



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目：大肠杆菌利用甘露糖生产 2'-岩藻糖基乳糖的途径构建及优化
作者：李莎, 胡雅雯, 李俊众, 孙雪, 李玉, 李庆刚
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240123
收稿日期: 2024-06-07
网络首发日期: 2024-11-06
引用格式: 李莎, 胡雅雯, 李俊众, 孙雪, 李玉, 李庆刚. 大肠杆菌利用甘露糖生产 2'-岩藻糖基乳糖的途径构建及优化[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20240123>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20240123

大肠杆菌利用甘露糖生产 2'-岩藻糖基乳糖的途径构建及优化

李莎, 胡雅雯, 李俊众, 孙雪, 李玉, 李庆刚

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-fucosyllactose, 2'-FL) 是岩藻糖基修饰的一种人乳寡糖, 在婴幼儿的生长发育中起着重要作用。利用微生物合成 2'-FL 是实现其大规模生产的可行方法, 但是在其合成过程中碳源的利用效率较低, 限制了 2'-FL 生产水平的进一步提高。本文构建一种可以使菌株利用甘油进行自身生长, 利用甘露糖进行 2'-FL 生产的细胞生长与生产互不干扰的新策略, 在大肠杆菌中敲除了磷酸甘露糖异构酶基因 *manA*, 获得了可以利用甘油进行菌株生长, 利用甘露糖进行 2'-FL 生产的工程菌株, 提高了 2'-FL 的转化率, 由原有的 10.77% 提高至 53.8%; 进一步通过敲除前体物 GDP-岩藻糖的分支途径, 优化关键酶 α -1,2-岩藻糖基转移酶和甘露糖-1-磷酸鸟苷酰转移酶的表达水平, 提高了 2'-FL 的产量, 通过测定菌株生长情况及甘露糖的转化率对这一策略进行了理论验证, 后续会将这种方法应用到实验室已有的 2'-FL 高产菌株中, 进一步提高甘露糖到 2'-FL 的转化率, 为构建 2'-FL 高效合成的工业菌株提供参考。

关键词: 2'-岩藻糖基乳糖; 人乳寡糖; 甘露糖; 大肠杆菌; 微生物合成

中图分类号: TQ920.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Construction and Optimization of the Pathway from Mannose to 2'-Fucosyllactose in *Escherichia coli*

LI Sha, HU Yawen, LI Junzhong, SUN Xue, LI Yu, LI Qinggang

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: 2'-fucosyllactose (2'-FL) is a kind of fucosyl-modified human milk oligosaccharides, which plays an important role in the infants' growth. 2'-FL could be synthesized by microorganism with high production. However, the carbon source utilization efficiency is low in this method, limiting the improvement of 2'-FL production continuously. In this paper, a new strategy was constructed to enable the strain to use glycerol for self-growth, and the cell growth and production of mannose for 2'-FL concentration did not interfere with each other, and the phosphomannose isomerase (ManA) in *Escherichia coli* strain was deleted in this study, and the obtained strain could use glycerol for cell growth and use mannose for 2'-FL synthesis, and the conversion rate of 2'-FL was improved, from the original 10.77% to 58.3%. Furthermore, by knocking out the branching pathway of the precursor GDP-fucose, optimizing the expression levels of key enzymes α -1,2-fucosyltransferase and mannose-1-phosphate guanyloyltransferase, the production of 2'-FL was increased. This strategy was verified by measuring the growth of the strain and the conversion rate of mannose, and this method will be applied in the existing 2'-FL high-producers in the laboratory to further improve the conversion rate of mannose to 2'-FL, and provide a reference for the construction of industrial strains with efficient synthesis of 2'-FL.

Key words: 2'-fucosyllactose; human milk oligosaccharides; mannose; *Escherichia coli*; microbial synthesis

收稿日期: 2024-06-07; 修回日期: 2024-09-05

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC2104902); 天津市研究生科研创新项目 (2022BKY134)

作者简介: 李莎 (2000-), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生; 通信作者: 李庆刚, 副研究员, liqinggang@tust.edu.cn

人乳寡糖 (human milk oligosaccharides, HMOs) 在母乳中的含量仅次于乳糖和脂类, 存在 200 余种不同的结构^[1-2]。HMOs 可抑制致病微生物对肠黏膜的黏附作用, 刺激有益菌群的生长, 有利于婴儿肠道、大脑发育^[3-5]。2'-岩藻糖基乳糖 (2'-fucosyllactose, 2'-FL) 是岩藻糖基修饰的 HMOs, 在 HMOs 中占比最多, 约为 31%^[6]。目前, 2'-FL 已经获批可以添加至婴幼儿配方奶粉中, 具有广阔的市场应用前景, 其生产方法受到更为广泛的关注^[7]。

2'-FL 的生产可采用化学合成、酶法合成和微生物合成的方法, 其中, 微生物合成法具有条件温和、成本低、环境友好等特点^[8]。代谢工程及合成生物学的发展, 进一步提高了微生物合成 2'-FL 的水平^[9]。目前, 大多以大肠杆菌作为宿主菌株进行 2'-FL 的微生物合成^[10]。其原因为: 大肠杆菌遗传背景清晰、生长迅速, 并且自身具有生产 2'-FL 前体物鸟嘌呤 5'-二磷酸-β-L-岩藻糖 (GDP-岩藻糖) 的完整途径, 进一步表达异源 α-1,2 岩藻糖基转移酶后, 即可生产 2'-FL^[11-12]。2'-FL 的微生物合成途径如图 1 所示。以果糖-6-磷酸为前体, 依次通过磷酸甘露糖异构酶 (ManA)、磷酸甘露糖变位酶 (ManB)、甘露糖-1-磷酸鸟苷酰转移酶 (ManC)、GDP-甘露糖 4,6-脱水酶 (Gmd) 和 GDP-4-酮-6-脱氧甘露糖 3,5-变旋酶/4-还原酶 (WcaG) 的催化作用合成 GDP-岩藻糖。GDP-岩藻糖和乳糖在 α-1,2-岩藻糖基转移酶 (FutC) 的作用下, 最终生成 2'-FL^[13-14]。

