

基于转录调节因子 PuuR 的 1,4-丁二胺生物传感器的构建与优化

刘俊杰^{1,2}, 蒋敏敏^{1,2}, 孙彤^{1,2}, 孙祥祥^{1,2}, 赵咏灿^{1,2}, 顾明霞^{1,2}, 路福平^{1,2*}, 黎明^{1,2*}

1 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

2 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

刘俊杰, 蒋敏敏, 孙彤, 孙祥祥, 赵咏灿, 顾明霞, 路福平, 黎明. 基于转录调节因子 PuuR 的 1,4-丁二胺生物传感器的构建与优化[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 437-447.

LIU Junjie, JIANG Minmin, SUN Tong, SUN Xiangxiang, ZHAO Yongcan, GU Mingxia, LU Fuping, LI Ming. Construction and optimization of 1,4-butanediamine biosensor based on transcriptional regulator PuuR[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 437-447.

摘要: 生物传感器已经成为实时监测特定小分子和精确控制生物系统中基因表达的强大工具。用于 1,4-丁二胺生物合成的高通量传感器可以极大地提高 1,4-丁二胺高产菌株的筛选效率。为研究调整生物传感器特性的策略,本研究开发了一种以转录调节因子 PuuR 为基础的 1,4-丁二胺生物传感器,其同源的操作子 puuO 被组装在大肠杆菌组成型启动子 P_{gapA} 中,以控制下游的高能绿色荧光蛋白(superfolder green fluorescent protein, sfGFP)作为报告蛋白表达。最终该传感器在 1,4-丁二胺浓度处于 0–50 mmol/L 时 GFP/ OD_{600} 值与 1,4-丁二胺浓度之间能稳定地表现出线性关系。本研究采用大肠杆菌基因组中不同强度的启动子对 1,4-丁二胺生物传感器进行分子改造,探究并改进基于 PuuR 的 1,4-丁二胺生物传感器的功能性质,为高通量筛选高产 1,4-丁二胺的工程菌株奠定了基础。
关键词: 大肠杆菌; 1,4-丁二胺; 生物传感器; 转录调节因子 PuuR

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2101800, 2021YFC2100402, 2022YFC2105502); 国家自然科学基金(22278321, 32072161)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2101800, 2021YFC2100402, 2022YFC2105502) and the National Natural Science Foundation of China (22278321, 32072161).

*Corresponding authors. E-mail: LU Fuping, lfp@tust.edu.cn; LI Ming, liming09@tust.edu.cn

Received: 2024-02-28; Accepted: 2024-05-20; Published online: 2024-07-25

Construction and optimization of 1,4-butanediamine biosensor based on transcriptional regulator PuuR

LIU Junjie^{1,2}, JIANG Minmin^{1,2}, SUN Tong^{1,2}, SUN Xiangxiang^{1,2}, ZHAO Yongcan^{1,2}, GU Mingxia^{1,2}, LU Fuping^{1,2*}, LI Ming^{1,2*}

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology (Tianjin University of Science & Technology), Ministry of Education, Tianjin 300457, China

2 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Biosensors have become powerful tools for real-time monitoring of specific small molecules and precise control of gene expression in biological systems. High-throughput sensors for 1,4-butanediamine biosynthesis can greatly improve the screening efficiency of high-yielding 1,4-butanediamine strains. However, the strategies for adapting the characteristics of biosensors are still rarely studied, which limits the applicability of 1,4-butanediamine biosensors. In this paper, we propose the development of a 1,4-butanediamine biosensor based on the transcriptional regulator PuuR, whose homologous operator puuO is installed in the constitutive promoter P_{gapA} of *Escherichia coli* to control the expression of the downstream superfolder green fluorescent protein (sfGFP) as the reporter protein. Finally, the biosensor showed a stable linear relationship between the GFP/ OD_{600} value and the concentration of 1,4-butanediamine when the concentration of 1,4-butanediamine was 0–50 mmol/L. The promoters with different strengths in the *E. coli* genome were used to modify the 1,4-butanediamine biosensor, and the functional properties of the PuuR-based 1,4-butanediamine biosensor were explored and improved, which laid the groundwork for high-throughput screening of engineered strains highly producing 1,4-butanediamine.

Keywords: *Escherichia coli*; 1,4-butanediamine; biosensor; transcriptional regulator PuuR

1,4-丁二胺(1,4-butanediamine), 又称腐胺(putrescine)^[1-2], 是一种包含 2 个氨基的胺类化合物。它是一种重要的生物胺, 普遍存在于食物及人体的某些器官中, 参与细胞的代谢调控, 可以在与生物体内其他生物胺共同的抗肿瘤反应中发挥作用^[3-4]。1,4-丁二胺的主要工业用途是用于合成聚酰胺材料, 如聚酰胺 46 (polyamide 46, PA46)、聚酰胺 4T (polyamide 4T, PA4T)等, 它们具有优异的材料性能, 可用于重型纤维和工程产品^[5]。特别是 PA46, 由 1,4-丁二胺和己二酸缩合而成, 由于具有高熔点、优异的机械性能和耐溶剂性, 能够作为一种优良的工程塑

料被广泛应用于机械电子、医药等领域^[6]。

目前, 1,4-丁二胺的大规模工业化生产主要依赖以石化为基础的化学合成法^[7-8]。由于化学合成需要依赖石油这种不可再生资源, 反应条件苛刻且对环境不友好, 所以急需开发一种环保且高产的生产方式。随着基因工程和代谢工程的不断发展, 微生物发酵法生产 1,4-丁二胺由于具有绿色环保、可持续利用、原料低廉等优点^[9], 已经成为未来的发展趋势^[10]。目前高产 1,4-丁二胺的研究主要集中在敲除 1,4-丁二胺降解途径及副产物途径^[11]、对不同来源的鸟氨酸脱羧酶基因进行比较并过表达鸟氨酸脱羧

酶^[12-13]以及发酵优化等方面。这些传统的遗传修饰方法构建的 1,4-丁二胺生产菌株的产量较低,远远不能满足工业生产需求,因此需要对 1,4-丁二胺合成途径的关键基因的表达进行优化,并对关键途径酶进行定向进化。

