

• 合成生物技术 •

Gloeobacter violaceus 视紫红质在大肠杆菌中的异源表达与功能评价

方嘉煜^{1,2}, 朱泰承¹, 张延平¹, 李寅¹

1 中国科学院微生物研究所 微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

方嘉煜, 朱泰承, 张延平, 等. *Gloeobacter violaceus* 视紫红质在大肠杆菌中的异源表达与功能评价. 生物工程学报, 2021, 37(2): 604-614.

Fang JY, Zhu TC, Zhang YP, et al. Heterologous expression and function evaluation of *Gloeobacter violaceus* rhodopsin in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2021, 37(2): 604-614.

摘要: 质子泵型视紫红质是一种在自然界广泛存在的简单光合系统, 它可以结合视黄醛, 在光照下将质子由胞内泵向胞外, 形成质子梯度势, 在一定程度上促进 ATP 的合成。在非光合工程菌中引入视紫红质将光能转化为化学能有助于促进微生物生长、生产以及提高细胞耐受性。文中在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中异源表达了来自 *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 的质子泵型视紫红质 Gloeorhodopsin (GR), 并验证了它的功能活性。在大肠杆菌中表达时, GR 可以正确行使光驱质子泵功能, 最大吸收波长位于 539 nm。GR 分布在细胞膜表面, 没有在胞内形成包涵体。在通过核糖体结合位点 (Ribosome binding site, RBS) 优化的手段提升 GR 的表达水平之后, 观察到了胞内 ATP 水平的提高, 证实在特定的条件下, GR 可以为异源宿主带来额外的能量补充。

关键词: 视紫红质, 质子泵, ATP, 表达优化, 膜定位, 大肠杆菌

Heterologous expression and function evaluation of *Gloeobacter violaceus* rhodopsin in *Escherichia coli*

Jiayu Fang^{1,2}, Taicheng Zhu¹, Yanping Zhang¹, and Yin Li¹

1 Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Proton-pumping rhodopsin (PPR) is a simple photosystem widely distributed in nature. By binding to retinal, PPR

Received: May 29, 2020; **Accepted:** August 19, 2020

Supported by: Key Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KFZD-SW-215).

Corresponding authors: Yanping Zhang. Tel: +86-10-64807351; E-mail: zhangyp@im.ac.cn

Taicheng Zhu. Tel: +86-10-64807351; E-mail: zhutc@im.ac.cn

中国科学院重点部署项目 (No. KFZD-SW-215) 资助。

网络出版时间: 2020-09-10

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200909.1146.002.html>

can transfer protons from the cytoplasmic to the extracellular side of the membrane under illumination, creating a proton motive force (PMF) to synthesize ATP. The conversion of light into chemical energy by introducing rhodopsin into nonphotosynthetic engineered strains could contribute to promoting growth, increasing production and improving cell tolerance of microbial hosts. Gloeorrhodopsin (GR) is a PPR from *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. We expressed GR heterologously in *Escherichia coli* and verified its functional activity. GR could properly function as a light-driven proton pump and its absorption maximum was at 539 nm. We observed that GR was mainly located on the cell membrane and no inclusion body could be found. After increasing expression level by ribosome binding site optimization, intracellular ATP increased, suggesting that GR could supply additional energy to heterologous hosts under given conditions.

Keywords: rhodopsin, proton pump, ATP, optimized expression, membrane localization, *Escherichia coli*

自然界中光能营养型生物可以依靠光能利用系统将光能转化为化学能,从而为自身生理代谢供能。叶绿素光系统是最为熟知的光能利用系统,是高等植物、藻类、蓝细菌等进行光合作用的基础。除此之外,自然界中还存在另一种结构相对简单但广泛存在的光能利用系统——视紫红质(Rhodopsin)。

视紫红质是一种 7 次跨膜蛋白,因其蛋白质中的赖氨酸残基共价结合发色团视黄醛显紫色而得名。自然界中已发现的视紫红质,可根据蛋白质序列的相似程度区分为 Type I 和 Type II 两类^[1]。Type II 即动物视网膜型,又称作视蛋白(Opsin),存在于高等的真核生物中,主要发现于动物的视网膜上,是一类 G 蛋白偶联受体,可感受光信号并触发信号通路。Type I 即微生物型(或称古菌类型),首先发现于细菌中,随后在古菌、真核

生物中陆续发现。在 Type I 视紫红质中,有一类质子泵型视紫红质(Proton-pumping rhodopsin, PPR)^[2],它结合的视黄醛分子在吸收光子后产生构象的改变,引起整体蛋白的变构,从而促进质子外流,产生膜内外的质子梯度形成质子驱动力(Proton motive force, PMF)推动 ATP 合酶合成 ATP(图 1),将光能转化为化学能^[3-4]。

PPR 广泛存在于海洋、河流和湖泊等水体以及植物表面^[5]。在许多天然宿主中,PPR 已经被证实具备利用光能提高细胞能量水平的功能。海洋黄杆菌 *Dokdonia* sp. MED134 在较低有机质浓度的条件下,可以借助 PPR 在光照下促进细胞生物量的积累^[6]。海洋弧菌 *Vibrio* sp. AND4 在生长环境缺乏营养时,会促进自身 PPR 的表达,并利用其延续自身的生存^[7-8]。海冰嗜冷菌 *Psychroflexus torquus* 的 PPR 可以帮助其在高盐胁迫的条件下,促进细胞的生长^[9]。

