

# 串联表达 NAD 激酶和谷氨酸脱氢酶基因 对 L-谷氨酸产量的影响

张大龙<sup>1,2,3</sup>, 徐庆阳<sup>1,2,3</sup>, 张成林<sup>1,2,3</sup>, 邱博<sup>4</sup>, 万红兵<sup>4</sup>, 王晋<sup>4</sup>, 谢希贤<sup>1,2,3</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457) (2. 天津市氨基酸高效绿色制造工程实验室, 天津 300457)  
(3. 代谢控制发酵技术国家地方联合工程实验室, 天津 300457) (4. 北京轻发生物技术中心, 北京 100037)

**摘要:** 由 *ppnk* 和 *gdh* 编码的 NAD 激酶和谷氨酸脱氢酶是 L-谷氨酸合成途径中的两个重要酶。以谷氨酸生产菌 CN1021 基因组为模板 PCR 扩增 *ppnk* 和 *gdh* 基因并转化至该菌中, 检测上述两个基因单独表达和串联表达对 L-谷氨酸产量的影响。结果表明, 当两个基因单独过表达时, 其酶活性分别提高 2.4 和 2.1 倍, L-谷氨酸产量分别提高 7.9% 和 1.4%。当将两个基因串联表达时, 其酶活性分别提高 2.0 和 1.5 倍, L-谷氨酸的产量却提高了 13.2%。说明过表达 *ppnk* 和 *gdh* 能够有效提高 L-谷氨酸产量, 且具有协同作用。

**关键词:** NAD 激酶; 谷氨酸脱氢酶; 谷氨酸生产菌 CN1021; 基因串联表达

文章编号: 1673-9078(2013)1-1555-1558

## Effect of Co-expression of *ppnk* and *gdh* on L-glutamate Production

ZHANG Da-long<sup>1,2,3</sup>, XU Qing-yang<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Cheng-lin<sup>1,2,3</sup>, QIU Bo<sup>4</sup>, WAN Hong-bing<sup>4</sup>, WANG Jin<sup>4</sup>,  
XIE Xi-xian<sup>1,2,3</sup>

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

(2. Tianjin Engineering Lab of Efficient and Green Amino Acid Manufacture, Tianjin 300457, China)

(3. National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin 300457, China)

(4. Beijing Qingfa Biotechnology Center, Beijing 100037, China)

**Abstract:** The *ppnk* and *gdh* encoding NAD kinase (NADK) and glutamate dehydrogenase (GDH) were two important enzymes in the glutamate biosynthesis pathway. The two genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the glutamate-producing strain CN1021. The specific activity of NAD kinase in extracts was increased by 2.4-fold, and GDH, by 2.1-fold. When both genes were co-expressed in CN1021, the activity of NADK and GDH were increased by 2.0-fold and 1.5-fold, respectively. The flask fermentation results showed that the separate over-expression of *ppnk* and *gdh* in CN1021 approximately 7.9% higher and 1.4% more L-glutamate than the original strain, moreover, co-expressing the two genes strain exhibited 13.2% higher L-glutamate. Taken together, the results demonstrated that co-expression of *gdh* and *ppnk* genes can significantly improve the production of L-glutamate.

**Key words:** NAD kinase; glutamate dehydrogenase; *Corynebacterium glutamicum* CN1021; co-expression

L-谷氨酸是世界上最大的氨基酸品种之一, 具有增鲜、降低血氨、改善中枢神经系统、改善儿童智力发育、扩张血管、增强血液循环、促进花穗发育等功能, 并被广泛应用于食品、医药、人造制革、化妆品及农业等行业<sup>[1-2]</sup>。1957 年, 自木下等采用发酵法生产 L-谷氨酸获得成功以来, L-谷氨酸的生产技术日新

收稿日期: 2013-03-01

基金项目: 国家科技支撑计划 (2011BAC11B03); 国家高技术研究发展计划 (2013AA102106)

