

The Impact of Strong Promoter *Psod* on *Pyc* Gene Expression in *Corynebacterium glutamicum*

Zhicheng Zou, Jiaxi Jiang, Junhui Ding, Baoyi Qiao, Yijia Cao, Wei Zhou*, Jun Chen*

College of Chemistry and Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan Hubei

Email: *547493966@qq.com, *celljun@163.com

Received: Jul. 2nd, 2019; accepted: Jul. 16th, 2019; published: Jul. 23rd, 2019

Abstract

In order to obtain a strain with high yield of L-malic acid, the wild-type *C. glutamicum* was modified with gene editing. The superoxide dismutase gene promoter (*Psod*) was inserted ahead of pyruvate carboxylase gene (*pyc*), a key gene in the oxaloacetate anaplerotic reaction, to promote the yield of L-malic acid in a flow of pyruvate to oxaloacetate, then to L-malic acid. This strain was named as CZM03. The experimental results showed that the PYC activity was upregulated about 2.2-fold in CZM03 compared with the wild-type *C. glutamicum*. There was no significant difference in the growth rate and the maximum biomass at the plateau stage between the two strains. This indicates that the knock-in of the *Psod* promoter had no significant effect on the growth of the bacteria, but the activity of PYC increased significantly, which was beneficial to the accumulation of the target products.

Keywords

L-Malic Acid, *C. glutamicum*, Gene Editing, Pyruvate Carboxylase, Superoxide Dismutase Gene Promoter (*Psod*)

强启动子 *Psod* 对谷氨酸棒状杆菌 *pyc* 基因表达的影响

邹志成, 蒋佳稀, 丁俊辉, 乔宝艺, 曹懿佳, 周卫*, 陈俊*

武汉科技大学化学与化工学院, 湖北 武汉

Email: *547493966@qq.com, *celljun@163.com

收稿日期: 2019年7月2日; 录用日期: 2019年7月16日; 发布日期: 2019年7月23日

*通讯作者。

文章引用: 邹志成, 蒋佳稀, 丁俊辉, 乔宝艺, 曹懿佳, 周卫, 陈俊. 强启动子 *Psod* 对谷氨酸棒状杆菌 *pyc* 基因表达的影响[J]. 微生物前沿, 2019, 8(3): 103-109. DOI: 10.12677/amb.2019.83013

摘要

为了获得L-苹果酸高产的谷氨酸棒状杆菌(*C. glutamicum*), 通过基因编辑, 在草酰乙酸回补途径的关键酶丙酮酸羧化酶基因(*pyc*)前面, 敲入超氧化物歧化酶基因启动子(*Psod*), 重组菌株命名为CZM03, 通过强启动子*Psod*增强PYC酶活性, 促进丙酮酸→草酰乙酸→苹果酸, 利于苹果酸的生成。结果表明: 与野生型*C. glutamicum*相比, 重组菌株CZM03的PYC活性上调了约2.2倍; 到平台期, 两者的生长速率和最大生物量没有显著差异。这表明*Psod*强启动子的敲入, 对菌的生长没有明显影响, 但是PYC的酶活却有大幅度提高, 这对于目的产物的积累是有利的。

关键词

L-苹果酸, 谷氨酸棒状杆菌, 基因编辑, 丙酮酸羧化酶, 超氧化物歧化酶基因启动子*Psod*

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

L-苹果酸是一种重要的四碳化合物, 已被美国能源部列为十二大生物基平台化合物之一, 在食品、医药、化工等行业有着广泛的应用。目前苹果酸的合成主要有化学合成法、酶法和发酵法[1]。化学合成法虽然成本低廉, 但合成的苹果酸为 DL 型, 不易吸收, 且有一定的毒性, 不宜在食品与医药工业中应用。酶转化法生产 L-苹果酸主要以富马酸酶转化为主, 依赖高纯度的富马酸为原料, 而富马酸价格昂贵。发酵法合成苹果酸, 目前通常采用曲霉属菌株作为生产菌株[2] [3] [4] [5], 产量较高, 但是生产周期长、产杂酸多、且难以对其进行遗传改造。

