DOI:10.12441/spyswjs.20220910002 [文章编号] 1673-1689(2024)08-0058-10

提高大肠杆菌脂多糖产量的类脂 A 合成途径优化

董笑飞[1,3] 王小元[1,2,3*]

(1. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品安全国际联合实验室,江苏 无锡 214122; 3. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)是大肠杆菌细胞外膜的主要成分,因其具有免疫原性,在医学上具有广泛的应用前景。脂多糖分子通常由类脂 A、核心糖及 O 抗原三部分组成。分别敲除大肠杆菌 MG1655 中的 *rapZ*、*fabF* 和 *ptsO* 基因,大肠杆菌中脂多糖产量分别提高了 25.0%、27.6% 和 14.6%。通过联合敲除 3 个基因并构建菌株 MWD001,脂多糖产量提高了 30.6%,每克 MWD001 干细胞(dry cell weight,DCW)中脂多糖合成质量也从出发菌株 MG1655 的 7.73 mg 提升至 10.10 mg。最后在 MWD001 基因组中类脂 A 合成关键基因簇 *lpxD-fabZ-lpxA-lpxB* 前插入阿拉伯糖诱导的启动子 P_{BAD},脂多糖产量进一步提升至 12.24 mg。以上结果表明,在大肠杆菌中敲除 *rapZ*、*fabF* 和 *ptsO* 基因,并过表达 *lpxD-fabZ-lpxA-lpxB* 基因簇,能够显著提高脂多糖的产量。

关键词:大肠杆菌;脂多糖;类脂 A;*rapZ*;*fabF*;*ptsO*

Optimizing Synthetic Pathways of Lipid A to Improve Lipopolysaccharide Production in *Escherichia coli*

DONG Xiaofei[1,3] *WANG Xiaoyuan*[1,2,3*]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Lipopolysaccharide (LPS), a major component in the outer membrane of *Escherichia coli,* possesses immunogenic properties and holds significant potential for medical applications. The LPS molecule typically consists of three parts: lipid A, a core oligosaccharide and O-antigen. Individual deletion of *rapZ*、*fabF* or *ptsO* gene in *E. coli* MG1655 increased LPS production by 25.0%, 27.6% or 14.6%, respectively. MWD001 was constructed by simultaneously deleting all the three genes in MG1655, and a 30.6% increase in LPS production was achieved, with LPS yield per gram of dry cell weight (DCW) rising from 7.73 mg in the parental strain MG1655 to 10.10 mg in MWD001. Finally, an arabinose-induced promoter P_{BAD} was inserted upstream of the key gene cluster *lpxD-fabZ-lpxA-lpxB* in MWD001 genome, further increasing LPS production to 12.24 mg. These findings demonstrate that deletion of *rapZ*、*fabF* and *ptsO* genes, combined with overexpressing of the gene cluster *lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*, significantly improves LPS production in *E. coli.*

Keywords: *Escherichia coli*; lipopolysaccharide; lipid A; *rapZ*; *fabF*; *ptsO*

脂多糖是革兰氏阴性菌细胞外膜的主要成分,其典型结构由内到外依次为:类脂 A、核心糖和 O 抗原。LPS 是高效的 Toll 样受体(TLR)激动剂,皮克级剂量即可引起免疫反应[1]。LPS 及其衍

基金项目:国家“十三五”重点研发计划项目(2017YFC1600102)。

通信作者:王小元(1965—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物细胞膜和细胞壁关键分子组成、结构及功能研究。E-mail:xwang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2022-09-10 **修回日期:**2022-09-24

生物被广泛应用于免疫学、细菌学和药剂学等领域[2-4]。在市售的伤寒疫苗、甲肝疫苗、HPV疫苗、新型乙肝疫苗及新型冠状病毒疫苗中都充当了疫苗佐剂[5-9]。

LPS在生产、修饰、运输和定位的整个过程中，需要200多个基因的参与。大肠杆菌的LPS合成遵循“Raetz途径”[10]，且遵循严格的顺序。整个途径由β-十四酰基ACP（3-OH-C_{14}-ACP）和鸟苷二磷酸-N-乙酰氨基葡萄糖（UDP-GlcNAc）起始，经过胞内9个酶的催化，在细胞质中合成Kdo_2-lipid A，相关途径见图1。随后，若干内核心糖连接在Kdo糖上，形成类脂A-核心糖。类脂A-核心糖经过MsbA蛋白质翻转至细胞内膜外侧上，在周质空间里，经WbbL连接酶与O抗链多聚体结合，最终形成完整的LPS。在MG1655菌株中，由于基因组上*wbbL*基因被转座子插入失活，无法将O抗原连接在核心糖上[11]。

大肠杆菌MG1655是常用的革兰氏阴性菌，其遗传背景清晰，基因编辑手段成熟，生长迅速。此外，它所产生的LPS结构清晰，可以作为试验用生产LPS的菌株。

*rapZ*基因位于基因簇*ptsN-rapZ-ptsO*中，但不在磷酸烯醇丙酮酸依赖的磷酸转移酶系统（phosphotransferase system，PTS）中承担功能[12]。RapZ蛋白质调控重要的生物膜合成起始底物葡糖胺-6-磷酸（GlcN6P）。当敲除*rapZ*基因后，胞内GlcN6P的负控调节被打破，*glmS*转录表达水平显著提高[13]，产生更多的LPS合成底物UDP-GlcNAc，这种特性或许有利于LPS的产生。有研究显示，JS09噬菌体对*rapZ*无义突变株的感染性降低，当该噬菌体经过LPS提前孵育后，对野生型菌株的感染性也显著降低，可能正是由于突变株的*rapZ*基因突变引起了LPS产量的增加[14]。

*ptsO*基因同样位于基因簇*ptsN-rapZ-ptsO*中，其参与PTS系统，编码非必需成分NPr[12]。去磷酸化的NPr通过与LpxD蛋白质相互作用，抑制LpxD活性，可以降低LPS的生成[15]。当敲除*ptsO*基因后，LpxD蛋白质的活性显著提高，进而提高了LPS产量。*fabF*基因是编码β-酮酰基-ACPII型合成酶的基因，与*fabB*基因的结构和功能类似[16]，共同负责脂肪酸碳链FA（16∶1）到FA（18∶1）的延长[17]，且两者与不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸（unsaturated fatty acid/saturated fatty acid，UFA/SFA）值有密切联系。在*fabF*缺陷株中，细胞膜上的UFA/SFA值增加，则类脂A层变厚[18]。另有研究表明，过表达*fabB*，UFA/SFA值显著升高[19]。尽管Ray等[20]认为LpxK催化活性与磷脂中所有脂肪酸含量都有关，但Emiola等[21]根据体外试验发现UFA对LpxK有催化作用，而SFA则相反。因此敲除*fabF*后，UFA/SFA值增加，促进LpxK活性，进而提高LPS合成效率。

