

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的敲除对于谷氨酸棒杆菌 V1 生理代谢的影响

仇爱梅¹ 窦文芳² 李会² 许正宏^{2*}

(1. 江南大学 医药学院制药工程研究室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘 要: 【目的】L-缬氨酸生物合成的前体物质是丙酮酸。为了增加磷酸烯醇式丙酮酸向丙酮酸的代谢流向,优化 L-缬氨酸前体物质的供应,以一株积累 L-缬氨酸的谷氨酸棒杆菌 V1 (*Corynebacterium glutamicum* V1)为对象,构建磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)基因敲除的重组菌株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc,并研究 pepc 敲除后菌株生理特性的改变。

【方法】运用交叉 PCR 方法得到 pepc 基因内部缺失的同源片段 Δ pepc,并构建敲除质粒 pK18mobsacB- Δ pepc。利用同源重组技术获得 pepc 基因缺陷突变株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc。采用摇瓶发酵对 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 进行发酵特性的研究。对谷氨酸棒杆菌模式菌株 *C. glutamicum* ATCC 13032、出发菌株 *C. glutamicum* V1 和敲除菌株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 的丙酮酸激酶(Pyruvate kinase, PK)、丙酮酸脱氢酶(Pyruvate dehydrogenase, PDH)、丙酮酸羧化酶(Pyruvate carboxylase, PC)分别进行测定和分析。【结果】PCR 验证以及 PEPC 酶活测定都表明筛选到 pepc 缺陷的突变菌株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc,摇瓶发酵结果表明,突变菌株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 不再积累 L-缬氨酸而是积累 L-精氨酸达到 7.48 g/L。酶活测定结果表明出发菌株的 PDH 和 PC 酶活均低于模式菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 和重组菌株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc,出发菌株的 PK 与 PEPC 酶活与模式菌株没有较大的差异。【结论】研究表明,通过切断 PEPC 参与的三羧酸循环的回补途径,增加磷酸烯醇式丙酮酸向丙酮酸的流向使丙酮酸向 TCA 循环的流量增加,精氨酸的累积量提高。同时,以丙酮酸为前体的 L-缬氨酸和丙氨酸的积累量降低。

关键词: 谷氨酸棒杆菌, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶, L-缬氨酸, 基因敲除

*通讯作者: Tel: 86-510-85918206; 信箱: zhenghuxu@163.com

收稿日期: 2011-12-27; 接受日期: 2012-03-19

Effect of phosphoenolpyruvate carboxylase gene knock-out on physiological metabolism in *Corynebacterium glutamicum* V1

QIU Ai-Mei¹ DOU Wen-Fang² LI Hui² XU Zheng-Hong^{2*}

(1. Laboratory of Pharmaceutical Engineering, School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] In order to optimize precursor supply for L-valine biosynthesis, a *Corynebacterium glutamicum* V1 mutant with phosphoenolpyruvate carboxylase gene (*pepc*) in-frame deletion was constructed through crossover PCR and homologous recombination. The effect of *pepc* knock-out on physiological characteristics of the mutant was investigated. [Methods] The upstream and downstream fragments of *pepc* were cloned from *C. glutamicum* V1 chromosome and ligated to integration vector. The mutant *C. glutamicum* V1- Δ *pepc* was screened by homologous recombination. The physiological characteristics of the mutant were investigated by fermentation experiments and enzymes activity measurement of pyruvate carboxylase (PC), pyruvate dehydrogenase (PDH) and pyruvate kinase (PK). The mutant with *pepc* gene in-frame deletion was screened and confirmed by PCR and phosphoenolpyruvate carboxylase activity determination. [Results] The *pepc* knock-out resulted in L-arginine accumulation to 7.48 g/L and no accumulation of L-valine, which accompanied by increase of PDH activity and PC activity in *C. glutamicum* V1- Δ *pepc*. The knock-out of *pepc* gene affected the metabolism of the strain to some extent. [Conclusion] Blocking the anaplerotic pathway PEPC participated increased TCA cycle, leading to the increase of L-arginine and decrease of amino acids with pyruvic acid as precursor, such as L-valine and alanine.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, Phosphoenolpyruvate carboxylase, L-Valine, Gene knock-out

L-缬氨酸是人体必需氨基酸, 同时又是 3 种支链氨基酸之一, 因其特殊的结构和功能, 在人类生命代谢中占有特别重要的地位。因此 L-缬氨酸被广泛应用于医药、食品及化妆品等领域。医药方面, L-缬氨酸主要用于配制复合氨基酸制剂, 特别是应用于高支链氨基酸输液(如 3H 输液等)及口服液。近年来, 人们发现 L-缬氨酸是一种免疫抗生素的原料, 其用量猛增, 年消耗量已达数

