

## • 关键核心技术 •

**刘延峰** 江南大学生物工程学院研究员、博士生导师。主要从事利用合成生物技术构建细胞工厂用于合成重要营养化学品及食品组分的应用基础研究。近年来在 *Nature Communications*、*Metabolic Engineering* 和 *Biotechnology and Bioengineering* 等领域内权威期刊发表论文 20 余篇，申请发明专利 25 项，授权发明专利 12 项；主持包括国家自然科学基金面上项目、青年基金，国家重点研发计划子课题，江苏省自然科学基金优秀青年基金等在内的省部级科研项目 10 项。入选中国科协“青年人才托举工程”项目(2017)，获得江苏省科学技术一等奖(2020)、“闵恩泽能源化工奖青年进步奖”(2019)。现为 *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 期刊编委、国际生物过程协会会员。



# 枯草芽孢杆菌中高效响应 *N*-乙酰神经氨酸生物传感器的构建

孙佳琦<sup>1,2</sup>，曹燕亭<sup>1,2</sup>，吕雪芹<sup>1,2</sup>，李江华<sup>1,2</sup>，刘龙<sup>1,2</sup>，堵国成<sup>1,2</sup>，陈坚<sup>1,2</sup>，刘延峰<sup>1,2\*</sup>

1 江南大学生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122

2 江南大学未来食品科学中心，江苏 无锡 214122

孙佳琦，曹燕亭，吕雪芹，李江华，刘龙，堵国成，陈坚，刘延峰. 枯草芽孢杆菌中高效响应 *N*-乙酰神经氨酸生物传感器的构建[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2502-2516.

SUN Jiaqi, CAO Yanting, LÜ Xueqin, LI Jianghua, LIU Long, DU Guocheng, CHEN Jian, LIU Yanfeng. Development of biosensors highly responsive to *N*-acetylneuraminic acid in *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2502-2516.

**摘 要：**枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是公认的食品安全菌株，目前已被用于多种高附加值产品的生物合成，包括被广泛用作营养化学品和药物中间体的 *N*-乙酰神经氨酸(*N*-acetylneuraminic acid, NeuAc)。响应目标产物的生物传感器被广泛用于代谢工程中的动态调控和高通量筛选等方面，以提高生物合成效率。但是，枯草芽孢杆菌中缺乏可高效响应 NeuAc 的生物传感器。因此，本文首先测试和优化了能将胞外 NeuAc 转运进胞内的转运蛋白，获得了一系列具有不同转运能力的菌株，以用于后续响应 NeuAc 的生物传感器的验证；随后将响应 NeuAc 的转录因子 Bbr\_NanR 的结合位点插入枯草芽孢杆菌组成型启动子的不同位置，筛选具有活性的杂合启动子；接下来，通过在具有 NeuAc 转运能力的枯草芽孢杆菌中表达 Bbr\_NanR，选择能响应 NeuAc 的杂合启动子，并进一

资助项目：国家重点研发计划(2018YFA0900300)；国家自然科学基金(32222069)；江苏省自然科学基金(BK20200085)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900300), the National Natural Science Foundation of China (32222069), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20200085).

\*Corresponding author. E-mail: yanfengliu@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-12-01; Accepted: 2023-02-22; Published online: 2023-03-02

步通过优化 Bbr\_NanR 表达量获得了一系列动态范围广、激活倍数高的生物传感器, 其中生物传感器 P535-N2 能灵敏地响应胞内 NeuAc 浓度的变化, 具有最大的动态范围, 为(180–20 245) AU/OD; P566-N2 则具有最高的激活倍数, 为 122 倍, 是已报道的枯草芽孢杆菌中响应 *N*-乙酰神经氨酸的生物传感器的 2 倍。本文构建的响应 NeuAc 的生物传感器可用于高产 NeuAc 的酶突变体和枯草芽孢杆菌菌株的筛选, 为枯草芽孢杆菌生物合成 NeuAc 提供了高效、灵敏的分析和调控工具。

关键词: 枯草芽孢杆菌; *N*-乙酰神经氨酸; 转录因子; 生物传感器

## Development of biosensors highly responsive to *N*-acetylneuraminic acid in *Bacillus subtilis*

SUN Jiaqi<sup>1,2</sup>, CAO Yanting<sup>1,2</sup>, LÜ Xueqin<sup>1,2</sup>, LI Jianghua<sup>1,2</sup>, LIU Long<sup>1,2</sup>, DU Guocheng<sup>1,2</sup>, CHEN Jian<sup>1,2</sup>, LIU Yanfeng<sup>1,2\*</sup>

1 Key Laboratory of Sugar Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** *Bacillus subtilis* is recognized as a generally-regarded-as-safe strain, and has been widely used in the biosynthesis of high value-added products, including *N*-acetylneuraminic acid (NeuAc) which is widely used as a nutraceutical and a pharmaceutical intermediate. Biosensors responding to target products are widely used in dynamic regulation and high-throughput screening in metabolic engineering to improve the efficiency of biosynthesis. However, *B. subtilis* lacks biosensors that can efficiently respond to NeuAc. This study first tested and optimized the transport capacity of NeuAc transporters, and obtained a series of strains with different transport capacities for testing NeuAc-responsive biosensors. Subsequently, the binding site sequence of Bbr\_NanR responding to NeuAc was inserted into different sites of the constitutive promoter of *B. subtilis*, and active hybrid promoters were obtained. Next, by introducing and optimizing the expression of Bbr\_NanR in *B. subtilis* with NeuAc transport capacity, we obtained an NeuAc-responsive biosensor with wide dynamic range and higher activation fold. Among them, P535-N2 can sensitively respond to changes in intracellular NeuAc concentration, with the largest dynamic range (180–20 245) AU/OD. P566-N2 shows a 122-fold of activation, which is 2 times of the reported NeuAc-responsive biosensor in *B. subtilis*. The NeuAc-responsive biosensor developed in this study can be used to screen enzyme mutants and *B. subtilis* strains with high NeuAc production efficiency, providing an efficient and sensitive analysis and regulation tool for biosynthesis of NeuAc in *B. subtilis*.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; *N*-acetylneuraminic acid; transcription factor; biosensor

*N*-乙酰神经氨酸(*N*-acetylneuraminic acid, NeuAc)又称燕窝酸, 是一种带负电荷的功能性单糖, 存在于多种动物、植物、微生物中, 也

是人体中唾液酸的主要存在形式<sup>[1]</sup>。NeuAc 不仅是唾液酸化人乳低聚糖的重要单体之一, 也是神经节苷脂的传递递质, 因此常作为食品添

加剂促进婴幼儿的大脑和骨骼发育,有利于维持老年人的大脑健康,减缓老年痴呆症等神经系统疾病的发展<sup>[2-4]</sup>。此外,NeuAc也被应用于药物、疾病治疗等领域<sup>[5-6]</sup>。由于天然提取法和化学合成法的局限性,目前,N-乙酰神经氨酸更多地用生物合成法获得,主要包括酶法合成、全细胞催化法以及微生物发酵法。其中,酶法合成和全细胞催化都需要添加昂贵的前体物质,造成生产成本的增加,而微生物发酵法可以通过廉价碳源实现N-乙酰神经氨酸的从头合成,成为最具有潜力的生产策略<sup>[1]</sup>。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为一种革兰氏阳性模式菌株,拥有成熟的基因操作工具,且无内毒素,被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认证为食品级微生物<sup>[7]</sup>。在工业生产中,枯草芽孢杆菌因生长迅速、对培养条件要求较低、不易受噬菌体感染等优势而备受关注,广泛应用于食品、药品、酶制剂等的生产<sup>[8-11]</sup>,是合成N-乙酰神经氨酸的优良宿主。

