

重组大肠杆菌全细胞催化制备假尿苷

王倩倩¹, 刘亚琦¹, 屈琰¹, 刘欢¹, 高歌¹, 徐庆阳^{1,2}, 陈宁^{1,2*}, 范晓光^{1,2*}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

王倩倩, 刘亚琦, 屈琰, 刘欢, 高歌, 徐庆阳, 陈宁, 范晓光. 重组大肠杆菌全细胞催化制备假尿苷[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 799-811.

WANG Qianqian, LIU Yaqi, QU Yan, LIU Huan, GAO Ge, XU Qingyang, CHEN Ning, FAN Xiaoguang. Whole-cell catalytic production of pseudouridine by recombinant *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 799-811.

摘要: 假尿苷是非编码 RNA 中含量最多的修饰核苷, 在生物和医药领域用途广泛。现有的假尿苷制备方法普遍存在步骤繁琐、生产效率低、生产成本高等缺点。本研究在大肠杆菌中设计了新颖的酶级联反应路线, 并实现了全细胞催化尿苷制备假尿苷。首先, 质粒过表达内源的假尿苷-5-磷酸糖苷酶、核糖激酶和核糖核苷水解酶, 构建出尿苷到假尿苷的代谢途径, 实现了假尿苷的积累; 然后, 筛选内源的高活性核糖核苷水解酶, 促进了尿苷的水解, 为假尿苷的合成提供了更多前体; 接着, 对底物与产物的转运途径进行改造, 提升假尿苷产量的同时避免了副产物尿苷的积累。最终获得的重组菌株 Ψ-7 在 24 h 内可以全细胞催化 30 g/L 尿苷产生 27.24 g/L 假尿苷, 转化率为 90.8%, 生产效率为 1.135 g/(L·h), 假尿苷产量和生产效率为现有酶催化法报道的最高值。

关键词: 假尿苷; 大肠杆菌; 全细胞催化; 假尿苷-5-磷酸糖苷酶; 核糖激酶; 核糖核苷水解酶

Whole-cell catalytic production of pseudouridine by recombinant *Escherichia coli*

WANG Qianqian¹, LIU Yaqi¹, QU Yan¹, LIU Huan¹, GAO Ge¹, XU Qingyang^{1,2}, CHEN Ning^{1,2*}, FAN Xiaoguang^{1,2*}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Pseudouridine is the most abundant modified nucleoside found in non-coding RNA

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD2101401)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD2101401).

*Corresponding authors. E-mail: FAN Xiaoguang, xiaoguangfan@tust.edu.cn; CHEN Ning, ningch@tust.edu.cn

Received: 2023-07-03; Accepted: 2023-11-07; Published online: 2023-12-01

and is widely used in biological and pharmaceutical fields. However, current methods for pseudouridine production suffer from drawbacks such as complex procedures, low efficiency and high costs. This study presents a novel enzymatic cascade reaction route in *Escherichia coli*, enabling the whole-cell catalytic synthesis of pseudouridine from uridine. Initially, a metabolic pathway was established through plasmid-mediated overexpression of endogenous pseudouridine-5-phosphate glycosidase, ribokinase, and ribonucleoside hydrolase, resulting in the accumulation of pseudouridine. Subsequently, highly active endogenous ribonucleoside hydrolase was screened to enhance uridine hydrolysis and provide more precursors for pseudouridine synthesis. Furthermore, modifications were made to the substrates and products transport pathways to increase the pseudouridine yield while avoiding the accumulation of by-product uridine. The resulting recombinant strain Ψ -7 catalyzed the conversion of 30 g/L uridine into 27.24 g/L pseudouridine in 24 h, achieving a conversion rate of 90.8% and a production efficiency of 1.135 g/(L·h). These values represent the highest reported yield and production efficiency achieved by enzymatic catalysis methods to date.

Keywords: pseudouridine; *Escherichia coli*; whole-cell catalysis; pseudouridine-5-phosphate glycosidase; ribokinase; ribonucleoside hydrolase

假尿苷是 1951 年发现的第一个修饰核苷，也是 RNA 上最丰富的修饰核苷，被称为 RNA 中的“第五种核苷”^[1-3]。假尿苷是一种嘧啶核苷，是尿苷的 5 位核糖异构体，核糖不与尿嘧啶 N1 相连，而与嘧啶环的 C5 连接^[4]。将假尿苷及其类似物替换尿苷加入 mRNA，可以解决 mRNA 药物容易被免疫系统识别而被清除、产生免疫副反应的问题^[5-6]。假尿苷作为一种 RNA 的代谢产物，具有仅从肾脏排泄的特点，在临床医学上可用于监测肿瘤的发生、发展及肾病的诊治等^[7]。假尿苷具有十分重要的应用价值，随着假尿苷市场需求量的不断扩大，其制备方法也引起了广泛的关注。

在哺乳动物细胞系和组织的 RNA 中，假尿苷的含量仅为尿苷含量的 0.2%–0.7%，因此不适合从 RNA 中直接提取假尿苷。1961 年，首次报道了化学合成假尿苷的方法，但总收率仅为 2%，且产物为 α 和 β 异构体的混合物^[8]。目前，假尿苷的生产方法主要有化学合成法、化学-酶法和生物法，但普遍存在步骤复杂繁琐、

生产成本低、生产效率低和产品难于回收纯化等缺点^[9-10]，导致产品售价较高，限制了其在生物和医药领域中的大规模应用。因此，迫切需开发廉价的、适合工业化放大的假尿苷生产工艺。

大肠杆菌具有清晰的遗传背景，可以在廉价培养基上快速生长，是代谢工程和合成生物学最常用的底盘细胞之一^[11-12]。本研究以大肠杆菌(*Escherichia coli*) MG1655 作为出发菌株，设计了新颖的酶级联反应路线，并实现了全细胞催化尿苷制备假尿苷(图 1)。首先通过质粒强化大肠杆菌内源的假尿苷-5-磷酸糖苷酶基因 *yeiN*、核糖激酶基因 *rbsK* 以及核糖核苷水解酶基因 *rihB* 的表达，构建出尿苷到假尿苷的代谢途径；其次，筛选并使用高活性的核糖核苷水解酶基因 *rihA* 替代 *rihB*，增强了尿苷的水解，为假尿苷的合成提供了更多前体；最后，基因组整合大肠杆菌内源的核苷渗透酶基因 *nupC*，强化了底物向胞内的转运，敲除假尿苷转运蛋白编码基因 *psuT*，减少了产物向胞内的转运。

