

# 大肠杆菌 *ptsHIcrr* 操纵子的快速敲除及敲除菌生长性能测定

周军智<sup>1,2</sup> 邹永康<sup>1,2</sup> 戴红梅<sup>2</sup> 李树龙<sup>2</sup> 蔡亚非<sup>1</sup> 方宏清<sup>2\*</sup>

(1. 安徽师范大学生命科学学院 安徽 芜湖 241000)

(2. 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

**摘要:** 敲除大肠杆菌磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(简称 PTS 系统) *ptsHIcrr* 操纵子, 考察敲除菌株生长特性并将其与 *ptsG* 敲除菌进行比较。利用 *I-Sce I* 特异性切割和 Red 同源重组方法成功构建了大肠杆菌 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* 敲除菌。在 LB 培养基中, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* 的生长行为与 DH5 $\alpha$  和 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* 明显不同, 其最高菌密度是 DH5 $\alpha$  和 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* 的近 2 倍, 而 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* 生长行为与 DH5 $\alpha$  无明显差异。但在含 1% 葡萄糖的 LB 中, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* 和 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* 均表现出生长优势, 最高菌密度依次是 DH5 $\alpha$  的 2.8 和 2 倍; 培养液中最终乙酸含量分别是 DH5 $\alpha$  的 12.2%、47%。在 M9 修饰培养基中, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* 比生长速率(1/h)和比葡萄糖消耗速率[g/(g·h)]明显低于 DH5 $\alpha$ , 并略低于 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG*。结果说明, *ptsHIcrr* 操纵子敲除菌改变了葡萄糖的代谢速率, 并呈现与 *ptsG* 基因敲除菌不同的代谢特点。

**关键词:** Red 同源重组, PTS 系统, *ptsHIcrr* 操纵子, 大肠杆菌

## One-step Knockout of the *ptsHIcrr* Operon in *Escherichia coli* and Characterization of the Mutant

ZHOU Jun-Zhi<sup>1,2</sup> ZOU Yong-Kang<sup>1,2</sup> DAI Hong-Mei<sup>2</sup> LI Shu-Long<sup>2</sup>  
CAI Ya-Fei<sup>1</sup> FANG Hong-Qing<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241000, China)

(2. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

**Abstract:** The *ptsHIcrr* operon of phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS) of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was deleted to generate DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* strain, and its characteristics of growth and metabolism were compared with that of DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG*. DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* were successfully constructed by using a one-step markerless deletion method that is a modified Red homologous recombination combined with specific cutting of *I-Sce I*. In LB medium, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* has a significant different characteristic of growth with DH5 $\alpha$  and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG*, and the maximum biomass of DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* is about two times of that of DH5 $\alpha$  or DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG*. However, there was

no difference between the growth of DH5 $\alpha$  and that of DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG*. In LB medium supplemented with 1% glucose, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* and DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* both grew better than DH5 $\alpha$ , and the maximal cell densities were approximately 2 times and 2.8 times of that of DH5 $\alpha$  respectively. In the end of culture, the concentrations of acetic acid of DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr*, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* were 12.2%, 47% of that of DH5 $\alpha$ . In a modified M9 medium, the specific growth rate (1/h) and the specific glucose consumption rate [g/(g·h)] of DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* were much slower than that of DH5 $\alpha$  and a little slower than that of DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG*. Altogether, the *ptsHIcrr* operon-deleted mutant changed the specific glucose consumption rate and showed many different characteristics of growth and metabolism from that of the  $\Delta$ *ptsG*-deleted mutant.

