

基于低拷贝质粒的高产紫色杆菌素 谷氨酸棒杆菌的构建和发酵

卢丹妮, 洪沛雄, 张国超, 叶燕锐*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 该研究以公认安全 (Generally Recognized as Safe, GRAS) 的谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 为宿主, 构建高产紫色杆菌素的重组菌株。利用谷氨酸棒杆菌天然大质粒 pTET3 的复制与分配元件, 构建了低拷贝质粒 pOK12CG1, 该质粒在谷氨酸棒杆菌中的拷贝数约为 6 拷贝/基因组, 且与谷氨酸棒杆菌常用质粒 pEC-XK99E 和 pXMJ19 兼容。以低拷贝质粒 pOK12CG1 为骨架构建了携带紫色杆菌素合成操纵子 (vioABCDE) 的质粒 pCGvio, 并分别以谷氨酸棒杆菌标准株 ATCC 13032 和插入序列 (Insertion Sequence, IS) 元件删除株为宿主, 构建了 7 株合成紫色杆菌素的重组菌株。通过初步筛选, 发现基于低拷贝质粒的重组菌株 ATCC 13032/pCGvio, 其紫色杆菌素产量 (508.24 mg/L) 高于基于中高拷贝质粒的重组菌株 ATCC 13032/pECvio (376.16 mg/L), 而基于低拷贝质粒的 IS 元件删除重组菌株 ISDM023/pCGvio 紫色杆菌素产量达到了 610.13 mg/L。进一步采用正交实验设计对重组菌株 ISDM023/pCGvio 进行培养基体积比 ($V_{LB}:V_{BHS}$)、诱导时间和 IPTG 诱导剂浓度这 3 个因素的发酵条件优化。结果表明, 在 $V_{LB}:V_{BHS}$ 为 1:2、诱导时间为 18 h、IPTG 浓度为 0.75 mmol/L 的优化条件下, 紫色杆菌素的摇瓶发酵产量可达了 1 007.47 mg/L。该研究成功构建了紫色杆菌素的谷氨酸棒状杆菌重组菌株 ISDM023/pCGvio, 为谷氨酸棒状杆菌高效合成紫色杆菌素奠定了实验基础, 也为其它产物的高效合成提供参考。

关键词: 低拷贝质粒; 谷氨酸棒状杆菌; 紫色杆菌素; 发酵优化

文章编号: 1673-9078(2023)02-170-179

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.2.0389

Construction and Fermentation of Efficient Violacein-producing *Corynebacterium glutamicum* Strains using Low Copy Number Plasmids

LU Danni, HONG Peixiong, ZHANG Guochao, YE Yanrui*

(School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: For high violacein production, a recombinant strain was constructed using *Corynebacterium glutamicum* [generally recognized as safe (GRAS)] as the host cell. The low copy number plasmid pOK12CG1 was constructed using the replication and partition elements from pTET3, a natural large plasmid of *C. glutamicum*. The plasmid pOK12CG1, maintained at ~6 copies per genome, was compatible with common plasmids pEC-XK99E and pXMJ19 of *C. glutamicum*. The violacein synthesis operon (vioABCDE)-carrying plasmid pCGvio was constructed using the low copy number plasmid pOK12CG1 as backbone. Seven violacein-producing recombinant strains were developed using the standard strain of *C. glutamicum* ATCC 13032 and the deletion strain of the insertion sequence (IS) element as host cells. Initial screening indicated that the recombinant strain ATCC 13032/pCGvio harboring low copy number plasmids produced more violacein (508.24 mg/L) than the recombinant strain ATCC13032/pECvio harboring medium and high copy number plasmids (376.16 mg/L). Violacein production by the IS element deletion recombinant strain ISDM023/pCGvio reached 610.13 mg/L. Fermentation conditions for the recombinant strain

引文格式:

卢丹妮,洪沛雄,张国超,等.基于低拷贝质粒的高产紫色杆菌素谷氨酸棒杆菌的构建和发酵[J].现代食品科技,2023,39(2):170-179

LU Danni, HONG Peixiong, ZHANG Guochao, et al. Construction and fermentation of efficient violacein-producing *Corynebacterium glutamicum* Strains using low copy number plasmids [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(2): 170-179

收稿日期: 2022-04-06

基金项目: 广东省基础与应用基础研究重大项目 (2020B0301030005)

作者简介: 卢丹妮 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物基因组工程, E-mail: ludanni@uritest.com.cn

通讯作者: 叶燕锐 (1981-), 男, 副教授, 研究方向: 合成生物学与微生物基因组工程, E-mail: esyanrui@scut.edu.cn

ISDM023/pCGvio were further optimized by orthogonal experimental design to optimize three factors: medium volume ratio ($V_{LB}:V_{BHIS}$), induction time, and IPTG inducer concentration. Under optimal conditions ($V_{LB}:V_{BHIS}=1:2$, induction time=18 h, and IPTG concentration=0.75 mmol/L) the final production yield of violacein in shake flasks was 1 007.47 mg/L. Herein, the recombinant strain ISDM023/pCGvio of *C. glutamicum* was successfully constructed, providing a biological system for efficient production of violacein in *C. glutamicum* and serving as a reference for the efficient production of other high-value compounds.