作者利用CRISPR-Cas9基因编辑技术，在MG1655中敲除上述可能影响LPS产量的*ptsO*、*fabF*、*rapZ*基因，又将来源于pBAD33[22]的阿拉伯糖诱导启动子P_{BAD}插入关键的*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*基因簇前，通过调整该基因簇的表达量，构建一株利于产生LPS的大肠杆菌。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及试剂

出发菌株、质粒及构建所得的菌株和质粒见表1。

蛋白胨、酵母粉：英国OXOID公司；氯化钠、盐酸、硫酸、苯酚、甘油：国药集团化学试剂有限公司；透析袋、透析夹：生工生物工程（上海）股份有限公司；DNase I、RNase A、蛋白酶K、各类抗生素：北京索莱宝科技有限公司；2×*Pfx* DNA聚合酶：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；质粒提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒：北京天根生物科技有限公司；Simply P总RNA提取试剂盒：Bioflux公司。

LB基础培养基：蛋白胨10 g，氯化钠10 g，酵母提取物5 g，蒸馏水1 L。所有菌体生长环境温度均为37 ℃，培养基质为LB基本培养基，用于筛选的固体培养基另添加20 g琼脂。各抗生素质量浓度分别为：卡那霉素50 mg/L、壮观霉素50 mg/L、氨苄青霉素100 mg/L。CRISPR-Cas9系统中，用于诱导Cas9的*L*-阿拉伯糖浓度为30 mmol/L，异丙基硫代半乳糖苷IPTG浓度为0.5 mmol/L。

1.2 基因编辑技术

采用CRISPR-Cas9基因编辑技术，敲除和插入MG1655菌株上的染色体基因，所用引物见表2。基因组提取和质粒提取采用对应试剂盒说明书所

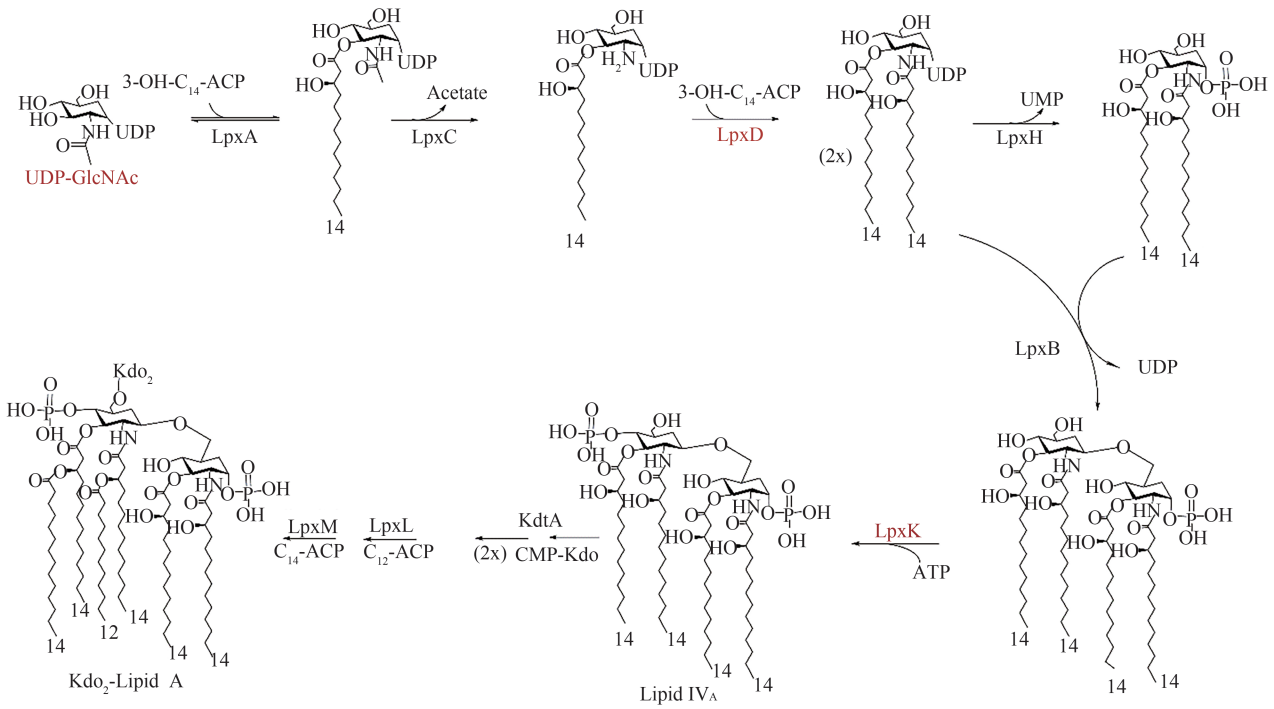


图 1　Kdo_2-lipid A 合成途径

Fig. 1　Biosynthesis pathway of Kdo_2-lipid A

表 1　菌株和质粒

Table 1　Strains and plasmids

菌株及质粒	名称	描述	来源
菌株	JM109	Wild-type *E. coli*	NEB
	MG1655	Wild-type *E. coli*	NEB
	MG1655Δ*fabF*	Derived from MG1655 by deleting *fabF* gene	本研究
	MG1655Δ*ptsO*	Derived from MG1655 by deleting *ptsO* gene	本研究
	MG1655Δ*rapZ*	Derived from MG1655 by deleting *rapZ* gene	本研究
	MWD001	Derived from MG1655 by deleting *fabF*、*ptsO* and *rapZ* genes	本研究
	MWD002	Derived from MWD001 by inserting P_{BAD} between *bamA* gene and *skp* gene	本研究
质粒	pTargetF	pMB1 aadA sgRNA	[23]
	pCas	Ori R6K, FRT Kan^R FRT, Amp^R	[23]
	pBAD33	Ori p15A, Cm^R, Amp^R	[24]
	pTargetF-*fabF*	pMB1 aadA sgRNA-*fabF*	本研究
	pTargetF-*ptsO*	pMB1 aadA sgRNA-*ptsO*	本研究
	pTargetF-*rapZ*	pMB1 aadA sgRNA-*rapZ*	本研究
	pTargetF-P_{BAD}	pMB1 aadA sgRNA	本研究

