DOI:10.12441/spyswjs.20231130002 [文章编号] 1673-1689(2025)05-0050-13

PhrG-RapG-DegU群体感应调控枯草芽孢杆菌中甲萘醌-7的合成

黄俊宝 黄茜琳 陈 宇 高旭丽 罗雅妮 陶 伟 刘永圆 郭明雨 吴 晶 刘 艳*

(安徽工程大学生物与食品工程学院,安徽 芜湖 241000)

摘要:【目的】通过挖掘转录调控因子,研究了转录调控系统对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*,*B. subtilis*)168中甲萘醌-7(MK-7)产量的影响。**【方法】**利用信号分子PhrG五肽、RapG蛋白质与转录调控因子DegU,在*B. subtilis* 168中成功构建了PhrG-RapG-DegU调控系统,用以微调关键基因的表达,使MK-7合成途径中关键基因的表达能够响应细胞密度变化。**【结果】**通过该系统,菌株BS06中MK-7的产量达到了102.47 mg/L。**【结论】**群体感应调控系统的微调能够有效提高*B. subtilis* 168中MK-7产量。

关键词:枯草芽孢杆菌168;PhrG-RapG-DegU;群体感应;维生素K_2

PhrG-RapG-DegU Quorum Sensing Regulates Menaquinone-7 Production in *Bacillus subtilis*

HUANG Junbao HUANG Xilin CHEN Yu GAO Xuli LUO Yani TAO Wei
*LIU Yongyuan GUO Mingyu WU Jing LIU Yan**

(College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

Abstract: [**Objective**] The effects of the transcription regulation system on menaquinone-7 (MK-7) production in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) 168 were studied by excavating transcription regulators. [**Method**] With the signal molecule PhrG pentapeptide, RapG, and the transcription regulator DegU, a PhrG-RapG-DegU regulatory system was successfully constructed in *B. subtilis* 168 to fine-tune the expression of key genes, so that the expression of key genes in the MK-7 synthesis pathway can respond to the changes in cell density. [**Result**] The production of MK-7 in strain BS06 reached 102.47 mg/L through this system. [**Conclusion**] Fine tuning of quorum sensing can effectively improve the MK-7 production in *B. subtilis* 168.

Keywords: *Bacillus subtilis* 168; PhrG-RapG-DegU; qourusm sensing; vitamin K_2

维生素K_2(VK_2)作为一种优良的药用化合物,在对抗多种疾病如骨质疏松症和阿尔茨海默病,抑制肿瘤细胞增殖,促进凝血,预防心血管疾病以及用作营养增强剂方面都有着十分广泛的应用前景[1-5]。VK_2来源于食品、化学合成[6-7]和微生物发酵,可直接被人体吸收,半衰期长,具有良好的生物安全性[8]。根据侧链数量的不同,可以将VK_2分为不同的类别,其中MK-7是*B. subtilis*中生物含量、生物活性和生物利用度[9]最高的甲萘醌类物质,也是VK_2最有效的亚型[10]。

群体感应是实现细胞间通信的一种方式[11],也是微生物群落与周围环境之间信息交换的重要工具[12-13],可自发检测细菌浓度变化,调节相关基因的表达[14-15],平衡细胞生长与产物合成之间的

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32372295);安徽省高校杰出青年基金项目(2023AH020013);安徽省高校自然科学研究重点项目(2023AH050938);安徽省大学生创新创业计划项目(202310363254)。

通信作者:刘 艳(1981—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事工业微生物代谢调控研究。 E-mail:liuyan@ahpu.edu.cn

收稿日期:2023-11-30 **修回日期:**2023-12-12

关系，控制细胞代谢流向，避免发生失衡。相较于传统的调控模式，群体感应不需要添加额外的诱导剂，没有遗传干预，不依赖代谢途径，对细胞生长没有负担[16]。群体感应调控系统使细菌能够根据细胞密度的变化动态微调相关基因的表达，以适应环境的变化[17]。Kim等[18]在大肠杆菌中构建了群体感应系统，调节红没药烯的生物合成，使其终产量达到了1.1 g/L。

转录调控因子DegU作为*B.subtilis*中双组分调节系统（two-component regulatory system，TCS）的响应调节器[19-22]，控制着许多重要的生理过程，如鞭毛形成[23]、细胞感受态的发育[24]和细胞运动[25]。在细胞中，DegU被认为是控制细胞命运的分子开关[26]，其C端的螺旋-转角-螺旋（helix-turn-helix，HTH）结构可以识别特定的DNA序列[27-30]。天冬氨酸磷酸酶RapG[31-33]及其同源PhrG能够调控DegU-P的活性。借助PhrG-RapG系统，在菌株*B. subtilis* 168中构建一个基于细胞密度的动态调节元件，使MK-7合成途径中关键基因的表达受到细胞密度的调控。

作者构建了一个由细胞密度控制的动态调控元件，将产物合成与细胞生长动态连接起来，平衡两者之间的关系，使细胞能够自主控制代谢过程，避免了代谢流的失衡。为提高VK_2的工业生产水平和构建*B.subtilis*细胞工厂奠定了基础，同时，也为提高相关菌株中次生代谢产物产量提供了新思路。

1　材料与方法

1.1　菌株和培养基

所有接种培养基均使用LB液体培养基，37 ℃培养。LB液体培养基：0.5 g/dL酵母提取物、1.0 g/dL胰蛋白胨、1.0 g/dL氯化钠，pH 7.0，固体培养基中每升加入20 g琼脂，121 ℃灭菌20 min。发酵培养基为SYG培养基，37 ℃静置培养6 d。SYG发酵培养基：5.000 g/dL大豆蛋白胨、2.000 g/dL酵母提取物、5.000 g/dL甘油、0.386 g/dL K_2HPO_4、0.162 g/dL KH_2PO_4，pH 7.0，121 ℃灭菌20 min。每升发酵培养基中加入2 mL微量元素。所用抗生素的最终质量浓度为氯霉素5 μg/mL、卡那霉素50 μg/mL。

所有化学试剂：生工生物工程（上海）股份有限公司；MK-7标准品：日本富士胶片和光纯药株式会社；分子试验相关试剂：宝日医生物技术（北京）有限公司。所使用的菌株及质粒见表1，所有的PCR引物序列见表2。

1.2　启动子文库的构建

对*degU*上游片段（*degU*-L）、氯霉素抗性片段（-C_m^r-）、IPTG诱导型启动子$P_{grac100}$和*degU*基因片段进行克隆、纯化、融合，获得*degU*-L-C_m^r-$P_{grac100}$-*degU*片段，将其整合到*B. subtilis* 168基因组上，得到菌株BN00。通过扩增增强型绿色荧光蛋白基因（*egfp*），与*B. subtilis* 168基因组中的8个原始启动子构建目标片段P_x-eGFP，将构建的目标片段P_x-eGFP导入BN00中，获得菌株BN01~BN08，通过检测种子液的相对荧光强度与光密度，以测定原始启动子的相对转录强度。

1.3　eGFP荧光强度的测定和突变体启动子的筛选

为分析启动子的特性，筛选出符合目标的启动子，将重组菌株BN01~BN08单菌落转接到LB培养基中，在37 ℃、220 r/min条件下培养16 h。每4 h取样检测eGFP的相对荧光强度，同时检测不同IPTG浓度下的相对荧光强度。采用多功能酶标仪，在激发波长490 nm、发射波长530 nm、增益为60的条件下，检测细胞的相对荧光强度。在波长600 nm处检测细胞的光密度。通过相对荧光强度（细胞的相对荧光强度与细胞的光密度的比值）表征启动子的相对转录强度。

