

基于二维电泳高表达蛋白斑点的谷氨酸棒杆菌强启动子P1937的鉴定

张玮祎*, 张 献, 李川敏, 徐大庆#

河北农业大学生命科学学院, 河北 保定
Email: 2411793670@qq.com, #daqingxu2013@163.com

收稿日期: 2021年2月8日; 录用日期: 2021年2月28日; 发布日期: 2021年3月11日

摘 要

为了构建高效谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)细胞工厂, 需要开发出更多的高效基因表达元件。强启动子的使用是使基因高效表达的关键环节, 然而关于谷氨酸棒杆菌强启动子鉴定的报道十分少见。本试验基于谷氨酸棒杆菌细胞全蛋白二维电泳, 对其中分子量大小约为30 KDa、等电点约为4.0的斑点进行研究, 分析其对应蛋白编码基因的启动子。根据试验结果表明, *Cgl1937*基因的启动子P1937具有更高的转录活性。将强启动子Ptac-M和启动子P1937分别连接到启动子探测载体pDXW-11上, 通过电转化进谷氨酸棒杆菌*C. glutamicum* ATCC13032感受态细胞, 以获得工程菌株*C. glutamicum*/pDXW-11-Ptac-M和*C. glutamicum*/pDXW-11-P1937。测试工程菌株对氯霉素的耐受性, 实验结果表明, 菌株*C. glutamicum*/pDXW-11-Ptac-M和*C. glutamicum*/pDXW-11-P1937的耐受性分别为30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和40 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 对报告蛋白氯霉素酰基转移酶CAT酶活进行检测, 结果表明, *C. glutamicum*/pDXW-11-Ptac-M和*C. glutamicum*/pDXW-11-P1937的酶比活力分别为0.85 U/mg蛋白质和9.53 U/mg蛋白质; 通过荧光定量PCR检测两种工程菌株氯霉素乙酰基转移酶*cat*基因转录水平, 实验结果显示, *cat*基因在启动子P1937的控制下, 其转录水平是Ptac-M的2.07倍。以上结果表明, 谷氨酸棒杆菌*Cgl1937*基因的启动子P1937为强启动子。

关键词

谷氨酸棒杆菌, 二维电泳, 内源强启动子, 启动子活性检测

Identification of the Strong Promoter P1937 in *Corynebacterium glutamicum* Based on the High Expression Protein Bolt of Two-Dimensional Electrophoresis

Weiye Zhang*, Xian Zhang, Chuanmin Li, Daqing Xu#

*第一作者。
#通讯作者。

文章引用: 张玮祎, 张献, 李川敏, 徐大庆. 基于二维电泳高表达蛋白斑点的谷氨酸棒杆菌强启动子 P1937 的鉴定[J]. 微生物前沿, 2021, 10(1): 21-29. DOI: 10.12677/amb.2021.101004

Abstract

It is very necessary to develop more gene expression elements for constructing efficient *Corynebacterium glutamicum* cell factories. The usage of strong promoter is a key to gene efficient expression. However, there are few reports on identification of strong promoters in *C. glutamicum*. In this study, based on the two-dimensional electrophoresis of the whole cell protein of *C. glutamicum*, we selected the protein blot (MD, approx. 30 kDa; pI, approx. 4.0) to analyze the promoters of the genes. The results of promoter prediction showed that the promoter of the *Cgl1937* gene, P1937, has a strong activity. The strong promoter *Ptac-M* and the promoter P1937 were inserted into the promoter-probe vector pDXW-11, and transformed into *C. glutamicum* ATCC13032, generating the engineered strains *C. glutamicum*/pDXW-11-*Ptac-M* and *C. glutamicum*/pDXW-11-P1937. The results of the chloramphenicol gradient test showed that the tolerance of the strains *C. glutamicum*/pDXW-11-*Ptac-M* and *C. glutamicum*/pDXW-11-P1937 were 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The activity test of the reporter protein chloramphenicol acyltransferase CAT showed that the activities of the two strain were 0.85 U/mg protein and 9.53 U/mg protein. The qPCR test showed that the transcription level of the *cat* gene under the control of P1937 was 2.07 times higher than that under the control of the strong promoter *Ptac-M*. These results demonstrate that the promoter P1937 of gene *Cgl1937* is a strong promoter in *C. glutamicum*.

