



大肠杆菌 Nissle 1917 的多组学分析及其产微菌素的功能验证

汤佳冰, 张颖, 叶佳微, 张显, 饶志明, 徐美娟*

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

汤佳冰, 张颖, 叶佳微, 张显, 饶志明, 徐美娟. 大肠杆菌 Nissle 1917 的多组学分析及其产微菌素的功能验证[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3238-3252.

TANG Jiabing, ZHANG Ying, YE Jiawei, ZHANG Xian, RAO Zhiming, XU Meijuan. Multiomics analysis of *Escherichia coli* Nissle 1917 and functional validation of microcin[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3238-3252.

摘要: 【目的】探究益生大肠杆菌 Nissle 1917 (*Escherichia coli* Nissle 1917, EcN)与模式菌株的代谢及转录差异, 为构建工程菌株 EcN 提供参考, 进一步推动食品安全菌株 EcN 的应用。【方法】软件分析比较 EcN 和模式菌株 BL21(DE3)、W3110 的基因组、转录组差异, 并通过质粒构建表达验证; 在 BL21(DE3)中质粒表达 EcN 来源的微菌素(microcin)并进行抑菌效果验证。【结果】共挖掘出 904 个差异编码基因。同时以不同碳源为底物分析验证了不同菌株在碳源吸收利用方面的差异, 以启动子 P_{flic} 在不同菌株中的表达情况验证了转录调控上的差异; 最终构建的微菌素重组菌株在培养 12 h 时, 抑菌率提高了 30.3%。【结论】研究一定程度上阐明了 EcN 的代谢特性及其与模式菌株的转录差异, 并为微菌素作为窄谱治疗药物来抑制肠道病原体和减少肠细菌水华的研究提供了思路。

关键词: 大肠杆菌; Nissle 1917; 多组学分析; 微菌素

资助项目: 国家自然科学基金(32270036, 32070035); 国家重点研发计划(2023YFD1300700); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP221012, JUSRP622022); 工业生物技术教育部重点实验室开放课题(KLIB-KF202305)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270036, 32070035), the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1300700), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP221012, JUSRP622022), the Open Project of the Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education (KLIB-KF202305).

*Corresponding author. E-mail: xumeijuan@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-02-06; Accepted: 2024-03-29; Published online: 2024-04-03

Multimomics analysis of *Escherichia coli* Nissle 1917 and functional validation of microcin

TANG Jiabing, ZHANG Ying, YE Jiawei, ZHANG Xian, RAO Zhiming, XU Meijuan*

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

Abstract: [Objective] To compare the metabolism and transcription between the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) and the model strains, thus providing a reference for the engineering and promoting the application of the food-safe strain EcN. [Methods] The genome and transcriptome were compared between EcN and model strains BL21(DE3) and W3110 by software, and plasmids were constructed to verify the differences. EcN-derived microcin was expressed in BL21(DE3) and the antibacterial effect of microcin was verified. [Results] A total of 904 differentially coding genes were identified. The differences in carbon source absorption and utilization of different strains were verified by experiments with different carbon sources as substrates. The expression of the promoter P_{flic} confirmed the differences in transcription among different strains. The recombinant strain of microcin showed an increase of 30.3% in the inhibition rate after 12 h of culture. [Conclusion] This study clarifies the metabolic characteristics of EcN and confirms the differences in transcription between EcN and model strains. Moreover, this study provides ideas for the development of microcin as a narrow-spectrum therapeutic drug to inhibit intestinal pathogens and reduce intestinal bacterial blooms.

Keywords: *Escherichia coli*; Nissle 1917; multimomics analysis; microcin

大肠杆菌(*Escherichia coli*)研究历史悠久, 具有明确的遗传背景, 是主要的工业生产菌株之一。在工业生产中, 大肠杆菌在氨基酸及其衍生物的生物合成方面表现出令人满意的能力^[1-2]。然而, 大肠杆菌大多为条件性病原体, 存在一定的感染风险。考虑到生物安全性, 研究人员更倾向于选择食品安全级菌株, 如谷氨酸棒杆菌、枯草芽孢杆菌等, 特别是在药物相关的高附加值产品生产过程中。迫切需要一株大肠杆菌菌株来打破大肠杆菌和食品安全级菌株之间的壁垒, 而大肠杆菌 Nissle 1917 (*Escherichia coli* Nissle 1917, EcN)的发现带来了这种可能性^[3]。

EcN 自 1917 年被分离以来, 已被确认为一种益生菌^[4], 广泛应用于预防感染性腹泻和免疫调节。由于抗原聚合酶 *wzy* 基因点突变终止导致侧链较短, 易被血清清除, 缺乏同种病原菌株中普遍存在的致病因子, 大量的实验证明 EcN 不具有致病性^[3,5-6]。此外, Brader 等^[7]发现, EcN 作为将 p53 和 Tum-5 递送至实体瘤用于癌症治疗的靶向载体, 可以通过正电子发射断层扫描 (positron emission tomography, PET) 和视频促进肿瘤检测。有赖于 EcN 菌株本身的黏附性和肿瘤靶向作用, 潘秋莎等总结了研究人员在药物联用和定向给药方向对 EcN 的广泛开发, 为抗肿

瘤治疗提供新思路^[5,8]。

作为一个有前途的多功能生物学应用菌株, EcN 已经得到了可预见性的长期发展。然而只有少数几个研究是通过基因组整合或质粒游离表达生产特定的产物^[9-11]。我们希望通过基因组和转录组的数据比较, 挖掘 EcN 在代谢和酶表达方向的差异, 期望促使 EcN 工业化生产。实验常用的工业大肠杆菌菌株有 W3110 和 BL21。缺乏 *recA* 重组酶基因和 α -半乳糖的 W3110 更适合作为分子操作的载体进行基因组整合以生产相关产物, W3110 在液体培养时可以耐受更高的菌体浓度, 通常作为高密度发酵的

底盘细胞进行开发和修饰^[1]。以 BL21(DE3) 为代表的 B 系列由于具有 T7 聚合酶, 能持续高效合成长片段 DNA, 因而在靶蛋白的表达方面具有优势。本研究选择了这 2 个具有代表性的菌株 W3110 和 BL21(DE3), 并将它们与 EcN 进行了比较。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株

本研究所使用的菌株、质粒如表 1 所示。引物合成序列如表 2 所示, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Features	来源 Source
菌株 Strains		
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> str. B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> +]	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> W3110	F ⁻ λ ⁻ rph-1 INV (rrnD, rrnE)	Lab stock
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Wild type EcN; serotype O6:K5:H1	Lab stock
质粒 Plasmids		
pXMJ-19	Shuttle vector, His-tag, Chl ^R	Lab stock
p19-Mkate	A derivative of pXMJ-19, harboring the <i>mkate</i> gene	This study
p19- <i>mcmIA</i>	A derivative of pXMJ-19, harboring the <i>mcmIA</i> gene	This study
p19- <i>mchIB</i>	A derivative of pXMJ-19, harboring the <i>mchIB</i> gene	This study

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Sequences (5'→3')
p19-1	ACATCGATAAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTC
p19-2	CAGAATATTTGCCAGAACC GTTATGATG
p19-Mkate-1	GTTGACGGCGATTGAGCCGAC
p19-Mkate-2	CCTTAGTAAGTATTTTTCAAAAAATGGC
p19-Mkate-3	TTGAAAAATACTTACTAAGGATGCTATCCGAATTGATCAAGGAA
p19-Mkate-4	CAGCCAAGCTTTATCGATGTCCGAGTTTAGACGGCAGATCGCAGT
<i>mchIB</i> -1	ATGAGTTATAAAAACTGTCCC
<i>mchIB</i> -2	TTAGCTACCGCCACCAGCAGAAGAACTG
<i>mcmIA</i> -1	CTATTTAAAATCCACTGGTGTAAC TTTGTAAG
<i>mcmIA</i> -2	TTAACTCCACTCCCCGACGACGAA

