

大肠杆菌 *cdd* 和 *thrA* 基因的敲除及其对胞苷积累量的影响

方海田^{1,2}, 周运佼¹, 谢希贤¹, 徐庆阳¹, 陈宁¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457) (2. 宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021)

摘要: 以大肠杆菌 AU39 作为出发菌株, 通过基因工程手段对其进行改造, 旨在提高胞苷产量。首先, 通过 Red 重组系统敲除了大肠杆菌 AU39 基因组上的胞苷脱氨酶基因 *cdd*, 阻断了胞苷的分解代谢; 敲除了 *E. coli* AU39 (Δcdd) 基因组上的高丝氨酸脱氨酶基因 *thrA*, 阻断天冬氨酸向高丝氨酸的代谢途径。然后, 分别对不同基因缺失菌株进行培养发酵, 与出发菌株 *E. coli* AU39 相比, 两株突变株都有不同程度的胞苷积累, *E. coli* AU39 (Δcdd) 与 *E. coli* AU39 ($\Delta cdd\Delta thrA$) 的胞苷产量提高了 1.25 倍与 1.6 倍, 而尿苷产量均相对有所降低。

关键词: 大肠杆菌; 胞苷; 基因敲除

文章编号: 1673-9078(2012)10-1306-1310

Effect of Gene knockout of *cdd* and *thrA* on Cytidine Production in *E. coli*

FANG Hai-tian^{1,2}, ZHOU Yun-jiao¹, XIE Xi-xian¹, XU Qing-yang¹, CHEN Ning¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

(2. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In order to develop a host strain to produce cytidine, a synthetic pathway has been constructed for the production of cytidine from glucose in *Escherichia coli*. Cytidine deaminase *cdd* gene was deleted from an *E. coli* AU39 wild type strain to develop AU39 (Δcdd). Then homoserine dehydrogenase gene (*thrA*) was deleted from an AU39 (Δcdd) strain to develop AU39 ($\Delta cdd\Delta thrA$), the intracellular concentration of aspartate was expected to be increased. Compared with the cytidine production in AU39, the cytidine production in AU39 (Δcdd) and AU39 ($\Delta cdd\Delta thrA$) were increased by 1.25 and 1.6-folds. It was concluded that a cytidine-producing strain with a relatively high yield can be developed using a metabolic engineering approach.

Key words: *Escherichia coli*; cytidine; gene knockout

嘧啶核苷是一类主要的核苷物质, 主要包括尿嘧啶核苷和胞嘧啶核苷。嘧啶核苷是多用途的核苷, 嘧啶核苷的医用价值较广泛, 在美国, 核酸类药物近年来在抗病毒、抗肿瘤、治疗艾滋病药物方面显示了不可替代的作用。胞嘧啶核苷(cytosine riboside)又名胞苷(cytidine), 胞啶, 1- β -D-呋喃核苷胞嘧啶^[1,2]。胞苷作为嘧啶核苷, 主要用于生产抗肿瘤、抗病毒药物的中间体, 是制造阿糖胞苷(Ara-CR)、环胞苷(Cyclo C)、三磷酸胞苷(CTP)、胞二磷胆碱(CDP-Choline)等药物的主要原料^[2,3]。随着抗病毒、抗肿瘤、治疗艾滋病药物研制的深入, 对天然嘧啶核苷的需求量加大, 人们期望得到廉价的、能大规模生产胞苷的工艺方法。于是, 发酵法生产胞苷的研究也日益得到更广泛的重视

收稿日期: 2012-06-25

基金项目: 天津科技大学科学研究基金 (20100211)

作者简介: 方海田 (1978-), 男, 博士研究生

通信作者: 陈宁, 教授

^[2,4]。采用微生物发酵法生产胞苷, 具有条件简单、成本低、产率高、周期短、控制容易等优势, 是大规模生产胞苷的首选技术。经过传统诱变得到的菌株会产生大量次级突变, 具有菌体生长速度慢等弱点, 是目前工业生产中难以解决的问题。基因工程技术改造菌株, 如基因克隆、基因敲除等, 因其无次级突变、改造目的性强、实验周期短等优势^[4]逐渐受到人们的重视。

