

分类号: Q93

单位代码: 10363

密级: 公开

学号: 2220510108

枯草芽孢杆菌动态调控系统的构建及其在 MK-7 合成
途径的应用

CONSTRUCTION OF THE DYNAMIC
REGULATORY SYSTEM OF *BACILLUS SUBTILIS*
AND APPLICATION IN THE MK-7 SYNTHESIS
PATHWAY

学生姓名: _____ 高旭丽 _____

指导教师: _____ 刘艳教授 _____

专 业: _____ 生物工程 _____

研究方向: _____ 微生物资源与育种 _____

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：高旭丽

日期：2025 年 5 月 18 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：高旭丽

指导教师签名：马晓

日期：2025 年 5 月 18 日

日期：2025 年 5 月 18 日

枯草芽孢杆菌动态调控系统的构建及其在 MK-7 合成途径的应用

摘 要

七烯甲萘醌（MK-7）作为一种具有显著药理活性的优良药用化合物，不仅在促进骨骼发育、防止骨质疏松、预防心血管疾病等方面有显著效果，而且在预防帕金森综合征、阿尔茨海默症等神经退行性疾病的症状上表现出色，还展现出了抑制肿瘤细胞增殖的显著效果，因此具有十分广泛的应用前景。但在 MK-7 的工业化生产过程中存在产量低，生产周期长等问题，虽然已经采用了许多策略来提高枯草芽孢杆菌中 MK-7 的产量，但这些常见方法的有效性并不高，利用动态调控系统构建调控开关来平衡枯草芽孢杆菌中 MK-7 生产过程中存在的生长与代谢之间的问题成为近年来的研究热点。本课题通过构造动态调控开关 PhrC-RapC-SinR，对 MK-7 的合成途径中副产物的合成进行调控，进而提高 MK-7 的合成能力。具体研究内容如下：

(1) 对 SinR 进行生物信息学分析。通过生物信息学工具对转录因子 SinR 的理化性质、结构域以及空间结构进行预测及分析，结果表明 SinR 不存在信号肽，无跨膜区，为胞内蛋白。进一步对二级结构进行预测，结果表明 SinR 的二级结构相对简单，以 α -螺旋与无规则卷曲组成，通过氢键、疏水键等非共价相互作用维系其三级结构的构象，基于对 SinR 三级结构的建模预测，我们发现了三个潜在

的结合口袋。此外，根据 SinR 与其他基因的相互作用网络分析，我们还发现 SinR 作为一种重要的转录因子，在细菌基因表达调控中发挥着至关重要的作用。不仅参与了细胞的多种生理过程，如代谢、抗逆性以及生物膜的形成等，还通过与其他关键基因相互作用，形成了一个复杂的调控网络。它作为调控网络中的一个关键节点，调控着多个目标基因的表达。

(2) PhrC-RapC-SinR 动态调控系统构建及 SinR 靶向启动子的优化。为了验证 RapC 对 SinR 的调控作用，利用 IPTG 诱导型启动子 $P_{grac100}$ 替换 *rapC* 的原始启动子，并利用绿色荧光蛋白(eGFP) 作为 SinR 表达量的指示蛋白，通过检测荧光强度的变化表明 RapC 对 SinR 的表达有抑制作用。将启动子 P_{phrC} 原位替换为 $P_{grac100}$ ，再次检测荧光强度表明 PhrC 可以缓解 RapC 对于 sinR 的抑制作用，证明了构建 PhrC-RapC-SinR 调控系统的可行性。随后，对 SinR 靶向启动子进行筛选并优化。通过对 SinR 的分析，确定 SinR 的靶向启动子： P_{tapA} 、 P_{epsA} 、 P_{spoIIA} 、 P_{slrR} 、 P_{aprE} 、 P_{cpr} 、 P_{sacB} 、 P_{amyE} 、 P_{bpr} 。经过启动子转录强度的对比，筛选获得 SinR 调控效果最佳的启动子 P_{epsA} ，对 P_{epsA} 序列中 SinR 结合位点的数量以及核心区域-35 区及-16 区进行优化，获得一系列响应 SinR 浓度的启动子，其中 SinR 抑制效果最佳的启动子为 P_{e9} ，其抑制作用为 P_{epsA} 的 4.36 倍。以枯草芽孢杆菌 168 为出发菌株，构建了 PhrC-RapC-SinR 动态调控元件，通过响应菌体密度，实现对 SinR 的精确调控。最后，为了验证 PhrC-RapC-SinR 系统的特异性，利用启动子 P_{hag} 控制 *phrC* 和 *rapC* 的表达，观测细胞密度(OD_{600})

与启动子 P_{e9} 转录强度的关系。结果表明，当 OD_{600} 小于 10.3 时，动态调控元件 PhrC-RapC-SinR 对目的基因的抑制作用较弱；当 OD_{600} 大于 10.3 后，开始明显抑制后续基因的表达。因此，PhrC-RapC-SinR 系统可以通过响应细胞密度作为一个开关来调控靶基因的转录。

(3) MK-7 合成过程中代谢分流途径的分析及利用动态调控系统微调枯草芽孢杆菌 MK-7 的合成。MK-7 合成途径中存在诸如芳香族氨基酸及羟基丁酮等物质的副产物合成途径，会对 MK-7 的合成造成代谢分流。通过敲除上述物质的调控基因 *aroA*、*aroH*、*trpE*、*pabAB*、*dhbB*、*alsS-D*，发酵 6 天后，MK-7 的产量由 13.96 mg/L 分别降为 5.15 mg/L、7.63 mg/L、7.75 mg/L、11.01 mg/L，7.92 mg/L、5.77 mg/L，生物量由 30.67 分别下降为 16.15、17.81、20.12、25.81、20.51、17.39。证明此类物质在菌体生长方面起着重要作用，进而影响 MK-7 的产量。所以无法通过敲除副产物合成途径中的基因减少 MK-7 合成途径的代谢分流，因此我们将动态调控元件 PhrC-RapC-SinR 作为调控开关，将副产物调控基因的原始启动子替换为优化后响应 SinR 的启动子，通过响应菌体密度微调上述基因的表达，使菌株生长和代谢分开。最终重组菌株 BW6-3 (P_{e11} -*aroA*:: P_{e9} -*aroH*:: P_{e9} -*trpE*:: P_{e9} -*dhbB*:: P_{e16} -*alsS-D*) MK-7 的产量为 87.53 mg/L，是出发菌株 BS168 的 6.27 倍。同时，BW6-3 的 OD_{600} 值高于 BS168，表明此次改造对细菌的生长未产生负担，同时能有效减轻 MK-7 竞争分流，提高产量。结果证明了 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统在枯草芽孢杆菌 MK-7 合成过程中干

扰代谢分流的可行性，同时，也为提高相关菌株中次生代谢产物的产量提供了一种新的思路。

关键词：枯草芽孢杆菌，SinR，动态调控，启动子工程，MK-7

Construction of the dynamic regulatory system in *Bacillus subtilis* and application in the MK-7 synthesis pathway

ABSTRACT

Menaquinone-7 (MK-7), a superior medicinal compound with remarkable pharmacological activity, exhibits significant therapeutic potential across multiple domains. It not only demonstrates proven efficacy in promoting bone development, preventing osteoporosis, and mitigating cardiovascular risks, but also shows exceptional promise in alleviating symptoms of neurodegenerative diseases such as Parkinson's syndrome and Alzheimer's disease. Additionally, its potent anti-proliferative effects against tumor cells highlight its broad clinical applications. Despite these promising attributes, industrial production of MK-7 faces challenges such as low yields and extended production cycles. Although numerous strategies have been employed to enhance MK-7 production in *Bacillus subtilis*, the effectiveness of conventional approaches remains limited. Consequently, the development of dynamic regulatory systems to construct control switches, aimed at resolving the growth-metabolism imbalance during MK-7 biosynthesis in *Bacillus*

subtilis, has emerged as a focal area of recent research. The present study proposes an innovative dynamic regulatory switch, PhrC-RapC-SinR, designed to modulate byproduct synthesis within the MK-7 biosynthetic pathway. By optimizing the regulatory mechanisms governing metabolic flux, this switch enhances the overall efficiency of MK-7 production. The specific research objectives are as follows:

(1) Bioinformatics analysis of SinR. A comprehensive bioinformatics analysis was conducted on the transcription factor SinR. Utilizing advanced bioinformatics tools, we predicted and analyzed the physicochemical properties, functional domains, and three-dimensional structure of SinR. The results revealed that SinR lacks a signal peptide and transmembrane regions, confirming its intracellular localization. Further prediction of the secondary structure indicated a relatively simple composition dominated by α -helices and random coils, with the tertiary structure stabilized through non-covalent interactions such as hydrogen bonds and hydrophobic forces. Based on homology modeling of SinR's tertiary structure, three potential binding pockets were identified. Furthermore, an interaction network analysis between SinR and other genes elucidated its pivotal role as a master transcription factor in bacterial gene expression regulation. SinR not only participates in diverse cellular physiological processes, including metabolism, stress resistance, and biofilm formation, but also forms a complex regulatory network

through interactions with other key genes. As a critical node within this network, SinR modulates the expression of multiple target genes, underscoring its essential function in orchestrating bacterial cellular activities.

(2) Construction of the PhrC-RapC-SinR dynamic regulatory system and optimization of SinR-targeted promoters. To validate the regulatory effect of RapC on SinR, the native promoter of *rapC* was replaced with the IPTG-inducible promoter P_{grac100} . Green fluorescent protein (eGFP) was employed as a reporter for SinR expression levels. By monitoring changes in fluorescence intensity, we demonstrated that RapC exerts an inhibitory effect on SinR expression. Subsequently, the promoter P_{phrC} was replaced in situ with P_{grac100} , and fluorescence intensity measurements revealed that PhrC can alleviate the RapC-mediated suppression of SinR, thus confirming the feasibility of constructing the PhrC-RapC-SinR regulatory system. Next, we screened and optimized SinR-targeted promoters. Through comprehensive analysis of SinR, the following candidate promoters were identified: P_{tapA} , P_{epsA} , P_{spoIIA} , P_{slrR} , P_{aprE} , P_{epr} , P_{sacB} , P_{amyE} , and P_{bpr} . By comparing their transcriptional strengths, P_{epsA} emerged as the most effective promoter under SinR regulation. Further optimization of the SinR binding site number and the core regions (-35 and -16 zones) within the P_{epsA} sequence yielded a series of promoters responsive to SinR concentration.

Among these, promoter P_{e9} exhibited the strongest inhibitory effect, with suppression 4.36-fold greater than that of P_{epsA} . Employing *Bacillus subtilis* 168 as the host strain, we constructed the PhrC-RapC-SinR dynamic regulatory element, enabling precise control over SinR expression in response to bacterial cell density. Finally, to verify the specificity of the PhrC-RapC-SinR system, the promoters P_{hag} were used to drive the expression of *phrC* and *rapC*. By observing the relationship between cell density (OD_{600}) and the transcriptional intensity of promoter P_{e9} , we found that when OD_{600} was below 10.3, the dynamic regulatory element exerted weak inhibitory effects on target genes. However, when OD_{600} exceeded 10.3, significant suppression of downstream gene expression was observed. These findings establish that the PhrC-RapC-SinR system functions as a cell density-responsive switch to modulate target gene transcription.

(3) Analysis of metabolic shunt pathways during MK-7 biosynthesis and fine-tuning its production via a dynamic regulatory system in *Bacillus subtilis*. The MK-7 biosynthetic pathway is accompanied by shunt pathways producing byproducts such as aromatic amino acids and acetoin, which divert metabolic fluxes away from MK-7 production. Gene knockout experiments targeting key regulatory genes (*aroA*, *aroH*, *trpE*, *pabAB*, *dhbB*, *alsS-D*) in these shunt pathways revealed significant reductions in MK-7 yields from 13.96 mg/L to 5.15

mg/L, 7.63 mg/L, 7.75 mg/L, 11.01 mg/L, 7.92 mg/L, and 5.77 mg/L, respectively. Concurrently, biomass decreased from 30.67 to 16.15, 17.81, 20.12, 25.81, 20.51, and 17.39, respectively. These results demonstrate the crucial roles of these shunt metabolites in bacterial growth, which indirectly affect MK-7 production. Since direct knockout of shunt pathway genes compromised both growth and MK-7 synthesis, we adopted the PhrC-RapC-SinR dynamic regulatory element as a genetic switch. By replacing native promoters of shunt pathway genes with optimized SinR-responsive promoters, we achieved cell density-dependent fine-tuning of gene expression, decoupling bacterial growth from metabolic flux distribution. The engineered strain BW6-3, harboring promoter replacements ($P_{e11}\text{-}aroA::P_{e9}\text{-}aroH::P_{e9}\text{-}trpE::P_{e9}\text{-}dhbB::P_{e16}\text{-}alsS\text{-}D$), produced 87.53 mg/L MK-7, representing a 6.27-fold increase over the parental strain BS168. Notably, BW6-3 exhibited higher OD₆₀₀ values than BS168, indicating that the metabolic reprogramming did not impose growth burdens while effectively mitigating metabolic competition for MK-7 biosynthesis. These findings validate the feasibility of employing the PhrC-RapC-SinR system to modulate metabolic shunts during MK-7 production in *Bacillus subtilis*. Furthermore, this strategy offers a novel approach for enhancing secondary metabolite yields in related bacterial strains by optimizing metabolic flux distribution.

KEY WORDS: *Bacillus subtilis*, SinR, dynamic regulatory, promoter engineering, MK-7

目录

摘 要	I
ABSTRACT	V
第 1 章 绪论	1
1.1 七烯甲萘醌简介	1
1.1.1 MK-7 的结构及理化性质	1
1.1.2 MK-7 的生物活性及功能	1
1.1.3 MK-7 的来源	3
1.1.4 枯草芽孢杆菌中 MK-7 的生物合成	4
1.2 动态调控系统简介	6
1.2.1 动态调控的种类	7
1.2.2 群体感应系统	7
1.3 枯草芽孢杆菌转录因子 SinR 的调控网络分析	8
1.4 生物信息学的应用	9
1.5 研究目的、内容及意义	9
1.5.1 研究目的与意义	9
1.5.2 研究内容	10
第 2 章 枯草芽孢杆菌转录因子 SinR 的生物信息学分析	11
2.1 前言	11
2.2 实验方法	11
2.2.1 SinR 的理化性质	11
2.2.2 SinR 的功能位点及其结构域	11
2.2.3 SinR 的二、三级结构及其调控作用关系网络	11
2.3 结果与分析	12
2.3.1 SinR 的理化性质分析	12
2.3.2 SinR 的功能位点及其结构域分析	13
2.3.3 SinR 的二、三级结构及其调控作用关系网络分析	15
2.4 本章小结	17
第 3 章 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统的构建及 SinR 靶向启动子的优化	18

3.1 前言	18
3.2 实验材料	19
3.2.1 菌株及质粒	19
3.2.2 仪器及试剂	24
3.2.3 培养基及溶液	26
3.3 实验方法	27
3.3.1 菌株活化及感受态制备	27
3.3.2 分子生物学实验方法	30
3.3.3 重组菌株的构建及抗性祛除	29
3.3.4 启动子工程	30
3.3.5 相对荧光强度的检测	30
3.4 结果与分析	31
3.4.1 PhrC、RapC 对 SinR 的调控作用	31
3.4.2 SinR 靶向启动子的筛选	34
3.4.3 SinR 靶向启动子的优化	38
3.4.4 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统的构建	41
3.5 本章小结	43
第 4 章 MK-7 合成过程代谢分流途径的分析及利用动态调控系统调节枯草芽孢杆菌 MK-7 的合成	44
4.1 前言	44
4.2 实验材料	45
4.2.1 菌株及质粒	45
4.2.2 仪器及试剂	49
4.2.3 培养基及溶液	49
4.3 实验方法	49
4.3.1 菌株活化及感受态制备	49
4.3.2 分子生物学实验方法	49
4.3.3 重组菌株的构建及抗性祛除	49
4.3.5 MK-7 的发酵及提取	50
4.3.6 MK-7 的检测及标曲制定	50

4.4 结果与分析	50
4.4.1 MK-7 生物合成途径的分析	50
4.4.2 动态调控系统对 SA 途径中代谢分流途径的调控作用	54
4.4.3 动态调控系统对 MK 途径和甘油裂解途径中代谢分流途径的调控作用	57
4.4.4 动态调控系统对菌体生长情况的影响	59
4.5 本章小结	60
第 5 章 结论与展望	62
5.1 结论	62
5.2 展望	63
参考文献	65

第 1 章 绪论

1.1 七烯甲萘醌简介

甲萘醌（Menaquinone, MK），又称维生素 K₂，是维生素 K 家族中的一种重要成员。维生素 K 是一类具有 2-甲基-1,4 萘醌环骨架结构并在 C3 位置连接侧链的衍生物，主要分为维生素 K₁（叶绿醌）和维生素 K₂（甲萘醌）两大类^[1]。其中，维生素 K₂ 根据侧链上饱和异戊二烯链的数量不同，又可分为多种亚型。七烯甲萘醌（MK-7）萘醌环侧链含有七个异戊烯单元，作为维生素 K₂ 系列化合物中的重要活性体之一，因其独特的结构和广泛的生物活性，近年来在生物医药、营养保健等领域受到了广泛关注^[2]。

1.1.1 MK-7 的结构及理化性质

MK-7 的分子式为 C₄₆H₆₄O₂，分子量为 649。其结构特点在于侧链中含有七个异戊烯单元，这一结构特征赋予了 MK-7 独特的生物活性。MK-7 呈白色至淡黄色晶体粉末状，熔点为 53-55 °C，沸点较高，密度适中。MK-7 对光和温度敏感，因此在储存和使用过程中需要注意避光和控温。易溶于正己烷等有机溶剂，溶于乙醇，微溶于甲醇，几乎不溶于水。这一性质使得 MK-7 在制备和应用过程中需要选择合适的溶剂和工艺条件。此外，MK-7 在常温下相对稳定，不易分解，但在高温、强酸或强碱等极端条件下，其结构可能会受到影响，导致生物活性降低或丧失。

1.1.2 MK-7 的生物活性及功能

MK-7 具有极高的生物利用率和生理活性，其血液半衰期长达三天，能在体内长时间发挥作用。这使得 MK-7 在促进骨骼健康、保护心血管健康等方面具有显著优势。

1.1.2.1 促进骨骼健康

MK-7 能够刺激成骨细胞的分化与增殖，这是骨骼生长、修复和维持的关键过程。MK-7 可以通过促进成骨细胞的活性，加速骨骼的生长发育，提高骨密度和骨质量^[3,4]。同时，MK-7 还能调控骨细胞外基质的矿化，确保骨基质中的矿物

质（如钙和磷）以正确的比例和形式沉积，从而形成坚固的骨骼结构。此外，MK-7 还能上调骨标志物基因的表达，如骨钙素（OC）和基质 Gla 蛋白（MGP）等，这些基因在骨骼的生长、修复和矿化过程中起着重要作用^[5]。更重要的是，MK-7 能够抑制破骨细胞的生成，破骨细胞是负责骨骼吸收的细胞，其活动过度会导致骨质疏松。MK-7 通过抑制破骨细胞的生成和活性，从而减少骨骼的吸收过程，减缓骨质流失速度，可以有效预防和改善骨质疏松^[6]，这一功能对于老年人以及长期卧床不起等易发生骨质疏松的人群具有重要意义。

1.1.2.2 保护心血管健康

MK-7 在心血管健康方面也发挥着重要作用^[7]。它能够激活一种叫做 Matrix Gla 蛋白（MGP）的物质，这种蛋白具有阻止钙离子在动脉壁中沉积的功能^[8]。钙离子在动脉壁中的沉积是动脉粥样硬化的重要诱因之一，因此 MK-7 的这一作用机制有助于降低动脉粥样硬化的风险^[9]。此外，MK-7 形式的维生素 K₂ 已在健康和患病患者队列的大量试验中证明，对血管钙化的发展具有长期保护作用^[10,11]。

1.1.2.3 预防阿尔茨海默病

近年来的研究表明，MK-7 还具有预防阿尔茨海默病（老年痴呆症）的潜力。神经退行性变导致类似阿尔茨海默病的认知障碍，而 MK-7 可以通过增加乙酰胆碱（与认知过程密切相关的神经递质）和 BDNF（脑源性神经营养因子）水平，同时减少氧化应激、神经炎症和 β -淀粉样蛋白（引起神经突退缩和神经元变性的脑内老年斑）的水平，从而保护大脑海马神经元免受损伤^[12,13]，这一发现为 MK-7 在神经退行性疾病的预防和治疗中提供了新的应用前景。

1.1.2.4 其他生物活性及功能

除了上述主要功能外，维生素 K₂ 可以作为线粒体电子载体预防线粒体功能障碍导致的帕金森综合征^[14]；通过与结合抑制因子 κ B 诱导癌细胞的细胞周期停滞，抑制癌细胞的增殖^[15]，并且通过与子炔素 A 的联合治疗可以诱导细胞 G1 期的生长停滞，显著抑制原癌基因 c-MYC 的表达，进而抑制白血病细胞及癌细胞的增长^[16]，由此预防癌症；同时，研究表明维生素 K₂ 对于儿童大脑发育和神经系统功能完整性的发育具有促进作用^[17]，此外维生素 K₂ 促进血液凝固方面、缓解炎症、降低 II 型糖尿病等方面也发挥着重要的作用^[18-20]。

综上所述，MK-7 作为维生素 K₂ 的一种重要亚型，具有多种生物活性及功能。在促进骨骼健康、保护心血管健康、预防阿尔茨海默病、帕金森综合征以及抗癌症等方面均表现出色。这些功能使得 MK-7 成为生物医药和营养保健领域的研究热点，并为其在相关领域的应用提供了理论基础和实践指导。

1.1.3 MK-7 的来源

尽管 MK-7 展现出广泛的生物活性与显著的应用潜力，然而，当前 MK-7 在市场上的应用范围相对有限。此外，由于其生产成本偏高，导致 MK-7 的市场售价也较为昂贵。目前，市场上 MK-7 的来源主要可以归结为以下三类。

一是从食物中提取。在自然界中，一些经过特定发酵工艺的食品，例如日本传统的纳豆中富含 MK-7。Jeong^[21]等人的研究表明市面上销售的纳豆中 MK-7 含量范围为 285.0-1221.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ，在中国食品科学技术学会第二十一届年会中有报道枯草芽孢杆菌对纳豆粉经过 48 h 发酵，MK-7 的含量可达到 $2.05 \pm 0.05\text{ mg}/100\text{ g}$ ^[22]。然而，遗憾的是，纳豆因其别具一格的风味，并未能赢得大众的广泛青睐。相比之下，奶酪、乳制品、肉类及蜂蜜中的 MK-7 含量较少^[23-25]。这种源自自然的 MK-7，其分子结构与人体的生物环境高度契合，因此极易被人体消化系统吸收利用。然而，食物中 MK-7 的含量并非固定不变，而是受到发酵条件、原材料品质、微生物的种类和活性等多种外部因素的制约。因此，尽管通过食物获取 MK-7 是一种既天然又健康的方式，但通过食物获取的 MK-7 不能满足人体所需的摄入量。此外，通过食物提取 MK-7 的工业生产中，食物中无法获得稳定且充足的 MK-7 供应，提取 MK-7 的工序复杂，成本过高，并不能满足工业中实际生产的要求。