生物传感器(biosensor)作为一种重要的合成生物学工具,在细胞工厂中具有多种应用。代谢工程中常用的生物传感器可分为基于RNA的核糖开关(riboswitches)和适体酶(aptazymes),以及基于转录因子的传感器[transcription factor (TF)-based biosensors]<sup>[12]</sup>,其中基于转录因子的传感器应用更为广泛,在适应性进化、高活性酶筛选、高产菌株筛选、动态调控、基因型和表型异质性调控等方面都发挥了重要作用<sup>[13-17]</sup>。Pang等<sup>[18]</sup>在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中构建了响应NeuAc的适体酶,基于此开发了生长偶联的筛选策略,并获得了NeuAc产量提高42%高产菌株。Peters等<sup>[19]</sup>在大肠杆菌中构建了基于转录因子的响应NeuAc的生物传感器,并用不同产量的菌株验证了生物传感器作为高通量

筛选方法的适用性。目前,基于大肠杆菌来源的NanR, Zhang等<sup>[20]</sup>在枯草芽孢杆菌中构建了可响应NeuAc的生物传感器,但是其动态范围和灵敏度不高,限制了其在指导NeuAc生产方面的应用。

本研究选取短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)来源NanR (Bbr\_NanR)在枯草芽孢杆菌中构建了可高效响应NeuAc的生物传感器。首先测试和优化了来源于大肠杆菌的NeuAc转运蛋白NanT和NanC的转运能力,获得了一系列具有不同转运能力的菌株,以用于后续响应NeuAc的生物传感器的验证;随后,将Bbr\_NanR特异性结合序列(NanR binding site)插入到枯草芽孢杆菌组成型启动子的不同位置,构建了一系列杂合启动子,并用这些杂合启动子调控绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达,选择了一系列有活性的杂合启动子用于后续实验;接下来,通过在具有NeuAc转运能力的枯草芽孢杆菌中表达Bbr\_NanR,选择能响应NeuAc的杂合启动子,并在此基础上进一步优化Bbr\_NanR表达量,成功获得了一系列可以在枯草芽孢杆菌中高效响应NeuAc的生物传感器,它们能灵敏地响应胞内NeuAc浓度的变化,且具有更高的动态范围。本文构建的响应NeuAc的生物传感器可用于高产NeuAc的酶突变体和枯草芽孢杆菌菌株的筛选,为枯草芽孢杆菌生物合成NeuAc提供了高效、灵敏的分析和调控工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

本研究所用初始菌株与质粒均为实验室保藏。详细信息见表1和表2。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Descriptions	Sources
<i>B. subtilis</i> 168	Wild-type strain	Lab store
<i>E. coli</i> JM109	Wild-type strain	Lab store
BSXC	<i>B. subtilis</i> 168 derivate, overexpression of <i>comK</i> under the control of promoter <i>PxylA</i>	Lab store
BS-nanT	Derivate, overexpression of <i>nanT</i> under the control of promoter P43	This study
BS-nanC	BSXC derivate, overexpression of <i>nanC</i> under the control of promoter P43	This study
BSP1	BSXC derivate, overexpression of <i>nanT</i> under the control of promoter <i>PxpaC</i>	This study
BSP2	BSXC derivate, overexpression of <i>nanT</i> under the control of promoter <i>PyceC</i>	This study
BSP3	BSXC derivate, overexpression of <i>nanT</i> under the control of promoter <i>PlytR</i>	This study
BSP4	BSXC derivate, overexpression of <i>nanT</i> under the control of promoter <i>PsdhB</i>	This study
BSP6	BSXC derivate, overexpression of <i>nanT</i> under the control of promoter <i>PodhA</i>	This study
BSP7	BSXC derivate, overexpression of <i>nanT</i> under the control of promoter P333	This study
BSP8	BSXC derivate, overexpression of <i>nanT</i> under the control of promoter <i>PyvyD</i>	This study
BSP9	BSXC derivate, overexpression of <i>nanT</i> under the control of promoter <i>Pveg</i>	This study
BSP10	BSXC derivate, overexpression of <i>nanT</i> under the control of promoter P566	This study

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Descriptions	Sources
pHT01	Expression vector	Lab store
p7S6P43	p7S6 containing P43 promoter	[7]
p7S6P1	p7S6 containing <i>PxpaC</i> promoter	Lab store
p7S6P2	p7S6 containing <i>PyceC</i> promoter	Lab store
p7S6P3	p7S6 containing <i>PlytR</i> promoter	Lab store
p7S6P4	p7S6 containing <i>PsdhB</i> promoter	Lab store
p7S6P6	p7S6 containing <i>PodhA</i> promoter	Lab store
p7S6P7	p7S6 containing P333 promoter	Lab store
p7S6P8	p7S6 containing <i>PyvyD</i> promoter	Lab store
p7S6P9	p7S6 containing <i>Pveg</i> promoter	Lab store
p7S6P10	p7S6 containing P566 promoter	Lab store
pHT-veg- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter <i>Pveg</i> linked with <i>gfp</i>	Lab store
pHT-nanR	pHT01 with promoter <i>PrpsT</i> linked with <i>nanR</i>	This study
pHT-N1- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N1 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N2- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N2 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N4- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N4 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N5- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N5 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N6- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N6 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N7- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N7 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N9- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N9 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N10- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N10 linked with <i>gfp</i>	This study

(待续)

(续表 2)

Plasmids	Descriptions	Sources
pHT-N11- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N11 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N12- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N12 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N13- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N13 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N14- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N14 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N15- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N15 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N16- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N16 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N17- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N17 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N18- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N18 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N19- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N19 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N20- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N20 linked with <i>gfp</i>	This study
pHT-N21- <i>gfp</i>	pHT01 with promoter N21 linked with <i>gfp</i>	This study
PrpsT-N1	Expression of <i>nanR</i> by <i>PrpsT</i> promoter in pHT-N1- <i>gfp</i>	This study
PrpsT-N2	Expression of <i>nanR</i> by <i>PrpsT</i> promoter in pHT-N2- <i>gfp</i>	This study
PrpsT-N4	Expression of <i>nanR</i> by <i>PrpsT</i> promoter in pHT-N4- <i>gfp</i>	This study
PrpsT-N10	Expression of <i>nanR</i> by <i>PrpsT</i> promoter in pHT-N10- <i>gfp</i>	This study
PrpsT-N11	Expression of <i>nanR</i> by <i>PrpsT</i> promoter in pHT-N11- <i>gfp</i>	This study
PrpsT-N14	Expression of <i>nanR</i> by <i>PrpsT</i> promoter in pHT-N14- <i>gfp</i>	This study
PrpsT-N16	Expression of <i>nanR</i> by <i>PrpsT</i> promoter in pHT-N16- <i>gfp</i>	This study
PrpsT-N17	Expression of <i>nanR</i> by <i>PrpsT</i> promoter in pHT-N17- <i>gfp</i>	This study
P535-N2	Expression of <i>nanR</i> by P535 promoter in pHT-N2- <i>gfp</i>	This study
Pt8-N2	Expression of <i>nanR</i> by Pt8 promoter in pHT-N2- <i>gfp</i>	This study
P566-N2	Expression of <i>nanR</i> by Pt9 promoter in pHT-N2- <i>gfp</i>	This study
P535-N17	Expression of <i>nanR</i> by P535 promoter in pHT-N17- <i>gfp</i>	This study
Pt8-N17	Expression of <i>nanR</i> by Pt8 promoter in pHT-N17- <i>gfp</i>	This study
P566-N17	Expression of <i>nanR</i> by Pt9 promoter in pHT-N17- <i>gfp</i>	This study
P566-N10	Expression of <i>nanR</i> by Pt9 promoter in pHT-N10- <i>gfp</i>	This study

