

枯草芽孢杆菌核黄素操纵子与 *ribC* 基因的 修饰与遗传效应

夏苗苗 刘露 班睿*

(天津大学化工学院 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300072)

摘要:【目的】研究核黄素操纵子(*rib*)组成型高表达,以及 *ribC* 基因低水平表达对枯草芽孢杆菌过量合成核黄素的影响。【方法】在染色体原位修饰启动子,用 mRNA 稳定子替换 mRNA 前导区,使 *rib* 操纵子组成型高表达;修饰 *ribC* 基因的启动子,降低 *ribC* 基因的表达水平。采用 qRT-PCR 方法,表征基因的相对表达水平;通过摇瓶发酵,测定重组菌的生物量和核黄素产量,表征相关基因修饰所表现的遗传效应。【结果】用 *gsiB* mRNA 稳定子替换核黄素操纵子的 mRNA 前导区,使其相对表达水平提高了约 1 500 倍。*ribC* 基因启动子-35 区的首个碱基由“T”突变为“C”,使 *ribC* 基因的表达水平下降了 97%以上。得到的重组菌株 LX34 在补加蔗糖 20 g/L 的 LB 培养基上摇瓶发酵 36 h,可积累核黄素 2.1 g/L,同时生物量没有明显下降。【结论】使用 *gsiB* mRNA 稳定子,能够有效地提高目标基因或操纵子的表达水平;启动子-35 区首个碱基的点突变,能够有效降低 *ribC* 基因的表达水平;*rib* 操纵子过量表达和 *ribC* 基因低水平表达,使细胞能够过量合成并积累核黄素。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 核黄素, *rib* 操纵子, *ribC* 基因, mRNA 稳定子

The genetic modification effect of *rib* operon and *ribC* gene in *Bacillus subtilis*

XIA Miao-Miao LIU Lu BAN Rui*

(Key Laboratory of Systems Biotechnology of the Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: [Objective] This research focus on the influence of *rib* operon constitutively over-expression and *ribC* gene low levels expression on the synthesis and accumulation of riboflavin in *Bacillus subtilis*. [Methods] For the constitutively over-expression of *rib* operon, its promoter was modified *in situ*, and the mRNA leader region was replaced by mRNA stabilizer. Using point mutations of its promoter -35 region, *ribC* gene transcription level was reduced. The transcription levels of the target genes were analysed by qRT-PCR method. The genetic effects of the modified genes were assessed by measuring the biomass and riboflavin production of the recombinant in shaking flask fermentation. [Results] The relative transcription levels of *gsiB* stabilizer-modified *rib* operon have increased about

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA02A701)

*通讯作者: 信箱: banrui@tju.edu.cn

收稿日期: 2014-04-29; 接受日期: 2014-06-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-06-12

1 500 times. The first base mutations of *ribC* promoter -35 region can lead to its expression levels decreased by more than 97%. With the LB medium supplemented with sucrose 20 g/L, fermentation was completed in 36 h and the resulting recombinant strains LX34 can accumulate riboflavin 2.1 g/L, meanwhile no significant decline in the biomass. [Conclusion] The *gsiB* mRNA stabilizer can effectively improve transcription levels of the target gene or operon. A point mutation in the first base of promoter -35 region can effectively reduce the transcription of *ribC* gene. The over-expression of *rib* operon and the expression reduced significantly of *ribC* gene result in the accumulation of riboflavin.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Riboflavin, *rib* operon, *ribC* gene, mRNA stabilizer

核黄素在全世界的年产量已超过 6 000 t, 被广泛地应用于食品、饲料和医药等领域。核黄素的工业生产主要是采用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的发酵生产技术。目前用于核黄素工业生产的 *B. subtilis* 菌株都是在诱变筛选的多重抗性突变株基础上, 结合基因工程改造所选育的突变型工程菌^[1-2]。由于经过反复的诱变处理, 高产核黄素菌株会出现许多不利的生理改变, 如代时延长、生物量下降、抗染菌能力差及产量性状不稳定等。如果完全采用精确的基因工程技术育种, 可以避免基因的意外损伤, 在核黄素高产的前提下, 保持菌株具有正常的生长速率和最大生物量。