1.1.2 酶和试剂

Dpn I 限制性核酸内切酶、PrimerSTAR MAX DNA 聚合酶、*2×Taq* DNA 聚合酶均购自 TaKaRa Bio 公司(大连); 高保真酶、同源重组克隆试剂盒、感受态制备试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒均购自上海捷瑞生物工程有限公司; 氯霉素、卡那霉素、壮观霉素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白胨和酵母粉均购自 OXOID 公司; 氯化钠、磷酸盐缓冲液及其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 121 °C 灭菌 15 min。LB 固体培养基在 LB 液体培养基的基础上, 额外添加琼脂粉 2.0 g/L。

基本培养基(g/L): MgSO₄ 1.5, CaCl₂ 2.2, 5×M9 盐溶液 12.8, KH₂PO₄ 3.0, NaCl 0.5, NH₄Cl 1.0。

1.2 基因组分析比较

使用 EzBioCloud^[12] 软件计算平均核苷酸同一性(average nucleotide identity, ANI)。OrthoANLu 值和基因组覆盖率由 JSpeciesWS^[13] 计算。多重基因组比对的分析采用 Geneious Prime Mauve 插件。基因组岛(genome islands, GIs)使用在线工具进行基因组岛相关信息的预测(<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>)^[14]。CRISPR-Cas 系统的预测及鉴定使用 CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/>)^[15] 进行。

1.3 转录组数据获取

挑取单菌落, 接种至 10 mL 基本培养基中, 37 °C、150 r/min 培养 8–12 h, 转接 50 mL 培养

基, 37 °C、150 r/min 培养 2、6、12 h, 4 °C、7 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 去除上清培养基, 液氮冷冻, 送至金唯智生物科技有限公司测序获取相关数据。

1.4 重组质粒以及重组大肠杆菌的构建

利用同源重组酶试剂盒, 添加片段和质粒浓度比 2:1, 按说明书 55 °C 孵育 20–40 min; 10 μL 上述混合物添加至 100 μL 转化感受态中, 混合均匀, 冰浴 10–30 min, 42 °C 热激 90 s, 放回冰上 5 min, 添加 800 μL 复苏培养基, 放置 37 °C 摇床复苏 1.2 h 左右, 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 涂板培养过夜, PCR 验证; 挑选正确的转化子, 过夜培养后利用提质粒试剂盒提取质粒, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

1.5 荧光强度检测

*OD*₆₀₀ 稀释至合适浓度(仪器检测范围, 具体数值为 0–1 以内), 酶标仪同时检测荧光强度和 *OD*₆₀₀, 激发光波长为 588 nm, 发射光波长为 635 nm, 荧光强度为测定的荧光值/*OD*₆₀₀。

1.6 重组菌株诱导表达

在 37 °C 条件下进行平板划线培养过夜, 挑取单菌落, 接种至 10 mL 基本培养基, 37 °C、150 r/min 培养 8–12 h, 转接至 50 mL LB 液体培养基, 37 °C、150 r/min 培养 2 h, 添加 0.01 mol/L IPTG, 16 °C、150 r/min 培养 12–14 h, 收集菌体。

1.7 重组菌共培养检测抑菌效率

具体方法见参考文献[16]。

2 结果与分析

2.1 EcN 基因组的一般特征

如表 3 所示, 比较了 3 种菌株的基因组基本信息^[17-18], 具体的基因序列见图 1, 由 NCBI 下载获

表 3 三种菌株的基因组信息比较

Table 3 Comparison of genomic information among three strains

Strains	Total length (bp)	A	C	G	T	G+C content (%)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	4 529 413	1 115 131	1 152 123	1 148 922	1 113 237	50.80
<i>E. coli</i> W3110	4 625 146	1 138 672	1 173 216	1 175 969	1 137 289	50.79
<i>E. coli</i> Nissle 1917	5 441 121	1 346 867	1 379 070	1 372 973	1 342 211	50.58

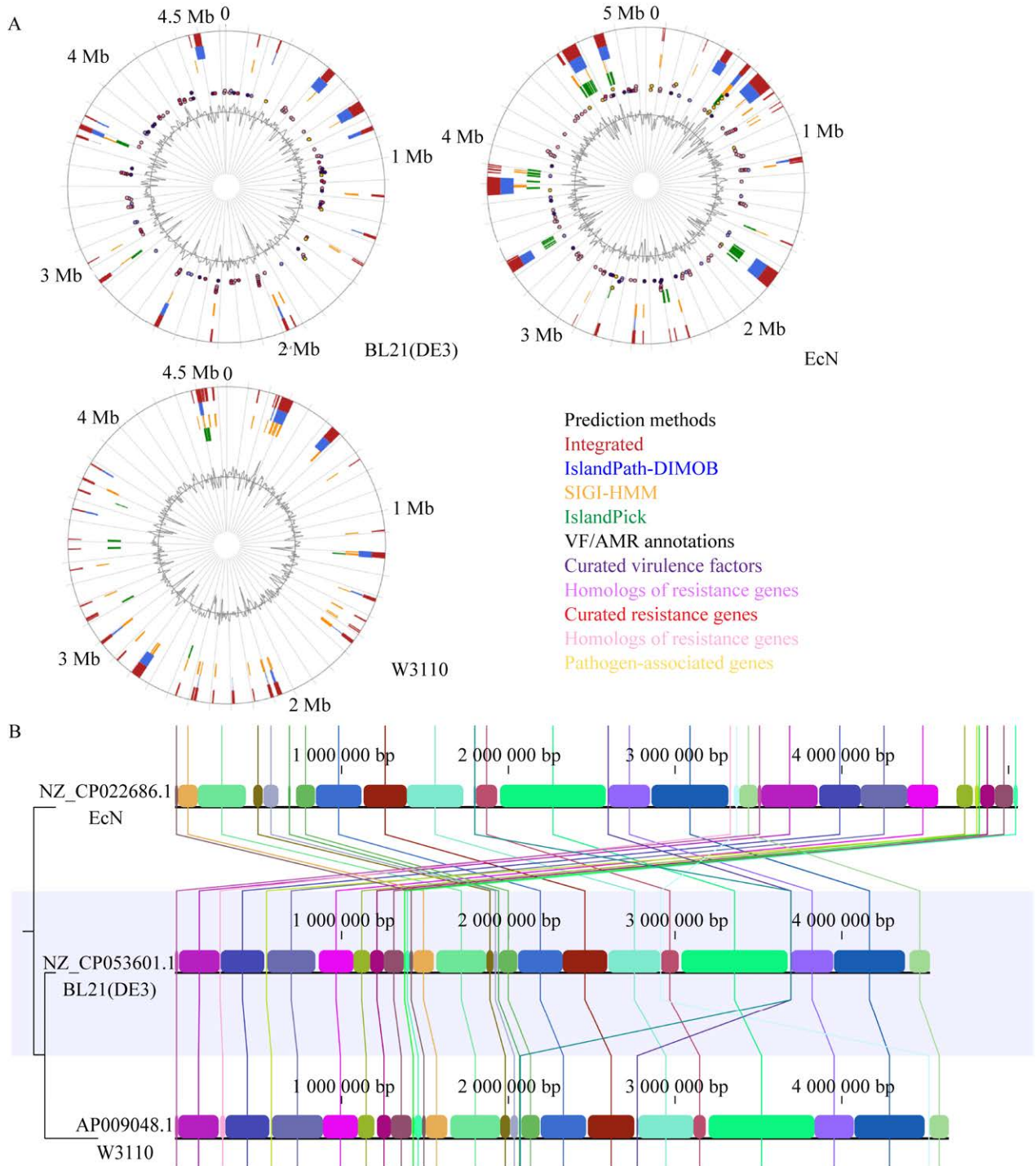


图 1 大肠杆菌 BL21(DE3)、W3110、EcN 基因岛预测及基因组比对

Figure 1 Gene island prediction and genomic alignment of *Escherichia coli* BL21(DE3), W3110 and Nissle 1917 with Mauve. A: Gene island prediction. B: Genomic alignment.