高产菌株的筛选和关键途径酶的定向进化会生成大型且全面的突变文库^[14-15]。但是由于缺乏快速有效的评价方法或筛选工具,从基数庞大的文库中获得高产菌株常常受到限制^[16]。传统的 1,4-丁二胺高产菌株筛选方法,如薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)^[17]、离子色谱(ion chromatography, IC)^[18]、气相色谱(gas chromatography, GC)^[19]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[20]等不适合从大规模和多样化的突变库中分离高产 1,4-丁二胺的菌株^[21-22],因此需要开发有效的高通量筛选工具^[23-24],对所生成的文库成员进行高通量筛选^[25]。

目前,基于转录因子的生物传感器经常用于高通量筛选^[24]、适应性进化^[26]、实时监测^[27]和单细胞分析。本研究旨在开发设计一种以转录调节因子 PuuR 为基础的 1,4-丁二胺生物传感器来监测细胞内的 1,4-丁二胺水平^[28],以达到

从基数庞大的文库中高效筛选出高产 1,4-丁二胺菌株的目的。

puu 途径是大肠杆菌中已知的一种 1,4-丁二胺利用途径^[29]。在 *puu* 途径中, *puuA* 和 *puuD* 的启动子位于 *puuA* 与 *puuD* 基因间区域,其中含有 4 个 PuuR 结合位点 FA、FB、FC 和 FD(即操作子 *puuO*),受 PuuR 负调控(图 1)。PuuR 在 1,4-丁二胺浓度低的情况下会与 *puuA* 和 *puuD* 的启动子上 4 个结合位点结合并抑制 *puu* 基因的转录,如果细胞中的游离 1,4-丁二胺浓度达到足够高的水平,其会与 PuuR 结合从而改变 PuuR 的构象, PuuR 就会从结合位点上分离出来, *puu* 基因开始转录。*puu* 途径利用 1,4-丁二胺并降低其在细胞中的浓度后, PuuR 可再次与结合位点结合。

前期研究结果表明构建基于 PuuR 的生物传感器能够报告大肠杆菌中的 1,4-丁二胺浓度^[30],该团队设计的 1,4-丁二胺生物传感器检测范围为 0.11–7.18 mmol。另外一个团队构建了基于谷氨酸棒状杆菌转录调控因子的生物传感器^[31],它的检测限 ≤ 0.2 mmol/L, K 为 11.4 mmol/L。另一个研究团队构建出了基于 PuuR 的体外 1,4-丁二胺生物传感器^[32],其构建报告元件启动子

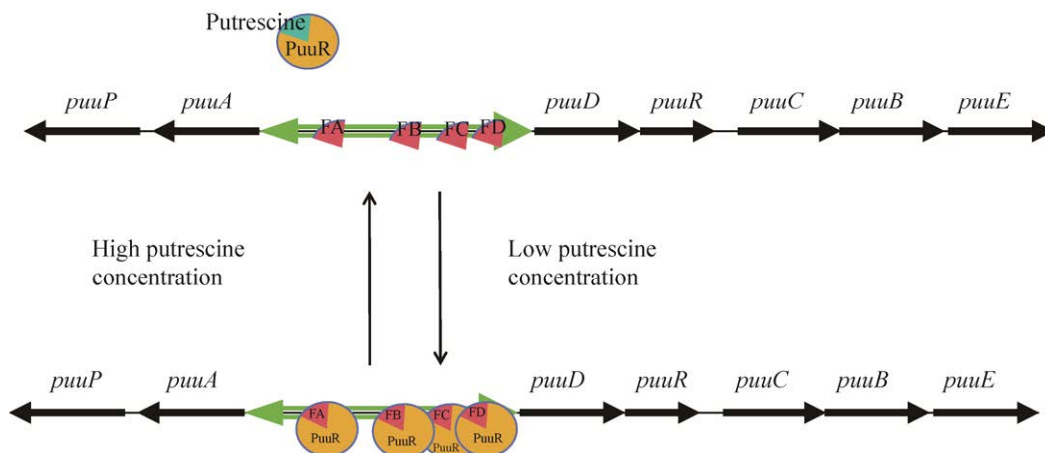


图 1 PuuR 调节机制

Figure 1 Regulatory mechanism of PuuR.

的方式值得借鉴。这些 1,4-丁二胺生物传感器虽然都能在一定水平上反映 1,4-丁二胺浓度与报告基因的关系,但是由于检测范围小或荧光表达水平低等原因限制了利用其进行高产 1,4-丁二胺工程菌株的筛选的应用。

本研究基于大肠杆菌中 *PuuR* 的调节机制,通过筛选转录调节因子及报告元件表达的启动子,构建了一种灵敏度高、检测范围广、荧光基数大、不易筛选出假阳性突变体的 1,4-丁二胺生物传感器,为筛选 1,4-丁二胺合成关键酶的基因突变体和高产 1,4-丁二胺的工程菌株奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) K12、JM109 和质粒 pRSM3 等由本实验室保存。生物传感器质粒均为本研究构建(表 1)。

1.1.2 主要试剂与工具酶

PrimerSTAR Max DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Kpn* I、*Spe* I、*Nhe* I、*Xba* I、*Nde* I、*Bgl* II、DNA Ligation Kit 为宝日医生物技术(北京)有限公司产品;质粒提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒等为 Omega Bio-Tek 公司产品;蛋白胨和

