

## 研究报告

# 大肠杆菌色氨酸生物合成途径关键酶的调控研究

于金龙<sup>1</sup>, 王静<sup>2</sup>, 李剑欣<sup>1</sup>, 郭长江<sup>4</sup>, 黄英武<sup>3</sup>, 徐琪寿<sup>1</sup>

1 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

2 河南中医学院基础医学院, 郑州 450008

3 中国人民解放军 306 医院中心实验室, 北京 100101

4 军事医学科学院卫生学与环境医学研究所, 天津 300050

**摘要:** 为了通过基因工程手段提高大肠杆菌色氨酸产量, 对色氨酸生物合成途径中的关键基因 *trpR*、*tnaA*、*aroG* 和 *trpED* 进行了改造。首先通过敲除 *trpR* 基因解除了基因组上色氨酸合成和转运关键酶受到的反馈阻遏调控, 进而又敲除了 *tnaA* 基因, 阻断了色氨酸的分解代谢。然后, 将色氨酸合成途径的关键酶 *aroG*fbr 和 *trpED*fbr 基因串联表达, 以去除色氨酸生物合成途径的瓶颈。与对照 MG1655 相比, *trpR* 基因单敲菌色氨酸浓度提高了 10 倍, 双敲菌色氨酸浓度提高了约 20 倍。pZE12-*trpED*fbr 转入双敲菌后色氨酸浓度提高到 168 mg/L, 而将 *aroG*fbr 和 *trpED*fbr 转入双敲菌后, 色氨酸浓度提高到 820 mg/L。为构建色氨酸高产菌奠定了基础。

**关键词:** *aroG* 和 *trpED* 共表达, *trpR* 和 *tnaA* 双敲除, 色氨酸

## Regulation of Key Enzymes in Tryptophan Biosynthesis Pathway in *Escherichia coli*

Jinlong Yu<sup>1</sup>, Jing Wang<sup>2</sup>, Jianxin Li<sup>1</sup>, Changjiang Guo<sup>4</sup>, Yingwu Huang<sup>3</sup>, and Qishou Xu<sup>1</sup>

1 Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China

2 School of Basic Medicine, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

3 The Centre for Experimental Medicine, 306 Hospital, Beijing 100101, China

4 Institute of Hygiene & Environmental Medicine, Academy of Military Medical Science, Tianjin 300050, China

**Abstract:** To improve tryptophan production in *Escherichia coli*, key genes in the tryptophan biosynthesis pathway -*aroG*, *trpED*, *trpR* and *tnaA* were manipulated. *TrpR* gene was knocked out to eliminate the repression on the key genes controlling tryptophan biosynthesis and transportation on bacteria chromosome, and the tryptophan degradation was blocked by *tnaA* gene knockout. Then the bottleneck in tryptophan biosynthesis pathway was removed by co-expressing *aroG*<sup>fbr</sup> gene and *trpED*<sup>fbr</sup> gene. Compared with the MG1655, the tryptophan production of *trpR* knockout and double-genes knockout strains was improved 10-folds and about 20-folds, respectively. After the *trpED*<sup>fbr</sup> was expressed, the tryptophan production increased to 168 mg/L, and when the *aroG*<sup>fbr</sup> and *trpED*<sup>fbr</sup> were co-expressed, the tryptophan production increased to 820 mg/L. This work laid the foundation for further construction of higher-efficient engineered strain for tryptophan production.

**Keywords:** *aroG*<sup>fbr</sup> and *trpED*<sup>fbr</sup>, co-expression, *trpR* and *tnaA* double knockout, tryptophan production

**Received:** September 19, 2007; **Accepted:** November 7, 2007

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 30300010).

