



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117701552 B

(45) 授权公告日 2025.02.14

(21) 申请号 202310849039.X
 (22) 申请日 2023.07.11
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 117701552 A
 (43) 申请公布日 2024.03.15
 (83) 生物保藏信息
 CCTCC NO:M2023631 2023.04.26
 (73) 专利权人 山东大学
 地址 266237 山东省青岛市即墨滨海路72号
 (72) 发明人 王倩 祁庆生 王琦 李红杰
 (74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221
 专利代理师 李箐

(56) 对比文件
 CN 112980758 A, 2021.06.18
 CN 1351660 A, 2002.05.29
 Lilu Zhang等. Cloning of two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes HemA and HemO from Rhodospseudomonas palustris with favorable characteristics for 5-aminolevulinic acid production. *Biotechnol Lett.* 2013, 第35卷 763-768.
 Sohei Hiasa等. Development of green fluorescent protein-based cAMP indicators for covering a wide range of cAMP concentrations. *RSC Adv.* 2023, 第13卷第 15514篇. (续)
 审查员 王慧

(51) Int. Cl.
 C12N 15/10 (2006.01)
 C12N 15/70 (2006.01)
 C12N 15/65 (2006.01)
 C12N 9/10 (2006.01)
 C12N 1/21 (2006.01)
 C12P 13/00 (2006.01)
 C12R 1/19 (2006.01)

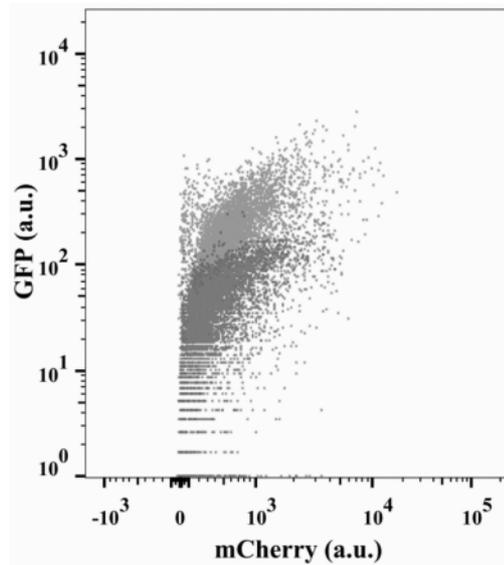
权利要求书1页 说明书8页
 序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种高产5-氨基乙酰丙酸的工程菌株筛选方法、工程菌及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种高产5-氨基乙酰丙酸的工程菌株筛选方法、工程菌及应用,属于工程微生物领域。本发明使用基于胞内cAMP水平变化响应ALA的生物传感器,通过荧光激活细胞分选(FACS)对大肠杆菌基因组突变体文库进行筛选,得到了一株高产ALA的突变体大肠杆菌。结果表明,本发明所筛选到的突变体大肠杆菌相比于野生型的大肠杆菌具有更高的ALA产量。



CN 117701552 B

[接上页]

(56) 对比文件

Lilu Zhang等.Cloning of two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes HemA and HemO from Rhodospseudomonas palustris with favorable characteristics for 5-aminolevulinic acid

production.Biotechnol Lett.2013,第35卷763-768.

Tatiana Emanuelli等.Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain.Neurochemistry International.2001,第38卷213-218.

1. 一种高产5-氨基乙酰丙酸工程菌株的筛选方法,其特征在于,包括如下步骤:以大肠杆菌作为出发菌株,过表达出发菌株中的ALA合成酶,转入DNA聚合酶III的突变体dnaQ*及筛选质粒诱导大肠杆菌基因组突变获得突变体文库,从突变体文库中筛选ALA高产菌株;

所述ALA合成酶来源于沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*) KUGB306,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;

所述dnaQ*的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;

所述筛选质粒具有核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示的表达盒;

从突变体文库中筛选ALA高产菌株的步骤如下:

(1) 将突变体文库中的菌株接种至LB培养基中培养,培养过程中加入脱水四环素诱导dnaQ*的表达,收集菌体通过流式细胞仪分选具有较低绿色荧光强度的菌株,分选后的到的菌株接种至抗性培养基上培养并重复进行上述筛选过程至获得荧光水平明显下降的菌株;

(2) 基于ALA发酵能力对步骤(1)筛选后的菌株进行再次筛选,选取ALA产量较高的菌株进行摇瓶发酵验证。

2. 一种高产5-氨基乙酰丙酸的工程菌,其特征在于,所述菌株命名为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DM16,该工程菌已于2023年4月26日保藏于中国典型培养物保藏中心,简称CCTCC,地址为:中国,武汉,武汉大学,其生物保藏号为:CCTCC NO:M2023631。

