

a 分类号: Q815

单位代码: 10363

密级: 公开

学号: 2220510105

费氏链霉菌代谢物新霉素核糖开关传感器的构建与应用

CONSTRUCTION AND APPLICATION OF RIBOSWITCH
FOR NEOMYCIN, A METABOLITE OF STREPTOMYCES
FRADIAE

学生姓名:	张轩绮
校内导师:	薛正莲
专 业:	生物工程
研究方向:	合成生物学与发酵工程

论文答辩日期: 2025 年 5 月 15 日

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： 张轩绮

日期： 2025 年 5 月 15 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： 张轩绮

指导教师签名：薛正莲

日期：2025 年 5 月 15 日

日期：2025 年5月 15日

费氏链霉菌代谢物新霉素的核糖开关传感器的构建与应用

摘 要

新霉素作为重要氨基糖苷类抗生素，在农业和医疗领域需求持续增长，但其传统发酵工艺存在产能瓶颈。本研究针对费氏链霉菌（*Streptomyces fradiae*）生产体系，将核糖开关生物传感器与基因线路设计相结合，通过筛选获得特异性识别新霉素 B 的核糖开关 N1，并构建包含启动子、动态调控元件和报告基因的四模块表达系统。重组菌株 SF-N(SF/pPR-N1-space-eGFP)成功建立新霉素浓度与荧光信号的线性响应关系，在 0-64 mM 范围内实现剂量依赖型监测。通过三因素五水平正交实验优化影响平板孢子形成质量因素琼脂浓度、链霉素浓度及 pH 值，得出琼脂 2.4%、链霉素 8%、pH7.6（A₅B₃C₄）为最优参数组合，在此条件下生成的孢子，使重组菌株 SF-N 摇瓶效价较原始菌株 SF-2 提升 43%。该研究构建的“感知-反馈”基因线路为抗生素生物合成动态调控提供了新范式，其耦合培养基优化的双重策略对工业菌株智能改造具有重要参考价值。主要研究内容和结果如下：

（1）核糖开关生物传感器的理性设计与工程优化：基于同源序列筛选与分子对接分析，鉴定新霉素 B 特异性核糖开关 N1，其 G9:C22 碱基对与 U 型旋转基序构成配体识别的结构基础。通过构建集成启动子、核糖开关 N1、14 bp 间隔序列（space）及 eGFP 的四模块表达元件 ermE[#]，没有间隔序列（space）的重组菌株 SF/pPR-N1-eGFP 因

空间位阻导致的 RBS 暴露不足缺陷，使核糖体结合效率显著提升。优化后的重组菌株 SF-N 新霉素产量较原始菌株提高 20%，并建立了配体浓度-荧光响应的动态调控逻辑，为高通量筛选系统奠定核心元件基础。

（2）荧光生物传感器的功能验证与应用：引入 space 区域的重组菌株 SF-N 展现出高灵敏度（0-64 mM 线性响应）、强特异性及信号-代谢同步性：通过增强核糖开关构象稳定性，实现低阈值荧光信号检测；缩短了延滞期并加速对数期生长，证实传感器对菌株代谢状态的适配性；在 7 天发酵中荧光强度与胞内新霉素效价严格同步，验证其动态监测可靠性。该传感器可实时反馈胞内代谢物变化，为高产菌株筛选与发酵精准调控提供高效工具。

（3）发酵工艺多参数协同优化与代谢调控机制解析：基于正交试验与双指标评价模型，解析影响平板孢子形成质量因素琼脂浓度、链霉素浓度及 pH 值对新霉素效价与荧光值的差异化调控：链霉素浓度对效价影响极显著（ $P < 0.01$ ），显著影响荧光信号；最优参数组合为琼脂 2.4%、链霉素 8%、pH7.6，此时新霉素 B 效价与荧光强度协同最大化（ $R^2 > 0.85$ ）。在此条件下生成的孢子，使重组菌株 SF-N 摇瓶效价达到 $9480 \pm 254.0 \text{ U/mL}$ ，较原始菌株 SF-2 提升 43%。结果显示，低浓度琼脂（1.2%-1.8%）下孢子较大但稀疏，孢子呈灰白色高浓度，菌丝扩展快但孢子成熟延迟且体积小高浓度琼脂（2.1%-2.4%）时孢子小而密集，颜色稍有加深，菌丝扩展慢而分化提前且孢子体量大且厚。

关键词：核糖开关；生物传感器；费氏链霉菌；新霉素；启动子
元件

CONSTRUCTION AND APPLICATION OF A RIBOSWITCH-BASED SENSOR FOR NEOMYCIN METABOLITE IN *STREPTOMYCES FRADIAE*

ABSTRACT

Neomycin, a crucial aminoglycoside antibiotic with escalating demand in agricultural and clinical sectors, faces production bottlenecks in conventional fermentation processes. This study addresses these limitations in *Streptomyces fradiae* by integrating riboswitch-based biosensors with genetic circuit engineering. A neomycin B-specific riboswitch (N1) was identified through systematic screening and incorporated into a quad-module expression system comprising a constitutive promoter, dynamic regulatory elements, and an eGFP reporter gene. The engineered strain SF-N (SF/pPR-N1-space-eGFP) established a linear correlation ($R^2 > 0.95$) between neomycin concentration (0–64 mM) and fluorescence intensity, enabling real-time dose-dependent monitoring. A three-factor, five-level orthogonal experiment optimized sporulation parameters (agar, streptomycin, pH), identifying 2.4% agar, 8% streptomycin, and pH 7.6 (A5B3C4) as optimal conditions. Implementation of this strategy enhanced the shake-flask titer of SF-N by 43% compared to the wild-type SF-2. The

developed "perception-feedback" genetic circuit establishes a novel paradigm for dynamic regulation of antibiotic biosynthesis, while the dual approach coupling genetic engineering with medium optimization provides a strategic framework for intelligent industrial strain development. Key findings include:

(1) Rational Design and Engineering Optimization of Riboswitch Biosensors: Through homologous sequence screening and molecular docking analysis, we identified the neomycin B-specific riboswitch N1, whose ligand recognition is structurally based on the G9:C22 base pair and U-shaped rotational motif. Construction of a four-module expression element ($ermE^{\#}$) integrating a promoter, riboswitch N1, 14 bp spacer sequence, and eGFP revealed that the recombinant strain SF/pPR-N1-eGFP lacking the spacer exhibited significantly enhanced ribosome binding efficiency due to reduced spatial hindrance-induced insufficient ribosomal binding site (RBS) exposure. The optimized strain SF-N demonstrated a 20% increase in neomycin production compared to the parental strain and established dynamic ligand concentration-fluorescent response regulation, providing a core component framework for high-throughput screening systems.

(2) Functional Validation and Application of Fluorescent Biosensor: The recombinant strain SF-N incorporating the spacer region demonstrated high sensitivity (0-64 mM linear response), strong

specificity, and signal-metabolism synchronization. Enhanced riboswitch conformational stability enabled low-threshold fluorescence detection, while shortened lag phase and accelerated logarithmic growth confirmed sensor-metabolic state compatibility. During 7-day fermentation, fluorescence intensity strictly paralleled intracellular neomycin titer, validating dynamic monitoring reliability. This sensor provides real-time feedback on intracellular metabolite fluctuations, offering an efficient tool for high-yield strain screening and precision fermentation control.

(3) Multi-Parameter Fermentation Optimization and Metabolic Regulation Analysis: Orthogonal experiments with a dual-index evaluation model revealed differential regulation of neomycin titer and fluorescence by critical sporulation factors (agar 2.0-2.8%, streptomycin 6-10%, pH 7.2-8.0). Streptomycin concentration exerted highly significant effects on antibiotic titer ($P < 0.01$) and notable fluorescence modulation. The optimal parameters (2.4% agar, 8% streptomycin, pH 7.6) achieved synergistic maximization of neomycin B production and biosensor signal ($R^2 > 0.85$). This optimized sporulation protocol enabled recombinant strain SF-N to reach $9480 \pm 254.0 \text{ U/mL}$ shake-flask titer, representing a 43% enhancement over parental strain SF-2. The results showed that under low-concentration agar (1.2%-1.8%), spores were larger but sparsely distributed, appearing grayish-white, with faster mycelial extension yet delayed sporulation and smaller spore volume. In

contrast, under high-concentration agar (2.1%-2.4%), spores became smaller and densely packed, slightly darker in color, accompanied by slower mycelial extension but accelerated differentiation, yielding larger and thicker spores.

KEYWORDS: riboswitch, Biosensor, *Streptomyces fradiae*, Neomycin, Promoter sub-component

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	IV
第 1 章 绪论	1
1.1 新霉素的概述	1
1.1.1 新霉素的理化性质	1
1.1.2 新霉素的生物合成	2
1.1.3 新霉素合成研究与应用发展	2
1.1.4 新霉素的检测方式	3
1.2 生物传感器概述	4
1.2.1 生物传感器工作原理	4
1.2.2 生物传感器的应用	5
1.3 核糖开关的概述	7
1.3.1 核糖开关的发现	7
1.3.2 核糖开关结构	7
1.3.3 核糖开关的作用机理	7
1.3.4 核糖开关在生物传感器中的应用	8
1.4 研究意义及内容	10
1.4.1 研究意义	10
1.4.2 研究内容	11
第二章 新霉素核糖开关重组菌株的构建	12
2.1 引言	12
2.2 实验材料	13
2.2.1 菌株和质粒	13
2.2.2 实验试剂	13
2.2.3 实验仪器	14
2.2.4 培养基	15
2.3 实验方法	15

2.3.1 重组菌株的构建	15
2.3.2 重组菌株摇瓶发酵验证	18
2.3.3 新霉素含量测定	19
2.4 结果与讨论	19
2.4.1 理论分析对新霉素有响应的开关	19
2.4.2 重组菌株质粒构建	21
2.5 本章小结	24
第三章 新霉素核糖开关费氏链霉菌菌株的表征	25
3.1 引言	25
3.2 实验材料	26
3.2.1 菌株	26
3.2.2 实验试剂	26
3.2.3 实验仪器	26
3.2.4 培养基	26
3.3 实验方法	27
3.3.1 重组菌株生长特性及荧光强度分析	27
3.3.2 重组菌株摇瓶发酵的效价及荧光验证	27
3.3.3 内外源新霉素对 SF-N 菌株荧光强度的影响	27
3.3.4 SF-N 菌株摇瓶发酵过程中荧光强度及效价分析	28
3.4 结果与讨论	28
3.4.1 重组菌株生长特性及荧光强度分析	28
3.4.2 重组菌株摇瓶发酵价及荧光验证	29
3.4.3 内外源新霉素对 SF-N 菌株荧光强度的影响	32
3.4.4 SF-N 菌株摇瓶发酵过程中荧光强度及效价分析	33
3.5 本章小结	34
第四章 基于核糖开关生物传感器优化平板孢子生成条件	35
4.1 引言	35
4.2 实验材料	35
4.2.1 菌株	35

4.2.2 培养基及培养条件	35
4.3 实验方法	36
4.3.1 菌株的接种与培养方法	36
4.3.2 孢子及效价的检测方法	36
4.3.3 正交实验优化平板孢子生成条件	36
4.4 结果与讨论	37
4.4.1 基于核糖开关生物传感器优化平板孢子生成条件	37
4.5 本章小结	41
第五章 结论与展望	43
5.1 结论	43
5.2 展望	44
参考文献	46
个人科研成果	55
致谢	56

第 1 章 绪论

1.1 新霉素的概述

1.1.1 新霉素的理化性质

新霉素(Neomycin)属于氨基糖苷类抗生素家族,由费氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)代谢产生。其分子式为 $C_{23}H_{48}N_6O_{17}S$, 分子质量为 712.7222, 常规状态下为无味、白色或浅黄色粉末。其密度为 1.6 g/cm³; 熔点为 250 °C, 是一种易溶于水, 不溶于乙醇的化合物。该抗生素因其对革兰氏阴性菌(如大肠杆菌和沙门氏菌)及部分革兰氏阳性菌(如金黄色葡萄球菌)的广谱抑菌作用而被关注, 但因其系统给药时的毒副作用(如耳毒性和肾毒性), 临床主要限制于局部或非吸收性制剂(如外用软膏、滴眼液或口服肠道术前消毒)^[1]。

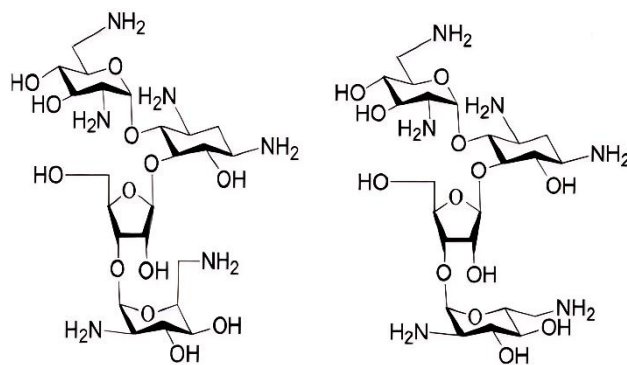


图 1-1 新霉素 B (左) 和 C (右) 化学结构式

Figure.1-1 The structural formula of Neomycin B and C

新霉素的复合物由三种化学结构高度相似但存在细微差异的组分构成, 即新霉素 A、B 和 C^[2-5]。三者的差异主要源于糖环上羟基和氨基的取代位点及立体构型, 导致其生物学特性(如抗菌效力、毒性)显著不同。其中, 新霉素 A (Neamine) 是三者中分子量最小的组分, 仅包含一个脱氧链霉胺(deoxystreptamine)核心与一个氨基糖单元。其结构简化导致与细菌核糖体的结合能力较弱, 因此抑菌活性显著低于新霉素 B 和 C。研究显示, 新霉素 A 对部分耐药菌可能表现出协同增效作用, 但因单独使用效果有限, 临床价值较低。新霉素 B 对需氧革兰氏阴性杆菌(如肺炎克雷伯菌)及部分葡萄球菌的杀菌效果最为突出; 新霉素 C 的结构与新霉素 B 极为相似, 仅在某一位点的羟基取代基取向上存在立体异构差异

(如 C5'羟基的构型不同)^[6, 7]。这种微小变化导致其与核糖体结合的亲和力略低于新霉素 B，因此抗菌活性约为后者的 60-70%。

1.1.2 新霉素的生物合成

氨基糖苷类抗生素的持续研究热潮，源于其生物合成酶系统与遗传调控机制的特殊性^[8-9]。新霉素的代谢合成机制呈现出典型的级联反应特征：以 D-葡萄糖-6-磷酸为起始底物，经 2-脱氧青蟹肌糖合酶 NeoC 催化的合成反应与 2-脱氧-青蟹肌糖氨基转移酶基因 NeoS 介导的氨基转移过程，首先生成 2-脱氧青蟹肌糖胺，继而通过 2-脱氧青蟹肌醇脱氢酶基因 NeoE 的脱氢作用转化为 2-脱氧链霉素^[10-12]。该中间体在糖基转移 NeoM 的催化下完成糖基化修饰，形成关键中间产物 2-氨基-乙酰基巴龙霉素。此转化过程需 FAD 依赖性脱氢酶基因 NeoQ 与氨基转移酶基因 NeoB 的协同调控，而去乙酰酶 NeoD 则在糖基化阶段执行去乙酰化功能^[13, 14]。随后的代谢通路中，磷酸核糖基转移酶基因 NeoL 与磷酸酶基因 NeoP 共同介导新霉素 A 的磷酸核糖基化，形成核糖霉素，该过程伴随核糖霉素 GlcNAc 转移酶 NeoF 与 UDP-GlcNAc 的协同作用。值得注意的是，新霉素 Y2 的生成涉及核糖霉素与 GlcNAc 的分子重组，而 NeoQ 与 NeoB 在此阶段再次参与巴龙霉素向新霉胺的转化。终产物新霉素 B 的立体构型最终由 SAM 依赖性差向异构酶 NeoN 确定^[15, 16]。

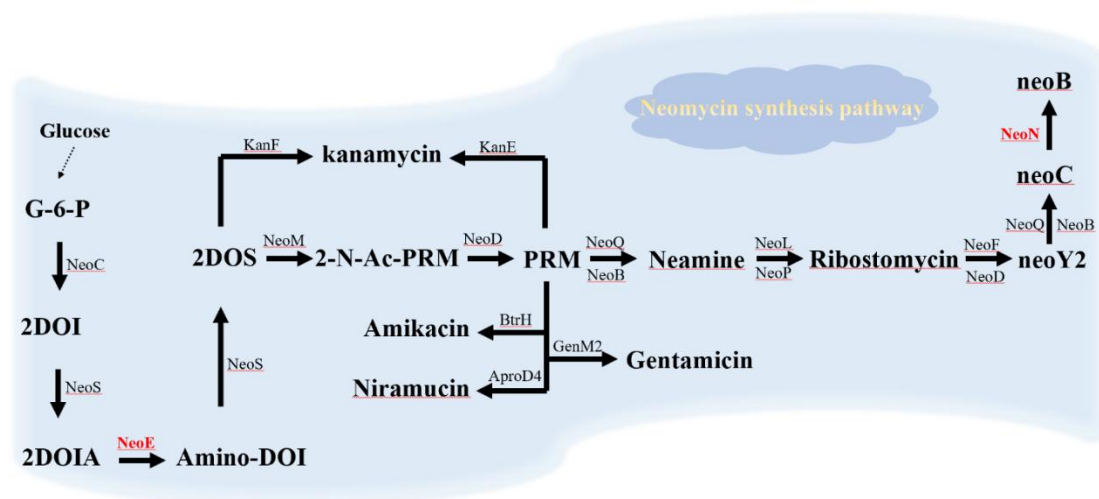


图 1-2 新霉素合成途径

Figure 1-2 Neomycin biosynthetic pathway

1.1.3 新霉素合成研究与应用发展

当前市场研究显示，硫酸新霉素的国际市场需求呈现持续扩张态势，预计

2023 年将形成具有显著体量的产业规模,并在 2024-2030 年周期内维持稳定增长趋势。这种发展动能主要源于三个维度的支撑:全球农业产能的系统性提升、畜牧养殖领域对抗菌制剂的依赖性增强,以及食品供应链安全标准的普遍升级。

表 1-1 新霉素合成研究进展
Table 1-1 Research progress on neomycin synthesis

时间	主要突破	关键参数/成果
1949	美国学者从爱荷华州土壤分离获得	原始菌株分离成功 ^[4]
1978	原生质体融合技术	42℃高温下保持 83%生产能力 ^[17, 18]
2008	紫外线-LiCl 处理诱变	得到较原始菌株产量的 205 倍的 WB40s-6 ^[19]
2014	化学诱变剂 NTG 结合链霉素抗性筛选	得到新霉素 C 含量降低,新霉素 B 效价比初始菌株高一半的高产菌株 ^[20]
2014	等离子射流诱变	筛选出产量提高 10.4%的稳定菌株 ^[21]
2017	合成途径基因调控研究,过表达 afsA-g 和 neoR 基因	新霉素效价分别提升 55%和 21% ^[22]
2019	ARTP 诱变及链霉素抗性筛选	摇瓶效价达原始菌株 1.45 倍的遗传稳定突变株 ^[23]
2019	基因编辑改造生物合成基因簇	构建 SF/PKCZ03 重组菌,效价提高 36% ^[24]
2020	过表达微型基因簇	降低副产物的积累量,效价增加 13.1% ^[25]
2020-2021	过表达 11 个关键酶/基因	最高的过表达菌株产量提高 23.07% ^[26, 27]
2022	NeoE/NeoN 定点突变及过表达	显著促进新霉素生物合成 ^[28, 29]
2025	建立高效的 CRISPR/ cas9n 介导的基因组编辑工具箱	提高修饰策略效率,有利于新霉素的合成 ^[30]

1.1.4 新霉素的检测方式

新霉素生物效价评估主要依赖两类经典方法:①琼脂扩散法(管碟法)^[31]:通过量化固体培养基表面抑菌圈直径(18 小时培养周期)实现浓度相关分析,但其检测下限较高且受抗生素扩散动力学制约;②浊度分析法(比浊法)^[32]:基于液体培养体系(6 小时检测周期)中微生物增殖导致的浊度变化进行光密度检测,虽然时效性提升,但受生物体系选择特异性影响显著。

