

hprK 基因敲除及其对枯草芽孢杆菌核黄素发酵的影响 Knockout of the *hprK* Gene in *B. subtilis* CcpA Mutant and Its Influence on Riboflavin Fermentation

张 帆 宋 辉 班 睿*

ZHANG Fan, SONG Hui and BAN Rui*

天津大学化工学院生物工程系,天津 300072

Department of Biochemical Engineering, College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China

摘 要 枯草芽孢杆菌在葡萄糖丰富的环境中,胞内糖分解代谢物浓度的提高将引起碳分解代谢物阻遏效应(CCR)及糖吸收的抑制,对核黄素等发酵过程产生不利影响。通过缺陷细胞的分解代谢物控制蛋白 A(CcpA)可以解除 CCR 效应,但不能解除糖吸收的抑制。磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(PTS)是枯草芽孢杆菌主要的糖吸收方式,HPr 蛋白和双功能的 HPr 激酶/HPr-Ser46-P 磷酸酶(HprK/P)参与 PTS 系统的调控。在葡萄糖丰富的条件下,HprK/P 的激酶活性受 1,6-二磷酸果糖激活,催化 HPr 蛋白 46 位丝氨酸残基磷酸化,形成 HPr-Ser46-P。HPr-Ser46-P 抑制某些碳源透过酶基因的表达,同时 HPr-Ser46-P 难以被酶 I 在 His15 磷酸化,不能在 PTS 系统中发挥转移磷酸基团的作用,使细胞的糖吸收受到抑制。在 CcpA 缺陷的背景下,敲除核黄素生产菌株 *B. subtilis*24A1/pMX45 的 HprK/P 编码基因 *hprK*,构建了 CcpA 和 HprK/P 双缺陷的重组菌 *B. subtilis*ZHc/pMX45。摇瓶发酵显示,*B. subtilis*ZHc/pMX45 核黄素发酵的最适葡萄糖浓度由 24A1/pMX45 的 8% 提高到 10%,核黄素产量达到 4.374mg/mL,比 24A1/pMX45 提高了 19.2%。结果表明,CcpA 和 HprK/P 的双缺陷可有效解除高浓度葡萄糖所引起的 CCR 效应和糖吸收抑制,有助于提高细胞对葡萄糖的耐受力,并提高核黄素产量。

关键词 枯草芽孢杆菌, HPr 蛋白, *hprK* 基因, 磷酸糖转移酶系统(PTS), 核黄素

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0534-05

Abstract In *Bacillus subtilis*, raising the amount of carbon catabolite in vivo would lead to carbon catabolite repression(CCR) and restrain the absorption of glucose. By deleting CcpA the CCR effect could be relieved, but the absorption of glucose remains restrained. The phosphoenol-pyruvate - sugar phosphotransferase system(PTS) is the main glucose transportation system in *B. subtilis*. HPr protein together with HprK/P participate in the glucose transportation. The HPr protein is phosphorylated at His-15 forming HPr-His-15-P transferring phosphate group from HPr to EII. While HprK/P phosphorylate HPr at Ser-46 forming HPr-Ser-46-P. HPr-Ser-46-P cannot participate in the transportation of glucose. The Knockout of *ccpA* gene increases the amount of fructose 1,6-bisphosphate(FBP) in vivo. And FBP could activate HPr kinase. So when CcpA is deleted, most part of the HPr will be phosphorylated at Ser-46. Absorption of glucose is blocked. In this study, by disruption of *hprK* gene, the obtained *B. subtilis*ZHc/pMX45 reaches the peak riboflavin production of 4.374mg/mL at the optimum glucose concentration of 10%, 19.2% higher than that of *B. subtilis*24A1/pMX45 at the optimum glucose concentration of 8%.

