

汤 玥,何浩波,何 凯,等. 产 *L*-蛋氨酸基因工程菌株的构建[J]. 江苏农业科学,2020,48(22):37-43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.22.006

产 *L*-蛋氨酸基因工程菌株的构建

汤 玥,何浩波,何 凯,陈馨茹,胡翠英,姚雪梅,李良智
(苏州科技大学,江苏苏州 205009)

摘要:以野生型蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) EN34 为出发菌株,增强胱硫醚 γ -合成酶基因(*metI*)表达,敲除或弱化腺苷蛋氨酸合成酶的编码基因 *metK*,分析这 2 个基因的改变对蛋氨酸产量的影响。从枯草芽孢杆菌基因组中扩增 P43 强启动子,连接到 pEB03 质粒,利用重组连接的方法,将 *metI* 从 *Bacillus cereus* EN34 扩增重组连接到质粒,构建成 pEB03-P43-SD-*metI*,通过电击转化到 *Bacillus cereus* EN34,获得 *Bacillus cereus* EN34(pEB03-P43-SD-*metI*) 菌株。通过 *Bacillus cereus* EN34 扩增 *metK* 基因,提取质粒 pKVM1 以及重组连接等方法,构建出 pKVM1::*metK'* 敲除质粒,将质粒电转化到 *Bacillus cereus* EN34 中进行 *metK* 交换,再筛选出单交换成功的菌株,最后获得 *metK* 弱化成功 *Bacillus cereus* EN34 Δ (*metK*) 菌株。经发酵培养基硫源优化分析得出,单独增强 *metI* 表达不能提高蛋氨酸产量,产量与出发菌株基本一致;改变 *metK* 基因,能提高蛋氨酸产量,但不能完全删除 *metK* 基因,否则将导致细胞死亡。硫源采用 200 μ L/L 甲基硫醇钠和二甲基硫醚的混合物(体积比 19:1)、15 g/L 的 Na_2SO_4 ,二者结合,*Bacillus cereus* EN34 Δ (*metK*) 菌株蛋氨酸产量为 440.66 mg/L,是出发菌株的 20 倍。本研究为芽孢杆菌工程菌的构建提供了一定的技术支持。

关键词:*L*-蛋氨酸;基因工程;芽孢杆菌;*metI* 基因;蛋氨酸产量

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)22-0037-07

蛋氨酸作为必需氨基酸之一,是动物饲料中必不可少的添加剂。产乳牛食用保护性蛋氨酸^[1-2],可以改善肉牛瘤胃内环境,提高产奶量^[3-4];喂食产蛋鸡或肉仔鸡保护性蛋氨酸能提高产蛋能力和肉质^[5-6];长期添加 OH-蛋氨酸能改善猪肉嫩度^[7]。现有全球制备蛋氨酸的方法主要是化学法^[8],发酵法制备蛋氨酸相对安全,但产量较低^[9-11]。目前,笔者所在实验室已筛选到 1 株蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* EN34),但由于代谢通路中复杂的调控机制,蛋氨酸产量难以提高。胱硫醚 γ -合成酶是由 *metI* 基因(早期称 *yjcl* 基因)编码,它有 2 个功能^[12-14],一是为硫酸盐存在时,催化 H_2S 与琥珀酰高丝氨酸反应形成 *L*-高半胱氨酸;二是催化 *O*-琥珀酰高丝氨酸生成胱硫醚。通过加强 *metI* 基因的表达,促进胞外 S 元素的消化吸收,可以提高蛋氨

酸产量。*S*-腺苷甲硫氨酸(SAM)合成酶(由 *metK* 基因编码)催化蛋氨酸变成 SAM^[15-16],是蛋氨酸重要代谢途径,阻断或减弱此途径,理想状态下能有效截留 *L*-蛋氨酸,从而提高蛋氨酸产量。目前,针对蜡样芽孢杆菌这 2 个基因的改变研究较少,鉴于此,本研究以 *Bacillus* sp. EN34 为出发菌株,通过基因工程的方法,增强胱硫醚 γ -合成酶的表达量以及减弱或阻断 SAM 合成酶,以提高蛋氨酸产量。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒 蜡样芽孢杆菌 EN34(*Bacillus cereus* EN34)为笔者所在实验室筛选保存菌株。质粒 pEB03、pKVM1,以及感受态细胞 S17-1 均为笔者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、基因组 DNA 小量抽提试剂盒(离心柱式)等均购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA Marker 250 bp I、II、III 均购自上海捷瑞生物工程有限公司;*Eco*R I、*Hind* III、*Bam*H I 均购自北京全式金生物技术有限公司; T_4 连接酶购自基因生物技术国际贸易(上海)有限公司;重组酶 ClonExpress® II 购自南京诺唯

