

## · 工业生物技术 ·

## 构建葡萄糖二酸指示系统筛选肌醇加氧酶突变株

王磊<sup>1</sup>, 刘叶<sup>1</sup>, 巩旭<sup>1</sup>, 刘龙<sup>1,2</sup>, 康振<sup>1,2</sup>

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

王磊, 刘叶, 巩旭, 等. 构建葡萄糖二酸指示系统筛选肌醇加氧酶突变株. 生物工程学报, 2018, 34(11): 1772–1783.

Wang C, Liu Y, Gong X, et al. Construction of a glucaric acid biosensor for screening *myo*-inositol oxygenase variants. Chin J Biotech, 2018, 34(11): 1772–1783.

**摘 要:** 葡萄糖二酸是一种高附加值天然有机酸, 已经广泛应用于疾病防治、生产聚合物材料等领域。在葡萄糖二酸的合成途径中, 肌醇加氧酶 MIOX 所催化的肌醇转换为葡萄糖醛酸的过程是整个途径的限速步骤。通过应用将葡萄糖二酸浓度与绿色荧光蛋白荧光强度相结合的筛选系统, 从突变体文库中筛选出 3 株有潜力的肌醇加氧酶突变体(K59V/R60A、R171S 和 D276A), 使 MIOX 活性得到提高。重组菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3)/MU-R171S 的葡萄糖二酸产量相比于未突变菌株提高了 36.5%。

**关键词:** 葡萄糖二酸, 肌醇加氧酶, 生物传感器, 高通量筛选

## Construction of a glucaric acid biosensor for screening *myo*-inositol oxygenase variants

Cui Wang<sup>1</sup>, Ye Liu<sup>1</sup>, Xu Gong<sup>1</sup>, Long Liu<sup>1,2</sup>, and Zhen Kang<sup>1,2</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Glucaric acid (GA), a top value-added chemical from biomass, has been widely used for prevention and control of diseases and the production of polymer materials. In GA biosynthesis pathway, the conversion of inositol to glucuronic acid that catalyzed by *myo*-inositol oxygenase is the limiting step. It is necessary to improve MIOX activity. In the present study, we constructed a high-throughput screening system through combing the concentration of GA with the green fluorescent protein fluorescence intensity. By applying this screening system, three positive variants (K59V/R60A, R171S and D276A) were screened from the mutant library. In comparison, the recombinant strain *Escherichia coli* BL21(DE3)/MU-R171S

**Received:** February 7, 2018; **Accepted:** April 25, 2018

**Supported by:** The National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (No. LITE2018-16), the Program for Chang Jiang Scholar and Innovative Research Team in University (No. IRT\_15R26).

**Corresponding authors:** Zhen Kang. Tel: +86-510-85918307; Fax: +86-510-85918309; E-mail: zkang@jiangnan.edu.cn

Long Liu. Tel: +86-510-85918312; Fax: +86-510-85918309; E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn

轻工技术与工程国家一流学科项目 (No. LITE2018-16), 长江学者和创新团队发展计划 (No. IRT\_15R26)资助。

网络出版时间: 2018-05-14

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180511.1550.002.html>

accumulated more GA, 136.5% of that of the parent strain.

**Keywords:** glucaric acid, *Myo*-inositol oxygenase, biosensor, high-throughput screening

葡萄糖二酸在一些水果、蔬菜及哺乳动物中均有发现,特别是在一些十字花科蔬菜(如花椰菜、苜蓿芽等)、水果(樱桃、葡萄柚、柑橘等)中含量丰富<sup>[1]</sup>。葡萄糖二酸与其衍生物早在1996年就被证实在疾病防治方面具有潜在应用价值,包括降低胆固醇<sup>[2]</sup>、用于癌症化疗,并能以葡萄糖二酸钙的形式作为一种膳食补充剂<sup>[3-4]</sup>。葡萄糖二酸已成功用于生产一种羟基化的尼龙,产生可降解的纤维<sup>[5]</sup>。众多附加应用使得葡萄糖二酸在2004年被美国能

源部确认为“最具价值的生物炼制产品”之一<sup>[6]</sup>。

葡萄糖二酸的生产主要依赖使用硝酸为氧化剂的葡萄糖化学氧化法<sup>[7]</sup>,该方法存在耗费大量试剂、污染环境等问题,故国内外研究人员纷纷寻求通过生物法生产该物质。Prather团队通过在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中异源表达途径酶肌醇加氧酶 MIOX 和醛酸脱氢酶 Udh,成功构建了葡萄糖二酸合成途径,实现了葡萄糖二酸在 *E. coli* 中的生物合成<sup>[8]</sup>(图1)。随后该团队研究人员将该

