

• 合成生物技术 •

## 麦芽糖诱导梯度强度启动子的定向进化改造

张国强<sup>1,2#</sup>, 滕茂放<sup>1,2,3#</sup>, 刘松<sup>1,2</sup>, 周景文<sup>1,2</sup>, 李江华<sup>1,3</sup>, 堵国成<sup>1,3</sup>

1 江南大学 未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

3 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

张国强, 滕茂放, 刘松, 周景文, 李江华, 堵国成. 麦芽糖诱导梯度强度启动子的定向进化改造. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2606-2617.

ZHANG GQ, TENG MF, LIU S, ZHOU JW, LI JH, DU GC. Directed evolution of maltose induced promoters with expanded gradient intensity. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2606-2617.

**摘要:** 不同灵敏度与响应强度的启动子在基因表达调控与代谢工程改造中应用广泛。为筛选不同诱导表达强度的启动子元件, 本研究以麦芽糖诱导启动子  $P_{glvc}$  为对象, 通过易错 PCR 方法对麦芽糖诱导型启动子进行突变获得启动子突变体库, 然后基于四环素筛选的细胞生长偶联方法对突变体进行高效筛选, 获得了不同响应范围和强度的启动子突变体, 最终得到的诱导型启动子突变体 (MT2、MT3、MT4、MT6) 对麦芽糖诱导剂的响应范围从 0–3 g/L 扩展至 0–15 g/L, 其中最高诱导表达强度菌株 (MT8) 较原始启动子菌株的绿色荧光蛋白表达水平提高约 3.15 倍, 有利于进一步拓展梯度强度启动子在枯草芽孢杆菌代谢工程和合成生物学中的应用。

**关键词:** 诱导启动子; 麦芽糖; 定向进化; 梯度强度; 枯草芽孢杆菌

**Received:** April 2, 2022; **Accepted:** May 17, 2022; **Published online:** May 20, 2022

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904900); National Natural Science Foundation of China (32172153)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study

**Corresponding author:** ZHANG Guoqiang. Tel: +86-510-85911286; E-mail: gqzhang@jiangnan.edu.cn

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2019YFA0904900); 国家自然科学基金 (32172153)

# Directed evolution of maltose induced promoters with expanded gradient intensity

ZHANG Guoqiang<sup>1,2#</sup>, TENG Maofang<sup>1,2,3#</sup>, LIU Song<sup>1,2</sup>, ZHOU Jingwen<sup>1,2</sup>, LI Jianghua<sup>1,3</sup>, DU Guocheng<sup>1,3</sup>

1 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Promoters with different sensitivity and response intensity are useful tools in gene expression regulation and metabolic engineering. Maltose induced promoter  $P_{glvc}$  was engineered to obtain promoters with different induced expression intensities. A promoter  $P_{glvc}$  mutant library was built by error-prone PCR, and screened by a growth-associated method using tetracycline resistance as an indicator. A library of promoter mutants with different sensitivity and intensity was obtained, and the maltose-induced response threshold range of promoter mutants (MT2, MT3, MT4, MT6) was extended from 0–3 g/L to 0–15 g/L. Among them, the highest induced expression intensity (MT8) was about 3.15 times higher than that of the original promoter for eGFP expression, which would be useful for its application in metabolic engineering and synthetic biology.

**Keywords:** inducible promoter; maltose; directed evolution; gradient intensity; *Bacillus subtilis*

启动子是 RNA 聚合酶的识别序列,可以起始 DNA 的转录,对于基因的表达至关重要<sup>[1]</sup>。由于诱导型的启动子具有操作简单、可调控等优点,近年来,基于诱导型启动子调控机制,研究人员开发了不同的诱导型表达系统,实现异源蛋白的高效表达或基因的精确调控,已经广泛应用于酶工程、蛋白质工程以及代谢工程领域<sup>[2-4]</sup>。例如,在大肠杆菌中,T7 表达系统在诱导表达后仅几个小时,目的蛋白即可占细胞总蛋白的 50%以上<sup>[5-6]</sup>;枯草芽孢杆菌中常用的诱导型启动子包括受 IPTG 诱导的  $P_{spac}$  启动子<sup>[7]</sup>,受木糖诱导的  $P_{xyI}$  启动子<sup>[8]</sup>,受蔗糖诱导的  $P_{sacB}$  启动子<sup>[9]</sup>及受麦芽糖诱导的  $P_{glv}$  启动子等<sup>[10-11]</sup>。然而,部分诱导型启动子在实际应用中也存在缺陷需要进一步完善,例如诱导表达强度低、诱导

响应范围窄、响应阈值过高或过低等问题。

枯草芽孢杆菌中麦芽糖的代谢主要由麦芽糖操纵子 (*glv operon*) 调控,该操纵子主要由 3 个功能基因组成,分别为 *glvA*、*glvR* 和 *glvC*<sup>[10,12]</sup>。其中, *glvC* 编码膜转运蛋白,主要功能是将胞外的麦芽糖转运至胞内,并通过磷酸烯酮式丙酮酸激酶将麦芽糖磷酸化。*glvR* 编码的调控蛋白 GlvR 通过与 6-磷酸麦芽糖结合被激活,可以特异性识别麦芽糖诱导启动子  $P_{glv}$  的结合区域,启动麦芽糖启动子的表达。*glvA* 编码以  $NAD^+$  为辅酶的 6-磷酸- $\alpha$ -葡萄糖苷酶,主要作用为分解 6-磷酸麦芽糖<sup>[13-14]</sup>。麦芽糖诱导型的启动子  $P_{glv}$  包含-35 区、-10 区和 *cre* 序列等,其中 *cre* 序列可以与活化的分解代谢物控制蛋白 CcpA 结合,产生葡萄糖阻遏效应<sup>[15-16]</sup>。

