

转运系统集成改造提升大肠杆菌胞外蛋氨酸积累

董伟^{1,2}, 李由然^{1,2}, 张梁^{1,2}, 丁重阳^{1,2}, 石贵阳^{*1,2}

(1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 通过构建大肠杆菌(*Escherichia coli*) W3110 MetD 吸收系统编码基因 *metI*、*metN*、*metQ* 单个缺损菌株, 获得胞外蛋氨酸吸收速率最小菌株; 游离及染色体整合表达 *YjeH* 和 *YeaS* 分泌系统编码基因 *yjeH* 和 *yeaS*, 研究增强蛋氨酸分泌与弱化蛋氨酸吸收集成改造策略对菌体胞外蛋氨酸积累和生物量的影响, 为理性构建蛋氨酸高产菌株提供可行策略。实验结果表明, 基因 *metI* 的缺损对胞外蛋氨酸的吸收影响最大, 吸收速率降低了 16.7%; 游离表达基因 *yjeH* 和 *yeaS*, 胞外蛋氨酸开始积累, 胞外蛋氨酸最大积累量为 0.21 g/L 和 0.18 g/L; 染色体整合表达基因 *yjeH* 和 *yeaS*, 胞外蛋氨酸的最大积累量为 0.48 g/L 和 0.25 g/L, 与游离表达相比提高了 128% 和 38.9%。增强蛋氨酸分泌与弱化蛋氨酸吸收集成改造策略对于促进胞外蛋氨酸的积累效果显著, 可以作为理性构建蛋氨酸高产菌株的策略。

关键词: 大肠杆菌; 转运系统; L-蛋氨酸; 基因敲除

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2020)03-0056-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.008

Effect of Amino Acid Transporter System Modification on Extracellular L-methionine Accumulation in *Escherichia coli*

DONG Wei^{1,2}, LI Youran^{1,2}, ZHANG Liang^{1,2}, DING Zhongyang^{1,2}, SHI Guiyang^{*1,2}

(1. National Engineering Laboratory of Food Fermentation Technology, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: For the research of amino acid transporter system, it is important to construct a rational amino acid production strain. In this study, *Escherichia coli* 3110 mutants with MetD methionine absorption system pertinent genes *metI*, *metN* or *metQ* deleted were constructed to confirm the main factor in extracellular methionine absorption. Then genes *yjeH* and *yeaS* of methionine secretion system were overexpressed by plasmids and genomic integration to investigate the comprehensive effects on extracellular methionine accumulation and biomass. Compared with wild type strain W3110, the methionine uptake capacity of *metI* gene damaged strain decreased 16.7%. Combining *yjeH* and *yeaS* overexpression through episomal plasmid, the methionine accumulation could reach 0.21 g/L and 0.18 g/L, and the concentration increased 128% and 38.9% after *yjeH* and *yeaS*

收稿日期: 2018-03-29

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31401674); 国家 863 计划项目(2012AA02120101); 江南大学自主重点项目(JUSRP51503)。

* 通信作者: 石贵阳(1963—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物能源、酶工程与技术研究。E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

overexpression through genomic integration, reached 0.48 g/L and 0.25 g/L, respectively. In conclusion, to improve amino acid secretion and absorption simultaneously is effective for extracellular methionine accumulation and this mode can be regarded as a strategy for constructing rational amino acid production strains.

Keywords: *Escherichia coli*, transporter system, L-methionine, gene knockout

蛋氨酸作为一种含硫氨基酸被广泛应用于饲料添加,食品制造,生物制药等领域^[1-3],目前,蛋氨酸的生产仍然停留在利用化石燃料通过化工合成的办法满足市场需求,对生态环境造成很大压力。微生物发酵法生产L-蛋氨酸因其低成本与环境友好型等特点,受到越来越多专家学者的亲睐。通过随机诱变和代谢工程可以选育蛋氨酸高产菌株,但前者不确定性较强,工作量较大。随着全基因组测序技术和系统代谢工程的日趋成熟,使理性改造菌株发酵生产蛋氨酸成为代谢合成研究的热点^[4]。

目前,微生物代谢工程改造增强蛋氨酸合成主要通过加强蛋氨酸合成酶编码基因 *metB*^[5-6]、S-腺苷甲硫氨酸合成酶编码基因 *metK*^[7]、解除反馈抑制的高丝氨酸转琥珀酰基酶 HTS^{Flr}^[8]和高丝氨酸琥珀酰基转移酶编码基因 *metA*^[9]的表达等方式来增强碳代谢途径,敲除 *MetJ* 阻遏蛋白编码基因 *metJ*、*MetD* 运输系统的编码基因 *metNIQ*、赖氨酸合成途径编码基因 *lysA* 和苏氨酸合成途径编码基因 *thrC* 等方式阻断支路降解途径,同时也有关于硫代谢途径和葡萄糖运输途径修饰相关的研究报道^[10,11]。微生物代谢合成网络结构复杂,为了避免代谢流流向一些未知的支路途径和减少胞内氨基酸的过量积累对菌体生长造成负担,氨基酸转运系统成为一些研究者关注的重点,如本研究室曾发现转运蛋白对苏氨酸代谢合成起到非常重要的作用^[1]。大肠杆菌蛋氨酸 *MetD*

吸收转运系统编码基因 *metN*、*metI* 和 *metQ* 的全部敲除可以降低 *E.coli* W3110 胞外蛋氨酸的吸收速率,YjeH 和 YeaS 分泌系统可以加强蛋氨酸向胞外转运,但目前并没有将两者相结合进行胞外蛋氨酸积累影响的报道^[12]。