目前的研究主要集中于对 2'-FL 合成途径进行调控, 发酵罐中 2'-FL 产量从低于 5 g/L 提高至约 121 g/L^[15-19]。相关研究以酿酒酵母为宿主构建了 2'-FL 的合成途径, 发酵罐中最高产量为 22 g/L^[20]。由于 2'-FL 合成途径的代谢通量与糖酵解途径相比较低, 大量碳源流向糖酵解途径用于细胞生长, 利用碳源合成 2'-FL 的效率较低, 2'-FL 的生产并未达到理想水平^[21-22]。

本研究对大肠杆菌合成 2'-FL 的代谢途径进行

重构, 敲除磷酸甘露糖异构酶基因 *mana*, 使大肠杆菌的生长代谢与 2'-FL 的合成代谢相互独立: 菌株仅能利用甘油作为碳源进行自身的生长代谢, 不能进行 2'-FL 的合成; 同时, 大肠杆菌仅能利用甘露糖作为碳源进行 2'-FL 的合成, 不能进行生长代谢。这种利用不同碳源分别供应菌株生长和 2'-FL 合成的新策略, 提高了菌株利用甘露糖生产 2'-FL 的转化率。敲除 2'-FL 前体物 GDP-岩藻糖分解途径的 UDP-葡萄糖脂质载体转移酶基因 *wcaJ*, 调控 α-1,2-岩藻糖基转移酶 FutC 和甘露糖-1-磷酸鸟苷酰转移酶 ManC 的表达水平, 提高了大肠杆菌工程菌株中 2'-FL 的生产水平。

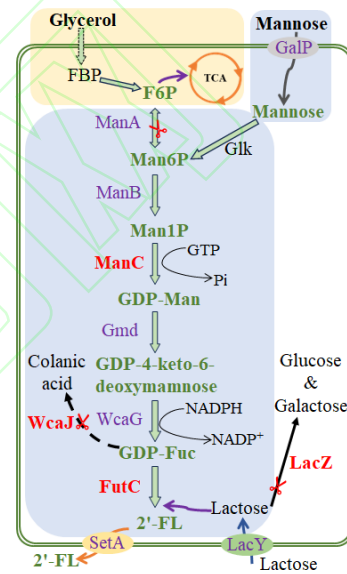


图 1 2'-FL 的微生物合成途径

Fig.1 2'-FL synthesis pathway in microbial

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物

本研究中所用菌株和质粒见表 1, 引物信息表 2。

表 1 菌株和质粒
Tab.1 Strains and plasmids

类别	名称	特性	来源
菌株	<i>E.coli</i> DH5α	F' ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA</i> <i>argF</i>) U169 <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> - <i>mk</i> ⁺) <i>supE44</i> λ - <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>phoA</i>	实验室保藏
	L	MG1655 Δ <i>lacIZ</i> ::P _{trc} - <i>wcaG</i> - <i>gmd</i> - <i>lacY</i>	实验室保藏
	L1	Δ <i>mana</i>	本研究
	L2	L1 Δ <i>wcaJ</i>	本研究
	L3	L1 (pTrc99a- <i>manB</i> - <i>manA</i> , pSB4K5- <i>futC</i> - <i>manC</i>)	本研究
	L4	L1 (pTrc99a- <i>manB</i> , pSB4K5- <i>futC</i> - <i>manC</i>)	本研究
	L5	L2 (pTrc99a- <i>manB</i> - <i>manA</i> , pSB4K5- <i>futC</i> - <i>manC</i>)	本研究

质粒	L6	L2 (pTrc99a- <i>manB</i> , pSB4K5- <i>futC-manC</i>)	本研究
	L7	L2 (pTrc99a- <i>manB</i> , pSB4K5- <i>P_{J23105}-futC-manC</i>)	本研究
	L8	L2 (pTrc99a- <i>manB</i> , pSB4K5- <i>P_{J23110}-futC-manC</i>)	本研究
	L9	L2 (pTrc99a- <i>manB</i> , pSB4K5- <i>P_{J23100}-futC-manC</i>)	本研究
	pCAGO	Ap ^R , containing Cas9 and gRNA	实验室保藏
	pTrc99a	Ap ^R , GenBank accession no.: U13872	实验室保藏
	pSB4K5	Km ^R , pSB4K5-I52002 (GenBank accession no.: EU496099) backbone	实验室保藏
	pTrc99a- <i>manB</i>	pTrc99a derivative, using promoter <i>P_{trc}</i> to overexpress <i>manB</i>	本研究
	pTrc99a- <i>manB-manA</i>	pTrc99a derivative, using promoter <i>P_{trc}</i> to overexpress <i>manB&manA</i>	本研究
pSB4K5- <i>futC-manC</i>	pSB4K5 derivative, using promoter <i>P_{trc}</i> to overexpress <i>futC&manC</i>	本研究	
pSB4K5- <i>P_{J23105}-futC-manC</i>	pSB4K5 derivative, using promoter <i>P_{J23105}</i> to overexpress <i>futC&manC</i>	本研究	
pSB4K5- <i>P_{J23110}-futC-manC</i>	pSB4K5 derivative, using promoter <i>P_{J23110}</i> to overexpress <i>futC&manC</i>	本研究	
pSB4K5- <i>P_{J23100}-futC-manC</i>	pSB4K5 derivative, using promoter <i>P_{J23100}</i> to overexpress <i>futC&manC</i>	本研究	