现代仪器分析法中,高效液相色谱(HPLC)因具备 ppb 级检测限与优异的选择性^[33, 34],已成为新霉素质控的首选技术。典型方案采用反相色谱系统配合梯度洗脱,其中文献^[35]报道的邻苯二甲醛柱后衍生化 HPLC 联用技术,有效解决了新霉素衍生物检测的灵敏度瓶颈。

分光光度检测体系^[36]则通过三类显色反应实现快速检测:碱性酒石酸铜络合法^[37, 38]通过铜离子螯合作用产生显色产物;乙酰丙酮-甲醛缩合法^[39]基于氨基的缩合显色机制;邻苯二醛衍生法^[40]则通过伯胺特异性反应生成发色团,各方法均

在特定波长呈现特征吸收峰。

传统新霉素检测方法受限于时间、操作复杂度及设备依赖性，难以满足高通量筛选对速度、成本与自动化水平的要求。

1.2 生物传感器概述

在生命体系中，由基因编码的蛋白质或 RNA 元件（如转录因子和核糖开关）普遍存在，这类生物分子能够通过构象变化感知胞内特定代谢物的浓度变化，进而调控下游基因的信号输出功能^[41]。基于此原理构建的代谢物生物传感器，通过生物识别元件将目标化合物浓度转化为荧光信号、细胞活性或代谢通路调控等可视化指标，其作用机制类似于微生物体内的精密监测仪表。这类合成生物学工具不仅能实时监测胞内代谢物动态变化，更为代谢工程优化提供了重要技术手段。近年来的研究实践表明，代谢物生物传感器凭借其单细胞水平的精准检测特性，在微生物细胞工厂的智能化改造和动态优化领域展现出显著的应用价值。

1.2.1 生物传感器工作原理

代谢物生物传感器的核心结构由生物识别单元和信号转换单元构成：前者因特定代谢物的作用发生构象改变，后者则负责将这种构象变化转化为可检测的输出信号（如光信号或生理响应）。自然界中存在着多种具有不同作用模式的识别单元，其中以通过蛋白质-DNA 互作调控基因表达的转录因子（TFs），以及直接结合小分子引起 RNA 二级结构改变的核糖开关最为典型。

基于转录（激活、抑制）因子的代谢物生物传感器：这类蛋白通过结合增强子或启动子区域形成复合体，通过激活或抑制 RNA 聚合酶与基因的结合，精确控制转录效果^[42]。当目标代谢物诱导其构象变化时（如解除转录抑制因子的空间阻隔效应），即可将代谢物浓度转化为荧光信号或细胞表型变化。目前 RegTransBase 等数据库已收录 1488 种原核生物转录因子及其结合位点信息，为设计传感器提供了资源基础^[43]。天然转录因子已被成功改造用于检测木糖^[44]、丁醇^[45]、氨基酸类^[43]及辅酶衍生物^[46]等多种物质。值得注意的是，通过工程化改造可突破天然限制，如将 *E.coli* 的阿拉伯糖响应元件 AraC 重塑为特异性识别甲羟戊酸^[47]、四氢嘧啶^[48]等非天然底物的传感器，甚至实现跨物种应用——经改造的甲羟戊酸传感器已成功在 *M.extorquens* 中发挥作用^[49]，显著拓展了这类分子装置的适用范围。

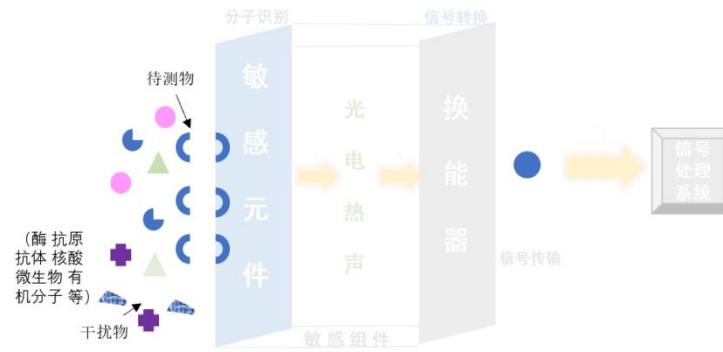


图 1-3 生物传感器原理图

Figure 1-3 Schematic diagram of a biosensor

基于核糖开关的代谢物生物传感器：核糖开关作为位于 mRNA 前导区的顺式 RNA 调控元件，通过效应物诱导的 RNA 二级结构动态调控基因表达：当效应物结合时，其构象变化可触发转录终止或翻译抑制；反之则允许转录延伸或翻译启动^[50, 51]。基于这种构象转换机制，可通过耦联易检测信号基因（如报告基因）构建代谢物传感器。

其他类型的代谢物生物传感器：除转录因子和核糖开关外，多种新型生物识别单元正被引入代谢物传感器的构建中，包括压力响应型启动子^[52]、具有翻译干扰功能的核糖体肽^[53]，以及基于荧光共振能量转移（FRET）原理设计的代谢物感应蛋白系统^[54, 55]等创新组件。这类新型元件的持续开发为代谢工程领域提供了更丰富的传感工具选择，显著拓展了生物传感器的功能边界。

1.2.2 生物传感器的应用

生物传感器驱动的高通量筛选技术：菌株工程化改造常需经历多轮设计-构建-测试循环（DBT 循环）方能确定最优基因组合，但传统检测通量已成为制约合成生物学发展的关键瓶颈^[56]。基于代谢物生物传感器的单细胞检测技术结合流式细胞分选，可将筛选通量提升至 10^9 细胞/天，实现 DBT 循环效率的百万级提升。该技术自 2012 年通过 LysG 转录因子-lysE 启动子系统筛选赖氨酸高产菌株^[57]以来，已拓展至多种应用场景：Lrp 调控元件优化支链氨基酸生产^[58]；DmpR 系统改造有机磷酸酯降解酶活性^[59, 60]；SATRE 策略通过甲羟戊酸传感器实现代谢流重编程^[61]。跨物种适配性研究显示，XylR 元件经改造可在酵母中调控木糖转运^[62]，而 FapR/fapO 系统在真核与原核体系均展现调控优势^[63]。创新检测策略持续涌现：SoxR 转录因子监测 NADPH 代谢平衡^[64]；tnaC 传感器实现色氨酸代谢

双向调控^[65]；双菌系统通过核糖开关将维生素 B2 转化为荧光信号^[66]。这些技术突破为代谢工程提供了从单酶优化到全局网络调控的全方位解决方案。

动态调控：进化筛选策略通过模拟自然选择机制：使基因型差异转化为菌株生存竞争差异，从而富集高产表型。当代谢物生物传感器将产物浓度与生长调控基因偶联时，单轮筛选通量可突破 10^{10} 细胞量级。该策略的典型案例分析包括：2013 年构建的 1-丁醇-TetA 偶联系统，通过 BmoR 转录因子调控四环素抗性实现途径优化^[67]；2014 年整合 MAGE 技术与 TtgR 传感器，结合 TolC 孔蛋白双向筛选使柚皮素产量提升 36 倍^[68]；赖氨酸-OFF 核糖开关通过镍离子敏感性实现高产菌株自然富集^[69]。该技术体系已拓展至真核系统，如利用 MetJ-metO 元件在酵母中建立 SAM 动态调控网络，通过双输入元件筛选使 GAL11 突变株产量提升 7 倍^[70]。这些生长偶联筛选系统为代谢工程提供了自动化进化平台。

代谢工程中，单纯强化合成途径的酶表达往往难以获得最优产量，因过量表达易引发代谢失衡，导致毒性中间体堆积或关键代谢物匮乏^[71]。相较于固定表达调控，基于代谢物生物传感器的动态调控系统可实时响应胞内代谢状态，平衡生长与产物合成。典型案例包括：Ntr 调节器通过乙酰磷酸感知动态优化番茄红素合成，产量提升 18 倍^[71]；FadR 系统耦联酰基辅酶 A 与乙醇代谢，使 FAEE 产量达 1.5g/L^[72]；FapR 负反馈回路有效缓解丙二酰辅酶 A 毒性，在 E.coli 和酵母中分别提升脂肪酸^[73]与 3-羟基丙酸^[74]产量。核糖开关技术亦展现调控潜力，赖氨酸-OFF/ON 开关通过 gltA 动态调节使产量提升 21-63%^[75, 76]。分级调控策略通过时序控制实现代谢分流，如 lux 群体感应系统驱动 TCA 循环向异丙醇合成切换^[77]，或 GAL/PHXT1 双系统协调甲羟戊酸途径提升类胡萝卜素至 1156 mg/L^[78]。压力响应元件进一步扩展调控维度，FPP 敏感启动子通过 PrstA/PgadE 协同使紫穗槐二烯转化率倍增^[79]。这些自适应调控网络为代谢工程提供了精准的代谢流平衡解决方案。

非遗传细胞间异质性选择：细胞间非遗传异质性由蛋白表达随机性引发，导致同一培养体系中不同细胞的生产效率显著分化，形成高产与低效亚群并存的现象，造成代谢资源浪费^[80]。针对此问题，基于转录因子的群体质量控制系统（PopQC）通过持续筛选高产细胞，可显著提升合成效率^[81]。例如：FadR-TetA 偶联系统通过四环素抗性富集高产游离脂肪酸（FFA）菌株，产量提升 3 倍；TyrR

转录因子介导的筛选机制优化了酪氨酸合成。传统代谢工程策略常忽略此类异质性影响，而工业规模下微环境波动会加剧低效细胞对整体效能的限制。因此，将 PopQC 与传统优化手段整合，有望构建兼顾高效生产与成本控制的普适性策略。

1.3 核糖开关的概述

1.3.1 核糖开关的发现

核糖开关是 2002 年耶鲁大学 Breaker 研究小组在细菌中作为一种基于 RNA 的胞内维生素衍生传感器而被发现的^[82]。是天生存在的 RNA 传感器元件，能与一系列小分子代谢物结合并对转录、翻译、剪切、RNA 稳定性实施调控作用，具有高特异性、高敏感型和表达速度快等优点，核糖开关广泛的生化结构和遗传学研究已建立了核糖开关在原核生物、真菌与植物三大生命系统中发挥功能的基本原理，并对开发抗生素，设计新型分子传感器以及将核糖开关整合进合成电路具有重要的指导意义。

1.3.2 核糖开关结构

核糖开关包括两个功能区域^[83]：适体结构域（aptamer domain, AD）和表达结构域（expression domain, EPD），适体结构域特异性的结合目标代谢物后发生构象变化，引起了表达结构域形成选择性的茎环结构，从而引起下游相关基因表达水平的变化。核糖开关一个显著的特点是与适配子的结合不是蛋白质^[84]，而是一些特异性的小分子化合物，如维生素、嘌呤及其衍生物，蛋白辅酶及其相关化合物，氨基酸和被磷酸化的糖类等^[85]。核糖开关特异性的结合特异性小分子配体，通过构象变化调控下游基因表达的 RNA 片段。它可以通过感受周围代谢物浓度的变化从转录和翻译水平上改变其表达量，为维持着机体平衡发挥着重要作用。

核糖开关普遍存在并参与细菌的生物合成、代谢及毒力作用。根据核糖开关的结合代谢类型，大体分为小分子代谢型、离子型、环境敏感型和 tRNA 敏感性。随着不同核糖开关的发现，细菌中可同时存在两种或两种以上的核糖开关，且多种核糖开关之间存在着协同作用，使表达调控作用更加精准。

1.3.3 核糖开关的作用机理

基于调控机制差异，核糖开关可分为三大功能模块：翻译激活型、转录终止抑制型及 mRNA 自剪切型^[86]。研究显示，革兰氏阳性菌多采用转录水平调控系统，而革兰氏阴性菌则偏好翻译水平调控模式，其进化选择机制仍有待阐明^[85]。

翻译激活型中,当配体缺失时,核糖体结合位点(RBS)被锁定于初始构象,导致翻译起始复合物无法正常组装。配体结合后触发构象重排,使RBS序列暴露并与核糖体互作,从而激活基因表达。与之相对,翻译抑制模块通过配体诱导的构象变化遮蔽RBS,典型实例为SAM-II核糖开关对S-甲硫氨酸的响应机制^[87]。值得注意的是,原核生物的RBS区域被定义为SD序列,而真核系统则采用Kozak序列作为识别标志;转录终止抑制型的调控核心在于polyU尾介导的转录终止信号。RNA聚合酶在延伸过程中遭遇此类结构时,其转录活性会被强制终止。该型核糖开关通过配体结合重构RNA二级结构,形成抗终止子构象以维持转录连续性;mRNA自剪切型具有独特的核酶激活特性,配体结合可直接触发RNA链的特定位置切割,导致翻译进程中断。其剪切位点的精确识别依赖于分支序列与5'-3'端识别元件的协同作用。以glmS核糖开关为例,自剪切过程导致mRNA的5'端三磷酸帽结构被水解,暴露的5'羟基基团易受RNase J识别并降解^[88]。值得注意的是,该调控模式目前被证实为真核生物中唯一存在的核糖开关作用途径^[89]。

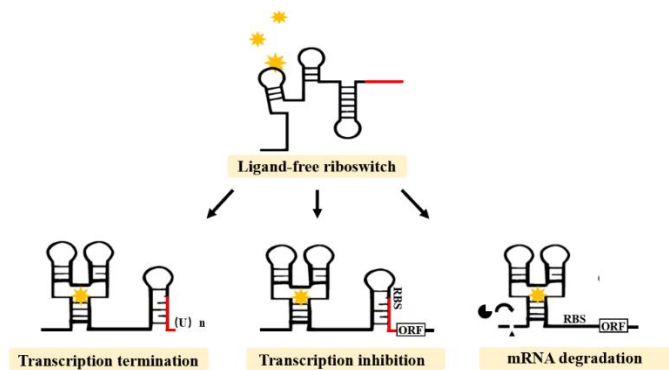


图 1-4 核糖开关的调节机制

Figure 1-4 Regulatory mechanism of riboside switch

1.3.4 核糖开关在生物传感器中的应用

核糖开关作为小分子报告器:核糖体开关可通过基因报告系统监测体内小分子水平并用于生物工程筛选。典型方法是将目标5'-UTR与报告基因(如 β -半乳糖苷酶或GFP)融合,通过蛋白表达水平反映配体浓度变化^[83, 90]。例如,用于维生素B12检测,构建基于btuB操纵子的B12报告系统,发现GFP表达受B12浓度调控^[91]。该系统用于验证类咕啉补救途径功能,并筛选BtuC2D2F转运体关键氨基酸^[92]。通过cdiG信号分子研究,在枯草芽孢杆菌中植入cdiG报告基因,通过流式细胞术完成37种艰难梭菌代谢酶的高通量筛选^[93]。另通过改造GEMM-I核糖开关实现跨物种酶活性检测^[94]。利用酶工程优化来协助茶碱合成:

通过核糖开关-GFP 报告系统筛选获得高活性咖啡因脱甲基酶突变体^[95]。赖氨酸生产：核糖开关调控的抗性基因辅助选择优化菌株，产量提升 10 倍^[96]。利用产物分离策略，构建独立报告菌株（如核黄素敏感型大肠杆菌），与生产菌共培养后通过微反应器+FACS 筛选，获得产能提升 150%的工业菌株^[97]。该技术优势在于无需设计新转录因子即可实现代谢物动态监测与工程优化。

条件基因调控核糖开关：核糖开关可通过外源小分子精准调控基因表达，其应用已从天然代谢物研究扩展至合成生物学与跨物种工程。主要进展包括：跨物种基因调控：优化后核糖开关在大肠杆菌中诱导水平超 300 倍^[98]；工程化茶碱响应系统适用于革兰氏阳性/阴性菌、分枝杆菌^[99]及链霉菌等，达窝链霉菌产生的玫瑰黄素通过同时靶向 FMN 核糖开关和黄素酶产生抗菌效应，其多靶点作用机制可显著降低耐药性发生^[100]。天蓝色链霉菌中辅酶 B12 通过双重机制调控核糖核苷酸还原酶表达，其核糖开关突变可解除转录抑制，且极低浓度 B12 即抑制 NrdJ 缺陷株生长，故证明核糖开关在 RNR 表达平衡及 B12 敏感性中起核心调控作用^[101]。金色链霉菌 TK24 通过整合转录组与蛋白质组数据实现基因组系统性重新注释，揭示其 5'-UTR 中广泛存在核糖开关等顺式调控元件，并证实 26/27 个次级代谢物基因簇在特定条件下活跃表达，为解析核糖开关介导的基因调控网络及次级代谢工程提供了关键分子基础^[102]。灰色链霉菌中甘氨酸核糖开关通过直接结合甘氨酸并解除其 5'UTR 转录终止子对 *gcvTH/gcvP* 操纵子的抑制，增强甘氨酸裂解系统（GCV）的转录延续以介导甘氨酸解毒，突变体因 UTR 缺失丧失甘氨酸响应能力而导致高浓度甘氨酸下生长严重受限，核糖开关通过动态调控 GCV 系统维持甘氨酸代谢平衡的关键作用^[103]。综上所述，链霉菌中的核糖开关通过特异性结合小分子代谢物动态调控基因表达，驱动次级代谢合成、毒素解毒及 DNA 修复等关键功能，其高效调控机制与合成生物学工具开发及新型抗菌药物设计深度关联，成为基础研究与工业应用的核心分子元件；真核适配：酵母中开发四环素/新霉素核开关阻断核糖体扫描^[104-106]；植物/哺乳动物细胞中实现茶碱调控病毒复制^[107, 108]。细胞行为编程运动控制：茶碱响应型 CheZ 蛋白使大肠杆菌定向趋化^[109, 110]；增殖调控：适配体酶系统调节 T 细胞活力（2 倍变化）及酵母/U2-OS 细胞周期^[111-113]；基因功能研究：四环素控制系统实现酿酒酵母必需基因条件敲低（如 NOP8、SEC1）^[114]，或选择性表达显性负突变体（如 *csrA* 调

控自聚集)^[115]。复杂逻辑系统：天然/合成串联核开关构建生化逻辑门，实现多配体协同调控；结合 ON/OFF 开关开发浓度依赖型信号发生器^[116]。其技术优势是无需引入调控蛋白，直接整合至转基因组，支持动态、模块化调控网络构建。

核糖开关工程代谢通量：代谢工程的核心目标是通过改造生物体提升工业/燃料化合物产量，同时需平衡代谢通量与细胞活性。核糖开关因能动态响应代谢物调控基因表达，成为关键工具。例如高产菌株筛选，通过核糖开关报告系统筛选高产酶或菌株。对代谢通路精准调控，直接控制中心代谢酶活性以优化碳流分配。如赖氨酸生产：在谷氨酸棒状杆菌中，将大肠杆菌赖氨酸响应型“关闭开关”插入柠檬酸合成酶基因上游，减少 TCA 循环碳损耗，使赖氨酸产量提高 63%^[117]；强化输出：进一步在天然转运体 lysE 基因前添加工程化“开启开关”，协同提升总产量^[118]。通过动态调节代谢瓶颈节点，避免传统静态改造引发的生长抑制问题。

基于核糖开关的荧光生物传感器：基于核糖开关的生物传感器凭借其高效开发、高特异性及环境适应性优势，正逐步替代传统蛋白质传感器^[119]。其核心优势包括：①RNA 可通过 T7 RNA 聚合酶体外快速合成，加速高通量开发（对比蛋白传感器需复杂工程优化，且 GFP 依赖氧气发色团成熟）^[120]；②适配体天然进化形成的高配体特异性和变构调节能力，可精准区分目标分子（如 SAH 传感器能排除 300 倍过量的 SAM 干扰）^[121]；③基于菠菜染料的荧光系统支持厌氧成像^[40]。应用方面，该类传感器已实现细菌代谢物（如 TPP、SAH）的实时动态监测——例如追踪大肠杆菌 TPP 合成速率^[122]，或高灵敏度检测 SAH 以评估 MTAN 酶抑制效果^[123]；同时还可解析信号分子（cdiG、cdiA、cAG）的功能，如验证古菌中 cdiA 信号活性^[124]，并通过高通量筛选发现新型 Hypr GGDEF 酶，颠覆“GGDEF 仅产 cdiG”的传统认知^[125]。这些案例表明，核糖开关传感器为体内代谢通路解析和酶-信号网络研究提供了实时、高分辨率的强大工具。