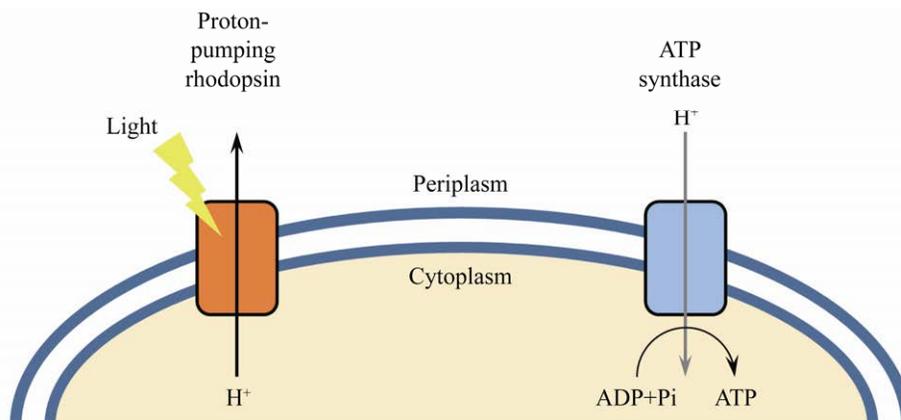


图 1 质子泵型视紫红质的作用原理(改自 Claassens 等^[4])

Fig. 1 Proton-pumping mechanism of PPR. Modified from reference Claassens et al^[4].

此外, PPR 也在许多异源宿主中成功表达。来自海洋 γ -变形菌 SAR86 分支的 PPR 第一个在大肠杆菌中成功表达, 并且观察到了它的光驱质子泵功能^[2]。Walter 等发现该 PPR 在大肠杆菌中表达后, 可以在细胞呼吸受到抑制的情况下促进鞭毛的运动^[10]。Kuniyoshi 等将该 PPR 和氢酶在大肠杆菌中共表达, 显著提高了氢气产量^[11]。Chen 等在集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中表达该 PPR 后, 在合适的对照下, 也可以观察到对细胞生长的促进作用^[12]。Johnson 等将该 PPR 表达在希瓦氏菌中后, 发现细胞的乳酸摄取能力和发电能力都得到了显著的提升^[13]。这些异源表达的成功案例, 初步显示出 PPR 作为光能功能元件, 在促进工业微生物生长、生产以及提高耐胁迫能力方面的应用潜力。

Gloeobacter violaceus PCC 7421 是一种从瑞士石灰质岩中分离出来的蓝藻^[14]。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析, 它与多种蓝藻的分化时间较早^[15-16]。与典型的蓝藻相比, 它没有类囊体, 光合系统和呼吸系统均位于细胞质膜上, 这两个系统可能会共享一些电子传递链上的载体蛋白^[17]。通过基因组测序, 发现这种蓝藻中含有与质子泵型视紫红质高度同源的一种新视紫红质^[18], 被命名为 Gloeorhodopsin (GR)。由于没有类囊体, 所以这种蓝藻基于叶绿素光系统的光合作用较弱, 而 GR 可以补偿因此带来的能量短缺^[19]。在本研究中, 我们尝试在大肠杆菌中异源表达 GR, 测试在异源表达的 GR 是否具有光驱质子泵活性。在此基础上, 研究了 GR 在细胞中的定位, 系统优化了 GR 在大肠杆菌中的表达水平, 并考察了 GR 在光照下对胞内 ATP 水平的影响, 为探索能否利用 PPR 为工业微生物供能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BW25113, 实验室保存; 大肠杆菌

Trans1-T1, 购自北京全式金生物技术有限公司。表达质粒 pED31, 实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

PCR 相关试剂, 购自北京擎科新业生物技术有限公司; 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶, 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 细菌质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒, 购自杭州爱思进生物技术有限公司; 全反式视黄醛, 购自 Sigma-Aldrich 公司; ATP 检测试剂盒, 购自上海碧云天生物技术有限公司; 其余常见药品与试剂均购自北京化工厂和国药集团化学试剂有限公司。

光照培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; pH 计, Mettler Toledo 公司; 多功能酶标仪, Tecan 公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基: 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 10 g NaCl, 加蒸馏水定容至 1 L, 121 °C, 0.1 MPa, 高压蒸汽灭菌 15 min。固体培养基额外添加 15 g/L 琼脂粉。

M9 无机盐培养基: 17.1 g Na₂HPO₄·12H₂O, 3.0 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl, 1.0 g NH₄Cl, 加蒸馏水定容至 1 L, 另配制 2 mol/L MgSO₄, 0.1 mol/L CaCl₂, 分开单独灭菌, 121 °C, 0.1 MPa, 15 min。灭菌后 MgSO₄ 和 CaCl₂ 稀释 1 000 倍加入培养基中, 再添加 10 g/L 葡萄糖。

1.2 实验方法

1.2.1 表达载体和菌株构建

GR 基因序列 (登录号 NP_923144) 委托上海捷瑞生物工程有限公司合成, 基因经 *EcoR* I 和 *Sac* I 双酶切后, 连接至 pED31 质粒载体上, 热激转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞, 涂布含有卡那霉素的 LB 固体平板, 挑取单菌落进行 PCR 验证筛选, 委托北京擎科新业生物技术有限公司测序, 正确克隆电击转化大肠杆菌 BW25113 感受态细胞, 最终得到表达菌株 BW25113 (pED31-GR)。

1.2.2 RBS 优化

通过在线 RBS 优化工具 (https://www.denovodna.com/software/design_rbs_calculator), 针对 GR 的表达预测设计了 4 个不同强度的 RBS, 设计 GR 基因的上下游引物 (表 1), 将这 4 段 RBS 序列分别加在上游引物的 5' 端, 然后用这些对引物以之前构建好的 pED31-GR 质粒为模板扩增 GR 基因, 然后连入原载体, 得到一系列不同表达强度的 GR 表达菌株, 将它们简称为 GR-5、GR-10、GR-20、GR-50。

