



## 高效 Rubisco 羧化活性筛选体系的设计与构建

王斐<sup>1,2</sup> 张君丽<sup>2,3</sup> 赵春华<sup>2,3</sup> 蔡真<sup>3</sup> 张晓黎<sup>\*1</sup> 柳国霞<sup>\*3</sup> 李寅<sup>3</sup>

1 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室 中国科学院烟台海岸带研究所 山东 烟台 264003

2 中国科学院大学 北京 100049

3 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室 微生物资源前期开发国家重点实验室 中国科学院微生物研究所 北京 100101

**摘要:**【背景】广泛存在于植物、藻类及其他自养微生物中的核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(Rubisco)是卡尔文循环中固定 CO<sub>2</sub> 的关键酶及限速酶,在生物质合成和全球碳循环中扮演着重要角色。鉴于 Rubisco 的重要性以及极低的固碳羧化活性,对 Rubisco 的筛选进化研究具有重要意义。【目的】构建一种适用于筛选高效 Rubisco 羧化活性的筛选体系。【方法】分析现有筛选体系对 Rubisco 羧化活性筛选压力缺失的原因,设计构建适用于高效 Rubisco 羧化活性的筛选体系,以 BWLac 产乳酸菌株为宿主,在含有 5% CO<sub>2</sub> 的 N<sub>2</sub> 环境下厌氧培养,比较不同羧化活性 Rubisco 对细胞生长的影响,通过 HPLC 及 LCMS 检测总乳酸及固定 CO<sub>2</sub> 生成乳酸的产量评估筛选体系。【结果】通过终端代谢产物乳酸产生下拉力,以及甘油代谢产生的剩余还原力需要平衡消耗掉的设计靶点,增强 Prk 和 Rubisco 的固碳支路代谢通量,加强 RuBP 对细胞的毒性抑制作用,使细胞生长与 Rubisco 活性有效偶联,构建高通量筛选办法。在新构建的筛选体系中,Rubisco 失活突变体 BWLac/197 不能生长,Rubisco 和 Prk 双失活突变体 BWLac/197-2021 生长未受影响,菌落大小约 1.58 cm。粗酶液羧化活性相差 2 倍以上的 RBC1 和 7002,其细胞生长在筛选条件下受不同程度抑制,菌落大小分别有 1.06 cm 和 0.65 cm。通过检测乳酸产量及甘油消耗量对筛选体系验证评估,RBC1 消耗甘油 1.39 g/L,产乳酸 2.82 g/L,其中来自于 NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub> 的标记乳酸含量为 18.05 μmol/L,比 7002 的相应检测结果高 1.3–1.6 倍,检测结果与筛选体系设计原理相符,即乳酸产量越高,甘油消耗越多,Rubisco 羧化活性越高,细胞生长得越好。【结论】成功设计构建了高效 Rubisco 羧化活性筛选体系,为进化或探索更高羧化活性 Rubisco 提供有效的高通量筛选办法。

**关键词:** 核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶,羧化活性,乳酸,CO<sub>2</sub> 固定,筛选体系

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (21506245)

**\*Corresponding authors:** ZHANG Xiao-Li: Tel: 86-535-2109181; E-mail: xlzhang@yic.ac.cn  
LIU Guo-Xia: Tel: 86-10-64807351; E-mail: liuguoxia@im.ac.cn

**Received:** 19-11-2019; **Accepted:** 23-11-2019; **Published online:** 27-03-2020

**基金项目:** 国家自然科学基金(21506245)

**\*通信作者:** 张晓黎: Tel: 0535-2109181; E-mail: xlzhang@yic.ac.cn

柳国霞: Tel: 010-64807351; E-mail: liuguoxia@im.ac.cn

**收稿日期:** 2019-11-19; **接受日期:** 2019-11-23; **网络首发日期:** 2020-03-27

## Design and construction of an efficient selection system for Rubisco's carboxylation

WANG Fei<sup>1,2</sup> ZHANG Jun-Li<sup>2,3</sup> ZHAO Chun-Hua<sup>2,3</sup> CAI Zhen<sup>3</sup> ZHANG Xiao-Li<sup>\*1</sup>  
LIU Guo-Xia<sup>\*3</sup> LI Yin<sup>3</sup>

1 Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China

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

3 CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Background] Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) is a key enzyme and the rate-limiting enzyme of CO<sub>2</sub> fixation in the Calvin cycle, and widespread in plants, algae and other autotrophic microorganisms, playing an important role in biomass synthesis and the global carbon cycle. In view of the importance and the extremely low carbon-fixation activity of Rubisco, it is of great significance to study the selection evolution of Rubisco. [Objective] This study aims to construct a selection system suitable for screening efficient Rubisco carboxylation. [Methods] The reason of the absence of selection pressure on Rubisco carboxylation in the existing system was analyzed, then the new selection system applicable for high efficiency Rubisco carboxylation was designed and constructed. The lactate-producing strain BWLac was used as the host, the growth of Rubisco expression strains with different carboxylation activities were compared under the anaerobic culture containing 5% CO<sub>2</sub>, HPLC and LCMS were used to detect total lactic acid production and the yield of lactic acid from fixed CO<sub>2</sub> for the evaluation of new constructed selection system. [Results] The design principle was considered to base on the pull-down force generated by the terminal metabolite lactic acid and the balance of the residual NADH generated by glycerol metabolism. These two parts could enhance the metabolic flux of the carbon-fixing branch of Prk and Rubisco, which could strengthen the inhibition of the toxicity of RuBP, coupling cell growth effectively with Rubisco activity to construct a high-throughput screening approach. In the newly constructed selection system, the Rubisco inactivated mutant BWLac/197 could not grow, while the growth of Rubisco and Prk double inactivated mutant BWLac/197-2021 was not affected with the colony size was about 1.58 cm. RBC1 and 7002, which carboxylation activities were detected to be more than 2 times different, the cell growth was inhibited to varying degrees under the screening conditions, and the colony size was 1.06 cm and 0.65 cm, respectively. The lactic acid production and glycerol consumption were also tested to evaluate the effectiveness of the selection system. RBC1 consumed 1.39 g/L of glycerol, produced 2.82 g/L of lactic acid, and labeled lactic acid content of 18.05 μmol/L, which was 1.3–1.6 times higher than the corresponding test result of 7002. The detection results were consistent with the design principle of the selection system, the higher the lactic acid production, the more glycerol consumption, the higher the Rubisco carboxylation, the better the cells grow. [Conclusion] An efficient selection system for Rubisco carboxylation was successfully designed and constructed to provide an effective high-throughput screening method for the evolution or exploration of Rubisco with higher carboxylation activity.

