



# 大肠杆菌胞内半胱氨酸响应型启动子的筛选表征

刘雪琪, 傅雅雯, 李鲁华, 杨套伟\*, 饶志明

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

刘雪琪, 傅雅雯, 李鲁华, 杨套伟, 饶志明. 大肠杆菌胞内半胱氨酸响应型启动子的筛选表征[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1204-1216.

LIU Xueqi, FU Yawen, LI Luhua, YANG Taowei, RAO Zhiming. Screening and characterization of cysteine responsive promoters from *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1204-1216.

**摘要:** 【目的】半胱氨酸是一种重要的含硫氨基酸, 广泛应用于化妆品、药品、食品等行业, 微生物发酵法合成半胱氨酸已成为当前研究的热点。基于比较转录组学分析等技术, 筛选并表征大肠杆菌(*Escherichia coli*)胞内对半胱氨酸浓度变化显著响应的启动子。【方法】在 *Escherichia coli* W3110 培养基中外源添加不同终浓度的半胱氨酸, 通过比较转录组学分析筛选转录水平显著响应半胱氨酸浓度变化的基因, 融合目标基因的启动子片段与荧光报告基因 *egfp* 构建启动子文库, 进一步测定不同半胱氨酸浓度条件下, 含有不同启动子重组菌的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)荧光强度。【结果】筛选并挖掘了随着半胱氨酸浓度提高而转录水平显著提升的 27 个基因, 并将基因的潜在启动子片段与荧光报告基因 *egfp* 融合构建启动子文库, 筛选获得对半胱氨酸变化具备特异性响应的启动子  $P_{E2}$ 。最后, 对  $P_{E2}$  启动子-35 区间隔区域 AAAT 进行随机突变, 最终获得在 1-7 g/L 半胱氨酸浓度范围内特异性响应性能显著提高的启动子  $P_{E2-33}$ 。【结论】本研究筛选表征的启动子  $P_{E2-33}$  是半胱氨酸特异性响应型启动子, 为构建半胱氨酸特异性生物传感器并用于半胱氨酸高产菌的高通量筛选奠定了基础。

**关键词:** 大肠杆菌; 半胱氨酸; 启动子; 响应型

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100900); 江苏省自然科学基金(BK20221537)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100900) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20221537).

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85916881, E-mail: ytw1228@163.com

Received: 2022-07-20; Accepted: 2022-09-12; Published online: 2022-09-23

# Screening and characterization of cysteine responsive promoters from *Escherichia coli*

LIU Xueqi, FU Yawen, LI Luhua, YANG Taowei\*, RAO Zhiming

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] Cysteine is an important sulfur-containing amino acid. Biosynthesis of cysteine has recently attracted increasing attention owing to its widespread application in cosmetics, medicine, food and other industries. Development of an efficient biosensor is indispensable for the screening of increased cysteine producers among a mutation library. In this study, on the basis of comparative transcriptome analysis, we screened and characterized some promoters from *Escherichia coli* that show significant response to changes in the cysteine concentration. [Methods] *E. coli* W3110 was cultured in LB medium with different concentrations of cysteine, and genes which showed significant improvement at the transcription level were screened. Then, the promoter fragment was amplified and fused with the fluorescent reporter gene *egfp* to construct a promoter library. Furthermore, the fluorescence intensity of recombinant bacteria with different promoters under different cysteine concentration was determined with a multi-functional microplate analyzer. [Results] A total of 27 genes, whose transcription levels increased significantly with the rise of cysteine concentration, were screened out and identified. The promoter P<sub>E2</sub> with specific response to changes in cysteine concentration was singled out. Subsequently, random mutation of AAAT was carried out in the P<sub>E2</sub> promoter -35 spacer region and we found that mutant promoter P<sub>E2-33</sub> had a higher specific response to the cysteine concentration range of 1–7 g/L. [Conclusion] The obtained promoter P<sub>E2-33</sub> in this study is a cysteine-specific response promoter, which lays a foundation for the construction of cysteine-specific biosensor and the high-throughput screening of cysteine-producing bacteria.

**Keywords:** *Escherichia coli*; cysteine; promoter; response

半胱氨酸分子内含活性巯基, 具有强还原力, 是一种重要的含硫氨基酸<sup>[1-2]</sup>。半胱氨酸具有多种重要的生理功能, 不仅可以增强肝功能、解除苯中毒、促进毛发生长, 还参与胶原蛋白的生成<sup>[3]</sup>, 因此被广泛应用于化妆品、药品、食品等行业<sup>[4]</sup>。微生物发酵法合成半胱氨酸已成为当前研究的热点<sup>[5]</sup>, 目前相关研究主要集中在对半胱氨酸代谢网络进行改造, 以提高半胱氨酸的产量。2019年 Kondoh 等<sup>[6]</sup>在谷

氨酸棒杆菌中过表达突变的 *cysE* 和 *serA* 基因, 以及破坏 *aecD* 和 *NCgl2463* 参与半胱氨酸降解和胱氨酸合成途径基因, 半胱氨酸的产量达 200 mg/L。同年 Wei 等<sup>[7]</sup>通过组合代谢工程策略对谷氨酸棒杆菌进行代谢改造, 主要包括优化半胱氨酸合成途径、敲除半胱氨酸降解途径基因、优化硫源等策略, 最终获得的重组谷氨酸棒杆菌 CYS-19 能够积累(947.9±46.5) mg/L 半胱氨酸。2020年 Liu 等<sup>[8]</sup>通过多途径改造

*E. coli* BW25113 成功构建了半胱氨酸高产菌株, 摇瓶发酵产量达(1 723.93±31.44) mg/L, 在 1.5 L 反应器中可积累 8.34 g/L 半胱氨酸。2021 年 Zhang 等<sup>[9]</sup>通过优化重组大肠杆菌合成半胱氨酸的发酵条件, 使重组大肠杆菌在摇瓶发酵水平半胱氨酸产量达到 3.85 g/L, 在 2 L 发酵罐水平半胱氨酸产量达到 10.25 g/L, 是目前报道的利用大肠杆菌生产半胱氨酸的最高水平。由于半胱氨酸代谢网络复杂, 涉及调控基因较多<sup>[10-11]</sup>, 目前代谢工程改造获得的菌株还不能满足工业化生产的需求。因此, 需要挖掘新的代谢调控节点, 以便进一步提高菌株合成半胱氨酸的性能。

