 取活化好的两菌株在 37 °C 亲和反应 12 h; 刮取亲和后的菌体, 重悬于 BC 培养基中, 并进行 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 梯度稀释; 将稀释的菌液涂布于含有 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 BC 平板, 50 °C 静置培养 15 h。

2 结果与分析

2.1 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 提高凝结芽孢杆菌 36D1 中 L-乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 转录水平验证

前期研究发现, 在培养基中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 可以显著上调凝结芽孢杆菌 2-6 菌株的 L-乳酸脱氢酶基因的转录水平, 进而提高 L-乳酸产量^[9]。本研究进一步验证了凝结芽孢杆菌 36D1 菌株是否存在相同的现象。虽然凝结芽孢杆菌 36D1 基因组上同时含有 L-乳酸脱氢酶 *LdhL* 和 D-乳酸脱氢酶 *LdhD*, 但两个基因距离位置较远且启动子不同, 并且 36D1 菌株的 D-乳酸产量极低, 因此, 本文排除了对 D-乳酸脱氢酶 *LdhD* 的研究, 聚焦 L-乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 的研究。以含有 NH_4Cl 的无机盐发酵培养基 C1 为对照, 观测菌株在含有 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的无机盐发酵培养基 H 中的 *ldhL* 的转录水平。RT-PCR 测定数值如表 3 所示。与 NH_4Cl 培养条件相比, 在含有 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的培养基中凝结芽孢杆菌 36D1 中的 *ldhL* 的转录水平提高了 13.78 倍。进一步测定上述 2 个培养条件下, L-乳酸的产量。如图 1 所示, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 培养条件下, L-乳酸的产量

表 3 凝结芽孢杆菌乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 在不同培养条件下的 C_t 数值

Table 3 C_t values of *ldhL* in *Heyndrickxia coagulans* determined by RT-PCR under different cultivation conditions

Sample	Housekeeping gene (16S rRNA gene)	Gene of interest (<i>ldhL</i>)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
NH ₄ Cl	8.64±0.10	26.55±0.11	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	9.06±0.06	23.18±0.08	13.78±0.78

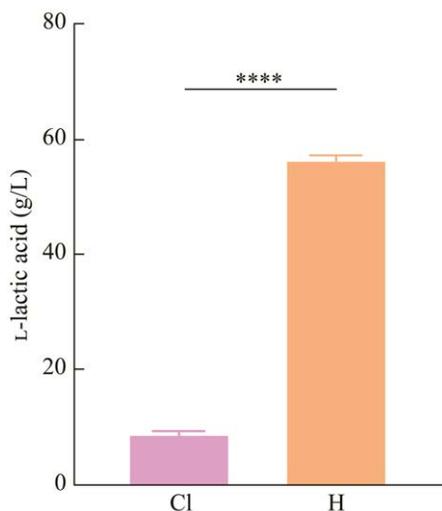


图 1 凝结芽孢杆菌 36D1 在不同培养基中发酵 24 h 的 L-乳酸浓度

Figure 1 The concentration of L-lactic acid during 24 h fermentation of *Heyndrickxia coagulans* 36D1 in different media. CI: The inorganic salt medium with NH₄Cl; H: The inorganic salt medium with (NH₄)₂HPO₄. ****: $P < 0.0001$. Data were shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

达到(56.75±0.52) g/L, 比 NH₄Cl 培养条件下的 (9.12±0.19) g/L 提升了 6 倍。因此, 本研究再次确认(NH₄)₂HPO₄ 可以提高凝结芽孢杆菌菌株的 L-乳酸脱氢酶基因转录水平。

2.2 凝结芽孢杆菌 DSM1Δ*ldhL*1Δ*ldhL*2 ΔP_{DSM1-1182} 菌株构建

上述研究结果显示(NH₄)₂HPO₄ 可以提高凝结芽孢杆菌 36D1 的 *ldhL* 转录水平。因此, 在凝结芽孢杆菌 *ldhL* 的启动子区域可能存在响应(NH₄)₂HPO₄ 的调控区域。依据 Kovács 等的研究, 凝结芽孢杆菌 L-乳酸脱氢酶上游 1 182 bp 的区域含有乳酸脱氢酶启动子(GenBank 登录号:

GU323916.1)^[7]。因此, 本研究聚焦在 *ldhL* 上游启动子区域(以下简称为 P₁₁₈₂)。由于目前还无法对凝结芽孢杆菌 36D1 进行遗传转化等基因操作, 本研究选取可进行遗传操作的凝结芽孢杆菌 DSM1 菌株为宿主, 开展相关的研究。为排除 DSM1 菌株自身 *ldhL* 上游启动子区域的干扰, 我们首先利用文献报道的基于温敏质粒 pMH77 的基因敲除系统^[7], 敲除 DSM1 菌株的 L-乳酸脱氢酶基因上游 1 182 bp 的片段(记为 P_{DSM1-1182})。构建凝结芽孢杆菌 *ldhL* 上游 1 182 bp 敲除质粒 pMH77-P_{DSM1-1182}, 转化 L-乳酸脱氢酶双基因敲除菌株 DSM1Δ*ldhL*1Δ*ldhL*2。PCR 验证及基因测序证实敲除该基因片段。如图 2 所示, 电泳结果证实 P_{DSM1-1182} 片段的敲除成功, 进一步基因测序证实成功构建了不含有自身 *ldhL* 上游启动子区的菌株, 命名为 *H. coagulans* DSM1Δ*ldhL*1Δ*ldhL*2ΔP_{DSM1-1182} 菌株, 并用于后续的研究中。

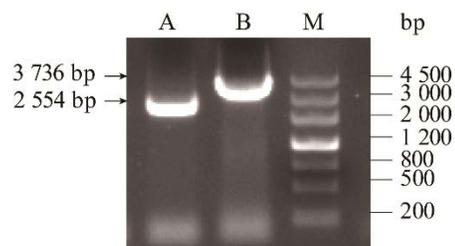


图 2 凝结芽孢杆菌 DSM1Δ*ldhL*1Δ*ldhL*2ΔP_{DSM1-1182} 菌株验证

Figure 2 The verification of strain *Heyndrickxia coagulans* DSM1Δ*ldhL*1Δ*ldhL*2ΔP_{DSM1-1182}. Lane A: The PCR amplification product of strain with P_{DSM1-1182} deletion; Lane B: The PCR amplification product of strain *H. coagulans* DSM1Δ*ldhL*1Δ*ldhL*2.

2.3 凝结芽孢杆菌结合转移质粒构建

虽然凝结芽孢杆菌 DSM1 是可以进行遗传操作的菌株,但其电转化效率较低,尤其对大于 7 kb 质粒的电转化效率极低,成为该菌遗传操作的限制因素。接合转移法常被用于地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌等菌株的外源基因转化,本研究尝试建立凝结芽孢杆菌接合转移质粒,用于满足后续的分子操作需求。以大肠杆菌 S17-1 作为供体菌,选择 pNW33N-TraJ 质粒为研究对象,优化供体菌与受体菌的亲和时间实验结果,如图 3 显示,亲和时间 12 h 的条件下,获得最高的转化效率,最终确定两菌株最佳亲和时间为 12 h。当质粒大小为 7 000 bp 时,接合转移的转化效率可达到 4.6×10^{-4} transconjugants/recipient。本研究也是首次报道在凝结芽孢杆菌中采用结合转移方法实现质粒转化。

2.4 凝结芽孢杆菌 36D1 应答 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的启动子区域鉴定

2.4.1 凝结芽孢杆菌 36D1 的 *ldhL* 上游 1 182 bp 基因功能验证

前述实验数据证实 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 可以提高凝结芽孢杆菌 *ldhL* 的转录水平,首先测试了响应磷酸盐的调控关键位点是否位于 *ldhL* 上游启动子区内。通过克隆 36D1 菌株完整的 L-乳酸脱氢酶基因和上游 P_{1182} 启动子序列,构建了重组质粒 pNW33N-TraJ-36D1-1182+*ldhL*,并将该重组质粒导入 *H. coagulans* DSM1 Δ *ldhL*1 Δ *ldhL*2 Δ $P_{\text{DSM1-1182}}$ 菌株,测试乳酸脱氢酶对磷酸盐的响应情况。表

