

## 研究报告

大肠杆菌 *rhtA* 缺失对血红素合成的影响杨燕<sup>1</sup> 郑珂<sup>2</sup> 潘梅<sup>1</sup> 唐蕾<sup>\*1,2</sup>

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122

**摘要:**【背景】*Escherichia coli* BL21(DE3)是基因工程的常用宿主,以C5途径合成5-氨基乙酰丙酸(5-Aminolevulinic acid, ALA),ALA是合成血红素的重要前体物质,但ALA分泌对血红素合成的影响尚不清楚。【目的】阐明参与ALA外运的RhtA在血红素合成途径中的作用。【方法】利用Red同源重组,敲除*Escherichia coli* BL21(DE3)的*rhtA*,同时构建重组质粒pEA过表达血红素合成途径中的关键酶基因*hemA*,检测分析血红素及其前体物质含量,以及血红素合成途径中10个关键基因的表达水平。【结果】敲除*rhtA*对菌体生长没有显著影响,敲除菌株BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*与原始菌株BL21(DE3)比较,ALA的胞外含量下降23%,血红素含量提高12%,尿卟啉III(Uroporphyrin III, UIII)、粪卟啉III(Coproporphyrin III, CIII)和原卟啉IX(Protoporphyrin IX, PPIX)的含量分别提高25%、15%和18%;敲除*rhtA*同时过表达*hemA*的菌株BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*/pEA与仅过表达*hemA*的菌株BL21(DE3)/pEA比较,胞外ALA减少了16%,血红素含量提高了24%,UIII和CIII含量分别提高55%和64%,PPIX含量显著增加,约为4.7倍。实时定量PCR结果表明,*rhtA*缺失后,*hemC*基因转录水平下调,其余9个基因转录水平均有不同程度的上调。【结论】*rhtA*敲除减少了ALA的外运,使得胞内血红素产量得到提高。

关键词: 大肠杆菌, *rhtA*, 5-氨基乙酰丙酸, 血红素, Red同源重组The effect of *rhtA* deletion on heme synthesis in *Escherichia coli*YANG Yan<sup>1</sup> ZHENG Ke<sup>2</sup> PAN Mei<sup>1</sup> TANG Lei<sup>\*1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

**Abstract:** [Background] *Escherichia coli* BL21(DE3) is a commonly used host for genetic engineering. It synthesizes 5-aminolevulinic (ALA) through C5 pathway. ALA is an important precursor, while its secretion on the heme synthesis is unclear. [Objective] To elucidate the role of RhtA in the export of ALA in the heme synthesis pathway. [Methods] *rhtA* was knocked out by Red homologous recombination, and plasmid pEA was constructed to overexpress *hemA*, a key enzyme gene in the heme biosynthesis pathway. The contents of heme and its precursors as well as the transcription levels of 10 key genes in the heme synthesis pathway

**Foundation items:** 111 Project (111-2-06); National Light Industry Technology and Engineering First-class Discipline Independent Project Funding (LITE2018-27)

\*Corresponding author: Tel: 86-510-85918296; E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

Received: 20-02-2019; Accepted: 25-04-2019; Published online: 31-05-2019

基金项目: 111 引智计划(111-2-06); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助(LITE2018-27)

\*通信作者: Tel: 0510-85918296; E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2019-02-20; 接受日期: 2019-04-25; 网络首发日期: 2019-05-31

were analyzed. **[Results]** The deletion of *rhtA* had no significant effect on cell growth. Compared with parental strain BL21(DE3), the extracellular content of ALA decreased by 23% while the content of heme increased by 12% in the knockout strain BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*. The contents of uroporphyrin III (UIII), coproporphyrin III (CIII) and protoporphyrin IX (PPIX) increased by 25%, 15% and 18%, respectively in BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*. Compared with the strain BL21(DE3)/pEA in which *hemA* was overexpressed, the content of extracellular ALA reduced by 16% and the content of heme increased by 24% in the strain BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*/pEA. And the contents of UIII and CIII increased by 55% and 64%, respectively. The content of PPIX increased significantly, about 4.7 times in BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*/pEA compared with that in BL21(DE3)/pEA. The results of real-time quantitative PCR showed that after the deletion of *rhtA*, the transcription level of *hemC* was down-regulated, while those of the other 9 genes were up-regulated to various degrees. **[Conclusion]** The *rhtA* knockout reduces the export of ALA and leads to an increase in intracellular heme production.

**Keywords:** *Escherichia coli*, *rhtA*, 5-Aminolevulinic acid, Heme, Red homologous recombination

卟啉(Porphyrin)是自然界中普遍存在的一类色素辅因子, 基于 4 个吡咯环(四吡咯)结构, 用于各种生物过程, 包括储存和运输氧分子(肌红蛋白和血红蛋白)、氧化磷酸化的电子传递(细胞色素 b 和 c)和烃类氧化(细胞色素 P450 和细胞色素氧化酶)等<sup>[1]</sup>。血红素(Heme)也叫铁卟啉<sup>[2]</sup>, 其分子结构由一个 PPIX 和一个 Fe<sup>2+</sup>或者 Fe<sup>3+</sup>构成, 是过氧化物酶等多种酶的辅因子, 有载氧、贮氧、促进氧化还原、进行电子传递等重要生物学功能<sup>[3]</sup>。

卟啉应用广泛, 可用作药物、保健品; 同时也是半合成血卟啉(Haematoporphyrin, HP)及其衍生物(Hematoporphyrin derivatives, HPD)、原卟啉钠(Protoporphrin disodium)的原料<sup>[4]</sup>。因其化学合成存在一些困难且产率较低<sup>[5]</sup>, 所以生物合成卟啉意义重大。但由于卟啉本身具有较强的生理毒性<sup>[6]</sup>, 在生物体内的合成受到严格调控, 所以利用生物法合成卟啉的关键在于了解不同生物体中卟啉的调控机制, 而目前卟啉的调控机制尚不明确<sup>[7]</sup>。大肠杆菌作为基因工程的常用宿主, 以 C5 途径合成各种卟啉物质<sup>[8]</sup>(图 1), 用于血红素生产或者用于表达血红素结合蛋白。如何大量合成所需的卟啉物质, 一直存在很大困扰<sup>[9]</sup>。

