



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103131663 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201310072083. 0

(22) 申请日 2013. 03. 07

(73) 专利权人 中国科学院天津工业生物技术研究所

地址 300308 天津市空港经济区西七道 32 号

(72) 发明人 张学礼 谭在高 朱欣娜 徐洪涛

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006. 01)

C12P 7/46 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12R 1/19 (2006. 01)

审查员 毛舒燕

权利要求书2页 说明书26页
序列表4页 附图3页

(54) 发明名称

提高丁二酸产量的重组菌及构建方法

(57) 摘要

本发明公开了提高丁二酸产量的重组菌及构建方法。本发明提供的重组菌,为大肠杆菌或其突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 酶活,得到的重组菌。本发明的实验证明,本发明利用具有不同表达强度的组成型调控元件分别调控 *E. coli* 的 *ppc* 和 *pck* 基因的表达,探究了 PPC 与 PCK 酶活与丁二酸生产之间的规律;并在此基础上,通过协同调控 *E. coli* 的 *ppc* 和 *pck* 基因,同时利用 PPC 和 PCK 两个催化酶,发挥各自催化优势,显著提高了 *E. coli* 丁二酸的产量和转化率。

1. 重组菌, 为提高大肠杆菌或其突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 酶活, 得到的重组菌;

所述提高大肠杆菌或其突变株中 PPC 和 PCK 酶活的方法如下:

将所述大肠杆菌或其突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为如下 A 组调控元件中的任意一种, 且将所述大肠杆菌或其突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为如下 A 组调控元件和 B 组调控元件中的任意一种:

所述 A 组调控元件由人工调控元件 M1-12、M1-30、M1-46、M1-37 和 M1-93 组成;

所述 B 组调控元件由人工调控元件 Ppck*、RBSL-1、RBSL-2 和 RBSL-3 组成;

所述人工调控元件 M1-12 的核苷酸序列为序列表中的序列 4;

所述人工调控元件 M1-30 的核苷酸序列为序列表中的序列 5;

所述人工调控元件 M1-46 的核苷酸序列为序列表中的序列 6;

所述人工调控元件 M1-37 的核苷酸序列为序列表中的序列 7;

所述人工调控元件 M1-93 的核苷酸序列为序列表中的序列 8;

所述人工调控元件 Ppck* 的核苷酸序列为序列表中的序列 2;

所述人工调控元 RBSL-1 的核苷酸序列为序列表中的序列 11;

所述人工调控元 RBSL-2 的核苷酸序列为序列表中的序列 12;

所述人工调控元 RBSL-3 的核苷酸序列为序列表中的序列 13;

所述磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因调控元件的核苷酸序列为序列表中的序列 3;

所述磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因调控元件的核苷酸序列为序列表中的序列 9。

2. 根据权利要求 1 所述的重组菌, 其特征在于:

所述提高大肠杆菌中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 酶活的方法为将所述大肠杆菌中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-46, 且将所述大肠杆菌中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 RBSL-2。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的重组菌, 其特征在于:

所述提高大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 酶活的方法为如下 1) -8) 中任意一种:

1) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-46, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 Ppck*;

2) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-12, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 Ppck*;

3) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 Ppck*;

4) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-93, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基

因的调控元件替换为所述人工调控元件 *Ppck**；

5) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-12, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37；

6) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-46, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37；

7) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37；

8) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-93, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37。

4. 根据权利要求 1 所述的重组菌, 其特征在于: 所述大肠杆菌突变株为敲除大肠杆菌中的乳酸脱氢酶基因、丙酮酸甲酸裂解酶编码基因和磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的磷酸转移酶 I 编码基因, 且将大肠杆菌中的半乳糖转运蛋白编码基因 *galP* 的调控元件替换成人工调控元件 *Ppck**, 得到的重组菌；

所述半乳糖转运蛋白编码基因 *galP* 调控元件的核苷酸序列为序列表中的序列 1；

所述人工调控元件 *Ppck** 的核苷酸序列为序列表中的序列 2。

5. 根据权利要求 1 所述的重组菌, 其特征在于: 所述替换均通过同源重组实现。

6. 根据权利要求 1 所述的重组菌, 其特征在于: 所述大肠杆菌为 ATCC 8739。

7. 权利要求 1-6 中任一所述重组菌在生产丁二酸中的应用。

8. 制备权利要求 1-6 中任一所述重组菌的方法。

提高丁二酸产量的重组菌及构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及提高丁二酸产量的重组菌及构建方法。

背景技术

[0002] 丁二酸又称为琥珀酸,在生物体中,作为 TCA 循环过程中重要的中间代谢物,同时也具有重要的应用价值。丁二酸可以作为多种重要化合物的前体原料,如 1,4-丁二醇、四氢呋喃等,被广泛应用于食品、医药、化妆品,可降解塑料合成等方面,因此被美国能源部认为是 12 种最具价值的大宗化学品之一。目前丁二酸主要以不可再生的石油原料,通过化学法合成。由于石油资源的日益枯竭,利用微生物法产丁二酸引起了人们的极大关注。与化学合成法相比,微生物发酵法具有很多优势,而且由于丁二酸合成过程中吸收 CO₂,可以有效减缓温室气体的排放。目前,研究较多的产琥珀酸微生物菌株主要有: *Actinobacillus succinogenes* (McKinlay et al., 2000), *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Nghiem et al., 1997), *Mannheimia succiniciproducens* (Lee et al., 2002) 以及 *Escherichia coli* (Vemuri et al., 2005; Jantama et al., 2008a; Jantama et al., 2008b; Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2009b)。其中大肠杆菌 *E. coli* 由于其遗传背景明确、易操作、生长速率快、易培养及利用碳源广等诸多优点而受到越来越多的重视,被认为是最有潜力的琥珀酸生产菌株 (Jantama et al., 2008a; Vemuri et al., 2002a; Zhang et al., 2009b)。

[0003] *E. coli* 在厌氧条件下进行混合酸发酵,主要产生乳酸、甲酸、乙酸以及少量的丁二酸 (Clark, 1989)。对于丁二酸生产而言,副产物乳酸、甲酸、乙酸等的存在会抑制丁二酸的产量和转化率,也给下游的分离纯化带来困难。因此,需要改变 *E. coli* 细胞内的代谢流,抑制上述副产物的生成。先前的研究中,以 *E. coli* W1485 为出发菌,利用插入抗性基因的方法同时使乳酸脱氢酶 (*ldhA*) 以及丙酮酸甲酸裂解酶 (*pf1B*) 编码基因失活,获得突变菌株 NZN111 (Stols et al., 1997)。该菌株由于缺少了 *Ldh* 以及 *Pf1B*,使得乳酸和甲酸的产量显著降低,但是由于扰动导致的细胞体内的氧化还原不平衡,丙酮酸大量积累,使得菌株在厌氧条件下不能以葡萄糖为碳源进行生长。Chatterjee 等人发现 *ptsG* 基因中的突变使得 NZN111 突变株能够重新利用葡萄糖生长,发酵产物中丁二酸、乙酸和乙醇的比例为 2 : 1 : 1 (Chatterjee et al., 2001)。

[0004] 磷酸转移酶系统 (phosphoenolpyruvate (PEP) : carbohydrate phosphotransferase systems (PTS)) 是大肠杆菌吸收利用葡萄糖的主要方式 (Flores et al., 1996; Gosset, 2005; Postma et al., 1993; Zhang et al., 2009a)。该系统由可溶性的酶 I/Hpr (*ptsHI* 基因编码) 以及酶 II (包括 IIA/B/C, 由 *crr* 以及 *ptsG* 基因编码) 组成 (Hernandez-Montalvo et al., 2003; Postma et al., 1993; Lu et al., 2011)。在 PTS 系统中,吸收一分子的葡萄糖需要消耗一分子的 PEP, PEP 被认为是 *E. coli* 中合成若干重要化合物的前体分子,大量 PEP 用于葡萄糖的吸收对于 *E. coli* 化合物合成而言是不经济的,失活 PTS 系统将有利于提高 PEP 的供给以及相关目的产物的生成 (Flores et al., 1996; Wang

et al., 2006; Yi et al., 2003; Zhang et al., 2009b)。

[0005] 作为 *E. coli* 厌氧条件下丁二酸合成中的前体, PEP 是 *E. coli* 代谢调控的重要节点 (Millard et al., 1996; Zhang et al., 2009b)。在 *E. coli* 中, 存在着两个 PEP 催化酶类, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC (GenBank No: ACA79659.1; GI: 169756960) 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK (GenBank No: AAC76428.1; GI: 1789807)。这两个酶在这一催化过程中分别展现出不同的催化性能。其中, PPC 是正常条件下的主要催化酶类, 对底物之一的 CO_3^{2-} 或者 HCO_3^- 的 K_m 值低, 催化速度快, 在催化过程中伴随着 Pi 的释放。Millard 等人通过过表达 *E. coli* 来源的 *ppc* 基因, 使得菌株 JCL1208 的丁二酸产量提高 3.5 倍 (Millard et al., 1996)。Lin 等人的研究也表明, 在 *E. coli* GJT001 中过表达高粱 (*Sorghum vulgare*) 来源的 *ppc* 基因, 有效地提高了丁二酸的产量 (Lin et al., 2005)。正常情况下, *E. coli* *pck* 基因的表达受到葡萄糖的抑制, 只有在糖异生的情况下才会被激活表达, 但是与 PPC 相比, *E. coli* PCK 催化 PEP 生成 OAA 的过程中伴随着 ATP 的生成, 是能量节省型的反应 (Zhang et al., 2009b)。Kim 等人发现在 *ppc* 基因缺失的情况下, 过表达 *Actinobacillus succinogenes* 的 *pck* 基因使得野生型 *E. coli* K12 菌株的丁二酸产量提高 6.5 倍 (Kim et al., 2004); Kwon 等人的研究结果表明, 在含有高浓度的 HCO_3^- 的条件下, 过表达 *E. coli* *pck* 基因使得菌株的丁二酸产量提高 2.2 倍 (Kwon et al., 2006); Zhang 等人的研究工作表明, *pck* 上游 -64 调控元件区域的点突变 (*pck**) 将会解除葡萄糖对 *pck* 的阻遏效应, 显著提高 PCK 活性, 提高 *E. coli* 丁二酸产率 (Zhang et al., 2009b)。

[0006] PPC 和 PCK 在催化 PEP 羧化过程中展现出不同的反应特性: PPC 酶对 HCO_3^- 亲和能力高 ($K_m: 0.1 \mu\text{M}$, Kai et al., 1999), 催化速度快 (Wohl and Markus, 1972), 能够快速地将 PEP 羧化成 OAA, 为丁二酸的合成提供前体, 但是这一过程中也伴随着能量的损失 (Pi 的释放); 与之相比, 虽然 PCK 酶对 HCO_3^- 的亲和力较低 ($K_m: 13 \mu\text{M}$, Matte et al., 1996), PEP 羧化的速度较慢, 催化活性 (specific activity) 为 $28 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ (Krebs and Bridger, 1980), 但是在这一过程中, 伴随着 ATP 的生成, ATP 的产生将有利于菌株在厌氧条件下的生长。

发明内容

[0007] 本发明提供了提高丁二酸产量的重组菌及构建方法。

[0008] 本发明提供的重组菌, 为提高大肠杆菌或其突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 酶活, 得到的重组菌。

[0009] 上述提高大肠杆菌或其突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 酶活为提高大肠杆菌或其突变株菌体中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 含量。

[0010] 上述重组菌中, 所述提高大肠杆菌或其突变株中 PPC 和 PCK 酶活的方法如下:

[0011] 将所述大肠杆菌或其突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为如下 A 组调控元件中的任意一种, 且将所述大肠杆菌或其突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为如下 A 组调控元件和 B 组调控元件中的任意一种:

[0012] 所述 A 组调控元件由人工调控元件 M1-12、M1-30、M1-46、M1-37 和 M1-93 组成;

[0013] 所述 B 组调控元件由人工调控元件 Ppck*、RBSL-1、RBSL-2 和 RBSL-3 组成;

- [0014] 所述人工调控元件 M1-12 的核苷酸序列为序列表中的序列 4；
- [0015] 所述人工调控元件 M1-30 的核苷酸序列为序列表中的序列 5；
- [0016] 所述人工调控元件 M1-46 的核苷酸序列为序列表中的序列 6；
- [0017] 所述人工调控元件 M1-37 的核苷酸序列为序列表中的序列 7；
- [0018] 所述人工调控元件 M1-93 的核苷酸序列为序列表中的序列 8；
- [0019] 所述人工调控元件 Ppck* 的核苷酸序列为序列表中的序列 2；
- [0020] 所述人工调控元 RBSL-1 的核苷酸序列为序列表中的序列 11；
- [0021] 所述人工调控元 RBSL-2 的核苷酸序列为序列表中的序列 12；
- [0022] 所述人工调控元 RBSL-3 的核苷酸序列为序列表中的序列 13；
- [0023] 所述磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因调控元件的核苷酸序列为序列表中的序列 3；
- [0024] 所述磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因调控元件的核苷酸序列为序列表中的序列 9。

[0025] 上述重组菌中,所述提高大肠杆菌中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 酶活的方法为将所述大肠杆菌中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-46,且将所述大肠杆菌中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 RBSL-2,得到重组菌 ZT-020。

[0026] 上述替换均采用同源重组的方法,上述将所述大肠杆菌中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-46,且将所述大肠杆菌中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 RBSL-2 按照实施例 2 中的重组菌 ZT-020 的构建方法进行。