述方法：基因组片段以 MG1655 基因组为模板，来源于质粒的片段以对应的质粒为模板，加入对应引物，使用 2×*Pfx* DNA 聚合酶并经过 PCR 扩增获得。经过核酸凝胶电泳确认条带正确后，使用胶回收试剂盒进行片段的回收与纯化。

以 MG1655Δ*fabF* 菌株的构建为例简述本研究中基因敲除操作。使用网站 http://chopchop.cbu.uib.no/预测可供 pTargetF-*fabF* 识别的 NGG 序列，该序列应在 *fabF* 基因序列的中间位置。在引物 5′端引入 *fabF* 序列中 NGG 前 20 bp 的序列，设计引物对 sg-*fabF*-F/sg-*fabF*-R，以 pTargetF 为模板，通过 PCR 获得 pTargetF-*fabF* 线性质粒。将其导入 JM109 化学感受态中，涂布在壮观霉素选择培养平板上并过夜培养，挑选转化子。以 N20-

表2 质粒构建及菌株构建所用引物

Table 2 Primers used for the construction of plasmids and strains

引物	序列（5′–3′）
ptsO-U-F	ACGGTCGCCATTGGTTGTAC
ptsO-U-R	TGCCCAGCTTGTTTGTGATTT
ptsO-D-F	AAATCACAAACAAGCTGGGCACGCTGCTGATGTTGGATT
ptsO-D-R	GAGTTTGAAGGGAGTTGTATGTC
sg-*ptsO*-F	ACGTAATGACGAAGGCACCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
sg-*ptsO*-R	CGGTGCCTTCGTCATTACGTACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC
N20-*ptsO*-F	ACGTAATGACGAAGGCACCG
N20-R	GGTCACCGTAACCAGCAAATC
fabF-U-F	GTGTCTAAGCGTCGTGTAGTTGTG
fabF-U-R	CGCTCTTTATCCCACGGGCAATGCGGGTTGCGTTCTC
fabF-D-F	GCCCGTGGGATAAAGAGCG
fabF-D-R	TACCAAAGCCGACGAGTTCA
sg-*fabF*-F	GTCAACGATTGTGAACATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
sg-*fabF*-R	CCATGTTCACAATCGTTGACACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC
N20-*fabF*-F	GTCAACGATTGTGAACATGG
rapZ-U-F	ATGAAGCGTAGTTATTCGGTAATGT
rapZ-U-R	TGGCGACCGGAGAAAGCGTCAGGCAGGTT
rapZ-D-F	ACGCTTTCTCCGGTCGCCATTGGTTGTAC
rapZ-D-R	CATGCCCAGCTTGTTTGTGAT
sg-*rapZ*-F	AATTGTGTACTTCTGTGTGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
sg-*rapZ*-R	CCACACAGAAGTACACAATTACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC
N20-*rapZ*-F	AATTGTGTACTTCTGTGTGG
bamA-U-F	TGCCAGCATTACTTTCTCCG
bamA-U-R	CCGGACGCATCTTACCAGGTTTTACCGATGTTAAACTGGA
P_{BAD}-M-F	AAACCTGGTAAGATGCGTCCGGCGTAGAG
P_{BAD}-M-R	CTTACCATCCCATCGGGTATGGAGAAACAGTAGAGAGTTG
skp-D-F	TTCTCCATACCCGATGGGATGGTAAGGAGTTTATTGTGAAAAAG
skp-D-R	CCTGTTTCAGTACGTCGGCAGT
T-P_{BAD}-F	TGTAAATCGGATGATGCTGTAGG
T-P_{BAD}-R	AGTACGTCGGCAGTGATGTCTT
sg-P_{BAD}-F	TTCTCCACAAAGGAATGTAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
sg-P_{BAD}-R	CTACATTCCTTTGTGGAGAAACTAGTATTATACCTAGGACTGAGC
N20-P_{BAD}-F	TTCTCCACAAAGGAATGTAG

fabF-F/N20-R为引物，挑取单菌落为模板，进行菌落PCR验证。将筛选得到的正确转化子接到含壮观霉素的液体培养基中，提取质粒pTargetF-*fabF*。以MG1655为模板，使用引物对*fabF*-U-F/*fabF*-U-R扩增出上游片段，*fabF*-D-F/*fabF*-D-R扩增出下游片段，通过引物上的反向互补片段，利用融合PCR重叠上下游片段，得到敲除片段*fabF*-UD。将200 ng敲除质粒与300 ng敲除片段一同电击转入MG1655/pCas电转感受态中，在30 ℃下于壮观霉素和卡那霉素双抗平板上培养20 h。用引物对*fabF*-U-F/ *fabF*-D-R进行验证，以MG1655为阴性对照，得到正确敲除后的转化子。此后，添加IPTG去除pTargetF-*fabF*，42 ℃下转接两代去除pCas。验证引物对分别为N20-*fabF*-F/N20-R和pCas-F/pCas-R，最终得到不含其他质粒的、敲除成功的MG1655Δ*fabF*。

构建MG1655Δ*ptsO*：使用引物对sg-*ptsO*-F/sg-*ptsO*-R构建pTargetF-*ptsO*质粒，并用N20-*ptsO*-F/N20-R验证质粒。上游片段使用*ptsO*-U-F/ *ptsO*-U-R扩增，下游片段用*ptsO*-D-F/*ptsO*-D-R扩增，在重叠上下游时，选用引物*ptsO*-U-F/*ptsO*-D-R，得到敲除片段*ptsO*-UD。

构建MG1655Δ*rapZ*：使用引物对sg-*rapZ*-F/sg-*rapZ*-R构建pTargetF-*rapZ*质粒，并用N20-*rapZ*-F/N20-R验证质粒。上游片段使用*rapZ*-U-F/*rapZ*-U-R扩增，下游片段用*rapZ*-D-F/*rapZ*-D-R扩增，在重叠上下游时，选用引物*rapZ*-U-F/*rapZ*-D-R，得到敲除片段*rapZ*-UD。