Key words: low copy number plasmid; *Corynebacterium glutamicum*; violacein; fermentation optimization

紫色杆菌素 (Violacein) 是一种含有双吲哚的紫色天然色素^[1], 具有抗肿瘤、抗致病菌、抗病毒、抗氧化等活性^[2,3], 在食品、印染、化妆品和医药行业都有重要的潜在应用价值^[4]。紫色杆菌素来源于紫色色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*)、蓝黑紫色杆菌 (*Janthinobacterium lividum*) 等革兰氏阴性细菌, 其生物合成从 L-色氨酸开始, 先后通过 vioABCDE 操纵子编码的 5 个酶 (VioA、VioB、VioE、VioD 和 VioC) 催化合成。紫色色杆菌、蓝黑紫色杆菌^[5]等天然菌种为条件致病菌, 使紫色杆菌素的发酵生产与在食品领域的应用受到限制。Pemberton 等^[6]首次将紫色杆菌素操纵子克隆至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中, 但仅获得浅紫色的菌落, 未测定紫色杆菌素的产量。Rodrigues 等^[7]通过敲除 *trpR*、*tnaA*、*sdaA* 基因, 过表达莽草酸途径中 *aroFBL* 和 *tktA* 等多步遗传操作, 提高大肠杆菌内的 L-色氨酸含量, 使脱氧紫色杆菌素的产量提高到了 277 mg/L。蒋培霞等^[8]选用来源 *Duganella* sp. B2 菌株的紫色杆菌素基因, 并在大肠杆菌、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 和弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 等革兰氏阴性细菌中进行紫色杆菌素的异源合成, 结果显示在弗氏柠檬酸杆菌工程菌的产量最高, 经优化后可达到 1.68 g/L, 但该宿主是一种条件致病菌, 不适合用于食品行业产品的工业发酵。谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是氨基酸的主要生产菌, 作为公认的食品安全菌株 (Generally Recognized as Safe, GRAS), 在食品领域得到广泛应用和研究。孙宏年等^[9,10]将来源于蓝黑紫色杆菌的紫色杆菌素操纵子重叠基因进行解耦, 并在每个开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 上游添加核糖体结合位点 (Ribosome Binding Site, RBS), 然后克隆到中高拷贝的 pEC-XK99E 质粒, 并转化谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 和 ATCC 21850 等菌株中, 在 LBHIS 培养基中进行摇瓶发酵, ATCC 13032 的紫色杆菌素产量达到约 200 mg/L, 而在发酵培养基中, ATCC 21850 的紫色杆菌素产量约 180 mg/L。本研究首先从谷氨酸棒状杆菌天然大质粒

的复制与分配元件, 构建了新的大肠杆菌-谷氨酸棒状杆菌低拷贝穿梭质粒, 并基于该低拷贝质粒, 初步以谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 为宿主合成紫色杆菌素, 发现了基于低拷贝质粒的紫色杆菌素比基于中高拷贝质粒的紫色杆菌素产量更高。此外, 考虑到谷氨酸棒状杆菌基因组中存在许多可表达转座酶的插入序列 (Insertion Sequence, IS) 元件, 会通过转座作用破坏外源引入的 DNA, 不仅限制菌种的遗传操作, 在工业生产中还会导致菌株生产力下降和退化的情况^[11,12], 本研究也比较了基于低拷贝质粒的紫色杆菌素操纵子在 IS 序列删除的谷氨酸棒状杆菌株中的产量, 发现 IS 序列的删除可提高紫色杆菌素的产量。本研究进一步对其中产量最高的重组菌株进行紫色杆菌素的发酵条件优化。本研究的结果为低拷贝质粒用于紫色杆菌素的高效合成提供了新的角度。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SpeI、*EcoRI*、*EcoRV*、*DpnI* 等 DNA 限制性内切酶, 赛默飞科技有限公司; DNA marker 和 Primer STAR Max DNA 聚合酶, 日本 TaKaRa 公司; KOD FX 聚合酶, 东洋纺 (上海) 生物科技有限公司; 硫酸卡那霉素、氯霉素、IPTG (异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷), 北京索莱宝科技有限公司; 质粒小量快速提取试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司; DNA 纯化回收试剂盒, 南京诺唯赞公司。实验所用的菌株和质粒见表 1 和表 2。

