

· 合成生物技术 ·

谷氨酸棒杆菌乙酰羟酸合酶的高效表达调控及应用

乔倩倩^{1,2,3}, 宁舒展^{1,2,3}, 王瑞瑞⁴, 郑宇¹, 路福平¹, 陈久洲^{2,3}, 刘娇^{2,3*},
郑平^{1,2,3*}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

3 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

4 深圳科兴天合生物科技有限公司, 广东 深圳 518000

乔倩倩, 宁舒展, 王瑞瑞, 郑宇, 路福平, 陈久洲, 刘娇, 郑平. 谷氨酸棒杆菌乙酰羟酸合酶的高效表达调控及应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3114-3126.

QIAO Qianqian, NING Shuzhan, WANG Ruirui, ZHENG Yu, LU Fuping, CHEN Jiuzhou, LIU Jiao, ZHENG Ping. Efficient expression regulation of acetohydroxyacid synthase for production of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3114-3126.

摘要: 谷氨酸棒杆菌是支链氨基酸工业生产的主力菌, 乙酰羟酸合酶(acetohydroxyacid synthase, AHAS)是支链氨基酸合成的关键酶, 强化 AHAS 的表达是提高菌种水平的关键手段。然而目前还未实现高效调控 AHAS, 本研究首先基于前期开发的靶基因表达调控报告系统, 从 6 个组成型强启动子中筛选乙酰羟酸合酶编码基因 *ilvBN* 的高效表达启动子, 成功获得 P_{gpmA} 启动子, 表达强度是 P_{ilvBN} 天然启动子的 23.3 倍。其次, 在 P_{gpmA} 启动子基础上, 构建并通过平板荧光成像初步筛选了 3 种人工合成核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)文库, 发现“R₍₉₎N₍₆₎”为优势的突变文库, 通过进一步的孔板复筛, 成功获得 36 个不同的强度增强的 RBS 突变体, 最高强度可达天然启动子 P_{ilvBN} 的 62.3 倍。最后, 选择 P_{gpmA} 启动子分别组合 3 种 RBS(野生型、RBS18 和 RBS36)调控 *ilvBN*^{S155F} 的表达生产 L-缬氨酸, L-缬氨酸产量随着表达调控元件强度的增强而提高, 分别为 1.17、1.38、2.29 g/L。在 RBS18 调控的基础上进一步组合 *ilvC* 过表达, L-缬氨酸产量可达 7.57g/L。本研究获得的 AHAS 表达调控元件库, 可为改造 AHAS 生产 L-缬氨酸等支链氨基酸提供丰富元件, 并为其他关键酶的表达调控提供思路和方法借鉴。

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 支链氨基酸; 乙酰羟酸合酶; 组成型强启动子; 人工合成核糖体结合位点文库

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100900); 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-CXRC-058)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100900) and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-CXRC-058).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Jiao, liu_j@tib.cas.cn; ZHENG Ping, zheng_p@tib.cas.cn

Received: 2024-03-16; Accepted: 2024-05-20; Published online: 2024-05-22

Efficient expression regulation of acetohydroxyacid synthase for production of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*

QIAO Qianqian^{1,2,3}, NING Shuzhan^{1,2,3}, WANG Ruirui⁴, ZHENG Yu¹, LU Fuping¹, CHEN Jiuzhou^{2,3}, LIU Jiao^{2,3*}, ZHENG Ping^{1,2,3*}

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

2 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

4 Shenzhen Kexing Tianhe Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518000, Guangdong, China

Abstract: *Corynebacterium glutamicum* is a major workhorse in the industrial production of branched-chain amino acids (BCAAs). The acetohydroxyacid synthase (AHAS) encoded by *ilvBN* is a key enzyme in the biosynthesis of BCAAs. Enhancing AHAS expression is essential for engineering BCAA producers. However, at present, the available studies only used limited promoters to regulate AHAS expression, which is insufficient for achieving efficient regulation. Herein, we first employed a previously developed reporter system to screen out a strong constitutive promoter P_{gpmA^*} from six candidate promoters for expressing *ilvBN*. P_{gpmA^*} showcased the expression strength 23.3-fold that of the native promoter P_{ilvBN} . Moreover, three synthetic RBS libraries based on the promoter P_{gpmA^*} were constructed and evaluated by plate fluorescence imaging. The results revealed that “R₍₉₎N₍₆₎” was the best mutant library. A total of 36 RBS mutants with enhanced strength were further screened by evaluation in 96-deep-well plates, and the highest strength reached up to 62.3-fold that of P_{ilvBN} . Finally, the promoter P_{gpmA^*} was combined with three RBS mutants (WT, RBS18, and RBS36) to fine-tune the expression of *ilvBN*^{S155F} for L-valine biosynthesis, respectively. Increased expression strength led to enhanced L-valine production, with titers of 1.17, 1.38, and 2.29 g/L, respectively. The combination of RBS18 strain with the further overexpression of *ilvC* produced 7.57 g/L L-valine. The regulatory elements obtained in this study can be utilized to modulate AHAS expression for BCAA production in *C. glutamicum*. Additionally, this strategy can guide the efficient expression regulation of other key enzymes.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; branched-chain amino acids; acetohydroxyacid synthase; strong constitutive promoter; synthetic ribosome binding site library

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一种不产芽孢、不运动、兼性好氧的革兰氏阳性细菌,被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认证为安全

(generally recognized as safe, GRAS)的菌株^[1-2]。该菌株是氨基酸工业生产的主力菌,年产氨基酸超 600 万 t,主要产品为 L-谷氨酸、L-赖氨酸、支链氨基酸和 L-脯氨酸等^[3-6]。由于其具有生长

速度快、底物谱广、工业环境适应性强、生产强度高、工业放大稳定性好等优势,近年来已发展成为一种重要的工业底盘菌,广泛用于生产化学品、燃料、材料、天然产物和重组蛋白等^[7-11]。

支链氨基酸,包括 L-缬氨酸、L-亮氨酸与 L-异亮氨酸,作为人类和动物不能合成的必需氨基酸,广泛应用于多个领域,包括食品、化妆品、医药、动物饲料等^[12]。2020 年全球支链氨基酸市场达到 2.33 亿美元,预计到 2026 年将超过 3 亿美元^[6]。随着氨基酸在食品营养强化剂、低蛋白日粮添加剂中的推广使用,支链氨基酸市场需求增长迅速。目前,支链氨基酸主要通过谷氨酸棒杆菌一步发酵生产。代谢工程改造谷氨酸棒杆菌高产氨基酸是合成生物学领域系统代谢育种的典范,合成途径复杂的 L-赖氨酸产量已超 200 g/L,糖酸转化率超过理论最大值的 85%^[13]。相较而言,支链氨基酸的生产水平还有较大差距,产量低于 120 g/L,糖酸转化率还有较大提升空间^[14-16]。