得。EcN 含有最大的基因组长度，包含更多的独特信息。ANI^[19]是在核苷酸水平比较 2 个基因组亲

缘关系的指标。ANI 被定义为 2 个微生物基因组同源片段之间平均的碱基相似度，特点是在近缘

物种之间有较高的区分度。它显示了 2 个基因组之间所有同源蛋白质编码基因在核苷酸水平上的相似性。利用 EzBioCloud 软件, 本研究计算了 3 种菌株的 G+C 含量, 并计算了 ANI 值, 如表 4 所示。

平均核苷酸同一性(ANI)是一种模拟决策 Diffie-Hellman (decisional Diffie-Hellman, DDH) 的简单算法。尽管 ANI 被广泛用于分类和识别细菌, 但与 DDH 一样, 比较倒数计算时, 2 个基因组序列之间的 ANI 值可能彼此不同, 在某些情况下超过 1%。OrthoANI^[20]的开发克服了与 ANI 算法相关的 ANI 倒数值存在巨大差异的问题。此外, OrthoANIu 工具使用 ARCH 而不是 BLAST 进行 OrthoANI 计算, 这增加了比较研究的数量, 并大大减少了计算时间, 它提供了一种更强大、更快速的方法来分类学目的的平均核苷酸差异。利用 JSpeciesWS 计算了 OrthoANlu 值和基因组覆盖率, 与 ANI 数值相比, OrthoANIu 的结果表现出更高的区分度: 株间 OrthoANIu 值越高, 株间亲缘关系越高。如表 5 所示, 很明显 W3110 和 BL21(DE3)的亲缘关系更近。

如图 1 所示, 本研究用基因组岛^[21](GIs)预测软件预测了 3 种菌株的基因组岛相关信息, 并用软件 Geneious Prime Mauve 分析了 EcN、BL21(DE3)和 W3110 基因组的整体情况。如图 1

所示, EcN 相较于 BL21(DE3)和 W3110 基因组在基因组整体和基因组岛等都出现了诸多不同。EcN 的基因组更大, 包含更多独特的基因组区域, 同时具有大量的抗性基因和预测的基因组岛——涉及到铁载体、噬菌体蛋白、转座酶、ABC 转运蛋白和糖基转移酶等多个方面。此外, EcN 和其他 2 个基因组相比发生了大量的基因重排, 这会导致相同基因在不同菌株中表达水平差异。

2.2 基因组探索和可视化的同源数据分析

全基因组直系同源基因簇(orthologous clusters)的分析是比较基因组学研究的重要步骤, 鉴定直系同源簇之间的聚类及构建网络可以帮助解释跨多个物种的蛋白质的功能和进化关系。某一类物种全部基因泛基因组可分为 3 个部分, 包括核心基因组(core genome)、附属基因组(accessory genome)以及特有基因(specific genes)。核心基因组即所有个体共有的保守基因家族; 附属基因指存在于部分个体中的基因家族, 与物种的分化有关, 赋予个体竞争优势; 特有基因只存在于某一个体中, 通常与该个体的独特表型相关, 如对特定环境的适应性或独特的致病性等^[22]。比较分析某类物种的直系同源簇为了解基因组的动态、物种进化、环境适应性机制等提供了有用信息。本研究利用软件 OrthoVenn

表 4 三种菌株的平均核苷酸同一性(ANI)值

Table 4 Calculation of average nucleotide identity values among three strains

ANI (aligned nucleotides)	<i>E. coli</i> Nissle 1917	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> W3110
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917		97.22 (77.51)	97.21 (78.16)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	97.22 (88.05)		99.15 (94.60)
<i>E. coli</i> W3110	97.21 (86.31)	99.15 (92.42)	

表 5 三种菌株的 OrthoANlu 值和基因组覆盖率

Table 5 Calculation of OrthoANlu values and genome coverage among three strains

OrthoANlu value (genome coverage)	<i>E. coli</i> Nissle 1917	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> W3110
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917		97.08 (64.10)	97.00 (63.65)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	97.08 (53.35)		99.07 (68.04)
<i>E. coli</i> W3110	97.00 (54.11)	99.07 (69.48)	

进行 3 个菌株基因组同源基因簇比较, 利用 NCBI 下载获得的蛋白序列进行比较分析^[23]。如图 2 所示, EcN、BL21(DE3)、W3110 共有的蛋白数量为 3 421 个, 基本可以认为是大肠杆菌的核心基因组。当然, 精确的大肠杆菌核心基因组

需要更多不同种的大肠杆菌去补充筛选^[24]。相较于 BL21(DE3)和 W3110, EcN 具有 631 个独特的蛋白。同时, EcN 也缺乏 273 个 BL21(DE3)和 W3110 共有的同源蛋白。3 株菌总计在 145 个 GO 分类中表现出存在独特的蛋白, 其中 273 个 BL21(DE3)

