# 大肠杆菌四氢嘧啶合成途径的构建与优化

魏伟伟[1,2]，王 阳[1,2]，堵国成[1,2]，康 振[*1,2]

（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

**摘要**：为了构建重组工程菌株发酵合成四氢嘧啶，解决野生型菌株对高盐环境的依赖，作者克隆了来自伸长盐单胞菌（*Halomonas elongata* ATCC 33173）的四氢嘧啶合成相关基因簇 *ectABC* 并在大肠杆菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）中重构了四氢嘧啶的合成途径。通过宿主比较发现，与 *E. coli* W3110、*E. coli* DH5α 和高产天冬氨酸的大肠杆菌（命名为 *E. coli*（asp））相比，*E. coli* BL21（DE3）更适用于四氢嘧啶的合成（185.23 mg/L）。进一步分析了不同拷贝数的表达系统对四氢嘧啶合成的影响，发现高拷贝的 pRSFDuet-1 为载体时产四氢嘧啶量最高，达 267.3 mg/L。在此基础上，采用核糖体结合位点（RBS）优化策略，对四氢嘧啶合成途径 3 个酶 EctA、EctB 与 EctC 进行了组合优化表达，四氢嘧啶产量提高至 521.24 mg/L。为强化前体天冬氨酸和天冬氨酸 β-半醛的供给，对天冬氨酸激酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、天冬氨酸转氨酶和天冬氨酸裂解酶进行了过量表达。研究表明，单独强化天冬氨酸激酶的表达更有利于四氢嘧啶的合成（551.24 mg/L），为构建高产四氢嘧啶的工程菌种提供了新的策略。

**关键词**：四氢嘧啶；大肠杆菌；*ectABC*；RBS 优化；过量表达

**中图分类号**：Q 815　**文章编号**：1673-1689（2021）07-0030-12　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.07.004

# Construction and Optimization of Ectoine Synthesis Pathway in *Escherichia coli*

*WEI Weiwei*[1,2]，*WANG Yang*[1,2]，*DU Guocheng*[1,2]，*KANG Zhen*[*1,2]

（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

**Abstract**: Ectoine is widely used in medicine, cosmetics and other fields. This study aimed to construct recombinant *Escherichia coli* strain to synthesize ectoine to solve the dependence of wild-type strain on high salt environment. Ectoine synthesis encoding gene cluster *ectABC* was cloned from *Halomonas elongata* ATCC 33173 and reconstructed in *Escherichia coli*. In order to confirm a suitable host, four commonly used *E. coli* strains, i.e., *E. coli* W3110, *E. coli* DH5α and *E. coli* (asp) and *E. coli* BL21 (DE3) were compared, and *E. coli* BL21 (DE3) was found to be the best host for ectoine synthesis(185.23 mg/L). Further analysis of the effect of expression systems with

**收稿日期**：2020-02-08

**基金项目**：国家自然科学基金面上项目（31970085）；江苏省科技支撑计划项目（BE2019630）；国家轻工技术与工程一流学科自主课题（LITE2018-16）；江南大学自主科研计划重点项目（JUSRP51707A）。

***通信作者**：康 振（1982—），男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事微生物合成生物学（功能多糖与寡糖）与代谢工程、酶工程方面的研究。E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

different copy numbers on ectoine synthesis was carried out, and the results showed that pRSFDuet-1 with high copy number generated the highest titer of ectoine (267.3 mg/L). On this basis, the ribosomal binding site optimization strategy was introduced to optimize the expression of three enzymes including EctA, EctB and EctC, producing ectoine to 521.24 mg/L. To increase the supply of precursors aspartate and aspartate semialdehyde, aspartate kinase, aspartate hemialdehyde dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, aspartate aminotransferase and aspartate lyase were overexpressed. The results demonstrated that the single overexpression of aspartate kinase was beneficial to ectoine biosynthesis and the production was eventually enhanced to 551.24 mg/L. The present study provides a new strategy to construct ectoine-producing strain.

**Keywords:** ectoine, *E. coli*, *ectABC*, RBS optimization, overexpression

四氢嘧啶(Ectoine)是一种极性、易溶、生理pH范围内不带电荷的小分子有机物[1]，摩尔质量为142.2 g/mol，分子式为$C_6H_{10}N_2O_2$。为了避免细胞中水分的丢失并维持平衡，生活在高盐环境中的耐盐和嗜盐原核生物形成了细胞质-盐机制和有机渗透机制这两种主要机制，中度嗜盐菌和耐高盐菌主要采用渗透机制。作为研究最充分的相容性溶质之一，ectoine是好氧中度嗜盐细菌中最常见的渗透压调控物[2]。研究表明，四氢嘧啶对蛋白质的构象和活性有积极的影响，因此可以提高它们的功能性[3-5]。此外，四氢嘧啶对细菌细胞处于极端环境（干旱、冷冻、高盐碱、高温、射线等）中的核酸、蛋白质、酶等起到保护作用，目前广泛应用于医药、化妆品、酶工业等领域[6-7]。

四氢嘧啶的合成主要有两种方法：化学合成法和生物合成法。化学合成法存在着很多问题，包括生产过程复杂、合成产率低、副产物多且与目标产物的化学性质相似、下游分离纯化难度很高等[8]。生物合成法主要采用酶催化法和发酵法。董等[9]采用酶催化法，利用*E. coli* BW-pBAD-ectABC表达四氢嘧啶合成基因簇*ectABC*获得具有相应酶活性的全细胞或粗酶液，然后将*L*-天冬氨酸钠经生物转化反应后得四氢嘧啶。该方法中，需要诱导表达并提取酶，操作复杂且成本较高。传统发酵法常采用的是一种“细菌挤奶”的方法，通过循环控制培养环境中盐浓度的增加与降低来分别实现*H. elongata*中四氢嘧啶的合成与分泌。该方法中高盐的发酵废液对生产设备腐蚀严重，对环境压力大[9]。与以上生产方法相比，以大肠杆菌为宿主的微生物发酵法能够以葡萄糖为底物，实现低盐条件下四氢嘧啶的从头合成。此外，通过合理代谢调控与精准发酵条件控制，能够实现四氢嘧啶的高产。因此，以大肠杆菌为宿主的微生物发酵法生产四氢嘧啶具有很好的发展前景。

在极度嗜盐的光营养硫酸杆菌(*Extothiorhodospira* Haloloris)中，科学家首次发现了四氢嘧啶[10]。如今，许多细菌中都已经阐明了四氢嘧啶的天然合成途径[11-13]。作为天冬氨酸的代谢支路途径，四氢嘧啶的合成过程在*ectABC*编码的3种酶的催化作用下完成，见图1。包括3个步骤：1)首先二氨基丁酸氨基转移酶(EctB)催化天冬氨酸半醛，即“天冬氨酸家族”氨基酸生物合成途径的中间体合成*L*-2,4-二氨基丁酸(DA)；2)随后二氨基丁酸乙酰转移酶(EctA)将*L*-2,4-二氨基丁酸乙酰化生成N-乙酰-*L*-2,4-二氨基丁酸（NADA)；3）最后由ectoine合成酶(EctC)催化环化反应形成ectoine[1,14]。

1997年，来自嗜盐马立球菌的四氢嘧啶生物合成途径基因簇(*ectABC*)首次被克隆至*E. coli* XL1-Blue中，使得*E. coli* XL1-Blue能够在含0.86 mol/L的NaCl的MM63培养基中正常生长，并且实现了其对中等盐度的渗透调节作用[2]。近年来，更多不同来源的*ectABC*簇被克隆，包括*Halomonas elongatd*[15]，*Chromohalobacter salexigen*(原名*Halomonas elongata* DSM 3043)[16]，*Halobacillus dabanensis* D-8T[13]和*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z[12]等。作者将来源于伸长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)的基因簇*ectABC*克隆至大肠杆菌中，并进行了表达宿主与表达系统的选择，关键基因*ectA*、*ectB*、*ectC*的RBS序列优化，途径限速酶基因的过表达等工作，提高了四氢嘧啶的产量。

