

分类号: Q81  
密 级: 公开

单位代码: 10422  
学 号: 202012706



山东大学  
SHANDONG UNIVERSITY

# 硕士学位论文

Thesis for Master Degree  
(专业学位)

论文题目: 多群体感应系统在大肠杆菌中的构建及其应用

Construction and Application of Multiple Quorum Sensing Systems in *Escherichia coli*

作者姓名	杨晓雅
培养单位	微生物技术研究院
专业名称	生物与医药
指导教师	梁泉峰 教授
合作导师	祁庆生 教授

2023 年 06 月 01 日

## 摘 要

群体感应 (Quorum sensing, QS) 系统是单细胞生物中普遍存在的信息交流工具。近年来, 群体感应系统已被开发为自诱导调控模块, 对合成生物学和代谢工程有重要意义。本研究在大肠杆菌中构建和优化了三个独立的群体感应系统, 并探究了其在微生物生物合成和合成生态系统构建中的应用潜力。

在第一部分中, 构建了自诱导的 Sal QS 系统, 通过调控水杨酸生物合成的案例验证了其有效性。Sal QS 系统是一个人工构建的调控系统, 其信号分子的结构和天然 QS 信号分子的结构相差较大, 有很好的应用潜能。然而目前还没有在单细胞中构建自诱导的 Sal QS 系统的报道。通过调整质粒拷贝数和精确调控关键基因的表达, 在大肠杆菌中成功构建出了灵敏度高且诱导范围大的 Sal QS 系统。随后将其应用到水杨酸的合成中, 实验菌株的水杨酸产量相比于对照菌提高了 151%, 证明了该系统的有效性。

在第二部分中, 初步构建了一个基于上述 Sal QS 系统、Las QS 系统和 Tra\* QS 系统的三菌株合成生态系统。目前, 对合成生态系统的研究大多是基于双菌株系统开展的, 对于多菌株系统的研究相对匮乏。以三种 QS 系统作为通讯模块, 毒素-抗毒素系统作为效应模块, 通过对系统中关键基因的表达调控, 成功构建了三菌株的共培养系统。进一步优化接种比例, 通过添加不同的诱导剂组合实现了合成系统中优势种群的转变。该工作对于构建人工生态系统以及设计人工菌群以高效生产有价值产物等方面具有一定意义。

在第三部分中, 先构建并优化了上一部分应用的 Las QS 系统和 Tra\* QS 系统, 然后结合稳定期特异性启动子的调控, 首次构建了一个独立于代谢通路的、自诱导的三层动态调控系统。在该调控系统中, 受 Las QS 系统, 稳定期特异性启动子和 Tra\* QS 系统调控的特定基因从前到后依次表达。我们尝试将该系统应用到 3-羟基丙酸 (3-Hydroxypropionic acid, 3-HP) 的生物合成中。具体而言, 结合人工反式编码小 RNA 抑制系统以动态抑制必需基因 *gltA* 和 *fabD* 的表达, 动态上调 3-HP 生产基因 *acc* 和 *mcr* 的表达, 进一步优化上述调控顺序以高效合成 3-HP。本实验表明三层动态调控系统相比于静态调控、单层动态调控和双层动态调控在 3-HP 生产中更有优势, 摇瓶发酵产量达到 7.0 g/L, 证明了三层动态调控在代谢工程中的应用潜力。

**关键词:** 群体感应; 水杨酸; 人工微生物生态系统; 动态调控; 3-羟基丙酸

## ABSTRACT

The quorum sensing system is a ubiquitous tool for information exchange in single celled organisms. In recent years, quorum sensing systems have been widely used in synthetic biology and metabolic engineering. In this study, three independent quorum sensing systems were constructed and applied to the construction of different systems in synthetic biology.

Firstly, we constructed a self-induced Sal quorum sensing system orthogonal to the classical Lux system and applied it to the dynamic regulation of salicylic acid synthesis. Sal system is an artificially constructed population sensing system with few synthase genes in the system, and the structure of signal molecules differs greatly from that of natural population sensing system. Therefore, Sal system has good application potential. However, there are no reports of constructing a self-induced Sal system in single cells. We first constructed a self-induced Sal system on the high copy plasmid skeleton of *Escherichia coli*. Then, precise expression regulation of key genes is performed to construct a system with high sensitivity and wide induction range. Subsequently, on the basis of this system, a self-induced Sal system was successfully constructed in the same cell for the first time by adding a sal synthase gene. Finally, it was applied to the production of salicylic acid, and the yield of salicylic acid from the engineered strain increased by 151% compared to the control strain.

In the second part, combining the Sal system with the Las system and the Tra\* system, a three bacteria microbial ecosystem was initially constructed. In the research of synthetic ecosystems, more attention has been paid to the study of dual strains, while the study of multiple strains is still lacking. We chose the Las system, Tra\* system, and Sal system to combine positive and negative feedback to build a three-strain synthetic microbial ecosystem. The quorum sensing system serves as a communication module, and the toxin antitoxin system serves as an effect module to design and construct three different strains in the ecosystem. By regulating the expression of key genes in the system, two systems in each bacterium can work normally. Next, select suitable co cultured strains and further optimize the co culture inoculation ratio. Finally, the dominant population in the system is changed by adding different combinations of inducers. This part of work has certain application potential for constructing a synthetic biological coculture artificial bacterial population system for efficient production of valuable products.

Finally, the optimization group sensing system Las system, Tra \* system, and stable phase specific promoter subsystem were constructed and applied to the three-level dynamic regulation system of metabolic engineering. The Las system, Tra \* system, and stable phase specific promoter system with different startup times obtained through screening and optimization were constructed into a three-layer regulatory system with time difference. In this system, the first to start is the Las system, followed by the stable startup specific dynamic subsystem, and finally the Tra \* system. After the construction of the three-layer regulatory system, it was applied to the production of 3-hydroxypropionic acid through the malonyl coenzyme A pathway. Combining a three-layer regulatory system with an artificially encoded trans-microRNA suppression system, the dynamic growth inhibitory genes *gltA* and *fabD* are dynamically expressed, and *acc* and *mcr* are dynamically expressed to efficiently synthesize 3-hydroxypropionic acid. Compared to static regulation, single layer dynamic regulation, and double layer dynamic regulation, the final yield of 3-hydroxypropionic acid is the highest by using a three-layer dynamic regulation system, with a shake flask fermentation rate of 7.0 g /L. The results demonstrate the necessity and great application potential of three-layer dynamic regulation.

**Key words:** quorum sensing system; Salicylic acid; Artificial microbial ecosystem; Dynamic regulation; 3-Hydroxypropionic acid

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 合成生物学.....	1
1.2 群体感应系统.....	2
1.3 稳定期特异性启动子.....	3
1.4 人工反式编码的 sRNA.....	4
1.5 动态调控.....	4
1.6 水杨酸的概述.....	6
1.7 3-羟基丙酸的概述.....	6
1.8 合成微生物群落.....	7
1.8.1 合成生态系统的应用.....	8
1.8.2 合成生态系统的研究进展.....	8
1.9 本论文的研究内容及意义.....	9
第二章 自诱导 Sal 系统在大肠杆菌的构建及应用.....	11
2.1 实验材料.....	11
2.1.1 实验菌株和质粒.....	11
2.1.2 实验引物.....	13
2.1.3 培养基.....	14
2.1.4 相关试剂和缓冲液.....	16
2.1.5 常用生化试剂.....	18
2.1.6 常用试剂盒.....	19
2.1.7 仪器与设备.....	19
2.2 实验方法.....	20
2.2.1 菌种和核酸片段的保藏.....	20
2.2.2 分子生物学常规操作技术.....	20
2.2.3 关键基因的表达强度调整.....	23
2.2.4 其他分子生物学常规操作.....	23
2.2.5 系统的表征.....	23
2.2.6 人工反式编码小 RNA 抑制靶基因片段的构建.....	24
2.3 实验结果与讨论.....	25
2.3.1 群体感应系统的选择、构建及优化.....	25
2.3.2 应用 Sal 系统结合提高水杨酸产量.....	29
2.4 本章小结.....	32
第三章 基于群体感应系统的三菌株生态系统的初步构建.....	33
3.1 实验材料.....	33

3.1.1 实验菌株和质粒.....	33
3.1.2 实验引物.....	35
3.1.3 培养基.....	39
3.1.4 相关试剂和缓冲液.....	40
3.1.5 常用生化试剂.....	40
3.1.6 常用试剂盒.....	40
3.1.7 仪器与设备.....	40
3.2 实验方法.....	40
3.2.1 大肠杆菌基因组的定点整合.....	40
3.2.2 表达 ccdB 基因质粒的构建.....	41
3.2.3 关键基因表达强度的调整.....	41
3.2.4 共培养的特征与分析.....	41
3.3 实验结果与讨论.....	41
3.3.1 合成生态系统的设计.....	41
3.3.2 合成生态系统的初步表征.....	42
3.3.3 优化合成生态系统中关键基因的表达.....	44
3.3.4 合成生态系统的构建和表征.....	48
3.4 本章小结.....	49
第四章 三层动态调控系统的构建及应用.....	51
4.1 实验材料.....	51
4.1.1 实验菌株和质粒.....	51
4.1.2 实验引物.....	54
4.1.3 培养基.....	56
4.1.4 相关试剂和缓冲液.....	56
4.1.5 常用生化试剂.....	57
4.1.6 常用试剂盒.....	57
4.1.7 仪器与设备.....	57
4.2 实验方法.....	57
4.2.1 关键基因表达强度的调整.....	57
4.2.2 系统的表征.....	57
4.2.3 常规发酵检测手段.....	57
4.3 实验结果与讨论.....	58
4.3.1 群体感应系统的选择及设计.....	58
4.3.2 稳定期特异性启动子系统的选择及设计.....	59
4.3.3 三层调控系统的构建.....	60
4.3.4 三层调控系统调控 3-羟基丙酸的生产.....	61
4.4 本章小结.....	65
创新性成果与展望.....	66

创新性成果.....	66
展望.....	66
参考文献.....	67

## 缩略词表 (ABBREVIATION)

英文缩写	英文名称	中文名称
3OC6HSL	N-(3-oxohexanoyl)-homoserine lactone	N-(3-氧代己酰基)-高丝氨酸内酯
3OC12HSL	N-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone	N-(3-氧代十二烷酰基)-高丝氨酸内酯
3-HP	3-Hydroxypropionic acid	3-羟基丙酸
ACC	Acetyl-CoA carboxylase	乙酰辅酶 A 羧化酶
ACP	Acyl carrier protein	酰基载体蛋白
AHL	Acyl-homoserine lactone	酰基高丝氨酸内酯
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
ATP	Adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
atsRNA	Artificial small RNA	人工反式编码小 RNA
bp	Base pair	碱基对
Cm	Chloromycetin	氯霉素
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTPs	Mixture of dNTP	dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 的等摩尔混合物
FabD	Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase	丙二酰辅酶 A 酰基载体蛋白转酰基酶
GltA	Citrate synthase	柠檬酸合成酶
HPLC	High-performance liquid chromatography	高效液相色谱

---

Kan	Kanamycin	卡那霉素
kb	Kilobase pair	千碱基对
L	Liter	升
LB	Luria-Bertanim medium	细菌全营养培养基
mL	Milliliter	毫升
mM	Mmol per liter	毫摩尔每升
MCR	Malonyl-CoA reductase	丙二酰辅酶 A 还原酶
MSA	Malonate semialdehyde	丙二酰半醛
M	Mole per liter	摩尔每升
nM	Nmol per liter	纳摩尔每升
°C	Degrees centigrade	摄氏度
OD	Optical density	光密度
PCR	Polymerase chain reaction	聚合成酶链式反应
PEP	Phosphoenolpyruvate	磷酸烯醇丙酮酸盐
PPC	Phosphoenolpyruvate carboxylase	磷酸烯醇丙酮酸羧化酶
QS	Quorum sensing	群体感应
RBS	Ribosome Bind Site	核糖体结合位点
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
RNase	Ribonuclease	RNA 酶
rpm	Rotation per minute	转每分钟
sal	Salicylates	水杨酸

---

---

Spc	Spectinomycin	壮观霉素
sRNA	Small RNA	小 RNA

---

# 第一章 绪论

## 1.1 合成生物学

合成生物学是基因组学和系统生物学等多种学科交叉后衍生出的一门创建、控制和编程细胞行为的学科。合成生物学在传统生物学的基础之上,以理性设计为指导,设计改造出一系列新的生物元件、生物模块和生物系统。在合成生物学发展的初期,研究者们首先探索新的启动子或者在现有启动子的基础上对其进行改造以满足设计需求;其次将生物基本元件结合起来,构建出了具有不同功能的合成模块,如开关<sup>[1,2]</sup>、振荡器<sup>[3,4]</sup>、逻辑门<sup>[5,6]</sup>、级联元件<sup>[7]</sup>等,之后,上述合成模块已经不能满足发展的需求,研究者们开始将生物模块和其他调控模块组装起来,构建功能更加强大的合成系统以调节基因表达、蛋白质功能和细胞间通讯等<sup>[8]</sup>。合成生物学发展迅速,已经被广泛应用到多个领域。在生态领域,人工合成微生物生态系统的构建对于探索自然界生态系统中种群间的关系有重要意义<sup>[9]</sup>;在生物生产领域,合成模块和基因线路被应用到生产途径相关基因的调控中,从而解决了代谢工程中出现的部分难题<sup>[10]</sup>;在医疗领域,具有潜在预防和治疗肠道感染活性的工程微生物已经被成功开发<sup>[11]</sup>。合成生物学推动了生物学及其他学科的发展,是近年来的热门研究学科。

生物元件是构建生物系统和生物功能模块中的基础元件,是一段氨基酸或者核苷酸序列。生物元件常常被用于构建基因线路。生物元件是一切生物学装置和基因线路的基础,开发和挖掘新的生物学元件对于合成生物学的发展至关重要。美国麻省理工学院建立了一个包含启动子、终止子、核糖体结合位点、转录单元以及蛋白质编码区等在内的各种标准元件的标准化生物元件登记库,为查找相关调控元件和开展研究工作提供了便利<sup>[12]</sup>。

目前,随着合成生物学的深入发展,单功能的基因线路和合成模块已经无法满足应用的需求。代谢工程中常常选择基于群体感应系统构建的动态调控系统来缓解生产与生长之间的矛盾,随着生产途径复杂度的增加,单个动态调控系统已经无法满足设计的需求。因此可以独立于代谢通路、可以广泛应用的多层动态调控系统是合成生物学研究的一大热点<sup>[13]</sup>。

同时,合成生物学的研究中仍然有许多难题尚未解决。系统构成越复杂,系统的稳定性越好,但是复杂的系统在构建初期可能会出现难以预测的行为,造成系统崩溃。构建一种组成复杂、关系简单和行为可控的生态系统对合成生物学的发展是至关重要的。

## 1.2 群体感应系统

一般来说,多细胞生物中才存在细胞与细胞间的信息交流,但是单细胞生物并没有被孤立,其通过感知环境中的信号分子来进行交流。群体感应系统是单细胞生物中普遍存在的交流工具。微生物群体在生长过程中会根据群体密度变化来调节特定群体性行为,这是少量菌体或单个菌体时并不具备的特征。因此群体感应是细菌中的一种依赖于种群密度的细胞信号传导机制<sup>[14, 15]</sup>。在合成生物学中,群体感应系统常常作为一种通讯工具或者是作为一个自诱导调控系统被广泛地研究。

群体感应这一概念首次被提出是在1994年<sup>[15]</sup>,但在此之前人们已经发现海洋细菌费氏弧菌的发光行为与菌体密度相关,且菌体密度与发光强度是呈现正相关的<sup>[16-18]</sup>。单细胞间的许多生理行为都和群体感应系统密切相关,如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中毒力因子的产生<sup>[19]</sup>、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中孢子的形成<sup>[20, 21]</sup>、根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中Ti质粒的接合转移<sup>[22]</sup>、抗生素和生物膜的形成<sup>[23]</sup>等。群体感应使单细胞生物更加高效地完成特定生理活动,对其在特定环境中的生存至关重要。

群体感应系统的工作原理一般如下所述。首先,细菌通过自身合酶基因合成并释放出信号分子,当细胞密度增加时,信号分子的浓度也增加,当其的浓度达到一定的阈值后,与相应的受体蛋白结合形成复合物触发信号传导级联反应,从而改变特定基因的表达,最终改变细菌间的特定行为<sup>[24]</sup>。

不同的群体感应系统的信号分子的类型并不相同。革兰氏阴性菌中一般是酰基高丝氨酸内酯作为QS信号分子<sup>[25]</sup>,革兰氏阳性菌中的QS信号分子一般是寡肽<sup>[26, 27]</sup>,而吡喃酰硼酸二酯,即AI-2,既存在于革兰氏阳性菌中,又存在于革兰氏阴性菌中。AI-2是一种用于种间交流的信号分子<sup>[14]</sup>,在多种类微生物群落的种群信息交流中发挥了重要作用<sup>[28, 29]</sup>。

天然的群体感应系统大多可以感应多个信号分子,研究者们通过对其结合蛋白的改造,筛选出特异性较好的调控蛋白,来满足设计的需要。Scott等人通过对结合蛋白TraR的突变,实现了更高的诱导倍数<sup>[30]</sup>。部分天然群感系统灵敏度较低,通过对其启动子进行改造,可以增加其灵敏度。Ge等人通过改变CRP结合位点的数目和重新设计lux box的-10位点的序列,构建了一个具有高动态范围和低泄露水平的QS突变体文库<sup>[31]</sup>。

随着合成生物学和代谢工程的发展,QS系统被应用到基因线路设计、合成系统构建和产物生产中<sup>[10, 32-35]</sup>。Jiang等人构建了两个正交的群体感应系统,应用其进一步构建了自动延迟级联线路,实现在无外源诱导剂时基因的顺序表达<sup>[36]</sup>。Hu等人应用群体感应系统作为通讯模块构建了微生物生态系统。通过在培

培养基中添加不同浓度抗生素来实现菌株之间的转换,该模型的建立阐明了环境影响、遗传网络和系统行为之间的复杂相互作用<sup>[32]</sup>。Jiang 通过以群体感应系统作为通讯模块构建的生态系统在环境、医疗和生物技术等方面有较大的应用潜力<sup>[9]</sup>。Gupta 等人应用群体感应系统动态下调磷酸果糖激酶 1 的表达,使 G6P 更多地流向生产途径,提高了肌醇的产量<sup>[10]</sup>。群体感应与传感器等调控元件不同,它是独立于代谢途径的,因此,被广泛应用到代谢工程中,用来动态调控部分基因的表达以提高产量<sup>[37]</sup>。

群体感应系统还可以和其他系统相结合,应用到生产中<sup>[38, 39]</sup>。Lv 等人利用群体感应系统与生物传感器动态控制生产途径,通过群体感应系统下调磷酸果糖激酶 1 的表达,同时通过生物传感器响应中间产物肌醇来动态表达肌醇加氧酶,提高了糖醛酸的产量<sup>[38]</sup>。Bao 等人将群体感应系统与多个细菌小 RNA 结合,构建了动态抑制系统<sup>[40]</sup>。Wu 等人将群体感应系统与同步裂解线路和代谢拨动开关相结合,通过调控共培养系统中两种菌群比例,实现了以纤维二糖为原料共培养生产异丙醇<sup>[41]</sup>。综上,群体感应系统作为一种简单的、独立的和自诱导的调控元件,在合成生物学、代谢工程和生物医疗等领域具有广泛的应用空间。

### 1.3 稳定期特异性启动子

启动子是直接影响基因表达水平的重要基因组调控元件。到目前为止,有三种类型的启动子已被用于高水平表达异源蛋白:组成型启动子、诱导特异性启动子和自身诱导型启动子<sup>[42, 43]</sup>。尽管诱导特异性启动子是最广泛使用的类型,但对诱导剂化合物的需求可能会增加其工业应用的成本。组成型启动子,在目标蛋白对菌体产生压力的案例中是不适用的。自身诱导型启动子是大规模蛋白质生产的理想选择,这有助于以低成本高效生产异源蛋白质。稳定期特异性启动子是一种自身诱导型启动子,在不需要诱导剂的情况下诱导靶基因在稳定期表达。目前,稳定期特异性启动子已经被很好地应用到生产中。最近,研究者通过对稳定期特异性启动子进行随机突变,在大肠杆菌中筛选了强度更高的响应生长的启动子<sup>[44]</sup>。

最新的研究中将群体感应系统和稳定期特异性启动子结合构建了 AND 门并成功提高了枯草芽孢杆菌中的蛋白质产量<sup>[45]</sup>。稳定期特异性启动子的调控不需要调控蛋白和诱导剂的参与,在代谢工程和合成生物学中有广泛的应用空间。

## 1.4 人工反式编码的 sRNA

RNA 介导的调控机制已经被逐步解析及应用。非编码 RNA 广泛存在于生物体内,是一类重要的调节因子<sup>[46]</sup>。通过抑制靶基因的翻译和降解核酸酶 RNase 实现基因沉默。细菌中的非编码 RNA 通常较小,被称为细菌小 RNA (Small RNA, sRNA)。大肠杆菌中存在 50 多种 sRNA,占蛋白质编码基因数量的 1%-2%。某些小 RNA (如 DsrA 等)的调控过程需要伴侣蛋白 Hfq 的参与, Hfq 能够促进小 RNA 与靶 mRNA 的结合并且能够保护小 RNA 免受核酸酶的影响。

传统反义 RNA 的应用因其低抑制效果而受到限制。构建人工反式编码 sRNA (atsRNA) 以靶向调节目标基因是一种有效的 RNA 沉默方法。Man 等人构建了使用 RNA 伴侣 Hfq 的 atsRNA, atsRNA 是一种在大肠杆菌中进行特异性基因沉默的有效方法,为破译细菌中的基因功能提供了一种新的研究方法<sup>[47]</sup>。

atsRNA 被设计成由 mRNA 核糖核酸碱基配对区、Hfq 结合位点和典型的 Rho 非依赖性转录终止子组成的模块化结构。从充分研究的细菌内源性反式编码 sRNA,如 RyhB、DsrA 和 OxyS 中提取 Hfq 结合位点和 Rho 非依赖性终止子。atsRNA 形成两到四个茎环,包括一个由 mRNA 配对区形成的茎环和一个由 Rho 非依赖性终止子形成的茎环。Hfq 结合位点位于两个茎环之间。在 atsRNA 中的设计中应避免起始密码子 AUG 的出现,以防止翻译。atsRNA 能够导致靶 mRNA 的翻译抑制和核酸酶 RNase E 依赖性降解,其中,翻译抑制是基因沉默的主要原因<sup>[48]</sup>。

与传统方法相比,atsRNA 介导的基因沉默具有许多优势。这是一种简单快速的下调特定基因表达的方法。现有的原核生物基因功能破译方法,如同源重组和转座子突变等,极大地限制了对细菌基因组的研究。在转录后水平上起作用的 atsRNA 提供了一种简单的基因沉默方法,有望成为破译细菌基因功能的替代工具。

## 1.5 动态调控

代谢工程旨在操纵细胞代谢途径以最大限度地生产有价值的产品,如生物燃料和生物化学品等<sup>[49]</sup>。该领域的大部分工作都集中在深入了解核心代谢途径中的通量分布,然后将代谢物通量引向目标产物。静态调控策略,如基因敲除、启动子替换和引入异源基因等,能够改变细胞中的稳态通量分布以完成生产。尽管有许多成功提高产物产量的例子,但是该策略通常会导致细胞生长下降,进而限制生产力。除了生长和生产之间的矛盾外,异源途径的引入可能会导致代谢负担。

