精氨酸合成途径关键酶基因的过量表达及其对 L-精氨酸合成的影响

黄园园，郑穗平

（华南理工大学生物科学与工程学院，广东省微生物酶学重点实验室，广东广州 510006）

摘要：由 *Car*AB、*Arg*D、*Arg*J 三个基因分别编码的氨基甲酰磷酸合成酶、乙酰鸟氨酸转氨酶、鸟氨酸乙酰基转移酶是 L-精氨酸合成途径的关键酶。以谷氨酸棒杆菌 ATCC14067 为出发菌株，利用大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌的穿梭质粒 pEC-XK99E-p'、PEC-T18mob2，分别对精氨酸生物合成途径的关键酶基因 *Car*AB、*Arg*D、*Arg*J 进行单个基因表达、对 *Arg*D、*Arg*J 基因进行串联表达以及对 *Car*AB、*Arg*D、*Arg*J 三个基因进行共表达，分别得到过量表达菌株 14067-pEC-*Car*AB、14067-T18-*Arg*D、14067-T18-*Arg*J、14067-T18-*Arg*DJ、14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ。检测上述三个基因单独表达，串联表达及共表达对 L-精氨酸产量的影响。摇瓶发酵实验证明，这五株菌产精氨酸的能力较出发菌株 ATCC14067 分别提高了 1.61、1.14、1.19、1.28、2.91 倍。产量最高的共表达菌株 14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ，通过实时荧光定量 PCR 检测，表明 *Car*A、*Car*B、*Arg*D、*Arg*J 基因的表达量分别是 ATCC14067 的 2.50、5.60、3.59、4.70 倍。这表明过量表达基因 *Car*AB、*Arg*D、*Arg*J 可以有效提高精氨酸的产量。

关键词：谷氨酸棒杆菌；过量表达；共表达；L-精氨酸

文章篇号：1673-9078(2014)3-58-63

Overexpression of Key Enzymes in Arginine Biosynthetic Pathway and their Effects on L-arginine Production

HUANG Yuan-yuan, ZHENG Sui-ping

(College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangdong Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Carbamoyl phosphate synthase, Acetyl ornithine amino transferase and ornithine acetyl transferase encoded by *Car*AB, *Arg*D and *Arg*J were the key enzymes in L-arginine biosynthetic pathway. In *Corynebacterium glutamicum* ATCC14067, with the plasmids pEC-XK99E-p and PEC-T18mob2, the genes of *Car*AB, *Arg*D and *Arg*J in the arginine biosynthetic pathway were expressed individually, *Arg*D and *Arg*J were overexpressed in series and the *Car*AB, *Arg*D and *Arg*J were co-expressed. The ability of producing L-arginine of the recombination strains, 14067-pEC-*Car*AB, 14067-T18-*Arg*D, 14067-T18-*Arg*J, 14067-T18-*Arg*DJ and 14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ, increased 1.61, 1.14, 1.19, 1.28 and 2.19 times, respectively, in shake flask which compared with the starting strain ATCC14067. The real-time quantitative PCR showed that the relative expression of genes *Car*A, *Car*B, *Arg*D and *Arg*J in strain 14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ were 2.50, 5.60, 3.59 and 4.70 times, respectively, than ATCC14067. Therefore, overexpression of *Car*AB, *Arg*D and *Arg*J genes can effectively improve the production of L-arginine.

Key words: *Corynebacterium glutamicum*; overexpression; co-expression; L-arginine

L-精氨酸（L-arginine）是一种碱性氨基酸,在医药和食品工业有较广泛的用途,近年来备受氨基酸工业的广泛关注。早期精氨酸生成的主要方法是蛋白质水解及化学合成法[1]，但由于这些方法具有材料来源有限、工艺复杂、周期长、产品成分复杂等缺点，因而逐渐被淘汰。目前合成精氨酸的主导方法是微生物法，主要的生产菌主要是大肠杆菌和棒杆菌属的细菌[1]。随着 ATCC14067 基因组测序的完成[2]以及分子生物学技术和代谢工程的逐步发展和成熟，从而使的通过分子设计有目的控制谷氨酸棒杆菌 ATCC14067 精氨酸合成途径的代谢流成为可能，这为有效的提高精氨酸的产量提供更加有效的方法。