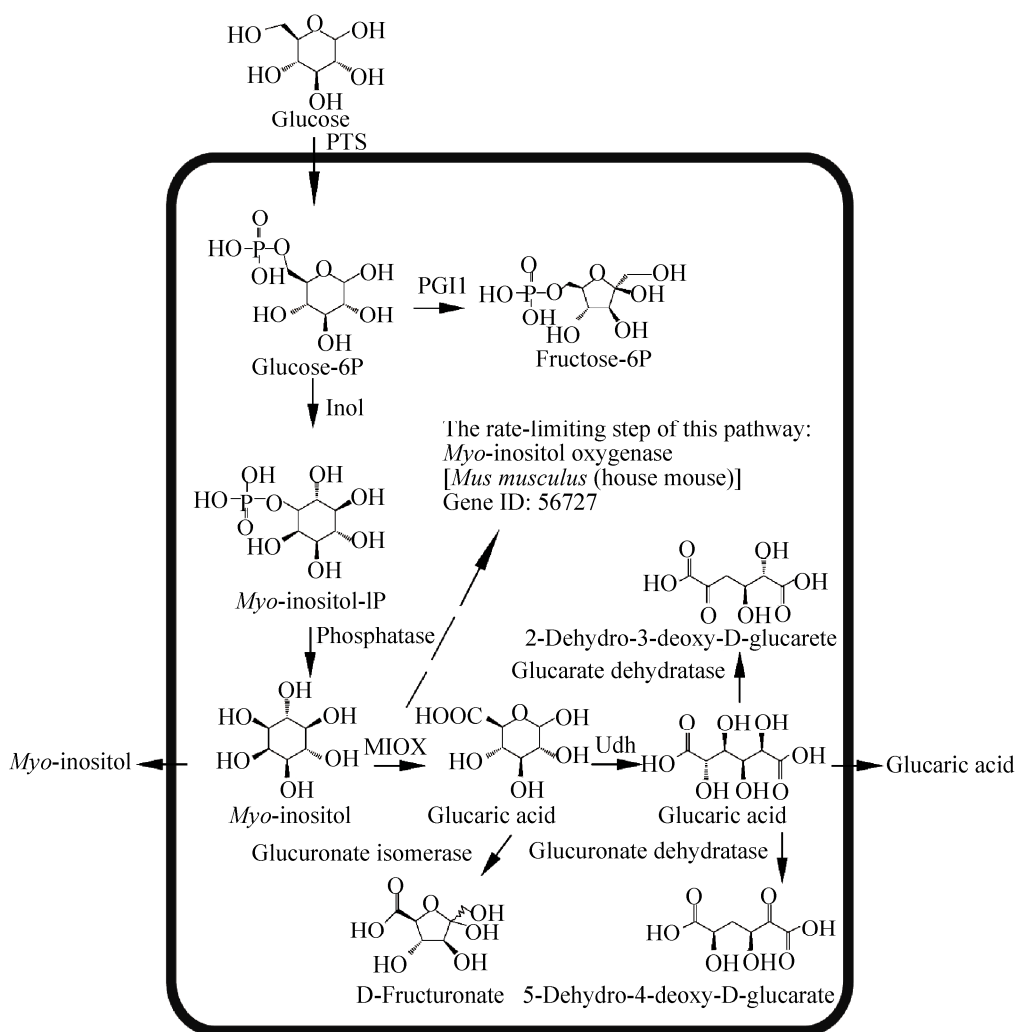


图1 重组 *E. coli* 葡萄糖二酸合成途径<sup>[8]</sup>

Fig. 1 The glucaric acid biosynthesis pathway in recombinant *E. coli*<sup>[8]</sup>.

葡萄糖二酸合成途径转移至酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中, 使以葡萄糖为底物的产量提高至 0.98 g/L<sup>[9]</sup>。Liu 等以毕赤酵母 *Pichia pastoris* 为宿主构建葡萄糖二酸合成途径, 通过添加肌醇使产量达到  $(6.61 \pm 0.30)$  g/L<sup>[10]</sup>。Lee 等通过构建环状支架聚合木聚糖内切酶 Xyn、 $\alpha$ -葡萄糖醛酸酶 AG 和醛酸脱氢酶 Udh, 提高了半纤维素水解率并氧化获得葡萄糖二酸<sup>[11]</sup>。

在重组 *E. coli* 葡萄糖二酸合成途径中, 葡萄糖首先通过磷酸烯醇式丙酮酸依赖性磷酸转移酶系统 (Phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase) 形成葡萄糖-6-磷酸, 之后葡萄糖-6-磷酸通过肌醇-1-磷酸合成酶 (Inositol-1-phosphate synthase, Ino1) 的作用异构化为肌醇-1-磷酸。在脱磷酸酶 (Inositol monophosphate 1-phosphatase) 水解作用下肌醇-1-磷酸脱去磷酸基团生成肌醇。肌醇通过来自小鼠的肌醇氧化酶 (*Myo*-inositol oxygenase, MIOX) 和来自丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 的醛酸脱氢酶 (Udh) 的催化氧化生成葡萄糖二酸。此外, *E. coli* 中存在葡萄糖醛酸和葡萄糖二酸的代谢途径, *uxaC* 基因编码的糖醛酸异构酶 (Glucuronate isomerase) 催化葡萄糖醛酸生成果糖醛酸, 果糖醛酸进一步转化后进入磷酸戊糖途径; *gudD* 基因编码的葡萄糖二酸脱水酶 (Glucarate dehydratase) 催化葡萄糖二酸生成 5-脱氢-4-脱氧-D-葡萄糖二酸, 进一步反应进入二羧酸代谢途径。

葡萄糖二酸的人工合成途径中, 催化肌醇转换为葡萄糖醛酸的 MIOX 的活性与 Ino1 和 Udh 相比较低, 同时稳定性差<sup>[12]</sup>、容易失活, 发酵培养过程中只在对数生长期具有较高活性, 进入稳定期后活性迅速降低<sup>[8]</sup>, 故 MIOX 所催化的反应被认为是二酸合成途径中的限速步骤。研究人员采取了一些策略来提高代谢通量: Dueber 等利用合成支架将 Ino1、MIOX 和 Udh 按比例装配成聚合体, 强化前体肌醇的合成, 提高了葡萄糖二酸的产量<sup>[13]</sup>; Shiue 等在 MIOX 的 N 端添加蛋白融

合标签提高其水溶性<sup>[14]</sup>; Liu 等使用连接肽将 MIOX 和 Udh 进行融合表达, 提高 MIOX 的比酶活<sup>[10]</sup>。目前, 这些改造策略都能提高葡萄糖二酸的产量, 但对 MIOX 的活力及稳定性提高有限, 依然无法满足应用要求, 因此, 通过蛋白质工程策略, 构建突变体文库, 通过大规模筛选获得最佳的 MIOX 突变体对于提高葡萄糖二酸的产量具有很大意义。

MIOX 酶活力的检测需要菌体裂解制备酶液, 与底物反应后进行地衣酚显色测 670 nm 吸光度。这一过程操作繁琐、耗时且具有破坏性<sup>[8]</sup>。研究结果表明提高 MIOX 酶活力可提高葡萄糖二酸的产量, 应用不同来源的 MIOX 时葡萄糖二酸的产量也不同, 可通过葡萄糖二酸的产量来反映 MIOX 突变体的酶活力<sup>[15-16]</sup>。常用的葡萄糖二酸含量检测方法是利用硼酸凝胶结合葡萄糖二酸, 与发酵液中的杂质分离后用高效液相色谱检测<sup>[8]</sup>, 该方法操作也较复杂, 且硼酸凝胶价格昂贵, 不适用于大规模筛选。若能将胞内代谢物与相应传感器和报告基因进行偶联, 使胞内代谢物浓度转化为便于检测的荧光信号, 就可对胞内代谢物浓度进行实时监测<sup>[16]</sup>。每个细胞以正比于其生产特定化合物的速度表达荧光蛋白或抗生素抗性基因, 就可通过内部代谢物浓度和报告基因表达之间的联系来筛选最理想的细胞<sup>[17]</sup>, 从而缩短设计-构建-检测的周期。与之相比, 已有的多数诱导系统缺乏对感应速度和程度的表征而只能以 0 或 1 的形式运作, 产生的信息足以用于过表达潜在的毒性基因, 却无法用于探测细胞行为、精确控制基因表达<sup>[18]</sup>。

