

产丁醇大肠杆菌工程菌的构建*

The Construction of Recombinant *Escherichia coli* Producing Butanol

林丽华^{1,2}, 郭媛¹, 裴建新¹, 庞浩^{1,2}, 黄日波^{1,2**}

LIN Li-hua^{1,2}, GUO Yuan¹, PEI Jian-xin¹, PANG Hao^{1,2}, HUANG Ri-bo^{1,2}

(1. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004)

(1. Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Life Science & Technology of Guangxi University)

摘要:【目的】为了在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中导入改良的丁醇合成途径,使非生产菌株大肠杆菌具备产丁醇的能力。【方法】克隆大肠杆菌乙酰转移酶基因 *atoB* 和丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)丁醇合成途径关键酶基因(*crt*, *hbd*, *adhE*),构建多顺反子表达质粒 pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt*-*hbd*;克隆齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)反式烯酰辅酶A还原酶基因 *ter*,构建表达质粒 pSTV29-*ter*,并将双质粒导入到大肠杆菌。【结果】构建的工程菌能半厌氧发酵产微量丁醇,产量为 0.08g/L。【结论】大肠杆菌中的丁醇合成途径导入成功,构建了产丁醇的大肠杆菌工程菌。

关键词:正丁醇 大肠杆菌 丙酮丁醇梭菌 齿垢密螺旋体 半厌氧发酵

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2014)01-0042-05

Abstract:【Objective】A modified 1-butanol pathway was constructed in non-native producer *Escherichia coli* to produce butanol. 【Method】By cloning the acetyltransferase gene from *E. coli*, and the key butanol synthetic pathway genes *crt*, *hbd* and *adhE* from *Clostridium acetobutylicum*, the polycistron expression plasmid pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt*-*hbd* was constructed; by cloning the trans-2-enoyl-CoA reductase gene *ter* from *Treponema denticola*, the expression plasmid pSTV29-*ter* was constructed. 【Result】The recombinant *E. coli* containing the double plasmids was fermented in micro-aerobic and the maximal concentration of butanol was 0.08g/L at 24h. 【Conclusion】The butanol synthetic pathway was expressed in *E. coli* and the recombinant strain of producing butanol was constructed successfully.

Key words: 1-butanol, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Treponema denticola*, micro-aerobic fermentation

收稿日期:2013-08-05

修回日期:2013-08-26

作者简介:林丽华(1984-),女,助理研究员,主要从事微生物学研究。

* 广西科技合作与交流计划项目(桂科合 1347004-1),广西科技攻关项目(桂科攻 10123007-3),广西科学院基本科研业务费项目(12YJ25SW05,13YJ22SW02),国家自然科学基金(21366007)资助。

** 通讯作者:黄日波(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事微生物生物技术及酶工程研究。E-mail:rbhuang@163.com。

【研究意义】丁醇是一种重要的化工原料和新型的生物燃料,国内外市场对丁醇的需求量逐年上升。由于石油价格的上涨与不可再生性,生物法生产丁醇受到了人们的广泛关注^[1]。丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)在很早以前就被用于丁醇的生产,通过其厌氧发酵,可将合适的碳水化合物转化为丙酮、丁醇和乙醇等溶剂(ABE发酵)^[2,3]。【前人研究进展】目前对梭菌合成及代谢网

络已研究得比较清晰,人们多利用基因工程手段影响梭菌体内丁醇合成代谢途径,改变合成代谢相关基因的表达模式^[4]。【本研究切入点】梭菌的生理代谢过程复杂、遗传操作也很困难,其基因工程菌的构建发展缓慢,通过构建其它耐受菌株表达系统,如大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达系统^[5]表达梭菌丁醇合成基因越来越引起人们的关注。大肠杆菌遗传背景清楚,基因操作简单,菌体生长速率较快,是被广泛应用的工业微生物,采用其作为发酵菌种,可以避免很多 ABE 发酵过程遇到的障碍,有利于优化调控^[6]。【拟解决的关键问题】利用本实验室筛选得到的丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*, gxa18-1)为模板,克隆其丁醇合成相关基因并导入大肠杆菌,成功构建产丁醇的大肠杆菌工程菌,导入的代谢途径及具体基因见图 1,其中反-2-烯酰 CoA 还原酶 *ter* 基因来源于齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*) ATCC35405^[7]。

