

敲除 $ptsG$ 基因及共表达透明颤菌血红蛋白提高大肠杆菌SHMT产量

韩 琴, 徐新星, 王儒昕, 李 鑫, 闫达中, 吴 菁, 刘 军*

(武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘 要: 利用Red同源重组技术敲除大肠杆菌BL21 (DE₃)的 $ptsG$ 基因, 得到 $ptsG$ 基因缺失菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ 。构建重组质粒, 得到表达大肠杆菌丝氨酸羟甲基转移酶 (serine hydroxymethyltransferase, SHMT) 工程菌株BL21 (DE₃) /pET-glyA、BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA, 及共表达SHMT和透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb) 工程菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV。在LB培养基中, BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA菌株与BL21 (DE₃) /pET-glyA菌株生长情况没有明显差异, BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV菌株稳定期的OD_{600 nm}值比BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA菌株提高了21.3%, 在LBG培养基中, 稳定期BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA菌株OD_{600 nm}值比BL21 (DE₃) /pET-glyA菌株提高了19.4%, BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV菌株OD_{600 nm}值比BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA菌株提高了21.5%。在LBG培养基中, 经过异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导, 与对照菌株BL21 (DE₃) /pET-28a相比较, 两种单表达工程菌株产SHMT活力分别是其6.4倍和7.7倍, 共表达工程菌株产SHMT活力是其9.6倍。实验结果表明, 敲除 $ptsG$ 基因能够增加大肠杆菌在含葡萄糖培养基中的生长量及SHMT表达量, 共表达VHb能进一步提高菌株生长量和SHMT产量。

关键词: Red同源重组; 丝氨酸羟甲基转移酶; 透明颤菌血红蛋白; $ptsG$ 基因; 共表达

Knockout of $ptsG$ and Co-Expression with *Vitreoscilla* Hemoglobin Enhance the Production of Serine Hydroxymethyltransferase in *Escherichia coli*

HAN Qin, XU Xinxing, WANG Ruxin, LI Xin, YAN Dazhong, WU Jing, LIU Jun*

(College of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: The phosphotransferase system G ($ptsG$)-deleted strain BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ was obtained by Red homologous recombination. Recombinant plasmids pET-glyA and pET-SV were constructed and transformed separately into the host strain. As a result, the engineered strains BL21(DE₃)/pET-glyA and BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA for expression of serine hydroxymethyltransferase (SHMT) from *Escherichia coli* were obtained as well as BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV for co-expression of *E. coli* SHMT and *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb). In LB medium, there was no significant difference between the growth of BL21(DE₃)/pET-glyA and that of BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA, but in the stationary phase, the OD_{600 nm} of BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV increased by 21.3% compared to that of BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA. In LBG medium, the OD_{600 nm} of BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA was 19.4% higher than that of BL21(DE₃)/pET-glyA in the stationary phase, but was 21.5% lower than that of BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV. In LBG medium, the SHMT activities produced by BL21(DE₃)/pET-glyA, $\Delta ptsG$ /pET-glyA and $\Delta ptsG$ /pET-SV were 6.4, 7.7 and 9.6 times as high as that produced by the control strain, respectively. The results showed that knockout of the $ptsG$ gene could increase the growth of *E. coli* in glucose-containing medium and SHMT expression, and this effect was enhanced by co-expression with VHb.

Keywords: Red homologous recombination; serine hydroxymethyltransferase; *Vitreoscilla* hemoglobin; $ptsG$ gene; co-expression
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181114-165

中图分类号: Q819

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 02-0119-07

收稿日期: 2018-11-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31270112); 湖北省自然科学基金项目 (2014CFC1133)

第一作者简介: 韩琴 (1993—) (ORCID: 0000-0001-5676-9642), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。

E-mail: 530946220@qq.com

*通信作者简介: 刘军 (1966—) (ORCID: 0000-0002-0646-2578), 男, 副教授, 博士, 研究方向为酶工程。

E-mail: junliu85@163.com

引文格式:

韩琴, 徐新星, 王儒昕, 等. 敲除*ptsG*基因及共表达透明颤菌血红蛋白提高大肠杆菌SHMT产量[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 119-125. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181114-165. <http://www.spkx.net.cn>

HAN Qin, XU Xinxing, WANG Ruxin, et al. Knockout of *ptsG* and co-expression with *Vitreoscilla* hemoglobin enhance the production of serine hydroxymethyltransferase in *Escherichia coli*[J]. Food Science, 2020, 41(2): 119-125. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181114-165. <http://www.spkx.net.cn>

L-丝氨酸是一种具有重要价值的氨基酸, 广泛应用于食品、医药、化妆品等行业中^[1]。*L*-丝氨酸每年约3 000 t市场量, 如果生产成本降低, 市场量会进一步增加^[1-2]。*L*-丝氨酸生产方法主要有蛋白水解提取法^[3]、化学合成法^[4]、发酵法^[5-6]、前体物细胞转化法^[7]或酶转化法^[8]。