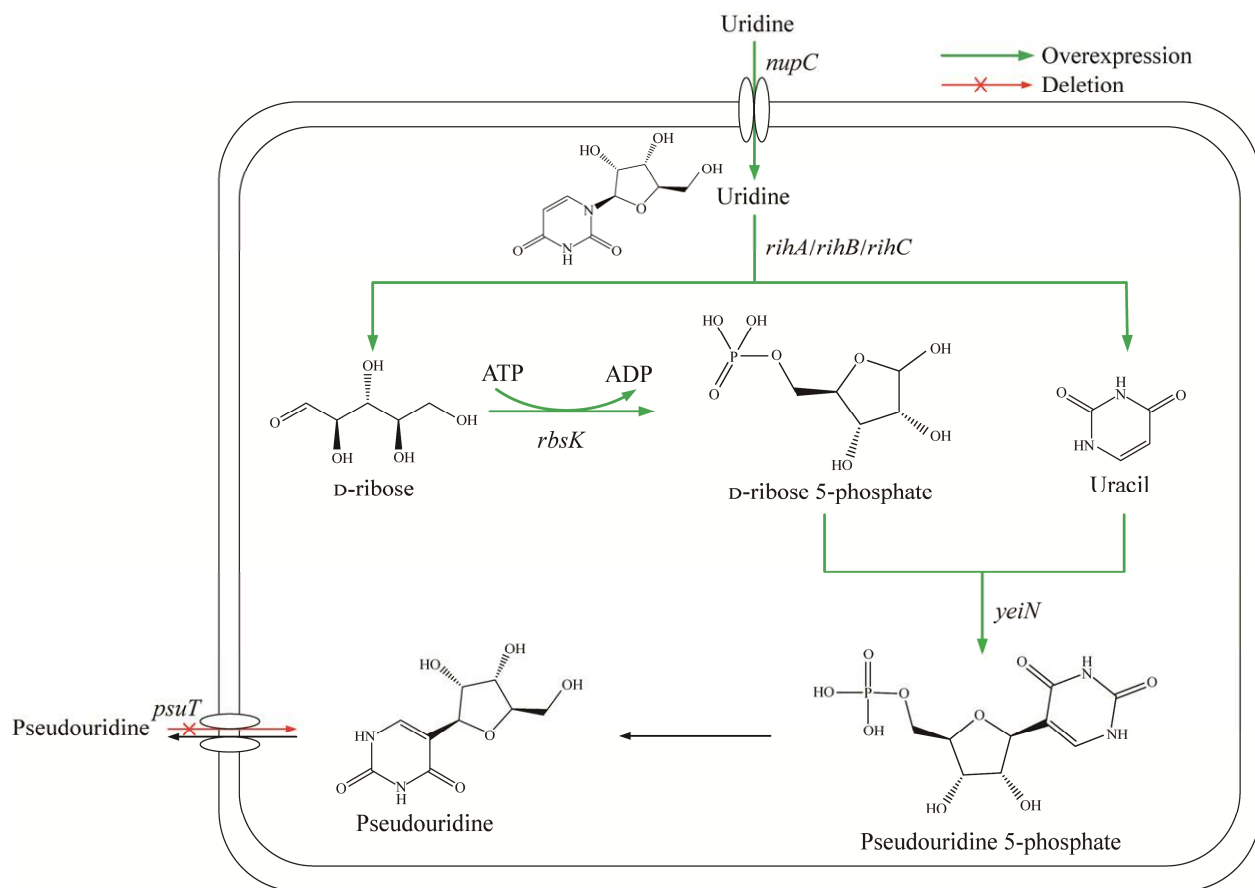


图 1 全细胞催化尿苷到假尿苷的代谢改造策略

Figure 1 Metabolic engineering strategies for whole-cell catalytic production of pseudouridine from uridine.

使用上述工程菌株实现了全细胞催化尿苷制备假尿苷，并对底物的添加方式和添加浓度进行了系统优化。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌株和质粒

本研究使用的菌株和质粒分别见表 1 和表 2。其中, *E. coli* DH5 α 用于质粒构建, *E. coli* MG1655 作为出发菌株。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Strains	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> DH5 α	F-, $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i>	Lab store
<i>E. coli</i> MG1655	Wild-type, $\Delta lacI$	Lab store
Ψ -1	<i>E. coli</i> MG1655 harboring plasmid P-3	This study
Ψ -2	<i>E. coli</i> MG1655 harboring plasmid P-4	This study
Ψ -3	<i>E. coli</i> MG1655 harboring plasmid P-5	This study
Ψ -4	<i>E. coli</i> MG1655 harboring plasmid P-6	This study
Ψ -5	<i>E. coli</i> MG1655 harboring plasmid P-7	This study
Ψ -6	Ψ -4, <i>yjgX::P_{trc}-nupC</i>	This study
Ψ -7	Ψ -6, $\Delta psuT$	This study

2×YT 培养基(g/L): 蛋白胨 16, 酵母粉 10, NaCl 5。

斜面培养基(g/L): 葡萄糖 5, 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 牛肉膏 10, NaCl 5, 琼脂 20。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 25, 酵母粉 5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄ 0.002 8, VB₁、VB₃、VB₅、VB₁₂、V_H 各 0.0013; pH 7.0–7.5。

全细胞催化培养基(g/L): 葡萄糖 20, Na₂HPO₄·7H₂O 6.8, KH₂PO₄ 3, NH₄Cl 3, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄ 0.02。

1.1.3 引物

本研究中所使用的引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 序列见表 3。

1.1.4 试剂

蛋白胨、酵母粉, 购自 Oxoid 公司; KH₂PO₄、

Na₂HPO₄·7H₂O、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄·7H₂O、FeSO₄、MnSO₄ 和 NaCl, 购自国药集团化学试剂有限公司; 假尿苷、尿苷, 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乙腈(色谱纯), 购自赛默飞世尔科技公司; 基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒, 购自 Omega Bio-Tek 公司; 限制性内切酶、Primer STAR HS DNA 聚合酶, 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 单片段快速克隆试剂盒, 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒构建方法

以 *E. coli* MG1655 的基因组为模板, 根据所需表达的不同基因片段, 使用 Primer Premier 5.0 及 CE Design 设计合适的引物, 利用 PCR