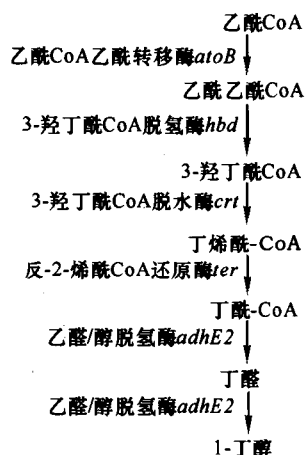


图 1 导入的产正丁醇代谢途径及相关表达基因

Fig. 1 The new pathway for 1-butanol production in *E. coli* and the relative expressed genes

Note: 乙酰 CoA, acetyl-CoA; 乙酰乙酰 CoA, acetoacetyl-CoA; 3-羟丁酰 CoA, 3-hydroxybutyryl-CoA; 丁烯酰-CoA, crotonyl-CoA; 丁酰-CoA, butyryl-CoA; 丁醛, butyraldehyde; 1-丁醇, 1-butanol; *atoB*, acetyl-CoA acetyltransferase; *hbd*, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; *crt*, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase; *ter*, trans-2-enoyl-CoA reductase; *adhE2*, aldehyde/alcohol dehydrogenase.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

丙酮丁醇梭菌 gxa18-1 为本实验室筛选获得。大肠杆菌 BW25113Δ *adh* Δ *ldh* 为本实验室构建。

齿垢密螺旋体 ATCC35405 购自美国典型培养物保藏中心。质粒 pSTV29 购自宝生物公司。

1.1.2 酶和试剂

PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒为上海生物工程有限公司的产品;限制性内切酶 *Bsp*HI、*Xma*I、*Bam*HI、*xho*I、*Hind*III,小牛肠碱性去磷酸化酶及 T4 DNA 连接酶为 MBI Fermentas 产品;异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自 Calbiochem 公司;酵母提取物和胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品;其它试剂为国产分析纯。

1.1.3 培养基和培养条件

大肠杆菌培养和转化子筛选采用 LB 培养基,发酵采用 TB 培养基(TB+2% glucose+4mL glycerol/L)^[8],培养条件为 37℃、250r/min。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 报道的基因序列设计 PCR 反应引物(表 1,下划线部分为酶切位点,引物 *adhE*-*Xma*I、*crt*-*Bam*HI、*hbd*-*SOE* 上均加有 SD 序列,*crt* 与 *hbd* 分别扩增后,再通过重叠延伸 PCR 法(SOE-PCR)连接成 *crt*-*hbd* 片段)。

1.2.2 分子生物学操作

基因组 DNA 的提取与质粒转化参考文献[9]进行操作;DNA 酶切、去磷酸化、连接参照产品说明进行。

丁醇合成相关基因的扩增:以大肠杆菌的总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增 *atoB*;以丙酮丁醇梭菌的总 DNA 为模板,进行 PCR 分别扩增 *adhE2*、*crt*、*hbd*,再以 *crt*、*hbd* 为模板进行 SOE-PCR 扩增 *crt*-*hbd*;以齿垢密螺旋体的总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增 *ter*。

相关基因的 PCR 扩增的反应条件:94℃ 2min, 94℃ 30s, 54℃ t_1 min, 72℃ t_2 min, 30 个循环;72℃ 10min。引物的退火时间 t_1 和延伸时间 t_2 分别是 60.9℃、70s, 50℃、2.5min, 58℃、50s, 58℃、50s, 60℃、70s。*crt*-*hbd* 片段的 SOE-PCR 条件是:先各加 1μL *crt*、*hbd* 扩增产物做模板,94℃ 2min, 94℃ 30s, 50℃ 1min, 72℃ 1min, 5 个循环, 72℃ 10min;再加入上下游引物 *crt*-*Bam*HI 和 *hbd*-*xho*I, 94℃ 2min, 94℃ 30s, 58℃ 1min, 72℃ 1.6min, 18 个循环, 72℃ 10min。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