通过物理或化学诱变技术可以获得成千上万个突变菌株, 是筛选新的调控靶点的常用技术手段。然而, 这需要建立高效的高通量筛选方法。小分子生物传感器是当下合成生物学研究的热点, 它具有多方面的应用, 如检测生物体内代谢物的水平、构建高通量筛选方法筛选正向突变株、直接或间接指示微生物合成目标产物的水平等<sup>[12]</sup>。目前利用特异性小分子构建半胱氨酸生物传感器的相关研究甚少, Takumi 等<sup>[13]</sup>在菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*)内发现了一个新的编码半胱氨酸脱硫酶基因 *ccdA*, 其表达受上游转录调控因子 *ccdR* 调控。研究人员认为, *ccdA* 是第一个被发现受半胱氨酸诱导表达的基因, 其主要生理作用与半胱氨酸的解毒密切相关。Liu 等<sup>[14]</sup>通过将菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*)的 *ccdR* 基因和 *ccdA* 基因的启动子片段与荧光报告基因 *gfp* 相融合, 构建了半胱氨酸单细胞生物传感器, 在 0–32 mmol/L 的半胱氨酸浓度下, 荧光信号强度与半胱氨酸浓度之间具有良好的线性关系。小分子生物传感器通过将启动子响应代谢物浓度变化与荧光报告蛋

白亮度相耦联<sup>[15-16]</sup>, 通过检测荧光强度进而筛选出代谢物积累较多的菌株<sup>[17]</sup>。本研究对不同半胱氨酸浓度压力下培养的 *E. coli* W3110 进行了比较转录组分析, 旨在找寻大肠杆菌胞内对半胱氨酸特异性响应的启动子, 为构建高效半胱氨酸特异性生物传感器奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* W3110、*E. coli* JM109、质粒 pET28a 由本实验室保藏。本研究所用引物如表 1 所示。

#### 1.1.2 酶和试剂

*Xho* I、*Bam*H I、*Dpn* I 限制性核酸内切酶、DNA 聚合酶, TaKaRa 公司; 高保真酶、同源重组酶克隆试剂盒、感受态制备试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒、细菌 DNA 基因组提取试剂盒, 上海捷瑞生物工程有限公司; 卡那霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白胨和酵母粉, OXOID 公司; 氯化钠、磷酸盐缓冲液、氨基酸分析纯试剂, 国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0。LB 固体培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 20.0。

### 1.2 质粒提取、基因组提取

质粒提取按照上海捷瑞生物工程有限公司质粒提取试剂盒说明书方法提取, 基因组提取按照上海捷瑞生物工程有限公司细菌基因组提取试剂盒说明书方法提取。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
pET28a-F1/R1	GCCATCATCATCATCACAGCAG/GTTTAGAGGCCCAAGGGTAT
pET28a-F2/R2	CACTCGAGCACCACCACC/CATTATATCTCCTTCTTGGATCCGCGACCCATTTGC
pET28a-F3/R3	GATCGAGATCGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCT/TCACAATTCCGATCTCGATCCTCTACG CCGGAC
pET28a-F4/R4	AAGAAGGAGATATAATGGGTAAGGGAGAAGA/ GGATCCGCGACCCATTTGC
egfp-F	AAGAAGGAGATATAATGGGTAAGGGAGAAGAACTTTTCACT
egfp-R	GTGGTGGTGGTGTCTCGAGTGTATTGTTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCC
E1-F	CAAATGGGTCGCGGATCCGCGTGGTGGTGACGATCATC
E1-R	ACCCATTATATCTCCTTCTTTGTTATTCTTTTTTTGGCAGGGTGATAAT
E2-F	CAAATGGGTCGCGGATCCCCCGCAGAAATGGCGGAAGT
E2-R	ACCCATTATATCTCCTTCTTGAATAGAAAGATTCTTTATTTGTCTATGTGC
E3-F	CAAATGGGTCGCGGATCCAGCTTTTCATTCTGACTGCAACGG
E3-R	ACCCATTATATCTCCTTCTTGGTTGTTACCTCGTTACCTTTGGTTCG
E4-F	CAAATGGGTCGCGGATCCTGGCGAAGCGAAAGATGACGACA
E4-R	CCCATTATATCTCCTTCTTAGCATTTCCTTTTTTCTATCCACGGGA
K1-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCTATTAAGAGAGATAAACATTTGCCGCTGTTGG
K1-R	ACCCATTATATCTCCTTCTTATTTTACTTCCTTCATTTGGGCCTTTCG
K2-F	CAAATGGGTCGCGGATCCGGAATGCTCACCAACATGCTCGG
K2-R	CCCATTATATCTCCTTCTTAATTATTACCTTTTGAAGAAATTAGCCCTTGGG
R1-F	CAAATGGGTCGCGGATCCACAAAATGCGCGGCACTGG
R1-R	ACCCATTATATCTCCTTCTTCTTCTCTCCATTCACTGATAAGGCG
S1-F	CAAATGGGTCGCGGATCCGCGAGATTAACCTTCCCGGCCA
S1-R	CCCATTATATCTCCTTCTTTGGAATGATCTCCTCGAAAATTTATTTACATTACTG
G1-F	CAAATGGGTCGCGGATCCTGTCAGCGTCGAGGCGGAG
G1-R	CCCATTATATCTCCTTCTTGTTTTTTCTTGTAAATGGCAGGTGC
G2-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCCGGTGAACTGACCTCAGCGATG
G2-R	CCCATTATATCTCCTTCTTTTTTCATATCCTGTCGTTTGTTCGATTCA
G3-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCATCGGTTACTGGTGGAACTGACT
G3-R	CCCATTATATCTCCTTCTTAATTGAGAGTGCTCCTGAGTATGGG
G4-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCTGTTTCATTTCGCGGGTTTGAAATGG
G4-R	CCCATTATATCTCCTTCTTTGAAATCCTTGCTAAATATGCCTGTAGATC
P1-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCGGTCGCGGAATAATTTTGTGGAGC
P1-R	CCCATTATATCTCCTTCTTTGGTAACCCCTTAATGTAACGTTATGTAGG
P2-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCATTGCGGGCGATTTAACAATGC
P2-R	CCCATTATATCTCCTTCTTAATGCGACCAATAATCGTAATGAATATGAGAAG
P3-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCTTTCGCGATTTCATCTGCGGTG
P3-R	CCCATTATATCTCCTTCTTTTCGTCATTTCAGACGCTGCCA
C1-F	AGCAAATGGGTCGCGGATCCCTTCAGCATATTTGTTGGTCAGCTG
C1-R	CCCATTATATCTCCTTCTTATGGTCTTCTTTTTTTGCATCTTAATTGATGT
J1-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCAGCTATGGGTGCTTTGGATAGTAAAAGC
J1-R	CCCATTATATCTCCTTCTTGGAGACCAGAGCTCCAATTATTTATAAACGAAA
J2-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCAGCAGGTTCAATCTGAACCTCAGT