收稿日期:2020-02-18

基金项目:江苏省大学生创新创业计划(编号:201810332059X);苏州科技发展规划农业基础设施项目(编号:SYN201507);苏州科技大学科学研究项目(编号:XKQ201611)。

作者简介:汤 玥(1999—),女,江苏扬州人,主要从事发酵工程方面的研究。E-mail:1430701525@qq.com。

通信作者:胡翠英,硕士,高级实验师,主要从事发酵工程方面的研究。E-mail:13151170848@163.com。

赞生物科技股份有限公司;氯霉素、氨苄青霉素、红霉素等抗生素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,使用浓度分别为 25、100、10 μg/mL。氨基酸含量分析所用试剂、培养基成分均购自国药集团化学试剂有限公司。主要仪器有电泳仪(Subcell 德国 Eppendorf 公司),凝胶成像分析仪(Gel Doc XR + 美国 Bio - Rad 公司),全波长紫外分光光度计(NanoDrop 2000 美国 Thermo Electron 公司),细胞电穿孔仪(ECM630 美国 BTX 公司),氨基酸分析仪(A300 德国 MembraPure 公司),聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(5332 德国 Eppendorf 公司)等。

1.1.3 培养基 LB 培养基(1 L):蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 10 g,pH 值为 7.0;种子液(1 L):牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,pH 值为 7.2;发酵培养基(1 L):葡萄糖 110 g,尿素 8 g,KH₂PO₄ 1 g,MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g,FeSO₄ · 7H₂O 0.2 g,MnSO₄ ·

H₂O 0.2 g,(NH₄)₂SO₄ 2 g,生物素 5 μg/100 mL,硫胺素 200 μg/100 mL,Na₂SO₄ 15 g,pH 值为 6.5。

1.2 PCR 引物设计

利用 KEGG Pathway 网站与 MEGA5 分析 *metK* 和 *metI* 基因保守序列,利用 NCBI 数据库设置 3 对引物(*metI* F/R、*metK1* F/R、*metK2* F/R),用于扩增 EN34 菌株相应的基因,然后测序。根据测序结果,设置引物 *metI* - F(含 *EcoR* I 与 P43 部分序列)、*metI* - R(含 *Bam*H I 与部分 pEB03 上面的序列)、*metKU* F(含 pKVM1 质粒上部分序列、*EcoR* I 序列)、*metKU* R(含 *metK* 下游部分序列)、*metKD* F(含 *metK* 前面部分序列)、*metKD* R(含 pKVM1 质粒上部分序列、*EcoR* I 序列)。P43 强启动子来源于枯草芽孢杆菌,依据 NCBI 数据库,设置 P43 引物 P43 F(含 *Hind* III 序列)与 P43 R(含 *EcoR* I 和 SD 序列)。扩增基因的引物名称和具体引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物

名称	引物序列(5'→3')
P43 F	CCCAAGCTTTGTGACGTGCATGCAGGCCG
P43 R	CCGGAATTCCTCCTTATAATGGTACCGCTATCACT
<i>metI</i> F	ATGTCAACTATCGAAACAAAA
<i>metI</i> R	TCATATTCTTACACCTTCTTTTA
<i>metI</i> - F	ACCATTATAAGGAGGGAATTCATGTCAACAATCGAAACAAAAGTACG
<i>metI</i> - R	CGCTCTAGAACTAGTGGATCCTCATATTCTTACACCTTCTTTTACCCC
<i>metK1</i> F	CGTCATCTGTTACATCTGAGT
<i>metK1</i> R	TCCGGATCGATTTCTTCCCA
<i>metK2</i> F	GATGAAAATGGTAAACCACTACG
<i>metK2</i> R	GCTTTGTCTGTACGTTCCCAT
<i>metK</i> U F	CTGCAGAAGCTTCTAGAAATTCGACGCAAATGCACGTGTAGC
<i>metK</i> U R	GAGCTGCATCGTCAGTCATTTGACCTTCGC
<i>metK</i> D F	AATGACTGACGATGCAGCTCGTTATGTTCCGA
<i>metK</i> D R	GGTACCCGGGAGCTCGAATTCGTACGTCCGAAGTGCCCT

