

谷氨酸棒杆菌人工合成启动子文库的构建及应用

刘莫识^{1,2,3}, 刘娇^{2,3}, 孙冠男^{2,3}, 路福平¹, 王钰^{2,3}, 郑平^{2,3}, 孙际宾^{2,3}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院系统微生物工程重点实验室 天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 国家合成生物技术创新中心, 天津 300308

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. 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*. Chin J Biotech, 2022, 38(2): 831-842.

摘要: 启动子是实现基因精细表达调控的重要工具, 广泛应用于微生物的代谢工程改造。谷氨酸棒杆菌是重要的工业底盘, 已报道的启动子文库较少且主要是基于完全人工设计的突变序列构建获得。本研究对谷氨酸棒杆菌 *odhA* 基因天然启动子的-10 区及附近序列进行随机突变, 借助 *rfp* 报告基因和荧光成像系统进行高通量筛选, 构建了包含 57 个相对强度为 2.4–16.7 倍的人工启动子文库, 最高强度可达强诱导型启动子 P_{trc} 的 2.3 倍。分析文库的突变序列, 发现 55 个启动子突变体的-10 区保守序列“TANNNT”均向 3'端移动 1–4 个碱基, 其中移动 4 个碱基的突变体占 68%; 同时发现强、中、弱启动子突变体在不同位置还呈现 T 或 G 保守碱基。选择 5 个不同强度的启动子应用于 L-脯氨酸合成途径 γ -谷氨酰激酶 (ProB) 的表达调控, 结果显示, L-脯氨酸产量随着启动子强度增强逐渐提高, 相对强度为 9.8 倍的启动子达到最高产量 (6.4 g/L), 更高强度的启动子将不再提高 L-脯氨酸的产量。本研究基于谷氨酸棒杆菌天然启动子 P_{odhA} 构建文库, 成功获得 1 个强度增强显著、分布均匀的新型启动子文库, 可用于谷氨酸棒杆菌的系统代谢工程改造, 还可为更多启动子文库的构建提供思路和方法借鉴。

关键词: 谷氨酸棒杆菌; 人工合成启动子文库; P_{odhA} 启动子; L-脯氨酸

Received: March 11, 2021; **Accepted:** May 8, 2021; **Published online:** June 4, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904900); National Natural Science Foundation of China (31800038); Tianjin Natural Science Foundation, China (18JCQNJC10300)

Corresponding authors: LIU Jiao. Tel/Fax: +86-22-84861943; E-mail: liu_j@tib.cas.cn

ZHENG Ping. Tel/Fax: +86-22-84861943; E-mail: zheng_p@tib.cas.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0904900); 国家自然科学基金 (31800038); 天津市自然科学基金 (18JCQNJC10300)

Construction and application of a synthetic promoter library for *Corynebacterium glutamicum*

LIU Moshi^{1,2,3}, LIU Jiao^{2,3}, SUN Guannan^{2,3}, LU Fuping¹, WANG Yu^{2,3}, ZHENG Ping^{2,3}, SUN Jibin^{2,3}

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

2 Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

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

Abstract: Promoter is an important genetic tool for fine-tuning of gene expression and has been widely used for metabolic engineering. *Corynebacterium glutamicum* is an important chassis for industrial biotechnology. However, promoter libraries that are applicable to *C. glutamicum* have been rarely reported, except for a few developed based on synthetic sequences containing random mutations. In this study, we constructed a promoter library based on the native promoter of *odhA* gene by mutating the -10 region and the bystanders. Using a red fluorescent protein (RFP) as the reporter, 57 promoter mutants were screened by fluorescence imaging technology in a high-throughput manner. These mutants spanned a strength range between 2.4-fold and 19.6-fold improvements of the wild-type promoter. The strongest mutant exhibited a 2.3-fold higher strength than the widely used strong inducible promoter P_{trc} . Sequencing of all 57 mutants revealed that 55 mutants share a 1–4 bases shift (4 bases shift for 68% mutants) of the conserved -10 motif “TANNNT” to the 3' end of the promoter, compared to the wild-type promoter. Conserved T or G bases at different positions were observed for strong, moderate, and weak promoter mutants. Finally, five promoter mutants with different strength were employed to fine-tune the expression of γ -glutamyl kinase (ProB) for L-proline biosynthesis. Increased promoter strength led to enhanced L-proline production and the highest L-proline titer of 6.4 g/L was obtained when a promoter mutant with a 9.8-fold higher strength compared to the wild-type promoter was used for ProB expression. The use of stronger promoter variants did not further improve L-proline production. In conclusion, a promoter library was constructed based on a native *C. glutamicum* promoter P_{odhA} . The new promoter library should be useful for systems metabolic engineering of *C. glutamicum*. The strategy of mutating native promoter may also guide the construction of promoter libraries for other microorganisms.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*; synthetic promoter library; P_{odhA} promoter; L-proline

谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是从土壤中分离的一种无芽孢、不运动的革兰氏阳性细菌, 菌体形态为短杆至棒状, 属于放线菌目棒状杆菌属, 已被美国食品药品监督管理局 (FDA) 认证为安全菌株 (GRAS)^[1-2]。谷氨酸棒

状杆菌在 1957 年被首次报道用于 L-谷氨酸的发酵生产^[3], 然后被广泛用于 L-赖氨酸、L-异亮氨酸、L-缬氨酸和 L-精氨酸等氨基酸的生产^[4]。近年来, 谷氨酸棒状杆菌已经发展成为重要的工业底盘, 能够利用多种可再生原料生产各种天然

或非天然的产品^[5-6]。

启动子是调控基因表达的重要元件,位于结构基因 5'端上游非编码区,是 RNA 聚合酶特异性识别和结合的 DNA 片段。随着代谢工程和合成生物学的发展,启动子工程已成为调控基因表达并优化目标产物生物合成途径的关键技术^[7-8],其中获得高效的启动子是主要的挑战。诱导型启动子在诱导后通常可以达到较高表达强度,谷氨酸棒杆菌中使用最多的强诱导型启动子是 IPTG 诱导的 P_{trc} 和 P_{tac} 启动子。但使用诱导剂会增加生产成本,同时存在稳定性较差等问题,研究人员倾向于利用强组成型启动子改造谷氨酸棒杆菌用于生产氨基酸等产品^[9-10]。谷氨酸棒杆菌天然的强组成型启动子 P_{eftu} 、 P_{sod} 和 P_{cspB} 等已经广泛用于增强合成途径关键基因的表达,提高 L-赖氨酸、L-精氨酸、L-异亮氨酸和 L-脯氨酸等产品的产量^[11-14]。然而,有限的天然强组成型启动子难以满足精细代谢调控的需求。