达菌株在含有氯霉素的 513 培养基中进行活化,随后分别接种至仅以 NH_4Cl 为无机氮来源的发酵培养基 C1 和仅以 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 为无机氮来源的发酵培养基 H 中,培养至指数期,收集菌体提取总 RNA,测定 L-乳酸脱氢酶的表达情况。RT-PCR 结果显示(表 4),与 NH_4Cl 培养菌株相比,在重组菌株中, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的存在使 *ldhL* 的转录水平提高了 5.31 倍,表明凝结芽孢杆菌 36D1 来源的 *ldhL* 上游的 1 182 bp 区域确实存在可以响应 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的位点。

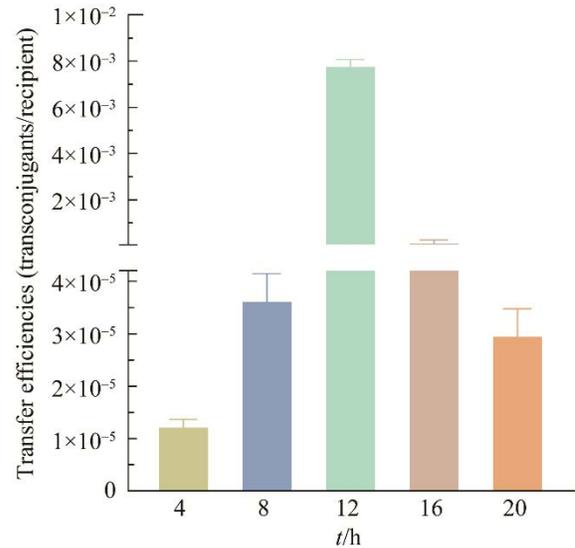


图 3 不同亲和时间条件的质粒转化效率

Figure 3 The transfer efficiencies under different affinity time. Data were shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

表 4 工程菌株中 *ldhL* 基因 RT-PCR 测定 C_t 数值

Table 4 C_t values of *ldhL* in engineered strain were determined by RT-PCR

Sample	Housekeeping gene (16S rRNA gene)	Gene of interest (<i>ldhL</i>)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
NH_4Cl	9.03 \pm 0.09	25.71 \pm 0.05	
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	8.79 \pm 0.10	23.07 \pm 0.05	5.31 \pm 0.20

2.4.2 凝结芽孢杆菌 36D1 的 *ldhL* 上游响应磷酸盐启动子核心区域的确定

P_{1182} 区域内存在参与 $(NH_4)_2HPO_4$ 调控的基因元件, 但是具体的区域还需进一步研究。首先在大肠杆菌系统中开展核心功能区域的实验。通过启动子预测网站(www.denovodna.com)对 *ldhL* 上游的 P_{1182} 片段进行预测, 发现 P_{1182} 序列中含有多个启动子序列, 如图 4A 所示, 将 *ldhL* 上游的 P_{1182} 片段分为 P_B 、 P_E 、 P_L 、 P_J 、 P_G 和 P_I 这 6 个预测的可能启动子区域。这些启动子区域均具有可能的-35 区、-10 区及启动子序列。以绿色荧光蛋白 sfGFP 为表征信号^[15], 分别构建质粒 pRG-36D1- P_L +sfGFP、pRG-36D1- P_B +sfGFP、pRG-36D1- P_E +sfGFP、pRG-36D1- P_J +sfGFP、pRG-36D1- P_G +sfGFP 和 pRG-36D1- P_I +sfGFP, 以全长片段 pRG-36D1- P_{1182} +sfGFP 质粒作为阳性对照, 将上述所构建的质粒转化大肠杆菌 TOP10 菌株, 培养至指数中后期进行取样检测荧光信号强度。图 4B 结果显示 P_L 、 P_B 、 P_E 、 P_G 具有明显的启动子效应, P_B 可分为 P_E 与 P_I 两部分, P_I 无明显的启动子效应, P_E 可分为 P_J 与 P_G