(待续)

(续表 1)

Primers	Sequences (5'→3')
J2-R	CCCATTATATCTCCTTCTTTGTTTCAACCTCTCAATCGCTCAATGAC
M1-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCGGGTGTTGCTGACGCCATTAAG
M1-R	CCCATTATATCTCCTTCTTTGTTGTTTGTTCCTTGAAGTCCTTAACG
O1-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCGAGCCACCTGATCAGGATCATTTTG
O1-R	CCCATTATATCTCCTTCTTCGATTTTCTTTCTTAGGGTATAAAGTAGCG
O2-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCCGTTGCTCTACCCTATCGCC
O2-R	CCCATTATATCTCCTTCTTTGACTCCTCCATTTGGCTGTCAG
O3-F	AGCAAATGGGTCGCGGATCCCAGCCTCGAATCTGTATTGAAGTCC
O3-R	ACCCATTATATCTCCTTCTTGATTCGATTTCCGTTTAAAATGAAGATACGGC
F1-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCGTTGCGTGCTCAGGGCTTTC
F1-R	CCCATTATATCTCCTTCTTATTCGGTTACTCCTTTACGAACGTT
F2-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCGACACGCTGTGCACCGATGAC
F2-R	CCCATTATATCTCCTTCTTGCGTCTTAAACTCCTGTGGTGCA
F3-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCCCGTTCCAGCCTTCGATAGTTACT
F3-R	CCCATTATATCTCCTTCTTTGCTTGGGTCCCCACGCGTTA
Q1-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCCAGTGTATGTGTGCCACGGC
Q1-R	CCCTTACCCATTATATCTCCTTCTTATCATCCTCCACAAAATGATAAAGGCT
D1-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCGACGGCGCTGGTCACACTG
D1-R	CCCTTACCCATTATATCTCCTTCTTAGCTGATACCTCATTCTTAATAAGATAAGATGT
E2-N-F/R	TTTATCACGCNNNNAATTTGTGGTGATCTACAC/TCACCACAAATTNNNNGCGTGATAAAAAGCTA TTTG

### 1.3 比较转录组测序

首先将 *E. coli* W3110 菌株于 37 °C、180 r/min 条件下活化培养 10 h，以 1% 的接种量转接至含有已灭菌 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中，37 °C、180 r/min 培养至  $OD_{600}$  值约为 0.4；随后分别添加终浓度为 0、3、6、10 g/L 的半胱氨酸，继续培养 6 h 后收集菌体，并用液氮冷冻，送至苏州金唯智生物科技有限公司进行比较转录组测序分析。

### 1.4 质粒构建

根据同源重组酶克隆试剂盒说明书，计算目的片段与载体片段混合体系。在同源重组酶的作用下，37 °C 水浴条件下连接 1 h，取连接后的重组质粒化学转化入 *E. coli* JM109 感受态中。以引物 pET28a-F1 和 pET28a-R1 进行聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 验证，挑选阳性克隆，按照 1.2 所述方法提取

质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司测序验证。

### 1.5 孔板培养

24 深孔板培养菌株的接种量为 1%，培养条件为 37 °C、600 r/min。每个孔含有 2.5 mL 已灭菌 LB 培养基、终浓度为 50 μg/mL 卡那霉素和不同终浓度的半胱氨酸。

### 1.6 GFP 荧光测定

将 1 mL 待测菌液 12 000 r/min 离心 1 min，用等体积磷酸盐缓冲液洗涤重悬 2 遍，稀释至  $OD_{600}$  值约为 0.4，向黑色避光酶标板中每个孔加入 200 μL 稀释液后，采用多功能酶标仪 Biotek 设定激发波长 485 nm、发射波长 528 nm 进行荧光测定，并测定  $OD_{600}$  吸光值，计算荧光值比吸光值，比较相对荧光强度。

### 1.7 构建启动子突变文库

以提取的质粒 pE2-egfp 作为模板，以引物

E2-N-F 和 E2-N-R 进行 PCR 扩增, PCR 产物在 *Dpn* I 的作用下 37 °C 消化 1 h, 将消化后的产物化学转化入 *E. coli* W3110 感受态细胞中, 将重组细胞涂布在 LB 固体培养基(含 50 µg/mL 卡那霉素)放置 37 °C 培养箱内培养 10 h, 菌落 PCR 筛选鉴定后, 建立 E2 启动子突变文库。挑选菌落至含有不同浓度半胱氨酸的 LB 液体培养基(含 50 µg/mL 卡那霉素)中, 在 96 孔板中培养至  $OD_{600}$  值约为 0.5 后测定荧光强度。将正向突变菌株扩增培养提取质粒, 送至苏州金唯智生物科技有限公司测序验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 比较转录组分析

通过比较转录组数据分析, 筛选得到不同半胱氨酸浓度下转录水平相对于对照组提升 20 倍以上的 27 个基因, 其转录水平差异如图 1

所示。该 27 个基因分别属于 E 氨基酸运输与代谢、K 基因转录、R 一般功能预测、S 未知功能、G 碳水化合物运输和代谢、P 无机离子的转运与代谢、C 能量生产和转化、J 翻译、M 细胞膜、O 翻译后修饰、F 核苷酸运输和代谢、Q 次级代谢物的合成转运和分解、D 细胞周期控制, 对应基因的启动子以基因功能缩写的字母序号命名(表 2)。

### 2.2 启动子文库构建与筛选

以 pET28a 为骨架质粒, 以实验室已有的 *egfp* 基因片段为模板, 以引物 *egfp*-F 和 *egfp*-R 进行 PCR 扩增, 如前述方法 1.4 进行质粒构建。挑选阳性克隆提质粒测序正确后, 通过设计带有同源臂的引物 pET28a-F3 和 pET28a-R3, 以 pET28a-*egfp* 为模板反向 PCR 去除 T7 启动子序列片段, 琼脂糖凝胶电泳纯化回收并送至苏州金唯智生物科技有限公司测序验证。