蛋白水解提取法存在工艺复杂和分离精制困难等缺点。化学合成法存在污染重和*D*-丝氨酸与*L*-丝氨酸分离困难等缺点。发酵法生产*L*-丝氨酸主要是利用大肠杆菌和谷氨酸棒杆菌, 它们合成*L*-丝氨酸代谢网络复杂, 并且胞内*L*-丝氨酸可用于合成甘氨酸、半胱氨酸和色氨酸, 作为碳单位来源用于合成嘌呤、胸腺嘧啶核苷酸和磷脂分子。另外, 在脱水酶或脱氨酶作用下, 胞内*L*-丝氨酸被降解, 故*L*-丝氨酸在体内很难得到积累^[1]。前体物细胞转化法存在转化率偏低、反应时间长以及成本高等缺陷^[7]。酶转化法是目前国际上普遍采用的方法, 具有反应过程简单、副反应少和生产效率高等优点。丝氨酸羟甲基转移酶 (serine hydroxymethyltransferase, SHMT) 是用于丝氨酸酶法合成的酶, 它由*glyA*编码, 以吡哆醛磷酸酯为辅酶, 在四氢叶酸存在下催化甲醛、甘氨酸生成*L*-丝氨酸^[8]。

SHMT的高效制备是酶法生产*L*-丝氨酸的基础。菌体高密度培养可以提高单位发酵液产酶水平。然而, 在大肠杆菌高密度发酵生产过程中, 菌体生物量和外源蛋白表达量往往受到溶解氧不足的限制而难以达到较高的水平, 提高细胞的氧利用效率能够增加菌体生长。血红蛋白是生物体结合、运输氧分子的蛋白质, 广泛存在于细菌、真菌和动植物中^[9]。透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb) 是一种专性好氧的革兰氏阴性丝状菌在低氧环境中产生的一种可溶性蛋白, 具有较高的氧吸附和解离速率常数^[10]。该蛋白已在多种宿主中成功表达, 能够促进细胞生长、蛋白质合成和提高代谢物产率^[11], 表明在大肠杆菌中共表达目的蛋白和VHb是改善发酵过程溶氧限制、增加细胞生长和外源蛋白产量的有效手段。已报道, 在大肠杆菌中共表达 α -淀粉酶和VHb, 提高了 α -淀粉酶的表达量^[12-13]; Pablos等^[14]在大肠杆菌菌株W3110中表达VHb后, 微氧环境中菌体生物量提高了约33%, 同时菌体比生长速率提高了约30%。于慧敏等^[15]将*vgb*基因插入产聚 β -羟基丁酸酯 (poly- β -hydroxybutyrate, PHB) 重组大肠杆菌VG1

(pTU14) 染色体中, 发现*vgb*基因的引入可以同时促进菌体生长和PHB的积累, 且溶氧水平越低, VHb表达量越大, 这种促进作用越明显。郑方亮等^[16]通过敲除ATP合酶基因并进一步插入*vgb*基因, 使钝齿棒杆菌T6-13谷氨酸产出累积量提高了36.91%。

大肠杆菌在高密度发酵过程中, 产生乙酸等代谢副产物。乙酸累积是抑制菌体生长和外源蛋白产量的另一重要因素, 乙酸产生是由于菌体对葡萄糖的摄取速率与细胞的碳代谢速率不平衡所致^[17]。大肠杆菌对葡萄糖的摄取主要通过磷酸转移酶系统 (phosphotransferase system, PTS) 完成, PTS包括EI、HPr以及EIIs, 前两者为胞质可溶型蛋白, 分别由*ptsH*基因和*ptsI*基因编码, 后者多为蛋白复合体, 对碳水化合物具有特异性, 包括EI^{Man}、EI^{Fru}、EI^{Bgl}、EI^A^{Glc}和EI^{ICB}^{Glc}等^[18], 其中由*ptsG*基因编码的酶EI^{ICB}^{Glc}在葡萄糖的跨膜转运中具有重要作用^[19]。EI^{ICB}^{Glc}蛋白介导的高效葡萄糖磷酸转运, 易导致胞内三羧酸循环和糖酵解不平衡, 从而生成大量乙酸, 不利于菌体高密度生长^[20]。韩武洋等^[21]敲除了谷氨酸棒杆菌ATCC13032编码葡萄糖PTS系统关键转运蛋白基因*ptsG*、*ptsH*-*ptsI*和葡萄糖转运系统关键转运蛋白基因*abc*、*abc2*和*iolt1*, 表明*ptsG*、*ptsH*-*ptsI*、*abc*、*abc2*和*iolt1*所编码的转运蛋白具有葡萄糖转运功能, 并且葡萄糖的转运除PTS外还存在其他转运系统。*ptsG*基因缺陷菌株能使胞内三羧酸循环和糖酵解趋于平衡, 乙酸产量减少。因此, 利用代谢工程技术, 构建*ptsG*基因敲除菌株, 能够降低葡萄糖摄取速率及乙酸累积, 促进菌体生长, 增加外源蛋白的表达量。

