

谷氨酸棒杆菌内源表达元件的筛选

刘秀霞[△] 赵子豪[△] 孙杨 杨艳坤 白仲虎*

(江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】构建谷氨酸棒杆菌表达元件探测载体,筛选能够启动蛋白表达的序列片段。【方法】基于谷氨酸棒杆菌表达载体 pXMJ19,利用 Golden Gate 新型克隆方法构建表达元件插入位点,使筛选的片段能够与报告基因快速无缝衔接,同时避免残留额外的序列对表达元件效果测试产生可能存在的干扰。对本课题组前期的谷氨酸棒杆菌 BZH001 高、中、低溶氧条件下的发酵样品转录组数据进行分析,筛选出稳定于高转录水平的 6 个基因,通过软件预测每个基因的启动子区域和 5'UTR 区域,两者构成能够启动基因表达的功能性元件,并将其从基因组中克隆出来。以增强型绿色荧光蛋白基因 *egfp* 作为报告基因,快速测量出表达元件的效果。【结果】获得 5 个不同效果的内源性表达元件,最好的元件插入探测载体后在谷氨酸棒杆菌中表达的荧光强度大于 3 500 RFU/OD₆₀₀。【结论】通过结合转录组数据,探测载体能够快速有效筛选表达元件,为将来人们对谷氨酸棒杆菌基因工程改造和生物系统的构建提供更多基础材料。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, RNA-Seq, 启动子, 探测载体

Selection of endogenous expression elements from *Corynebacterium glutamicum*

LIU Xiu-Xia[△] ZHAO Zi-Hao[△] SUN Yang YANG Yan-Kun BAI Zhong-Hu*

(National Engineering Laboratory of Cereal Fermentation Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] We constructed a *Corynebacterium glutamicum* expression-element probe vector and selected sequences that can activate expression of protein. [Methods] Based on the classic plasmid pXMJ19, we set the inserted position with the new method of Golden Gate cloning strategy that can connect material sequence to the report gene seamlessly, avoiding remaining unwanted sequence that may interfere the measurement of expression elements effect. By analyzing the

Foundation item: National Basic Research Program of China (No. 2013CB733602); National Natural Science Foundation of China (No. 31570034); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20150148); Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51401A)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85329306; E-mail: baizhonghu@jiangnan.edu.cn

[△]These authors equally contributed to this work

Received: February 26, 2016; **Accepted:** May 23, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 24, 2016

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2013CB733602); 国家自然科学基金项目(No. 31570034); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20150148); 中央高校基本科研业务费专项项目(No. JUSRP51401A)

*通讯作者: Tel: 86-510-85329306; E-mail: baizhonghu@jiangnan.edu.cn

[△]共同第一作者

收稿日期: 2016-02-26; **接受日期:** 2016-05-23; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-05-24

transcriptomic data of *C. glutamicum* BZH001 cultivated under different dissolved oxygen level in our previous study, we screened six genes stabilizing in high transcriptional level, analyzed their promoter regions and 5'UTR regions by the promoter software prediction, and then amplified the promoter sequences associated with 5'UTR regions of the six genes. The activities of these expression elements were measured using the reporter gene *egfp* in the probe vector. **[Results]** Five expression elements with different performances were achieved, and the best one could reach over 3 500 RFU/ OD_{600} of fluorescent intensity. **[Conclusion]** Associated with the transcriptomic data, we can screen effective expression elements using this probe vector, which can provide more genetic parts for the future genetic engineering and construction of biological system in *Corynebacterium glutamicum*.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, RNA-Seq, Promoter, Probe-vector

