

摘要

染料脱色过氧化物酶 (Dye-decolorizing Peroxidases, DyPs) 是近年来新发现的一类以血红素为辅基的过氧化物酶, 可用于木质素与多种染料的降解。目前已在大肠杆菌等工程菌中实现了 DyPs 的异源表达, 但由于辅因子血红素的缺乏导致酶活性低。因此, 在对 DyP 酶进行高效表达的同时, 提升辅因子血红素产量至关重要。本研究以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 为出发菌株, 通过对血红素合成途径的改造、减少前体物质的外泌与调控血红素合成途径基因的表达等策略获取了高产血红素菌株; 将经过改造得到的血红素高产菌株作为宿主菌表达 DyP 酶, 大幅提升了 *TfuDyP* 的酶活力。主要研究内容和结果如下:

(1) *E. coli* 血红素 C5 途径的强化。血红素合成关键前体 5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, ALA) 通过 C4 或 C5 两条途径合成, *E. coli* 以 C5 途径合成 ALA, 首先以可积累前体卟啉的 *tolC* 缺失菌株 WT Δ T 为出发菌株, 过表达 C5 途径中编码谷氨酰-tRNA 还原酶的 *hemA* 基因, 用于提高细胞内 ALA 的水平, 从而增加卟啉的积累; 随后共同过表达编码亚铁螯合酶的 *hemH* 基因, 将积累的卟啉转化为血红素, 血红素产量提升至 $34.69 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 为野生菌的 3.44 倍; 通过外源添加亚铁离子进一步提升血红素的产量, 最终在添加 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚铁离子时获得了 $40.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血红素产量, 达到了野生菌的 3.98 倍。

(2) *E. coli* 血红素 C4 途径的构建。通过 Red 同源重组的方法敲除了 C5 途径中编码谷氨酸-1-半醛-2,1-变位酶的 *hemL* 基因, 得到了 C5 途径缺失菌株 WT Δ L, 进而异源表达来自类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 的 ALA 合酶 (*RspHemA*, *hemA^R*), 得到了以 C4 途径合成血红素的菌株 WT Δ L/pCA^R; WT Δ L/pCA^R 的血红素产量达到 $43.51 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 远高于野生菌、C5 途径过表达菌株与两途径共表达菌株的血红素产量; 随后过表达了血红素合成途径下游的 *hemH* 基因与编码 ALA 脱水酶的 *hemB* 基因, 进一步提升了血红素产量至 $59.46 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 为野生菌的 5.89 倍。

(3) 血红素过氧化物酶的异源表达及酶活分析。将本实验室保存的来自嗜热放线菌 (*Thermobifida fusca*) 的 *TfuDyP* 导入本研究所获得的血红素高产菌株, 并检测酶活力。结果显示含有中拷贝质粒 pET28a 表达 *TfuDyP* 基因与低拷贝质粒 pCDFDuet1 表达 *hemA^R* 的工程菌 WT Δ L/pCA^R-pED 与 WT Δ T/pCA^R-pED 的酶活分别为 $30.25 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 与 $32.75 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 是野生菌中单独表达 *TfuDyP* 的 WT/pED 菌株的 5.98 与 6.47 倍; 对 *TfuDyP* 进行蛋白纯化, 重组菌 WT Δ T/pCA^R-pED 表达的酶活力进一步提升至 $110.63 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

以上结果表明, 血红素代谢途径的调控可以提高以血红素为辅基的重组 *TfuDyP*。

关键词: *E. coli*; 血红素; C5 途径; C4 途径; 过氧化物酶

Abstract

Dye-decolorizing peroxidases (DyPs) are newly discovered peroxidases with heme as cofactor, which can be used for the degradation of lignin and a variety of dyes. At present, heterologous expression of DyPs has been achieved in engineering bacteria such as *Escherichia coli*, but the lack of cofactor results in low enzyme activity. Therefore, it is crucial to increase the yield of heme while efficiently expressing DyP enzymes. In this study, *Escherichia coli* BL21 (DE3) was used as the starting strain and the high-yielding heme strain was obtained by modifying the heme synthesis pathway, reducing the secretion of precursors, and regulating the expression of genes involved in the heme synthesis pathway. The modified heme high-yielding strains are used as the host strains for expressing the DyP enzyme, and the enzyme activity of *TfuDyP* is greatly improved. The main research contents and results are as follows:

(1) Enhancement of heme C5 pathway in *E. coli*. 5- Aminolevulinic acid (ALA), a key precursor for heme synthesis, was synthesized via C4 and C5 pathways, while ALA was synthesized via C5 pathway in *E. coli*. Firstly, the *hemA* gene (encoding glutamyl -tRNA reductase) of C5 pathway was overexpressed in *tolC*-deleted *E. coli* WT Δ T to increase the level of ALA in cells, which lead to the accumulation of precursor porphyrin; subsequently, the *hemH* gene (encoding Ferrochelatase) was co-expressed and the accumulated porphyrin was converted into heme, and the yield of heme was increased to 34.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, which was 3.44 fold of that in WT. The yield of heme was further improved by adding ferrous ions, and finally the yield of heme was 40.18 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ at the concentration of ferrous ions of 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, which was 3.98 fold of that in WT.

(2) Construction of C4 pathway in *E. coli*. The *hemL* gene of C5 pathway was knocked out by Red homologous recombination, and the *E. coli* with C5 pathway-deleted was obtained. And then the ALA synthase (*RspHemA*, *hemA^R*) from *Rhodobacter sphaeroides* was heterologously expressed, so that the WT Δ L/PCA^R with C4 pathway synthesis of heme was obtained. It was found that the heme yield of WT Δ L/PCA^R reached 43.51 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, which was much higher than that of WT, C5 pathway overexpressed strains and strains of two pathway co-expression. Subsequently, the downstream genes *hemB* (encoding ALA dehydratase) and *hemH* of heme synthesis pathway was overexpressed, which further increased the heme yield to 59.46 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, which was 5.89 fold of that in WT.

(3) Heterologous expression and enzyme activity analysis of heme peroxidase. The *TfuDyP* stored in our laboratory from *Thermobifida fusca* was introduced into the

heme-producing strain obtained in this study to detect the enzyme activity. The results showed that the enzyme activity of WT Δ L/pCA^R-pED and WT Δ T/pCA^R-pED containing medium copy plasmid pET28a expressing *TfuDyP* gene and low copy plasmid pCDFDuet1 expressing *hemA^R* was significantly improved to 30.25 U·mg⁻¹ and 32.75 U·mg⁻¹, which were 5.98 and 6.47 fold of that in the strain WT/pED containing pET28a expressing *TfuDyP* in WT. After *TfuDyP* was purified, the enzyme activity of the recombinant strain WT Δ T/pCA^R-pED was further increased to 110.63 U·mg⁻¹.

The above results indicate that the regulation of heme metabolic pathway can improve the activity of recombinant *TfuDyP* with heme as cofactor.

Keywords: *E. coli*; heme; C5 pathway; C4 pathway; peroxidase

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 血红素简介.....	1
1.1.1 血红素的结构特征.....	1
1.1.2 血红素的功能与应用.....	1
1.2 血红素生物合成与代谢调控.....	2
1.2.1 前体 ALA 的生物合成.....	2
1.2.2 ALA 至血红素的合成.....	3
1.2.3 血红素合成代谢调控.....	4
1.3 以血红素为辅基的染料脱色过氧化物酶.....	5
1.3.1 DyPs 概述.....	5
1.3.2 TfuDyP 概述.....	6
1.4 本研究立题依据与主要研究内容.....	6
1.4.1 本研究立题依据.....	6
1.4.2 主要研究内容.....	7
第二章 材料与方法.....	9
2.1 实验材料.....	9
2.1.1 主要试剂.....	9
2.1.2 主要仪器.....	10
2.1.3 质粒与菌株.....	10
2.1.4 培养基及溶液配制.....	12
2.1.5 本研究所用引物.....	12
2.2 实验方法.....	13
2.2.1 分子生物学操作.....	13
2.2.2 缺失菌株的构建.....	15
2.2.3 过表达菌株的构建.....	16
2.2.4 菌株发酵与检测方法.....	16
2.2.5 血红素过氧化物酶的制备与检测.....	18
2.2.6 ALA 合酶的制备与检测.....	19
第三章 结果与讨论.....	21
3.1 E. coli 血红素 C5 合成途径改造.....	21
3.1.1 C5 途径强化菌株的构建.....	21
3.1.2 tolC 缺失及 hemA 与 hemH 过表达对 E. coli 生长的影响.....	22
3.1.3 过表达 hemA 对卟啉和血红素合成的影响.....	23

3.1.4 共表达 hemA 与 hemH 对血红素合成的影响	24
3.1.5 亚铁离子对胞内血红素含量的影响.....	25
3.2 E. coli 血红素 C5 合成途径的阻断	26
3.2.1 hemL 敲除与回补菌株的构建	26
3.2.2 hemL 缺失对 E. coli 生长的影响	29
3.2.3 hemL 缺失对 E. coli 血红素合成的影响	30
3.3 E. coli 血红素 C4 合成途径的构建	31
3.3.1 ALA 合酶基因的选择与表达.....	31
3.3.2 C4 合成途径导入对 E. coli 生长的影响	32
3.3.3 C4 途径导入对血红素与 ALA 合成的影响.....	33
3.3.4 血红素合成下游途径基因过表达.....	34
3.3.5 亚铁离子对 WT Δ L/pCHA ^R 血红素含量的影响	36
3.3.6 C4 与 C5 途径共表达对于血红素合成的影响	36
3.4 TfuDyP 的异源表达与酶活分析.....	37
3.4.1 高拷贝质粒表达 TfuDyP.....	37
3.4.2 中拷贝质粒共表达血红素合成途径基因与 TfuDyP	40
3.4.3 纯酶活性分析.....	43
3.4.4 纯酶的光谱分析.....	44
主要结论与展望	46
主要结论.....	46
展望.....	46
参考文献.....	48

第一章 绪论

1.1 血红素简介

1.1.1 血红素的结构特征

血红素，由原卟啉IX（Protoporphyrin IX, PPIX）与亚铁离子络合形成，广泛存在于自然界的各种生物体中^[1,2]。血红素的分子式为 $C_{33}H_{33}FeN_4O_2$ ，相对分子质量为 616.48，其结晶呈蓝黑色，不溶于水，溶于氢氧化钠、碳酸钠、氨水等碱性水溶液。血红素的存在形式多样，其主要的区别在于卟啉环侧链不同，其共同的特征是都从血红素 b 型结构衍化而来^[3]，结构式如图 1-1 所示，亚铁离子位于卟啉环的中央，与卟啉环形成了共轭结构，因而血红素的物理化学性质比较稳定。

