

基于模块化优化策略强化大肠杆菌合成血红素

翁焕娇^{1,2}, 丁雯雯^{1,2}, 石雅南^{1,2}, 李江华^{*1,2}, 康振^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 血红素是一种参与生物体内的氧分子传递的含铁辅基,也是一种良好的补血剂。目前有关血红素合成途径的研究较少,其调控机理尚不清楚。采用模块化组装策略,将 ALA 合成关键基因 *hemA*、*hemL* 分为第一模块,用高拷贝质粒 pUC19 过量表达;将血红素合成途径的 7 个基因分成第二、第三模块,其中,基因 *hemB*、*hemC*、*hemD* 和 *hemE* 为第二模块;基因 *hemF*、*hemG* 和 *hemH* 为第三模块,利用拷贝数不同的质粒 pRSFDuet-2、pCDFDuet-2 和 pACYCDuet-2 调控第二、第三模块中各基因的表达水平,对这 2 个模块进行组合表达。其中重组菌株 *Escherichia coli*-D6 在摇瓶发酵 48 h 时血红素产量最高,达到 0.56 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{OD})$;在 3 L 发酵罐中进行分批培养,发酵 48 h 时血红素产量达到 0.954 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{OD})$ 。

关键词: 血红素;5-氨基乙酰丙酸;模块化组合;代谢流量

中图分类号:Q 815 文章编号:1673-1689(2019)06-0086-09 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.012

Enhancement of Heme Synthesis Pathway in *Escherichia coli* via a Modular Optimization Strategy

WENG Huanjiao^{1,2}, DING Wenwen^{1,2}, SHI Yanan^{1,2}, LI Jianghua^{*1,2}, KANG Zhen^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Heme, an iron containing prosthetic group for oxygen transfer in the body, is a good kind of blood tonic. At present, only few studies on heme biosynthesis have been reported. The regulatory mechanism of heme biosynthesis is still unclear. In the present study, by applying the modular combination strategy, the committed genes *hemA* and *hemL* as the first module was overexpressed by the high copy number plasmid pUC19. In parallel, the downstream heme biosynthesis pathway genes were divided into the second (*hemB*, *hemC*, *hemD* and *hemE*) and third (*hemF*, *hemG*, and *hemH*) modules, and were combinatorially expressed by the plasmids pRSFDuet-2, pCDFDuet-2 and pACYCDuet-2. In comparison, the recombinant strain *E. coli* D6 achieved the highest heme titer

收稿日期: 2016-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670092);江苏省自然科学基金项目(BK20141107);江苏省科技支撑计划项目(BE2014607);教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT_15R26)。

* 通信作者: 李江华(1966—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事酶技术、发酵过程优化与控制等方面的研究。

E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

引用本文: 翁焕娇,丁雯雯,石雅南,等. 基于模块化优化策略强化大肠杆菌合成血红素[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(06):86-94.

(0.56 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{OD})$) at 48 h in shake flask cultures. By applying a batch fermentation strategy, the heme production was increased to 0.954 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{OD})$ at 48 h in 3 L fermenter.

Keywords: heme, 5-aminolevulinic acid, modular combination, metabolic fluxes

血红素是一种存在于生物体内的含铁卟啉衍生物,由原卟啉与1个二价铁原子构成^[1]。其核心是亚铁离子,具有携氧能力,是有氧呼吸及厌氧呼吸电子传递链蛋白质的重要组分,参与生物细胞中的多种氧化代谢,包括氧气运输、氧化应激反应和依赖于电子传递的氧化磷酸化等;除此之外,它还参与其他双原子气体的合成,例如一氧化碳和一氧化氮^[2-3]。作为一个调节因子,血红素通过在转录水平、翻译水平、蛋白质靶定、蛋白质稳定性和分化等方面介导基因的表达^[4-12]。目前,血红素不仅在食品行业常被用于着色剂,如肠类制品;在医学临床上也广泛的使用,如作为半合成胆红素原料,生产抗肝功能亢进、抗炎作用和抗肿瘤作用的重要药物等。此外,血红素也是良好的补血剂,亚铁血红素可直接被人体吸收,吸收率高达10%~20%^[13-16]。

包括血红素在内的卟啉类化合物的合成可以通过化学合成,但是由于它们结构复杂,合成过程中反应步骤繁琐,得率比较低,使得卟啉类化合物价格昂贵^[17]。为此,微生物成为生产结构复杂的卟啉类化合物的最佳选择。随着基因工程技术的成熟,选择大肠杆菌作为宿主大量合成血红素具有广阔的前景^[1,18]。

在生物体内,血红素的合成需要经过多步酶促反应,且途径中涉及到的酶大部分都是高度保守的^[2]。5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, ALA)是合成血红素的关键前体物质^[19]。如图1(a)所示,两分子ALA在依赖于 Zn^{2+} 的ALA脱水酶(HemB,由基因 $hemB$ 编码)催化下缩合生成胆色素原,然后4分子胆色素原在羟甲基胆素合成酶(HemC,由基因 $hemC$ 编码)的作用下进一步缩合生成不稳定的羟甲基胆素,接着在尿卟啉原Ⅲ合成酶(HemD,由基因 $hemD$ 编码)的环化作用下生成含有四吡咯环的尿卟啉原Ⅲ,再经过尿卟啉原Ⅲ脱羧酶(HemE,由基因 $hemE$ 编码)的作用,将尿卟啉原Ⅲ的4个侧链脱羧形成甲基,生成粪卟啉原Ⅲ;粪卟啉原Ⅲ在粪卟啉原Ⅲ氧化酶(HemF,由基因 $hemF$ 编码)的催化作用生成原卟啉原Ⅸ,同时释放 H_2O_2 和 CO_2 。

在原卟啉原氧化酶(HemG,由基因 $hemG$ 编码)催化下去除原卟啉原Ⅸ的6个氢原子生成原卟啉Ⅸ。最后亚铁螯合酶(HemH,由基因 $hemH$ 编码)通过原卟啉Ⅸ的内部螯合铁离子形成血红素,从而完成整个血红素合成途径。

