

代谢工程方法改造大肠杆菌生产胸苷

李思梦¹, 李晓静², 陈涛¹

1 天津大学化工学院 教育部系统生物工程重点实验室, 天津 300072

2 海军工程大学勤务学院, 天津 300072

李思梦, 李晓静, 陈涛. 代谢工程方法改造大肠杆菌生产胸苷. 生物工程学报, 2015, 31(1): 105-114.

Li SM, Li XJ, Chen T. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for thymidine production. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 105-114.

摘要: 胸苷是抗艾滋病药物司他夫定 (3'-脱氧-2',3'-双脱氢胸苷) 和叠氮胸苷的重要前体物质。应用代谢工程方法对大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 生物合成胸苷进行了研究。通过敲除 *E. coli* BL21 嘧啶回补途径的 *deoA*、*tdk* 和 *udp* 三个基因, BS03 工程菌株能够积累 21.6 mg/L 胸苷。为了增加合成胸苷前体物核糖-5-磷酸和 NADPH 的供给, 进一步敲除 *pgi* 和 *pyrL* 使工程菌 BS05 胸苷的产量提高到 90.5 mg/L。而通过过表达胸苷合成途径的 *ushA*、*thyA*、*dut*、*ndk*、*nrdA* 和 *nrdB* 六个基因, 菌株 BS08 胸苷的产量能达到 272 mg/L。通过分批补料发酵, BS08 最终可以积累 1 248.8 mg/L 的胸苷。本研究结果表明经过代谢工程改造的 *E. coli* BL21 具有良好的胸苷合成能力和应用潜力。

关键词: 代谢工程, 胸苷, 从头合成途径

Metabolic engineering of *Escherichia coli* for thymidine production

Simeng Li¹, Xiaojing Li², and Tao Chen¹

1 Key Laboratory of Systems Bioengineering of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2 College of Service, Naval University of Engineering, Tianjin 300072, China

Abstract: Thymidine is a commercially useful precursor for production of antiviral compounds such as stavudine and

Received: April 1, 2014; **Accepted:** May 19, 2014

Supported by: National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (Nos. 2011CBA00804, 2012CB725203).

Corresponding author: Chen Tao. Tel: +86-22-27406770; E-mail: chentao@tju.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2011CBA00804, 2012CB725203) 资助。

网络出版时间: 2014-05-28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140196.html>

azidothymidine. Biosynthesis of thymidine by *Escherichia coli* BL21 (DE3) was studied using metabolic engineering methods. The *deoA*, *tdk* and *udp* of the salvage pathway were disrupted from *E. coli* BL21 to construct BS03 that produced 21.6 mg thymidine per liter. Additional deletion of *pgi* and *pyrL* increased the supply of thymidine precursors and the resulting strain BS05 produced 90.5 mg thymidine/L. At last, *ushA*, *thyA*, *dut*, *ndk*, *nrdA* and *nrdB* of thymidine biosynthetic pathway were overexpressed, and the resulting strain BS08 produced 272 mg thymidine/L. In fed-batch fermentation, BS08 accumulated 1 248.8 mg thymidine/L. Metabolically engineered strain *E. coli* has potential applications for thymidine production.

Keywords: metabolic engineering, thymidine, *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway

胸苷包括一分子 2-脱氧核糖和一分子胸腺嘧啶碱基,是抗艾滋病司他夫定(3'-脱氧-2',3'-双脱氢胸苷)和叠氮胸苷的前体物质^[1-2]。由于艾滋病病人数量的急剧增加,廉价的、能大规模生产胸苷的工艺方法得到了广泛的关注。用化学合成法生产胸苷,工艺过程十分冗长使得最终得到的胸苷成本较为昂贵^[3-5]。使用生物法生产胸苷具有工艺简单、后续分离成本低廉等优势,因此构建高产胸苷的工程菌株具有良好的应用前景。

目前,国内多是用菌种诱变^[6]来提高胸苷的生产水平或酶法^[5,7-8]来生产胸苷。在细胞中,胸苷的用途仅涉及到 DNA 的合成,因此细胞内胸苷的含量非常低,并且受到严密的调控^[9-12]。作为 DNA 的组成物质,嘧啶核苷酸在微生物细胞内的合成有 2 种途径:一条是利用葡萄糖等碳源和氮源合成核苷酸,这种合成途径称为从头合成途径(*de novo* pathway),另一条是由嘧啶碱基通过核糖基化及磷酸化而合成的补救途径。补救途径是细胞摄取环境中的碱基和核苷来合成核苷酸,在这个过程中,需要胸苷磷酸化酶、胸苷激酶和尿苷磷酸化酶参与催化,这 3 种酶分别由 *deoA*、*tdk* 和 *udp* 基因编码^[13]。从头合成途径是从氨甲酰磷酸与

