



研究快报

大肠杆菌突变株高密度生长的多因素分析

谢雨康^{1,2} 吴海英³ 伏聪^{1,2} 陈艾^{1,3} 史吉平^{1,2,3} 孙俊松^{*1,2,3}

1 中国科学院上海高等研究院 上海 201210

2 中国科学院大学 北京 100049

3 上海科技大学 上海 201210

摘要:【背景】pBHR68 是表达聚-3-羟基丁酸酯(Poly-3-Hydroxybutyrate, PHB)合成基因簇的高拷贝质粒, 大肠杆菌 K-12 突变菌株 S17-3 在携带该质粒时生长密度高, 耐低 pH 且在低 pH 条件下生长时高产可拉酸(Colic Acid, CA)。【目的】系统探究与菌种(大肠杆菌 S17-3)及质粒(pBHR68)相关的高密度生长现象的分子机理, 提示 PHB 和 CA 合成代谢与高密度生长的偶联机制。【方法】解析质粒的构成、CA 合成途径基因组成对高密度生长现象的影响; 利用全基因组同比分析寻找可能的关键突变基因; 开展转录组学分析, 筛查大肠杆菌 S17-3 及其转化子在不同培养方式中的转录组数据, 通过基因敲除实现基因功能及细胞生长状态的验证。【结果】大肠杆菌 S17-3 的高密度生长菌与 PHB 合成的操纵子的过表达以及 *rhsA* 的多位点突变相关, *RcsA* 是 CA 合成与高密度生长中碳代谢流调控的关键调控蛋白。在低 pH 培养时, 敲除可拉酸合成的关键糖基转移酶导致生物量提升; 此外, 大肠杆菌 S17-3/pBHR68 的高密度生长还可能与乳糖操纵子异常的转录调控相关, *lacZ* 突变株高密度生长特性消失, 而且无法合成可拉酸。【结论】研究分析了引起大肠杆菌 S17-3 高密度生长的多种因素, 为大肠杆菌提高生长密度现象的进一步分析提供了重要线索, 也为利用大肠杆菌 S17-3 的优异生理特性将其改造为寡糖合成的底盘细胞奠定了研究基础。

关键词: 大肠杆菌, 高密度生长, 聚-3-羟基丁酸酯, 可拉酸

Fundamental analysis of *Escherichia coli* mutant S17-3 capable of high-density growthXIE Yukang^{1,2} WU Haiying³ FU Cong^{1,2} CHEN Ai^{1,3} SHI Jiping^{1,2,3} SUN Junsong^{*1,2,3}

1 Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China

Abstract: [Background] When *Escherichia coli* K-12 mutant S17-3 carries high copy number plasmid pBHR68 expressing the gene cluster for synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB), it presents some special physiological features, such as high-density growth, low pH tolerance, and high yield of colonic

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (32070055)

*Corresponding author: E-mail: sunjs@sari.ac.cn

Received: 14-03-2021; Accepted: 31-03-2021; Published online: 17-05-2021

基金项目: 国家自然科学基金(32070055)

*通信作者: E-mail: sunjs@sari.ac.cn

收稿日期: 2021-03-14; 接受日期: 2021-03-31; 网络首发日期: 2021-05-17

acid (CA) at low pH. **[Objective]** To systematically explore the molecular mechanism of high-density growth that related to strain (*E. coli* S17-3) and plasmid (pBHR68), and to reveal the coupling mechanism between the high-density growth and the anabolism of PHB or CA. **[Methods]** We dissected the plasmid composition and the gene structure for CA synthesis pathway that might have caused high-density growth, searched for key mutations by multiple genome alignment analysis. The transcriptomic data of *E. coli* S17-3 and its growth performances in different media were scrutinized, the functions of the verified genes were analyzed by gene knockout. **[Results]** The high-density growth of *E. coli* S17-3 was related to the overexpression of the whole gene cluster for PHB synthesis, as well as the multi-site mutations within *rhsA*; RcsA may play as a key factor that not only regulates the production of CA but also mediates the channeling of carbon flow during *E. coli* S17-3's growth; The knockout of key enzymes in CA operon led to the increase of biomass at low pH; In addition, the high-density growth of *E. coli* S17-3/pBHR68 may also be related to lactose metabolism, since *lacZ* null mutation abolished the capability of CA synthesis as well as the high-density growth. **[Conclusion]** We analyzed the factors that may link to the high-density growth of *E. coli* S17-3, and found out some important clues which laid a research foundation for studies to remold *E. coli* S17-3 as a chassis cell for production of oligosaccharides.

Keywords: *Escherichia coli*, high-density growth, poly-3-hydroxybutyrate, colanic acid

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)的遗传改造工具丰富、生长快速,而且能高效地进行生物转化,并利用廉价底物生产化学中间体,是蛋白表达最常用的实验菌株,也是最重要的工业生产菌株之一^[1]。因此,大肠杆菌生长速度及发酵密度的提高对于工业生产具有重要的应用价值^[2]。*E. coli* S17-3 是一株 *E. coli* K-12 系列的突变株,来源于广泛应用的实验模式菌株 *E. coli* S17-1。研究发现,*E. coli* S17-3 在携带质粒 pBHR68 表达聚-3-羟基丁酸酯(Polyhydroxybutyrate, PHB)合成基因簇时,表现出异于寻常大肠杆菌实验菌株的特性,重组菌株 *E. coli* S17-3/pBHR68 在富含葡萄糖、乳糖或甘油等多种碳源的培养基中均实现高密度生长,最高 OD_{600} 达到 40 以上;该菌株具有较强的耐酸能力,而且在使用 pH 为 4.5 的富营养培养基中发酵时可高产可拉酸(Colanic Acid, CA),其摇瓶产量达到 10.39 g/L,是之前报道的大肠杆菌 CA 最高产量的 100 倍左右^[3]。前期针对 *E. coli* S17-3 及 *E. coli* S17-1 的全基因组测序及比对发现,*E. coli* S17-3 存在多处突变,这些突变有些会导致某些关键调控蛋白的突变,有些则只是改变了蛋白编码区上游的序列^[4]。本研究为了探究 *E. coli* S17-3/pBHR68 生

长特异性的分子生物学机制,首先研究质粒 pBHR68 结构对细胞密度的影响,再结合全基因组比对和转录组数据分析,考察代谢相关基因的敲除对细胞生长及 CA 合成的影响,从而建立基于 *E. coli* S17-3 底盘细胞的多糖类医药中间体生物合成系统。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物

