谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 阻遏蛋白 ArgR 与 L-精氨酸合成途径相关基因的相互作用

敖婉钦,张豪,郑穗平

(华南理工大学生物科学与工程学院,广东广州 510640)

摘要:在细菌中阻遏蛋白 ArgR 通过与精氨酸合成途径相关基因中的保守序列结合,阻遏相关基因的转录。在谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 中,精氨酸生物合成涉及的基因位于基因簇 argCJBDFRGH 和 carAB 中。构建重组菌株 E.coli BL21(DE3)/pET22b-argR, 诱导表达 ATCC 14067 来源的 ArgR,成功得到目的蛋白。利用分子筛色谱柱对 ArgR 蛋白进行分析,表明 ArgR 蛋白相对分子质量在 108 ku 左右,在活性状态下 ArgR 蛋白为六聚体。合成生物素标记的谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 来源的 argC、argJ、argB、argF、argG、argH、carA 基因片段,采用凝胶阻滞实验(EMSA)观察 ArgR 蛋白与其在体外的相互作用。结果表明,ArgR 蛋白能够在体 外与 argC 基因-26~+32 bp、argB 基因-86~29 bp、argG 基因-161~104 bp、carA 基因-99~42 bp 结合,且与 argB 基因的结合程度最大, 但不与 argJ、argF、argH 基因片段结合。本文首次将 argC、argB、argG、carA 基因中 ArgR 蛋白结合的靶标位点定位在 60 bp 内, 为更深入的研究谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 中精氨酸合成的调控机制提供了理论依据。

关键词:谷氨酸棒状杆菌; ArgR; 分子筛色谱柱; 凝胶阻滞实验 文章篇号:1673-9078(2019)01-15-21

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.003

Interaction between Repressor Protein ArgR and Arginine Biosynthesis

Pathway Related Genes in Corynebacterium glutamicum ATCC 14067

AO Wan-qin, ZHANG Hao, ZHENG Sui-ping

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) **Abstract:** In bacteria, the repressor protein inhibits the transcription of arginine biosynthesis related genes through binding to conserved sequences in these genes. In *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, the genes involved in arginine biosynthesis are located in *argCJBDFRGH* and *carAB* gene clusters. The recombinant *E.coli* BL21 (DE3)/ pET22b-*argR* was constructed to induce the expression of ArgR derived from ATCC 14067 and subsequently achieve the target protein. The analysis of the ArgR protein using molecular sieve columns showed that the relative molecular mass of ArgR protein was about 108 ku, and the ArgR protein was hexamer in the active state. The *argC, argJ, argB, argF, argG, argH, carA* gene fragments were obtained from biotin-labeled *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, and their *in vitro* interactions with the ArgR protein were examined by electrophoretic mobility shift assays (EMSA). The results showed that the ArgR protein could bind to *argC* gene at positions -26 ~+32 bp, *argB* gene at positions -86~-29 bp, *argG* gene at positions -161~-104 bp, and *carA* gene at positions -99~ -42 bp, and the degree of binding to the *argB* gene was the greatest whilst no binding between ArgR and the *argJ, argF* or *argH* gene fragment. For the first time, the target binding sites of ArgR protein in *argC, argB, argG, and carA* genes were located within 60 bp, which provided a theoretical basis for further study on the regulatory mechanism of arginine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067.

Key words: Corynebacterium glutamicum; ArgR; molecular sieve columns; electrophoretic mobility shift assays

谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 (曾被命名为黄色 短杆菌, Brevibacterium flavum) 是一种无芽孢的革兰 氏阳性短杆状细菌,是多种氨基酸的重要生产工业菌 种。谷氨酸棒状杆菌中精氨酸生物合成途径见图 1, 收稿日期: 2018-04-06 基金项目:国家自然科学基金项目 (31671840) 作者简介: 敖婉软 (1993-),女,硕士研究生,研究方向:发酵工程

通讯作者:郑穗平(1972-),男,教授,研究方向:发酵工程、代谢工程

涉及连续的8个酶促反应。采用经济循环途径,即乙 酰基团在鸟氨酸乙酰转移酶的作用下被转移至谷氨酸 形成乙酰谷氨酸,然后重新进入精氨酸合成途径。乙 酰谷氨酸激酶是精氨酸生物合成途径中的关键酶,受 到终产物精氨酸反馈抑制。同时,谷氨酸棒状杆菌精 氨酸的合成还存在另一旁路途径,即由氨甲酰磷酸形 成瓜氨酸进入精氨酸合成途径^[1]。

谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 中 argCJBDFRGH

基因簇中相关基因的转录分析和 *argR* 基因缺失突变体的构建证实了 ArgR 作为精氨酸生物合成的负调节物的作用^[2],且 Lee S Y 等人^[3]利用 ChIP 实验发现ArgR 可以结合在 *argC、argB、argF*和 *argG* 基因的上游,但不结合在 *argT*和 *argH* 基因的上游。在钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS1.542 中,袁永^[4]通过EMSA 实验发现 ArgR 可以与*argB、argF*和 *carAB* 三个基因的上游序列结合。目前谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 的全基因组测序已经完成^[5],通过基因的序列比对发现该菌中精氨酸代谢途径的基因序列与谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 和钝齿棒杆菌^[6]具有一定的差异,因此,研究谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 中ArgR 与精氨酸代谢途径中各操纵子特异片段的相互作用,了解精氨酸合成的调控机制,有利于谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 精氨酸高产菌株的构建。



Fig.1 The economic cycle of arginine biosynthesis in Corynebacterium glutamicum

本实验对可能存在 ArgR 结合序列的 argC、argJ、 argB、argF、argG、argH、carA 基因上游序列进行了 分析,结合文献在每个基因中选择合成 58 bp 的 DNA 片段。通过构建重组菌株 E.coli BL21(DE3) / pET22bargR,诱导和纯化后得到 ArgR 蛋白,采用 EMSA 观 察 ArgR 蛋白与 DNA 片段在体外的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067、质粒扩增宿主 E.coli Top10、表达宿主 E. coli BL21(DE3)和质粒 pET-22b(+)均为华南理工大学生物科学与工程学院微 生物酶学实验室保存。

1.1.2 主要试剂与仪器

仪器引物合成和测序以及生物素标记的 DNA 片段的合成由上海生工生物工程有限公司完成;其他试剂均为市售国产分析纯。AKTA 蛋白纯化系统,美国通用电气公司;SEC-3 分子筛色谱柱,美国安捷伦科技有限公司;UVJLY-1 紫外交联仪,北京宾达英创科技有限公司;Waters 1525 液相色谱仪(2695 分离单元),Milford,MA,USA; 5 mL HisTrap[™] HP 层析柱,美国通用电气公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及表达载体的构建

以谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 基因组 DNA 为 模版, 扩增 *argR* 基因。扩增上游引物为 ArgR-S: 5' -TGT<u>CATATG</u>ATGTCTCTTGGCTCAACCCC-3'(下 划线为 Nde I 酶切位点);下游引物为 ArgR-A: 5' -TAG<u>CTCGAG</u>AGTGGTGCGCCCGCTGAGTA-3'(下 划线为 Xho I 酶切位点)。将 PCR 扩增产物回收后得 到的片段和质粒 pET-22b(+)均用 XhoI/NdeI 进行双酶 切,将酶切产物分别回收后用 T4 DNA 连接酶进行连 接。连接产物转入 *E.coli* Top10 感受态细胞,涂布于 含 50 µg/mL 羧苄青霉素的 LB 平板, 37 ℃过夜培养。 1.2.2 酶的诱导表达、纯化、SDS-PAGE 分析

将重组表达载体 pET-22b-argR 转化至 E.coli BL21(DE3)中,菌落 PCR 鉴定后,挑取阳性转化子接 入 10 mL LB 培养基(含 50 μg/mL 羧苄青霉素)中, 37 ℃、250 r/min 培养 12 h。随后将种子液以 1%的接 种量接种至 TB 发酵培养基(含 50 μg/mL 羧苄青霉素) 中,37 ℃进行培养。待 OD_{600 nm}达到 0.7~0.9 时,加 入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导 12 h 后。取发酵液离心收集菌体。破碎细胞后离心 60 min, 采用 6%浓缩胶和 12%分离胶对上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 检测。随后利用 Ni-NTA His-Bind 纯化柱 对上清液进行纯化以获得较纯的 ArgR 蛋白。在构建 重组质粒时使要表达的 ArgR 蛋白带有六个组氨酸标 签(His-tag),在咪唑浓度较低时,ArgR 蛋白可以吸 附在柱子上,在高浓度的咪唑浓度下则脱离下来。用 不同咪唑浓度的洗脱缓冲液(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 40、60、80、100 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 洗脱目的蛋白。收集各浓度梯度的洗脱液, 根据 SDS-PAGE 分析确定最佳洗脱浓度。根据所得到的最 佳洗脱浓度纯化 ArgR 蛋白。