**Keywords:** Red homologous recombination, PTS system, *ptsHIcrr* operon, *Escherichia coli*

大肠杆菌主要通过磷酸烯醇式丙酮酸-糖磷酸转移酶系统(简称 PTS 系统)以基团转移方式进行葡萄糖的摄取,此系统对于菌体具有以下生理学意义:碳水化合物转运和代谢、分解物代谢阻遏、碳源储备、协调碳氮代谢平衡等<sup>[1]</sup>。PTS 系统包括 EI、HPr 以及 EIIs, 前两者为胞质可溶型蛋白, 分别由 *ptsH*、*ptsI* 编码, 后者多为蛋白复合体, 对碳水化合物具有特异性, 包括 EI<sup>Man</sup>、EI<sup>Fru</sup>、EI<sup>Bgl</sup>、EI<sup>A</sup><sup>Glc</sup>、EIICB<sup>Glc</sup>等<sup>[1]</sup>, 其中 *crr* 基因编码的 EI<sup>A</sup><sup>Glc</sup> 以及 *ptsG* 基因编码的 EIICB<sup>Glc</sup> 在葡萄糖磷酸化转运中起主要作用, EI<sup>A</sup><sup>Glc</sup> 蛋白的磷酸化及去磷酸化状态在“分解物代谢阻遏”中起关键作用<sup>[1]</sup>。EIICB<sup>Glc</sup> 介导的高效葡萄糖磷酸化转运易导致糖酵解循环和三羧酸循环的不平衡, 产生大量乙酸<sup>[2]</sup>。*ptsG* 缺陷株可以减小葡萄糖转运速率, 使胞内糖酵解循环和三羧酸循环趋于平衡, 进而减小乙酸分泌, 利于高密度发酵<sup>[2]</sup>。但是, *ptsG* 缺陷株仍然可以通过 PTS 系统转运葡萄糖, 如 EI<sup>Man</sup>等<sup>[1]</sup>。通过 PTS 系统转运葡萄糖, 葡萄糖的磷酸化需要磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)提供磷酸基团, 从而降低了胞内 PEP 水平<sup>[1]</sup>。PEP 是芳香族化合物合成代谢途径的主要前体之一。Flores 等通过自然筛选获得了 *ptsHIcrr* 缺陷株, 并以此缺陷株为基础构建了用于高效合成莽草酸等重要化合物的工程菌<sup>[3]</sup>。我们实验室参照文献[4-5]将 *I-Sce I* 特异性切割技术和 Red 重组技术相结合建立了一步无痕修饰 *E. coli* 基因组方法。运用此方法可以直接进行 PCR 筛选阳性重组子, 避免了现有基因组修饰方法费时费力、往往还残留下一些痕迹的缺点。本文应用这种“一步无痕修饰”方法构建了大肠杆菌 *ptsHIcrr* 敲除菌, 并测定了该敲除菌的生长性能, 为后续构建生产莽草酸及其他芳香族氨基酸工程菌株打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒与菌株:** 低拷贝辅助质粒 pKDS (为本室自行构建, 含  $\lambda$  噬菌体重组酶和 *I-Sce I* 归巢内切酶、温敏型复制子; *exo*、*bet*、*gam* 以及归巢内切酶均受阿拉伯糖启动子调控), 高拷贝打靶质粒 pG 以 pET-28a (+)为基础构建; 组成型表达 EGFP 的质粒 pCP-EGFP 为本室构建, DH5 $\alpha$  和 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* 为本实验室保存菌种。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶、DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; 葡萄糖检测试剂盒及乙酸检测试剂盒分别购自中生北控生物科技有限公司、Boehringer-Mannheim 公司; 氯霉素、卡那霉素购自 AMRESCO 公司; Electroporation System ECM 399 购自 HARVARD APPARATUS 公司, 其他均为分析纯化学试剂。

**1.1.3 培养基及培养条件:** LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10; LBG 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 葡萄糖 10; FMG 培养基(g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 7, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 3, NaCl 2.5, 酵母粉 12, 蛋白胨 15, 另加 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 和 2 g 葡萄糖; M9 修饰培养基(g/L)是在 M9 培养基基础上稍加修改获得的, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 64, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15, NaCl 2.5, NH<sub>4</sub>Cl 5.0, 另加 2 mL 1 mol/L MgSO<sub>4</sub> 和 100  $\mu$ L 1 mol/L CaCl<sub>2</sub>, 再加入终浓度为 0.2%的葡萄糖和 0.1%的酵母粉。氯霉素和卡那霉素工作浓度均为 50 mg/L。