本研究所用菌株和质粒见表 1。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 2。

1.1.2 主要仪器及试剂

基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小量制备试剂盒、PCR 清洁试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒,康宁生命科学(吴江)有限公司;高保真 DNA 聚合酶 2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus)、2×Rapid Taq Master Mix、ClonExpress II One Step Cloning Kit,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;QuickCut *EcoR* I、QuickCut *Bam*H I、QuickCut *Dpn* I,宝日医生物技术(北京)有限公司。S1000 Thermal Cycler PCR 仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统、MicroPulser 电穿孔仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;

表 1 本研究使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Characteristics and description	References
<i>E. coli</i> strains		
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	Lab stock
BW25113	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, <i>lacZ</i> 4787(<i>del</i>)::rrnB-3, LAM ⁻ , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Lab stock
S17-3	A mutant strain derived from <i>E. coli</i> S17-1, with mutations at <i>cyaA</i> , <i>csrA</i> , <i>pgi</i> , <i>rhsA</i> , etc	Lab stock
S173T7	S17-3 <i>rrsG</i> ::P _{Lac} - <i>lacI</i> -T7 RNA polymerase cassette	Lab stock
S17-3 Δ <i>ugd</i>	S17-3, Δ <i>ugd</i>	This study
S17-3 Δ <i>wcaJ</i>	S17-3, Δ <i>wcaJ</i>	This study
S17-3 Δ <i>rcsA</i>	S17-3, Δ <i>rcsA</i>	This study
BW25113 Δ <i>rhsA</i>	BW25113, Δ <i>rhsA</i>	This study
S17-3 Δ <i>rhsA</i> :: <i>rhsA</i>	S17-3, mutated <i>rhsA</i> replaced <i>in situ</i> by WT <i>rhsA</i> from BW25113	This study
S17-3 Δ <i>lacZ</i>	S17-3, Δ <i>lacZ</i>	This study
Plasmids		
pKD4	A template plasmid for <i>frt</i> -flanked <i>kan</i> cassette, Kan ^r , Amp ^r	CGSC ^[5]
pKD46	A temperature-sensitive Red recombinase plasmid containing λ -Red genes (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>), <i>oriR101</i> , Amp ^r	CGSC
pCP20	A temperature-sensitive plasmid containing FLP recombinase, <i>oriR101</i> , Amp ^r , Cm ^r	CGSC
pBHR68	pBluescript II SK(-) derived backbone with PHB synthesis gene cluster <i>phaCAB</i>	A gift from CHEN Guoqiang team ^[6]
pBHR68-Ptac	Backbone of pBHR68 with <i>phaCAB</i> under P _{Tac}	This study
pBHR68-PxylA	Backbone of pBHR68 with <i>phaCAB</i> under P _{XylA}	This study
pBHR68-T7	Backbone of pBHR68 with <i>phaCAB</i> under T7 promoter	This study
pBHR68CABec	Backbone of pBHR68 with codon optimized PHB synthesis gene cluster <i>phaCABec</i>	This study
pBHR68 Δ T	pBHR68 with the deletion of CAB terminator	This study
pBHR68-C	pBHR68 with the deletion of <i>phaA</i> and <i>phaB</i>	This study
pBHR68-AB	pBHR68 with the deletion of <i>phaC</i>	This study
pBS+CAB	Vector pBluescript II SK(+) with PHB synthesis gene cluster <i>phaCAB</i>	This study
pBS-CAB	Vector pBluescript II SK(-) with PHB synthesis gene cluster <i>phaCAB</i>	This study

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Primers sequence (5'→3')
pBluecirF	TTGCGGCCGCACTCGAGACGCGCCCTGTAGCGGC
pBluecirR	TCCTTTCCATAGGCTCCGCCCCC
CABF	CGGAGCCTATGGAAGGATCCCCCGGGCAAGTACCTTGCC
CABR	CTCGAGTGCGGCCGCAAAGCGAATTCTTCTGAATCCATGACCAGCTGCTT
lacZ Ant HAF	CCGCTTGCTGCAACTCTCTCAG
lacZ Ant HAR	GCAGCTCCAGCCTACACAATCGCTCAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG
lacZ Pos HAF	TATTCATATGGACCATGGCTAATTCTAATAACCGGGCAGGCCATGTCTG
lacZ Pos HAR	CATGCCGTAATAATCCACAGCAGG
fkanF	GAGCGATTGTGTAGGCTGGAGC
fkanR	GAATTAGCCATGGTCCATATGAATA

Tanon EPS300 电泳仪, 上海天能科技有限公司; NanoDrop 2000c 分光光度计、GeneRuler DNA Ladder Mix: 赛默飞世尔科技公司; 恒温培养振荡器、超净工作台、恒温培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基及发酵条件

用于大肠杆菌生长及发酵的培养基为 LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 酵母提取物 5.0, 调节 pH 至 7.0, 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 20 min。使用抗生素筛选时, 在培养基中加入对应抗生素, 终浓度为: 氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$, 硫酸卡那霉素 50 $\mu\text{g/mL}$, 氯霉素 25 $\mu\text{g/mL}$ 。

富碳源培养基的配制是在 LB 培养基中加入了终浓度为 20 g/L 的葡萄糖或其他碳源, 如甘油、乳糖等。LBG 培养基为 LB 液体培养基中加入 20 g/L 葡萄糖。大肠杆菌酸诱导产 CA 的培养条件为: 500 mL 摇瓶中加入 50 mL 富碳源培养基, 利用 3 mol/L 的 HCl 溶液将培养基的初始 pH 调节至 4.5。大肠杆菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 恒温摇床振荡培养。

1.2.2 质粒构建及大肠杆菌的转化

本研究中, 构建质粒使用快速克隆试剂盒 ClonExpress II One Step Cloning Kit。本研究中 PCR 扩增方法见参考文献[7]。以 pBS-CAB 的构建为例, 线性化的载体片段可以使用 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切 pBluescript II SK(-)质粒, 经琼脂糖凝胶电泳、凝胶回收获得; 或使用 pBluecirF/R 引物对, 以 pBlueScript II SK(-)质粒为模板 PCR 扩增获得。插入片段 PHB 操纵子序列使用 CABF/R 引物对, 以 pBHR68 质粒为模板 PCR 扩增获得。PCR 扩增的 DNA 片段经过 *Dpn* I 酶切消除模板, 防止模板质粒的转化导致假阳性。通过 PCR 清洁试剂盒纯化后测定载体和插入片段浓度, 计算出相应的体积比, 再按照试剂盒说明书配制酶促连接反应体系, 反应后将混合物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。菌落 PCR 产物经测序验证正确, 表明 pBS-CAB 质粒