本研究中以 *E.coli* W3110 为出发菌株,通过比较 *metN*、*metI* 和 *metQ* 单基因敲除菌株与 *metN*、*metI* 和 *metQ* 的全部敲除菌株胞外蛋氨酸吸收速率,选择胞外吸收速率最小的菌株进行 YjeH 和 YeaS 分泌系统研究,阐述弱化蛋氨酸吸收与增强蛋氨酸分泌集成改造策略对胞外蛋氨酸积累的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 本研究中所用的基座菌株 *E. coli* W3110 为实验室保藏,基因敲除所需要的质粒 pKD13、pKD46、pCP20 购于美国耶鲁大学大肠杆菌菌株库 (CGSC, *E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, USA)^[12]。实验室构建和保藏的质粒 pET-ABY,由 pN25 启动子控制蛋氨酸操纵子编码框 pET-ABY 的表达,*metA*、*metB*、*malY* 分别编码高丝氨酸琥珀酰转移酶、 γ -胱硫醚聚合酶、 β -胱硫醚酶。重组菌 M10、M11、M12、M13、M14、M15、M16 为本研究构建,各菌株及质粒见表 1。

1.1.2 工具酶及试剂 实验所用的 RNA 提取试剂

表 1 本研究中主要的菌株和质粒

Table 1 Main strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	描述	来源
菌株		
<i>E. coli</i> W3110	F- λ -rph-1 INV (rrnD, rrnE)	CGSC
M10	W3110 $\Delta metJ$	作者所在实验室构建、保存
M11	W3110 $\Delta metN$	作者所在实验室构建、保存
M12	W3110 $\Delta metI$	作者所在实验室构建、保存
M13	W3110 $\Delta metQ$	作者所在实验室构建、保存
M14	W3110 $\Delta metNIQ$	作者所在实验室构建、保存

续表 1

菌株/质粒	描述	来源
M15	W3110 $\Delta metI$, $\Delta metJ$:: <i>yjeH</i>	作者所在实验室构建、保存
M16	W3110 $\Delta metI$, $\Delta metJ$:: <i>yeaS</i>	作者所在实验室构建、保存
质粒		
pKD46	ApR, λ Red recombinase expression plasmid, ara ⁻ -inducible expression, temperature sensitive replication	[14]
pKD13	CmR, ApR, oriR plasmid containing an FRT-Km-FRT cassette	[14]
pCP20	ApR, CmR, repA (Ts), pSC101 based vector expressing the yeast Flp recombinase	[14]
pET-ABY	KmR, pN25 启动子控制表达 <i>metA^{tr}</i> , <i>metB</i> , <i>malY</i>	作者所在实验室构建、保存

盒、2 $\times$ taq PCR master mix、质粒 DNA 提取试剂盒, 购自杭州宝赛生物公司; 胰蛋白胨、琼脂粉、酵母粉, 购自英国 Oxoid 公司; 琼脂糖, 购自 Biowest 公司; 氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素, 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 培养基及培养条件 SOB 培养基 (g/L): 酵母粉 5, KCl 0.186, MgCl₂ 0.95, NaCl 0.5, 蛋白胨 20; 转接携带有质粒 pKD46 的液体 SOB 培养基需另加入 7.5 g/L L-阿拉伯糖。

摇瓶发酵培养基为改进的 TPM 培养基 (g/L)^[13]: 维生素 B12 0.01, 葡萄糖 20, MgSO₄·7H₂O 2, MnSO₄·4H₂O 0.5, 酵母粉 4, KH₂PO₄ 4, (NH₄)₂SO₄ 14,

L-threonine 0.238, L-lysine 0.164, CaCO₃ 10, PLP 0.01, 生物素 0.01, 微量元素母液 5 mL。微量元素母液成份 (g/L): CuSO₄·5H₂O 1, CaCl₂ 1.35, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.23, ZnSO₄·7H₂O 2.25, FeSO₄·7H₂O 10, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.106, 35 g/dL HCl, 10 mL, 调整最终 pH 为 7.0。接种体积分数 2%, 31 °C、250 r/min 摇床培养 48 h。

分析培养基 (g/L): 蛋氨酸 0.5, H₃BO₃ 1, MgSO₄ 2.05, MnSO₄ 20, (NH₄)₂SO₄ 0.75, NH₄Cl 0.13, FeSO₄ 40, CaCl₂ 40, CoCl₂ 8, (NH₄)₂HPO₄ 2, ZnSO₄ 4, CuCl₂ 2, (NH₄)₂Mo₇O₂₄ 2.8, Na₂HPO₄ 2, K₂HPO₄ 4, 调整最终 pH 6.7。

1.1.4 引物

表 2 本实验所用引物
Table 2 Oligonucleotides used in this study

引物名称	序列 (5'→3')
In <i>metQ</i> -FW ^a	TTACCAGCCTTTAAACAGCTCCGCCGTTAAACACTTTGTTTGCTGCTTCGTAAACTTCGGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
In <i>metQ</i> -RV	ATGGCGTTCAAATTCAAAACCTTTGCGGCAGTGGGAGCCCTGATCGGATCACTGGCACTCCGGGATCCGTCG
In <i>metI</i> -FW ^a	TTACTTGCAGTGACAGCCCGGACGATGCGGTGCGCTGCCAACTGAATTAATAAAACCGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
In <i>metI</i> -RV	ATGTCTGAGCCGATGATGTGGCTGCTGTTCTGTTGGCGTATGGGAAACGCTGGCAATGATCCGGGATCCGTCG
In <i>metN</i> -FW ^a	CAGTACCTCTACTTTTACATGGTGTTCCTGCAGCCAGGCAATGGCGGCTTGCCTATCTTGCTAGGCTGGAGCTGCTTCG
In <i>metN</i> -RV	ATGATAAAACCTTTCGAATATCACCAAAGTGTTCACCAGGGCACCCGCACCATCCAGGTCGGGGATCCGTCG
Y <i>metQ</i> -FW	GGTGCAGTGCTTTGAACGGGT
Y <i>metQ</i> -RV	ACCGTTTCTGCGATTGTGA
Y <i>metI</i> -FW	TGGCACGGCAACCTGCCAAC
Y <i>metI</i> -RV	TGCGTCTGGAGTTTACCGGT
Y <i>metN</i> -FW	TAACGGAACAATCGCTGCC
Y <i>metN</i> -RV	GTTACTACCACCAGCGCAAA