构建MWD001：联合敲除*fabF*、*ptsO*、*rapZ*基因。

构建MWD002：使用引物对sg-P_{BAD}-F/sg-P_{BAD}-R构建pTargetF-P_{BAD}质粒，并用N20-P_{BAD}-F/N20-R验证质粒。上游片段以*bamA*-U-F/*bamA*-U-R为引物对，以MG1655基因组为模板扩增；中游片段以P_{BAD}-M-F/P_{BAD}-M-R为引物对，以质粒pBAD33为模板扩增；下游片段以*rapZ*-D-F/*rapZ*-D-R为引物对，以MG1655基因组为模板扩增。在重叠上中下游时，以*bamA*-U-F/*skp*-D-R为引物对，以相同物质的量的上中下游混合片段作为模板，得到敲除片段P_{BAD}-UMD。各转化子经过菌落PCR验证及基因组测序，显示构建成功。菌株构建流程及质粒图见图2。

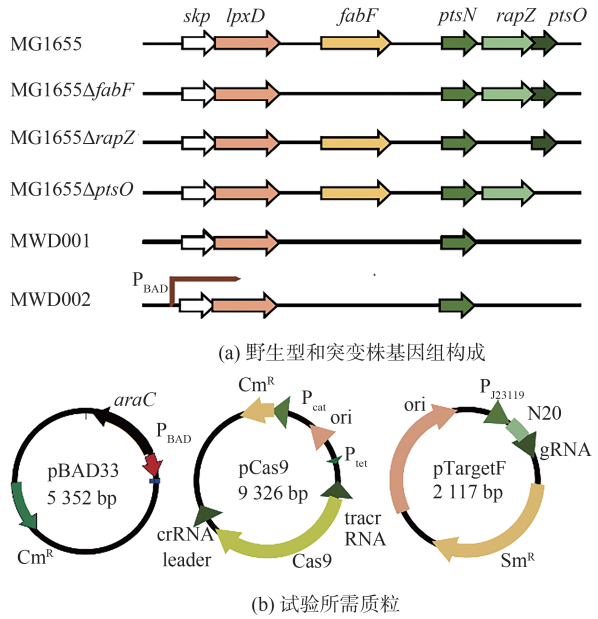


图 2 菌株构建流程及质粒图

Fig. 2 Construction process of strains and the map of plasmids

1.3 热酚法提取 LPS

采用 Leive[25] 改进的热酚水法提取野生型 MG1655 及各突变株的 LPS。活化后的种子置于试管中培养过夜，以 OD_{600} 为 0.020 时的菌体浓度转接到装有 LB 培养基的三角瓶中，于 37 ℃、200 r/min 条件下培养 16 h，测定菌体浓度。Wu 等[26] 研究发现，每升菌液中含 1 g 干物质时 OD_{600} 值为 0.323，根据各样品 OD_{600} 值统一控制干物质的质量为 258.4 g，提取菌液中的 LPS。将菌液离心并弃除上清液，用 15 mL 双蒸水重悬菌团，与 15 mL 体积分数 90% 的热苯酚混合后，置于 68 ℃水浴中，以 150 r/min 振荡混合 1 h 以促进细胞裂解释放 LPS。随后离心 20 min 进行分相，由于糖链的亲水性，LPS 将会分布在上部的水相中。静置 6 h 后，将 5 mL 澄清上相转移至透析袋中，在去离子水中透析 24 h，将透析袋中所有液体分别收集并冷冻干燥。

得到的洁白蓬松状 LPS 重新溶解在 1 mL 去离子水中，用于半定量和定量测定 LPS 质量浓度，制作标准曲线的样品还需要进一步纯化。

1.4 酶解法纯化 LPS

热酚法提取的 LPS 还含有部分核酸、蛋白质、磷脂等杂质，必须经过纯化后才能测定其质量。按作者所在实验室方法[27]，称取 LPS 粗样并重悬到 Tris-HCl 缓冲液中；以 1 mg LPS 粗样加入 1 μg 酶的比例，依次经过 Dnase I、RNase A 和蛋白酶 K 3 种酶解反应，反应条件均为 37 ℃下反应 2 h；加入 5 mL 水饱和酚终止反应，沉淀所有蛋白质；将所得浊液离心取上相后，透析 24 h 并冷冻干燥；之后进行除磷脂操作，将干燥的蓬松固体复溶于氯仿与甲醇体积比为 2∶1 的混合液中，洗涤 2 次；最后将沉淀复溶于去离子水中，再次冷冻干燥，得到 LPS 纯品。

水饱和酚的配制：向 300 g 苯酚中加入 80 mL 去离子水，水浴加热搅拌至溶解，随后转移至装有 200 mL 去离子水的 1 L 分液漏斗中，轻轻振荡混合成乳浊液；静置 6 h 分层，下层无色透明液体即为水饱和酚，将其置于棕色试剂瓶中保存。

1.5 LPS 半定量检测

采用 SDS-PAGE 及银染显色法进行 LPS 的半定量检测。将淡黄色的均质 LPS 溶液与 5×SDS 上样缓冲液以体积比 4∶1 混合，于 100 ℃下煮沸 10 min 去除空间结构。根据商用凝胶试剂盒说明书制作凝胶，LPS 溶液冷却后每孔上样体积为 5 μL。样品在上层 5 g/dL 的浓缩胶中时恒定电流为 12 mA，到下层 12 g/dL 的分离胶时切换至 25 mA。

按照作者所在实验室方法对凝胶进行银染[28]。根据银染后 LPS 特征条带的显色深浅及面积大小半定量确定试验组与对照组的 LPS 质量浓度。

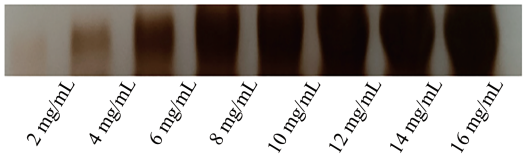
1.6 LPS 定量检测

采用半胱氨酸-硫酸显色法对组成和结构相同的 LPS 进行定量测定。LPS 中的庚糖基团与硫酸煮沸后会形成不稳定的一级有色物质，24~48 h 后转变为稳定的二级有色物质，在 505 nm 和 545 nm 处有特异性吸收峰[29]。有研究表明加入半胱氨酸会显著提高生成稳定二级产物的速率[30]。参考 Emiola 等[21] 的方法并稍加修改，将 50 μL 的 LPS 水溶液样品与 450 μL 体积分数 84% 硫酸剧烈振荡混合，随后加入 5 μL 新配制的质量分数 6% 的半胱氨酸盐酸盐水溶液，于沸水中严格煮沸 20 min。室温下缓慢降温并转移 100 μL 混合物至 96 孔板中，1 h 后使用酶标仪测定波长在 505 nm 和 545 nm 处的吸光度，并计算差值（A_{505}-A_{545}）。