Keywords

Corynebacterium glutamicum, Two-Dimensional Electrophoresis, Endogenous Strong Promoter, Promoter Activity Test

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)在 1957 年首次被发现是作为谷氨酸的天然生产者[1]。因其具有生长迅速[2]，基因组稳定[3]，代谢网络具有可塑性[4]等优点，谷氨酸棒杆菌成为了重要的工业微生物。研究作为基因转录调控元件的谷氨酸棒杆菌启动子具有重要的理论和应用价值。启动子活性的强弱在很大程度上影响着转录的起始、持续作用的时间以及外源基因的表达水平，进而宿主细胞中外源基因的表达程度也受到了影响。基因翻译区的上游区域是属于启动子序列的区域，通过其与对应的转录因子互作，可以精确调控下游基因的转录[5]。

细菌启动子活性主要取决于启动子与一致序列的相似性，其活性会被-10 区、-35 区以及一些在致序列附近的非高度保守核苷酸所影响[6]。研究表明，在-10 区中心的 TATAAT 序列会增强启动子的活性，而-10-六聚体上游的 TG 二聚体则对启动子的强度有影响[7]。且有研究数据表明，对启动子-10 区和-35 区的碱基进行突变会对启动子的转录水平造成较大影响，而改变-10 区和-35 区之间的碱基序列则对启动子的活性影响较小[8]。谷氨酸棒杆菌中的内源启动子可通过以下 3 种主要的方法寻找：1) 基于随机序列

合成启动子库, 2) 启动子突变和 3) 使用启动子预测软件, 基于其转录组、基因组或蛋白质组来鉴定新的高效的启动子[9]。值得注意的是, 谷氨酸棒杆菌中启动子的-10 区的碱基序列是高度保守的, -35 区则相对保守[10]。尽管大肠杆菌中的启动子 *P-tac* 和 *LacZ* 均被证明能在谷氨酸棒杆菌中使用, 但低效率与泄露表达使这些外来启动子不能完美的表达目的蛋白[11]。因此, 选择高活性的内源启动子成为一大热点。然而关于谷氨酸棒杆菌高效内源启动子鉴定的相关报道很少, 这限制了应用谷氨酸棒杆菌细胞工厂高效生产重组蛋白的研究。本研究望通过分析在谷氨酸棒杆菌细胞全蛋白二维电泳图上展现的高表达蛋白斑点, 以鉴定谷氨酸棒杆菌内源强启动子序列, 为构建高效的谷氨酸棒杆菌细胞工厂提供有力的基因表达元件。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料及培养基

大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3); 野生型谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* ATCC13032 为本研究所用到的菌株。*E. coli-C. glutamicum* 启动子穿梭载体为实验室前期构建的载体[12]。表 1 为本研究中所用到的引物。

称取 5 g 的 Yeast Extract、10 g 的 Tryptone 以及 10 g 的 NaCl 配制 1 L 的 LB 培养基(pH 7.0), 用于大肠杆菌菌株培养, 培养温度为 37°C; 本试验还需用到 LBHI 培养基(pH 7.0), 配制 1 L 该培养基需称取 5 g 的 Tryptone、2.5 g 的 Yeast Extract、5 g 的 NaCl 和 18.5 g 的脑心浸液, 此培养基用于谷氨酸棒杆菌菌株的培养, 培养温度为 30°C。