乙酰羟酸合酶(acetohydroxyacid synthase, AHAS)是支链氨基酸合成的第一个共有酶(图 1A),也是主要的限速酶^[17]。谷氨酸棒杆菌 AHAS 由 2 个亚基组成,分别由 *ilvB* 和 *ilvN* 基因编码,可催化 2 分子丙酮酸合成 L-缬氨酸和 L-亮氨酸前体 2-乙酰乳酸,同时可催化 1 分子酮丁酸和 1 分子丙酮酸合成 L-异亮氨酸前体 2-乙酰-2-羟基丁酸,该酶的酶活力受到 3 种支链氨基酸的反馈抑制^[18]。*ilvBN* 与 *ilvC* 位于一个操纵子(图 1B),该操纵子存在经典的衰减子调控,*ilvB* 基因前的转录片段可以翻译为含 15 个氨基酸的前导肽,包括 3 个 L-缬氨酸、2 个 L-亮氨酸和 2 个 L-异亮氨酸,受到 3 种支链氨基酸的转录弱化调控^[19]。全基因组规模转录起始位点鉴定研究发现,该操纵子还存在其他转录起始位点,结

合不同条件转录组学研究表明 *ilvB* 和 *ilvN* 的转录水平基本一致,而 *ilvC* 通常存在较大差异,表明 *ilvC* 还存在其他重要的启动子调控^[20]。

采用组成型的表达调控元件增强限速酶的表达,是代谢工程改造氨基酸生产菌的重要手段。改造谷氨酸棒杆菌支链氨基酸生产菌,主要是采用常用的组成型启动子调控 *ilvBN* 基因的表达,包括 P_{tac} 启动子和谷氨酸棒杆菌内源的组成型启动子 P_{tuf} 、 P_{gapA} 和 P_{sod} 等^[14,21-22]。然而,以上调控只采用了一个或几个启动子进行测试,仅能表明增强 AHAS 表达能够提高支链氨基酸产量,无法明确 AHAS 的调控强度及是否需要进一步增强,因此仍需要开发 *ilvBN* 的高效表达调控元件库。团队前期已经开发了靶基因精细调控元件的筛选及表征体系,通过目标调控元件表达靶基因 N 端 180 bp、柔性 linker 和 *rfp* 融合基因,筛选靶基因的精细表达调控元件^[23]。启动子和核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)改造是增强调控元件表达强度的重要手段,在谷氨酸棒杆菌中也已证实以上改造可以增强元件的表达强度^[24-27]。

本研究从谷氨酸棒杆菌中 6 个组成型启动子突变体筛选表达 *ilvBN* 基因的启动子,获得了表达强度显著提高的 P_{gpmA} 启动子;进一步对该启动子的 RBS 及 RBS 与起始密码子间序列进行突变筛选,成功获得表达强度更高的 RBS 突变体。选择 P_{gpmA} 启动子分别组合 3 个 RBS 突变体表达调控 AHAS,发现 L-缬氨酸产量随着表达调控元件强度的增强逐步提高,组合 *ilvC* 过表达可以进一步显著提高 L-缬氨酸产量。本研究获得高效表达调控元件库,可为调控 AHAS 生产 L-缬氨酸等支链氨基酸提供元件,还可为其他关键酶的精细表达调控提供方法借鉴。

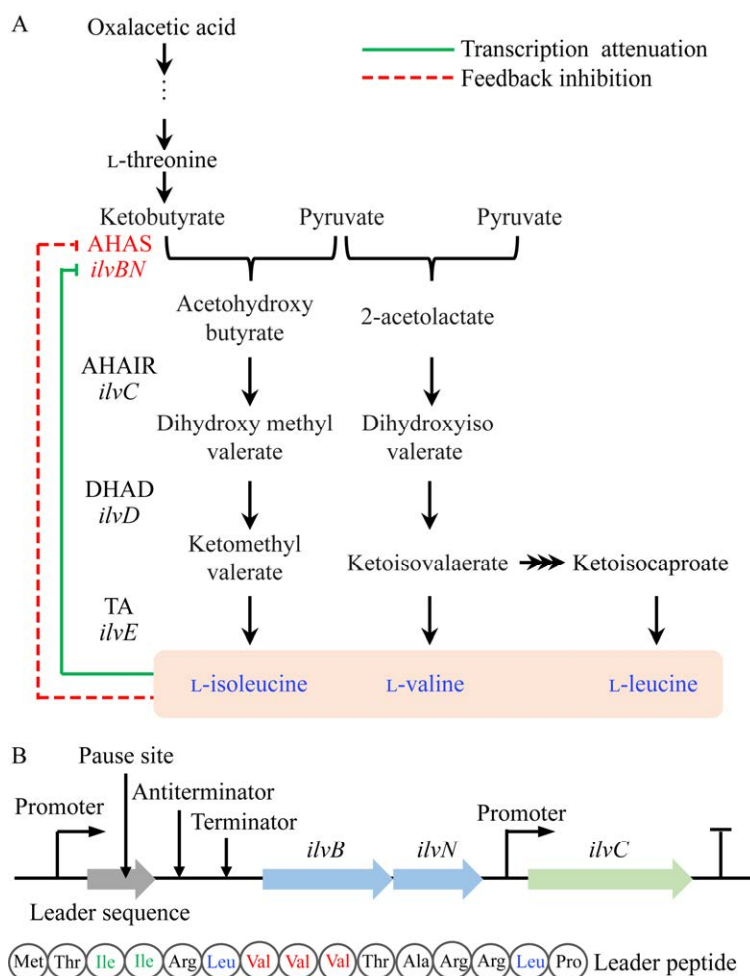


图 1 支链氨基酸合成途径及 *ilvBNC* 操纵子的转录调控 A: 支链氨基酸合成途径. B: *ilvBNC* 操纵子的转录调控

Figure 1 Synthesis pathway of branched-chain amino acids and transcriptional regulation of *ilvBNC* operon. A: Synthesis pathway of branched-chain amino acids. B: Transcriptional regulation of *ilvBNC* operon. AHAS (encoded by *ilvBN*): Acetohydroxyacid synthetase; AHAIR (encoded by *ilvC*): Acetohydroxyacid isomeroreductase; DHAD (encoded by *ilvD*): Dihydroxyacid dehydratase; TA (encoded by *ilvE*): Transaminase.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒

本研究使用的菌株和质粒见表 1。

1.1.2 引物

本研究使用的引物见表 2, 引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.3 仪器与试剂

本研究所使用的主要分子构建试剂盒、相关试剂以及分析检测仪器均与实验室前期发表的研究文章^[25]一致。

1.1.4 培养基

用于大肠杆菌(*Escherichia coli*)培养的 LB 培养基和用于谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*)培养的 TSB 培养基的配制参考文献^[25]。L-缬氨