荧光检测方法可利用已知的变构转录调节蛋白响应一些常见的代谢中间体, 如丙酮酸<sup>[19]</sup>、磷酸烯醇丙酮酸<sup>[20]</sup>、柠檬酸盐<sup>[21]</sup>、乳酸<sup>[22]</sup>、不饱和脂肪酸<sup>[23]</sup>等。通过小分子传感器的选择或筛选, 已经产生了新的酶和基因组来提高目标代谢产物

的产量<sup>[24-27]</sup>。已得到良好表征并应用较广泛的传感器有 LacI<sup>[28]</sup>、TetR<sup>[29]</sup>、AraC<sup>[30]</sup>、LuxR<sup>[31]</sup>等,其他可用的有 PrpR<sup>[32]</sup>、RhaRS<sup>[33]</sup>、CymR<sup>[34]</sup>、XylS<sup>[35]</sup>、AcrR<sup>[36]</sup>、CdaR、MphR<sup>[37]</sup>、TtgR<sup>[38-39]</sup>等。

其中 CdaR (Carbohydrate diacid regulator) 是一种来自 *E. coli* 的转录激活因子,参与调节 *E. coli* 葡萄糖二酸和粘酸分解代谢酶的表达。这些酶的编码基因分布于 3 个转录单元中,包括葡萄糖二酸脱水酶、粘酸脱水酶、5-酮-4-脱氧-D-葡糖二酸醛缩酶、羟基丙二酸半醛还原酶和己糖二酸转运蛋白<sup>[40]</sup>。对不同碳源存在下的葡萄糖二酸脱水酶、粘酸脱水酶、甘油酸激酶和羟基丙二酸半醛还原酶的活性分析发现葡萄糖二酸和粘酸代谢系统受协同调节。通过对 *E. coli* MC4100 进行甲基磺酸乙酯突变和蓝白斑筛选、测序,最终在 3 个转录单元之外找到了葡萄糖二酸和粘酸代谢的共同调节基因——*cdaR*<sup>[41]</sup>。对其进行 Tn5 插入失活会损伤 *E. coli* 对葡萄糖二酸、粘酸和甘油酸的代

谢<sup>[42]</sup>,此外计算机分析显示该基因产物是具有保守螺旋-转角-螺旋结构域的蛋白,可与其他基因调节蛋白如 XylR<sup>[43]</sup>被归为一类。*cdaR* 基因编码的是非活性的变构转录激活蛋白,受葡萄糖二酸、粘酸或甘油酸激活后转变为活性形式,结合到 *gudP* 启动子的调控序列后发挥变构调节作用,启动下游基因的转录。

据此,本研究以绿色荧光蛋白为报告基因,在 *E. coli* 中构建响应葡萄糖二酸的指示系统,测试诱导物浓度与荧光强度的关系,并构建葡萄糖二酸合成途径,将葡萄糖二酸指示系统应用于对 mMIOX 突变体的高通量筛选。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒与菌株

本研究所用菌株和质粒均为作者所在实验室购买和保藏,详见表 1。

表 1 本研究所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Name	Description	Source
Plasmids		
pHTC- <i>gfp</i>	pHTC derivate with gene <i>gfp</i> following P43	[44]
pUC57-mM	pUC57 carrying codon-optimized <i>MIOX</i> from mouse, Ap <sup>r</sup>	[10]
pRSFDuet- <i>gudP-gfp</i>	pRSFDuet-1 Carrying gene <i>gfp</i> driving by <i>gudP</i> promoter	This study
pRSFDuet- <i>Pgfp-cdaR</i>	pRSFDuet-1 Carrying gene <i>gfp</i> driving by <i>gudP</i> promoter and coding sequence of <i>cdaR</i>	This study
pETDuet-mM-U	pETDuet <sub>1</sub> carrying gene <i>mMIOX</i> and <i>udh</i>	This study
Strains		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pRSFDuet-1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) derivate, harboring plasmid pRSFDuet-1	This study
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/ <i>gudP-gfp</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) derivate, harboring plasmid pRSFDuet- <i>gudP-gfp</i>	This study
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/ <i>Pgfp-cdaR</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) derivate, harboring plasmid pRSFDuet- <i>Pgfp-cdaR</i>	This study
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) / <i>Pgfp-cdaR</i> -MU	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) derivate, harboring plasmid pRSFDuet- <i>Pgfp-cdaR</i> and pETDuet-mM-U	This study
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/MU	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) derivate, harboring plasmid pETDuet-mM-U	This study

### 1.1.2 试剂

PrimerSTAR Max DNA 聚合酶、DNA marker、Solution I、*E. coli* Competent Cell Preparation Kit 均购自 TaKaRa (大连)；2×Taq PCR Master Mix 购自南京诺唯赞科技有限公司；限制性内切酶、GeneJET Gel Extraction Kit 及 GeneJET PCR Purification Kit 购自 Thermo Fisher Scientific 公司；PCR 引物 (见表 2) 由上海睿迪有限公司合成；SanPrep 柱式质粒小量抽提试剂盒购自上海 Sangon 有限公司；易错 PCR 试剂盒购自 Agilent Technologies 有限公司。肌醇、葡萄糖二酸钾色谱级标准品购自 Sigma-Aldrich 公司。其他试剂均购自国药控股有限公司。

### 1.1.3 培养基

LB 培养基 (g/L)：胰蛋白胨 10，酵母粉 5，氯化钠 10。制备固体培养基时添加 2% 的琼脂。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因的扩增和质粒的构建

以 *E. coli* MG1655 基因组为模板，利用引物对 p23119-CdaR-F/R 扩增得到带有启动子 P23119 的调

节蛋白基因 *cdaR*，用引物 gudP-F 和 gudP-R 扩增启动子序列 *gudP*。以 pHTC-*gfp* 为模板，用引物 *gfp*-F 和 *gfp*-R 扩增基因 *gfp*。将扩增得到的片段 *gudP* 和 *gfp* 进行融合 PCR，得到融合片段 *gudP-gfp*，使用限制性酶切位点 *Spe* I 和 *Sca* I 对其进行双酶切，连接到具有相应切口的质粒 pRSFDuet-1 上，连接后得到质粒 pRSFDuet-*gudP-gfp*。使用限制性酶切位点 *Pst* I 和 *Xho* I 对 *cdaR* 片段进行双酶切，连接到具有相应切口的质粒 pRSFDuet-*gudP-gfp* 上，连接后的质粒命名为 pRSFDuet-P*gfp-cdaR*。