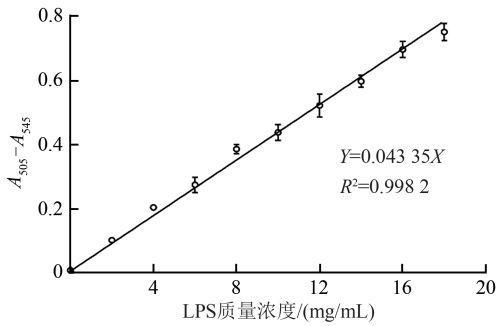
另外，测量不同质量浓度纯化后的 LPS 溶液的吸光度差值，以 LPS 质量浓度为横坐标，吸光度

差值为纵坐标绘制标准曲线，以上试验均重复3次。

纯化后的LPS以质量浓度2 mg/mL为梯度配制水溶液，银染结果见图3(a)，半胱氨酸-硫酸法测定结果见图3(b)。图3(b)所得回归方程为Y=0.043 35X，R^2=0.998 2，可信度高。说明在测定质量浓度范围内，吸光度差值与LPS质量浓度呈现较好的线性关系。



(a) 不同质量浓度LPS的银染图



Y—吸光度差值；X—LPS质量浓度。

(b) 采用半胱氨酸-硫酸法测定的吸光度与LPS质量浓度的关系

图3　使用银染半定量与半胱氨酸-硫酸法定量检测LPS质量浓度

Fig. 3　Detection of LPS mass concentration by semi-quantitative sliver-staining and quantitative measurement *via* the cysteine-sulfuric acid method

1.7　实时定量荧光PCR分析

相关基因的转录水平通过stepone plus实时定量荧光仪检测，所用引物见表3。RNA提取、cDNA反转录、RT-PCR上机操作等根据各自试剂盒说明书进行。

2　结果与讨论

2.1　敲除*ptsO*、*rapZ*、*fabF*对LPS产量的影响

LPS属于生长偶联型产物，各敲除突变株在LB基础培养基中的生长曲线及LPS产量测定结果见图4。

各菌株在LB基础培养基中到达平台期的生长速度和最终的菌体浓度均未出现显著变化，见图4(a)。这可能是由于敲除的3个基因中，*ptsO*编码的NPr在PTS系统中的作用可被多个同源物替代[12]；*fabF*产物在脂肪酸合成途径中可被同工酶FabB替代[16]；而敲除*rapZ*则增加了胞内GlcN6P的浓度，GlcN6P作为细胞中合成多种重要物质所需的底物，其合成增加有利于菌体生长。

表3　RT-PCR所用引物

Table 3　Primers used for RT-PCR in this study

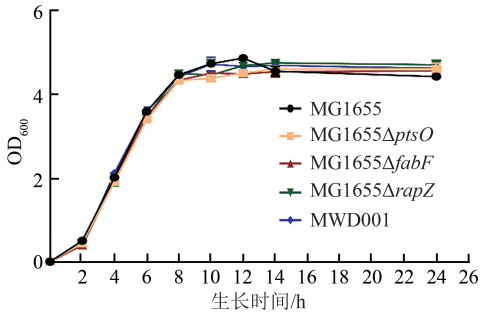
名称	序列(5′-3′)
Q-*lpxA*-F	ACATTGCGCACGATTGTACG
Q-*lpxA*-R	CAGAACTGATGGACTGCGGT
Q-*lpxC*-F	AAGTCACCCTGACGTTACGC
Q-*lpxC*-R	GCTCGTTGACCAGACACGTA
Q-*lpxD*-F	GGCAGCCTGAAAATTGGTCG
Q-*lpxD*-R	ATGCCCGTAACCGTCACTTT
Q-*lpxK*-F	CGGGGATATGGTGGTAAGGC
Q-*lpxK*-R	GCATCAGAACGAACGGGAGA
Q-*msbA*-F	TTTTGATTGTGCTGGCACCG
Q-*msbA*-R	TTCTTTGTGGCCCTTCAGCA
Q-*glmS*-F	CAACAGCACAGTTAACTGAGTGG
Q-*glmS*-R	GTTACCTTGGTTCACTGGCAATC
Q-*fabZ*-F	TCCCGTTCTTACTGGTGGAT
Q-*fabZ*-R	TGCTTCCAGAATCAGCACAC
16S RNA-F	AATGGCGCATACAAAGAGAAGC
16S RNA-R	GTTGCAGACTCCAATCCGGA

各突变株银染显色明显比相同条件下MG1655提取的LPS显色更深，条带更宽，见图4(b)。半胱氨酸-硫酸法的定量结果见图4(c)。与MG1655的产量(7.73 mg)相比，MG1655Δ*ptsO*、MG1655Δ*rapZ*、MG1655Δ*fabF*、MWD001的LPS产量分别达到了8.86、9.66、9.86、10.10 mg，分别提高了14.6%、25.0%、27.6%、30.6%。

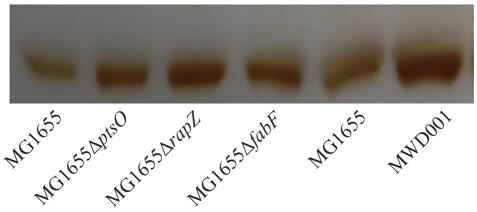
结果表明，分别单独敲除*ptsO*、*rapZ*、*fabF*基因均可提升LPS产量。然而，在联合敲除这些基因后，各菌株的LPS产量提升并不显著。这可能是由于在LPS合成的整个途径中，仍有一些基因起到限速作用，导致MWD001菌株的LPS产量较各个单基因敲除菌株并没有大幅度提升。