在某些代谢途径中,对不同代谢模块进行时序控制是有效的优化方案,因此,需要建立复杂的遗传回路以实现针对不同代谢模块的有序控制。这些难题依靠静态调控已经不能解决,需要动态调控的加入<sup>[50]</sup>。

动态调控是控制微生物细胞工厂基因表达的有效策略,对于改善生产途径中有毒中间体的影响、基本竞争反应或通量失衡等问题有重要意义。动态调控可使细胞生长和产物合成解耦,并有助于在不破坏细胞稳态的情况下提高产物产量<sup>[51]</sup>。Farmer 等人首次在大肠杆菌中应用基于 Ntr 的生物传感器动态控制生产途径中关键基因的表达,通过响应乙酰磷酸来动态表达 *ppc* 和 *ldi*,提高番茄红素的产量<sup>[52]</sup>。

相比于静态调控,动态调控可以避免因敲除关键代谢基因带来的生长影响,从而提高终产物的产量,如异丙醇、肌醇和番茄红素等<sup>[10,52,53]</sup>。研究表明,柠檬酸合成酶编码基因 *gluA* 的缺失导致菌株生长变差<sup>[54]</sup>,Soma 等人将动态调控应用到异丙醇的生产中,通过动态下调 *gluA* 的表达减少了内源竞争途径对生产前体乙酰辅酶 A 的消耗,将其重定向到异丙醇的生产中,相比于静态调控,实验菌株的产量提高了 3.1 倍<sup>[53]</sup>。Gupta 等人应用动态调控生产肌醇,应用独立于代谢通路的控制模块动态抑制磷酸果糖激酶 1 的合成,与静态调控相比,产量提高 5.5 倍<sup>[38]</sup>。

实现动态调控的合成元件包括生物传感器、诱导系统和群体感应系统等。生物传感器能够响应生产途径中的中间产物来精准控制代谢通量的分布。研究者通常基于对外部诱导物、细胞内代谢物、环境因素或细胞生长做出反应的不同生物传感器来设计合成线路以完成动态调控<sup>[10,55,56]</sup>。但是生物传感器的筛选是相对耗时和困难的,而且只能应用到特定的生产途径中,这限制了该元件的广泛应用。基于诱导剂构建的动态调控可以被广泛地应用到多种生产途径中,但是额外添加诱导剂会增加生产成本。基于 QS 构建的动态调控是独立于代谢通路的,可以被广泛地应用到多种生产场景中,并且自诱导的群体感应系统不需要外源添加诱导剂,能够节约一定的生产成本。因此,群体感应元件在代谢工程中具有较大的开发潜力。

动态调控根据层级数分为单层调控、双层调控和多层调控。单层调控主要用来平衡代谢通量或者是降低异源基因表达毒性<sup>[54,57]</sup>。Torella 等人将应用动态调控系统生产中链脂肪酸,通过动态抑制酰基-ACP 的延伸,使代谢通量更多地流向中链脂肪酸的生产中<sup>[58]</sup>。双层动态调控相对来说应用的生产途径比较复杂,可以同时解决代谢通量的流向问题和外源基因的毒性或者是两个基因的时序表达。Xu 等人应用双层动态调控生产脂肪酸,动态表达外源基因 *acc* 以降低异源蛋白对细胞的生长毒性,同时动态抑制内源基因 *fapR* 使代谢通量更多地流向生产,

与静态控制生产菌株相比,产量提高了 2.1 倍<sup>[57]</sup>。动态调控策略在微生物生产中有广泛的应用潜力,构建自诱导的多层动态调控系统对于精确调控代谢过程具有重要意义。

## 1.6 水杨酸的概述

水杨酸在植物体内是一种主要的植物激素,调节植物的各种应激反应,如对病原体的抵抗、开花、产热,衰老和非生物胁迫反应,以两种主要形式存在,游离形式为游离水杨酸,结合形式为水杨酸甲酯也被称为“冬青油”和水杨酸<sup>[59]</sup>。

水杨酸在疾病治疗中也发挥了重要作用。乙酰水杨酸,又称阿司匹林,在 1987 年被合成,在医学中用来降低患心血管疾病、结直肠癌、前列腺癌、食道癌、喉癌和胃癌的风险<sup>[60]</sup>。另外,研究表明,水杨酸可以调节多种细胞功能,包括凋亡基因的表达和 DNA 错配修复。

生物体内存在多种响应水杨酸的天然转录因子,如 CmeR, NahR 等。水杨酸与传统 QS 信号分子的分子结构是不同的,可被设计为一种潜在的新型诱导剂以进行细胞通讯和动态调控。Du 等人将水杨酸设计为一种类似群体感应系统的通讯系统,应用到共培养中。在酿酒酵母体内合成水杨酸,在大肠杆菌体内感应水杨酸,实现在不同微生物间的信息交流<sup>[61]</sup>。Xue 等人研究了 NahR 对于水杨酸盐的响应,而水杨酸盐作为环境污染物萘分解代谢途径中的中间体,通过合理的设计,让 NahR 和响应水杨酸的启动子 P<sub>Sal</sub> 来感应环境污染物萘的量<sup>[62]</sup>。Nasr 等人构建了一个在模式生物大肠杆菌和酿酒酵母中响应水杨酸、多种芳香和吡啶诱导物的生物传感器,转录因子是空肠弯曲杆菌来源的 CmeR,属于抑制因子的 TetR 家族<sup>[63]</sup>。目前,基于水杨酸信号分子的诱导系统已被初步验证,但是通常需要外源添加或者异源供应诱导剂,这限制了该系统的后续应用。设计自诱导的水杨酸调控系统是亟需解决的问题。

## 1.7 3-羟基丙酸的概述

3-羟基丙酸(3-HP)是一种重要的化学物质,具有较大的应用价值。如作为前体合成可降解塑料聚 3-羟基丙酸或进一步被衍生以合成化合物 1,3-丙二醇、丙烯酸、丙二酸、丙烯酰胺和丙烯腈等<sup>[64]</sup>。3-HP 具有巨大的商业应用潜力,其市场价值和规模估计分别超过 100 亿美元/年和 360 万吨/年<sup>[65]</sup>。目前,3-HP 的生产主要基于化石原料的化学合成,但化学生产成本高昂且对环境不安全。3-HP 被美国能源部列为从可再生材料中获得的最有前途的化学品之一,它的合成可以通

过工程微生物实现。目前,已有五种 3-HP 生物合成途径被报道,分别是:甘油途径、1,3-丙二醇途径、 $\beta$ -丙氨酸途径和丙二酰辅酶 A 途径和草酰乙酸途径<sup>[65-67]</sup>。

甘油途径主要有两种:辅酶 A 依赖性途径和辅酶 A 非依赖性途径,它们都是先将甘油转化为 3-羟基丙醛<sup>[68]</sup>。不同的是辅酶 A 依赖性途径由 3-羟基丙醛到 3-羟基丙酸需要三步反应,整个过程伴随着一分子 ATP 和一分子 NADH 的产生<sup>[69]</sup>。辅酶 A 非依赖性途径由 3-羟基丙醛到 3-羟基丙酸仅需一步反应,生产途径短,代谢中间体少,这是微生物从甘油生产 3-羟基丙酸研究最广泛的途径。然而,天然乙醛脱氢酶的低酶活性,以及乙醛脱氢酶和甘油脱水酶之间的表达失衡,是辅酶 A 非依赖性途径的主要限制因素。

在丙二酰辅酶 A 途径中,乙酰辅酶 A 被乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase, ACC) 转化为丙二酰 CoA,之后丙二酰-CoA 被丙二酰辅酶 A 还原酶 (Malonyl-CoA reductase, MCR) 催化,经两步反应转化为 3-羟基丙酸<sup>[70]</sup>。MCR 由两个不同的功能结构域组成: MCR-C 催化丙二酰辅酶 A 还原为丙二酰半醛 (Malonate semialdehyde, MSA), MCR-N 催化 MSA 还原为 3-HP,整个反应总共消耗两分子 NADPH。

$\beta$ -丙氨酸途径也是一种常用的 3-HP 合成途径。 $\beta$ -丙氨酸可以通过多种氨基酸的转氨作用或脱羧作用形成,如精氨酸、赖氨酸和天冬氨酸等。在该途径中, $\beta$ -丙氨酸被  $\beta$ -丙氨酸丙酮酸转氨酶转化为 MSA,之后 MSA 被 3-羟基丙酸脱氢酶还原为 3-HP。另外,研究表明, $\gamma$ -氨基丁酸转氨酶也能够将  $\beta$ -丙氨酸转化为 MSA。

1,3-丙二醇途径是在醋杆菌中被发现的。在该途径中,1,3-丙二醇被醇脱氢酶转化为 3-HPA,之后 3-HPA 被醛脱氢酶转化为 3-HP。其中,醛脱氢酶是该生产过程的限速酶,平衡两种酶的活性是提高 3-HP 滴度的有效策略。

草酰乙酸途径最近被构建为一种简单的 3-HP 生产途径。在草酰乙酸途径中,苯甲酰甲酸脱羧酶 (MdiC) 催化草酰乙酸直接转化为 MSA。目前,草酰乙酸途径仅在酿酒酵母中构建,还未有在其他微生物中构建该途径以生产 3-HP 的报道。

已被改造用于 3-HP 生物合成的底盘细胞包括肺炎克雷伯菌、大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、酿酒酵母、嗜蓝单胞菌和反硝化假单胞菌。其中,肺炎克雷伯菌、嗜蓝单胞菌和反硝化假单胞菌表现出最有前途的 3-HP 生产潜力。

## 1.8 合成微生物群落

微生物群落是一种复杂的由个体和生态环境共同影响和进化的网络,在生态系统中发挥着重要作用<sup>[71]</sup>。微生物群落与维持生态平衡、保护人类的身体健康及

生物能源生产等息息相关<sup>[71-75]</sup>。目前,我们对微生物群落的了解仍然不够透彻。自然界的微生物群落至少是由数十个以上的物种组成的,物种的多样性限制了我们对群落的研究。生物技术的快速发展帮助研究者更快地了解到微生物群落的组成和作用机制。合成生物学的一个重要研究方向就是构建人工合成微生物生态系统研究某些生态学原理和探究其在某些领域的应用潜力。

合成微生物生态系统一般是人为地在不同的菌株或者是物种间建立某种联系,使其在同一个培养条件下共同生存<sup>[76]</sup>。常用的手段是将不同的功能模块进行组装,在微生物内构建出简单的、稳定的、可控的小型生态系统。合成生态系统操作简单,研究方便,更容易去建立数学模型,在微生物群落的研究中广受欢迎<sup>[77, 78]</sup>。

### 1.8.1 合成生态系统的应用

人工合成微生物群落应用较广,主要在医疗领域、代谢工程领域、环境治理领域等多种领域发挥作用。在医疗领域中,人们通过研究微生物群落发现了多种有益微生物可用于疾病的治疗,如梭状芽孢杆菌可用于治疗过敏性腹泻,从健康人类的肠道微生物种群中分离出 11 株可以免疫辅助治疗癌症的菌株<sup>[79, 80]</sup>。在代谢工程领域,生产途径复杂时应用单菌株生产代谢压力大,将生产途径分成多个模块,应用合成生态系统分割生产途径和缓解代谢压力,在多种产物如红景天苷、丁醇、苯酚、柚皮素等的生产中发挥了重要作用<sup>[81-83]</sup>。在环境检测和治理领域中,研究者构建了可以检测有效有机磷农药的微生物联盟,其检测效率和有机磷的化学检测器相同,但主要是依据微生物去治理,减少了对环境的危害<sup>[84]</sup>。另外, Gilbert 等人研究了一个可以降解有机磷的微生物群落<sup>[85]</sup>; Martinez 等人研究了一个可以提高石油硫化物脱硫作用的微生物群落<sup>[86]</sup>。

### 1.8.2 合成生态系统的研究进展

微生物群落是一个复杂的生态系统,群落中种群的组成与相互作用决定了群落最终的结构<sup>[87]</sup>。种群之间的关系大致分为四种:竞争、共生、中立和寄生,其中共生又分为互利共生、偏利共生和偏害共生<sup>[76, 88]</sup>。自然界的微生物群落组成复杂、环境复杂、相互关系复杂,不利于探究工作的开展。合成微生物群落关系相对简单,对研究微生物间的生态关系和进一步应用有重要意义<sup>[89, 90]</sup>。

目前,主要利用大肠杆菌和酵母菌等模式生物来构建合成微生物群落。模拟自然界中种群间的生态关系构建的合成微生物群落主要依靠的是菌株间互相提供生长必需的营养物质来实现的<sup>[89, 91-94]</sup>。如在酿酒酵母中构建的生态系统,是由一株产赖氨酸但缺乏腺嘌呤维持生长的菌株和另一株产腺嘌呤但缺乏赖氨酸维持生长的菌株共同组成,当两株菌分开时彼此都不能存活,只有当两株菌在一起

共培养后,两株菌才能生存<sup>[93]</sup>。类似地,绝大多数的共生系统都是依靠氨基酸喂养来实现的。模拟自然界中种群间的竞争关系构建的合成微生物系统主要依靠菌株释放抑制或者是杀死对方的物质来实现的<sup>[9,95]</sup>。

目前的生态系统研究中主要由两株菌组成,三株菌组成的生态系统关系简单,如剪刀-石头-布模型是基于负反馈构建的<sup>[96]</sup>。在合成微生物生态系统中,仍然需要一种关系复杂、操作简单、可以人为的控制群落组成的研究。

## 1.9 本论文的研究内容及意义

群体感应系统是合成生物学和代谢工程研究中的重要工具,被广泛地应用到复杂系统和基因线路的构建中。我们将其应用到动态调控系统和多细胞体系的构建中。

首先在大肠杆菌高拷贝质粒骨架上构建了需要外源添加水杨酸的 Sal 系统,利用合成生物学策略对 Sal 系统进行调整,筛选出符合预期的外源添加诱导剂的 Sal 系统。接下来在大肠杆菌中引入外源基因 *pchBA*, 延长莽草酸途径,合成水杨酸,首次构建了自诱导的 Sal 系统。最后将其应用到水杨酸的生产中,将 Sal 系统和人工反式编码小 RNA 结合,抑制生长必需基因 *ppc*, 积累前体物质 PEP, 从而提高终产物水杨酸的产量。

自然界的生态系统存在着较多难以预测和控制的复杂因素,限制了进一步探索。合成微生物生态系统作为一种理想的生物模型,具有复杂性低和可控性高的特点,是探索生态关系的一种重要手段。将上一部分构建的 Sal 系统与其他两种群体感应系统和毒素-抗毒素系统结合,成功构建了一个三菌株生态系统,在不加诱导剂时,该合成系统的三菌株能够稳定共存,通过添加不同的诱导剂组合,实现了生态系统中种群的转变。该合成生态系统为探索生态原理提供了新的研究模型,为进一步利用合成微生物群落合作生产高价值化合物提供了可选择的方案。

已报道的动态调控多是单层和双层动态调控,单层调控主要是解决代谢流的流向问题;双层调控可以同时解决代谢流的流向和异源蛋白引起的细胞毒性问题。在较复杂的生产途径中,可能需要同时解决多个问题,如生产途径中引入的外源基因争夺有限的细胞资源的问题,外源蛋白可能会导致细胞毒性的问题,生产途径中的中间产物需要层层递进式积累的问题等。此时,双层动态调控已经不能满足需求,三层调控能更好地解决问题。将上一部分应用的两个自诱导的正交群体感应系统和响应细胞生长的稳定期特异性启动子元件进行组合,首次构建了一个独立于代谢通路的、自诱导的三层动态调控系统,并将其应用到 3-羟基丙酸的生产中。首先进行了调控元件的表征和筛选,在筛选出响应阈值较广以及开启时间

存在时间差的三个系统后，将其进行组合，成功构建了三层动态调控系统。随后将三层调控系统与人工反式编码 RNA 相结合，动态抑制生长必需基因 *gltA* 和 *fabD*，动态表达 *acc* 和 *mcr*，生产 3-羟基丙酸。相比于不应用动态调控、应用单层动态调控、应用双层动态调控生产 3-羟基丙酸的对照菌株，应用三层调控的菌株的产量得到了有效提高。本研究表明三层调控在复杂的代谢途径中可以很好地解决多种难题。

## 第二章 自诱导Sal系统在大肠杆菌的构建及应用

天然的群体感应系统在实际应用过程中存在正交性较差的问题。合成生物学家模仿天然的群体感应系统的结构，通过设计信号分子的生物合成途径、合理改造诱导启动子和定向进化转录因子等措施构建了多个良好的人工群体感应系统。这些系统的信号分子大多为次级代谢产物，在结构上和天然群体感应系统信号分子相差较大，其正交性优于传统的群体传感系统，为基于群体感应的应用提供了更多的选择。

通过分析目前已开发的人工群体感应系统，以合酶组成较简单并且信号分子结构和多种天然群体感应系统(Las系统和Lux系统)有较大差异的、正交的Sal系统作为出发系统，进行人工QS系统的构建。通过调整关键基因的表达和筛选验证，首次在大肠杆菌中构建了一个完全自诱导的Sal QS系统。接下来，将该Sal系统和人工反式编码RNA结合来调控水杨酸的合成以验证其有效性。该自诱导人工群体感应系统的构建，为合成生物学和代谢工程中通讯工具和诱导系统的选择提供了新的工具。

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验菌株和质粒

本章节所使用的菌株和质粒如表 2-1 所示。

表 2-1 菌株和质粒

Strains and Plasmids	Relevant characteristics	Source
	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 Δ</i>	
<i>E. coli</i> TOP10	<i>lacX74mpG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-</i>	Lab stock
SalA	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pSal-A	This study
SalB	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pSal-B	This study
SalB-3	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pSal-B-3	This study
SalB-4	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pSal-B-4	This study
SalB-5	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pSal-B-5	This study

续表 2-1 菌株和质粒

Strains and Plasmids	Relevant characteristics	Source
SalC	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pSal-C	This study
StrainG	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pGFP-100	This study
StrainG-MicC1	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pGFP-MicC1	This study
Strain1-Sal	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pSal1	This study
Strain1-PPC2	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pSal1-PPC2	This study
Strain1-PPC3	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pSal1-PPC3	This study
pSal-A	Cm <sup>R</sup> , P <sub>sal</sub> -RBS 30- <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pSal-B	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23104-RBS 30- <i>nahR</i> , P <sub>sal</sub> -RBS 30- <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pSal-B-3	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23104-RBS 35- <i>nahR</i> , P <sub>sal</sub> -RBS 30- <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pSal-B-4	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23104*-RBS 30- <i>nahR</i> , P <sub>sal</sub> -RBS 30- <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pSal-B-5	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23104-RBS 30- <i>nahR</i> , P <sub>sal</sub> -RBS 35- <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pSal-C	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23100-RBS 34- <i>pchBA</i> , BBa_J23104*-RBS 30- <i>nahR</i> , P <sub>sal</sub> -RBS 30- <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pGFP-100	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23100-RBS 30- <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pGFP-MicC1	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23100-RBS 30- <i>gfp</i> , P <sub>sal</sub> -MicC1-GFP, ori pBR322	This study
pSal1	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23100-RBS 34- <i>pchBA</i> , ori pBR322	This study
pSal1-PPC2	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23100-RBS 34- <i>pchBA</i> , BBa_J23104*-RBS 30- <i>nahR</i> , P <sub>sal</sub> -MicC1-PPC2, ori pBR322	This study
pSal1-PPC3	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23100-RBS 34- <i>pchBA</i> , BBa_J23104*-RBS 30- <i>nahR</i> , P <sub>sal</sub> -MicC1-PPC3, ori pBR322	This study

### 2.1.2 实验引物

本章节所使用的引物如表 2-2 所示。

表 2-2 引物

Name	Sequence
J04-RBS35	CATCTAGTATTCTCCTCTTTAATCTCTAGAGCTAGCACAAATAC CTAGGAC
RBS35-nahR	TCTAGAGATTAAGAGGAGAATACTAGATGATGGAAGCTGCG TGATCTGGATC
Psal-RBS35	CATCTAGTATTCTCCTCTTTAATCTCTAGAGATCCTCTATGGTA CTCGTGATGGC
RBS35-GFP	CATCTAGTATTCTCCTCTTTAATCTCTAGAGATCCTCTATGGTA CTCGTGATGGC
Sal-1	TCTTTCTCTAGAGCTAGCACTGTACCTAGGACTGAGCTAGCC GTCAAGATGGTAAGCCCTCCCGTATC
Sal-2	CCTAGGTACAGTGCTAGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACT AGATGGCTATGAAAACCTCCCGAAGACTGC
Sal-3	CGGTATCATTGCAGCCATCCGGCAAAAAAGGGCAA
Sal-4	CTTTTTTGCCGGATGGCTGCAATGATACCGCGAGA
400-sRNA-GFP-1	CTTTTCTTCTCAAGTCAGAGGTTTTACCGTCATC
400-sRNA-GFP-2	GTGAAAACCTCTGACTTGAGAAGAGAAAAGAAAACCGCCG
GFP-sRNA-3	TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTACTGTGCTAGCGTGAAA AGTTCTTCTCCTTTACGCTTTCTGTTGGGCCATTGCATTG
GFP-sRNA-4	GCGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACGCTAGCACAGTACCTAG GACTGAGCTAGCTGTCAAGAGACGGTCACAGCTTGTCTG
ppc2-1	ATGAACGAAACAATAATCCGCATTGCTTTCTGTTGGGCCATTG CATTGC
ppc2-2	AAAGCAATGCGGAATATTGTTTCGTTTCATGATCCTCTATGGTAC TCGTGATGGC

续表 2-2 引物

Name	Sequence
ppc3-1	ATACCACAGCATTTTCGCCGAAAGGCTTTCTGTTGGGCCATTG CATTGC
ppc3-2	AAAGCCTTTCGGCGAAATGCTGTGGTATGATCCTCTATGGTA CTCGTGATGGC

### 2.1.3 培养基

#### (1) LB 培养基 (g/L)

表 2-3 LB 液体培养基成分表

成分名称	g/L
酵母粉	5
蛋白胨	10
氯化钠	10

培养基的 PH 调节至 7.0, 在 121°C 下高压蒸汽灭菌 20 min。

取 100 mL 的液体 LB 培养基加入锥形瓶中, 再按照 1.5%-2.0% 加入琼脂粉 (1.5-2.0 g/L), 在 121°C 下高压蒸汽灭菌 20 min。使用前加热融化, 再冷却到 50°C 左右, 按照一定比例加入抗生素, 混合均匀后使用。

#### (2) SOB 培养基 (g/L)

表 2-4 SOB 液体培养基成分表

成分名称	g/L
酵母粉	5
蛋白胨	20
氯化钠	0.5
氯化钾	0.186
硫酸镁	1.2

溶于水, 定容至 1 L, 121°C 灭菌 20 min。

#### (3) SOC 培养基 (g/L)

向 SOB 培养基中加入 20 g/L 提前配制好的葡萄糖溶液。

(4) M9C 培养基 (g/L)

表 2-5 M9C 液体培养基成分表

成分名称	含量
甘油	20 g/L
葡萄糖	2.5 g/L
酵母粉	5 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g/L
NaCl	0.5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	1 g/L
MOPS	2 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	14.7 mg/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.5 mg/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.25 mg/L
VB1	2 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.25 mg/L
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.7 mg/L
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.6 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 mg/L
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.15 mg/L

培养基 PH 调节至 7.0, 在 121℃下高压蒸汽灭菌 20 min。

(5) M9 培养基 (g/L)