1.2.3 利用分子筛色谱柱测定 ArgR 蛋白的较精确分子量

用几种已知分子量的蛋白质为标准,进行凝胶层 析,以每种蛋白质的洗脱体积对它们的分子量的对数 作图,绘制出标准洗脱曲线。未知蛋白质在同样的条 件下进行凝胶层析,根据其所用的洗脱体积,从标准 洗脱曲线上可求出此未知蛋白质对应的精确分子量。 色谱条件。色谱柱:SEC-3300 Å 分子筛色谱柱(300 mm×7.8 mm);流动相:50 mM Tris-HCl, pH 7.0 和 150 mM NaCl。流量:1 mL/min;柱温:24 ℃;检测 波长:214 nm。注射体积:5 μL。

1.2.4 凝胶阻滞实验观察 ArgR 蛋白与 DNA 片段在体外的相互作用

凝胶阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA),是体外分析 DNA 与蛋白质相互作用的一种 凝胶电泳技术^[7,8]。蛋白质与 DNA 结合后将大大增加 相对分子质量,DNA 片段与蛋白混合后,若该复合物 在凝胶电泳中的迁移速率变小,就说明该 DNA 片段 与蛋白分子发生了相互作用。

Corynebacterium glutamicum ATCC 14067 中与精 氨酸生物合成相关的基因的位置如图 2,8 个结构基因 组成精氨酸生物合成基因簇 argCJBDFRGH,其分别 从 argC 和 argG 的启动子开始独立转录,产生两个有 序排列的操纵子 argCJBDFR 和 argGH^[13],而编码氨 甲酰磷酸生物合成的 carAB 基因簇与精氨酸操纵子不 连接^[2]。在精氨酸生物合成相关的基因中,有 7 个基 因 (argC、argJ、argB、argF、argG、argH、carA) 的上游可能存在 ArgR 结合序列,括号中给出了不同 基因之间的碱基对数目。为了确定 7 个基因上游的 ArgR 结合位点,我们依次对灰色条指示的区域进行了 序列分析,并从中各选择性合成 58 bp 的 DNA 片段, 利用 EMSA 实验观察 ArgR 与其的相互作用。

白与精氨酸生物合成的8个结构基因的启动子区域都 有结合作用,将与 ArgR 蛋白相结合的序列进行分析 后发现,它们均由两个相邻的18 bp的保守回文序列 组成,于是将该保守序列称为 ARG box。在谷氨酸棒 状杆菌 ATCC 13032 中, Grant T 等人^[2]使用与 argC 上 游区域的特定部分同源的未标记的寡核苷酸进行竞争 性 EMSA, 将 ArgR 结合序列定位在-27~+18 bp。并检 测到一对 14 bp 的 ARG boxes 序列,据此我们对 C. glutamicum ATCC 14067 中 argC 上游区域进行分析, 并选择合成-26~+32 bp(图 3-a 黑色加粗碱基)。由于 文献中大部分 ARG box 出现在起始位点附近^[11],从 Lee SY 等人测定的 argJ 基因结合区域的 163 bp 碱基 对中选择合成-36~+22 bp(图 3-b 黑色加粗碱基)。在 谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 中,通过 EMSA 结果和 计算机分析发现 argB 上游区域(-77~-25) 对于 ArgR 的结合是重要的。且 argB 上游区域的突变分析发现了 该区域中 ArgR 结合的关键核苷酸(-58 位的 G, -55 位的 C, -41 位的 A)^[12]。在 C. glutamicum ATCC 14067 中对同源序列进行分析,并选择合成-86~-29 bp(图 3-c 黑色加粗碱基)进行 EMSA 实验。从 Lee S Y 等 人测定的 argF 基因结合区域的 148 bp 碱基对中选取 -35~+23 bp(图 3-d 黑色加粗碱基)。在谷氨酸棒状杆 菌 AS019 中对核苷酸序列的分析揭示了 argG 基因的 推定的-10和-35区域,SD序列和ATG起始密码子。 并利用转录元件搜索软件 TESS 程序在 argG 启动子区 域中检测到单个 ARG box^[13]。根据序列同源性在 C. glutamicum ATCC 14067 中对同源序列进行分析,选 择合成-161~-104 bp (图 3-e 黑色加粗碱基)。从 Lee S Y 等人测定的 argH 基因结合区域的 148 bp 碱基对中 选取-53~+5 bp (图 3-f 黑色加粗碱基)。在谷氨酸棒状 杆菌 ATCC 13032 中, Grant T 等人^[2]使用与 carA 上游 区域的特定部分同源的未标记的寡核苷酸进行竞争性 EMSA,将 ArgR 结合序列定位在-61~-90 bp,并检测 到一个 14 bp 的 ARG box 序列, 据此我们对 C. glutamicum ATCC 14067 中 carA 上游区域进行分析,

