

• 工业生物技术 •

基于时间序列转录组筛选谷氨酸棒杆菌内源高效组成型启动子

王迎春^{1,2,3}, 刘娇^{2,3}, 倪晓蒙^{2,3}, 雷宇³, 郑平^{2,3}, 刁爱坡¹

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

3 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

王迎春, 刘娇, 倪晓蒙, 等. 基于时间序列转录组筛选谷氨酸棒杆菌内源高效组成型启动子. 生物工程学报, 2018, 34(11): 1760–1771.

Wang YC, Liu J, Ni XM, et al. Screening efficient constitutive promoters in *Corynebacterium glutamicum* based on time-series transcriptome analysis. Chin J Biotech, 2018, 34(11): 1760–1771.

摘 要: 启动子是重要的转录调控元件, 广泛用于工业菌株的代谢工程改造。谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 是重要的氨基酸生产菌株, 但已报道的组成型强启动子较少。对谷氨酸高产菌 *Corynebacterium glutamicum* SL4 发酵过程的 10 个时间点样品进行转录组测序, 筛选在发酵过程中稳定转录并且转录水平最高的 10 个基因; 分别克隆其启动子序列至红色荧光蛋白 (RFP) 报告系统, 通过荧光强度表征启动子在 SL4 菌株中的强度, 再在野生型 *C. glutamicum* ATCC 13869 和 ATCC 13032 中验证部分启动子的通用性; 并采用 LacZ 蛋白进一步评价强启动子的表达效果。结果显示, 成功筛选到 3 个可以通用的组成型启动子 P_{cysK} 、 P_{gapA} 和 P_{fumC} 。其中 P_{cysK} 的表达强度最高, 与诱导型强启动子 P_{tac} 对比, 在 SL4 和 13869 菌株中均达到其 2 倍 (RFP) 和 4 倍 (LacZ) 以上; 在 ATCC 13032 菌株中, P_{cysK} 的表达强度为 P_{tac} 的 0.3–0.4 倍。 P_{cysK} 首次被报道为强启动子, 可用于谷氨酸棒杆菌强化合成途径的代谢工程改造。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, 时间序列转录组, 启动子, RFP 报告系统

Received: January 29, 2018; **Accepted:** April 26, 2018

Supported by: Tianjin Science and Technology Program (Nos. 15PTCYSY00020, 14ZCZDSY00058), Tianjin Municipal City, the First “Special Support Plan for Talents Development” and “High-level Innovation and Entrepreneurship Team”, National Natural Science Foundation of China (No. 31700044).

Corresponding authors: Ping Zheng. Tel/Fax: +86-22-84861943; E-mail: zheng_p@tib.cas.cn

Aipo Diao. Tel/Fax: +86-22-60602948; E-mail: diaoaipo@tust.edu.cn

天津市科技计划项目 (Nos. 15PTCYSY00020, 14ZCZDSY00058), 天津市特支计划高层次创新创业团队, 国家自然科学基金 (No. 31700044) 资助。

Screening efficient constitutive promoters in *Corynebacterium glutamicum* based on time-series transcriptome analysis

Yingchun Wang^{1,2,3}, Jiao Liu^{2,3}, Xiaomeng Ni^{2,3}, Yu Lei³, Ping Zheng^{2,3}, and Aipo Diao¹

¹ School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

² Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

³ Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Promoter, an essential regulatory element, is widely used for metabolic engineering of industrial strains. *Corynebacterium glutamicum* is an important industrial workhorse to produce various amino acids. However, strong constitutive promoters that are applicable to *C. glutamicum* are rarely reported. In this study, we first performed a time-series transcriptome analysis of a glutamate hyper-producing strain *C. glutamicum* SL4 by using RNA-Seq. Overall, we picked 10 samples at different time during the fermentation process. By analyzing the time-series transcriptome data, we selected 10 candidate genes with the highest transcriptional level. These genes were all transcribed stably during the fermentation process. We subsequently cloned the promoter sequences and evaluated the promoters' strength in strain SL4 using a red fluorescent protein reporter system. To evaluate the universality of the promoters in different *C. glutamicum* strains, we further tested the performance of some promoters in wild type *C. glutamicum* strains, including ATCC 13869 and ATCC 13032. The strongest promoter was further characterized using LacZ as a reporter in all the three *C. glutamicum* strains. Finally, we successfully obtained three constitutive promoters with universality, P_{cysK} , P_{gapA} and P_{fumC} . P_{cysK} is the most efficient promoter among the three *C. glutamicum* strains. In strains SL4 and ATCC 13869, the strength of P_{cysK} is 2-fold of the strong inducible promoter P_{tac} using the red fluorescent protein as a reporter and 4-fold of P_{tac} using LacZ as a reporter. Moreover, the strength of P_{cysK} reaches 30%–40% of P_{tac} in strain ATCC 13032. The promoter P_{cysK} is identified as a strong promoter for the first time, which can be used as an efficient biobrick for metabolic engineering of synthesis pathways in *C. glutamicum*.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, time-series transcriptome, promoter, red fluorescent protein reporter system

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 是重要的氨基酸工业生产菌株, 主要用于生产 L-谷氨酸、L-赖氨酸和 L-异亮氨酸等氨基酸^[1]。谷氨酸棒杆菌可以适应简单原料和复杂环境, 耐受高浓度碳源^[2], 并已被美国 FDA 认证为安全 (Generally recognized as safe, GRAS) 的微生物^[3], 近年来又被广泛用于生产生物乙醇和异丁醇等生物燃料^[4–6]、琥珀酸和乳酸等有机酸、二元胺和聚羟基丁酸脂等生物材料单体^[7–9]以及重组蛋白等生物大分子^[10]。代谢工程强化目标产物的合成途径是提升工业菌株性能的常用策略, 其中利用强启动子构建高效的转录表达盒已经被证明是非常有效的手段^[3,11–12]。

谷氨酸棒杆菌中关于诱导型启动子的研究较多, 例如已经成功地构建了 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 诱导型、麦芽糖诱导型、葡萄糖酸诱导型、阿拉伯糖诱导型、鼠李糖诱导型、