**1.1.4 引物:** 引物 C1 及 C4 中带框序列分别为 *EcoR I*、*Xho I* 酶切位点, 带下划线序列为归巢内切酶特异性识别的 18 bp 碱基。*ptsHIcrr* 操纵子打靶

DNA 线性片段以重叠 PCR 获得, 故引物 C3 与 C2 部分序列反向互补, 鉴定引物 C5/C6。引物合成及相关测序均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

表 1 实验中所用引物  
Table 1 Primers in this research

名称 Name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
C1	CCGGAATTCAGGGGATAACAGGGTAATATGCCAG AAACCATGAGTAT
C2	AGTAAATGGGCGCATCTCGTGGATGTATTCCC CAACTTATAGG
C3	TCCACGAGATGCGGCCCAATTACT
C4	CCGCTCGAGTAGGGGATAACAGGGTAATCATCGCA AATCAAAATCCTT
C5	TTTTGAAGATAACTCGCTG
C6	ATGACACTTCTACGGTGGT

## 1.2 方法

**1.2.1 PCR 打靶片段及打靶质粒制备:** 以 DH5 $\alpha$  基因组为模板, 以 C1/C2 为引物进行 PCR 扩增得到 *ptsHIcrr* 操纵子左同源臂; C3/C4 为引物 PCR 扩增得到 *ptsHIcrr* 操纵子右同源臂, 再分别以回收的左右同源臂为共同模板, 以 C1/C4 为引物进行重叠 PCR 得到 *ptsHIcrr* 基因的线性打靶 DNA 片段 C1。打靶片段 C1 和 pET 载体经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 连接等步骤得到打靶质粒 pG。

**1.2.2 *ptsHIcrr* 操纵子快速敲除及鉴定:** (1) 电转化: 取 1  $\mu$ L 打靶质粒(1 mol/L)和 7  $\mu$ L 辅助质粒 pKDS (4 mol/L)至 50  $\mu$ L 电转感受态细胞并混匀, 冰浴后将混合物转移至已预冷的 1 mm 电击杯中, 1.8 kV 电击转化, 电击完成后迅速加入 1 mL SOC 培养基在 30 $^{\circ}$ C 以 220 r/min 振荡 1 h 培养后涂布卡那、氯霉素双抗平板, 筛选阳性转化子, 最终获得“共转菌液”。(2) 诱导敲除: 取 500  $\mu$ L 共转菌于 50 mL 含有氯霉素抗性的 FMG 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD 约 0.2 时, 加入终浓度为 0.2% 的 L-阿拉伯糖诱导 4 h, 诱导结束后取 100  $\mu$ L 诱导菌液稀释至 10 $^{-4}$ , 再取稀释菌液(10 $^{-4}$ ) 100  $\mu$ L 涂布氯霉素抗性平板, 30 $^{\circ}$ C 培养。基因敲除策略见图 1。(3) 敲除菌阳性菌落 PCR 鉴定及分离: 以上述氯霉素平板中单菌落为模板, 以 C5/C6 为引物进行菌落 PCR 以鉴定阳性重组菌落, 将含有辅助质粒的阳性菌落接种于液

体 LB, 42 $^{\circ}$ C 培养约 12 h 以剔除辅助质粒 pKDS, 随后将菌液涂布无抗平板, 37 $^{\circ}$ C 培养后随机挑取无抗平板中 20 个单菌接种于氯霉素抗性平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后, 不能在氯霉素抗性平板生长的单菌落所对应的无抗平板上的单菌落即是敲除菌。