C. glutamicum 是经典的食品性安全菌, 遗传背景清晰, 已广泛用于化学品的生物制造[6] [7] [8]。*C. glutamicum* 在厌氧条件下, 丙酮酸经过还原 TCA (rTCA)途径合成苹果酸, 理论上的糖酸转化率为 200%, 是目前所有已知 L-苹果酸合成途径中最高的[9]。本研究采用系统生物学方法对 *C. glutamicum* 中 L-苹果酸代谢途径进行分析, 通过基因编辑, 对野生型 *C. glutamicum* 进行代谢途径改造, 在草酰乙酸回补途径的关键酶丙酮酸羧化酶基因(*pyc*)前面, 敲入超氧化物歧化酶基因启动子(*Psod*), 增强 PYC 酶活性, 促进丙酮酸→草酰乙酸→苹果酸, 利于目标产物的积累。

2. 材料与方法

2.1. 材料

本研究所用到的菌株和质粒见表 1。

野生型 *C. glutamicum* ATCC13032 菌株、*E. coli* DH5 α 由本实验室保存; 质粒 DNA 提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自 Omega Bio-Tek 公司; 限制性内切酶购自 Thermo scientific; T4 DNA ligase 购自 TaKaRa; fast Pfu PCR Mix DNA 聚合酶购自北京佳兰生物科技有限公司; 引物均由江苏金唯智生物科技有限公司合成; 其它试剂均为国产分析纯。

用于扩增 *pyc* 基因上游同源臂的引物为 CPyr-U1 和 CPyr-U2; 用于扩增 *pyc* 基因下游同源臂的引物

Table 1. Lists of strains and plasmids used for this study**表 1.** 本研究所用菌株、质粒

Name	Description	Sources
<i>C. glutamicum</i>	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Stored in lab
<i>C. glutamicum</i> CZM03	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 (<i>Psod</i>) <i>pyc</i>	This study
pK19ms- <i>Psod-pyc</i>	pK19mobsacB derivative containing upstream and downstream homology arms of <i>pyc</i> gene and <i>Psod</i>	This study

为 CPyr-D1 和 CPyr-D2; 用于扩增 *Psod* 启动子的引物分别 CPs 1 和 CPs 2; *Psod* 敲入后的检测引物为 OPs1 和 Ops2。具体引物序列组成见表 2。

Table 2. Primers used in this study**表 2.** 本研究所用的引物

引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度
CPyr-U 1	CTATGACATGATTACAAGCTTGCTGTGGCAGTGACCAACCG	58°C
CPyr-U 2	CCCGGAATAATTGGCAGCTATAGAGTAATTATTCCTTTCAACAAGAGACC	
CPyr-D 1	TTTTACCCGTGTCGACTCACACATCTTCAACG	58°C
CPyr-D 2	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCCAAAGATGGGGTAAGTCTGGCC	
CPs 1	TAGCTGCCAATTATTCCGGG	58°C
CPs 2	ATGTGTGAGTCGACACGGGTAAAAAATCCTTTC	
OPs 1	TGCAATATCAACAAAAAGGCCTA	60°C
OPs 2	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCCAAAGATGGGGTAAGTCTGGCC	

注: 引物 CPyr-D 2 与 OPs 2 共用。

发酵种子液培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 5, 酵母提取物 2.5, 氯化钠 5, NaAce 2.5。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, KHCO₃ 20, NaAce 5, KH₂PO₄ 0.75, K₂HPO₄ 0.75, (NH₄)₂SO₄ 5, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCl₂ 0.2, MnSO₄·4H₂O 0.02, FeSO₄·7H₂O 0.005, V_H 0.2 mg/L, V_{B1} 0.2 mg/L。

2.2. 方法

2.2.1. 基因敲出载体构建

Psod 启动子的敲入载体 pK19ms-*Psod-pyc* 构建: 先扩增用于同源重组的上、下游同源臂片段, 再扩增 *Psod* 启动子片段, 然后利用 Soeing PCR, 获得上游同源臂、*Psod* 启动子、下游同源臂三者的融合片段; 将融合片段以双酶切的方式克隆至 pK19mobsacB, 获得 *Psod* 启动子的敲入载体 pK19ms-*Psod-pyc*。

2.2.2. 敲入载体电转化 *C. glutamicum*

制备 *C. glutamicum* 感受态细胞, 制备方法参照文献[10]进行。敲入载体电转化 *C. glutamicum* 感受态细胞的参数设置为: 1.8 kV, 4 mS。具体操作步骤参照文献[10]进行。

2.2.3. 酶活测定

丙酮酸羧化酶酶活测定参照文献[11]进行。

2.2.4. 生长曲线绘制

每隔 3 h 取样, 于 OD₆₀₀ 处测菌液浓度, 并绘制生长曲线。

2.2.5. 残糖测定

取 0.5 mL 培养好的菌液于 2 mL 的离心管中, 加入 0.5 mL 的 DNS, 在沸水中孵育 5 min 立即置于冰水浴冷却, 然后在 A_{540} 测 OD 值, 再根据标准曲线计算出残糖, 具体参考文献[12]。