**Keywords:** Rubisco, Carboxylation, Lactate, CO<sub>2</sub> fixation, Selection system

核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco, EC 4.1.1.39)是 Calvin 循环中固定 CO<sub>2</sub> 的关键酶,既可以催化 1,5-二磷酸核酮糖(RuBP)与 CO<sub>2</sub> 发生羧化反应,生成 3-磷酸甘油酸(3-PGA),又能催化 RuBP

与 O<sub>2</sub> 发生氧化反应,生成 3-PGA 和二磷酸乙醇酸(2-PG)。由于 Calvin 循环是自然界中绝大多数自养生物固定 CO<sub>2</sub> 合成有机物的基础,而 Rubisco 作为 Calvin 循环中第一步反应的催化剂,直接将无机 CO<sub>2</sub> 转变为有机碳水化合物,因而在生物质合成和

全球碳循环中扮演着重要角色<sup>[1-2]</sup>。

Rubisco 也是 Calvin 循环中固定 CO<sub>2</sub> 的限速酶, 这主要体现在两个方面: 一是对 CO<sub>2</sub> 的催化效率低, Rubisco 对 CO<sub>2</sub> 的转化数  $k_{cat}$  约为 1–13 s<sup>-1</sup>, 即每秒只能催化几个 CO<sub>2</sub> 分子, 只有多数常见酶的百分之一到千分之一<sup>[3]</sup>; 二是对 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 的选择性低, 除了 CO<sub>2</sub> 以外, 空气中大量存在的 O<sub>2</sub> 也是 Rubisco 的底物, 而 Rubisco 对 CO<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 的选择性  $S_{C/O}$  仅为 1–240, 其中  $S_{C/O}$  定义为 Rubisco 对 CO<sub>2</sub> 的催化效率( $k_{cat}/K_m$ )除以其对 O<sub>2</sub> 的催化效率<sup>[4]</sup>, 如此低的选择性使得大量 O<sub>2</sub> 占据了 Rubisco 的活性中心, 对 CO<sub>2</sub> 产生竞争性抑制, 阻碍 Rubisco 发生羧化反应固定 CO<sub>2</sub>。

鉴于 Rubisco 生物固碳的重要作用以及极低的催化能力, 探索发现未知 Rubisco 的固碳能力或是对已有 Rubisco 做分子改造, 提高 Rubisco 对 CO<sub>2</sub> 的催化效率具有重要意义。由于 Rubisco 的活性中心高度保守且催化活性复杂, 现有的关于理性设计或是定向进化的研究报道中, 多数突变都导致 Rubisco 的活性下降<sup>[5-7]</sup>或者对 CO<sub>2</sub> 选择性下降<sup>[6,8-9]</sup>, 或是 Rubisco 对 CO<sub>2</sub> 的催化能力提高有限<sup>[10-17]</sup>。通过定向进化对 Rubisco 分子进行改造获得了相对较好的结果, 古菌 *Methanococcoides burtonii* 的 Rubisco 对 CO<sub>2</sub> 催化效率从 10.5 μmol/s 提高到 15.1 μmol/s, 选择性  $S_{C/O}$  从 1.3 提高到 1.5<sup>[16]</sup>, 对 CO<sub>2</sub> 催化效率和选择性同时提高, 然而提高程度有限。因此, 设计适用于羧化活性更高的高效筛选体系, 探索发现或进化新的未知 Rubisco, 提高其对 CO<sub>2</sub> 催化能力, 是长期以来备受关注且需要解决的研究热点之一。

本研究分析了现有筛选体系的缺点和不足, 基于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 设计一种新的 Rubisco 筛选体系, 通过增强 Rubisco 固碳支路代谢通量, 加强细胞生长与 Rubisco 羧化活性的有效偶联, 构建高效 Rubisco 羧化活性筛选体系。通过该筛选体系的设计构建, 为筛选或探索发现 Rubisco

羧化活性显著提高的酶分子元件提供简单快捷的操作办法, 有助于进一步提高光合生物中生物质合成的效率, 为生物固碳实现 CO<sub>2</sub> 减排的研究提供有价值的固碳元件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

使用的质粒和菌株见表 1。如没有特殊要求, 菌株培养使用 LB 培养基和 M9 培养基<sup>[15]</sup>。

### 1.2 Rubisco 在 *E. coli* 中的诱导表达

*E. coli* BL21(DE3) 或者 BWLac 作为宿主用于 Rubisco 的表达, 于 LB/Kan 抗性液体培养基 (50 μg/mL 卡那霉素) 37 °C、200 r/min 下培养过夜, 次日以 1% 接种量接种于新鲜 LB/Kan 液体培养基中 37 °C、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  约为 0.6–0.8, 添加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.05 mmol/L, 转移至 22 °C 培养 6 h, 用于诱导表达 Rubisco。

### 1.3 筛选培养条件

#### 1.3.1 现有筛选体系的培养条件

BL21(DE3) 宿主表达 Rubisco197、197-2021、7002、RBC1 的菌株, 划线于 0.4% (质量体积比) 木糖、50 μg/mL 卡那霉素、0.05% (质量体积比) 酪蛋白水解物、0.02 mmol/L IPTG 的 M9 平板上, 于 5% (体积比) CO<sub>2</sub> 密闭环境 (其他气体成分与大气相同) 中, 置于 25 °C 培养。