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristics	Source
pREDCas9	Spe ^r , Cas9 and λ Red recombinase expression vector	Lab store
pGRB	Amp ^r , gRNA expression vector	Lab store
pTrc99a, Δ <i>lacI</i>	Amp ^r , Δ <i>lacI</i>	Lab store
P-1	Amp ^r , pTrc99a carrying P _{trc-yeiN} , Δ <i>lacI</i>	This study
P-2	Amp ^r , pTrc99a carrying P _{trc-yeiN} , P _{trc-rbsK} , Δ <i>lacI</i>	This study
P-3	Amp ^r , pTrc99a carrying P _{trc-yeiN} , P _{trc-rbsK} , P _{lac-rihB} , Δ <i>lacI</i>	This study
P-4	Amp ^r , pTrc99a carrying P _{trc-yeiN} , P _{trc-rbsK} , P _{m112-rihB} , Δ <i>lacI</i>	This study
P-5	Amp ^r , pTrc99a carrying P _{trc-yeiN} , P _{trc-rbsK} , P _{trc-rihB} , Δ <i>lacI</i>	This study
P-6	Amp ^r , pTrc99a carrying P _{trc-yeiN} , P _{trc-rbsK} , P _{trc-rihA} , Δ <i>lacI</i>	This study
P-7	Amp ^r , pTrc99a carrying P _{trc-yeiN} , P _{trc-rbsK} , P _{trc-rihC} , Δ <i>lacI</i>	This study

表 3 DNA 片段扩增引物

Table 3 Primers used for the amplification of DNA fragments

Primer names	Sequences (5'→3')
pTrc99a-JD-S	CACTCCCCTTCTGGATAATGTTT
pTrc99a-JD-A	CGTTCACCGACAAACAACAGATA
P _{trc-yeiN} -S	ATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGACCAT GTCTGAATTAATAAATTTCCCCTG
P _{trc-yeiN} -A	CACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGT TAACCCGCGAGACGCTG
P _{trc-rbsK} -S	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGACCATG CAAAACGCAGGCAGC

(待续)

(续表 3)

Primer names	Sequences (5'→3')
<i>P_{trc}-rbsK-A</i>	CACCGACAAACAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGT CACCTCTGCCTGTCTAAAAATG
<i>P_{lac}-rihB-S</i>	CTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATG GAAAAGAGAAAAATTATTCTGGA
<i>P_{m112}-rihB-S</i>	GAGATAACAACGTTGATATAATTGAGCCCTTTTGGTGCCTCAGTCAGTTTAAACCAGGAAACA GCTATGGAAAAGAGAAAAATTATTCTGGA
<i>P_{trc}-rihB-S</i>	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGG AAAAGAGAAAAATTATTCTGGA
<i>P_{trc}-rihB-A</i>	CACCGACAAACAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGT TAATGGGTTTTGATGTAGCCG
<i>P_{trc}-rihA-S</i>	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGG CACTGCCAATTCTGTTAG
<i>P_{trc}-rihA-A</i>	CACCGACAAACAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGT TAAGCGTAAAATTTACAGACGATCA
<i>P_{trc}-rihC-S</i>	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATG CGTTTACCTATCTTCCTCGA
<i>P_{trc}-rihC-A</i>	CACCGACAAACAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGT TACGACGCCAGAGCCAGC
<i>Sal I-P_{trc}-S</i>	CGGGGATCCTCTAGAGTCGACTTGACAATTAATCATCCGGCTCG
<i>P_{trc}-Hind III-A</i>	TCCGCCAAAACAGCCAAGCTTATTTGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAA
<i>EcoR I-P_{trc}-S</i>	AGGAAACAGACCATGGAATTCTTGACAATTAATCATCCGGCTCG
<i>P_{trc}-Kpn I-A</i>	TCTAGAGGATCCCCGGGTACCATTTGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAA
<i>Sma I-P_{lac}-S</i>	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGTTTACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGT
<i>Sma I-P_{m112}-S</i>	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGTTATCTCTGGCGGTGTTGACAAGAGATAACAACG
<i>Sma I-P_{trc}-S</i>	AATTCGAGCTCGGTACCCGGGTTGACAATTAATCATCCGGCTCG
<i>P_{trc}-BamH I-A</i>	CAAGTCGACTCTAGAGGATCCATTTGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAA GCTCAGGGAGTCATTGGTAAAG
<i>UP-<i>psuT</i>-S</i>	CCAGACCAATAAAGAACCCGCCATCCCCACAACACTTCTCA
<i>DN-<i>psuT</i>-S</i>	TGAGAAGTGTGTGGGGATGGCGGGTCTTTATTGGTCTGG
<i>DN-<i>psuT</i>-A</i>	TGAAGAGTGTGGTGCCTTGC
<i>gRNA-<i>psuT</i>-S</i>	AGTCCTAGGTATAATACTAGTCATCATGCTCTACTTCCCACGTTTTAGAGCTAGAA
<i>gRNA-<i>psuT</i>-A</i>	TTCTAGCTCTAAAACGTGGGAAGTAGAGCATGATGACTAGTATTATACCTAGGACT GGAAGTCAACGGGTTATGCG
<i>UP-<i>yjgX</i>-S</i>	TGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAAAA AATCACCACGAATACCGAATC
<i>DN-<i>yjgX</i>-S</i>	AAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATAC AGTGTCTTCCCTGAGCCG
<i>DN-<i>yjgX</i>-A</i>	GGCGAAGGATACCATCAAGC
<i>P_{trc}-nupC-S</i>	TCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGACCATGG ACCGCGTCCCTTCATTT
<i>nupC-P_{trc}-A</i>	CACCGACAAACAACAGATAAAAACGAAAGGCCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGT TACAGCACCATGCTGCGA
<i>gRNA-<i>yjgX</i>-S</i>	AGTCCTAGGTATAATACTAGTTGGCCATTGCGGATGGTTAAGTTTTAGAGCTAGAA
<i>gRNA-<i>yjgX</i>-A</i>	TTCTAGCTCTAAAACCTTAACCATCCGCAATGGCCAAGTATTATACCTAGGACT

扩增获得所需的含有酶切位点和启动子的目的基因片段并纯化回收产物；根据所需表达的基因选择合适的酶切位点，对质粒 pTrc99a $\Delta lacI$ 进行双酶切并纯化回收产物；回收的 PCR 产物和酶切产物在重组酶 Exnase[®] II 的作用下同源重组，经转化、挑取单菌落筛选、菌落 PCR 鉴定后获得重组质粒。多基因片段重组质粒构建方法如上所述，依次分别选用不同的酶切位点来连接多个目的基因片段。