续表 2

引物名称	序列(5'→3')
K1	AGGCTATTCGGCTATGACTG
K2	GGACAGGTCCGTCTTGACAA
<i>metJ</i> -tyb1FW	CGGGGTACCACTATGCGGGTTTACGGTCAGTACCCAC
<i>metJ</i> -tyb1RV	GACGCGTGCGTTCATCGGTGAGGATTTTTTA
<i>metJ</i> -tyb2FW	AAATCCCGGAAGCGGCAAAAGAGATCATGC
<i>metJ</i> -tyb2RV	CATGCTTAAGCTGATAAGCGTAGCGCATCA
<i>metJ</i> -kanFW	CTTAAGGTGTTAAAAATCCTCACCGATGAACGCTAGGCTGGAGCTGCTTCG
kan-ptac-RV	ACCACAGCTTCCGATGGCTGCCTGACGCCATCCGGGGATCCGTCG
kan-Ptac-FW	TGGCGTCAGGCAGCCAT
<i>metJ</i> -Ptac-RV	ATGATCTCTTTTGCCGCTTCCGGGATTTCTGCTGCTGCGAAAAATAAACAAAAGAGTT
YjeH-Sma I-FW	GTTGCCCGGATGAGTGGACTCAAACAAGAAC
YjeH-Hind III-RV	GCGTCAAGCTTTTATGTGTTATGCCATTTTCCGGC
YeaS-Sma I-FW	GTTGCCCGGATGCTGCCGCTGCAGGCCGGGCCAAGAT
YeaS-Hind III-RV	GCGTCAAGCTTATAAAGATGAAAAAACACGATTATTATG
<i>YmetJ</i> -FW	GTATTAGTAAGTACTGCACCAGCACCACT
<i>YmetJ</i> -RV	GCTGAAATCATACGGTTTACCGAGATAACGTTTTGCCG
<i>QyjeH</i> -FW	CATTATTAGGCACTGGCGTGT
<i>QyjeH</i> -RV	CAATCGCAATCGGGAACA
<i>QyeaS</i> -FW	TTACTGGACCTATCTGTTTGGG
<i>QyeaS</i> -RV	CGCCTTTCATACCGCTACTG
Pf-16S	CACACTGGAAGTGAAGACACG ^[16]
Pr-16S	TGCTTCTTCTGCGGGTAACG ^[16]
<i>metJ</i> -tyb1RV	GACGCGTGCGTTCATCGGTGAGGATTTTTTA

注:a 用于敲除基因的同源臂以下划线标记;酶切位点以下划线标记;Q 命名的引物用于 qRT-PCR。

1.2 方法

1.2.1 基因敲除和基因组替换方法 利用 Red 重组技术进行基因敲除^[14]。1)PCR 打靶片段的制备:质粒 pKD13 作为模版,以 In *metQ*-FW/In *metQ*-RV、In *metI*-FW/In *metI*-RV、In *metN*-FW/In *metN*-RV 为引物,2×*taq* 聚合酶扩增片段大小为 1.4 kb 的敲除盒 *metQ*、*metI*、*metN*。PCR 扩增体系 10 μL,2×PCR master mix 5 μL,ddH₂O 4.7 μL,模板 0.1 μL,引物各 0.1 μL。2)突变盒的纯化浓缩:PCR 反应产物凝胶电泳纯化后所得片段中加入 1/50 倍体积 5 mol/L NaCl 和 2 倍体积预冷的无水乙醇,于-70℃冰箱静置 20 min,取出后 4℃、12 000 r/min 离心 10 min,去除上清液后得到黏附于管壁的絮状沉淀,加入无水乙醇(预冷),4℃、12 000 r/min 离心 4 min,用适量 ddH₂O 振荡溶解。3)基因敲除:制备含有质粒 pKD46 的 *E. coli* 感受态细胞,电转体系为:感受态细胞,95 μL;突变盒片段,5 μL;电压,1 800 V;后培养 37℃,1 h。

以 *Y metQ*-FW/*Y metQ*-RV、*Y metI*-FW/*Y metI*-RV、*Y metN*-FW/*Y metN*-RV 作为引物进行 PCR 验证。4)卡那霉素抗性的消除:制备整合了敲除盒的 *E. coli* 菌株的感受态细胞,通过电激转化导入质粒 pCP20,利用含有氯霉素抗性的 SOB 固体平板进行筛选,挑取转化子进行 PCR 验证。

基因组上整合替换,所用引物见表 2。打靶片段的制备参见文献^[15]。利用 Red 重组在 *E. coli* W3110 染色体上单拷贝整合 *yjeH*、*yeaS*。

1.2.2 菌体生长曲线的测定 分别挑取 *E. coli* W3110、M11、M12、M13 的单菌落于 20 mL SOB 液体培养基,37℃、200 r/min 过夜培养,转接 50 mL FM 培养基,37℃、200 r/min 培养,每隔 2 h 取样检测分光光度计 600 nm 下的菌体密度,测定生长曲线。