L-精氨酸合成有关的八个酶由九个基因编码，如

收稿日期：2013-10-13

作者简介：黄园园（1990-），女，硕士研究生，研究方向：主要从事氨基酸代谢流工程的研究

通讯作者：郑穗平（1972-），男，博士，教授，研究方向：主要从事发酵工程、代谢工程的研究

图 1 所示[3],该途径有九个基因组成五个操纵子，它们可接受同一个调节基因发出的信号，从而进行协同作用。精氨酸合成途径的关键酶包括氨基甲酰磷酸合成酶、乙酰鸟氨酸转氨酶、乙酰基转移酶[4]。其中，氨基甲酰磷酸合成酶包含两个亚单位，这两个亚单位是由 *Car*A 和 *Car*B 基因编码的。它是精氨酸合成途径的另一条支路代谢，直接补充精氨酸的前体物质,鸟氨酸。*Arg*D 基因编码乙酰鸟氨酸转氨酶，报道表明，在精氨酸的合成中间步骤中，放大 N-乙酰谷氨酸半醛至 N-乙酰鸟氨酸的转化中涉及的酶反应可以增加 L-精氨酸的流量，从而提高 L-精氨酸的产率。*Arg*J 基因编码鸟氨酸乙酰基转移酶，在乙酰环化途径中，通过鸟氨酸乙酰基转移酶把 N-乙酰鸟氨酸的乙酰基团转移到 L-谷氨酸。由于这种酶，精氨酸生物合成途径在第一和第五酶反应步骤之间重新环化，上述的乙酰环化途径能量上优于线性途径，因为所述的途径一旦从作为供体的乙酰辅酶 A 启动，N-乙酰鸟氨酸就能用作乙酰基团的供体。

本文以谷氨酸棒杆菌 ATCC14067 为出发菌株，采用 PCR 扩增出与精氨酸合成途径相关的基因 *Car*AB、*Arg*D、*Arg*J，并分别对其进行单个基因过量表达；*Arg*D、*Arg*J 基因串联的过量表达；以及对 *Car*AB、*Arg*D、*Arg*J 三个基因的共表达，研究其过量表达对 L-精氨酸产量的影响。摇瓶发酵实验证明，过量表达 *Car*AB、*Arg*D、*Arg*J 基因，能够有效提高 L-精氨酸的产量。尤其是 *Car*AB、*Arg*D、*Arg*J 三个基因的共表达，使 L-精氨酸的产量提高了 2.91 倍。

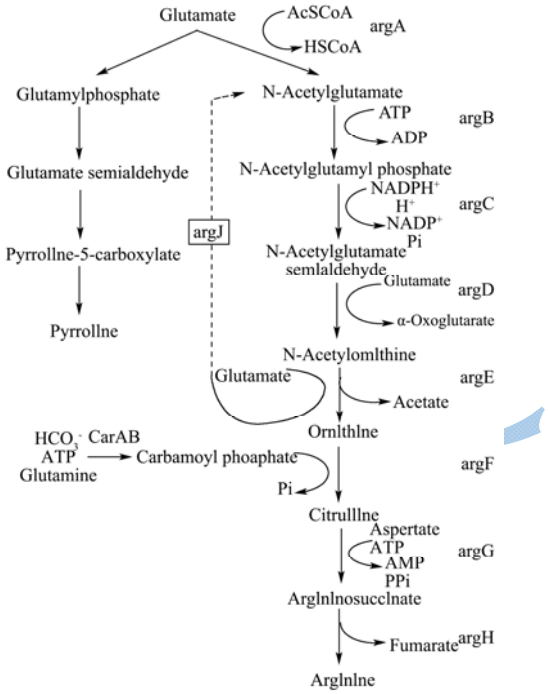


图 1 黄色短杆菌精氨酸生物合成通路及其调控

Fig.1 L-arginine biosynthesis pathway and its regulation in Brevibacterium flavum