RhtA (*rhtA* 编码)是一类氨基酸二级转运蛋白, 参与大肠杆菌中苏氨酸和高丝氨酸的外排<sup>[10]</sup>, 经鉴定 RhtA 也是大肠杆菌中 5-氨基乙酰丙酸

(5-Aminolevulinic, ALA)的外运蛋白<sup>[11]</sup>。ALA 是一种天然存在的非蛋白质类氨基酸<sup>[12]</sup>, 是卟啉合成的重要前体物质<sup>[13]</sup>。*hemA* 编码 ALA 合成的关键酶(谷氨酰 t-RNA 还原酶)<sup>[14]</sup>, 过表达 *hemA* 有利于 ALA 和卟啉含量的提高<sup>[15]</sup>。有研究表明过表达 *rhtA* 加速了 ALA 的外排并且使得 ALA 产量提高了 45.9%<sup>[16]</sup>, 但大量 ALA 会被 RhtA 蛋白转运到胞外<sup>[17]</sup>。

本文采用 Red 同源重组, 敲除 *E. coli* BL21(DE3) 中的 *rhtA*, 减少血红素代谢途径中前体物质 ALA 的外运, 同时过表达 *hemA*, 检测 C5 途径中的各代谢产物以及基因表达水平, 探讨敲除 *rhtA* 对卟啉合成的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒与引物

实验中所用到的菌株和质粒相关信息见表 1, 本研究中所用引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成, 引物详细信息见表 2。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Xba* I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶, 质粒提取、纯化试剂盒, TaKaRa 公司; ClonExpress® II One Step Cloning Kit、ClonExpress® MultiS One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 5-氨基乙酰丙酸盐酸盐标准品, 氯高铁血红素(Hemin)及草酸, Sigma 公司; 尿卟啉 III 盐酸盐(Uroporphyrin III dihydrochloride,

UIII)、粪卟啉 III 盐酸盐 (Coproporphyrin III dihydrochloride, CIII)标准品, Frontier Scientific 公司; 原卟啉 IX (Protoporphyrin IX, PPIX)标准品, 源叶生物公司; 异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷 (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、硫酸

卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(Amp)和氯霉素(Cm), 生工生物工程(上海)股份有限公司。

荧光光度计, SHIMADZU 公司; 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 酶标仪, Molecular Devices 公司; 高效液相色谱仪, Waters 公司。

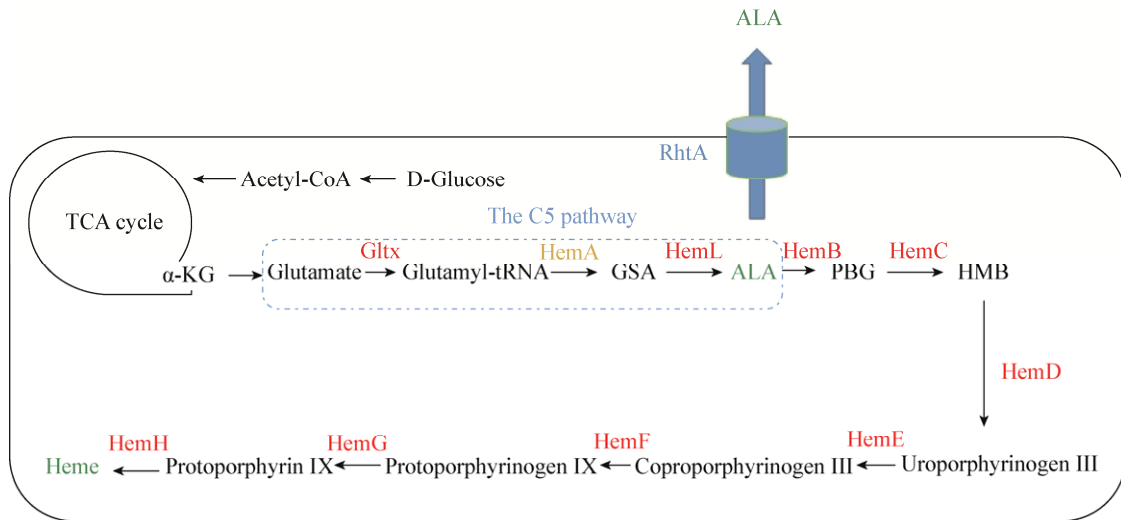


图 1 大肠杆菌血红素代谢途径

Figure 1 The heme metabolism pathway in *E. coli*

注: GltX: 谷氨酰 t-RNA 合成酶; HemA: 谷氨酰 t-RNA 还原酶; HemL: ALA 合成酶; HemB: ALA 脱水酶; HemC: PBG 脱氨酶; HemD: 尿卟啉原 III 合酶; HemE: 尿卟啉原氧化脱羧酶; HemF: 粪卟啉原氧化脱羧酶; HemG: 原卟啉原氧化酶; HemH: 铁螯合酶;  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -酮戊二酸; GSA: 谷氨酰-1-半醛; ALA: 5-氨基乙酰丙酸; PBG: 胆色素原; HMB: 羟甲基胆色烷。

Note: GltX: Glutamyl t-RNA synthetase; HemA: Glutamyl t-RNA reductase; HemL: ALA synthase; HemB: ALA dehydratase; HemC: PBG deaminase; HemD: Uroporphyrinogen III synthase; HemE: Uroporphyrinogen decarboxylase; HemF: Coproporphyrinogen oxidative decarboxylase; HemG: Protoporphyrinogen oxidase; HemH: Iron chelatase;  $\alpha$ -KG: Alpha-ketoglutaric acid; GSA: Glutamine-1-semialdehyde; ALA: 5-aminolevulinic acid; PBG: Choline pigment; HMB: Hydroxymethyl cholestane.