1.4 研究意义及内容

1.4.1 研究意义

新霉素主要是由费氏链霉菌发酵生产的氨基糖苷类抗生素，被广泛的用于医药和农业领域。当前全球市场对新霉素类药物的需求呈现持续增长态势，其工业化生产主要依赖于微生物代谢过程。然而现有生物发酵技术仍存在诸多技术缺陷，

这些工艺层面的不足直接影响了产效提升，成为制约行业发展的关键因素。新霉素的合成受限于菌株性能，传统且单一的代谢调控策略不足以快速获得高产新霉素的费氏链霉菌。在传统策略的基础上，科研人员正通过双重路径实现突破：一方面运用基因工程手段对生产菌株进行遗传改良，另一方面系统优化发酵罐内的培养参数。这种综合性的技术革新对于突破现有产能瓶颈具有重要的应用价值。创建响应新霉素的核糖开关生物传感器高通量筛选高产新霉素的菌株是解决上述难题的重要策略，也是应对新霉素产业升级和提高经济效益的重要技术。然而，费氏链霉菌缺乏自适应的 RNA 核糖开关且新霉素和开关之间的构效关系报道较少。

1.4.2 研究内容

本研究针对新霉素 B 高产菌株费氏链霉菌的高通量筛选需求，基于大肠杆菌中已验证的新霉素 B 特异性核糖开关 N1，尝试构建适配于该菌的基因线路型生物传感器。由于费氏链霉菌缺乏内源或外源转录因子对新霉素的特异性响应报道，研究选择核糖开关依赖型传感机制，通过基因线路设计将 N1 元件整合至宿主菌的遗传系统中。具体研究内容包括：首先，设计并构建包含启动子、核糖开关 N1、非编码间隔序列（space）及 eGFP 报告基因的四模块表达元件，通过调整核糖开关与核糖体结合位点（RBS）的间距优化转录调控效率，分析新霉素 B 浓度与荧光信号响应的相关性；同时，针对宿主菌生理特性，采用三因素（琼脂浓度、链霉素浓度、pH 值）正交实验优化平板孢子形成条件，筛选利于菌株代谢活性与传感器功能协同的参数组合。在功能验证中，通过摇瓶发酵监测荧光信号动态变化，探究其与胞内新霉素 B 合成进程的同步性。此外，建立宽域浓度梯度诱导实验，确定核糖开关 N1 在宿主中的线性响应范围，并探索发酵过程中菌丝聚集、培养基成分等因素对信号检测的潜在影响。研究旨在开发一种基于核糖开关-基因线路联用的传感系统，为费氏链霉菌新霉素 B 合成途径的动态监测与高产菌株筛选提供技术方法。

第二章 新霉素核糖开关重组菌株的构建

2.1 引言

新霉素 B 作为广谱氨基糖苷类抗生素，在医疗与畜牧领域具有不可替代的应用价值。当前工业化发酵生产过程中普遍存在目标产物纯度低、副产物累积等问题，亟需通过代谢工程手段开发高产菌株。近年来，合成生物学技术的突破为微生物代谢产物的高效筛选开辟了新途径，其中核糖开关凭借其直接感知小分子并调控基因表达的特性，成为构建生物传感器的关键元件。然而，天然核糖开关在灵敏度和特异性方面仍存在局限，难以满足工业化筛选对检测性能的严苛要求，这驱动着研究者通过分子设计与元件重构实现性能优化。

本研究聚焦于新霉素 B 特异性核糖开关的分子识别机制，通过对多种候选核糖开关进行系统性分析，发现核糖开关 N1 展现出独特的空间构象特征。相较于其他同类型元件，其配体结合域在分子对接过程中表现出更优的结合亲和力与构象变化能力，为后续工程化改造奠定了理论基础。基于此，研究团队创新性地构建了集成启动子、核糖开关 N1 及调控元件的复合表达单元 $\text{ermE}^\#$ 。在构建人工合成启动子 $\text{ermE}^\#$ 时，新霉素 B 通过特异性结合核糖开关 N1 触发其发夹结构解旋，进而调控下游 eGFP 报告基因的表达。值得注意的是，基因线路中调控元件的空间排布直接影响传感器性能：在初始构建的菌株中，由于核糖开关 N1 的茎环结构与 RBS 区域空间距离过近。当新霉素 B 诱导发夹结构展开时，RNA 聚合酶的庞大体积与残留茎环结构产生空间位阻，导致 RBS 结合位点被部分遮蔽，造成核糖体识别效率下降，降低基因线路的灵敏度与特异性。通过引入特定设计的间隔序列延长核糖开关 N1 下游结构域，使 RBS 位点完全暴露于转录复合物作用范围，该优化策略成功提升了核糖体结合效率，使生物传感器的信号响应幅度实现显著增强。

本研究通过分子元件优化与基因线路重构，致力于开发高灵敏度新霉素 B 生物传感器体系，为费氏链霉菌的定向进化筛选提供了新型工具。

2.2 实验材料

2.2.1 菌株和质粒

表 2-1 实验菌株

Table 2-1 Experimental strain

质粒/菌株	描述	来源
菌株		
<i>DH5α</i>	同于制作感受态细胞	实验室保藏
ET12567 (pUZ8002)	含有 pUZ8002 质粒的去甲基化菌株用于与放线菌的结合转移	实验室保藏
<i>E. coli</i> (puc57-N1-eGFP)	含有 N1-eGFP 片段的载体菌	公司合成
<i>S. fradiae</i> SF-2	ARTP 诱变获得高产菌	实验室保藏
<i>E. coli</i> ET12567/pPR-N1-space-eGFP	含有 pPR-N1-space -eGFP 质粒的 <i>E. coli</i> ET12567	本论文构造
<i>E. coli</i> ET12567/pPR-N1-eGFP	含有 pPR-N1-eGFP 质粒的 <i>E. coli</i> ET12567	本论文构造
<i>E. coli</i> ET12567/pPR-eGFP	含有 pPR-eGFP 质粒的 <i>E. coli</i> ET12567	本论文构造
<i>SF/pPR-N1-eGFP</i>	含有 pPR-N1-eGFP 质粒的 <i>E. coli</i> ET12567	本论文构造
<i>SF/pPR-N1-space-eGFP</i>	含有 pPR- N1-space-eGFP 质粒的 <i>S. fradiae</i> SF-2	本论文构造
<i>SF/pPR-eGFP</i>	含有 pPR-eGFP 质粒的 <i>S. fradiae</i> SF-2	本论文构造
质粒		
pPR(pSET152-PermE*-RBS)	表达质粒	实验室保藏
pPR-N1-eGFP	用来表达 N1-eGFP 的质粒	实验室保藏
pPR-N1-space-eGFP	用来表达 N1-space-eGFP 的质粒	实验室保藏
pPR-eGFP	用来表达 eGFP 的质粒	实验室保藏

2.2.2 实验试剂

表 2-2 实验试剂

Table 2-2 Experimental reagent

试剂名称	试剂规格	生产厂家
高保真 DNA 聚合酶(2 × Phanta Max Master Mix)	BR	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
同源重组酶 C115 (ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit C115)	BR	南京诺唯赞生物科技股份有限公司

续表 2-2

试剂名称	试剂规格	生产厂家
卡那霉素	AR	生工生物工程(上海)股份有限公司
甲氧苄啶	AR	生工生物工程(上海)股份有限公司
安普霉素	AR	生工生物工程(上海)股份有限公司
氯霉素	AR	生工生物工程(上海)股份有限公司
细全基因组提取试剂盒		生工生物工程(上海)股份有限公司
质粒提取试剂盒		生工生物工程(上海)股份有限公司
胶回收试剂盒		生工生物工程(上海)股份有限公司
Glu red 染料		生工生物工程(上海)股份有限公司
甲醇	HPLC	上海沃凯药业有限公司
乙腈	HPLC	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
无水乙醇	AR	中国医药集团有限公司
氯甲酸苄甲酯	AR	中国医药集团有限公司
硼酸	BC Grade	生工生物工程(上海)股份有限公司
硼砂	BC Grade	生工生物工程(上海)股份有限公司
甘氨酸	AR	中国医药集团有限公司
新霉素标准品		新宇药业股份有限公司

卡那霉素（Kan）溶液：称取 0.5 g 卡那霉素，溶解于无菌水中，然后定至 10 mL，再用 0.22 微米滤膜过滤。

安普霉素（Apr）溶液：称取 0.5 g 安普霉素，溶解于无菌水中，然后定容至 10 mL，再用 0.22 微米滤膜过滤。

氯霉素（Cm）溶液：称取 0.5 g 氯霉素，溶解于无菌水中，然后定容至 10mL，再用 0.22 微米滤膜过滤。

氨苄青霉素（Amp），称取 0.5 g 氨苄青霉素，溶解于无菌水中，然后定容至 10 mL，再用 0.22 微米滤膜过滤。

甲氧苄啶溶液：取 0.5 g 甲氧苄啶溶解于二甲基亚砷中，定容至 10 mL，再用 0.22 微米滤膜过滤。

2.2.3 实验仪器

表 2-3 实验仪器

Table 2-3 Experimental instrument

仪器	生产厂家
振荡培养箱	上海知楚仪器有限公司
生化培养箱	上海知楚仪器有限公司
超声清洗器	合肥金尼克医疗器械有限公司
数显恒温水浴锅	上海一恒科学仪器有限公司
高效液相色谱仪	岛津公司

续表 2-3

仪器	生产厂家
PCR 仪	杭州朗基科学仪器有限公司
核酸电泳仪	北京六一生物科技有限公司

2.2.4 培养基

LB 培养基 (g/L)：胰蛋白胨 10，酵母粉 5，NaCl 10，pH 7.0。

YEME 培养基 (g/L)：蔗糖 103，酵母粉 3，葡萄糖 10，蛋白胨 5，麦芽粉 3，pH 7.0。

MS 培养基 (g/L)：蛋白胨 3，葡萄糖 10，玉米浆 3，牛肉膏 1，NaCl 5，琼脂 20，pH 7.3~7.8。

发酵培养基：碳源采用可溶性淀粉 70 g/L 与葡萄糖 20 g/L 配体系，辅以玉米浆 (2.5 g/L) 提供生长因子；氮源由花生饼粉 28 g/L、中温豆饼粉 5 g/L、酵母粉 6 g/L、胰蛋白胨 9 g/L 复合供给，另添加硫酸铵 6 g/L 强化氮素；无机盐体系包含 NaCl 4.5 g/L、磷酸氢二钠 0.4 g/L 和碳酸钙 4 g/L 维持渗透压及缓冲能力，豆油 3 g/L 作为消泡剂；特别添加高温淀粉酶 0.3 g/L 促进多糖分解。培养基灭菌后 pH 调控至 6.8-7.3 范围使用。

2.3 实验方法

2.3.1 重组菌株的构建

2.3.1.1 人工合成响应新霉素的启动子元件 *ermE*[#]-1 的菌株构建

本研究构建 N1 新霉素核糖开关传感器的阅读框，启动子 *ermE*[#]-1 为核糖开关线性载体质粒 pPR 的原始启动子 *ermE*^{*}、N1 核糖开关、RBS 结合位点和 eGFP 与终止子等元件组合在一起构成完整的阅读框。

基于大肠杆菌对密码子的偏爱性和简并性重新设计从文献中得到的人工合成的最小的核糖开关 N1 序列 (CCGACGAACAGGAAATTACCAGGTCAG)。依据模板基因 pPR 序列设计的正反引物。以合成质粒 puc57-N1-eGFP 为模板设计引物。

表 2-4 PCR 引物序列

Table 2-6 PCR primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')
N1-F	GCCGGTTGGTAGGATCCAGCGTCTAGACCGACGAAC
N1-R	GATTACGAATTTCGATATCTCAGTACTTGTACAGCTCGTCC

基因 N1 的聚合酶链式反应扩增得平末端

表 2-5 PCR 反应体系
Table 2-5 System of PCR reaction

成分	体积 (μl)
引物 F	1
引物 R	1
pUC 57 模板	1
primer star max	10
dd H ₂ O	7

以克隆质粒 pUC 57 为模板,在合适的反应体系和条件下(表 2-4 and 2-5) 用正反引物 PCR 得到平末端基因 N1-eGFP 序列。用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 扩增产物并回收 N1-eGFP 基因。

提取质粒 pPR 并用 *Bam*HI 和 *Eco*RV 酶切后回收得到线性片段

用含 50 μg/mL 的 Apramycin 培养在含 2%琼脂的 LB 上划线获得 pset152 单菌落,在培养箱中 37°C 培养 12-18 h。挑取长势良好的单菌落于 LB 中,200 rpm,37°C培养 4-8 h, 然后提取质粒 pPR。在表 2-6 的酶切体系下, 1%的琼脂糖凝胶电泳验证并回收线性片段。

表 2-6 BamHI 和 EcoRV 酶切反应体系
Table 2-6 System of digestion of BamHI and EcoRV

成分	体积 (μl)
pset152 质粒	13
BamHI	1.5
EcoRV	1.5
Buffer R	2
37°C孵育 3h	

一步克隆构建重组 ET12567(DH5a (pPR-N1-eGFP))

在合适的同源重组体系和反应条件下(表 2-7), 将线性载体片段和目的基因 N1-eGFP, 通过同源重组原理获得表达质粒 pPR-N1-eGFP, 进而转化到感受态 DH5a 中; 筛选得到重组子后, 挑取长势良好的菌落, 重新活化后提取表达质粒 pPR-N1-eGFP, 将质粒转化到感受态 ET12567 中。

表 2-7 重组大肠杆菌的构建
Table 2-7 Construction of strain *E. coli* DH5a (pPR-N1-eGFP)

成分	体积 (ul)
Pset152 载体	5
No-space-EGFP	2
重组酶	10
ddH ₂ O	3
50°C反应 20min	

接合转移到费氏链霉菌

接合转移供体制备:挑取经过平板活化的 *E.coli* ET12567(pPR -N1-EGFP)新鲜单菌落,接种于 5 mL 含 50 ug/mL Apr、25 ug/mL Km、25 ug/mL Cm 的 LB 液体培养基中,37 °C、200 rpm 培养过夜,按 1:100 的比例转接到含相同抗生素的 100mLLB 液体培养基中,同等条件下培养至 OD600 为 0.4-0.6,离心收集菌体,无菌生理盐水洗涤两次后控制菌浓为 108 cfu/mL,悬浮备用。

接合转移受体制备:在费氏链霉菌于固体平板上划线培养 7~9 d,待孢子成熟,用适量的 YEME 液体培养基进行冲洗,并用无菌玻璃珠将冲洗液充分振荡打散,再通过使用 8 层纱布过滤除去菌丝,得到孢子悬浮液,控制孢子悬浮液浓度为 108 cfu/mL。

接合转移基础方法:将制备好的费氏链霉菌孢子悬浮液于 50 °C 热激 10min,37 °C 、 200 rpm 预培养 3 h 。再取 500μL 备用的 *E.coli* ET12567(pPR-N1-EGFP)菌悬液与 500 μL 热激后的费氏链霉菌孢子悬浮液混合,之后通过 4000 rpm 离心 5 min,弃去大部分上清,用残留液悬浮菌体后涂布于 MS 固体平板上,于 30 °C 培养 16 h 后用含 50 ug/mL Apr 和 500 ug/mL NA 的抗生素水。溶液覆盖平板,继续于 30 °C 培养 2~3d 长出接合子得到 SF/pPR-N1-eGFP。

2.3.1.2 人工合成响应新霉素的启动子元件 *ermE*#-2 的菌株构建

作为对照组,本次实验设计了包含启动子 *ermE**、eGFP 和 RBS 结合位点与终止子的表达框。将已知的 pPR-N1-EGFP 核糖开关 N1 的 27 个碱基序列删掉,并重新利用 snapgene 设计引物。

表 2-8 PCR 引物序列
Table 2-8 PCR primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')
GFP-F	AGGACCCCAggatccgcATGGTGAGCAAGGGCG
GFP-R	tgattacgaattcgatTCAGTACTTGTACAGCTCG

基因 N1 的聚合酶链式反应扩增得平末端(同上)

提取质粒 pPR 并 *NotI* 和 *EcoRV* 酶切后回收得到线性片段 (同上)

一步克隆构建重组 *E. coli* ET12567(DH5a (pPR-EGFP) (同上)

接合转移到费氏链霉菌得到 SF/pPR-eGFP (同上)

2.3.1.3 重组菌株灵敏度和特异性的探究

将 SF/pPR-N1-eGFP 和 SF/pPR-eGFP 重组菌株单菌落孢子接入 YEME 种子

培养基，置于 35℃，220 rpm 的恒温恒湿摇床培养，参考原始菌株 SF-2，取 48 h 的菌液，洗涤后重悬使用激光共聚焦图成像菌株的荧光状态。

挑取 SF/pPR-N1-eGFP 和 SF/pPR-eGFP 重组菌株单菌落孢子接于 YEME 培养基培养至对数生长期，按 1% 的接种量接种于 30 mL/250 mL 发酵培养基的锥形瓶中，在恒温恒湿摇床中发酵 4 d，取发酵液洗涤后成像菌株荧光状态。

2.3.1.4 人工合成响应新霉素的启动子元件 ermE# 的菌株构建

表 2-9 PCR 引物序列

Table 2-9 PCR primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')
space1-F	ACTCCACAGGAGGACCC
space2-F	TCTAGACCGACGAACAGGAAATTACCAGGTCAGACTCCACAGGAGGAC
space3-F	GCCGGTTGGTAGGATCCAGCGTCTAGACCGACGAAC
space-R	gattacgaattcgatataTCAGTACTTGTACAGCTCGTCC

经文献证实，在核糖开关后添加一段碱基可以增加附近的结构灵活性。结构变化的影响可以增强 RBS 位点与 RNA 聚合酶的结合，故本研究设计在 N1 核糖开关后添加一段 14 个碱基的无义基因，将其导入同一受体菌 SF-2，探究是否对其灵敏度和特异性有正向作用。

重新利用 snapgene 设计引物，首先以 pPR-N1-EGFP 为模板，扩增后以上一级产物为模板并反复三次。

提取质粒 pPR 并 *Bam*HI 和 *Eco*RV 酶切后回收得到线性片段(同上)

一步克隆构建重组 *E. coli* ET12567(DH5a (pPR-N1-space-EGFP) (同上)

接合转移到费氏链霉菌得到 SF/pPR-N1-space-eGFP (同上)，将其命名为 SF-N。

2.3.2 重组菌株摇瓶发酵验证

将三株重组菌株和原始菌株单菌落孢子接种于 YEME 液体培养基中进行 40h 预培养。随后将菌液转移至发酵培养基，在恒定温湿度参数 (35℃/75% RH) 控制下维持 7 天发酵周期。发酵终止后，取 1 mL 样本经 8000 rpm 离心力处理 8 分钟，所得上清液按 1:50 体积比用无菌水稀释后进行 HPLC 分析。摇瓶发酵体系参数设置为：250 mL 锥形瓶装载 30 mL 培养基，1% 接种量，控制摇床运行参数为 220 rpm 转速配合恒温恒湿环境。

2.3.3 新霉素含量测定

新霉素 B 效价测定采用柱前衍生高效液相色谱法 (HPLC)，高效液相色谱仪为岛津 LC10ATVP^[126]，以 95: 5=乙腈: 水为流动相，检测器为 SPD-10Avp(UV—VIS)及柱温箱的设置为 24℃。

(1) 标准曲线构建：精密称定新霉素标准品，用无菌水配制 500 U/mL 母液。通过梯度稀释法制备 0-400 U/mL 浓度梯度（间隔 80 U/mL），各取 360 μ L 置避光离心管进行衍生化。反应体系依次注入等体积乙腈、pH 8.0 硼酸盐缓冲液及 8 mM FMOC-Cl 溶液，避光条件下室温衍生 15 分钟后，加入 72 μ L 甘氨酸终止液（0.1 M），经涡旋振荡 30 秒充分混匀。最终样品经 0.22 μ m 有机滤膜过滤后进样分析。