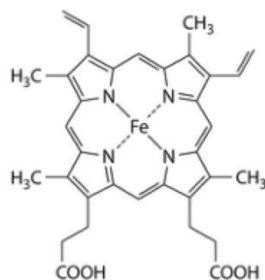


图 1-1 血红素的结构示意图

Fig. 1-1 Schematic diagram of heme structure

1.1.2 血红素的功能与应用

血红素在细胞内以游离或与蛋白相互结合的形式存在，两种形式的血红素在生物体内发挥着多种关键作用。由于血红素的结构含有亚铁离子，因此游离血红素参与了维持机体内铁的供给与转运，生物体中约有 70%的铁以血红素的形式存在，游离铁与结合铁的相互转化，用于维持细胞稳态，调节代谢^[4]。血红素作为辅因子与众多酶与蛋白结合也具有重要的生理功能：因血红素含有亚铁离子，具备结合氧气的的能力，因此成为呼吸作用以及电子传递链中相关蛋白的重要组成部分^[5,6]；血红素作为辅因子与酶结合，作为辅基调控酶活性，进而参与机体生命活动，如底物的氧化催化（过氧化物酶）、机体的损伤修复（一氧化氮合酶）等^[7,8]；此外，血红素在调控昼夜节律发生、信号转导、基因表达调控、miRNA 加工合成等生命活动中也发挥了重要作用^[9-11]。随着各项研究的深入，血红素的功能还将被进一步挖掘。

基于血红素的结构与多种功能，血红素在实际应用中具有广泛的用途：由于血红素铁更容易被吸收^[12]，因此可作为补铁剂与抗贫血药物用于医疗保健；在食品工业方面，血红素可以替代对人体有致癌作用的亚硝酸盐与人工合成色素，增加食品安全性^[13,14]；在疾病诊断与治疗方面，血红素被广泛用于治疗缺铁和急性间歇性卟啉症^[15]、疟原虫溶

解^[16]等方面，还可以用于制备抗癌药物中的卟啉系列药物^[17]。

1.2 血红素生物合成与代谢调控

1.2.1 前体 ALA 的生物合成

血红素生物合成的第一步是 5-氨基乙酰丙酸（5-aminolevulinic acid, ALA）的合成，而根据 ALA 合成的方式不同，将血红素的生物合成成分成 C4 和 C5 两条途径，一般在一种生物体中仅存在 C4 或 C5 中的一种，目前仅在可进行光合作用的 *Euglena gracilis* 与 *Scenedesmus obliquus* 中发现 C4 途径和 C5 途径同时存在^[18, 19]。

C4 途径广泛存在于真菌、酵母、非硫光合细菌和鸟类与哺乳动物中。由 *hemA* 基因编码的 ALA 合酶（5-aminolevulinic acid synthase, ALAS）是 C4 途径唯一酶，也是限速酶，以磷酸吡哆醛（PLP）作为辅因子，催化甘氨酸（Glycine, Gly）与琥珀酰-辅酶 A（Succinyl-CoA）缩合生成 ALA，并释放 CO₂ 与辅酶 A。ALAS 包括 N 端、催化域、C 端三个结构域，三个结构域通过形成连结紧密的同源二聚体发挥功能^[20]，催化机制如下：首先，在甘氨酸和琥珀酰-辅酶 A 同时存在时，Gly 与 PLP 结合形成 PLP-Gly 复合体，引发转醛亚胺作用；随后琥珀酰-辅酶 A 被 Gly 攻击释放出 CoA，同时脱羧生成 ALA，该步反应是催化反应的限速步骤^[21]。

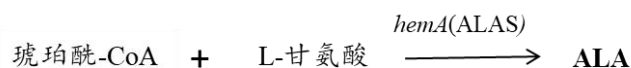


图 1-2 ALA 的 C4 合成途径

Fig. 1-2 C4 synthetic pathway of ALA

C5 途径主要存在于高等植物、藻类和多种细菌中。在 C5 途径中，ALA 是通过三步反应生成的，其中包括由 *gltX* 基因编码的谷氨酰 tRNA 合成酶（Glutamyl-tRNA synthetase, GluTS）连接谷氨酸和 tRNA^{Glu} 形成谷氨酰-tRNA^[22, 23]，随后由 *hemA* 基因编码的谷氨酰-tRNA 还原酶（Glutamyl-tRNA reductase, GluTR）还原生成谷氨酸-1-半醛（Glutamyl-1-semialdehyde, GSA）^[24, 25]，最后，在 *hemL* 基因编码的谷氨酰-1-半醛-2,1-变位酶（Glutamyl-1-semialdehyde transaminase, GSAM）的作用下，不稳定的 GSA 在 GSAM 的作用下快速转氨生成 ALA。其中，GSAM 二聚体与呈 V 型的 GluTR 二聚体紧密结合成一个高度互补的复合体，以避免 GSA 的降解^[26-28]。此外，GSAM 与 GluTR 均受到终产物血红素的反馈调控^[29-31]。

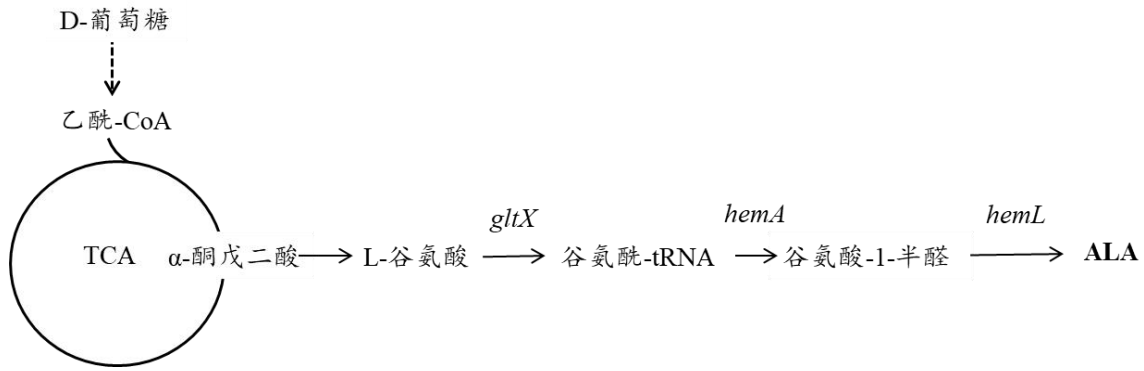


图 1-3 ALA 的 C5 合成途径

Fig. 1-3 C5 synthetic pathway of ALA

1.2.2 ALA 至血红素的合成

血红素生物合成下游途径如图 1-4 所示, 首先由 *hemB* 基因编码的 ALA 脱水酶 (ALA dehydratase, ALAD) 将两分子 ALA 缩合生为胆色素原 (PBG) [32], 接下来四分子 PBG 被 *hemC* 编码的 PBG 脱氨酶 (Porphobilinogen deaminase, PBGD) 的缩合为羟甲基胆素 (Hydroxymethyl cholerin, HMB), 之后 HMB 在 *hemD* 编码的尿卟啉 III 合成酶 (Uroporphyrinogen III synthetase, UROS) 的作用下生成具有四吡咯环结构的尿卟啉原 III (Uroporphyrinogen III, UPGIII) [33], 接下来由 UPGIII 通过三种不同的途径合成血红素, 具体取决于物种。一种途径是由四种酶组成的原卟啉依赖性 (PPD) 途径, 由 *hemE* 编码的尿卟啉原 III 脱羧酶 (Uroporphyrinogen III decarboxylase, UROD) 脱羧并释放 CO_2 生成粪卟啉原 III (Coproporphyrinogen III, CPGIII), 随后经由 *hemF* 基因编码的粪卟啉原 III 氧化酶 (Coproporphyrinogen III oxidase, CPO) 的继续脱羧氧化, 生成原卟啉原 IX (Protoporphyrinogen IX, PPGIX) [34], 并伴随 CO_2 的释放, 继而又在基因 *hemG* 编码的卟啉原氧化酶 (Protoporphyrinogen oxidase, PPO) 的催化下生成原卟啉 IX (Protoporphyrin IX, PPIX) [35], 最后由 *hemH* 基因编码的亚铁螯合酶 (Ferrochelatase, FECH) 螯合亚铁离子与 PPIX, 生成血红素 [2], 该途径被称为经典途径, 发现于变形菌和真核生物; 第二种途径是在硫酸盐还原细菌和古细菌中发现的原血红素途径, 由 UPGIII 经过三步酶促生成西罗血红素 (Siroheme), 随后西罗血红素经三步酶促反应合成血红素; 第三种途径是粪卟啉依赖性 (CPD) 途径, 它是最近发现的存在于放线菌和厚壁菌门中的非经典途径 [36]。

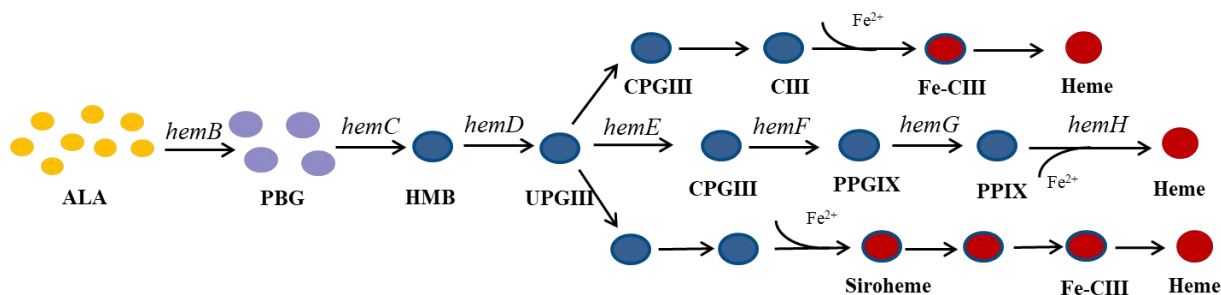


图 1-4 ALA 至血红素生物合成途径

Fig. 1-4 The biosynthetic pathway from ALA to heme

注：图中三条途径从上至下依次为 CPD 途径、PPD 途径与原血红素途径；CIII：Coproporphyrin III，Fe-CIII：Fe-Coproheme III

