



基于 *cdd* 基因敲除和嘧啶操纵子转移的 胞苷产生菌的研究

苏 静, 邓培生, 谢希贤, 陈 宁

(工业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: 以大肠杆菌作为出发菌株,通过基因工程手段对其进行改造,旨在提高胞苷产量. 首先,通过 Red 重组系统敲除了大肠杆菌 MG3028 基因组上的胞苷脱氨酶基因 (*cdd*),阻断了胞苷的分解代谢. 然后,构建了含解淀粉芽孢杆菌 TS8 嘧啶操纵子结构基因的重组质粒 pPYR3021,并将其转入 *E.coli* MG3028(Δcdd). 与出发菌株 *E.coli* MG3028 相比,*E.coli* MG3028(Δcdd)的胞苷产量提高了近 2 倍,而尿苷产量降低了近 75%,携带重组质粒 pPYR3021 的菌株胞苷产量较出发菌株提高了近 6 倍.

关键词: 大肠杆菌; 胞苷脱氨酶; 嘧啶操纵子; Red 重组; 胞苷

中图分类号: Q784 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2010)05-0001-05

Study on Cytidine Producing Strain Based on *cdd* Gene Knockout and Pyrimidine Operon Transfer

SU Jing, DENG Pei-sheng, XIE Xi-xian, CHEN Ning

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

Abstract: To enhance production of cytidine, *Escherichia coli* was manipulated by using genetic engineering methods. The *cdd* gene of *Escherichia coli* MG3028 was knocked out to block cytidine degradation by Red recombination system. Then the recombinant plasmid pPYR3021 containing pyrimidine operon of *Bacillus amyloliquefaciens* TS8 was constructed and transformed into *E.coli* MG3028(Δcdd). Compared with original strain MG3028, knockout of the *cdd* gene led to the enhanced production of cytidine by nearly 2-fold, and reduced production of uridine by 75%. The production of recombinant strain harboring a plasmid pPYR3021 was improved by 6-fold.

Keywords: *Escherichia coli*; cytidine deaminase; pyrimidine operon; Red recombination; cytidine

胞苷是人体和动植物体内 RNA 的结构组成部分,在生物体内生理生化过程中起着重要的调控作用,具有多方面生理活性. 同时,胞苷又是很多抗病毒、抗肿瘤和抗艾滋病药物的良好中间体以及基因工程研究的重要原材料^[1]. 采用微生物发酵法生产胞苷,具有条件简单、成本低、产率高、周期短、控制容易等优势^[2],是大规模生产胞苷的首选技术. 经过传统诱变得到的菌株会产生大量次级突变,具有菌体生长速度慢等弱点,是目前工业生产中难以解决的问

题. 基因工程技术改造菌株,如基因克隆、基因敲除等,因其无次级突变、改造目的性强、实验周期短等优势逐渐受到人们的重视.

在大肠杆菌胞苷从头合成途径中,尿苷酸(UMP)合成酶系和三磷酸(CTP)胞苷合成酶系受到尿嘧啶核苷酸和胞嘧啶核苷酸的反馈抑制,而胞苷脱氨酶使胞苷进一步反应生成尿苷^[3-4]. 本文为了提高胞苷产量,首先利用 Red 重组系统敲除了胞苷脱氨酶基因 *cdd*,切断胞苷进一步代谢为尿苷的分解途径,

构建了含解淀粉芽孢杆菌 TS8 噬菌操纵子结构基因的重组质粒 pPYR3021, 此操纵子编码 UMP 从头合成途径中的 6 个关键酶。发酵研究表明, 经过这些改造后, 胞苷产量有了不同程度的提高, 这为进一步选育胞苷生产菌奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Escherichia coli MG3028 是本实验室筛选得到的一株胞苷产生菌株。解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) TS8 是本实验室通过诱变得到的菌株, 它带有 5-氟胞苷 (5-FC^r) 和 3-脱杂氮尿嘧啶 (3-DU^r) 抗性。质粒 pMU3021 (含有四环素抗性基因)、pMD18-T、pKD3 (含有氯霉素抗性基因)、pKD46 (温敏型复制子, 含有受 P_{araB} 启动子调控的 *exo*、*bet*、*gam* 基因, Amp^r)、pCP20 (同时含有氯霉素和氨基青霉素抗性基因) 由天津科技大学代谢工程研究室保存。