Key words *Bacillus subtilis*, HPr protein, *hprK* gene, phosphotransferase system(PTS), riboflavin

磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(PTS)是枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)主要的糖吸收方式^[1], PTS系统由非专一性的能量耦合蛋白酶I(EI)和磷酸转移蛋白(HPr),以及糖专一性蛋白酶II(EII)组成。葡萄糖专一性的EII^{Glc}由*ptsG*基因编码,与编码EI的*ptsI*基因和编码HPr的*ptsH*基因构成操纵子*ptsGHI*,其表达需要葡萄糖的诱导和抗终止蛋白GlcT的作用^[2]。当环境中缺乏葡萄糖时,GlcT被EII^{Glc}磷酸化而失去抗终止活性。

HPr蛋白15位组氨酸残基是依赖磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的磷酸化位点,由EI催化形成HPr-His15-P。HPr-His15-P进一步使EII磷酸化,在糖吸收过程中发挥传递磷酸基团的功能^[3]。HPr蛋白46位的丝氨酸残基是依赖于ATP的磷酸化位点,被双功能的HPr激酶/P-Ser-HPr磷酸酶(HPrK/P)催化,磷酸化形成HPr-Ser46-P。HPr-Ser46-P作为辅助因子与分解代谢物控制蛋白A(CcpA)相互作用^[4],参与细胞碳分解代谢物阻遏作用(CCR),氮代谢、产能代谢和糖吸收的调节,对*B. subtilis*大约10%的基因具有激活或阻遏作用。

HPrK/P由*hprK*基因编码,位于染色体307°结构基因长度为930bp,由310个氨基酸残基组成。HPrK/P的激酶活性被糖酵解途径的关键中间代谢物1,6-二磷酸果糖(FBP)激活^[5,6],被无机磷酸抑制,HPrK/P的磷酸酶活性则被无机磷酸激活。因此,HPrK/P表现出激酶活性或磷酸酶活性取决于细胞生长环境中碳源的丰富或缺乏状态。当环境中葡

萄糖丰富时,HPrK/P表现激酶活性,催化HPr磷酸化形成HPr-Ser46-P。HPr-Ser46-P与CcpA蛋白共同阻遏PTS糖透过酶的表达^[7];HPr-Ser46-P还抑制非PTS碳源的透过酶的活性;另外,HPr-Ser46-P被EI磷酸化的效率比HPr低约600倍^[8],不能有效的在PTS系统中发挥传递磷酸基团的功能。因此,当HPr蛋白以HPr-Ser46-P的状态存在时,细胞的糖吸收受到抑制。

细菌中广泛存在的CCR效应,对于许多工业发酵过程非常不利。在*B. subtilis*核黄素发酵菌株中,敲除*ccpA*基因而解除CCR效应^[9],使发酵能够在8%的葡萄糖浓度下进行,并显著提高核黄素的发酵产量。但是,CcpA的缺失并不影响HPr-Ser46-P的存在。在高浓度葡萄糖条件下,HPr-Ser46-P仍然具有抑制糖吸收的作用,进而对发酵产生不利影响。

本文在CcpA缺陷的背景下,进一步敲除了核黄素生产菌株的*hprK*基因,构建了CcpA和HPrK/P双缺陷株。结果表明,HPrK/P的缺失提高了菌株对葡萄糖的耐受能力,也显著提高了菌株的核黄素发酵产量。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

实验涉及的菌株和质粒如表1所示。*B. subtilis*24A1/pMX45是CcpA缺陷的产核黄素工程菌株。质粒pMX45带有核黄素操纵子,在*B. subtilis*中有两个拷贝。

表1 本实验用到的菌种和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmid used in this study

| Strain or plasmid | Relevant characteristics | Source |
|-------------------------------|--|------------------|
| <i>E. coli</i> top10 | Host for plasmid construction | Laboratory stock |
| <i>B. subtilis</i> 168 | <i>trpC2</i> | Laboratory stock |
| <i>B. subtilis</i> 24A1 | 8-AG ^r , Em ^r , rosefavin ^r , Dc ^r , Δ <i>ccpA</i> : em | Laboratory stock |
| <i>B. subtilis</i> 24A1/pMX45 | 8-AG ^r , Em ^r , rosefavin ^r , Dc ^r , Δ <i>ccpA</i> : erm | Laboratory stock |
| <i>B. subtilis</i> ZHc | 8-AG ^r , Em ^r , rosefavin ^r , Dc ^r , Δ <i>ccpA</i> : erm, Δ <i>hprK</i> : cm | This study |
| <i>B. subtilis</i> ZHc/pMX45 | 8-AG ^r , Em ^r , rosefavin ^r , Dc ^r , Δ <i>ccpA</i> : erm, Δ <i>hprK</i> : cm | This study |
| pC194 | Cm ^r | Laboratory stock |
| pHP13 | Cm ^r , Em ^r | Laboratory stock |
| pHP13-hpr | Cm ^r , Em ^r | This study |
| pHP13-hpr : cat | Cm ^r , Em ^r , Δ <i>hprK</i> : cm | This study |
| pMX45 | Em ^r , rib operon, <i>B. subtilis</i> plasmid | Laboratory stock |