表 2 引物

Table 2 Primers

引物名称	序列
manA-up-F	ggaacgcctgaccgtgctcattccc
manA-up-R	attaattaatgatcaatccctgttttaatgtggaa
manA-cat-F	gggattgatcattaattaatctcgagtgacgga
manA-cat-R	tgttttaatgtgaaatatacccactattccttctcggttcggatggactatt
manA-down-F	ttaattccacataaaacaggattgatcagcttactgaaaaaataacatct
manA-down-R	aaagtcagcttcccgtgccagat
wcaJ-up-F	tcaccactttgtcgttccatcacttcc
wcaJ-up-R	aacgatgacaaaactaaaaaacgcg
wcaJ-cat-F	tttttagattgtcactgittattaataatctcgagtgacg
wcaJ-cat-R	gcgccataagtgaaaccggccttacttcggttcgatggactattacgccccgccctgccac
wcaJ-down-F	ccggttcaccttatggcgcagcatgtagccttcaatgaggttcctgttattagccccttacc
wcaJ-down-R	aacgcggtcgtatcagcaaatcaacctg
ZTB-F	gaacgagtaagtacccgggatccttagatcga
ZTB-R	tctccttctaaagtaaacaaacacaattccacacattatagcagc
B-F	ttgtttaactttaagaaggagatatacatatgaaaaaataacctgctttaaagc
B-R	ccccgggtacttactcgttcagcaacgtcagcaga
ZTBA-F	gtaccggggatcctctagatcga
ZTBA-R	tctccttctaaagttaaacaaataactcgttcagcaacgtca
BA-F	gtttaactttaagaaggagatatacatatgcaaaaactcattaactcagtg
BA-R	tctagaggatccccgggtacttacagctgttgaaacacgc
pSB4K5-ZT-F	acgggtgaagaggcactggctgaattggtttg
pSB4K5-ZT-R	cttctaaagttaacaaaggctgtttcctgtgtgagattgttat
futC-trc-F	ctttgtttaactttaagaaggagatataccatggcctttaaagtgtgcaattt
futC-trc-R	ggtatatccttctaaagttaacaaataaagcgttatacttttgggatttt
manC-F	ctttaagaaggagatataccatggcgcagtcgaaactctatccag
manC-R	ccagtcctcttacaccgtccgtagcgcg
105-F	gtcctaggtactatgctagcccttgtttaactttaagaaggagatataccatggcctttt
105-R	gctagcatagtacctaggactgagctagccgtaaaaacgtaaatgcatgccctcaggt
110-F	gtcctaggtacaatgctagcccttgtttaactttaagaaggagatataccatggcctttt
110-R	gctagcattgtacctaggactgagctagccgtaaaaacgtaaatgcatgccctcaggt
100-F	gtcctaggtacagtgctagcccttgtttaactttaagaaggagatataccatggcctttt
100-R	gctagcactgtactaggactgagctagccgtaaaaacgtaaatgcatgccctcaggt

1.1.2 主要试剂

DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂, 天根生化科技 (北京) 有限公司; 无缝克隆试剂盒 (ClonExpress® CE II), 南京诺唯赞生物科技有限公司; DNA 聚合酶, Thermo Fisher Scientific 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器与设备

主要仪器设备包括 PCR 扩增仪 (赛默飞世尔科技公司), 电泳仪 (Baygene), 冷冻高速离心机 (赛默飞世尔科技公司), 电转化仪 (美国 BTX 公司), 高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司), 高速振荡摇床 (上海知楚仪器有限公司), 分光光

度计(赛默飞世尔科技公司)等。

1.1.4 培养基

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

发酵培养基: 甘油 15 g/L, 酵母粉 5 g/L, KH_2PO_4 8 g/L, NH_4Cl 2 g/L, 柠檬酸 1.7 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 g/L, 硫胺素 4.5 mg/L, 10 ml/L 微量元素 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.38 g/L, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.1 g/L, CaCl_2 2.0 g/L), 不同质量浓度甘露糖(分别设置为 0、1、5、10 g/L), 乳糖 5 g/L, 调节 pH 为 7.0。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

构建 pTrc99a-*manB*: 以质粒 pTrc99a 为模板, 用引物 ZTB-F/R 扩增出载体片段; 以野生型 *E. coli* MG1655 基因组 DNA 为模板, 以引物 B-F/R 进行 *manB* 基因扩增, 使用无缝克隆酶将 *manB*、pTrc99a 线性载体片段连接, 连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 对转化子进行 PCR 验证、测序后, 获得质粒 pTrc99a-*manB*。

构建 pTrc99a-*manB-manA*: 以质粒 pTrc99a-*manB* 为模板, 用引物 ZTBA-F/R 扩增出载体片段; 以野生型 *E. coli* MG1655 基因组 DNA 为模板, 以引物 BA-F/R 进行 *manA* 基因扩增, 使用无缝克隆酶将 *manA*、pTrc99a-*manB* 为线性载体片段连接, 连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 对转化子进行 PCR 验证、测序后, 获得质粒 pTrc99a-*manB-manA*。

构建 pSB4K5-*futC-manC*: 以质粒 pSB4K5 为模板, 使用引物 pSB4K5-ZT-F/R, PCR 扩增得到线性 pSB4K5 载体片段。选择来自幽门螺杆菌的 α -(1,2)-岩藻糖基转移酶基因 *futC*, 使用引物 futC-trc-F/R, 以全基因合成的 *futC* 基因为模板, PCR 扩增得到 *futC* 基因片段。使用引物 manC-F/R, 以野生型 *E. coli* MG1655 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到 *manC* 基因片段, 使用无缝克隆酶将 *futC* 基因片段、*manC* 基因片段与线性载体 pSB4K5 片段连接, 连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 对转化子进行 PCR 验证、测序后, 获得质粒 pSB4K5-*futC-manC*。

构建 pSB4K5-*P_{J23105}-futC-manC*、pSB4K5-*P_{J23110}-futC-manC* 和 pSB4K5-*P_{J23100}-futC-manC*: 以质粒 pSB4K5-*futC-manC* 为模板, 用引物 105-F/R、110-F/R 和 100-F/R 分别扩增出线性片段 pSB4K5-