1.2.3 血红素合成代谢调控

血红素合成代谢调控策略一般包括：提高代谢途径的关键酶基因的表达以提高关键前体物的合成，从而提升血红素的产量；减少血红素合成前体的外泌；增强血红素的外泌等。这些策略被单独或组合使用用于血红素的生产已有报道，如过表达 *hemA* 编码的谷氨酰-tRNA 还原酶，可提高 ALA 的合成，从而提升血红素产量^[37]；以甘氨酸和琥珀酸为碳源，组成性过表达 *ALAS* 与下游的血红素生物合成基因，可产生 $3.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 血红素^[38]；*hemB*、*hemC*、*hemD*、*hemE* 和 *coaA*（编码泛酸激酶）的过度表达增加了大肠杆菌中的血红素浓度^[39]；通过敲除 ALA 的转运蛋白如 *RhtA*、*EamA* 减少 ALA 外泌可提高胞内血红素的含量^[40, 41]；Zhao 等通过在 *E. coli* 中过表达 *C5* 与 PPD 途径、敲除可能的血红素降解酶的 *yfeX* 基因以及负责乳酸和醋酸形成途径的 *ldhA* 和 *pta* 基因、过表达血红素输出子等策略得到了 $115.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血红素产量^[42]；Zhang 等人在谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中将转录调节因子 *DtxR*、*C4* 与 CPD 血红素生物合成途径进行共表达，利用系统代谢工程减少血红素与细胞膜的结合从而提高血红素的产量至 $309.18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[43]。

尽管在血红素的合成方面已经取得了一些进展，但血红素生产仍然面临着重大挑战。例如，血红素生物合成途径的调节机制是复杂的，并且不是很清楚。基因的简单过度表达可能不会达到积极的效果^[44]。例如，当 *hemD* 的表达减少时，HMB 将自发转化为尿卟啉原 I，从而减少 UPGIII 的合成，进而减少血红素的合成；高水平的 *hemD* 和 *hemF* 表达导致 ALA 积累增加^[38, 45-47]。这些发现表明血红素合成途径的每个基因的表达水平需要进行适当的调控。

此外，针对血红素前体积累的研究均集中在 ALA，而在革兰氏阴性菌中，*TolC* 具有向胞外排出蛋白质、毒素、抗微生物剂的功能^[48]，有研究表明 *tolC* 缺失菌具有积累卟啉化合物的能力^[49]，因此，通过敲除 *tolC* 基因以积累卟啉，并同时强化血红素合成途径基因的表达理论上可提升血红素产量，但有关 *tolC* 缺失菌积累卟啉后向血红素的转

化未见报道；而常用工程菌如 *E. coli*、*C. glutamicum* 以 C5 途径生产血红素，之前的研究均采用过表达 C5 途径基因或共表达 C5 与 C4 途径基因，然而血红素对于 C5 途径基因有较强的反馈抑制、且需要多步反应，不利于调控。

1.3 以血红素为辅基的染料脱色过氧化物酶

1.3.1 DyPs 概述

过氧化物酶（Peroxidase, POD）作为氧化还原酶的一类，利用过氧化氢作为电子受体催化蒽醌类、偶氮类与酚类等多种底物的氧化，广泛存在于自然界的各类生物体中。绝大多数的过氧化物酶以血红素作为辅因子^[50]，并在重要的生物过程中发挥关键作用，如木质素的生物合成、降解和宿主防御机制^[51, 52]。

染料脱色过氧化物酶（Dye-decolorizing Peroxidases, DyPs）是血红素过氧化物酶家族的一员，最早由 Kim S J 等人从担子真菌 *Thanatephorus cucumeris* Dec1 中分离纯化，由于其对 18 种不同类型的染料具有脱色功能而被命名^[53, 54]。研究者们对于 DyPs 的酶学性质与结构特征的研究的不断深入表明，DyPs 是血红素过氧化物酶家族中区别于传统血红素过氧化物酶的新型家族，例如，DyPs 的二级结构中含有多个 α -螺旋和 β 折叠，但其他类型的血红素过氧化物酶则缺少 β 折叠^[55]。目前已经有多种 DyP 型过氧化物酶被发现并表征，这些过氧化物酶的分子量通常在 40-50 kDa，具有铁氧还蛋白样折叠，其活性依赖于非共价但紧密结合的血红素 b 辅因子^[56]。血红素 b 是最常见的血红素辅因子，存在于多种蛋白质中，如细胞色素 P450、血红蛋白和大多数过氧化物酶^[57, 58]。通过对各个 DyP 型过氧化物酶的基因序列比对其共性与特性，Kamiike T 等人将已发现的 DyPs 分为了 A、B、C、D 四个大类^[59, 60]。

由于 DyPs 能够对多种合成染料进行脱色降解^[61-63]，因此可对染料工业中的印染废水进行处理；DyPs 对于木质素也具有高效分解作用^[64]，因此 DyPs 也可用于处理农业废料等的处理；还有研究表明，由于哺乳动物中不存在 DyPs，因此 DyPs 还有望成为新型的抗微生物药物靶点^[65]。

产 DyPs 的微生物，尤其是真菌微生物，在产酶过程中的迟滞期较长，这意味着 DyPs 的生产成本较高，不适合大规模工业生产。目前，在工业酶的应用中，已经通过异源表达系统产生了大量未修饰或修饰的重组酶，以处理实际应用中的问题^[66]。与其他酶类似，DyPs 的高效表达需要选择合适的宿主细胞作为底盘细胞，并结合成熟的高密度发酵工艺。利用 *E. coli* 作为表达载体构建工程菌，DyP 产量从野生型的 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到了 $63 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[67]。目前已鉴定的能在 *E. coli* 中稳定表达的 DyP 基因主要来自 *Thermus thermophilus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*P. putida*、*B. subtilis*、*Chloromonospora*、*P. fluorescens* 与 *Rhodococcus* RHA1。这些重组表达的酶在染料和更复杂的木质素底物的降解中已有应用。为了获得更高效的产酶，作为最常用的蛋白质表达系统，重组 *E. coli* 表达系统优于其他表达系统^[68]。其中，*E. coli* BL21(DE3)及其衍生菌株被广泛用于重组

蛋白表达, 在生产 DyPs 方面, 已经实现了 *ZmDyP*、*BaDyP*、*AajDyP*、*eDyP* 和 *SvidDyP* 的表达, *E. coli* 表达系统将在实验研究和工业生产应用中发挥更大的作用^[54, 69, 70]。

在对 DyPs 进行异源表达时, 由于血红素的产量受到自身代谢产物的严格调控, 不能过量积累, 无法满足外源蛋白过表达后对于辅因子的大量需求。而对于血红蛋白的研究表明辅因子血红素的充足供应对于血红蛋白发挥生物功能必不可少^[71], 辅基水平的不足将导致酶活性较低^[72, 73]。因此, 在 DyPs 得到高效表达的同时, 血红素的充足供应显得尤为重要。朱竹兵等^[74]在培养基中添加氯高铁血红素、ALA、谷氨酸、 FeCl_2 , 发现均可提高来源于褐色嗜热放线菌 (*Thermobifida fusca*) 的 *TfuDyP* 的酶活性, ALA 添加量为 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时酶活性最大达到 $65 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$; 顾鹏帅等^[75]将 *TfuDyP* 与大肠杆菌 *hemA* 基因共表达, 使酶活性提高了 110%; 皮倩等通过增加内、外源 ALA 分别将来自 *Rhodococcus jostii* 的 *RhDyPB* 酶活力提升了 102%与 93%^[76]; Ramzi 等人^[77]共表达了来自 *Salmonella typhimurium* 的 *hemA^S* 和来自 *E. coli* 的 *hemL*, 并表达异源 DyP, 采用提升胞内 ALA 的水平 ($117.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的方式来提高 DyP 酶活力 ($66.7 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$)。

1.3.2 *TfuDyP* 概述

TfuDyP 来自嗜热放线菌, 由 430 个氨基酸组成, 质量为 46 kDa, 是细菌过氧化物酶超家族中的新成员, 并且是 *T. fusca* Tat 系统的第一个特征底物蛋白。

TfuDyP 在低 pH 下活性最高, 并对蒽醌染料显示高反应性, 对标准过氧化物酶底物、芳香硫化物和偶氮染料显示中等活性^[55, 78-80], 这表明 *TfuDyP* 可以接受广泛的底物, 因此是其他过氧化物酶的一种有希望的替代品, 例如 HRP, 因为这些过氧化物酶很难在例如 *E. coli* 中表达。

TfuDyP 在 60°C 下孵育 2 h 后丧失了 50% 的原始活性, 而在 30°C 和 40°C 下孵育 2 h 后仍保持活性, 这表明 *TfuDyP* 是一种热稳定过氧化物酶^[81]。

与其他异源表达的细菌 DyP 型过氧化物酶相比, *TfuDyP* 主要是以全酶的形式获得的^[82]。此外, *TfuDyP* 也是一个很好的全细胞生物转化候选者, 因为它被运输到大肠杆菌周质, 这增加了它的底物可获得性, 因为大多数底物能够进入周质, 而不是细胞质^[83]。

1.4 本研究立项依据与主要研究内容

1.4.1 本研究立项依据

以血红素为辅因子的染料脱色过氧化物酶 DyPs 可用于多种染料与木质素的降解, 在工业、农业与环保等方面具有应用潜力。在对 DyPs 进行异源表达时, 血红素的供应不足常使得 DyPs 酶活力较低, 因此在对 DyPs 进行高效表达的同时, 提升血红素产量对于 DyPs 酶活力的提升至关重要。

本研究旨在通过血红素代谢途径的调控, 减少血红素合成前体的外泌, 调控关键基因的表达水平, 解除血红素的反馈抑制, 提升血红素的产量, 并通过不同拷贝数的质粒

探究 *TfuDyP* 的最适表达水平，为以血红素作为辅因子的过氧化物酶的酶活力提升提供了策略。

1.4.2 主要研究内容

本文以 *E. coli* 血红素合成途径为研究对象，以 *E. coli* BL21(DE3)为出发菌，首先分别获取以 C5 或 C4 两条途径生产血红素的菌株，随后在两菌株中进行代谢调控，获取高产血红素菌株。在 C5 途径菌株中，通过防止前体底物外泌、调控关键基因表达与外源添加底物亚铁离子的策略提升血红素产量；在 C4 途径菌株中，通过导入异源基因解除血红素反馈抑制、共表达下游途径关键基因等策略提升血红素产量；并比较了 C5 与 C4 途径的血红素合成能力；最后，将 *TfuDyP* 导入血红素高产菌株，并优化表达水平，得到酶活力较高的重组菌株（图 1-5）。