作者简介: 张大龙(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 主要从事氨基酸生产菌的定向改造及发酵过程优化的研究

通讯作者: 谢希贤(1976-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 主要从事代谢控制发酵的研究

月异, 其生产规模也不断扩大<sup>[3]</sup>。

目前主要采用谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 作为 L-谷氨酸发酵生产菌种。众所周知, 获得性状优良的 L-谷氨酸生产菌种是实现高产量的前提。以往主要采用诱变育种的方法实现菌种改造, 但该方法工作量大且具有一定的盲目性。近年来随着谷氨酸棒杆菌基因组测序的完成<sup>[4]</sup>以及谷氨酸棒杆菌基因操作技术的不断完善, 使得通过分子生物学手段对谷氨酸棒杆菌进行定向改造成为现实<sup>[5]</sup>。

在谷氨酸棒杆菌中, NAD 激酶 (NAD kinase, NADK, 由 *ppnk* 编码) 是生物体能量代谢途径中的一个关键酶<sup>[6]</sup>, 通过过表达该酶编码基因 *ppnk*, 有助于提高胞内 NADP(H) 的水平, 进而有可能提高谷氨酸的

产量。谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, GDH, 由 *gdh* 编码)是谷氨酸合成途径的关键酶之一<sup>[7]</sup>, 该酶催化  $\alpha$ -酮戊二酸还原生成 L-谷氨酸并受 L-谷氨酸的反馈抑制和反馈阻遏作用。因此过表达该酶基因可解除 L-谷氨酸的反馈作用, 从而达到提高产量的目的。本文以谷氨酸生产菌 CN1021 基因组为模板 PCR 扩增 *ppnk* 和 *gdh* 基因并转化至该菌中, 研究过表达 NADK 和 GDH 对 L-谷氨酸产量的影响。结果表明过表达 *ppnk* 和 *gdh* 基因能够有效提高 L-谷氨酸的产量, 且具有协同效应。本文可为谷氨酸工程菌的定向改造奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究所有的菌种及质粒如表 1 所示。

表 1 菌株和质粒

菌株和质粒	特性	来源
Strains		
CN1021	L-glutamate producing strain C. glutamicum (Ts+GluHXr+OMr)	[8]
CN1021pXMJ19	C. glutamicum CN1021 harboring pXMJ19	This work
CN1021-P	C. glutamicum CN1021 harboring pXMJ19P	This work
CN1021-G	C. glutamicum CN1021 harboring pXMJ19G	This work
CN1021-PG	C. glutamicum CN1021 harboring pXMJ19PG	This work
DH5 $\alpha$	deoR, recA1, endA1, phoA, supE44E coli host strain	[9]
DH5 $\alpha$ pXMJ19P	DH5 $\alpha$ harboring pXMJ19P	This work
DH5 $\alpha$ pXMJ19G	DH5 $\alpha$ harboring pXMJ19G	This work
DH5 $\alpha$ pXMJ19PG	DH5 $\alpha$ harboring pXMJ19PG	This work
Plasmids		
pXMJ19	Expression vector, ptac, lacIq, Cmr	[10]
pXMJ19P	Plasmid carrying the <i>ppnk</i>	This work
pXMJ19G	Plasmid carrying the <i>gdh</i>	This work
pXMJ19PG	Plasmid carrying the <i>ppnk</i> and <i>gdh</i>	This work

#### 1.1.2 培养基及培养条件

摇瓶种子培养基(g/L): 葡萄糖 30, 尿素 5, 玉米浆 20 mL, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub> 1.5, VB<sub>1</sub> 0.3 mg, pH 7.0。摇瓶发酵培养基(g/L): 葡萄糖 80, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,

MgSO<sub>4</sub> 2, MnSO<sub>4</sub> 30 mg, FeSO<sub>4</sub> 30 mg, 玉米浆 20 mL, 糖蜜 40 mL。大肠杆菌采用 LB 培养基于 37 °C 培养, 谷氨酸棒杆菌采用 LBHIS<sup>[11]</sup>培养基于 32 °C 培养, 需要时加入终浓度为 10  $\mu$ g/mL 氯霉素 (Chloroamphenicol, Cm)抗性。