定向进化在蛋白质结构和功能改良方面具有重要应用<sup>[17-18]</sup>。利用化学诱变、易错 PCR、DNA 改组等方法构建突变体库<sup>[19-20]</sup>，通过筛选获得满足特定需求的蛋白质突变体，可以有效改善蛋白质催化或调控性能，扩展功能蛋白的应用范围，已广泛用于提高目标蛋白的热稳定性、催化特异性以及可溶性表达水平等<sup>[21]</sup>。例如，Gong 等通过随机诱变筛选将碱性蛋白酶的活性提高了 6.6 倍，表达水平提高了 4.8 倍<sup>[22]</sup>。类似地，Ben 等利用易错 PCR 技术随机突变芽孢杆菌 *Bacillus* sp. US149 来源的麦芽糖淀粉酶，获得热稳定性提高的突变体，50 °C 下的半衰期由 30 min 提高至 70 min<sup>[23]</sup>。为筛选不同梯度表达强度的启动子元件，本研究通过易错

PCR 对麦芽糖诱导型启动子进行随机突变获得启动子突变体库，进而利用细胞生长偶联方法进行高效进化筛选，并获得了不同麦芽糖响应范围和诱导表达强度的启动子突变体。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

本研究所用原始菌株及质粒均为实验室保藏 (表 1)。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 用于所有质粒的克隆，枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) WB600 用于启动子筛选。PCR 引物 (表 2) 及测序服务均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。

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		
pHT01	Expression vector, P <sub>grac</sub> , Cm	Lab stock
pHT01-eGFP	eGFP	This work
pHT01M1	P <sub>glv</sub> , eGFP	This work
pHT01M11	P <sub>glvc</sub> , eGFP	This work
pHT01MT	P <sub>glvc</sub> , tetA, eGFP	This work
Strains		
<i>E. coli</i> JM109	For plasmid construction	Lab stock
<i>B. subtilis</i> WB600	Expression host	Lab stock
JM1	WB600 harboring pHT01M1	This work
JM2	WB600 harboring pHT01M11	This work
JMT	WB600 harboring pHT01MT	This work
MT1	WB600 harboring pHT01MT mutant 1	This work
MT2	WB600 harboring pHT01MT mutant 2	This work
MT3	WB600 harboring pHT01MT mutant 3	This work
MT4	WB600 harboring pHT01MT mutant 4	This work
MT5	WB600 harboring pHT01MT mutant 5	This work
MT6	WB600 harboring pHT01MT mutant 6	This work
MT7	WB600 harboring pHT01MT mutant 7	This work
MT8	WB600 harboring pHT01MT mutant 8	This work
MT9	WB600 harboring pHT01MT mutant 9	This work
MT10	WB600 harboring pHT01MT mutant 10	This work
MT11	WB600 harboring pHT01MT mutant 11	This work

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primer used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
eGFP-F	<u>TAAAGGAGGAAGGATCCATGGGTAAGGGAGAAGAACTTTTCACTG</u>
eGFP-R	<u>GACGTCTGACTCTAGATTA</u> TTTGTATAGTTTCATCCATGCCATGTGTAATC
pHT01-F	<u>TAATCTAGAGTTCGACGTC</u> CCCCG
pHT01-R	GGATCCTTCCTCCTTTAATTGGGAATTGTTATC
Pglv-F	CACCGGAATTAGCTT <u>GGTAC</u> CCCCCTGCCTTTTCTAAATTCACGC
Pglv-R	CTTCTCCCTTACCCAT <u>GGATC</u> CTTCCTCTCTTTTATGGAGTGAAAGTGCTC
PGLV-M1-F	<u>GAATTGTA</u> AAATTTATCAAGGAGGTCGTCATATGAAGAAAAATCATTCTCAATCGT
PGLV-M1-R	<u>CTCCTTGATA</u> AAATTTTACAATTCCATTTATACCATGAGATAGCTCGTC
TET-F	<u>CATAAAAAGGAGGAAGGATCCG</u> TGAATACATCCTATTACAATCGAATTTACGACAC
TET-R	<u>CAGAACCACCACCACCAGAACC</u> GCCACCGAAATCCCTTTGAGAATGTTTATACATTCAAGGTAACCAG
PTV-F	<u>GTTCTGGTGGTGGTGGTTCTG</u> TGGCGGTTCTATGGGTAAGGGAGAAGAACTTTTCACTG
PTV-R	<u>GGATCCTTCCTCCTTTTATG</u> GAGTGAAAG
PG-F	<u>GTTTCCACCGGAATTAGCT</u> TGGTACC
PG-R	<u>GATGTATTCACGGATCCTTCCTCCTTTTATG</u>
PGV-F	<u>CATAAAAAGGAGGAAGGATCCG</u> TGAATACATC
PGV-R	<u>GCTAATTCCGGTGGAAACGAGGTC</u>

Homologous sequences used for one-step seamless cloning and enzyme digestion site were underlined.

### 1.1.2 仪器和试剂

仪器：UV-2450 紫外可见分光光度计购自 Shimadzu 公司；PCR 仪购自 Eppendorf 公司；酶标仪购自 Bio-Tek 公司；恒温培养箱购自上海精宏实验设备有限公司。

试剂：一步克隆试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司(以下简称“上海生工”)；DNA 聚合酶、DNA marker 购自大连宝生物有限公司 (TaKaRa)；易错 PCR 随机突变试剂盒购自安捷伦科技有限公司；其他化学试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司(分析纯)。

### 1.1.3 培养基

Luria-Bertani (LB) 培养基：10 g/L 蛋白胨，5 g/L 酵母提取物，10 g/L NaCl，筛选培养基添加 100 μg/mL 氨苄青霉素，固体培养基中添加 20 g/L 琼脂。四环素母液使用无水乙醇配置，浓度为 20 mg/mL，用作四环素抗性筛选。

## 1.2 方法

### 1.2.1 麦芽糖诱导启动子 $P_{glvc}$ 重组质粒的构建

将绿色荧光蛋白 eGFP 基因片段与 pHT01 载体片段连接，获得质粒 pHT01-eGFP；将 *Bacillus subtilis* 168 中麦芽糖诱导启动子  $P_{glv}$  扩增后与 pHT01-eGFP 表达载体进行一步克隆组装，替换  $P_{grac}$  启动子，获得质粒 pHT01M1；通过定点突变将  $P_{glv}$  启动子上的碳代谢元件 *cre* 序列上的 CG 突变为 AT，得到携带突变启动子  $P_{glvc}$  的质粒 pHT01M11 (图 1)。利用一步克隆酶、Gibson 多片段组装酶连接构建质粒转化 *E. coli* JM109，将筛选得到的转化子进行菌落 PCR 验证并将样品测序。