从 1956 年人们分离得到谷氨酸生产的优势菌株谷氨酸棒杆菌之后, 这种菌便在发酵生产氨基酸、有机酸、高级醇等工业产品中扮演着重要角色^[1-2]。基因工程技术的不断发展, 以及合成生物学技术的出现和应用, 为人们提供了更多对谷氨酸棒杆菌的改造方法, 从而提高产品产量。如还晓静等通过在谷氨酸棒杆菌中使用 pDXW 系列质粒过表达 NAD 激酶, 提高 L-异亮氨酸合成必需的辅因子 NADPH 的供应, 从而提高 L-异亮氨酸的产量^[3]。来书娟等使用含 *tac* 启动子的质粒 pXMJ19 过表达 3-磷酸甘油酸激酶, 增强糖酵解途径和三羧酸循环^[4]。杨柳等应用 *groES* 基因的表达元件 *Pgro* 实现了木糖异构酶在谷氨酸棒杆菌中的过表达^[5]。不过, 谷氨酸棒杆菌的基因操作工具依旧较少, 使人们在蛋白表达和代谢途径的改造中局限于 *tac*、*trc*、*cspB* 等有限的启动子中, 而且缺乏丰富的 RBS 序列与之搭配。谷氨酸棒杆菌因其无内毒素、胞外无水解酶活性等特点, 成为未来极具潜力的表达宿主^[6], 这也引起了不少人对开发谷氨酸棒杆菌高效表达系统的尝试。如 Yim 等对谷氨酸棒杆菌人工合成启动子文库进行筛选, 获得了高效启动子 P_{H36} , 并且成功用于单链抗体 scFv 的分泌表达^[7-8]。Rytter 等对 *tac* 启动子的关键区域进行突变, 获得了一系列不同强度的 *tac* 启动子突变体^[9]。面对代谢工程和合成生物学的飞速发展, 谷氨酸棒杆菌需要开发更多的表达元件, 从而满足不同目标基因各自的要求, 协调各个功能蛋白之间的相互作用, 使生物系统更加高效平稳^[10]。

本研究基于应用广泛的谷氨酸棒杆菌-大肠杆菌穿梭表达质粒 pXMJ19^[11], 使用新型克隆技术构建谷氨酸棒杆菌表达元件探测载体。目前, 针对高效和高通量克隆的需求, 有很多新的方法更加快捷和简单, 对于基因序列的要求更少, 如 Clontech 的 In-Fusion 系统、胞外 PCR 和胞内同源重组法等^[12-13]。本文使用的 Golden Gate 方法^[14], 价格低廉并且更适于多个片段与同一载体无缝连接, 见图 1。将所筛选的片段与报告基因 *egfp* 无缝连接, 从而避免传统探测载体上的 *EcoR* I、*Bam*H I 等酶切位点对表达元件效果的评估产生干扰, 使探测载体能够更加精确地对插入表达元件的效果进行测定。本实验室在前期工作中通过对 *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) BZH001 在高、中、低溶氧条件下的发酵样品转录组进行测定, 得到了不同基因在稳定期的转录水平数据。本研究将转录组数据与计算机预测和实验测量相结合, 筛选受溶氧水平影响较

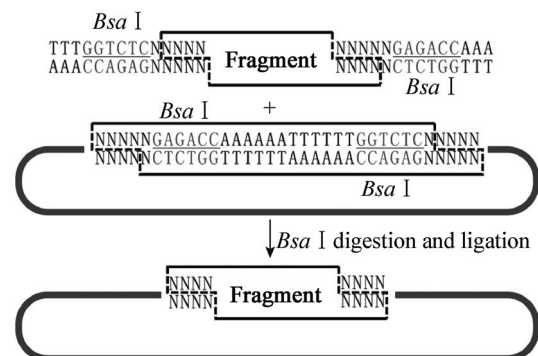


图 1 Golden Gate 克隆方法

Figure 1 Golden Gate cloning strategy

小的高转录水平组成型启动子, 连同下游的 5'UTR 序列组成可以启动表达的功能元件。最终获得了一系列有效的表达元件, 增加了谷氨酸棒杆菌用于表达强度调节和系统构建的功能序列。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种和质粒: 谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* BZH001、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、质粒 pXMJ19、pMD19-T-EGFP 由本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂与仪器: 限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*H I、*Eco*R V 及 T4 DNA 连接酶等购自 Thermo 公司; *Bsa* I 二型内切酶、Q5 超保真聚合酶购自 NEB 公司; 质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 基因组提取试剂

盒购自北京天根公司; 氯霉素、卡那霉素等抗生素购自上海生物工程有限公司; 其余试剂均为国产或者进口分析纯。

高速冷冻离心机和 PCR 热循环仪, 美国 ThermoFisher 公司; Synergy H4 酶标仪, 美国 BioTek 公司; 恒温金属浴, 北京天根公司; Dark Reader, 北京达科为生物公司; 核酸和蛋白电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 培养基和培养条件: 大肠杆菌使用 LB 培养基^[3]在 37 °C 培养, 谷氨酸棒杆菌使用 BHI 培养基^[7]在 30 °C 培养。抗生素使用氯霉素, 作用终浓度在大肠杆菌中为 34 mg/L, 在谷氨酸棒杆菌中为 10 mg/L。