(2) 效价定量分析：待测样品经离心处理获得上清液，按 1:49 体积比例稀释后参照标准流程执行衍生化操作。通过 HPLC 测定特征色谱峰面积，采用外标法结合标准曲线方程计算新霉素 B 生物效价。

2.4 结果与讨论

2.4.1 理论分析对新霉素有响应的开关

基于对 N1 核糖开关序列的同源性，另筛选到了 7 个新霉素核糖开关，使用 Autodock Vina 软件对 8 个核糖开关与 neomycin 小分子进行对接。新霉素核糖开关的碱基序列如表 2-10 所示；新霉素核糖开关与新霉素配体的分子对接示意图如图 2-1 所示。

表 2-10 筛选后的新霉素核糖开关序列

Table 2-10 Neomycin riboswitch aptamers after screening	
名称	序列
Aptamer1	GCCGACCGGGAGGCGTGCGGCCTG
Aptamer2	GGCGCCCAACGCGTCGACAAGGAGA
Aptamer3	CCGGCGAACCGGCTGTACGCCCCGC
Aptamer4	CTCGACGACTACGCCAAGGCCCTGG
Aptamer5	CGTGCCCCTGGCGCTGCTGGAGGAG
Aptamer6	GCCAACCAGGAGTTCAACAACCTCGC
Aptamer7	GCCGCCGACGTGGTCCGCTTCGGCG
Aptamer8 (N1)	CCGACGAACAGGAAATTACCAGGTCAG

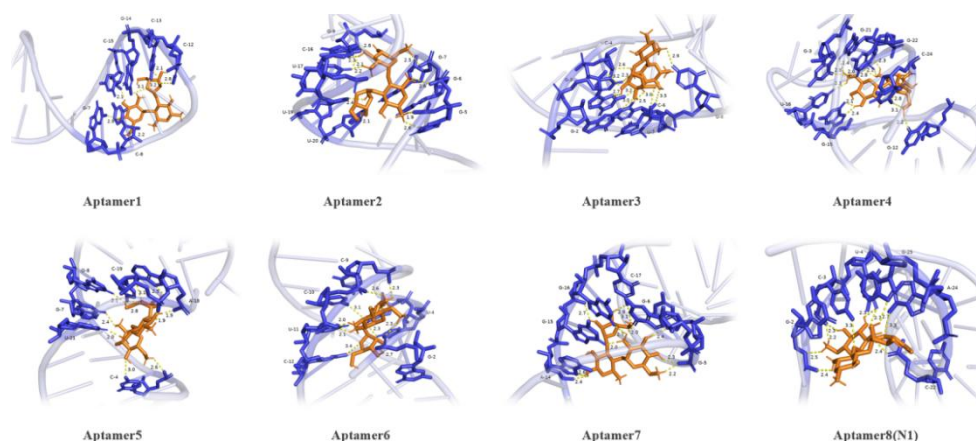


图 2-1 适体与新霉素分子对接 3D 图

Figure 2-1 3D diagram of aptamer docking with neomycin molecule

如表 2-11 所示, 通常情况下结合能越小, 结合作用越好: 结合自由能 < -7.0 kcal/mol: 具有较强结合, 蛋白质和配体之间的相互作用较为稳定。 -7.0 kcal/mol $<$ 结合自由能 < -4.0 kcal/mol: 结合作用中等, 蛋白质和配体之间有一定的相互作用。 -4.0 kcal/mol $<$ 结合自由能: 配体和受体结合作用较差。由此可知, N1 与新霉素之间的相互作用较好。

表 2-11 各新霉素核糖开关与新霉素对接的最低结合能

Table 2-11 The minimum binding energy of each aptamer to neomycin

序号	最低结合能(kcal/mol)
Aptamer 1	-7.2
Aptamer 2	-7.9
Aptamer 3	-7.4
Aptamer 4	-7.5
Aptamer 5	-8
Aptamer 6	-7.7
Aptamer 7	-7.9
Aptamer 8	-9

新霉素核糖开关的自由形式以构象集合的形式存在, 包括在环境温度下占主导地位的开放形式和在较低温度下普遍存在的具有额外碱基配对相互作用的更紧凑的形式。开放形式的特点是一个非结构化的末端六环, 由一个带有两个 C:G 碱基对的短螺旋、一个内部不对称环和一个较长的末端螺旋闭合(图 2-1, Aptamer8)。在紧凑的构象中, 存在三个额外的碱基对(G9:C22, U10:U21 和 U13:U18)和一个折叠的标准 u 型旋转基序(U14, U15 和 A16), 并且在 G5:C23 和 G9:C22 碱基对之间观察到一个连续的 a 型螺旋, 在螺旋间堆叠相互作用, 留下一个小的内部凸起的三个核苷酸(C6-U8)。这种紧凑的构象非常类似于 RNA 的配

体结合状态。自由态紧致构象与束缚构象的结构相似性强烈表明配体通过构象选择机制与自由态紧致构象结合，并进一步使其稳定^[127]。

2.4.2 重组菌株质粒构建

2.4.2.1 目的基因的 PCR 扩增

为了进一步验证基因线路构建结合新霉素的费氏链霉菌核糖开关重组菌株，本文通过在底盘费氏链霉菌 SF-2 中得到的 3 株重组菌株，并结合绿色荧光蛋白对重组菌株比较表征和摇瓶发酵研究其对于新霉素产量的影响。首先设计对应其相应片段的扩增引物，利用高保真酶 2×PrimeSTAR Max DNA Polymerase 获得所需核糖开关的目标 DNA 片段。而后使用 DNA 胶回收试剂盒回收得到纯化的基因片段，-20℃保存备用。各个启动子元件的示意图如图 2-2 所示，其 DNA 凝胶电泳图如图 2-3 所示，核糖凝胶电泳检测图泳道 1-5 在 500-1000 bp 处有条带，这与基因片段 SF-N 801 bp、SF/pPR-N1-eGFP 787 bp 和 SF/pPR-eGFP 723 bp 相吻合。

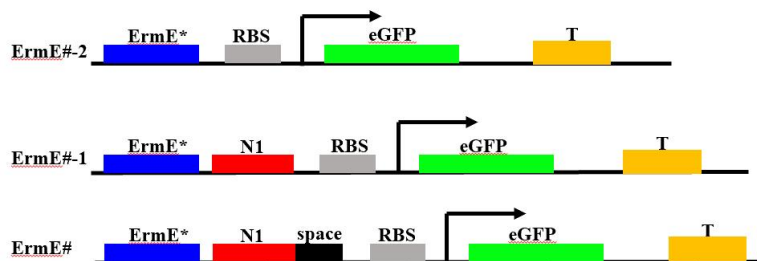


图 2-2 重组菌株启动子元件示意图

Fig 2-2 Schematic diagram of the original promoter of the recombinant strain

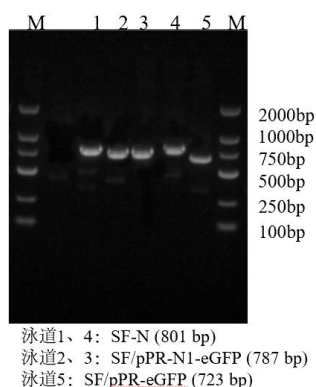


图 2-3 目的基因的 PCR 扩增凝胶电泳图

Figure 2-3 PCR amplification gel electropherogram of the target gene

刮取少量重组菌株接合子至 1.5 ml EP 管，并加入 100 μ L 无菌水并放入金属浴煮沸 10 分钟后用离心机 12000 rpm 条件下离心 5 min。以上清液当模板，使

用相应引物进行 PCR 验证，如图 2-4 所示。大小与预期一致，表明重组质粒均已成功导入费氏链霉菌 SF-2 中。

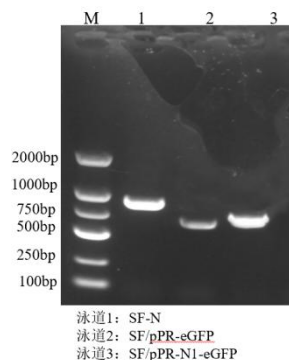


图 2-4 重组菌株接合子的菌落 PCR 凝胶电泳图

Figure 2-4 Electropherograms of colony PCR gel of the conjugators of the recombinant strain

2.4.2.2 启动子元件 *ermE*[#]-1、*ermE*[#]-2 菌株灵敏度和特异性的验证

如图 2-5, a 为 SF/pPR-N1-eGFP 培养 48h 的种子液激光共聚焦显微镜的成像图, c 为发酵 96h 的激光共聚焦显微镜的成像图; b 为 SF/pPR-eGFP 培养 48 h 的种子液激光共聚焦显微镜的成像图, d 为发酵 96h 的激光共聚焦显微镜的成像图。其中保证种子液成像下的激光共聚焦功率及电压设置保持一致, 发酵液成像下的激光共聚焦功率及电压设置保持一致。由图的明亮程度得知实验组 SF/pPR-N1-eGFP 无论是种子液还是发酵液中的荧光强度明显低于对照组 SF/pPR-eGFP, 不符合我们设计实验的预期效果。故我们尝试增加 space 碱基, 探究其序列是否能够使重构的 SF-N 灵敏性和特异性增强。

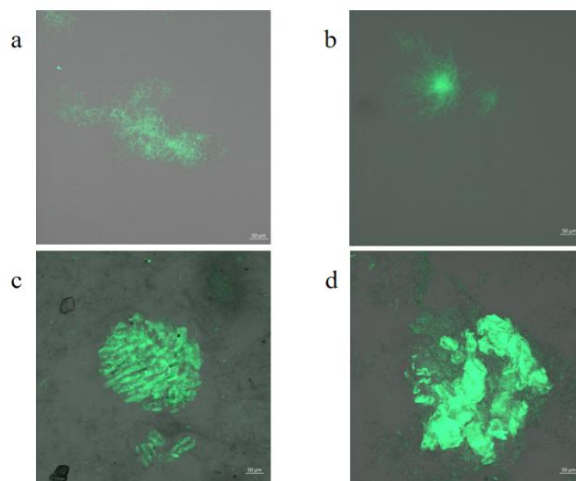


图 2-5 重组菌株在种子和发酵液中的激光共聚焦图

a SF/pPR-N1-eGFP 在 48 h 时种子液的激光共聚焦图; b SF/pPR-eGFP 在 48 h 时种子液的激光共聚焦图; c SF/pPR-N1-eGFP 在 96 h 时发酵液中的激光共聚焦图; d SF/pPR-eGFP 在 96 h 时发酵液中的激光共聚焦图

Figure 2-5 Laser confocal images of the recombinant strains in the seed culture and fermentation

broth. a. Laser confocal image of the seed culture of SF/pPR-N1-eGFP at 48 h; b. Laser confocal image of the seed culture of SF/pPR-eGFP at 48 h; c. Laser confocal image of the fermentation broth of SF/pPR-N1-eGFP at 96 h; d. Laser confocal image of the fermentation broth of SF/pPR-eGFP at 96 h.

如图 2-6 为启动子元件 $ermE\#-1$ 和 $ermE\#$ 在有无新霉素配体下的设计原理图, 图 a 显示核糖开关 N1 的茎环结构与 RBS 区域空间距离过近。当新霉素 B 诱导发夹结构展开时, 大体积的 RNA 聚合酶与残留茎环结构产生空间位阻, 导致 RBS 结合位点被部分遮蔽, 结合效率下降。引入 space 序列延长核糖开关 N1 下游结构域, 使 RBS 位点完全暴露于转录复合物作用范围, 在理论上可以提升了 RNAP 结合效率, 使生物传感器的信号响应增强。

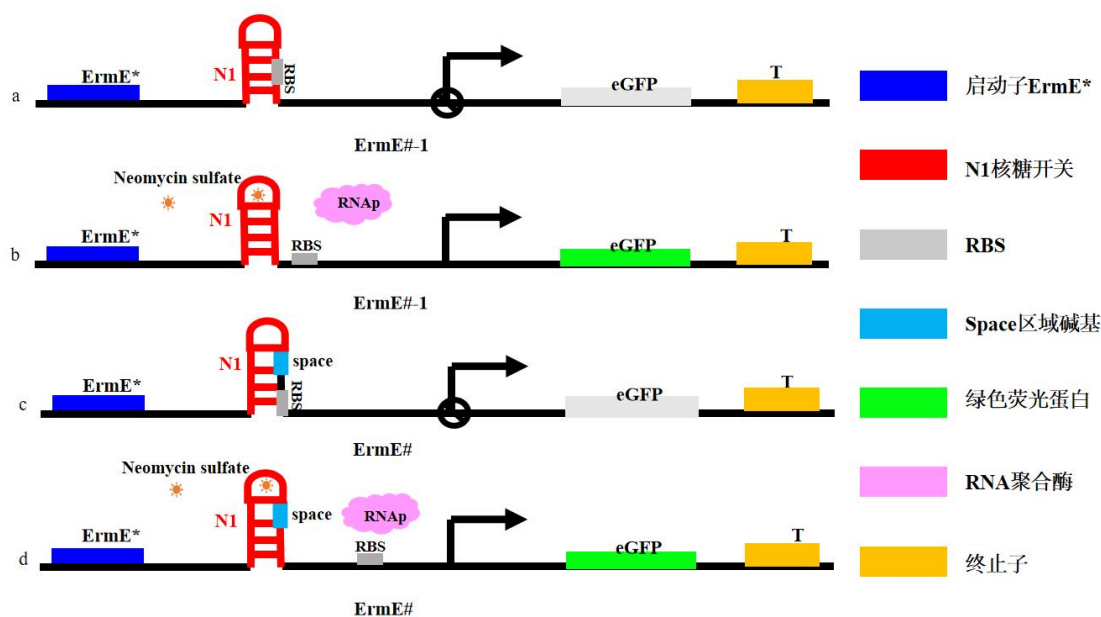


图 2-6 启动子元件 $ermE\#-1$ 、 $ermE\#$ 的设计原理

Figure 2-6 Design principles of promoter components $ermE\#-1$ and $ermE\#$

2.4.2.3 重组菌株的摇瓶发酵验证

将构建的三株重组菌株和原始菌株进行摇瓶发酵并测定新霉素产量, 结果显示相对于出发菌株 SF-2, 三株重组菌株经摇瓶发酵七天之后, 测定的新霉素产量达到了 7943 U/mL、6849 U/mL 和 7029 U/mL, 相对于 SF-2 分别提高了 20%、3.5%和 6.3%如图 2-7。相对于 SF-N, SF/pPR-N1-eGFP、SF/pPR-eGFP 对于新霉素 B 发酵效价提升不明显。这部分结果说明, 核糖开关 N1 对费氏链霉菌新霉素的发酵调控可能发挥着重要的作用, 且通过两组实验证明, 带有启动子元件 $ermE\#$ 的重组菌株 SF-N 与新霉素 B 的响应灵敏度和特异性更强, 符合设计实验的初衷。如图 2-7。

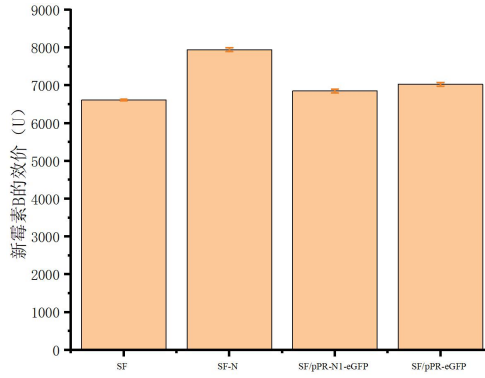


图 2-7 重组菌株摇瓶发酵效价

Fig.2-6 Shake flask fermentation titer of the recombinant strain

2.5 本章小结

本章以新霉素特异性核糖开关的启动子元件设计为核心，通过理性筛选与系统优化构建了高效生物传感系统。首先基于同源序列分析筛选获得 8 个候选核糖开关，其中 N1 核糖开关展现出最优结合特性：分子对接结果显示其与新霉素 B 的结合自由能最低，显著优于其他候选元件。其特有的 G9:C22 碱基对和 U 型旋转基序为配体识别提供了结构基础，符合构象选择结合机制^[155]。

构建了集成启动子、核糖开关 N1、space 碱基域及 eGFP 的四模块表达元件 ermE[#]。该系统中，新霉素 B 通过特异性结合触发核糖开关 N1 发夹结构解旋，动态调控下游 GFP 报告基因表达，构建了配体浓度-基因表达响应的逻辑关联。

在基因线路工程化设计中，调控元件的空间排布被证实为影响传感器性能的关键因素。初始构建的不含 space 的重组菌株 SF/pPR-N1-eGFP 中，核糖开关 N1 与 RBS 区域因间隔序列缺失导致空间排布过密。新霉素 B 诱导的结构展开引发 RNA 聚合酶与残留茎环结构产生空间位阻，造成 RBS 位点暴露不足，显著削弱核糖体识别效率，表现为荧光信号强度较对照组明显降低。通过引入特异性设计的 14 bp 非编码间隔序列 space 对元件间距进行优化后，重组菌株 SF-N 的 RBS 位点得以充分暴露于转录复合物作用界面，核糖体结合效率显著提升，成功实现信号响应能力的系统性增强。摇瓶发酵验证进一步表明，优化后的重组菌株 SF-N 新霉素效价较原始菌株 SF-2 提高 20%。

该研究通过分子对接预测、结构域优化与基因线路迭代设计，建立了高灵敏度新霉素 B 生物传感器体系。不仅为费氏链霉菌高产菌株的高通量筛选提供了新型工具，更通过揭示核糖开关动态构象调控与基因线路空间适配的协同机制，对推动费氏链霉菌生物传感器使用的升级具有重要理论与实践价值。

第三章 新霉素核糖开关费氏链霉菌菌株的表征

3.1 引言

新霉素作为氨基糖苷类抗生素的重要成员，其工业化生产高度依赖于费氏链霉菌的次级代谢调控网络。近年来，核糖开关因其能够特异性结合小分子代谢物并直接调控基因表达的特性，成为优化放线菌次级代谢工程的重要工具。本研究基于特异性结合新霉素 B 的核糖开关 N1 和基因线路原理，构建了能够响应新霉素 B 的生物传感器：通过理性设计将 N1 核糖开关与翻译终止元件耦联。当新霉素 B 与 N1 结合时，其发夹结构解旋，解除对下游报告基因 eGFP 的翻译抑制，从而实现荧光强度与胞内新霉素浓度的正相关响应。本研究将该重构核糖开关整合至费氏链霉菌基因组中，旨在建立一种基于荧光报告系统的实时监测平台，以动态解析新霉素生物合成与菌株代谢状态的耦合关系。为实现这一目标，需对重组菌株的表型特征进行多维度系统评价，包括生长动力学、荧光响应灵敏度及发酵代谢产物的时空分布规律。

本研究将增强型绿色荧光蛋白（eGFP）作为报告基因与核糖开关耦联，利用荧光信号强度实时反映胞内新霉素合成水平。为验证该荧光报告系统的可靠性，本文从生长特性、代谢响应、信号特异性三个维度构建多层次评价体系：（1）重组菌株生理特性解析：通过联用生长曲线与细胞干重测定，量化菌株增殖动力学差异，结合对数期菌体激光共聚焦显微成像，建立荧光基线数据；（2）发酵代谢动态监测：在 7 天摇瓶发酵周期内，同步追踪胞内/胞外荧光强度与新霉素效价变化，利用平行实验设计消除连续取样误差，并通过玻璃珠分散策略克服菌丝聚集对光学信号采集的干扰；（3）信号通路特异性验证：采用两阶段梯度浓度外源新霉素诱导实验，解析核糖开关剂量-响应关系，同时通过种子液阶段连续破碎取样，阐明内源代谢物积累与荧光信号的时间关联性。上述多尺度表征策略不仅确保实验数据的生物学可重复性，更为核糖开关调控网络与新霉素合成代谢的互作机制研究提供方法学范式。