1.2.2 基因编辑方法

本研究利用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑系统对大肠杆菌进行基因组改造^[13]。CRISPR/Cas9 基因编辑系统由 pREDCas9 和 pGRB 两个质粒构成，包括 Cas9 蛋白表达系统、 λ 噬菌体的 RED 重组系统、gRNA 表达质粒、供体 DNA 以及诱导质粒固化系统。针对不同的靶位点利用 gRNA 设计工具 CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>) 设计出不同的 20 bp 间隔序列，退火后与线性化 pGRB 在重组酶 Exnase[®] II 作用下连接，通过化学转化至 *E. coli* DH5 α ，筛选后获得所需 gRNA 表达质粒。使用 Primer Premier 5.0 设计引物，根据待编辑基因设计上下游同源臂引物，以待整合基因设计整合基因的扩增引物，通过 PCR 扩增分别得到待编辑基因的上下游同源臂和整合基因片段，再经过重叠 PCR 获得重叠 DNA 片段(整合片段：上游同源臂-待整合基因-下游同源臂，敲除片段：上游同源臂-下游同源臂)。pGRB 质粒能够转录出相应的 gRNA，同 Cas9 蛋白结合后形成复合物识别到靶位点，并实现该靶位点的双链 DNA 断裂^[14]。此时，在重组酶作用下，DNA 重组片段与断裂的双链 DNA 发生同源重组从而实现基因的精准敲除与整合。

1.2.3 全细胞催化方法

将活化好的适量菌株接种至种子培养基

中，37 °C 培养 14–16 h 至菌体 OD_{600} 达到 15–20，培养期间通过流加氨水维持 pH 7.0，摇瓶培养转速设置为 200 r/min，分批培养的溶氧设置为 30%–40%。

离心收集培养好的菌体，使用 PBS 缓冲液清洗菌体一次。将清洗后的菌体重悬在全细胞催化培养基中，菌体浓度 OD_{600} 为 40 左右。摇瓶催化时一次性加入 5 g/L 底物尿苷，分批补料催化时流加终浓度为 5–40 g/L 底物尿苷。催化反应温度为 37 °C，反应时间为 24 h，流加氨水维持 pH 7.0。

1.2.4 检测与分析

通过紫外分光光度计测定菌体浓度 OD_{600} ；通过高效液相色谱仪检测尿嘧啶、尿苷和假尿苷的浓度^[15]，色谱柱为 Phenomenex Gemini 5u C18 110A (150 mm \times 4.6 mm)，流动相为含 0.2% 乙腈的 0.02 mol/L KH_2PO_4 缓冲液，柱温 30 °C，检测波长 254 nm，流动相流速 1 mL/min。

2 结果与分析

2.1 在大肠杆菌中构建尿苷到假尿苷的代谢途径

大肠杆菌内源的假尿苷-5-磷酸糖苷酶能够催化尿嘧啶与 5-磷酸核糖合成假尿苷单磷酸，假尿苷单磷酸在核苷酸酶的作用下脱磷酸形成假尿苷，假尿苷可在大肠杆菌自身转运蛋白的作用下实现外排。但是，尿嘧啶在水中的溶解度极低，5-磷酸核糖价格昂贵且易被代谢，两者均不适合作为酶催化的底物。本研究选择溶解度较高的尿苷作为底物，设计了一条新颖的假尿苷合成途径(图 1)。尿苷在核糖核苷水解酶的作用下转化为尿嘧啶和 D-核糖，D-核糖在核糖激酶的作用下转化为 5-磷酸核糖，反应所需的 ATP 可通过糖代谢提供。通过上述酶的级联反应，可以实现以尿苷为底物直接制备假尿苷。

以 pTrc99a $\Delta lacI$ 为组成型表达载体, 首先连接 P_{trc} 启动子控制的假尿苷-5-磷酸糖苷酶基因 *yeiN*, 构建出重组质粒 P-1。然后, 将 P_{trc} 启动子控制的核糖激酶基因 *rbsK* 连接到质粒 P-1, 构建出重组质粒 P-2。考虑到大肠杆菌中核糖核苷水解酶种类较多且底物特异性宽泛, 选用了其中一种核糖核苷水解酶基因 *rihB*, 并使用 3 种不同表达强度的启动子控制其表达(表达强度 $P_{trc} > P_{m112} > P_{lac}$), 将其分别连接到质粒 P-2, 构建出重组质粒 P-3-P-5。将 3 种质粒 P-3-P-5 分别转化至 *E. coli* MG1655 $\Delta lacI$ 菌株, 获得工程菌 Ψ -1- Ψ -3, 并对其进行摇瓶全细胞催化测试。催化过程中一次性加入 5 g/L 底物尿苷, 催化周期 24 h, 结果如图 2 所示。菌株 Ψ -1- Ψ -3 均检测到假尿苷的积累, 说明构建的尿苷到假尿苷代谢途径可行。随着 *rihB* 基因表达强度的提高, 假尿苷的积累量从 1.09 g/L 提

高到 1.93 g/L, 尿苷的剩余量从 1.86 g/L 减少到 1.01 g/L, 说明提高核糖核苷水解酶的表达强度有助于增强尿苷的水解, 为假尿苷的合成提供了更多的前体尿嘧啶和核糖。此外, 3 株菌均检测到尿嘧啶的剩余, 说明水解得到的尿嘧啶没有完全转化为假尿苷。

2.2 大肠杆菌内源高活性核糖核苷水解酶的筛选

大肠杆菌中存在 3 种核糖核苷水解酶, 分别由 *rihA*、*rihB* 和 *rihC* 编码^[16]。RihA 和 RihB 属于特异性水解酶, 主要参与尿苷和胞苷的水解, 但对 2 种底物的亲和力不同^[17]。RihC 属于非特异性水解酶, 可以水解多种核苷, 如腺苷、鸟苷、尿苷和胞苷等, 底物特异性较宽泛。由于尿苷的水解程度与假尿苷积累呈正相关性, 对大肠杆菌内源的 3 种核糖核苷水解酶进行了比较筛选。