1.2.3 荧光显微成像

利用 Overlap PCR 的方法, 将绿色荧光蛋白 EGFP 的编码序列接在 GR 序列的 C 端, Linker 为 GGGGSGGGGS, 之后同上述载体与菌株构建过程, 得到带绿色荧光蛋白标签的 GR 表达菌株。

融合蛋白表达菌株在 LB 培养基中过夜培养后, 取样离心, 使用 PBS 缓冲液洗 3 遍 (5 000 r/min, 2 min), 制片, 使用 Nikon N-SIM 超分辨率显微镜进行观察, 得到重构图像。

1.2.4 吸收光谱检测

将 GR 表达菌株在 LB 培养基中过夜培养后, 取样离心 (5 000 r/min, 2 min), 重悬在缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.0) 中, 冰浴超声破碎 (25% 功率, 工作 3 s, 停歇 4 s, 共 15 min), 离心 (4 °C, 8 000×g, 20 min) 取上清, 超速离心 (4 °C, 120 000×g, 90 min), 弃上清, 将沉淀用 150 mmol/L NaCl 溶液重悬, 置于石英比色皿中, 加入终浓度 10 μmol/L 的视黄醛

后, 分别在 0 min 和 30 min 测量 450–650 nm 的吸收光谱, 相减即得到 GR 的吸收光谱。

1.2.5 质子泵功能检测

将 GR 表达菌株在 LB 培养基中过夜培养 (实验组添加视黄醛, 对照组不添加) 后, 取样离心, 使用生理盐水洗 3 遍 (5 000 r/min, 2 min), 重悬在生理盐水中, 将 pH 计探头伸入。实验在暗室中进行, 通过开关 LED 灯控制光照 (100 μE/(m²·s)) 和黑暗, 先保持黑暗稳定溶液 pH, 之后以 5 min 为一个阶段交替光照和黑暗, 每分钟记录溶液 pH。

1.2.6 胞内 ATP 检测

将 GR 表达菌株在 LB 培养基中过夜培养后, 转接至 M9 无机盐培养基中 (实验组添加视黄醛, 对照组不添加), 调整 OD₆₀₀ 为 0.1, 在黑暗中培养约 12 h, 到达对数生长末期, 然后加入 5 g/L 乙酸, 并转移至光照培养箱 (100 μE/(m²·s)) 中, 处理 3 h。

分别取处理前和处理后的菌体样品, 先测定 OD₆₀₀ 并调整各样品一致, 离心 (5 000 r/min, 2 min), 重悬在缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 中, 冰浴超声破碎 (25% 功率, 工作 3 s, 停歇 3 s, 共 5 min), 离心 (4 °C, 12 000×g, 5 min), 取上清。按照 ATP 检测试剂盒, 在黑色 96 孔板中, 先加入 100 μL 检测试剂, 再加入 20 μL 细胞破碎上清, 混匀后孵育 15 min, 利用酶标仪检测各孔化学发光强度, 然后根据标准曲线换算得到 ATP 浓度。

表 1 RBS 优化所用引物

Table 1 Primers for RBS optimization

Primer name	Primer sequence (5'–3')	Size (bp)
GR-5-F	ATCGGAATTCGCTCCACCCCTAAGGAGGTTTATTATGCTGATGACCGTGTTTTCTTC	58
GR-10-F	ATCGGAATTCGATATTAAGGAGGTTTTTTTATGCTGATGACCGTGTTTTCTTC	53
GR-20-F	ATCGGAATTCGCTGGAAACGTAAGGAGGTATTATTATGCTGATGACCGTGTTTTCTTC	59
GR-50-F	ATCGGAATTCGCTCTAACTATAACTAAGGAGGTATTTATGCTGATGACCGTGTTTT	59
GR-R	ATCGGAGCTCTTAGGAGATCAGGCTACCAC	30

2 结果与分析

2.1 GR 的系统发育分析

将 GR 与其他一些典型的视紫红质^[20]根据氨基酸序列进行系统发育分析, 利用邻接法建树, 得到系统发育树 (图 2)。结果显示, 与 GR 最为相近的是两种 xanthorhodopsin, 这一类视紫红质还另含有类胡萝卜素的生色团^[21]。已有研究报道 GR 除了可以结合视黄醛, 还可以结合 salinixanthin 和 echinenone, 而这两种色素都含有 4-keto 基团^[22-23], 所以 GR 很可能含有类似 xanthorhodopsin 的类胡萝卜素捕光天线。

从上述视紫红质中挑选出质子泵功能的 xanthorhodopsin、proteorhodopsin、bacteriorhodopsin, 进一步与 GR 进行氨基酸序列分析 (图 3) 发现, 在光驱动的质子运输过程中, 残基 D121 可以成为质子受体, E132 可以成为质子供体, 而 K257 可以成为视黄醛结合位点^[2]。因此, 可以从序列上预测, GR 具有完整的质子泵功能。

2.2 GR 在大肠杆菌中的异源表达

为了实现在大肠杆菌中表达 GR, 构建了表达 GR 的大肠杆菌载体。将按大肠杆菌密码子偏好性优化的 GR 基因序列, 用酶切连接的方法, 克隆至实验室之前构建的诱导型表达载体 pED31 上, 获得重组载体 pED31-GR。该载体使用 tac 启动子, 需要 IPTG 诱导表达。将重组载体转化大肠杆菌宿主 BW25113, 构建获得表达 GR 的重组菌株 BW25113/pED31-GR。