人工合成启动子文库 (synthetic promoter library) 包含连续而完整的一系列表达强度的启动子,可为调控目标基因的表达提供最佳启动子。基于启动子文库的基因表达调控策略也已经广泛应用于细菌的代谢工程改造^[15-17]。Yim 等首次在谷氨酸棒杆菌中构建了人工合成启动子文库,其对 70 bp 的启动子区域进行完全随机突变,以绿色荧光蛋白 (GFP) 为报告系统,基于流式细胞分选技术 (FACS) 高通量筛选各种强度的组成型启动子,并将最强启动子 P_{H36} 用于木聚糖内切酶的高效生产^[18]; Wei 等通过设计包含-35 区“NNGNCN”、-10 区“NNTANANT”、RBS 区“AAAGGA”和随机突变区的共 80 bp 序列构建启动子文库,结合 FACS 高通量筛选,成功获得了不同强度的启动子,并应用于 L-苏氨酸合成途径的精细调控^[19]。Rytter 等^[20]和 Zhang^[21]等^[21]也通过保留-10 区和-35 区的共有

序列,突变核心启动子区的其他序列,分别构建了谷氨酸棒杆菌的人工合成启动子文库。目前报道的谷氨酸棒杆菌启动子文库主要通过人工设计序列突变,再结合高通量筛选方法构建的。谷氨酸棒杆菌天然启动子 P_{gdh} 和 P_{dapA} 在-10 区和-35 区进行序列突变,也可以获得表达强度增强的启动子突变体,但是表达强度提高幅度较小^[22-23]。Li 等基于 RNA-Seq 数据的分析,扩增了 90 个可能包含启动子-5'-UTR (PUTR) 的序列,获得 17 个与常用的强 P_{sod} UTR 相比更强的 PUTR^[24]。谷氨酸棒杆菌的基因组编辑技术已经取得显著进步,为满足规模化基因表达调控的需求,依然需要构建新型人工合成启动子文库。

基于天然启动子设计突变也是一种主要的人工合成启动子文库构建的方法。本研究对谷氨酸棒杆菌天然启动子 P_{odhA} 的-10 区及附近序列进行随机突变构建启动子文库,以红色荧光蛋白 (RFP) 为筛选标记,借助荧光成像系统快速筛选荧光强度增强的突变体,成功构建了 1 个启动子强度增强显著、覆盖范围均匀的新型启动子文库。选择不同强度的启动子应用于 L-脯氨酸合成途径关键酶 γ -谷氨酰激酶 (ProB) 的精细表达调控,发现 L-脯氨酸产量随着启动子强度增强持续提高,达到阈值后产量不再提高。本研究获得的启动子文库也可用于其他基因的表达调控,还可为更多高效启动子文库的构建提供思路和筛选方法的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用菌株与质粒见表 1。

1.1.2 引物设计及合成

本研究所用引物名称及序列见表 2,引物均由苏州金唯智公司合成。

表 1 本研究所用菌株和质粒

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
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wild-type strain	Lab stock
SLCgP1	ATCC 13032 derivative with ProB ^{G149K}	Lab stock
Plasmids		
pEC-XK99E	Expression vector of <i>C. glutamicum</i> , IPTG-inducible promoter P _{trc} , Km ^R	[25]
pEC-XK99E- <i>rfp</i>	pEC-XK99E derivative, expressing <i>rfp</i> under the control of P _{trc}	[26]
pEC-XK99E-P _{odhA} - <i>rfp</i>	pEC-XK99E derivative, expressing <i>rfp</i> under the control of P _{odhA}	This study
pEC-P _{odhA}	pEC-XK99E derivative, expressing ProB ^{G149K} under the control of wild type promoter of <i>odhA</i>	This study
pEC-P1	pEC-XK99E derivative, expressing ProB ^{G149K} under the control of P1	This study
pEC-P19	pEC-XK99E derivative, expressing ProB ^{G149K} under the control of P19	This study
pEC-P50	pEC-XK99E derivative, expressing ProB ^{G149K} under the control of P50	This study
pEC-P53	pEC-XK99E derivative, expressing ProB ^{G149K} under the control of P53	This study
pEC-P57	pEC-XK99E derivative, expressing ProB ^{G149K} under the control of P57	This study

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
pEC-F	ATGGCTTCCTCCGAAGACGTTATCAAAG
pEC-R	GGAGAAAATACCGCATCAGGC
<i>odhA</i> -F	TGCGGTATTTTCTCCCACGTTATTTTTAGGAGAAGCTGTC
<i>odhA</i> -R	TTCGGAGGAAGCCATGGCAGGTAATCGCCTCTTTT
<i>odhA</i> -W1	ATAATCAGCCAACGACCAACNNNNNNNNNATAAAACAAAGCTCAATAAACCCCTC
<i>odhA</i> -W3	AACCTTCCATACGAACTTTGAAACG
<i>odhA</i> -W2	GTTGGTCGTTGGCTGATTATGC
<i>odhA</i> -W4	CAAAGTTCGTATGGAAGGTTCCG
<i>odhA</i> -WT-1	ATAATCAGCCAACGACCAACGTTACAGTGGATAAAACAAAGCTCAATAAACCCCTC
<i>odhA</i> -1-1	ATAATCAGCCAACGACCAACGGTGTGTAGGATAAAACAAAGCTCAATAAACCCCTC
<i>odhA</i> -19-1	ATAATCAGCCAACGACCAACTTGCTAGTATATAAAACAAAGCTCAATAAACCCCTC
<i>odhA</i> -50-1	ATAATCAGCCAACGACCAACGTTGTTATGATAAAACAAAGCTCAATAAACCCCTC
<i>odhA</i> -53-1	ATAATCAGCCAACGACCAACGTTGTTATGATAAAACAAAGCTCAATAAACCCCTC
<i>odhA</i> -57-1	ATAATCAGCCAACGACCAACTTAGTGTATGATAAAACAAAGCTCAATAAACCCCTC
<i>odhA</i> -2	GATGCGCTCACGCATGGCAGGTAATCGCCTCTTT
<i>odhA</i> -3	TGCGGTATTTTCTCCCACGTTATTTTTAGGAGAAGCTGTC
<i>odhA</i> -4	GTTGGTCGTTGGCTGATTATGC
ProB-F	ATGCGTGAGCGCATCTCCAA
ProB-R	TTACGCGCGGCTGGCGTA
pEC-1	GCCAGCCGCGGTAAGTGCAGGCATGCAAGCTTG
pEC-2	GGAGAAAATACCGCATCAGGC