**Corresponding author:** Yingwu Huang and Qishou Xu. Tel: +86-10-64839884; E-mail: yjlsy2002@yahoo.com.cn

国家自然科学基金(No. 30300010)资助。

在大肠杆菌中心代谢途径之后,色氨酸生物合成途径主要包括共同途径和分支途径两个部分<sup>[1,2]</sup>,共同途径从 3-脱氧-2-阿拉伯庚酮糖-7-磷酸(DAHP)经莽草酸生成分支酸(CHA),分支途径由分支酸经邻氨基苯甲酸生成色氨酸。共同途径中,DAHP 合成酶(DS)催化 4-磷酸赤藓糖(E4P)和磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)缩合生成 DAHP 的反应是莽草酸途径的限速步骤<sup>[2]</sup>,酶的合成受到转录水平的调控。DS 有三种同工酶,分别由 *aroG*、*aroF* 和 *aroH* 编码,酶的活性则分别受 phe、tyr、trp 反馈抑制。分支途径中,*trpE*、*trpD* 编码的邻氨基苯甲酸合成酶(AS)是色氨酸生物合成的关键酶<sup>[3]</sup>,酶的合成受转录阻遏调控,酶的活性受反馈抑制调控。大肠杆菌中,对关键酶基因的表达进行转录阻遏调控是由 *trpR* 蛋白实施的<sup>[4]</sup>,与色氨酸结合后,*trpR* 蛋白转录阻遏 *aroH*、色氨酸操纵子和 *mtr* 基因。在 *TnaA* 编码的色氨酸酶(tryptophanase)的作用下,色氨酸被分解为吲哚(indole)(图 1)。为了提高色氨酸产量,本实验首先敲除了 *trpR* 基因,去除了基因组上色氨酸合成及转运关键酶受到的反馈阻遏调控,然后又进一步敲除了 *tnaA* 基因,阻断了色氨酸分解代谢,经过这些改造后,工程菌色氨酸产量有了不同程度的提高。在此基础上,通过对抗反馈抑制的 *aroG* 基因和 *trpED* 基因在中拷贝质粒上串联表达,进一步去除色氨酸合成途径中的瓶颈,工程菌色氨酸产量进一步增加,为构建色氨酸高产奠定了基础。



图 1 大肠杆菌色氨酸生物合成通路及其调控  
Fig. 1 The tryptophan biosynthesis pathway and its regulation in *E. coli*

The DS and AS are key enzymes in tryptophan biosynthesis pathway, trpR protein represses DS and AS, and tnaA product degrades the tryptophan

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

菌株、质粒见表 1, 实验引物见表 2。

## 1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶 *Nhe* I、*Pst* I、*Nde* I、*Xba* I、*Kpn* I、DL2000 marker、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、均购自 TaKaRa 公司；PCR 产物回收试剂盒、质粒

DNA 提取试剂盒均购自天根公司。

### 1.3 基因敲除

噬菌体 Red 重组系统可以催化具有同源侧翼序列的线性 DNA 片段与细菌染色体的靶基因进行同源重组(图 2)。利用噬菌体 Red 重组系统敲除基因之前需设计特异引物<sup>[5]</sup>, 引物 5' 端与被敲除基因同源, 3' 端与抗性基因同源, PCR 扩增抗性基因后, 抗性基因的两翼各含有与染色体靶基因两翼同源的序列 40~60 bp。在 pKD46 表达的 Red 重组酶作用下, 线性片段两翼同源序列与染色体靶基因发生同源重组, 结果染色体上基因被抗性基因替换。接着 pCP20 表达的 FLP 重组酶识别抗性基因两端的 FRT 位点, 从而将抗性基因从染色体上切割下来, 实现基因敲除。

### 1.3.1 *trpR* 基因敲除

设计引物 H1 和 H2, 引物 5' 端 36 bp 与待敲除的靶基因同源, 3' 端 20 bp 与 pKD3 上的 cat 同源, 中间序列为 FRT 位点。以 H1 和 H2 为引物, PCR 扩增 pKD3 质粒。设计 overlap PCR 引物: N1 和 N2, 然后以 PCR 产物的 100 倍稀释液为模板, 以 N1 和 N2 为

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Strains and plasmids

Strains and plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>Escherichia coli</i> MG 1655	recipient strain	our lab
MG $\Delta$ R	<i>trpR</i> knocked out	this work
MG $\Delta$ RT	<i>trpR tnaA</i> double knocked out	this work
BWR1	<i>lacR</i> integrated into genome	our lab
MG $\Delta$ R-R	<i>trpR</i> knocked out; <i>lacR</i> integrated into genome	this work
MG $\Delta$ RT-R	<i>trpR tnaA</i> double knocked out; <i>lacR</i> integrated into genome	this work
Plasmids		
pZE12	Ap <sup>r</sup>	our lab
pET22b- <i>tnaA5'</i> - <i>kan<sup>r</sup></i> - <i>tnaA3'</i>	Ap <sup>r</sup>	our lab
pZE12- <i>aroG</i> <sup><i>ibr</i></sup>	Ap <sup>r</sup>	our lab
pZE12- <i>trpED</i> <sup><i>ibr</i></sup>	Ap <sup>r</sup>	our lab
pZE12- <i>trpED</i> <sup><i>ibr</i></sup> - <i>aroG</i> <sup><i>ibr</i></sup>	Ap <sup>r</sup>	this work
pKD3	Cm <sup>r</sup>	our lab
pCP20	Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	our lab
pKD46	Ap <sup>r</sup>	our lab