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

菌株、质粒见表 1，实验引物见表 2。

表 1 本研究所用的菌种及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and Plasmids	Description	Rf
Strains		
E.coli TOP10	F-，mcrAΔ(mrr-hsd RMS-mcrBC)，φ80，lacZΔM15，△lacX74，recA1，araΔ139Δ(ara-leu)7697，galU，galK，rps，(Strr) endA1，nupG	Store in this lab
ATCC14067	*Brevibacterium flavum/ Corynebacterium glutamicum*	Store in this lab
14067-T18-*Arg*D	ATCC14067 with plamid PEC-T18mob2-*Arg*D	In this work
14067-T18-*Arg*J	ATCC14067 with plamid PEC-T18mob2-*Arg*J	In this work
14067-T18-*Arg*DJ	ATCC14067 with plamid PEC-T18mob2-*Arg*DJ	In this work
14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ	ATCC14067 with plamid pEC-XK99E-p'-*Car*AB-T18-*Arg*DJ	In this work
14067-pEC-*Car*AB	ATCC14067 with plamid pEC-XK99E-p'-*Car*AB	In this work
Plasmids		
pEC-XK99E-p'-*Car*AB	Containing *Car*AB in pEC-XK99E-p'	In this work
PEC-T18mob2-*Arg*D	Containing *Arg*D in PEC-T18mob2	In this work
PEC-T18mob2-*Arg*J	Containing *Arg*J in PEC-T18mob2	In this work
PEC-T18mob2-*Arg*DJ	Containing *Arg*D and *Arg*J in PEC-T18mob2	In this work

1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶 *Xba* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ、*Sma* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ、DL15000 marker、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶，

均购自 TaKaRa 公司；PCR 产物回收试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒均购自 TAKARA 公司；RNA 提取试剂盒 RNeasy midi Kit、PCR 产物凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司；RNA 纯化试剂盒购自 MN 公司 (Nucleospin RNA Clean-up, Macherey Nagel)。

1.3 培养基

LB：蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 5 g/L，NaCl 10 g/L；种子培养基：葡萄糖 20 g/L，蛋白胨 20 g/L，K_2HPO_4 1.5 g/L，KH_2PO_4 0.5 g/L，$MgSO_4·7H_20$ 0.5 g/L，酵母浸出物 10 g/L，biotin 0.005 g/L；发酵培养基：葡萄糖 150 g/L，大豆粉 20 g/L，尿素 3 g/L，K_2HPO_4 0.7 g/L，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g/L，$CaCO_3$ 30 g/L。

1.4 PCR 引物设计及目的片段的扩增

*Car*AB-1、*Car*AB-2 基因分别带有 *Sma* Ⅰ、*Xba* Ⅰ的酶切位点用于扩增 *Car*AB 基因（4529 bp）；D-*Arg*J-P1、D-*Arg*J-P2 基因分别带有 *Kpn* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ的酶切位点用于扩增 *Arg*J 基因（1212 bp）；D-*Arg*D-P1、D-*Arg*D-P2 基因分别带有 *Kpn* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ的酶切位点用于扩增 *Arg*D 基因（1056 bp）；在基因 *Arg*J、*Arg*D 的上下游分别设计有重叠区域的引物 *Arg*J-1、*Arg*J-2、*Arg*D-1、*Arg*D-2，用于重叠延伸 PCR 将 *Arg*J 和 *Arg*D 进行拼接,得到串联基因 *Arg*DJ，酶切位点为 *Kpn* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ；引物均由华大基因合成，具体序列见表 2。

PCR 扩增基因 *Car*AB(*Arg*J、*Arg*D）的反应体系为 50 μL：Primer Star HS 25.0 μL，上下游引物各 0.3 μL，14067 基因组 1.5 μL，H_2O 22.9 μL，总体积 50.0 μL, 混合后进行扩增。PCR 反应程序：95 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min/kb，30 个循环；72 ℃最后延伸 7 min。

