



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104928225 B

(45)授权公告日 2018.06.12

(21)申请号 201510278530.7

(22)申请日 2015.05.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104928225 A

(43)申请公布日 2015.09.23

(83)生物保藏信息
CCTCC NO:M2015262 2015.04.28
CCTCC NO:M2015263 2015.04.28

(73)专利权人 武汉中科光谷绿色生物技术有限
公司
地址 430074 湖北省武汉市东湖开发区高
新大道666号

(72)发明人 黄娇芳 孙立洁 陈祥松 袁丽霞
王纪 吴金勇 朱薇薇 王刚
姚建铭 史吉平 魏东

(74)专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限
公司 42104

代理人 唐正玉

(51)Int.Cl.
C12N 1/21(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12P 13/00(2006.01)
C12R 1/19(2006.01)

(56)对比文件
CN 98810854 A,2000.12.27,
CN 101213293 A,2008.07.02,
Paula Arenal. et al.Metabolic
engineering for high yielding L(-)-
carnitine production in Escherichia coli.
《Microbial Cell Factories》.2013,第12卷(第
56期),图2-3,第3页,第8页左栏,第9页左栏。

审查员 张彬

权利要求书2页 说明书8页
序列表3页 附图1页

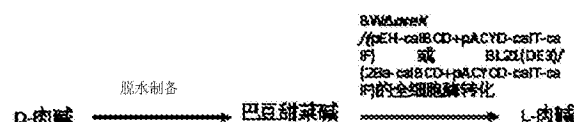
(54)发明名称

一种产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌及构
建方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种产L-肉碱的大肠杆菌基因
工程菌的构建方法和用途。所述基因工程菌是
通过将编码巴豆甜菜碱转化为L-肉碱的三个关键
基因caiB、caiC和caiD连同转运子编码基因caiT
和正调控子caiF一起转入大肠杆菌中过表达,通
过厌氧启动子控制或IPTG诱导L-肉碱合成相关
基因的表达,同时删除大肠杆菌自身的编码异柠
檬酸脱氢酶磷酸酶/激酶的aceK基因。基因工程
菌经产酶培养后,收集菌体作为全细胞酶源,直
接转化巴豆甜菜碱生成L-肉碱,经转化后,L-肉
碱产量最高可达30g/L以上,摩尔转化率最高为
42%,产量和转化率比野生株提高了60倍以上,
达到国内报道的生物法制备的领先水平。本发
明的基因工程菌对底物的转化效率高,酶反应工

简单,生产原料成本低廉,节约资源,无污染。



1. 一种产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌,其特征在于:所述基因工程菌将大肠杆菌野生株BW25113基因组上编码异柠檬酸脱氢酶磷酸酶/激酶的aceK基因删除得到大肠杆菌突变株BW Δ aceK,选择厌氧诱导的质粒pET-A,在多克隆位点的NdeI/KpnI酶切位点插入caiBCD片段,得到第一个过表达质粒pEH-caiBCD;将caiT插入到pACYCD的NdeI/XhoI位点,同时将caiF插入到同一pACYCD的Hind III/EcoR I位点,得到第二个过表达质粒pACYCD-caiT-caiF;将两个过表达质粒pEH-caiBCD和pACYCD-caiT-caiF同时转入大肠杆菌突变株BW Δ aceK中,获得产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌BW Δ aceK/(pEH-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF);

从大肠杆菌野生株BW25113的基因组上扩增caiBCD片段,正向引物序列为:5' - G G G C A T A T G G A T C A T C T A C C C A T G C C - 3' ; 反向引物序列为:5' - ATTGGTACCCAACCGTGAGCTATTACGCC-3' 。

2. 一种产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌,其特征在于:所述基因工程菌选择IPTG诱导的质粒pET28a,在pET28a的插入位点NdeI/XhoI插入caiBCD片段,得到第一个过表达质粒pET28a-caiBCD;将caiF插入到pACYCD的NdeI/XhoI位点,同时将caiT插入到同一pACYCD的Hind III/EcoR I位点,得到第二个过表达质粒pACYCD-caiT-caiF;将两个过表达质粒pET28a-caiBCD和pACYCD-caiT-caiF同时转入大肠杆菌大肠杆菌BL21 (DE3) 菌株中,获得产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 。

3. 根据权利要求1所述的产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的构建方法,其特征在于按以下步骤进行:

步骤一:以大肠杆菌野生株BW25113为出发菌株,将基因组上的aceK基因删除,得到大肠杆菌突变株BW Δ aceK;步骤二:从大肠杆菌野生株BW25113的基因组上扩增caiBCD片段,引物设计正向为:5' -GGGCATATGGATCATCTACCCATGCC-3' ;引物设计反向为:5' -ATTGGTACCCAACCGTGAGCTATTACGCC-3' ;从大肠杆菌W3110的基因组上扩出基因caiF和caiT,扩增caiF的正向和反向引物序列分别为:5' -CACGCCCATATGTGTGAAGGATATGTTGAAAAC-3' 和 5' -CAGCTCGAGTTAACGACGCATACTCTTTGACAA-3' ;扩增caiT的正向和反向引物序列分别为:5' -GGGGAATTCATGAAGAATGAAAAGAGAAAACGG-3' 和 5' -GCCAAGCTTTTAATCTTTCCAGTTCTGTTTCGCG-3' ;步骤三:选择一个厌氧启动子诱导的质粒pET-A为载体,在多克隆位点的NdeI/KpnI酶切位点插入caiBCD片段,得到过表达质粒pEH-caiBCD;将caiF和caiT分别插入到同一个质粒pACYCD的NdeI/XhoI和EcoRI/HindIII位点,得到过表达质粒pACYCD-caiT-caiF;步骤四:将两个过表达质粒pEH-caiBCD和pACYCD-caiT-caiF同时转入大肠杆菌突变株BW Δ aceK中,获得产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌BW Δ aceK/(pEH-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 。

4. 根据权利要求2所述的产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的构建方法,其特征在于按以下步骤进行:

步骤一:选择一个IPTG诱导启动子的质粒pET28a为载体,在多克隆位点的NdeI/XhoI酶切位点插入caiBCD片段,得到过表达质粒pET28a-caiBCD;步骤二:将过表达质粒pET-caiBCD转入大肠杆菌表达株BL21 (DE3) 中,获得基因工程菌BL21 (DE3) /pET28a-caiBCD;步骤三:从大肠杆菌W3110上扩出基因caiF和caiT,caiF的正向和反向引物分别为:5' -CACGCCCAT ATGTGTGAAGGATATGTTGAAAAC-3' (SEQ NO.3) 和 5' -

CAGCTCGAGTTAACGACGCATACTCTTTGACAA-3' (SEQ NO.4); caiT的正向和反向引物分别为:5'-GGGGAATTCATGAAGAATGAAAAGAGAAAAACGG-3' (SEQ NO.5) 和 5'-GCCAAGCTTTAATCTTTCCAGTTCTGTTTCGCG-3' (SEQ NO.6); 步骤四:将caiF和caiT同时插入到pACYCD的NdeI/XhoI和EcoR I/Hind III位点,得到过表达质粒pACYCD-caiT-caiF;步骤五:将过表达质粒pACYCD-caiT-caiF转入大肠杆菌基因工程菌BL21 (DE3) /pET28a-caiBCD中,获得产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF)。

5. 根据权利要求1或2所述的产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的用途,其特征在于利用所述工程菌生产L-肉碱,按以下步骤进行:

步骤一:全细胞酶源制备:

将基因工程菌常规放大培养后,接入产酶培养基;工程菌BW Δ aceK/pEH-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 先进行有氧培养,然后转入厌氧培养或工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 进行有氧培养;在0~10°C,8000~12000rpm离心,收集菌体,用pH为6~8的10~100mmol/l的磷酸缓冲液洗涤两次,低温保存菌体;

步骤二:酶转化生产L-肉碱:

在含有巴豆甜菜碱底物的转化反应液中,添加步骤一得到的湿菌体作为酶源,菌体浓度为10~50g/L;反应液置于摇床150~220rpm进行酶转化,得到L-肉碱溶液。

6. 根据权利要求5所述的产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的用途,其特征在于:步骤一中,产酶培养基的组成为:甘油1~10ml/L、蛋白胨5~20g/L、酵母粉5~20g/L、KH₂PO₄ 1~10g/L、K₂HPO₄ 1~10g/L、富马酸钠0~10g/L以及巴豆甜菜碱0~10g/L,pH为6~8。

7. 根据权利要求5所述的产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的用途,其特征在于:步骤一中,工程菌BW Δ aceK/ (pEH-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 先进行有氧培养,然后转入厌氧培养,厌氧培养的条件为:振荡培养或发酵罐培养,有氧培养0~6小时,厌氧诱导培养5~24h;工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 进行有氧培养条件为:振荡培养或发酵罐培养,有氧培养0~6小时。

8. 根据权利要求5所述的产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的用途,其特征在于:步骤二中,转化反应液的pH为7.0,底物巴豆甜菜碱的浓度为20~100g/L,转化反应进行的条件为:30~39°C,瓶装量1/10~1/3,反应时间1~4小时。

9. 根据权利要求5所述的产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的用途,其特征在于:步骤二中所述巴豆甜菜碱利用拆分废物D-肉碱进行脱水制备而得。

一种产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌及构建方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌及构建方法和用途,属生物工程技术领域。

背景技术

[0002] L-肉碱(左旋肉碱,L-Carnitine)又称维生素B₁₂,是一种维生素制品,与动物体内脂肪酸代谢有关。当动物因先天性或代谢性疾病引起体内肉碱缺乏时,会使机体乏力和产生许多心血管疾病。目前L-肉碱除了以强化营养方式用于婴儿和体弱多病者外,还作为药物用于降低血脂、减肥和医治心血管疾病,由于其疗效显著正引起人们的极大兴趣与关注。近年来,L-肉碱被广泛应用于医药、保健和食品等领域,被瑞士、法国、美国和世界卫生组织规定为法定的多用途应用剂,具有很大的应用市场。