表 1 本研究中使用的质粒和菌株

Table 1 Strains and plasmids used in this study

质粒/菌株 Plasmids/Strains	特性 Characteristics	来源/参考文献 Sources/References
Plasmids		
pET-28a	Expression plasmid, T7 promoter, Kan <sup>R</sup>	[15]
pET-22b	Expression plasmid, T7 promoter, Amp <sup>R</sup>	TaKaRa
pKD4, pKD46, pCP20	Red homologous recombination knockout plasmids	[18]
pEUTD	pET-22b inserted with <i>UrhtA</i> , <i>Kan2</i> and <i>DrhtA</i>	This study
pER	pET-28a inserted with <i>rhtA</i>	This study
pEA	pET-28a inserted with <i>hemA</i>	[15]
Strains		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>; E. coli B strain), with DE3, a <math>\lambda</math> prophage carrying the T7 RNA <i>pol</i> gene</i>	[15]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>rhtA</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) deleted <i>rhtA</i>	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>rhtA</i> /pER	<i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>rhtA</i> transformed with plasmid pER	This study
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pEA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) transformed with plasmid pEA	[15]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>rhtA</i> /pEA	<i>E. coli</i> BL21(DE3) $\Delta$ <i>rhtA</i> transformed with plasmid pEA	This study

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')	大小 Sizes (bp)
UrhtAF	ggataacaattccc <u>TCTAGAC</u> ATCCAGCAT TTCATGTACGGC	43
UrhtAR	cagctccagcctacacaatATTTACATTTCTG CATGGTTATGCA	44
DrhtAF	ttccatgtcaCCTTTCTCCACAAATATCT AGACTTAA	39
DrhtAR	gtgggtggtggtg <u>CTCGAGT</u> CAGGTTGA AACCGCCCA	39
rkanF	tATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	23
rkanR	ggagaaggTGACATGGGAATTAGCCA TGG	30
KrhtAF	CATCCAGCATTTTCATGTACGGCAAT	25
KrhtAR	TCAGGTTGAAACCGCCCATTTTGT	24
QrhtAF	ATCCAGATGATCGATCAGTGCG	22
QrhtAR	GCTGTTGCTTCTTCATAGCGG	22
<i>rhtA</i> 1F	atgggtcgcgatcc <u>GAATTC</u> TTAATTAATG TCTAATTCCTTTATTTTGCTC	52
<i>rhtA</i> 1R	gtgggtggtggtg <u>CTCGAGAT</u> GCCTGGT TCATTACGTAAAATG	45

注: 表格中下划线标注为酶切位点序列, 小写字母表示同源臂序列。

Note: The sequences of restriction sites are underlined and the sequences of homologous arms are indicated with lowercase letters.

### 1.1.3 培养基

LB 液体培养基(固体培养基加入 1.5%琼脂), 抗性培养基为在 LB 培养基灭菌温度降至 60 °C 后, 加入相应比例 Kan (终浓度为 50 mg/L)、Amp (终浓度为 50 mg/L)或 Cm 溶液(终浓度为 25 mg/L)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 质粒构建

以 NCBI 上公布的 *E. coli* BL21 基因组序列 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AM946981.2>) 为模板, 设计引物 *rhtA*1F 和 *rhtA*1R, 通过 PCR 扩增得到 *rhtA* 目的片段(888 bp), 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切 pET-28a, 纯化目的基因片段和线性化质粒, 使用 ClonExpress® II One Step Cloning Kit, 按照说明书上的操作步骤进行连接, 将连接产物转化入 *E. coli* JM109 中, 在 Kan 抗性平板上筛选阳性转化子, 进行双酶切验证和基因测序(天霖生物科技有限公司), 将序列正确的质粒定名为 pER。

### 1.2.2 大肠杆菌 *rhtA* 的敲除

以 NCBI 上公布的 *E. coli* BL21 基因组序列(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AM946981.2>)为模板, 设计敲除 *rhtA* 上下同源序列的引物。引物 UrhtAF 和 UrhtAR 扩增出 *rhtA* 上游约 500 bp 的同源序列基因 UrhtA, 引物 DrhtAF 和 DrhtAR 扩增 *rhtA* 下游约 500 bp 的同源序列基因 DrhtA, 以 pKD4 质粒为模板设计引物 rkanF 和 rkanR, 扩增 Kan 抗性及其两端 FRT 基因 kan2, 质粒 pET-22b 经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切, 使用 ClonExpress® MultiS One Step Cloning Kit, 按照说明书上的操作步骤进行, 将扩增得到的 3 个基因片段与线性化质粒进行连接, 将连接产物转化入 *E. coli* JM109 中, 在 Kan 和 Amp 双抗平板上筛选阳性转化子进行验证, 得到质粒 pEURD。以 pEURD 为模板, 利用引物 KrhtAF 和 KrhtAR 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): 模板 1 μL, PrimerSTAR Max DNA Polymerase 25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 22 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, X °C 15 s, 72 °C Y s, 30 个循环; 72 °C 10 min (其中退火温度 X 根据不同基因片段的引物 T<sub>m</sub> 值进行设置, 延伸时间 Y 则根据片段长度按照每分钟扩增 1 000 个碱基的速度进行分配设置)。最终得到两端带有 500 bp *rhtA* 基因上下游同源序列、中间为含有 FRT 位点的 Kan 抗性基因 Kan2 的 DNA 打靶片段, 用于敲除 *rhtA*。