[0027] 上述重组菌中,所述提高大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 酶活的方法为如下 1)-8) 中任意一种：

[0028] 1) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-46,且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 Ppck*；得到重组菌 ZT-015；上述替换均采用同样重组的方法,具体方法见实施例 5 的(二)；

[0029] 2) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-12,且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 Ppck*；得到重组菌 ZT-014；上述替换均采用同样重组的方法,具体方法见实施例 5 的(二)；

[0030] 3) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37,且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 Ppck*；得到重组菌 ZT-016；上述替换均采用同样重组的方法,具体方法见实施例 5 的(二)；

[0031] 4) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-93,且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 Ppck*；得到重组菌 ZT-017；上述替换均采用同样重组的方法,具体方法见实施例 5 的(二)；

[0032] 5) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-12, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37; 得到重组菌 ZT-010; 上述替换均采用同样重组的方法, 具体方法见实施例 5 的(一);

[0033] 6) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-46, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37; 得到重组菌 ZT-011; 上述替换均采用同样重组的方法, 具体方法见实施例 5 的(一);

[0034] 7) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37; 得到重组菌 ZT-012; 上述替换均采用同样重组的方法, 具体方法见实施例 5 的(一);

[0035] 8) 将所述大肠杆菌突变株中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PPC 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-93, 且将所述大肠杆菌突变株中磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 基因的调控元件替换为所述人工调控元件 M1-37; 得到重组菌 ZT-013; 上述替换均采用同样重组的方法, 具体方法见实施例 5 的(一)。

[0036] 上述大肠杆菌突变株 Suc-T108 为敲除大肠杆菌中的乳酸脱氢酶基因、丙酮酸甲酸裂解酶编码基因和磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的磷酸转移酶 I 编码基因, 且将大肠杆菌中的半乳糖转运蛋白编码基因 galP 的调控元件替换成人工调控元件 Ppck*, 得到的重组菌; 上述替换均为同源重组的方式, 具体方法见实施例 1 的一;

[0037] 所述半乳糖转运蛋白编码基因 galP 调控元件的核苷酸序列为序列列表中的序列 1;

[0038] 所述人工调控元件 Ppck* 的核苷酸序列为序列列表中的序列 2。

[0039] 上述重组菌中的所述替换均通过同源重组实现。

[0040] 上述重组菌中, 所述大肠杆菌为 ATCC8739。

[0041] 上述重组菌在生产丁二酸中的应用也是本发明保护的范围。

[0042] 制备上述重组菌的方法也是本发明保护的范围, 方法见上述所示。

[0043] 本发明的实验证明, 本发明利用具有不同表达强度的组成型调控元件分别调控 E. coli 的 PPC 与 PCK 基因的表达, 探究了 PPC 与 PCK 酶活与丁二酸生产之间的规律; 并在此基础上, 通过协同调控 E. coli ppc 和 pck 基因, 同时利用 PPC 和 PCK 两个催化酶, 发挥各自催化优势, 显著提高了 E. coli 丁二酸的产量和转化率。

附图说明

[0044] 图 1 为 PCK 酶活与丁二酸产率之间的关系

[0045] 其中 1a 为 ZT-001 至 ZT-005 中 PCK 酶活与丁二酸产率之间的关系;

[0046] 1b 为 Suc-T110 以及 ZT-004A、ZT-004B、ZT-004C 中 PCK 酶活与丁二酸产率之间的关系;

[0047] 图 2 为 PCK 酶为低活性时, PPC 酶活与丁二酸产率之间的关系

[0048] 图 3 为 PCK 酶为中等活性时, PPC 酶活与丁二酸产率之间的关系

[0049] 图 4 为 PCK 酶为高活性时, PPC 酶活与丁二酸产率之间的关系

具体实施方式

[0050] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0051] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0052] 下述实施例中重组菌株 M1-12、M1-30、M1-46、M1-37、M1-93 均记载在: Lu, J., J. Tang, et al. (2012). "Combinatorial modulation of galP and glk gene expression for improved alternative glucose utilization." *Appl Microbiol Biotechnol* 93(6):2455-2462. 公众可从天津工业生物技术研究所获得。

[0053] 实施例 1、大肠杆菌 ATCC8739 突变株重组大肠杆菌 Suc-T108 的构建

[0054] 一、质粒 pXZ-CS 的构建

[0055] 质粒构建操作步骤共四步:

[0056] 第一步,以 pACYC184 质粒(Mok, Y. K., Clark, D. R., Kam, K. M. and Shaw, P. C. BsiY I, a novel thermophilic restriction endonuclease that recognizes 5' CCNNNNNNGG3' and the discovery of a wrongly sequenced site in pACYC177. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19:2321-2323; 公众可从天津工业生物技术研究所获得) DNA 为模板,使用引物 184-cat-up/184-cat-down, 扩增得到氯霉素抗性基因, 基因片段大小为 994bp, 包含有氯霉素基因启动子序列, 称为片段 I。

[0057] 扩增体系为: NewEngland Biolabs Phusion5X 缓冲液 10 μ l、dNTP(每种 dNTP 各 10mM) 1 μ l、DNA 模板 20ng、引物(10 μ M) 各 2 μ l、Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶 (2.5U/ μ l) 0.5 μ l、蒸馏水 33.5 μ l, 总体积为 50 μ l。

[0058] 扩增条件为 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟(1 个循环); 98 $^{\circ}$ C 变性 10 秒、56 $^{\circ}$ C 退火 10 秒、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒(30 个循环); 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟(1 个循环)。

[0059] 第二步,以芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* sp *subtilis* 168DNA(该菌购自中国普通微生物菌种保藏中心, CGMCC No. 1. 1390) 为模板,使用引物 Bs-sacB-up/Bs-sacB-down 进行 PCR 扩增果聚糖蔗糖转移酶基因(sacB), 基因片段大小为 1618bp, 含有 sacB 基因启动子序列, 称为片段 II。

[0060] 扩增体系为: NewEngland Biolabs Phusion5X 缓冲液 10 μ l、dNTP(每种 dNTP 各 10mM) 1 μ l、DNA 模板 20ng、引物(10 μ M) 各 2 μ l、Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶 (2.5U/ μ l) 0.5 μ l、蒸馏水 33.5 μ l, 总体积为 50 μ l。

[0061] 扩增条件为 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟(1 个循环); 98 $^{\circ}$ C 变性 10 秒、57 $^{\circ}$ C 退火 10 秒、72 $^{\circ}$ C 延伸 40 秒(30 个循环); 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟(1 个循环)。

[0062] 第三步,将第一步得到的片段 I 和第二步得到的片段 II 分别用限制性内切酶 SacI(NEB 公司) 在 37 $^{\circ}$ C 酶切 30 分钟; PCR 纯化试剂盒清洗(Gel/PCR Extration Kit, 购自 BioMIGA 生物技术有限公司); 各取 20ng 片段 I 和片段 II, 加入 1 μ l 10XT4 连接缓冲液(NEB 公司)、1 μ l T4-DNA 快连酶(NEB 公司), 补充蒸馏水至 10 μ l, 25 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟; 以酶连片段为底物, 取 1 μ l, 用引物 184-cat-up/Bs-sacB-down PCR 扩增, 扩增体系和扩增条件同第二步, 得到含有 cat-sacB 连接片段 III。

[0063] 第四步,将 PCR 获得的片段 III 取 1 μ l, 加入 1 μ l pEASY-blunt simple 载体(试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司), 25 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟; 加入 50 μ l Trans10 感受态细胞(购

自北京全式金生物技术有限公司)中,冰浴 30 分钟。42℃热激 30 秒,立即置于冰上 2 分钟。加入 250 μ l LB 培养基,200rpm,37℃孵育 1 小时。取 200 μ l 菌液涂在含有氨苄霉素(终浓度为 100 μ g/ml)和氯霉素(终浓度为 34 μ g/ml)的 LB 平板上,过夜培养后,挑选 5 个阳性单菌落,进行菌落 PCR 验证,引物为 M13-F/M13-R。送样测序分析,结果正确的为阳性克隆,得到质粒 pXZ-CS(表 3)。

[0064] 二、构建重组大肠杆菌 Suc-T108

[0065] 重组大肠杆菌 Suc-T108 为将大肠杆菌 ATCC8739 敲除乳酸脱氢酶基因 *ldhA*、丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 *pf1B*、磷酸转移酶 I 编码基因 *ptsI*;且将半乳糖转运蛋白编码基因 *galP* 调控元件(序列 1)置换成 *Ppck**(序列 2)得到的重组菌。

[0066] 构建方法具体分为以下 4 个步骤:

[0067] (1) 乳酸脱氢酶基因 *ldhA* 的敲除

[0068] 重组菌 Suc-T102 为采用两步同源重组法将大肠杆菌 ATCC8739 中的乳酸脱氢酶基因 *ldhA* 敲除。

[0069] 乳酸脱氢酶基因 *ldhA* (GenBank No:YP_001725238.1;GI:170020284)的敲除采用两步同源重组的方法,共分为以下六步:

[0070] 第一步,以大肠杆菌 ATCC8739 (Gunsalus IC, Hand DB. The use of bacteria in the chemical determination of total vitamin C. J Biol Chem. 1941, 141:853-858. 公众可从天津工业生物技术研究所获得)基因组 DNA 为模板,使用引物 XZ-*ldhA*-up/XZ-*ldhA*-down,扩增 1753bp PCR 产物,该 PCR 产物包含大肠杆菌 ATCC8739 的乳酸脱氢酶编码基因 *ldhA* 及其上下游各 400 个左右碱基。

[0071] 扩增体系为:New England Biolabs Phusion5X 缓冲液 10 μ l、dNTP(每种 dNTP 各 10mM)各 1 μ l、DNA 模板 20ng、引物(10 μ M) 2 μ l、Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶(2.5U/ μ l)0.5 μ l、蒸馏水 33.5 μ l,总体积为 50 μ l。扩增条件为 98℃预变性 2 分钟(1 个循环);98℃变性 10 秒、59℃退火 10 秒、72℃延伸 1 分钟 30 秒(30 个循环);72℃延伸 5 分钟(1 个循环)。

[0072] 将上述 1753bpPCR 产物克隆到 pEASY-Blunt 克隆载体(购自北京全式金生物技术有限公司)上。克隆体系为:1 μ l PCR 扩增产物、1 μ l pEASY-Blunt 克隆载体,轻轻混合、室温反应 5 分钟后加入 50 μ l Trans1-T1 感受态细胞中(购自北京全式金生物技术有限公司),冰浴 30 分钟。42℃热激 30 秒,立即至于冰上 2 分钟。加入 250 μ l LB 培养基,200rpm,37℃孵育 1 小时。取 200 μ l 菌液涂在含有卡那霉素(终浓度为 15 μ g/ml)的 LB 平板上,过夜培养后,挑选 5 个阳性单菌落,将阳性克隆进行液体培养,提取阳性克隆质粒进行测序验证,测序结果表明在载体 pEASY-Blunt 上插入了乳酸脱氢酶基因及其上下游各 400 个左右碱基,证明质粒构建正确,将得到的重组质粒命名为 pXZ001。

[0073] 第二步,以 pXZ001 质粒 DNA 为模板,使用引物 XZ-*ldhA*-1/XZ-*ldhA*-2 扩增,得到 4758bp 的 PCR 产物,该 PCR 产物包含 pEASY-Blunt 载体和乳酸脱氢酶编码基因上下游各 400 个左右碱基。

[0074] 扩增体系为:NewEngland Biolabs Phusion5X 缓冲液 10 μ l、dNTP(每种 dNTP 各 10mM)各 1 μ l、DNA 模板 20ng、引物(10 μ M) 2 μ l、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase(2.5U/ μ l)0.5 μ l、蒸馏水 33.5 μ l,总体积为 50 μ l。扩增条件为 98℃预变性

2 分钟(1 个循环);98°C 变性 10 秒、60°C 退火 10 秒、72°C 延伸 2 分钟(30 个循环);72°C 延伸 5 分钟(1 个循环)。

[0075] 第三步,将含有氯霉素基因(cat)和果聚糖蔗糖转移酶基因(sacB)DNA 片段 cat-sacB 连接至第二步的 PCR 扩增产物,具体如下:

[0076] 以 pXZ-CS 为模板,使用引物 cat-sacB-up/cat-sacB-down 扩增,得到 2618bp 的 PCR 产物,即为含有氯霉素基因(cat)和果聚糖蔗糖转移酶基因(sacB)的 DNA 片段。

[0077] 连接体系为:10ng 的第二步 4758bp 的 PCR 产物、30ng 的 cat-sacB DNA 片段,2 μ l 110XT₄ 连接缓冲液(NEB 公司),1 μ l T4 连接酶(NEB 公司,400,000 cohesive end units/ml),补充蒸馏水至 20 μ l。室温连接 2 小时,取 5 μ l 加入 50 μ l TransI-T1 感受态细胞中(购自北京全式金生物技术有限公司),冰浴 30 分钟。42°C 热激 30 秒,立即置于冰上 2 分钟。加入 250 μ l LB 培养基,200rpm,37°C 孵育 1 小时。取 200 μ l 菌液涂在含有氯霉素(终浓度为 17ug/ml)的 LB 平板上,过夜培养后,挑选 5 个阳性单菌落,将阳性克隆进行液体培养,提取阳性克隆质粒(将 cat-sacB DNA 片段克隆到 pXZ001 中的质粒)进行测序验证,测序结果在上述第二步的 PCR 扩增产物上连接了 cat-sacB DNA 片段,证明质粒构建正确,将得到的重组质粒命名为 pXZ002C。