鉴于VHb与*ptsG*基因的生物效应, 本研究将敲除大肠杆菌*ptsG*基因, 在缺失*ptsG*基因菌株中共表达SHMT和VHb, 以期提高工程菌株产SHMT的能力, 实现工程菌株高效生产SHMT, 为酶法制备*L*-丝氨酸提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒

透明颤菌 (*Vitreoscilla*)、*Escherichia coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE₃)、质粒pKD13 (氯霉素抗性)、质粒pCP20 (氨苄霉素、氯霉素抗性)、质粒pKD46 (氨苄霉

素抗性)由本实验室保存;pET-28a载体 德国Novagen公司。

1.1.2 试剂、试剂盒与引物

限制性内切酶、T4 DNA Ligase、Pyrobest™ DNA Polymerase、DNA Marker、蛋白Marker 日本TaKaRa公司;细菌基因组快速提取试剂盒、质粒快速提取试剂盒、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物回收试剂盒、GenClean琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、L-阿拉伯糖、氯霉素、氨苄青霉素、卡那霉素上海捷瑞生物工程有限公司;Tris base、甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺 美国Fluka公司;蛋白胨、酵母粉英国Oxoid公司;其余试剂均为国产分析纯。

引物由上海捷瑞生物工程公司合成,具体序列见表1。

表1 实验所用引物
Table 1 Primer sequences used in this research

引物	引物序列	酶切位点
P _{SHMT上}	CATGCCATGGGCTTAAAGCGTGAAATGAACATTG	NcoI
P _{SHMT下}	CGAGGATCCTTATGCGTAAACCGGGTAAC	BamHI
P _{VHb上}	CATGCCATGGGCTTAGACAGCAAAACCATTAACA	NcoI
P _{VHb下}	CGAGGATCCTTATTCACCGCTTGAGCGTA	BamHI
P _{ptsG A上}	ATCGAGGAAAAGAGAATCAAC	
P _{ptsG A下}	GAAGCAGCTCCAGCTACACGAACCGACGCCAGCAGAAT	
P _{cmr上}	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
P _{cmr下}	ATGGGAATTAGCCATGGTCC	
P _{ptsG B上}	GGACCATGGCTAATTCATCCATCAGGCGTTTTCGGTACTAAAT	
P _{ptsG B下}	GGGTGGAATTTGAACCTCAAC	

注:下划线部分为限制性酶切割位点。

1.1.3 培养基

LB培养基:蛋白胨10 g/L,酵母粉5 g/L,NaCl 10 g/L;
LBG培养基:蛋白胨10 g/L,酵母粉5 g/L,NaCl 10 g/L,
葡萄糖25 g/L。

1.2 仪器与设备

GBox-HR-E-M凝胶成像系统 英国Syngene公司;
TProfessional PCR仪 德国Biometra公司;5417R台式
高速冷冻离心机、Electroporator 2010电转化仪 德国
Eppendorf公司;DYY-6C电泳仪、DYCZ系列垂直式电
泳槽 北京六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 ptsG基因敲除菌株的构建

利用Red同源重组技术敲除大肠杆菌BL21(DE₃)的ptsG基因^[22]。以pKD13为模板,P_{cmr上}和P_{cmr下}扩增氯霉素抗性基因。以大肠杆菌BL21(DE₃)基因组为模板,以P_{ptsG A上}与P_{ptsG A下}扩增ptsG基因上游同源臂,以P_{ptsG B上}与P_{ptsG B下}扩增ptsG基因下游同源臂。利用重叠PCR连接上述三片段,回收两端具有ptsG基因的氯霉素抗性基因片段,用于敲除大肠杆菌ptsG基因。

按1%接种量,将过夜培养携带pKD46质粒的大

肠杆菌BL21(DE₃)菌液接种至50 mL加有氨苄青霉素(60 μg/mL)的LB培养基中,培养至OD_{600 nm}为0.5~0.6,加入0.1 g/100 mL L-阿拉伯糖诱导2 h。将菌液冰浴,离心收集菌体。用10%甘油清洗菌体3次后悬于500 μL甘油中,制备电转化感受态细胞。将两端具有同源臂的氯霉素抗性基因片段电转化至感受态细胞(电转条件:电压1.8 kV/cm、1 mm电击杯)。加入1 mL预冷的LB培养基,在37 ℃、100 r/min培养2 h。涂布于含有氯霉素(25 μg/mL)的LB平板,筛选重组子,利用PCR鉴定,并测序确证。

将质粒pCP20转入氯霉素抗性重组子,30 ℃培养8 h,转至42 ℃培养过夜。pCP20在42 ℃表达FLP内切酶,将FRT位点间的氯霉素抗性基因从大肠杆菌基因组上切除掉,得到氯霉素抗性基因消除的ptsG基因敲除菌株。