乙酸诱导型、四环素诱导型和丙酸诱导型等诱导型启动子^[13–16]。在代谢工程改造中, 诱导型启动子可以通过改变诱导剂浓度实现不同强度表达, 使用最多的是 IPTG 诱导启动子, 如 P_{trc} 和 P_{tac} 。然而由于其需要添加诱导剂, 近年来谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造更倾向使用组成型启动子。常用的内源组成型启动子包括 P_{cspB} 、 P_{tuf} 、 P_{sod} 和 P_{gapA} 。Tateno 等^[17]和 Vogt 等^[18]利用 P_{cspB} 启动子分别提高 L-赖氨酸和 L-异亮氨酸的产量。Park 等^[19]和 Kim 等^[20]利用 P_{tuf} 启动子分别提高 L-精氨酸和 L-鸟氨酸的产量。Park 等^[19]和 Jensen 等^[21]利用 P_{sod} 启动子分别提高 L-精氨酸和 L-谷氨酸衍生物的产量。随着合成生物学的发展, 研究者开始发展人工合成启动子。Yim 等^[22]通过人工合成完全随机的 70 bp 序列, 再基于 GFP 筛选了系列强度启动子, 并且应用于木聚糖内切酶等的分泌生产。Rytter 等^[23]基于谷氨

酸棒杆菌启动子-10 区共有序列和大肠杆菌启动子-35 区共有序列设计并筛选了人工启动子。

目前已经表征的组成型启动子的表达强度大多低于完全诱导的 P_{tac} 等启动子。Ravasi 等^[24]用 GFP 作为报告系统进行比较, 结果显示 P_{cspB} 和 P_{sod} 启动子的表达强度分别约为 P_{tac} 的 0.5 和 0.1 倍。Shang 等^[25]用 LacZ 作为报告系统表征部分内源启动子, 结果显示 P_{tuf} 和 P_{sod} 启动子的表达强度分别约为 P_{tac} 的 0.7 倍和 0.3 倍, 只有 P_{pgk} 启动子的表达强度比 P_{tac} 高, 约为 P_{tac} 的 1.35 倍。因此依然需要挖掘更多高表达强度的组成型启动子。

转录组和蛋白质组学可以系统地表征基因的表达水平, 近年来已经被用于筛选启动子元件。Zhao 等^[26]从谷氨酸棒杆菌蛋白组数据中显示高蛋白表达的 12 个基因中筛选到强组成型启动子 P_{pgk} 。蛋白组数据只能间接反映基因的转录水平, 直接反映基因转录水平的转录组数据更有利于筛

选高表达强度的启动子。刘秀霞等^[27]通过分析谷氨酸棒杆菌高、中、低溶氧条件下的转录组数据, 从不同条件下均高转录的 6 个候选基因中筛选到组成型强启动子 P_{tuf} 。本研究基于谷氨酸高产菌 *C. glutamicum* SL4 发酵过程的时间序列转录组数据, 筛选发酵过程均稳定转录且转录水平最高的 10 个基因; 通过红色荧光蛋白 (RFP) 报告系统在 SL4 菌株中表征这些基因的启动子强度, 并采用野生型菌株和 LacZ 蛋白进一步验证部分启动子的通用性。最终获得了 3 个通用的组成型启动子, 其中 P_{cysK} 首次被报道为强启动子, 这些启动子均可用于谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本研究所用菌株与质粒见表 1。

表 1 本研究所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Description	Reference or source
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	General cloning host	TaKaRa
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC 13869	Wild-type strain	Lab stock
ATCC 13032	Wild-type strain	Lab stock
SL4	A mutant of ATCC 13869, hyper-producing glutamate, temperature-sensitive	Lab stock
Plasmids		
pEC-XK99E	Expression vector of <i>C. glutamicum</i> , IPTG-inducible promoter P_{trc} , Km ^R	[28]
pSB4K5- <i>rfp</i>	A vector containing <i>rfp</i> gene	Lab stock
pZSP1	A vector containing <i>lacZ</i> gene	Lab stock
pXMJ19	Shuttle vector of <i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> , IPTG-inducible promoter P_{tac} , Cm ^R	[29]
pEC-XK99E- <i>rfp</i>	pEC-XK99E derivative, expressing RFP under the control of P_{trc}	This study
pWYC-1	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{tuf}	This study
pWYC-2	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{gapA}	This study
pWYC-3	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{rpsA}	This study
pWYC-4	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{gltA}	This study
pWYC-5	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{cysK}	This study
pWYC-6	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{gdhA}	This study
pWYC-7	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{ctaD}	This study
pWYC-8	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{rpoB}	This study
pWYC-9	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{infB}	This study
pWYC-10	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{fumC}	This study
pWYC-11	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, P_{trc} was replaced with P_{tac}	This study
pEC-XK99E- <i>lacZ</i>	pEC-XK99E- <i>rfp</i> derivative, <i>rfp</i> was replaced with <i>lacZ</i>	This study
pWYC-12	pWYC-11 derivative, <i>rfp</i> was replaced with <i>lacZ</i>	This study
pWYC-13	pWYC-5 derivative, <i>rfp</i> was replaced with <i>lacZ</i>	This study

1.1.2 引物设计与合成

本研究所用引物使用 Vector 软件设计, 引物名称及序列如表 2 所示, 引物均由苏州金唯智公司合成。

1.1.3 主要试剂与仪器

质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒均购自北京 TIANGEN 公司; 基因组

提取试剂盒购自美国 Biomiga 公司; RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit) 购自 QIAGEN 公司; 重组克隆试剂盒 (ClonExpress[®] CE II) 购自南京 Vazyme 公司; 酵母粉和蛋白胨购自英国 Oxoid 公司; 卡那霉素等抗生素购自北京 Solarbio 公司; 其余所有试剂均为国产分析纯。PCR 热循环仪, Applied Biosystems 公司; 分光光度计, Shimadzu

