



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114181963 A

(43) 申请公布日 2022.03.15

(21) 申请号 202111482246.3

C12P 25/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.07

C12R 1/19 (2006.01)

(71) 申请人 上海市农业科学院

地址 201107 上海市闵行区北翟路2901号
上海市农业科学院

(72) 发明人 邓永东 姚泉洪 田永生 张文慧
彭日荷 许晶 王波 高建杰
韩红娟 王丽娟 王宇

(74) 专利代理机构 北京中济纬天专利代理有限公司 11429

代理人 靳魁

(51) Int. Cl.

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

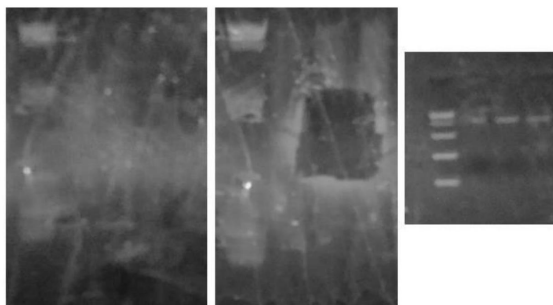
权利要求书2页 说明书9页
序列表1页 附图6页

(54) 发明名称

一种利用DNA改组提高大肠杆菌工程菌产核黄素能力的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种利用DNA改组提高大肠杆菌工程菌产核黄素能力的方法,涉及基因工程领域,包括如下步骤:构建含26个基因的产核黄素的大肠杆菌工程菌;T7RNA聚合酶基因表达单元DNA重排和定向筛选,抽提获得第一批阳性质粒;核黄素生物合成和转运系统的DNA重排和定向筛选,抽提获得第二批阳性质粒;大肠杆菌 σ 因子基因的DNA重排和定向筛选,抽提获得第三批阳性质粒;将第三批质粒导入到不同底盘细胞获得重组菌株;选取核黄素产量最高的阳性菌株。有效消除产核黄素的大肠杆菌工程菌构建过程中T7RNAP对大肠杆菌宿主的毒性问题、产物的反馈抑制问题以及构建的核黄素生物合成基因的适度和协调表达问题。进一步提高大肠杆菌工程菌株生物合成核黄素的效率和产量。



1. 一种利用DNA改组提高大肠杆菌工程菌产核黄素能力的方法,其特征在于,所述方法包括:

构建含26个基因的产核黄素的大肠杆菌工程菌;

T7 RNA聚合酶基因表达单元DNA重排和定向筛选,获得第一批阳性菌株,并抽提获得第一批阳性质粒;

核黄素生物合成和转运系统的DNA重排和定向筛选,获得第二批阳性菌株,并抽提获得第二批阳性质粒;

大肠杆菌 σ 因子基因的DNA重排和定向筛选,获得第三批阳性菌株,并抽提获得第三批阳性质粒;

将第三批质粒导入到不同底盘细胞获得重组菌株;对重组菌株进行试管液体培养,并对每种工程菌株的核黄素生物合成产量进行分析测定,选取产量最高的阳性菌株。

2. 如权利要求1所述利用DNA改组获得高产核黄素的大肠杆菌工程菌的方法,其特征在于,所述T7 RNA聚合酶基因表达单元DNA重排和定向筛选的方法包括:

化学合成带lacI阻遏蛋白的lac启动子和T1终止子控制的T7RNAP基因表达单元;

根据转化子菌落黄色深浅进行初步筛选;

挑取深黄色的大肠杆菌阳性菌落进行液体培养,并用HPLC技术准确测定培养液中的核黄素含量;

通过重排、建库和定向筛选获得第一批阳性菌株,并抽提获得第一批阳性质粒。

3. 如权利要求2所述利用DNA改组获得高产核黄素的大肠杆菌工程菌的方法,其特征在于,所述核黄素生物合成和转运系统的DNA重排和定向筛选的方法包括:

将第一批阳性质粒混合进行酶切,在混合载体上构建突变元件文库;转化大肠杆菌,根据转化子菌落黄色深浅进行初步筛选;

挑取深黄色的大肠杆菌阳性菌落进行液体培养,并用HPLC技术准确测定培养液中的核黄素含量;

通过重排、建库和定向筛选获得核黄素产量显著提高的第二批阳性菌株,并抽提获得第二批阳性质粒。

4. 如权利要求3所述利用DNA改组获得高产核黄素的大肠杆菌工程菌的方法,其特征在于,所述核黄素生物合成和转运系统的DNA重排和定向筛选的方法包括:

通过PCR技术扩增并克隆大肠杆菌 σ 因子EcRpoD基因,完成核苷酸全序列分析;

消除基因内部的常用限制性内切酶切点;

使用DNA shuffling技术对基因进行高效突变;

在第二批阳性质粒上构建突变基因文库;

电击转化大肠杆菌,根据转化子菌落颜色浅进行初步筛选;随后挑取深黄色的大肠杆菌阳性菌落进行液体培养,并用HPLC技术准确测定培养液中的核黄素含量;

通过重排、和定向筛选获得核黄素产量显著提高的第三批阳性菌株。

5. 如权利要求4所述利用DNA改组获得高产核黄素的大肠杆菌工程菌的方法,其特征在于,所述大肠杆菌底盘细胞包括:

DH5 α 、HB101、JM105、JM109-DE3、C600、RR1、XL1-Blue、BL21、BL21-DE3、EG61-BL21-AI、BL21-DE3-PlysS、ER2566、IJ1127、MV1190、DH10B、MC8、JM83、SURE、ElectroTen-Blue、XL10-

Gold、OmniMAX 2T1和TOP10。

一种利用DNA改组提高大肠杆菌工程菌产核黄素能力的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程领域,具体而言,涉及一种利用DNA改组提高大肠杆菌工程菌产核黄素能力的方法。

背景技术

[0002] 在构建合成核黄素的大肠杆菌工程菌的构建的基础上,遇到了两个存在的问题:

[0003] 第一方面:T7 RNAP对大肠杆菌宿主的毒性问题。T7启动子是最强的原核启动子之一,高活性的T7 RNA聚合酶合成mRNA的速度比大肠杆菌RNA聚合酶快5倍;同时由于T7启动子没法被大肠杆菌RNA聚合酶识别,只能被噬菌体自身编码的T7 RNAP特异识别和调控;加上T7启动子和终止子的长度均很短。鉴于以上特点和优势,使T7表达系统成为外源基因高表达和原核合成生物学体系构建的首选。但T7 RNAP对大肠杆菌具有较强毒性,这使该体系的应用过程中面临诸多困难。

[0004] 第二方面:产物的反馈抑制、核黄素生物合成基因的适度和协调表达问题。创制复杂的合成生物学体系过程中,解除产物积累的反馈抑制非常重要,另外外源基因的高表达往往不利于最终产物的生物合成,而且每个基因表达不能在同一水平,而是存在某种合适的比例。

