



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Bioengineering—Article

## 重构异戊二烯焦磷酸代谢途径促进萜类化合物的合成

徐昱皓<sup>a,b</sup>, 吕雪芹<sup>a,b</sup>, 崔世修<sup>a,b</sup>, 刘延峰<sup>a,b</sup>, 夏洪志<sup>c</sup>, 李江华<sup>a,b</sup>, 堵国成<sup>a,b</sup>, 李兆丰<sup>d</sup>, Rodrigo Ledesma-Amaro<sup>e</sup>, 陈坚<sup>b,\*</sup>, 刘龙<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

<sup>b</sup> Science Center for Future Foods, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

<sup>c</sup> Richen Bioengineering Co., Ltd., Nantong 226000, China

<sup>d</sup> State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

<sup>e</sup> Department of Bioengineering and Centre for Synthetic Biology, Imperial College London, London SW7 2AZ, UK

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 June 2022

Revised 28 December 2022

Accepted 21 March 2023

Available online 25 July 2023

#### 关键词

萜类

基因回路

枯草芽孢杆菌

异戊二烯焦磷酸

### 摘要

萜类化合物是最大的一类天然产物。它们是以异戊二烯焦磷酸(IPP)作为基本单元构建而成的。使用细胞工厂合成萜类化合物已经引起了极大关注。而迄今为止,IPP的供应不足仍然是高效合成萜类化合物的主要挑战。在本项研究中,发现在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中,中心代谢和IPP供应之间的代谢通量分配不平衡阻碍了IPP的积累。因此,本研究构建了一系列响应丙酮酸和(或)丙二酰辅酶A的双输入多输出(two-input-multi-output, TIMO)基因回路,对IPP的代谢途径进行了改造,使IPP的积累增加了将近4倍。随后,设计了一种IPP代谢网络重构策略以提高三种萜类化合物的产量,包括维生素K2(MK-7,4.1倍)、番茄红素(9倍)和β-胡萝卜素(0.9倍)。在50-L的生物反应器中,MK-7的产量达到1549.6 mg·L<sup>-1</sup>,是迄今为止报道的最高产量。本文提出了一种基于TIMO基因回路的IPP代谢网络重构框架,可用于复杂代谢网络的协同精细调控,从而实现萜类化合物的高效合成。

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

萜类化合物是最大的一类天然产物,在医药、香精、食品添加剂等领域有着广泛的应用[1–2]。然而,大部分萜类化合物的生产者(主要是植物),由于含量低、缺乏遗传改造工具和生长周期长等因素,不适合大规模合成萜类化合物。与此相反,利用基因工程改造微生物细胞工厂来合成萜类化合物是一种极具前景的可持续生产方式[3–4]。萜类化合物的代谢网络可分为三个模块,即中心代谢模块、

异戊二烯焦磷酸(IPP)供应模块和萜类化合物合成模块。IPP是萜类化合物生物合成的基本组成部分。自然界中存在两种IPP生物合成模块:以丙酮酸和甘油醛-3-磷酸作为前体的2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸(MEP)模块(存在于细菌和植物中);以乙酰辅酶A作为前体的甲羟基异戊烷酮(MVA)模块(存在于真核生物和古细菌中)[3]。在大多数微生物细胞工厂中,IPP供应不足会限制萜类化合物的产量。因此,需要加强胞内IPP的供应。然而,如何调节中心代谢和IPP合成途径之间的代谢通量仍是需要

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [jchen@jiangnan.edu.cn](mailto:jchen@jiangnan.edu.cn) (J. Chen), [longliu@jiangnan.edu.cn](mailto:longliu@jiangnan.edu.cn) (L. Liu).

2095-8099/©2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 28(9): 166–178

引用本文: Xianhao Xu, Xueqin Lv, Shixiu Cui, Yanfeng Liu, Hongzhi Xia, Jianghua Li, Guocheng Du, Zhaofeng Li, Rodrigo Ledesma-Amaro, Jian Chen, Long Liu. Re-modeling Isoprene Pyrophosphate Metabolism for Promoting Terpenoids Bioproduction. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.03.019>

解决的关键问题[5]。

目前, 已经有多种策略被应用于促进IPP的合成, 如中心代谢工程[6]和限速酶工程[7-8]。例如, 通过增加乙酰辅酶A的供应和上调MVA途径中限速酶的表达, 可以显著提高异戊二烯的产量[9]。此外, 在大肠杆菌(*E. coli*)中异源引入MVA通路可以触发MVA和MEP通路之间的协同作用, 从而增加IPP代谢池的供应[10]。然而, 这些静态调控策略可能会导致有毒中间体的积累、代谢失衡和产生新的代谢瓶颈, 并最终影响萜类化合物的产量、得率和生产强度。

近年来, 研究人员提出可以通过模拟细胞本身的调节机制, 构建能够响应胞内外信号的人工基因回路, 对细胞的代谢通量进行动态调控, 这些信号包括温度、光、氧气和中间代谢产物[11-13]。动态调控能够根据细胞的代谢状态, 实时平衡和微调胞内的代谢通量, 防止中间代谢物的积累, 促进产物的高效合成[12]。基于响应IPP的基因回路, Chou等[14]设计了一个适应性进化系统, 显著增加了萜类化合物的产量。此外, Zhou等[15]开发了一种柚皮素-香豆酸-丙二酰辅酶A相平衡(NCOMB)的基因回路, 用于动态控制前体丙二酰辅酶A的合成。虽然这些基因回路在一定程度上可以提高萜类化合物的合成, 但它们相互独立, 单一输入, 靶点专一, 并且不能协同调节IPP代谢网络, 导致IPP的供应和目标产物的产量受限。

本文提出了一种基于双输入多输出(TIMO)基因回

路的流程框架用以重构IPP的代谢网络(图1)。并将其应用于改造枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)高效合成萜类化合物七烯甲萘醌(menaquinone-7, MK-7)。MK-7能够有效预防骨质疏松症、动脉钙化和帕金森病[16]。首先, 在MK-7生产菌株BS17[17]中引入MVA模块以促进IPP积累, 获得菌株BS17-MVA。随后, 通过测定菌株BS17-MVA[图1(a)]中胞内代谢物的含量来鉴定限制IPP供应的瓶颈, 并设计了一个级联调控系统协同调节IPP的代谢[图2(b)]。接下来, 根据设计的级联调控系统, 基于转录因子FapR、PdhR和反义转录[图1(c)、(d)], 构建了一系列丙二酰辅酶A响应型基因回路以及响应丙二酰辅酶A和丙酮酸的双信号输入“与”门和“或”门回路[图1(c)和(d)]。最后, 将这些基因回路引入BS17-MVA中, 动态调控中心代谢模块和IPP供应模块间的代谢通量[图1(e)], 使MK-7在50-L生物反应器中的产量达到 $1549.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 这是迄今为止报道的MK-7最高产量。另外, 将该流程框架应用于另外两种萜类化合物(番茄红素和 $\beta$ -胡萝卜素)代谢网络的调控, 验证了该流程框架的普适性。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 菌株、质粒和培养条件