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>rfp</i> -F	GGATAACAATTTACACAGGAAAGGAGTTGAGAATGGCTTCCTCCGAAGACGTTATC
<i>rfp</i> -R	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGTTAAGCACCGGTGGAGTGACGAC
pEC-XK99E-F	CTGCAGGCATGCAAGCTTGCC
pEC-XK99E-R	CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
Δrfp -F	CTGTTTTGGCGGATGAGAGAAG
Δrfp -R	TCTCAACTCCTTTGGCCTGTGTGA
<i>lacZ</i> -F	ACAGGCCAAAGGAGTTGAGAATGATTACGGATTCACTGGCC
<i>lacZ</i> -R	TCTCTCATCCGCCAAAACAGTTACGCGAAATACGGGCAGA
P _{lac} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTC
P _{lac} -R	ATAGCTGTTTCCTGTGTGGGGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
Δtrc -F	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
Δtrc -R	GGAGAAAATACCGCATCAGGC
P _{trf} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCCATCGGTGACGTGAACCTCC
P _{trf} -R	TGTGAAATTGTTATCCGCTCTGTATGTCCTCCTGGACTTCG
P _{gapA} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCCGCGCCGAAGATCTGAAGAT
P _{gapA} -R	TGTGAAATTGTTATCCGCTCCACGCACCAAACCTACTCAC
P _{rpsA} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCATTGGTGGCTTGAGGTTTTTC
P _{rpsA} -R	TGTGAAATTGTTATCCGCTCATTGCTCCGAAATGGATAGG
P _{glfA} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCGGAAGTCGGTCATGTCTTCG
P _{glfA} -R	TGTGAAATTGTTATCCGCTCTTCCGGATTACGGAAGTAGTC
P _{cysK} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCTGAACATAGTCGAGGCGGATC
P _{cysK} -R	TGTGAAATTGTTATCCGCTCATTGCCCATGTCGGGTGGT
P _{gdhA} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCGGTCAAATTTCTCCGATGTAGCG
P _{gdhA} -R	TGTGAAATTGTTATCCGCTCGTTCCCATCTCGGCTGCATG
P _{ctaD} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCGCAGACCGGACTTTTGAATTTGG
P _{ctaD} -R	TGTGAAATTGTTATCCGCTCAGGTTCTCCTGACTACGGGA
P _{rpoB} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCCCTGCTGTTCAAATAGATTTTCCC
P _{rpoB} -R	TGTGAAATTGTTATCCGCTCCTCACGCGGGTAATTGCAC
P _{infB} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCAGTCGCTTGAACCGGCATGAA
P _{infB} -R	TGTGAAATTGTTATCCGCTCAGTTTTTGCCAGAGGTTTCAAGG
P _{fumC} -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCTGCACCTAGTAGACCATTCAAGT
P _{fumC} -R	TGTGAAATTGTTATCCGCTCGAGAATTAAATACGGCTGTCAC

公司; Nanodro 超微量核酸蛋白测定仪, Thermo Scientific 公司; 电击转化仪, Mettler Toledo 公司; DM5000B 荧光显微镜, Leica 公司; SpectraMax M5 多功能连续酶标仪, Molecular Devices 公司; Illumina MiSeq 平台, Illumina 公司。

1.1.4 培养基

LB 培养基: 10 g/L NaCl, 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 根据需要添加 50 μ g/mL 卡那霉素, 用于 *E. coli* 培养。LBG 培养基: 10 g/L NaCl, 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 5 g/L 葡萄糖, 根据需要添加 25 μ g/mL 卡那霉素, 用于 *C. glutamicum* ATCC 13869 和 ATCC 13032 培养。SGY 培养基: 5 g/L 葡萄糖, 10 g/L 酵母粉, 18 g/L 大豆蛋白胨, 1 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 10 g/L 尿素, 0.5 g/L 丁二酸, 10 μ g/L 生物素, pH 调至 7.1, 根据需要添加 25 μ g/mL 卡那霉素, 用于 *C. glutamicum* SL4 培养。

1.2 方法

1.2.1 构建基于 RFP 的启动子报告系统

以 pEC-XK99E 质粒为模板, 以 pEC-XK99E-F 和 pEC-XK99E-R 为引物反向扩增得到线性化载体 pEC-XK99E。以 pSB4K5-*rfp* 质粒为模板, 以 *rfp*-F 和 *rfp*-R 为引物扩增得到携带 RBS 序列的 *rfp* 片段。由于引物 *rfp*-F 和 *rfp*-R 携带用于重组克隆的同源臂, 使用重组克隆试剂盒, 将扩增得到的 *rfp* 片段与线性化载体 pEC-XK99E 进行重组连接, 获得重组质粒 pEC-XK99E-*rfp*。采用 100 倍油镜在绿色激发光下显微镜观察荧光。

1.2.2 *C. glutamicum* SL4 菌株的时间序列转录组测序及目标基因筛选

实验室前期在 5 L 发酵罐, 采用温敏工艺 (以葡萄糖为碳源, 玉米浆、大豆蛋白胨和氨水调 pH 提供氮源, 生物素充足) 分批补料发酵 *C. glutamicum* SL4 菌株生产谷氨酸, 初期发酵温度为 33 $^{\circ}C$, 8 h 开始升温至 36.5 $^{\circ}C$, 其后逐渐升温至 39.5 $^{\circ}C$, 发酵周期 28 h。本研究直接从发酵

罐中取样, 取样时间分别为 1、3、5.5、8、9.5、11.5、13.5、15.5、18.5、23.5 h, 菌体 4 $^{\circ}C$ 离心快速收集, 液氮速冻并保存于 -80 $^{\circ}C$ 。液氮研磨菌体成粉末状, 再采用 QIAGEN RNeasy Mini Kit 试剂盒进行 RNA 的提取及纯化。RNA 样品送中国科学院天津工业生物技术研究所技术支撑中心, 在 Illumina MiSeq 平台上进行建库及双端 150 bp 测序, 每个样品获得约 1.5 G 原始数据。测序数据经过质量过滤后, 利用 Samtools 和 HTSeq 软件计算每个样本中每个基因的 count 值 (每个基因比对上的 reads 数), 通过 Python 脚本和 FPKM (Fragments Per Kilobase Million) 公式计算每个样本中每个基因的 FPKM 值。计算每个基因 10 个时间点的 FPKM 平均值, 根据 (每个时间点的 FPKM 值-平均值)/平均值计算每个点的波动, 筛选 8 个以上时间点的上下波动不超过平均值 50% 的基因 (由于 10 个点波动都不超过 50% 会去掉大量高转录水平的基因), 再选择 FPKM 平均值最高的 10 个基因。

1.2.3 启动子的克隆及其 RFP 报告质粒的构建

tuf、*gapA*、*gltA*、*gdhA* 基因的启动子序列由查阅文献分析比对菌株 *C. glutamicum* SL4 的基因序列获得, *rpsA*、*cysK*、*ctaD*、*rpoB*、*infB*、*fumC* 选择全部上游非编码区作为其启动子序列, 所有启动子表征时使用相同的 5'-UTR 和 SD 序列 (下划线): 5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGGC CAAAGGAGTTGAGAATG-3', ATG(加粗)为起始密码子。以 SL4 菌株的基因组为模板, 采用相应的引物 (表 2) 扩增 10 个启动子片段。以 pXMJ19 质粒为模板, 采用 P_{tac} -F 和 P_{tac} -R 引物扩增 P_{tac} 启动子片段。以 pEC-XK99E-*rfp* 质粒为模板, 以 Δtrc -F 和 Δtrc -R 为引物反向扩增去除质粒中的 P_{trc} , 获得线性化载体片段。使用重组克隆试剂盒, 将启动子片段与线性化载体片段分别进行重组连接, 获得含有不同启动子的 11 个报告质粒。所有