P_{J23105}-futC-manC、pSB4K5-*P_{J23110}-futC-manC* 和 pSB4K5-*P_{J23100}-futC-manC*, 使用无缝克隆酶分别将以上 3 个线性片段连接, 连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 对转化子进行 PCR 验证、测序后, 分别获得质粒 pSB4K5-*P_{J23105}-futC-manC*、pSB4K5-*P_{J23110}-futC-manC* 和 pSB4K5-*P_{J23100}-futC-manC*。

1.2.2 菌株构建

本研究所用的菌株是在实验室已有菌株 L 的基础上继续构建的。菌株 L 是以大肠杆菌 K12 MG1655 为出发菌株构建, 敲除 *lacI* 和 *lacZ* 基因, 并在原 *lacZ* 基因处以 P_{trc} 启动子过表达 *wcaG*、*gmd* 和 *lacY* 基因^[23]。基因敲除技术为 CRISPR/Cas9 基因编辑^[24]。菌株 L 敲除 *manA* 基因后, 获得菌株 L1。菌株 L1 继续敲除 *wcaJ* 基因后, 获得菌株 L2。

菌株 L1 的构建: 首先, 构建基因敲除所需的同源重组片段, 包含上下游同源臂、氯霉素抗性基因 *cat* 和通用的 N20 序列 (TAGTCCATCGAACCGAAGTAAGG), 以实验室保存的 MG1655 野生型菌株为模板, 分别利用表 2 中的引物对 *manA-up-F/R* 和 *manA-down-F/R* 为引物, PCR 扩增得到同源重组的上下游同源臂。以通过 PCR 获得的菌株 L 中的带有 *cat-N20* 序列的片段为模板, 利用引物对 *manA-cat-F/R* 为引物进行 PCR 扩增, 获得新的带有 *cat-N20* 序列的片段。以上下游同源臂, 新的带有 *cat-N20* 序列的片段, 这 3 个片段为模板, 利用引物 *manA-up-F* 和 *manA-down-R* 进行重叠 PCR, 得到同源重组片段。将同源重组片段通过电转化导入含有 pCAGO 质粒的菌株 L 中, 进行第一步同源重组。挑选正确克隆进行第二次同源重组。挑取第二次同源重组后的正确克隆, 传代丢失 pCAGO 质粒, 从而获得敲除 *manA* 基因的 L1 菌株。

菌株 L2 的构建: 构建过程同菌株 L1 的构建过程, 但是构建同源重组片段所用的引物不同。具体引物使用如下: 用表 2 中的引物对 *wcaJ-up-F/R* 和 *wcaJ-down-F/R*, PCR 扩增得到同源重组的上下游同源臂。用引物对 *wcaJ-cat-F/R* 为引物进行 PCR 扩增, 获得新的带有 *cat-N20* 序列的片段。用引物 *wcaJ-up-F* 和 *wcaJ-down-R* 将获得的 3 个片段进行重叠 PCR, 得到同源重组片段。

菌株 L3、L4 的构建: 将质粒 pTrc99a-*manB-manA* 和 pSB4K5-*futC-manC* 共同转化至菌株 L1 中, 得到菌株 L3。利用同样的方法将质粒 pTrc99a-*manB* 和 pSB4K5-*futC-manC* 共同转化至菌株 L1 中,

得到菌株 L4。

菌株 L5、L6 的构建: 将质粒 pTrc99a-*manB-manA* 和 pSB4K5-*futC-manC* 共同转化至菌株 L2 中, 得到菌株 L5。利用同样的方法将质粒 pTrc99a-*manB* 和 pSB4K5-*futC-manC* 共同转化至菌株 L2 中, 得到菌株 L6。

菌株 L7、L8 和菌株 L9 的构建: 将质粒 pTrc99a-*manB* 和 pSB4K5-P_{J23105}-*futC-manC* 共同转化至菌株 L2 中, 得到菌株 L7。利用同样的方法将质粒 pTrc99a-*manB* 和 pSB4K5-P_{J23110}-*futC-manC* 共同转化至菌株 L2 中, 得到菌株 L8。将质粒 pTrc99a-*manB* 和 pSB4K5-P_{J23100}-*futC-manC* 共同转化至菌株 L2 中, 得到菌株 L9。

1.2.3 菌株培养

常规的菌株培养: 利用 LB 培养基, 37°C (含有 pCAGO 质粒的菌株培养温度为 30°C)、220 r/min 条件下培养。发酵 2'-FL 时, 取文中 L3 至 L9 菌株的甘油菌 10 μL 接入到 5 mL 的 LB 液体培养基中, 37°C、220 r/min 过夜培养, 按 2% 的接种量转接到发酵培养基中。使用 24 深孔板进行发酵培养, 装液量为 2 mL, 37°C、600 r/min 条件下培养。利用分光光度计测定菌株的生长状况 (A₆₀₀)。

1.2.4 2'-FL 产量的测定

2'-FL 产量测定所用的液相色谱柱为 Carbohydrate ES (5 μm, 250 mm×4.6 mm), 检测器为蒸发光检测器, 流动相为乙腈与水 (体积比为 70: 30), 流量为 0.8 mL/min, 柱温为 30°C, 进样量为 10 μL^[22]。利用不同浓度的 2'-FL 标准品制作标准曲线, 计算样品中 2'-FL 的含量。

1.2.5 甘露糖合成 2'-FL 转化率的计算

甘露糖合成 2'-FL 的转化率(R)按照式(1)计算。

$$R = \frac{P_1 - P_2}{\frac{Mr_1}{Mr_2} \times m} \quad (1)$$

式中: P₁ 为 2'-FL 实际产量, g; P₂ 为培养基中甘露糖为 0 g 时发酵后 2'-FL 的产量, g; Mr₁ 为 2'-FL 相对分子质量; Mr₂ 为甘露糖相对分子质量; m 为甘露糖的利用量, g。