本研究中涉及的菌株、质粒和引物详见附录A中的

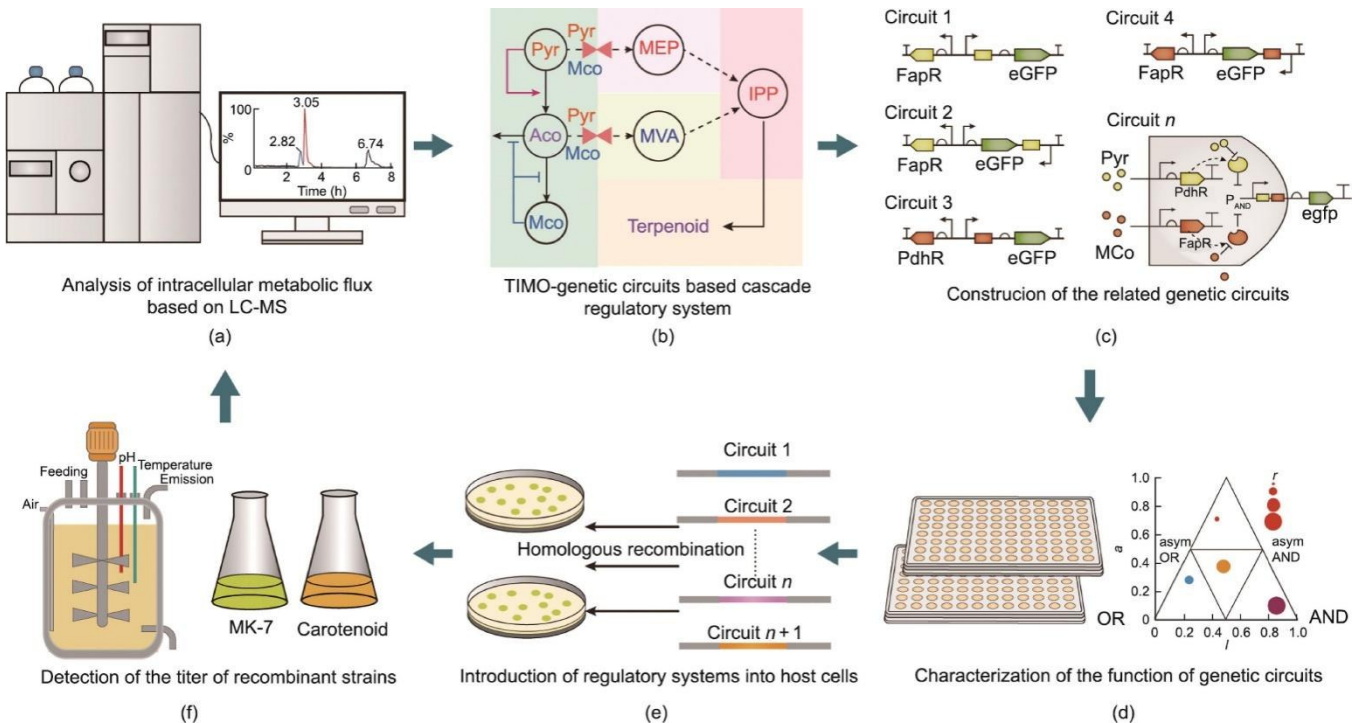


图1. 基于双输入多输出(TIMO)基因回路的IPP代谢网络重构流程框架。

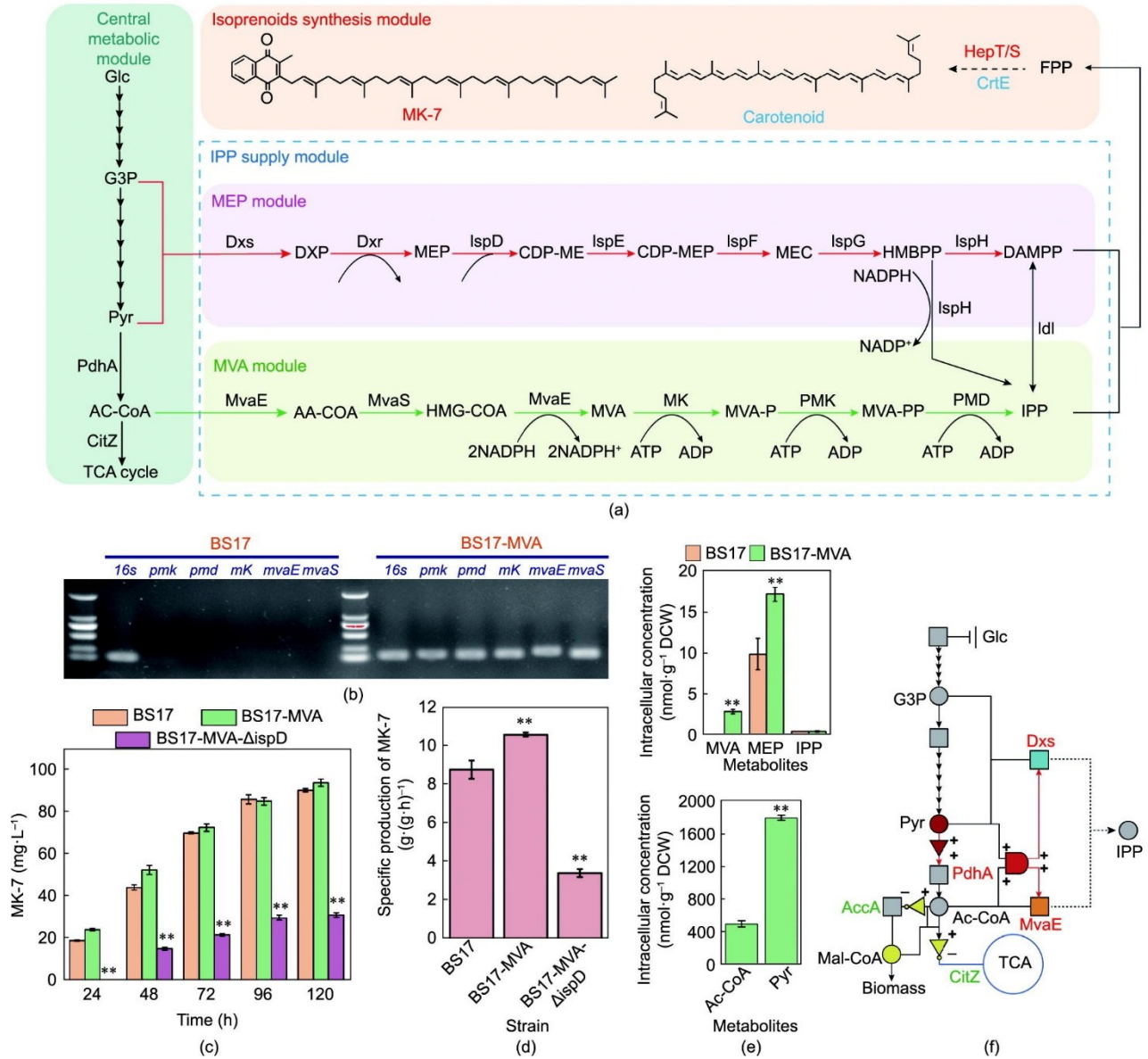


图2. 在 *B. subtilis* 中引入 MVA 途径。

表 S1~S3。 *E. coli* 在 37 °C 下培养于 LB 培养基，需要时添加 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的氨苄青霉素。MK-7 的发酵培养基配方如下：葡萄糖 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，大豆蛋白胨 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，酵母提取物 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。抗生素卡那霉素、壮观霉素、博来霉素和氯霉素的工作浓度分别为 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。化学试剂均采购于 Sigma-Aldrich (美国) 或国药集团有限公司 (中国)。

## 2.2. DNA 遗传改造

为构建丙二酰辅酶 A 响应型基因回路，首先使用引物 Zai\_fapR/F 线性化质粒 pHT01-P43-GFP。然后，以 *B. subtilis* 168 的基因组为模板，fabHAF/R、fabHBF/R 和 fabIF/R 为引物，扩增获得启动子  $P_{fabHA}$ 、 $P_{fabHB}$  和  $P_{fabI}$ ，并使

用 Gibson Assembly Cloning Kit (NEB, 英国) 融合片段，获得质粒 pHT01-fabHA-GFP、pHT01-fabHB-GFP 和 pHT01-fabI-GFP。接着分别使用反向 PCR 和引物 FapRU-F/R、FapRD-F/R、FapR1-F/R 将 FapR 的结合位点 (5'-AATTATATACTACTATTAGTACCTAGTCTTAATT-3') 插入质粒 pHT01-P43-GFP 中，获得质粒 pHT01-P43FU-GFP、pHT01-P43FD-GFP 和 pHT01-P43F1-GFP。使用引物 Zai\_VegF/R 线性化质粒 pHT01-P43-GFP，并以 *B. subtilis* 168 的基因组为模板，PvegF/R、FabI\_VegF/R、FapR\_vegF/R 为引物，扩增获得  $P_{veg}$ 、 $P_{fabI}$  和  $fapR$ 。最后，使用 Gibson 组装将片段融合。以质粒 pHT01-P43FD-GFP 为模板，P43FDTUF/R 为引物，构建 FapR 结合位点突文库。接着用 NEB 公司的限制性核酸内切酶 *DpnI* 消化

PCR产物并转化进入 *E. coli* JM109 感受态细胞 (Takara, 日本) 中。质粒 pHT01-PxylA-fapR-fabI-GFP 和 pHT01-PxylA-fapR-P43FD180-GFP 的构建方法与质粒 pHT01-Pveg-fapR-fabI-GFP 类似。以质粒 pStop 为模板, PI-AN\_xylAF/R 为引物, 获得启动子  $P_{xylA}$  片段。

反义丙二酰辅酶 A 响应型回路构建的方法如下。以 *E. coli* K12 为模板, P\_GAPF/R 为引物获得片段 PGAP 并使用 Gibson 组装插入质粒 pHT01-P43-GFP 中, 获得重组质粒 pHT01-GAP-GFP。为了构建反义丙二酰辅酶 A 传感器, 首先利用引物 Fan\_ZaiF/R 对质粒 pHT01-grac100 进行线性化处理。然后, 分别用引物 Fan\_fabIF/R 和 Fan\_180DF/R 从相应的质粒中克隆出启动子  $P_{fabI}$ 、P43FD 和 P43FD180。最后, 用 Gibson 组装融合这些片段。采用反向 PCR 和引物 Qu\_fabIF/R、Qu\_DF/R、Qu\_180DF/R 分别去除质粒 pHT01-grac100-fabI、pHT01-grac100-P43FD 和 pHT01-grac100-P43FD180 中的启动子核心区域。反义启动子文库的构建过程与 FapR 结合位点突变文库类似, 并以 Tu\_fabIGF/R 作为简并引物。

双输入逻辑门的构建过程如下。分别使用引物 Yu\_yteJMF/R、Yu\_yteJUF/R 将 FapR 结合位点插入质粒 pHT01-yteJM-GFP、pHT01-yteJU-GFP 中, 获得重组质粒 AyteJM-P43FD180 和 AyteJU-P43FD180。接着, 以质粒 AyteJM-P43FD180 和 AyteJU-P43FD180 为模板, Pgrac100MF/R、Pgrac100UF/R 为引物, 构建质粒 AyteJMG-P43FD180 和 AyteJUG-P43FD180。使用引物 YteJ\_(1/2/3/4/5/6/7/8/9/10)UF/R 和 grac100\_(1/2/3/4/5/6/7/8/9/10)UF/R 来优化 PdhR 结合位点与质粒 AyteJU-P43FD180 和 AyteJUG-P43FD180 中 -35 区间的距离。分别使用引物对 UP\_P180F/R 和 DP\_P180F/R, 将启动子 P43FD180 插入质粒 pHT01-yteJU-GFP 中启动子 yteJU 的上游或下游, 获得重组质粒 OyteJU-P43FD180 和 OP43FD180-yteJU。为了优化启动子 P43FD180 与 yteJU 之间的距离, 利用引物 100\_F/(100/200/300/400/500)R 从 *E. coli* K12 基因组中克隆出不同长度的 yeeZ (GenBank ID: 946538) 片段, 并使用 Gibson 组装将其插入 OyteJU-P43FD180 中。

### 2.3. 菌株构建

*B. subtilis* 的分子生物学操作参照前文[18]进行。通过敲除 *B. subtilis* 168 的 fapR 基因, 获得菌株 168- $\Delta$ FapR。随后, 以 *E. coli* K12 基因组为模板, 扩增基因 pdhR (GenBank ID: 944827), 构建重组菌株 PR 和 PR- $\Delta$ fapR。接着, 分别以 *B. subtilis* 168 基因组和质粒 pHT01-P43-GFP 为模板, 扩增启动子  $P_{gsiB}$ 、 $P_{veg}$  和 P43D1, 替换 PR 菌株中

pdhR 基因的 P43 启动子, 获得菌株 Pveg-PR、PgsiB-PR 和 P43D1-PR。

在菌株 BS17 中构建 MVA 通路的操作流程如下。首先, 在金唯智生物科技有限公司 (中国) 合成来自 *Enterococcus faecalis* 的基因 mvaE (编码乙酰辅酶 A 硫解酶; GenBank ID: AF290092) 和 mvaS (编码 MVA 合酶; GenBank ID: AF290092), 以及来自 *Methanosarcina mazei* 的基因 mk (编码 MVA 激酶; GenBank ID: AAM31458), 并进行密码子优化。接着, 以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 基因组为模板, 扩增基因 pmK (编码磷酸甲羟戊酸激酶; GenBank ID: 855260) 和 pmD (编码二磷酸 MVA 脱羧酶; GenBank ID: 855779)。最后, 将这些基因整合到 BS17 的基因组中, 利用 P43 启动子进行表达, 获得重组菌株 BS17-MVA。