串联基因 *Arg*DJ 的扩增，首先扩增出有重叠区的 *Arg*J（引物 *Arg*J-1、*Arg*J-2）及 *Arg*D（引物 *Arg*D-1、*Arg*D-2），然后通过重叠延伸得到串联基因 *Arg*DJ。PCR 扩增串联基因 *Arg*DJ 的反应体系为 50 μL：KOD Buffer 25.0 μL 引物（*Arg*J-1、*Arg*D-2）各 2 μL，模板 *Arg*J、*Arg*D 各 1 μL，dNTP 5.0 μL，KOD 酶 1.0 μL，H_2O 13.0 μL，总体积 50.0 μL，混合后进行扩增。PCR 反应程序：95 ℃预变性 2 min；94 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 3 min，30 个循环；72 ℃最后延伸 10 min。

表 2 目的基因扩增引物

Table 2 Primers for PCR

Primer name	Primer sequence (5’-3’)
*Car*AB-P1	Forward: 5’-TCCCCCGGGGGAGTGAGTAAAGACACCACCACCTA-3’
*Car*AB-P2	Reverse: 5’-TGCTCTAGAGCATTAAGCCTTGACTGCGTGGT-3’
D-*Arg*J-P1	Forward: 5’-GGGGTACCCCATGGCCGAAAAAGGCATTACCGCGC-3’
D-*Arg*J-P2	Reverse: 5’-CGGAATTCCGGCCTGTGCCCTTTTCCCTGCTTG-3’
D-*Arg*D-P1	Forward: 5’-GGGGTACCCCATGAGCACGCTGGAAACTT-3’
D-*Arg*D-P2	Reverse: 5’-CGGAATTCCGAAAACCATCAAGAACAGCTTG-3’
*Arg*J-1	Forward: 5’-GGGGTACCCCATGGCCGAAAAAGGCATTACCGCGC-3’
*Arg*J-2	Reverse: 5’-GCCTGTGCCCTTTTCCCTGCTTGTTAGTTGGAGTGTTGTTTCTTT-3’
*Arg*D-1	Forward: 5’-AAGCAGGGAAAAGGGCACAGGCATGAGCACGCTGGAAACTT-3’
*Arg*D-2	Reverse: 5’-CGGAATTCCGAAAACCATCAAGAACAGCTTG-3’

1.5 重组质粒的构建

1.5.1 表达载体 PEC-T18mob2-*Arg*D 的构建（或 PEC-T18mob2-*Arg*J 和的构建）

将目的片段 *Arg*D（或 *Arg*J) 和表达载体 PEC-T18mob2 均用限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ进行双酶切, 双酶切体系 50 μL：载体或目的基因片段 25.0 μL，10×M buffer 5.0 μL，*EcoR* I、*Kpn* I 各 2.5 μL，补水至 50 μL，37 ℃酶切 12 h。双酶切产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶回收，回收产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收，用于下一步的连接反应。连接反应体系 10 μL：片段 8.0 μL，载体 0.5 μL，T4 连接 E-buffer 1.0 μL，T4 ligase enzyme 0.5 μL，16 ℃连接过夜。将上述连接体系转化入大肠杆菌 TOP10 感受态，涂布于含四环素至终浓度为 0.005 g/L 的 LB 平板上，37 ℃恒温培养 12~16 h。挑选单菌落进行菌落 PCR 鉴定（PCR 体系同前目的基因的 PCR 体系），将鉴定正确的菌落转接入含四环素至终浓度为 0.005 g/L 的 LB 液体培养基中，37 ℃，200 r/min 过夜培养, 提取质粒并进行双酶切鉴定，酶切体系同前。

1.5.2 表达载体 pEC-XK99E-p'-*Car*AB 的构建

目的片段 *Car*AB 和表达载体 pEC-XK99E-p’的酶切体系 50 μL：载体或目的基因片段 25.0 μL，10×M buffer 5.0 μL，*Sma* I、*Xba* I 各 2.5 μL，补水至 50 μL，37 ℃酶切 12 h。连接体系如前 1.5.1 所述。将连接体系转化入大肠杆菌 TOP10 感受态，涂布于含添加卡那