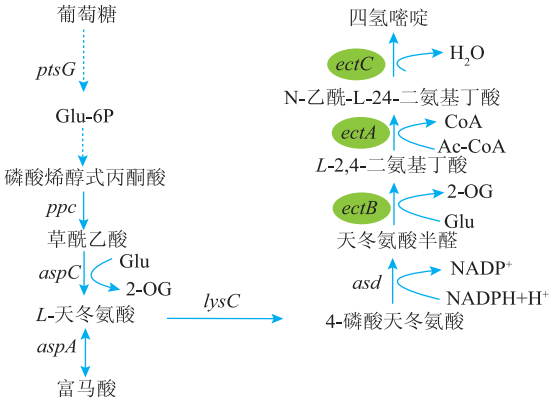



**图 1　重组大肠杆菌合成四氢嘧啶路线示意**

**Fig. 1　Schematic diagram of the engineered ectoine synthesis route in recombinant *E. coli***

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

**1.1.1　菌株与质粒**　大肠杆菌 *E. coli* JM109: 由作者所在实验室提供，用于质粒构建和保存;*E. coli* (asp)：购自上海市工业微生物研究所菌种保藏中心，用于四氢嘧啶工程菌的构建;*H. elongata* ATCC 33173:购自中国海洋微生物菌种保藏管理中心,用于扩增目的基因簇 *ectABC*,主要菌株和质粒见表 1。

**1.1.2　主要培养基**

1)LB 培养基(组分 g/L):酵母粉 5.0,氯化钠 10.0,蛋白胨 10.0;固体培养基需另加 1.5 g/dL 琼脂粉。

2)摇瓶验证培养基(组分 g/L):酵母粉 2.0,磷

**表 1　本研究所用质粒和菌株**

**Table 1　Plasmids and strains used in this study**

| 名称 | 特征 | 来源 |
|---|---|---|
| 质粒 | | |
| pBBR1MCS-2 | Kan$^r$,*E. coli* 表达载体 | 作者所在研究室 |
| pRSFDuet-1 | Kan$^r$,含有双 T7 启动子,*E. coli* BL21(DE3)表达载体 | 作者所在研究室 |
| pCDFDuet-1 | Str$^r$,含有双 T7 启动子,*E. coli* BL21(DE3) 表达载体 | 作者所在研究室 |
| pETDuet-1 | Amp$^r$,含有双 T7 启动子,*E. coli* BL21(DE3)表达载体 | 作者所在研究室 |
| pB-ABC | pBBR1MCS-2 含有基因簇 *ectABC* | 本研究 |
| pR-ABC | pRSFDuet-1 含有基因簇 *ectABC* | 本研究 |
| pC-ABC | pCDFDuet-1 含有基因簇 *ectABC* | 本研究 |
| R-A | pRSFDuet-1 含有基因簇 *RBS-ectABC* | 本研究 |
| R-B | pRSFDuet-1 含有基因簇 *ectA-RBS′-ectBC* | 本研究 |
| R-C | pRSFDuet-1 含有基因簇 *ectAB-RBS′-ectC* | 本研究 |
| R-AB | pRSFDuet-1 含有基因簇 *RBS-ectA-RBS′-ectBC* | 本研究 |
| R-AC | pRSFDuet-1 含有基因簇 *RBS-ectAB-RBS′-ectC* | 本研究 |
| R-BC | pRSFDuet-1 含有基因簇 *ectA-RBS′-ectB-RBS′-ectC* | 本研究 |
| R-ABC | pRSFDuet-1 含有基因簇 *RBS-ectA-RBS′-ectB-RBS′-ectC* | 本研究 |
| R-AB-L | pRSFDuet-1 含有基因簇 *RBS-ectA-RBS′-ectBC-lysC$^{fbr}$* | 本研究 |
| pET-asd | pETDuet-1 含有基因 *asd* | 本研究 |
| pET-p-a | pETDuet-1 含有基因 *ppc* 和 *aspc* | 本研究 |
| pET-aspA | pETDuet-1 含有基因 *aspA* | 本研究 |
| 菌株 | | |
| *E. coli* JM109 | recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi-1 Δ(lac-proAB)/F' [traD36proAB+lacIq *E. coli* lacZΔM15] | 作者所在研究室 |
| *E. coli* W3110 | F$^-$ λ- rph-1 INV(rrnD, rrnE) | 作者所在研究室 |
| *E. coli* BL21(DE3) | *F$^-$ ompT lon hsdS(Rb-MB-)gal dcm*λDE3(*Lac*I *lac*UV 5-T7 gene 1 *ind1 sam7 nin5*) | 作者所在研究室 |
| *E. coli* DH5α | F$^-$λ$^-$ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* ϕ80dlacZΔM15 Δ (*lacZYA*-argF)U169, *hsdR17*($r_K^-m_K^+$) | 作者所在研究室 |
| *E. coli* (asp) | 特定条件下高产天冬氨酸的大肠杆菌 | SIIM |
| *H. elongata* ATCC 33173 | 伸长盐单胞菌,天然生产四氢嘧啶的野生菌 | MCCC |
| EW/pB-ABC | *E. coli* W3110 含有质粒 pBBR1MCS-2-*ectABC* | 本研究 |

续表 1

| 名称 | 特征 | 来源 |
|---|---|---|
| EB/pB-ABC | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 pBBR1MCS-2-*ectABC* | 本研究 |
| ED/pB-ABC | *E. coli* DH5α 含有质粒 pBBR1MCS-2-*ectABC* | 本研究 |
| E(asp)/pB-ABC | *E. coli* (asp)含有质粒 pBBR1MCS-2-*ectABC* | 本研究 |
| E/pR-ABC | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 pRSFDuet-1-*ectABC* | 本研究 |
| E/pC-ABC | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 pCDFDuet-1-*ectABC* | 本研究 |
| ECT-A | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 pR-R-ABC | 本研究 |
| ECT-B | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 pR-A-R′-BC | 本研究 |
| ECT-C | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 pR-AB-R′-C | 本研究 |
| ECT-AB | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 pR-R-A-R′-BC | 本研究 |
| ECT-AC | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 pR-R-AB-R′-C | 本研究 |
| ECT-BC | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 pR-A-R′-B-R′-C | 本研究 |
| ECT-ABC | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 pR-R-A-R′-B-R′-C | 本研究 |
| ECT-AB-L | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 R-AB-L | 本研究 |
| ECT-AB-a | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 R-AB 和 pET-*asd* | 本研究 |
| ECT-AB-L-p-a | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 R-AB-L 和 pET-p-a | 本研究 |
| ECT-AB-L-a | *E. coli* BL21(DE3)含有质粒 R-AB-Lr 和 pET-*aspA* | 本研究 |

酸二氢钾 3.0，十二水磷酸氢二钠 25.0，硫酸铵 16.0，七水硫酸镁 1.0，七水硫酸锰 0.01，葡萄糖 20.0。

**1.1.3** 主要试剂　2×Taq DNA 聚合酶、Primer star DNA 聚合酶和 *Dpn* I 消化酶：购自诺唯赞(南京)生物科技有限公司；质粒小量抽提试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、柱回收试剂盒、卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(Amp)和 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒：购自生工生物工程(大连)；四氢嘧啶标准样品：购自 Sigma-Aldrich 公司(上海)；考马斯亮蓝染色液：购自碧云天生物技术研究所；其他化学试剂：购自国药的分析纯；PCR 引物：由金唯智(苏州)生物科技有限公司合成，详见表 2；ClonExpress 一步法定向克隆试剂盒：购自 Vazyme Biotech(南京)。