为了动态控制 BS17-MVA 中的 MK-7 代谢网络, 将基因 pdhR 整合到 BS17-MVA 的基因组中, 得到菌株 BS17-P。同时敲除静态调节菌株中的 fapR 基因, 得到对照菌株 BS17-F。然后, 用丙酮酸激活型启动子 (D11 和 D6) 替换菌株 BS17-P 中基因 pdhA 的内源性启动子, 得到菌株 BS17-P1 和 BS17-P2。同样地, 用丙酮酸激活型启动子 (D11) 替换菌株 BS17-F 中基因 pdhA 的内源性启动子, 得到菌株 BS17-F1。接着, 将丙二酰辅酶 A 抑制型启动子 (FabIG18-5 和 FabIG12-29) 插入基因 accA 和 citZ 的 3' 末端, 获得相应的动态和静态调节菌株。同样地, 将基因 mvaE、dxs 和 hepS 的原始启动子 P43 替换为丙酮酸、丙二酰辅酶 A 双信号输入 “与” 门回路的启动子 (AyteJM-P43FD180、AyteJU9-P43FD180 和 AyteJUG2-P43FD180) 或 “或” 门回路的启动子 (OyteJU-P43FD180、OyteJU300-P43FD180 和 OyteJU500-P43FD180), 获得相应的动态和静态调节菌株 (详见附录 A 中的表 S3)。

在 BS17-MVA 和 BS17-P13 中构建  $\beta$ -胡萝卜素生物合成途径的方法如下。首先, 以质粒 pAC-BETAipi (从 Adgene 公司购买) 为模板, 扩增 *Erwinia herbicola* Eho10 来源的 crtE (编码香叶基二磷酸合酶; GenBank ID: 69517638)、crtB (编码番茄红素合酶; EMBL ID: GU721093.1)、crtI (编码番茄红素脱氢酶; GenBank ID: 66827556) 和 crtY (编码类胡萝卜素  $\beta$ -环化酶; EMBL ID: GU721093) 基因。接着, 从 *B. subtilis* 的基因组中扩增  $P_{veg}$  启动子。然后, 使用 Gibson 组装将基因 crtE、crtB、crtI、crtY 和  $P_{veg}$  插入质粒 pHT01-P43-GFP 中, 得到质粒 pHT01-Beta。最后, 将质粒 pHT01-Beta 转化进入 BS17-MVA 和 BS17-P13 菌株中, 得到 MVA-Beta 和 P13-Beta 菌株。

## 2.4. FapR 突变文库的构建及 FapR 定点饱和突变

使用 QuickMutation Random Mutagenesis Kit (碧云天生物技术有限公司) 试剂盒构建 FapR 突变文库。使用引物对 FapRF/R 进行三轮易错 PCR。每轮易错 PCR 的产物经纯化后, 使用 Gibson 组装技术替换质粒 pHT01-PxylA-fapR-P43FD180-GFP 中的野生型 *fapR* 基因。接着, 使用 *DpnI* 酶 (NEB) 消化融合产物, 转化到 *E. coli* JM109 感受态细胞 (Takara) 中。接下来, 从 *E. coli* 中提取质粒文库, 并进一步转化到 168-ΔFapR 中, 生成 FapR 突变文库。以质粒 pHT01-PxylA-fapR-P43F180D-GFP 为模板, 使用反向 PCR 对 FapR 中 Arg106 位点进行定点饱和突变, 所使用的引物是 FapR106F 和 FapR106R。

## 2.5. 荧光测定和流式细胞分析

为了检测所构建的不同基因回路菌株的荧光强度, 首先将菌株涂布至含有  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  氯霉素的 LB 固体板上, 并在  $37^\circ\text{C}$  下培养 12 h。然后, 挑取单菌落至含有  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  氯霉素的 LB 培养基中, 在  $37^\circ\text{C}$  下培养 12 h。接着, 取  $4 \mu\text{L}$  培养物接种到含有  $200 \mu\text{L}$  LB 培养基 ( $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  氯霉素) 的 96 孔荧光板中。另外, 根据需要, 向培养基中添加  $5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  诱导剂、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG 和  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浅蓝菌素。通过 Cytation 酶标仪 (BioTek, 美国) 检测增强型绿色荧光蛋白 eGFP 的荧光强度 (激发波长  $488 \text{ nm}$ , 发射波长  $520 \text{ nm}$ ) 和  $\text{OD}_{600}$ 。

所有分选步骤中, 不同突变库的 *B. subtilis* 从  $-80^\circ\text{C}$  解冻后, 以 1% (*V/V*) 的接种量接种到  $10 \text{ mL}$  含  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  氯霉素的液体 LB 培养基中, 在  $37^\circ\text{C}$  下培养 12 h。然后, 以 2% (*V/V*) 的接种量接种到  $50 \text{ mL}$  含  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  氯霉素的液体 LB 培养基中 (必要时添加  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浅蓝菌素), 在  $37^\circ\text{C}$  和  $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的条件下培养 16 h。接着, 将  $1 \text{ mL}$  的细胞培养物用 1 倍磷酸盐缓冲液 (PBS; NaCl 0.8%、KCl 0.02%、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.144%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.024%; pH 值 7.4) 洗涤两次, 用 1 倍 PBS 重悬并稀释菌体至  $\text{OD}_{600}$  达到 0.6。最后, 根据荧光强度, 使用流式细胞仪 (BD FACSArica III, 美国) 分选获得两万多个突变体。使用 FlowJo VX10 软件进行荧光强度数据分析。

## 2.6. 逻辑门的数学模型

本文使用 Cox 等[19]开发的模型来表征逻辑门的逻辑关系。该模型定义了三个参数:  $r$ , 逻辑门的动态范围;  $a$ , 逻辑门的不对称性, 量化了每个转录因子对逻辑门的抑制作用, 其中较大的  $a$  值意味着该门仅由两个转录因子中的一个调节;  $l$ , 逻辑门的逻辑关系。参数  $a$  和  $l$  的值在

0 到 1 范围内。纯“与”门的特征为  $a = 0$  和  $l = 1$ , 而纯“或”门的特征为  $a = l = 0$ 。参数  $a$ 、 $l$  和  $r$  的计算方程如下:

$$r = \frac{\text{GFP(IV)}}{\text{GFP(I)}} \quad (1)$$

$$l = \frac{2 \times \lg(\text{IV}) - \lg(\text{II} \times \text{III})}{2 \times \lg(r)} \quad (2)$$

$$a = \frac{\lg \text{III} - \lg \text{II}}{\lg r} \quad (3)$$

将不同条件下逻辑门的相对荧光强度 (即无转录因子、仅存在 FapR、仅存在 PdhR、FapR+PdhR) 由高到低排序, 并标记为  $\text{IV} \geq \text{III} \geq \text{II} \geq \text{I}$ 。

## 2.7. 荧光定量 PCR 分析

首先, 从发酵液中取  $1 \text{ mL}$  的细胞, 迅速冷冻于液氮中, 用于荧光定量 PCR 分析。随后, 使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, 德国) 提取细胞总 RNA。接着使用 Prime-Script RT-PCR Kit Takara, 日本) 合成互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。荧光定量体系使用 TB Green Premix Ex Taq II (Takara, 日本) 配置, 反应在 LightCycler 480 II 实时定量 PCR 仪 (Roche Applied Science, 德国) 中进行。以基因 *16sRNA* 作为内参。

## 2.8. MK-7 和 $\beta$ -胡萝卜素的摇瓶和 50-L 生物反应器发酵

MK-7 和  $\beta$ -胡萝卜素的摇瓶发酵方法如下。首先, 在 LB 固体平板上划线活化菌株, 于  $37^\circ\text{C}$  下孵育 12 h。然后, 挑取单菌落接种到含有  $10 \text{ mL}$  LB 培养基的  $50 \text{ mL}$  离心管中, 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下培养 12 h。接下来, 将  $1 \text{ mL}$  过夜培养的种子液接种到含有  $15 \text{ mL}$  培养基 ( $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖、 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  大豆蛋白胨、 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酵母提取物和  $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 的  $250 \text{ mL}$  摇瓶中,  $40^\circ\text{C}$ 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下发酵 5 天。

MK-7 的 50-L 生物反应器发酵方法如下。首先, 在 LB 固体平板上划线活化菌株, 于  $37^\circ\text{C}$  下孵育 12 h。然后, 挑取单菌落接种到含有  $500 \text{ mL}$  LB 培养基的  $2 \text{ L}$  摇瓶中, 在  $37^\circ\text{C}$  和  $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下培养 12 h。接下来, 将 8% (*V/V*) 的种子液接种到含有  $30 \text{ L}$  发酵培养基 ( $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖、 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  大豆蛋白胨、 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  酵母提取物和  $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 的 50-L 生物反应器中。溶氧浓度控制在 40%~60%, 发酵温度为  $40^\circ\text{C}$ 。葡萄糖浓度维持在  $20\text{--}30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 2.9. MK-7 及胞内代谢物含量检测方法

首先, 在  $0.5 \text{ mL}$  发酵液中加入  $2 \text{ mL}$  MK-7 萃取液

(2-异丙醇：正己烷=1：2)用于提取MK-7。接着，在涡旋振荡器上振荡混合物10 min，并以6000g离心5 min。混合物的上清液用于检测MK-7的浓度。使用高效液相色谱法(HPLC)检测MK-7的浓度。仪器为Agilent 1260，色谱柱是C18 ODS柱(5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm; Thermo Fisher Scientific, 美国)，柱温为40  $^{\circ}\text{C}$ 。流动相为甲醇：二氯甲烷(9：1, *V/V*)，流速为1 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 。使用Agilent OpenLAB控制面板收集和分析HPLC数据。

使用葡萄糖-乳酸检测仪(M100; 深圳市西尔曼科技有限公司)检测发酵液中葡萄糖的含量。使用微量丙酮酸(PA)测定试剂盒(Solarbio, 中国)测量胞内丙酮酸的浓度。从发酵液中取3 mL的细胞迅速冷冻于液氮中，用于检测胞内的乙酰辅酶A、丙二酰辅酶A、MEP和MVA浓度。随后，将细胞解冻后，使用等体积的无菌水漂洗细胞两次，再使用3 mL的无菌水重悬菌体。然后，添加12 mL预冷的萃取液(乙腈：甲醇：水=4：4：2)，于4  $^{\circ}\text{C}$ 下萃取胞内代谢物16 h。之后，9000g离心10 min收集上清，于冷冻干燥仪(Labconco, 美国)冻干。再使用100  $\mu\text{L}$ 超纯水复溶冻干粉，9000g离心10 min收集上清，用于后续的高效液相色谱-质谱联用(LC-MS)检测。