1.2 试剂与试剂盒

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、质粒载体 pMD18-T, TaKaRa 公司; PCR 引物, 上海生物工程公司; 1 000 bp marker, Fermentas 公司; L-阿拉伯糖, 北京新经科生物技术公司; DNA 片段胶回收试剂盒、基因组 DNA 的提取试剂盒、质粒小样快速提取试剂盒, 北京博迈德公司; IPTG、X-gal、溶菌酶、氨基青霉素及氯霉素, 北京索莱宝公司; 蛋白胨、酵母粉, Oxoid 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

种子培养基: 葡萄糖 20 g, 玉米浆 50 mL, 豆饼水解液 20 mL, 酵母膏 15 g, (NH₄)₂SO₄ 10 g, 柠檬酸三钠 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 5 g, KH₂PO₄ 1.5 g, FeSO₄·7H₂O 15 mg, V_{B1} 100 mg, 蒸馏水 1 000 mL。

发酵培养基: 葡萄糖 20 g, 玉米浆 5 mL, 豆饼水解液 25 mL, 酵母膏 1 g, 柠檬酸三钠 2 g, MgSO₄·7H₂O 5 g, KH₂PO₄ 2 g, FeSO₄·7H₂O 100 mg, 蒸馏水 1 000 mL。

SOC 培养基: 胰蛋白胨 20 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 0.5 g, KCl 2.5 mmol, MgCl₂ 10 mmol, 葡萄糖 20 mmol, 蒸馏水 1 000 mL。

1.4 引物设计

本文所用引物: P1 (5'-AAAGCCACAACGGGTTCGTAACACTGTTATCCCATTACATGATTATGAGGCAACGCCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAG-3'), P2 (5'-ACCAGGAGAGGGCTGGCAAGCCGGAC

AAAGCGTTCACGCCGCATCCGGCAC CAGGCTAACGGCTGACATGGGAATTAGC-3'), P3 (5'-GCTGGATTATCAGGAAGGT-3'), P4 (5'-TAACAGGCTGAGGAACACG-3'), P5 (5'-GAGACTCGAGGAAACGGAGGAGAAAAACAT-3'), P6 (5'-GAGAGCGGCCGCGCTGTTGTTTTCTGCCGGTTGTC-3'), P7 (5'-GAGAGCGGCCGCGGCTATTC CGGGTACCATTTCGC-3'), P8 (5'-GAGACTCGAGC GCGATCAACAAGGAATTCCAGTG-3'), 由北京博迈德公司合成。设计引物 P1、P2, 引物 5'端 56 bp (下划线所示) 与待敲除的靶基因同源, 3'端 23 bp 与 pKD3 上的氯霉素基因同源, 中间序列为 FRT 位点。以 P1、P2 为引物, PCR 扩增出 pKD3 上的氯霉素基因。根据大肠杆菌 MG3028 *cdd* 基因及上下游序列设计鉴定引物 P3、P4。根据解淀粉芽孢杆菌基因序列, 设计引物 P5、P6, PCR 扩增出噬菌操纵子序列。根据质粒 pMU3021 的基因序列设计引物 P7、P8, 扩出质粒 pMU3021 上包括复制起始位点、启动子、四环素抗性在内的结构元件。

1.5 方法

1.5.1 利用 Red 重组系统构建大肠杆菌 *cdd* 基因缺失株

感受态的制备^[5]: 将含有 pKD46 的大肠杆菌 MG3028 接种, 30 °C 过夜培养 12 h, 2% 接种至 100 mL 的 LB 培养基 (氨基青霉素的质量浓度为 100 μg/mL), 30 °C 培养至 A₆₀₀ 为 0.2 ~ 0.3 时, 加入 L-阿拉伯糖至 100 mmol/L, 继续培养至 A₆₀₀ 为 0.5 ~ 0.6, 充分表达 pKD46 上的 Exo、Bet 和 Gam 3 个蛋白。菌体预冷至 4 °C, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃培养基, 用预冷的无菌水洗涤 1 次, 用预冷的 10% 甘油离心洗涤 3 次, 用 600 μL 预冷的 10% 甘油重悬细胞, 每管 50 μL 分装, 存放于 -80 °C 冰箱待用。

