

分类号: Q93

密 级: 公开

单位代码: 10363

学 号: 2210520118

枯草芽孢杆菌群体感应调控系统构建及其在维生素 K₂ 合成中的应用

Construction of the quorum sensing regulatory system and its application of vitamin K₂ biosynthesis in *Bacillus subtilis*

学生姓名: 黄俊宝

指导教师: 刘艳 (教授)

专 业: 生物工程

研究方向: 微生物资源与应用

论文答辩日期: 2024 年 5 月

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：黄俊宜

日期：2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：黄俊宜

指导教师签名：： 

日期：2024 年 5 月 30 日

日期：2024 年 5 月 30 日

枯草芽孢杆菌群体感应调控系统构建及其在维生素 K₂ 合成中的应用

摘 要

七烯甲萘醌 (menaquinone-7, MK-7) 是维生素 K₂ 的一种, 在人体中具备较高的生物活性。作为一种必需性的脂溶性维生素, MK-7 在人体中具有较长的半衰期与较好的生物相容性, 在阿尔兹海默病、骨质疏松、心血管疾病等许多疾病的治疗方面都具有显著的作用, 同时, 近期的研究也表明其在抑制肿瘤的扩增方面也具有着良好的作用。微生物发酵是生产 MK-7 的重要手段, 但是却存在产量低、周期长等一系列问题, 市场需求一直无法得到较好的满足。

利用群体感应系统调控枯草芽孢杆菌中维生素 K₂ 的产生能力不足的问题是近年来的研究热点, DegU 作为枯草芽孢杆菌双组分调控系统的响应调节器, 控制着枯草芽孢杆菌中指数后期阶段到稳定生长阶段的各种生命过程。本课题通过 DegU 的生物信息学分析, 探究其与不同基因在枯草芽孢杆菌中的相互作用方式, 在枯草芽孢杆菌中围绕 DegU 蛋白构建了一个受到细菌密度调控的调控系统, 动态平衡了细菌生长与产物合成之间的矛盾, 最终获得一株 MK-7 高产菌株, 为工业生产维生素 K₂ 提供了理论基础与现实依据。主要的研究内容如下:

- (1) 利用生物信息学分析研究 DegU 蛋白相对分子质量、氨基

酸数目、分子式、等电点、半衰期、脂肪系数、不稳定系数、跨膜结构、亚细胞定位、保守结构域、金属离子结合位点、DNA 结合位点等一系列信息，分析 DegU 的作用。其中，DegU 蛋白的 56 aa 位置既是金属离子结合位点，也是磷酸化位点，同时还是激活位点，这表明该位点在 DegU 发挥作用时的重要性。同时，DegU 蛋白的 HTH 结构也是与 DNA 结合的区域，控制着生命进程。分析 *degU* 基因相互作用网络，我们发现，*degU* 与枯草芽孢杆菌中多个组氨酸激酶之间都相互作用，这表明枯草芽孢杆菌中各个双组分系统之间相互作用，互相影响，也说明 *degU* 在枯草芽孢杆菌基因调控中的重要性。

(2) 在枯草芽孢杆菌中重构 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统。通过研究 RapG、PhrG 和 DegU 之间的相互作用，我们发现天冬氨酸磷酸酶 RapG 能够抑制 DegU 的启动子结合活性，该抑制作用能够被 RapG 同源的细胞外信号分子 PhrG 部分缓解。为验证 *rapG*、*phrG*、*degU* 对于菌株生长的影响，我们分别敲除 *rapG*、*phrG*、*degU* 基因，获得重组菌株 BL01、BL02 和 BL03，比较重组菌株与原始菌株 BS168 的生长曲线我们发现，重组菌株的生长均受到一定程度的抑制，其中 *degU* 基因被敲除后对于细胞生长的抑制最为严重。为了研究由 RapG、PhrG 和 DegU 组成的调控系统对该菌株细胞生长和 MK-7 产生的影响，我们分别使用组成型启动子 P_{hag} 和 P_{43} 表达 *rapG*、*phrG* 和 *degU* 基因，获得重组菌株 BS01、BS02 和 BS03。与原始菌株 BS168 相比，重组菌株 BS01 的细胞密度和 MK-7 产量均显著降低，且菌株 BS01 的 MK-7 产量仅为 12.92 mg/L。这也表明 RapG 对细胞生长和 MK-7

的产生均有显著的抑制作用。在重组菌株 BS01 的基础上, 利用组成型启动子 P_{hag} 表达 $phrG$, 获得重组菌株 BS02。相较于 BS01, BS02 细胞的生长抑制得到了较好的缓解, 但不论是最大 OD_{600} 还是 MK-7, 都没有恢复到 BS168 的水平, BS02 的 MK-7 产量只有 20.52 mg/L, 这也表明, PhrG 可以部分缓解 RapG 的毒副作用。以菌株 BS02 为基础, 利用组成型启动子 P_{43} 表达 $degU$, 获得重组菌株 BS03。我们可以发现, 与原菌株相比, 重组菌株 BS03 的细胞密度得到较大幅度的提升。菌株 BS03 在第 6 天 MK-7 的最终产量也得到较大幅度的提升, 增加了 31.8%, 达到 28.18 mg/L。这表明, PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统可以作为一个分子开关, 控制相关基因的调控水平, 以响应细胞密度的变化, 进而提高目标菌株的发酵产量。

(3) 构建一个自诱导的启动子, 用以调控 MK-7 合成途径中关键基因的表达。首先, 通过对枯草芽孢杆菌中的原始启动子进行筛选, 获得能够响应 DegU-P 调控的 8 个启动子: P_{degQ} 、 P_{comK} 、 P_{sacB} 、 P_{aprE} 、 P_{bpr} 、 P_{flgB} 、 P_{sacX} 和 P_{wapA} 。通过启动子的转录强度比较, 筛选发现 P_{degQ} 具有较高的转录活性; 通过对原始启动子 P_{degQ} 的-35 区和-10 区的随机突变, 将其突变为与 DegU-P 亲和力更强的位点, 获得 8 个重组启动子, 筛选获得活性最高的启动子 P_5 , 其活性为原始启动子 P_{degQ} 的 2.2 倍。然后, 使用启动子 P_5 调控 MK-7 合成途径中关键基因 $ispH$ 和 $hepS/T$ 的表达, 促进有毒中间代谢物的快速转化, 避免对细胞毒害作用的同时促进 MK-7 的合成。摇瓶发酵结果表明, 重组菌株 BS06 最大 OD_{600} 值为 29.032, 重组菌株 BS06 的生长曲线也与原菌十分相似,

这表明我们对于菌株的改造对于菌株的生长没有产生负担。与此同时，重组菌株 BS06 第六天 MK-7 产量达到 102.47 mg/L，远超原始菌株，发酵第 6 天的细胞得率达到 3.573，是原菌的 5.2 倍，这些结果都表明，利用 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统调控枯草芽孢杆菌相关基因的表达，能够有效提高枯草芽孢杆菌中 MK-7 的产量。

关键词：枯草芽孢杆菌，群体感应，启动子，维生素 K₂，生物信息学

Construction of the quorum sensing regulatory system and its application of vitamin K₂ biosynthesis in *Bacillus subtilis*

ABSTRACT

Menaquinone-7 (MK-7), as a kind of vitamin K₂, which has high biological activity in human body. As an essential fat-soluble vitamin, MK-7 has a long half-life and good biocompatibility in the human body, and plays a significant role in the treatment of many diseases such as Alzheimer's disease, osteoporosis, cardiovascular disease, and recent studies have shown that it also plays a good role in inhibiting the expansion of tumors. Microbial fermentation is an important means to produce MK-7, but there are a series of problems such as low yield and long cycle, and the market demand has been unable to be better satisfaction.

Using quorum sensing to regulate the production of vitamin K₂ in *Bacillus subtilis* to make up for its insufficient production capacity has been the focus of research for many years. As a response regulator of the two-component regulatory system of *Bacillus subtilis*, DegU controls various life processes from the late exponential stage to the stable growth

stage in *Bacillus subtilis*. Through bioinformatics analysis of DegU, this study explored the interaction between DegU and different genes in *Bacillus subtilis*. A regulatory system regulated by bacterial density was constructed around DegU protein in *Bacillus subtilis*, which dynamically balanced the contradiction between bacterial growth and product synthesis, and finally obtained a MK-7 high-yielding strain, which provide a theoretical and practical basis for the industrial production of biotin K₂. The main research contents are as follows:

(1) The molecular weight, number of amino acids, molecular formula, isoelectric point, half-life, fat coefficient, instability coefficient, transmembrane structure, subcellular localization, conserved domain, metal ion binding site, DNA binding site and a series of information of DegU protein were analyzed by bioinformatics analysis. Among them, position 56 aa of DegU protein is both a metal ion binding site, a phosphorylation site, and an activation site, which indicates the importance of this site in the function of DegU. Meanwhile, the HTH structure of DegU protein is also a DNA-binding region that controls life processes. By analyzing the interaction network of *degU*, we found that *degU* interacts with multiple histidine kinases in *Bacillus subtilis*, which indicates that the two-component systems of *Bacillus subtilis* interact and influence each other, and also indicates the importance of *degU* in the regulation of *Bacillus subtilis*.

(2) The PhrG-RapG-DegU quorum-sensing regulatory system was constructed in *Bacillus subtilis*. By studying the interaction between RapG, PhrG, and DegU, we found that the aspartate phosphatase RapG inhibits the promoter binding activity of DegU, and this inhibition is partially mitigated by PhrG, the extracellular signaling molecule homologous of RapG. To verify the effects of RapG, PhrG and DegU on the growth of strains, we knocked out the genes of *rapG*, *phrG* and *degU*, respectively, and obtained recombinant strains BL01, BL02 and BL03. By comparing the growth curves of the recombinant strains with the original strain BS168, we found that the growth of the recombinant strains was inhibited to a certain extent, knockout of *degU* resulted in the most severe inhibition of cell growth. To investigate the effect of the regulatory system composed of RapG, PhrG, and DegU on cell growth and MK-7 production in *Bacillus subtilis*, recombinant strains BS01, BS02, and BS03 were obtained by expressing *rapG*, *phrG*, and *degU* with constitutive promoters P_{hag} and P_{43} . Compared with the original strain BS168, the cell density and MK-7 production of the recombinant strain BS01 were significantly reduced, and the MK-7 production of strain BS01 was only 12.92 mg/L, which indicated that RapG exerted a significant inhibitory effect on both cell growth and MK-7 production. On the basis of recombinant strain BS01, the recombinant strain BS02 was obtained by using the constitutive promoter P_{hag} to express *phrG*.

Compared with BS01, the growth inhibition of BS02 cells was better alleviated, but neither the maximum OD₆₀₀ nor MK-7 production could recover to the level of BS168, and the MK-7 production of BS02 was only 20.52 mg/L, which also indicated that PhrG could partially alleviate the side effects of RapG. The recombinant strain BS03 was obtained by using the constitutive promoter P₄₃ to express *degU* based on strain BS02. Compared with the original strain, the cell density of the recombinant strain BS03 was significantly increased. The final MK-7 production of strain BS03 on the 6th day was also significantly increased by 31.8% to 28.18 mg/L. This suggests that the PhrG-RapG-DegU quorum-sensing regulatory system can act as a molecular switch to control the level of regulation of relevant genes in response to changes in cell density, which in turn improves fermentation yield of the target strain.

(3) A self-inducible promoter was constructed to regulate the expression of key genes in MK-7 synthesis pathway. First, eight promoters were obtained that could respond to DegU-P regulation by screening the original promoters in *Bacillus subtilis*: P_{degQ}、P_{comK}、P_{sacB}、P_{aprE}、P_{bpr}、P_{flgB}、P_{sacX} and P_{wapA}. P_{degQ} has the high transcriptional activity by comparing the transcription intensity of other promoters. Eight recombinant promoters were obtained by random mutation of the -35 and -10 regions of the original promoter P_{degQ} to the site with stronger affinity for DegU-P. The most active promoter P₅ was selected with 2.2 times

activity higher than that of the original promoter P_{degQ} . Then, the promoter P_5 was used to regulate the expression of *ispH* and *hepS/T*, the key genes in the MK-7 synthesis pathway, to promote the rapid transformation of toxic intermediate metabolites, avoid the toxic effect on cells and promote the synthesis of MK-7. Shake flask fermentation results showed that the maximum cell density of the recombinant strain BS06 was 29.032, and the growth curve of the recombinant strain BS06 was also very similar to that of the original strain, indicating that our modification of the strain did not cause burden on the growth of the strain. At the same time, the yield of MK-7 of recombinant strain BS06 reached 102.47 mg/L on the sixth day of fermentation, far exceeding that of the original strain, and the cell yield reached 3.573 on the sixth day of fermentation, which was 5.2 times that of the original strain. All these results indicated that the expression of related genes of *Bacillus subtilis* was regulated by PhrG-RapG-DegU quorum sensing regulatory system. It can effectively improve the production of MK-7 in *Bacillus subtilis*.

KEY WORDS: *Bacillus subtilis*, quorum sensing, promoter, vitamin K₂, bioinformatics

目录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	V
第 1 章 绪论.....	1
1.1 维生素 K ₂ 简介.....	1
1.1.1 维生素 K ₂ 的理化性质.....	1
1.1.2 维生素 K ₂ 的来源.....	2
1.1.2.1 食物来源.....	2
1.1.2.2 化学合成.....	2
1.1.2.3 微生物发酵.....	3
1.1.3 枯草芽孢杆菌用于生产维生素 K ₂	3
1.1.4 维生素 K ₂ 的功能与应用.....	4
1.1.4.1 骨质疏松.....	5
1.1.4.2 心血管疾病.....	5
1.1.4.3 癌症治疗.....	5
1.1.4.4 阿尔兹海默症.....	6
1.1.4.5 其他应用.....	6
1.1.5 维生素 K ₂ 的市场现状.....	7
1.2 群体感应调控系统的简介.....	7
1.2.1 革兰氏阳性菌.....	8
1.2.2 革兰氏阴性菌.....	8
1.2.3 群体感应调控系统的应用.....	8
1.3 枯草芽孢杆菌中基于转录调控因子 DegU 的群体感应调控网络分析.....	9
1.4 枯草芽孢杆菌中的 sigma 因子.....	10
1.5 生物信息学的概况.....	11
1.6 研究内容、目的与意义.....	11

1.6.1 研究目的与意义.....	11
1.6.2 研究内容.....	12
第 2 章 枯草芽孢杆菌中转录调控因子 <i>degU</i> 的生物信息学分析.....	13
2.1 前言.....	13
2.2 数据来源.....	13
2.3 数据分析方法.....	13
2.3.1 DegU 基本性质分析.....	13
2.3.2 DegU 结构域分析.....	13
2.4 结果与分析.....	14
2.4.1 DegU 蛋白的基本性质分析.....	14
2.4.2 DegU 结构域分析.....	16
2.4.3 DegU 的 HTH-LUXR 结构域分析.....	16
2.4.4 金属离子结合位点分析.....	17
2.4.5 <i>degU</i> 基因相互作用网络.....	18
2.4.6 DegU 蛋白的空间结构.....	18
2.5 本章小结.....	19
第 3 章 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统的构建.....	20
3.1 前言.....	20
3.2 实验材料.....	20
3.2.1 菌种和质粒.....	20
3.2.2 主要药品与仪器.....	21
3.2.3 培养基.....	23
3.2.4 主要溶液.....	23
3.3 实验方法.....	24
3.3.1 枯草芽孢杆菌的活化以及感受态的制备.....	24
3.3.2 枯草芽孢杆菌全基因组与质粒的提取.....	24
3.3.3 重组菌株的构建.....	24
3.3.4 氯霉素抗性的去除.....	28
3.3.5 eGFP 强度的测定.....	28

3.3.6 摇瓶发酵合成 MK-7.....	29
3.3.7 菌株生长曲线的测定.....	29
3.3.8 维生素 K ₂ 的提取与检测.....	29
3.3.9 维生素 K ₂ 标准曲线的绘制.....	29
3.4 结果与分析.....	30
3.4.1 重组菌株的构建.....	30
3.4.2 维生素 K ₂ 标准曲线的绘制.....	34
3.4.3 RapG、PhrG 和 DegU 相互作用关系验证.....	36
3.4.4 <i>rapG</i> 、 <i>phrG</i> 、 <i>degU</i> 对于菌株生长的影响.....	37
3.4.5 PhrG-RapG-DegU 调控系统对菌株细胞生长和 MK-7 产生的影响	37
3.5 本章小结.....	39
第 4 章 自诱导启动子的构建与动态调控枯草芽孢杆菌中 MK-7 合成途径.....	40
4.1 前言.....	40
4.2 实验材料.....	41
4.2.1 菌株与质粒.....	41
4.2.2 实验药品与仪器.....	41
4.2.3 培养基与溶液.....	41
4.3 实验方法.....	41
4.3.1 枯草芽孢杆菌的活化以及感受态的制备.....	41
4.3.2 重组菌株的构建.....	41
4.3.3 氯霉素抗性的去除.....	47
4.3.4 启动子文库的构建.....	47
4.3.5 eGFP 强度的测定和突变启动子的筛选.....	48
4.3.6 启动子的突变筛选.....	48
4.3.7 枯草芽孢杆菌 MK-7 合成途径中关键基因的表达调控.....	48
4.3.8 摇瓶发酵合成 MK-7.....	49
4.3.9 菌株生长曲线的测定.....	49
4.3.10 维生素 K ₂ 的提取与检测.....	49

4.3.11 维生素 K ₂ 标准曲线的绘制.....	49
4.4 结果与分析.....	49
4.4.1 构建受 DegU-P 调控的启动子文库.....	49
4.4.1.1 原始启动子的相对荧光强度分析.....	49
4.4.1.1.1 菌株的构建.....	49
4.4.1.1.2 原始启动子的荧光强度比较.....	52
4.4.1.2 启动子的突变分析.....	52
4.4.1.2.1 重组启动子的构建.....	52
4.4.1.2.2 重组启动子转录强度分析.....	53
4.4.1.3 重组启动子 P ₅ 的功能验证.....	55
4.4.2 枯草芽孢杆菌中 MK-7 发酵过程分析.....	56
4.4.3 枯草芽孢杆菌中 MK-7 合成途径的动态调控.....	57
4.4.3.1 重组菌株的构建.....	57
4.4.3.2 <i>ispG</i> 对于菌株生长的影响.....	58
4.4.3.3 重组启动子 P ₅ 用以调控枯草芽孢杆菌 MK-7 合成途径中关键基因的表达.....	60
4.5 本章小结.....	62
第 5 章 结论与展望.....	63
5.1 结论.....	63
5.2 展望.....	64
参考文献.....	66
附录 1 中英文缩略词说明.....	77
攻读学位期间所发表的学术论文目录及获奖情况.....	79
致谢.....	80

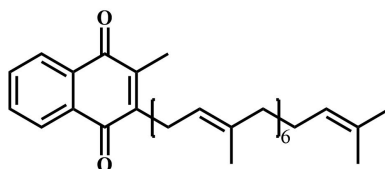
第 1 章 绪论

1.1 维生素 K₂ 简介

维生素 K₂ 是一种人体必需的脂溶性化合物，最早是由丹麦科学家 Dam^[1] 在肝脏和麻子油中发现。维生素 K₂ 因其具有良好的药物活性，并且对于许多疾病的预防与治疗都有较好的效果而广受人们关注。

1.1.1 维生素 K₂ 的理化性质

维生素 K₂ 是由萘醌环和不同数量的异戊二烯侧链组成的一系列化合物的统称，根据异戊二烯侧链数目的不同，可以将维生素 K₂ 的类别分为 MK-1~MK-14，其中，MK-7 是枯草芽孢杆菌中生物含量、生物利用度与生物活性最高的维生素 K₂，也是最有效的维生素 K₂ 形式。MK-7 的结构式如图 1-1 所示，其分子式为 C₄₆H₆₄O₂，分子量为 649.00，分子结构 CAS 为 2124-57-4，在人体内的半衰期为 72 h，外观为黄色晶体，熔点在 54 °C~56 °C，不溶于水，易溶于有机溶剂，在强光条件下易分解。



MK-7

图 1-1 MK-7 的分子结构式

Figure 1-1 Molecular structure formula of MK-7

MK-7 存在两种异构体形式：非线性的顺式结构和线性的反式结构（图 1-2），双键排列的不同使得分子结构发生差异，导致生物活性的差异，其中，反式结构具备更高的羧化能力与生物活性^[2]。同时，也只有反式结构的 MK-7 能够在人体中发挥生物学功能^[3]，相关研究表明，顺式结构的生物活性只有反式结构的百分之一^[4]。

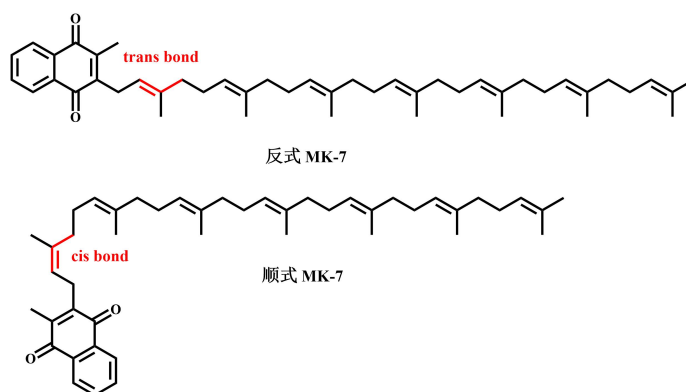


图 1-2 MK-7 的顺式结构与反式结构

Figure 1-2 Trans and cis bond of MK-7

1.1.2 维生素 K₂ 的来源

1.1.2.1 食物来源

维生素 K₂ 是人体所必需的，但是却无法自身合成，只能通过肠道微生物合成^[5]或者从食物^[6]中获取。在人体肠道中，有许多菌株能够产生维生素 K₂^[7]，例如迟缓真球菌（*Eubacterium lentum*）、乳酸杆菌（*Bacillus acidi lactici*）和双歧杆菌（*Bacillus bifidus*）等。维生素 K₂ 的主要膳食来源则为动物产品^[8]和发酵食品^[9]，例如肝脏、肉制品、奶制品、鸡蛋和纳豆。其中，纳豆中维生素 K₂ 的含量可以达到 998 μg/100 g，作为日本的传统食品，纳豆在日本广受欢迎，是其重要的维生素 K₂ 补充来源；而在欧洲和北美地区，人们则是主要通过奶酪来满足维生素 K₂ 的需求^[8]。由于食物中维生素 K₂ 的生物含量较少，同时从食物中提取维生素 K₂ 的困难较大，因此工业上很少从食物中提取获得维生素 K₂。

1.1.2.2 化学合成

1958 年，Isler^[10]首先完成维生素 K₂ 的化学合成，通过将聚异戊烯与 2-甲基-1,4-萘醌环结合，经过后续一系列反应得到维生素 K₂，开启了化学法合成维生素 K₂ 的先河。之后，研究人员又通过探索研究发明了更多化学法生产维生素 K₂ 的方法，如：Yoshinori^[11]利用锡烷烷基化反应制备甲萘醌、Lipshutz^[12]利用镍作为催化剂，以铝烷烷基化反应得到维生素 K₂、Min^[13]利用延长侧链的方法合成维生素 K₂。在最近的研究中，Aneta^[14]设计了一种全新的“1+6”策略，将甲萘醌单异戊烯基衍生物与六异戊烯基溴化物结合连接，在经过后续一系列反应后可以得到高纯度的 MK-7。虽然目前化学法合成维生素 K₂ 的技术比较成熟，但是化学法合成存在试剂毒性大、高污染、副产物多、产率低、能耗较高等诸多问题，容

易造成环境污染与资源浪费，同时，化学合成中维生素 K₂ 的全反式构型含量较低，这就导致化学合成的维生素 K₂ 的生物活性较低。

1.1.2.3 微生物发酵

微生物发酵可以获得具有高生物活性的反式结构的 MK-7，同时也可以避免化学法合成中有毒中间体的产生。能够发酵生产维生素 K₂ 的菌株很多，例如枯草芽孢杆菌^[15]、大肠杆菌^[16]、黄精杆菌^[17]、解淀粉芽孢杆菌^[18]、纳豆芽孢杆菌^[19]等。微生物发酵方式可以分为固体发酵与液体发酵两种，其中，固体发酵过程中的发酵参数难以控制，产生大量热^[20]，菌体生长缓慢，因此在工业生产中很少采用固体发酵。相较于固体发酵，液体发酵能够增加菌体的相对接触面积，促进细胞生长，缩短发酵周期，减少生物反应器的体积，能够有效规避固体发酵存在的一系列弊端。目前，提高维生素 K₂ 产量的策略大致可以分为三类：菌株改良^[21]、工艺优化^[22]与生物反应器^[23]，其中最根本的途径是通过基因工程策略构建高产菌株，增强合成途径中关键基因的表达，减少竞争途径的碳流量都可以有效增加 MK-7 合成途径中的碳流量，提高菌株产维生素 K₂ 的能力，从根本上解决 MK-7 合成效率低的问题。

1.1.3 枯草芽孢杆菌用于生产维生素 K₂

作为一种典型的革兰氏阳性菌模式菌株^[24]，枯草芽孢杆菌的研究比较透彻。作为美国食品药品监督管理局（FDA）认证的食品级安全表达系统^[25]，枯草芽孢杆菌可以产生 MK-4~MK-8 的同系物，其中，生物活性和生物利用度最高的 MK-7 能够占到 96%^[26]，被誉为最有潜力和最主要生产维生素 K₂ 的微生物。

在枯草芽孢杆菌中，维生素 K₂ 的生物合成途径可以分为三个模块（图 1-3）：莽草酸途径（shikimate pathway, SA）、甲萘醌途径（menaquinone pathway, MK）和甲基赤藓糖醇-4-焦磷酸途径（2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway, MEP）。MK-7 是由萘醌母环和异戊二烯侧链组成^[27]，其中，萘醌母环是由莽草酸途径和 MK 途径合成，异戊二烯侧链是由 MEP 途径合成，MEP 途径也是维生素 K₂ 合成的限速途径。在 MEP 途径中，存在多个关键基因，其中，Dxs（1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶）和 Dxr（1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶）被认为是 MEP 途径中的限速酶^[28]；同时，在 MEP 途径中，会产生两种有毒中间代谢物 HMBPP（1-羟基-2-甲基-2-丁烯基-4-二磷酸）和 DMAPP（二甲基烯丙基二磷