千吨。

丙酮酸是 L-缬氨酸生物合成途径(图 1)的前体化合物, 经乙酰乳酸合成酶、乙酰乳酸异构还原酶等作用生成 L-缬氨酸, 因此丙酮酸的可利用性直接影响到 L-缬氨酸的生物合成。丙酮酸是由磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶的作用下生成的; 同时磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenolpyruvate, PEP)还可以在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的作用

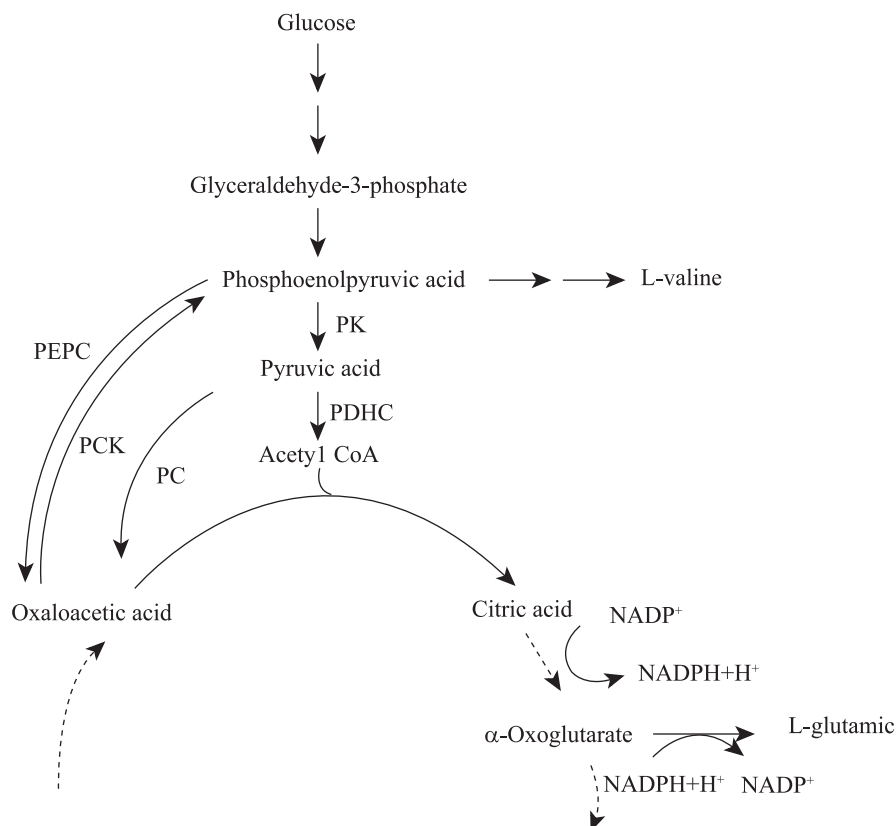


图 1 L-缬氨酸生物合成途径

Fig. 1 The biosynthetic pathway of L-valine

下生成草酰乙酸, 进入三羧酸循环, 在三羧酸循环中起着回补作用^[1]。多种细菌中的 PEPC 都已经得到研究^[2-3], 天冬氨酸和 α -酮戊二酸对其有抑制作用, 而乙酰辅酶 A 和果糖 1,6-二磷酸对其有激活作用^[3-5]。本文将一株生产 L-缬氨酸的菌株 *C. glutamicum* V1 中编码磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的基因 *pepc* 采用交叉 PCR 以及同源重组技术进行敲除, 从而阻断 PEPC 催化的回补途径, 减少 PEP 的代谢支流, 使 PEP 更多地流向丙酮酸, 并研究了基因 *pepc* 部分缺失后菌体的生理代谢状况。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒(表 1)

1.2 主要试剂和仪器

T4 DNA 连接酶、*ExTaq* DNA 聚合酶购自宝

生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); 溶菌酶、蛋白酶 K 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、小量质粒提取试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 苹果酸脱氢酶购自上海宝曼生物科技有限公司; L-乳酸脱氢酶和 CoAS-Na 购自 Sigma; NADH、NAD、ATP、ADP、TPP 等购自上海生工生物工程有限公司。其他试剂为进口或国产分析纯生化试剂。使用的仪器主要有: 凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 基因扩增仪, 美国 PE 公司(MJ); 台式高速冷冻离心机(1-15 k), 德国 Sigma 公司; 电热恒温水槽(DK-8D), 上海精宏实验设备有限公司; 全温摇瓶柜(HYG), 上海新蕊自动化设备有限公司。

