

启动子替代构建克雷伯氏菌普鲁兰酶高产菌株^{*}

许苗苗¹,焦国宝²,王明道¹,孙利鹏²,刘仲敏²,邱立友¹

1(河南农业大学 生命科学院,农业部农业微生物酶工程重点实验室,河南 郑州,450002)

2(河南仰韶生化工程有限公司,河南 浉池,472400)

摘 要 应用启动子替代技术将普鲁兰酶产生菌克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.) HN9 的普鲁兰酶基因的启动子替换为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 P43 启动子,构建高产酶菌株。通过融合 PCR,将由 3 个 DNA 片段融合得到启动子替代同源重组片段,该 3 个 DNA 片段分别是带有克雷伯氏菌普鲁兰酶基因启动子上游部分同源序列的四环素抗性基因(*Tet*)的上游片段 Tet1、带有枯草芽孢杆菌 P43 启动子部分上游同源序列的 *Tet* 下游片段 Tet2 和带有克雷伯氏菌普鲁兰酶基因上游同源序列的 P43 启动子部分序列的 Pro。经电转化将同源重组片段导入克雷伯氏菌中,转化子的普鲁兰酶基因表达水平比出发菌株提高 10.23 ~ 11.45 倍,摇瓶发酵酶活力提高 8.97 ~ 10.52 倍。结果表明,应用高效组成型启动子 P43 替代原始菌株的普鲁兰酶基因的启动子能够显著提高普鲁兰酶基因的表达量和发酵酶活力。

关键词 克雷伯氏菌;普鲁兰酶;启动子替代

普鲁兰酶(EC 3.2.1.41)不仅能够专一性地水解支链淀粉分支点中的 α -1,6 糖苷键,还能将最小单位的支链分解,与淀粉酶和糖化酶配合使用,可大幅度提高液化后淀粉的水解速度和糖化率,和 β -淀粉酶联合作用,可大大提高麦芽糖得率^[1],因此被广泛应用于高葡萄糖浆、超高麦芽糖浆、啤酒及改性淀粉等生产中^[2-3]。尽管我国在普鲁兰酶产生菌的资源筛选、分子改造及基因工程等方面的研究取得了一定的进展,但无论是从自然界筛选的菌株还是工程菌株,均存在酶活力低、酶学性质差等问题,至今尚未实现工业化生产,市场被少数大型跨国公司所垄断,价格昂贵,难以满足国内食品与发酵等行业的迫切需要。

已报道的提高普鲁兰酶发酵活力的方法有理化诱变育种和构建异源表达工程菌。应用紫外线或亚硝基胍诱变,及紫外线与亚硝基胍、硫酸二乙酯或甲基磺酸乙酯等复合诱变,普鲁兰酶产生菌芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) 的普鲁兰酶发酵活力提高 1.8 ~ 3.4 倍^[4-8]。应用基因工程手段,在大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、产气克雷伯氏菌(*Klebsiella aerogenes*)或毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中进行异源表达,已获得了一些产酶能力强于原始菌的重组菌,发酵活力比原始

菌株提高上百倍^[9-12],成为提高普鲁兰酶发酵活力的主要育种策略。应用启动子工程,将普鲁兰酶产生菌的普鲁兰酶基因的启动子用高效启动子替代构建高产菌株尚未见报道。本研究将普鲁兰酶产生菌克雷伯氏菌 HN9 的普鲁兰酶基因的原有启动子替换成枯草芽孢杆菌的高效组成型启动子 P43,得到的转化子的发酵酶活力比出发菌株提高了 10 余倍。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒载体

克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.) HN9,河南农业大学酶工程实验室保藏菌株。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 1.4255,中国普通微生物菌种保藏管理中心。pBR322 质粒,宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 培养基

斜面保藏培养基(g/L):糯米粉 10.0,蛋白胨 5.0,酵母膏 5.0, KH_2PO_4 0.50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10, KH_2PO_4 0.50,琼脂 20.0, pH 6.0

种子培养基(g/L):蛋白胨 10.0,牛肉膏 3.0, NaCl 5.0, pH 6.0

产酶培养基(g/L):糯米粉 5.0,蛋白胨 5.0, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, pH 自然。

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0, NaCl 10.0(固体培养基含 15.0 琼脂粉)。