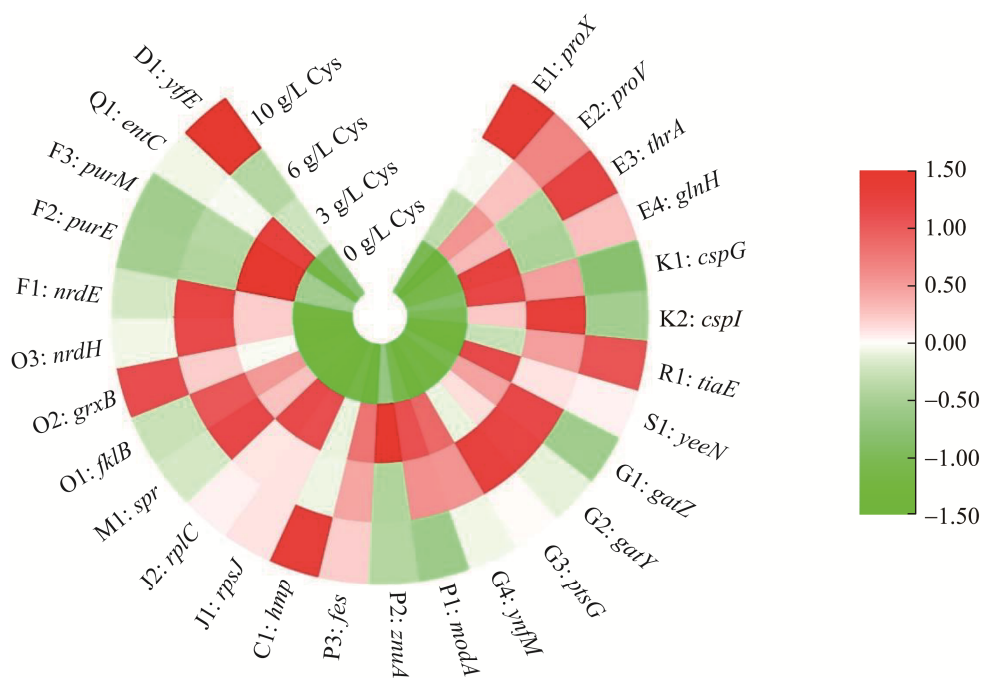


图 1 不同半胱氨酸浓度下 *Escherichia coli* W3110 转录水平显著提高基因

Figure 1 The transcription level of *Escherichia coli* W3110 significantly increased under different cysteine concentrations.

表 2 27 个转录水平提高基因

Table 2 27 genes with elevated transcription levels

Code	Gene name	Function
E1	<i>proX</i>	Amino acid transport and metabolism
E2	<i>proV</i>	Amino acid transport and metabolism
E3	<i>thrA</i>	Amino acid transport and metabolism
E4	<i>glnH</i>	Amino acid transport and metabolism
K1	<i>cspG</i>	Transcription
K2	<i>cspI</i>	Transcription
R1	<i>tiaE</i>	General function prediction
S1	<i>yeeN</i>	Function unknown
G1	<i>gatZ</i>	Carbohydrate transport and metabolism
G2	<i>gatY</i>	Carbohydrate transport and metabolism
G3	<i>ptsG</i>	Carbohydrate transport and metabolism
G4	<i>ynfM</i>	Carbohydrate transport and metabolism
P1	<i>modA</i>	Inorganic ion transport and metabolism
P2	<i>znuA</i>	Inorganic ion transport and metabolism
P3	<i>fes</i>	Inorganic ion transport and metabolism
C1	<i>hmp</i>	Energy production and conversion
J1	<i>rpsJ</i>	Translation
J2	<i>rplC</i>	Translation
M1	<i>spr</i>	Membrane
O1	<i>flkB</i>	Posttranslational modification
O2	<i>grxB</i>	Posttranslational modification
O3	<i>nrdH</i>	Posttranslational modification
F1	<i>nrdE</i>	Nucleotide transport and metabolism
F2	<i>purE</i>	Nucleotide transport and metabolism
F3	<i>purM</i>	Nucleotide transport and metabolism
Q1	<i>entC</i>	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
D1	<i>ytfE</i>	Cell cycle control

通过 KEGG 和 Softberry 查询并预测转录水平显著提高的 27 个基因包含潜在启动子的前 500 bp 序列, 设计对应带有同源臂的引物, 以 *E. coli* W3110 基因组为模板扩增出目的基因上游 500 bp 序列片段, 如前述方法 1.4 构建含有不同启动子的质粒。挑选阳性克隆并提取质粒, 送至苏州金唯智生物科技有限公司测序验证正确后, 再将重组质粒化学转化入 *E. coli* W3110 感受态中, 获得包含 27 个启动子的文库(图 2)。

将每个启动子重组菌株分别在含 0、1、2、3 g/L 半胱氨酸的 96 孔板中进行培养。培养至  $OD_{600}$  值约为 0.5, 转移至 96 孔黑色酶标板中进行荧光强度测定, 测定结果如图 3 所示。对初筛启动子半胱氨酸浓度与相对荧光强度进行线性回归分析, 以回归系数大于 1 500 作为筛选标准。筛选到 6 个重组菌株相对荧光强度随半胱氨酸浓度提高, 分别为 E2、P2、M1、O3、F3、S1, 如表 3 所示。

### 2.3 启动子响应半胱氨酸浓度灵敏性与特异性分析

将分别含 6 个不同启动子的重组菌 E2、P2、M1、O3、F3、S1 菌株培养至  $OD_{600}$  值约为 0.4, 之后分别添加半胱氨酸终浓度为 0、1、2、3、5、7 g/L, 继续培养 2.5 h。可以观察到, 随着半胱氨酸浓度提高, E2、P2、M1 启动子重组菌菌体变绿明显(表 4)。由于半胱氨酸为含硫氨基酸, 部分半胱氨酸经过胞内代谢为硫化氢, 产生的硫化氢与培养基内的微量元素生成沉淀, 推测对照组菌体颜色加深的原因与此相关。因此, 为了排除菌体颜色中非荧光的干扰, 采用多功能酶标仪测定 GFP 荧光强度以进一步确定启动子强度(图 4)。对复筛启动子半胱氨酸浓度与荧光强度进行线性回归分析, 以回归系数大于 1 500 作为筛选标准(表 3)。筛选到启动子 E2 和 M1 相对于其余 4 个启动子对半胱氨酸浓度变化响应更加明显。以不添加半胱氨酸作为对照, 半胱氨酸添加浓度为 1 g/L 时, E2 相对荧光强度为 108.29%, M1 相对荧光强度为 108.19%; 半胱氨酸添加浓度为 2 g/L 时, E2 相对荧光强度为 120.19%, M1 相对荧光强度为 112.77%; 半胱氨酸添加浓度为 3 g/L 时, E2 相对荧光强度为 137.76%, M1 相对荧光强度为 125.63%; 半胱氨酸添加浓度为 5 g/L 时, E2 相对荧光强度为 152.46%, M1 相对荧光强