### 1.2.2 麦芽糖诱导启动子的表征与特性分析

将构建成功的麦芽糖诱导启动子重组质粒 pHT01M1 与 pHT01M11 转入宿主菌 *B. subtilis* WB600，在 LB 培养基中添加终浓度 2% 的麦芽糖，在 30 °C、220 r/min 条件下培养 12 h 后检测菌体荧光。选取麦芽糖、蔗糖、 $\alpha$ -乳糖、 $\alpha$ -

半乳糖、果糖和甘露糖对麦芽糖诱导启动子的诱导特异性进行分析,诱导终浓度为 2%。在 30 °C、220 r/min 条件下培养 12 h 后检测菌体荧光。为检测麦芽糖诱导启动子的相应阈值,在 LB 培养基中添加不同浓度的麦芽糖,于 30 °C、220 r/min 条件下培养 12 h 后检测菌体荧光。

### 1.2.3 基于四环素筛选的麦芽糖诱导启动子进化质粒的构建

用引物 TET-F/TET-R 扩增四环素蛋白基因 *tetA*,用引物 PTV-F/PTV-R 扩增质粒 pHT01M11 载体片段,再通过一步克隆将四环素蛋白基因 *tetA* 与 pHT01M11 载体连接起来,得到融合蛋白的表达质粒 pHT01MT。该筛选模型是基于耐药性膜泵 TetA 蛋白,该蛋白具有将四环素转运出细胞和转运  $\text{Ni}^{2+}$  进入细胞的双重功能,因此可以通过不同菌株性状进化筛选启动子响应与表达强度。

### 1.2.4 麦芽糖诱导启动子突变体库的构建

利用易错 PCR 构建  $P_{\text{glv}}$  启动子突变体库,质粒 pHT01MT 作为模板。PCR 反应混合物由 ddH<sub>2</sub>O (41.5  $\mu\text{L}$ )、易错 DNA 聚合酶 (1  $\mu\text{L}$ )、pHT01MT (20 ng/ $\mu\text{L}$ , 1.0  $\mu\text{L}$ )、引物 PG-F (10  $\mu\text{mol/L}$ , 0.5  $\mu\text{L}$ )、引物 PG-R (10  $\mu\text{mol/L}$ , 0.5  $\mu\text{L}$ )、dNTPs (40 mmol/L, 1.0  $\mu\text{L}$ ) 和缓冲液 (5  $\mu\text{L}$ ) 组成,聚合酶链反应条件包括 95 °C 预变性 2 min; 随后 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物与克隆载体 pHT01MT 连接,并将连接产物用于转化 *E. coli* JM109。在含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 平板上 37 °C 孵育过夜后,随机挑取转化子测序,计算平均突变率。琼脂平板上的所有克隆用无菌去离子水洗脱,接种至含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37 °C 孵育 4 h。提取质粒得到麦芽糖诱导启动子质粒突变库 pHT01MT\*,用

于转化 *B. subtilis* WB600,然后将其涂在含 10  $\mu\text{g/mL}$  氯霉素的 LB 琼脂平板上,于 37 °C 孵育过夜。

### 1.2.5 菌体浓度与荧光检测

菌体在 LB 培养基中培养过程中,取相应时间的菌液,用分光光度计检测其在 600 nm 处的吸光值  $OD_{600}$ ,用酶标仪检测菌体的绿色荧光强度(激发光波长 488 nm 和发射光波长 509 nm),计算相对荧光强度(荧光强度与  $OD_{600}$  的比值)。

### 1.2.6 麦芽糖诱导启动子的进化与筛选

将质粒 pHT01MT 转入 *B. subtilis* WB600 中,接种至 LB 培养基,待  $OD_{600}$  为 1.5–2.0 时,添加麦芽糖诱导剂。在正向筛选中,分别添加不同浓度的麦芽糖 (0 g/L、0.5 g/L、1 g/L、1.5 g/L、2 g/L、3 g/L) 与四环素 (2  $\mu\text{g/mL}$ 、3  $\mu\text{g/mL}$ 、4  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$ ); 在反向筛选中,分别添加不同浓度的麦芽糖 (0 g/L、0.5 g/L、1 g/L、1.5 g/L、2 g/L、3 g/L) 与  $\text{NiCl}_2$  (1  $\mu\text{mol/L}$ 、2  $\mu\text{mol/L}$ 、4  $\mu\text{mol/L}$ 、6  $\mu\text{mol/L}$ ),培养 6 h 后,测定菌液在 600 nm 处的吸光值  $OD_{600}$ 。

将得到的含 pHT01MT\* 突变体菌株从琼脂平板上转移至 96 孔板进行初步筛选。正向筛选中,将菌液培养至  $OD_{600}$  约 1.0 后,添加 2  $\mu\text{g/mL}$  的四环素和不同浓度的麦芽糖 (第一轮筛选 4 g/L, 第二轮筛选 8 g/L, 第三轮筛选 12 g/L),培养 6 h 后,检测菌体生长  $OD_{600}$ ,去除部分诱导响应强度过低或者无响应的启动子,筛选生长较好的菌株进入反向筛选。反向筛选中,将菌株培养至  $OD_{600}$  约 1.0,添加 6  $\mu\text{mol/L}$   $\text{NiCl}_2$  和不同浓度的麦芽糖 (第一轮筛选 2 g/L, 第二轮筛选 4 g/L, 第三轮筛选 8 g/L),培养 6 h 后,检测菌体生长  $OD_{600}$ ,去除部分存在泄露表达或诱导响应阈值过低的启

动子，筛选生长较好的菌株进行诱导表达评价及测序验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 麦芽糖诱导启动子 $P_{glvc}$ 重组质粒的构建与表征