二是通过化学合成法合成。维生素 K₂ 的合成可追溯至 20 世纪中叶，采用 Friedel-Crafts 烷基化法合成，但该方法生成的维生素 K₂ 中含有大量异构体以及其他副产物，对于人体具有生物活性的维生素 K₂ 含量较低^[26]。随后，Min^[27]利用短链通过亲核取代反应偶联前体物质，从而合成维生素 K₂，但产物中 MK-4 的占比较多。Aneta^[28]分步获得高纯度的含一个异戊二烯侧链的甲萘醌衍生物与六异戊烯基溴化物，再进行高效结合，最终获得纯度高达 99.9% 的 MK-7。虽然 MK-7 的化学合成法经过不断创新，MK-7 的产量及纯度得到有效提升，但是化学合成 MK-7 的步骤相对复杂，需要精确控制反应条件和原料配比。此外，对于

人体而言,只有具有全反式异戊烯侧链的 MK-7 展现出明确的生物活性^[29],但在化学合成过程中,形成全反式构型具有挑战性,这不仅增加了生产成本,还可能导致生产效率低下。此外,合成 MK-7 的过程中可能会使用有害的化学物质和溶剂,这些物质在生产和处理过程中可能会对环境造成污染。

三是通过微生物发酵合成^[30]。在自然界中,众多细菌都具备合成维生素 K₂ 的能力,其中典型的代表有枯草芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、大肠杆菌以及乳酸菌^[31]。其中芽孢杆菌发酵合成的维生素 K₂ 以 MK-7 为主,而大肠杆菌主要合成用于电子传递的 MK-8,乳酸菌的主要产物则为 MK-9^[32,33]。研究初期,科研人员的主要聚焦于高产菌株的筛选及诱变育种、发酵条件的优化^[34,35]以及生物膜反应器的革新与突破。Xu^[36]从豆豉中筛选获得一株生产 MK-7 的解淀粉芽孢杆菌,并通过常压室温等离子体(ARTP)系统,对分离到的高产 MK-7 菌株进行诱变处理,使得 MK-7 产量由 7.1 mg/L 上升到 30.2 mg/L。以枯草芽孢杆菌 BS-5 为出发菌株,许静^[37]等人采用 UV-NTG 复合诱变的方式进行诱变,使诱变后菌株的 MK-7 产量达到 19.85 mg/L,与原始菌株产量相比提高了 90.5%。黄友美^[38]等人通过对发酵培养基中碳源、氮源和无机盐优化后 MK-7 的产量提高了 48.04%。Zhou^[39]等人通过向发酵液中添加表面活性剂 Tween-80 改变了细菌细胞膜的形态,有利于 MK-7 向胞外转移,最终使得 MK-7 含量提高了 80.3%。从实验室规模逐步放大到中试规模和生产规模时,研究人员也对生物膜反应器进行优化。随着生物技术的不断发展,生物反应器正逐步实现自动化和智能化。通过集成先进的传感器、控制器和执行器等技术手段,生物反应器可实现更加精确和高效的 MK-7 生产^[40-43]。随着基因工程、转录组学和蛋白质组学的发展,对 MK-7 的研究逐渐转向了基因敲除和过表达等静态调控。例如, Ma^[44]将 MK-7 合成途径中的一些关键酶 MenA (1,4-二羟基-2-萘酸合成酶)、Dxs (1-脱氧-D-木黄糖-5-磷酸合成酶)、Idi (异戊烯基二磷酸异构酶)、Dxr (1-脱氧-D-木黄糖-5-磷酸还原异构酶)组合在一个基因簇上并利用强启动子过表达上述基因,导致 MK-7 的产量增加 11 倍。

1.1.4 枯草芽孢杆菌中 MK-7 的生物合成

枯草芽孢杆菌作为一种经美国食品药品监督管理局认证的食品安全菌株,是一种重要的工业微生物^[45]。其显著优势在于生长速度极快,能够在极短的时间内

迅速增殖，达到较高的细胞密度，这对于提高生产效率至关重要^[46]。此外，该菌株展现出极强的抗逆性，能够轻松应对包括高温、干燥、化学制剂等多种不利环境条件的挑战，从而确保了其在各种复杂环境下的稳定生长和高效产出。在培养方面，枯草芽孢杆菌表现出极高的适应性，对营养条件的要求相对宽松，使得其在实验室和工业环境中的培养变得简单。更为重要的是，它拥有高效的产物合成能力，能够大量合成 MK-7 等高价产物，这对于提升经济效益具有重要意义^[47]。同时，枯草芽孢杆菌的遗传背景清晰明了，分子操作方法也相当成熟，这为科研人员提供了极大的便利^[48]。他们可以通过基因工程等手段对菌株进行定向改造和优化，从而进一步提高 MK-7 的产量和品质。因此，枯草芽孢杆菌成为了实验室研究和工业生产 MK-7 的首选菌株^[49]。

在枯草芽孢杆菌中 MK-7 的代谢过程被模块化区分为 4 个途径，分别是甘油途径、莽草酸 (SA) 途径、甲基赤藓糖醇磷酸途径 (MEP 途径) 以及甲萘醌 (MK) 途径^[50]。首先利用甘油分解为葡萄糖，进一步经过糖酵解途径形成必要的能量及中间代谢产物。利用赤藓糖-4-磷酸 (E4P) 和磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 通过 SA 途径和 MK 途径形成萘醌环，利用 3-磷酸甘油醛 (G3P) 和丙酮酸 (PYP) 通过 MEP 途径形成异戊二烯侧链，最终在去甲基甲萘醌甲基转移酶 MenG 的作用下合成 MK-7 (图 1-1)。在 MK-7 合成过程中伴随着诸多副产物的合成，这一过程不仅会消耗大量的底物资源，而且所产生的部分副产物在 MK-7 合成的后期阶段还会发挥抑制作用。如，在莽草酸途径中，合成的分支酸可以形成苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸，这些芳香族酸含量过高会对 DAHP 合酶起反馈抑制作用^[51]，而 DAHP 合成酶是莽草酸途径第一步反应的催化酶。综上所述，枯草芽孢杆菌中 MK-7 的代谢过程是一个复杂而精细的系统，涉及多个途径和众多酶促反应。通过深入研究和优化这些途径，可以进一步提高 MK-7 的产量和品质，为相关产业的发展提供有力支持。

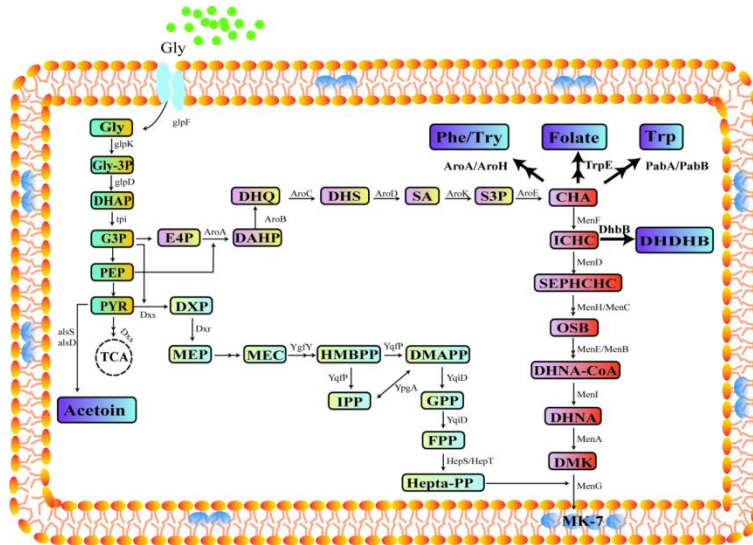


图 1-1 枯草芽孢杆菌中甲萘醌-7 的生物合成途径

Figure 1-1 Biosynthetic pathway of menadione-7 in *Bacillus subtilis*

1.2 动态调控系统简介

代谢工程对微生物进行改造主要是通过改变或调控微生物体内关键的代谢途径或引入新的代谢途径来提高目标产物产量、增强细胞耐受性、减少副产物等^[52]。传统的代谢工程通过静态调控实现生产所需，常见途径有对目标产物合成中的关键基因进行过表达和对旁路途径相关基因进行敲除，由于操作简单、周期短、易设计等特点，被广泛用于与菌株的改造^[53]。经改造的菌株用于生产时，其产量与原始菌株相比呈现出增长趋势，但在大规模工业生产时，菌体某一代谢通量的过度驱动导致细胞本身代谢流与能量分配体系失衡、细胞周期阻滞、毒性压力等问题的发生，限制了目标产物得率及生物合成产能^[54]。相比之下，在微生物细胞内存在天然的动态调控系统可以依据自身所处环境对基因表达进行精准调控，对中间代谢物的生产和消耗的严格动态控制，防止它们积累，推动通量增加通过途径，从而实现更高的滴度、产量或生产率。因此，越来越多的研究人员受微生物天然存在的动态调控机制的启发，利用原有机或设计新的动态调控机制对微生物进行代谢改造，使微生物对细胞生长和产品合成的代谢流进行精确分配，以实现工业生产所需^[55,56]。

微生物的动态调控系统主要包括三大部分：信号分子、传感元件、调控元件^[57]，通过传感元件（转录因子、核糖核酸开关、特定蛋白等）接受信号分子的信

号（如代谢物、诱导物浓度变化、外界环境变化等），进一步导致调控元件（启动子、核糖核酸开关、微小 RNA、CRISPR 系统等）调控基因表达，维持体内平衡、协调代谢流量以及使代谢适应不断变化的环境和压力的途径^[58,59]。目前，常见的动态调控方式是对代谢网络中关键酶基因的表达进行动态调控，通过感知胞内代谢物浓度波动或胞外环境信号变化实现目标化合物的精准调控与产量提升，有效地解决了传统代谢工程因静态调控导致的代谢负担积累和产物合成效率衰减的问题。随着合成生物学、蛋白质组学、计算机算法等各领域的发展，复杂的代谢通路被精确调控，微生物的代谢网路逐渐清晰，动态调控在工业微生物中被广泛应用^[60,61]

1.2.1 动态调控的种类

动态调控的种类繁多，按响应信号分类可以分为以下几种：

(1) 依赖于外部条件改变的动态调控

外源添加诱导物：通过添加特定的诱导物来触发调控机制^[62]。

外部物理条件变化：如光照、温度等物理条件的改变来响应并调控系统^[63,64]。

培养基成分变化：通过改变培养基中的成分实现动态调控系统^[65]。

(2) 依赖于特定代谢途径的动态调控

以代谢途径中的中间代谢物或产物为信号，利用能够响应这些代谢物的核糖开关或生物传感器对代谢途径进行调控。例如，在脂肪酸的生产中，利用转录抑制因子 FapR 特异性感应丙二酰辅酶 A，并调节枯草芽孢杆菌脂肪酸生物合成途径中的基因表达^[66]。

(3) 依赖于群体密度的动态调控

通过模仿微生物中的群体感应现象，以特定信号分子来反映群体密度，细胞通过感知这些信号分子对代谢途径进行调控^[60]。

1.2.2 群体感应系统

群体感应（Quorum sensing, QS）系统是一种微生物间通过分泌和感知信号分子（又称自体诱导物）来协调群体行为的动态调控机制^[67]。该系统允许微生物评估群体密度，进而同步调整基因表达，以适应环境变化或执行如生物发光、抗生素产生、生物膜形成等集体行为。在群体感应系统中，信号分子随着细胞密度的增加而累积，一旦达到阈值，即被特定的传感元件（如 LuxR/I 型或 RhlR/I 型

受体蛋白)识别并结合,形成激活态复合体。这一复合体随后结合至调控元件,启动或抑制下游基因的表达。群体感应不仅参与微生物间的群体交流,还在微生物与宿主相互作用、环境适应及生物技术应用中发挥着重要作用^[68]。通过人工改造群体感应系统,可以精确控制微生物群体的行为,为工业微生物的高效生产、环境治理及新型生物材料的开发提供创新策略。如 Nikolaos^[69]等利用 Lux 系统对大肠杆菌丝氨酸生产途径进行调控,在较低生物量的条件下,生产力与静态调控相比提高了约 28.3%,达到 2.99 mM 丝氨酸/小时。Tian 等^[70]应用内源性 QS 系统与 CRISPRi 耦合,同时下调 TCA 循环、脂肪酸和氨基酸合成途径中的关键节点,以提高工业链霉菌物种的雷帕霉素产量。

但目前对于群体感应系统的开发和利用仍不全面,还有大量未知的调控机制有待研究。目前的研究多集中于对已知系统进行改造或合成代谢途径,通过人工合成途径,利用单菌或混菌发酵进行生产目标产物,但成功应用于工业生产的案例较少。随着代谢组学、蛋白质组学、合成生物学等领域的发展,群体感应系统将在工业生产方面发挥更大的作用。

1.3 枯草芽孢杆菌转录因子 SinR 的调控网络分析

枯草芽孢杆菌中转录因子 SinR 是生物膜的主要调节因子^[71],通过结合 DNA 序列中启动子的特定位点,使 DNA 形成环化结构,抑制 RNA 聚合酶与启动子区域的结合,对生物膜的调控是通过抑制编码胞外蛋白的操纵子 *tapA-sipW-tasA* 和编码胞外多糖合成的操纵子 *epsA-O* 的转录从而抑制生物膜的合成^[72,73]。研究表明 SinR 识别启动子中的序列为“GTTYTYT”,其中对序列“GTTCTCT”的结合效果更好,此外, SinR 对于反向重复序列“GTTCTCTAAAGAGAAC”的亲和力最高^[71]。SinI 作为 SinR 的拮抗剂,能够与 SinR 的特定区域紧密结合,形成稳定的复合物,从而有效地阻断 SinR 与其目标 DNA 的结合^[74]。

SinR-SinI 双组份系统可以通过调节生物膜的形成影响细菌在环境中的适应性和生存能力。而 She^[75]的研究表明 ComA 可以调控 SinR-SinI 之间的结合,而 ComA 由受到群体感应系统 PhrC-RapC 的调控^[76,77]。由 *phrC* 编码的 pro-PhrC 信号转导肽被分泌到胞外,编码非信号转导肽的 5 肽序列被特异性蛋白酶剪切后形成具有生物活性的 PhrC 信号分子。随着微生物细胞的生长,胞外信号分子的浓度随细胞密度的增加而累积,当细胞密度到达饱和状态,PhrC 通过细胞膜表面

的受体蛋白寡肽通透酶（Opp）转运到细胞中，特异性结合同源 RapC，并抑制其活性^[78]。因此通过群体感应系统 PhrC-RapC 对 SinR 的调控作用，我们可以构建响应细胞密度的动态调控元件 PhrC-RapC-SinR，当细胞处于生长阶段时，RapC 抑制 SinR 的活性，而随着细菌的生长，细胞密度持续升高，当胞外积累的 PhrC 的浓度突破阈值时，被转运到胞内与 RapC 发生相互作用，使得 RapC 构象改变，解除对 SinR 的抑制作用，使得 SinR 可以结合靶向启动子进而调控后续基因表达。

1.4 生物信息学的应用

生物信息学通过数学算法、计算机科学以及统计学建模等多学科交叉，构建出解析生物学的数字化体系。不仅突破了生物学传统实验的认知维度，更带来了生物网络建模、预测、解析以及系统生物学等全新研究方向。凭借强大的分析能力，生物信息学为海量实验信息的深度挖掘提供了技术支撑，使生命科学从经验性观察转向定量预测与机理推演成为可能，显著提升了生命现象的解析。

生物信息学通过整合和分析海量的基因组、转录组和蛋白质组数据，能够预测未知蛋白的潜在功能和结构特征。这种预测能力不仅为科研人员提供了研究方向的指引，还为新蛋白的发现和功能验证提供了有力的理论支持。基于生物信息学的预测结果，科研人员可以更有针对性地设计实验，验证未知蛋白的功能，从而加速新蛋白资源的开发和利用^[79]。此外，通过对氨基酸序列的分析和计算，生物信息学能够预测蛋白三维结构和可能的相互作用界面。这些结构信息对于理解未知蛋白的功能机制、设计针对性的抑制剂以及开发新的生物技术产品具有重要意义^[80]。

生物信息学的应用展现出了强大的潜力和独特的价值。它不仅为未知蛋白的发现和功能验证提供了有力的理论支持，还为医学进步、生物技术开发和工业生产等领域提供了新的思路和途径^[81,82]。随着技术的不断进步和应用领域的不断拓展，生物信息学将在生物学的研究和应用中发挥更加重要的作用，为人类社会的可持续发展贡献更多智慧和力量。

1.5 研究目的、内容及意义

1.5.1 研究目的与意义

有研究表明,将细胞生长与产物合成分割开更有利于目标产物的合成,因此在本文中,我们利用 PhrC、RapC 与 SinR 的相互作用关系,在枯草芽孢杆菌中成功构造了一个响应细胞密度的动态调控系统 PhrC-RapC-SinR,用于动态调控 MK-7 合成途径中与细胞生长相关的副产物的合成,协调细胞生长与目标产物合成间的代谢流分配:在细胞生长阶段,使副产物的合成用于菌体生长,而当菌体在大量发酵 MK-7 时,抑制副产物对前体物质的竞争,使更多的前体物质用于 MK-7 的合成。

1.5.2 研究内容

首先,通过对枯草芽孢杆菌动态调控系统分析,找到负控型转录因子 SinR 以及调控系统 PhrC-RapC,进而验证 PhrC、RapC 和 SinR 相互作用关系,证明了构建 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统的可行性。其次,通过对 SinR 靶向启动子优化,对 SinR 在启动子的结合序列和启动子核心区域进行改造,最终获得一系列 SinR 靶向启动子。最后,在枯草芽孢杆菌中构建 PhrC-RapC-SinR 动态调控元件,利用该元件与启动子 P_{e9} 结合作为调控基因表达的动态调控系统,调控 MK-7 的合成。通过响应菌体密度动态调控副产物合成途径,平衡细胞生长与 MK-7 合成过程,最终获得菌株 BW6-3 的 MK-7 产量达到 87.53 mg/L,是出发菌株 BS168 的 6.27 倍。本研究不仅为实现枯草芽孢杆菌微生物工厂的构建奠定了坚实的技术支持,同时也为提高次级代谢物的产量研究提供了研究思路。

第 2 章 枯草芽孢杆菌转录因子 SinR 的生物信息学分析

2.1 前言

SinR 是枯草芽孢杆菌中生物膜的主要调控因子，可以结合到 *epsA-O* 和 *tapA-sipW-tasA* 操纵子的启动子区域，使 DNA 弯曲，从而调控操纵子的转录和表达，减少生物膜基质多糖和蛋白质的合成，影响生物膜的形成和稳定性^[72]。而生物膜的稳定性又与 MK-7 的密切相关。本章节利用生物信息学技术系统性的解析了 SinR 的特征：对 SinR 的序列特征、理化性质、二级结构、三级构象特征、结构域、亚细胞定位、相互作用关系等信息进行预测分析，全面解析了转录因子 SinR 在枯草芽孢杆菌中的作用机制，为后续代谢工程改造奠定了生物学基础。

2.2 实验方法

2.2.1 SinR 的理化性质

运用在线工具 ProtPram 和 ProtScal 对枯草芽孢杆菌转录因子 SinR 氨基酸组分、稳定性、亲疏水性等理化性质进行分析。

2.2.2 SinR 的功能位点及其结构域

运用在线工具 TMHMM Server 预测 SinR 是否存在跨膜结构。运用在线工具 SignalP ServerQ 预测 SinR 是否存在信号肽。运用在线工具 Psortb 3.0 预测 SinR 中潜在的磷酸位点。

2.2.3 SinR 的二、三级结构及其调控作用关系网络

运用 SOPMA 及 SWISSMODEL 预测 SinR 的二级结构和三级结构。再通过 DoGSiteScorer 网站在线预测 SinR 的结合口袋，再利用 STRING 形成基因相互作用网络。

表 2-1 SinR 生物信息学分析所用在线软件

Table 2-1 Online software used for the SinR bioinformatics analysis

软件	网址
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Phyre ²	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2
ProtPram	https://web.expasy.org/protparam/
ProtScal	https://web.expasy.org/protscal/
TMHMM Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
SignalP ServerQ	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/
Psorb 3.0	https://www.psort.org/psortb/
SOPMA	http://pbil.ibcp.fr/
SWISSMODE	https://beta.swissmodel.expasy.org/

2.3 结果与分析

2.3.1 SinR 的理化性质分析

通过 ProtPram 和 Novo Pro 在线工具的分析, SinR 分子式为 $C_{574}H_{914}N_{158}O_{181}S_2$, 分子量为 12988.64 Da。蛋白质等电点为 6.75, 偏酸性, 带负电荷的残留物总数 (Asp+Glu) 和带正电荷的残基总数 (Arg+Lys) 均为 19。不稳定系数为 28.11, 较为稳定, 脂肪系数为 75.50。由图 2-1 可知, SinR 含 19 种氨基酸, 共 111 个氨基酸, 其中数量最多的氨基酸为 Glu 和 Lys, 为 13 个, 占比 11.7% (图 2-1)。SinR 总平均亲水性为 -0.896, 属于亲水性蛋白。其中 SinR 氨基酸的亲水性最大值为 -3.156, 最小值为 1.992。

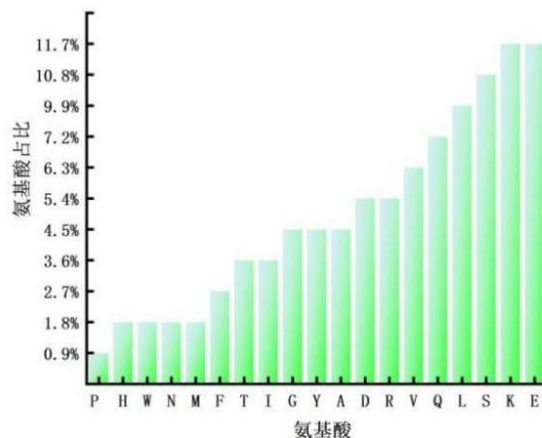


图 2-1 SinR 中氨基酸组成及占比

Figure 2-1 Amino acid composition and proportion in SinR

P: 脯氨酸 (Proline), H: 组氨酸 (Histidine), W: 色氨酸 (Tryptophan), N: 天冬酰胺 (Asparagine), M: 甲硫氨酸 (Methionine), F: 苯丙氨酸 (Phenylalanine), T: 苏氨酸 (Threonine), I: 异亮氨酸 (Isoleucine), G: 甘氨酸 (Glycine), Y: 酪氨酸 (Tyrosine), A: 丙氨酸 (Alanine), D: 天冬氨酸 (Aspartic acid), R: 精氨酸 (Arginine), V: 缬氨酸 (Valine), Q: 谷氨酰胺 (Glutamine), L: 亮氨酸 (Leucine), S: 丝氨酸 (Serine), K: 赖氨酸 (Lysine), E: 谷氨酸 (Glutamic acid)

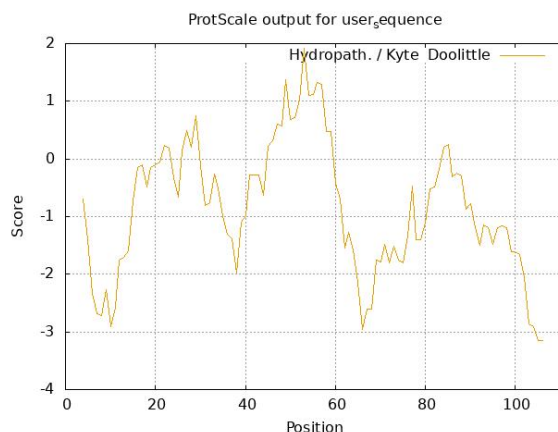


图 2-2 SinR 的疏水性分析

Figure 2-2 Hydrophobicity analysis of SinR

2.3.2 SinR 的功能位点及其结构域分析

通过 TMHMM Server 与 SignalP 对 SinR 进行跨膜结构以及信号肽预测, 结果表明, SinR 中跨膜螺旋结构预测的数量 0 个, 不存在跨膜结构 (图 2-3) 和信