3. 结果与分析

3.1. 敲入载体 pK19ms-*Psod-ptyc* 的构建

以野生型 *C. glutamicum* 基因组 DNA 为模板, 扩增目的片段, 参照方法 1.2.1, 构建敲入载体 pK19ms-*Psod-ptyc*。结果见图 1, 图 1(a) 的 1 号为 *ptyc* 基因上游同源臂(约 500 bp), 2 号为 *Psod* 启动子片段(约 200 bp), 3 号 *ptyc* 基因下游同源臂(约 500 bp), 4 号为上游同源臂、*Psod* 启动子、下游同源臂的融合片段(大小约为 1200 bp)。

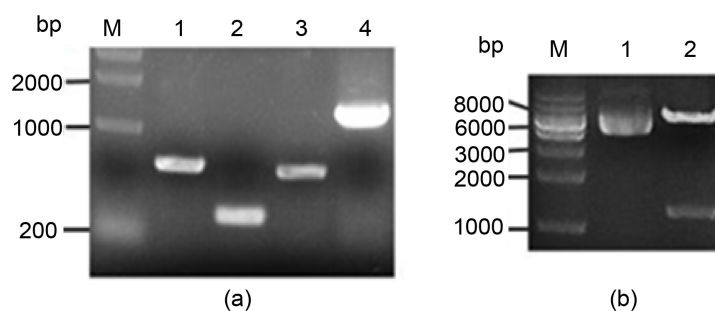


Figure 1. Construction of the knock-in vector pK19ms-*Psod-ptyc*. (a) Amplification of the target fragments. 1: the up-stream arm of *ptyc* gene, 2: the *Psod* promoter fragment, 3: the down-stream arm of *ptyc* gene; (b) Identification of the knock-in vector by restriction enzyme digestion. 1: the recombinant vector pK19ms-*Psod-ptyc*, 2: digestion the recombinant vector pK19ms-*Psod-ptyc* by *Hind* III and *Bam*HI

图 1. 敲入载体 pK19ms-*Psod-ptyc* 的构建。(a) 敲入片段的扩增: 1: *ptyc* 基因上游同源臂, 2: *Psod* 启动子片段, 3: *ptyc* 基因下游同源臂; (b) 敲入载体的酶切鉴定: 1: 重组质粒 pK19ms-*Psod-ptyc*, 2: 重组质粒 pK19ms-*Psod-ptyc* 用 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切

将此融合片段克隆(酶切位点为 *Hind* III 和 *Bam*HI)至 pK19mobsacB 载体(大小为 5719 bp), 得到重组载体 pK19ms-*Psod-ptyc*。重组质粒进行双酶切鉴定, 结果见图 1(b), 所得条带大小与预期相一致(1200 bp), 说明上游同源臂、*Psod* 启动子、下游同源臂的融合片段已成功克隆到 pK19mobsacB 载体上, 重组载体命名为 pK19ms-*Psod-ptyc*。

3.2. 重组菌株 CZM03 的鉴定

将所构建的敲入质粒载体, 电转化谷氨酸棒状杆菌, 筛选阳性重组菌株并鉴定, 结果见图 2。M 为 DNA 分子量标记 Marker, 1 号和 2 号分别以野生型 *C. glutamicum* 和重组菌株 CZM03 的基因组 DNA 为模板, 以上游同源臂的上游引物 CPyr-U1 和下游同源臂的下游引物 CPyr-D2, 检测 *Psod* 启动子的敲入情况, *Psod* 启动子大小为 200 bp, 上、下游同源臂大小约为 500 bp, 由图 2(a)可以看出, *Psod* 启动子已成功敲入。

同时, 在 *Psod* 内部设计选取引物为 OPs 1, 然后分别以野生型 *C. glutamicum* 和重组菌株 CZM03 的基因组 DNA 为模板, 用 OPs 1 和 CPyr-D 2 (OPs 2) 进行扩增检测, 结果见图 2(b), 泳道 3 为重组菌株 CZM03 的基因组 DNA 为模板扩增结果, 有特异条带扩增出来, 泳道 4 为野生型 *C. glutamicum* 的基因组 DNA