[0078] 第四步,以 pXZ002C 质粒 DNA 为模板,使用引物 XZ-ldhA-up/XZ-ldhA-down 扩增出 3447bp DNA 片段 I,扩增体系为:NewEngland Biolabs Phusion5X 缓冲液 10 μ l、dNTP(每种 dNTP 各 10mM)各 1 μ l、DNA 模板 20ng、引物(10 μ M)2 μ l、Phusion High-Fidelity DNA 聚合酶(2.5U/ μ l)1 μ l、蒸馏水 33.5 μ l,总体积为 50 μ l。扩增条件为 98°C 预变性 2 分钟(1 个循环);98°C 变性 10 秒、59°C 退火 10 秒、72°C 延伸 1 分钟 40 秒(30 个循环);72°C 延伸 5 分钟(1 个循环)。DNA 片段 I 包含乳酸脱氢酶编码基因 ldhA 上游 400 个左右碱基、cat-sacB DNA 片段、乳酸脱氢酶编码基因 ldhA 下游 400 个左右碱基。

[0079] 将 DNA 片段 I 用于第一次同源重组:首先将 pKD46 质粒(Datsenko, wanner. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA. 2000. 97(12):6640-6645;公众可从天津工业生物技术研究获得)通过氯化钙转化法转化至大肠杆菌 ATCC8739,然后将 DNA 片段 I 电转至带有 pKD46 的大肠杆菌 ATCC8739。

[0080] 电转条件为:首先准备带有 pKD46 质粒的大肠杆菌 ATCC8739 的电转化感受态细胞(Dower et al., 1988;Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. 1988. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res. 16:6127-6145);将 50 μ l 感受态细胞置于冰上,加入 50ng DNA 片段 I,冰上放置 2 分钟,转移至 0.2cm 的 Bio-Rad 电击杯。使用 MicroPulser (Bio-Rad 公司)电穿孔仪,电击参数为电压 2.5kv。电击后迅速将 1ml LB 培养基转移至电击杯中,吹打 5 次后转移至试管中,75rpm,30°C 孵育 2 小时。取 200 μ l 菌液涂在含有氯霉素(终浓度为 17ug/ml)的 LB 平板上,37°C 过夜培养后,挑选 5 个单菌落进行 PCR 验证,使用引物 XZ-ldhA-up/XZ-ldhA-down 进行验证,挑选一个正确的单菌落,命名为 Suc-T101。

[0081] 第五步,将第二步得到的 4758bp 的 PCR 产物进行磷酸化处理,自连得到的质粒用于第二次同源重组;具体步骤如下:将第二步的 4758bp 的 PCR 产物首先用 PCR 纯化试剂盒清洗(Gel/PCR Extration Kit,购自 BioMIGA 生物技术有限公司);取 30ng 纯化后的 PCR 扩

增产物,加入 2 μ l 110XT4 连接缓冲液 (NEB 公司)、1 μ l T4 多核苷酸激酶 (NEB 公司),补充蒸馏水至 20 μ l,37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟;加入 1 μ l T4 连接酶 (NEB 公司,400,000 cohesive end units/ml),室温反应 2 小时得到连接产物;取 5 μ l 连接产物加入 50 μ l Trans1-T1 感受态细胞(购自北京全式金生物技术有限公司)中,冰浴 30 分钟。42 $^{\circ}$ C 热激 30 秒,立即至于冰上 2 分钟。加入 250 μ l LB 培养基,200rpm,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。取 200 μ l 菌液涂在含有卡那霉素(终浓度为 15 μ g/ml)的 LB 平板上,过夜培养后,挑选 5 个阳性单菌落,将阳性克隆进行液体培养,提取阳性克隆质粒进行测序验证,测序结果上述第二步的 PCR 扩增产物进行了自连,证明质粒构建正确,得到质粒 pXZ003。

[0082] 第六步,以 pXZ003 质粒 DNA 为模板,用引物 XZ-1dhA-up/XZ-1dhA-down 扩增出 829bp DNA 片段 II。DNA 片段 II 用于第二次同源重组。将 DNA 片段 II 电转至菌株 Suc-T101。

[0083] 电转条件为:首先准备带有 pKD46 质粒的 Suc-T101 的电转化感受态细胞;将 50 μ l 感受态细胞置于冰上,加入 50ng DNA 片段 II,冰上放置 2 分钟,转移至 0.2cm 的 Bio-Rad 电击杯。使用 MicroPulser (Bio-Rad 公司)电穿孔仪,电击参数为电压 2.5kv。电击后迅速将 1ml LB 培养基转移至电击杯中,吹打 5 次后转移至试管中,75 转,30 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时,去除 pKD46 质粒。将菌液转移至含有 10% 蔗糖的没有氯化钠的 LB 液体培养基(250ml 烧瓶中装 50ml 培养基),培养 24 小时后在含有 6% 蔗糖的没有氯化钠的 LB 固体培养基上划线培养。经过 PCR 验证,所用引物为 XZ-1dhA-up/XZ-1dhA-down,正确的菌落扩增产物为 763bp 的片段,挑选一个正确的单菌落,将其命名为 Suc-T102 (表 1)。

[0084] 敲除 1dhA 基因所构建的质粒见表 3,使用的引物序列见表 2。

[0085] (2) 丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 pf1B 的敲除

[0086] 重组菌 Suc-T104 为在重组菌 Suc-T102 中敲除丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 pf1B (GenBank No:ACA78322.1;GI:169755623),操作步骤共以下六步:

[0087] 第一步,以大肠杆菌 ATCC8739 基因组 DNA 为模板,使用引物 XZ-pf1B-up/XZ-pf1B-down,扩增得到 2260bp 大肠杆菌 ATCC8739 的丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 pf1B 及其上下游各 400 个左右碱基。将扩增产物克隆到 pEASY-Blunt 克隆载体上。提取阳性克隆质粒进行测序验证,测序结果表明在载体 pEASY-Blunt 上插入了丙酮酸甲酸裂解酶编码基因及其上下游各 400 个左右碱基,证明质粒构建正确,将得到的重组质粒命名为 pXZ014。

[0088] 第二步,以 pXZ014 质粒 DNA 为模板,使用引物 XZ-pf1B-1/XZ-pf1B-2 进行 PCR 扩增,得到 4808bp 扩增产物,其包含 pEASY-Blunt 载体和丙酮酸甲酸裂解酶编码基因上下游各 400 个左右碱基。

[0089] 第三步,以 pXZ-CS 质粒为模板,使用引物 cat-sacB-up/cat-sacB-down 扩增,得到 2618bp 的 PCR 产物,即为含有氯霉素基因(cat)和果聚糖蔗糖转移酶基因(sacB)的 DNA 片段。

[0090] 将含有氯霉素基因(cat)和果聚糖蔗糖转移酶基因(sacB)的 DNA 片段连接至第二步的 4808bp PCR 扩增产物;转化 Trans1-T1 感受态细胞。取 200 μ l 菌液涂在含有氯霉素(终浓度为 17 μ g/ml)的 LB 平板上,过夜培养后,挑选 5 个阳性单菌落,将阳性克隆进行液体培养,提取阳性克隆质粒(将 cat-sacB DNA 片段克隆到 pXZ014 中的质粒)进行测序验证,测序结果在上述第二步的 PCR 扩增产物上连接了 cat-sacB DNA 片段,证明质粒构建正确,将得到的重组质粒命名为 pXZ015C。

[0091] 第四步,以 pXZ015C 质粒 DNA 为模板,使用引物 XZ-pf1B-up/XZ-pf1B-down 扩增出 3497bp DNA 片段 I。DNA 片段 I 包含丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 pf1B 上游 400 个左右碱基、cat-sacB DNA 片段、丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 pf1B 下游 400 个左右碱基。

[0092] 将 DNA 片段 I 用于第一次同源重组。首先将 pKD46 质粒通过氯化钙转化法转化至菌株 Suc-T102,然后将 DNA 片段 I 电转至带有 pKD46 的菌株 Suc-T102。

[0093] 电转条件同实施例 1 步骤(1)第四步。取 200 μ l 菌液涂在含有氯霉素(终浓度为 17ug/ml)的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养后,挑选 5 个单菌落进行 PCR 验证,所用引物为 XZ-pf1B-up/XZ-pf1B-down,挑选一个正确的单菌落,将其命名为 Suc-T103。

[0094] 第五步,将第二步 4808bp 扩增产物进行磷酸化处理,进行自连。具体步骤同实施例 1 步骤(1)第五步,得到质粒 pXZ016。

[0095] 第六步,以 pXZ016 质粒 DNA 为模板,用引物 XZ-pf1B-up/XZ-pf1B-down 扩增出 DNA 片段 II。DNA 片段 II 用于第二次同源重组。将 DNA 片段 II 电转至 Suc-T103,电转条件同实施例 1 步骤(1)第六步。经过 PCR 验证,所用引物为 XZ-pf1B-up/XZ-pf1B-down,正确的菌落扩增产物为 879bp 的片段,挑选一个正确的单菌落,将其命名为 Suc-T104 (表 1)。

[0096] 敲除 pf1B 基因所构建的质粒见表 3,使用的引物序列见表 2。

[0097] (3) 磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的磷酸转移酶 I 编码基因 ptsI 的敲除

[0098] 重组菌 Suc-T106 为敲除重组菌 Suc-T104 中磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的磷酸转移酶 I 编码基因 ptsI (GenBank No: AAC75469.1 ;GI :1788756 ;) 得到的重组菌 ;具体方法如下,共分为以下六步 :

[0099] 第一步,以大肠杆菌 ATCC8739 基因组 DNA 为模板,使用引物 XZ-ptsI-up/XZ-ptsI-down,扩增得到 913bp 扩增产物,为大肠杆菌 ATCC8739 的磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的磷酸转移酶 I 编码基因 ptsI 及其上下游各 400 个左右碱基。将 913bp 扩增产物克隆到 pEASY-Blunt 克隆载体上。提取阳性克隆质粒进行测序验证,测序结果表明在载体 pEASY-Blunt 上插入了磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的磷酸转移酶 I 编码基因 ptsI 及其上下游各 400 个左右碱基,证明质粒构建正确,将得到的重组质粒命名为 pXZ008。

[0100] 第二步,以 pXZ008 质粒 DNA 为模板,使用引物 XZ-ptsI-1/XZ-ptsI-2 进行 PCR 扩增,得到 4656bp 扩增产物,扩增产物包含 pEASY-Blunt 载体和丙酮酸甲酸裂解酶编码基因上下游各 400 个左右碱基。

[0101] 第三步,以 pXZ-CS 质粒为模板,使用引物 cat-sacB-up/cat-sacB-down 扩增,得到 2618bp 的 PCR 产物,即为含有氯霉素基因(cat)和果聚糖蔗糖转移酶基因(sacB)的 DNA 片段。

[0102] 将含有氯霉素基因(cat)和果聚糖蔗糖转移酶基因(sacB)DNA 片段连接至第二步的 4656bp PCR 扩增产物 ;转化 Trans1-T1 感受态细胞。取 200 μ l 菌液涂在含有氯霉素(终浓度为 17ug/ml)的 LB 平板上,过夜培养后,挑选 5 个阳性单菌落,将阳性克隆进行液体培养,提取阳性克隆质粒(将 cat-sacB DNA 片段克隆到 pXZ008 中的质粒)进行测序验证,测序结果在上述第二步的 PCR 扩增产物上连接了 cat-sacB DNA 片段,证明质粒构建正确,将得到的重组质粒命名为 pXZ009C。

[0103] 第四步,以 pXZ009C 质粒 DNA 为模板,使用引物 XZ-ptsI-up/XZ-ptsI-down 扩增出 3345bp DNA 片段 I ;DNA 片段 I 包含磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的磷酸转移酶 I 编码基因

ptsI 上游 400 个左右碱基、cat-sacB DNA 片段、磷酸烯醇式丙酮酸依赖型的磷酸转移酶 I 编码基因 ptsI 下游 400 个左右碱基。

[0104] 将 DNA 片段 I 用于第一次同源重组。首先将 pKD46 质粒通过氯化钙转化法转化至菌株 Suc-T104, 然后将 DNA 片段 I 电转至带有 pKD46 的菌株 Suc-T104。

[0105] 电转条件同实施例 1 步骤(1) 第四步。取 200 μ l 菌液涂在含有氯霉素(终浓度为 17ug/ml) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后, 挑选 5 个单菌落进行 PCR 验证, 所用引物为 XZ-ptsI-up/XZ-ptsI-down, 得到验证正确的单菌落, 将其命名为 Suc-T105。

[0106] 第五步, 将第二步得到 4656bp PCR 扩增产物进行磷酸化处理, 进行自连。具体步骤同实施例 1 步骤(1) 第五步, 得到质粒 pXZ010。

[0107] 第六步, 以 pXZ010 质粒 DNA 为模板, 用引物 XZ-ptsI-up/XZ-ptsI-down 扩增出 727bpDNA 片段 II。DNA 片段 II 用于第二次同源重组。将 DNA 片段 II 电转至菌株 Suc-T105。电转条件同实施例 1 步骤(1) 第六步。经过 PCR 验证, 所用引物为 XZ-ptsI-up/XZ-ptsI-down, 挑选一个正确的单菌落, 将其命名为 Suc-T106 (表 1)。