表 1 本研究所用菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Descriptions	Sources
<i>Escherichia coli</i>		
Trans1-T1	General cloning host	TransGen Biotech Co., Ltd.
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
	ATCC 13032, wild-type strain	ATCC
Plasmids		
pEC-XK99E	Expression vector of <i>Corynebacterium glutamicum</i> with promoter P_{trc} , Km^R	Lab store
pEC-XK99E- <i>rfp</i> -1	pEC-XK99E derivative carrying first <i>ilvB</i> 180, linker and <i>rfp</i> with P_{ilvBN} promoter	This study
pEC-XK99E- <i>rfp</i> -2	pEC-XK99E derivative carrying first <i>ilvB</i> 180, linker and <i>rfp</i> with P_{pgi} promoter	This study
pEC-XK99E- <i>rfp</i> -3	pEC-XK99E derivative carrying first <i>ilvB</i> 180, linker and <i>rfp</i> with P_{fda} promoter	This study
pEC-XK99E- <i>rfp</i> -4	pEC-XK99E derivative carrying first <i>ilvB</i> 180, linker and <i>rfp</i> with P_{gpmA} promoter	This study
pEC-XK99E- <i>rfp</i> -5	pEC-XK99E derivative carrying first <i>ilvB</i> 180, linker and <i>rfp</i> with P_{gltA} promoter	This study
pEC-XK99E- <i>rfp</i> -6	pEC-XK99E derivative carrying first <i>ilvB</i> 180, linker and <i>rfp</i> with P_{mdh} promoter	This study
pEC-XK99E- <i>rfp</i> -7	pEC-XK99E derivative carrying first <i>ilvB</i> 180, linker and <i>rfp</i> with P_{odhA} promoter	This study
pEC-WT- <i>ilvBN</i> ^{S155F}	pEC-XK99E derivative carrying <i>ilvBN</i> ^{S155F} with P_{gpmA^*} promoter and wild-type RBS	This study
pEC-RBS18- <i>ilvBN</i> ^{S155F}	pEC-XK99E derivative carrying <i>ilvBN</i> ^{S155F} with P_{gpmA^*} promoter and RBS18 RBS	This study
pEC-RBS36- <i>ilvBN</i> ^{S155F}	pEC-XK99E derivative carrying <i>ilvBN</i> ^{S155F} with P_{gpmA^*} promoter and RBS36 RBS	This study
pEC-RBS18- <i>ilvBN</i> ^{S155F} C	pEC-XK99E derivative expressing <i>ilvBN</i> ^{S155F} C with P_{gpmA^*} promoter and RBS18 RBS	This study

酸发酵培养基: 80 g/L 葡萄糖, 2 g/L 酵母粉, 20 g/L (NH₄)₂SO₄, 5 g/L 尿素, 1 g/L KH₂PO₄, 1.3 g/L K₂PO₄·3H₂O, 42 g/L MOPS, 0.01 g/L CaCl₂, 0.01 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.01 g/L MnSO₄·H₂O, 1 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0.2 mg/L CuSO₄, 0.02 mg/L NiCl₂·6H₂O, 0.25 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.03 g/L 原儿茶酸, 0.1 mg/L VB₁, 0.2 mg/L 生物素, NaOH 调 pH 至 7.1–7.2, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 不同启动子表征菌株构建

以 pEC-XK99E 质粒为模板, 使用引物 pEC-1 和 pEC-2 扩增 pEC-XK99E 质粒骨架; 以 *C. glutamicum* ATCC 13032 基因组为模板, 使用引物 *ilvBN*-F 和 *ilvBN*-R 扩增 *ilvBN* 基因启动子、RBS 和 *ilvB* 基因 N 端 180 bp 的 DNA 片段; 以包含 *rfp* 基因的质粒为模板, 使用引物 *rfp*-F 和 *rfp*-R 扩增包含 linker 和 *rfp* 基因的 DNA 片段。以上 3 个片段通过一步重组试剂盒进行连接,

获得 pEC-XK99E-*rfp*-1 表征质粒。以该表征质粒为模板, 使用引物 pEC-2 和 pEC-3 扩增质粒骨架和 *rfp* 片段。分别以包含对应启动子的质粒为模板, 使用引物 *pgi*-F 和 *pgi*-R、*fda*-F 和 *fda*-R、*gpmA*-F 和 *gpmA*-R、*gltA*-F 和 *gltA*-R、*mdh*-F 和 *mdh*-R、*odhA*-F 和 *odhA*-R 分别扩增各启动子片段。分别通过两片段重组进行连接, 获得对应的表征质粒, 并通过电转化至 *C. glutamicum* ATCC 13032 菌株, 获得对应表征菌株。

1.2.2 RBS 文库构建及平板荧光筛选

以 pEC-XK99E-*rfp*-4 表征质粒为模板, 使用引物 pEC-1 和 RBS-N5 扩增质粒骨架, 使用引物 RBS-N1、RBS-N2、RBS-N3 分别与引物 RBS-N4 扩增含有突变区域的 3 个短片段。以上相应的两个片段通过一步重组试剂盒连接后, 转化至 *E. coli* Trans1-T1 感受态中, 并涂布在含有 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体平板上, 获得质粒文库菌。使用 2 mL 无菌水收集平板上的全部转化子, 并提

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
pEC-1	CTGCAGGCATGCAAGCTTGG	20
pEC-2	GGAGAAAATACCGCATCAGGC	21
pEC-3	ATGAATGTGGCAGCTTCTCAAC	22
pEC-4	GCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGG	25
<i>rfp</i> -F	CCGGTGTATGACCCGCTCTATGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTG GGTCCGGCGGTGGCTCTGCTTCCTCCGAAGACGTTATCAAAG	85
<i>rfp</i> -R	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGTTAAGCACCGGTGGAGTGACGAC	43
<i>ilvBN</i> -F	GCCTGATGCGGTATTTTCTCCGCCTGCCTGAACTTTGTGAGA	42
<i>ilvBN</i> -R	ATAGAGCGGGTCATACACCGG	21
<i>pgi</i> -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCCCGGATGGCCACGTCG	36
<i>pgi</i> -R	GTTGAGAAGCTGCCACATTCATGAAAACCTCTTTATTGTCGTAAAT	47
<i>fda</i> -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCCCGATAGTGTATGTGCTGACCTG	44
<i>fda</i> -R	GTTGAGAAGCTGCCACATTCATAAGGTGTCTCTCCAAAAGGTG	44
<i>gpmA</i> -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCCTGGGCGACGCCTTA	36
<i>gpmA</i> -R	GTTGAGAAGCTGCCACATTCATTTTCCGTTAGTCATAGTACTATC	47
<i>gltA</i> -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCCCAAACGATGAAAAACGCC	40
<i>gltA</i> -R	GTTGAGAAGCTGCCACATTCATGATATCCCTTTCAAACATATTTGTTCCG	49
<i>mdh</i> -F	GCCTGATGCGGTATTTTCTCCCGATTCCCATGATGCC	39
<i>mdh</i> -R	GTTGAGAAGCTGCCACATTCATTAACAATCCTCAATCCTTGTAGGG	47
<i>odhA</i> -F	CCTGATGCGGTATTTTCTCCACGTTATTTTAGGAGAACTGTCAAC	47
<i>odhA</i> -R	GTTGAGAAGCTGCCACATTCATGGCAGGTAATCGCCTCTTTTC	43
RBS-N1	GGATAGTACCTATGACTAACRRRRRRNNNNATGAATGTGGCAGCTTCTCAAC	52
RBS-N2	GGATAGTACCTATGACTAACRRRRRRNNNNNNATGAATGTGGCAGCTTCTCAAC	56
RBS-N3	GGATAGTACCTATGACTAACRRRRRRNNNNNNATGAATGTGGCAGCTTCTCAAC	57
RBS-N4	CCAAGCTTGCATGCCTGCAG	20
RBS-N5	GTTAGTCATAGGTAATCCTATCAC	26
<i>ilvBN</i> -1	TTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCG	40
<i>ilvBN</i> -2	GGGAGTGGGCTGTTGAGAAGCTGC	24
<i>ilvBN</i> -3	CTTCTCAACAGCCCACTCCC GCCACGGTTGCAAGCCGTGGTC	42
<i>ilvBN</i> -4	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGTTAGATCTTGCCGGAGCC	39
<i>ilvBNC</i> -1	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGTTAAGCGTTTCTGCGGAGCGTCAACCTTGACC	54
pEC-F	TACGGTTCCTGGCCTTTTGC	20
pBV220R	CTGCGTTCGATTTAATCTG	20