天冬氨酸合成氨甲酰磷酸天冬氨酸开始,经过一系列反应合成 UMP。UMP 是嘧啶核苷酸的共同前体,它经过一系列反应生成胞嘧啶核苷酸和胸腺嘧啶核苷酸。在野生菌中,前体物 dUMP 被直接转化成 dTMP,进而生成 dTDP 和 dTTP。胸苷在胞内的主要存在形式是 dTTP,而且 dTTP 一经合成就马上被利用合成 DNA^[14]。目前通过代谢工程方法构建胸苷生产菌株的研究较少,其中 Lee 课题组对大肠杆菌生产胸苷进行了较系统的研究,其构建的 BLdtugRPA24 菌株在以甘油为碳源的 pH-stat 流加发酵中积累 5.2 g/L 胸苷^[2,13,15-17]。因此,可以通过代谢工程方法定向改造大肠杆菌使其大量积累胸苷。

本文首先敲除了 *E. coli* BL21 (DE3) 补救途径的 *deoA*、*tdk*、*udp* 三个基因,截断其分解途径;随后敲除了 *pgi* 基因和 *pyrL* 序列,增加胸苷前体物的供应,并通过过表达大肠杆菌胸苷合成途径的 *ushA*、*thyA*、*dut*、*ndk*、*nrdA*、*nrdB* 六个基因来增加胸苷的合成通量(图 1)。最后,初步考查了各工程菌生产胸苷的能力,其中最终菌株 BS08 在摇瓶发酵中积累 272 mg/L 胸苷,在分批补料发酵中可积累胸苷 1 248.8 mg/L。

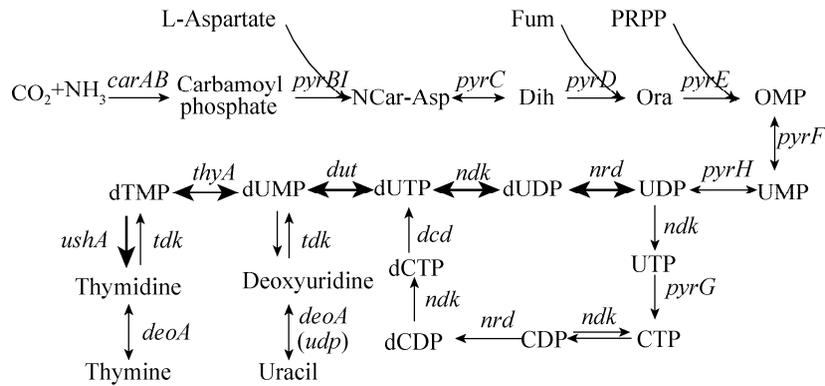


图 1 胸苷合成途径^[13]

Fig. 1 Thymidine biosynthetic pathway. Genes and their corresponding enzymes were shown as follows: *carAB*, carbamoylphosphate synthetase; *pyrBI*, aspartate carbamoyl transferase; *pyrC*, dihydroorotase; *pyrD*, dihydroorotate oxidase; *pyrE*, orotate phosphoribosyltransferase; *pyrF*, OMP decarboxylase; *pyrG*, CTP synthetase; *pyrH*, nucleoside phosphate kinase; *nrd*, nucleotide diphosphate reductase; *ndk*, nucleoside diphosphate kinase; *dut*, deoxyribonucleotide triphosphatase; *thyA*, thymidylate synthase; *ushA*, 5'-deoxyribonucleotidase; *deoA*, thymidine phosphorylase; *tdk*, thymidine kinase; *udp*, uridine phosphorylase. The overexpressed genes in this study are indicated by the bold arrows. This figure is consulted with the figure of Lee et al^[13].

1 材料与方 法

1.1 菌株和质粒

菌株与质粒见表 1。 *Escherichia. coli* BL21 (DE3) 作为基因敲除和质粒表达的宿主菌， *E. coli* DH5 α 作为质粒构建的宿主菌。

1.2 试剂与仪器

酵母抽提物、胰蛋白胨、基因组提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒等均购自上海生工生物工程有限公司。快速高保真 DNA 聚合酶 *Fast pfu* 购自北京全式金生物技术有限公司。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自加拿大富酶泰斯 Fermentas 公司。其他试剂为国产分析纯。

仪器：TU1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司)；BLBIO-5GJ 发酵罐 (上海百仑生物科技有限公司)；SBA40E 生物传感仪 (山东省科学院生物研究所)；HP 1100 LC 高效

液相色谱仪 (Agilent 188 Technologies, USA)。

1.3 发酵培养

种子培养基：10 g/L 胰蛋白胨，5 g/L 酵母抽提物，5 g/L 氯化钠；摇瓶发酵培养基：10 g/L 胰蛋白胨，5 g/L 酵母抽提物，5 g/L 氯化钠，0.1 mol/L 3-吗啉丙磺酸 (MOPS)，10 g/L 葡萄糖；流加发酵初始培养基：15 g/L 胰蛋白胨，10 g/L 酵母抽提物，5 g/L 氯化钠，0.4 g/L MgSO $_4$ ·7H $_2$ O，20 g/L 葡萄糖；流加培养基：454.5 g/L 葡萄糖与 22.7 g/L 酵母抽提物混合液。上述培养基在需要时添加 50 μ g/mL 氨苄青霉素和 20 μ g/mL 四环素。