1.2 培养基的配制

LBHIS 培养基 (1 L)^[13]: 由 LB 和 BHIS 分别配制, 使用前等比例混合而成。

LB 培养基 (1 L): 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 氯化钠 5 g。

BHIS 培养基 (1 L): 脑心浸液肉汤粉末 37 g, 山梨醇 91 g。

表 1 本研究所用的菌株

Table 1 Strains used in this study

菌株	相关特性	来源
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F</i> ⁻ , <i>endA</i> 1, <i>hsdR</i> 17(rK ⁻ , MK ⁺), <i>supE</i> 44, <i>thi</i> -l, <i>λ</i> ⁻ , <i>recA</i> 1, <i>gyrA</i> 96, <i>ΔlacU</i> 169(Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M</i> 15)	TaKaRa
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	谷氨酸棒状杆菌的野生型菌株	ATCC
<i>C. glutamicum</i> ISDM023	ATCC13032菌株, 删除了IS <i>cg1a</i> 、IS <i>cg1b</i> 、IS <i>cg1d</i> 元件	实验室保存
<i>C. glutamicum</i> ISDM024	ATCC13032菌株, 删除了IS <i>cg2b</i> 、IS <i>cg2f</i> 、IS <i>cg2g</i> 元件	实验室保存
<i>C. glutamicum</i> ISDM025	ATCC13032菌株, 删除了IS <i>cg3a</i> 、IS <i>cg3b</i> 元件	实验室保存
<i>C. glutamicum</i> ISDM026	ATCC13032菌株, 删除了IS <i>cg5a</i> 、IS <i>cg5b</i> 元件	实验室保存
<i>C. glutamicum</i> ISDM027	ATCC13032菌株, 删除了IS <i>cg13a</i> 、IS <i>cg13b</i> 、IS <i>cg21</i> 元件	实验室保存
<i>C. glutamicum</i> ISDM028	ATCC13032菌株, 删除了IS <i>cg6a</i> 、IS <i>cg6b</i> 、IS <i>cg8</i> 、IS <i>cg14</i> 、IS <i>cg16a</i> 、IS <i>cg16b</i> 元件	实验室保存
<i>C. glutamicum</i> ISDM029	ATCC13032菌株, 删除了IS <i>cg1a</i> 、IS <i>cg1b</i> 、IS <i>cg1d</i> 、IS <i>cg2b</i> 、IS <i>cg3a</i> 、IS <i>cg3b</i> 、IS <i>cg8</i> 、IS <i>cg14</i> 、IS <i>cg21</i> 元件	实验室保存
<i>C. Glutamicum</i> ATCC13032/pOK12CG1	ATCC13032菌株, 携带pOK12CG1质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. Glutamicum</i> ATCC13032/pOK12CG2	ATCC13032菌株, 携带pOK12CG2质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. Glutamicum</i> ATCC13032/pXMJ19	ATCC13032菌株, 携带pXMJ19质粒, Cm ^R	本文构建
<i>C. Glutamicum</i> ATCC13032/pEC-XK99E	ATCC13032菌株, 携带pEC-XK99E质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. Glutamicum</i> ATCC13032/pECvio	ATCC13032菌株, 携带pECvio质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. Glutamicum</i> ATCC13032/pCGvio	ATCC13032菌株, 携带pCGvio质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. glutamicum</i> ISDM023/pCGvio	ISDM023菌株, 携带pCGvio质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. glutamicum</i> ISDM024/pCGvio	ISDM024菌株, 携带pCGvio质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. glutamicum</i> ISDM025/pCGvio	ISDM025菌株, 携带pCGvio质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. glutamicum</i> ISDM026/pCGvio	ISDM026菌株, 携带pCGvio质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. glutamicum</i> ISDM027/pCGvio	ISDM027菌株, 携带pCGvio质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. glutamicum</i> ISDM028/pCGvio	ISDM028菌株, 携带pCGvio质粒, Kan ^R	本文构建
<i>C. glutamicum</i> ISDM029/pCGvio	ISDM029菌株, 携带pCGvio质粒, Kan ^R	本文构建

表 2 本研究所用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

质粒	相关特性	来源
pXMJ19	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> 穿梭载体, Cm ^R	实验室保存
pEC-XK99E	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> 穿梭载体, Kan ^R	实验室保存
pECvio	pEC-XK99E载体, 携带紫色杆菌素合成操纵子, 该操纵子由Ptac启动子控制, Kan ^R	实验室保存
pOK12CG1	pOK12质粒衍生物, 含有合成的谷氨酸棒杆菌复制与分配功能序列, kan ^R	本文构建
pOK12CG2	pOK12CG1质粒衍生物, 含有合成的谷氨酸棒杆菌复制与分配功能序列 (删除包含2个22 bp-box区域的104 bp序列), kan ^R	本文构建
pCGvio	pOK12CG1质粒衍生物, 携带PlacI-lacI和Ptac-vio基因, kan ^R	本文构建

1.3 仪器与设备

T100PCR 扩增仪和 Gene Pulser Xcell 电穿孔仪均购自美国 Bio-Rad 公司; Tanon-5200 Multi 凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司; 微量紫外分光光度计 NP80 购自德国 Implen 公司; TECAN infinite M200 Pro 多功能光栅酶标仪购自德国 TECAN 公司; JY92-II 超

声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技责任有限公司。

1.4 方法

1.4.1 谷氨酸棒状杆菌低拷贝质粒复制子的获取
本实验构建的低拷贝质粒所需的复制子序列来源于谷氨酸棒状杆菌的 pTET3^[14], 包括 *repA*、*parA* 和 *parB* 基因, 以及两个 22 bp-box 序列, 由上海捷瑞生

物工程有限公司合成,并克隆至 pOK12 载体中,命名为 pOK12CG1。参考文献^[13]的方法将 pOK12CG1 质粒电转至 ATCC13032,得到 ATCC13032/pOK12CG1 菌株。电转化率的计算:将 0.5 μg 质粒转化至 ATCC13032 后,取适量转化液涂布在对应抗性的 BHIS 平板上,30 ℃ 孵育 2 d,每个实验重复 3 次,按公式(1)计算菌落个数并得出转化效率。

$$a = \frac{b}{c} \times n \quad (1)$$

式中:

a ——电转化效率;

b ——菌落总数;

c ——DNA 总量;

n ——稀释倍数。

1.4.2 质粒相容性分析

将 pXMJ19、pEC-XK99E 质粒同时电转至 ATCC 13032/pCGBACT1 谷氨酸棒状杆菌感受态,涂布至含有卡那霉素(Kanamycin, Km)和氯霉素(Chloramphenicol, Cm)的 BHIS (Km 质量浓度 25 μg/mL, Cm 质量浓度 17 μg/mL) 平板培养,通过菌落 PCR 进行转化子验证。