取文库质粒。将约 1 μg 的文库质粒通过电转化导入 *C. glutamicum* ATCC 13032 菌株，并分别涂布 5 个含 25 μg/mL 卡那霉素的 TSB 固体平板。每个平板长约 500–1 000 个转化子。使用荧光图像分析系统对克隆进行荧光拍照，初步筛选优势文库，再对优势文库的菌液进行大量

的平板涂布，筛选荧光亮度增强的克隆。

1.2.3 启动子及 RBS 突变体的强度表征

将表征菌株在含有 25 μg/mL 卡那霉素的 TSB 固体平板上过夜活化。活化后的新鲜菌苔接种到每孔含 200 μL TSB 液体培养基的 96 孔板中，在 30 °C 和 800 r/min 条件下过夜培养。转

接 10 μL 至含有 200 μL TSB 液体培养基的 96 孔板中培养, 每个菌株设置 3 个平行, 在孔板摇床中 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 培养, 培养 24 h 后, 使用酶标仪分别测定 OD_{600} 和荧光值(设置激发波长为 560 nm, 发射波长为 607 nm), 然后通过荧光值/ OD_{600} 计算荧光强度。

1.2.4 L-缬氨酸生产菌株的构建

以 pEC-XK99E-*rfp*-4 质粒为模板, 使用引物 pEC-1 和 pEC-4 扩增骨架; 以 pEC-XK99E-*rfp*-4 及对应的 RBS 突变体质粒为模板, 使用引物 *ilvBN*-1 和 *ilvBN*-2 扩增对应的调控元件片段; 以 *C. glutamicum* ATCC 13032 中 *ilvN* 基因的 S155F 位点突变的突变体基因组为模板, 使用引物 *ilvBN*-3 和 *ilvBN*-4 扩增 *ilvBN*^{S155F} 基因片段, 使用引物 *ilvBN*-3 和 *ilvBNC*-1 扩增 *ilvBN*^{S155F}C 基因片段, 然后通过一步重组试剂盒将相应的片段与骨架进行连接, 经测序比对成功后, 将获得的质粒电转化至 *C. glutamicum* ATCC 13032 菌株中, 成功获得能够用于评价 L-缬氨酸生产的菌株。

1.2.5 L-缬氨酸产量评价

在 TSB 固体平板上活化生产菌株, 随后接种到每孔含 800 μL TSB 液体培养基的 24 孔板中培养 6 h, 并以初始 OD_{600} 约为 0.06 转接至每孔 800 μL 的发酵培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 培养 24 h 后, 取样测定 OD_{600} 、葡萄糖和 L-缬氨酸, 培养过程均添加 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素。将发酵上清液使用去离子水稀释一定倍数后混匀离心, 将样品在沸水中水浴处理 10 min, 然后进行离心, 以去除蛋白质, 保留上清液。然后于离心管中加入 200 μL 衍生缓冲液、300 μL 衍生剂和 40 μL 待测样品, 混合均匀后振荡 1 min 并再次离心。随后在 65 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下水浴 60 min, 冷却至室温后进行离心。最后加入 660 μL 定容缓冲液至总体积为 1.2 mL, 振荡混匀, 使用 0.2 μm 有机系针头滤器进行过膜处理。衍生剂为 2,4-二硝

基氟苯。使用 Agilent 1260 高效液相色谱测定 L-缬氨酸产量, 流动相分别为 50 mmol/L 乙酸钠和 50%乙腈。分析条件为: 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速 1 mL/min; 进样 20 μL , 吸收波长: 360 nm。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸棒杆菌中筛选表达 *ilvBN* 基因的强启动子

研究团队前期针对谷氨酸棒杆菌糖酵解、柠檬酸循环、磷酸戊糖途径中多个基因的启动子, 在启动子-10 区及附近序列进行突变建库, 筛选获得了 6 个可提高启动子转录强度的突变体(图 2A)。为了筛选表达 *ilvBN* 基因的强启动子, 采用实验室前期开发的靶基因表达元件表征系统(图 2B)^[23], 构建了 6 个强启动子及 *ilvBN* 基因天然启动子的表征质粒, 所有启动子均携带其野生型 RBS, 6 个强启动子表征质粒的起始密码子均为 ATG, 而 *ilvBN* 基因天然启动子的起始密码子为 GTG。将对照质粒 pEC-XK99E 及构建的 7 个表征质粒, 分别转化至 *C. glutamicum* ATCC 13032 菌株, 获得对应的表征菌株。按照 1.2.3 所述的方法, 表征以上启动子表达 *ilvBN* 的强度, 结果显示 5 个启动子的荧光强度均较天然启动子显著提高(图 2C), 其中启动子 P_{gpmA^*} 的荧光强度最高, 是天然启动子 P_{ilvBN} 的 23.3 倍, 为筛选获得的最强启动子。

2.2 P_{gpmA^*} 强启动子野生型 RBS 基础上构建并筛选人工合成 RBS 文库

RBS 可以在翻译水平调控基因的表达, 文献报道 RBS 序列的 A/G 碱基组成和长度, 以及与其起始密码子之间的间隔序列的长度和序列组成, 均对 RBS 的调控强度具有重要影响^[26-28]。为进一步增强 *ilvBN* 基因的表达, 本研究在获得的 P_{gpmA^*} 强启动子的野生型 RBS 基础上, 分别设计构建了 3 个 RBS 文库“ $R_{(6)N_{(4)}}$ ”“ $R_{(8)N_{(6)}}$ ”