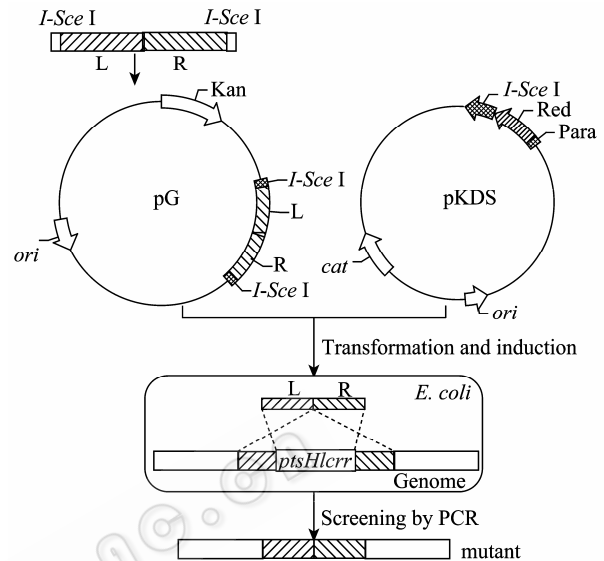


图 1 *ptsHIcrr* 基因敲除策略

Fig. 1 The one-step markerless deletion strategy of *ptsHIcrr* gene

Note: L: Upstream of *ptsHIcrr*; R: Downstream of *ptsHIcrr*.

**1.2.3 菌体生长曲线:** 分别挑取 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr*, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* 和 DH5 $\alpha$  单菌落于 5 mL LB, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜后取等量菌体转接至 50 mL LBG, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 继续培养, 定时测定菌体密度, 与此同时保留样品, 以测定发酵液葡萄糖浓度及乙酸含量。

**1.2.4 乙酸含量测定:** 参照乙酸检测试剂盒。

**1.2.5 葡萄糖含量测定:** 参照葡萄糖检测试剂盒。

**1.2.6 葡萄糖消耗速率测定参照文献[3]:**  $q_s = \mu/Y_{x/s}$  (其中,  $\mu = (dx/dt)/x$ ,  $Y_{x/s} = dx/ds$ ,  $-q_s = (ds/dt)/x$ ,  $-q_s$  为比葡萄糖消耗速率, g/(g·h);  $\mu$  为比生长速率, 1/h;  $Y_{x/s}$  为细胞得率, g/L;  $x$  为菌体浓度, g/L;  $S$  为葡萄糖浓度, g/L;  $t$  为培养时间, h)。

**1.2.7 EGFP 的表达:** 将组成型表达 EGFP 荧光蛋白的质粒 pCP-EGFP 转化至 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr*、DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* 和 DH5 $\alpha$ 。挑取单菌落接种于 5 mL LBG 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养过夜, 次日离心收获菌体, 对产物进行 SDS-PAGE 检测。

## 2 结果和分析

### 2.1 打靶质粒构建及 *ptsHIcrr* 敲除菌

将 *ptsHIcrr* 操纵子打靶片段经 *EcoR* I / *Xho* I 双酶切后与 pET-28a (+) 连接得到打靶质粒 pG。按图 1 所示方法敲除 *ptsHIcrr* 操纵子, 经 PCR 鉴定(图 2, 鉴定引物 C5/C6, 阳性产物大小约 2500 bp, 阴性产物大小约 5200 bp) 和测序确证(图 3) 成功敲除了 *ptsHIcrr* 操纵子, 获得了  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌。

### 2.2 $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$ 、 $DH5\alpha\Delta ptsG$ 及 $DH5\alpha$ 生长代谢特征比较

**2.2.1 LB、LBG 培养基中生长性能:** 在 LB 培养基中,  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌的对数生长期延长, 最高菌密度约为  $DH5\alpha$  的 2 倍, 而  $DH5\alpha\Delta ptsG$  敲除菌和  $DH5\alpha$  生长曲线几乎完全重合(图 4)。说明

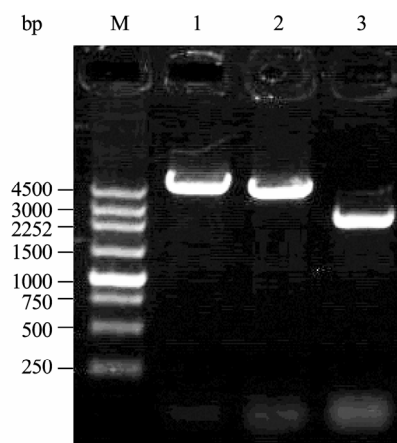


图 2  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  by PCR

注: M: DL250 DNA marker; 1,2: 野生型大肠杆菌  $DH5\alpha$ ; 3: *ptsHIcrr* 敲除菌。

Note: M: DL250 DNA marker; 1,2:  $DH5\alpha$ ; 3:  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$ .

