

铜和镍响应的双组分基因诱导表达系统的设计与优化

丁文骏^{1,2}, 周胜虎^{1,2*}, 邓禹^{1,2*}

1 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

丁文骏, 周胜虎, 邓禹. 铜和镍响应的双组分基因诱导表达系统的设计与优化[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 2145-2157.
DING Wenjun, ZHOU Shenghu, DENG Yu. Design and optimization of a two-component inducible gene expression system responsive to copper and nickel[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 2145-2157.

摘要: 双组分系统是一种广泛存在于细菌中的信号传递系统, 能够有效地发挥信号识别、信号传导、基因调节这 3 种功能, 从而实现信号的跨膜传输和放大。基于双组分系统构建的基因表达调控工具已被广泛应用于合成生物学和环境监测领域。传统基因诱导系统 T7 和 P_{BAD} 系统存在成本高、诱导剂易被细胞利用、诱导剂浓度与基因表达水平线性差等问题。为了开发低成本、诱导剂浓度与基因表达水平线性高的诱导系统, 本研究基于双组分系统 CusS-CusR 和嵌合 NrsS/CusS-CusR, 成功开发了分别由 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导的基因表达系统。通过优化组氨酸激酶(CusS 或 NrsS/CusS)与响应调节蛋白(CusR)的表达水平, 将 Cu^{2+} 诱导表达系统本底表达荧光强度由 2 400 a.u.降低至 852 a.u., 动态范围由 1.2 倍提升至 8.7 倍。同样结构的 Ni^{2+} 诱导表达系统本底荧光强度为 2 711 a.u., 动态范围为 5.6 倍。进一步通过提升目标基因的核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)强度和报告质粒拷贝数, 使 Cu^{2+} 诱导系统和 Ni^{2+} 诱导系统的动态范围分别提升至 50.0 倍和 14.3 倍。与传统 T7 和 P_{BAD} 诱导系统相比, 本研究构建的 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导系统表现出更优的诱导梯度和更低的诱导成本, 不仅为传统表达系统提供了有力补充, 也为满足多样化实验需求提供了更多选择。

关键词: 双组分系统; 铜离子诱导系统; 镍离子诱导系统; 蛋白表达; 生物传感器

资助项目: 国家重点研发计划(2024YFA0918000); 江苏省重点研发计划(现代农业) (BE2022322); 江苏省杰出青年基金(BK20220089); 国家自然科学基金(22378170, 22478156)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2024YFA0918000), the Key Research and Development Project of Jiangsu Province (Modern Agriculture) (BE2022322), the Distinguished Young Scholars of Jiangsu Province (BK20220089), and the National Natural Science Foundation of China (22378170, 22478156).

*Corresponding authors. E-mail: DENG Yu, dengyu@jiangnan.edu.cn; ZHOU Shenghu, zhoush@jiangnan.edu.cn

Received: 2025-01-23; Accepted: 2025-03-17; Published online: 2025-03-18

Design and optimization of a two-component inducible gene expression system responsive to copper and nickel

DING Wenjun^{1,2}, ZHOU Shenghu^{1,2*}, DENG Yu^{1,2*}

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

Abstract: Two-component systems (TCS) are signal transduction systems ubiquitous in bacteria, effectively performing signal recognition, transduction, and gene regulation to achieve transmembrane signal transmission and amplification. Gene expression regulation tools based on TCS have been extensively applied in synthetic biology and environmental monitoring. The traditional gene induction systems, T7 and P_{BAD} systems, have problems such as high cost, ease of inducer utilisation by cells, and poor linearity between inducer concentration and gene expression level. In order to develop low-cost induction systems with high linearity between inducer concentration and gene expression level, in this study, we developed two gene expression systems induced by Cu^{2+} and Ni^{2+} based on the CusS-CusR TCS and the chimeric NrsS/CusS-CusR TCS. By optimizing the expression levels of histidine kinase (CusS or NrsS/CusS) and the response regulator (CusR), we reduced the background fluorescence intensity of the Cu^{2+} -inducible system from 2 400 a.u. to 852 a.u. and improved its dynamic range from 1.2 folds to 8.7 folds. The Ni^{2+} -inducible system with a similar structure demonstrated a background fluorescence intensity of 2 711 a.u. and a dynamic range of 5.6 folds. Subsequently, we increased the ribosome binding site (RBS) strength and plasmid copy number, increasing dynamic ranges of 50.0 folds and 14.3 folds for the Cu^{2+} - and Ni^{2+} -inducible systems, respectively. Compared with T7- and P_{BAD} -inducible systems, the Cu^{2+} - and Ni^{2+} -inducible systems developed in this study exhibit improved induction gradients and decreased induction costs, providing robust complements to existing expression systems and offering versatile options for diverse experimental applications.

Keywords: two-component system; copper ion-inducible system; nickel ion-inducible system; protein expression; biosensor

双组分系统(two-component system, TCS)是一类广泛存在于原核生物中的信号转导系统^[1],通过介导细胞外与细胞内信号传递,在渗透压调节、运动性、趋化性、毒力因子生成等多种关键细胞过程的调控中发挥重要作用^[2-5]。典型的TCS通常由2种功能蛋白串联构成,分别是负责细胞膜外信号识别的组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和负责胞内基因表达调控的响应调节蛋白(response regulator, RR)^[6]。HK主要由跨

膜传感模块、信号转换模块以及激酶控制模块组成^[7-8],跨膜传感模块包括2个 α 跨膜螺旋跨膜结构域(transmembrane, TM)和周质感觉结构域(ligand binding domain, LBD)。当胞外配体与LBD内的底物口袋结合后,会引起TM的构象变化,该构象变化被信号转换模块HAMP结构域接收后进一步传递至激酶核心模块(Dhp和CA结构域)。Dhp和CA结构域催化ATP的 γ -磷酸基团转移至HK保守的His残基上,从而

形成磷酸化的 HK。RR 主要由负责接收 HK 信号的结构域(receiver domain, REC)和负责基因表达调控的 DNA 结合结构域(DNA binding domain, DBD)组成。REC 会接受 HK 上的磷酸基团使自身磷酸化从而引发 RR 的构象动态变化,这种构象变化会进一步改变 RR 对 DNA 的亲合力,进而实现对目标基因转录表达的调控^[9]。基于这一工作原理, TCS 可作为潜在的基因诱导表达系统,与 IPTG 和阿拉伯糖等诱导表达系统互为补充,形成多元化的表达体系。

高效的诱导表达系统要求诱导剂廉价、稳定、不易被微生物利用,基因表达水平与诱导剂水平正相关。 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 等金属离子是潜在的廉价稳定诱导剂。因此,基于 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 的 TCS 具有成为新型诱导表达系统的潜力。近年来,利用双组分系统工程化构建的表达系统在合成生物学^[10-14]、环境监测和微生物环境修复领域得到了广泛应用。基于恶臭假单胞菌的 TCS——TodS/TodT 构建的生物传感器受到苯、甲苯、二甲苯等有机污染物的激活进而调节 *tod* 基因的表达,从而产生分解这些芳香族化合物的酶^[15]。基于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TCS——CusS/CusR 和 ZraS/ZraR 系统开发了特异性识别铜离子和锌离子的双组分传感器。进一步通过将下游调控基因替换为与金属离子结合短肽(CBP 和 ZBP)嵌合的外膜蛋白 OmpCt-CBP 和 OmpCt-ZBP,实现了微生物对铜离子和锌离子的特异性吸附,每克细胞干重的最大吸附量分别达到 (13.0 ± 0.3) mg 和 (11.40 ± 0.42) mg^[10]。此外,利用结构域交换技术开发的赅生物传感器也展现出良好的金属特异性^[16]。将生物传感器的报告基因替换为目标基因,即可实现可控诱导的基因表达。然而,现有的 Cu^{2+} 和 TB^{3+} 表达系统存在动态范围较低和最大表达水平较低等问题,限制了其在基因诱导表达中的应用。