霉素至终浓度为 0.05 g/L LB 平板上，37 ℃恒温培养 12~16 h。鉴定的方法 1.5.1 所述。

1.5.3 串联表达载体 PEC-T18mob2-*Arg*DJ 的构建

将目的片段 *Arg*DJ 和表达载体 PEC-T18mob2 按照表达载体 PEC-T18mob2-*Arg*D 的构建方法进行酶切、回收、连接、转化、鉴定。

1.6 ATCC14067 感受态的制备及电激转化

1.6.1 单表达及串联表达菌株的构建

制备 ATCC14067 的感受态[5~7]，并将构建好的表达载体 PEC-T18mob2-*Arg*D、PEC-T18mob2-*Arg*J、PEC-T18mob2-*Arg*JD 以及 pEC-XK99E-p'-*Car*AB 分别电击转化入 ATCC14067 感受态，涂布于含有终浓度为 0.005 g/L 的四环素的 LB 平板上以及含有终浓度为 0.05g/L 的卡那霉素的 LB 平板上，30 ℃培养箱倒置培养 48~72 h[5~7]，利用鉴定引物进行鉴定，所得到正确重组的菌株分别命名为 14067-T18-*Arg*D、14067-T18-*Arg*J、14067-T18-*Arg*DJ、14067-pEC-*Car*AB。

1.6.2 共表达菌株的构建

将构建好的表达载体 pEC-XK99E-p'-*Car*AB 电击转化 ATCC14067 感受态，涂布于含有终浓度为 0.05 g/L 的卡那霉素平板上。筛选出构建正确的菌株，制备 14067-pEC-*Car*AB 感受态，将表达载体 PEC-T18mob2-*Arg*DJ 电击转化入 14067-pEC-*Car*AB 感受态，涂布于含有卡那霉素至终浓度为 0.05g/L，四环素至终浓度为 0.005 g/L 的 LB 平板上，30 ℃倒置培养 48~72 h，利用鉴定引物进行鉴定，得到正确重组的菌株命名为 14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ。

1.7 重组菌株的发酵、精氨酸产量的检测及相关基因表达量的检测

1.7.1 重组菌的发酵

将平板上活化的重组菌挑取一环接种至种子培养基中，250 r/min，30 ℃过夜培养 24 h。转接于新的种子培养基中，250 r/min，30 ℃培养至生长对数中后期，转接至发酵培养基，控制其初始 OD_{600} 为 1.0，培养 12 h 后添加终浓度为 0.2 g/L 的 IPTG，共发酵 72 h，做三个平行。

1.7.2 发酵液中精氨酸产量的检测

发酵结束后，取发酵液 1 mL 于 10000 rpm 离心 5 min，取上清，用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤，用于 HPLC 检测精氨酸产量[8]。色谱条件如下，色谱仪为 Waters1525，色谱柱为 Agilent 20RBAXSB-C18 （416 mm×150 mm，5 μm），洗脱条件：流动相 A（pH 6.4 的醋酸钠缓冲溶液）：流动相 B（800 mL/L 的乙腈）=91:9；流速，1 mL/min；检测波长，254 nm；进样量，10 uL；柱温，43 ℃。

1.8 目的基因表达量的荧光定量 PCR 检测

取谷氨酸棒杆菌发酵 12 h 的发酵液，离心取上清，放入液氮中保存，用于提取总 RNA。根据 NCBI 查得的序列，用 Primer Premier 5.0 设计引物。所用引物见表三，基因由华大基因合成。发酵菌株总 RNA 的提取，方法参照 RNA 提取试剂盒 RNeasy midi Kit （QIAGEN），将提出的总 RNA 进行反转录反应获得其 cDNA。进行实时荧光定量 PCR 反应，选取谷氨酸棒杆菌 *dna*E 为内参基因，*Car*AB、*Arg*D、*Arg*J 基因为靶基因。荧光定量 PCR 反应体系（20 μL）及方法如下：SYBR® Premix Ex Taq ™ II（2×）10 μL；正向引物（10 μM）0.8 μL；反向引物（10 μM）0.8 μL；ROX Reference Dye II 0.4 μL；模板（cDNA 溶液）2.0 μL；超纯水 6.0。反应程序：预变性，95 ℃，30 s，1 个循环；变性，95 ℃，5 s；退火/延伸 60 ℃，34 s，40 个循环；融解曲线，机器自动设置；每个反应均做 3 孔重复。