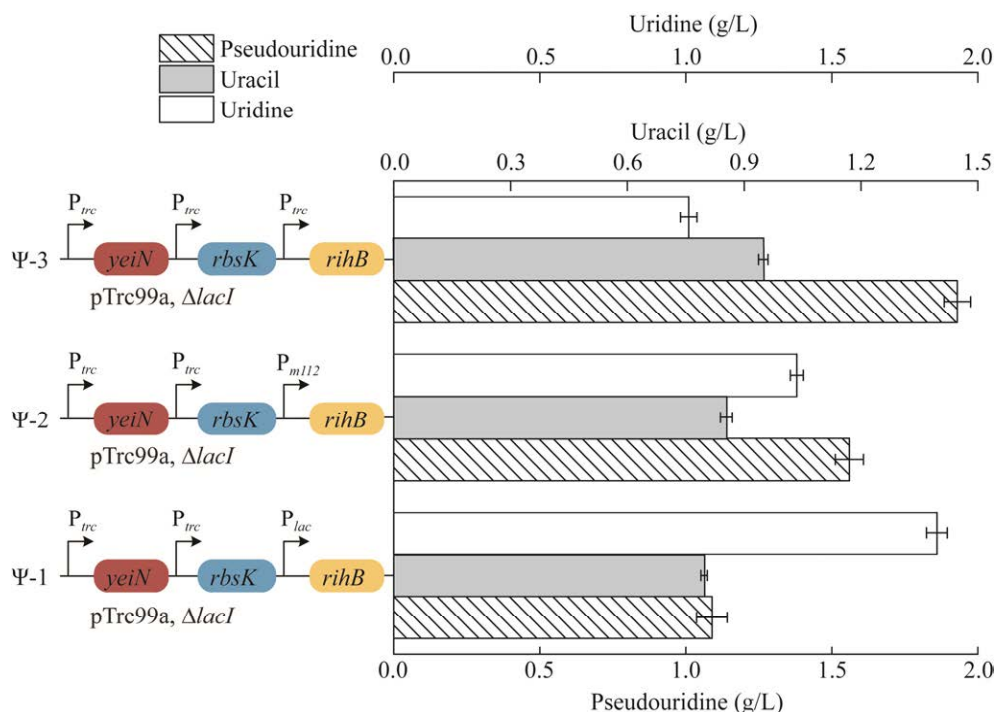


图 2 菌株 Ψ -1- Ψ -3 全细胞催化制备假尿苷的结果

Figure 2 Whole-cell catalytic production of pseudouridine by strains Ψ -1, Ψ -2 and Ψ -3.

将 P_{trc} 启动子控制的 *rihA* 和 *rihC* 基因分别连接到质粒 P-2, 构建出重组质粒 P-6 和 P-7 并转化至 *E. coli* MG1655 $\Delta lacI$ 菌株, 获得工程菌 Ψ -4 和 Ψ -5。对 Ψ -3- Ψ -5 菌株进行摇瓶全细胞催化测试, 催化过程中一次性加入 5 g/L 底物尿苷, 催化周期 24 h, 结果如图 3 所示。过表达 *rihA* 菌株 Ψ -4 的假尿苷积累量最高, 为 2.39 g/L, 与过表达 *rihB* 菌株 Ψ -3 和过表达 *rihC* 菌株 Ψ -5 相比分别提高了 23.8% 和 109.6%。此外, 菌株 Ψ -4 的尿苷剩余量最低, 为 0.54 g/L, 与菌株 Ψ -3 和 Ψ -5 相比分别减少了 46.5% 和 74.6%。以上结果表明, RihA 对尿苷的水解作用明显强于 RihB 和 RihC, 更适合作为假尿苷的全细胞催化用酶。

2.3 底物与产物转运途径改造

转运途径改造是降低副产物外排, 提升目标产物积累的常用策略^[18]。大肠杆菌 *nupC* 和

nupG 基因编码的核苷渗透酶可以将胞外核苷转运至胞内, 底物特异性较宽泛^[19]; *psuT* 基因编码的假尿苷转运蛋白则可以将胞外的假尿苷转运至胞内。由于转运蛋白为膜蛋白, 不适合大量表达, 因此在菌株 Ψ -4 的 *yjgX* 假基因位点上整合 P_{trc} 启动子控制的 *nupC* 基因, 增强尿苷向胞内的转运, 减少副产物尿苷的积累, 获得工程菌 Ψ -6。如图 4A 所示, 上游同源臂基因片段的长度为 568 bp, P_{trc} -*nupC* 片段长度为 1 326 bp, 下游同源臂基因片段的长度为 505 bp, 重叠基因片段 *yjgX*:: P_{trc} -*nupC* 的长度为 2 311 bp, 原菌以引物 UP-*yjgX*-S 及 DN-*yjgX*-A 扩增片段长度为 1 286 bp, 阳性菌以引物 UP-*yjgX*-S 及 DN-*yjgX*-A 扩增出的片段长度为 2 311 bp, 说明 *yjgX*:: P_{trc} -*nupC* 重叠基因片段整合成功。接着, 敲除菌株 Ψ -6 的 *psuT* 基因, 减少假尿苷向胞内的转运, 增加目标产物假尿苷在胞外的积累,

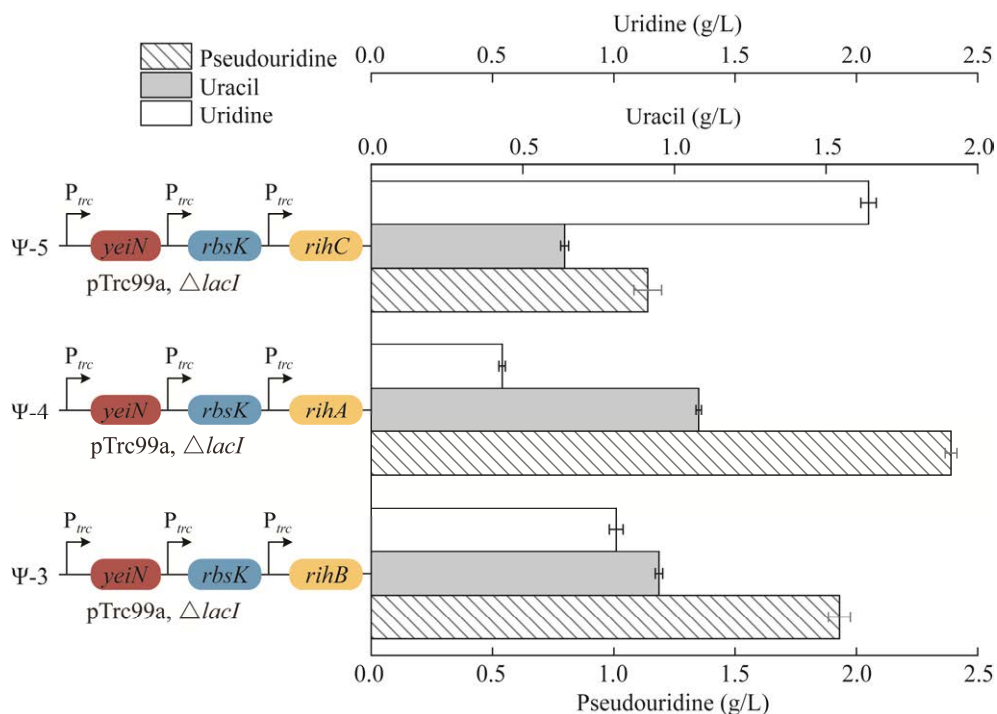


图 3 菌株 Ψ -3- Ψ -5 全细胞催化制备假尿苷的结果

Figure 3 Whole-cell catalytic production of pseudouridine by strains Ψ -3, Ψ -4 and Ψ -5.