将空质粒菌株 BW25113/pED31 (对照) 和 BW25113/pED31-GR 在含 0.5 mmol/L IPTG 和 10 μ mol/L 视黄醛的 LB 培养基中诱导培养过夜, 离心收集菌体。由于视紫红质多肽链与视黄醛结合后形成的活性视紫红质会显红色, 可以重组菌是否变红来判断 GR 是否获得了活性表达。图 4 显示, 与对照相比, BW25113/pED31-GR 菌体颜色明显变红, 初步证明 GR 成功表达。

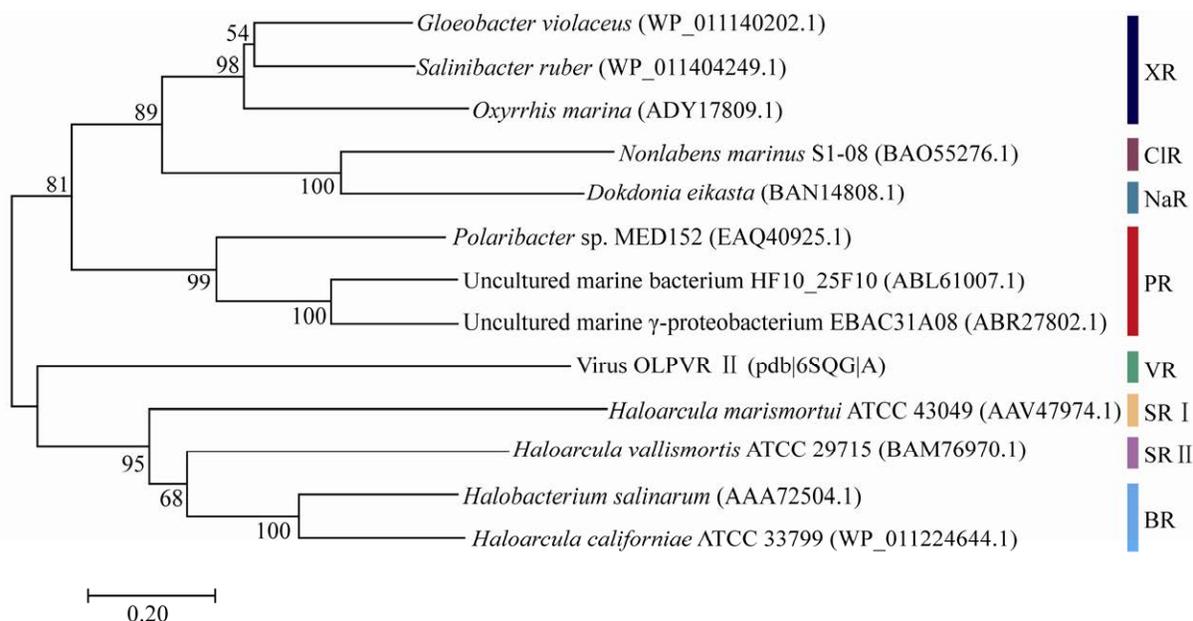


图 2 GR 与几种典型视紫红质的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of GR and several typical rhodopsins. XR: xanthorhodopsin; CIR: chloride-transporting rhodopsin; NaR: sodium-transporting rhodopsin; PR: proteorhodopsin; VR: viral rhodopsin; SR I: sensory rhodopsin I; SR II: sensory rhodopsin II; BR: bacteriorhodopsin.

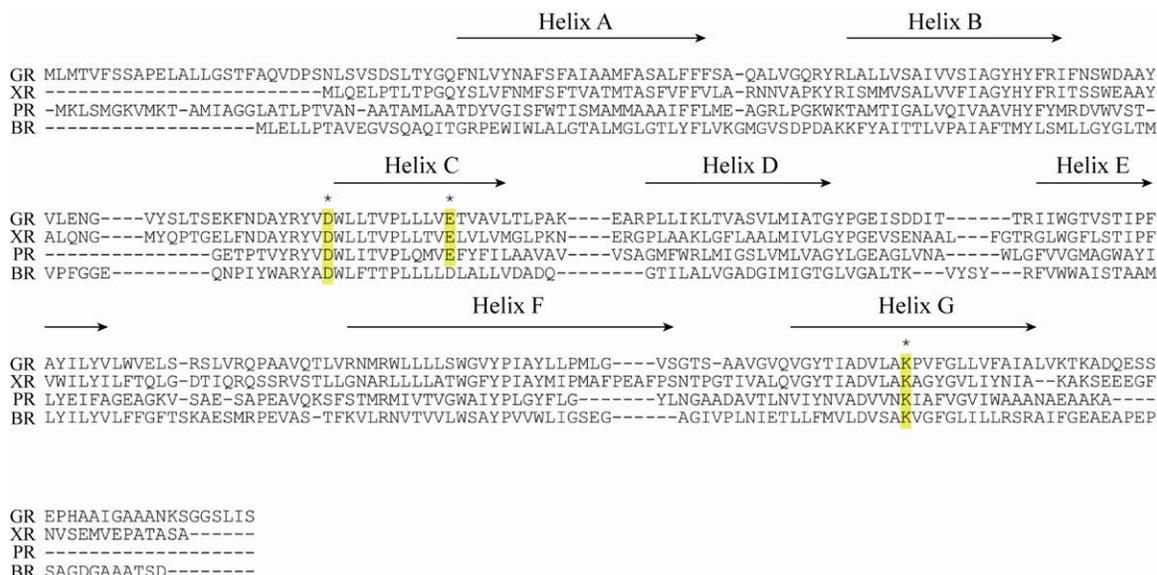


图 3 GR 与几种质子泵型视紫红质的序列比对

Fig. 3 Sequence alignment of GR and several proton-pumping rhodopsins. XR: xanthorhodopsin from *Salinibacter ruber*; PR: proteorhodopsin from uncultured marine γ -proteobacterium EBAC31A08; BR: bacteriorhodopsin from *Halobacterium salinarum*. Helical segments are numbered and marked by arrow. Residues for proton transport are marked with yellow boxes.