1.1.4 引物设计及合成: 研究所需引物使用 Primer 5 设计, 引物名称及序列见表 1, 引物合成和测序

表 1 PCR 引物
Table 1 The primers for PCR

引物名称 The name of primer	引物序列 Primer sequences (5'→3')	酶切位点 Restriction sites
p19-MUT-F	GATGGTAGTGTGGGGTCACCCATGCGAGAGTAG	
p19-MUT-R	CTACTCTCGCATGGGGTGACCCACACTACCATC	
p19-0-F	ATCCTATCATGCCATAACCGC	
p19-0-R	CCCAAGCTTCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTA TTTCAGAATATTTGCCAGAACC	<i>Hind</i> III
dBsaI-E-F	CCCAAGCTTCTGGTTGAGACCAAAAAATTTTTGGTCTCAATGGTGAGCAAGGGCG	<i>Hind</i> III, <i>Bsa</i> I
dBsaI-E-R	CCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	<i>Bam</i> H I
A1-F	TTTGGTCTCATGGTTTCAACAGCATTGATTCG	<i>Bsa</i> I
A1-R	TTTGGTCTCACCATTTGTATGTCTCTCGACTTCG	<i>Bsa</i> I
A2-F	TTTGGTCTCATGGTCCAGCACTACATCCGTATCC	<i>Bsa</i> I
A2-R	TTTGGTCTCACCATGTGGCAGTTACCTTCCGG	<i>Bsa</i> I
A3-F	TTTGGTCTCATGGTCTGGAGGAGGCGCAAC	<i>Bsa</i> I
A3-R	TTTGGTCTCACCATGATGTCTCTCCCGGTGGT	<i>Bsa</i> I
A4-F	TTTGGTCTCATGGTGCAGAAGCTGGAAGTTTTGG	<i>Bsa</i> I
A4-R	TTTGGTCTCACCATCGTTAAACCTGCTTCCTTGTAC	<i>Bsa</i> I
A5-F	TTTGGTCTCATGGTTCGAACGTTGTCTAGAGAAGATTTA	<i>Bsa</i> I
A5-R	TTTGGTCTCACCATCTTCCGTTCCCTTCTCTCT	<i>Bsa</i> I
A6-F	TTTGGTCTCATGGTCTAAAAACGATTTATAGCGAAATTTAG	<i>Bsa</i> I
A6-R	TTTGGTCTCACCATTCCTGACCCCTTGG	<i>Bsa</i> I
Pgro-F	TTTGGTCTCATGGT CGCTGTATATAACCTGCGTACG	<i>Bsa</i> I
Pgro-R	TTTGGTCTCACTT GAGAAAAATTTGTGTGTGCC	<i>Bsa</i> I

工作由苏州金唯智公司完成。

1.2 方法

1.2.1 启动子探测载体的构建：为了使用 Golden Gate 无缝克隆方法，首先要将 pXMJ19 质粒上的干扰性 *Bsa* I 酶切位点 GGTCTC 突变为 GGTCAC。以 pXMJ19 为模板，p19-MUT-F、p19-MUT-R 为引物扩增突变后的线性质粒。反应体系为：10×Buffer 5 μL、dNTPs(各 2.5 mmol/L) 4 μL、上下游引物各 (0.2 μmol/L) 1 μL、Q5 DNA 聚合酶(2 U/μL) 0.5 μL、模板 1 μL，加水至 50 μL。PCR 扩增条件为：98 °C 3 min；98 °C 15 s，72 °C 3.25 min，30 个循环；72 °C 2 min。产物用 *Dpn* I 37 °C 酶切处理 2 h 后直接转化到 *E. coli* DH5α 中，得到正确突变的质粒命名为 p19-mut。

使用 *Eco*R V 和 *Hind* III 对质粒 p19-mut 进行双酶切，去掉质粒中的 *lacI* 和 *tac* 启动子片段。使用引物 p19-0-F、p19-0-R 将两片段中间的骨架部分用

PCR 克隆出来，并在下游引物中加入 T7 终止子，得到的质粒为 p19-0。

使用引物 dBsaI-E-F 和 dBsaI-E-R 将报告基因 *egfp* 从本实验室另一含此基因序列的质粒 pMD19-T-EGFP 中克隆出来，在其 N 端加入两个反向 *Bsa* I 酶切位点 (TGAGACCAAAAAATTTTT TGGTCTCA)。使用 *Hind* III、*Bam*H I 对所克隆的 *egfp* 基因片段和质粒 p19-0 同时进行双酶切，并且用 T4 连接酶将两者连接，得到谷氨酸棒杆菌探测载体 p19-A0。构建过程见图 2。