表 1 PCR 反应引物

Table 1 PCR Primers

引物 Primer	序列 Sequence	来源 Source
<i>atoB</i> - <i>Bsp</i> H I	CCCGG TCATGAAAAATTGTGTCATCGT	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
<i>atoB</i> - <i>Xma</i> I	CCC CCCGGGTTAATTCAACCGTTCAATCA	
<i>adhE</i> - <i>Xma</i> I	CCC CCCGGGAGGAAACAGACCATGAAAGTTACAAATCAAAAAGAA	丙酮丁醇梭菌 <i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>adhE</i> - <i>Bam</i> H I	CG GGATCCTTAAAATGATTTTATATAGATA	
<i>crt</i> - <i>Bam</i> H I	CG GGATCCAGGAAACAGACCATGGAACATAACAATGTTCAT	丙酮丁醇梭菌 <i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>crt</i> -SOE	TTTTTCATGGTCTGTTTCCTTCTAGACTATCTATTTTTGAAGCCTTCAATTTTTTC	
<i>hbd</i> -SOE	AAAAATAGATAGTCTAGAAGGAAACAGACCATGAAAAAGGTATGTGTTATAGGTGCA	丙酮丁醇梭菌 <i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>hbd</i> - <i>xho</i> I	CCG CTCGAGTTATTTTTGAATAATCGTAGAAACCTTTTCCT	
<i>ter</i> - <i>Hind</i> III	CCC AAGCTTGATGATTGTAAAACCAATGGTTAGGAACA	齿垢密螺旋体 <i>Treponema denticola</i>
<i>ter</i> - <i>Bam</i> H I	CG GGATCCTTAAAATCCTGTGCAACCTTTCTACCTCG	

表达载体的构建:如图 2 所示,构建表达载体 pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt*-*hbd* 和 pSTV29-*ter*。分别逐步构建 pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt*-*hbd* 的多顺反子系统:先将 *Bsp*H I、*Xma* I 双酶切的 *atoB* 片段, *Xma* I、*Bam*H I 双酶切的 *adhE* 片段与用 *Nco* I (与 *Bsp*H I 为同尾酶)、*Bam*H I 双酶切的 pSE380 进行三片段连接,构建表达质粒 pSE380-*atoB*-*adhE*。再将 *Bam*H I、*xho* I 双酶切的 *crt*-*hbd* 片段与经同样双酶切的质粒 pSTV29-*atoB*-*adhE* 进行连接,构建

表达质粒 pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt*-*hbd*。将 *Bam*H I、*Hind*III 酶切的 *ter* 片段与经同样双酶切的质粒 pSTV29 进行连接,构建表达载体 pSTV29-*ter*。

1.2.3 工程菌发酵

将过夜培养的种子液按 1% 接种量接种至三角瓶,37℃、250r/min 培养,待长至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6 时加入终浓度 0.1mmol 的 IPTG 诱导,转移至兰盖瓶,在 30℃、250r/min 半厌氧发酵 24 h。

1.2.4 产物测定

测定仪器是 Agilent6890 气相色谱仪。色谱条件:phenomen ZB-WAXplus 色谱柱;FID(225℃) 检测器;进样口压力为 8.0psi;柱箱温度为 40℃;氢气流量为 30mL/min;进样量 0.5μL。正丁醇出峰时间为 10.41min。内标为正丙醇,出峰时间为 8.70min。

2 结果与分析

2.1 丁醇合成相关基因的扩增产物检测

用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测相关 PCR 产物,分别在 1.2kb、2.5kb、1.6kb、1.2kb 附近有特异的单一 DNA 条带(图 3),均与目的基因片段大小一致,即 *atoB*、*adhE*、*crt*-*hbd*、*ter*。

2.2 表达载体的鉴定

提取质粒 pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt*-*hbd* 和 pSTV29-*ter*,分别进行单酶切验证,琼脂糖凝胶电泳检测发现大小正确,分别约为 9.5kb 和 4.2kb(图

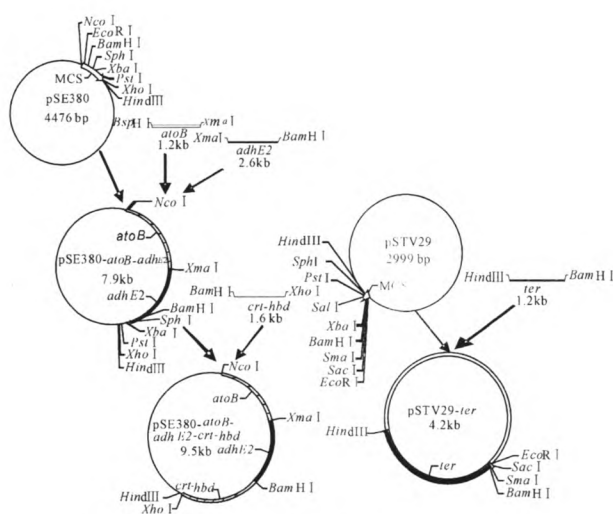


图 2 表达载体 pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt*-*hbd* 和 pSTV29-*ter* 的构建