1.1.3 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒均购自北京 TIANGEN 公司；一步重组克隆试剂盒 (ClonExpress[®] CE II) 购自南京诺唯赞公司；酵母粉和蛋白胨购自英国 Oxoid 公司；其余所有试剂均为国产分析纯。PCR 仪, Applied Biosystems 公司；分光光度计, 日本岛津公司；Nanodrop 超微量核酸蛋白测定仪, Thermo Scientific 公司；电击转化仪, Mettler Toledo 公司；多功能微孔板检测仪, Molecular Devices 公司；生物传感分析仪 SBA-40D, 山东省科学院；Tanon 5200 Multi 全自动化学发光/荧光图像分析系统, 上海天能科技有限公司。

1.1.4 培养基

LB 培养基: 10 g/L NaCl, 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 根据需要添加 25 μg/mL 卡那霉素, 用于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 培养。

TSB 培养基: 5 g/L 葡萄糖, 5 g/L 酵母粉, 9 g/L 大豆蛋白胨, 1 g/L K₂HPO₄·3H₂O, 3 g/L 尿素, 0.5 g/L 丁二酸, 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O, 20 g/L 3-(N-吗啡啉)丙磺酸 (3-morpholinopropane-1-sulfonic acid, MOPS), 10 μg/L 生物素, 0.1 mg/L 维生素 B₁ (VB₁), pH 调至 7.2, 根据需要添加 25 μg/mL 卡那霉素, 用于 *C. glutamicum* 的培养。

L-脯氨酸发酵培养基: 1 g/L 酵母粉, 1 g/L 大豆蛋白胨, 1 g/L K₂HPO₄·3H₂O, 1 g/L NaCl, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 40 g/L MOPS, 0.4 mg/L 生物素, 0.1 mg/L VB₁, 10 g/L 尿素, 80 g/L 葡萄糖, 0.45 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.05 g/L FeSO₄·7H₂O, 初始 pH 7.2, 根据需要添加 25 μg/mL 卡那霉素。

1.2 方法

1.2.1 谷氨酸棒杆菌 P_{odhA} 启动子强度表征质粒的构建

以 pEC-XK99E-*rfp* 为模板^[26], 以 pEC-F 和 pEC-R 为引物, 扩增质粒骨架和红色荧光蛋白

基因的 DNA 片段。以 *C. glutamicum* ATCC 13032 基因组为模板, 以 *odhA*-F 和 *odhA*-R 为引物, 扩增 P_{odhA} 启动子的 DNA 片段。以上 2 个片段通过南京诺唯赞公司的一步重组克隆试剂盒连接, 获得 pEC-XK99E-P_{odhA}-*rfp* 表征载体。

1.2.2 谷氨酸棒杆菌 P_{odhA} 启动子文库的构建和筛选

以 pEC-XK99E-P_{odhA}-*rfp* 为模板, 以含突变碱基的 *odhA*-W1 和 *odhA*-W3 为引物扩增启动子片段, 以 *odhA*-W2 和 *odhA*-W4 为引物扩增质粒骨架, 以上两个片段通过诺唯赞的一步重组克隆试剂盒连接 2-5 管, 每管 20 μL, 分别转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Trans1-T1 感受态细胞, 各涂布于 1 块含 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体平板上, 水洗收集平板上的所有克隆, 提取质粒, 获得 P_{odhA} 启动子文库质粒。

约 1 μg 文库质粒转化 *C. glutamicum* ATCC 13032 感受态细胞, 涂布于约 30 块含 25 μg/mL 卡那霉素的 TSB 固体平板, 每块平板约含有 300-500 个克隆, 采用 Tanon 5200 Multi 全自动化学发光/荧光图像分析系统进行荧光拍照, 初步筛选荧光亮度增强的克隆。

1.2.3 谷氨酸棒杆菌 P_{odhA} 启动子文库的强度表征

将由平板筛选获得的荧光强度增强的菌株和含有 pEC-XK99E 空质粒的对照菌株以及含有 pEC-XK99E-*rfp* 质粒的对照菌株在含 25 μg/mL 卡那霉素的 TSB 固体平板上活化, 接种至 96 孔板中, 每孔为 800 μL 含 25 μg/mL 卡那霉素的 TSB 液体培养基, 含有 pEC-XK99E-*rfp* 质粒的对照菌株在培养基中添加 1 mmol/L IPTG, 其他菌株均不需要添加 IPTG, 每个样品 3 个平行, 30 °C、800 r/min 培养 24 h 后测定 OD₆₀₀ 和荧光值, 激发波长为 560 nm, 发射波长为 607 nm, 荧光强度为测定的荧光值/OD₆₀₀, 即

RFU/ OD_{600} 。分别扣除空质粒对照菌的本底荧光强度，再与天然启动子扣除本底后的荧光强度进行比较，获得启动子的相对强度 (relative intensity, RI)。