1.3 细菌基因组 DNA 的提取

第一作者:硕士研究生(邱立友教授为通讯作者,E-mail:qliyou@henau.edu.cn)。

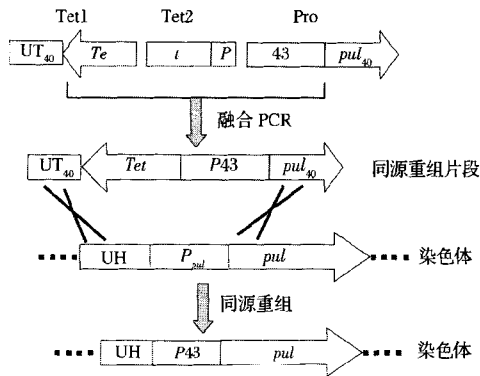
^{*}“十二五”农村领域国家科技计划课题(2013AA102101-2)

收稿日期:2015-05-18,改回日期:2015-06-20

将枯草芽孢杆菌或克雷伯氏菌接种到 LB 液体培养基中,30 ℃,220 r/min 摇瓶培养 15 h,8 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,然后按照 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明书提取菌体 DNA。

1.4 PCR 扩增

普鲁兰酶基因启动子替代同源重组片段的构建及同源重组启动子替代过程见图 1。



Tet1、Tet2、Pro:组成同源重组片段的 3 个 DNA 片段;UH:上游同源序列;Tet:四环素抗性基因;P43:枯草芽孢杆菌 P43 启动子; pul:普鲁兰酶基因

图 1 同源重组片段的构建及同源重组启动子替代示意图

Fig. 1 The construction of the homologous recombination fragment and promoter swapping

同源重组片段由 3 个 DNA 片段构成,分别是带有克雷伯氏菌普鲁兰酶基因启动子上游部分同源序列的四环素抗性基因(*Tet*)的上游片段 Tet1(同源臂长 40 bp)、带有枯草芽孢杆菌 P43 启动子部分上游同源序列的 *Tet* 下游片段 Tet2、和带有克雷伯氏菌普鲁兰酶基因上游同源序列的 P43 启动子部分序列的 Pro(同源臂长 40 bp)。PCR 扩增 Tet1 所用的引物是 Tet-F1 和 Tet-R1(表 1),以 pBR322 质粒为模板,扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,66 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 31 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增 Tet2 所用的引物是 Tet-F2 和 Tet-R2(表 1),模板是 pBR322 质粒。扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,70 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 31 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增片段 P 所用的引物是 Pro-F3 和 Pro-R3(表 1),以枯草芽孢杆菌基因组 DNA 为模板,扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,70 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 31 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。

1.5 融合 PCR

采用 3 轮融合 PCR 将 3 个 DNA 片段 Tet1、Tet2 和 Pro 融合构建普鲁兰酶基因启动子替代同源重组片段。第 1 轮 PCR 的模板是 Tet1 和 Tet2 片段,并以

表 1 PCR 引物^①
Table 1 Primers used in this study

名称	引物碱基序列	PCR 产物大小/ bp
Tet-F1	5'-GGGGGATGATTGCGCCCCGGAAGCAAAAATATCTAATTAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCG-3'	838
Tet-R1	5'-GCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTC-3'	
Tet-F2	5'-CGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTCGGTCATTTTCGGCGAGGACCGCTTCCCTGGAG-3'	690
Tet-R2	5'-CCTGCATGCACGTCGACACGAGATGCCCGCGT-3'	
Pro-F3	5'-ACCGGCGGCATCTCCTGTCGACGTGCATGCAGG-3'	481
Pro-R3	5'-TCCAAGCTAATAGGGCATGACAGGTATATCTGAGCATCGATATAATGCTACCGCTATCACTT-3'	
ZF1	5'-CTCAGGACTCACAGGGAATACCA-3'	550
ZR1	5'-GCATAACCAAGCCTATGCCTACA-3'	
YF2	5'-CCTACTACTGGGCTGCTTCCTA-3'	1 410
YR2	5'-CACATCCTGCGGGTCGGGCCTA-3'	
16S_F	5'-AGAAGAAGCACCGGCTAACTC-3'	213
16S_R	5'-CTCTACGCATTTACCGCTAC-3'	
pul(A)-F	5'-GAAGCAGAACGACAGCAAGG-3'	408
pul(A)-R	5'-GTGGTCCATACCGCCAGTGA-3'	

注:下划线指示的是同源臂序列。

此两片段做引物。PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,71 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 80 s,共 18 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。第 2 轮 PCR 的模板是第 1 轮 PCR 的产物和 Pro 片段,以该 2 片段作为引