#### 1.3.2 新构建筛选体系的培养条件

BWLac 宿主表达 Rubisco197、197-2021、7002、RBC1 的菌株, 划线或涂布于 0.5% (质量体积比) 木糖、0.613% (质量体积比) 甘油、50 μg/mL 卡那霉素、0.05% (质量体积比) 酪蛋白水解物、0.02 mmol/L IPTG 的 M9 平板上, 于 5% (体积比) CO<sub>2</sub> 的密闭厌氧环境中, 即 5% CO<sub>2</sub> 和 95% N<sub>2</sub>, 置于 25 °C 培养。

### 1.4 粗酶活检测

常温条件下 12 000 r/min 离心 1 min 后, 收集  $OD_{600}$  为 10 的诱导表达细胞, 用 1 mL Rubisco 活性检测缓冲液重悬 (100 mmol/L HEPES, pH 8.0,

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

名称 Name	说明 Description	来源 Source
质粒 Plasmids		
pET30a-T7-trc-rbc7002-trp-prk (7002)	PT7/trc-Rubisco from <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002, Ptrp-prk from <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	[15]
pET30a-T7-trc-rbc197-trp-prk (197)	Rubisco 7002 RbcL K197M 失活突变体	[15]
pET30a-T7-trc-rbc197-trp-prk2021 (197-2021)	Inactivated mutant Rubisco 7002 RbcL K197M RbcL K197M, Prk2021 双失活突变体	[15]
pET30a-T7-trc-rbc1-trp-prk (RBC1)	Double inactivated mutant with RbcL K197M and Prk2021 PT7/trc-Rbc1, RBC1 来源于环境微生物	本研究
	PT7/trc-Rbc1, RBC1 from environmental microorganisms	This work
菌株 Strains		
BL21(DE3)	$F^-$ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <i>rBB^-mB^-</i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> ( <i>DE3</i> )	Novagen
BWLac	BW25113 $\Delta$ <i>frdABCD</i> $\Delta$ <i>pflB::ldhA</i> 产乳酸菌株	实验室保存
BWLac/pET30a-T7-trc-rbc7002-trp-prk	Lactate producing strain BW25113 $\Delta$ <i>frdABCD</i> $\Delta$ <i>pflB::ldhA</i> BWLac 宿主表达 Prk 和 Rbc 7002	Stored in our lab 本研究
BWLac/pET30a-T7-trc-rbc197-trp-prk	Prk and Rbc 7002 expression in BWLac	This work
BWLac/pET30a-T7-trc-rbc197-trp-prk2021	BWLac 宿主表达 Prk 和 Rbc 197 失活突变体 Prk and inactivated mutant Rbc 197 expression in BWLac	本研究 This work
BWLac/pET30a-T7-trc-rbc1-trp-prk	BWLac 宿主表达 Prk2021 和 Rbc 197 双失活突变体 Double inactivated mutant Prk2021 and Rbc7002 expression in BWLac	本研究 This work
	BWLac 宿主表达 Prk 和 Rbc1 Prk and Rbc1 expression in BWLac	本研究 This work

20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA), 于 200 W 超声破碎(3 s, 共 40 次), 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min 后取上清, 粗酶液于厌氧箱中冰浴除氧。

以下操作均在厌氧箱中完成: 添加 NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub> 使其终浓度为 100 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 冰浴 30 min 用于 Rubisco 激活; 取一定体积激活的 Rubisco 粗酶液与活性检测缓冲液互混, 添加底物 RuBP 起始反应, 使其终浓度为 0.5 mmol/L, 反应 5 min 后用 1 mol/L HCl 终止反应, 孵育 2 min 后用 1 mol/L NaOH 中和反应体系。

### 1.5 HPLC 分析

Agilent 1200 HPLC 系统, 配备 RID 示差折光检测器。色谱柱为 Aminex HPX-87 H 有机酸分析柱(7.8×300 mm), 柱温 55 °C, 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液, 流速 0.6 mL/min, 进样体积为 10 μL。使用上述方法设置 Agilent 12000 APLC 系统检测木糖、甘

油和乳酸的含量检测, 每组试验样品重复 3 次以上。

### 1.6 <sup>13</sup>C 标记代谢产物的 LCMS 检测

#### 1.6.1 <sup>13</sup>C 标记 3-PGA 检测分析

使用 Agilent 6460 LC-MS/MS 系统, 选用色谱柱 Agilent XDC18 (5 μmol/L, 150×4.6 mm), 多重反应监测模型 MRM 进行检测。Di-n-488 butylammonium acetate (DBAA) 作为挥发性离子对试剂, 用于阴离子检测条件下的 3-PGA 离子化。柱温 40 °C, 流动相 A 为 5 mmol/L DBAA 水溶液, 流动相 B 为 5 mmol/L DBAA 甲醇溶液, 流速 0.6 mL/min, 进样体积 50 μL, 质谱检测器气体温度 350 °C。每组试验样品重复 3 次以上。

#### 1.6.2 <sup>13</sup>C 标记乳酸检测分析

使用高效液相色谱-三重四级杆复合线性离子阱质谱 QTRAP 6500 LC-MS/MS 系统, 多重反应监测模型 MRM 进行检测。选用色谱柱 HyperREZ XP 有机酸柱(100×7.7 mm), 柱温 40 °C, 流速 0.4 mL/min, 去离子水洗脱 10 min。

进样体积 10  $\mu\text{L}$ , 质谱检测器温度 550  $^{\circ}\text{C}$ , 检测电压 4 500 V。每组试验样品重复 3 次以上。