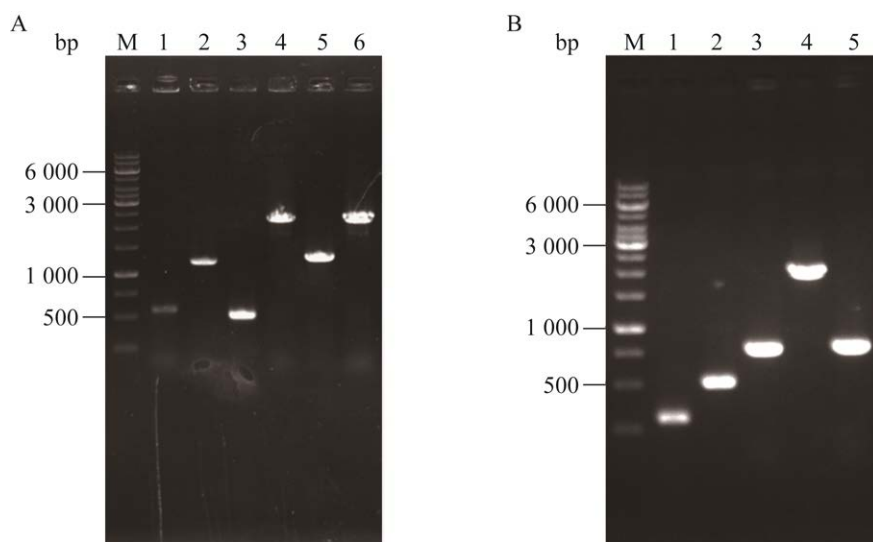


图4 整合 *nupC* 基因(A)和敲除 *psuT* 基因(B)的 PCR 验证图 A: M: DNA marker; 1: *yigX* 上游同源臂片段; 2: P_{trc} -*nupC* 基因片段; 3: *yigX* 下游同源臂片段; 4: *yigX*: P_{trc} -*nupC* 重叠片段; 5: 阴性单菌落鉴定; 6: 阳性单菌落鉴定. B: M: DNA marker; 1: 上游同源臂片段; 2: 下游同源臂片段; 3: 重叠片段; 4: 阴性单菌落鉴定; 5: 阳性单菌落鉴定

Figure 4 PCR diagram verification of gene *nupC* integration (A) and gene *psuT* deletion (B). A: M: DNA marker; 1: *yigX* upstream homologous arm fragment; 2: P_{trc} -*nupC* gene fragment; 3: *yigX* downstream homologous arm fragment; 4: *yigX* overlapping fragment; 5: Negative single colony identification; 6: Positive single colony identification. B: M: DNA marker; 1: Upstream homologous arm fragment; 2: Downstream homologous arm fragment; 3: Overlapping fragment; 4: Negative single colony identification; 5: Positive single colony identification.

获得工程菌 Ψ -7。如图 4B 所示, 上游同源臂基因片段的长度为 303 bp, 下游同源臂基因片段的长度为 513 bp, 敲除基因重叠片段的总长为 775 bp, 原菌以引物 UP-*psuT*-S 及 DN-*psuT*-A 扩增片段长度为 1 970 bp, 阳性菌以引物 UP-*psuT*-S 及 DN-*psuT*-A 扩增出的片段长度为 775 bp, 说明 *psuT* 基因敲除成功。

对 Ψ -4、 Ψ -6、 Ψ -7 菌株进行摇瓶全细胞催化测试, 催化过程中一次性加入 5 g/L 底物尿苷, 催化周期 24 h, 结果如图 5 所示。与菌株 Ψ -4 相比, 基因组过表达 *nupC* 基因后, 2 株菌均无尿苷的剩余, 说明强化核苷渗透酶的表达能显著提升底物尿苷向胞内的转运效率。菌株

Ψ -7 的假尿苷积累量达到 3.55 g/L, 与菌株 Ψ -6 和 Ψ -4 相比分别提高了 19.5%和 48.5%; 尿嘧啶剩余量为 0.33 g/L, 与菌株 Ψ -6 和 Ψ -4 相比分别降低了 45.9%和 69.4%。以上结果表明, 通过改造转运系统不仅可以优化胞内的底物和产物浓度, 也有助于增加底物向产物的有效转化, 减少中间体尿嘧啶的形成与外排。

2.4 分批补料全细胞催化制备假尿苷

理论上, 1 分子底物尿苷可以转化为 1 分子产物假尿苷, 但是从摇瓶全细胞催化结果可以看出, 一次性投入底物尿苷催化, 尿苷到假尿苷的最高转化率(Ψ -7 菌株)为 71%, 远低于理论转化率。一方面, 全细胞催化过程中菌体会

利用多余的尿苷为碳源进行增殖；另一方面，大量的尿苷会推动水解反应的进行，造成尿嘧啶的积累。因此，在反应器中采用分批补料方式流加底物尿苷并对尿苷的终浓度进行优化，结果如图 6 所示。流加终浓度为 5 g/L 的底物尿苷时， Ψ -7 菌株假尿苷的积累量达到 3.89 g/L，与一次性投料相比提高了 9.6%，说明分批补料方式有助于减少底物尿苷的额外消耗。当底物尿苷流加终浓度从 5 g/L 提升到 30 g/L 时，假

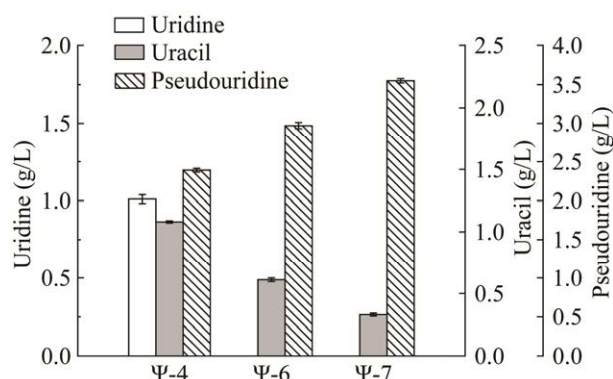


图 5 菌株 Ψ -4、 Ψ -6 和 Ψ -7 全细胞催化制备假尿苷的结果

Figure 5 Whole-cell catalytic production of pseudouridine by strains Ψ -4, Ψ -6 and Ψ -7.

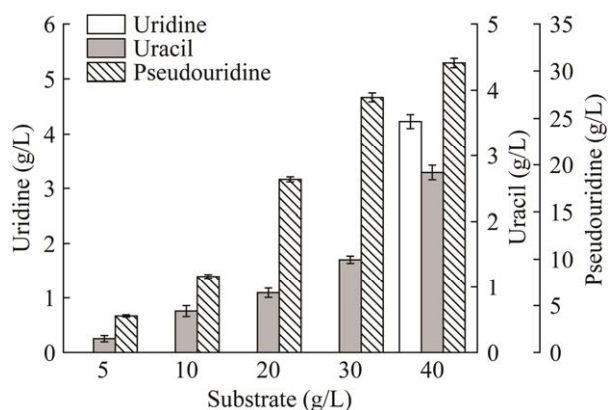


图 6 分批补料全细胞催化制备假尿苷

Figure 6 Fed-batch whole-cell catalytic production of pseudouridine.