以从恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* KT2440 中提取的基因组 DNA 为模板，用引物对 Udh-F/R 扩增得到基因 *udh*，将此片段使用限制性酶切位点 *Nde* I 和 *Kpn* I 进行双酶切，连接到具有响应切口的质粒 pETDuet-1 上，连接后得到质粒 pETDuet-U；以 pUC57-mM 质粒为模板，用引物对 MIOX-F/R 扩增得到小鼠来源的 *MIOX* 基因，将该片段使用限制性酶切位点 *Nco* I 和 *Hind* III 进行双酶切，连接到具有相应切口的质粒 pETDuet-U 上，连接后得到质粒 pETDuet-mM-U。

表 2 本研究中所用引物序列

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')
p23119-CdaR-F	TGCACTGCAGTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCGGATCCAAGGAGG AAAAAAAAATGGCTGGCTGGCATCTTGATA
p23119-CdaR-R	CCGCTCGAGCTACCGCTCTTCATCCAGTTGTA
gudP-F	CGGACTAGTATGCTGTTGATTGACGCCAGTG
gudP-R	TGTTGCACTCCTGAAAATTCGC
gfp-F	GCGAATTTTCAGGAGTGCAACAATGGGTAAGGGAGAAGAAGCTTTT
gfp-R	AAAAGTACTTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCA
MIOX-F	CATGCCATGGGCATGAAGGTCGACGTAGGTCCAGATC
MIOX-R	CCCAAGCTTTTACCAGGACAGAGTGCCAGGG
Udh-F	GGGAATTCCATATGATGACCACTACCCCTTCAATCGC
Udh-R	CGGGGTACCTTAGTTGAACGGGCGGCCAC
Mut-MIOX-F	AAGAAGGAGATATACCATGGGCATG
Mut-MIOX-R	TTATGCGGCCGCAAGCTTTTA

### 1.2.2 *E. coli* 的转化

*E. coli* 感受态制备参见 *E. coli* Competent Cell Preparation Kit (TaKaRa 大连) 使用说明书。

### 1.2.3 突变 MIOX 和筛选

以 pUC57-mM 质粒为模板, 使用引物对 Mut-MIOX-F/R 对 *mMIOX* 进行易错 PCR, 将得到的片段使用限制性酶切位点 *Nco* I 和 *Hind* III 进行双酶切, 连接到具有相应切口的质粒 pETDuet-U 上, 连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE3)/*Pgfp-cdaR* 后, 挑选单菌落接种到每孔带有 200  $\mu$ L LB 液体培养基的 96 浅孔板中, 以未突变的 *E. coli* BL21 (DE3)/*Pgfp-cdaR*-MU 为对照, 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养后, 以 10% 接种量 (V/V) 转接到含有 IPTG 的 96 孔板 LB 培养基中, 培养 12 h 后用酶标仪检测, 筛选荧光较强的突变株。

### 1.2.4 MIOX 酶活的测定

以肌醇作为底物, 根据 MIOX 转化肌醇生成葡萄糖醛酸的含量, 检测 MIOX 的催化活性。MIOX 单位酶活定义: 1 min 内生成 1 nmol/L 葡萄糖醛酸所需要的酶量。取样将发酵液离心弃上清 (5 000 r/min、4  $^{\circ}$ C、5 min), 用 Tris-Cl 缓冲液 (10 mmol/L, pH 8.0) 清洗 2 遍菌体以消除发酵液中杂质的影响, 将菌体重悬在清洗缓冲液中, 同时加入等体积 1.0 mm 硅珠, 采用 FastPrep-24 均质破碎仪破碎, 破壁后离心取上清 100  $\mu$ L 至 1.5 mL EP 管内, 加入 900  $\mu$ L 反应液, 立即放入 30  $^{\circ}$ C 恒温金属浴中反应 1 h, 加入 100  $\mu$ L 的 30% 三氯乙酸终止反应。取上述反应液 1 mL 加入玻璃比色管内, 然后加入 2 mL 苔黑素试剂, 混匀后, 在沸水中反应 15 min。当反应物冷却至室温时, 在 670 nm 下测量吸光度。

葡萄糖醛酸标准曲线的绘制: 分别配置浓度为 4、8、12、16、20、24 mg/L 的葡萄糖醛酸标准溶液及苔黑素试剂 (在 10 mL 的浓盐酸中加入

40 mg 苔黑素和 5.4 mg  $\text{FeCl}_3$ )。在玻璃比色管内加入 1 mL 的葡萄糖醛酸标准溶液及 2 mL 苔黑素试剂, 混匀后, 在沸水中反应 15 min。当反应物冷却至室温时, 在 670 nm 下测量吸光度。以葡萄糖醛酸的浓度作为 X 轴, 以测得的 670 nm 的吸光度作为 Y 轴, 绘制标准曲线。

将以含有肌醇反应液的吸光度减去不含肌醇反应液的吸光度, 得到的差值根据葡萄糖醛酸标准曲线计算得出葡萄糖醛酸的含量, 从而计算 MIOX 酶活。

底物反应液: 含有 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、2 mmol/L L-半胱氨酸、1 mmol/L  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  和 10 g/L 肌醇。以不添加肌醇的反应液作为对照。

### 1.2.5 葡萄糖二酸的测定

标准样品的准备: 称取一定质量的葡萄糖二酸钾标样, 溶于 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液中, 配置终浓度为 1 g/L 的葡萄糖二酸溶液, 将其用 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液稀释, 配置终浓度分别为 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 g/L 的葡萄糖二酸溶液。

样品的 Affi-Gel 凝胶处理: 取 1 mL 发酵液在 12 000 r/min 下离心 5 min。取 0.9 mL 发酵液上清或葡萄糖二酸溶液加入 2 mL EP 管内, 然后加入 0.1 mL 1 mol/L 磷酸钾缓冲液及 50 mg Affi-Gel, 漩涡振荡 5 次, 每次停 20 min (室温下), 然后将样品 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。用 1 mL 80 mmol/L 磷酸钾-20 mmol/L 硼酸缓冲液 (pH 7.0) 加入到沉淀中, 漩涡振荡, 离心弃上清 (重复 3 次)。用 0.375 mL 0.1 mol/L HCl 洗脱 2 次, 混合离心, 将上清转移到 1.5 mL EP 管中, 用 1 mol/L NaOH 调中性 (75  $\mu$ L), 加去离子水 (75  $\mu$ L) 补足到 0.9 mL。经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 供液相分析<sup>[8]</sup>。