号肽（图 2-4），证明该蛋白不是分泌蛋白，属于胞内蛋白。通过 Psortb 3.0 软件预测其在细胞内的分布，结果表明 SinR 的亚细胞定位分布于细胞质中。SinR 作为转录因子，能够响应外部和内部信号，并通过磷酸化过程调节其活性。通过 NetPhos 3.1 Server 预测 SinR 中磷酸化位点。由图 2-5 可知，SinR 有 16 个磷酸化位点，其中 3 个酪氨酸位点，4 个苏氨酸位点，9 个丝氨酸位点。

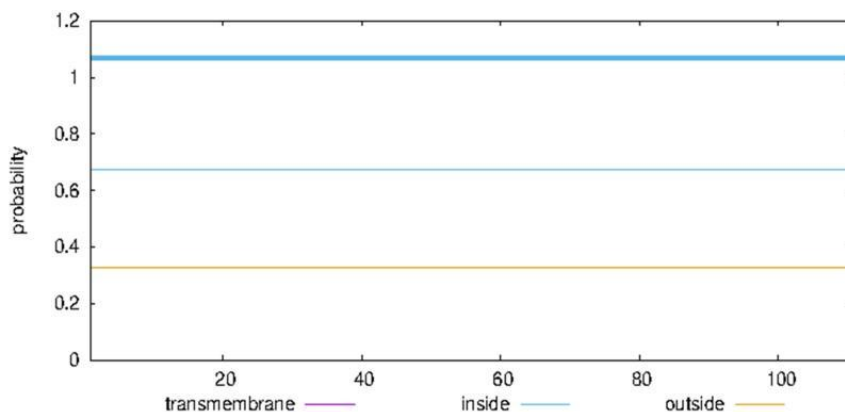


图 2-3 SinR 跨膜结构分析

Figure 2-3 Transmembrane structure analysis of SinR

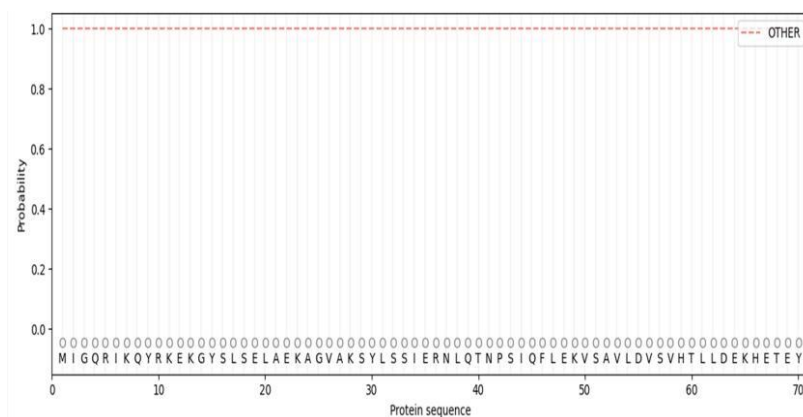


图 2-4 SinR 信号肽分析

Figure 2-4 SinR signal peptide analysis

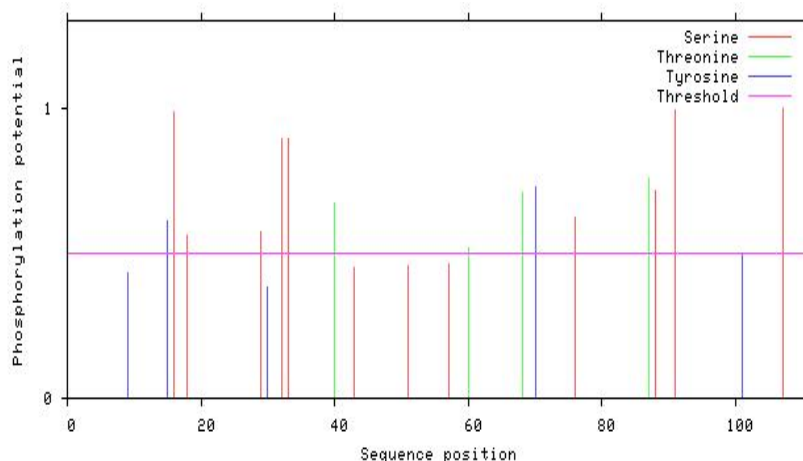


图 2-5 SinR 磷酸化位点分析

Figure 2-5 Analysis of the SinR phosphorylation sites

2.3.3 SinR 的二、三级结构及其调控作用关系网络分析

通过 SOPMA 对 SinR 的二级结构进行预测，结果表明其二级结构较为简单（图 2-6）， α 螺旋占 67.57%，无规则卷曲占 32.43%，无其他结构。通过 SWISSMODEL 预测 SinR 的三级结构，由图 2-7 可知，SinR 主要是通过 α -螺旋以及部分无规则卷曲构成，验证了二级结构的分析结果。通过 NCBI 分析 SinR 可知，3-61 氨基酸位点形成的结构为螺旋转角螺旋 XRE（HTH-XRE）家族样蛋白质，属于转录调节因子的外源性反应元件家族，是 DNA 结合蛋白，而 74-101 氨基酸位点形成的结构是 SinI 结合区域。利用 DoGSiteScorer 预测出 SinR 有三个结合口袋，口袋 1 和口袋 2 位于 DNA 结合区域，口袋 3 位于 SinI 结合区域，且结合口袋均位于结构为“HTH”的区域（图 2-7B）。

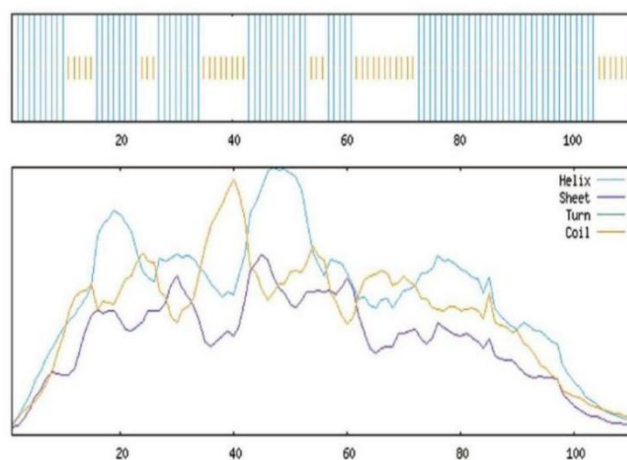


图 2-6 SinR 二级结构分析

Figure 2-6 SinR secondary structure analysis

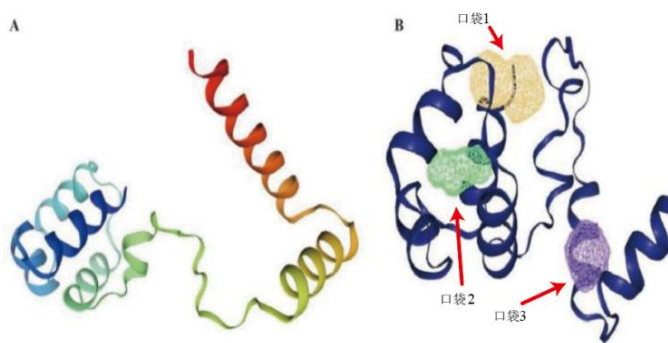


图 2-7 SinR 三级结构及结合口袋分析

Figure 2-7 Analysis of the tertiary structure and binding pocket of SinR.

A: SinR 三级结构; B: SinR 结合口袋

通过 STRING 形成关于 SinR 与其他基因相互作用网络可知（图 2-8），SinR 与生物膜调控基因 *tapA*, *sipW*, *ymcA*, *epsA*, *epsE*, *bslA* 等基因密切相关，而生物膜的形成和存在对细菌的代谢活性具有显著的调节作用，它使得悬浮细胞聚集转变为群体，通过影响细胞能量转换、群体通信、运输系统引发了整个代谢系统的广泛改变^[83]。而在有关 MK-7 的研究中也表明生物膜对 MK-7 的合成具有调控作用，Yi^[43]通过两阶段发酵，增强了生物膜的形成，MK-7 的产量也随着增加。Cui^[84]通过敲除由 SinR 调控的生物膜主要组成成分的编码基因 *epsA-C* 和 *yqxM-tasA* 操纵子，抑制了枯草芽孢杆菌生物膜的形成，导致枯草芽孢杆菌 168 的 MK-7 滴度从 1.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 降低至 1.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 0.65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。Wu^[57]通过对 SinR 的定点突变进而影响了生物膜形态，导致 MK-7 产量的增加。此外，SinR 与 *spo0A* 和 *abrB* 之间也存在相互作用关系，*spo0A* 对于细菌芽孢的形成、毒力因子的产生以及 MK-7 合成都密切相关^[85,86]，而 AbrB 作为全局调控因子之一，与其他全局调控因子共同协作，可以调控枯草芽孢杆菌中基因的表达^[87]，因此，研究 SinR 对于 MK-7 的合成具有重要意义。

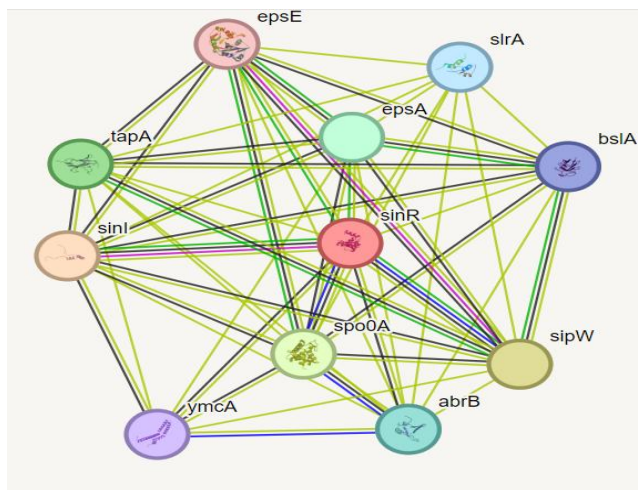


图 2-8 SinR 与其他基因的相互作用网络

Figure 2-8 Interaction network between SinR and other genes

2.4 本章小结

本文通过对 SinR 的生物信息学信息分析,系统的解析了转录因子 SinR 的分子特征和功能网络。具体研究内容如下:

(1) 通过对 SinR 的理化性质、亲水性分析、功能位点和结构域等基本信息分析,推断出 SinR 为亲水性胞内蛋白,具有 16 个磷酸化位点。

(2) 通过对 SinR 的二、三级结构分析我们发现,其二级结构较为简单,三级结构存在 HTH-XRE 结构,该结构中的 C 端与 DNA 结合,改变 DNA 构象,调节 RNA 聚合酶与 DNA 的结合能力,发挥调控作用。

(3) SinR 的相互作用网络表明, SinR 作为生物膜主要调控因子,可以通过调节生物膜主要成分的编码基因来调控生物膜的形成,影响细胞能量转换、群体通信以及运输系统,此外它还可以与 *spo0A*、*abrB* 相互作用影响细胞的代谢情况。而 MK-7 代谢过程与生物膜的形成密切相关,因此,在后续的实验,我们围绕着 SinR 的调控网络进行分析,优化其靶向启动子,构建动态调控系统并用于调控 MK-7 合成途径,提高 MK-7 的产量。

第 3 章 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统的构建及 SinR 靶向启动子的优化

3.1 前言

动态调控系统能够根据环境变化或特定信号自动调节系统状态的技术。在生物技术领域，被广泛应用于微生物代谢工程的优化，以实现代谢产物的高效合成和细胞的稳定生长。而在枯草芽孢杆菌中，Phr-Rap 系统作为一种重要的 QS 系统，能够响应细胞密度的变化，从而精确控制信号转导途径，提高细菌的适应性和存活能力。因此，该系统逐渐成为研究精确调控基因表达、优化代谢途径和提高细菌存活能力的热点。

启动子工程是一种通过改造和优化启动子序列来影响基因表达效率的技术。通常涉及对启动子核心区域以及上游序列的改造，以调控转录活性，从而改变目的基因的表达水平。启动子工程在枯草芽孢杆菌中具有广泛的应用前景，Zhou^[88]通过优化启动子序列，将启动子 P_{yib} 的-10、-35 区以及-16 区通过用共有序列替换，最终工程化启动子表达的 β -半乳糖苷酶（BgaB）活性提高 26 倍，超折叠绿色荧光蛋白（sfGFP）强度增加 195 倍。由此可见，通过改造和优化启动子序列，可以显著改变目的基因的表达水平，为工业化生产提供有力支持。

第二章对 SinR 的生物信息学进行了详细的分析，这有利于我们了解 SinR 的基本信息。本章我们依据 SinR 在枯草芽孢杆菌中的动态调控网络，重新构造了感应群体密度的动态调控元件 PhrC-RapC-SinR，使 SinR 的表达量与细胞密度相关联。此外，根据第二章中关于 SinR 与其他基因的相互作用网络可知以及参考文献可知，SinR 可以与 *tapA*、*sipW*、*ymcA*、*epsA*、*epsE*、*bslA*、*spo0A*、*abrB* 等基因密切相关^[72,89,90]。我们通过启动子工程，对 SinR 的靶向启动子进行改造，扩大 SinR 对靶向启动子的调控范围，并与动态调控元件 PhrC-RapC-SinR 形成一个随菌体密度变化而调控启动子转录强度的动态调控开关，进而控制受启动子调控的基因的表达。

3.2 实验材料

3.2.1 菌株及质粒

本章所用菌株及质粒信息见表 3-1，构菌过程所用引物信息见表 3-2。出发菌株 BS168 为本实验室保藏菌株。

表 3-1 菌株及质粒

Table 3-1 Strains and plasmids

菌株/质粒	描述	来源
BS168		本实验保藏
BP00	BS168:: <i>sinR</i> -eGFP	本实验构建
BP01	BS168:: <i>sinR</i> -eGFP:: $P_{\text{grac100}}\text{-}rapC$	本实验构建
BP02	BS168:: <i>sinR</i> -eGFP:: $P_{\text{grac100}}\text{-}phrC$	本实验构建
BX00	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR$	本实验构建
BX01	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR::P_{\text{tapA}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BX02	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR ::P_{\text{epsA}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BX03	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR ::P_{\text{spoIIA}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BX04	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR ::P_{\text{slrR}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BX05	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR ::P_{\text{aprE}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BX06	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR ::P_{\text{epr}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BX07	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR ::P_{\text{sacB}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BX08	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR ::P_{\text{amyE}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BX09	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR ::P_{\text{codY}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BG1	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR::P_{\text{e1}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BG2	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR::P_{\text{e2}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BG3	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR::P_{\text{e3}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BG4	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR::P_{\text{e4}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BG5	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR::P_{\text{e5}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BG6	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR::P_{\text{e6}}\text{-eGFP}$	本实验构建
BG7	BS168 :: $P_{\text{grac100}}\text{-}sinR::P_{\text{e7}}\text{-eGFP}$	本实验构建

菌株/质粒	描述	来源
BG8	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e8} -eGFP	本实验构建
BG9	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e9} -eGFP	本实验构建
BG11	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e11} -eGFP	本实验构建
BG12	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e12} -eGFP	本实验构建
BG13	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e13} -eGFP	本实验构建
BG14	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e14} -eGFP	本实验构建
BG15	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e15} -eGFP	本实验构建
BG16	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e16} -eGFP	本实验构建
BG17	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e17} -eGFP	本实验构建
BG18	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e18} -eGFP	本实验构建
BG19	BS168 :: P _{grac100} - <i>sinR</i> ::P _{e19} -eGFP	本实验构建
BP03	BS168 :: P _{e9} -eGFP	本实验构建
BP04	BS168 :: P _{e9} -eGFP::P _{hag} - <i>rapC</i>	本实验构建
BP05	BS168 :: P _{e9} -eGFP::P _{hag} - <i>rapC</i> ::P _{hag} - <i>phrC</i>	本实验构建
p7C6	包含 lox71-zeo-lox66 片段及氨苄、氯霉素抗性	本实验室保藏
pDG-Cre	含温控型启动子 P _{spac} 诱导 cre 表达	本实验室保藏
pHT-XCR6	包含启动子 P _{grac100} 及氯霉素、氨苄抗性	本实验室保藏

表 3-2 本章所用引物

Table 3-2 Primers used in this chapter

菌株	引物	序列
BP00	BP00-1	GTGGAAGCCAAAGAGGCAAATA
	BP00-2	AGAGGAGTAGATGGTGAGCAAGGGCG
	BP00-3	CCTTGCTCACCATCTACTCCTCTTTTGGGATTTTCTC
	BP00-4	TGTTTTTCGCTGCCTGAGCAGAGGC
	BP00-5	GCTCAGGCAGCGAAAACATACCACCTATCAT
	BP00-6	TACACAGTGGAACGGCTTGAC
BP01	BP01-1	CGGTTTGGTTGAAGGGTT

菌株	引物	序列
BP01	BP01-2	TCAGGTTGACCCCGAAGACG
	BP01-3	GAGGGTGAAGGAGAGCGGATAACAATTCACAC
	BP01-4	GTTATCCGCTCTCCTTCACCCTCTCCCATC
	BP01-5	GGTGGGATCCATGAAGAGTGGGGTAATTCCTTC
	BP01-6	CCCCACTCTTCATGGATCCCACCTCCTTTAATTG
BP02	BP02-1	AAGCTCTCCTTTGTCGCA
	BP02-2	CCTTTAATTGCGGATCGAAGAGGATTGCG
	BP02-3	AGGAGTGAAGGTTTGTAGCGGATAACAATTCACACAG
	BP02-4	GTGTGAAATTGTTATCCGCTACAAACCTTCACTCCTTTGTATT
	BP02-5	AGGAGGTGGGATCCATGAAATTGAAATCTAAGTTGTTTGTATT
	BP02-6	GACAAACAACCTTAGATTTCAATTCATGGATCCCACCT
BX00	BX00-1	CGGAGCTAAAGTCCCCT
	BX00-2	GCGGCAGCAATACATCTC
	BX00-3	AAGGTGATGACACGAATTCGAGCTCGGT
	BX00-4	AGCTCGAATTCGTGTCATCACCTTCCTTGTGATAT
	BX00-5	CGGTATGATAGGTGGTAGAACGCTCGGTTGC
	BX00-6	CGAGCGTTCTACCACCTATCATACCGTTCTG
	BX00-7	TTGTGAGCGGATAATTGATTGGCCAGCGTATTAAAC
	BX00-8	TGGCCAATCAATTATCCGCTCACAATTCCGC
BX01	BX01-1	TGTTTCCCAGCAGTGGTT
	BX01-2	CTCCCCTTCCACTTTGATT
	BX01-3	AGGTGGTATGTTTTCGATGTTTCGATTGTTTCACAATCAG
	BX01-4	ATTGTGAAACAATCGAAACATCGAAAACATACCACCTATCATACC
	BX01-5	GATCCACCGGATCTAGATAAGAGCGGATAACAATTCACAC
	BX01-6	TGTTATCCGCTCTTATCTAGATCCGGTGGATCCAAG
	BX01-7	GTGTTTTACAGGAGGTAAGATATGGTGAGCAAGGGC
	BX01-8	CCCTTGCTCACCATATCTTACCTCCTGTAAAACACTGTAA
BX02	BX02-1	GGGGATGCCTTTCCACTT

菌株	引物	序列
	BX02-2	TGTTTGTCCGAATGGTGC
	BX02-3	CTGAAGGCTATGAATACATGGTGAGCAAGGGC
	BX02-4	CTTGCTCACCATGTATTCATAGCCTTCAGCCTTC
	BX02-5	AGGTGGTATGTTTTCGCATGAATGAGAATATGAGTTTCAAAGAAT
	BX02-6	TGAAACTCATATTCTCATTTCATGCGAAAACATACCACCTATCAT
BX03	BX03-1	CAGGACTGACCGAGGAAG
	BX03-2	TTCAAGCCTGGAAACCTG
	BX03-3	GGAATGAGCATGGTGAGCAAGGGCG
	BX03-4	CCTTGCTCACCATGCTCATTCTCCTTGATATGATC
	BX03-5	TGGTATGTTTTCGCGGAGATTTGTTATGGATGTGGAG
	BX03-6	ATCCATAACAAATCTCCGCGAAAACATACCACCTATCATAC
BX04	BX04-1	TGAGCAGAATCAGCACGAA
	BX04-2	TGGATACGCCTGACTCAAC
	BX04-3	ACGGATAATTCTTCCAATCATCGAAAACATACCACCTATCATACC
	BX04-4	AGGTGGTATGTTTTCGATGATTGGAAGAATTATCCGTTTGTAC
	BX04-5	AGGAATAGAGGAGAATTCATATTATGGTGAGCAAGGGC
	BX04-6	CCCTTGCTCACCATAATATGAAATTCTCCTCTATTCTGTC
BX05	BX05-1	GCCGGCTCCCTTTGTAC
	BX05-2	GGAGAGGGTAAAGAATGGTGAGCAAGGGC
	BX05-3	CCTTGCTCACCATTCTTTACCCTCTCCTTTTAAAAAATTTCAG
	BX05-4	GGTGGTATGTTTTCGGTGAGAAGCAAAAAATTGTGGATC
	BX05-5	ACAATTTTTTGCTTCTCACCGAAAACATACCACCTATCATACC
	BX05-6	GCCTTGAGAGTGAAGAGCC
BX06	BX06-1	GTAAAAATACTCGGCAGCGCCTC
	BX06-2	GGAGATGAATCATGGTGAGCAAGGGCG
	BX06-3	CCTTGCTCACCATGATTCATCTCCTTTTTCTATGATGTTTG
	BX06-4	ATAGGTGGTATGTTTTCGATGAAAAACATGTCTTGCAAACCT
	BX06-5	GTTTGCAAGACATGTTTTTCATCGAAAACATACCACCTATCATACC

菌株	引物	序列
	BX06-6	GATTTTGCTGTCTGACGTCG
	BX07-1	CAAAATAACCAGATAGCCCCCT
	BX07-2	CATGAACGATGGTGAGCAAGGGCG
	BX07-3	CCTTGCTCACCATCGTTCATGTCTCCTTTTTTATGTAC
BX07	BX07-4	AGGTGGTATGTTTTCGATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACA
	BX07-5	TGCAAACCTTTTTGATGTTTCATCGAAAACATACCACCTATCATACC
	BX07-6	AGCTGTAGTTGCCTTCATCG
	BX08-1	GTGATCGGAGTCATGATCAATTG
	BX08-2	AGTGTCAAGAATGGTGAGCAAGGGCG
BX08	BX08-3	CCCTTGCTCACCATTCTTGACACTCCTTATTTGATTTTTTGA
	BX08-4	GGTGGTATGTTTTCGATGTTTGCAAAACGATTCAAAACC
	BX08-5	ATCGTTTTGCAAACATCGAAAACATACCACCTATCATACC
	BX08-6	CAGCCAGTACCAGTTCGA
	BX09-1	CCTCATGAACATCACTGGAG
	BX09-2	GCTTGCCTCGCCTGC
BX09	BX09-3	CCTTGCTCACCATTTTCATCCCCCTTTTTCAACATG
	BX09-4	AGGTGGTATGTTTTCGATGAGGAAAAAACGAAAAACAGAC
	BX09-5	CTGTTTTTCGTTTTTTTCTCATCGAAAACATACCACCTATCATACC
	BX09-6	GGGGGATGAAAATGGTGAGCAAGGGC
	BP04-1	TGGTCTTTACGGCTTTGGC
	BP04-2	CCCGGGTGTGAAACTCCTTTCTCTAGTGAC
	BP04-3	GGAGTTTCACACCCGGGGATCCTCT
BP04	BP04-4	GCCAATCAGAAATCTTTTCATGTTCAAGCGAAAACA TACCAC
	BP04-5	GGTATGTTTTTCGCTTGAACATGAAAAGATTTCTGATTGGCG
	BP04-6	ACGGAGGTTATATAAACCCGGGGATCCTCT
	BP04-7	CCCGCATCCAGGGTGATGTTTGTCAAGTTATTAAAT
	BP04-8	ACTTCACCATCGGGCAATA
	BP05-1	CGGTTTGGTTGAAGGGTT