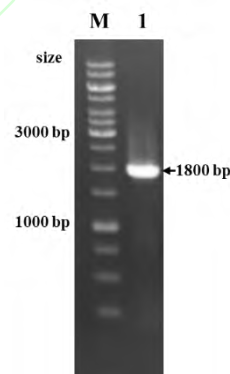
2 结果与分析

2.1 敲除磷酸甘露糖异构酶基因 *manA*

甘露糖通过磷酸转移酶系统 (PTS) 转入胞内生成甘露糖-6-磷酸, 在甘露糖异构酶 ManA 的催化作用下合成果糖-6-磷酸参与到糖酵解途径, 用于细胞生长。由于 2'-FL 合成途径的代谢通量低于糖酵

解途径, 导致大量碳源流向糖酵解途径用于细胞生长, 2'-FL 合成时的碳源利用效率较低。敲除基因 *manA* 后, 甘露糖-6-磷酸无法在胞内被用于生长, 从而大部分流向 2'-FL 的合成途径。利用甘油作为碳源供应细胞进行生长代谢, 甘露糖进行 2'-FL 的合成, 则可能实现菌株生长与生产的碳代谢独立运行, 提高碳源利用效率、2'-FL 转化率的目的。

在菌株 L 的基础上, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑的方法敲除磷酸甘露糖异构酶编码基因 *manA*。利用已构建的同源重组片段依次进行第一步、第二步同源重组后, 进行平板划线分离单菌落, 挑选出在含有 100 mg/L 氨苄霉素的 LB 平板上生长, 但在含有 25 mg/L 氯霉素的 LB 平板上不生长的单克隆, 进行菌落 PCR 验证, 菌落 PCR 验证时片段大小为 1863 bp。图 2 表明, 菌落 PCR 验证获得的电泳条带大小约为 1800 bp, 与理论大小一致。将其进行序列测定无误后, 获得了第二步同源重组菌株。将第二步同源重组菌株, 在 37°C 条件下进行传代培养, 丢失其中的 pCAGO 质粒, 从而获得敲除 *manA* 的菌株, 命名为 L1。



M. DNA marker; 1. 菌株 L1 的 PCR 样品

图 2 验证菌株 L1 的菌落 PCR 电泳图

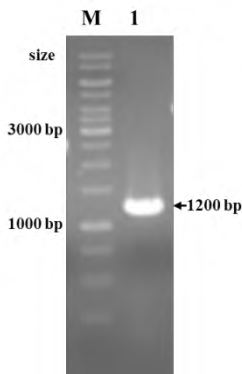
Fig.2 Electrophoresis diagram of PCR product for strain L1 validation

2.2 敲除 GDP-岩藻糖分支途径酶基因 *wcaJ*

进一步敲除 2'-FL 合成途径中的 UDP-葡萄糖脂质载体转移酶 WcaJ, 使甘露糖合成的 GDP-岩藻糖不能进入 GDP-岩藻糖分支途径 (可拉酸合成途径), 可以提高工程菌株对甘露糖的利用效率, 进而提高甘露糖合成 2'-FL 时的转化率。

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑的方法敲除 GDP-岩藻糖分支途径酶编码基因 *wcaJ*。利用已构建的同源重组片段依次进行第一步、第二步同源重组后, 进行平板划线分离单菌落, 挑选出在含有 100 mg/L 氨苄霉素的 LB 平板上生长, 但在含有 25 mg/L 氯

霉菌的 LB 平板上不生长的单克隆, 进行菌落 PCR 验证, 菌落 PCR 验证时片段大小为 1290 bp。图 3 表明, 菌落 PCR 验证获得的电泳条带大小约为 1200 bp, 与理论大小一致。将其进行序列测定无误后, 获得了第二步同源重组菌株。将第二步同源重组菌株, 在 37℃ 条件下进行传代培养, 丢失其中的 pCAGO 质粒, 从而获得敲除基因 *wcaJ* 的菌株, 命名为 L2。



M. DNA marker; 1. 菌株 L2 的 PCR 样品

图 3 验证菌株 L2 的菌落 PCR 电泳图

Fig.3 Electrophoresis diagram of PCR product for strain L2 validation

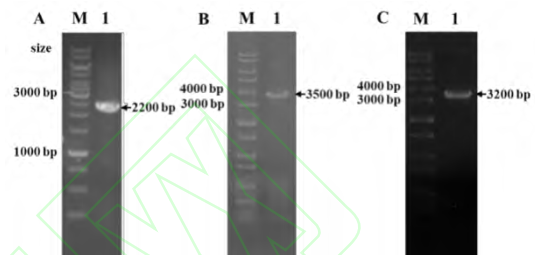
2.3 利用甘露糖生产 2'-FL 菌株的构建

从甘露糖合成 2'-FL 途径中包括 5 个酶, 其中 Gmd 和 WcaG 的酶活性较高^[25-26], 在菌株 L1、L2 中, 已经利用 *P_{trc}* 启动子对其在基因组上进行了过表达。分别在质粒水平多拷贝数过表达途径中另外 3 个酶, 包括磷酸甘露糖变位酶 ManB、 α -(1,2)-岩藻糖基转移酶 FutC、甘露糖-1-磷酸鸟嘌呤基转移酶 ManC, 构建 2'-FL 合成途径。同时, 为了探究 *manA* 基因存在与否时, 对甘露糖生成 2'-FL 的转化率 (甘露糖利用情况) 的影响, 在质粒水平过表达 ManA, 作为相应的对照菌株。