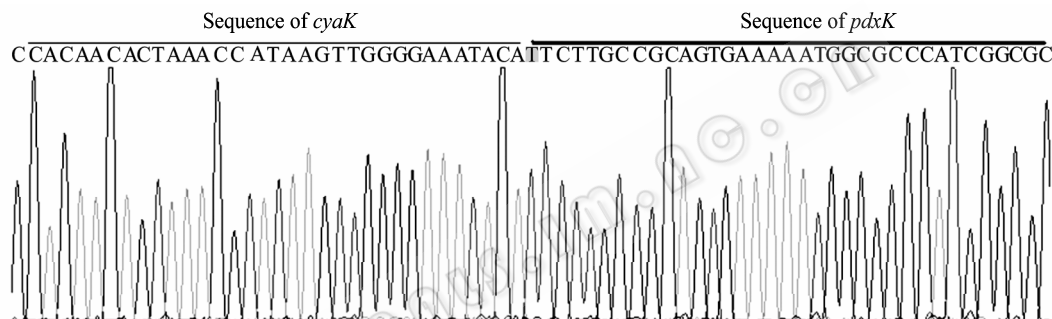


图 3  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  部分测序结果

Fig. 3 Sequence of  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$

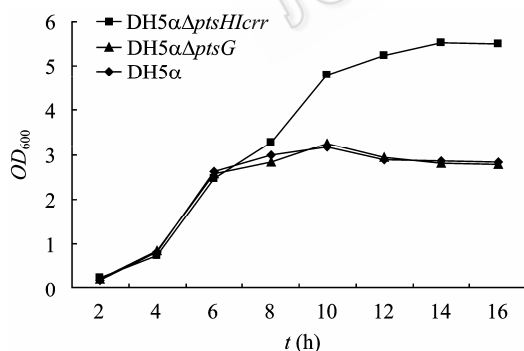


图 4  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$ 、 $DH5\alpha\Delta ptsG$  和  $DH5\alpha$  在 LB 培养基中的生长曲线

Fig. 4 Comparison of growth curves of  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$ ,  $DH5\alpha\Delta ptsG$  and  $DH5\alpha$  in LB medium

$DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌能更好的利用复合培养基进行生长。

在含有 1% 葡萄糖的 LBG 培养基中,  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌的最高菌密度与 LB 培养基中的基本相同, 但  $DH5\alpha\Delta ptsG$  敲除菌的最高菌密度是

LB 培养基中的 2.8 倍(图 5)。培养结束时,  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌和  $DH5\alpha\Delta ptsG$  敲除菌的葡萄糖消耗量分别是  $DH5\alpha$  的 59% 和 210%。 $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌和  $DH5\alpha\Delta ptsG$  敲除菌产乙酸水平分别为  $DH5\alpha$  的 12.2% 和 47% (表 2)。结果提示,  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌利用葡萄糖的能力及产酸水平大幅度降低。

**2.2.2 MY9 培养基中缺陷株生长代谢特征:** 为了比较准确地测定  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌利用葡萄糖的能力, 我们选择了 M9 修饰培养基, 以消除其他可以作为碳源的物质对菌体生长的影响。如图 6 所示,  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌、 $DH5\alpha\Delta ptsG$  敲除菌的菌密度分别是  $DH5\alpha$  的 24% 和 35%; 葡萄糖消耗量分别是  $DH5\alpha$  的 5.5% 和 21%。计算得出  $DH5\alpha\Delta ptsHIcrr$  敲除菌、 $DH5\alpha\Delta ptsG$  敲除菌和  $DH5\alpha$  的比生长速率 (1/h) 依次为 0.083、0.096 和 0.218; 比葡萄糖消耗速

率[g/(g·h)]依次是 0.073、0.084 和 0.294。以上结果说明: (1) *ptsHlcr* 敲除菌和 *ptsG* 敲除菌均能减小葡萄糖摄取速率, 前者葡萄糖转运速率相对较低。(2) *ptsHlcr* 敲除菌比葡萄糖消耗速率变化和比生长速率变化相一致, 也就是说可以通过控制比葡萄糖吸收速率来控制比生长速率。