表 2 实验引物  
Table 2 Primers used in this study

Code	Primer sequence	Target gene
H1	5'-TATTCAGCAGCGATGGCAGAACAGCGTCACCAGGAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'	
H2	5'-ACCTCTTCCAGCCACTGGCGCAGCTCGACGGGCGCGCATATGAATA-3'	
N1	5'-TAACAATGGCGACATATTATGGCCCAACAATCACCTATTTCAGCAGCGATGGCAGA-3'	<i>trpR</i> knock out
N2	5'-TTATCAGGCCTACAAAATCAATCGCTTTTCAGCAACACCTCTCCAGCCACTGGCG-3'	<i>trpR</i> knock out
V1	5'-GCCCAACAATCACCT-3'	verify <i>trpR</i> knock out mutants
V2	5'-CGTTTCATAATGCCGT-3'	verify <i>trpR</i> knock out mutants
tnaP1	5'-CCGCTCGAGTCTGAGTGTAAATAATGTAGCC-3'	<i>tnaA</i> knock out fragments
tnaP2	5'-ACATGCATGCGAGGATATAGAGAACGAAGG-3'	<i>tnaA</i> knock out fragments
tnaT1	5'-CCCTTGATTTGCCCTTCT-3'	verify <i>tnaA</i> knock out mutants
tnaT2	5'-GCTATAACCATAACACCC-3'	verify <i>tnaA</i> knock out mutants
12GF	5'-CTCAGAAATTGTGAGCGGATAAC-3'	pZE12- <i>aroG</i> <sup>fbr</sup>
12GR	5'-GTGAAGACGAAAGGGCCTCG-3'	pZE12- <i>aroG</i> <sup>fbr</sup>
21ptf	5'-CGCGCTAGCCGAGAATTGTGAGCGGATAAC-3'	P <sub>LlacO-1</sub> - <i>trpED</i> <sup>fbr</sup> -T1
21ptr	5'-GCGAGATCTGGTCTAGGGCGCGGATTG-3'	P <sub>LlacO-1</sub> - <i>trpED</i> <sup>fbr</sup> -T1

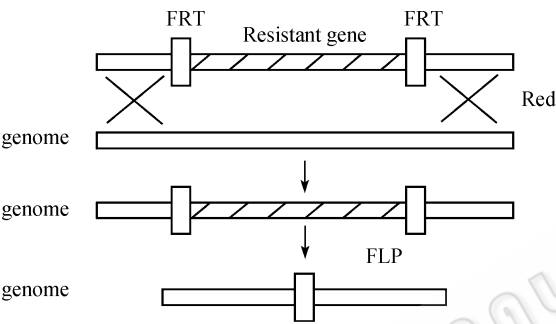


图 2 基因敲除示意图  
Fig. 2 Gene knockout strategy

引物进行第二轮 PCR 扩增，得到 *trpR* 基因敲除线性片段，第二轮 PCR 扩增一方面减少了电转片段中的 pKD3，减少了假阳性，另一方面将 PCR 产物两端的同源序列延长到 60 bp，提高了敲除效率。将电转仪调到 2.5 kV，25  $\mu$ F，脉冲控制器调到 200  $\Omega$ ，将线性片段电转入大肠杆菌培养过夜，待单克隆长出后，以 V1 和 V2 为引物，菌落 PCR 鉴定基因敲除菌，筛选得到的阳性菌划线 42 $^{\circ}$ C 培养，丢失 pKD46。经多次传代并鉴定的阳性菌落进行下一步实验。将 pCP20 转入细菌，30 $^{\circ}$ C 培养至长出菌落，43 $^{\circ}$ C 划线，pCP20 和抗性基因同时丢失。用鉴定引物 V1 和 V2 再次进行菌落 PCR 鉴定，将筛选得到的阳性菌落经多次传代进行下一步实验。