1.2.4 P_{odhA} 启动子突变体应用于 L-脯氨酸生产菌株的构建

以 SLCgP1 菌株的基因组为模板，分别以 *odhA*-WT-1 和 *odhA*-2、*odhA*-19-1 和 *odhA*-2、*odhA*-50-1 和 *odhA*-2、*odhA*-53-1 和 *odhA*-2、*odhA*-57-1 和 *odhA*-2 为引物，扩增启动子片段一；以 SLCgP1 菌株的基因组为模板，以 *odhA*-3 和 *odhA*-4 为引物，扩增启动子片段二；以 SLCgP1 菌株的基因组为模板，以 ProB-F 和 ProB-R 为引物，扩增 ProB^{G149K} 片段；以 pEC-XK99E 质粒为模板，以 pEC-1 和 pEC-2 为引物扩增质粒骨架。以上启动子片段一分别与启动子片段二、ProB^{G149K} 片段和质粒骨架通过诺唯赞的一步重组试剂盒克隆连接，分别获得 pEC- P_{odhA} 、pEC-P1、pEC-P19、pEC-P50、pEC-P53、pEC-P57 质粒，将以上质粒和对照质粒分别转化 SLCgP1 菌株，获得对照菌株和过表达菌株。

1.2.5 L-脯氨酸的测定

用 3% (W/V) 磺基水杨酸稀释样品到适当浓度，取 1 mL 稀释液，加入 1 mL 酸合茚三酮 (1.25 g 茚三酮溶于 30 mL 冰醋酸和 20 mL 6 mol/L H_3PO_4 中，70 °C 加热溶解) 和 1 mL 冰醋酸，100 °C 沸水浴反应 45 min；冷却后，静置，吸取 200 μ L 在 520 nm 下测定 OD 值。采用浓度为 0、5、10、20、25、50、100 mg/L 的 L-脯氨酸绘制标准曲线，根据标准曲线计算待测样品的浓度。

1.2.6 P_{odhA} 启动子突变体改造菌株的 L-脯氨酸生产能力评价

在 TSB 固体平板上活化 1.2.4 中构建的对照菌株和过表达菌株，接种至 24 孔板中，每孔

为 800 μ L 含 25 μ g/mL 卡那霉素的 TSB 液体培养基，30 °C、800 r/min 培养 8 h，以相同的初始 OD_{600} 转接至 24 孔板中，每孔为 800 μ L 含 25 μ g/mL 卡那霉素的 L-脯氨酸发酵培养基，每个菌株 3 个平行，30 °C、800 r/min 培养 18 h 后检测 OD_{600} 、L-脯氨酸产量和葡萄糖含量。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸棒杆菌 P_{odhA} 启动子文库的构建和筛选

odhA 基因编码 α -酮戊二酸脱氢酶复合体 E1 亚基，是三羧酸 (TCA) 循环中的关键基因。 P_{odhA} 启动子为 *odhA* 基因上游的 141 bp，序列较短，Pfeifer-Sancar 等鉴定了该启动子的转录起始位点 (TSS)、-10 区和核糖体结合位点 (RBS) (图 1A)；由于谷氨酸棒杆菌启动子的-35 区保守性较低，未获得鉴定^[27]。根据 1.2.1 所描述的方法，在大肠杆菌中构建启动子强度表征质粒 pEC-XK99E- P_{odhA} -*rfp*，质粒测序正确，表明重组质粒构建成功。根据 1.2.2 所描述的方法，对 -10 区及附近共 10 个碱基进行随机突变，构建 P_{odhA} 启动子文库质粒 (图 1B)，收集总容量约为 10^5 个单克隆的菌体，提取文库质粒。

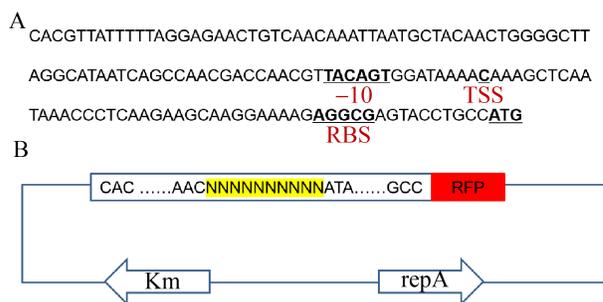


图 1 P_{odhA} 启动子文库的设计和构建策略

Figure 1 Design and construction of the P_{odhA} promoter library. (A) Sequence of the native P_{odhA} promoter. (B) Schematic representation of the designed synthetic promoter library.

约 1 μg 文库质粒转化 *C. glutamicum* ATCC 13032 菌株, 涂布于平板, 共获得约 10 000 个克隆。使用荧光图像分析系统对每一块平板进行荧光拍照, 可观察到荧光亮度明显增强的克隆(图 2), 根据荧光亮度筛选增强不同程度的克隆。

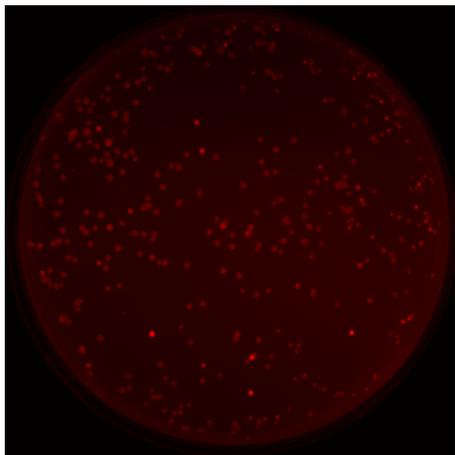


图 2 P_{odhA} 启动子文库的荧光图
Figure 2 Fluorescence image of P_{odhA} promoter library.

2.2 P_{odhA} 启动子文库的强度表征

按照 1.2.3 所描述的方法, 对初筛获得的克隆进行强度表征, 使用 96 孔板培养 24 h 后测定 OD_{600} 和荧光值, 计算荧光强度和相对强度, 并从低到高进行排序(图 3)。文库启动子的相对强度是 P_{odhA} 野生型的 2.4–16.7 倍, 最高强度启动子 P57 (16.7 倍) 是强诱导型启动子 P_{trc} 的 2.3 倍, 14 个启动子的强度均高于 P_{trc} 。根据相对强度将启动子分为 3 组, 以诱导型强启动子 P_{trc} (添加 1 mmol/L IPTG, 相对强度为 7.2 倍) 的相对强度为参照。弱启动子 (weak promoters) 的相对强度为 4 倍以下 (含 4 倍), 包括启动子 P1–P18; 中等强度启动子 (moderate promoters) 的相对强度为 4.0–7.2 倍, 包括启动子 P19–P43; 强启动子 (strong promoters) 的相对强度为 7.2 倍以上, 包括启动子 P44–P57。该文库的启动子强度增强显著、分布均匀, 可为基因表达调控提供所需的系列强度。