1.4.3 质粒稳定性分析

传代实验步骤^[15]:取 ATCC 13032/pOK12CG1、ATCC 13032/pXMJ19、ATCC 13032/pEC-XK99 菌株进行平板划线活化,然后分别挑取 3 种单菌落至含对应抗生素(Km 质量浓度 25 μg/mL 或 Cm 质量浓度 17 μg/mL)的 BHIS 培养基中于 30 ℃ 过夜生长;将其接种至 10 mL 无抗生素的液体 BHIS 培养基(保证初始 OD₆₀₀≈0.05);将细胞在 30 ℃,250 r/min 培养 24 h,每隔 24 h 将细胞重复转移到新鲜的无抗培养基中,同时,在稀释 10⁶ 倍后均匀涂布在添加或不添加抗生素的 BHIS 平板上,30 ℃ 培养 2~3 d,每组设 3 个平行;通过公式(2)计算两种平板的菌落数来计算丢失率。

$$d = \frac{e-f}{e} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

d ——质粒丢失率, %;

e ——无抗性平板上的菌落总数;

f ——抗性平板上的菌落总数。

1.4.4 质粒拷贝数测定

按参考文献^[16]的方法,采用定量 PCR 测定质粒的拷贝数。计算拷贝数的公式如下:

$$g = \frac{h \times i}{j \times k} \quad (3)$$

式中:

g ——质粒与基因组的相对拷贝数;

h ——基因组大小, bp;

i ——质粒 DNA 的量, pg;

j ——质粒 DNA 的大小, bp;

k ——基因组 DNA 的量, pg。

1.4.5 紫色杆菌素重组表达质粒的构建与鉴定

采用 Takara 的 Primer STAR Max DNA 聚合酶,以 pOK12CG1 质粒和 pECvio 质粒为模板,分别扩增线性 pOK12CG1 载体片段、ID1 以及 ID2 片段, DpnI 消化过夜后,进行 DNA 凝胶回收,通过 Gibson assembly 进行组装并电转 *E. coli* DH5α;提取阳性克隆的质粒,使用限制性内切酶 EcoRV 进行单酶双酶切验证正确后进行测序。

1.4.6 紫色杆菌素重组菌的构建

先将测序正确的重组质粒 pCGvio 电转化至 *C. glutamicum* ATCC 13032 和 7 株敲除不同 IS 序列的 ATCC 13032 菌株(见表 1)中,涂布在无抗生素或者含有卡那霉素抗性 BHIS 平板上,同时将 *C. glutamicum* ATCC13032/pECvio 菌株划线活化,9 组平板均置于 30 ℃ 培养 24 h;从 BHIS 平板中挑选出线紫色单克隆于对应抗性的 BHIS 液体培养基中 30 ℃ 培养并保存。

1.4.7 紫色杆菌素重组菌的发酵

在超净工作台中,将 1.4.6 中得到的 8 个重组菌株的阳性转化子以及对照组 *C. glutamicum* ATCC13032、*C. glutamicum* ATCC13032/pECvio 菌株单菌落接种至装有 5 mL 含相应抗生素的液体 BHIS 培养基中,30 ℃、220 r/min 培养 12 h,再以 1% (m/V) 接种量转接至含 50 mL LBHIS 培养基的 100 mL 三角摇瓶中,30 ℃、220 r/min 培养 12 h 后加入 1 mmol/L IPTG 试剂,以 20 ℃、220 r/min 条件培养 72 h,获得发酵液。

1.4.8 紫色杆菌素的检测

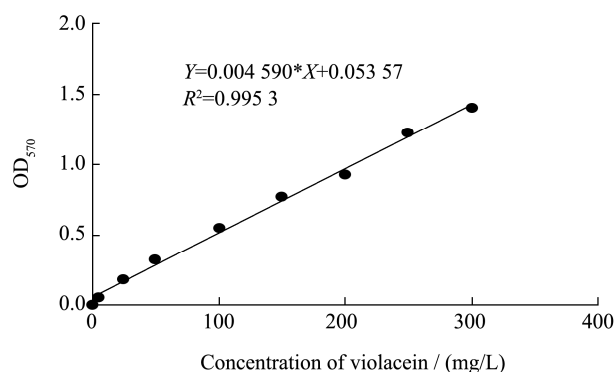


图 1 紫色杆菌素的标准曲线

Fig.1 Standard Curve of violacein

(1) 按文献方法^[10]制作紫色杆菌素标准曲线:配制终质量浓度为 0、5、10、20、40、80、160、320 mg/mL 紫色杆菌素溶液,使用微量分光光度计测

定其在 OD₅₇₀ 值, 重复 3 次, 取不同浓度的紫色杆菌素粗提取液 X (mg/L) 与 570 nm 的吸光度 Y , 拟合的线性关系, 取平均值绘制标准曲线, 如图 1 所示。

(2) 发酵体系中紫色杆菌素的测定: 按文献方法^[9,16]获取紫色杆菌素的粗提乙醇溶液, 使用微量紫外分光光度计测定 OD₅₇₀ 值, 按标准曲线算出紫色杆菌素的浓度值, 求出紫色杆菌素的产量。

1.4.9 正交法优化发酵培养条件

本研究采用 LBHIS 丰富培养基作为发酵培养基, 以诱导剂添加时间、诱导剂 (IPTG) 浓度及培养基 (LB:BHIS) 比例为考察因素, 按照正交设计表 L₉(3⁴) 设计 3 个因素 3 个水平的正交试验, 比较不同发酵条件组合对紫色杆菌素产量的影响。试验设计的因素和水平见表 3。

表 3 发酵条件优化因素表

Table 3 Optimization factors of fermentation conditions			
水平	IPTG 浓度 (mmol/L)	诱导剂 添加时间/h	培养基 (LB:BHIS)比例
1	0.50	12	1:2
2	0.75	18	1:1
3	1.00	24	2:1