大肠杆菌 *rhtA* 的敲除参考阮元勇等<sup>[19]</sup>, 具体过程为: 将 2 503 bp 左右的线性打靶片段电转入 BL21(DE3)/pKD46 后, 迅速加入 1 mL LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 振荡复苏 12 h 进行同源重组, 之后均匀涂布在含有 Kan 抗性的 LB 培养基上, 37 °C 筛选阳性重组菌。挑取阳性单菌落, 以 *E. coli* BL21(DE3)为对照, 利用引物 QrhtAF 和 QrhtAR 进行菌落 PCR 扩增, 验证条带大小正确后, 再导入 pCP20 质粒, 28 °C 振荡培养 4 h 后, 涂布至 Amp 抗性平板上, 28 °C 培养过夜, 挑取阳性转化子, 以 *E. coli* BL21(DE3)为对照, 利用引物 QrhtAF 和 QrhtAR 进行菌落 PCR 扩增, 验证条带大小正确后,

送至天霖生物科技无锡有限公司测序, 经过测序验证正确后, 再通过 42 °C 培养, 消除胞内质粒, 得到没有任何抗性的 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*。

### 1.2.3 培养方法

各菌株在 50 mL LB 液体培养基 37 °C、200 r/min 活化 12 h 后, 2% 接种量至 300 mL LB 液体培养基中培养 12 h, 对应菌株中加入 Kan 抗生素, 需要添加诱导剂的菌株, 在培养 2 h 后加入终浓度 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 10 h。

### 1.2.4 ALA 浓度检测

参考陈丹园等<sup>[15]</sup>ALA 检测方法, 以 5-氨基乙酰丙酸盐标准品作为标准样品, 以水做空白参照, 在 554 nm 处测定吸光度  $A_{554}$ , 根据绘制的标准曲线得出测定样品的 ALA 浓度。

### 1.2.5 血红素浓度检测

利用荧光法检测血红素浓度, 参考陈丹园等<sup>[15]</sup>大肠杆菌胞内血红素检测方法。

### 1.2.6 菌体量测定方法

菌体密度采用浊度法间接测量, 通过  $OD_{600}$  来表示, 并换算为菌体干重(Dry cell weight, DCW)。取不同浓度的 *E. coli* BL21 菌液, 8 000×g 离心 10 min 去上清, 用去离子水洗涤 3 次, 将菌体放于 105 °C 烘箱至菌体恒重, 将干燥后菌体干重(DCW)与对应的细胞密度绘制曲线, 得到菌体干重(DCW)和  $OD_{600}$  的关系:  $1 OD_{600}=0.2978 \text{ g/L DCW}$ 。

### 1.2.7 卟啉浓度检测

通过高效液相荧光检测法检测卟啉<sup>[20]</sup>, 样品制备过程为: 取 3 mg 干重大肠杆菌, 加入 1 mL Tris-EDTA (pH 7.2) 缓冲液吸吹混匀, 超声(200 W, 超声 5 s, 间隔 6 s)破碎 5 min 后, 加入 3 mL 乙腈涡旋 5 min, 之后 8 000×g 离心 5 min, 将上清液制备装入液相小瓶中<sup>[21]</sup>, 一式三份, 进行 HPLC 检测卟啉(为了验证胞内卟啉是否萃取完全, 进行二次萃取, HPLC 重复检测, 将两次检测得到的卟啉数值相加)。

HPLC 检测: 色谱柱为 Bischoff Prontoosil-120-5-C18-ace-EPS (5  $\mu\text{m}$ , 125 mm×4 mm), 流动相 A (0.5 mol/L、pH 5.1 的乙酸盐与乙腈的体积比为 90:10), 流动相 B (甲醇与乙腈的体积比为 90:10),

流速 1 mL/min, 柱温 25 °C, 荧光检测器激发波长 400 nm, 发射波长 630 nm。

### 1.2.8 基因转录水平检测

各菌株于 37 °C、200 r/min 培养过夜后以 1% 体积分数的接种量转接新鲜 LB 培养基中, 培养 12 h 后, 4 °C、12 000×g 离心 5 min 收集菌体, 用 50 mg/mL 的溶菌酶 37 °C 破壁 10 min。之后按照 TaKaRa 试剂盒说明书进行总 RNA 提取, 提取的 RNA 浓度及纯度使用核酸定量仪测定, 之后将 RNA 直接反转录成 cDNA 用于荧光定量实验。以上述 cDNA 为模板, 荧光定量 PCR 引物见表 3, 选择编码 3-磷酸甘油醛脱氢酶的基因 *gapA* 作为内参基因, 采用 SYBR<sup>®</sup> Green I 嵌合荧光法, 反应体系参照 TaKaRa 试剂盒说明书。

表 3 本研究所用荧光定量 PCR 引物

Table 3 Primers for fluorescent quantitative PCR used in this study

引物 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')	大小 Sizes (bp)
<i>gapAF</i>	GCTACTACCGCTACTCAG	18
<i>gapAR</i>	TCAGGTCAACTACAGATACG	20
<i>gltXF</i>	CGAAGACCATATCAACAACAC	21
<i>gltXR</i>	GACGCACCAGATAGTTCA	18
<i>hemAF</i>	CTCTACGGTCACAGTGTT	18
<i>hemAR</i>	CGGTTGGCGATAATCATC	18
<i>hemLF</i>	AGGATTATTACGGTGTGGAA	20
<i>hemLR</i>	GCGACTTCATTCAGACAG	18
<i>hemBF</i>	TATTCGTTCCGTGATGACT	19
<i>hemBR</i>	TGACCGTGAGATGTGTATT	19
<i>hemCF</i>	ACTGGATAACGGCGAATA	18
<i>hemCR</i>	GAGTGCGAGAATCATCAAG	19
<i>hemDF</i>	TGAGCACTGGTTACTACAC	19
<i>hemDR</i>	CATCGTTGTGACGGTTATC	19
<i>hemEF</i>	CGACTGGACAACGGATAT	18
<i>hemER</i>	CGCTACTTCTTCTCAATGC	20
<i>hemFF</i>	CTACACCGACGCTTATTTAC	20
<i>hemFR</i>	GCATTGACATCAGGATAGAC	20
<i>hemGF</i>	GGTGCTTCTATTTCGCTATG	19
<i>hemGR</i>	CTGTTGGTCTGTGGAGTA	18
<i>hemHF</i>	GAGACGCTGGAAGAGATT	18
<i>hemHR</i>	GCAACAAGATTAGCCATCAT	20

