

## 大肠杆菌 *L*-组氨酸生物合成途径的改造及其对工程菌 *L*-组氨酸产量的影响

魏 伟, 刘 倩, 卢利宁, 谢希贤

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 改造大肠杆菌 *L*-组氨酸生物合成途径, 以提高 *L*-组氨酸的产量. 用 NTG 诱变大肠杆菌 M-17(SG<sup>r</sup>), 依次赋予其 2-噻唑丙氨酸(2-TA)和组氨酸氧脞酸盐(HisHx)遗传标记, 再以突变株 M-18(SG<sup>r</sup> + 2-TA<sup>r</sup> + HisHx<sup>r</sup>)基因组为模板, 扩增组氨酸操纵子基因, 构建出重组质粒 pUC118-his-operon, 将重组质粒导入突变株 M-18(SG<sup>r</sup> + 2-TA<sup>r</sup> + HisHx<sup>r</sup>)得到工程菌 *E. coli* M-19(SG<sup>r</sup> + 2-TA<sup>r</sup> + HisHx<sup>r</sup>/pUC118-his-operon). 根据 *zwf* 和 *prs* 基因序列分别合成引物进行 PCR 扩增, PCR 产物与载体 pSTV28 连接, 构建重组质粒 pSTV28-*zwf*、pSTV28-*prs* 和 pSTV28-*zwf-prs*, 将重组质粒分别转化至工程菌 *E. coli* M-19, 摇瓶发酵测定重组工程菌 *L*-组氨酸的产量. 摇瓶发酵结果显示, *L*-组氨酸产量与对照株相比, 工程菌 *E. coli* M-19 提高了 4.5 倍, 双质粒系统重组工程菌 *E. coli* MZH-19、*E. coli* MPH-19 和 *E. coli* MZPH-19 分别提高了 5.14、5.78、8.43 倍.

**关键词:** *L*-组氨酸; 组氨酸操纵子; 大肠杆菌; 双质粒系统; 摇瓶发酵

中图分类号: Q812 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2011)04-0006-04

## Modification of *L*-histidine Biosynthesis Pathway in *E. coli* and Its Effect on *L*-histidine Yield

WEI Wei, LIU Qian, LU Li-ning, XIE Xi-xian

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,  
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** To modify the metabolic pathway of *L*-histidine biosynthesis in *E. coli* and increase *L*-histidine yield. *E. coli* M-18(SG<sup>r</sup> + 2-TA<sup>r</sup> + HisHx<sup>r</sup>) was obtained by *N*-Methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(NTG) mutagenesis derived from the original strain *E. coli* M-17(SG<sup>r</sup>). The histidine operon was amplified by PCR from *E. coli* M-18(SG<sup>r</sup> + 2-TA<sup>r</sup> + HisHx<sup>r</sup>) chromosome and ligated it into the pUC118 vector. The recombinant plasmid pUC118-his-operon was transformed into *E. coli* M-18(SG<sup>r</sup> + 2-TA<sup>r</sup> + HisHx<sup>r</sup>) by electroporation. The *zwf* gene and *prs* gene were amplified by PCR, and then ligated to pSTV28 plasmid. The recombinant plasmids pSTV28-*zwf*, pSTV28-*prs* and pSTV28-*zwf-prs* were transformed into *E. coli* M-19(SG<sup>r</sup> + 2-TA<sup>r</sup> + HisHx<sup>r</sup>/pUC118-his-operon), respectively. Flask-shaking fermentation results showed that, compared with *E. coli* M-18, the *L*-histidine yield in the engineering strain *E. coli* M-19 was 4.5 folds of that in the control, and in the two-plasmid system of recombinant engineering strains *E. coli* MZH-19, *E. coli* MPH-19 and *E. coli* MZPH-19 were 5.14 folds, 5.78 folds and 8.43 folds of that in the control, respectively.