### 1.1.2 培养基

LB 培养基: 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L NaCl, 固体培养基添加 20 g/L 的琼脂粉。根据需要添加相应浓度的抗生素(氯霉素终浓度为 5 mg/L, 壮观霉素终浓度为 100 mg/L, 氨苄霉素终浓度为 100 mg/L)。

### 1.1.3 主要试剂

PrimeStar max 聚合酶购于 TaKaRa 公司; 质粒提取、感受态制备试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司; GeneJET PCR 纯化试剂盒购于 Thermo Scientific 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因序列与引物合成

将 NCBI 数据库中 *B. breve* UCC2003 来源 NanR 的氨基酸序列送至苏州金唯智公司进行密码子优化(表达宿主: *Bacillus subtilis* 168)并合成, Bbr\_NanR 结合位点参考 Egan 等<sup>[21]</sup>的报道。文中所有引物的合成和测序反应均由苏州金唯智生物科技有限公司或者生工生物工程(上海)股份有限公司(以下简称“上海生工”)完成, 本文部分引物信息见表 3, 更换启动子所用引物根据表 4 启动子序列进行设计。

表 3 本研究所用引物

Table 3 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Used for
ydbD-1f	ATCAAGAAATCGGCCGAAAAGGCG	Construction of BS-nanT (nanC)
ydbD-1r	CTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCGGCTTTGATTATGCCTTCAGAACCGTCC	
p7SP43-2f	GAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG	
p7SP43-nanC-2r	CAGAAAGTATTTTAGCCTTTTTCATGTGTACATTCTCTCTTACCTATAATGGTACCGC	
p7SP43-nanT-2r	GGTTGTAGTACTCATGTGTACATTCTCTCTTACCTATAATGGTACCGC	
nanC-3f	GGAATGTACACATGAAAAAGGCTAAAATACTTTCTGGCGTATTATTACT	
nanC-3r	CTACAGTTTAAATGACACACCAATGCGAT	
nanT-3f	AGAGAGGAATGTACACATGAGTACTACAACCCAGAATATCCCGTG	
nanT-3r	TTAACTTTTGTTTTGACTAAATCGTTTTTGCG	
nanC_ydbD-4f	ATCGCATTGGTGTGTCAATTAACTGTAGCAAAACATCATGTTTTGGGCTTGTCTCT	
nanT_ydbD-4f	CGCCAAAACGATTTAGTCAAAACCAAAAGTTAACAAAACATCATGTTTTGGGCTT GTC	
ydbD-4r	GAAACAAGAATGGATGAAGCGTCTTGAC	
rh_ydbD-F	CGCAACAACGACTAATCAAAAGCATAAAGGC	
rh_ydbD-R	CGAAAAGATTCTAGTTCCCATCTCGATACGC	
Spc-P1-R	CACGGGATATTCTGGGTGTAGTACTCATTTTTATCACCTCCTTCTCAGTTTAAATAT TATTATCTACTACGTTC	Optimization of <i>nanT</i> expression
Spc-P2-R	CACGGGATATTCTGGGTGTAGTACTCATTTTTATCACCTCCTTATAGTCACATTTAT TTTTACGCTCAC	
N2-F	GACATAAGACATCAGATGTCGTATAATAAATGTAAAGGAGGTGATAAAAATGGGTAA GGGAG	Construction of plasmids carrying hybrid promoters
N2-R	GACATCTGATGTCTTATGTCAAATAAAATTTAAATTATATCAACGTTAATAAAAGTTC AAGCGAAAACATAACCATATCA	
pN-F	CGTCCATGGAGATCTTTGTCTGCA	Construction of plasmids carrying biosensor
pN-R	CGGGATTTCCCGGCAGTCTGACAAGTTATTCTGCAATAGTTATTTGTATAGTTCATCC ATGCCATGTGTAATCCC	
nanR-F	GAATAACTTGTGAGACTGCCGGGAAATCCCGGCAGTCTTTTTTCCATTAAAACACGG CTTATTCTGTGCCGCCTTGGATTCTC	
nanR-R	TGCAGACAAAGATCTCCATGGACG	
P535-F	GAATTGTAGGATTAAGCAACCCTCTATTTGAGAGGCCGTTTTTTCGTCCATGGAGA TCTTTGTCTGCA	Optimization of <i>nanR</i> expression
P535-R	TCGAAATAGAGGGTTGCTTAATCCTACAATTCTTGATATAATTAGTTGTGCTAAAGGA GGTGAAATGTACACATGAGCA	

### 1.2.2 重组菌株的构建

BS-nanC、BS-nanT 的构建: 以 *B. subtilis* 168 基因组为模板, 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增 *ydbD* 位点上下游各 1 000 bp 的序列作为左右同源臂, 以 *E. coli* JM109 基因组为模板, 扩增 *nanC*、*nanT* 基因, 以实验室保存质粒 p7S6P43<sup>[7]</sup>为模板扩增壮观

霉素抗性框和 P43 启动子片段。通过融合 PCR 将左右臂、抗性框和 P43 启动子片段、*nanC* (*nanT*)片段进行融合, 获得基因 *nanC* (*nanT*)的表达框, 并转化枯草芽孢杆菌 BSXC 感受态, 获得菌株 BS-nanC (BS-nanT)。