1.2.2 启动子的筛选和插入：本课题组前期实验得到了 *C. glutamicum* BZH001 在 0、30%和 50%溶氧条件下发酵培养至稳定期的样品 RNA-Seq 测序结果(GenBank 登录号：GSE77502)，将在 30 °C 下搅拌速度为 400 r/min、通气速率为 3 L/min 的条件定义为 100%溶氧条件。从这些数据中先筛选出溶氧对转录水平影响较小的基因，将筛选范围限制在

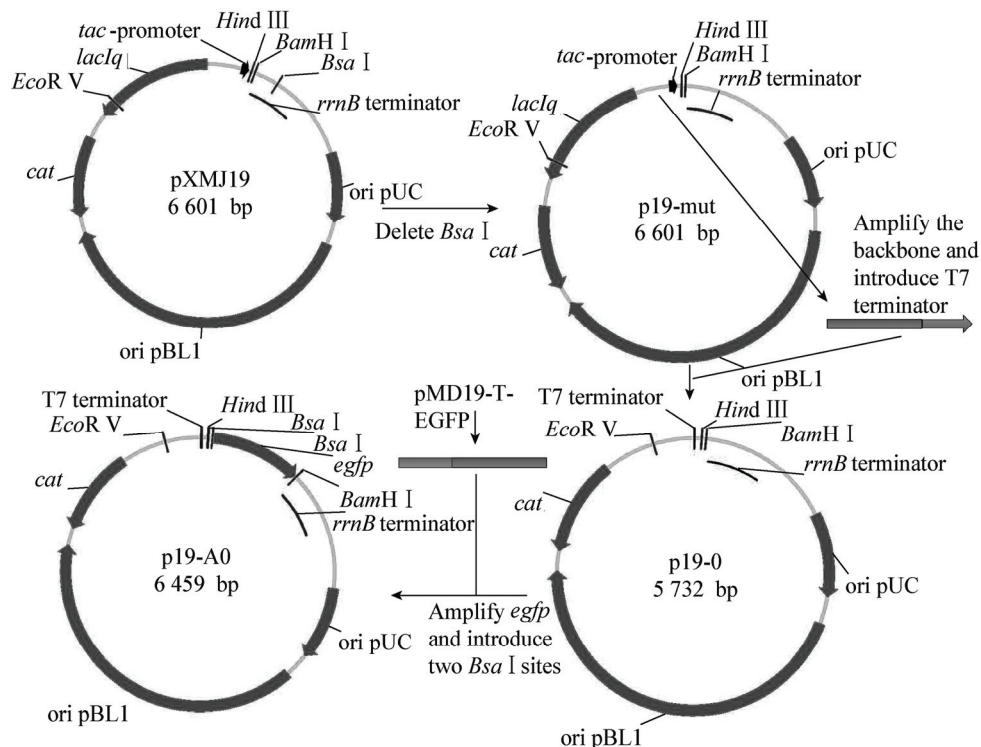


图 2 p19-A0 载体构建过程
Figure 2 Construction of p19-A0

$V_{\text{oxygen}} = \left| \log_{10} \frac{\text{FPKM}_{\text{高溶氧}}}{\text{FPKM}_{\text{低溶氧}}} \right| < 0.15$ 这一范围内。再从中筛选出转录水平较高的基因, 转录丰度以 FPKM (Fragments per kilobase of exon permillion fragments mapped) 表示。对每个筛选到的基因开放阅读框上游 300 bp 内的序列进行启动子预测, 使用软件 http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html^[15], 选取启动子预测分数在 0.7 分以上的基因。预测的启动子上游延伸 60 bp, 下游延伸至 ATG 之前, 整体作为表达元件, 从而保留启动子上游潜在的 UP 序列和下游 RBS 序列。其整体认为是能够有效启动基因表达的功能性片段, 同时以谷氨酸棒杆菌 *Pgro* 强表达元件作为阳性对照^[5]。根据 NCBI 数据库中 *C. glutamicum* ATCC 13032 (GenBank 登录号: NC_003450) 基因组数据设计引物, 并且在上下游引物都加上 *Bsa* I 酶切位点。以 *C. glutamicum* BZH001 基因组为模板, 扩增出这 7 个片段。PCR 扩增条件为: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 30 个循环; 72 °C 2 min, 反应体系同上。所得片段经过 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 用 *Bsa* I 内切酶酶切, 胶回收功能元件片段, 并且分别连接到同样用 *Bsa* I 酶切得到的 p19-A0 载体上。得到含 7 种不同表达功能元件的 *egfp* 表达质粒。