为了克服上述挑战,本研究以 CusS/CusR

和嵌合 NrsS-CusS/CusR 系统为基础,分别开发了由 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导的蛋白表达系统。通过优化 HK (CusS 或 NrsS-CusS)与 RR (CusR)的表达比例,成功解决了因细菌内源性双组分系统之间串扰而导致的高本底表达问题。进一步优化报告质粒的拷贝数及目标基因的 RBS 强度,显著提高了目标基因的诱导表达倍数和最大表达水平。与 T7 和 P_{BAD} 表达系统相比, Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导系统具有诱导剂成本低、梯度调控效果好等优势,表达不同蛋白质的稳定性较高,不仅为传统基因诱导表达系统提供了重要补充,还进一步拓宽了蛋白表达工具的选择范围,在生物工程领域中具有巨大的应用潜力。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所用菌株和质粒如表 1 所示。

1.1.2 主要试剂

无水氯化钙、五水硫酸铜、六水氯化镍、甘油、氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司, IPTG、阿拉伯糖、氯霉素、链霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 主要培养基

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L、酵母浸粉 5 g/L、NaCl 10 g/L (121 °C, 灭菌 20 min); LB 固体培养基是在 LB 液体培养基基础上加入 15 g/L 琼脂制备而成。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

2×Rapid Taq Master Mix 和 2×Phanta Flash Master Mix (Dye Plus) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)被分别用于菌落 PCR 和基因/启动子扩增。Dpn I 用于全质粒 PCR 产物消化。BBa_J23109 和 BBa_J23100 启动子以及 RBS29、RBS30 等不同强度 RBS 均来源于安德森网站

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics and functions	Source
Strains		
<i>Escherichia coli</i> JM109	Wild-type strains for plasmid construction	Lab store
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue ($\Delta cusS\Delta cusR$)	Gene expression system performance characterization	Lab store
Plasmids		
pCDFDuet-1	CloDF13 ori, P _{T7} , Sm ^R	Lab store
pACYCDuet-1	p15A ori, P _{T7} , Cm ^R	Lab store
pJKR-H- <i>cadR</i>	pUC ori, P _{BAD} , Amp ^R	Lab store
pACYC-CusS-CusR	pACYCDuet-1, P _{Bba_J23109} , <i>cusS</i> , P _{Bba_J23100} , <i>cusR</i>	Lab store
pACYC-NCusS-CusR	pACYCDuet-1, <i>nrsS/cusS_i</i> , <i>cusR</i>	Lab store
pCDF-P _{cusC} -G10-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBSG10, <i>sfgfp</i>	Lab store
pACYC-T7-CusS/CusR	pACYCDuet-1, P _{T7} , <i>cusS/cusR</i>	This study
pACYC-CusS/CusR	pACYCDuet-1, P _{BAD} , <i>cusS-cusR</i>	This study
pCDF-P _{cusC} -S29-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBS29, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-P _{cusC} -S30-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBS30, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-P _{cusC} -S31-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBS31, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-P _{cusC} -S32-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBS32, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-P _{cusC} -S33-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBS33, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-P _{cusC} -S34-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBS34, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-P _{cusC} -S35-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBS35, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-P _{cusC} -S64-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBS64, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-T7-GFP	pCDFDuet-1, P _{T7} , RBS35, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-T7-OFp	pCDFDuet-1, P _{T7} , RBS35, <i>mOrange</i>	This study
pCDF-T7-RFP	pCDFDuet-1, P _{T7} , RBS35, <i>rfp</i>	This study
pCDF-T7-YFP	pCDFDuet-1, P _{T7} , RBS35, <i>venus</i>	This study
pCDF-P _{BAD} -GFP	pCDFDuet-1, P _{BAD} , RBS35, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-P _{BAD} -OFp	pCDFDuet-1, P _{BAD} , RBS35, <i>mOrange</i>	This study
pCDF-P _{BAD} -RFP	pCDFDuet-1, P _{BAD} , RBS35, <i>rfp</i>	This study
pCDF-P _{BAD} -YFP	pCDFDuet-1, P _{BAD} , RBS35, <i>venus</i>	This study

(<https://parts.igem.org/>)。空载质粒 pACYCDuet-1 和空载质粒 pCDFDuet-1 分别用于构建 Cu²⁺和 Ni²⁺传感质粒和蛋白报告质粒。质粒构建方法采用 Gibson 组装和全质粒 PCR^[17-18]。本研究所用引物如表 2 所示。

Cu²⁺传感质粒 pACYC-CusS/CusR 的构建流程如下：使用引物 CusS/CusR-F 和 CusS/CusR-R 从大肠杆菌基因组中扩增获得 *cusS/cusR* 片段，将该片段连接至 pACYCDuet-1 质粒 T7 启动子下游，得到质粒 pACYC-T7-CusS/CusR，使用引物 BAD-F 和 BAD-R 从质粒 pJKR-H-*cadR* 上扩增获得阿拉伯糖启动子相关片段，将 pACYC-T7-CusS/CusR 启动子替换为 P_{BAD}，获得质粒 pACYC-CusS/CusR。Ni²⁺传感

质粒 pACYC-NCusS-CusR 中 *nrsS_p* 为组氨酸激酶 NrsS 截短片段，*cusS_p* 为组氨酸激酶 CusS 截短片段，拼接后形成的嵌合蛋白 NcusS。

报告质粒 pCDF-P_{cusC}-S29-GFP 的构建流程如下：以 pCDF-P_{cusC}-G10-GFP 质粒为模板，使用引物 RBS29-F 和 RBS29-R 进行全质粒 PCR，将纯化得到的 PCR 产物经过 *Dpn* I 消化后进行转化，得到 pCDF-P_{cusC}-S29-GFP 质粒。更换 RBS 的相关质粒均按照此方法进行构建。相关质粒为 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导系统报告质粒。

报告质粒 pCDF-T7-GFP 的构建流程如下：以质粒 pCDF-P_{cusC}-G10-GFP 为模板，使用引物 GFP-F 和 GFP-R 扩增获得 *sfgfp* 片段，连接至 pCDFDuet-1 质粒 T7 启动子下游获得质粒 pCDF-

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
CusS/CusR-F	atgaaactgttgattgctgaagatgaaaagaa
CusS/CusR-R	ttaagcgggtaattgataacccaacctgtccc
BAD-F	aaatataatgacctcttgataacccaagagggc
BAD-R	atggagaacagtagagagttgataaaaag
RBS29-F	gttcacacaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt
RBS29-R	agtaggttctctgtgtaactctagaaggctcataattctggtg attttatgc
RBS30-F	gattaaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt
RBS30-R	agtaggttctctcttaactctagaaggctcataattctggtgat ttttatgc
RBS31-F	agtcacacaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt
RBS31-R	agtaggttctctgtgactctagaaggctcataattctggtg ttttatgcc
RBS32-F	gagtcacacaggaaagtagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt
RBS32-R	agtaggttctctgtgactctagaaggctcataattctggtgat ttatgcc
RBS33-F	tagagtcacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt
RBS33-R	agtagtctgtgactctagaaggctcataattctggtgattt atgccgcc
RBS34-F	agagaaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt
RBS34-R	agtaggttctctcttctctagaaggctcataattctggtgattt atgccgc
RBS35-F	agattaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt
RBS35-R	agtaggttctctcttctctagaaggctcataattctggtgat ttatgcc
RBS64-F	agagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt
RBS64-R	agtaggttctctcttctctagaaggctcataattctggtgattt atgccgc
GFP-F	attaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaactgt caccggtgtgtt
GFP-R	atgctagaactggcatgcatctttgtacagttcgtccataccgt gggtga
OFP-F	attaagaggagaaatactagatgcaaaaggagagagaac aatatggctat
OFP-R	atgctagaactggcatgcatcttatacagttcattccataccacc ggtgct
RFP-F	atgctagaactggcatgcatcttatacagttcattccataccacc ggtgct
RFP-R	atgctagaactggcatgcatcttatacagttcattccataccacc ggtgct
YFP-F	attaagaggagaaatactagatggtatcaaaaggagagagc tatttacaggg
YFP-R	atgctagaactggcatgcatcttatacagttcattccataccacc cgtgat

