



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 119040232 B

(45) 授权公告日 2025. 06. 24

(21) 申请号 202411115546.1

C12N 15/65 (2006.01)

(22) 申请日 2024.08.14

C12N 15/75 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 15/31 (2006.01)

申请公布号 CN 119040232 A

C12N 15/60 (2006.01)

(43) 申请公布日 2024.11.29

C12N 15/01 (2006.01)

(73) 专利权人 浙江茵创生物技术有限公司

G01N 21/64 (2006.01)

C12R 1/10 (2006.01)

地址 312432 浙江省绍兴市嵊州市鹿山街

(56) 对比文件

道欣农路1977号优森浙东电商产业园

Rao, Y等.Efficient sustainable production of protocatechuic acid from glucose by engineered Bacillus licheniformis. CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL.2025,第505卷全文.

311-1 (住所申报)

(72) 发明人 陈守文 饶忆 蔡冬波 占杨杨

李滔 闫世豪 王佳琪 赵瑞

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 (普通

合伙) 42001

专利代理师 龚莹莹

审查员 门思琦

(51) Int.Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表 (电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种基于转录因子BsdA的PCA生产菌株细胞生物传感器及应用

(57) 摘要

本发明属于生物工程技术领域,公开了一种基于转录因子BsdA的PCA生产菌株细胞生物传感器及应用。本发明的原儿茶酸生物传感器适用于原儿茶酸高产菌株的育种。本发明以能响应原儿茶酸的、来源于地衣芽孢杆菌DW2中的转录调控因子BsdA作为基础功能元件,通过将原儿茶酸浓度与绿色荧光蛋白荧光强度相偶联,构建一种高效的原儿茶酸生物传感器。其可实现地衣芽孢杆菌胞内原儿茶酸浓度的实时监测,以及用于快速筛选原儿茶酸高产菌株的诱变育种。

1. 一种基于转录因子BsdA的原儿茶酸生产菌株细胞生物传感器,所述的生物传感器为重组的地衣芽胞杆菌,所述的重组的地衣芽胞杆菌,其整合了由转录因子BsdA驱动荧光蛋白的表达载体,以及表达原儿茶酸合酶的表达载体;

所述的整合了由转录因子BsdA驱动荧光蛋白的表达载体,是将地衣芽胞杆菌DW2 菌株的BsdBCD 基因簇置换为荧光蛋白基因,由转录因子BsdA 与PbsdB 启动子驱动荧光蛋白的表达;

所述的转录因子BsdA的序列为SEQ ID NO.1所示;

所述的荧光蛋白为绿色荧光蛋白,黄色荧光蛋白,红色荧光蛋白或蓝色荧光蛋白;

所述的表达原儿茶酸合酶的表达载体,原儿茶酸合酶的序列为SEQ ID NO.4所示。

2. 根据权利要求1所述的生物传感器,所述的原儿茶酸合酶基因为SEQ ID NO.3所示。

3. 根据权利要求1所述的生物传感器,所述的地衣芽胞杆菌为地衣芽胞杆菌P-20。

4. 权利要求1所述的生物传感器在制备高产原儿茶酸菌株中的应用。

一种基于转录因子BsdA的PCA生产菌株细胞生物传感器及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种基于转录因子BsdA的PCA生产菌株细胞生物传感器及应用。

背景技术

[0002] 原儿茶酸(PCA)是一种天然的酚酸类芳香族化合物,具有多种药理活性,从而可作为医药、功能性食品和化妆品的原料(DOI:10.1016/j.biortech.2020.124239)。此外,PCA是重要的平台化合物,其可作为具有广泛应用领域的高附加值化合物生物制造的前体物,比如香兰素、没食子酸、己二酸等(DOI:10.1016/j.biortech.2020.124239)。由于PCA具有广泛的应用价值,从而近些年PCA的高效生产收到越来越多的关注。

[0003] 微生物合成法是PCA高效生产的重要手段之一,目前通过菌株遗传改造已实现PCA在多种微生物宿主合成(DOI:10.1016/j.ymben.2024.02.003),而高产PCA的菌株遗传改造的快速筛选是实现PCA工业化生产的基础和关键。生物传感器能够特异性响应目标化合物从而输出便于检测的荧光信号,因而已经被广泛应用于菌株遗传改造的高通量筛选。目前,基于转录因子构建的生物传感器最常见。最常用的转录因子是细菌转录因子,包括配体结合结构域和DNA结合结构域(DOI:10.1021/acssynbio.1c00549)。然而PCA生物传感器的研究几乎空白,降低了PCA高产菌株的获得效率,阻碍了其工业化生产的进程。