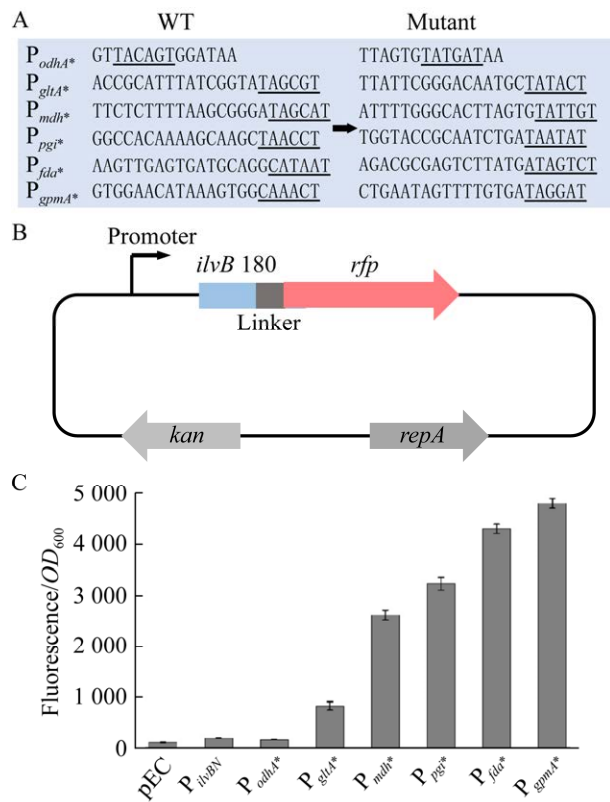


图2 筛选表达 *ilvBN* 基因的强启动子 A: 不同启动子的-10区及邻近序列. B: 筛选启动子的报告系统. C: 不同启动子的荧光强度

Figure 2 Screening strong promoters for *ilvBN* expression. A: Extended -10 regions of different promoters. B: A tailored reporter system for screening promoters. C: Fluorescence intensities of different promoters.

“R₍₉₎N₍₆₎”, 起始密码子均为 ATG (图 3A)。按照 1.2.2 所述的方法, 分别构建 RBS 文库, 针对每块平板, 利用荧光图像分析系统进行荧光成像, 转化子的荧光亮度反映了荧光蛋白的表达水平。3 个文库均可以获得荧光亮度更高的转化子, 表明文库突变可提高表达强度。文库 3 中亮度提高的转化子比例更大, 同时包含亮度更强的转化子(图 3B)。因此, 选择文库 3 进行突变体筛选, 进一步挑选不同荧光亮度的转化子。

2.3 RBS 突变体文库的表达强度表征

对 RBS 文库 3 平板荧光初筛获得的转化子, 在 96 孔板培养并表征荧光强度, 结合突变体的测序结果, 成功获得了 36 个荧光强度提高的 RBS 突变体(图 4)。与 P_{gpmA^*} 强启动子表达元件相比, 在该启动子野生型 RBS 基础上构建的 RBS 文库的相对表达强度是它的 1.2–2.7 倍; 与 P_{ilvBN} 天然启动子表达元件相比, 在 P_{gpmA^*} 强启动子野生型 RBS 基础上构建的 RBS 文库的相对表达强度是它的 28.1–62.3 倍, 这些 RBS 突变体进一步提升了 *ilvBN* 基因的调控强度。按照荧光的相对强度将 RBS 突变体分为 2 组, 以 P_{ilvBN} 天然启动子荧光强度为参照, 中等强度 RBS (moderate RBS) 突变体的相对强度为 38 倍以下, 包括 RBS1-RBS18; 高强度 RBS (strong

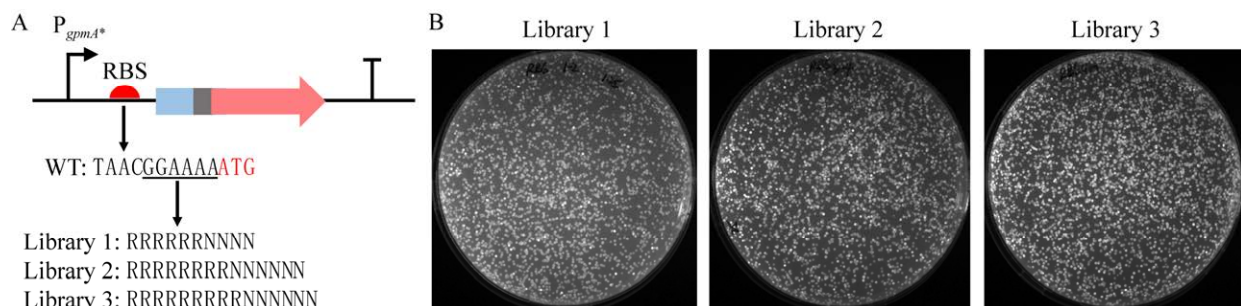


图3 RBS 文库的构建策略及平板荧光成像筛选 A: RBS 文库的构建策略. B: RBS 文库转化子的平板荧光成像

Figure 3 Construction strategy and fluorescence imaging of RBS libraries. A: Construction strategy of RBS libraries. B: Fluorescence imaging of transformants from RBS libraries on agar plate.

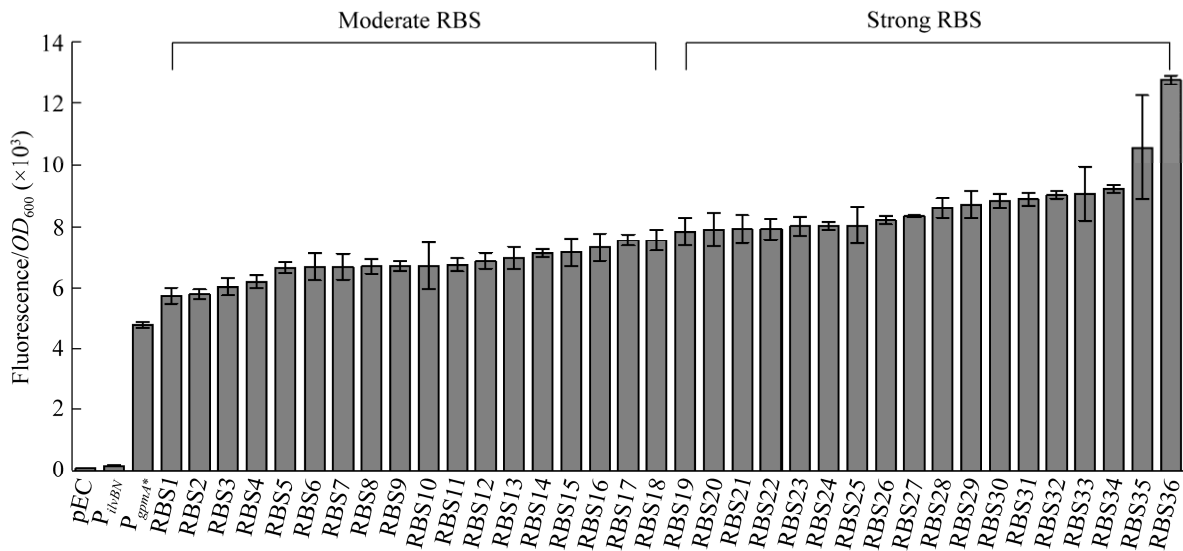


图4 RBS文库的荧光强度

Figure 4 Fluorescence intensity of RBS library. pEC was the empty plasmid. P_{ilvBN} and P_{gpmA*} were as control groups. Error bars represent the standard deviations obtained from three independent cultures.