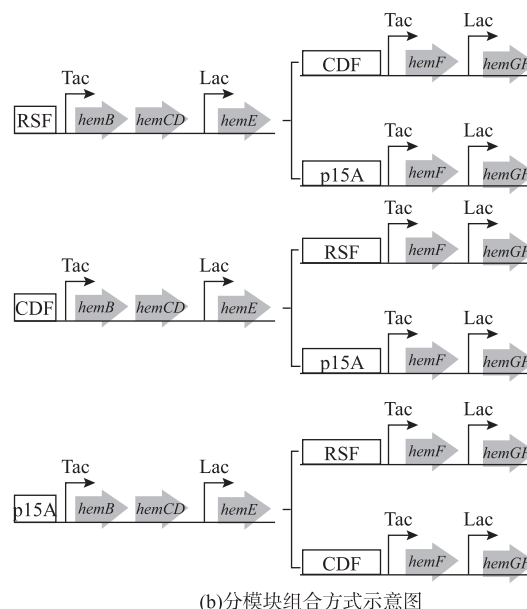
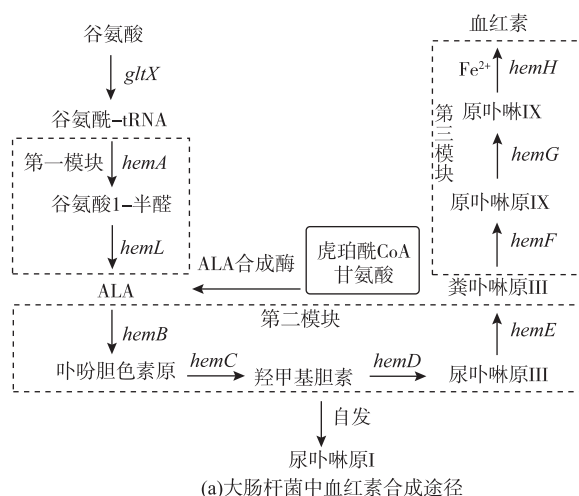


图1 大肠杆菌中血红素合成途径及途径基因分模块组合方式示意图

Fig. 1 Heme biosynthesis pathway in *E. coli* and the modular assembling ways of genes

在大肠杆菌中,ALA 的合成受血红素的严格反馈调控^[20]。张俊丽等发现,过量表达血红素合成途径基因 *hemD*、*hemF* 有利于 ALA 的积累^[21]。Kwon 等成功在大肠杆菌中表达来源于类球红细菌的 *hemA* 基因,合成血红素^[22]。此外,通过异源表达泛酸途径的 *coaA* 基因和卟啉合成途径的 *hemB*、*hemC*、*hemD*、*hemE* 基因,也可获得高产血红素的菌株,但是这个产量对于工业生产来讲,还是较低^[23]。因此,进一步对血红素合成途径进行改造,提高血红素产量是十分必要的。

微生物代谢网络往往复杂且多变,通过引入模块化组合策略能很好地解决代谢途径中代谢流量的平衡问题,提高产量和转化率^[24]。由于血红素合成途径调控机理复杂,受多方面因素影响^[25-26]。为了进一步促进血红素的积累,本研究将 ALA C5 合成途径关键酶基因 *hemL* 和 *hemA* 划分为第一模块,用高拷贝质粒 pUC19 过量表达,同时将来源于大肠杆菌血红素生物合成途径的基因 *hemB*、*hemC*、*hemD*、