1.3.2 表达载体及工程菌株的构建

以大肠杆菌BL21(DE₃)基因组为模板,用P_{SHMT上}和P_{SHMT下}扩增出glyA基因;以透明颤菌基因组为模板,用P_{VHb上}和P_{VHb下}扩增出vgb基因。用NcoI和BamHI双酶切纯化后的PCR产物,依次用T4 DNA Ligase连接到用NcoI和BamHI双酶切的质粒pET-28a上,得到重组质粒pET-glyA和pET-vgb。

利用BglII和HindIII双酶切质粒pET-vgb,回收含T7启动子和vgb基因的DNA片段。用BamHI和HindIII双酶切质粒pET-glyA,用T4 DNA Ligase将它与含vgb基因和T₇启动子的DNA片段连接,得到共表达SHMT和VHb重组质粒pET-SV。

将质粒pET-28a、重组质粒pET-glyA及pET-SV转化宿主菌,得到对照菌株BL21(DE₃)/pET-28a,单表达SHMT工程菌株BL21(DE₃)/pET-glyA、BL21(DE₃)ΔptsG/pET-glyA及共表达SHMT和VHb工程菌株BL21(DE₃)ΔptsG/pET-SV。

1.3.3 菌株生长测定

挑取单表达SHMT工程菌株及共表达SHMT和VHb工程菌株单菌落,分别接种于LB培养基中,在37 ℃培养10 h后,转接于LB和LBG培养基中,在37 ℃、200 r/min继续培养,定时取样测定菌密度。

1.3.4 工程菌诱导表达SHMT

将菌种接种到装有20 mL LB的100 mL三角瓶中,培养基中添加50 μg/mL卡那霉素,37 ℃培养过夜。按1%接种量接装有50 mL LBG的250 mL三角瓶中,37 ℃培养到OD_{600 nm}为0.8~1.0,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)至终浓度为1 mmol/L诱导蛋白表达。诱导6 h后,将菌液离心,去上清液,收集细胞,用于分析ptsG基因缺失及共表达VHb对菌株产SHMT的影响。

1.3.5 SHMT表达水平及酶活力测定

对收集的经过IPTG诱导的细胞,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)方法^[23]检测蛋白表达水平,并测定其SHMT活力。SHMT活力测定采用分光光度法^[24],其基本原理是,SHMT可催化DL-苯基丝氨酸分解产生苯甲醛,后者在279 nm波长处有特征性的吸收峰值,根据苯甲醛浓度回归方程可以确定反应液中苯甲醛浓度。酶活力单位定义:在30℃条件下,反应1 h催化底物产生100 μmol苯甲醛为1个酶活力单位(U)。

1.4 数据统计分析

菌体生物量测定及酶活力测定实验均做3个平行样,数据均利用Origin 8.0软件进行统计分析,并作图。

2 结果与分析

2.1 *ptsG*基因敲除

以 $P_{ptsG A}$ 上和 $P_{ptsG B}$ 下为引物,以对照菌株和从氯霉素平板上长出的转化子基因组作模板进行PCR扩增,PCR扩增产物为2 400 bp和2 030 bp,分别与对照菌株和 $ptsG$ 基因缺失的氯霉素抗性转化子预计扩增产物大小一致,且后者与进行 $ptsG$ 基因缺失的两同源臂及氯霉素抗性基因三片段拼接产物大小一致(图1),表明用于 $ptsG$ 基因缺失片段已整合进大肠杆菌BL21(DE₃)基因组,并替换掉其基因组中两同源臂之间的序列。

对鉴定的氯霉素抗性菌株消去抗性基因。以 $P_{ptsG A}$ 上和 $P_{ptsG B}$ 下为引物,以在氯霉素平板上不生长的菌株基因组做模板进行PCR扩增,扩增产物的大小与预计大小1 100 bp一致(图1)。对扩增的产物测序,证实氯霉素抗性基因被剔除,得到了 $ptsG$ 基因敲除菌株BL21(DE₃)Δ $ptsG$ 。

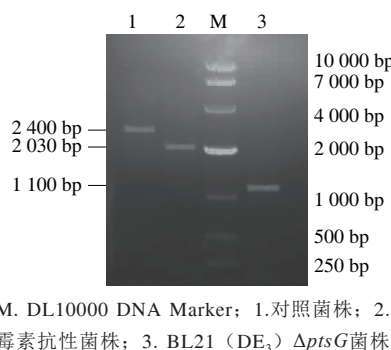


图1 PCR鉴定 $ptsG$ 基因缺失菌株BL21(DE₃)Δ $ptsG$

Fig. 1 Identification of the $ptsG$ -deleted strain BL21(DE₃)Δ $ptsG$ by PCR

2.2 重组载体与工程菌株的构建

质粒pET-*glyA*和pET-*vgb*构建过程见图2。用NcoI和BamHI双酶切鉴定构建的重组载体pET-*glyA*和pET-*vgb*。酶切pET-*glyA*产生两条带,其中大片段与pET-28a单酶