使用LC-MS检测MEP和IPP的含量。色谱柱为Luna 3  $\mu\text{m}$  NH<sub>2</sub>柱(150 mm  $\times$  2 mm, 3  $\mu\text{m}$ )。流动相A为水：乙腈(95：5，含有20 mm的NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，pH=9.5)，流动相B为乙腈。流速为0.2 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 。HPLC条件如下：0~1 min, 20% A; 1~30 min, 20% A~100% A; 30~31 min, 100% A; 31~31.1 min, 100% A~20% A; 31.1~40 min, 20% A; 柱温为30  $^{\circ}\text{C}$ 。MS条件为负离子模式和全扫描。使用软件MassLynx V4.1收集并分析LC-MS数据。检测仪器为Waters Maldi Synapt Q-ToF MS(美国)。乙酰辅酶A和丙二酰辅酶A的检测方法参照Onorato等[20]的方法，MVA的检测方法遵循Kindt等[21]的方法，MEP的检测方法遵循Buescher等[22]的方法。使用软件MassLynx V4.1收集并分析LC-MS数据。

## 2.10. 数据分析

所有实验均进行了三次独立重复。在SPSS 25.0中使用*t*-tests进行统计数据分析。 $P < 0.05$ 时数据具有统计学意义。当 $P < 0.05$ 时，表示为\*；当 $P < 0.01$ 时，表示为\*\*。

## 3. 结果

### 3.1. 异源引入MVA模块增强IPP供应

在前期研究中，通过在*B. subtilis*中过表达限速酶1-

脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶(Dxs)和1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶(Dxr)，增强了IPP的供应[0.27 nmol $\cdot$ g $^{-1}$ 干菌量(DCW)]，获得了一株MK-7高产菌株BS17[17]。Gao等[23]发现在*E. coli*中引入异源MVA模块能够显著增加IPP供应和MK-7的产量。为进一步强化IPP的供应，将MVA模块引入菌株BS17中。将*Enterococcus faecalis*来源的*mvaE*基因(编码乙酰辅酶A硫解酶)和*mvaS*基因(编码甲羟戊酸合酶)、*Methanosarcina mazei*来源的*mk*基因(编码甲羟戊酸激酶)以及*S. cerevisiae*来源的*pmK*基因(编码磷酸甲羟戊酸激酶)和*pmD*基因(编码二磷酸甲羟戊酸脱羧酶)整合到BS17基因组，得到重组菌株BS17-MVA[图2(a)]。RT-PCR结果显示，基因*mvaE*、*mvaS*、*mk*、*pmK*和*pmD*在菌株BS17-MVA中成功转录[图2(b)]。随后，敲除了BS17-MVA中MEP模块的必需基因*ispD*(编码2-C-甲基-D-赤藓糖醇4-磷酸胞苷转移酶)，得到重组菌株BS17-MVA- $\Delta$ ispD[图2(a)]。由于MEP是*B. subtilis*中负责IPP合成的唯一模块[图1(a)]，菌株BS17-MVA- $\Delta$ ispD的生长表明MVA模块已在菌株BS17-MVA中成功表达并具有活性。此外，BS17-MVA- $\Delta$ ispD的细胞生长速率、葡萄糖消耗速率和MK-7产量显著低于BS17和BS17-MVA[见图2(c)及附录A中的图S1(a)和(b)]，表明仅存在MVA模块无法为细胞生长和MK-7合成提供足够的IPP。

与菌株BS17相比，BS17-MVA的最大OD<sub>600</sub>降低了16%，单位细胞的MK-7产量提高了19%，胞内MEP(17.10 nmol $\cdot$ g $^{-1}$  DCW)和IPP(0.30 nmol $\cdot$ g $^{-1}$  DCW)含量分别提高了85%和11%，副产物乳酸(0.28 g $\cdot$ L $^{-1}$ )和乙酸(1.82 g $\cdot$ L $^{-1}$ )的浓度分别降低了27%和17%[见图2(d)和(e)及附录A中的图S1(b)和(c)]。这些结果表明，MVA模块和MEP模块之间存在协同效应，可以增强IPP的供应。此外，菌株BS17-MVA中的胞内丙酮酸(1783.65 nmol $\cdot$ g $^{-1}$  DCW)和乙酰辅酶A(485.84 nmol $\cdot$ g $^{-1}$  DCW)含量显著高于MEP(17.10 nmol $\cdot$ g $^{-1}$  DCW)和MVA(2.73 nmol $\cdot$ g $^{-1}$  DCW)的含量[图2(e)]。胞内MEP的含量显著高于MVA的含量。这些结果表明，中心代谢模块、MEP模块和MVA模块间的代谢通量分布不平衡，限制了MK-7的合成。

丙酮酸和乙酰辅酶A是MEP和MVA途径的前体。此外，丙酮酸和丙二酰辅酶A是细胞中的两种关键代谢物；丙酮酸是连接糖酵解和三羧酸(TCA)循环的关键节点，而来自乙酰辅酶A的丙二酰辅酶A是脂质合成的前体[24]。因此，本研究设计了一个基于TIMO基因回路的级联调节系统，该系统能够响应胞内丙酮酸和丙二酰辅酶A

的含量, 重构IPP的代谢网络[图2(f)]。首先, 用丙酮酸激活型基因回路激活*pdhA*基因的表达, 当胞内丙酮酸含量过高时, 促进丙酮酸向乙酰辅酶A的转换。随后, 用丙二酰辅酶A抑制型的基因回路抑制*accA*和*citZ*基因的表达。因此, 胞内高浓度的丙酮酸会抑制乙酰辅酶A流入脂质合成途径和TCA循环。之后, 使用响应丙酮酸与丙二酰辅酶A的“与”门回路或“或”门回路强化基因*dxs*和*mvaE*的表达。当胞内丙酮酸和丙二酰辅酶A含量过高时, 中心代谢流将流向IPP供应模块而不是细胞生长。与“或”门回路相比, “与”门回路还平衡了MEP模块和MVA模块之间的代谢通量, 从而促进了MEP和MVA模块间的协同作用。在前期工作中, 构建了一系列丙酮酸响应型基因回路[25]。本研究设计并构建了一系列双功能丙二酰辅酶A响应型基因回路、丙酮酸与丙二酰辅酶A双信号输入型“与”门回路和“或”门回路。

### 3.2. 丙二酰辅酶A响应型基因回路的设计与构建

FapR是*B. subtilis*中的丙二酰辅酶A响应转录因子, 主要调控一些参与脂肪酸合成途径的基因, 如*fabHA*(编码3-氧代ACP合酶III)、*fabHB*(同样编码3-氧代ACP合酶III)和*fabI*(编码烯酰-ACP还原酶)[26]。因此, 首先使用*fabHA*、*fabHB*和*fabI*的天然启动子来构建丙二酰辅酶A响应型基因回路。同时, 将FapR结合位点插入组成

型强启动子P43的核心区域, 构建了三个合成启动子[见图3(a)及附录A中的图S2(a)]。结果表明, 启动子 $P_{fabHB}$ 、 $P_{fabI}$ 、P43FD、P43F1在菌株168中的活性明显低于在168- $\Delta$ fapR(敲除FapR)中的活性, 说明启动子 $P_{fabHB}$ 、 $P_{fabI}$ 、P43FD、P43F1的活性被FapR抑制。此外, 添加浅蓝菌素(一种促进丙二酰辅酶A积累的脂肪酸合成途径抑制剂), 可以减弱FapR的抑制作用[见图3(b)和(c)及附录A中的图S2(b)~(e)]。此外, 当质粒表达FapR时,  $P_{fabI}$ 的活性显著降低, 并且浅蓝菌素不能完全解除FapR的抑制作用(见附录A中的图S3), 表明FapR与其结合位点间的结合能力相对较弱, 这可能限制了基因回路的动态范围。

然后, 通过添加不同含量的浅蓝菌素来检测丙二酰辅酶A基因回路的响应阈值。结果表明, 胞内丙二酰辅酶A的浓度会随着浅蓝菌素添加量的增加而逐渐升高[见图3(d)及附录A中的图S4(a)]。此外, 基因回路的相对荧光强度显示出对丙二酰辅酶A的剂量依赖性, 响应阈值为50~130 nmol·g<sup>-1</sup> DCW[图3(e)]。同时, 发现添加葡萄糖(常用的碳源)可促进胞内丙二酰辅酶A的积累, 并激活基因回路[见附录A中的图S4(b)]。此外, 发现丙二酰辅酶A基因回路对丙二酰辅酶A具有高度特异性[图3(f)]。