1.2.3 菌体生物量的测定 菌体浓度以分光光度计 600 nm 下的吸光值 OD₆₀₀ 表示,菌体干重(DCW)以本实验室的经验公式换算获得:

$$DCW = OD_{600} \times 0.3809 - 0.0048^{[12]}$$

1.2.4 蛋氨酸的测定 HPLC 柱前邻苯二醛(OPA)自动衍生法测定蛋氨酸的浓度, Waters C18(250

mm×4.6 mm, 0.5 μm) 反相柱分离, A、B 流动相梯度洗脱, 洗脱程序如表 3 所示, 柱温 40 ℃, 紫外检测器检测, 检测波长 338 nm。

表 3 HPLC 蛋氨酸分析洗脱程序

Table 3 Gradient elution for analysis of L-methionine by HPLC

时间/min	A 相/%	B 相/%	流量/(mL/min)
0	90.0	10.0	1.00
16.00	44.0	56.0	1.00
20.50	0.0	100.0	1.20
23.00	0.0	100.0	1.20
24.00	90.0	10.0	1.00
27.00	90.0	10.0	1.00

注: 流动相 A: 三乙胺, 0.2 mL; 四氢呋喃, 5 mL; 醋酸钠, 5 g; ddH₂O, 1 L; pH 7.2。

流动相 B: 乙腈, 400 mL; 甲醇, 400 mL; 醋酸钠, 5 g; ddH₂O, 200 mL; pH 7.2。

1.2.5 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 利用试剂盒提取大肠杆菌总的 RNA, qPCR CT 值的校正以引物 pf-16S, pr-16S 扩增 16S rRNA 作为内参基因, 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 模型进行检测^[16], 所用引物见表 2。

1.2.6 蛋氨酸胞内运输能力检测 SOB 培养基中添加 0.5 g/L 蛋氨酸作为种子培养基, 过夜培养, 诱导菌株表达蛋氨酸吸收载体。在蛋氨酸分析培养基中添加 1 g/L 的蛋氨酸作为碳源, 发酵过程中检测菌体生长过程中蛋氨酸的消耗情况, 以蛋氨酸对菌体的比消耗速率表征大肠杆菌吸收蛋氨酸的能力。

2 结果与分析

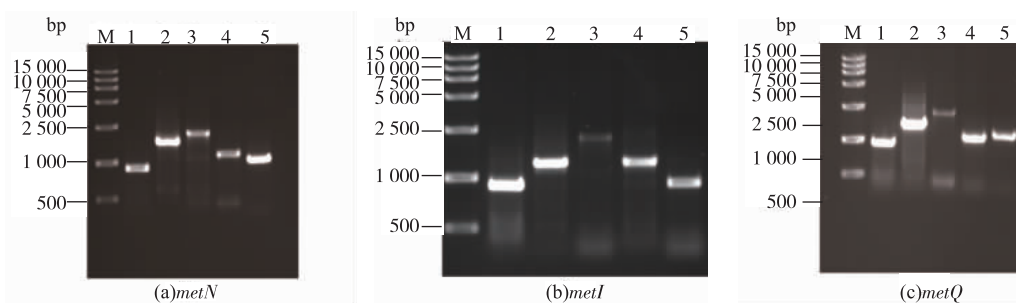
2.1 MetD 运输系统缺失菌株的构建

以 *E. coli* W3110 为出发菌株, 按照 1.2.1 的方法敲除 *metN*、*metI*、*metQ*, 构建菌株 M11、M12、M13,

结果如图 1 所示。*metN*、*metI*、*metQ* 的鉴定引物分别为 Y *metN*-FW/Y *metN*-RV、Y *metI*-FW/Y *metI*-RV、Y *metQ*-FW/Y *metQ*-RV, 利用 2 对引物与 K1、K2 对敲除菌株进行菌落 PCR 验证, 得到 990、740、1 170 bp 和 1 170、1 420、1 090 bp 的 PCR 片段, 电泳结果与理论值相符, 消除 *kan* 抗性后, 得到 850、880、950 bp 的 DNA 片段, 送生工测序结果正确, 成功构建了 *metN*、*metI*、*metQ* 基因敲除菌株。

2.2 弱化蛋氨酸吸收基座菌株的筛选

按照 1.2.6 的方法对大肠杆菌 W3110 和重组菌株 M11、M12、M13 蛋氨酸吸收能力进行了检测。图 2 表示摇瓶培养 10 h 菌体的生长以及培养基中蛋氨酸质量浓度的变化, 表 4 列出了重组菌株蛋氨酸的比消耗速率。由图 2 可知, 在蛋氨酸分析培养基中重组菌与对照菌株均生长缓慢, 但是对蛋氨酸的



M: DL 1 500 marker; (a)1, (b)1, (c)1: Kan 消除菌 Ygene-FW 和 Ygene-RV PCR 产物, 850、880、950 bp; (a)2, (a)2, (c)2: 原始菌 Ygene-FW 和 Ygene-RV PCR 产物, 1 560、1 320、1 650 bp; (a)3, (b)3, (c)3: *metN*、*metI*、*metQ* 打靶片段, 2 050、2 080、2 150 bp; (a)4, (a)4, (c)4: K1 和 Ygene-FW PCR 产物, 990、740、1 170 bp; (a)5, (b)5, (c)5: K2 和 Ygene-RV PCR 产物, 1 170、1 420、1 090 bp。

图 1 *metN*、*metI*、*metQ* 突变转化子的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of *metN*, *metI*, *metQ* gene mutants