## 2 结果与分析

### 2.1 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA* 和 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*/pER 菌株的构建

以质粒 pEURD 为模板, 利用引物 *KrhtAF* 和 *KrhtAR* 扩增得到长度为 2 503 bp 的打靶片段(图 2A)。将打靶片段电转进 BL21(DE3)/pKD46 后, 利用引物 *QrhtAF* 和 *QrhtAR* 对获得的阳性重组菌株进行菌落 PCR 鉴定, 同源重组成功后理论上可获得 2 561 bp 片段, 而 BL21(DE3)则为 1 946 bp 片段, 结果表明挑取的菌落均可扩增出 2 561 bp 片段(图 2B), 同源重组成功。转入 pCP20 质粒后, 利用引物 *QrhtAF* 和 *QrhtAR* 对阳性菌进行菌落 pCR 鉴定, *rhtA* 敲除成功的菌落理论上 PCR 结果为 1 067 bp (保留一个 FRT 位点), 而 BL21(DE3) PCR 结果为 1 946 bp, 结果表明挑取的菌落均可扩增出 1 067 bp 片段(图 2C), 对验证正确的敲除菌测序, 结果正确, 表明 *rhtA* 被成功敲除, 并将敲除菌命名为 BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*。

通过 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定 pER 质粒, *rhtA*

长度为 888 bp, pET-28a 质粒双酶切后为 5 335 bp, 双酶切条带大小与理论一致(图 2D), 对构建的质粒测序, 结果正确, 将 pER 转化入 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA* 中, 得到回补菌株 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*/pER。

### 2.2 *rhtA* 敲除对于大肠杆菌生长的影响

以在 LB 培养基中各时刻所测定的菌体密度对培养时间作图得到各菌株生长曲线(图 3), 结果表明在培养初期各菌体密度几乎一致, 2-7 h 内 BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA* 的菌体密度稍高于 BL21(DE3), 7 h 后 BL21(DE3)菌体密度稍高于 BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*, 到达 12 h BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA* 与 BL21(DE3)菌体密度几乎一致。回补菌株 BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*/pER 与 BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*/pET-28a 在 LB 液体培养基中生长 12 h 的生长曲线几乎完全重合, 菌株 BL21(DE3)/pET-28a 在 12 h 时的菌体密度与回补菌株 BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*/pER、BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*/pET-28a 相差不大, 表明在 LB 液体培养基中, 敲除大肠杆菌 *rhtA* 对菌株生长影响不大, 与文献[22]报道一致。

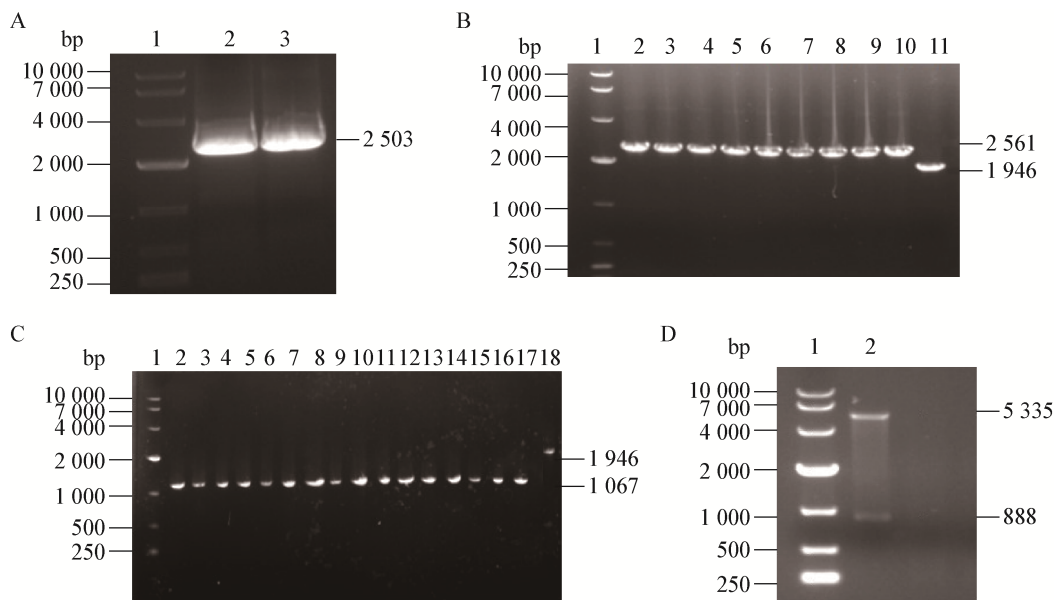


图 2 *rhtA* 敲除与回补质粒 pER 的电泳验证

### Figure 2 Electrophoretic verification of *rhtA* knockout and replenishing plasmid pER

注: 1: Marker. A: 打靶片段的 PCR 扩增; 2-3: 打靶片段. B: 打靶片段导入后的菌落 PCR 验证; 2-10: 打靶片段重组成功的菌株; 11: *E. coli* BL21(DE3)对照. C: Kan 抗性基因消除后的 PCR 扩增; 2-17: *rhtA* 敲除菌株; 18: *E. coli* BL21(DE3)对照. D: pER 质粒的双酶切; 2: pER.