1.3 培养基和培养条件

1.3.1 培养基: (1) LB^[6]培养基用于培养大肠杆

表 1 实验所用菌株和质粒
Table 1 The strains and plasmids used in this work

菌株和质粒 Strains or plasmids	特性 Characteristics	来源 Source
<i>E. coli</i> JM109		Stored in this lab
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	ATCC	Stored in this lab
<i>C. glutamicum</i> V1	L-valine producer	Stored in this lab
<i>C. glutamicum</i> V1- Δ <i>pepc</i>	V1 with <i>pepc</i> knock-out	This study
pMD19-T Vector	T-vector, 2.7 kb, Amp ^R , lacZ	TaKaRa
pK18 <i>mobsac</i> B	Km ^R , Suc ^S , Mobilizable <i>E. coli</i> vector	Stored in this lab
pK18 <i>mobsac</i> B- Δ <i>pepc</i>	pK18 <i>mobsac</i> B with <i>pepc</i> in-frame deletion fragment Δ <i>pepc</i> from V1	This study

菌。(2) LB 培养基中添加 3% 甘氨酸、0.1% Tween^[7-8]用于电击转化用 *C. glutamicum* V1 感受态细胞的培养。(3) LB 培养基加 0.5%葡萄糖用于菌株 *C. glutamicum* V1 的培养。(4) LB 培养基中添加 10%的蔗糖用于敲除菌株二次重组的筛选。(5) *C. glutamicum* V1 的摇瓶种子培养基(%): 葡萄糖 3, 生化玉米浆 1, (NH₄)₂SO₄ 2, KH₂PO₄ 0.45, MgSO₄ 0.05, FeSO₄ 0.001, MnSO₄ 0.001, VH 100 μg/L, 硫胺素 200 μg/L, CO(NH₂)₂ 0.35, pH 6.8–7.0, 装液量 25 mL/250 mL。(6) *C. glutamicum* V1 的摇瓶发酵培养基(%): 葡萄糖 12.5, (NH₄)₂SO₄ 3.5, 蛋白胨 2, KH₂PO₄ 0.45, MgSO₄ 0.05, FeSO₄ 0.001, MnSO₄ 0.001, VH 100 μg/L, 硫胺素 200 μg/L, pH 6.8–7.0。(7) *C. glutamicum* V1 的保藏斜面培养基(%): 蛋白胨 1, 牛肉膏 1, 酵母膏 0.3, 氯化钠 0.3, 琼脂 2, pH 7.0–7.2。抗生素使用浓度为: 氨苄青霉素 100 mg/L, 硫酸卡那霉素 50 mg/L。

1.3.2 培养条件: 大肠杆菌在 37 °C 培养, *C. glutamicum* ATCC 13032、*C. glutamicum* V1 和 *C. glutamicum* V1- Δ *pepc* 在 30 °C 培养。

1.4 DNA 操作

大肠杆菌 DNA 操作参照文献[6], 棒杆菌基因组 DNA 的提取参照文献[7,9]。大肠杆菌的转化采用 CaCl₂ 法, 谷氨酸棒杆菌的转化采用电击

转化法^[10]。
1.5 *pepc* 基因缺失片段的 PCR 扩增
参照 *C. glutamicum* ATCC13032 的 *pepc* 基因序列分别设计两对引物, 用于 PCR 扩增得到 *C. glutamicum* V1 的 *pepc* 内部缺失的片段 Δ *pepc*。
P1: 5'-CGGCCCCCGGGATGACTGATTTTTT A-3';
P2: 5'-TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGGACA TAAGGGTACCGTC-3';
P3: 5'-CCCATCCACTAAACTTAAACAATCA TCTCCGCTAAGTAC-3';
P4: 5'-ATCTAGACTAGCCGGAGTTGCGC A-3'。

下划线部分分别是限制性酶切位点 *Sma* I 和 *Xba* I, 斜体标示的是添加的21个碱基的互补序列。
以 *C. glutamicum* V1 的基因组为模板, ①用 P1、P2 引物对以及 P3、P4 引物对分别克隆左右同源臂: 95 °C 4 min; 94 °C 45 s, 57 °C 45 s, 72 °C 60 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。②用 P1、P4 引物对以分别克隆出的左右同源臂为模板克隆 *pepc* 内部缺失的同源片段 Δ *pepc*: 95 °C 4 min; 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 110 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

验证敲除是否成功的引物对是:
PEPCF: 5'-ACATCAGGTTCTCTCGGTCAAA T-3';

PEPCR: 5'-GGTTGTCATCAAGCAGATCATCA-3'。

验证 PCR 条件: 95 °C 4 min; 94 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 150 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成, DNA 测序由上海捷瑞生物工程有限公司完成。引物设计采用 DNAMAN 软件。