1.2 基因操作方法

限制性内切酶为 Fermentas 公司产品;T4 连接酶为 TaKaRa 公司产品;Taq DNA 聚合酶及其它试剂均购自上海生工生物工程有限公司。DNA 的纯化

和浓缩、大肠杆菌感受态细胞的制备与转化、CTAB 法小规模提取质粒、DNA 片段的酶切和连接等操作,具体方法参照‘分子克隆实验指南’和供货商提供的操作说明。转化 *B. subtilis*24A1 和 *B.*

*subtilis*ZHc 采用原生质体转化法, *B. subtilis* 染色体提取采用玻璃珠法。

PCR 反应条件: 92℃ 预变性 4min, 然后在以下条件进行 30 轮循环: 92℃ 变性 30s, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 40s, 在最后一个循环完成后, 72℃ 保温 5min。PCR 扩增 *hpr::Cm* 片段时, 延伸反应时间为 1.5min。

1.3 发酵条件和分析方法

核黄素发酵培养基组分为 2.5% 酵母粉, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2% 的尿素, 根据实验要求分别加入 10% 的蔗糖或不同浓度的葡萄糖作为发酵碳源。发酵条件为 41℃、250r/min、5% 接种量、装瓶量 50 mL/500mL, 自然 pH 值。发酵周期为 72 ~ 84h, 每间隔 12h 取样进行核黄素定量分析。

核黄素定量分析采用分光光度法: 在 444nm 下测定发酵液的吸光度值, 根据 $Y = 0.0319X - 0.0042$ 计算核黄素的含量; Y 为吸光度, X (mg/L) 为稀释后的核黄素浓度。

2 结果

2.1 重组质粒 pHP13-*hpr::cat* 的构建

hprK 基因位于 *B. subtilis* 染色体 3594.20kb ~ 3595.13kb, 基因长度为 930bp。分别在 *hprK* 基因上下游各 100bp 处设计引物 *hprK-up* (5'-CTCGAACTGCAGCAGTTTAGGTTCAAGCCCCGAAAG-3') 和 *hprK-down* (5'-GATCATGGAATTCAAAGCGCCGAGACCGATA-3'), 在 *hprK-up* 中引入 *Pst* I 的酶切位点, 在 *hprK-down* 中引入 *EcoR* I 的酶切位点。提取 *B. subtilis*168 的染色体作为模板, PCR 扩增 1.1kb 的 *hprK* 基因片段。PCR 产物与质粒 pHP13 分别用 *Pst* I 和 *EcoR* I 双酶切后, 进行连接反应。连接产物转化 *E. coli* top10, 在氯霉素抗性平板上筛选转化子。经提取质粒和酶切电泳检测, 得到重组质粒 pHP13-*hpr*。

设计引物 *Cm-up* (5'-GAGAGAGGATCCTCTAGATTATTCCTCAACTAAAGCACC-3') 和 *Cm-down* (5'-GATATAGGATCCGGTACCTCTAGAGCTCAACGTCAATAAAGCAAT-3'), 在上、下引物中都引入 *Xba* I 酶切位点。以质粒 pC194 为模板, PCR 扩增出包括带有氯霉素抗性 (Cm^r) 的 1.1kb 的 *cat* 基因片段。

hprK 基因内部有两个 *Xba* I 酶切位点, 位于中部相距约 100bp。用 *Xba* I 分别消化质粒 pHP13-*hpr* 和 *cat* 片段, 然后两者进行连接反应。连接产物转化 *E. coli* top10, 用含 5 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板筛选抗性菌落。随机挑取 10 株抗性菌株提取质粒, 分