1.4　启动子的突变筛选

将1.3中获得的受DegU-P正向调控的启动子P_{degQ}的-35区和-10区域随机突变为$sigma^A$、$sigma^B$和$sigma^H$的一致识别序列，通过改变不同的sigma因子的顺序和位置，获得8个不同的启动子P_1~P_8。将目标片段P_x-eGFP导入BN00取代P_{degQ}，得到菌株BN09~BN16，检测种子液的相对荧光强度。

1.5　基因组的整合与筛选

采用无缝克隆技术实现相关基因操作[34]。首先，对目标基因的上游序列、lox71-zeo-lox66、目标启动子P_5的序列进行扩增、纯化和融合。以融合片段为模板，扩增得到目标片段。测序成功后，将目标片段整合到目标基因组上面。用P_5替代*ispH*和*hepS/T*的原始启动子，通过抗性平板筛选阳性菌落，用Cre/loxP系统消除阳性菌株的抗性，最终在50 ℃下培养12 h，消除PDG148质粒。

表 1　研究中使用的菌株及质粒

Table 1　Strains and plasmids used in this study

	菌株及质粒	基因型	来源
菌株	*B. subtilis* 168	*nprE aprE epr bpr mpr* ∷ *ble nprB* ∷ *bsr vpr wprA* ∷ *hyg cm* ∷ *neo*	作者所在实验室保藏
	B. subtilis 168-*ispG* ∷ P_{43}	*B. subtilis* 168，C_m^r-P_{43}-*ispG*	本研究
	BC00	*B. subtilis* 168，*degU*-eGFP	本研究
	BC01	BC00 衍生，$P_{grac100}$-*rapG*	本研究
	BC02	BC00 衍生，P_{hag}-*rapG*	本研究
	BC03	BC00 衍生，P_{hag}-*rapG*，C_m^r-P_{hag}-*phrG*	本研究
	BL01	*B. subtilis* 168，Δ*rapG*	本研究
	BL02	*B. subtilis* 168，Δ*phrG*	本研究
	BL03	*B. subtilis* 168，Δ*degU*	本研究
	BN00	*B. subtilis* 168，$P_{grac100}$-*degU*	本研究
	BN01	BN00 衍生，C_m^r-P_{degQ}-eGFP	本研究
	BN02	BN00 衍生，C_m^r-P_{comK}-eGFP	本研究
	BN03	BN00 衍生，C_m^r-P_{sacB}-eGFP	本研究
	BN04	BN00 衍生，C_m^r-P_{aprE}-eGFP	本研究
	BN05	BN00 衍生，C_m^r-P_{bpr}-eGFP	本研究
	BN06	BN00 衍生，C_m^r-P_{flgB}-eGFP	本研究
	BN07	BN00 衍生，C_m^r-P_{sacX}-eGFP	本研究
	BN08	BN00 衍生，C_m^r-P_{wapA}-eGFP	本研究
	BN09	BN00 衍生，C_m^r-P_1-eGFP	本研究
	BN10	BN00 衍生，C_m^r-P_2-eGFP	本研究
	BN11	BN00 衍生，C_m^r-P_3-eGFP	本研究
	BN12	BN00 衍生，C_m^r-P_4-eGFP	本研究
	BN13	BN00 衍生，C_m^r-P_5-eGFP	本研究
	BN14	BN00 衍生，C_m^r-P_6-eGFP	本研究
	BN15	BN00 衍生，C_m^r-P_7-eGFP	本研究
	BN16	BN00 衍生，C_m^r-P_8-eGFP	本研究
	BS01	*B. subtilis* 168，P_{hag}-*rapG*	本研究
	BS02	BS01 衍生，P_{hag}-*phrG*	本研究
	BS03	BS02 衍生，P_{43}-*degU*	本研究
	BS04	BS03 衍生，P_5-*hepS*	本研究
	BS05	BS04 衍生，P_5-*hepT*	本研究
	BS06	BS05 衍生，C_m^r-P_5-*ispH*	本研究
质粒	P7C6	Pmd18-T 包含 lox71-zeo-lox66 片段	作者所在实验室保藏
	PDG148	Amp，Km，*E. coli-B. subtilis* 穿梭载体，包含 P_{spac} 控制的 *cre*	作者所在实验室保藏
	pHT-XCR6	Amp，Cm，包含 $P_{grac100}$	作者所在实验室保藏

1.6　重组菌株的发酵培养与 MK-7 产量的测定

选择 BS06 作为测定的目标菌株，菌株活化后，按 2 mL/dL 接种到发酵培养基 SYG 中，在 37 ℃下静态培养 6 d。在 250 mL 的锥形烧瓶反应器中静置发酵生产 MK-7。每隔 12 h 取 2 mL 发酵液，采用高效液相色谱（HPLC）法检测菌株的 MK-7 产量。

MK-7 提取方法：取 2 mL 混匀发酵液于 5 mL 棕色离心管中，10 000 r/min 离心 5 min，将上清液吸入 5 mL 棕色离心管，加入 4 倍体积的萃取液，萃取液为正己烷-异丙醇的混合液（正己烷与异丙醇体积比为 2∶1），培养箱振荡 20 min，避光静置 30 min，12 000 r/min 离心 5 min。将上清液过 0.22 μm 滤膜后置于进样瓶中，采用 HPLC 法检测，流动相为二氯甲烷-甲醇混合液（二氯甲烷与甲醇体积比为 9∶1），柱温 35 ℃，流量 1.0 mL/mim。

表2 研究中使用的PCR引物

Table 2 PCR primers used in this study

菌株	引物	引物序列（5′—3′）
BS01	*rapG*-L-F	TTTGTGGTCTTTACGGCTTTG
	rapG-L-R	ATCCGCTCGTGAAACTCCTTTCTCTAGTGACT
	rapG-L-P7C6-F	AGGAGTTTCACGAGCGGATAACAATTTCACACA
	rapG-L-P7C6-R	TAACGCTGCCCACCTATCATACCGTTCG
	P7C6-P_{hag}-F	ATAGGTGGGCAGCGTTATCCAGCG
	P7C6-P_{hag}-R	GGGTGCGATCTTATTCATTGTTTTGTTCCTCCCTGAATATG
	P_{hag}-*rapG*-F	GGGAGGAACAAAACAATGAATAAGATCGCACCCG
	P_{hag}-*rapG*-R	CTTTCTCGGACAACAAGTCAT
BS02	*rapG*-F	TGCTTGCCTACTTCTCCTTAT
	rapG-R	GTGAAATTGTTATCCGCTCTTATATAACCTCCGTTCGTTTAATCAGT
	rapG-P7C6-F	ATTAAACGAACGGAGGTTATATAAGAGCGGATAACAATTTCACACAG
	rapG-P7C6-R	CGCTGCCCACCTATCATACCGTTCGT
	P7C6-P_{hag}-F	ATAGGTGGGCAGCGTTATCCAGCG
	P7C6-P_{hag}-R	GCCAATCAGAAATCTTTTCATTGTTTTGTTCCTCCCTGAATATGT
	P_{hag}-*phrG*-F	AGGGAGGAACAAAACAATGAAAAGATTTCTGATTGGCG
	phrG-R	CACGGCGATTTGAATACACTT
BS03	*degU*-L-F	CAAATGCTGGCGAATGTTATG
	degU-L-R	CGGGTAAGCCACGCCTCCT
	P7C6-F	CGTGGCTTACCCGGGGATCCTC
	P7C6-R	AACAATGTTTACTTTAGTCACGTGTACATTCCTCTCTTACCTATAATG
	degU-F	AGAGAGGAATGTACACGTGACTAAAGTAAACATTGTTATTATCGAC
	degU-R	GTTGTTCACGCATTTCTTTCG
BS04	*hepS*-L-F	CGGAGAAGACCCGAATAG
	hepS-L-R-P7C6	GTTATCCGCTCAAATATCACCCTTGTCCCCAAA
	hepS-L-P7C6-F	GGGACAAGGGTGATATTTGAGCGGATAACAATTTCACACA
	P_5-R-*hepS*	CCGTAGATGTCTTGCAATCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATTCAG
	P_5-*hepS*-F	GGAGAGGGTAAAGATTGCAAGACATCTACGGAACT
	hepS-R-R	TGTAGCAAGCGTCCGAAT
BS05	*hepT*-L-F	GAACACTTCAACCTCCCG
	hepT-L-R-P7C6	CGCTCTTTTCAGGCCCGCCT
	hepT-L-P7C6-F	GGGCCTGAAAAGAGCGGATAACAATTTCACACAG
	P-R-*hepT*	CGCCAGTAAACGAATGATATTTAACATTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATTCAGA
	P-*hepT*-F	AGGAGAGGGTAAAGAATGTTAAATATCATTCGTTTACTGGCG
	hepT-R-R	TGGGCTTTCGGTTCGTTAA
BS06	*ispH*-L-F	GCGAGGACCTTCATTTGG
	ispH-L-R-P7C6	TGTTATCCGCTCTTTCGGTTGTCCTCCAATACT
	ispH-L-P7C6-F	AGGACAACCGAAAGAGCGGATAACAATTTCACAC
	P7C6-R-P_5	CGTTCTTCGGTTACGATATAAATCCACCTATCATACCGTTCGTATA
	P7C6-P_5-F	ACGGTATGATAGGTGGATTTATATCGTAACCGAAGAACGTT
	P_5-R-*ispH*	CGGTGAAATTTTAATTACGTCCATTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATTCA
	P_5-*ispH*-F	AAAGGAGAGGGTAAAGAATGGACGTAATTAAAATTTCACCG
	ispH-R-R	CACTTGAGTAGCGAGGC
BN00	*degU*-L-F	TATCCGAGGTCAGCCGTAA
	degU-L-R	CGCTCAAGCCACGCCTCCTT
	degU-L-P7C6-F	GCGTGGCTTGAGCGGATAACAATTTCACAC
	P7C6-R-$P_{grac100}$	CGCTTACATCATTCTTTTCTACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAG

续表

菌株	引物	引物序列（5′—3′）
BN00	P7C6-$P_{grac100}$-F	AGCATACATTATACGAACGGTAGAAAAGAATGATGTAAGCGTGAAA
	$P_{grac100}$-R-*degU*	ACAATGTTTACTTTAGTCACGGATCCCACCTCCTTTAATTG
	$P_{grac100}$-*degU*-F	GGAGGTGGGATCCGTGACTAAAGTAAACATTGTTATTATCGAC
	degU-R-R	CACTTCACATTCCCGCCTA
BN01	*degQ*-L-F	ATTGAAAGCAACAACTGGGACA
	degQ-L-R-eGFP	CTTGCTCACCATCGTTTCCACACTCCTTTTTT
	degQ-L-eGFP-F	GTGTGGAAACGATGGTGAGCAAGGGC
	egfp-R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	egfp-P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCT
	P7C6-R-*degQ*	CAAGTTTCTTTTCCATGTTCAAGCGAAAACATACCACC
	P7C6-*degQ*-F	TGGTATGTTTTCGCTTGAACATGGAAAAGAAACTTGAAGAAGTAAAAC
	degQ-R-R	AACGACTCCGAGCGATTA
BN02	*comK*-L-F	TTGCCAGCGACGATTCCA
	comK-L-R-eGFP	CCTTGCTCACCATATTATGGCCTCCATCCTTTTTC
	comK-L-eGFP-F	ATGGAGGCCATAATATGGTGAGCAAGGGC
	egfp-R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	egfp-P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R-*comK*	CGTCTGTTTTCTGACTCATGTTCAAGCGAAAACATACCAC
	P7C6-*comK*-F	GTTTTCGCTTGAACATGAGTCAGAAAACAGACGC
	comK-R-R	ATCTTCGTCCGCTCTTCT
BN03	*sacB*-L-F	CTGATTCACCGCAATCTTGT
	sacB-L-R-*egfp*	CCCTTGCTCACCATCGTTCATGTCTCCTTTTTTATGTAC
	sacB-L-*egfp*-F	AGACATGAACGATGGTGAGCAAGGGC
	egfp-R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	egfp-P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R-*sacB*	TGCAAACTTTTTGATGTTCATGTTCAAGCGAAAACATACCAC
	P7C6-*sacB*-F	GGTATGTTTTCGCTTGAACATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACA
	sacB-R	TCTGCGTAGAATCCTCTGTTT
BN04	*aprE*-L-F	CTGCAAGGCTTGAAATAACG
	aprE-L-R-*egfp*	CCCTTGCTCACCATTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAAATTCAG
	aprE-L-*egfp*-F	GGAGAGGGTAAAGAATGGTGAGCAAGGGC
	egfp-R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	egfp-P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R-*aprE*	TTTGCTTCTCACGTTCAAGCGAAAACATACCACC
	P7C6-*aprE*-F	GTTTTCGCTTGAACGTGAGAAGCAAAAAATTGTGGATCA
	aprE-R	GGAGCCATCACATCAAGC
BN05	*bpr*-L-F	ATGAACATCACTGGAGGAACA
	bpr-L-R-eGFP	CCTTGCTCACCATTTTCATCCCCCTTTTTCAACATG
	bpr-L-eGFP-F	GGGGGATGAAAATGGTGAGCAAGGGC
	egfp-R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	egfp-P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R-*bpr*	TCGTTTTTTTCCTCATGTTCAAGCGAAAACATACCACC
	P7C6-*bpr*-F	GGTATGTTTTCGCTTGAACATGAGGAAAAAAACGAAAAACAGAC
	bpr-R	AAATGTCAGCATCAGTGCC
BN06	*flgB*-L-F	ATACTGCTTTCCCTGTTGAGA
	flgB-L-R-eGFP	CCTTGCTCACCATATCCACTTACCTCCATTTCAGT
	flgB-L-eGFP-F	GGAGGTAAGTGGATATGGTGAGCAAGGGC