BSP1–BSP10 的构建: 左右臂和 *nanT* 片段参考上述方法获得, 以实验室保存的 p7S6P1

表 4 本研究所用启动子序列

Table 4 Promoter sequence used in this study

Promoters	Sequences (5'→3')
Pveg	TTATTAACGTTGATATAATTTAAATTTTATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTACAATAAATGT
P43	TCTTACATTTATTTTACATTTTGTAGAAATGGGCGTGAAAAAAGCGCGCGATTATGTAAAAATATAAAGTGATAGCGGTACCATTATAG
Pm1	AAAAATAAAAAAAGTGTGACAAAAAATCAAAATATGGTATAATTGAAA
P214	CAAAATCGCAAAAAAGTGTGACAACTTAACTCAGATCTGGTATAATAGAAA
P566	AAAAAACGGCCTCTCGAAATAGAGGGTTGACACTCTTTTGAGAATATGTTATATTATCAG
P535	AAAAAACGGCCTCTCGAAATAGAGGGTTGCTTAATCCTACAATTCTTGATATAATTAGTTGTGCT
N1	TTATTAACGTTGATATAATTTAAATTTTATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTACAATAAGACATCAGATGTCATAT
N2	TTATTAACGTTGATATAATTTAAATTTTATTTGACATAAGACATCAGATGTCGTATAATAAATGT
N3	TTATTAACGTTGATATAATTTAAATTTTATTTGACATAAGACATCAGATGTCGTACAATAAATGT
N4	TTATTAACGTTGATATAATTTAAATTATAAGACATCAGATGTCATATTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTACATAAATGT
N5	TCTTACATTTATTTTACATTTTGTAGAAATGGGCGTGAAAAAAGCGCGCGATTATGTAAAAATTAGACATCAGACGTCTTATAAAGTGATAGCGGTACCATTATAG
N6	TCTTACATTTATTTTACATTTTGTAGAAATGGGCGTGAAAAAAGACATCAGATGTCTAATATATAAAGTGATAGCGGTACCATTATAG
N7	TCTTACATTTATTTTACATTTTGTAGAAATGGGCGTGAAAAAAGACATCAGATGTCTAAAATATAAAGTGATAGCGGTACCATTATAG
N8	TCTTACATTTATTTTACATTTTATCAGACATCAGATGTCAAATGGGCGTGAAAAAAGCGCGCGATTATGTAATAATATAAAGTGATAGCGGTACCATTATAG
N9	AAAAATAAAAAAAGTGTGACAAAAAATCAAAATATGGTATAATCAGACATCAGATGTCATATTGAAA
N10	AAAAATAAAAAAAGTGTGACAATTAGACATCAGACGTCTTATAATTGAAA
N11	AAAAATAAAAAAATAAGACATCAGAAGTCAAATGTGTTGACAAAAAATCAAAATATGGTATAATTGAAA
N12	CAAAATCGCAAAAAAGTGTGACAACTTAACTCAGATCTGGTATAATTAGACATCAGACGTCTGATAGAAA
N13	CAAAATCGCAAAAAAGTGTGACAATTAGACATCAGACGTCTGTATAATAGAAA
N14	CAAAATCGCAAAATAAGACATCAGAAGTCAAATGTGTTGACAACTTAACTCAGATCTGGTATAATAGAAA
N15	AAAAAACGGCCTCTCGAAATAGAGGGTTGACACTCTTTTGAGAATATGTTATATTAGACATCAGACGTCTGATATCAG
N16	AAAAAACGGCCTCTCGAAATAGAGGGTTGACAATCAGACATCAGAAGTCTTATATTATCAG
N17	AAAAAACGGCCTCTCGAAATAATTAGACATCAGACGTCTGTATGAGGGTTGACACTCTTTTGAGAATATGTTATATTATCAG
N18	AAAAAACGGCCTCTCGAAATAGAGGGTTGCTTAATCCTACAATTCTTGATATAATTAGACATCAGACGTCTGAT
N19	AAAAAACGGCCTCTCGAAATAGAGGGTTGCTTAAATCAGACATCAGAAGTATAATTAGTTGTGCT
N20	AAAAAACGGCCTCTCGAAATAGAGGGTTGCTTAAATCAGACATCAGAAGTCTAATTAGTTGTGCT
N21	AAAAAACGGCCTCTCGAAATATTAGACATCAGACGTCTGGATGCTTAATCCTACAATTCTTGATATAATTAGTTGTGCT
PrpsT	CACAGTGTCTTAAGGTAAATCTTCTTCAATAGAACAATTGTATTCTATCAACACACCTTTAGATTGCAATATAAA
Pt8	TTCAAATATGAGAATATTATACAACACGAGCCCATTTTGTCAAATAAAATTTAAATTTAAATTTCTATGATTCCTCAA

系列质粒<sup>[22]</sup>为模板扩增获得壮观霉素抗性框和启动子片段,然后按照上述 BS-nanT 的构建方法得到重组菌株 BSP1-BSP10。

### 1.2.3 重组质粒的构建

杂合启动子重组质粒的构建:以 pHT-veg-gfp 为模板,用相应的引物进行扩增获得带有杂合启动子的线性质粒片段,上下游引物包括杂合启动子序列、特异性结合序列,且存在一段 20 bp 左右的重叠(overlap)。利用 Thermo Scientific GeneJET PCR 纯化试剂盒对所获得的线性质粒片段进行纯化,然后取 10  $\mu$ L 转化 *E. coli* JM109 感受态,并涂布抗性平板。次日将平板上的单菌落送上海生工测序,将测序正确的单菌落扩大培养,并提取重组质粒。优化 *nanR* 表达量时,也采用同样的环化 PCR 的方式替换 *nanR* 的启动子。

生物传感器重组质粒的构建:分别以杂合启动子重组质粒为模板,用引物 pN-F/R 扩增质粒骨架及杂合启动子表达的绿色荧光蛋白基因 *gfp*,以 pHT-nanR 为模板,用引物 nanR-F/R 扩增 *PrpsT* 启动子表达的 *nanR* 基因,利用 Thermo Scientific GeneJET PCR 纯化试剂盒将所得片段纯化,经 Gibson 组装<sup>[23]</sup>后转化 *E. coli* JM109 感受态,并涂布抗性平板。次日将平板上的单菌落送上海生工测序,将测序正确的单菌落扩大培养,并提取重组质粒。

### 1.2.4 感受态细胞的制备和转化

大肠杆菌感受态制备与转化:超级感受态细胞制备试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司,按照说明书要求制备、转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,用于质粒的构建。

枯草芽孢杆菌感受态制备与转化:参考 Zhang 等<sup>[24]</sup>的方法,在 *B. subtilis* 168 基因组上整合了一个受木糖诱导型启动子 *PxyIA* 调控的 *comK* 基因,得到菌株 BSXC 作为本研究的出发

菌株,利用木糖诱导制备感受态细胞。挑取平板活化的 *B. subtilis* 单菌落在 1 mL LB 培养基中于 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 的条件下培养 12 h,加入 LB 培养基稀释至 5 mL,并加入终浓度为 3% 的木糖,于 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下诱导 2 h 后获得感受态。将适量的质粒或片段加入 100  $\mu$ L *B. subtilis* 感受态细胞,于 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 的条件下培养 1.5 h 后涂布相应抗性平板,置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养。

### 1.2.5 胞内 NeuAc 浓度检测

胞内 NeuAc 测定样品制备:取 1 mL 发酵液,置于预冷为 4  $^{\circ}$ C 的离心机,6 000 r/min 离心 5 min,弃尽上清液,将菌体重悬于 1 mL 预冷的无菌水中洗涤 1 次,6 000 r/min 离心 5 min,弃尽上清液,用 0.2 mL 无菌水重悬菌体,后加入 0.4 mL 乙腈和 0.4 mL 甲醇混匀,并置于 -20  $^{\circ}$ C 过夜萃取。将萃取液于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,上清液置于冷冻干燥机过夜干燥。干燥后的粉末重悬于一定体积的无菌水以浓缩样品,用于高效液相色谱检测。

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测:取样品通过 0.22  $\mu$ m 的滤膜,采用 Aminex HPX-87H 柱(300 nm $\times$ 7.8 nm)进行 HPLC 检测,检测参数如下:采用 10 mmol/L  $H_2SO_4$  作为流动相,0.5 mL/min 流速进样,进样量为 10  $\mu$ L,柱温为 40  $^{\circ}$ C,紫外检测器波长为 210 nm。

### 1.2.6 GFP 荧光强度检测方法

将培养过夜的种子液以 2% 转接到含有 0.2 mL LB 培养基的 96 浅孔板中,37  $^{\circ}$ C、900 r/min 培养 8 h,用酶标仪在 490 nm 的激发波长、530 nm 的发射波长和 60 的增益值下测定 GFP 的荧光强度;在 600 nm 的波长下测定  $OD_{600}$ 。减去培养基的背景噪声后,计算荧光强度与  $OD_{600}$  的比值,再减去无 GFP 表达的对照菌株的荧光强



度与  $OD_{600}$  的比值, 即得到相对荧光强度。

## 2 结果与分析

### 2.1 NeuAc 转运蛋白 NanT 和 NanC 的测试和表达优化

在响应小分子代谢物的生物传感器构建过程中, 常常采用在培养基中添加不同浓度的小分子代谢物来验证生物传感器的响应性能, 而枯草芽孢杆菌不具备将胞外 NeuAc 转运进胞内的能力, 因此, 首先需要构建能将胞外 NeuAc 转运进胞内的枯草芽孢杆菌, 便于外源添加 NeuAc 以验证生物传感器的性能。为了不影响内源基因的表达, 选择 *ydbC* 和 *ydbD* 基因的间隔位置作为基因组整合表达 *nanC* 和 *nanT* 的位点。按照方法 1.1.2, 将由 P43 启动子调控 *nanC* (*nanT*) 的表达框整合到枯草芽孢杆菌 BSXC 的基因组, 得到菌株 BS-nanC (BS-nanT)。为了比较 NanC 和 NanT 转运 NeuAc 的能力, 将菌株 BS-nanC 和 BS-nanT 分别在添加了 10 g/L 和 80 g/L NeuAc 的 LB 培养基中发酵 12 h, 随