构建完成。

E. coli S17-3 和 *E. coli* BW25113 的转化使用电转法^[8]。将电穿孔仪预设程序设置为原核生物, 调至设置菜单中的 EC2 程序, 输出电压为 2 500 V。将加入 DNA 片段或质粒的感受态细胞转移到预冷的电击杯, 擦拭电极片, 电击后立刻加入 700 μL LB 液体培养基冲洗, 转移到 1.5 mL EP 管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 恒温摇床中孵育 1 h 后涂布相应抗性平板培养。挑取单菌落进行 PCR, 并对 PCR 产物进行测序验证。

1.2.3 基因敲除

大肠杆菌的基因组改造借助 Red 重组系统完成, 该系统包含质粒 pKD4、pKD46、pCP20^[5], 均购自美国耶鲁大学的大肠杆菌遗传保藏中心(The Coli Genetic Stock Center, CGSC)。

以在 *E. coli* S17-3 菌株中敲除 *lacZ* 为例, 首先使用 *lacZ* Ant HAF/R、*lacZ* Pos HAF/R 引物对, 以 *E. coli* S17-3 菌液为模板, 分别 PCR 扩增 *lacZ* 位点上下游 300 bp 的同源臂; 使用 fkanF/R 引物对, 以 pKD4 为模板, PCR 扩增含有 Kan^r 筛选标记的 *kan* Cassette。以上片段通过 Fusion-PCR 连接, Fusion-PCR 方法见参考文献[9]。按照上游同源臂—*kan* Cassette—下游同源臂的顺序连接, 清洁纯化后备用。将 pKD46 电转入 *E. coli* S17-3 中, 接种单克隆至 LB 培养基, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 添加阿拉伯糖诱导转化子中 Red 重组酶的表达并制备感受态细胞; 再将上述 Fusion-PCR 连接的 DNA 片段转化感受态细胞, *lacZ* 被 *kan* Cassette 替换, 获得 Kan^r 转化子; 随后将 pCP20 转入 Kan^r 的重组菌中, 利用 pCP20 表达的 Flp 重组蛋白消除抗性标记; 最后通过 42 $^{\circ}\text{C}$ 的高温培养消除温敏型质粒 pKD46 和 pCP20, 得到无抗的 *E. coli* S17-3 $\Delta lacZ$ 。

1.2.4 CA 定量检测

胞外多糖 CA 的含量是通过检测岩藻糖含量并经过换算完成的。首先绘制岩藻糖浓度的标准曲线。取 50 μL 不同浓度的岩藻糖标准品, 加入 4.5 mL 14 mol/L 硫酸溶液, 沸水浴 20 min, 冷却至室温后

分别测量其 OD_{396} 和 OD_{427} , 再加入 100 μL 的 1 mol/L 半胱氨酸硫酸盐溶液, 再次测定其 OD'_{396} 和 OD'_{427} , 计算出 ΔOD_{396} ($OD'_{396}-OD_{396}$) 和 ΔOD_{427} ($OD'_{427}-OD_{427}$)。以岩藻糖浓度作为横坐标, 以 $\Delta OD_{396}-\Delta OD_{427}$ 作为纵坐标, 绘制岩藻糖浓度的标准曲线, 计算出浓度换算方程。

进行样品岩藻糖浓度测定时, 取 50 μL 样品经同样流程检测, 通过 $\Delta OD_{396}-\Delta OD_{427}$ 值, 对应岩藻糖标准曲线标定样品中岩藻糖的浓度, 并推算出 CA 的浓度^[10]。

1.2.5 全基因组测序比对及转录组学分析

E. coli S17-3 全基因组扫描测序使用 Illumina 测序方法。测序工作由美吉生物公司完成。测序得到的基因组序列和 BW25113 基因组 (NCBI Reference Sequence: NZ_CP00927 3.1) 比对, 进行单核苷酸多态性和插入缺失突变分析。

为了进行转录组数据分析, 首先进行测序样品的准备。将 *E. coli* S17-3/pBHR68 和 *E. coli* S17-3 接种到初始 pH 分别为 7.0 和 4.5 的 LBG 培养基中, 生长曲线表明在摇瓶培养约 9 h 时, *E. coli* S17-3/pBHR68 和 *E. coli* S17-3 培养液的细胞密度出现显著差异, 此时对培养液立刻进行液氮保存, 每种培养条件进行 3 个重复实验, 将收集的冷冻样品交由生工生物工程(上海)股份有限公司完成总 mRNA 提取及后续的转录组测序, 针对测序结果开展基因表达的差异化分析。

2 结果与分析

2.1 质粒介导的高密度生长分析

pBHR68 是一种高拷贝质粒, 是 *E. coli* S17-3 高密度生长和高产 CA 的关键之一。前期研究发现, 利用低拷贝质粒表达同样的 PHB 操纵子, *E. coli* S17-3 转化株的高密度生长现象消失^[3]。因此, 本研究针对该质粒的结构和序列开展研究, 经全质粒测序显示, 该质粒由 pBluescript II SK(-) 载体作为骨架, 在 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切位点之间

插入来自罗氏真养菌(*Ralstonia eutropha*)的 PHB 合成操纵子, 包括上游长 843 bp 的启动子区域 CAB Promoter、*phaC*、*phaA*、*phaB* 和下游长 568 bp 的终止子区域 CAB Terminator。

为研究该质粒能够激发 *E. coli* S17-3 高密度生长的分子机理, 对 pBHR68 的表达元件进行了替换或缺失, 将其原有的启动子区域 CAB Promoter 分别替换为大肠杆菌中强启动子 P_{Tac} 、 P_{XylA} 和 T7 启动子; 针对 *phaCAB* 基因簇, 首先开展了大肠杆菌密码子优化, 将 *phaCAB* 序列替换成 *phaCABec*; 对合成 PHB 的完整操纵子, 分别缺失 *phaC*、*phaA-B*、CAB Terminator 序列; 对原有质粒载体的骨架, 替换为结构类似的 pBluescript II SK(+) 和 pBluescript II SK(-), 如图 1A 所示。分子构建完成后, 将 pBHR68-T7 电转化 *E. coli* S173T7 菌株, *E. coli* S173T7 为 *E. coli* S17-3 的改造菌株, 其基因组整合了 T7 RNA 聚合酶的表达框。其他质粒分别电转化 *E. coli* S17-3, 各个重组菌株进行摇瓶培养, 72 h 后测定发酵液的 OD_{600} 。如图 1B 所示, 针对质粒的不同元件进行的改造均不同程度地降低了 *E. coli* S17-3 重组菌株的发酵生物量, 移除 PHB 操纵子中部分基因使菌株高密度生长特性消失。