物,PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,69 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 100 s,共 18 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。第 3 轮 PCR 的模板是第 2 轮 PCR 产物,所用引物是 Tet-F1 与 Pro-R3。PCR 扩增条件:

94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,66 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 100 s,共 33 个循环,72 ℃延伸 10 min。将第 3 轮 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,将融好的片段切胶纯化获得同源重组片段,送北京华大基因有限公司进行测序验证。

1.6 转化及转化子的 PCR 鉴定

按魏东等的方法^[13]制备克雷伯氏菌 HN9 感受态细胞。参考郑艳的方法^[14]进行电转化。取 2 μL 的同源重组片段(98 ng/μL)与 50 μL 的克雷伯氏菌 HN9 感受态细胞充分混合,然后转移至 2 mm 的电击转化杯中,采用 Bio-Rad 电击转化仪,电击参数:2 kV,25 μF 和电阻 200 Ω。电穿孔转化后,将电击转化液迅速转移至新鲜的 1 mL LB 液体培养基中,于 37 ℃、200 r/min 摇床复苏 60 min,然后均匀地涂在含有 22 μg/mL 四环素的抗性 LB 平板中,37℃ 恒温培养箱培养过夜。能够长出的菌落即是转化子。将转化子在不含四环素的 LB 平板中継代培养 10 代,再转接到含四环素的 LB 平板中能够生长的菌落即是转化子。

转化子的 PCR 鉴定所用引物是 Tet-F1 与 Pro-R3 (表 1),模板是转化子的基因组 DNA。PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,66℃ 退火 30 s,72 ℃延伸 100 s,共 30 个循环,72℃ 延伸 10 min。为了进一步验证同源重组部位是否正确,采用引物 ZF1 和 ZR1、YF2 和 YR2(表 1)再进行 2 次 PCR 鉴定。ZF1 位于克雷伯氏菌基因组中普鲁兰酶基因启动子的上游,ZR1 和 YF2 位于同源重组片段中,YR2 位于克雷伯氏菌基因组中普鲁兰酶基因的下游。PCR 所用的模板是转化子的基因组 DNA,PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,共 30 个循环,72℃ 延伸 10 min。PCR 产物分别用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.7 半定量 PCR

转化子和出发菌株普鲁兰酶基因表达量采用半定量 PCR 方法进行分析。总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂,提取的总 RNA 用 gDNA Eraser 于 42 ℃反应 2 min 去除基因组 DNA 后,再进行反转录合成 cDNA,cDNA 的合成采用 PrimeScript RT Reagent Kit,37℃ 反应 15 min,之后在 85 ℃反应 5 s,用作半定量 PCR 反应模板。

以 pul(A)-F 和 pul(A)-R 为上下游引物(表 1)PCR 扩增普鲁兰酶基因 cDNA,PCR 扩增条件:94 ℃

预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,共 36 个循环,72 ℃延伸 10 min。以 16S_F 和 16S_R 为上下游引物(表 1)PCR 扩增 housekeeping gene 16S rRNA 基因 cDNA,PCR 扩增条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45s,共 32 个循环,72 ℃延伸 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 显色后,用凝胶成像系统(G-BOX 凝胶成像系统,英国 Syngene 公司)照相并用 Gel Base/Gel Blot Support 软件分析各电泳条带的灰度值。

1.8 普鲁兰酶活力测定

克雷伯氏菌 HN9 出发菌株或转化子斜面菌苔各接 1 环于 100 mL 的种子培养基中,34 ℃、220 r/min 摇瓶培养 16 h。制备的种子培养液按 8% 的比例接入 50 mL 的产酶培养基中,30 ℃、200 r/min 摇瓶培养 48 h。发酵液 8 000 r/min 离心 20 min,取上清液测定普鲁兰酶活力。酶活测定采用 DNS 法^[15],于 540 nm 波长下比色测定酶水解普鲁兰糖产生的还原糖的含量。酶活力单位定义为,在上述条件下,每分钟产生相当于 1 μmol 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活力单位。

2 结果与分析

2.1 启动子替代同源重组片段的构建

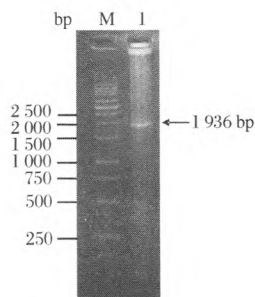
分别以 pBR322 质粒和枯草芽孢杆菌基因组 DNA 为模板,PCR 扩增得到构成普鲁兰酶基因启动子替代同源重组片段的 3 个 DNA 片段 Tet1、Tet2 和 Pro(图 2)。经 3 轮融合 PCR 得到同源重组片段(图 3)。