[0005] 为进一步提高大肠杆菌工程菌株生物合成核黄素的效率和产量,本发明通过DNA重排和定向筛选体系上进一步优化,提高建库容量和筛选效率,同时开展工程菌株的基因组DNA重排和定向筛选,以消除T7 RNAP对大肠杆菌宿主的毒性问题、产物的反馈抑制问题以及构建核黄素生物合成基因的适度和协调表达问题。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种利用DNA改组提高大肠杆菌工程菌产核黄素能力的方法,解决背景提出所提出的至少一个技术问题。

[0007] 一种利用DNA改组提高大肠杆菌工程菌产核黄素能力的方法,所述方法包括:

[0008] 构建含26个基因的产核黄素的大肠杆菌工程菌;

[0009] T7 RNA聚合酶基因表达单元DNA重排和定向筛选,获得第一批阳性菌株,并抽提获得第一批阳性质粒;

[0010] 核黄素生物合成和转运系统的DNA重排和定向筛选,获得第二批阳性菌株,并抽提获得第二批阳性质粒;

[0011] 大肠杆菌 σ 因子基因的DNA重排和定向筛选,获得第三批阳性菌株,并抽提获得第三批阳性质粒;

[0012] 将第三批质粒导入到不同底盘细胞获得重组菌株;对重组菌株进行试管液体培养,并对每种工程菌株的核黄素生物合成产量进行分析测定,选取产量最高的阳性菌株。

[0013] 优选的,所述T7 RNA聚合酶基因表达单元DNA重排和定向筛选的方法包括:

[0014] 化学合成带lacI阻遏蛋白的lac启动子和T1终止子控制的T7RNAP基因表达单元;

- [0015] 根据转化子菌落黄色深浅进行初步筛选；
- [0016] 挑取深黄色的大肠杆菌阳性菌落进行液体培养,并用HPLC技术准确测定培养液中的核黄素含量；
- [0017] 通过重排、建库和定向筛选获得第一批阳性菌株,并抽提获得第一批阳性质粒。
- [0018] 优选的,所述核黄素生物合成和转运系统的DNA重排和定向筛选的方法包括:
- [0019] 将第一批阳性质粒混合进行酶切,在混合载体上构建突变元件文库;转化大肠杆菌,根据转化子菌落黄色深浅进行初步筛选；
- [0020] 挑取深黄色的大肠杆菌阳性菌落进行液体培养,并用HPLC技术准确测定培养液中的核黄素含量；
- [0021] 通过重排、建库和定向筛选获得核黄素产量显著提高的第二批阳性菌株,并抽提获得第二批阳性质粒。
- [0022] 优选的,所述核黄素生物合成和转运系统的DNA重排和定向筛选的方法包括:
- [0023] 通过PCR技术扩增并克隆大肠杆菌 σ 因子EcRpoD基因,完成核苷酸全序列分析;
- [0024] 消除基因内部的常用限制性内切酶切点;
- [0025] 使用DNA shuffling技术对基因进行高效突变;
- [0026] 在第二批阳性质粒上构建突变基因文库;
- [0027] 电击转化大肠杆菌,根据转化子菌落颜色浅进行初步筛选;随后挑取深黄色的大肠杆菌阳性菌落进行液体培养,并用HPLC技术准确测定培养液中的核黄素含量;
- [0028] 通过重排、和定向筛选获得核黄素产量显著提高的第三批阳性菌株。
- [0029] 优选的,所述大肠杆菌底盘细胞包括:
- [0030] DH5 α 、HB101、JM105、JM109-DE3、C600、RR1、XL1-Blue、BL21、BL21-DE3、EG61-BL21-AI、BL21-DE3-PlysS、ER2566、IJ1127、MV1190、DH10B、MC8、JM83、SURE、ElectroTen-Blue、XL10-Gold、OmniMAX 2T1和TOP10;
- [0031] 技术效果:
- [0032] 本发明有效消除产核黄素的大肠杆菌工程菌构建过程中T7 RNAP对大肠杆菌宿主的毒性问题、产物的反馈抑制问题以及构建的核黄素生物合成基因的适度和协调表达问题。进一步提高大肠杆菌工程菌株生物合成核黄素的效率和产量,最终核黄素产量较原始菌株提高了161.8%。

附图说明

[0033] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

- [0034] 图1.lacpol1基因DNA重排示意图
- [0035] 图2.突变lacpol1转化平板筛选
- [0036] 图3.lacpol1突变基因核黄素含量图
- [0037] 图4.T7Guarib基因DNA重排示意图
- [0038] 图5.突变操纵子转化平板筛选

- [0039] 图6. 突变基因核黄素含量图
[0040] 图7. 大肠杆菌EcRpoDS基因DNA重排示意图
[0041] 图8. 突变体转化平板筛选图
[0042] 图9. 突变基因核黄素含量图
[0043] 图10. 不通底盘细胞转化摇瓶发酵液
[0044] 图11. 5个颜色较深底盘细胞核黄素含量图

具体实施方式

[0045] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0046] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0047] 本发明实施例提供一种提高产核黄素的大肠杆菌工程菌产量的DNA重排和定向筛选方法，包括如下步骤：

[0048] 构建含26个基因的产核黄素的大肠杆菌工程菌；

[0049] T7 RNA聚合酶基因表达单元DNA重排和定向筛选，获得第一批阳性菌株，并抽提获得第一批阳性质粒；

[0050] 核黄素生物合成和转运系统的DNA重排和定向筛选，获得核黄素产量显著提高的第二批阳性菌株，并抽提获得第二批阳性质粒；

[0051] 大肠杆菌 σ 因子基因的DNA重排和定向筛选，获得核黄素产量显著提高的第三批阳性菌株，并抽提获得第三批阳性质粒；

[0052] 将第三批质粒导入到不同底盘细胞获得重组菌株；对重组菌株进行试管液体培养，并对每种工程菌株的核黄素生物合成产量进行分析测定，选取产量最高的阳性菌株。

[0053] 使用T7启动子控制枯草杆菌核黄素生物合成途径基因的表达。由于大肠杆菌本身不含T7 RNA聚合酶，需要将外源T7 RNA聚合酶引入宿主菌，因而核黄素的整个从头生物合成途径全部受T7 RNA聚合酶的调控，通过控制T7RNA聚合酶的表达量和活性，就可以控制酶和核黄素转运蛋白的表达量。由于高活性的T7 RNA聚合酶合成mRNA的速度比大肠杆菌RNA聚合酶快5倍，诱导表达几小时后目的蛋白通常可以占到细胞总蛋白的50%以上。因此，为了使T7系统能够在合成生物学中实现商业应用，有必要对T7RNA聚合酶的活性进行精准调节。本发明实施例首先化学合成了带lacI阻遏蛋白的lac启动子和T1终止子控制的T7RNAP基因表达单元，开展了T7RNAP表达单元的DNA重排，在pA8101质粒的基础上构建突变单元文库，转化大肠杆菌DH10B【pA6428】感受态，根据转化子菌落黄色深浅进行初步筛选；挑取黄色较深的大肠杆菌阳性菌落进行液体培养，并用HPLC技术准确测定培养液中的核黄素含量；最终通过几轮的突变、建库和定向筛选获得一批阳性菌株，并抽提获得一批阳性质粒。