在大肠杆菌胞苷从头合成途径中, 天冬氨酸是一个重要的前体物质^[5,6], 与氨甲酰磷酸在天冬氨酸转氨甲酰酶的作用下反应生成氨甲酰天冬氨酸, 而胞苷脱氨酶使胞苷进一步反应生成尿苷^[5,7]。本文为了提高胞苷产量, 利用 Red 重组系统^[8-11]敲除了胞苷脱氨酶基因 *cdd*, 以切断胞苷进一步代谢为尿苷的分解途径; 敲除了高丝氨酸脱氢酶基因 *thrA*, 以增强天冬氨酸向嘧啶合成途径的分流量, 阻断天冬氨酸向高丝氨酸、苏氨酸的分流途径^[12,13]。发酵研究表明, 经过这些改

造后,胞苷产量有了不同程度的提高,这为进一步选育胞苷生产菌奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Escherichia coli AU39 是本实验室经过诱变而得到的一株胞苷产生菌株。pMD18-T、pKD3(含有氯霉素抗性基因)、pKD46(温敏型复制子,含有受 P_{araB} 启动子调控的 *exo*、*bet*、*gam* 基因, Amp^r)、pCP20(同时含有氯霉素和氨苄青霉素抗性基因)由天津科技大学代谢工程研究室保存。

1.2 试剂与试剂盒

PCR 引物,北京华大基因公司;Taq DNA 聚合酶,1,000 bp marker, Fermentas 公司;L-阿拉伯糖,北京新经科生物技术公司;DNA 片段胶回收试剂盒,北京天恩泽基因科技有限公司;基因组 DNA 的提取试剂盒、质粒小样快速提取试剂盒,北京博迈德公司;IPTG、X-gal、溶菌酶、氨苄青霉素及氯霉素,北京索莱宝公司;蛋白胨、酵母粉, Oxoid 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 15, (NH₄)₂SO₄ 2, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O 1, 酵母粉 1, 玉米浆 1 mL/L, V_H 0.3 mg/L, V_{B1} 1.3 mg/L, FeSO₄·7H₂O 2.8 mg/L, MnSO₄·H₂O 1.2 mg/L, pH 7.0~7.2, 消泡剂若干滴。灭菌条件: 115 °C, 20 min。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 15, (NH₄)₂SO₄ 1.8, K₂HPO₄ 7, MgSO₄·7H₂O 2, 酵母粉 1, 玉米浆 2 mL/L, FeSO₄·7H₂O 80 mg/L, 钼酸铵 0.84 μg/L, 硼酸 15 μg/L, CoCl₂·6H₂O 4.2 μg/L, MnSO₄·H₂O 1.5 μg/L, CuSO₄·7H₂O 1.5 μg/L, ZnSO₄·7H₂O 1.8 μg/L, 苯酚红 (0.1%) 20 mL/L, pH 7.0~7.2, 消泡剂若干滴。灭菌条件: 115 °C, 20 min。

1.4 引物设计

根据 NCBI 上报道的 pKD46 序列与 pKD3、*E. coli* K-12 MG1655 标准株^[14]胞苷脱氨酶编码基因 *cdd* 和高丝氨酸脱氨酶编码基因 *thrA* 的基因序列,采用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 pKD46 鉴定引物和同源片段扩增引物以及敲除菌落鉴定引物。本文所用引物见表 1,均由北京华大基因公司合成。

1.5 实验方法

1.5.1 利用 Red 重组系统构建大肠杆菌 *cdd* 基因缺失株

感受态的制备^[9]: 将含有 pKD46 的大肠杆菌 AU39 接种, 30 °C 过夜培养 12 h, 2% 接种至 100 mL

的 LB 培养基(氨苄青霉素的质量浓度为 100 μg/mL), 30 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.2~0.3 时, 加入 L-阿拉伯糖至 100 mmol/L, 继续培养 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6, 充分表达 pKD46 上的 *Exo*、*Bet* 和 *Gam* 3 个蛋白。菌体预冷至 4 °C, 10000 r/min 离心 10 min, 弃培养基, 用预冷的无菌水洗涤 1 次, 用预冷的 10% 甘油离心洗涤 3 次, 用 600 μL 预冷的 10% 甘油重悬细胞, 每管 50 μL 分装, 存放于 -80 °C 冰箱待用。