摇瓶培养：取 -80 $^{\circ}$ C 保藏的种子培养液接入 50 mL LB 种子培养基中，37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养。待 *OD* 长到对数中后期，以 *OD* $_{600}$ 为 0.05 的初始接种量接入到 100 mL 的发酵培养基中，37 $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下培养。*OD* $_{600}$ 达到 0.4 时，添加终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导质粒上基因的表达。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strain or plasmid	Description	Source or reference
Stains		
<i>E. coli</i> DH5 α		Invitrogen
BL21 (DE3)	Wild type	Lab collection
BS01	WT $\Delta deoA$	This study
BS02	WT $\Delta deoA\Delta tdk$	This study
BS03	WT $\Delta deoA\Delta tdk\Delta udp$	This study
BS04	WT $\Delta deoA\Delta tdk\Delta udp\Delta pgi$	This study
BS05	WT $\Delta deoA\Delta tdk\Delta udp\Delta pgi\Delta pyrL$	This study
BS06	BS05 containing pLS4	This study
BS07	BS05 containing pLM2	This study
BS08	BS05 containing pLS4 and pLM2	This study
Plasmids		
pTKS/CS	p15A replication, Cmr, Tetr, I-Sce I restriction sites	[18]
pTKRED	pSC101 replication, temperature sensitive replication origin, Spcr, ParaBAD-driven I-Sce I gene, Red recombinase expression plasmid, lac-inducible expression	[18]
p5C	Expression vector, pSC101 replication, Ptrc, Ampr	Lab collection
pTRC99A	Expression vector, pBR322 replication, Ptrc, Tetr	Lab collection
pLS4	p5C-synRBS- <i>ushA</i> -synRBS- <i>thyA</i> -synRBS- <i>dut</i> -synRBS- <i>ndk</i>	This study
pLM2	pTRC99A-synRBS- <i>nrdA</i> -synRBS- <i>nrdB</i>	This study

Ampr: ampicillin resistance; Spcr: spectinomycin resistance; Tetr: tetracycline resistance.

发酵罐培养：种子液生长至对数中期时，以 5% 的接种量接种到含有 2.5 L 发酵液的 5 L 发酵罐中，在 37 °C 条件下进行培养。 OD_{600} 达到 0.6–0.8 之间时，添加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L。通过溶氧和转速的偶联控制使溶氧水平保持在 20%–30% 之间，通气量为 1 vvm。通过添加 10% NH_4OH 调节发酵液 pH 维持在 7.0。当葡萄糖浓度低于 5 g/L 时，添加 110 mL 流加培养基。发酵结束时，补料添加的葡萄糖大约为 250 g，最终体积在 2.9–3.0 L 之间。

1.4 基因敲除

如图 2 所示，本实验先用 PCR 扩增出待敲除基

因的上游 F 和下游 D 各 300–500 bp 包括一段 30 bp 的同源序列，以及质粒 pTKS/CS 上包括 I-Sce I 位点的 *tetA* 片段，通过融合 PCR 扩增出片段 F-tet-D^[19]。将片段 F-tet-D 电转入含有 pTKRED 质粒的感受态细胞中，利用 red 重组系统进行同源重组，筛选出 *tetA* 片段取代了待敲除基因的菌株^[20]。其后诱导 I-Sce I 酶表达，在 F-tet-D 片段内的 I-Sce I 酶切位点进行酶切，导致该位点发生 DNA 双链断裂。断裂的基因组通过设计的 30 bp 同源片段进行同源重组，通过菌落 PCR 验证筛选出目的基因敲除菌株^[21]。敲除成功的菌落通过在 42 °C 下试管培养，可以消除胞内的 pTKRED 质粒。

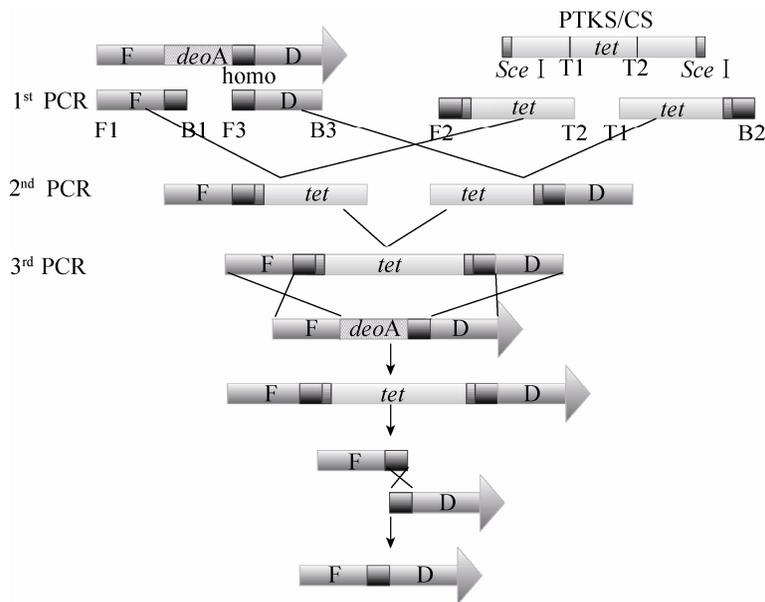


图2 基因敲除

Fig. 2 Gene disruption.