B. subtilis 的核黄素生物合成涉及细胞的多个代谢途径。磷酸戊糖途径及下游延伸途径产生 5-磷酸核酮糖和磷酸核糖焦磷酸(PRPP), 嘌呤合成途径及下游延伸途径将 PRPP 转化为 GTP。核黄素合成途径以 5-磷酸核酮糖与 GTP 为前体物, 经过七步反应合成核黄素。在细胞的严格代谢调控下, *B. subtilis* 不会过量合成核黄素。只有完全解除各个相关代谢途径或生化反应的代谢调控机制, 细胞才能过量合成核黄素。

参与核黄素合成途径代谢所有酶的编码基因, 构成核黄素操纵子(*rib* operon)。*rib* 操纵子的表达受到严格的转录弱化调控, 效应物是核黄素的衍生物黄素腺嘌呤单核苷酸(FMN), 调控元件称为 *RFN* 元件, 位于 *rib* 操纵子的 mRNA 前导区。胞内较高水平的 FMN 将与 *RFN* 元件相互作用, 使 *rib* 操纵子 mRNA 前导区形成终止子结构而停止转录, 这种调控方式也称为“Riboswitch”调控机制^[3-5]。*rib* 操纵子

的组成型高表达是细胞过量合成核黄素的必要条件之一。可以通过诱变处理筛选玫瑰黄素抗性突变株, 使 *RFN* 元件点突变而解除 *rib* 操纵子的表达调控机制^[1]。也可以通过替换组成型强启动子和 mRNA 稳定子的基因工程修饰, 实现 *rib* 操纵子的组成型高表达^[6-7]。

mRNA 稳定子是一段 mRNA 前导区序列, 具有稳定下游序列, 延缓 mRNA 降解, 增加其半衰期的作用。使用 mRNA 稳定子提高目标基因的表达水平, 已经成为继使用强启动子和增加基因拷贝数之外的另一种有效手段。*B. subtilis* 的 *gsiB* 和 *asnH* 基因, 其 mRNA 前导区都具有 mRNA 稳定子功能。*gsiB* 稳定子全长 16 bp^[8], 用于高水平表达目标基因已有成功的先例, 但未见用于 *rib* 操纵子的表达。*asnH* 稳定子全长 365 bp^[9], 可使 *asnH* 基因的 mRNA 半衰期长达 1 h, 但未见实际应用的报道。

ribC 基因编码双功能的黄素激酶/FAD 合成酶, 顺序催化核黄素转化为 FMN 和 FAD。细胞内正常的黄素激酶/FAD 合成酶活性水平足以将过量合成的核黄素迅速转化, 导致细胞不积累和分泌肉眼观测水平的核黄素。*ribC* 基因是必需基因, 不能采用基因敲除的方法解决问题。目前采用的方法都是诱变筛选玫瑰黄素抗性突变株, 然后在这种抗性突变株中筛选 *ribC* 基因编码序列点突变, 黄素激酶的活性大幅度降低, 而能够积累和分泌核黄素的突变菌株^[10-12]。

在本研究的先期工作中, 已初步完成了嘌呤合成途径的基因工程改造, 构建了重组菌株 *B. subtilis* L30。在此基础上, 本研究将聚焦于核黄素合成及

相关途径的基因工程改造。通过修饰启动子和使用 mRNA 稳定子, 使 *rib* 操纵子组成型高表达。通过修饰启动子的-35 区, 降低 *ribC* 基因的表达水平。考察 *rib* 操纵子组成型高表达和 *ribC* 基因低水平表达, 对细胞核黄素过量合成和积累的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

菌株(表 1), 质粒 pE194 和 pC194 为本实验室保藏。PCR 引物(表 2)由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