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Sources
JM109	K-12, l-, F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laq^FZAM15</i>], <i>endA1</i> , <i>glnX44</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , Δ (<i>lacproAB</i>), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi</i>	Lab store
K12	Wild-type	Lab store
pRSM3	Kan ^r , RSFori	Lab store
pUC57- <i>eGFP</i>	Amp ^r , pUC57 carrying <i>eGFP</i>	Lab store
pUC57- <i>sfGFP</i>	Amp ^r , pUC57 carrying <i>sfGFP</i>	Lab store
pRSM3- <i>eGFP</i>	Kan ^r , pRSM3 carrying <i>eGFP</i>	This study
pRSM3- <i>eGFP-puuR</i>	Kan ^r , pRSM3 carrying <i>eGFP</i> and <i>puuR</i>	This study
pP _{gapA} -R-P _{TacR2} -e	Kan ^r , <i>eGFP</i> under P _{TacR2} promoter, <i>puuR</i> under P _{gapA} promoter	This study
pP _{gapA} -R-P _{gap(A+)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(A+)} promoter, <i>puuR</i> under P _{gapA} promoter	This study
pP _{gapA} -R-P _{gap(A-)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(A-)} promoter, <i>puuR</i> under P _{gapA} promoter	This study
pP _{gapA} -R-P _{gap(AB+)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(AB+)} promoter, <i>puuR</i> under P _{gapA} promoter	This study
pP _{gapA} -R-P _{gap(AB-)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(AB-)} promoter, <i>puuR</i> under P _{gapA} promoter	This study
pP _{gapA} -R-P _{gap(ABG+)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(ABG+)} promoter, <i>puuR</i> under P _{gapA} promoter	This study
pP _{gapA} -R-P _{gap(ABG-)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(ABG-)} promoter, <i>puuR</i> under P _{gapA} promoter	This study
pP _{enO} -R-P _{gap(A-)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(A-)} promoter, <i>puuR</i> under P _{enO} promoter	This study
pP _{acnB} -R-P _{gap(A-)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(A-)} promoter, <i>puuR</i> under P _{acnB} promoter	This study
pP _{fbaB} -R-P _{gap(A-)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(A-)} promoter, <i>puuR</i> under P _{fbaB} promoter	This study
pP _{fkA} -R-P _{gap(A-)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(A-)} promoter, <i>puuR</i> under P _{fkA} promoter	This study
pP _{enO} -R-P _{gap(ABG+)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(ABG+)} promoter, <i>puuR</i> under P _{enO} promoter	This study
pP _{acnB} -R-P _{gap(ABG+)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(ABG+)} promoter, <i>puuR</i> under P _{acnB} promoter	This study
pP _{fbaB} -R-P _{gap(ABG+)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(ABG+)} promoter, <i>puuR</i> under P _{fbaB} promoter	This study
pP _{fkA} -R-P _{gap(ABG+)} -sf	Kan ^r , <i>sfGFP</i> under P _{gap(ABG+)} promoter, <i>puuR</i> under P _{fkA} promoter	This study
K12 Δ <i>puu</i>	MG1655 Δ <i>puu</i>	Lab store
PUT5	MG1655 Δ <i>argRApatAΔpuuAΔspeEDΔspeG</i>	Lab store
PUT11	MG1655 Δ <i>argRApatAΔpuuAΔspeEDΔspeGΔpuuPΔargFΔycdSTUVΔpotFGHIΔplap</i>	Lab store

酵母浸粉为 Oxoid 公司产品; 1,4-丁二胺盐酸盐购自上海毕得医药科技股份有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 121 °C 灭菌 20 min。根据需要在 LB 培养基中添加不同浓度的 1,4-丁二胺盐酸盐得到含不同浓度 1,4-丁二胺的 LB 培养基。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计

根据质粒 pRSM3 的多克隆位点设计目的片段的引物(表 2)。

1.2.2 1,4-丁二胺生物传感器构建方法

首先以 pUC57-*eGFP* 为模板 PCR 扩增 *eGFP* 片段, 扩增条件: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。将 *eGFP* 片段用 *Kpn* I 和 *Spe* I 处理, 处理后的 *eGFP* 片段连接至 pRSM3 质粒的相应位点得到重组质粒

pRSM3-*eGFP*。接下来以大肠杆菌 K12 基因组为模板扩增 *puuR* 片段, 将用 *Nhe* I 和 *Nde* I 处理后的 *puuR* 片段, 连接至 pRSM3-*eGFP* 质粒的 *Xba* I 和 *Nde* I 位点间得到重组质粒 pRSM3-*eGFP-puuR*。最后以合成的双启动子片段为模板扩增 P_{gapA}-P_{TacR2} 片段, 将 *Nde* I 和 *Kpn* I 处理的 P_{gapA}-P_{TacR2} 片段连接至 pRSM3-*eGFP-puuR* 质粒的相应位点得到重组质粒 pP_{gapA}-R-P_{TacR2}-e (图 2)。后续构建均按照此方法将相应的元件克隆至传感器质粒 pP_{gapA}-R-P_{TacR2}-e 的相应酶切位点处。

1.2.3 1,4-丁二胺生物传感器功能鉴定方法

在 48 孔细胞培养板上培养携带不同 1,4-丁二胺生物传感器质粒的大肠杆菌重组菌株, 用 0–100 mmol/L 浓度的 1,4-丁二胺诱导荧光蛋白的表达情况来鉴定生物传感器的功能。将重组菌株接种到 5 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素(kanamycin, Kan)的 LB 试管中并生长过夜, 随后将过夜培养物按 1% 的比例转接到 0.5 mL 含 50 μg/mL

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
eGFP-S	GGGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGA
eGFP-A	GGACTAGTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
PuuR-UP-S	CTAGCTAGCACGCGTCATTCTTTATATACACTTCATCCTTCAAGCC
PuuR-DN-A	GGAATTCATATGAGTGATGAGGGACTGGC
sfGFP-S	GGGGTACCATGAGCAAAGGAGAAGAAGCTTTTCAC
sfGFP-A	GGACTAGTTTTGTAGAGCTCATCCATGCCA
puuO-A-UP	CTAGGGTGGTCATTATATTTTACGT
puuO-A-DN	CTAGACGTAAAATATAATGACCACC
puuO-AB-UP	CTAGGGTGGTCATTATATTTTACGTATGTTCAATATTTTTTCAA
puuO-AB-DN	CTAGTTGAAAAAATATTGAACATACGTAAAATATAATGACCACC
puuO-ABG-UP	CTAGGGTGGTCATTATATTTTACGTTGAAAAAATATTGAACATA
puuO-ABG-DN	CTAGTATGTTCAATATTTTTTCAACGTAAAATATAATGACCACC
eno-UP-Bgl II	GAAGATCTTGGCCAGTTCATCCGGAGTTT
eno-DN-Nde I	GGAATTCATATGGTTTTCTCAAGTCACTAGTTAAACTGA
fbaB-UP-Bgl II	GAAGATCTAGGTAATGTAAGGTACGCGATGACAA
fbaB-DN-Nde I	GGAATTCATATGCTATGCTCCCGTAAATTCCGATTGG
pfkA-UP-Bgl II	GAAGATCTGGAGGGTAAACGGTCTATGCTT
pfkA-DN-Nde I	GGAATTCATATGTACCTCTGAACTTTGGAATGCAAAATG