3. 一种菌剂,其特征在于,所述菌剂包括权利要求2所述工程菌。

4. 如权利要求3所述的菌剂,其特征在于,所述菌剂为固体或液体制剂,还包括药学上所必须的载体,所述固体制剂选自菌粉、颗粒剂;所述液体制剂选自水悬浮剂、可分散油悬浮剂;所述药学上可接受的载体选自分散剂、润湿剂、崩解剂、粘结剂、消泡剂、抗冻剂、增稠剂、填料和溶剂中的一种或多种。

5. 一种5-氨基乙酰丙酸的生物合成方法,其特征在于,在如权利要求2所述的大肠杆菌DM16中过表达ALA合成酶制备重组菌,然后在重组菌发酵过程中补充甘氨酸进行5-氨基乙酰丙酸的合成;

所述ALA合成酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示;

具体步骤如下:

通过质粒转染向如权利要求2所述的大肠杆菌(*Escherichia coli*) DM16中导入氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的ALA合成酶,将修饰后菌株转入LB培养基中作为种子进行培养,再移入发酵培养基中进行发酵培养;所述发酵培养基的成分如下:18~22 g/L葡萄糖,1~3 g/L酵母提取物,8~12g/L 琥珀酸,3~5g/L甘氨酸,16~17 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1~4 g/L KH_2PO_4 , 15~18g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.8~1.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的发酵培养基,每12h补充3~5 g/L 的甘氨酸。

6. 如权利要求5所述5-氨基乙酰丙酸的生物合成方法,其特征在于,发酵过程采用摇瓶发酵,发酵温度为35~38°C,转速为200~250rpm;发酵过程中,当 $\text{OD}_{600} \sim 0.6$ 时添加0.1mM的IPTG进行诱导。

一种高产5-氨基乙酰丙酸的工程菌株筛选方法、工程菌及应用

技术领域

[0001] 本发明属于工程微生物技术领域,具体涉及一种高产5-氨基乙酰丙酸的工程菌株筛选方法、一株高产5-氨基乙酰丙酸的工程菌及基于该菌株的5-氨基乙酰丙酸生物合成方法。

背景技术

[0002] 公开该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

[0003] 5-氨基乙酰丙酸(ALA)是一种非蛋白质氨基酸,是合成四吡咯化合物(包括血红素、卟啉、叶绿素和维生素B12)的必要前体,这些化合物在维持机体正常生理功能方面发挥着关键作用。由于其安全性、环境兼容性和生物降解性,ALA在农业、畜牧业和医药领域有着广泛的应用。如今,通过微生物发酵生产ALA是一种环境友好、简单、廉价和可持续的方法,它避免了化学合成中复杂的反应步骤、高成本和环境污染的缺点。

[0004] ALA的生物合成途径广泛存在于植物、动物和微生物中,其生物合成途径分为C4(Shemin)途径和C5途径。在C4途径中,通过ALA合成酶(hemA)使琥珀酰辅酶A和甘氨酸一步缩合产生ALA。在C5途径中,谷氨酸经历谷氨酰tRNA合成酶、谷氨酰tRNA还原酶(hemA)和谷氨酰-1-半醛转氨酶(hemL)的三个顺序酶促反应,生成ALA,这与C4途径相比更复杂。到目前为止,酶筛选、途径工程、发酵过程优化都已得到研究,ALA的微生物产量也得到了显著提高。

[0005] ALA作为一种氨基酮化合物,具有很高的反应性和不稳定性,并且能够产生活性氧(ROS)。活性氧产生途径包括:(1)ALA经历烯醇化和好氧化以产生ROS;(2)ALA自发二聚被不可逆地分解为2,5-(β -羧乙基)吡嗪,同时生成ROS;(3)ALA的下游产物原卟啉IX,辐射后产生ROS。大量的ROS引发氧化应激并影响细胞的生理状态。在ALA的微生物生产过程中,ALA的产生会对生产宿主的生理状态造成影响并抑制宿主的生长与生理活性,从而限制ALA生产效率。有研究表明,当增加了大肠杆菌对于ALA的耐受性后,能够明显改善发酵过程中大肠杆菌的生长状态并且对ALA的生产具有显著的促进作用,相似的调控方式应用于其他微生物,也能够显著增加微生物对产物耐受性并促进微生物生产。同时,对于生产底盘细胞代谢通量的调控也是提高相关产物的通用手段,并且已经有了大量关于将代谢通量引入ALA生产途径的报道,如:将代谢通量引入到TCA循环,抑制ALA的下游途径的代谢通量等,相关研究比较完善。

[0006] 以上都是用于ALA生产底盘细胞的理性设计策略,而关于ALA生产底盘细胞的非理性设计策略却鲜有报道,相比于理性设计来说,非理性设计具的优势包括:1.更广泛的搜索空间:理性设计仅仅能够调整特定的基因或基因片段,而非理性设计的随机突变能够涉及到整个基因组,从而探索更广泛的可能性。2.更高的概率发现未知的功能:当研究人员不完