1.5 质粒的构建

首先提取 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 基因组 DNA 并以其为模板, 按照引物 *ushA*-F/*ushA*-B 进行 *ushA* 基因的 PCR 扩增。纯化后的 *ushA* 基因片段与载体 p5C 分别经 *Sac* I 和 *Sma* I 双酶切, 酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶连接得到表达载体 pLS1, 并电转化到感受态细胞, 涂布含有氨苄青霉素的 LB 平板, 挑选抗性克隆, 提质粒进行 *Sac* I 和 *Sma* I 双酶切鉴定, 对鉴定正确的质粒送测序验证。用同样方法, 在 pLS1 质粒上依次插入了基因 *thyA*、*dut* 和 *ndk*, 得到质粒 pLS4。pLS4 质粒上的 *ushA*、*thyA*、*dut* 和 *ndk* 四个基因的转录由强启动子 P_{trc} 控制。采用同样的方法在 pTRC99A 上克隆了 *nrdA* 和 *nrdB* 基因, 得到 pLM2 质粒。pLM2 上编码核苷二磷酸还原酶的 *nrdA* 和 *nrdB* 基因的转录也被强启动子 P_{trc} 控制。引物见表 2。

1.6 数据测定

1) 菌体密度: 取发酵液经适当稀释, 在 600 nm 下测定吸光度, 本文中所有数据结果均为 3 组平行实验的平均值。2) 发酵液中的残余葡萄糖: 发酵液离心取上清, 稀释到适当倍数, 用 SBA40E 生物传感仪测定残余葡萄糖。3) 胸苷的测定: 发酵液离心取上清, 膜过滤后用高效液相色谱直接测定发酵液内胸苷的浓度。色谱条件为: luna C18(2) (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm) 为分离柱, V (乙腈): V (三氟乙酸): V (水)=4:0.05:95.5 为流动相, 流速为 1 mL/min, 测定波长为 260 nm^[13]。4) 胞内 CTP 和 dUTP 用高氯酸法抽提^[22], 色谱条件为: Agilent ZORBAX SB-Aq (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm) 为分离柱, 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (含有 10 mmol/L 的四丁基溴化铵): 乙腈=89.5:10.5 为流动相, 流速为 1 mL/min, 测定波长为 254 nm^[23]。

表 2 过表达基因引物

Table 2 Oligonucleotides for gene overexpression

Primer	Sequence (5'-3')
ushA-F	CGAGCTCCATAGGATACTAGTCAAAGTAGAGGAAGACATGAAATTATTGCAGCGGGG
ushA-B	TCCCCCGGGT TACTGCCAGCTCACCTCAC
thyA-F	CGCGGATCC TAAATAAAAAGACCCCAATATACGGAGGAATCTATGAAACAGTATTTAGAACT
thyA-B	CTAGTCTAGATT AGATAGCCACCGGCGCTT
dut-F	CTAGTCTAGACCGTCACCACGACGCTAAGGAGCACAATACATGAAAAAATCGACGTTAAGATTCTG G
dut-B	ACGCGTCGACTT ACTGACGACCAGAGTGAC
ndk-F	ACGCGTCGACATCCGAACAAAAACGCTAACCCTAAGGAGCTAATTATGGCTATTGAACGTACTTT
ndk-B	CCCAAGCTTTTAACGGGTGCGCGGGCACA
nrdA-F	CCGGAATTCGACATTATAGGCCAGGAAGGAGGTTAATATGAATCAGAATCTGCTGGT
nrdA-B	GGCGAGCTCTCAGATCTTACATGCGCCGC
nrdB-F	CCCCCGGGTCCACCGGACCACCGCAACCAGGAGGCGCAAATGGCATATACCACCTTTTC
nrdB-B	GCTCTAGATCAGAGTTGGAAGTTACTCA

Bold face are protection bases; underline sequence are restriction enzyme cutting site; italics are the designed RBS sequences.