切质粒大小一致,小片段约为1 250 bp,与含有T7启动子和 $glyA$ 基因的DNA片段大小相符(图3)。酶切重组pET-*vgb*质粒产生两条片段,大片段与pET-28a质粒大小一致,小片段与 vgb 基因大小一致(图4)。序列测定进一步证实,重组载体pET-*glyA*和pET-*vgb*构建成功。

从构建的共表达重组载体pET-SV的菌株中提取质粒,以 $P_{VHb上}$ 和 $P_{VHb下}$ 为引物进行PCR扩增,结果见图5,扩增片段与预期大小458 bp一致。序列测定进一步证实,共表达SHMT和VHb的重组载体pET-SV构建成功。

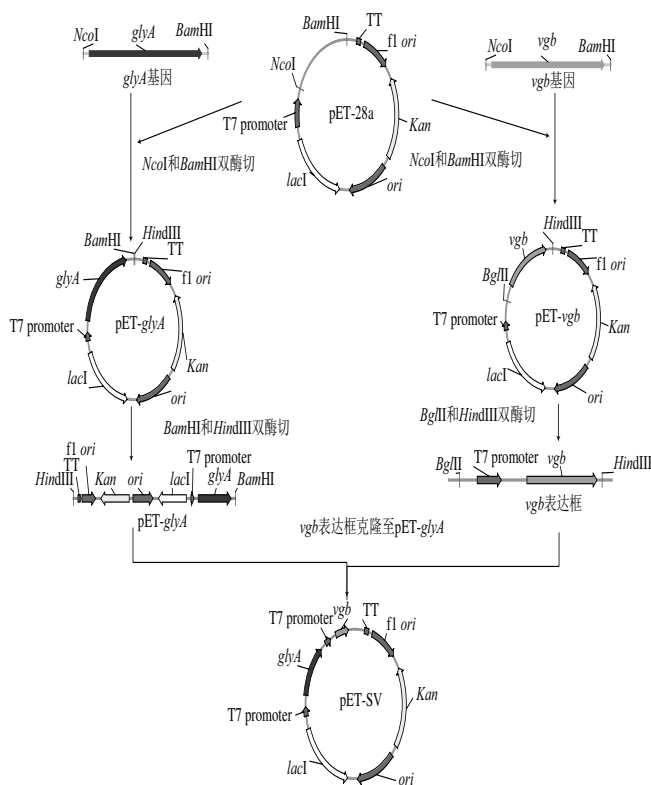
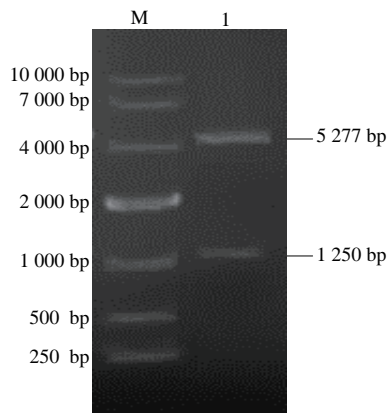


图2 重组质粒的构建

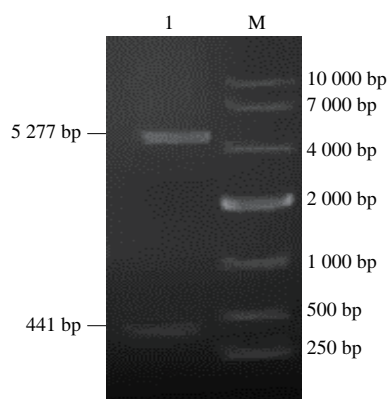
Fig. 2 Construction of recombinant plasmids



M. DL10000 DNA Marker; 1. 质粒pET-*glyA*双酶切产物(NcoI/BamHI)。

图3 酶切鉴定重组质粒pET-*glyA*

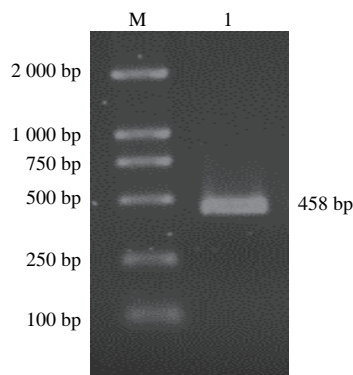
Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET-*glyA* by enzymedigestion



M. DL10000 DNA Marker; 1. 质粒pET-vgb双酶切产物 (NcoI/BamHI)。

图4 酶切鉴定重组质粒pET-vgb

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pET-vgb by enzyme digestion



M. DL2000 DNA Marker; 1. 质粒pET-SV。

图5 PCR扩增vgb基因

Fig. 5 PCR amplification products of vgb gene

将质粒pET-28a、重组质粒转化大肠杆菌BL21 (DE₃) 及BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$, 得到对照菌株BL21 (DE₃) /pET-28a、单表达SHMT工程菌株BL21 (DE₃) /pET-glyA、BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA及共表达SHMT和VHb工程菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV。