**Keywords:** *L*-histidine; his operon; *Escherichia coli*; two-plasmid system; flask-shaking fermentation

*L*-组氨酸的化学名为 *L*- $\alpha$ -氨基- $\beta$ -咪唑丙酸, 是含有咪唑核的碱性氨基酸, 具有多种生理功能, 在医药、饲料及食品行业发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>. 目前, 国内

对发酵生产组氨酸的研究和报道较少, 且产酸水平较低. 其中姚晓玲等<sup>[2]</sup>利用黄色短杆菌发酵可积累 *L*-组氨酸 128.28 mg/L, 许益清等<sup>[3]</sup>以谷氨酸棒杆菌为

收稿日期: 2010-12-09; 修回日期: 2011-03-01

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI63B01)

作者简介: 魏 伟(1985—), 男, 山西长治人, 硕士研究生; 通信作者: 谢希贤, 副教授, xixianxie@tust.edu.cn.

出发菌株,定向选育突变株,发酵3 d产L-组氨酸达1~1.6 g/L。但这远远不能满足市场需求,因此加快研究发酵生产L-组氨酸的重大意义。

本文通过亚硝基胍(NTG)诱变选育具有组氨酸结构类似物抗性的突变株,解除L-组氨酸对生物合成途径上的关键酶<sup>[4]</sup>——ATP磷酸核糖基转移酶(ATP-PRT, *hisG* 基因编码)的反馈抑制。利用双质粒系统对L-组氨酸生物合成途径进行改造,过表达整个组氨酸操纵子和中心代谢途径的 *zwf* 和 *prs* 基因,增加大肠杆菌L-组氨酸生物合成的代谢流,以期进一步提高L-组氨酸产量,并为构建高产L-组氨酸工程菌奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养基

#### 1.1.1 菌株及质粒

*E. coli* DH5 $\alpha$ 及 *E. coli* M-17(SG<sup>f</sup>)均为天津科技大学代谢工程实验室保藏菌种;质粒 pUC118、pSTV28, TaKaRa 公司。

#### 1.1.2 培养基(g/L)

LB 培养基:蛋白胍 10, 酵母粉 5, NaCl 10, pH 7.0, 抗生素氨苄青霉素使用质量浓度为 100  $\mu$ g/mL, 氯霉素使用质量浓度为 25  $\mu$ g/mL。

基本培养基:葡萄糖 5, 硫酸铵 10, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 0.4, 硫酸锰 0.01, 硫酸亚铁 0.01, V<sub>B</sub> 1 100  $\mu$ g, V<sub>H</sub> 100  $\mu$ g, 琼脂粉 20, pH 7.0~7.2。

种子培养基:葡萄糖 15, 硫酸铵 3, 玉米浆 10 mL, 磷酸二氢钾 1.0, 硫酸镁 0.4, 硫酸锰 0.01, 硫酸亚铁 0.01, V<sub>B1</sub> 300  $\mu$ g, V<sub>H</sub> 200  $\mu$ g, pH 7.0~7.2。

发酵培养基:葡萄糖 20, 硫酸铵 10, 玉米浆 20 mL, 磷酸二氢钾 1.5, 硫酸镁 0.2, 硫酸锰 0.015, 硫酸亚铁 0.015, V<sub>B1</sub> 200  $\mu$ g, V<sub>H</sub> 100  $\mu$ g, pH 7.0~7.2。

### 1.2 试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶, TaKaRa 公司; Long PCR Enzyme Mix、1 000 bp ladder, Fermentas 公司; PCR 引物由北京博迈德科技发展有限公司合成; PCR 产物纯化试剂盒, 北京天恩泽基因科技有限公司; 质粒小样快速提取试剂盒和细菌基因组提取试剂盒, 北京博迈德公司; IPTG、X-gal、氨苄青霉素、氯霉素, 北京索莱宝公司; 诱变剂亚硝基胍(NTG), 日本 TCI 公司; L-组氨酸(L-His)、2-噻唑丙氨酸(2-TA)及组氨酸氧肟酸盐(HisHx), 美国 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 诱变方法