续表

菌株	引物	引物序列（5′—3′）
BN06	*egfp*-R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	egfp-P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R-*flgB*	CCAGAAAATAAGCTCAAGTTCAAGCGAAAACATACCACC
	P7C6-*flgB*-F	ATGTTTTCGCTTGAACTTGAGCTTATTTTCTGGAACGATACAA
	flgB-R	ATTCATCGCCGTGACATT
BN07	*sacX*-L-F	CAGCAATCCGTATCTGCG
	sacX-L-R-eGFP	CTTGCTCACCATGCAATTAAAACCTCCTTTGCTG
	sacX-L-eGFP-F	GGAGGTTTTAATTGCATGGTGAGCAAGGGC
	egfp-R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	egfp-P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R-*sacX*	TCTTTTGCAATCTCTTTATGCAAGTTCAAGCGAAAACATACCAC
	P7C6-*sacX*-F	GGTATGTTTTCGCTTGAACTTGCATAAAGAGATTGCAAAAGAATT
	sacX-R	GATAGGACGATGGTGGAGTAG
BN08	*wapA*-L-F	TCTTTCTTGTATTCAACTGGGTG
	wapA-L-R-eGFP	CCCTTGCTCACCATTTCCTCTCTCCTTTTGTAATAAAAGTAATATT
	wapA-L-eGFP-F	AGGAGAGAGGAAATGGTGAGCAAGGGC
	egfp-R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	egfp-P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R-*wapA*	GCCTCTTTCTTTTTTTCATGTTCAAGCGAAAACATACCACC
	P7C6-*wapA*-F	ATGTTTTCGCTTGAACATGAAAAAAAGAAAGAGGCGAAAC
	wapA-R	TGTCTGACCGTTCAACCTC
BL01	Δ*rapG*-L-F	TGGTCTTTACGGCTTTGGC
	Δ*rapG*-L-R-P7C6	CCCGGGTGTGAAACTCCTTTCTCTAGTGAC
	Δ*rapG*-L-P7C6-F	GGAGTTTCACACCCGGGGATCCTCT
	P7C6-R-Δ*rapG*-R	GCCAATCAGAAATCTTTTCATGTTCAAGCGAAAACATACCAC
	P7C6-Δ*rapG*-R-F	GGTATGTTTTCGCTTGAACATGAAAAGATTTCTGATTGGCG
	Δ*rapG*-R-R	ACTTCACCATCGGGCAATA
BL02	Δ*phrG*-L-F	AGAGGACAGGGCTTTCAG
	Δ*phrG*-L-R-P7C6	ATCCCCGGGTTTATATAACCTCCGTTCGTTTAATCAG
	Δ*phrG*-L-P7C6-F	ACGGAGGTTATATAAACCCGGGGATCCTCT
	P7C6-R-Δ*phrG*-R	CCCGCATCCAGGGTGATGTTTGTCAGTTATTAAAT
	P7C6-Δ*phrG*-R-F	ACCCTGGATGCGGGGGTTCAA
	Δ*phrG*-R-R	AAATTCCCGCTTGTCCTG
BL03	Δ*degU*-L-F	TCCTAACGCACCTTCACC
	Δ*degU*-L-R-P7C6	ATCCCCGGGTTATAATAGGAGACTTGCCTTTTACTAGG
	Δ*degU*-L-P7C6-F	GGCAAGTCTCCTATTATAACCCGGGGATCCTCT
	P7C6-R-Δ*degU*-R	GAGGCGTGGCTTAGGGTGATGTTTGTCAGTTATTAAAT
	P7C6-Δ*degU*-R-F	ACATCACCCTAAGCCACGCCTCCT
	Δ*degU*-R-R	CAGGTAGAATTGACGATGATCCA
B. subtilis 168-*ispG*::P_{43}	*ispG*-L-F	AGCATCAATAGATGTTGCACTC
	ispG-L-R-P7C6	ATCCGCTCTCGCTCCTTAATTGTAGTTGCC
	ispG-L-P7C6-F	AGGAGCGAGAGCGGATAACAATTTCACACAG
	P7C6-R-*ispG*	ATTTCACTCACTTGCAAGTGTACATTCCTCTCTTACCTATAATGG
	P7C6-*ispG*-F	GTAAGAGAGGAATGTACACTTGCAAGTGAGTGAAATCACAC
	ispG-R	TAGTCAAACGCTTTCGCTG

续表

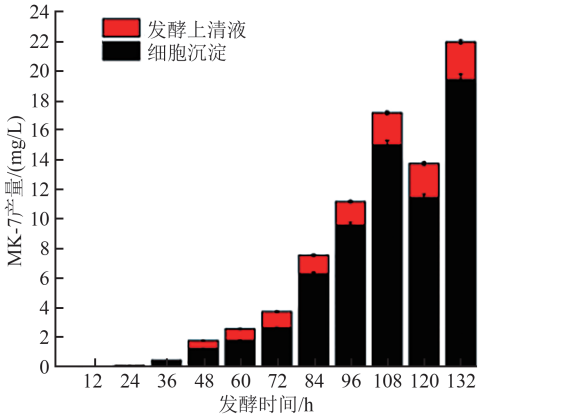
菌株	引物	引物序列(5′—3′)
Cre	*cre*-F	GCCTGCATTACCGGTCGATG
	cre-R	CTAATCGCCATCTTCCAGCAGGC
BC00	*degU*-F	GAAGCGGCTCGTATTGTTG
	degU-R-*egfp*	CCTTGCTCACCATCTATCTCATTTCTACCCAGCC
	degU-*egfp*-F	CTGGGTAGAAATGAGATAGATGGTGAGCAAGGGC
	P7C6-R-*degU*-R	AGGCAAGTCTCCTATTATAGTTCAAGCGAAAACATACCAC
	P7C6-*degU*-R-F	GGTATGTTTTCGCTTGAACTATAATAGGAGACTTGCCTTTTACTAGG
	degU-R-R	CTTCACCCAAATGAGTGCC

2　结果与讨论

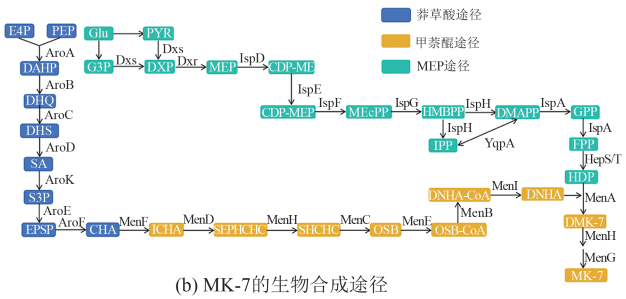
2.1　*B. subtilis* 168 中 MK-7 的生产过程分析

B. subtilis 168 作为典型的革兰氏阳性菌，具有发酵周期短、分泌能力强、发酵产物单一等优点，是生产 MK-7 的优势菌株。如图 1(a)所示，随着发酵时间的增加，MK-7 的增加具有一定的规律性：在细胞生长的早期阶段，细胞生长缓慢，MK-7 的产量缓慢增加；随着发酵时间的增加，MK-7 的产量也稳步提升；在发酵后期，MK-7 的产量逐渐趋于稳定。

MK-7 由母链萘醌环和异戊二烯侧链组成。如图 1(b)所示，在 *B. subtilis* 168 中，异戊二烯侧链主要通过 MEP 途径合成。4-羟基-3-甲基丁烯-2-二磷酸合成酶(IspG)是 MEP 途径中的关键酶，催化甲基赤藓三醇环二磷酸(MEcPP)合成 HMBPP，*ispG* 的缺失将导致异戊二烯生物合成完全丧失，多个基因功能受损和电子转移受阻[35-36]，使异戊二烯侧链的合成无法顺利进行，从而影响 MK-7 的合成。如图 2 所示，相较于原始菌株，*B. subtilis* 168-*ispG*∷P_{43} 的生长受到严重抑制，这进一步证实了 *ispG* 表达量的增加会对菌株有严重的毒性作用，导致菌株生长失衡，严重抑制菌株生长。



(a) *B. subtilis* 168的MK-7产量变化



(b) MK-7的生物合成途径

图 1　*B. subtilis* 168 的 MK-7 产量变化及其生物合成途径

Fig. 1　MK-7 production variation and its biosynthetic pathway in *B. subtilis* 168

2.2　基于 *degU* 的 *B. subtilis* 168 基因表达调控系统的分析及 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统的构建

Hu 等[37]揭示了 RapQ 和 PhrQ 之间的相互作用关系及其对 DegU 的影响。为揭示 RapG、PhrG 和 DegU 之间是否存在类似的作用关系，首先将增强的绿色荧光蛋白插入 *B. subtilis* 168 基因组 *degU*，获得菌株 BC00。利用 IPTG 诱导的启动子 $P_{grac100}$ 表达 *rapG*，并将重组片段导入菌株 BC00 中，得到重组菌株 BC01。通过比较种子液在不同 IPTG 浓度下的相对荧光强度，可以发现在 30 μmol/L 时，种子液的相对荧光强度明显低于 0 μmol/L 时，见图 3(a)，