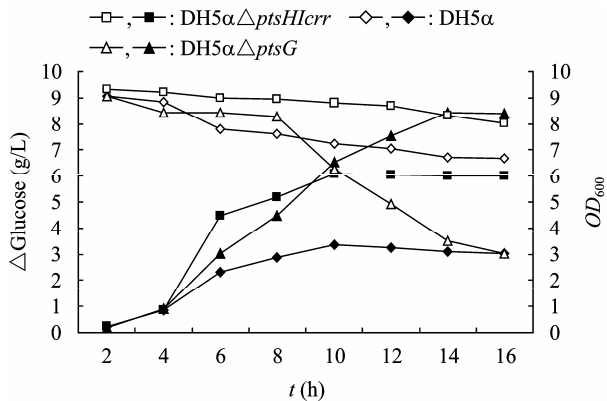


图 5 *DH5αΔptsHlcr*、*DH5αΔptsG* 和 *DH5α* 在 LBG 培养基中的生长

Fig. 5 Growth characteristics of *DH5αΔptsHlcr*, *DH5αΔptsG* and *DH5α* in LBG medium

注: 实心: 生长曲线; 空心: 葡萄糖消耗曲线。

Note: Solid: Cell growth kinetics; Hollow: Glucose consumption curves.

表 2 不同菌株在 LBG 中培养时乙酸形成的比较			
Table 2 Acetic acid determination of <i>DH5αΔptsHlcr</i> , <i>DH5αΔptsG</i> and <i>DH5α</i>			
菌株 Strains	<i>DH5αΔptsHlcr</i>	<i>DH5αΔptsG</i>	<i>DH5α</i>
乙酸含量 Content of acetic acid (mg/L)	155 ± 7	620 ± 7	1266 ± 37

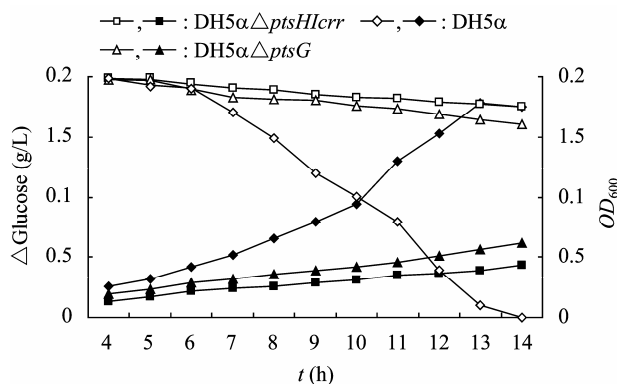


图 6 *DH5αΔptsHlcr*、*DH5αΔptsG* 和 *DH5α* 于 M9 修饰培养基中的生长性能

Fig. 6 Growth characteristics of *DH5αΔptsHlcr*, *DH5αΔptsG* and *DH5α* in modified M9 medium

注: 实心: 生长曲线; 空心: 葡萄糖消耗曲线。

Note: Solid: Cell growth kinetics; Hollow: Glucose consumption curves.

### 2.3 EGFP 蛋白表达及分析

用 SDS-PAGE 检测 EGFP 表达状况, 结果如图 7 所示。在 *DH5αΔptsHlcr*、*DH5αΔptsG* 和 *DH5α* 电泳图谱中, 在 27 kD 处有一明显表达带, 与 EGFP 理论值相符, 经 Gel-pro 软件分析发现缺陷株和对照株蛋白表达差异不明显。由于 *DH5αΔptsHlcr* 具有高密度发酵优势, 为此有利于目的蛋白表达。

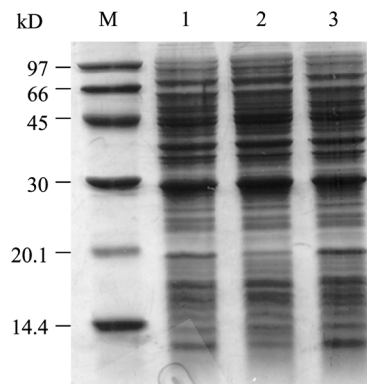


图 7 EGFP 在 *DH5αΔptsHlcr*、*DH5αΔptsG* 和 *DH5α* 中表达

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of EGFP expressed in *DH5αΔptsHlcr*, *DH5αΔptsG* and *DH5α*

注: M: Protein marker; 1: pCP-EGFP/*DH5αΔptsHlcr*; 2: pCP-EGFP/*DH5αΔptsG*; 3: pCP-EGFP/*DH5α*.

