

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 *CarAB*、*ArgD*、*ArgJ* 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 *CarAB*、*ArgD*、*ArgJ* 进行单个基因表达、对 *ArgD*、*ArgJ* 基因进行串联表达以及对 *CarAB*、*ArgD*、*ArgJ* 三个基因进行共表达, 分别得到过量表达菌株 14067-pEC-*CarAB*、14067-T18-*ArgD*、14067-T18-*ArgJ*、14067-T18-*ArgDJ*、14067-pEC-*CarAB*-T18-*ArgDJ*。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-*CarAB*-T18-*ArgDJ*, 通过实时荧光定量 PCR 检测, 表明 *CarA*、*CarB*、*ArgD*、*ArgJ* 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 *CarAB*、*ArgD*、*ArgJ* 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

文章编号: 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 *CarAB*, *ArgD* and *ArgJ* 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 *CarAB*, *ArgD* and *ArgJ* in the arginine biosynthetic pathway were expressed individually, *ArgD* and *ArgJ* were overexpressed in series and the *CarAB*, *ArgD* and *ArgJ* were co-expressed. The ability of producing L-arginine of the recombination strains, 14067-pEC-*CarAB*, 14067-T18-*ArgD*, 14067-T18-*ArgJ*, 14067-T18-*ArgDJ* and 14067-pEC-*CarAB*-T18-*ArgDJ*, 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 *CarA*, *CarB*, *ArgD* and *ArgJ* in strain 14067-pEC-*CarAB*-T18-*ArgDJ* were 2.50, 5.60, 3.59 and 4.70 times, respectively, than ATCC14067. Therefore, overexpression of *CarAB*, *ArgD* and *ArgJ* 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

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

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

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 *CarA* 和 *CarB* 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。*ArgD* 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-乙酰鸟氨酸半醛至 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。*ArgJ* 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 *CarAB*、*ArgD*、*ArgJ*, 并分别对其进行单个基因过量表达; *ArgD*、*ArgJ* 基因串联的过量表达; 以及对 *CarAB*、*ArgD*、*ArgJ* 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 *CarAB*、*ArgD*、*ArgJ* 基因,能够有效提高 L-精氨酸的产量。尤其是 *CarAB*、*ArgD*、*ArgJ* 三个基因

的共表达,使 L-精氨酸的产量提高了 2.91 倍。

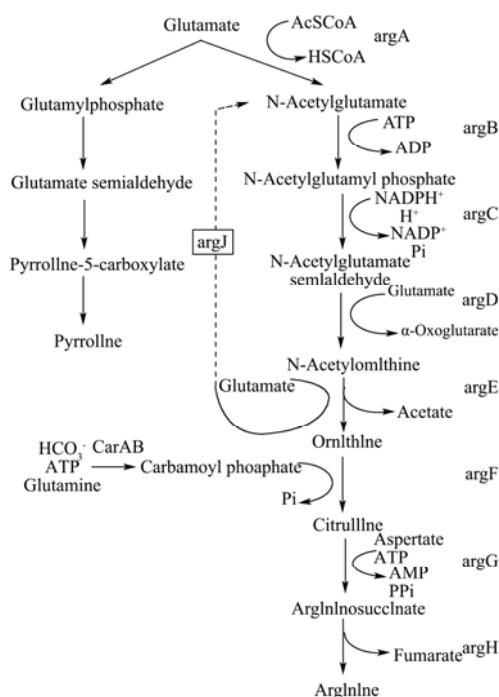


图 1 黄色短杆菌精氨酸生物合成通路及其调控

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		
<i>E.coli</i> TOP10	F-, mcrAΔ(mrr-hsd RMS-mcrBC), ϕ80, lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araΔ139Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rps, (Strr)endA1, nupG	Store in this lab
ATCC14067	<i>Brevibacterium flavum</i> / <i>Corynebacterium glutamicum</i>	Store in this lab
14067-T18-ArgD	ATCC14067 with plamid PEC-T18mob2-ArgD	In this work
14067-T18-ArgJ	ATCC14067 with plamid PEC-T18mob2-ArgJ	In this work
14067-T18-ArgDJ	ATCC14067 with plamid PEC-T18mob2-ArgDJ	In this work
14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ	ATCC14067 with plamid pEC-XK99E-p'-CarAB-T18-ArgDJ	In this work
14067-pEC-CarAB	ATCC14067 with plamid pEC-XK99E-p'-CarAB	In this work
Plasmids		
pEC-XK99E-p'-CarAB	Containing <i>CarAB</i> in pEC-XK99E-p'	In this work
PEC-T18mob2-ArgD	Containing <i>ArgD</i> in PEC-T18mob2	In this work
PEC-T18mob2-ArgJ	Containing <i>ArgJ</i> in PEC-T18mob2	In this work
PEC-T18mob2-ArgDJ	Containing <i>ArgD</i> and <i>ArgJ</i> 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, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 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, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $CaCO_3$ 30 g/L。