表 2-6 M9 液体培养基成分表

成分名称	g/L
酵母粉	0.2
葡萄糖	20
氯化钠	1
硫酸镁	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	14

续表 2-6 M9 液体培养基成分表

成分名称	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.2
NH <sub>4</sub> Cl	1

### 2.1.4 相关试剂和缓冲液

#### (1) 抗生素

氨苄青霉素(Amp), 溶于水, 冷冻储存浓度 100 mg/mL, 工作浓度 100 μg/mL;  
 壮观霉素(Spc), 溶于水, 冷冻储存浓度 100 mg/mL, 工作浓度 25 μg/mL;  
 卡那霉素(Kan), 溶于水, 冷冻储存浓度 100 mg/mL, 工作浓度 50 μg/mL;  
 氯霉素(Cm), 溶于无水乙醇, 冷冻储存浓度 100 mg/mL, 工作浓度 17 μg/mL。  
 水溶性抗生素用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

#### (2) 诱导剂

3OC6HSL 和 3OC12HSL (溶于 DMSO): 储存浓度为 0.1、1、10、100、1000 和 10000 μM, 工作浓度为储存浓度的千分之一。

水杨酸(溶于水): 储存浓度为 10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-3</sup> mM, 工作浓度是其储存浓度的千分之一。

#### (3) 50×TAE 电泳缓冲液

取 Tris 242 g, 冰醋酸 57.1 mL, 0.5 mM EDTA 100 mL, 用去离子水溶解, 定容至 1 L, PH 调至 8.5。

#### (4) 0.8%琼脂糖凝胶

在 300 mL 锥形瓶中加入 40 mL 的 1×TAE 缓冲液, 再加入 0.32-0.40 g 琼脂糖, 微波炉加热至完全溶解, 冷却到 60°C左右加入 0.01% (vol/vol) 花青素染料, 轻微摇匀, 倒入胶板中, 插入相应的梳子, 自然凝固。

#### (5) 50%葡萄糖溶液

提前准备好 500 mL 左右沸水, 向其中加入 550 g 的一水葡萄糖, 快速搅拌加速一水葡萄糖溶解, 然后用磁力搅拌器加热搅拌至其完全溶解, 定容至 1 L。115°C灭菌 30 min。

#### (6) 甘油-CaCl<sub>2</sub> 溶液

表 2-7 甘油-CaCl<sub>2</sub> 溶液成分表

成分名称	g/L
丙三醇	150 mL
氯化钙	6.71 g
PIPES	6.66 g
ddH <sub>2</sub> O	定容至 1 L

将 PIPES 加入准备好的水中，用 NaOH 颗粒调节 pH 至 6.8-7.0 左右，待 PIPES 全部溶解，随后向溶液中加入称量好的氯化钙和丙三醇，定容至 1 L，121℃ 灭菌 20 min。

(7) 10%甘油

取 100 mL 丙三醇，溶于水，定容至 1 L。121℃ 灭菌 20 min。

(8) Gibson 组装体系

表 2-8 Gibson 组装体系 5×反应缓冲液成分表

5×isothermal reaction buffer		6 mL	供货商
100 mM	dATP	60 μL	NEB
100 mM	dTTP	60 μL	NEB
100 mM	dCTP	60 μL	NEB
100 mM	dGTP	60 μL	NEB
100 mM	NAD	300 μL	Solarbio
1 M	DTT	300 μL	Solarbio
1 M	Tris-HCl (pH 7.5)	3 mL	Solarbio
2 M	MgCl <sub>2</sub>	150 μL	国药集团

表 2-9 2×Gibson 组装体系

组分	1.25 mL
5× isothermal reaction buffer	500 μL
10 U/μL T5 Exonuclease	1 μL
2 U/μL Phusion DNA polymerase	31.25 μL
40 U/μL Taq DNA ligase	250 μL
ddH <sub>2</sub> O	468.75 μL

(9) 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

量取 98%浓硫酸 272.5 μL，用 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L，使用孔径为 0.22 μm 的水相滤膜对溶液进行过滤除菌，超声 5 min 去除气泡。

(10) 0.1%甲酸

量取 1 mL 的甲酸，用蒸馏水定容至 1 L，用 0.22 μm 的水相滤膜抽滤除菌。

### 2.1.5 常用生化试剂

表 2-10 生化试剂

生化试剂	生产公司
酵母提取粉 Yeast extract	Oxoid 公司
胰蛋白胨 Tryptone	Oxoid 公司
氯化钠 Sodium chloride	国药集团化学试剂有限公司
琼脂粉 Agar	Solarbio 公司
氨苄青霉素 Ampicillin	生工生物工程(上海)股份有限公司
壮观霉素 Spectinomycin	生工生物工程(上海)股份有限公司
氯霉素 Chloromycin	生工生物工程(上海)股份有限公司
硫酸卡那霉素 Kanamycin	Solarbio 公司
三氯甲烷 chloroform	国药集团化学试剂有限公司
甲醇 methanol	国药集团化学试剂有限公司
High fidelity DNA 聚合酶, dNTP 及其缓冲液	全式金生物技术(北京)有限公司
Taq DNA 聚合酶, dNTP 及其缓冲液	康为世纪生物科技(北京)有限公司
Phusion DNA 聚合酶, dNTP 及其缓冲液	Thermo Fisher 公司
Vazyme DNA 聚合酶, dNTP 及其缓冲液	诺唯赞生物科技(南京)有限公司

### 2.1.6 常用试剂盒

表 2-11 试剂盒

生化试剂	生产公司
琼脂糖凝胶试剂盒	天根生化科技（北京）公司产品
普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	天根生化科技（北京）公司产品
质粒小提试剂盒	天根生化科技（北京）公司产品

### 2.1.7 仪器与设备

表 2-12 仪器设备

实验设备与仪器	制造商
微量移液器	德国 Eppendorf 公司
Eppendorf mini 离心机	德国 Eppendorf 公司
5417R 型 Eppendorf 高速冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司
微型离心机	江苏海门其林贝尔仪器有限公司
Mikro 220 型离心机	德国 Hettich 公司
FM70A 型自动制冰机	宁波格兰特制冷设备制造有限公司
LifeTouch PCR 仪	杭州博日科技有限公司
XP Cyclcr PCR 仪	杭州博日科技有限公司
DYY-8C 电泳仪	北京六一仪器厂
5102 型电子分析天平	常州万德天平仪器有限公司
ALC-210.3 型电子分析天平	德国 Sartorius Stedim 公司
ABI04-S 型电子分析天平	瑞士梅特勒公司
Tanon 2500 型紫外成像仪	上海天能科技有限公司
MILIPORE 超纯水系统	MILIPORE 公司
78-2 型双向磁力搅拌器	国华电器有限公司
DHG-9076A 电热恒温鼓风干燥箱	ThermoFisher Scientific 公司
BCD-216TDXZ 型冰箱	上海精宏实验设备有限公司
-80℃超低温冰箱	青岛海尔股份有限公司
DNP-9052 型电热恒温培养箱	扬州市培英实验仪器有限公司
HZQ-Q 型全温振荡培养箱	上海精宏实验设备有限公司

续表 2-12 仪器设备

实验设备与仪器	制造商
CHB-100 型恒温金属浴	上海 TOMOS 科学仪器有限公司
HYG-C 型多功能摇床	哈尔滨东联电子技术开发有限公司
DK-S24 型电热恒温水浴	杭州博日科技有限公司
振荡恒温金属浴	哈尔滨东联电子技术开发有限公司
超净工作台	昆山市超声波仪器有限公司
QL-901 型涡旋振荡器	郑州长城科工贸有限公司
SHB-III 循环水式多用真空泵	美国 Bio-Rad 公司
液相色谱 CLASS-VP 10A	日本岛津 SHIMADZU 公司
UV-1800 型分光光度计	山东省科学院生物研究所
SBA 生物传感分析仪	日本岛津 SHIMADZU 公司

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 菌种和核酸片段的保藏

菌种短期保藏：将菌液用一次性接种环在对应抗性的平板上划线，从而分离出单菌落，倒置在相应温度的培养箱中，培养 12 h，待长出的单菌落大小合适后，将平板从培养箱中取出，用封口膜密封，于 4℃冰箱冷藏保存。或者在培养 12 h 后的菌液中加入 20% (vol/vol) 的无菌甘油，于 -20℃冰箱冷冻储存。

菌种长期保藏：在平板上挑取需要保存的单克隆菌落，接种到相应抗性的液体培养基中培养 12 h，吸取 800 μL 的菌液和 200 μL 无菌甘油，在 1.5 mL 的 Eppendorf 管中混合均匀，在 -80℃冰箱可长期保存。

核酸片段的保藏：将提取的质粒和回收的 DNA 片段放置于 -20℃冰箱可短期保存，放置于 -80℃冰箱可长期保存。

### 2.2.2 分子生物学常规操作技术

(1) Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 的 PCR 反应体系如表 2-13 所示，PCR 反应条件如表 2-14 所示。

表 2-13 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 的反应体系 (50  $\mu\text{L}$ )

组分	添加量
dNTP Mix	1 $\mu\text{L}$
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase	1 $\mu\text{L}$
模板 DNA	1 $\mu\text{L}$
上游引物	2 $\mu\text{L}$
下游引物	2 $\mu\text{L}$
2 $\times$ Phanta Max Buffer	25 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 $\mu\text{L}$

表 2-14 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 的 PCR 反应条件

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	3 min	
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	15 sec	
退火	56 $^{\circ}\text{C}$	15 sec	30
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	30 sec/kb	
彻底延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	3 min	

(2) 2 $\times$ ES Taq Master Mix 的 PCR 反应体系如表 2-15 所示, PCR 反应条件如表 2-16 所示。

表 2-15 2 $\times$ ES Taq Master Mix 的 PCR 反应体系 (50  $\mu\text{L}$ )

组分	添加量
菌体	少许
上游引物	1 $\mu\text{L}$
下游引物	1 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ES Taq Master Mix	25 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	Up to 50 $\mu\text{L}$

表 2-16 2×ES Taq Master Mix 的 PCR 反应条件

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	10 min	
变性	95°C	30 sec	
退火	56°C	30 sec	30
延伸	72°C	30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	3 min	

### (3) 大肠杆菌热激化法转化

- 1) 取出实验所需的感受态细胞，放置于冰盒内，使其解冻。
- 2) 吸取适量的核酸样品（如质粒、核酸片段、组装体系等），缓慢加入到感受态细胞中，混合均匀，静置冰浴 20 min。
- 3) 用浮漂将其置于 42°C 水浴锅中热激 90 s。
- 4) 随后冰浴 2 min。
- 5) 在 EP 管中加入 900 μL SOC 培养基，于 37°C 和 450 rpm 条件下恢复培养 1 h 左右。
- 6) 离心，取出适量的上清液，剩余混合均匀，涂布于含有相应抗性的 LB 平板上，在适宜的温度下倒置培养至长出单克隆菌落。

### (4) 大肠杆菌化学感受态制备

- 1) 在无菌试管中加入 5 mL LB 液体培养基，接种目的菌株，在 37°C 摇床中 220 rpm 下振荡培养 12 h。
- 2) 随后在含 50 mL LB 的液体培养基的锥形瓶中转接 1 mL 的培养液，在 37°C 摇床中 220 rpm 振荡培养，待菌液 OD<sub>600</sub> 约为 0.4-0.5 后，在冰上冰浴 30 min。
- 3) 提前预冷离心机至 4°C，将菌液转移至无菌的 50 mL 离心管中，4000 rpm、4°C 条件下离心 10 min，去除上清，加入 25 mL 提前预冷的无菌 0.1 mol/L CaCl<sub>2</sub>-甘油溶液，吹吸以重新混合均匀菌体。
- 4) 再次重复步骤 (3) 两次。
- 5) 最后一次混合均匀后将菌液分装入 1.5 mL 无菌的 Eppendorf 离心管中，每管 100 μL 置于 -80°C 保藏备用。

### (5) 大肠杆菌的电转化

- 1) 提前将目标菌株接至试管中，在适宜条件下培养 12 h。

2) 将试管中的菌液进行转接, 于适宜生长条件的摇床中培养至菌株的  $OD_{600}$  在 0.6 左右。

3) 吸取适量的菌体至 EP 管, 离心。

4) 用 900  $\mu\text{L}$  10% 的甘油清洗菌体三次。

5) 向 EP 管中加入 100  $\mu\text{L}$  10% 的甘油, 混合均匀后, 加入准备好的核酸样品, 再次混合均匀。

6) 将混合液加入到 2 mm 电转杯中, 在 2.5 kv、25  $\mu\text{F}$ 、200  $\Omega$  的条件下进行电转化。

7) 加入 900  $\mu\text{L}$  SOC 培养基至电转杯中, 混合均匀, 随后转移至 EP 管中。将 EP 管置于恒温振荡器中, 适宜条件下恢复培养 1 h 左右。

8) 将适量菌液涂布到含相应抗性的 LB 平板上, 倒置于适宜的温度的培养箱中培养 12 h。

### 2.2.3 关键基因的表达强度调整

将质粒上需要调整表达强度的关键基因更换启动子或者是 RBS, 选择更换后的启动子或者 RBS 做为同源臂, 在其两端设计上下游引物, 以原质粒作为模板, PCR 扩增片段, 随后将扩增的片段回收, 组装, 化转。

### 2.2.4 其他分子生物学常规操作

PCR 片段回收的操作方法参考相应公司的 PCR 产物纯化试剂盒说明书; 质粒提取、胶回收、大肠杆菌基因组提取等操作方法参考相应公司的质粒小提试剂盒、质粒小提中量试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明书。

### 2.2.5 系统的表征

#### (1) 外源添加诱导剂系统的表征

在试管中接入含有相应抗生素的 5 mL LB 培养基, 将需要表征的单克隆菌株接种至试管中, 在相应培养条件下, 培养 12 h。在 24 孔板中接入 1 mL 的含有相应抗性的液体培养基, 将培养的种子以 2% 接种量接种到孔中, 根据需求在培养基中加入不同浓度的诱导剂水杨酸或者是 3OC6HSL、3OC12HSL。将接种后的 24 孔板放于深孔板震荡培养仪中, 于适宜条件下连续培养。培养一定时间后, 吸取适量菌液作为样品, 用清水将样品清洗三次, 最后用酶标仪测量  $OD_{600}$ 、绿色荧光 (激发光 485 nm, 发射光 528 nm)。

#### (2) 自诱导系统的表征

在试管中接入含有相应抗生素的 5 mL LB 培养基，将需要表征的单克隆菌株接种至试管中，在相应培养条件下，培养 12 h。在 24 孔板中接入 1 mL 的含有相应抗性的液体培养基，将培养的孢子以 2%接种量接种到孔中。将接种后的 24 孔板放于深孔板震荡培养仪中，于适宜条件下连续培养。培养一定时间后，吸取适量菌液作为样品，用清水将样品清洗三次，最后用酶标仪测量 OD<sub>600</sub>、绿色荧光（激发光 485 nm，发射光 528 nm）。

### （3）人工反式编码 RNA 的表征

同（2）。

## 2.2.6 人工反式编码小 RNA 抑制靶基因片段的构建

首先从靶基因上选取合适的结合位点，将人工反式编码小 RNA（MicC1 或 MicC2）中的启动子区域换成我们需要的组成型启动子或者是群体感应启动，其余部分不做改变。其中 MicC1 和 MicC2 是送基因合成公司合成的。

### 1) 水杨酸的摇瓶发酵

1) 种子活化：从-80℃冰箱取出冷冻的菌株，室温融化后用无菌接种环将少量菌液划线至 Cm 抗性的 LB 平板上，37℃培养 12 h。挑取单菌落接种至含有 Cm 的 LB 液体培养基的试管中，在 37℃ 摇床中 220 rpm 培养 12 h。

2) 摇瓶发酵：将试管中的孢子按照 2%的接种量转接至含有 Cm 的 50 mL M9C 液体培养基的带挡板锥形瓶中，0 h 时添加 2.5 g/L 50%葡萄糖，800 μL 微量元素母液。在 37℃摇床中 220 rpm 下培养发酵 72 h，每组发酵均进行三个重复。

### （3）高效液相色谱法检测水杨酸

HPLC 的具体检测方法参考文献<sup>[98]</sup>。

## 2.3 实验结果与讨论

### 2.3.1 群体感应系统的选择、构建及优化

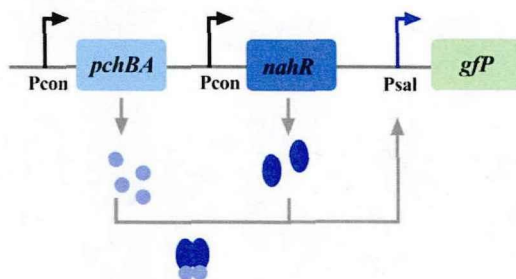


图 2-1 Sal 系统工作原理

通过分析人工群体感应系统的复杂性和正交性，我们选择 Sal 系统为出发系统。该系统以铜绿假单胞菌来源的 *pchBA* 作为合酶基因，以恶臭假单胞菌来源的 *nahR* 作为转录因子编码基因，特异性启动子为  $P_{sal}$ 。工作原理如图 2-1 所示，PchBA 以支链氨基酸作为前体合成水杨酸，水杨酸和 NahR 蛋白结合形成复合物激活 GFP 表达。Du 等人在大肠杆菌中构建了需要外加信号分子的 Sal 系统，发现 NahR 对 sal 的灵敏度较低，随后，对 NahR 进行随机突变，筛选出灵敏度更高的突变体 NahR Q168R<sup>[61]</sup>。

我们选择上述 NahR 突变体作为转录因子，在高拷贝质粒上构建了外源添加诱导剂的 Sal 系统（图 2-2）。组成型表达 NahR，以  $P_{sal}$  启动子控制 GFP 表达，该菌株命名为 SalB。在对照菌株 SalA 中，仅以  $P_{sal}$  启动子控制 GFP 表达（图 2-2）。通过外源添加一系列浓度 0、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$  mM 的水杨酸，对菌株 SalB 进行荧光表征。对照菌株为 *E. coli* TOP10 和菌株 SalA。结果如图 2-3 所示。SalA 荧光强度高于 *E. coli* TOP10，表明启动子  $P_{sal}$  有一定的本底泄露。在 SalB 中加入不同浓度梯度的诱导剂水杨酸，荧光强度并没有较大的变化（图 2-3）。分析原因，可能是 Sal 系统中 NahR 或者 GFP 的表达量不合适。为了解决这个问题，我们先对 Sal 系统进行初步改造，主要是对 NahR 的表达强度进行调整。

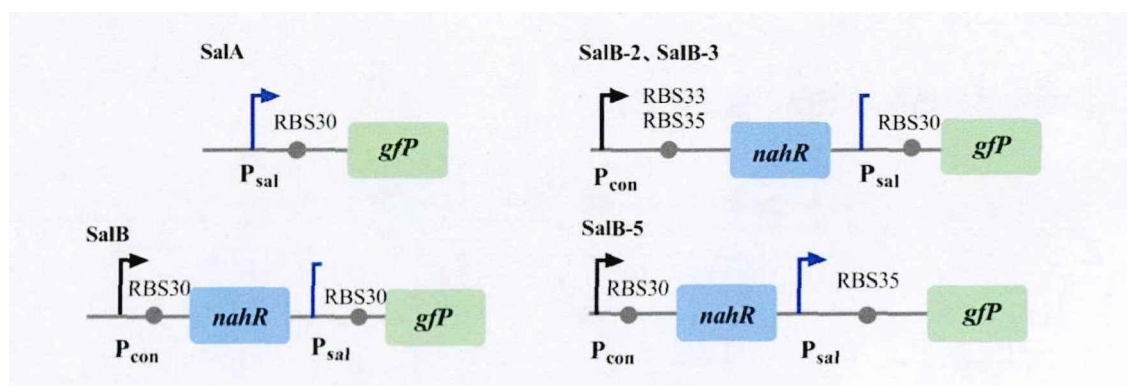


图 2-2 Sal 系统的改造质粒

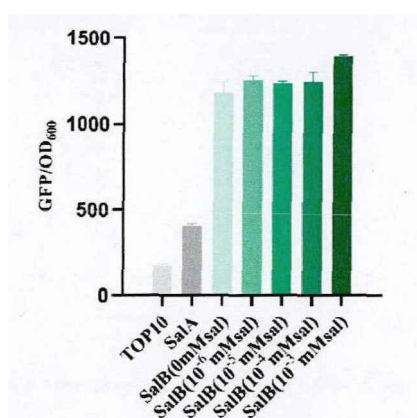


图 2-3 外源添加诱导剂的 Sal 系统表征

通过更换不同的核糖体结合位点 (RBS)，来完成对 NahR 的表达强度的调整。选择了几种不同强度的 RBS: BBa\_B0030、BBa\_B0033、BBa\_B0035 (<http://parts.igem.org/>)，分别简称为 RBS30、RBS33、RBS35。在不同菌株或者是不同拷贝数的质粒骨架上，RBS 的强度可能会有所变化，因此我们对上述 RBS 进行了初步验证。菌株 SalA 中质粒上的 RBS 为 RBS30。结果表明：在 *E. coli* TOP10 的高拷贝质粒上验证的 RBS 强度由大到小为 RBS30>RBS35>RBS33 (图 2-4)。

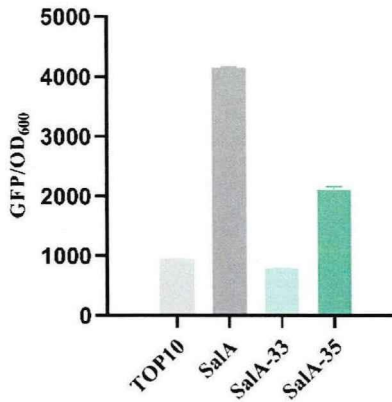


图 2-4 不同RBS 的强度表征

接下来,我们将 NahR 的 RBS 更换为 RBS33 或者是 RBS35, 构建菌株 SalB-2 或 SalB-3 (图 2-2)。在此过程中发现一株突变株, 命名为 SalB-4, 该菌株质粒上 NahR 的启动子 J23104 发生突变(表 2-17)。通过添加一系列不同浓度的 sal 诱导剂对 SalB-3、SalB-4 进行表征, 结果显示, 更换了 RBS 的菌株中 Sal 系统激活表达程度很弱, 而启动子发生突变的菌株 SalB-4 可以响应 sal 的诱导(图 2-5)。随后对突变后的启动子进行表征, 发现突变大大降低了它强度(图 2-6)。最终分析上述实验结果, 发现菌株 SalB 中系统不工作是因为结合蛋白的表达量过高引起的。

表 2-17 启动子序列

启动子	启动子序列
J23104 (J04)	TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATTGTGCTAGC
J23104 突变 (J04*)	TTGACAGCTAGCTAGTCCTAGGTATTGTGCTAGC