## 2 结果与分析

### 2.1 现有 Rubisco 羧化活性筛选体系的原理及缺点

现有筛选体系的筛选原理基于 RuBP 对细胞的毒性抑制作用, 其基本原理是在 *E. coli* 中共表达磷酸核酮糖激酶 (phosphoribulokinase, Prk) 和 Rubisco, Prk 将胞内磷酸戊糖途径的中间产物 5-磷酸核酮糖(Ru5P)转化为 RuBP, 通过 RuBP 的细胞毒性抑制菌落生长, 将 Rubisco 活性与细胞生长耦联, 形成筛选压力(图 1A), RuBP 被 Rubisco 羧化/氧化为糖酵解途径中的 3-PGA, 从而解除细胞毒性使其恢复生长, 表现为 Rubisco 代谢 RuBP 能力越强, 细胞生长得越好<sup>[11,13]</sup>。然而, 对于具有更高羧化活性的 Rubisco BL21(DE3)/RBC1, 其粗酶液羧化活性为 0.20 U/mL (图 1B), 在现有筛选条件下, 对比粗酶液 Rubisco 羧化活性仅为 0.06 U/mL 的 BL21(DE3)/7002 (图 1B), RBC1 的羧化活性约是 7002 的 3 倍, 但是在筛选平板上的菌株划线生长没有明显差异(图 1C)。由此发现, 现有筛选体系通过细胞的生长情况不能有效区别羧化活性差

异明显的 Rubisco, 推测可能是由于 Prk 和 Rubisco 代谢支路通量不足, RuBP 毒性对细胞生长抑制不明显, 不能通过细胞生长表征不同羧化活性的 Rubisco。因此, 现有筛选体系不适用于高通量筛选羧化活性明显提高的 Rubisco 酶分子元件, 需要针对 Rubisco 的羧化固碳能力设计构建能够有效且高通量筛选出高活性 Rubisco 的新筛选体系。

### 2.2 高效 Rubisco 羧化活性筛选体系的设计

针对 2.1 节中现有筛选体系不能筛选获得羧化活性更高的 Rubisco 酶分子元件的问题, 希望通过增加 Prk 和 Rubisco 的固碳支路代谢通量, 提高 RuBP 细胞毒性的抑制作用, 放大 Rubisco 羧化活性差异在细胞生长方面的体现。为此, 从两个方面考虑设计如何增强 Rubisco 的固碳代谢通量, 设计原理示意图如图 2 所示。一是以乳酸终端代谢产物形成下拉力, 为 Rubisco 羧化活性固定的  $\text{CO}_2$  找到终端出口, 设计强化丙酮酸到乳酸终端代谢产物的代谢路径, 阻断丙酮酸到乙酰 CoA 的甲酸裂解酶 PflB 活性, 以及丙酮酸到琥珀酸的琥珀酸脱氢酶 Frd 活性, 使乳酸成为细胞在厌氧条件下丙酮酸代谢的主要代谢终产物, 通过乳酸的代谢生成

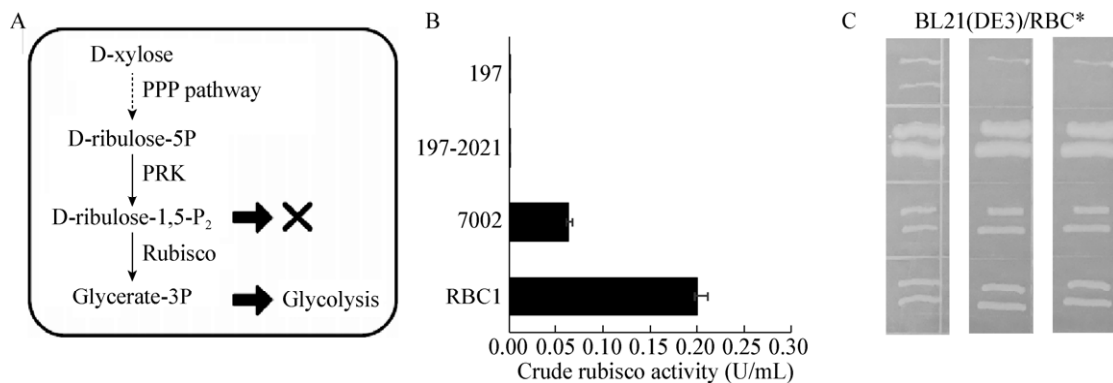


图 1 现有筛选体系中不同羧化活性 Rubisco 的平板生长情况

Figure 1 Growth of strains containing Rubisco with different carboxylation activities on the original activity-directed selection plates

注: A: 现有筛选体系的原理示意图<sup>[15]</sup>; B: BL21(DE3)宿主中表达 Rubisco 的粗酶液活性; C: 筛选平板的生长情况。

Note: A: Original activity-directed selection rationale; B: Crude Rubisco activity in BL21(DE3) host; C: Growth of strains on selected plates.

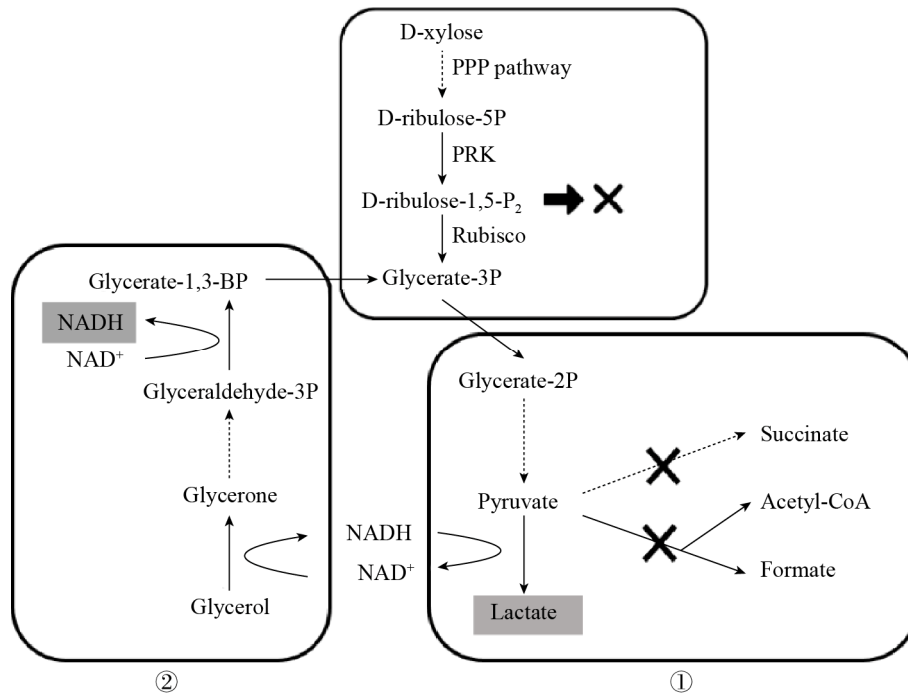
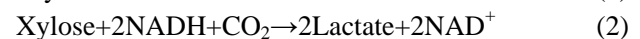