T7-GFP, 以此方法分别获得 pCDF-T7-OFP、pCDF-T7-RFP、pCDF-T7-YFP 等质粒。以上述质粒为模板, 更换 P_{T7} 为 P_{BAD} , 分别获得 pCDF- P_{BAD} -GFP、pCDF- P_{BAD} -OFP、pCDF- P_{BAD} -RFP、pCDF- P_{BAD} -YFP。

1.2.2 孔板筛选方法

将构建成功的重组质粒转化至 *E. coli* XL1-Blue ($\Delta cusS\Delta cusR$) 菌株中, 在 37 °C 条件下于 LB 固体平板上过夜培养。随后, 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 在 37 °C、250 r/min 条件下培养过夜, 制备种子液。将种子液以 4% (体积比) 的接种量转接至装有适量 LB 液体培养基的 48 深孔板中, 在 37 °C、250 r/min 条件下培养。待培养液 OD_{600} 达到 0.4–0.6 时, 每孔添加 20 μ L 诱导剂 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} , 使体系的最终体积为 1 mL。诱导 12 h 后, 测定重组细胞的荧光强度。将终浓度为 33 μ g/mL 的氯霉素和 50 μ g/mL 的链霉素根据需求添加至培养基中。

1.2.3 荧光强度分析

将诱导后的菌液使用质量分数为 0.85% 的氯化钠溶液清洗 3 遍, 并稀释清洗后的菌液至 OD_{600} 为 0.4–0.8。荧光强度(a.u.)和细胞密度 (OD_{600}) 采用 BioTek HT 平板阅读器(伯腾仪器有限公司)测量。测定 GFP、OFP、RFP 和 YFP 在不同波长激发光和发射光下的荧光强度(GFP, 激发/发射: 485/528 nm; OFP, 激发/发射: 530/560 nm; RFP, 激发/发射: 588/633 nm; YFP, 激发/发射: 500/530 nm)。相对荧光强度为荧光强度与 OD_{600} 的比值。

1.2.4 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况

将诱导 12 h 后的重组细胞浓缩至 OD_{600} = 2.0, 取 20 μ L 菌液并加入 5 \times Loading buffer, 混匀后 98 °C 加热处理 10 min。利用 12% SDS-PAGE 分析蛋白表达情况, 上样量为 10 μ L。电泳结束后使用考马斯亮蓝 G-250 染液染色, 脱色后分析蛋白质表达水平。

2 结果与分析

2.1 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统的构建与结构优化

微生物基因组上的天然双组分系统大多以操纵子结构存在,即 HK 和 RR 共用一个启动子和终止子。本研究首先将 *E. coli* XL1-Blue 基因组上的天然 *cusS/cusR* 基因簇克隆至 pCDFDuet-1 质粒,进

一步替换启动子 P_{T7} 为 P_{BAD} (图 1A),使 *cusS-cusR* 的表达水平受到阿拉伯糖浓度控制。在不同浓度的 Cu^{2+} 和 2 mmol/L 阿拉伯糖诱导下,传感器的绿色荧光输出随着 Cu^{2+} 浓度的增加呈现上升趋势(图 1B)。然而,在未添加 Cu^{2+} 诱导时,传感器仍表现出较高的本底表达水平,动态范围仅为 1.2 倍。通过调节阿拉伯糖诱导浓度,从而优化 *cusS/cusR* 的表达水平依然无法显著降低传感器的本底表达(图 1C)。