2 结果与分析

2.1 基因敲除菌株的构建

F-tet-D 通过双交换同源重组整合到基因组上, PCR 产物如图 3A 所示。tetA 经过分子内同源重组被成功剔除出基因组, 其相应的 PCR 产物如图 3B 所示, 并将 PCR 产物进行测序验证基因敲除成功。验证结果正确的菌落在 42 °C 培养以消除 pTKRED 质粒, 得到菌株 BS01。同样的方法依次敲除了 *tdk*、*udp*、*pgi* 和 *pyrL* 基因。

2.2 胸苷磷酸化酶 (*deoA*)、胸苷激酶 (*tdk*) 和尿苷磷酸化酶 (*udp*) 基因敲除对菌株生产胸苷的影响

补救途径合成嘧啶核苷酸需要胸苷磷酸化酶、胸苷激酶、尿苷磷酸化酶, 而这 3 个酶也催化胸苷分解为胸腺嘧啶和生成 dTMP。在野生型

菌株的基础上, 敲除基因 *deoA*、*tdk* 和 *udp*, 得到 BS01 ($\Delta deoA$)、BS02 ($\Delta deoA\Delta tdk$) 和 BS03 ($\Delta deoA\Delta tdk\Delta udp$)。对这 3 株菌进行摇瓶发酵, 通过高效液相色谱法对发酵液进行检测。BS01 和 BS02 在整个发酵过程中未检测到胸苷的生成, 这说明胸苷的分解途径还没有完全被阻断。BS03 在发酵过程中的最大比生长速率为 1.44 h^{-1} , 9 h OD_{600} 达到 7.86, 发酵 9 h 消耗了 10 g/L 的葡萄糖, 积累了 22.8 mg/L 的胸苷。发酵 24 h 时胸苷浓度为 21.6 mg/L, 仅有微量下降, 如图 4 所示。发酵结果表明, 在同时敲除这 3 个基因的情况下才能有效截断胸苷分解途径, 使细胞积累少量的胸苷。这和 Lee 等^[13]的研究结果一致, 他们构建的遗传背景类似的菌株 BLdtu 也消除了胸苷的降解, 在以甘油为碳源的丰富培养基中可以积累 12 mg/L 的胸苷。

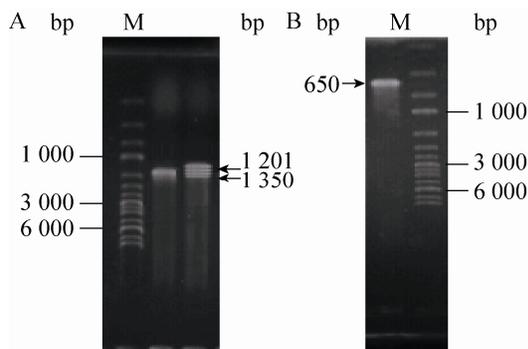


图3 菌落 PCR 验证

Fig. 3 Colony PCR verification. (A) The fragments amplified by F1/T2 and T1/B3 were 1 350 bp and 1 201 bp. The T1 and T2 were internal primers of *tetA*. (B) The fragment after *tetA* disrupted was about 650 bp.

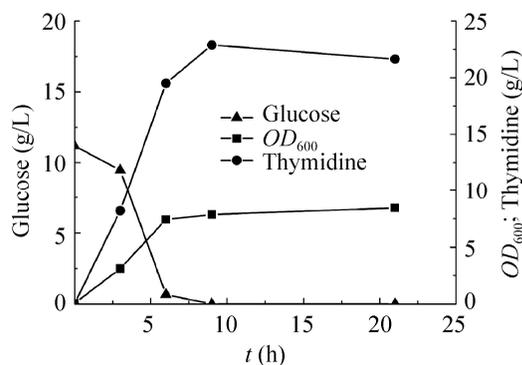


图4 BS03 发酵曲线

Fig. 4 Fermentation using strain BS03.

2.3 *pgi* 和 *pyrL* 基因敲除对生产胸苷的影响

为了增加胸苷前体物的供给,敲除了 *pgi* 基因,构建了 BS04 菌株。BS04 发酵结果如图 5 所示,对数期的比生长速率为 0.53 h^{-1} ,发酵 24 h 进入稳定期,葡萄糖被耗尽。与菌株 BS03 相比,菌株 BS04 的比生长速率下降了 63%,发酵时间增长,但最终菌体密度较高 (44 h 的 $OD_{600}=15.2$)。最终胸苷的浓度为 78.7 mg/L ,相对于菌株 BS03 的产量提高了 3.6 倍。

在嘧啶核苷酸从头合成途径中,核苷二磷

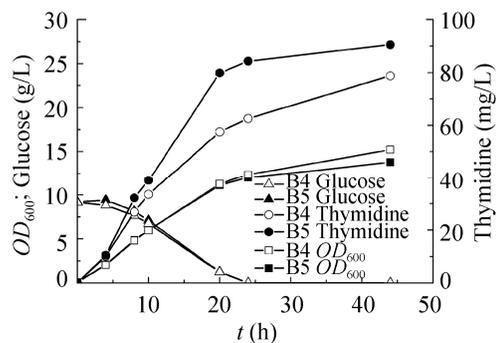


图5 BS04 和 BS05 发酵曲线

Fig. 5 Fermentation using strains BS04 and BS05.