利用麦芽糖诱导型启动子构建麦芽糖诱导荧光蛋白表达的重组质粒，如图 1 所示。由于枯草芽孢杆菌中原始的麦芽糖诱导启动子  $P_{glv}$  受麦芽糖诱导同时也受到葡萄糖的抑制，这限制了该启动子作为表达元件的应用。有研究报道将启动子中的 *cre* 序列上的 CG 碱基突变为 AT 能减缓葡萄糖抑制，进一步促进  $P_{glv}$  的诱导表达<sup>[10]</sup>。因此，我们构建含麦芽糖诱导启动子重组质粒 pHT01M1 与 pHT01M11 (含 *cre* 位点突变,  $P_{glvc}$ ) 转入宿主菌 *B. subtilis* WB600 中，在添加终浓度 2% 麦芽糖培养 7 h 后，诱导后菌株荧光强度明显提高。其中，启动子  $P_{glvc}$  的相对荧光强度在加入麦芽糖诱导 10 h 后较  $P_{glv}$  提高 1.81 倍 (图 2)。

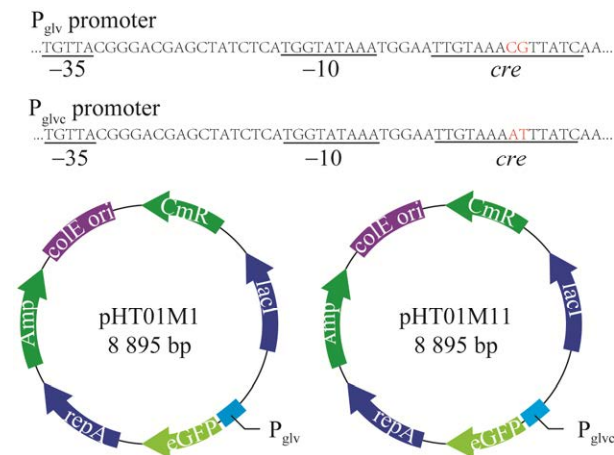


图 1 含麦芽糖诱导启动子  $P_{glv}$  与  $P_{glvc}$  重组质粒的构建

Figure 1 Construction of recombinant plasmid containing a maltose induced promoter.

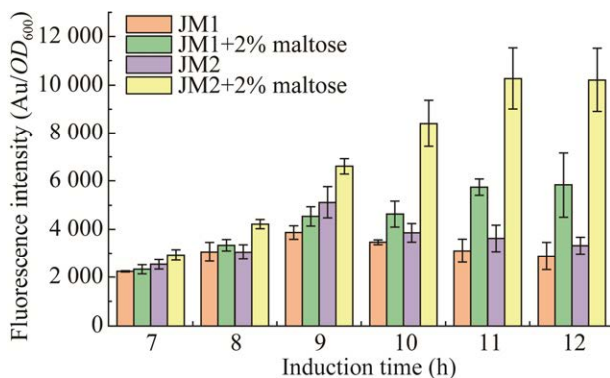


图 2 麦芽糖诱导启动子重组质粒的荧光表达水平表征

Figure 2 Fluorescence characterization of recombinant plasmid of maltose induced promoter. JM1 strain contains plasmid pHT01M1; JM2 strain contains plasmid pHT01M11.

### 2.2 麦芽糖诱导启动子 $P_{glvc}$ 特异性与响应阈值分析

为验证麦芽糖诱导启动子对诱导剂响应的特异性，我们选取了不同糖类进行启动子诱导水平分析，其中包括蔗糖、 $\alpha$ -乳糖、 $\alpha$ -半乳糖、果糖和甘露糖，分别以 2% 的终浓度对麦芽糖诱导启动子进行诱导，并通过绿色荧光蛋白评价其表达水平。结果如图 3 所示，该启动子对其他糖类的响应较低，对麦芽糖具有较好诱导响应特异性。

为检测麦芽糖诱导启动子响应范围，我们比较添加不同浓度麦芽糖对启动子表达的影响。首先，添加 0–10 g/L 浓度麦芽糖分别诱导启动子  $P_{glv}$  和  $P_{glvc}$ ，通过分析麦芽糖诱导后 12 h 的荧光强度变化发现初始  $P_{glv}$  启动子及其 *cre* 序列改造后的启动子  $P_{glvc}$  对麦芽糖诱导响应范围均为 0–3 g/L (图 4A、4B)。我们进一步比较低浓度麦芽糖对  $P_{glv}$  和  $P_{glvc}$  的影响，以分析麦芽糖诱导启动子的诱导阈值范围，结果如图 4C 和 4D 所示，当麦芽糖诱导浓度在 0–5 g/L 范围内， $P_{glv}$  启动子强度在麦芽糖诱导 10 h 与 12 h 后会

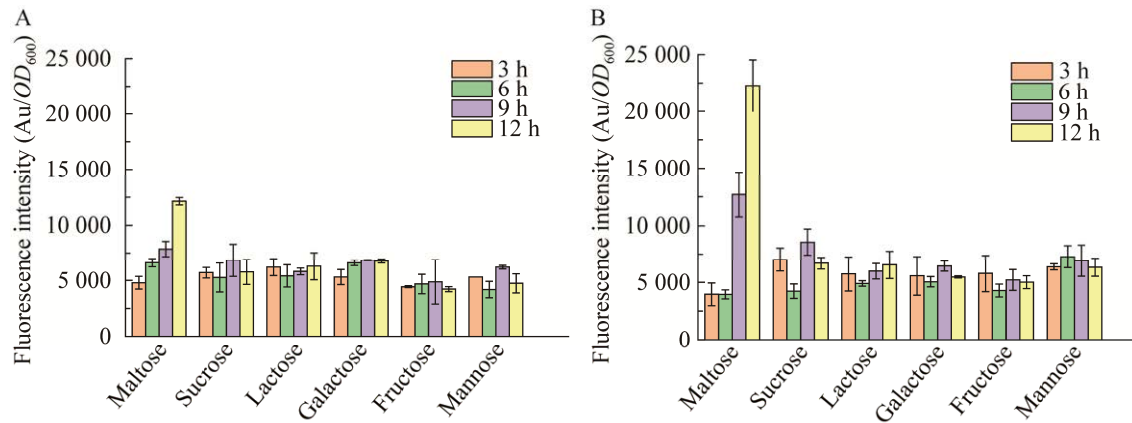


图3 麦芽糖诱导型启动子特异性分析

Figure 3 The specificity of maltose inducible promoter. The relative fluorescence intensity of  $P_{glv}$  promoter (A) and  $P_{glvC}$  promoter (B) induced by different inducers for 3 h, 6 h, 9 h and 12 h.