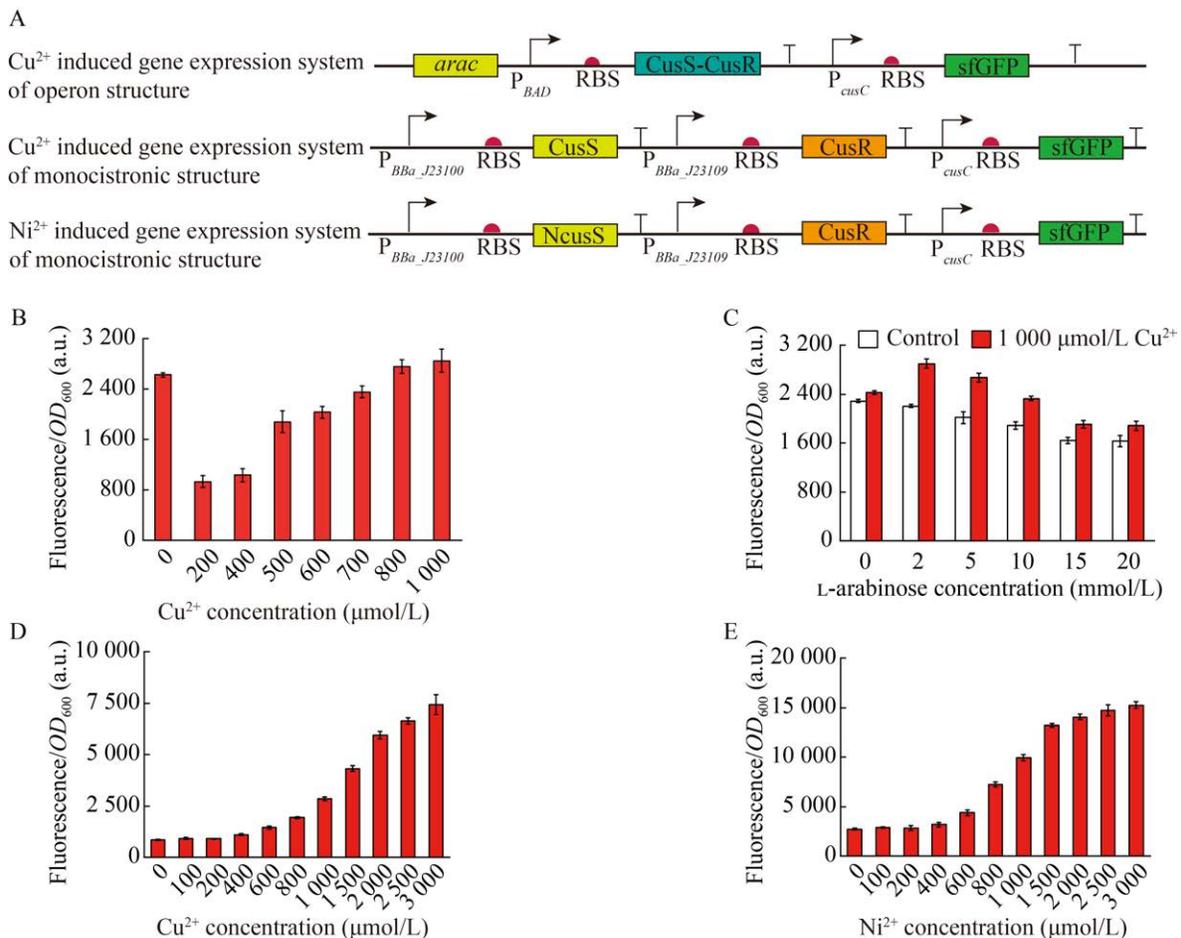


图 1 不同回路结构对 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 诱导表达系统影响

Figure 1 Effect of different loop structures on Cu^{2+} and Ni^{2+} induced expression system. A: Schematic representation of the structure of the operon structure of the Cu^{2+} induced expression system and the monocistron structure of Cu^{2+} and Ni^{2+} induced expression system; B: Fluorescence expression of Cu^{2+} induced expression system of operon structure co-induced by 2 mmol/L L-arabinose and different concentrations of Cu^{2+} ; C: Fluorescence expression of Cu^{2+} induced expression system of operon structure co-induced by 600 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} and different concentrations of L-arabinose; D: Fluorescence expression of Cu^{2+} induced expression system of monocistron structure induced by different concentration of Cu^{2+} ; E: Fluorescence expression of Ni^{2+} induced expression system of monocistron structure induced by different concentration of Ni^{2+} . Error bars indicate standard deviation from the mean ($n=3$).

为了进一步降低本底表达水平,利用弱组成型启动子 BBa_J23109 和强组成型启动子 BBa_J23100 分别调控 *cusR* 和 *cusS* 的表达,构建了单顺反子结构的 Cu^{2+} 诱导表达系统(图 1A)。在不同浓度的 Cu^{2+} 诱导下,测定传感器的荧光输出情况(图 1D)。结果表明,与操纵子结构相比,降低 *cusR* 的表达水平后,单顺反子结构的 Cu^{2+} 传感器本底表达荧光强度由 2 400 a.u. 降低至 852 a.u., 最大荧光强度由 2 800 a.u. 提升至 7 400 a.u., 动态范围由 1.2 倍提高至 8.7 倍。

Ni^{2+} 诱导表达系统是通过将 Cu^{2+} 诱导表达系统中的 HK (CusS) 跨膜结构域和周质感知结构域与集胞藻属 (*Synechocystis* sp.) PCC 6803 中的镍感知双组分系统^[19] 的 HK (NrsS) 交换获得的。尽管两者在感知金属离子的方式上有所不同,但交换后的结构域组合具有相同的调控机制,均通过同一响应调节蛋白 CusR 与下游启动子 P_{cusC} 调控目标基因表达。因此,将 Cu^{2+} 诱导表达系统最佳的表达结构应用到 Ni^{2+} 诱导表达系统(图 1A)。在不同浓度的 Ni^{2+} 诱导下,传感器的本底表达荧光强度为 2 711 a.u., 最大诱导表达荧光强度为 15 243 a.u., 动态范围为 5.6 倍(图 1E)。

2.2 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统拆分与 RBS 优化

TCS 系统的信号输出不仅与 HK 和 RR 的表达水平密切相关,还受到目标基因拷贝数和上游 RBS 强度的影响。使用高拷贝质粒和强 RBS 表达目标基因,将更有助于提高诱导系统的输出水平。因此,为了进一步优化 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统,将 P_{cusC} -RBS-sfGFP 克隆至拷贝数更高的 pCDFDuet-1 质粒上,从而将诱导表达系统拆分为传感质粒和报告质粒这 2 个部分(图 2A)。研究发现,拆分 Cu^{2+} 诱导表达系统后,相比未拆分前(图 1D),本底表达荧光强度从 852 a.u. 提高至 1 050 a.u., 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 诱导下荧光强度从 2 853 a.u. 增加至 18 111 a.u. (图 2B), 响应倍数由 3.3 倍提升至 17.2 倍。拆分 Ni^{2+} 诱导表达系统后,相比未拆分前(图 1E),本底表达荧光强度从 2 711 a.u. 增加至 6 669 a.u.,

1 000 $\mu\text{mol/L}$ Ni^{2+} 诱导下荧光强度从 9 939 a.u. 增加至 28 003 a.u. (图 2C), 响应倍数由 3.7 倍提升至 4.2 倍。这些结果表明,提高报告质粒的拷贝数可以显著放大 TCS 系统的信号输出,从而增强本底表达和最大诱导表达水平。

此外,通过优化 RBS 强度,进一步提高了 GFP 的翻译效率。与 2.1 节中使用的强 RBS G10 相比,当 RBS 强度较低时, Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统在未添加诱导剂或添加 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导剂后,荧光强度显著降低。随着 RBS 强度的增强,本底表达和诱导后的荧光强度逐渐增加(图 2D、2E)。当 sfGFP 的 RBS 强度最高时, Cu^{2+} 诱导表达系统的本底表达荧光强度和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 诱导下的荧光强度分别由 1 050 a.u. 和 18 111 a.u. 提高至 1 154 a.u. 和 50 454 a.u., 响应倍数由 17.2 倍提升至 43.7 倍。 Ni^{2+} 诱导表达系统的本底表达荧光强度和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Ni^{2+} 诱导下的荧光强度分别由 6 669 a.u. 和 28 003 a.u. 分别提升至 7 990 a.u. 和 33 628 a.u., 响应倍数无明显变化。

2.3 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统的诱导性能表征

理想的基因诱导表达系统应具备低本底表达、较高的最高诱导水平、较广动态范围、良好的梯度诱导效果以及使用成本低廉的诱导剂等特点。为评估 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统的性能,本研究以 *sfGFP* 作为报告基因,系统分析了诱导剂浓度和诱导时间对 Cu^{2+} (图 3A) 和 Ni^{2+} (图 3B) 诱导表达系统的影响,并与传统的 T7 表达系统(图 3C) 和 P_{BAD} 表达系统(图 3D) 进行了对比。过高的本底表达会导致目标基因在未添加诱导剂的情况下发生渗漏表达,从而影响系统的可调性和响应性。低本底表达能够确保目标基因仅在存在诱导剂时得到充分表达,避免非特异性表达。结果显示,T7 表达系统的本底表达最低,其荧光强度仅为 102 a.u., 而 Ni^{2+} 诱导表达系统的本底表达最高,荧光强度为 7 990 a.u.。 Cu^{2+} 诱导表达系统和 P_{BAD} 表达系统的本底荧光强度分别为 1 106 a.u. 和 1 291 a.u., 表现出相似的性能。