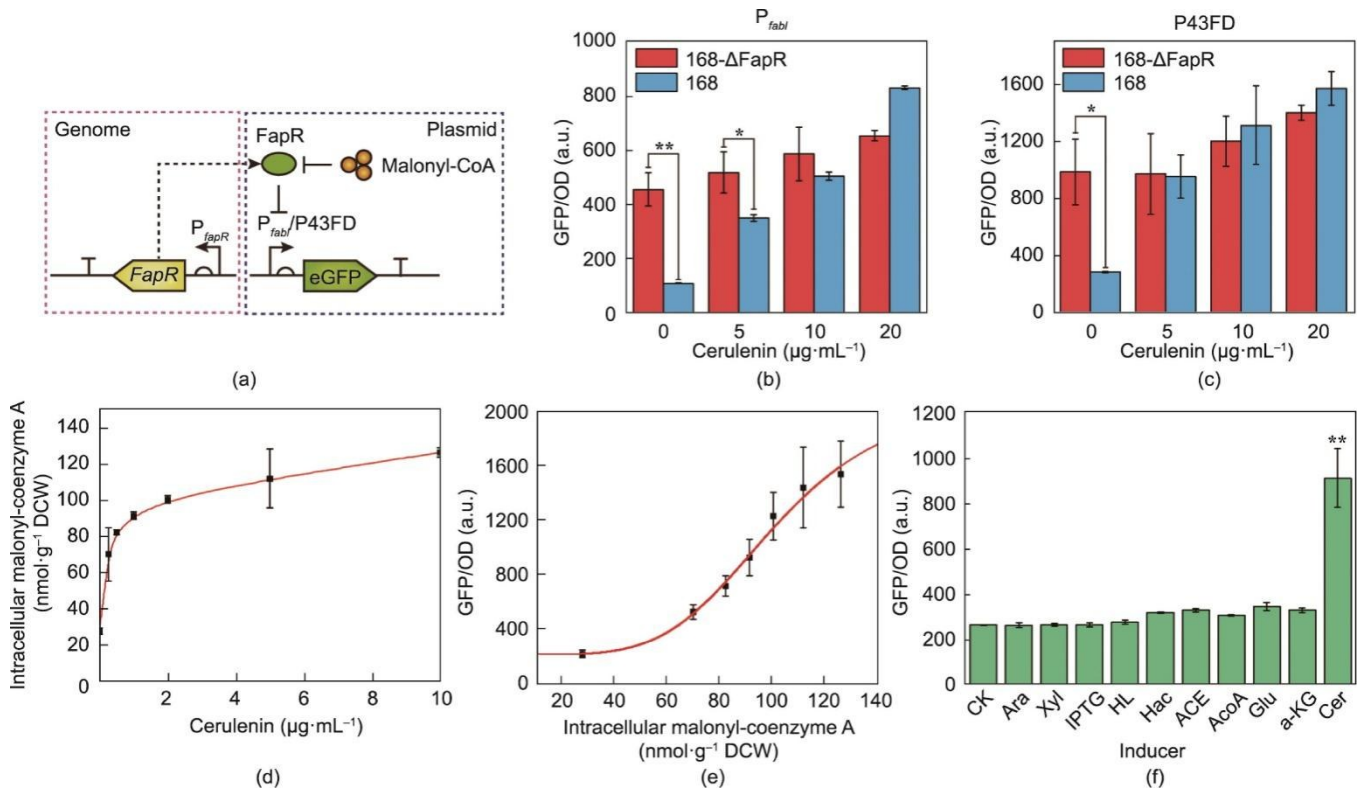


图3. 丙二酰辅酶A响应型基因回路的构建与特征鉴定。

### 3.3. 丙二酰辅酶A 响应型基因回路的动态范围和响应阈值优化

具有不同动态范围的基因回路可用于目标基因表达水平的精细调控。上文发现 FapR 的结合序列可能是影响基因回路动态范围的关键因素，因此本节通过构建启动子 P43FD 的突变文库来获得具有不同动态范围的基因回路（见附录 A 中的图 S5）。首先，使用反义 PCR 在 FapRD 的结合位点处进行突变。随后，使用流式细胞仪分选在添加  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浅蓝菌素时具有更高荧光强度的突变体[见附录 A 中的图 S5 (a) 和 (b)]。接着，分选未添加浅蓝菌素时荧光强度较低的突变体[见附录 A 中的图 S5 (c) 和 (d)]。此步骤的目的是去除不再受 FapR 调控的逃逸突变体。最终，成功获得了一系列具有不同动态范围的丙二酰

辅酶 A 响应型基因回路，其中 P43FD180 的动态范围最高，达到 6.4 倍[图 4 (a)]。此外，发现动态范围变大的突变体的 FapR 结合位点具有更对称的回文结构[见附录 A 中的图 S5 (e)]。这可能是由于回文结构增强了转录因子和结合位点之间的亲和力[27]。

响应阈值决定了基因回路的实际应用范围。本节使用了两种策略来调整基因回路的响应阈值：①改变 FapR 的表达水平；②构建 FapR 突变体。首先，使用木糖诱导型启动子  $P_{xyIA}$  来调节 FapR 的表达水平，并测试其对启动子  $P_{fabI}$  和 P43FD180 活性的影响。结果显示当木糖不存在时，启动子  $P_{fabI}$  和 P43FD180 的活性仍受到 FapR 的抑制[见图 4 (b) 及附录 A 中的图 S7]，表明木糖诱导型启动子  $P_{xyIA}$  存在泄露表达[28]。此外，随着木糖添加量的增加，启动子

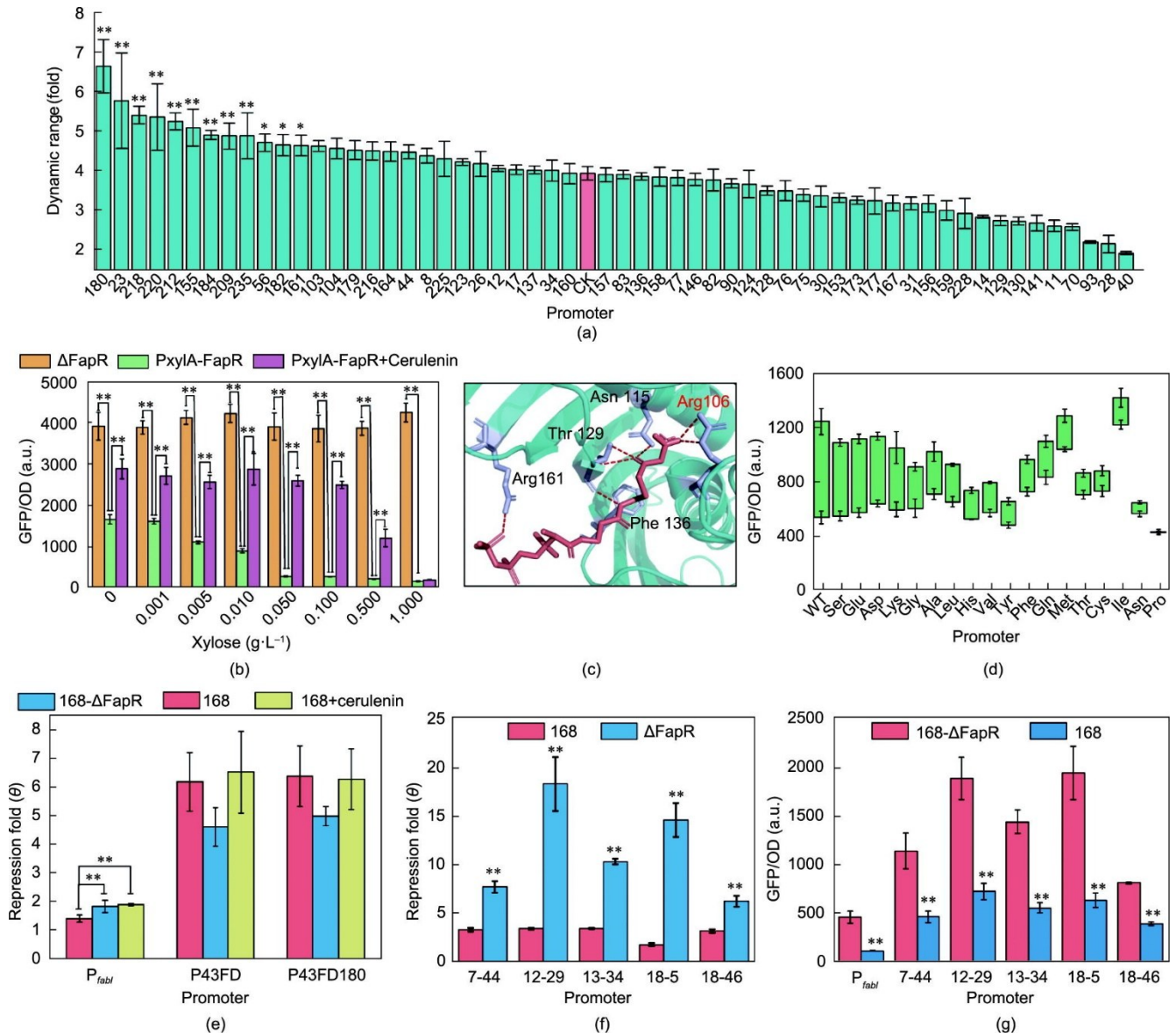


图 4. 双功能丙二酰辅酶 A 响应型基因回路的构建。



$P_{fabI}$ 和P43FD180的活性逐渐降低,表明增加FapR的表达减少了基因回路的表达泄露。同时,随着木糖浓度的增加,浅蓝菌素的激活作用逐渐减弱。此结果表明,随着FapR表达水平的增加,需要更高含量的丙二酰辅酶A来中和过表达FapR所产生的抑制作用。这些结果表明增加FapR的表达增加了基因回路的响应阈值。

随后,使用易错PCR构建了FapR的突变体文库。使用流式细胞仪对突变体进行分选,并根据添加浅蓝菌素时细胞的荧光强度将细胞分为4种类型[见附录A中的图S8(a)]。然而,当对突变体进行复筛时,发现当未添加浅蓝菌素时,荧光强度较高的突变体不再抑制基因表达,表明它们已经失去了调节功能。此外,这些突变体的测序结果表明,它们的DNA结合域的Thr23或Gln36发生了突变[见附录A中的图S8(b)],表明Thr23和Gln36是影响FapR结合DNA的关键残基。此外,成功筛选到一株突变体菌株(Arg106-Tyr),在添加浅蓝菌素的情况下其相对荧光强度明显低于原始菌株。这一发现表明其响应阈值得到了提高。有报道称,Arg106是FapR与丙二酰辅酶A结合的关键残基之一[图4(c)][29]。因此,对Arg106进行饱和突变。结果表明,当添加或未添加浅蓝菌素时,Arg106位点的突变减少了基因回路的荧光强度变化,表明Arg106影响了FapR的响应阈值[图4(d)]。

### 3.4. 反义丙二酰辅酶A响应型基因回路的设计与构建

上述构建的基因回路均为丙二酰辅酶A激活型基因回路。为了可以同时激活和抑制基因的表达,需构建双功能的基因回路。有研究表明,FapR可以激活*E. coli*中的合成启动子 $P_{GAP}$ [30]。然而,在*B. subtilis*中,FapR不能激活 $P_{GAP}$ (见附录A中的图S9)。反义转录是一种简单通用的调控工具,可以作为“非”门实现信号转换[25]。因此,本文使用反义转录将丙二酰辅酶A激活型基因回路转化为丙二酰辅酶A抑制型基因回路。将丙二酰辅酶A激活型启动子 $P_{fabI}$ 、P43FD和P43F180反转并插入*egfp*的3'端。然而,只有当 $P_{fabI}$ 被用作反义启动子时,反义转录的抑制作用才会被FapR减弱[图4(e)]。此外,当添加浅蓝菌素时, $P_{fabI}$ 的抑制作用会增强。然而, $P_{fabI}$ 基因回路的动态范围只有1.3倍。为提高基因回路的动态范围,本文使用了两种策略:①将P43FD180的FapR结合位点替换为 $P_{fabI}$ 的结合位点,从而产生杂交型启动子P43FD180G;②将启动子 $P_{fabI}$ 的核心区替换为强启动子 $P_{grac100}$ 的核心区,增强 $P_{fabI}$ 的强度,形成杂合启动子FabIG。结果表明,虽然P43FD180G不能产生丙二酰辅酶A抑制型基因回路,但FabIG的动态范围增加了3.0倍[见附录A中的