hemE、*hemF*、*hemG*、*hemH* 分为第二、第三模块,其中基因 *hemB*、*hemC*、*hemD*、*hemE* 为第二模块,基因 *hemF*、*hemG*、*hemH* 为第三模块,利用拷贝数不同的质粒改变第二、第三模块中基因的表达强度,对这 2 个模块的基因组合表达,得到的重组菌株 *E. coli* -D1、*E. coli* -D2、*E. coli* -D3、*E. coli* -D4、*E. coli* -D5、*E. coli* -D6、*E. coli* -D7,在 250 mL 的摇瓶发酵 48 h 时,其血红素产量分别为 0.08、0.09、0.25、0.35、0.44、0.56、0.46 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{OD})$ 。将摇瓶水平上血红素产量最高的重组菌株 *E. coli*-D6 在 3 L 发酵罐中进行放大培养,48 h 时产量达到 0.954 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{OD})$ 。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株 *E. coli* JM109,用于重组质粒的构建;*E. coli* DH5 α ,作为宿主细胞,用于重组质粒的表达。相关质粒和菌株见表 1。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株	特征	来源
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi-1 Δ (lac-proAB)/F' [traD36 proAB+lacIq E. coli lacZΔM15]</i>	本实验室
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F' φ80 dlacZ ΔM15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk⁻,mk⁺) phoA supE44Δ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	本实验室
<i>E. coli</i> -D1	<i>E. coli</i> DH5 α 含有质粒 pUC19- <i>hemA</i> ⁺ - <i>hemL</i>	本研究
<i>E. coli</i> -D2	<i>E. coli</i> DH5 α 含有质粒 pUC19- <i>hemA</i> ⁺ - <i>hemL</i> 、pRSFDuet-2- <i>hemB</i> - <i>hemC</i> - <i>hemD</i> - <i>hemE</i> 和 pCDFDuet-2- <i>hemF</i> - <i>hemG</i> - <i>hemH</i>	本研究
<i>E. coli</i> -D3	<i>E. coli</i> DH5 α 含有质粒 pUC19- <i>hemA</i> ⁺ - <i>hemL</i> 、pRSFDuet-2- <i>hemB</i> - <i>hemC</i> - <i>hemD</i> - <i>hemE</i> 和 pACYCDuet-2- <i>hemF</i> - <i>hemG</i> - <i>hemH</i>	本研究
<i>E. coli</i> -D4	<i>E. coli</i> DH5 α 含有质粒 pUC19- <i>hemA</i> ⁺ - <i>hemL</i> 、pCDFDuet-2- <i>hemB</i> - <i>hemC</i> - <i>hemD</i> - <i>hemE</i> 和 pRSFDuet-2- <i>hemF</i> - <i>hemG</i> - <i>hemH</i>	本研究
<i>E. coli</i> -D5	<i>E. coli</i> DH5 α 含有质粒 pUC19- <i>hemA</i> ⁺ - <i>hemL</i> 、pCDFDuet-2- <i>hemB</i> - <i>hemC</i> - <i>hemD</i> - <i>hemE</i> 和 pACYCDuet-2- <i>hemF</i> - <i>hemG</i> - <i>hemH</i>	本研究
<i>E. coli</i> -D6	<i>E. coli</i> DH5 α 含有质粒 pUC19- <i>hemA</i> ⁺ - <i>hemL</i> 、pACYCDuet-2- <i>hemB</i> - <i>hemC</i> - <i>hemD</i> - <i>hemE</i> 和 pRSFDuet-2- <i>hemF</i> - <i>hemG</i> - <i>hemH</i>	本研究
<i>E. coli</i> -D7	<i>E. coli</i> DH5 α 含有质粒 pUC19- <i>hemA</i> ⁺ - <i>hemL</i> 、pACYCDuet-2- <i>hemB</i> - <i>hemC</i> - <i>hemD</i> - <i>hemE</i> 和 pCDFDuet-2- <i>hemF</i> - <i>hemG</i> - <i>hemH</i>	本研究
质粒		
pUC19- <i>hemA</i> ⁺ - <i>hemL</i>	pUC19 含有基因 <i>hemA</i> ⁺ 和 <i>hemL</i>	本实验室
pRSFDuet-2	pRSFDuet-1 衍生体,含有 tac 启动子和 lac 启动子,RSF 复制子,Kn ^R	本实验室
pCDFDuet-2	pCDFDuet-1 衍生体,含有 tac 启动子和 lac 启动子,CloDF13 复制子,Sm ^R	本实验室
pACYCDuet-2	pACYCDuet-1 衍生体,含有 tac 启动子和 lac 启动子,P15A 复制子,Cm ^R	本实验室
pRSFDuet-2- <i>hemB</i> - <i>hemC</i> - <i>hemD</i> - <i>hemE</i>	pRSFDuet-2 含有基因 <i>hemB</i> 、 <i>hemC</i> 、 <i>hemD</i> 和 <i>hemE</i>	本研究
pCDFDuet-2- <i>hemB</i> - <i>hemC</i> - <i>hemD</i> - <i>hemE</i>	pCDFDuet-2 含有基因 <i>hemB</i> 、 <i>hemC</i> 、 <i>hemD</i> 和 <i>hemE</i>	本研究
pACYCDuet-2- <i>hemB</i> - <i>hemC</i> - <i>hemD</i> - <i>hemE</i>	pACYCDuet-2 含有基因 <i>hemB</i> 、 <i>hemC</i> 、 <i>hemD</i> 和 <i>hemE</i>	本研究
pRSFDuet-2- <i>hemF</i> - <i>hemG</i> - <i>hemH</i>	pRSFDuet-2 含有基因 <i>hemF</i> 、 <i>hemG</i> 和 <i>hemH</i>	本研究
pCDFDuet-2- <i>hemF</i> - <i>hemG</i> - <i>hemH</i>	pCDFDuet-2 含有基因 <i>hemF</i> 、 <i>hemG</i> 和 <i>hemH</i>	本研究
pACYCDuet-2- <i>hemF</i> - <i>hemG</i> - <i>hemH</i>	pACYCDuet-2 含有基因 <i>hemF</i> 、 <i>hemG</i> 和 <i>hemH</i>	本研究

1.1.2 主要试剂和工具酶 质粒小量提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、抗生素包括氨苄青霉素、硫酸卡那霉素、氯霉素和链霉素等、IPTG 等,均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;胶回收试剂盒和各种限制性内切酶等,购自 Thermo 公司;Primer Star Max DNA 聚合酶、DNA 连接酶、感受态细胞制备试剂盒,购于宝生物工程(大连)有限公司;5-氨基乙酰丙酸和胆色素原,购于 Sigma-Aldrich 公司;胰蛋白胨、酵母提取物,购于 Oxoid 公司;其他化学试剂,均购于上海国药集团,纯度为分析纯。

1.1.3 培养基 LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,氯化钠 10,酵母粉 5.0,pH 7.0;装液量 8 mL/dL;

发酵培养基 (g/L): (NH₄)₂SO₄ 15, KH₂PO₄ 5.0,

Na₂HPO₄·12H₂O 15, MgSO₄·7H₂O 1.0, 酵母提取物 1.0, 葡萄糖 20; pH 7.0, 装液量 30 mL/250 mL。

分批发酵培养基 (g/L): (NH₄)₂SO₄ 15, KH₂PO₄ 5.0, Na₂HPO₄·12H₂O 15, MgSO₄·7H₂O 1.0, 酵母提取物 1.0, 葡萄糖 35; pH 7.0, 装液量 1.5 L/3 L。

固体培养基是在此基础上添加 2.0 g/L 琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 血红素合成途径 2 个模块的相关表达载体构建 以 *E. coli* DH5α 基因组为模板分别扩增 *hemB*、*hemC*、*hemD*、*hemE*、*hemF*、*hemG*、*hemH* 基因, 然后以融合 PCR 将 *hemC* 和 *hemD* 片段融合为 *hemC-hemD*, 将 *hemG* 和 *hemH* 片段融合为 *hemG-hemH*。引物表 2 所示。