表 1 菌株
Table 1 Strains

菌株 Strains	遗传标记及说明 Genetic markers and instructions	来源 Source
<i>B. subtilis</i> L30	<i>trpC2</i> , $\Delta araR::Para-neo$, $\Delta purR$, $\Delta guaC$, $\Delta purA$	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> 24A1	8-AG ^r , 6-SG ^r , DC ^r , ROF ^r , $\Delta ccpA::erm$, <i>recA</i> ⁺	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> LX31	<i>trpC2</i> , $\Delta araR::Para-neo$, $\Delta purR$, $\Delta guaC$, $\Delta purA$, <i>Arib</i> ⁺ : <i>cat</i>	This study
<i>B. subtilis</i> LX32	<i>trpC2</i> , $\Delta araR::Para-neo$, $\Delta purR$, $\Delta guaC$, $\Delta purA$, <i>rib</i> ⁺ (<i>gsiB</i>)	This study
<i>B. subtilis</i> LX33	<i>trpC2</i> , $\Delta araR::Para-neo$, $\Delta purR$, $\Delta guaC$, $\Delta purA$, <i>rib</i> ⁺ (<i>asnH</i>)	This study
<i>B. subtilis</i> LX34	<i>trpC2</i> , $\Delta araR::Para-neo$, $\Delta purR$, $\Delta guaC$, $\Delta purA$, <i>rib</i> ⁺ (<i>gsiB</i>), <i>ribC35</i> ^t	This study

表 2 PCR 反应引物
Table 2 PCR primers

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')
R1	ACATATTCCC GTTATGCATCG
R2	GAAGGTTTTATATTACAGCGAAATAAACTTACAATTTGAGAAAAAC
R3	ATGGGTGCTTTAGTTGAAGAGAGTTGGCACAGTGAAGCCG
R4	CTATTCCTTTGTCGGTTTTGCCG
C1	GCTGTAATATAAAAAACCTTC
C2	TCTTCAACTAAAGCACCCAT
R1'	GATAGAGGAGACATCGTCGTG
R2'	AGCGATCCTTTTTAAAGTTGTCAATGAAATAAACTTACAATTTGAGAAAAAC
R3'	AAATGGAAGAGTATTATATGAAGCTGGCCTTAGATCTTGCGAAGC
R4'	GCTCTTTCCAGATTTACTTTGC
P1	ATTGACAACCTTTAAAAAGGATCGCTATAATAACCAATAAGGACAAAAGGAGGAATTCAAAATGGAAGA GTATTATATGAAGCT
P2	AGCTTCATATAAATACTCTTCCATTTTGAATTCCTCCTTTTGTCTTATTGGTTATTATAGCGATCCTTTTTAA AGTTGTCAAT
B1	CTTTAAAAAGGATCGCTATAATAACCAATAAGGACAGAGGAAAAGGATGAAAAAGG
B2	CATATAAATACTCTTCCATTTGTTTCTCACCTCCTTATCAAGTTGGCGTG
RTrib1	TGGCTCTCATCGCTGTG
RTrib2	CATTGGCTTCTACGGTGTC
RTcepA1	ACGAGCATGTGGCGGAAT
RTcepA2	CGATAGCGACTGACGGTGT
RC1	GTATCAGGCGTGCTTCC
RC2	GTTTTGGTCGTAGAGCACACAGCAAGACATTCGCCAAT
Em1	GTGTGCTCTACGACCAA
Em2	CGCGATCCACTCGGCGTATGTTATTCA
RC3	CGCGGATCCCGTGAAGAGCATAACAG
RC4	CCGGAATTCCTCCATACAATTACGAACCTCCTC

1.2 酶和化学试剂

Taq 酶和 *Pfu* 酶购自北京全式金生物技术有限公司; PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物有限公司; 限制性内切酶、dNTP 和 cDNA 第一链合成试剂盒购自 Thermo scientific 公司; 细菌总 RNA 提取试剂盒购自 Tiangen 公司; iQTM SYBR Green supermix 购自 Bio-Rad 公司; 玫瑰黄素、核黄素标准品购自 Sigma 公司; 其他试剂均为进口试剂。

1.3 培养基和培养条件

B. subtilis 的一般培养均使用固体或液体的 LB 培养基[蛋白胨 10.0 g/L, 酵母抽提物 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, pH 7.0, 琼脂粉 15.0 g/L (固体培养基)], 摇瓶发酵培养使用在 LB 培养基中补加蔗糖 20 g/L 的 LBS2 培养基。培养温度为 37 °C, 液体培养的摇床转速为 220 r/min。用于筛选转化子的固体 LB 培养基, 根据需要加入红霉素 3 mg/L 或玫瑰黄素 100 mg/L。