后检测其胞内 NeuAc 含量。

与 BS-nanC 相比, BS-nanT 转运 NeuAc 的能力更强, 且外源添加不同浓度的 NeuAc 时胞内浓度差异较大, 是验证响应 NeuAc 的生物传感器的更优宿主(图 1A)。BS-nanT 在外源添加 10–80 g/L NeuAc 的 LB 培养基中发酵 12 h 时, 胞内 NeuAc 浓度也存在差异, 但是胞内 NeuAc 浓度总体偏低, 最高也只有 310  $\mu\text{g/mL}$  (图 1B), 这不利于对响应 NeuAc 浓度范围广的生物传感器的验证, 于是进一步对 *nanT* 进行表达优化。选取枯草芽孢杆菌中 9 个不同强度的内源启动子(P1、P2、P3、P4、P6、P7、P8、P9 和 P10)<sup>[22]</sup> 替换 P43 启动子调控 *nanT* 的表达, 得到菌株 BSP1–BSP10。如图 2 所示, 当在添加了 10 g/L NeuAc 的 LB 培养基中发酵 12 h 时, 菌株 BSP1–BSP10 的胞内 NeuAc 含量在 230–635  $\mu\text{g/mL}$  之间变化。其中, BSP1、BSP2、BSP7 和 BSP9 之间的胞内 NeuAc 含量差异显著, 且胞内 NeuAc 浓度范围更广(230–635  $\mu\text{g/mL}$ ), 可用于后续响应 NeuAc 生物传感器的性能验证。

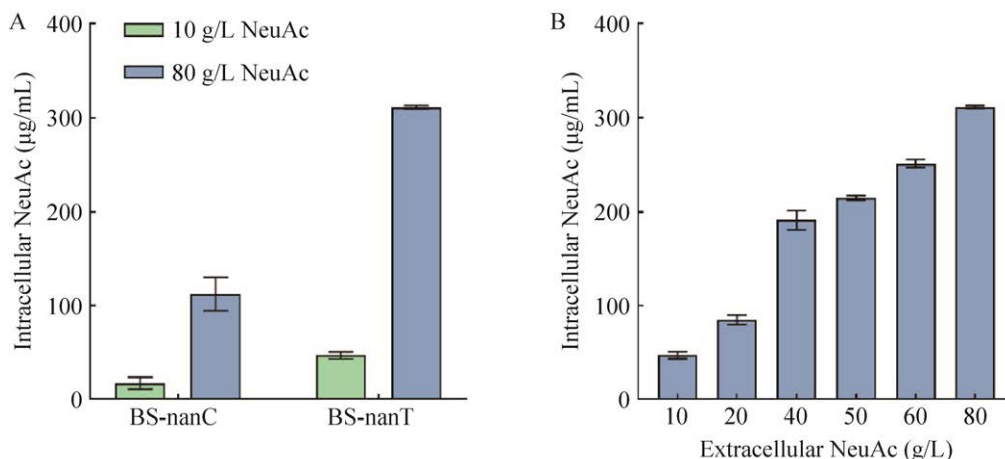


图 1 比较 NanT 和 NanC 的转运能力

Figure 1 Comparison of transport capacity of NeuAc between BS-nanC and BS-nanT. A: Comparison of intracellular NeuAc concentration between BS-nanC and BS-nanT when adding 10 g/L NeuAc to the medium. B: Intracellular NeuAc concentration of BS-nanT when extracellular NeuAc is different.

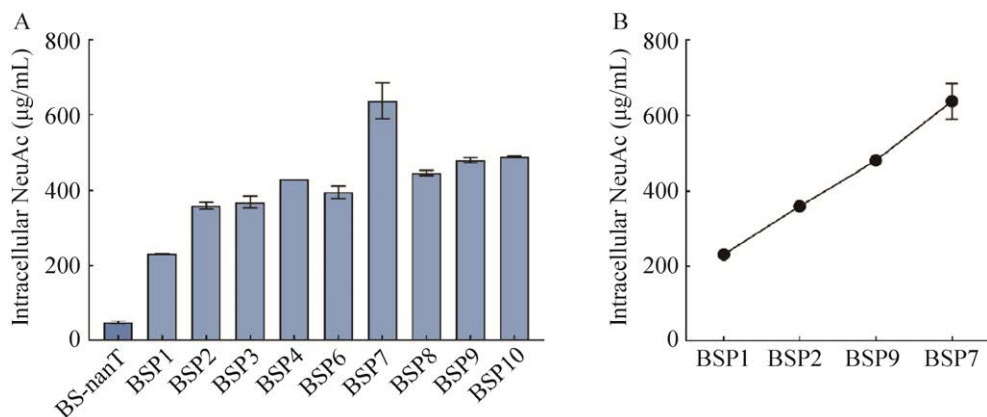


图2 *nanT* 的表达优化

Figure 2 Expression optimization of *nanT*. A: Comparison of intracellular NeuAc concentration of strains with different promoters controlling *nanT* when adding 10 g/L NeuAc to the medium. B: Comparison of intracellular NeuAc concentration of strains BSP1, BSP2, BSP7 and BSP9 when adding 10 g/L NeuAc to the medium.

## 2.2 响应 NeuAc 生物传感器的设计与构建

基于转录因子的生物传感器通常包括 3 个部分：响应特定代谢物的转录因子，含有转录因子结合位点的启动子以及受其调控表达的报告基因<sup>[25-26]</sup>。响应 NeuAc 生物传感器的原理如图 3A 所示，当胞内不存在 NeuAc 时，Bbr\_NanR 作为阻遏蛋白结合在其结合位点上，抑制响应启动子调控的报告基因的表达；当胞内存在 NeuAc 时，胞内 NeuAc 与 Bbr\_NanR 的结合会影响 Bbr\_NanR 的阻遏活性，从而激活响应启动子的表达。

因此，首先设计了含有 NanR 结合位点的杂合启动子。如图 3B 所示，将 Bbr\_NanR 特异性结合位点放在了 6 个组成型启动子 *Pveg*、*P43*、*Pm1*、*P214*、*P566*、*P535*<sup>[27-28]</sup> 的-35 区前、-35 区和-10 区中间、-10 区后，设计了 21 个带有 Bbr\_NanR 结合位点的杂合启动子 N1-N21 (序列如表 4 所示)。以 pHT01 质粒为载体，分别用杂合启动子表达 GFP，将构建成功的质粒转化 BS-nanT 菌株以检测杂合启动子活性。如图 4 所示，虽然大多数杂合启动子在插入 NanR 的结合序列后活性明显降低甚至失去活性，但

是杂合启动子 N1、N2、N10、N11、N14、N16、N17 显示出了接近甚至超过强组成型启动子 P566 的活性，因此，选择这些杂合启动子用于后续响应 NeuAc 生物传感器的构建。