1.3.2 *tnaA* 基因敲除

我们实验室已将 *tnaA* 基因 5' 端 420 bp 片段与

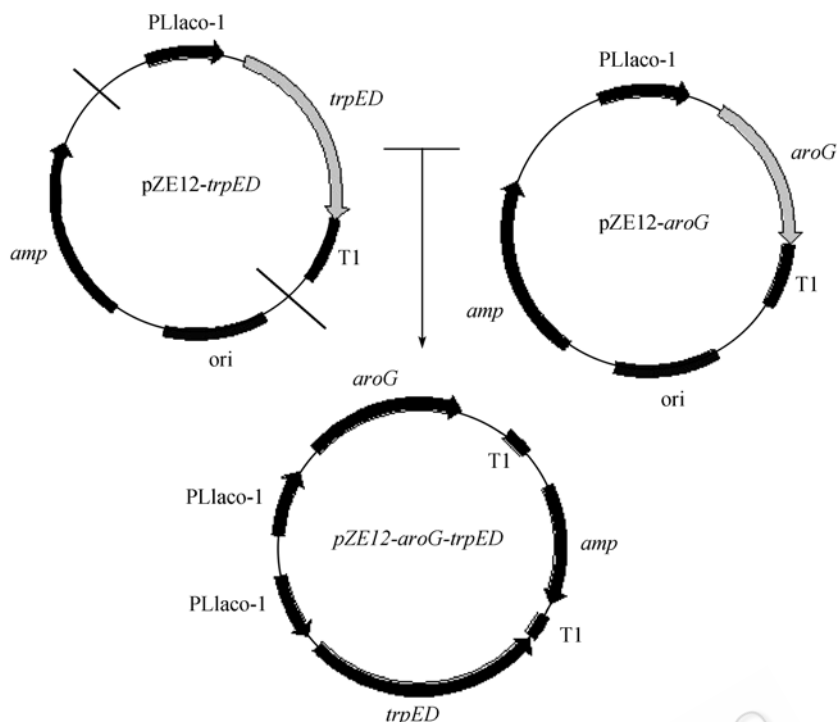
*kan<sup>r</sup>* 以及 *tnaA* 基因 3' 端 480 bp 片段串联后连接到 pET22b 载体上，构建了 pET22b-*tnaA*5' -*kan<sup>r</sup>*-*tnaA*3'。敲除 *tnaA* 基因时，首先以 tnaAP1 和 tnaAP2 为引物，以 pET22b-*tnaA*5' -*kan<sup>r</sup>*-*tnaA*3' 为模板，PCR 扩增得到敲除线性片段 *tnaA*5' -*kan<sup>r</sup>*-*tnaA*3'，因为抗性基因两端没有 FRT 位点，所以，抗性基因替换掉 *tnaA* 基因后没有从染色体上切割下来。线性片段电转入 *trpR* 单敲菌电感受态，涂布于含卡那霉素的 LB 平板上，37 $^{\circ}$ C 培养至长出菌落。用鉴定引物 tnaAT1 和 tnaAT2 菌落 PCR 鉴定单克隆，筛选得到的阳性菌丢失 pKD46 后，经多次传代进行下一步实验。与敲除 *trpR* 不同，由于卡那霉素抗性基因两端没有 FRT 位点，卡那霉素抗性基因替换掉 *tnaA* 基因后不能被切割下来而是保留在基因组上，这样也有利于 *tnaA* 敲除菌的筛选。

1.4 P1 转导

P1 转导步骤参见: open wetware database ([http://openwetware.org/wiki/Sauer:P1\\_vir\\_phage\\_transduction](http://openwetware.org/wiki/Sauer:P1_vir_phage_transduction))。

1.5 质粒构建

pZE12 是由 Lutz 等人构建的<sup>[6]</sup>，具有拷贝数适中、调控严谨等特点。设计两对引物 12GF/12GR 和 21ptf/21ptr(见表 2)，扩增 pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup> 整个质粒和 pZE12-*trpED*<sup>fbr</sup> 上的 P<sub>LlacO-1</sub>-*trpED*<sup>fbr</sup>-T1 片段，并将这两个片段连接起来，构建成 pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup>-*trpED*<sup>fbr</sup>(图 3)，在这个质粒上，两个基因都分别受各自的启动子和终止子调控。

图3 pZE12-aroG<sup>fbr</sup>-trpED<sup>fbr</sup>构建示意图Fig. 3 The construction of pZE12-aroG<sup>fbr</sup>-trpED<sup>fbr</sup>