表 2 引物

Table 2 Primers used in this study

基因	引物
<i>hemB</i>	F1: AATACGGATCCAAGGAGGAAAATATATGACAGACTTAATC
	R1: AATACGAGCTCTTAACGCAGAATCTTCTCTCAGC
<i>hemC</i>	F2: AAATACTGCAGAAGGAGGAAAATATATGTTAGACAATG
	R2: ACTCATATATTTTCCTCCTTTCATGCCGGGGCGTCTCC
<i>hemD</i>	F3: ACGGAGACGCCCCGGCATGAAAGGAGGAAAATATATGAGTATCCTTG
	R3: CGTAGAAGCTTTTATTGTAATGCCCGTAAAAGC
<i>hemE</i>	F4: TCGATCATATGAAGGAGGAAAATATATGACCGAAC
	R4: TCGATCTCGAGTTAGCGGTGATACTGTTTCAGACAG
<i>hemF</i>	F5: AATACGGATCCAAGGAGGAAAATATATGAAACCCGAC
	R5: GCATCAAGCTTTTACACCCAATCCCTGACCTTAATAAAC
<i>hemG</i>	F6: TCGATCATATGAAGGAGGAAAATATGTGAAAACATTAATTCTTTCTCAAC
	R6: ACGCATATATTTTCCTCCTTTTATTTTCAGCGTCGGTTTG
<i>hemH</i>	F7: ACAAAACCGACGCTGAAATAAAAGGAGGAAAATATATGCCGTCAGAC
	R7: TCGATCTCGAGTTAGCGATACGCCGCAACAAG

注:下划线部分为限制性内切酶识别位点

利用酶切位点 *Pst* I 和 *Hind* III 将片段 *hemC-hemD* 分别与表达载体 pRSFDuet-2、pCDFDuet-2、pACYCDuet-2 连接, 获得重组载体 pRSFDuet-2-*hemC-hemD*、pCDFDuet-2-*hemC-hemD*、pACYCDuet-2-*hemC-hemD*。通过 *Bam*H I 和 *Sac* I 将片段 *hemB* 分别与载体 pRSFDuet-2-*hemC-hemD*、pCDFDuet-2-*hemC-hemD*、pACYCDuet-2-*hemC-hemD* 连接, 得到重组载体 pRSFDuet-2-*hemB-hemC-hemD*、pCDFDuet-2-*hemB-hemC-hemD*、pACYCDuet-2-*hemB-hemC-hemD*。将扩增得到的 *hemE* 片段通过酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I 分别连接到 pRSFDuet-2-

hemB-hemC-hemD、pCDFDuet-2-*hemB-hemC-hemD*、pACYCDuet-2-*hemB-hemC-hemD* 中, 得到重组质粒 pRSFDuet-2-*hemB-hemC-hemD-hemE*、pCDFDuet-2-*hemB-hemC-hemD-hemE*、pACYCDuet-2-*hemB-hemC-hemD-hemE*。

利用酶切位点 *Bam*H I 和 *Hind* III 将从大肠杆菌基因组扩增得到的片段 *hemF* 分别与表达载体 pRSFDuet-2、pCDFDuet-2、pACYCDuet-2 连接, 获得重组载体 pRSFDuet-2-*hemF*、pCDFDuet-2-*hemF*、pACYCDuet-2-*hemF*。通过 *Nde* I 和 *Xho* I 将片段 *hemG-hemH* 分别与载体 pRSFDuet-2-*hemF*、

pCDFDuet-2-*hemF*, pACYCDuet-2-*hemF* 连接, 得到重组载体 pRSFDuet-2-*hemF*-*hemG*-*hemH*、pCDFDuet-2-*hemF*-*hemG*-*hemH*、pACYCDuet-2-*hemF*-*hemG*-*hemH*。

1.2.2 大肠杆菌合成血红素相关重组工程菌株的构建 将本实验室保藏的质粒 pUC19-*hemA*-*hemL* 转化菌株 *E. coli* DH5 α , 得到重组菌株 *E. coli* DH5 α :pUC19-*hemA*-*hemL*。将大肠杆菌血红素合成途径两个模块的相关重组质粒两两组合, 转化菌株 *E. coli* DH5 α :pUC19-*hemA*-*hemL*, 得到重组工程菌株 *E. coli* -D1、*E. coli* -D2、*E. coli* -D3、*E. coli* -D4、*E. coli* -D5、*E. coli* -D6、*E. coli* -D7:

E. coli -D1:pUC19-*hemA*-*hemL*;

E. coli -D2:pUC19-*hemA*-*hemL*+pRSFDuet-2-*hemB*-*hemC*-*hemD*-*hemE*+pCDFDuet-2-*hemF*-*hemG*-*hemH*;

E. coli -D3:pUC19-*hemA*-*hemL*+pRSFDuet-2-*hemB*-*hemC*-*hemD*-*hemE*+pACYCDuet-2-*hemF*-*hemG*-*hemH*;

E. coli -D4:pUC19-*hemA*-*hemL*+pCDFDuet-2-*hemB*-*hemC*-*hemD*-*hemE*+pRSFDuet-2-*hemF*-*hemG*-*hemH*;

E. coli -D5:pUC19-*hemA*-*hemL*+pCDFDuet-2-*hemB*-*hemC*-*hemD*-*hemE*+pACYCDuet-2-*hemF*-*hemG*-*hemH*;

E. coli -D6:pUC19-*hemA*-*hemL*+pACYCDuet-2-*hemB*-*hemC*-*hemD*-*hemE*+pRSFDuet-2-*hemF*-*hemG*-*hemH*;

E. coli -D7:pUC19-*hemA*-*hemL*+pACYCDuet-2-*hemB*-*hemC*-*hemD*-*hemE*+pCDFDuet-2-*hemF*-*hemG*-*hemH*。

1.2.3 菌株培养条件

1) 摇瓶培养。挑取在斜面培养基中培养的重组菌株 *E. coli* -D1、*E. coli* -D2、*E. coli* -D3、*E. coli* -D4、*E. coli* -D5、*E. coli* -D6、*E. coli* -D7, 接种于 LB 培养基, 37 °C 过夜培养约 12 h 后, 以体积分数 1% 接种量转接发酵培养基中发酵, 0 h 时添加 0.1 mmol/L IPTG 诱导基因表达以及对应的抗生素, 氨苄青霉素 (100 μ g/mL)、卡那霉素 (50 μ g/mL)、链霉素 (50 μ g/mL)、氯霉素 (34 μ g/mL), 37 °C, 220 r/min 培养, 4 h 时添加 100 μ mol/L 的 FeSO₄, 周期 48 h。