1.6 酶活分析

1.6.1 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶: 将 *C. glutamicum* ATCC 13032、*C. glutamicum* V1 和 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 接种于发酵培养基, 30 °C 培养 36 h 后, 离心收集菌体, 先低速离心去除 CaCO_3 , 然后用 100 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.5) 洗涤 2 次并重悬, 在冰浴条件下超声破碎菌体, 然后离心取上清液进行酶活测定。

采用苹果酸脱氢酶偶联^[11]的方法进行酶活测定: 3 mL 体系中含有: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 6 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸, 10 mmol/L NaHCO_3 , 0.15 mmol/L NADH, 1 mmol/L DTT, 2 U/mL 苹果酸脱氢酶, 3.3 mmol/L MnSO_4 , 适量的粗酶液。样品混合均匀后测定 A_{340} 值。其中 NADH 的摩尔消光系数为 6 220 L/(mol·cm)。

一个单位磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活力定义为: 反应体系中每分钟转化 1 μmol NADH 为 NAD^+ 所需的酶量。

1.6.2 丙酮酸脱氢酶系: 将 *C. glutamicum* ATCC 13032、*C. glutamicum* V1 和 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 分别接种于培养基中, 在 30 °C 摇床培养 36 h 后, 离心收集菌体。用 50 mmol pH 7.4 的磷酸钾盐缓冲液洗涤 2 次。冰浴条件下超声破碎, 然后离心取上清液进行酶活测定。

采用辅酶 A 法: 通过测定 NADH 的形成 (340 nm 光吸收的增加) 来实现。参照 Schwartz ER 等^[12]、Maldonado ME 等^[13]和 Nemeria N 等^[14]所用方法加以修改。

3 mL 反应体系中包含: 磷酸钾盐缓冲液

(pH 7.4) 50 mmol/L, MgCl_2 1.0 mmol/L, CoAS-Na 0.05 mmol/L, 半胱氨酸盐酸盐 3.0 mmol/L, TPP 0.2 mmol/L, NAD 2.0 mmol/L, 丙酮酸钠 2.0 mmol/L 和适量的粗酶液。对照为不加丙酮酸钠加入酶液反应起始。反应混合物在 30 °C 下预热 5 min, 然后加入酶液反应起始, 扫描时间为 10 min (室温 20 °C)。

酶活单位定义: 反应体系中每分钟转化 1 μmol NAD 为 NADH 所需的酶量。

1.6.3 丙酮酸羧化酶: 将 *C. glutamicum* ATCC 13032、*C. glutamicum* V1 和 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 分别接种于发酵培养基中, 在 30 °C 摇床培养 36 h 后, 离心收集菌体。用 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 6.3, 含 50 mmol/L NaCl) 洗涤 2 次, 适量 HEPES (100 mmol/L, 含 20% 甘油) 悬浮, 置于 -20 °C 保存。测定酶活前, 将之取出冰融, 加入 3% CTAB 使终浓度为 0.3%, 迅速混匀后室温作用 1 min, 取适量立即用于测定反应。

采用苹果酸脱氢酶偶联法^[15], 3 mL 反应体系含: Tris-HCl (pH 8.0) 100 mmol/L, 丙酮酸钠 20 mmol/L, NaHCO_3 10 mmol/L, MgCl_2 10 mmol/L, ATP 二钠盐 8 mmol/L, NADH 0.05 mmol/L, 苹果酸脱氢酶 1 U, 适量细胞 CTAB 悬液。

NADH 的氧化由 340 nm 光吸收测得。活力单位定义: 一个活力单位(U)为上述细胞处理和反应条件下, 每分钟转化 1 nmol NADH 所需的细胞量。

1.6.4 丙酮酸激酶: 将 *C. glutamicum* ATCC 13032、*C. glutamicum* V1 和 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 分别接种于发酵培养基中, 在 30 °C 摇床培养 36 h 后, 离心收集菌体。用 80 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.7) 洗涤 2 次, 用该缓冲液悬浮菌体, 置冰浴中超声破碎菌体细胞。细胞破碎液经 8 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液用于酶活测定。

采用乳酸脱氢酶偶联法测定^[16], 1 mL 反应体系含: Tris-HCl (pH 7.7) 80 mmol/L, KCl

20 mmol/L, MnCl_2 10 mmol/L, PEP 5 mmol/L, ADP 0.33 mmol/L, NADH 0.067 mmol/L, 9 U 乳酸脱氢酶, 适量的粗酶液。于 340 nm 测定吸光值。