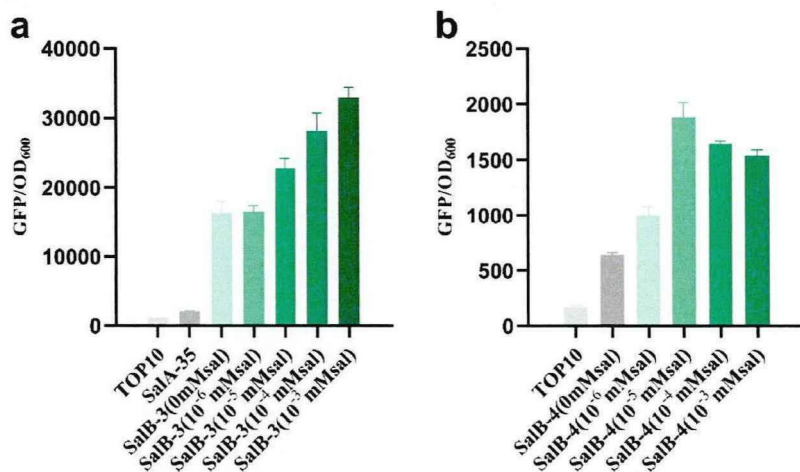


图 2-5 外源添加诱导剂 Sal 系统的改造表征图

a: SalB-3 菌株的表征结果; b: SalB-4 菌株的表征结果。

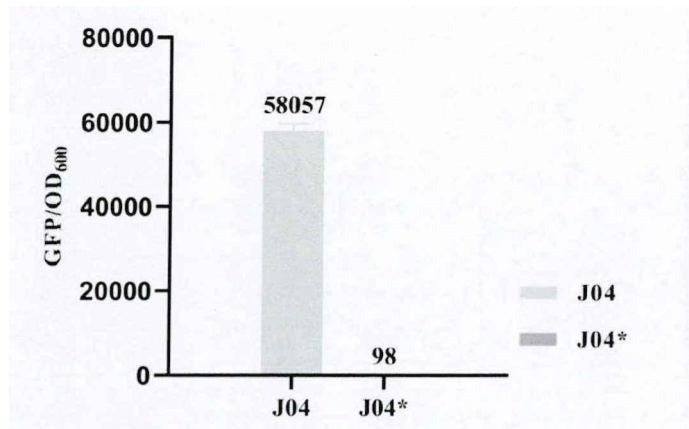


图 2-6 J23104 突变后的强度表征

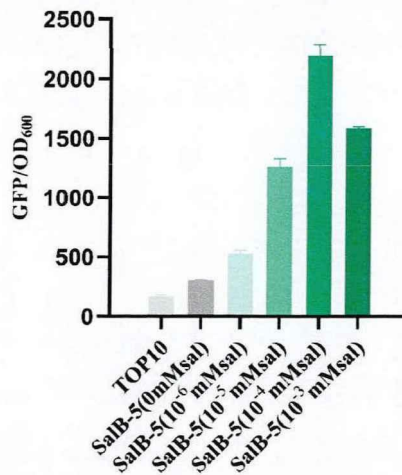


图 2-7 外源添加诱导剂 Sal 系统的再次改造表征

接下来，我们在 SalB-4 的基础上加入合酶基因 *pchBA* 以构建自诱导系统，构建菌株 SalC（图 2-8）。在 24 孔板中表征菌株 SalB-4 和 SalC，用酶标仪检测荧光强度。结果表明：相比于 SalB-4 菌株，SalC 菌株中 GFP 表达（图 2-9）。即 SalC 可以合成水杨酸来自诱导报告基因的表达，完全自诱导的 Sal 系统在 *E. coli* TOP10 中构建成功，该系统的建立丰富了合成生物学群体感应系统的工具库。接下来，我们尝试将其应用到代谢工程中以验证自诱导 Sal 系统的实用性。

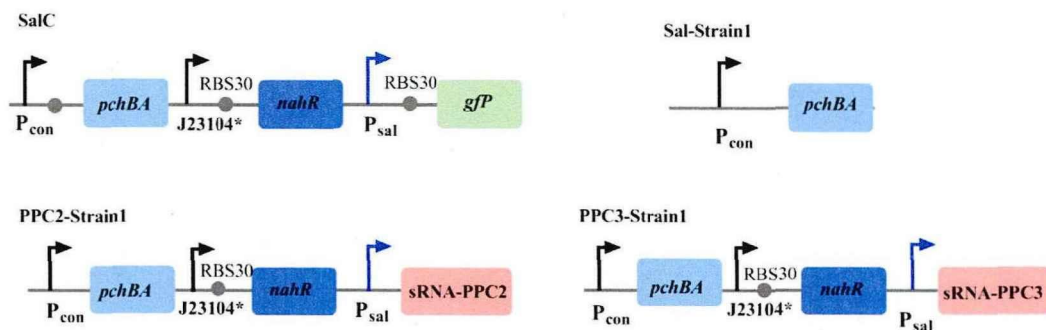


图 2-8 诱导 Sal 系统和水杨酸生产菌株

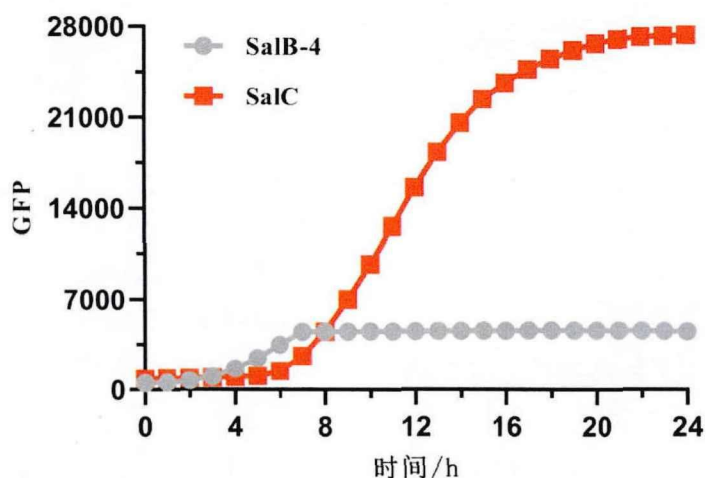


图 2-9 自诱导 Sal 系统的表征

### 2.3.2 应用 Sal 系统结合提高水杨酸产量

水杨酸是一种商业价值很高的化合物，传统的合成方法是化学合成，但是会造成一定的环境污染。近年来，研究者们尝试在微生物体内合成水杨酸。水杨酸在大肠杆菌中的合成是以莽草酸途径中的支链氨基酸作为前体物，具体生产途径如图 2-10。研究表明，磷酸烯醇丙酮酸盐（Phosphoenolpyruvate, PEP）的充足供应已被证明是莽草酸途径衍生化合物生物合成的关键因素<sup>[99]</sup>。除了作为莽草酸途径的前体外，PEP 还是糖酵解和 TCA 循环中的必需代谢产物<sup>[100]</sup>。然而，直接破坏这些相互竞争的途径会损害细胞的生长。特别是，大肠杆菌中磷酸烯醇丙酮酸羧化酶（由 *ppc* 编码）的直接缺失显著降低了细胞生长<sup>[101]</sup>。

sal的生产途径

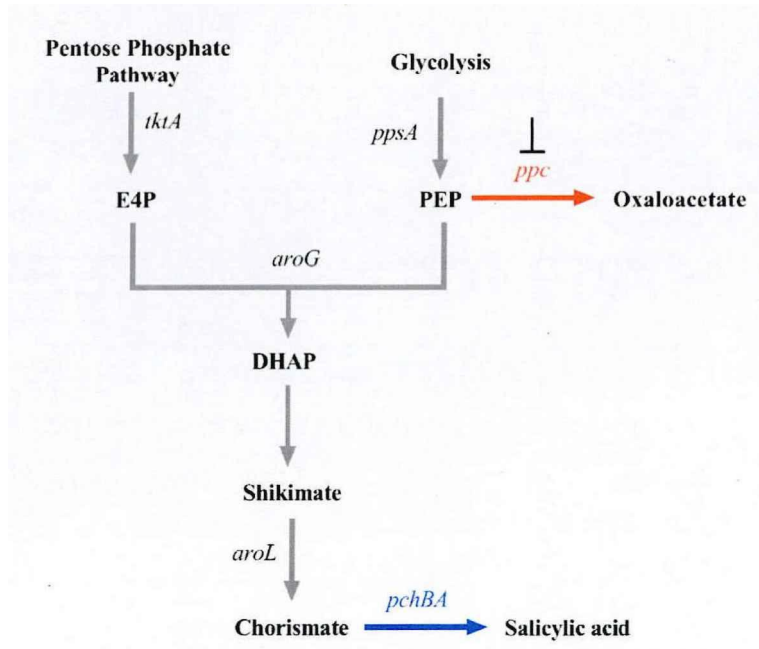


图 2-10 水杨酸的生产途径

我们选择用  $P_{sal}$  和人工反式编码小 RNA (MicC1) 相结合动态调控竞争途径中 *ppc* 的表达, 平衡代谢流, 积累 PEP, 从而提高水杨酸的产量。我们首先验证了 MicC1 在 *E. coli* TOP10 中的抑制效果。对照菌株组成型表达报告基因 *gfp*, 命名为 StrainG。在 StrainG 的基础上, 用 MicC1 去抑制 GFP 的表达, 构建菌株 StrainG-MicC1。表征结果显示, StrainG-MicC1 的荧光值远低于 StrainG, 这表明 MicC1 可以很好地在 *E. coli* TOP10 中发挥抑制作用 (图 2-11)。

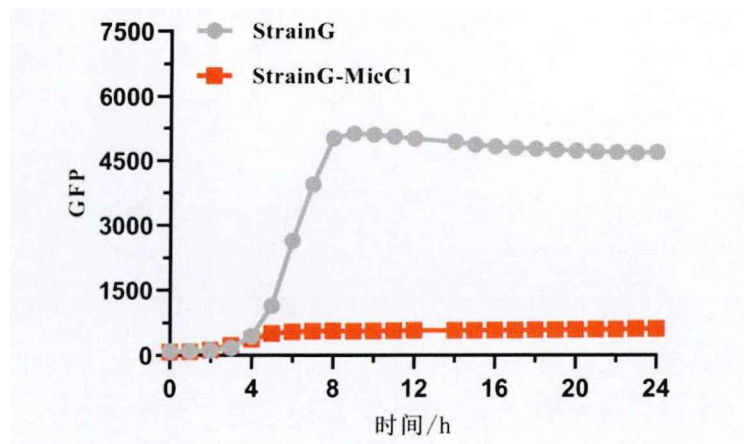


图 2-11 人工反式编码小 RNA (MicC1) 的表征

在高拷贝质粒上组成型表达外源基因 *pchBA*, 构建了水杨酸生产的基础质粒  $pSal1$ 。文献报道, 用 MicC1 抑制 *ppc* 序列上的 PPC2 和 PPC3 结合位点是有效

的。我们在质粒 Sal1 的基础构建了质粒 pSal1-PPC2 和 pSal1-PPC3，两者能够表达 Sal 系统动态诱导 MicC1 分别抑制基因 *ppc* 的 PPC2 和 PPC3 位点(表 2-18)。将质粒 pSal1、pSal1-PPC2 和 pSal1-PPC3 分别转化入 *E. coli* TOP10，构建菌株 Sal-Strain1、PPC2-Strain1 和 PPC3-Strain1 (图 2-8)。

表 2-18 PPC 结合位点

结合位点	位点序列
PPC2	ATGAACGAACAATATTCCGCATTG
PPC3	ATACCACAGCATTTCGCCGAAAGG

接下来对菌株 Sal-Strain1、PPC2-Strain1 和 PPC3-Strain1 进行摇瓶发酵，结果如图 2-12，三株菌的生长曲线相差不大，但是水杨酸的产量有明显的不同。在发酵 48 h 时，Sal-Strain1 中水杨酸的产量为 47 mg/L，PPC2-Strain1 中水杨酸的产量为 100 mg/L，PPC3-Strain1 中水杨酸的产量为 99 mg/L。在 48h 后，Sal-Strain1 和 PPC3-Strain1 中水杨酸的产量已经没有太大的变化，在发酵 72h 时，Sal-Strain1 的水杨酸产量为 60 mg/L，PPC2-Strain1 的水杨酸产量为 151 mg/L，PPC3-Strain1 的水杨酸产量为 100 mg/L。

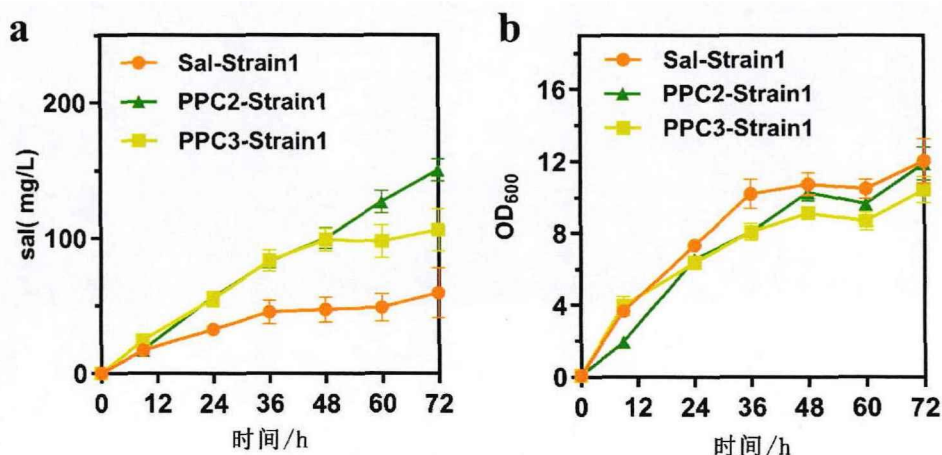


图 2-12 发酵菌株的水杨酸产量和生长

(a) 发酵菌株的水杨酸产量 (b) 发酵菌株的生长

最终发酵结果表明，应用动态调控生产可以很好地提高水杨酸的产量，PPC2-Strain1 相比于 Sal-Strain1 产量提高了 151%，PPC3-Strain1 相比于 Sal-Strain1 产量提高了 66%。PPC2-Strain1 和 PPC3-Strain1 中水杨酸的产量差异可能是由于对 *ppc* 的抑制程度不同引起的，PPC2-Strain1 中对 *ppc* 的抑制强度高于 PPC3-Strain1，可能积累较多的 PEP 实现更高的水杨酸产量。

## 2.4 本章小结

建立与天然 QS 系统正交的新型 QS 系统对合成生物学研究非常重要。我们首先以 *E. coli* TOP10 作为宿主菌，通过调整关键基因 *nahR* 的表达强度，成功在高拷贝质粒骨架上构建了需要外源添加诱导剂的 Sal 系统。在此基础上，我们进一步表达 *sal* 合酶基因，首次在 *E. coli* TOP10 中构建了一个完全自诱导的 Sal 系统，该系统丰富了合成生物学工具库。我们进一步将 Sal 系统应用到水杨酸的生产调控中，证明了该系统在代谢工程中的应用潜力。

## 第三章 基于群体感应系统的三菌株生态系统的初步构建

人工合成微生物生态系统的构建是合成生物学的新兴领域。在自然界中,最简单的生态系统也包括十多个种群组成并且关系复杂,限制了我们对其的深入探索与研究。在生态学上,环境因素一直被认为是决定生态系统稳定和进化的重要因素。生态系统与其周围环境之间的相互作用较复杂,目前对于环境因素如何影响生态系统演化的研究相对较少,这阻碍了微生物生态系统的进一步应用和保护。工程微生物的遗传信息相对明确,基于工程微生物构建的人工合成微生物生态系统组成简单、关系明确、行为可控,有助于我们去解析天然生态系统的某些机制。另一方面,在代谢工程中,生产途径越复杂代谢压力越大。将生产途径分成两个甚至多个模块,通过构建合成生态系统并在多个菌株中构建不同的代谢模块是缓解代谢压力的有效方案。然而,设计和构建出稳定性较好且具有一定应用价值的微生物生态系统依旧是微生物生态系统研究领域的一个瓶颈。近年来对多菌株合成生态系统的研究仍然较少,根据生产需求去人工调整生态系统中不同种群的比例仍然是挑战。设计可调整的多菌株生态系统对于基础研究和探索进一步的应用是有重要意义的。

群体感应系统已经被广泛地应用于生态系统中通讯模块的建立,然而大部分群体感应系统的合酶可以同时产生多种信号分子,为复杂生态系统的构建以及其种群关系的研究造成一定的困难,选择外源添加信号分子的方式去设计构建生态系统,简化了人工合成生态系统中未知的关系,使之后的研究更加方便。本章利用三个群体感应系统作为合成生态系统的通讯模块,将毒素-抗毒素蛋白 CcdA-CcdB 作为效应模块,成功构建出了一个稳定共存的三菌株生态系统。通过添加不同的小分子诱导剂组合,成功实现生态系统中优势菌株的转变,为进一步的应用打下了很好的基础。

### 3.1 实验材料

#### 3.1.1 实验菌株和质粒

本章节所使用的菌株和质粒如表 3-1 所示。

表 3-1 菌株和质粒

Strains and Plasmids	Relevant characteristic	Source
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ Δ M15 Δ lacX74nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-</i>	Lab stock
TOP10-RFP	<i>E. coli</i> TOP10 derivative, <i>rfp</i> integrated into the genome	This study
TOP10-CCDA	<i>E. coli</i> TOP10 derivative, <i>ccdA</i> integrated into the genome	This study
C01	TOP10-RFP harboring pC01-H-30 and pC01-L-303030	This study
C02	TOP10-RFP harboring pC02-H-30 and pC02-L-303030	This study
C03	TOP10-RFP harboring pC03-H-30 and pC03-L-303030	This study
C01-RG	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pC01R-H-30 and pC01G-L-30	This study
C02-RG	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pC02R-H-30 and pC02G-L-30	This study
C03-RG	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pC03R-H-30 and pC03G-L-30	This study
C01-1	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pC01A-32 and pC01B-353034	This study
C01-2	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pC01A-32 and pC01B-343034	This study
C02-1	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pC02A-34 and pC02B-303034	This study
C02-2	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pC02A-34 and pC02B-33034	This study
C02-3	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pC02A-34 and pC02B-333035	This study
C02-4	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pC02A-34 and pC02B-353034	This study
C03-1	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pC03A-34 and pC03B-303034	This study
pC01-H-30	Cm <sup>R</sup> , P <sub>tra*</sub> -RBS 30- <i>ccdA</i> , ori pBR322	This study
pC01R-H-30	Cm <sup>R</sup> , P <sub>tra*</sub> -RBS 30- <i>rfp</i> , ori pBR322	This study
pC02-H-30	Cm <sup>R</sup> , P <sub>las</sub> -RBS 30- <i>ccdA</i> , ori pBR322	This study

续表 3-1 菌株和质粒

Strains and Plasmids	Relevant characteristic	Source
pC02R-H-30	Cm <sup>R</sup> , P <sub>las</sub> -RBS 30- <i>rfp</i> , ori pBR322	This study
pC03-H-30	Cm <sup>R</sup> , P <sub>sal</sub> -RBS 30- <i>ccdA</i> , ori pBR322	This study
pC03R-H-30	Cm <sup>R</sup> , P <sub>sal</sub> -RBS 30- <i>rfp</i> , ori pBR322	This study
pC01A-32	Cm <sup>R</sup> , P <sub>tra</sub> -RBS 32- <i>ccdA</i> , ori pBR322	This study
pC01A-34	Cm <sup>R</sup> , P <sub>tra</sub> -RBS 34- <i>ccdA</i> , ori pBR322	This study
pC02A-34	Cm <sup>R</sup> , P <sub>las</sub> -RBS 34- <i>ccdA</i> , ori pBR322	This study
pC03A-34	Cm <sup>R</sup> , P <sub>sal</sub> -RBS 34- <i>ccdA</i> , ori pBR322	This study
pC01B-343034	Amp <sup>R</sup> , BBa_J23104-RBS 34- <i>traR(W)</i> , BBa_J23104-RBS 30- <i>lasR</i> , P <sub>las</sub> -RBS 34- <i>ccdB</i> , ori p15A	This study
pC01B-353034	Amp <sup>R</sup> , BBa_J23104-RBS 35- <i>traR(W)</i> , BBa_J23104-RBS 30- <i>lasR</i> , P <sub>las</sub> -RBS 34- <i>ccdB</i> , ori p15A	This study
pC02B-303034	Amp <sup>R</sup> , BBa_J23104-RBS 30- <i>lasR</i> , BBa_J23104-RBS 30- <i>nahR</i> , P <sub>sal</sub> -RBS 34- <i>ccdB</i> , ori p15A	This study
pC02B-333034	Amp <sup>R</sup> , BBa_J23104-RBS 33- <i>lasR</i> , BBa_J23104-RBS 30- <i>nahR</i> , P <sub>sal</sub> -RBS 34- <i>ccdB</i> , ori p15A	This study
pAH69	pSC101 ori, HK022 integrase	185
pHK	R6K ori, HK022 <i>attP</i> , Kan <sup>R</sup> , FRT	185
pHK-GFP	R6K ori, HK022 <i>attP</i> , Kan <sup>R</sup> , FRT, <i>gfp</i>	This study
pHK-CCDA	R6K ori, HK022 <i>attP</i> , Kan <sup>R</sup> , FRT, <i>ccdA</i>	This study

### 3.1.2 实验引物

本章节所使用的引物如表 3-2 所示。

表 3-2 引物

Name	Sequence
213-RFP-1	CTAGATGAAGCAGCGATGGCTTCCTCCGAAGACG
213-RFP-2	TTCGGAGGAAGCCATCGCTGCTTCATCTAGTATTTCTCCTC
213-RFP-3	GAAAACTACGCTTAAGGTGATAATACTAGAGCCAGGCATC
213-RFP-4	TCTAGTATTATCACCTTAAGCGTAGTTTTTCGTCGTTTGC
400-GFP-1	TAAAAGAGAGAGCCGATGCGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACT GG
400-GFP-2	TTCTCCTTTACGCATCGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAAACC
400-GFP-3	GAACTATACAAATAACGCCATTAACCTGATGTTCTGG
400-GFP-4	ATCAGGTTAATGGCGTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTG
RBS32-RFP	ATCAGGTTAATGGCGTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTG
RBS33-RFP	TCTAGAGTCACACAGGACTACTAGATGATGGCTTCCTCCGAAG ACG
RBS34-RFP	TCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGATGGCTTCCTCCGA AGACG
RBS35-RFP	TCTAGAGATTAAAGAGGAGAATACTAGATGATGGCTTCCTCCG AAGACG
RBS32-GFP	TCTAGAGTCACACAGGAAAGTACTAGATGATGCGTAAAGGAG AAGAACTTTTCACTGG
RBS33-GFP	TCTAGAGTCACACAGGACTACTAGATGATGCGTAAAGGAGAA GAACTTTTCACTGG

续表 3-2 引物

Name	Sequence
RBS34-GFP	TCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGATGCGTAAAGGAG AAGAACTTTTCACTGG
RBS35-GFP	TCTAGAGATTAAAGAGGAGAATACTAGATGATGCGTAAAGG AGAAGAACTTTTCACTGG
RBS32-CcdA	TCTAGAGTCACACAGGAAAGTACTAGATGATGAAGCAGCGT ATTACAGTGACAG
RBS34-CcdA	TCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGATGAAGCAGCGTA TTACAGTGACAG
RBS34-CcdB	TCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGATGCAGTTTAAGG TTTACACC
RBS32-J04	CATCTAGTACTTTCTGTGTGACTCTAGAGCTAGCACAATAC CTAGGACTGAG
RBS33-J04	CATCTAGTAGTCCTGTGTGACTCTAGAGCTAGCACAATACCT AGGAC
RBS34-J04	CATCTAGTATTTCTCCTCTTTCTCTAGAGCTAGCACAATACCT AGGACTGAG
RBS35-J04	CATCTAGTATTCTCCTCTTTAATCTCTAGAGCTAGCACAATAC CTAGGAC
RBS32-Ptra	CATCTAGTACTTTCTGTGTGACTCTAGATATTCGACTATAAC AAACCATTTTCTTGCG
RBS33-Ptra	CATCTAGTAGTCCTGTGTGACTCTAGATATTCGACTATAACAA ACCATTTTCTTGCG