酸），影响细胞的生长。研究发现，*ispH* 的表达能够加速 HMBPP 和 DMAPP 的转化，避免对于细胞生长产生的毒害作用^[29]。同时，*ispG*（4-羟基-3-甲基丁烯-2-烯-1-基二磷酸合成酶）和 *ispH*（1-羟基-2-甲基-2-（E）-丁烯基-4-二磷酸还原酶）在细胞中具有不可替代性，对于细胞来说是不可或缺的，目前尚未发现可以绕开 4-羟基-3-甲基丁烯-2-烯基二磷酸合成酶和 4-羟基-3-甲基丁烯-2-烯基二磷酸还原酶的生物^[30]。

在 MK 途径中，存在七种 *men* 基因，分别是 *menF*（甲基萘醌特异性异分支酸合成酶）、*menD*（2-酮戊二酸脱羧酶和 2-琥珀酰-5-烯醇式丙酮酸-6-羟基-3-环己烯-1-羧酸合成酶）、*menH*（2-琥珀酰-6-羟基-2,4-环己二烯-1-羧酸合成酶）、*menC*（O-琥珀酰苯甲酸酯-CoA 合成酶）、*menE*（O-琥珀酰苯甲酸-CoA 连接酶）、*menB*（二羟基萘甲酸合成酶）和 *menI*（1,4-二羟基-2-萘酰辅酶 A 水解酶），影响异戊二烯侧链和萘醌母环结合的 1,4-二羟基-2-萘甲酸二酰基转移酶（MenA）也被认为是维生素 K₂ 合成过程中的关键酶和限速酶^[31]。

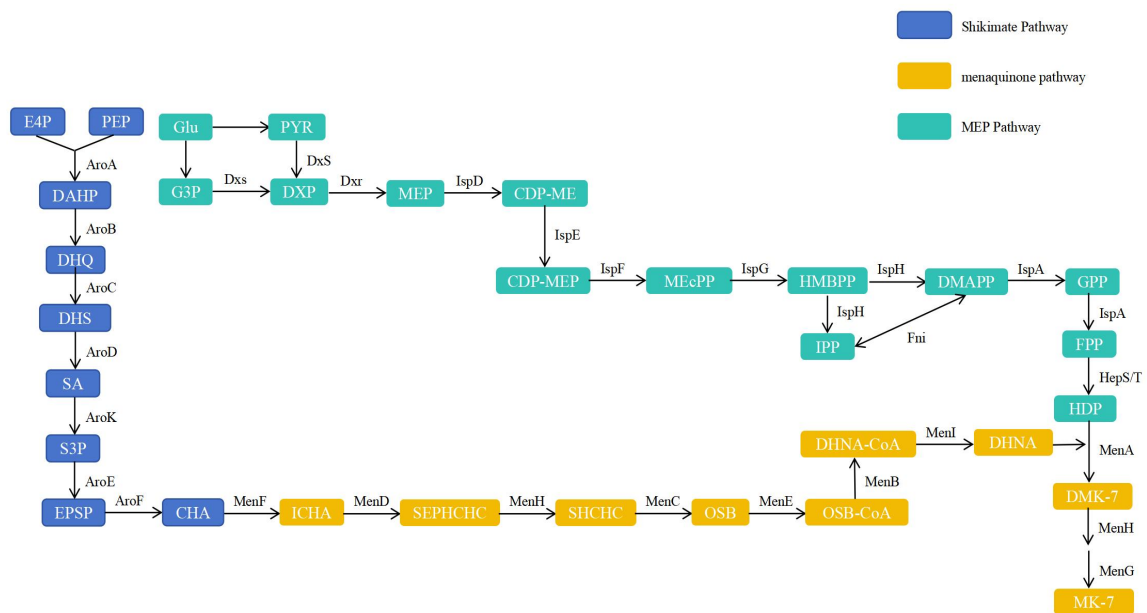


图 1-3 枯草芽孢杆菌中 MK-7 的生物合成途径

Figure 1-3 Biosynthesis pathway of MK-7 in *Bacillus subtilis*

1.1.4 维生素 K₂ 的功能与应用

作为甲萘醌化合物的一种，维生素 K₂ 在疾病治疗和医疗保健方面都有着十分广泛的应用，研究发现，维生素 K₂ 的摄入可以有效预防心血管疾病和骨质疏松的发生，同时，维生素 K₂ 在帕金森等疾病时也有着较好的疗效，甚至在抑制

肿瘤细胞的增值扩增方面，维生素 K₂ 往往也具备着意想不到的效果。

1.1.4.1 骨质疏松

作为一种常见疾病，骨质疏松症是人类健康的一个重要威胁。骨质疏松症是指因为骨骼密度和骨骼质量下降，进而引起一系列后续骨骼问题如骨微结构退化、骨骼质量下降、骨骼脆性增加，使得骨折风险增加，严重甚至会导致瘫痪。一般来说，除了绝经^[32]和年纪增加而导致的骨质疏松外，许多疾病如内分泌疾病、慢性肾脏疾病和血液系统疾病等在一定程度上都会引起骨质疏松。维生素 K₂ 能够促进骨钙素中的 γ -羧基谷氨酸残基的羧化过程^[33]，加强其与钙离子和羟基磷灰石等的结合能力，促进骨骼矿化，提高骨骼强度；此外，维生素 K₂ 能够抑制骨吸收因子和破骨细胞活性^[34]，抑制骨骼的吸收，提升骨骼强度。大量的临床研究都表明，长期摄入维生素 K₂ 能够有效增强骨骼强度，预防骨质疏松。

1.1.4.2 心血管疾病

作为世界范围内第一大疾病死亡原因，随着世界老龄化程度的增加，其对于人类的危害程度日渐增加^[35]。心血管疾病是指血管病变而导致的全身血液流向异常，血液供应不及时，导致心脏或者大脑缺血，主要的病因包括动脉粥样硬化斑块的血栓性破裂、动脉发生病变增厚^[35]。维生素 K₂ 能够激活骨钙素和血管壁中的 Gla 蛋白的表达^[36]，该蛋白能够抑制血管的钙化，降低心血管疾病的发病频率。一项研究表明，膳食摄入维生素 K₂ 对于老年患者的冠心病有着良好的保护作用^[37]，维生素 K₂ 摄入量的增加能够有效降低动脉硬化，这也表明维生素 K₂ 对与心血管疾病有着不菲的疗效。因此，在日常生活中，增加维生素 K₂ 类食物的摄入量能够有效预防心血管疾病。

1.1.4.3 癌症治疗

癌症一直是损害人类健康的重要凶手，每年都会有近千万例由癌症导致的死亡发生。癌症会使得人体某些恶性细胞快速增值并影响其他正常细胞，破坏人体细胞正常生理功能，目前常见的癌症为肺癌、皮肤癌、乳腺癌和直肠癌等。研究表明，维生素 K₂ 在抗癌的临床试验中发挥着不俗的功能：（1）维生素 K₂ 可以通过抑制因子 κ B（NF- κ B）诱导癌细胞的细胞周期停滞，抑制癌细胞的增值^[38]；（2）维生素 K₂ 可以诱导癌细胞 G0-G1 期发生停滞，也可以降低碱性螺旋-环-螺旋拉链转录因子 c-MYC 的表达，使得癌细胞生长停滞和诱导癌细胞的分化^[39]；

(3) 通过诱导肿瘤抑制基因 *p53* 的表达和激活外源性凋亡途径, 维生素 K_2 可以诱导癌细胞的凋亡^[40]; (4) 维生素 K_2 可以激活细胞自噬来抑制癌细胞的增值^[41]; (5) 癌细胞一个重要的致病原因是因为它可以通过非正常扩增来影响其他正常细胞的功能, 研究发现, 维生素 K_2 可以有效抑制这种侵袭作用^[42]; (6) 除了单独使用维生素 K_2 来治疗癌症外, 维生素 K_2 与其他药物的联合用药也可以发挥出意想不到的效果, 例如当治疗肝癌时, 药物索拉非尼的单独使用会抑制细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂基因 *p21* 的表达, 同时也会抑制细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 的磷酸化, 而当维生素 K_2 与索拉非尼共同使用时, 维生素 K_2 可以缓解索拉非尼带来的负面效果, 促进癌细胞的凋亡^[43]。

1.1.4.4 阿尔兹海默症

阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起病隐匿的进行性发展的神经退行性疾病, 目前无法被治愈, AD 的两大特征在于患者大脑神经毒性 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, $A\beta$) 的细胞外沉积和 tau 蛋白在神经元中的积累^[44]。许多因素如神经炎症、氧化应激、血管疾病和线粒体功能障碍都会导致阿尔兹海默症发病率的增加, 科学家发现, 维生素 K_2 可以减少 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 诱导的细胞凋亡、改善血管健康、逆转小胶质细胞活化、抑制神经炎症和限制氧化应激, 改善神经元健康, 这对于阿尔兹海默症的预防和症状缓解方面都十分重要^[44]。现有的医学条件下, 大型药理学实验尚未找到治疗和预防阿尔兹海默症的有效药物, 在这种背景下, 维生素 K_2 在阿尔兹海默症疾病治疗方面的相关应用很有可能弥补这一方面的空白, 为阿尔兹海默症特效药的研发提供了一个较好的思路。

1.1.4.5 其他应用

2 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) 作为一种慢性代谢疾病, 无法被治愈, 只能通过药物来维持一个正常的血糖水平。2 型糖尿病会导致血管损伤和各种器官组织的功能衰退, 严重损害人体健康, 而维生素 K_2 的摄入可以有效降低 2 型糖尿病的患病风险, 研究发现, 每增加 $10\ \mu\text{g}$ 维生素 K_2 的摄入量, 就可以降低 7% 的 2 型糖尿病的患病风险^[45]; 对于儿童大脑发育和神经系统功能完整性的发育, 维生素 K_2 同样至关重要^[46]; 除此之外, 维生素 K_2 在体内能够激活凝血因子和抗凝血蛋白的生物活性, 能够有效降低出血型疾病, 促进血液凝固,

在凝血方面也发挥着重要的作用^[47]；作为炎症的非特异性标志物，C-反应蛋白（C-reaction Protein, CRP）是一种具有较好稳定性和精确性的正五聚体急性时相蛋白，在机体遭受炎症损伤时其水平会快速升高，能够有效反映机体的炎症水平。维生素 K₂ 可能会诱导类风湿关节炎滑膜细胞的凋亡，有研究表明^[48, 49]，在定期摄入维生素 K₂ 后，患者 CRP 水平得到降低，类风湿关节炎的炎症症状也得到缓解。

1.1.5 维生素 K₂ 的市场现状

随着全球老龄化社会的到来和人们对于自身健康水平愈发关注，维生素 K₂ 的市场需求也在逐步生长。2019 年，维生素 K₂ 的全球市场份额达到 102.9 万美元，预期到 2026 年，能够增长到 400 万美元。在这之中，需求最大的欧洲，占据 34.2% 的份额（2019），其次便是北美，占据 32.8% 的份额（2019）；世界范围内维生素 K₂ 的主要生产厂家包括 Kappa Bioscience、NattoPharma、Gnosis、DSM、Viridis BioPharma 和 Frutarom。我国在该方面起步较晚，目前只有广东双骏生物科技有限公司具有维生素 K₂ 的生产许可，但是由于企业规模等方面的限制，产能远远无法满足国内的市场需求，只能通过进口来满足国内的市场需求^[50]。

1.2 群体感应调控系统的简介

作为一种细胞间的通信工具^[51]，群体感应（quorum sensing, QS）在细菌和真菌^[52]中普遍存在。作为细胞之间的化学通信，细胞之间可以借助群体感应来共享有关细胞密度的相关信息，并调节相关基因的表达^[53]。在这个过程中，细胞会产生自诱导剂^[54]（autoinducers, AIs）来协调细胞与细胞之间的行为与基因表达。因此，在细菌中，群体感应由两个部分组成：受体蛋白与自诱导剂^[55]，其中，自诱导剂一般由细菌产生，能够与目标受体蛋白结合，激活响应基因的表达，发挥特定功能。群体感应是一个连续的过程，在细胞生长过程中，随着细胞密度的增加，自动诱导剂在环境中的积累会逐渐增多，当其浓度到达特定值时，会与特定受体结合而发挥相应功能^[56, 57]。群体感应的存在赋予了细胞群体不同于单个细胞的能力，使得细菌对于营养有限条件的适应能力得到增强，对于竞争微生物和宿主免疫系统攻击的抵御能力得到增强^[51]。群体感应控制的生物过程很多，如：生物发光^[58]、毒力因子^[59]、抗生素^[60]、孢子的形成^[61]和生物膜的产生^[57]等。

1.2.1 革兰氏阳性菌

在革兰氏阳性菌中,有两类群体感应系统:分泌性寡肽(secreted oligopeptides)和双组分系统(two-component systems),主要是由膜结合的传感器激酶受体和细胞质转录因子组成,能够直接作用于基因的表达^[62]。自诱导肽(autoinducing peptides, AIPs),是一种在细胞中产生,并被加工和分泌到胞外的肽,是革兰氏阳性菌群体感应系统中的信号分子。随着细胞数量的增加,胞外 AIPs 的浓度会逐渐增加,当其浓度达到最高时,自诱导肽会与细胞膜或者双组分系统中的组氨酸激酶受体发生结合,激活激酶的活性,发挥下游的调控作用。

1.2.2 革兰氏阴性菌

与革兰氏阳性菌不同的是,革兰氏阴性菌群体感应系统的自诱导剂主要为酰基高丝氨酸内酯^[63](acyl-homoserine lactones, AHLs)或者其他由 s-腺苷蛋氨酸(s-adenosylmethionine, SAM)合成的分子,能够自由通过细胞膜扩散到胞外,与存在于细胞膜上和细胞质内的受体特异性结合,发挥调控作用。同时,革兰氏阴性菌群体感应系统往往会改变数十甚至上百个涉及生命活动的基因的表达状况;在自诱导的过程中,自诱导剂驱动的群体感应刺激着自诱导剂合成的增加,进而建立了一个前馈回路,被认为可以促进细菌群体中基因的表达。

1.2.3 群体感应调控系统的应用

代谢工程作为目前的研究热点,具有高滴度、高产量和高生产效率等优势^[64]。传统的静态调控策略例如基因敲除、过表达、核糖体位点改造和启动子改造、基因突变等都是关注于细菌的局部变化,往往具有定向和不可逆性,容易造成细胞代谢的失衡,有毒中间代谢物的积累,细胞生长的停滞^[65]。群体感应作为动态调控的一种,可以实时感知细胞内外信号的变化,调控相关基因的表达。作为自然的微生物通讯系统,群体感应在不需要人工干预、无需额外诱导剂和不会对细胞生长代谢产生负担^[66]的前提下,能够调控细胞密度相关的细胞行为。相较于静态调控,以群体感应为例的动态调控系统在代谢调控方面具有不菲的作用,能够帮助微生物适应复杂的环境变化^[67],分配不同途径之间的代谢流量,实现目标产物的快速积累,使得微生物可以在细胞生长和产物合成之间顺利转换。

群体感应的本质是微生物通过信号分子感知自身和环境变化并通过调控基因表达水平的变化,是一种有效的自我调控机制。群体感应系统的存在实现了细

胞内外的信号交换, 单个的微生物细胞可以执行类似于多细胞生物的功能。作为一种普遍存在的微生物现象, 群体感应多个领域都具有着十分广泛的应用。在工业生产中, 一方面, 群体感应可用于减少异源途径对于细胞的毒性, 沈^[68]等人在大肠杆菌中设计了一种 Esa 群体感应系统, 实现了 4-羟基苯乙酸 (4HPAA) 的从头合成, 通过定向进化获得突变体 ARO10 和 FeaB 变体, 提高了 4-羟基苯基丙酮酸到 4HPAA 的转化效率, 在不添加额外诱导剂的前提下, 4HPAA 的产量达到 17.39 ± 0.26 g/L, 摩尔产率为 23.2%, 与静态控制途径相比, 滴度提高了 46.4%; 另一方面, 群体感应还可用于平衡菌株生产和产物合成之间的关系, 崔^[69]等人在枯草芽孢杆菌中开发出一种 Phr60-Rap60-Spo0A 动态调控开关, 通过响应细胞密度的变化以调节 MK-7 合成途径中关键基因的表达, 平衡细胞生长和产物合成之间的关系, 最终将 MK-7 的产量提高到 360 mg/L。除此之外, 为解决群体感应在分批补料发酵中信号效率不稳定的问题, Soma^[70]等人在大肠杆菌中设计了一种群体感应代谢拨动开关 (metabolic toggle switch, MTS), 使得在补料发酵过程中群体感应信号能够更好地输出。在延长食品保质期方面, 多种食源性病原微生物的生物膜的产生都有群体感应系统的参与, 因此, 群体感应抑制剂 (quorum sensing inhibitors, QSI) 的添加是一种抑制食物腐败微生物和食源性病原菌的有效手段^[71, 72]。

1.3 枯草芽孢杆菌中基于转录调控因子 DegU 的群体感应调控网络分析

在群体感应调控系统中, 转录调控因子 DegU 作为枯草芽孢杆菌双组分调控系统 (two-component system, TCS) 的响应调节器^[73, 74], 控制着许多重要的生命进程, 如鞭毛形成^[75]、细胞感受态的发育^[74]和细胞运动^[76]等。在基因调控层面, DegU-P 能够促进多个基因的转录, 而 DegU 同时又能够促进作为遗传能力主要调节器的 *comK* 的转录, 因此 DegU 被视为控制细胞命运的分子开关^[77]。研究发现, 不同浓度的 DegU-P 在细胞内发挥不同的功能^[78]: 低水平的 DegU~P 能够促进细胞群体发挥聚集运动, 中等水平的 DegU~P 能够促进细胞生物膜的形成, 而高水平的 DegU-P, 一方面, 在生产胞外蛋白酶和生产 γ -PGA 方面发挥着促进作用^[76], 另一方面, 又能够抑制群体运动和生物膜的形成。因此我们认为, DegU 可以通过自身的逐步磷酸化在协调多细胞行为方面发挥着至关重要的作用。

同时, DegU 属于 NarL 响应调节器家族, 在其 C 端具有一个螺旋-转角-螺旋

(helix-turn-helix, HTH) 的结构, 用以识别特定的 DNA 序列^[79, 80]。DegU-P 可以与目标基因的启动子区域发生结合, 形成 DegU-DNA 二聚体的结构^[79, 81, 82], 进而调控相关基因的活性, 而这种结合作用被天冬氨酸磷酸酶 RapG 所抑制^[83]。关于 RapG 与 DegU-P 的调控作用方式, 有科学家认为, RapG 可以借助自身的 TRP 结构域与 DegU~P 发生结合, 进而发挥 RapG 的抑制作用^[84]。*phrG* 编码的 PhrG 五肽在细胞内合成为 pre-PhrG 并被分泌到胞外, 在细胞周质中逐渐成熟。随着细胞的生长, 细胞密度逐渐增加, 胞外的 PhrG 五肽浓度也在不断增加, 当细胞密度到达一定的阈值时, PhrG 会通过细胞膜上的寡肽渗透酶复合体 (oligopeptide permease, Opp) 进入胞内^[83], 特异性结合 RapG 并抑制其活性, 进而恢复 DegU-P 的调控活性。借助 RapG 蛋白和信号分子 PhrG, 我们可以构建一个基于细胞密度的动态调控原件: 在细菌生长初期, 细胞密度较低, RapG 结合到 DegU-P 上抑制其发挥作用; 随着细菌的生长, 细胞密度逐渐升高, 当细胞密度达到一定浓度时, 胞外的 PhrG 通过细胞膜上的寡肽渗透酶复合体进入细胞并与 RapG 特异性结合, 解除 RapG 对 DegU-的抑制作用, DegU-P 结合到靶基因的启动子区域发挥调控作用。

作为枯草芽孢杆菌双组分调控系统的响应调节器, DegU 控制着很多重要的生命进程^[85]。双组分调控系统作为枯草芽孢杆菌中重要的调控系统, 在接收到外界环境信号后, 通过影响目的基因的转录过程, 进而控制着相关基因的转录^[78], 帮助枯草芽孢杆菌适应复杂变化的外界环境。DegSU 双组分调控系统作为细菌和古细菌中常见的信号转导模块^[86], 控制着枯草芽孢杆菌从指数阶段到稳定生长阶段的各种生命进程^[87], 该信号转导途径能够使得细菌及时感知周围环境的变化并作出对应的调整^[78]。双组分调控系统是由传感器组氨酸激酶 (histidine kinase, HK) (DegS) 及其同源的天冬氨酸响应调节器 (response regulator, RR) (DegU) 组成: 当细胞感知到外界环境的变化时, 信号分子会被传递到传感器激酶 (DegS) 上, 使其自身的组氨酸残基发生自磷酸化 (DegS-P), 然后磷酸集团便会转移到同源的响应调节器的天冬氨酸 (DegU) 残基上使其发生磷酸化 (DegU-P), 进而影响基因的转录过程。

1.4 枯草芽孢杆菌中的 sigma 因子

sigma 因子作为细菌启动子的核心元件, 能够提高启动子与 RNA 聚合酶的

结合效率。在枯草芽孢杆菌中存在多种 σ 因子^[88]，分别发挥着不同的作用。这些 σ 因子根据重要性和功能的不同，可分为主要的 σ 因子和次要的 σ 因子：其中，主要的 σ 因子也称为管家 σ 因子，主要负责生命活动所必需的一些基因的转录；其他 σ 因子，被称为环境特异性 σ 因子，只在特定情况下控制特定基因的转录。在 BS168 中， σ^A 被称为管家基因， σ^B 被认为是应对一般压力的 σ 因子，而 σ^H 在指数后期和产孢阶段起着重要作用^[89]。

表 1-1 枯草芽孢杆菌中的 σ 因子Table 1-1 The σ factors in *Bacillus subtilis*

名称	功能描述
σ A	管家基因，早期芽胞形成相关，是枯草芽孢杆菌中最重要的 σ 因子
σ B	应激反应
σ C	指数后期基因表达
σ D	自融素与鞭毛基因表达
σ E	早期母细胞基因表达
σ F	早期前孔隙基因表达
σ G	晚期前孔隙基因表达
σ H	指数后期阶段基因表达和早期孢子形成
σ K	晚期母细胞基因表达
σ L	降解酶基因的表达

1.5 生物信息学的概况

作为一门全新的学科，生物信息学的出现是生物学科、计算机学科和统计学科等多学科高度交叉的结果，生物信息学的出现改变了生物学的研究方式，使得生物学上大量实验数据的处理与分析成为了可能^[90]，极大程度提高生物学的研究水平。

1.6 研究内容、目的与意义

1.6.1 研究目的与意义

在本研究中，我们研究了细胞密度与菌株产量之间存在的关系，以寻求一种能够平衡枯草芽孢杆菌中细胞生长与产物合成之间对立关系的方法；为此，我们

通过研究 PhrG、RapG 与 DegU 的相互作用关系，在枯草芽孢杆菌中成功构造了一个 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统，为动态调控枯草芽孢杆菌中相关基因的表达、减少有毒中间代谢物 HMBPP 和 DMAPP 的积累对细胞生长生成的影响、平衡细胞生长和产物合成之间的关系、提高底物转化效率提供了解决方案。

1.6.2 研究内容

首先，通过对枯草芽孢杆菌代谢途径的分析，找到了代谢途径中的关键调控因子 DegU；其次通过筛选获得调控效果最佳的原始启动子 P_{degQ} ，通过对该启动子进行改造和突变，构建启动子文库，筛选获得最符合预期的自诱导启动子 P_5 ，用以调控合成途径中关键基因的表达。接下来，使用构建的 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统优化枯草芽孢杆菌中 MK-7 的合成途径。本实验中构建出一个受细胞密度控制的动态调控原件，将产物合成和细胞生长动态联系了起来，平衡了二者之间的关系，使得细胞能够自主控制代谢过程，避免了代谢流的失衡，最终菌株 BS06 的细胞密度达到 28.677，在 250 mL 反应器中 MK-7 的产量达到 102.47 mg/L，这证明我们实验方案的可行性，实现了 VK₂ 高产量合成，为提高 VK₂ 的工业化生产水平和实现枯草芽孢杆菌微生物工厂的构建奠定了坚实的基础，同时也为提高次级代谢物在相关菌株的产量的研究提供了思路。

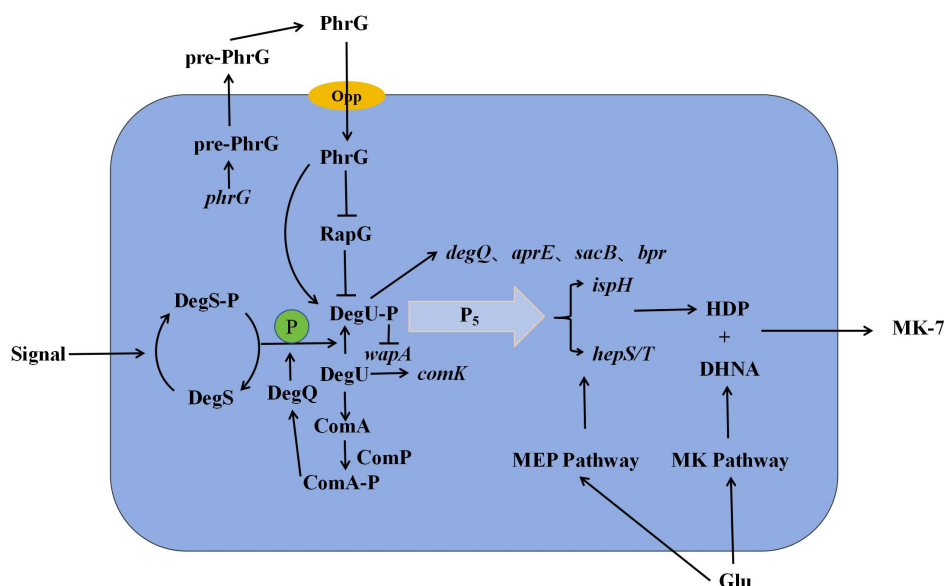


图 1-4 枯草芽孢杆菌中基于 DegU 的生物代谢途径

Figure 1-4 DegU-based biological metabolic pathways in *Bacillus subtilis*

第2章 枯草芽孢杆菌中转录调控因子 *degU* 的生物信息学分析

2.1 前言

转录因子 DegU 是枯草芽孢杆菌双组分调控系统中的响应调节器^[87], 是一种普遍存在并且很重要的转录因子, 在蛋白酶的产生、生物膜的形成^[91, 92]、孢子的形成、细菌的群集活动与复杂的菌落结构方面^[91]都发挥着存在的作用, 对于枯草芽孢杆菌的多细胞行为存在着重要的协调作用, 能够有效帮助细菌缓解来自外界的压力。在枯草芽孢杆菌中, DegU 的表达受到 Phr-Rap 系统的调控, 对于维生素 K₂ 的形成有着显著的影响作用。本章节通过生物信息学技术对 DegU 的生物膜分布、蛋白空间结构、理化性质与亚细胞定位、相互作用关系等信息进行预测分析, 为我们更好地理解 DegU 在枯草芽孢杆菌中的作用机理与调控方式, 为构建以 DegU 为中间枢纽的群体感应调控方式奠定了基础。