### 3 讨论

Red 重组技术具有短同源臂、高重组效率等优点而被广泛应用于大肠杆菌基因组修饰<sup>[4-5]</sup>, 但是目前常用的 Red 介导“两步基因剔除”方法会在基因组上遗留一些残余的片段, 如重组酶靶位点、标记基因等可能导致极性效应或基因重排, 并使后续操作变得复杂。而理想的基因组修饰技术应该简单、高效, 而且不残留多余的 DNA 片段<sup>[4-6]</sup>。

本文利用 Red 重组技术和 *I-Sce I* 特异性切割技术相结合的“一步无痕修饰”方法成功构建了 *DH5αΔptsHlcr* 敲除菌。辅助质粒 pKDS 含有在阿拉伯糖启动子控制下的 Red 重组酶基因和 *I-Sce I* 归巢内切酶基因。打靶质粒为高拷贝质粒, 在其打靶片段两侧各有一个 *I-Sce I* 酶切位点, 打靶片段对应于靶基因上下游各约 1000 bp 左右的同源臂。在终浓度 0.2% L-阿拉伯糖诱导下, Red 重组酶和 *I-Sce I* 酶共同表达, 归巢内切酶从辅助质粒上“切下”打靶 DNA 片段, 打靶片段随后在 Red 重组酶的作用下与基因组上对应区域进行重组, 实现基因剔除。该方

法具有操作简单、实验周期短、重组效率较高等特点, 可以直接用 PCR 筛选阳性重组子。在敲除 *ptsHIcrr* 操纵子实验中, 直接菌落 PCR 筛选阳性率为 7/80。本实验室曾用该方法构建了 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG*、JM109 $\Delta$ *ptsG*、HB101 $\Delta$ *ptsG* 和 BL21(DE3) $\Delta$ *ptsG*, PCR 阳性率依次为: 5/80、7/80、6/80 和 3/80。DH5 $\alpha$  和 JM109 来源于 K12 菌株, HB101 为 K12 和 B 杂交株, BL21 来源于 B 株, 说明此方法适用于不同系列的大肠杆菌。这种方法使 DNA 修饰变得更容易、更有效, 并有望成为功能基因组分析的有力工具。

大肠杆菌 *ptsHIcrr* 操纵子敲除后会降低菌体对葡萄糖的吸收速率, 从而降低菌体比生长速率和代谢产物乙酸的形成。此外, 由于 *crr* 基因的敲除解除了“分解物代谢阻遏”现象, 激活了 *ugpE*、*glpT*、*amt*、*cynX*、*cysZ* 等基因, 因此能更有效地利用复合培养基水解产物来维持菌体生长, 表现出在 LB 培养基中培养时可以获得更高的菌密度<sup>[7]</sup>。与 *ptsG* 敲除菌比较, *ptsHIcrr* 敲除菌彻底阻断了葡萄糖经过 PTS 途径入胞, 而 *ptsG* 敲除菌仍然能够利用 PTS 途径中的 EII<sup>Man</sup> 等运输体转运葡萄糖, 并利用 PEP 提供磷酸基团对其磷酸化, 降低胞内 PEP 水平(1 mol Glucose + 1 mol PEP  $\rightarrow$  1 mol Glucose-6-P + 1 mol Pyruvate)<sup>[8-9]</sup>。而在 *ptsHIcrr* 敲除菌中, 葡萄糖仅可以通过 GalP、Glc 协同作用途径入胞, 并以 ATP 为磷酸基团供体(1 mol Glucose + 1 mol ATP  $\rightarrow$  1 mol Glucose-6-P + 1 mol ADP)<sup>[10-11]</sup>, 而不是消耗 PEP。当外界葡萄糖浓度大于 0.2 mmol/L 时, PTS 缺陷株细胞外膜通道蛋白 OmpF、OmpC 和内膜蛋白 GalP 共同作用下完成葡萄糖低水平转运<sup>[12]</sup>。在含 2 g 葡萄糖/L 的 M9 修饰培养基中, DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr*、DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* 和 DH5 $\alpha$  的比葡萄糖消耗速率[g/(g·h)]分别为 0.073、0.084 和 0.294, 表明由 EIICB<sup>Glc</sup>、EII<sup>Man</sup> 以及 GalP 参与葡萄糖转运的速率依次减小, 其中由 GalP 介导的葡萄糖转运速率最低, 此结果与 Flores 等报道相一致<sup>[12]</sup>。当 M9 修饰培养基中葡萄糖浓度为 10 g/L 时, DH5 $\alpha$ 、DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsG* 和 DH5 $\alpha$  $\Delta$ *ptsHIcrr* 比葡萄糖消耗速率依然依次减小, 而且与比生长速率变化相一致(结果未给出), 进一步说明可以通过控制比葡萄糖吸收速率来控制比生长速率。