RBS)为38倍以上,包含RBS19–RBS36。以上RBS突变体的表达强度显著增强,且其表达强度呈梯度分布,可为谷氨酸棒杆菌中*ilvBN*基因的高效表达提供可用元件。

2.4 RBS文库的序列分析

为了研究RBS突变体序列与其表达强度之间的相关性,分析了所有RBS突变体的测序结果,获得了RBS及间隔区的15 bp碱基的突变序列(图5A)。除了RBS28在第9位引入的突变为T,其余突变体序列均与设计相符。非设计碱基引入推测是引物合成错误所致。同时发现5个突变体存在其他可能的起始密码子(红色标注),3个为同框表达,2个为不同框表达,为避免其影响,后续可选用其他突变。为进一步探究序列位置及保守性对表达强度的影响,针对RBS突变区的序列,利用序列分析网站WebLogo (<http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>)进行分析,并统计突变区域的碱基出现概率。对全部突变体序列进行分析发现,在设定的9个A/G突变区A碱基含量明显高于G,第1、4、5位

为A的概率均超70%;在设定的6个随机间隔区的第10、12、13、15位均为A出现概率最高,第11、14位均为G出现概率最高(图5B)。对中等强度突变体序列进行分析,发现在设定的9个A/G突变区碱基分布与全部突变体类似,但整体上A出现概率有所下降;在设定的6个随机间隔区第11位为T出现概率最高,其余均为A出现概率最高(图5C)。对高强度突变体序列进行分析发现,在设定的9个A/G突变区A出现概率最高,其余均为A出现概率最高(图5D)。以上结果表明RBS区序列高A含量有利于提高表达强度,RBS与起始密码子间隔区的第11、14位碱基组成也是影响表达强度的关键。

2.5 强启动子及RBS突变体应用于L-缬氨酸生产

AHAS是支链氨基酸合成的关键酶,受到3种支链氨基酸的反馈抑制,文献报道S155F突变可以解除反馈抑制^[29]。由于L-亮氨酸和L-异亮氨酸的合成还受其他酶的限制,为了应用筛选

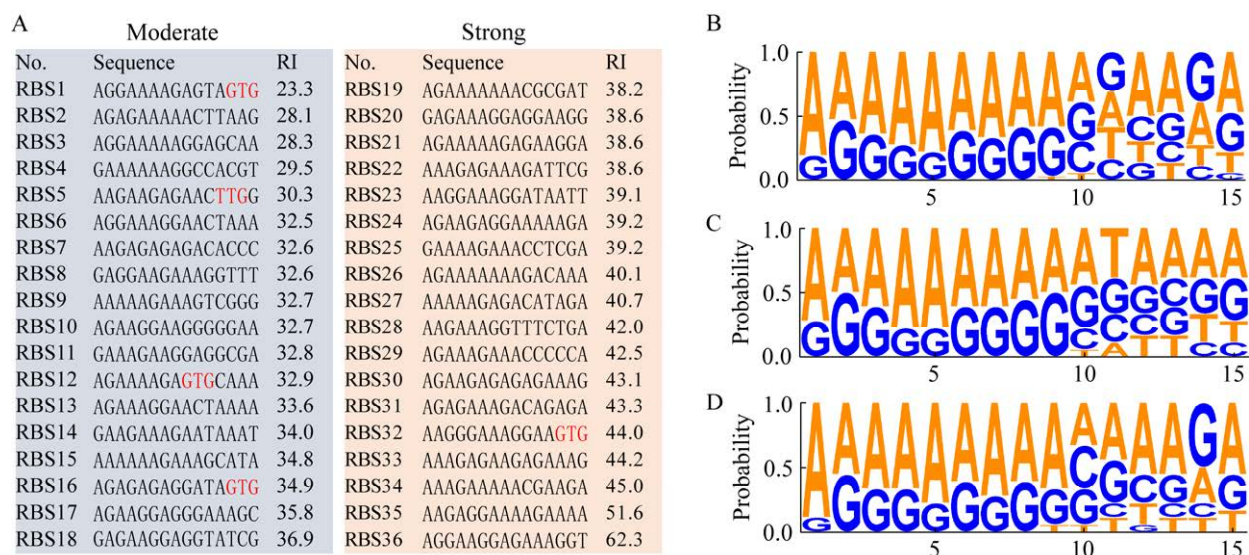


图5 RBS 突变体序列及保守性分析 A: RBS 突变体序列. B: 全部 RBS 突变体的保守性分析. C: 中等强度 RBS 突变体的保守性分析. D: 高强度 RBS 突变体的保守性分析

Figure 5 Sequences and conservative analysis of RBS mutants. A: Sequences of RBS mutants. RI: Relative intensity (RI) of RBS mutants. The bases marked in red are potential start codons. B: Conservative analysis of all RBS mutants. C: Conservative analysis of moderate RBS mutants. D: Conservative analysis of strong RBS mutants.

获得元件调控 AHAS 生产支链氨基酸, 本研究选择强启动子 P_{gpmA^*} 和起始密码子 ATG, 分别组合 WT 野生型 RBS、中等强度 RBS 突变体 RBS18 和高强度 RBS 突变体 RBS36, 在质粒上过表达 $ilvBN^{S155F}$ 生产 L-缬氨酸。为了进一步验证组合其他基因改造的调控潜力, 选择在 RBS18 调控基础上组合 $ilvC$ 基因的过表达生产 L-缬氨酸。构建过表达质粒及 L-缬氨酸生产菌 (图 6A) 并进行 24 孔板发酵, 分别测定发酵终点的 OD_{600} 、L-缬氨酸产量和葡萄糖消耗量 (图 6B)。结果显示, 不同 RBS 表达的 $ilvBN^{S155F}$ 菌株的生长和葡萄糖消耗差异较小, OD_{600} 为 15.4–16.2, 葡萄糖消耗为 41.3–46.7 g/L; 3 株菌的 L-缬氨酸产量随着表达调控元件强度的提高而逐渐增加, 野生型 RBS 表达菌株的产量为 1.17 g/L; RBS18 表达菌的产量为 1.38 g/L, 较野生型 RBS