为了验证这些高活性的杂合启动子能否被 Bbr\_NanR 抑制，能否被 NeuAc 激活，在杂合启动子调控 GFP 表达框的上游引入 *PrpsT* 启动子表达的 *nanR*，然后将构建成功的 7 个生物传感器质粒转入 BS-nanT，发现当不添加 NeuAc 时，杂合启动子 N1、N2、N10、N16 和 N17 能被一定程度地抑制；当外源添加 10 g/L NeuAc 时，这几个杂合启动子也能被激活(图 5A)。其中 N2、N10 和 N17 能被激活至少 2 倍，这有利于灵敏地响应低浓度的胞内 NeuAc。因此，选择了这几个杂合启动子进行后续实验。接下来分析了外源添加不同浓度的 NeuAc 时杂合启动子 N2、N10、N17 的表达情况，如图 5B-5D 所示，虽然它们都能被激活，但是当胞外添加 10 g/L 的 NeuAc (低浓度)时它们的表达强度已接近杂合启动子被完全激活的强度，因此，推测 *nanR* 的表达量不足以用于响应更高浓度的胞内 NeuAc，并利用不同强度的启动子优化 *nanR* 表达。

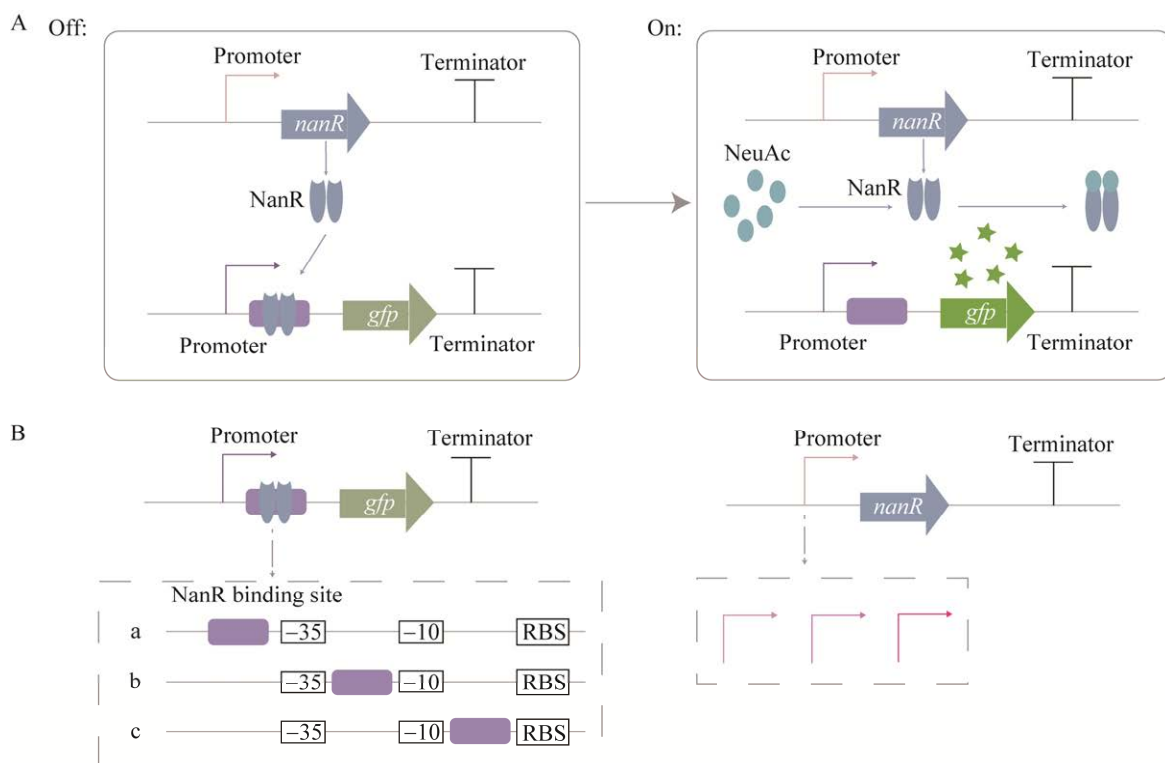


图3 响应 NeuAc 生物传感器的作用原理和构建策略示意图

Figure 3 Schematic diagram of function principle and construction strategy of NeuAc-responsive biosensor. A: When NeuAc is absent, NanR binds to the NanR binding site located on the promoter controlling GFP, inhibiting the expression of GFP; When NeuAc is present, NeuAc binds to NanR to activate GFP expression. B: The biosensor was developed by inserting the NanR binding site into different positions of the GFP promoter and optimizing *nanR* expression.

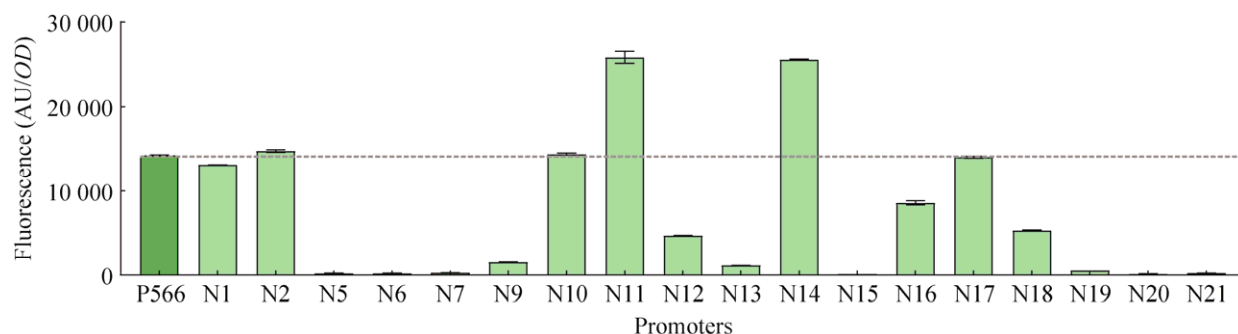


图4 杂合启动子活性验证

Figure 4 Testing the activity of the hybrid promoters.

在 2.1 中, 研究发现当外源添加 10 g/L 的 NeuAc 时, 菌株 BSP1、BSP2、BSP9、BSP7 的胞内 NeuAc 浓度在 230–635  $\mu\text{g/mL}$  范围内存在显著差异。为了能获得响应 NeuAc 浓度范围

广且灵敏的生物传感器, 后续选择这 4 株菌去验证生物传感器对不同浓度 NeuAc 的响应效果。分别选取 N2、N10 和 N17 启动子表达 GFP, 在此基础上选取 3 个不同强度的启动子 P535、