M - 1 kb plus DNA Maker; 1 - Tet1; 2 - Tet2; 3 - Pro

图 2 构成启动子替代同源重组片段的 3 个 DNA 片段的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification for the three DNA fragments which will be used to construct the homologous recombination fragment for promoter swapping



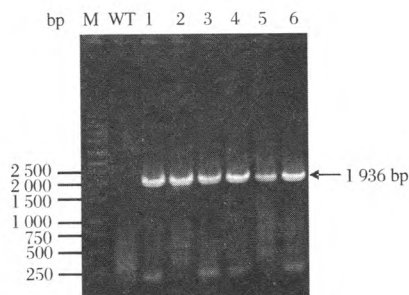
M - 1kb plus DNA Maker; 1 - 融合 PCR 产物

图 3 三个 DNA 片段的融合 PCR 产物的电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis analysis of the PCR products for the three DNA fragments fusion

2.2 转化子的鉴定

将普鲁兰酶基因启动子替代同源重组片段经电转化导入克雷伯氏菌中,得到的转化子经继代培养得到遗传稳定的转化子。随机挑选 6 个转化子,提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。从该 6 个转化子中均能扩增得到全长同源重组片段(图 4)、克雷伯氏菌普鲁兰酶基因启动子上游与同源重组片段上游之间的序列(图 5)和同源重组片段下游与克雷伯氏菌普鲁兰酶基因上游之间的序列(图 6),表明同源重组片段导入转化子中并发生了正确的同源重组,克雷伯氏菌普鲁兰酶基因的启动子被枯草芽孢杆菌的 P43 启动子所替代。



M - 1kb plus DNA Maker; WT - 出发菌株; 1 ~ 6 - 转化子

图 4 转化子基因组中导入的启动子替代同源重组片段的 PCR 鉴定

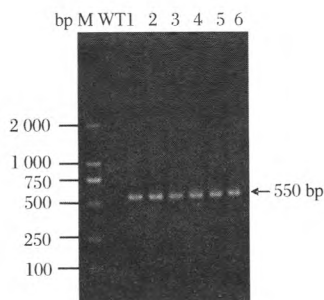
Fig. 4 PCR for the identification of the introduced homologous recombination fragment in the transformants

2.3 转化子普鲁兰酶基因表达量半定量 PCR 分析

半定量 PCR 分析 6 个随机挑选的转化子的普鲁兰酶基因的表达量,均显著高于出发菌株,表达水平比出发菌株提高 10.23 ~ 11.45 倍(图 7)。

2.4 转化子普鲁兰酶发酵活力

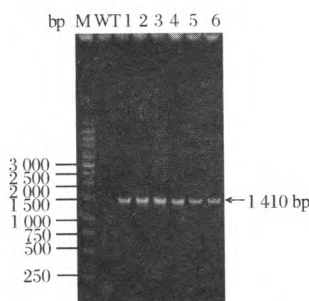
用产酶培养基摇瓶培养转化子和出发菌株,测定



M - DL2000 DNA Maker; WT - 出发菌株; 1 ~ 6 - 转化子

图 5 转化子基因组中普鲁兰酶基因启动子上游与同源重组片段上游之间序列的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR for the identification of the sequence between the up stream of the pullulanase gene promoter and in the up stream of the homologous recombination fragment in the transformants



M - 1kb plus DNA Maker; WT - 出发菌株; 1 ~ 6 - 转化子

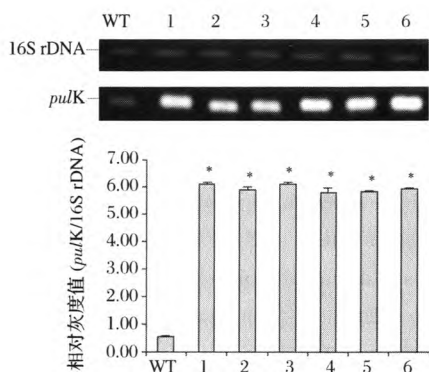
图 6 转化子基因组中同源重组片段下游与普鲁兰酶基因下游之间序列的 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR for the identification of the sequence between the down stream in the homologous recombination fragment and the down stream of the pullulanase gene in the transformants