2) 分批培养。挑选已在平板上活化的重组菌株

E. coli -D6, 接种于 LB 培养基, 37 °C 过夜培养约 12 h 后, 以体积分数 2% 接种量转接到装有 1.5 L 发酵培养基的 3 L 发酵罐中培养, 0 h 时添加 0.1 mmol/L IPTG 诱导基因表达以及对应的抗生素, 氨苄青霉素 (100 μ g/mL)、卡那霉素 (50 μ g/mL)、氯霉素 (34 μ g/mL), 37 °C, 400 r/min 培养, 4 h 时添加 100 μ mol/L 的 FeSO₄, 通过流加 4 mol/L 的 NaOH 将发酵液的 pH 控制在 6.5 左右, 发酵周期 48 h。

1.2.4 分析方法

1) OD₆₀₀ 测定。取适量发酵液于 EP 管中, 12 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 用等体积去离子水重悬菌体; 重悬液经适当稀释后, 以去离子水为空白对照, 在紫外分光光度计 600 nm 波长下, 测定细胞浓度。

2) 葡萄糖质量浓度测定。取适量发酵液于 EP 管中, 12 000 r/min 离心 3 min, 以适当的倍数稀释发酵液上清液, 用 SBA-40C 生物传感分析仪 (山东省科学院) 检测葡萄糖质量浓度。

3) ALA 质量浓度测定。ALA 质量浓度测定采用 Mauzerall 和 Granick 的分光光度法^[27]: 取适量发酵液于 EP 管中, 12 000 r/min 离心 3 min, 以适当的倍数稀释发酵液上清液。取稀释液 300 μ L, 分别加入 400 μ L 的乙酸钠缓冲液 (称取 82 g 无水乙酸钠, 加入 57 mL 冰醋酸, 并用去离子水定容至 1 L) 和 35 μ L 的乙酰丙酮, 混合均匀后煮沸反应 10 min。冷却至室温, 再加入 Modified Ehrlich's reagent 试剂 (称取 1 g 对二甲氨基苯甲醛, 加入体积分数 70% 高氯酸 8 mL, 并用冰醋酸定容至 50 mL) 反应 10 min, 在紫外分光光度计 556 nm 波长下, 测定吸光值, 然后根据不同浓度的 ALA 标准样品在 556 nm 波长下的吸光值计算出样品 ALA 的质量浓度。

4) 胆色素原质量浓度测定^[27]。取等 OD 发酵液于 EP 管中, 4 °C, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 用 0.25 mol/L 的磷酸氢二钠缓冲液 (称取 6.703 g 磷酸氢二钠, 溶于 100 mL 去离子水中, 并用 0.25 mol/L 的柠檬酸溶液调节 pH 至 6.65) 清洗 2 次菌体后重悬菌体, 并使用超声破碎仪破碎细胞; 将细胞裂解液在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 5 min, 取裂解液上清液 500 μ L, 加入等体积的 The regular Ehrlich's reagent 试剂 (称取 2 g 对二甲氨基苯甲醛, 溶于 100 mL 浓盐酸), 室温反应 5 min 后在紫外分光光度计 554 nm 波长下测定吸光值, 然后根据

不同浓度的胆色素原标准样品在 554 nm 波长下的吸光值计算出样品中胆色素原的质量浓度。

5) 血红素质量浓度测定。血红素质量浓度的测定采用荧光法^[28]: 取适量发酵液于 EP 管中, 12 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 用等体积去离子水重悬菌体, 测定其 OD₆₀₀; 准备 2 个相同的 1.5 mL EP 管 (其中一个作为对照实验), 分别加入 0.1 OD 的细胞重悬液, 同时加入 200 mmol/L 草酸溶液, 将其总体积补足至 500 μ L, 然后加入 2 mol/L 草酸溶液 500 μ L, 混合均匀后迅速在 100 $^{\circ}$ C 条件下反应 30 min, 对照组放置在室温条件下。待样品自然冷却后在 12 000 r/min 条件下离心 5 min, 取 200 μ L 上清液于黑色 96 孔板中, 在酶标仪中测定样品和对照组的荧光值, 其中血红素荧光测定的激发波长为 400 nm, 发射波长为 620 nm。根据不同浓度血红蛋白标准样品的荧光值计算出样品中血红素的质量浓度。

2 结果与讨论

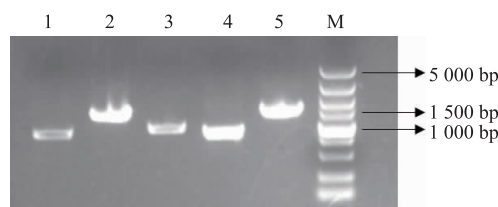
2.1 血红素合成途径分析与模块化构建

在微生物代谢和工业生物技术中, 如何找到一种高效的方法解决微生物代谢途径中代谢流的平衡已成为一个难题。传统的理性设计策略往往不能对细胞代谢有一个整体把握; 而组合方法虽然覆盖面较广, 但是需要进行高通量筛选。对此, Bradley 等^[24]提出一个多模块代谢工程改造理论 (multivariate modular metabolic engineering, MMME), 将代谢途径中的关键酶分为特定的模块, 同时通过控制不同模块的表达水平来平衡代谢途径中的代谢流。由于 MMME 方法简单, 应用广泛, 已逐渐成为代谢工程和工业生物技术领域中重要的改造手段。