别以提取质粒为模板, 用引物 *hprK-up* 和 *hprK-down* 进行 PCR 扩增。如果是重组质粒 pHP13-*hpr::cat*, PCR 产物应该是 2.1kb 的 *hpr::cat* 片段。结果筛选出 3 株带有 pHP13-*hpr::cat* 的转化子。

2.2 CcpA 和 HprK/P 双缺陷菌株的构建

将 PCR 扩增的 2.1kb 的 *hprK::cat* 片段转化 *ccpA* 缺陷菌株 *B. subtilis*24A1, 在含有 5 μ g/mL 氯霉素的 CMR 完全再生培养基上筛选抗性菌株, 共得到四个抗性菌株: *B. subtilis*ZHa、ZHb、ZHc 和 ZHd。

分别提取这 4 株菌的染色体作为模板, 依据 *hprK* 基因上下游各 130bp 处的碱基序列设计验证引物 P1 (5'-CTTCCTGATTCATGAAGTTC-3') 和 P2 (5'-GCTCTGGGTAATCGTGTG-3'), 根据 PCR 产物的大小验证在染色体 *hprK* 位点是否发生了双交换重组。若 *hprK::cat* 片段与染色体 *hprK* 位点发生了双交换重组, PCR 产物应为 2.2kb 的 *hprK::cat* 片段; 反之, PCR 产物只能是约 1.1kb 的 *hprK* 基因及旁侧序列片段。PCR 产物的电泳结果显示 (图 1), *B. subtilis*24ZHc 的 PCR 产物为单一的 2.2kb 条带, 与理论预期相符, 说明 *cat* 基因插入到了 *hprK* 基因中间。证明 *B. subtilis*24ZHc 被敲除了 *hprK* 基因, 是 HprK/P 缺陷菌株。其余 3 株菌的 PCR 产物除 2.2kb 条带外, 还有一条约 1.1kb 的条带。这种情况可能是 *hprK::cat* 片段通过其它重组方式插入了 *hprK* 基因的附近, 并没有正确的插入到 *hprK* 基因内部。

将带有核黄素操纵子的质粒 pMX45 通过原生质体转化法转入 *B. subtilis*ZHc 中, 用红霉素抗性平板筛选和提取质粒酶切电泳鉴定, 得到 CcpA 和 HprK/P 双缺陷的核黄素发酵菌株 *B. subtilis*ZHc/pMX45。

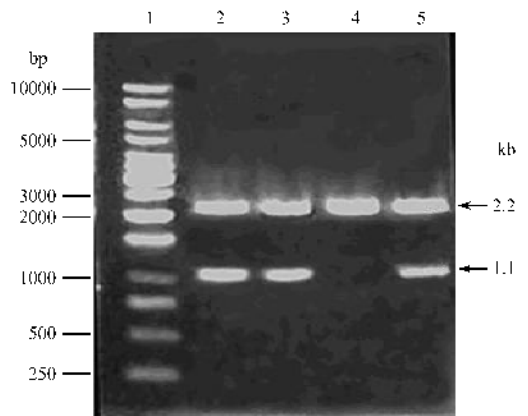


图 1 *hprK* 缺陷菌株验证 PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 PCR identification of *hprK* knockout mutant

1: 1.1 kb DNA ladder; 2: *B. subtilis* ZHa; 3: *B. subtilis* ZHb; 4: *B.*

2.3 蔗糖对 *B. subtilis* ZHc/pMX45 核黄素发酵的影响

发酵培养基用 10% 的蔗糖作为碳源, 分别进行 *B. subtilis* ZHc/pMX45 和 24A1/pMX45 的摇瓶发酵比较, 发酵 72h, 每隔 12h 取样测定核黄素浓度(图 2)。两株菌在蔗糖培养基中的核黄素发酵过程基本没有区别, 发酵 72h 核黄素产量为 3mg/mL。 *B. subtilis* 主要通过分泌胞外蔗糖酶, 将蔗糖水解为果糖和葡萄糖, 然后通过 PTS 系统吸收进入细胞。虽然在 CcpA 和 HprK/P 缺陷菌株中, 果糖和葡萄糖可以同时吸收, 但是只有葡萄糖能够直接进入磷酸戊糖途径为核黄素合成提供前体物, 而果糖主要通过糖酵解途径分解, 很少进入磷酸戊糖途径。因此, 在蔗糖作为核黄素发酵的碳源情况下, 葡萄糖的供给量代替糖吸收速率成为核黄素发酵的限制因素, 使 *B. subtilis* ZHc/pMX45 和 24A1/pMX45 的核黄素发酵过程表现出基本一致的特征。