注:下划线表示酶切位点。

1.3 *metI* 基因加强表达

metI 基因加强表达的操作流程如图 1 所示。(1)获得 *metI* 扩增产物。接种 EN34 菌株于种子液,30 ℃培养过夜,用液氮碾磨菌体,提取总 DNA。用 *metI* F/R 引物扩增 *metI* 基因并测序。(2)构建 pEB03 + P43 + SD 质粒。获取枯草芽孢杆菌基因组,用 P43 F/R 引物(带 SD 序列)扩增 P43 强启动子,获得 P43 - SD 产物。用 *EcoR* I 与 *Hind* III 双酶切 pEB03 质粒,连接 P43 - SD。转化连接产物到 S17 - 1 感受态细胞,挑取转化子,用引物 P43 F 与 P43 R 验证,获得含 pEB03 - P43 - SD 质粒的 S17 -

1。(3) pEB03 - P43 - SD - *metI* 表达质粒的构建。用 *Bam*H I 酶切 pEB03 - P43 - SD 质粒,将酶切产物用 Exnase 酶重组连接 *metI* 基因扩增产物(用 *metI* - F/R 扩增)。重组连接产物转化到 S17 - 1 感受态细胞,挑取转化子,利用 *metI* - F/R 验证 *metI* 基因序列,获得含 pEB03 - P43 - SD - *metI* 质粒 S17 - 1 细胞。(4)电击转化与验证。将 pEB03 - P43 - SD - *metI* 质粒电击转化到 *Bacillus* sp. EN34 感受态细胞中^[17]。电击转化条件:电容 25 μF,电阻 200 Ω,脉冲电压 2 500 V/cm,约 4.5 ms/次脉冲。向电击液中加入 LB 培养基,30 ℃静置 2 h,涂布 LB

平板(含氯霉素),30 ℃ 培养 24 ~ 36 h;用引物 P43 F/R 验证是否有 P43 强启动子。将获得的菌株命名为 *Bacillus cereus* EN34 pEB03-P43-SD-*metI*。