菌株	引物	序列
BP05	BP05-2	GAGGGTGAAGGAGAGCGGATAACAATTCACAC
	BP05-3	GTTATCCGCTCTCCTTCACCCTCTCCCATC
	BP05-4	GGTGGGATCCATGAAGAGTGGGGTAATTCCTTC
	BP05-5	CCCCTCAGGTTGACCCCGAAGACG
	BP05-6	GTGAAATTGTTATCCGCTCTTATATAACCTCCGTTTCGTTTAATCAGT
	BP05-7	ATTAAACGAACGGAGGTTATATAAGAGCGGATAACAATTCACAC
	BP05-8	ACTCTTCATGGATCCCACCTCCTTTAATTG
BP06	BP06-1	AAGCTCTCCTTTGTCGCA
	BP06-2	CCTTTAATTGCGGATCGAAGAGGATTTC
	BP06-3	AGGAGTGAAGGTTTGTAGCGGATAACAATTCACACAG
	BP06-4	GTGTGAAATTGTTATCCGCTACAAACCTTCACTCCTTTGTATT
	BP06-5	AACGCTGCCCCACCTATCATAACCGTTTCG
	BP06-6	ATAGGTGGGCAGCGTTATCCAGCG
	BP06-7	GGGTGCGATCTTATTCATTGTTTTGTTCCCTCCCTGAAT
	BP06-8	GGGAGGAACAAAACAATGAATAAGATCGCACCCG

3.2.2 仪器及试剂

本研究主要试剂见表 3-3，主要仪器见表 3-4。

表 3-3 主要试剂

Table 3-3 Primary reagents

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
甘油	分析纯	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

药品名称	规格	生产厂家
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
Prime STAR® 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
氯化钙	分析纯	上海生工生物
氯化镁	分析纯	上海生工生物
溶菌酶	分子生物	上海生工生物
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

表 3-4 实验仪器

Table 3-4 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	BIO-RAD
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

仪器名称	生产厂家
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	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
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
核酸定量仪	美林恒通(北京)仪器有限公司

3.2.3 培养基及溶液

LB 培养基：胰蛋白胨、酵母提取物各 10 g，NaCl 5 g，定容到 1000 mL，pH 7.0。固体培养基加入 20 g 琼脂，121 °C 高压蒸汽灭菌 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 CaCl₂+ 20 μ L 250 mmol/L MgCl₂。

SPI 培养基和 SPII 培养基中各溶液均需 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 灭菌（除 50%葡萄糖外）。

表 3-5 主要溶液

Table 3-5 Main Solutions

溶液	药品	质量	备注
SPI-A	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4 g	定容至 100 mL
	K ₂ HPO ₄	2.14 g	
	KH ₂ PO ₄	1.2 g	

溶液	药品	质量	备注
	柠檬酸三钠二水化合物	0.2 g	
SPI-B	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04 g	定容至 100 mL
100×EGTA	EGTA 固体	0.38035 g	定容至 100 mL pH 8.0
50 %葡萄糖水溶液	葡萄糖	5 g	加 5 mL 水 0.22 μm 滤膜过滤
100×CAYE	酪蛋白水解物	2 g	定容至 100 mL
	酵母提取物	10 g	
50 mmol/L CaCl ₂	CaCl ₂	0.555 g	定容至 100 mL
250mmol/L MgCl ₂	MgCl ₂	2.375 g	定容至 100 mL pH 8.0

3.3 实验方法

3.3.1 菌株活化及感受态制备

从-80 °C冰箱中取出冻藏的枯草芽孢杆菌 168，置于 4 °C冰箱中自然融化，在 LB 固体培养基平板上划线，37 °C恒温过夜培养。挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中，在 37 °C、220 rpm 摇瓶培养 12~16 h 至菌株生长对数期，完成菌株的活化。

感受态枯草芽孢杆菌的制备如图 3-1，挑取一个单菌落接种于含 2 mL SPI培养基的试管中，220 rpm，37 °C条件下，培养 12-16 h 后吸取 40 μL 转接 2 mL 新鲜的 SPI培养基中，以相同的条件再次培养 5-6 h。吸取 200 μL SPI培养基中的菌液转接于 2 mL SPII培养基中，37 °C、220 rpm 培养 2-3 h 后添加 20 μL EGTA，培养 10 min 后得到感受态枯草芽孢杆菌，可用于导入纯化后的 PCR 片段。

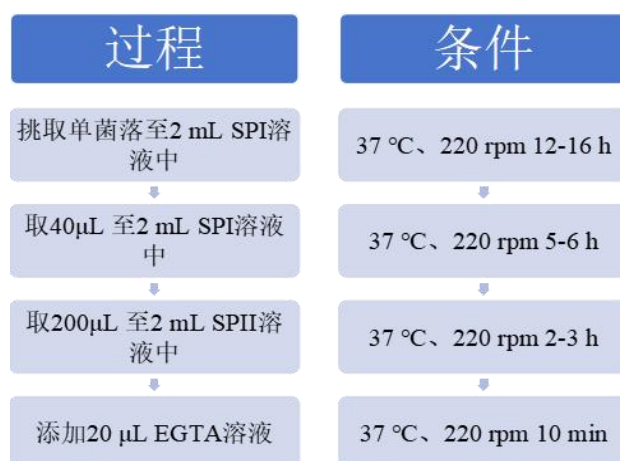


图 3-1 感受态枯草芽孢杆菌制备过程

Figure 3-1 Preparation process of *Bacillus subtilis* competency

3.3.2 基因提取与片段扩增

3.3.2.1 细菌全基因组和质粒抽提

参考 3.3.1 中活化方式将菌株活化后，利用细菌全基因组提取试剂盒和质粒提取试剂盒，参照说明书步骤对菌株进行全基因组与目标质粒的提取，并检测产物浓度。

3.3.2.2 目标片段的扩增

利用 SnapGene 设计引物，并交由金斯瑞生物技术有限公司合成。按照 Takara 公司 Primer star Max 高保真 DNA 聚合酶说明书进行 PCR 扩增。扩增得到单片段后，利用 Overlap PCR 技术将单片段融合获得目标片段。

表 3-6 PCR 体系

Table 3-6 PCR system

体系组分	25μL 体系	50μL 体系
DNA 模板	0.5	1
上游引物	1	2
下游引物	1	2
酶	12.5	25
ddH ₂ O	10	20

表 3-7 PCR 程序

Table 3-7 PCR procedures

PCR 程序	反应温度	反应时间
预变性	98 °C	3 min
变性	98 °C	10 s
退火	55 °C	5 s
延伸	72 °C	100 bp/s
终延伸	72 °C	5-10 min
保存	4 °C	∞

3.3.3 重组菌株的构建及抗性祛除

3.3.3.1 重组菌株的构建

将目标片段纯化后加入感受态溶液中,利用同源重组的方法将目标片段整合到菌株染色体基因中。培养 3-4 h 后涂布于氯霉素抗性平板,利用氯霉素抗性平板筛选获得阳性克隆,挑取阳性克隆,接种到含有氯霉素的 LB 培养基中,37 °C,220 rpm 条件下培养 12-16 h,进行菌液 PCR 验证,获得目标菌株。

3.3.3.2 氯霉素抗性祛除

将上述菌株按照图 3-1 中的步骤制备为感受态后,导入 cre 质粒,培养 3-4 h 后涂布于卡那霉素抗性平板。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 条件下过夜培养,利用 IPTG 诱导表达 Cre 重组酶,切除 *loxP* 位点之间的氯霉素抗性基因^[9]。将菌液稀释涂布在 LB 固体培养基平板上,获得单菌落后再次活化分别点涂与无抗的 LB 固体培养基平板和含氯霉素抗性的固体培养基平板上,若无抗培养基平板出现菌落,而氯霉素抗性平板未出现菌落,则证明氯霉素抗性已祛除。

3.3.3.3 卡那霉素抗性祛除

挑取祛除氯霉素抗性的菌株接种至 LB 中,在 50 °C,220 rpm 条件下培养 12 h,使 cre 质粒自融。将菌液稀释涂布与 LB 固体培养基,挑取单菌落再次活化,分别点涂与无抗的 LB 固体培养基平板和含卡那霉素抗性的固体培养基平板

上,若无抗培养基平板出现菌落,而卡那霉素抗性平板未出现菌落,则证明卡那霉素抗性已祛除。最终,获得无抗性的重组菌株,并用甘油管藏法保种。

3.3.4 启动子工程

3.3.4.1 诱导表达 SinR

为了调控 SinR 的表达量,参考 3.3.2.2 中目标片段扩增方式,对 *sinR* 上游片段(L-*sinR*)、氯霉素抗性片段(-*C_m^r*)、IPTG 诱导型启动子 $P_{grac100}$ 及 *sinR* 进行克隆、融合、纯化,获得 L-*sinR*-*C_m^r*- $P_{grac100}$ -*sinR* 片段,将其整合到 BS168 基因组上,获得 SinR 受 IPTG 诱导表达的菌株 BX00。将菌株活化后向菌液中添加 IPTG 诱导 SinR 表达。

3.3.4.2 SinR 靶向启动子的筛选

通过 SinR 与其他基因的相互作用网络及文献报道可知,启动子 P_{tapA} 、 P_{epsA} 、 P_{spoIIA} 、 P_{slrR} 、 P_{aprE} 、 P_{cpr} 、 P_{sacB} 、 P_{amyE} 、 P_{bpr} 均可能受到 SinR 的调控。为了研究 SinR 对下游靶向启动子是否具有调节作用,在启动子 P_x 后插入报告蛋白 eGFP 的基因,通过荧光强度的变化反映 SinR 的上述启动子的调控作用,筛选目标启动子。

3.3.4.3 目标启动子的改造

由于启动子片段较短,我们通过搭桥法合成改造的启动子。首先,设计多对引物,每对引物的末端都包含有与相邻引物互补的碱基序列,这样可以在后续的反应中作为“桥”将各段引物连接起来。接着,按照预定的顺序和比例,将这些引物混合在一起,并进行退火处理,使引物之间的互补碱基能够充分配对,形成稳定的双链结构。然后,利用 DNA 聚合酶的延伸功能,使这些配对的引物延伸、连接,最终合成出包含所需突变区域的完整 DNA 片段。

3.3.5 相对荧光强度的检测

将菌株活化后按照培养基体积 2% 的接种量吸取菌液到含有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,并按需添加不同浓度的 IPTG,在 37 °C 220 rpm 的条件下摇瓶培养 12 h。用多功能酶标仪检测细胞的荧光强度和光密度:在激发波长为 490 nm,检测细胞的荧光强度,在 600 nm 波长下检测细胞的光密度。

相对荧光强度=细胞的荧光强度/细胞的光密度。

3.4 结果与分析

3.4.1 PhrC、RapC 对 SinR 的调控作用

3.4.1.1 重组菌株的构建

为了直观地表示 SinR 的变化量，将绿色荧光蛋白 eGFP 的编码基因插入基因 *sinR* 后，通过荧光强度的变化反映 SinR 表达量的变化。首先以 BS168、p7C6、BL21-eGFP 为模板，利用表 3-2 中引物对 BP00-1/BX00-4，BX00-3/BX00-6，BX00-5/BX00-8，BX00-7/BX00-2 扩增 *sinR* 左同源臂（L-*sinR*）、*eGFP*、氯霉素编码基因 *Cm^r*、*sinR* 右同源臂（*sinR*-R）片段，将 4 片段通过 Overlap PCR 融合为 *sinR*-*eGFP*-*Cm^r*-*sinR*-R。将目标片段纯化后加入 BS168 感受态溶液中，通过染色体重组的方法将片段融合到 BS168 染色体中。37 °C 培养 3-4 h 后，4000 rpm 离心 2 min，留 100 μL 上清液与沉淀混匀后涂布到含氯霉素抗性的筛选平板上，将得到的菌落进行菌液 PCR 验证筛选阳性克隆菌株，获得含 SinR-eGFP 的菌株 BP00（图 3-2）。

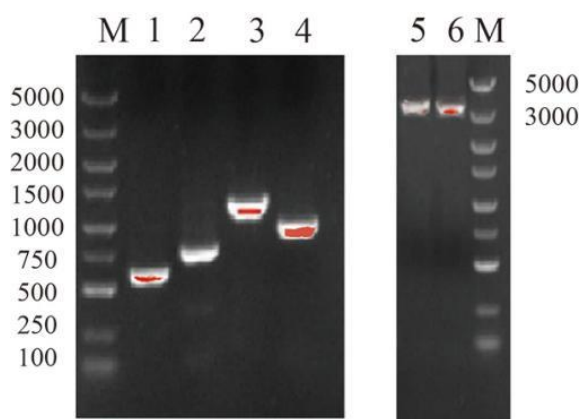


图 3-2 重组菌株 BP00 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3-2 DNA agarose gel electrophoregrams of recombinant strain BP00

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1: *sinR* 同源臂 L-*sinR*; 泳道 2: 绿色荧光蛋白编码基因;
泳道 3: 氯霉素编码基因: *Cm^r*; 泳道 4: *sinR* 右同源臂 *sinR*-R; 泳道 5: L-*sinR*-*eGFP*-*Cm^r*-*sinR*-R
融合片段; 泳道 6: BP00 菌液 PCR 验证

为了验证 PhrC、RapC 对 SinR 的调控作用，利用 IPTG 诱导型启动子 P_{grac100} 调控 PhrC、RapC 的表达。具体操作步骤为：以 pHT-XCR6 为模板扩增启动子

$P_{grac100}$ 的基因片段, 以 BS168 全基因组为模板扩增 *phrC*、*rapC* 基因片段, 通过 Overlap PCR 技术融合目标片段形成 $P_{grac100}$ -*rapC* 和 $P_{grac100}$ -*phrC*, 将融合片段导入祛除抗性的菌株 BP00 中, 替换 *rapC*、*phrC* 的原始启动子, 形成菌株 BP01 (图 3-3) 和 BP02 (图 3-4)。

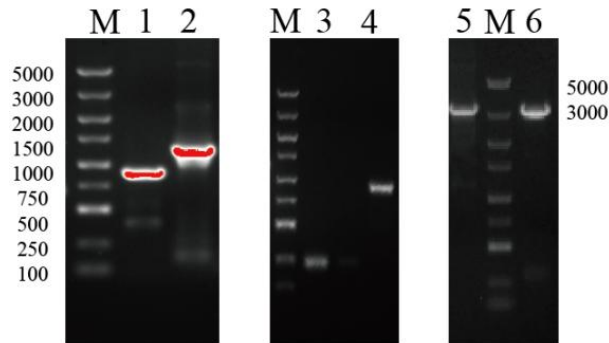


图 3-3 重组菌株 BP01 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3-3 DNA agarose gel electrophoregrams of recombinant strain BP01

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1: *rapC* 左同源臂 L-*rapC*; 泳道 2: 氯霉素编码基因: C_m^r ; 泳道 3: 启动子 $P_{grac100}$; 泳道 4: *rapC* 右同源臂 *rapC*-R; 泳道 5: L-*rapC*- C_m^r - $P_{grac100}$ -*rapC*-R 融合片段; 泳道 6: BP01 菌液 PCR 验证

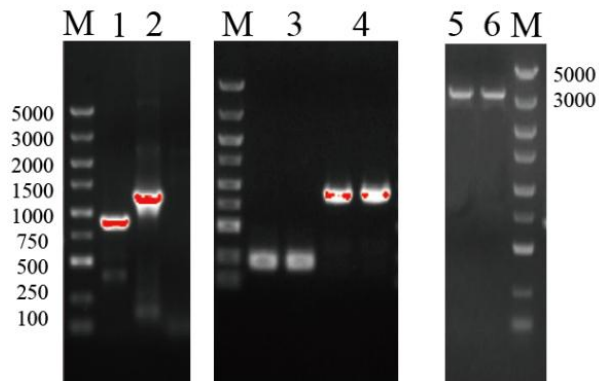


图 3-4 重组菌株 BP02 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3-4 DNA agarose gel electrophoregrams of recombinant strain BP02

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1: *phrC* 左同源臂 L-*phrC*; 泳道 2: 氯霉素编码基因: C_m^r ; 泳道 3: 启动子 $P_{grac100}$; 泳道 4: *phrC* 右同源臂 *phrC*-R; 泳道 5: L-*phrC*- C_m^r - $P_{grac100}$ -*phrC*-R 融合片段; 泳道 6: BP01 菌液 PCR 验证

3.4.1.2 PhrC、RapC 和 SinR 相互作用关系验证

为了验证 RapC 对 SinR 的调控作用,将 BP01 活化后,接种到 LB 培养基中,37 °C下,以 220 rpm 的转速进行培养。12 h 后,在其中一个培养批次中加入了 IPTG 以诱导表达 RapC,而另一批次则不添加 IPTG 作为对照组。分别检测添加 IPTG 4 h、8 h、12 h、16 h 后两组菌液中的荧光强度。由图 3-5 可知,添加 IPTG 后,4 个检测时间的荧光强度均明显低于不添加 IPTG 的荧光强度,其中添加 IPTG 培养 12 h 后,其荧光强度为初始强度的 57.37%,证明 RapC 对 SinR 的活性起到抑制作用。

为了验证 PhrC 解除 RapC 对 SinR 抑制作用的能力,按照同样的方法培养 BP00、BP01、BP02。添加 IPTG 培养 12h 后检测三株重组菌株菌液的荧光强度,对比其相对荧光强度的差异。由图 3-6 可知,BP01 的荧光强度仅为 BP00 的 57.37%。而与 BP01 的荧光强度相比,BP02 的荧光增加了 72.53%。有较大幅度的提高,但与 BP00 相比,降低了 20.90%,并没有恢复 BP00 的荧光强度。这说明 PhrC 可以缓解 RapC 对 SinR 的抑制作用,但并不能完全缓解其抑制作用。

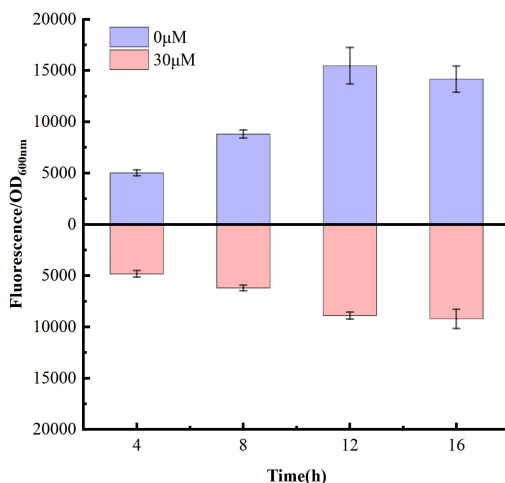


图 3-5 RapC 对 SinR 的调控作用

Figure 3-5 Regulation of SinR by RapC

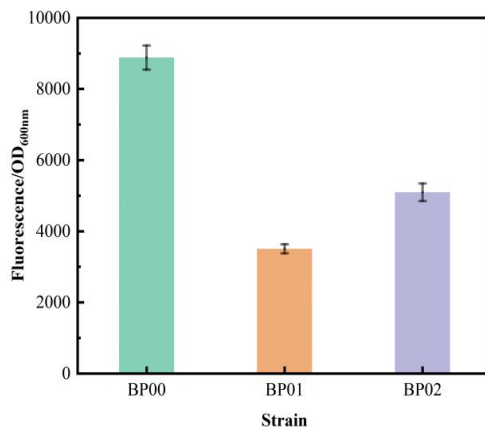


图 3-6 PhrC-RapC 对 SinR 的调控作用

Figure 3-6 Regulation of PhrC-RapC on SinR

3.4.2 SinR 靶向启动子的筛选

3.4.2.1 重组菌株的构建

为了筛选受 SinR 调控的启动子，首先要构建可以调控 SinR 表达的菌株。根据 3.3.4.1 中诱导表达 SinR 的方法，以 BS168、p7C6、pHT-XCR6 为模板分别扩增 *sinR* 左同源臂 (L-*sinR*)、氯霉素抗性片段 (-*C_m^r*)、IPTG 诱导型启动子 $P_{grac100}$ 及 *sinR* 右同源臂，融合、纯化后获得 L-*sinR*-*C_m^r*- $P_{grac100}$ -*sinR*-R 片段，将其添加到 BS168 感受态菌液中培养 3-4 h 后涂布到含氯霉素抗性的筛选平板上筛选阳性克隆菌株进行菌液 PCR 验证，获得 SinR 受 IPTG 诱导表达的菌株 BX00 (图 3-7)。

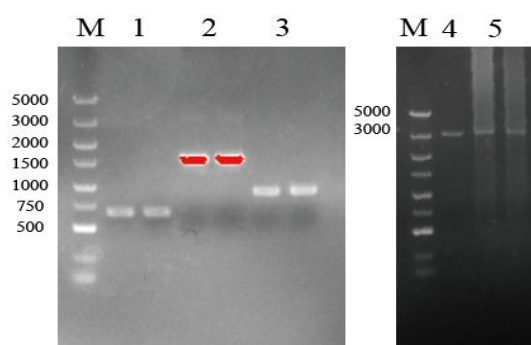


图 3-7 重组菌株 BX00 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3-7 DNA agarose gel electrophoregrams of recombinant strain BX00

M: 5000bp DNA marker; 泳道 1: *sinR* 左同源臂 (L-*sinR*) ; 泳道 2: *C_m^r*- $P_{grac100}$ 基因片段; 泳道 3: *sinR* 右同源臂 (*sinR*-R) ; 泳道 4: L-*sinR*-*C_m^r*- $P_{grac100}$ -*sinR*-R 融合片段; 泳道 5: BX00 菌液 PCR 验证

采用 eGFP 的荧光亮度作为衡量启动子转录活跃度的直观指标。将编码绿色荧光蛋白 eGFP 的基因片段、启动子 P_{tapA} 、 P_{epsA} 、 P_{spoIIA} 、 P_{slrR} 、 P_{aprE} 、 P_{epr} 、 P_{sacB} 、 P_{amyE} 、 P_{bpr} 片段以及氯霉素编码基因 (C_m^r) 融合为片段 $P_x-eGFP-C_m^r$ ，纯化后导入到无抗的 BX00 中获得由启动子不同重组菌株 BX01-BX09 (图 3-8)。