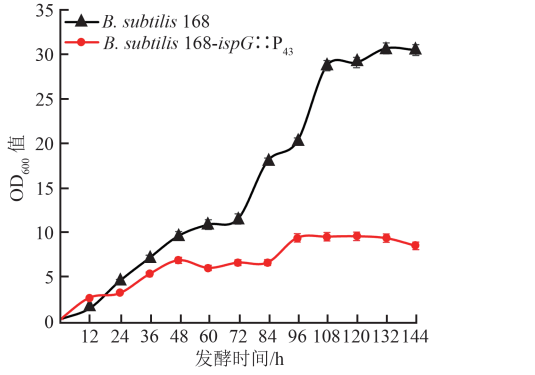
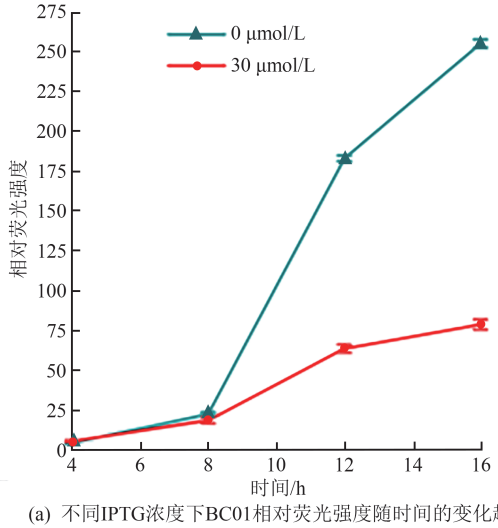


图 2　*B. subtilis* 168 和 *B. subtilis* 168-*ispG*∷P_{43} 发酵过程中的细胞生长曲线

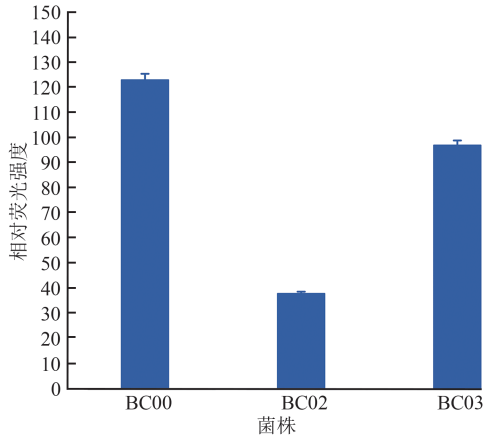
Fig. 2　Cell growth curves of *B. subtilis* 168 and *B. subtilis* 168-*ispG*∷P_{43} during the fermentation process

验证了RapG对DegU活性的抑制作用。

为了研究PhrG五肽和RapG蛋白质的作用机制，首先利用P_{hag}在菌株BC00中表达*rapG*，获得BC02。然后，利用P_{hag}在菌株BC00中表达*rapG*和*phrG*，得到重组菌株BC03。通过图3(b)可以发现，培养16 h后BC02的相对荧光强度仅为BC00的1/3，说明RapG可以抑制DegU-P的活性；BC03的相对荧光强度相较于BC02有较大幅度的提高，但没有恢复到BC00的相对荧光强度。这说明PhrG可以缓解RapG对DegU-P的抑制作用，但目前还无法完全恢复。



(a) 不同IPTG浓度下BC01相对荧光强度随时间的变化趋势



(b) BC00、BC02和BC03在16 h时的相对荧光强度对比

图3　RapG、PhrG与DegU的相互作用关系验证

Fig. 3　Validation of the interactions between RapG, PhrG, and DegU

为验证基因*rapG*、*phrG*和*degU*的作用，在*B. subtilis* 168中分别敲除*rapG*、*phrG*和*degU*，得到重组菌株BL01(*B. subtilis* 168-Δ*rapG*)、BL02(*B. subtilis* 168-Δ*phrG*)和BL03(*B. subtilis* 168-Δ*degU*)，如图4所示，重组菌株的生长都受到了一定程度的抑制，BL01和BL02的最大OD_{600}值均低于原始菌株。这可能是因为PhrG五肽的合成被阻断后，RapG受到的抑制作用严重降低，其生物活性得到提高，对DegU的抑制作用也有一定程度的提高。菌株BL03的密度也在一定范围内下降，这可能是因为*degU*调控了多个基因的转录和表达。敲除*degU*后，相关基因的转录受到抑制，表达减少，菌株生长受到抑制。

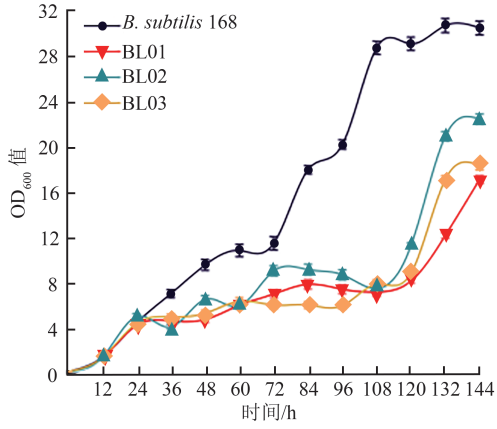


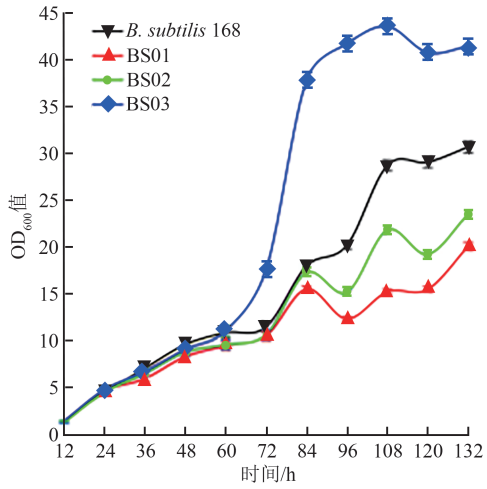
图4　*B. subtilis* 168、BL01、BL02和BL03的生长趋势

Fig. 4　Growth trends of *B. subtilis* 168, BL01, BL02, and BL03

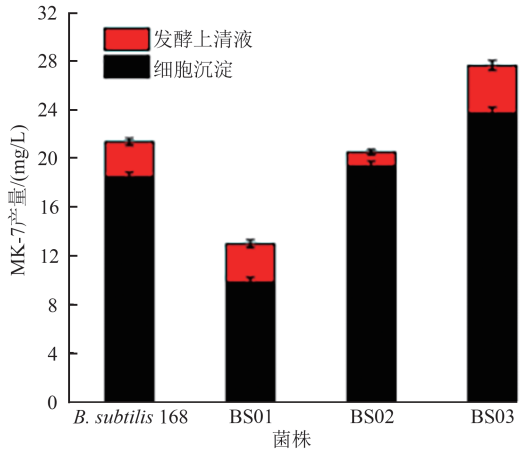
通过图5可以发现，BS01的细胞密度和MK-7的产量较*B. subtilis* 168均明显降低，MK-7最大产量仅为12.92 mg/L，这表明RapG对细胞生长和MK-7的产生均有显著的抑制作用。相较于BS01，BS02的生长抑制得到了较好的缓解，但不论是最大OD_{600}值还是MK-7产量，都没有恢复到*B. subtilis* 168的水平，BS02的MK-7产量只有20.52 mg/L，这也表明PhrG可以部分缓解RapG的副作用。BS03的细胞密度和MK-7产量相较于原始菌株*B. subtilis* 168均得到较大幅度的提升，MK-7产量达到28.18 mg/L，增加了31.8%，表明PhrG-RapG-DegU群体感应调控系统可以作为一个分子开关，控制相关基因的调控水平，以响应细胞密度的变化，提高MK-7的产量。

2.3　诱导启动子和群体感应系统的构建

为了探讨DegU-P的具体调控模式以及不同浓度的DegU-P是否能发挥不同的调控作用，用启动子$P_{grac100}$调控*degU*的表达，获得菌株BN00。