一个酶活力单位定义为: 反应体系中每分钟转化 1 μmol NADH 所需的酶量。

1.6.5 粗酶液中蛋白总含量的测定: 采用考马斯亮蓝法^[17]。

2 结果与讨论

2.1 基因 *pepc* 内部缺失的同源片段 Δpepc 的获得和重组质粒 pK18mobsacB- Δpepc 的构建及验证

以 *C. glutamicum* V1 的基因组为模板, P1、P2 为引物, PCR 扩增得到基因 *pepc* 同源臂 A, 其长度为 790 bp 左右; 同时以 P3、P4 为引物, PCR 扩增出基因 *pepc* 另一同源臂 B, 长度约 850 bp 左右; 然后再以 P1、P4 为引物, 以同源臂 A、B 作为模板进行 PCR 扩增, 得到的基因片段即为基因 *pepc* 内部缺失的同源片段基因 Δpepc , 全长为 1 700 bp 左右, 同源片段 Δpepc 成功构建。

将缺失片段 Δpepc 连接至 pMD19-T 载体上, 连接完毕将其转化进入 *E. coli* JM109 中, 挑取转化子并培养 12 h, 然后提取质粒。分别对质粒 pMD19-T- Δpepc 以及 pK18mobsacB 利用限制性内切酶 *Xba* I 与 *Sma* I 进行双酶切。回收并纯化酶切后的同源片段 Δpepc 以及质粒 pK18mobsacB, 然后将同源片段 Δpepc 连接至质粒 pK18mobsacB 上, 构建出重组质粒 pK18mobsacB- Δpepc , 然后将其转化进入 *E. coli* JM109 中进行扩增, 挑取转化子并过夜培养, 提取质粒通过限制性内切酶 *Xba* I 与 *Sma* I 双酶切验证, 取验证成功的重组质粒进行后续试验。

2.2 敲除菌株 *C. glutamicum* V1- Δpepc 的筛选以及验证

将重组质粒 pK18mobsacB- Δpepc 利用电击转化方法转入菌株 *C. glutamicum* V1, 涂布到含

有卡那霉素的平板上, 重组质粒在 *C. glutamicum* V1 的染色体上定点整合, 在含有卡那霉素的平板上生长得到第一次重组的转化子。然后将此转化子转接到含有 10% 蔗糖的 LB 培养基中, 由于重组质粒 pK18mobsacB- Δpepc 上含有 *sacB* 基因, 对蔗糖敏感而不能生长。因此蔗糖的存在使重组质粒从染色体上分离, 从而不再具有 *sacB* 基因。通过菌落基因组 PCR 鉴定筛选成功敲除的菌株 *C. glutamicum* V1- Δpepc 。

为了验证 *pepc* 已经被成功敲除, 对菌株 *C. glutamicum* V1- Δpepc 进行了 PCR 验证和 PEPC 酶活测定。将筛选得到的敲除菌株提取基因组作为模板, 以 PEPCF 和 PEPCR 为验证引物进行 PCR 扩增, 得到比 *pepc* 原始长度 2 760 bp 小了约 1 200 bp 的敲除片段, 即得到约 1 500 bp 的片段(图 2)。与预期的结果是一致的。经 PCR 产物测序亦验证了 *pepc* 已经成功敲除。

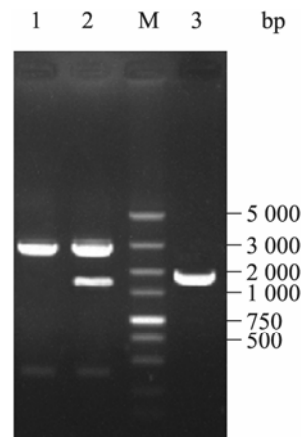


图 2 *pepc* 基因敲除菌株的 PCR 验证

Fig. 2 Characterization of defined *pepc* knock-out mutant by PCR analysis

注: M: DNA 标准分子量 DL5000; 1: *C. glutamicum* V1 中的基因 *pepc* 的 PCR 产物; 2: 带有质粒 pK18mobsacB- Δpepc 的菌株 *C. glutamicum* V1 中基因 *pepc* 的 PCR 产物; 3: 突变菌株 *C. glutamicum* V1- Δpepc 中基因 *pepc* 的 PCR 产物。

Note: M: DNA marker DL5000; 1: PCR fragment of *pepc* in *C. glutamicum* V1; 2: PCR fragment of *pepc* in *C. glutamicum* V1 with pK18mobsacB- Δpepc ; 3: PCR fragment of *pepc* in *C. glutamicum* V1- Δpepc .