表 1 本实验中所用引物

Table 1 Primers in this study

Gene	Direction	Sequence (5'→3')
P1 ^a		CCA ^{ACTT} GGCGATA ^{ACTT} GCAATCTGCA
		CTGGAACCTATTCTGGCAGACAAGTACT TTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAG
P2 ^a		TGTGACAGCCGAGAGCTTTCAGCGTTGC
		GGAGGTGGCATCCCACTGAATCAACGGC TAACGGCTGACATGGGAATTAGC
N1		ATCCACGTTTTCAAACCGCTTTTGC
		TAAGCGAGAAGCACTCGGTTCGATAC
P3 ^a		CGAGTGTGAAGTTCGGCGGTACATCAG
		TGGCAAATGCAGAACGTTTTCTGCGTGT TTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAG
P4 ^a		CATCAAACCCGACGCTCATATTGGCACTG
		GAAGCCGGGGCATAAACTTTAACCATGT AACGGCTGACATGGGAATTAGC
N3		GACGCGTACAGGAAACACAG
		GCCTCAACCGTGACTACATCT
pKD46	S	GGGAATTTCGAGCTCTAAGGAGGTT
	A	GTCATCGCCATTGCTCCCCAAATAC

注: ^a Underline sequences are priming site sequences for template pKD3。

氯霉素抗性基因片段的扩增: 以质粒 pKD3 为模板, P1、P2 为引物, PCR 扩增出含有氯霉素抗性基因的目的片段。

氯霉素抗性基因替换拟敲除的目的基因 *cdd*: 将扩增得到的 1166 bp 片段约 120 ng 加入上述制备好的感受态细胞中, 混匀, 转入 2 mm 电击杯中, 用 Bio-Rad 电击仪做电转化^[9,10]。电击电压 1.8 kV, 电击时间为 5~6ms, 电击后迅速加入 1 mL 的 SOC 培养基, 165 r/min, 37 °C 培养 2 h 后涂于含有氯霉素的平板(氯霉素质量浓度为 34 μg/mL)上。过夜培养后用菌落 PCR 鉴定含氯霉素抗性基因的重组菌。

抗性基因的消除及鉴定: pCP20 质粒^[10,11,15]含有一个翻转重组酶(FLP)基因, 42 °C 诱导表达的 FLP 重组酶可以与 FRT 位点结合, FRT 位点自身发生同源重

组,从而消除一个 FRT 位点及抗性基因。pCP20 的复制起点为温度敏感型,在 42 °C 高温下不能复制。

将 pCP20 转入氯霉素抗性克隆,37 °C 复苏 2 h,在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素平板上筛选转化子。筛选的转化子 42 °C 过夜培养,分别涂布于含 25 μg/mL 氯霉素平板和无抗性平板,挑选在无抗性平板上生长而在氯霉素平板上不生长的单菌落即为抗性基因消除的菌株。以 N1、N2 为引物,对氯霉素抗性消失的克隆进行 PCR 鉴定,PCR 产物进行测序验证。

1.5.2 利用 Red 重组系统构建大肠杆菌 thrA 基因缺失株

将扩增出的氯霉素抗性基因片段转化到含有质粒 pKD46 的 AU39 (*Δcdd*)感受态细胞中,37 °C 复苏 2 h 后涂布于氯霉素抗性平板上培养约 24 h。以 P3、P4 为引物,PCR 鉴定氯霉素抗性平板上长出来的阳性转化子。将 pCP20 转入氯霉素抗性克隆,37 °C 复苏 2 h,在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素平板上筛选转化子。挑选出的转化子 42 °C 培养过夜后,分别涂布于氯霉素抗性平板和无抗性平板,挑选在无抗性平板上生长而在氯霉素平板上不生长的单菌落,用鉴定引物 N3、N4 作进一步测序鉴定。