并选择合成-99~-42 bp 处(图 3-g 黑色加粗碱基)。

在大肠杆菌 (Escherichia coli)^[9,10]中, ArgR 蛋



图 2 谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 中精氨酸生物合成基因簇 Fig.2 Genetic organization of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 arginine biosynthetic genes

而科技		Modern Food Science and Technology	201
	a 1	KIQ_RS11115 stop CGCACCACCTGCACTTCCAGGTGGTGGCGGCGGCGGACACGCTGGCTACTAAAAATTCATGCT GCGTGGTGGACGTGAAGGTCCACCACCGCCGCCTGTGCGACCGATG <u>ATT</u> TTTAAGTACGA	
	61	TTTACCCACTTGCAGTTTTAGCTGTAGGTGGGTTTTTGCATGTCTAACCCGTCTTTTATG AAATGGGTGAACGTCAAAATCGACATCCACCCAAAAAACGTACAGATTGGGCAGAAAATAC	
	121		
	181	$+_{32}ARG box(argC_1) ARG box(argC_2) argC start$ TGTATGGTGTAACTAT	
		ACATACCACATIGATA	
	b	argC stop	
	1	CTTAAGCGTTGGTTTTGATGAGGCAGCAGGCCTGCCACAGGTCGGCGTCGCACCTTAAAG	
		-36	>
	61	TAGCGCCTTAAAGCGGCGCCTTCAAACCAAGCGCCCTAACCAGCAA ACAAAAACACAT	
		ATCGCGGAATTTCGCCGCGAAGTTTGGTTCGCGGGGATTGGTCGTT TGTGTTTGTGTA	
	121		
	121	GATTAAGTCATCCTCAAGGTGTACCGGCTTTTTCCGTAATGGC	
	с	-82 -77 -58 -55 argJ stop	
	1	TCGAACCACTGACCTGAGCTT CTCCTACGTGGAGATCAACTCOCCGTACAGCACTTAAAA AGCTTGGTGACTGGACTCGAA GAGGATGCACCTCTAGTTGAGGCGCATGTCGTGAATTTT	
	61	41 -25 AGAACAACACTCCAACTAACAAGCAGGGAAAAGGGCACAGGCATGAATGA	
	A	are grad stop	
	1	-35 CHILD SUP	
	1	CACTAGTGGCTGCTTCTTTAGCGTCTGCGTCAGTTCCG ATAACGGCTCTGTTAGCGT<u>ATT</u> argF start	
	61	AGGACTTAAACTTATGACTTCACAACCACAGGTTCGCCATTTCCTGGCTGATGATGATCT TCCTGAATTTGAATACTGAAGTGTTGGTGTCCAAGCGGTAAAGGACCGACTACTACTAGA	
	e	araR stop 161 ABG hov($araG$)	
	1	CTTAAAGCGCCCCCTAGTTCAAGGCTTGTTAATCGCTTGTTAATGCAGGCAG	
	(1		
	01	TTGGGCTCACAAAAAAAGCTCCTTATGGTTGGGAAAGTTGTGTTATTAAAAGAAATTTGTA	
	121	转录起始 CCTTGCTG <u>T</u> CCACCACGGCTGGCAAGGAACTTAAAATGAAGGAGCACACCTCATG	
		GGAACGACAGGTGGTGCCGACCGTTCCTTGAATTTTAQ <u>TTCCTC</u> GTGTGGAG <u>ITAC</u>	
	f	argG stop -53	
	1	GAGGTTCTAGCGATTGTTCGCGCGAGCGCGCGCGCGCGCG	
		$argH_{-1} \xrightarrow{argH_{+5}}$	
X	61	CATCCAGACTAGAACTTCAAGTATTTAGAAAGTAGAAGAACACCACATGGA GTAGGTCTGATCTTGAAGTTCATAAATCTTTCATCTTCTTGTGGTG <u>TAC</u> CT	
	g	carAB start	
	1	-42 TACTCACGGTGACTGTTGTCGCCTTTCGTGTGTCTGCCTTTTTAAAAG ÅAATTGGCTGGT ATGAGTGCCACTGACAACAGCGGAAAGCACACAGACGGAAAAATTTTC TTTAACCGACCA	
	61	-61 ARG box(<i>carAB</i>) -90 -99	
	61	TGATAACCCTGAATGTAGTTTATTCAATTCATTGCATTATATGCAÄTGTGGCGCGCGTGCAT ACTATTGGGA <u>CTTACATCAAATAA</u> GTTAAGTAACGTAATATACGTTACACCGCGCACGTA	
	121	ACTATGCACCCACCCGTTAAGCGTTTTGTG	
		TGATACGTGGGTGGGCAATTCGCAAAACAC	