根据 Gunhild 等^[29]对血红素合成途径中酶分子结构和功能的分析, 血红素合成途径中的中间产物不稳定, 所有的卟啉原类物质会快速氧化成相关的卟啉类物质, 因此可以推测血红素合成途径中的酶分子之间可能存在相关作用。例如, 为了避免尿卟啉原 I 的积累, HemC 和 HemD 可能会形成一个蛋白复合体, 而且在细菌中, 编码 HemC 和 HemD 的基因是由同一个操纵子操控的; 在 HemH 作用下将铁离子整合进原卟啉 IX 内部的过程中需要 HemG 的参与^[30], 因此推测 HemG 和 HemH 之间会形成一个蛋白复合体, 根据文献报道, 已经在蓝细菌中验证 HemG 与 HemH 的蛋白复合体的存在^[31]。

在本研究中为了保证血红素合成的前体物质 ALA 的质量浓度, 将 ALA 合成的关键基因 *hemAs* 和 *hemL* 划分为第一模块, 用 pUC19 质粒过量表达; 为了优化大肠杆菌中血红素合成途径的相关基因 *hemB*、*hemC*、*hemD*、*hemE*、*hemF*、*hemG*、*hemH*, 将这 7 个基因分为 2 个模块, *hemB*、*hemC*、*hemD*、*hemE* 基因为第二模块, *hemF*、*hemG*、*hemH* 为第三模块, 并使用 3 个兼容质粒 pRSFDuet-2 (高拷贝质粒)、pCDFDuet-2 (中低拷贝质粒) 和 pACYCDuet-2 (低拷贝质粒), 对第二、第三模块中的基因进行组装优化表达 (图 1), 考察其对血红素产量的影响。

以 *E. coli* DH5 α 基因组为模板分别扩增 *hemB*、*hemC*、*hemD*、*hemE*、*hemF*、*hemG*、*hemH* 基因, 同时将片段 *hemC*、*hemD* 融合为 *hemC-hemD*, 片段 *hemG*、*hemH* 融合成 *hemG-hemH*, 得到基因片段凝胶电泳图如图 2 所示。将上述各基因片段连接到 T-Vector pMD19 (Simple) 上, 测序正确后, 将质粒双酶切, 得到的各重组基因片段与经过相同酶切位点处理后的表达载体连接, 构建一系列重组载体。



M: DL 5000 DNA 标准相对分子质量; 1: *hemB* 基因; 2: *hemC-hemD* 基因; 3: *hemE* 基因; 4: *hemF* 基因; 5: *hemG-hemH* 基因

图 2 各基因片段琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of genes

2.2 血红素合成途径优化与血红素的强化

将构建好的重组载体两两组合, 转入含有 pUC19-*hemA^s*-*hemL* 质粒的大肠杆菌 DH5 α 中, 得到重组菌株 *E. coli* -D1、*E. coli* -D2、*E. coli* -D3、*E. coli* -D4、*E. coli* -D5、*E. coli* -D6、*E. coli* -D7, 进行摇瓶发酵培养, 在培养 4 h 后添加 100 μ mol/L Fe²⁺, 测定菌体生长情况、ALA 积累量、胆色素原质量浓度和血红素产量。如图 3 所示, 血红素产量越高, 重组菌的发酵液颜色越红; 其中, 重组菌 *E. coli* -D2 用高拷贝质粒表达第二模块的基因, 用中低拷贝质粒表达第三模块的基因时, 其生物量远低于其他菌株, 可能是由于基因 *hemG* 的产物原卟啉 IX 的过量积累对细胞具有毒害作用^[32]; 而且过量表达

ALA 下游途径的基因后,ALA 产量与重组菌 *E. coli* -D1(没有过量表达 ALA 下游途径基因)相比,明显下降;同时检测了表达基因 *hemB* 后的产物 PBG,发现各重组菌株的 PBG 产量没有明显差异,推测可能是 HemB 蛋白比较稳定,并不是血红素合成途径中

的限速酶;另外,从图 3(e)中可以看出,用中低拷贝质粒表达第二模块的基因,血红素产量较高,其中 6 号菌株用低拷贝质粒表达第二模块的基因,用高拷贝表达第三模块的基因,其血红素产量最高,达到 $0.56 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{OD})$ 。