其普鲁兰酶活力,6 个随机挑选的转化子的普鲁兰酶活力均显著高于出发菌株,比出发菌株提高 8.97 ~ 10.52 倍(图 8)。

3 讨论

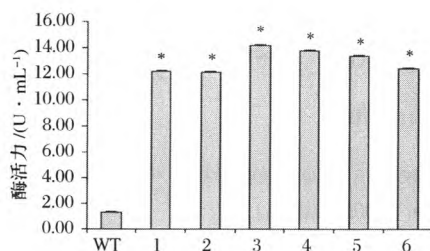
产普鲁兰酶野生菌中普鲁兰酶的合成受到麦芽糖调节子的调控,淀粉、普鲁兰糖、麦芽三糖和麦芽糖诱导该酶的合成,而葡萄糖则抑制该酶的合成^[16]。这有可能是野生菌株及其诱变突变株发酵酶活力低的原因。构建工程菌异源表达普鲁兰酶基因,可以打破这种调控机制。目前,异源表达普鲁兰酶的常用原核宿主菌是大肠杆菌,与大多数野生菌株产的普鲁兰酶是胞外分泌型酶^[17]不同,大肠杆菌表达的普鲁兰酶位于胞内包涵体中,给酶的提取纯化带来困难。同



pulK - 克雷伯氏菌 HN9 的普鲁兰酶基因; WT - 出发菌株;
1~6 - 转化子; * - 表示与出发菌株有显著差异 ($P < 0.05$)

图7 普鲁兰酶基因表达水平的半定量 PCR 分析

Fig. 7 The analysis of semi-quantitative RT-PCR
for the pullulanase gene expression



WT - 出发菌株; 1~6 - 转化子; * - 表示与出发菌株有显著
差异 ($P < 0.05$)

图8 克雷伯氏菌 HN9 及其转化子的普鲁兰酶
发酵酶活力

Fig. 8 pullulan enzyme activities of *Klebsiella* HN9
and the transformants in the ferment broth

样的问题也存在于普鲁兰酶异源表达的另一常用的
原核宿主菌枯草芽孢杆菌中^[18]。

启动子工程是代谢工程的重要策略,采用具有不同特点的启动子精细调节内源或外源基因的表达,使产物产量最大化^[19]。利用3种类型的启动子 P43, *Pap*r 和 *Pam*y 调控枯草芽孢杆菌异源表达普鲁兰酶, *Pap*r 是嗜碱芽孢杆菌 (*B. alcalophilus*) 的碱性蛋白酶基因的启动子, *Pam*y 是解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 的 α -淀粉酶基因的启动子,它们表达普鲁兰酶基因的效率 *Pap*r > *Pam*y > P43^[20]。然而, *Pap*r 是诱导型启动子,受淀粉诱导。 *Pap*r 是时期特异性启动子,特异性地在对数末期表达^[21]。本研究用枯草芽孢杆菌的组成型启动子 P43 替代克雷伯氏菌普鲁兰酶基因的启动子,打破了原有的普鲁兰酶基因表达的调控机制,实现了普鲁兰酶基因在原始菌中的高效表达,基因表达水平和发酵酶活力均比

原始菌提高 10 余倍。该技术与理化诱变相比,能够进行定向育种,育种效率高,用组成型启动子替代原始菌的诱导型启动子,打破了原始菌细胞的代谢调控机制。与构建异源表达工程菌相比,没有改变菌株原有的代谢途径和产物分泌途径,能够避免或减少宿主菌蛋白酶对外源目的酶蛋白的降解。采用其他比 P43 更高效的启动子来替代原始菌普鲁兰酶基因的启动子,是否能够得到产酶更高的菌株,还有待进一步研究。构建的启动子替代转化子中过量转录的 mRNA 可能不稳定,影响目标基因的过量表达和产酶活力,也有待进一步的探索。