氯霉素抗性基因片段的扩增: 以质粒 pKD3 为模板, P1、P2 为引物, PCR 扩增出含有氯霉素抗性基因的目的片段。

氯霉素抗性基因替换拟敲除的目的基因 *cdd*: 将扩增得到的 1 166 bp 片段约 120 ng 加入上述制备好的感受态细胞中, 混匀, 转入 0.2 cm 电击杯中, 用 Bio-Rad 电击仪做电转化^[6]。电击电压 1.8 kV, 电击时间为 5 ~ 6 ms, 电击后迅速加入 1 mL 的 SOC 培养基, 165 r/min, 37 °C 培养 2 h 后涂于含有氯霉素的平板 (氯霉素质量浓度为 34 μg/mL) 上。过夜培养后用菌落 PCR 鉴定含氯霉素抗性基因的重组菌。

抗性基因的消除及鉴定: pCP20 质粒^[7-8]含有一个翻转重组酶 (FLP) 基因, 42 °C 诱导表达的 FLP 重

组酶可以与 FRT 位点结合, FRT 位点自身发生同源重组, 从而消除一个 FRT 位点及抗性基因. pCP20 的复制起点为温度敏感型, 在 42 °C 高温下不能复制.

将 pCP20 转入氯霉素抗性克隆, 37 °C 复苏 2 h, 在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素平板上筛选转化子. 筛选的转化子 42 °C 过夜培养, 分别涂布于含 25 μg/mL 氯霉素平板和无抗性平板, 挑选在无抗性平板上生长而在氯霉素平板上不生长的单菌落即为抗性基因消除的菌株. 以 P3、P4 为引物, 对氯霉素抗性消失的克隆进行 PCR 鉴定, PCR 产物进行测序验证.

1.5.2 质粒构建及转化

以解淀粉芽孢杆菌 TS8 染色体 DNA 为模板, P5、P6 为引物, PCR 扩增出噬噬操纵子的结构基因, 同时, 以 P7、P8 为引物扩增出质粒 pMU3021 上包括复制起始位点、启动子、四环素抗性在内的部分结构元件. 将纯化的两段 PCR 产物酶切连接起来, 构建成质粒 pPYR3021 (图 1), 在这个质粒上, *pyr* 基因受 pMU3021 质粒的启动子的调控.

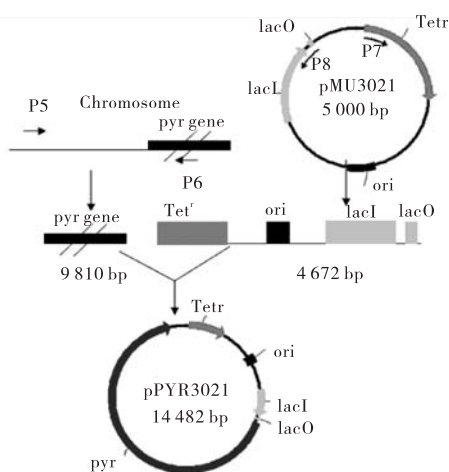


图 1 质粒 pPYR3021 的构建

Fig.1 Construction of plasmid pPYR3021

在 1.5 mL 无菌离心管中加入 1 μL 质粒 DNA 和 200 μL 大肠杆菌 MG3028 (Δcdd) 感受态细胞, 轻弹管壁混匀, 冰上放置 30 min. 将离心管置于 42 °C 的恒温水浴 90 s 后, 快速将离心管冰浴 3 min. 向离心管中加入 500 μL 的 LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养 1 h. 取 150 μL 的 LB 液体培养基菌悬液, 涂布到含 50 μg/mL 四环素抗性的 LB 平板上, 37 °C 恒温培养 12 h 后筛选转化子, 得到重组菌株 MG3028 (Δcdd /pPYR3021).