[0054] 为了降低产物对核黄素生物合成途径中酶的反馈抑制，同时实现核黄素合成途径中酶的精准协调表达，进一步提高大肠杆菌阳性菌株的核黄素产量。本发明设计对枯草杆菌核黄素生物合成系统进行长DNA重排；将第一批阳性质粒混合进行酶切，在混合载体上构建突变元件文库；转化大肠杆菌，根据转化子菌落黄色深浅进行初步筛选；随后挑取黄色较

深的大肠杆菌阳性菌落进行液体培养,并用HPLC技术准确测定培养液中的核黄素含量;通过几轮的重组、建库和定向筛选获得核黄素产量显著提高的第二批阳性菌株,并抽提获得第二批阳性质粒。

[0055] 大肠杆菌 σ 因子是所有RNA聚合酶的辅助因子,它是DNA依赖的RNA聚合酶的固有组分, σ 因子通常与DNA结合,且沿着DNA搜寻,直到在启动子上碰到核心酶,从而实现大肠杆菌整体转录水平的调控。为了实现大肠杆菌基因组整体转录水平的优化,本发明设计通过全局转录调控机制实现生物合成途径快速优化,通过改变RNA聚合酶的转录效率和对启动子的亲和力,使细胞整体转录水平发生改变,结合核黄素含量的定向筛选,最终筛选获得基因组整体转录水平利于核黄素生物合成的阳性基因。首先通过PCR技术扩增并克隆大肠杆菌 σ 因子EcRpoD基因,完成核苷酸全序列分析;消除基因内部的常用限制性内切酶切点;使用DNA shuffling技术对基因进行高效突变;在第二批阳性质粒上构建突变基因文库;电击转化大肠杆菌,根据转化子菌落黄色深浅进行初步筛选;随后挑取黄色较深的大肠杆菌阳性菌落进行液体培养,并用HPLC技术准确测定培养液中的核黄素含量;通过几轮的突变、建库和定向筛选获得核黄素产量显著提高的第三批阳性菌株。

[0056] 选择22种包括EG61 ([BL21 (AI)])不同的大肠杆菌底盘细胞[包括DH5 α 、HB101、JM105、JM109 (DE3)、C600、RR1、XL1-Blue、BL21、BL21 (DE3)、EG61 [BL21 (AI)]、BL21 (DE3) PlysS、ER2566、IJ1127、MV1190、DH10B、MC8、JM83、SURE、ElectroTen-Blue、XL10-Gold、OmniMAX 2T1、TOP10],将构建的核黄素生物合成系统质粒转化入不同底盘细胞,获得重组菌株;对每个重组菌株进行试管液体培养,并对每种工程菌株的核黄素生物合成产量进行分析测定,最终获得产量显著提高的阳性菌株。

[0057] 下面结合详细的实施例,进一步说明:

[0058] 其中,构建含26个基因的产核黄素的大肠杆菌工程菌的具体方法为:

[0059] 合成从头合成核黄素所需要的26个基因使用的为南京诺唯赞生物科技有限公司 (Vazyme Biotech Co., Ltd),26个基因如下:BsGLK1、BsZWF1、BsPgl、BsGND、BsYWLF、BsPRS、BspurF、BspurD、BspurN、BspurL、BspurQ、BspurS、BspurM、BspurK、BspurE、BspurC、BspurB、BspurH、BsGuaA、BsGuaB、BsGMPK、BsNDK、BsRibA、BsRibB、BsRibG和BsRibH,随后分别将拼接的26个基因原核表达单元和日本TAKARA公司的pMD18-ST载体连接,选择pBR322 Ori和广宿主pBBR1MCS质粒Ori的两种载体。随后将这两个质粒同时转化美国Invitrogen公司的BL21-AI (Cat no.6070-03) [F' ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm araB::T7RNAP-tetA] (命名EG61) 大肠杆菌感受态,在LB+Km+Ap固体平板筛选双质粒转化子。

[0060] 将26个基因原核表达单元拼接和4个核黄素生物合成功能模块组装,选择T7启动子和终止子控制以上26个化学合成基因的表达,完成了26个基因原核表达单元拼接;构建了两个不同复制起点和抗性标记的质粒pBR326 (1860bp, Apr) 和pYB8895 (4523bp, Kmr),在两个相容质粒基础上组装了核黄素从头生物合成途径4大功能模块,包括:核酮糖-5-磷酸生物合成、次黄嘌呤核苷酸 (IMP) 生物合成、GTP生物合成和核黄素RIB操纵子。利用体外重组技术将核酮糖-5-磷酸生物合成模块 (T7PRPP) 和次黄嘌呤核苷酸 (IMP) 生物合成功能模块 (T7BsIMP) 拼装入pYB326载体的EcoRI和HindIII之间,构成质粒pA6428;同时将GTP生物合成功能模块 (T7BSGTP) 和核黄素RIB生物合成功能模块 (T7BsRib) 进行拼装入pYB8895载体的EcoRI和HindIII之间,构成的质粒为pA8101。将pA6428和pA8101同时转化染色体带有

T7 RNAP基因的大肠杆菌菌株,就获得了含有4个功能模块和26个基因原核表达单元的从头合成核黄素的生物合成系统的大肠杆菌工程菌株,该工程菌株作为原始菌株。

[0061] 进一步的,T7 RNA聚合酶基因表达单元DNA重排和定向筛选的方法为:

[0062] 本发明实施例首先设计由原核lac启动子控制RNAP的表达单元LacRNAP,首先对lacI阻遏蛋白基因和T7 RNAP基因进行了大肠杆菌密码子和结构优化,优化遵循以下原则:优化基因密码子,提高基因翻译效率;消除基因内部的常用限制性内切酶的识别位点,便于表达盒构建;消除逆向重复序列、茎环结构和转录终止信号,使基因内部的GC/AT均衡,提高RNA的稳定性;消除内含子识别序列,避免在编码区内发生内含子剪接,导致基因功能的丧失;RNA起始基因编码蛋白符合N端原则(Tobias1991),以提高翻译蛋白的稳定性;避免6个或更多的连续的A+T序列,5个或更多的G+C序列;避免2、3位用CG和TA双寡核苷酸,以上序列易造成甲基化,从而引起基因沉默;设计提高基因5'端的自由能,降低3'端的自由能,以提高基因翻译效率。密码子和结构优化的lacI和T7 RNAP基因分别定名为lacIS和T7 RNAPS,在完成两个基因设计的基础上,对T7 RNAPS基因表达单元lacpol1进行了化学合成,控制lacIS基因表达的为lacI原先的启动子PlacI和终止子lacI-ter,而控制T7 RNAPS基因表达的为lac启动子和T1终止子,整个表达单元全长4536bp (SEQIDNo.1),全长lacpol1序列内部仅含有一个NdeI切点,便于随后的遗传操作。