两部分, P_J 无明显的启动子效应, 由此推断 P_G 为凝结芽孢杆菌 36D1 的 *ldhL* 的核心启动子。

2.4.3 凝结芽孢杆菌 36D1 中响应 $(NH_4)_2HPO_4$ 的核心启动子 P_G 验证

在大肠杆菌中以绿色荧光蛋白 sfGFP 表征获得核心启动子区域后, 进一步在凝结芽孢杆菌中以乳酸脱氢酶 *ldhL* 为表达基因进行重复验证。使用上文初步鉴定的 P_L 和 P_G 启动子分别驱动 *ldhL* 基因表达, 构建 pNW33N-TraJ-36D1- P_L +*ldhL*、pNW33N-TraJ-36D1- P_G +*ldhL* 表达质粒, 以全基因片段 P_{1182} 构建的表达质粒 pNW33N-TraJ-36D1- P_{1182} +*ldhL* 为对照。将构建的表达质粒接合转移 *H. coagulans* DSM1 Δ *ldhL*1 Δ *ldhL*2 Δ $P_{DSM1-1182}$ 菌株中, 进而在乳酸发酵 513 培养基中测定每单位 OD_{600} 的 L-乳酸合成水平。如图 5A 所示, P_L 和 P_G 启动子均可以驱动 *ldhL* 基因的表达从而合成乳酸, 但 P_G 的启动子活性更强, 所产的乳酸含量最高。与大肠杆菌数据基本一致, P_G 启动子的活性甚至高于完整 P_{1182} 的启动子活性, P_L 也有一定的启动子活性, 但相比之下, 产生了最低量的 L-乳酸, 进一步确认 P_G 为 *ldhL* 的核心启动子。

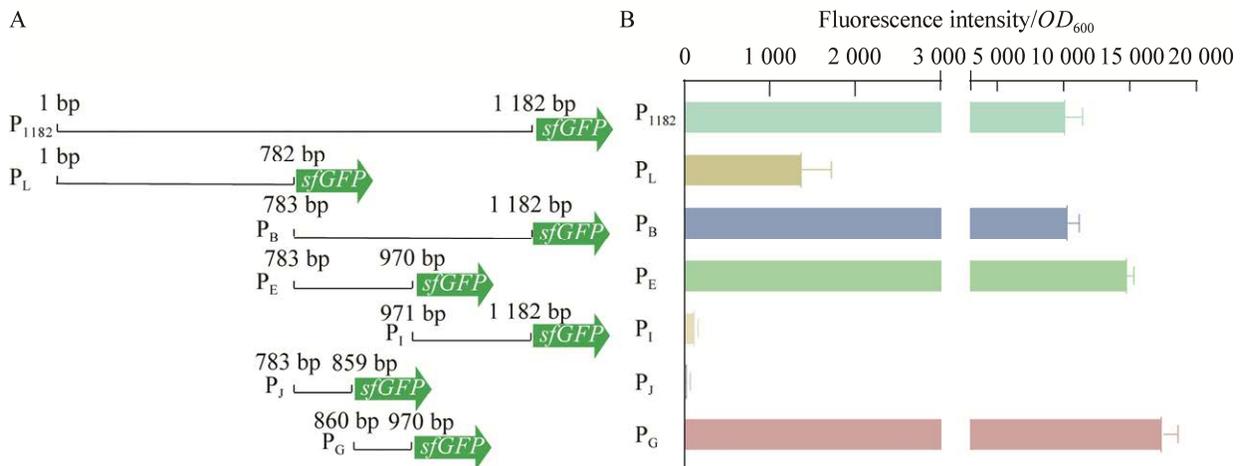


图 4 凝结芽孢杆菌 36D1 乳酸脱氢酶基因 *ldhL* 上游 P_{1182} 内启动子核心区

Figure 4 Identification of the core region of *ldhL* promoter of *Heyndrickxia coagulans* 36D1. A: The positions of different promoters in P_{1182} . B: The signal strength of different promoters represented by sfGFP. Data were shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