1.5.3 菌体浓度测定

取 0.2 mL 待测液,加入 9.8 mL,0.25 mol/L 的盐酸以溶解溶液中的碳酸钙,摇匀,以空白培养液为对比,752 型分光光度计测定 OD₆₀₀。

1.5.4 分析测定

采用 HPLC 测定发酵产生的胞苷、尿苷、尿嘧啶和胞嘧啶^[4,16]。

2 结果与讨论

2.1 cdd 基因敲除及鉴定

在 pKD46 的辅助下,成功敲除了 *E. coli* AU39 菌株 *cdd* 基因。*cdd* 基因敲除前用鉴定引物 PCR 扩增出的片段为 851 bp,敲除后用鉴定引物 PCR 扩增出的片段为 1274 bp。氯霉素抗性基因缺失后,用鉴定引物 PCR 扩增出的片段为 286 bp。结果显示:PCR 扩增的目的条带与理论值一致,如图 1(a)所示。测序结果为:.....ATCCACGTTTTCAAACCGCTTTTGCCCAACTTGC GGATAACTTGCAATCTGCACTGGAACCTATTCTG GCAGACAAGTACTTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGA GAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGG ACCATGGCTAATCCCATGTTCAGCCGTTAATCATGGTT AAAGTTTATGCCCGGCTTCCAGTGCCAATATGA GCGTTCGGTTTGATGTGCTCGGGGCGGCGGTGA CACCTGTTGATGGTGCATTGCTCGGAGATGTAGT CACGGTTGAGGC.....

TGAAAGCTCTCGGCTGTCACAGTATCGACCGAG TGCTTCTCGCTTAA.....

注:斜体加粗部分为 pKD3 上的序列,其中方框部分为 FRT 位点;其余部分为 *cdd* 中未替换部分。

胞苷脱氨酶结构基因 *cdd* 全长 885 bp,结果显示,经反敲除后,773 bp 缺失,被 pKD3 上 124 bp 片段替换,故认为已完全失活。

2.2 thrA 基因敲除及鉴定

在 pKD46 的辅助下,成功敲除了 *E. coli* AU39 (*Δcdd*)菌株 *thrA*。*thrA* 基因敲除前用鉴定引物 PCR 扩增出的片段为 2463 bp,敲除后用鉴定引物 PCR 扩增出的片段为 1200 bp。氯霉素抗性基因缺失后,用鉴定引物 PCR 扩增出的片段为 386 bp。结果显示:琼脂糖凝胶电泳结果与理论值一致,如图 1(b)所示。测序结果为:.....GACGCGTACAGGAAACACAGAAAAAAGCCCGC ACCTGACAGTGCGGGCTTTTTTTTCGACCAA GGTAAACGAGGTAACAACCATGCGAGTGTTGAAG TTCGGCGGTACATCAGTGGCAAATGCAGAACGT TTTCTGCGTGTGTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGA ACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGG ACCATGGCTAATCCCATGTTCAGCCGTTAATCATGGTT AAAGTTTATGCCCGGCTTCCAGTGCCAATATGA GCGTTCGGTTTGATGTGCTCGGGGCGGCGGTGA CACCTGTTGATGGTGCATTGCTCGGAGATGTAGT CACGGTTGAGGC.....

注:斜体加粗部分为 pKD3 上的序列,其中方框部分为 FRT 位点;其余部分为 *thrA* 中未替换部分。

高丝氨酸脱氢酶结构基因 *thrA* 全长 2463 bp,结果显示,经反敲除后,2404 bp 缺失,被 pKD3 上 124 bp 片段替换,故认为已完全失活。

2.3 基因改造对菌体生长的影响

将出发菌株大肠杆菌 AU39、敲除了 *cdd* 基因的 AU39 (*Δcdd*)和 AU39 (*ΔcddΔthrA*)摇瓶发酵 40 h,根据发酵液不同时期的吸光度绘制生长曲线,如图 2 所示。结果表明,敲除 *cdd* 基因其生长曲线与出发菌株 AU39 基本一致,它们到达对数生长期与进入稳定期的时间无明显差别,由此说明,敲除 *cdd* 基因对大肠杆菌 AU39 的生长状况没有太大影响,这可能是补救途径的存在而引起的。而敲除 *thrA* 基因后,菌株生长周期加长,其到达对数生长期延长了 1 h,且菌体浓度最高只能达到 2.423,原因可能是基因缺失导致营养缺陷,对菌株的生长造成了一定的压力。