[0063] 为了实现T7系统能够在合成生物学中实现商业应用,对T7 RNAP的活性进行精准调节。根据上述已知的序列(SEQ ID No.1),设计两条引物用于突变文库的构建,PCR扩增引物为:R45521 (5'-GTC,TTG,AGG,GG T,TTT,TTG,GTC,GAC,CCA,GAA,GCA,TTG,GTG,CAC,CG T,GC-3'),和R45522 (5'-CGC,TGG,CGA,TTC,AGG,TTC,AAG,CTT,GGT,GTC,GAC,CTA,CTC,AGG,AGA,GCG,TTC,ACC,GAC-3'),斜体部分为同源片段,由于PCR产物长度较长,本发明实施例使用Ex-taq进行PCR扩增,采用以下PCR反应程序:94℃10min预变性,94℃变性45s,60℃退火50s和72℃延伸5min,共30个循环,72℃终延伸10min。PCR产物经0.7%Agrose电泳,透吸袋法回收4.5kb左右的产物。回收的lacpol1表达单元用100μL DNase I缓冲液(50mmol/L Tris-ClpH7.4+1mmol/L MgCl₂)溶解,加入0.1U DNase I,25℃处理15min,70℃加热10min使DNase I失活,混合物经10%丙烯酰胺凝胶电泳,透吸袋法回收500-1000bp的片段,如图1左和图1中示意。用10μL10×无引物PCR缓冲液(Primerless PCR Buffer)(50mmol/LKCl+10mmol/LTris-Cl pH9.0+1%Triton)溶解沉淀。随后进行Primerless PCR扩增,反应体系:5μL小片段DNA+4μL 2.5mmol/L dNTPs+4.5μL 25mmol/L MgCl₂+Taq2U+ddH₂O to 50μL;

[0064] 反应程序为:94℃40S,40℃50s,72℃1min,共20个循环),通过0.7%Agrose电泳检测PCR扩增产物是否准确。最后进行Primer PCR扩增。反应体系:5μL Primerless PCR产物+R45521 0.2ng+R45522 0.2ng+10×PCR Buffer 5μL+2.5mmol/L dNTPs4μL+Ex-taq2U+ddH₂O to 50μL。反应程序为:94℃1min,60℃1min,72℃10min,共35个循环,0.7%Agrose电泳检测,回收4.5Kb的DNA片段,如图1右示意。

[0065] 使用Vazyme Biotech Co的ClonExpress一步法无缝克隆试剂盒,按照使用说明将回收的PCR产物通过体外重组法和SalI+HindIII双酶切的大肠杆菌生物合成核黄素的载体pA8101=pYB8895[T7BSGTP+T7BsRib]进行体外重组,反应体系:15-20bp完全一致的序列,线性化载体:50-200ng,插入片段20-200ng,5X CEII Buffer 4μL,Exnase II 2μL,补加ddH₂O到20μL。37℃下30min后放入冰浴5min,随后-20℃保存,需要时解冻转化。

[0066] 将上述所得的重组产物转化染色体不带有T7 RNAP基因的大肠杆菌DH10B【pA6428】的化学感受态,将转化子涂布于LB固体培养基上,37℃生长过夜,如图2所示。进一步的,根据突变体菌落黄色深浅进行初步筛选获得一批突变体,随机命名为突变体1、突变体3、突变体6、突变体9、突变体12。

[0067] 对大肠杆菌阳性突变体1、突变体3、突变体6、突变体9和突变体12进行摇瓶液体培养,以上述原始菌株作为对照组,液体培养培养基:葡萄糖40g/L,酵母粉10g/L,胰蛋白胨10g/L,磷酸二氢钾13.5g/L,七水硫酸镁2g/L,氯化钠2g/L,氯化钠2g/L,柠檬酸2g/L,5mL 200×微量元素,调节pH=7;并用HPLC检测核黄素含量,方法参照(段云霞.产核黄素工程菌*B. subtilis* PY的代谢工程研究[D].天津大学,2007),结果如图3所示,计算得知这些突变菌株中突变菌株9菌株中最高可产生大约0.68g/L的核黄素。然后抽提获突变菌株9的质粒,并对这个突变菌株(突变菌株9)的lacP₀₁₁突变基因进行了核苷酸全序列分析(SEQIDNo.2),定名为lacp_{011a}。通过序列比对,观察到lacI内部存在两个氨基酸位点突变,分别为S93L和S288L,推测这两个氨基酸位点的突变和lacI的超级阻遏有关。

[0068] 对挑选出的许多突变菌株的菌液进行核黄素含量测定,计算得知这些突变菌株中突变体9菌株中最高可产生大约0.68g/L的核黄素。之后对这个突变菌株(突变菌株3)的lacP₀₁₁突变基因进行了核苷酸全序列分析(SEQIDNo.2),定名为lacp_{011a}。通过序列比对,观察到lacI内部存在两个氨基酸位点突变,分别为S93L和S288L,推测这两个氨基酸位点的突变和lacI的超级阻遏有关。

[0069] 进一步的,核黄素生物合成系统的DNA重排和定向筛选的方法为:

[0070] 本发明实施例化学合成了一长操纵子T7Guarib(SEQIDNo.3),包含枯草杆菌核黄素生物合成系统2个功能模块(T7BSGTP和T7BsRib)中的8个基因,包括:BsGuaAS、BsGuaBS、BsGMPKS、BsNDKS、BsRibAS、BsRibBS、BsRibGS和BsRibHS,此外还增加了BsribU基因,该基因的功能为核黄素外排的efflux,总共9个基因,该长操纵子由T7启动子和终止子控制,基因之间为T7 SD序列连接。