1.5.3 菌体浓度测定

取 0.2 mL 待测液, 加入 9.8 mL 0.25 mol/L 的盐酸以溶解溶液中的碳酸钙, 摇匀, 以空白培养液为参

比, 752 型分光光度计测定 A_{600} .

1.5.4 胞苷和尿苷的测定^[9]

采用 HPLC 测定反应生成的胞苷和尿苷.

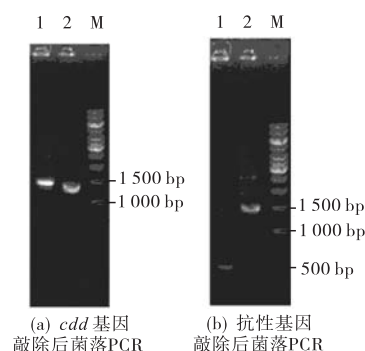
1.5.5 菌株传代培养^[10]

从胞苷产生菌 MG3028 (Δcdd /pPYR3021) 中挑取单菌落接种于含 50 μg/mL 四环素的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 过夜培养, 第 2 天按 1% 的接种量接种不含四环素的 LB 液体培养基中, 37 °C 连续振荡培养, 每隔 6 h 转管, 间隔一定时间取样, 取得不同代数的菌液. 分别取第 0、20、40、60、80、100 代菌株适量稀释, 涂布于空白 LB 平板, 37 °C 过夜培养, 分别挑取 100 个单菌落到空白 LB 平板和含四环素的 LB 平板, 37 °C 过夜培养, 计算工程菌在无四环素选择压力下传代时质粒丢失率.

2 结果

2.1 *cdd* 基因敲除及鉴定

将扩增出的氯霉素抗性基因片段转化到含有质粒 pKD46 的 MG3028 感受态细胞中, 37 °C 复苏 2 h 后涂布于氯霉素抗性平板上培养约 24 h. 以 P3、P4 为引物, PCR 鉴定氯霉素抗性平板上长出来的阳性转化子. *cdd* 基因敲除前用鉴定引物 PCR 扩增出的片段为 1305 bp, 敲除后用鉴定引物 PCR 扩增出的片段为 1474 bp. 结果显示: PCR 扩增的目的条带与理论值一致, 如图 2(a) 所示.



(a): 1. *cdd* 基因重组后菌落 PCR; 2. 重组前 PCR; M. 1 000 bp DNA marker.

(b): 1. 完全敲除抗性基因后菌落 PCR; 2. 敲除抗性基因前菌落 PCR; M. 1 000 bp DNA marker.

图 2 *cdd* 基因敲除鉴定结果

Fig.2 Verification of *cdd* gene knockout

将 pCP20 转入氯霉素抗性克隆, 37 °C 复苏 2 h, 在含有 100 μg/mL 氨苄青霉素平板上筛选转化子. 挑选出的转化子 42 °C 培养过夜后, 分别涂布于氯霉素抗性平板和无抗性平板, 挑选在无抗性平板上生长而

在氯霉素平板上不生长的单菌落,用鉴定引物 P3、P4 作进一步鉴定. 氯霉素抗性基因缺失后,用鉴定引物 PCR 扩增出的片段为 544 bp. 琼脂糖凝胶电泳结果与理论值一致,如图 2(b)所示.

2.2 含嘧啶操纵子的表达载体 pPYR3021 的构建及转化子筛选

以 P5、P6 为引物,PCR 扩增出嘧啶操纵子的结构基因;同时,以 P7、P8 为引物扩增出质粒 pMU3021 上包括复制起始位点、启动子、四环素抗性在内的结构元件. 分别用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切两段纯化的 PCR 产物,然后将酶切片段连接起来,构建成质粒 pPYR3021,转化敲除了 *cdd* 基因的大肠杆菌 MG3028(Δcdd). 在含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 四环素抗性的 LB 平板上,筛选转化子,得到重组菌株 MG3028(Δcdd /pPYR3021). 提取质粒测序,结果表明构建成功.