报告质粒分别转化 *C. glutamicum* SL4、*C. glutamicum* ATCC 13869 和 *C. glutamicum* ATCC 13032 菌株, 获得表达荧光蛋白的重组菌。

1.2.4 OD_{600} 和荧光值的测定

挑取平板活化的单克隆接入含 20 mL SGY 或 LBG 培养基的 100 mL 三角瓶中, 30 °C、220 r/min 条件下过夜培养, 取适量培养物转接入含 30 mL SGY 或 LBG 培养基的 250 mL 三角瓶中, 使得初始 OD_{600} 为 0.5, 在同样的条件下培养, 每隔 2–4 h 取样检测 OD_{600} 和荧光强度。每个样品 3 个平行。包含 P_{trc} 和 P_{tac} 启动子的对照菌株在接种时添加 0.5 mmol/L IPTG。 OD_{600} 稀释至合适浓度在酶标仪上测定。荧光强度测定, 先用 PBS 缓冲液洗涤菌体 2 次, 再稀释至合适浓度, 在多功能连续酶标仪上分别测定 OD_{600} 和荧光值, 激发波长为 560 nm, 发射波长为 607 nm, 荧光强度为测定的荧光值/ OD_{600} 。

1.2.5 LacZ 表达质粒和菌株的构建及 β -半乳糖苷酶活性的测定

分别以 pEC-XK99E-*rfp*、pWYC-11 和 pWYC-5 质粒为模板, 以 Δrfp -F 和 Δrfp -R 为引物反向扩增获得各质粒去除 *rfp* 的质粒骨架; 以质粒 pZSP1 为模板, 以 *lacZ*-F 和 *lacZ*-R 为引物扩增得到 *lacZ* 片段。采用一步重组克隆试剂盒, 将扩增得到的 *lacZ* 段与对应的质粒骨架进行重组连接, 分别获得 pEC-XK99E-*lacZ*、pWYC-12 和 pWYC-13 重组质粒。所有质粒使用相同的 5'-UTR 和 SD 序列(下划线): 5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGGCCACACAGGAAACAGCTATG-3', ATG(加粗)为起始密码子。所有重组质粒分别电转化至 3 株谷氨酸棒杆菌中。

检测 β -半乳糖苷酶活性: 菌株培养与荧光测定相同, 每个样品设定 3 个平行。取适量稳定期菌液冰上孵育 20 min, 再取 0.5 mL 菌液于 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 用 0.5 mL 预冷的 Z 缓冲

液 (0.06 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.04 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.01 mol/L KCl、0.001 mol/L MgSO_4 、0.05 mol/L β -巯基乙醇, pH 7.0) 重悬细胞, 测定 OD_{600} 。取 0.1 mL 上述样品加入 100 μL 氯仿和 50 μL 0.1% SDS, 振荡混匀, 30 °C 孵育 1 h。加入 0.2 mL 30 °C 预热的反应底物 ONPG (4 mg/mL), 混匀并开始计时, 30 °C 孵育一定时间。当反应液充分变为黄色后, 加入 0.5 mL 1 mol/L Na_2CO_3 溶液, 振荡混匀, 同时记录时间。在酶标仪中测定 OD_{420} 和 OD_{550} 的数值, 通过以下公式计算酶活: $\text{Miller Units} = 1000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) / (OD_{600} \times \text{菌液体积}(\text{mL}) \times \text{反应时间}(\text{min}))$ 。

2 结果与分析

2.1 构建基于 RFP 的启动子报告系统

以 *rfp* 作为报告基因, 根据 1.2.1 所描述的方法, 在大肠杆菌 DH5 α 中构建 pEC-XK99E-*rfp* 质粒 (图 1), 转化子菌落 PCR 验证和质粒测序都正确, 表明重组质粒构建成功。将 pEC-XK99E-*rfp* 质粒电转化至 *C. glutamicum* SL4 中, 获得 *C. glutamicum* SL4 (pEC-XK99E-*rfp*) 菌株, 荧光显微镜观察显示其可以表达红色荧光蛋白 (图 2), 表明 RFP 报告系统构建成功。

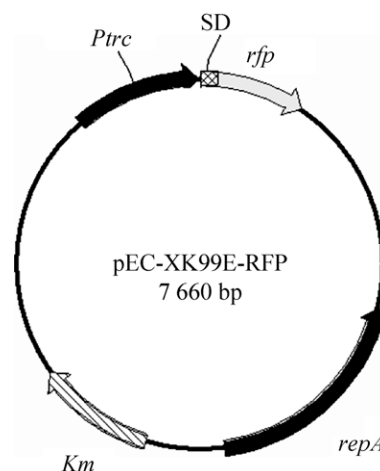


图 1 pEC-XK99E-*rfp* 质粒图谱

Fig. 1 Plasmid map of pEC-XK99E-*rfp*.

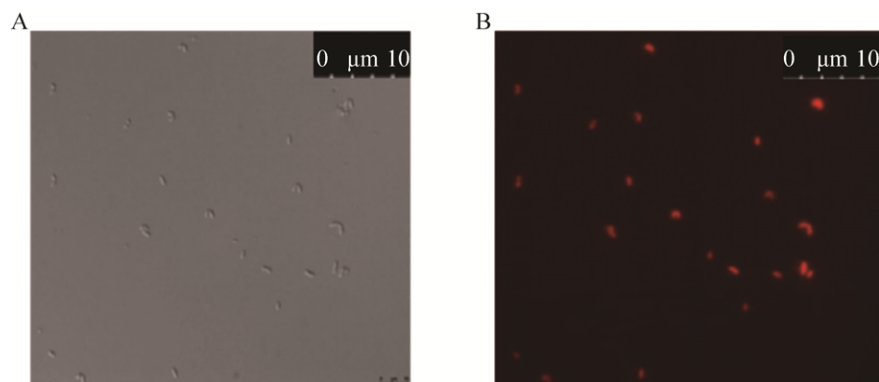


图2 *C. glutamicum* SL4 (pEC-XK99E-*rfp*) 菌株的荧光显微镜观察

Fig. 2 Fluorescence microscope observation of *C. glutamicum* SL4 (pEC-XK99E-*rfp*). (A) Visible light. (B) Fluorescence.