表 2　本研究所用 PCR 引物

Table 2　Primers used in this study

| 引物名称 | 引物序列 (5′-3′) |
|---|---|
| ectABC-F1 | GCGGTGGCGGCCGCTCTAGATTACAGCGGCTTCTGGTCGTC |
| ectABC-R1 | TCCTGCAGCCCGGGGGATCCGCTACAGCGAACCACGACAATGAACGCAACCACAGAG |
| pB-F | GGATCCCCCGGGCTGCAGGA |
| pB-R | TCTAGAGCGGCCGCCACCGC |
| pR-F1 | CGGTACCCTCGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAAC |
| pR-R1 | GGCCGGCCGATATCCAATTGAGATCTGCCATATGTATATCTCC |
| pC-F | CGGTACCCTCGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAAC |
| pC-R | GGCCGGCCGATATCCAATTGAGATCTGCCATATGTATATCTCC |
| EctA-F | GTATAAGAAGGAGATATACATAATGAACGCAACCACAGAGCCCTTTACACCC |
| EctA-R | CTCTGTGGTTGCGTTCATTATGTATATCTCCTTCTTATACTTAACTAATATAC |
| EctB-F | CAGATCTGAAAGGAGGAAAATATATGCAGACCCAGATTCTCGAACGCATGG |
| EctB-R | GGTCTGCATATATTTTCCTCCTTTCAGATCTGGTCGGTCTGGAACGGGC |
| EctC-F | AAGGAGGAAAATATCGACATGATCGTTCGCAATCTCG |
| EctC-R | GTCGATATTTTCCTCCTTTCAGCTAAAGGCCTGCTTGGTG |
| lysC-F1 | ACAGCCAGGATCCGAATTCATGGCCCTGGTCGTACAGAAATATGG |
| lysC-R1 | ATTATGCGGCCGCAAGCTTTTAGCGTCCGGTGCCTGCATAAAC |
| pR-F2 | AAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAG |
| pR-R2 | GAATTCGGATCCTGGCTGTGGTGATGAT |
| lysC-F2 | CGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCGACGG |
| lysC-R2 | AACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTG |
| asd-F | GAGATATACCATGGGCAGCAGAAGGAGGAAAATATATGAAAAATGTTGGTTTTATCGGCT |

续表 2

| 引物名称 | 引物序列 (5′–3′) |
|---|---|
| asd–R | GCTCGAATTCGGATCCTGGCTGTGTTACGCCAGTTGACGAAGC |
| pET–F1 | CACAGCCAGGATCCGAATTCGAGC |
| pET–R1 | CTGCTGCCCATGGTATATCTCCTTCTTA |
| ppc–F | ATATACATATGGCAGATCTCATGAACGAACAATATTCCGCATTGCG |
| aspC–R | CAGCCTAGGTTAATTAAGCTGCTTACAGCACTGCCACAATCGC |
| aspA–F | ATACATATGGCAGATCTCAAGGAGGAAAATATATGTCAAACAACATTCGTATCGAAGAAG |
| aspA–R | CAGCCTAGGTTAATTAAGCTTACTGTTCGCTTTCATCAGTATAGCG |
| pET–F2 | GCAGCTTAATTAACCTAGGCTGC |
| pET–R2 | GAGATCTGCCATATGTATATCTCCTTC |

## 1.2 方法

### 1.2.1 培养方法

1)种子培养:挑取 LB 平板上的单菌落接种至装有 30 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中,37 ℃、220 r/min 培养 8~10 h。

2)摇瓶发酵培养:将培养好的种子液以体积分数 2%,接种至装有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中进行培养,同时添加终浓度 0.25 mmol/L 的 IPTG 诱导产四氢嘧啶,发酵温度为 30 ℃,摇床转速为 220 r/min。

**1.2.2 全质粒环化 PCR 方法** 设计引物对 F/R,在上下游引物上引入需要改变的序列,并使 *F* 和 *R* 具有 25~30 bp 互为反向互补序列的同源臂。以质粒为模板,使用引物对 F/R 进行全质粒环化 PCR,得到的产物使用 *Dpn* I 消化,纯化回收后转化大肠杆菌感受态细胞,涂布相应抗性平板,37 ℃恒温培养 12~16 h,挑选阳性转化子进行测序。

**1.2.3 重组质粒的构建** 以 *H. Elongata* ATCC 33173 基因组为模板,使用引物 ectABC–F/e ctABC–R,扩增含有不同载体同源臂序列的基因簇 *ectABC*,获得 *ectABC* 片段;分别以 pBBR1MCS–2、pRSFDuet–1、pCDFDuet–1 质粒为模板,使用引物对 pB–F/pB–R、pR–F1/pR–R1、pC–F/pC–R 扩增获得相应的线性化的载体;使用 *Dpn* I 消化后,利用一步克隆酶将上述获得的 3 种目的基因簇片段 *ectABC* 和 3 种线性化的载体分别进行连接,构建成的重组质粒分别命名为 pB–ABC、pR–ABC、pC–ABC。

分别使用引物对 EctA–F/EctA–R、EctB–F/EctB–R、EctC–F/EctC–R 以重组载体 pR–ABC 为模板进行全质粒环化 PCR,得到的产物使用 *Dpn* I 消化,纯化回收后转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布卡那抗性平板,37 ℃恒温培养 12~16 h,挑选阳性转化子进行测序。测序正确的重组质粒即为单基因 *RBS* 序列替换的重组质粒,分别命名为 R–A、R–B 和 R–C。

分别使用引物对 EctA–F/EctA–R、EctB–F/EctB–R 和 EctC–F/EctC–R,以重组载体 R–B、R–C 和 R–A 为模板进行全质粒环化 PCR,得到的产物使用 *Dpn* I 消化,纯化回收后转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布卡那抗性平板,37 ℃恒温培养 12~16 h,挑选平板上较大的单菌落进行测序。测序正确的重组质粒即为双基因 *RBS* 序列替换的重组质粒,分别命名为 R–AB、R–AC 和 R–BC。

使用引物对 EctA–F/EctA–R 扩增,以重组载体 R–BC 为模板进行全质粒环化 PCR,得到的产物使用 *Dpn* I 酶进行消化,产物纯化回收后转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布卡那抗性平板,37 ℃恒温培养 12~16 h,挑选阳性转化子进行测序。测序正确的重组质粒即为三基因 *RBS* 序列替换后的重组质粒,命名为 R–ABC。

以谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的基因组为模板,使用引物对 lysC–F1/lysC–R1 扩增基因 *lysC*,获得含有定点突变的目的基因片段 $lysC^{(GIA)}$。以质粒 R–AB 为模板,使用引物对 pR–F2/pR–R2 进行 PCR 扩增,获得线性化载体。使用 *Dpn* I 消化后,将线性化载体和目的基因片段利用一步克隆酶进行连接,产物全部转化 *E. coli* JM109。在卡那抗性平板上随机挑取单菌落,使用通用引物进行菌落 PCR 验证。为了构建谷氨酸棒杆菌解除了反馈抑制的天冬氨酸激酶 $LysC^{fbr}$(含有定点突变(C932T))的重组质粒,挑取上述电泳验证正确的转化子进行测序,将测序正确的转化子提取重组质粒,以其为模板,使用引物对 lysC–F2/lysC–R2 进行全质粒环化 PCR。使用 *Dpn* I 消化后将产物转化 *E. coli* BL21(DE3),