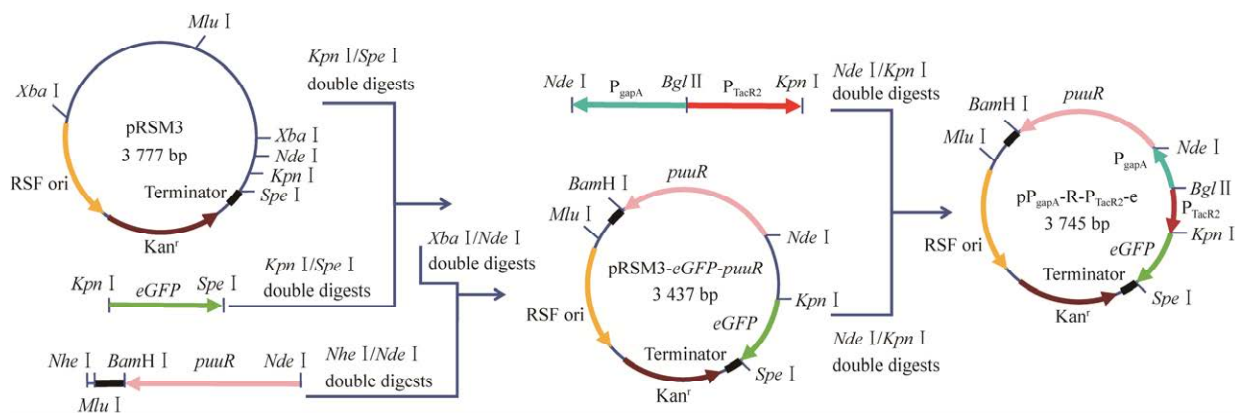


图2 1,4-丁二胺生物传感器质粒构建流程

Figure 2 Construction process of 1,4-butanediamine biosensor plasmid.

Kan 的 LB 培养基的 48 孔细胞培养板中, 37 °C、400 r/min 进行培养。当细胞 OD_{600} 达到 0.3–0.4 时, 将含有不同浓度 1,4-丁二胺的 LB 溶液分别加入到每个培养孔中, 让重组菌株在最终浓度为 0–100 mmol/L 的 1,4-丁二胺 LB 溶液中, 37 °C、400 r/min 培养 20 h。培养结束后测量 OD_{600} 和 GFP 荧光强度, 通过计算 GFP/OD_{600} 值来展现 1,4-丁二胺浓度与荧光强度的关系。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌 1,4-丁二胺传感器的构建

根据大肠杆菌体内 PuuR 调节机制, 为便于进行高通量筛选, 选用大肠杆菌糖酵解和三羧酸循环中鉴定出的最强组成型启动子 P_{gapA} ^[33], 替换文献报道中的诱导型启动子 P_{lacIQ} 作为调控元件 *puuR* 的启动子, 以增强 *puuR* 的表达和其对 P_{TacR2} 的调控。同时, 仍然利用文献报道的 P_{TacR2} 启动子为报告基因 *eGFP* 的启动子, 构建了 1,4-丁二胺生物传感器质粒 $pP_{gapA}\text{-R-}P_{TacR2}\text{-e}$ (图 3)。在 1,4-丁二胺浓度低的情况下, PuuR 会与 P_{TacR2} 启动子上结合位点 *puuO* 结合, 抑制 *eGFP* 基因的转录。如果细胞中的游离 1,4-丁二胺浓度达到足够高的水平, 1,4-丁二胺就与 PuuR 结合从而改变 PuuR 的构象, PuuR 就会从结合位点上分

离出来, *eGFP* 基因开始转录表达荧光。

2.2 大肠杆菌 1,4-丁二胺传感器的功能鉴定

将传感器质粒 $P_{gapA}\text{-R-}P_{TacR2}\text{-e}$ 转化大肠杆菌 JM109 构建成重组菌株, 检测传感器对不同浓度 1,4-丁二胺的响应情况。结果如图 4 所示,

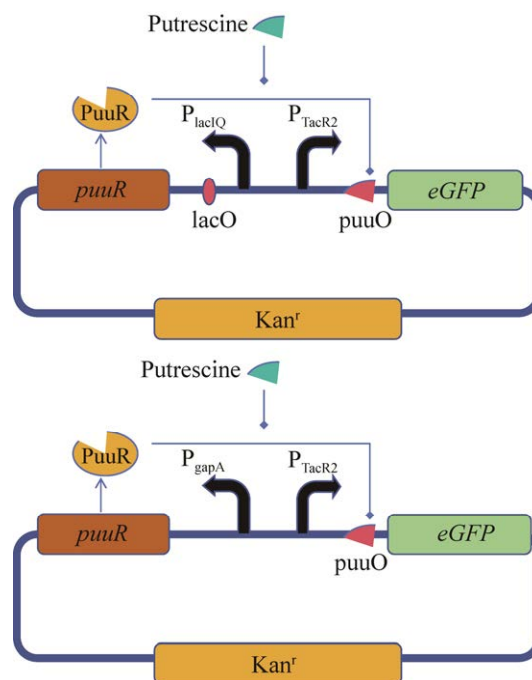


图3 1,4-丁二胺生物传感器的构建

Figure 3 Construction of the 1,4-butanediamine biosensor.

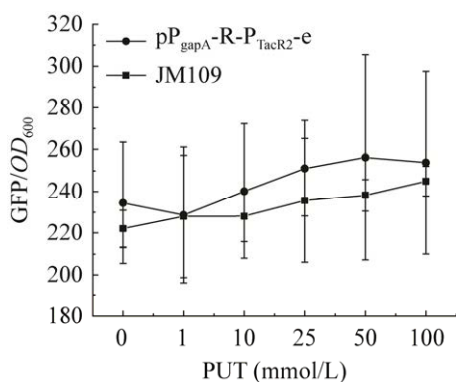


图 4 生物传感器质粒功能鉴定

Figure 4 Functional identification of the biosensor plasmids.