表 3 荧光定量 PCR 引物

Table 3 Primers for RT-qPCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
RT-*Car*A-1	Forward: GACCTGGGCATTAAGCAAAACAC
RT-*Car*A-2	Reverse: GCCTGATGGGTTGTACTGCTTGAT
RT-*Car*B-1	Forward: CCCTGGGCCGTAACTACAT
RT-*Car*B-2	Reverse: TCCCCTGCGAAGAACTCAT
RT-*Arg*D-1	Forward: TACCCTTACGGCGACACCGATTAC
RT-*Arg*D-2	Reverse: CGCCCGTTTCACCCTGGATT
RT-*Arg*J-1	Forward: GCATCGTTGAGTTCGTCCTG
RT-*Arg*J-2	Reverse: CCGTTACGTTTGACACCCTGGAT

2 结果与讨论

2.1 重组质粒 PEC-T18mob2-*Arg*D、PEC-T18mob2-*Arg*J、PEC-T18mob2-*Arg*DJ 及 pEC-XK99E-p'-*Car*AB 的构建

将上述 1.5.1、1.5.2、1.5.3 中经菌落 PCR 鉴定连接成功的菌落进行液体培养，提取重组质粒 PEC-T18mob2-*Arg*D、PEC-T18mob2-*Arg*J、PEC-T18

mob2-*Arg*DJ、pEC-XK99E-p'-*Car*AB，将质粒 PEC-T18mob2-*Arg*D、PEC-T18mob2-*Arg*J 及 PEC-T18mob2-*Arg*DJ 用 *EcoR* I、*Kpn* I 进行双酶切鉴定，双酶切能够分别切出与 *Arg*D、*Arg*J 及 *Arg*DJ 大小相符的条带，说明 PEC-T18mob2-*Arg*D、PEC-T18mob2-*Arg*J、PEC-T18mob2-*Arg*DJ 构建成功；质粒 pEC-XK99E-p'-*Car*AB 用 *Sma* I、*Xba* I 进行双酶切鉴定，双酶切能够切出与 *Car*AB 大小相符的条带，说明 pEC-XK99E-p'-*Car*AB 构建成功。电泳检测如图 2。

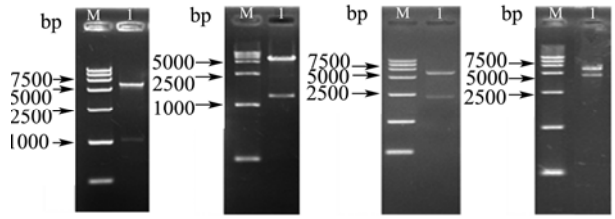


图 2 重组质粒 PEC-T18mob2-*Arg*D、PEC-T18mob2-*Arg*J、PEC-T18mob2-*Arg*DJ、pEC-XK99E-p'-*Car*AB 的双酶切图谱

Fig.2 Restriction map of PEC-T18mob2-*Arg*D、PEC-T18mob2-*Arg*J、PEC-T18mob2-*Arg*DJ and pEC-XK99E-p'-*Car*AB

注：a: M: DNA Marker DL15000bp ladder; 1: 经 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切的 PEC-T18mob2-*Arg*D; b: M.DNA Marker DL15000bp ladder; 1: 经 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切的 PEC-T18mob2-*Arg*J; c: M: DNA Marker DL15000bp ladder; 1: *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切的 PEC-T18mob2-*Arg*DJ; dD: M.: DNA Marker DL15000bp ladder; 1: 经 *Sma* I、*Xba* I 双酶切的 pEC-XK99E-p'-*Car*AB。