全理解一个基因时,随机突变的方法能够发掘出该基因的其他(未知的)功能。3.更高的效率:随机突变方法不需要事先了解复杂的调控机制和基因功能,减少了研究成本和时间。同时,基于高通量筛选方法,可以快速鉴别出筛选的菌株。

[0007] 因此,在ALA的微生物生产过程中,底盘菌对ALA的耐受性对于微生物发酵生产效率具有较为重要的作用,获取更加适宜ALA微生物发酵的底盘菌对于提高ALA发酵效率具有重要意义。

发明内容

[0008] 为了获得更加适宜ALA微生物发酵生产的底盘细胞,本发明基于非理性设计策略,构建了大肠杆菌的基因组突变体文库并进行筛选,最终获得了一株高产ALA的大肠杆菌DM16。

[0009] 基于上述研究成果,本发明提供如下的技术方案:

[0010] 本发明首先提供了一种高产5-氨基乙酰丙酸工程菌的筛选方法,包括如下步骤:以大肠杆菌为出发菌株,过表达出发菌株中的ALA合成酶(hemA),转入DNA聚合酶III的突变体dnaQ*及筛选质粒诱导大肠杆菌基因组突变获得突变体文库,从突变体文库中筛选ALA高产菌株。

[0011] 野生型大肠杆菌只能通过C5途径合成5-ALA,以谷氨酸为前提,在谷氨酰tRNA合成酶、谷氨酰tRNA还原酶、谷氨酸-1-半醛转氨酶系列酶的催化下最终生成5-ALA。上述三步反应中,限速步骤为谷氨酰tRNA还原酶催化的谷氨酰tRNA还原为GSA的反应。为了获取适宜ALA发酵的工程菌,本发明向大肠杆菌中导入C4合成途径,以甘氨酸和琥珀酰辅酶A为前体,PLP作为辅因子,一步反应生成ALA。并通过构建突变体文库筛选其中能够进行ALA高效合成的菌株。

[0012] DNA聚合酶III(dnaQ)既有5'→3'方向聚合酶活性,也有3'→5'核酸外切酶活性。该酶的活性较强,为DNA聚合酶I的15倍,DNA聚合酶II的300倍,可以在引物的3'-OH上以每分钟约5万个核苷酸的速度延长新的DNA链,是大肠杆菌DNA复制中链延长反应的主导聚合酶。本发明首先构建了一个dnaQ的突变体dnaQ*,dnaQ*相比于dnaQ具有较低的校对活性。因此当dnaQ*用于大肠杆菌的基因组复制时会在基因组上保留下来一些突变位点,通过这种方式获得了大肠杆菌的基因组突变体文库。首先基于荧光强弱及抗性对突变体进行分选,分选后突变菌株通过摇瓶发酵,筛选ALA高产的突变菌株。

[0013] 上述筛选质粒是一种基于胞内cAMP水平变化响应ALA的生物传感器,通过导入该质粒,技术人员可基于荧光强度方便的筛选ALA高表达菌株。

[0014] 本发明通过上述方式筛选得到产量最高的菌株,丢失重组质粒后进行了保藏,命名为DM16。

[0015] 因此,本发明还提供一株高产5-氨基乙酰丙酸的工程菌,所述菌株命名为大肠杆菌(*Escherichia coli*)DM16,该菌株已于2023年4月26日保藏于中国典型培养物保藏中心,简称CCTCC,地址为:中国,武汉,武汉大学,其生物保藏号为:CCTCC NO:M2023631。

[0016] 上述菌株可用于5-氨基乙酰丙酸的生物合成,使用DM16作为ALA C4途径生产的生产菌株,将hemA基因在DM16中进行过表达,使DM16菌株能够通过C4途径生产ALA,含有hemA基因的DM16菌株在ALA的发酵过程中补充甘氨酸用于ALA的合成。

附图说明

[0017] 构成本发明的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。

[0018] 图1为FACS筛选后的结果对比;

[0019] 浅色散点代表初始文库菌株的单细胞荧光水平,深色散点代表分选后文库菌株的单细胞荧光水平;

[0020] 图2为FACS分选后的单菌落在孔板中ALA的产量;

[0021] 深色代表野生型菌株的ALA产量,浅色代表挑取的突变体单菌落的ALA产量;

[0022] 图3为突变体菌株的摇瓶发酵结果;

[0023] 深色为ALA产量,浅色为生物量;

[0024] 图4为质粒丢失菌株DM16的ALA生产能力验证;