图S10(a)]。

然而,当使用FabIG作为反义启动子时,在FapR存在的情况下,它仍然能抑制*egfp*的表达。这可能是由于FabIG的泄露表达。最近的研究表明,即使反义启动子没有活性,反义启动子的转录因子结合位点也会抑制正向启动子的表达[31]。这是因为转录因子会与结合位点结合,作为阻碍物抑制正向启动子起始的RNA聚合酶(RNAP)的延伸。为了验证基因回路的泄露抑制作用是否是这个原因造成的,本文研究团队去除了反义启动子P43FD180、P43FD和 $P_{fabI}$ 的启动子区域,只保留了FapR结合位点,从而生成了启动子P43FD180Q、P43FDQ和FaBIQ。结果表明,无论转录因子FapR是否存在,P43FD180Q、P43FDQ和FabIQ均能够抑制*egfp*的表达,且抑制作用相似[见附录A中的图S10(b)]。该结果表明FapR与结合位点的结合不会抑制正向启动子的转录。P43FD180Q、P43FDQ和FabIQ对*egfp*表达的抑制作用可能是由于FapR结合位点的回文结构[见附录A中的图S10(c)]。3'非翻译区的回文结构会影响基因的表达水平[32]。综上所述,基因回路的泄露抑制作用是由于反义启动子泄露表达与FapR结合位点的回文结构。

随后,为进一步提高基因回路的动态范围,对启动子FabIG-35区的周围序列进行了突变,并构建了启动子文库。成功获得了5种突变体7-44、12-29、13-34、18-5和18-46,动态范围分别为2.3、5.4、3.0、8.2和1.9倍[见图4(f)及附录A中的图S11]。其中,12-29和18-5的动态范围高于FabIG。最后,检测了启动子7-44、12-29、13-34、18-5和18-46的表达特征[图4(g)]。结果表明,它们在菌株168- $\Delta$ FapR中的活性高于 $P_{fabI}$ ,表明提高反义启动子的活性是优化基因回路动态范围的有效策略。

### 3.5. 响应丙酮酸和丙二酰辅酶A的“与”门基因回路的构建与优化

PdhR是*E. coli*中的一种丙酮酸响应型转录因子,其调控机制与FapR的相似[33]。为了构建一个响应丙酮酸和丙二酰辅酶A的双信号输入“与”门回路,将FapR Box180插入实验室前期构建的丙酮酸响应型启动子yteJU和yteJM的-10区下游[25],得到杂合启动子AyteJU-P43FD180和AyteJM-P43FD180。只有当丙二酰辅酶A和丙酮酸同时存在时,FapR和PdhR的抑制作用才会解除,启动子才会开始转录[图5(a)]。随后,检测了启动子AyteJU-P43FD180和AyteJM-P43FD180在4种不同菌株中的相对荧光强度,包括*B. subtilis* 168(+*fapR*, -*pdhR*)、168- $\Delta$ FapR(-*fapR*, -*pdhR*)、PR(+*fapR*, +*pdhR*)和PR-

$\Delta$ FapR ( $-fapR, +pdhR$ )。结果表明, AyteJU-P43FD180 和 AyteJM-P43FD180 在菌株 *B. subtilis* 168 ( $+fapR, -pdhR$ ) 和 PR- $\Delta$ FapR ( $-fapR, +pdhR$ ) 中的活性显著低于在 168- $\Delta$ FapR ( $-fapR, -pdhR$ ) 中的活性。此外, 它们在菌株 PR ( $+fapR, +pdhR$ ) 中的活性最低 (见附录 A 中的图 S12)。这些结果表明, FapR 和 PdhR 均能保持其抑制功能, 并且当两者都存在时, 它们具有协同作用并且能够减少启动子的泄露 [34]。AyteJU-P43FD180 和 AyteJM-P43FD180 的动态范围分别为 3.0 倍和 12.9 倍。此外, 同时添加丙酮酸和浅蓝菌素可显著恢复菌株 PR ( $+fapR, +pdhR$ ) 中 AyteJU-P43FD180 和 AyteJM-P43FD180 的活性 (见附录 A 中的图 S12)。然而, 仅添加丙酮酸或浅蓝菌素也轻微激活了 PR 中的启动子活性。这些结果表明, 成功构建了可以响应丙酮酸和丙

二酰辅酶 A 的双信号输入“与”门回路。然而, 当仅添加一种诱导剂时, 仍能观察到一定程度的泄露表达。

为了提高“与”门回路的动态范围并减少其泄露表达, 将 AyteJU-P43FD180 和 AyteJM-P43FD180 的启动子核心区域替换为强启动子 *Pgrac100* 的核心区域, 分别构建 AyteJUG-P43FD180 和 AyteJMG-P43FD180。它们的动态范围分别达到了 9.8 倍和 8.7 倍, 同时也减少了泄露表达 (见附录 A 中的图 S13)。此外, 与 AyteJU-P43FD180 和 AyteJM-P43FD180 相比, AyteJUG-P43FD180 和 AyteJMG-P43FD180 的逻辑特征和“与”门回路 ( $a=0, l=1$ ) 更加类似, 因为它们的泄露程度更少 [图 5 (b)]。然而, 即使同时添加丙酮酸和浅蓝菌素, AyteJUG-P43FD180 和 AyteJMG-P43FD180 在菌株 PR ( $+fapR, +pdhR$ ) 中的活性也没有

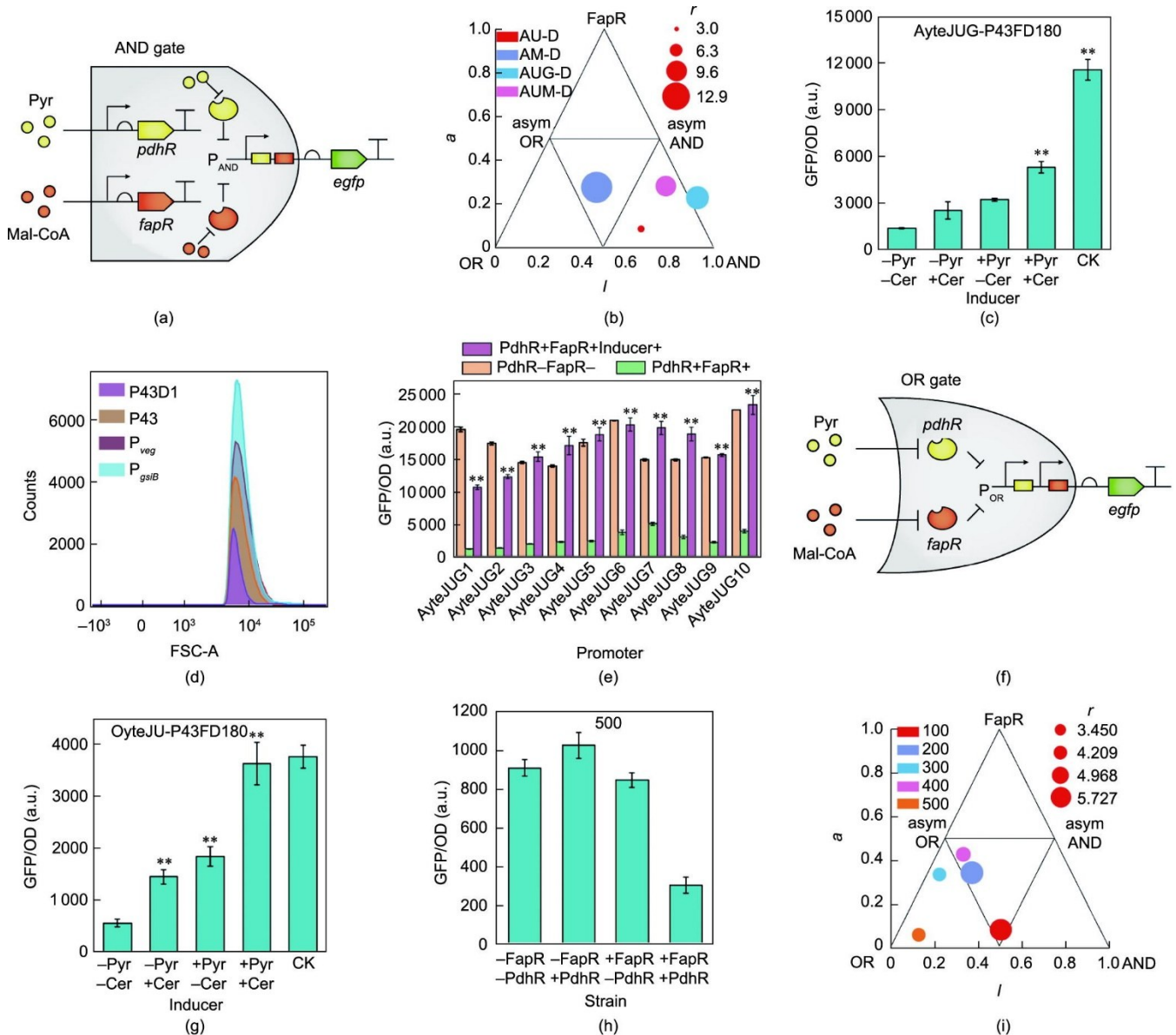


图5. 响应丙酮酸和丙二酰辅酶 A 型的双信号输入“与”门或“或”门回路的构建与优化。

被完全激活[见图5(c)及附录A中的图S14]。该结果表明PdhR和FapR的抑制作用没有被完全解除。根据附录A中的图S13所示的结果,在*B. subtilis* 168 (+*fapR*, -*pdhR*)中, AyteJUG-P43FD180和AyteJMG-P43FD180的活性完全由浅蓝菌素诱导,而它们在PR- $\Delta$ FapR (-*fapR*, +*pdhR*)中的活性未被丙酮酸完全诱导。这些结果表明影响“与”门回路完全诱导的原因与转录因子PdhR的性能有关。

为了解决这个问题,首先通过改变PdhR的启动子来调整其表达水平。共选择了4个不同强度的启动子来表达PdhR: P43、 $P_{gsiB}$ 、 $P_{veg}$ 和P43D1。其中,P43、 $P_{gsiB}$ 、 $P_{veg}$ 为组成型启动子,P43D1为丙酮酸激活型启动子[25]。结果表明,与 $P_{gsiB}$ 和 $P_{veg}$ 相比,P43和P43D1减少了“与”门回路的泄露表达(见附录A中的图S15)。随后,使用流式细胞仪分析基因回路的荧光强度分布。结果表明,当使用P43D1表达PdhR时,“与”门回路在各个单细胞中的荧光强度更加均匀[图5(d)]。这一发现表明,使用自诱导启动子表达PdhR可降低基因回路的表达噪音,这与之前的结果一致[35]。在自然界中,大多数转录因子的表达也是自我调节的,如GlnR和GltR[36-37],表明这种调节可能有利于维持整个细胞调控网络的稳定性。最后,调整了AyteJU-P43FD180和AyteJUG-P43FD180中PdhR结合位点与-35区之间的距离。结果显示,AyteJU9-P43FD180和AyteJUG2-P43FD180的动态范围最高,分别为9.1倍和17.3倍。此外,几乎所有回路都能被丙酮酸和浅蓝菌素完全激活[见图5(e)及附录A中的图S16和图S17]。