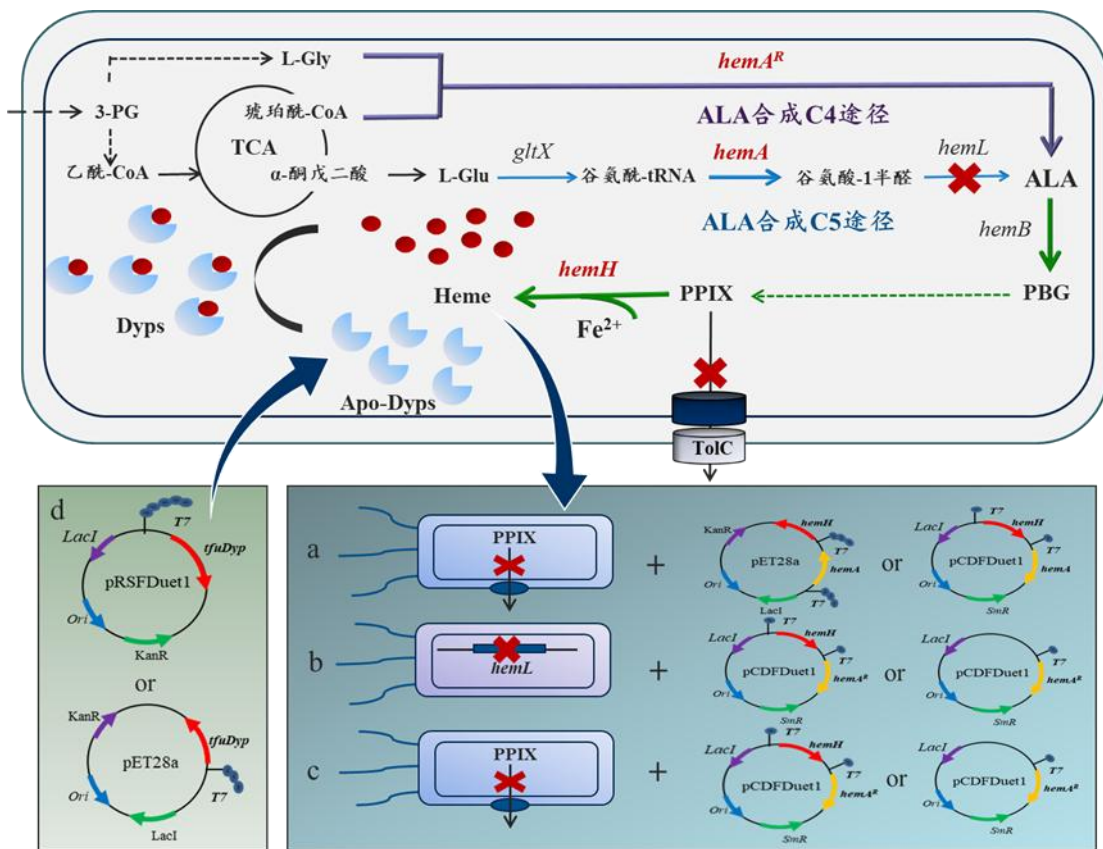


图 1-5 大肠杆菌血红素合成途径改造及 DyP 异源表达技术路线

Fig. 1-5 Technical route of transformation of heme synthesis pathway and DyP heterologous expression in *Escherichia coli*

蓝色：ALA 合成 C5 途径；紫色：ALA 合成 C4 途径；绿色：血红素合成下游途径；虚线：过程被省略；加粗：过表达；×：基因被敲除

a: C5 途径调控；b: C4 途径调控；c: C5+C4 途径调控；d: *TfuDyP* 异源表达

pRSFDuet1: 高拷贝质粒；pET28a: 中拷贝质粒；pCDFDuet1: 低拷贝质粒

本研究主要研究内容如下：

(1) *E. coli* 血红素 C5 途径的强化。以具有积累卟啉能力的 *tolC* 缺失菌 WT Δ T 为出发菌株，通过过表达血红素 C5 途径基因 *hemA* 进一步积累卟啉、共表达下游关键基因 *hemH* 将积累的卟啉转化为血红素与添加底物亚铁离子进一步促进卟啉的转化提升血红素产量。

(2) *E. coli* 血红素 C4 途径的构建。以 *E. coli* BL21(DE3)为出发菌株，通过敲除 *hemL* 基因阻断 C5 途径，随后导入来自类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 的 ALA 合酶 (*RspHemA*, *hemA^R*)，得到以 C4 途径合成血红素的重组大肠杆菌；分析了 C4 途径重组菌的生长状态、ALA 与血红素产量后，与血红素合成途径下游基因 *hemB* 与 *hemH* 进行共同过表达，用于进一步提升血红素产量；并比较了 C5 途径单独表达、C4 途径单独表达与两途径共同表达菌株的血红素产量。

(3) 血红素过氧化物酶的异源表达与酶活力分析。首先分别以高拷贝与中拷贝质粒为载体异源表达 *TfuDyP* 基因，随后与血红素合成途径基因共同表达，通过检测酶活力得到合适的 *TfuDyP* 表达载体，并导入上述(1)和(2)构建的菌株中；最后对重组菌 *TfuDyP* 进行蛋白纯化和光谱分析，探究提升血红素产量对于 *TfuDyP* 酶活力的影响。

第二章 材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 主要试剂

本研究中所使用的主要试剂列于表 2-1。

表 2-1 主要试剂

Table 2-1 Main experimental reagent

主要试剂	公司
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司
胰蛋白胨	国药集团化学试剂有限公司
酵母粉	国药集团化学试剂有限公司
琼脂条	国药集团化学试剂有限公司
葡萄糖	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	国药集团化学试剂有限公司
磷酸氢二钠	国药集团化学试剂有限公司
30%过氧化氢	国药集团化学试剂有限公司
十二烷基硫酸钠 (SDS)	国药集团化学试剂有限公司
高氯酸	国药集团化学试剂有限公司
对二甲基苯甲醛	国药集团化学试剂有限公司
无水乙酸钠	国药集团化学试剂有限公司
冰乙酸	国药集团化学试剂有限公司
乙酰丙酮	国药集团化学试剂有限公司
磷酸-5-吡哆醛 (PLP)	美国 Sigma 公司
琥珀酰辅酶 A	美国 Sigma 公司
二水合草酸	美国 Sigma 公司
氯高铁血红蛋白	美国 Sigma 公司
2,2-联氮-二 (3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 二铵盐 (ABTS)	美国 Sigma 公司
硫酸卡那霉素	生工生物 (上海) 股份有限公司
氨苄青霉素	生工生物 (上海) 股份有限公司
氯霉素	生工生物 (上海) 股份有限公司
硫酸链霉素	生工生物 (上海) 股份有限公司
L-阿拉伯糖	生工生物 (上海) 股份有限公司
异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)	生工生物 (上海) 股份有限公司
5-氨基乙酰丙酸盐盐酸盐	生工生物 (上海) 股份有限公司
丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 (29:1)	生工生物 (上海) 股份有限公司
过硫酸铵	生工生物 (上海) 股份有限公司
四甲基己二胺 (TEMED)	生工生物 (上海) 股份有限公司

基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 片段试剂盒、Primerstar Max DNA

polymerase、Premix Taq™、限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Xho* I、*EcoR* V、*Nde* I、*Not* I等均从宝生物工程（大连）有限公司购入，于南京诺唯赞生物科技有限公司购入一步克隆试剂盒 ClonExpress® MultiS One Step Cloning Kit。

2.1.2 主要仪器

本研究中所使用的主要仪器与设备列于表 2-2。

表 2-2 仪器与设备

Table 2-2 Main experimental apparatus in this study

主要仪器	公司
紫外-可见分光光度计	尤尼柯（上海）仪器有限公司
核酸电泳仪、蛋白电泳仪、PCR 仪、电转仪、 凝胶成像仪	美国 Bio-Rad 公司
双垂直电泳槽	北京市六一仪器厂
恒温水浴锅	兴城科技仪器有限公司
金属浴 MK-20	杭州奥盛仪器有限公司
pH 测量仪	梅特勒-托利多公司
MJ-150 恒温培养箱	上海光都仪器设备有限公司
高压灭菌锅	致微（厦门）仪器有限公司
HKL-A 组合摇床	太仓市强乐实验设备有限公司
数控超声波清洗仪	昆山市超声仪器有限公司
冰箱	青岛海尔特种电气有限公司
-80℃超低温冰箱	青岛海尔特种电气有限公司
冷冻高速离心机	德国 Eppendorf 公司
多功能酶标仪	美国伯腾仪器有限公司
超净工作台	苏州净化设备有限公司
超声破碎仪	南京舜玛设备有限公司
核酸定量仪	汉诺仪器有限公司
AKTA avant 25 蛋白纯化仪	美国 GE 公司