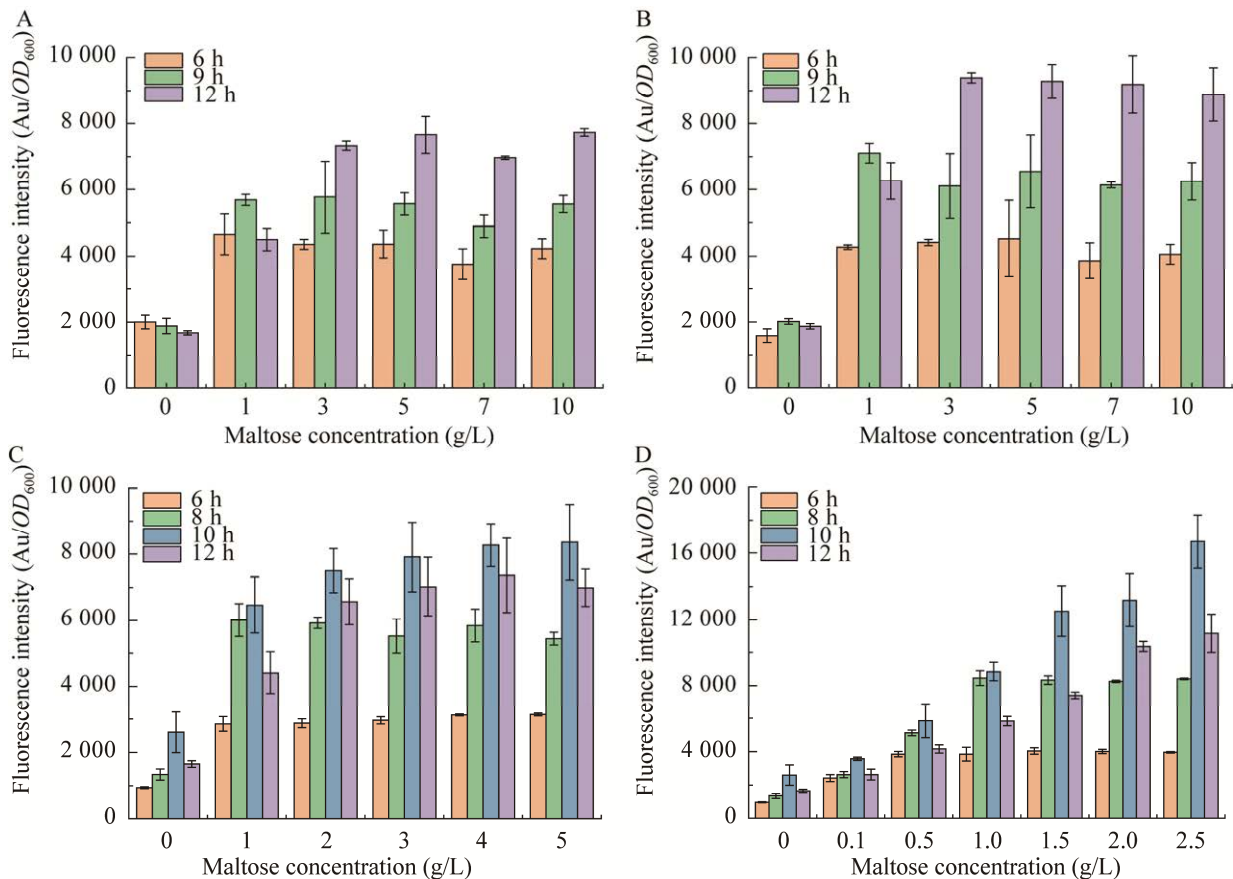


图4 麦芽糖诱导启动子的诱导响应水平分析

Figure 4 Response threshold analysis of maltose inducible promoter. The relative fluorescence intensity of  $P_{glv}$  promoter (A) and  $P_{glvC}$  promoter (B) induced by different maltose concentrations (0–10 g/L) for 6 h, 9 h and 12 h. The relative fluorescence intensity of  $P_{glv}$  promoter induced by different maltose concentrations (0–5 g/L) (C) and the relative fluorescence intensity of  $P_{glvC}$  promoter induced by different maltose concentrations (0–2.5 g/L) (D) for 6 h, 8 h, 10 h and 12 h.

随着麦芽糖浓度增加而增强，但当麦芽糖浓度大于 2 g/L 后，其诱导表达强度增加幅度减缓；在麦芽糖浓度 0–2.5 g/L 范围内， $P_{glvc}$  启动子诱导强度逐渐增强，并且其诱导强度与麦芽糖浓度具有较好的正相关性。

### 2.3 利用细胞生长偶联进化麦芽糖诱导启动子

虽然启动子  $P_{glvc}$  在低浓度麦芽糖具有较好的梯度诱导表达能力，但是对麦芽糖的响应浓度范围较窄。为进一步拓展启动子的响应范围，采用随机突变和四环素细胞生长偶联方法对麦芽糖诱导启动子  $P_{glvc}$  定向进化。首先，在启动子  $P_{glvc}$  后连接具有双向筛选标记的 TetA 蛋白，然后通过 3×GS 柔性肽将绿色荧光蛋白 eGFP 与 TetA 蛋白 C 端连接（图 5A）。其中，TetA 蛋白

作为膜泵，具有将四环素转运出细胞产生抗性和转运  $Ni^{2+}$  进入细胞的双重功能<sup>[24-25]</sup>，荧光蛋白主要用于定量分析麦芽糖诱导启动子的表达强度。

在细胞生长偶联的进化方法中，利用 TetA 蛋白对  $P_{glvc}$  启动子突变体进行双向筛选。其中，四环素作为正向筛选标记，可以去除部分诱导响应强度过低或者无反应的启动子，这些启动子在较高麦芽糖浓度存在时，仍无法有效启动 TetA 蛋白表达，导致不能在含四环素培养条件下正常生长；利用不同浓度的  $NiCl_2$  进行反向筛选，去除部分存在泄露表达或诱导响应初始阈值过低的启动子，这些启动子在较低浓度麦芽糖存在时就能有效表达 TetA 蛋白，向胞内转运  $Ni^{2+}$ ，导致细菌生长缓慢（图 5B）。