1.4.10 数据分析方法

采用 SPSS 19.0 在线软件进行正交实验的单因素和多因素方差分析^[17], 采用 Graphpad prism 8.0 软件进行图表的绘制。

2 结果与讨论

2.1 低拷贝载体 pOK12CG1 的构建

典型的低拷贝质粒含有编码分配相关蛋白的 *parA* 和 *parB* 基因、类着丝粒元件 *parS* 和编码复制蛋白的 *repA* 基因^[18,19]。谷氨酸棒状杆菌的天然大质粒为低拷贝质粒 (一般 5~10 拷贝/基因组)^[15], 因此可以将其复制和分配的关键元件用于构建低拷贝的大肠杆菌-谷氨酸棒状杆菌穿梭载体。由于谷氨酸棒状杆菌大多数天然大质粒的基因缺乏注释, 选择注释相对清楚的 pTET3 (27.8 kb)^[14] 作为出发质粒。pTET3 来源于谷氨酸棒状杆菌 LP-6, 属于 pCG1 家族, 其中编码分配相关蛋白的 *parA* 和 *parB* 基因、编码复制蛋白的 *repA* 基因、以及 pCG1 家族特有的与低拷贝质粒的复制和维持有关的 22 bp-box 等^[20]关键基因/元件有明确的注释, 且分布比较集中 (图 2), 但其类着丝粒元件 *parS* 的序列未知。本研究选择从 *repA* 上游 300 bp 到

parA 下游 300 bp 的 3.7 kb 序列, 进行基因合成, 并克隆至 pOK12 中, 构建得到 pOK12CG1 (图 3)。为了测试 pOK12CG1 是否可在大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌中穿梭, 将其电转化至谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 中, 并以 pOK12 和两个常见的大肠杆菌-谷氨酸棒状杆菌穿梭质粒 pXMJ19 和 pEC-XK99E 作为对照, 结果发现 pOK12CG1 的转化效率约为 10⁴ CFU/μg, 与 pXMJ19 和 pEC-XK99E 的转化效率接近, 而 pOK12 无法转化谷氨酸棒状杆菌 (图 4), 说明 3.7 kb 序列与 pOK12 组成的 pOK12CG1 为大肠杆菌-谷氨酸棒状杆菌穿梭质粒。谷氨酸棒状杆菌 pCG1 家族质粒的 22 bp-box 序列对于质粒的复制和维持有重要的作用^[20,21], 而 3.7 kb 中含有 2 个 22 bp-box, 为证明其作用, 决定从 pOK12CG1 载体中删除了含有该 2 个 22 bp-box 区域的 104 bp 序列, 得到 pOK12CG2。电转化的结果表明, pOK12CG2 比 pOK12CG1 载体低 90 倍 (图 4), 说明了这两个 22 bp-box 序列对 pOK12CG1 在谷氨酸棒状杆菌中的自主复制具有重要的作用。

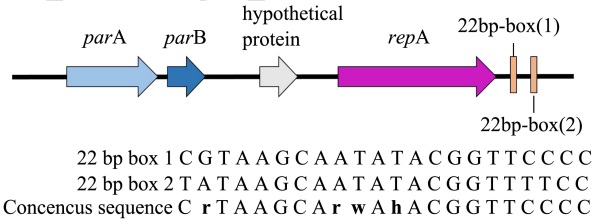


图 2 pTET3 复制和分配序列示意图

Fig.2 Schematic diagram of the replication and distribution sequence of pTET3

注: 使用了粗体单个字母代码: r, A 或 G; w, A 或 T; h, A 或 T 或 C。

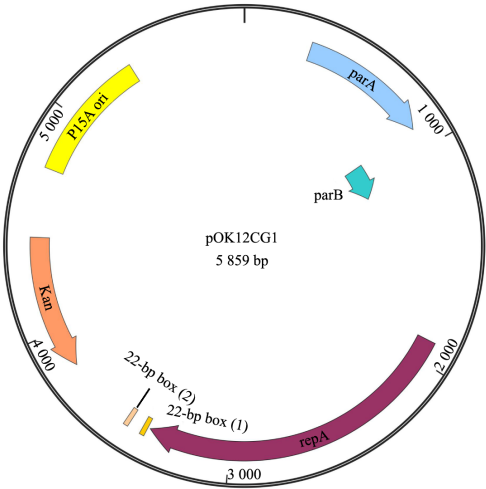


图 3 pOK12CG1 质粒图谱

Fig.3 Schematic diagram of pCG12CG1 plasmid

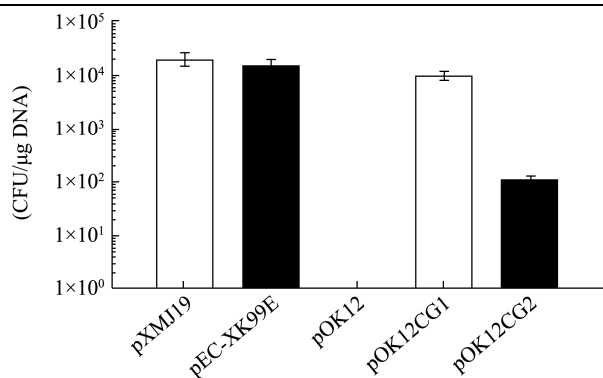


图4 pOK12CG1 质粒的电转化效率

Fig.4 Electroporation efficiency of pOK12CG1 plasmid

2.2 pOK12CG1 质粒复制稳定性、拷贝数与相容性分析

为评估连续传代培养过程中质粒在谷氨酸棒状杆菌宿主中的稳定性,我们将 ATCC 13032/pOK12CG1 菌株接种于无抗生素的 BHIS 液体培养基中并连续传代 12 d,结果显示,在连续传代 12 d 后, pOK12CG1 的平均丢失率约为 56%,与谷氨酸棒状杆菌常用的 pXMJ19 (~74%) 和 pEC-XK99E (~56%) 相近(图 5),表明 pOK12CG1 在无抗性的培养基中完全仍然可以相对稳定地复制。