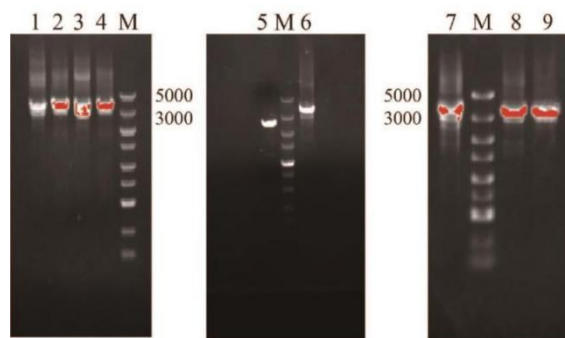


图 3-8 重组菌株 BX01-BX09 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3-8 DNA agarose gel electrophoregrams of recombinant strains BX01-BX09

M: 5000bp DNA marker; 泳道 1: $L-tapA-P_{tapA}-eGFP-C_m^r-tapA-R$ 融合片段, 泳道 2: $L-epsA-P_{epsA}-eGFP-C_m^r-epsA-R$ 融合片段; 泳道 3: $L-spoIIA-P_{spoIIA}-eGFP-C_m^r-spoIIA-R$ 融合片段; 泳道 4: $L-slrR-P_{slrR}-eGFP-C_m^r-slrR-R$ 融合片段; 泳道 5: $L-aprE-P_{aprE}-eGFP-C_m^r-aprE-R$ 融合片段; 泳道 6: $L-epr-P_{epr}-eGFP-C_m^r-epr-R$ 融合片段; 泳道 7: $L-sacB-P_{sacB}-eGFP-C_m^r-sacB-R$ 融合片段; 泳道 8: $L-amyE-P_{amyE}-eGFP-C_m^r-amyE-R$ 融合片段; 泳道 9: $L-bpr-P_{aprE}-eGFP-C_m^r-bpr-R$ 融合片段

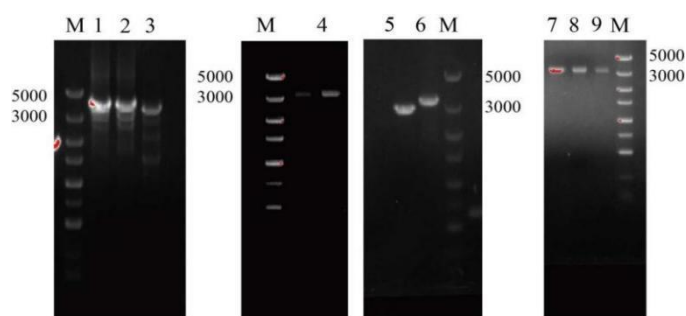


图 3-9 重组菌株 BX01-BX09 菌液 PCR 验证

Figure 3-9 PCR validation of recombinant strain BX01-BX09

M: 5000bp DNA marker; 泳道 1: BX03 菌液 PCR 验证; 泳道 2: BX02 菌液 PCR 验证; 泳道 3: BX01 菌液 PCR 验证; 泳道 4: BX04 菌液 PCR 验证; 泳道 5: BX05 菌液 PCR 验证; 泳道 6: BX06 菌液 PCR 验证; 泳道 7: BX07 菌液 PCR 验证; 泳道 8: BX08 菌液 PCR 验证; 泳道 9: BX09 菌液 PCR 验证

3.4.1.2 靶向启动子的筛选

首先, 将菌株 BX01-BX09 进行活化, 使其生长状态达到指数生长期。随后, 将这些活化后的菌株分别接种到装有 50 mL LB 培养基的锥形瓶中。37 °C 下, 以 220 rpm 的转速进行培养, 培养 12 h 后, 向菌液中添加 IPTG, 诱导 SinR 表达进而对启动子的转录强度产生调控。为了验证 SinR 对启动子的调控效果, 我们检测了菌液的相对荧光强度。实验结果显示 (图 3-10), 与不添加 IPTG 诱导的菌液相比, 添加 IPTG(40 μ M)的菌液中, 菌株 BX01(P_{tapA}-eGFP)、BX02(P_{epsA}-eGFP)、BX03(P_{spoIIA}-eGFP)、BX04(P_{slrR}-eGFP)、BX06(P_{epr}-eGFP)、BX08(P_{amyE}-eGFP)的相对荧光强度发生下降, BX05(P_{aprE}-eGFP)、BX07(P_{sacB}-eGFP)、BX09(P_{bpr}-eGFP)的相对荧光强度上升, 表明 SinR 对启动子 P_{tapA}、P_{epsA}、P_{spoIIA}、P_{slrR}、P_{epr}、P_{amyE} 的转录作用起抑制作用。

在菌液中未添加 IPTG 的情况下, 由于 SinR 的表达量相对较低, 无法对启动子产生明显的抑制作用, 因此其相对荧光强度较高。然而, 当我们向菌液中添加 IPTG 后, 有效诱导了大量 SinR 的产生, 这些 SinR 对启动子的转录作用产生抑制效果, 进而降低了 eGFP 的表达。通过检测相对荧光强度, 我们可以清晰地看到, 在添加 IPTG 后, 菌株 BX01、BX02、BX04 的菌液中相对荧光强度的变化更加明显, 分别下降 34.17%、37.81%、23.20%。这意味着 SinR 对启动子 P_{tapA}、P_{epsA} 和 P_{slrR} 转录效率的抑制作用更明显因此选择菌株 BX01、BX02、BX04 做进一步研究。

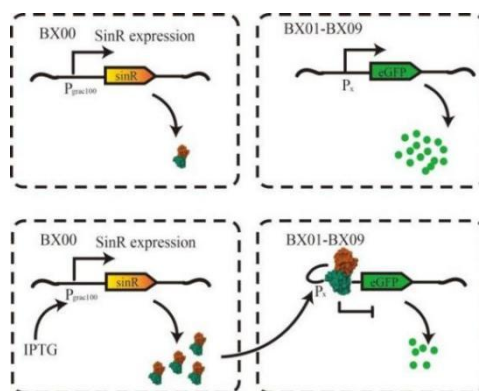


图 3-10 菌株 BX01-BX09 中 SinR 对启动子的调控机制

Figure 3-10 Mechanism of SinR regulation by the promoter in BX01-BX09

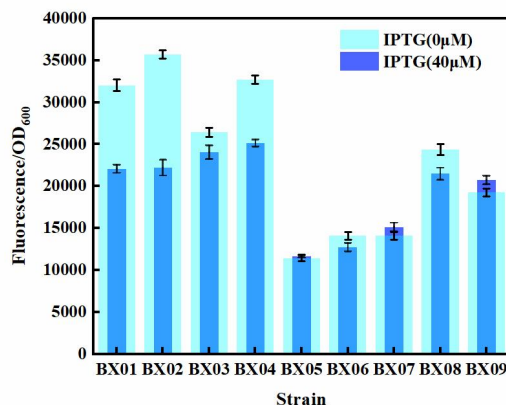


图 3-11 SinR 对靶向启动子的调控强度

Figure 3-11 Strength of regulation of targeted promoters by SinR

为了深入探究不同浓度的 SinR 对 P_{tapA} 、 P_{epsA} 和 P_{slrR} 这三个启动子转录效率的抑制强度，我们检测在不同浓度 IPTG 诱导下，菌株 BX01、BX02、BX04 的相对荧光强度的变化情况。如图 3-12，随着 IPTG 浓度的逐渐增加，菌株 BX01、BX02、BX04 的相对荧光强度均呈现出一个先下降后上升的变化趋势。有研究表明，SinR 作为一种重要的转录调控因子，能够直接与启动子的特定序列结合，使得含有该序列的 DNA 片段发生弯曲，进而有效阻止 RNA 聚合酶与启动子区域的结合，从而抑制后续基因的表达过程。当 IPTG 浓度为 $20 \mu\text{M}$ 时，由于诱导作用相对较弱，因此生成的 SinR 浓度也较低。在这种情况下，SinR 对启动子转录的抑制作用较弱，导致相对荧光强度的变化并不明显。然而，随着 IPTG 浓度的不断增加，其诱导作用逐渐增强，从而表达出更多的 SinR。这些 SinR 与启动子结合，有效地抑制了转录的发生，使得相对荧光强度逐渐降低。但值得注意的是，IPTG 本身对细胞具有一定的毒害作用，当 IPTG 浓度过高时，会对细胞生长产生胁迫，导致细胞状态受损，因此，在 IPTG 浓度较高的情况下，我们观察到相对荧光强度出现了一定的上升趋势。

在对比了三株菌在不同 IPTG 浓度下的相对荧光强度变化程度后，我们发现 SinR 对启动子 P_{epsA} 的调控作用最为显著，能够使相对荧光强度降低高达 217.04%。因此，我们将选择启动子 P_{epsA} 作为进一步研究的对象，以期在更深入的层面上扩大 SinR 对基因转录调控作用。

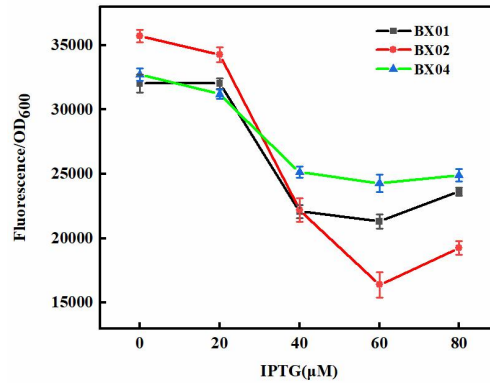


图 3-12 菌株 BX01、BX02、BX04 的相对荧光强度随 IPTG 浓度的变化

Figure 3-12 Relative fluorescence intensity of strains BX01, BX02 and BX04 varied with the IPTG concentration

3.4.3 SinR 靶向启动子的优化

启动子是基因表达调控中的核心遗传元素，它在最为基础的层面上掌控着基因的表达开关，并且精确地决定了基因表达的时期。鉴于启动子在合成生物学领域，尤其是遗传线路设计中的不可或缺性和极其重要的作用，我们对启动子 P_{epsA} 进行了深入的优化改造，旨在扩大转录调控因子 SinR 对 P_{epsA} 的调控范围和效率。先前的研究已经明确揭示，SinR 的结合序列为 -GTTCTYT-，并且当启动子区域包含有 -GTTCTCTNNAGAGAAC- 这样的反向重复序列时，SinR 的调控作用会显得更为强烈和有效。此外，启动子核心区域对启动子的转录效率也有重要的调节作用。基于这些研究结果，我们对启动子 P_{epsA} 中原有的 SinR 结合序列进行突变设计，并插入了不同数量的该结合位点，以期达到更精细的调控效果。由于启动子序列较短，我们通过搭桥法利用多段引物碱基互补配对直接合成突变区域。

3.4.3.1 重组菌株的构建

利用表 3-2 中的引物，通过“搭桥法”对启动子 P_{epsA} 中 SinR 结合区域进行优化，将启动子原有的结合位点序列“GTTATTTTCGTTTCATT”和“GTTCTTT”突变为“GTTCTCTCGTTCTCT”和“GTTCTCT”，之后再插入“GTTCTCTAAGAGAAC”，在突变为“GTTCTCT”序列的单一序列后插入“AGAGAAC”形成反向重复序列“GTTCTCTAAGAGAAC”，获得启动子 $P_{\text{e1}}-P_{\text{e5}}$ ，用相同的

方法突变启动子核心区域，获得启动子 P_{e6} - P_{e19} （图 3-13）。利用突变后的启动子片段 P_{ex} 替换菌株 BX02 中 P_{epsA} ，获得重组菌株 BG1-BG9（图 3-14）。

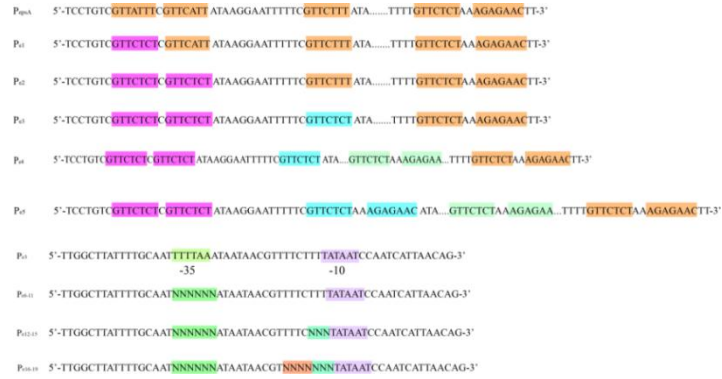


图 3-13 启动子 P_{epsA} 的优化过程

Figure 3-13 Optimization procedure for the promoter P_{epsA}

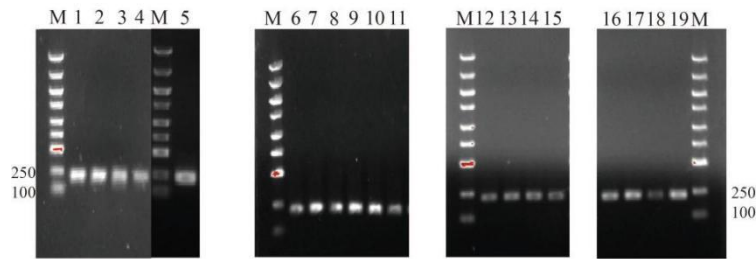


图 3-14 启动子优化结果

Figure 3-14 Promoter optimization results

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1-19: 搭桥法获得启动子 P_{e1} - P_{e19} 片段

3.4.3.2 SinR 靶向启动子的优化

首先，对原始启动子 P_{epsA} 的 SinR 结合位点优化后的启动子进行检测。如图 3-15，随着结合位点数量的增加，相对荧光强度开始呈现逐渐降低的趋势，启动子 P_{e3} 的转录效率降最低，与 P_{epsA} 相比，转录效率下降 2.17 倍。但当结合位点数量继续增加时，启动子的转录效率开始上升。推测是因为当增加结合序列的数量时，会使更多 SinR 与 DNA 结合，DNA 弯曲程度增大，因此 RNA 聚合酶与启动子结合难度也增大，导致启动子转录效率降低，eGFP 表达量下降，因此荧光强度下降。但当结合位点数量过多时，DNA 弯曲形成的位阻使得 SinR 无法与多余的结合位点结合，因此当结合位点的数量达到一定值后，结合位点的数量不再影响 P_{epsA} 的转录强度。此外，插入过多的结合位点会导致启动子长度增加，

过长的核苷酸序列也会影响转录效率^[92]。因此，插入更多结合位点反而无法达到预期效果。根据实验结果，后续基因操作基于启动子 P_{e3} 。

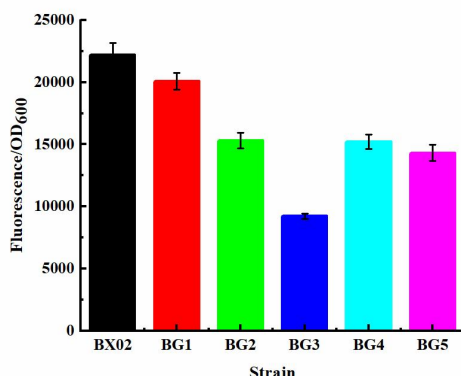


图 3-15 启动子 $P_{\epsilon psA}$ 中 SinR 结合位点的数量对转录效率的影响

Figure 3-15 Effect of the number of SinR binding sites in the promoter $P_{\epsilon psA}$ on transcription efficiency

合成生物学中许多工具箱是围绕启动子核心区域进行设计^[88]。由于启动子 $P_{\epsilon psA}$ 的-10 区序列为“-TATAAT-”（细菌常见保守序列），在这里我们主要改造-35 区和-16 区序列。由图 3-16 可知，将原始-35 区序列突变后，荧光强度再次发生明显变化。获得不同调控强度的启动子，其中抑制效果最佳的启动子为 P_{e9} ，其抑制作用为 $P_{\epsilon psA}$ 的 4.36 倍。继续对 P_{e9} 的-16 区进行改造后其荧光强度均出现增强现象（图 3-17）。证明改造-16 区会削弱 SinR 与启动子结合的位阻，减弱 SinR 的抑制作用。

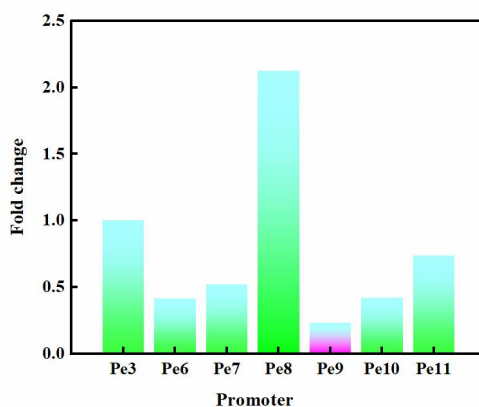


图 3-16 优化启动子 P_{e3} -35 区转录效率的变化倍数

Figure 3-16 Fold change in transcriptional efficiency of the optimized P_{e3} promoter's -35 region

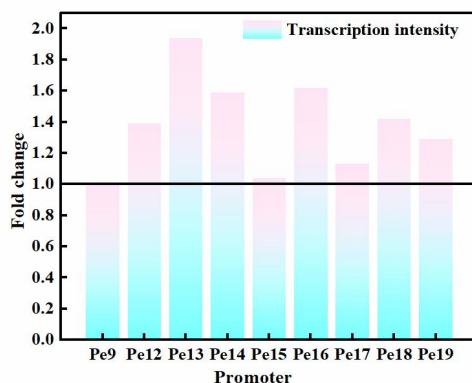
图 3-17 改造启动子 P_{e9} 核心区域-16 区转录效率变化倍数

Figure 3-17 Fold change in transcriptional efficiency of the optimized P_{e3} promoter's -16 region

3.4.4 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统的构建

基于 PhrC-RapC 对 SinR 的调控作用，我们企图构建一个动态调控系统 PhrC-RapC-SinR 来调控靶向启动子的转录效果，通过细胞密度的变化动态调控启动子调控基因的表达。

3.4.4.1 重组菌株的构建

为了验证 RapC-PhrC-SinR 系统对启动子的调控作用，首先将 eGFP 编码基因的片段插入菌株 BG9 中形成菌株 BP03，利用 eGFP 的表达程度反映 P_{e9} 的转录强度。随后将 P_{hag} -rapC 和 P_{hag} -phrC 导入菌株 BP03 获得菌株 BP04 和 BP05 (3-18)。

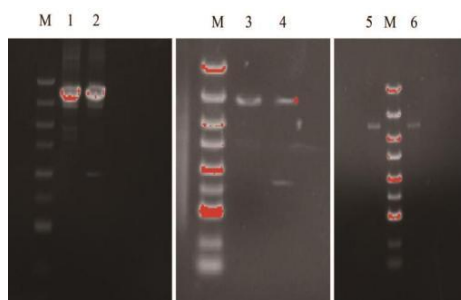


图 3-18 重组菌株 BP03-BP05 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3-18 DNA agarose gel electrophoresis diagram of the recombinant strains BP03-BP05

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1: $L-P_{e9}$ -eGFP- C_m^r - P_{e9} -R 融合片段; 泳道 2: BP03 菌液 PCR 验证; 泳道 3: $L-rapC$ - C_m^r - P_{hag} -rapC-R 融合片段; 泳道 4: BP03 菌液 PCR 验证; 泳道 5: $L-phrC$ - C_m^r - P_{hag} -phrC-R 融合片段; 泳道 6: BP05 菌液 PCR 验证

3.4.4.2 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统的分析

将菌株 BP03、BP04 和 BP05 分别接种至在 LB 培养基培养并检测菌液中的 OD 值与荧光强度。由图 3-19 可知，菌株 BP03 中随着培养时间的增加，荧光强度呈现先上升后下降的趋势，证明在菌株生长前期，SinR 对启动子 P_{e9} 的抑制作用较弱，绿色荧光蛋白正常表达，而随着培养时间的增加，SinR 对启动子的转录抑制效果增强，导致荧光强度降低。在菌株 BP04 中，在细胞生长初始阶段与菌株 BP03 的荧光强度无明显区别，但随着细胞密度的不断增加，荧光强度并未出现降低的情况，表明随着菌体生长合成的 RapG 解除了 SinR 对 P_{e9} 的抑制作用，使得 eGFP 得以正常表达。而在菌株 BP05 中，相对荧光强度也呈现出先上升后下降的情况，但相对荧光强度低于 BP03 的荧光强度。当 BP05 在生长初期，荧光强度较低且几乎没有变化，当细胞密度增加到 4.2(OD_{600})时，随着摇瓶中细胞密度的增加，eGFP 荧光强度开始增加，但相对荧光强度仍低于 BP03，表明在菌株生长阶段，PhrC 未开始调节 RapC 对 SinR 的抑制，因此启动子可以正常转录 eGFP，而当细胞密度增加到 10.3(OD_{600})时，相对荧光强度明显低于 BP03，荧光强度的下降速率也高于 BP03。这些结果表明，随着细胞密度增大，PhrC 进入细胞后逐渐解除了 RapC 对 SinR 的抑制作用，使得 SinR 可以抑制 P_{e9} 的调控作用。因此，我们可以利用 PhrC-RapC-SinR 群体感应系统结合 SinR 靶向启动子 P_{e9} 作为调控基因表达的开关，通过菌体生长动态调控基因的表达。

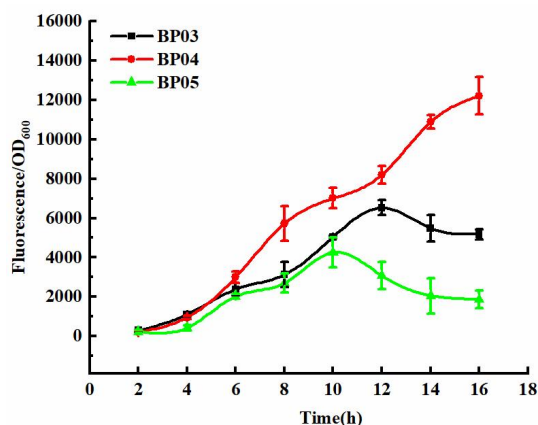


图 3-19 重组菌株 BP03-BP05 的相对荧光强度

Figure 3-19 Relative fluorescence intensities of the recombinant strains BP03-BP05

3.5 本章小结

动态调节系统已被证明可以通过平衡细胞的生长和代谢物的合成来有效地提高生产能力，其中，群体感应（QS）系统作为一种动态调节系统的形式，在细菌中广泛存在。合成生物学的兴起促使研究人员使用 QS 系统来构建基因电路。这些电路根据细菌的生长来自动调节基因的表达，减少不必要的中间体，提高目标产品的产量。在本章中我们以 SinR 为枢纽，构建了一个 PhrC-RapC-SinR 动态调控元件，通过响应细胞密度的变化调节 SinR 的表达，并筛选出 SinR 的靶向启动子 P_{epsA} 进行优化，获得一系列响应不同浓度的 SinR 的启动子。将动态调控元件与 SinR 靶向启动子结合应用于枯草芽孢杆菌中，形成一个受细胞密度调控的动态调控系统，可以用来调控代谢途径中基因的表达。具体研究内容如下：

(1) 首先，通过对 BS168 中 PhrC、RapC 与 SinR 之间的调控作用进行验证，根据相对荧光强度结果表明，RapC 能够有效抑制 SinR 的活性，而 PhrC 可以随着菌体密度的增加缓解这种抑制作用，但是没有办法完全恢复 RapC 对 SinR 的抑制作用，因此验证了构建 PhrC-RapC-SinR 群体感应动态调控系统的可行性。