2.2 *C. glutamicum* SL4 菌株发酵过程的转录组测序及目标基因的筛选

根据 1.2.2 描述的方法, 进行 *C. glutamicum* SL4 菌株发酵过程 10 个时间点样品的转录组测序, 并通过组学数据分析筛选候选基因。取样时间包括菌体生长和产酸的各个时期, 可以全面地分析该菌株发酵过程的基因转录水平。由于常规谷氨酸棒杆菌 RNA 提取方法中的溶菌酶处理过程会改变胞内真实的 RNA 水平, 本研究采用液氮研磨法提取 10 个样品的总 RNA, 所有样品的 RNA 浓度和完整性都可以达到测序要求。根据转录组的数据分析, 筛选出发酵过程均稳定转录且转录水平最高的 10 个基因, 其发酵过程的转录水平如图 3 所示, FPKM 平均值及基因功能等如

表 3 所示, 其中 *tuf* 和 *gapA* 基因的整体转录水平更高, 其他 8 个基因转录水平差异较小。

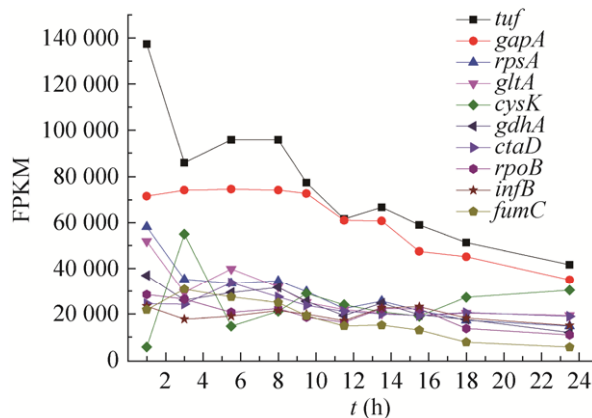


图3 10 个目标基因在发酵过程中的转录水平

Fig. 3 The transcriptional expression levels of 10 selected genes in fermentation process.

表3 10 个目标基因的功能、FPKM 平均值和启动子长度

Table 3 Functions, FPKM averages and promoter lengths of 10 selected genes

Gene	Function	FPKM average	Promoter	Length
<i>tuf</i>	Elongation factor Tu	77 355	P _{<i>tuf</i>}	590
<i>gapA</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	61 702	P _{<i>gapA</i>}	421
<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	29 382	P _{<i>rpsA</i>}	246
<i>gltA</i>	Citrate synthase 1	28 012	P _{<i>gltA</i>}	718
<i>cysK</i>	O-acetylserine sulphydrylase	24 792	P _{<i>cysK</i>}	610
<i>gdhA</i>	NADP-specific glutamate dehydrogenase	24 372	P _{<i>gdhA</i>}	527
<i>ctaD</i>	Cytochrome c oxidase subunit 1	23 469	P _{<i>ctaD</i>}	521
<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	20 301	P _{<i>rpoB</i>}	402
<i>infB</i>	Translation initiation factor IF-2	19 880	P _{<i>infB</i>}	543
<i>fumC</i>	Fumarate hydratase class II	16 284	P _{<i>fumC</i>}	299

2.3 *C. glutamicum* SL4 菌株中表征启动子的强度

按照方法 1.2.3 成功构建含不同启动子的报告质粒。将含有不同启动子表达 RFP 的 *C. glutamicum* SL4 重组菌接入培养基中,按照 1.2.4 中的方法进行培养,并使用多功能酶标仪分别检测 OD_{600} 和荧光强度,以稳定期 35 h 的荧光强度表征启动子强度。重组菌的生长情况如图 4A 和 4C 所示,与空质粒、 P_{trc} 和 P_{tac} 对照相比,所有菌的生长无明显差别,都在 12 h 即可达到稳定期, OD_{600} 约为 6,说明这些启动子表达 RFP 不影响菌株生长。荧光

强度检测结果如图 4B 和 4D 所示,前 12 h 所有启动子的荧光强度都较低,在 12–23 h 期间荧光强度逐渐增强,培养至 23 h 时基本达到最高,其后保持稳定。IPTG 诱导型对照启动子 P_{trc} 和 P_{tac} 的强度和表达模式都基本一致,为了同文献对比,以 P_{tac} 启动子的强度进行比较。 P_{cysK} 、 P_{gapA} 和 P_{fumC} 启动子为表达强度最高的 3 个组成型启动子(图 4B),其强度顺序为 $P_{cysK} > P_{gapA} > P_{fumC}$,分别达到 (1190 ± 31) 、 (163 ± 3) 和 (110 ± 4) RFU/ OD_{600} ,其强度分别为 P_{tac} 的 2.2、0.3 和 0.2 倍;其余 7 个启动子的表达强度都更低。