构建质粒 pTrc99a-*manB* 时, 对转化后获得的单克隆进行菌落 PCR 验证。如果构建成功, 则菌落 PCR 验证时片段大小为 2175 bp。图 4A 表明, 菌落 PCR 验证获得的电泳条带大小约为 2200 bp, 与理论大小一致。将其进行序列测定无误后, 获得了质粒 pTrc99a-*manB*; 构建质粒 pTrc99a-*manB-manA* 时, 对转化后获得的单克隆进行菌落 PCR 验证。如果构建成功, 则菌落 PCR 验证时片段大小为 3427 bp。图 4B 表明, 菌落 PCR 验证获得的电泳条带大小约为 3500 bp, 与理论大小一致。将其进行序列测定无误后, 获得了质粒 pTrc99a-*manB-manA*; 构建质粒 pSB4K5-*futC-manC* 时, 对转化后获得的单克隆

进行菌落 PCR 验证。如果构建成功, 则菌落 PCR 验证时片段大小为 3186 bp。图 4C 表明, 菌落 PCR 验证获得的电泳条带大小约为 3200 bp, 与理论大小一致。将其进行序列测定无误后, 获得了质粒 pSB4K5-*futC-manC*。

将构建完成的质粒 pTrc99a-*manB-manA* 和 pSB4K5-*futC-manC* 共同转化至菌株 L1 以及菌株 L2 中, 得到菌株 L3 和菌株 L5。利用同样的方法将质粒 pTrc99a-*manB* 和 pSB4K5-*futC-manC* 共同转化至菌株 L1 以及菌株 L2 中, 得到菌株 L4 和菌株 L6。



A: 质粒 pTrc99a-*manB* 验证; B: 质粒 pTrc99a-*manB-manA* 验证; C:

质粒 pSB4K5-*futC-manC* 验证

M. DNA marker; 1. PCR 样品

图 4 验证菌株的菌落 PCR 电泳图

Fig. 4 Electrophoresis diagram of PCR product for strain validation

2.4 利用甘露糖生产 2'-FL 菌株的评价

为了探究 *manA* 基因存在与否, 对甘露糖利用情况的影响, 比较了不同浓度甘露糖的发酵条件下菌株 L3、L4 和菌株 L5、L6 的 2'-FL 产量。对已经构建的菌株 L3、L4、L5 和 L6 进行培养, 在不同初始甘露糖浓度 (分别设置为 0、1、5、10 g/L) 的发酵条件下, 测定 2'-FL 产量以及计算甘露糖合成 2'-FL 的转化率, 结果如图 5 和图 6 所示。

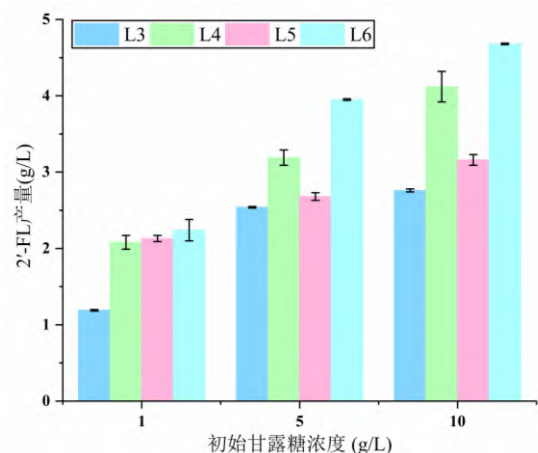


图 5 不同菌株的 2'-FL 产量

Fig. 5 2'-FL production of different strains

图5表明, *manA* 基因缺失的菌株 L4 和 L6 的 2'-FL 产量 (10 g/L 甘露糖时, 2'-FL 产量分别为 4.12、4.68 g/L) 均高于相应的对照菌株 L3 和 L5 (10 g/L 甘露糖时, 2'-FL 产量分别为 2.76、3.16 g/L), 图 6A 表明, 添加 5 g/L 和 10 g/L 甘露糖的发酵条件下, 携带 *manA* 基因的菌株 L3 和 L5 的发酵液中, 甘露糖基本被消耗完全, 而缺失 *manA* 基因的菌株 L4 和 L6 的发酵液中, 甘露糖仍然有大量剩余, 添加 5 g/L 甘露糖时, 菌株 L4 和 L6 的甘露糖剩余量分别为 2.27、2.5 g/L; 添加 10 g/L 甘露糖时, 菌株 L4 和 L6 的甘露糖剩余量分别为 7.05、6.76 g/L。结合图 5 和图 6A 的数据, 可以说明在存在 *ManA* 的菌株中, 甘露糖大部分被用来进行菌体的生长代谢, 而没有用来合成 2'-FL; 而缺失 *ManA* 的菌株中即使剩余了大量甘露糖, 2'-FL 产量仍然较高, 说明甘露糖没有被菌体利用进行自身的生长代谢, 而是被用来合成了 2'-FL。图 6B 结果显示, 缺失 *ManA* 的菌株 L4、L6, 甘露糖生产 2'-FL 的转化率均有提高, 添加 10 g/L 甘露糖时, 转化率分别为 51.63% 和 53.8% (对照菌株 L3 和 L5 的转化率分别为 10.77% 和 12.68%)。实现了将菌株的生长与 2'-FL 的生产分开的目的——菌株利用甘油进行细胞生长代谢, 利用甘露糖进行 2'-FL 合成代谢。

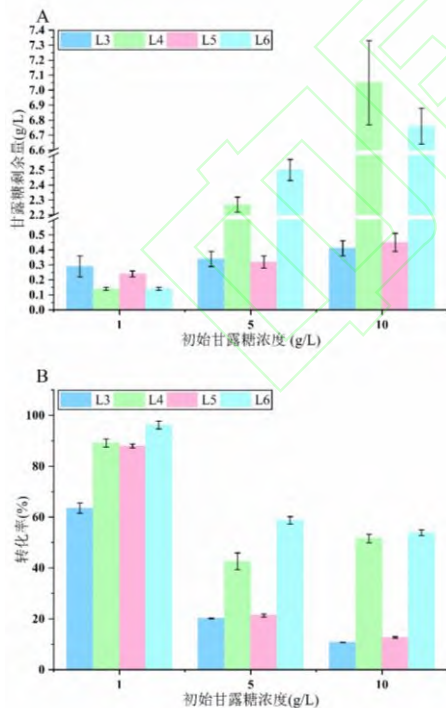


图 6 不同菌株的甘露糖剩余量及甘露糖至 2'-FL 的转化率

Fig. 6 The residual mannose in different strains and the conversion rates of mannose to 2'-FL