#### 1.1.3 试剂

限制性内切酶、Taq 酶及连接酶购自 Takara 公司。酶活性测定所用试剂购自 Sigma 公司。RNA 提取试剂盒和 UltraSYBR 二步法荧光定量 PCR 试剂盒(With ROX)购自北京康为世纪生物科技有限公司。

#### 1.1.4 引物

根据 GenBank 上检索获得的 *ppnk* 和 *gdh* 核苷酸序列分别设计扩增引物 (表 2)。

表 2 引物序列

引物	序列(5'-3')	用途
P1	GCGGGTACCTGATTGACACGGCT GTAAAGG (Kpn I)	Ppnk 扩增
P2	GCGGAATTCGCGAACGTTTTTCT AAATCCTC (EcoR I)	
G1	GCGAAGCTTGCTCCAGCAAAC GCCT (Hind III)	Gdh 扩增
G2	GCGTCTAGA CACGCTTAAAGA CACC (Xba I)	
RT-P1	GCTGGTTGTGAGCCCCAAAATC	<i>ppnk</i> RT-qPCR 检测
RT-P2	GAGGCATAGGAATGGGACGG	
RT-G1	AAGGACCCTCATTACGCT	<i>gdh</i> RT-qPCR 检测
RT-G2	CATCAACCCAAGGCACAC	
16S-1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S RT-qPCR 检测 (内参)
16S-2	GGTACCTTGTTACGACTT	

## 1.2 方法

### 1.2.1 *ppnk* 和 *gdh* 基因克隆及表达载体的构建

通过 PCR 方法从 CN1021 菌株基因组 DNA 中扩增得到 *ppnk* 和 *gdh* 基因, 并分别克隆至穿梭质粒 pXMJ19 质粒上。构建了三种表达质粒: pXMJ19P、pXMJ19G 和 pXMJ19PG 用于研究。DNA 的操作参考文献<sup>[12]</sup>。

### 1.2.2 *ppnk* 和 *gdh* 基因过表达菌株的构建

采用电转化法<sup>[13]</sup>分别将重组质粒 pXMJ19P、pXMJ19G 和 pXMJ19PG 导入谷氨酸生产菌 CN1021 感受态细胞中。在含有 10  $\mu$ g/mL 的 Cm 抗性平板上筛选阳性菌株。经提取质粒 PCR 和酶切验证, 最终筛选得到三株基因工程菌株分别命名为 CN1021-P、CN1021-G 和 CN1021-PG。

### 1.2.3 *ppnk* 和 *gdh* 基因的实时荧光定量 PCR 检

测

将基因工程菌株于 LBHIS 培养基培养至对数生长期,取 1 mL 菌液 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 并经逆转录获得 cDNA。然后,以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 反应(引物序列见表 2)。反应条件:95 °C 预变性 10 min,1 个循环;95 °C 15 s,60 °C 1min,40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算被测基因的转录水平。

### 1.2.4 酶活力的测定

菌体培养及酶的粗提纯参照文献<sup>[5]</sup>。(1) NADK 酶活性测定见文献<sup>[6]</sup>,酶活力定义为:在标准酶活性测定条件下,1 min 内 1 mL 反应体系产生 1 μM NADP 所需酶量;(2) GDH 酶活性测定见文献<sup>[7]</sup>。酶活力定义为:在标准酶活性测定条件下,每分钟还原 1 μM NADP<sup>+</sup>或氧化 1 μM NADPH 所需酶量。

### 1.2.5 总蛋白质与 L-谷氨酸的测定

总蛋白测定参照文献<sup>[8]</sup>。L-谷氨酸的测定采用 SBA-40C 生物传感仪。菌体生物量的测定:取 1 mL 发酵液,12000 r/min 离心,将菌体用蒸馏水洗涤 2 次后置于真空干燥箱中 80 °C 干燥至恒重,用分析天平称重。