2.2　过表达*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*基因簇对LPS产量的影响

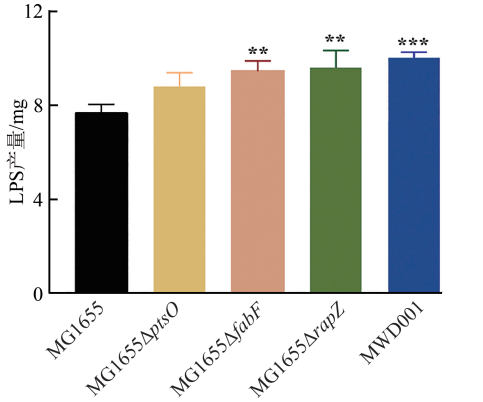
为了进一步提高LPS产量，在MWD001染色体基因簇*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*之前插入转录强度随阿拉伯糖添加量增加而增加的启动子P_{BAD}，结果见图5。根据预试验结果，选择阿拉伯糖添加终



(a) 各突变株菌体浓度OD_{600}随培养时间变化的曲线



(b) 同等菌体干质量下相应突变株提取的LPS的银染图



—P<0.01；*—P<0.001。

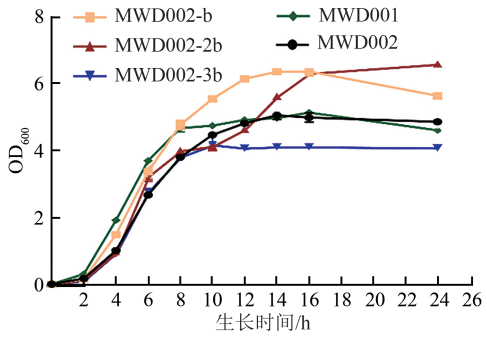
(c) 采用半胱氨酸-硫酸法测定的对应菌株LPS的产量

图 4　MG1655 △ *ptsO*、MG1655 △ *rapZ*、MG1655 △ *fabF*、MWD001 在 LB 培养基中的生长情况及 LPS 产量

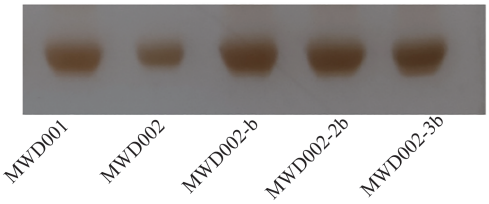
Fig. 4　Growth and LPS yield of MG1655△*ptsO*, MG1655△rapZ, MG1655△ *fabF* and MWD001 in LB medium

浓度分别为 0、7.5、15.0、22.5 mmol/L 的 LB 液体培养基，根据启动子表达强度分别命名为 MWD002、MWD002-b、MWD002-2b、MWD002-3b。

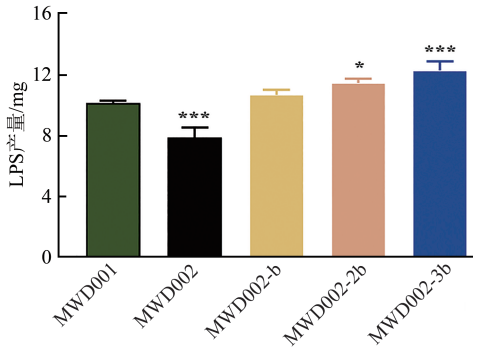
在不同 P_{BAD} 表达强度下，以 MWD001 为对照组，对 MWD002 进行生长曲线测定，见图 5(a)。在无诱导剂阿拉伯糖时，MWD002 中 P_{BAD} 渗漏表达，因此在前期 MWD002 生长比 MWD001 缓慢。MWD001 在 8 h 时到达平稳期，而 MWD002 在 12 h 时才到达平稳期，两者最终 OD_{600} 均在 5.0 左右。诱导剂添加浓度为 7.5 mmol/L 时，菌体生长速度最快，前期其生长速度与 MWD001 相似，但后期生长速度更快，到达平



(a) MWD002在P_{BAD}不同表达强度下菌体浓度OD_{600}随培养时间变化的曲线



(b) 相同菌体干质量下突变株提取的LPS的银染图



*—P<0.05；***—P<0.001。

(c) 采用半胱氨酸-硫酸法测定的对应菌株LPS的产量

图 5　MWD002 在 P_{BAD} 不同转录强度下的生长情况及 LPS 产量

Fig. 5　Growth and LPS yield of MWD002 at different P_{BAD} transcriptional intensities

台期时 OD_{600} 为 6.1。诱导剂添加浓度为 15 mmol/L 时，出现了“二次生长”现象，这可能是由于阿拉伯糖首先作为碳源被使用，随后菌体才使用培养基中其他不易被利用的碳源，最终菌体浓度 OD_{600} 也达到了 6.2。诱导剂添加浓度为 22.5 mmol/L 时，对 MWD002-3b 的生长有显著影响，平台期的菌体浓度 OD_{600} 仅为 4.1。

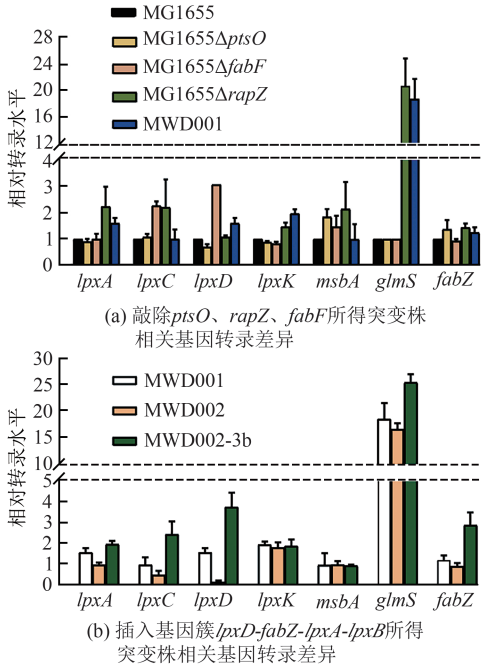
通过银染条带深浅与宽窄结果判断，MWD002 的 LPS 产量显著低于 MWD001，而 MWD002-b、MWD002-2b 和 MWD002-3b 的 LPS 产量均高于 MWD001，但它们之间的差异不明显。

半胱氨酸-硫酸定量检测的 LPS 产量见图 5(c)，

与出发菌MWD001的LPS产量（10.10 mg）相比，MWD002的LPS产量下降至7.84 mg，降幅达22.3%。这是由于基因簇*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*在插入的启动子P_{BAD}诱导下渗漏表达，而*lpxA*、*lpxD*位于类脂A合成路径的上游段，导致LPS合成通路受到较大影响。MWD002-b的LPS产量为10.66 mg，提升5.6%；MWD002-2b的LPS产量为11.42 mg，提升13.1%；MWD002-3b的LPS产量为12.24 mg，提升21.3%。表明随着P_{BAD}转录强度的增加，基因簇*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*表达强度也随之增加，进而逐步提升了LPS产量。因此，基于MWD001，过表达*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*基因簇可进一步提升LPS产量。