图 3 谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 中精氨酸生物合成基因序列的分析

Fig.3 The proposed structure of the arginine biosynthesis genes in C. glutamicum ATCC 14067

现代食品科技

将 ArgR 蛋白分别与 7 个基因(*argC、argJ、argB、argF、argG、argH、carA*) 片段混合,室温结合反应 30 min。反应结束后,将反应体系加到 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。电泳结束后将聚丙烯酰胺凝 胶取出用于转膜,具体流程如下:将尼龙膜浸泡活化后,把聚丙烯酰胺凝胶放到膜上,利用转移电泳槽在 380 mA 下转移 30 min。转膜结束后,用紫外线交联 仪器设备进行交联,然后用 5%脱脂乳封闭 1 h。加入 1000 倍稀释的链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶反应 1 h。经洗膜后加入化学发光 HRP 底物(辣根过氧 化物酶底物,也常被称为 ECL 试剂),37 ℃避光显色 至条带清晰。

2 结果与讨论

2.1 ArgR 蛋白的表达与纯化

将连接产物转入 E.coli Top10 感受态细胞,采用 T7 通用引物 PCR 筛选获得阳性菌,挑取阳性转化子 培养后提取质粒,用 Ndel 和 Xhol 双酶切,得到长度 约为 6000 bp 和 520 bp 的两个 DNA 片段(图 4)。测 序结果表明,质粒中所含有的目的基因片段序列正确。





Fig.4 The construction of recombinant plasmid pET22b-argR

注: a 重组质粒图谱; b 质粒 pET22b-argR 经 Nde I 和 Xho I 双酶切的电泳图, M DL5000; 1-2 质粒 pET22b-argR 双 酶切后的产物。

对破碎菌体后离心得到的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 检测,发现目的蛋白主要存在于上清液中 (图 5a),于是利用 Ni-NTA His-Bind 纯化柱对上清液 进行纯化以获得较纯的 ArgR 蛋白。收集各浓度梯度 洗脱液进行 SDS-PAGE 分析,在咪唑浓度为 100 mM (图 5b line 4)时,可以看到在 15 ku 有一条明显的条 带。利用网站(http://web.expasy.org/protparam/)对 ArgR 氨基酸序列进行分析, ArgR 单体含有 171 个氨 基酸,分子质量为 18.5 ku。说明该条带即 ArgR 蛋白。



Fig.5 The purification of ArgR protein

注: a 菌体破碎后上清液与沉淀的 SDS-PADE 电泳图; M 蛋白质 Marker; b 纯化洗脱液 SDS-PADE 电泳图; M 蛋白质 Marker; 1~4 不同咪唑浓度(40、60、80、100 mmol/L)的洗 脱缓冲液洗脱蛋白的洗脱液。

2.2 ArgR 蛋白的分子量测定

利用分子筛色谱柱测定 ArgR 分子量,用几种已 知分子量的蛋白质为标准,进行凝胶层析,以每种蛋 白质的洗脱体积对它们的分子量的对数作图,绘制出 标准洗脱曲线 y=-2.5815x+22.437 融合蛋白 ArgR 的保 留时间为 9.430,计算得其分子量为 109.28 ku,因此 确定天然状态下的 ArgR 是六聚体。