2.4 葡萄糖对 *B. subtilis* ZHc/pMX45 核黄素发酵的影响

分别用含有 5%、8%、10% 和 12% 葡萄糖作为碳源的发酵培养基进行 *B. subtilis* ZHc/pMX45 和 24A1/pMX45 的摇瓶发酵, 发酵进行 84h, 每隔 12h 取

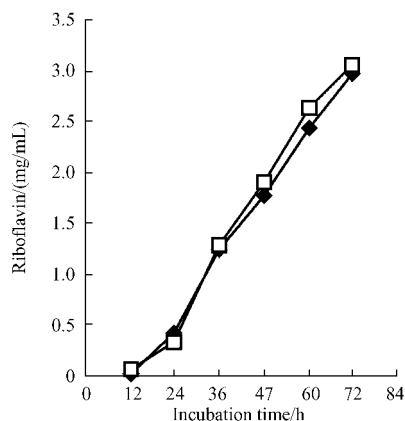


图 2 10% 蔗糖为碳源的核黄素发酵曲线
Fig. 2 Contrast of riboflavin fermentation with 10% sucrose as carbon source
◆ 24A1/pMX45 ; □ ZHc/pMX45

样测定发酵液中核黄素浓度(图 3)。结果显示, 当葡萄糖浓度为 8% 时, *B. subtilis* 24A1/pMX45 的核黄素产量最高, 达到 3.67mg/mL。而 ZHc/pMX45 在 10% 葡萄糖浓度的条件下, 达到核黄素最高产量 4.37mg/mL, 核黄素产量提高了 19.2%。结果说明, HprK/P 的缺失改善了 ZHc/pMX45 对葡萄糖的吸收效率, 使细胞能够耐受更高的葡萄糖浓度, 并且糖吸收速率不再是核黄素合成的限制因素, 使 ZHc/p