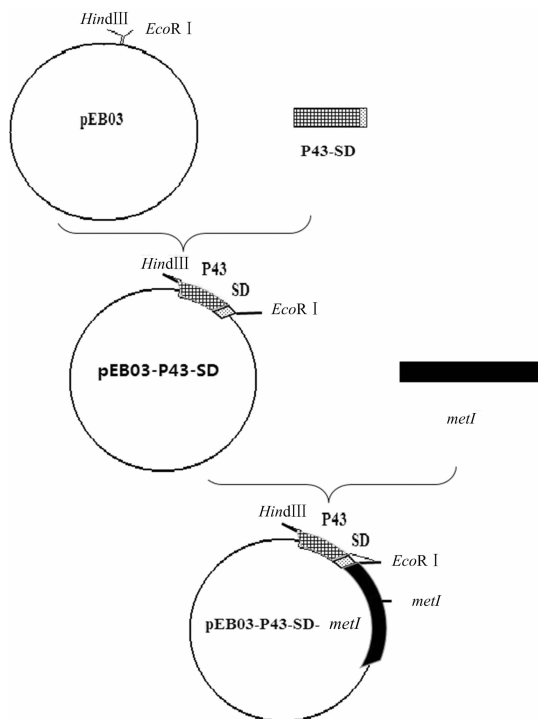


图1 pEB03-P43-SD-*metI* 质粒构建流程

1.4 *metK* 基因敲除

metK 基因敲除流程见图 2。(1)扩增 EN34 菌株中 *metK*。因 *metK* 较长,分成 2 部分扩增,中间重

叠。利用引物 *metK1* F/R、*metK2* F/R 扩增 *metK* 基因,测序。(2)分别扩增 *metK* 上下游部分序列,如图 2 中 *metK* U(格子)与 *metK* D(点)片段,引物为 *metKU* F/R、*metKD* F/R。(3) pKVM1::*metK'* 的构建。重组连接 pKVM1 的 *EcoR* I 酶切产物与 *metK* 上下游部分序列。将连接产物转化到 S17-1 感受态细胞中。挑取在氨苄 LB 平板上长出的菌落。以 *metKU* F/R 为引物验证是否含有 *metK'* 基因。(4) pKVM1::*metK'* 质粒电击转化 EN34 菌株。方法同“1.3”节。涂布平板[含安苄(Amp)、异丙基-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-gal)];30 ℃ 培养 24 ~ 36 h;挑出蓝色菌株到新的 LB 培养基中,过夜培养。(5)单交换转化子。将培养液接种至 LB 培养基(含 Amp、SAM、IPTG 和 X-gal)中,30 ℃ 培养 6 ~ 12 h,转接至新鲜 LB 培养基中,42 ℃ 培养 6 ~ 12 h,系列稀释(10^{-4} 和 10^{-5})至含葡萄糖的营养肉汤固体培养基平板(含氨苄、SAM、IPTG 和 X-gal),42 ℃ 过夜培养,挑取转化子,非蓝色菌落,在 42 ℃ LB 培养基中培养 16 h,以 *metKU* F 与 *metKD* R 为引物验证单交换转化子。(6)双交换转化子。挑取转化子至 LB 液体培养基(含 SAM)中,30 ℃ (无抗性)培养并转接两代,稀释涂 LB 平板,30 ℃ 培养,挑取转化子,并进行分子验证(双交换)。将获得的菌株命名为 *Bacillus cereus* EN34Δ(*metK*)。