### 3.6. 响应丙酮酸和丙二酰辅酶A的“或”门基因回路的构建与优化

为构建响应丙酮酸和丙二酰辅酶A的双信号输入“或”门回路,将丙酮酸激活型启动子yteJU插入丙二酰辅酶A激活型启动子P43FD180的下游或上游部分,从而产生串联启动子OP43FD180-yteJU和OyteJU-P43FD180。当其中一个启动子被诱导剂激活时,下游基因的表达就可以启动[图5(f)]。结果表明,当诱导剂不存在时,OP43FD180-yteJU和OyteJU-P43FD180在菌株PR(+*fapR*, +*pdhR*)中的相对荧光强度显著低于其在168- $\Delta$ FapR(-*fapR*, -*pdhR*)、*B. subtilis* 168(+*fapR*, -*pdhR*)和PR- $\Delta$ FapR(-*fapR*, +*pdhR*)中的相对荧光强度(见附录A中的图S18)。这一发现表明,只有当两种转录因子都存在时,启动子的活性才会受到抑制。此外,发现OP43FD180-yteJU和OyteJU-P43FD180在*B. subtilis* 168(+*fapR*, -*pdhR*)和PR- $\Delta$ FapR(-*fapR*, +*pdhR*)中的相对荧光强度显著低于其在168- $\Delta$ FapR(-*fapR*, -*pdhR*)中的相对荧

光强度。此外,当存在其中一种诱导剂(丙酮酸盐或浅蓝菌素)时,OP43FD180-yteJU和OyteJU-P43FD180在菌株PR(+*fapR*, +*pdhR*)中的相对荧光强度显著增加,但仍低于两种诱导剂同时存在时的相对荧光强度[见图5(g)及附录A中的图S19]。这些结果表明,已经成功构建了可以响应丙酮酸和丙二酰辅酶A的双信号输入“或”门回路。然而,当仅有一个诱导剂存在时,“或”门回路的活性低于同时存在两个诱导剂时的活性,这可能是由于两个启动子串联可以协同增强下游基因的转录[38]。

为了降低串联启动子的协同效应,改变了两个启动子之间的距离。通过在启动子yteJU和P43FD180之间插入不同长度的*yeeZ*基因片段,成功构建了“或”门基因回路OyteJU100-P43FD180、OyteJU200-P43FD180、OyteJU300-P43FD180、OyteJU400-P43FD180和OyteJU500-P43FD180。结果表明,随着两个启动子之间距离的增加,串联启动子的活性逐渐降低[见图5(h)及附录A中的图S20]。此外,根据建模结果,当两个启动子之间的距离增加时,所构建的基因回路的逻辑特征更接近于理想的“或”门回路[见图5(i)及附录A中的图S21]。同时,“或”门的动态范围增加了5.6倍(OyteJU200-P43FD180)。

### 3.7. 基于TIMO基因回路重构IPP代谢途径

随后,基于上述基因回路构建了一个级联调节系统来动态重构菌株BS17-MVA中的IPP代谢[见图2(f)及附录A中的图S22]。将代谢网络分为三个模块:中心代谢模块、IPP供应模块(MVA+MEP通路)和萜类合成模块。首先,在中心代谢模块中,使用两种具有不同动态范围的丙酮酸激活型启动子(D11、D6)动态增强丙酮酸脱氢酶PdhA的表达,同时用两种具有不同动态范围的丙二酰辅酶A抑制型启动子(FabIG18-5和FabIG12-29)动态抑制AccA和柠檬酸合酶CitZ的表达。然后,在IPP供应模块中,用三个具有不同动态范围的丙酮酸与丙二酰辅酶A双信号输入“与”门回路(AyteJM-P43FD180、AyteJU9-P43FD180和AyteJUG2-P43FD180)或“或”门回路(OyteJU-P43FD180、OyteJU300-P43FD180和OyteJU500-P43FD180)动态增强1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶Dxs和乙酰乙酰辅酶A硫解酶MvaE的表达。结果表明,与菌株BS17-MVA相比,菌株BS17-P13的MK-7产量( $203.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )增加了135.8%[图6(a)]。此外,在菌株BS17-P13中,控制Dxs和MvaE表达的是“与”门回路(AyteJUG2-P43FD180)。如附录A中的图S23所示,菌株P12、P17和P18的葡萄糖消耗率显著低于其他菌株。此外,菌株P12

的MK-7产量明显低于P11和P13（受不同强度的“与”门回路调控的平行菌株）。菌株P17和P18的MK-7产量显著低于P19（受不同强度的“与”门回路调控的平行菌株）。这些结果表明，菌株P12、P17和P18不能有效地将葡萄糖转化为MK-7，因此它们的葡萄糖消耗较低。此外，发现菌株P10和P12中MK-7的产量较低可能是由胞内乙酰辅酶A、MVA、MEP和IPP的浓度较低、较高的丙酮酸：乙酰辅酶A比率及其中心代谢通量的不平衡引起的（见附录A中的图S24）。这些结果表明，同时调控MEP和MVA模块的代谢通量能够促进萜类化合物的合成。作为静态调控的菌株对照，当表达基因回路的菌株中不存在PdhR和FapR时，MK-7的最高产量（菌株BS17-F5）相对于菌株BS17-MVA仅增加30%（ $112.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ）。

为进一步提高MK-7的产量，在菌株BS17-P13中，使用“与”门回路（AyteJUG2-P43FD180）动态激活MK-7合成途径中庚酰二磷酸合酶（HepTS）的表达，得到菌株BS17-P20，该菌株在摇瓶中的MK-7产量达到 $467.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外，本研究发现与BS17-MVA相比，菌株BS17-P20的胞内MVA（ $78.18 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DCW}$ ）、MEP（ $161.58 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$

DCW）和IPP（ $1.50 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DCW}$ ）含量在48 h时分别增加了28.6、15.3和4倍[见图6（b）及附录A中的图S25]。同时，与BS17-MVA相比，菌株BS17-P20的胞内乙酰辅酶A（ $364.6 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DCW}$ ）和丙酮酸（ $1213.20 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DCW}$ ）含量分别降低了25.0%和32.0%[见图6（c）及附录A中的图S26]。此外，与BS17-MVA（6.3：1）相比，菌株BS17-P20中的胞内MEP/MVA含量比（3.3：1）有所下降。这些结果表明，所构建的级联调控框架重构了IPP代谢途径，从而促进了MK-7的合成。此外，基因回路中所使用的启动子比初始的启动子活性更弱，表明MK-7的产量与控制MVA和MEP表达的启动子强度不呈正相关。这一发现进一步表明IPP含量的增加是由于基因回路的协同调节引起的。菌株BS17-P20中的IPP含量（ $368.8 \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ）高于许多植物，包括模式植物拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）（ $1.1 \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ）、烟草（*Nicotiana attenuate*）（ $32.2 \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ）和挪威云杉（ $303.7 \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ）[39]。

随后，在菌株BS17-MVA和BS17-P13中构建了萜类化合物 $\beta$ -胡萝卜素的从头合成途径，从而验证基于TIMO基因回路的IPP代谢网络重构框架的普适性[图6（d）]。

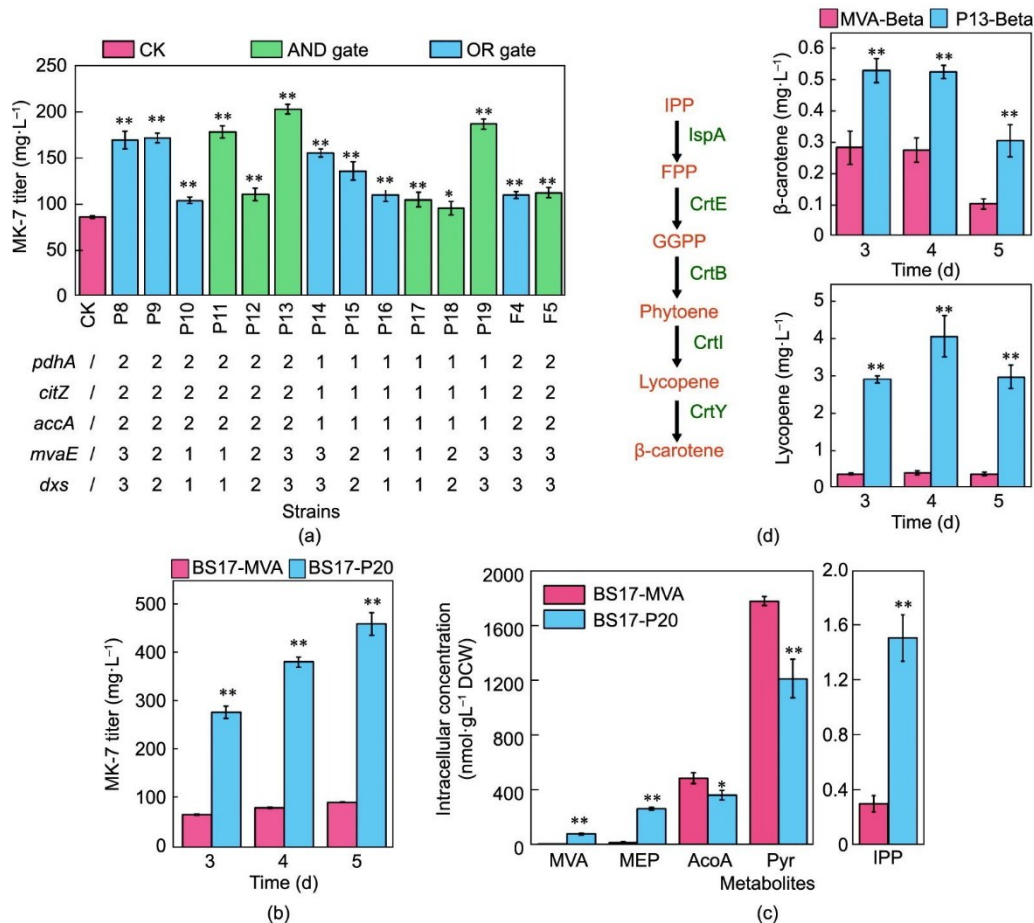


图6. MK-7代谢的动态调控。

将 *Erwinia herbicola* Eho10 来源的香叶基二磷酸合酶 (CrtE)、八氢番茄红素合酶 (CrtB)、八氢番茄红素去饱和酶 (CrtI) 和番茄红素  $\beta$ -环化酶 (CrtY) 在低拷贝质粒 pHT01 中表达, 并转化到菌株 BS17-MVA 和 BS17-P13 中, 分别获得重组菌株 MVA-Beta 和 P13-Beta [图 6 (d)]。菌株 P13-Beta 的  $\beta$ -胡萝卜素产量 ( $0.53 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 是菌株 MVA-Beta ( $0.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 1.9 倍。菌株 P13-Beta 的番茄红素产量 ( $4.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 是菌株 MVA-Beta ( $0.41 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 10 倍 [见图 6 (d) 及附录 A 中的图 S27]。这些结果表明, 本研究构建的级联调控系统也可以提高其他萜类化合物的产量。