[0071] 首先用

[0072] R47390 (5'-CGC, TCT, CCT, GAG, TAG, GTC, GAC, CGA, TCC, CGC, GAA, ATT, AAT, ACG, ACT, CA-3') 和R47399 (5'-CGC, TGG, CGA, TTC, AGG, TTC, AAG, CTT, GGT, GTC, GAC, GG A, TCC, AAA, AAA, CCC, CTC, AAG, ACC, CGT-3') 一对引物,使用Ex-taq进行PCR扩增,反应条件为:94℃ 10min预变性,94℃变性1min,60℃退火1min和72℃延伸12min,共30个循环,72℃终延伸10min。PCR产物经0.7%Agrose电泳,透吸袋法回收8319bp的PCR产物。回收的T7Guarib DNA片段以100μL DNase I缓冲液(50mmol/L Tris-Cl pH7.4+1mmol/L MgCl₂)溶解,加入0.1U DNase I,25℃处理15分钟。70℃处理10分钟。10%丙烯酰胺电泳,透吸袋法回收500-1500bp的片段(图4左和图4中)。用10μL 10×无引物PCR缓冲液(Primerless PCR Buffer)(50mmol/LKCl+10mmol/L Tris-Cl pH9.0+1%Triton)溶解沉淀。随后进行Primerless PCR扩增,反应体系:5μl小片段DNA+4μl 2.5mmol/L dNTPs+4.5μl 25mmol/LMgCl₂+Taq2U+ddH₂O to 50μl;反应程序为:94℃40S,40℃50s,72℃1min,共20个循环),0.7%Agrose电泳检测PCR扩增结果。最后进行PrimerPCR扩增反应。反应体系:5μl Primerless PCR产物+R47390 0.2ng+R47399 0.2ng+10×PCR Buffer 5μL+2.5mmol/L dNTPs4μL+Ex-taq2U+ddH₂O to 50 μL。反应程序为:94℃1min,60℃1min,72℃10.0min,共35个循环,0.7%Agrose电泳检测,回

收8.3Kb的DNA片段(图4右)。

[0073] 为了便于T7Guarib操纵子的DNA重排、建库和定向筛选,本发明实施例将已经筛选获得lacp11a突变基因重新进行PCR扩增,引物为R45581(5'-CGA,ATT,TTA,ACA,AAA,TAT,TAA,CGC,GAA,TTC,CCA,GAA,GCA,TTG,GTG,CAC,CGT,GCA-3')和R45582(5'-CGC,TGG,CGA,TTC,AGG,TTC,AAG,CTT,GGT,GTC,GAC,CTA,CTC,AGG,AGA,GCG,TTC,ACC,GAC-3')并通过重组法插入pYB8895质粒,并完成全序列测定,构成质粒pYB8895【lacp11a】。将回收的T7Guarib DNA重排产物通过体外重组法和经SalI+HindIII双酶切的pYB8895【lacp11a】载体连接,重组1h后转化大肠杆菌DH10B【pA6428】,同样获得一批突变体,如图5。

[0074] 随后挑取一批黄色较深的大肠杆菌阳性突变体,随机命名为突变体21、突变体25、突变体29、突变体32和突变体36,进行液体培养,以上述突变体9和原始菌种作为对照,并用HPLC技术准确测定这些突变菌株培养液中的核黄素含量。计算得知这些突变菌株中突变体25菌株中最高可产生大约0.88g/L的核黄素,如图6。

[0075] 随后对这个核黄素含量最高的突变体25菌株进行质粒抽提,并进行核苷酸全序列分析(SEQIDNo.4)。通过序列比对,观察到基因内部存在9个氨基酸位点突变,分别为BsGuaAS基因的E127D,BsGuaBS基因的K125R,BsGMPKS基因的K151Q,BsNDKS基因的N103K,BsRibAS基因的E175D,BsRibBS基因的L132V和K79Q,BsRibGS基因的Q129E,推测这些突变氨基酸位点通过协同作用从而提高这个突1变菌株中核黄素的产量,将该突变操纵子定名为T7Guaribm。

[0076] 进一步的,大肠杆菌 σ 因子基因的DNA重排和定向筛选的方法为:

[0077] 大肠杆菌 σ 因子EcRpoD是所有RNA聚合酶的辅助因子,它是DNA依赖的RNA聚合酶的固有组分, σ 因子通常与DNA结合,且沿着DNA搜寻,直到在启动子上碰到核心酶,从而实现了对大肠杆菌整体转录水平的调控。为了实现大肠杆菌基因组整体转录水平的优化,本研究设计通过全局转录调控机制实现生物合成途径快速优化,通过改变RNA聚合酶的转录效率和对启动子的亲和力,使细胞整体转录水平发生改变,结合核黄素含量的定向筛选,最终筛选获得基因组整体转录水平利于核黄素生物合成的阳性基因。

[0078] 首先设计一对引物:

[0079] (R27304:5'-GAA,TTC,GGA,TCC,ATG,GAG,CAA,AAC,CCG,CAG,TCA,CAG-3'和R27305:5'-AAA,GAG,CTC,TTA,ATC,GTC,CAG,GAA,GCT,ACG,CAG-3'),以抽提的大肠杆菌基因组DNA为模板,使用Ex-Taq扩增出长度1800bp左右的产物,反应程序为:94℃50s,60℃50s,72℃2min,共30个循环,72℃终延伸5min。随后,0.7%Agrose电泳检测,回收1.8Kb左右的DNA片段,PCR产物经过1%agarose凝胶电泳,回收产物,和日本TAKARA公司的pMD18-ST载体连接,连接物转化大肠杆菌DH5 α ,菌液涂布于LB固体平板,挑取白色菌落于LB液体培养基进行过夜培养,离心收集菌体,碱法抽提质粒,用EcoRI+SacI进行双酶切鉴定,将鉴定正确的阳性质粒送上海生工生物科技有限公司进行插入片段的核苷酸全序列分析。结果显示,阳性克隆YN2098的插入序列和大肠杆菌EcRpoD基因序列完全一致。

[0080] 由于YN2098质粒中EcRPOD基因内部存在BamHI切点,影响随后的遗传操作。在BamHI切点附近设计一对突变引物:

[0081] R38046(5'-GAT,CGC,CTG,ACG,AAT,CCA,CCA,GGT,TGC-3')

[0082] 和R38047(5-TGG,TGG,ATT,CGT,CAG,GCG,ATC,ACC,CGC,TCT-3'),通过“重叠延伸

PCR技术”消除基因内部的BamHI切点,获得正确的阳性质粒YN5383,消除内部切点的EcRpoD基因定名为EcRpoDS (SEQIDNo.5)。

[0083] 随后使用R27304和R27305引物,使用Ex-taq对EcRpoDS基因进行扩增,反应条件为:94℃10min预变性,94℃变性50s,60℃退火50s和72℃延伸2min,共30个循环,72℃终延伸10min。PCR产物经0.7%Agrose电泳,透吸袋法回收1850bp左右的PCR产物。回收的DNA片段以100μL DNase I缓冲液(50mmol/LTris-ClpH7.4+1mmol/L MgCl₂)溶解,加入0.1U DNase I,25℃处理15min。70℃处理10min。10%丙烯酰胺电泳,透吸袋法回收50-100bp的片段。用10μL 10×无引物PCR缓冲液(Primerless PCR Buffer)(50mmol/L KCl+10mmol/LTris-Cl pH9.0+1%Triton)溶解沉淀。随后进行Primerless PCR扩增,反应体系:5μL小片段DNA+4μL2.5mmol/LdNTPs+4.5μL 25mmol/LMgCl₂+Taq2U+ddH₂O to 50μL;反应程序为:94℃40s,40℃50s,72℃1min,共20个循环),0.7%Agrose电泳检测PCR扩增结果(图7左下)。最后进行PrimerPCR扩增反应。反应体系:5μl Primerless PCR产物+R27304 0.2ng+R27305 0.2ng+10×PCR Buffer 5μL+2.5mmol/L dNTPs 4μL+Ex-taq2U+ddH₂O to50μL。反应程序为:94℃50s,60℃50s,72℃2.0min,共35个循环,0.7%Agrose电泳检测,回收1.84Kb的DNA片段,如图7右下所示。