常规化学诱变法, 参见文献[5]。

#### 1.3.2 目的突变株的筛选

结构类似物突变株的获得: 将诱变处理的菌液适度稀释后涂布于含有一定浓度的 2-TA 和 HisHx 的基本培养基上, 培养 2~3 d, 挑出单菌落, 即得到结构类似物 2-TA 和 HisHx 抗性突变株。

#### 1.3.3 PCR 引物设计与合成

根据 GenBank 中 *E. coli* K-12 编码 his operon (7 461 bp)、*zwf* (1 476 bp) 和 *prs* (948 bp) 基因序列, 分别设计引物, 在两端引入酶切位点(下划线所示)和保护碱基。分别用引物 H1 (CTCGTCGGATCCTCCTTTCCCGCTCATTCAAT)/H2 (TGTTCGGGATCCAAGAAAAGGGCAGGGTGGTG)、Z1 (GCAAGGATCCACTTAAGGAGAATGACATGGCGGT)/Z2 (TGAGCGCATGCCGCAGATATTACTCAAACTCAT) 和 P1 (GCTAGAATTCCCTGAGGTTCTTCTCGTGCCTGATA)/P2 (AGCCGGATCCCTTAGTGTTTCGAAATGGCAGAGATC) 来扩增突变株 *E. coli* M-18 (SG<sup>f</sup>+2-TA<sup>f</sup>+HisHx<sup>f</sup>) 的 his operon、*zwf* 和 *prs* 基因及其上下游部分序列, 其中长片段 his operon 基因 PCR 扩增反应体系总体积为 50  $\mu$ L, 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 2 min, 94  $^{\circ}$ C 20 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 68  $^{\circ}$ C 6 min, 共 25 个循环; 68  $^{\circ}$ C 10 min。DNA 片段的回收、酶切、纯化、与载体的连接、转化等操作参见文献[6]。

#### 1.3.4 his operon、*zwf* 和 *prs* 基因的克隆与测序

取 PCR 产物 5  $\mu$ L 在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳检测, 使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 回收产物直接与 pMD19-T Simple 载体连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态, 在含 IPTG (24 mg/mL) 和 X-gal (20 mg/mL) 的 Amp<sup>r</sup> (100  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板上 37  $^{\circ}$ C 培养 16 h, 随机挑选白色菌落进行 PCR; 并提取质粒单酶切验证, 得到重组质粒 pMD19-his-operon、pMD19-*zwf* 和 pMD19-*prs*, 进行测序和序列分析。

#### 1.3.5 重组质粒的构建

用限制性内切酶 *Bam*HI 酶切重组质粒 pMD19-his-operon, 纯化回收后, 与 pUC118 *Bam*HI/BAP 载体按等物质的量比连接转化, 电转化法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在氨苄青霉素抗性平板上筛选转化子, 挑选单克隆, 提取质粒, 酶切鉴定。用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Sph*I 对重组质粒 pMD19-*zwf* 及质粒 pSTV28 双酶切, 用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Bam*HI 对重组质粒 pMD19-*prs* 及质粒 pSTV28 双酶切, 琼脂

糖凝胶电泳回收酶切片段,按照质粒 DNA 与目的基因物质的量比为 1 : 4 进行连接转化,化学法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞,在氯霉素抗性平板上筛选转化子,随机挑取单菌落进行菌落 PCR 验证,并提质粒进行双酶切验证.

1.3.6 摇瓶发酵

种子培养:500 mL 挡板瓶中装液量为 30 mL,9 层纱布封口,往复式摇床 200 r/min、32 °C 培养 12 ~ 15 h.

摇瓶发酵:按 10%的接种量将种子液接入装液量为 27 mL 的 500 mL 挡板瓶中,摇床 200 r/min、32 °C 培养 36 h. 发酵期间补加氨水控制 pH 在 7.0 左右,流加 60%葡萄糖,使其维持在 1% ~ 2%.