在卡那抗性平板上随机挑取单菌落，经液体培养基培养后提取质粒进行测序。

以 *E. coli* BL21(DE3)基因组为模板，分别使用引物对 asd-F/asd-R 和 aspA-F/aspA-R 扩增基因 *asd* 和 *aspA* 的序列；以 pRSFDuet-1-*ppc*-*aspC* 为模板，使用引物对 ppc-F/aspC-R 扩增 *ppc*-*aspC* 组合基因片段；以 pETDuet-1 为模板，分别使用引物对 pET-F1/pET-R1 和 pET-F2/pET-R2 进行 PCR，获得线性化的 pETDuet-1。使用 *Dpn* I 消化后，将 pET-F1/pET-R1 扩增得到的线性化载体与 *asd* 片段和 pET-F2/pET-R2 获得的线性化载体与 *aspA* 片段、*ppc*-*aspC* 组合基因片段分别利用一步克隆酶进行连接，构建成的重组质粒分别命名为 pET-*asd*、pET-*aspA* 和 pET-p-a。

**1.2.4** 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化　参照文献[17]进行。

**1.2.5** 菌体浓度的测定　取 1 mL 发酵培养液，使用去离子水稀释适当倍数(以 $OD_{600}$=0.2~0.8 为准)，使用 722 s 型紫外分光光度计测定其在 600 nm 处的吸光度($OD_{600}$)。

**1.2.6** 葡萄糖质量浓度的测定　取 1 mL 发酵培养液，使用去离子水稀释适当倍数(葡萄糖质量浓度在 0.5~3 g/L)后，13 000 离心 2 min，取上清液用葡萄糖-乳酸生物传感分析仪（深圳西尔曼科技有限公司)测定葡萄糖质量浓度。

**1.2.7** 四氢嘧啶的检测

1) 检测样品的制备：取 1 mL 发酵液进行离心(13 000 r/min 离心 2 min)，将获得的上清液使用超纯水稀释适当倍数，再经 0.22 μm 的水系微孔滤膜过滤后打入液相瓶中，待测。

2) HPLC 检测：使用 Agilent 1260 高效液相色谱仪测定四氢嘧啶。进样量 5 μL，色谱柱为赛默飞 ODS-2 C18(4.6 mm×250 mm)色谱柱，柱温 30 ℃，流动相为体积分数 2%的乙腈，流量 0.6 mL/min，使用紫外检测器(VWD)，检测波长为 210 nm。

## 2 结果与分析

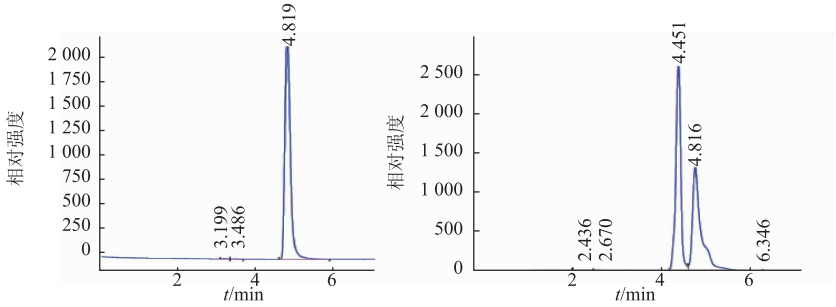
### 2.1 合成四氢嘧啶的大肠杆菌工程菌的构建与验证

将方法 1.2.3 中获得的重组质粒 pB-ABC 分别转化 *E. coli* W3110、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* DH5α 和 *E. coli* (asp) 的感受态细胞；pR-ABC 和 pC-ABC 转化 *E. coli* BL21(DE3)的感受态细胞，获得的工程菌分别命名为 EW/pB-ABC、EB/pB-ABC、ED/pB-A BC、E (asp)/pB-ABC、E/pR-ABC 和 E/pC-ABC。

为了验证大肠杆菌异源表达 *ectABC* 基因簇后能否正常产生四氢嘧啶，将构建成功的四氢嘧啶工程菌进行摇瓶发酵，并对发酵液上清液进行 HPLC 与 LC-MS 分析，见图 2。与四氢嘧啶标准样品的 HPLC 分析图相比，重组菌发酵后的样品在相同的时间(4.82 min)出现了特征峰，说明重组菌可以产生四氢嘧啶。图 3 的 LC-MS 分析图表明，四氢嘧啶标样和重组菌发酵样品在 $[M+H]^+$ *m/z* 为 143.08 处都出现了特征峰，再次证明重组菌可以产生四氢嘧啶。

### 2.2 大肠杆菌工程菌的摇瓶验证

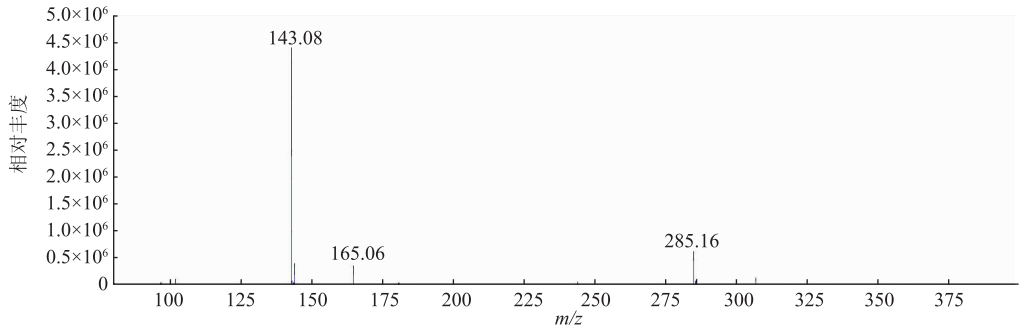
**2.2.1** 不同宿主工程菌的摇瓶验证　验证了大肠杆菌重组菌可以合成四氢嘧啶后，为了获得较好的大肠杆菌表达宿主，初步以 pBBR1 MCS-2 为表达载体，分别以 *E. coli* W3110、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* DH 5α、*E. coli* (asp)4 株不同的大肠杆菌为宿主，成功构建了不同的四氢嘧啶工程菌，分别为 EW/pB-ABC、EB/pB-ABC、ED/pB-ABC、E(asp)/pB-ABC。在摇瓶水平上对四氢嘧啶工程菌进行了验证，