[0108] 敲除 ptsI 基因所构建的质粒见表 3, 使用的引物序列见表 2。

[0109] (4) 半乳糖转运蛋白编码基因 galP 调控元件置换成 Ppck*

[0110] 重组菌 Suc-T108 为将菌株 Suc-T106 中半乳糖转运蛋白编码基因 galP (Genbank No: AAC75980.1 ;GI :1789312) 调控元件 (序列 1) 置换成调控元件 Ppck* (序列 2), 操作步骤共以下六步:

[0111] 第一步, 以大肠杆菌 ATCC8739 基因组 DNA 为模板, 使用引物 XZ-galP-P-up/XZ-galP-P-down, 扩增 841bp 扩增产物, 为大肠杆菌 ATCC8739 的半乳糖转运蛋白编码基因 galP 调控元件其上下游各 400 个左右碱基。将扩增产物克隆到 pEASY-Blunt 克隆载体上。提取阳性克隆质粒进行测序验证, 测序结果表明在载体 pEASY-Blunt 上插入了敲除半乳糖转运蛋白编码基因 galP 调控元件及其上下游各 400 个左右碱基, 证明质粒构建正确, 将得到的重组质粒命名为 pXZ011。

[0112] 第二步, 以 pXZ011 质粒 DNA 为模板, 使用引物 XZ-galP-P-1/XZ-galP-P-2 进行 PCR 扩增, 得到 4614bp 扩增产物, 其扩增产物包含 pEASY-Blunt 载体和半乳糖转运蛋白编码基因 galP 调控元件以及上下游各 400 个左右碱基。

[0113] 第三步, 以 pXZ-CS 质粒为模板, 使用引物 cat-sacB-up/cat-sacB-down 扩增, 得到 2618bp 的 PCR 产物, 即为含有氯霉素基因(cat) 和果聚糖蔗糖转移酶基因(sacB) 的 DNA 片段。

[0114] 将含有氯霉素基因(cat) 和果聚糖蔗糖转移酶基因(sacB) DNA 片段连接至第二步的 4614bp PCR 扩增产物。转化 Trans1-T1 感受态细胞。取 200 μ l 菌液涂在含有氯霉素(终浓度为 17 μ g/ml) 的 LB 平板上, 过夜培养后, 挑选 5 个阳性单菌落, 将阳性克隆进行液体培养, 提取阳性克隆质粒(将 cat-sacB DNA 片段克隆到 pXZ010 中的质粒) 进行测序验证, 测序结果在上述第二步的 PCR 扩增产物上连接了 cat-sacB DNA 片段, 证明质粒构建正确, 将得到的重组质粒命名为 pXZ012C。

[0115] 第四步, 以 pXZ012C 质粒 DNA 为模板, 使用引物 XZ-galP-P-up/XZ-galP-P-down 扩增出 3303bp DNA 片段 I ; 该 DNA 片段 I 包含半乳糖转运蛋白编码基因 galP 调控元件上游 400 个左右碱基、cat-sacB DNA 片段、半乳糖转运蛋白编码基因 galP 调控元件下游 400 个

左右碱基。

[0116] 将 DNA 片段 I 用于第一次同源重组。首先将 pKD46 质粒通过氯化钙转化法转化至菌株 Suc-T106, 然后将 DNA 片段 I 电转至带有 pKD46 的菌株 Suc-T106。

[0117] 电转条件同实施例 1 步骤(1) 第四步。取 200 μ l 菌液涂在含有氯霉素(终浓度为 17ug/ml) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后, 挑选 5 个单菌落进行 PCR 验证, 使用引物为 XZ-galP-P-up/XZ-galP-P-down, 得到验证正确的单菌落, 将其命名为 Suc-T107。

[0118] 第五步, 以大肠杆菌 ATCC8739 基因组 DNA 为模板, 使用引物 P-pck^{*}-up-SpeI/P-pck^{*}-down-KpnI 扩增大肠杆菌 ATCC8739 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 的调控元件 pck, 引物序列见表 2。PCR 产物进行 SpeI (购自 NEB 公司) 和 KpnI (购自 NEB 公司) 酶切。将其克隆到经过相同酶酶切的质粒 pTrc99A (Amann, E., Ochs, B. and Abel, K. J. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in Escherichia coli. Gene. 1988, 69:301-15. 公众可从天津工业生物技术研究获得) 表达载体上, 命名为质粒 pXZ602。以质粒 pXZ602 为模板, 设计引物 pck^{*}-F/pck^{*}-R 进行扩增, 引物序列为见表 2。扩增产物经过 T4 多核苷酸激酶(购自 NEB 公司) 加磷, 自连得到阳性质粒, 测序验证无误后, 命名为 pXZ603。

[0119] 以 pXZ603 为模板, 使用引物 P-pck^{*}-up-SpeI 和 P-pck^{*}-down-KpnI 扩增, 得到 378bp 磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 的突变调控元件 Ppck^{*}, 与第二步得到的 4614bp 扩增产物连接, 得到质粒 pXZ013。

[0120] 用 XZ-galP-P-up/XZ-galP-P-down 引物对以质粒 pXZ013 为模板进行扩增出 DNA 片段 II。

[0121] 第六步, DNA 片段 II 用于第二次同源重组。将 DNA 片段 II 电转至 Suc-T107。电转条件同实施例 1 步骤(1) 第六步。经过引物 XZ-galP-P-up/XZ-galP-P-down 进行 PCR 以及测序验证, 得到 1051bp 为正确的单菌落, 将其命名为 Suc-T108 (表 1)。

[0122] 将半乳糖转运蛋白编码基因 galP 调控元件替换成 Ppck^{*} 所构建的质粒见表 3, 使用的引物序列见表 2。

[0123] 表 1、生产丁二酸的重组大肠杆菌

菌株名	相关特征*
ATCC 8739	野生型
Suc-T102	$\Delta IdhA$,
Suc-T104	$\Delta IdhA$, $\Delta pflB$
Suc-T106	$\Delta IdhA$, $\Delta pflB$, $\Delta ptsI$
Suc-T108	$\Delta IdhA$, $\Delta pflB$, $\Delta pstI$, $Ppck^*-galP$
在菌株 Suc-T108 中调控 <i>pck</i> 基因表达	
ZT-001	Suc-T108, MI-12- <i>pck</i>
ZT-002	Suc-T108, MI-30- <i>pck</i>
ZT-003	Suc-T108, MI-46- <i>pck</i>
ZT-004	Suc-T108, MI-37- <i>pck</i>
ZT-005	Suc-T108, MI-93- <i>pck</i>
Suc-T110	Suc-T108, <i>pck^*</i>
ZT-004A	Suc-T108, RBSL-1- <i>pck</i>
ZT-004B	Suc-T108, RBSL-2- <i>pck</i>
ZT-004C	Suc-T108, RBSL-3- <i>pck</i>
[0124]	在菌株 Suc-T108 中调控 <i>ppc</i> 基因表达
ZT-006	Suc-T108, MI-12- <i>ppc</i>
ZT-007	Suc-T108, MI-46- <i>ppc</i>
ZT-008	Suc-T108, MI-37- <i>ppc</i>
ZT-009	Suc-T108, MI-93- <i>ppc</i>
在菌株 Suc-T108 中协同调控 <i>ppc</i> 与 <i>pck</i> 基因表达	
ZT-010	Suc-T108, MI-12- <i>ppc</i> , MI-37- <i>pck</i>
ZT-011	Suc-T108, MI-46- <i>ppc</i> , MI-37- <i>pck</i>
ZT-012	Suc-T108, MI-37- <i>ppc</i> , MI-37- <i>pck</i>
ZT-013	Suc-T108, MI-93- <i>ppc</i> , MI-37- <i>pck</i>
ZT-014	Suc-T108, MI-12- <i>ppc</i> , <i>pck^*</i>
ZT-015	Suc-T108, MI-46- <i>ppc</i> , <i>pck^*</i>
ZT-016	Suc-T108, MI-37- <i>ppc</i> , <i>pck^*</i>
ZT-017	Suc-T108, MI-93- <i>ppc</i> , <i>pck^*</i>
在菌株 ATCC8739 中调控 <i>ppc</i> 与 <i>pck</i> 基因表达	
ZT-018	ATCC 8739, RBSL-2- <i>pck</i>
ZT-019	ATCC 8739, MI-46- <i>ppc</i>
ZT-020	ATCC 8739, MI-46- <i>ppc</i> , RBSL-2- <i>pck</i>

[0125] Ppck* 代表大肠杆菌 *pck* 调控元件突变体（在相对于 ATG 起始处的 -64 位处 G 变为 A）。MI-12、MI-30、MI-46、MI-37、MI-93 是先前构建的人工调控元件元件，以大肠杆菌 *lacZ* 基因调控元件诱导后的强度为 1，这些人工调控元件元件的调控元件强度分别为它的 0.1、0.8、1.7、2.5、5 倍。RBSL-*pck* 是本实验室在 MI-37-*pck* 调控元件元件的基础上，通过

RBS 文库构建, 筛选获得的 pck 调控元件元件。

[0126] 表 2、本发明中使用的引物

[0127]

名称	序列
pXZ-CS 构建	
184-cat-up	GCTAGGTACCTGTGACGGAAGATCACTTCG
184-cat-down	GCTAGAGCTCGCGGCTATTTAACGACCCT (SacI)
Bs-sacB-up	GCTAGAGCTCAAGTAAATCGCGCGGGTTT (SacI)
Bs-sacB-down	GCTAGGATCCTTATTTGTAACTGTTAATTGTC
M13-F	GTA AACGACGGCCAGT
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
<i>ldhA</i> 基因敲除	
XZ-ldhA-up	GATAACGGAGATCGGGAATG
XZ-ldhA-down	CTTTGGCTGTCAGTTCACCA
XZ-ldhA-1	TCTGGAAAAAGGCGAAACCT
XZ-ldhA-2	TTTGTGCTATAAACGGCGAGT
cat-sacB-up	TGTGACGGAAGATCACTTCGCA
cat-sacB-down	TTATTTGTAACTGTTAATTGTCCT
<i>pf1B</i> 基因敲除	
XZ-pf1B-up	TGTCCGAGCTTAATGAAAAGTT
XZ-pf1B-down	CGAGTAATAACGTCCTGCTGCT
XZ-pf1B-1	AAACGGGTAACACCCCAGAC
XZ-pf1B-2	CGGAGTGTAACGTCGAACA
<i>ptsI</i> 基因敲除	
XZ-ptsI-up	CGCATTATGTTCCCGATGAT
XZ-ptsI-down	CACCAATCAGCGTGACAACT
XZ-ptsI-1	GCCACCATCGTAATCCTGTT
XZ-ptsI-2	ATAGCGCACCACTCAATTT
<i>galP</i> 调控元件替换为 P _{pck*}	
XZ-galP-P-up	ATCTGCTGCACCCGATCTAC
XZ-galP-P-down	GAACCGGCAACAAACAAAAT
XZ-galP-P-1	ATGCCTGACGCTAAAAAACAGGG
XZ-galP-P-2	GATTAAACGCTGTTATCTGCAA
P-pck*-up-SpeI	GCATACTAGTGTTGGTTATCCAGAATCAAA
P-pck*-down-KpnI	GCATGGTACCAGCCAATATGTATTGCCTGAATAG
pck*-F	ACGGTTAACACCCCCAAAAAG
pck*-R	GACAAGGCTCATAGATTTACGTATC
<i>pck</i> 表达强度调控	
pck-cat-sacB-up	CGCCATATAAACCAAGATTTAACCTTTTGAGAACATTTCCACACCTAA

[0128]

	TGTGACGGAAGATCACTTCGCA
pck-cat-sacB-down	ATACCATAAGCCTCGAGTTCTTGCGGGGTCAAACCATTGTTAACGCGCATTTA TTTGTAACTGTTAATTGTCCT
pck-up-P	CGCCATATAAACCAAGATTTAACCTTTTGAGAACATTTCCACACCTAATTAT CTCTGGCGGTGTTGAC
pck-RBS-down	ATACCATAAGCCTCGAGTTCTTGCGGGGTCAAACCATTGTTAACGCGCATAGC TGTTTCCTGGTT
pck-RBSL-up	ATCAGTTTGCCACTTCAGCCAGCCG
pck-RBSL-down	ATACCATAAGCCTCGAGTTCTTGCGGGGTCAAACCATTGTTAACGCGCATNNN NNNYCTCCTGGTTTAAACAATAAAT
pck-YZ-up	ACGCCATAAACAATCCAA
pck-YZ-down	CGCATTTCACTGCTCCTT
pck-RBSL-short-up	TTCAGCCAGCCGCTCATC
pck-RBSL-short-down	GAAACGGACGGAAGACG
<i>ppc</i> 表达强度调控	
ppc-cat-sacB-up	GTTTGCTGAAGCGATTTGCGCAGCATTTGACGTCACCGCTTTTACGTGGCTTTA TAAAA TGTGACGGAAGATCACTTCGCA
ppc-cat-sacB-down	TTGCCGAGCATACTGACATTACTACGCAATGCGGAATATTGTTGTTTCAT TTATTTGTAACTGTTAATTGTCCT
ppc-up-P	GTTTGCTGAAGCGATTTGCGCAGCATTTGACGTCACCGCTTTTACGTGGCTTTA TAAAA TTATCTCTGGCGGTGTTGAC
ppc-RBS-down	TTGCCGAGCATACTGACATTACTACGCAATGCGGAATATTGTTGTTTCAT AGCTGTTTCCTGGTT
ppc-YZ-up	ACCAGTTCCAGCGACAGC
ppc-YZ-down	TCCGACCTACACCTTTGG