1.4 基因操作

所有 DNA 片段都是以 *B. subtilis* L30 染色体或质粒为模板, 通过 PCR 扩增得到, DNA 片段的拼接采用重叠 PCR 方法^[13]。均采用 DNA 片段转化感受态细胞, 用 LB 抗性平板筛选重组子的方法, 实现目标基因或操纵子的染色体原位修饰。*B. subtilis* 感受态细胞的制备及转化方法, 均采用标准的 SPIZIZEN 方法^[14-15]。转化子的初步鉴定采用提取染色体、PCR 扩增、酶切、电泳及比较电泳图谱的方法。转化子的最终鉴定采用 DNA 测序方法, 委托北京奥科鼎盛生物科技公司进行 DNA 测序。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

所修饰基因或操纵子的表达水平, 采用测定胞内相应基因 mRNA 相对水平的方式进行表征。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法, 测定胞内的 mRNA 水平, 以 *ccpA* 基因作为参比基因。总 RNA 的提取、cDNA 第一链的扩增和 RT-PCR 的操作方法和条件, 分别按照所用试剂盒的操作说明进行。分别测定细胞在指数期和稳定期的 C_t 值, 每个样品 3 个平行, 以平均值按照公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 mRNA 的相对水平。

1.6 摇瓶发酵及生物量和核黄素的测定

摇瓶发酵分别采用 LB 培养基和补加蔗糖 20 g/L 的 LBS2 培养基, 500 mL 摇瓶装瓶量为 10%。在 37 °C、220 r/min 振荡培养 36 h。发酵液离心, 上清适当稀释后用分光光度计测定 A_{444} , 根据公式: 核黄素(g/L) = $A_{444} \times 10/323$, 计算发酵液中核黄素的含量。菌体沉淀用无菌水洗涤后重悬, 适当稀释, 用分光光度计测定 OD_{600} 值。

2 结果与分析

2.1 *rib* 操纵子缺陷菌株的构建

为了在 *B. subtilis* L30 的染色体原位进行 *rib* 操纵子的修饰, 需要先构建 *rib* 操纵子缺陷型菌株, 以方便后续的基因操作和转化子筛选。分别用引物 R1/R2 和 R3/R4 扩增 *rib* 操纵子的两段同源序列 (526 和 512 bp), 用引物 C1/C2 从质粒 pC194 上扩增氯霉素抗性基因片段 (920 bp)。将上述 3 个片段拼接为一个 1 958 bp 的片段, 氯霉素抗性基因片段位于两个同源片段之间。用这个拼接片段转化 *B. subtilis* L30 感受态细胞, 在氯霉素抗性平板上筛选转化子。因氯霉素抗性基因替换 *rib* 操纵子的启动子和 mRNA 前导区序列, 得到的转化子为 *rib* 操纵子失活的核黄素缺陷菌株 *B. subtilis* LX31。LX31 可以利用培养基中的外源核黄素, 所以在 LB 培养基上生长正常, 在 GMI 和 GMII 培养基上表现为生长延迟。但由于结构类似物的竞争作用, LX31 在含 100 mg/L 玫瑰黄素的 LB 平板上不能生长。

2.2 *rib* 操纵子的修饰及 mRNA 稳定子的替换

启动子的-35 区序列对启动子的强度有重要影响, 强启动子的-35 区序列更接近或相同于共同序列。野生型 *rib* 操纵子启动子-35 区序列为“TTGCGT”, 与共同序列“TTGACA”有所差异。野生型 *rib* 操纵子 mRNA 前导区的 *RFN* 元件是控制 *rib* 操纵子表达的关键序列。拟修饰 *rib* 操纵子的启动子-35 区, 使其与共同序列一致; 并分别用 *gsiB* 基因或 *asnH* 基因的 mRNA 稳定子替换 *rib* 操纵子的 mRNA 前导区, 实现 *rib* 操纵子的组成型高表达。*rib* 操纵子启动子及 mRNA 前导区修饰前后的序列如图 1 所示。