测序结果表明 pBHR68 以 pBluescript II SK(-) 为骨架构建, 但 pBS-CAB 转化菌株的 OD_{600} 却显著降低。进一步的序列比对发现, pBHR68 和 pBS-CAB 的序列虽高度相似, 但在 4 个位点发生单碱基突变, 其中 3 个位于载体的多克隆位点上, 另一处突变在质粒的复制起始位点 *ori* 内 (148C>T)。此外, 质粒提取实验发现, 在同一批质粒提取过程中, 即使使用同等生物量的细胞, pBHR68 的质粒提取量依然是质粒大小相同的 pBS-CAB 的 3 倍以上, 据此推测位于 *ori* 位点的该碱基突变提升了 pBHR68 的胞内拷贝数, 提高了大肠杆菌 PHB 合成酶的表达量, 进而促进了 *E. coli* S17-3 重组株的高密度生长。

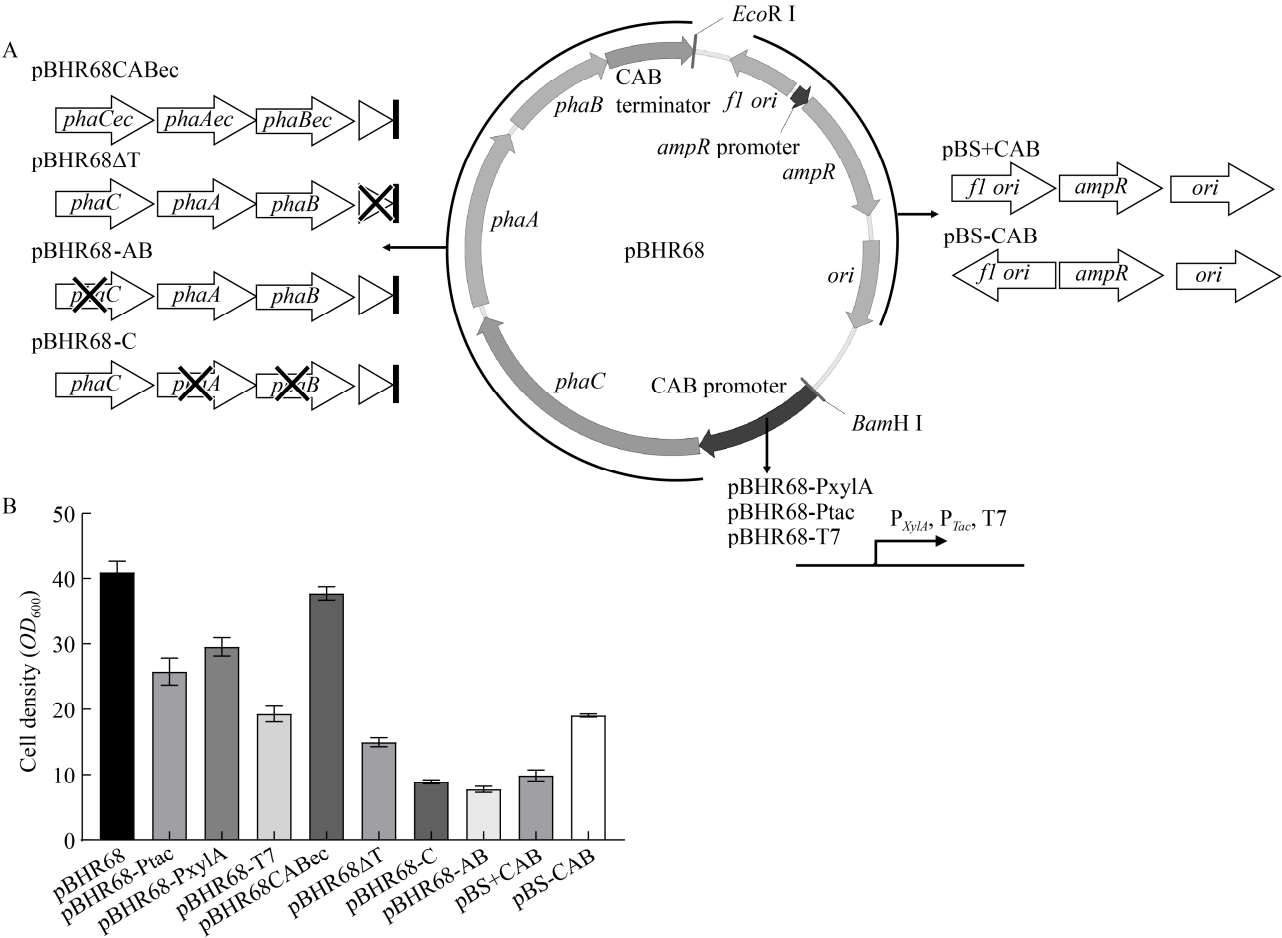


图 1 质粒 pBHR68 引起的高密度生长分析
Figure 1 Analysis of pBHR68-induced high-density growth
Note: A: Plasmid maps of pBHR68 and its derivatives plasmids; *phaC*: Encoding poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase; *phaA*: Encoding acetyl-CoA acetyltransferase; *phaB*: Encoding acetoacetyl-CoA reductase. B: Cell density of *E. coli* S17-3 transformants harboring different plasmids

2.2 全基因组扫描分析

对 *E. coli* S17-3 及其出发菌株 *E. coli* S17-1 进行了基因组扫描测序，并与模式大肠杆菌 BW25113 进行比对分析，发现 *E. coli* S17-3/S17-1 与 *E. coli* BW25113 的差异性较大，前 2 株菌中含有 *E. coli* BW25113 没有的前噬菌体序列；相比 *E. coli* S17-1, *E. coli* S17-3 也存在多处突变，涉及糖代谢、糖转运和 RNA 转录等突变位点，如表 3 所示。