HPLC 分析条件: 流动相为 5 mmol/L 稀硫酸, 色谱柱为 Aminex HPX-87H (美国 Bio-Rad), 流速 0.5 mL/min, 柱温 55  $^{\circ}$ C, 进样量 10  $\mu$ L, 检测器为紫外检测器 (210 nm)。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄糖二酸指示系统的构建

#### 2.1.1 葡萄糖二酸指示系统重组质粒的构建

*E. coli* MG1655 来源的 *cdaR* 编码非活性激活蛋白, 被葡萄糖二酸激活后结合到启动子调控序列, 开启下游基因的转录 (图 2)。本研究所构建的质粒应用启动子 P23119 使得 *cdaR* 基因得以组成型表达。培养基中的葡萄糖二酸经酶转运进入胞内后激活 CdaR 使其转变为活性形式, 进而与操纵子区域结合, 启动下游结构基因转录, 即本研究中作为报告基因的 *gfp*。构建的质粒经过测序验证, 命名为 pRSFDuet-Pgfp-cdaR (图 3)。

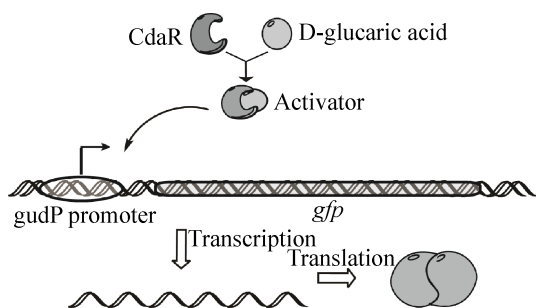


图 2 葡萄糖二酸指示系统示意图

Fig. 2 Schematic diagram of glucaric acid biosensor.

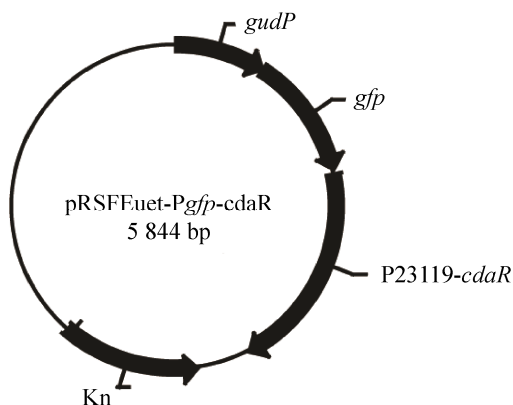


图 3 葡萄糖二酸指示系统重组质粒 pRSFDuet-Pgfp-cdaR 图谱

Fig. 3 The map of glucaric acid biosensor recombinant plasmid pRSFDuet-Pgfp-cdaR.

将带有该指示系统质粒的菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR 在 LB 培养基中培养, 以菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pRSFDuet-1 和 *E. coli* BL21 (DE3)/gudP-gfp 为对照, 加入葡萄糖二酸进行诱导后使用酶标仪检测荧光强度, 结果如图 4 所示, 只有同时具有调节蛋白基因 *cdaR* 和受其调控的 *gudP* 启动子序列的菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR 可以在葡萄糖二酸的诱导下产生荧光, 表明该指示系统成功构建。在培养基中添加前体物质肌醇和葡萄糖醛酸, 与不添加葡萄糖二酸的对照都没有观察到荧光反应, 验证了调节蛋白 CdaR 在该途径中结合葡萄糖二酸的专一性。

#### 2.1.2 葡萄糖二酸浓度与荧光反应强度关系的测定

为了研究该指示系统响应葡萄糖二酸的浓度范围, 在 *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR 培养基中加入了梯度浓度的葡萄糖二酸进行诱导。用酶标仪测定了荧光值和 600 nm 吸光度, 归一化荧光值由实验测得的荧光值除以吸光度所得, 应用此比值以补偿时间和批次之间细胞密度差异。使用 12 h 时的归一化荧光值来反映诱导物葡萄糖二酸浓度与荧光反应强度之间的关系, 结果如图 5A 所示, 在 0–600 mg/L 浓度范围内, 绿色荧光蛋白荧光强

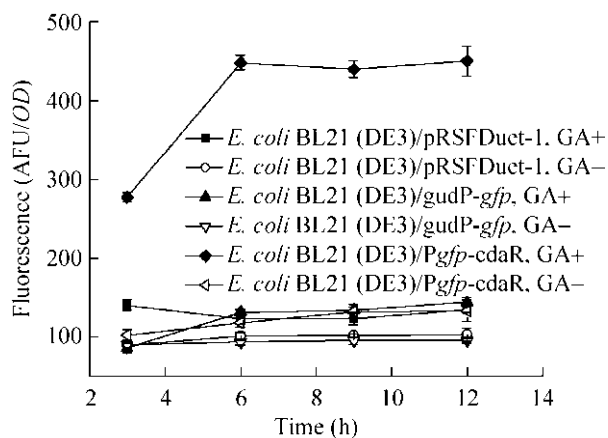


图 4 不同菌株对葡萄糖二酸的荧光响应

Fig. 4 The fluorescence response of different strains to glucaric acid supplement.

度与所加的葡萄糖二酸浓度之间呈良好的线性关系,在 600–4 000 mg/L 浓度范围内 (图 5B), 荧光反应强度继续随着葡萄糖二酸浓度的增加而增强, 外加葡萄糖二酸响应的上限约为 4 000 mg/L (19.1 mmol/L), 葡萄糖二酸浓度达到 4 000 mg/L 以上时影响菌体生长。

## 2.2 葡萄糖二酸合成途径的构建

为了方便对突变肌醇加氧酶 MIOX 进行筛选, 首先需要在 *E. coli* BL21 (DE3) 中构建以肌醇为底物的葡萄糖二酸合成途径。构建表达载体 pETDuet-mM-U, 以 T7 启动子分别驱动小鼠来源的肌醇加氧酶 (MIOX) 和恶臭假单胞菌来源的醛酸脱氢酶 (Udh), 如图 6 所示, 并进行了测序验证。

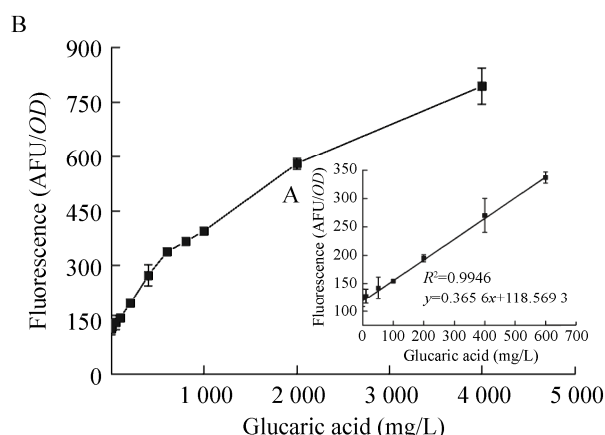


图 5 葡萄糖二酸指示系统的荧光分析

Fig. 5 Fluorescence assay of glucaric acid biosensor.