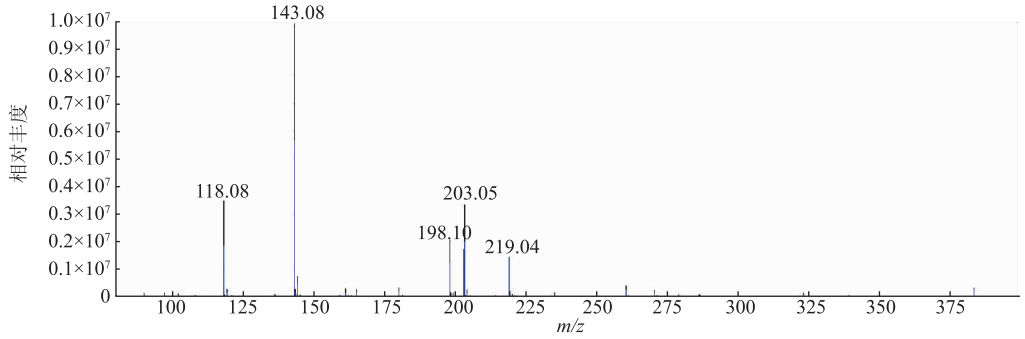

(a) 四氢嘧啶标准样品　(b) 四氢嘧啶工程菌发酵上清液

**图 2　四氢嘧啶标样与重组菌发酵液的 HPLC 分析图**

**Fig. 2　HPLC analysis of authentic ectoine and ectoine accumu- lation in recombinant strains**




(a) 四氢嘧啶标准样品




(b) 四氢嘧啶工程菌发酵上清液

**图 3　四氢嘧啶标样与重组菌发酵液的 LC-MS分析图**

**Fig. 3　LC-MS analysis of authentic ectoine and ectoine accumulation in recombinant strains**

结果见图 4。4 株不同的四氢嘧啶工程菌均能够产生一定量的四氢嘧啶,且最高产量有明显差异。其中,以 *E. coli* BL21(DE3)作为表达宿主的菌株 EB/pB-ABC 的四氢嘧啶最高产量为 185.23 mg/L,而 EW/pB-ABC、ED/pB-ABC、E(asp)/pB-ABC 的四氢嘧啶最高产量均低于 100 mg/L,分别为 92.52、80.36、40.21 mg/L。比较各菌株最高生物量($OD_{600}$)发现,EB/pB-ABC、EW/pB-ABC、ED/pB-ABC、E(asp)/pB-ABC 共 4 株工程菌略有差异,分别为 10.01、9.65、10.21、9.87 等,说明异源基因的表达可能对 4株工程菌的生长影响不大。综上所述,以上 4 株大肠杆菌中最适合进行四氢嘧啶生产的菌株是 *E. coli*BL21(DE3)。

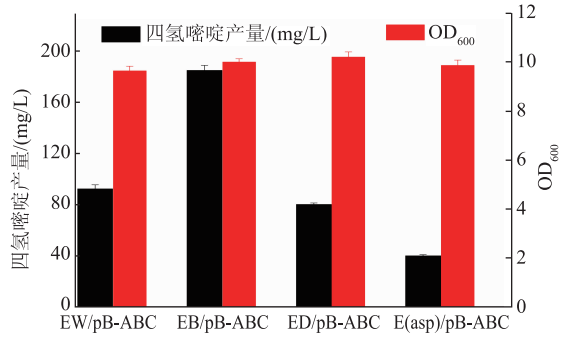



**图 4　表达宿主的比较结果**

**Fig. 4　Comparison result of expressing hosts**

**2.2.2　不同表达载体工程菌的摇瓶验证**　确定了合适的表达宿主后,为了进一步获得更好的 *E. coli* BL21(DE3)表达载体,又选择了两个具有不同拷贝数的表达系统,进行 *ectABC* 基因簇的异源表达。这两个表达系统分别为 pRSFDuet-1 和 pCDFDuet-1,具有相同的 MCS 和双 T7 启动子。新构建的工程菌分别为 E/pR-ABC 和 E/pC-ABC。在 250 mL 摇瓶水平上对 EB/pB-ABC、E/pR-ABC、E/pC-ABC 进行发酵验证。如图 5 所示,3 株工程菌的四氢嘧啶最高产量具有较明显的差异,E/pR-ABC 的最多,产量为 267.3 mg/L;E/pC-ABC 次之,为 139.56 mg/L;EB/pB-ABC 最少,为 110.97 mg/L。由此说明,具有较高拷贝数的 pRSFDuet-1 质粒能够产生较多的四氢嘧啶。比较 3 株菌的最高 $OD_{600}$ 值发现,E/pR-ABC、E/pC-ABC 和 EB/pB-ABC 等 3 株工程菌的差异不明显,最高 $OD_{600}$ 值分别为 10.2、10.0、10.13,说明质粒拷贝数对工程菌生长的影响不大。因此,E/pR-ABC 不仅具有良好的生长状况,而且四氢嘧啶产量比较高,使得其单位菌体产四氢嘧啶量也最多,比较适合进行四氢嘧啶合成途径的后续改造。

## 2.3　RBS 改造菌株的构建

为了探索 E/pR-ABC 中 *ectA*、*ectB*、*ectC* 等 3 个

基因较为平衡的表达水平，按照方法 1.2.3，采用 RBS 序列组合优化的策略，对异源基因 *ectA*、*ectB*、*ectC* 进行改造,优化策略见图 6。所构建的 RBS 改造工程菌分别被命名为:ECT-A、ECT-B、ECT-C、ECT-AB、ECT-AC、ECT-BC 和 ECT-ABC。

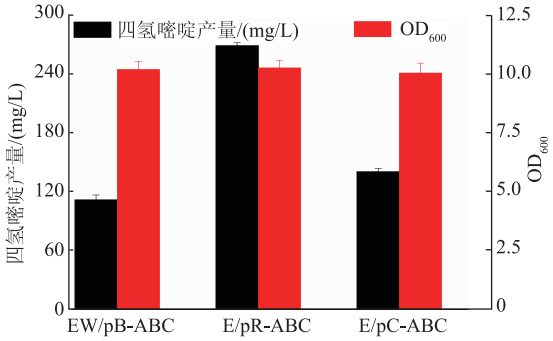
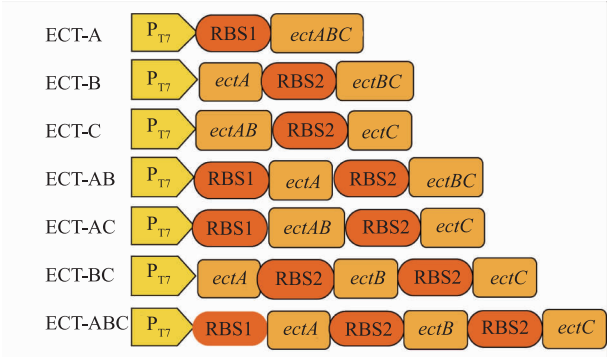



**图 5　表达系统的比较结果**

**Fig. 5　Comparison result of expressing systems**




RBS1:AAG AAGGAGATATA;RBS2:AAGGAGGAAAATAT。

**图 6　RBS 序列优化策略**

**Fig. 6　Optimization strategy of RBS sequence**

**2.3.1**　*单基因 RBS 改造菌株的摇瓶验证*　在摇瓶水平上对单基因进行 RBS 序列改造的菌株 ECT-A、ECT-B 和 ECT-C 进行验证。如图 7(a)所示,菌体 $OD_{600}$ 值随着时间的推移而增加,残糖值随着时间的推移而降低。与对照菌 E/pR-ABC 相比,ECT-A 的 $OD_{600}$ 值略高，耗糖略低;ECT-B 和 ECT-C 的 $OD_{600}$ 值和耗糖都略低。由此说明对 *ectA* 的 RBS 序列改造不会影响菌体生长，而对 *ectB* 和 *ectC* 的 RBS 序列改造会稍微抑制菌体生长。如图 7(b)所示,四氢嘧啶产量差异明显,其中 ECT-A 的产量最高,达到 450.07 mg/L,比对照菌的最高产量(304.24 mg/L)提高 47.9%;而 ECT-B 和 ECT-C 的产量都明显偏低,最高值分别为 161.22 mg/L 和 262.53 mg/L，比对照菌分别降低 47.0%和 13.7%,见图 7(c)。与其他 3 株工程菌相比，菌株 ECT-A 的单位菌体产四氢嘧啶量整体较高，说明菌株 ECT-A 具有较好的生产四氢嘧啶的能力。