Fig. 2 Construction of the expression vector pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt*-*hbd* and pSTV29-*ter*

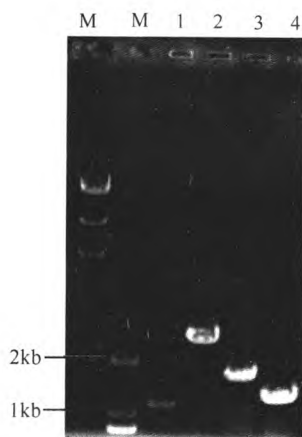


图3 PCR产物

Fig.3 PCR product

M;DNA marker;1: *atoB* 的 PCR 产物条带 (1.2kb);2: *adhE2* 的 PCR 产物条带(2.5kb);3: *crt-hbd* 的 PCR 产物条带(1.6kb);4: *ter* 的 PCR 产物条带(1.2kb)。

M;DNA marker;1;Fragment of *atoB* (1.2kb);2;Fragment of *adhE2* (2.5kb);3;Fragment of *crt-hbd* (1.6kb);4;Fragment of *ter* (1.2kb)。

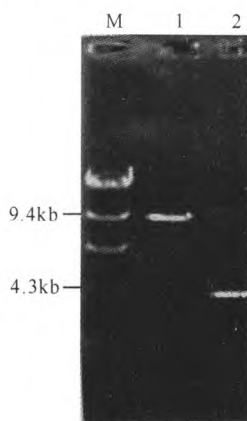


图4 表达载体 pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt-hbd* 和 pSTV29-*ter* 的酶切验证

Fig.4 Expression vectors digested by restriction endonuclease

M;DNA marker λ Hind III;1:pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt-hbd* 单酶切片 (9.5kb);2: pSTV29-*ter* 单酶切片 (4.2kb)。

M;DNA marker λ Hind III;1:pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt-hbd* digested by restriction endonuclease (9.5kb);2:pSTV29-*ter* digested by restriction endonuclease (4.2kb)。

4),最后测定序列,测序结果与预期一致,表明成功构建表达载体。

2.3 工程菌产物测定

将含表达质粒 pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt-hbd* 和 pSTV29-*ter* 的大肠杆菌菌株的发酵液离心,取上清测定高效气相色谱,在正丁醇出峰时间 10.415min 处有产物峰出现(图 5,8.703min 处为正丙醇标样),表明大肠杆菌工程菌能发酵产正丁醇,产量为 0.08g/L。

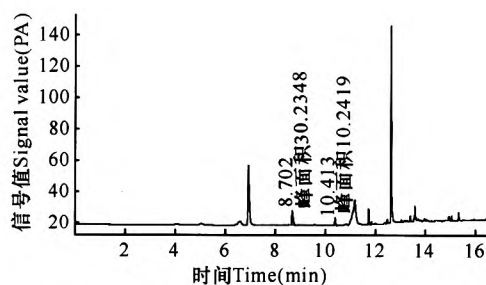


图5 工程菌发酵产物的高效气相色谱

Fig.5 HPLC analysis of fermentation product for recombinant *E.coli* BW25113 containing pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt-hbd* and pSTV29-*ter*

3 结束语

本研究克隆大肠杆菌乙酰转移酶基因 *atoB*、丙酮丁醇梭菌丁醇合成途径关键酶基因 *crt*、*hbd*、*adhE*, 构建了表达质粒 pSE380-*atoB*-*adhE*-*crt-hbd*;克隆齿垢密螺旋体反式烯酰辅酶 A 还原酶基因 *ter*, 构建了表达质粒 pSTV29-*ter*, 并将双质粒转化到大肠杆菌。构建的大肠杆菌工程菌中导入了改良的丁醇合成途径,能半厌氧发酵产微量丁醇,产量为 0.08g/L。