1.4 PCR 引物设计及目的片段的扩增

CarAB-1、*CarAB*-2 基因分别带有 *Sma* I、*Xba* I 的酶切位点用于扩增 *CarAB* 基因 (4529 bp); *D-ArgJ*-P1、*D-ArgJ*-P2 基因分别带有 *Kpn* I、*EcoR* I 的酶切位点用于扩增 *ArgJ* 基因 (1212 bp); *D-ArgD*-P1、*D-ArgD*-P2 基因分别带有 *Kpn* I、*EcoR* I 的酶切位点用于扩增 *ArgD* 基因 (1056 bp); 在基因 *ArgJ*、*ArgD*

的上下游分别设计有重叠区域的引物 *ArgJ*-1、*ArgJ*-2、*ArgD*-1、*ArgD*-2, 用于重叠延伸 PCR 将 *ArgJ* 和 *ArgD* 进行拼接, 得到串联基因 *ArgDJ*, 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 *CarAB*(*ArgJ*、*ArgD*) 的反应体系为 50 μ L: Primer Star HS 25.0 μ L, 上下游引物各 0.3 μ L, 14067 基因组 1.5 μ L, H_2O 22.9 μ L, 总体积 50.0 μ L, 混合后进行扩增。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min/kb, 30 个循环; 72 $^{\circ}C$ 最后延伸 7 min。

串联基因 *ArgDJ* 的扩增, 首先扩增出有重叠区的 *ArgJ* (引物 *ArgJ*-1、*ArgJ*-2) 及 *ArgD* (引物 *ArgD*-1、*ArgD*-2), 然后通过重叠延伸得到串联基因 *ArgDJ*。PCR 扩增串联基因 *ArgDJ* 的反应体系为 50 μ L: KOD Buffer 25.0 μ L 引物 (*ArgJ*-1、*ArgD*-2) 各 2 μ L, 模板 *ArgJ*、*ArgD* 各 1 μ L, dNTP 5.0 μ L, KOD 酶 1.0 μ L, H_2O 13.0 μ L, 总体积 50.0 μ L, 混合后进行扩增。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}C$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 3 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}C$ 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')
<i>CarAB</i> -P1	Forward: 5'-TCCCCCGGGGAGTGAGTAAAGACACCACCACCTA-3'
<i>CarAB</i> -P2	Reverse: 5'-TGCTCTAGAGCATTAAGCCTTGACTGCGTGGT-3'
<i>D-ArgJ</i> -P1	Forward: 5'-GGGGTACCCCATGGCCGAAAAAGGCATTACCGCGC-3'
<i>D-ArgJ</i> -P2	Reverse: 5'-CGGAATTCGCGCCTGTGCCCTTTCCCTGCTTG-3'
<i>D-ArgD</i> -P1	Forward: 5'-GGGGTACCCCATGAGCACGCTGGAAACTT-3'
<i>D-ArgD</i> -P2	Reverse: 5'-CGGAATTCGAAAAACCATCAAGAACAGCTTG-3'
<i>ArgJ</i> -1	Forward: 5'-GGGGTACCCCATGGCCGAAAAAGGCATTACCGCGC-3'
<i>ArgJ</i> -2	Reverse: 5'-GCCTGTGCCCTTTCCCTGCTTGTTAGTTGGAGTGTGTTTCTTT-3'
<i>ArgD</i> -1	Forward: 5'-AAGCAGGGAAAAGGGCACAGGCATGAGCACGCTGGAAACTT-3'
<i>ArgD</i> -2	Reverse: 5'-CGGAATTCGAAAAACCATCAAGAACAGCTTG-3'

1.5 重组质粒的构建

1.5.1 表达载体 PEC-T18mob2-*ArgD* 的构建 (或 PEC-T18mob2-*ArgJ* 的构建)

将目的片段 *ArgD* (或 *ArgJ*) 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 μ L: 载体或目的基因片段 25.0 μ L, 10 \times M buffer 5.0 μ L, *EcoR* I、*Kpn* I 各 2.5 μ L, 补水至 50 μ L, 37 $^{\circ}C$ 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 μ L: 片段 8.0 μ L, 载体 0.5 μ L, T4 连接 E-buffer 1.0 μ L, T4 ligase enzyme 0.5 μ L, 16 $^{\circ}C$ 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 $^{\circ}C$ 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入含四环素至终浓度为 0.005 g/L 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}C$, 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'-*CarAB* 的构建