2.2 数据来源

枯草芽孢杆菌 *degU* 全基因组碱基序列与 DegU 蛋白全氨基酸序列皆从 NCBI 数据库下载获得。

2.3 数据分析方法

2.3.1 DegU 基本性质分析

DegU 蛋白的相对分子质量、氨基酸数目、分子式、等电点、半衰期、脂肪系数与不稳定系数等一系列基本信息可从 Expasy ProtParam 网站获得, DegU 蛋白是否存在跨膜结构可以通过 TMHMM Server 软件预测得到, DegU 蛋白的定位可以通过 Psortb 3.0 软件预测得到, DegU 蛋白是否存在信号肽可以通过在线软件 SignalP 4.1 预测获得。

2.3.2 DegU 结构域分析

使用在线软件进行蛋白质的结构预测和功能分析。

表 2-1 生物信息学分析常用在线软件

Table 2-1 Online software commonly used for bioinformatics analysis

软件名称	网址
ExPASy ProtParam	https://web.expasy.org/protparam
TMHMM Server	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0
Psortb 3.0	https://www.psort.org/psortb
SignalP 4.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1
Conserved domain search	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Phyre2	www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index
DogSiteScorer	https://bio.tools/dogsitescorer
STRING	https://cn.string-db.org

2.4 结果与分析

2.4.1 DegU 蛋白的基本性质分析

ExPASy ProtParam tool 网站显示, DegU 蛋白氨基酸数目为 229, 相对分子质量为 25 866.57 Da, 等电点为 5.66, 分子式为 $C_{1,142}H_{1,835}N_{323}O_{345}S_8$, 总原子数为 3 653, 在哺乳动物网织红细胞体外的半衰期为 30 h, 在酵母体内的半衰期为 20 h, 在大肠杆菌体内的半衰期为 10 h, 不稳定系数为 39.56, 稳定。脂肪系数为 10 118, 总平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.251 (图 2-1), 具有亲水性。Psortb 3.0 软件结果显示, DegU 蛋白分布在细胞质中, TMHMM Server 软件结果显示, DegU 蛋白不存在跨膜结构 (图 2-2), SignalP 4.1 软件结果显示, DegU 蛋白不存在信号肽 (图 2-3), 因此不属于分泌型蛋白。综上所述, 初步推断 DegU 蛋白为亲水性非膜蛋白。

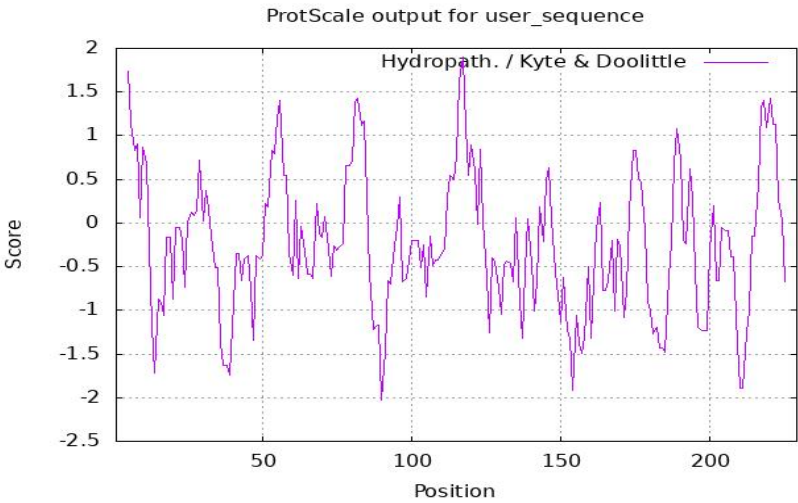


图 2-1 DegU 的总平均亲水性分析

Figure 2-1 Hydrophilicity analysis of DegU

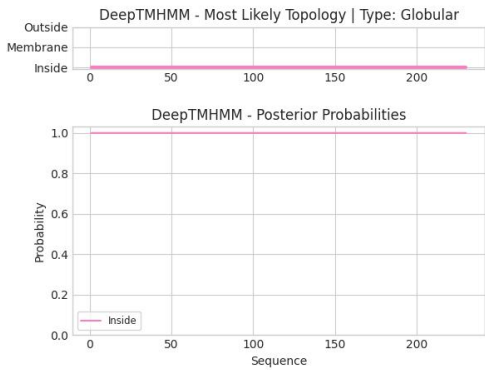


图 2-2 DegU 的跨膜结构分析

Figure 2-2 Transmembrane structure analysis of DegU

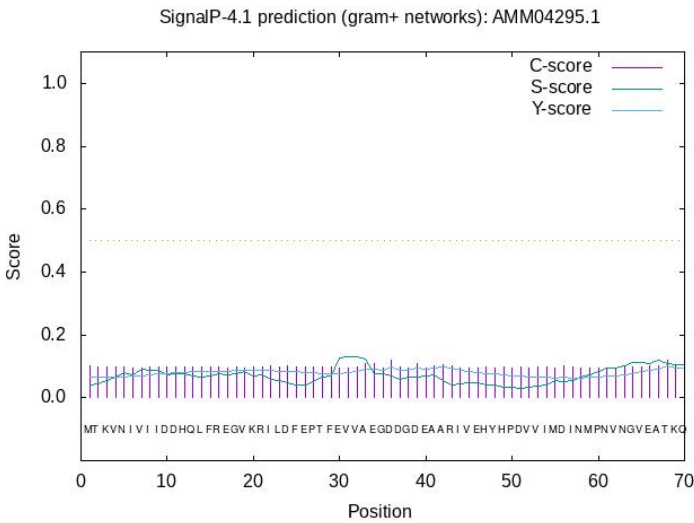


图 2-3 DegU 的信号肽分析

Figure 2-3 Signal peptide analysis of DegU

2.4.2 DegU 结构域分析

对 DegU 蛋白的保守结构域（图 2-4）分析我们发现，DegU 蛋白的是具有信号接收器（receiver, REC）和 LuxR 家族螺旋-转角-螺旋（helix-turn-helix, HTH）结构域的响应调节因子，是双组分系统的响应调节器。在 DegU 蛋白的保守结构域的 10、11 和 56 aa 的位置存在金属离子结合位点，同时 56 aa 也是磷酸化位点，这有可能意味着这个位点在蛋白质功能和调控中存在着重要的联系。我们可以发现，在 DegU 蛋白的保守结构域中，存在 6 个激活位点，分别是 10、11、56、84、103 和 106 aa 的位置，包含磷酸化位点和金属离子结合位点，其中，56 aa 位置既是金属离子结合位点，也是磷酸化位点，同时还是激活位点，因此我们推测，该位置可能是 DegU 蛋白功能的关键调控位点。当 DegU 蛋白接收到信号后，可能会首先在该位置磷酸化，改变自身结构，进而引发金属离子的结合，激活蛋白质的表达。当磷酸化位点、金属离子结合位点和激活位点同时位于同一区域时，可以有效提高蛋白质在接收信号后的处理速度，执行细胞功能。

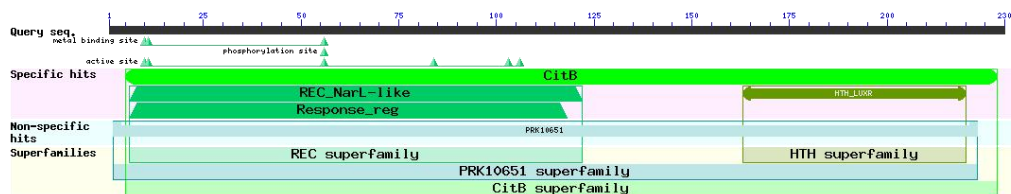


图 2-4 DegU 的保守结构域分析

Figure 2-4 Conserved domain analysis of DegU

2.4.3 DegU 的 HTH-LUXR 结构域分析

在 DegU 蛋白的结构域中，存在一个位于 163-220 aa 的 HTH-LUXR 结构域（图 2-5），该结构域是一个螺旋-转角-螺旋结构，由大约 57 个氨基酸组成，是 DegU 蛋白与 DNA 结合的位点，主要存在于 LuxR/FixJ 家族的转录调节因子中。该结构在多种生物中普遍存在，在该结构域中，DNA 与 HTH 结构的 C 端结合，而 N 端包含自诱导剂结合结构域和反应调节结构域。在大部分情况下，luxR 都是充当转录激活因子。当遇到特定情况时，luxR 型调控因子也可以发挥抑制作用甚至是双重作用。因此，在微生物中，luxR 型调控因子可以控制生物过程中的多种生命进程。

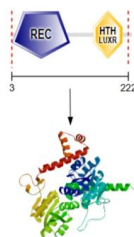


图 2-5 DegU 的结构示意图

Figure 2-5 Schematic representation of the structure of DegU

HTH-LUXR 结构域包含四个螺旋束结构，其中，HTH 结构包含名为支架螺旋的第二螺旋和名为识别螺旋第三螺旋两部分，HTH 结构与 DNA 的结合发生在主螺旋结构中，第四螺旋参与 *gerE* 与 *traR* 的二聚化过程。

2.4.4 金属离子结合位点分析

双组分系统中，信号转导是由蛋白组氨酸激酶与响应调节蛋白中的磷酸化接受受体结构域之间的金属离子依赖性磷酸继电器反应介导的，对于许多接收器来说， Mg^{2+} 是首选的金属离子，但也使用其他二价离子，如 Mn^{2+} 。在 DegU 蛋白的结构域中，存在两个金属离子结合位点：位于 6-122 aa 位置的 4IF4（图 2-6）和位于 6-118 aa 位置的 4YN8（图 2-7）。其中，在 4IF4 上， Mg^{2+} 与来自金黄色葡萄球菌 VraR 的 REC 结构域的 2 个水分子、氟化苄和 2 个 Asp 残基配位；在 4YN8 上， Mg^{2+} 与 3 个水分子和白喉杆菌反应调节子 ChrA 的 REC 结构域的 Asp/his 残基配位。

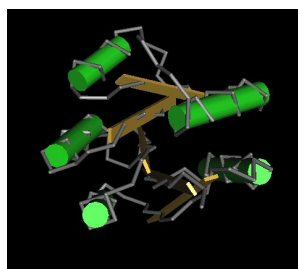


图 2-6 4IF4 的结构示意图

Figure 2-6 Schematic representation of the structure of 4IF4

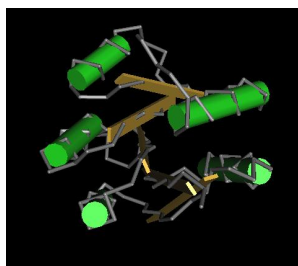
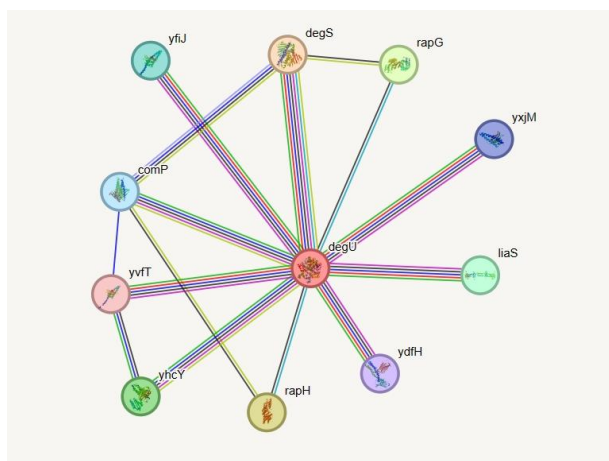


图 2-7 4YN8 的结构示意图

Figure 2-7 Schematic representation of the structure of 4YN8

2.4.5 *degU* 基因相互作用网络

通过 STRING 构建了 *degU* 相互作用网络（图 2-8），可以发现，DegU 不仅受到反应调节因子天冬氨酸磷酸酶 RapG 的调控，同时也天冬氨酸磷酸酶 RapH 的调控，这表明，*degU* 在枯草芽孢杆菌中受到多个 Phr-Rap 系统的调控。*degU* 还与组氨酸激酶编码基因 *degS*、*comP*、*yxjM*、*liaS*、*ydfH*、*yhcY* 和 *yvfT* 之间都存在相互作用，但观察线条数量发现，DegU 与组氨酸激酶 DegS 的联系最为密切，这说明在枯草芽孢杆菌中，二者之间关系密切，相互影响。同时我们也可以推测，枯草芽孢杆菌中，各个双组分系统之间并不是相互独立的，而是相互连接，彼此影响。相互作用网络表明，*degU* 在枯草芽孢杆菌中的调控方面发挥重要的作用。

图 2-8 *degU* 基因相互作用网络Figure 2-8 The interaction network of *degU*

2.4.6 DegU 蛋白的空间结构

通过 DogSiteScorer 的结果分析（图 2-9）我们可以发现，DegU 蛋白没有配体，但是有两个底物催化口袋。



图 2-9 DegU 蛋白的空间结构示意图

Figure 2-9 Spatial structure of the DegU

2.5 本章小结

本文通过对 DegU 蛋白的生物信息学信息进行预测与分析，预测 DegU 蛋白的结构，分析其在枯草芽孢杆菌调控网络中的作用。具体研究内容如下：

(1) 通过对 DegU 蛋白的亲水性分析、亚细胞分布、跨膜结构分析和信号肽等基本信息分析，推断出 DegU 蛋白为亲水性非膜蛋白。

(2) 通过对于 DegU 蛋白的保守结构域分析我们发现，DegU 蛋白的 56 aa 位置既是金属离子结合位点，也是磷酸化位点，同时还是激活位点，因此我们推断该位置是 DegU 蛋白功能的关键调控位点。

(3) DegU 的 HTH-LUXR 结构域是 DegU 蛋白与 DNA 结合的位点，是生物体中普遍存在的调控结构。在该结构域中，DNA 与 HTH 结构的 C 端结合，发挥调控作用。在大部分情况下，该能够都是发挥促进作用，但在特定情况下可以发挥抑制作用甚至是拮抗作用。

(4) *degU* 的相互作用网络表明，DegU 在枯草芽孢杆菌代谢网络中的重要性。因此，在后续的实验，我们围绕着 DegU 的调控网络进行分析与构造，以构建出一株高产 MK-7 的目标菌株。

第3章 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统的构建

3.1 前言

群体感应作为细胞间的通讯工具，在不依赖代谢途径、不需要额外诱导剂的情况下，调控基因的表达。群体感应与代谢物响应启动子和生物传感器被共同是为动态调控的三个组成部分，其中，代谢物响应启动子一般是指对原始启动子进行筛选获得的能够响应特定代谢产物的启动子，用以调控目标产物的合成。在大肠杆菌中，通过对有毒中间体有响应的启动子进行鉴定筛选，将其用于法呢基焦磷酸（FPP）的合成，最终将产量提高 2 倍^[93]。生物传感器一般来源于转录因子，在其与底物相互作用时，通过与 DNA 分子的结合以达到调控的目的。Lo 等人^[94]在大肠杆菌中利用设计的生物传感器原件将细胞生长与产物合成连接起来，最终将目标产物羟基肉桂酸的产量与生长速度分别提升 5 倍和 2 倍。但是，由于代谢物响应启动子和生物传感器在一定程度上会受到代谢途径的局限性，因此，不受代谢途径调控和代谢产物诱导的群体感应系统成为目前的研究热点。

在上一章中，通过对枯草芽孢杆菌中 DegU 蛋白的生物学信息精选筛选分析，我们对于该蛋白的基本信息有了一定的了解。在本章中，我们围绕枯草芽孢杆菌中 *degU*，重构了枯草芽孢杆菌中的群体感应系统，使得细菌能够依据细胞密度的变化调控下游基因的表达。首先，通过对枯草芽孢杆菌中 RapG、PhrG 和 DegU 相互作用关系验证，推断出三者之间的相互作用关系；其次，通过基因敲除验证三者对于菌株生长的影响；最后，在枯草芽孢杆菌中构造 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统，用于调控下游基因的表达。

3.2 实验材料

3.2.1 菌种和质粒

枯草芽孢杆菌 BS168、质粒 p7C6、质粒 pDG-Cre、质粒 pHT-XCR6 均为本实验室保藏。

3.2.2 主要药品与仪器

表 3-1 主要实验药品

Table 3-1 Main experimental drugs

药品名称	规格	生产厂家
胰蛋白胨	生物级别	上海生工生物
酵母提取物	生物级别	上海生工生物
大豆蛋白胨	生物级别	上海生工生物
NaCl	分析纯	国药集团
K ₂ HPO ₄	分析纯	国药集团
KH ₂ PO ₄	分析纯	国药集团
HCl	分析纯	国药集团
NaOH	分析纯	国药集团
琼脂糖	分析纯	上海生工生物
IPTG	分子生物	上海生工生物
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	分子生物	TaKaRa 生物
PCR 产物纯化试剂盒	分子生物	上海生工生物
胶回收试剂盒	分子生物	上海生工生物
质粒提取试剂盒	分子生物	天根生物
细菌基因组提取试剂盒	分子生物	天根生物
50×TAE 缓冲溶液	分子生物	天根生物
Goldview 核酸染料	染色剂	北京兰杰柯科技有限公司
6×Loading Buffer	分子生物	赛默飞世尔科技(中国)有限公司
甘油	分析纯	上海生工生物
溶菌酶	分子生物	上海生工生物
甲醇	色谱级	阿拉丁试剂
异丙醇	色谱级	阿拉丁试剂
正己烷	色谱级	阿拉丁试剂

二氯甲烷	色谱级	阿拉丁试剂
氯霉素	美国药典标准	上海生工生物
卡那霉素	美国药典标准	上海生工生物
氯化钙	分析纯	上海生工生物
氯化镁	分析纯	上海生工生物

表 3-2 实验主要仪器

Table 3-2 Main experimental instruments

仪器名称	生产厂家
DYCP-30D 水平电泳槽	北京六一仪器厂
超纯水机	和泰
双层振荡培养箱	知楚仪器
K30 干燥恒温器	金坛市盛蓝仪器制造有限公司
台式冷冻高速离心机	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
自动凝胶成像系统	SYNGENE
TU-1810 紫外可见分光光度计	北京普析通用仪器有限责任公司
HS-Z1-20 不锈钢蒸馏水机	常州未来仪器制造有限公司
TLE104E 电子天平	梅特勒托利多仪器（上海）有限公司
VD-850 型桌上式洁净工作台	苏州净化仪器有限公司
JY1000C 三恒电泳仪	北京君意东方电泳设备有限公司
高压蒸汽灭菌器	日本 SANYO
EL20pH 剂	梅特勒托利多仪器（上海）有限公司
微波炉	Galanz
SHZ-82A 气浴恒温振荡器	金坛市杰瑞尔电器有限公司
PCR 仪	伯乐生命医学产品（上海）有限公司
250D 数显光照培养箱	金坛市杰瑞尔电器有限公司
精密微量进样器	上海高鸽工贸有限公司
TG16-G 高速冷冻离心机	湘仪离心机仪器有限公司
制冰机	雪科
DHG-9143BS-III 电热恒温鼓风干燥箱	上海申安医疗器械厂

酶标仪	赛默飞
TG16-W 微量高速离心机	湘仪离心机仪器有限公司
高效液相色谱仪	日本岛津
核酸定量仪	美林恒通（北京）仪器有限公司

3.2.3 培养基

表 3-3 培养基

Table 3-3 Media used in this study

培养基名称	配方	备注
LB 培养基	NaCl 5 g, 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 10 g	定容到 1 000 mL, 调 pH 7.0, 121℃灭菌 20 min, 固体培养基加入 20 g 琼脂
SYg 发酵培养基	酵母提取物 50 g, 甘油 50 g, 酵母提取物 20 g, K ₂ HPO ₄ 3.86 g, KH ₂ PO ₄ 1.62 g, 微量元素 2 mL	定容到 1 000 mL, 调 pH 7.0, 121℃灭菌 20 min, 微量元素过滤除菌后加入灭菌后的培养基
Sipizizen 感受态培养基	SPI 溶液, SPII 溶液, 250 mmol/L MgCl ₂ , 50 mmol/L CaCl ₂ , 50% 葡萄糖	

3.2.4 主要溶液

SPI-A: 0.4 g (NH₄)₂SO₄, 2.14 g K₂HPO₄, 1.2 g KH₂PO₄, 0.2 g 柠檬酸三钠二水化合物, 加水定容到 100 mL, 121℃灭菌 20 min;

SPI-B: 0.04 g MgSO₄·7H₂O, 加水定容到 100 mL, 121℃灭菌 20 min;

100×EGTA: 0.38035 g EGTA 固体, 加水定容到 100 mL, NaOH 水溶液调 pH 8.0, 121℃灭菌 20 min;

50 %葡萄糖水溶液: 5 g 葡萄糖固体加 5 mL 水, 过滤除菌;

100×CAYE: 2 g 酪蛋白水解物, 10 g 酵母提取物, 加水定容到 100 mL, 121℃灭菌 20 min;

50 mmol/L CaCl₂: 0.555 g CaCl₂, 加水定容到 100 mL, 121℃灭菌 20 min;

250 mmol/L MgCl₂: 2.375 g MgCl₂, 加水定容到 100 mL, NaOH 水溶液调 pH

8.0, 121°C灭菌 20 min;

SPI 培养基: 0.98 mL SPI-A+ 0.98 mL SPI-B+ 20 μ L 50 %葡萄糖+ 20 μ L 100 $\times$ CAYE;

SPII 培养基: 1.96 mL SPI+ 20 μ L 50 mmol/L CaCl_2 + 20 μ L 250 mmol/L MgCl_2

3.3 实验方法

3.3.1 枯草芽孢杆菌的活化以及感受态的制备

出发菌株枯草芽孢杆菌 168 储存在-80 °C冰箱中, 在 4 °C自然融化。菌株的活化培养均在 LB 培养基中进行, 将固体培养基上长出的单菌落接种到含有 5 mL LB 液体培养基的试管中, 在 37 °C、220 rpm 条件下培养 12~16 h 完成菌株的活化。

枯草芽孢杆菌感受态的制备采用 Spizizen 法^[95]进行化学转化, 将固体培养基表面的单菌落接种到 SPI培养基中, 37 °C、220 rpm 条件下培养 12~16 h 后, 取 40 μ L 培养菌液接种到 SPI培养基中, 培养 5~6 h 后, 取 200 μ L 接种到 SPII培养基中, 培养 1.5~2 h, 加入 20 μ L EGTA 溶液, 培养 10 分钟后获得枯草芽孢杆菌的感受态菌株。

3.3.2 枯草芽孢杆菌全基因组与质粒的提取

将枯草芽孢杆菌和含有目的质粒的大肠杆菌划线挑取单菌落后, 接种到 LB 液体培养基中活化培养至对数期, 分别采用细菌全基因组提取试剂盒和质粒提取试剂盒进行全基因组与目标质粒的提取, 采用核酸定量仪检测产物浓度。

3.3.3 重组菌株的构建

采用无缝克隆技术进行重组菌株的构建^[95], 将重组片段整合到枯草芽孢杆菌全基因组上。引物采用 snapgene 设计引物, 委托金斯瑞生物技术有限公司合成 (表 3-4)。扩增出单片段后, 利用重叠延伸 PCR (overlap PCR) 技术融合获得重组片段, 将其与感受态细胞混合, 培养一段时间后涂布于抗性平板, 将长出来的单菌落进行菌液 PCR 验证, 获得正确的转化菌株, 采用 cre/loxP 系统消除重组菌株的抗生素抗性^[95], cre 质粒在 50 °C条件下培养 12 h 消除。

表 3-4 第三章所用的引物设计

Table 3-4 Primes sed in Chapter III

引物		序列 (5'→3')
	<i>degU</i> -F	GAAGCGGCTCGTATTGTTG
	<i>degU</i> -R- <i>egfp</i>	CCTTGCTCACCATCTATCTCATTTCTACCCAGCC
	<i>degU</i> - <i>egfp</i> -F	CTGGGTAGAAATGAGATAGATGGTGAGCAAGGGC
<i>degU</i> -eGFP	P7C6-R- <i>degU</i> -R	AGGCAAGTCTCCTATTATAGTTCAAGCGAAAACATA CCAC
	P7C6- <i>degU</i> -R-F	GGTATGTTTTTCGCTTGAAGTATAATAGGAGACTTGCC TTTTACTAGG
	<i>degU</i> -R-R	CTTCACCCAAATGAGTGCC
	<i>rapG</i> -L-F	CTGCTGTTTGGAATCTGG
	<i>rapG</i> -L-R-P7C6	TGTTATCCGCTCGTGAAACTCCTTTCTCTAGTGACTT A
	<i>rapG</i> -L-P7C6-F	AGAAAGGAGTTTCACGAGCGGATAACAATTTACACAC
	P7C6-R-P _{grac100}	CGCTTACATCATTCTTTTCCCACCTATCATACCGTTTCG
P _{grac100} - <i>rapG</i>	P7C6-P _{grac100} -F	CGGTATGATAGGTGGGAAAAGAATGATGTAAGCGTG AAAAA
	P _{grac100} -R- <i>rapG</i>	GGTGCGATCTTATTCATGGATCCCACCTCCTTTAATT G
	P _{grac100} - <i>rapG</i> -F	GGTGGGATCCATGAATAAGATCGCACCCG
	<i>rapG</i> -R	CGGGCATACTCATCGTTC
	<i>rapG</i> -L-F	TTTGTGGTCTTTACGGCTTTG
	<i>rapG</i> -L-R	ATCCGCTCGTGAAACTCCTTTCTCTAGTGACT
	<i>rapG</i> -L-P7C6-F	AGGAGTTTCACGAGCGGATAACAATTTACACACA
P _{hag} - <i>rapG</i>	<i>rapG</i> -L-P7C6-R	TAACGCTGCCCACCTATCATACCGTTTCG
	P7C6-P _{hag} -F	ATAGGTGGGCAGCGTTATCCAGCG
	P7C6-P _{hag} -R	GGGTGCGATCTTATTCATTGTTTTGTTCCCTCCTGAAT ATG