续表 3-2 引物

RBS34-Ptra	CATCTAGTATTTCTCCTCTTTCTCTAGATATTCGACTATAACAA ACCAATTTCTTGCG
RBS35-Ptra	CATCTAGTATTCTCCTCTTTAATCTCTAGAGATATTCGACTATA ACAAACCAATTTCTTGCG
Plas-RBS32	CATCTAGTACTTTCCTGTGTGACTCTAGATGAAGAATTTACGC AAATTC
Plas-RBS33	CATCTAGTAGTCCTGTGTGACTCTAGATGAAGAATTTACGCA AATTC
Plas-RBS34	CATCTAGTATTTCTCCTCTTTCTCTAGATGAAGAATTTACGCA AATTC
Plas-RBS35	CATCTAGTATTCTCCTCTTTAATCTCTAGACTCTAGTGAAGAA TTTACGC
Psal-RBS33	CATCTAGTAGTCCTGTGTGACTCTAGAGATCCTCTATGGTACT CGTGATGGC
Psal-RBS34	CATCTAGTATTTCTCCTCTTTCTCTAGAGATCCTCTATGGTACT CGTGATGGC
Psal-RBS35	CATCTAGTATTCTCCTCTTTAATCTCTAGAGATCCTCTATGGTA CTCGTGATGGC
RBS32-LasR	TCTAGAGTCACACAGGAAAGTACTAGATGATGGCCTTGGTT GACGGTTTTTC
RBS33-LasR	TCTAGAGTCACACAGGACTACTAGATGATGGCCTTGGTTGAC GGTTTTTC
RBS34-LasR	TCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGATGGCCTTGGTTG ACGGTTTTTC

续表 3-2 引物

RBS35-LasR	TCTAGAGATTAAGAGGAGAATACTAGATGATGGCCTTGGTT GACGGTTTTTC
RBS32-TraR	TCTAGAGTCACACAGGAAAGTACTAGATGATGCAGCACTGG CTGGACAAG
RBS33-TraR	TCTAGAGTCACACAGGACTACTAGATGATGCAGCACTGGCT GGACAAG
RBS34-TraR	TCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGATGCAGCACTGGC TGGACAAG
RBS35-TraR	TCTAGAGATTAAGAGGAGAATACTAGATGATGCAGCACTG GCTGGACAAG
RBS33-nahR	TCTAGAGTCACACAGGACTACTAGATGATGGAAGTGCCTGAT CTGGATC
RBS34-nahR	TCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGATGGAAGTGCCTG ATCTGGATCTG
RBS35-nahR	TCTAGAGATTAAGAGGAGAATACTAGATGATGGAAGTGCCTG TGATCTGGATC
CcdA-1	GTATTCTCCTCTTTAATCTCTAGAGCTAGCACTGTACCTAGGA CTGAGCTAGCCGAGAGCAGCGACTGAGGTGATCTTG
CcdA-2	ACAGTGCTAGCTCTAGAGATTAAGAGGAGAATACTAGATG ATGAAGCAGCGTATTACAGTGACAG
CcdA-3	GAGAGTCATTACCCCTCACCAGTCCCTGTTCTCGTCAGC
CcdA-4	AACAGGGACTGGTGAGGGGTAATGACTCTCTAGCTTGAGG

### 3.1.3 培养基

同 2.1.3

### 3.1.4 相关试剂和缓冲液

同 2.1.4

### 3.1.5 常用生化试剂

同 2.1.5

### 3.1.6 常用试剂盒

同 2.1.6

### 3.1.7 仪器与设备

同 2.1.7

## 3.2 实验方法

### 3.2.1 大肠杆菌基因组的定点整合

1) 首先构建整合质粒, 将需要整合到基因组上的目的基因片段构建到带有 R6K 复制子、HK022 *attP*、FLP 识别位点和抗性筛选标记的质粒骨架上。

2) 将温敏型质粒 pAH69 电转化到需目标菌株中, 涂布到添加氨苄青霉素的平板上, 在 30°C 培养箱中培养。

3) 挑取上一步平板上长出的单菌落, 接种至 5 mL LB 液体培养基中培养 12 h。将培养 12 h 后的菌液按 1% 的接种量转接至 SOB 培养基中继续培养, 当 OD<sub>600</sub> 为 0.4 左右时, 将培养温度升高至 37°C, 诱导重组酶的表达。培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6 左右时, 将其制备成电转感受态, 随后将第一步构建的整合质粒电转化到该感受态细胞中。恢复培养时, 先在 37°C 下培养 30 min, 再升高至 42°C 培养 60 min。最终涂布在含相应抗生素的固体培养基中, 放置于 37°C 培养箱中培养。

4) 挑取上一步的单菌落进行菌落 PCR 验证, 筛选出正确的重组子。

5) 将温敏质粒 pCP20 电转化到上一步筛选得到的正确的重组菌株中, 用来去除抗性筛选标记。随后挑取成功的转化子于 42°C 条件下培养, 转接二至三代, 以温敏质粒 pCP20 的去除。

6) 培养后的菌液涂布到无抗固体培养基平板上, 分离单菌落, 然后将菌落依次在卡那霉素 (筛选标记)、氨苄青霉素 (pCP20 抗性) 和无抗固体培养基平板上划线扩增。其中在无抗性固体培养基平板上生长在其他抗性平板上不生长的菌株是成功去除温敏质粒 pCP20 以及抗性筛选标记的重组菌株。

### 3.2.2 表达 *ccdB* 基因质粒的构建

在构建表达 *ccdB* 基因的质粒时，扩增目的片段，随后片段回收，组装后，将菌株 TOP10-CCDA 制成感受态，进行化转。

原理：菌株 TOP10-CCDA 中表达解毒蛋白 CcdA，可以中和构建质粒上毒性蛋白 CcdB 的毒性。

### 3.2.3 关键基因表达强度的调整

同 2.2.3

### 3.2.4 共培养的特征与分析

在含有相应抗生素的 5 mL LB 培养基中转接需要进行共培养表征的单克隆菌株，在 37°C 的摇床中 220 rpm 培养 12 h。将培养 12 h 后的种子以 2% 接种量，按照一定的菌株比进行接种。转接至 700  $\mu$ L 的含有相应抗性的 LB 液体培养基中。如果需要添加诱导剂，则在培养基中加入相应的诱导剂组合。将接种后的 48 孔板缓慢放到深孔板震荡培养仪中，在 37°C 下 500 rpm 连续培养。培养一定时间后，取出部分菌液，用清水将其清洗三次，再将 OD<sub>600</sub> 稀释至 0.8 以下，用酶标仪测量 OD<sub>600</sub>、红色荧光（激发光 590 nm，发射光 645 nm）。

## 3.3 实验结果与讨论

### 3.3.1 合成生态系统的设计

我们选择第二章和第三章中应用的 Las、Tra\*、Sal 系统作为通讯模块，效应模块选择毒素-抗毒素系统。通过添加不同的诱导剂来诱导群体感应系统表达，*ccd* 操纵子编码的 CcdA-CcdB 毒素抗毒素系统执行命令。*ccd* 系统中包含两个基因，即 *ccdA* 和 *ccdB*。其中 *ccdB* 编码的 CcdB 是一种毒素蛋白，它是一种 DNA 促旋酶抑制剂，与 DNA 促旋酶和断裂的双链 DNA 复合物结合，使 DNA 促旋酶失效并最终导致细胞死亡。*ccdA* 编码的 CcdA 蛋白是一种解毒蛋白，保护细胞免受 CcdB 的毒性。我们设计了三菌株的竞争生态系统，竞争关系的建立是通过通讯模块和效应模块共同完成的。图 3-1 为系统的设计。

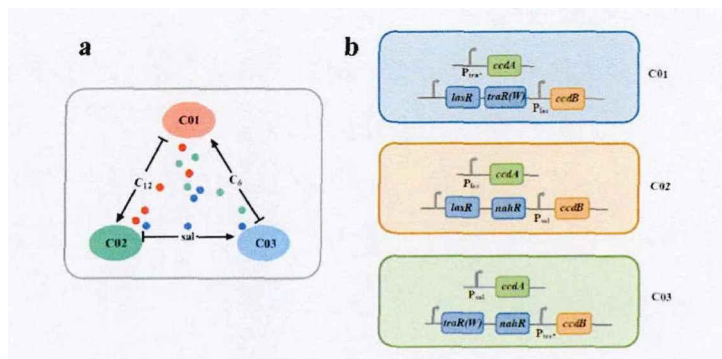


图 3-1 三菌株生态系统

a: 系统的模式图; b: 系统菌株的设计。

该生态系统由 C01、C02、C03 三菌株构成，我们在 C01、C02、C03 菌株的基因组上整合了 *rfp* 报告基因，以便于后续的分析与检测。在 C01 菌株中，表达 Tra\* 系统的受体蛋白 TraR(W) 和 Las 系统的受体蛋白 LasR，以  $P_{tra^*}$  启动子控制 CcdA 表达，以  $P_{las}$  启动子控制 CcdB 表达；在 C02 菌株中，表达 Las 系统的受体蛋白 LasR 和 Sal 系统的受体蛋白 NahR，以  $P_{las}$  启动子控制 CcdA 表达，以  $P_{sal}$  启动子控制 CcdB 表达；在 C03 菌株中，表达 Sal 系统的受体蛋白 NahR 和 Tra\* 系统的受体蛋白 TraR(W)，以  $P_{sal}$  启动子控制 CcdA 表达，以  $P_{tra^*}$  启动子控制 CcdB 表达（图 3-1-b）。

在该生态系统中，加入小分子诱导剂 3OC6HSL，诱导 C01 菌株表达解毒蛋白 CcdA 从而促进生长，诱导 C03 菌株表达毒素蛋白 CcdB 从而抑制生长；加入小分子诱导剂 3OC12HSL，诱导 C02 菌株表达解毒蛋白 CcdA 从而促进生长，诱导 C01 菌株表达毒素蛋白 CcdB 从而抑制生长；加入小分子诱导剂 sal，诱导 C03 菌株表达解毒蛋白 CcdA 从而促进生长，诱导 C02 菌株表达毒素蛋白 CcdB 从而抑制生长（图 3-1-a）。

### 3.3.2 合成生态系统的初步表征

根据上述生态系统的设计，我们构建了菌株 C01、C02、C03，通过加入不同的诱导剂并检测报告蛋白红色荧光的强度来确认菌株生长状态的变化。

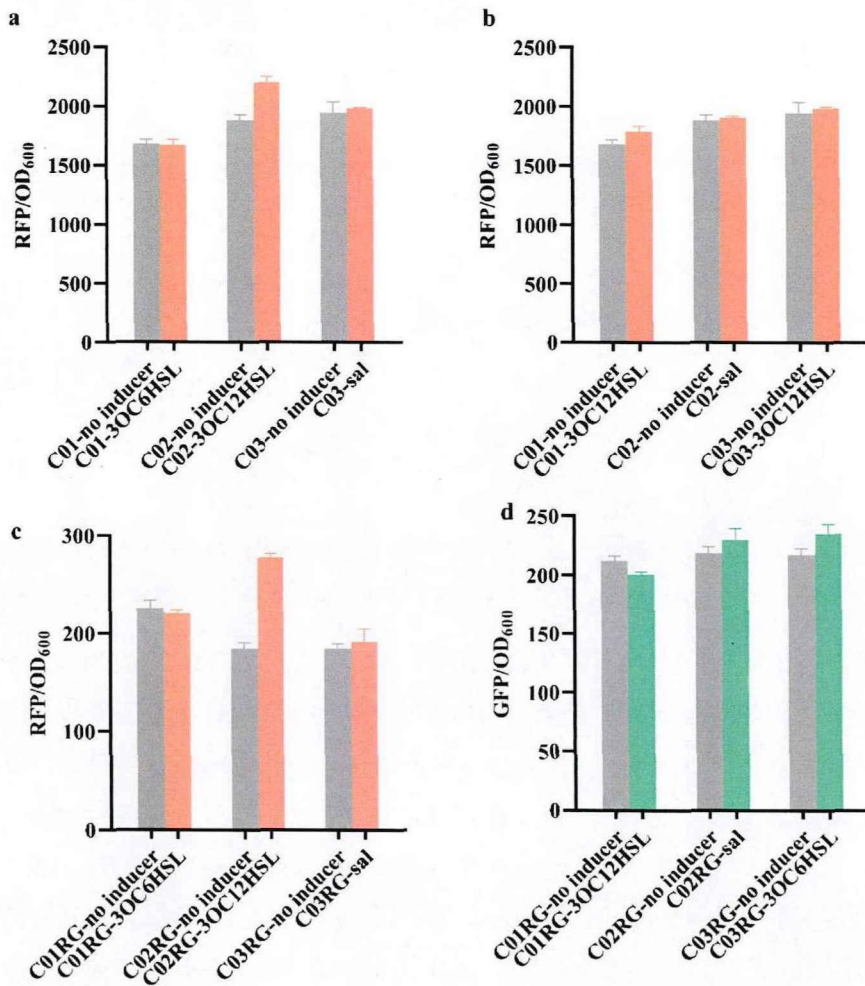


图 3-2 单菌株的初步表征

a: 单菌株促进生长的初步表征；b: 单菌株抑制生长的初步表征；c: 单菌株改造后的 RFP 表征；d: 单菌株改造后的 GFP 表征。

依据该系统的设计，预期结果如下所述。加入小分子诱导剂 3OC6HSL，促进 C01 菌株生长，荧光变强，抑制 C03 菌株生长，荧光变弱；加入小分子诱导剂 3OC12HSL，促进 C02 菌株生长，荧光变强，抑制 C01 菌株生长，荧光变弱；加入小分子诱导剂 sal，促进 C03 菌株生长，荧光变强，抑制 C02 菌株生长，荧光变弱。但是实验结果表明，三株菌的生长状态都没有明显的变化（图 3-2）。造成这一现象的原因可能是：一、菌株本身的 CcdA 泄露较高，完全中和了 CcdB 的毒性；二、群体感应系统自身不工作。

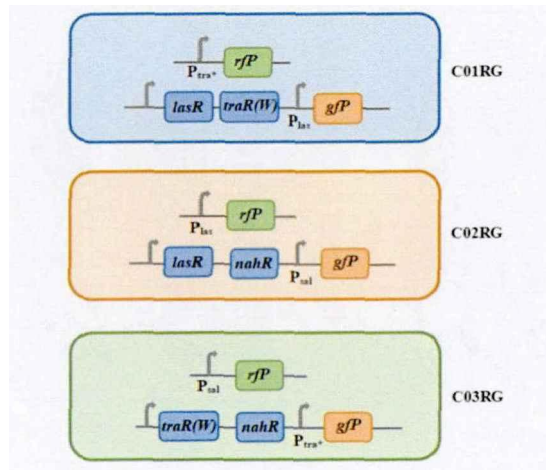


图 3-3 三菌株中 QS 系统的验证

为了探究单菌株生长状态不发生改变的原因，我们将菌株 C01、C02、C03 中的 CcdA 都更换为 RFP，CcdB 都更换为 GFP，得到菌株 C01RG、C02RG 和 C03RG（图 3-3）。随后，分别在不添加诱导剂，向 C01RG 添加信号分子 3OC6HSL 或 3OC12HSL，向 C02RG 添加信号分子 3OC12HSL 或 sal，向 C03RG 添加信号分子 3OC6HSL 或 sal 这三种情况下进行单菌株的表征并检测荧光。如果菌株生长状态不受诱导是因为 CcdA/CcdB 的泄露表达引起的，则更换为报告基因后的菌株在加入诱导剂后荧光强度会有所变化；如果菌株的生长状态不受诱导是因为群体感应系统不工作引起的，则更换为报告基因后的菌株加入诱导剂后荧光强度不会发生变化。

表征结果显示，在加入不同的诱导剂后，C01RG、C02RG、C03RG 的荧光表达并没有明显的变化（图 3-2）。这表明 C01、C02、C03 在添加诱导剂后，三株菌的生长状态都无明显的变化是由于群体感应系统不工作引起的。

### 3.3.3 优化合成生态系统中关键基因的表达

明确菌株的生长状态不受诱导的原因后，我们尝试对系统中关键基因（*traR(W)*、*lasR*、*nahR*、*gfp*、*rfp*）的表达强度进行优化。具体优化方案如图 3-4 所示。我们从 iGEM 元件库中选择了五种不同强度的 RBS，分别为 BBa\_B0030、BBa\_B0032、BBa\_B0033、BBa\_B0034、BBa\_B0035，并分别以 RBS30、RBS32、RBS33、RBS34、RBS35 表示。用上述不同的 RBS 调控关键基因的表达强度，然后对其进行组合并表征，期望筛选到正常工作并且泄露表达较低的群感系统。

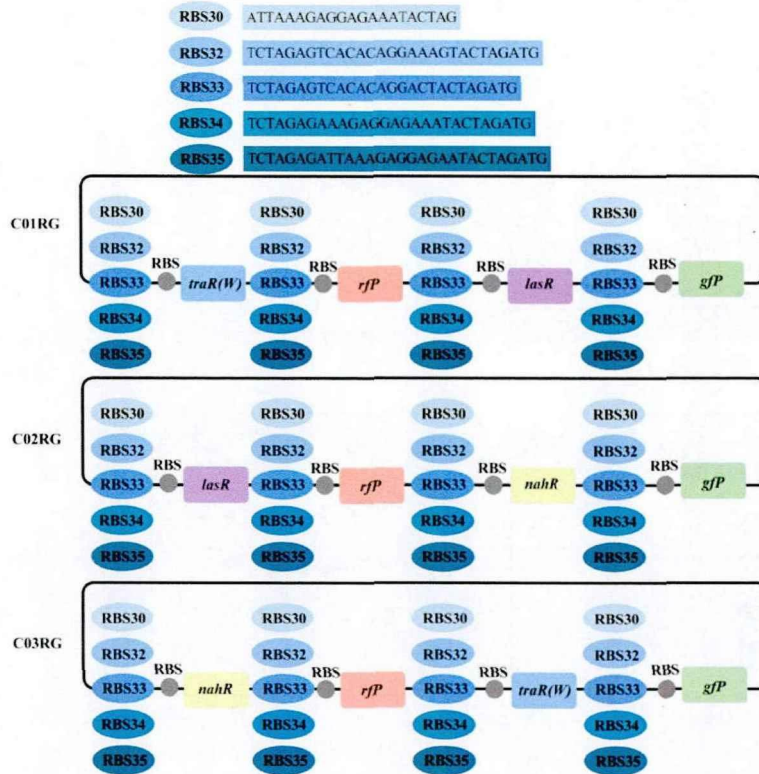


图 3-4 菌株的改造方案

首先我们对 C01RG 进行改造，在 Tra\* QS 系统的改造中构建了 24 个菌株，在 Las QS 系统的改造中构建了 13 个菌株。在对 Tra\* 系统的改造中，当 TraR(W) 的 RBS 为 RBS34，RFP 的 RBS 为 RBS32 时，我们将其简写为 C01R-34-32。结果表明，在 C01R-34-32、C01R-35-32、C01R-34-33、C01R-35-33 中，系统正常工作，但 C01R-34-33、C01R-35-33 的本底泄露水平较高。在 Las 系统的改造中，C01G-30-34 中的系统正常工作且本底泄露低（图 3-5）。最后，我们将 C01RG 中的 RFP/GFP 又更换为 CcdA/CcdB，构建菌株 C01-01、C01-02。C01-01 中 TraR(W) 的 RBS 为 RBS35，CcdA 的 RBS 为 RBS32，LasR 的 RBS 为 RBS30，CcdB 的 RBS 为 RBS34。C01-02 中 TraR(W) 的 RBS 为 RBS34，CcdA 的 RBS 为 RBS32，LasR 的 RBS 为 RBS30，CcdB 的 RBS 为 RBS34。

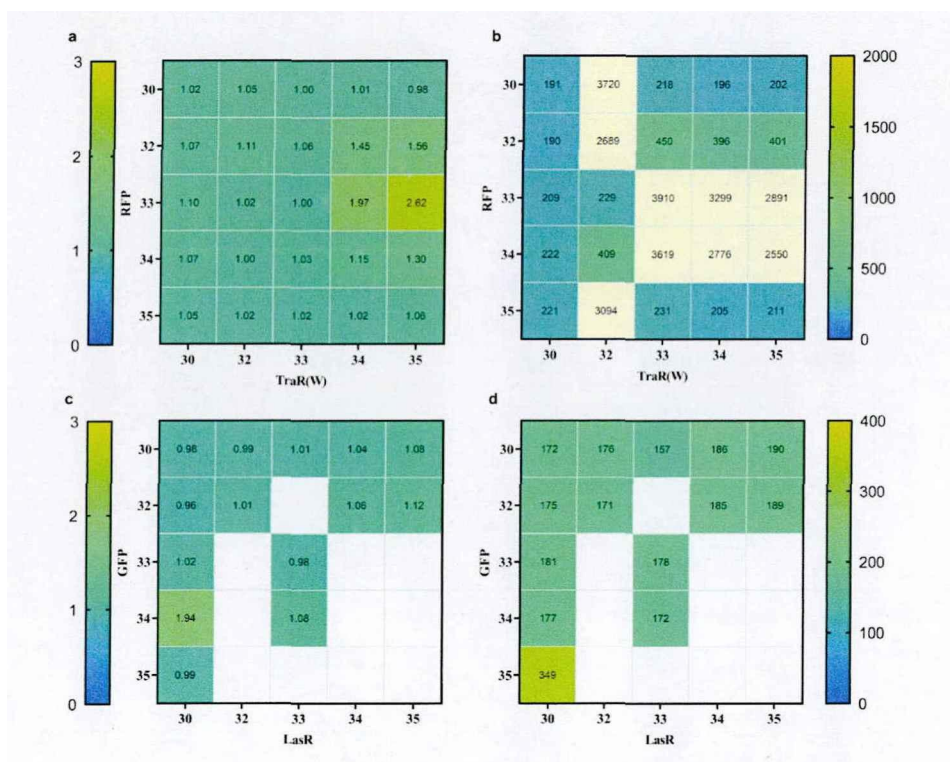


图 3-5 改造后的菌株 C01RG 表征

a: 改造后 Tra\*系统的诱导倍数; b: 改造后 Tra\*系统的本底泄露; c: 改造后 Las 系统的诱导倍数; d: 改造后 Las 系统的本底泄露。横坐标对应的数字代表转录因子的核糖体结合位点, 纵坐标对应的数字为报告基因的核糖体结合位点。

其次我们对 C02RG 进行改造, 在 Las 系统的改造中构建了 23 个菌株, 在 Sal 系统的改造中构建了 3 个菌株对其进行表征, 根据 C01RG 的命名规律对改造后的 C02RG 进行命名。结果表明, C02R-30-34、C02R-32-34、C02R-33-34、C02R-34-34、C02R-35-34 中 Las 系统正常工作, 但本底泄露水平整体都较高, 选择诱导倍数较低和较高的三株菌 C02R-30-34、C02R-33-34、C02R-35-34 进行后续实验。在 Sal 系统的改造, C02G-30-34 和 C02G-30-35 符合预期 (图 3-6)。最后, 我们将 C02RG 中的 RFP/GFP 又更换为 CcdA/CcdB, 理论上经过组合, 可以构建九株菌, 但是在构建过程中部分菌株生长不佳, 舍弃。最后构建菌株 C02-01、C02-02、C02-03、C02-04。C02-01 中 LasR 的 RBS 为 30, CcdA 的 RBS 为 34, NahR 的 RBS 为 30, CcdB 的 RBS 为 34。C02-02 中 LasR 的 RBS 为 33, CcdA 的 RBS 为 34, NahR 的 RBS 为 30, CcdB 的 RBS 为 34。C02-03 中 LasR 的 RBS 为 33, CcdA 的 RBS 为 34, NahR 的 RBS 为 30, CcdB 的 RBS 为 35。C02-04 中 LasR 的 RBS 为 35, CcdA 的 RBS 为 34, NahR 的 RBS 为 30, CcdB 的 RBS 为 34。