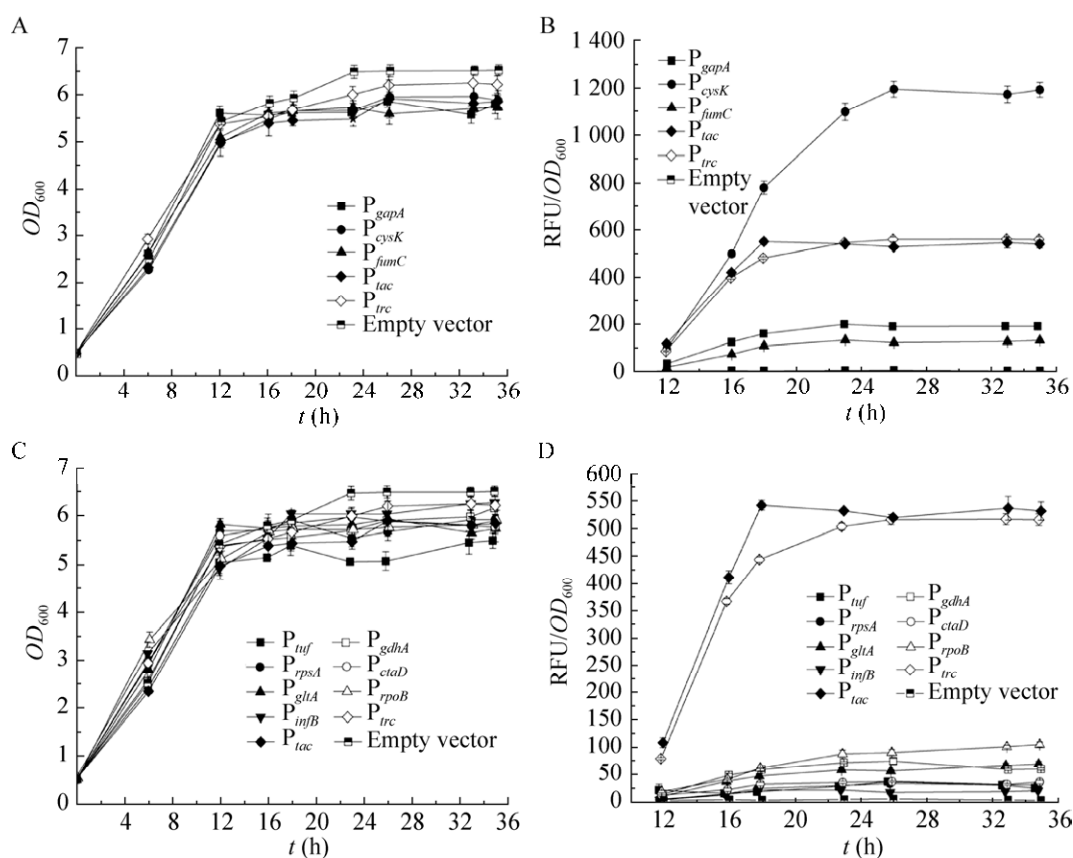


图 4 不同启动子表达 RFP 的 *C. glutamicum* SL4 系列重组菌的生长曲线及荧光强度

Fig. 4 The growth curves and fluorescence intensities of *C. glutamicum* SL4-based recombinants expressing RFP with different promoters. The growth curves were shown in A and C, and the fluorescence intensities were shown in B and D. (A) and (B) P_{cysK} , P_{gapA} and P_{fumC} ; (C) and (D) P_{tuf} , P_{rpsA} , P_{glbA} , P_{gdhA} , P_{ctaD} , P_{poB} and P_{infB} . P_{trc} and P_{tac} were used as 2 control promoters. Error bars indicate the standard deviations from 3 independent cultures.

2.4 野生型谷氨酸棒杆菌中表征启动子强度

为了评价 3 个启动子 P_{cysK} 、 P_{gapA} 和 P_{fumC} 的通用性, 将含有这 3 个启动子的报告质粒及对照质粒分别转入野生型 *C. glutamicum* ATCC 13869 和 ATCC 13032, 并采用更通用的 LBG 培养基培养, 以稳定期 23 h 的荧光强度表征启动子强度。与对照菌株相比, 不同启动子表达 RFP 的 ATCC 13869 和 ATCC 13032 重组菌的生长无明显差别, 说明在这 2 个菌株中不同启动子表达 RFP 均不影响菌株的生长。荧光强度检测结果如图 5 所示, P_{trc} 和 P_{tac} 的强度和表达模式也基本一致, 同样以 P_{tac} 启动子的强度进行比较, 在 ATCC 13869 菌株中, P_{cysK} 、 P_{gapA} 和 P_{fumC} 启动子强度分别达到 $(1\ 075 \pm 21)$ 、 (98 ± 5) 和 (72 ± 5) RFU/ OD_{600} , 强度及顺序与在 SL4 菌株中类似, 其强度分别是 P_{tac} 的 2.1、0.2 和 0.1 倍; 在 ATCC 13032 菌株中, P_{cysK} 、 P_{gapA} 和 P_{fumC} 启动子强度分别达到 (154 ± 2) 、 (77 ± 6) 和 (48 ± 6) RFU/ OD_{600} , 强度顺序与在 SL4 和

ATCC 13869 菌株中类似, 其中 P_{gapA} 和 P_{fumC} 启动子强度变化较小, 分别为 P_{tac} 的 0.2 倍和 0.1 倍; 但 P_{cysK} 启动子强度明显下降, 只有 P_{tac} 的 0.3 倍。

2.5 P_{cysK} 启动子用于 LacZ 蛋白表达

为了进一步评价强启动子 P_{cysK} 的蛋白表达效果, 分别在 *C. glutamicum* SL4、ATCC 13869 和 ATCC 13032 菌株中验证其表达 LacZ 的效果, 并以 P_{trc} 和 P_{tac} 启动子为对照。测定蛋白表达稳定期的 β -半乳糖苷酶活性, 结果如图 6 所示, P_{trc} 和 P_{tac} 启动子在 3 株菌中的表达效果相似, 也以 P_{tac} 进行比较, 在 SL4 和 ATCC 13869 菌株中, P_{cysK} 启动子表达的 LacZ 活性分别约为 P_{tac} 的 4.1 和 4.3 倍; 在 ATCC 13032 菌株中, P_{cysK} 启动子表达的 LacZ 活性约为 P_{tac} 的 0.4 倍。以上结果表明, P_{cysK} 启动子表达 LacZ 的趋势与 RFP 一致, 但在 SL4 和 ATCC 13869 菌株中可以更加高效地表达 LacZ。