为模板扩增结果，无特异条带出现，这进一步证实 *Psod* 已成功插入到 *pyc* 基因上游。

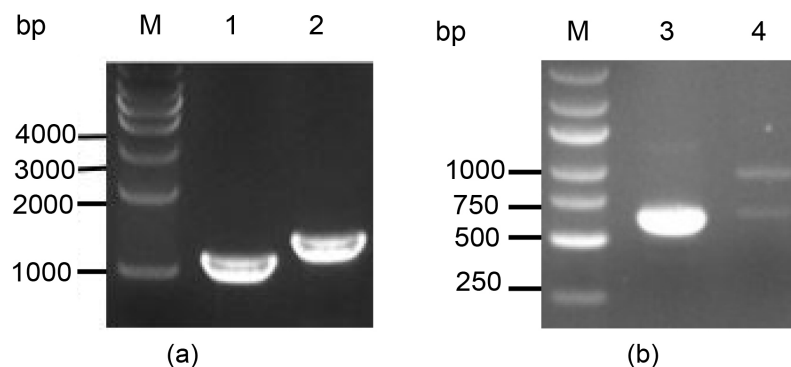


Figure 2. Identification the recombinant strains
图 2. 重组菌株的鉴定

3.3. 重组菌株的生长特性

野生型 *C. glutamicum* (WT)、重组菌株 CZM03 的生长情况，结果见图 3。WT、CZM03 在接种后 5 h 左右进入对数生长期，对数生长约 15 h 后，进入平台期，平台期维持约 10 h 左右，进入衰亡期。两株菌的生长速率和平台期达到的最大生物量，没有明显差异。这表明 *Psod* 强启动子的敲入，对菌的生长没有明显影响，但是 PYC 的酶活有显著提高(见图 4)，这对于目的产物的积累是有利的。

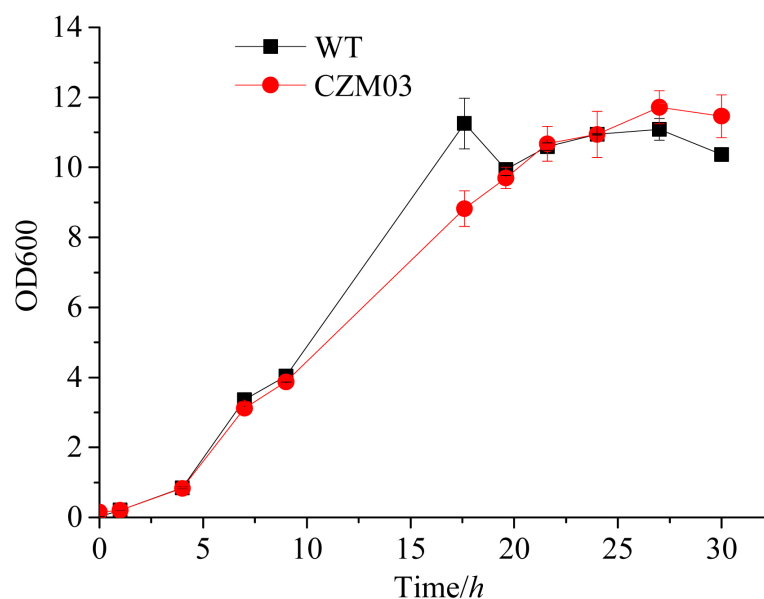


Figure 3. Growth curve of different strains
图 3. 不同菌株的生长曲线

3.4. 重组菌株 PYC 酶活分析

丙酮酸至苹果酸的厌氧代谢通路为：丙酮酸→草酰乙酸→苹果酸。丙酮酸至草酰乙酸的转化步骤由 PYC 催化，通过 *Psod* 增强 PYC 酶活，可以加速丙酮酸向草酰乙酸的转化，进而利于苹果酸的生成。为此，我们检测了 CZM03 菌株的 PYC 酶活性，实验结果表明，敲入 *Psod* 后，C03 菌株的 PYC 酶活较野生型上调了约 2.2 倍。