## 2 结果与分析

### 2.1 过表达 ppnk 和 gdh 基因重组质粒的鉴定及基因工程菌株的构建

分别将构建好的 ppnk 过表达质粒 pXMJ19P、gdh 过表达质粒 pXMJ19G 以及 ppnk 和 gdh 串联表达质粒 pXMJ19PG 转化至 DH5α 感受态细胞中,经 Cm 平板筛选得到转化子。挑选单菌落进行活化后抽提质粒进行酶切验证并委托北京华大基因有限公司测定插入目的片段的 DNA 序列。酶切图谱如图 1 所示。

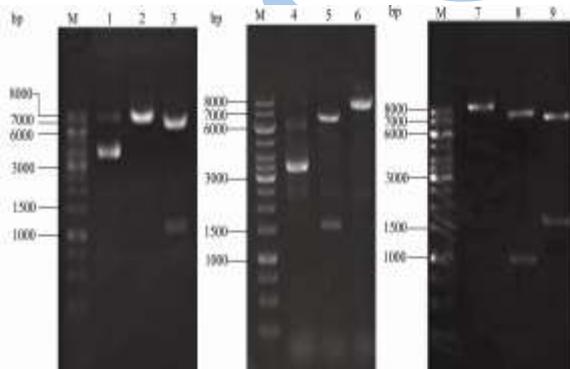


图 1 重组质粒的 pXMJ19P、pXMJ19G 和 pXMJ19PG 酶切图谱  
Fig.1 Restriction map of pXMJ19P, pXMJ19G and pXMJ19PG

注: M: DNA marker; 1: pXMJ19P; 2: 经 EcoR I 酶切的 pXMJ19P; 3: 经 Kpn I 和 EcoR I 双酶切的 pXMJ19P; 4: pXMJ19G; 5: 经 Xba I 和 Hind III 双酶切的 pXMJ19G; 6: 经 Hind III 酶切的 pXMJ19G; 7: 经 EcoR I 酶切的 pXMJ19PG; 8:

经 Kpn I 和 EcoR I 双酶切的 pXMJ19PG; 9: 经 Xba I 和 Hind III 双酶切的 pXMJ19PG。

由图 1 可知,重组质粒 pXMJ19P 经 EcoR I 酶切后得到分子量约 7600 bp 的条带(2 泳道),经 Kpn I 和 EcoR I 双酶切后出现分子量约 1000 bp (ppnk 基因片段)和 6600 bp (pXMJ19)的条带(泳道 3),与预期结果一致。pXMJ19G 和 pXMJ19PG 也具有与预期结果一致的酶切图谱。基因测序结果与 GenBank 公布序列一致。

将重组质粒 pXMJ19P、pXMJ19G、pXMJ19PG 转化至谷氨酸生产菌 CN1021 感受态细胞中,经 Cm 抗性平板筛选和 PCR 鉴定获得的基因工程菌株分别命名为 CN1021-P、CN1021-G 和 CN1021-PG。