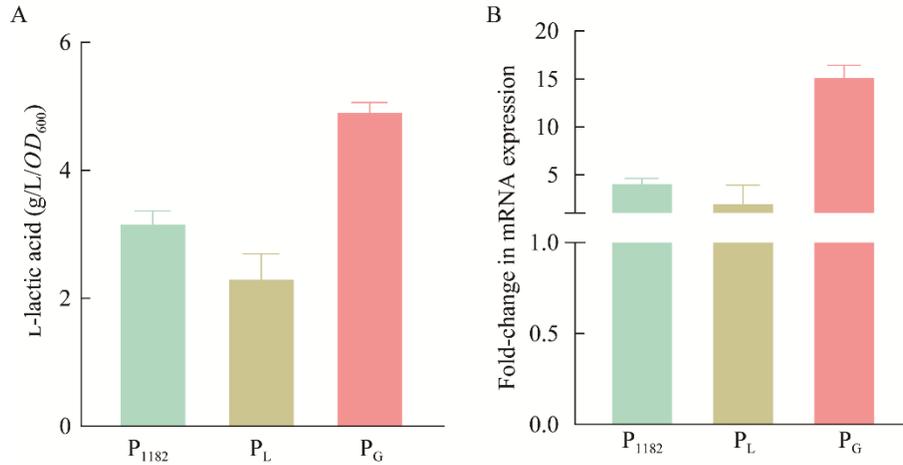


图5 不同启动子驱动下的 L-乳酸产量及 *ldhL* 基因转录水平

Figure 5 L-lactic acid production and *ldhL* gene transcription levels driven by different promoter. A: L-lactic acid synthesis level per unit bacterial volume. B: The transcription level of *ldhL* was increased in fermentation medium containing $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ compared with NH_4Cl fermentation medium. Data were shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

为验证 P_G 启动子是否是响应磷酸盐的核心启动子，进一步检测了在 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 添加条件下，重组菌株中 *ldhL* 的转录水平。将含有表达质粒 pNW33N-TraJ-36D1-P_L+*ldhL*、pNW33N-TraJ-36D1-P_G+*ldhL* 和 pNW33N-TraJ-36D1-P₁₁₈₂+*ldhL* 的菌株接入含有氯霉素抗性的 513 培养基中进行活化，将活化好的菌株分别接入含有 NH_4Cl 的无机盐发酵培养基与含有 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的无机盐发酵培养基中培养至指数期，取样收集菌体提取总 RNA。以在含有 NH_4Cl 的无机盐发酵培养基中 *ldhL* 的转录水平为对照，计算菌株在含有 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的无机盐发酵培养基中 *ldhL* 的转录水平的变化情况。如图 5B 所示，在 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 发酵培养基中，含有 P_G 启动子和完整 P₁₁₈₂ 的菌株表现出 *ldhL* 转录水平明显上调，其中 P_G 启动子驱动的菌株 *ldhL* 转录水平上调倍数达到 15 倍。上述实验结果进一步明确 P_G 启动子是凝结芽孢杆菌响应磷酸盐的核心启动子区域。值得注意的是，P_L 启动子也表现出一定的对磷酸盐响

应的现象，但上调倍数要小于完整 P₁₁₈₂ 驱动的数据，其具体功能还需后续进一步的研究。

2.5 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 响应启动子 P_G 在 D-乳酸合成菌株的应用

Singhvi 等报道，添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 可以激活乳酸乳球菌 RM2-24 的 D-乳酸脱氢酶的基因表达^[10]。为了验证 P_G 启动子在磷酸盐条件下对异源基因的作用，选取来源于德氏乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶为例^[16]，以全长 P₁₁₈₂ 启动子驱动 D-乳酸脱氢酶基因 *ldhD* 作为对照，构建了重组表达质粒 pNW33N-TraJ-36D1-P_G+*ldhD* 和 pNW33N-TraJ-36D1-P₁₁₈₂+*ldhD*，将上述 2 个表达质粒接合转移转入菌株 *H. coagulans* DSM1 Δ *ldhL1* Δ *ldhL2* Δ P_{DSM1-1182}，构建的重组菌株在含有氯霉素抗性的乳酸发酵 513 培养基中进行培养。将菌株分别接入含有 NH_4Cl 的无机盐发酵培养基与含有 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的无机盐发酵培养基，培养至指数期，取样收集菌体提取总 RNA。如图 6A 所示，在 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 培养条件下，