1.3.7 分析方法

采用高效液相分析系统测定 *L*-组氨酸含量<sup>[7]</sup>.

2 结果与分析

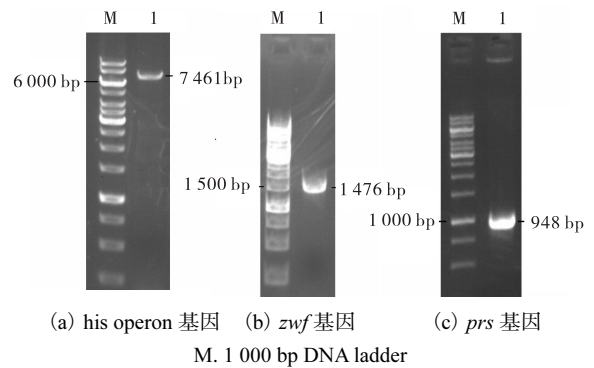
2.1 组氨酸结构类似物的抗性突变株的筛选

利用 NTG 对出发菌株 *E. coli* M-17(SG<sup>r</sup>)进行诱变处理,将其涂布到含有 2-TA(3 g/L)的基本培养基上,筛选到 11 株能积累 *L*-组氨酸的突变株,在这 11 株菌中选活力较高的突变株 *E. coli* M-17(SG<sup>r</sup> + 2-TA<sup>r</sup>)为再次诱变的出发菌株.在野生菌体内,当 *L*-组氨酸含量达到生理需要时,*L*-组氨酸操纵子受到终产物 *L*-组氨酸的反馈阻遏.另外,合成途径的第 1 个酶 ATP-PRT 是 *L*-组氨酸合成途径的限速酶,酶活性受到终产物 *L*-组氨酸的反馈抑制<sup>[4]</sup>.通过赋予组氨

酸结构类似物抗性标记可以解除 *L*-组氨酸对 ATP-PRT 的反馈抑制<sup>[8]</sup>.对突变株 *E. coli* MTA-17(SG<sup>r</sup>+2-TA<sup>r</sup>)再次诱变,同样方法筛选得到 HisHx(10 g/L)的抗性突变株 *E. coli* M-18(SG<sup>r</sup>+2-TA<sup>r</sup>+ HisHx<sup>r</sup>),但是该突变株的组氨酸产量没有明显的提高.

2.2 his operon、zwf 和 prs 基因的 PCR 扩增

以提取的突变株 M-18 的基因组为模板,H1/H2、Z1/Z2 和 P1/P2 为引物分别扩增部分脱敏的 his operon、zwf 和 prs 基因,PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图 1 所示.在约 7 500、1 500、1 000 bp 处有目的条带,与预期大小相符.



(a) his operon 基因 (b) zwf 基因 (c) prs 基因  
M. 1 000 bp DNA ladder

图 1 PCR 扩增结果

Fig.1 Results of PCR amplification

2.3 重组质粒的构建及其酶切验证

按方法 1.3.5 构建重组质粒,并对阳性克隆进行限制性酶切分析,结果如图 2 所示.重组质粒 pUC118-his-operon、pSTV28-zwf、pSTV28-prs 和 pSTV28-zwf-prs 双酶切后与预期大小相符,表明重组质粒构建成功.