Table 1. Primers used in this study

表 1. 研究中使用的引物

引物名称 The name of primers	序列 Sequences	限制酶切位点 Restriction enzyme sites	退火温度
P1937-F	atatgatccgtaacgtggcaaacgaacaatgtctcactagactaaagtgagatcgacaagcctaatt	<i>Bam</i> HI、 <i>Hind</i> III	72.1°C
P1937-R	aattaagctttgtcgatctcactttagtctagtagacattgttcgtttgcctcgttacggatccatat	<i>Bam</i> HI、 <i>Hind</i> III	72.1°C
<i>Ptac-M-F</i>	atataagcttaattgtatccgctcacaattccacacattatacagccgatgattaattgtcaacagctcaggatccaatt	<i>Bam</i> HI、 <i>Hind</i> III	71.7°C
<i>Ptac-M-R</i>	aattggatcctgagctgttgacaattaatcatcgctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaattaagcttatat	<i>Bam</i> HI、 <i>Hind</i> III	71.7°C
16s rDNA-F	gtagggtgcgagcgttgtc	—	57.6°C
16s rDNA-R	cgccattggtgttctcctctg	—	55.9°C
<i>cat-F</i>	tcagctggatattacggcct	—	51.8°C
<i>cat-R</i>	gaaagacggtgagctggtga	—	53.8°C

2.2. 前期工作

在实验室前期工作中, 获取了谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的细胞全蛋白, 并在相应公司将获得的细胞沉淀进行二维电泳及质谱分析。公司返还相关数据后, 利用质谱法分析我们从二维电泳图上选取的一些染色较深的蛋白点, 同时使用 NCBI 网站查询其氨基酸序列。最后结合谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 全基因组注释信息对二维电泳图上的高表达蛋白斑点进行分析, 分析所含蛋白质的等电点、分子量等相关数据, 以便后续与二维电泳图上的蛋白斑点进行比对。同样, 我们在前期工作中在启动子预测网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>) 上对编码人为选择的染色较深的蛋白点基因进行了启动子分析, 选择的区域为起始密码子上游的 DNA 序列处, 获得了一系列预测的启动子片段。

2.3. 扩增目的片段

为扩增目的启动子的 DNA 片段, 采用寡核苷酸退火法将设计好的正反引物合成双链 DNA。引物序列 ataggatccgtaacgtggcaaacgaacaatgtctcactagactaaagtgagatcgacaaagcttaatt (P1937-F)和 aattaagctttgtcgtatcacttttagtctagtagagacattgttcgtttgccctcggtacggatccat (P1937-R)用于合成启动子 P1937 片段, 利用引物序列 atataagcttaattgttatccgctcacaattccacacattatacagagccgatgattaattgtcaacagctcaggatccaatt (*Ptac-M-F*)及 aattggatcctgagctgttgacaattaatcatcggctcgataatgtgtggaattgtgagcggataacaattaagcttata (*Ptac-M-R*) 扩增启动子 *Ptac-M* 片段。正、反向引物各 1 μ L 囊括在制备的 50 μ L PCR 反应体系。经过 10 倍稀释的正反引物及所需的其他试剂充分混匀后进行 PCR 反应, 反应条件同张献等的方法[13]。

2.4. 构建重组载体

启动子探测载体上含有的 *Bam*HI 及 *Hind*III 的酶切位点, 因此在对引物进行设计时也加入这两种酶的酶切位点, 利用这两种限制性内切酶分别对启动子 P1937 和 *Ptac-M* 以及启动子探测载体 pDXW-11 在相应酶切位点处进行双酶切, 随后 T4 连接酶的使用, 能让片段用与启动子探测载体相连接形成重组载体, 后通过热激转化法转化进 *E. coli* 感受态细胞中。其中 *E. coli* 感受态细胞的制备以及转化方法遵循 Sambrook 等的方法进行[14]。转化并利用氯霉素抗性验证成功后, 即获得了携带启动子 P1937 的重组载体 pDXW-11-P1937 和携带启动子 *Ptac-M* 的重组载体 pDXW-11-*Ptac-M*。

2.5. 谷氨酸棒杆菌电转化

首先遵循 Xu 等[15]的方法制得谷氨酸棒杆菌感受态细胞。后通过电击转化方式将重组探测载体 pDXW-11-P1937 和 pDXW-11-*Ptac-M* 转化进 *C. glutamicum* ATCC13032 感受态细胞中, 其转化方法同样依据 Xu 等[15]的方法进行。利用氯霉素抗性验证成功后, 即构建了带有启动子 P1937 的重组菌株 *C. glutamicum*/pDXW-11-P1937 和带有启动子 *Ptac-M* 的重组菌株 *C. glutamicum*/pDXW-11-*Ptac-M*。