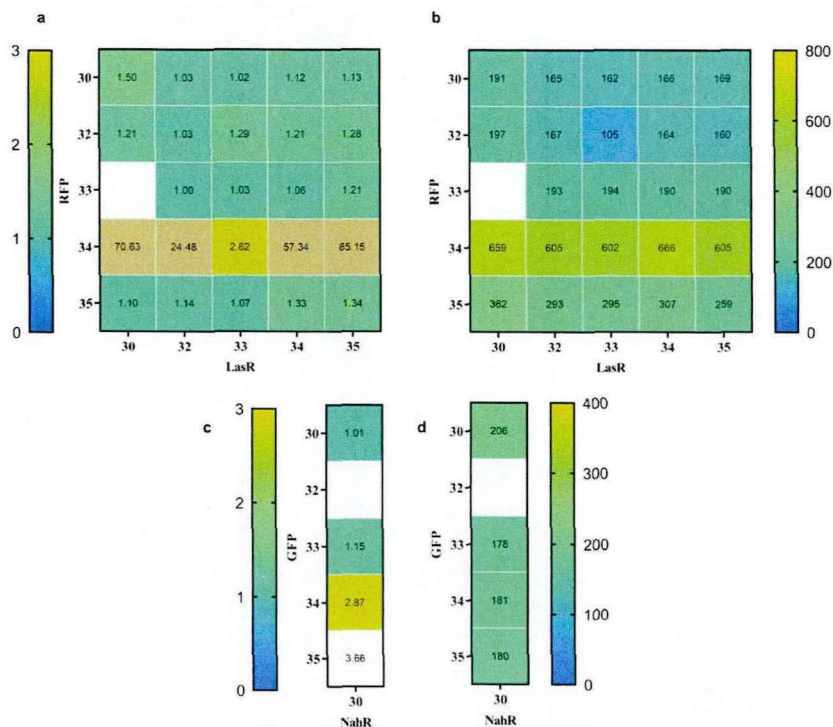


图 3-6 改造后的菌株 C02RG 表征

a: 改造后 Las 系统的诱导倍数; b: 改造后 Las 系统的本底泄露; c: 改造后 Sal 系统的诱导倍数; d: 改造后 Sal 系统的本底泄露。横坐标对应的数字代表转录因子的核糖体结合位点, 纵坐标对应的数字为报告基因的核糖体结合位点。

最后我们对 C03RG 进行改造, 在 Sal 系统的改造中构建了 3 个菌株, 在 Tra\* 系统的改造中构建了 4 个菌株对其进行表征。根据 C01RG 的命名规律对改造后的 C03RG 命名。在 Sal 系统的改造中, C3R-30-34、C03R-30-35 中的 Sal 系统正常工作, 但 C03R-30-35 本底泄露水平较高。在 Tra\* 系统的改造中, C03G-30-34 和 C03G-30-35 符合预期 (图 3-7)。最后, 我们将 C03RG 中的 RFP/GFP 又更换为 CcdA/CcdB, 理论上经过组合, 可以构建两株菌, 但是在构建过程中有一株菌生长不佳, 舍弃。最后构建菌株 C03-01。C03-01 中 NahR 的 RBS 为 RBS30, CcdA 的 RBS 为 RBS34, TraR(W) 的 RBS 为 RBS30, CcdB 的 RBS 为 RBS34。

综上所述, 在进行优化之后, 我们得到了表征良好的单菌株 C01-01、C01-02、C02-01、C02-02、C02-03、C02-04、C03-01, 作为后续合成系统构建的菌株候选。

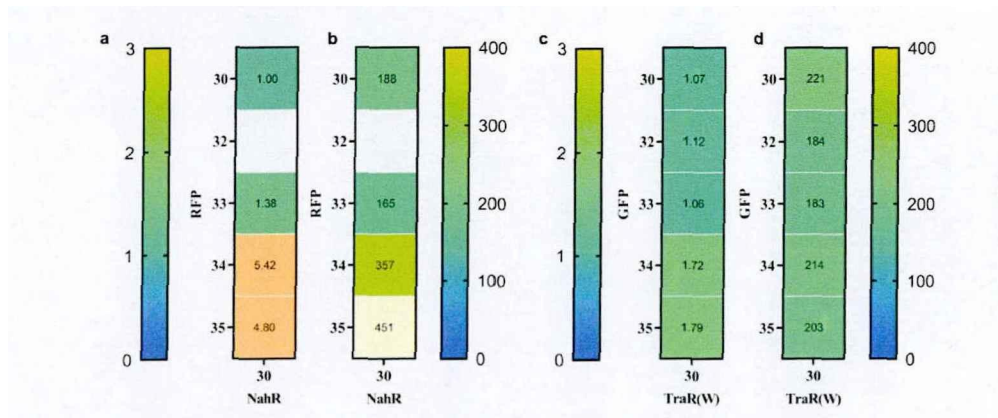


图 3-7 改造后的菌株 C03RG 表征

a: 改造后 Sal 系统的诱导倍数; b: 改造后 Sal 系统的本底泄露; c: 改造后 Tra\*系统的诱导倍数; d: 改造后 Tra\*系统的本底泄露。横坐标对应的数字代表转录因子的核糖体结合位点, 纵坐标对应的数字为报告基因的核糖体结合位点。

### 3.3.4 合成生态系统的构建和表征

在三株菌共培养时, 选择用菌株基因组上稳定表达的报告基因的荧光值来反映生长, 但是在用酶标仪检测荧光时, 荧光不同误差也会不同, 例如红色荧光的强弱和菌体生长无关, 而绿色荧光受生长影响较大。为了减少误差, 我们选用单色荧光来表示三株菌各自的生长状态。每组实验有三个对照, 每个对照组仅有一个菌株基因组表达 RFP, 其他两个菌株不表达 RFP, 因为 RFP 的荧光值几乎不受 OD<sub>600</sub> 的影响, 所以每个对照组的荧光强度代表不同的菌株在生态系统中的生长状态。

我们对上述菌株进行组合, 进行共培养的表征, 其中 C01-02、C02-02 和 C03-01 在共培养过程中的生长状态相差不大。

我们尝试添加不同的诱导剂组合来表征合成生态系统的种群变化。在不添加任何诱导剂时, C01-02 是优势菌株, C03-01 生长缓慢。加入诱导剂组合 1 (3OC12HSL+3OC6HSL), 3OC12HSL 会促进 C02-02 生长, 抑制 C01-02 生长, 3OC6HSL 会促进 C01-02 生长抑制 C03-01 生长; 在这个组合中, C01-02 生长受 3OC12HSL 抑制 3OC6HSL 促进, 但 3OC12HSL 的抑制更明显, C02-02 的生长受 3OC12HSL 的影响促进, C03-01 受 3OC6HSL 诱导抑制, 最终 C02-02 是优势菌株。加入诱导剂组合 2 (3OC12HSL+sal), 3OC12HSL 会促进 C02-02 生长抑制 C01-02 生长, sal 会促进 C03-01 生长抑制 C02-02 生长; 在这个组合中, C01-02 生长受 3OC12HSL 抑制, C02-02 的生长既受 sal 的诱导抑制又受 3OC12HSL 的影响促进, 但 sal 的抑制更加明显, 导致 C02-02 最终生长缓慢, C03-01 受 sal 诱导促进生长, 最终 C03-01 是优势菌株。加入诱导剂组合 3 (3OC6HSL+sal),

3OC6HSL 会促进 C01-02 生长抑制 C03-01 生长, sal 会促进 C03-01 生长抑制 C02-02 生长; 在这个组合中, C01-02 受 3OC6HSL 诱导促进生长, C02-02 的生长受 sal 抑制, 生长缓慢, C03-01 的生长既受 3OC6HSL 的诱导抑制又受 sal 的影响促进, 但 3OC6HSL 的抑制更加明显, 生长缓慢, 最终 C01-02 是优势菌株 (图 3-8)。经过多次重复, 生态系统中优势菌株的转变仍然是相同的, 表明系统在这种生长环境下很稳定。

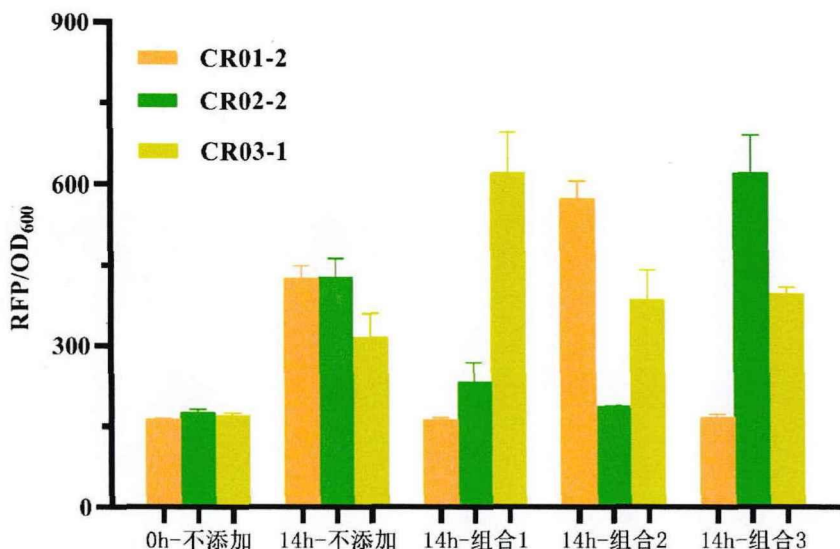


图 3-8 优势种群转化的共培养表征

### 3.4 本章小结

本章构建了一个三菌株人工合成生态系统。该系统中的通讯模块为 Las、Tra\* 和 Sal 群体感应系统, 效应模块选择 *ccd* 毒素系统。首先构建出三株菌分别进行表征, 但是结果显示菌株生长不受调控, 经过分析和设计实验验证后, 证明原因是群体感应系统不工作。接下来, 我们对每株菌中的两个系统分别进行改造, 优化关键基因 (*traR(W)*、*lasR*、*nahR*、*gfp*、*rfp*) 的表达强度, 成功筛选到了系统可以正常工作并且本底泄露低的单个菌株。

在进行合成生态系统的构建和表征过程中, C01-02、C02-02 和 C03-01 三菌株能够稳定共存并且生长状态相差不大。在后续试验中, 我们通过加入不同的诱导剂组合, 成功实现了合成生态系统中优势菌株的转变。我们使用信号分子作为基本的环境因素, 初步构建了一个微生物合成生态系统, 演示了外部因素如何影响优势种群的转变。这个有趣的现象可能有助于阐明自然界中优势物种的转变。

同时，在代谢工程中，生产途径越复杂菌株代谢压力越大。该生态系统还可以应用到生产中，将生产途径分为多个模块，构建到不同的菌株中，减少生产菌株的代谢压力，同时通过添加不同的诱导剂，将生产菌株转换为优势菌。

## 第四章 三层动态调控系统的构建及应用

在微生物中引入外源代谢途径在一定程度上会与宿主正常代谢争夺有限的细胞资源，导致生长压力。另外，外源基因的过早表达可能会导致细胞毒性从而影响细胞生长。基于群体感应的动态调控可以重新分配细胞资源，平衡细胞生长与代谢产物生产之间的矛盾，是代谢工程中缓解代谢负担的有效手段。

前体物的积累可以在一定程度上提高产物产量。而前体物的积累主要有两个方面：一、过表达基因，二、通过敲除相关的基因来阻止其进入别的代谢途径。必需基因的敲除可能会使菌株转变为营养缺陷型菌株，生长变差甚至不生长，通过额外添加菌株所缺乏的营养物质能够恢复生长，但是增加了生产成本。结合动态调控元件利用人工反式编码小 RNA 去动态抑制基因表达是解决上述问题的有效方案。

本实验中，选择上一部分实验应用的正交的 Las 系统、Tra\*系统和与它们正交的稳定期特异性启动子元件设计和构建一个具有表达时间差的三层调控系统。在该系统中，首先开启的是  $P_{las}$  启动子；其次是开启的稳定期特异性启动子  $P_{31}$ ；最后开启的是  $P_{tra^*}$  启动子。然后将该系统应用到 3-羟基丙酸的生产调控中以验证其应用潜力。实验菌株在摇瓶发酵中的 3-羟基丙酸的产量达到 7.0 g/L，相比于采取静态调控、单层调控和双层调控方案的生产菌株，产量分别提高了 27%、13%、8%。与现有的动态调控方案相比，该三层调控系统能够同时解决平衡细胞资源分配、特定时期调控外源基因表达和逐级累积中间产物以减少代谢负担的重要问题，在代谢工程中有较大的应用潜力。

### 4.1 实验材料

#### 4.1.1 实验菌株和质粒

本章节所使用的菌株和质粒如表 4-1 所示。

表 4-1 菌株和质粒

Strains and Plasmids	Relevant characteristic	Source
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15</i> <i>Δ lacX74nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697</i> <i>galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-</i>	Lab stock

续表 4-1 菌株和质粒

Strains and Plasmids	Relevant characteristic	Source
Tra*01	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pTra*-107	This study
Tra*02	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pTra*-108	This study
Tra*03	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pTra*-100	This study
Tra*04	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pTra*-114	This study
Las01	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pLas-107	This study
Las02	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pLas-100	This study
Las03	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pLas-114	This study
StrainP-1.1	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pP-1.1	This study
StrainP-2.1	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pP-2.1	This study
StrainP-3.1	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pP-3.1	This study
StrainG-MicC2	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pGFP-MicC2	This study
Strain1	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pH-ACC and pL-M CR	This study
Strain2	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pH-3.1-ACC and pL-3.1-MCR	This study
Strain3	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pH-3.1-ACC-tra-fabD and pL-3.1-MCR	This study
Strain4	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pH-3.1-ACC and pL-3.1-MCR-las-gltA	This study
Strain5	<i>E. coli</i> TOP10 harboring pH-3.1-ACC-tra-fabD and pL-3.1-MCR-las-gltA	This study
pTra*-107	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23107-RBS 30- <i>esal</i> , BBa_J23104-RBS 30- <i>traR(W)</i> , P <sub>tra+</sub> - <i>gfp</i> , ori pBR322	This study

续表 4-1 菌株和质粒

Strains and Plasmids	Relevant characteristic	Source
pTra*-108	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23108-RBS 30- <i>esal</i> , BBa_J23104-RBS 30- <i>traR(W)</i> , P <sub>tra*</sub> - <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pTra*-100	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23100-RBS30- <i>esal</i> , BBa_J23104-RBS30- <i>traR(W)</i> , P <sub>tra*</sub> - <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pTra*-114	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23114-RBS30- <i>esal</i> , BBa_J23104-RBS30- <i>traR(W)</i> , P <sub>tra*</sub> - <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pLas-107	Amp <sup>R</sup> , BBa_J23107-RBS30- <i>lasI</i> , BBa_J23104-RBS30- <i>lasR</i> , P <sub>las</sub> - <i>gfp</i> , ori p15A	This study
pLas-100	Amp <sup>R</sup> , BBa_J23100-RBS30- <i>lasI</i> , BBa_J23104-RBS30- <i>lasR</i> , P <sub>las</sub> - <i>gfp</i> , ori p15A	This study
pLas-114	Amp <sup>R</sup> , BBa_J23114-RBS30- <i>lasI</i> , BBa_J23104-RBS30- <i>lasR</i> , P <sub>las</sub> - <i>gfp</i> , ori p15A	This study
pP-1.1	Cm <sup>R</sup> , P <sub>1.1</sub> - <i>gfp</i> , ori p15A	This study
pP-2.1	Cm <sup>R</sup> , P <sub>2.1</sub> - <i>gfp</i> , ori p15A	This study
pP-2.1	Cm <sup>R</sup> , P <sub>3.1</sub> - <i>gfp</i> , ori p15A	This study
pGFP-MicC2	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23100-RBS30- <i>gfp</i> , P <sub>sal</sub> -MicC2- <i>gfp</i> , ori pBR322	This study
pMCR	Amp <sup>R</sup> , BBa_J23104-RBS30- <i>lacR</i> , P <sub>lac</sub> - <i>mcR</i> , ori pBR322	This study
pH-ACC	Cm <sup>R</sup> , BBa_J23107-RBS30- <i>acC</i> , ori pBR322	This study
pL-MCR	Amp <sup>R</sup> , BBa_J23104-RBS30- <i>mcR</i> , ori p15A	This study
pH-3.1-ACC	Cm <sup>R</sup> , P <sub>3.1</sub> -RBS30- <i>acC</i> , ori pBR322	This study
pL-3.1-MCR	Amp <sup>R</sup> , P <sub>3.1</sub> -RBS30- <i>mcR</i> , ori p15A	This study

续表 4-1 菌株和质粒

Strains and Plasmids	Relevant characteristic	Source
pH-3.1-ACC-tra-fabD	Cm <sup>R</sup> , P <sub>3.1</sub> -RBS30- <i>acC</i> , BBa_J23100-RBS30- <i>esaI</i> , BBa_J23104-RBS30- <i>traR(W)</i> , P <sub>tra*</sub> -MicC1-fabD, ori pBR322	This study
pL-3.1-MCR-las-gltA	Amp <sup>R</sup> , P <sub>3.1</sub> -RBS30- <i>mcR</i> , BBa_J23100-RBS30- <i>lasI</i> , BBa_J23104-RBS30- <i>lasR</i> , P <sub>las</sub> -MicC2-gltA, ori p15A	This study

#### 4.1.2 实验引物

本章节所使用的引物如表 4-2 所示。

表 4-2 引物

Name	Sequence
107-ESAI-1	CCCTAGGTATTATGCTAGCTCTAGAGTCACACAGGACTACT AGATGGATGCTGGAGCTGTTCGACG
107-ESAI-2	GTGACTCTAGAGCTAGCATAATACCTAGGGCTGAGCTAGC CGTAAACATGAGCAGATCCTCTACGCC
108-ESAI-1	TCCTAGGTATAATGCTAGCTCTAGAGTCACACAGGACTAC TAGATGGATGCTGGAGCTGTTCGACG
108-ESAI-2	TCCTAGGTATAATGCTAGCTCTAGAGTCACACAGGACTAC TAGATGGATGCTGGAGCTGTTCGACG
Tra-1	CCTAGGTACAGTGCTAGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATA CTAGATGGATGCTGGAGCTGTTCGAC
Tra-2	TCTTTCTCTAGAGCTAGCACTGTACCTAGGACTGAGCTAG CCGTCAACATGAGCAGATCCTCTACGCC

续表 4-2 引物

Name	Sequence
114-ESAI-1	TCCTAGGTACAATGCTAGCTCTAGAGTCACACAGGACTAC TAGATGGATGCTGGAGCTGTTTCGACG
114-ESAI-2	GTGACTCTAGAGCTAGCATTGTACCTAGGACTGAGCTAGC CATAAACATGAGCAGATCCTCTACGCC
107-LASI-2	GTGACTCTAGAGCTAGCATAATACCTAGGGCTGAGCTAGC CGTAAACACGAATTCGAAATGTGCGCTT
107-LASI-1	CCCTAGGTATTATGCTAGCTCTAGAGTCACACAGGACTACT AGATGGATGATCGTACAAATTGGTCGGCG
Las-1	TCTTTCTCTAGAGCTAGCACTGTACCTAGGACTGAGCTAG CCGTCAACACGAATTCGAAATGTGCGCTTC
Las-2	CCTAGGTACAGTGCTAGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATA CTAGATGGATGATCGTACAAATTGGTCGGCG
114-LASI-1	GTGACTCTAGAGCTAGCATTGTACCTAGGACTGAGCTAGC CATAAACACGAATTCGAAATGTGCGCTTC
114-LASI-2	TCCTAGGTACAATGCTAGCTCTAGAGTCACACAGGACTAC TAGATGGATGATCGTACAAATTGGTCGGCG
P3-F	CTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAATGACGGTCGGG TAACTACCAC
P3-R	CTAGTATTTCTCCTCTTTCT
107-ACC-1	CCGCTTACAGACAAGCACTGCGACTCCTGCATTAG
107-ACC-2	GCAGGAGTCGCAGTGCTTGTCTGTAAGCGGATGCC
J04-MCR-1	CACCTGACGTCTAAGCACGAATTCGAAATGTGCGC

续表 4-2 引物

Name	Sequence
J04-MCR-2	CATTTCGAATTCGTGCTTAGACGTCAGGTGGCACC
3.1-ACC-1	GACAAGCTGTGACCGGACGGTCGGGTAAC TACCAC
3.1-ACC-2	AGTTACCCGACCGTCCGGTCACAGCTTGTCTGTAAG
MCR-3.1-1	CACCTGACGTCTAAGGAATTCGAAATGTGCGCCGAC
MCR-3.1-2	GCACATTTCGAATTCCTTAGACGTCAGGTGGCACC
Las-gltA-1	ACCGAAATCTATCTCATTGCTAGTTATAAAAATTATGAAATTT GCGTAAATTCTTCAGGGTGAGTTTTGCTTTTGTATCAGCC
Las-gltA-2	TTATAACTAGCAAATGAGATAGATTTCCGGTGAACCCGGACC CTTGCTAGGCTCGAACTTAGACGTCAGGTGGCACC
Las-gltA-3	CTTTTCTCTTCTCAAGGCGTATCACGAGGCAGAATTC
Las-gltA-4	GCCTCGTGATACGCCTTGAGAAGAGAAAAGAAAACCGCCG
Micc-fabd-3	ACTGATTTTCCAACATATAAAAAGACAACATCCCGACCCCC TCAGGGTCGGGATTTTTTTTGGAAACACAGAAA
Micc-fabd-2	GGCAATGCAATGGCCCAACAGAAACGCGCTGGTTCGTTTC TAGGATAAGGATATTCGACTATAACAA
Tra-fabd-3	TTTTTCGACCAAAGGCCGAAACAAGCGCTCATGAG
Tra-fabd-4	GAGCGCTTGTTTTCGGCCTTTGGTCGAAAAAAAAAAGCCCG

#### 4.1.3 培养基

同 2.1.3

#### 4.1.4 相关试剂和缓冲液

同 2.1.4

#### 4.1.5 常用生化试剂

同 2.1.5

#### 4.1.6 常用试剂盒

同 2.1.6

#### 4.1.7 仪器与设备

同 2.1.7

### 4.2 实验方法

#### 4.2.1 关键基因表达强度的调整

同 2.2.3

#### 4.2.2 系统的表征

同 2.2.5

#### 4.2.3 常规发酵检测手段

##### (1) 3-羟基丙酸的摇瓶发酵

1) 种子活化: 从-80°C冰箱取出菌株, 将少量菌液划线至相应抗性的 LB 平板, 37°C培养 12 h。挑取单菌落接种至含有相应抗性的 LB 液体培养基的试管中, 37°C、220 rpm 培养 12 h。

2) 摇瓶发酵: 将试管中的种子按照 2%的接种量转接至含有相应抗性的 50 mL M9 液体培养基的锥形瓶中, 添加 20 g/L 葡萄糖, 800  $\mu$ L 的生物素母液, 125  $\mu$ L 的 20%的硫酸镁母液。在 30°C, 220 rpm 的条件下培养发酵, 每组分批发酵均进行三个平行实验。