其中，*csrA*、*pgi*、*fruK* 等基因涉及碳代谢及其网络调控，我们前期对其开展了初步的研究^[4,8]，但 RhsA 的蛋白功能研究较少。RhsA 属于 Rhs 蛋

表 3 全基因组扫描测序及比对分析
Table 3 Comparative analysis of whole-genome scan sequencing

KEGG gene name	Annotation	Mutation type
<i>csrA</i>	Carbon storage regulator	1 SNP
<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	1 SNP
<i>galP</i>	D-galactose transporter	1 SNP
<i>fruK</i>	1-phosphofructokinase	1 SNP
<i>rbsK</i>	Ribokinase	2 SNP
<i>recG</i>	ATP-dependent DNA helicase	1 SNP
<i>rhsA</i>	Rhs element protein	Multi-site mutations

Note: SNP: Single nucleotide polymorphism

白家族, 研究表明, 过表达 *rhsA* 部分序列会显著影响细胞的蛋白翻译过程, 降低细胞的生长速率和活性^[11], 而 *E. coli* S17-3 的 *rhsA* 存在多位点突变, 推测这些突变可能是导致 *E. coli* S17-3/pBHR68 高密度生长的原因之一。

我们在模式菌株 *E. coli* BW25113 中敲除了 *rhsA*, 构建了重组菌株 *E. coli* BW25113 Δ *rhsA*/pBHR68, 将其接种到初始 pH 为 7.0 的 LBG 培养基中, 37 °C 进行 24 h 的摇瓶培养, 并测定其生长密度, 直至培养基中的碳源被完全消耗。结果如图 2 所示, 相比对照菌株 *E. coli* BW25113、*E. coli* BW25113/pBHR68 以及 *E. coli* BW25113 Δ *rhsA*, *E. coli* BW25113 Δ *rhsA*/pBHR68 的细胞生长密度大幅提高(图 2A), 与 *E. coli* S17-3/pBHR68 的生长曲线(图 2B)很接近, 而且 PHB 产量显著增加(图 2C)。多种有机酸在培养液中积累很少, 其中含量最高的乙酸的浓度仅为 0.9 g/L, 其余 3 株大肠杆菌的乙酸积累量平均约为 4.0 g/L, 因此, *rhsA* 的敲除能显著减少乙酸的合成, 从而促进大肠杆菌菌株生物量的持续累积。在 *E. coli* S17-3 中回补来自 *E. coli* BW25113 的未突变的 *rhsA* 后, 菌株的高密度生长未完全消失, 但生长密度有显著下降(图 2B), PHB 产量也下降(图 2C), 表明 *rhsA* 是影响生长的因素之一, 并且在 *E. coli* S17-3 中还存在 *rhsA* 以外的其他因素导致高密度生长。

2.3 CA 合成与高密度生长相关性分析

E. coli S17-3 重组菌株可以耐受更低 pH 条件, 而且在将重组大肠杆菌接种低 pH 培养基时能够高水平合成 CA, 但细胞密度较低^[3]。为探究胞外 pH 对宿主细胞的主要碳代谢及生长行为的影响, 依据前期研究数据, 本研究先围绕 CA 合成的 3 个关键酶 RcsA、Ugd 和 WcaJ 开展了基因敲除, 分别电转 pBHR68, 在初始 pH 4.5 条件下摇瓶培养 72 h, 检测最大 OD_{600} 及 CA 产量, 如图 3 所示。RcsA 是 CA 合成途径的调控因子, 已证实其可以对 CA 合成的大基因簇进行正向转录调控^[12]。Ugd

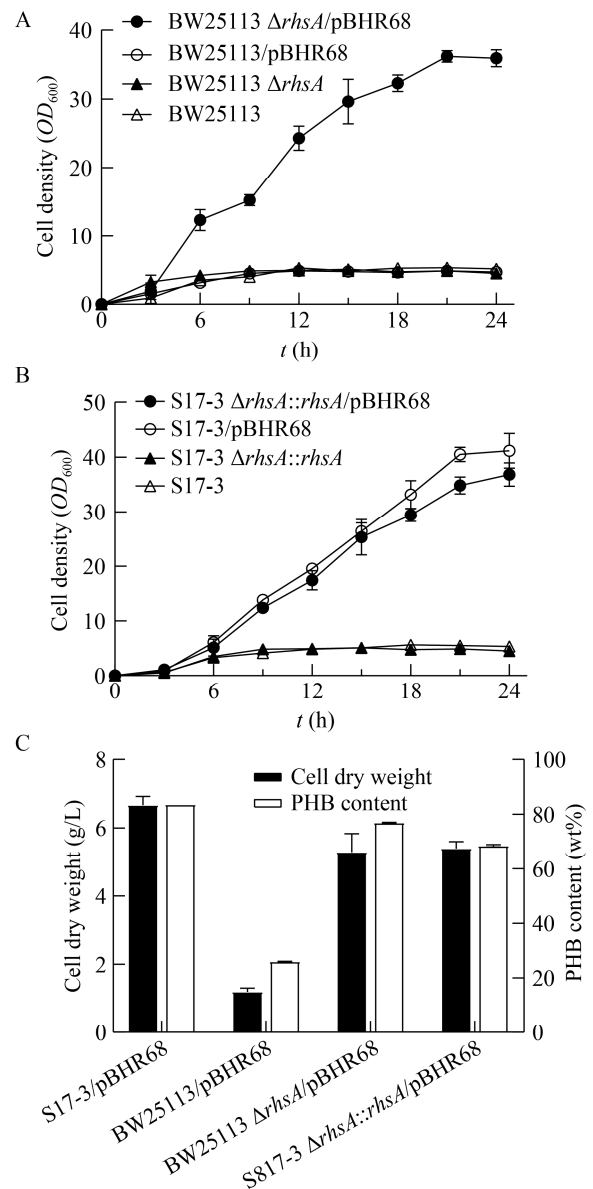


图 2 *E. coli* BW25113 (A)和 *E. coli* S17-3 (B)菌株生长曲线及 PHB 产量(C)

Figure 2 Growth profiles of *E. coli rhaA* mutants BW25113 (A) and S17-3 (B) and PHB content (C)

将 UDP-D-葡萄糖氧化成 UDP-D-葡萄糖醛酸, 为 CA 的合成提供前体底物。WcaJ 是 CA 单体组装的第一个酶, 敲除 *wcaJ* 后大肠杆菌 CA 合成的能力完全消失。