## 1.6 工程菌诱导

将质粒 pZE12-*trpED*<sup>fbr</sup> 以及 pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup>-*trpED*<sup>fbr</sup> 分别转入 MG 1655ΔRT-R 中,待细菌长起后,挑取单克隆在 LB 液体培养基中过夜培养,然后按 1%比例稀释到 M63 培养基中,37℃振荡培养,待 *OD*<sub>600</sub> 达到 0.6 时,加入终浓度为 0.2 mol/L 的 IPTG 诱导。当工程菌 *OD*<sub>600</sub> 达到 1 时,取样 10 mL 用于测定酶活,当 *OD*<sub>600</sub> 达到 3 时,取上清用于测定色氨酸浓度。

## 1.7 表达产物电泳分析

重组菌诱导完毕后,离心收集菌体。加入 5×SDS 凝胶加样缓冲液 20 μL, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8)80 μL,混匀,沸水浴处理 5 min,取 10 μL 上清进行电泳。

## 1.8 粗酶液的提取

当工程菌发酵液 *OD*<sub>600</sub> 达到 1 时,4℃离心收集菌体,将菌体重悬于 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液中,悬液在冰浴中超声破碎,4℃离心,上清即为粗酶液,用于酶活性测定。

## 1.9 酶活性测定

DAHP 合成酶(DS)活性测定参照参考文献[7],邻氨基苯甲酸合成酶(AS)酶活性测定参照参考文献[8]。

## 1.10 色氨酸测定

参照参考文献[9]。

# 2 结果

## 2.1 *trpR* 及 *tnaA* 敲除及鉴定

以 V1 和 V2 为引物,菌落 PCR 鉴定 *trpR* 敲除菌,扩增出 1000 bp 片段的菌落为阳性克隆(图 4A)。将 pCP20 转入阳性克隆,抗性基因从染色体上切割下来,以 V1 和 V2 为引物进行第二轮菌落 PCR 鉴定,结果对照菌落扩出 500 bp 的片段,丢失抗性基因的菌落扩出的片段长 300 bp(图 4B),选取敲除成功的阳性菌落,划线传代,保存,将其命名为 MGΔR。将 *tnaA* 基因敲除线性片段电转入 *trpR* 单敲菌,菌落 PCR 鉴定,结果大部分菌落扩出长为 1500 bp 左右的片段,表明敲除成功,少部分扩出 1800 bp 片段(图 4C)。丢失 pKD46 后,基因双敲除成功,将其命名为 MGΔRT。

## 2.2 P1 转导

pZE12 质粒多克隆位点前的启动子是 P<sub>LlacO-1</sub>,诱导表达需要 *lacR* 参与。本研究利用 P1 转导方法将 BWRI 基因组上的 *lacR-Sp'* 基因整合到双基因敲除菌基因组,转完的双敲菌具有 Sp 抗性,说明 P1

转导成功。我们将 *trpR* 基因敲除成功,并在基因组上插入 *lacR* 的工程菌命名为 MG $\Delta$ R-R,将 *trpR* 和 *tnaA* 双基因双敲除成功,并在基因组上插入 *lacR* 的工程菌命名为 MG $\Delta$ RT-R。

### 2.3 质粒构建

设计两对引物扩增 pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup> 整个质粒和 pZE12-*trpED*<sup>fbr</sup> 上的 P<sub>LlacO-1</sub>-*trpED*<sup>fbr</sup>-T1 片段,分别得到长度为 4000 bp (图 5A)和 3500 bp 线性片段(图 5B),将这两个片段连接起来,构建 pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup>-

*trpED*<sup>fbr</sup>, 测序结果表明构建成功。

### 2.4 蛋白表达 SDS-PAGE 检测结果

按上述方法培养并诱导 pZE12/MG $\Delta$ RT-R、pZE12-*trpED*<sup>fbr</sup>/MG $\Delta$ RT-R 和 pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup>-*trpED*<sup>fbr</sup>/MG $\Delta$ RT-R,提取蛋白用于 SDS-PAGE 电泳检测。结果如图 6 所示,与对照 pZE12/MG $\Delta$ RT-R 相比,重组子 pZE12-*trpED*<sup>fbr</sup>/MG $\Delta$ RT-R 中 *trpED* 表达明显增加,而重组子 pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup>-*trpED*<sup>fbr</sup>/MG $\Delta$ RT-R 菌 DS 和 AS 蛋白表达量增加并不明显。