目的片段 *CarAB* 和表达载体 pEC-XK99E-p' 的酶切体系 50 μ L: 载体或目的基因片段 25.0 μ L, 10 \times M buffer 5.0 μ L, *Sma* I、*Xba* I 各 2.5 μ L, 补水至 50 μ L, 37 $^{\circ}C$ 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 °C 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-ArgDJ 的构建

将目的片段 *ArgDJ* 和表达载体 PEC-T18mob2 按照表达载体 PEC-T18mob2-*ArgD* 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-*ArgD*、PEC-T18mob2-*ArgJ*、PEC-T18mob2-*ArgJD* 以及 pEC-XK99E-p'-*CarAB* 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 °C 培养箱倒置培养 48~72 h^[5-7], 利用鉴定引物进行鉴定, 得到正确重组的菌株分别命名为 14067-T18-*ArgD*、14067-T18-*ArgJ*、14067-T18-*ArgDJ*、14067-pEC-*CarAB*。

1.6.2 共表达菌株的构建

将构建好的表达载体 pEC-XK99E-p'-*CarAB* 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-*CarAB* 感受态, 将表达载体 PEC-T18mob2-*ArgDJ* 电击转化入 14067-pEC-*CarAB* 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 °C 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 °C 过夜培养 24 h。转接于新的种子培养基中, 250 r/min, 30 °C 培养至生长对数中后期, 转接至发酵培养基, 控制其初始 OD₆₀₀ 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 °C。

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 *dnaE* 为内参基因, *CarAB*、*ArgD*、*ArgJ* 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 °C, 30 s, 1 个循环; 变性, 95 °C, 5 s; 退火/延伸 60 °C, 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- <i>CarA</i> -1	Forward: GACCTGGGCATTAAGCAAAACAC
RT- <i>CarA</i> -2	Reverse: GCCTGATGGGTTGTACTGCTTGAT
RT- <i>CarB</i> -1	Forward: CCCTGGGCCGTAACACTACAT
RT- <i>CarB</i> -2	Reverse: TCCCTGCGAAGAACTCAT
RT- <i>ArgD</i> -1	Forward: TACCCTTACGGCGACACCGATTAC
RT- <i>ArgD</i> -2	Reverse: CGCCCGTTTCACCCCTGGATT
RT- <i>ArgJ</i> -1	Forward: GCATCGTTGAGTTCGTCCTG
RT- <i>ArgJ</i> -2	Reverse: CCGTTACGTTTGACACCCCTGGAT

2 结果与讨论

2.1 重组质粒 PEC-T18mob2-*ArgD*、PEC-T18mob2-*ArgJ*、PEC-T18mob2-*ArgDJ* 及 pEC-XK99E-p'-*CarAB* 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-*ArgD*、PEC-T18mob2-*ArgJ*、PEC-T18

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

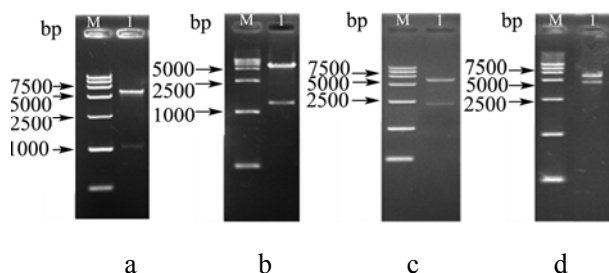


图 2 重组质粒 PEC-T18mob2-ArgD、PEC-T18mob2-ArgJ、PEC-T18mob2-ArgDJ、pEC-XK99E-p'-CarAB 的双酶切图谱

Fig.2 Restriction map of PEC-T18mob2-ArgD、PEC-T18mob2-ArgJ、PEC-T18mob2-ArgDJ and pEC-XK99E-p'-CarAB

注：a：M：DNA Marker DL15000bp ladder；1：经 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切的 PEC-T18mob2-ArgD；b：M：DNA Marker DL15000bp ladder；1：经 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切的 PEC-T18mob2-ArgJ；c：M：DNA Marker DL15000bp ladder；1：经 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切的 PEC-T18mob2-ArgDJ；d：M：DNA Marker DL15000bp ladder；1：经 *Sma* I、*Xba* I 双酶切的 pEC-XK99E-p'-CarAB。