GFP/OD₆₀₀ 数值较低,无法判断 GFP/OD₆₀₀ 数值变化是由 1,4-丁二胺浓度变化引起还是由操作误差引起;另外 GFP/OD₆₀₀ 值无法直观显示与 1,4-丁二胺浓度的线性关系。因此需要更换荧光蛋白报告基因,并优化荧光蛋白报告基因的启动子。

2.3 报告基因及报告基因启动子的优化

为了得到性能更优的 1,4-丁二胺生物传感器,决定从 2 方面来优化生物传感器:一是用更灵敏的 *sfGFP* 作为报告基因,更换报告基因 *eGFP*;二是在大肠杆菌 P_{gapA} 启动子的-10 或-35 序列附近插入能与 *PuuR* 结合的不同操作子 *puuO* 序列(FA/FB/FC/FD),优化 *PuuR* 对 *sfGFP* 的表达调控。通过对 P_{gapA} 中增添 *puuO* 序列进行优化,构建了含有不同 *puuO* 序列的 1,4-丁二胺的生物传感器质粒 pP_{gapA}-R-P_{gap(A+)}-sf、pP_{gapA}-R-P_{gap(A-)}-sf、pP_{gapA}-R-P_{gap(AB+)}-sf、pP_{gapA}-R-P_{gap(AB-)}-sf、pP_{gapA}-R-P_{gap(ABG+)}-sf、pP_{gapA}-R-P_{gap(ABG-)}-sf (图 5)。

将构建的传感器质粒转化大肠杆菌 JM109,然后进行传感器的功能验证(图 6)。更换报告基因后,GFP/OD₆₀₀ 值明显提高。其中含有 pP_{gapA}-R-P_{gap(AB-)}-sf 质粒的重组菌株初始 GFP/OD₆₀₀ 值过高,说明启动子 P_{gap(AB-)}不能有效调控 *sfGFP*

的表达。含有 pP_{gapA}-R-P_{gap(A+)}-sf、pP_{gapA}-R-P_{gap(AB+)}-sf 和 pP_{gapA}-R-P_{gap(ABG-)}-sf 质粒的重组菌株在 1,4-丁二胺浓度 1-25 mmol/L 范围内 GFP/OD₆₀₀ 值与 1,4-丁二胺浓度存在线性关系,当 1,4-丁二胺浓度达到 25 mmol/L 以上时,GFP/OD₆₀₀ 值与 1,4-丁二胺浓度之间的线性关系消失,甚至当 1,4-丁二胺浓度超过 50 mmol/L 时,GFP/OD₆₀₀ 值反而出现下降。只有含有 pP_{gapA}-R-P_{gap(A-)}-sf 和 pP_{gapA}-R-P_{gap(ABG+)}-sf 质粒的重组菌株当 1,4-丁二胺的浓度在 0-50 mmol/L 范围内时,GFP/OD₆₀₀ 值与 1,4-丁二胺的浓度呈正相关。但是,随着 1,4-丁二胺浓度的升高,GFP/OD₆₀₀ 值增加量不太明显,可能是由于控制 *puuR* 表达的 P_{gapA} 启动子活性太强,导致结合到 *puuO* 位点 *PuuR* 蛋白的浓度太高。因此,需要对控制 *puuR* 表达的启动子进行优化,降低控制 *puuR* 表达的启动子强度。

2.4 *puuR* 启动子的优化

为了弱化 *puuR* 的表达,筛选了大肠杆菌 K12 的 4 个不同强度的组成型启动子 P_{enO}、P_{acnB}、P_{fbaB}、P_{fka} 进行比较。P_{gapA}、P_{enO}、P_{acnB}、P_{fbaB} 和 P_{fka} 启动子的强度分别为 43.6、25.5、13.6、9.5 和 5.6^[33]。用 P_{enO}、P_{acnB}、P_{fbaB} 和 P_{fka} 分别取代 pP_{gapA}-R-P_{gap(A-)}-sf 和 pP_{gapA}-R-P_{gap(ABG+)}-sf 质粒上的 P_{gapA},得到相应的重组质粒:pP_{enO}-R-P_{gap(A-)}-sf、pP_{acnB}-R-P_{gap(A-)}-sf、pP_{fbaB}-R-P_{gap(A-)}-sf、pP_{fka}-R-P_{gap(A-)}-sf、pP_{enO}-R-P_{gap(ABG+)}-sf、pP_{acnB}-R-P_{gap(ABG+)}-sf、P_{fbaB}-R-P_{gap(ABG+)}-sf 和 pP_{fka}-R-P_{gap(ABG+)}-sf。

将构建的传感器质粒转化大肠杆菌 JM109,然后进行传感器的功能验证(图 7)。更换 *puuR* 启动子后,GFP/OD₆₀₀ 值明显提高。其中以 P_{gap(A-)}作为报告基因启动子的质粒的重组菌株在 1,4-丁二胺浓度达到 25 mmol/L 以上时,GFP/OD₆₀₀ 值与 1,4-丁二胺浓度之间失去了线