3.2 实验材料

3.2.1 菌株

本章使用菌株见 2.2.1

3.2.2 实验试剂

表 3-1 实验试剂

Table 3-1 Experimental reagent

试剂名称	试剂规格	生产厂家
甲醛	AR	中国医药集团有限公司

注：未列出与前面章节重复试剂

3.2.3 实验仪器

表 3-2 实验仪器

Table 3-2 Experimental instrument

实验仪器	生产厂家
荧光分光光度计	日立
超声破碎仪	Bio-Rad Laboratories
冷冻高速离心机	美国 DLAB
电热恒温鼓风干燥箱	上海医疗器械厂有限公司
蔡司 LSM 900 激光共聚焦显微镜	德国蔡司
全波长酶标仪	Thermo Fisher
涡旋振荡器	Lab Companion

注：未列出与前面章节重复仪器

3.2.4 培养基

LB 培养基 (g/L)：胰蛋白胨 10，酵母粉 5，NaCl 10，pH 7.0。

YEME 液体培养基 (g/L)：蔗糖 103，酵母粉 3，葡萄糖 10，蛋白胨 5，麦芽粉 3，pH 7.0。

MS 固体培养基 (g/L)：蛋白胨 3，葡萄糖 10，玉米浆 3，牛肉膏 1，NaCl 5，琼脂 20，pH 7.3~7.8。

发酵培养基 (g/L)：碳源采用可溶性淀粉 70 与葡萄糖 20 配体系，辅以玉米浆 (2.5) 提供生长因子；氮源由花生饼粉 28、中温豆饼粉 5、酵母粉 6、胰蛋白胨 9 复合供给，另添加硫酸铵 6 强化氮素；无机盐体系包含 NaCl 4.5、磷酸氢二钠 0.4 和碳酸钙 4 维持渗透压及缓冲能力，豆油 3 作为消泡剂；特别添加高温淀粉酶 0.3 促进多糖分解。培养基灭菌后 pH 调控至 6.8-7.3 范围使用。

3.3 实验方法

3.3.1 重组菌株生长特性及荧光强度分析

挑取重组菌株及其原始菌株单菌落孢子接入 YEME 种子培养基,置于 35℃, 220 rpm 的恒温恒湿摇床培养,每隔 10 h 取样 2 ml 测定 OD 值后 12000 rpm 离心 10 min,弃上清,将沉淀置于 80℃的烘箱中过夜烘干,检测其干重。确定每个菌株的生长曲线后,再挑取单菌落孢子至种子培养基,选择对数期 40 h 的种子液,经过三次离心洗涤后重悬后,将样品涂抹到载玻片,排除气泡后加盖玻片导致在激光共聚焦显微镜下,后使用激光共聚焦显微镜呈现各菌株的荧光状态。激光共聚焦显微镜(10×物镜,Ex: 488 nm/Em: 510 nm)成像参数标准化:激光功率 13%,电压为 710 V。

3.3.2 重组菌株摇瓶发酵的效价及荧光验证

将重组菌株单菌落孢子接种于 YEME 液体培养基中进行 40 h 预培养。随后将菌液转移至发酵培养基,在恒定温湿度参数(35℃/75% RH)条件下维持 7 天发酵周期。发酵终止后,取 1 mL 样本经 8000 rpm 处理 8 分钟,所得上清液按 1:50 体积比用无菌水稀释后进行 HPLC 分析。摇瓶发酵体系参数设置为:250 mL 锥形瓶装载 30 mL 培养基,1%接种量,控制摇床运行参数为 220 rpm 转速配合恒温恒湿环境。

挑取重组菌株和原始菌株单菌落孢子接种于 YEME 培养基培养至对数生长期,按 1%的接种量接种于 30 mL/250 mL 发酵培养基的锥形瓶中,在恒温恒湿摇床中发酵 7 d,每日取 2 ml 发酵液离心取上清测量其效价并洗涤发酵液沉淀,使用荧光分光光度计测量发酵过程中的荧光强度和使用激光共聚焦显微镜观察菌团发光状态。为了排除每日取样发酵液体积日益减少对菌株发酵产量产生影响,设置平行实验,保证同一株菌接种量一致,且每日取样丢弃不会对后续结果产生影响。考虑到费氏链霉菌菌体成丝状,生长过程中菌丝抱团,摇瓶中加玻璃珠并在激光共聚焦显微镜下观察区别。培养条件为 35 °C、220 rpm、75% RH。取过后的样品加入 1%的甲醛放入-20℃冰箱保存。

3.3.3 内外源新霉素对 SF-N 菌株荧光强度的影响

从固体平板上挑取 sSF-N 菌株单菌落孢子接种于 YEME 种子培养基内,依据其生长曲线的趋势取 2mL 样液直接破碎后

荧光分光光度计测量一次荧光值。超声波细胞破碎仪的设置功率为 270W，报警温度为 50℃，工作总时间为 10min。

从固体平板上挑取 SF-N 菌株单菌落孢子接种于 YEME 种子培养基内，取对数生长期的种子液（摇床培养 40 h），于 50 ml 离心管内，4℃离心收集菌体，用 YEME 清洗三次后，稀释，测定 OD600 值，使其范围在 0.4-0.8。配置 0 mM、5 mM、10 mM、25 mM、50 mM、100 mM、200 mM、300 mM、400 mM 梯度浓度的新霉素。取 2 ml 菌液于 10 ml 离心管内，设置三组平行，并分别添加 2 μ l 不同梯度浓度的新霉素，放置摇床培养 24 h。一轮培养后得出的大致最适浓度范围再进一步缩小浓度范围，使用 0 mM、2 mM、4 mM、8 mM、16 mM、32 mM、64 mM、100 mM 再次重复测量

3.3.4 SF-N 菌株摇瓶发酵过程中荧光强度及效价分析

从平板上 SF-N 菌株单菌孢子落接种于 YEME 培养基 48 h，以 1%的接种量加入含有 30 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中，在恒温恒湿摇床中发酵 7 d，于用于测量每日效价的摇瓶安置于不同摇床，设置平行实验，保证每瓶发酵液只取一次，不会因连续取样使发酵液减少致效价产生影响，培养条件为 35℃、220 rpm、75% RH。每次取 2 ml，离心（12000 rpm，5 min）后取上清为胞外分泌，测试其荧光值及效价；取沉淀后清洗三次，使用超声波细胞破碎仪破碎后为胞内分泌，测试其荧光值及效价。

3.4 结果与讨论

3.4.1 重组菌株生长特性及荧光强度分析

通过生物量干重（DCW）与光密度（OD600）双变量联用策略，对构建的三株重组菌株和原始菌株进行生长表型表征。如图 3-1 所示，各菌株生长曲线呈现显著分化特征：图 a-d 分别对应 SF-N、SF/pPR-N1-eGFP、SF/pPR-eGFP 及 SF-2。其中，SF/pPR-eGFP 与 SF-2 呈现相似的生长动力学特征，其典型四阶段表现为：0-24h 为延滞期，24-64h 进入对数生长期，64-72h 过渡至稳定期，72h 后进入衰亡期。

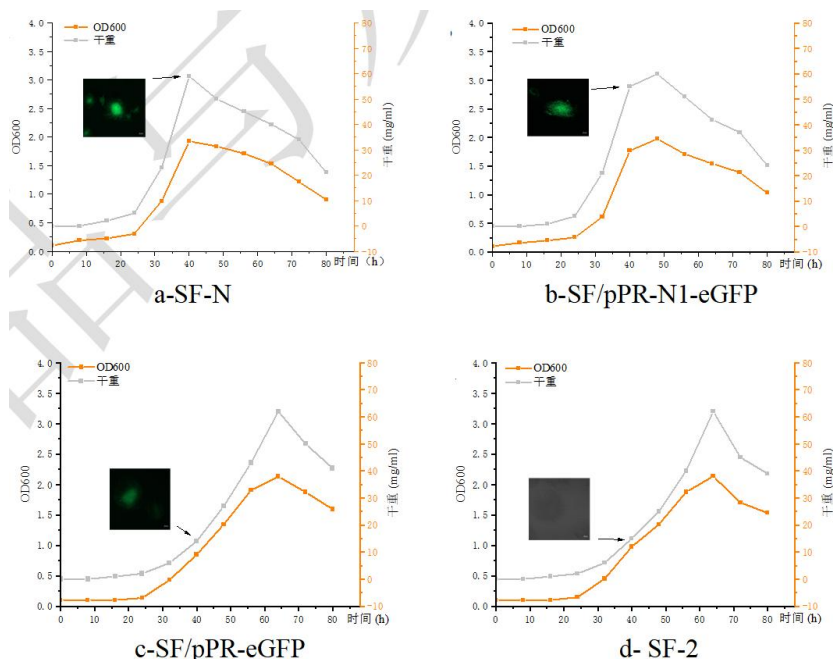


图 3-1 重组菌株与原始菌株生长曲线图与 40 h 时的荧光图

Fig. 3-1 Growth curves of recombinant strain and original strain fluorescence patterns at 40 h

相较于野生型，携带新霉素核糖开关调控元件的重组菌株 SF-N 与 SF/pPR-N1-eGFP 表现出显著提升的生物合成活性：1）延滞期缩短至 18 h；2）对数生长期比生长速率提升；3）提前 12 h 进入稳定期。且重组菌株的 DCW_{max} 值较野生型有所降低，该现象与对数生长期时间压缩导致的生物量积累效率下降相关，同时印证了 *space* 区域对菌株代谢负荷的优化作用。根据次级代谢产物合成理论，重组菌株提前进入稳定期与新霉素 B 的生物合成窗口期前移具有正向关联性。

如图 3-1 所示，SF-N 呈现显著增强的荧光信号强度，较 SF/pPR-N1-eGFP 提升明显，而 SF/pPR-eGFP 荧光较弱及 SF-2 未检测到特异性荧光。该数据证实，*space* 区域的碱基序列优化可显著增强核糖开关适配体结构域与新霉素配体的结合亲和力，进而提高转录调控效率。重组菌株在种子阶段即表现出新霉素 B 前体的微量合成，其配体依赖性荧光激活机制为后续高通量筛选提供了理论依据。

3.4.2 重组菌株摇瓶发酵价及荧光验证

在为期七天的摇瓶发酵过程中，三株重组菌株的新霉素 B 合成动态呈现阶段性特征，如图 3-2。发酵初期（第 1-2 天），各菌株的效价积累较为缓慢，处于代谢适应阶段。从第 3 天起，效价增长速率显著提升，尤其在第 3-4 天期间，各菌株均表现出明显的合成加速现象，其中携带核糖开关 N1 与 *ermE*[#] 启动子的

SF-N 菌株在此阶段的效价增幅最为显著。进入发酵后期（第 5-7 天），效价增速逐渐趋于平缓，进入稳定期。

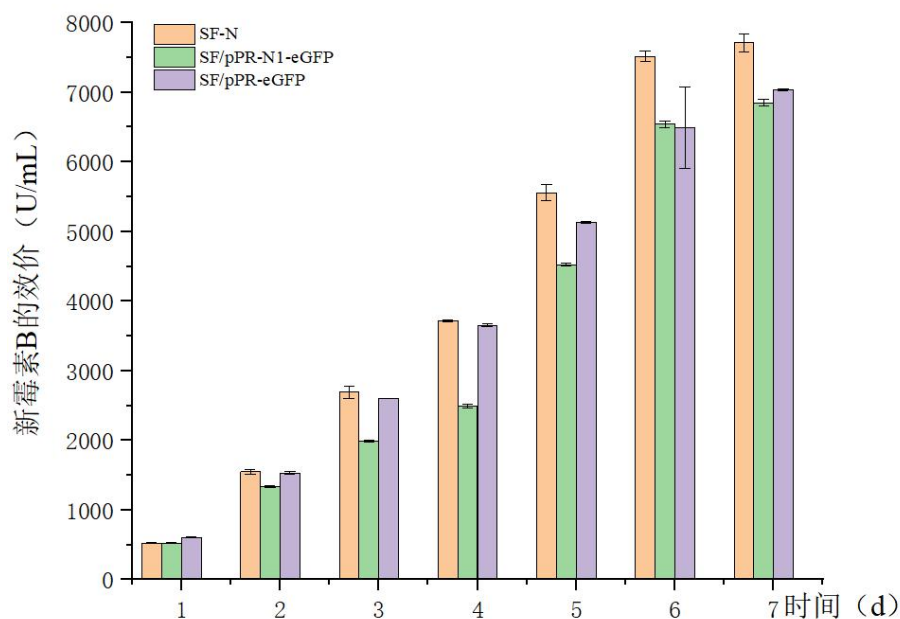


图 3-2 重组菌株发酵曲线

Fig.3-2 Fermentation curves of recombinant strains

值得注意的是，对比菌株 SF/pPR-N1-eGFP 和 SF/pPR-eGFP 在整个发酵周期中效价提升不明显，其效价动态曲线与对照菌株 SF-N 相比，在关键的第 3-4 天加速期缺乏明显的代谢响应。这一现象进一步证实核糖开关 N1 与 *ermE*[#]启动子的协同作用能够特异性增强新霉素生物合成途径的调控效率，特别是在发酵中期（第 3-4 天）通过精密的时间响应机制激活次级代谢产物的高效合成。该动态特征与实验设计的代谢工程策略预期高度吻合。

摇瓶发酵过程中重组菌株的荧光表达特性如图 3-3 所示，其中 a-c 三组图像分别对应携带不同调控元件的重组质粒 SF-N、SF/pPR-N1-eGFP 和 SF/pPR-eGFP 在 1-7 天发酵周期内的荧光显微成像。为避免因荧光信号持续增强导致的图像过曝现象，本实验将共聚焦显微镜的检测电压优化至 696 V，较前期实验参数有所下调。从整体荧光强度分析，SF-N 重组菌株的荧光信号显著高于 SF/pPR-N1-eGFP 菌株，且前四日呈现持续增强趋势，证实 *space* 调控元件对菌株代谢活性具有正向调控作用。而 SF/pPR-eGFP 菌株的荧光强度未见显著差异，符合 eGFP 表达独立于次级代谢途径的理论预期。

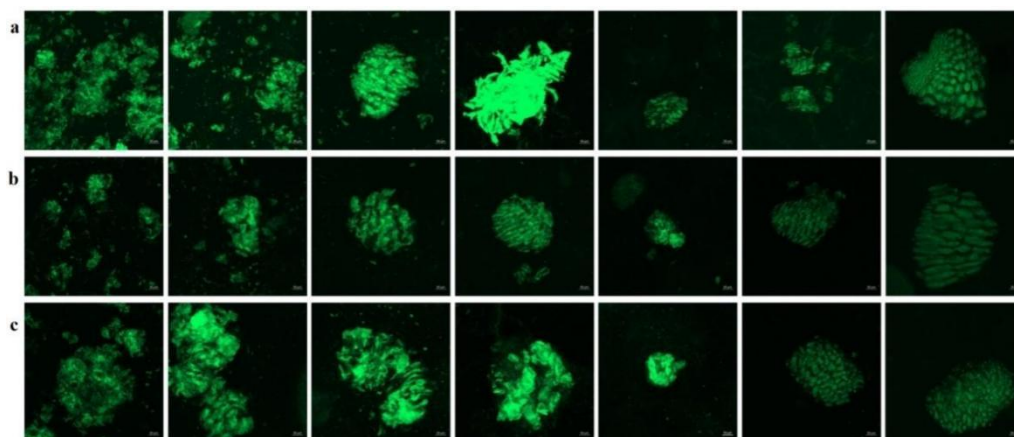


图 3-3 重组菌株发酵七天荧光成像图

a SF-N 每天的激光共聚焦图；b SF/pPR-N1-eGFP 每天的激光共聚焦图；c SF/pPR-eGFP 每天的激光共聚焦图

Figure 3-3 Fluorescence imaging of the recombinant strain after seven days of fermentation.

a. Daily laser confocal images of SF-N; b. Daily laser confocal images of SF/pPR-N1-eGFP;
c. Daily laser confocal images of SF/pPR-eGFP.

针对 SF-N 菌株的时序分析显示，其荧光强度在第 1-4 天呈梯度上升，但第 5 天后出现显著衰减，通过调节显微成像参数（10×与 2.5×物镜切换）及焦平面优化，结合菌体形态学观察得出以下机制解析：费氏链霉菌在液体发酵体系中呈现双相生长特性，前 4 天处于对数生长期并伴随次级代谢产物合成，第 4 天后进入稳定期并启动孢子形成过程。显微观察显示（图 3-4a,b），随着培养时间延长，发酵液内壁逐渐出现菌丝体聚集成团现象，同时菌液色泽随代谢进程逐步加深。共聚焦显微成像（图 3-4a 10×物镜，图 3-4b 2.5×物镜）证实菌丝团的三维结构导致荧光信号衰减，其厚度与荧光强度呈负相关。鉴于发酵培养基含有花生饼粉、玉米浆等胶体成分，离心分离困难导致的菌体滞留可能是荧光分光光度计检测值偏低的主要原因。

补充实验表明（图 3-4c），机械破碎处理（玻璃珠震荡）导致菌丝体结构破坏，胞内 eGFP 蛋白外泄形成弥散荧光信号，此现象与荧光分光光度计检测值异常升高具有显著相关性。

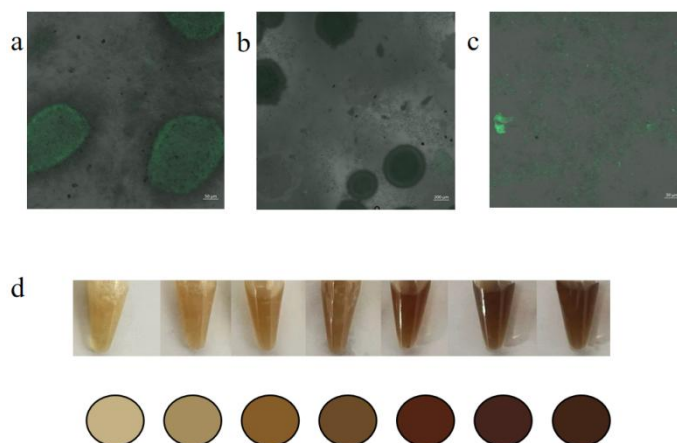


图 3-4 重组菌株 SF-N 发酵后期荧光特性分析

a.10 倍镜下，激发波长为 488nm 和 510 nm 成像图片叠加的 SF-N 第五天发酵液；b 2.5 倍镜下，激发波长为 488 nm 和 510 nm 成像图片叠加的 SF-N 第五天发酵液；c 10 倍镜下，激发波长为 488 nm 和 510 nm 成像图片叠加的 SF-N 加玻璃珠的第五天发酵液；d SF-N 每日发酵液高速离心后的上清液

Fig 3-4. Fluorescence Characterization Analysis of Recombinant Strain SF-N during Late Fermentation Phase(a) Day 5 fermentation broth of SF-N under 10× magnification with superimposed images at 488 nm and 510 nm excitation wavelengths; (b) Day 5 fermentation broth of SF-N under 2.5× magnification with superimposed images at 488 nm and 510 nm excitation wavelengths; (c) Day 5 fermentation broth of SF-N with glass beads under 10× magnification with superimposed images at 488 nm and 510 nm excitation wavelengths; (d) Supernatant of SF-N fermentation broth after daily high-speed centrifugation.

3.4.3 内外源新霉素对 SF-N 菌株荧光强度的影响

图 3-5a 描述的是重组菌株 SF-N 种子培养过程中，内源新霉素合成与荧光相应信号特性，经超声波破碎处理的种子液胞内荧光强度随培养时间呈非线性增长模式，培养后期荧光增幅速率下降，可能与营养消耗和菌浓过高有关：1）三维培养空间限制导致细胞接触抑制效应；2）碳氮源营养底物呈现限制性消耗；3）细胞死亡率超过增殖速率。上述代谢应激状态与 HPLC 检测的日际效价动态共同验证了本研究的理论预测模型。

在外源新霉素诱导优化实验中，采用宽域浓度梯度（0-400 mM）进行初步剂量效应分析（图 3-5b），发现荧光响应值在 50-100 mM 区间呈现显著剂量依赖性增强。基于此，进一步通过等比级数梯度稀释法建立精细浓度矩阵（图 3-5c），确定核糖开关系统的相应新霉素的浓度范围为 0-64mM。该优化参数为后续规模化筛选提供了关键工艺控制点。

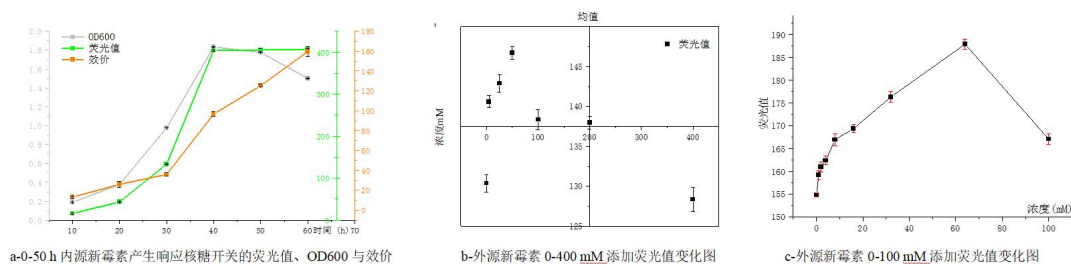


图 3-5 内外源新霉素对 SF-N 菌株荧光强度的影响

Figure 3-5 Effects of endogenous and exogenous neomycin on the fluorescence intensity of strain SF-N.