消耗速率显著差异。由表4可知,摇瓶培养10 h, *metN*、*metI*、*metQ* 基因单敲除菌株 M11、M12、M13 蛋氨酸平均比消耗速率分别为 11.23、10.34、12.03 mg/(L·h), 与对照菌 W3110 相比蛋氨酸的平均比消耗速率分别降低了 9.5%、16.7%、3.1%。*metI* 基因的敲除显著降低了大肠杆菌对于胞外蛋氨酸的吸收效率,*metN* 次之;敲除基因 *metQ*, 蛋氨酸吸收能力降

低幅度最小。本研究室前期研究发现,*metNIQ* 三敲除菌株胞外蛋氨酸吸收速率降低了 13.4%^[12], 基因 *metI* 单敲除更加有利于减少大肠杆菌对胞外蛋氨酸的重吸收。因此,本研究将 M12 作为弱化蛋氨酸吸收基座菌株与蛋氨酸分泌系统相结合进行集成改造,考察胞外蛋氨酸的积累。

表4 重组菌株蛋氨酸吸收能力

Table 4 L-methionine uptake capacity of strains with MetD modified transport system

菌株	OD ₆₀₀	L-蛋氨酸消耗速率/ (mg/(L·h))	L-蛋氨酸消耗速率/ (DCW mg/(L·h·g DCW))
<i>E. coli</i> W3110	2.02 ±0.03	9.49±0.15	12.42±0.21
M11	2.01±0.06	8.54±0.23	11.23±0.33
M12	2.01±0.05	7.86±0.19	10.34±0.26
M13	2.03±0.02	9.24±0.17	12.03±0.19

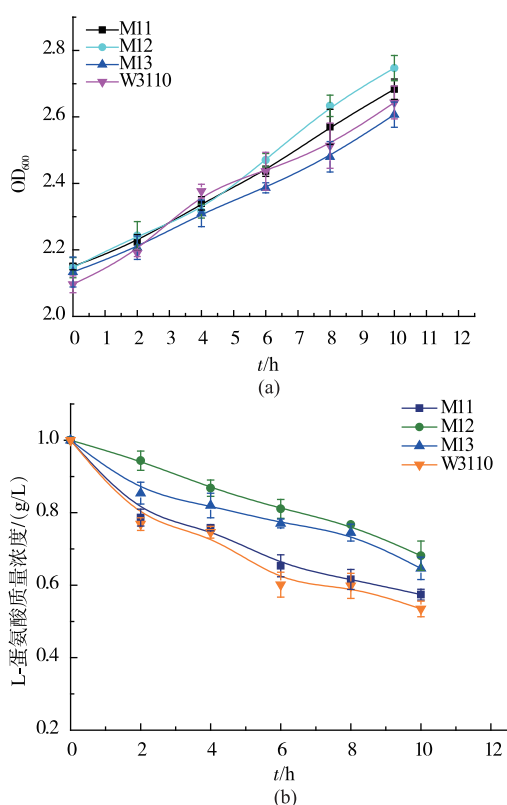


图2 蛋氨酸分析培养基中重组菌株生长状况

Fig. 2 Growth status of recombinant strains in methionine assay medium

2.3 YjeH, YeaS 运输系统游离表达对菌株生长以及蛋氨酸胞外积累的影响

将实验室前期构建的 *yjeH*、*yeaS* 基因过表达载体 pKK-*yjeH*、pKK-*yeaS* 转染 M12, 记录菌体生长

以及胞外蛋氨酸积累情况。从图3可以看出 *yjeH* 与 *yeaS* 的过表达在一定程度上均抑制了菌体的生长, 本研究室前期构建用来表达解除了反馈抑制的高丝氨酸转琥珀酰基酶和增强蛋氨酸代谢过程中的 γ -胱硫醚聚合酶以及 β -胱硫醚酶^[12]的质粒 pET-ABY 的表达可以有效缓解生长抑制。*yjeH*、*yeaS* 的过量表达可能使大肠杆菌胞内蛋氨酸质量浓度过

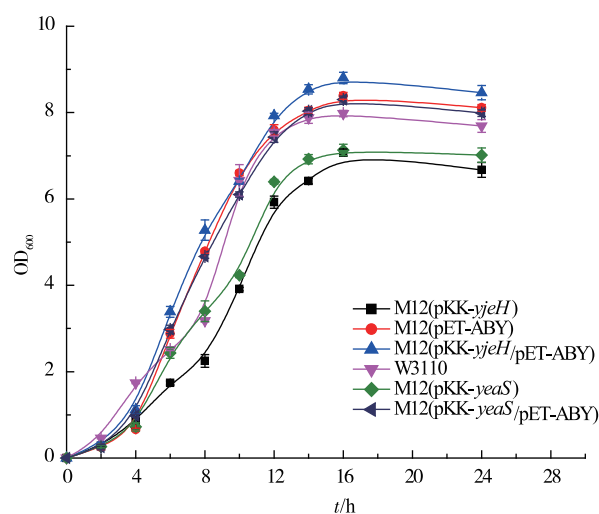


图3 重组菌株 *E. coli* M12、M12(pET-ABY)、M12(pET-ABY/pKK-*yjeH*)、M12(pKK-*yjeH*)、M12(pKK-*yjeH*/pKK-*yeaS*)、M12(pET-ABY/pKK-*yeaS*) 生长曲线

Fig. 3 Growth curves of recombinant strains *E. coli* M12, M12(pET-ABY), M12(pET-ABY/pKK-*yjeH*), M12(pKK-*yjeH*), M12(pKK-*yjeH*/pKK-*yeaS*) and M12(pET-ABY/pKK-*yeaS*) mutants