2.2 实时荧光定量 PCR 法对过量表达基因 *Car*AB、*Arg*D、*Arg*J 的检测

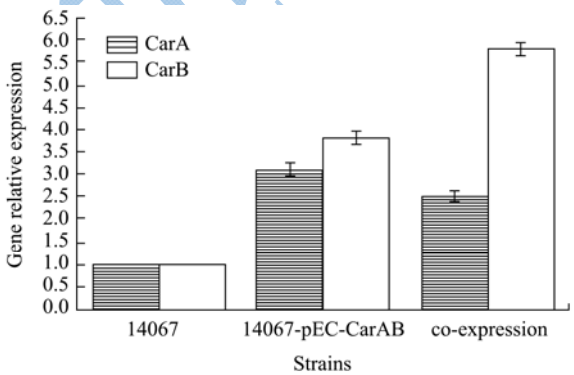


图 3 *Car*A、*Car*B 基因的表达量

Fig.3 Expression quantitation of *Car*A, *Car*B

注：Co-expression: 14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ。

以谷氨酸棒杆菌的 *dna*E 基因作为内参基因，对菌株 ATCC14067、14067-pEC-*Car*AB、14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ 中的 *Car*AB 基因进行荧光定量 PCR 扩增；ATCC14067、14067-T18-*Arg*D、14067-T18-*Arg*DJ、14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ 中的 *Arg*D 基因进行荧光定量 PCR 扩增；ATCC14067、14067-T18-*Arg*J、14067-T18-*Arg*DJ、14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ 中的 *Arg*J 基因进行荧光定量 PCR 扩增，结果见图 3。

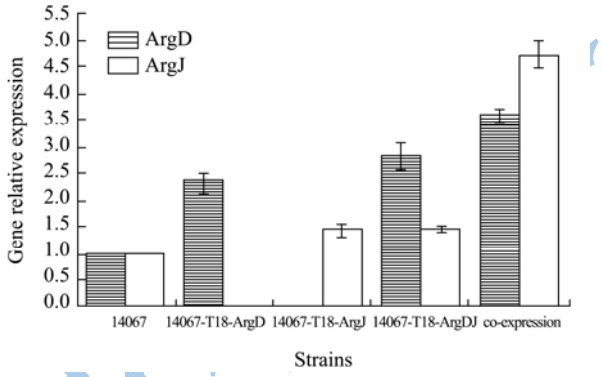


图 4 ArgD、ArgJ 基因的表达量

Fig.4 Expression quantitation of *Arg*D、*Arg*J

注：Co-expression：14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ。

菌株 14067-pEC-*Car*AB、14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ 中 *Car*A 基因的表达量分别为菌株 ATCC14067 的 3.10 倍、2.50 倍，表明 *Car*A 的过量表达是有效的；菌株 14067-pEC-*Car*AB、14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ 中 *Car*B 基因的表达量分别为菌株 ATCC14067 的 3.80 倍、5.80 倍，表明 *Car*B 的过量表达是有效的；菌株 14067-T18-*Arg*D、14067-T18-*Arg*DJ、14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ 中 *Arg*D 基因的表达量分别为菌株 ATCC14067 的 2.27、2.85、3.59 倍，表明 *Arg*D 的过量表达是有效的；菌株 14067-T18-*Arg*J、14067-T18-*Arg*DJ、14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ 中 *Arg*J 基因的表达量分别为菌株 ATCC14067 的 1.46 倍、1.45、4.70 倍，表明 *Arg*D 的过量表达是有效的。

2.3 重组菌的精氨酸产量

将 ATCC14067、14067-pEC-*Car*AB、14067-T18-*Arg*D、14067-T18-*Arg*J、14067-T18-*Arg*DJ、14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ 六株菌进行发酵，利用 HPLC 检测其发酵液中的精氨酸的产量。如图 5 所示，其精氨酸产量分别为 1.01 g/L、1.63 g/L、1.15 g/L、1.20 g/L、1.29 g/L、2.94 g/L，其精氨酸产量分别提高了 1.61、