2.3 基因改造对菌体生长的影响

将出发菌株大肠杆菌 MG3028、敲除了 *cdd* 基因的 MG3028(Δcdd) 和含有质粒 pPYR3021 的 MG3028(Δcdd /pPYR3021) 摇瓶发酵 40 h, 根据发酵液不同时期的吸光度绘制生长曲线,如图 3 所示. 结果表明,敲除了 *cdd* 基因其生长曲线与出发菌株 MG3028 基本一致,它们到达对数生长期与进入稳定期的时间无明显差别,而转入重组质粒 pPYR3021 后,菌株生长周期加长,其到达对数生长期延长了 2 h,且菌体浓度最高只能达到 1.623,原因可能是重组质粒太大,它的存在对菌株的生长造成了一定的压力. 由此说明,敲除 *cdd* 基因对大肠杆菌 MG3028 的生长状况没有太大影响,而转入重组质粒对菌株的生长有一定的影响.

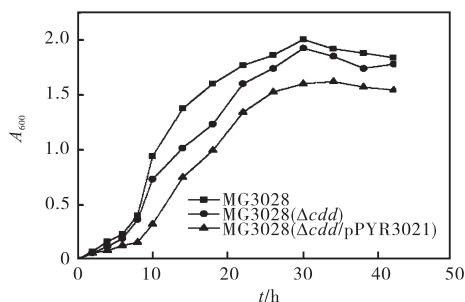


图3 大肠杆菌 MG3028、MG3028(Δcdd)、MG3028(Δcdd /pPYR3021)的生长曲线

Fig.3 Growth curve of *Escherichia coli* MG3028, MG3028(Δcdd) and MG3028(Δcdd /pPYR3021)

2.4 敲除 *cdd* 基因和过表达嘧啶操纵子 *pyr* 基因对大肠杆菌胞苷积累的影响

将 *cdd* 基因缺失突变株 MG3028(Δcdd) 和转化了质粒 pPYR3021 的 MG3028(Δcdd /pPYR3021) 进

行摇瓶发酵实验,同时以出发菌株大肠杆菌 MG3028 作为对照菌株,HPLC 分析胞苷和尿苷的变化. 结果如图 4 所示,*cdd* 基因缺失突变株 MG3028(Δcdd) 胞苷产量为 $(0.181 \pm 0.012) \text{ g/L}$,较出发菌株略有提高,而尿苷产量明显降低,说明敲除 *cdd* 基因可有效地阻断嘧啶代谢通量由胞苷流向尿苷和尿嘧啶,使胞苷有所积累. 转化质粒 pPYR3021 后,胞苷产量由出发菌株 MG3028 的 $(0.098 \pm 0.004) \text{ g/L}$ 增加到 $(0.580 \pm 0.026) \text{ g/L}$. 同时,尿苷产量也略有增加,说明过表达嘧啶操纵子基因 *pyr*,可以显著增强嘧啶代谢途径,胞苷产量有所提高.

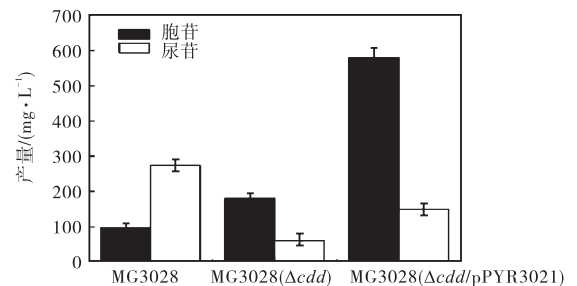


图4 大肠杆菌 MG3028、MG3028(Δcdd)、MG3028(Δcdd /pPYR3021)胞苷产量的比较

Fig.4 Cytidine yield of *E. coli* MG3028, MG3028(Δcdd) and MG3028(Δcdd /pPYR3021)

2.5 含嘧啶操纵子重组质粒 pPYR3021 稳定性测定

工程菌株 MG3028(Δcdd /pPYR3021) 在没有筛选压力下的质粒稳定性如表 1 所示. 结果说明在没有筛选压力下质粒不稳定,到第 100 代时质粒丢失率达到了 22%.