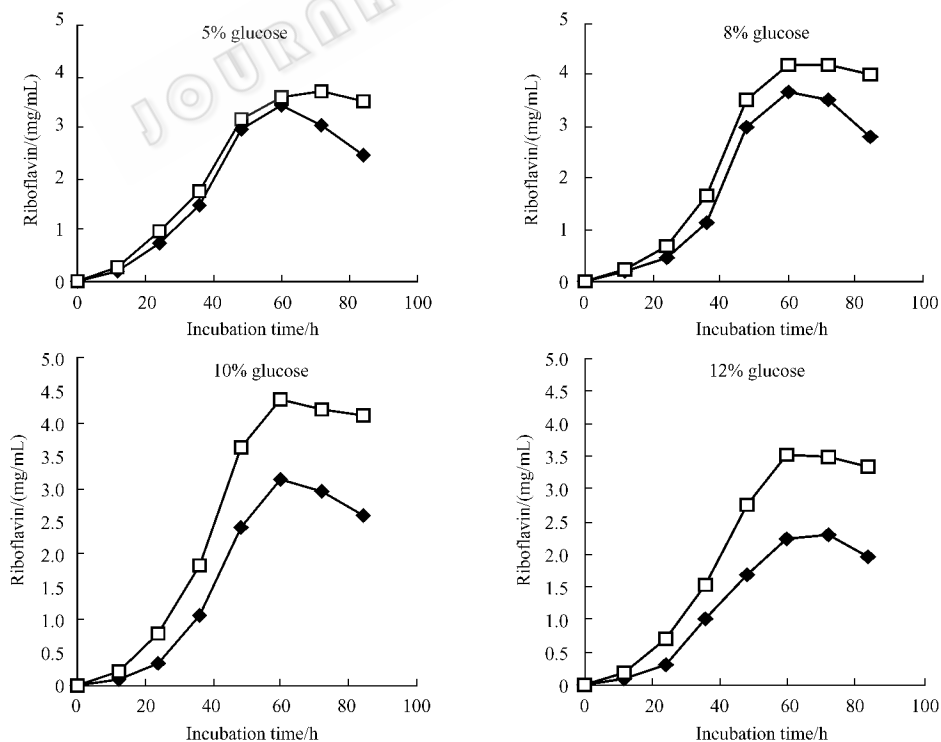


图 3 葡萄糖为碳源的核黄素发酵曲线

Fig. 3 Contrast of riboflavin fermentation with glucose as carbon source

◆ 24A1/pMX45 ; □ ZHc/pMX45

pMX45 能够在更高的葡萄糖浓度下达到更高的核黄素发酵产量。

3 讨论

因为葡萄糖所引起的 CCR 效应及其它代谢改变,使包括核黄素发酵在内的许多发酵都不能在较高的葡萄糖浓度下进行。工业上通常的采用流加工艺,或者选用淀粉等物质作为碳源以避免 CCR 效应。通过对菌种的遗传改造,在分子水平上彻底阻断葡萄糖所引起的负面效应,则是最佳的解决方法。通过敲除 *ccpA* 基因构建的 *CcpA* 缺陷菌株 *B. subtilis*24A1/pMX45 核黄素发酵的最适葡萄糖浓度达到 8%,并且葡萄糖在 60h 内能够全部耗尽,核黄素产量可达 3.67mg/mL。*CcpA* 缺陷虽然阻断了糖分解代谢物所引起的 CCR 效应,但是并没有完全消除对糖吸收的抑制。因为糖分解代谢物对糖吸收的调控还通过 *FBP-HprK/P-HPr* 发挥作用。*CcpA* 和 *HprK/P* 双缺陷使细胞进一步失去了形成 *HPr-Ser46-P* 能力,保证了糖专一性 E II 的表达不受抑制,保证了有足够的 *HPr* 参与 PTS 过程的磷酸转移,阻断了糖分解代谢物对糖吸收的抑制。由于糖吸收的改善,*B. subtilis*ZHc/pMX45 对葡萄糖浓度的耐受力提高到 10%,核黄素发酵产量随底物浓度的提高而提高到 4.37mg/mL,相比提高了 19.2%。

REFERENCES (参考文献)

[1] Reizer J, Bachem S, Reizer A *et al.* Novel phosphotransferase

system genes revealed by genome analysis—the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 1999, **145**: 3419 – 3429

- [2] Bachem S, Stulke J. Regulation of the *Bacillus subtilis* GlcT antiterminator protein by components of the phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**(20): 5319 – 5326
- [3] Ye JJ, Saier MH Jr. Regulation of sugar uptake via the Phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase Systems in *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* is mediated by ATP-dependent phosphorylation of seryl residue 46 in HPr. *Journal of Bacteriology*, 1996, **178**(12): 3557 – 3563
- [4] Blencke HM, Homuth G, Ludwig H *et al.* Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metabolic Engineering*, 2003, **5**: 133 – 149
- [5] Hanson KG, Steinhauer K, Reizer J *et al.* HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis* expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. *Microbiology*, 2002, **148**: 805 – 1811
- [6] Mondero V, Poncet S, Mijakovic I *et al.* Mutations lowering the phosphatase activity of HPr kinase/phosphatase switch off carbon metabolism. *The EMBO Journal*, 2001, **20**(15): 3928 – 3937
- [7] Brückner R, Titgemeyer F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, **209**: 141 – 148
- [8] Nessler S, Fieulaine S, Poncet S *et al.* HPr Kinase/Phosphorylase, the sensor enzyme of catabolite repression in Gram-positive bacteria: structural aspects of the enzyme and the complex with its protein substrate. *Journal of Bacteriology*. 2003, **185**(14): 4003 – 4010
- [9] Ying M (应明), Ban R (班睿). Knockout of the *ccpA* gene in *B. subtilis* and its influence on riboflavin fermentation. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2006, **46**(1): 23 – 27