Wild-type	ATTGCGTACTTTAAAAAGGATCGCTATAATAACCAATAAGGACA -35 -10 +1GAGGGGAGGGAAACAAATGGAAGAGTATTATATGAA..... RBS Initiation codon
Modified by <i>gsiB</i> mRNA stabilizer	ATTGacaACTTTAAAAAGGATCGCTATAATAACCAATAAGGACA -35 -10 +1 aaaggaggaattcaaaATGGAAGAGTATTATATGAA..... RBS Initiation codon
Modified by <i>asnH</i> mRNA stabilizer	ATTGacaACTTTAAAAAGGATCGCTATAATAACCAATAAGGACA -35 -10 +1 gagggaaggat.....ccaactgataaggagtgaGAAACAAATGGAAG..... RBS Initiation codon

图 1 *rib* 操纵子序列及修饰Figure 1 The sequence and modification sequence of *rib* operon

注: 大写字母为原始序列; 小写字母为修饰后序列。

Note: Uppercase letters represent the wild-type sequence; Lowercase letters represent the modified sequence.

用 PCR 引物 R1'/R2' 扩增 *rib* 操纵子启动子及上游序列(998 bp), 在引物 R2' 中引入启动子-35 区的点突变。用引物 R3/R4' 扩增 *rib* 操纵子的第一个基因(*ribD*)编码序列(1 330 bp)。合成引物 P1 和 P2, 然后退火、延伸, 形成双链的 *gsiB* mRNA 稳定子及旁侧序列。将上述 3 个片段拼接为一个 2 411 bp 的片段, *gsiB* mRNA 稳定子位于中间。拼接产物转化 *rib* 操纵子缺陷菌株 LX31, 在玫瑰黄素抗性平板上筛选出转化子。转化子经测序验证, 得到了 *rib* 操纵子按预定设计及被 *gsiB* 稳定子替换的重组菌株 *B. subtilis* LX32。另外用引物 B1/B2 从 *B. subtilis* 染色体上扩增出 *asnH* mRNA 稳定子(446 bp), 与相同的 *rib* 操纵子启动子上游序列和 *ribD* 序列拼接。2 744 bp 的拼接产物转化 LX31 感受态细胞, 用玫

瑰黄素抗性平板筛选转化子, 得到了 *rib* 操纵子启动子修饰及 mRNA 前导区被 *asnH* 稳定子替换的重组菌株 *B. subtilis* LX33。

分别培养菌株 L30、LX32 和 LX33, 测定指数期和稳定期胞内 *rib* 操纵子的 mRNA 相对水平。RT-PCR 的扩增位置, 选择在位于 *rib* 操纵子中间的 *ribA* 基因内, 引物为 RTrib1 和 RTrib2。参比基因 *ccpA* 的 RT-PCR 引物为 RTccpA1 和 RTccpA2。测定的平均结果显示, 菌株 LX32 和 LX33 的 *rib* 操纵子胞内 mRNA 水平分别是对照菌株 L30 的 1 531 倍和 9 倍(表 3)。这一结果表明, *rib* 操纵子启动子-35 区的修饰, 对提高 *rib* 操纵子表达水平的贡献不大。而 *gsiB* 稳定子的替换非常有效地提高 *rib* 操纵子的表达水平, *asnH* 稳定子的效果则相对较差。

表 3 核黄素操纵子的 qRT-PCR 转录分析

Table 3 The transcription analysis of *rib* operon using qRT-PCR

	L30 <i>ccpA</i>	L30 <i>ribA</i>	ΔC_t	LX32 <i>ccpA</i>	LX32 <i>ribA</i>	ΔC_t	LX33 <i>ccpA</i>	LX33 <i>ribA</i>	ΔC_t
C _t 1	20.98	27.10	-	24.28	19.91	-	17.68	20.88	-
C _t 2	20.70	27.12	-	24.46	19.93	-	17.61	20.89	-
C _t 3	20.61	27.12	-	24.40	20.82	-	17.80	20.94	-
Mean	20.76	27.11	6.35	24.45	20.22	-4.23	17.70	20.90	3.20
$\Delta\Delta C_t$						-10.58			-3.15
$2^{-\Delta\Delta C_t}$						1 531.00			9.00