表 1 质粒稳定性

Tab.1 Plasmid stability

代数	0	20	40	60	80	100
质粒稳定性/%	100	97	93	87	82	78

3 讨论

目前,利用发酵法生产胞苷的菌株大部分为芽孢杆菌属,主要原因是芽孢杆菌属的嘧啶核苷代谢通量大,相关酶基因集成簇,反馈阻遏和反馈抑制易于解除,适合选育胞苷产生菌,但该菌是革兰氏阳性菌,载体受体系统研究少,且有质粒不稳定的障碍,所以采用基因工程技术修饰改造枯草芽孢杆菌难度较大,相关的报道也较少. 相比于枯草芽孢杆菌,大肠杆菌具有遗传背景清晰、基因操作简单和异源基因兼容性好等特点,已成为基因工程研究方面应用最广泛的宿主菌.

基于大肠杆菌在基因工程操作方面的优势,本文选择大肠杆菌作为出发菌株.首先,利用 Red 重组系统敲除了 MG3028 上的胞苷脱氨酶基因(*cdd*),构建出 *cdd* 基因缺失突变株,与出发菌株相比,此菌株胞苷产量提高了近 2 倍,尿苷降低了近 75%,说明阻断胞苷降解通路对提高胞苷浓度也是必要的.

不同于大肠杆菌的嘧啶操纵子不连续地分散在染色体上^[11],构成解淀粉芽孢杆菌嘧啶操纵子的 6 个结构基因是连接在一起的.解淀粉芽孢杆菌 TS8 是通过诱变筛选得到的一株胞苷产生菌,它带有 5-FC^r 和 3-DU^r 抗性,在一定程度上解除胞苷生物合成途径中所受反馈抑制与反馈阻遏.本文将 TS8 嘧啶操纵子引入大肠杆菌,以增强受体菌嘧啶代谢流量.当把重组质粒 pPYR3021 转入 *cdd* 基因缺失突变株,胞苷产量提高了近 6 倍,同时,尿苷也略有提高,说明过表达嘧啶操纵子基因,可以显著增强嘧啶代谢途径,增加胞苷产量.

参考文献:

- [1] 姜妍,许爱军.国内外抗病毒药物研发进展[J].黑龙江医药,2006,19(5):388.
- [2] 乔宾福.微生物产生核苷和核酸[J].工业微生物,1998,28(1):22-27.
- [3] Barry W P,Raymond J K. The biosynthesis pathway of cytidine[J]. Bacteriol,1975,3(2):604-615.
- [4] Rima B K,Takahashi I. Pathway analysis of cytidine synthesis[J]. J Bacteriol,1977(124):574-579.
- [5] 韩聪,张惟材,游松,等.大肠杆菌 ptsG 基因敲除及其缺陷株生长特性研究[J].生物工程学报,2004,20(1):16-20.
- [6] Yu D,Ellis H M,Lee E C,et al. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(11):5978-5983.
- [7] Yuan L Z,Rouviere P E,Larossa R A,et al. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *Escherichia coli* [J]. Metab Eng,2006,8(1):79-90.
- [8] Datsenko K A,Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(12):6640-6645.
- [9] 苏静,黄静,谢希贤,等.枯草芽孢杆菌 *cdd* 基因敲除及对胞苷发酵的影响[J].生物技术通讯,2010,21(1):39-42.
- [10] 李莉,范小连,何丽敏,等.125Ser-rIL-2 工程菌稳定性研究[J].中国医药工业杂志,1996,27(4):158-160.
- [11] Turnbough C L Jr,Switzer R L. Regulation of pyrimidine biosynthetic gene expression in bacteria:Repression without repressors[J]. Microbiol Mol Biol Rev,2008,72(2):266-300.