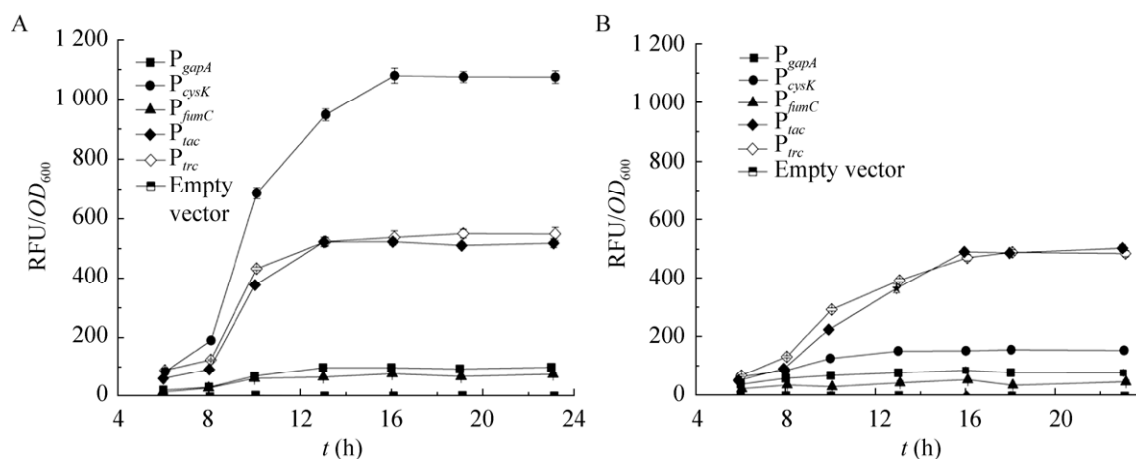


图 5 P_{cysK} 、 P_{gapA} 和 P_{fumC} 启动子表达 RFP 的 *C. glutamicum* ATCC 13869 和 ATCC 13032 系列重组菌的荧光强度
Fig. 5 The fluorescence intensities of *C. glutamicum* ATCC 13869 and ATCC 13032-based recombinants expressing RFP with P_{cysK} , P_{gapA} and P_{fumC} . (A) ATCC 13869. (B) ATCC 13032. P_{trc} and P_{tac} were used as 2 control promoters. Error bars indicate the standard deviations from 3 independent cultures.

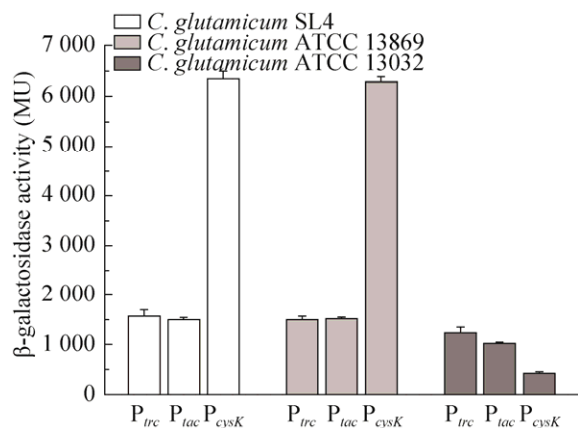


图6 P_{cysK} 启动子在 *C. glutamicum* SL4、ATCC 13869 和 ATCC 13032 菌株中表达 LacZ

Fig. 6 LacZ were expressed by using the promoter P_{cysK} in *C. glutamicum* SL4, ATCC 13869 and ATCC 13032, respectively. P_{trc} and P_{tac} were used as 2 control promoters. Error bars indicate the standard deviations from 3 independent cultures.

3 讨论

随着谷氨酸棒杆菌在现代生物技术产业中被越来越多地用于生产更多产品,需要挖掘更多的表达元件用于遗传育种改造,从而实现高效生产不同目标产物^[10,30]。相比于诱导型启动子,高效的组成型启动子逐渐展现出优势^[31-33]。本研究采用 RFP 报告系统,从发酵过程均高水平转录的 10 个基因中筛选到 3 个内源组成型启动子,其中 P_{cysK} 启动子首次被报道为强启动子,为谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造提供了新的表达元件。

多种条件或多个时间点的转录组数据,可以反映每个基因的转录水平和转录模式,从而可以帮助筛选所需类型的启动子元件。本研究基于发酵过程的时间序列转录组数据筛选的 10 个发酵过程均高水平转录的基因,与刘秀霞等^[27]通过分析不同溶氧条件转录组数据筛选的 6 个不同溶氧条件均高水平转录的基因相比,只有 *tuf* 基因是共有的,其基于 EGFP 报告系统表征 P_{tuf} 启动子为强启动子,而在本研究中采用 RFP 报告系统表征

发现 P_{tuf} 的强度很低。与其相比,本研究选取的 P_{tuf} 启动子长度更长。Ravasi 等^[24]发现不同报告基因对相同启动子的评价结果也存在较大差异。因此我们认为启动子序列、报告基因、菌株和培养条件的差异是造成 P_{tuf} 启动子表征结果不同的主要原因。此前报道的组成型启动子 P_{sod} 和 P_{cspB} ,其起始转录的基因在发酵过程中均可以稳定转录,但平均转录水平没有排在前 10 位,因此没有入选。另外,本研究中多个基因基于 RFP 报告系统表征的启动子强度与转录组数据中的转录水平 FPKM 值并不一致,该现象在其他已报道的类似研究中同样存在。在原核生物中启动子是影响基因转录水平的主要因素,因此一般来说,以全基因组规模的转录组数据筛选内源启动子是一种可行的初筛方法。但是由于基因的转录水平也受基因序列(包括报告基因)、基因的拷贝数、DNA 的二级结构、mRNA 的稳定性和基因转录的外部环境条件等的影响,所以高转录水平的基因不一定都能通过报告系统表征出强启动子。蛋白质的表达水平还与 5'-UTR、SD 序列、mRNA 的二级结构和密码子使用频率等相关,所以当采用相同的 5'-UTR、SD 序列和报告基因表征不同启动子时,可以通过 RFP 等报告蛋白的表达量来表征不同启动子在相同条件的强度,但是如果以上因素发生变化时,启动子强度也可能不同。由此可见,以上因素都可能导致报告系统表征的启动子强度与转录组数据中的转录水平不一致,研究者在使用相关结果时应当全面慎重评估。

为验证本研究发现的 3 个内源组成启动子的普适性,又分别在 ATCC 13869 和 ATCC 13032 菌株中进行了表征和效果评价。在 SL4 和 ATCC 13869 菌株中, P_{cysK} 启动子强度约为 IPTG 诱导型启动子 P_{tac} 的 2.2 倍;在 ATCC 13032 菌株中,其强度约为 P_{tac} 的 0.3 倍,其在 3 株菌中表达 LacZ 的效果与 RFP 趋势一致,该启动子的表达强度受

菌株影响较大,因此在不同的谷氨酸棒杆菌菌株中使用时需要注意此点。 P_{gapA} 和 P_{fumC} 启动子的强度在 3 株菌中差异较小,约为 P_{tac} 的 0.1–0.3 倍,其受菌株影响较小。根据 Shang 等^[25]建议的内源组成型强启动子标准,将表达强度大于等于 P_{tac} 的 0.3 倍划分为强启动子,而小于 0.3 倍为弱启动子。由此可见, P_{cysK} 为强启动子, P_{gapA} 和 P_{fumC} 为弱启动子。