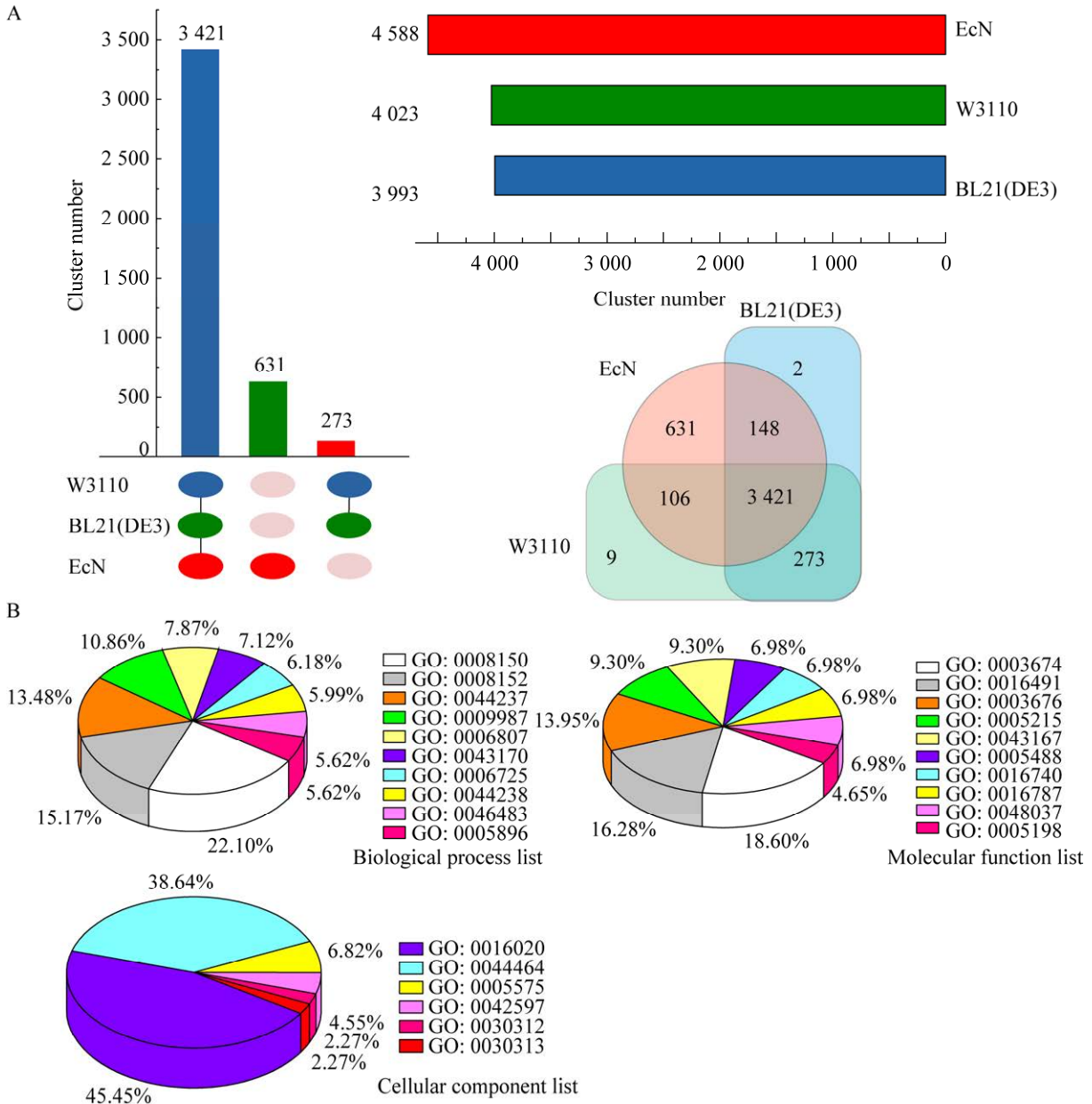


图 2 大肠杆菌 BL21(DE3)和 W3110 及 EcN 差异蛋白的富集分析

Figure 2 Enrichment analysis of differential proteins in *Escherichia coli* BL21(DE3), W3110 and EcN. A: Quantity analysis of differential proteins. B: Protein cluster analysis lacking in EcN.

和W3110共有的同源蛋白涉及到了56个GO分类, EcN具有的631个独特蛋白涉及到了115个GO分类, 上述蛋白都具有明确的GO注释。

过去的研究重点关注 EcN 特有基因及其优势, 本研究以模式菌株为模板, 重点关注 EcN 在作为底盘细胞改造中可能遇到的问题。如图 2 所示, 通过对相关蛋白进行基因本体论(gene ontology, GO)功能注释及富集分析, 揭示了 W3110 和 BL21(DE3)共有但在 EcN 菌株中缺乏的蛋白的 GO 功能类别的比例, 包括生物过程(biological process)、分子功能(molecular function)和细胞成分(cellular component)。其中, EcN 在生物过程这一类别中表现出了最多基因的缺失, 包括实现模块特定生物学目标所需要的所有步骤, 说明在相关的代谢路径上, EcN 相较于模式菌株存在弱势。对具体的基因进行分析发现, EcN 菌株在 3-苯基丙酸、尿嘧啶、脂肪酸、肉碱等多个代谢路径中存在相关蛋白的缺失。在后续以 EcN 为底盘细胞进行代谢改造的过程中, 需要尽量避免相关基因缺失造成的影响。

2.3 EcN 碳源吸收利用差异

相关文献的调研结果表明, EcN 仅应用于

ω -3 脂肪酸^[25]、肝素^[26]和 5-氨基乙酰丙酸^[27]的生产, EcN 整体的代谢特性尚未阐明。碳源是工业发酵培养基的主要成分, 是代谢合成目标产物的起始。大肠杆菌可利用多种底物作为碳源, 除了葡萄糖是常见高密度发酵碳源, 近年由于环保意识的增强, 利用木糖、甘油进行发酵也逐渐成为热点。如表 6 所示, 基因组的比对结果表明 EcN 在葡萄糖、木糖、甘油等碳源代谢路径上和工程菌株都存在多个差异基因, 可能对整体的碳源吸收利用偏好性造成较大的影响。本研究分析比较了 3 株菌分别以木糖、甘油和葡萄糖作为碳源的生长情况, 结果如图 3 所示。

基因组结果显示, EcN 缺失 XylE 蛋白编码基因的大肠杆菌吸收转运木糖有 2 种主要方式: 通过由操纵子 *xyIFGH* 编码控制的 ABC-transporter 转运; 或由 *xylE* 基因编码控制的质子/木糖共运输。虽然质子/木糖蛋白 XylE (K_m 为 63-169 $\mu\text{mol/L}$)对木糖亲和力要低于 ABC-transporter (K_m 为 0.2-4.0 $\mu\text{mol/L}$), 但是 ABC-transporter 在转运木糖时需要消耗 1 分子的 ATP, 影响细胞的生长。XylE 编码 D-xylose:H(+)-symporter, 在肠杆菌中负责将木糖

表 6 EcN 中碳源利用差异基因

Table 6 The list of unique protein in carbon source utilization in EcN

GO	Name	Protein
GO: 0009401	Phosphoenolpyruvate-dependent	PTS 2-O-a-mannosyl-D-glycerate transporter subunit IIBC
	Glycosphosphotransferase system	PTS cellobiose transporter subunit IIBC
		PTS fructose transporter subunit IIA
GO: 0005975	Carbohydrate metabolism	Inactive 6-phospho-alpha-glucosidase
GO: 0008643	Carbohydrate transport	D-xylose transporter XylE
GO: 0006071	Glycerol metabolic processes	Fructose 1,6-bisphosphatase YggF
GO: 0006006	Glucose metabolism processes	RHS element protein
		Glutathione S-transferase
		Type IV secretion protein Rhs
		RHS element protein
		Aldose-1-epimerase