2.6. 谷氨酸棒杆菌内源启动子活性分析

2.6.1. 耐受性实验

载体上存在氯霉素筛选标记, 因此制备具有不同氯霉素浓度梯度的 LBHI 平板, 并将携带有启动子 P1937 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 和携带启动子 *Ptac-M* 的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 这两种菌株在以上平板上进行接种, 并观察菌落生长情况, 初步判断启动子活性强弱。

2.6.2. 氯霉素乙酰基转移酶活检测

用 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8)溶液洗涤收集到离心管中的 30 mL 培养液的细胞沉淀, 高速离心后, 用移液枪吸取 1 mL 上述缓冲液吹吸细胞沉淀, 使其重悬, 对悬浊液进行超声波破碎, 整个反应过程始终处于低温状态进行。破碎后离心获得上清, 上清液即为粗酶液, 依据 Shaw 等[16]的方法对氯霉素乙酰基转移酶活进行测定。同时以 BCA 蛋白作为标准品, 绘制标准蛋白曲线。最终计算氯霉素乙酰基转移酶活力。

2.6.3. qPCR 反应

当菌液 OD₆₀₀ 为 3 时收集菌体沉淀, 依照 RNA 提取试剂盒的操作步骤提取谷氨酸棒杆菌细菌总 RNA, 该试剂盒使用的方法为 TRIZOL 法。将提取出的 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳以判定其是否完整, 同时检测 RNA 浓度, 以便后续试验时计算相关试剂的加入量。随后对提取的 RNA 进行后续操作, 首先使用试剂盒去除谷氨酸棒杆菌基因组 DNA, 其次通过反转录形成 cDNA。得到相应菌株的 cDNA 后使用绿色荧光

染料以及 qPCR 检测系统 Archimed-X4 进行 qPCR 反应。本试验中每次反应阴性对照以及标准品校正的设置是为了确保试验结果有效, 同时还需要进行三个生物学重复和三个技术重复, 以进一步保障试验结果的有效性。根据文献记载, 本试验中同样以谷氨酸棒杆菌的 16S rDNA 作为内参基因, ΔCT 记作不同菌株 CT 值的差。氯霉素乙酰转移酶作为报告基因, 其表达水平表示的为带有重组启动子探测载体的谷氨酸棒杆菌中相应启动子的转录水平, 16S rDNA 基因的转录水平则表示野生型谷氨酸棒杆菌中启动子的转录水平[17]。对数据进行处理是使用 Livak 等[18]的 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法, 其中 $\Delta\Delta\text{CT}$ 是处理组, 即构建的工程菌株的 CT 值的差减去对照组, 即携带强启动子 *Ptac-M* 的谷氨酸棒杆菌的 CT 值的差, 处理组 ΔCT 的计算方法为靶基因, 即氯霉素乙酰转移酶的 CT 值与内参基因, 即谷氨酸棒杆菌 16S rDNA 的 CT 值的差, 对照组 ΔCT 值应用同样的方式处理数据。最终计算得出菌株 *C. glutamicum/pDXW-11-P1937* 和 *C. glutamicum/pDXW-11-Ptac-M* 的 *cat* 基因的转录水平。

3. 结果与分析

3.1. 二维电泳分离谷氨酸棒杆菌中蛋白

二维电泳技术的使用, 使谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 细胞中所含有的蛋白质得到分离, 此步骤实验室前期工作中已经完成。二维电泳图如图 1 所示。详细内容参见张献[13]等文章。

