

大肠杆菌碳酸酐酶对L-色氨酸生物合成的影响

贾慧萍

宁夏伊品生物科技股份有限公司 宁夏 银川 750100

摘要: 大肠杆菌cynT基因编码的产物是碳酸酐酶。碳酸酐酶是一种含锌的酶,催化二氧化碳的可逆水合作用,能在微生物合成过程中固定二氧化碳,提高微生物的碳源利用效率。而大肠杆菌scrA基因编码的全局性调控蛋白负调控芳香族氨基酸生物合成中碳中心代谢途径。因此本研究以CRISPR/Cas9基因编辑的方式敲除了scrA以解除其负调控,同时过表达大肠杆菌碳酸酐酶编码基因cynT,使L-色氨酸的产量提高了6.54%。

关键词: 大肠杆菌; 碳酸酐酶; 二氧化碳生物固定; cynT基因; scrA基因

L-色氨酸属于中性芳香族氨基酸,代谢途径复杂^[1-2],其正向代谢工程研究主要集中在中心碳代谢的改造以增强前体物PEP与E4P的供应,同时提高PEP与E4P的缩合效率,提高莽草酸途径强度^[3];另一方面是解除分支途径关键酶受到的反馈调节,强化分支合成效率^[4-5]。

由于大肠杆菌scrA基因编码的全局性调控蛋白协调多个酶的活性和代谢途径,可以通过敲除scrA基因实现芳香族合成过程中碳中心途径的负调控的解除,同时加强正调控,这既增强了理想代谢途径又抑制了竞争代谢途径^[6]。另一方面可通过增强路径依赖型CO₂固定效率来提高微生物的碳源利用效率。

碳酸酐酶催化二氧化碳的可逆水合作用,能在微生物代谢过程中固定二氧化碳,因此可以将其用于大肠杆菌发酵产品的代谢工程研究与应用中。据报道,大肠杆菌具有两种碳酸酐酶,即Can(碳酸酐酶2)和CynT(碳酸酐酶1),已阐明Can是β型的碳酸酐酶,是大肠杆菌在通常大气的二氧化碳分压下生长所必需的;而CynT由CynT编码,其以cynTSX操纵子的形式被转录,受cynR编码的cynR蛋白的调控,被氰酸盐诱导表达^[7]。

因此,本文在本实验室开发的工程菌株*E. coli* CGMCC7.267的基础上,以CRISPR/Cas9基因编辑的方式将scrA编码区替换为以trc启动和终止的内源碳酸酐酶编码基因cynT,即增强了CO₂固定效率,又同时敲除了scrA以解除碳中心途径的负调控,从而提高L-色氨酸的生产能力。

1 材料和方法

1.1 菌种和引物

L-色氨酸生产菌CGMCC7.267(*Escherichiacoli*),为本实验室自主开发的高产L-色氨酸的工程菌株。

CRISPR/Cas9系统中pREDCas9质粒携带gRNA质粒消除系统、λRed重组系统及Cas9蛋白表达系统;pGRB质粒

包括启动子J23119, gRNA-Cas9结合区域和终止子序列。以pGRB质粒构建gRNA质粒,以便将Cas9-gRNA的复合体通过碱基配对和PAM识别目的基因靶位点,实现目的DNA双链断裂,完成同源重组。引物如下:

大写字体的碱基为pGRB克隆载体同源臂序列,小写字体的碱基为scrA sgRNA序列:

gcsrAF:5'-TGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAAT
ACTAGTtgacctcatcccaatcatgGTTTTAGAGCTAGAAATAG
CAAGTTAAAATAAGG-3'

gcsrAR:5'-CCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCT
AAAACcatgattggggatgaggtaACTAGTATTATACCTAGGA
CTGAGCTAGCTGTCA-3'

gF:5'-GTCTCATGAGCGGATACATATTTG-3'

gR:5'-ATGAGAAAGCGCCACGCT-3'

csrA位点整合cynT的重组组件引物:

P1:5'-CTACGGATGCATCGGGAAAC-3',

P2:5'-TCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAG
CCGGATGATTAATTGTCAATCTTTCCGCGTCTCATCT
TT-3',

P3:5'-TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTT
CACACAGGAAACAGACCGTGAAAGAGATTATTGAT
GG-3'