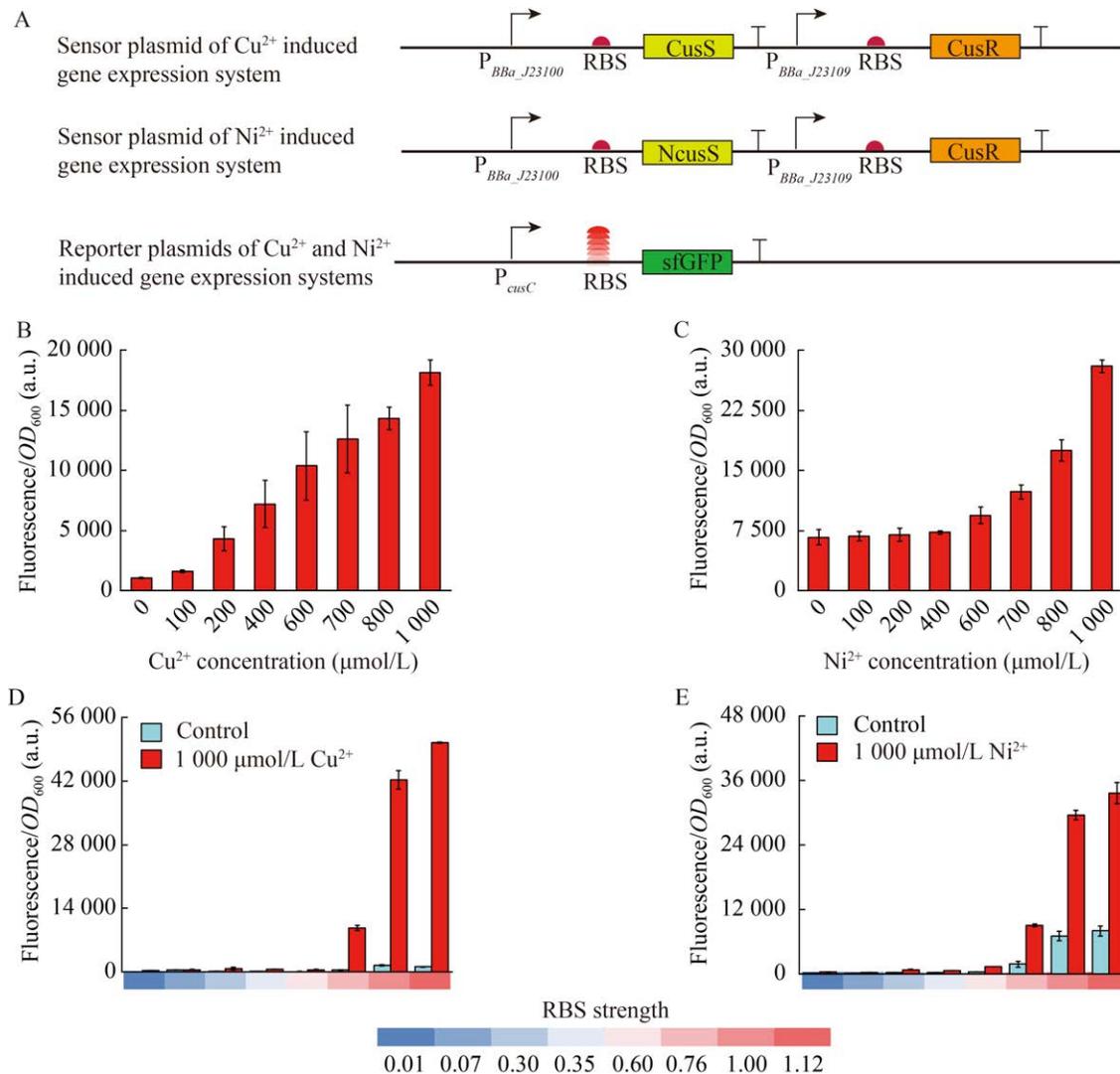


图 2 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 诱导表达系统报告质粒优化

Figure 2 Optimisation of reporter plasmids for Cu^{2+} and Ni^{2+} induced expression systems. A: Schematic representation of the structure of the sensor plasmid expressed on the pACYCDuet-1 plasmid and the reporter plasmid expressed on the pCDFDuet-1 plasmid of the Cu^{2+} and Ni^{2+} induced expression system; B: The fluorescence expression of the Cu^{2+} induced expression system with separated sensor and reporter plasmids under different concentrations of Cu^{2+} ; C: The fluorescence expression of the Ni^{2+} induced expression system with separated sensor and reporter plasmids under different concentrations of Ni^{2+} ; D: Fluorescence expression of the Cu^{2+} induced expression system under gradient intensity RBS regulation of the target gene *sfgfp* under none inducers and 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} induction; E: Fluorescence expression of the Ni^{2+} induced expression system under gradient intensity RBS regulation of the target gene *sfgfp* under none inducers and 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Ni^{2+} induction. Error bars indicate standard deviation from the mean ($n=3$).

最高诱导水平反映了在诱导后系统所能产生的最高目标蛋白量，对于蛋白质生产和酶类合成等应用具有重要意义。在各系统的最大诱导水平对比中， P_{BAD} 表达系统表现最佳，在 5.0 mmol/L

阿拉伯糖诱导 12 h 后，达到了最高的荧光强度 181 542 a.u.。 Cu^{2+} 诱导系统则表现较弱，在 5.0 mmol/L Cu^{2+} 诱导 8 h 后，荧光强度为 60 614 a.u.。T7 系统和 Ni^{2+} 诱导系统分别在

0.2 mmol/L IPTG 诱导 8 h 和 4 mmol/L Ni^{2+} 诱导 12 h 后, 达到最高的荧光强度, 分别为 97 908 a.u. 和 114 414 a.u.。在性能表征方面, Cu^{2+} 诱导系统和 Ni^{2+} 诱导系统动态范围最高, 分别达到 50.0 倍和 14.3 倍。此外, 4.0 mmol/L Ni^{2+} 和 5.0 mmol/L Cu^{2+} 已接近 *E. coli* XL1-Blue 正常生长可耐受的最大胁迫浓度, 更高浓度的金属离子将严重抑制菌株生长, 从而降低诱导系统的性能。

在诱导后最高表达时间点下, 诱导梯度效应的线性化水平决定了是否能通过调控诱导剂浓度以精确调节蛋白表达水平。高线性化水平对于高效的蛋白生产和基因功能研究至关重要。

要。为此, 本研究分析了 Cu^{2+} (图 3E)、 Ni^{2+} (图 3F)、T7 (图 3G) 和 P_{BAD} (图 3H) 系统在最高表达时间点下, 诱导剂浓度与蛋白表达量之间的线性关系。结果表明, 相较于 T7 和 P_{BAD} 系统, Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统在诱导剂浓度与基因表达水平之间表现出更优越的线性关系。

2.4 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统在表达不同蛋白质时的应用普适性

为了进一步评估 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统在不同蛋白质表达中的普适性, 选择了 4 种不同类型的荧光蛋白(GFP、OFP、RFP 和 YFP), 并使用 Cu^{2+} (图 4A)、 Ni^{2+} (图 4B)、T7 (图 4C) 和