	<i>P_{hag}-rapG-F</i>	GGGAGGAACAAAACAATGAATAAGATCGCACCCG
	<i>P_{hag}-rapG-R</i>	CTTTCTCGGACAACAAGTCAT
	<i>rapG-F</i>	TGCTTGCCTACTTCTCCTTAT
	<i>rapG-R</i>	GTGAAATTGTTATCCGCTCTTATATAACCTCCGTTTCGT TTAATCAGT
	<i>rapG-P7C6-F</i>	ATTAAACGAACGGAGGTTATATAAGAGCGGATAACA ATTTCACACAG
<i>P_{hag}-phrG</i>	<i>rapG-P7C6-R</i>	CGCTGCCCCACCTATCATACCGTTTCGT
	<i>P7C6-P_{hag}-F</i>	ATAGGTGGGCAGCGTTATCCAGCG
	<i>P7C6-P_{hag}-R</i>	GCCAATCAGAAATCTTTTCATTGTTTTGTTCCCTCCCT GAATATGT
	<i>P_{hag}-phrG-F</i>	AGGGAGGAACAAAACAATGAAAAGATTCTGATTG GCG
	<i>phrG-R</i>	CACGGCGATTTGAATACACTT
	<i>ΔrapG-L-F</i>	TGGTCTTTACGGCTTTGGC
	<i>ΔrapG-L-R-P7C6</i>	CCCGGGTGTGAAACTCCTTTCTCTAGTGAC
	<i>ΔrapG-L-P7C6-F</i>	GGAGTTTCACACCCGGGGATCCTCT
<i>ΔrapG</i>	<i>P7C6-R-ΔrapG-R</i>	GCCAATCAGAAATCTTTTCATGTTCAAGCGAAAACA TACCAC
	<i>P7C6-ΔrapG-R-F</i>	GGTATGTTTTCGCTTGAACATGAAAAGATTCTGATT GGCG
	<i>ΔrapG-R-R</i>	ACTTCACCATCGGGCAATA
	<i>ΔphrG-L-F</i>	AGAGGACAGGGCTTTCAG
	<i>ΔphrG-L-R-P7C6</i>	ATCCCCGGGTTTATATAACCTCCGTTTCGTTTAATCAG
<i>ΔphrG</i>	<i>ΔphrG-L-P7C6-F</i>	ACGGAGGTTATATAAACCCGGGGATCCTCT
	<i>P7C6-R-ΔphrG-R</i>	CCCGCATCCAGGGTGATGTTTGTCAGTTATTAAAT
	<i>P7C6-ΔphrG-R-F</i>	ACCCTGGATGCGGGGGTTCAA
	<i>ΔphrG-R-R</i>	AAATTCCCGCTTGTCTCTG
<i>ΔdegU</i>	<i>ΔdegU-L-F</i>	TCCTAACGCACCTTCACC

$\Delta degU$ -L-R-P7C6	ATCCCCGGGTTATAATAGGAGACTTGCCTTTTACTAG
	G
$\Delta degU$ -L-P7C6-F	GGCAAGTCTCCTATTATAACCCGGGGATCCTCT
P7C6-R- $\Delta degU$ -R	GAGGCGTGGCTTAGGGTGATGTTTGTTCAGTTATTAAR
P7C6- $\Delta degU$ -R-F	ACATCACCCCTAAGCCACGCCTCCT
$\Delta degU$ -R-R	CAGGTAGAATTGACGATGATCCA
$degU$ -L-F	CAAATGCTGGCGAATGTTATG
$degU$ -L-R	CGGGTAAGCCACGCCTCCT
P7C6-F	CGTGGCTTACCCGGGGATCCTC
P ₄₃ - $degU$	AACAATGTTTACTTTAGTCACGTGTACATTCCTCTCT
	TACCTATAATG
$degU$ -F	AGAGAGGAATGTACACGTGACTAAAGTAAACATTGT
	TATTATCGAC
$degU$ -R	GTTGTTACGCATTCTTTTCG

表 3-5 第三章所使用的菌株与质粒

Table 3-5 Strains and plasmids sed in Chapter III

名称	特征	来源
<i>B. subtilis</i> 168		实验室储存
BC00	<i>B. subtilis</i> 168 衍生菌株, $degU$ -eGFP	本章
BC01	<i>B. subtilis</i> 168 衍生菌株, $degU$ -eGFP, P _{grac100} - $rapG$	本章
BC02	<i>B. subtilis</i> 168 衍生菌株, $degU$ -eGFP, P _{hag} - $rapG$	本章
BC03	<i>B. subtilis</i> 168 衍生菌株, $degU$ -eGFP, P _{hag} - $rapG$, P _{hag} - $phrG$	本章
BL01	<i>B. subtilis</i> 168 衍生菌株, $\Delta rapG$	本章
BL02	<i>B. subtilis</i> 168 衍生菌株, $\Delta phrG$	本章
BL03	<i>B. subtilis</i> 168 衍生菌株, $\Delta degU$	本章
BS01	<i>B. subtilis</i> 168 衍生菌株, P _{hag} - $rapG$	本章

BS02	<i>B. subtilis</i> 168 衍生菌株, $P_{hag-rapG}$, $P_{hag-phrG}$	本章
BS03	<i>B. subtilis</i> 168 衍生菌株, $P_{hag-rapG}$, $P_{hag-phrG}$, $P_{43-degU}$	本章
pHT-XCR6	Amp, Cm, 包含 $P_{grac100}$	实验室储存
pDG-Cre	Amp, Km, <i>E.coli-B.subtilis</i> 穿梭载体, 包含 P_{spac} 控制的 <i>cre</i>	实验室储存
p7C6	Pmd18-T 包含 lox71-zeo-lox66 片段	实验室储存

表 3-6 PCR 反应程序

Table 3-6 PCR reaction procedures

循环步骤	温度	时间
34 个循环	98 °C	3 min
	98 °C	10 s
	55 °C	5 s
	72 °C	100 bp/s
延伸	72 °C	5 min
保存	4 °C	∞

3.3.4 氯霉素抗性的去除

将含有氯霉素抗性的重组菌株利用 spizizen 法制成感受态细胞后, 将 *cre* 质粒转化到重组菌株中, 利用卡那霉素抗性平板筛选获得阳性克隆。挑取阳性克隆, 接种到含有卡那霉素和 IPTG 的 LB 培养基中, 37 °C, 220 rpm 条件下培养 10 h, 消除氯霉素抗性, 将消除完氯霉素的重组菌株接种到 LB 培养基中, 50 °C, 220 rpm 条件下培养 12 h, 消除菌株携带的 *cre* 质粒, 将过夜培养的种子液稀释涂布到 LB 培养基, 37 °C 静置培养 12 h, 将生长出来的单菌落分别转接到 LB 培养基、氯霉素抗性培养基和卡那霉素抗性培养基上, 无抗性菌株在 LB 培养基生长但是在氯霉素抗性培养基和卡那霉素抗性培养基上不生长。选取合适的单菌落保种, 获得无抗性的重组菌株。

3.3.5 eGFP 强度的测定

将重组菌株单菌落转接到 LB 培养基中, 在 37 °C、220 rpm 下培养至对数期, 按照 2% 接种到含有 50 mL LB 液体培养基的锥形瓶中。每 4 h 取样检测 eGFP 的

荧光强度；通过增加 IPTG 的浓度，检测不同浓度下的荧光强度。用多功能酶标仪检测细胞的荧光强度：在激发波长为 490 nm，发射波长为 530 nm，增益为 60 的条件下，检测细胞的荧光强度。

3.3.6 摇瓶发酵合成 MK-7

目的菌株划线于 LB 固体培养，将生长出来的单菌落接种到 LB 液体培养基培养至对数期，按照 2 % 的接种量接到盛有 50 mL 液体 SYg 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中，37 °C 条件下静置培养 6 d，每隔 12 h 取样检测 MK-7 产量。

3.3.7 菌株生长曲线的测定

菌株在 LB 固体培养基活化后，接入 LB 液体培养基过夜培养。按照 2% 的接种量将过夜培养液转入盛有 50 mL 液体 SYg 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中，混合均匀，37 °C，静置培养，每隔 12 h 取样，样品放在冰箱贮存，最后统一采用酶标仪进行测定 600 nm 处的吸光度。在检测过程中，每隔 12 h 进行取样，测量时适当稀释进而保持细胞光密度的数值在 0.2~0.8 之间。

3.3.8 维生素 K₂ 的提取与检测

采用高效液相色谱（HPLC）法检测发酵液中维生素 K₂ 的含量。取 2 mL 混匀的发酵液于 5 mL 的棕色离心管中，10 000 r/min，离心 5 min，将上清液吸入 5 mL 棕色离心管中，加入 4 倍体积的萃取剂，震荡培养箱震荡 20 min，将离心管避光静置 30 min，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液，0.22 μm 滤膜过滤，加入进样瓶中。色谱柱为赛默飞 5 μm C18（4.6×250 mm），萃取剂为正己烷与异丙醇的混合液（正己烷与异丙醇的比为 2：1），流动相为甲醇与二氯甲烷的混合物（甲醇与二氯甲烷的比为 9：1），流速：1.0 mL/min，进样量：10 μL，温度：35 °C，紫外检测波长：254 nm。

3.3.9 维生素 K₂ 标准曲线的绘制

称取 0.1 g 的 VK₂ 标准品，用流动相定容到 1 mL，配置成 100 mg/mL 的母液，存储在棕色 EP 管中，低温避光保存。将母液稀释成不同浓度梯度的 VK₂ 溶液，通过高效液相色谱检测峰面积。测量得到标准方程为 $Y=14\,368x+1\,272.3$ ， $R^2=0.999\,6$ ，表明二者之间的线性关系良好。

3.4 结果与分析

3.4.1 重组菌株的构建

利用同源重组的方法^[95], 将增强型绿色荧光标签通过 *spizizen* 化学法插入枯草芽孢杆菌 168 基因组基因 *degU* 后, 涂布于抗性平板筛选获得重组菌株 BC00 (图 3-1), 利用 *cre/loxP* 系统去除菌株的抗生素抗性。利用重叠延伸 PCR 的方法扩增得到融合片段 $P_{grac100}$ -*rapG*、 P_{hag} -*rapG*, 转化到重组菌株 BC00 中得到重组菌株 BC01 (图 3-2) 和 BC02 (图 3-3), 去除抗生素抗性后将融合片段 P_{hag} -*phrG* 转化到重组菌株 BC02 中得到重组菌株 BC03。

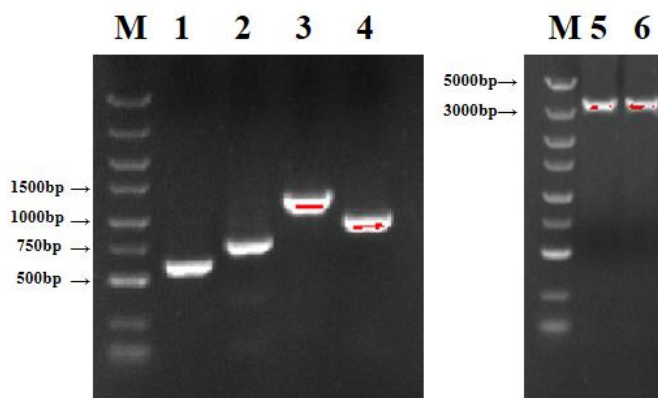


图 3-1 BC00 的 PCR 鉴定

Figure 3-1 Identification of recombinant strain BC00

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *degU* 同源臂; 泳道 2, 增强型绿色荧光蛋白标签片段; 泳道 3, 氯霉素抗性片段; 泳道 4, *degU* 下游同源臂; 泳道 5, *degU*-eGFP-P7C6-*degU*-R 融合片段; 泳道 6, BC00 菌液 PCR 验证

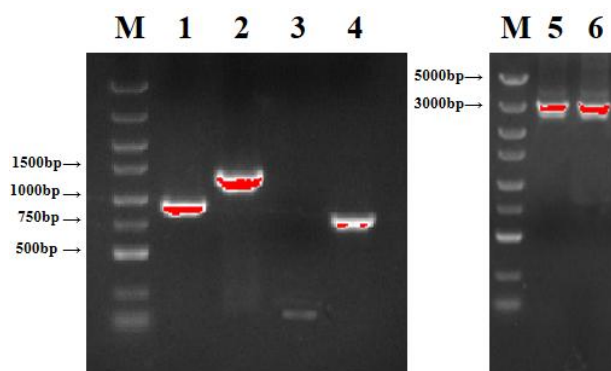


图 3-2 BC01 的 PCR 鉴定

Figure 3-2 Identification of recombinant strain BC01

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *rapG*-L 同源臂; 泳道 2, P7C6 片段; 泳道 3, 启动子 $P_{grac100}$ 片段; 泳道 4, *rapG* 同源臂; 泳道 5, *rapG*-L-P7C6- $P_{grac100}$ -*rapG* 融合片段; 泳道 6, BC01 菌液 PCR 验证

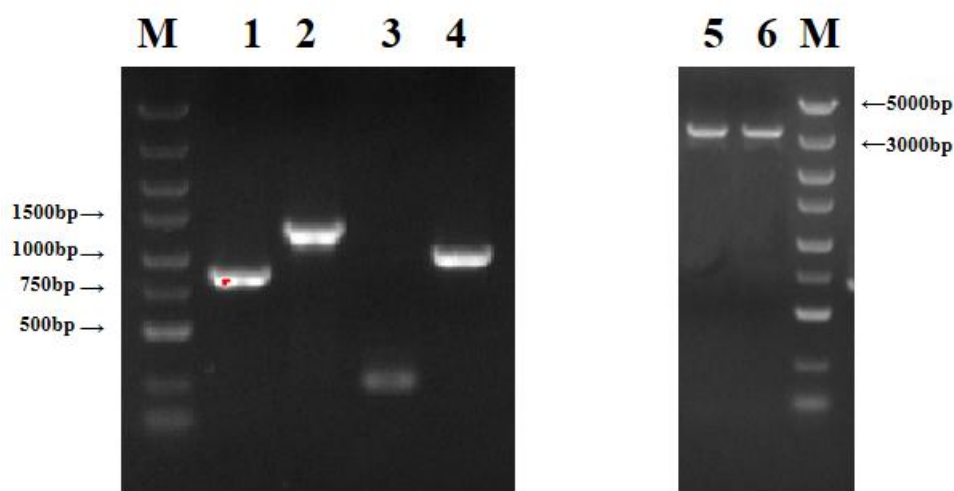


图 3-3 BC02 的 PCR 鉴定

Figure 3-3 Identification of recombinant strain BC02

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *rapG*-L 同源臂; 泳道 2, P7C6 片段; 泳道 3, 启动子 P_{hag} 片段; 泳道 4, *rapG* 同源臂; 泳道 5, *rapG*-L-P7C6- P_{hag} -*rapG* 融合片段; 泳道 6, BC02 菌液 PCR 验证

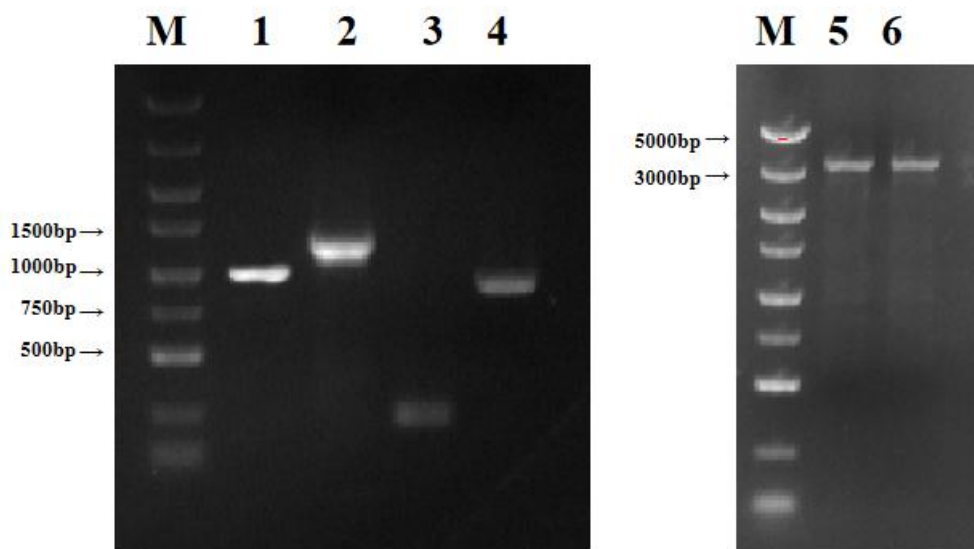


图 3-4 BC03 的 PCR 鉴定

Figure3-4 Identification of recombinant strain BC03

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *phrG*-L 同源臂; 泳道 2, P7C6 片段; 泳道 3, 启动子 *P_{hag}* 片段; 泳道 4, *phrG* 同源臂; 泳道 5, *phrG*-L-P7C6-*P_{hag}*-*phrG* 融合片段; 泳道 6, BC03 菌液 PCR 验证

为验证 *rapG*、*phrG* 和 *degU* 基因缺失对于菌株生长造成的影响, 我们分别在枯草芽孢杆菌中敲除 *rapG*、*phrG* 和 *degU* 基因, 得到重组菌株 BL01, BL02 与 BL03, 具体操作为: 以枯草芽孢杆菌 168 基因组为模板, 扩增得到片段 *rapG*-L 和 *rapG*-R, 以质粒 p7C6 为模板, 扩增得到氯霉素抗性片段 P7C6, 利用重叠延伸 PCR (overlap PCR) 的方法获得重组片段 *rapG*-L-P7C6-*rapG*-R, 通过 spizizen 化学法插入枯草芽孢杆菌 168 基因组, 涂布于抗性平板筛选获得重组菌株 BL01 (图 3-5), 利用同样的方法得到 BL02 (图 3-6) 与 BL03 (图 3-7)。

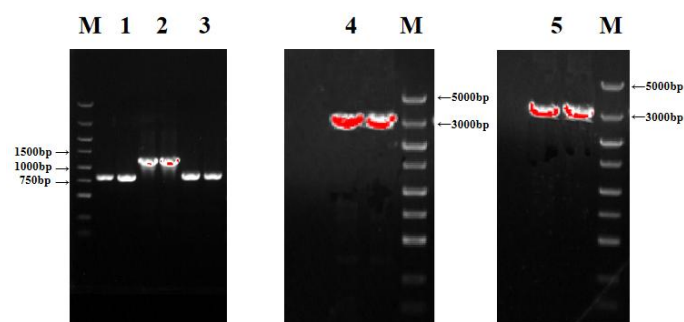


图 3-5 BL01 的 PCR 鉴定

Figure3-5 Identification of recombinant strain BL01

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *rapG* 上游同源臂; 泳道 2, 氯霉素抗性片段; 泳道 3, *rapG* 下游同源臂; 泳道 4, *rapG*-L-P7C6-*rapG*-R 融合片段; 泳道 5, BL01 菌液 PCR 验证

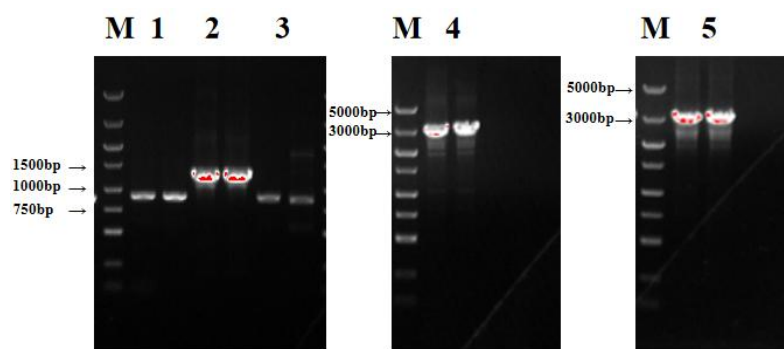


图 3-6 BL02 的 PCR 鉴定

Figure3-6 Identification of recombinant strain BL02

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *phrG* 上游同源臂; 泳道 2, 氯霉素抗性片段; 泳道 3, *phrG* 下游同源臂; 泳道 4, *phrG*-L-P7C6-*phrG*-R 融合片段; 泳道 5, BL02 菌液 PCR 验证

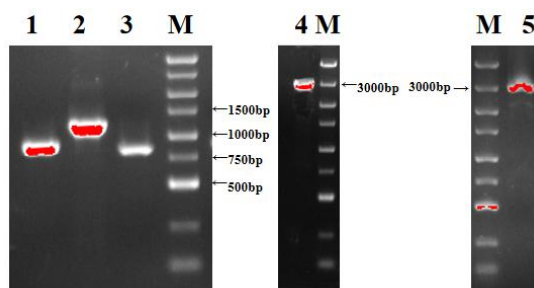


图 3-7 BL03 的 PCR 鉴定

Figure3-7 Identification of recombinant strain BL03

M: 5000 bp DNA marker, 泳道 1, *degU* 上游同源臂; 泳道 2, 氯霉素抗性片段; 泳道 3, *degU* 下游同源臂; 泳道 4, *degU*-L-P7C6-*degU*-R 融合片段; 泳道 5, BL03 菌液 PCR 验证

为了研究由 RapG、PhrG 和 DegU 组成的调控系统对该菌株细胞生长和 MK-7 产生的影响, 我们首先用构成型启动子 P_{hag} 表达 *rapG*, 并将其导入 BS168 基因组, 获得菌株 BS01。具体操作为: 以枯草芽孢杆菌 168 基因组为模板, 扩增得到片段 *rapG*-L、*rapG*-R 和 P_{hag} , 以质粒 p7C6 为模板, 扩增得到氯霉素抗性片段 P7C6, 利用重叠延伸 PCR (overlap PCR) 的方法获得重组片段 *rapG*-L-P7C6- P_{hag} -*rapG*, 通过 spizizen 化学法插入枯草芽孢杆菌 168 基因组基因中, 涂布于抗性平板筛选获得重组菌株 BS01 (图 3-8), 利用同样的方法在 BS01 的基础上依次获得 BS02 (图 3-9) 与 BS03 (图 3-10)。

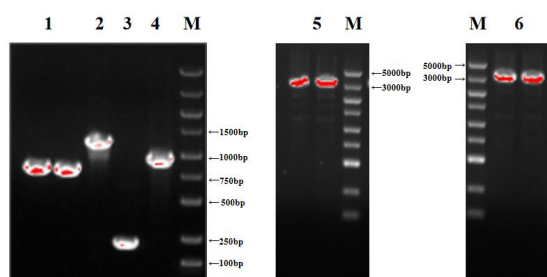


图 3-8 BS01 的 PCR 鉴定

Figure3-8 Identification of recombinant strain BS01

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *rapG* 上游同源臂; 泳道 2, 氯霉素抗性片段; 泳道

3, *P_{hag}*; 泳道 4, *rapG* 同源臂; 泳道 5, *rapG*-L-P7C6-*P_{hag}*-*rapG* 融合片段; 泳道 6, BS01

菌液 PCR 验证

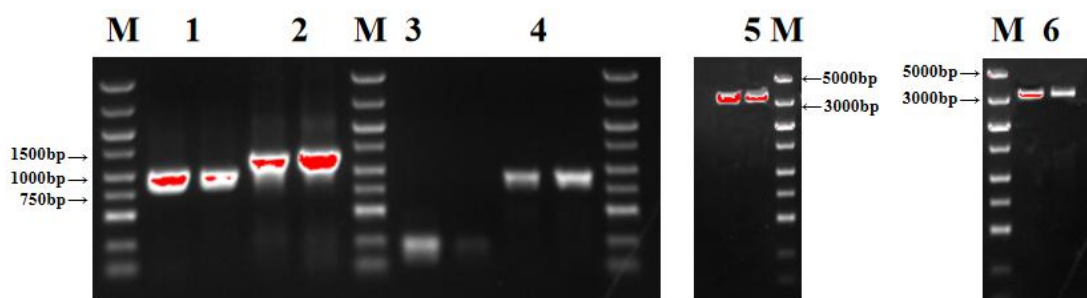


图 3-9 BS02 的 PCR 鉴定

Figure3-9 Identification of recombinant strain BS02

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *phrG* 上游同源臂; 泳道 2, 氯霉素抗性片段; 泳道 3, *P_{hag}*; 泳道 4, *phrG* 同源臂; 泳道 5, *phrG*-L-P7C6-*P_{hag}*-*phrG* 融合片段; 泳道 6, BS02

菌液 PCR 验证

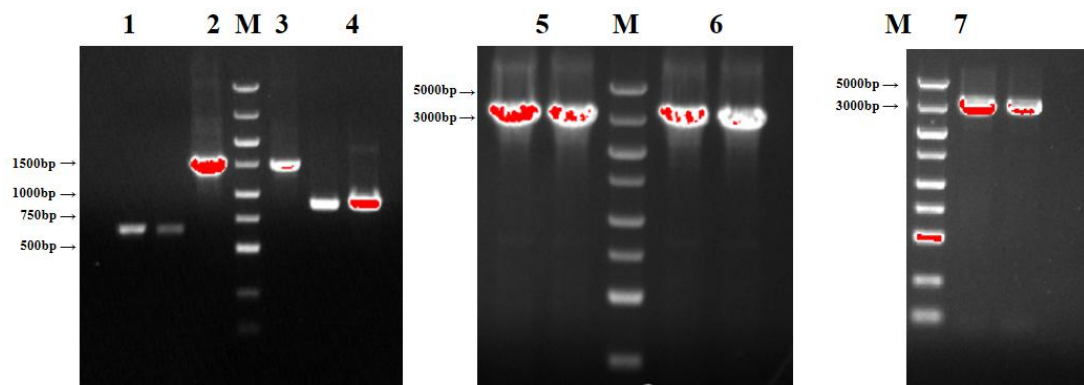


图 3-10 BS03 的 PCR 鉴定

Figure3-10 Identification of recombinant strain BS03

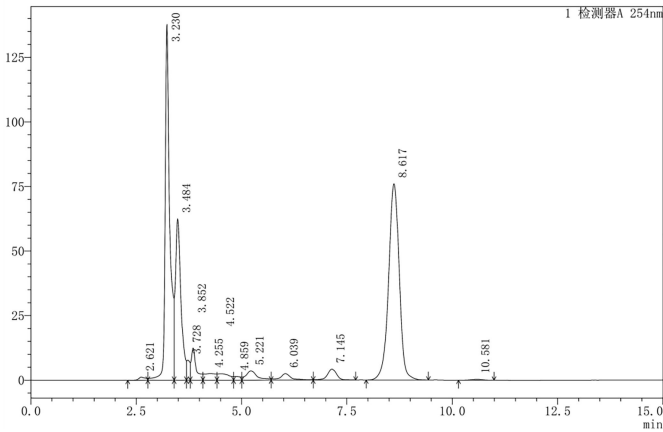
M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *degU* 上游同源臂; 泳道 2, 3, 氯霉素抗性片段; 泳道 4, *degU* 下游同源臂; 泳道 5, 6, *degU*-L-P7C6P₄₃-*degU* 融合片段; 泳道 6, BS03 菌液