### 2.2 基因工程菌中 ppnk 和 gdh 基因转录水平的检测

分别将基因工程菌培养至对数中前期,按照 1.2.3 的方法进行实时荧光定量 PCR 检测,结果如图 2 所示。

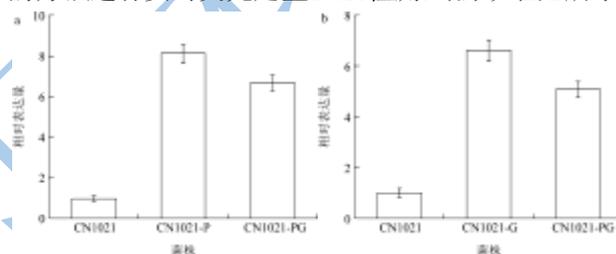


图 2 基因工程菌中 ppnk 和 gdh 的转录水平

Fig.2 ppnk and gdh RNA level in genetic engineering strains

注: a: ppnk 的转录水平; b: gdh 的转录水平。

与出发菌株相比,基因工程菌株 CN1021-P 和 CN1021-PG 中的 ppnk 基因的相对表达量分别提高了约 8 倍和 6 倍;基因工程菌株 CN1021-P 和 CN1021-PG 中的 gdh 基因的相对表达量分别提高了约 6 倍和 5 倍。表明 ppnk 和 gdh 基因在相应的基因工程菌中能够成功转录且转录水平上均有一定程度的提高。

### 2.3 基因工程菌株 NADK 和 GDH 酶活性的检测

虽然基因工程菌株的 ppnk 和 gdh 基因转录水平量已有大幅度提高,但能否成功过表达出有活性的酶还需进一步确定。将各菌株培养至对数期,经 IPTG 诱导 4 h 后,离心收集细胞并超声破碎,取适量粗酶液进行酶活性检测,基因工程菌株的 NADK 和 GDH 酶活性如表 3 所示。

结果表明,CN1021-P 中的 NAD 激酶和 CN1021-G 中的 GDH 酶活性比出发菌株分别提高了 2.4 和 2.1 倍,而 CN1021-PG 中两种酶的活性分别提高了 2.0 倍和 1.5 倍。表明 ppnk 和 gdh 基因能够在基因工程菌中成功表达出有活性的酶。

表 3 NADK 和 GDH 酶活力的测定

Table 3 Assay of NADK and GDH activities

菌株名称	NADK 酶活力		GDH 酶活力	
	酶活力 /( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ )	相对酶活力	酶活力 /( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ )	相对酶活力
CN1021	0.993	1.0	0.062	1.0
CN1021-P	2.390	2.4	-	-
CN1021-G	-	-	0.131	2.1
CN1021-PG	2.046	2.0	0.093	1.5