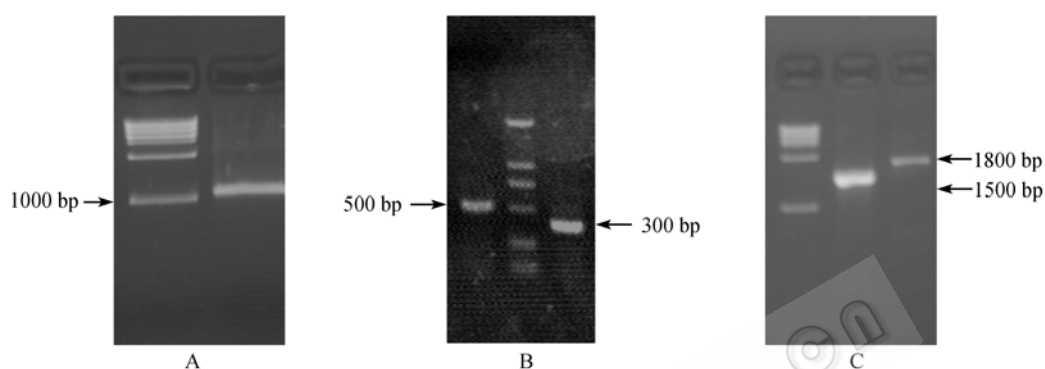


图 4 *trpR* 基因以及 *tnaA* 基因敲除鉴定结果示意图

Fig. 4 The verification of *trpR* and *TnaA* double genes knock out

A: colony PCR products of *trpR* knockout positive clone; B: colony PCR products of *trpR* knockout positive clone after resistant gene is eliminated from chromosome (control 500 bp, sample 300 bp); c: colony PCR products of *tnaA* knockout positive clone (control 1800 bp, sample 1500 bp)

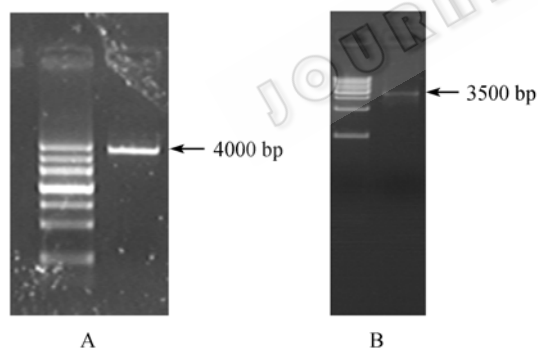


图 5 质粒 pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup>-*trpED*<sup>fbr</sup> 构建鉴定结果示意图

Fig. 5 Verification of pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup>-*trpED*<sup>fbr</sup>

A: PCR amplification of the whole pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup>; B: P<sub>LlacO-1</sub>-*trpED*<sup>fbr</sup>-T1 PCR fragments

### 2.5 酶活测定

按上述方法培养并诱导 pZE12/ $\Delta$ RT-R、pZE12-*trpED*<sup>fbr</sup>/MG $\Delta$ RT-R 和 pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup>-*trpED*<sup>fbr</sup>/MG $\Delta$ RT-R,取样用于酶活测定,结果如图 7 所示,由图可知,与对照 pZE12/MG $\Delta$ RT-R 相比,pZE12-

*trpED*<sup>fbr</sup>/MG $\Delta$ RT-R 的 *trpED* 活性提高了 8.3 倍,而 pZE12-*aroG*<sup>fbr</sup>-*trpED*<sup>fbr</sup>/MG $\Delta$ RT-R 的 *aroG* 和 *trpED* 活性分别提高了 4.3 倍和 7 倍。

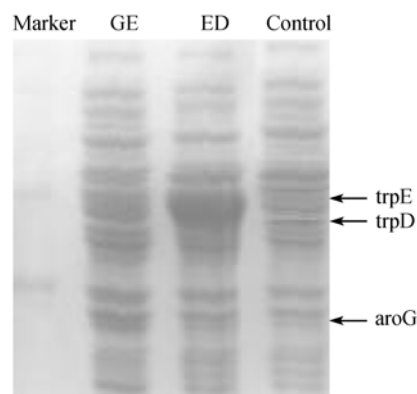


图 6 蛋白表达 SDS-PAGE 结果

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of total cell protein

Control: pZE12/MG $\Delta$ RT-R; ED: pZE12-*trpED*/MG $\Delta$ RT-R; EG: pZE12-*aroG*-*trpED*/MG $\Delta$ RT-R