[0084] 对基因重排产物进行BamHI+SacI双酶切过夜,在本研究构建的原核表达载体G251[该载体是原核表达载体,pBR322复制起点,带有PGm启动子和T1终止子,筛选标记为Ap抗性]上建库,转化带有pYB8895[lacT7po 11a+T7Guaribm]的DH10B大肠杆菌菌株,在0.5mM IPTG的LB+Km+Ap平板上筛选黄色变深的细菌菌落,如图8。

[0085] 挑取一批黄色较深的大肠杆菌阳性突变体,随机命名为突变体42、突变体45、突变体49、突变体53和突变体56进行液体培养,以上述突变体25和原始菌株作为对照;并用HPLC技术准确测定培养液中的核黄素含量。计算得知在这些突变菌株中突变体53菌株中最高可产生大约1.14g/L的核黄素,如图9。

[0086] 随后对这个突变体53菌株进行质粒抽提,并进行核苷酸全序列分析(SEQIDNo.6)。通过序列比对,观察到基因内部存在2个氨基酸位点突变,分别为D96H和S366A,推测这两个突变位点协同作用从而通过改变RNA聚合酶的转录效率和对启动子的亲和能力,使得核黄素生物合成的能力增强。

[0087] 进一步的,核黄素生物合成系统和底盘细胞的适配,即将第三批质粒导入到不同底盘细胞获得重组菌株;对重组菌株进行试管液体培养,并对每种工程菌株的核黄素生物合成产量进行分析测定,选取产量最高的阳性菌株。

[0088] 将上一步筛选获得的EcRpoDS突变基因表达质粒G251[EcRpoDS45]为模板,分别在原核PGm启动子5'端和T1终止子3'端设计一对引物进行PCR扩增,扩增产物为PGm+EcRpoDS45+T1表达单元,定名为PGmEcRpoDS45T1,引物为:

[0089] R45589(5'-GTC,TTG,AGG,GGT,TTT,TTG,GTC,GAC,GCA,CAC,CGT,GGA,AAC,GGA,TG-3'),和

[0090] R45590(5'-TGC,CGC,TGG,CGA,TTC,AGG,TTC,AAG,CTT,GGT,GTC,GAC,CTA,CTC,AGG,AGA,GCG,TTC,ACC,GAC-3'),使用适合长基因高保真扩增的Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase,PCR扩增程序为:95℃预变性40s;95℃变性45s,60℃退火45s,72℃延伸3min,扩增25个循环;72℃终延伸10min。PCR产物经过1%agarose凝胶电泳,回收

2400bp左右的产物,并通过体外重组法插入质粒pYB8895【lacp11a+T7Guaribm】构成新的重组质粒pYB8895【lacp11a+T7Guaribm+PGmEcRpoDS45T1】,并完成全序列测定。

[0091] 最终将pYB8895[lacT7p11a+T7Guaribm+PGmEcRpoDS45T1]和pA6428混合对大肠杆菌进行双质粒转化。选择22种包括EG61-BL21-AI不同的大肠杆菌底盘细胞[包括DH5 α 、HB101、JM105、JM109-DE3、C600、RR1、XL1-Blue、BL21、BL21-DE3、EG61-BL21-AI、BL21-DE3-PlysS、ER2566、IJ1127、MV1190、DH10B、MC8、JM83、SURE、ElectroTen-Blue、XL10-Gold、OmniMAX 2T1、TOP10]进行转化从而进行核黄素生物合成系统和底盘细胞的适配性研究,其中DH5 α 、HB101、JM105、JM109-DE3、TOP10菌株为本实验室保存。C600、RR1、XL1-Blue、BL21、BL21-DE3、EG61-BL21-AI、BL21-DE3PlysS购买自上海唯地生物技术有限公司。MV1190、DH10B、MC8、JM83、SURE、XL10-Gold、ElectroTen-Blue、ER2566、IJ1127、OmniMAX 2T1购买自生工生物技术有限公司、NEB和INVITROGEN。随后按照所购买菌株的说明进行划线,次日挑取单菌落进行常规化学感受态制备,然后进行常规感受态转化。分别挑取单个转化子接种到10mL LB培养基中,37 $^{\circ}$ C,摇床过夜。取1mL菌液接种到50mL LB液体培养基里,37 $^{\circ}$ C,摇床培养6-8h,使菌液OD600达到0.75左右,从菌液颜色深浅初步判断哪个菌株核黄素产量高,如图10。

[0092] 从图10菌液颜色上可以看出转化,BL21-DE3,BL21-DE3-plysS,ER2566和JM109-DE3五种大肠杆菌底盘细胞的核黄素产量明显高于其它细胞。接下来为了进一步说明哪个菌株是最适底盘细胞,我们又对发酵液进行了HPLC准确测定培养液中的核黄素含量。计算得知,BL21(DE3)底盘细胞菌株中最高可产生大约1.44g/L的核黄素,如图11,因而得出BL21-DE3是最适底盘细胞,而原始菌株产量为0.55g/L,相比于原始菌株其产量提高了161.8%。

[0093] 以上描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下本发明还会有各种变化和改进,这些变化和进步都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等同物界定。

序列表

- <110> 上海市农业科学院
- <120> 一种利用DNA改组提高大肠杆菌工程菌产核黄素能力的方法
- <141> 2021-12-06
- <160> 6
- <170> SIPOSequenceListing 1.0
- <210> 1
- <211> 4522
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <400> 1
- <210> 2
- <211> 4522
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <400> 2
- <210> 3
- <211> 8378
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <400> 3
- <210> 4
- <211> 8319
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <400> 4
- <210> 5
- <211> 1842
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <400> 5
- <210> 6
- <211> 1842
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <400> 6