为了评价 *wcaJ* 基因的敲除是否将更多的甘露

糖引向合成途径, 比较了菌株 L5 与 L3, 菌株 L6 与 L4 的 2'-FL 产量和转化率。由图 5 和图 6B 可知, 添加 10 g/L 甘露糖时, 菌株 L5 的 2'-FL 产量 (3.16 g/L)、转化率 (12.68%) 高于菌株 L3 (分别为 2.76 g/L 和 10.77%), 菌株 L6 的 2'-FL 产量 (4.68 g/L)、转化率 (53.80%) 高于菌株 L4 (分别为 4.12 g/L 和 51.63%), 表明进一步敲除 *wcaJ* 基因后, 确实达到了将更多的甘露糖流向 2'-FL 合成途径的目的。敲除 GDP-岩藻糖分支途径, 利于 2'-FL 的合成。

2.5 优化途径酶 FutC 和 ManC 的表达水平

质粒的大小对于其胞内拷贝数有一定的影响, 质粒越大, 拷贝数越低。为了避免质粒过大, 首先在两个质粒上, 分别利用 P_{trc} 启动子过表达 2'-FL 合成途径酶的关键酶基因 *manB*, 以及 *futC-manC*。过表达 *ManB* 所用质粒 pTrc99a 的胞内拷贝数约为 20 个; 过表达 *ManC* 和 *FutC* 质粒 pSB4K5 的胞内拷贝数约为 5 个, 理论上表达水平较低。

为评价 *FutC* 和 *ManC* 不同表达水平对 2'-FL 产量的影响, 构建了质粒 pSB4K5- P_{J23105} -*futC-manC*、pSB4K5- P_{J23110} -*futC-manC* 和 pSB4K5- P_{J23100} -*futC-manC*。使用 Biobrick 系列启动子 P_{J23105} 、 P_{J23110} 和 P_{J23100} 分别过表达 *futC*、*manC* 基因, 表 3 列出了 Biobrick 数据库中以上启动子强度与启动子 P_{trc} 强度的比较结果, 启动子 P_{trc} 、 P_{J23105} 、 P_{J23110} 和 P_{J23100} 的强度依次增加 (https://parts.igem.org/Part:BBa_J23100)。

将质粒 pTrc99a-*manB* 和 pSB4K5- P_{J23105} -*futC-manC* 共同转化至菌株 L2 中, 得到菌株 L7。利用同样的方法将质粒 pTrc99a-*manB* 和 pSB4K5- P_{J23110} -*futC-manC* 共同转化至菌株 L2 中, 得到菌株 L8。将质粒 pTrc99a-*manB* 和 pSB4K5- P_{J23100} -*futC-manC* 共同转化至菌株 L2 中, 得到菌株 L9。如图 7 所示, 对菌株 L7、L8 和 L9 的 2'-FL 生产能力进行评价, 对照菌株为菌株 L6。由图 7 可知, 菌株 L7 (5.18 g/L)、L8 (5.49 g/L) 和 L9 (5.28 g/L) 的 2'-FL 产量均高于对照菌株 L6 (4.92 g/L)。利用启动能力较强的启动子过表达 2'-FL 合成途径基因 *futC*、*manC* 时, 2'-FL 的产量确实得到了提高。优化途径酶的表达水平对提高 2'-FL 的生产水平确实具有重要作用。

然而, 这些菌株中具有最强启动子强度的菌株 L9 的 2'-FL 产量却低于菌株 L8 的 2'-FL 产量, 表明 2'-FL 合成途径基因的过表达水平与 2'-FL 产量之间的关系并没有与预想的一致: 并不是基因过表达水

平越高,越有利于 2'-FL 的生产,可能是途径基因的过强的表达水平干扰了胞内代谢途径之间的相互平衡,或者增加了细胞的代谢负担。

表 3 不同启动子的相对强度

Table 3 The relative strengths of promoters

启动子名称	相对强度
P _{J23100}	2547
P _{J23110}	844
P _{J23105}	623
P _{trc}	146

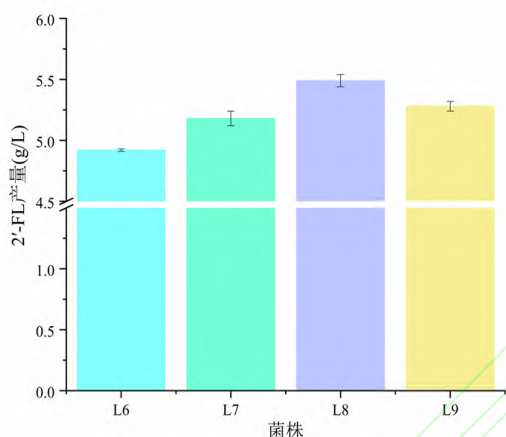


图 7 不同强度过表达 FutC 和 ManC 时, 菌株的 2'-FL 产量

Fig. 7 2'-FL production of strains with different expression strengths of FutC and ManC