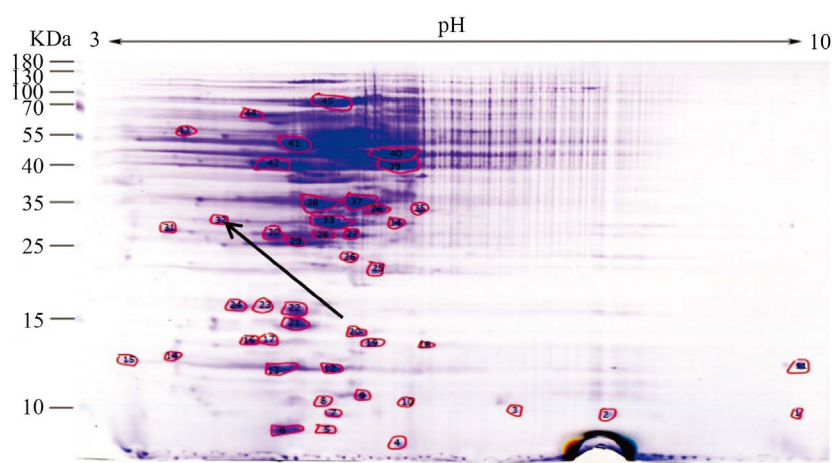


Figure 1. The map of two-dimensional electrophoresis (the blots indicated by arrows with a MW size of approximately 30 KDa and a pI of approximately 4.0)

图 1. 二维电泳图(箭头所指的 MW 大小约为 30 KDa, pI 约为 4.0 的斑点)

选择图 1 中箭头所指出来的蛋白点作为鉴定强启动子的点的原因为该斑点颜色较深, 该蛋白斑点的 MW 约为 30 KDa, pI 约为 4.0。实验室前期工作中已将上述标注出的蛋白斑点中所含有的蛋白质的分子质量以及等电点进行了鉴定, 与所选的蛋白斑点匹配后, 发现有 6 种蛋白质与二维电泳上的高表达蛋白斑点理论上相匹配。其分别为 *dapF*、*gluB*、*aftC*、*Cgl0148*、*Cgl0392*、*Cgl1937*、*Cgl2540*。其中 *dap* 蛋白家族、*glu* 蛋白家族和 *aft* 蛋白家族含有单个蛋白, 即 *dapF* 蛋白、*gluB* 蛋白以及 *aftC* 蛋白, 多重转录元件控制着它们的转录, 所以难以预测准确的启动子序列。因此, *Cgl1937*、*Cgl0148*、*Cgl0392* 以及 *Cgl2540* 基因被选择用来预测其相应启动子序列。

3.2. 网站预测启动子序列

利用预测网站对上述筛选出的编码相关蛋白质基因的启动子序列进行预测, 发现未能预测出编码

Cgl0148 以及 *Cgl0392*、*Cgl2540* 基因的相应启动子序列。*Cgl1937* 基因预测出了相应启动子序列，其序列为 GTAACGTGGCAAACGAACAATGTCTCACTAGACTAAAGTGAGATCGACA。如图 2 所示，ATG 为 *Cgl1937* 基因的开放阅读框的起始密码子，TAA 则作为终止密码子，序列总长度为 72 bp。由此获得了 *Cgl1937* 基因的启动子 P1937。

```

ATGGCTTCTA  AACTGTTAC  CGTCGGTTCC  TCAGTAGGCT  TACATGCCCG
TCCTGCATCG  ATTATCGCGG  AAGCTGCCGC  AGAGTATGAT  GACGAAATAT
TGCTTACACT  CGTGGGAAGT  GATGACGATG  AGGAAACGGA  CGCGAGCTCT
TCCCTAATGA  TTATGGCTCT  GGGGGCCGAG  CACGGTAATG  AAGTTACTGT
CACCTCAGAT  AACGCAGAGG  CGGTAGAAAA  GATCGCTGCC  TTAATAGCAC
AAGACTTGA  TGCGGAG

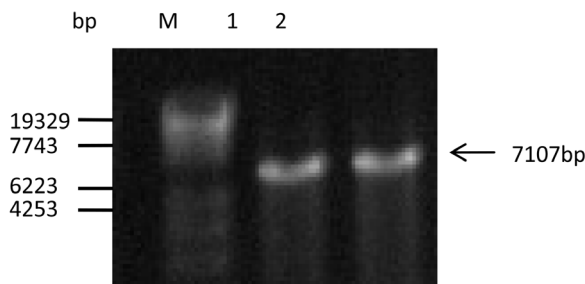
```