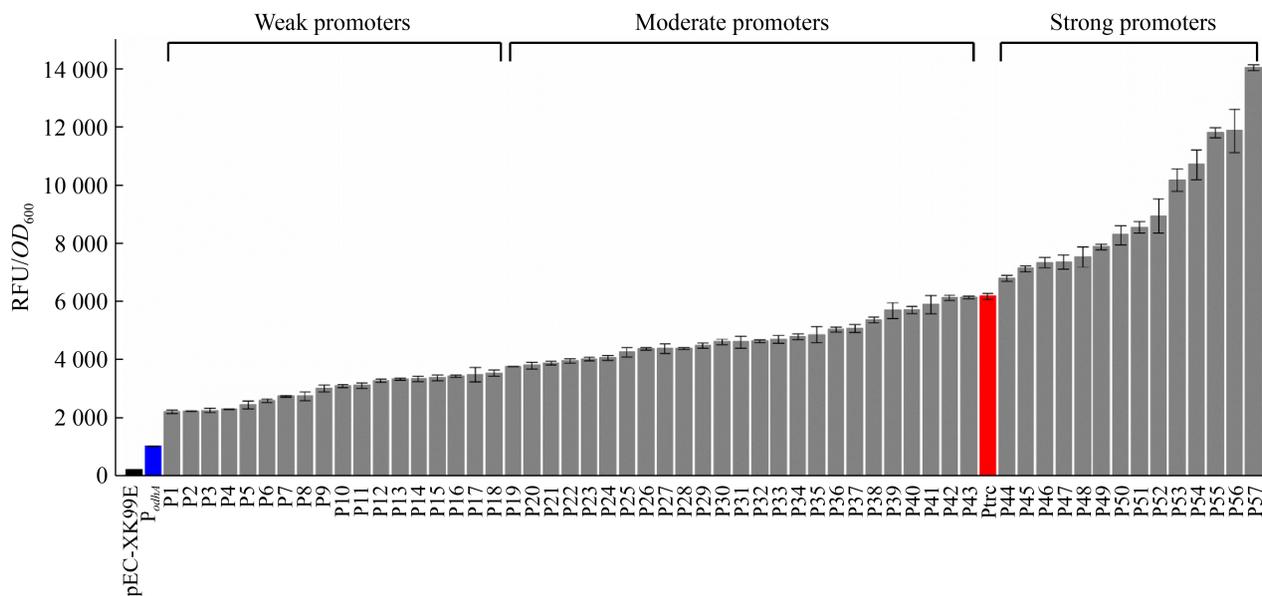


图 3 P_{odhA} 启动子文库的荧光强度
Figure 3 Fluorescence intensities of the P_{odhA} promoter library. P_{odhA} was the wild type promoter. P_{trc} was used as a control promoter. Error bars indicate the standard deviations from 3 independent cultures.

2.3 P_{odhA} 启动子文库的序列分析

为分析启动子序列和强度之间的相关性,对所有启动子突变体进行测序,获得突变体的-10区及附近序列(图4)。进一步采用 WebLogo 网站 (<http://weblogo.threplusone.com/create.cgi>) 对所有突变体的突变区序列进行分析,统计突变区及附近碱基的保守性(图5A)。结果显示,与野生型启动子 P_{odhA} 的-10区保守序列“TANNNT”的位置相比,96%突变体(55/57)的-10区呈现整个保守基序向3'端移动1-4个碱基位置的特征,68%的突变体(39/57)移动4个碱基,表明启动子强度增强与-10区保守序列的位置密切相关。

为进一步探究突变区其他位置的特征和强度的关系,分别分析了弱启动子(图5B)、中等强度启动子(图5C)和强启动子(图5D)的突

变区碱基保守性。除了-10区保守序列“TANNNT”中的3个保守碱基,每个强度组的部分其他碱基也具有较高保守性;随着启动子强度的增强,部分位置的碱基偏好性更明显。弱启动子突变区仅在第3位出现T的频率较高,为50%;中等强度启动子突变区在第2、3、5、9、10位分别出现T、G、T、T、T的频率较高,均在50%左右;强启动子突变区第2、4、5、9位分别出现T、T、G、T的频率较高,均高于50%。以上结果表明,启动子强度还与突变区其他位置的T或G碱基保守性相关。

2.4 P_{odhA} 启动子突变体用于 L-脯氨酸生产

γ -谷氨酰激酶 ProB 是 L-脯氨酸合成途径的关键酶,受到 L-脯氨酸的反馈抑制,解除其反馈抑制是实现 L-脯氨酸生产所必需的,ProB^{G149K}是目前报道的最佳解除反馈抑制突变体^[28]。