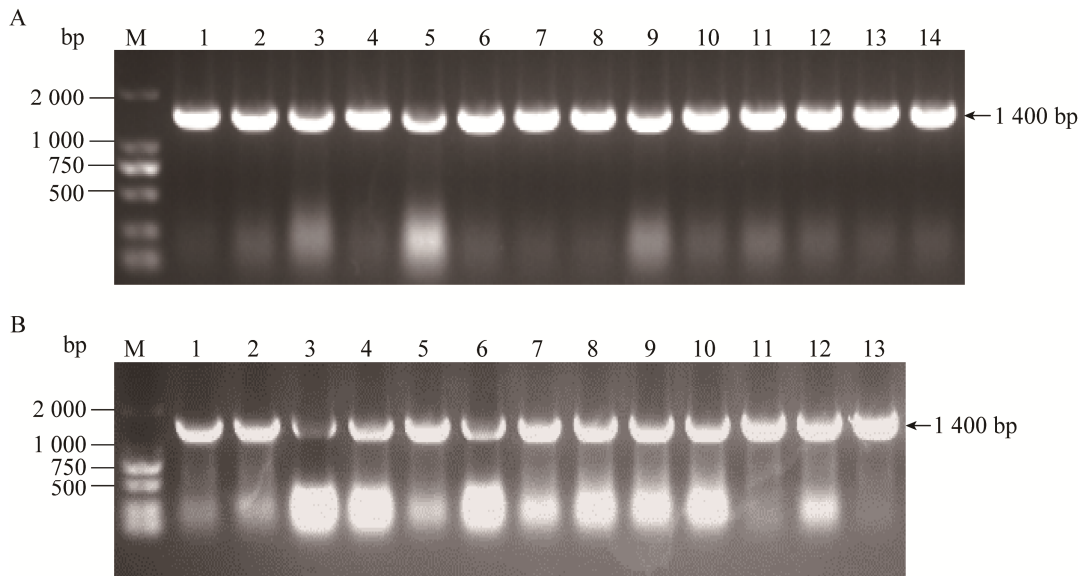


图 2 重组菌启动子菌落 PCR 验证

Figure 2 PCR validation of different promoter recombinant strains. A: PCR validation of E1–P2. Lane 1–14: Result of recombinant strain E1, E2, E3, E4, K1, K2, R1, S1, G1, G2, G3, G4, P1, P2. B: PCR validation of P3–D1. Lane 1–13: Result of recombinant strain P3, C1, J1, J2, M1, O1, O2, O3, F1, F2, F3, Q1, D1. M: DL2000 Marker.

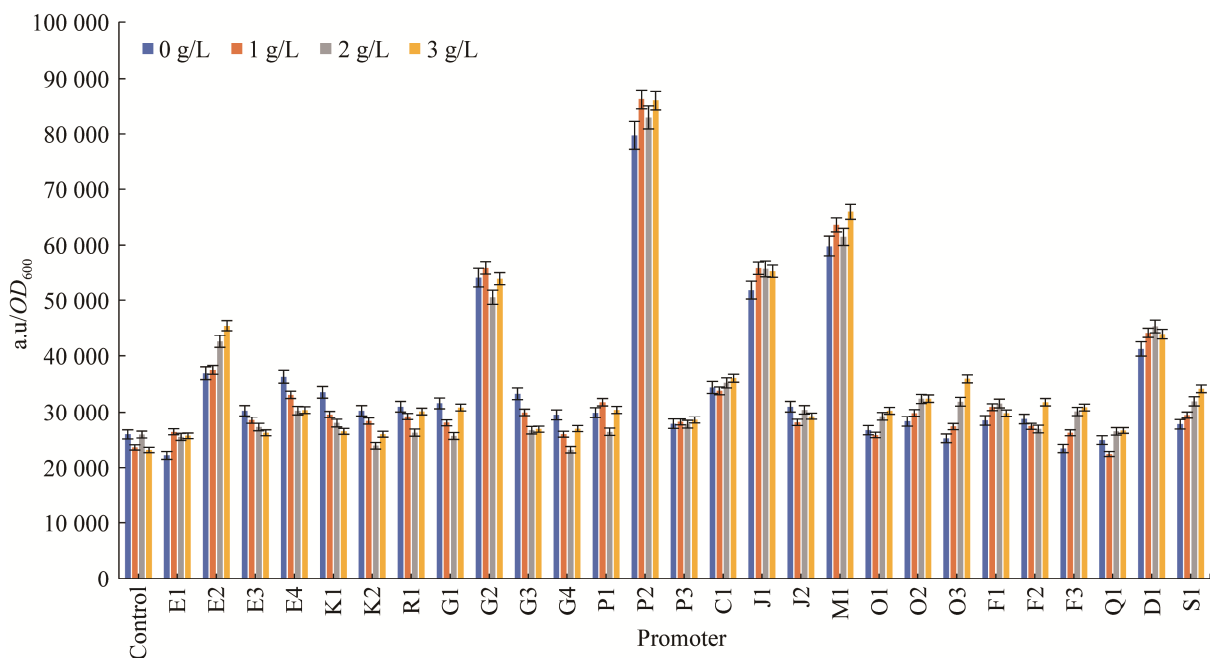


图 3 27 个启动子在不同半胱氨酸浓度下相对荧光强度比较

Figure 3 Comparison of fluorescence intensity of 27 promoters at different cysteine concentrations. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.