(a) *B. subtilis* 168、BS01、BS02和BS03的生长趋势



(b) *B. subtilis* 168、BS01、BS02和BS03发酵第6天的MK-7产量对比

图 5 *B. subtilis* 168、BS01、BS02、BS03 的生产趋势和 MK-7 产量对比

Fig. 5 Growth trends and MK-7 production of *B. subtilis* 168, BS01, BS02, and BS03

DegU-P 可以与靶基因的启动子结合并发挥调控作用，为了反映 DegU-P 的作用强度，使用增强的绿色荧光蛋白 eGFP 来反映启动子的相对转录强度。

通过 *B. subtilis* 168 中的原始启动子进行筛选，选择了 8 个受 DegU-P 调控的启动子：P_{degQ}、P_{comK}、P_{sacB}、P_{aprE}、P_{bpr}、P_{flgB}、P_{sacX}和P_{wapA}，获得了菌株 BN01~BN08，并测定了这些菌株的相对荧光强度。如图 6 所示，P_{degQ}的转录活性远高于其他 7 个原始启动子。因此，选择 P_{degQ}作为后续研究的目标启动子。

启动子作为基因工程途径修饰的重要组成元件，在调控 *B. subtilis* 的基因表达中发挥着重要的作用[38]。在不同的情况下往往需要构建特定的启动子，以满足转录途径的特定需要[39]。DegU-P 的调控作用体现在通过与启动子结合来调控相关基因的转录活性[30]。研究发现，DegU-P 的启动子选择性体现在结合序列上[27]。与更喜欢结合反向重复序列（IR）的 DegU 相比，DegU-P 更有可能与直接重复序列（DR）结合[27]。根据不同的结合序列，可以对启动子进行特异性修饰，以提高启动子与 DegU-P 之间的结合效果。

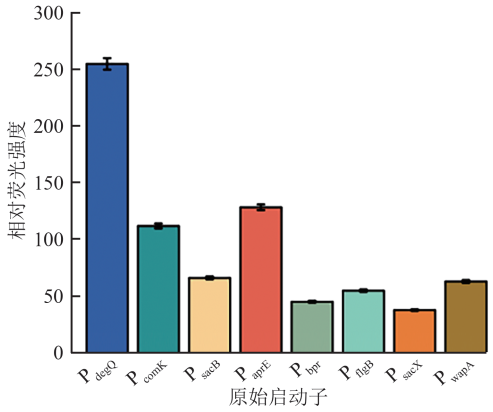


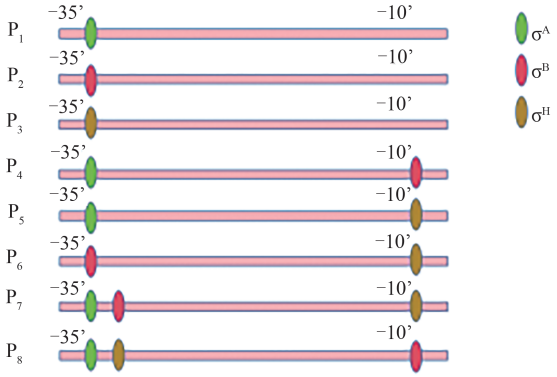
图 6 原始启动子的相对荧光强度

Fig. 6 Relative fluorescence intensity of the original promoters

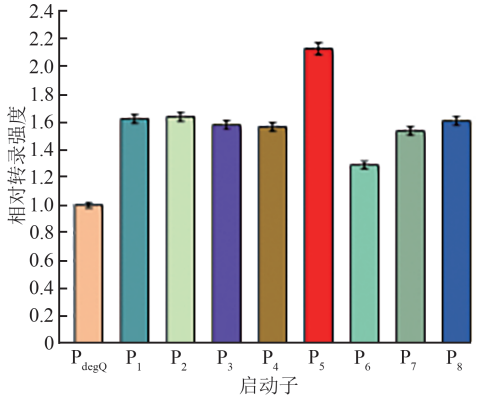
在 *B. subtilis* 168 中存在多种 sigma 因子[28]，主要的 sigma 因子称为管家 sigma 因子，主要负责生命活动所必需的一些基因转录；其他 sigma 因子，被称为环境特异性 sigma 因子，只在特定情况下控制特定基因的转录。在 *B. subtilis* 168 中，σ^A被称为管家 sigma 因子，σ^B是应对一般压力的 sigma 因子，而 σ^H在指数期后期和产孢阶段起着重要作用[40]。

为了构建出更符合要求的启动子，以满足修饰特定转录途径的需要，首先将目标启动子 P_{degQ}的-35 区和-10 区域突变为 σ^A、σ^B和 σ^H结合位点。其次，将这些启动子的特定区域变更为 DR，以提高 DegU-P 的结合活性，获得启动子 P_1、P_2和 P_3，通过相对荧光强度分析可以发现，3 种启动子的相对荧光强度排序为 P_2>P_1>P_3。启动子通过与 RNA 聚合酶结合发挥调节作用[23]，一般来说，较多的 sigma 因子可能更好地帮助启动子被 RNA 聚合酶识别[41]，具有更高的转录活性；同时，含有多个 sigma 因子的启动子也可能对恶劣环境具有较强的抗性。在 P_{degQ}的基础上，构建了启动子 P_4~P_8，相对荧光强度结果显示（见图 7），P_5的活性明显高于

其他启动子，而P_6的活性最低。较多的sigma因子结合位点可能并不总能提高启动子的相对转录强度，这可能是因为当启动子包含多个sigma因子结合位点时，下游sigma因子的结合可能导致上游sigma因子结合过程暂停，从而导致转录活性降低[41]。通过对原启动子P_{degQ}进行修饰改造，获得了一个相对转录强度为原启动子2.2倍的重组启动子P_5，并选择其作为后续试验的关键自诱导启动子。重组启动子核心的核苷酸序列见表3。



(a) 重组启动子结构示意图



(b) 重组启动子与原启动子P_{degQ}的相对转录强度对比

图7　重组启动子的构建与相对转录强度分析

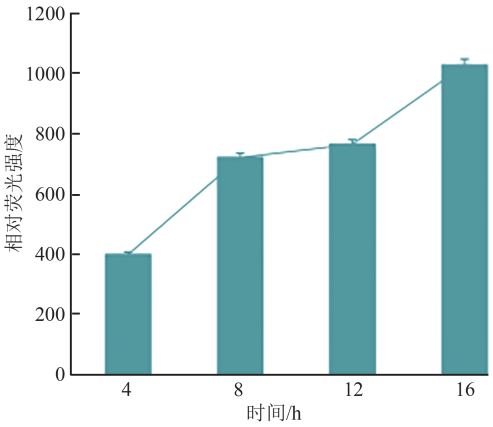
Fig. 7　Construction and relative transcription intensity of recombinant promoters

为了验证目标启动子P_5是否符合要求，用IPTG诱导的启动子$P_{grac100}$调控*degU*的表达后，通过加入不同浓度的IPTG来反映*degU*的表达强度。如图8(a)所示，在4~16 h时，随着时间的增加，启动子P_5的相对荧光强度逐渐增加，说明DegU-P可以有效调控启动子的转录。同时，如图8(b)所示，随着IPTG浓度的增加，种子液的相对荧光强度也逐渐增加，表明DegU-P浓度的增加对目标启动子转录活性的调控作用也逐渐增强。