Note: 1: Marker. A: PCR amplification of target fragment; 2-3: Target fragment. B: Colony PCR verification after introduction of target fragments; 2-10: Strains with recombinant target fragments; 11: *E. coli* BL21(DE3) control. C: PCR amplification after elimination of Kan resistant gene; 2-17: Strains with *rhtA* knockout; 18: *E. coli* BL21(DE3) control. D: Double enzyme digestion of pER plasmid; 2: pER.



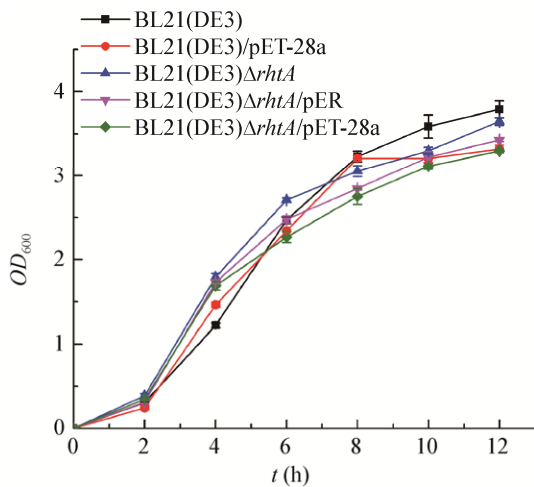


图3 各菌株生长曲线

Figure 3 Growth curve of each strain

注: BL21(DE3) $\Delta rhtA$ /pER 培养 2 h 后添加终浓度 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导。

Note: IPTG was added with a final concentration of 0.2 mmol/L at 2 h cultivation of BL21(DE3) $\Delta rhtA$ /pER.

### 2.3 *rhtA* 基因敲除对于胞外 ALA 和胞内血红素积累的影响

对摇瓶培养 12 h 后的不同菌进行代谢产物分析, 结果表明 BL21(DE3) $\Delta rhtA$  胞外 ALA 浓度为 8.937 mg/L、胞内血红素浓度为 11.700  $\mu\text{mol/L}$ , BL21(DE3)胞外 ALA 浓度为 11.627 mg/L、胞内血红素浓度为 10.433  $\mu\text{mol/L}$  (图 4A), BL21(DE3) $\Delta rhtA$  与 BL21(DE3)相比, 胞外 ALA 浓度减少了 23%、胞内血红素浓度增加了 12%, 回补菌株 BL21(DE3) $\Delta rhtA$ /pER 胞外的 ALA 浓度为 12.249 mg/L、胞内血红素浓度为 6.065  $\mu\text{mol/L}$ 。敲除菌胞外 ALA 量减少, 回补菌株胞外 ALA 基本提高到原菌株 BL21(DE3)水平, 表明 RhtA 参与胞内 ALA 外运, 与文献[11]报道一致。减少 ALA 外运, 胞内血红素含量得到相应提高。

大肠杆菌中 *hemA* 编码谷氨酰 t-RNA 还原酶, 该酶改变了谷氨酰 t-RNA 的形成, 用于蛋白质和 ALA 的合成<sup>[23]</sup>。BL21(DE3) $\Delta rhtA$ /pEA 胞外 ALA 浓度为 21.500 mg/L、血红素浓度为 33.244  $\mu\text{mol/L}$ , BL21(DE3)/pEA 胞外 ALA 浓度为 25.660 mg/L、血红素浓度为 26.882  $\mu\text{mol/L}$  (图 4B), BL21(DE3) $\Delta rhtA$ /pEA 与 BL21(DE3)/pEA 相比较, 胞外 ALA 浓度减少了 16%, 表明 RhtA 确实参与大肠杆菌 ALA 的外

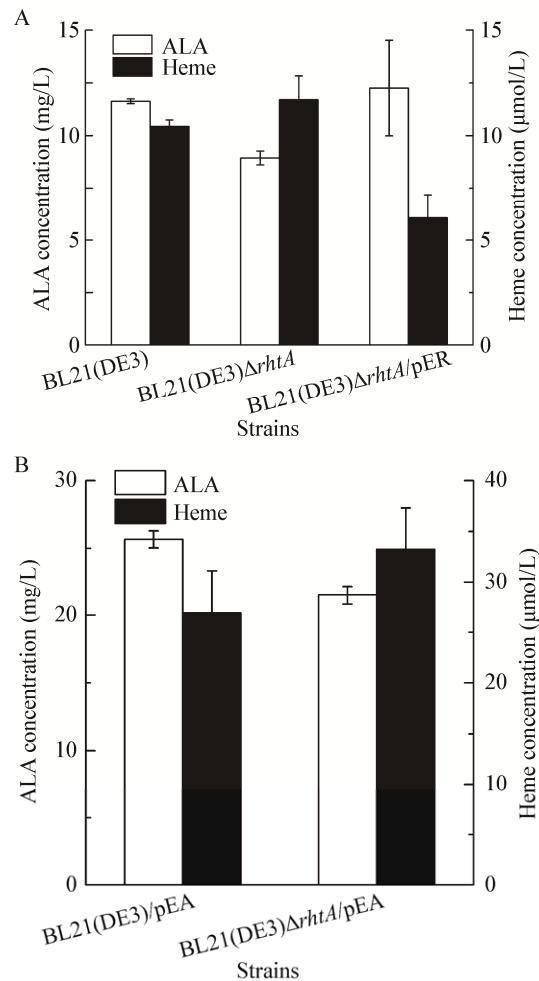


图4 各菌株的胞外 ALA 与胞内血红素含量比较

Figure 4 Comparison of extracellular ALA and intracellular heme contents in each strain

注: A: 菌株 BL21(DE3)、BL21(DE3) $\Delta rhtA$  与 BL21(DE3) $\Delta rhtA$ /pEA; B: 菌株 BL21(DE3)/pEA 与 BL21(DE3) $\Delta rhtA$ /pEA。

Note: A: Strain BL21(DE3), BL21(DE3) $\Delta rhtA$  and BL21(DE3) $\Delta rhtA$ /pEA; B: Strain BL21(DE3)/pEA and BL21(DE3) $\Delta rhtA$ /pEA.