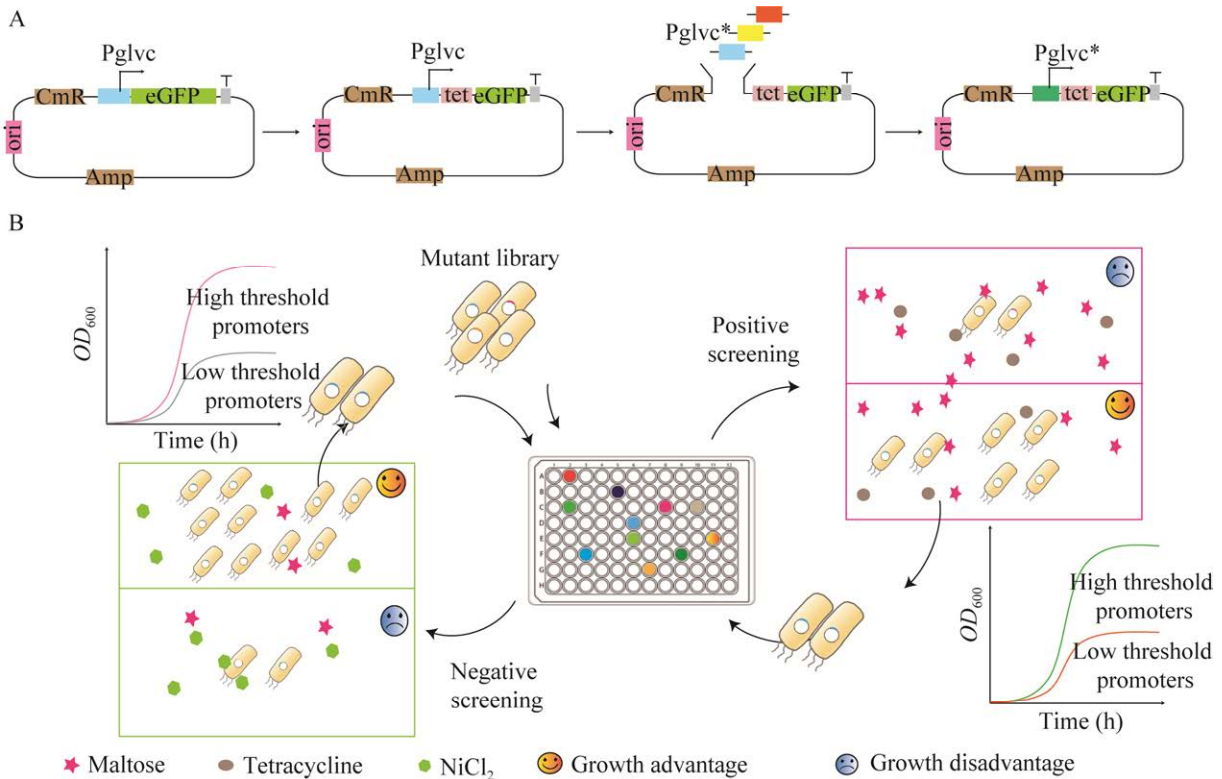


图 5 麦芽糖诱导型启动子的定向进化示意图

Figure 5 Diagram of maltose inducible promoter evolution. (A) Construction of plasmid with bidirectional screening fusion protein and maltose promoter mutation library. (B) Flow chart of directed evolution for maltose promoter.



为确定  $P_{glvc}$  启动子正向与反向筛选的条件, 我们对筛选方法验证优化, 首先将含有 pHT01MT 质粒的 *B. subtilis* WB600 预培养, 然后分别添加不同浓度的麦芽糖与不同浓度筛选试剂 (四环素或  $NiCl_2$  溶液), 继续培养 6 h, 比较菌体生长情况。结果显示在添加四环素浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,  $P_{glvc}$  梯度诱导效果明显, 随着诱导剂浓度的增加, 菌体生长能力逐渐增强; 而反向筛选中, 添加 6  $\mu\text{mol}/\text{L}$   $NiCl_2$  的效果比较明显, 随着诱导剂浓度的增加, 菌体生长受到抑制, 表明该进化方法是可行的 (图 6)。因此, 在接下来的实验中, 我们设定在四环素浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  或  $NiCl_2$  浓度为 6  $\mu\text{mol}/\text{L}$  条件下, 进行了 3 轮正反筛选, 其中 1 次正向筛选和 1 次反向筛选定义为一轮筛选, 最终获得突变后的启动子库。

#### 2.4 麦芽糖诱导启动子突变体的荧光表征

通过连续 3 轮进化, 我们获得不同的进化

菌株突变体库, 并从其中挑选出 11 株生长情况优良的菌株, 分别编号为 MT1-MT11, 并用 24 孔板诱导培养进行荧光验证 (图 7)。通过对筛选出的麦芽糖浓度响应范围扩大或诱导表达强度增加的突变体启动子序列进行测序, 最终获得突变体 MT2 (C215T)、MT3 (T183A)、MT4 (G363A)、MT5 (G32A)、MT6 (T280C) 和 MT8 (T382C)。与含  $P_{glvc}$  初始启动子的对照菌株 JMT 相比, 突变体诱导响应范围扩大, 在 0–15 g/L 的麦芽糖浓度范围下, 大部分突变体均具有较好的梯度响应, 而对照菌株 JMT 在麦芽糖浓度低于 3 g/L 时即达到最高诱导表达强度。此外, 获得的突变体 MT5 (G32A) 与 MT8 (T382C) 的荧光强度比对照菌株分别提高了 2 倍和 3.15 倍。因此, 通过定向进化获得的启动子突变体具有更宽泛的梯度诱导表达范围, 可进一步应用于枯草芽孢杆菌的代谢工程调控。