尿苷的积累量从 3.89 g/L 提升到 27.24 g/L，转化率从 77.8% 提升到 90.8%，而尿嘧啶的剩余量仅从 0.21 g/L 提升到 1.42 g/L。当底物尿苷流加终浓度为 40 g/L 时，底物尿苷没有完全消耗，剩余 4.23 g/L，假尿苷的积累量为 30.86 g/L，转化率为 77.2%。以上结果表明，细胞数量与底物浓度之间存在最优比例，底物浓度过低或过高均会造成底物利用率下降，进而影响尿苷向假尿苷的高效转化。

3 讨论与结论

假尿苷作为 RNA 中重要的“第五种核苷”，已广泛用于生物医药领域，但其生产方法均具有局限性。李静简等^[20]以 2,3,5-三苄氧基-D-核糖酸-1,4-内酯与 2,4-二烷氧基-5-溴嘧啶为原料通过加成、还原、脱保护基等反应后得到假尿苷；金峰等^[21]以 D-核糖和尿嘧啶为起始反应物经有机溶剂通过加成、缩合、脂肪酶拆分、脱保护基等反应后得到假尿苷，但两种化学合成方法均存在步骤繁琐、收率较低的问题。肖聪等^[22]使用化学-酶法合成假尿苷，先化学合成 5-磷酸核糖，再用假尿苷-5-磷酸糖苷酶催化 5-磷酸核糖与尿嘧啶合成假尿苷单磷酸，最后去磷酸化得到假尿苷，产量为 7.9 g/L，转化率为 51%；陈伟等^[23]将来自于链霉菌 ID38640 中的假尿苷合成基因 *pumH*、*pumJ* 和 *pumD* 克隆至大肠杆菌体内，96 h 可转化 10 g/L 肌苷产生 7.2 g/L 假尿苷；朱文娟等^[24]利用重组大肠杆菌分别表达尿苷磷酸化酶 UdP、嘌呤核苷磷酸化酶 DeoD、磷酸戊糖变位酶 DeoB 以及假尿苷-5-磷酸糖苷酶 YeiN，再将酶液混合，24 h 可转化尿苷产生 1.16 g/L 假尿苷，转化率为 95%；时鹏等^[25]利用重组大肠杆菌分别表达糖苷水解酶 PpnN、

假尿苷-5-磷酸糖苷酶 LpPUG 以及碱性磷酸水解酶 PhoA, 将酶纯化后可以转化尿苷酸产生 12.2 g/L 假尿苷, 转化率为 75.5%; Zhou 等^[26] 利用代谢工程手段改造大肠杆菌, 可利用葡萄糖经 52 h 发酵产生 7.9 g/L 假尿苷, 转化率为 15%。如表 4 所示, 生物法与化学法相比的优势在于生产工艺简单、原料来源广泛, 但存在假尿苷生产效率低、生产成本高的问题, 难以真正应用于工业化生产。本研究设计了新颖的酶级联反应路线, 在大肠杆菌中使用质粒过表达内源的高活性核糖核苷水解酶基因 *rihA*、核糖激酶基因 *rbsK* 和假尿苷-5-磷酸糖苷酶基因 *yeiN*, 基因组整合核苷渗透酶基因 *nupC* 并缺失假尿苷转运蛋白基因 *psuT*, 得到的重组菌株 Ψ-7 在 24 h 内可以全细胞催化 30 g/L 尿苷产生 27.24 g/L 假尿苷, 转化率为 90.8%, 生产效率为 1.135 g/(L·h), 假尿苷产量和生产效率为现有生物法报道的最高值。

假尿苷与尿苷互为同分异构体, 区别在于分子中连接的核糖结构不同。现有酶催化法需先将尿苷磷酸化为尿苷酸, 再将尿苷酸水解为尿嘧啶和 1-磷酸核糖, 最后通过变位作用将 1-磷酸核糖转化为 5-磷酸核糖用于假尿苷合

成, 效率较低^[24]; 或者直接将尿苷酸水解为尿嘧啶和 5-磷酸核糖用于假尿苷合成, 原料成本较高^[25]。本研究使用核糖核苷水解酶将尿苷水解为尿嘧啶和 D-核糖, 再通过核糖激酶将 D-核糖磷酸化为 5-磷酸核糖用于假尿苷合成, 简化了反应过程, 增加了反应效率。由于所有的催化用酶均为大肠杆菌自身来源, 酶与底盘菌株的适配性以及表达效率较现有报道更高。此外, 本研究优化了底物和产物的转运途径, 增加底盘细胞摄取底物的能力, 弱化了底盘细胞摄取产物的能力, 提升了底物向产物的转化。为了进一步提升酶催化效率, 后续可以筛选高活性的假尿苷-5-磷酸糖苷酶以及特异性强的假尿苷单磷酸水解酶用于假尿苷单磷酸的合成以及去磷酸化, 系统优化酶的表达强度和全细胞催化方式, 为酶催化法制备假尿苷的工业放大提供理论依据。

本研究通过途径设计及代谢改造, 提高了假尿苷的酶催化水平, 但依然需以尿苷作为反应底物。为了进一步降低生产成本, 后续可以强化大肠杆菌中葡萄糖到尿苷的合成途径, 使细胞能够自身代谢积累底物, 最终实现假尿苷的直接发酵生产。

表 4 不同生物法生产假尿苷的方法比较

Table 4 Comparison on the production of pseudouridine by different biological methods

Methods	Substrates	Time (h)	Pseudouridine titer (g/L)	Conversion rate (%)	Productivity (g/(L·h))	References
Whole-cell catalysis	Inosine	96	7.20	72.0	0.075	[23]
Crude enzyme catalysis	Uridine	24	1.16	95.0	0.048	[24]
Pure enzyme catalysis	Uridine 5'-monophosphate	—	12.20	75.5	—	[25]
Fermentation	Glucose	52	7.90	15.0	0.152	[26]
Whole-cell catalysis	Uridine	24	27.24	90.8	1.135	This study