Weak promoters		Moderate promoters		Strong promoters	
Sequences	RI	Sequences	RI	Sequences	RI
P_{odhA} GTTACAGTGGATAA	-	P19 TTGCTAGTATATAA	4.3	P44 GTGGTAAGTTATAA	8.0
P1 GGTGTGTAGGATAA	2.4	P20 AGTGTACTGTATAA	4.3	P45 AAGTGATAGGATAA	8.4
P2 CGCTACACTTATAA	2.4	P21 GTAGTAATATATAA	4.4	P46 GGTGTAGTATATAA	8.6
P3 TATATTATTAATAA	2.5	P22 CCGAGTTATAATAA	4.5	P47 GTCGTATATAATAA	8.7
P4 ATATATTAAGATAA	2.5	P23 GGATGTTATTATAA	4.6	P48 CTATAGTAGAATAA	8.9
P5 GTGAGTTAAATAA	2.7	P24 TGGTATGGTGATAA	4.6	P49 GGGTGGTAGAATAA	9.3
P6 CCGTATAATTATAA	2.9	P25 CCGTGACTATAA	4.9	P50 GTCTGTTATGATAA	9.8
P7 GGTATTATAAATAA	3.1	P26 GTCGGGTATGATAA	5.0	P51 TTTTGCTAAAATAA	10.1
P8 AGTATAGTGTATAA	3.1	P27 TAGTAGTATTATAA	5.0	P52 GTCTGATATCATAA	10.6
P9 ATAAAGTAAAGATAA	3.4	P28 AAGTTATAATATAA	5.0	P53 ACGTGTATGATAA	12.0
P10 AATGTCTATAATAA	3.5	P29 TTGGTCTACAATAA	5.1	P54 TTTTGGTATGATAA	12.7
P11 TATTGTTATGATAA	3.5	P30 TTCGTAATGATAA	5.3	P55 GGGTGGTATAATAA	14.0
P12 TGTGGATATAATAA	3.7	P31 ATGGGCTAAAATAA	5.3	P56 TTCTGATAGGATAA	14.1
P13 CCCACGTATAATAA	3.8	P32 AACATGTAAGATAA	5.3	P57 TTAGTGTATGATAA	16.7
P14 GTTGTATGCTATAA	3.8	P33 GTACGGTAGTATAA	5.4		
P15 GGTATAATTTATAA	3.8	P34 TTAGGATATGATAA	5.5		
P16 CGAGTATACTATAA	3.9	P35 AGGGTGTAGTATAA	5.6		
P17 GCCTGATAGGATAA	4.0	P36 TTGTATACTTATAA	5.8		
P18 CTGAGGTAACATAA	4.0	P37 TGTACTTTATAA	5.9		
		P38 AAGTGTAAATATAA	6.2		
		P39 TTATTATATAATAA	6.6		
		P40 AGGTATAATAATAA	6.6		
		P41 ATACTGTAGTATAA	6.8		
		P42 CTGCGTTATAATAA	7.1		
		P43 TGTGTAAGATATAA	7.2		

图4 启动子突变体的-10区及附近序列和相对强度

Figure 4 Extended -10 regions and relative intensity (RI) of promoter mutants. The -10 regions were underlined.

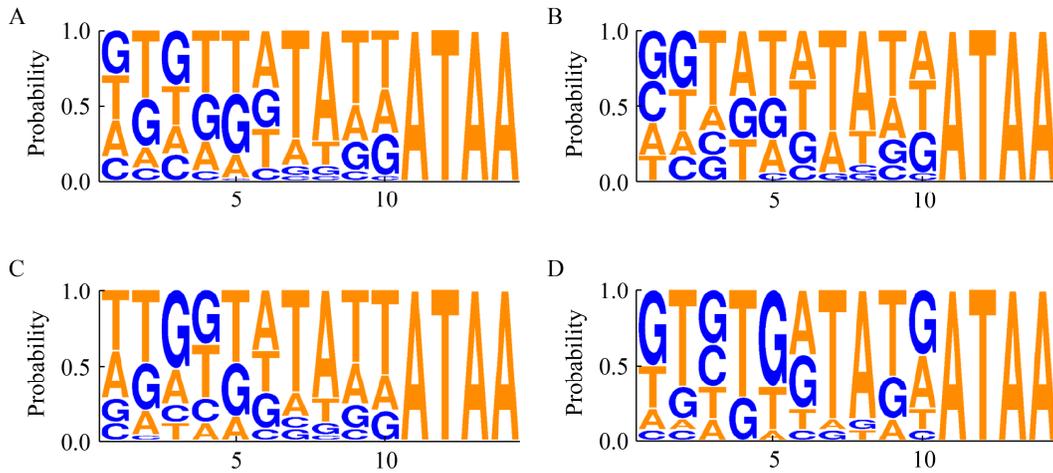


图5 -10区及附近序列的保守性分析

Figure 5 Per-base conservation analysis of the extended -10 regions. (A) All promoter mutants. (B) Weak promoters. (C) Moderate promoters. (D) Strong promoters.

为了应用 P_{odhA} 启动子文库精细调控 ProB 的表达以提高 L-脯氨酸产量, 在文库中选择 5 个不同强度的启动子构建 ProB^{G149K} 的过表达菌株, 分别为弱启动子 P1、中等强度启动子 P19、强启动子 P50、P53 和 P57, 按照 1.2.4 所描述的方法构建 $proB^{G149K}$ 表达质粒和菌株 (图 6)。构建的菌株及对应的荧光强度、相对强度和-10 区及附近序列如表 3 所示。

按照 1.2.5 所描述的方法进行 24 孔板发酵, 测定 OD_{600} 、L-脯氨酸产量和葡萄糖消耗量, 并计算糖酸转化率。生长情况如图 7A 所示, 与对照菌株相比, 所有菌株的生长无明显差别, 表明这些启动子表达 ProB^{G149K} 不影响菌株的生长。L-脯氨酸产量如图 7B 所示, 对照菌株 SLCgP1 (pEC-XK99E) 的 L-脯氨酸产量是 2.8 g/L, 野生型启动子 P_{odhA} 过表达菌株产量提高 25%, P1 的产量与野生型无显著差异, P19 提高 60%, P50 提高 133%, 达到最高产量 6.4 g/L, P53 和 P57 的产量与 P50 没有显著差异。从葡萄糖到 L-脯氨酸的转化率如图 7C 所示, 变化趋势与产量一致。对照菌株 SLCgP1 (pEC-XK99E) 的糖

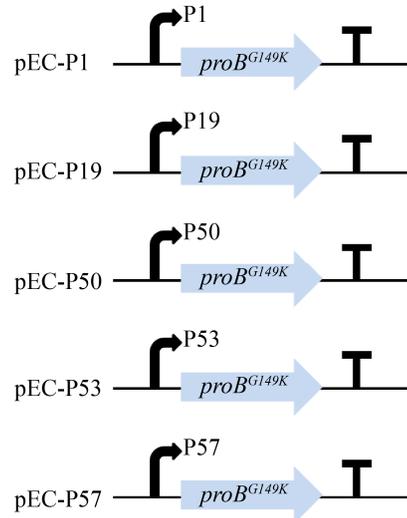


图6 $proB^{G149K}$ 表达质粒构建示意图

Figure 6 Construction sketch map of $proB^{G149K}$ expression plasmids.