2.1.3 质粒与菌株

本研究中所使用的质粒与菌株列于表 2-3。

表 2-3 质粒与菌株

Table 2-3 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	描述	来源
菌株		
WT(<i>E. coli</i> BL21 (DE3))	表达宿主，出发菌株	实验室保藏
WTΔT	WT 敲除基因 <i>tolC</i>	[84]
WTΔL	WT 敲除基因 <i>hemL</i>	本研究
WTΔL/L	WTΔL 导入质粒 pEL	本研究
WTΔL/pEA	WTΔL 导入质粒 pEA	本研究
WTΔL/pCA ^R	WTΔL 导入质粒 pCA ^R	本研究
WTΔL/pCBA ^R	WTΔL 导入质粒 pCBA ^R	本研究
WTΔL/pCHA ^R	WTΔL 导入质粒 pCHA ^R	本研究
WT/pCA ^R	WT 导入质粒 pCA ^R	本研究
WT/pCHA ^R	WT 导入质粒 pCHA ^R	本研究
WTΔT /pEA	WTΔT 导入质粒 pEA	本研究
WTΔT /pEAH	WTΔT 导入质粒 pEAH	本研究
WTΔT /pCA	WTΔT 导入质粒 pCA	本研究
WTΔT /pCAH	WTΔT 导入质粒 pCAH	本研究
WTΔT/pCA ^R	WTΔT 导入质粒 pCA ^R	本研究
WTΔT/pCHA ^R	WTΔT 导入质粒 pCHA ^R	本研究
WT/pED	WT 导入质粒 pED	本研究
WT/pRD	WT 导入质粒 pRD	本研究
WTΔT/ pRD	WTΔT 导入质粒 pRD	本研究
WTΔT/ pED	WTΔT 导入质粒 pED	本研究
WTΔT/ pRAHD	WTΔT 导入质粒 pRAHD	本研究
WTΔL/pCA ^R -pED	WTΔL 导入质粒 pCA ^R 与质粒 pED	本研究
WTΔL/pCBA ^R -pED	WTΔL 导入质粒 pCBA ^R 与质粒 pED	本研究
WTΔL/pCHA ^R -pED	WTΔL 导入质粒 pCHA ^R 与质粒 pED	本研究
WTΔL/pCA ^R -pRD	WTΔL 导入质粒 pCA ^R 与质粒 pRD	本研究
WTΔL/pCBA ^R -pRD	WTΔL 导入质粒 pCBA ^R 与质粒 pRD	本研究
WTΔL/pCHA ^R -pRD	WTΔL 导入质粒 pCHA ^R 与质粒 pRD	本研究
WTΔT/pCA ^R -pED	WTΔT 导入质粒 pCA ^R 与质粒 pED	本研究
WTΔT/pCHA ^R -pED	WTΔT 导入质粒 pCHA ^R 与质粒 pED	本研究
质粒		
pKD4、pKD46、pCP20	Red 同源重组敲除质粒	实验室保藏
pEL	pET28a 连接基因 <i>hemL</i>	实验室保藏
pEA	pET28a 连接基因 <i>hemA</i>	实验室保藏
pEAH	pET28a 连接基因 <i>hemA</i> 与 <i>hemH</i>	实验室保藏
pCA ^R	pCDFDuet1 连接基因 <i>hemA^R</i>	本研究
pCBA ^R	pCDFDuet1 连接基因 <i>hemB</i> 与 <i>hemA^R</i>	本研究
pCHA ^R	pCDFDuet1 连接基因 <i>hemH</i> 与 <i>hemA^R</i>	本研究

续表 2-3

菌株/质粒	描述	来源
菌株		
pCA	pCDFDuet1 连接基因 <i>hemA</i>	本研究
pCAH	pCDFDuet1 连接基因 <i>hemA</i> 与 <i>hemH</i>	本研究
pED	pET28a 连接基因 <i>TfuDyP</i>	[75]
pRD	pRSFDuet1 连接基因 <i>TfuDyP</i>	实验室保藏
pRAHD	pRSFDuet1 连接基因 <i>TfuDyP</i> 、 <i>hemA</i> 、 <i>hemH</i>	本研究

2.1.4 培养基及溶液配制

本研究中所使用的培养基与常用溶液列于表 2-4。

表 2-4 培养基与溶液

Table 2-4 Media and solution formula

培养基/溶液	配方
LB 培养基	10 g·L ⁻¹ NaCl、10 g·L ⁻¹ 酵母粉和 5 g·L ⁻¹ 的胰蛋白胨（固体培养基加入 2%琼脂条），调 pH 至 7.0，121°C、20 min 灭菌
硫酸卡纳霉素	配置 50 mg·mL ⁻¹ 的母液，0.22 μm 滤膜过滤除菌，贮存于-20°C冰箱备用
氨苄青霉素	配置 100 mg·mL ⁻¹ 的母液，0.22 μm 滤膜过滤除菌，贮存于-20°C冰箱备用
氯霉素	配置 25 mg·mL ⁻¹ 的母液，0.22 μm 滤膜过滤除菌，贮存于-20°C冰箱备用
硫酸链霉素	配置 50 mg·mL ⁻¹ 的母液，0.22 μm 滤膜过滤除菌，贮存于-20°C冰箱备用
IPTG 溶液	配置 0.2 mol·L ⁻¹ 的母液，0.22 μm 滤膜过滤除菌，贮存于-20°C冰箱备用
磷酸缓冲液（PBS）	7.16 g Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, 3.12 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 溶于 1 L 去离子水中，调 pH 至 7.4
对-二甲基氨基苯甲醛（DMAB）显色剂	1.0 g 二甲氨基苯甲醛，5 mL 70%高氯酸，5 mL 水依次加到 30 mL 冰乙酸中，加冰乙酸定容到 50 mL
乙酸盐缓冲液	82.0 g 无水乙酸钠、57 mL 冰乙酸加入 700 mL 去离子水中，完全溶解后调 pH 至 4.6，定容至 1 L
醋酸缓冲液	1.64 g 醋酸钠溶于 1 L 水中，用冰乙酸调 pH 至 4.5
蛋白纯化上样缓冲液	1.36 g 咪唑，50 mL 甘油，11.41 g K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O，6.80 g KH ₂ PO ₄ ，29.25 g NaCl，加水定容至 1 L，调 pH 至 7.4，0.22 μm 滤膜抽滤备用
蛋白纯化洗脱缓冲液	34.04 g 咪唑，50 mL 甘油，11.41 g K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O，6.80 g KH ₂ PO ₄ ，29.25 g NaCl，加水定容至 1 L，调 pH 至 7.4，0.22 μm 滤膜抽滤备用

2.1.5 本研究所用引物

本研究中所使用的引物序列列于表 2-5。引物设计软件为 SnapGene，由生工生物（上

海)股份有限公司合成。

表 2-5 本研究所用引物

Table 2-5 Sequences of primers used in this study

引物名称	序列 (5'→3')
UhemLF	CTTACTCATGGAGGGTTCCTGATT
UhemLR	gaagcagetccagcctacacTAACGTGAGTGCGCCAGAAC
DhemLF	gctaattcccatgtcATCATCGGCGGTGGAATG
DhemLR	CTTCGCAAACACCCGACG
KF	ggcgcactcacgtaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KR	ccaccgccgatgatGACATGGGAATTAGCCATGGTCC
LF	GCACTCCACTGTTTATCGAAAAAGC
LR	ATTGATATCTTCCATGCTGTGCG
hemAF1	taagaaggagatatacatATGACCCTTTTAGCACTCG
hemAR	ggtttctttaccagactcgagCTACTCCAGCCCGAGGCTG
hemBF	accacagccaggatccATGACAGACTTAATCCAACGCCC
hemBR	taagcattatcgggccgcTAACGCAGAATCTTCTTCTCAGCC
hemHF	atcaccacagccaggatccATGCGTCAGACTAAAACCGG
hemHR1	taagcattatcgggccgcTTAGCGATACGCGGCAACAA
hemAF2	agtataagaaggagatatacatatgACCCTTTTAGCACTCG
hemHR2	ageggtttctttaccagactcgagTTAGCGATACGCGGCAACAAG
QhemAF1	ATGACCCTTTTAGCACTCGG
QhemBF	ATGACAGACTTAATCCAACGCCC
QhemHF	ATGCGTCAGACTAAAACCGG
QhemAF2	ATTATAACCTGGCGCTGGATAC
QtfuDF	ATGACCGAACCAGACACGG
QpRR	CATGTGCTGGCGTTCAAATT
QpER	GGATCGAGATCTCGATCCCG
QpCR2	TAGACGAGTCCATGTGCTGG
QpCR1	CGATTATGCGGCCGTGTAC

注：表中小写字母代表同源臂序列，下划线代表酶切位点序列

2.2 实验方法

2.2.1 分子生物学操作

2.2.1.1 基因组 DNA 的提取

选取平板中生长的 *E. coli* BL21(DE3)的单一菌落，在 LB 液体培养基中以 37℃、200 r·min⁻¹ 的条件培养 12 h 左右，收集适量菌体细胞，具体步骤参考 TaKaRa 基因组提取试剂盒说明书。

2.2.1.2 质粒 DNA 的提取

选取含目的基因质粒的菌株在 LB 液体培养基中过夜活化后转接至新鲜的 LB 液体

培养基中，以 37°C，200 r·min⁻¹ 的条件培养 12-16 h，参考 TaKaRa 质粒提取试剂盒说明书所示步骤提取相应质粒。

2.2.1.3 聚合酶链式 (Polymerase chain reaction, PCR) 反应

PCR 扩增反应体系 (50 μL) 如表 2-6 所示。其中 Primerstar Max DNA polymerase 用于扩增过表达基因片段，Premix Taq™ 用于菌落 PCR 验证。

表 2-6 PCR 扩增反应体系
Table 2-6 Reactive system of PCR

组分	体积 (μL)
模板	1
Primerstar Max DNA polymerase/ Premix Taq™	25
上游引物 (10 μmol·L ⁻¹)	2
下游引物 (10 μmol·L ⁻¹)	2
灭菌水	20

Premix Taq™ 反应条件：95°C、5 min 预变性，95°C、30 s 变性，T_m°C、30 s 退火，72°C、60 s·kb⁻¹ 延伸，30 个循环后 72°C 彻底延伸 5 min。

Primerstar Max DNA polymerase 反应条件：98°C、5 min 预变性，98°C、10 s 变性，T_m°C、5 s 退火，72°C、5 s·kb⁻¹ 延伸，30 个循环后 72°C 彻底延伸 5 min。

2.2.1.4 DNA 片段纯化回收

PCR 产物经核酸电泳验证条带正确后根据 TaKaRa 片段纯化试剂盒说明书进行纯化回收。

2.2.1.5 限制性酶切

将质粒按照表 2-7 体系在 37°C 酶切 30 min 左右。

表 2-7 酶切体系
Table 2-7 Enzyme digestion reactive system

组分	酶切体系 (10 μL)
质粒	1 μg
限制性内切酶 1	1 μL
限制性内切酶 2	1 μL
10×酶切缓冲体系	5 μL
灭菌水	补足至 10 μL

酶切产物进行凝胶核酸电泳检验纯度合格后进行纯化回收，然后使用核酸定量仪测定浓度，-20°C 保存备用。

2.2.1.6 DNA 片段连接

一步克隆连接：将纯化回收的线性载体与目的片段按照诺唯赞 ClonExpress® MultiS

One Step Cloning Kit 说明书进行连接。

重叠延伸 PCR 连接: 用于基因敲除打靶片段的获取, 首先根据目的片段设计三个片段的扩增引物(上游片段的下游引物、下游片段的上游引物及中间片段的两端引物需带有相应的同源臂), PCR 扩增三个片段并经核酸电泳检验后纯化回收, 测定核酸浓度, 按片段长度对各片段进行相应比例的稀释后作为模板进行第二次 PCR 即可获得打靶片段, 第二次 PCR 引物为上游片段的上游引物和下游片段的下游引物。