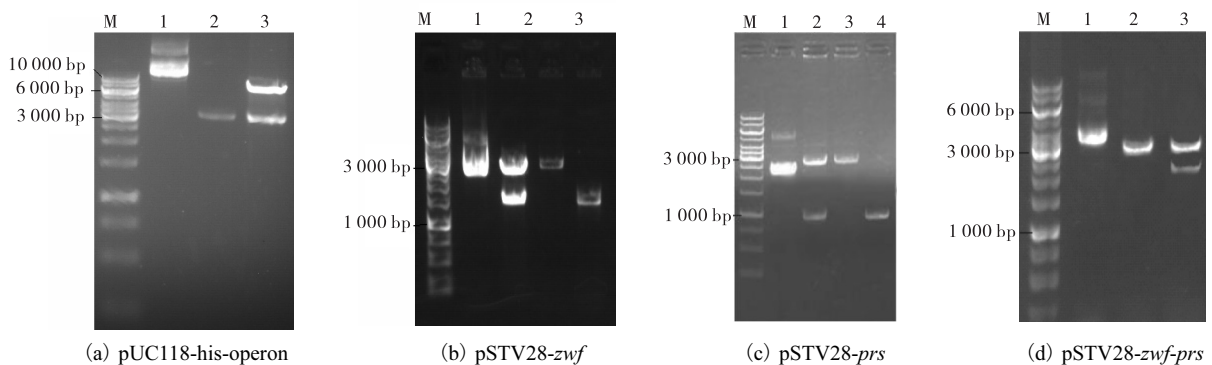


图 2 重组质粒的酶切验证

Fig.2 Identification of recombinant plasmids by digestion

将重组质粒 pUC118-his-operon、pSTV28-zwf、pSTV28-prs 和 pSTV28-zwf-prs 分别转化至突变株 *E. coli* M-18,得到重组工程菌 M-19(SG<sup>r</sup>+ 2-TA<sup>r</sup>+His Hx<sup>r</sup>/pUC118-his-operon)、MZH-19(SG<sup>r</sup>+ 2-TA<sup>r</sup>+HisHx<sup>r</sup>/

pSTV28-zwf/pUC118-his-operon)、MPH-19(SG<sup>r</sup>+2-TA<sup>r</sup>+HisHx<sup>r</sup>/pSTV28-prs/pUC118-his-operon) 和 MZPH-19(SG<sup>r</sup>+2-TA<sup>r</sup>+HisHx<sup>r</sup>/pSTV28-zwf-prs/pUC118-his-operon).

## 2.4 工程菌的摇瓶发酵

将重组工程菌 *E. coli* M-19、*E. coli* MZH-19、*E. coli* MPH-19、*E. coli* MZPH-19 和对照株 *E. coli* M-18 进行摇瓶发酵 36 h, 测定 L-组氨酸产量, 结果如图 3 所示。