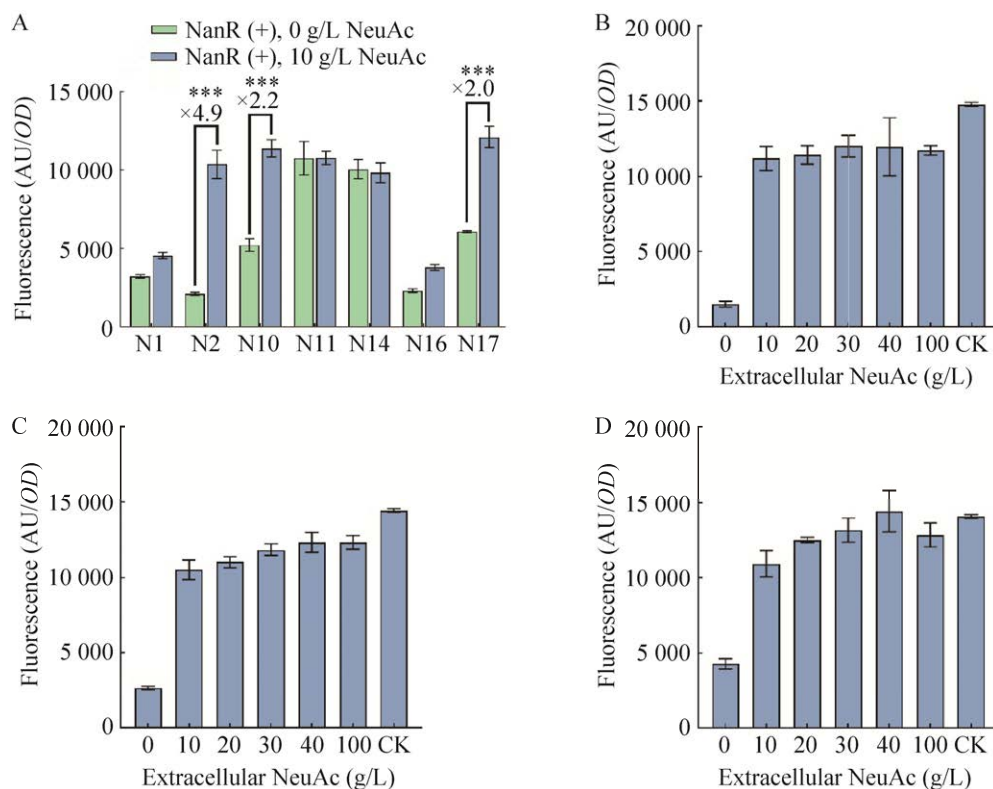


图5 响应 NeuAc 生物传感器激活效果验证

Figure 5 Testing the NeuAc-responsive biosensor. A: Testing whether hybrid promoters respond to NeuAc. Test of PrpsT-N2 (B), PrpsT-N10 (C) and PrpsT-N17 (D) in the presence of different intracellular concentrations of NeuAc. CK represents the absence of Bbr\_NanR. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

Pt8、P566 优化 *nanR* 的表达。将构建成功的重组质粒 P535-N2、Pt8-N2、P566-N2、P566-N10、P535-N17、Pt8-N17、P566-N17 分别转入菌株 BSP1、BSP2、BSP7、BSP9 中。当外源添加 10 g/L 的 NeuAc 时,发现 P566-N10 虽然能够响应 NeuAc,但是激活后的杂合启动子活性远远小于无 *nanR* 存在时杂合启动子的活性,对此,推测 *nanR* 的表达量太高,P566-N10 可能需要更高浓度的胞内 NeuAc 才能被更高强度地激活。除 P566-N10 外的 6 个生物传感器都可以灵敏地响应 NeuAc,且激活强度可达到 18–122 倍(图 6)。其中 P535-N2 响应 NeuAc 的动态范围最广,为(180–20 245) AU/OD;P566-N2 响应 NeuAc 的激活强度最大,为 122 倍,为已报道

的枯草芽孢杆菌中响应 NeuAc 的生物传感器<sup>[20]</sup>的 2 倍。此外,本文只是在胞内 NeuAc 浓度为 0–635  $\mu\text{g/mL}$  的范围内对几个生物传感器进行了验证,635  $\mu\text{g/mL}$  的胞内 NeuAc 浓度并未使 P535-N2、Pt8-N2 和 P566-N2 达到饱和状态,因此,这 3 个生物传感器响应的 NeuAc 浓度范围可能比所使用的 0–635  $\mu\text{g/mL}$  范围更广,可以用于分析和检测更高浓度的胞内 NeuAc。

### 3 讨论与结论

*N*-乙酰神经氨酸由于在食品和医药等方面的广泛应用及潜在价值而备受关注,枯草芽孢杆菌作为食品安全级模式微生物,是生产 NeuAc 的理想宿主。目前,Zhang 等<sup>[22]</sup>以枯草芽孢杆



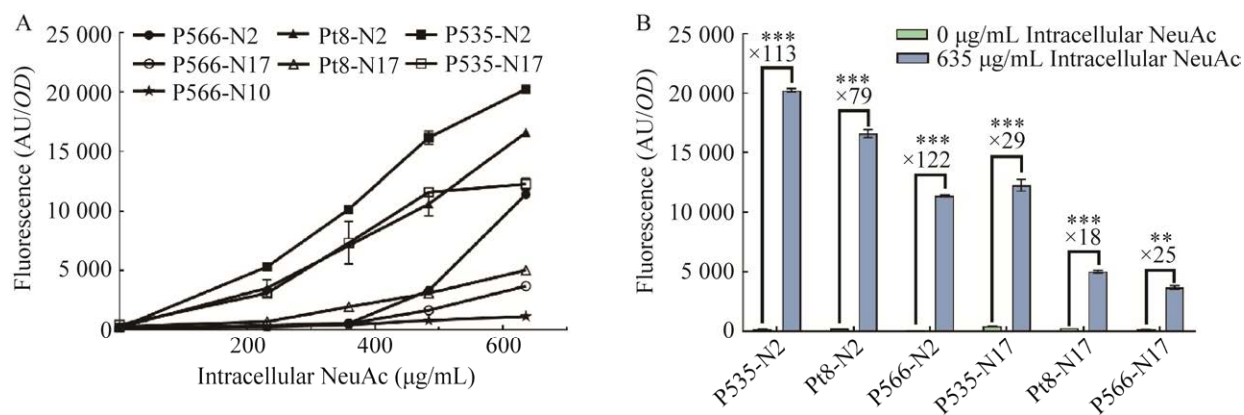


图6 响应 NeuAc 生物传感器的动态范围和激活强度

Figure 6 Dynamic range and activation folds of NeuAc-responsive biosensors. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

菌作为宿主菌株生产 NeuAc, 使用葡萄糖作为唯一碳源, 在 5 L 发酵罐中分批补料发酵, NeuAc 产量达到 30.10 g/L。然而, 枯草芽孢杆菌中 NeuAc 合成途径的改造存在细胞生长与产物生产不平衡、中间产物过度积累等一系列问题, 限制了 NeuAc 的高效合成。响应目标产物的生物传感器常结合流式细胞术实现其在高通量筛选中的应用, 也常用于基因回路的设计以构建智能细胞工厂, 提高生物合成效率。虽然本研究构建的响应 NeuAc 的生物传感器响应的是胞内 NeuAc 浓度变化, 但是目前已有越来越多的研究结合这种生物传感器和流式细胞仪来进行高通量筛选, 并获得了胞外目标产物产量增加的菌株, 证实了这类生物传感器在高产菌株筛选中的应用潜力<sup>[16,18,29-30]</sup>。另外, 本文发现当在枯草芽孢杆菌中适量表达大肠杆菌来源的 NanT 时, 不同的胞外 NeuAc 浓度会导致不同的胞内 NeuAc 浓度。因此, 结合基于液滴微流控的共培养, 构建的响应胞内 NeuAc 的生物传感器也可用于胞外 NeuAc 产量增加的菌株的高通量筛选。构建用于枯草芽孢杆菌的高效响应 NeuAc 的生物传感器, 对于指导 NeuAc 的合成

具有重要意义。

本研究首先引入大肠杆菌来源的 NeuAc 转运蛋白 NanT, 并选取 10 个不同强度的启动子对其进行表达优化, 获得 4 株具有不同 NeuAc 转运能力的枯草芽孢杆菌作为响应 NeuAc 生物传感器的验证宿主。然后选取 6 个组成型启动子, 分别在其不同区域插入 Bbr\_NanR 结合位点并验证活性, 获得了 7 个有活性的杂合启动子, 在此基础上进一步引入和优化 Bbr\_NanR 的表达, 得到了 6 个能够高效响应 NeuAc 的生物传感器。其中 P535-N2 具有最广的动态范围, 为(180–20 245) AU/OD; P566-N2 的激活倍数最高, 可达 122 倍, 为枯草芽孢杆菌中已报道的响应 NeuAc 生物传感器<sup>[20]</sup>的 2 倍。