结果表明, *ugd* 缺失株 CA 产量下降, 但在酸性条件恢复了高密度生长的能力, *wcaJ* 缺失株细

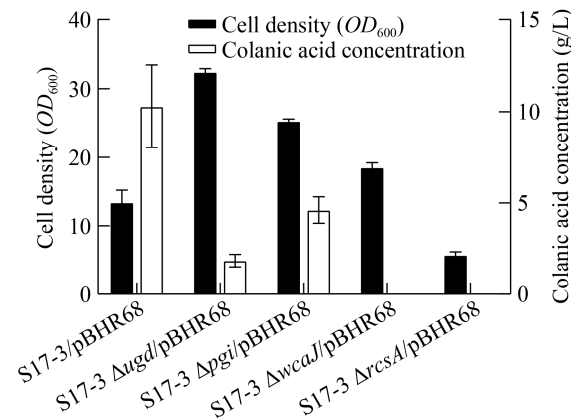


图 3 CA 合成途径关键基因缺失对 CA 合成和细胞密度的影响
Figure 3 Cell density and CA concentration from different mutants

胞密度也有所提升,表明 CA 合成与高密度生长对应 2 种拮抗的碳代谢流,并且可能存在 pH 诱导的碳代谢流调控因子。前期的研究表明, *rcsA* 敲除会导致 Ugd 酶活消失^[8], *rcsA* 缺失菌株不仅 CA 合成途径受到抑制,也可能无法提供 CA 合成所需要的单糖组分。然而 *rcsA* 缺失株的细胞密度远低于 *ugd* 缺失株,说明 RcsA 对生长密度的调控影响不是通过调控 Ugd 的表达完成的。RcsA 缺失菌株在中性和酸性条件下生长均受到限制,在初始 pH 值为 7.0 条件下发酵 72 h,最高 OD_{600} 仅为 10.6,提示 RcsA 不仅是 CA 合成途径的调控因子,还与高密度生长的代谢调控相关,可能是大肠杆菌调控碳代谢流走向的关键因素。

2.4 转录组学分析

转录组数据可以实时捕捉到不同遗传背景的微生物在同样营养及培养条件下基因转录全局调控的差异性,因此,我们采集了重组菌株 *E. coli* S17-3/pBHR68 在 pH 7.0 和 pH 4.5 培养时的转录组数据,并以 *E. coli* S17-3 在相同条件下的培养作为对照进行了对比分析。结果如表 4 所示,在 pH 为 7.0 时, *E. coli* S17-3/pBHR68 胞内磷酸戊糖途径相关的 *zwf* 等基因表达显著上调,该碳代谢流的加强会增加辅因子 NADPH 的供应,从而促进

表 4 转录组学分析

S17-3/pBHR68, pH 7.0 vs pH 4.5		pH 7.0, S17-3/pBHR68 vs S17-3	
Gene name	Log ₂ (fold change)	Gene name	Log ₂ (fold change)
<i>pykF</i>	3.25	<i>lacZ</i>	5.41
<i>gapA</i>	2.09	<i>lacY</i>	4.61
<i>zwf</i>	1.87	<i>lacA</i>	3.28
<i>cyaA</i>	1.44	<i>ldhA</i>	3.27
<i>galE</i>	-9.05	<i>glnP</i>	-3.67
<i>wza</i>	-8.91	<i>glnH</i>	-3.39
<i>gmd</i>	-8.26	<i>waaS</i>	-3.20
<i>rcsA</i>	-6.07	<i>ybhB</i>	-2.39
<i>ymgA</i>	-4.50	<i>waaJ</i>	-2.24
<i>ycgZ</i>	-4.35	<i>glf</i>	-1.89
<i>ariR</i>	-2.76	<i>waaB</i>	-1.66
<i>lacZYA</i>	Undetected	<i>rcsA</i>	Undetected

PHB 的合成^[4];而在 pH 为 4.5 时,己糖糖苷合成途径的相关基因转录水平明显加强,从而大幅提升 CA 的生产水平。 *rcsA* 以及 Rcs 双组分信号转导系统中相关的基因 *ymgA*、*ycgZ*、*ariR* 在 pH 不同时转录水平差异较大,表明 *rcsA* 可能是受胞外 pH 影响调控细胞碳代谢流的关键因子,与敲除实验的结果一致。

对比未携带 pBHR68 质粒的 *E. coli* S17-3,发现 *E. coli* S17-3/pBHR68 在高密度生长的过程中, *rcsA* 以及 Rcs 信号转导系统相关的编码基因转录变化差异不显著。 *waaS*、*waaJ*、*glf*、*waaB* 等寡糖合成的相关基因转录均下调,表明高密度生长菌株中的碳代谢流发生改变。此外,乳糖操纵子的结构基因 *lacZYA* 转录水平显著上调,其中 *lacZ* 上调 30 倍以上。由于该批次发酵仅使用葡萄糖作为碳源,未添加乳糖或 IPTG,不涉及乳糖代谢,而且全基因组测序未发现乳糖操纵子序列存在任何突变,因此乳糖操纵子的异常上调值得进一步探究。为此,我们进行了 *lacZ* 的基因敲除。如图 4 所示,重组菌株 *E. coli* S17-3 Δ *lacZ*/pBHR68 在初始 pH 值为 7.0 的 LBG 培养基中无法实现高密度生长。此外,在 pH 值为 4.5 时,该菌株也无法像

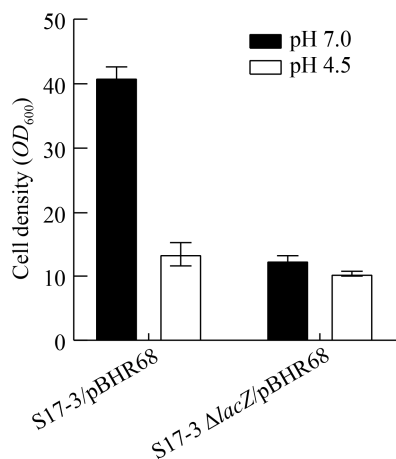


图4 *lacZ* 缺失的 *E. coli* S17-3 菌株生长变化

Figure 4 Comparison of the cell densities in *lacZ*-deleted *E. coli* S17-3 strain and the wild type cells