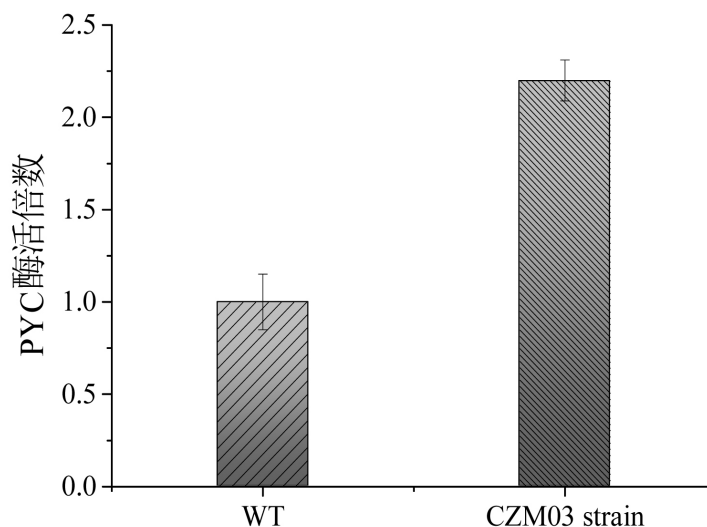


Figure 4. Assay of the enzyme activity of PYC & metabolic products
图 4. PYC 酶活测定和代谢产物分析

4. 结论

- 1) 构建强启动子 *Psod* 敲入载体, 成功地在野生型 *C. glutamicum* 的丙酮酸羧化酶基因(*pyc*)前面敲入 *Psod* 启动子。
- 2) 强启动子 *Psod* 敲入后, 所获得的重组菌株, 与野生型 *C. glutamicum* 相比, 生长速度和最大生物量无明显差异。
- 3) 与野生型 *C. glutamicum* 相比, 重组菌株 CZM03 的 PYC 活性上调了约 2.2 倍。

致 谢

感谢全国大学生创新创业大赛项目(201710488013)的资助;感谢武汉科技大学大学生创新创业大赛项目(201710488013)的资助;感谢湖北大学生物催化与酶工程国家重点实验室开放基金(SKLBEE2018002)的资助。

参考文献

- [1] Knuf, C., Nookaew, I., Remmers, I., *et al.* (2014) Physiological Characterization of the High Malic Acid Producing *Aspergillus oryzae* Strain 2103a-68. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 3517-3527. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5465-x>
- [2] Zelle, R.M., De Hulster, E., Van Winden, W.A., *et al.* (2008) Malic Acid Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Engineering of Pyruvate Carboxylation, Oxaloacetate Reduction, and Malate Export. *Applied & Environmental Microbiology*, **74**, 2766-2777. <https://doi.org/10.1128/AEM.02591-07>
- [3] Zhang, T., Ge, C., Deng, L., *et al.* (2015) C4-Dicarboxylic Acid Production by Overexpressing the Reductive TCA Pathway. *FEMS Microbiology Letters*, **362**, pii: fnv052. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv052>
- [4] McCulloch, M., McFarland, S., Berry, A., *et al.* (2013) Metabolic Engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for Increased Production of l-Malic Acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 8903-8912. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5132-2>
- [5] Liu, J., Xie, Z., Shin, H.D., *et al.* (2017) Rewiring the Reductive Tricarboxylic Acid Pathway and L-Malate Transport Pathway of *Aspergillus oryzae* for Overproduction of L-Malate. *Journal of Biotechnology*, **253**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.05.011>
- [6] Heider, S.A. and Wendisch, V.F. (2015) Engineering Microbial Cell Factories: Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* with a Focus on Non-Natural Products. *Biotechnology Journal*, **10**, 1170-1184. <https://doi.org/10.1002/biot.201400590>

- [7] Kim, H.T., Baritugo, K.A., Oh, Y.H., *et al.* (2018) Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the High-Level Production of Cadaverine. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **6**, 5296-5305. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00009>
- [8] Kim, H.T., Khang, T.U., Baritugo, K.A., *et al.* (2019) Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the Production of Glutaric Acid, a C5 Dicarboxylic Acid Platform Chemical. *Metabolic Engineering*, **51**, 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.08.007>
- [9] Liu, J., Li, J., Shin, H.D., *et al.* (2017) Protein and Metabolic Engineering for the Production of Organic Acids. *Biore-source Technology*, **239**, 412-421. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.052>
- [10] Van der Rest, M., Lange, C. and Molenaar, D. (1999) A Heat Shock Following Electroporation Induces Highly Efficient Transformation of *Corynebacterium glutamicum* with Xenogeneic Plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **52**, 541-545. <https://doi.org/10.1007/s002530051557>
- [11] 仇爱梅, 窦文芳, 李会, 等. 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的敲除对于谷氨酸棒杆菌 V1 生理代谢的影响[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1215-1224.
- [12] Kim, D.H., Lee, S.B. and Jeong, G.T. (2014) Production of Reducing Sugar from *Enteromorpha intestinalis* by Hydrothermal and Enzymatic Hydrolysis. *Biore-source Technology*, **161**, 348-353. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.078>

Hans 汉斯

知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询;
或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: amb@hanspub.org