**表 3 启动子的半胱氨酸浓度与相对荧光强度相关性分析**

Table 3 Correlation analysis of cysteine concentration and fluorescence intensity of promoters

Code	Cys (g/L)	Linear regression equation	$R^2$
E2	0-3	$y=3\ 066.1x+32\ 934$	0.929 3
P2	0-3	$y=1\ 550.4x+79\ 860$	0.430 6
M1	0-3	$y=1\ 642.2x+58\ 603$	0.626 9
O3	0-3	$y=3\ 669.6x+20\ 913$	0.980 6
F3	0-3	$y=2\ 629.6x+21\ 078$	0.944 6
S1	0-3	$y=2\ 162.5x+25\ 431$	0.994 6
E2	0-7	$y=1\ 813.7x+18\ 181$	0.982 4
M1	0-7	$y=2\ 174.1x+54\ 216$	0.787 2
E2-33	0-7	$y=2\ 652.1x+24\ 367$	0.935 1

度为 130.99%；半胱氨酸添加浓度为 7 g/L 时，E2 相对荧光强度为 168.60%，M1 相对荧光强度为 127.75%。

用 17 种常见氨基酸(半胱氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸)分别诱导培养，观察启动子是否对半胱氨酸具有特异性响应。将含有 E2 和 M1 启动子的重组菌，在初始添加 1 g/L 和 5 g/L 的 17 种常见氨基酸的 LB 培养基中进行培养，并分别测定 GFP 荧光强度。E2 启动子对半胱氨酸











































特异性响应如图 5 所示，外源添加半胱氨酸浓度由 1 g/L 增加至 5 g/L 时，相对荧光强度由 17 599.19 增加至 29 848.76，提高了 64.92%；而在另外 16 种氨基酸浓度由 1 g/L 增加至 5 g/L 时，相对荧光强度基本没有变化，说明 E2 启动子对半胱氨酸具有特异性响应；由图 6 可以看出 M1 启动子响应半胱氨酸的相对荧光强度与其他 16 种氨基酸差异并不显著，推测 M1 启动子为较强组成型启动子。

#### 2.4 随机突变启动子 E2 优化响应半胱氨酸

为进一步提高 E2 启动子对半胱氨酸浓度变化响应的灵敏性，我们采用细菌启动子在线预测工具 Softberry 对 E2 启动子进行预测，进一步确定其启动子元件。原核生物启动子的-35 区和-10 区为保守序列，是 RNA 聚合酶的关键结合区域。有研究表明原核生物中-35 区至-10 区之间间隔区域核苷酸的改变会影响基因转录活性的高低，对间隔区域靠近-10 区进行高 GC 含量的突变有可能会启动子转录活性的下降<sup>[18-19]</sup>。因此我们选择对 E2 启动子靠近-35 区的间隔区域富含 AT 的区域进行随机突变(图 7)，突变后共挑选 500 个单菌落进行筛选，最终筛选到正向突变株 E2-31 和 E2-33 (图 8)，其中 E2-33 整体相对荧光强度较 E2 提

**表 4 菌体颜色随半胱氨酸浓度变化**

Table 4 The color of bacteria varies with cysteine concentration

Cys (g/L)	Control	E2	P2	M1	O3	F3	S1
0							
1							
2							
3							
5							
7							

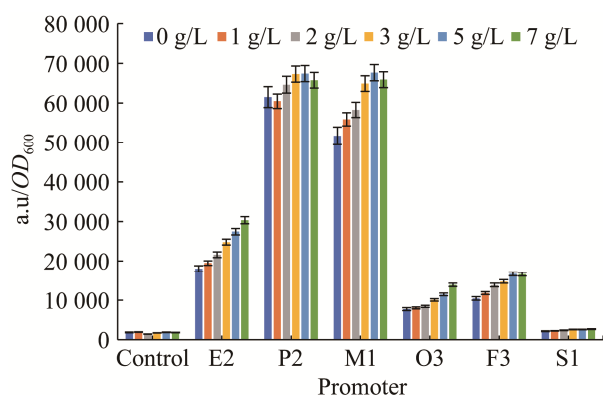


图 4 六个启动子在不同半胱氨酸浓度下相对荧光强度比较

Figure 4 Comparison of fluorescence intensity of 6 promoters at different cysteine concentrations. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

高了 15.57%。以不添加半胱氨酸作为对照, 半胱氨酸为 1 g/L 时, E2-33 相对荧光强度为 115.13%, 较 E2 提高了 6.84%; 半胱氨酸为 2 g/L 时, E2-33 相对荧光强度为 141.32%, 较 E2 提高了 21.13%; 半胱氨酸为 3 g/L 时, E2-33 相对荧光强度为 153.70%, 较 E2 提高了 15.94%; 半胱氨酸为

5 g/L 时, E2-33 相对荧光强度为 167.88%, 较 E2 提高了 15.42%; 半胱氨酸为 7 g/L 时, E2-33 相对荧光强度为 184.17%, 较 E2 提高了 15.57%。最终筛选获得 E2-33 突变株启动子在 0–7 g/L 半胱氨酸范围内, 线性回归系数由 1 813.7 提升至 2 652.1, 说明 E2-33 对半胱氨酸响应性能提高(表 3)。提质粒进行测序, 其间隔区由 AAAT 突变为 CTGC。荧光强度的提高, 为构建半胱氨酸特异性生物传感器进一步奠定了基础。

### 3 讨论与结论

半胱氨酸作为一种重要的氨基酸, 其代谢途径涉及多种酶和产物, 可调节诸如氧化应激、能量代谢和细胞自噬等生理和病理过程。微生物代谢改造合成半胱氨酸已成为当前研究的热点<sup>[4]</sup>, 然而目前的代谢工程改造获得的菌株还不能满足工业化生产的需求, 需要挖掘新的代谢调控节点, 以便进一步提高菌株合成半胱氨酸的性能。诱变技术是挖掘新的调控靶点的常用技术手段, 然而, 这需要高效的高通量筛选方法与之配合。小分子生物传感器在微生

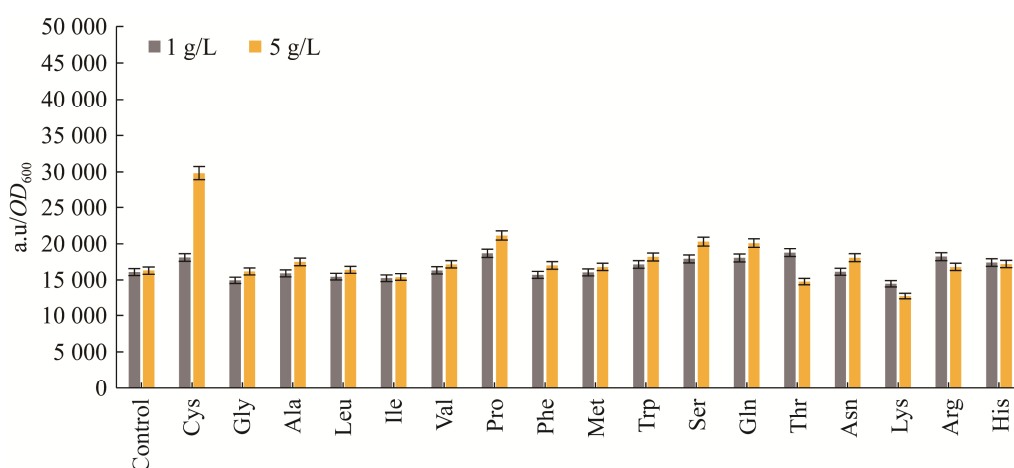


图 5 E2 启动子重组菌在不同常见氨基酸下相对荧光强度比较

Figure 5 Comparison of fluorescence intensity of recombinant bacteria with E2 promoter under different common amino acids. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