E. coli S17-3/pBHR68 那样高产 CA。因此, LacZ 也是 *E. coli* S17-3 高密度生长以及高产 CA 碳代谢调控中的关键蛋白之一,但其分子机理尚需要进一步解析。

3 讨论与结论

通过分子生物学改造提高发酵微生物的培养密度具有重要的工业应用价值。微生物的高密度培养往往是在生物反应器中,通过对培养条件实时精确的调控以及营养物的及时补加才能实现,而在摇瓶培养时,普通微生物如大肠杆菌通常无法实现高密度培养,其 OD_{600} 的最高值一般不会超过 10。在构建工业微生物时一般需要引入外源代谢途径,通常会导致宿主菌株碳代谢流调控的失衡,不利于细胞生长^[2]。本研究中的突变株 *E. coli* S17-3 在携带高拷贝质粒 pBHR68 时,其发酵密度明显高于普通大肠杆菌,提示 PHB 合成途径的引入会延长微生物的对数生长期。前期研究发现,高拷贝质粒 pBHR68、菌株 *E. coli* S17-3、富碳培养基是高密度培养所必需的几个条件。因此,本研究首先针对质粒 pBHR68 的构建进行了研究,发现构成 PHB 操纵子的 3 个基因必不可少。此外, pBHR68 复制起始区 *ori* 上的序列突变可能也是重要因素,其带来的质粒拷贝数的增加会影响 PHB 合成途径的表

达量。由此,我们可推断, PHB 合成代谢的增加导致的碳代谢重新分配可能是宿主细胞高密度生长的重要原因,因为在利用 LBG 培养基时,富足的碳源会带来 ATP 及 NADPH 还原力的富余,这些还原力的电子清除会使微生物启动微氧发酵途径,导致有机酸等副产物的累积,并最终抑制微生物的生长^[13]。然而 *E. coli* S17-3/pBHR68 有机酸的合成量明显低于对照菌株^[8],显示突变株自动完成了高碳培养条件下的碳代谢流优化,其中 RhsA 可能是重要调控蛋白,因为 *rhsA* 在 *E. coli* BW25113 菌株的缺失不仅能够重现 *E. coli* S17-3/pBHR68 的高密度培养,而且其发酵液中有有机酸的累积量也明显下降。在 BW25113 或其他大肠杆菌宿主中敲除 *csrA* 和 *rhsA*,并引入 pBHR68 质粒或过表达其他大量消耗 ATP 和 NADPH 的外源合成途径,引发高密度生长,进一步提升目的产物的积累,是值得期待的代谢工程改造策略。

E. coli S17-3/pBHR68 的另一明显特征是在低 pH 值培养时能够高产 CA。这一特殊的生理现象具有重要的应用价值,因为 CA 是一种富含岩藻糖的胞外多糖,其合成需要 GDP-L-岩藻糖作为底物之一,而 GDP-L-岩藻糖也是微生物合成岩藻糖基人乳寡糖的底物,因此,CA 合成途径的改造是人乳寡糖生物合成的重要研究内容^[14]。本研究通过 *ugd* 和 *wcaJ* 的基因敲除,发现在糖代谢活动中,CA 单体的合成对细胞密度增加具有阻抑作用,提示微生物存在碳源代谢流分配的反馈系统,而 RcsA 可能是调控碳代谢流走向的关键因子。本研究中的转录组分析还发现突变株中 *lacZ* 的转录水平异常上调,敲除 *lacZ* 显著降低细胞生长密度和 CA 合成能力,表明 *E. coli* S17-3 在围绕乳糖代谢或更广泛的糖代谢活动中具有独特的调控方式。在一些主要的人乳寡糖合成中需要使用乳糖作为底物,为防止底物被利用, *lacZ* 需要被敲除,因此,这一发现对于利用 *E. coli* S17-3 进行人乳寡糖合成的研究有重要参考意义。据报道,使用突变的 *lacZ* Δ M15 代替 Δ lacZ 能够提升 3-FL 产量^[15],该

现象可能与乳糖操纵子参与 CA 合成有关。此外, *E. coli* S17-3 的耐酸生长性能可以用于酸性代谢产物的异源合成, 通过敲除 *ugd* 和 *wcaJ* 抑制 CA 合成途径, 改变碳代谢流, 从而在酸性条件下也实现高密度生长, 提高产量。

综上所述, *E. coli* S17-3/pBHR68 具有独特的性能和碳代谢流, 该突变株在富碳源培养基中引发高密度生长是多种因素共同作用的综合结果 (图 5A), 其代谢路径中涉及一些节点酶或调控蛋白, 如图 5B 中所示的 RcsA、LacZ、CsrA、Pgi 和