2.2.1.7 感受态细胞的制备

化学转化感受态细胞的制备: 根据 TaKaRa 公司 *E. coli* Competent Cell Preparation Kit 使用说明书操作。

电转化感受态细胞的制备: 将 30°C、200 r·min⁻¹ 摇床振荡培养过夜后的 WT/pKD46 菌株以 2% 接种量转接至 50 mL 含有 Amp 抗性的新鲜 LB 液体培养基, 30°C、200 r·min⁻¹ 摇床振荡培养至 OD₆₀₀ 至 0.2 左右时加入 30 mmol·L⁻¹ 的 L-阿拉伯糖进行诱导, 待 OD₆₀₀ 为 0.5-0.6 时停止培养。菌液于冰上预冷 30 min, 随后转移至提前预冷的 50 mL 灭菌离心管, 4°C、5000 ×g 离心 10 min 后弃上清, 用等体积预冷的灭菌水洗涤菌体两次, 4°C、5000 ×g 离心 10 min, 弃上清, 再用等体积预冷的 10% 甘油洗涤菌体后弃上清, 最后, 用 1 mL 10% 甘油重悬菌体, 分装至 1.5 mL 灭菌离心管中, 每管 100 μL, -80°C 保存备用。

2.2.1.8 *E. coli* BL21(DE3)的转化

化学转化步骤: 将制备好的感受态细胞于冰上融化, 将 2 μL 质粒或 10 μL 连接产物添加至 100 μL 感受态细胞, 轻轻混匀后冰浴 30 min, 随后于 42°C、90 s 条件下进行热激, 再冰浴 5 min, 之后加入 1 mL 的 LB 液体培养基, 37°C、200 r·min⁻¹ 复苏 1 h 或 30°C、200 r·min⁻¹ 复苏 2 h 左右; 取 100 μL 菌液涂布至含有相应抗性的 LB 固体培养基上, 37 或 30°C 过夜培养。

电转化步骤: 取 500 ng 左右的基因敲除打靶片段, 加入至 100 μL 的 WT/pKD46 感受态细胞中, 混匀后全部转移至预冷的电转杯中, 随后电击, 然后向电转杯中迅速加入 1 mL 的 LB 液体培养基, 将细胞重悬后转移至 1.5 mL 灭菌离心管中, 37°C、200 r·min⁻¹ 过夜复苏后室温 5000 ×g 离心 5 min, 将浓缩后的菌液均匀涂布至含有 Kan 抗性的 LB 固体培养基, 37°C 倒置培养。

2.2.2 缺失菌株的构建

2.2.2.1 敲除 *hemL* 基因打靶片段的获取

如图 2-1 所示, 以 NCBI 上公布的 *E. coli* BL21(DE3) 基因组序列为模板设计敲除 *hemL* 基因的上下游同源序列的上下游引物与鉴定引物。

引物 U*hem*LF/R 扩增出 *hemL* 基因上游同源序列 U*hem*L, 引物 D*hem*LF/R 扩增 *hemL* 下游同源序列 D*hem*L, 以 pKD4 质粒为模板设计带有 *hemL* 基因上下游同源序列同源臂的引物 KF/R, 扩增两端带有 FRT 位点的 Kan 抗性基因片段 *kan*。将三个片段纯化回收

后测定其浓度，进行适当稀释后作为模板，并以 UhemLF/DhemLR 为引物扩增出打靶片段 UKD。

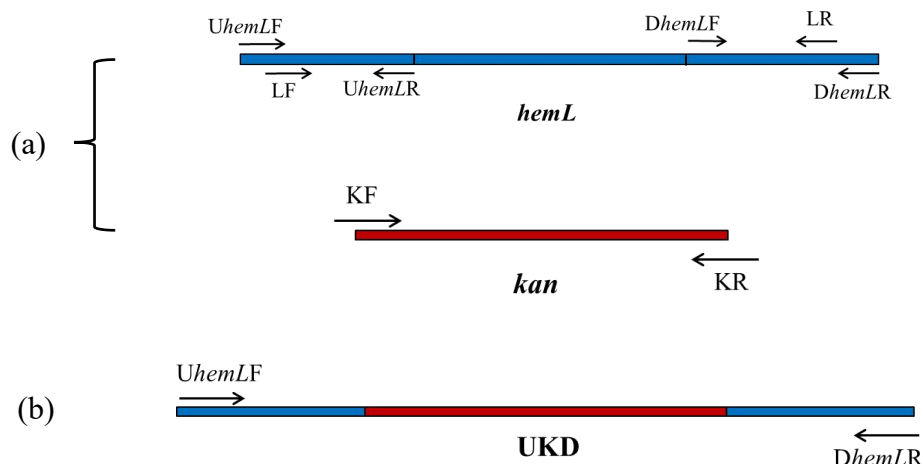


图 2-1 *hemL* 基因敲除打靶片段的扩增相关引物设计

Fig. 2-1 Partial primer design for knocking out *hemL* gene

2.2.2.2 *hemL* 基因缺失菌株构建

参考 Datsenko^[85]的方法对 *E. coli* 的 *hemL* 基因进行敲除，采用电转化的方式将打靶片段 UKD 转入 WT/pKD46，经 37°C、200 r·min⁻¹ 过夜复苏后涂布至 Kan 抗性平板，37°C 继续培养筛选阳性克隆。利用引物 LF/R 对转化子进行菌落 PCR 验证，验证条带大小正确后导入 pCP20 质粒，于 30°C、200 r·min⁻¹ 摇床振荡培养约 2 h 后涂布至氯霉素抗性平板，继续 30°C 培养，次日利用引物 LF/R 对转化子进行 PCR 验证，验证条带大小正确后送至上海生工测序，经测序验证正确后，通过 42°C 培养消除胞内质粒，得到无任何抗性的菌株。

2.2.3 过表达菌株的构建

以 NCBI 上公布的 *E. coli* BL21(DE3) 的全基因组序列为模板设计引物，通过 PCR 扩增出相应的基因片段，使用限制性内切酶将质粒线性化，参照诺唯赞一步克隆试剂盒说明书中的步骤连接载体与基因片段，将连接产物转入相应感受态细胞，在抗性平板上筛选阳性单克隆菌株进行菌落 PCR 并提取质粒进行酶切验证（根据质粒图谱设计鉴定引物进行菌落 PCR 验证）。

2.2.4 菌株发酵与检测方法

2.2.4.1 菌株生长曲线测定

各菌株在 37°C、200 r·min⁻¹ 过夜活化后，以 2% 接种量转接至 50 mL 的新鲜 LB 培养基培养基，继续于 37°C、200 r·min⁻¹ 摇床进行培养。带有质粒的菌株在培养基中加入相应抗生素，需要添加诱导剂的菌株，在培养至 OD₆₀₀ 为 0.6-0.8 时加入终浓度 0.2 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导，生长曲线根据 OD₆₀₀ 值与时间关系进行绘制，共测定 12 h，每

间隔 2 h 进行取样，各菌株均取 3 个平行样。

2.2.4.2 培养方法

各菌株在 37°C、200 r·min⁻¹ 过夜活化后，以 2% 接种量转接至 50 mL 的新鲜 LB 培养基，37°C、200 r·min⁻¹ 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.6-0.8 时加入终浓度 0.2 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 进行诱导，测定 ALA 与血红素时诱导 8 h 后终止培养，测定酶活力时诱导 10 h 后终止培养。

2.2.4.3 ALA 浓度检测

ALA 的检测参考 Mauzerall^[86] 的检测方法，以 5-氨基乙酰丙酸盐盐酸盐 (ALA-HCl) 作为标准样品，以去离子水作为空白标样，测定不同浓度的 ALA-HCl 在 554 nm 下的吸光值，绘制如图 2-2 所示的标准曲线，根据标准曲线即可计算样品中 ALA 的浓度。

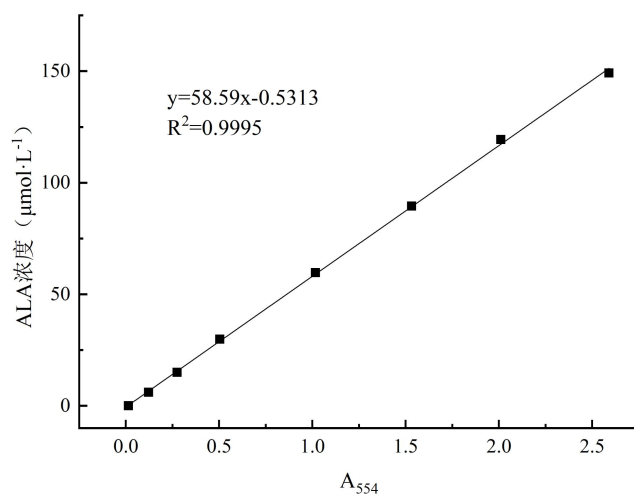


图 2-2 ALA 标准曲线

Fig. 2-2 Standard curve of 5-Aminolevulinic acid concentration

2.2.4.4 血红素浓度检测

参考陈丹园等^[87, 88]的方法检测血红素浓度。取 8·OD₆₀₀⁻¹ mL 菌体量（为了保持测定血红素时的菌体量一致，取了适量的发酵液体积 Vml，使得 V·OD₆₀₀=8；例如：如果 OD₆₀₀=0.4，就取 20 mL 菌液）于 4°C、12000 ×g 离心 5 min 后弃上清，10 mL 超纯水重悬后 4°C、12000 ×g 离心 5 min 后弃上清，每管加入 500 μL 的 20 mmol·L⁻¹ 草酸溶液重悬后转移至棕色离心管，4°C 冰箱放置 16 h 后加入 2 mol·L⁻¹ 草酸溶液，混匀后均分至棕色离心管，一份室温放置，另一份 95°C 水浴 30 min。冷却后于 4°C、12000 ×g 离心 5 min 后在激发波长 400 nm、发射波长 620 nm 下检测其荧光值。计算测定的荧光差值后由血红素标准曲线得到相应血红素浓度。