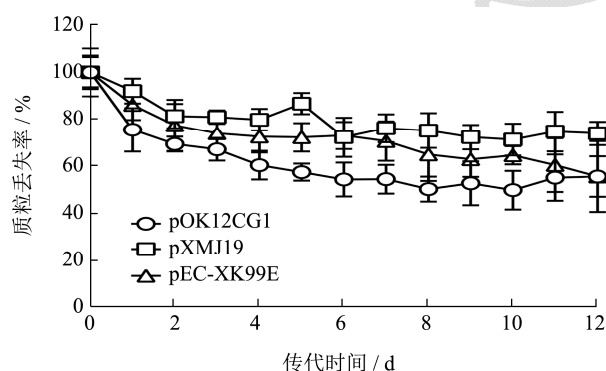


图5 pOK12CG1 载体复制能力验证

Fig.5 Verification of replication ability of pOK12CG1 vector

注: ATCC 13032/pOK12CG1 菌株、ATCC 13032/pXMJ19 菌株与 ATCC 13032/pEC-XK99E 菌株在 BHIS 培养基(Km 质量浓度 25 μg/mL 或 Cm 质量浓度 17 μg/mL) 中过夜活化生长,然后每隔 24 h 将细胞传代培养(初始 OD₆₀₀≈0.05)至新鲜的无抗性培养基。

表4 pOK12CG1 载体的质粒拷贝数

Table 4 Plasmid copy number of pOK12CG1 vector

质粒名称	拷贝数*
pOK12CG1	6.10±2.50
pXMJ19	65.50±23.10
pEC-XK99E	361.70±74.40

注: *Average plasmid copy number per genome.

采用 qPCR 法测定了 pOK12CG1、pXMJ19 与 pEC-XK99E 质粒的拷贝数,结果表明,中等拷贝的 pXMJ19 和高拷贝的 pEC-XK99E 的拷贝数分别为约 40~90 拷贝/基因组和约 290~430 拷贝/基因组,与文献报道接近^[22,23],而 pOK12CG1 的拷贝数为 3~9 拷贝/基因组,与文献报道的 pTET3 质粒的拷贝数(5~10 拷贝/基因组)^[14]相当,属于低拷贝质粒^[13,24]。为研究谷氨酸棒状杆菌低拷贝载体 pOK12CG1 的相容性,选择分别基于 pBL1/colE 和 rep/colE 复制子的 pXMJ19 和 pEC-XK99E 穿梭载体作为相容性测试的质粒,把 pXMJ19 (pBL1/colE 复制子)、pEC-XK99E (rep/colE 复制子)、pOK12CG1 (pTET3/p15A 复制子)依次电转化至谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 中,并对含有 3 种质粒的转化子进行连续 7 d 的传代培养,菌落 PCR 的结果表明,说明 pOK12CG1 载体能与含 pBL1/colE 复制子和含 rep/colE 复制子系列质粒相容(图 6)。

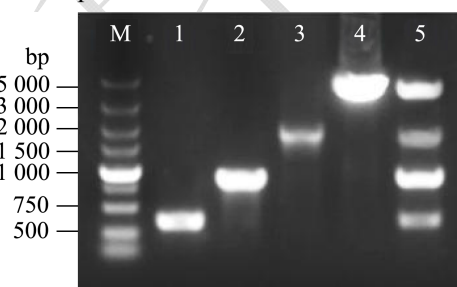


图6 ATCC 13032 菌株的转化子菌落 PCR 验证

Fig.6 PCR verification of transformant colonies of ATCC 13032

注: M 为 250 bp DNA marker;泳道 1 为 ATCC 13032 genome 的 PCR 产物;泳道 2、3、4 分别是 pXMJ19、pEC-XK99E、pOK12CG1 质粒 PCR 产物;泳道 5 是 pOK12CG1、pXMJ19、pEC-XK99E 质粒共转 ATCC 13032 的转化子 PCR 产物。

2.3 紫色杆菌素低拷贝质粒与重组菌株的构建

通过将文献报道的紫色杆菌素操纵子^[10]克隆至低拷贝 pOK12CG1 中获得 pCGvio 质粒。其中紫色杆菌素操纵子由诱导型启动子 Ptrc 控制,紫色杆菌操纵子中的每个基因上游加入了 RBS 序列^[10]。构建的结果如图 7a 所示,构建 pCGvio 质粒所需的线性载体 pOK12CG1 为 5 869 bp, ID1 片段 4 235 bp, ID2 片段为 4 690 bp(图 7a)。将 3 个片段进行 Gibson assembly 并电转化至 *E.coli* DH5α,在 37 °C 过夜培养后, LB 抗性平板长出紫色菌落,将平板放置 20 °C 以下过夜后紫色变深(图 7c),说明质粒已成功转入大肠杆菌并生成紫色杆菌素。酶切(图 7b)、菌落 PCR(图 7d)和测序的结果证明 pCGvio 质粒构建成功,质粒图谱如图 8 所示。