图2 高效 Rubisco 羧化活性筛选体系设计原理图  
Figure 2 Selection rationale of high efficiency carboxylation

持续拉动 Prk 和 Rubisco 固碳支路；二是依据甘油代谢产乳酸剩余还原力 NADH 的特征，见反应式(1)，设计通过 Prk 和 Rubisco 支路代谢利用木糖，固定 CO<sub>2</sub> 生成乳酸，如反应式(2)所示，消耗甘油代谢产乳酸剩余的 NADH，从而平衡胞内还原力，也就是说，通过甘油代谢产乳酸的过剩还原力，增强 Prk 和 Rubisco 固碳支路代谢通量(图2)。

通过以上两方面的设计增强 Prk 和 Rubisco 的固碳支路代谢通量，Rubisco 固定 CO<sub>2</sub> 的反应式(3)即为 1 分子木糖与 2 分子甘油共利用，固定 1 分子 CO<sub>2</sub> 生成 4 分子乳酸，同时生成 2 分子 ATP，还原力平衡，细胞能够正常生长。理论上，甘油的消耗利用越多，生成的 NADH 越多，木糖通过 Rubisco 固定 CO<sub>2</sub> 代谢支路生成乳酸的通量越大，Prk 产 RuBP 越多，对细胞生长抑制越强，需要代谢利用 RuBP 能力更强的 Rubisco 来解除抑制，细胞生长越好，Rubisco 固定 CO<sub>2</sub> 的羧化活性越高，同时乳酸产量越高。新设计的高效 Rubisco 羧化活性筛选体系，不仅可以使 Rubisco 羧化活性与细胞

生长有效耦联构成筛选压力，同时乳酸产量与 Rubisco 羧化活性也呈正相关变化，可通过乳酸产量对初筛的 Rubisco 酶分子做复筛验证工作，相对于同位素标记 NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub> 的 Rubisco 羧化活性测定，操作简单、经济快捷。



### 2.3 高效 Rubisco 羧化活性筛选体系的构建

依照以上设计原理，以 BW25113  $\Delta\text{frdABCD}\Delta\text{pflB}::\text{ldhA}$  产乳酸菌株 BWLac 为宿主，使用 pET 质粒构建 Prk 和 Rubisco 固碳支路，以终端产物乳酸为下拉力，同时甘油为共利用碳源，生成乳酸产生剩余还原力，增强 Rubisco 固碳支路的代谢流量，放大 RuBP 细胞毒性的抑制效果，构建新的能够实现高效筛选 Rubisco 羧化活性的筛选体系。

Prk 和 Rubisco 固碳支路中的磷酸核酮糖激酶 Prk 来源于 *Synechococcus* sp. PCC7942，由于其代

谢产物 RuBP 对细胞生长有毒性抑制作用, Prk 的编码基因由 *trp* 启动子阻遏调控, 即有色氨酸存在的情况下, Prk 表达受抑制, 而在 M9 培养基中可以正常表达生产 RuBP, 从而抑制细胞生长, 形成筛选压力。不同来源的 Rubisco 或是 Rubisco 突变体的编码基因均由 T7 和 *trc* 双启动子调控, 在 BL21(DE3)和 BWLac 宿主中均可以由 IPTG 诱导表达, 羧化反应代谢 RuBP, 减缓或解除细胞抑制现象, 固定 CO<sub>2</sub>生成 3-PGA, 最终生成终端代谢产物乳酸。

本研究构建了 BWLac/RBC\*系列菌株, 其中 RBC7002 的 Rubisco 来源于蓝细菌 *Synechococcus* sp. PCC7002, RBC1 的 Rubisco 来源于其他环境微生物, 二者的羧化活性在 BWLac 宿主中的粗酶活性分别为 0.04 U/mL 和 0.15 U/mL, RBC1 和 7002 的 Rubisco 粗酶活性仍保持 3 倍以上差异(图 3)。此外, 设计 Rubisco 失活突变体 197, Rubisco 和 Prk 双失活突变体 197-2021 为对照菌株, 用于评价筛选体系是否有效。Rubisco 失活突变体 197 即 RBC7002 的大亚基 RbcL 存有 K197M 突变, 此位点突变阻碍了 Mg<sup>2+</sup>的结合激活而使 Rubisco 失活<sup>[18]</sup>。Rubisco 和 Prk 双失活突变体 197-2021 是在 RBC 失活的基础上, 共表达 Prk2021 突变体, 即 K20M 和 S21A, 两个与 ATP 结合密切相关位点的突变<sup>[19]</sup>, 致使 Prk 无活性。BWLac/197 和 BWLac/197-2021 的粗酶液中都检测不到 Rubisco 活性(图 3)。

将以上构建的 Prk 和 RBC\*共表达质粒转化涂布在方法 1.3.2 的筛选平板上, 于 5% CO<sub>2</sub>的 N<sub>2</sub> 环境下厌氧培养, 比较含有不同羧化活性 Rubisco 菌株的菌落生长大小, 依据以上筛选原理, 菌落生长越大, Rubisco 羧化活性越强。

#### 2.4 高效 Rubisco 羧化活性筛选体系的验证

依据以上设计构建的筛选体系, 筛选平板上 Rubisco 失活突变体 197 不能生长, Prk 和 Rubisco 双失活突变体 197-2021 生长状态良好, 基本不受