1.14、1.19、1.28、2.91 倍。

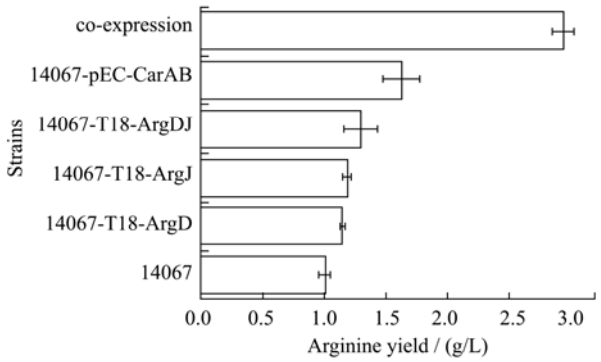


图 5 过量表达菌株的精氨酸产量

Fig.5 Arginine production of the overexpression strains

3 结论

3.1 利用大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌的穿梭质粒 pEC-XK99E-p’和 PEC-T18mob2 对黄色短杆菌 ATCC14067 精氨酸合成途径的关建酶的基因 *Arg*D、*Arg*J、*Car*AB 进行单表达、串联表达、共表达，分别得到 ATCC14067、14067-pEC-*Car*AB、14067-T18-*Arg*D、14067-T18-*Arg*J、14067-T18-*Arg*DJ、14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ 六株菌。这六株菌产精氨酸的能力较出发菌株 ATCC14067 分别提高了 1.61、1.14、1.19、1.28、2.91 倍。产量最高的菌株 14067-pEC-*Car*AB-T18-*Arg*DJ 中 *Car*A、*Car*B、*Arg*D、*Arg*J 基因的表达量分别是出发菌株 ATCC14067 的 2.50 倍、5.60 倍、3.59 倍、4.70 倍。

3.2 这些结果表明，过量表达精氨酸合成途径的关建酶对提高精氨酸的产量，能够有效提高 L-精氨酸的产量。本文为定向优化 L-精氨酸的代谢流，提高 L-精氨酸产量奠定了基础。但是最大量的提高精氨酸的产量，仍需要调控整个精氨酸合成途径中相关的酶间的比例，从而降低整个代谢途径的负担，从而进一步提高精氨酸的产量。

参考文献

[1] 刘飞.钝齿棒杆菌 N-乙酰谷氨酸激酶编码基因 argB 的克隆表达研究[D].无锡市:江南大学,2008

LIU Fei.Cloning and Expression of acetylglutamate kinase from Corynebacterium Crenatum [D]. WuXi city: Jiangnan University, 2008

[2] LV Yangyong, Liao Juan-jun, Wu Zhanhong, et al. Genome Sequence of Corynebacterium glutamicum ATCC14067, Provides Insight into Amino Acid Biosynthesis in Coryneform Bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(3): 742-743

[3] Vehary Sakanyan, Pavel Petrosyan, Michele Lecocq, et al. Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in Corynebacterium glutamicum: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway [J]. Microbiology, 1996, 142: 99-108

[4] Nicolas Glansdorff, YingXu. Microbial Arginine Biosynthesis: Pathway, Regulation and Industrial Production [M]. Berlin,Springer Berlin Heidelberg, 2007

[5] M E vander Rest, C Lange, D Molenaar. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of Corynebacterium glutamicum with xenogeneic plasmid DNA [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(4): 541-545

[6] 蔡冬梅.精氨酸高产菌株钝齿棒杆菌中 argJ 基因的功能研究[D].无锡市:江南大学,2009

CAI Dong-Mei. The function investigation of argJ gene in an L-arginnine hyper-producing strains Corynebacterium Crenatum [D]. WuXi city: Jiangnan University, 2009

[7] A Tauch, A Puhler, J Kalinowski, et al.Plasmids in Corynebacterium glutamicum and their molecular classification by comparative genomics [J]. Journal of Biotechnology, 2003, 104(1): 27-40

[8] 郑灏,程显隆,魏锋,等.雷丸中 16 种氨基酸的柱前衍生化 RP-HPLC 法含量测定[J].药物分析杂志,2011,31(9): 1631-1635

ZHENG Hao, CHENG Xian-Long, WEI Feng, et al. Pre-column derivatization RP-HPLC determation of 16 amino acids in omphalia lapidescens Schroet [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(9): 1631-1635