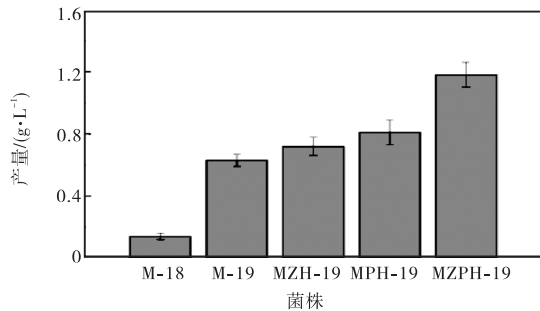


图3 不同菌株的L-组氨酸摇瓶发酵36h产量的比较

Fig.3 Production of 36 h flask-shaking fermentation of L-histidine

由图3可知,工程菌 *E. coli* M-19、*E. coli* MZH-19、*E. coli* MPH-19、*E. coli* MZPH-19 的 L-组氨酸产量与对照株相比,分别提高了 4.5、5.14、5.78、8.43 倍. 工程菌 *E. coli* M-19 中重组质粒携带了脱敏的 his operon 基因, L-组氨酸产量提高, 推测其原因为提高了其在大肠杆菌内的拷贝数及其所编码酶的活性. *zwf* 基因编码的 G-6-PDH 是 HMP 途径的限速酶, 工程菌 *E. coli* MZH-19 在过表达 his operon 的同时又过表达了 *zwf* 基因, 使得 L-组氨酸产量提高, 推测其原因为工程菌 *E. coli* MZH-19 的 HMP 途径相对活跃, 且 G-6-PDH 催化产生了大量的 NADPH 和 H<sup>+</sup>, 为生物体的合成提供还原力, 同时也为 L-组氨酸的合成提供了氢供体. 工程菌 *E. coli* MPH-19 共表达了 his operon 和 *prs* 基因, 使得 L-组氨酸产量提高, 推测其原因为 *prs* 基因的过表达为 L-组氨酸的合成提供了更多的前体物质 PRPP. 工程菌 *E. coli* MZPH-19 表达了 his operon 和 *zwf-prs*, 使得 L-组氨酸产量提高, 推测其原因为 L-组氨酸合成的中心代谢途径——HMP 途径增强, 前体物质 PRPP 增多, 葡萄糖的整个代谢流向合成 L-组氨酸的方向分布。

## 3 结 语

L-组氨酸的合成代谢途径较长, 调控相对复杂, 因此通过诱变单一地选育结构类似物抗性突变株并不会完全打通菌体内合成 L-组氨酸的代谢途径, 进而大量积累组氨酸. 本研究通过传统的诱变方法和基因工程相结合的手段来构建 L-组氨酸基因工程

菌, 对大肠杆菌 L-组氨酸生物合成的代谢途径进行了改造. 首先用亚硝基胍 (NTG) 诱变 *E. coli* M-17 (SG<sup>r</sup>), 依次赋予其 2-TA 和 HisHx 遗传标记, 得到突变株 *E. coli* M-18 (SG<sup>r</sup> + 2-TA<sup>r</sup> + HisHx<sup>r</sup>), 再以提取的突变株 *E. coli* M-18 基因组为模板, 利用 PCR 技术扩增突变株的整个组氨酸操纵子基因, 并将其连接到 pUC118 载体上, 过表达组氨酸生物合成途径上的一系列酶系, 从而使组氨酸得到积累. 由于重组质粒 pUC118-his-operon 在 11 000 bp 左右, 不易再进行分子生物学操作, 故选择了另一个可以相容的质粒 pSTV28 进行进一步的改造, 且 pSTV28 质粒的拷贝数较低, 更有利于代谢物的生成. 本研究利用了复制子不同的两个相容性质粒 pSTV28 (复制子为 p15A) 和 pUC118 (复制子为 pMB1) 对 L-组氨酸生物合成途径进行了进一步的改造, 扩增了 L-组氨酸生物合成中心代谢途径的关键酶编码基因 *zwf* 和编码合成 L-组氨酸的前体物质 PRPP 的 *prs* 基因. 由实验结果表明, 双质粒重组基因工程菌 *E. coli* MZH-19、*E. coli* MPH-19 和 *E. coli* MZPH-19 与对照株比较, L-组氨酸产量分别提高了 5.14、5.78、8.43 倍, 因此双质粒系统的改造可进一步提高 L-组氨酸的产量。

## 参考文献:

- [1] 陈宁. 氨基酸工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2009.
- [2] 姚晓玲, 曾莹, 宋卫江. L-组氨酸产生菌的诱变选育[J]. 中国酿造, 2007(7): 18-20.
- [3] 许益清, 张伟国. L-组氨酸产生菌株的选育[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 83-85.
- [4] Mizukami T, Hamu A, Ikeda M, et al. Cloning of the ATP phosphoribosyl transferase gene of *Corynebacterium glutamicum* and application of the gene to L-histidine production[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1994, 58(4): 635-638.
- [5] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2003.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] 张昌伟, 徐庆阳, 刘淑云, 等. 2,4-二硝基氟苯衍生效测定发酵液中组氨酸方法的优化[J]. 现代化工, 2007, 27(S2): 743-943.
- [8] Araki K, Nakayama K. L-histidine production by histidine analog-resistant mutants from several bacteria[J]. Agricultural Biology and Chemistry, 1971, 35(13): 2081-2088.