同时对菌株 *C. glutamicum* V1 和 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 进行 PEPC 酶活测定。结果表明菌株 *C. glutamicum* V1 的比酶活为 0.40 ± 0.017 U/mg, 而 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 测不到 PEPC 的酶活。因此表明 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 的确是 *pepc* 基因内部缺失的突变菌株。

2.3 基因 *pepc* 敲除对于菌株 *C. glutamicum* V1 的生理生化影响

采用摇瓶发酵对菌株 *C. glutamicum* V1 和 *pepc* 内部缺失的突变菌株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 进行生理特性的对比研究。

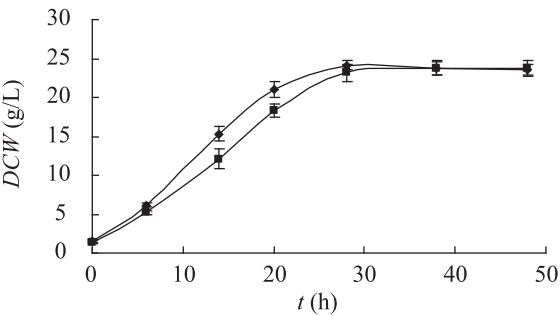


图 3 出发菌与突变菌生长曲线
Fig. 3 Growth curve of *C. glutamicum* V1 and *C. glutamicum* V1- Δ pepc
注: ◆: 菌株 *C. glutamicum* V1 的生长曲线; ■: 菌株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 的生长曲线。
Note: ◆: Growth curve of *C. glutamicum* V1; ■: Growth curve of *C. glutamicum* V1- Δ pepc.

由生长曲线可以看出(图 3), 突变菌株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 的生长略缓于出发菌株 *C. glutamicum* V1, 但最终在稳定期 34 h 后与出发菌株相比没有较大差异。

发酵 48 h 结束后, 将菌株 *C. glutamicum* V1 和突变菌株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 的发酵液处理后进行所有氨基酸分析, 结果如表 2 所示, 同时将模式菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 的发酵液也进行了氨基酸含量分析。由表中可以看出, 以草酰乙酸为前体合成的氨基酸如赖氨酸、天冬氨酸和苏氨酸的浓度明显降低, 以 α -酮戊二酸为前体合成的氨基酸的浓度明显提高, 尤其是精氨酸产量由 0.0073 g/L 提高到 7.48 g/L; L-缬氨酸的积累量却降至 0.15 g/L, 与 L-缬氨酸有共同前体的亮氨酸和丙氨酸的积累量也明显降低。

2.4 丙酮酸脱氢酶、丙酮酸羧化酶和丙酮酸激酶的测定

为了探讨 *pepc* 基因敲除引起的碳代谢流的改变, 我们测定了不积累 L-缬氨酸的模式菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 (表 2)、积累 L-缬氨酸的出发菌株 *C. glutamicum* V1 和 *pepc* 基因内部缺失的突变菌株 *C. glutamicum* V1- Δ pepc 的丙酮酸激酶、丙酮酸脱氢酶、丙酮酸羧化酶以及磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的活性(表 3)。

表 2 发酵液中的氨基酸分析 Table 2 The amino acids analysis of fermentation broth									
菌株 Strains	氨基酸浓度 <i>c</i> (Amino acid) (g/L)								
	D	E	T	R	A	V	L	K	P
<i>C. glutamicum</i> V1	0.0032 ± 2.1 E-4	0.16 ± 0.012	0.029 ± 0.00 2 3	0.0073 ± 5.8 E-4	1.32 ± 0.13	14.60 ± 0.74	0.092 ± 0.00 7 5	1.16 ± 0.082	0.22 ± 0.019
<i>C. glutamicum</i> V1- Δ pepc	0.00031 ± 2.7 E-5	0.49 ± 0.043	0.0016 ± 1.3 E-4	7.48 ± 0.37	0.26 ± 0.018	0.15 ± 0.009	$1.36\text{E}-5\pm$ $1.1\text{E}-6$	0.88 ± 0.053	1.26 ± 0.11
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	0.092 ± 0.00 5 7	0.25 ± 0.019	0.11 ± 0.009	0.34 ± 0.021	0.30 ± 0.022	0.22 ± 0.019	0.62 ± 0.053	0.56 ± 0.031	0.048 ± 0.00 3 5

表 3 不同菌株中 PEPC、PDH、PK 和 PC 的比酶活
Table 3 Specific activities of PEPC, PDH, PK and PC of different strains

菌株 Strains	PEPC (U/mg protein)	PDH (U/mg protein)	PK (U/mg protein)	PC (U/mg cell)
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	0.38±0.015	0.63±0.058	0.76±0.026	5.24±0.530
<i>C. glutamicum</i> V1	0.40±0.017	0.23±0.021	0.75±0.024	1.93±0.018
<i>C. glutamicum</i> V1-Δ <i>pepc</i>	0	0.58±0.051	0.73±0.011	6.24±0.620

由表 3 可知, 出发菌株与模式菌株的 PEPC 酶活并没有较大的区别, 3 株菌的 PK 酶活也相差不多。但是出发菌株的 PDH 和 PC 酶活均低于模式菌株和突变菌株, 表明模式菌株与突变菌株在丙酮酸节点处的代谢通量主要流向三羧酸循环, 这也解释了模式菌株与突变菌株不能积累 L-缬氨酸的现象。