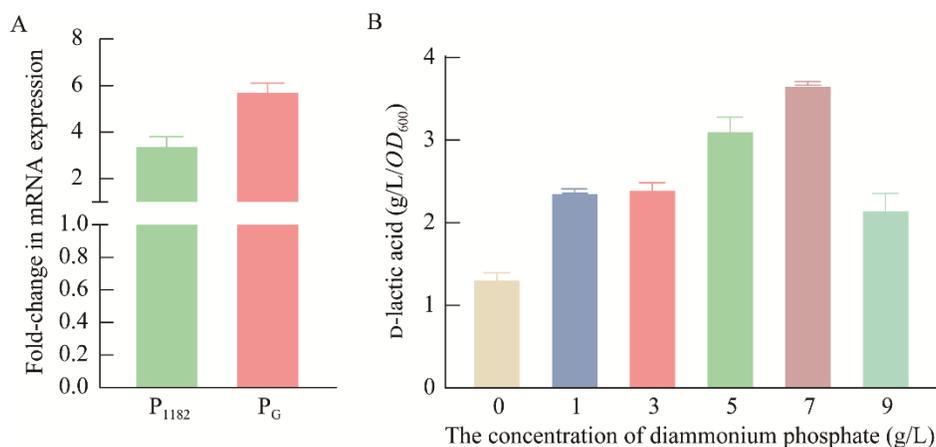


图 6 不同表达质粒的宿主菌中 *ldhD* 转录水平和在不同浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 培养条件下 D-乳酸产量

Figure 6 The variation of *ldhD* transcription and D-lactate production under different concentrations of diammonium phosphate. A: The multiplier of increased transcription levels of *ldhD* in each expression plasmid regulated by $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ compared with NH_4Cl . P₁₁₈₂: The plasmid named pNW33N-TraJ-36D1-P₁₁₈₂+*ldhD*; P_G: The plasmid named pNW33N-TraJ-36D1-P_G+*ldhD*. B: D-lactic acid production under different concentration $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ culture conditions. Data were shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

启动子 P_G和 P₁₁₈₂都可以上调 D-乳酸脱氢酶的转录水平, 并且 P_G 启动子的活性更高。这说明除 L-乳酸脱氢酶基因的启动子, 对 D-乳酸脱氢酶也具有同样的激活效果。本研究进一步测定了在不同 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 添加浓度和 P_G 启动子驱动下, 重组菌株产 D-乳酸的情况。如图 6B 所示, 随着 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 添加量的增加, D-乳酸的产量呈现出相应的上升趋势, 在 7 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 添加量时获得 D-乳酸的最高产量, 但进一步提高 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 添加量到 9 g/L 时, 则造成 D-乳酸合成水平的下降。综上所述, 启动子 P_G 在 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的激活下也可以提高 D-乳酸脱氢酶的转录水平, 进一步确认 P_G 为凝结芽孢杆菌 36D1 响应磷酸盐核心区域。

3 讨论与结论

无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 等被广泛应用于工业发酵过程中^[17]。本文作者在前期研究中发现, 在培养基中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 可以

提高乳杆菌的乳酸脱氢酶的转录水平, 进而提高乳酸的产量, 而 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等无上述功能^[9-11]。文献报道, 在含有 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的培养基中, 乳酸乳杆菌 RM2-24 菌株的乳酸脱氢酶的活力为 0.25 U/mg, 在不含有 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的条件下, 其乳酸脱氢酶的活力仅为 0.15 U/mg, 但磷酸盐如何激活乳酸脱氢酶的表达机制未见报道^[10]。无机磷作为六大重要元素, 除参与遗传物质的代谢外, 还参与许多重要的细胞过程, 包括能量代谢和细胞内信号传导等。目前响应无机磷的主要机制是 Pho 调节子, 其构成细菌中非常有效和灵敏的调节机制。它由双组分调节系统控制, 包括内膜组氨酸激酶传感蛋白(PhoR)和细胞质转录反应调节因子, 其在大肠杆菌中命名为 PhoB, 在枯草芽孢杆菌中命名为 PhoP^[18]。在已报道的磷酸盐调节机制中, 当无机磷稀缺时, PhoR 磷酸化 PhoB, 磷酸化的 PhoB 能够结合 DNA 上的特定序列并激活或抑制靶基因的转录, 这些特定序列, 称为 PHO 盒。在大多数细菌中, PHO 盒是