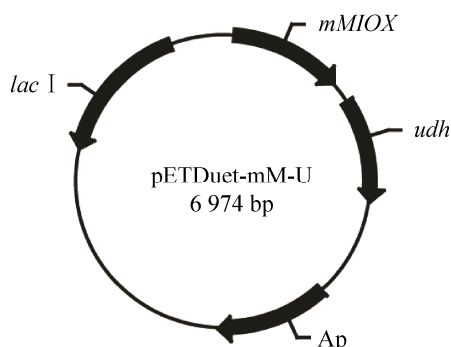


图 6 葡萄糖二酸合成途径重组质粒图谱

Fig. 6 The map of glucaric acid biosynthesis pathway plasmid pETDuet-mM-U.

将重组菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU 接种至液体 LB 培养基, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 10%接种量 (V/V) 转接至含有肌醇的 LB 培养基中 (以不添加肌醇为对照), 加 IPTG 后 30 °C、220 r/min 培养, 24 h 取发酵液上清进行液质检测, 结果见图 7, 在发酵液中检出葡萄糖二酸峰, 表明重组菌株中催化肌醇生产葡萄糖二酸的途径构建成功。IPTG 诱导后每 3 h 取样, 用酶标仪检测荧光和 OD<sub>600</sub>, 菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU 添加肌醇的荧光值明显高于未添加肌醇的对照 (图 8), 表明该菌株中 MIOX 和 Udh 实现活性表达, 并与葡萄糖二酸指示系统成功偶联, 使重组 *E. coli* 中葡萄糖二酸的生产转化为荧光信号。

## 2.3 MIOX 突变体的筛选

使用易错 PCR 对 MIOX 进行突变, 初筛时使用 Qpix 挑菌机将突变体接种到 96 孔板中过夜培养, 以 10%接种量转接到含有肌醇的 LB 液体培养基中, IPTG 诱导培养 12 h 后用酶标仪检测, 筛选荧光较强的突变株。初筛从 3 900 株菌中得到 7 株, 经测序后分别为: K59V/R60A、K70E、R171S、Q180V、N205F、P269E、D276A。以未突变菌株

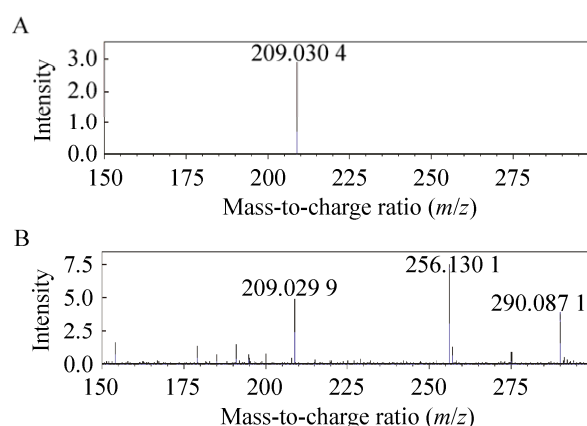


图 7 葡萄糖二酸标准品和重组 *E. coli* 发酵液上清的质谱检测

Fig. 7 Mass spectrum of standard glucaric acid sample and the culture supernatant from recombinant *E. coli*. (A) Standard GA sample. (B) Culture supernatant of recombinant *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU.



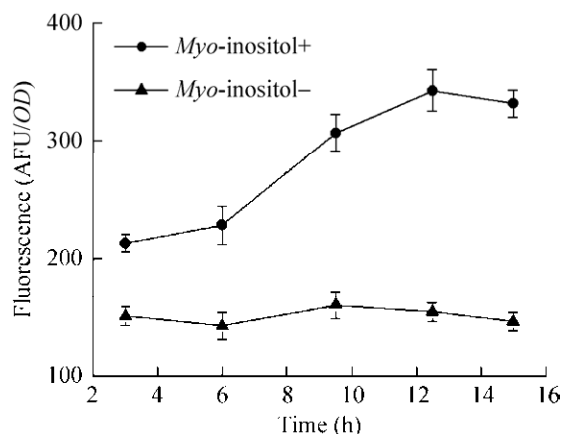


图 8 *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU 的荧光分析 (肌醇 10 g/L)

Fig. 8 Fluorescence assay of *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU (myo-inositol 10 g/L).

*E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU 作为对照, 将初筛得到的菌株采用地衣酚显色法测酶活进行复筛, 得到突变体 K59V/R60A、R171S、D276A, 它们与野生型的酶活分别为  $(43.17 \pm 1.68)$  U/mL、 $(54.14 \pm 1.02)$  U/mL、 $(40.25 \pm 1.24)$  U/mL、 $(34.71 \pm 0.89)$  U/mL (图 9)。SDS-PAGE 分析结果表明 MIOX 与其突变体的表达量无明显差异 (图 10)。因此, MIOX 突变体酶活的增加可能归因于其比活力的提高。

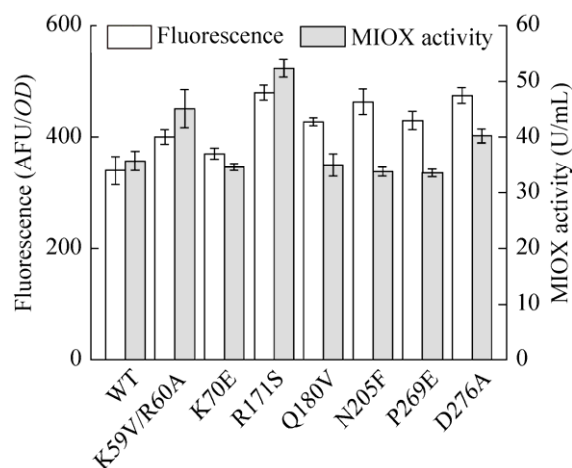


图 9 MIOX 突变体的酶活及荧光响应

Fig. 9 Enzyme activity and fluorescence of MIOX variants.