Figure 2. The ORF sequences of gene *Cgl1937* (the grey part) and the sequences of the predict promoter (underlined nucleotides)

图 2. *Cgl1937* 基因开放阅读框(灰色部分)及预测的启动子序列(划线部分)

3.3. 工程菌株的构建

通过电击将扩增得到的启动子 P1937 和 *Ptac-M* 的 DNA 片段与启动子探测载体 pDXW-11 连接后的重组载体转化进谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 感受态细胞中，抽提转化子 DNA，对其进行验证时采用双酶切法。如图 3 所示，酶切后质粒大小达到了预期，说明成功构建并得到了携带启动子 P1937 的重组工程菌株 *C. glutamicum*/pDXW-11-P1937 和携带启动子 *Ptac-M* 的重组工程菌株 *C. glutamicum*/pDXW-11-*Ptac-M*。



(M: Marker λ -EcoT14; 1: *C. glutamicum*/pDXW-11-*Ptac-M*; 2: *C. glutamicum*/pDXW-11-P1937)

Figure 3. The result of double digestions

图 3. 双酶切结果图

3.4. 鉴定内源启动子 P1937 转录活性

首先初步判定所含有的启动子的转录活性，使用氯霉素分别对野生型谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* ATCC13032 以及在本研究中构建成功的工程菌株 *C. glutamicum*/pDXW-11-P1937、*C. glutamicum*/pDXW-11-*Ptac-M* 进行耐受性实验。实验结果表明，以上三种菌株的氯霉素耐受浓度分别为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以及 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。随后为进一步研究两种启动子的转录活性，对工程菌株 *C. glutamicum*/pDXW-11-P1937 和 *C. glutamicum*/pDXW-11-*Ptac-M* 的氯霉素乙酰基转移酶的比活力值进行检测，得到 *C. glutamicum*/pDXW-11-P1937 的 CAT 蛋白酶比活力为 9.53 U/mg 蛋白质；*C. glutamicum*/pDXW-11-*Ptac-M* 的 CAT 蛋白酶比活力为 0.85 U/mg 蛋白质，结果见图 4。

通过荧光定量 PCR 技术来直观的表现构建的工程菌株 *C. glutamicum*/pDXW-11-P1937 中所含有的启动子 P1937 和 *C. glutamicum*/pDXW-11-*Ptac-M* 中所含有的强启动子 *Ptac-M*，对氯霉素乙酰基转移酶基

因 *cat* 的转录水平, 结果表明, 启动子 P1937 控制下的 *cat* 基因的转录水平高于启动子 *Ptac-M* 控制下的水平, 是其 2.07 倍, 结果见图 5。