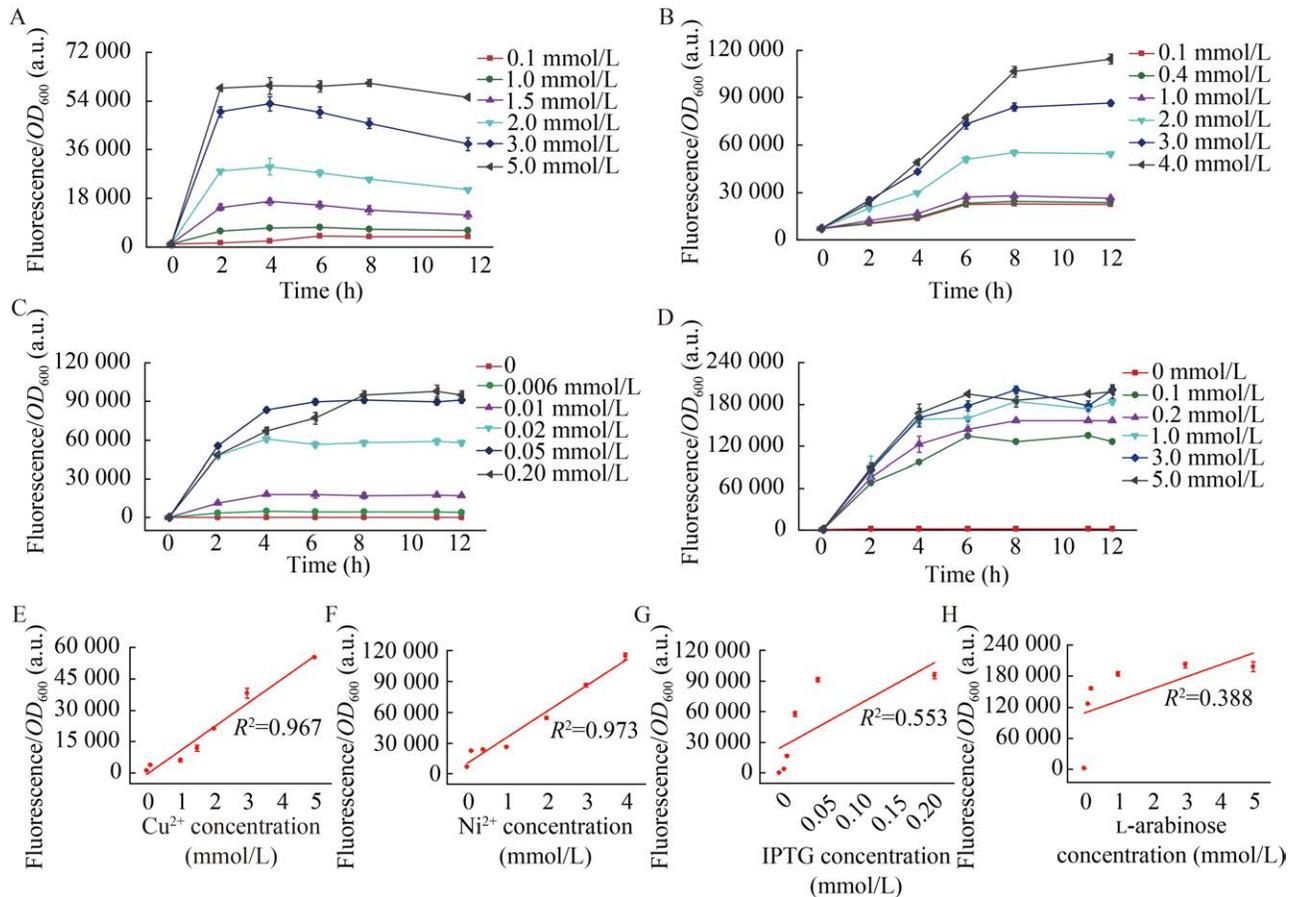


图 3 基因诱导表达系统性能表征

Figure 3 Performance characterisation of gene-induced expression systems. Effect of induction time and inducer concentration on the Cu^{2+} (A), Ni^{2+} (B), T7 (C) and P_{BAD} (D) induced expression system. Analysis of linear relationship between inducer concentration and gene expression level at time of maximum expression in Cu^{2+} (E), Ni^{2+} (F), T7 (G) and P_{BAD} (H) gene expression systems. Error bars represent the standard deviation from the mean ($n=3$).

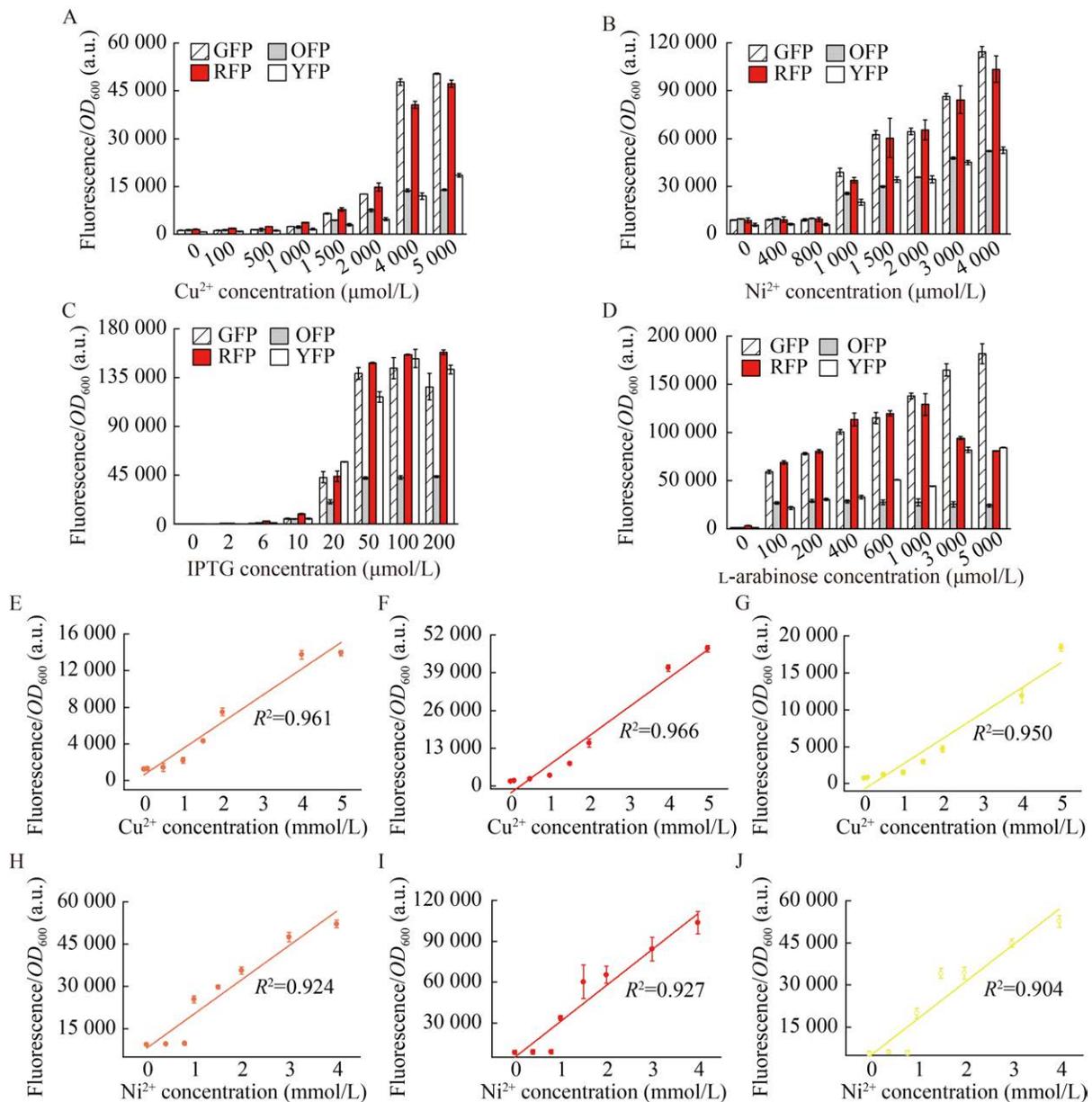


图4 蛋白种类对基因诱导系统的影响

Figure 4 Effect of protein type on gene induction system. The induction of GFP, OFP, RFP and YFP by T7 (A), P_{BAD} (B), Cu²⁺ (C) and Ni²⁺ (D) induced expression systems under the control of gradient inducers. Linear level analysis of gradient induction of OFP (E), RFP (F) and YFP (G) by Cu²⁺ induced expression system. Linear level analysis of gradient induction of OFP (H), RFP (I) and YFP (J) by Ni²⁺ induced expression system. Error bars represent the standard deviation from the mean ($n=3$).