REFERENCES

- [1] 宋靖慧, 彭金英, 伊成器. 真核生物 mRNA 上的化学修饰和基因表达调控[J]. 中国科学:生命科学, 2021, 51(5): 479-495.
SONG JH, PENG JY, YI CQ. Chemical modifications in eukaryotic mRNA regulate gene expression[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2021, 51(5): 479-495 (in Chinese).
- [2] LI XY, MA SQ, YI CQ. Pseudouridine: the fifth RNA nucleotide with renewed interests[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2016, 33(8): 108-116.
- [3] SCHWARTZ S, BERNSTEIN DA, MUMBACH MR, JOVANOVIĆ M, HERBST RH, LEÓN-RICARDO BX, ENGREITZ JM, GUTTMAN M, SATIJA R, LANDER ES, FINK G, REGEV A. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA[J]. Cell, 2014, 159(1): 148-162.
- [4] SPENKUCH F, MOTORIN Y, HELM M. Pseudouridine: still mysterious, but never a fake (uridine)! [J]. RNA Biology, 2014, 11(12): 1540-1554.
- [5] KARAM M, DAOUD G. mRNA vaccines: past, present, future[J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022, 17(4): 491-522.
- [6] KOWALZIK F, SCHREINER D, JENSEN C, TESCHNER D, GEHRING S, ZEPP F. mRNA-based vaccines[J]. Vaccines, 2021, 9(4): 390.
- [7] 陈旭, 冯娟, 胡晓波, 王昌富. 假尿嘧啶核苷作为肾病和肿瘤生物标志物的研究进展[J]. 检验医学, 2019, 34(9): 864-867.
CHEN X, FENG J, HU XB, WANG CF. Research progress of pseudouridine as a biomarker of kidney disease and cancer[J]. Laboratory Medicine, 2019, 34(9): 864-867 (in Chinese).
- [8] RILEY AT, SANFORD TC, WOODARD AM, CLERC EP, SUMITA M. Semi-enzymatic synthesis of pseudouridine[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2021, 44(7): 128105.
- [9] LIU YJ, GUO XH, BAI P. Recent progress in the syntheses of carbocyclic nucleosides[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2014, 34(11): 2202-2216.
- [10] WESTARP S, KASPAR F, NEUBAUER P, KURRECK A. Industrial potential of the enzymatic synthesis of nucleoside analogs: existing challenges and perspectives[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2022, 78: 102829.
- [11] WAEGEMAN H, SOETAERT W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(12): 1891-1910.
- [12] WANG ZB, SUN JX, YANG Q, YANG JM. Metabolic engineering *Escherichia coli* for the production of lycopene[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(14): 3136.
- [13] LI YF, LIN ZQ, HUANG C, ZHANG Y, WANG ZW, TANG YJ, CHEN T, ZHAO XM. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing[J]. Metabolic Engineering, 2015, 31: 13-21.
- [14] WU MY, SUNG LY, LI H, HUANG CH, HU YC. Combining CRISPR and CRISPRi systems for metabolic engineering of *E. coli* and 1,4-BDO biosynthesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(12): 2350-2361.
- [15] 王景萍, 李杰, 周丽莉, 郭嫵, 王玲. 高效液相色谱法假尿苷次黄嘌呤含量测定[J]. 医药论坛杂志, 2004, 25(10): 21-22.
WANG JP, LI J, ZHOU LL, GUO Y, WANG L. Determination on concentration of pseudouridine and hypoxanthine in the human serum by HPLC[J]. Journal of Medical Forum, 2004, 25(10): 21-22 (in Chinese).
- [16] MUZZOLINI L, VERSÉES W, TORNAGHI P, van HOLSBEKE E, STEYAERT J, DEGANI M. New insights into the mechanism of nucleoside hydrolases from the crystal structure of the *Escherichia coli* YbeK protein bound to the reaction product[J]. Biochemistry, 2006, 45(3): 773-782.
- [17] PETERSEN C, MØLLER LB. The RihA, RihB, and RihC ribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(2): 884-894.
- [18] ZHU Y, ZHOU C, WANG Y, LI C. Transporter engineering for microbial manufacturing[J]. Biotechnology Journal, 2020, 15(9): e1900494.
- [19] WU H, LI Y, MA Q, LI Q, JIA Z, YANG B, XU Q, FAN X, ZHANG C, CHEN N, XIE X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield uridine production[J]. Metabolic Engineering, 2018, 49(9): 248-256.
- [20] 李静简, 李学林, 马龙. 一种假尿嘧啶核苷的合成方法: CN114940676A[P]. 2022-08-26.
LI JJ, LI XL, MA L. A method for synthesizing pseudouracil nucleosides: CN114940676A[P]. 2022-08-26 (in Chinese).

- [21] 金峰, 金美研, 金涛, 何亚杰. 一种假尿苷的新合成方法: CN114702481A[P]. 2022-07-05.
JIN F, JIN MY, JIN T, HE YJ. A new synthetic formula for pseudouridine: CN114702481A[P]. 2022-07-05 (in Chinese).
- [22] 肖聪, 吴结缘. 一种化学酶法合成假尿苷的方法: CN114196715A[P]. 2022-03-18.
XIAO C, WU JY. Method for synthesizing pseudouridine by chemical enzyme method: CN114196715A[P]. 2022-03-18 (in Chinese).
- [23] 陈伟, 郑玲辉, 廖云娥, 周敏, 王雪峰, 朱进伟, 高祥, 陈世敏, 彭湘屏, 石磊. 一种产假尿苷工程菌及其应用: CN112592880B[P]. 2021-10-12.
CHEN W, ZHENG LH, LIAO YE, ZHOU M, WANG XF, ZHU JW, GAO X, CHEN SM, PENG XP, SHI L. Pseudouridine-producing engineering bacterium and application thereof: CN112592880B[P]. 2021-10-12 (in Chinese).
- [24] 朱文娟, 万丽花, 付敏杰, 沈旺鑫, 田锋, 刘鹏, 黄祝渊. 一种酶法生产假尿苷的方法: CN116144720A[P]. 2023-05-23.
ZHU WJ, WAN LH, FU MJ, SHEN WX, TIAN F, LIU P, HUANG ZY. Method for producing pseudouridine by enzyme method: CN116144720A[P]. 2023-05-23 (in Chinese).
- [25] 时鹏, 冯速, 韩艺文, 唐伟, 刘阳. 一种酶法合成假尿苷的方法: CN115851854A[P]. 2023-03-28.
SHI P, FENG S, HAN YW, TANG W, LIU Y. Method for synthesizing pseudouridine by enzyme method: CN115851854A[P]. 2023-03-28 (in Chinese).
- [26] ZHOU M, TANG RY, WEI LY, WANG JD, QI H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient production of pseudouridine[J]. ACS Omega, 2023, 8(39): 36386-36392.

(本文责编 郝丽芳)