##### (2) 分光光度计测定生长曲线

取 1 mL 发酵菌液于 EP 管中, 12000 rpm 离心 1 min 后弃上清, 向菌体沉淀中加入适量 ddH<sub>2</sub>O, 吹吸混匀重悬菌体, 适当稀释菌体直至吸光度为 0.1-0.8 左右。检测细胞在 600 nm 波长处的吸光度, 并换算出细胞浓度, 由此绘制细胞生长曲线。

##### (3) 高效液相色谱法检测 3-羟基丙酸

HPLC 具体检测方法参照文献<sup>[97]</sup>。

### 4.3 实验结果与讨论

#### 4.3.1 群体感应系统的选择及设计

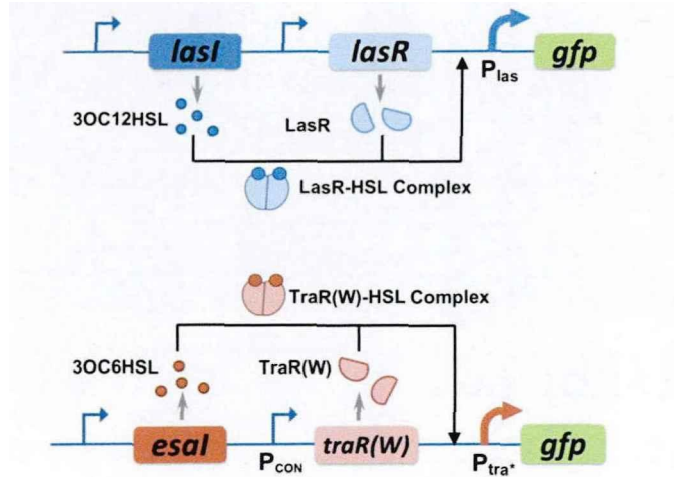


图 4-1 群体感应系统的工作原理

经过查阅文献以及结合实验室前期工作，我们选择了正交性较好的 Las QS 系统和 Tra\* QS 系统。然后在 Las QS 系统中，以 AHL 合成酶 LasI 产生的 3OC12HSL 作为信号分子，受体蛋白是 LasR，启动子是 P<sub>las</sub>。在 Tra\* QS 系统中，以 AHL 合成酶 EsaI 产生的 3OC6HSL 作为信号分子，受体蛋白是 TraR 突变体 TraR(W)，启动子是经过突变的 P<sub>tra\*</sub>（图 4-1）。

AHL 合酶的表达强度会影响信号分子到达响应阈值的时间，即影响群体感应的开启时间。为了获得不同开启时间的 Tra QS 系统和 Las QS 系统，我们以调整 AHL 合酶的表达强度为切入点，分别用不同强度的启动子 J23107、J23108、J23100、J23114 (<http://parts.igem.org/>) 调控 EsaI 或 LasI 的表达，进行群体感应系统的筛选。

对于 Tra QS 系统，我们用上述不同强度的组成型启动子表达 EsaI，组成型表达 TraR(W)，P<sub>tra\*</sub> 诱导表达 GFP，构建质粒 pTra\*-107、pTra\*-108、pTra\*-100、pTra\*-114。将质粒 pTra\*-107、pTra\*-108、pTra\*-100、pTra\*-114 分别转入 *E. coli* TOP10 中，构建菌株 Tra01、Tra02、Tra03、Tra04。在 24 孔板中进行表征，用酶标仪检测绿色荧光。在 Tra\* 系统的开启时间上，菌株 Tra01 和 Tra04 的开启时间最早，GFP 在 4 h 开始表达；Tra02 次之，GFP 在 4.5 h 开始表达；Tra03 的开启时间最晚，GFP 在 9.5 h 开始表达（图 4-2）。

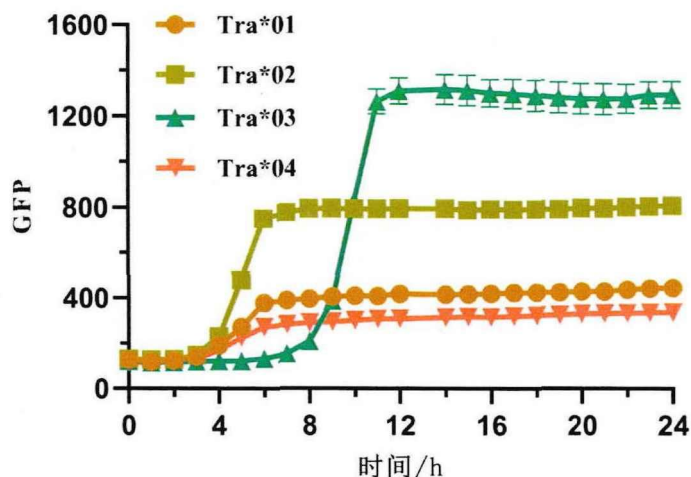


图 4-2 改造后的Tra\*系统的表征

对于 Las QS 系统，用上述不同强度的组成型启动子表达 LasI，组成型表达 LasR， $P_{las}$  诱导表达 GFP，构建质粒 pLas-107、pLas-100、pLas-114。将质粒 pLas-107、pLas-100、pLas-114 分别转入 *E. coli* TOP10 中，构建菌株 Las01、Las02、Las03。在 24 孔板中进行表征，用酶标仪检测绿色荧光。在 Las 系统的开启时间上，菌株 Las02 的开启时间较早，GFP 在 3 h 开启表达；Las03 和 Las01 开启时间较晚，GFP 在 4 h 开启表达（图 4-3）。

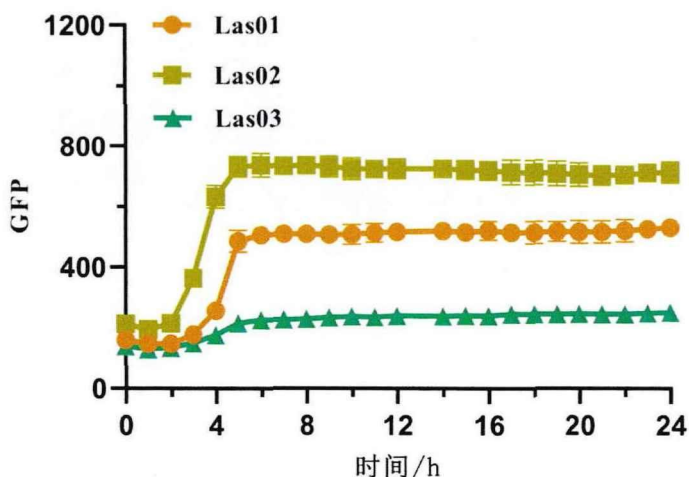


图 4-3 改造后的Las系统的表征

### 4.3.2 稳定期特异性启动子系统的选择及设计

稳定期特异性启动子是微生物基因组中的一类诱导型启动子。这类启动子的开启不需要诱导剂，通过响应菌体的生长来开启基因的表达<sup>[44]</sup>。我们选择三个已经报道的可以在 *E. coli* 中工作的稳定期特异性启动子  $P_{1.1}$ 、 $P_{2.1}$ 、 $P_{3.1}$  诱导表达报

告基因 *gfp*。表征结果表明：在 *E. coli* TOP10 中，三个系统都是在 5.5 h 开始表达，P<sub>3.1</sub> 的诱导强度最高，P<sub>1.1</sub> 的诱导强度最低（图 4-4）。

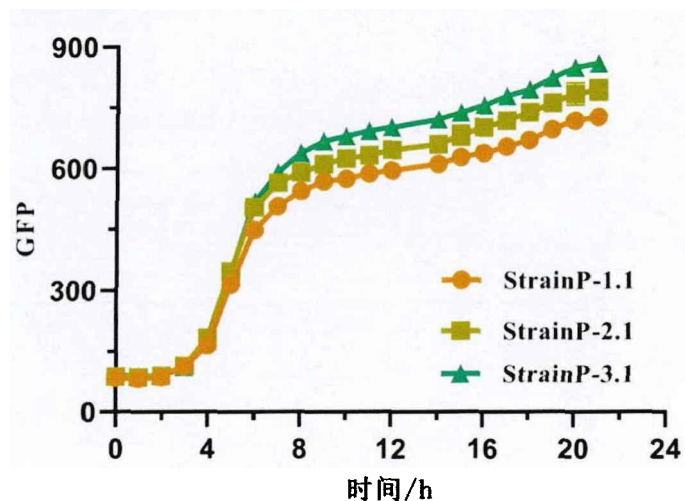


图 4-4 稳定期特异性启动子系统的表征

### 4.3.3 三层调控系统的构建

通过对 Tra\*系统、Las 系统和稳定期特异性启动子系统进行分析，选择出三个诱导最大值较高、系统开启时间上有一定时间差的系统，进行组合，构建一个三层调控系统（图 4-5）。在三层调控系统中，随着菌体生长，首先开启的是 Las 系统，开启时间为 3 h；其次是稳定期特异性启动子 P<sub>3.1</sub> 系统开启，开启时间为 5.5 h；最后开启的是 Tra\*系统，开启时间为 9.5 h。该三层调控系统完能够在不同的时间点自主开启不同基因的表达。接下来，我们尝试将该三层动态调控系统应用 3-HP 的生产调控中以验证其在代谢工程中的应用潜能。

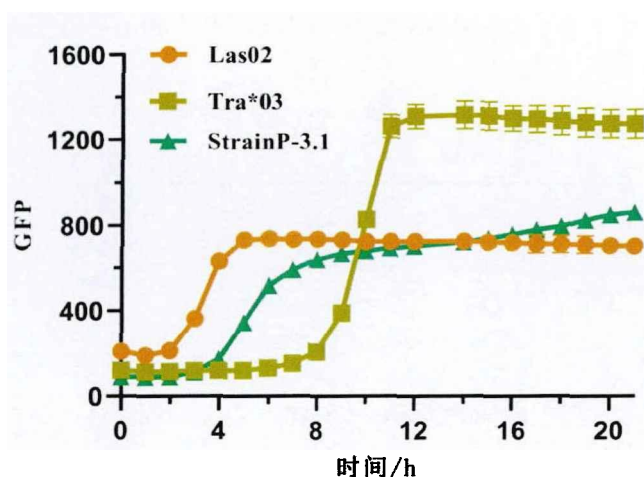


图 4-5 三层调控系统的表征

### 4.3.4 三层调控系统调控 3-羟基丙酸的生产

3-HP 是一种很有前途的高附加值化学品。在 *E.coli* 中主要是通过丙二酰辅酶 A 途径以葡萄糖作为前体合成 3-HP。在该途径中，乙酰辅酶 A 被乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 转化为丙二酰辅酶 A，之后丙二酰辅酶 A 被通过 NADPH 依赖性的丙二酰辅酶 A 还原酶 (MCR) 催化的两步反应转化为 3-HP (图 4-6)。MCR 由两个不同的功能结构域组成：MCR-C 催化丙二酰辅酶 A 还原为丙二酰半醛 (MSA)，MCR-N 催化 MSA 还原为 3-HP，整个反应总共消耗两分子 NADPH。其中的重要限速步骤是 ACC 和 MCR，研究表明，ACC 和 MCR 过早的表达会阻碍细胞生长，从而降低三羟基丙酸的产量。

在大肠杆菌中生产 3-HP 首先需要引入外源基因 *acc*、*mcr* 构建生产线路。我们首先组成型表达 ACC、MCR，构建 3-HP 生产的基础菌株 Strain1。

#### 3-HP生产途径

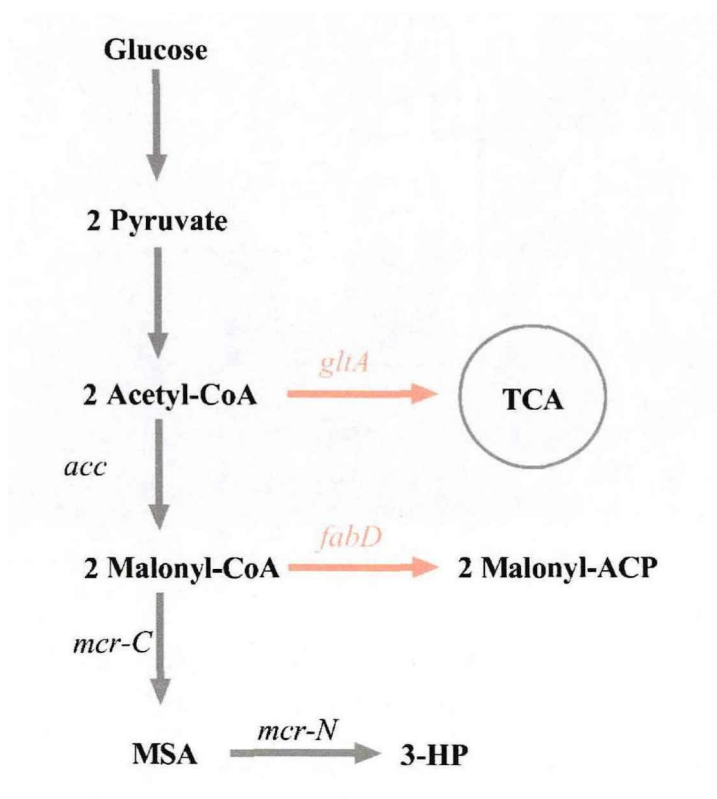


图 4-6 3-HP 的生产途径

为了充分验证三层调控的有效性和应用潜力，我们分别设计了静态调控、单层调控和双层调控的对照组。

第一步，构建单层动态调控生产 3-HP 的菌株 Strain2，相比于 Strain1，Strain2 通过稳定期特异性启动子  $P_{3.1}$  响应生长来动态开启 ACC 和 MCR 的表达。菌株

构建成功后进行摇瓶发酵，发酵结果表明，Strain1 和 Strain2 的生长曲线和葡萄糖消耗相差不大，Strain2 中 3-HP 的产量有所提高，由 Strain1 的 5.5 g/L 提高到 6.2 g/L（图 4-7）。在 3-HP 合成过程中，ACC 蛋白会对细胞产生毒性，动态调控其表达能够有效缓解生长前期蛋白对细胞的毒性，从而提高了最终的产量。

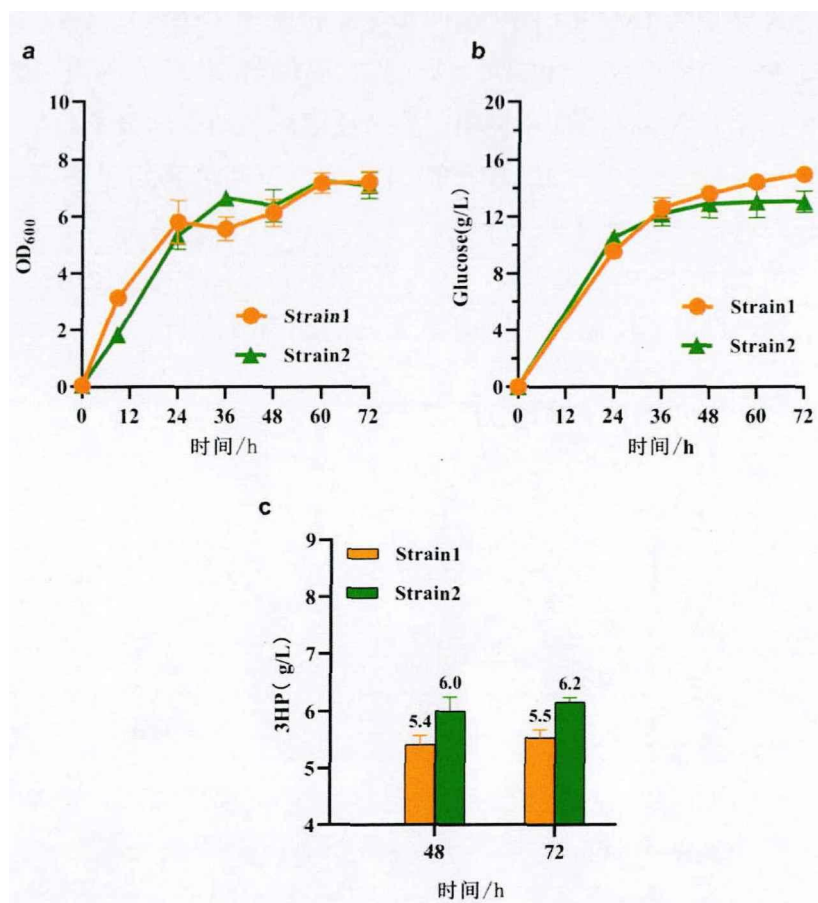


图 4-7 单层动态调控生产菌株发酵

a: Strain1 和 Strain2 的发酵生长曲线; b: Strain1 和 Strain2 的发酵过程中的糖耗; c: Strain1 和 Strain2 发酵中的 3-HP 产量。

第二步，我们尝试构建双层动态调控的菌株。在代谢工程中，提高中间产物的积累量能够有效提高产量。在 3-HP 的生产途径中，两种中间产物乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 除了流向 3-HP 还会流向其他途径。乙酰辅酶 A 会流向 TCA 循环，催化这一步反应的酶是柠檬酸合酶，由 *gltA* 编码；丙二酰辅酶 A 会流向脂肪酸循环，催化这一步反应的酶是丙二酰辅酶 A 转酰酶，由 *fabD* 编码，研究表明，*gltA* 和 *fabD* 是细菌生长的必需基因，必需基因敲除后细胞死亡。我们将群体感应系统和人工反式编码小 RNA 结合去动态抑制 *gltA* 或 *fabD* 的表达以减少对细胞的影响。这一步，我们构建了两种双层调控生产菌株 Strain3 和 Strain4。

在 Strain3 中，我们选择将 Tra\*系统与人工反式编码小 RNA (MicC1) 系统

相结合去动态抑制 *fabD*，积累丙二酰辅酶 A，用  $P_{3.1}$  启动子诱导基因 *acc*、*mcr* 表达。在发酵刚开始时，菌体量较少，产生的 AHL 量不足以开启群体感应系统，当菌体量达到一定的  $OD_{600}$ ，群体感应系统的启动子开始表达诱导 MicC1 来抑制 *fabD*，从而减少丙二酰辅酶 A 流向脂肪酸循环，从而流向 3-HP 的生产途径中。

在 Strain4 中，我们选择将 Las\* 系统与人工反式编码小 RNA (MicC2) 系统相结合去动态抑制 *gltA*，积累乙酰辅酶 A，用  $P_{3.1}$  启动子诱导基因 *acc*、*mcr* 表达。在发酵刚开始时，菌体量较少，产生的 AHL 量不足以开启群体感应系统，当菌体量达到一定的  $OD_{600}$ ，群体感应系统的启动子开始表达诱导 MicC1 抑制 *gltA*，从而减少乙酰辅酶 A 流向 TCA 循环，从而流向 3-HP 的生产途径中。

对 Strain1、Strain2、Strain3、Strain4 进行摇瓶发酵。Strain3 的产量相比于 Strain1 提高了 18%，生长也有一定改善，糖耗相差不大。然而 Strain4 的产量最终比 Strain1 低，葡萄糖消耗变多 (图 4-8)。抑制 *gltA*，积累乙酰辅酶 A，进而积累丙二酰辅酶 A，但是丙二酰辅酶 A 更多地流向了脂肪酸合成途径而不是 3-HP 合成途径，所以 Strain4 的产量低于 Strain1 的产量。引入第三层动态调控可能能够解决这一问题。

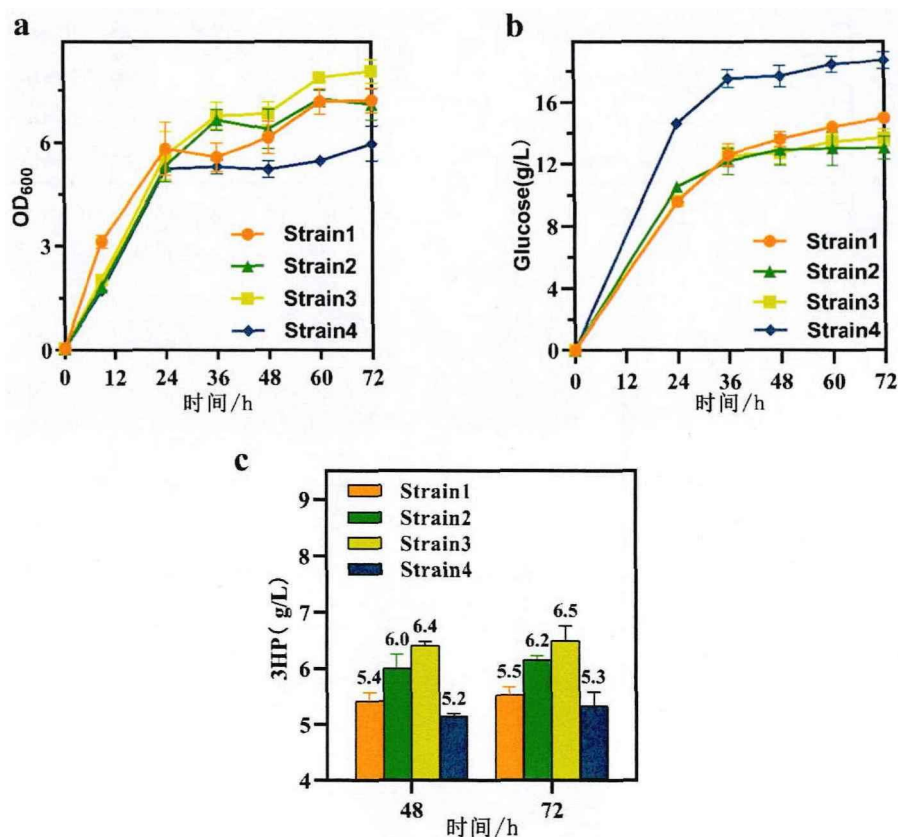


图 4-8 双层动态调控生产菌株发酵

a: 发酵生长曲线; b: 发酵过程中的糖耗; c: 发酵中的 3-HP 产量。

接下来，我们设计了三层调控生产菌株 Strain5。将 Las 系统和 MicC2 结合去动态抑制 *gltA*，Tra\*系统与 MicC1 系统相结合去动态抑制 *fabD*，P<sub>3.1</sub> 启动子诱导基因 *acc*、*mcr* 表达。在该调控过程中，细菌先生长，当生长到一定的 OD<sub>600</sub> 后，Las 系统开启，进而抑制 *gltA*，积累乙酰辅酶 A，然后稳定期特异性启动子系统诱导 *acc* 和 *mcr* 的表达，加速乙酰辅酶 A 向 3-HP 的转化，最后 Tra\*系统开启以抑制 *fabD*，减少丙二酰辅酶 A 流向竞争途径。

摇瓶发酵，实验结果表明，Strain5 的产量提高到 7.0 g/L，相比于双层、单层和静态调控菌株分别增加了 8%、13%、27%，而且 Strain5 的最终 OD<sub>600</sub> 最高，糖耗相对其他生产菌较低（图 4-9）。本实验证明了该三层调控系统在精确调控基因表达以改善产量方面的优势。