血红素标准曲线绘制方法为：称取一定量的氯高铁血红素溶解于 0.25% 的 Na₂CO₃ 作为血红素母液，将血红素母液稀释为不同浓度的血红素标准液后各取 50 μL 加入 500 μL 的 20 mmol·L⁻¹ 草酸溶液，后续操作与样品测定方法相同，计算测定的荧光差值后与

血红素浓度绘制为标准曲线，如图 2-3 所示。

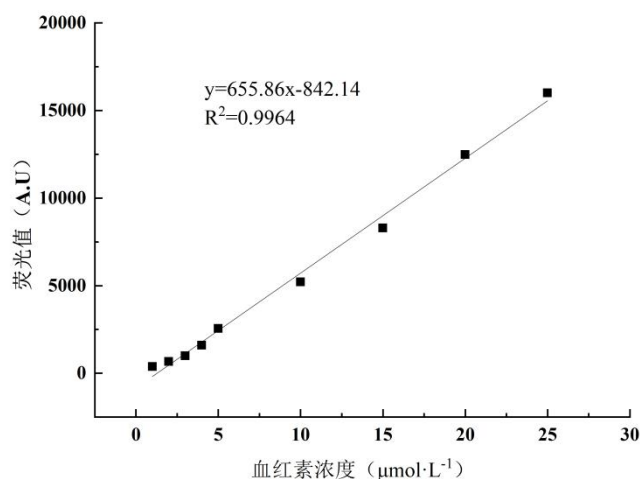


图 2-3 血红素标准曲线

Fig. 2-3 Standard curve of heme concentration

2.2.4.5 卟啉荧光检测

卟啉检测样品处理方法同 2.2.4.4，其中室温放置的样品用于卟啉的检测，在激发波长 400 nm、发射波长 620 nm 下的荧光值作为胞内卟啉的积累量。

2.2.5 血红素过氧化物酶的制备与检测

2.2.5.1 DyP 重组酶粗酶液制备

将诱导培养结束后的菌体以 $8000 \times g$ 离心 10 min 后弃上清，用 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 磷酸缓冲液 (pH 为 7.4) 重悬菌体。

将重悬后的菌体进行超声破碎，破碎条件为：功率 60%，工作 2 s，间歇 2 s，破碎时间为 20 min。破碎完成后于 4°C 、 $12000 \times g$ 离心 5 min，所得上清液即为 DyP 粗酶液， 4°C 冰箱保存备用。

2.2.5.2 SDS-PAGE 分析

取 $20 \mu\text{L}$ 制备好的待测蛋白样品与 $5 \mu\text{L}$ 的 $4\times\text{SDS-PAGE}$ Loading Buffer 混匀后，沸水浴 15 min，冷却至室温后 $12000 \times g$ 离心 1 min 待用。参照 SDS-PAGE 配制试剂盒进行分离胶 (12%) 与浓缩胶 (5%) 的配制，将制备好的蛋白胶插入电泳槽中，倒入配制好的电泳缓冲液，将适量处理好的蛋白样品加入蛋白胶孔中，设置好电压与运行时间后启动蛋白电泳仪。待程序运行结束后取出蛋白胶，染色 30 min 后取出，加入足够的蛋白胶脱色液过夜脱色。使用凝胶成像仪观测目的蛋白是否表达。

2.2.5.3 蛋白浓度测定

蛋白质浓度测定按照 TaKaRa Bradford Protein Assay Kit 说明书进行，蛋白质标准曲线如图 2-4 所示。参照蛋白质标准曲线，通过计算即可得到待测样品中的蛋白浓度。

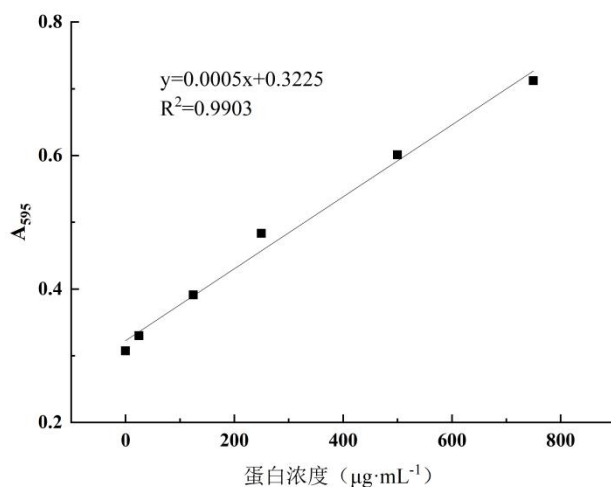


图 2-4 蛋白浓度标准曲线

Fig. 2-4 Standard curve of protein concentration

2.2.5.4 DyP 重组酶纯酶制备

采用亲和层析的方法对重组目标蛋白进行分离纯化，使用 5 mL HisTrap HP 镍柱，DyP 重组酶粗酶液经 0.22 μm 滤膜过滤后作为蛋白纯化样品，首先用含有终浓度为 20 mmol·L⁻¹ 咪唑的蛋白纯化上样缓冲液 (pH 7.4) 冲洗管路，平衡柱子后进行上样，用蛋白纯化上样缓冲液除去粗酶液中的大量杂蛋白，之后用含有终浓度为 500 mmol·L⁻¹ 咪唑的蛋白纯化洗脱缓冲液 (pH 7.4) 进行目标蛋白的洗脱，观察洗脱曲线，将对应洗脱峰的 EP 管置于冰上保存。对纯化得到的酶液进行 SDS-PAGE 分析，以检验其纯度。

2.2.5.5 DyP 重组酶酶活性检测

采用 ABTS 法检测 DyP 重组酶酶活，3 mL 反应体系如表 2-8 所示，H₂O₂ 最后加入启动反应，反应 30 s，随后立即加入 2% 的 SDS 终止反应，测定 420 nm 下的吸光度值 ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。酶活定义为：在 25°C、pH 4.5 的条件下，每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需要的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。比酶活 (U·mg⁻¹) 为酶活与蛋白浓度的比值。

表 2-8 DyP 酶活测定反应体系

Table 2-8 The reaction system of DyP enzyme activity determination

组分	终浓度 (mmol·L ⁻¹)	体积 (μL)
醋酸缓冲液 ABTS	20	1990
ABTS	0.2	600
MnCl ₂	0.4	100
酶液		10
H ₂ O ₂	0.2	300

2.2.6 ALA 合酶的制备与检测

粗酶液获取方法同 2.2.5.1，ALA 合成酶比活性的测定参考^[89, 90]进行，具体步骤

为：取 335 μL 粗酶液加入 165 μL 反应液（表 2-9），混匀。在 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床中反应 10 min 后加入 150 μL 的 10% 三氯乙酸，离心后取 300 μL 上清液装入离心管中，加入 400 μL 的乙酸盐缓冲液（pH 4.6）和 35 μL 的乙酰丙酮后沸水浴 15 min，待冷却至室温后加入等体积的 DMAB 显色剂。显色 30 min，测定 554 nm 下的吸光值，根据 ALA 标准曲线计算产物 ALA 的含量。

酶活定义为：37 $^{\circ}\text{C}$ 时，每分钟产生 1 nmol ALA 所需的 ALAS 酶量作为 1 个酶活力单位（U）。比酶活（ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ）为酶活与蛋白浓度的比值。

表 2-9 ALA 合成酶比活力测定的反应液组份

Table 2-9 Reaction component of measuring special activity of ALAS

储存液浓度	终浓度	所需体积（ μL ）
1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸	0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50
1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2	20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	10
1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 琥珀酰辅酶 A	0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	100
10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PLP	0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	5

第三章 结果与讨论

3.1 *E. coli* 血红素 C5 合成途径改造

3.1.1 C5 途径强化菌株的构建

已有报道指出, *tolC* 的缺失可在革兰氏阴性菌中积累卟啉^[49], 因此 *tolC* 缺失的 *E. coli* 理论上可用于血红素的高效生产, 本研究 C5 途径的强化即基于 *tolC* 缺失菌。

本课题组前期已经获得了 *tolC* 缺失菌 WTΔT, 为了保证出发菌株的正确, 首先以 BL21(DE3) 为模板, 在 *tolC* 基因上下游 700 bp 左右位置设计引物 QtolCF/R 对 WTΔT 进行菌落 PCR 鉴定, *tolC* 基因缺失菌株的菌落 PCR 所得条带理论大小应为 1503 bp, 而野生菌为 3022 bp, 图 3-1b 的结果显示 WTΔT 菌落 PCR 结果与理论值相符, 可用于下一步实验。随后提取实验室保存的 pEA、pEAH 质粒, 使用引物 hemAF/R、hemHF/R 分别对质粒 pEA 与 pEAH 上的 *hemA* 与 *hemH* 基因进行验证, 理论条带大小分别为 1257、963 bp, PCR 扩增产物的电泳条带在理论值附近, 表明质粒正确。将验证正确的质粒导入 WTΔT, 得到 WTΔT/pEA 与 WTΔT/pEAH 菌株, 使用鉴定引物 QhemAF1/Q28aR (图 3-1a) 进行菌落 PCR 和测序验证, 条带大小分别为 1276 与 2430 bp, 图 3-1b 结果显示菌株正确。