上述结果表明,基于低拷贝质粒的谷氨酸棒状杆菌重组菌株紫色杆菌素产量高于高拷贝质粒,类似的现象在其它物种与其它产物也有报道,在 *E. coli* 中使用低拷贝质粒合成番茄红素的产量是高拷贝质粒的 2~3 倍^[25],说明了在某些代谢工程中,低拷贝质粒可能减轻了代谢符合,更利于提高细胞的生产能力。需提出的是谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 不是色氨酸高产菌株,仅在丰富培养基(如 LBHIS)中可以高效合成紫色杆菌素,而在发酵培养基中的产量很低^[9,10],可改用色氨酸高产菌株(如 CICC 20192、ATCC 21850 等)作为宿主,构建高产紫色杆菌素的重组菌株。

2.4 紫色杆菌素的发酵条件优化

诱导剂浓度、诱导剂添加时间和培养温度对紫色杆菌素的在谷氨酸棒杆菌 ATCC 21850 中的产量有直

接影响^[9,10],本实验使用的宿主为 ATCC 13032,需用丰富培养基 LBHIS 进行发酵,因此选取三个主要因素:诱导剂添加时间、诱导剂浓度及培养基比例($V_{LB}:V_{BHIS}$),通过设计 3 个因素 3 个水平的正交试验来筛选合适的发酵条件^[26],结果如表 5、图 10 所示。

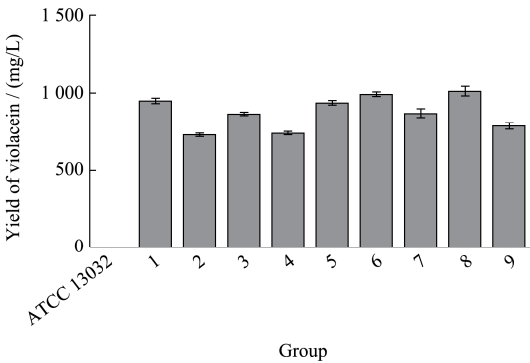


图 10 正交试验中紫色杆菌素产量

Fig.10 The yield of violacein in orthogonal test

表 5 正交设计实验结果

Table 5 Experimental results of orthogonal design

组别	IPTG浓度/(mmol/L)	诱导剂添加时间/h	LBHIS培养基比例($V_{LB}:V_{BHIS}$)	Violacein产量平均值/(mg/L)
1	1	1	1	940.09
2	1	2	3	719.97
3	1	3	2	857.23
4	2	1	3	729.12
5	2	2	2	930.89
6	2	3	1	986.86
7	3	1	2	858.24
8	3	2	1	1 007.47
9	3	3	3	780.42
K1	2 517.29	2 527.45	2 934.42	
IIj	2 646.87	2 658.33	2 646.36	
IIIj	2 646.13	2 624.51	2 229.51	
K1 avg值	839.10	842.48	978.14	
K2 avg值	882.29	886.11	882.12	
K3 avg值	882.04	874.84	743.17	
最佳水平	2	2	1	
R	43.19	43.63	234.97	

表 6 正交试验的多因素方差分析结果

Table 6 Results of multivariate analysis of variance of orthogonal test

描述	平方和	df	均方	F	p
截距	6 777 851.130	1	6 777 851.130	10 525.419	0.000**
IPTG 浓度	3 710.154	2	1 855.077	2.881	0.258
诱导剂添加时间	3 076.728	2	1 538.364	2.389	0.295
培养基比例($V_{LB}:V_{BHIS}$)	90 252.001	2	45 126.001	63.881	0.015*

注: $R^2=0.985$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

通过表 5 直观地分析得知, 携带 pCGvio 质粒的 ISDM023 菌株经采用不同发酵条件进行紫色杆菌素的表达, 其含量最高可达到 1 007.47 mg/L; 此外, 由各因素的极差值大小可判断对紫色杆菌素表达量的影响大小分别为: 培养基比例 ($V_{LB}:V_{BHS}$) > 诱导剂添加时间 > IPTG 浓度。

从表 6 的多因素方差分析结果可知 IPTG 浓度、诱导剂添加时间、培养基比例 ($V_{LB}:V_{BHS}$) 这 3 个因素对于 Viol 产量的差异关系: IPTG 浓度、诱导剂添加时间并不会对产量产生差异关系, 只有培养基比例 ($V_{LB}:V_{BHS}$) 会对产量产生显著性差异关系 ($P<0.05$), 进一步使用单因素方差研究该因素发现 (表 7) 培养基比例 ($V_{LB}:V_{BHS}$) 中的两两水平间也存在显著性差异, 说明 LB 与 BHS 培养基的比例确实对紫色杆菌素的产量有较大影响。在最优发酵条件下, 重组菌株 ISDM023/pCGvio 的紫色杆菌素产量为 1 007.47 mg/L。本研究主要采用摇瓶发酵的方法, 对于补糖、溶氧、pH 值等因素均无法有效控制, 未充分挖掘重组菌株发酵合成紫色杆菌素的潜力, 后续和进一步通过微型或小型发酵罐, 对上述因素开展更为全面的发酵优化。

表 7 培养基比例 ($V_{LB}:V_{BHS}$) 因素的方差分析结果

Table 7 Results of ANOVA for the scale factor of medium

($V_{LB}:V_{BHS}$)				
水平项	均值差值	标准误 SE	t 值	P 值
1.0~2.0	96.020	20.720	4.634	0.044*
1.0~3.0	234.969	20.720	11.340	0.008**
2.0~3.0	138.949	20.720	6.706	0.022*