菌株 LX32 和 LX33 在 LB 平板上培养 3 d, 菌落未显示出肉眼可见的黄色。采用 LBS2 液体培养基摇瓶培养 36 h, LX32 的培养液显现出核黄素特有的黄绿色, 但核黄素的含量仅有约 0.10 g/L; 菌株 LX33 的培养液无明显黄绿色, 也未检出核黄素。两株菌的生长特征与对照菌 L30 相比, 均未有明显变化。

2.3 *ribC* 基因的修饰及低水平表达

菌株 LX32 的 *rib* 操纵子表达水平虽然大幅度提高, 但是核黄素产量却很低, 原因是过量合成的核黄素大部分被转化生成了辅酶 FMN 和 FAD, 而没有被积累和分泌。设计将 *ribC* 基因启动子的-35 区由“TTGCCG”修饰为“CTGCCG”, 以降低其表达水平, 减少胞内黄素激酶的酶量, 限制核黄素转化反应的代谢速率, 使核黄素能够过量积累和分泌。

用引物 RC1/RC2 扩增 *ribC* 基因的一段上游序列(1 382 bp), 作为上游同源臂; 用引物 Em1/Em2 从质粒 pE194 上扩增红霉素抗性基因片段(1 253 bp), 作为选择标记; 用引物 RC3/RC4 扩增包括启动子在内的 *ribC* 基因片段(1 828 bp), 作为下游同源臂。在引物 RC3 中引入 *ribC* 基因启动子-35 区的点突变, 即用“C”替换“T”。将上述 3 个片段顺序拼接为 4 463 bp 的片段, 拼接产物转化菌株 LX32 感受态细胞, 在红霉素抗性平板上筛选转化子。平板培养 36 h 后, 有约 1/2 的抗性单菌落呈现黄色, 表明有过量的核黄素被分泌。挑选黄色较深的菌落提取染色体, 对其 *ribC* 基因测序, 发现其 *ribC* 基因启动子-35 区发生了预定的点突变, 而白色菌落均不带有预定的点突变。带有预定点突变的转化子, 命名为 *B. subtilis* LX34。培养 LX34 菌株, 以 L30 为对照, 测定其胞内 *ribC* 基因的 mRNA 水平。结果显示, LX34 菌株 *ribC* 基因 mRNA 的平均水平只有 L30 菌株的 1/35 (表 4)。这表明 *ribC* 基因启动子-35 区首个碱基的“T→C”突变可使 *ribC* 基因的表达水平下降 97% 以上。*ribC* 基因表达水平的这种下降幅度, 有效地限制了核黄素的转化, 足以使细胞过量合成的核黄素能够积累和分泌, 形成了肉眼可见的黄色菌落。

表 4 *ribC* 基因的 qRT-PCR 转录分析
Table 4 The transcription analysis of *ribC* gene using qRT-PCR

	L30 <i>ccpA</i>	L30 <i>ribC</i>	ΔC_t	LX34 <i>ccpA</i>	LX34 <i>ribC</i>	ΔC_t
C ₁	15.35	18.08	-	15.55	23.12	-
C ₂	15.98	17.79	-	15.60	23.23	-
C ₃	15.30	17.83	-	15.71	23.02	-
Mean	15.54	17.90	2.36	15.62	23.12	7.50
$\Delta\Delta C_t$				5.14		
$2^{-\Delta\Delta C_t}$				0.029		

2.4 LX34 菌株的生长特征及产核黄素能力

本实验室保藏有一株产核黄素的菌株 *B. subtilis* 24A1^[16], 是经反复诱变筛选的多重抗性突变菌株, 虽然能够过量合成核黄素, 但其代时延长, 生物量降低, 特别容易染菌。分别使用 LB 培养基和 LBS2 培养基, 进行 LX34 和 24A1 菌株的摇瓶发酵培养, 分别测定发酵 36 h 时发酵液的 OD_{600} 和核黄素产量, 结果如图 2 所示。