表达菌株的产量提高 18%; RBS36 表达菌株的产量为 2.29 g/L, 较 RBS18 表达菌株的产量提高 66%。RBS18 调控基础上组合 $ilvC$ 基因的过表达菌株, OD_{600} 和葡萄糖消耗较无组合改造菌株差异较小, 而 L-缬氨酸产量达 7.57 g/L, 较无组合改造菌株产量提高 5.5 倍。以上结果表明, 本研究筛选获得的表达调控元件库可用于调控 AHAS 的表达生产 L-缬氨酸, 进一步组合其他基因改造可以实现更高水平 L-缬氨酸生产。

3 讨论

谷氨酸棒杆菌广泛用于生产支链氨基酸, 对 AHAS 等关键酶进行精细的表达调控是提高菌株产量的重要策略。启动子是控制基因转录的重要元件, RBS 和起始密码子是控制翻译的重要元件, 改造启动子核心区、RBS 和起始密

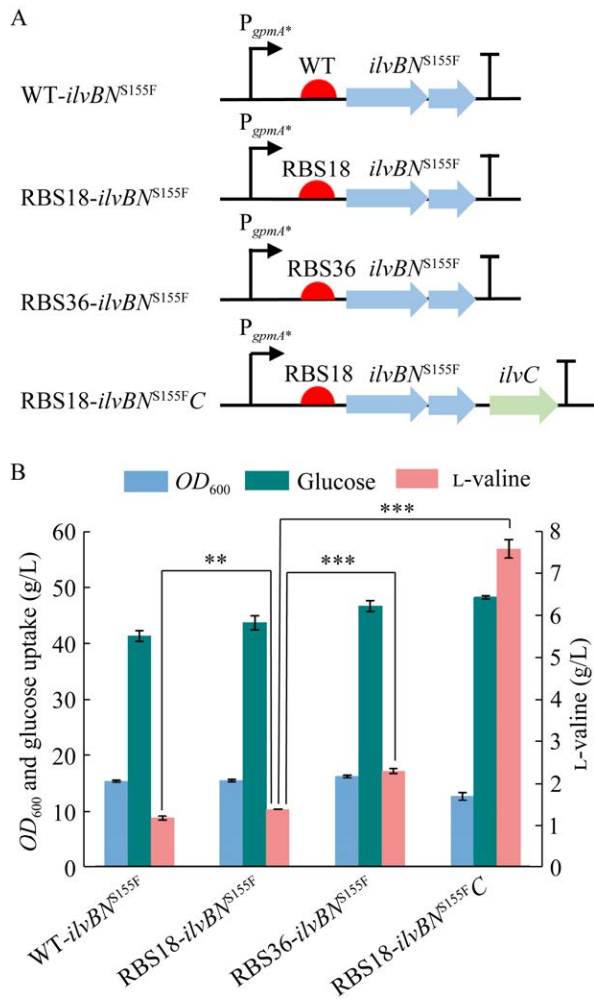


图6 应用不同表达调控元件生产L-缬氨酸 A: 菌株构建示意图. B: 24孔板L-缬氨酸产量

Figure 6 L-valine production with different expression regulatory elements. A: Schematic diagram of strain construction. B: L-valine production in 24-well plates. **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, student's two-tailed t -test.

码子均可以改变调控强度, 组合改造可以实现更加高效的表达调控。本研究通过强启动子筛选以及RBS文库构建和筛选, 成功获得了调控AHAS的高质量元件库, 可为L-缬氨酸等支链氨基酸生产提供高效元件。

目前报道的AHAS表达调控均只利用有限的启动子进行测试。在L-缬氨酸生产中, 研究人员采用常规报告系统表征的由强到弱的 P_{uf} 、

P_{gapA} 、 P_{sod} 和 P_{ilvBN} 启动子, 用于调控 $ilvBN^M C$ 的表达, 发现 P_{gapA} 启动子产量最高^[14]。由于存在适配性问题, 相同启动子表达不同基因经常呈现较大表达强度差异, 因此以上研究难以直接将 $ilvBN^M C$ 的表达强度与产量相互关联。在L-亮氨酸生产中, 也测试了使用组成型 P_{tac} 和 P_{uf} 启动子分别调控 $ilvBNC$ 的表达, 发现两种启动子均能明显提高产量, 但两者之间的产量和转录水平的差异均较小^[21]。在L-异亮氨酸生产中, 采用IPTG诱导型 P_{tac} 启动子分别过表达野生型和解除反馈抑制的 $ilvBN$, 均能提高产量^[30]。以上研究表明增强AHAS的表达均可以提高支链氨基酸产量, 然而无法直接证明表达强度与产量之间的相关性。本研究通过 $ilvBN$ 基因表达调控元件筛选, 成功获得了相比其天然启动子最高可达62.3倍表达强度的调控元件库, 可为AHAS的精细调控提供丰富元件。

RBS及RBS与起始密码子的间隔序列, 对翻译的起始和蛋白的高效表达均具有重要的作用。在谷氨酸棒杆菌中, 前期研究主要是分别针对RBS和间隔序列构建文库, 实现翻译水平表达调控。“AAAGGN₍₆₋₉₎”“AAAGGAN₍₈₎”“AAAGGAN_(7/8)”文库, 分别被用于调控莽草酸合成、甘油利用和L-高丝氨酸合成途径^[24,31-32]。基因组原位连续8个G的RBS, 可以通过碱基编辑形成A/G随机文库, 实现了木糖利用和番茄红素合成途径的表达调控^[26]。本研究通过设计“R₍₆₎N₍₄₎”“R₍₈₎N₍₆₎”“R₍₉₎N₍₆₎”组合突变文库, 发现3个文库均可以实现AHAS的表达调控, 其中R₍₉₎N₍₆₎更有利于其高效表达, 可为谷氨酸棒杆菌中基于RBS文库进行表达调控提供方法借鉴。

4 结论

本研究基于前期开发的靶基因表达调控元件报告系统, 分别采用6个组成型强启动子表

达调控 *ilvBN* 基因, 筛选获得了 P_{gpmA} 启动子, 表达强度可达 P_{ilvBN} 天然启动子的 23.3 倍; 进一步通过优势的 RBS 文库 $R_{(9)}N_{(6)}$ 进行突变筛选, 成功获得了 36 个不同强度增强的 RBS 突变体, 最高强度可达 P_{ilvBN} 天然启动子的 62.3 倍。应用 3 种不同强度的元件调控 *ilvBN*^{S155F} 的表达, 发现 L-缬氨酸产量随着元件增强逐步提高, 组合 *ilvC* 的过表达可以进一步大幅提高产量。本研究获得的强启动子及 RBS 突变体, 可应用于精细调控 AHAS 生产支链氨基酸。