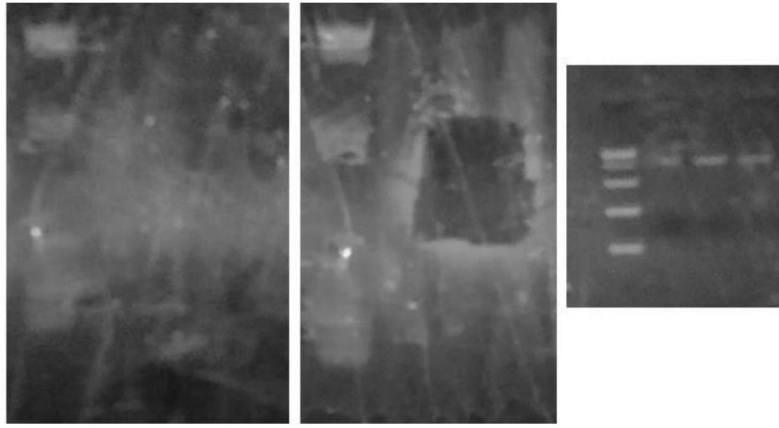


图1



图2

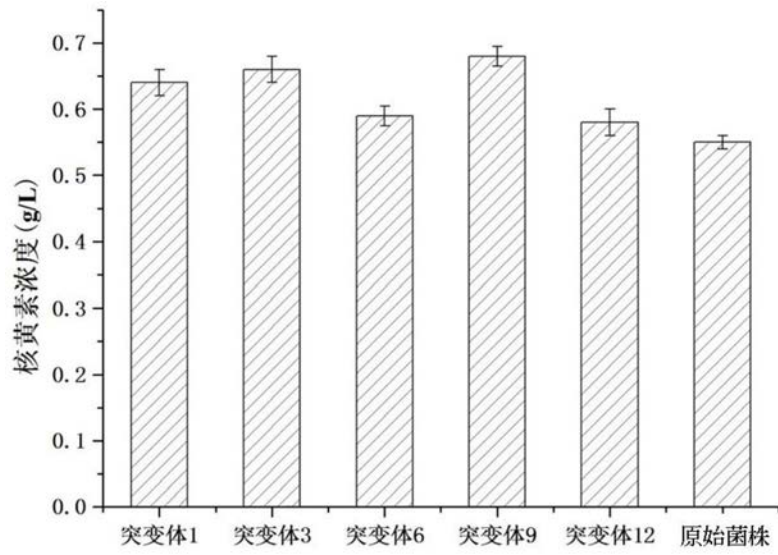


图3

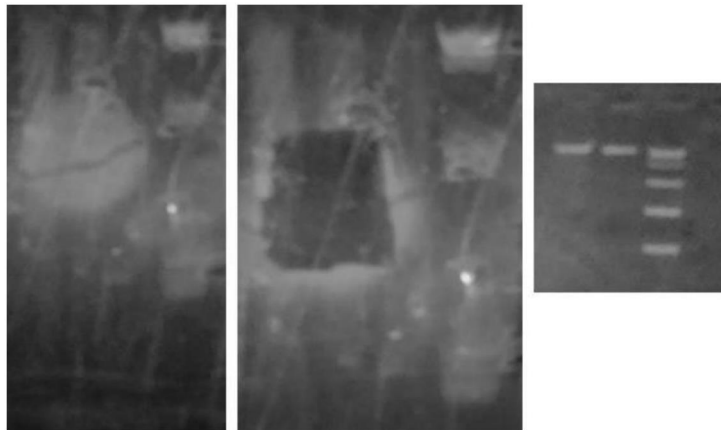


图4

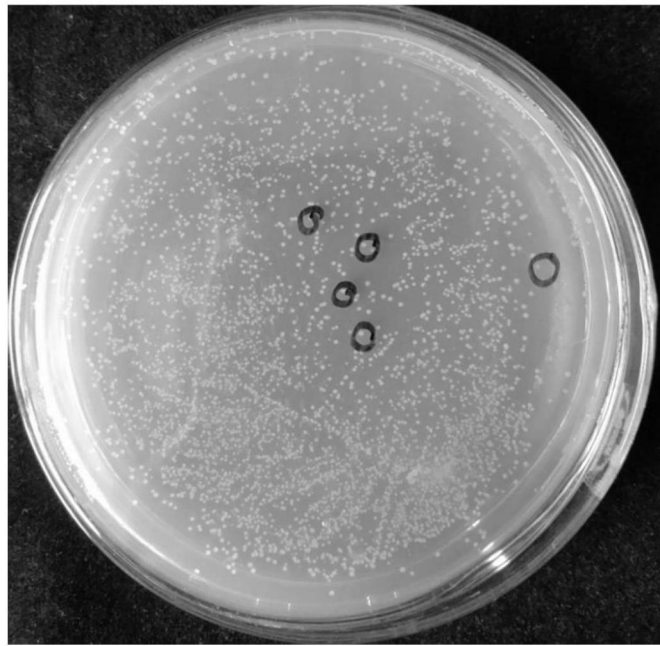


图5

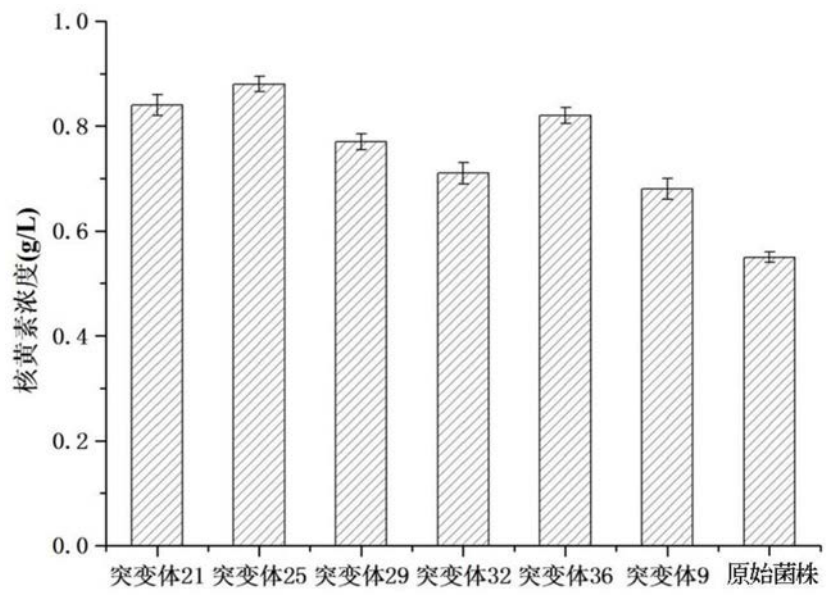