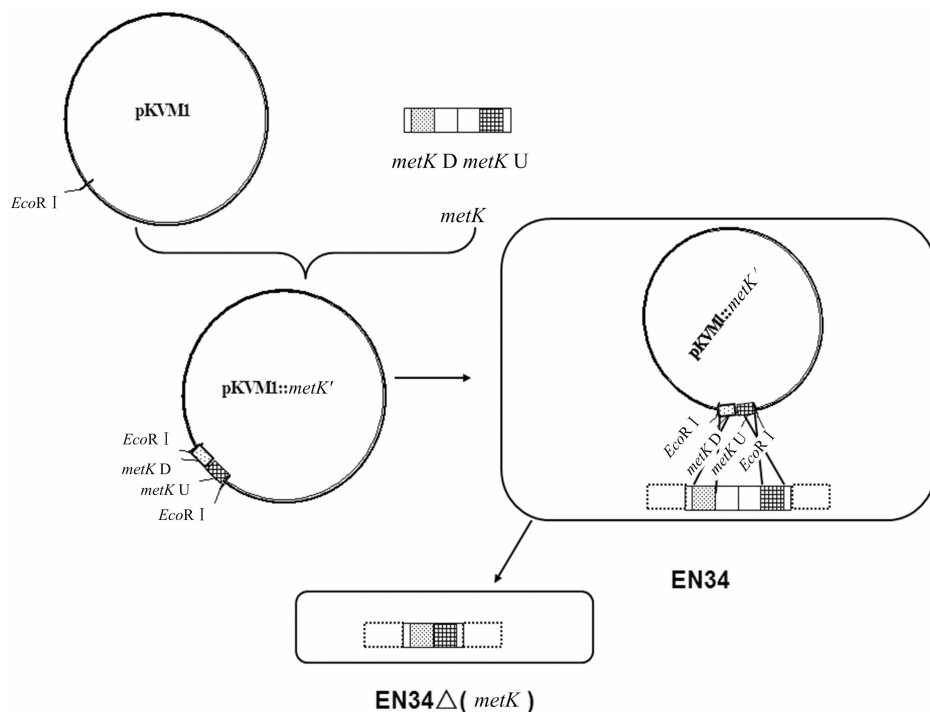


图2 *metK* 基因敲除流程

1.5 蛋氨酸产量分析

分别接种 *Bacillus cereus* EN34、*Bacillus cereus* EN34 (pEB03 - P43 - SD - *metI*)、*Bacillus cereus* EN34Δ(*metK*) 到种子液, 过夜培养, 接种到发酵培养基, 向培养 *Bacillus cereus* EN34Δ(*metK*) 的发酵培养基中加入 10 mg/L SAM, 下同。30 ℃ 200 r/min 摇床培养 72 h。发酵液 10 000 r/min 离心 10 min, 取 400 μL 上清液样品, 加入 100 μL 10% 的碘基水杨酸, 2 ~ 8 ℃ 静置 60 min。14 500 r/min 离心 5 min, 用 0.22 μm 针式过滤器过滤, 得到的样品用氨基酸分析仪分析。每种菌平行 3 次试验。

1.6 优化培养基成分

Bacillus cereus EN34 (pEB03 - P43 - SD - *metI*) 增加 *metI* 表达, *metI* 催化反应之一是加速 Na₂SO₄ 向蛋氨酸的转化, 针对此菌的优化项是改变培养基中 Na₂SO₄ 的含量。发酵培养基中其他成分不变, Na₂SO₄ 浓度梯度为 5、10、15、20、25、30、35、45 g/L。

Bacillus cereus EN34Δ(*metK*) 蛋氨酸相对产量较高, 对培养条件也做了 2 种硫源的优化。发酵培养基中其他成分不变, Na₂SO₄ 浓度梯度为 5、10、15、

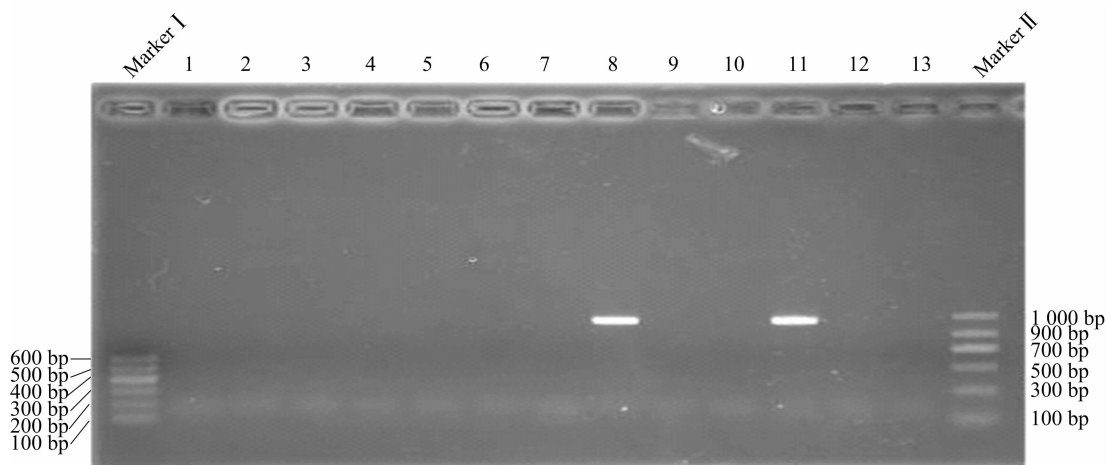
20、25 g/L。向发酵培养基中梯度添加甲基硫醇钠和二甲基硫醚的混合物, 二者体积比为 19 : 1, 替换发酵培养基中 Na₂SO₄。混合物的添加浓度分别为 200、250、300、350、400 μL/L。