REFERENCES

- [1] LEE JY, NA YA, KIM E, LEE HS, KIM P. The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(5): 807-822.
- [2] WOO HM, PARK JB. Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 180: 43-51.
- [3] WENDISCH VF, JORGE JMP, PÉREZ-GARCÍA F, SGOBBA E. Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(6): 105.
- [4] SHENG Q, WU XY, XU XY, TAN XM, LI ZM, ZHANG B. Production of L-glutamate family amino acids in *Corynebacterium glutamicum*: physiological mechanism, genetic modulation, and prospects[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2021, 6(4): 302-325.
- [5] LIU J, XU JZ, RAO ZM, ZHANG WG. Industrial production of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum*: progress and prospects[J]. Microbiological Research, 2022, 262: 127101.
- [6] YU SZ, ZHENG B, CHEN ZY, HUO YX. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for producing branched chain amino acids[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 230.
- [7] BECKER J, ROHLES CM, WITTMANN C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 122-141.
- [8] BARITUGO KA, KIM HT, DAVID Y, CHOI JI, HONG SH, JEONG KJ, CHOI JH, JOO JC, PARK SJ. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fermentative production of chemicals in biorefinery[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(9): 3915-3937.
- [9] KOGURE T, INUI M. Recent advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for bioproduction of value-added aromatic chemicals and natural products[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(20): 8685-8705.
- [10] ZHAO NN, QIAN L, LUO GJ, ZHENG SP. Synthetic biology approaches to access renewable carbon source utilization in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(22): 9517-9529.
- [11] ZHA J, ZHAO Z, XIAO ZY, ENG T, MUKHOPADHYAY A, KOFFAS MA, TANG YJ. Biosystem design of *Corynebacterium glutamicum* for bioproduction[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2023, 79: 102870.
- [12] PARK JH, LEE SY. Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 491-506.
- [13] XU JZ, RUAN HZ, YU HB, LIU LM, ZHANG WG. Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 39.
- [14] 赵阔, 程金宇, 郭亮, 高聪, 宋伟, 吴静, 刘佳, 柳亚迪, 刘立明, 陈修来. 谷氨酸棒杆菌代谢工程高效生产 L-缬氨酸[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3253-3272. ZHAO K, CHENG JY, GUO L, GAO C, SONG W, WU J, LIU J, LIU YD, LIU LM, CHEN XL. Highly efficient production of L-valine by multiplex metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3253-3272 (in Chinese).
- [15] WANG YY, XU JZ, JIN ZY, XIA XL, ZHANG WG. Improvement of acetyl-CoA supply and glucose utilization increases L-leucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology Journal, 2022, 17(8): e2100349.
- [16] XIONG HB, LIU YP, XU QY. Effect of sodium dodecyl sulfate on the production of L-isoleucine by the fermentation of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Bioengineered, 2020, 11(1): 1124-1136.
- [17] AMORIM FRANCO TM, BLANCHARD JS. Bacterial

- branched-chain amino acid biosynthesis: structures, mechanisms, and drugability[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(44): 5849-5865.
- [18] LIANG YF, LONG ZX, ZHANG YJ, LUO CY, YAN LT, GAO WY, LI H. The chemical mechanisms of the enzymes in the branched-chain amino acids biosynthetic pathway and their applications[J]. *Biochimie*, 2021, 184: 72-87.
- [19] MORBACH S, JUNGER C, SAHM H, EGGELING L. Attenuation control of *ilvBNC* in *Corynebacterium glutamicum*: evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome binding site[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90(5): 501-507.
- [20] PFEIFER-SANCAR K, MENTZ A, RÜCKERT C, KALINOWSKI J. Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 888.
- [21] WANG YY, SHI K, CHEN PD, ZHANG F, XU JZ, ZHANG WG. Rational modification of the carbon metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to enhance L-leucine production[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(6): 485-495.
- [22] ZHANG YC, LIU YD, ZHANG SY, MA WJ, WANG JL, YIN LH, WANG XY. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* WM001 to improve L-isoleucine production[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2021, 68(3): 568-584.
- [23] LIU J, LIU MS, SHI T, SUN GN, GAO N, ZHAO XJ, GUO X, NI XM, YUAN QQ, FENG JH, LIU ZM, GUO YM, CHEN JZ, WANG Y, ZHENG P, SUN JB. CRISPR-assisted rational flux-tuning and arrayed CRISPRi screening of an L-proline exporter for L-proline hyperproduction[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 891.
- [24] 张悦, 张继伟, 吴硕, 徐宁, 刘君, 魏亮. 谷氨酸棒杆菌人工核糖体结合位点(RBS)文库的建立与应用[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(23): 25-32.
- ZHANG Y, ZHANG JW, WU S, XU N, LIU J, WEI L. Construction and application of an artificial ribosomal binding site (RBS) library in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(23): 25-32 (in Chinese).
- [25] 刘莫识, 刘娇, 孙冠男, 路福平, 王钰, 郑平, 孙际宾. 谷氨酸棒杆菌人工合成启动子文库的构建及应用[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(2): 831-842.
- LIU MS, LIU J, SUN GN, LU FP, WANG Y, ZHENG P, SUN JB. Construction and application of a synthetic promoter library for *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(2): 831-842 (in Chinese).
- [26] WANG Y, CHENG HJ, LIU Y, LIU Y, WEN X, ZHANG K, NI XM, GAO N, FAN LW, ZHANG ZH, LIU J, CHEN JZ, WANG LX, GUO YM, ZHENG P, WANG M, SUN JB, MA YH. *In-situ* generation of large numbers of genetic combinations for metabolic reprogramming via CRISPR-guided base editing[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 678.
- [27] KIM GY, KIM J, PARK G, KIM HJ, YANG JN, SEO SW. Synthetic biology tools for engineering *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2023, 21: 1955-1965.
- [28] MÜLLER C, BAKKES PJ, LENZ P, WAFFENSCHMIDT V, HELLECKES LM, JAEGER KE, WIECHERT W, KNAPP A, FREUDL R, OLDIGES M. Accelerated strain construction and characterization of *C. glutamicum* protein secretion by laboratory automation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(12): 4481-4497.
- [29] STELLA RG, GERTZEN CGW, SMITS SHJ, GÄTGENS C, POLEN T, NOACK S, FRUNZKE J. Biosensor-based growth-coupling and spatial separation as an evolution strategy to improve small molecule production of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 68: 162-173.
- [30] YIN LH, HU XQ, XU DQ, NING JF, CHEN J, WANG XY. Co-expression of feedback-resistant threonine dehydratase and acetohydroxy acid synthase increase L-isoleucine production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(5): 542-550.
- [31] WEI L, ZHAO JH, WANG YR, GAO JS, DU MH, ZHANG Y, XU N, DU HM, JU JS, LIU QD, LIU J. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-level γ -aminobutyric acid production from glycerol by dynamic metabolic control[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 69: 134-146.
- [32] ZHANG B, ZHOU N, LIU YM, LIU C, LOU CB, JIANG CY, LIU SJ. Ribosome binding site libraries and pathway modules for shikimic acid synthesis with *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 71.

(本文责编 陈宏宇)