P_{BAD} (图4D)诱导表达系统进行表达。测定不同浓度诱导剂诱导12 h后的蛋白质表达水平,发现在本底表达方面,T7诱导表达系统表现出显著的优势,4种荧光蛋白的本底表达均最低。相比之下,其他3种诱导表达系统中,P_{BAD}系

统对OFP的本底表达最低,其本底荧光强度为985 a.u.。在最大表达水平方面,T7系统对OFP、RFP和YFP的诱导表达最为优越,最大表达荧光强度分别为43 722、126 568和142 352 a.u.;而P_{BAD}诱导系统在表达GFP时表现最优,最大荧

光强度为 181 542 a.u.。

为了探究 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统在梯度诱导的线性化水平上的优势, 分析了 Cu^{2+} 诱导表达系统对 OFP (图 4E)、RFP (图 4F)、YFP (图 4G) 以及 Ni^{2+} 诱导表达系统对 OFP (图 4H)、RFP (图 4I)、YFP (图 4J) 在最大诱导水平下与诱导剂浓度之间的线性关系。结果表明, Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统对这 3 种蛋白的梯度诱导曲线的

R^2 值均大于 0.900, 表明这 2 种系统在诱导剂浓度和诱导水平上具有较强的线性相关性, 并且这种线性相关性具有良好的普适性。

为了进一步探讨 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统在梯度诱导方面的优势, 对其在不同浓度诱导剂条件下 GFP (图 5A)、OFP (图 5B)、RFP (图 5C) 和 YFP (图 5D) 这 4 种蛋白的诱导表达情况进行了 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 结果显示, 与 Ni^{2+}

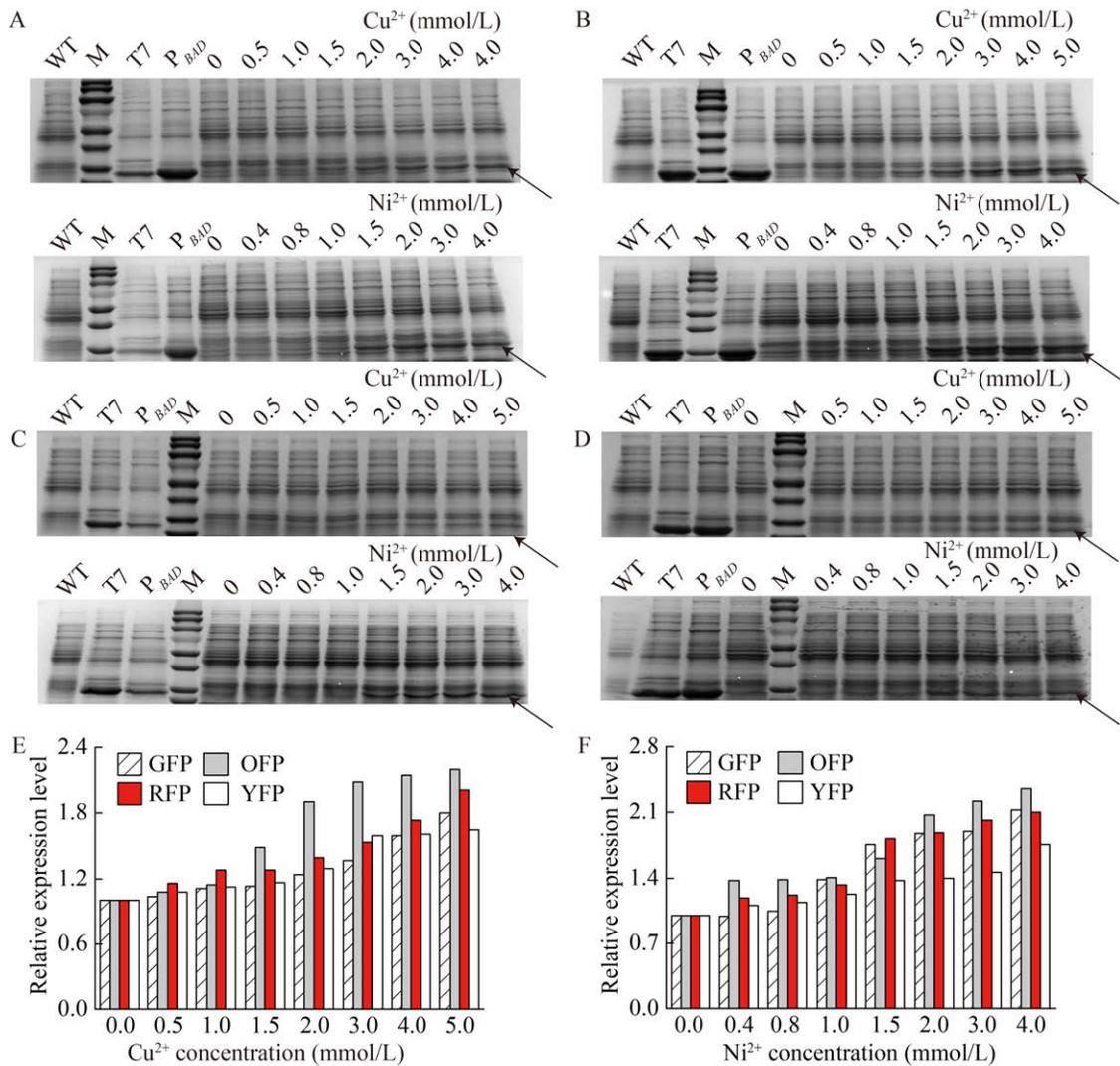


图 5 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统蛋白表达 SDS-PAGE 及灰度分析

Figure 5 SDS-PAGE and gray scale analysis of protein expression in Cu^{2+} and Ni^{2+} induced expression system. SDS-PAGE analysis of GFP (A), OFP (B), RFP (C) and YFP (D) expression by Cu^{2+} and Ni^{2+} induction system under the control of gradient concentration inducer. M: Protein marker. E: Gray analysis of Cu^{2+} induced expression system SDS-PAGE. F: Gray analysis of Ni^{2+} induced expression system SDS-PAGE. The direction of the arrow is the location of the target protein band.

诱导表达系统相比, Cu^{2+} 诱导系统在最大蛋白表达量上存在一定劣势, 但在低浓度诱导下, Ni^{2+} 诱导表达系统蛋白表达量的差异较小。随着 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 浓度的提高, GFP、OFP、RFP 和 YFP 这 4 种蛋白的表达量均呈上升趋势。进一步使用 ImageJ 得到的灰度分析结果(图 5E、5F)与 SDS-PAGE 结果一致。以上结果进一步表明通过荧光强度分析不同诱导系统的表达性能的结果是可靠的。

3 讨论与结论

双组分系统是原核生物中广泛存在的一类重要信号传递机制, 主要负责胞内外环境信号的感知与响应, 在细菌的多种生命活动中发挥关键作用。目前, 对于双组分系统的研究主要集中于离子和小分子化合物传感器开发与应用^[20-21]。近年来, 随着合成生物学的快速发展, 双组分系统在动态调控代谢过程和环境信号响应等领域的潜力逐渐显现。一些研究者利用双组分系统组氨酸激酶和响应调节蛋白在接受外界信号后的互作特性, 尝试开发更复杂的动态调控网络^[22-24]。尽管如此, 双组分系统作为一种新型蛋白表达系统的潜力仍未得到充分挖掘。