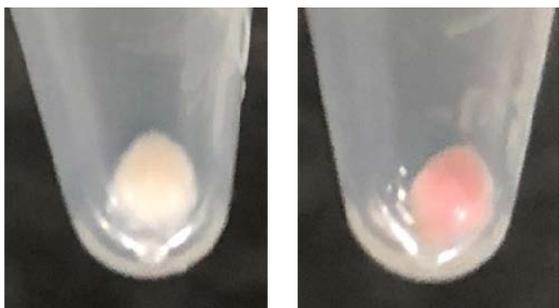


图 4 表达 GR 的大肠杆菌在含视黄醛培养基中的颜色变化

Fig. 4 Color change of GR-expressing strain in the medium with retinal. Left: control strain; right: GR-expressing strain.

2.3 重组 GR 的表征

为进一步表征重组 GR 的性质和功能, 首先检测了 GR 的吸收光谱。提取重组菌 BW25113/pED31-GR 的细胞膜组分, 溶解在 150 mmol/L NaCl 溶液中, 并添加 10 μ mol/L 视黄醛, 在添加后 0 min 和 30 min 分别对溶液进行波长扫描, 以 0 min 时的吸光度为基底值, 相减得到的即为 GR 的吸收光谱 (图 5)。结果显示, 在加入视黄醛之

后, 膜组分在 539 nm 处有明显的吸收峰值, 而以相同的方法对空质粒对照菌株 BW25113/pED31 进行测定, 则没有观察到明显的吸光度变化。说明 GR 存在这样一个特征吸收峰。同时这也再次证明了 GR 的成功表达且可与视黄醛正确结合。

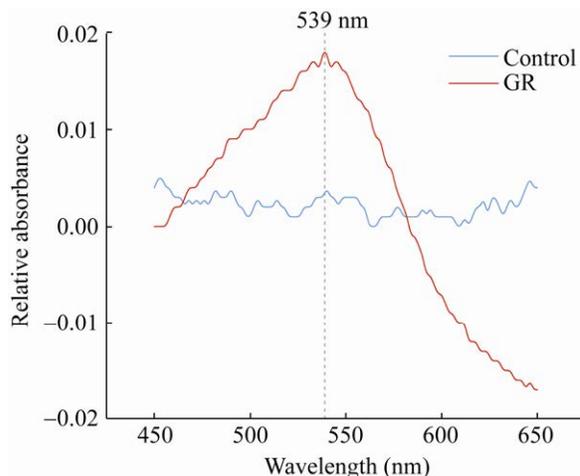


图 5 GR 的吸收光谱

Fig. 5 Absorption spectrum of GR. Relative absorbance is the absorbance change of crude membrane after adding retinal. Control: empty plasmid strain.

为了表征 GR 的光驱质子泵功能, 将重组菌 BW25113/pED31-GR 细胞悬浮于 150 mmol/L NaCl 溶液中, 记零时刻的溶液 pH 为 0, 以每 5 min 为一个阶段, 不断交换黑暗和光照条件, 记录每分钟溶液的 pH 变化 (图 6)。实验组细胞培养时添加视黄醛, 并以未添加视黄醛的细胞作为对照组。结果显示, 在 5–10 min 和 15–20 min 的光照阶段时, 实验组的溶液 pH 值明显下降 (约 0.08), 说明细胞在接受光照时向胞外泵出质子, 而在 10–15 min 和 20–25 min 的无光阶段, 溶液的 pH 值又恢复到初始水平。与此同时, 对照组溶液的 pH 值无论光照与否一直无明显变化。同样的, 对空质粒对照菌株 BW25113/pED31 也采取上述测试, 并没有观察到 pH 值随光暗周期有明显的

变化。以上结果验证了重组 GR 在大肠杆菌中发挥了光驱质子泵的功能。

2.4 RBS 优化提高 GR 表达量

Kirchman 等研究表明, 单位细胞的视紫红质数量显著影响其对细胞的供能效果^[24]。为了进一步加强 GR 的供能效果, 我们采用 RBS 优化策略, 以提高大肠杆菌中 GR 的表达量。

通过生物信息学预测^[25], 得到了 4 段针对 GR 的不同强度的 RBS 序列, 将其替换掉原始的 RBS 序列, 得到的新序列分别命名为 GR-5、GR-10、GR-20、GR-50。将构建获得的新重组菌株用相同的培养条件诱导培养。如图 7 所示, 相比于原始 GR, GR-10 与 GR-20 颜色显著加深, 其中以 GR-10 菌株的菌体颜色最深 (完全显示红色)。

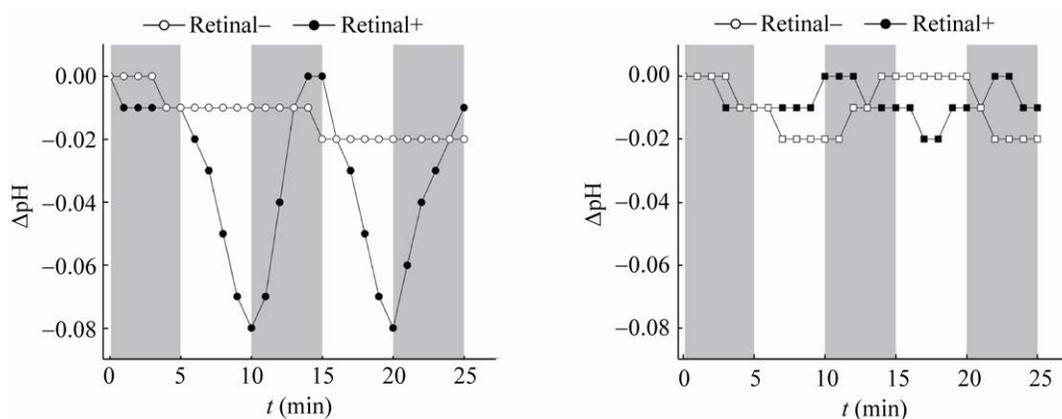


图 6 GR 的质子泵活性

Fig. 6 Proton pump activity of GR. pH was recorded every one minute after an equilibration period of 5 min, followed by illumination (white area) for 5 min, and darkness (grey area) for 5 min. Data was normalized by the difference respecting to the data at 0 min. Left: GR expressed strain; Right: empty plasmid strain.