酸还原酶和二氢叶酸还原酶都需要 NADPH 为辅因子,核糖-5-磷酸是嘧啶核苷酸和嘌呤核苷酸的共同前体,而核糖-5-磷酸和 NADPH 都是在磷酸戊糖途径合成的。*pgi* 基因是 EMP 途径的必需基因,敲除 *pgi* 能够阻止葡萄糖-6-磷酸异构为果糖-6-磷酸,使葡萄糖-6-磷酸流向磷酸戊糖途径,增加磷酸戊糖途径的通量,为胸苷的合成提供更多的前体物。Hyeon Cheol Lee 等^[16]在 BLdtug24 的基础上敲除了 *pgi* 基因,构建出 BLdtugp24 菌株。采用 pH-stat 流加方式,BLdtugp24 胸苷产量达到 1.02 g/L ,比出发菌株 BLdtug24 的产量提高了 4.86 倍。

天冬氨酸氨甲酰基转移酶是嘧啶核苷酸从头合成途径的第一个关键酶,*pyrB* 和 *pyrI* 分别编码其催化亚基和调节亚基,构成一个操纵子。*pyrB* 上游有一段调控序列 *pyrL*,其序列内部包含有一个不依赖于 ρ 因子的转录终止子。研究表明,在胞内 UTP 浓度较高时,大约 98% 的转录均在此位点终止^[24]。敲除 *pyrL* 调控序列可以解除 UTP 对 *pyrBI* 操纵子转录的弱化作用^[25]。为了 *pyrBI* 可以组成型表达,在 BS04 基础上敲除了 *pyrL* 调控序列,构建了 BS05 菌株。如图 5 所示,该菌株对数期的比生长速率与 BS04 一

致, 发酵 24 h 时进入稳定期, *pyrL* 敲除对菌体生长速率几乎没有影响。发酵产物检测最终胸苷的产量达到 90.5 mg/L, 与 BS04 相比, 菌株 BS05 胸苷产量提高了 15%。

2.4 过表达 *ushA*、*thyA*、*dut*、*ndk*、*nrdA* 和 *nrdB* 对胸苷生产的影响

为了进一步提高胸苷的产量, 过表达 UDP 到胸苷的核苷二磷酸还原酶 (*nrdAB*)、核苷二磷酸激酶 (*ndk*)、dUTP 酶 (*dut*)、胸苷酸合酶 (*thyA*) 和脱氧核糖核苷酸酶 (*ushA*)。首先在 BS05 菌株中导入 pLS4 质粒, 得到 BS06 菌株。同样在 BS05 菌株中导入 pLM2 质粒, 得到 BS07 菌株。将 pLS4 和 pLM2 同时转入 BS05 中, 得到重组菌株 BS08。

为了考察 BS06、BS07 和 BS08 生产胸苷的能力, 对这 3 株菌分别进行了发酵。发酵结果见表 3, BS06 发酵 44 h 时积累 100.7 mg/L 的胸苷, 比 BS05 提高了 11.3%, 其得率为 10.3 mg/(g glucose)。而 BS07 菌株发酵 64 h 可以积累 169.2 mg/L 的胸苷, 是 BS05 菌株的 1.87 倍, 其得率为 18.6 mg/(g glucose)。BS07 对数期的比生长速率 0.46 h^{-1} , 发酵 52 h 进入稳定期, 生长迟滞期变长。同时过表达 6 个基因的 BS08 菌株, 64 h 可以积累 272 mg/L 的胸苷, 是 BS06 产量的 2.7 倍, BS07 产量的 1.6 倍, 其得率达到 23.3 mg/(g glucose)。由表 3 可以看出, BS06 胞内 dUTP/CTP 与 BS05 基本一致, BS07 胞内 dUTP/CTP 较 BS05 有微量增加, 而 BS08 胞内 dUTP/CTP 显著增加, 这表明过表达这 6 个基因增加了 UDP 到胸苷的通量, 使更多的 UDP 流向胸苷而不是 CTP。

鉴于 BS08 是这些工程菌中产量最高的菌株, 对 BS08 进行了初步的补料发酵实验。如图 6 所示, BS08 在 64 h 时达到最大 OD_{600} 约为 47.5。当