本研究成功开发了 2 种基于双组分系统的由 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导的基因表达系统。有研究显示, 当 CusR 表达水平过高时, 大肠杆菌内源性双组分系统 HprS-HprR 可磷酸化 CusR, 进而与 P_{cusC} 结合激活下游基因的表达。然而, 在外源 Cu^{2+} 存在时, CusS 在胞内发生聚集, CusS-CusR 系统占据主导地位, 从而解除 HprS-HprR 系统的干扰^[25]。通过使用弱组成型启动子和强组成型启动子分别调控 RR 和 HK 表达, 使 Cu^{2+} 诱导表达系统动态范围由 1.2 倍提升至 8.7 倍。具有该结构的 Ni^{2+} 诱导表达系统的动态范围达到 5.6 倍, 有效地解决了细菌自身不同双组分系统间的信号串扰问题。进一步提高报告质粒拷贝数和优化目的基因 RBS, 将 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 诱导表达系统动态范围分别提升至 50.0 倍和 14.3 倍。与传统的 T7 和 P_{BAD} 诱导

表达系统相比, Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统具有更好的梯度诱导线性水平和更低的诱导成本, 且在不同蛋白表达过程中具有普适性。

大肠杆菌的传统基因表达系统主要包括 T7 和 P_{BAD} 诱导表达系统。尽管二者在生物技术领域得到了广泛应用, 但仍存在一定局限性。例如, IPTG 成本较高, 不适用于需要低成本操作的应用场景; P_{BAD} 表达系统中阿拉伯糖价格则相对较低, 但由于会被细胞利用导致诱导浓度降低等缺陷, 限制了其在高精度调控和复杂基因回路中的应用。本研究开发的 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导基因表达系统在成本控制方面表现出显著优势。其中, 氯化铜和氯化镍的价格较低, 且不被细胞代谢利用, 从而提高了诱导的稳定性。然而, 该系统仍存在一定局限性, 即仅在较高浓度的诱导剂条件下才能有效启动基因表达, 可能导致培养基中重金属离子累积, 从而引发生物废水中重金属含量超标的问题。双组分系统的功能主要受组氨酸激酶(HK)和响应调节蛋白(RR)的影响, 因此, 可通过蛋白质工程手段提高 HK 和 RR 的活性, 或通过分子生物学策略优化报告基因的输出强度, 以降低有效诱导剂的使用浓度, 进一步改善系统的适用性。

总之, 本研究的优化策略不仅有效解决了 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 诱导表达系统的本底表达高和动态范围低的问题, 还为其他双组分系统的工程化开发提供了新的思路。未来, 随着对双组分系统调控机制的更深入理解以及更多调控技术的创新, Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 基因诱导表达系统有望发展成为一种高效、灵活且具有广普适性的蛋白表达工具, 进一步拓宽生物技术与工业应用的边界, 为合成生物学和环境工程领域的创新提供更多可能。

作者贡献声明

丁文骏: 方案设计、实验操作、初稿写作、数据管理、实验操作、提供材料; 周胜虎: 数据管理、方案设计、经费支持、稿件润色修改、

监督指导；邓禹：监督指导、稿件润色修改、经费支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] AFFANDI T, McEVOY MM. Mechanism of metal ion-induced activation of a two-component sensor kinase[J]. *Biochemical Journal*, 2019, 476(1): 115-135.
- [2] MIZUNO T, MIZUSHIMA S. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes[J]. *Molecular Microbiology*, 1990, 4(7): 1077-1082.
- [3] AKERLEY BJ, MONACK DM, FALKOW S, MILLER JF. The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(3): 980-990.
- [4] DARZINS A. The *pilG* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* *Pilus* production and twitching motility, is homologous to the enteric, single-domain response regulator CheY[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(18): 5934-5944.
- [5] DERETIC V, MOHR CD, MARTIN DW. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: signal transduction and histone-like elements in the regulation of bacterial virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 1991, 5(7): 1577-1583.
- [6] STOCK AM, ROBINSON VL, GOUDREAU PN. Two-component signal transduction[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69: 183-215.
- [7] BI SY, POLLARD AM, YANG YL, JIN F, SOURJIK V. Engineering hybrid chemotaxis receptors in bacteria[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(9): 989-1001.
- [8] FUNG DKC, MA YZ, XIA TY, LUK JCH, YAN AX. Signaling by the heavy-metal sensor CusS involves rearranged helical interactions in specific transmembrane regions[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 100(5): 774-787.
- [9] GIEDROC DP, ARUNKUMAR AI. Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches[J]. *Dalton Transactions*, 2007(29): 3107-3120.
- [10] RAVIKUMAR S, GANESH I, YOO IK, HONG SH. Construction of a bacterial biosensor for zinc and copper and its application to the development of multifunctional heavy metal adsorption bacteria[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(5): 758-765.
- [11] PECA L, KÓS PB, MÁTÉ Z, FARSANG A, VASS I. Construction of bioluminescent cyanobacterial reporter strains for detection of nickel, cobalt and zinc[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 289(2): 258-264.
- [12] GANESH I, RAVIKUMAR S, LEE SH, PARK SJ, HONG SH. Engineered fumarate sensing *Escherichia coli* based on novel chimeric two-component system[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 168(4): 560-566.
- [13] ZHAO JY, SUN HH, WANG GG, WANG Q, WANG YP, LI QB, BI SY, QI QS, WANG Q. Engineering chimeric chemoreceptors and two-component systems for orthogonal and leakless biosensing of extracellular γ -aminobutyric acid[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(25): 14216-14228.
- [14] RAVIKUMAR S, DAVID Y, PARK SJ, CHOI JI. A chimeric two-component regulatory system-based *Escherichia coli* biosensor engineered to detect glutamate[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 186(2): 335-349.
- [15] DÍAZ E, PRIETO MA. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11(5): 467-475.
- [16] LIANG HH, DENG X, BOSSCHER M, JI QJ, JENSEN MP, HE C. Engineering bacterial two-component system PmrA/PmrB to sense lanthanide ions[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(6): 2037-2039.
- [17] NELSON MD, FITCH DHA. Overlap extension PCR: an efficient method for transgene construction[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 772: 459-470.
- [18] PRYOR JM, POTAPOV V, KUCERA RB, BILOTTI K, CANTOR EJ, LOHMAN GJS. Enabling one-pot Golden Gate assemblies of unprecedented complexity using data-optimized assembly design[J]. *PLoS One*, 2020, 15(9): e0238592.
- [19] LÓPEZ-MAURY L, GARCÍA-DOMÍNGUEZ M, FLORENCIO FJ, REYES JC. A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(1): 247-256.
- [20] WANG JF, ZHANG C, SETH CHILDERS W. A biosensor for detection of indole metabolites[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(7): 1605-1614.
- [21] SELVAMANI V, MARUTHAMUTHU MK, ARULSAM Y, EOM GT, HONG SH. Construction of methanol sensing *Escherichia coli* by the introduction of novel chimeric MxcQZ/OmpR two-component system from *Methylobacterium organophilum* XX[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2017, 34(6): 1734-1739.
- [22] RUTTER JW, DEKKER L, FEDOREC AJH, GONZALES DT, WEN KY, TANNER LES, DONOVAN E, OZDEMIR T, THOMAS GM, BARNES CP. Engineered acetoacetate-inducible whole-cell biosensors based on the AtoSC two-component system[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(11): 4278-4289.
- [23] GANESH I, RAVIKUMAR S, YOO IK, HONG SH. Construction of malate-sensing *Escherichia coli* by introduction of a novel chimeric two-component system[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(4): 797-804.
- [24] STEIN V, ALEXANDROV K. Synthetic protein switches: design principles and applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(2): 101-110.
- [25] URANO H, YOSHIDA M, OGAWA A, YAMAMOTO K, ISHIHAMA A, OGASAWARA H. Cross-regulation between two common ancestral response regulators, HprR and CusR, in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology*, 2017, 163(2): 243-252.