目前已有相关研究在大肠杆菌中成功导入丁醇合成途径^[6,8,10]、用于丁醇生物合成,上述菌株发酵后都能够获得微量的丁醇,证明由非天然生产宿主生产丁醇是可行的。异源丁醇合成也存在许多困难,例如相关酶蛋白基因的合理选择、基因的有效表达、代谢中间产物的平衡以及完全敲除竞争性途径等,将来仍然需要合成生物学、代谢工程、蛋白质工程等手段来提高丁醇的产物浓度^[2]。另外由于丁醇代谢途径的关键酶遇氧失活,在好氧条件下不产丁醇,而在厌氧和微好氧发酵条件下大肠杆菌生长速率缓慢,这严重影响产物的生成。下一步工作计划可对现有工程菌进行发酵过程优化;通过代谢工程,敲除大肠杆菌副产物代谢途径相关基因,使碳源更多流向丁醇代谢途径,进一步提高丁醇产量。

参考文献:

- [1] Ni Y, Sun Z H. Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 83(3): 415-423.
- [2] 顾阳, 蒋宇, 吴辉, 等. 生物丁醇制造技术现状和展望[J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 914-923.
Gu Y, Jiang Y, Wu H, et al. Current status and prospects of biobutanol manufacturing technology [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(7): 914-923.
- [3] 米慧芝, 杨登峰, 关妮, 等. 丙酮丁醇梭菌发酵糖蜜生产

- 丁醇的发酵条件优化[J]. 广西科学, 2011, 18(3): 278-282, 288.
- Mi H Z, Yang D F, Guan N, et al. Butanol yield from-sugarcane molasses by *Clostridium acetobutylicum* and optimization of its fermentation condition[J]. Guangxi Sciences, 2011, 18(3): 278-282, 288.
- [4] 杨明, 刘力强, 牛昆, 等. 丙酮丁醇发酵菌的分子遗传改造[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(10): 109-114.
Yang M, Liu L Q, Niu K, et al. Genetic features and modification of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii* for acetone butanol and ethanol fermentation[J]. China Biotechnology, 2009, 29(10): 109-114.
- [5] Bond-Watts B B, Bellerose R J, Chang M C Y. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways[J]. Nature Chemical Biology, 2011, 7: 222-227.
- [6] 张艳, 周鹏鹏, 王丕祥, 等. 丁醇合成途径关键酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 588-593.
Zhang Y, Zhou P P, Wang P X, et al. Cloning and expression of key genes of butanol synthetic pathway in *Escherichia coli* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(5): 588-593.
- [7] Shen C R, Lan E I, Dekishima Y, et al. Driving forces enable high-titer anaerobic 1-butanol synthesis in *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(9): 2905-2915.
- [8] Atsumi S, Cann A F, Connor M R, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production [J]. Metab Eng, 2008, 10(6): 305-311.
- [9] 曼尼阿蒂斯 T, 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 译. 第 2 版. 北京: 中国科学出版社, 2002.
Maniatis T, Sambrook J, Fritsch E F. Molecular cloning a laboratory manual [M]. Jin D Y, translated. 2nd edition. Beijing, China Science Press, 2002.
- [10] Inui M, Suda M, Kimura S, et al. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 77(6): 1305-1316.

(责任编辑: 陈小玲)

广西主要发明专利指标全面增长

新闻时间: 2014-1-9

广西壮族自治区科技厅 6 日介绍, 第二十三届广西科技活动周将于 1 月 9 日至 15 日举办, 主题为“创新驱动发展, 科技引领未来”。届时将全面展示科技自主创新、科学发展的成效、成果, 宣传科学知识, 弘扬科技是第一生产力的精神。

广西科技厅副厅长刘建宏在当天的新闻通气会上介绍, 过去的一年, 广西科技工作在产业自主创新取得新成就; 国家级科技创新平台和基地实现新突破; 成功承办首届中国-东盟技术转移与创新合作大会; 专利质押融资首次突破亿元大关; 全区首批院士工作站启动建设等方面取得突出成就。

据了解, 2013 年 1 月至 10 月, 广西主要发明专利指标全面增长, 申请量和授权量增长率、发明专利申请比重、每万人口发明专利拥有量增长率均全国第 2 位。

刘建宏表示, 为充分发挥科技在实现富民强桂新跨越、与全国同步实现小康目标中的重要支撑作用, 必须大力夯实科技基础条件, 有效集聚创新资源, 加快广西创新体系建设, 增强企业自主创新能力, 突破产业关键共性技术制约, 优化配置科技资源, 营造良好的创新环境, 全面推进科技进步与自主创新。

据悉, 本届科技活动周将安排广西科学技术奖励大会暨第二十三届广西科技活动周开幕式、广西新技术新产品交流交易会、科技专题活动、科普活动 4 大板块内容。

(摘自中国新闻网)