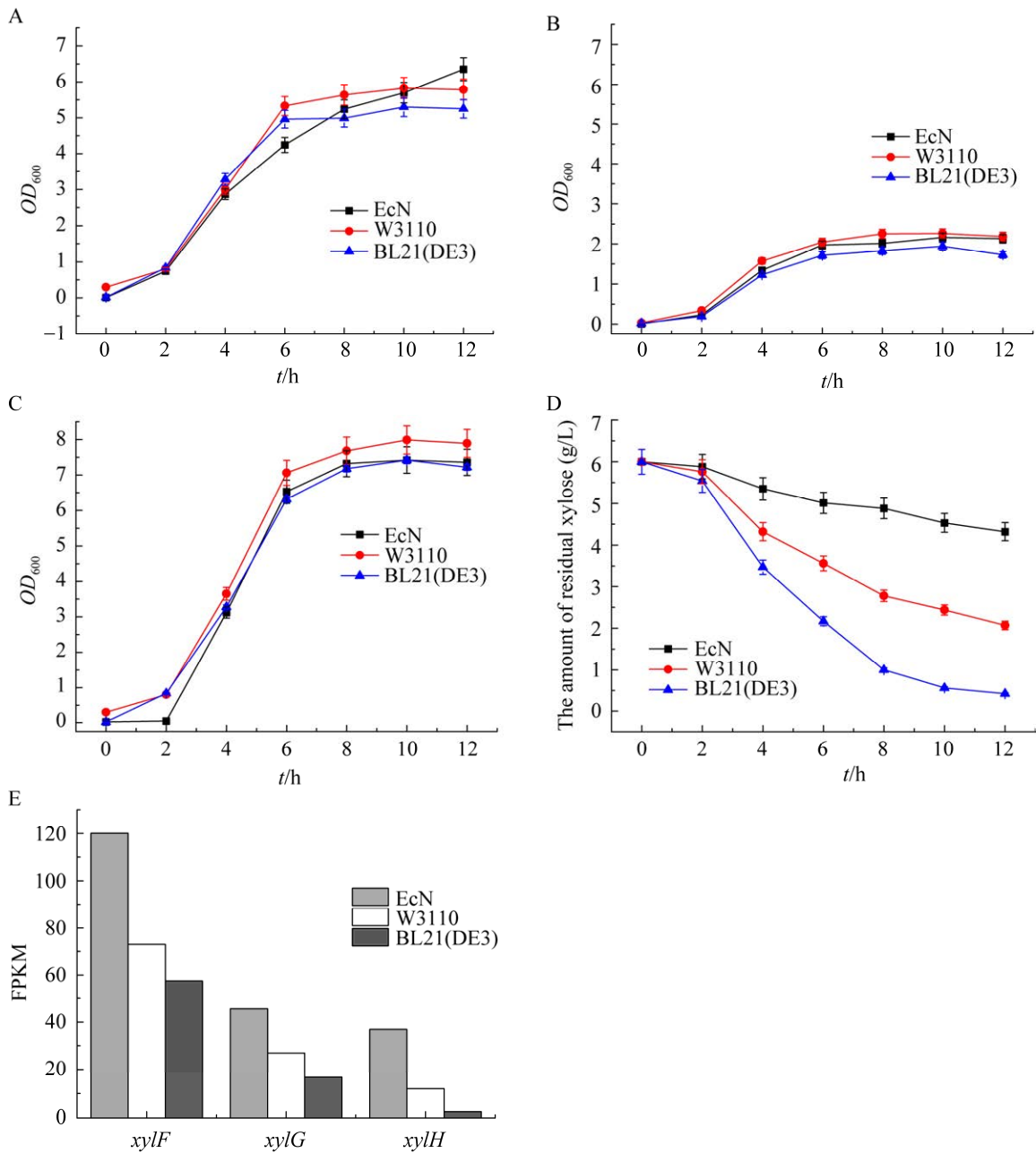


图3 大肠杆菌 BL21(DE3)、W3110、EcN 生长情况

Figure 3 Growth of *Escherichia coli* BL21(DE3), W3110 and EcN. A: Growth curves-with xylose as carbon source. B: Growth curves-with glucose as carbon source. C: Growth curves-with glycerol as carbon source. D: Consumption rate of xylose. E: Transcription level of genes about xylose absorption.

以质子依赖的方式同向转运进入细胞,同时木糖被确认是 XylE 唯一可以转运的底物^[28]。在以木糖为单独碳源培养过程中, EcN 表现出了 3 株菌中最高 OD_{600} 。对培养过程中木糖的消耗速率

进行进一步分析发现: XylE 的缺失,一定程度上影响了 EcN 对木糖的利用,使其表现出整体偏低的木糖消耗;同时 XylE 的缺失,并不影响 EcN 菌株本身的生长,使其 OD_{600} 最终达到最高。

相较于模式菌株, EcN 在基本培养基中表现出了较高的 *xylF*、*xylG* 以及 *xylH* 转录水平, 表明 EcN 在 XylE 蛋白的缺失情况下, 充分利用 *xylF*、*xylG* 以及 *xylH* 编码的 ABC-transporter 转运利用木糖。

在分别以葡萄糖、甘油为碳源的培养过程中, 在吸收利用效率及最终生物量上都表现出了 W3110>EcN>BL21(DE3)的结果。在相关的代谢路径比较中, 未发现已知关键酶的缺失, 但一些假定蛋白的差异可能是造成最终结果的原因, 例如 EcN 在甘油代谢途径中 YggF 的缺失: 大肠杆菌有 2 个编码 II 型 FBPsases 的基因 *glpX* 和 *glpF* (甘油转运促进剂), 它们与 *glpK* (甘油激酶) 形成操纵子(*glpFKX*)。YggF 与 GlpX 的序列一

致性为 58%, 是操纵子(*cmtBA* 和 *yggPFDC*)编码甘露醇磷酸烯醇丙酮酸依赖性转移酶(*CmtB* 和 *CmtA*)的一部分。Zhao 等研究提出了其他解释, 不同菌株糖酵解途径相关基因的表达水平可能影响菌株对葡萄糖的吸收利用^[29]。EcN 糖酵解代谢活性水平相较于 W3110 偏低, 可能是导致其最终生物量低于 W3110 的原因。

2.4 EcN 转录分析

基因的转录水平和基因的缺失同样影响整条代谢通路, 通过对转录调控相关基因蛋白的分析比较(表 7), 可以明显发现 EcN 中出现了多个转录调控因子的缺失, 这种缺失会导致大量基因在不同的菌株中存在转录水平上的差异。

表 7 EcN 中转录调控缺失基因列表

Table 7 The list of genes with missing transcriptional regulation in EcN

GO	Name	Protein
GO: 0045893	Positive regulation of transcription, DNA templating	DNA-binding transcriptional dual regulator HcaR DNA-binding transcriptional activator FeaR
GO: 0006355	Transcriptional regulation, DNA templating	Antitoxin of the MqsRA toxin-antitoxin system/DNA-binding transcriptional repressor MqsA DNA-binding transcriptional dual regulator IdnR Putative LuxR family transcriptional regulator FimZ Protein YiiF Putative LuxR family transcriptional regulator YqeH
GO: 0045892	Transcriptional negative regulation, DNA templating	Putative transcriptional regulator BdcR DNA-binding transcriptional activator MhpR
GO: 0006351	Transcription, DNA templates	DNA-binding transcriptional regulator FrlR DNA-binding transcriptional repressor AscG Putative DNA-binding transcriptional regulator YiaU DNA-binding transcriptional repressor PuuR DNA-binding transcriptional dual regulator DicA DNA-binding transcriptional regulator DmlR Putative DNA-binding transcriptional regulator YcaN Putative DNA-binding transcriptional regulator FrvR Antitoxin/DNA-binding transcriptional repressor DinJ DNA-binding transcriptional repressor ArsR

EcN、BL21(DE3)和 W3110 相同培养条件下的转录组数据表明, EcN 在趋化性、无氧呼吸、DNA 整合、菌毛这 4 个方面表现出特异性的高水平表达且错误发现率(false discovery rate, FDR)最低。在无氧呼吸的 GO 中, EcN 表现出了突出的硝酸还原酶的高水平转录, 硝酸还原酶(nitrate reductase, NAR)对质子动力有贡献直接有助于节约能量, 同时也使氮被同化成生物量, 这说明 EcN 在厌氧环境下有较强的竞争力, 在氮源利用方面可能也有相关偏好性^[30]。