3.4.4 SF-N 菌株摇瓶发酵过程中荧光强度及效价分析

经优化后的实验方法描述如下：每日采集发酵液样本进行离心分离，收集上清液作为胞外代谢产物样本，分别用于胞外生物效价测定及菌体自溶释放的绿色荧光蛋白定量分析。对离心沉淀物采用缓冲液洗涤三次后重悬至初始体积，经超声波细胞破碎仪处理以裂解菌体，随后离心获得胞内可溶性组分，该组分主要包含胞内积累的 eGFP 表达产物及微量未完成跨膜转运的新霉素 B 前体。

如图 3-6 所示实验数据显示，胞内荧光强度随发酵时间延长呈现显著累积效应，而胞外荧光信号自第三发酵天起出现统计学显著下降，此结果与前期摇瓶发酵实验现象比较一致，可能与发酵液中色素类次级代谢产物积累及菌丝成团干扰导致荧光信号降低，具体作用机制尚需通过代谢组学分析进一步阐明；胞内和胞外的效价一直随着发酵时间的增加而增加，胞外效价到第六天基本平衡。实验数据证实，该传感器可通过 eGFP 荧光信号强度与新霉素 B 产量之间的线性关系，实现发酵周期内新霉素 B 高产菌株的高通量筛选，满足工业菌种选育的定量需求。

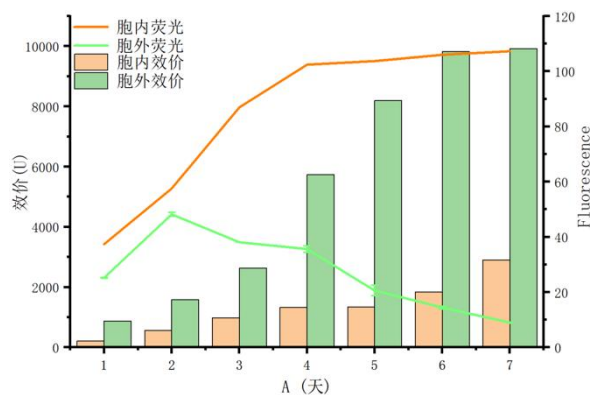


Fig.3-6 SF-N 发酵过程中胞内外荧光强度和新霉素效价

3-6 Intracellular and extracellular fluorescence values and neomycin potency during SF-N fermentation

3.5 本章小结

本研究成功构建了一种基于新霉素核糖开关 N1 的荧光生物传感器，并通过多维度实验验证了其在新霉素合成监测中的有效性与应用潜力。实验结果表明，重组菌株 SF-N 的荧光强度与新霉素浓度呈显著正相关，且其响应特性具有高度的特异性与灵敏度。具体表现为：

(1) 信号特异性与剂量响应：梯度浓度外源新霉素诱导实验显示，SF-N 的荧光强度在 0-64 mM 范围内呈现显著剂量依赖性，但代谢产物积累与基因表达在超过一定范围后，调控呈非线性动力学关系—例如在高链霉素浓度区间荧光信号与效价响应解耦，但现存在费氏链霉菌产新霉素 B 效价范围都处于线性范围内，证明本传感器创建的合理性。space 区域通过增强核糖开关与新霉素 B 的结合亲和力，显著提高了生物传感器的检测灵敏度。值得注意的是，通过对比不同菌株的菌丝分散状态与荧光分布，发现 space 区域的存在有效减少了菌丝聚集对信号采集的干扰。而无 space 菌株因核糖开关响应效率不足，需依赖更高浓度的外源诱导剂才能触发荧光表达，且其菌丝团块导致的信号屏蔽效应更为显著。

(2) 生长特性与荧光表达协同性：携带 space 区域碱基的重组菌株 (SF-N) 相较于无 space 设计的重组菌株 (SF/pPR-N1-eGFP) 展现出显著优势，其延滞期缩短、对数期生长速率加快，表明 space 区域的引入优化了核糖开关的调控效率。同时，SF-N 的荧光强度显著高于其他重组菌株，尤其在种子培养阶段即可检测到高信噪比的荧光信号，证明 space 区域通过稳定核糖开关的适配体构象，显著提升了其对内源新霉素的响应灵敏度。

(3) 发酵动态监测可靠性：在 7 天摇瓶发酵中，SF-N 的荧光强度前四天持续升高，与新霉素效价积累趋势严格同步，而无 space 设计的重组菌株荧光响应滞后且强度较低。此外，胞内荧光值的持续增长进一步证实，space 区域通过维持核糖开关的活性构象，可实时反馈胞内代谢产物的动态变化，而对照菌株因结构稳定性不足导致信号衰减。

综上所述，本文构建的生物传感器通过引入 space 区域优化核糖开关性能，不仅能够实时、动态监测新霉素合成过程，还可通过荧光强度差异快速区分高产菌株与低效菌株。这一策略为高通量筛选新霉素高产菌株及发酵过程精准调控提供了高效、低成本的技术平台。

第四章 基于核糖开关生物传感器优化平板孢子生成条件

4.1 引言

链霉菌属孢子质量对其后续发酵生成次级代谢物的产量和质量都会产生比较大的影响,本文聚焦固体培养基中利用链霉素抗性筛选^[24]、琼脂浓度和 pH^[157]增强孢子的抗逆性与核糖开关生物传感器的协同作用机制,揭示二者信号强度间存在显著正相关效应。这种抗生素选择压的施加与基于 RNA 适配体的分子传感系统形成动态耦合。工程化设计的核糖开关特异性识别新霉素 B 分子,通过构象转换激活荧光报告基因表达^[156],建立产物浓度与荧光信号的线性关联模型。

微生物发酵工艺的系统优化是提升次级代谢产物生物合成效能的核心策略,其本质在于通过多维度参数解析揭示关键因子的协同调控规律。在费氏链霉菌合成新霉素 B 的复杂代谢网络中,培养基理化特性与培养环境参数的交互作用深刻影响着菌株的代谢通量分配及产物合成动力学。基于正交试验设计的数学原理,将组合理论中的空间均衡分布原则与统计学方差分析相结合,构建具有正交特性的多维参数空间,在保证实验数据代表性的同时显著提高工艺优化效率。琼脂基质作为培养基固化载体,其微结构特性在发酵工艺中发挥双重调控功能:通过构建三维多孔网络结构,不仅调控渗透压的空间分布梯度,更通过调节氧传递速率影响菌丝分化模式;培养基 pH 的动态平衡则通过调控跨膜电势差与酶活稳态,直接影响前体物质摄取及产物的胞外分泌。通过构建多因素正交试验体系,结合产物生物效价检测与荧光信号实时监测技术,建立代谢活性与产物积累的双重评价模型。

4.2 实验材料

4.2.1 菌株

重组菌株 SF-N

4.2.2 培养基及培养条件

菌株活化培养基、种子培养基以及发酵培养基均见 2.2.4

4.3 实验方法

4.3.1 菌株的接种与培养方法

菌株的接种与培养方法参考 2.3.2。

4.3.2 孢子及效价的检测方法

孢子质量的检测方法：1) 孢子形态与大小差异-低琼脂浓度（1.2%-1.8%）：培养基硬度较低，菌丝体扩散范围广，孢子形成区域松散。孢子大小：孢子体积较大，但分布稀疏，可能因营养竞争减弱导致孢子成熟周期延长；形态特征：孢子链排列不规则，表面光滑度降低（可能因代谢压力较小）。高琼脂浓度（2.1%-2.4%）：培养基硬度增加，限制菌丝扩散，促进孢子集中分化。孢子大小：孢子体积较小，但密度显著升高，可能与机械压力加速孢子成熟有关；形态特征：孢子链排列紧密，表面粗糙度增加（高渗透压诱导次生代谢产物沉积）。

2) 孢子颜色变化-低琼脂浓度-颜色：孢子呈浅灰色或灰白色，可能因次级代谢产物（如放线菌素）合成减少。原因可能为培养基通透性高，氧气扩散充分，抑制厌氧代谢途径，减少色素沉积。高琼脂浓度：颜色：孢子颜色加深，常伴随菌落边缘色素环形成。原因可能为受限的氧气扩散激活应激响应通路，促进黑色素或吩嗪类色素合成。

3) 生长速度与孢子成熟时间-低琼脂浓度：菌丝扩展速度：快，但孢子分化延迟（培养 6-7 天才可见成熟孢子，且孢子量少）。原因可能为菌丝优先进行营养吸收而非分化，能量向生物量积累倾斜。高琼脂浓度：菌丝扩展速度：慢，但孢子分化提前（培养 4-5 天即形成致密孢子层）。原因可能为机械压力触发群体感应，加速发育阶段转换。

新霉素 B 效价检测方法参考 2.3.3。

4.3.3 正交实验优化平板孢子生成条件

在数学学科的相关理论中，正交法主要是在数理统计、概率论和线性代数为基础的前提下，选用标准的正交化作为试验设计原理而进行相关的设计试验，选取对新霉素 B 的校价具有影响的三个因素琼脂浓度，链霉素浓度和 pH。每个因素确定五个水平，利用 L25（5⁶）正交试验，以新霉素 B 的校价、胞内荧光值为考察指标，确定最佳工艺，正交试验因素与水平设计见表 4-1。

表 4-1 正交试验因素与水平设计

Table 4-1 Orthogonal test factors and horizontal design

因素	水平				
	1	2	3	4	5
A-琼脂浓度 (%)	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4
B-链霉素浓度 (%)	0	5	8	10	15
C-pH	7.3	7.4	7.5	7.6	7.7

4.4 结果与讨论

4.4.1 基于核糖开关生物传感器优化平板孢子生成条件

费氏链霉菌孢子质量对后续发酵生成新霉素的产量和质量都产生比较大的影响，本实验选取琼脂浓度、链霉素浓度和 pH 三个因素，其中通过链霉素压力筛选获得高抗性工业菌株（提高发酵过程稳定性）；琼脂基质微结构通过三维孔隙协同调控渗透压梯度与氧传递，定向优化菌丝分化；pH 的动态平衡则通过调控跨膜电势差与酶活稳态，直接影响前体物质摄取及产物的胞外分泌。每个因素确定五个水平，以新霉素 B 效价和胞内荧光值为考察指标，优化最佳工艺，按照 L25 (5⁶) 正交设计表进行试验，结果如表 4-2 所示。

表 4-2 正交试验方案及结果

Table 4-2 Orthogonal test scheme and results

试验号	因素			结果	
	A-琼脂浓度	B-链霉素浓度	C-pH	新霉素 B 效价 (U)	胞内荧光值
1	1	1	1	7015±112	100.26±1.25
2	1	2	3	7444±218	103.46±1.12
3	1	3	5	8129±322	125.09±1.03
4	1	4	2	7490±213	113.75±0.85
5	1	5	4	7175±125	119.92±0.56
6	2	1	5	7541±218	104.76±0.84
7	2	2	2	7143±327	106.56±1.08
8	2	3	4	8018±232	128.47±1.15
9	2	4	1	7629±134	114.27±1.32
10	2	5	3	7292±220	104.89±1.42
11	3	1	4	7548±126	120.95±1.62
12	3	2	1	7805±223	113.93±1.09

续表 4-2

试验号	因素				结果
	A-琼脂浓度	B-链霉素浓度	C-pH	新霉素 B 效价 (U)	胞内荧光值
13	3	3	3	8038±318	117.36±1.22
14	3	4	5	8226±216	104.7±0.96
15	3	5	2	7477±124	107.75±0.94
16	4	1	3	7562±228	115.07±1.15
17	4	2	5	7451±332	117.97±1.17
18	4	3	2	8832±234	114.96±0.52
19	4	4	4	8205±126	118.18±1.19
20	4	5	1	7550±220	104.68±1.42
21	5	1	2	7642±321	110.86±1.32
22	5	2	4	7889±215	127.34±1.38
23	5	3	1	8360±214	123.33±1.19
24	5	4	3	8910±219	130.92±1.24
25	5	5	5	7793±225	114.92±1.27

表 4-3 各因素对新霉素 B 的校价的极差分析

Table 4-3 Analysis of the difference of each factor on the calibration price of neomycin B

	A	B	C
K ₁	37253.0	37308.0	39254.0
K ₂	37623.0	37732.0	39027.0
K ₃	39094.0	41377.0	39280.0
K ₄	39600.0	40460.0	38668.0
K ₅	40594.0	37287.0	37935.0
k ₁	7450.6	7461.6	7850.8
k ₂	7524.6	7546.4	7805.4
k ₃	7818.8	8275.4	7856.0
k ₄	7920.0	8092.0	7733.6
k ₅	8118.8	7457.4	7587.0
r	668.2	818.0	269.0
影响次序: B>A>C		最优组合: A ₅ B ₃ C ₃	

正交试验分析中, K_i 为对应因素中第 i 个水平试验指标值之和, k_i 表示对应因素中第 i 个水平试验指标值的均值, r 值表示固定因素中 k_i 的最大值和最小值的差值, r 值越大, 表明该因素设置的不同水平对评价指标的影响越大, 从而说

明该因素对评价指标的影响越大,反之,说明该因素对实验结果的影响较小。通过对新霉素 B 的效价进行正交分析,由表 4-3 中新霉素 B 的效价极差(r 值)分析可知,三个因素对新霉素 B 的效价的影响程度依次为 $B > A > C$,即链霉素浓度 $>$ 琼脂浓度 $>$ pH,从 k_1 、 k_2 、 k_3 、 k_4 、 k_5 的大小分析得出,感官评分的最优条件为 $A_5B_4C_3$ 。

表 4-4 各因素对胞内荧光值的极差分析

Table 4-4 Analysis of the range of factors on intracellular fluorescence values

	A	B	C
K1	562.480	553.900	556.470
K2	562.950	568.260	555.880
K3	564.690	609.210	574.700
K4	570.860	584.820	611.860
K5	607.370	552.160	569.440
k_1	112.496	110.780	111.294
k_2	112.590	113.652	111.176
k_3	112.938	121.842	114.940
k_4	114.172	116.964	122.372
k_5	121.474	110.432	113.888
r	8.978	11.410	11.196
影响次序: $B > C > A$ 最优组合: $A_5B_3C_4$			

通过对胞内荧光值进行正交分析,由表 4-4 中极差(r 值)分析可知,三个因素对胞内荧光值的影响程度依次为 $B > C > A$,即链霉素浓度 $>$ pH $>$ 琼脂浓度,以胞内荧光值最大值为优化目标,从 k_1 、 k_2 、 k_3 、 k_4 、 k_5 的大小分析得出,胞内荧光值的最优条件为 $A_5B_3C_4$ 。

表 4-5 各因素对新霉素 B 的校价的方差分析结果

Table 4-5 Analysis of variance results of each factor on the calibration price of neomycin B

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
A	1543606	4	385901.5	4.954	0.014	*
B	3009401	4	752350.3	9.658	0.001	**
C	110299.8	4	27574.94	0.354	0.836	
误差 e	934828.9	12	77902.41			

注: **表示具有极显著 ($P < 0.01$) 影响, *表示具有显著 ($P < 0.05$) 影响

表 4-6 各因素对胞内荧光值的方差分析结果

Table 4-6: ANOVA results of each factor on intracellular fluorescence values

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
A	292.872	4	73.218	2.716	0.08	
B	454.043	4	113.511	4.211	0.023	*

续表 4-6

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
C	417.951	4	104.488	3.876	0.03	*
误差 e	323.467	12	26.956			

注: **表示具有极显著 ($P<0.01$) 影响, *表示具有显著 ($P<0.05$) 影响

可以用方差分析法来检验各因素对新霉素 B 的校价影响的实际情况, 通过计算各因素以及误差的离差平方和, 然后求出自由度、均方、F 值, 并进行 F 检验。新霉素 B 的校价方差分析结果如表 4-3 所示, 从表 4-3 的方差分析结果表中, 可以看出, 链霉素浓度对新霉素 B 的校价影响极显著 ($P<0.01$), 琼脂浓度对新霉素 B 的校价影响显著 ($P<0.05$), pH 对新霉素 B 的校价影响不显著 ($P>0.05$)。通过分析三个因素的 F 值可知, 三个因素的影响次序为链霉素浓度 > 琼脂浓度 > pH, 综合考虑三个因素对新霉素 B 的校价的影响, 得到最优组合为 $A_5B_3C_3$, 即当琼脂浓度为 2.4%, 链霉素浓度为 8%, pH 为 7.5 时新霉素 B 的校价最大。

对胞内荧光值进行方差分析, 方差分析结果如表 4-7 所示, 从表 4-7 的方差分析结果表中, 可以看出, 链霉素浓度、pH 对胞内荧光值具有显著影响 ($P<0.05$), 琼脂浓度对胞内荧光值的影响不显著 ($P>0.05$), 通过分析三个因素的 F 值可知, 三个因素的影响次序为链霉素浓度 > pH > 琼脂浓度, 综合考虑三个因素对胞内荧光值的影响, 得到最优组合为 $A_5B_3C_4$, 即当琼脂浓度为 2.4%, 链霉素浓度为 8%, pH 为 7.6 时胞内荧光值最大。

综合考虑三个因素对新霉素 B 的校价、胞内荧光值的影响, 选取优水平, 对于 A 因素来说, 新霉素 B 的校价在 5 水平取得最大值, 胞内荧光值在 5 水平取最大值, 因此 A 因素取 5 水平为最优; 对于 B 因素来说, 在 3 水平, 新霉素 B 的校价取得最大值, 在 3 水平, 胞内荧光值取得最大值, 因此 B 因素选 3 水平最优; 对于 C 因素来说, 在 3 水平, 新霉素 B 的校价取得最大值, 胞内荧光值在 4 水平取得最大值, 且方差分析 C 因素对胞内荧光值的显著性 ($P=0.022$) 大于新霉素 B 的校价的显著性 ($P=0.836$), 因此 C 因素选 4 水平最优; 综合考虑三个因素对新霉素 B 的校价、胞内荧光值的影响, 得到最优组合为 $A_5B_3C_4$, 即当琼脂浓度为 2.4%, 链霉素浓度为 8%, pH 为 7.6 时胞内荧光值和效价最大, 在此最优条件下获得的孢子, 做三组平行摇瓶发酵验证, 得到 SF-N 的平均效价为 9480 U/mL, 比原始菌株 SF-2 效价提高了 43%。

通过方差分析发现, 琼脂浓度不仅显著影响新霉素 B 效价, 其物理特性还

通过改变培养基渗透压调控孢子形成动力学^[128]。当琼脂浓度处于 1.2-1.8%低水平区间时，基质疏松性导致菌丝体延展受限，孢子形成数量减少，且生成周期延长至 6-8 天；而 2.1-2.4%高浓度琼脂通过增强基质刚性，使孢子形成速率提升，孢子密度也大大提高，显著缩短成熟周期至 48 小时。这种结构-功能关联性在正交试验中得到印证：全局最优组合 A5B3C4（琼脂 2.4%、链霉素 8mg/mL、pH7.6）通过高琼脂浓度构建的致密网络，既促进孢子快速高效形成，又通过限制菌丝过度生长使代谢流更多导向新霉素 B 合成，最终实现效价提升与荧光信号强度增强的双重优化。