[0129] 表 3、本发明中构建的质粒

质粒	质粒信息
pXZ-CS	来自于 pACYC184 质粒的 <i>cat</i> 基因和来自于 <i>Bacillus subtilis</i> 的 <i>sacB</i> 基因连接到一起, 克隆到 pEASY-blunt simple 质粒
<i>IdhA</i> 基因敲除	
pXZ001	以 <i>E. coli</i> ATCC8739 基因组为模板, PCR 扩增 <i>IdhA</i> (XZ-ldhA-up/XZ-ldhA-down) 并克隆到 pEASY-Blunt 载体上。
pXZ002C	以 pXZ-CS 为模板, PCR 扩增 <i>cat-sacB</i> cassette (cat-sacB-up/cat-sacB-down) 并克隆到以 pXZ001 质粒 DNA 为模板, 使用引物 XZ-ldhA-1/ XZ-ldhA-2 扩增出的 DNA 片段上。
pXZ003	以 pXZ001 质粒 DNA 为模板, 使用引物 XZ-ldhA-1/ XZ-ldhA-2 扩增出的 DNA 片段磷酸化并自连。
<i>pf1B</i> 基因敲除	

[0130]

pXZ014	以 <i>E. coli</i> ATCC8739 基因组为模板, PCR 扩增 <i>pf1B</i> (XZ-pf1B-up/XZ-pf1B-down) 并克隆到 pEASY-Blunt 载体上。
pXZ015C	以 pXZ-CS 为模板, PCR 扩增 <i>cat-sacB</i> cassette (cat-sacB-up/cat-sacB-down) 并克隆到以 pXZ014 质粒 DNA 为模板, 使用引物 XZ-pf1B-1/XZ-pf1B-2 扩增出的 DNA 片段上。
pXZ016	以 pXZ014 质粒 DNA 为模板, 使用引物 XZ-pf1B-1/XZ-pf1B-2 扩增出的 DNA 片段磷酸化处理并自连。
<i>ptsI</i> 基因敲除	
pXZ008	以 <i>E. coli</i> ATCC8739 基因组为模板, PCR 扩增 <i>ptsI</i> (XZ-ptsI-up/XZ-ptsI-down) 并克隆到 pEASY-Blunt 载体上。
pXZ009C	以 pXZ-CS 为模板, PCR 扩增 <i>cat-sacB</i> cassette (cat-sacB-up/cat-sacB-down) 并克隆到以 pXZ008 质粒 DNA 为模板, 使用引物 XZ-ptsI-1/XZ-ptsI-2 扩增出的 DNA 片段上。
[0131] pXZ010	以 pXZ008 质粒 DNA 为模板, 使用引物 XZ-ptsI-1/XZ-ptsI-2 扩增出的 DNA 片段磷酸化处理并自连。
<i>Ppck*</i> 调控元件替换	
pXZ602	以 <i>E. coli</i> ATCC8739 的基因组为模板, PCR 扩增磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶 PCK 的调控元件 <i>pck</i> (P-pck*-up-SpeI/ P-pck*-down-KpnI) 并克隆到载体 pTrc99A 上。
pXZ603	以 pXZ602 质粒 DNA 为模板, 使用引物 <i>pck*-F/pck*-R</i> 扩增出的 DNA 片段磷酸化处理并自连。
pXZ011	以 <i>E. coli</i> ATCC8739 基因组为模板, PCR 扩增 <i>galP</i> (XZ-galP-P-up/XZ-galP-P-down) 并克隆到 pEASY-Blunt 载体上。
pXZ012C	以 pXZ-CS 为模板, PCR 扩增 <i>cat-sacB</i> cassette (cat-sacB-up/cat-sacB-down) 并克隆到以 pXZ007 质粒 DNA 为模板, 使用引物 XZ-galP-P-1/XZ-galP-P-2 扩增出的 DNA 片段上。
pXZ013	以 pXZ010 质粒 DNA 为模板, 使用引物 XZ-galP-P-1/XZ-galP-P-2 扩增出的 DNA 片段与 <i>Ppck*</i> 相连。

[0132] 三、重组大肠杆菌 Suc-T108 生产丁二酸

[0133] 1、发酵生产丁二酸

[0134] 种子培养基和发酵培养基均由以下成分组成：

[0135] 大量元素：葡萄糖和 / 或木糖、碳酸盐、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $(NH_4)_2HPO_4$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ；

[0136] 微量元素： $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 、 $ZnCl_2$ 、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 和 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ；

[0137] 水；

[0138] 以上成分在所述发酵培养基中的浓度分别为：

[0139] 大量元素：葡萄糖 50g/L-150g/L 或 50g/L 或 100g/L 或 150g/L、碳酸盐 1g/L-20g/L 或 1g/L 或 7.9g/L 或 8.4g/L 或 10g/L 或 20g/L、 $NH_4H_2PO_4$ 5g/L-5g/L 或 0.5g/L 或 1g/L

或 5g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1g/L-10g/L 或 1g/L 或 3g/L 或 10g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L-5g/L 或 0.1g/L 或 1g/L 或 5g/L 和 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1g/L-5g/L 或 0.1g/L 或 1g/L 或 5g/L；

[0140] 微量元素： $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 $\mu\text{g/L}$ -5 $\mu\text{g/L}$ 或 0.2 $\mu\text{g/L}$ 或 1.5 $\mu\text{g/L}$ 或 5 $\mu\text{g/L}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 $\mu\text{g/L}$ -5 $\mu\text{g/L}$ 或 0.05 $\mu\text{g/L}$ 或 0.1 $\mu\text{g/L}$ 或 5 $\mu\text{g/L}$ 、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 $\mu\text{g/L}$ -5 $\mu\text{g/L}$ 或 0.05 $\mu\text{g/L}$ 或 0.1 $\mu\text{g/L}$ 或 5 $\mu\text{g/L}$ 、 ZnCl_2 0.05 $\mu\text{g/L}$ -5 $\mu\text{g/L}$ 或 0.05 $\mu\text{g/L}$ 或 0.1 $\mu\text{g/L}$ 或 5 $\mu\text{g/L}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 $\mu\text{g/L}$ -5 $\mu\text{g/L}$ 或 0.05 $\mu\text{g/L}$ 或 0.1 $\mu\text{g/L}$ 或 5 $\mu\text{g/L}$ 和 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 $\mu\text{g/L}$ -5 $\mu\text{g/L}$ 或 0.05 $\mu\text{g/L}$ 或 0.2 $\mu\text{g/L}$ 或 5 $\mu\text{g/L}$ ；

[0141] 所述碳酸盐为 KHCO_3 、 NaHCO_3 或 NH_4HCO_3 。

[0142] 本发明的实施例中具体采用的种子培养基和发酵培养基的组分具体如下：葡萄糖 100g/L、碳酸盐 7.9g/L、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g/L 和 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1g/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.5 $\mu\text{g/L}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、 ZnCl_2 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 $\mu\text{g/L}$ 和 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 $\mu\text{g/L}$ 、 KHCO_3 10g/L。

[0143] 1)、种子培养：250ml 三角瓶中种子培养基为 50ml，115℃ 灭菌 15min。冷却后将重组大肠杆菌 Suc-T108 按照 1%(V/V) 的接种量接种于种子培养基，在 pH 值为 7.0、37℃ 和 120rpm 的条件下培养 16 小时得到种子液，用于发酵培养基接种。

[0144] 2)、发酵培养：发酵罐中培养基为 250ml，将种子液按照终浓度 $\text{OD}_{550}=0.1$ 的接种量接种于发酵培养基，37℃，150rpm 的条件下培养 96 小时，每隔 24h 取样得到发酵液，发酵液为发酵罐内所有物质。以 ATCC8739 为对照。

[0145] 分析方法：使用安捷伦 (Agilent-1200) 高效液相色谱仪对发酵液中的组分进行测定。发酵液中的葡萄糖、丁二酸和其他有机酸浓度测定采用伯乐公司 (Biorad) 的 Aminex HPX-87H 有机酸分析柱。丁二酸标准品购自 SIGMA 公司，产品目录号为 W327700。

[0146] 结果：丁二酸标准品的保留时间为 14.25min；重组菌 Suc-T108 厌氧发酵 96 小时生产了 4mM 的丁二酸 (保留时间为 14.25min)，糖酸转化率为 0.17mol/mol。

[0147] ATCC8739 发酵 96h 生产了 44mM 的丁二酸，糖酸转化率为 0.17mol/mol；

[0148] 2、重组大肠杆菌 Suc-T108 中 PCK 酶活的测定

[0149] 取 30mL 对数生长中后期的发酵液于 50mL 离心管中，4℃ 下以 10000r/min 离心 10min，弃去上清液，收集菌体，用 5mL 100mmol/L Tris-Cl 水溶液 (Tris 碱溶于水中，用 HCl 调节 pH 值为 6.6) 洗涤 2 次后，将菌体悬浮 3mL 100mmol/L Tris-HCl，置于冰槽中超声 (功率：25W；开：1s；关：3s) 破碎 3-5min，4℃ 下以 10000r/min 离心 20min，收集上清液用于酶活测定。

[0150] PCK 酶活性检测反应体系为：反应缓冲液 995 μl (100mM Tris、10mM MgCl_2 、75mM NaHCO_3 、5mM MnCl_2 、10mM ADP、1mM DTT、20U MDH、0.2mM NADH、10mM PEP；pH6.6)，加入 5 μl 上述超声离心后的上清液，混匀后置于比色皿中，记录 A_{340} 的变化情况。空白对照为反应缓冲液加入 5 μl 的 ddH_2O 。

[0151] PPC 酶活性检测反应体系为：反应缓冲液 995 μl (100mM Tris、10mM MgCl_2 、25mM NaHCO_3 、1mM DTT、20U MDH、0.2mM NADH、10mM PEP；pH8.0)，加入 5 μl 上述超声离心后的上清液，混匀后置于比色皿中，记录 A_{340} 的变化情况。空白对照为反应缓冲液加入 5 μl 的 ddH_2O 。

[0152] 酶活力单位定义为：每分钟每 mg 蛋白消耗 NADH 的 μMol 。

- [0153] Suc-T108 菌株中的 PCK 酶活 :0.11U/mg 蛋白 ;
- [0154] Suc-T108 菌株中的 PPC 酶活 :0.095U/mg 蛋白。
- [0155] ATCC8739 的 PCK 酶活为 :0.1U/mg 蛋白 ;
- [0156] ATCC8739 的 PPC 酶活为 :0.1U/mg 蛋白。
- [0157] 实施例 2、提高大肠杆菌 ATCC8739 中的 PPC 和 PCK 酶活构建重组菌 ZT-020
- [0158] 重组菌 ZT-020 为将大肠杆菌 ATCC8739 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 RBSL-2 (序列 12),且将 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-46 (序列 6),得到的重组菌 ;
- [0159] 仅提高大肠杆菌 ATCC8739 中的 PCK 酶活的重组菌 ZT-018 为将大肠杆菌 ATCC8739 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 RBSL-2 (序列 12),得到的重组菌 ;
- [0160] 仅提高大肠杆菌 ATCC8739 中的 PPC 酶活的重组菌 ZT-019 为将大肠杆菌 ATCC8739 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-46 (序列 6),得到的重组菌 ;
- [0161] 重组菌 ZT-018 的构建方法如下 :
- [0162] 第一步同源重组 :与实施例 1 的一的步骤(1)的第四步相同,以 pXZ-CS 质粒为模板,使用引物 pck-cat-sacB-up 和 pck-cat-sacB-down 扩增 DNA 片段 I,用于第一次同源重组。引物序列见表 2 ;得到 2717bpDNA 片段 I,将所得 DNA 扩增片段 I 电转至带有 pKD46 质粒的大肠杆菌 ATCC8739 中,筛选氨苄青霉素与氯霉素抗性的菌落,得到中间重组菌 ;
- [0163] 第二步同源重组 :以后面实施例 3 中的(一)构建的重组菌 ZT-004B 的基因组 DNA 为模板,使用引物 pck-RBSL-short-up/pck-RBSL-short-down 扩增 ZT-004B 菌中 pck 基因的人工调控元件 RBSL-2 及其上下游各约 400bp 的同源臂,得到 955bp 的片段,用于第二步同源重组的调控元件片段,引物序列见表 2。
- [0164] 将 955bp 的片段电转入整合 DNA 片段 I 的中间重组菌,得到重组菌。电转化和筛选方法与实施例 1 的一的步骤(1)的第六步相同。
- [0165] 重组菌的 PCR 验证的引物 pck-RBSL-short-up/pck-RBSL-short-down,得到 955bp 以及测序正确的为阳性菌落,将其命名为菌株 ZT-018 ;
- [0166] 重组菌 ZT-019 的构建方法如下 :
- [0167] 第一步同源重组 :与实施例 1 的一的步骤(1)的第四步相同,以 pXZ-CS 为模板,使用引物 ppc-cat-sacB-up 和 ppc-cat-sacB-down 扩增 DNA 片段 I,用于第一次同源重组 ;引物序列见表 2 ;得到 2726bp DNA 片段 I,将所得 DNA 扩增片段 I 电转至带有 pKD46 质粒的大肠杆菌 ATCC8739 中,筛选氨苄青霉素与氯霉素抗性的菌落,得到中间重组菌 ;
- [0168] 第二步同源重组 :以重组菌 M1-46 的基因组 DNA 为模板,使用引物 ppc-up-P 和 ppc-RBS-down,得到包含 ppc 启动子两侧同源臂和人工调控元件 M1-46 的 193bp 的 DN A 片段 ppc-M1-46 ;引物序列见表 2。
- [0169] 将上述 DN A 片段 ppc-M1-46 电转入整合 ppc-cat-sacB 片段的中间重组菌,得到重组菌。电转化和筛选方法与实施例 1 的一的步骤(1)的第六步相同。
- [0170] PCR 验证的引物 ppc-YZ-up/ppc-YZ-down,得到 758bp 的为正确的单菌落,将其命名为菌株 ZT-019 (表 1)。
- [0171] 重组菌 ZT-020 的构建方法具体如下 :
- [0172] 第一步同源重组 :与实施例 1 的一的步骤(1)的第四步相同,以 pXZ-CS 为模板,使