趋化性和菌毛 2 个类别都与 EcN 生物膜形成、细胞黏附性的生物特性相关。通过表达 3 种菌毛(F1A、F1C 和卷曲菌毛), EcN 形成生物膜定殖于上皮细胞, 更好地抵御致病菌的入侵, 相较于模式菌株, EcN 表现出了极高的菌毛、鞭毛和相关运动蛋白转录水平。其中, *fliC* 表达量对整体鞭毛产生较大影响, 细胞内 FliC 供应不足是造成大肠杆菌鞭毛生长停滞的重要原因, 而转录组数据表明 EcN 保持着较高的 *fliC* 转录水平^[31]。为了进一步明确转录水平上的差异, 本研究选用荧光蛋白对 P_{flic} 启动子进行表征。在最近的研究中, P_{flic} 已被证明是在 W3110 中能够有效地削弱代谢通量的启动子^[1,26], 其在生长前期正常表达, 生长中后期表达量减少, 是有效的生长调控型启动子, 被广泛用于在生长后期关闭代谢通路, 积累目标产物。在本研究中, 利用 pXMJ-19 载体, 选择了未经截短的启动子 P_{flic} 表达荧光蛋白 MKate, 分别导入 EcN 和 W3110, 检测整个生长过程中荧光强度。结果如图 4 所示, 2 株菌荧光强度表现出相同的变化趋势, 但在 EcN 中始终表现出较高的荧光强度。

DNA 整合涉及到大量的重组酶、整合酶和转座酶, 这些酶是介导细菌耐药性传播的重要可移动遗传元件^[32], 在介导细菌抗性基因的获得、传播扩散等方面发挥了重要作用, 与 EcN 中存

在的大量特有抗性基因岛对应, 它们的基因序列往往以基因簇的方式在基因组中插入并在正常培养环境中以较低的转录水平表达。其中, 表达量相对较高的是微菌素基因簇, 位于基因组岛 I, 编码 Microcin M (*mcmA*)、Microcin H47 (*mchB*) 及其同源免疫基因(分别为 *mcmI* 和 *mchI*)^[33-34]。先前的研究表明^[33], 培养环境中 Fe^{3+} 的浓度可能会影响微菌素相关基因的表达。通过比较基本培养基和富铁培养基中微菌素的转录水平(图 4), 进一步确认了铁离子和微菌素的相关性。在基本培养基中, EcN 表达出更高的微菌素转录水平, 是富铁培养基中的 2 倍左右; 而在富铁培养基中, 随着培养时间增长铁离子消耗, 微菌素基因表达逐渐上调。

2.5 EcN 的微菌素功能验证

微菌素 H47 和 M 与铁螯合剂结合, 被受体感应, 以“特洛伊木马”的方式侵入菌体, 可尝试作为窄谱治疗药物来抑制肠道病原体、减少肠杆菌细菌、黏附性侵袭性大肠杆菌和相关病原体肠道沙门氏菌水华^[34-35], 但相关的研究和表征还是不足。为明确 2 种微菌素在竞争过程中的作用效果, 我们尝试在蛋白表达的优势菌株 BL21(DE3)中分别表达 2 种微菌素的合成基因, 探究其对应的抑菌效果。

如图 5 所示, 本研究利用 pXMJ-19 载体, 构建重组质粒 p19-*mcmIA* 和 p19-*mchIB*, 将重组质粒导入到 BL21(DE3)中进行诱导表达, 观察重组菌的抑菌效果。由于目前的技术还难以从菌上清液中分离出微菌素^[36], 因此选择添加重组菌上清与指示菌株克雷伯氏菌共培养, 通过检测指示菌株的生长情况验证重组菌株的抑菌效果^[16]。研究发现, 重组菌株 BL21-p19-*mcmIA* 对指示菌株产生一定的抑制作用, 而 BL21-p19-*mchIB* 抑制效果较弱, 说明在对克雷伯氏菌的竞争中 *mcmIA* 起

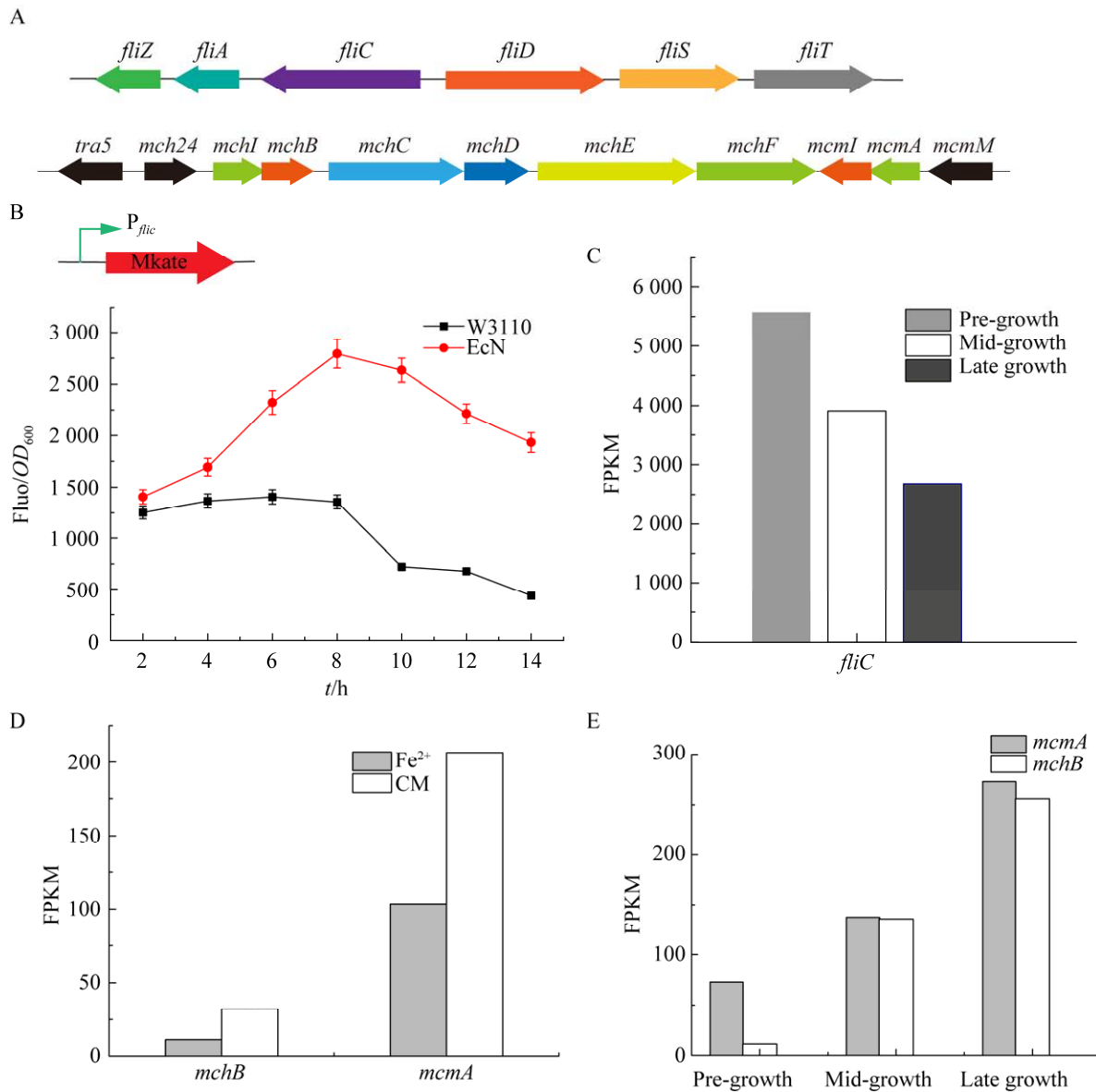


图 4 荧光蛋白表达验证启动子表达水平

Figure 4 Validation through fluorescent protein. A: Gene cluster of flagellar and microcin. B: Curves of fluorescence intensity. C: Transcription levels of *fliC*. D: Transcription levels of microcin in basic medium and iron-rich medium. E: Transcription levels of microcin at different growth stages.