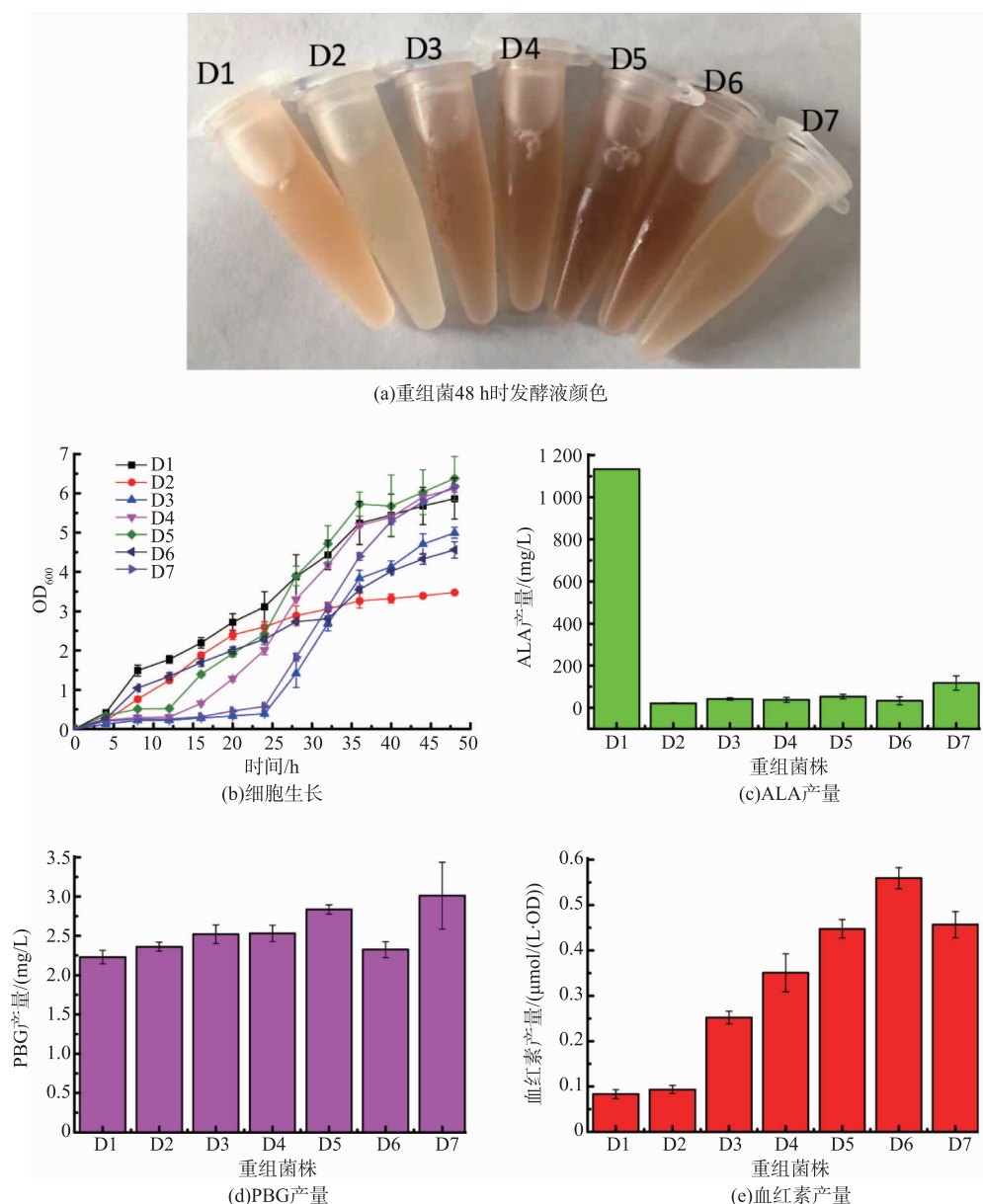


图 3 血红素合成途径基因分模块表达对细胞生长代谢的影响

Fig. 3 Effect of expression of genes in heme biosynthesis pathway on cell metabolism

2.3 血红素分批发酵

选择摇瓶发酵培养中血红素产量最高的重组菌株 *E. coli* -D6, 进一步验证其合成血红素的能

力, 将 *E. coli* -D6 在 3 L 发酵罐中进行放大培养, 同样在培养 4 h 后添加 $100 \mu\text{mol}/\text{L}$ Fe^{2+} , 发酵过程参数变化如图 4 所示。

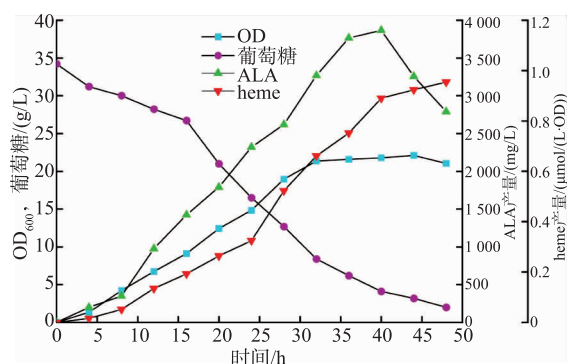


图4 重组菌株 *E. coli* -D6 在 3 L 发酵罐中分批培养合成血红素

Fig. 4 Batch fermentation of heme by the recombinant strain *E. coli*-6 in a 3 L fermentor

从图4可以看出,12 h后葡萄糖开始大量被消耗,重组菌株开始大量积累ALA,40 h左右ALA产量最高,达到3 865 mg/L,随着血红素在菌体生长后期的积累,ALA开始消耗,产量慢慢下降,在48 h发酵结束时,ALA产量剩余2 789 mg/L;28 h后,重组菌株开始大量合成血红素,在发酵48 h时,此时葡萄糖几乎完全耗尽,血红素产量最高,达到0.954 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{OD})$,与摇瓶水平上血红素的产量相比,提高了约70%。在整个发酵过程中,ALA大量积累,虽然后期随着血红素的积累,ALA开始消耗,但是明

显从ALA到血红素的转化率仍然很低。血红素的合成途径中存在其他竞争的分支途径,研究表明,HMB自发环化形成粪卟啉原I以及原卟啉到血红素的转化率低是血红素合成过程中的限速步骤^[1]。如何进一步提高ALA到血红素的转化率可作为下一步研究的重点。

3 结 语

血红素合成途径复杂且受严格调控,目前关于血红素合成方面的研究比较少。本研究通过将来源大肠杆菌的血红素合成途径基因分成2个模块,利用拷贝数不同的质粒,将2个模块随机组合,在过量表达谷氨酰-tRNA还原酶(*hemA*编码)、谷氨酰胺转移酶(*hemL*编码)的基础上,强化了血红素合成途径。本研究构建的重组大肠杆菌工程菌 *E. coli* -D6:pUC19 -*hemA* -*hemL* +pACYCDuet -2 -*hemB* -*hemC* -*hemD* -*hemE* + pRSFDuet -2 -*hemF* -*hemG* -*hemH* 摇瓶发酵培养48 h,生产血红素0.56 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{OD})$ 。在3 L发酵罐中进行分批培养,其血红素浓度达到0.954 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{OD})$,比摇瓶上提高了70%。采用代谢工程策略,改造微生物菌株来合成目的产物血红素,有效提高了血红素产量。

参考文献:

- [1] PRANAWIDJAJA S,CHOI S I,LAY B W,et al. Analysis of heme biosynthetic pathways in a recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiology Biotechnology*,2015,25(6):880-886.
- [2] PANEK H,O'BRIAN M R. A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis[J]. *Microbiology*,2002,148:2273-2282.
- [3] RODGERS K R. Heme-based sensors in biological systems[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*,1999,3:158-167.
- [4] NAKAJIMA O,TAKAHASHI S,HARIGAE H,et al. Heme deficiency in erythroid lineage causes differentiation arrest and cytoplasmic iron overload[J]. *The EMBO Journal*,1999,18:6282-6289.
- [5] WANG L,ELLIOTT M,ELLIOTT T. Conditional stability of the HemaA protein (glutamyl-tRNA reductase) regulates heme biosynthesis in *Salmonella typhimurium*[J]. *Journal of Bacteriology*,1999,181:1211-1219.
- [6] QI Z,HAMZA I,O'BRAIN M R. Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator(Irr) protein[J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*,1999,96(23):13056-13061.
- [7] REDDY S V,ALCANTARA O,ROODMAN G D,et al. Inhibition of tartrate-resistant acid phosphatase gene expression by hemin and protoporphyrin IX. identification of a hemin-responsive inhibitor of transcription[J]. *Blood*,1996,88:2288-2297.
- [8] HACH A,HON T,ZHANG L. A new class of repression modules is critical for heme regulation of the yeast transcriptional activator Hap1[J]. *Molecular and cellular biology*,1999,19:4324-4333.
- [9] OGAWA K,SUN J,TAKETANI S,et al. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1[J]. *The EMBO Journal*,2001,20:2835-2843.
- [10] SCHMITT M P. Identification of a two-component signal transduction system from *Corynebacterium diphtheriae* that activates

- gene expression in response to the presence of heme and hemoglobin[J]. **Journal of Bacteriology**, 1999, 181:5330-5340.
- [11] CHEN J J, LONDON I M. Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase[J]. **Trends in Biochemical Sciences**, 1995, 20(3):105-108.
- [12] LATHROP J T, TIMKO M P. Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif[J]. **Science**, 1993, 259(5094):522-525.
- [13] LUO Xianjun. The preparation method of heme and its application[J]. **Journal of Biochemical Medicine**, 1990, 1:12-14. (in Chinese)
- [14] OSHIMA H, YAMADA S, SAITO I, et al. A simple and rapid method for determination of heme and non-heme irons in food[J]. **Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health**, 1993, 39:114-120.
- [15] ZHONG Yaoguang, NAN Qingxian. The research development of the blood of domestic animals at home and abroad[J]. **Review of China Agricultural Science and Technology**, 2003, 5(3):26-29. (in Chinese)
- [16] WOLF H U, LINK H, LANG W. Preparation, purification and characterization of chlorohaemin[J]. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, 1992, 373(6):305-313.
- [17] HIBINO A, PETRI R, BUCHS J, et al. Production of uroporphyrinogen III, which is the common precursor of all tetrapyrrole cofactors, from 5-aminolevulinic acid by *Escherichia coli* expressing thermostable enzymes[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(16):7337-7344.
- [18] KANG Z, WANG Y, GU P, et al. Engineering *Escherichia coli* for efficient production of 5-aminolevulinic acid from glucose[J]. **Metabolic Engineering**, 2011, 13(5):492-498.
- [19] ZHANG Junli, KANG Zhen, QIU Ling, et al. The construction of engineered *Saccharomyces cerevisiae* to produce 5-aminolevulinic acid[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015. (in Chinese)
- [20] YANG P, LIU W, CHENG X, et al. A new strategy for production of 5-aminolevulinic acid in recombinant *Corynebacterium glutamicum* with high yield[J]. **Applied Environmental Microbiology**, 2016, 82(9):2709-2717.
- [21] ZHANG J, KANG Z, CHEN J, et al. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*[J]. **Scientific Reports**, 2015, 5:8584.
- [22] KWON O H, KIM S, HAHM D H, et al. Potential application of the recombinant *Escherichia coli* synthesized heme as a bioavailable iron source[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2009, 19(6):604-609.
- [23] LEE M J. Effect of gene amplifications in porphyrin pathway on heme biosynthesis in a recombinant *Escherichia coli*[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2013, 23(5):668-673.
- [24] BIGGS B W, DE Paepe B, SANTOS C N, et al. Multivariate modular metabolic engineering for pathway and strain optimization [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2014, 29:156-162.
- [25] MCNICHOLAS P M, JAVOR G, DARIE S, et al. Expression of the heme biosynthetic pathway genes *hemCD*, *hemH*, *hemM*, and *hemA* of *Escherichia coli*[J]. **FEMS Microbiology Letter**, 1997, 146:143-148.
- [26] LEVICAN G, KATZ A, DE Armas M, et al. Regulation of a glutamyl-tRNA synthetase by the heme status[J]. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, 2007, 104(9):3135-3140.
- [27] MAUZERALL D, GRANICK S. The occurrence and determination of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1956, 219(1):435-446.
- [28] SASSA S. Sequential induction of heme pathway enzymes during erythroid differentiation of mouse Friend leukemia virus-infected cells[J]. **Journal of Experimental Medicine**, 1976, 143(2):305-315.
- [29] LAYER G, REICHEL T, JAHN D, et al. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis[J]. **Protein Science**, 2010, 19(6):1137-1161.
- [30] GC F, TL A, SW K, et al. Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1988, 263(8):3835-3839.
- [31] A M, IU H, M R, et al. Complex formation between protoporphyrinogen IX oxidase and ferrochelatase during haem biosynthesis in *Thermosynechococcus elongatus*[J]. **Microbiology**, 2008, 154(12):3707-3714.
- [32] LERMONTOVA I, KRUSE E, MOCK H P, et al. Cloning and characterization of a plastidial and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase[J]. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, 1997, 94(16):8895-8900.