由7个保守的核苷酸和4个保守性较低的核苷酸组成的11个核苷酸的序列^[19]。PHO盒也被广泛发现存在于与无机磷代谢不直接相关的其他基因中,显示Pho调节子的丰富多样性作用,其不仅作为无机磷同化的调节因子,而且可作为细胞代谢过程中的重要调节因子(master regulator),包括通过蛋白质磷酸化来调节细胞代谢过程^[20]。越来越多的研究证实,Pho调节子也参与营养代谢网络(nutritional cross-talk)、次级代谢产物合成以及其他重要细胞过程的调节^[21]。乳酸生产是细胞重要的初级代谢途径^[22],乳酸脱氢酶则是胞内乳酸生产的关键酶。本研究中,在添加3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的条件下,乳酸脱氢酶的转录水平是 NH_4Cl 培养基中的13.78倍。Ahn等在*Pichia pastoris*中改造获得了磷酸盐响应启动子PHO89^[23],发现启动子直接影响着基因的表达,该启动子可以响应低浓度磷,并启动目的基因的表达。通过分析PHO89启动子序列,得到2个PHO调节系统可能的结合位点。在凝结芽孢杆菌L-乳酸脱氢酶上游区域并未发现类似的PHO盒的序列,显示该菌存在与*P. pastoris*不同的调控机制。前面通过对乳酸脱氢酶上游1 182 bp的启动子区域进行分析,并结合实验验证,确定了 P_G 为核心启动子。下一步对磷酸盐结合区域的研究将会有助于解析磷酸盐响应机制,凝结芽孢杆菌响应磷酸盐提高L-乳酸脱氢酶基因转录的启动子 P_G 是否与磷酸盐结合的位点相关,后续将会对 P_G 位点进行深入研究,如以 P_G 作为探针捕获与其相互作用的蛋白,通过EMSA及BLI等体外分析技术确定与 P_G 结合的核心蛋白,获得体内参与 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 对*ldhL*的转录调控的关键调控因子,将有助于我们进一步解析凝结芽孢杆菌响应磷酸盐的机制。此外,在凝结芽孢杆菌中L-乳酸脱氢酶参与糖酵解、丙酮酸代谢等多个生理过程,本研究发现磷酸盐提高乳酸产量,

也可能是磷酸盐的添加增强了丙酮酸的合成水平,从而提高了L-乳酸的产量。因此,磷酸盐对于凝结芽孢杆菌的生理代谢过程的影响机制还有待进一步探究。另一方面,无机盐向胞内的输送是以无机离子形式穿膜。由于磷酸根在水溶液中会存在多种离子形式,依据目前实验数据,我们无法确认胞内激活L-乳酸脱氢酶基因转录的具体磷酸根离子形式。然而, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 是工业发酵培养中广泛使用的无机盐,本研究发现并证实凝结芽孢杆菌 P_G 启动子具有响应 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的现象,其可以作为工业发酵菌株改造的一个低成本的启动子元件,具有较好的应用潜力。

参考文献

- [1] SARLES WB, HAMMER BW. Observations on *Bacillus coagulans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1932, 23(4): 301-314.
- [2] OKANO K, TANAKA T, OGINO C, FUKUDA H, KONDO A. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 413-423.
- [3] LI Y, WANG LM, JU JS, YU B, MA YH. Efficient production of polymer-grade D-lactate by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 186-191.
- [4] 于波, 曾艳, 姜旭, 王丽敏, 马延和. 聚合级L-乳酸的非粮生物质发酵研究进展[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(4): 411-421.
YU B, ZENG Y, JIANG X, WANG LM, MA YH. Trends in polymer-grade L-lactic acid fermentation by non-food biomass[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(4): 411-421 (in Chinese).
- [5] ZHANG CL, ZHOU C, ASSAVASIRIJINDA N, YU B, WANG LM, MA YH. Non-sterilized fermentation of high optically pure D-lactic acid by a genetically modified thermophilic *Bacillus coagulans* strain[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 213.