主要的作用。此外，同源重组菌株的抑菌效果低于 EcN 原菌。由此得出结论，EcN 是最为适合的微菌素表达载体。将质粒 p19-*mcmIA* 导入到 EcN 菌株中进行抑菌效果的检验，如图 5 所示，在培养 12 h 时，EcN-p19-*mcmIA* 抑菌率提高了 30.3%，表现出了更强的抑菌效果。

EcN 的抑菌效果是多重机制相互作用的结

果，微菌素的作用机制与铁离子的竞争息息相关^[33]，在微菌素编码基因前存在“Fur box”，EcN 具有 6 种铁摄取系统——儿茶酚酸盐及其螯合物、异肟、催产素、混合铁载体、ChuA 蛋白和 EfeU 蛋白，在与其他微生物竞争中的关键作用如表 8 所示，EcN 在铁离子吸收运输方面表现出更多的差异 GO 和特有基因。

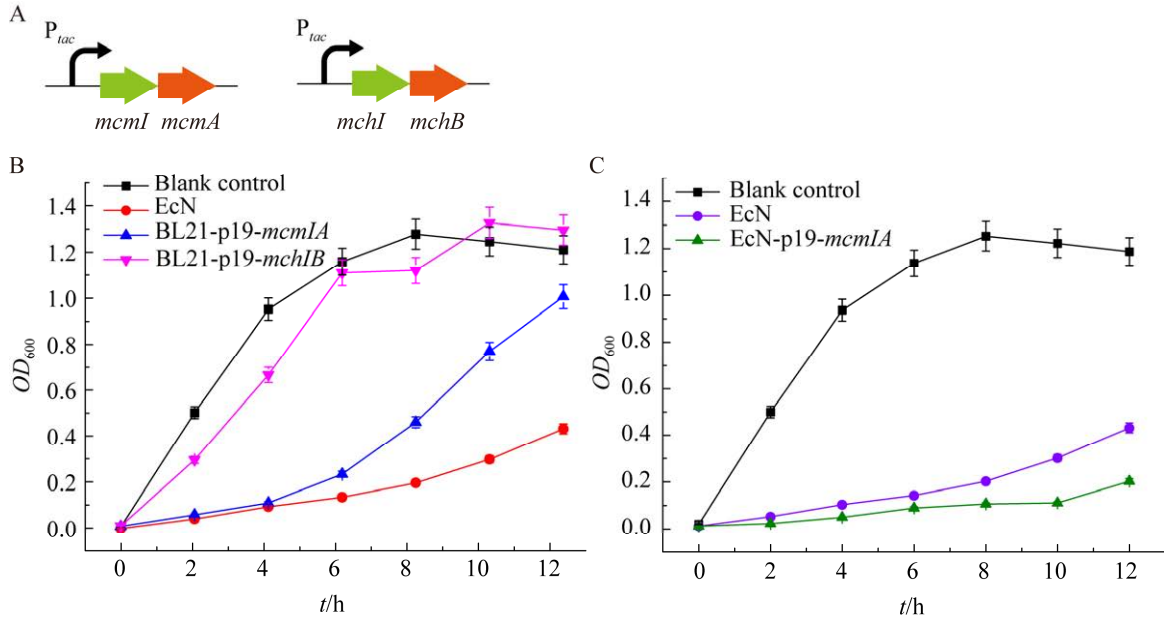


图 5 重组菌抑菌效果验证

Figure 5 Verification of antibacterial effect of recombinant bacteria. A: Schematic diagram of plasmids construction. B: Growth curves of co-cultured indicator strains. C: Growth curves of co-cultured indicator strains.

表 8 EcN 铁离子吸收运输差异 GO 列表

Table 8 The list of different GO of iron absorption and transport in EcN

GO	Name	P-value
GO: 0055072	Iron ion homeostasis	6.79E-58
GO: 0006826	Iron ion transport	7.56E-14
GO: 0015891	Siderophore transport	1.63E-12
GO: 0033214	Iron assimilation by chelation and transport	0.001 3
GO: 0046872	Metal ions are combined	0.000 0
GO: 0008237	Metallopeptidase activity	4.16E-36

3 讨论与结论

随着人们对微生物产品生物安全性的日益重视,益生菌生态网络作为代谢工程宿主具有良好的应用前景^[3,37]。本研究对 EcN 和实验室常用的菌株进行基因组学分析,分析比较了基因组的整体差异情况,挖掘出总计 904 个特有基因。利用相关软件,我们对 EcN 相较于模式菌株的缺失蛋白进行聚类分析,并在碳源吸收、转录调控方面与模式菌株进行了比较和分析,希望能通过进一步解析 EcN 与模式菌株之间的差异,推动

其发展成为一种新的工业微生物底盘细胞。此外, EcN 的特有基因往往以基因簇的形式在基因组上插入并表达,这些基因簇与 EcN 的益生机制紧密相关。本研究选取了表达量相对较高的微菌素基因簇,在 BL21(DE3)中克隆表达,检验了其抑菌效果并探究可能的影响因素。相较于模式菌株, EcN 多重益生机制相互作用,是目前最适合的微菌素表达载体。近年,抗生素滥用的问题引发热议,一方面导致细菌的耐药性迅速增强,另一方面导致肠道微生物环境失调,引发一系列代谢、免疫疾病,微菌素是一种潜在的传统抗生

素的抗菌替代品^[16]。因此, 在 EcN 中进一步过表达微菌素, 获得更强的抑菌效果, 使其作为窄谱治疗药物来抑制肠道病原体和减少肠细菌不失为一个良好的选择: 通过“以菌治菌”的生物拮抗作用, 维持并调节肠道微生物平衡, 构建生物学屏障以达到治疗的目的^[38]。