P4:5'-ACCGACAAACAACAGATAAAAACGAAAGGC
CCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTGTTACG
CTGCGGTTCGGTTGGC-3',

P5:5'-AGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCT
GTTGTTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAA
TTCTTTGCTCCTTGAAAGATT-3',

P6:5'-CTATCGCCACCGTTCATGCA-3'.

csrA位点重组整合cynT的鉴定引物:

P7:5'-CGCTCGTACATGGTCTTCTC-3',

P8:5'-GCACCGATGGATGAGTTTGC-3',
 P9:5'-GCAATATCGTCCCTTCCTAC-3',
 P10:5'-GGTGAACACACAGATTCGTC-3'.

1.2 方法

利用CRISPR/Cas9基因编辑技术将工程菌株CGMCC7.267的csrA基因替换为内源cynT基因,以trc启动子和终止子启动和终止cynT的表达。

1.2.1 csrA基因整合位点sgRNA的构建

依据NCBI公布的E.coli W3110基因组序列,设计sgRNA靶序列,PCR退火后与Spe I酶切的pGRB质粒NEB组装1h后转化DH5a,并涂布到含有氨苄霉素的2-YT琼脂平板上37°C培养。

1.2.2 PCR扩增cynT整合的DNA重组组件

以E.coli W3110基因组DNA为模板,以引物P1/P2、P3/P4、P5/P6和KAPAHiFi iHotStart DNA聚合酶PCR扩增上同源臂、Ptrc-cynT-Ttrc和下同源臂,纯化后以引物P1/P6 overlap PCR获得基因组上缺失csrA同时整合Ptrc-cynT-Ttrc的重组组件ΔcsrA:Ptrc-cynT-Ttrc 2275bp。

1.2.3 pRED-Cas9质粒转化工程菌

将pRED-Cas9质粒导入工程菌株CGMCC7.267感受态细胞,并涂布到含有壮观霉素的2-YT琼脂平板上32°C培养。

1.2.4 cynT重组整合组件的转化

制备CGMCC7.267-Cas9感受态细胞并转化pGRB-csrA和重组整合组件ΔcsrA-Ptrc-cynT-Ttrc,以终浓度0.1mM的IPTG诱导λ-Red介导同源重组,并涂布到含有壮观霉素和氨苄霉素的2-YT琼脂平板上32°C培养。

1.2.5 重组质粒的诱导丢失

由于宿主菌带有的pRED-Cas9和pGRB-csrA质粒对工程宿主有一定影响,所以务必对其消除。pRED-Cas9携带sgRNA质粒消除系统,在0.2%阿拉伯糖条件下宿主菌中的sgRNA会消除,挑选在壮观霉素上生长而在氨苄霉素上不生长的菌落就是丢失pGRB-csrA质粒的菌株。再利用高温热激及壮观霉素抗性负筛进行pRED-Cas9质粒的丢失。

1.2.6 5L发酵罐发酵实验

将工程菌YPTrp-cynT001及出发菌株CGMCC7.267分别接种在BLBIO-5GC-4-H型号的5L发酵罐中以本实验室L-色氨酸发酵培养基和培养条件进行发酵实验,每个菌株重复三次。发酵结束后以高效液相色谱法检测L-色氨酸含量。

2 结果与分析

2.1 csrA基因整合位点sgRNA的构建

以引物gF/gR PCR扩增构建的重组载体pGRB-csrA,结果获得639bp的预期DNA片段,琼脂糖凝胶电泳如图1泳道1。将其测序鉴定后与预期DNA序列一致,确实含有csrA基因整合位点20bp sgRNA序列,将其命名为pGRB-csrA。

2.2 CRISPR/Cas9质粒的转化

pRED-Cas9质粒转化L-色氨酸工程菌株CGMCC7.267感受态细胞,以引物pCF/pCR菌落PCR鉴定,获得943bp的为阳性转化子,琼脂糖凝胶电泳如图1泳道2所示。

2.3 cynT重组组件的扩增

PCR扩增上同源臂、Ptrc-cynT-Ttrc和下同源臂,以引物P1/P6 overlap PCR获得重组组件ΔcsrA:Ptrc-cynT-Ttrc2279bp,琼脂糖凝胶电泳结果如图1泳道3。