2.3 重组菌株生长曲线

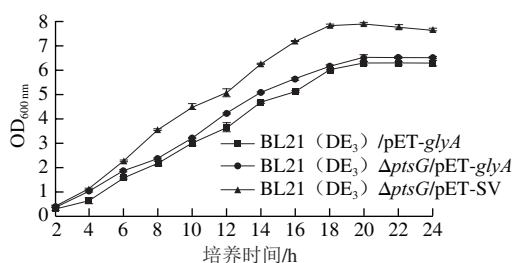


图6 BL21 (DE₃) /pET-glyA、BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA和BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV在LB培养基中的生长曲线

Fig. 6 Growth curve of BL21(DE₃)/pET-glyA, BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA and BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV in LB medium

将BL21 (DE₃) /pET-glyA、BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA和BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV 3种菌株, 分别

在LB和LBG培养基中37℃培养, 每隔2h取样测OD_{600nm}值, 绘制生长曲线。从图6可知, 在没有葡萄糖的LB培养基中, BL21 (DE₃) /pET-glyA和BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA两种菌株生长情况相差不大, 但BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV菌株在稳定期的OD_{600nm}值比BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA菌株提高了21.3%, 比BL21 (DE₃) /pET-glyA提高了25.5%, 表明vgb基因的引入可以促进菌体生长, 提高菌体生长密度。

在含有葡萄糖的LBG培养基中, 稳定期BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA菌株OD_{600nm}比BL21 (DE₃) /pET-glyA提高了19.4%, BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV菌株OD_{600nm}值比BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA菌株提高了21.5% (图7), 表明ptsG基因缺失可以增加菌株在含葡萄糖的培养基中生长, 过表达VHb能进一步提高菌株生长量。

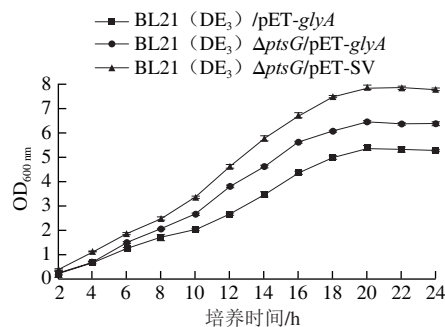
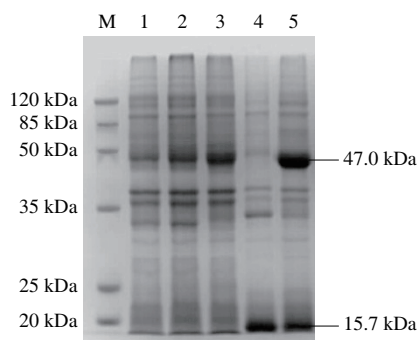


图7 BL21 (DE₃) /pET-glyA、BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA和BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV在LBG培养基中的生长曲线

Fig. 7 Growth curve of BL21(DE₃)/pET-glyA, BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA and BL21(DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV in LBG medium

2.4 工程菌株的诱导表达及酶活力分析



M. 蛋白质Marker; 1. BL21 (DE₃) /pET-28a; 2. BL21 (DE₃) /pET-glyA; 3. BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-glyA; 4. BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-vgb; 5. BL21 (DE₃) $\Delta ptsG$ /pET-SV。

图8 工程菌株表达SHMT和VHb的SDS-PAGE分析

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of protein expression in recombinant strains

对诱导后的菌体全细胞进行SDS-PAGE, 结果见图8。工程菌株BL21 (DE₃) /pET-glyA和BL21 (DE₃)

$\Delta ptsG/pET-glyA$ 在分子质量47 kDa处有蛋白表达条带,大小与SHMT相符。工程菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-vgb$ 在分子质量15.7 kDa处有蛋白表达条带,大小与VHb一致。工程菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-SV$ 在分子质量47 kDa和15.7 kDa处均有蛋白表达条带,产物大小分别与SHMT和VHb一致。上述结果表明,SHMT和VHb在携带它们相应编码基因 $glyA$ 和 vgb 的工程菌株中均得到表达。

经IPTG诱导后,测定菌株产SHMT活力,对照菌株BL21 (DE₃) $pET-28a$ 、工程菌株BL21 (DE₃) $pET-glyA$ 、BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-glyA$ 和共表达工程菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-SV$ 的SHMT活力分别为30.6、195.8、235.6 U/mL和293.8 U/mL。相比对照菌株,两种单表达基因工程菌株SHMT活力分别提高了6.4倍和7.7倍;共表达基因工程菌株的SHMT活力提高了9.6倍。因此, $ptsG$ 基因的敲除能够增加工程菌株在含葡萄糖培养基中SHMT的表达量,共表达VHb能进一步提高菌株SHMT产量。