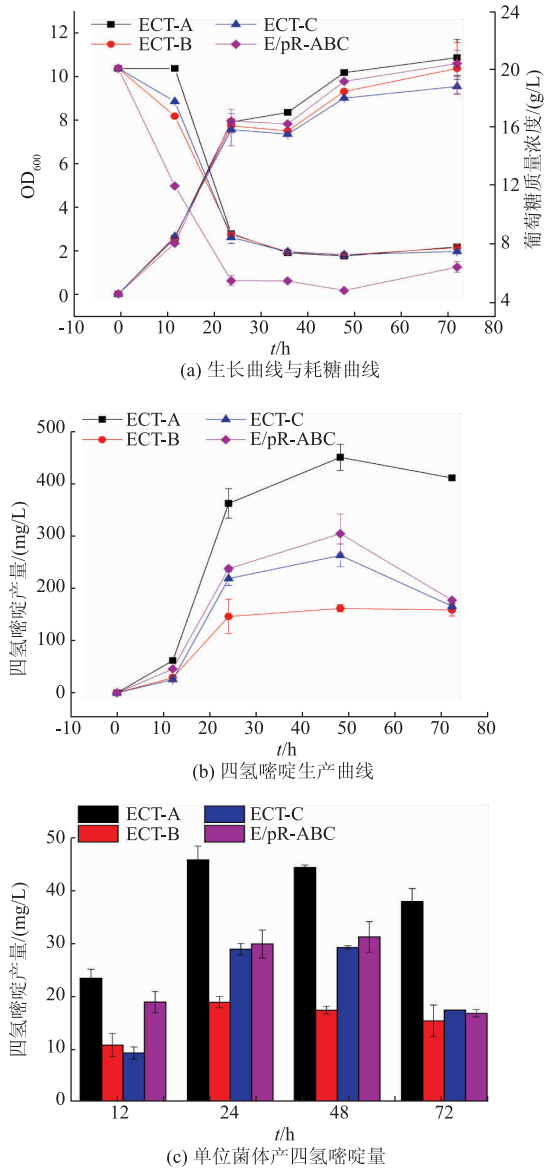
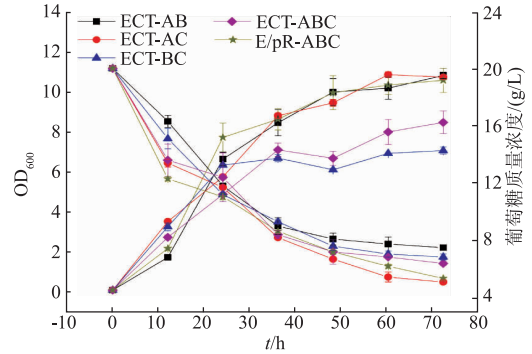



**图 7　单基因 RBS 序列改造对细胞生长代谢的影响**

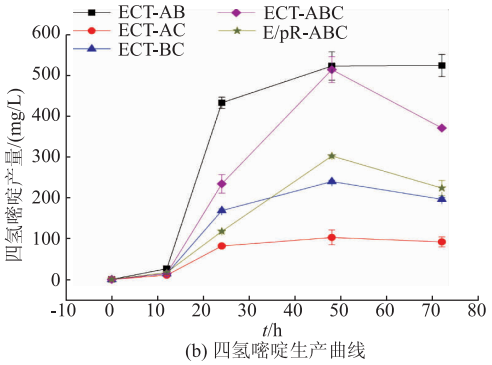
**Fig. 7　Effect of RBS sequence modification of single gene on cell metabolism**

**2.3.2**　*多基因 RBS 改造菌株的构建及摇瓶验证*　在摇瓶水平上对多基因 RBS 序列改造菌 ECT-AB、ECT-AC、ECT-BC 和 ECT-ABC 进行验证，见图 8(a)。菌体 $OD_{600}$ 值随着时间的推移而增加,残糖质量浓度随着时间的推移而降低。与对照菌 E/pR-ABC 相比,ECT-AB 和 ECT-AC 的 $OD_{600}$ 值相差不大,ECT-AB 的耗糖略低，说明相应的 RBS 序列改造对菌体生长影响不大;ECT-BC 和 ECT-ABC 的

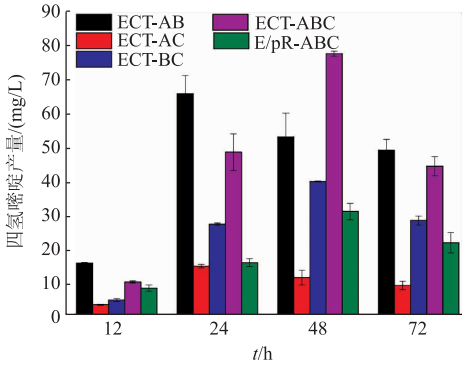
$OD_{600}$ 值略低,耗糖略高,说明相应的 RBS 序列改造对菌体生长产生抑制。如图 8(b)所示,四氢嘧啶产量差异明显,其中 ECT-AB 的最高产量达 562.18 mg/L,比对照菌(301.91 mg/L)提高 86.2%;ECT-ABC 的产量也比对照菌高,最高达到 512.94 mg/L,提高 69.9%;ECT-AC 和 ECT-BC 的产量都较低,最高值分别为 102.57 mg/L 和 239.03 mg/L,比对照菌 E/pR- ABC 的最高产量降低了 66.0%和 20.8%。如图 8(c)所示,菌株 ECT-AB 单位菌体产四氢嘧啶量整体较高,说明菌株 ECT-AB 产四氢嘧啶能力比较稳定。



(a) 生长曲线与耗糖曲线



(b) 四氢嘧啶生产曲线

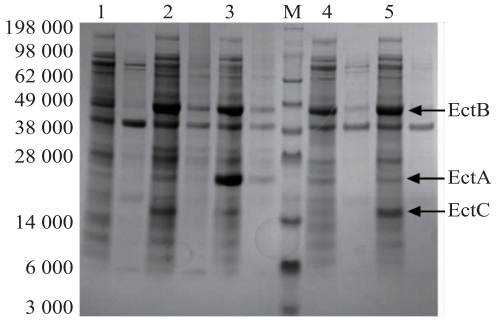


(c) 单位菌体产四氢嘧啶量

**图 8 多基因 RBS 序列改造对细胞生长代谢的影响**

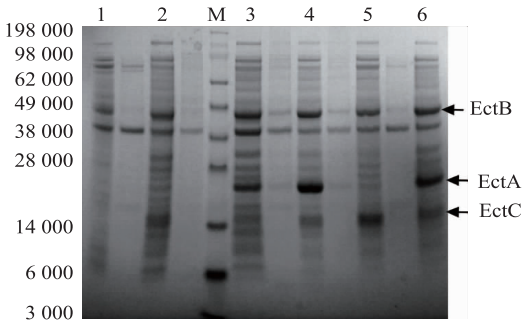
**Fig. 8 Effect of RBS sequence modification of multi gene on cell metabolism**

**2.3.3 RBS 优化菌株的 SDS-PAGE 分析** 如图 9 所示,与对照(空载体)相比,经 IPTG 诱导后重组子 E/pR-ABC、ECT-A、ECT-B、ECT-C、ECT-AB、ECT-AC、ECT-BC 和 ECT-ABC 都有特异性条带(EctA 为 20 670,EctB 为 46 090,EctC 为 14 810),说明都能够正常表达 EctA、EctB 和 EctC。



M: 蛋白质marker; 1: *E. coli* BL21(DE3)/pRSFDuet-1; 2: E/pR-ABC; 3: ECT-A; 4: ECT-B; 5: ECT-C.

(a) 单基因RBS序列改造菌的发酵上清液



M: 蛋白质marker; 1: *E. coli* BL21(DE3)/pRSFDuet-1; 2: E/pR-ABC; 3: ECT-AB; 4: ECT-AC; 5: ECT-BC; 6: ECT-ABC.