图 7 不同 RBS 的 GR 菌株的菌体颜色

Fig. 7 Color of GR strains with different RBS. From left to right: original GR, GR-5, GR-10, GR-20, GR-50.

为了定量鉴定各组 GR 的表达量, 我们使用一种半定量的方法来初步定量。采用国际照明委员会 (International Commission on Illumination) 制定的 CIEL*a*b* 表色系统对各菌株的菌体颜色进行颜色深浅分析。利用 PhotoShop 软件对图 7 进行分析, 在 Lab 模式下读取各菌株的菌体部分区域的色相 a* 值和色相 b* 值 (图 8)。a* 值由负到正表示绿色减弱, 红色增强; b* 值由负到正表示蓝色减弱, 黄色增强。

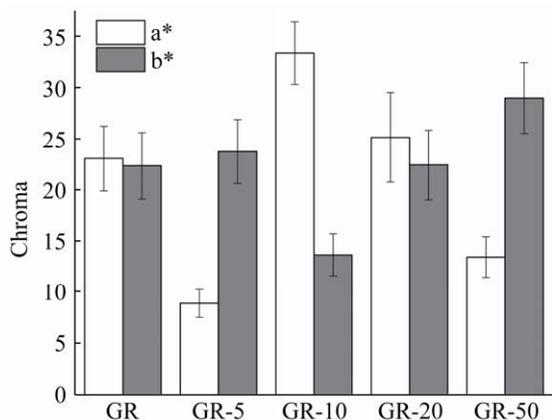


图 8 各 GR 菌株菌体颜色的 CIEL*a*b* 表色

Fig. 8 CIEL*a*b* coordinates of the color of each GR strain.

可以观察到 GR-10 的 a^* 值最大, 且高于原始 GR, 说明它的红色最深, GR 蛋白含量最高。这在一定程度上可以判断 GR-10 的表达量最高。表明了含 GR-10 序列的重组菌中 GR 的表达量得到了显著的提升。

2.5 GR 在大肠杆菌中的细胞定位

为了更直观地检测 GR 在大肠杆菌内的表达以及 GR 在细胞内的具体定位, 将 GR 与绿色荧光蛋白标签 EGFP 在大肠杆菌中融合表达, 采用荧光成像的方法观察 GR 在细胞中的定位。为了更清晰地观察到 GR 在细胞中的分布情况, 采用了高分辨的结构照明显微成像技术 (Structure illumination microscopy, SIM), 理论上它可以达到普通荧光显微镜两倍的分辨率。

运用 SIM 技术, 可以较为清晰地观测到 GR 在细胞中的定位 (图 9), 根据图象, 可以判断绝大多数的 GR 都是分布在大肠杆菌的细胞膜上, 在胞质中没有形成明显的过表达或者包涵体等情况。可以说明 GR 在大肠杆菌中表达良好, 且成功定位至细胞膜表面。

2.6 GR 表达对大肠杆菌胞内 ATP 水平的影响

为了验证 GR 是否能够利用光能为重组大肠杆菌供能, 我们对重组菌 BW25113/pED31-GR-10

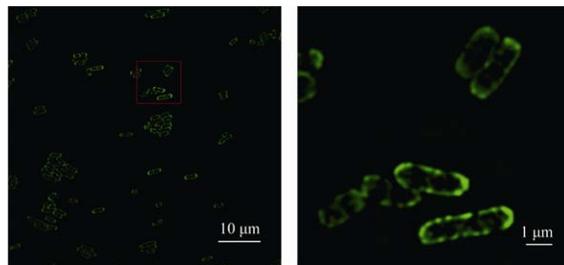


图 9 融合蛋白 GR-EGFP 在大肠杆菌细胞中的 SIM 成像

Fig. 9 SIM images of GR-expressing cells. The fusion protein of GR and EGFP was expressed in *E. coli*. GR localization was determined by EGFP (green) using SIM. The right image is a magnification of the red box in the left image. Image magnification: left: 1 200 \times ; right: 7 500 \times . Objective magnification: 100 \times .