用引物 ppc-cat-sacB-up 和 ppc-cat-sacB-down 扩增 DNA 片段 I,用于第一次同源重组 ;引物序列见表 2 ;得到 2726bp DNA 片段 I,将所得 DNA 扩增片段 I 电转至带有 pKD46 质粒的重组菌 ZT-018 中,筛选氨苄青霉素与氯霉素抗性的菌落,得到中间重组菌 ;

[0173] 第二步同源重组 :以质粒 M1-46 为模板,使用引物 ppc-up-P 和 ppc-RBS-down,得到包含 ppc 启动子两侧同源臂和人工调控元件 M1-46 的 193bp 的 DNA 片段 ppc-M1-46 ;引物序列见表 2。

[0174] 将上述 DNA 片段 ppc-M1-46 电转入整合了片段 I(ppc-cat-sacB)的中间重组菌,得到重组菌。电转化和筛选方法与实施例 1 的一的步骤(1)的第六步相同。

[0175] PCR 验证的引物 ppc-YZ-up/ppc-YZ-down,得到 758bp 且测序无误的为正确的单菌落,将其命名为菌株 ZT-020 (表 1)。

[0176] 二、重组大肠杆菌 ZT-018、ZT-019、ZT-020 生产丁二酸

[0177] 1、发酵生产丁二酸

[0178] 种子培养基的配方、发酵培养基的配方、厌氧发酵方法和分析检测方法均与实施例 1 的二的 1 相同。以 ATCC8739 为对照。

[0179] 结果 :厌氧发酵 96 小时,ATCC8739 生产了 44mM 的丁二酸,糖酸转化率为 0.17mol/mol ;

[0180] ZT-018 (RBSL-2-pck) 生产了 75mM 的丁二酸,比 ATCC8739 的丁二酸产量提高了 70%,糖酸转化率为 0.29mol/mol,比 ATCC8739 提高了 93% ;

[0181] ZT-019 (ppc-M1-46) 生产了 104mM 的丁二酸,糖酸转化率为 0.40mol/mol,比 ATCC8739 的丁二酸产量提高了 136%,糖酸转化率提高了 135% ;

[0182] ZT-020(RBSL-2-pck/M1-46-ppc)生产了 115mM 的丁二酸,糖酸转化率为 0.44mol/mol,比 ATCC8739 菌株的丁二酸产量提高了 160%,糖酸转化率提高了 158% ;比 ZT-018 (RBSL-2-pck)单基因调控菌株的丁二酸产量提高了 53%,糖酸转化率提高了 52% ;比 ZT-019 (M1-46-ppc) 单基因调控菌株的丁二酸产量提高了 11%,糖酸转化率提高了 10%。

[0183] 2、重组大肠杆菌 ZT-020 中 PCK 和 PPC 酶活的测定

[0184] 酶活测定方案同实施例 1 的二的 2。

[0185] 重组大肠杆菌中的 PCK 酶活为 :ZT-020:2.2U/mg 蛋白 ;ZT-018 :2.2U/mg 蛋白 ; ZT-019 :0.1U/mg 蛋白 ;ATCC8739 :0.1U/mg 蛋白 ;

[0186] 重组大肠杆菌中的 PPC 酶活为 :ZT-020:0.47U/mg 蛋白 ;ZT-018 :0.1U/mg 蛋白 ; ZT-019 :0.43U/mg 蛋白 ;ATCC8739 :0.1U/mg 蛋白。

[0187] 实施例 3、提高重组大肠杆菌 Suc-T108 中 PCK 酶活构建重组菌

[0188] (一) 重组大肠杆菌 ZT-001 至 ZT-005 的构建

[0189] 一、重组大肠杆菌 ZT-001 至 ZT-005 的构建

[0190] 重组大肠杆菌 ZT-001 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为 M1-12 (序列 4),得到的重组菌 ;

[0191] 重组大肠杆菌 ZT-002 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为 M1-30 (序列 5),得到的重组菌 ;

[0192] 重组大肠杆菌 ZT-003 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件替换为 M1-46 (序列 6),得到的重组菌 ;

[0193] 重组大肠杆菌 ZT-004 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件替换为 M1-37 (序列 7), 得到的重组菌;

[0194] 重组大肠杆菌 ZT-005 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件替换为 M1-93 (序列 8), 得到的重组菌;

[0195] 具体如下:

[0196] 第一步同源重组: 与实施例 1 的一的步骤(1)的第四步相同, 以 pXZ-CS 质粒为模板, 使用引物 pck-cat-sacB-up 和 pck-cat-sacB-down 扩增 DNA 片段, 用于第一次同源重组。引物序列见表 2; 得到 2717bp DNA 片段 I, 将所得 DNA 扩增片段 I 电转至带有 pKD46 质粒的重组菌 Suc-T108, 筛选氨苄青霉素与氯霉素抗性的菌落, 得到中间重组菌;

[0197] 第二步同源重组: 分别以重组菌株 M1-12、M1-30、M1-46、M1-37、M1-93 的基因组 DNA 为模板, 使用引物 pck-up-P/pck-RBS-down 扩增, 分别得到 184bp 的包含 pck 启动子两侧同源臂和人工调控元件 M1-12、M1-30、M1-46、M1-37、M1-93 的 DNA 片段 pck-M1-12、pck-M1-30、pck-M1-46、pck-M1-37、pck-M1-93, 引物序列见表 2。

[0198] 将上述 DNA 片段 pck-M1-12、pck-M1-30、pck-M1-46、pck-M1-37、pck-M1-93 分别电转入整合片段 I 的中间菌, 得到重组菌。电转化和筛选方法与实施例 1 的一的步骤(1)的第六步相同。经过 PCR 验证, 使用引物为 pck-YZ-up/pck-YZ-down, 得到 676bp 为正确的单菌落, 将其命名为重组菌 ZT-001 至 005 (表 1)。

[0199] 二、重组大肠杆菌 ZT-001 至 ZT-005 生产丁二酸

[0200] 1、发酵生产丁二酸

[0201] 种子培养基的配方、发酵培养基的配方、厌氧发酵方法和分析检测方法均与实施例 1 的二的 1 相同。

[0202] 结果: 厌氧发酵 96 小时, ZT-001 生产了 17mM 的丁二酸, 糖酸转化率为 0.15mol/mol; ZT-002 生产了 31mM 的丁二酸, 糖酸转化率为 0.38mol/mol; ZT-003 生产了 31mM 的丁二酸, 糖酸转化率为 0.38mol/mol; ZT-004 生产了 55mM 的丁二酸, 糖酸转化率为 0.48mol/mol; ZT-005 生产了 12mM 的丁二酸, 糖酸转化率为 0.18mol/mol。

[0203] 2、重组大肠杆菌 ZT-001 至 ZT-005 中 PCK 酶活的测定

[0204] 酶活测定方案同实施例 1 的二的 2。

[0205] 重组大肠杆菌中的 PCK 酶活为: ZT-001 :0.24U/mg 蛋白; ZT-002 :0.38U/mg 蛋白; ZT-003 :0.38U/mg 蛋白; ZT-004 :0.53U/mg 蛋白; ZT-005 :0.21U/mg 蛋白。

[0206] 各菌株中 PCK 酶活与丁二酸产量的关系如图 1a 所示。

[0207] (二)、重组大肠杆菌 Suc-T110 以及 ZT-004A、ZT-004B、ZT-004C 的构建

[0208] 一、重组大肠杆菌 Suc-T110 以及 ZT-004A、ZT-004B、ZT-004C 的构建

[0209] 重组大肠杆菌 Suc-T110 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 Ppck*(序列 2), 得到的重组菌;

[0210] 重组大肠杆菌 ZT-004A、ZT-004B、ZT-004C 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为含有兼并碱基的人工调控元件 M1-37-RBSL (序列 10), 得到的三个单克隆重组菌, 通过测序确定其各自具体的人工调控元件序列。具体为:

[0211] 重组大肠杆菌 ZT-004A 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 RBSL-1 (序列 11), 得到的重组菌;

[0212] 重组大肠杆菌 ZT-004B 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3) 替换为人工调控元件 RBSL-2 (序列 12), 得到的重组菌;

[0213] 重组大肠杆菌 ZT-004C 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3) 替换为人工调控元件 RBSL-3 (序列 13), 得到的重组菌;

[0214] 具体如下:

[0215] 第一步同源重组:与实施例 1 的一的步骤(1)的第四步相同,以 pXZ-CS 为模板,使用引物 pck-cat-sacB-up 和 pck-cat-sacB-down 扩增 DNA 片段 I,用于第一次同源重组。引物序列见表 2;得到 2717bp DNA 片段 I,将所得 DNA 扩增片段 I 电转至带有 pKD46 质粒的重组菌 Suc-T108,筛选氨苄青霉素与氯霉素抗性的菌落,得到中间重组菌;

[0216] 第二步同源重组:以 pXZ603 质粒为模板,使用引物 P-pck*-up-SpeI/P-pck*-down-KpnI 扩增(引物序列见表 2),得到 378bp 人工调控元件 Ppck*;将 378bp 人工调控元件 Ppck* 电转入整合了片段 I 的中间重组菌,得到重组菌 1。重组菌 1PCR 验证的引物 pck-YZ-up/pck-YZ-down,得到 676bp 且测序正确的单菌落,将其命名为菌株 Suc-T110;

[0217] 另外,以重组菌 ZT-004 的基因组 DNA 为模板,使用引物 pck-RBSL-up/pck-RBSL-down 扩增(引物序列见表 2),得到 619bp 的 DNA 片段 III。将 619bp 的 DNA 片段 III 电转入整合片段 I 的中间重组菌,在得到的重组菌中挑出三个单克隆,分别命名为重组菌 2、重组菌 3、重组菌 4。电转化和筛选方法与实施例 1 的一的步骤(1)的第六步相同。

[0218] 重组菌 2、重组菌 3、重组菌 4 的 PCR 验证的引物为 pck-YZ-up/pck-YZ-down,得到 676bp 的为正确的单菌落,分别命名为重组菌 ZT-004A、ZT-004B 和 ZT-004C。

[0219] 二、重组大肠杆菌 Suc-T110、ZT-004A 至 ZT-004C 生产丁二酸

[0220] 1、发酵生产丁二酸

[0221] 种子培养基的配方、发酵培养基的配方、厌氧发酵方法和分析检测方法均与实施例 1 的二的 1 相同。

[0222] 结果:厌氧发酵 96 小时, Suc-T110 生产了 226mM 的丁二酸,糖酸转化率为 1.12mol/mol;ZT-004A 生产了 217mM 的丁二酸,糖酸转化率为 0.99mol/mol;ZT-004B 生产了 264mM 的丁二酸,糖酸转化率为 1.20mol/mol;ZT-004C 生产了 256mM 的丁二酸,糖酸转化率为 1.16mol/mol。

[0223] 2、重组大肠杆菌 Suc-T110、ZT-004A 至 ZT-004C 中 PCK 酶活的测定

[0224] 酶活测定方案同实施例 1 的二的 2。

[0225] 重组大肠杆菌中的 PCK 酶活为:Suc-T110:1.84U/mg 蛋白;ZT-004A:1.52U/mg 蛋白;ZT-004B:2.22U/mg 蛋白;ZT-004C:1.98U/mg 蛋白;

[0226] 各菌株中 PCK 酶活与丁二酸产量的关系如图 1b 所示。

[0227] 实施例 4、提高重组大肠杆菌 Suc-T108 中 PPC 酶活构建重组菌 ZT-006 至 ZT-009 的构建

[0228] 一、重组大肠杆菌 ZT-006 至 ZT-009 的构建

[0229] 重组大肠杆菌 ZT-006 为将重组菌 Suc-T108 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-12(序列 4),得到的重组菌;

[0230] 重组大肠杆菌 ZT-007 为将重组菌 Suc-T108 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-46(序列 6),得到的重组菌;

[0231] 重组大肠杆菌 ZT-008 为将重组菌 Suc-T108 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-37(序列 7),得到的重组菌;

[0232] 重组大肠杆菌 ZT-009 为将重组菌 Suc-T108 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-93(序列 8),得到的重组菌;

[0233] 具体如下:

[0234] 第一步同源重组:与实施例 1 的一的步骤(1)的第四步相同,以 pXZ-CS 质粒为模板,使用引物 ppc-cat-sacB-up 和 ppc-cat-sacB-down 扩增 DNA 片段 I,用于第一次同源重组;引物序列见表 2;得到 2726bp DNA 片段 I,将所得 DNA 扩增片段 I 电转至带有 pKD46 质粒的重组菌 Suc-T108,筛选氨苄青霉素与氯霉素抗性的菌落,得到中间重组菌;