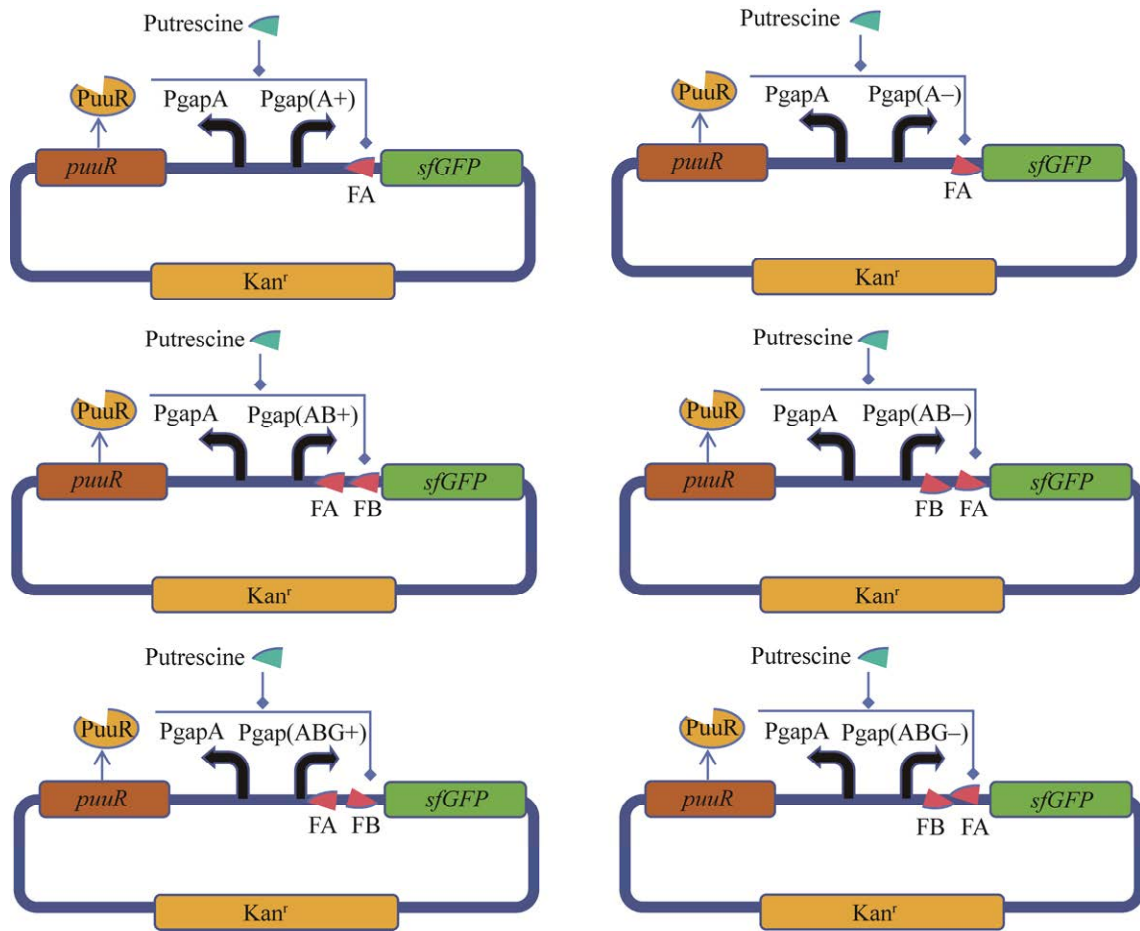


图5 含合成启动子 $P_{gap(A+)}$ 、 $P_{gap(A-)}$ 、 $P_{gap(AB+)}$ 、 $P_{gap(AB-)}$ 、 $P_{gap(ABG+)}$ 和 $P_{gap(ABG-)}$ 质粒的构建

Figure 5 Construction of plasmids harboring synthetic promoters $P_{gap(A+)}$, $P_{gap(A-)}$, $P_{gap(AB+)}$, $P_{gap(AB-)}$, $P_{gap(ABG+)}$ and $P_{gap(ABG-)}$.

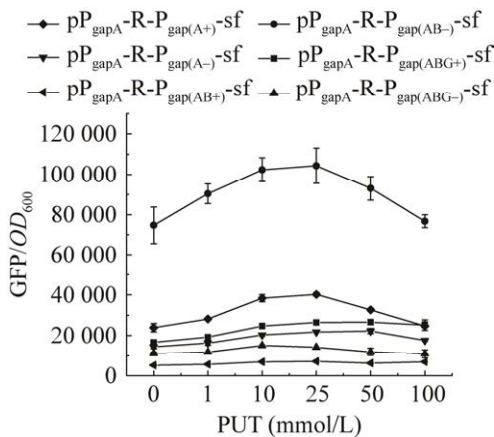


图6 生物传感器质粒功能鉴定

Figure 6 Functional identification of the biosensor plasmids.

性关系,说明更换了 $puuR$ 启动子后,新选用的启动子与启动子 $P_{gap(A-)}$ 不能高效联动调控 $sfGFP$ 的表达。以 $P_{gap(ABG+)}$ 作为报告基因启动子的质粒的重组菌株中含 $pP_{fkaA-R-P_{gap(ABG+)}}-sf$ 和 $pP_{fbaB-R-P_{gap(ABG+)}}-sf$ 质粒的重组菌株在 1,4-丁二胺浓度达到 25 mmol/L 以上时, GFP/OD_{600} 值与 1,4-丁二胺浓度之间也失去了线性关系。含 $pP_{gapA-R-P_{gap(ABG+)}}-sf$ 、 $pP_{eno-R-P_{gap(ABG+)}}-sf$ 和 $pP_{acnB-R-P_{gap(ABG+)}}-sf$ 质粒的重组菌株在 1,4-丁二胺浓度为 0-50 mmol/L 范围内时, GFP/OD_{600} 值与 1,4-丁二胺的浓度呈正相关。且随着 1,4-丁二胺浓度的升高, GFP/OD_{600} 值增加量更加明

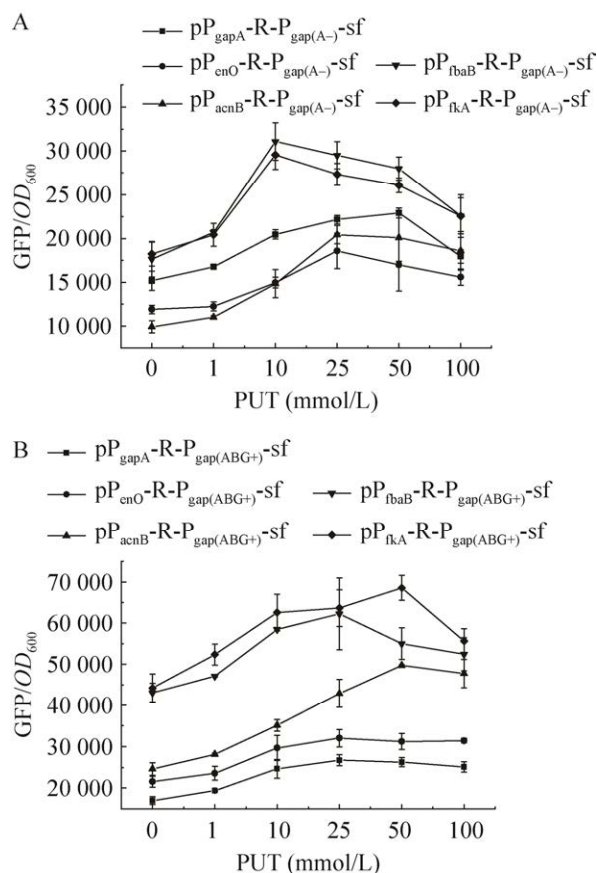


图7 以 $P_{gap(A-)}$ (A)及 $P_{gap(ABG+)}$ (B)为基础的生物传感器质粒功能鉴定

Figure 7 Functional identification of the biosensor plasmids based on $P_{gap(A-)}$ (A) and $P_{gap(ABG+)}$ (B).