胞内 ATP 水平进行了检测。前人的研究表明, 由于视紫红质产生的 PMF 与细胞自身异化代谢所产生的 PMF 相比相对较弱^[10], 故其对细胞能量水平的影响一般需要细胞处在较为贫乏的营养条件下才能显现出来。于是我们选择通过乙酸处理的方式来降低胞内本底的 ATP 水平^[26], 然后在此基础上测试 GR-10 对 ATP 生产的促进作用。

按是否添加视黄醛分为实验组和对照组, 先将重组菌 BW25113/pED31-GR-10 细胞在黑暗中培养至对数生长末期, 然后加入 5 g/L 乙酸处理 3 h, 同时给予光照。分别在处理开始和结束时检测胞内 ATP 水平 (图 10)。可以观察到在酸处理过后, 细胞胞内 ATP 水平急剧下降, 但实验组的胞内 ATP 水平显著高于对照组, 说明正确行使功能的 GR 产生的 PMF 可以有效提高细胞的胞内 ATP 水平。

3 讨论

能量是微生物生长发酵的核心问题之一。在微生物异养生长过程中, ATP 主要来源于氧化磷酸化和底物水平磷酸化, 而引入基于质子泵型视紫红质的光能转化模块, 将为工业微生物解决能量限制问题提供新的解决思路。例如, 厌氧发酵

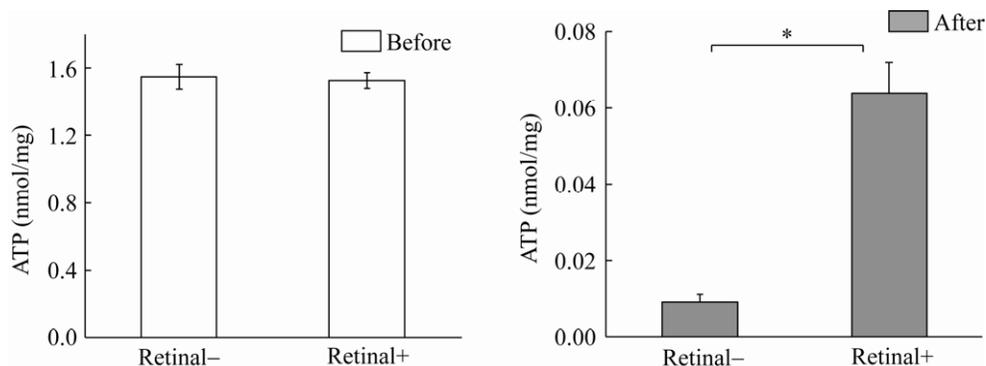


图 10 酸胁迫下 GR-10 对细胞 ATP 水平的影响

Fig. 10 Effect of GR-10 on cellular ATP level under acid stress. Left: cellular ATP level before treatment. Right: cellular ATP level after treatment. The data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). *: $P<0.05$.

与好氧发酵相比,虽然碳损低,但也同样会面临能量短缺、生长差、细胞耐受性差等问题,而引入质子泵型视紫红质进行额外的能量补充,则可以有效缓解这些问题^[27]。此外,在近几年兴起的人工固碳领域,固碳途径的重构和创建已取得了许多进展,但能量供应仍然是限制固碳效率的一大重要因素^[28-29],而基于 PPR 的光能转化模块将为该问题的解决提供重要思路。

本研究在大肠杆菌中表达了来源于 *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 的质子泵型视紫红质 GR。在吸收光谱测定中,我们发现 GR 的吸收峰位于 539 nm 处,与变形菌视紫红质相近,处于叶绿素 a、藻红蛋白、藻蓝蛋白等典型光合色素的吸收光谱覆盖范围之外,可能具有补充拓宽某些天然光合宿主改造的工程菌捕光光谱的潜力^[30-32]。在细胞定位实验中,我们直观地观察到 GR 均分布在膜上,没有出现积聚在胞内的现象。Karnik 等研究表明,在大肠杆菌中过表达视紫红质,未嵌入膜中的视紫红质无法行使功能,并且会被快速降解^[33]。

针对质子泵型视紫红质普遍存在的表达量低导致的效果不显著问题,我们采用了 RBS 优化的策略提升 GR 的表达水平,以期在一个合适的较高表达水平上放大 GR 的作用。

我们建立了一种计算机软件辅助的视紫红质含量简单鉴定方法,对不同 RBS 的 GR 菌株进行含量的分析。这一方法得到的结果与肉眼观察到的结果具有较为良好的一致性,可以作为一种大批量初筛的方法,但不能用于精确定量。

筛选得到的高表达 GR-10 菌株,在酸胁迫的环境下可以依靠光为细胞补充 ATP,将胞内 ATP 水平维持在一个相对较高的水平,这是低表达水平的原始 GR 所没有表现出来的。这初步显示出了 GR 对细胞耐受酸胁迫方面的应用潜力。另一方面,结合目前文献结果来看,PPR 可产生的能量水平相对较弱,通常需要在极端贫乏的环境下才能显现^[10,12,34-35],而且其对于自然宿主生长的促进作用报道也不一致^[36-37]。因此,仍需要对 PPR 这一重要的光转化模块进行更为系统的研究、评价以及设计。

综上,本研究通过 GR 在大肠杆菌中的功能性表达,证实了将基于质子泵型视紫红质的光能转化模块引入工程菌供能是可行的,对提高工业微生物生产及耐胁迫能力等做出了有益的尝试。

REFERENCES

- [1] Spudich JL, Yang CS, Jung KH, et al. Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to