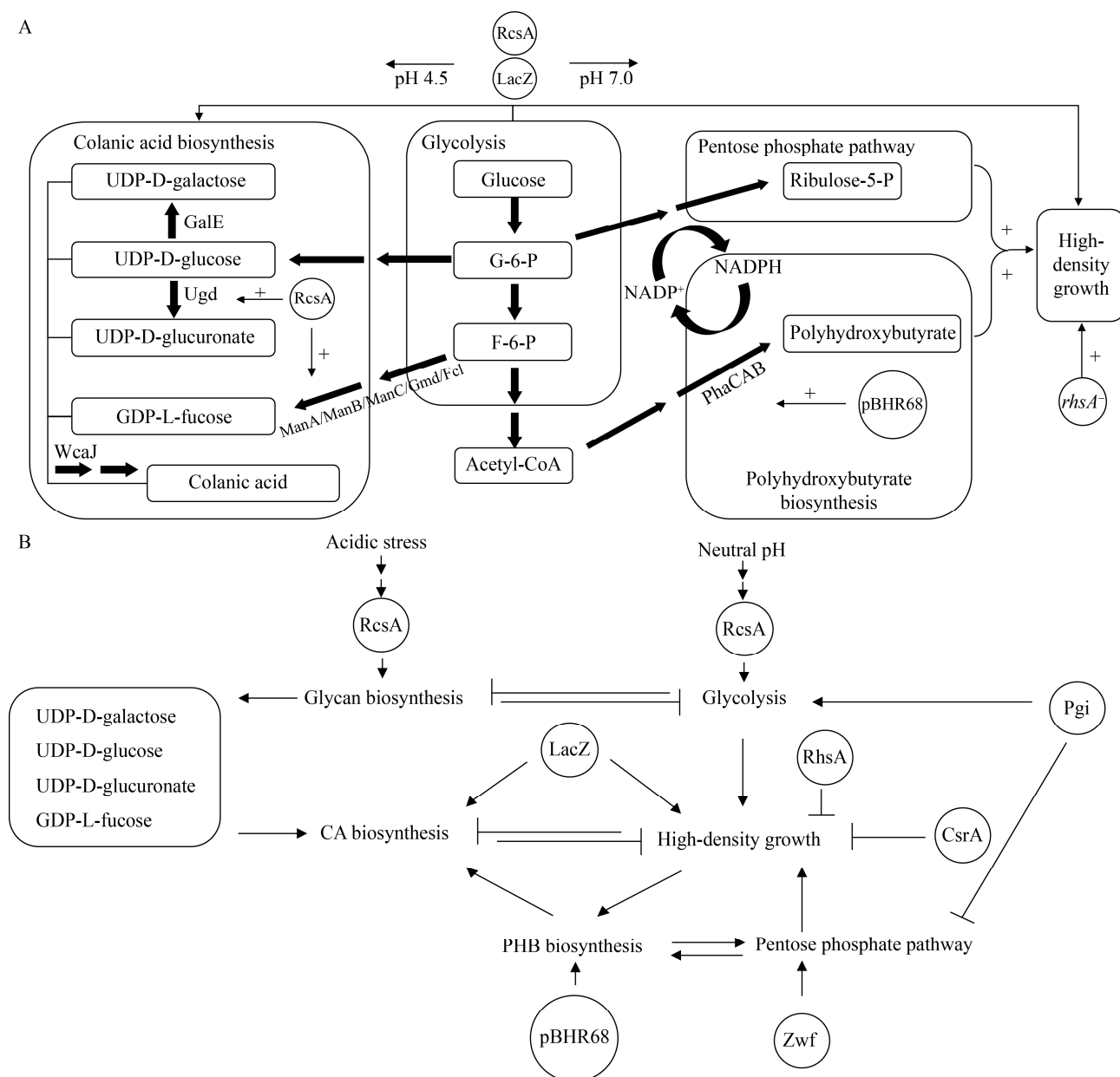


图 5 *E. coli* S17-3/pBHR68 相关碳代谢流走向(A)及其可能的网络调控网络节点分布(B)

Figure 5 Demonstration of carbon flow channeling (A) and the composition of the regulatory network (B) in *E. coli* S17-3/pBHR68

Note: GalE: UDP-galactose-4-epimerase; Ugd: UDP-glucose 6-dehydrogenase; WcaJ: Undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase; ManA/ManB/ManC/Gmd/Fcl: GDP-L-fucose synthesizing enzymes of the *de novo* pathway; RcsA: DNA-binding transcriptional activator; LacZ: Beta-galactosidase; PhaCAB: Gene cluster for synthesis of PHB; *rhsA*: Encoding Rhs element protein; Pgi: Glucose-6-phosphate isomerase; Zwf: Glucose-6-phosphate dehydrogenase

Zwf 等, 它们在碳代谢流分配的网络调控中起到关键作用, 但由其所构筑的代谢网络的详细调控机制仍有待进一步解析。本研究分析了一株拥有稀缺性能的大肠杆菌突变株的高生长密度的影响因素, 为模式大肠杆菌或工业大肠杆菌提高生长密度的工程改造提供了研究参考, 也是将 *E. coli* S17-3 构筑成工业生产底盘细胞的前期研究之一。

REFERENCES

- [1] Riesenber g D, Menzel K, Schulz V, Schumann K, Veith G, Zuber G, Knorre WA. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 34(1): 77-82
- [2] Shiloach J, Fass R. Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(5): 345-357
- [3] Wu HY, Chen SW, Ji MH, Chen Q, Shi JP, Sun JS. Activation of colanic acid biosynthesis linked to heterologous expression of the polyhydroxybutyrate pathway in *Escherichia coli*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 752-760
- [4] Chen Q, Wu HY, Wang ZS, Xie YK, Li YQ, Sun JS. Multiple-site mutations in *Escherichia coli* capable of high-density growing induced from the biosynthesis of polyhydroxybutyrate[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(7): 112-118 (in Chinese)
陈桥, 吴海英, 王宗寿, 谢雨康, 李宜青, 孙俊松. 聚羟基丁酸酯合成引发的高密度生长大肠杆菌的多位点突变分析[J]. 生物技术通报, 2020, 36(7): 112-118
- [5] Mosberg JA, Lajoie MJ, Church GM. Lambda red recombineering in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate[J]. Genetics, 2010, 186(3): 791-799
- [6] Wu H, Chen JC, Chen GQ. Engineering the growth pattern and cell morphology for enhanced PHB production by *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(23): 9907-9916
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual[M]. Jin DY, Li MF, Trans. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1992 (in Chinese)
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 2 版. 北京: 科学出版社, 1992
- [8] Wu HY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of polyhydroxybutyrate and colanic acid[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, 2019 (in Chinese)
吴海英. 大肠杆菌聚- β -羟基丁酸酯及胞外多糖可拉酸的合成研究[D]. 上海: 中国科学院上海生命科学研究院博士学位论文, 2019
- [9] Steffan NH, Henry DH, Robert MH, Jeffrey KP, Larry RP. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. Gene, 1989, 77(1): 51-59
- [10] Obadia B, Lacour S, Doublet P, Baubichon-Cortay H, Cozzzone AJ, Grangeasse C. Influence of tyrosine-kinase wzc activity on colanic acid production in *Escherichia coli* K12 cells[J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 367(1): 42-53
- [11] Aggarwal K, Lee KH. Overexpression of cloned *RhsA* sequences perturbs the cellular translational machinery in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(18): 4869-4880
- [12] Navasa N, Rodríguez-Aparicio L, Ferrero MÁ, Monteagudo-Mera A, Martínez-Blanco H. Polysialic and colanic acids metabolism in *Escherichia coli* K92 is regulated by RcsA and RcsB[J]. Bioscience Reports, 2013, 33(3): e00038
- [13] Partridge JD, Sanguinetti G, Dibden DP, Roberts RE, Poole RK, Green J. Transition of *Escherichia coli* from aerobic to micro-aerobic conditions involves fast and slow reacting regulatory components[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(15): 11230-11237
- [14] Huang D, Yang KX, Liu J, Xu YY, Wang YY, Wang R, Liu B, Feng L. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose through modular pathway enhancement[J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 23-38
- [15] Choi YH, Park BS, Seo JH, Kim BG. Biosynthesis of the human milk oligosaccharide 3-fucosyllactose in metabolically engineered *Escherichia coli* via the salvage pathway through increasing GTP synthesis and β -galactosidase modification[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(12): 3324-3332