图6

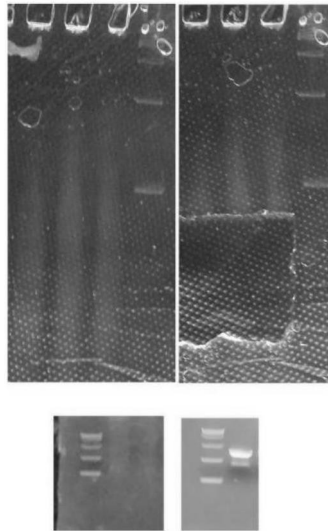


图7

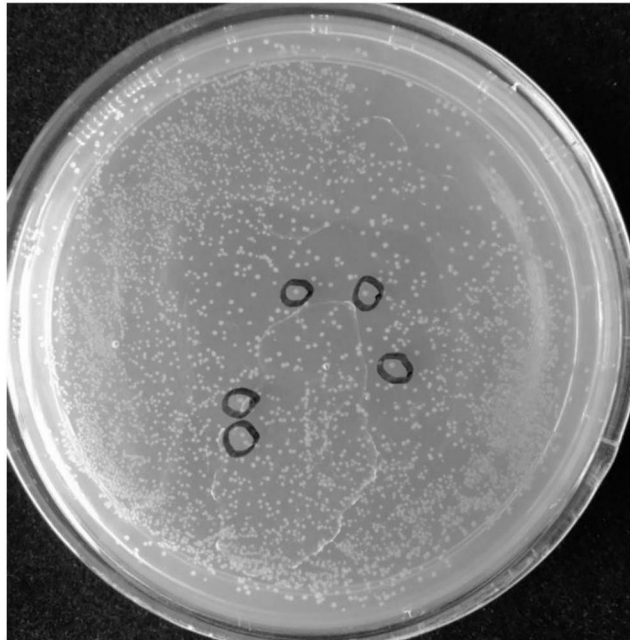


图8

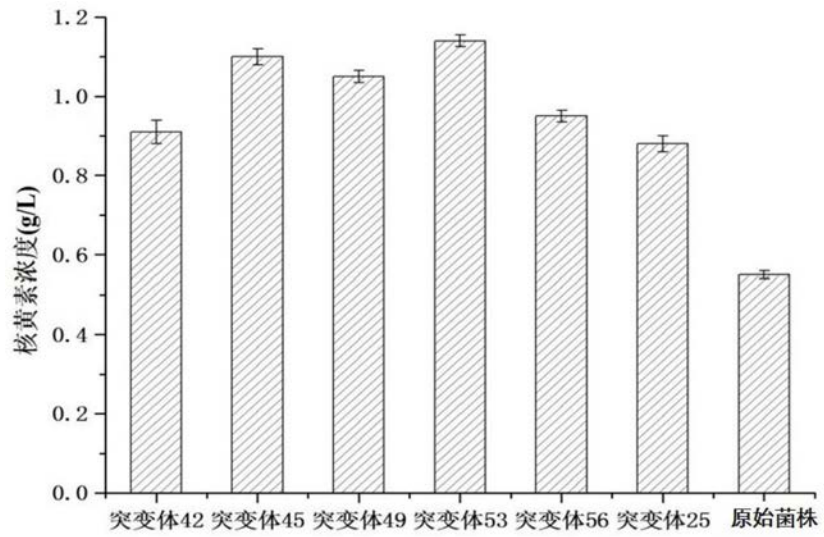


图9

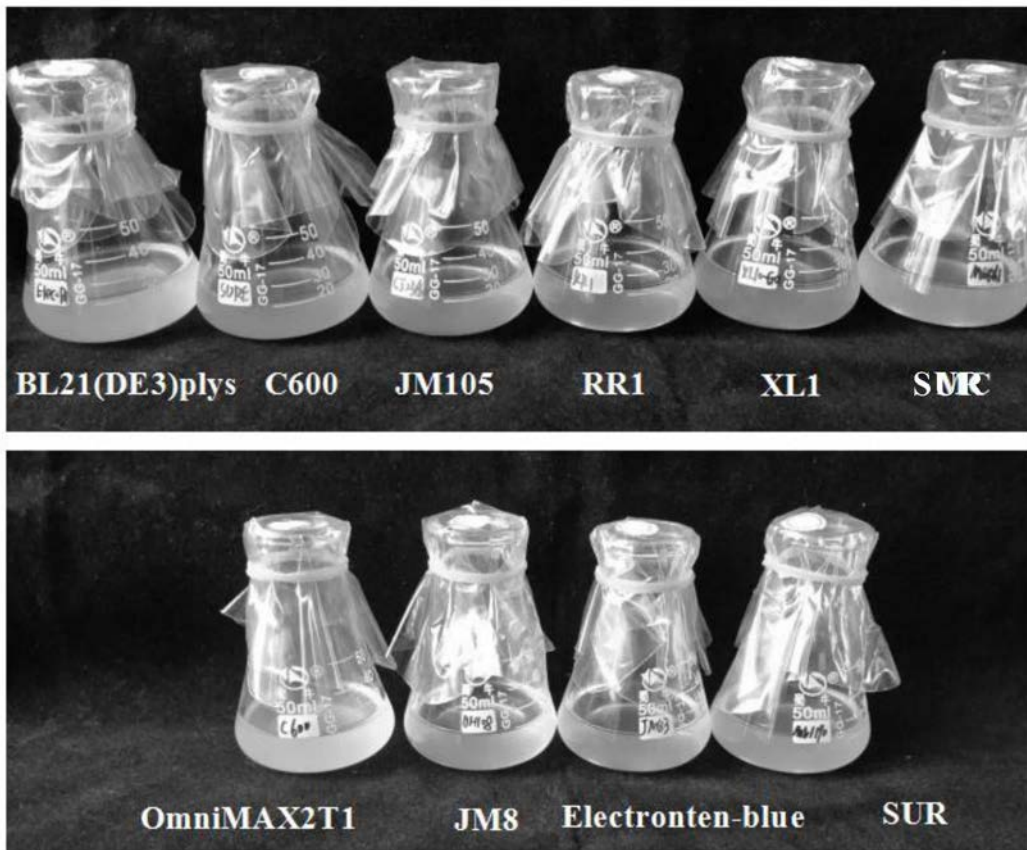


图10

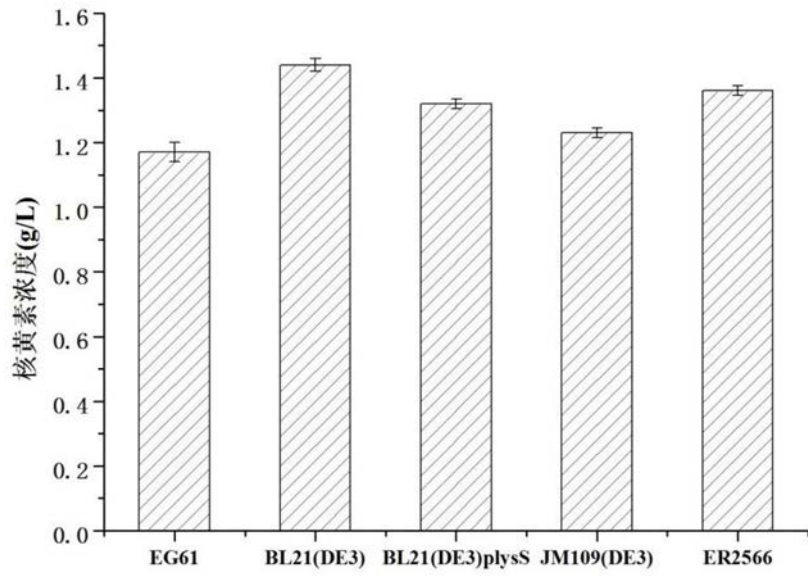


图11