PCR 验证

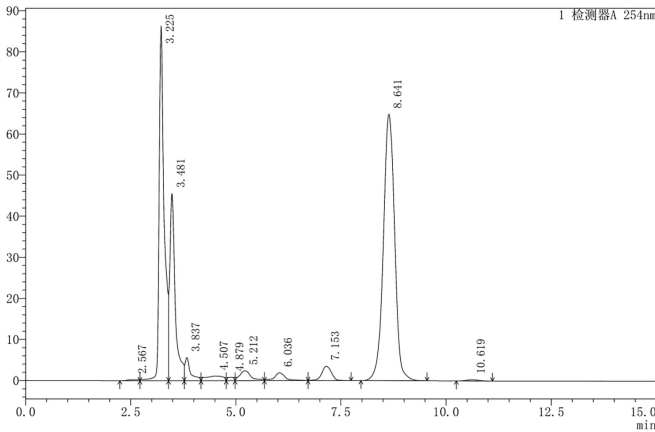
3.4.2 维生素 K₂ 标准曲线的绘制

使用高效液相色谱检测 MK-7 的产量, 我们发现, 无论是标准品还是样品, 除了流动相所固有的杂峰外, 无额外明显杂峰, 且出峰明显; 在 0~100 mg/L 浓度范围内, 维生素 K₂ 浓度与峰面积之间的线性关系, 得到标准方程为 $Y=14368x+1272.3$, 二者之间线性关系良好, 相关性系数 $R^2=0.9996$, 可以用作维生

素 K₂ 标准浓度的换算。



(a)



(b)

图 3-11 MK-7 高效液相色谱图

(a) 标准品; (b) 样品

Figure 3-11 The MK-7 HPLC chromatogram

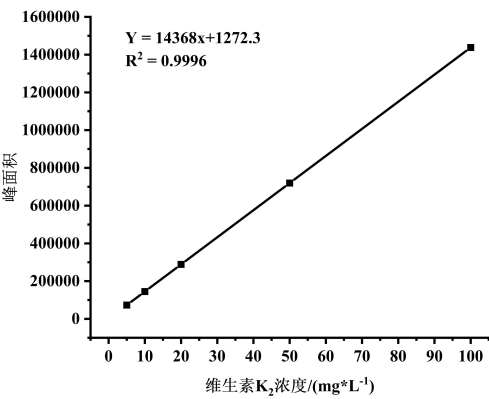


图 3-12 维生素 K₂ 标准曲线

Figure 3-12 Standard curve of vitamin K₂

3.4.3 RapG、PhrG 和 DegU 相互作用关系验证

为验证 RapG 对于 DegU 活性的抑制作用，我们将重组菌株 BC01 于不同培养条件下分别培养，观察不同 IPTG 浓度下，BC01 种子液的相对荧光强度（图 3-13），如图所示，在相同的培养时间下，随着 IPTG 浓度的增加，种子液的相对荧光强度之间降低，这表明，RapG 对于 DegU 的活性有着明显的抑制作用。

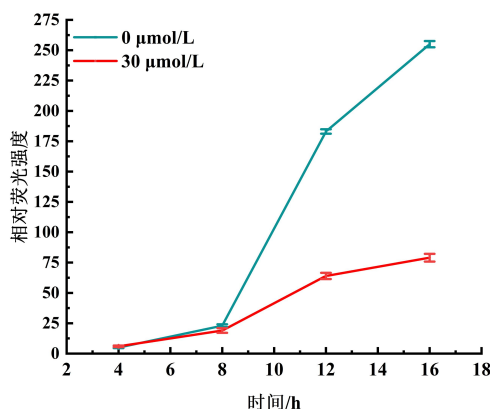


图 3-13 不同 IPTG 浓度下 BC01 相对荧光强度随时间的变化趋势

Figure 3-13 Trend of the relative fluorescence intensity of BC01 at different IPTG concentrations with time

为验证 PhrG 能否缓解 RapG 对于 DegU 活性的抑制作用，我们分别将重组菌株 BC00、BC02 和 BC03 接种到含有相同 IPTG 浓度的种子培养基中培养 16 h，观察重组菌株的相对荧光强度（图 3-14）可以发现，在 16h 的培养条件下，BC02 的荧光强度仅为 BC00 的 1/3，说明 RapG 能够明显抑制 DegU-P 的活性；分析 BC03 的荧光强度我们可以发现，BC03 的荧光强度相较于 BC02 有较大幅度的提升，但是还没有恢复 BC00 的荧光强度。这表明，PhrG 能够缓解 RapG 对 DegU 的抑制作用，但是没有办法完全恢复。

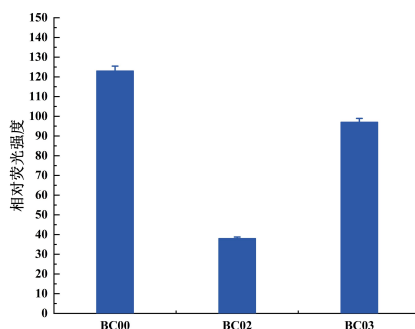


图 3-14 BC00、BC02 和 BC03 在 16 h 时的相对荧光强度比较图

Figure 3-14 The relative fluorescence intensity comparison plots of BC00, BC02 and BC03
at 16 h

3.4.4 *rapG*、*phrG*、*degU* 对于菌株生长的影响

为了构建符合要求的调控系统，我们需要了解调控系统中的关键基因可能对系统产生的影响。为此，我们分别敲除 *rapG*、*phrG* 和 *degU*，得到重组菌株 BL01（BS168- $\Delta rapG$ ）、BL02（BS168- $\Delta phrG$ ）和 BL03（BS168- $\Delta degU$ ），如图 3-15 所示，重组菌株的细胞生长都受到了一定程度的抑制：BL01 和 BL02 的最大 OD₆₀₀ 均低于原菌株，这可能是因为 PhrG 五肽的合成被阻断后，RapG 受到的抑制作用严重降低，其生物活性得到提高，对 DegU 调节活性的抑制作用也一定程度的提高。菌株 BL03 的细胞密度也在一定范围内下降，这可能是因为 *degU* 调控了多个基因的转录和表达。敲除 *degU* 后，相关基因的转录受到抑制，表达减少，细胞生长受到抑制。

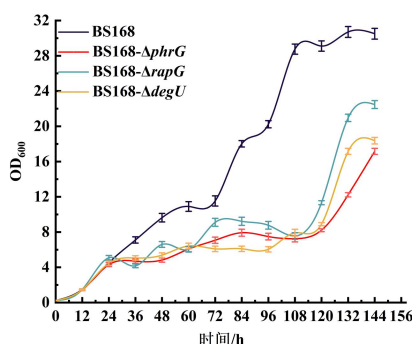


图 3-15 BL01、BL02 和 BL03 的生长趋势

Figure 3-15 Growth trends of BL01, BL02 and BL03

3.4.5 PhrG-RapG-DegU 调控系统对菌株细胞生长和 MK-7 产生的影响

前文提到，调控系统中关键基因的缺失会对细胞生长产生一定的副作用。因此，为了研究由 RapG、PhrG 和 DegU 组成的调控系统对该菌株细胞生长和 MK-7 产生的影响，我们首先用构成型启动子 P_{hag} 表达 *rapG*，并将其导入 BS168 基因组，获得菌株 BS01。通过图 3-16 和 3-17 可以看到，与原始菌株 BS168 相比，重组菌株 BS01 的细胞密度和 MK-7 产量均显著降低，且菌株 BS01 的 MK-7 产量仅为 12.92 mg/L。这也表明 RapG 对细胞生长和 MK-7 的产生均有显著的抑制

作用。在重组菌株 BS01 的基础上，利用构成型启动子 P_{hag} 表达 *phrG*，获得重组菌株 BS02。根据图 3-16，我们发现，相较于 BS01，BS02 细胞的生长抑制得到了较好的缓解，但不论是最大 OD₆₀₀ 还是 MK-7，都没有恢复到 BS168 的水平，BS02 的 MK-7 产量只有 20.52 mg/L（图 3-17），这也表明，PhrG 可以部分缓解 RapG 的副作用。以菌株 BS02 为基础，利用组成型启动子 P_{43} 表达 *degU*，获得重组菌株 BS03。通过图 3-16 我们可以发现，与原菌株相比，重组菌株 BS03 的细胞密度得到较大幅度的提升。菌株 BS03 在第 6 天 MK-7（图 3-17）的最终产量也得到较大幅度的提升，增加了 31.8%，达到 28.18 mg/L。这表明，PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统可以作为一个分子开关，控制相关基因的调控水平，以响应细胞密度的变化，进而提高目标菌株的发酵产量。

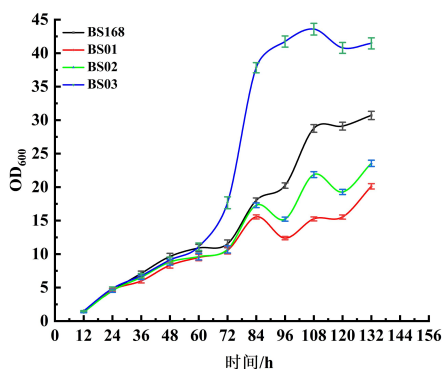


图 3-16 BS168、BS01、BS02 和 BS03 的生长趋势

Figure 3-16 Growth trends of BS168, BS01, BS02 and BS03

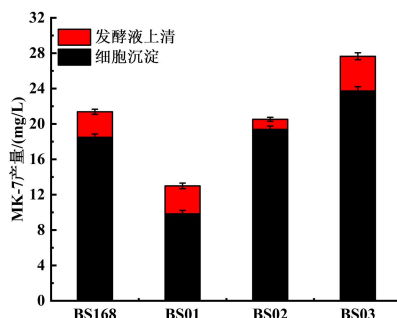


图 3-17 BS168、BS01、BS02 和 BS03 发酵第六天 MK-7 产量对比

Figure 3-17 MK-7 production of BS168, BS01, BS02 and BS03 on the 6th day

3.5 本章小结

群体感应作为微生物的细胞通讯方式,能够在不破坏细胞代谢平衡的情况下,改变细胞内的代谢流向。在枯草芽孢杆菌中,群体感应被广泛应用。在本章中,我们利用枯草芽孢杆菌的群体感应调控系统,围绕 DegU 构建了一个 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统,该系统能够感知细胞密度的变化,进而动态调控相关基因的表达,能够有效提高代谢途径中的基因表达。具体研究内容如下:

(1) 首先,通过对枯草芽孢杆菌中 RapG、PhrG 和 DegU 相互作用关系验证,相对荧光强度结果表明,RapG 能够有效抑制 DegU 的活性,这种抑制作用被 RapG 同源的细胞外信号肽 PhrG 缓解,但是 PhrG 没有办法完全恢复 RapG 对 DegU 的抑制作用。

(2) 其次,为验证 *rapG*、*phrG* 和 *degU* 对于枯草芽孢杆菌细胞生长的影响,我们分别在枯草芽孢杆菌中敲除 *rapG*、*phrG* 和 *degU*,获得重组菌株 BL01、BL02 和 BL03。观察菌株的生长曲线我们发现,相较于原始菌株,三株重组菌株的生长均受到一定程度的抑制,其中在敲除 *degU* 后,细胞生长收到的抑制最为明显,细胞密度最大 OD₆₀₀ 仅为原菌的一半,这也证明了 *degU* 基因对于枯草芽孢杆菌菌株生长的重要性。

(3) 最后,我们在枯草芽孢杆菌中成功构建 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统,用以调控下游关键基因的表达。在该系统中, DegU-P 的活性受到 PhrG-RapG 系统的调控,依赖细胞密度的变化调控代谢途径中基因的表达。因此,PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统可以作为一个响应细胞密度的分子开关,控制下游基因的表达,提高 MK-7 的产量。

第 4 章 自诱导启动子的构建与动态调控枯草芽孢杆菌中 MK-7 合成途径

4.1 前言

在前文中，我们在枯草芽孢杆菌中成功构建出一个基于 DegU 的群体感应调控系统，使得细胞能够借助密度的变化来调控相关基因的表达。DegU 作为 DNA 结合蛋白，能够与 DNA 分子的相互结合，形成 DegU-DNA 二聚体的结构，影响下游基因的转录过程，进而调控目的基因的表达。研究发现，不同磷酸化程度的 DegU 的 DNA 结合序列不尽相同^[96]，相较于 DegU 喜欢结合到反向重复序列（inverted repeat, IR）上，DegU-P 的 DNA 结合序列更多是直接重复序列（direct repeat, DR），因此，根据结合序列的不同，可以对启动子进行定向改造，提高启动子调控活性的同时，也提高 DegU-P 与启动子的结合效率。

作为基因改造的重要原件，启动子作为基因工程途径修饰的重要组成元件^[97]，在调控枯草芽孢杆菌的基因表达中发挥着重要的作用。在不同的情况下，往往需要根据转录途径的需要构建特定的启动子，以满足特定的转录途径转化的需要^[98]。在本章中，我们通过对枯草芽孢杆菌原始启动子进行突变筛选，获得能够响应 DegU-P 同时具有较高转录活性的启动子 P₅，用以调控 MK-7 合成途径中关键基因的表达。

借助 PhrG-RapG-DegU 调控系统和启动子 P₅，我们成功在枯草芽孢杆菌中优化了 MK-7 的合成途径：当细胞密度较低时，细胞中的碳代谢流会主要流向细胞生长，使得细胞密度能够快速增加；当细胞密度达到一定阈值时，下游代谢途径被激活，避免了有毒物质积累对细胞产生的毒害作用，平衡了细胞生长与产物合成之间的对立关系。本实验构建了一个由细胞密度控制的动态调控元件，将产物合成与细胞生长动态连接起来，平衡二者之间的关系，使细胞能够自主控制代谢过程，避免了代谢流的失衡。

4.2 实验材料

4.2.1 菌株与质粒

实验菌株与质粒参照 3.2.1。

4.2.2 实验药品与仪器

实验过程中用到的药品与仪器参照 3.2.2。

4.2.3 培养基与溶液

活化培养基：胰蛋白胨 10 g，酵母提取物 5 g，NaCl 10 g，加水定容到 1 000 mL，调 pH 7.0，固体培养基加入 20 g 琼脂，121℃灭菌 20 min。

IPTG 水溶液：称取 0.238 g 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）粉末，加入 10 mL 去离子水充分溶解，配置成 0.1 mmol/L 浓度的水溶液，过滤除菌。

发酵培养基：大豆蛋白胨 50 g，甘油 50 g，酵母提取物 20 g，K₂HPO₄ 3.86 g，KH₂PO₄ 1.62 g，加水定容到 1 000 mL，调 pH 7.0，121℃灭菌 20 min，使用时每升培养基加入 2 mL 过滤除菌的微量元素。

感受态溶液：参照 3.2.4。

4.3 实验方法

4.3.1 枯草芽孢杆菌的活化以及感受态的制备

参照 3.3.1。

4.3.2 重组菌株的构建

参照 3.3.3。

表 4-1 第四章所用的引物设计

Table 4-1 Primes sed in Chapter IV

引物	序列（5'→3'）
<i>degU</i> -L-F	TATCCGAGGTCAGCCGTAA
<i>degU</i> -L-R	CGCTCAAGCCACGCCTCCTT
<i>degU</i> -L-P7C6-F	GCGTGGCTTGAGCGGATAACAATTTACAC
P _{grac100} - <i>degU</i>	CGCTTACATCATTCTTTTCTACCGTTTCGTATAATGTAT
P7C6-R-P _{grac100}	GCTATACGAAG
P7C6-P _{grac100} -F	AGCATACATTATACGAACGGTAGAAAAGAATGATGT
	AAGCGTGAAA

$P_{\text{grac100-R-degU}}$	ACAATGTTTACTTTAGTCACGGATCCCACCTCCTTTA
	ATTG
	GGAGGTGGGATCCGTGACTAAAGTAAACATTGTTAT
$P_{\text{grac100-degU-F}}$	TATCGAC
degU-R-R	CACTTCACATTCCCCGCCTA
degQ-L-F	ATTGAAAGCAACAACCTGGGACA
degQ-L-R-eGFP	CTTGCTCACCATCGTTTCCACACTCCTTTTTT
degQ-L-eGFP-F	GTGTGGAAACGATGGTGAGCAAGGGC
$P_{\text{degQ-eGFP}}$	egfp-R-P7C6 CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	egfp-P7C6-F GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCT
	P7C6-R- degQ CAAGTTTCTTTTCCATGTTCAAGCGAAAACATACCA
	CC
	P7C6- degQ-F TGGTATGTTTTTCGCTTGAACATGGAAAAGAACTTG
	AAGAAGTAAAAC
degQ-R-R	AACGACTCCGAGCGATTA
comK-L-F	TTGCCAGCGACGATTCCA
comK-L-R-eGFP	CCTTGCTCACCATATTATGGCCTCCATCCTTTTTTC
comK-L-eGFP-F	ATGGAGGCCATAATATGGTGAGCAAGGGC
$P_{\text{comK-eGFP}}$	egfp-R-P7C6 CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	egfp-P7C6-F GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R- comK CGTCTGTTTTCTGACTCATGTTCAAGCGAAAACATA
	CCAC
	P7C6- comK-F GTTTTCGCTTGAACATGAGTCAGAAAACAGACGC
comK-R-R	ATCTTCGTCCGCTCTTCT
sacB-L-F	CTGATTCACCGCAATCTTGT
$P_{\text{sacB-eGFP}}$	sacB-L-R-eGFP CCCTTGCTCACCATCGTTTCATGTCTCCTTTTTTATGTA
	C
	sacB-L-eGFP-F AGACATGAACGATGGTGAGCAAGGGC
	egfp-R-P7C6 CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG

	<i>egfp</i> -P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R- <i>sacB</i>	TGCAAACCTTTTGTATGTTTCATGTTCAAGCGAAAACA TACCAC
	P7C6- <i>sacB</i> -F	GGTATGTTTTCGCTTGAACATGAACATCAAAAAGTT TGCAAAACA
	<i>sacB</i> -R	TCTGCGTAGAATCCTCTGTTT
	<i>aprE</i> -L-F	CTGCAAGGCTTGAAATAACG
	<i>aprE</i> -L-R-eGFP	CCCTTGCTCACCATTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAA AATTCAG
	<i>aprE</i> -L-eGFP-F	GGAGAGGGTAAAGAATGGTGAGCAAGGGC
P_{aprE} -eGFP	<i>egfp</i> -R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	<i>egfp</i> -P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R- <i>aprE</i>	TTTGCTTCTCACGTTCAAGCGAAAACATACCACC
	P7C6- <i>aprE</i> -F	GTTTTCGCTTGAACGTGAGAAGCAAAAAATTGTGG ATCA
	<i>aprE</i> -R	GGAGCCATCACATCAAGC
	<i>bpr</i> -L-F	ATGAACATCACTGGAGGAACA
	<i>bpr</i> -L-R-eGFP	CCTTGCTCACCATTTTCATCCCCCTTTTTCAACATG
	<i>bpr</i> -L-eGFP-F	GGGGGATGAAAATGGTGAGCAAGGGC
	<i>egfp</i> -R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
P_{bpr} -eGFP	<i>egfp</i> -P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R- <i>bpr</i>	TCGTTTTTTTCCTCATGTTCAAGCGAAAACATACCA CC
	P7C6- <i>bpr</i> -F	GGTATGTTTTCGCTTGAACATGAGGAAAAAAACGA AAAACAGAC
	<i>bpr</i> -R	AAATGTCAGCATCAGTGCC
	<i>flgB</i> -L-F	ATACTGCTTTCCTGTTGAGA
P_{flgB} -eGFP	<i>flgB</i> -L-R-eGFP	CCTTGCTCACCATATCCACTTACCTCCATTTTCAGT
	<i>flgB</i> -L-eGFP-F	GGAGGTAAGTGGATATGGTGAGCAAGGGC

	<i>egfp</i> -R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	<i>egfp</i> -P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R- <i>flgB</i>	CCAGAAAATAAGCTCAAGTTCAAGCGAAAACATAC
		CACC
	P7C6- <i>flgB</i> -F	ATGTTTTCGCTTGAAGTTGAGCTTATTTTCTGGAACG
		ATACAA
	<i>flgB</i> -R	ATTCATCGCCGTGACATT
	<i>sacX</i> -L-F	CAGCAATCCGTATCTGCG
	<i>sacX</i> -L-R-eGFP	CTTGCTCACCATGCAATTAAAACCTCCTTTGCTG
	<i>sacX</i> -L-eGFP-F	GGAGGTTTTAATTGCATGGTGAGCAAGGGC
P _{<i>sacX</i>} -eGFP	<i>egfp</i> -R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	<i>egfp</i> -P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R- <i>sacX</i>	TCTTTTGCAATCTCTTTATGCAAGTTCAAGCGAAAA
		CATACCAC
	P7C6- <i>sacX</i> -F	GGTATGTTTTCGCTTGAAGTTGCATAAAGAGATTGC
		AAAAGAATT
	<i>sacX</i> -R	GATAGGACGATGGTGGAGTAG
	<i>wapA</i> -L-F	TCTTTCTTGTATTCAACTGGGTG
	<i>wapA</i> -L-R-eGFP	CCCTTGCTCACCATTTCCTCTCTCCTTTTGTAATAAA
		AGTAATATT
	<i>wapA</i> -L-eGFP-F	AGGAGAGAGGAAATGGTGAGCAAGGGC
P _{<i>wapA</i>} -eGFP	<i>egfp</i> -R-P7C6	CCCGGGTCTTGTACAGCTCGTCCATG
	<i>egfp</i> -P7C6-F	GAGCTGTACAAGACCCGGGGATCCTCTAG
	P7C6-R- <i>wapA</i>	GCCTCTTCTTTTTTTCATGTTCAAGCGAAAACATAC
		CACC
	P7C6- <i>wapA</i> -F	ATGTTTTCGCTTGAACATGAAAAAAGAAAGAGGC
		GAAAC
	<i>wapA</i> -R	TGTCTGACCGTTCAACCTC
P _{5-hepS}	<i>hepS</i> -L-F	CGGAGAAGACCCGAATAG

<i>hepS</i> -L-R-P7C6		GTTATCCGCTCAAATATCACCTTGTCCCCAAA
<i>hepS</i> -L-P7C6-F		GGGACAAGGGTGATATTTGAGCGGATAACAATTTCA
		CACA
P7C6-R-P ₅		CGTTCTTCGGTTACGATATAAATCCACCTATCATACC
		GTTCGTATA
P7C6-P ₅ -F		ACGGTATGATAGGTGGATTTATATCGTAACCGAAGA
		ACGTT
P ₅ -R- <i>hepS</i>		CCGTAGATGTCTTGCAATCTTTACCCTCTCCTTTTAA
		AAAAATTCAG
P ₅ - <i>hepS</i> -F		GGAGAGGGTAAAGATTGCAAGACATCTACGGAACT
<i>hepS</i> -R-R		TGTAGCAAGCGTCCGAAT
<i>hepT</i> -L-F		GAACACTTCAACCTCCCG
<i>hepT</i> -L-R-P7C6		CGCTCTTTTCAGGCCCGCCT
<i>hepT</i> -L-P7C6-F		GGGCCTGAAAAGAGCGGATAACAATTTACACACAG
		CGTTCTTCGGTTACGATATAAATCCACCTATCATACC
P7C6-R-P ₅		GTTCGTATA
		ACGGTATGATAGGTGGATTTATATCGTAACCGAAGA
P ₅ - <i>hepT</i>	P7C6-P ₅ -F	ACGTT
		CGCCAGTAAACGAATGATATTTAACATTCTTTACCCT
P-R- <i>hepT</i>		CTCCTTTTAAAAAAATTCAGA
		AGGAGAGGGTAAAGAATGTAAATATCATTTCGTTTA
P- <i>hepT</i> -F		CTGGCG
		TGGGCTTTCGGTTCGTAA
<i>hepT</i> -R-R		GCGAGGACCTTCATTTGG
<i>ispH</i> -L-F		TGTTATCCGCTCTTTCGGTTGTCCTCCAATACT
<i>ispH</i> -L-R-P7C6		AGGACAACCGAAAGAGCGGATAACAATTTACACAC
		CGTTCTTCGGTTACGATATAAATCCACCTATCATACC
P ₅ - <i>ispH</i>	P7C6-R-P ₅	GTTCGTATA
	P7C6-P ₅ -F	ACGGTATGATAGGTGGATTTATATCGTAACCGAAGA

		ACGTT
	<i>P₅-R-ispH</i>	CGGTGAAATTTTAATTACGTCCATTCTTTACCCTCTC
		CTTTTAAAAAAATTCA
	<i>P₅-ispH-F</i>	AAAGGAGAGGGTAAAGAATGGACGTAATTAAAATT
		TCACCG
	<i>ispH-R-R</i>	CACTTGAGTAGCGAGGC
	<i>ispG-L-F</i>	AGCATCAATAGATGTTGCACTC
	<i>ispG-L-R-P7C6</i>	ATCCGCTCTCGCTCCTTAATTGTAGTTGCC
	<i>ispG-L-P7C6-F</i>	AGGAGCGAGAGCGGATAACAATTTACACACAG
<i>P₄₃-ispG</i>	<i>P7C6-R-ispG</i>	ATTTCACTCACTTGCAAGTGTACATTCCTCTCTTACC
		TATAATGG
	<i>P7C6-ispG-F</i>	GTAAGAGAGGAATGTACACTTGCAAGTGAGTGAAA
		TCACAC
	<i>ispG-R</i>	TAGTCAAACGCTTTTCGCTG