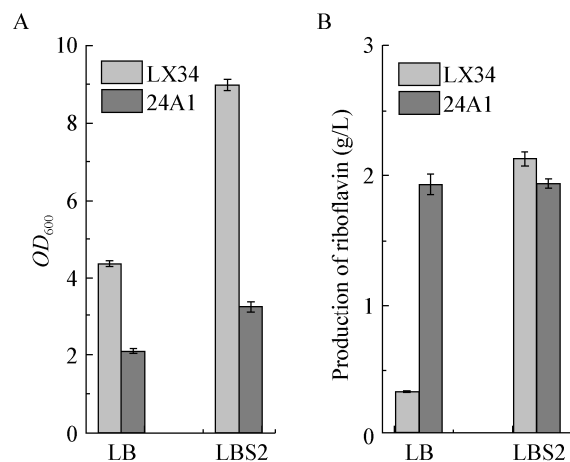


图 2 菌株 LX34 和 24A1 摇瓶培养 36 h 的 OD_{600} 和核黄素产量

Figure 2 The OD_{600} and riboflavin production of strains LX34 and 24A1 after shake culture 36 h

注: A: 生物量; B: 核黄素产量。

Note: A: Biomass; B: Production of riboflavin.

在两种培养基中, 菌株 LX34 的最大生物量均显著高于 24A1, 说明对 *rib* 操纵子和 *ribC* 基因的精确修饰没有对细胞的生长产生附加的不利影响。在 LB 培养基中, LX34 的核黄素产量低于 24A1; 而在补加了碳源的 LBS2 培养基中, 其核黄素产量高于 24A1, 可以达到 2.13 g/L。导致这一现象的原因, 可能与 LX34 的生长能力和较高的生物量有关。LB 培养基中有限的碳源浓度限制了 LX34 的生长和核黄素产量; 而补加 20 g/L 的碳源, 使 LX34 的生长能力和产核黄素能力得到了相对充分的体现。这一结果显示, 基因工程构建的菌株 LX34, 较之诱变育种筛选的菌株 24A1, 在生长和产核黄素方面都具有明显的优势。

3 讨论

本研究分别使用了 *gsiB* mRNA 稳定子和 *asnH* mRNA 稳定子替换 *rib* 操纵子的 mRNA 前导区。这一替换既可以解除 *rib* 操纵子的表达调控机制, 也可以延长其 mRNA 的半衰期, 达到 *rib* 操纵子组成型高表达的目的。从实际效果看, 使用 *asnH* mRNA 稳定子仅使 *rib* 操纵子的 mRNA 胞内水平相对提高了 9 倍。与受严格调控的野生型 *rib* 操纵子相比, mRNA 水平的提高很可能是 *rib* 操纵子组成型表达的结果, 而不是 *asnH* mRNA 稳定子延长 mRNA 半衰期所产生的效应。*asnH* mRNA 稳定子在 *rib* 操纵子的 mRNA 前导区, 基本没有起到稳定子的作用。前人的研究, 仅仅是观察到了 *asnH* 稳定子的稳定现象, 并没有阐明其稳定机制, 也没有实际应用的成功例子。本研究观察到的现象至少说明, *asnH* 稳定子没有广泛的稳定作用。与之相反, *gsiB* mRNA 稳定子在 *rib* 操纵子的 mRNA 前导区显现了非常突出的稳定效应, mRNA 相对水平提高了约 1 531 倍。如果考虑对照菌株 L30 受严格调控的 *rib* 操纵子, 可能干扰比较结果。用 *rib* 操纵子同为组成型表达的 LX33 和 LX32 菌株相比, *gsiB* mRNA 稳定子的稳定效应要超过 *asnH* 稳定子 100 倍以上。根据前人的研究与我们的观察判定, *gsiB* mRNA 稳定子用

于提高目标基因表达水平, 具有比较广泛的适应性, 并且效果突出。

启动子-35 区首个基因点突变能够大幅度降低 *ribC* 基因的表达水平, 能够达到显著减少胞内黄素激酶酶量和酶活性水平的目的。从菌株 LX34 的摇瓶发酵结果可以看出, *ribC* 基因表达水平的降低, 没有影响细胞的正常生长, 说明核黄素转化为 FMN 和 FAD 的限制没有影响细胞正常生长对 FMN 和 FAD 需要。另一方面从菌株 LX34 的核黄素产量看, *ribC* 基因表达水平的降低幅度足以满足细胞积累核黄素的需要。因此, 通过使启动子-35 区发生点突变而降低目标基因的表达水平, 在效果上是令人满意的, 在技术操作上是相对简单易行的。启动子-35 区不同位点的点突变, 导致目标基因表达水平下降的幅度也是不同的, 这为较精确的控制目标基因的表达水平提供了可能性。