2.3　关键基因转录水平对LPS产量的影响

对构建的各突变株进行类脂A合成过程中关键基因的转录水平测定，选定的关键基因包括*lpxA*、*lpxC*、*lpxD*、*lpxK*、*msbA*、*glmS*和*fabZ*，结果见图6。



(a) 敲除*ptsO*、*rapZ*、*fabF*所得突变株相关基因转录差异

(b) 插入基因簇*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*所得突变株相关基因转录差异

图6　LPS合成相关基因的实时定量荧光PCR分析

Fig. 6　RT-PCR analysis of genes involved in LPS synthesis

与MG1655相比，MG1655Δ*ptsO*的*lpxD*基因表达量约为70%，*msbA*表达量约为180%，其余各基因并未表现出明显差异。可能是由于敲除*ptsO*后，LpxD活性增加[15]，但合成LPS需要多个酶协同作用，因此只能通过提升LPS产量，同时减少*lpxD*表达量以适应新的代谢平衡。

MG1655Δ*fabF*的*lpxK*基因表达量下降，约为MG1655的80%，而其他基因如*lpxC*、*lpxD*、*msbA*等均有上升，分别约为MG1655的220%、300%、150%。敲除*fabF*提高了胞内UFA/SFA值，从而激活了LpxK的活性[18,21]。此时，MG1655Δ*fabF*稍微减少了*lpxK*基因的表达，同时其他基因的表达量稍有增加。

MG1655Δ*rapZ*的*glmS*基因表达量显著高于对照组，约为MG1655的20倍。此外，*lpxA*、*lpxC*、*lpxK*、*msbA*和*fabZ*的表达量也有所上升，为对照的1.5~2.0倍。这是由于敲除*rapZ*基因解除了*glmS*的负反馈抑制[13]，从而极大增加了该基因的表达。*fabZ*转录水平也有所增加，在LPS合成过程中，*fabZ*与*lpxA*竞争底物以合成磷脂[31]。另外，由于*fabZ*基因在染色体上与*lpxA*紧密相连，所以其增幅与*lpxA*相似。

在转录水平上，MWD001各基因的转录均有类似于单基因敲除菌株的表现，但其LPS产量较各单基因敲除菌株提升较小。

在不添加/添加22.5 mmol/L的阿拉伯糖，即基因簇*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*渗漏表达/高表达两种情况下，对MWD002进行基因转录水平测定，见图6（b）。MWD002与MWD002-3b在转录水平上差异巨大。MWD002属于P_{BAD}渗漏表达，位于该启动子下游的*lpxD*、*fabZ*、*lpxA*的表达量较低，表达强度分别约为野生型的20%、90%、100%；而MWD002-3b则为高表达，表达强度分别约为野生型的380%、290%、200%。同时，LPS合成的重要限速基因*lpxC*的表达在MWD002-3b中得到了显著提升，由50%提升到250%。此外，*fabZ*的表达量也提高到MG1655的300%，研究表明，*fabZ*的过表达会刺激LpxC蛋白质更加稳定，不易被FtsH蛋白酶降解[32]。以上这些重要基因表达水平的提高，显著提高了MWD002-3b的LPS产量。

值得注意的是，MWD002的*lpxK*基因表达水平并没有下降。Roy等[33]发现，当*lpxD*表达被抑制时，LpxK的活性也会降低；而当*lpxD*过表达时，LpxK的酶活性与正常值相比没有变化。对比MWD002与MWD002-3b，前者的*lpxD*表达量更

低，因此其LpxK的酶活性将会下降。然而，为了维持菌体生长，某种机制上调了MWD002的*lpxK*表达量。因此，尽管两者在*lpxK*表达量上相似，但其活性应该有所不同。综上所述，过表达基因簇*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*会进一步增加LPS的产量。目前，国内外对LPS的研究主要集中在类脂A结构及其对TLR4/MD2的免疫原性上[34-35]。关键基因转录水平对LPS产量的影响为疫苗研发提供了新的视角。

3 结论

在类脂A合成途径中，通过敲除*ptsO*、*fabF*基因以解除LpxD、LpxK受到的抑制，同时敲除*rapZ*以增加前体物质UDP-GlcNAc的供应。构建了MWD001菌株，该菌株LPS产量可达10.10 mg，较野生型增长了30.6%。该菌株中的*lpxA*、*lpxC*、*lpxD*、*lpxK*、*glmS*和*fabZ*转录水平均有所提升，但LPS产量的增长幅度与单基因敲除菌株相比并未达到预期。为进一步增强类脂A合成途径中基因的表达水平，将阿拉伯糖诱导启动子P_{BAD}插到MWD001基因组的*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*基因簇前，构建MWD002菌株。当添加22.5 mmol/L的阿拉伯糖诱导剂时，LPS产量达到12.24 mg，比MWD001提高了21.3%。综上，通过联合敲除*fabF*、*ptsO*、*rapZ*基因，合理提升基因簇*lpxD-fabZ-lpxA-lpxB*的表达量，构建了一株利于LPS产生的大肠杆菌MWD002。随着Cervarix、Fendrix、Mosquirix和Shingrix[6]等商业疫苗中MPLA的佐剂效果被认可，市场对MPLA的需求将会进一步扩大。如何增加LPS产量以及改变类脂A结构使其在数量和质量上得到进一步提升，仍需进一步研究。

参考文献

[1] KAWAI T，AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity：update on Toll-like receptors [J]. Nature Immunology，2010，11(5)：373-384.

[2] TONG N K，BERAN J，KEE S A，et al. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients [J]. Kidney International，2005，68(5)：2298-2303.

[3] WILEY S R，RAMAN V S，DESBIEN A，et al. Targeting TLRs expands the antibody repertoire in response to a malaria vaccine[J]. Science Translational Medicine，2011，3(93)：93ra69.

[4] PONE E J，ZHANG J S，MAI T，et al. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-κB pathway[J]. Nature Communications，2012，3：767.