基因回路的鲁棒性在大规模发酵中可能较差。例如, 在菌株 BS17 中引入群体感应系统, 可将 MK-7 在摇瓶中的产量提高到  $360 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但菌株 BS17 在生物反应器中的 MK-7 会降至  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  [17]。为测试基于 TIMO 基因回路的 IPP 代谢网络重构框架在大规模发酵中的稳定性, 进一步检测了菌株 BS17-P20 在 50-L 生物反应器中的生产性能。生物反应器中的葡萄糖浓度维持在  $20\text{--}30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 菌株的最大  $\text{OD}_{600}$  在 56 h 时达到 83.6。发酵 132 h 后, MK-7 的产量达到  $1549.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 这是迄今为止报道的 MK-7 最高产量 (见附录 A 中的图 S28)。

## 4. 结论

综上所述, 本研究基于响应丙酮酸和丙二酰辅酶 A 的 TIMO 基因回路, 设计了一个级联调节系统, 成功重构和协同调控了 *B. subtilis* 中的 IPP 代谢网络, 并检测了该系统的普遍性和鲁棒性。该调控系统为其他底盘细胞中 IPP 代谢网络的重构提供了新策略。此外, 这项研究证明了多信号、协调和级联动态调控策略可被用于复杂代谢网络的全局调控。

## 致谢

感谢国家自然科学基金 (32070085、32200050、31871784、32021005)、江苏省自然科学基金 (BK20221079)、国家博士后创新人才支持计划 (BX20220136)、江苏省卓越博士后计划 (2022ZB498)、中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP52019A、JUSRP121010、JUSRP221013)、国家重点研发计划 (2020YFA0908300)、江苏省研究生科研与实践创新计划 (KYCX1) 的资助。

## Compliance with ethics guidelines

Xianhao Xu, Xueqin Lv, Shixiu Cui, Yanfeng Liu, Hongzhi Xia, Jianghua Li, Guocheng Du, Zhaofeng Li, Rodrigo Ledesma-Amaro, Jian Chen, and Long Liu declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.03.019>.

## References

- [1] Li M, Hou F, Wu T, Jiang X, Li F, Liu H, et al. Recent advances of metabolic engineering strategies in natural isoprenoid production using cell factories. *Nat Prod Rep* 2020;37(1):80–99.
- [2] Denby CM, Li RA, Vu VT, Costello Z, Lin W, Chan LJG, et al. Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. *Nat Commun* 2018;9:965.
- [3] Daletos G, Katsimpouras C, Stephanopoulos G. Novel strategies and platforms for industrial isoprenoid engineering. *Trends Biotechnol* 2020;38(7):811–22.
- [4] Paddon CJ, Keasling JD. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat Rev Microbiol* 2014;12(5):355–67.
- [5] Chen Y, Daviet L, Schalk M, Siewers V, Nielsen J. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism. *Metab Eng* 2013;15:48–54.
- [6] Wang C, Zada B, Wei G, Kim SW. Metabolic engineering and synthetic biology approaches driving isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol* 2017;241:430–8.
- [7] Xie W, Lv X, Ye L, Zhou P, Yu H. Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering. *Metab Eng* 2015;30:69–78.
- [8] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, Simeon F, Leonard E, et al. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science* 2010;330(6000):70–4.
- [9] Lv X, Xie W, Lu W, Guo F, Gu J, Yu H, et al. Enhanced isoprene biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by engineering of the native acetyl-CoA and mevalonic acid pathways with a push–pull–restrain strategy. *J Biotechnol* 2014;186:128–36.
- [10] Yang C, Gao X, Jiang Y, Sun B, Gao F, Yang S. Synergy between methylerythritol phosphate pathway and mevalonate pathway for isoprene production in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 2016;37:79–91.
- [11] Wang X, Han J, Zhang X, Ma Y, Lin Y, Wang H, et al. Reversible thermal regulation for bifunctional dynamic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Nat Commun* 2021;12:1411.
- [12] Hossain GS, Saini M, Miyake R, Ling H, Chang MW. Genetic biosensor design for natural product biosynthesis in microorganisms. *Trends Biotechnol* 2020;38(7):797–810.
- [13] Jones TS, Oliveira SMD, Myers CJ, Voigt CA, Densmore D. Genetic circuit design automation with Cello 2.0. *Nat Protoc* 2022;17(4):1097–113.
- [14] Chou HH, Keasling JD. Programming adaptive control to evolve increased metabolite production. *Nat Commun* 2013;4:2595.
- [15] Zhou S, Yuan S, Nair PH, Alper HS, Deng Y, Zhou J. Development of a growth coupled and multi-layered dynamic regulation network balancing malonyl-CoA node to enhance (2S)-naringenin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 2021;67:41–52.
- [16] Scheiber D, Veulemans V, Horn P, Chatrou ML, Potthoff SA, Kelm M, et al. High-dose menaquinone-7 supplementation reduces cardiovascular

- calcification in a murine model of extraosseous calcification. *Nutrients* 2015; 7(8):6991–7011.
- [17] Cui S, Lv X, Wu Y, Li J, Du G, Ledesma-Amaro R, et al. Engineering a bifunctional *phr60-rap60-spo0A* quorum-sensing molecular switch for dynamic fine-tuning of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*. *ACS Synth Biol* 2019;8(8):1826–37.
- [18] Zhang X, Cui Z, Hong Q, Li S. High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(7):4101–3.
- [19] Cox RS, Surette MG, Elowitz MB. Programming gene expression with combinatorial promoters. *Mol Syst Biol* 2007;3:145.
- [20] Onorato JM, Chen L, Shipkova P, Ma Z, Azzara AV, Devenny JJ, et al. Liquid–liquid extraction coupled with LC/MS/MS for monitoring of malonyl-CoA in rat brain tissue. *Anal Bioanal Chem* 2010;397(7):3137–42.
- [21] Kindt E, Szekely-Klepser G, Fountain ST. The validation of a simple LC/MS/MS method for determining the level of mevalonic acid in human plasma. *Biomed Chromatogr* 2011;25(3):323–9.
- [22] Buescher JM, Moco S, Sauer U, Zamboni N. Ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites. *Anal Chem* 2010;82(11):4403–12.
- [23] Gao Q, Chen H, Wang G, Yang W, Zhong X, Liu J, et al. Highly efficient production of menaquinone-7 from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol* 2021;10(4):756–65.
- [24] Commichau FM, Forchhammer K, Stülke J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol* 2006;9(2):167–72.
- [25] Xu X, Li X, Liu Y, Zhu Y, Li J, Du G, et al. Pyruvate-responsive genetic circuits for dynamic control of central metabolism. *Nat Chem Biol* 2020;16(11):1261–8.
- [26] Albanesi D, de Mendoza D, Fap R. From control of membrane lipid homeostasis to a biotechnological tool. *Front Mol Biosci* 2016;3:64.
- [27] Li J, Dai S, Chen X, Liang X, Qu L, Jiang L, et al. Mechanism of forkhead transcription factors binding to a novel palindromic DNA site. *Nucleic Acids Res* 2021;49(6):3573–83.
- [28] Bhavsar AP, Zhao X, Brown ED. Development and characterization of a xylose-dependent system for expression of cloned genes in *Bacillus subtilis*: conditional complementation of a teichoic acid mutant. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(1):403–10.
- [29] Schujman GE, Guerin M, Buschiazzo A, Schaeffer F, Llarrull LI, Reh G, et al. Structural basis of lipid biosynthesis regulation in Gram-positive bacteria. *EMBO J* 2006;25(17):4074–83.
- [30] Xu P, Li L, Zhang F, Stephanopoulos G, Koffas M. Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(31):11299–304.
- [31] Hao N, Palmer AC, Ahlgren-Berg A, Shearwin KE, Dodd IB. The role of repressor kinetics in relief of transcriptional interference between convergent promoters. *Nucleic Acids Res* 2016;44(14):6625–38.
- [32] Court DL, Gan J, Liang Y, Shaw G, Tropea JE, Costantino N, et al. RNase III: genetics and function; structure and mechanism. *Annu Rev Genet* 2013; 47: 405–31.
- [33] Feng Y, Cronan JE. PdhR, the pyruvate dehydrogenase repressor, does not regulate lipoic acid synthesis. *Res Microbiol* 2014;165(6):429–38.
- [34] Bordoy AE, O'Connor NJ, Chatterjee A. Construction of two-input logic gates using transcriptional interference. *ACS Synth Biol* 2019;8(10):2428–41.
- [35] Isaacs FJ, Hasty J, Cantor CR, Collins JJ. Prediction and measurement of an autoregulatory genetic module. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(13):7714–9.
- [36] Fisher SH, Wray LV. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase regulates its own synthesis by acting as a chaperone to stabilize GlnR-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(3):1014–9.
- [37] Belitsky BR, Sonenshein AL. Altered transcription activation specificity of a mutant form of *Bacillus subtilis* GltR, a LysR family member. *J Bacteriol* 1997; 179(4):1035–43.
- [38] Liu Z, Zheng W, Ge C, Cui W, Zhou L, Zhou Z. High-level extracellular production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* WB800 by multiple tandem promoters. *BMC Microbiol* 2019;19(1):89.
- [39] Krause T, Reichelt M, Gershenzon J, Schmidt A. Analysis of the isoprenoid pathway intermediates, dimethylallyl diphosphate and isopentenyl diphosphate, from crude plant extracts by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal* 2020;31(6):770–7.