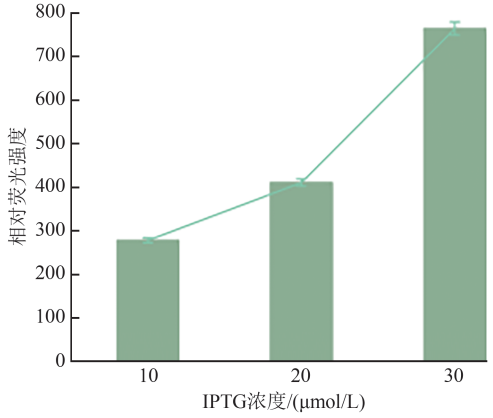
表3　重组启动子核心的核苷酸序列

Table 3　Nucleotide sequences of the recombinant promoter core

启动子	序列（5′—3′）
P_1	TTGACATTTTATTGCATTTATGTTATAAT
P_2	AGGTTTATTTAGGCTTGATTTTAGGGTAT
P_3	AGGAATTTTTATGTCTATTTACGAAT
P_4	AGGTTTTTGACATGATCTATTTAGGGTATTATAAT
P_5	AGGAATTTTGACATCTATTTACGAATTTGATATAAT
P_6	AGGTTTCTATTTAGGAATTTTTAGGGTATTTTACGAAT
P_7	AGGAATTTGACAAAGGTTTTACGAATTTTTATAATAAGGGTAT
P_8	AGGAATTATTTAGGTTTAAATCGAATTGACATTTGGGTATTCTATTTATATAAT



(a) 启动子P_5的相对荧光强度随时间的变化趋势



(b) 启动子P_5的相对荧光强度随IPTG浓度的变化趋势

图8　启动子P_5的功能验证

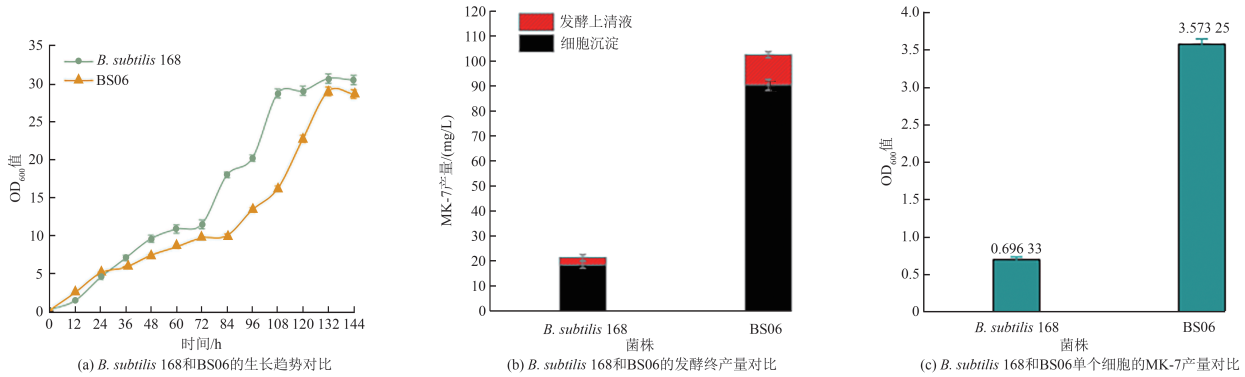
Fig. 8　Functional validation of the promoter P_5

2.4　PhrG-RapG-DegU群体感应系统调控*B. subtilis* 168中MK-7的合成

MK-7由萘醌环和异戊二烯侧链组成，其中萘醌环通过MK途径合成，异戊二烯侧链通过类异戊二烯磷酸生物合成途径和MEP途径合成。MEP途径产生2种有毒的中间代谢产物：二甲基烯丙基二

磷酸(DMAPP)和1-羟基-2-甲基-2-丁烯基-4-二磷酸(HMBPP),虽然对细胞生长有毒副作用,但这2种物质对异戊二烯侧链的合成必不可少。前文的结果已经表明,静态调控无法解决有毒中间体对细胞生长的毒副作用,也无法解决细胞生长和产物合成之间的矛盾。因此,作者构建了一个由细胞密度控制的动态调控元件,来调节相关代谢物的生物合成,控制代谢流向,缓解细胞生长和产物合成之间的矛盾。

在MEP途径中,中间代谢产物HMBPP可以在IspH的作用下合成DMAPP和IPP,而IPP的供应是MK-7高效合成的关键因素。*ispG*的表达很容易引起HMBPP的积累,过表达*ispH*可以消除IspG对细胞的毒性风险[42]。异戊二烯侧链HDP合成的最后一步是在HepS/T编码的庚烯基二磷酸合酶的作用下催化FPP合成。因此,在重组菌株BS03的基础上,利用重组启动子P_5表达*ispH*和*hepS/T*,获得重组菌株BS06,使相关基因的表达受到细胞密度的调控。如图9所示,在250 mL锥形烧瓶中重组菌株BS06的MK-7最大产量为102.47 mg/L,远高于原始菌株,证明了利用PhrG-RapG-DegU群体感应调控系统调控*B. subtilis* 168相关基因的表达,可实现菌株的高产。



(a) *B. subtilis* 168和BS06的生长趋势对比 (b) *B. subtilis* 168和BS06的发酵终产量对比 (c) *B. subtilis* 168和BS06单个细胞的MK-7产量对比

图9 发酵第6天*B. subtilis* 168和BS06的对比图

Fig. 9 Comparison of *B. subtilis* 168 and BS06 on day 6 of fermentation

作者利用PhrG-RapG系统与DegS/U的相互作用,构建了一个能够响应细胞密度变化的调控系统。然而,在*B. subtilis* 168中存在多个对MK-7合成有副作用的分支途径,这些途径的存在可能会减少碳代谢流向MK-7合成途径;同时特定基因的表达将与MK-7合成途径中的关键酶竞争底物,抑制MK-7的合成,但其表达的缺失会对细胞生长造成损害。在这种情况下,通过构建一个负调控启动子响应细胞密度,以调节分支途径的表达,在细菌生长的后期减少分支代谢物的合成,增加MK-7合成途径中碳代谢的流入,减少流出,以促进MK-7的合成。

3 结论

为了提高发酵过程中MK-7的产量,在*B. subtilis* 168中构建了一个PhrG-RapG-DegU群体感应调控系统。通过构建启动子文库,筛选获得了一个重组启动子P_5,其相对转录强度为启动子P_{degQ}的2.2倍。通过上调转录途径中关键基因的表达,使目标基因的表达受细胞密度的调控,将细胞生长与产物合成有机统一,实现细菌生长的自我调控。通过构建调控系统,目标菌株BS06在250 mL锥形烧瓶中的MK-7产量达到102.47 mg/L,实现了在*B. subtilis* 168中MK-7的高效合成,同时也为其他相关次生代谢物的生物合成提供了新思路。在该研究中只关注利用群体感应调控系统上调关键基因的表达及其对MK-7合成的影响,但关于负调控系统的研究较少。因此,在接下来的研究中,应关注*B. subtilis* 168中自抑制系统的构建及其对细胞生长和MK-7合成的影响,以及这2种系统的结合应用。

参考文献

[1] SCHURGERS L J, TEUNISSEN K J F, HAMULYÁK K, et al. Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K_1 and natto-derived

menaquinone-7[J]. Blood，2007，109(8)：3279-3283.

[2] 王永利，付刚，张子梦，等. 代谢工程改造枯草芽孢杆菌高效生产MK-7[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(8)：86-94.
WANG Y L，FU G，ZHANG Z M，et al. Efficient production of MK-7 by metabolic engineering in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(8)：86-94.(in Chinese)

[3] LOYAL J，DANZIGER P，WOOD K E. Midwives' perspectives about vitamin K prophylaxis against vitamin K deficiency bleeding of the newborn[J]. Maternal and Child Health Journal，2022，26(8)：1641-1648.