发酵 80 h 时, 胸苷的产量达到 1 248.8 mg/L, 是摇瓶发酵的 4.6 倍, 生产率达到 15.61 mg/(L·h), 得率为 12.5 mg/(g glucose)。Lee 等^[16]构建的菌株 BLdtugp24, 敲除了 *deoA*、*tdk*、*udp*、*ung* (编码尿嘧啶-DNA 糖基化酶, 对错配 DNA 进行碱基切除修复) 和 *pgi* 基因, 过表达了来自 PBS2 噬菌体的 TMPase, 来自 T4 噬菌体的胸苷酸合酶、核苷二磷酸还原酶 (*nrdAB*) 和硫氧还蛋白 (*nrdC*), 以及大肠杆菌自身的尿苷激酶与 dCTP 脱氨酶 (*udk-dcd* 操纵子)。本研究在菌株改造的代谢策略与 Lee 等^[13]的研究有所不同: 考虑到敲除 *ung* 基因会影响细胞的遗传稳定性, 本研究并没有敲除 *ung*; 另一方面, 由于 *E. coli* 中嘧啶核苷酸从头合成途径的第一个关键酶天冬氨酸氨甲酰基转移酶的转录表达受到严格的弱化调控, 因此, 敲除了 *pyrL* 序列使其编码基因 *pyrBI* 可以组成型表达。在葡萄糖为碳源的 pH-stat 流加发酵中, BLdtugp24 在 64 h 可以积累 1.02 g/L 胸苷, 生产率为 15.8 mg/(L·h), 得率为 6.1 mg/(g glucose)^[16]。在分批补料发酵过程中, BS08 的胸苷产量比 BLdtugp24 产量要高约 22%, 但值得注意的是其最大细胞干重只有 BLdtugp24 的 42.6%, 这表明在流加发酵工艺方面, 仍需要进一步优化来提高生物量和胸苷产量。天冬氨酸也是胸苷的前体物之一, 并且其价格低廉, 因此也可以尝试直接向培养基中添加适量天冬氨酸来增加胸苷的合成通量。从分批补料发酵结果中可以看出, 菌体生长延迟期较长, 可以通过优化 IPTG 加入时间来有效缩短延迟期, 提高合成胸苷的生产率。或者尝试改用 pH-stat 流加发酵方式来代替分批补料发酵, 可能会取得更好的效果。另外, Koo 等还构建了工程菌 BLdtugRPA24, 该菌株并没有敲除 *pgi*,

表 3 基因过表达对胸苷生产的影响

Table 3 Effects of genes overexpression on thymidine production

Strains	OD_{600}	Thymidine (mg/L)	Thymidine yield (mg/g glucose)	dUTP (nmol/g DCW)	CTP (nmol/g DCW)	dUTP/CTP Ratio (%)
BS05	13.8±0.5	90.5±3.0	9.3±0.3	7.6±0.5	41.9±2.2	18.1
BS06	15.1±0.3	100.7±5.1	10.3±0.5	2.7±0.3	14.7±0.8	18.4
BS07	12.1±0.7	169.2±10.3	18.6±1.1	17.4±1.1	83.3±3.4	20.9
BS08	15.9±0.6	272±11.3	23.3±0.9	16.3±0.9	61.7±1.9	26.4

Notes: the data of BS05 and BS06 were obtained at 44 h; the data of BS07 and BS08 were obtained at 64 h; the data of intercellular metabolites were obtained at mid-log phase. $1.0 OD_{600} = 0.45$ g DCW/L.

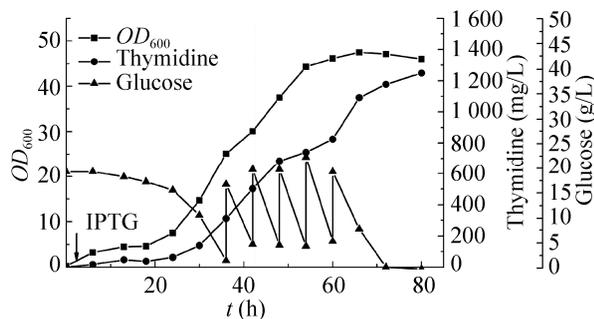


图6 BS08分批补料发酵

Fig. 6 Fed-batch fermentation using strain BS08.

而是敲除 *purR*、*pepA* 和 *argR* 三个基因以提高 *carAB* 操纵子的转录水平。该菌株更适合利用甘油为底物生产胸苷，在 pH-stat 流加发酵条件下积累了 5.2 g/L 胸苷^[2]。因此在代谢工程改造方面，BS08 的胸苷合成通量仍有很大的改进空间，这些问题将在后续的工作中进一步研究与完善。

3 结论

本实验以 *E. coli* BL21 为出发菌株，敲除了嘧啶核苷酸回补途径的 *deoA*、*tdk* 和 *udp* 3 个基因，使 BS03 能够积累 21.6 mg/L 胸苷。在 BS03 基础上敲除了 *pgi*，增加合成胸苷的前体物来源，BS04 可以积累 78.7 mg/L 胸苷，进一步敲除了 *pyrL* 序列，使 *pyrBI* 组成型表达，BS05 胸苷的产量达到 90.5 mg/L，较 BS03 提高了 4.2 倍。随后过表达了

大肠杆菌胸苷合成途径的 *ushA*、*thyA*、*dut*、*ndk*、*nrdA* 和 *nrdB* 六个基因来增加胸苷的合成通量，BS08 菌株在摇瓶条件下可以积累 272 mg/L 胸苷，在分批补料发酵条件下，胸苷的产量达到 1 248.8 mg/L，生产率为 15.61 mg/(L·h)，得率为 12.5 mg/(g glucose)。