显,尤其是含有 pP_{acnB} -R- $P_{gap(ABG+)}$ -sf 质粒的重组菌株,所以后续选用此菌株继续做更进一步的功能鉴定。

在 K12-MG1655 的基础上构建了一个 1,4-丁二胺降解途径(puu)敲除菌株 $K12\Delta puu$, 用来进行进一步的生物传感器的功能鉴定。把重组质粒 pP_{acnB} -R- $P_{gap(ABG+)}$ -sf 分别转入 JM109、K12、 $K12\Delta puu$ 菌株,并用上述方法对其进行进一步的功能验证(图 8)。本研究构建的 1,4-丁二胺生物传感器 pP_{acnB} -R- $P_{gap(ABG+)}$ -sf 在 3 株不同的菌株中当 1,4-丁二胺浓度处于 0-50 mmol/L 时 GFP/OD_{600} 值与 1,4-丁二胺浓度之间能稳定地展现出线性关系。虽然 1,4-丁二胺浓度为

100 mmol/L 时, GFP/OD_{600} 值的大小与 1,4-丁二胺浓度为 10 mmol/L 时相近,但由于在 0-50 mmol/L 的 1,4-丁二胺浓度下菌体生长基本不会受到影响,在 50 mmol/L 以上的 1,4-丁二胺浓度下菌体生长变慢,所以在实际应用中能通过判断菌体生长情况来辅助判断 1,4-丁二胺产量的浓度范围。在不外加 1,4-丁二胺的情况下 3 株底盘菌株的 GFP/OD_{600} 值 $JM109 < K12 < K12\Delta puu$,这可能是由于 3 株底盘菌株本身 1,4-丁二胺产量的差距所导致(图 9)。

2.5 P_{acnB} -R- $P_{gap(ABG+)}$ -sf 的胞内功能鉴定

在通过外加 1,4-丁二胺的方式验证出传感器 pP_{acnB} -R- $P_{gap(ABG+)}$ -sf 对不同浓度的外源 1,4-丁二胺有响应后,测试了生物传感器是否能够

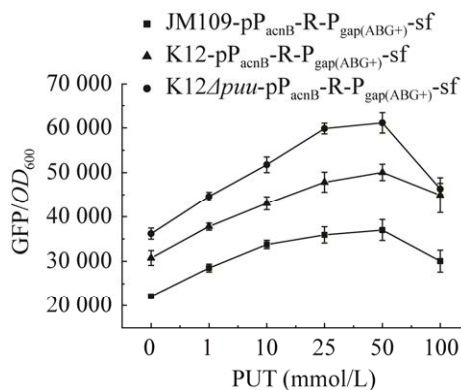


图8 生物传感器质粒功能鉴定

Figure 8 Functional identification of the biosensor plasmids.

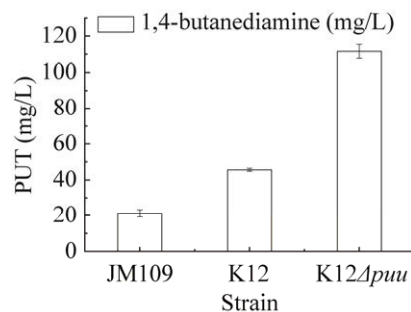


图9 JM109、K12、 $K12\Delta puu$ 菌株的本底 1,4-丁二胺产量

Figure 9 Background 1,4-butanedi-amine production of JM109, K12, and $K12\Delta puu$ strains.

报告由基因修饰引起的细胞内 1,4-丁二胺水平的变化。为此,将丁二胺生物传感质粒 $pP_{acnB}\text{-R-P}_{gap(ABG^+)}\text{-sf}$ 转化至由本实验室构建好的 2 个底盘菌株 PUT5、PUT11 中,通过对比 GFP/ OD_{600} ,进一步地验证了本研究所构建的生物传感器质粒可以用于报告 1,4-丁二胺高产菌株发酵过程中的 1,4-丁二胺产量(图 10)。

3 讨论与结论

1,4-丁二胺可以作为单体合成一种优良的工业塑料 PA46,其工业化生产采用化学合成法,这一方法被荷兰的帝斯曼公司所垄断。由于具有绿色环保的优势,使用微生物发酵法生产 1,4-丁二胺已经成为未来的发展趋势。由于缺乏高通量筛选工具,采用传统的代谢工程技术构建的产 1,4-丁二胺工程菌株因产量较低,不能满足工业化生产的要求,因此需要开发设计一款高通量筛选的 1,4-丁二胺生物传感器,结合合成生物学技术对 1,4-丁二胺合成途径进行设计和优化,筛选出高产 1,4-丁二胺工程菌株。

本研究根据大肠杆菌转录调节因子 PuuR 的调节机制,构建了 1,4-丁二胺生物传感器 $pP_{acnB}\text{-R-P}_{gap(ABG^+)}\text{-sf}$ 。该传感器选用了组成型启动子 P_{acnB} 替换掉先前研究中的诱导型启动子 P_{lacIQ} 作为调控元件 $puuR$ 的启动子,节省了添

加诱导剂的环节,提高了筛选效率。并选用荧光强度更强的 $sfGFP$ 替换 $eGFP$ 作为报告基因,将 $puuO$ 操作位点插入强启动子 P_{gapA} 中作为报告基因的启动子,最终在 1,4-丁二胺浓度处于 0–50 mmol/L 时 GFP/ OD_{600} 值与 1,4-丁二胺浓度之间能稳定地表现出线性关系。经过胞内功能鉴定,证明 1,4-丁二胺生物传感器 $pP_{acnB}\text{-R-P}_{gap(ABG^+)}\text{-sf}$ 在不同的 1,4-丁二胺生产菌株中运用能够直观地表现出其产量差距。

为了更高效地将 1,4-丁二胺生物传感器应用于实际的高产 1,4-丁二胺菌株筛选中,后续可以通过增添更多的操作子 $puuO$ 或者突变阻遏蛋白 PuuR 来提高其与操作子 $puuO$ 的结合能力,以达到降低基础荧光、扩大检测范围的目的。为了开发生物传感器辅助的高通量筛选平台,也可以将报告基因替换为抗性基因等与生长密切相关的基因,将 1,4-丁二胺的高产与生长进行联动,以更方便地筛选高产菌株。

REFERENCES

- [1] 李东霞,黎明,王洪鑫,王舒雅,路福平. 生物法合成戊二胺研究进展[J]. 生物工程学报, 2014, 30(2): 161-174.
LI DX, LI M, WANG HX, WANG SY, LU FP. Progress in biosynthesis of diaminopentane[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(2): 161-174 (in Chinese).
- [2] TABOR CW, TABOR H. Polyamines in microorganisms[J]. Microbiological Reviews, 1985, 49(1): 81-99.
- [3] SARI IN, SETIAWAN T, KIM KS, WIJAYA YT, CHO KW, KWON HY. Metabolism and function of polyamines in cancer progression[J]. Cancer Letters, 2021, 519: 91-104.
- [4] HOLBERT CE, CULLEN MT, CASERO RA, STEWART TM. Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity[J]. Nature Reviews Cancer, 2022, 22(8): 467-480.
- [5] FREUDENBERG RA, WITTEMEIER L, EINHAUS A, BAIER T, KRUSE O. Advanced pathway engineering for phototrophic putrescine production[J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(10): 1968-1982.
- [6] AN MF, ZHANG QL, LIN YF, WANG DL, CHEN W, MENG LP, YIN PC, LI LB. Stretch-induced reverse brill transition in polyamide 46[J]. Macromolecules, 2020, 53(24): 11153-11165.
- [7] 赵晓. 高分子量聚己二酰丁二胺的合成工艺及性能研究[D]. 郑州: 郑州大学硕士学位论文, 2014.