[4] 冯静静，吴静，李伟，等. 两阶段转速调控对纳豆芽胞杆菌合成维生素K_2的影响[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(2)：37-45.
FENG J J，WU J，LI W，et al. Effects of two-stage rotational speed regulation on vitamin K_2 synthesis by *Bacillus subtilis* natto[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(2)：37-45.(in Chinese)

[5] IVANOVA D，ZHELEV Z，GETSOV P，et al. Vitamin K：redox-modulation，prevention of mitochondrial dysfunction and anticancer effect[J]. Redox Biology，2018，16：352-358.

[6] BAJ A，WAŁEJKO P，KUTNER A，et al. Convergent synthesis of menaquinone-7 (MK-7)[J]. Organic Process Research & Development，2016，20(6)：1026-1033.

[7] REN L J，PENG C，HU X C，et al. Microbial production of vitamin K_2：current status and future prospects[J]. Biotechnology Advances，2020，39：107453.

[8] PUCAJ K，RASMUSSEN H，MØLLER M，et al. Safety and toxicological evaluation of a synthetic vitamin K_2，menaquinone-7[J]. Toxicology Mechanisms and Methods，2011，21(7)：520-532.

[9] ŁASZCZ M，TRZCIŃSKA K，KUBISZEWSKI M，et al. Structural and physicochemical studies of two key intermediates and the impurity in the new synthesis route of vitamin MK-7[J]. Journal of Molecular Structure，2018，1160：304-310.

[10] MAHDINIA E，DEMIRCI A，BERENJIAN A. Biofilm reactors as a promising method for vitamin K (menaquinone-7) production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2019，103(14)：5583-5592.

[11] 宋刚，曹春振，杨志馨，等. 群体感应调控下的乳酸菌细菌素合成[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(11)：12-17.
SONG G，CAO C Z，YANG Z X，et al. Bacteriocin synthesis of lactic acid bacteria under quorum sensing[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(11)：12-17.(in Chinese)

[12] MEHTA P，GOYAL S，LONG T，et al. Information processing and signal integration in bacterial quorum sensing[J]. Molecular Systems Biology，2009，5：325.

[13] YI L，DONG X，GRENIER D，et al. Research progress of bacterial quorum sensing receptors：classification，structure，function and characteristics[J]. Science of the Total Environment，2021，763：143031.

[14] 胡秀玲，熊利洋，魏云林. 革兰氏阳性菌群体感应系统研究进展[J]. 中国生物工程杂志，2023，43(1)：165-173.
HU X L，XIONG L Y，WEI Y L. Research progresses on quorum sensing system involved in gram positive bacteria[J]. China Biotechnology，2023，43(1)：165-173.(in Chinese)

[15] MORENO-GÁMEZ S，HOCHBERG M E，VAN DOORN G S. Quorum sensing as a mechanism to harness the wisdom of the crowds[J]. Nature Communications，2023，14：3415.

[16] GUPTA A，REIZMAN I M B，REISCH C R，et al. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit[J]. Nature Biotechnology，2017，35(3)：273-279.

[17] DE F CARDOSO P，PERCHAT S，VILAS-BOAS L A，et al. Diversity of the Rap-Phr quorum-sensing systems in the *Bacillus cereus* group[J]. Current Genetics，2019，65(6)：1367-1381.

[18] KIM E M，WOO H M，TIAN T，et al. Autonomous control of metabolic state by a quorum sensing (QS)-mediated regulator for bisabolene production in engineered *E. coli*[J]. Metabolic Engineering，2017，44：325-336.

[19] HU Y M，CAI Q X，TIAN S，et al. Regulator DegU is required for multicellular behavior in *Lysinibacillus sphaericus*[J]. Research in Microbiology，2018，169(3)：177-187.

[20] OGURA M，YOSHIKAWA H，CHIBAZAKURA T. Regulation of the response regulator gene degU through the binding of SinR/SlrR and exclusion of SinR/SlrR by DegU in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology，2014，196(4)：873-881.

[21] ERMOLI F. SwrA as global modulator of the two-component system DegSU in *Bacillus subtilis*[J]. Research in Microbiology，2021，172(6)：103877.

[22] MÄDER U，ANTELMANN H，BUDER T，et al. *Bacillus subtilis* functional genomics：genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics[J]. Molecular Genetics and Genomics，2002，268(4)：455-467.

[23] KOBAYASHI K. Gradual activation of the response

regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 66(2): 395-409.

[24] OGURA M, YAMAGUCHI H, KI Y, et al. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B. subtilis* two-component regulatory systems[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(18): 3804-3813.

[25] MURRAY E J, KILEY T B, STANLEY-WALL N R. A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour[J]. Microbiology, 2009, 155(1): 1-8.

[26] DAHL M K, MSADEK T, KUNST F, et al. The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(20): 14509-14514.

[27] TSUKAHARA K, OGURA M. Promoter selectivity of the *Bacillus subtilis* response regulator DegU, a positive regulator of the *fla*/*che* operon and *sacB*[J]. BMC Microbiology, 2008, 8: 8.

[28] COLLINS K M, EVANS N J, TORPEY J H, et al. Structural analysis of *Bacillus subtilis* sigma factors[J]. Microorganisms, 2023, 11(4): 1077.

[29] GUPTA M, RAO K K. Phosphorylation of DegU is essential for activation of amyE expression in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Biosciences, 2014, 39(5): 747-752.

[30] HAMOEN L W, VAN WERKHOVEN A F, VENEMA G, et al. The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(16): 9246-9251.

[31] GALLEGOS-MONTERROSA R, CHRISTENSEN M N, BARCHEWITZ T, et al. Impact of Rap-Phr system abundance on adaptation of *Bacillus subtilis*[J]. Communications Biology, 2021, 4: 468.

[32] TJALSMA H, KOETJE E J, KIEWIET R, et al. Engineering of quorum-sensing systems for improved production of alkaline protease by *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(3): 569-578.

[33] OGURA M, SHIMANE K, ASAI K, et al. Binding of response regulator DegU to the *aprE* promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2003, 49(6): 1685-1697.

[34] YAN X, YU H J, HONG Q, et al. Cre/lox system and PCR-based genome engineering in *Bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5556-5562.

[35] SAGGU G S, GARG S, PALA Z R, et al. Characterization of 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (IspG) from *Plasmodium vivax* and it's potential as an antimalarial drug target[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 96: 466-473.

[36] ALTINCICEK B, KOLLAS A K, SANDERBRAND S, et al. GcpE is involved in the 2-*C*-methyl-*D*-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(8): 2411-2416.

[37] HU L X, ZHAO M, HU W S, et al. Poly-γ-glutamic acid production by engineering a DegU quorum-sensing circuit in *Bacillus subtilis*[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(12): 4156-4170.

[38] 张琳,刘平,王阳,等. 枯草芽孢杆菌 P_{spovG} 启动子改造与表征[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(5):20-27.
ZHANG L, LIU P, WANG Y, et al. Engineering and characterization of *Bacillus subtilis* P_{spovG} promoter[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(5): 20-27.(in Chinese)

[39] 孙海烨,张梁,李由然,等. rDNA 介导的乳酸克鲁维酵母整合型表达载体的构建及初步验证[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(10):87-97.
SUN H Y, ZHANG L, LI Y R, et al. Construction and verification of a ribosomal DNA-mediated integrative expression vector in *Kluyveromyces lactis*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(10): 87-97.(in Chinese)

[40] HALDENWANG W G. The sigma factors of *Bacillus subtilis*[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 1-30.

[41] HOOK-BARNARD I G, HINTON D M. The promoter spacer influences transcription initiation *via* sigma70 region 1.1 of *Escherichia coli* RNA polymerase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(3): 737-742.

[42] WANG Y, SHI Y N, HU L T, et al. Engineering strong and stress-responsive promoters in *Bacillus subtilis* by interlocking sigma factor binding motifs[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2019, 4(4): 197-203.

(责任编辑:史润东东)