(b) 多基因RBS序列改造菌的发酵上清液

**图 9 RBS 序列改造菌的 SDS-PAGE 分析图**

**Fig. 9 SDS-PAGE analysis of ectABC expressed in *E. coli***

与阳性对照菌 E/pR-ABC 相比,ECT-A、ECT-AB、ECT-AC 和 ECT-ABC 发酵液中表达的 EctA 都有明显增加,ECT-AB 和 ECT-ABC 发酵液中表达的 EctB 也明显增加,ECT-AC 和 ECT-ABC 发酵液中表达的 EctC 变化不大。而图 7(b)和图 8(b)的结果表明,ECT-A、ECT-AB 和 ECT-ABC 的四氢嘧啶产量明显提高,且 ECT-AB 比 ECT-A 和 ECT-ABC 产量都更高,而 ECT-AC 的四氢嘧啶产量则略低。由此推测,可能 RBS 改造前菌株的 EctA 和 EctB 的表达量是限制四氢嘧啶生产的因素之一。

与 ECT-AB 相比,ECT-ABC 发酵液中表达的 EctC 略高,但是四氢嘧啶产量略低;同时,与 E/pR -ABC 相比,ECT-C 发酵液中表达的 EctC 略高,但四

氢嘧啶产量降低;由此可以推测,EctC 的本底表达能够满足四氢嘧啶的生产,表达量增加时会增加菌体负担,不会促进四氢嘧啶的生产。

与阳性对照菌 E/pR-ABC 相比,ECT-B 和 ECT-BC 发酵液中表达的 EctB 都没有增加,ECT- BC 发酵液中表达的 EctC 有所增加,而图 7(b)和图 8(b) 表明,ECT-B 和 ECT-BC 的四氢嘧啶产量都有所减少,进一步说明了 EctB 的表达量是限制四氢嘧啶生产的因素之一。与 ECT-AB 相比,ECT-B 发酵液中表达的 EctB 和四氢嘧啶产量都没有增加,由此推测可能是 EctA 的高表达量能够促进四氢嘧啶合成量的增加,而四氢嘧啶合成对 EctB 的需求则能够促进 EctB 的表达。

综上,EctA、EctB 和 EctC 的平衡表达对四氢嘧啶产量的提高具有重要意义。本研究中,ECT- AB 产四氢嘧啶总量最高,单位菌体产四氢嘧啶量也比较高,可用于进一步改造。

### 2.4 四氢嘧啶合成途径强化菌的构建与验证

在以大肠杆菌为宿主的四氢嘧啶工程菌中,葡萄糖作为碳源进行四氢嘧啶合成时需要经历很长的代谢途径,同时需要多种酶的催化。作为氨基酸衍生物,四氢嘧啶的合成是以 *L*-天冬氨酸或 *L*-天冬氨酸 *β*-半醛为底物进行的。为使工程菌产生更多底物,作者对天冬氨酸激酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、天冬氨酸转氨酶和天冬氨酸裂解酶进行了过量表达,构建了不同的强化菌株,并进行了摇瓶水平的验证。

**2.4.1** *L*-天冬氨酸 *β*-半醛途径强化工程菌的构建与验证 将方法 1.2.3 获得的过量表达天冬氨酸激酶和天冬氨酸半醛脱氢酶的重组质粒分别命名为 R-AB -L 和 pET-*asd*,分别转化 *E. coli* JM109。在相应抗性平板上随机挑取单菌落,使用通用引物进行菌落 PCR 验证。挑取电泳验证正确的转化子进行测序,将测序正确的转化子提取重组质粒,R-AB-L 转化 *E. coli* BL21(DE3)的感受态细胞,pET-*asd* 转化重组菌 ECT-AB 的感受态细胞,获得的重组菌分别命名为 ECT- AB-L 和 ECT-AB-a。在摇瓶水平上对重组菌株 ECT-AB-L 和 ECT-AB-a 进行验证,见图 10(a)。菌体 $OD_{600}$ 值随着时间的推移而增加,残糖质量浓度随着时间的推移而降低。与对照菌 ECT-AB 相比,过量表达 *lysC*$^{fbr}$ 和 *asd* 的两株菌 $OD_{600}$ 值整体偏高,最高 $OD_{600}$ 值和耗糖整体相差不大,由此说明基因过表达对菌体生长影响不大。图 10(b)表明,四氢嘧啶产量差异明显,其中 ECT-AB-L 的产量普遍较高,最高达到 551.24 mg/L,比对照菌的最高产量(521.23 mg/L)提高 5.7%;而 ECT-AB-a 的产量明显比对照菌低,最高产量仅为 333.94 mg/L,比对照菌 ECT-AB 的最高产量降低了 35.9%。图 10(c)表明,菌株 ECT-AB-L 单位菌体产四氢嘧啶量比 ECT-AB 略高,适宜进行深入改造。

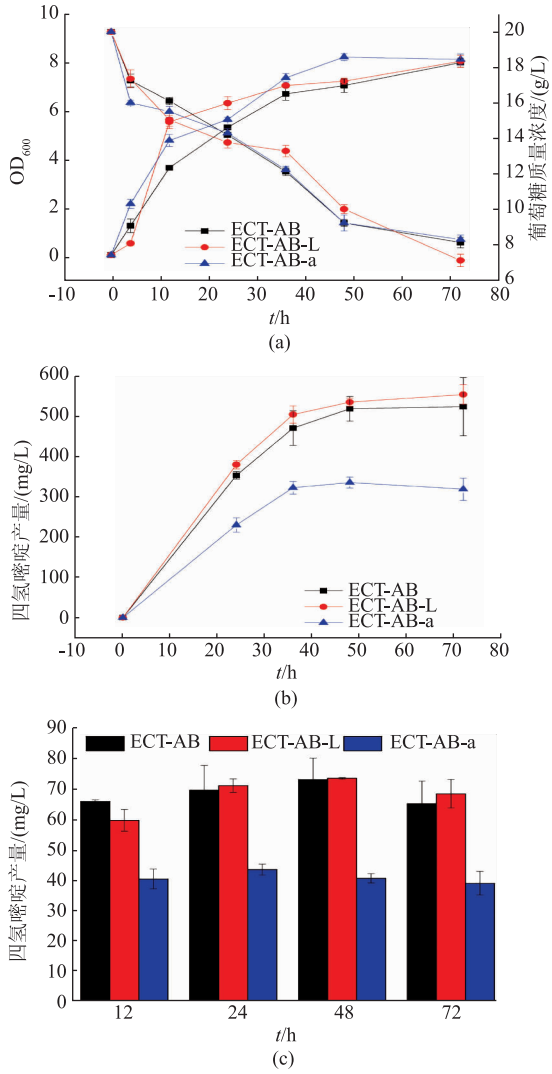



**图 10 过量表达 *lysC*$^{fbr}$ 与 *asd* 对细胞生长代谢的影响**

**Fig. 10 Effect of overexpression of *lysC*$^{fbr}$ and *asd* on cell Metabolism**

**2.4.2** *L*-天冬氨酸途径强化菌株的构建与验证 将方法 1.2.3 获得的过量表达磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、天冬氨酸转氨酶和天冬氨酸裂解酶的重组质粒 pET-p-a 和 pET-*aspA* 分别转化 *E. coli* JM109。在

相应抗性平板上随机挑取单菌落,使用通用引物进行菌落 PCR 验证。挑取电泳验证正确的转化子进行测序,将测序正确的转化子提取重组质粒,分别转化 ECT-AB-L 的感受态细胞,获得重组菌分别命名为 ECT-AB-L-p-a 和 ECT-AB-L-a。在摇瓶水平上对重组菌 ECT-AB-L-p-a 和 ECT-AB-L-a 进行了验证,见图 11(a)。菌体 $OD_{600}$ 值随着时间的推移而增加,残糖质量浓度随着时间的推移而降低。与对照菌 ECT-AB 相比,过量表达 *ppc-aspC* 和 *aspA* 的两株菌 $OD_{600}$ 值相差不大,最高 $OD_{600}$ 值和耗糖整体相差也不大,由此说明基因过表达对菌体生长影响不大;如图 11(b)和 11(c)所示,重组菌 ECT-AB-L-p-a 和 ECT-AB-L-a 产四氢嘧啶产量与单位菌体产量均比 ECT-AB-L 偏低,说明 *ppc*、*aspC* 和 *aspA* 过表达后并不能提高四氢嘧啶产量。