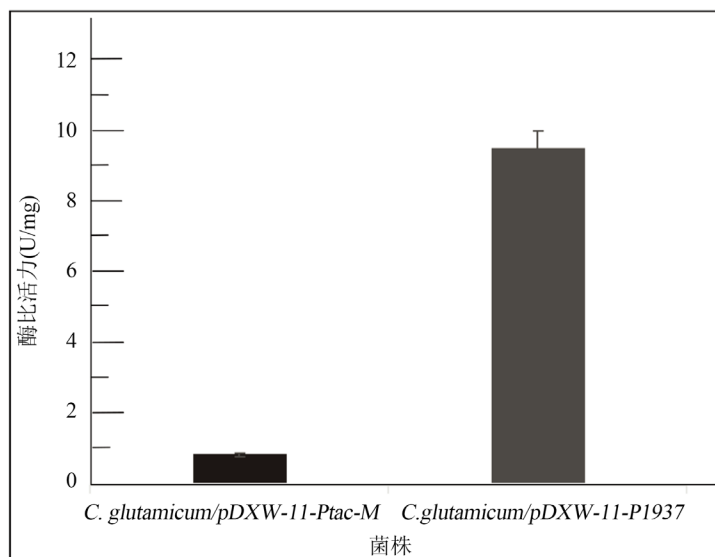


Figure 4. The detection of Chloramphenicol Acetyltransferase's specific activity

图 4. 氯霉素乙酰基转移酶酶比活力检测

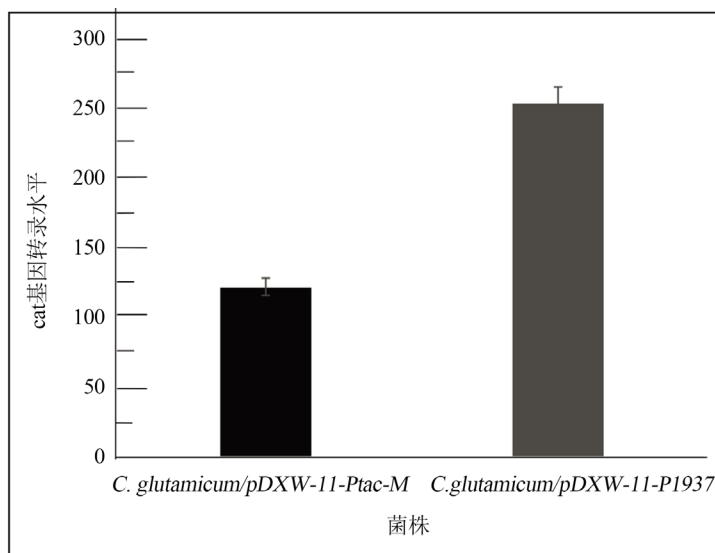


Figure 5. The result of qPCR

图 5. qPCR 检测结果

4. 结论与讨论

本实验室的前期工作中, 二维电泳技术的应用, 使谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* ATCC13032 的细胞中所含蛋白质得到了分离, 选取其中一些高表达的蛋白点进行质谱解析, 并通过在线启动子预测网站, 对选出的蛋白点处的编码相应蛋白质的基因的启动子进行预测, 相关文章详见张献等[13]。前期构建的启动子 *Ptac-M* 为本试验所用的对照启动子, 且其经过验证是谷氨酸棒杆菌强启动子[12]。基于以上成果,

为检测启动子转录活性的强弱,本研究设计了氯霉素耐受性实验及报告蛋白氯霉素酰基转移酶酶活实验。试验结果表明预测出的编码 *CgI1937* 蛋白基因的启动子 P1937 的转录活性高于谷氨酸棒杆菌强启动子 *Ptac-M*。而 qPCR 实验的结果则更加直观的表明在启动子 P1937 调控下 *cat* 基因的转录水平明显大于在启动子 *Ptac-M* 的调控下的转录水平。以上结果均可证明启动子 P1937 在谷氨酸棒杆菌中为强启动子。

为了更深入研究细菌的启动子,就需要人们识别和发现新的启动子,以满足人们的各种需求。本试验寻找谷氨酸棒杆菌内源启动子的方法为基于谷氨酸棒杆菌蛋白组的基础,通过启动子预测网站进行预测,以寻找更高效的内源启动子。此方法可以更加广泛的寻找启动子序列,为人们提供更多选择。除了通过上述方法寻找启动子,还可以基于启动子的结构特征、启动子在基因组中的分布特征、计算机建模、RNA 聚合酶的特殊亚基等方式寻找新的启动子[19]。