[0235] 第二步同源重组:以重组菌株 M1-12、M1-46、M1-37、M1-93 的基因组 DNA 为模板,使用引物 ppc-up-P 和 ppc-RBS-down,分别得到 193bp 的包含 ppc 启动子两侧同源臂和人工调控元件 M1-12、M1-46、M1-37、M1-93 的 DNA 片段 ppc-M1-12、ppc-M1-46、ppc-M1-37、ppc-M1-93;引物序列见表 2。

[0236] 将上述 DNA 片段 ppc-M1-12、ppc-M1-46、ppc-M1-37、ppc-M1-93 分别电转入整合了片段 I 的中间重组菌,分别得到重组菌。电转化和筛选方法与实施例 1 的一的步骤(1)的第六步相同。

[0237] PCR 验证的引物 ppc-YZ-up/ppc-YZ-down,得到 758bp 的为正确的单菌落,将其命名为菌株 ZT-006 至 ZT-009(表 1)。

[0238] 二、重组大肠杆菌 ZT-006 至 ZT-009 生产丁二酸

[0239] 1、发酵生产丁二酸

[0240] 种子培养基的配方、发酵培养基的配方、厌氧发酵方法和分析检测方法均与实施例 1 的二的 1 相同。

[0241] 结果:厌氧发酵 96 小时,ZT-006 生产了 75mM 的丁二酸,糖酸转化率为 0.65mol/mol;ZT-007 生产了 94mM 的丁二酸,糖酸转化率为 0.63mol/mol;ZT-008 生产了 58mM 的丁二酸,糖酸转化率为 0.59mol/mol;ZT-009 生产了 56mM 的丁二酸,糖酸转化率为 0.49mol/mol。

[0242] 2、重组大肠杆菌 ZT-006 至 ZT-009 中 PPC 酶活的测定

[0243] 酶活测定方案同实施例 1 的二的 2。

[0244] 重组大肠杆菌中的 PPC 酶活为:ZT-006:0.34U/mg 蛋白;ZT-007:0.47U/mg 蛋白;ZT-008:0.60U/mg 蛋白;ZT-009:1.01U/mg 蛋白。

[0245] 各菌株中 PPC 酶活与丁二酸产量的关系如图 2 所示。

[0246] 实施例 5、提高重组大肠杆菌 Suc-T108 中的 PPC 和 PCK 酶活构建重组菌

[0247] (一)重组大肠杆菌 ZT-010 至 ZT-013 的构建

[0248] 重组大肠杆菌 ZT-010 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 M1-37(序列 7),且将 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-12(序列 4),得到的重组菌;也就是将重组菌 ZT-004 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-12(序列 4),得到的重组菌;

[0249] 重组大肠杆菌 ZT-011 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 M1-37(序列 7),且将 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元

件 M1-46 (序列 6);也就是将重组菌 ZT-004 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9) 替换为人工调控元件 M1-46 (序列 6),得到的重组菌;

[0250] 重组大肠杆菌 ZT-012 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 M1-37 (序列 7),且将 PPC 基因的调控元件(序列 9) 替换为人工调控元件 M1-37 (序列 7);也就是将重组菌 ZT-004 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9) 替换为人工调控元件 M1-37 (序列 7),得到的重组菌;

[0251] 重组大肠杆菌 ZT-013 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 M1-37 (序列 7),且将 PPC 基因的调控元件(序列 9) 替换为人工调控元件 M1-93 (序列 8);也就是将重组菌 ZT-004 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9) 替换为人工调控元件 M1-93 (序列 8),得到的重组菌;

[0252] 具体如下:

[0253] 第一步同源重组:与实施例 1 的一的步骤(1) 的第四步相同,以 pXZ-CS 质粒为模板,使用引物 ppc-cat-sacB-up 和 ppc-cat-sacB-down 扩增 DNA 片段 I,用于第一次同源重组;引物序列见表 2;得到 2726bp DNA 片段 I,将所得 DNA 扩增片段 I 电转至带有 pKD46 质粒的重组菌 ZT-004,筛选氨苄青霉素与氯霉素抗性的菌落,得到中间重组菌;

[0254] 第二步同源重组:以重组菌株 M1-12、M1-46、M1-37、M1-93 基因组 DNA 为模板,使用引物 ppc-up-P 和 ppc-RBS-down,分别得到 193bp 的包含 ppc 启动子两侧同源臂和人工调控元件 M1-12、M1-46、M1-37、M1-93 的 DNA 片段 ppc-M1-12、ppc-M1-46、ppc-M1-37、ppc-M1-93;引物序列见表 2。

[0255] 将上述 DNA 片段 ppc-M1-12、ppc-M1-46、ppc-M1-37、ppc-M1-93 分别电转入中间重组菌,分别得到重组菌。电转化和筛选方法与实施例 1 的一的步骤(1) 的第六步相同。

[0256] PCR 验证的引物 ppc-YZ-up/ppc-YZ-down,得到 758bp 的为正确的单菌落,将其命名为菌株 ZT-010 至 ZT-013 (表 1)。

[0257] 二、重组大肠杆菌 ZT-010 至 ZT-013 生产丁二酸

[0258] 1、发酵生产丁二酸

[0259] 种子培养基的配方、发酵培养基的配方、厌氧发酵方法和分析检测方法均与实施例 1 的二的 1 相同。

[0260] 结果:厌氧发酵 96 小时,ZT-010 (M1-12-ppc/M1-37-pck)生产了 119mM 的丁二酸,糖酸转化率为 0.94mol/mol,比 ZT-006 (单调控 ppc 至 M1-12-ppc)的产量提高了 59%,糖酸转化率提高了 45%;比 ZT-004 (单调控 pck 至 M1-37-pck)的产量提高了 116%,糖酸转化率提高了 96%;

[0261] ZT-011 (M1-46-ppc/M1-37-pck)生产了 156mM 的丁二酸,糖酸转化率为 1.09mol/mol,比 ZT-007 (单调控 ppc 至 M1-46-ppc)的产量提高了 66%,糖酸转化率提高了 73%;比 ZT-004 (单调控 pck 至 M1-37-pck)的产量提高了 184%,糖酸转化率提高了 127%;

[0262] ZT-012 (M1-37-ppc/M1-37-pck)生产了 138mM 的丁二酸,糖酸转化率为 1.01mol/mol,比 ZT-008 (单调控 ppc 至 M1-37-ppc)的产量提高了 138%,糖酸转化率提高了 71%;比 ZT-004 (单调控 pck 至 M1-37-pck)的产量提高了 151%,糖酸转化率提高了 110%;

[0263] ZT-013 (M1-93-ppc/M1-37-pck)生产了 130mM 的丁二酸,糖酸转化率为 1.02mol/mol,比 ZT-009 (单调控 ppc 至 M1-93-ppc)的产量提高了 132%,糖酸转化率提高了 108%;比

ZT-004 (单调控 pck 至 M1-37-pck) 的产量提高了 136%, 糖酸转化率提高了 112%。

[0264] 2、重组大肠杆菌 ZT-010 至 ZT-013 中 PPC/PCK 酶活的测定

[0265] 酶活测定方案同实施例 1 的二的 2。

[0266] 重组大肠杆菌中的 PPC 酶活为 :ZT-010 :0.34U/mg 蛋白 ;ZT-011 :0.47U/mg 蛋白 ;
ZT-012 :0.60U/mg 蛋白 ;ZT-013 :1.01U/mg 蛋白 ;

[0267] 重组大肠杆菌中的 PCK 酶活为 :ZT-010 :0.53U/mg 蛋白 ;ZT-011 :0.53U/mg 蛋白 ;
ZT-012 :0.53U/mg 蛋白 ;ZT-013 :0.53U/mg 蛋白 ;

[0268] PPC 酶活与丁二酸的产量之间的关系如图 3。

[0269] (二)、重组大肠杆菌 ZT-014 至 ZT-017 的构建

[0270] 重组大肠杆菌 ZT-014 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 Ppck* (序列 2), 且将 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-12 (序列 4), 得到的重组菌 ;也就是将重组菌 Suc-T110 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-12 (序列 4), 得到的重组菌 ;

[0271] 重组大肠杆菌 ZT-015 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 Ppck* (序列 2), 且将 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-46 (序列 6), 得到的重组菌 ;也就是将重组菌 Suc-T110 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-46 (序列 6), 得到的重组菌 ;

[0272] 重组大肠杆菌 ZT-016 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 Ppck* (序列 2), 且将 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-37 (序列 7), 得到的重组菌 ;也就是将重组菌 Suc-T110 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-37 (序列 7), 得到的重组菌 ;

[0273] 重组大肠杆菌 ZT-017 为将重组菌 Suc-T108 中的 PCK 基因的调控元件(序列 3)替换为人工调控元件 Ppck* (序列 2), 且将 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-93 (序列 8), 得到的重组菌 ;也就是将重组菌 Suc-T110 中的 PPC 基因的调控元件(序列 9)替换为人工调控元件 M1-93 (序列 8), 得到的重组菌 ;

[0274] 具体如下 :

[0275] 第一步同源重组 :与实施例 1 的一的步骤(1)的第四步相同, 以 pXZ-CS 质粒为模板, 使用引物 ppc-cat-sacB-up 和 ppc-cat-sacB-down 扩增 DNA 片段 I, 用于第一次同源重组 ;引物序列见表 2 ;得到 2726bp DNA 片段 I, 将所得 DNA 扩增片段 I 电转至带有 pKD46 质粒的重组菌 Suc-T110, 筛选氨苄青霉素与氯霉素抗性的菌落, 得到中间重组菌 ;

[0276] 第二步同源重组 :以重组菌株 M1-12、M1-46、M1-37、M1-93 为模板, 使用引物 ppc-up-P 和 ppc-RBS-down, 分别得到 193bp 的包含 ppc 启动子两侧同源臂和人工调控元件 M1-12、M1-46、M1-37、M1-93 的 DNA 片段 ppc-M1-12、ppc-M1-46、ppc-M1-37、ppc-M1-93 ;引物序列见表 2。

[0277] 将上述 DNA 片段 ppc-M1-12、ppc-M1-46、ppc-M1-37、ppc-M1-93 分别电转入中间重组菌, 分别得到重组菌。电转化和筛选方法与实施例 1 的一的步骤(1)的第六步相同。

[0278] PCR 验证的引物 ppc-YZ-up/ppc-YZ-down, 得到 758bp 的为正确的单菌落, 将其命名为菌株 ZT-014 至 ZT-017 (表 1)。

[0279] 二、重组大肠杆菌 ZT-014 至 ZT-017 生产丁二酸

[0280] 1、发酵生产丁二酸

[0281] 种子培养基的配方、发酵培养基的配方、厌氧发酵方法和分析检测方法均与实施例 1 的二的 1 相同。

[0282] 结果：厌氧发酵 96 小时，Suc-T110 (ppc wt/pck*) 生产了 226mM 的丁二酸，糖酸转化率为 1.12mol/mol，比 XZ-T014 (ppc wt) 的产量提高了近 7 倍，糖酸转化率提高了 5.6 倍；

[0283] ZT-014 (M1-12-ppc/pck*) 生产了 270mM 的丁二酸，糖酸转化率为 1.18mol/mol，比 ZT-006 (单调控 ppc 至 M1-12-ppc) 的产量提高了 2.6 倍，糖酸转化率提高了 82%；

[0284] ZT-015 (M1-46-ppc/pck*) 生产了 282mM 的丁二酸，糖酸转化率为 1.24mol/mol，比 ZT-007 (单调控 ppc 至 M1-46-ppc) 的产量提高了 2 倍，糖酸转化率提高了 97%；

[0285] ZT-016 (M1-37-ppc/pck*) 生产了 237mM 的丁二酸，糖酸转化率为 1.16mol/mol，比 ZT-008 (单调控 ppc 至 M1-37-ppc) 的产量提高了 3 倍，糖酸转化率提高了 97%；

[0286] ZT-017 (M1-93-ppc/pck*) 生产了 210mM 的丁二酸，糖酸转化率为 1.16mol/mol，比 ZT-009 (单调控 ppc 至 M1-93-ppc) 的产量提高了 2.75 倍，糖酸转化率提高了 137%；

[0287] 在这些调控菌株中，ZT-015 (M1-46-ppc/pck*) 的调控效果最好，丁二酸产量为 282mM，糖酸转化率为 1.24mol/mol，分别比 ZT-014 (ppc wt/pck*) 的产量提高了 23%，转化率提高了 10%。

[0288] 2、重组大肠杆菌 ZT-014 至 ZT-017 中 PPC/PCK 酶活的测定

[0289] 酶活测定方案同实施例 1 的二的 2。

[0290] 重组大肠杆菌中的 PPC 酶活为：ZT-014 :0.34U/mg 蛋白；ZT-015 :0.47U/mg 蛋白；ZT-016 :0.60U/mg 蛋白；ZT-017 :1.01U/mg 蛋白；

[0291] 重组大肠杆菌中的 PCK 酶活为：ZT-014 :1.8U/mg 蛋白；ZT-015 :1.8U/mg 蛋白；ZT-016 :1.8U/mg 蛋白；ZT-017 :1.8U/mg 蛋白。

[0292] PPC 酶活与丁二酸的产量之间的关系如图 4 所示。

[0001]