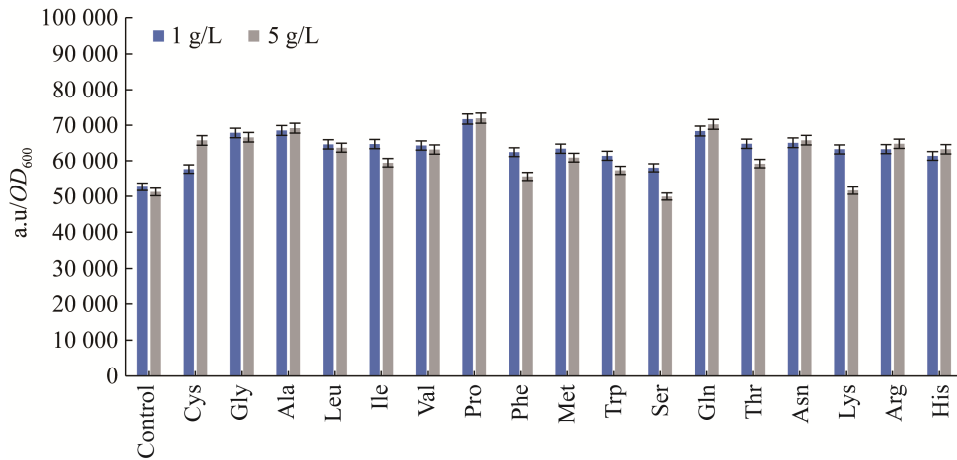


图 6 M1 启动子重组菌在不同常见氨基酸下相对荧光强度比较

Figure 6 Comparison of fluorescence intensity of recombinant bacteria with M1 promoter under different common amino acids. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

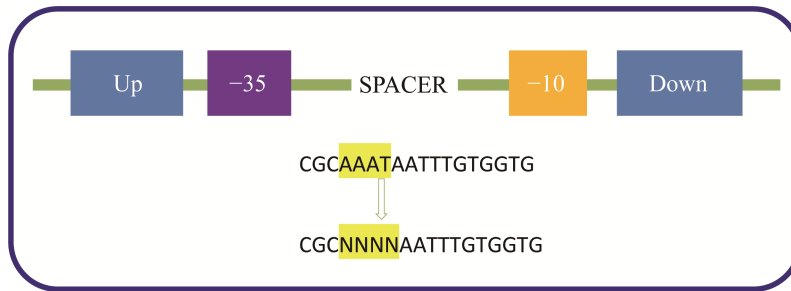


图 7 E2 启动子间隔区域随机突变

Figure 7 Random mutations in the E2 promoter spacer region.

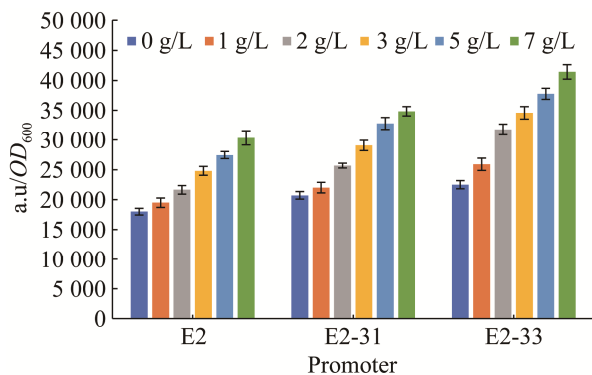


图 8 E2 突变体在不同半胱氨酸浓度下相对荧光强度比较

Figure 8 Comparison of fluorescence intensity of E2 mutants at different cysteine concentrations. The standard deviations of the data points were obtained from triplicate measurements and denoted by error bars.

物细胞工厂中的主要应用包括高产菌株的高通量筛选和微生物胞内代谢的动态调控<sup>[20]</sup>，如以 TyrR 为元件的检测苯丙氨酸的传感器<sup>[21]</sup>，以 Lrp 为元件的检测蛋氨酸和支链氨基酸的传感器<sup>[22]</sup>等。Liu 等<sup>[23]</sup>基于核糖开关 ribo727 构建色氨酸生物传感器，有效筛选到色氨酸产量较初始菌株提升至 165.9% 的正向突变株。Dahl 等<sup>[24]</sup>发现法尼焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)的压力响应特性，利用 FPP 存在下下调基因的启动子控制 FPP 的合成，而被 FPP 激活的启动子用于调控下游产物紫穗槐二烯的合成，这种利用代谢调控的生物传感器策略使紫穗槐二烯产量增加了 2 倍。目前有关半胱氨酸特异性生物

传感器的研究较少, Liu 等<sup>[14]</sup>构建的半胱氨酸单细胞生物传感器能在 0–32 mmol/L 的半胱氨酸浓度下, 荧光信号强度与半胱氨酸浓度之间具有良好的线性关系。本研究通过比较转录组学分析、融合报告基因构建技术和分子突变技术, 最终筛选并表征 1 个能在 0–7 g/L 半胱氨酸范围内特异性响应半胱氨酸浓度变化的启动子  $P_{E2-33}$ , 为建立构建半胱氨酸特异性生物传感器奠定基础, 进而为构建高效微生物细胞工厂提供可能。