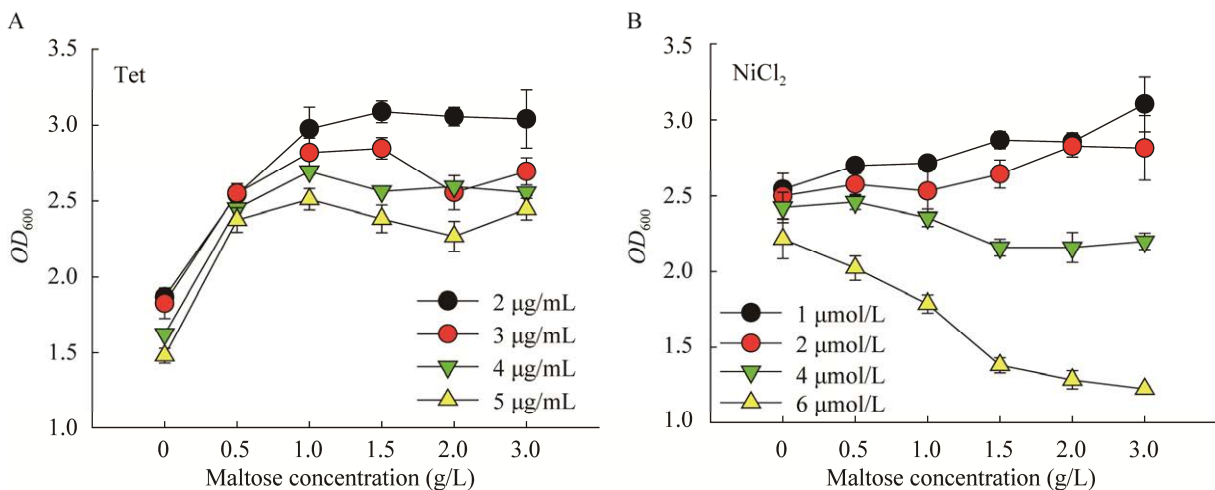


图 6 麦芽糖诱导型启动子进化方法的验证

Figure 6 Validation of maltose inducible promoter evolution method. The relationship of the growth of bacteria and maltose concentration (0–3 g/L) at different tetracycline concentrations (2–5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (A) or different  $NiCl_2$  concentrations (1–6  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) (B).

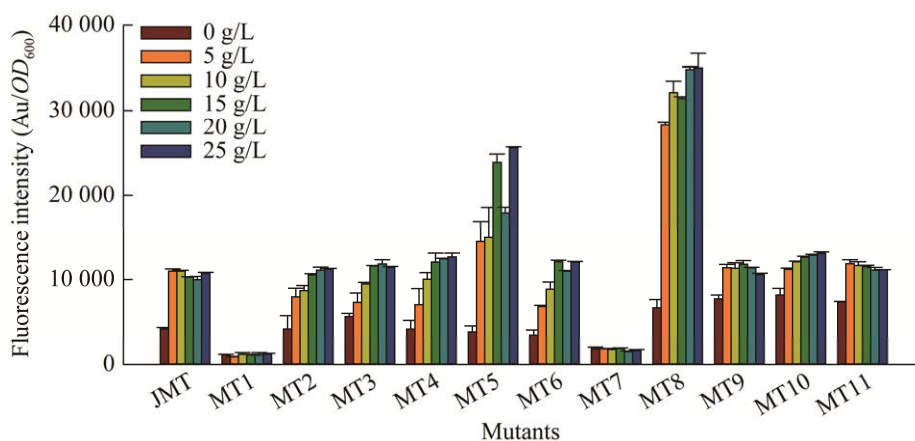


图7 麦芽糖诱导型启动子突变体的荧光表征

Figure 7 Fluorescence characterization of maltose inducible promoter mutants. JMT strain contains plasmid pHT01MT; MT1-MT11 strain contains plasmid pHT01MT\* with mutations on promoter sequence.

### 3 讨论

枯草芽孢杆菌具有遗传背景清晰、食品安全和蛋白分泌能力强等优点,被广泛用于酶与化学品的工业生产<sup>[26]</sup>,然而相比大肠杆菌,对枯草芽孢杆菌的表达系统元件的研究仍需进一步完善。启动子是基因表达调控至关重要的元件,可对基因表达时间与强度进行精确调控,因此,进化筛选更强、更灵敏的启动子具有重要意义<sup>[27]</sup>。对启动子的改造常用的方式主要有易错 PCR、定点突变、DNA 改组以及构建杂交启动子等,可以提高其表达水平或者改善表达泄露等问题<sup>[28-29]</sup>。例如,研究人员通过对枯草芽孢杆菌启动子  $P_{veg}$  上的转录因子 GamR 结合序列设计改造,获得了对 6-磷酸氨基葡萄糖具有不同动态范围的启动子,并作为生物传感器用于基因回路的调控<sup>[30]</sup>。

本研究通过易错 PCR 构建麦芽糖诱导启动子突变体库,并利用 TetA 蛋白能转运  $Ni^{2+}$  进入细胞同时向细胞外转运四环素的特点,将启动子的强度与细胞生长进行偶联,通过改变启动子诱导剂的浓度,对启动子的诱导响应范围与

强度进行筛选。通过 3 轮的快速定向进化与筛选,获得了对麦芽糖诱导响应范围与诱导强度均提升的突变体,并分析启动子的突变位点。其中,麦芽糖诱导启动子突变体的响应范围由原来的 0-3 g/L 扩大至 0-15 g/L,最高诱导强度较出发菌株增强了 3.15 倍。本研究获得的宽泛的梯度响应启动子,可以用于蛋白表达或途径精细调控;而响应阈值高的启动子可以降低对诱导剂麦芽糖的灵敏度,也可作为高活力麦芽糖淀粉酶等进化筛选的生物传感器。综上,通过双向筛选获得的不同诱导剂梯度响应或表达强度的麦芽糖启动子可作为代谢工程和合成生物学调控元件,进一步拓展其在枯草芽孢杆菌代谢调控中应用,有利于产高值化学品和蛋白质等细胞工厂的构建<sup>[31]</sup>。

### REFERENCES

- [1] Deaner M, Alper HS. Promoter and terminator discovery and engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2018, 162: 21-44.
- [2] Cazier AP, Blazek J. Advances in promoter engineering: novel applications and predefined transcriptional control. *Biotechnol J*, 2021, 16(10): e2100239.