3 讨论

本研究利用Red同源重组技术敲除大肠杆菌 $ptsG$ 基因。由于 $ptsG$ 基因编码的酶EIICB^{Glc}主要在大肠杆菌葡萄糖的跨膜转运中起作用^[18-19],故在没有葡萄糖的LB培养基中, $ptsG$ 基因缺失菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-glyA$ 和菌株BL21 (DE₃) $pET-glyA$ 生长情况差别不明显。在含有葡萄糖的LB培养基中,敲除了 $ptsG$ 基因的菌株对葡萄糖吸收速率降低,细胞代谢产物乙酸产生少,减少了乙酸对菌体生长的影响,同时由于菌株仍然能够利用PTS途径中的EIIMan等运输体转运葡萄糖^[20,25],并利用磷酸烯醇式丙酮酸提供磷酸基团对葡萄糖磷酸化,故 $ptsG$ 基因缺失工程菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-glyA$ 比工程菌株BL21 (DE₃) $pET-glyA$ 在稳定期OD_{600 nm}提高了19.4%,并且菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-glyA$ 产SHMT活力比菌株BL21 (DE₃) $pET-glyA$ 提高了20.3%。

菌体生物量和外源蛋白表达量往往受到发酵液溶解氧水平的影响。VHb能加快大肠杆菌胞内三羧酸循环进程,提高菌体对乙酰辅酶A的消耗速度,进而在一方面能够促进菌体生物量的增加,另一方面可以抑制乙酸等代谢副产物的生成^[26]。研究表明,在不含葡萄糖或含葡萄糖的LB培养基中,共表达VHb均能够提高菌株的生物量。在没有葡萄糖的LB培养基中,共表达VHb工程菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-SV$ 在稳定期的OD_{600 nm}值比菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-glyA$ 提高了21.3%;在含有葡萄糖的LB培养基中,菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-SV$ 的OD_{600 nm}值比菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-glyA$ 提高了21.5%,并且产SHMT活力比菌株BL21 (DE₃) $\Delta ptsG/pET-glyA$ 提高了24.7%。

为实现重组蛋白高效生产,高细胞密度培养技术至关重要,得到高密度菌体是提高重组蛋白的前提。在厌氧或供氧不足条件下,大肠杆菌发酵产生乙酸,另外,当大肠杆菌生长的培养基含葡萄糖过多,即使在溶氧充足情况下,也可以产生乙酸^[27]。高浓度乙酸会降低菌体生长速率和生物量,从而导致外源蛋白产量降低。目前,在发酵工艺上主要通过控制葡萄糖补料速率,减少大肠杆菌发酵过程中乙酸的生成^[28-29]。这种方法能限制大肠杆菌发酵中乙酸积累,但发酵工艺复杂。本研究构建的 $ptsG$ 缺失菌株,由于葡萄糖的吸收速率降低,可以避免使用复杂的发酵控制工艺,使菌体产乙酸得到控制,在生产中具有优势。溶氧不足也常会成为大肠杆菌高密度发酵的限制因素,虽然在发酵过程中可以通过增加通气量、加大搅拌速率提高发酵液溶氧水平,但在菌体发酵密度达到一定量时,这些手段的效果会降低。VHb具有高的氧吸附和解离速率常数^[10],可以增加菌株氧利用效率,减少菌株乙酸生成,促进菌体生长,缩短发酵周期,因此,构建的共表达VHb工程菌株可提高大肠杆菌对氧的利用和对低溶氧环境的耐受能力,在SHMT高密度发酵产生中将会更加有利。

本研究构建的 $ptsG$ 基因缺失工程菌株及共表达VHb工程菌株在发酵罐中的生长特性及SHMT表达水平有待进一步分析,期望能够简化发酵工艺操作,提高SHMT生产水平,降低L-丝氨酸生产成本。

参考文献:

- [1] ZHANG X M, XU G Q, SHI J S, et al. Microbial production of L-serine from renewable feedstocks[J]. Trends in Biotechnology, 2018, 38(7): 700-712. DOI:10.1016/j.tibtech.2018.02.001.
- [2] BECKER J, WITTMANN C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production the heartbeat of industrial strain development[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23(5): 718-726. DOI:10.1016/j.copbio.2011.12.025.
- [3] ZHU G Y, ZHU X, WAN X L, et al. Hydrolysis technology and kinetics of poultry waste to produce amino acids in subcritical water[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2010, 88(2): 187-191. DOI:10.1016/j.jaap.2010.04.005.
- [4] EFFENBERGER F, ZOLLER C. Investigations on the synthesis of DL-serine from α -haloacrylic acid derivatives[J]. Tetrahedron, 1988, 44(17): 5573-5582. DOI:10.1016/S0040-4020(01)86062-2.
- [5] ZHANG Y, SHANG X L, LAI S J, et al. Reprogramming one-carbon metabolic pathways to decouple L-serine catabolism from cell growth in *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(2): 635-646. DOI:10.1021/acssynbio.7b00373.
- [6] MUNDHADA H, SCHNEIDER K, CHRISTENSEN H B, et al. Engineering of high yield production of L-serine in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(4): 807-816. DOI:10.1002/bit.25844.
- [7] CHAO H, WU B, SHEN P. Overexpression of the methanol dehydrogenase gene *mxhF* in *Methylobacterium* sp. MB200 enhances