序列表

<110>天津工业生物技术研究所

<120>提高丁二酸产量的重组菌及构建方法

<160> 13

<210> 1

<211> 156

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

gatgcctcc aatatggtta tttttattg tgaattaaga taggtgagta cgacgtaaaa 60

agatgtgaag caaatcacat cagtgtaate gcttacacta acatttatct tagttatggt 120

ttaagtgcac gaaaataatt gagttatata atcata 156

<210> 2

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

gttggttatc cagaatcaaa aggtggggtta attatcgcat ccgggcagta gtattttget 60

tttttcagaa aataatcaaa aaaagttagc gtggtgaatc gatactttac cggttgaatt 120

tgcacatcaatt tcattcagga atgcgattcc actcacaata ttcccgccat ataaaccaag 180

atttaacctt ttgagaacat ttccacacc taaaatgcta tttctcgat aatagcaacc 240

gtttcgtgac aggaatcacg gagttttttg tcaaatatga atttctccag atacgtaaat 300

ctatgagcct tgtcacggtt aacaccccca aaaagacttt actattcagg caatacatat 360

tggctaagga gcagtga 378

<210> 3

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

[0002]

<400> 3	
gttggttatc cagaatcaaa aggtgggtta attatcgcac cgggcagta gtattttgct	60
tttttcagaa aataatcaaa aaaagttagc gttgtgaatc gatactttac cggttgaatt	120
tgcacatcaatt tcattcagga atgagattcc actcacaata ttcccgccat ataaaccaag	180
atttaaccit ttgagaacat ttccacacc taaaatgcta ttctgcgat aatagcaacc	240
gtttcgtgac aggaatcaag gagtttttg tcaaatatga attctccag atacgtaaat	300
ctatgagcct tctcgcggtt aacaccccca aaaagacttt actattcagg caatacatat	360
tggctaagga gcagtgaa	378
<210> 4	
<211> 88	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 4	
ttatctctgg cgggtgtgac aagagataac aacgttgata taattgagcc cttttggtgc	60
gtcagtcagt ttaaaccagg aaacagct	88
<210> 5	
<211> 88	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 5	
ttatctctgg cgggtgtgac aagagataac aacgttgata taattgagcc tgaggtgct	60
tattattcgt ttaaaccagg aaacagct	88
<210> 6	
<211> 88	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 6	
ttatctctgg cgggtgtgac aagagataac aacgttgata taattgagcc tctcgcacca	60

[0003]

ccaattcggg ttaaaccagg aaacagct	88
<210> 7	
<211> 88	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 7	
ttatctctgg cgggtgtgac aagagataac aacgttgata taattgagcc actggctcgt	60
aatttattgt ttaaaccagg aaacagct	88
<210> 8	
<211> 88	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 8	
ttatctctgg cgggtgtgac aagagataac aacgttgata taattgagcc cgtattgta	60
gcattgtacgt ttaaaccagg aaacagct	88
<210> 9	
<211> 92	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 9	
gacgacgaaa agcaaagccc gagcatatc gcgccaatgc gacgtgaagg atacagggt	60
atcaaacgat aagatggggt gctggggta at	92
<210> 10	
<211> 89	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> n=a 或 g 或 c 或 t; r=g 或 a	
<400> 10	
ttatctctgg cgggtgtgac aagagataac aacgttgata taattgagcc actggctcgt	60
aatttattgt ttaaaccagg agrnnnnnn	89

[0004]

<210> 11	
<211> 89	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 11	
ttatctctgg cgggtgttgac aagagataac aacgttgata taattgagcc actggctcgt	60
aattttattgt ttaaaccagg agaaagaac	89
<210> 12	
<211> 89	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 12	
ttatctctgg cgggtgttgac aagagataac aacgttgata taattgagcc actggctcgt	60
aattttattgt ttaaaccagg agaccttcc	89
<210> 13	
<211> 89	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 13	
ttatctctgg cgggtgttgac aagagataac aacgttgata taattgagcc actggctcgt	60
aattttattgt ttaaaccagg agaagaaac	89

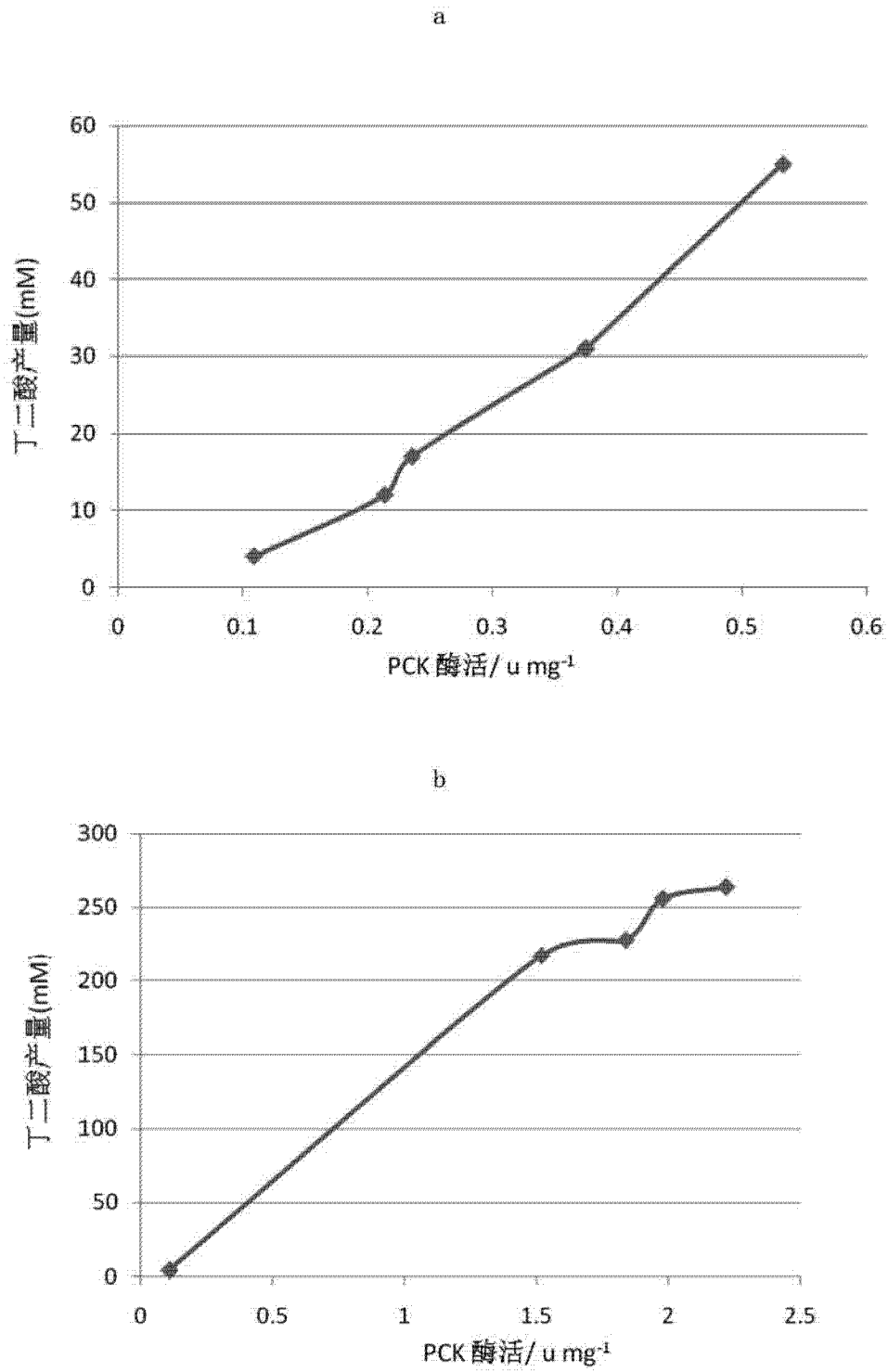


图 1

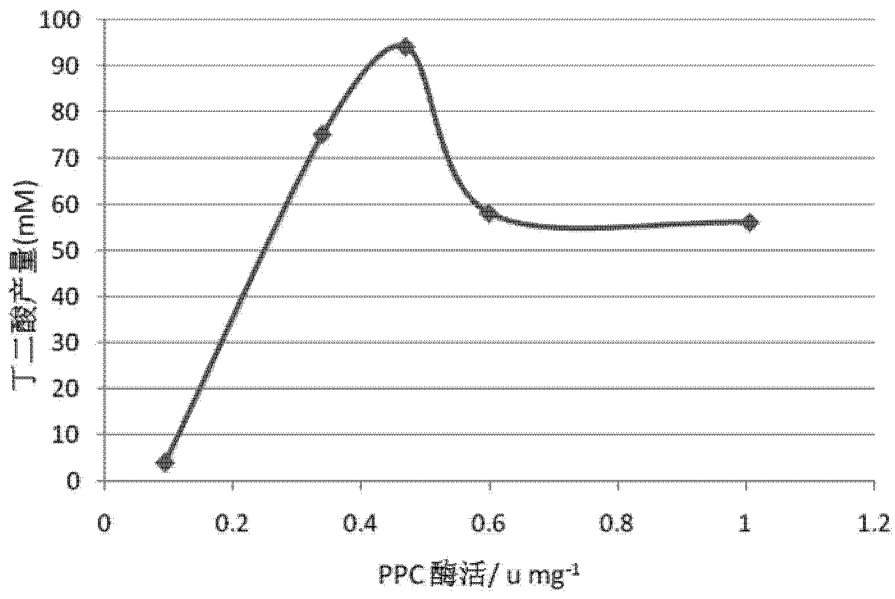


图 2

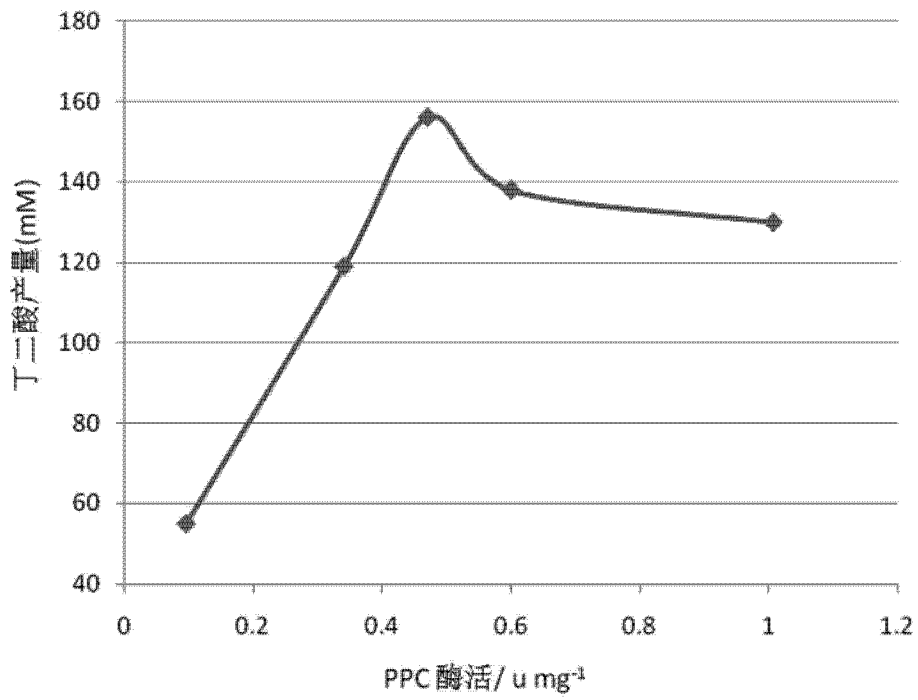


图 3

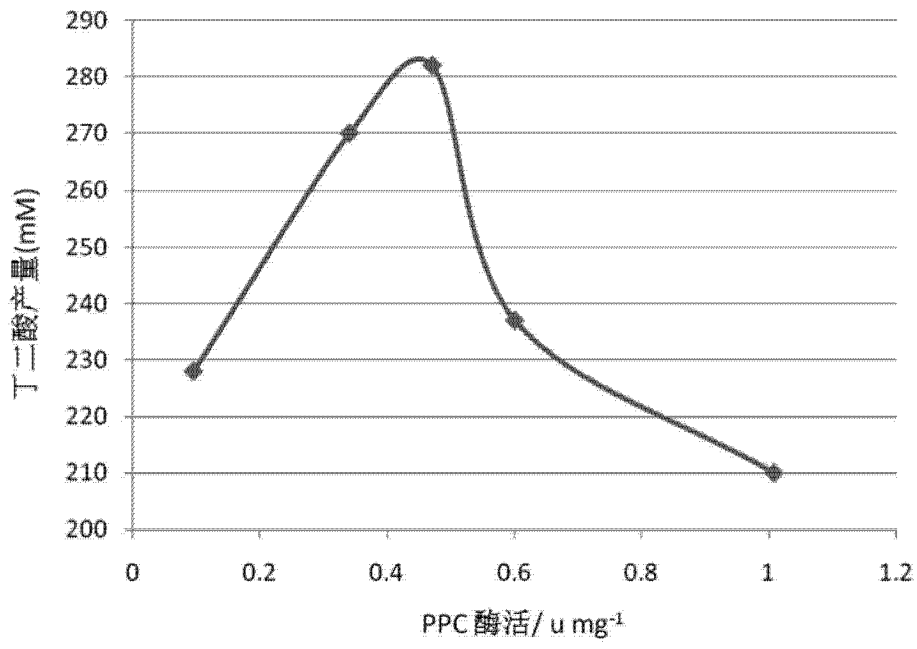


图 4