目前,对谷氨酸棒杆菌启动子的研究是一大热点,因其控制着转录的起始,且影响着谷氨酸棒杆菌蛋白表达系统能否高效表达目的蛋白。虽然目前关于谷氨酸棒杆菌内源强启动子的相关报道较少,但是会有越来越多的启动子元件被识别、被赋予功能,独特的启动子序列和有调控功能的元件可以被更合理的设计出来[20]。本研究成功鉴定出高活性内源启动子 P1937,为之后通过建立谷氨酸棒杆菌细胞工厂,利用其高效表达目标蛋白奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M., *et al.* (1957) *Applied Microbiology*, **3**, 193. <https://doi.org/10.2323/jgam.3.193>
- [2] Hartbrich, A., Schmitz, G., Weuster-Botz, D., *et al.* (1996) Development and Application of a Membrane Cyclone Reactor for *in Vivo* NMR Spectroscopy with High Microbial Cell Densities. *Biotechnology and Bioengineering*, **51**, 624-635. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960920\)51:6<624::AID-BIT2>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960920)51:6<624::AID-BIT2>3.0.CO;2-J)
- [3] Nakamura, Y., Nishio, Y., Ikeo, K., *et al.* (2003) The Genome Stability in *Corynebacterium* Species Due to Lack of the Recombination Repair System. *Gene*, **317**, 149-155. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00653-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00653-X)
- [4] 龙梦飞, 徐美娟, 张显, 等. 合成生物学与代谢工程在谷氨酸棒杆菌产氨基酸中的应用[J]. 中国科学, 2019, 49(5): 541-552.
- [5] 李慧萍, 姚兴伟, 郭楠, 等. 影响启动子活性测定的关键影响因素[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(7): 1017-1020.
- [6] Xu, N., Wei, L. and Liu, J. (2019) Recent Advances in the Applications of Promoter Engineering for the Optimization of Metabolite Biosynthesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **35**, 33. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2606-0>
- [7] Albersmeier, A., Pfeifer-Sancar, K., Ruckert, C., *et al.* (2017) Genome-Wide Determination of Transcription Start Sites Reveals New Insights into Promoter Structures in the Actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, **257**, 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.008>
- [8] Jensen, R.R. and Hammer, K. (1998) Artificial Promoters for Metabolic Optimization. *Biotechnology and Bioengineering*, **58**, 191-195. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980420\)58:2/3<191::AID-BIT11>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980420)58:2/3<191::AID-BIT11>3.0.CO;2-G)
- [9] Zhang, W., Zhao, Z.H., Yang, Y.K., *et al.* (2003) Construction of an Expression Vector That Uses the *aph* Promoter for Protein Expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid*, **94**, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.09.001>
- [10] Gruber, T.M. and Gross, C.A. (2003) Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space. *Annual Review of Microbiology*, **57**, 441-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090913>
- [11] Liu, X.X., Yang, Y.K., Zhang, W., *et al.* (2015) Expression of Recombinant Protein Using *Corynebacterium glutamicum*: Progress, Challenges and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, **20**, 1-13.
- [12] Xu, D., Tan, Y., Shi, F., *et al.* (2011) Construction of a Novel Promoter Vector and Its Application for Screening Strong Promoter for *Brevibacterium flavum* Metabolic Engineering. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**, 961-968. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0539-8>
- [13] 张献, 张玮祎, 李川敏, 等. 谷氨酸棒杆菌 *CgI0864* 基因强启动子的鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2020, 43(2): 76-82.
- [14] Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.

-
- [15] Xu, D., Tan, Y., Huan, X., *et al.* (2010) Construction of a Novel Shuttle Vector for Use in *Brevibacterium flavum*, an Industrial Amino Acid Producer. *Journal of Microbiological Methods*, **80**, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.003>
- [16] Shaw, W.V. (1975) Chloramphenicol Acetyltransferase from Chloramphenicol-Resistant Bacteria. *Methods in Enzymology*, **43**, 737-755. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(75\)43141-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(75)43141-X)
- [17] Zhao, Z.H., Liu, X.X., Zhang, W., *et al.* (2016) Construction of Genetic Parts from the *Corynebacterium glutamicum* Genome with High Expression Activities. *Biotechnology Letters*, **38**, 2119-2126. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2196-y>
- [18] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods*, **24**, 70-79. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [19] 徐友强, 马翠卿, 陶飞. 细菌启动子识别及应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2010, 26(10): 1393-1403.
- [20] Jeschek, M., Gerngross, D. and Panke, S. (2016) Rationally Reduced Libraries for Combinatorial Pathway Optimization Minimizing Experimental Efforts. *Nature Communications*, **7**, Article No. 11163. <https://doi.org/10.1038/ncomms11163>