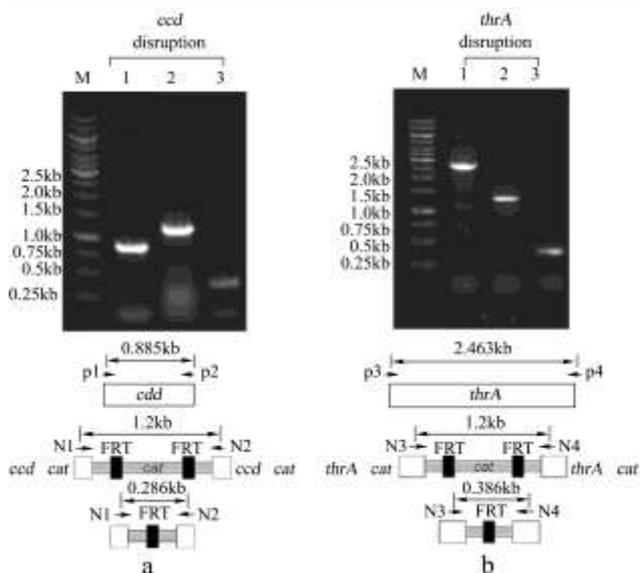


图1 *cdd*和 *thrA*基因缺失突变株的PCR验证分析

Fig.1 PCR analysis of two disruption mutants

注：(A) *cdd*基因的敲除。M, size marker; lane 1, *cdd* (0.851 kb); lane 2, *cdd::cat* (1.2 kb); lane 3, *cdd-cdd* (0.4 kb), represented to *cdd*; (B) *thrA*基因的敲除。M, size marker; Lane 1, *thrA* (2.463 kb); lane 2, *thrA::cat* (1.2 kb); lane 3, *thrA-thrA* (0.4 kb)。

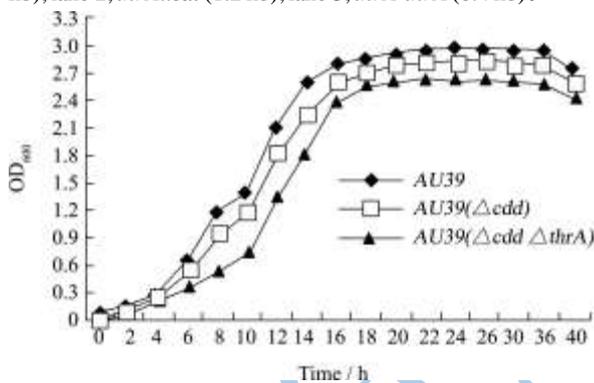


图2 大肠杆菌 AU39、AU39 (Δcdd) 和 AU39 ($\Delta cdd \Delta thrA$) 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *E.coli* AU39, AU39 (Δcdd) and AU39 ($\Delta cdd \Delta thrA$)

2.4 敲除 *cdd* 基因和 *thrA* 基因对大肠杆菌胞苷积累的影响

将 *cdd* 基因缺失突变株 AU39 (Δcdd)和敲除 *thrA* 基因的 AU39 ($\Delta cdd \Delta thrA$)进行摇瓶发酵实验, 同时以出发菌株大肠杆菌 AU39 作为对照菌株, HPLC 分析胞苷和尿苷的变化。结果如图 3 所示, *cdd* 基因缺失突变株 AU39 (Δcdd)胞苷产量为(0.151±0.012) g/L, 较出发菌株 AU39 的(0.121±0.012) g/L 略有提高, 是 AU39 的 1.25 倍, 而尿苷产量明显降低, 说明敲除 *cdd* 基因可有效地阻断嘧啶代谢通量由胞苷流向尿苷和尿嘧啶, 使胞苷有所积累。敲除 *thrA* 基因后, 对比 AU39, AU39($\Delta cdd \Delta thrA$)的胞苷产量增加到了 (0.190±0.026)

g/L, 是 AU39 的 1.6 倍, 说明敲除 *thrA* 基因能有效阻断天冬氨酸向高丝氨酸的代谢, 使天冬氨酸向胞苷合成途径的分流量有所增加。同时, 尿苷、尿嘧啶和胞嘧啶的产量也略有增加, 可以显著增强嘧啶代谢途径, 促使胞苷产量显著提高。

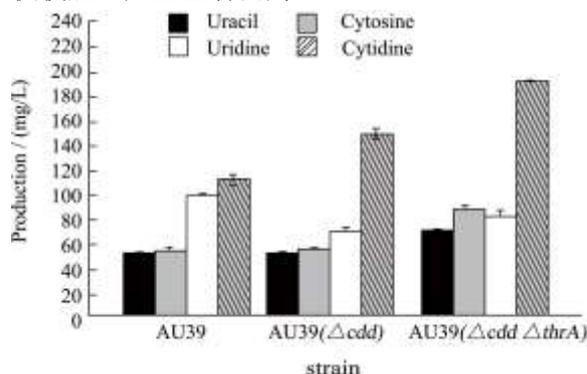


图3 大肠杆菌 AU39、AU39 (Δcdd) 和 AU39 ($\Delta cdd \Delta thrA$) 胞苷产量的比较

Fig.3 Cytidine yield of *E.coli* AU39, AU39 (Δcdd) and AU39 ($\Delta cdd \Delta thrA$)