最后, 在最优条件下, 同时培养 3 种菌株。

2 结果与分析

2.1 质粒 pEB03 - P43 - SD - *metI* 构建

以 *Bacillus cereus* EN34 基因组为模板, 扩增 *metI*, 电泳分析得出, 片段大小为 1 113 bp。以枯草芽孢杆菌基因组 DNA 为模板, 扩增 P43 强启动子, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, 扩增片段大小约为 450 bp (含 SD 序列)。用 T₄ 连接酶连接 pEB03 质粒酶切产物与 P43 - SD, 对连接成功的菌株提取质粒 pEB03 - P43 - SD, 重组连接此质粒酶切产物与 *metI* 片段, 转化 S17 - 1 感受态细胞后挑取菌落, 培养, 电泳分析结果 (图 3) 表明, 在选取的 13 个菌株中, 有 2 个菌株 (8 号和 11 号) 中获得 *metI* 序列, 片段大小与预期一致, 约 1 000 bp。证明质粒 pEB03 - P43 - SD - *metI* 构建成功。



1~13 为构建后各菌株质粒的 *metI* 扩增结果

图3 质粒 pEB03-P43-SD-*metI* 构建后 *metI* 电泳验证结果

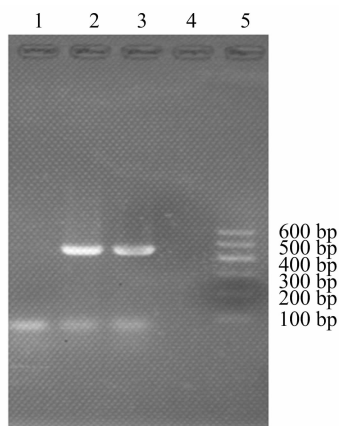
2.2 电击转化质粒 pEB03 - P43 - SD - *metI*

将质粒 pEB03 - P43 - SD - *metI* 电击转化到 *Bacillus cereus* EN34 感受态细胞后, 挑取获得的菌株, 利用 PCR 法验证是否有 P43 强启动子 (大约 400 bp)。经电泳分析, 获得 8 株转化成功的菌株, 为与出发菌株对照, 分析了检验转化成功的 1 株菌株、出发菌株、质粒 pEB03 - P43 - SD - *metI* P43 序列扩增电泳图, 结果见图 4。由图 4 可知, 出发菌株没有扩增出 P43 序列, 而转化成功的菌株与质粒

pEB03 - P43 - SD - *metI* 的 P43 扩增成功, 在约 450 bp 处均有明显的条带。

2.3 构建质粒 pKVM1::*metK'*

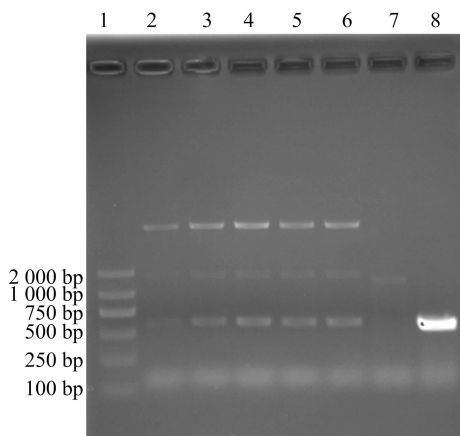
以 *Bacillus cereus* EN34 基因组为模板, *metK1* F/R、*metK2* F/R 为引物扩增出 *metK* 基因完整序列, 经测序分析, 全长约 1 095 bp。用引物 *metKU* F/R、*metKD* F/R 扩增相应片段, 2 个片段大小均约为 300 bp。2 个片段重组连接后命名为 *metK'*, 大小约为 600 bp。将 pKVM1 酶切产物与 2 个片段重组



1—*Bacillus cereus* EN34 P43; 2—电击成功后的 *Bacillus cereus* EN34 P43; 3—pEB03-P43-SD-*metI* 质粒 P43; 4—未上样; 5—Mark 100 bp-l

图4 构建质粒电击成功后 P43 扩增电泳结果

连接,形成 pKVM1::*metK'*,转化感受态细胞 S17-1。经验证,质粒 pKVM1::*metK'* 中含有 *metK'*,说明质粒构建成功,见图 5 中 8 号样品电泳结果。



1—Marker; 2~6—单交换成功菌株 *metK* 扩增结果; 7—*Bacillus cereus* EN34 *metK* 扩增结果; 8—构建的质粒 *metK* 扩增结果