影响, 菌落直径大小约 1.58 cm, RBC1 和 7002 的划线和单菌落生长均受到不同程度的抑制, 其中 7002 生长受严重抑制, 菌落直径大小仅有 0.65 cm, 而 RBC1 的生长受抑制程度不明显, 单菌落直径大小可达 1.06 cm (图 4B)。因此, 该筛选体系通过限定条件下的细胞生长菌落大小, 成功表征了 Rubisco 的不同羧化活性, 尤其对 7002 的生长抑制较强, 即使 RBC1 的羧化活性比 7002 高 3 倍以上, RBC1 的生长在此筛选体系中同样呈现出一定程度的抑制效果, 推测可能因为乳酸终端产物的下拉力, 以及消耗甘油代谢产生的剩余还原力, Prk 和 Rubisco 固碳支路的代谢通量增强, 代谢生成的 RuBP 更多, 细胞生长受抑制程度加剧(图 4A 和 4B), 通过菌落生长大小能够有效区分羧化活性显著不同的 Rubisco 酶分子元件。

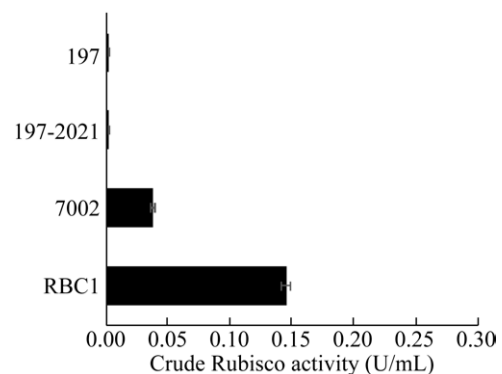


图 3 BWLac 宿主中表达 Rubisco 的粗酶液活性  
Figure 3 Crude Rubisco activity in BWLac host

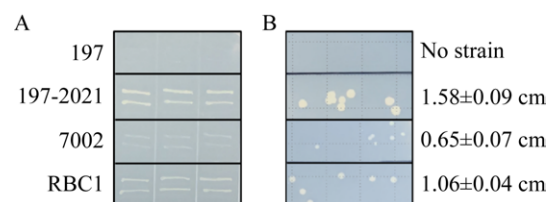


图 4 高效羧化活性筛选体系 Rubisco 平板生长情况  
Figure 4 Growth of strains containing Rubisco with different carboxylation activities on the high efficiency carboxylation directed selection plates



为了验证以上推测是否正确,分析检测了 BWLac/RBC\*系列菌株的乳酸产量以及来自于标记  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  的乳酸含量。BWLac/RBC\*采用先诱导表达 Rubisco 再乳酸发酵的二阶段培养法,在 LB 培养基中诱导表达 6 h 后,离心收集菌体,用添加有 5 g/L 木糖、6.13 g/L 甘油、100 mmol/L HEPES 和 100 mmol/L  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  的 M9 培养基复混,置于 37 °C 厌氧培养 72 h。取培养液上清,用于乳酸产量的对比分析。

Rubisco 的羧化活性越高,乳酸产量越高,其中来自于标记  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  的乳酸也越多(图 5)。羧化活性更高的 RBC1,乳酸产量为 2.82 g/L,高于 7002 的 2.16 g/L(图 6A),RBC1 中  $^{13}\text{C}$  标记乳酸含量也高于 7002,分别为 18.05  $\mu\text{mol/L}$  和 13.46  $\mu\text{mol/L}$ (图 6B)。此外,相对于 7002,RBC1 消耗了更多的甘油,即 1.39 g/L,7002 的甘油消耗仅 0.92 g/L(图 6A)。由此可见,乳酸产量和甘油消耗的实际检测情况与构建筛选体系的设计原理相符,乳酸产量越高,甘油消耗越多,Rubisco 的羧化活性越高,总之,本研究中新构建的筛选体系适用于高效筛选 Rubisco 羧化活性更高的酶分子元件。

### 3 讨论与结论

设计选择合适的筛选压力,实现高通量筛选是酶分子定向进化的重要研究内容。本研究针对 Rubisco 羧化活性设计的高效筛选体系,解决了现有筛选体系中 Prk 和 Rubisco 固碳支路代谢通量不足及 RuBP 抑制细胞生长不明显的问题,引入了终端代谢产物乳酸和甘油代谢剩余还原力的两个设计靶点,通过生成乳酸的下拉力和消耗平衡过剩的 NADH,增强了 Prk 和 Rubisco 固碳支路代谢通量,强化了 RuBP 对细胞生长的抑制效果,通过 Rubisco 的羧化反应解除 RuBP 抑制毒性。迄今为止,已报道研究的 Rubisco 酶分子中,蓝细菌来源的 Rubisco 其羧化活性较高,*Synechococcus* sp. PCC7002 对  $\text{CO}_2$  的转化数  $k_{\text{cat}}$  为 13.4  $\text{s}^{-1}$ ,对  $\text{CO}_2$

和  $\text{O}_2$  的选择性  $S_{\text{C/O}}$  为 52<sup>[20]</sup>,尽管  $k_{\text{cat}}$  很高,Rubisco 7002 在新构建的筛选体系中生长受到了明显抑制,也就是说,本研究中的筛选体系为具有更高羧化活性的 Rubisco 提供了更广泛的筛选空间。

本研究构建的筛选体系不仅适用于高通量筛选 Rubisco 的初筛工作,还可以用乳酸产量复核初筛的 Rubisco 酶分子或是突变文库的突变体,相较于 Rubisco 羧化活性的碳同位素检测方法操作更加简便快捷,普通实验室的 HPLC 乳酸检测即可评估验证初筛结果。

本研究中应用的 Prk 来源于 *Synechococcus* sp. PCC7942,比活 230.9  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein})$ <sup>[21]</sup>,而 7002 的 Rubisco 比活仅有 0.91  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein})$ <sup>[15]</sup>,因此,筛选体系中用 trp 弱启动子调控 Prk 表达,Rubisco 选择 T7 和 trc 强启动子诱导表达,以弥补二者酶学性质之间的差距,SDS-PAGE 结果显示 Prk 条带不可见。以此筛选体系为基础,可进一步构建突变文库提高 Rubisco 羧化活性,通过提高 Prk 表达量优化筛选体系,从而提高 RuBP 的胞内积累浓度,加强筛选压力。事实上,当 Prk 的表达使用 Lac 启动子时,7002 的 Rubisco 在筛选平板上不能生长(结果未展示),推测 RuBP 积累过多,7002 的 Rubisco “解毒”能力较弱,致使细胞不能生长。所以,本研究构建的筛选体系其筛选压力具有可调整优化的潜力,可以用于筛选 Rubisco 羧化活性提高数十倍甚至更高活性的酶分子元件,减轻 Rubisco 在 Calvin 循环中固定  $\text{CO}_2$  的限速影响。