酸转化率是 0.05 g/g, P50 可达最高转化率 (提高 160%, 0.12 g/g), P53 和 P57 的糖酸转化率与 P50 没有显著差异。以上结果表明, L-脯氨酸产量和糖酸转化率随着启动子强度增强不断提高, 相对强度为 9.8 倍时达到最高, 此文库可为 ProB^{G149K} 的表达提供合适的启动子。

表 3 用于 L-脯氨酸生产的人工启动子和菌株

Table 3 Selected synthetic promoters and strains constructed for L-proline production

Strains	Promoters	Fluorescence intensity	Relative intensity	Extended -10 region
SLCgP1 (pEC-XK99E)	Blank control	205.5±12.0	—	—
SLCgP1 (pEC-P _{odhA})	P _{odhA}	1 032.5±10.6	1.0	GTTACAGTGGATAA
SLCgP1 (pEC-P1)	P1	2 199.5±73.9	2.4	GGTGTGTAGGATAA
SLCgP1 (pEC-P19)	P19	3 759.5±5.5	4.3	TTGCTAGTATATAA
SLCgP1 (pEC-P50)	P50	8 296.0±334.0	9.8	GTCTGTTATGATAA
SLCgP1 (pEC-P53)	P53	1 0180.6±375.8	12.0	ACGTGTTATGATAA
SLCgP1 (pEC-P57)	P57	14 044.1±99.6	16.7	TTAGTGTATGATAA

The -10 regions were underlined.

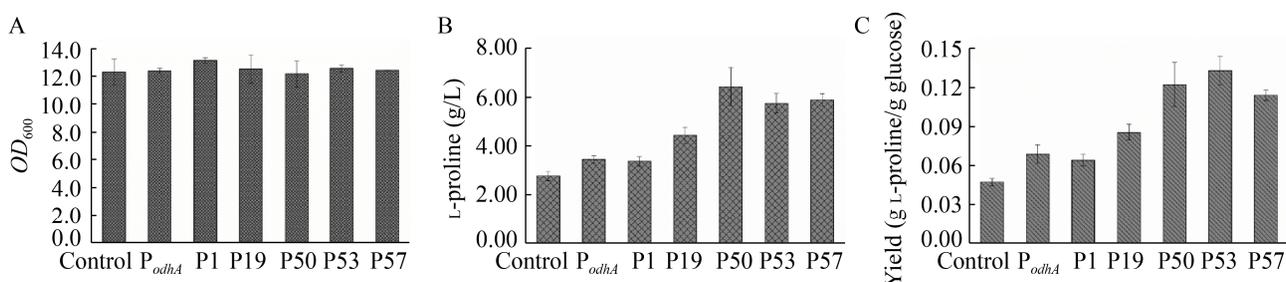


图 7 应用不同人工启动子菌株的 L-脯氨酸发酵

Figure 7 Fermentation analysis of the strains using different synthetic promoters. (A) Cell growth. (B) L-proline production. (C) L-proline yield from glucose. Error bars indicate the standard deviations from 3 independent cultures.

3 讨论

谷氨酸棒杆菌是一种重要的氨基酸工业生产菌株，在基因水平实现精细表达调控是提升菌种水平的重要手段。相比于有限的特定强度启动子，具有系列梯度强度的人工合成启动子文库具有明显优势。本研究通过随机突变谷氨酸棒杆菌天然启动子 P_{odhA} 的-10 区序列及附近序列，结合 RFP 报告系统和荧光成像技术，构建了一个新型谷氨酸棒杆菌高效启动子文库，可为谷氨酸棒杆菌的代谢工程改造提供精细表达调控元件。

原核生物启动子的-35 区和-10 区是 RNA 聚合酶直接作用的位点，-35 区是 RNA 聚合酶识别的位点，-10 区是 RNA 聚合酶紧密结合的位点，其序列的改变会影响启动子的活性。目

前报道的细菌人工启动子文库主要是通过人工设计启动子核心区的突变来构建，谷氨酸棒杆菌中报道的 4 个人工合成启动子文库均是通过 60–80 bp 启动子核心区引入突变构建的^[18-21]。在植物乳杆菌^[29]和嗜盐单胞菌^[30]等细菌中也有通过突变天然启动子核心区的非保守序列构建人工启动子文库的报道。谷氨酸棒杆菌天然启动子具有高度保守的-10 区序列“TANNNT”，而-35 区保守性较低，-35 区与-10 区之间的间距为 16–19 bp，基于 RNA-seq 技术鉴定的转录起始位点及启动子预测软件无法预测出 P_{odhA} 启动子的-35 区^[27]。本研究基于谷氨酸棒杆菌天然启动子 P_{odhA} 构建启动子文库，针对启动子保守的-10 区及附近共 10 个碱基进行随机突变，成功获得 57 个表达强度增强的启动子突变体。我们发现几乎所有启动子突变体

产生的新的-10 区保守序列“TANNNT”均向 3'端移动了 1-4 个碱基 (图 4), 只有 2 个弱启动子突变体例外 (P3 和 P7), 表明启动子强度与-10 区序列的位置密切相关; 除了-10 区保守序列“TANNNT”中的 3 个保守碱基, 不同强度的启动子组在其他位置还呈现不同的 T 或 G 保守碱基。本研究证实, 对天然启动子的-10 区及附近序列突变可以构建高效人工启动子文库, 同时提示研究人员-10 区的位置及附近序列的保守性也是影响启动子强度的重要方面, 为人工启动子文库构建提供了新思路。

基于随机突变的方法构建启动子文库需要依赖高效的报告系统及筛选方法, 目前最常用的是荧光报告系统结合 FACS 进行高通量分选。由于单细胞分选之前需要通过扩大培养来实现荧光蛋白的表达, 导致细胞数量在原始文库基础上产生数量级的增长, 通常需要分选约 10^7 个细胞才能获得较好的启动子突变体^[18-19]; 同时荧光蛋白的表达受细胞生长状态等影响, 存在较高的假阳性, 通常需要多轮 (3-4 轮) 分选。该方法还依赖高端设备流式细胞仪, 较费时费力, 成本高。本研究采用的荧光报告系统结合常规国产荧光成像设备, 通过直接涂布平板后荧光成像, 可以快速实现原始细胞文库的筛选, 不需要扩大培养; 基于单菌落荧光亮度筛选也几乎不存在假阳性。本研究采用的文库筛选方法可以为快速筛选细菌启动子文库提供方法借鉴。