- humans. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 365-392.
- [2] Béjà O, Aravind L, Koonin EV, et al. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 2000, 289(5486): 1902-1906.
- [3] Brown LS, Jung KH. Bacteriorhodopsin-like proteins of eubacteria and fungi: the extent of conservation of the haloarchaeal proton-pumping mechanism. *Photochem Photobiol Sci*, 2006, 5(6): 538-546.
- [4] Claassens NJ, Volpers M, dos Santos VAPM, et al. Potential of proton-pumping rhodopsins: engineering photosystems into microorganisms. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(11): 633-642.
- [5] Govorunova EG, Sineshchekov OA, Li H, et al. Microbial rhodopsins: diversity, mechanisms, and optogenetic applications. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 845-872.
- [6] Gómez-Consarnau L, González JM, Coll-Lladó M, et al. Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine flavobacteria. *Nature*, 2007, 445(7124): 210-213.
- [7] Gómez-Consarnau L, Akram N, Lindell K, et al. Proteorhodopsin phototrophy promotes survival of marine bacteria during starvation. *PLoS Biol*, 2010, 8(4): e1000358.
- [8] Akram N, Palovaara J, Forsberg J, et al. Regulation of proteorhodopsin gene expression by nutrient limitation in the marine bacterium *Vibrio* sp. AND4. *Environ Microbiol*, 2013, 15(5): 1400-1415.
- [9] Feng S, Powell SM, Wilson R, et al. Light-stimulated growth of proteorhodopsin-bearing sea-ice psychrophile *Psychroflexus torquis* is salinity dependent. *ISME J*, 2013, 7(11): 2206-2213.
- [10] Walter JM, Greenfield D, Bustamante C, et al. Light-powering *Escherichia coli* with proteorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(7): 2408-2412.
- [11] Kuniyoshi TM, Balan A, Schenberg ACG, et al. Heterologous expression of proteorhodopsin enhances H₂ production in *Escherichia coli* when endogenous Hyd-4 is overexpressed. *J Biotechnol*, 2015, 206: 52-57.
- [12] Chen Q, van der Steen JB, Dekker HL, et al. Expression of *holo*-proteorhodopsin in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metab Eng*, 2016, 35: 83-94.
- [13] Johnson ET, Baron DB, Naranjo B, et al. Enhancement of survival and electricity production in an engineered bacterium by light-driven proton pumping. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13): 4123-4129.
- [14] Rippka R, Waterbury J, Cohen-Bazire G. A cyanobacterium which lacks thylakoids. *Arch Microbiol*, 1974, 100(1): 419-436.
- [15] Honda D, Yokota A, Sugiyama J. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J Mol Evol*, 1999, 48(6): 723-739.
- [16] Nelissen B, de Baere R, Wilmotte A, et al. Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. *J Mol Evol*, 1996, 42(2): 194-200.
- [17] Guglielmi G, Cohen-Bazire G, Bryant DA. The structure of *Gloeobacter violaceus* and its phycobilisomes. *Arch Microbiol*, 1981, 129(3): 181-189.
- [18] Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, et al. Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res*, 2003, 10(4): 137-145.
- [19] Choi AR, Shi L, Brown LS, et al. Cyanobacterial light-driven proton pump, *Gloeobacter* rhodopsin: complementarity between rhodopsin-based energy production and photosynthesis. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e110643.
- [20] Pushkarev A, Inoue K, Larom S, et al. A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics. *Nature*, 2018, 558(7711): 595-599.
- [21] Vollmers J, Voget S, Dietrich S, et al. Poles apart: Arctic and Antarctic *Octadecabacter* strains share high genome plasticity and a new type of xanthorhodopsin. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e63422.
- [22] Imasheva ES, Balashov SP, Choi AR, et al. Reconstitution of *Gloeobacter violaceus* rhodopsin with a light-harvesting carotenoid antenna. *Biochemistry*, 2009, 48(46): 10948-10955.
- [23] Balashov SP, Imasheva ES, Boichenko VA, et al. Xanthorhodopsin: a proton pump with a

- light-harvesting carotenoid antenna. *Science*, 2005, 309(5743): 2061-2064.
- [24] Kirchman DL, Hanson TE. Bioenergetics of photoheterotrophic bacteria in the oceans. *Environ Microbiol Rep*, 2013, 5(2): 188-199.
- [25] Borujeni AE, Cetnar D, Farasat I, et al. Precise quantification of translation inhibition by mRNA structures that overlap with the ribosomal footprint in N-terminal coding sequences. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(9): 5437-5448.
- [26] Sun YR, Fukamachi T, Saito H, et al. ATP requirement for acidic resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2011, 193(12): 3072-3077.
- [27] Johnson ET, Schmidt-Dannert C. Light-energy conversion in engineered microorganisms. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(12): 682-689.
- [28] Rabaey K, Girguis P, Nielsen LK. Metabolic and practical considerations on microbial electrosynthesis. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(3): 371-377.
- [29] Fast AG, Papoutsakis ET. Stoichiometric and energetic analyses of non-photosynthetic CO₂-fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuels and chemicals. *Curr Opin Chem Eng*, 2012, 1(4): 380-395.
- [30] Walter JM, Greenfield D, Liphardt J. Potential of light-harvesting proton pumps for bioenergy applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21(3): 265-270.
- [31] Blankenship RE, Tiede DM, Barber J, et al. Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement. *Science*, 2011, 332(6031): 805-809.
- [32] Larkum AWD, Ross IL, Kruse O, et al. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(4): 198-205.
- [33] Karnik SS, Nassal M, Doi T, et al. Structure-function studies on bacteriorhodopsin. II. Improved expression of the bacterio-opsin gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1987, 262(19): 9255-9263.
- [34] Courties A, Riedel T, Rapaport A, et al. Light-driven increase in carbon yield is linked to maintenance in the proteorhodopsin-containing *Photobacterium angustum* S14. *Front Microbiol*, 2015, 6: 688.
- [35] Wang Y, Li Y, Xu T, et al. Experimental evidence for growth advantage and metabolic shift stimulated by photophosphorylation of proteorhodopsin expressed in *Escherichia coli* at anaerobic condition. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(5): 947-956.
- [36] Riedel T, Gómez-Consarnau L, Tomasch J, et al. Genomics and physiology of a marine flavobacterium encoding a proteorhodopsin and a xanthorhodopsin-like protein. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e57487.
- [37] Yoshizawa S, Kawanabe A, Ito H, et al. Diversity and functional analysis of proteorhodopsin in marine *Flavobacteria*. *Environ Microbiol*, 2012, 14(5): 1240-1248.

(本文责编 陈宏宇)