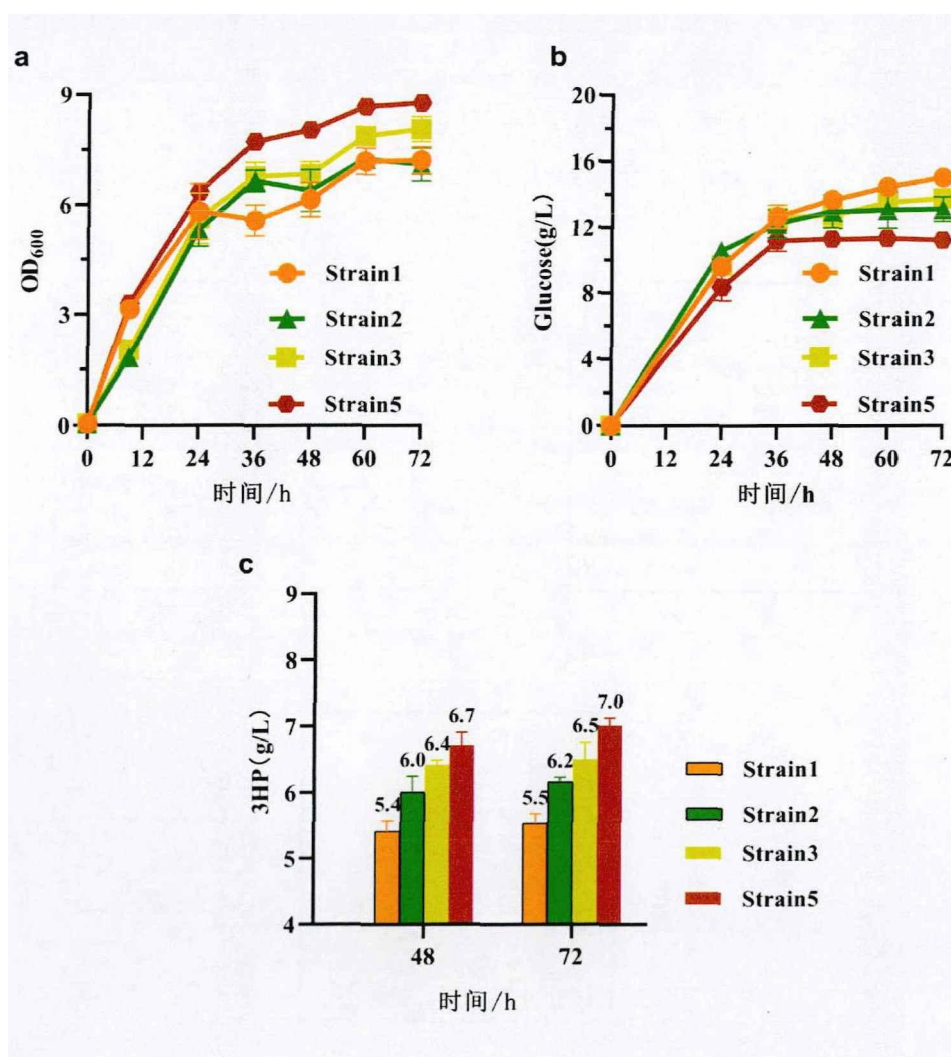


图 4-9 三层动态调控生产菌株发酵

a: 发酵生长曲线; b: 发酵过程中的糖耗; c: 发酵中的 3-HP 产量。

## 4.4 本章小结

本章首先筛选了开启时间不同的两个完全正交的自诱导群感系统和一个稳定期特异性启动子系统，然后利用这三个系统之间开启时间上的时间差，构建了一个具有时间差的自诱导的三层动态调控系统。具体而言，群体感应系统的开启时间与信号分子的浓度相关，我们通过调整信号分子合酶基因的表达强度，改变了信号分子的积累速率和到达阈值的时间，从而实现了群感系统的不同的开启时间。通过比较群体感应系统与稳定期特异性启动子系统的开启时间，我们筛选出了三个开启时间相差较大且表达强度较高的调控元件以构建三层动态调控系统。

接下来，我们验证了三层动态调控系统的应用潜力。在 3-HP 的生物合成中，外源基因表达的 ACC 蛋白导致细胞毒性。同时，其生产前体乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 也是细菌体内的重要中间代谢物，因此，产物生产和细胞生长存在竞争，而敲除相关基因会严重影响细胞正常代谢。在该调控案例中，我们将 Las 系统和 MicC2 结合去动态抑制 *gltA* 以保证生长和积累前体乙酰辅酶 A，Tra\*系统与 MicC1 系统相结合去动态抑制 *fabD* 以积累前体丙二酰辅酶 A，P<sub>3.1</sub> 启动子诱导基因 *acc*、*mcr* 动态表达以减少外源蛋白过早表达导致的细胞毒性。本实验表明，三层动态调控系统相比于双层、单层和静态调控在精确调控细胞代谢和生物合成方面是有优势的。

本论文首次构建了独立于通路的、自诱导的三层动态调控系统，在代谢工程调控中有较大应用潜力，能够同时解决平衡菌体生长和生产、产物层级积累以及减缓外源基因表达导致的细胞毒性的问题。

## 创新性成果与展望

### 创新性成果

1. 本论文以组成成分较简单并且和多种天然群体感应系统（Las 系统和 Lux 系统）正交的 Sal 系统作为出发系统，通过调整关键基因的表达和筛选验证，首次在大肠杆菌中构建了一个完全自诱导的 Sal QS 系统，为合成生物学和代谢工程中通讯工具和诱导系统的选择提供了新的工具。

2. 本论文初步构建出了一个稳定共存的三菌株生态系统。通过添加不同的信号分子组合，成功实现生态系统中优势菌株的转变。为探究环境因素改变对生态系统中优势种群的转变奠定基础。

3. 本论文筛选了开启时间不同的两个完全正交的自诱导群体感应元件和一个稳定期特异性启动子元件，首次构建了独立于通路的、自诱导的三层动态调控系统。通过将该系统应用于 3-HP 的生产调控，证实了其在代谢工程中的应用潜力，并表明该系统能够同时解决平衡菌体生长和生产、产物层级积累以及减缓外源基因表达导致的细胞毒性的问题。

### 展望

1. 在已构建的自诱导 Sal QS 系统的基础上，进一步优化水杨酸的合成途径，提高水杨酸的产量。

2. 通过引入合酶基因，构建自诱导的生态系统，帮助进一步理解生态系统的种群关系，通过接入比例的变化，实现优势菌株的转变，进而应用到代谢工程中，实现共培养生产。

3. 对于三层动态调控系统，通过优化关键基因的调控顺序，筛选出产量进一步提高的工程菌株。

## 参考文献

- [1] GARDNER T S, CANTOR C R, COLLINS J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*[J]. Nature, 2000,403(6767): 339-342.
- [2] HAM T S, LEE S K, KEASLING J D, et al. Design and construction of a double inversion recombination switch for heritable sequential genetic memory[J]. Plos One, 2008,3(7): e2815.
- [3] TIGGES M, MARQUEZ LAGO T T, STELLING J, et al. A tunable synthetic mammalian oscillator[J]. Nature, 2009,457(7227): 309-312.
- [4] GOH K I, KAHNG B, CHO K H. Sustained oscillations in extended genetic oscillatory systems[J]. Biophys J, 2008,94(11): 4270-4276.
- [5] RINAUDO K, BLERIS L, MADDAMSETTI R, et al. A universal RNAi-based logic evaluator that operates in mammalian cells[J]. Nat Biotechnol, 2007,25(7): 795-801.
- [6] WIN M N, SMOLKE C D. Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices[J]. Science, 2008,322(5900): 456-460.
- [7] HOOSHANGI S, THIBERGE S, WEISS R, et al. Ultrasensitivity and noise propagation in a synthetic transcriptional cascade[J]. PNAS, 2005,102(10): 3581-3586.
- [8] PURNICK P E, WEISS R. The second wave of synthetic biology: from modules to systems[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009,10(6): 410-422.
- [9] JIANG W, YANG X, GU F, et al. Construction of synthetic microbial ecosystems and the regulation of population proportion[J]. ACS Synth Biol, 2022,11(2): 538-546.
- [10] GUPTA A, REIZMAN I M, REISCH C R, et al. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit[J]. Nat Biotechnol, 2017,35(3): 273-279.
- [11] HWANG I Y, KOH E, WONG A, et al. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models[J]. Nat Commun, 2017,8: 15028.
- [12] SHETTY R P, ENDY D, KNIGHT T J. Engineering biobrick vectors from biobrick parts[J]. J Biol Eng, 2008,2: 5.
- [13] HOLTZ W J, KEASLING J D. Engineering static and dynamic control of synthetic pathways[J]. Cell, 2010,140(1): 19-23.

- [14] GRAY K M. Intercellular communication and group behavior in bacteria[J]. Trends Microbiol. 1997,5(5): 184-188.
- [15] FUQUA W C, WINANS S C, GREENBERG E P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. J Bacteriol. 1994,176(2): 269-275.
- [16] ENGBRECHT J, NEALSON K, SILVERMAN M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*[J]. Cell. 1983,32(3): 773-781.
- [17] ENGBRECHT J, SILVERMAN M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence[J]. PNAS USA, 1984,81(13): 4154-4158.
- [18] EBERHARD A, BURLINGAME A L, EBERHARD C, et al. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase[J]. Biochemistry. 1981,20(9): 2444-2449.
- [19] PASSADOR L, COOK J M, GAMBELLO M J, et al. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication[J]. Science. 1993,260(5111): 1127-1130.
- [20] LAZZAZZERA B A. The intracellular function of extracellular signaling peptides[J]. Peptides. 2001,22(10): 1519-1527.
- [21] GROSSMAN A D. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*[J]. Annu Rev Genet. 1995,29: 477-508.
- [22] PIPER K R, BECK V B S, FARRAND S K. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction[J]. Nature. 1993,362(6419): 448-450.
- [23] WINSON M K, CAMARA M, LATIFI A, et al. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PNAS U S A. 1995,92(20): 9427-9431.
- [24] NG W L, BASSLER B L. Bacterial quorum-sensing network architectures[J]. Annu Rev Genet. 2009,43: 197-222.
- [25] FUQUA C, PARSEK M R, GREENBERG E P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing[J]. Annu Rev Genet. 2001,35: 439-468.
- [26] RUTHERFORD S T, BASSLER B L. Bacterial quorum sensing: its role in

- virulence and possibilities for its control[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012,2(11).
- [27] LASARRE B, FEDERLE M J. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2013,77(1): 73-111.
- [28] CHEN X, SCHAUDER S, POTIER N, et al. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron[J]. *Nature*, 2002,415(6871): 545-549.
- [29] SCHAUDER S, SHOKAT K, SURETTE M G, et al. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule[J]. *Mol Microbiol*, 2001,41(2): 463-476.
- [30] SCOTT S R, HASTY J. Quorum sensing communication modules for microbial consortia[J]. *ACS Synth Biol*, 2016,5(9): 969-977.
- [31] GE C, YU Z, SHENG H, et al. Redesigning regulatory components of quorum-sensing system for diverse metabolic control[J]. *Nat Commun*, 2022,13(1).
- [32] HU B, Du J, ZOU R Y, et al. An environment-sensitive synthetic microbial ecosystem[J]. *Plos One*, 2010,5(5): e10619.
- [33] CELIK O V, KONG W, BLANCHARD A E, et al. Spatial interference scale as a determinant of microbial range expansion[J]. *Sci Adv*, 2018,4(11): u695.
- [34] BALAGADDE F K, SONG H, OZAKI J, et al. A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem[J]. *Mol Syst Biol*, 2008,4: 187.
- [35] SAEIDI N, WONG C K, LO T M, et al. Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen[J]. *Mol Syst Biol*, 2011,7: 521.
- [36] JIANG W, HE X, LUO Y, et al. Two completely orthogonal quorum sensing systems with self-produced autoinducers enable automatic delayed cascade control[J]. *ACS Synth Biol*, 2020,9(9): 2588-2599.
- [37] WU J, BAO M, DUAN X, et al. Developing a pathway-independent and full-autonomous global resource allocation strategy to dynamically switching phenotypic states[J]. *Nat Commun*, 2020,11(1): 5521.
- [38] LV Y, QIAN S, Du G, et al. Coupling feedback genetic circuits with growth phenotype for dynamic population control and intelligent bioproduction[J]. *Metab Eng*, 2019,54: 109-116.
- [39] XU P. Production of chemicals using dynamic control of metabolic fluxes[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018,53: 12-19.
- [40] BAO S H, JIANG H, ZHU L Y, et al. A dynamic and multilocus metabolic

- regulation strategy using quorum-sensing-controlled bacterial small RNA[J]. *Cell Rep.* 2021.36(3): 109413.
- [41] WU S, QIAO J, YANG A, et al. Potential of orthogonal and cross-talk quorum sensing for dynamic regulation in cocultivation[J]. *Chem Eng J.* 2022.445: 136720.
- [42] SCHUMANN W. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Adv Appl Microbiol.* 2007.62: 137-189.
- [43] WENZEL M, MULLER A, SIEMANN-HERZBERG M, et al. Self-inducible *Bacillus subtilis* expression system for reliable and inexpensive protein production by high-cell-density fermentation[J]. *Appl Environ Microbiol.* 2011.77(18): 6419-6425.
- [44] JAISHANKAR J, SRIVASTAVA P. Strong synthetic stationary phase promoter-based gene expression system for *Escherichia coli*[J]. *Plasmid.* 2020.109: 102491.
- [45] XU K, TONG Y, LI Y, et al. Autoinduction AND gate inhibits cell lysis to enhance protein production in *Bacillus subtilis* controlled by population density and cell physiological state[J]. *ACS Synth Biol.* 2023.12(3): 842-851.
- [46] GOTTESMAN S. The small RNA regulators of *Escherichia coli* : roles and mechanisms[J]. *Annu Rev Microbiol.* 2004.58(1): 303-328.
- [47] SHARMA V, YAMAMURA A, YOKOBAYASHI Y. Engineering artificial small RNAs for conditional gene silencing in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synth Biol.* 2012.1(1): 6-13.
- [48] MAN S, CHENG R, MIAO C, et al. Artificial trans-encoded small non-coding RNAs specifically silence the selected gene expression in bacteria[J]. *Nucleic Acids Res.* 2011.39(8): e50.
- [49] WEBER W, SCHOENMAKERS R, SPIELMANN M, et al. Streptomyces-derived quorum-sensing systems engineered for adjustable transgene expression in mammalian cells and mice[J]. *Nucleic Acids Res.* 2003.31(14): e71.
- [50] BIGGS B W, De PAEPE B, SANTOS C N, et al. Multivariate modular metabolic engineering for pathway and strain optimization[J]. *Curr Opin Biotechnol.* 2014.29: 156-162.
- [51] BROCKMAN I M, PRATHER K L. Dynamic metabolic engineering: New strategies for developing responsive cell factories[J]. *Biotechnol J.* 2015.10(9): 1360-1369.
- [52] FARMER W R, LIAO J C. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control[J]. *Nat Biotechnol.* 2000.18(5): 533-537.

- [53]SOMA Y, TSURUNO K, WADA M, et al. Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch[J]. *Metab Eng*, 2014,23: 175-184.
- [54]PATRICK W M, QUANDT E M, SWARTZLANDER D B, et al. Multicopy suppression underpins metabolic evolvability[J]. *Mol Biol Evol*, 2007,24(12): 2716-2722.
- [55]FANG Y, WANG J, MA W, et al. Rebalancing microbial carbon distribution for L-threonine maximization using a thermal switch system[J]. *Metab Eng*, 2020,61: 33-46.
- [56]CHEN W, KALLIO P T, BAILEY J E. Construction and characterization of a novel cross-regulation system for regulating cloned gene expression in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1993,130(1): 15-22.
- [57]XU P, LI L, ZHANG F, et al. Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control[J]. *PNAS USA*, 2014,111(31): 11299-11304.
- [58]TORELLA J P, FORD T J, KIM S N, et al. Tailored fatty acid synthesis via dynamic control of fatty acid elongation[J]. *PNAS USA*, 2013,110(28): 11290-11295.
- [59]VLOT A C, DEMPSEY D A, KLESSIG D F. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2009,47: 177-206.
- [60]DOSHI A, BANDEY I, NEVOZHAY D, et al. Design and characterization of a salicylic acid-inducible gene expression system for Jurkat cells[J]. *J Biotechnol*, 2022,346: 11-14.
- [61]Du P, ZHAO H, ZHANG H, et al. De novo design of an intercellular signaling toolbox for multi-channel cell-cell communication and biological computation[J]. *Nat Commun*, 2020,11(1): 4226.
- [62]XUE H, SHI H, YU Z, et al. Design, construction, and characterization of a set of biosensors for aromatic compounds[J]. *ACS Synth Biol*, 2014,3(12): 1011-1014.
- [63]NASR M A, TIMMINS L R, MARTIN V, et al. A versatile transcription factor biosensor system responsive to multiple aromatic and Indole Inducers[J]. *ACS Synth Biol*, 2022,11(4): 1692-1698.
- [64]WANG X, CUI Z, SUN X, et al. Production of 3-Hydroxypropionic Acid from renewable substrates by metabolically engineered microorganisms: A review[J]. *Molecules*, 2023,28(4).

- [65]ZABED H M, AKTER S, RUPANI P F. et al. Biocatalytic gateway to convert glycerol into 3-hydroxypropionic acid in waste-based biorefineries: Fundamentals, limitations, and potential research strategies[J]. *ADV BIOCHEM ENG BIOT*, 2023,62: 108075.
- [66]LIANG B, SUN G, ZHANG X. et al. Recent advances, challenges and metabolic engineering strategies in the biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2022,119(10): 2639-2668.
- [67]De FOUCHECOUR F, SANCHEZ-CASTANEDA A K, SAULOU-BERION C, et al. Process engineering for microbial production of 3-hydroxypropionic acid[J]. *Biotechnol Adv*, 2018,36(4): 1207-1222.
- [68]TALARICO T L, AXELSSON L T, NOVOTNY J. et al. Utilization of Glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: Purification of 1,3-Propanediol:NAD Oxidoreductase[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990,56(4): 943-948.
- [69]DISHISHA T, PEREYRA L P, PYO S H, et al. Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol[J]. *Microb Cell Fact*, 2014,13: 76.
- [70]ZHU J, XIE J, WEI L, et al. Identification of the enzymes responsible for 3-hydroxypropionic acid formation and their use in improving 3-hydroxypropionic acid production in *Gluconobacter oxydans* DSM 2003[J]. *Bioresour Technol*, 2018,265: 328-333.
- [71]FALKOWSKI P G, FENCHEL T, DELONG E F. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles[J]. *Science*, 2008,320(5879): 1034-1039.
- [72]PACE N R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere[J]. *Science*, 1997,276(5313): 734-740.
- [73]RITTMANN B E. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008,100(2): 203-212.
- [74]RAPP K·M, JENKINS J P, BETENBAUGH M J. Partners for life: building microbial consortia for the future[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2020,66: 292-300.
- [75]SCHMIDT T M. The maturing of microbial ecology[J]. *Int Microbiol*, 2006,9(3): 217-223.
- [76]GROSSKOPF T, SOYER O S. Synthetic microbial communities[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2014,18(100): 72-77.
- [77]KARKARIA B D, FEDOREC A, BARNES C P. Automated design of synthetic

- microbial communities[J]. *Nat Commun*, 2021,12(1): 672.
- [78]SMITH R, TAN C, SRIMANI J K, et al. Programmed Allee effect in bacteria causes a tradeoff between population spread and survival[J]. *PNAS USA*, 2014,111(5): 1969-1974.
- [79]TANOUE T, MORITA S, PLICHTA D R, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity[J]. *Nature*, 2019,565(7741): 600-605.
- [80]ATARASHI K, TANOUE T, SHIMA T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species[J]. *Science*, 2011,331(6015): 337-341.
- [81]GUO X, LI Z, WANG X, et al. De novo phenol bioproduction from glucose using biosensor-assisted microbial coculture engineering[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019,116(12): 3349-3359.
- [82]ZHAO C, SINUMVAYO J P, ZHANG Y, et al. Design and development of a "Y-shaped" microbial consortium capable of simultaneously utilizing biomass sugars for efficient production of butanol[J]. *Metab Eng*, 2019,55: 111-119.
- [83]LIU X, LI X B, JIANG J, et al. Convergent engineering of syntrophic *Escherichia coli* coculture for efficient production of glycosides[J]. *Metab Eng*, 2018,47: 243-253.
- [84]KHATUN M A, HOQUE M A, ZHANG Y, et al. Bacterial consortium-based sensing system for detecting organophosphorus pesticides[J]. *Anal Chem*, 2018,90(17): 10577-10584.
- [85]GILBERT E S, WALKER A W, KEASLING J D. A constructed microbial consortium for biodegradation of the organophosphorus insecticide parathion[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003,61(1): 77-81.
- [86]MARTINEZ I, MOHAMED M E, ROZAS D, et al. Engineering synthetic bacterial consortia for enhanced desulfurization and revalorization of oil sulfur compounds[J]. *Metab Eng*; 2016,35: 46-54.
- [87]LIU F, MAO J, KONG W, et al. Interaction variability shapes succession of synthetic microbial ecosystems[J]. *Nat Commun*, 2020,11(1): 309.
- [88]SONG H, DING M Z, JIA X Q, et al. Synthetic microbial consortia: from systematic analysis to construction and applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2014,43(20): 6954-6981.
- [89]ZIESACK M, GIBSON T, OLIVER J, et al. Engineered interspecies amino acid cross-feeding increases population evenness in a synthetic bacterial consortium[J]. *Msystems*, 2019,4(4).

- [90] COYTE K Z, SCHLUTER J, FOSTER K R. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability[J]. *Science*. 2015,350(6261): 663-666.
- [91] MEE M T, COLLINS J J, CHURCH G M. et al. Syntrophic exchange in synthetic microbial communities[J]. *PNAS USA*, 2014,111(20): E2149-E2156.
- [92] KERNER A, PARK J, WILLIAMS A. et al. A programmable *Escherichia coli* consortium via tunable symbiosis[J]. *Plos One*. 2012,7(3): e34032.
- [93] HOSODA K, SUZUKI S, YAMAUCHI Y. et al. Cooperative adaptation to establishment of a synthetic bacterial mutualism[J]. *Plos One*, 2011,6(2): e17105.
- [94] SHOU W, RAM S, VILAR J M. Synthetic cooperation in engineered yeast populations[J]. *PNAS U S A*, 2007,104(6): 1877-1882.
- [95] LIU F, MAO J, LU T, et al. Synthetic, context-dependent microbial consortium of predator and prey[J]. *ACS Synth Biol*. 2019,8(8): 1713-1722.
- [96] LIAO M J, DIN M O, TSIMRING L. et al. Rock-paper-scissors: Engineered population dynamics increase genetic stability[J]. *Science*. 2019,365(6457): 1045-1049.
- [97] WANG S, JIN X, JIANG W, et al. The Expression modulation of the key enzyme *acc* for highly efficient 3-Hydroxypropionic Acid production[J]. *Front Microbiol*, 2022,13: 902848.
- [98] GE C, YU Z, SHENG H. et al. Redesigning regulatory components of quorum-sensing system for diverse metabolic control[J]. *Nat Commun*, 2022,13(1): 2182.
- [99] BONGAERTS J, KRAMER M, MULLER U. et al. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds[J]. *Metab Eng*, 2001,3(4): 289-300.
- [100] MATSUMOTO T, TANAKA T, KONDO A. Engineering metabolic pathways in *Escherichia coli* for constructing a "microbial chassis" for biochemical production[J]. *Bioresour Technol*, 2017,245(Pt B): 1362-1368.
- [101] PENG L, ARAUZO-BRAVO M J, SHIMIZU K. Metabolic flux analysis for a *ppc* mutant *Escherichia coli* based on <sup>13</sup>C-labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004,235(1): 17-23.