2.3 凝胶阻滞实验观察 ArgR 蛋白与 DNA 片

段在体外的相互作用

如果将 ArgR 蛋白先与生物素标记的 DNA 反应 30 min 后,再加入竞争 DNA(非标记)反应 30 min, 然后进行凝胶阻滞实验。由于竞争 DNA(非标记)远 远多于标记的 DNA,按照动力学原理,绝大部分蛋白 质会与竞争 DNA 结合,使标记 DNA 处于自由状态, 凝胶电泳的放射自显影图上不会出现阻滞条带。



图 7 ArgR 与 argC、argJ、argB、argF、argG、argH、carA基 因片段的 EMSA 结果

Fig.7 EMSAs showing ArgR-*argC*, ArgR-*argJ*, ArgR-*argB*, ArgR-*argF*, ArgR-*argG*, ArgR-*argH*, ArgR-*carA* gene fragments binding

注: a、b、c、d、e、f、g 图分别为 ArgR 与 argC、argJ、 argB、argF、argG、argH、carA 基因片段的 EMSA 结果。line 1: 生物素标记的探针; line 2: 生物素标记的探针与 ArgR 蛋白 的混合物; line 3: 生物素标记的探针、ArgR 蛋白和竞争 DNA (非标记)的混合物。

结果显示 ArgR 蛋白与 argC (a 图)、argB (c 图)、 argG (e 图)和 carA (g 图)基因片段可以在体外结合,表 现出了明显的阻滞效果,且加入竞争 DNA (非标记) 后,大部分标记 DNA 被竞争下来,说明 ArgR 蛋白与 argC、argB、argG、carA 基因片段的结合具有可逆性。 但 ArgR 蛋白与 argJ (b 图)、argF (d 图)、argH (f 图) 基因片段的 EMSA 结果没有出现滞后条带,表明它们 在体外没有结合。从四个可以结合的基因片段可以看 出,ArgR 蛋白的靶标位点没有十分确定的位置,可能 包含翻译起始位点,如 argC (-26~+32),可能位于翻 译起始位点上游较近处,如 *argB*(-86~-29), *carA*(-99~-42);可能位于翻译起始位点上游较远处,如 *argG*(-161~-104)。

由于加入的 ArgR 蛋白(10 µg) 和 DNA 双链(20 fmol) 的量是固定的,但滞后条带颜色的深浅不同, 说明 ArgR 蛋白并不是同等强度的与 *argC、argB、 argG、carA* 基因片段结合,其中 ArgR 蛋白与 *argB* 基因片段的结合量最多,这有可能因为 *argB* 的表达产 物是关键酶乙酰谷氨酸激酶,其受到终产物精氨酸的 反馈抑制^[14]。在合成的 *argC* 基因片段中仅包含了文 献中测定的一对 ARG boxes 中第二个 ARG box 的完 整序列,但 ArgR 蛋白仍然可以与其结合,说明可能 一个 ARG box 就可以与 ArgR 蛋白结合,另一个 ARG box 的存在可以使这种结合更稳定^[15,16]。

3 结论

3.1 精氨酸的生物合成是通过细胞内的代谢网络进行的,该代谢网络由众多的酶催化相互关联的一系列 化学反应以及特异性的膜转移系统所构成。*argR*是 L-精氨酸生物合成途径中普遍存在的一个调控基因, 但不同来源的 ArgR 蛋白对不同基因调控作用不同 [^{15-17]}。有研究报告指出谷氨酸棒状杆菌 ArgR 行使着 负调控功能,过量表达将降低谷氨酸棒状杆菌产精氨 酸的能力^[13]。

3.2 本实验首次从谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 基因 组中扩增得到长度为 516 bp 的 argR 片段,并将其连 接到原核表达载体 pET-22b(+)上,转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 获得重组菌株 E.coli BL21(DE3)/ pET22b-argR。以异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG)诱导实现高效可溶性表达。利用 Ni-NTA His-Bind 纯化柱进行纯化,用不同咪唑浓度的洗脱液 洗脱,取各浓度的洗脱流出液进行 SDS-PAGE 电泳分 析。结果显示, ArgR 蛋白主要存在于含有 100 mM 咪 唑洗脱流出液中。Native PAGE 及分子筛色谱柱对纯 化后的蛋白进行分析表明, ArgR 蛋白分子质量在 108 ku 左右,由于其单体分子量为18 ku,所以 ArgR 在天 然状态下为六聚体。最后采用凝胶阻滞实验(EMSA), 发现 ArgR 可以与谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 中乙 酰谷氨酸半醛脱氢酶编码基因 argC-26~+32 bp,乙酰 谷氨酸激酶编码基因 argB -86~-29 bp,精氨琥珀酸合 成酶编码基因 argG-161~-104 处,编码氨甲酰磷酸生 物合成的 carA 基因-99~-42 bp 结合,其中对 argB 基 因片段的结合反应较为显著。说明在谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 精氨酸代谢过程中, ArgR 可能通过结合 到这四种酶上游的基因片段上来影响这四种酶的表达