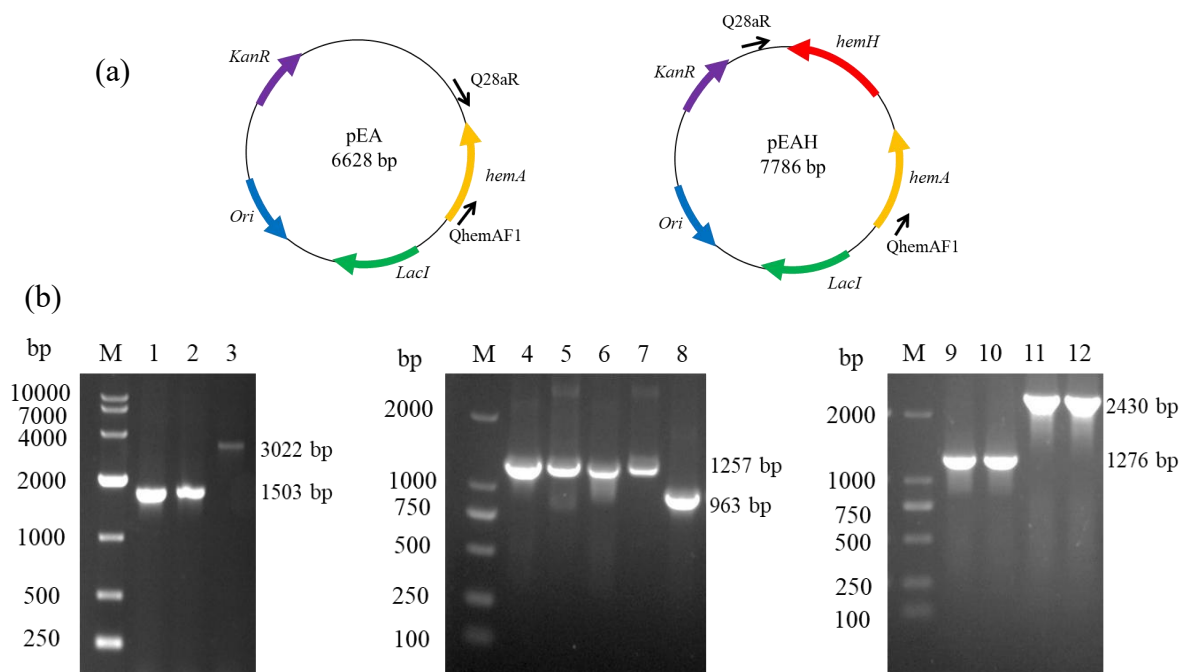


图 3-1 *tolC* 缺失与 *hemA*、*hemH* 过表达菌株与质粒的验证

Fig. 3-1 Verification of *tolC*-deleted and overexpressed of *hemA* and *hemH* strains and plasmids

a: pEA 与 pEAH 质粒图谱; b: 菌株与质粒验证

M: DNA marker; 1-3: *tolC* 基因敲除验证 (1、2 为敲除菌, 3 为野生菌); 4-7: *hemA* 基因验证; 8: *hemH* 基因验证; 9、10: WTΔT/pEA 菌落 PCR 验证; 11、12: WTΔT/pEAH 菌落 PCR 验证

分别使用限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I 对质粒 pCA^R 与 pCHA^R 进行双酶切，得到线性化载体 pCDFDuet1 与 pCH，以 *E. coli* 基因组为模板扩增得到带有同源臂与酶切位点的 *hemA* 基因，*hemA* 基因片段与线性化载体连接分别得到质粒 pCA 与 pCAH，将质粒 pCA 与 pCAH 分别导入 WTΔT，得到菌株 WTΔT/pCA 与 WTΔT/pCAH。提取 pCA 与 pCAH 质粒进行双酶切验证，*hemA* 基因片段长度为 1257 bp，载体长度分别为 3694 与 4653 bp；并以 QhemAF1/QpCR2 为引物分别对 WTΔT/pCA 与 WTΔT/pCAH 进行菌落 PCR 验证，理论条带大小为 1318 bp；以 QhemHF1/QpCR2 为引物对 WTΔT/pCAH 进行菌落 PCR 验证，理论条带大小为 2432 bp。结果如图 3-2 所示，酶切与菌落 PCR 条带大小均与理论值相符，表明菌株构建成功。

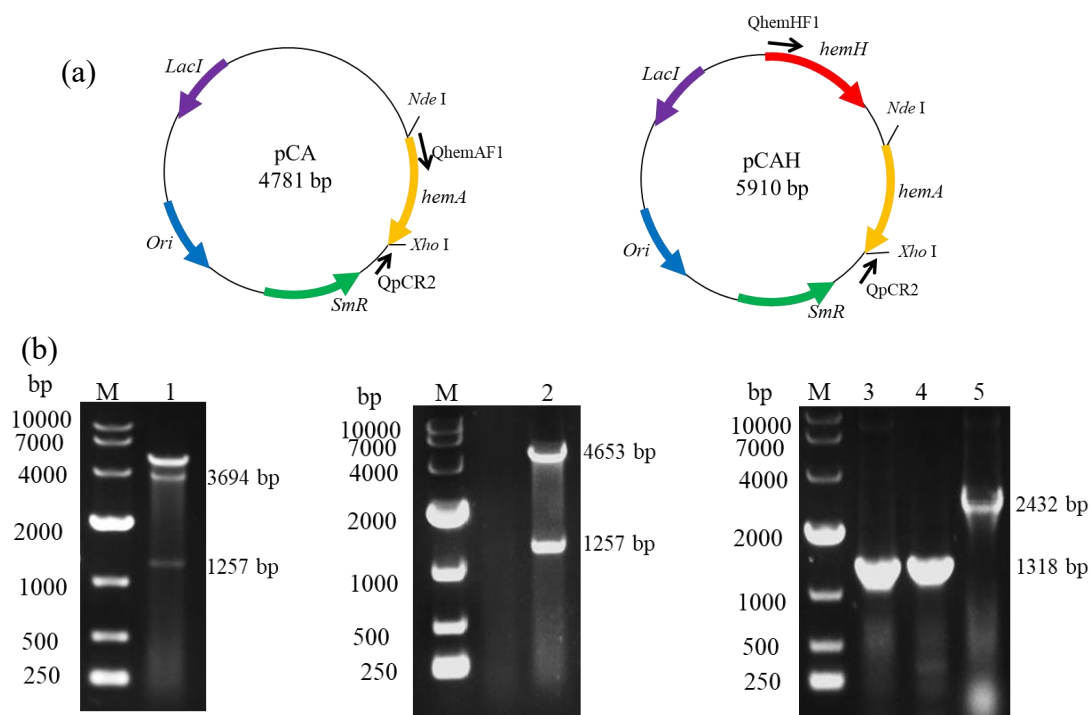


图 3-2 WTΔT/pCA 与 WTΔT/pCAH 菌株与质粒验证

Fig. 3-2 Verification of WTΔT/pCA 与 WTΔT/pCAH and overexpression plasmids

a: pCA 与 pCAH 质粒图谱; b: WTΔT/pCA 与 WTΔT/pCAH 菌株与质粒验证

M: DNA marker; 1: pCA 酶切验证; 2: pCAH 酶切验证; 3、4: WTΔT/pCA 与 WTΔT/pCAH 菌落 *hemA* 基因验证; 5: WTΔT/pCAH 菌落 *hemA+hemH* 基因验证

3.1.2 *tolC* 缺失及 *hemA* 与 *hemH* 过表达对 *E. coli* 生长的影响

为了检测 *tolC* 的缺失、*hemA* 单独过表达、*hemA* 与 *hemH* 共同过表达对 *E. coli* 生长的影响，每间隔 2 h 测定各菌株测定 OD₆₀₀，检测了各菌株 12 h 内的生长趋势（含有质粒的菌株在 OD₆₀₀ 约为 0.6-0.8 时加入 IPTG 进行诱导），并绘制成相应的生长曲线。

图 3-3 的结果显示 *tolC* 缺失的 *E. coli* 在前 4 h 的生长曲线与野生菌基本重合，在 4 h 后敲除菌的 OD₆₀₀ 略高于野生菌，表明 *tolC* 的缺失对于 *E. coli* 生长无不利影响；同样的，敲除菌中导入空载质粒 pET28a 对于 *E. coli* 的生长也无不利影响；相较于 WTΔT 与 WT

菌株，WT Δ T/pEA 菌株 OD₆₀₀ 有较明显提升，而 WT Δ T/pEAH 菌株 OD₆₀₀ 则有所下降。其原因可能是，*hemA* 单独过表达使得血红素产量增加，血红素在细胞内作为多种酶的辅因子^[5]（如呼吸链中的细胞色素 c），在生命活动中作用较大，因此 *hemA* 过表达有利于细胞生长；而由于胞内游离铁离子的缺乏，且 *hemH* 的共同过表达将耗费更多的能量，因此使得生长受到了一定的抑制。

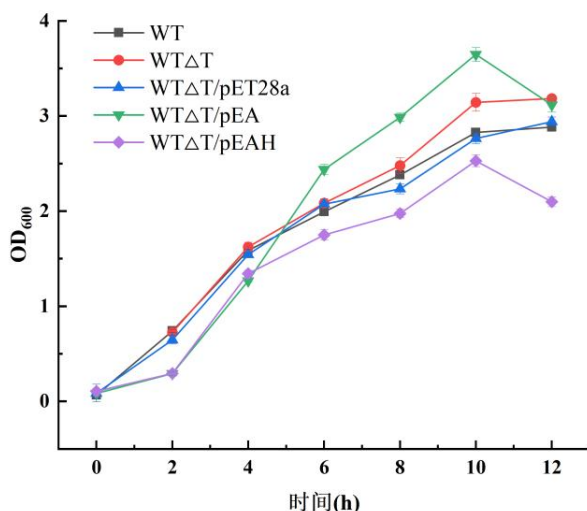


图 3-3 各菌株生长曲线

Fig. 3-3 Growth curve of each strain

3.1.3 过表达 *hemA* 对卟啉和血红素合成的影响

tolC 缺失菌可在胞内积累卟啉用于血红素的合成，之前的报道表明外源添加 ALA 可在 *tolC* 缺失大肠杆菌中积累大量卟啉^[91]，但外源添加是不经济的，因此过表达 *hemA* 基因用于增加内源 ALA，进而积累卟啉并转化为血红素。通过比较分别使用中拷贝与低拷贝质粒强化 C5 途径的菌株 WT/pEA 与 WT/pCA 血红素浓度，探究不同拷贝数质粒强化 C5 途径表达对于大肠杆菌血红素浓度的影响。

相较于野生菌，WT Δ T 菌株的胞内卟啉增加了 64%，而血红素产量略有下降，为 $8.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ；WT Δ T/pEA 菌株胞内卟啉大幅增加，血红素产量为 WT 菌株的 2.62 倍，达到 $26.47 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 而 WT Δ T/pCA 菌株的卟啉与血红素含量也有提升，但低于 WT Δ T/pEA 菌株（图 3-4），表明 *hemA* 基因更适合使用中拷贝质粒进行过表达。以上结果表明 *hemA* 的过表达大幅提升了胞内卟啉与血红素产量，这与之前的报道一致^[91, 92]。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/125100334003011114>