本研究侧重对响应 NeuAc 生物传感器的构建及响应性能的验证, 在后续的研究中, 可以通过增加胞内 NeuAc 浓度进一步探究生物传感器的动态范围。此外, 本研究构建的生物传感器可结合流式细胞仪应用于枯草芽孢杆菌中 NeuAc 合成途径的高活性酶突变体及高产菌的筛选、群体质量控制等, 为枯草芽孢杆菌进一步高效生产 NeuAc 奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] YANG HQ, LU LP, CHEN XZ. An overview and future prospects of sialic acids[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 46: 107678.
- [2] RÖHRIG CH, CHOI SSH, BALDWIN N. The nutritional role of free sialic acid, a human milk monosaccharide, and its application as a functional food ingredient[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(5): 1017-1038.
- [3] van KARNEBEEK CDM, BONAFÉ L, WEN XY, TARAILO-GRAOVAC M, BALZANO S, ROYER-BERTRAND B, ASHIKOV A, GARAVELLI L, MAMMI I, TUROLLA L, BREEN C, DONNAI D, CORMIER-DAIRE V, HERON D, NISHIMURA G, UCHIKAWA S, CAMPOS-XAVIER B, ROSSI A, HENNET T, BRAND-ARZAMENDI K, et al. *NANS*-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development[J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(7): 777-784.
- [4] WANG B. Molecular mechanism underlying sialic acid as an essential nutrient for brain development and cognition[J]. *Advances in Nutrition*, 2012, 3(3): 465S-472S.
- [5] SALCEDO J, BARBERA R, MATENCIO E, ALEGRÍA A, LAGARDA MJ. Gangliosides and sialic acid effects upon newborn pathogenic bacteria adhesion: an *in vitro* study[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(2): 726-734.
- [6] CHEESEMAN J, KUHNLE G, SPENCER DIR, OSBORN HMI. Assays for the identification and quantification of sialic acids: challenges, opportunities and future perspectives[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2021, 30: 115882.
- [7] ZHANG XL, LIU YF, LIU L, WANG M, LI JH, DU GC, CHEN J. Modular pathway engineering of key carbon-precursor supply-pathways for improved *N*-acetylneuraminic acid production in *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(9): 2217-2231.
- [8] LIU YF, LIU L, LI JH, DU GC, CHEN J. Synthetic biology toolbox and chassis development in *Bacillus subtilis*[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(5): 548-562.
- [9] YANG S, DU GC, CHEN J, KANG Z. Characterization and application of endogenous phase-dependent promoters in *Bacillus subtilis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(10): 4151-4161.
- [10] NIU TF, LV XQ, LIU ZM, LI JH, DU GC, LIU L. Synergetic engineering of central carbon and nitrogen metabolism for the production of *N*-acetylglucosamine in *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2020, 67(1): 123-132.
- [11] YANG H, LIU YF, LI JH, LIU L, DU GC, CHEN J. Systems metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for efficient biosynthesis of 5-methyltetrahydrofolate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(7): 2116-2130.
- [12] CARPENTER AC, PAULSEN IT, WILLIAMS TC. Blueprints for biosensors: design, limitations, and applications[J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9(8): 375.
- [13] CAO YT, TIAN RZ, LV XQ, LI JH, LIU L, DU GC, CHEN J, LIU YF. Inducible population quality control of engineered *Bacillus subtilis* for improved *N*-acetylneuraminic acid biosynthesis[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(9): 2197-2209.
- [14] 钱蕾, 刘延峰, 李江华, 刘龙, 堵国成. 适应性进化和改造质粒稳定性促进枯草芽孢杆菌合成 *N*-乙酰神经氨酸[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(5): 1-6.
- QIAN L, LIU YF, LI JH, LIU L, DU GC. Regulating the synthesis of *N*-acetylneuraminic acid based on adaptive evolution and plasmid stability modification in *Bacillus subtilis*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(5): 1-6 (in Chinese).
- [15] DABIRIAN Y, GONÇALVES TEIXEIRA P, NIELSEN J, SIEWERS V, DAVID F. FadR-based biosensor-assisted screening for genes enhancing fatty acyl-CoA pools in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(8): 1788-1800.
- [16] LIU YF, ZHUANG YY, DING DQ, XU YR, SUN JB, ZHANG DW. Biosensor-based evolution and elucidation of a biosynthetic pathway in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(5): 837-848.
- [17] YEOM SJ, KIM M, KWON KK, FU YY, RHA E, PARK SH, LEE H, KIM H, LEE DH, KIM DM, LEE SG. A synthetic microbial biosensor for high-throughput screening of lactam biocatalysts[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5053.
- [18] PANG QX, HAN H, LIU XQ, WANG ZG, LIANG QF, HOU J, QI QS, WANG Q. *In vivo* evolutionary engineering of riboswitch with high-threshold for *N*-acetylneuraminic acid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 59: 36-43.
- [19] PETERS G, de PAEPE B, de WANNEMAERKER L, DUCHI D, MAERTENS J, LAMMERTYN J, de MEY

- M. Development of *N*-acetylneuraminic acid responsive biosensors based on the transcriptional regulator NanR[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(7): 1855-1865.
- [20] ZHANG XL, CAO YT, LIU YF, LIU L, LI JH, DU GC, CHEN J. Development and optimization of *N*-acetylneuraminic acid biosensors in *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2020, 67(4): 693-705.
- [21] EGAN M, O'CONNELL MOTHERWAY M, van SINDEREN D. A GntR-type transcriptional repressor controls sialic acid utilization in *Bifidobacterium breve* UCC2003[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(4): 1-9.
- [22] ZHANG XL, WANG CY, LV XQ, LIU L, LI JH, DU GC, WANG M, LIU YF. Engineering of synthetic multiplexed pathways for high-level *N*-acetylneuraminic acid bioproduction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(49): 14868-14877.
- [23] GIBSON DG, SMITH HO, HUTCHISON CA III, VENTER JC, MERRYMAN C. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(11): 901-903.
- [24] ZHANG XZ, ZHANG YH P. Simple, fast and high-efficiency transformation system for directed evolution of cellulase in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4(1): 98-105.
- [25] JEON Y, LEE YJ, KIM K, JANG G, YOON Y. Transcription factor-based biosensors for detecting pathogens[J]. *Biosensors*, 2022, 12(7): 470.
- [26] UMENO D, KIMURA Y, KAWAI-NOMA S. Transcription factors as evolvable biosensors[J]. *Analytical Sciences*, 2021, 37(5): 699-703.
- [27] LU ZH, YANG SH, YUAN X, SHI YY, OUYANG L, JIANG SJ, YI L, ZHANG GM. CRISPR-assisted multi-dimensional regulation for fine-tuning gene expression in *Bacillus subtilis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(7): e40.
- [28] LIU DY, MAO ZT, GUO JX, WEI LY, MA HW, TANG YJ, CHEN T, WANG ZW, ZHAO XM. Construction, model-based analysis, and characterization of a promoter library for fine-tuned gene expression in *Bacillus subtilis*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(7): 1785-1797.
- [29] YANG P, WANG J, PANG QX, ZHANG FY, WANG JS, WANG Q, QI QS. Pathway optimization and key enzyme evolution of *N*-acetylneuraminate biosynthesis using an *in vivo* aptazyme-based biosensor[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 43: 21-28.
- [30] RAMAN S, ROGERS JK, TAYLOR ND, CHURCH GM. Evolution-guided optimization of biosynthetic pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(50): 17803-17808.

(本文责编 陈宏宇)