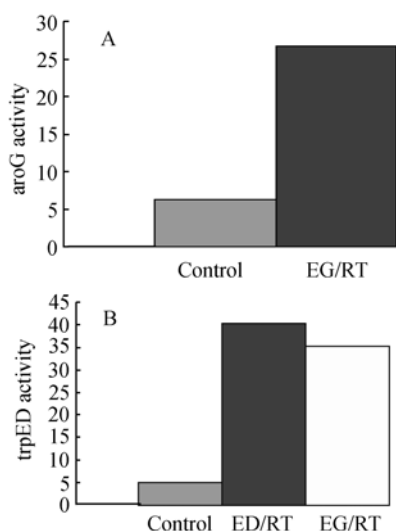


图7 DAHP合成酶(DS)和邻氨基苯甲酸酶(AS)活性测定结果

Fig. 7 The activity of DS and AS

A: DS activity; B: AS activity. Control: MG  $\Delta$ RT-R; ED/RT: pZE12-trpED/MG  $\Delta$ RT-R; EG/RT: pZE12-aroG-trpED/MG  $\Delta$ RT-R

## 2.6 色氨酸浓度测定

发酵 pZE12/MG1655、pZE12/MG  $\Delta$  R-R、pZE12/MG  $\Delta$  RT-R、pZE12-trpED<sup>fbr</sup>/MG  $\Delta$  RT-R、pZE12-aroG<sup>fbr</sup>-trpED<sup>fbr</sup>/MG  $\Delta$  RT-R, 当发酵液 OD<sub>600</sub> 达到 3 时, 取上清用于测定色氨酸浓度。结果如图 8 所示, 由图可知, pZE12/MG1655 发酵液中色氨酸浓度为 2.5 mg/L, 单基因敲除菌色氨酸产量为 25 mg/L, 双基因敲除菌色氨酸产量为 48 mg/L, pZE12-trpED<sup>fbr</sup>/MG  $\Delta$  RT-R 色氨酸产量为 168 mg/L, 而 pZE12-aroG<sup>fbr</sup>-trpED<sup>fbr</sup>/MG  $\Delta$  RT-R 色氨酸产量达到了 820 mg/L。

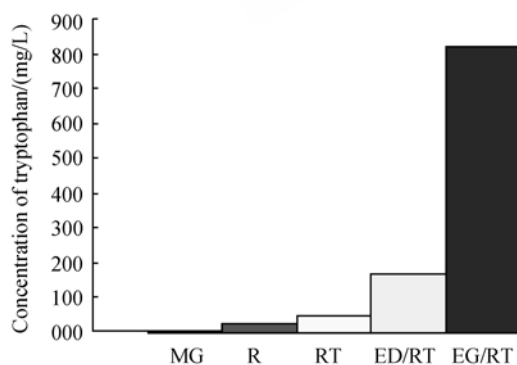


图8 不同菌株色氨酸产量比较

Fig. 8 The tryptophan production of different stains

MG: MG1655; R: MG  $\Delta$ R-R; RT: MG  $\Delta$ RT-R; ED/RT: pZE12-trpED/MG  $\Delta$ RT-R; EG/RT: pZE12-aroG-trpED/MG  $\Delta$ RT-R

## 3 讨论

大肠杆菌芳香族氨基酸生物合成途径中, 存在

着复杂的调控机制, 这些调控机制的存在使细胞内色氨酸的浓度维持在一定的生理浓度之内。本文对色氨酸生物合成起关键作用的基因逐步进行了改造, 并比较了每个基因改造之后色氨酸产量的增加程度。与对照 MG1655 相比, *trpR* 单基因敲除菌色氨酸产量提高了 10 倍, 说明去除了基因组上色氨酸合成及转运关键酶受到的反馈阻遏调控作用有利于色氨酸产量的提高, 进而敲除 *tnaA* 后, 工程菌色氨酸产量提高了 20 倍, 说明阻断胞内色氨酸降解通路对提高胞内色氨酸浓度也是必要的。与 MG  $\Delta$ RT-R 相比, 工程菌 pZE12-trpED<sup>fbr</sup>/MG  $\Delta$ RT-R 的 *trpED* 活性提高了 8.3 倍, 色氨酸产量提高了 3.5 倍, 工程菌 pZE12-aroG<sup>fbr</sup>-trpED<sup>fbr</sup>/MG  $\Delta$ RT-R 色氨酸产量提高了 17 倍, *aroG*<sup>fbr</sup> 和 *trpED*<sup>fbr</sup> 的活性则分别提高了 4 倍和 7.3 倍, 说明在双敲除 *trpR* 和 *tnaA* 导致宿主菌产酸背景增加的基础上, 改造共同途径和分支途径关键酶使其活性提高导致了工程菌色氨酸产量的进一步升高。