[0003] L-肉碱的生产方法主要有化学合成法、直接提取法、微生物发酵法和酶转化法等。目前,国内主要采用化学合成法生产,首先合成DL-混旋肉碱,然后进行拆分得到L-肉碱,该方法环境污染较大,并且D-肉碱副产物废弃造成资源浪费。而直接从牛肉等提取法,成本太高产量太低,几乎没有应用价值。微生物发酵法和酶转化法是最有应用价值的方法,目前商业化使用的底物主要有 γ -丁基甜菜碱和巴豆甜菜碱。CN101014709A使用粗糙脉孢菌来源的 γ -丁基甜菜碱羟化酶,利用 γ -丁基甜菜碱为底物进行酶转化生产L-肉碱,该方法涉及的酶纯化步骤繁多,酶转化反应辅助因子众多,生产成本太高。CN101068925将来源于粗糙脉孢菌的S-腺苷甲硫氨酸-6-N-赖氨酸-甲基转移酶、6-N-三甲基赖氨酸羟化酶、3-羟基-6-N-三甲基赖氨酸醛缩酶、 γ -三甲基氨基醛脱氢酶与 γ -丁基甜菜碱羟化酶等五个编码基因构建到大肠杆菌的T7过表达质粒中,转入宿主大肠杆菌BL21(DE3)体内,在含有赖氨酸的培养基中生产L-肉碱的产量为19.8mg/L。巴豆甜菜碱为底物的转化方法有其独特优点,底物便宜,且可利用拆分废物D-肉碱进行脱水制备,但一般菌株均不耐巴豆甜菜碱,需经过大量的筛选工作获得高耐受性的菌株。EP0457735A1使用筛选的奇异变形杆菌能转化底物浓度为12%的巴豆甜菜碱生成L-肉碱,摩尔转化率为40~43%,转化率有待提高。而采用全细胞酶转化巴豆甜菜碱可以克服菌株对底物的高浓度不耐性,如CN96117166.9使用大肠杆菌的紫外诱变株对巴豆甜菜碱进行转化,L-肉碱产量最高达15~20g/L,转化率为40~50%,此值还达不到工业化生产水平,产量和转化率都有待提高。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是提供一种产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌及构建方法和用途。通过基因重组技术获得具有高转化活性的大肠杆菌基因工程菌,并结合全细胞酶转化工艺优化,大大提高L-肉碱产量,达到生物法制备L-肉碱的产量和转化率的领先水平。

[0005] 本发明通过以下方案来实现:

[0006] 一种产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌,其特征在于:所述基因工程菌将大肠杆菌

野生株BW25113基因组上编码异柠檬酸脱氢酶磷酸酶/激酶的aceK基因删除得到大肠杆菌突变株BW Δ aceK,选择厌氧诱导的质粒pET-A,在多克隆位点的NdeI/KpnI酶切位点插入caiBCD片段,得到第一个过表达质粒pEH-caiBCD;将caiT插入到pACYCD的NdeI/XhoI位点,同时将caiF插入到同一pACYCD的Hind III/EcoR I位点,得到第二个过表达质粒pACYCD-caiT-caiF;将两个过表达质粒pEH-caiBCD和pACYCD-caiT-caiF同时转入大肠杆菌突变株BW Δ aceK中,获得产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌BW Δ aceK/(pEH-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF)。

[0007] 一种产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌,其特征在于:所述基因工程菌选择IPTG诱导的质粒pET28a,在pET28a的插入位点NdeI/XhoI插入caiBCD片段,得到第一个过表达质粒pET28a-caiBCD;将caiF插入到pACYCD的NdeI/XhoI位点,同时将caiT插入到同一pACYCD的Hind III/EcoR I位点,得到第二个过表达质粒pACYCD-caiT-caiF;将两个过表达质粒pET28a-caiBCD和pACYCD-caiT-caiF同时转入大肠杆菌大肠杆菌BL21 (DE3) 菌株中,获得产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF)。

[0008] 从大肠杆菌野生株BW25113的基因组上扩增caiBCD片段,正向引物序列为:5' - G G G C A T A T G G A T C A T C T A C C C A T G C C - 3' ; 反向引物序列为:5' - A T T G G T A C C C A A C C G T G A G C T A T T A C G C C - 3' 。

[0009] 所述的产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的构建方法,其特征在于按以下步骤进行:

[0010] 步骤一:以大肠杆菌野生株BW25113为出发菌株,将基因组上的aceK基因删除,得到大肠杆菌突变株BW Δ aceK;步骤二:从大肠杆菌野生株BW25113的基因组上扩增caiBCD片段,引物设计正向为:5' -GGGCATATGGATCATCTACCCATGCC-3' ;引物设计反向为:5' -ATTGGTACCCAACCGTGAGCTATTACGCC-3' ;从大肠杆菌W3110的基因组上扩出基因caiF和caiT,扩增caiF的正向和反向引物序列分别为:5' -CACGCCCATATGTGTGAAGGATATGTTGAAAAAC-3' 和5' -CAGCTCGAGTTAACGACGCATACTCTTTGACAA-3' ;扩增caiT的正向和反向引物序列分别为:5' -G G G G A A T T C A T G A A G A A T G A A A G A G A A A A C G G - 3' 和5' -G C C A A G C T T T T A A T C T T T C C A G T T C T G T T T C G C G - 3' ;步骤三:选择一个厌氧启动子诱导的质粒pET-A为载体,在多克隆位点的NdeI/KpnI酶切位点插入caiBCD片段,得到过表达质粒pEH-caiBCD;将caiF和caiT分别插入到同一个质粒pACYCD的NdeI/XhoI和EcoRI/HindIII位点,得到过表达质粒pACYCD-caiT-caiF;步骤四:将两个过表达质粒pEH-caiBCD和pACYCD-caiT-caiF同时转入大肠杆菌突变株BW Δ aceK中,获得产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌BW Δ aceK/(pEH-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF)。

[0011] 所述的产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的构建方法,其特征在于按以下步骤进行:

[0012] 步骤一:从大肠杆菌野生株BW25113的基因组上扩增caiBCD片段,引物设计正向为:5' -GGGCATATGGATCATCTACCCATGCC-3' (SEQ ID NO.1) ;引物设计反向为:5' -ATTCTCGAGCAACCGTGAGCTATTACGCC-3' (SEQ ID NO.9) ;步骤二:选择一个IPTG诱导启动子的质粒pET28a为载体,在多克隆位点的NdeI/XhoI酶切位点插入caiBCD片段,得到过表达质粒pET28a-caiBCD;步骤三:将过表达质粒pET-caiBCD转入大肠杆菌表达株BL21 (DE3) 中,获得基因工程菌BL21 (DE3) /pET28a-caiBCD;步骤四:从大肠杆菌W3110上扩出基因caiF和caiT,

caiF的正向和反向引物分别为:5' -CACGCCCAT ATGTGTGAAGGATATGTTGAAAAAC-3' (SEQ NO.3)和5' -CAGCTCGAGTTAACGACGCATACTCTTTGACAA-3' (SEQ NO.4);caiT的正向和反向引物分别为:5' -GGGAATTC ATGAAGAATGAAAAGAGAAAAACGG-3' (SEQ NO.5)和5' -GCCAAGCTT TTAATCTTTCCAGTTCTGTTTCGCG-3' (SEQ NO.6);步骤五:将caiF和caiT同时插入到pACYCD的NdeI/XhoI和EcoR I/Hind III位点,得到过表达质粒pACYCD-caiT-caiF;步骤六:将过表达质粒pACYCD-caiT-caiF转入大肠杆菌基因工程菌BL21 (DE3) /pET28a-caiBCD中,获得产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF)。

[0013] 将大肠杆菌体内编码异柠檬酸脱氢酶磷酸酶/激酶的aceK基因删除,该aceK基因参与三羧酸循环的异柠檬酸脱氢酶的翻译后调控,对巴豆甜菜碱转化为L-肉碱有抑制作用,因此将ace K基因删除后,L-肉碱的产量有少量提高。在大肠杆菌原有基因簇表达基础上,克隆体内转化巴豆甜菜碱生产L-肉碱的三个关键酶编码基因caiBCD,这三个基因分别编码巴豆甜菜碱基-CoA:肉碱CoA转移酶(CaiB)、ATP-依赖的辅酶A连接酶(CaiC)以及巴豆甜菜碱基-CoA水合酶(CaiD)。caiBCD片段插入到外源质粒厌氧诱导的强启动子的控制下游,选择NdeI/KpnI双酶切位点插入,重组质粒再转入大肠杆菌ace K突变株体内进行过表达。此外,将转运子编码基因caiT和正调控子caiF在质粒pACYCD的Hind III/EcoR I和NdeI/XhoI位点插入,最后一并转入大肠杆菌中进行过表达,构建好的基因工程菌生产L-肉碱的产量和底物转化率有明显提高。

[0014] 所述基因工程菌BW Δ aceK/ (pEH-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 是保藏号为CCTCC NO:M2015262的菌株;基因工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 是保藏号为CCTCC NO:M2015263的菌株。此两株基因工程菌于2015年4月28日保藏于中国典型培养物保藏中心,地址在中国武汉大学,CCTCC NO:M2015262的分类号为:大肠杆菌CASOV-6 *Escherichia coli* CASOV-6,CCTCC NO:M2015263的分类号为:大肠杆菌CASOV-7 *Escherichia coli* CASOV-7。