通过细胞生长的菌落大小来表征 Rubisco 羧化活性的高通量筛选方法,筛选获得的酶分子是总活性的提高,不能区别可溶性表达的提高和比酶活提高的差异,这也是所有酶分子定向进化筛选突变体的共性问题。此前已有报道,关于来源于 *Synechococcus* sp. PCC6301 的 Rubisco 进化,获得了大亚基 RbcL F345I 突变株,其可溶性提高了



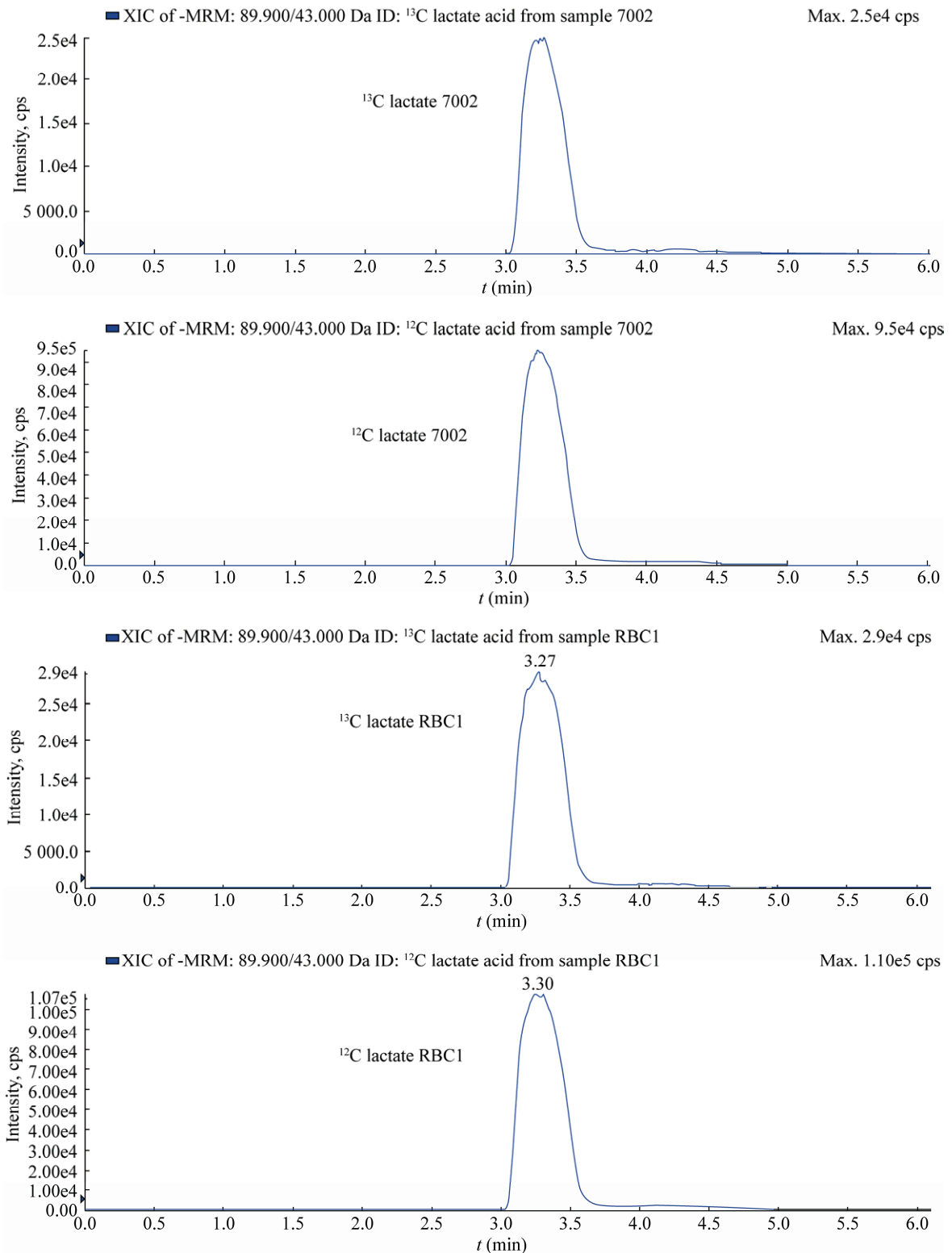


图 5 BWLac/7002 和 BWLac/RBC1 中乳酸的 LCMS 检测结果

Figure 5 LCMS results of lactate from BWLac/7002 and BWLac/RBC1

Note: cps: Counts per second.

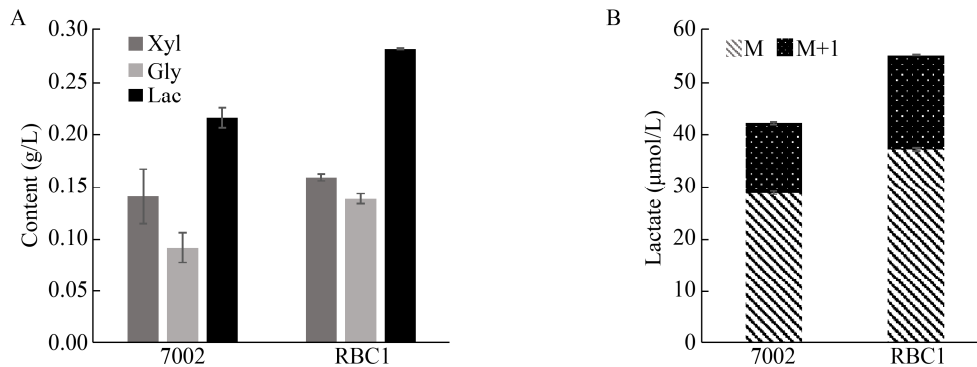


图6 不同羧化活性 Rubisco 的产乳酸能力评价

Figure 6 Lactate production capacity of Rubisco with different carboxylation activities

注: A: 木糖(Xyl)和甘油(Gly)消耗量, 以及乳酸(Lac)产量; B: LCMS 的乳酸检测结果. M 为未标记乳酸, M+1 为  $^{13}\text{C}$  标记乳酸.