参 考 文 献

- [1] Nair S U, Singhal R S, Kamat M Y. Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDTA-13 [J]. *Bioresour Technology*, 2007, 98(4): 856 - 859.
- [2] 乔宇, 丁宏标, 王海燕, 等. 普鲁兰酶的研究进展 [J]. *生物技术进展*, 2011, 1(3): 189 - 194.
- [3] 胡先望, 陈朋, 吴润, 等. 新普鲁兰酶水解淀粉及应用研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(11): 363 - 367.
- [4] 唐宝英, 朱晓慧, 刘佳. 耐酸耐热普鲁兰酶菌株的筛选及发酵条件的研究 [J]. *微生物学通报*, 2001, 28(1): 39 - 43.
- [5] 马晓军, 张晓君. 碱性普鲁兰酶产生菌选育和发酵条件的研究 [J]. *西北植物学报*, 2002, 22(4): 883 - 888.
- [6] 郭宏文, 邹东恢, 杜国军, 等. 普鲁兰酶产生菌的诱变育种 [J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(2): 167 - 169.
- [7] Nair S U, Singhal R S, Kamat M Y. Enhanced production of thermostable pullulanase type 1 using *Bacillus cereus* FDTA 13 and its mutant [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, 44(2): 275 - 282.
- [8] Bakshi A, Patnaik P R, Gupta J K. Thermostable pullulanase from a mesophilic *Bacillus cereus* isolate and its mutant UV7. 4 [J]. *Biotechnology Letters*, 1992, 14(8): 689 - 694.
- [9] 聂尧, 严伟, 徐岩. 工业属性普鲁兰酶的开发及其催化性能改善的研究进展 [J]. *生物加工过程*, 2013, 11(1): 104 - 112.
- [10] Janse B J H, Pretorius I S. Expression of the *Klebsiella pneumoniae* pullulanase-encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Current Genetics*, 1993, 24(1/2): 32 - 37.
- [11] BO X, YANG Yun-juan, HUANG Zun-xi. Cloning and overexpression of gene encoding the pullulanase from *Bacillus naganoensis* in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 16(8): 185 - 191.
- [12] 吴丽双, 田健, 郑甲, 等. 普鲁兰酶基因在毕赤酵母中

- 组成型表达及定点突变研究[J]. 生物学杂志, 2013, 30(5), 10-13.
- [13] 魏东, 王敏, 庄文超, 等. 克雷伯氏肺炎杆菌电击转化条件的优化[J]. 中国酿造, 2012, 31(4): 18-21.
- [14] 郑艳. 肺炎克雷伯氏菌基因转化技术的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2007.
- [15] 刘震, 张永根, 张微微, 等. 淀粉分解菌的筛选及产酶条件的优化[J]. 饲料工业, 2013(23): 27-30.
- [16] Antranikian G. Microbial degradation of starch. In: Winkelman, G. (Ed.), Microbial Degradation of Natural Products [M]. New York: Verlag Chemie, 1992: 27-56.
- [17] 姜楠, 宋诒, 王萍. 普鲁兰酶及其分泌相关蛋白的研究进展[J]. 微生物学报, 2011, 51(6): 725-731.
- [18] LI W, ZHOU X, LU P. Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* [J]. Research in Microbiology, 2004, 155(8): 605-610.
- [19] Blazeck J, Alper HS. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level[J]. Biotechnology Journal, 2013, 8(1): 46-58.
- [20] WANG Y, LIU Y, WANG Z, et al. Influence of promoter and signal peptide on the expression of pullulanase in *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(9): 1783-1789.
- [21] 余小霞, 田健, 刘晓青, 等. 枯草芽孢杆菌表达系统及其启动子研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(2): 35-44.

Construction of high pullulanase producing strain of *Klebsiella* by promoter swapping

XU Miao-miao¹, JIAO Bao-guo², WANG Ming-dao¹, SUN Li-peng²,
LIU Zhong-min², QIU Li-you¹

1 (School of Life Sciences, Henan Agricultural University, Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China)

2 (Henan Yangshao Biochemical Engineering Co., Ltd, Mianchi 472400, China)

ABSTRACT The high pullulanase producing strains of *Klebsiella* sp. HN9 were constructed through the replacement of HN9 pullulanase gene promoter by constitutive promoter P43 derived from *Bacillus subtilis* via promoter swapping technique. The homologous recombination fragment for promoter swapping was obtained by overlap extension PCR to fused the three DNA fragments, which were Tet1 (comprised of the upstream of HN9 pullulanase gene promoter and the upstream in tetracycline resistance gene), Tet2 (comprised of the downstream in tetracycline resistance gene and the upstream in P43), and Pro (comprised of the downstream in tetracycline resistance gene and the downstream in P43). The homologous recombination fragment was introduced into HN9 by electroporation transformation. The pullulanase gene expression levels and fermentation enzyme activities of the transformants were respectively 10.23-11.45 times and 8.97-10.52 times higher than those of wild type strain. The results showed that use of the constitutive promoter P43 to drive the expression of pullulanase gene may be an effective approach for improving the pullulanase gene expression and fermentation enzyme activities.

Key words *Klebsiella*; pullulanase gene; promoter swapping