通过外源添加半胱氨酸和转录组学分析, 筛选获得了转录水平对半胱氨酸浓度变化具有显著响应的 20 余种基因, 其主要参与了氨基酸运输与代谢、碳水化合物运输和代谢、无机离子的转运与代谢、核苷酸运输和代谢及次级代谢物的合成转运和分解, 特别是响应最显著的 E2 基因编码蛋白, 主要负责氨基酸运输与代谢。外源添加半胱氨酸会对大肠杆菌生理与代谢产生外界刺激, 作为生理应答, 参与氨基酸运输与代谢的基因/蛋白会被诱导加强表达, 这可能是这些基因的启动子强度响应半胱氨酸浓度变化的原因, 特别是 E2 基因的启动子可能会有半胱氨酸结合或响应区域, 相关区域突变后,  $P_{E2-33}$  会对半胱氨酸响应更加灵敏, 具体的结合或响应区域, 我们会在后续研究中详细探讨。利用转录组测序获得的 27 个基因转录水平上调 20 倍以上, 而利用 GFP 报告基因测定启动子强度时并没有这么大的差异, 主要原因可能是: 利用 GFP 报告基因测定启动子强度时, 主要是比较 GFP 蛋白表达的差异, 通过比较转录组测序分析时, 主要初步探究基因转录水平的高低, 而从转录组到蛋白质组要经历一个复杂且精细的调控阶段, 细胞中的蛋白丰度主要由翻译水平控制。因此在利用 GFP 报告基因从翻译水平测定启动子强度时,

其差异并没有基因转录水平差异大。目前获得的启动子  $P_{E2-33}$  响应半胱氨酸浓度梯度变化具有较好的特异性和显著性, 本研究构建的  $P_{E2-33}$  启动子耦联荧光报告蛋白的小分子生物传感器, 可以用于后续高效筛选通过诱变育种后半胱氨酸产量显著提升的突变菌株, 为未来获得新的改造靶点、揭示半胱氨酸合成机制和构建具有工业化应用前景的菌株奠定基础。

### 参考文献

- [1] KAWANO Y, OHTSU I, TAKUMI K, TAMAKOSHI A, NONAKA G, FUNAHASHI E, IHARA M, TAKAGI H. Enhancement of L-cysteine production by disruption of *yciW* in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119(2): 176-179.
- [2] DOWNS DM. Balancing cost and benefit: how *E. coli* cleverly averts disulfide stress caused by cystine[J]. *Molecular Microbiology*, 2020, 113(1): 1-3.
- [3] DASSLER T, MAIER T, WINTERHALTER C, BÖCK A. Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(5): 1101-1112.
- [4] TAKAGI H, OHTSU I. L-cysteine metabolism and fermentation in microorganisms[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2017, 159: 129-151.
- [5] CALCE E, DELUCA S. The cysteine S-alkylation reaction as a synthetic method to covalently modify peptide sequences[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2017, 23(2): 224-233.
- [6] KONDOH M, HIRASAWA T. L-cysteine production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(6): 2609-2619.
- [7] WEI L, WANG H, XU N, ZHOU W, JU JS, LIU J, MA YH. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-cysteine production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(3): 1325-1338.
- [8] LIU H, WANG Y, HOU YH, LI ZM. Fitness of chassis cells and metabolic pathways for L-cysteine overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(50): 14928-14937.
- [9] 张博, 史永吉, 杨辉, 吴梓丹, 陈开, 蔡雪, 柳志强, 郑裕国. 通过发酵优化提高大肠杆菌生产 L-半胱氨酸产量[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 175-180. ZHANG B, SHI YJ, YANG H, WU ZD, CHEN K, CAI X, LIU ZQ, ZHENG YG. Enhancement of L-cysteine production in *Escherichia coli* through fermentation optimization[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 175-180 (in Chinese).
- [10] RYU OH, JU JY, SHIN CS. Continuous L-cysteine production using immobilized cell reactors and product extractors[J]. Process Biochemistry, 1997, 32(3): 201-209.
- [11] KAWANO Y, ONISHI F, SHIROYAMA M, MIURA M, TANAKA N, OSHIRO S, NONAKA G, NAKANISHI T, OHTSU I. Improved fermentative L-cysteine overproduction by enhancing a newly identified thiosulfate assimilation pathway in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(18): 6879-6889.
- [12] YANG S, LIU QT, ZHANG YF, DU GC, CHEN J, KANG Z. Construction and characterization of broad-spectrum promoters for synthetic biology[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(1): 287-291.
- [13] TAKUMI K, NONAKA G. Bacterial cysteine-inducible cysteine resistance systems[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(9): 1384-1392.
- [14] 刘川, 刘清岱, 徐宁, 周威, 刘君. 半胱氨酸单细胞生物传感器的构建及应用[J]. 中国食品添加剂, 2018(5): 147-154. LIU C, LIU QD, XU N, ZHOU W, LIU J. Construction and application of a single-cell biosensor for detection of cysteine[J]. China Food Additives, 2018(5): 147-154 (in Chinese).
- [15] 周琴, 孙明, 喻子牛. 利用绿色荧光蛋白基因 *gfp* 研究芽胞杆菌的启动子活性[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 543-546. ZHOU Q, SUN M, YU ZN. Studies on the activities of promoters of *Bacillus* using green fluorescent protein gene[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(4): 543-546 (in Chinese).
- [16] MAHR R, von BOESELAGER RF, WIECHERT J, FRUNZKE J. Screening of an *Escherichia coli* promoter library for a phenylalanine biosensor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(15): 6739-6753.
- [17] GWON DA, SEOK JY, JUNG GY, LEE JW. Biosensor-assisted adaptive laboratory evolution for violacein production[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(12): 6594.
- [18] HOOK-BARNARD IG, HINTON DM. The promoter spacer influences transcription initiation via sigma 70 region 1.1 of *Escherichia coli* RNA polymerase[J]. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(3): 737-742.
- [19] LIU HT, JAKKULA LUMR, von OHLEN T, GANTA RR. Sequence determinants spanning-35 motif and AT-rich spacer region impacting *Ehrlichia chaffeensis* sigma 70-dependent promoter activity of two differentially expressed p28 outer membrane protein genes[J]. DNA Research: an International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes, 2016, 23(5): 495-505.
- [20] LIU D, EVANS T, ZHANG FZ. Applications and advances of metabolite biosensors for metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 35-43.
- [21] 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.
- [22] MUSTAFI N, GRÜNBERGER A, KOHLHEYER D, BOTT M, FRUNZKE J. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(4): 449-457.
- [23] LIU YF, YUAN HL, DING DQ, DONG HN, WANG QH, ZHANG DW. Establishment of a biosensor-based high-throughput screening platform for tryptophan overproduction[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(6): 1373-1383.
- [24] DAHL RH, ZHANG FZ, ALONSO-GUTIERREZ J, BAIDOO E, BATH TS, REDDING-JOHANSON AM, PETZOLD CJ, MUKHOPADHYAY A, LEE TS, ADAMS PD, KEASLING JD. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(11): 1039-1046.