1.2.3 谷氨酸棒杆菌基因操作: 谷氨酸棒杆菌的质粒转化使用电击热击转化法^[16]。谷氨酸棒杆菌基因组的提取使用天根生化科技有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

1.2.4 表达元件强度的测定: 将阳性谷氨酸棒杆菌接种于 BHI 培养基中, 使用 24 孔深孔培养板, 30 °C、230 r/min 培养过夜, 转接于 BHI 固体培养基, 同时分别按 1% 接种量接种于另一含 BHI 培养基的 24 孔培养板中, 相同条件下培养 24 h。

固体培养基平板使用 Dark Reader 观察荧光效果。高通量培养板中的细胞样品, 收集后用 PBS 缓冲液洗 2 次, 重悬并将 OD_{600} 调到 0.5 左右, 使用多功能酶标仪 Synergy H4 测定荧光强度。激发波长为 488 nm, 发射波长为 507 nm^[17]。以含有 p19-0

质粒的谷氨酸棒杆菌作为空白对照。比较不同功能元件的表达效果。

2 结果与分析

2.1 表达元件探测载体的构建

2.1.1 原质粒 pXMJ19 上 *Bsa* I 酶切位点的突变: 使用超保真酶扩增得到的产物, 经过 *Dpn* I 酶消化模板后, 转化 *E. coli* DH5 α , 挑取转化子, 提取质粒测序, 选出正确突变掉 *Bsa* I 酶切位点并且质粒其他部分没有突变的转化子。

2.1.2 p19-0 的构建: 将 PCR 扩增得到的含 T7 终止子的骨架片段连入质粒 p19-mut 中, 所得 *E. coli* DH5 α 转化子提取质粒, 酶切验证, 经过 *Eco*R V 和 *Hind* III 双酶切, 得到 318 bp 和 5 414 bp 两个片段, 酶切结果见图 3, 表明重组质粒 p19-0 构建成功。

2.1.3 表达元件探测载体 p19-A0 的构建: 将 PCR 扩增得到 N 端含两个反向 *Bsa* I 酶切位点的报告基因 *egfp* 片段连入质粒 p19-0 中, 所得转化子提取质粒, 经过 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切, 得到 758 bp 和 5 701 bp 两个片段, 酶切结果见图 4, 表明表达元件探测载体 p19-A0 构建成功。

2.2 谷氨酸棒杆菌表达功能片段的插入

2.2.1 表达元件筛选结果: 通过对谷氨酸棒杆菌在

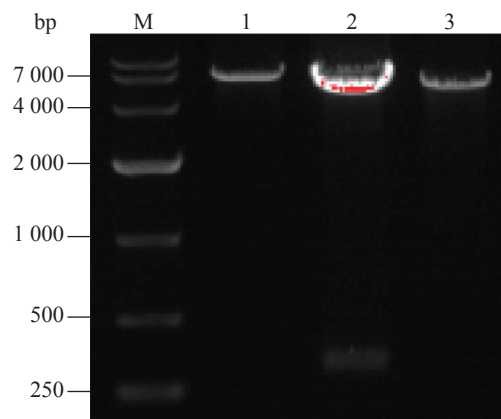


图 3 p19-0 质粒酶切鉴定

Figure 3 Identification of restriction enzyme digestion of p19-0

Note: M: DL10000 marker; 1: pXMJ19/*Hind* III; 2: p19-0/*Eco*R V and *Hind* III; 3: p19-0/*Hind* III.

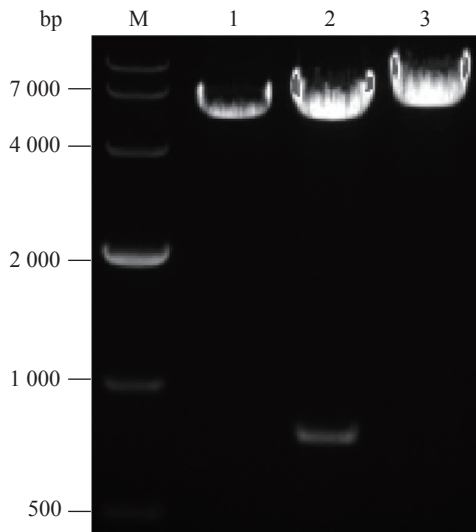


图4 p19-A0 质粒酶切验证

Figure 4 Identification of restriction enzyme digestion of p19-A0

Note: M: DL10000 marker; 1: p19-0/*Hind* III; 2: p19-A0/*Hind* III and *Bam* H I; 3: p19-A0/*Hind* III.