[0025] 深色为ALA产量,浅色为生物量。

具体实施方式

[0026] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0027] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0028] 正如背景技术所介绍的,在ALA的微生物生产过程中,菌株对ALA的耐受性对于ALA的大肠杆菌的微生物发酵生产具有重要的作用,为了筛选获得更加适宜ALA微生物发酵生产的底盘细胞,本发明基于胞内cAMP水平变化响应ALA的生物传感器通过荧光激活细胞分选(FACS)对大肠杆菌基因组突变体文库进行筛选,得到了一株高产ALA的突变体大肠杆菌。

[0029] 具体方案如下:

[0030] 第一方面,提供一种高产5-氨基乙酰丙酸工程菌株的筛选方法,包括如下步骤:以大肠杆菌作为出发菌株,过表达出发菌株中的ALA合成酶(hemA),转入DNA聚合酶III的突变体dnaQ*及筛选质粒诱导大肠杆菌基因组突变获得突变体文库,从突变体文库中筛选ALA高产菌株。

[0031] 上述筛选方法还具有如下优选方案:

[0032] 出发菌株,上述筛选方法以大肠杆菌作为出发菌株,由于大肠杆菌属可能具有相似的代谢流,因此出发菌株理论上可选任意的大肠杆菌,考虑到成本经济,可采用常规的模式菌,本发明验证的一种实施方式中,为大肠杆菌DH5 α 。

[0033] ALA合成酶(hemA),来源于沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*) KUGB306,序列如SEQ ID NO:1所示,通过构建重组质粒转入出发菌株。

[0034] DNA聚合酶III的突变体,所述dnaQ*的序列如SEQ ID NO:2所示,同样通过构建重组质粒转入出发菌株。

[0035] 筛选质粒,所述筛选质粒具有SEQ ID NO.5所示的表达盒。

[0036] 从突变体文库中筛选ALA高产菌株的步骤如下:

[0037] (1) 将突变体文库中的菌株接种至LB培养基中培养,培养过程中加入脱水四环素诱导dnaQ*的表达,收集菌体通过流式细胞仪分选具有较低荧光强度的菌株,分选后的菌株接种至抗性培养基上培养并重复进行上述筛选过程至获得荧光水平明显下降的菌株;

[0038] (2) 基于ALA发酵能力对步骤(1)筛选后的菌株进行再次筛选,选取ALA产量较高的菌株进行摇瓶发酵验证。

[0039] 本发明通过摇瓶发酵得到的产量最高的菌株(含有上述提到的三种质粒)进行质粒的去除,其中产量最高的菌株为DM16,是一个无抗性无质粒的菌株。随后本发明对DM16菌株ALA生产的性能进行了验证(随机挑取了四个丢失质粒的DM16单菌落),重新转化hemA基因进行ALA发酵,证明该菌株对ALA具有良好的耐受性,能够稳定高产ALA,可作为5-氨基乙酰丙酸的工程菌应用于工业发酵。

[0040] 第二方面,提供一种高产5-氨基乙酰丙酸的工程菌,所述菌株命名为大肠杆菌(*Escherichia coli*)DM16,该菌株已于2023年4月26日保藏于中国典型培养物保藏中心,简称CCTCC,地址为:中国,武汉,武汉大学,其生物保藏号为:CCTCCNO:M2023631。

[0041] 第三方面,提供一种菌剂,所述菌剂包括第二方面所述工程菌,或所述菌的发酵培养物。

[0042] 上述菌的发酵培养物,即第二方面所述工程菌的发酵产物,其中具有相当剂量的ALA。

[0043] 另外,上述菌剂可以为固体或液体制剂,还包括药学上所必须的载体,所述固体制剂如菌粉、颗粒剂,所述液体制剂如水悬浮剂、可分散油悬浮剂;所述药学上可接受的载体选自分散剂、润湿剂、崩解剂、粘结剂、消泡剂、抗冻剂、增稠剂、填料和溶剂中的一种或多种。本发明对所述农药学上可接受的辅料的来源等没有特殊限制,一般采用市售产品即可。

[0044] 第四方面,提供一种5-氨基乙酰丙酸的生物合成方法,过表达大肠杆菌DM16中的ALA合成酶(hemA)制备重组菌,重组菌发酵过程中补充甘氨酸进行5-氨基乙酰丙酸的合成。

[0045] 具体步骤如下:

[0046] 通过质粒转染向大肠杆菌(*Escherichia coli*)DM16中导入外源hemA,将修饰后菌株转入LB培养基中作为种子进行培养,再移入发酵培养基中进行发酵培养;所述发酵培养基的成分如下:18~22g/L葡萄糖,1~3g/L酵母提取物,8~12g/L琥珀酸,3~5g/L甘氨酸,16~17g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,1~4g/L KH_2PO_4 ,15~18g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.8~1.2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.01g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的发酵培养基,每12h补充3~5g/L的甘氨酸。

[0047] 优选的,所述采用摇瓶发酵,发酵温度为35~38°C,转速为200~250rpm。

[0048] 优选的,上述发酵过程中,还可以向培养基中添加IPTG和/或脱水四环素;