[0015] 所述的产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的用途,其特征在于利用所述工程菌生产L-肉碱按以下步骤进行:

[0016] 步骤一:全细胞酶源制备:

[0017] 将基因工程菌常规放大培养后,接入产酶培养基;工程菌BW Δ aceK/pEH-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF 先进行有氧培养,然后转入厌氧培养,或,工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 进行有氧培养;在0~10℃,8000~12000rpm离心,收集菌体,用pH为6~8的10~100mmol/l的磷酸缓冲液洗涤两次,低温保存菌体;

[0018] 步骤二:酶转化生产L-肉碱:

[0019] 在含有巴豆甜菜碱底物的转化反应液中,添加步骤一得到的湿菌体作为酶源,菌体浓度为10~50g/L;反应液置于摇床150~220rpm进行酶转化,得到L-肉碱溶液;

[0020] 步骤一中,产酶培养基的组成为:甘油1~10ml/L、蛋白胨5~20g/L、酵母粉5~20g/L、KH₂PO₄1~10g/L、K₂HPO₄1~10g/L、富马酸钠0~10g/L以及巴豆甜菜碱0~10g/L,pH为6~8。

[0021] 步骤一中,工程菌BW Δ aceK/ (pEH-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 先进行有氧培养,然后转入厌氧培养,厌氧培养的条件为:振荡培养或发酵罐培养,有氧培养0~6小时,厌氧诱导培养5~24h;工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 进行有氧培养件

为:振荡培养或发酵罐培养,有氧培养0~6小时。

[0022] 步骤二中,转化反应液的pH为7.0,底物巴豆甜菜碱的浓度为20~100g/L,转化反应进行的条件为:30~39℃,瓶装量1/10~1/3,反应时间1~4小时。

[0023] 步骤二中所述巴豆甜菜碱利用拆分废物D-肉碱进行脱水制备而得。

[0024] 本发明的优点和积极效果:

[0025] (1) 提高巴豆甜菜碱转化成L-肉碱的合成基因的拷贝数。将巴豆甜菜碱-CoA连接酶和水合酶等编码基因*caiBCD*插入质粒pET-A和pET-28a,将转运子*caiT*和调控基因*caiF*插入质粒pACYCD中,同时得到两种过表达质粒导入大肠杆菌BW Δ*aceK*和BL21 (DE3)中,提高了关键酶基因*caiBCD*、*caiF*和*caiT*的拷贝数。

[0026] (2) 增强并稳定L-肉碱合成基因的表达量。在质粒中,*caiBCD*置于强厌氧启动子控制下,该启动子的表达活性不受宿主细胞中各种阻抑因子对L-肉碱合成基因表达的控制,提高了合成基因的表达量。

[0027] (3) 节约酶活诱导与生产成本。重组质粒启动子为厌氧诱导的强启动子,不需要添加其他外源诱导剂和乳糖等,不仅控制简单,而且大大节约了生产成本。

[0028] (4) 高效并稳定地合成L-肉碱。在质粒IPTG诱导以及高效稳定表达的双重作用下,基因工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-*caiBCD*+pACYCD-*caiT*-*caiF*)全细胞对巴豆甜菜碱的摩尔转化率达到40%以上,L-肉碱产量达到9.5g/L以上,转化率和产量都达到较高,与比野生型提高了17倍左右。而当原料投入量为50g/L时,L-肉碱的产量为16g/L,摩尔转化率为35%。

附图说明

[0029] 图1为本发明的大肠杆菌基因工程菌利用从D-肉碱脱水而来的巴豆甜菜碱进行酶转化生产L-肉碱的示意图。

具体实施方式

[0030] 以下实施例中使用的质粒、PCR试剂等采用商业产品,具体操作按照说明书进行。其他未注明的实验操作按照常规分子操作方法进行。

[0031] 实施例1:

[0032] 1. 产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的构建

[0033] (1) 根据大肠杆菌的基因组序列中的*caiTABCDE*操纵子,设计正向引物F-*caiBCD*-NdeI:5'-GGGCATATGGATCATCTACCCATGCC-3' (SEQ ID NO.1)'和反向引物R-*caiBCD*-KpnI:5'-ATTGGTACCCAACCGTGAGCTATTACGCC-3' (SEQ ID NO.2)或R-*caiBCD*-XhoI:5'-ATTCTCGAGCAACCGTGAGCTATTACGCC-3' (SEQ ID NO.9),引物两端添加NdeI和KpnI酶切位点(下划线)。

[0034] *CaiF*的正向引物F-*caiF*-NdeI:5'-CACGCCCAT ATGTGTGAAGGATATGTTGAAAAAC-3' (SEQ ID NO.3)和反向引物R-*caiF*-xhoI:5'-CAGCTCGAGTTAACGACGCATACTCTT TGACAA-3' (SEQ ID NO.4)。 *caiT*的正向引物F-*caiT*-EcoRI:5'-GGGGAATTC ATGAAGAATGAAAAGAGAAAAACGG-3' (SEQ ID NO.5),反向引物R-*caiT*-HindIII:5'-GCCAAGCTT TTAATCTTTCCAGTTCTGTTTCGCG-3' (SEQ ID NO.6)。