低,影响了大肠杆菌生长过程中所需要物质的合成,菌体的生长受到抑制,同时胞外蛋氨酸的质量浓度过高也会抑制菌体的生长,质粒 pET-ABY 的表达强化了蛋氨酸合成途径,在基因交互作用的影响下其生长抑制得到了有效缓解。对比 M12(pET-ABY)、M12 (pET-ABY/pKK-*yjeH*) 和 M12 (pET-ABY/pKK-*yeaS*) 发酵过程中胞内蛋氨酸的质量浓度变化,如图4所示,YjeH、YeaS 运输系统的强化促进了大肠杆菌向胞外分泌 L-蛋氨酸,降低了胞内 L-蛋氨酸的积累,YjeH 运输系统的效果更为显著。我们对 2 种转运系统游离表达菌株进行了发酵实验,结果如图 5 所示,YjeH 与 YeaS 运输系统的表达都能够在胞外积累一定量的蛋氨酸,其最大积累量分别为 0.21 g/L 和 0.18 g/L,蛋氨酸产率分别为 0.06 g/g DCW 和 0.05 g/g DCW。

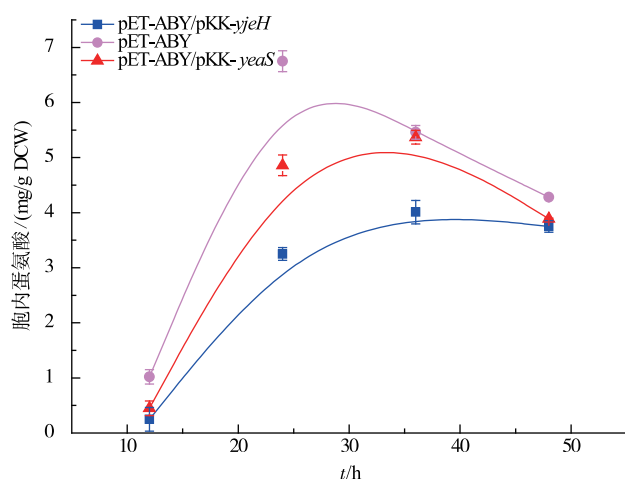


图 4 重组菌株发酵过程中胞内蛋氨酸的质量分数

Fig. 4 Intracellular methionine concentration during fermentation of recombinant strains

2.4 YjeH 和 YeaS 在染色体上的整合表达

metJ 为大肠杆菌蛋氨酸代谢过程中的关键阻遏基因,其通过与代谢过程中关键基因 *metK*、*metQIN*、*metF*、*metC*、*metE*、*metBL* 和 *metR* 等启动子的 Met-box 相结合来影响蛋氨酸代谢通路,为了降低 SAM 和 *metJ* 的共阻遏效应,我们通过敲除编码基因 *metJ* 构建解除阻遏调控的重组菌株^[17-20]。构建打靶质粒 *T-metJ*PtacM^[15],通过电激转化的方法,在 *E. coli* W3110 染色体上敲除 *metJ* 基因并单拷贝整合 *yjeH* 和 *yeaS* 基因,一步实现 *metJ* 的敲除和 *yjeH*、*yeaS* 在染色体上的整合表达。以 W3110 染色

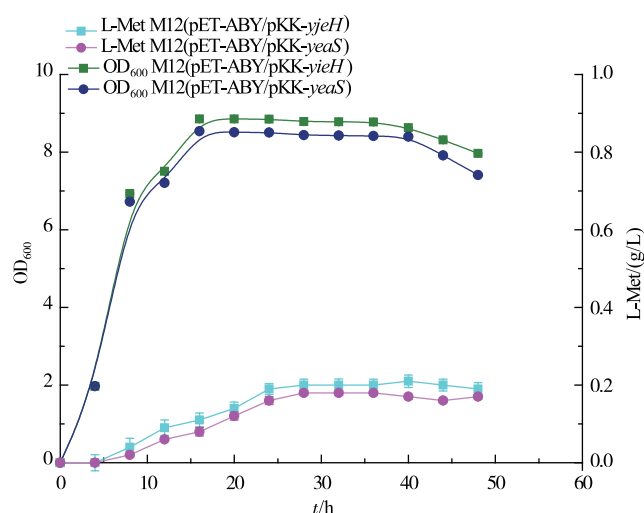


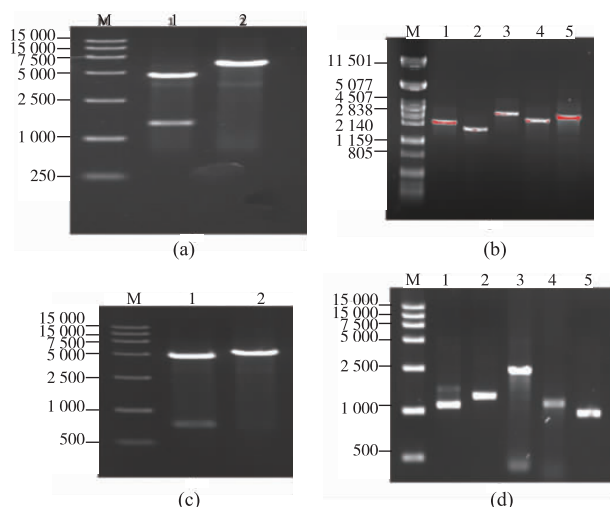
图 5 重组菌 M12 (pKK-*yeaS*/pET-ABY)、M12 (pKK-*yjeH*/pET-ABY) 摇瓶发酵生长代谢状况

Fig. 5 Growth and metabolism of recombinant M12 (pKK-*yeaS*/pET-ABY) and M12 (pKK-*yjeH*/pET-ABY) during shake flask fermentation