3种溶氧水平下3个平行测定得到的数据进行分析, 筛选出 *tuf*、*rpsM*、*NCgl2088*、*rplK*、*NCgl1855*、*NCgl2493* 这6个满足条件的基因, 随后使用 BDGP Neural Network Promoter Prediction, V2.2 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 进行预测, 筛选结果见表2。

为使筛选的元件能够有效启动基因的表达, 保留原基因的5'UTR部分, 每个基因的启动子及其5'UTR部分构成可以启动基因表达的功能元件, 在本研究中被称为表达元件。

2.2.2 表达元件的克隆: 使用片段 A1–A6 和 *Pgro* 分别对应的引物 F、R 将这7个表达元件克隆出来。得到的 A1–A6 和 *Pgro* 片段大小分别为 231、287、377、352、220、221、197 bp。电泳分析结果如图5所示。将功能表达片段和质粒 p19-A0 分别用 *Bsa* I 酶切、胶回收纯化后, 片段和载体上的 *Bsa* I 识别序列会被去掉, 从而使表达元件序列与报告基因 *egfp* 序列随后直接相连, 得到表达质粒 p19-A1、A2、A3、A4、A5、A6、*Pgro*。经测序挑选出构建正确的转化子。提取质粒再转化到 *C. glutamicum* BZH001 中, 筛选出阳性转化子。

2.2.3 表达元件强度分析: 以含有质粒 p19-A0 的谷氨酸棒杆菌转化子作为阴性对照菌, 连同7种插入不同表达元件的工程菌在 BHI 固体培养基中培养后的荧光效果见图6。

在24孔深孔培养板中培养24h后, 菌液统一稀释8倍, 酶标仪所测 OD_{600} 在 0.504–0.588 之间, 差别较小, 说明使用这6个筛选得到的内源性表达元件片段表达 EGFP 不会对菌体生长产生明显的抑制。通过不同表达元件片段插入后报告基因 *egfp* 表达水平的比较, 测定这些可以启动基因表达的功能性片段的效果见图7。PBS 重悬菌液经破碎后 SDS-PAGE 结果见图8, 与空白对照 p19-A0 菌的条带对比, 检测到在 25 kD 和 35 kD 之间有一条 27 kD 大小的条带。

结合图7和图8可以看出, 单位菌浓度下不同表达元件具有不同的启动表达的效果。A1 表达元

表2 筛选得到的稳定高转录水平基因

Table 2 Genes stabilizing in high level of transcription screened from RNA-seq data

Gene ID	基因名称 Name of genes	产物 Product	平均 FPKM Average FPKM	V_{oxygen}	启动子预测评分 Promoter score	截取片段命名 Name of element parts
NCgl0480	<i>tuf</i>	Elongation factor Tu	20 536.7	0.085	1.00	A1
NCgl0537	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	7 802.3	0.080	0.72	A2
NCgl2088	<i>NCgl2088</i>	Hypothetical protein	6 523.2	0.143	0.99	A3
NCgl0459	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	4 016.1	0.105	0.75	A4
NCgl1855	<i>NCgl1855</i>	LexA repressor	2 474.5	0.150	0.97	A5
NCgl2493	<i>NCgl2493</i>	Hypothetical protein	2 242.9	0.099	0.98	A6

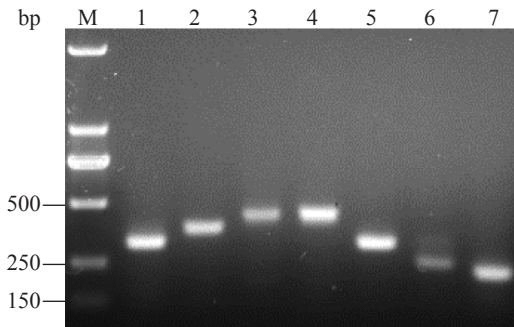
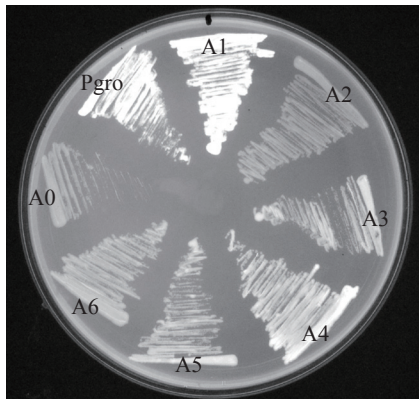
图 5 A1-A6 和 *Pgro* 的 PCR 产物Figure 5 PCR products of A1-A6 and *Pgro*Note: M: DL2000 marker; 1-6: A1-A6; 7: *Pgro*.