(2) 其次，通过对 SinR 靶向启动子的筛选，我们发现启动子 P_{epsA} 对 SinR 浓度的变化展现出了极高的灵敏度。随后通过启动子工程对启动子 P_{epsA} 的 SinR 结合位点以及核心区域进行优化，成功突变出一系列对 SinR 具有显著响应的启动子变体。这些变体在响应 SinR 后，展现出了不同的调控幅度，其中，启动子 P_{e9} 展现出最为显著的抑制活性，其抑制作用为 P_{epsA} 的 4.36 倍。作用为后续动态调控系统的应用提供了丰富的调控工具。

(3) 最后，在 BS168 菌株中，我们成功地构建了一个 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统。该系统通过细胞密度的变化来动态地调控 SinR 靶向启动子 P_{e9} 下游基因的表达水平，这一调控机制可以灵活地响应菌体生长情况，实现对目标基因的动态调控以平衡代谢工程中细胞生长和产物合成之间的关系。

第 4 章 MK-7 合成过程代谢分流途径的分析及利用动态调控系统调节枯草芽孢杆菌 MK-7 的合成

4.1 前言

由于枯草芽孢杆菌在生产 MK-7 过程中表现出高效生产能力、高安全性、低成本以及产品纯度高显著优势，成为了工业生产 MK-7 的首选优势菌株。为了提高 MK-7 的产量，满足日益增长的市场需求，许多研究开始聚焦于 MK-7 合成途径中催化酶的表达，通过理性设计突变限速酶，优化酶与底物的结合效率、增强催化活性或提高稳定性，进而提高 MK-7 合成速率。或者通过过表达关键酶的编码基因，增加关键酶在细胞内的表达量，直接促进了 MK-7 合成途径的通量^[93,94]，而对于 MK-7 合成途径中副产物合成途径的研究较少。

MK-7 合成过程中存在众多代谢分流途径，这些途径与 MK-7 竞争前体物质，影响 MK-7 的合成量。因此，采取敲除副产物合成途径中关键基因的策略，可以确保这些基因所编码的蛋白质或酶停止合成，进而致使该代谢路径被完全切断或遭受强烈抑制，从而有效削弱乃至消除副产物在生物合成过程中的竞争效应^[95]。但是，当敲除的基因是细胞生长或生存所必需的基因时，基因敲除可能会打破细胞内原有的代谢平衡，不仅会影响细胞的正常生理功能，而且会使细胞陷入生长停滞还可能对细胞造成毒性压力，进而影响菌株的生长性能和稳定性^[96,97]。因此，在菌株中对基因进行操作时，必须考虑改造过程对细胞代谢的影响，平衡细胞生长与产物合成之间的关系，最大限度地降低代谢失衡的风险，实现菌株性能的优化和生物技术的应用价值。

本章通过对 MK-7 代谢途径进行分析，挖掘出与细胞生长相关的副产物，并利用上一章构建的动态调控系统 PhrC-RapC-SinR 和优化后的启动子对相关基因进行动态调控，使 MK-7 的合成受细胞密度的调控。当菌株处于生长阶段，副产物合成途径正常表达，促进细胞生长；当细胞密度达到 PhrC-RapC-SinR 系统的响应阈值时，抑制副产物对 MK-7 合成途径的竞争作用，使更多前体物质用于合成 MK-7。通过精准地调控 MK-7 代谢途径与副产物合成途径之间的关键节点，

有效地抑制 MK-7 生产过程中的代谢分流,引导更多地前体物质、能量流向 MK-7 合成途径。

4.2 实验材料

4.2.1 菌株及质粒

本章所用出发菌株为 BS168,质粒参考 3.2.1,重组菌株见表 4-1,构菌过程所用引物信息见表 4-2。

表 4-1 菌株及质粒

Table 4-1 Strains and plasmids

菌株/质粒	描述	来源
BS168		本实验保藏
BS01	BS168 :: $\Delta aroA$	本实验构建
BS02	BS168 :: $\Delta aroH$	本实验构建
BS03	BS168 :: $\Delta trpE$	本实验构建
BS04	BS168 :: $\Delta pabAB$	本实验构建
BS05	BS168 :: $\Delta dhbB$	本实验构建
BS06	BS168 :: $\Delta alsS-D$	本实验构建
BW1-1	BS168::P _{hag} -rapC::P _{hag} -phrC::P _{e2} -aroA	本实验构建
BW1-2	BS168::P _{hag} -rapC::P _{hag} -phrC::P _{e3} -aroA	本实验构建
BW1-3	BS168::P _{hag} -rapC::P _{hag} -phrC::P ₁₁ -aroA	本实验构建
BW2	BS168::P _{hag} -rapC::P _{hag} -phrC::P _{e11} -aroA::P _{e9} -aroH	本实验构建
BW3	BS168::P _{hag} -rapC::P _{hag} -phrC::P _{e11} -aroA::P _{e9} -aroH::P _{e9} -trpE	本实验构建
BW4	BS168::P _{hag} -rapC::P _{hag} -phrC::P _{e11} -aroA::P _{e9} -aroH::P _{e9} -trpE::P _{e9} -dhbB	本实验构建
BW5	BS168::P _{hag} -rapC::P _{hag} -phrC::P _{e11} -aroA::P _{e9} -aroH::P _{e9} -trpE::P _{e9} -dhbB::P _{e9} -alsA-D	本实验构建
BW6-1	BS168::P _{hag} -rapC::P _{hag} -phrC::P _{e11} -aroA::P _{e9} -aroH::P _{e9} -trpE::P _{e9} -dhbB::P _{e11} -alsA-D	本实验构建

菌株/质粒	描述	来源
BW6-2	BS168::P _{hag} - <i>rapC</i> ::P _{hag} - <i>phrC</i> ::P _{e11} - <i>aroA</i> ::P _{e9} - <i>aroH</i> ::P _{e9} - <i>trpE</i> ::P _{e9} - <i>dhbB</i> ::P _{e13} - <i>alsA-D</i>	本实验构建
BW6-3	BS168::P _{hag} - <i>rapC</i> ::P _{hag} - <i>phrC</i> ::P _{e11} - <i>aroA</i> ::P _{e9} - <i>aroH</i> ::P _{e9} - <i>trpE</i> ::P _{e9} - <i>dhbB</i> ::P _{e16} - <i>alsA-D</i>	本实验构建
BW6-4	BS168::P _{hag} - <i>rapC</i> ::P _{hag} - <i>phrC</i> ::P _{e11} - <i>aroA</i> ::P _{e9} - <i>aroH</i> ::P _{e9} - <i>trpE</i> ::P _{e9} - <i>dhbB</i> ::P _{e17} - <i>alsA-D</i>	本实验构建

表 4-2 本章所用引物

Table 4-2. Primers used in this chapter

菌株	引物	序列
BS01	BS01-1	GTCTGATGACGACCGCAA
	BS01-2	TTTTCAGCCTTCGAGAGC
	BS01-3	ATTGAGGTGGAAAAAGAGCGGATAACAATTCACACAG
	BS01-4	GTGAAATTGTTATCCGCTCTTTTCCACCTCAATCAGCATA AAAAG
	BS01-5	ACGGTATGATAGGTGGAGTTTTACTTCAGGATTTTTTATGG
	BS01-6	GCATAAAAAATCCTGAAGTAAACTCCACCTATCATACCGTTC GTATA
BS02	BS02-1	ATGGGCAGATCACTCACG
	BS02-2	ATCGGTATCGTGTGGTGG
	BS02-3	AGGAGACATCGAGCGGATAACAATTCACACAG
	BS02-4	CGCTCGATGTCTCCTCCAATCGCCA
	BS02-5	ACGGTATGATAGGTGGTACGATAAGAACAGCTTAGAAATA CACA
	BS02-6	AGCTGTTCTTATCGTACCACCTATCATACCGTTCGTAT
BS03	BS03-1	CGAAAAGACTGTAGGCTGTG
	BS03-2	CTCCGTTTCCTTCCTTCAGTG
	BS03-3	AGTGAGAGCAGAGCGGATAACAATTCACACAG

菌株	引物	序列
	BS03-4	GTTATCCGCTCTGCTCTCACTCCTTATGGCAA
	BS03-5	ATGATAGGTGGCGGAAAAACCCTTACTGCC
	BS03-6	GGGTTTTTCCGCCACCTATCATACCGTTCG
BS04	BS04-1	GAACCCTGGAAGCAGTGTA
	BS04-2	TCAAGAACCGAGTTCGTCAT
	BS04-3	AGAAAATAGAGGAATGATACAAGAGCGGATAACAATTTC ACAC
	BS04-4	GAAATTGTTATCCGCTCTTGTATCATTCTCTATTTTCTTTT TTACTTG
	BS04-5	CGGTATGATAGGTGGATGATATATGTGAACGGCCG
	BS04-6	GCCGTTACATATATCATCCACCTATCATACCGTTCG
BS05	BS05-1	CCTCTTGCGATGGTATGG
	BS05-2	GAGAGACCCAAAGGAACG
	BS05-3	AGAGGAAGTGTTTCATGAGCGGATAACAATTTACACACA
	BS05-4	GTGAAATTGTTATCCGCTCATGAACACTTCCTCTCAAATT
	BS05-5	GGTATGATAGGTGGAAGGAGGGTAAACAAACGGA
	BS05-6	ACCCTCCTTCCACCTATCATACCGTTCG
BS06	BS06-1	AAACCGATTACGAGAAGGC
	BS06-2	GGCTGCTGGATGTATTG
	BS06-3	GTGAGGGTGGAGCGGATAACAATTTACACAG
	BS06-4	GTTATCCGCTCCACCCTCACTCCTTATTATGCA
	BS06-5	CGAACGGTATGATAGGTGGAAGAAAAAAGAAAGCCCCTTTT A
	BS06-6	GGGGCTTTCTTTTTTTCTTCCACCTATCATACCGTTCGTATA
	BW1-1	GACCGTTTTGATGAGTGGAT
	BW1-2	TGCCCTCAGCCTGTAATC
	BW1-3	GAAATTGTTATCCGCTCTTTTTTCCACCTCAATCAGCATAAAAA
	BW1-4	G GCTGAAGGCTATGAATACATGAAACGAGATAAGGTGCA

菌株	引物	序列
BW1	BW1-5	ACCTTATCTCGTTTCATGTATTCATAGCCTTCAGCCTTC
	BW1-6	ACGGTATGATAGGTGAATATGAAATTCTCCTCTATTCCTGTCTG
	BW1-7	CAGGAATAGAGGAGAATTTTCATATTCACCTATCATACCGTTCGT A
	BW1-8	TAATGCTGATTGAGGTGGAAAAAGAGCGGATAACAATTTTCAC AC
BW2	BW2-1	GACAGAGCGTTTCTGGAGG
	BW2-2	GGAGGAGACATCGAGCGGATAACAATTTTCACACAG
	BW2-3	TTATCCGCTCGATGTCTCCTCCAATCGCC
	BW2-4	GCTGAAGGCTATGAATACATGATGATTCGCGGAATTCG
	BW2-5	CGCGAATCATCATGTATTCATAGCCTTCAGCCTTCC
	BW2-6	GCTCTCACTCCTTATGGCA
BW3	BW3-1	ACAAATGGCGATTGGAGG
	BW3-2	GGAGTGAGAGCAGAGCGGATAACAATTTTCACAC
	BW3-3	GTTATCCGCTCTGCTCTCACTCCTTATGGC
	BW3-4	GGCTGAAGGCTATGAATACATGAATTTCCAATCAAACATTTCC G
	BW3-5	GGAAATGTTTGATTGGAAATTCATGTATTCATAGCCTTCAGCCT TC
	BW3-6	TCTAAGTGCCCGTCTTGAAC
BW4	BW4-1	TGTCAACACCCAAGGAAAAC
	BW4-2	TCAGCAACTGCATCTCCC
	BW4-3	AGGAAGTGTTTCATGAGCGGATAACAATTTTCACACAG
	BW4-4	AGGTATAGCCATGTATTCATAGCCTTCAGCCTTCC
	BW4-5	CTGAAGGCTATGAATACATGGCTATACCTGCCATTTCAG
	BW4-6	GTGAAATTGTTATCCGCTCATGAACACTTCCTCTCAAATTGT
BW5	BW5-1	AGTATTGAAGATGGCGAAGC
	BW5-2	ATGTGACTAACACGACTCCC

菌株	引物	序列
BW6-1	BW5-3	GTGAGGGTGGAGCGGATAACAATTTACACAG
BW6-2	BW5-4	GAAATTGTTATCCGCTCCACCCTCACTCCTTATTATGC
BW6-3	BW5-5	TTCTTTTGTGCTTTTGTCAAGTATTCATAGCCTTCAGCCTTC
	BW5-6	GGCTGAAGGCTATGAATACTTGACAAAAGCAACAAAAGAACA AAATC

4.2.2 仪器及试剂

仪器：高效液相色谱仪：日本岛津 LC-2030，实验过程中用到的其余仪器及试剂参照 3.2.2。

4.2.3 培养基及溶液

(1) LB 培养基：参照 3.2.3。

(2) 发酵培养基：甘油 50 g/L，大豆蛋白胨 50 g/L，酵母提取物 20 g/L， KH_2PO_4 1.62 g/L， K_2HPO_4 3.86 g/L，调 pH 7.0，121 °C 灭菌 20 min。

(3) 感受态溶液：参照 3.2.3。

(4) 萃取剂：正己烷：异丙醇 2：1 (v/v)。

(5) 流动相：甲醇：二氯甲烷 9：1 (v/v)。

4.3 实验方法

4.3.1 菌株活化及感受态制备

菌株活化及感受态制备方法参照 3.3.1。

4.3.2 基因提取与片段扩增

基因提取及目标片段扩增实验方法参照 3.3.2。

4.3.3 重组菌株的构建及抗性祛除

4.3.3.1 重组菌株的构建

基因敲除菌株的构建：将基因 X 的上游片段 (L-X)、氯霉素抗性基因片段 (C_m^r) 和基因 X 的下游片段 (X-R) 融合后导入 BS168，利用氯霉素抗性替换

掉目标基因 X。随后，将敲除目标基因 X 的菌株接种到含有氯霉素的抗性平板上进行筛选并进行菌液 PCR 验证，筛选获得阳性克隆。

其他构菌方法参照 3.3.3.1。

4.3.3.2 氯霉素抗性祛除

氯霉素抗性祛除参照 3.3.3.2。

4.3.3.3 卡那霉素抗性祛除

卡那霉素祛除参照 3.3.3.3。

4.3.4 MK-7 的发酵及提取

发酵：将重组菌株活化后，吸取 1 mL 菌液接种到含有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中，加入 100 μ L 微量元素，37 $^{\circ}$ C 条件下静置培养 6 d。

提取：取发酵液混匀后吸取 2 mL 加入 5 mL 棕色离心管中，10000 rpm 离心 5 min。在沉淀物和上清液中分别加入 4 倍体积的萃取剂，震荡 20 min 后避光静置 30 min，再次离心 5 min，用 0.22 μ m 的滤膜过滤上清液，保存至棕色进样瓶。

4.3.5 MK-7 的检测及标曲制定

检测：利用高效液相色谱法进行检测，使用 C-18 柱（4.6 mm $\times$ 155 mm）进行 HPLC 分析。柱温为 35 $^{\circ}$ C，流动相流速为 1.0 mL/min，检测波长为 245 nm。

标曲制定：称取 VK₂ 标准品，用流动相配置成不同浓度的溶液，通过高效液相色谱检测峰面积。根据溶液浓度与峰面积关系制作标准方程。

4.4 结果与分析

4.4.1 MK-7 生物合成途径的分析

MK-7 在枯草芽孢杆菌的代谢途径被模块化地区分为 SA 途径、MK 途径、甘油裂解途径和 MEP 途径。在这些代谢途径中，有许多底物竞争途径、底物反馈抑制和代谢毒性形成代谢负担影响 MK-7 的合成。为了降低菌株的代谢负担，使更多前体物质流向 MK-7 合成途径，提高 MK-7 的含量，将上述途径中会与 MK-7 竞争前体物质的调控基因进行敲除。

4.4.1.1 重组菌株的构建

参考 4.3.3.1 中基因敲除菌株的构建方法，分别敲除基因 *aroA*、*aroH*、*trpE*、

pabAB、*dhbB* 以及 *alsS-D* 操纵子，形成重组菌株 BS01-BS06（图 4.1）。

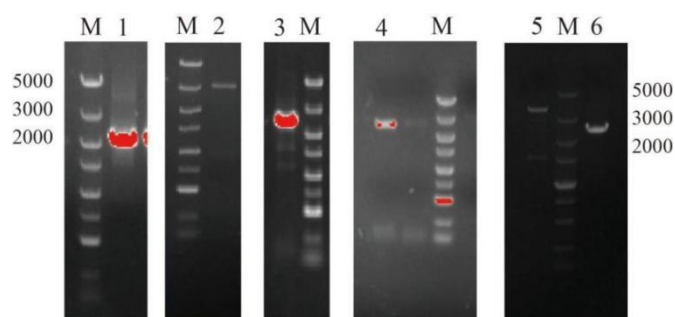


图 4-1 重组菌株 BS01-BS06 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 4-1 DNA agarose gel electrophoregrams of recombinant strains BS01-BS06

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1: *L-aroA-C_m^r-aroA-R* 融合片段; 泳道 2: *L-aroH-C_m^r-aroH-R* 融合片段; 泳道 3: *L-trpE-C_m^r-trpE-R* 融合片段; 泳道 4: *L-pabAB-C_m^r-pabAB-R* 融合片段; 泳道 5: *L-dhbB-C_m^r-dhbB-R* 融合片段; 泳道 6: *L-alsS-C_m^r-alsD-R* 融合片段

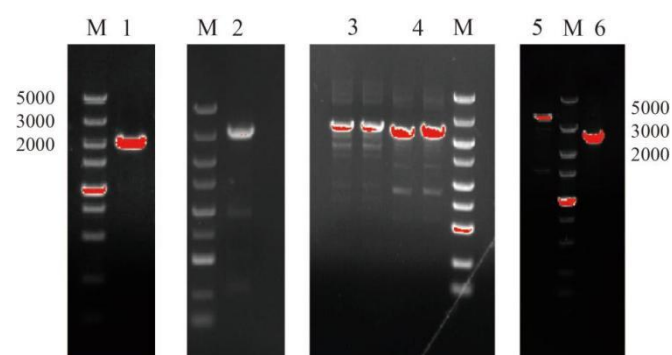


图 4-2 重组菌株 BS01-BS09 菌液 PCR 验证

Figure 4-2 PCR validation of recombinant strain BS01-BS09

M: 5000bp DNA marker; 泳道 1: BS03 菌液 PCR 验证; 泳道 2: BS02 菌液 PCR 验证; 泳道 3: BS03 菌液 PCR 验证; 泳道 4: BS04 菌液 PCR 验证; 泳道 5: BS05 菌液 PCR 验证; 泳道 6: BS06 菌液 PCR 验证

4.4.1.2 重组菌株对 MK-7 产量的影响

在 SA 途径中，赤藓糖-4-磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸经 SA 途径的七步酶催化反应生成分支酸，而 MK-7 的合成起始于分支酸^[98]。分支酸经分支酸变位酶（AroA/AroH）催化生成预苯酸，用于合成苯丙氨酸和酪氨酸；经邻氨基苯甲酸合成酶（TrpE）催化生成邻氨基苯甲酸，用于合成色氨酸；经对氨基苯甲酸合成酶（PabB/PabA）催化生成 4-氨基-4-脱氧分支酸，用于合成叶酸，都会对 MK-7

的代谢起底物竞争作用，同时苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸会对 DAHP 合酶起反馈抑制作用^[99-101]，进而减少合成 MK-7 的底物。

在 MK 途径中，分支酸在异分支酸合成酶的催化作用下转化为异分支酸用于 MK-7 的合成，但是在异分支酸裂合酶（DhbB）催化下生成 2,3-二羟基-2,3-二羟基苯甲酸（DHDHB），用于肠菌素的合成^[102]，增加了异分支酸的消耗。

在甘油裂解和 MEP 途径中，涉及甘油向葡萄糖的异化转变，随后葡萄糖进入糖酵解途径，为 SA 途径与 MEP 途径提供必需的前体物质。在碳代谢活动旺盛或 NADH 发生累积的条件下，MEP 途径的关键起始物——丙酮酸，在乙酰乳酸合成酶（AlsS）与乙酰乳酸脱羧酶（AlsD）的协同催化作用下，转化为羟基丁酮^[103]，会进一步会形成溢出代谢物，消耗了额外的碳源，与流向 MK-7 的碳源形成了直接的竞争关系。

通过敲除 MK-7 合成过程中竞争途径所需酶的编码基因形成重组菌株 BX01-BX06，将重组菌株以及对照菌株 BS168 活化后接入发酵培养基，发酵 6 天后对各菌株 MK-7 产量进行检测。对比 BS168 与 6 株改造菌 MK-7 产量(图 4-3)：发酵 6 天后，BS01 的产量与出发菌株相比降低了 63.14%，BS02、BS03、BS05、BS06 的产量分别降为 7.63 mg/L、7.75 mg/L、7.92 mg/L、5.77 mg/L，BS04 产量为 11.01 mg/L，与出发菌株的产量相近。当敲除竞争基因后，却出现了产量下降的现象，推测原因为：尽管敲除 *aroA*、*aroH*、*trpE* 会减少对分支酸的竞争，增加合成 MK-7 的前体物质，但芳香族氨基酸（苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸）的减少会影响细菌生长，对 MK-7 产量影响更大。同时，*aroA* 编码的酶是一个双功能酶，除具有部分分支酸变位酶活性外，还具有 DAHP 合成酶活性，而 DAHP 合成酶是 SA 途径第一步的催化酶，敲除 *aroA* 导致 DAHP 合成酶表达量下降严重影响 MK-7 合成途径^[51]；DhbB 是铁离子载体^[102]，敲除 *dhbB* 会使得胞内游离铁离子浓度增加，对细胞毒害作用增加。而对于 *alsS-alsD* 来说，催化生成的羟基丁酮可维持细胞 pH 的稳定，敲除 *alsS-alsD* 后，胞内 pH 失衡导致代谢失衡，因此敲除上述基因导致 MK-7 产量均不同程度下降；而敲除 *pabAB* 后 MK-7 的产量变化较小，可能是因为尽管 PabAB 利用分支酸合成叶酸盐的前体物质，但竞争作用较弱，对 MK-7 产量减小可能是因为菌株生长受抑制引起的。为了验证这些猜测，检测重组菌株的细胞密度。

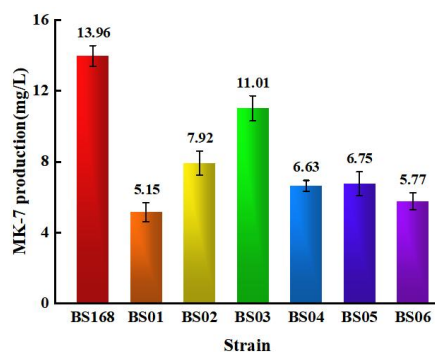
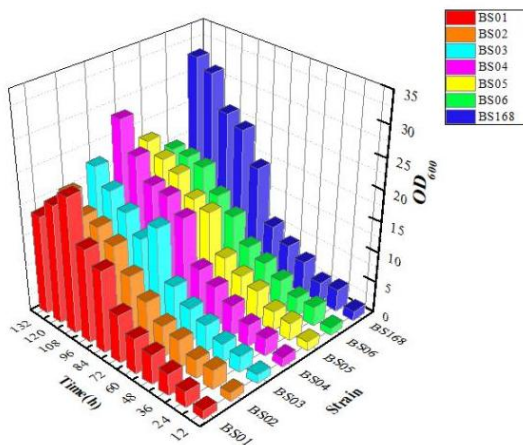