[0049] 进一步的,发酵过程中,当 $\text{OD}_{600} \sim 0.6$ 时添加0.1mM的IPTG进行诱导。

[0050] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本发明的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本发明的技术方案。

[0051] 实施例1

[0052] 一、实验方法

[0053] 1.1菌株、培养基和培养条件

[0054] 选取大肠杆菌DH5 α 细胞用于质粒的构建和大肠杆菌基因组突变体文库的构建,大

肠杆菌DH5 α 及突变体文库中的菌株采用如下培养基:

[0055] LB培养基:10g/L蛋白胨,5g/L酵母提取物和5g/L NaCl,余量为水。

[0056] 1.2质粒构建

[0057] 1.2.1hemA质粒构建

[0058] 根据Rhodopseudomonas palustris KUGB306中ALA合酶hemA的蛋白序列,如SEQ ID NO:1所示。以大肠杆菌作为表达宿主进行密码子优化进行基因合成,通过使用Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(Vazyme Biotech,Nanjing,China)和相应的引物对其进行扩增,将扩增后的基因片段使用ClonExpress II One Step Cloning Kit(Vazyme Biotech,Nanjing,China)将其插入到pTrc99a质粒上,获得hemA的过表达质粒。上述构建过程涉及的引物序列如下表1:

[0059] 表1

名称	序列	编号
pRPA-F	TAAATCAGAACGCAGAAGCG	SEQ ID NO.6
[0060] pRPA-R	GCACAGCCATACCACAGC	SEQ ID NO.7
hemA-F	AAGCTGTGGTATGGCTGTGC	SEQ ID NO.8
hemA-R	CCGCTTCTGCGTTCTGATT	SEQ ID NO.9

[0061] 1.2.2基因组随机突变质粒构建

[0062] 大肠杆菌MG1655购自上海唯地生物。通过使用Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(Vazyme Biotech,Nanjing,China)和相应的引物,从大肠杆菌MG1655基因组DNA中扩增目的片段。将dnaQ片段纯化回收后使用ClonExpress II One Step Cloning Kit(Vazyme Biotech,Nanjing,China)将其插入到pACYC184质粒上受脱水四环素诱导表达。随后通过反式PCR的方法在dnaQ上引入D12A的点突变获得dnaQ*的突变体表达质粒。限制性内切酶从Thermo Fisher Scientific(Waltham,MA)购买。引物合成和Sanger测序由Tsingke(Beijing,China)进行。

[0063] 出发菌株大肠杆菌MG1655中野生型dnaQ序列如下:

[0064] mstaitrqiv ldtettgmnq igahyeghki ieigavevvn rrltgnnfhv ylkpdrldvp eafgvhgiad

[0065] eflldkptfa evadefmdyi rgaelviha afdigfmdye fsllkrdipk tntfckvtds lavarkmfpg

[0066] krnsldalca ryeidnskrt lhgalldaq i laevylamtg gqtsmafame getqqqqgea tiqrivrqas

[0067] klrsvfatde eiaahearld lvqkkggsc l wra(SEQ ID NO.2);

[0068] 本实施例中构建的突变体dnaQ*序列如下:

[0069] mstaitrqiv latettgmnq igahyeghki ieigavevvn rrltgnnfhv ylkpdrldvp eafgvhgiad

[0070] eflldkptfa evadefmdyi rgaelviha afdigfmdye fsllkrdipk tntfckvtds lavarkmfpg

[0071] krnsldalca ryeidnskrt lhgalldaqi laevylamtg gqtsmafame getqqqqgea
tiqrivrqas

[0072] klrvvfatde eiaahearld lvqkkggsc1 wra(SEQ ID NO.3)。

名称	序列	编号
tetR-F	GAATTCTTTTCTCTATCACTGATAGGGAG TGGT	SEQ ID NO.10
tetR-R	CGCAGACCAAAACGATCTCAAGCATGC TTAAGACCCACTTTCAC	SEQ ID NO.11
pACYC-F	TTGAGATCGTTTTGGTCTGC	SEQ ID NO.12
pACYC-R	AAATTACGCCCCGCCCTGCCACTCAT	SEQ ID NO.13
[0073] dnaQ*-F1	ACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAG AATTCTCTAGAGTCACACAGGAAAGTAC TAGATGAGCACTGCAATTACACG	SEQ ID NO.14
dnaQ*-R1	GGTTTCGGTAGCGAGAACGATCTGGCGT GTAATTGCAGTGCTCATCTAGTACTTT	SEQ ID NO.15
dnaQ*-F2	CGTTCTCGCTACCGAAACCACCGGTATG AACCAGATTGGTGCGCA	SEQ ID NO.16
dnaQ*-R2	ATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTCC ACAGCCAGGATCCGAATTCTTACG	SEQ ID NO.17