表 4-2 第四章所使用的菌株与质粒

Table 4-2 Strains and plasmids sed in Chapter IV

名称	特征	来源
<i>B. subtilis</i> 168		实验室储存
BN00	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$	本章
BN01	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, $C_m^r\text{-P}_{\text{degQ}}\text{-eGFP}$	本章
BN02	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, $C_m^r\text{-P}_{\text{comK}}\text{-eGFP}$	本章
BN03	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, $C_m^r\text{-P}_{\text{sacB}}\text{-eGFP}$	本章
BN04	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, $C_m^r\text{-P}_{\text{aprE}}\text{-eGFP}$	本章
BN05	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, $C_m^r\text{-P}_{\text{bpr}}\text{-eGFP}$	本章
BN06	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, $C_m^r\text{-P}_{\text{flgB}}\text{-eGFP}$	本章
BN07	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, $C_m^r\text{-P}_{\text{sacX}}\text{-eGFP}$	本章
BN08	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, $C_m^r\text{-P}_{\text{wapA}}\text{-eGFP}$	本章
BN09	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, $C_m^r\text{-P}_1\text{-eGFP}$	本章
BN10	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, $C_m^r\text{-P}_2\text{-eGFP}$	本章

BN11	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, C_m^r -P ₃ -eGFP	本章
BN12	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, C_m^r -P ₄ -eGFP	本章
BN13	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, C_m^r -P ₅ -eGFP	本章
BN14	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, C_m^r -P ₆ -eGFP	本章
BN15	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, C_m^r -P ₇ -eGFP	本章
BN16	BS168 衍生菌株, $P_{\text{grac100}}\text{-degU}$, C_m^r -P ₈ -eGFP	本章
BS01	BS168 衍生菌株, $P_{\text{hag}}\text{-rapG}$	本章
BS02	BS168 衍生菌株, $P_{\text{hag}}\text{-rapG}$, $P_{\text{hag}}\text{-phrG}$	本章
BS03	BS168 衍生菌株, $P_{\text{hag}}\text{-rapG}$, $P_{\text{hag}}\text{-phrG}$, $P_{43}\text{-degU}$	本章
BS04	BS168 衍生菌株, $P_{\text{hag}}\text{-rapG}$, $P_{\text{hag}}\text{-phrG}$, $P_{43}\text{-degU}$, $P_5\text{-hepS}$	本章
BS05	BS168 衍生菌株, $P_{\text{hag}}\text{-rapG}$, $P_{\text{hag}}\text{-phrG}$, $P_{43}\text{-degU}$, $P_5\text{-hepS}$, $P_5\text{-hepT}$	本章
BS06	BS168 衍生菌株, $P_{\text{hag}}\text{-rapG}$, $P_{\text{hag}}\text{-phrG}$, $P_{43}\text{-degU}$, $P_5\text{-hepS}$, $P_5\text{-hepT}$, C_m^r -P ₅ -ispH	本章
pHT-XCR6	Amp, Cm, 包含 P_{grac100}	实验室储存
pDG-Cre	Amp, Km, <i>E.coli-B.subtilis</i> 穿梭载体, 包含 P_{spac} 控制的 <i>cre</i>	实验室储存
p7C6	Pmd18-T 包含 lox71-zeo-lox66 片段	实验室储存
eGFP	包含增强型绿色荧光标签	实验室储存

4.3.3 氯霉素抗性的去除

参照 3.3.4。

4.3.4 启动子文库的构建

对 *degU* 上游片段 (*degU*-L)、氯霉素抗性片段 ($-C_m^r$)、IPTG 诱导型启动子 P_{grac100} 和 *degU* 基因片段进行克隆、纯化、融合, 获得 *degU*-L- C_m^r - P_{grac100} -*degU* 片段, 将其整合到 BS168 基因组上, 得到菌株 BN00。通过扩增增强型绿色荧光标签基因 (eGFP), 利用 eGFP 片段与 *B. subtilis* 168 基因组中的 8 个原始启动子 (P_{degQ} 、 P_{comK} 、 P_{sacB} 、 P_{aprE} 、 P_{bpr} 、 P_{flgB} 、 P_{sacX} 和 P_{wapA}) 构建目标片段 Px-eGFP, 将构建的目标片段 Px-eGFP 导入到 BN00 中, 分别获得菌株 BN01-BN08, 通过检测种子液的荧光强度与光密度, 以检测原始启动子的相对转录强度。

4.3.5 eGFP 强度的测定和突变体启动子的筛选

分析启动子的特性筛选出符合目标的启动子，将重组菌株 BN01-BN08 单菌落转接到 LB 培养基中，在 37 °C、220 rpm 条件下培养 16 h。通过增加 IPTG 的浓度，检测不同浓度下的荧光强度。用多功能酶标仪检测细胞的光密度和荧光强度：在激发波长为 490 nm，发射波长为 530 nm，增益为 60 的条件下，检测细胞的荧光强度。在 600 nm 波长下检测细胞的光密度。为了反映每个启动子的相对转录强度，我们使用相对荧光强度（细胞的荧光强度/细胞的光密度）来反映启动子的相对转录强度。

4.3.6 启动子的突变筛选

将上一步中筛选获得的受 DegU-P 正向调控的启动子 P_{degQ} 的-35 区和-10 区域随机突变为 σ^A 、 σ^B 和 σ^H 的一致识别序列，通过改变不同的 sigma 因子的顺序和位置，获得 8 个不同的启动子 P_1 - P_8 。将目标片段 Px-eGFP 导入 BN00 取代 P_{degQ} ，得到菌株 BN09-BN16，检测种子液的相对荧光强度。

表 4-3 σ^A 、 σ^B 和 σ^H 的一致识别序列

Table 4-3 Consensus recognition sequences of σ^A , σ^B , and σ^H

序列	
σ^A	-TTGACA (-35') -N14-TGNTATAAT (-10') -
σ^B	-AGGTTT (-35') -N17-GGGTAT (-10') -
σ^H	-AGGAATT (-35') -N14-CGAAT (-10') -

4.3.7 枯草芽孢杆菌 MK-7 合成途径中关键基因的表达调控

本研究采用无缝克隆技术实现相关基因操作^[95]。首先，对目的基因的上游序列、lox71-zeo-lox66、目标启动子 P_5 的序列和目标基因序列进行扩增、纯化和融合。以融合片段为模板，扩增得到目标片段。将目标片段整合到目标基因组上面。用 P_5 替代 *ispH* 和 *hepS/T* 的原始启动子，通过抗性平板筛选阳性菌落，测序成功后，用 Cre/loxP 系统消除阳性菌株的抗性，最终在 50 °C 下培养 12 h，消除 PDG148 质粒。

4.3.8 摇瓶发酵合成 MK-7

参照 3.3.6。

4.3.9 菌株生长曲线的测定

参照 3.3.7。

4.3.10 维生素 K₂ 的提取与检测

参照 3.3.8。

4.3.11 维生素 K₂ 标准曲线的绘制

参照 3.3.9。

4.4 结果与分析

4.4.1 构建受 DegU-P 调控的启动子文库

4.4.1.1 原始启动子的相对荧光强度分析

4.4.1.1.1 菌株的构建

为得到重组菌株 BN00，我们以质粒 pHT-XCR6 为模板，扩增得到启动子 P_{grac100}，与 *degU* 左同源臂、氯霉素抗性片段与 *degU* 片段融合得到重组片段 *degU*-L-P7C6-P_{grac100}-*degU*，琼脂糖凝胶电泳验证成功后（图 4-1），利用 *spizizen* 转化法将重组片段转化到枯草芽孢杆菌中，利用抗生素平板筛选获得阳性克隆，利用 Cre 质粒去除氯霉素抗性后获得重组菌株 BN00。

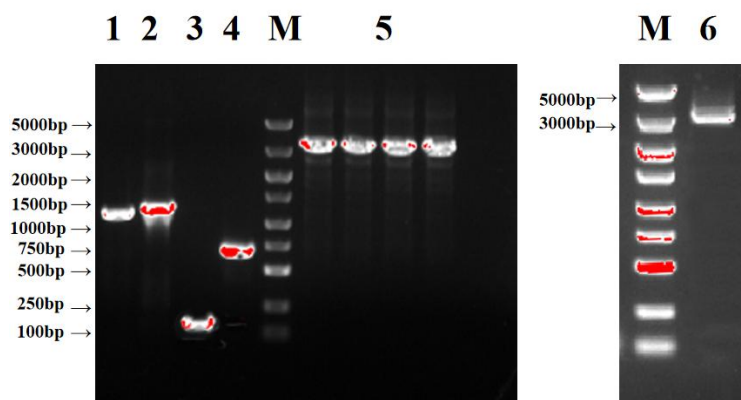


图 4-1 BN00 的 PCR 鉴定

Figure 4-1 Identification of recombinant strain BN00

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *degU* 上游同源臂; 泳道 2, 氯霉素抗性片段; 泳道 3, P_{grac100}; 泳道 4, *degU* 下游同源臂; 泳道 5, *degU*-L-P7C6-P_{grac100}-*degU* 融合片段; 泳道 6, BN00 菌液 PCR 验证

在重组菌株 BN00 的基础上，我们利用 BS168 全基因组为模板扩增得到 *degQ*-L 和 *degQ*，利用质粒 p7C6 为模板扩增得到氯霉素抗性片段，利用 eGFP 为模板扩增得到增强型绿色荧光标签，利用重叠延伸 PCR 的方法获得融合片段 *degQ*-L-eGFP-P7C6-*degQ*（图 4-2），利用琼脂糖凝胶电泳验证后转化到 BN00 中，氯霉素抗性平板筛选获得阳性克隆，通过菌液 PCR 验证成功后获得重组菌株 BN01，成功将绿色荧光标签插入启动子 P_{degQ} 后。利用相同的方法将绿色荧光标签插入启动子 P_{comK} 、 P_{sacB} 、 P_{aprE} 、 P_{bpr} 、 P_{flgB} 、 P_{sacX} 和 P_{wapA} 后面，分别获得重组菌株 BN02-BN08（图 4-3 到图 4-5）。在验证 P_{bpr} 、 P_{flgB} 、 P_{sacX} 和 P_{wapA} 后面是否成功插入绿色荧光标签，我们通过扩增 P_x -eGFP 来判断。

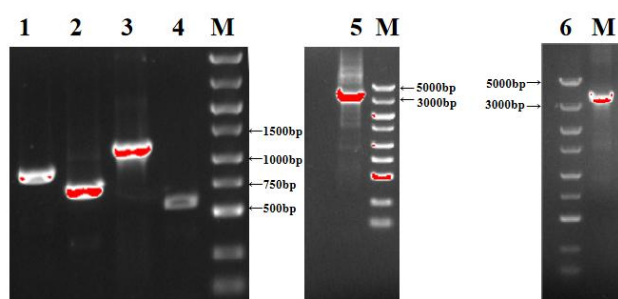


图 4-2 BN01 的 PCR 鉴定

Figure 4-2 Identification of recombinant strain BN01

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *degQ* 上游同源臂; 泳道 2, 绿色荧光标签; 泳道 3, 氯霉素抗性片段; 泳道 4, *degQ* 同源臂; 泳道 5, *degQ*-L-eGFP-P7C6-*degQ* 融合片段; 泳道 6, BN01 菌液 PCR 鉴定验证片段

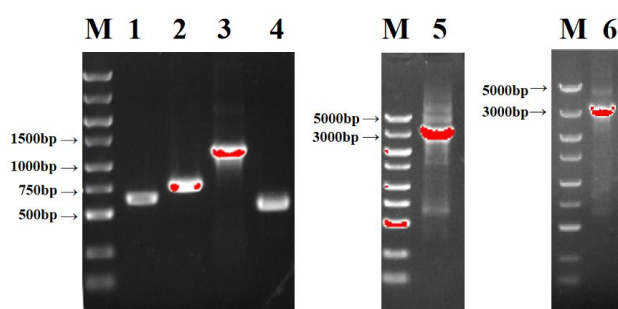


图 4-3 BN02 的 PCR 鉴定

Figure 4-3 Identification of recombinant strain BN01

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *comK* 上游同源臂; 泳道 2, 绿色荧光标签; 泳道 3, 氯霉素抗性片段; 泳道 4, *comK* 同源臂; 泳道 5, *comK*-L-eGFP-P7C6-*comK* 融合片段; 泳道 6, BN02 菌液 PCR 鉴定验证片段

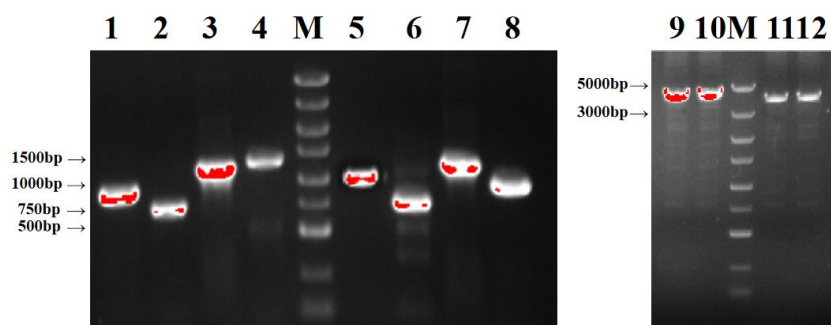


图 4-4 BN03、BN04 的 PCR 鉴定

Figure 4-4 Identification of recombinant strain BN03 and BN04

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *scaB* 上游同源臂; 泳道 2, 绿色荧光标签; 泳道 3, 氯霉素抗性片段; 泳道 4, *scaB* 同源臂; 泳道 5, *aprE* 上游同源臂; 泳道 6, 绿色荧光标签; 泳道 7, 氯霉素抗性片段; 泳道 8, *aprE* 同源臂; 泳道 9, *scaB*-L-eGFP-P7C6-*scaB* 融合片段; 泳道 10, BN03 菌液 PCR 鉴定验证片段; 泳道 11, *aprE*-L-eGFP-P7C6-*aprE* 融合片段; 泳道 12, BN04 菌液 PCR 鉴定验证片段

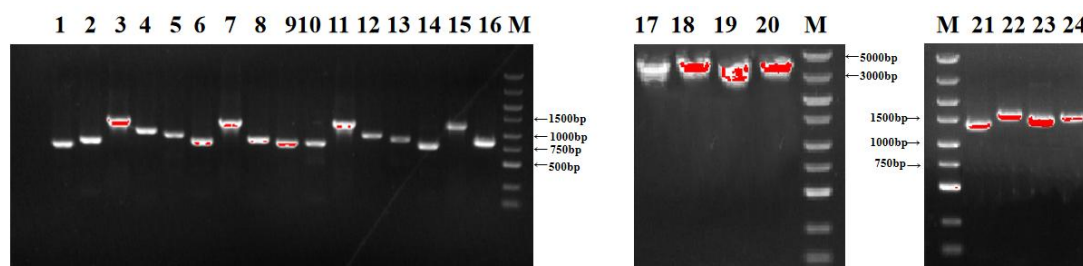


图 4-5 BN05、BN06、BN07 和 BN08 的 PCR 鉴定

Figure 4-5 Identification of recombinant strain BN05、BN06、BN07 and BN08

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *bpr* 上游同源臂; 泳道 2, 绿色荧光标签; 泳道 3, 氯霉素抗性片段; 泳道 4, *bpr* 同源臂; 泳道 5, *flgB* 上游同源臂; 泳道 6, 绿色荧光标签; 泳道 7, 氯霉素抗性片段; 泳道 8, *flgB* 同源臂; 泳道 9, *sacX* 上游同源臂; 泳道 10, 绿色荧光标签; 泳道 11, 氯霉素抗性片段; 泳道 12, *sacX* 同源臂; 泳道 13, *wapA* 上游同源臂; 泳道 14, 绿色荧光标签; 泳道 15, 氯霉素抗性片段; 泳道 16, *wapA* 同源臂; 泳道 17, *bpr*-L-eGFP-P7C6-*bpr* 融合片段; 泳道 18, *flgB*-L-eGFP-P7C6-*flgB* 融合片段; 泳道 19, *sacX*-L-eGFP-P7C6-*sacX* 融合片段; 泳道 20, *wapA*-L-eGFP-P7C6-*wapA* 融合片段; 泳道 21, BN05 菌液 PCR 验证片段 *bpr*-L-eGFP; 泳道 22, BN06 菌液 PCR 验证片段 *flgB*-L-eGFP; 泳道 23, BN07 菌液 PCR 验证片段 *sacX*-L-eGFP; 泳道 24, BN08 菌液 PCR 验证片段

wapA-L-eGFP

4.4.1.1.2 原始启动子的荧光强度比较

为比较原始启动子的转录强度差异，我们将重组菌株 BN01-BN08 接种到含有 IPTG 的 LB 液体培养基中，37 °C，220 rpm 条件下培养 16 h。通过分析种子液的相对荧光强度，我们发现，在相同的培养条件下，每个原始启动子的转录活性各不相同（4-6）。其中，*degQ* 启动子的相对转录强度最高，*comK*、*sacB*、*aprE*、*bpr*、*flgB*、*sacX* 和 *wapA* 的启动子的相对转录强度仅为 P_{degQ} 的 70%、39%、69%、27%、30%、21%和 37%，因此，我们选择 P_{degQ} 作为后续研究的目标启动子。

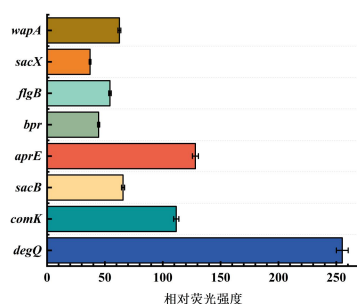


图 4-6 原始启动子的相对荧光强度比较

Figure 4-6 Comparison of relative fluorescence intensity of the original promoters

4.4.1.2 启动子的突变分析

4.4.1.2.1 重组启动子的构建

为构建出符合要求的启动子，我们对原始启动子 P_{degQ} 的-35 区和-10 区进行改造。为实现短片段的合成，我们采用搭桥法合成（图 4-7）。我们将 P_{degQ} 分为两部分，前半部分不变，命名为 P_Q ，后半部分通过搭桥法合成后与 P_Q 融合，获得新的启动子。

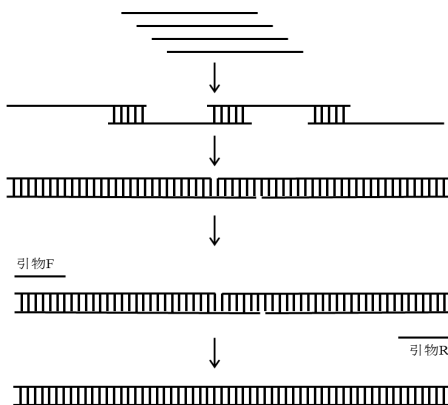


图 4-7 片段基因的合成

Figure 4-7 Synthesis of the fragmented genes

启动子 P_1 和 P_2 的构造过程如图 4-8 所示，将融合成功获得的启动子 P_1 和 P_2 与 P_Q 的琼脂糖凝胶电泳比较发现， P_1 和 P_2 的长度长于 P_Q ，测序比对后，启动子构造成功。采用相同的方法获得重组启动子 P_3 - P_8 （图 4-9）。

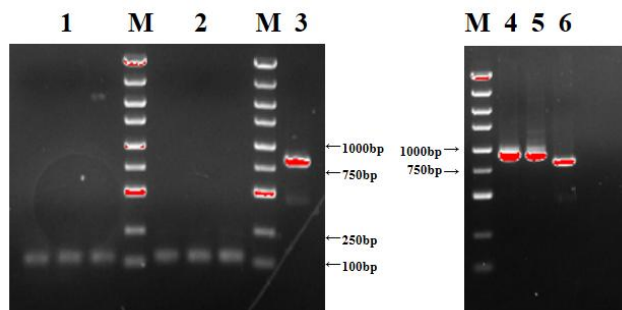


图 4-8 P_1 和 P_2 构造过程 PCR 鉴定

Figure 4-8 Identification of P_1 and P_2 structural processes

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, 启动子 P_1 突变区域; 泳道 2, 启动子 P_2 突变区域; 泳道 3, P_Q 片段; 泳道 4, 启动子 P_1 ; 泳道 5, 启动子 P_2 ; 泳道 6, P_Q 片段

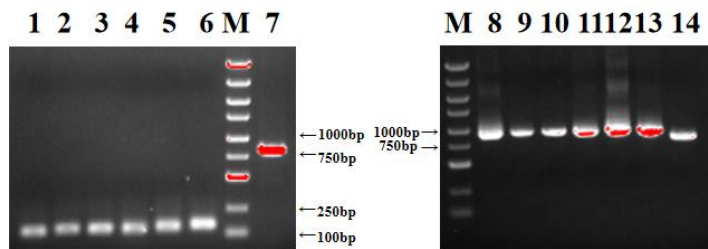


图 4-9 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 、 P_8 构造过程 PCR 鉴定

Figure 4-9 Identification of P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7 and P_8 structural processes

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, 启动子 P_3 突变区域; 泳道 2, 启动子 P_4 突变区域; 泳道 3, 启动子 P_5 突变区域; 泳道 4, 启动子 P_6 突变区域; 泳道 5, 启动子 P_7 突变区域; 泳道 6, 启动子 P_8 突变区域; 泳道 7, P_Q 片段; 泳道 8, 启动子 P_3 ; 泳道 9, 启动子 P_4 ; 泳道 10, 启动子 P_5 ; 泳道 11, 启动子 P_6 ; 泳道 12, 启动子 P_7 ; 泳道 13, 启动子 P_8 ; 泳道 14, P_Q 片段

4.4.1.2.2 重组启动子转录强度分析

通过对 BS168 中原始启动子的筛选，我们获得了受 DegU-P 调控效果最显著的启动子 P_{degQ} 。为了构建出更符合要求的启动子，以满足修饰特定转录通路的需要，首先将目标启动子 P_{degQ} 的-35 区和-10 区域突变为 σ^A 、 σ^B 和 σ^H 结合位点。其次，将这些启动子的特定区域变更为 DR，以提高 DegU-P 的结合活性，从而

获得合适的启动子。我们将启动子 P_{degQ} 的-35 区和-10 区域突变为 σ^A 、 σ^B 和 σ^H ，获得启动子 P_1 、 P_2 和 P_3 (P_1 包含 σ^A 的结合基序， P_2 包含 σ^B 的结合基序， P_3 包含 σ^H 的结合基序) (图 4-10)。通过相对转录水平分析 (图 4-11)，可以发现，三种强度关系为 $P_2 > P_1 > P_3$ 。启动子通过与 RNA 聚合酶结合发挥调节作用^[75]，一般来说，较多的 sigma 因子可能更好地帮助启动子被 RNA 聚合酶识别，具有更高的转录活性；同时，含有多个 sigma 因子的启动子也可能对恶劣环境具有较强的抗性。为了构建出符合要求的启动子，在 P_{degQ} 的基础上，构建了启动子 P_4 - P_8 ，其中 P_4 包含 σ^H 和 σ^A 的结合基序， P_5 包含 σ^H 和 σ^B 的结合基序， P_6 包含 σ^B 和 σ^A 的结合基序， P_7 包含 σ^H 、 σ^A 和 σ^B 的结合基序， P_8 包含 σ^H 、 σ^B 和 σ^A 的结合基序 (其中 P_7 与 P_8 中的 σ^A 和 σ^B 位置相反)。图 4-11 的相对转录水平分析显示， P_5 的活性明显高于其他启动子，而 P_6 的活性最低。通过对原启动子 P_{degQ} 进行修饰改造，我们获得了一个转录强度为原启动子 2.2 倍的重组启动子 P_5 ，并选择其作为后续实验的关键自诱导启动子。重组启动子核心的核苷酸序列见表 4-4。

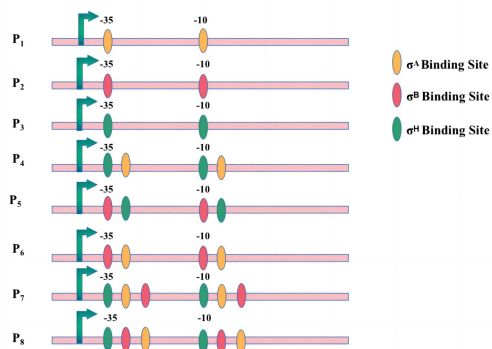


图 4-10 重组启动子的结构示意图

Figure 4-10 Schematic diagram of the reorganized promoter structure

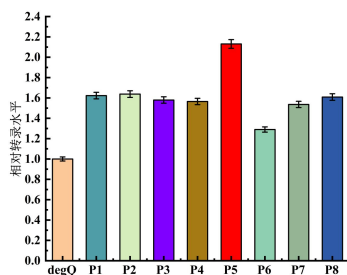


图 4-11 重组启动子的的转录强度对比

Figure 4-11 The transcription intensity of the recombinant promoter relative to the original promoter P_{degQ}

一般来说, 较多的 σ 因子可能更好地帮助启动子被 RNA 聚合酶识别, 具有更高的转录活性; 同时, 含有多个 σ 因子的启动子也可能对恶劣环境具有较强的抗性。然而, 通过分析所有启动子的相对荧光强度, 我们发现较多的 σ 因子结合位点可能并不总是能提高启动子的转录强度, 这可能有以下原因:

(1) 较多的西格玛因子结合位点增加了重组启动子的转录负担, 导致其转录强度降低; (2) 当启动子结构变长时, 容易发生缠绕, 降低转录活性; (3) 当启动子包含多个 σ 结合位点时, 下游 σ 因子的结合可能导致上游 σ 因子结合过程暂停, 从而导致转录活性降低^[99]。

表 4-4 重组启动子核心的核苷酸序列

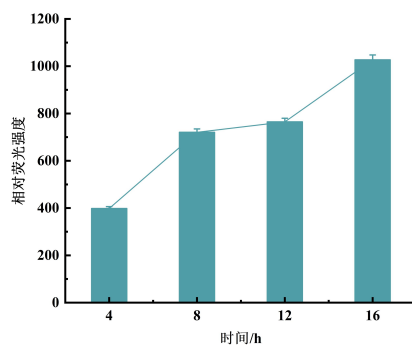
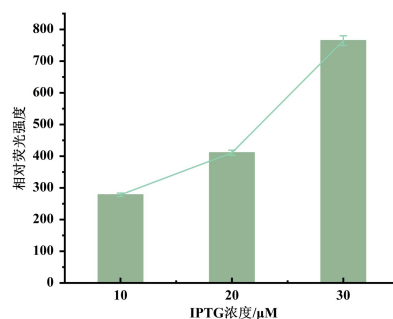
Table 4-4 The nucleotide sequences of the recombinant promoter core