Note: A: Consumption of xylose (Xyl) and glycerol (Gly), production of lactate (Lac); B: Lactate titer by LCMS. M means unlabeled lactate, M+1 means  $^{13}\text{C}$  labeled lactate.

近7倍, 而羧化作用的催化效率降低了17%<sup>[14]</sup>。为了尽可能避免筛选到可溶性表达的 Rubisco, 本研究中应用 22 °C 低温诱导表达 Rubisco, 以及 25 °C 的平板筛选培养温度, 目的是尽可能减少 Rubisco 诱导表达过程中形成不可溶包涵体, 从而降低筛选到 Rubisco 可溶性表达提高的可能性。

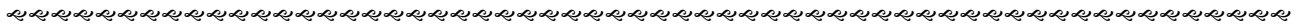
本研究成功设计构建了高效 Rubisco 羧化活性筛选体系, 为进化或探索更高羧化活性 Rubisco 提供了有效的高通量筛选办法。

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所付颖老师、中国科学院生物物理研究所谢振声老师对液相质谱检测工作的帮助。

## REFERENCES

- [1] Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, et al. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components[J]. *Science*, 1998, 281(5374): 237-240
- [2] Mann CC. Genetic engineers aim to soup up crop photosynthesis[J]. *Science*, 1999, 283(5400): 314-316
- [3] Tcherkez GGB, Farquhar GD, Andrews TJ. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(19): 7246-7251
- [4] Jordan DB, Ogren WL. Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase[J]. *Nature*, 1981, 291(5815): 513-515
- [5] Hartman FC, Harpel MR. Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1994, 63: 197-232
- [6] Spreitzer RJ, Salvucci ME. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, 53: 449-475
- [7] Li LA, Tabita FR. Maximum activity of recombinant ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of *Anabaena* sp. strain CA requires the product of the *rbcX* gene[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(11): 3793-3796
- [8] Lee GJ, McDonald KA, McFadden BA. Leucine 332 influences the  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  specificity factor of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Anacystis nidulans*[J]. *Protein Science*, 1993, 2(7): 1147-1154
- [9] Gutteridge S, Rhoades DF, Herrmann C. Site-specific mutations in a loop region of the C-terminal domain of the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase that influence substrate partitioning[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(11): 7818-7824
- [10] Smith SA, Tabita FR. Positive and negative selection of mutant forms of prokaryotic (cyanobacterial) ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 331(3): 557-569
- [11] Parikh MR, Greene DN, Woods KK, et al. Directed evolution of Rubisco hypermorphs through genetic selection in engineered *E. coli*[J]. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2006, 19(3): 113-119
- [12] Greene DN, Whitney SM, Matsumura I. Artificially evolved *Synechococcus* PCC6301 Rubisco variants exhibit improvements in folding and catalytic efficiency[J]. *Biochemical Journal*, 2007, 404(3): 517-524
- [13] Mueller-Cajar O, Morell M, Whitney SM. Directed

- evolution of Rubisco in *Escherichia coli* reveals a specificity-determining hydrogen bond in the form II enzyme[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(49): 14067-14074
- [14] Mueller-Cajar O, Whitney SM. Directing the evolution of Rubisco and Rubisco activase: first impressions of a new tool for photosynthesis research[J]. *Photosynthesis Research*, 2008, 98(1-3): 667-675
- [15] Cai Z, Liu GX, Zhang JL, et al. Development of an activity-directed selection system enabled significant improvement of the carboxylation efficiency of Rubisco[J]. *Protein & Cell*, 2014, 5(7): 552-562
- [16] Wilson RH, Alonso H, Whitney SM. Evolving *Methanococcoides burtonii* archaeal Rubisco for improved photosynthesis and plant growth[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 22284
- [17] Satagopan S, Huenig KA, Tabita FR. Selection of cyanobacterial (*Synechococcus* sp. Strain PCC 6301) Rubisco variants with improved functional properties that confer enhanced CO<sub>2</sub>-dependent growth of *Rhodobacter capsulatus*, a photosynthetic bacterium[J]. *mBio*, 2019, 10(4): e01537-19
- [18] Cleland WW, Andrews TJ, Gutteridge S, et al. Mechanism of Rubisco: the carbamate as general base[J]. *Chemical Reviews*, 1998, 98(2): 549-562
- [19] Higgins CF, Hiles ID, Salmond GPC, et al. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria[J]. *Nature*, 1986, 323(6087): 448-450
- [20] Andrews TJ, Lorimer GH. Catalytic properties of a hybrid between cyanobacterial large subunits and higher plant small subunits of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(8): 4632-4636
- [21] Kobayashi D, Tamoi M, Iwaki T, et al. Molecular characterization and redox regulation of phosphoribulokinase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2003, 44(3): 269-276



## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目，是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教學类栏目，也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教學栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟，一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表论文的平台，同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表，是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告，特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线，撰写的稿件内容必须要有新意、要实用，不是泛泛地叙述教学设计与过程，而是确实有感而发，是教学工作中的创新体会，或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性，做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教學思路应与时俱进，注意将国内外新的科技成果和教學理念贯穿到教學之中，只有这样才能真正起到教与学的互动，促进高校生物学教學的发展，更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时，为了给全国生物学领域的教學工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台，本栏目还开辟了“名课讲堂”版块，邀约相关生命科学领域，如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教學名师、知名科学家就教學和学生培养发表观点，推荐在教學改革、教學研究、引进先进教學手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文，为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台，促进高校教學和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！