3 结论

3.1 目前, 利用发酵法生产胞苷的菌株大部分为芽孢杆菌属, 主要原因是芽孢杆菌属的嘧啶核苷代谢通量大, 是适合选育胞苷产生菌的菌株之一, 但该菌是革兰氏阳性菌, 载体受体系统研究少, 且有质粒不稳定的障碍, 所以采用基因工程技术修饰改造枯草芽孢杆菌难度较大, 相关的研究报道也较少。相比于枯草芽孢杆菌, 大肠杆菌具有遗传背景清晰、基因操作简单和异源基因兼容性好等特点, 已成为基因工程研究方面应用最广泛的宿主菌。

3.2 基于大肠杆菌在基因工程操作方面的优势, 本文选择大肠杆菌作为出发菌株。首先, 利用 Red 重组系统敲除了大肠杆菌 AU39 上的胞苷脱氨酶基因 *cdd* 和高丝氨酸脱氢酶基因 *thrA*, 构建出 AU39 (Δcdd)和 AU39 ($\Delta cdd \Delta thrA$), 通过发酵研究表明, 与出发菌株相比, 突变菌株的胞苷产量分别提高了近 2 倍, 尿苷降低了近 75%, 说明阻断胞苷降解通路对提高胞苷浓度也是必要的, 阻断高丝氨酸途径, 增加天冬氨酸分流量对胞苷积累是有作用的。

参考文献

[1] 姜妍,许爱军.国内外抗病毒药物研发进展[J].黑龙江医药, 2006,19(5):388
 [2] 方海田,谢希贤,徐庆阳,等.微生物发酵法生产胞嘧啶核苷的研究进展[J].发酵科技通讯,2010,39(3):48-51
 [3] 魏志强,徐庆阳,刘淑云.枯草芽孢杆菌生产胞苷的途径分析

- [J].现代食品科技,2008,24(6):544-547
- [4] 苏静,黄静,谢希贤,等.枯草芽孢杆菌*ald*基因敲除及对胞苷发酵的影响[J].生物技术通讯,2010,21(1):39-42
- [5] Kevin D Loh, Prasad G, Eirene Markenscoff P, et al. A previously undescribed pathway for pyrimidine catabolism [J]. PNAS, 2006, 103(13): 5114-5119
- [6] Switzer R L. Discoveries in bacterial nucleotide metabolism [J]. Biol chem., 2009, 284(11): 6585-6594
- [7] 孙占敏,张克旭,陈宁.胞苷产生菌的选育[J].现代食品科技, 2006,22(3):284-285
- [8] Kirill A, Datsenko K A, B L Wanner. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products [J]. PNAS, 2000, 97: 6640-6645
- [9] Lee H C, Kim J H, Kim J S, et al. Fermentative production of thymidine by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain [J]. Appl and Environmental Microbiol, 2009, 75(8): 2423-2432
- [10] Benoît D, Gregory D, Hayette T, et al. Antibiotic marker modifications of λ -Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains [J]. Microbiol Methods, 2008, 75: 359-361
- [11] Murphy K C, K G Campellone, A R Poteete. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli* [J]. Gene, 2000, 246: 321-330
- [12] Satoru Asahi, Yutaka Tsunemi, Muneharu Doi. Effects of homoserine dehydrogenase deficiency on production of cytidine by mutants of *Bacillus subtilis* [J]. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(2): 353-354
- [13] S Morbach á R, Kelle á S, Winkels á H, et al. Engineering the homoserine dehydrogenase and threonine dehydratase control points to analyse flux towards L-isoleucine in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 45: 612-620
- [14] Blattner FR, Plunkett III G, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 [J]. Science, 1997, 277: 1453-1462
- [15] Tomoya Baba, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection [J]. Mol Systems Biol, 2006, 8: 1-11