3 结语

本研究以实验室前期工作为基础,在大肠杆菌 MG1655 衍生菌株中构建了利用甘油进行菌体生长和利用甘露糖进行 2'-FL 生产的代谢途径,提高了碳源的利用效率。通过敲除 ManA,实现了利用甘油进行细胞生长代谢、利用甘露糖进行 2'-FL 合成代谢相互独立的目的。结果表明这一策略确实实现了将菌株自身生长与 2'-FL 生产的互不干扰,并且提高了甘露糖到 2'-FL 的转化率(由原有的 10.77% 提高至 53.8%)。进一步敲除 GDP-岩藻糖分解途径的 WcaJ、调控途径关键酶 FutC 和 ManC 的表达水平,提高了菌株利用甘露糖合成 2'-FL 的生产水平。这种策略为 2'-FL 的微生物合成提供了新的思路,经过本研究证实了该策略的可行性后,后续研究中会把这种策略应用于实验室已有的 2'-FL 高产菌株中,进一步提高 2'-FL 的产量,为后续 2'-FL 生产菌株的改造及高效工业化应用奠定基础。

参考文献:

- [1] 揭良, 苏米亚, 贾宏信, 等. 母乳寡糖的研究进展[J]. 食品工业, 2020, 41(10): 258-261.
- [2] SMILOWITZ J T, LEBRILLA C B, MILLS D A, et al. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate[J]. Annual review of nutrition, 2014, 34: 143-169.
- [3] ROBERFROID M. Prebiotics: the concept revisited[J]. The journal of nutrition, 2007, 137(3 Suppl 2): 830-837.
- [4] 陈雪, 刘峰, 栾庆民, 等. 母乳低聚糖研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2019, 27(12): 10-12.
- [5] CHENG L, AKKERMAN R, KONG C, et al. More than sugar in the milk: human milk oligosaccharides as essential bioactive molecules in breast milk and current insight in beneficial effects[J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2021, 61(7): 1184-1200.
- [6] PETSCHACHER B, NIDETZKY B. Biotechnological production of fucosylated human milk oligosaccharides: Prokaryotic fucosyltransferases and their use in biocatalytic cascades or whole cell conversion systems[J]. Journal of biotechnology, 2016, 235: 61-83.
- [7] 李珍珍, 孙桂莲, 栾庆民, 等. 2'-岩藻糖基乳糖功能及制备研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2023, 31(9): 1-13.
- [8] 邢敏钰, 谭丹, 冉滢侨. 人乳寡糖 2'-岩藻糖基乳糖的功能及其全细胞生物合成[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2478-2497.
- [9] 李晨晨, 李梦丽, 张涛. 人乳寡糖的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(9): 284-292.
- [10] WAN L, ZHU Y, CHEN G, et al. Efficient production of 2'-fucosyllactose from L-fucose via self-assembling multienzyme complexes in engineered *Escherichia coli*[J]. ACS synthetic biology, 2021, 10(10): 2488-2498.
- [11] 刘爽, 王津, 邹妍, 等. 2'-岩藻糖基乳糖的功能及其应用现状[J]. 营养学报, 2020, 42(2), 187-192.
- [12] HUANG D, YANG K, LIU J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose through modular pathway enhancement[J]. Metabolic engineering, 2017, 41: 23-38.
- [13] 李雯. 代谢工程改造大肠杆菌产 2'-岩藻糖基乳糖[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [14] CHIN Y W, KIM J Y, KIM J H, et al. Improved production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* by expressing putative α -1,2-Fucosyltransferase, WcfB from *Bacteroides fragilis*[J]. Journal of biotechnology, 2017, 257: 192-198.
- [15] LIN L, GONG M, LIU Y, et al. Combinatorial metabolic

- engineering of *Escherichia coli* for *de novo* production of 2'-fucosyllactose[J]. *Bioresource technology*, 2022, 351: 126949.
- [16] BAUMGÄRTNER F, SEITZ L, SPRENGER G A, et al. Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose[J]. *Microbial cell factories*, 2013, 12(1): 40.
- [17] DROUILLARD S, DRIGUEZ H, SAMAIN E. Large-scale synthesis of H-antigen oligosaccharides by expressing *Helicobacter pylori* α -1,2-fucosyltransferase in metabolically engineered *Escherichia coli* Cells[J]. *Angewandte Chemie*, 2006, 118(11): 1810-1812.
- [18] NI Z, LI Z, WU J, et al. Multi-path optimization for efficient production of 2'-fucosyllactose in an engineered *Escherichia coli* C41 (DE3) derivative[J]. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2020, 8: 611900.
- [19] WANG L, ZHANG K, GAO S, et al. High-yield synthesis of 2'-fucosyllactose from glycerol and glucose in engineered *Escherichia coli*[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2023, 71(41): 15237-15248.
- [20] LEE J W, KWAK S, LIU J J, et al. Enhanced 2'-fucosyllactose production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* using xylose as a co-substrate[J]. *Metabolic engineering*, 2020, 62: 322-329.
- [21] NIITTYMÄKI J, MATTILA P, RENKONEN R. Differential gene expression of GDP-L-fucose-synthesizing enzymes, GDP-fucose transporter and fucosyltransferase VII[J]. *APMIS: Acta pathologica, microbiologica, et immunologica scandinavica*, 2006, 114(7/8): 539-548.
- [22] 杜胜阳, 王斌斌, 冯佳, 等. 乳酸菌基因敲除技术的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(1): 244-251.
- [23] SUN X, PENG Z, LI C, et al. Combinatorial metabolic engineering and tolerance evolving of *Escherichia coli* for high production of 2'-fucosyllactose[J]. *Bioresource technology*, 2023, 372: 128667.
- [24] ZHAO D, FENG X, ZHU X, et al. CRISPR/Cas9-assisted gRNA-free one-step genome editing with no sequence limitations and improved targeting efficiency[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 16624.
- [25] SULLIVAN F X, KUMAR R, KRIZ R, et al. Molecular Cloning of human GDP-mannose 4,6-dehydratase and reconstitution of GDP-fucose biosynthesis in vitro[J]. *Journal of biological chemistry*, 1998, 273(14): 8193-8202.
- [26] TONETTINI, RIZZINI, VIGEVANI, et al. Preliminary crystallographic investigations of recombinant GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase reductase from *E. coli*[J]. *Acta crystallographica*, 1998, 54: 684-686.