## 3 结 语

为解决四氢嘧啶对高盐环境的依赖问题,作者研究了大肠杆菌中重构四氢嘧啶的合成途径。比较不同的表达宿主后发现, 以 *E. coli* W3110、*E. coli* BL 21(DE3)、*E. coli* DH5α 和 *E. coli*(asp)为宿主时, 四氢嘧啶产量分别为:92.52、185.23、80.36、40.21 mg/L;*E. coli* BL21(DE3)更适合作为四氢嘧啶表达宿主。比较了不同拷贝数的表达系统,结果表明,以 *E. coli* BL21(DE3)为表达宿主,分别以 pBBR1MCS-2、pRSFDuet-1 和 pCDFDuet-1 为表达载体时, 四氢嘧啶产量分别为:110.97、267.25、139.56 mg/L; 高拷贝的 pRSFDuet-1 产四氢嘧啶量最高。确定表达宿主与表达系统后,又通过 RBS 优化策略,对四氢嘧啶合成途径 3 个酶 EctA、EctB 与 EctC 进行了组合优化表达,首次在大肠杆菌中探索了 3 个异源基因的平衡表达;结果表明,对 EctA 单独优化, 对 EctA 和EctB 同时优化和对 EctA、EctB 与 EctC 同时优化均能有效提高四氢嘧啶产量,其中对 EctA 和 EctB 同时优化时四氢嘧啶产量最多,为 521.24 mg/L。为强化前体天冬氨酸或天冬氨酸 β-半醛的供给,过量表达了天冬氨酸激酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、天冬氨酸

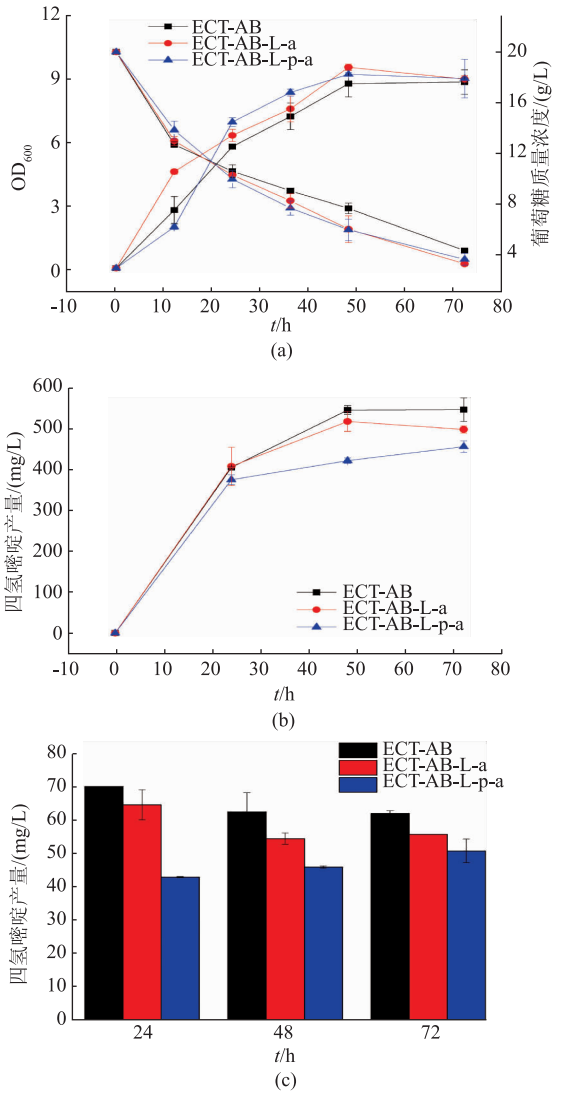



**图 11 过表达 *ppc-aspC* 与 *aspA* 对细胞生长代谢的影响**

**Fig. 11 Effect of overexpression of *ppc-aspC* and *aspA* on cell metabolism**

转氨酶和天冬氨酸裂解酶;结果表明,单独强化天冬氨酸激酶时更有利于四氢嘧啶的合成,达 551.24 mg/L。本研究可为四氢嘧啶在低盐条件下的微生物发酵提供一定的理论依据与技术支持,为实现其工业化还需进行更深入的研究与探索。同时,关于异源基因 *ectA*、*ectB* 和 *ectC* 平衡表达的深入研究以及关于前体强化菌中前体物质含量的改变等研究还需进一步进行。

## 参考文献：

[1] 宁义科. 大肠杆菌发酵生产四氢嘧啶的途径构建及代谢改造[D]. 天津：天津科技大学，2016.

[2] ZHANG B，BAO X，WANG L，et al. Cloning and characterization of the gene cluster for biosynthesis of ectoine from *Nesterenkonia halobia* DSM 20541[J]. **The Journal of Microbiology**，2008，46(3)：309-318.

[3] STILLER L M，GALINSKI E A，WITT EMHJ. Engineering the salt-inducible ectoine promoter region of *Halomonas elongata* for protein expression in a unique stabilizing environment[J]. **Genes**，2018，9(4)：184-191.

[4] 龚皎. 大肠杆菌中四氢嘧啶合成通路的构建与优化[D]. 兰州：兰州大学，2012：1-57.

[5] NAGATA S，WANG C. Efficient utilization of ectoine by halophilic *Brevibacterium* species and *Escherichia coli* subjected to osmotic downshock[J]. **The Society for Biotechnology**，2005，99(1)：61-67.

[6] 张欣. 构建 Ectoine 生物合成基因整合表达工程菌株及其耐盐能力测定[D]. 西宁：青海大学，2018：1-75.

[7] 姚倩倩. 高产四氢嘧啶菌株的分离及其发酵条件研究[D]. 南京：南京农业大学，2016：1-89.

[8] PASTOR J M，SALVADOR M，ARGANDONA M，et al. Ectoines in cell stress protection：uses and biotechnological production [J]. **Biotechnology Advances**，2010，28(6)：782-801.

[9] HE Y Z，GONG J，YU H Y，et al. High production of ectoine from aspartate and glycerol by use of whole-cell biocatalysis in recombinant *Escherichia coli*[J]. **Microbial Cell Factories**，2015，14(1)：1-10.

[10] GALINSKI E A，PFEIFFER H P，TRUPER H G. 1，4，5，6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid：a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*[J]. **FEBS Journal**，1985，149(1)：135-139.

[11] PETERS P，GALINSKI E A，TRUPER H G. The biosynthesis of ectoine[J]. **FEMS Microbiology Letters**，1990，71(1-2)：157-162.

[12] RESHETNIKOV A S，KHMELENINA V N，TROTSENKO Y A. Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph "*Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z"[J]. **Archives of Microbiology**，2006，184(5)：286-297.

[13] ZHAO B，LU W，YANG L，et al. Cloning and characterization of the genes for biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T[J]. **Current Microbiology**，2006，53(3)：183-188.

[14] GOLLER K，OFER A，GALINSKI E A.Construction and characterization of a NaCl- sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis[J]. **FEMS Microbiology Letters**，1998，161(2)：293-300.

[15] CANOVAS D，VARGAS C，ISABEI M，et al. Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043[J]. **Systematic and Applied Microbiology**，1998，21(4)：487-497.

[16] KUHLMANN A U，BREMER E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and *Related Bacillus* spp[J]. **Applied and Environmental Microbiology**，2002，68(2)：772-783.

[17]王宁宁，刘瑞，陈福生，等. 分泌表达苹果酸乳酸酶的大肠杆菌系统的构建[J]. 食品与生物技术学报，2016，35(5)：498-503.