[5] REED S G，ORR M T，FOX C B. Key roles of adjuvants in modern vaccines[J]. Nature Medicine，2013，19(12)：1597-1608.

[6] REED S G，CARTER D，CASPER C，et al. Correlates of GLA family adjuvants' activities[J]. Seminars in Immunology，2018，39：22-29.

[7] TALEGHANI N，BOZORG A，AZIMI A，et al. Immunogenicity of HPV and HBV vaccines：adjuvanticity of synthetic analogs of monophosphoryl lipid A combined with aluminum hydroxide[J]. APMIS，2019，127(3)：150-157.

[8] XIA S L，DUAN K，ZHANG Y T，et al. Effect of an inactivated vaccine against SARS-CoV-2 on safety and immunogenicity outcomes：interim analysis of 2 randomized clinical trials[J]. JAMA，2020，324(10)：951-960.

[9] SIRIWATTANANON K，MANOPWISEDJAROEN S，SHANMUGARAJ B，et al. Immunogenicity studies of plant-produced SARS-CoV-2 receptor binding domain-based subunit vaccine candidate with different adjuvant formulations [J]. Vaccines，2021，9(7)：744.

[10] RAETZ C R H，WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins [J]. Annual Review of Biochemistry，2002，71：635-700.

[11] RILEY M，ABE T，ARNAUD M B，et al. *Escherichia coli* K-12：a cooperatively developed annotation snapshot：2005[J]. Nucleic Acids Research，2006，34(1)：1-9.

[12] ZIMMER B，HILLMANN A，GÖRKE B. Requirements for the phosphorylation of the *Escherichia coli* EIIANtr protein *in vivo*[J]. FEMS Microbiology Letters，2008，286(1)：96-102.

[13] KALAMORZ F，REICHENBACH B，MÄRZ W，et al. Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology，2007，65(6)：1518-1533.

[14] ZHOU Y，BAO H D，ZHANG H，et al. A spontaneous *rapZ* mutant impairs infectivity of lytic bacteriophage vB_EcoM_JS09 against enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. mSphere，2021，6(2)：e01286-e01220.

[15] KIM H J，LEE C R，KIM M，et al. Dephosphorylated NPr of the nitrogen PTS regulates lipid A biosynthesis by direct interaction with LpxD [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications，2011，409(3)：556-561.

[16] LEE S，LEE S，YOON Y J，et al. Enhancement of long-chain fatty acid production in *Escherichia coli* by

coexpressing genes, including *fabF*, involved in the elongation cycle of fatty acid biosynthesis[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 169(2): 462-476.

[17] YAO J W, ROCK C O. Exogenous fatty acid metabolism in bacteria[J]. Biochimie, 2017, 141: 30-39.

[18] DIMOVSKA NILSSON K, GRANDÉN J, FAREWELL A, et al. Interrogation of chemical changes on, and through, the bacterial envelope of *Escherichia coli* FabF mutant using time-of-flight secondary ion mass spectrometry[J]. Surface and Interface Analysis, 2021, 53(12): 1006-1012.

[19] XIAO X R, YU X Y, KHOSLA C. Metabolic flux between unsaturated and saturated fatty acids is controlled by the FabA: FabB ratio in the fully reconstituted fatty acid biosynthetic pathway of *Escherichia coli*[J]. Biochemistry, 2013, 52(46): 8304-8312.

[20] RAY B L, RAETZ C R. The biosynthesis of gram-negative endotoxin. A novel kinase in *Escherichia coli* membranes that incorporates the 4'-phosphate of lipid A[J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(3): 1122-1128.

[21] EMIOLA A, ANDREWS S S, HELLER C, et al. Crosstalk between the lipopolysaccharide and phospholipid pathways during outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(11): 3108-3113.

[22] LUTZ R, BUJARD H. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli via* the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(6): 1203-1210.

[23] JIANG Y, CHEN B, DUAN C L, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome *via* the CRISPR-Cas9 system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(7): 2506-2514.

[24] REED W L, SCHLEIF R F. Hemiplegic mutations in AraC protein[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294(2): 417-425.

[25] LEIVE L. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1965, 21(4): 290-296.

[26] WU T, LI S W, YE L J, et al. Engineering an artificial membrane vesicle trafficking system (AMVTS) for the excretion of *β*-carotene in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(5): 1037-1046.

[27] HAN Y N, LI Y, CHEN J Z, et al. Construction of monophosphoryl lipid A producing *Escherichia coli* mutants and comparison of immuno-stimulatory activities of their lipopolysaccharides[J]. Marine Drugs, 2013, 11(2): 363-376.

[28] WANG Z, WANG J L, REN G, et al. Influence of core oligosaccharide of lipopolysaccharide to outer membrane behavior of *Escherichia coli*[J]. Marine Drugs, 2015, 13(6): 3325-3339.

[29] OSBORN M J. Studies on the gram-negative cell wall, I. evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of salmonella typhimurium[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1963, 50(3): 499-506.

[30] WRIGHT B G, REBERS P A. Procedure for determining heptose and hexose in lipopolysaccharides: modification of the cysteine-sulfuric acid method[J]. Analytical Biochemistry, 1972, 49(2): 307-319.

[31] HEATH R J, ROCK C O. Roles of the FabA and FabZ *β*-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(44): 27795-27801.

[32] THOMANEK N, ARENDS J, LINDEMANN C, et al. Intricate crosstalk between lipopolysaccharide, phospholipid and fatty acid metabolism in *Escherichia coli* modulates proteolysis of LpxC[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3285.

[33] ROY A M, COLEMAN J. Mutations in *firA*, encoding the second acyltransferase in lipopolysaccharide biosynthesis, affect multiple steps in lipopolysaccharide biosynthesis[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(6): 1639-1646.

[34] 王碧雯，李颜颜，王小元. 新型Kdo_2-1ipid A合成菌株构建及其免疫生化活性研究[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(5)：479-486.
WANG B W, LI Y Y, WANG X Y. Construction of *Escherichia coli* mutant producing novel Kdo_2-lipid A and study of its immunological and biochemical activities[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(5): 479-486.(in Chinese)

[35] 王小元，宋鸿军. 细菌内毒素的生物合成途径及分子结构多样性[J]. 食品与生物技术学报，2013，32(10)：1009-1015.
WANG X Y, SONG H J. Biosynthesis pathway and structure variability of bacterial endotoxin[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(10): 1009-1015.(in Chinese)

（责任编辑：刘冬梅）