[0035] (2) 以大肠杆菌基因组DNA为模板,利用TaKaRa公司的DNA聚合酶primestar和设计

的引物,扩增*caiBCD*、*caiF*和*caiT*的基因片段,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,回收长度约3.8kb、0.4kb和1.5kb处的基因片段,经核苷酸测序验证完全正确。

[0036] (3) 将上述步骤回收的*caiBCD*基因片段用NdeI和KpnI双酶切,连接酶连接,插入大肠杆菌表达质粒pET-A中,*caiBCD*置于厌氧强启动子控制下,形成重组质粒pEH-*caiBCD*。*caiT*的基因片段用HindIII/EcoR I双切,连接酶连接,置于IPTG诱导的质粒pACYCD上,得到重组质粒pACYCD-*caiT*,将*caiF*插入到质粒pACYCD-*caiT*的NdeI/XhoI位点,得到过表达质粒pACYCD-*caiT*-*caiF*;将以上两个重组质粒转入大肠杆菌突变株BW Δ *aceK*中,获得产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌BW Δ *aceK*/(pEH-*caiBCD*+pACYCD-*caiT*-*caiF*)。

[0037] (4) 根据大肠杆菌W3110基因组(NC_007779.1)序列设计引物,上游引物F-KO-*aceK*(SEQ ID NO.7):

[0038] 5' - CGTTTACGCCGCATCCGGCAATTCTCTGCTCCTGATGAGGGCGCTAAATGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'

[0039] 和下游引物R-KO-*aceK*(SEQ ID NO.8):

[0040] 5' - TGC GGAGAAAATTATATGGAAGCTTTACTCAAAAAGCATCTCCCATATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3';

[0041] 利用引物F-KO-*aceK*(SEQ ID NO.7)和R-KO-*aceK*(SEQ ID NO.8),以质粒pKD13为模板,利用商业化的PCR试剂,经PCR扩增得到DNA片段,纯化后,转入携带重组酶表达质粒pKD46的大肠杆菌BW25113中,得到具有卡纳抗性的BW Δ *aceK*:kan突变株;进一步通过42°C热激进行同源重组,筛选到消除卡纳抗性的*aceK*基因删除突变株BW Δ *aceK*。BW Δ *aceK*突变株较野生株对L-肉碱的消耗有所下降。

[0042] (5) 制备突变株BW Δ *aceK*的感受态细胞,将重组质粒pEH-*caiBCD*和pACYCD-*caiT*-*caiF*转入,涂氨苄和氯霉素平板筛选,提取质粒验证,得到携带过表达质粒并删除*aceK*的基因工程菌BW Δ *aceK*/(pEH-*caiBCD*+pACYCD-*caiT*-*caiF*),最终的基因工程株较野生株的L-肉碱产量和转化率提高了17倍左右。

[0043] 2. 大肠杆菌基因工程菌BW Δ *aceK*/(pEH-*caiBCD*+pACYCD-*caiT*-*caiF*)全细胞酶源的制备

[0044] (1) 配制产酶培养基:甘油5ml/L、蛋白胨15g/L、酵母粉5g/L、KH₂PO₄10g/L、K₂HPO₄1g/L、pH为8,灭菌。

[0045] (2) 接种量10%(V/V),将大肠杆菌基因工程菌逐级活化培养后,接于装有产酶培养基的容器中,先37°C有氧培养2小时,再转入厌氧培养18h后结束。

[0046] (3) 离心,0°C,12000rpm,收集菌体。用pH为7.4的浓度为67mmol/l的磷酸缓冲液洗涤细胞两次,收集3L产酶培养液的湿菌体约36.2g,保存于-20°C,以备后续酶转化使用。

[0047] 3. 全细胞酶转化巴豆甜菜碱制备L-肉碱

[0048] (1) 称取湿菌体(干重量为16g/L)悬浮于100ml pH为7.0的50mmol/l磷酸缓冲液中,加入巴豆甜菜碱底物的浓度为20g/L。

[0049] (2) 反应液置于37°C,220rpm进行酶转化。分时间段取样,每次离心分离的菌体重复用到酶转化反应中。

[0050] (3) 采用5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)法测定L-肉碱的产量。酶转化4小时后,上清液中L-肉碱的产量达到3.71g/L。

[0051] 实施例2:

[0052] 1. 产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的构建

[0053] 步骤一:从大肠杆菌野生株BW25113的基因组上扩增caiBCD片段,引物设计正向为:5'-GGGCATATGGATCATCTACCCATGCC-3'(SEQ ID NO.1);引物设计反向为:5'-ATTCTCGAGCAACCGTGAGCTATTACGCC-3'(SEQ ID NO.9);步骤二:选择一个IPTG诱导启动子的质粒pET28a为载体,在多克隆位点的NdeI/XhoI酶切位点插入caiBCD片段,得到过表达质粒pET28a-caiBCD;步骤三:将过表达质粒pET-caiBCD转入大肠杆菌表达株BL21(DE3)中,获得基因工程菌BL21(DE3)/pET28a-caiBCD;步骤四:从大肠杆菌W3110上扩出基因caiF和caiT,caiF的正向和反向引物分别为:5'-CACGCCCAT ATGTGTGAAGGATATGTTGAAAAAC-3'(SEQ NO.3)和5'-CAGCTCGAGTTAACGACGCATACTCTTTGACAA-3'(SEQ NO.4);caiT的正向和反向引物分别为:5'-GGGGAATTC ATGAAGAATGAAAAGAGAAAAACGG-3'(SEQ NO.5)和5'-GCCAAGCTT TTAATCTTTCCAGTTCTGTTTCGCG-3'(SEQ NO.6);步骤五:将caiF和caiT同时插入到pACYCD的NdeI/XhoI和EcoR I/Hind III位点,得到过表达质粒pACYCD-caiT-caiF;步骤六:将过表达质粒pACYCD-caiT-caiF转入大肠杆菌基因工程菌BL21(DE3)/pET28a-caiBCD中,获得产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌BL21(DE3)/(pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF)。

[0054] 2. 大肠杆菌基因工程菌BL21(DE3)/(pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF)全细胞酶源的制备

[0055] (1) 配制产酶培养基:甘油10ml/L、蛋白胨5g/L、酵母粉15g/L、KH₂PO₄5g/L、K₂HPO₄5g/L、富马酸钠4g/L以及巴豆甜菜碱4g/L,pH为6,灭菌。

[0056] (2) 接种量1%(V/V),将大肠杆菌基因工程菌逐级活化培养后,接于装有产酶培养基的容器中,37℃条件下加1mM IPTG有氧培养6小时。

[0057] (3) 离心,10℃,8000rpm,收集菌体。用pH为7.4的浓度为67mmol/l的磷酸缓冲液洗涤细胞两次。

[0058] 3. 全细胞酶转化巴豆甜菜碱制备L-肉碱

[0059] (1) 将上述湿菌体(干重量为16g/L)悬浮于pH为7.0的50mmol/l磷酸缓冲液中,加入巴豆甜菜碱底物的浓度为20g/L。

[0060] (2) 反应液置于37℃,220rpm进行酶转化,分时间段取样,每次离心分离的菌体重复用到酶转化反应中。

[0061] (3) 采用5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)法测定L-肉碱的产量。该DTNB法测定中,底物对产物测定的结果不会造成影响,使用L-肉碱特异性识别的肉碱乙酰转移酶(CAT)然后结合DTNB显色,测定其412nm处的吸收值。取4h时候离心的上清液,L-肉碱产量为6.5g/L,摩尔转化率约为36%。

[0062] 实施例3:

[0063] 1. 产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的构建

[0064] 同上实施例2步骤1。

[0065] 2. 大肠杆菌基因工程菌BL21(DE3)/(pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF)全细胞酶源的制备

[0066] (1) 配制产酶培养基:甘油10ml/L、蛋白胨5g/L、酵母粉15g/L、KH₂PO₄5g/L、K₂HPO₄5g/L、富马酸钠4g/L以及巴豆甜菜碱4g/L,pH为6。灭菌。

[0067] (2) 接种量1% (V/V), 将大肠杆菌基因工程菌逐级活化培养后, 接于装有产酶培养基的容器中, 37℃条件下加1mM IPTG有氧培养6小时。

[0068] (3) 离心, 10℃, 8000rpm, 收集菌体。用pH为7.4的浓度为67mmol/l的磷酸缓冲液洗涤细胞两次。

[0069] 3. 全细胞酶转化巴豆甜菜碱制备L-肉碱

[0070] (1) 将上述湿菌体(干重量为16g/L)悬浮于pH为7.0的50mmol/l磷酸缓冲液中, 加入巴豆甜菜碱底物的浓度为50g/L。

[0071] (2) 反应液置于37℃, 220rpm进行酶转化, 分时间段取样, 每次离心分离的菌体重复用到酶转化反应中。

[0072] (3) 采用5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 法测定L-肉碱的产量。该DTNB法测定中, 底物对产物测定的结果不会造成影响, 使用L-肉碱特异性识别的肉碱乙酰转移酶(CAT) 然后结合DTNB显色, 测定其412nm处的吸收值。取4h时候离心的上清液, L-肉碱产量为15.99g/L, 摩尔转化率约为35%。

[0073] 实施例4:

[0074] 1. 产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的构建

[0075] 同上实施例1步骤1。

[0076] 2. 大肠杆菌基因工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 全细胞酶源的制备

[0077] (1) 配制产酶培养基: 甘油10ml/L、蛋白胨5g/L、酵母粉15g/L、KH₂PO₄5g/L、K₂HPO₄5g/L、富马酸钠4g/L以及巴豆甜菜碱4g/L, pH为6。灭菌。