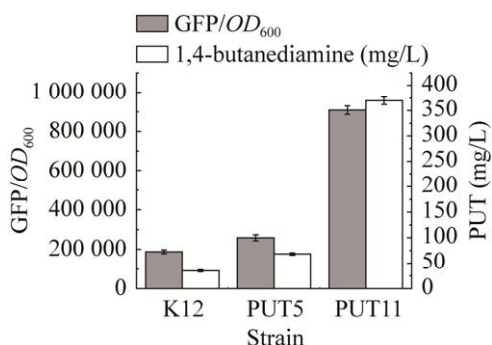


图 10 生物传感器质粒细胞内功能鉴定

Figure 10 Intracellular functional identification of the biosensor plasmids.

- ZHAO X. Study on synthesis technology and properties of high molecular weight poly (tetramethylene adipamide)[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University, 2014 (in Chinese)
- [8] QIAN ZG, XIA XX, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four carbon diamine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(4): 651-662.
- [9] KO YS, KIM JW, LEE JA, HAN T, KIM GB, PARK JE, LEE SY. Tools and strategies of systems metabolic engineering for the development of microbial cell factories for chemical production[J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(14): 4615-4636.
- [10] CHEN XL, GAO C, GUO L, HU GP, LUO QL, LIU J, NIELSEN J, CHEN J, LIU LM. DCEO biotechnology: tools to design, construct, evaluate, and optimize the metabolic pathway for biosynthesis of chemicals[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1): 4-72.
- [11] QIAN ZG, XIA XX, LEE SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine: a five carbon diamine[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(1): 93-103.
- [12] NGUYEN AQD, SCHNEIDER J, REDDY GK, WENDISCH VF. Fermentative production of the diamine putrescine: system metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolites*, 2015, 5(2): 211-231.
- [13] NGUYEN AQD, SCHNEIDER J, WENDISCH VF. Elimination of polyamine N-acetylation and regulatory engineering improved putrescine production by *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 201: 75-85.
- [14] ROGERS JK, TAYLOR ND, CHURCH GM. Biosensor-based engineering of biosynthetic pathways[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 84-91.
- [15] WANG HH, ISAACS FJ, CARR PA, SUN ZZ, XU G, FOREST CR, CHURCH GM. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution[J]. *Nature*, 2009, 460: 894-898.
- [16] TENG YX, ZHANG JL, JIANG T, ZOU YS, GONG XY, YAN YJ. Biosensor-enabled pathway optimization in metabolic engineering[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 75: 102696.
- [17] SHAKILA RJ, VASUNDHARA TS, KUMUDAVALLY KV. A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products[J]. *Food Chemistry*, 2001, 75(2): 255-259.
- [18] FAVARO G, PASTORE P, SACCANI G, CAVALLI S. Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode[J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(4): 1652-1658.
- [19] AWAN MA, FLEET I, THOMAS CLP. Determination of biogenic diamines with a vaporisation derivatisation approach using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2008, 111(2): 462-468.
- [20] Dadáková E, Křížek M, Pelikánová T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC)[J]. *Food Chemistry*, 2009, 116(1): 365-370.
- [21] LIM HG, JANG S, JANG S, SEO SW, JUNG GY. Design and optimization of genetically encoded biosensors for high-throughput screening of chemicals[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 54: 18-25.
- [22] LIN JL, WAGNER JM, ALPER HS. Enabling tools for high-throughput detection of metabolites: metabolic engineering and directed evolution applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(8): 950-970.
- [23] DIETRICH JA, McKEE AE, KEASLING JD. High-throughput metabolic engineering: advances in small-molecule screening and selection[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79(1): 563-590.
- [24] KORTMANN M, MACK C, BAUMGART M, BOTT M. Pyruvate carboxylase variants enabling improved lysine production from glucose identified by biosensor-based high-throughput fluorescence-activated cell sorting screening[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(2): 274-281.
- [25] KACZMAREK JA, PRATHER KLJ. Effective use of biosensors for high-throughput library screening for metabolite production[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2021, 48(9/10): kuab049.
- [26] CHOU HH, KEASLING JD. Programming adaptive control to evolve increased metabolite production[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2595.
- [27] ZHAO NN, QIAN L, LUO GJ, ZHENG SP. Synthetic biology approaches to access renewable carbon source utilization in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(22): 9517-9529.
- [28] TELLECHEA-LUZARDO J, STIEBRITZ MT, CARBONELL P. Transcription factor-based biosensors for screening and dynamic regulation[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1118702.
- [29] NEMOTO N, KURIHARA S, KITAHARA Y, ASADA K, KATO K, SUZUKI H. Mechanism for regulation of the putrescine utilization pathway by the transcription factor PuuR in *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(13): 3437-3447.
- [30] CHEN XF, XIA XX, LEE SY, QIAN ZG. Engineering tunable biosensors for monitoring putrescine in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(4): 1014-1027.
- [31] LI Z, SHEN YP, JIANG XL, FENG LS, LIU JZ. Metabolic evolution and a comparative omics analysis of *Corynebacterium glutamicum* for putrescine production[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2018, 45(2): 123-139.
- [32] SELIM AS, PERRY JM, NASR MA, PIMPRIKAR JM, SHIH SCC. A synthetic biosensor for detecting putrescine in beef samples[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2022, 5(11): 5487-5496.
- [33] 玄美娟, 张晓云, 高莹, 高丽影, 吴佳婧, 马梅, 王艳梅, 寇航, 路福平, 黎明. 大肠杆菌糖酵解途径和三羧酸循环启动子的表征及其应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(6): 20-30.
- XUAN MJ, ZHANG XY, GAO Y, GAO LY, WU JQ, MA M, WANG YM, KOU H, LU FP, LI M. Characterization of promoters in the glycolytic pathway and tricarboxylic acid cycle of *E. coli* and its application[J]. *China Biotechnology*, 2020, 40(6): 20-30 (in Chinese).