注: * $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。

3 结论

在本研究中, 我们构建的低拷贝质粒 pOK12CG1 能与常用的 pXMJ19 和 pEC-XK99E 具有相容性, 为谷氨酸棒状杆菌的代谢工程改造提供更多选择。发酵实验结果显示: 基于低拷贝质粒 pOK12CG1 的谷氨酸棒状杆菌重组菌株紫色杆菌素产量显著高于基于高拷贝质粒 pEC-XK99E 的重组菌株; 以 IS 元件删除菌株为宿主, 可以提高紫色杆菌素的产量, 为谷氨酸棒状杆菌菌种的进一步改良提供了参考。此外, 本文通过以删除 3 个 IS 基因的谷氨酸棒状杆菌 ISDM023 菌株为宿主, 低拷贝载体 pCGvio 为基因表达工具, 构建了一株高效合成紫色杆菌素的重组菌株 ISDM023/pCGvio。使用正交实验法对该菌株的培养条件进行了优化, 最终确定最佳诱导剂浓度是 0.75 mmol/L, 最佳诱导剂添加时间是 30 °C 培养 18 h 后, 最佳 LBHIS 培养基比例为 LB 和 BHS 体积比 1:2。综上, 本研究

基于低拷贝质粒, 构建了紫色杆菌素的谷氨酸棒状杆菌重组菌株 ISDM023/pCGvio, 其紫色杆菌素产量高于基于高拷贝质粒的重组菌株, 经过摇瓶发酵优化, 产量可达到 1 007 mg/mL, 为谷氨酸棒状杆菌高效合成紫色杆菌素奠定了实验基础, 也为其它产物的高效合成提供参考。

参考文献

- [1] 许嫚, 韩烨, 吕加平, 等. 细菌产蓝紫色素的化学结构解析及理化特性研究[J]. 核农学报, 2016, 30(3): 533-540
- [2] Platt D, Amara S, Mehta T, et al. Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: Potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 455(1-2): 107-112
- [3] 李红, 蔡友华, 陆最青, 等. 紫色杆菌素研究与开发进展[J]. 肇庆学院学报, 2015, 36(2): 44-48
- [4] Choi S Y, Kim S, Lyuck S, et al. High-level production of violacein by the newly isolated duginellavioleaceinigena strain 28 and its impact on *Staphylococcus aureus* [J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 1-12
- [5] Oh W T, Giri S S, Yun S, et al. *Janthinobacterium lividum* as an emerging pathogenic bacterium affecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fisheries in Korea [J]. Pathogens, 2019, 8(3): 146
- [6] Pemberton J M, Vincent K M, Penfold R J. Cloning and heterologous expression of the violacein biosynthesis gene cluster from *Chromobacterium violaceum* [J]. Current Microbiology, 1991, 22(6): 355-358
- [7] Rodrigues A L, Trachtman N, Becker J, et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein [J]. Metabolic Engineering, 2013, 20: 29-41
- [8] Jiang P X, Wang H S, Chong Z, et al. Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella* sp. B2 in different heterologous hosts [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(4): 1077-1088
- [9] Hongnian Sun, Dongdong Zhao, Bin Xiong, et al. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for violacein hyper production [J]. Microbial cell factories, 2016, 15(148): 1-9
- [10] 孙宏年. 高产紫色杆菌素谷氨酸棒状杆菌的构建和发酵[D]. 大连: 大连工业大学, 2016
- [11] Peng M, Liang Z. Degeneration of industrial bacteria caused by genetic instability [J]. World Journal of Microbiology and

- Biotechnology, 2020, 36(8): 119
- [12] Rugbjerg P, Sommer M. Overcoming genetic heterogeneity in industrial fermentations [J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 869-876
- [13] Eggeling L B M. Handbook of corynebacteriumglutamicum [M]. Boca Raton, CRC Press: 2005
- [14] Tauch A, G tcker S, P Hler A, et al. The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette aadA9 and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100 [J]. Plasmid, 2002, 48(2): 117-129
- [15] 卢丹妮.谷氨酸棒杆菌大容量穿梭载体的构建[D].广州:华南理工大学,2020
- [16] Lee C L, Ow D S W, Oh S K W. Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria [J]. J Microbiol Methods, 2006, 65(2): 258-267
- [17] 陈希孺,倪国熙.数理统计学教程[M].中国科学技术大学出版社,2009
- [18] Fumie H, Susumu N, Hisao U, et al. An F factor based cloning system for large DNA fragments [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 13: 3863-3869
- [19] Shizuya, H, Birren, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89(18): 8794-8797
- [20] Peters-Wendisch P G, Schiel B, Wendisch V F, et al. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum* [J]. J Mol MicrobiolBiotechnol, 2001, 3(2): 295-300
- [21] Trautwetter A, Blanco C. Structural organization of the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pCG100 [J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137(9): 2093-2101
- [22] Jiangang, Yang, Yueming, et al. Biosynthesis of rare ketoses through constructing a recombination pathway in an engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. Biotechnology & Bioengineering, 2015, 112(1): 168-180
- [23] Wang X, Zhang H, Hu J, et al. Construction of a novel expression system for use in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Plasmid, 2013, 75: 18-26
- [24] 张国超.谷氨酸棒状杆菌插入序列元件删除突变株的构建与分析[D].广州:华南理工大学,2021
- [25] Jones K L, Kim S W, Keasling J D. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria [J]. Metabolic Engineering, 2000, 2(4): 328-338
- [26] 许嫚,吕加平,韩焯,等.发酵生产紫色杆菌素的培养基及发酵条件优化[J].食品科技,2015,40(7):2-7