图 6 谷氨酸棒杆菌中各表达元件启动 EGFP 表达的荧光效果检测

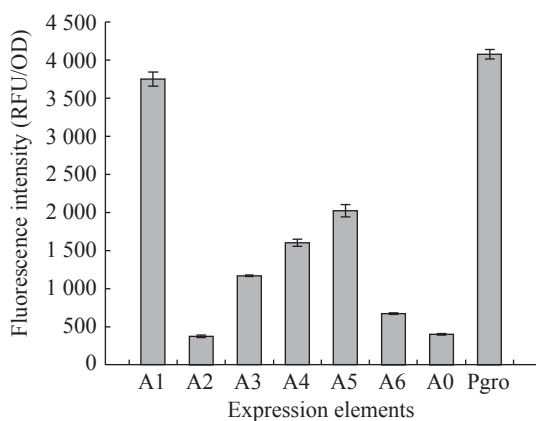
Figure 6 Fluorescence of EGFP promoted by different expression elements in *C. glutamicum*

图 7 谷氨酸棒杆菌中各表达元件启动 EGFP 表达的荧光强度检测

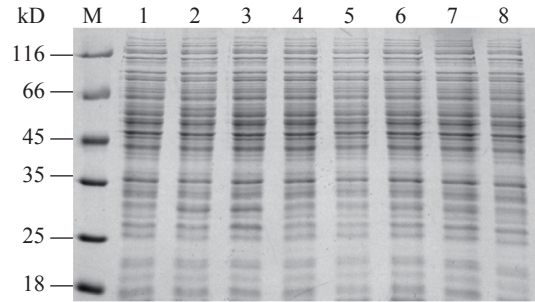
Figure 7 Fluorescence intensities of EGFP promoted by different expression elements in *C. glutamicum*

图 8 转化子及空白对照胞内可溶性蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 8 SDS-PAGE of soluble protein from *C. glutamicum* transformants and negative control注: M: 蛋白质 marker; 1: 阴性对照 p19-A0; 2: 阳性对照 p19-*Pgro*; 3-8: p19-A1-p19-A6.Note: M: Protein marker; 1: Negative control p19-A0; 2: Positive control p19-*Pgro*; 3-8: p19-A1-p19-A6.

件效果较高, 接近强启动子 *Pgro*。A5 也有一定的启动表达的活性。结果表明从谷氨酸棒杆菌基因组中获取到了有效的功能表达序列。表达元件 A2 没有表现出启动表达的效果, 其他片段启动表达的效果由高到低排列为 *Pgro*>A1>A5>A4>A3>A6。

3 讨论

为了进一步提高谷氨酸棒杆菌氨基酸/有机酸等物质的产量、构建新产品生产途径, 需要人工改造和构建代谢通路, 协调通路中各个调控蛋白的作用浓度。因此, 需要开发更多有效的表达元件才能满足逐渐精细和高效化的工程改造。

本研究构建了谷氨酸棒杆菌表达元件探测载体, 用于筛选包含启动子和 RBS 在内的具有完整启动蛋白表达功能的序列片段。在表达元件插入位点之前引入 T7 终止子, 可以防止 RNA 聚合酶转录通读, 同时, 潜在的 mRNA 在 T7 终止子处也会截断, 避免了融合蛋白的产生, 不需要加入 3 个不同阅读框的终止密码子(例如 *taactaactaa*)^[18], 简化了传统探测载体的序列结构。该谷氨酸棒杆菌表达元件探测载体 p19-A0, 大小为 6 459 bp, 采用谷氨酸棒杆菌经典的 pBL1 复制子。使用 Golden Gate 克隆方法设置表达元件插入位点, 实现无缝连接, 使表达元件效果得到了更好的评估。