3 讨论

丙酮酸是 L-缬氨酸生物合成途径中的重要前体物质, 它是由 PEP 在 PK 的催化作用下生成的。同时 PEP 和 CO₂ 还可以在 PEPC 的催化作用下不可逆地生成草酰乙酸, 这是三羧酸循环途径中的回补途径。本工作是利用同源重组技术构建了 *pepc* 基因敲除的突变菌株, 试图减少回补途径对于 PEP 的竞争性利用, 增加 PEP 向丙酮酸合成途径的代谢流量。实验结果表明, *pepc* 基因敲除导致突变株完全丧失 PEPC 活性。突变株的生理代谢发生了变化, 不再积累 L-缬氨酸, 同时赖氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、亮氨酸和丙氨酸的产量明显降低, 而谷氨酸和精氨酸的产量提高, 尤其是精氨酸由 0.007 3 g/L 提高到 7.48 g/L。

PEPC 催化 PEP 生成草酰乙酸, 当敲除 PEPC 后, PC 酶活的增强一定程度上补充了草酰乙酸的合成量, 但是以草酰乙酸为前体的氨基酸(赖氨酸、天冬氨酸和苏氨酸)的合成量的减少表明 PC 催化生成的草酰乙酸仍然不足以补充 PEPC 途径阻断所引起的草酰乙酸的减少, 这也表明 PC 催

化生成的草酰乙酸相比 PEPC 催化的回补途径生成的草酰乙酸要占少量。野生型棒杆菌在以葡萄糖为碳源生长时, 作为回补酶, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶和丙酮酸羧化酶可以相互替代, 二者同时表现活性, 但所起作用的程度有所不同, 丙酮酸羧化酶催化的途径对 C3 羧化活性的贡献占 90% 以上^[18-19], 应该是因为菌株前期经过一些传统诱变导致菌株的代谢流发生改变。以丙酮酸为前体物质的氨基酸(L-缬氨酸、亮氨酸和丙氨酸)产量的降低和 α-酮戊二酸为前体合成的氨基酸(谷氨酸和精氨酸)尤其是精氨酸产量的激增表明在突变菌株 *C. glutamicum* V1-Δ*pepc* 中代谢流通向 TCA。酶活测定结果表明突变菌株的 PDH 和 PC 活性比出发菌株高。这都表明敲除 PEPC 后, 代谢流并没有流向 L-缬氨酸, 反而是增强了 PDH 和 PC 的活性, 流向了 TCA 循环。同时可以推测 PDH 和 PC 催化的途径在高产 L-缬氨酸的菌株中有所削弱, 实验结果也证实了这一推测: 即出发菌株 *C. glutamicum* V1 的 PDH 和 PC 的酶活较模式菌株 *C. glutamicum* ATCC13032 低。当突变菌株 *C. glutamicum* V1-Δ*pepc* 中的 PEPC 途径被阻断, 其 TCA 循环途径受到影响, 从而导致 PDH 以及 PC 催化途径的代谢流增强, 表现为 PDH 以及 PC 的酶活较出发菌株 *C. glutamicum* V1 有明显的增强。但同时丙酮酸的代谢流流向 TCA 途径相比出发菌 *C. glutamicum* V1 的通畅使丙酮酸的有效积累浓度降低, 从而导致以丙酮酸为前体的氨基酸无法大量积累, 如 L-缬氨酸和丙氨酸。

陆敏涛等的研究工作表明, *C. pekinense* PD-67 的 *pepc* 基因敲除后菌体代谢变化较大, 生长变慢, 同时以丙酮酸为前体的氨基酸如 L-缬氨酸等积累量增加了 3 倍^[20]。而本实验中 *pepc* 基因敲除后, 菌株生长影响相对较弱, 表明其 TCA 循环影响相对较小, 菌株的 PDH 和 PC 活性增强也表明 PEPC 缺失对 TCA 循环代谢影响得到有效的补偿。但 PDH 和 PC 活性增强使丙酮酸向 TCA 代谢相对增强, 生成氨基酸所需的丙酮酸的有效浓度降低, 导致以丙酮酸为前体的缬氨酸、丙氨酸的累积量降低。国内外有关磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶缺陷对 L-缬氨酸合成影响的报道不多。本实验结果表明通过仅切断 PEPC 参与的三羧酸循环的回补途径, 增加磷酸烯醇式丙酮酸向丙酮酸的流向并不能提高 *C. glutamicum* V1 中 L-缬氨酸的积累。