在此最优条件下，对 SF/pPR-N1-space-eGFP 菌株做三组平行摇瓶发酵验证，如表 13，得到平均效价为 9480 U/mL，其均值范围约为 254 U/mL，比出发菌株 SF 提高了 43%，较优化前的 SF/pPR-N1-space-eGFP 菌株提高了 23%；平均荧光值为 131，较优化前的 SF/pPR-N1-space-eGFP 菌株提高了 11%。

表 4-7 培养基优化前后 SF/pPR-N1-space-eGFP 菌株效价与荧光值的差异比较

Table 4-7 Comparative analysis of the efficacy and fluorescence values of SF/pPR-N1-space-eGFP strains before and after medium optimization

菌株	指标	重复 1	重复 2	重复 3	均值±SD
优化后	效价 (U/mL)	9317	9491	9571	9480±254.0
SF/pPR-N1-space-eGFP 菌株	荧光值	130.5	128.9	131	131±2.1
优化前	效价 (U/mL)	7689	7765	7561	7672±204
SF/pPR-N1-space-eGFP 菌株	荧光值	117	120.7	116.4	118±4.3

该发现揭示了培养基物理特性对次级代谢产物合成的"结构-代谢"耦合机制：琼脂浓度通过调控孢子发生效率（形态学维度）与菌丝分化程度（生理学维度），协同影响新霉素生物合成通量。这种多尺度作用机制为合成生物学改造提供了新视角-通过理性设计培养基流变特性，可定向引导微生物群体行为向目标代谢表型演进。

4.5 本章小结

通过方差分析揭示了琼脂浓度、链霉素浓度及 pH 值对新霉素 B 效价与胞内荧光值的差异化调控机制。针对新霉素 B 效价，链霉素浓度呈现极显著影响（ $P < 0.01$ ），琼脂浓度影响显著（ $P < 0.05$ ），pH 值作用不显著（ $P > 0.05$ ），因素效应排序为链霉素浓度 > 琼脂浓度 > pH，最优参数组合为 A5B3C3。在胞内荧光

值分析中，链霉素浓度与 pH 值均显著 ($P < 0.05$)，琼脂浓度无显著影响，效应排序为链霉素浓度 > pH > 琼脂浓度，最优组合为 A5B3C4。通过多目标优化权衡发现，琼脂浓度与链霉素浓度在两指标中均于相同水平达到极值，而 pH 值因对荧光值的显著调控 ($P = 0.022$) 优先选择其荧光响应最优水平 (C4)，最终确定全局最优组合为 A5B3C4 (琼脂 2.4%、链霉素 8mg/mL、pH7.6)，在此最优条件下获得的孢子，做三组平行摇瓶发酵验证，得到 SF-N 平均效价为 9480 U/mL，比原始菌株 SF-2 效价提高了 43%。

这一结论体现了微生物发酵多维度优化策略的科学价值：通过融合正交试验设计与合成生物学监测技术，构建了涵盖代谢通量分析与基因回路响应的双指标评价模型，重组菌株 SF-N 的核糖开关-GFP 传感系统，实现了新霉素 B 浓度与荧光信号的动态耦合，为快速优化筛选影响新霉素高效合成的诸多因子提供了新方法。

第五章 结论与展望

5.1 结论

本文首先基于同源序列筛选获得候选核糖开关,其中 N1 因独特的 G-C 碱基配对及 U 型旋转基序展现出最优配体结合能力,其构象选择机制通过分子对接得到验证。设计包含启动子、核糖开关 N1、间隔序列及报告基因的四模块表达元件,利用新霉素 B 结合诱导核糖开关构象变化,动态调控下游基因表达水平。研究发现基因元件空间排布对传感性能具有关键影响。初始构建中核糖开关与 RBS 区域因缺乏间隔导致结构干扰,阻碍核糖体识别效率。通过引入 space 序列优化空间适配性,提升了 RBS 与 RNAP 的接触概率,增强系统信号响应能力。发酵验证表明,优化 space 后的重组菌株新霉素 B 效价提升了 20%。

通过优化新霉素核糖开关 N1 与启动子元件空间排布,得到了较为高效生物传感系统。重组菌株 SF-N 在缩短延滞期、提升生长速率的同时,显著增强新霉素 B 合成能力,其核糖开关与启动子的协同作用使次级代谢窗口期前移。荧光信号强度与菌株代谢活性及效价积累呈正相关,尤其在发酵中期(第 3-4 天)呈现显著响应,证实 space 区域碱基的优化可提升核糖开关结合亲和力与转录调控效率。发酵过程中菌丝聚集及代谢产物干扰导致后期荧光衰减,但胞内荧光累积效应与效价动态一致,验证了该传感器通过 eGFP 信号实现新霉素高产菌株高通量筛选的可行性,为工业菌种优化提供了动态监测策略。

基于核糖开关生物传感器,以新霉素 B 效价和胞内荧光值作为指标,采用三因素五水平正交实验,考察链霉素、琼脂和 pH 值对孢子形成质量的影响。结果表明,对链霉素浓度对新霉素 B 效价影响极显著($P<0.01$),琼脂浓度显著($P<0.05$),pH 无显著影响($P>0.05$),最优效价参数组合为 A5B3C3。胞内荧光值分析显示链霉素浓度与 pH 均显著($P<0.05$),最优荧光响应参数组合为 A5B3C4。全局最优参数组合 A5B3C4(琼脂 2.4%、链霉素 8%、pH7.6)实现效价与荧光值协同最大化。用此条件下形成的孢子,做三组平行摇瓶发酵验证,SF-N 菌株的平均效价为 $9480\pm254.0\text{U/mL}$,比原始菌株 SF-2 提升了 43%。

本文基于在费氏链霉菌核糖开关动态构象与基因线路空间适配原理,首创性

构建了基于核糖开关的四模块表达系统（*ermE*[#]），解决了传统静态调控系统的空间位阻效应；建立首个新霉素浓度-荧光信号动态响应模型，实现胞内代谢物浓度的实时在线监测；通过 *space* 区域优化增强核糖开关构象稳定性，使 RBS 与 RNAP 结合效率与信号信噪比增强，提高了检测灵敏度同步实现信号-代谢的时间耦合；创新性构建双指标正交评价体系，揭示琼脂浓度对孢子形态与代谢活性的双重调控规律。在一定浓度范围内，胞内荧光信号与新霉素效价具有很好的同步性，为不同场景下高产新霉素费氏链霉菌株的高通量筛选提供了新思路和新方法，也为链霉菌属其他次级代谢产物的高效筛选提供参考。

5.2 展望

本文开发的双功能生物传感器兼具动态监测（荧光信号与效价严格同步）与高通量筛选能力（通过荧光强度差异快速区分高产/低效菌株），初步实现了在新霉素发酵的前、中期的快速检测和筛选，为费氏链霉菌高产菌株的高效筛选、发酵过程实时监控提供了比较高效的解决方案，具有产业转化潜力。随着对新霉素生物合成调控和发酵技术的深入研究，后续可从以下方面进一步探索。

已有文献报道核糖开关 N1 对其他配体，如巴龙霉素和核糖霉素也同样可以响应，三种配体的结合亲和力为（*K_d* 值）：新霉素>核糖霉素>巴龙霉素^[129]。这两种配体也同样存在与费氏链霉菌的生物合成途径中，利用本文所构建的 N1 核糖开关费氏链霉菌进行传感器响应测试和特异性验证：分别添加梯度浓度新霉素、巴龙霉素和核糖霉素，测定荧光强度变化，绘制剂量-响应曲线，明确检测范围（线性区间）及交叉反应性；引入巴龙霉素和核糖霉素作为干扰物，验证传感器对目标配体的选择性。

随后利用 N1 核糖开关对多配体的响应特性，设计代谢途径逻辑门控系统。将本文中 *ermE*[#] 的 eGFP 替换成其他关键酶基因（如新霉素合成酶基因 *neoB* 或 *neoN*）^[130]，N1 与其偶联，构建“AND”或“OR”逻辑门。其中“OR”逻辑：任一配体（新霉素/巴龙霉素/核糖霉素）存在时激活基因表达，用于多诱导剂协同调控；“AND”逻辑（需结合其他调控元件）：仅在两种配体共存时激活基因，用于代谢平衡控制（如防止前体竞争）。利用代谢流调控验证，在费氏链霉菌中引入上述系统，通过 HPLC 检测不同配体组合下的新霉素产量及副产物（巴龙霉素、核糖霉素）积累量，验证逻辑门控效果。

构建多产物菌株的高通量筛选平台,开发基于 N1 核糖开关的荧光报告系统,同步筛选高产新霉素、巴龙霉素、核糖霉素的菌株。首先通过诱变(如 ARTP、UV)或 CRISPR-Cas 编辑技术,构建费氏链霉菌突变体库,将 N1 核糖开关传感器导入所有突变株,确保荧光信号与总氨基糖苷类产物(新霉素+巴龙霉素+核糖霉素)浓度正相关。由此进行高通量筛选,使用流式细胞仪或微孔板荧光检测仪,快速筛选高荧光强度菌株(高产多配体菌株)。

为了探究多配体共存时对 N1 核糖开关的竞争性结合规律,优化传感器特异性设计竞争性结合实验。固定 N1 核糖开关浓度,加入等摩尔浓度新霉素与巴龙霉素/核糖霉素混合液,通过 ITC 或荧光偏振分析结合优先性或通过突变关键碱基,设计变体核糖开关,筛选对单一配体具有高选择性的突变体。在发酵过程中交替添加不同配体,通过实时荧光监测分析传感器响应切换速度与稳定性测试其动态响应。

利用 N1 核糖开关实时监测多种代谢产物浓度,动态调整发酵参数。建立在线检测系统,例如在发酵罐中安装光纤荧光探头,实时采集重组菌株 SF-N 的荧光信号,建立荧光信号-多配体总浓度的标定曲线,结合化学计量学模型(如 PLS 回归)解析各组分贡献。当荧光信号达到阈值时,自动触发补料(如前体氨基酸)或调节 pH/溶氧,平衡三种抗生素合成速率。对比开环(固定参数)与闭环(反馈调控)发酵效价,验证系统优化效果。

参考文献

- [1]DONG Y,CUI C,LI C,etc.Activation of Dormant Secondary Metabolite Production by Introducing Neomycin Resistance into the Deep-Sea Fungus, *Aspergillus versicolor* ZBY-3[J].*Marine Drugs*,2014,12(8):4326-4352.
- [2]KAI LING H J L Z.A self-assembling RNA aptamer-based nanoparticle sensor for fluorometric detection of Neomycin B in milk[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016.
- [3]HE Y,YU H,CAI C,etc.Inhibition of H3K4me2 Demethylation Protects Auditory Hair Cells from Neomycin-Induced Apoptosis[J].*Molecular Neurobiology*, 2015,52(1):196-205.
- [4]LECHEVALIER S A W A. Neomycin,a New Antibiotic Active against Streptomycin-Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms1[J].*science*, 1949.
- [5]CHOI J S, KIM D W, KIM D S,etc.Novel neomycin sulfate-loaded hydrogel dressing with enhanced physical dressing properties and wound-curing effect[J].*Drug Deliv*, 2016,23(8):2806-2812.
- [6]LIU Y, WU Y, ZHANG X,etc.Neomycin inhibits growth of pancreatic cancer cells In Vitro and In Vivo[J]. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, 2016,36(1):82-87.
- [7]YUAN L,WEI H,FENG H,etc. Rapid analysis of native neomycin components on a portable capillary electrophoresis system with potential gradient detection[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006,385(8):1575-1579.
- [8]余永红, 夏焕章.2-脱氧链霉素类抗生素生物合成基因的研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2008,33(3):129-133.
- YU Y H, XIA H Z.Progress in the biosynthetic genes of 2-deoxystreptamine antibiotics[J]. *CHINESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS*, 2008,33(3):129-133.(in Chinese)
- [9]黄建峰,周剑.氨基糖苷类药物生物合成基因研究新进展[J].*海峡药学*,2012,24(4):14-17.
- [10]HIDEYUKI TAMEGAIA E N A K.Significance of the 20-kDa Subunit of Heterodimeric 2-Deoxy-scyllo-inosose Synthase for the Biosynthesis of Butirosin Antibiotics in *Bacillus circulans*[J].*Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry*, 2014.
- [11]HUANG F, LI Y, YU J,etc. Biosynthesis of aminoglycoside antibiotics:cloning, expression and characterisation of an aminotransferase involved in the pathway to 2-deoxystreptamineElectronic supplementary information (ESI) available: LC-MS, TLC and ESI-Q-TOF MS. See [J]. *Chemical Communications*, 2002(23):2860-2861.
- [12]YOKOYAMA K, KUDO F, KUWAHARA M, etc. Stereochemical Recognition of Doubly Functional Aminotransferase in 2-Deoxystreptamine Biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005,127(16):5869-5874.
- [13]HUANG F, SPITELLER D, KOORBANALLY N A, etc. Elaboration of

- Neosamine Rings in the Biosynthesis of Neomycin and Butirosin[J]. ChemBioChem, 2007,8(3):283-288.
- ^[14]DOW G T, THODEN J B, HOLDEN H M. The three - dimensional structure of NeoB: An aminotransferase involved in the biosynthesis of neomycin[J]. Protein Science, 2018,27(5):945-956.
- ^[15]KUDO F, HOSHI S, KAWASHIMA T, etc. Characterization of a Radicals -Adenosyl-l -methionine Epimerase, NeoN, in the Last Step of Neomycin B Biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014,136(39):13909-13915.
- ^[16]YOKOYAMA K, OHMORI D, KUDO F, etc. Mechanistic Study on the Reaction of a Radical SAM Dehydrogenase BtrN by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy[J]. Biochemistry, 2008,47(34):8950-8960.
- ^[17]BALTZ R H. Genetic recombination in Streptomyces fradiae by protoplast fusion and cell regeneration[J]. Journal of general microbiology, 1978,107(1):93.
- ^[18]GODFREY O, FORD L, HUBER M L B. Interspecies matings of Streptomyces fradiae with Streptomyces bikiniensis mediated by conventional and protoplast fusion techniques[J]. Canadian journal of microbiology, 1978,24(8):994-997.
- ^[19]滕慧,张亚雄. 复合诱变选育硫酸新霉素高产菌株的研究[J]. 中国酿造,2008, 27(13):37-39.
- ^[20]陈宏, 张祝兰, 孙菲. 等. 链霉素抗性突变理性筛选硫酸新霉素高产菌株[J]. 生物技术通报, 2014(12): 173-176.
- ^[21]王忠中, 张萍, 石彦鹏. 等离子技术在弗氏链霉菌和侧耳属诱变选育中的应用 [J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(06): 15-18.
- ^[22]Xiang XM, Wen ZW, Zhou JX, et al. Neomycin biosynthesis is regulated positively by AfsA-g and NeoR in Streptomyces fradiae CGMCC 4.7387[J]. Science China-Life Sciences, 2017, 76(009): 980-991.
- ^[23]余飞. 新霉素高产菌株的选育及其发酵过程优化[D].安徽工程大学,2019.
- ^[24]Zheng JZ, Li Y, Guan H, Zhang JH, Tan HR. Enhancement of neomycin production by engineering the entire biosynthetic gene cluster and feeding key precursors in Streptomyces fradiae CGMCC 4.576[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2019, 103(05): 2263-2275.
- ^[25]Zheng JZ, Li Y, Guan H, Zhang JH, et al. Component Optimization of Neomycin Biosynthesis via the Reconstitution of a Combinatorial Mini-Gene-Cluster in Streptomyces fradiae [J]. ACS synthetic biology, 2020, 9(9): 2493-2501.
- ^[26]孙俊峰, 王珊, 刘鹏飞, 等. 弗氏链霉菌遗传操作体系的优化与应用 [J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(02): 128-33.
- ^[27]孙俊峰. 新霉素生物合成的关键酶基因及其原位过表达[D]. 安徽工程大学, 2020.
- ^[28]Li X, Yu F, Liu K, et al. Uncovering the effects of ammonium sulfate on neomycin B biosynthesis in Streptomyces fradiae SF-2[J]. Fermentation, 2022, 8(12): 678-689.
- ^[29]Li X, Yu F, Wang F, et al. Point mutation of V252 in neomycin C epimerase enlarges substrate-binding pocket and improves neomycin B accumulation in Streptomyces fradiae[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2022. 9(1): 123-135.

- [30] WU Y, JIN H, YU Q, et al. Optimizing genome editing efficiency in *Streptomyces fradiae* via a CRISPR/Cas9-mediated editing system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2025,91(2).
- [31] 苏德模马绪荣. 药品微生物简学手册[J]. 中国创意写作研究, 2001(1):0-0.
- [32] FABIANE LACERDA FRANCISCO A M S T. Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products[J]. *ACCEPTED MANUSCRIPT*, 2014.
- [33] CLAROT I, REGAZZETI A, AUZEIL N, etc. Analysis of neomycin sulfate and framycetin sulfate by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005,1087(1-2):236-244.
- [34] SHABIR G A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization[J]. *Journal of Chromatography A*, 987 (2003) 57–66, 2003.
- [35] 张杨慧, 蒋孟虹, 赵敬丹, 等. 柱后衍生化-HPLC 法检测硫酸新霉素的有关物质[J]. *中国抗生素杂志*, 2019,44(5):568-573.
- ZHANG Y H, JIANG M H, ZHAO J D, etc. Detection of the related substances in neomycin sulphate by post-column derivatization HPLC[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2019,44(5):568-573.(in Chinese)
- [36] SRISOM P, LIAWRUANGRATH B, LIAWRUANGRATH S, etc. Simultaneous determination of neomycin sulfate and polymyxin B sulfate by capillary electrophoresis with indirect UV detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007,43(3):1013-1018.
- [37] 张英. 用比色法测定硫酸新霉素溶液的含量[J]. *首都医药*, 2000,7(10):33.
- [38] 何梅凤, 吴伟, 王延东, 等. 快速比色法测定硫酸新霉素滴眼剂的含量[J]. *药品评价*, 2006,3(3):202-203.
- HE M F, WU W, WANG Y D, etc. Determination of neomycin in neomycin sulfate eye drops by rapid colorimetric assay[J]. *DRUG EVALUATION*, 2006,3(3):202-203.(in Chinese)
- [39] 陈沛琦, 钱丽华, 高诚. 紫外分光光度法测定硫酸新霉素滴眼液的含量[J]. *江苏药学与临床研究*, 2005,13(4):59-60.
- CHEN P Q, QIAN L H, GAO C. Spectrophotometric Determination the Content of Neomycin Sulfate Eye Drops[J]. *JIANGSU PHARMACEUTICAL AND CLINICAL RESEARCH*, 2005,13(4):59-60.
- [40] 王国兰, 余立, 张寒. 复方硫酸新霉素喷雾剂含量测定方法的建立[J]. *首都医药*, 1999(11):27.
- [41] WANG X C, WILSON S C, HAMMOND M C. Next-generation RNA-based fluorescent biosensors enable anaerobic detection of cyclic di-GMP[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016,44(17):e139.
- [42] LATCHMAN D S. Transcription Factors: An Overview[J]. *INTRODUCTORY OVERVIEW*, 1997.
- [43] BINDER S, SCHENDZIELORZ G, STÄBLER N, etc. A high-throughput