PTS 系统缺失菌株依赖 GalP 及 Glc 以 ATP 提供的磷酸基进行葡萄糖磷酸化转运, 该葡萄糖转运

系统减少了胞内 PEP 的浪费, 有利于莽草酸等芳香族产物的生物合成<sup>[13-14]</sup>。但上述实验结果说明, 通过 GalP 途径转运葡萄糖的速率极低, 因而不利于菌体生长。目前正在通过调控 *ptsHIcrr* 敲除菌中 *galP* 基因的表达以改善菌体生长行为, 为进一步构建高效合成莽草酸的工程菌打下基础。

## 参考文献

- [1] Deutscher J, Francke C, Postma PW. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, **70**(4): 939–1031.
- [2] Sigala JC, Flores S, Flores N, *et al.* Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles. *Microbiology Biotechnology*, 2009, **16**(3/4): 224–235.
- [3] Veronica HM, Gosset G. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000(157): 186–191.
- [4] Choulifa A, Perrin A, Duion B. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the *I-Sce I* system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1995, **15**(4): 1968–1973.
- [5] Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. *Annual Review of Genetics*, 2002(36): 361–388.
- [6] Courcelle J, Hanawalt PC. RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics*, 1999, **262**(3): 543–551.
- [7] Flores S, Flores N, Anda RD, *et al.* Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2005, **10**(1): 51–63.
- [8] Picon A, Teixeira MJ, Postma PW. Reducing the glucose uptake rate in *Escherichia coli* affects growth rate but not protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004(90): 191–200.
- [9] Phue JN, Shiloach J. Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109). *Journal of Biotechnology*, 2004(109): 21–30.
- [10] Nam TW, Jung H, Park YH, *et al.* Analyses of Mlc-IIB<sup>Glc</sup> interaction and a plausible molecular mechanism of Mlc inactivation by membrane sequestration. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences, 2008, **105**(10): 3751–3756.
- [11] Veronica HM, Martinez A, Georgina HC, *et al.* Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation production. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003(83): 687–694.
- [12] Flores N, Flores S, Escalante A, *et al.* Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metabolic Engineering*, 2005(7): 70–87.
- [13] Alvaro RL, Luis C, Guillermo G, *et al.* Utility of an *Escherichia coli* strain engineered in the substrate uptake system for improved culture performance at high glucose and cell concentrations: an alternative to fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, **99**(4): 893–901.
- [14] Flores N, Ledia L, Sigala JC, *et al.* Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. *Molecular Microbiology*, 2007, **13**(1/3): 105–116.

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高校教改纵横(原高等院校教学)、名师名课(原名师讲堂)、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

#### 3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 4 页以内,研究报告 4–7 页(以上均包括图表)。

#### 3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏),大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

#### 3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“*et al.*”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- 期刊: [1] 刘杰,成子强,史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 1–3.  
 [2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.
- 图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.  
 [4] 董志扬,张树政,方宣钧,等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华璐等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2010-00-00 ; 接受日期: 2010-00-00

(下转 p.1187)