启动子	核心序列 (5'→3')
P _A	-TTGACATTTTATTGCATTTATGTTATAAT-
P _B	-AGGTTTATTTAGGCTTGATTTTAGGGTAT-
P _H	-AGGAATTTTATGTCTATTTACGAAT-
P _{BH}	-AGGTTTCTATTTAGGAATTTTAGGGTATTTTACGAAT-
P _{HA}	-AGGAATTTTGACATCTATTTACGAATTTGATATAAT-
P _{BA}	-AGGTTTGTGACATGATCTATTTAGGGTATTATAAT-
P _{HAB}	-AGGAATTTGACAAAGGTTTACGAATTTTATAATAAGGGTAT-
P _{HBA}	AGGAATTTATTTAGGTTTAAATCGAATTGACATTTGGGTATTCTATTTATATAAT-

注: σ^A 、 σ^B 和 σ^H 识别的一致序列用绿色、红色和橙色表示

4.4.1.3 重组启动子 P₅ 的功能验证

为了验证不同浓度的 DegU-P 作用下, 目标启动子 P₅ 的作用强度差异, 我们观察了相对荧光强度的差异, 并分析了相对荧光强度随时间的变化。用 IPTG 诱导的启动子 P_{grac100} 调控 *degU* 的表达后, 通过加入不同浓度的 IPTG 来反映 *degU* 的表达强度。如图 4-12 所示, 在 0-16 h 范围内, 随着时间的增加, 启动子 P₅ 的相对荧光强度逐渐增加, 说明 DegU-P 可以有效调控靶启动子的转录。同时, 随着 IPTG 浓度的增加, 种子液的相对荧光强度也逐渐增加 (图 4-13), 表明随着 DegU-P 浓度的增加, 对目标启动子转录活性的调控作用也逐渐增加。

图 4-12 启动子 P₅ 的相对荧光强度随时间的变化趋势Figure 4-12 Trend of the relative fluorescence intensity of the promoter P₅ over time图 4-13 启动子 P₅ 的相对荧光强度随 IPTG 浓度的变化趋势Figure 4-13 Trend of the relative fluorescence intensity of promoter P₅ with IPTG concentration

4.4.2 枯草芽孢杆菌中 MK-7 发酵过程分析

枯草芽孢杆菌 168 作为典型的革兰氏阳性菌株，具有发酵周期短、分泌能力强、发酵产物单一等优点，是 MK-7 发酵的优势菌株。通过观察图 4-14 的发酵曲线，我们发现随着发酵时间的增加，MK-7 的增加具有一定的规律性：在细胞生长的早期阶段，细胞生长缓慢，MK-7 的含量也缓慢增加。之后，随着发酵时间的增加，发酵液中 MK-7 的含量也稳步提升。在发酵后期，MK-7 的含量逐渐趋于稳定。

细胞生长的稳定是细胞一切活动的基础，也是能够高效发酵生产的基础，当细胞的生长代谢发生失衡时，细胞生长受到抑制，代谢途径正常运行受到影响，使得产物合成受到影响。通过观察原始菌株的发酵曲线，我们可以发现，随着发酵时间的增加，发酵液中的 MK-7 的产量与细胞密度都在逐步增加，其中从第三天到第四天的增加幅度最大，在第六天达到最大。当细胞密度达到 30 左右时，细胞密度逐渐趋于稳定，不再增加，同时发酵菌株的 MK-7 的产量也达到峰值，达到 21 mg/L（图 4-14）。

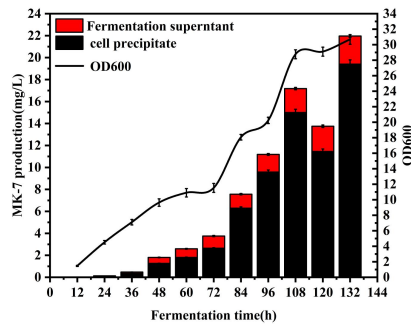


图 4-14 枯草芽孢杆菌 168 的发酵曲线与 MK-7 的生物合成途径

Figure 4-14 Fermentation curves of *Bacillus subtilis* 168 and biosynthetic pathway of MK-7

4.4.3 枯草芽孢杆菌中 MK-7 合成途径的动态调控

4.4.3.1 重组菌株的构建

利用同源重组的方法，构建重组菌株 BS04。构建过程如图 4-15 所示，使得基因 *hepS* 的表达受到重组启动子 P_5 的调控。利用 *cre/loxP* 去除氯霉素抗性后，利用同样的方法依次获得重组菌株 BS05（图 4-16）和 BS06（图 4-17）。

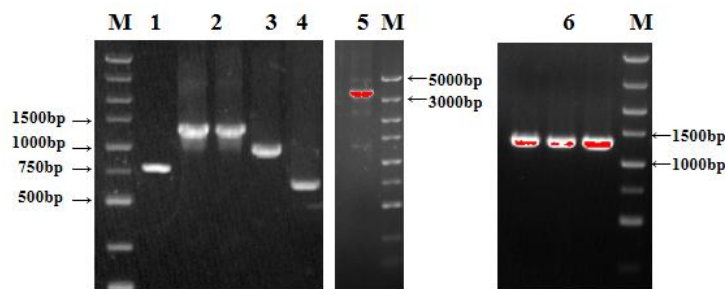


图 4-15 BS04 的 PCR 鉴定

Figure 4-15 Identification of recombinant strain BS04

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *hepS* 上游同源臂; 泳道 2, 氯霉素抗性片段; 泳道 3, 启动子 P_5 ; 泳道 4, *hepS* 同源臂; 泳道 5, *hepS*-L-P7C6- P_5 -*hepS* 融合片段; 泳道 6, BS04 菌液 PCR 鉴定;

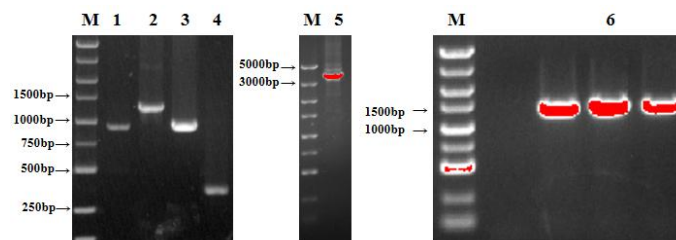


图 4-16 BS05 的 PCR 鉴定

Figure 4-16 Identification of recombinant strain BS05

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *hepT* 上游同源臂; 泳道 2, 氯霉素抗性片段; 泳道 3, 启动子 P_5 ; 泳道 4, *hepT* 同源臂; 泳道 5, *hepT*-L-P7C6- P_5 -*hepT* 融合片段; 泳道 6, BS05

菌液 PCR 鉴定

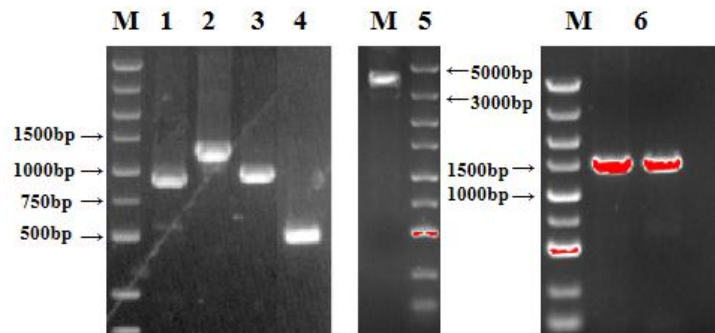


图 4-17 BS06 的 PCR 鉴定

Figure 4-17 Identification of recombinant strain BS06

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *ispH* 上游同源臂; 泳道 2, 氯霉素抗性片段; 泳道 3, 启动子 P_5 ; 泳道 4, *ispH* 同源臂; 泳道 5, *ispH*-L-P7C6- P_5 -*ispH* 融合片段; 泳道 6, BS06

菌液 PCR 鉴定

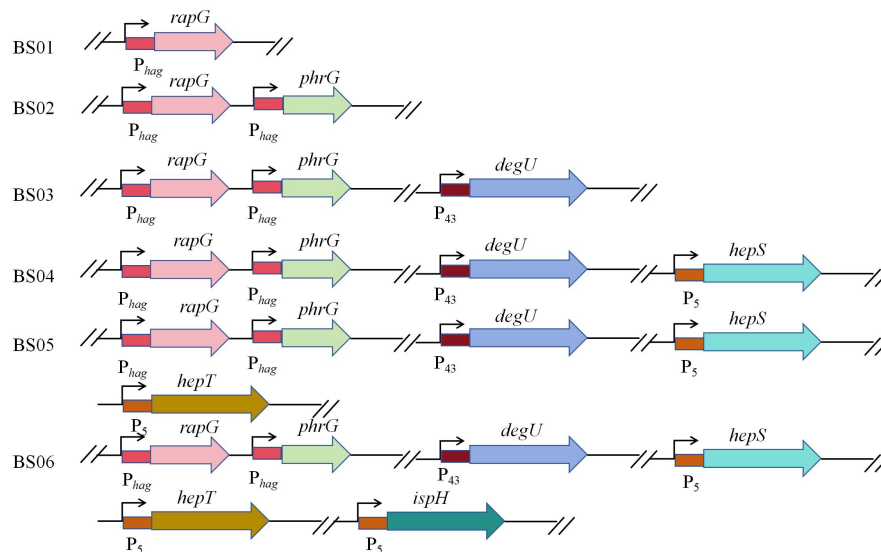


图 4-18 重组菌株的基因型

Figure 4-18 Genotypes of the recombinant strains

4.4.3.2 *ispG* 对于菌株生长的影响

MK-7 由母链萘醌环和异戊二烯侧链组成。如图 4-19 所示, 在枯草芽孢杆菌中, 异戊二烯侧链主要通过 MEP 途径合成, 4-羟基-3-甲基丁烯-2-二磷酸合成酶

(IspG) 是 MEP 途径中的关键酶, 催化甲基赤藓三醇环二磷酸 (MEcPP) 合成 1-羟基-2-甲基-2-丁烯基-4-二磷酸 (HMBPP), *ispG* 的缺失将导致异戊二烯生物合成完全丧失、多个基因功能受损和电子转移受阻^[100], 使得异戊二烯侧链的合成无法顺利进行, 从而影响了 MK-7 的合成。我们通过过表达 *ispG* 来检测其对细胞生长的影响, 获得菌株 BS168-*ispG*::P₄₃ (图 4-20)。通过图 4-21 我们可以发现, 相较于原始菌株, BS168-*ispG*::P₄₃ 的细胞生长受到严重抑制, 这进一步证实了 *ispG* 表达量的增加会对细胞有严重的毒性作用, 导致细菌生长失衡, 严重抑制细胞生长。因此, 我们希望通过群体感应来平衡细胞生长和产物生成之间的关系, 使细胞生长不受影响, 同时可以更好地提高细菌的生产。

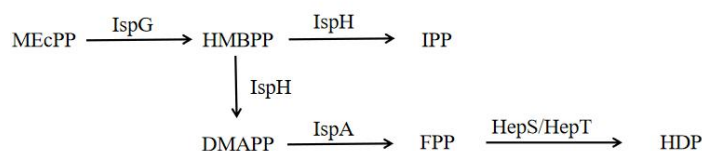
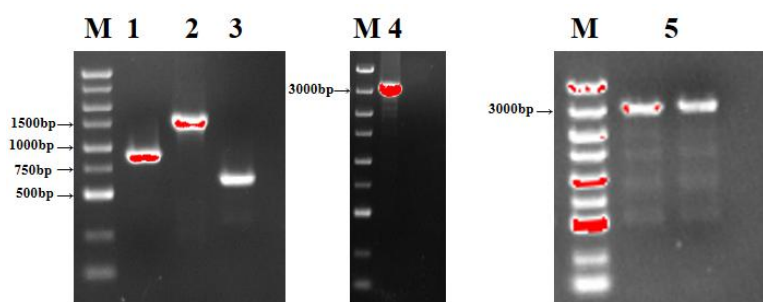


图 4-19 MEP 途径

Figure 4-19 MEP Pathway

图 4-20 BS168-*ispG*::P₄₃ 的 PCR 鉴定Figure 4-20 Identification of recombinant strain BS168-*ispG*::P₄₃

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1, *ispG* 上游同源臂; 泳道 2, P7C6; 泳道 3, *ispG*;
泳道 4, *ispG*-L-P7C6P43-*ispG* 融合片段; 泳道 5, BS168-*ispG*::P₄₃ 菌液 PCR 验证

在我们之前的工作中, 我们发现菌株 BS168- Δ *ispG* 无法通过正常的无缝操作技术来实现, 而敲除 *ispG* 的重组菌株也无法正常生长。这可能是因为 IspG 不仅在细菌细胞壁的形成中起着重要的作用^[101], 而且还因为它的正常表达是许多关键基因正常表达的关键。而 *ispG* 的缺失会对细菌的电子传递链造成损伤, 影响氧化呼吸, 这也可能是 *ispG* 被敲除后细菌不能正常存活的原因之一。

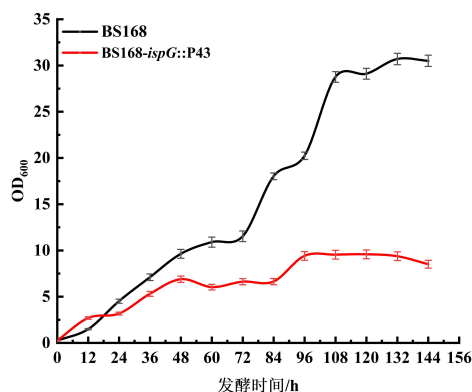


图 4-21 BS168 和 BS168-*ispG*::P₄₃ 发酵过程中的细胞生长曲线

Figure 4-21 Cell growth curve during the fermentation of BS168 and BS168-*ispG*::P₄₃

4.4.3.3 重组启动子 P₅ 用以调控枯草芽孢杆菌 MK-7 合成途径中关键基因的表达

MK-7 由萘醌环和异戊二烯侧链组成，其中萘醌环通过 MK 途径合成，异戊二烯侧链通过类异戊二烯磷酸生物合成途径和 MEP 途径合成。其中，MEP 途径是能够产生 IPP 的生物合成途径^[102]，IPP 对于 MK-7 的合成至关重要。然而，MEP 途径产生两种有毒的中间代谢产物二甲基烯丙基二磷酸（DMAPP）和 1-羟基-2-甲基-2-丁烯基-4-二磷酸（HMBPP），对细胞生长有毒副作用，会严重影响细胞，但这两种物质对异戊二烯侧链的合成是必不可少的。前文的实验已经证明，*ispG* 的过表达提高 HMBPP 的生物合成，减少了细菌的数量，抑制细胞生长，表明静态调控无法解决有毒中间体对细胞生长的毒副作用，也无法解决细胞生长和产物合成之间的矛盾。因此，我们构建了一个由细胞密度控制的动态调控元件，来调节相关代谢物的生物合成，控制代谢流程，缓解细胞生长和产物合成之间的矛盾。

在 MEP 途径中，中间代谢产物 HMBPP 可以在 *IspH* 的作用下合成 DMAPP 和 IPP，而 IPP 的供应是 MK-7 高效合成的关键因素。*ispG* 的表达很容易引起 HMBPP 的积累，造成细胞代谢失衡，损害细胞生产，*ispH* 的表达可以缓解 *IspG* 引起的副作用，过表达 *ispH* 可以消除 *IspG* 对细胞的毒性风险^[29]，减轻 HMBPP 的积累造成的负面影响。异戊二烯侧链 HDP 合成的最后一步是在 *HepS/T* 编码的庚烯基二磷酸合酶的作用下催化 FPP 合成。

因此，我们在重组菌株 BS03 的基础上，利用重组启动子 P₅ 表达 *ispH* 和 *hepS/T*,

获得重组菌株 BS06, 使得相关基因的表达受到细胞密度的调控。如图 4-22 所示, 重组菌株 BS06 在 250 mL 的锥形烧瓶中的最大产率为 102.47 mg/L, 远高于原菌株。同时, 单株菌株的产率达到 3.573 (图 4-23), 比原菌株高出 520 %。值得注意的是, BS06 的最大细胞密度与原菌株基本上是相同的, 两个菌株的生长趋势也非常相似 (图 4-24), 表明我们的改造没有对细菌的生长产生负担, 同时也证明了利用 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统调控枯草芽孢杆菌相关基因的表达, 实现菌株高产的可行性。

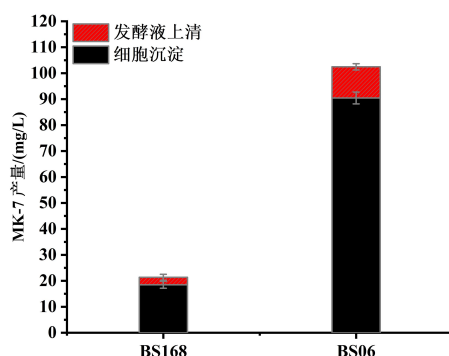


图 4-22 BS168 和 BS06 MK-7 产量对比

Figure 4-22 Production of BS168 and BS06 after 6 days of fermentation

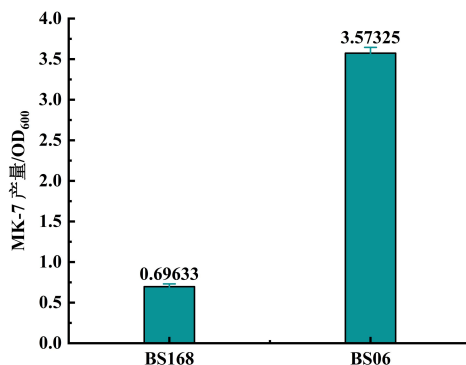


图 4-23 BS168 和 BS06 细胞得率对比

Figure 4-23 Yield (MK-7 prouuction/OD₆₀₀) of BS168 and BS06 after 6 days of fermentation

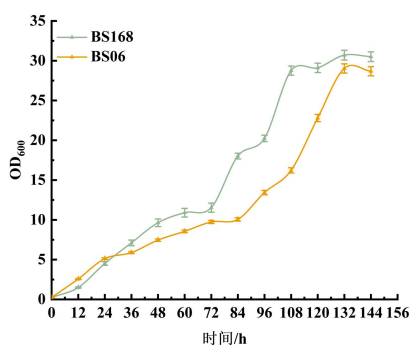


图 4-24 BS168 和 BS06 生长曲线

Figure 4-24 Growth trends of BS168 and BS06 after 6 days of fermentation

4.5 本章小结

前文中，通过对群体感应中感应元件（PhrG-RapG）和响应模块（DegU-P）的功能验证和相互作用关系验证，我们成功在枯草芽孢杆菌中设计了一个能够感知细胞密度的动态调节器 PhrG-RapG-DegU，使细菌能够感知细胞密度的变化并调节相关基因的表达。在本章中，我们对枯草芽孢杆菌原始启动子进行突变筛选，获得能够响应 DegU-P 且具有较高转录活性的启动子 P₅，用以调节 *ispH* 和 *hepS/T* 的表达，减少有毒中间代谢物对于细胞生长产生的毒害作用，最终获得一株高产 MK-7 的重组菌株。具体研究内容如下：

(1) 首先，我们利用 IPTG 诱导的启动子 P_{grac100} 调控 *degU* 的表达，并将其导入 BS168 中，获得菌株 BN00，通过外源添加的 IPTG 来反映 DegU-P 浓度的差异。

(2) 其次，在 BN00 的基础上，将绿色荧光标签插入原始启动子 P_{degQ}、P_{comK}、P_{sacB}、P_{aprE}、P_{bpr}、P_{flgB}、P_{sacX} 和 P_{wapA} 后，通过观察种子液的相对荧光强度，筛选获得相对转录强度最高的原始启动子 P_{degQ}。

(3) 接下来，对启动子 P_{degQ} 的结合位点序列进行随机突变，获得 8 个具有不同转录强度的重组启动子 P₁-P₈，其中启动子 P₅ 的强度是启动子 P_{degQ} 的 2.2 倍，用于后续的基因表达。

(4) 最后，利用重组启动子 P₅ 用以调控枯草芽孢杆菌 MK-7 合成途径中关键基因 *ispH* 和 *hepS/T* 的表达，最终成功构建出一株 MK-7 高产菌株，在 250 mL 锥形瓶中的 MK-7 含量达到 102.47 mg/L，是原菌的 4.9 倍。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

(1) 通过分析 DegU 的生物信息学, 我们初步推测, DegU 蛋白不存在信号肽, 属于亲水性非膜蛋白。DegU 蛋白是由信号接收器和 LuxR 家族螺旋-转角-螺旋结构域组成的响应调节因子。在其信号接受区域的 56 aa 位置既是金属离子结合位点, 也是磷酸化位点, 同时还是激活位点, 因此我们推断该位置是 DegU 蛋白功能的关键调控位点; DegU 蛋白的 HTH-LUXR 结构域是 DegU 蛋白与 DNA 结合的位点, DNA 分子结合在该结构的 C 端, 发挥调控作用。在枯草芽孢杆菌中, *degU* 还与多个组氨酸激酶编码基因 *comP*、*yxjM*、*liaS*、*ydfH*、*yhcY* 和 *yvfT* 之间都存在相互作用关系, 同时 *degU* 还受到组氨酸激酶 *rapH* 和 *rapG* 的调控, 这表明 *degU* 在枯草芽孢杆菌的代谢途径中发挥着重要的作用。

(2) 通过对 PhrG、RapG 和 DegU 相互作用关系关系的验证, 推断出 RapG 能够抑制 DegU-P 的活性, 而 PhrG 能够部分缓解这种抑制作用。因此, 在枯草芽孢杆菌中构造了一个 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统, 该系统能够有效提高枯草芽孢杆菌中 MK-7 的产量和细胞生长趋势, 这表明, PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统可以作为一个分子开关, 通过细胞密度的变化, 调控下游基因的表达, 进而提高目标菌株的发酵产量。

(3) 筛选枯草芽孢杆菌中受到 DegU-P 调控的启动子, 比较 8 个原始启动子的活性: P_{degQ} 、 P_{comK} 、 P_{sacB} 、 P_{aprE} 、 P_{bpr} 、 P_{flgB} 、 P_{sacX} 和 P_{wapA} , 获得活性最高的原始启动子 P_{degQ} , 其中, *comK*、*sacB*、*aprE*、*bpr*、*flgB*、*sacX* 和 *wapA* 的启动子的相对转录强度仅为 P_{degQ} 的 70%、39%、69%、27%、30%、21% 和 37%。对启动子 P_{degQ} 的核心区域进行突变改造, 将其改造为 sigma A、sigma B 和 sigma H 结合位点, 增强启动子转录活性的同时, 将重组启动子的-35 区和-10 区之间的间隔序列突变为 DR, 以提高 DegU-P 对于重组启动子的调控活性, 最终获得强度为原始启动子 2.2 倍的重组启动子 P_5 。通过研究重组启动子 P_5 的活性发现, 其活性随着时间和 DegU-P 浓度的增加而逐渐增强。

(4) 将重组启动子 P_5 运用于 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统中, 以

调控下游基因 *ispH* 和 *hepS/T* 的表达,加速 HDP 的合成,消除中间代谢物 HMBPP 和 DMAPP 对于菌株生长产生的毒副作用。获得的目标菌株 BS06 在发酵第六天的 MK-7 产量达到 102.47 mg/L, 远超原始菌株, 单个菌株的细胞得率为原菌的 5.2 倍, 这说明我们在枯草芽孢杆菌中构建的 PhrG-RapG-DegU 群体感应调控系统能够有效提高 MK-7 的产量。同时, 比较原始菌株 BS168 与重组菌株 BS06 的生长曲线我们可以发现, 二者的生长曲线极为相似, 重组菌株的最大细胞密度也与原菌基本相同, 这说明我们对于菌株的改造并没有对细菌的生长产生负担。

(5) 在本文中, 通过重构枯草芽孢杆菌中的群体感应代谢途径, 我们使用一个受到细胞密度调控的启动子 P_5 调控 MK-7 合成途径中有毒中间代谢物转化和异戊二烯侧链合成的基因, 避免在细胞生长过程中 HMBPP 和 DMAPP 对于细胞生长产生的毒害作用。具体过程如下: 在生长初期, 细胞数量较少, 细胞中天冬氨酸磷酸酶 RapG 发挥调控作用, 抑制 DegU-P 的活性, 启动子 P_5 的活性较低, 细胞中的碳代谢流向细胞生长途径, 使得细胞数量在短时间内快速增加; 同时有毒物质的合成受到的抑制, 避免了其对于细胞生长产生的毒害作用。当细胞密度达到一定程度时, 细胞外的 PhrG 五肽通过细胞膜上的 Opp 进入细胞内, 特异性的抑制 RapG 的活性, 回复 DegU-P 的调控活性, 提高启动子 P_5 的调控活性, 促进 MK-7 的合成。

5.2 展望

(1) 本研究利用 PhrG-RapG 系统与 DegS/U 的相互作用, 构建了一个能够响应细胞密度变化的调控系统。然而, 在 BS168 中存在多个对 MK-7 合成有副作用的分支途径, 这些途径的存在可能会减少碳代谢流向 MK-7 合成途径; 同时特定基因的表达将与 MK-7 合成途径中的关键酶竞争底物, 造成 MK-7 的合成受到抑制, 但其表达的缺失会对细胞生长造成损害。在这种情况下, 我们可以构建一个负调控启动子响应细胞密度, 以调节分支途径的表达, 在细菌生长的后期减少分支代谢物的合成, 增加 MK-7 合成途径中碳代谢的流入, 减少流出, 以促进 MK-7 的合成。因此, 在接下来的研究中, 我们将重点关注在 BS168 中自抑制系统的构建及其对细胞生长和 MK-7 合成的影响, 以及这两种系统的结合应用。

(2) DegU 蛋白的 56 aa 区域既是金属离子结合位点, 也是磷酸化位点, 同时也是激活位点。在本实验中, 对于该位置的研究较少, 后续的实验中可以

围绕该位点展开。

(3) 本实验中,通过对启动子的调控区进行突变改造,获得启动子突变文库。但是启动子的突变改造的样本太少,具有一定的偶然性,因此,可以在后续的实验中提高启动子文库中突变启动子的数量,以获得调控效果更好的重组启动子。

(4) 在获得重组菌株 BS06 后,并没有做后续的发醇条件的优化与发醇罐放大培养,没有办法彻底了解重组菌株 BS06 的发醇潜能,因此,后续的实验中可以通过对发醇培养基的优化,如碳源和氮源的优化、金属离子、发醇初始 pH 值、发醇温度等条件精选优化,筛选获得最佳的发醇条件,也应进行发醇罐放大培养,分析对 MK-7 产量的影响。