[0078] (2) 接种量1% (V/V), 将大肠杆菌基因工程菌逐级活化培养后, 接于装有产酶培养基的容器中, 37℃条件下加1mM IPTG有氧培养6小时。

[0079] (3) 离心, 10℃, 8000rpm, 收集菌体。用pH为7.4的浓度为67mmol/l的磷酸缓冲液洗涤细胞两次。

[0080] 3. 全细胞酶转化巴豆甜菜碱制备L-肉碱

[0081] (1) 加大菌体量, 将上述湿菌体(干重量为35g/L)悬浮于pH为7.0的50mmol/l磷酸缓冲液中, 加入巴豆甜菜碱底物的浓度为20g/L。

[0082] (2) 反应液置于37℃, 220rpm进行酶转化, 分时间段取样, 每次离心分离的菌体重复用到酶转化反应中。

[0083] (3) 采用5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 法测定L-肉碱的产量。该DTNB法测定中, 底物对产物测定的结果不会造成影响, 使用L-肉碱特异性识别的肉碱乙酰转移酶(CAT) 然后结合DTNB显色, 测定其412nm处的吸收值。取4h时候离心的上清液, L-肉碱产量为7.5g/L, 摩尔转化率约为42%。

[0084] 实施例5:

[0085] 1. 产L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌的构建

[0086] 同上实施例2步骤1。

[0087] 2. 大肠杆菌基因工程菌BL21 (DE3) / (pET28a-caiBCD+pACYCD-caiT-caiF) 全细胞酶源的制备

[0088] (1) 配制产酶培养基: 甘油10ml/L、蛋白胨5g/L、酵母粉15g/L、KH₂PO₄5g/L、

K_2HPO_4 5g/L、富马酸钠4g/L以及巴豆甜菜碱4g/L,pH为6。灭菌。

[0089] (2) 接种量1% (V/V), 将大肠杆菌基因工程菌逐级活化培养后, 接于装有产酶培养基的容器中, 37°C条件下加1mM IPTG有氧培养6小时。

[0090] (3) 离心, 10°C, 8000rpm, 收集菌体。用pH为7.4的浓度为67mmol/l的磷酸缓冲液洗涤细胞两次。

[0091] 3. 全细胞酶转化巴豆甜菜碱制备L-肉碱

[0092] (1) 将上述湿菌体(干重量为16g/L)悬浮于pH为7.0的50mmol/L磷酸缓冲液中, 加入底物巴豆甜菜碱达到终浓度100g/L。

[0093] (2) 反应液置于37°C, 220rpm进行酶转化, 每隔1小时取样离心, 离心后的上清采用5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 法测定L-肉碱的产量。而离心分离的菌体重复用到酶转化反应中。

[0094] (3) L-肉碱在酶催化4小时后上清样品中, 含量达到最高值。L-肉碱产量为30.75g/L, 摩尔转化率约为34%。

[0095] 以上实施结果表明, 经基因工程改造后的大肠杆菌具有较高的酶转化巴豆甜菜碱生成L-肉碱的能力, 酶转化反应简单快速, 底物获取容易价格低廉。在上述实施例中, 转化温度37°C, pH为中性条件下, 摩尔转化率最高达42%以上。本研究中的L-肉碱产量和摩尔转化率达到国内报道的先进水平, 具有潜在的工业化应用的价值。

序列表

- <110> 武汉中科光谷绿色生物技术有限公司
- <120> 一种产 L-肉碱的大肠杆菌基因工程菌及构建方法和应用
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <400> 1
- GGGCATATGG ATCATCTACC CATGCC 26
- [0001] <210> 2
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <400> 2
- ATTGGTACCC AACCGTGAGC TATTACGCC 29
- <210> 3
- <211> 34
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <400> 3
- CACGCCCATA TGTGTGAAGG ATATGTTGAA AAAC 34
- <210> 4
- <211> 33
- <212> DNA

[0002]

<213> 人工序列

<400> 4

CAGCTCGAGT TAACGACGCA TACTCTTTGA CAA 33

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

GGGGAATTCA TGAAGAATGA AAAGAGAAAA ACGG 34

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

GCCAAGCTTT TAATCTTTCC AGTTCTGTTT CGCG 34

<210> 7

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

CGTTTACGCC GCATCCGGCA ATTCTCTGCT CCTGATGAGG GCGCTAAATG

ATTCCGGGGA TCCGTCGACC 70

<210> 8

<211> 70

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

TGCGGAGAAA AATTATATGG AAGCTTTACT CAAAAAAGCA TCTCCCCATA

TGTAGGCTGG AGCTGCTTCG 70

<210> 9

-
- <211> 29
- <212> DNA
- [0003] <213> 人工序列
- <400> 9
- ATTCTCGAGC AACCGTGAGC TATTACGCC 29



图1