图 4-3 重组菌株 BX01-BX06 中 MK-7 产量

Figure 4-3 MK-7 production in BX01-BX06

4.4.1.3 重组菌株细胞密度的变化

由图 4-4 可知, BS01-BS06 的 OD_{600} 与出发菌株相比均有所下降, 其中敲除 *aroA*、*aroH*、*trpE*、*dhbB*、*alsS-alsD* 后, 发酵到 6 天后, OD_{600} 由 30.67 分别下降为 16.15、17.81、20.12、25.81、20.51、17.39, 表明敲除上述基因会影响菌株生长。Yang^[99]人的研究表明, 过表达 *aroA*、*aroH* 等基因有利于菌体的生长。由上述结果可知, 芳香族氨基酸及羟基丁酮等物质在前期菌体生长方面起着重要作用, 当菌体积累较多这些物质时又会对 MK-7 合成起到抑制作用。

图 4-4 重组菌株 BX01-BX06 在发酵过程中 OD_{600} 的变化Figure 4-4 OD_{600} changes of the recombinant strains BX01-BX06 during fermentation

因此, 不能对这些基因进行简单的敲除, 我们希望通过群体感应来调控上述基因进而平衡细胞生长和产物合成之间的关系, 使细胞生长与产物合成分开。在

发酵前期, 基因正常表达供细胞生长, 当细胞生长到一定数量后抑制上述基因表达, 使更多碳源流向 MK-7 的合成, 更好地提高细菌的生产。

4.4.2 动态调控系统对 SA 途径中代谢分流途径的调控作用

4.4.2.1 重组菌株的构建

首先参考 3.4.4.1 中菌株构建方法, 以 BS168 为出发菌株, 将 *phrC*、*rapC* 的原始启动子替换为受细胞密度调控的启动子 P_{hag} , 构建动态调控系统 PhrC-RapC-SinR 系统, 形成菌株 BW0-1 和 BW0-2, 为了有效调控催化前体物质分解所需酶的编码基因, 以重组菌株 BW0-2 为出发菌株, 将基因 *aroA* 的原始启动子替换为上一章优化后的启动子 P_{ex} , 获得菌株 BW1-X, 使得基因 *aroA* 是表达受到 SinR 的调控。利用相同的方法替换基因 *aroH*、*trpE* 的原始启动子获得其余重组菌株, 使分解分支酸所需酶的编码基因表达受 SinR 的调控。

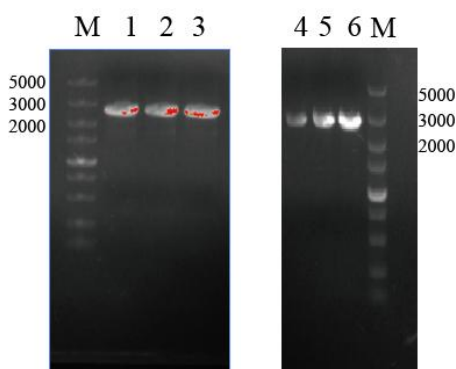


图 4-5 重组菌株 BW1-1、BW1-2、BW1-3 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 4-5 DNA agarose gel electrophoregrams of recombinant strains BW1-1, BW1-2 and BW1-3

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1: $L\text{-}aroA\text{-}C_m^r\text{-}P_{e2}\text{-}aroA\text{-}R$ 融合片段; 泳道 2: $L\text{-}aroA\text{-}C_m^r\text{-}P_{e3}\text{-}aroA\text{-}R$ 融合片段; 泳道 3: $L\text{-}aroA\text{-}C_m^r\text{-}P_{e11}\text{-}aroA\text{-}R$ 融合片段; 泳道 4: BW1-1 菌液 PCR 验证; 泳道 5: BW1-2 菌液 PCR 验证; 泳道 6: BW1-3 菌液 PCR 验证

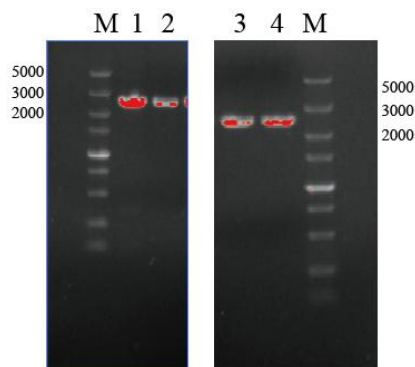


图 4-6 重组菌株 BW2、BW3 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 4-6 DNA agarose gel electrophoregrams of recombinant strains BW2 and BW3

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1: $L\text{-}aroH\text{-}C_m^r\text{-}P_{e9}\text{-}aroH\text{-}R$ 融合片段; 泳道 2: $L\text{-}trpE\text{-}C_m^r\text{-}P_{e9}\text{-}trpE\text{-}R$ 融合片段; 泳道 3: BW2 菌液 PCR 验证; 泳道 4: BW3 菌液 PCR 验证

4.4.2.2 动态调控 SA 途径对 MK-7 产量的影响

在 SA 途径中形成的分支酸在 AroA、AroH、TrpE 的催化作用下, 与用于合成 MK-7 的分支酸形成竞争, 但根据前文的实验表明敲除这些酶的编码基因并不会抑制其对 MK-7 的竞争, 反而会影响细胞生长, 降低 MK-7 的产量, 说明静态调控这些基因无法解决其对 MK-7 代谢过程中的竞争作用, 因此我们利用第三章所构建的动态调控系统精细的调控基因表达。

对于 AroA 而言, 它既是催化分支酸合成预苯酸, 又是 SA 途径的关键酶, 因此不能过分抑制 *aroA* 的表达。将 BW0-2 菌株中 P_{aroA} 替换替换为抑制作用为中等强度的启动子 P_{e2} 、 P_{e3} 、 P_{e11} , 获得菌株 BW1-1、BW1-2、BW1-3。对比 3 株菌株与 BS168 的 MK-7 产量可知, 菌株 BW1-1、BW1-2 和 BW1-3 中 MK-7 产量都出现了上升, 其中菌株 BW1-3 中 MK-7 的产量最高, 为 39.86 mg/L (图 4-7)。

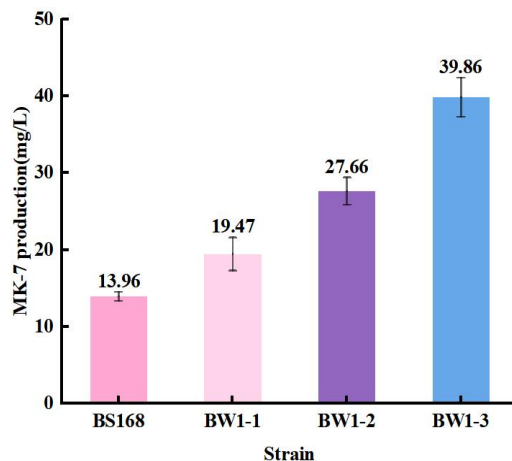


图 4-7 重组菌株 BW1-1、BW1-2 和 BW1-3 的 MK-7 产量

Figure 4-7 MK-7 production of recombinant strains BW1-1, BW1-2, and BW1-3

在重组菌株 BW1-3 的基础上，利用重组启动子 P_{e9} 表达基因 *aroH*，获得菌株 BW2。按照相同的构菌方法将菌株 BW2 中基因 *trpE* 的启动子替换为和 P_{e9} ，获得菌株 BW3。检测重组菌株 BW2 和 BW3 发酵 MK-7 的产量，相比于菌株 BW1 的产量，两个重组菌株的产量再次上升，最大产量分别为 52.01 mg/L、63.93 mg/L（图 4-8）。

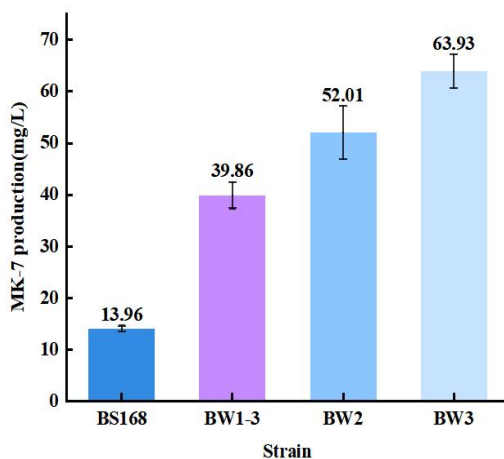


图 4-8 重组菌株 BW2 和 BW3 的 MK-7 产量

Figure 4-8 Production of MK-7 in the recombinant strain BW2 and BW3

4.4.3 动态调控系统对 MK 途径和甘油裂解途径中代谢分流途径的调控作用

4.4.3.1 重组菌株的构建

以 BW3 为出发菌株，将基因 *dhbB* 的启动子替换为启动子 P_{e9} ，获得重组菌株 BW4。紧接着利用启动子 P_{e9} 表达菌株 BW4 中的操纵子 *alsS-D*。使得 MK 途径和甘油裂解途径中代谢分流途径受 SinR 的调控。

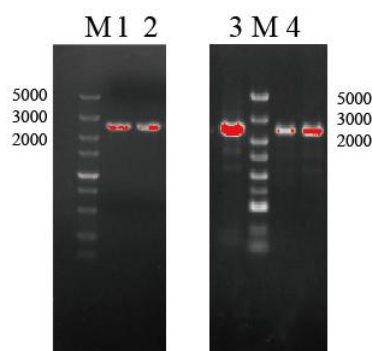


图 4-9 重组菌株 BW4、BW5 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 4-9 DNA agarose gel electrophoregrams of recombinant strains BW4、BW5

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1: *L-dhbB-C_m^r-P_{e9}-dhbB-R* 融合片段; 泳道 2: BW4 菌液 PCR 验证; 泳道 3: *L-alsS-D-C_m^r-P_{e9}-alsS-D-R* 融合片段; 泳道 4: BW5 菌液 PCR 验证

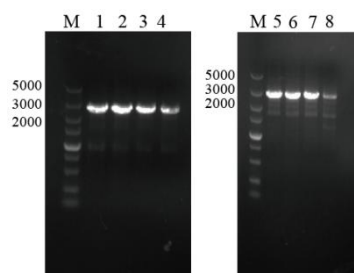


图 4-10 重组菌株 BW6-1、BW6-2、BW6-3、BW6-4 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 4-10 DNA agarose gel electrophoregrams of recombinant strains BW6-1- BW6-4

M: 5000 bp DNA marker; 泳道 1: *L-alsS-D-C_m^r-P_{e11}-alsS-D-R* 融合片段; 泳道 2: *L-alsS-D-C_m^r-P_{e13}-alsS-D-R* 融合片段; 泳道 3: *L-alsS-D-C_m^r-P_{e16}-alsS-D-R* 融合片段; 泳道 4: *L-alsS-D-C_m^r-P_{e17}-alsS-D-R* 融合片段; 泳道 5: BW6-1 菌液 PCR 验证; 泳道 6: BW6-2 菌液 PCR 验证; 泳道 7: BW6-3 菌液 PCR 验证; 泳道 8: BW6-4 菌液 PCR 验证

4.4.3.2 动态调控 MK 途径和甘油裂解途径对 MK-7 产量的影响

由 4.4.1 实验结果可知，敲除 MK 途径和甘油裂解途径中副产物的相关基因 *dhbB* 和操纵子 *alsS-D* 无法抑制对 MK-7 的分流作用，而通过启动替换，使基因 *dhbB* 和操纵子 *alsS-D* 的表达受启动子 P_{e9} 转录调控后，可以细胞密度的变化动态调控 *DhbB* 以及 *AlsS-D* 的表达量，既有利于细胞生长，又可以促进更多前体物质流向 MK-7 合成途径。

由图 4-11 可知，利用动态调控系统调控基因 *dhbB* 时，MK-7 的产量会逐步得到提升，达到 72.88 mg/L。但将启动子 $P_{alsS-alsD}$ 更换为启动子 P_{e9} 后，BW5 的产量反而下降为 61.47 mg/L。推测 MK-7 产量下降的原因为启动子 P_{e9} 调控下 *AlsS-D* 的表达量过低，导致催化合成的羟基丁酮大量减少，不仅会导致细胞 pH 失衡，而且会严重影响 NADH 的合成。而 MK-7 作为枯草芽孢杆菌细胞膜上电子传递载体，相关研究证明 NADH/NAD⁺ 比率影响 MK-7 水平，足够的电子传递可以保证 MK-7 的高效合成^[94]。NADH 含量的下降不仅使电子传递链上的关键步骤受阻，MK-7 的前体物质无法顺利转化为最终产物，而且还可能通过影响氧化还原状态和适应性机制等方面对枯草芽孢杆菌产生了广泛而深远的影响。

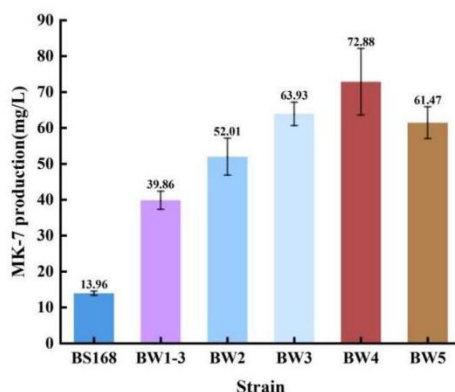


图 4-11 重组菌株 BW4 和 BW5 的 MK-7 产量

Figure 4-11 Production of MK-7 in the recombinant strains BW4 and BW5

因此，为了优化基因 *alsS-alsD* 的表达水平，利用 3.4.3 中经启动子工程优化后具有不同调控强度的启动子 P_{e11} 、 P_{e13} 、 P_{e16} 、 P_{e17} 来对其进行精细调控，获得重组菌株 BW6-1、BW6-2、BW6-3、BW6-4，测定重组菌株发酵液中 MK-7 的产量分别为 79.47 mg/L、73.70 mg/L、87.53 mg/L、75.52 mg/L（图 4-12），其中改

造后的菌株中产量最高的菌株为 BW6-3, 其产量是出发菌株 BS168 的 6.27 倍(图 4-13)。

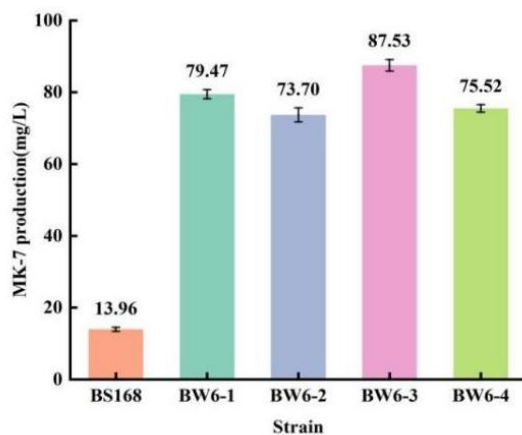


图 4-12 重组菌株 BW6-1、BW6-2、BW6-3、BW6-4 的 MK-7 产量

Figure 4-12 MK-7 production of recombinant strains BW6-1, BW6-2, BW6-3, and BW6-4

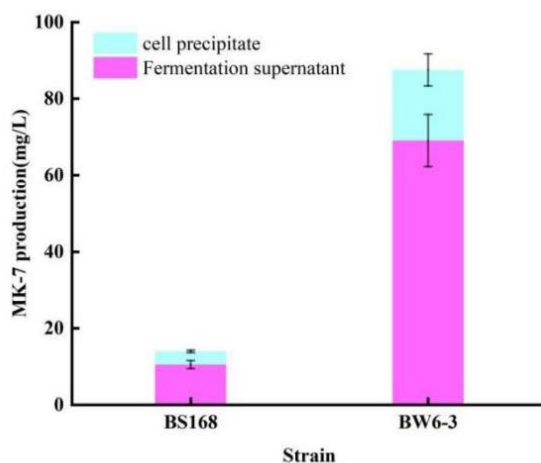


图 4-13 BS168 与重组菌株 BW6-3 的 MK-7 产量对比

Figure 4-13 Comparison of MK-7 production between BS168 and the recombinant strain BW6-3

4.4.4 动态调控系统对菌体生长情况的影响

在发酵过程中, 改造菌的 OD_{600} 值高于 BS168 (图 4-14), 推测为在发酵初期, BW6-3 的 OD 值未拨动群体感应开关, 因此色氨酸、苏氨酸等芳香族氨基酸正常表达, 会促进菌体生长, 随着 OD_{600} 值不断增大, 菌体浓度拨动动态调控开关后, SinR 表达量随之增加, 逐渐抑制目标基因的表达, 促进 MK-7 合成。BW6-3 的最大细胞密度比原菌株高, 且稳定期更久。最终菌株 BW6-3 细胞得率

为 2.77 mg/L（图 4-15），代谢效率比原菌株提升了 6.08 倍，表明此次改造对细菌的生长未产生负担，同时能有效减轻 MK-7 竞争分流，提高产量。证明了利用 PhrC-RapC-SinR 动态调控元件在枯草芽孢杆菌 MK-7 合成过程中干扰代谢分流的可行性。

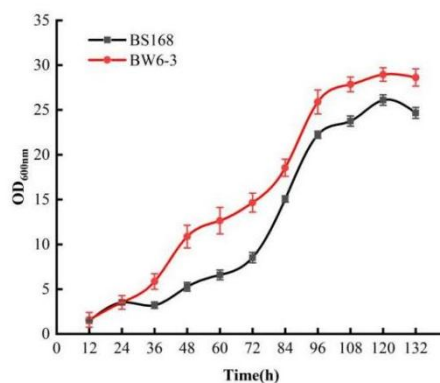


图 4-14 BS168 与重组菌株 BW6-3 的 OD₆₀₀ 对比

Figure 4-14 OD₆₀₀ of BS 168 and recombinant strain BW 6-3

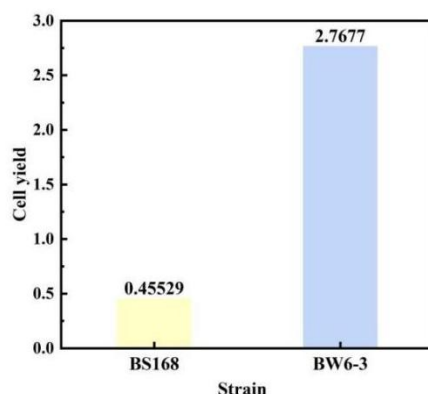


图 4-15 BS168 与重组菌株 BW6-3 单细胞产率

Figure 4-15 Cell yield of BS 168 and recombinant strain BW6-3

4.5 本章小结

在上一章，我们构建了动态调控元件 PhrC-RapC-SinR 以及优化 SinR 靶向启动子，获得一个可以感应细胞密度的动态调控系统。在本章中，我们将该系统应用于 MK-7 合成过程中副产物途径，将副产物合成过程所需酶编码基因的启动子替换为优化后的 SinR 靶向启动子，动态调控细胞生长与 MK-7 合成过程，当细胞密度低时，启动子调控的基因可以正常表达，合成的副产物促进细胞生长，而

当细胞密度达到 10.3 时，动态调控系统通过抑制启动子的转录强度而降低后续基因的表达，降低副产物对合成 MK-7 的前体物质的代谢分流作用，使得更多的前体物质用于 MK-7 的合成，最终 MK-7 的产量提高 6.27 倍。具体研究内容如下：

(1) 首先，对 MK-7 的合成途径进行分析，将催化前体物质转化为副产物所需酶的编码基因进行敲除，期望降低副产物的竞争作用，但结果表明敲除上述基因后 MK-7 的产量并没有提高。通过检测 OD 值的变化发现，敲除这些基因后菌株的细胞密度降低，抑制了菌株的生长，最终导致 MK-7 产量下降。

(2) 其次，在 BS168 中构建动态调控系统 PhrC-RapC-SinR，形成重组菌株 BW0-2。在菌株 BW0-2 中利用 SinR 靶向启动子依次动态调控分支酸变位酶（AroA/AroH）、邻氨基苯甲酸合成酶（TrpE）、异分支酸裂合酶（DhbB）、乙酰乳酸合成酶（AlsS）与乙酰乳酸脱羧酶（AlsD）编码基因的表达，获得 MK-7 高产菌株 BW6-3，在 250 mL 的锥形瓶中，MK-7 的产量达到 87.53 mg/L，对比出发菌株 BS168，MK-7 产量提高 6.27 倍。

(3) 最后，对比原始菌株 BS168 和重组菌株 BW6-3 在发酵过程中细胞密度的变化可知，在动态调控系统的作用下，重组菌株 BW6-3 的细胞密度始终高于 BS168，在细胞生长前期，重组菌株 BW6-3 的生长速度更快，最大细胞密度比原菌株高，且稳定期更久，更有利于 MK-7 的合成。证明此次改造对细菌的生长未产生负担，同时能有效减轻 MK-7 竞争分流及反馈抑制，提高产量。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

(1) 通过生物信息学分析 SinR, 预测结果表明 SinR 蛋白为亲水性胞内蛋白, 具有 16 个磷酸化位点。通过对于 SinR 的二、三级结构分析我们发现, 其二级结构较为简单, 三级结构存在 HTH-XRE 结构, 该结构中的 C 端与 DNA 结合, 改变 DNA 构象, 调节 RNA 聚合酶与 DNA 的结合能力, 发挥调控作用。通过分析 SinR 的作用网络表明, 在枯草芽孢杆菌中, SinR 在生物膜的形成、细菌芽孢的形成、毒力因子的产生以及生物合成发挥着重要的调控作用。

(2) 通过对 PhrC、RapC 和 SinR 相互作用关系的验证, 证明 RapC 对 sinR 的活性起到抑制作用, 而 RapC 的同源 PhrC 可以缓解 RapC 对 SinR 的抑制作用, 但并不能完全缓解其抑制作用, 证明了构建 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统的可行性。

(3) 通过对 SinR 靶向启动子进行筛选, 表明启动子 P_{epsA} 对 SinR 浓度的变化展现出了极高的灵敏度。随后, 通过启动子工程优化启动子 P_{epsA} , 将启动子序列中 SinR 的结合位点突变为调控作用更为有效的序列“GTTCTCT”, 并插入反向重复序列“GTTCTCTAAAGAGAAC”。最后对启动子核心区域进行改造, 最终获得启动子 P_{e9} , 与原始启动 P_{epsA} 相比, SinR 对 P_{e9} 的抑制作用最强, 其转录效率降低 4.36 倍。此外, 在枯草芽孢杆菌中构建了 PhrC-RapC-SinR 群体感应动态调控元件, 利用该系统与启动子 P_{e9} 结合作为调控基因表达的开关, 通过菌体生长情况动态调控基因的表达, 当细胞处于生长阶段, 启动子 P_{e9} 所调控的基因正常表达, 当细胞密度达到 10.3 时, 该系统开始强烈抑制下游基因的表达。

(4) 通过分析 MK-7 合成途径, 发现存在多个代谢分流途径, 因此, 对 MK-7 合成过程中分解前体物质所需酶 (AroA、AroH、TrpE、PabAB、DhbB、AlsS-D) 的编码基因进行基因敲除, 以期提高 MK-7 产量。但是结果却表明敲除这些副产物合成途径所需酶的编码基因并不能促进 MK-7 的合成, 基因敲除后反而抑制了菌体生长, 导致 MK-7 产量下降。因此我们将这些酶编码基因的启动子替换为前