2.2 实时荧光定量 PCR 法对过量表达基因

CarAB、ArgD、ArgJ 的检测

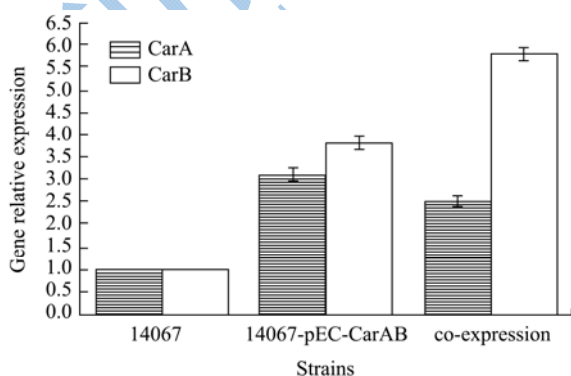


图 3 CarA、CarB 基因的表达量

Fig.3 Expression quantitation of CarA、CarB

注：Co-expression: 14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ。

以谷氨酸棒杆菌的 *dnaE* 基因作为内参基因，对菌株 ATCC14067、14067-pEC-CarAB、14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ 中的 *CarAB* 基因进行荧光定量 PCR 扩增；ATCC14067、14067-T18-ArgD、14067-T18-ArgDJ、14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ 中的 *ArgD* 基因进行荧光定量 PCR 扩增；ATCC14067、14067-T18-ArgJ、14067-T18-ArgDJ、14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ 中的 *ArgJ* 基因进行荧光定量 PCR 扩增，结果见图 3。

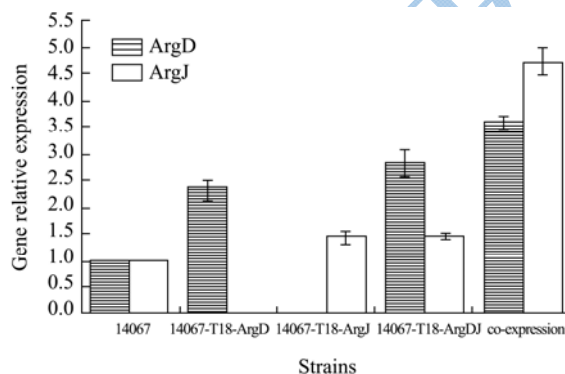


图 4 ArgD、ArgJ 基因的表达量

Fig.4 Expression quantitation of ArgD、ArgJ

注：Co-expression: 14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ。

菌株 14067-pEC-CarAB、14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ 中 *CarA* 基因的表达量分别为菌株 ATCC14067 的 3.10 倍、2.50 倍，表明 *CarA* 的过量表达是有效的；菌株 14067-pEC-CarAB、14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ 中 *CarB* 基因的表达量分别为菌株 ATCC14067 的 3.80 倍、5.80 倍，表明 *CarB* 的过量表达是有效的；菌株 14067-T18-ArgD、14067-T18-ArgDJ、14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ 中 *ArgD* 基因的表达量分别为菌株 ATCC14067 的 2.27、2.85、3.59 倍，表明 *ArgD* 的过量表达是有效的；菌株 14067-T18-ArgJ、14067-T18-ArgDJ、14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ 中 *ArgJ* 基因的表达量分别为菌株 ATCC14067 的 1.46 倍、1.45、4.70 倍，表明 *ArgD* 的过量表达是有效的。

2.3 重组菌的精氨酸产量

将 ATCC14067、14067-pEC-CarAB、14067-T18-ArgD、14067-T18-ArgJ、14067-T18-ArgDJ、14067-pEC-CarAB-T18-ArgDJ 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。

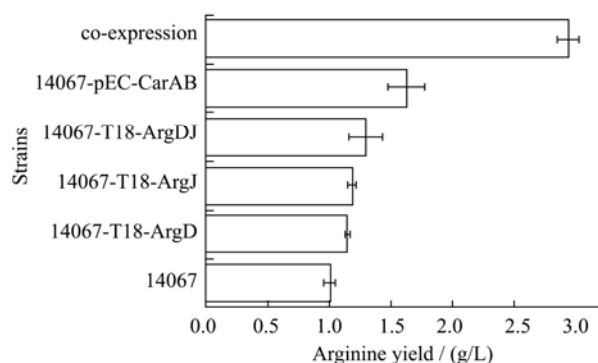


图5 过量表达菌株的精氨酸产量

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键酶的基因 *ArgD*、*ArgJ*、*CarAB* 进行单表达、串联表达、共表达, 分别得到 ATCC14067、14067-pEC-*CarAB*、14067-T18-*ArgD*、14067-T18-*ArgJ*、14067-T18-*ArgDJ*、14067-pEC-*CarAB*-T18-*ArgDJ* 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-*CarAB*-T18-*ArgDJ* 中 *CarA*、*CarB*、*ArgD*、*ArgJ* 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键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-arginine 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 determination of 16 amino acids in *omphalia lapidescens* Schroet [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 31(9): 1631-1635