4 结论

本研究基于谷氨酸高产菌 *C. glutamicum* SL4 的时间序列转录组数据,从发酵过程均高水平转录的基因筛选内源的组成型强启动子,通过 RFP 报告系统表征了 10 个候选启动子,成功获得 3 个可以通用的组成型启动子 P_{cysK} 、 P_{gapA} 和 P_{fumC} 。其中 P_{cysK} 的表达强度最高,也可以高效表达 LacZ 蛋白,该启动子首次被报道为强启动子,可作为高效元件用于谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造。

REFERENCES

- [1] Dong XY, Quinn PJ, Wang XY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine. *Biotechnol Adv*, 2011, 29(1): 11–23.
- [2] Ohnishi J, Mitsuhashi S, Hayashi M, et al. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(2): 217–223.
- [3] Woo HM, Park JB. Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol*, 2014, 180(15): 43–51.
- [4] Jojima T, Noburyu R, Sasaki M, et al. Metabolic engineering for improved production of ethanol by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(3): 1165–1172.
- [5] Blombach B, Eikmanns BJ. Current knowledge on isobutanol production with *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *Bioeng Bugs*, 2011, 2(6): 346–350.
- [6] Yamamoto S, Suda M, Niimi S, et al. Strain optimization for efficient isobutanol production using *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(11): 2938–2948.
- [7] Inui M, Murakami S, Okino S, et al. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2004, 7(4): 182–196.
- [8] Schneider J, Wendisch VF. Putrescine production by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(4): 859–868.
- [9] Matsumoto K, Kitagawa K, Jo SJ, et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* using propionate as a precursor. *J Biotechnol*, 2011, 152(4): 144–146.
- [10] Liu XX, Yang YK, Zhang W, et al. Expression of recombinant protein using *Corynebacterium glutamicum*: progress, challenges and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(4): 652–664.
- [11] Becker J, Wittmann C. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production—the heartbeat of industrial strain development. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(5): 718–726.
- [12] Seo SW, Yang J, Min BE, et al. Synthetic biology: tools to design microbes for the production of chemicals and fuels. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(6): 811–817.
- [13] Lee JY, Na YA, Kim E, et al. The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(5): 807–822.
- [14] Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, et al. A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. *Plasmid*, 2012, 68(2): 142–147.
- [15] Fan R, Liu JL, Han WY, et al. Study of the new inducible promoter in *Corynebacterium glutamicum*. *J Hainan Normal Univ: Nat Sci*, 2016, 29(2): 154–159 (in Chinese).

- 范荣, 刘金雷, 韩武洋, 等. 谷氨酸棒状杆菌新型诱导启动子的研究. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2016, 29(2): 154–159.
- [16] Chen XX, Chen B, Sun BB, et al. Analysis the intensity regulated by inducible promoters in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. J Shenyang Pharmaceut Univ, 2017, 34(2): 169–175 (in Chinese).
- 陈晓雪, 陈飏, 孙兵兵, 等. 诱导型启动子在谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 中调控强度的分析. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(2): 169–175.
- [17] Tateno T, Fukuda H, Kondo A. Direct production of L-lysine from raw corn starch by *Corynebacterium glutamicum* secreting *Streptococcus bovis* α -amylase using *cspB* promoter and signal sequence. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 77(3): 533–541.
- [18] Vogt M, Krumbach K, Bang WG, et al. The contest for precursors: channelling L-isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* without byproduct formation. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(2): 791–800.
- [19] Park SH, Kim HU, Kim TY, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. Nat Commun, 2014, 5: 4618.
- [20] Kim SY, Lee J, Lee SY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-ornithine. Biotechnol Bioeng, 2015, 112(2): 416–421.
- [21] Jensen JVK, Eberhardt D, Wendisch VF. Modular pathway engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the glutamate-derived compounds ornithine, proline, putrescine, citrulline, and arginine. J Biotechnol, 2015, 214: 85–94.
- [22] Yim SS, An SJ, Kang M, et al. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol Bioeng, 2013, 110(11): 2959–2969.
- [23] Rytter JV, Helmark S, Chen J, et al. Synthetic promoter libraries for *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(6): 2617–2623.
- [24] Ravasi P, Peiru S, Gramajo H, et al. Design and testing of a synthetic biology framework for genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. Microb Cell Factor, 2012, 11(1): 147.
- [25] Shang XL, Chai X, Lu XM, et al. Native promoters of *Corynebacterium glutamicum* and its application in L-lysine production. Biotechnol Lett, 2018, 40(2): 383–391.
- [26] Zhao ZH, Liu XX, Zhang W, et al. Construction of genetic parts from the *Corynebacterium glutamicum* genome with high expression activities. Biotechnol Lett, 2016, 38(12): 2119–2126.
- [27] Liu XX, Zhao ZH, Sun Y, et al. Selection of endogenous expression elements from *Corynebacterium glutamicum*. Microbiol China, 2016, 43(8): 1671–1678 (in Chinese).
- 刘秀霞, 赵子豪, 孙杨, 等. 谷氨酸棒杆菌内源表达元件的筛选. 微生物学通报, 2016, 43(8): 1671–1678.
- [28] Kirchner O, Tauch A. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol, 2003, 104(1/3): 287–299.
- [29] Jakoby M, Ngouoto-Nkili CE, Burkovski A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. Biotechnol Technol, 1999, 13(6): 437–441.
- [30] Kang MK, Lee J, Um Y, et al. Synthetic biology platform of CoryneBrick vectors for gene expression in *Corynebacterium glutamicum* and its application to xylose utilization. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(13): 5991–6002.
- [31] Yang L, Xu JL, Chen XY, et al. Effects of promoter modification on xylose isomerase gene *xylA* expression in *Corynebacterium glutamicum*. Adv New Renewable Energy, 2014, 2(5): 353–357 (in Chinese).
- 杨柳, 许敬亮, 陈小燕, 等. 启动子对木糖异构酶基因在谷氨酸棒杆菌中表达的影响. 新能源进展, 2014, 2(5): 353–357.
- [32] Choi JW, Yim SS, Lee SH, et al. Enhanced production of gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by expressing glutamate decarboxylase active in expanded pH range. Microb Cell Factor, 2015, 14(1): 21.
- [33] Yim SS, Choi JW, Lee SH, et al. Modular optimization of a hemicellulose-utilizing pathway in *Corynebacterium glutamicum* for consolidated bioprocessing of hemicellulosic biomass. ACS Synth Biol, 2016, 5(4): 334–343.

(本文责编 陈宏宇)