文中优化后的启动子，利用 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统，通过响应菌体密度动态调控副产物合成途径，平衡细胞生长与 MK-7 合成过程，最终获得菌株 BW6-3 发酵 6 天后 MK-7 产量达到 87.53 mg/L，是出发菌株 BS168 的 6.27 倍。

(5) 本文在枯草芽孢杆菌中，构建了动态调控元件 PhrC-RapC-SinR，并通过启动子工程优化 SinR 靶向启动子 P_{epsA} ，获得一系列启动子。将 PhrC-RapC-SinR 与启动子相结合作为动态调控系统对 MK-7 合成途径进行调控，通过细胞密度的变化调控副产物的合成，使菌体在发酵前期有利于细胞生长，而到发酵后期，抑制副产物的竞争作用，使更多的前体物质用于 MK-7 的合成。对比出发菌株 BS168 和重组菌株 BW6-3 的细胞密度，重组菌株在发酵前期生长较快，而且重组菌株的最大细胞密度也略高于 BS168，这说明改造并未对菌株产生代谢负担。

5.2 展望

(1) 本研究利用 PhrC-RapC-SinR 动态调控元件对 SinR 靶向启动子的调控作用，对 MK-7 合成途径中某些分支途径进行动态调控，抑制在合成 MK-7 过程中副产物的竞争作用和反馈抑制。然而，在 MK-7 合成途径中仍有其余竞争途径会争夺 MK-7 合成途径中的碳源和能量，影响 MK-7 的合成。因此，在接下来的研究中，仍需要对其他竞争途径进行调控。

(2) 本研究通过 PhrC-RapC-SinR 动态调控系统对分支途径关键基因进行动态调控，进而提高了 MK-7 的产量，尽管表型数据证实了调控系统的有效性，但基因表达水平的时序性变化特征尚未被系统解析。为此，后续研究可结合转录组学分析及实时荧光定量 PCR 等技术手段，对调控网络作用下的靶基因表达谱进行多维度定量表征，为进一步优化级联调控元件提供理论依据。

(3) 本实验基于 SinR 构建了一个动态调控系统，在 SinR 上游构建 PhrC-RapC-SinR 群体感应系统，在下游改造 SinR 靶向启动子，扩大启动子对 SinR 的响应范围，但对于 SinR 蛋白本身研究较少，后续的实验中可以对围绕该转录因子展开后续实验，进行深层次、系统性的改造。并通过启动子串联、组合调控元件、模块化组装等多层次调控策略，对 MK-7 的合成实现更精准动态调控。

(4) 在获得重组菌株 BW6-3 后，并没有系统对发酵工艺进行优化及发酵罐规模放大研究，对于菌株用于工业化生产 MK-7 的潜能难以全面评估，因此后续的

实验中可以通过对培养基成分优化和发酵参数优化,并进行放大培养发酵,研究菌株在不同规模发酵体系间的差异,以进一步为工业化生产提供方法。

参考文献

- [1]Jadhav N, Ajgaonkar S, Saha P, Gurav P, Pandey, A, etc. Molecular pathways and roles for vitamin K₂-7 as a health-beneficial nutraceutical: Challenges and opportunities[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 896920.
- [2] Xu L Y, QiU Y B, Zhang X M, etc. The efficient green bio-manufacturing of Vitamin K₂: design, production and applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 5: 1-16.
- [3] Apalset E M, Gjesdal C G, Eide G E, etc. Dietary vitamins K₁, K₂ and bone mineral density: the Hordaland Health Study[J]. *Archives of Osteoporosis*, 2010, 5(1): 73-81.
- [4] Capozzi A, Scambia G, Lello S. Calcium, vitamin D, vitamin K₂, and magnesium supplementation and skeletal health[J]. *Maturitas*, 2020, 140: 55-63.
- [5] Mishima E, Wahida A, Seibt T, etc. Diverse biological functions of vitamin K: from coagulation to ferroptosis[J]. *Nature Metabolism*, 2023, 5(6): 924-932.
- [6] Halder M, Petsophonsakul P, Akbulut A C, etc. Vitamin K: Double bonds beyond coagulation insights into differences between vitamin K₁ and K₂ in health and disease[J]. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20(4): 896.
- [7] Beulens J W J, Bots M L, Atsma F, etc. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(2): 489-493.
- [8] Spronk H M H, Soute B a M, Schurgers L J, etc. Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289(2): 485-490.
- [9] Kurnatowska I, Grzelak P, Masajtis-Zagajewska A, etc. Effect of vitamin K₂ on progression of atherosclerosis and vascular calcification in nondialyzed patients with chronic kidney disease stages 3-5[J]. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 2015, 125(9): 631-640.
- [10] Westenfeld R, Krueger T, Schlieper G, etc. Effect of vitamin K₂ supplementation

on functional vitamin K deficiency in hemodialysis patients: a randomized trial[J]. American Journal of Kidney Diseases, 2012, 59(2): 186-195.

[11] Pilkey R M, Morton A R, Boffa M B, etc. Subclinical vitamin K deficiency in hemodialysis patients[J]. American journal of kidney diseases, 2007, 49(3): 432-439.

[12] Zhang J, Zhang Y, Wang J, etc. Recent advances in Alzheimer's disease: mechanisms, clinical trials and new drug development strategies[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9(1): 211.

[13] Popescu A, German M. Vitamin K₂ holds promise for Alzheimer's prevention and treatment[J]. Nutrients, 2021, 13(7): 2206.

[14] Vos M, Esposito G, Edirisinghe J N, etc. Vitamin K₂ is a mitochondrial electron carrier that rescues Pink1 deficiency[J]. Science, 2012, 336(6086): 1306-1310.

[15] 惠文婷, 宋潼潼, 黄敏, 等. 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.

[16] Maniwa Y, Kasukabe T, Kumakura S, etc. 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.

[17] 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.

[18] 许洪高, 张彧格. 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.

[19] Ebina K, Shi K, Hirao M, etc. Vitamin K₂ administration is associated with decreased disease activity in patients with rheumatoid arthritis[J]. Modern Rheumatology, 2013, 23(5): 1001-1007.

[20] Beulens J W J, Van Der A D L, Grobbee D E, etc. Dietary phylloquinone and menaquinones intakes and risk of Type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2010, 33(8): 1699-1705.

[21] Jeong I S, Gu S Y, Park K H, etc. A simultaneous determination and monitoring of vitamin K₁ (phylloquinone) and vitamin K₂ (menaquinone) in vegetable drinks and natto sold on the Korean market[J]. Journal of Food Measurement and

Characterization, 2022, 16(1): 248-257.

[22] 郭辉, 董乃慧, 张素芳. 富含甲萘醌-7 的纳豆功能性食品:营养、风味及抗血栓生物活性[C]. 中国食品科学技术学会第二十一届年会, 2024 :502-503.

[23] Lal N, Berenjian A. Cis and trans isomers of the vitamin menaquinone-7: which one is biologically significant?[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(7): 2765-2776.

[24] Vermeer C, Raes J, Van't Hoofd C, etc. Menaquinone content of cheese[J]. Nutrients, 2018, 10(4): 446.

[25] Brudzynski K, Flick R. Accumulation of soluble menaquinones MK-7 in honey coincides with death of *Bacillus spp.* present in honey[J]. Food Chemistry: X, 2019, 1: 100008.

[26] Isler O, Rüegg R, Chopard-Dit-Jean L, etc. Synthese und Isolierung von Vitamin K₂ und isoprenologen Verbindungen[J]. Helvetica Chimica Acta, 1958, 41(3): 786-807.

[27] Min J H, Lee J S, Yang J D, 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.

[28] Baj A, Wałejko P, Kutner A, etc. Convergent synthesis of menaquinone-7 (MK-7)[J]. Organic Process Research & Development, 2016, 20(6): 1026-1033.

[29] Szterk A, Zmysłowski A, Bus K. Identification of cis/trans isomers of menaquinone-7 in food as exemplified by dietary supplements[J]. Food Chemistry, 2018, 243: 403-409.

[30] Ren L, Peng C, Hu X, etc. Microbial production of vitamin K₂: current status and future prospects[J]. Biotechnology Advances, 2020, 39: 107453.

[31] Hu P, Peng C, Zhang B, etc. Enhancing menaquinone-7 biosynthesis through strengthening precursor supply and product secretion[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2024, 47(2): 211-222.

[32] Zhang Z, Liu L, Liu C, etc. New aspects of microbial vitamin K₂ production by expanding the product spectrum[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 1-12.

[33] Bøe C A, Holo H. Engineering *Lactococcus lactis* for increased vitamin K₂

- production[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 191.
- [34] Zhang B, Peng C, Lu J, etc. Enhancing menaquinone-7 biosynthesis by adaptive evolution of *Bacillus natto* through chemical modulator[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 120.
- [35] Chen T, Xia H, Cui S, etc. Combinatorial methylerythritol phosphate pathway engineering and process optimization for increased menaquinone-7 synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2020, 30(5): 762-769.
- [36] Xu J, Zhang W. Menaquinone-7 production from maize meal hydrolysate by *Bacillus* isolates with diphenylamine and analogue resistance[J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2017, 18(6): 462-473.
- [37] 许静. 维生素 K₂ 高产菌株的选育及其生物合成相关基因表达丰度的研究[D]. 合肥工业大学, 2012.
- [38] 黄友美, 曹盛, 孙一斐, 等. 枯草芽孢杆菌 DC-1 产维生素 K₂ 的发酵条件优化[J]. *食品研究与开发*, 2024, 45(03): 123-130.
- [39] Zhou M J, Jing W, Hu L X, etc. Enhanced vitamin K₂ production by engineered *Bacillus subtilis* during leakage fermentation[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023, 39(8): 224.
- [40] Mahdinia E, Demirci A, Berenjian A. Strain and plastic composite support (PCS) selection for vitamin K (menaquinone-7) production in biofilm reactors[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2017, 40(10): 1507-1517.
- [41] Mahdinia E, Demirci A, Berenjian A. Optimization of *Bacillus subtilis natto* growth parameters in glycerol-based medium for vitamin K (menaquinone-7) production in biofilm reactors[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2018, 41(2): 195-204.
- [42] Berenjian A, Mahdinia E, Demirci A. Sustainable menaquinone-7 production through continuous fermentation in biofilm bioreactors[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2024, 47(7): 1107-1116.
- [43] Yi Y, Chen M, Coldea T E, etc. Soy protein hydrolysates induce menaquinone-7 biosynthesis by enhancing the biofilm formation of *Bacillus subtilis natto*[J]. *Food Microbiology*, 2024, 124: 104599.

- [44] Ma Y, McClure D D, Somerville M V, etc. Metabolic engineering of the MEP pathway in *Bacillus subtilis* for increased biosynthesis of menaquinone-7[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(7): 1620-1630.
- [45] Su Y, Liu C, Fang H, etc. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 173.
- [46] Zweers J C, Barák I, Becher D, etc. Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes[J]. Microbial Cell Factories, 2008, 7(1): 10.
- [47] Song Y, He S, Abdallah I I, etc. Engineering of multiple modules to improve amorphaadiene production in *Bacillus subtilis* using CRISPR-Cas9[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(16): 4785-4794.
- [48] Michna R H, Zhu B, Mäder U, etc. SubtiWiki 2.0—an integrated database for the model organism *Bacillus subtilis*[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 44(D1): D654-D662.
- [49] 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.
- [50] 杨绍梅. 枯草芽孢杆菌的模块化路径工程设计促进甲萘醌-7 的合成[D].天津大学, 2019.
- [51] Forlani G, Giberti S, Doria E. The levels of DAHP synthase, the first enzyme of the shikimate pathway, are related to free aromatic amino acids and glutamine content in *Nicotiana plumbaginifolia* Cell Cultures. Plants, 2023, 12(13):2524.
- [52] Volk M J, Tran V G, Tan S I, etc. Metabolic engineering: methodologies and applications[J]. Chemical Reviews, 2023, 123(9): 5521-5570.
- [53] Choi K R, Jang W D, Yang D, etc. Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering[J]. Trends in Biotechnology, 2019, 37(8): 817-837.
- [54] Wu G, Yan Q, Jones J A, etc. Metabolic burden: cornerstones in synthetic biology and metabolic engineering applications[J]. Trends in Biotechnology, 2016, 34(8): 652-664.

- [55] Cress B F, Trantas E A, Ververidis F, etc. Sensitive cells: enabling tools for static and dynamic control of microbial metabolic pathways[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 36: 205-214.
- [56] Wu J, Liu Y, Zhao S, etc. Application of dynamic regulation to increase L-phenylalanine production in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019: 923-932.
- [57] Wu J, Li W, Zhao S G, etc. Site-directed mutagenesis of the quorum-sensing transcriptional regulator SinR affects the biosynthesis of menaquinone in *Bacillus subtilis*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 113.
- [58] Venayak N, Anesiadis N, Cluett W R, etc. Engineering metabolism through dynamic control[J]. *Current opinion in biotechnology*, 2015, 34: 142-152.
- [59] Cho S, Shin J, Cho B K, etc. Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering[J], 2018, 19(4): 1089.
- [60] Cao Z, Liu Z, Mao X. Application of quorum sensing in metabolic engineering[J]. *International journal of molecular sciences*, 2023, 71(13): 5062-5074.
- [61] Otero-Muras I, Carbonell P. Automated engineering of synthetic metabolic pathways for efficient biomanufacturing[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 63: 61-80.
- [62] Chu P, Phan T T P, Nguyen T T T, etc. Potent IPTG-inducible integrative expression vectors for production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023, 39(6): 143.
- [63] Yin X, Shin H D, Li J, etc. P_{gas} , a low-pH-induced promoter, as a tool for dynamic control of gene expression for metabolic engineering of *Aspergillus niger*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(6): e03222-16.
- [64] Senoo S, Tandar S T, Kitamura S, etc. Light-inducible flux control of triosephosphate isomerase on glycolysis in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(12): 3292-3300.
- [65] Liang Q, Zhang H, Li S, etc. Construction of stress-induced metabolic pathway from glucose to 1, 3-propanediol in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89: 57-62.
- [66] 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.
- [67] Eickhoff M J, Bassler B L. SnapShot: bacterial quorum sensing[J]. Cell, 2018, 174(5): 1328-1328.
- [68] Papenfort K, Bassler B L. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(9): 576-588.
- [69] Anesiadis N, Kobayashi H, Cluett W R, etc. Analysis and design of a genetic circuit for dynamic metabolic engineering[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 2(8): 442-452.
- [70] Tian J, Yang G, Gu Y, etc. Developing an endogenous quorum-sensing based CRISPRi circuit for autonomous and tunable dynamic regulation of multiple targets in *Streptomyces*[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(14): 8188-8202.
- [71] Colledge V L, Fogg M J, Levnikov V M, etc. Structure and organisation of SinR, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 411(3): 597-613.
- [72] Cairns L S, Hobley L, Stanley-Wall N R. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms[J]. Molecular microbiology, 2014, 93(4): 587-598.
- [73] Romero D, Aguilar C, Losick R, etc. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(5): 2230-2234.
- [74] Newman J A, Rodrigues C, Lewis R J. Molecular basis of the activity of SinR protein, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis***[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(15): 10766-10778.
- [75] She Q, Hunter E, Qin Y, etc. Negative interplay between biofilm formation and competence in the environmental strains of *Bacillus subtilis*[J]. Msystems, 2020, 5(5): 10-128.
- [76] Liang Z, Qiao J Q, Li P P, etc. A novel Rap-Phr system in *Bacillus velezensis* NAU-B3 regulates surfactin production and sporulation via interaction with ComA[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2020, 104(23): 10059-10074.

- [77] Core L, Perego M. TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular microbiology, 2003, 49(6): 1509-22.
- [78] Pottathil M, Lazazzera B J. The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*[J]. Front Biosci, 2003, 8(4): 32-45.
- [79] 何新媛, 刘杨, 曾祥荷, 等. 基于生物信息学的蛋白质功能预测方法研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(07): 2087-2099.
- [80] 李昕晖, 钱育蓉, 岳海涛, 等. 基于生物信息学的蛋白质功能预测研究综述[J]. 计算机工程与应用, 2023, 59(16): 50-62.
- [81] 武文葵. 生物信息学在生物医学领域的应用[J]. 学园, 2024, 17(23): 95-97.
- [82] 何小用, 王大明, 孙文敬, 等. 变形假单胞菌 2-酮基葡萄糖酸激酶基因的克隆、表达及生物信息学分析[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 10-16.
- [83] Mahdinia E, Demirci A, Berenjian A. Biofilm reactors as a promising method for vitamin K (menaquinone-7) production[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2019, 103(14): 5583-5592.
- [84] Cui S X, Xia H Z, Chen T C, etc. Cell membrane and electron transfer engineering for improved synthesis of menaquinone-7 in *Bacillus subtilis*[J]. iScience, 2020, 23(3): 100918.
- [85] Klausmann P, Lilge L, Aschern M, etc. Influence of *B. subtilis* 3NA mutations in *spo0A* and *abrB* on surfactin production in *B. subtilis* 168[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 188.
- [86] Molle V, Fujita M, Jensen S T, etc. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2003, 50(5): 1683-1701.
- [87] Zhang Q, Zhu W, He S, etc. Understanding energy fluctuation during the transition state: The role of AbrB in *Bacillus licheniformis*[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 296.
- [88] Zhou C, Ye B, Cheng S, etc. Promoter engineering enables overproduction of foreign proteins from a single copy expression cassette in *Bacillus subtilis*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 111.
- [89] Dogsa I, Bellich B, Blaznik M, etc. *Bacillus subtilis* EpsA-O: A novel

exopolysaccharide structure acting as an efficient adhesive in biofilms[J]. *Biofilms and Microbiomes*, 2024, 10(1): 98.

[90] Milton M E, Cavanagh J. The biofilm regulatory network from *Bacillus subtilis*: a structure-function analysis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2023, 435(3): 167923.

[91] Yan X, Yu H J, Hong Q, etc. Cre/lox System and PCR-Based Genome Engineering in *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17): 5556-5562.

[92] Liu Z, Zheng W, Ge C, etc. High-level extracellular production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* WB800 by multiple tandem promoters[J]. *BMC Microbiology*, 2019, 19(1): 89.

[93] Xu J Z, Yan W L, Zhang W G, etc. Enhancing menaquinone-7 production in recombinant *Bacillus amyloliquefaciens* by metabolic pathway engineering[J]. *Rsc Advances*, 2017, 7(45): 28527-28534.

[94] 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.

[95] Huang X L, Gao X L, Huang J B, etc. Study on the effects of *bdhA* knockout on coproduction of menaquinone-7 and nattokinase by *Bacillus subtilis* based on RNA-Seq analysis[J]. *Process Biochemistry*, 2024, 144: 45-53.

[96] Nicolaou S A, Gaida S M, Papoutsakis E T. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation[J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(4): 307-331.

[97] Tan S Z, Prather K L J. Dynamic pathway regulation: recent advances and methods of construction[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 41: 28-35.

[98] Liu D F, Ai G M, Zheng Q X, etc. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains[J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1): 40.

[99] Yang S M, Cao Y X, Sun L M, etc. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* to promote *De Novo* biosynthesis of menaquinone-7[J]. *ACS Synthetic*

Biology, 2019, 8(1): 70-81.

[100] Zurawski G, Gunsalus R, Brown K, etc. Structure and regulation of *aroH*, the structural gene for the tryptophan-repressible 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid-7-phosphate synthetase of *Escherichia coli*[J]. Journal of molecular biology, 1981, 145(1): 47-73.

[101] Gilchrist D G, Kosuge T. Aromatic amino acid biosynthesis and its regulation. In Amino acids and derivatives[M]. Academic Press, 1980: 507-531.

[102] May J J, Wendrich T M, Marahiel M A. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric Ester *Bacillibactin**[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(10): 7209-7217.

[103] Renna M C, Najimudin N, Winik L R, etc. Regulation of the *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(12): 3863-3875.

攻读学位期间所发表的学术论文目录及获奖情况

1. Xuli Gao, Yani Luo, Elvis Kwame Adinkra, Yu Chen, Wei Tao, Yongyuan Liu, Mingyu Guo, Jing Wu, Chuanchao Wu, Yan Liu. Engineering a PhrC-RapC-SinR Quorum Sensing Molecular Switch for Dynamic Fine-Tuning of Menaquinone-7 Synthesis in *Bacillus subtilis*. Microbial Cell Factories
2. Xilin Huang, Xuli Gao¹, Junbao Huang, Yani Luo, Wei Tao, Mingyu Guo, Yongyuan Liu, Jing Wu, Yu Chen, Yan Liu. Study on the effects of *bdhA* knockout on coproduction of menaquinone-7 and nattokinase by *Bacillus subtilis* based on RNA-Seq analysis. Process Biochemistry
3. 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
4. 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

获奖情况:

1. 2022 年, 获三等奖学金
2. 2023 年, 获一等奖学金
3. 2024 年, 获二等奖学金
4. 2022 年, 获全国大学生翻译大赛省级三等奖
5. 2023 年, 获安徽省第十五届运动会省级二等奖
6. 2023 年, 项目“助老智慧+赋能先锋”获“互联网+”校级三等奖
7. 2023 年, 项目“一种构建高效合成维生素 K2 工程菌的方法”获校级优秀奖

致谢

时光的列车轰鸣向前，未曾为谁停歇，硕士生涯的终章已悄然奏响。回首这段求学岁月，恰似在岁月长河中悠然泛舟，有探索未知的波澜壮阔，也有攻克难关的潺潺细流。此刻，我满心感恩，欲将千言万语，诉与那些照亮我前行之路的人。

于学术之林，我的导师刘艳教授，便是那盏永不熄灭的明灯。从选题时的迷茫徘徊，到研究中的踌躇满志，再到论文撰写时的字斟句酌，导师始终以渊博的学识、严谨的态度为我指引方向。每一次的悉心指导，每一回的耐心答疑，都给予我前行的力量。同时，学院里其他授课老师也如繁星点点，照亮我求知的天空。你们用生动的课堂、丰富的案例，为我搭建起知识的殿堂，让我在专业领域不断深耕。

感谢我的同门师兄师姐，你们如经验丰富的舵手，在我遇到风浪时，为我指引避风的港湾，分享你们的经验与智慧，让我少走了许多弯路。感谢我的同窗好友以及师弟师妹们，在实验室中大家携手共进，相互帮助，解决实验过程的难题，共同度过了许多难忘的时光。你们的陪伴及帮助让这段看似单调的求学时光变得丰富多彩，“一代人终将老去，但总有人正年轻”希望实验室的师弟师妹不断书写属于我们实验室的辉煌篇章。感谢我的挚友，在我疲惫时给予我安慰，在我失落时给予我鼓励，是你们的陪伴，让我在异乡的求学路上不再孤单，让我感受到了友情的珍贵与美好。

家，永远是我心灵的归宿。父母的爱，如潺潺溪流，润物无声。在我为论文焦虑失眠时，是你们轻声的安慰让我心安；在我为实验失败沮丧时，是你们默默的支持给我力量。你们用无私的付出，为我撑起了一片晴朗的天空，让我能够心无旁骛地追逐自己的梦想。

硕士生涯的结束，是我人生新的起点。在未来的日子里，我将带着在母校学到的知识和技能，带着老师们的教诲和期望，带着同学们的祝福和鼓励，带着家人的爱和支持，在自己的路上，义无反顾的狂奔，体验璀璨如歌的生活。

最后，再次向所有关心、帮助和支持过我的人表示最衷心的感谢！祝愿老师们身体健康、工作顺利！祝愿同学们前程似锦、梦想成真！祝愿我的家人幸福安康、万事如意！