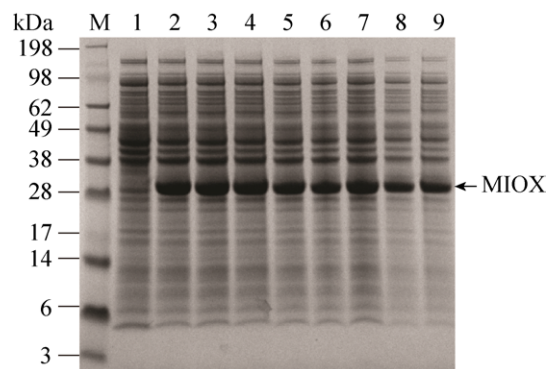


图 10 SDS-PAGE 分析 MIOX 的表达

Fig. 10 SDS-PAGE assay for the expression of MIOX. 1: negative control, *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR cell lysis supernatant; 2: positive control, *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU cell lysis supernatant; 3: *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU-K59V/R60A cell lysis supernatant; 4: *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU-K70E cell lysis supernatant; 5: *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU-R171S cell lysis supernatant; 6: *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU-Q80V cell lysis supernatant; 7: *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU-N205F cell lysis supernatant; 8: *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU-P269E cell lysis supernatant; 9: *E. coli* BL21 (DE3)/Pgfp-cdaR-MU-D276A cell lysis supernatant.

由于突变体库初筛时采用的是 96 孔板与摇瓶培养复筛在体积、溶氧等参数方面存在较大的差异, 导致初筛获得的突变体在两种不同体系下表现出不同的性状。最终, 我们选择在初筛和复筛中都表现较好的突变体 K59V/R60A、R171S、D276A 开展进一步的研究。

## 2.4 MIOX 突变体对葡萄糖二酸产量的影响

将上述突变位点 K59V/R60A、R171S、D276A 引入 *E. coli* BL21 (DE3)/MU, 得到菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/MU-K59V/R60A、*E. coli* BL21 (DE3)/MU-R171S 和 *E. coli* BL21 (DE3)/MU-D276A, 在含有肌醇的 LB 培养基中 IPTG 诱导 48 h 后葡萄糖二酸产量如图 11 所示, 依次为  $(126.69 \pm 8.66)$  mg/L、 $(172.97 \pm 6.08)$  mg/L、 $(146.39 \pm 6.39)$  mg/L、 $(134.65 \pm 8.07)$  mg/L, 提高程度与酶活相近, 从而进一步证明 MIOX 酶活力的提高有助于提高重组菌葡萄糖二酸的产量。

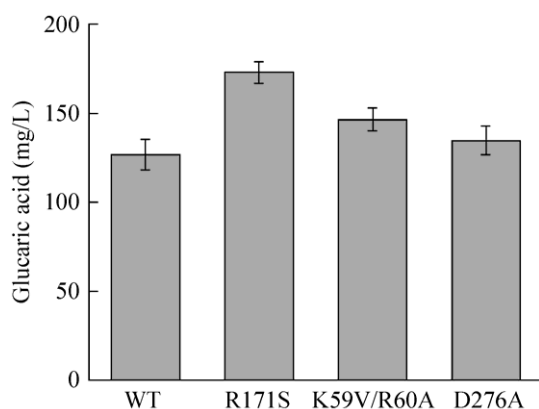


图 11 MIOX 突变对重组 *E. coli* BL21 (DE3) 葡萄糖二酸产量的影响

Fig. 11 Effect of MIOX variants on the glucaric acid production in recombinant *E. coli* BL21 (DE3).

### 3 结语

本研究构建了葡萄糖二酸指示系统, 通过结合绿色荧光蛋白和识别葡萄糖二酸的变构调节蛋白 CdaR, 将重组 *E. coli* 中葡萄糖二酸的生产与荧光信号偶联起来。验证了该指示系统与外加的葡萄糖二酸浓度间存在良好的线性关系, 并将其应用于肌醇加氧酶 MIOX 突变体文库的高通量筛选, 得到 3 株具有潜力的突变体, 经测序分别为 K59V/R60A、R171S 和 D276A, 其中 R171S 酶活提升最显著, 将其应用于重组 *E. coli* 中, 使葡萄糖二酸的产量提高了 36.5%。本研究结果同时说明 MIOX 在转化肌醇生成葡萄糖二酸的过程中起着重要作用。在前体物质肌醇的合成途径中肌醇-1-磷酸合成酶 (Ino1) 也是重要的限速酶, 为进一步提高葡萄糖二酸产量, 同时降低生产成本, 下一步研究可在 *E. coli* 中表达肌醇-1-磷酸合成酶基因, 构建从葡萄糖到葡萄糖二酸的合成途径, 应用葡萄糖二酸指示系统对肌醇-1-磷酸合成酶突变体进行筛选, 同时可抑制或敲除各支路代谢途径酶 (如糖醛酸异构酶、葡萄糖二酸脱水酶等, 图 1), 以减少中间产物的消耗, 进而增加葡萄糖二酸的积累。

### REFERENCES

- [1] Dwivedi C, Heck WJ, Downie AA, et al. Effect of calcium glucarate on  $\beta$ -glucuronidase activity and glucarate content of certain vegetables and fruits. *Biochem Med Metab Biol*, 1990, 43(2): 83–92.
- [2] Walaszek Z, Szemraj J, Hanausek M, et al. D-Glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterol-lowering effects of dietary D-glucarate in the rat. *Nutr Res*, 1996, 16(4): 673–681.
- [3] Singh J, Gupta KP. Calcium glucarate prevents tumor formation in mouse skin. *Biomed Environ Sci*, 2003, 16(1): 9–16.
- [4] Singh J, Gupta KP. Induction of apoptosis by calcium D-Glucarate in 7, 12-Dimethyl Benz [a] anthracene-exposed mouse skin. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2007, 26(1): 63–73.
- [5] Kiely DE, Chen L, Lin TH. Simple preparation of hydroxylated nylons-polyamides derived from aldaric. *Polym Agric Coproducts*, 1994, 575: 149–158.
- [6] Werpy T, Petersen G, Aden A, et al. Top value added chemicals from biomass. volume 1: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Washington, DC: US Department of Energy, 2004.
- [7] Kochkar H, Lassalle L, Morawietz M, et al. Regioselective oxidation of hydroxyl groups of sugar and its derivatives using silver catalysts mediated by tempo and peroxodisulfate in water. *J Catal*, 2000, 194(2): 343–351.
- [8] Moon TS, Yoon SH, Lanza AM, et al. Production of glucaric acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(3): 589–595.
- [9] Gupta A, Hicks MA, Manchester SP, et al. Porting the synthetic D-glucaric acid pathway from *Escherichia coli* to *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J*, 2016, 11(9): 1201–1208.
- [10] Liu Y, Gong X, Wang C, et al. Production of glucaric acid from myo-inositol in engineered *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*, 2016, 91: 8–16.
- [11] Lee CC, Kibblewhite RE, Paavola CD, et al. Production of glucaric acid from hemicellulose substrate by rosettasome enzyme assemblies. *Mol Biotechnol*, 2016, 58(7): 489–496.
- [12] Arner RJ, Prabhu KS, Reddy CC. Molecular cloning,