- [6] RHEE MS, KIM JW, QIAN YL, INGRAM LO, SHANMUGAM KT. Development of plasmid vector and electroporation condition for gene transfer in sporogenic lactic acid bacterium, *Bacillus coagulans*[J]. *Plasmid*, 2007, 58(1): 13-22.
- [7] KOVÁCS AT, van HARTSKAMP M, KUIPERS OP, van KRANENBURG R. Genetic tool development for a new host for biotechnology, the thermotolerant bacterium *Bacillus coagulans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(12): 4085-4088.
- [8] WANG Y, TASHIRO Y, SONOMOTO K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119(1): 10-18.
- [9] SUN LF, LI YF, WANG LM, WANG YP, YU B. Diammonium phosphate stimulates transcription of L-lactate dehydrogenase leading to increased L-lactate production in the thermotolerant *Bacillus coagulans* strain[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(15): 6653-6660.
- [10] SINGHVI M, JADHAV A, GOKHALE D. Supplementation of medium with diammonium hydrogen phosphate enhanced the D-lactate dehydrogenase levels leading to increased D-lactic acid productivity[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 736-739.
- [11] SINGHVI M, ZENDO T, IIDA H, GOKHALE D, SONOMOTO K. Stimulation of D- and L-lactate dehydrogenases transcriptional levels in presence of diammonium hydrogen phosphate resulting to enhanced lactic acid production by *Lactobacillus* strain[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 124(6): 674-679.
- [12] SUN LF, ZHANG CL, LYU PC, WANG YP, WANG LM, YU B. Contributory roles of two L-lactate dehydrogenases for L-lactic acid production in thermotolerant *Bacillus coagulans*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37916.
- [13] RACHINGER M, BAUCH M, STRITTMATTER A, BONGAERTS J, EVERS S, MAURER KH, DANIEL R, LIEBL W, LIESEGANG H, EHRENREICH A. Size unlimited markerless deletions by a transconjugative plasmid-system in *Bacillus licheniformis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 167(4): 365-369.
- [14] STRÄTZ M, SAUER U, KUHN A, DÜRRE P. Plasmid transfer into the homoacetogen *Acetobacterium woodii* by electroporation and conjugation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(3): 1033-1037.
- [15] ZONG YQ, ZHANG HM, LYU C, JI XY, HOU JR, GUO X, OUYANG Q, LOU CB. Insulated transcriptional elements enable precise design of genetic circuits[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 52.
- [16] LI C, TAO F, NI J, WANG Y, YAO F, XU P. Enhancing the light-driven production of D-lactate by engineering cyanobacterium using a combinational strategy[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9777.
- [17] ROSENBERG M, KRISTOFIKOVA L. Physiological restriction of the L-lactic acid production by *Rhizopus arrhizus*[J]. *Engineering in Life Sciences*, 1995, 15(4): 367-374.
- [18] SANTOS-BENEIT F, ORDÓÑEZ-ROBLES M, MARTÍN JF. Glycopeptide resistance: links with inorganic phosphate metabolism and cell envelope stress[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 133: 74-85.
- [19] BLANCO AG, SOLA M, GOMIS-RÜTH FX, COLL M. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator[J]. *Structure*, 2002, 10(5): 701-713.
- [20] BARREIRO C, MARTÍNEZ-CASTRO M. Regulation of the phosphate metabolism in *Streptomyces* genus: impact on the secondary metabolites[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(4): 1643-1658.
- [21] SANTOS-BENEIT F. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 402.
- [22] WANG LM, CAI YM, ZHU LF, GUO HL, YU B. Major role of NAD-dependent lactate dehydrogenases in the production of L-lactic acid with high optical purity by the thermophile *Bacillus coagulans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(23): 7134-7141.
- [23] AHN J, HONG J, PARK M, LEE H, LEE E, KIM C, LEE J, CHOI ES, JUNG JK, LEE H. Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3528-3534.