参考文献

- [1] Dam H. The antihemorrhagic vitamin of the chick [J]. The Biochemical journal, 1935, 29 (6) : 1273–1285.
- [2] Cirilli I, Orlando P, Silvestri S, etc. Carboxylative efficacy of trans and cis MK-7 and comparison with other vitamin K isomers [J]. Biofactors, 2022, 48 (5) : 1129-1136.
- [3] Sitkowski J, Bocian W, A. Szterk. The application of multidimensional NMR analysis to cis/trans isomers study of menaquinone-7 (vitamin K₂, MK-7) , identification of the (E, Z, E2, ω) -menaquinone-7 isomer in dietary supplements [J]. Journal of Molecular Structure, 2018, 1171: 449-457.
- [4] Knauer TE, Siegfried C, Willingham AK, etc. Metabolism and biological activity of cis- and trans-phyloquinone in the rat [J]. The Journal of nutrition, 1975, 105 (12) : 1519-1524.
- [5] Chatterjee K, Mazumder PM, Sarkar SR, etc. Neuroprotective effect of Vitamin K₂ against gut dysbiosis associated cognitive decline [J]. Physiology & Behavior, 2023, 269: 114252.
- [6] Schurgers L, Teunissen K, Hamulyák K, etc. Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K₁ and natto-derived menaquinone-7 [J]. Blood, 2007, 109 (8) : 3279-3283.
- [7] Liu Y, Bennekom E, Zhang Y, etc. Long-chain vitamin K₂ production in *Lactococcus lactis* is influenced by temperature, carbon source, aeration and mode of energy metabolism [J]. Microbial cell factories, 2019, 18 (1) : 129.
- [8] Vermeer C. Vitamin K: the effect on health beyond coagulation – an overview [J]. Food & Nutrition Research, 2017, 56 (1) : 10.
- [9] Fu X, Harshman SG, Shen X, etc. Multiple Vitamin K forms exist in dairy foods [J]. Current Developments in Nutrition, 2017, 1 (6) : e000638.
- [10] Schudel P, Mayer H, Metzger J, etc. Über die Chemie des Vitamins E. 1. Mitteilung. Die Umkehrung der Konfiguration am Kohlenstoffatom 2 von natürlichem (2R, 4'R, 8'R) - α -Tocopherol [J]. Helvetica Chimica Acta, 2004,

- 46 (1) : 333-343.
- [11] Yoshinori N. Regio-and stereoselective synthesis of coenzymes Q₁₀, vitamin K, and related Polyprenylquinones [J]. JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, 1980, 12 (7) : 4097-4104.
- [12] Lipshutz B, Kim S, Mollard P. An expeditious route to CoQn, vitamin K₁ and K₂, and related allylated paraquinones utilizing Ni (0) catalysis [J]. Tetrahedron, 1998, 29 (22) : 1241-1253.
- [13] Min J, Lee J, Yang J, etc. The Friedel-Crafts allylation of a prenyl group stabilized by a sulfone moiety: Expeditious syntheses of ubiquinones and menaquinones [J]. The Journal of Organic Chemistry, 2003, 68 (20) : 7925-7927.
- [14] Baj A, Wałejko P, Kutner A, etc. Convergent synthesis of menaquinone-7 (MK-7) [J]. Organic Process Research & Development, 2016, 20 (6) : 1026-1033.
- [15] Liao C, Ayansola H, Ma Y, etc. Advances in enhanced menaquinone-7 production from *Bacillus subtilis* [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 695526.
- [16] Gao Q, Chen H, Wang W, etc. Menaquinone-7 production in engineered *Escherichia coli* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 36 (9) : 132.
- [17] Ren T, Jin C, Jin F, etc. Flaviumibacter profundus sp. nov., isolated from eutrophic freshwater sediment [J]. Journal of Microbiology, 2018, 56 (7) : 467-471.
- [18] Xu J, Yan W, Zhang W. Enhancing menaquinone-7 production in recombinant *Bacillus amyloliquefaciens* by metabolic pathway engineering [J]. RSC Advances, 2017, 7 (45) : 28527-28534.
- [19] Luo M, Ren L, Chen S, etc. Effect of media components and morphology of *Bacillus natto* on menaquinone-7 synthesis in submerged fermentation [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2017, 21 (6) : 777-786.
- [20] Mahdinia E, Demirci A, Berenjian A. Production and application of

- menaquinone-7 (vitamin K₂) : a new perspective [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 33 (1) : 2.
- [21] Boumezbeur A, Bruer M, Stoecklin G. Rational engineering of transcriptional riboswitches leads to enhanced metabolite levels in *Bacillus subtilis* [J]. Metabolic Engineering, 2020, 61: 58-68.
- [22] Fang Z, Wang L, Zhao G, etc. A simple and efficient preparative procedure for menaquinone-7 from *Bacillus subtilis* (*natto*) using two-stage extraction followed by microporous resins [J]. Process Biochemistry, 2019, 83: 183-188.
- [23] Mahdinia E, Demirci A, Berenjian A. Effects of medium components in a glycerol-based medium on vitamin K (menaquinone-7) production by *Bacillus subtilis natto* in biofilm reactors [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 42 (2) :223-232.
- [24] Cui S, Xia H, Chen T, etc. Cell membrane and electron transfer engineering for improved synthesis of menaquinone-7 in *Bacillus subtilis* [J]. iScience, 2020, 23 (3) : 100918.
- [25] Galano M, van den Dungen M, van Rij T, etc. Safety evaluation of food enzymes produced by a safe strain lineage of *Bacillus subtilis* [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2021, 126: 105030.
- [26] Sato T, Yamada Y, Ohtani Y, etc. Production of menaquinone (vitamin K₂) -7 by *Bacillus subtilis* [J]. Journal of bioscience and bioengineering, 91 (1) , 16–20.
- [27] Gao Q, Chen H, Wang G, etc. Highly efficient production of menaquinone-7 from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10 (4) : 756-765.
- [28] Morikawa T, Uraguchi Y, Sanda S, etc. Overexpression of DnaJ-Like chaperone enhances carotenoid synthesis in *chlamydomonas reinhardtii* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 184 (1) : 80-91.
- [29] Li Q, Fan F, Gao X, etc. Balanced activation of IspG and IspH to eliminate MEP intermediate accumulation and improve isoprenoids production in *Escherichia coli* [J]. Metabolic Engineering, 2017, 44: 13-21.

-
- [30] Marshall B, Amritkar K, Wolfe M, etc. Evolutionary flexibility and rigidity in the bacterial methylerythritol phosphate (MEP) pathway [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1286626.
 - [31] Ding X, Zheng Z, Zhao G, etc. Bottom-up synthetic biology approach for improving the efficiency of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21 (1) : 101.
 - [32] Dina M, Hala A, Neven M, etc. Relation between circulating Vitamin K₂ level and osteoporosis in post-menopausal women [J]. *QJM: An International Journal of Medicine*, 2021, 114 (1) : 002.
 - [33] 宁传荣, 李 倩. 维生素 K 在骨质疏松症治疗中的临床研究进展 [J]. *沈阳医学院学报*, 2022, 24 (01) : 76-80.
 - [34] 杨国安, 王永福. 维生素代谢与骨病 [J]. *包头医学院学报*, 2015, 31 (09) : 147-149.
 - [35] Schurgers L, Akbulut A, Kaczor D, etc. Initiation and propagation of vascular calcification is regulated by a concert of platelet and smooth muscle cell-derived extracellular vesicles [J]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2018, 5:36.
 - [36] Beulens J, Bots M, Atsma F, etc. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203 (2) : 489-493.
 - [37] Geleijnse J, Vermeer C, Grobbee D, etc. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: The rotterdam study [J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134 (11) :3100-3105.
 - [38] 惠文婷, 宋潼潼, 黄 敏, etc. 维生素 K₂ 在衰老相关疾病中的作用及机制的研究进展 [J]. *国际老年医学杂志*, 2023, 44 (06) : 726-729.
 - [39] Maniwa Y, Kasukabe T, Kumakura S. Vitamin K₂ and cotylenin A synergistically induce monocytic differentiation and growth arrest along with the suppression of c-MYC expression and induction of cyclin G2 expression in human leukemia HL-60 cells [J]. *International Journal of Oncology*, 2015,

- 47 (2) : 473-480.
- [40] Li L, Qi Z, Qian J, etc. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma Smmc-7721 cells by vitamin K₂ is associated with p53 and independent of the intrinsic apoptotic pathway [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2010, 342 (1-2) : 125-131.
- [41] Xv F, Chen J, Duan L, etc. Research progress on the anticancer effects of vitamin K₂ [J]. Oncology letters, 2018, 15 (6) : 8926–8934.
- [42] Ide Y, Zhang H, Hamajima H, etc. Inhibition of matrix metalloproteinase expression by menatetrenone, a vitamin K₂ analogue [J]. Oncology reports, 2009, 22 (3) : 599–604.
- [43] Zhang Y, Zhang B, Zhang A, etc. Synergistic growth inhibition by sorafenib and vitamin K₂ in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Clinics, 2012, 67 (9) : 1093-1099.
- [44] Popescu A, German M. Vitamin K₂ holds promise for Alzheimer's prevention and treatment [J]. Nutrients, 2021, 13 (7) : 2206.
- [45] Beulens J, van der A, Grobbee D, etc. Dietary phyloquinone and menaquinones intakes and risk of type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2010, 33 (8) : 1699-1705.
- [46] Kozioł-Kozakowska A, Maresz K. The impact of Vitamin K₂ (Menaquinones) in children's health and diseases: A Review of the Literature [J]. Children, 2022, 9 (1) : 78.
- [47] 许洪高, 张戡格. 论纳豆维生素 K₂ 对凝血作用的影响 [J]. 中国品牌与防伪, 2023, S1: 50-54.
- [48] Ebina K, Shi K, Hirao M, etc. Vitamin K₂ administration is associated with decreased disease activity in patients with rheumatoid arthritis [J]. Modern Rheumatology, 2012, 23 (5) : 1001-1007.
- [49] Abdel-Rahman M, Alkady E, Ahmed S. Menaquinone-7 as a novel pharmacological therapy in the treatment of rheumatoid arthritis: A clinical study [J]. European Journal of Pharmacology, 2015, 761: 273-278.

-
- [50] 牟京霞, 刘建民. 维生素 K₂ 的生理功能及应用现状 [J]. 化工管理, 2020, 12: 201-202.
 - [51] Neiditch M, Capodagli G, Prehna G, etc. Genetic and structural analyses of rrnpp intercellular peptide signaling of gram-positive bacteria [J]. Annual Review of Genetics, 2017, 51 (1) : 311-333.
 - [52] Christina M, Diana K, Alexi I, etc. Intracellular action of a secreted peptide required for fungal virulence [J]. Cell Host & Microbe, 2016, 19(6): 849-864.
 - [53] Moreno-Gómez S, Hochberg M, van Doorn G. Quorum sensing as a mechanism to harness the wisdom of the crowds [J]. Nature Communications, 2023, 14 (1) : 3415.
 - [54] Wu S, Liu J, Liu C, etc. Quorum sensing for population-level control of bacteria and potential therapeutic applications [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019, 77 (7) : 1319-1343.
 - [55] Yi L, Dong X, Grenier D, etc. Research progress of bacterial quorum sensing receptors: Classification, structure, function and characteristics [J]. Science of The Total Environment, 2021, 763: 143031.
 - [56] Cardoso P, Perchat S, Vilas-Boas L, etc. Diversity of the Rap-Phr quorum-sensing systems in the *Bacillus cereus* group [J]. Current Genetics, 2019, 65 (6) : 1367-1381.
 - [57] Zhao X, Yu Z, Ding T. Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria [J]. Microorganisms, 2020, 8 (3) : 425.
 - [58] Müller J, Kuttler C, Hense B. Sensitivity of the quorum sensing system is achieved by low pass filtering [J]. Biosystems, 2008, 92 (1) : 76-81.
 - [59] Li W, Zeng T, Zhang Z, etc. Geraniol attenuates virulence factors by inhibiting quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1190619.
 - [60] Anguige K, King J, Ward J. Modelling antibiotic- and anti-quorum sensing treatment of a spatially-structured *Pseudomonas aeruginosa* population [J]. Journal of Mathematical Biology, 2005, 51 (5) : 557-594.
 - [61] Feng J, Zong W, Wang P, etc. RRNPP-type quorum-sensing systems regulate

- p solvent formation, sporulation and cell motility in
- Clostridium saccharoperbutylacetonicum*
- [J].
- Biotechnology for Biofuels*
- , 2020, 13(1): 84.
- [62] Papenfort K, Bassler B. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14 (9) : 576-88.
- [63] Patel R, Soni M, Soyantar B, etc. A clash of quorum sensing vs quorum sensing inhibitors: an overview and risk of resistance [J]. *Archives of Microbiology*, 2023, 205 (4) : 107.
- [64] Gu P, Ma Q, Zhao S, etc. Application of quorum sensing system in microbial synthesis of valuable chemicals: a mini-review [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 38 (11) : 192.
- [65] Liu Y, Liu L, Li J, etc. Synthetic biology toolbox and chassis development in *Bacillus subtilis* [J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37 (5) : 548-562.
- [66] Gupta A, Reizman I, Reisch C, etc. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit [J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35 (3) : 273-279.
- [67] Shen X, Wang J, Li C, etc. Dynamic gene expression engineering as a tool in pathway engineering [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 59: 122-129.
- [68] Shen Y, Fong L, Yan Z, etc. Combining directed evolution of pathway enzymes and dynamic pathway regulation using a quorum-sensing circuit to improve the production of 4-hydroxyphenylacetic acid in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12 (1) : 94.
- [69] Cui S, Lv X, Wu Y, etc. Engineering a bifunctional Phr60-Rap60-Spo0A quorum-sensing molecular switch for dynamic fine-tuning of menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis* [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8 (8) : 1826-1837.
- [70] Soma Y, Takahashi M, Fujiwara Y, etc. Design of synthetic quorum sensing achieving induction timing-independent signal stabilization for dynamic

- p>metabolic engineering of
- E. coli*
- [J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10 (6) : 1384-1393.
- [71] Skandamis P, Nychas G. Quorum sensing in the context of food microbiology [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78 (16) : 5473-5482.
- [72] Machado I, Silva L, Giaouris E, etc. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition [J]. Food Research International, 2020, 127: 108754.
- [73] Hu Y, Cai Q, Tian S, etc. Regulator DegU is required for multicellular behavior in *Lysinibacillus sphaericus* [J]. Research in Microbiology, 2018, 169 (3) : 177-187.
- [74] Ogura M, Yamaguchi H, Yoshida Ki, etc. DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* DegU, ComA and PhoP regulons: an approach to comprehensive analysis of *B.subtilis* two-component regulatory systems. *Nucleic acids research*. 2001, 29 (18) : 3804-3813.
- [75] Kobayashi K. Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis* [J]. Molecular Microbiology, 2007, 66 (2) : 395-409.
- [76] Murray E, Kiley T, Stanley-Wall N. A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour [J]. Microbiology, 2009, 155 (1): 1-8.
- [77] Dahl M, Msadek T, Kunst F, etc. The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis* [J]. The Journal of biological chemistry, 1992, 267 (20) : 14509–14514.
- [78] Cairns L, Martyn J, Bromley K, etc. An alternate route to phosphorylating DegU of *Bacillus subtilis* using acetyl phosphate[J]. BMC Microbiology, 2015, 15 (1) : 78.
- [79] Tsukahara K,Ogura M. Promoter selectivity of the *Bacillus subtilis* response regulator DegU, a positive regulator of the *fla/che* operon and *sacB* [J]. BMC

- Microbiology, 2008, 8 (1) : 8.
- [80] Shimane K. Mutational analysis of the helix-turn-helix region of *Bacillus subtilis* response regulator DegU, and identification of cis-acting sequences for DegU in the *aprE* and *comK* promoters [J]. Journal of Biochemistry, 2004, 136 (3) : 387-397.
- [81] Gupta M, Rao K. Phosphorylation of DegU is essential for activation of *amyE* expression in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Biosciences, 2014, 39 (5) : 747-752.
- [82] Hamoen L, Van Werkhoven A, Venema G, etc. The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97 (16) : 9246-9251.
- [83] Gallegos-Monterrosa R, Christensen M, Barchewitz T, etc. Impact of Rap-Phr system abundance on adaptation of *Bacillus subtilis* [J]. Communications Biology, 2021, 4 (1) : 2021.
- [84] Ogura M, Shimane K, Asai K, etc. Binding of response regulator DegU to the *aprE* promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis* [J]. Molecular Microbiology, 2003, 49 (6) : 1685-1697.
- [85] Ogura M, Yoshikawa H, Chibazakura T. Regulation of the response regulator gene *degU* through the binding of SinR/SlrR and exclusion of SinR/SlrR by DegU in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(4): 873-881.
- [86] Ermoli F, Bontà V, Vitali G, etc. SwrA as global modulator of the two-component system DegSU in *Bacillus subtilis* [J]. Research in Microbiology, 2021, 172 (6) : 103877.
- [87] Mäder U, Antelmann H, Buder T, etc. *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2002, 268 (4) : 455-467.
- [88] Collins K, Evans N, Torpey J, etc. Structural analysis of *Bacillus subtilis*

- p sigma factors [J].
- Microorganisms*
- , 2023, 11 (4) : 1077.
- [89] Haldenwang W. The sigma factors of *Bacillus subtilis* [J]. *Microbiological reviews*, 1995, 59 (1) : 1–30.
- [90] 马琳. 生物信息学在微生物中的应用 [J]. *工业微生物*, 2023, 53 (4) : 27-29.
- [91] Verhamme D, Kiley T, Stanley-Wall N. DegU co-ordinates multicellular behaviour exhibited by *Bacillus subtilis* [J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 65 (2) : 554-568.
- [92] Marlow V, Porter M, Hobley L, etc. Phosphorylated DegU manipulates cell fate differentiation in the *Bacillus subtilis* biofilm [J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 196 (1) : 16-27.
- [93] Dahl R, Zhang F, Alonso-Gutierrez J, etc. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31 (11) : 1039-1046.
- [94] Lo T, Chng S, Teo W, etc. A two-layer gene circuit for decoupling cell growth from metabolite production [J]. *Cell Systems*, 2016, 3 (2) : 133-143.
- [95] Yan X, Yu H, Hong Q, etc. Cre/lox system and pcr-based genome engineering in *Bacillus subtilis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (17) : 5556-5562.
- [96] Mishra A, Hughes A, Amon J, etc. Swra-mediated multimerization of DegU and an upstream activation sequence enhance flagellar gene expression in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2024, 436 (4) : 168419.
- [97] Cui W, Han L, Cheng J, etc. Engineering an inducible gene expression system for *Bacillus subtilis* from a strong constitutive promoter and a theophylline-activated synthetic riboswitch [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15 (1) : 199.
- [98] Lee S, Pan J, Park S, etc. Development of a stationary phase-specific autoinducible expression system in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 149 (1-2) : 16-20.
- [99] Wang Y, Shi Y, Hu L, etc. Engineering strong and stress-responsive promoters

- in *Bacillus subtilis* by interlocking sigma factor binding motifs [J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2019, 4 (4) : 197-203.
- [100] Saggu G, Garg S, Pala Z, etc. Characterization of 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (IspG) from *Plasmodium vivax* and it's potential as an antimalarial drug target [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 96: 466-473.
- [101] Altincicek B, Kollas A, Sanderbrand S, etc. GcpE Is Involved in the 2-C-Methyl-d-Erythritol 4-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183, (8) : 2411-2416.
- [102] Clomburg J, Qian S, Tan Z, etc. The isoprenoid alcohol pathway, a synthetic route for isoprenoid biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116 (26) : 12810-12815.

附录 1 中英文缩略词说明

中文名称	英文名称	缩写
甘油	glycerol	gly
甘油激酶	glycerol kinase	Glpk
甘油-3-磷酸脱氢酶	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GlpD
磷酸烯醇丙酮酸	phosphoenol pyruvate	PEP
赤藓糖-4-磷酸	erythrose 4-phosphate	E4P
3-脱氧阿拉伯七戊酸 7-磷酸	3-deoxy-arabino-heptulonate 7-phosphate	DAHP
3-脱氢奎尼酸盐	3-dehydroquinate	DHQ
3-脱氢莽草酸	3-dehydroshikimate	DHS
莽草酸	shikimic acid	SA
赤木酸 3-磷酸盐	shikimate 3-phosphate	S3P
5-O- (1-羧基乙烯基) -3-磷酸莽草酸酯	5-O- (1-carboxyvinyl) -3-phosphoshikimate	EPSP
分支酸	chorismate	CHA
异分支酸	Isochorismic Acid	isoCHA
2-丁二酰基-5-烯醇丙酮基-6-羟基-3-环己烯-1-羧酸酯	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate	SEPHCHC
2-丁二酰基-6-羟基-2,4-环己二烯-1-羧酸酯	2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate	SECHC
2-琥珀酰基苯甲酸酯	2-succinylbenzoate	OSB
2-琥珀酰基苯甲酸酯辅酶 A	2-succinyl benzoyl-CoA	OSB-CoA
1,4-二羟基-2-苯甲酰基辅酶 A	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA	DHNA-CoA
1,4-二羟基-2-苯甲酸	1,4-dihydroxy- 2-naphthoate	DHNA
1-脱氧木糖-5-磷酸盐	1-deoxyxylulose-5-phosphate	DXP
甲基赤藓糖醇 4-二磷酸	methyl-erythritol-4-diphosphate	MEP
4- (胞苷 5'-二磷酸) -2C 甲	4- (Cytidine 5'-diphospho)	CDP-ME

基 D 赤藓糖醇	-2-C-methyl-D-erythritol	
2-磷酸化-4-（胞苷 5'-二磷酸）-2-C-甲基-D-赤藓糖醇	2-Phospho-4-（cytidine 5'-diphospho）	CDP-MEP
2-C-甲基 D-赤藓糖醇 2,4-环二磷酸	-2-C-methyl-D-erythritol 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate	MEcPP
1 羟基 2 甲基 2 丁烯基 4 二磷酸	1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate	HMBPP
异戊烯基二磷酸酯	isopentenyl diphosphate	IPP
二甲基烯丙基二磷酸	dimethylallyl diphosphate	DMAPP
二磷酸甘氨酸	Geranyl diphosphate	GPP
法尼基二磷酸酯	farnesyl diphosphate	FPP
七戊烯基二磷酸酯	heptaprenyl diphosphate	HDP
2-去甲基甲萘醌	2-demethylmenaquinone	DMK
甲萘醌	menaquinone	MK

攻读学位期间所发表的学术论文目录及获奖情况

1. 黄俊宝, 黄茜琳, 陈宇, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 郭明雨, 刘永圆, 吴晶, 刘艳, 《*menD* 表达强度对枯草芽孢杆菌中维生素 K₂ 产量的影响》。食品与发酵工业, 网络首发。
2. 黄俊宝, 黄茜琳, 陈宇, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 刘永圆, 郭明雨, 吴晶, 刘艳, 《PhrG-RapG-DegU 群体感应调控枯草芽孢杆菌中甲萘醌-7 的合成》。食品与生物技术学报, 已接收。
3. 黄茜琳, 黄俊宝, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 郭明雨, 刘永圆, 吴晶, 吴超, 薛正莲, 陈宇, 刘艳, 《基于 RNA-seq 分析 *bdhA* 敲除对枯草芽孢杆菌产纳豆激酶和 MK-7 的影响》。微生物学报, 网络首发。
4. 黄茜琳, 黄俊宝, 高旭丽, 罗雅妮, 陶伟, 郭明雨, 刘永圆, 吴超, 吴晶, 刘艳, 《*aprN* 的 N 端编码序列改造促进纳豆激酶的高效表达》。食品与发酵工业, 已接收。

获奖情况:

1. 2021 年, 获一等奖学金
2. 2022 年, 获二等奖学金
3. 2023 年, 获一等奖学金
4. 2022 年, 专利“一种调节大肠杆菌菌膜形态和高效合成 MK-7 的方法”获校级三等奖。
5. 2022 年, 专利“一种维生素 K₂ 系列产物的生物合成方法”获校级三等奖。

致谢

时光荏苒，岁月如梭，三年时间转瞬即逝。在这段求学的时间里，我学习颇多，收益颇丰，遇到过困难，也享受过欢乐。值此之际，我希望对那些帮助过我，关心过我和支持过我的人致以最真挚的感谢。

首先，我要感谢我的导师刘艳教授。在这三年的时光里，她不仅给予了我学术上的悉心指导，同时在生活中也给予了我极大的关怀与支持。在论文的撰写过程中，老师不仅耐心教会我学会理解论文的内在逻辑，同时也会指出我论文的错误与不足之处，耐心教会我如何去改正；同时，当我在学术上遇到困难时，刘老师也会以其专业的知识替我答疑解惑，使我受益匪浅。作为我科研道路上的指路明灯，刘老师一直以其丰富的专业知识、科学的工作方式、严谨的科研态度和与人和善的待人方式指引着我前进的方向。值此之际，我要对刘艳老师表达最为深切的感激之情。

其次，我要对这三年时光中教导过我的授课老师表达我的感激之情，薛正莲教授、钱森和老师、王洲老师、魏明老师、赵世光老师、聂光军老师、朱龙宝老师、葛飞老师、李艳宾老师、张琴老师、李松老师、唐松老师和李婉珍老师对我的教导，点燃了我对于知识的渴望，激发了我对科研的兴趣；我还要感谢李翔飞老师和赵明老师，在我科研工作中遇到问题的解惑之情。

同时，我还要表达对实验室的同学们的感激之情。在这三年的时间里，我有幸与大家一起度过，你们的存在，不仅帮助我解决实验上的多种困难，同时也使我的科研之路不再那么孤单。我要感谢吴静师姐、李伟师兄、周梦洁师姐和胡汶松师兄对于我实验的耐心指导，也要感谢黄茜琳、罗雅妮、高旭丽、陶伟、刘永圆、郭明雨和吴晶对于我实验的帮助。在实验室的每一天，我们互相帮助，共同成长，互相分享实验的喜悦，解决实验的苦难。

此外，我还要感激我的家人，是他们给予了我学术道路上不断前行的坚实后盾，也是我在遇到困难时的力量源泉，是他们的爱与鼓励，让我在生活和科研中能够排除万难，不断向前。

感激我一路走来遇到的每一个人！

最后，感谢各位能够在百忙的时间中参加此次答辩和论文评阅的老师和专家们！