体为模板,用引物 YjeH-Sma I-FW/YjeH-Hind III-RV、YeaS-Sma I-FW/YeaS-Hind III-RV PCR 扩增 *yjeH*、*yeaS*,将所得到的基因片段,与经过 Hind III、Sma I 酶切处理过的载体 *T-metJ*PtacM 连接,酶切得到大小分别为 1 257 bp/5 059 bp 和 639 bp/5 059 bp 的片段如图 6(a)、6(c)所示,测序结果无碱基突变,说明载体 *T-metJ*PtacMyjeH、*T-metJ*PtacMyeaS 构建成功。按照 1.2.1 的方法将 *metJ*PtacMyjeH、*metJ*PtacMyeaS 整合到 W3110 的染色体上,构建菌株 M15、M16,鉴定结果如图 6(b)、6(d)所示。

2.5 YjeH 运输系统整合表达对菌株生长以及蛋氨酸胞外积累的影响

利用 RT-qPCR 比较了菌株 M15 相对于野生 *E. coli* W3110 *yjeH* 和 *yeaS* 基因的表达比率,结果如图 7 所示,与原始菌株相比,*yjeH*、*yeaS* 基因的表达水平分别提高了 1.65 倍和 1.59 倍。对 M15(pET-ABY)和 M16(pET-ABY)进行了发酵实验验证基因 *yjeH*、*yeaS* 整合表达对蛋氨酸胞外分泌的影响,如图 8 所示,M15(pET-ABY)和 M16(pET-ABY)最大胞外蛋氨酸的积累量分别为 0.48 g/L 和 0.25 g/L,蛋氨酸产率分别为 0.13 g/g DCW 和 0.08 g/g DCW。与游离表达相比,其产量分别提高了 128%和 38.9%,产率提高了 85.7%和 60%。



M:DL 1 500 DNA marker; (a)1:*Sma* I 和 *Hind* III 酶切质粒 *T-metJ*PtacyjeH, 5 059 bp 和 1 257 bp; (a)2:*Hind* III 单切质粒 *T-metJ*PtacyjeH 6 316 bp; (b)1:*YjjeH*-FW 和 *YjjeH*-RV PCR 产物, 1 422 bp; (b)2:*YjjeH*-FW 和 *YjjeH*-RV PCR 产物, 1 355 bp; (b)3:*kan* 消除菌 *YjjeH*-FW 和 *YjjeH*-RV PCR 产物, 2 312 bp; (b)4: 对照菌 *YjjeH*-FW 和 *YjjeH*-RV PCR 产物, 2 083 bp; (b)5:*k2* 和 *YjjeH*-RV PCR 产物, 2 203 bp; (c)1:*Sma* I 和 *Hind*III 酶切质粒 *T-metJ*PtacyeaS, 639 bp/5 059 bp; (c)2: *Hind*III 单切质粒 *T-metJ*PtacyeaS 6 316 bp; (d)1:*YyeaS*-FW 和 *k1* PCR 产物, 1 322 bp; (d)2:*k2* 和 *YyeaS*-RV PCR 产物, 1 255 bp; (d)3:对照菌 *YyeaS*-FW 和 *YyeaS*-RV PCR 产物, 2 212 bp; (d)4:*kan* 消除菌 *YyeaS*-FW 和 *YyeaS*-RV PCR 产物, 1 133 bp; (d)5:*YyeaS*-FW 和 *YyeaS*-RV PCR 产物, 1 103 bp

图 6 菌株 M15, M16 的 PCR 鉴定电泳图

Fig. 6 PCR identification of strain M15 and M16

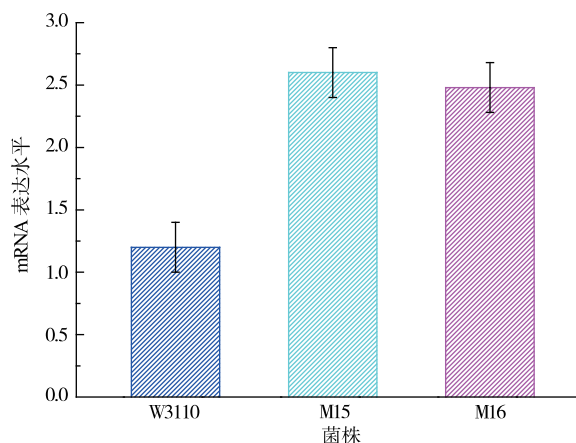


图 7 不同菌株 *yjeH* 转录水平测定

Fig. 7 Relative gene transcriptional levels of *yjeH* in the different strain

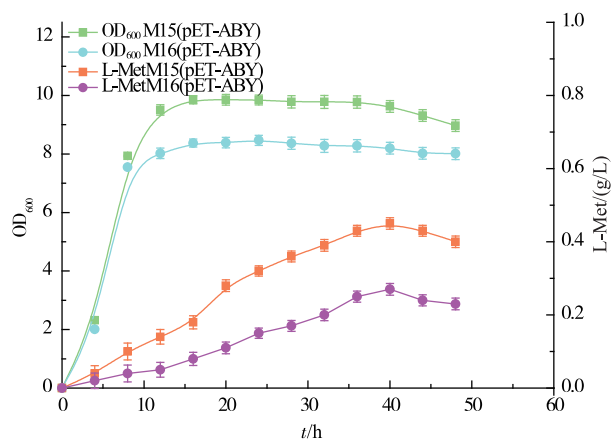


图 8 重组菌 M15 (pET-ABY)、M16 (pET-ABY) 摇瓶发酵生长代谢状况

Fig. 8 Growth and metabolism of recombinant M15 (pET-ABY) and M16 (pET-ABY) during shake flask fermentation