图5 *metK* 敲除最后单交换验证结果

2.4 改变 *Bacillus cereus* EN34 *metK* 基因

提取质粒 pKVM1::*metK'*,电击转化到 *Bacillus cereus* EN34 感受态细胞中。电转化后涂布含有 Amp、IPTG、X-gal 的平板中。质粒 pKVM1 上含有 β -半乳糖苷酶基因,并含有 Amp 抗性,因此电转化成功的转化子在 X-gal 存在的情况下能够显蓝色。挑选 5 株蓝色转化子进行单交换培养,挑取白色菌落。质粒 pKVM1 上带有的 Amp 抗性,即使发生单交换,其 Amp 抗性仍存在(*Bacillus cereus* EN34 原始菌无 Amp 抗性)。如果质粒与基因组没有发生重组,菌落显示蓝色,只有白色菌落有可能发生同源重组^[18]。进行双交换试验,没有菌株生长在 LB 平板上,说明发生双交换,SAM 无法合成,即使补充适

量 SAM,菌体也会死亡,所以最终只能获得单交换的菌株,单交换仅仅是弱化了 *metK* 基因^[19]。

以 *metK*U F/R 为引物,不同菌株的电泳结果如图 5 所示。选取的 5 株菌中均含有重组后的 *metK'* 基因(约 600 bp)和约 1 700 bp 较弱的 *metK* 完整基因,比 7 号泳道中 *Bacillus cereus* EN34 扩增的片段稍大,应该是 *metK*-*metK'* 结构。电泳图中 2~6 号菌株中出现更大的片段,应该有质粒插入到 *metK* 基因中,质粒大小约为 11 000 bp。

2.5 蛋氨酸产量分析

将 *Bacillus cereus* EN34 (pEB03 - P43 - SD - *metI*)、*Bacillus cereus* EN34 Δ (*metK*)、*Bacillus cereus* EN34 均接种到完全培养基,过夜培养后接种到发酵培养基。培养 72 h 后,利用氨基酸分析仪分析发酵液中蛋氨酸产量(图 6)。*Bacillus cereus* EN34 发酵液中蛋氨酸产量平均值为 38.89 mg/L,*Bacillus cereus* EN34 (pEB03 - P43 - SD - *metI*) 产量平均值为 29.46 mg/L。说明虽然 *metI* 基因增加了拷贝数,但蛋氨酸产量并没有提高。原因可能是发酵培养基中硫源的量不足,也可能是拷贝数增加了,但表达量还未提高。*Bacillus cereus* EN34 Δ (*metK*) 产量平均值为 79.58 mg/L。

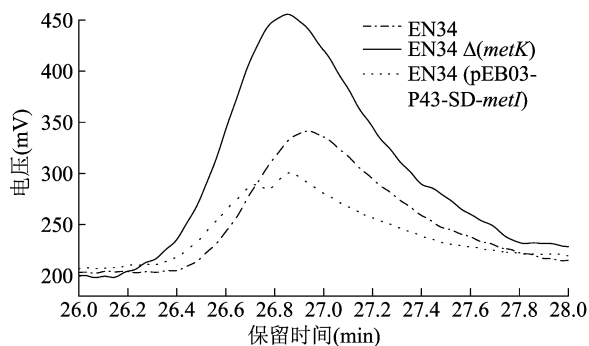


图6 工程菌与出发菌株蛋氨酸产量分析

2.6 培养条件优化

针对 *Bacillus cereus* EN34 (pEB03 - P43 - SD - *metI*) 菌株,梯度添加不同浓度的 Na_2SO_4 后,蛋氨酸产量有明显上升(图 7),当 Na_2SO_4 添加量达到 15 g/L 时,蛋氨酸产量达到最大值。由数据计算结果可知,此时蛋氨酸产量达 26.53 mg/L,与“2.5”节中结果一致。说明增加有强启动子 P43 的表达质粒,没有强化硫酸钠的代谢通路,须要进一步加强表达整个通路中的其他酶。 Na_2SO_4 浓度高于 15 g/L 时蛋氨酸产量变化不大,因此 Na_2SO_4 最佳添加量为 15 g/L。图 8 展现的是 Na_2SO_4 对 *Bacillus*