2.4 csrA位点重组整合cynT鉴定

以引物对P7/P8及P9/P10 PCR鉴定L-色氨酸工程菌株CGMCC7.267基因组上cynT替换csrA位点,阳性转化子P7/P8引物的确有约2041bp的条带,而P9/P10引物则有1578bp的条带,则重组组件Ptrc-cynT-Ttrc成功替换了csrA基因编码区,琼脂糖凝胶电泳结果如图1泳道4和泳道5。

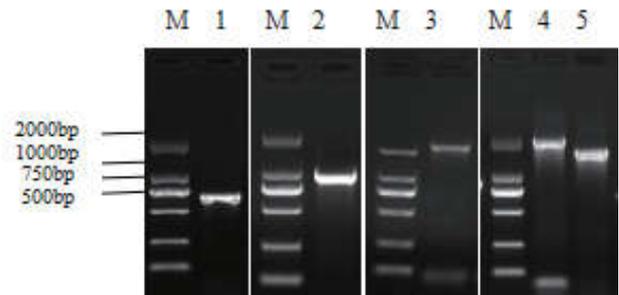


图1 csrA位点重组整合cynT的鉴定

M:DL2000 DNA Marker;1:pGRB-csrA;2:CGMCC7.267-pRED-Cas9;3:ΔcsrA:Ptrc-cynT-Ttrc

4:csrA位点重组整合cynT鉴定引物P7/P8;5:csrA位点重组整合cynT鉴定引物P9/P10

2.5 重组质粒的诱导丢失及工程菌株的保存

通过0.2%阿拉伯糖诱导消除宿主菌中的sgRNA,并利用氨苄霉素抗性负筛获得丢失sgRNA的菌株,进一步利用高温热激及壮观霉素抗性负筛获得pRED-Cas9质粒丢失的菌株。将L-色氨酸工程菌株CGMCC7.267基因组上csrA位点重组整合cynT的阳性转化子命名为YPTrp-cynT001。

2.6 cynT基因对L-色氨酸发酵的影响

按方法1.2.6进行L-色氨酸发酵验证,发酵结束时测定L-色氨酸产酸量,实验重复3次,每次取平行样均值,结果如表1。

表1 YPTrp-cynT001 5L发酵罐产酸结果

菌株	L-色氨酸产量/(g/L)				提高倍数	显著性分析
	发酵1	发酵2	发酵3	均值		
CGMCC7.267	38.63	39.62	37.87	38.71	--	--
YPTrp-cynT001	41.74	41.24	40.73	41.24	6.54%	<0.05

表1结果表明,在工程菌株CGMCC7.267的csrA基因位点整合内源cynT基因,增加cynT拷贝数,并以大肠杆菌强启动子trc启动cynT的过表达以提高碳酸酐酶表达量,有助于L-色氨酸合成,产量提高了6.54%,且csrA基因缺失未阻碍菌体生长与产酸。

3 结论

通过缺失csrA基因同时以强启动子trc过表达内源cynT的菌株,其发酵液L-色氨酸产量比出发菌株提升突出。本研究结果达到了将葡萄糖中心代谢流引向PEP以增加合成L-色氨酸前体物的目的,又将二氧化碳生物固定作为生物合成L-色氨酸重要工具,对于提高L-色氨酸的生产有至关重要的作用。

参考文献

- [1]张克旭等编.代谢控制发酵[M].轻工业出版社,1998.
[2]陈宁.氨基酸发酵工艺学[M].北京:中国轻工业出版

社,2007.

[3]王静,于金龙,张婷等.大肠杆菌生物合成中心代谢途径的改造及其对工程菌色氨酸产量的影响[J].中国医药生物技术,2008,3(2):93-97.

[4]王健,陈宁.基于途径分析及代谢流量分析的L-色氨酸发酵条件优化[J].云南大学学报,自然科学版,2004,26(6A):68-73.

[5]赵春光,程立坤,徐庆阳等.微生物法生产L-色氨酸的研究进展[J].发酵科技通讯,2008,37(4):34-36.

[6]黄钦耿,吴伟斌等.大肠杆菌整体代谢网络调控基因(csrA)的敲除及其对苯丙氨酸生物合成的影响[J].氨基酸和生物资源,2012,34(2):1-4.

[7]味之素株式会社.L-氨基酸的产生方法:94102007.X[P],1994-2-15.