3 结语

随着对微生物氨基酸合成途径的深入了解,转运系统在氨基酸育种研究中的作用越来越受到人们的重视,近年来的研究表明,对氨基酸向胞内吸收和胞外运输途径进行改造,是提高氨基酸产量行之有效的方法。*MetD* 运输系统是蛋氨酸吸收的主要途径,与过表达代谢途径中促进蛋氨酸合成的关键酶相比,修饰蛋氨酸向胞内的运输系统并不能提高蛋氨酸生物合成代谢流,但能够有效减少组织对胞外蛋氨酸的吸收,降低胞内蛋氨酸的浓度,改善内部环境,从而减弱蛋氨酸对细胞的毒害作用以及降低无效循环,进而可以提高鲁棒性以及氨基酸合成的能力^[12]。本实验以 *E. coli* W3110 为基座菌株,利用 Red 重组技术分别获得 *E. coli* W3110 中 *MetD* 运输系统的关键组分 *metN*、*metI* 和 *metQ* 单敲除菌株,与菌株 W3110 相比,*metI* 的缺失使胞外蛋氨酸吸收速率降低了 16.7%。为了避免多拷贝引起的转基因沉默以及基因表达水平过高抑制菌体生长,对 M12 进行 *yjeH* 和 *yeaS* 基因单拷贝整合有效促进了胞外蛋氨酸的积累,同时缓解了游离表达造成的菌体生长抑制现象, M15 (pET-ABY) 和 M16 (pET-ABY) 最大胞外蛋氨酸产量分别提高了 128% 和 38.9%。可见,在弱化蛋氨酸吸收基座菌株的基础上加强胞内蛋氨酸的分泌进行集成改造可以有效提高胞外蛋氨酸的积累。尽管很多研究人员分别进行

氨基酸转运分泌系统和吸收系统的研究,但将两者有机结合进行系统的分析改造是转运系统工程研

究的重要趋势,在以后蛋氨酸以及其他氨基酸生产菌株的理性改造过程中必将发挥愈来愈重要的作用。

参考文献:

- [1] MITSUHASHI S. Current topics in the biotechnological production of essential amino acids functional amino acids and dipeptides [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2014, 26(6):38-44.
- [2] TOWNSEND D M, TEW K D, TAPIERO H. Sulfur containing amino acids and human disease[J]. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2004, 58(1):47-55.
- [3] WILLKE T. Methionine production-a critical review[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014, 98(24):9893-9914.
- [4] KROMER J O, WITTMANN C, SCHRODER H, et al. Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Metabolic Engineering**, 2006, 8(4):353-369.
- [5] LIU P, SUI S, XU D, et al. Clinical analysis of the relationship between cystatin C and metabolic syndrome in the elderly[J]. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, 2014, 33(7-8):411-416.
- [6] JOHNSON J R, LILJESTRAND C A. Plaque assay for lambda transducing phage carrying the *E. coli metB* gene[J]. **Molecular and General Genetics MGG**, 1983, 190(3):527-530.
- [7] ZHAO X, WANG Q, GUO W, et al. Overexpression of *metK* shows different effects on avermectin production in various streptomyces avermitilis strains[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2013, 29(10):1869-1875.
- [8] WU D, GUO Y Y, XU N N, et al. Efficacy of anti - tumor necrosis factor therapy for extra-articular manifestations in patients with ankylosing spondylitis; a meta-analysis[J]. **BMC Musculoskeletal Disorders**, 2015, 16(1):1-9.
- [9] KISHIMOTO N, SAKAI H, JACKSON J, et al. Site specificity of the arabidopsis MET1 DNA methyltransferase demonstrated through hypermethylation of the superman locus[J]. **Plant Molecular Biology**, 2001, 46(2):171-183.
- [10] MOUSLIM C, CANO D A, CASADESUS J. The *sfhX*, *rfe* and *metN* genes of *salmonella typhimurium* and their involvement in the His^c pleiotropic response[J]. **Molecular and General Genetics MGG**, 1998, 259(1):46-53.
- [11] YANG Dongmei, LI Hua, LI Youran, et al. Effects of TdcC, SstT and LIV-1 systems deletion of *Escherichia coli* on extracellular L-threonine accumulation[J]. **Microbiology China**, 2017, 44(1):20-29. (in Chinese)
- [12] LI Hua, DONG Wei, LI Youran, et al. Effects of inactivating MetD transporter system of *Escherichia coli* W3110 on L-methionine production[J]. **Microbiology China**, 2017, 44(6):1416-1426. (in Chinese)
- [13] LEE K H, JIN H P, KIM T Y, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L - threonine production[J]. **Molecular Systems Biology**, 2007, 3(1):1-8.
- [14] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2000, 97(12):6640-6640.
- [15] XIAO Mengrong, ZHANG Liang, LIU Shuangping, et al. Transformation of phosphotransferase system in *Escherichia coli* [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2014, 30(10):1561-1572. (in Chinese)
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta}Delta C(T) methods[J]. **Methods**, 2001, 25(4):402-408.
- [17] HE Y Y, GARVIE C W, ELWORTHY S, et al. Structural and functional studies of an intermediate on the pathway to operator binding by *Escherichia coli* MetJ[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2002, 320(1):39-53.
- [18] AUGUSTUS A M, REARDON P N, HELLER W T, et al. Structural basis for the differential regulation of DNA by the methionine repressor MetJ[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2006, 281(45):34269-34276.
- [19] LI H, WANG B, LI Y R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* W3110 for the production of L-methionine[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2017, 44(1):75-88.
- [20] QU Gengsi, GUO Qian, FANG Fang, et al. Production of methionine by overexpression of methionine synthesis genes in *Escherichia coli* [J]. **Industrial Microbiology**, 2013, 43(5):21-26. (in Chinese)
- [21] LIU Q, LIANG Y, ZHANG Y, et al. YjeH is a novel exporter of L-methionine and branched chain amino acids in *Escherichia coli* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2015, 81(22):7753-7766.