- L*-serine production[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(4): 390-396. DOI:10.1111/lam.12467.
- [8] HUANG J J, CHEN L, HU N, et al. Characterization of a novel serine hydroxymethyltransferase isolated from marine bacterium *Arthrobacter* sp. and its application on *L*-serine production[J]. Aannals of Microbiology, 2015, 65(3): 1689-1698. DOI:10.1007/s13213-014-1008-7.
- [9] ROSS C H. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(12): 5675-5679. DOI:10.1073/pnas.93.12.5675.
- [10] ZHANG L, LI Y J, WANG Z N, et al. Recent developments and future prospects of *Vitreoscilla* hemoglobin application in metabolic engineering[J]. Biotechnology Advances, 2007, 25(2): 123-136. DOI:10.1016/j.biotechadv.2006.11.001.
- [11] STARK B C, PAGILLA K R, DIKSHIT K L. Recent applications of *Vitreoscilla* hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(4): 1627-1636. DOI:10.1007/s00253-014-6350-y.
- [12] TARI C, PARULEKAR S J, STARK B C, et al. Synthesis and excretion of α -amylase in *vgb⁺* and *vgb⁻* recombinant *Escherichia coli*: a comparative study[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59(6): 673-678. DOI:10.1002/(sici)1097-0290(19980920)59:6<673::aid-bit3>3.0.co;2-c.
- [13] AYDIN S, WEBSTER D A, STARK B C. Nitrite inhibition of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) in recombinant *E. coli*: direct evidence that VHb enhances recombinant protein production[J]. Biotechnology Progress, 2000, 16(6): 917-921. DOI:10.1021/bp0000757.
- [14] PABLOS T E, MORA E M, BORGNE S L, et al. *Vitreoscilla* hemoglobin expression in engineered *Escherichia coli*: improved performance in high cell-density batch cultivations[J]. Biotechnology Journal, 2011, 6(8): 993-1002. DOI:10.1002/biot.201000405.
- [15] 于慧敏, 史悦, 张延平, 等. 透明颤菌血红蛋白基因在产PHB重组大肠杆菌中的引入[J]. 微生物学报, 2001, 41(5): 548-552. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2001.05.005.
- [16] 郑方亮, 于亮, 牟晓丛, 等. 缺失ATP合酶和插入VHb基因对钝齿棒杆菌谷氨酸产量的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(7): 131-136. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201507024.
- [17] ÅKESSON M, KARLSSON E N, HAGANDER P, et al. On-line detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1999, 64(5): 590-598. DOI:10.1002/(sici)1097-0290(19990905)64:5<590::aid-bit9>3.0.co;2-t.
- [18] DEUTSCHER J, FRANCKE C, POSTMA P W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006, 70(4): 939-1031. DOI:10.1128/MMBR.00024-06.
- [19] SIEBOLD C, FLÜKIGER K, BEUTLER R, et al. Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS)[J]. FEBS Letters, 2001, 504(3): 104-111. DOI:10.1016/s0014-5793(01)02705-3.
- [20] STEINSIEK S, BETTENBROCK K. Glucose transport in *Escherichia coli* mutant strains with defects in sugar transport systems[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(21): 5897-5908. DOI:10.1128/JB.01502-12.
- [21] 韩武洋, 刘金雷, 杜红燕, 等. 谷氨酸棒状杆菌葡萄糖代谢阻断工程菌的构建[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 65-74. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201702011.
- [22] 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, 2000, 97(12): 6640-6645. DOI:10.1073/pnas.120163297.
- [23] MAMIATIS T, FRITSCHI E F, SAIVIBR J. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 908-938. DOI:10.1002/abio.370050118.
- [24] 蔡宇暘, 吴梧桐, 史燕东. SHMT基因工程菌的构建及高效表达[J]. 生物工程学报, 1996, 12(增刊1): 28-33. DOI:10.13345/j.cjb.1996.s1.005.
- [25] CHOU C H, BENNETT G N, SAR K Y. Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44(8): 952-960. DOI:10.1002/bit.260440811.
- [26] PABLOS T E, SIGALA J C, BORGNE S L, et al. Aerobic expression of *Vitreoscilla* hemoglobin efficiently reduces overflow metabolism in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Journal, 2014, 9(6): 791-799. DOI:10.1002/biot.201300388.
- [27] LEE S Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*[J]. Trends in Biotechnology, 1996, 14(3): 98-105. DOI:10.1016/0167-7799(96)80930-9.
- [28] KIM S, MOHAMEDALI K A, CHEUNG L H, et al. Overexpression of biologically active VEGF₁₂₁ fusion proteins in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 128(3): 638-647. DOI:10.1016/j.jbiotec.2006.11.027.
- [29] SHILOACH J, FASS R. Growing *E. coli* to high cell density-a historical perspective on method development[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(5): 345-357. DOI:10.1016/j.biotechadv.2005.04.004.