REFERENCES

- [1] Cooper DL, Lovett ST. Toxicity and tolerance mechanisms for azidothymidine, a replication gap-promoting agent, in *Escherichia coli*. DNA Repair, 2011, 10(3): 260–270.
- [2] Koo BS, Hyun HH, Kim SY, et al. Enhancement of thymidine production in *E. coli* by eliminating repressors regulating the carbamoyl phosphate synthetase operon. Biotechnol Lett, 2011, 33(1): 71–78.
- [3] Song KH, Kwon DY, Kim SY, et al. Thymidine production by *Corynebacterium ammoniagenes* mutants. J Micro Biol Biotechnol, 2005, 15(3): 477–483.
- [4] Tsen S. Chemostat selection of *Escherichia coli* mutants secreting thymidine, cytosine, uracil, guanine, and thymine. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 41(2): 233–238.
- [5] Xu Y. Study on the technology of enzymatic synthesis of thymidine and cytidine[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2009 (in Chinese).
徐渊. 酶法生物合成胸苷和胞苷工艺的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009.
- [6] Chang GQ, Ou L, Ding QB, et al. Breeding of

- thymineless *Escherichia Coli* mutated with N⁺ ions implantation. *Chem Bioeng*, 2011, 28(4): 49–52 (in Chinese).
- 昌国强, 欧伶, 丁庆豹, 等. N⁺离子注入诱变筛选胸腺嘧啶缺陷型大肠杆菌. *化学与生物工程*, 2011, 28(4): 49–52.
- [7] Shen RK, Qiu WR, Sun NX. Enzymatic synthesis of thymidine by nucleoside phosphorylases in *Escherichia coli*. *J East China Univer Sci Technol*, 1996, 22(6): 701–705 (in Chinese).
- 沈荣坤, 邱蔚然, 孙南翔. 应用大肠杆菌的核苷磷酸化酶合成胸苷. *华东理工大学学报*, 1996, 22(6): 701–705.
- [8] Qiu WR, Shen RK. Enzymatic synthesis of thymidine. *Chin Pharmac*, 1995, 26(9): 424–427.
- 邱蔚然, 沈荣坤. 酶法合成胸苷. *中国医药工业杂志*, 1995, 26(9): 424–427 (in Chinese).
- [9] Pierard A, Glansdorff N, Gigot D, et al. Repression of *Escherichia coli* carbamoylphosphate synthase: relationships with enzyme synthesis in the arginine and pyrimidine pathways. *J Bacteriol*, 1976, 127(1): 291–301.
- [10] Kantowitz ER. Allostery and cooperativity in *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Archives Biochem Biophys*, 2012, 519(2): 81–90.
- [11] Turnbough CL. Regulation of gene expression by reiterative transcription. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(2): 142–147.
- [12] Wilson HR, Turnbough CL. Role of the purine repressor in the regulation of pyrimidine gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1990, 172(6): 3208–3213.
- [13] Lee HC, Kim JH, Kim JS, et al. Fermentative production of thymidine by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol*, 2009a, 75(8): 2423–2432.
- [14] Gaithersburg MR, Rockville AD. Fermentation process for the production of pyrimidine deoxyribonucleosides: EP, 0504279B1. 1990-05–12.
- [15] Lee HC, Ahn JM, Lee SN, et al. Overproduction of thymidine by recombinant *Brevibacterium helvolum* amplified with thymidine monophosphate phosphohydrolase gene from bacteriophage PBS2. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(4): 265–268.
- [16] Lee HC, Kim JS, Jang W, et al. High NADPH/NADP⁺ ratio improves thymidine production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *J Biotechnol*, 2010, 149(1/2): 24–32.
- [17] Lee HC, Kim JS, Jang W, et al. Thymidine production by overexpression NAD⁺ kinase in an *Escherichia coli* recombinant strain. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(12): 1929–1936.
- [18] Kuhlman TE, Cox EC. Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(6): 92.
- [19] Lin Z, Xu Z, Li Y, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of riboflavin. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 104.
- [20] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [21] Metcalf WW, Jian GH, Daniels LL. Conditionally replicative and conjugative plasmids carrying lacZa for cloning, mutagenesis, and allele replacement in bacteria. *Plasmid*, 1996, 35(1): 1–13.
- [22] Barrette WC, Albrich JM, Hurst JK. Hypochlorous acid-promoted loss of metabolic energy in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1987, 55(10): 2518–2525.
- [23] Müller RH, Loffhagen N, Babel W. Rapid extraction of (di)nucleotides from bacterial cells and determination by ion-pair reversed-phase HPLC. *J Microbiol Methods*, 1996, 25(1): 29–35.
- [24] Turnbough CL, Hicks KL, Donahue JP. Attenuation control of pyrBI operon expression in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80(2): 368–372.
- [25] Levin HL, Schachman HK. Regulation of aspartate transcarbamoylase synthesis in *Escherichia coli*: analysis of deletion mutations in the promoter region of the pyrBI operon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(14): 4643–4647.

(本文责编 郝丽芳)