- expression, and characterization of *myo*-inositol oxygenase from mouse, rat, and human kidney. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324(4): 1386–1392.
- [13] Moon TS, Dueber JE, Shiue E, et al. Use of modular, synthetic scaffolds for improved production of glucaric acid in engineered *E. coli*. *Metab Eng*, 2010, 12(3): 298–305.
- [14] Shiue E, Prather KLJ. Improving D-glucaric acid production from *myo*-inositol in *E. coli* by increasing MIOX stability and *myo*-inositol transport. *Metab Eng*, 2014, 22: 22–31.
- [15] Rogers JK, Church GM. Genetically encoded sensors enable real-time observation of metabolite production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(9): 2388–2393.
- [16] Rogers JK, Guzman CD, Taylor ND, et al. Synthetic biosensors for precise gene control and real-time monitoring of metabolites. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(15): 7648–7660.
- [17] van Sint Fiet S, van Beilen JB, Witholt B. Selection of biocatalysts for chemical synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(6): 1693–1698.
- [18] Balagaddé FK, Song H, Ozaki J, et al. A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem. *Mol Syst Biol*, 2008, 8: 187.
- [19] Ogasawara H, Ishida Y, Yamada K, et al. PdhR (pyruvate dehydrogenase complex regulator) controls the respiratory electron transport system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2007, 189(15): 5534–5541.
- [20] Cortay JC, Nègre D, Galinier A, et al. Regulation of the acetate operon in *Escherichia coli*-purification and functional-characterization of the IclR repressor. *Embo J*, 1991, 10(3): 675–679.
- [21] Martin MG, Magni C, de Mendoza D, et al. CitI, a transcription factor involved in regulation of citrate metabolism in lactic acid bacteria. *J Bacteriol*, 2005, 187(15): 5146–5155.
- [22] Gao C, Hu CH, Zheng ZJ, et al. Lactate utilization is regulated by the fadr-type regulator LldR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2012, 194(10): 2687–2692.
- [23] Henry MF, Cronan JE, Jr. *Escherichia coli* transcription factor that both activates fatty acid synthesis and represses fatty acid degradation. *J Mol Biol*, 1991, 222(4): 843–849.
- [24] Dietrich JA, Shis DL, Alikhani A, et al. Transcription factor-based screens and synthetic selections for microbial small-molecule biosynthesis. *ACS Synth Biol*, 2013, 2(1): 47–58.
- [25] Tang SY, Cirino PC. Design and application of a mevalonate-responsive regulatory protein. *Angew Chem Int Edit*, 2011, 50(5): 1084–1086.
- [26] Tang SY, Qian S, Akinterinwa O, et al. Screening for enhanced triacetic acid lactone production by recombinant *Escherichia coli* expressing a designed triacetic acid lactone reporter. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(27): 10099–10103.
- [27] Yang J, Seo SW, Jang S, et al. Synthetic RNA devices to expedite the evolution of metabolite-producing microbes. *Nat Commun*, 2013, 4: 1413.
- [28] Gilbert W, Müller-Hill B. Isolation of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966, 56(6): 1891–1898.
- [29] Lutz R, Bujard H. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(6): 1203–1210.
- [30] Guzman LM, Belin D, Carson MJ, et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol*, 1995, 177(14): 4121–4130.
- [31] Canton B, Labno A, Endy D. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 787–793.
- [32] Lee SK, Keasling JD. A propionate-inducible expression system for enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 6856–6862.
- [33] Wegerer A, Sun TQ, Altenbuchner J. Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations. *BMC Biotechnol*, 2008, 8: 2.
- [34] Choi YJ, Morel L, Le François T, et al. Novel, versatile, and tightly regulated expression system for *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(15): 5058–5066.
- [35] Mermod N, Ramos JL, Lehrbach PR, et al. Vector for regulated expression of cloned genes in a wide range of gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 1986, 167(2): 447–454.

- [36] Sullivan MJ, Curson ARJ, Shearer N, et al. Unusual regulation of a leaderless operon involved in the catabolism of dimethylsulfoniopropionate in *Rhodobacter sphaeroides*. PLoS ONE, 2011, 6(1): e15972.
- [37] Noguchi N, Takada K, Katayama J, et al. Regulation of transcription of the *mph(A)* gene for macrolide 2'-phosphotransferase I in *Escherichia coli*: characterization of the regulatory gene *mphR(A)*. J Bacteriol, 2000, 182(18): 5052–5058.
- [38] Terán W, Felipe A, Segura A, et al. Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(10): 3067–3072.
- [39] Rössger K, Charpin-El-Hamri G, Fussenegger M. A closed-loop synthetic gene circuit for the treatment of diet-induced obesity in mice. Nat Commun, 2013, 4: 2825.
- [40] Hubbard BK, Koch M, Palmer DRJ, et al. Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: characterization of the (*D*)-glucarate/galactarate catabolic pathway in *Escherichia coli*. Biochemistry, 1998, 37(41): 14369–14375.
- [41] Blattner FR, Plunkett III G, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science, 1997, 277(5331): 1453–1462.
- [42] Monterrubio R, Baldoma L, Obradors N, et al. A common regulator for the operons encoding the enzymes involved in D-galactarate, D-glucarate, and D-glycerate utilization in *Escherichia coli*. J Bacteriol, 2000, 182(9): 2672–2674.
- [43] Koonin EV, Tatusov RL, Rudd KE. Sequence similarity analysis of *Escherichia coli* proteins: functional and evolutionary implications. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(25): 11921–11925.
- [44] Yang S, Kang Z, Cao WL, et al. Construction of a novel, stable, food-grade expression system by engineering the endogenous toxin-antitoxin system in *Bacillus subtilis*. J Biotechnol, 2016, 219: 40–47.

(本文责编 郝丽芳)