应用这一探测载体, 结合启动子预测软件, 评估了 6 个表达元件的效果。其中 5 个片段能够启动 *egfp* 表达, 最好的表达元件 A3 效果接近已报道的强表达元件 *Pgro*。这 5 个表达元件在探测载体上的测试效果与原转录组数据中的转录水平 FPKM 值并不对应, 因为基因的表达还受到密码子、mRNA 和蛋白质稳定性、mRNA 的二级结构等多方面的影响^[9,19-20], 所以将内源基因换成报告基因 *egfp* 之后, mRNA 的结构、稳定性等可能发生明显改变, 对蛋白的表达水平产生影响。这也表明, 高效的表达元件不一定要从最高转录水平的基因中获得。A2 片段未检测到启动表达的效果, 可能是上述原因所致, 也可能是操纵子结构造成了假阳性启动子的预测。筛选得到的其他 5 个表达元件, 即使受到各种因素的影响, 依旧显示出一定的效果。说明截取高转录水平基因的表达元件, 并以 *egfp* 作为报告基因的探测载体进行效果评估是一种快速有效的方法。本研究增加了谷氨酸棒杆菌基因操作可选择的元件, 并且提供了一种筛选不同效果表达元件的方法, 今后可以用于谷氨酸棒杆菌基因组中功能基因表达强度的调节, 应对更加复杂的代谢改造方式和人工生物系统。

参 考 文 献

- [1] Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K, et al. Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 358-366
- [2] Liu L, Yang HQ, Shin HD, et al. Recent advances in recombinant protein expression by *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, and *Streptomyces*: from transcription and translation regulation to secretion pathway selection[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(22): 9597-9608
- [3] Huan XJ, Li K, Shi F, et al. Overexpression of *Corynebacterium glutamicum* NAD kinase improves L-isoleucine biosynthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28(9): 1038-1047 (in Chinese)
还晓静, 李坤, 史锋, 等. 谷氨酸棒杆菌 NAD 激酶的过表达对 L-异亮氨酸合成的促进作用[J]. 生物工程学报, 2012, 28(9): 1038-1047
- [4] Lai SJ, Zhang Y, Liu SW, et al. Metabolic engineering and flux analysis of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production[J]. Science China Life Sciences, 2012, 42(4): 295-303 (in Chinese)
来书娟, 张芸, 刘树文, 等. 产 L-丝氨酸谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造和代谢流分析[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(4): 295-303
- [5] Yang L, Xu JL, Chen XY, et al. Effects of promoter modification on xylose isomerase gene *xyIA* expression in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Advances in New and 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[J]. 新能源进展, 2014, 2(5): 353-357
- [6] Liu XX, Yang YK, Zhang W, et al. Expression of recombinant protein using *Corynebacterium glutamicum*: progress, challenges and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2015. DOI:10.3109/07388551.2015.1004519
- [7] Yim SS, An SJ, Kang M, et al. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(11): 2959-2969
- [8] Yim SS, An SJ, Choi JW, et al. High-level secretory production of recombinant single-chain variable fragment (scFv) in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(1): 273-284
- [9] Rytter JV, Helmark S, Chen J, et al. Synthetic promoter libraries for *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(6): 2617-2623
- [10] Koffas MAG, Jung GY, Stephanopoulos G. Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression[J]. Metabolic Engineering, 2003, 5(1): 32-41
- [11] Jakoby M, Ngouoto-Nkili CE, Burkovski A. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors[J]. Biotechnology Techniques, 1999, 13(6): 437-441
- [12] Nakayama H, Shimamoto N. Modern and simple construction of plasmid: saving time and cost[J]. Journal of Microbiology, 2014, 52(11): 891-897
- [13] Zhu DW, Zhong X, Tan R, et al. High-throughput cloning of human liver complete open reading frames using homologous recombination in *Escherichia coli*[J]. Analytical Biochemistry, 2010, 397(2): 162-167
- [14] Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability[J]. PLoS One, 2008, 3(11): e3647
- [15] Liu GM, Zhao Z, Zhang YZ, et al. Cloning and analysis of promoter-active fragments from *Corynebacterium glutamicum* 10147[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(7): 972-977 (in Chinese)
刘桂明, 赵智, 张英姿, 等. 谷氨酸棒杆菌 10147 基因组中启动子活性片段的克隆与分析[J]. 微生物学报, 2009, 49(7): 972-977
- [16] van der Rest ME, Lange C, Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(4): 541-545
- [17] Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins[J]. Nature Methods, 2005, 2(12): 905-909
- [18] Xu DQ, Tan YZ, Li Y, et al. Construction of a novel promoter-probe vector and its application for screening strong promoter for *Brevibacterium flavum* metabolic engineering[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(4): 961-968
- [19] Mutalik VK, Guimaraes JC, Cambay G, et al. Quantitative estimation of activity and quality for collections of functional genetic elements[J]. Nature Methods, 2013, 10(4): 347-353
- [20] Jacobs E, Mills JD, Janitz M. The role of RNA structure in posttranscriptional regulation of gene expression[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2012, 39(10): 535-543