在这里需要特别提出的是, 本文利用 Red 重组的方法先后敲除了大肠杆菌染色体上的两个基因 *trpR* 基因和 *tnaA* 基因, 在敲除 *trpR* 基因时, 我们首先在抗性基因两端设计了 36 bp 的同源序列, 结果电转之后长出的克隆全部是假阳性, 我们推测可能是因为同源片段太短, 线性片段整合到染色体其他位置上, 导致假阳性产生。因此我们接着设计了 overlap PCR 引物 N1 和 N2, 将抗性基因两端同源序列延伸到 60 bp 后, 成功的敲除了 *trpR* 基因。敲除 *tnaA* 时, 基因敲除线性片段抗性基因两侧的同源片段长度分别达到 420 bp 和 480 bp, 电转之后长出的单克隆绝大部分都是阳性克隆。这表明利用 Red 重组系统进行基因敲除时, 增加同源片段的长度可能有助于敲除的成功。

此前, 我们实验室构建了 pBV-trpED<sup>fbr</sup>-aroG<sup>fbr</sup> (未发表), 在这个质粒上, 突变体共同置于同一个启动子调控下组成一个操纵子, 质粒转入双敲菌后, *trpED*、*aroG* 的活性以及色氨酸产量仅有小幅度升高。造成这种现象可能有如下两个方面的原因, 一是 pZE12 拷贝数较低, 表达的酶量比较适中, 而 pBV 拷贝数较高, 表达蛋白有很多是包涵体, 不利于产量提高, 另一方面, 本实验中, 两个基因都分别受各自的启动子和终止子调控, 与操纵子表达相

比, 较少发生转录不完全的情况, 从而有利于色氨酸产量的提高。

总之, 本文主要针对色氨酸合成的共同途径和分支途径进行了改造, 采用的双基因串联表达以及双基因敲除策略提高了色氨酸的产量, 但由于色氨酸生物合成通路中其他调控机制的存在<sup>[10,11]</sup>, 限制了改造的效果。下一步需要对工程菌的中心代谢途径进行改造, 使之生成较多的PEP和E4P, 打通从葡萄糖到 DAHP 通路, 以进一步提高色氨酸产量。

## REFERENCES

- [1] Bongaerts J, Krämer M, Müller U, *et al.* Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metabolic Engineering*, 2001, **3**(4): 289–300.
- [2] Tribe DE, Camakaris H, Pittard J. Constitutive and repressive enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: Regulation of enzyme synthesis at different growth rates. *The Journal of Bacteriology*, 1976, **127**(3): 1085–1097.
- [3] Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2006, **69**(6): 615–626.
- [4] Gunsalus RP, Yanofsky C. Nucleotide sequence and expression of *Escherichia coli* trpR, the structural gene for the trp aporepressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980, **77**(12): 7117–7121.
- [5] Kirill A Datsenko, Barry L Wanner. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, **97** (12): 6640–6645.
- [6] Rolf Lutz, Hermann Bujard. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**: 1203–1210.
- [7] Russell J McCandliss, Michael D, *et al.* 3-Deoxy-D-arabino- heptulosonate 7-phosphate synthase: purification and molecular characterization of the phenylalanine-sensitive isoenzyme from *E. coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, **253**: 4259–4265.
- [8] William A, Smith H. Mechanism of 3-methylanthranilic acid derepression of the tryptophan operon in *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology*, 1970, **101**(1): 209–217.
- [9] Iizuka H, Yajima T. Fluorometric determination of L-tryptophan with methoxyacetaldehyde. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1993, **16**: 103–106.
- [10] Tazuya-Murayama K, Aramaki H, Mishima M, *et al.* Effect of L-serine on the biosynthesis of aromatic amino acids in *Escherichia coli*. 2006, **52**(4): 256–260.
- [11] Tatarko M, Romeo T. Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 2001, **43**: 26–32.