- p approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level[J].
- Genome biology*
- , 2012,13(5):R40.
- [44]WANG M, LI S, ZHAO H. Design and engineering of intracellular - metabolite - sensing/regulation gene circuits in*Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016,113(1):206-215.
- [45]DIETRICH J A, SHIS D L, ALIKHANI A, etc. Transcription Factor-Based Screens and Synthetic Selections for Microbial Small-Molecule Biosynthesis[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013,2(1):47-58.
- [46]LI S, SI T, WANG M, etc. Development of a Synthetic Malonyl-CoA Sensor in*Saccharomyces cerevisiae* for Intracellular Metabolite Monitoring and Genetic Screening[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015,4(12):1308-1315.
- [47]TANG S Y, CIRINO P C. Design and Application of a Mevalonate - Responsive Regulatory Protein[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011,50(5):1084-1086.
- [48]CHEN W, ZHANG S, JIANG P, etc. Design of an ectoine-responsive AraC mutant and its application in metabolic engineering of ectoine biosynthesis[J]. *Metabolic Engineering*, 2015,30:149-155.
- [49]LIANG W F, CUI L Y, CUI J Y, etc. Biosensor-assisted transcriptional regulator engineering for *Methylobacterium extorquens* AM1 to improve mevalonate synthesis by increasing the acetyl-CoA supply[J]. *Metab Eng*, 2017,39:159-168.
- [50]EPSHTEIN V, MIRONOV A S, NUDLER E. The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003,100(9):5052-5056.
- [51]MELLIN J R, COSSART P. Unexpected versatility in bacterial riboswitches[J]. *Trends in Genetics*, 2015,31(3):150-156.
- [52]ZHANG F, CAROTHERS J M, KEASLING J D. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids[J]. *Nature Biotechnology*, 2012,30(4):354-359.
- [53]MINGYUE FANG T W C Z. Intermediate-sensor assisted push-pull strategy and its application in heterologous deoxyviolacein production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015.
- [54]ESTEVÃO A. PEROZA J C E G, ZAMBONI N. A genetically encoded FRET sensor for monitoring in vivo trehalose-6[J]. *Analytical Biochemistry Methods in the Biological Sciences*, 2014.
- [55]ALIREZA BEHJOUSIAR C K K M. In Situ Monitoring of Intracellular Glucose and Glutamine in CHO Cell Culture[J]. *In Situ Monitoring of CHO Cell Culture*, 2012.
- [56]ROGERS J K, CHURCH G M. Multiplexed Engineering in Biology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2016,34(3):198-206.
- [57]BINDER S, SCHENDZIELORZ G, STABLER N, etc. A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level[J]. *Genome Biol*, 2012,13(5):R40.
- [58]REGINA MAHR A C G A J, Q ÖRN KALINOWSKI B J F A N. Biosensor-driven adaptive laboratory evolution of L-valine production in *Corynebacterium*

- glutamicum[J]. *Metabolic Engineering*, 2015.
- [59] JEONG Y S, CHOI S L, KYEONG H H, etc. High-throughput screening system based on phenolics-responsive transcription activator for directed evolution of organophosphate-degrading enzymes[J]. *Protein Engineering Design and Selection*, 2012,25(11):725-731.
- [60] CHOI S, RHA E, LEE S J, etc. Toward a Generalized and High-throughput Enzyme Screening System Based on Artificial Genetic Circuits[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014,3(3):163-171.
- [61] LIANG W F, CUI L Y, CUI J Y, etc. Biosensor-assisted transcriptional regulator engineering for *Methylobacterium extorquens* AM1 to improve mevalonate synthesis by increasing the acetyl-CoA supply[J]. *Metab Eng*, 2017,39:159-168.
- [62] WANG M, LI S, ZHAO H. Design and engineering of intracellular - metabolite - sensing/regulation gene circuits in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016,113(1):206-215.
- [63] XU P, WANG W, LI L, etc. Design and Kinetic Analysis of a Hybrid Promoter-Regulator System for Malonyl-CoA Sensing in *Escherichia coli*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2014,9(2):451-458.
- [64] SIEDLER S, SCHENDZIELORZ G, BINDER S, etc. SoxR as a Single-Cell Biosensor for NADPH-Consuming Enzymes in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014,3(1):41-47.
- [65] MINGYUE FANG T W C Z, BAI X Z X Z. Intermediate-sensor assisted push-pull strategy and its application in heterologous deoxyviolacein production in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015.
- [66] MEYER A, PELLAUX R, POTOT S, etc. Optimization of a whole-cell biocatalyst by employing genetically encoded product sensors inside nanolitre reactors[J]. *Nature Chemistry*, 2015,7(8):673-678.
- [67] DIETRICH J A, SHIS D L, ALIKHANI A, etc. Transcription Factor-Based Screens and Synthetic Selections for Microbial Small-Molecule Biosynthesis[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013,2(1):47-58.
- [68] RAMAN S, ROGERS J K, TAYLOR N D, etc. Evolution-guided optimization of biosynthetic pathways[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014,111(50):17803-17808.
- [69] YANG J, SEO S W, JANG S, etc. Synthetic RNA devices to expedite the evolution of metabolite-producing microbes[J]. *Nature Communications*, 2013,4(1).
- [70] UMEYAMA T, OKADA S, ITO T. Synthetic Gene Circuit-Mediated Monitoring of Endogenous Metabolites: Identification of GAL11 as a Novel Multicopy Enhancer of S⁻-Adenosylmethionine Level in Yeast[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013,2(8):425-430.
- [71] FARMER W R, LIAO J C. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control[J]. *Nat Biotechnol*, 2000,18(5):533-537.
- [72] ZHANG F, CAROTHERS J M, KEASLING J D. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids[J]. *Nature Biotechnology*, 2012,30(4):354-359.
- [73] XU P, LI L, ZHANG F, etc. Improving fatty acids production by engineering

- dynamic pathway regulation and metabolic control[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014,111(31):11299-11304.
- [74]DAVID F, NIELSEN J, SIEWERS V. Flux Control at the Malonyl-CoA Node through Hierarchical Dynamic Pathway Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. ACS Synthetic Biology, 2016,5(3):224-233.
- [75]ZHOU L, ZENG A. Engineering a Lysine-ON Riboswitch for Metabolic Control of Lysine Production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2015,4(12):1335-1340.
- [76]ZHOU L, ZENG A. Exploring Lysine Riboswitch for Metabolic Flux Control and Improvement of Lysine Synthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2015,4(6):729-734.
- [77]YUKI SOMA T H. Self-induced metabolic state switching by a tunable cell density sensor for microbial isopropanol production[J]. Metabolic Engineering, 2015.
- [78]XIE W, YE L, LV X, etc. Sequential control of biosynthetic pathways for balanced utilization of metabolic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2015,28:8-18.
- [79]DAHL R H, ZHANG F, ALONSO-GUTIERREZ J, etc. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters[J]. Nature Biotechnology, 2013,31(11):1039-1046.
- [80]LIDSTROM M E, KONOPKA M C. The role of physiological heterogeneity in microbial population behavior[J]. Nature Chemical Biology, 2010,6(10):705-712.
- [81]XIAO Y, BOWEN C H, LIU D, etc. Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis[J]. Nature Chemical Biology, 2016,12(5):339-344.
- [82]WADE WINKLER A N R R. Thiamine derivatives bind messenger[J]. letters to nature, 2002.
- [83]韩祥东, 刘薇, 吴存祥, 等. 核糖开关与基因表达调控[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011,27(12):1094-1100.
- HAN X D, LIU W, WU C X, etc. Riboswitch in Gene Expression Regulation[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2011,27(12):1094-1100.(in Chinese)
- [84]BREAKER R R. Complex Riboswitches[J]. Science, 2008,319(5871):1795-1797.
- [85]BARRICK J E, BREAKER R R. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches[J]. Genome Biol, 2007,8(11):R239.
- [86]TOPP S, GALLIVAN J P. Emerging Applications of Riboswitches in Chemical Biology[J]. ACS Chemical Biology, 2010,5(1):139-148.
- [87]HALLER A, RIEDER U, AIGNER M, etc. Conformational capture of the SAM-II riboswitch[J]. Nature Chemical Biology, 2011,7(6):393-400.
- [88]COLLINS J A, IRNOV I, BAKER S, etc. Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme[J]. Genes & Development, 2007,21(24):3356-3368.
- [89]杨会勇, 刁勇, 林俊生, 等. 新型基因表达调控元件—人工核糖开关的构建及筛选[J]. 生物工程学报, 2012,28(02):134-143.
- [90]MANDAL M, LEE M, BARRICK J E, etc. A Glycine-Dependent Riboswitch That Uses Cooperative Binding to Control Gene Expression[J]. Science,

- 2004,306(5694):275-279.
- ^[91]Using a Riboswitch Sensor to Examine Coenzyme B₁₂ Metabolism and Transport in *E. coli*[J].
- ^[92]FOWLER C C, SUGIMAN-MARANGOS S, JUNOP M S, etc. Exploring intermolecular interactions of a substrate binding protein using a riboswitch-based sensor[J]. *Chem Biol*, 2013,20(12):1502-1512.
- ^[93]GAO X, DONG X, SUBRAMANIAN S, etc. Engineering of *Bacillus subtilis* Strains To Allow Rapid Characterization of Heterologous Diguanylate Cyclases and Phosphodiesterases[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014,80(19):6167-6174.
- ^[94]ZHOU H, ZHENG C, SU J, etc. Characterization of a natural triple-tandem c-di-GMP riboswitch and application of the riboswitch-based dual-fluorescence reporter[J]. *Scientific Reports*, 2016,6(1).
- ^[95]MICHENER J K, SMOLKE C D. High-throughput enzyme evolution in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic RNA switch[J]. *Metabolic Engineering*, 2012,14(4):306-316.
- ^[96]YANG J, SEO S W, JANG S, etc. Synthetic RNA devices to expedite the evolution of metabolite-producing microbes[J]. *Nature Communications*, 2013,4(1).
- ^[97]MEYER A, PELLAUX R, POTOT S, etc. Optimization of a whole-cell biocatalyst by employing genetically encoded product sensors inside nanolitre reactors[J]. *Nature Chemistry*, 2015,7(8):673-678.
- ^[98]ESPAH BORUJENI A, MISHLER D M, WANG J, etc. Automated physics-based design of synthetic riboswitches from diverse RNA aptamers[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016,44(1):1-13.
- ^[99]SEELIGER J C, TOPP S, SOGI K M, etc. A riboswitch-based inducible gene expression system for mycobacteria[J]. *PLoS One*, 2012,7(1):e29266.
- ^[100]PEDROLI, Danielle B, etc. Natural riboflavin analogs [J]. *Methods in molecular biology* vol. 1146 (2014): 41-63.
- ^[101]BOROVOK I, GOROVITZ B, SCHREIBER R, etc. Coenzyme B₁₂ controls transcription of the *Streptomyces* class Ia ribonucleotide reductase *nrdAB* operon via a riboswitch mechanism. *Journal of bacteriology*, 2006;188(7):2512-2520.
- ^[102]DROSTE J, RUCKERT C, KALINOWSKI J, et al. Extensive Reannotation of the Genome of the Model Streptomycete *Streptomyces lividans* TK24 Based on Transcriptome and Proteome Information [J]. *Front Microbiol*. 2021;12:604034.
- ^[103]TEZUKA T, OHNISHI Y. Two glycine riboswitches activate the glycine cleavage system essential for glycine detoxification in *Streptomyces griseus*. *Journal of bacteriology*, 2014,196(7), 1369–1376.
- ^[104]RUDOLPH M M, VOCKENHUBER M, SUESS B. Synthetic riboswitches for the conditional control of gene expression in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Microbiology*, 2013,159(Pt_7):1416-1422.
- ^[105]SUESS B. Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003,31(7):1853-1858.

- [106]WEIGAND J E, SANCHEZ M, GUNNESH E, etc. Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation[J]. RNA, 2008,14(1):89-97.
- [107]HANSON S, BERTHELOT K, FINK B, etc. Tetracycline - aptamer - mediated translational regulation in yeast[J]. Molecular Microbiology, 2003,49(6):1627-1637.
- [108]KETZER P, KAUFMANN J K, ENGELHARDT S, etc. Artificial riboswitches for gene expression and replication control of DNA and RNA viruses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014,111(5).
- [109]TOPP S, GALLIVAN J P. Guiding Bacteria with Small Molecules and RNA[J]. Journal of the American Chemical Society, 2007,129(21):6807-6811.
- [110]ROBINSON C J, VINCENT H A, WU M, etc. Modular Riboswitch Toolsets for Synthetic Genetic Control in Diverse Bacterial Species[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014,136(30):10615-10624.
- [111]GALLOWAY K E, FRANCO E, SMOLKE C D. Dynamically Reshaping Signaling Networks to Program Cell Fate via Genetic Controllers[J]. Science, 2013,341(6152).
- [112]WEI K Y, SMOLKE C D. Engineering dynamic cell cycle control with synthetic small molecule-responsive RNA devices[J]. Journal of Biological Engineering, 2015,9(1).
- [113]CHEN Y Y, MICHAEL C J A C. Genetic control of mammalian T-cell proliferation with synthetic RNA regulatory systems[J]. 2010.
- [114]KÖTTER P, WEIGAND J E, MEYER B, etc. A fast and efficient translational control system for conditional expression of yeast genes[J]. Nucleic Acids Research, 2009,37(18):e120.
- [115]JIN Y, WATT R M, DANCHIN A, etc. Use of a Riboswitch-controlled Conditional Hypomorphic Mutation to Uncover a Role for the Essential *csrA* Gene in Bacterial Autoaggregation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2009,284(42):28738-28745.
- [116]MURANAKA N, YOKOBAYASHI Y. A synthetic riboswitch with chemical band-pass response[J]. Chemical Communications, 2010,46(36):6825.
- [117]ZHOU L, ZENG A. Exploring Lysine Riboswitch for Metabolic Flux Control and Improvement of Lysine Synthesis in *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2015,4(6):729-734.
- [118]ZHOU L, ZENG A. Engineering a Lysine-ON Riboswitch for Metabolic Control of Lysine Production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. ACS Synthetic Biology, 2015,4(12):1335-1340.
- [119]SAKIKO OKUMOTO A J A W. Quantitative Imaging with Fluorescent Biosensors[J]. ANNUAL REVIEW OF PLANT BIOLOGY, 2012.
- [120]HEIM R, PRASHER D C, TSIEN R Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994,91(26):12501-12504.
- [121]HALLIDAY N M, HARDIE K R, WILLIAMS P, etc. Quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometry profiling of activated methyl cycle

- metabolites involved in LuxS-dependent quorum sensing in *Escherichia coli*[J]. *Analytical Biochemistry*, 2010,403(1-2):20-29.
- [122]YOU M, LITKE J L, JAFFREY S R. Imaging metabolite dynamics in living cells using a Spinach-based riboswitch[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015,112(21).
- [123]SU Y, HICKEY S F, KEYSER S G L, etc. In Vitro and In Vivo Enzyme Activity Screening via RNA-Based Fluorescent Biosensors for S⁻-Adenosyl-l-homocysteine (SAH)[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016,138(22):7040-7047.
- [124]KELLENBERGER C A, CHEN C, WHITELEY A T, etc. RNA-Based Fluorescent Biosensors for Live Cell Imaging of Second Messenger Cyclic di-AMP[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015,137(20):6432-6435.
- [125]HALLBERG Z F, WANG X C, WRIGHT T A, etc. Hybrid promiscuous (Hypr) GGDEF enzymes produce cyclic AMP-GMP (3' , 3' -cGAMP)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016,113(7):1790-1795.
- [126]余飞, 孙俊峰, 刘鹏飞, 等. 费氏链霉菌产硫酸新霉素高通量选育模型的建立及优化[J]. *食品与发酵工业*, 2019,45(8):162-167, 177.
- YU F, SUN J F, LIU P F, etc. A high-throughput screening method for selecting *Streptomyces fradiae* mutants with improved neomycin yield and its optimization[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019,45(8):162-167, 177.(in Chinese)
- [127]DUCHARDT FERNER E, WEIGAND J E, OHLENSCHLÄGER O, etc. Hochmodulare Struktur und Ligandenbindung durch “Conformational Capture” in einem minimalistischen RNA - Schalter[J]. *Angewandte Chemie*, 2010,122(35):6352-6355.
- [128]杜永光, 郝丽珍, 王萍, 等. 植物组织培养中琼脂浓度和pH对培养基凝固程度的影响[J]. *植物生理学通讯*, 2005,41(5):623.
- DU Y G,HAO L Z,WANG P etc. Effects of agar concentration and pH on coagulation degree of medium in plant tissue culture[J]. *Plant Physiol Letters*, 2005,41(5):623.
- [129]CHYŻY P, KULIK M, RE S, etc. Mutations of N1 Riboswitch Affect its Dynamics and Recognition by Neomycin Through Conformational Selection[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021,8.
- [130]GONG S, Du C, WANG Y. Regulation of the thiamine pyrophosphate (TPP)-sensing riboswitch in NMT1 mRNA from *Neurospora crassa*[J]. *FEBS Lett*, 2020,594(4):625-635.

个人科研成果

- [1] LIU, K., TONG, Z., **ZHANG, X** etc.. A Review: Development of a Synthetic Lactoferrin Biological [J].*System.Biodesign research*,2024.05.30.
- [2] **张轩绮**, 俞飞洋, 李翔飞, 等.费氏链霉菌代谢物新霉素核糖开关传感器的构建与应用[J]. 食品与发酵工业（已收录）
- [3] 刘坤, 薛正莲, 童珍, **张轩绮**.一种分泌表达人乳铁蛋白的毕赤酵母及其构建方法和用:202410286140.3[P].2024-06-07.

致谢

行文至此，落笔为终。回首三年求学时光，那些在图书馆查阅资料的日夜、与导师探讨学术问题的时刻、和同窗并肩奋斗的场景，此刻都化作心中温暖的回忆。这篇论文的完成，凝聚着太多人的帮助与支持，在此，我想用最朴实的话语，向他们表达最诚挚的谢意。

云山苍苍，师道长明。首先要向我的导师薛正莲教授致以最深切的敬意。导师严谨的治学态度、渊博的专业知识，不仅教会我如何做学问，更教会我如何做人。因为我的课题进度较慢，研三后半年老师一字一句的帮我修改论文，从早上修改到晚上连午饭都没吃，当时我的心里有震撼有敬佩，到最终的修改完善，每一个环节都离不开导师的悉心指导。面对我在研究中遇到的困惑与难题，老师总是耐心解答，为我指明方向。这份师恩，我将永远铭记于心。我坚定的相信：一个优秀且伟大的女性领导者您是真正的实至名归，不仅是摘下某个头衔的桂冠，而是让每个途经您星空的人，都找到属于自己的轨道与光芒。

同时，特别感谢我的小导师刘坤老师。在整个研究过程中，您亲自做实验为我演示实验细节，用实际行动诠释了严谨治学的态度与坚守原则的精神。无论是实验方案的反复推敲，还是论文数据的逐行核验，您始终以高标准要求我，不容许丝毫敷衍与疏漏；面对研究中可能出现的学术争议与模糊地带，您坚守学术规范，用清晰的逻辑和专业的判断指引我走向正确的方向。正是您这种对学术的敬畏之心与处事原则，让我在科研道路上少走了许多弯路，也让我明白了学术研究的责任与担当。

还有组内的李翔飞师兄和胡孟凯师兄，也一直毫无保留的帮我解决科研中遇到的问题。感谢所有授课老师，在课堂上，你们毫无保留地传授知识，用丰富的教学经验和专业见解，拓宽了我的学术视野，为我的论文写作和研究打下了坚实的基础。感谢刘艳老师、李闯老师、赵明老师、刘庆涛老师、张会敏老师以及生食院的各位老师，感谢你们一路的陪伴与关怀！

感谢一起学习的同组好友肖柳柳和王爱琳，我们也是同窗也是室友，相处三年，我们没有过矛盾，没有想象中的勾心斗角，相处的也十分和谐。是你们在我疲惫迷茫时给予鼓励，在我遇到困难时伸出援手。我们一起讨论问题、分享心得，

这段并肩作战的日子，是我研究生生活中最珍贵的回忆。还有已经毕业的师兄程一晗，帮助了我非常非常多，不仅是学习还有在实验陷入僵局的艰难时刻，师兄凭借丰富的经验给我提出建议，如暗夜明灯，驱散了笼罩在我心头的困惑。感谢刘俊师兄、周健师姐、洪佳伟师兄、王炳生师兄、韩肋撒师姐、张文芳师姐、朱司宝、王雨晴、高旭丽、孙佳成、倪张晨宇、俞飞洋以及 208 实验室每个小伙伴。

最后，要特别感谢我的父母和丈夫。在我求学的日子里，是你们默默承担了许多，给予我最温暖的关怀和最坚定的支持。你们的理解与包容，是我前进路上最强大的动力。

论文的完成，既是终点，也是新的起点。在安徽工程大学的三年难以忘怀，我将心怀感恩，迈向人生的新阶段！