[0074] 1.2.3筛选质粒的构建

[0075] 发明人的前期研究表明,ALA引起的ROS可降低大肠杆菌细胞内cAMP水平,并且与ALA浓度相关,通过CRP特异性调节的启动子可以表征ALA与细胞内cAMP的关系,进而反应细菌胞内ALA水平。本发明在启动子上游三个位置-83.5添加CRP强结合位点,对cAMP剂量和ALA剂量具有良好的反应性,相关研究记载于申请号(2022117303171)的专利文件中。基于该研究结论构建了筛选质粒:

[0076] 通过使用Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(Vazyme Biotech, Nanjing,China)和相应的引物,从大肠杆菌MG1655基因组DNA中扩增目的启动子。将启动子与GFP序列通过融合PCR连接在一起,使用目的启动子去调控GFP的表达。随后使用ClonExpress II One Step Cloning Kit(Vazyme Biotech,Nanjing,China)将其插入到pCDF-duet-1质粒上获得该筛选质粒,所述筛选质粒的表达盒中包括:启动子-核糖体结合位点(RBS)-GFP,其中,启动子序列如SEQ ID NO.4所示,上述表达盒序列如SEQ ID NO.5所示。

[0077] 1.3ALA的分析方法

[0078] 5-ALA的发酵培养基:20g/L葡萄糖,2g/L酵母提取物,10g/L琥珀酸,4g/L甘氨酸,16g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,3g/L KH_2PO_4 ,16g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,1g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.01g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的发酵培养基,每12h补充4g/L的甘氨酸。

[0079] 发酵条件:37°C,220rpm的条件下进行培养与发酵。在需要的情况下将适当浓度的抗生素添加到培养基中,包括氯霉素(34 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。添加0.1mM异丙基- β -d-硫代乙型乳糖苷(IPTG)诱导hemA的表达或200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的脱水四环素用于诱导dnaQ*基因的表达。

[0080] 将发酵液上清转入新的离心管中。按一定比例进行稀释。取稀释液400 μL ,分别加入200 μL 的乙酸钠缓冲液和100 μL 的乙酰丙酮,煮沸反应15min。冷却至室温,加入Modified Ehrlich's reagent试剂反应20min,然后利用1cM的比色皿在波长554nm下利用分光光度计检测OD值,根据ALA/OD₅₅₄的标准曲线计算出ALA的浓度。

[0081] 二、实验结果

[0082] 将带有ALA生产质粒(hemA)、基因组随机突变质粒(dnaQ*)和筛选质粒(用于后续ALA高通量筛选)的DH5 α 菌株接种到含有LB培养基的摇瓶中进行培养,在培养期间加入200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 脱水四环素诱导dnaQ*的表达,每12h转接一次。转接3-4次之后收集菌体,用PBS洗涤菌体3次,并使用PBS重悬。随后吸取一定量的菌液将其稀释到适宜的浓度进行后续的流式细胞仪分选,在分选过程中根据细菌的荧光强弱选取分选的区域,圈定一个分选门筛选落在门中的低绿色荧光的菌株,将分选出的菌液接种到含有相应抗性的LB培养基中进行培养用于下一次的继续分选,分选后最终得到的突变体菌株文库经过流式细胞仪分析,可以明显看到其整体荧光水平相比于初始文库的荧光水平有着明显的下降(图1)。

[0083] 将最终的文库在琼脂平板上进行划线挑取单菌落接种到孔板中进行初筛,根据测定的ALA产量的结果可以看到其中一些突变菌株的产量明显高于野生型菌株(图2)。本发明选取产量最高的前15个菌株接种到摇瓶中进行复筛,其中DM14、DM15和DM16三个菌株的产量要高于野生型菌株(图3)。

[0084] 随后本实施例将表现最好的DM16菌株进行了质粒的丢失,挑取了4个丢失了质粒的DM16菌株进行转化,将带有ALA C₄生产途径的质粒转化到DM16菌株中进行发酵验证,结果表明本实施例最终得到的DM16菌株的ALA产量(DM16-1:4.14 \pm 0.22g/L DM16-2:4.14 \pm 0.29g/L DM16-3:4.26 \pm 0.30g/L DM16-4:3.99 \pm 0.24g/L)要明显高于对照菌株(2.91 \pm 0.23g/L)。最终本实施例得到一株由DH5 α 突变获得的ALA高产菌株DM16,该菌株已经交由CCTCC保藏,保藏号为:CCTCC M 2023631。

[0085] 实施例2

[0086] 本实施例中,提供一种基于上述保藏菌株的ALA合成方法,包括如下步骤:

[0087] 将hemA基因转化到DM16菌株中,挑取单菌落接种到LB培养基中在37°C,220rpm的条件下进行过夜培养,将菌液以2%的接种量接种到含有50ml LB液体的摇瓶中作为种子进行培养,培养12-16h后,以2%的接种量接种到ALA发酵培养基中进行ALA的发酵。发酵培养基组分如下:20g/L葡萄糖,2g/L酵母提取物,10g/L琥珀酸,4g/L甘氨酸,16g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,3g/L KH_2PO_4 ,16g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,1g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.01g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的发酵培养基,每12h补充4g/L的甘氨酸。发酵条件:37°C,220rpm的条件下进行培养与发酵。

[0088] 所述菌株的ALA最高产量为4.26 \pm 0.30g/L。

[0089] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

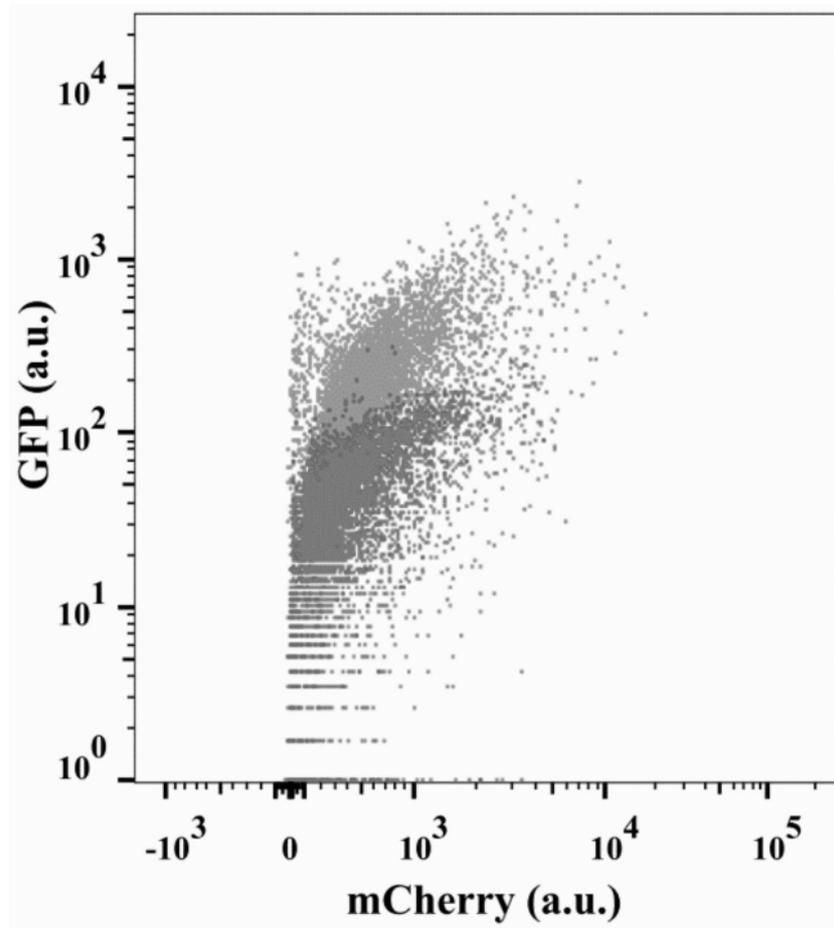


图1

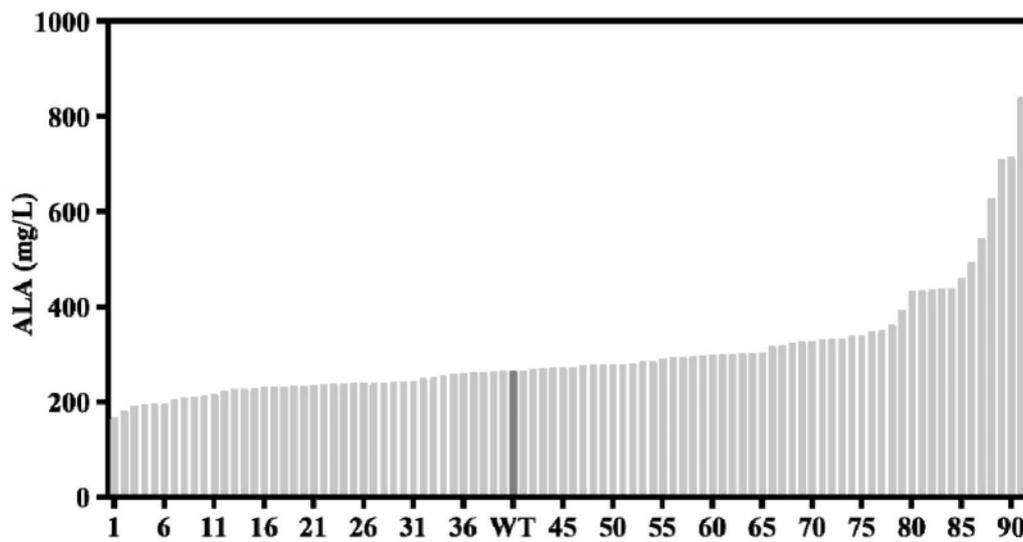


图2

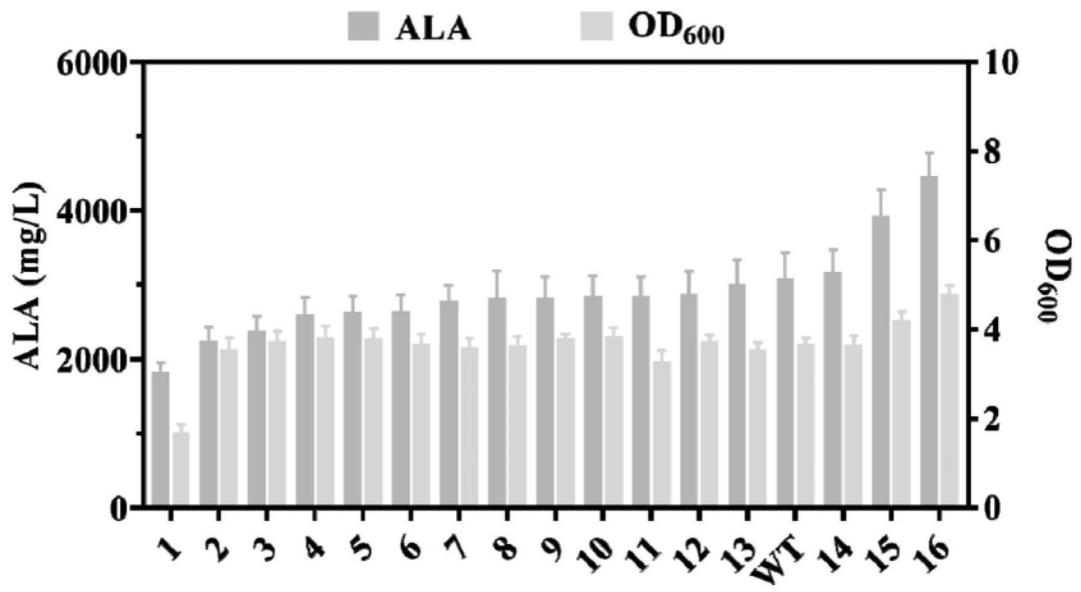


图3

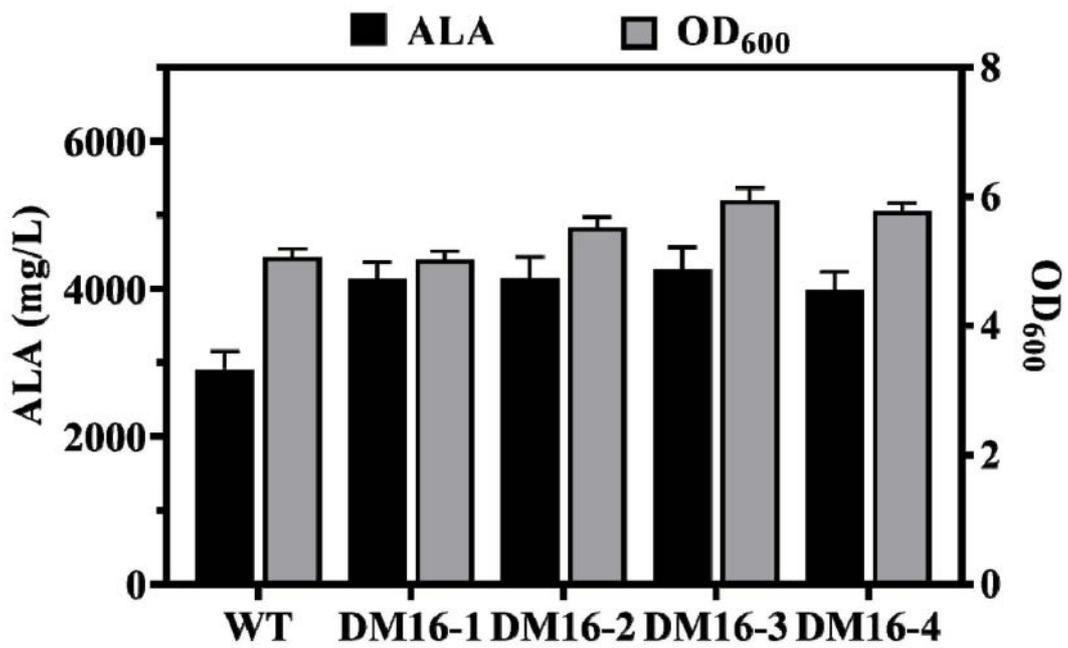


图4