运, 血红素浓度增加了 24%, 与文献[24]报道的过表达 *hemA* 可提高血红素的含量相一致。

### 2.4 *rhtA* 基因敲除对于胞内卟啉积累的影响

通过高效液相检测血红素合成途径中其他产物的变化, 结果表明 BL21(DE3) $\Delta rhtA$  与 BL21(DE3)相比较, 胞内的 UIII、CIII 和 PPIX 量分别提高 25%、15%和 18%; BL21(DE3) $\Delta rhtA$ /pEA 与 BL21(DE3)/pEA 相比较, 除了胞内的 UIII 和 CIII 分别提高 55%和 64%外, PPIX 量显著增加, 约为 BL21(DE3)/pEA 的 4.7 倍(表 4), 但是血红素的含量并没有显著提高,

表 4 不同菌株胞内卟啉含量

Table 4 Intracellular porphyrin contents of different strains

菌株 Strains	尿卟啉 III 浓度 Uroporphyrin III concentration (nmol/g DCW)	粪卟啉 III 浓度 Coproporphyrin III concentration (nmol/g DCW)	原卟啉 IX 浓度 Protoporphyrin IX concentration (nmol/g DCW)
BL21(DE3)	4.945±0.027	0.837±0.323	18.719±2.051
BL21(DE3) $\Delta$ <i>rhtA</i>	6.175±0.460	0.963±0.003	22.181±5.915
BL21(DE3)/pEA	3.368±0.120	0.700±0.027	23.606±0.002
BL21(DE3) $\Delta$ <i>rhtA</i> /pEA	5.234±0.232	1.148±0.021	134.213±1.537

原因可能来自两方面: 一是编码亚铁螯合酶的基因 *hemH* 转录水平较低, 二是胞内游离铁离子的缺乏。

### 2.5 *rhtA* 基因敲除对于血红素合成途径中各基因转录水平的影响

为了探究关键基因表达对血红素及卟啉合成的影响, 对途径中 10 个基因进行了 qRT-PCR 分析。结果表明敲除菌 BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA* 除 *hemC* 转录水平略有下调, 其余基因转录水平均有不同程度的上调(图 5)。*hemC* 编码的 PBG 脱氨酶, 使 4 分子 PBG 缩合成 1 分子 HMB, *hemC* 下调可能会导致环化形成卟啉的前体 HMB 量的不足; 其中编码原卟啉原 IX 氧化酶 HemG 的 *hemG* 转录水平上调最为显著(图 5), HemG 催化原卟啉原 IX 生成 PPIX, 促进胞内 PPIX 累积; *gltX* 和 *hemA* 转录上调有利于 ALA 积累和进一步转化成卟啉; *hemH* 转录水平上调并没有促成 PPIX 的进一步转化, 与文献[5]报道一致。PPIX 在 BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*/pEA 的累积可能是由于游离铁离子的缺乏所致。

### 3 讨论与结论

卟啉物质的合成在微生物的生长与代谢中起着重要作用。以往的大肠杆菌血红素代谢研究偏重于血红素合成途径中相关基因之间的相互作用与调控。本文主要关注了转运蛋白 RhtA 对血红素合成途径的影响。敲除 *rhtA* 后, 血红素合成途径中的前体物质 ALA 外运明显减少, 同时过表达 *hemA*, 胞内的卟啉量得以增加, 尤其 PPIX 累积明显, 对于终产物血红素的形成有一定的促进作用。因此可以将控制 ALA 转运蛋白的水平作为一种新的策略应用于基因工程菌如 *E. coli* BL21 的改造, 减少前体物质 ALA 的外排, 提高卟啉与血红素的合成。

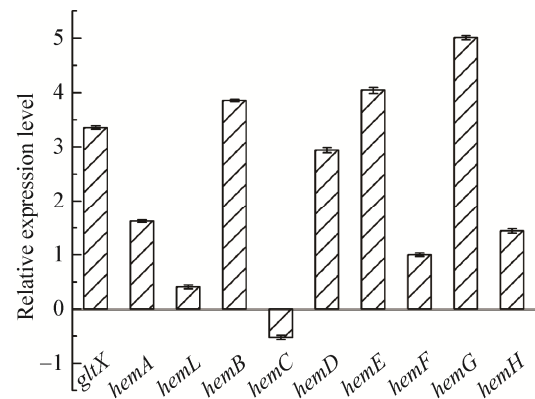


图 5 BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA* 菌株血红素合成途径中各基因的相对转录水平

Figure 5 Relative transcriptional level of each gene in the heme synthesis pathway of BL21(DE3) $\Delta$ *rhtA*

敲除 *rhtA* 后, 胞外 ALA 量减少但并没有低至零点, 表明 RhtA 蛋白并不是 ALA 唯一的外运蛋白。将 *rhtA* 敲除, 胞内过量累积的 ALA 依旧可以通过其他外排转运蛋白运送出胞外, 从而未对菌体生长造成显著影响。目前 *E. coli* 胞内卟啉及终产物血红素外运的研究还十分有限<sup>[25]</sup>, 虽有研究表明 *tolC* 编码的蛋白 TolC 可参与 PPIX 的转运<sup>[26]</sup>, 但在 *rhtA* 敲除菌中 PPIX 的累积和输送尚有待进一步研究。