- [3] Fitz E, Wanka F, Seiboth B. The promoter toolbox for recombinant gene expression in *Trichoderma reesei*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2018, 6: 135.
- [4] Kluge J, Terfehr D, Kück U. Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(15): 6357-6372.
- [5] Jia BL, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol*, 2016, 6(8): 160196.
- [6] Nie ZH, Luo H, Li JF, et al. High-throughput screening of T7 promoter mutants for soluble expression of cephalosporin C acylase in *E. coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 190(1): 293-304.
- [7] Sun HG, Bie XM, Lu FX, et al. Enhancement of surfactin production of *Bacillus subtilis* fmbR by replacement of the native promoter with the Pspac promoter. *Can J Microbiol*, 2009, 55(8): 1003-1006.
- [8] Jiang Y, Fu Y, Ren Z, et al. Screening and application of inducible promoters in *Ruminiclostridium papyrosolvans*. *Lett Appl Microbiol*, 2020, 71(4): 428-436.
- [9] Biedendieck R, Gamer M, Jaensch L, et al. A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. *J Biotechnol*, 2007, 132(4): 426-430.
- [10] Ming YM, Wei ZW, Lin CY, et al. Development of a *Bacillus subtilis* expression system using the improved Pglv promoter. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 55.
- [11] Li L, Mu L, Wang XJ, et al. A novel expression vector for the secretion of abaecin in *Bacillus subtilis*. *Braz J Microbiol*, 2017, 48(4): 809-814.
- [12] Yamamoto H, Serizawa M, Thompson J, et al. Regulation of the *glv* operon in *Bacillus subtilis*: YfiA (GlvR) is a positive regulator of the operon that is repressed through CcpA and cre. *J Bacteriol*, 2001, 183(17): 5110-5121.
- [13] Fehr M, Frommer WB, Lalonde S. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors. *PNAS*, 2002, 99(15): 9846-9851.
- [14] Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, et al. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*, 2004, 303(5654): 87-89.
- [15] 牛福星. 枯草芽孢杆菌转化方法的建立和 Pglv 高效表达载体的构建[D]. 南宁: 广西大学, 2015.
- Niu FX. Establishment of transformation method for *Bacillus subtilis* and construction of Pglv expression vector for high efficiency expression[D]. Nanning: Guangxi University, 2015 (in Chinese).
- [16] 张云雁. 耐碱性木聚糖酶基因(*xynA*)的克隆和表达及利用麦芽糖的诱导表达[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- Zhang YY. Clone and expression of alkali-tolerant xylanase gene and the induced expression by maltose[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2010 (in Chinese).
- [17] Bommol/Larius AS. Biocatalysis: a status report. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2015, 6: 319-345.
- [18] Reetz MT. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(34): 12480-12496.
- [19] Morrison MS, Podracky CJ, Liu DR. The developing toolkit of continuous directed evolution. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(6): 610-619.
- [20] Chae TU, Choi SY, Kim JW, et al. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 47: 67-82.
- [21] 曲戈, 赵晶, 郑平, 等. 定向进化技术的最新进展. *生物工程学报*, 2018, 34(1): 1-11.
- Qu G, Zhao J, Zheng P, et al. Recent advances in directed evolution. *Chin J Biotech*, 2018, 34(1): 1-11 (in Chinese).
- [22] Gong BL, Mao RQ, Xiao Y, et al. Improvement of enzyme activity and soluble expression of an alkaline protease isolated from oil-polluted mud flat metagenome by random mutagenesis. *Enzyme Microb Technol*, 2017, 106: 97-105.
- [23] Ben Mabrouk S, Ayadi DZ, Ben Hlima H, et al. Thermostability improvement of maltogenic amylase MAUS149 by error prone PCR. *J Biotechnol*, 2013, 168(4): 601-606.
- [24] Muranaka N, Sharma V, Nomura Y, et al. An efficient platform for genetic selection and screening of gene switches in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(5): e39.
- [25] Pang QX, Han H, Liu XQ, et al. *In vivo* evolutionary engineering of riboswitch with high-threshold for N-acetylneuraminic acid production. *Metab Eng*, 2020, 59: 36-43.

- [26] Cui WJ, Han LC, Suo FY, et al. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34(10): 1-19.
- [27] 王靖宇, 陈涛, 班睿, 等. 蜡样芽孢杆菌 ATCC14579 核黄素操纵子的克隆及在枯草芽孢杆菌中的表达. *生物加工过程*, 2004, 2(2): 68-73.  
Wang JY, Chen T, Ban R, et al. Cloning the riboflavin operon of *B. cereus* ATCC14579 and expression in *B. subtilis*. *Chin J Bioprocess Eng*, 2004, 2(2): 68-73 (in Chinese).
- [28] 孙先花, 苏小运. 丝状真菌启动子的基因工程改造进展. *广西科学*, 2017, 24(1): 73-76.  
Sun XH, Su XY. Research progress towards promoters genetic engineering in filamentous fungi. *Guangxi Sci*, 2017, 24(1): 73-76 (in Chinese).
- [29] 张云雁, 杨明明, 段玉兰, 等. 麦芽糖诱导耐碱性木聚糖酶基因在枯草芽孢杆菌中的表达. *饲料与畜牧*, 2011(2): 25-28.  
Zhang YY, Yang MM, Duan YL, et al. Maltose induced expression of alkali tolerant xylanase gene in *Bacillus subtilis*. *Anim Agric*, 2011(2): 25-28. (in Chinese)
- [30] Wu YK, Chen TC, Liu YF, et al. Design of a programmable biosensor-CRISPRi genetic circuits for dynamic and autonomous dual-control of metabolic flux in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(2): 996-1009.
- [31] Fu G, Yue J, Li DD, et al. An operator-based expression toolkit for *Bacillus subtilis* enables fine-tuning of gene expression and biosynthetic pathway regulation. *PNAS*, 2022, 119(11): e2119980119.

(本文责编 陈宏宇)