参 考 文 献

- [1] Eikmanns BJ, Follettie MT, Griot MU, et al. The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression[J]. Molecular and General Genetics, 1989, 218(2): 330–339.
- [2] Izui K, Matsuda Y, Kameshita I, et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli* inhibition by various analogs and homologs of phosphoenolpyruvate[J]. Journal of Biochemistry, 1983, 94(6): 1789–1795.
- [3] Mori M, Shiio I. Purification and some properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-overproducing mutant[J]. Journal of Biochemistry, 1985, 97(4): 1119–1128.
- [4] Mori M, Shiio I. Synergistic inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by aspartate and 2-oxoglutarate in *Brevibacterium flavum*[J]. Journal of Biochemistry, 1985, 98(6): 1621–1630.
- [5] Mori M, Shiio I. Multiple interaction of fructose 1, 6-bisphosphate and other effectors on phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-producing mutant[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1986, 50(10): 2605–2614.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 1595.
- [7] 余秉琦, 沈微, 诸葛健. 适用于异源 DNA 高效整合转化的谷氨酸棒杆菌电转化法[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(2): 78–81.
- [8] Kirchner O, Tauch A. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 104(1/3): 287–299.
- [9] Peters-Wendisch P, Stolz M, Etterich H, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7139–7144.
- [10] 沈天翔, 那淑敏, 肖文中, 等. 棒状类细菌电击转化中多种条件对转化效率的影响[J]. 生物工程学报, 1995, 11(3): 245–249.
- [11] O'Regan M, Thierbach G, Bachmann B, et al. Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032[J]. Gene, 1989, 77(2): 237–251.
- [12] Schwartz ER, Reed LJ. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*[J]. Biochemistry, 1970, 9(6): 1434–1439.
- [13] Maldonado ME, Oh KJ, Frey PA, et al. Studies on *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1972, 247(9): 2711–2716.
- [14] Nemeria N, Yan Y, Zhang Z et al. Inhibition of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex E1 subunit and its tyrosine 177 variants by thiamin 2-thiazolone and thiamin 2-thio-thiazolone diphosphates[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(49): 45969–45978.

- [15] 王绛, 刘阳剑, 王宇, 等. 钝齿棒杆菌 CD945 丙酮酸羧化酶基因的克隆、序列分析及表达[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 214-219.
- [16] Jetten MS, Gubler ME, Lee SH, et al. Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(7): 2501-2507.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [18] Petra G, Wendisch P, Volker F, et al. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Microbiology, 1997, 143(4): 1095-1103.
- [19] Petersen S, de Graaf AA, Eggeling L, et al. *In vivo* quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(46): 35932-35941.
- [20] 陆敏涛, 赵智, 张英姿, 等. 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的敲除对北京棒杆菌 PD-67 的生理代谢的影响[J]. 微生物学报, 2010, 50(10): 1334-1340.

书 讯

欢迎订阅《英语科技论文撰写与投稿(第二版)》

本书是科技论文写作与投稿的指南读物, 书中全方位地分析和展示了科技论文写作的技巧与诀窍。从论文选题、科技写作的道德规范、拟投稿期刊的选择等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量的实例分析阐述了论文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则, 分别从写作技巧、时态和语态的使用等角度介绍了科技论文正文的撰写, 举例说明了致谢及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

书中还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 从选词、重要语法和文体等方面系统地阐述了科技英语写作的文法与表达, 全面总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、在线投稿、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。此外, 还从 PPT 制作、会议讲演等方面系统地阐述了会议报告的准备与口头交流的注意事项。

本书可作为理工科研究生的教学用书或自学教材; 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

作者简介

任胜利: 理学博士, 国家自然科学基金委杂志社编审, 《中国科学》杂志社副总编辑。社会兼职有中国科技期刊编辑学会理事, 《编辑学报》编委、《中国科技术语》编委、《中国科技期刊研究》副主编等。

自 1997 年博士后出站后从事科技编辑工作以来, 先后在 *Science*, *Nature*, *Scientometrics*, *Learned Publishing*, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学和科技编辑与写作方面的论文或杂文 60 余篇。有丰富的科技编辑与写作方面的培训经验, 2007 年和 2009 年先后主持翻译了《科技英文写作与演讲》和《科技英语写作进阶》。曾获中国科学院期刊出版领域引进优秀人才择优支持、第二届中国出版政府奖优秀出版人物奖等资助和奖项。

个人博客: www.sciencenet.cn/blog/rensl.htm

订阅方式: 各地图书卖场及网上书店。

邮购: 定价: 35 元 ISBN: 978-7-03-031305-8

北京学士书店: 地址: 北京东黄城根北街 16 号(100717); 电话: 010-64000246, 64034558, 64034205;

科学出版社科学书店: 地址: 北京朝阳门内大街 135 号(100010); 电话: 010-64017892。