参考文献

- [1] CAI MM, ZHAO ZQ, LI XF, XU YY, XU MJ, RAO ZM. Development of a nonauxotrophic L-homoserine hyperproducer in *Escherichia coli* by systems metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 73: 270-279.
- [2] LIU YR, PAN XW, ZHANG HW, ZHAO ZQ, TENG ZX, RAO ZM. Combinatorial protein engineering and transporter engineering for efficient synthesis of L-carnosine in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 387: 129628.
- [3] ZHAO ZJ, XU SM, ZHANG WY, WU DJ, YANG GS. Probiotic *Escherichia coli* NISSLE 1917 for inflammatory bowel disease applications[J]. *Food & Function*, 2022, 13(11): 5914-5924.
- [4] MAYNERIS-PERXACHS J, MARÍA-MORENO-NAVARRETE J, MANUEL-FERNÁNDEZ-REAL J. The role of iron in host-microbiota crosstalk and its effects on systemic glucose metabolism[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2022, 18: 683-698.
- [5] LIU QY, GAI YK, CHEN YQ, LAN XL, JIANG DW. *Escherichia coli* Nissle 1917 as a novel microrobot for tumor-targeted imaging and therapy[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(8): 1226.
- [6] SONNENBORN U, SCHULZE J. The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917—features of a versatile probiotic[J]. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2009, 21(3/4): 122-158.
- [7] BRADER P, STRITZKER J, RIEDL CC, ZANZONICO P, CAI SD, BURNAZI EM, GHANI ER, HRICAK H, SZALAY AA, FONG Y, BLASBERG R. *Escherichia coli* Nissle 1917 facilitates tumor detection by positron emission tomography and optical imaging[J]. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2008, 14(8): 2295-2302.
- [8] 潘秋莎, 苏式兵, 赵明. 益生菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 功能研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(11): 3133-3139.
PAN QS, SU SB, ZHAO M. Advances in functional studies of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(11): 3133-3139 (in Chinese).
- [9] YAN X, LIU XY, ZHANG D, ZHANG YD, LI ZH, LIU X, WU FQ, CHEN GQ. Construction of a sustainable 3-hydroxybutyrate-producing probiotic *Escherichia coli* for treatment of colitis[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2021, 18: 2344-2357.
- [10] LAN YJ, TAN SI, CHENG SY, TING WW, XUE CF, LIN TH, CAI MZ, CHEN PT, NG IS. Development of *Escherichia coli* Nissle 1917 derivative by CRISPR/Cas9 and application for gamma-aminobutyric acid (GABA) production in antibiotic-free system[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 168: 107952.
- [11] ZAINUDDIN HS, BAI YF, MANSELL TJ. CRISPR-based curing and analysis of metabolic burden of cryptic plasmids in *Escherichia coli* Nissle 1917[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2019, 19(6): 478-485.
- [12] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [13] RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R, OLIVER GLÖCKNER F, PEPLIES J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(6): 929-931.
- [14] DHILLON BK, CHIU TA, LAIRD MR, LANGILLE MGI, BRINKMAN FSL. IslandViewer update: improved genomic island discovery and visualization[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(Web server issue): W129-W132.
- [15] POURCEL C, TOUCHON M, VILLEROT N, VERNADET JP, COUVIN D, TOFFANO-NIOCHE C, VERGNAUD G. CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D535-D544.
- [16] MA Y, FU W, HONG B, WANG XF, JIANG SJ, WANG JF. Antibacterial MccM as the major microcin in *Escherichia coli* Nissle 1917 against pathogenic enterobacteria[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(14): 11688.
- [17] 左君豪, 王雪, 曾君, 王猛, 郭志良, 季芳, 徐莉莉, 韦燕文, 王倩, 赵瑞利, 王承民. 一株 C3 形态多重耐药大肠杆菌噬菌体生物学特性和基因组分析[J]. *微生物学报*, 2023, 63(12): 4752-4768.
ZUO JH, WANG X, ZENG J, WANG M, GUO ZL, JI F, XU LL, WEI YW, WANG Q, ZHAO RL, WANG CM. Biological characteristics and genome of a C3-morphotype phage against multidrug-resistant *Escherichia coli*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(12): 4752-4768 (in Chinese).

- [18] 付静, 秦启伟. 30株大肠杆菌的泛基因组学特征分析[J]. 遗传, 2012, 34(6): 765-772.
FU J, QIN QW. Pan-genomics analysis of 30 *Escherichia coli* genomes[J]. *Hereditas* (Beijing), 2012, 34(6): 765-772 (in Chinese).
- [19] YOON SH, HA SM, LIM J, KWON S, CHUN J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(10): 1281-1286.
- [20] LEE I, OUK KIM Y, PARK SC, CHUN J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(2): 1100-1103.
- [21] 郭瑞亮, 张刚, 崔钦娜, 冯婕, 陈继峰. 细菌中基因组岛的转移与调控机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2234-2242.
GUO RL, ZHANG G, CUI QN, FENG J, CHEN JF. Regulation, excision and horizontal transfer of genomic islands in bacteria[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(10): 2234-2242 (in Chinese).
- [22] SEO EJ, WEIBEL S, WEHKAMP J, OELSCHLAEGER TA. Construction of recombinant *E. coli* Nissle 1917 (EcN) strains for the expression and secretion of defensins[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2012, 302(6): 276-287.
- [23] SUN JH, LU F, LUO YJ, BIE LZ, XU L, WANG Y. OrthoVenn3: an integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): W397-W403.
- [24] FU J, QIN QW. Pan-genomics analysis of 30 *Escherichia coli* genomes[J]. *Hereditas*, 2012, 34(6): 765-772.
- [25] AMIRI-JAMI M, ABDELHAMID AG, HAZAA M, KAKUDA Y, GRIFFITHS MW. Recombinant production of omega-3 fatty acids by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(20): fmv166.
- [26] DATTA P, FU L, BRODFUERER P, DORDICK JS, LINHARDT RJ. High density fermentation of probiotic *E. coli* Nissle 1917 towards heparosan production, characterization, and modification[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(3): 1051-1062.
- [27] CHEN JH, LI XH, LIU YM, SU TY, LIN CS, SHAO LJ, LI LH, LI WW, NIU GY, YU J, LIU L, LI MM, YU XL, WANG Q. Engineering a probiotic strain of *Escherichia coli* to induce the regression of colorectal cancer through production of 5-aminolevulinic acid[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(5): 2130-2139.
- [28] HENDERSON PJ, MAIDEN MC. Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 1990, 326(1236): 391-410.
- [29] ZHAO LL, YIN GB, ZHANG YL, DUAN CF, WANG Y, KANG Z. A comparative study on the genomes, transcriptomes, and metabolic properties of *Escherichia coli* strains Nissle 1917, BL21(DE3), and MG1655[J]. *Engineering Microbiology*, 2022, 2(1): 100012.
- [30] KUYPERS MMM, MARCHANT HK, KARTAL B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16: 263-276.
- [31] ZHAO ZY, ZHAO YF, ZHUANG XY, LO WC, BAKER MAB, LO CJ, BAI F. Frequent pauses in *Escherichia coli* flagella elongation revealed by single cell real-time fluorescence imaging[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1885.
- [32] 陈璇, 毛铃雅, 王钦, 王红宁, 雷昌伟. 细菌中介导多重耐药的 Tn7 转座子研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4133-4143.
CHEN X, MAO LY, WANG Q, WANG HN, LEI CW. Research progress in Tn7 transposons mediating multidrug resistance in bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(11): 4133-4143 (in Chinese).
- [33] PATZER SI, BAQUERO MR, BRAVO D, MORENO F, HANTKE K. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and Iron[J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 9): 2557-2570.
- [34] SASSONE-CORSI M, NUCCIO SP, LIU H, HERNANDEZ D, VU CT, TAKAHASHI AA, EDWARDS RA, RAFFATELLU M. Microcins mediate competition among *Enterobacteriaceae* in the inflamed gut[J]. *Nature*, 2016, 540: 280-283.
- [35] 梁轩, 张瑜, 汪业军, 朱国强. 肠道菌分泌的抑菌肽: 小菌素[J]. 微生物学报, 2019, 59(5): 821-831.
LIANG X, ZHANG Y, WANG YJ, ZHU GQ. Microcins: antibacterial peptides secreted by *Enterobacteria*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(5): 821-831 (in Chinese).
- [36] AZPIROZ MF, BASCUAS T, LAVIÑA M. Microcin H47 system: an *Escherichia coli* small genomic island with novel features[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26179.
- [37] ZHAO R, LI Z, SUN Y, GE W, WANG M, LIU H, XUN L, XIA Y. Engineered *Escherichia coli* Nissle 1917 with urate oxidase and an oxygen-recycling system for hyperuricemia treatment[J]. *Gut Microbes*, 2022, 14(1): 2070391.
- [38] BELL HN, HUBER AK, SINGHAL R, KORIMERLA N, REBERNICK RJ, KUMAR R, EI-DERANY MO, SAJJAKULNUKIT P, DAS NK, KERK SA, SOLANKI S, JAMES JG, KIM D, ZHANG L, CHEN B, MEHRA R, FRANKEL TL, GYORFFY B, FEARON ER, PASCA DI MAGLIANO M, et al. Microenvironmental ammonia enhances T cell exhaustion in colorectal cancer[J]. *Cell Metabolism*, 2023, 35(1): 134-149.