### REFERENCES

- [1] Lee MJ, Kim HJ, Lee JY, et al. Effect of gene amplifications in porphyrin pathway on heme biosynthesis in a recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 23(5): 668-673
- [2] Deng Y, Guo YX, Li C, et al. Research progress on the porphyrin compounds as a biological marker[J]. Central South Pharmacy, 2015, 13(5): 509-512 (in Chinese)  
邓晔, 郭瑶雪, 李春, 等. 血红素合成中间体——卟啉类化合物作为生物标记物的研究进展[J]. 中南药学, 2015, 13(5): 509-512
- [3] Beale SI. Biosynthesis of hemes[J]. EcoSal Plus, 2007, 2(2). DOI:



- 10.1128/ecosalplus.3.6.3.11
- [4] Pranawidjaja S, Choi S, Lay BW, et al. Analysis of heme biosynthetic pathways in a recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(6): 880-886
- [5] Li HJ. Construction of expression system for 5-aminolevulinic acid and the optimization of fermentation technics[D]. Jinan: Master's Thesis of Jinan University, 2016 (in Chinese)  
李慧杰. 5-氨基乙酰丙酸表达体系的构建及发酵工艺优化[D]. 济南: 济南大学硕士学位论文, 2016
- [6] Song YQ, Zhu RF, Chen P. Physiological distribution and regulation of heme[J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2015, 45(11): 1194-1205 (in Chinese)  
宋艳群, 祝融峰, 陈鹏. 血红素的生理分布与调控[J]. *中国科学: 化学*, 2015, 45(11): 1194-1205
- [7] Ge BS, Chen Y, Yu Q, et al. Regulation of the heme biosynthetic pathway for combinational biosynthesis of phycocyanobilin in *Escherichia coli*[J]. *Process Biochemistry*, 2018, 71: 23-30
- [8] Li T, Guo YY, Qiao GQ, et al. Microbial synthesis of 5-aminolevulinic acid and its coproduction with polyhydroxybutyrate[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(11): 1264-1274
- [9] Zhang JL, Kang Z, Qian SD, et al. Construction of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for production of 5-aminolevulinic acid[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2018, 37(3): 232-239 (in Chinese)  
张俊丽, 康振, 钱晟东, 等. 产 5-氨基乙酰丙酸酿酒酵母工程菌株的构建[J]. *食品与生物技术学报*, 2018, 37(3): 232-239
- [10] Livshits VA, Zakataeva NP, Aleshin VV, et al. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*[J]. *Research in Microbiology*, 2003, 154(2): 123-135
- [11] Zhang LC. Study on 5-aminolevulinic acid transporter in *Escherichia coli*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science and Technology, 2016 (in Chinese)  
张良程. 大肠杆菌中 5-氨基乙酰丙酸转运蛋白的研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2016
- [12] Meng QL, Zhang YF, Ju XZ, et al. Production of 5-aminolevulinic acid by cell free multi-enzyme catalysis[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 226: 8-13
- [13] Li ZX, Zhao L, Liang YL, et al. Advance on biosynthesis of 5-aminolevulinic acid[J]. *Bulletin of Fermentation Science and Technology*, 2017, 46(3): 178-182 (in Chinese)  
李智祥, 赵磊, 梁云龙, 等. 生物法合成 5-氨基乙酰丙酸的研究进展[J]. *发酵科技通讯*, 2017, 46(3): 178-182
- [14] Kang Z, Zhang JL, Yang S, et al. Advances in microbial production of 5-aminolevulinic acid[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(9): 1214-1222 (in Chinese)  
康振, 张俊丽, 杨森, 等. 微生物发酵生产 5-氨基乙酰丙酸研究进展[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(9): 1214-1222
- [15] Chen DY, Shen YJ, Yang Y, et al. Regulation of heme synthesis in *Escherichia coli* by overexpression of genes for the key enzymes and environmental factors[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(11): 7-14 (in Chinese)  
陈丹园, 沈云杰, 杨燕, 等. 关键酶基因的过表达与环境因素对大肠杆菌血红素合成的调控[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(11): 7-14
- [16] Kang Z, Wang Y, Gu PF, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient production of 5-aminolevulinic acid from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(5): 492-498
- [17] Kwon SJ, de Boer AL, Petri R, et al. High-level production of porphyrins in metabolically engineered *Escherichia coli*: systematic extension of a pathway assembled from overexpressed genes involved in heme biosynthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4875-4883
- [18] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6640-6645
- [19] Gong YY, Ni WC, Guo SQ, et al. Construction method of BL21(DE3) $\Delta$ *aroA* strain and its application: CN, 104099363A[P]. 2014-10-15 (in Chinese)  
巩元勇, 倪万潮, 郭书巧, 等. 一种 BL21(DE3) $\Delta$ *aroA* 菌株的构建方法及其应用: 中国, 104099363A[P]. 2014-10-15
- [20] Fotinos N, Convert M, Piffaretti JC, et al. Effects on gram-negative and gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic acid derivatives[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52(4): 1366-1373
- [21] Fyrestam J, Östman C. Determination of heme in microorganisms using HPLC-MS/MS and cobalt(III) protoporphyrin IX inhibition of heme acquisition in *Escherichia coli*[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(30): 6999-7010
- [22] Liu HL. Producing strain construction and fermentation condition optimization of 2-aminobutyrate[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2015 (in Chinese)  
刘宏亮. 2-氨基丁酸生产菌株构建及发酵条件优化[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2015
- [23] Beale SI, Gough SP, Granick S. Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975, 72(7): 2719-2723
- [24] Verderber E, Lucast LJ, van Dehy JA, et al. Role of the *hema* gene product and  $\delta$ -aminolevulinic acid in regulation of *Escherichia coli* heme synthesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(14): 4583-4590
- [25] Zhao XR, Choi KR, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for secretory production of free haem[J]. *Nature Catalysis*, 2018, 1(9): 720-728
- [26] Turlin E, Heuck G, Brandão MIS, et al. Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in *Escherichia coli*[J]. *MicrobiologyOpen*, 2014, 3(6): 849-859