注: -: 未测定。

### 2.4 过表达 ppnk 和 gdh 基因对 L-谷氨酸产量的影响

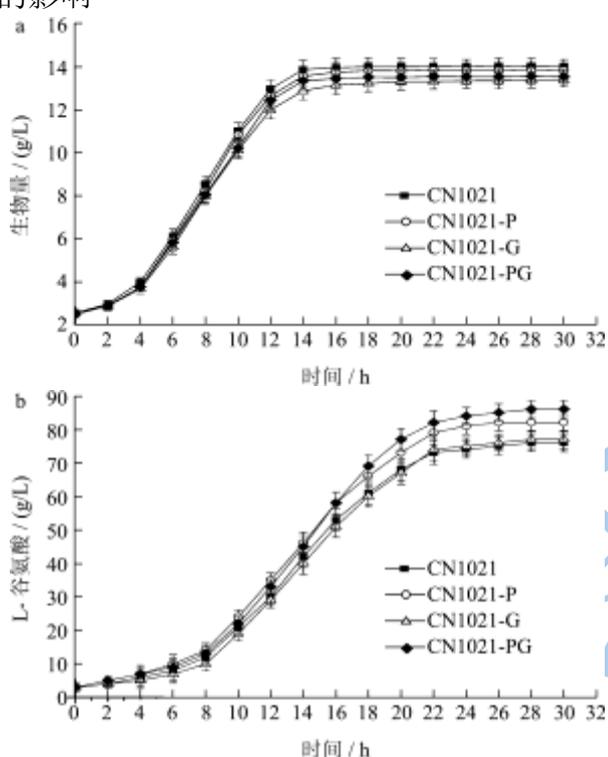


图 3 ppnk 和 gdh 基因过表达对 L-谷氨酸发酵的影响

Fig. 3 Effects of ppnk and gdh over-expression on L-glutamate fermentation

注: a: 生物量; b: L-谷氨酸产量。

采用摇瓶实验研究了过表达 ppnk 和 gdh 基因对基因工程菌株的生长和 L-谷氨酸产量的变化。实验结果见图 3。与出发菌株相比, 基因工程菌株的生长均受到一定的影响(图 3a)。可能是由于质粒的复制以及基因的过表达需要额外消耗菌体的能量和营养物质, 从而对菌株的生长带来一定的负作用。与出发菌株相比, 基因工程菌株 CN1021-G 和 CN1021-P 的 L-谷氨酸产量分别提高了 1.4% 和 7.9%, 而基因工程菌株 CN1021-PG 的 L-谷氨酸产量提高 13.2%(图 3b)。GDH 催化 L-谷氨酸的合成依赖于 NADPH, 这可能是基因工程菌株 CN1021-G 的 L-谷氨酸产量增加较少且低于

CN1021-PG 的原因。

### 3 结论

本研究实现了在已有 L-谷氨酸生产菌 CN1021 中过表达 ppnk 和 gdh 基因, 使得 L-谷氨酸的产量得到了显著的提高。表明同时增加 NADPH 的供应量和 GDH 的酶活性对 L-谷氨酸的合成是有效的。本实验可为今后基于代谢途径的谷氨酸生产菌的定向改造奠定理论基础。

### 参考文献

- [1] 张伟国, 钱和. 氨基酸生产技术及其应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997
- [2] 于信令. 味精工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009
- [3] Kinoshita S, Udaka M, Shimono Y. Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms [J]. J Gen. Appl. Microbiol., 1957, 3(6): 193-205
- [4] Ohnishi J, Mitsuhashi S, Hayashi M, et al. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 58(2): 217-223
- [5] 刘森芝. 谷氨酸发酵生产菌的研究与开发[J]. 发酵通讯科技, 2009, 38(2): 1-2
- [6] Shi Feng, Huan Xiaojing, Wang Xiaoyuan, et al. Overexpression of NAD kinases improves the l-isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum ssp. lactofermentum* [J]. Enzyme. Microb. Tech., 2012, 51: 73-80
- [7] Jean L, Oscar R, Aremel G, et al. Gene Replacement, Integration, and Amplification at the *gdhA* Locus of *Corynebacterium glutamicum* [J]. J. bacterial., 1993, 175(4): 1001-1007
- [8] 陈宁, 赵丽丽, 张克旭. L-谷氨酸温度敏感突变株的选育[J]. 生物技术通讯, 2002, 13(2): 152-154
- [9] Grant S G, Jesse J, Bloom F R. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990, 87(12): 4645-4649
- [10] Jakoby M, Ngoutou E, Burkovski A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors [J]. Biotechnol. Tech., 1999, 13(6): 437-441.
- [11] Keilhauer C, Eggeling L, Sahn H. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon [J]. J. Bacteriol., 1993, 175(17): 5595-5603
- [12] Michael R G, Joseph S. Molecular cloning: a laboratory

- manual (4<sup>th</sup> edition) [M]. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 2012
- [13] Vander R, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenetic plasmid DNA [J]. App.Microbiol. Biotech., 1999, 52(4): 541-545
- [14] 伍展红,郑穗平.谷氨酸棒杆菌 *ldh* 基因的敲除[J].生物技术通报,2012,2:107-111
- [15] Chao YP, Lo T E, Luo N S. Selective production of L-aspartic acid and L-phenylalanine by coupling reactions of aspartase and aminotranferase in *Escherichia coli* [J]. Enzyme. Microb. Tech., 2000, 27(2): 19-25
- [16] Shi F, Kawai S, Mori S, et al. Identification of ATP-NADH kinase isozymes and their contribution to supply of NADP(H) in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEBS Journal, 2005, 272(13): 3337-3349
- [17] Gourdon P, Nicholas D. Metabolic Analysis of Glutamate Production by *Corynebacterium glutamicum* [J]. Metab. Eng., 1999, 1(3): 224-231
- [18] Lowry H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J. Biol. Chem., 1951, 193: 265-27