4 结论

本研究通过对谷氨酸棒杆菌天然启动子 P_{odhA} 的-10 区及附近序列随机突变, 基于 RFP 报告系统和荧光成像技术进行高通量筛选, 成功构建了相对强度范围为 2.4-16.7 倍的启动子文库。对 57 个启动子突变体进行序列特征分析, 发现-10 区保守序列“TANNNT”的位置移动

和部分其他位置呈现 T 或 G 保守碱基是启动子活性增强的关键。选择 5 个不同强度的启动子应用于 L-脯氨酸合成途径关键酶 ProB 的精细表达调控, 相对强度为 9.8 倍的启动子可达最高产量。本研究在谷氨酸棒杆菌中基于天然启动子 P_{odhA} 构建了高效启动子文库, 可为谷氨酸棒杆菌的精细代谢调控提供新元件。

REFERENCES

- [1] Woo HM, Park JB. Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol, 2014, 180: 43-51.
- [2] Lee JY, Na YA, Kim E, et al. The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse. J Microbiol Biotechnol, 2016, 26(5): 807-822.
- [3] Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. J Gen Appl Microbiol, 1957, 3(3): 193-205.
- [4] Wendisch VF, Jorge JMP, Pérez-García F, et al. Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*. World J Microbiol Biotechnol, 2016, 32(6): 105.
- [5] Becker J, Rohles CM, Wittmann C. Metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of chemicals, fuels, materials, and healthcare products. Metab Eng, 2018, 50: 122-141.
- [6] Wendisch VF. Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production. Metab Eng, 2020, 58: 17-34.
- [7] 田荣臻, 刘延峰, 李江华, 等. 典型模式微生物基因表达精细调控工具的研究进展. 合成生物学, 2020, 1(4): 454-469.
Tian RZ, Liu YF, Li JH, et al. Progress in the regulatory tools of gene expression for model microorganisms. Synth Biol J, 2020, 1(4): 454-469 (in Chinese).
- [8] Lutz R, Bujard H. 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 Res, 1997, 25(6): 1203-1210.
- [9] Choi JW, Yim SS, Lee SH, et al. Enhanced production of gamma-aminobutyrate (GABA) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* by expressing glutamate decarboxylase active in expanded pH range. Microb

- Cell Fact, 2015, 14: 21.
- [10] Yim SS, Choi JW, Lee SH, et al. Modular optimization of a hemicellulose-utilizing pathway in *Corynebacterium glutamicum* for consolidated bioprocessing of hemicellulosic biomass. ACS Synth Biol, 2016, 5(4): 334-343.
- [11] Becker J, Zelder O, Häfner S, et al. From zero to hero—design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production. Metab Eng, 2011, 13(2): 159-168.
- [12] Park SH, Kim HU, Kim TY, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-arginine production. Nat Commun, 2014, 5: 4618.
- [13] Vogt M, Krumbach K, Bang WG, et al. The contest for precursors: channelling L-isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* without byproduct formation. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(2): 791-800.
- [14] Zhang J, Qian F, Dong F, et al. *De novo* engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-proline production. ACS Synth Biol, 2020, 9(7): 1897-1906.
- [15] Hwang HJ, Lee SY, Lee PC. Engineering and application of synthetic *nar* promoter for fine-tuning the expression of metabolic pathway genes in *Escherichia coli*. Biotechnol Biofuels, 2018, 11: 103.
- [16] Jin LQ, Jin WR, Ma ZC, et al. Promoter engineering strategies for the overproduction of valuable metabolites in microbes. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(21/22): 8725-8736.
- [17] Jensen PR, Hammer K. Artificial promoters for metabolic optimization. Biotechnol Bioeng, 1998, 58(2/3): 191-195.
- [18] Yim SS, An SJ, Kang M, et al. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol Bioeng, 2013, 110(11): 2959-2969.
- [19] Wei L, Xu N, Wang Y, et al. Promoter library-based module combination (PLMC) technology for optimization of threonine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(9): 4117-4130.
- [20] Rytter JV, Helmark S, Chen J, et al. Synthetic promoter libraries for *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(6): 2617-2623.
- [21] Zhang S, Liu D, Mao Z, et al. Model-based reconstruction of synthetic promoter library in *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol Lett, 2018, 40(5): 819-827.
- [22] Asakura Y, Kimura E, Usuda Y, et al. Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(4): 1308-1319.
- [23] Vasicová P, Pátek M, Nesvera J, et al. Analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *dapA* promoter. J Bacteriol, 1999, 181(19): 6188-6191.
- [24] Li N, Zeng W, Xu S, et al. Obtaining a series of native gradient promoter-5'-UTR sequences in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Microb Cell Fact, 2020, 19(1): 120.
- [25] Kirchner O, Tauch A. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. J Biotechnol, 2003, 104(1/2/3): 287-299.
- [26] 王迎春, 刘娇, 倪晓蒙, 等. 基于时间序列转录组筛选谷氨酸棒杆菌内源高效组成型启动子. 生物工程学报, 2018, 34(11): 1760-1771.
Wang YC, Liu J, Ni XM, et al. Screening efficient constitutive promoters in *Corynebacterium glutamicum* based on time-series transcriptome analysis. Chin J Biotech, 2018, 34(11): 1760-1771 (in Chinese).
- [27] Pfeifer-Sancar K, Mentz A, Rückert C, et al. Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique. BMC Genomics, 2013, 14: 888.
- [28] Jiang Y, Qian F, Yang J, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. Nat Commun, 2017, 8: 15179.
- [29] Rud I, Jensen PR, Naterstad K, et al. A synthetic promoter library for constitutive gene expression in *Lactobacillus plantarum*. Microbiology, 2006, 152(4): 1011-1019.
- [30] Li T, Li T, Ji W, et al. Engineering of core promoter regions enables the construction of constitutive and inducible promoters in *Halomonas* sp.. Biotechnol J, 2016, 11(2): 219-227.

(本文责编 郝丽芳)