现代食品科技

情况,进而影响精氨酸的代谢过程。这些实验结果将 为今后利用谷氨酸棒状杆菌 ATCC 14067 生产精氨酸 提供理论依据。

参考文献

- Petri K, Walter F, Persicke M, et al. A novel type of N-acetylglutamate synthase is involved in the first step of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Bmc Genomics, 2013,14: 15
- [2] Theron G, Reid S J. ArgR-promoter interactions in Corynebacterium glutamicum arginine biosynthesis [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2011, 58(2): 119-127
- [3] Lee S Y, Shin H S, Park J S, et al. Proline reduces the binding of transcriptional regulator ArgR to upstream of *argB* in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(1): 235-242
- [4] 袁永.钝齿棒杆菌 ArgR 的凝胶阻滞实验及单增李斯特菌 actA、inlB、p60 表达载体的构建[D].南昌:南昌大学,2012 YUAN Yong. Electrophoretic mobility shift assay by ArgR repressor from Corynebacterium crenatum and construction of expression vector carrying act A, inlB, p60 from Listeria monocytogenes [D]. Nanchang: Nanchang University, 2012
- [5] Lv Y Y, Liao J J, Wu Z H, et al. Genome sequence of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, which provides insight into amino acid biosynthesis in coryneform bacteria [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(3): 742-743
- [6] Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, et al. The complete Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins [J]. Journal of Biotechnology, 2003,104(1-3): 5-25
- [7] Molloy P L. Electrophoretic mobility shift assays [J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2000, 130: 235-246
- [8] Hellman L M, Fried M G Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions [J].

Nature Protocols, 2007, 2(8): 1849-1861

- [9] Charlier D, Roovers M, Van Vliet F, et al. Arginine regulon of *Escherichia coli* K-12. A study of repressor-operator interactions and of *in vitro* binding affinities versus *in vivo* repression [J]. Journal of Molecular Biology, 1992, 226(2): 367-386
- [10] Tian G, Lim D, Carey J, et al. Binding of the arginine repressor of *Escherichia coli* K12 to its operator sites [J]. Journal of Molecular Biology, 1992, 226(2): 387-397
- [11] Xu M J, Rao Z M, Dou W F, et al. The role of ARGR repressor regulation on L-arginine production in *Corynebacterium crenatum* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(3): 587-597
- [12] Lee S Y, Park J-M, Lee J H, et al. Interaction of transcriptional repressor ArgR with transcriptional regulator FarR at the *argB* Promoter region in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(3): 711-718
- [13] Yim S H, Jung S, Lee S K, et al. Purification and characterization of an arginine regulatory protein, ArgR, in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(12): 1911-1920
- [14] 闫洪波,王威,李令娣,等.原核细胞精氨酸生物合成途径的研究进展[J].生物技术通报,2015,31(1):21-28
 YAN Hong-bo, WANG Wei, LI Ling-di, et al. Research progress of the arginine biosynthetic pathway in prokaryotic cells [J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(1): 21-28
- [15] Iwanaga N, Ide K, Nagashima T, et al. Genome-wide comprehensive analysis of transcriptional regulation by ArgR in *Thermus thermophilus* [J]. Extremophiles, 2014, 18(6): 995-1008
- [16] Cho S, Cho Y B, Kang T J, et al. The architecture of ArgR-DNA complexes at the genome-scale in *Escherichia coli* [J]. Nucleic Acids Research, 2015,43(6): 3079-3088
- [17] Perez-Redondo R, Rodriguez-Garcia A, Botas A, et al. ArgR of *Streptomyces coelicolor* is a versatile regulator [J]. Plos One, 2012, 7(3): 16