核黄素生产菌 *B. subtilis* 24A1 完全来自于诱变育种。其 *rib* 操纵子 mRNA 前导区 *RFN* 元件内的 3 个点突变, 使其变为组成型表达。其 *ribC* 基因编码区的一个点突变, 使其编码产物黄素激酶的活性下降了 99%。菌株 24A1 是多种嘌呤结构类似物的抗性突变株, 这意味着其嘌呤合成途径相关基因或操纵子为组成型表达, 也意味着某些嘌呤代谢支路或者逆向反应被阻断。在 LBS2 培养基摇瓶发酵中, 菌株 LX34 的生长能力和产核黄素能力都超过了 24A1, 特别是最大生物量要超过一倍。这说明 24A1 菌株在诱变育种过程中, 可能发生了某些未知的基因突变, 削弱其生长能力, 这是诱变育种难以解决的问题。LX34 产核黄素能力优于 24A1, 一部分原因来自 LX34 较高的生物量, 也不排除基因工程精确修饰的遗传和生理效应优于诱变育种。有关菌株 LX34 产核黄素的优势和潜力, 还需要进一步的研究证明。

参考文献

- [1] Perkins JB, Sloma A, Pero JG, et al. Bacterial strains which overproduce riboflavin and methods of use thereof: United States Patent, US7091000B2[P]. 2003-12-18. <http://www.>

- google.com.hk/patents/US7091000
- [2] Charles AA, Andriy AS. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011, 75(2): 321-360
- [3] Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA. Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(14): 3141-3151
- [4] Mikhail SG, Andrey AM, Jomantas J, et al. A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes[J]. Genome Analysis, 1999, 15(11): 439-442
- [5] Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA. Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression[J]. Trends in Genetics, 2004, 20(1): 44-50
- [6] Lehmann M, Pragai Z, Schaber M. Increased production of a target product via stabilization of mRNA: European Patent, US8551732B2[P]. 2013-10-08 <http://www.google.com/patents/US8551732>
- [7] Lehmann M. Improved production of riboflavin: European Patent, EP2186880A1[P]. 2010-5-19. <http://www.google.com/patents/EP2186880A1?cl=en>
- [8] Jürgená B, Schwederá T, Hecker M. The stability of mRNA from the *gsiB* gene of *Bacillus subtilis* is dependent on the presence of a strong ribosome binding site[J]. Molecular and General Genetics, 1998, 258(5): 538-545
- [9] Morinaga T, Kobayashi K, Ashida H, et al. Transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *asnH* operon and role of the 5'-proximal long sequence triplication in RNA stabilization[J]. Microbiology, 2010, 156(6): 1632-1641
- [10] Mack M, Adolphus VL, Hohmann HP. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the favokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(40): 950-955
- [11] Coquard D, Huecas H, Ott M, et al. Molecular cloning and characterisation of the *ribC* gene from *Bacillus subtilis*: a point mutation in *ribC* results in riboflavin overproduction[J]. Molecular and General Genetics, 1997, 254(1): 81-84
- [12] Karelov DV, Kreneva RA, Errais LL, et al. Mutational analysis of the *ribC* gene of *Bacillus subtilis*[J]. Russian Journal of Genetics, 2011, 47(6): 856-861
- [13] Nikolai AS, Anton VB, Yevgeniya A, et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(2): e19
- [14] John S. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1958, 44(10): 1072-1078
- [15] Anagnostopoulos C, John S. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1961, 94: 741-746
- [16] Ying M, Ban R. Knockout of the *ccpA* gene in *Bacillus subtilis* and influence on riboflavin production[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(1): 23-27 (in Chinese)
应明, 班睿. 枯草芽孢杆菌 *ccpA* 基因敲除及其核黄素产量的影响[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 23-27