[0004] 针对上述问题,本发明在地衣芽孢杆菌中,挖掘了一个新型的响应PCA激活的转录因子BsdA,开发了基于转录因子BsdA的PCA生产菌株细胞生物传感器,以该生物传感器为基础,进行高产菌株诱变育种筛选,

[0005] 将其应用于PCA高产菌株诱变育种的快速筛选,以获得PCA高产菌株。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供了一种基于转录因子BsdA的PCA生产菌株细胞生物传感器,所述的生物传感器为

[0007] 本发明的另一个目的在于提供了一种基于转录因子BsdA的原儿茶酸生物传感器的应用。

[0008] 为了达到上述目的,本发明采取以下技术措施:

[0009] 一种基于转录因子BsdA的原儿茶酸生产菌株细胞生物传感器,所述的生物传感器为重组的地衣芽孢杆菌,所述的重组的地衣芽孢杆菌,其整合了由转录因子BsdA驱动荧光蛋白的表达载体,以及表达原儿茶酸合酶的表达载体。

[0010] 所述的转录因子BsdA编码的蛋白为SEQ ID NO.2所示;优选的,编码序列为SEQ ID NO.1所示。

[0011] 以上所述的生物传感器,优选的,所述的荧光蛋白为绿色荧光蛋白,黄色荧光蛋白,红色荧光蛋白或蓝色荧光蛋白。

[0012] 以上所述的生物传感器,优选的,所述的地衣芽胞杆菌为整合表达原儿茶酸合酶的表达载体的地衣芽胞杆菌。

[0013] 以上所述的生物传感器,优选的,所述的表达原儿茶酸合酶的表达载体,含有的原儿茶酸合酶基因编码的蛋白为SEQ ID NO.4所示,更优选的,所述的原儿茶酸合酶基因为SEQID NO.3所示。

[0014] 以上所述的生物传感器,优选的,所述的地衣芽胞杆菌为地衣芽胞杆菌P-20。

[0015] 本发明的保护范围还包括:

[0016] 上述生物传感器在制备高产原儿茶酸菌株中的应用;

[0017] 以上所述的应用,优选的,采取本领域的常规菌株方式,对上述菌株进行突变,筛选荧光亮度变高的菌株从而获得高产原儿茶酸的突变株。

[0018] 以上所述的突变,包括但不限于辐射,紫外照射、或药物刺激突变等。

[0019] 与现有技术相比,本发明方法具有以下优点:

[0020] (1) 本发明首次报道能响应于原儿茶酸信号分子激活的转录因子BsdA。

[0021] (2) 本发明提供了一个新型的原儿茶酸生物传感器,可实时监测原儿茶酸的含量。

[0022] (3) 传统的代谢产物诱变育种工作,存在大量的筛选和检测工作,耗时耗力。而本发明中,基于转录因子BsdA开发的原儿茶酸生物传感器,能方便、快速和有效地筛选PCA高产的诱变育种菌株。

附图说明

[0023] 图1为基于转录因子BsdA的原儿茶酸生物传感器设计图。

[0024] 图2为基于转录因子BsdA的原儿茶酸生物传感器表征图。

[0025] 图3为PCA高产的诱变育种发酵结果图。

具体实施方式

[0026] 本发明所述试剂或材料,如未特别说明,均来源于商业渠道。

[0027] 下面通过具体的实施方案叙述本发明。除非特别说明,本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外,实施方案应理解为说明性的,而非限制本发明的范围,本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对这些实施方案中的物料成分和用量进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。

[0028] 本发明,以本身高产PCA的P-20地衣芽胞杆菌为例进行说明,将普通的地衣芽胞杆菌实施例1:

[0029] 一种基于转录因子BsdA的PCA生产菌株细胞生物传感器

[0030] 申请人发现,PCA的表达可激活转录因子BsdA,因此,可以在转录因子BsdA上偶联荧光蛋白,从而指示PCA的表达量,从而筛选PCA高表达菌株。

[0031] 本实施例中的荧光蛋白以绿色荧光蛋白为例进行说明,其他荧光蛋白,例如红色荧光蛋白,黄色荧光蛋白,蓝色荧光蛋白等也能完成本发明。

[0032] 具体构建方法如下:

[0033] 1.根据地衣芽胞杆菌DW2(CN117402802A)基因组DNA序列中的bsdBCD基因簇的序

列,以及质粒pHY-R0-GFP(DOI:10.1016/j.ymben.2023.06.004)的序列,设计bsdBCD的上游同源臂引物(bsdBCD-F1、bsdBCD-R1)、下游同源臂引物(bsdBCD-F3、bsdBCD-R3)和报告蛋白GFP引物(GFP-F2、GFP-R2);然后以地衣芽胞杆菌DW2的基因组DNA和质粒pHY-R0-GFP为模板,分别PCR扩增以得到bsdBCD的上游同源臂片段、下游同源臂片段和报告蛋白GFP;

[0034] 其中,bsdBCD-F1、bsdBCD-R1、GFP-F2、GFP-R2、bsdBCD-F3、bsdBCD-R3的序列为:
bsdBCD-F1:CTGCAGCCCCGGGGATCCTGGAAAGGCGTTGTCGTG、bsdBCD-R1:TATATATTCCTCCTTTCTA
ATATACATGCGCCCCCTTTCCCTCTT、GFP-F2:GTATATTAGAAAGGAGGAATATATAATGGTGAGCAAGGGCG
AGG、GFP-R2:CGGATGCCTCCCTTTAGATTACTTGTACAGCTCGTCC、bsdBCD-F3:GGACGAGCTGTACAAGT
AATCTAAAGGGAGGCATCCG、bsdBCD-R3:GATCTTTTCTACGAGCTCCAATTGGCTGTACCTTGGC;

[0035] 2.以bsdBCD序列的上游同源臂、下游同源臂和报告蛋白GFP片段为模板,上游同源臂引物bsdBCD-F1、下游同源臂引物bsdBCD-R3为引物,通过重叠延伸PCR将bsdBCD序列的上游同源臂、报告蛋白GFP片段和下游同源臂连接到一起,得到目的片段bsdBCD-GFP;

[0036] 3.设计引物T2-T5-F/R,以质粒T2(2)-ori为模板,扩增T2骨架。其中,T2-T5-F/R的序列为:

[0037] T2-T5-F:GGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTC

[0038] T2-T5-R:GAGCTCGTAGAAAAGATCAAAGGA

[0039] 4.使用南京诺唯赞一步克隆试剂盒将步骤2和3得到的基因片段和线性T2骨架进行连接获得,通过氯化钙转化法将连接产物转入大肠杆菌DH5 α ,在经含有kan^r的培养基平板进行培养后,利用验证引物T2-F/R对转化子进行菌落PCR验证,以获得bsdBCD被置换的质粒T2::PbsdB-gfp(该质粒不再含有bsdBCD基因簇,由bsdA来驱动GFP的表达)。然后,将质粒T2::PbsdB-gfp电转入地衣芽胞杆菌P-20(CN117511832A,【0094】段,在本发明中也称为PCA20)中,在经含有kan^r的培养基平板进行培养后,利用验证引物T2-F/R对转化子进行菌落PCR验证,以获得重组菌株PCA20/T2::PbsdB-gfp。其中T2-F/R的序列为:

[0040] T2-L:ATGTGATAACTCGGCGTA

[0041] T2-R:GCAAGCAGCAGATTACGC

[0042] 5.将步骤4得到的重组菌株PCA20/T2::PbsdB-gfp在45℃条件下、含有卡那青霉素抗性的液体培养基上,转接培养3次,每次培养10-12h。并以T2-F与bsdBCD-YR为验证引物进行菌落PCR检测,以获得单交换成功的重组菌株PCA20-T2::PbsdB-gfp。接着,将其在37℃、不含有卡那青霉素的液体培养基中经过数次转接培养,用双交换验证引物bsdBCD-YF/R对挑选的转化子进行菌落PCR验证,以得到双交换成功的菌株PCA20::PbsdB-gfp。其中,bsdBCD-YF/R的序列为:

[0043] bsdBCD-YF:GAGTGAAAGTGATGGACGACC

[0044] bsdBCD-YR:CGTGTTTTCCGTCTGCGCTG

[0045] 6.以质粒pHY-R55-GFP(DOI:10.1016/j.ymben.2023.06.004)和谷氨酸棒状杆菌的原儿茶酸合酶基因qsuB(SEQ ID NO.3所示,编码SEQ ID NO.4所示蛋白)为模板,通过引物T5-F/R和QsuB-F/R,PCR扩增骨架pHY-R55和片段QsuB,并进行DNA回收;

[0046] 7.利用DpnI酶对载体骨架pHY-R55中残留的pHY-R55-GFP模板进行消化;

[0047] 8.采用Vazyme的同源重组酶(Exnase II)对载体骨架和片段进行处理,并在37℃条件下反应30min,使载体骨架pHY-R55和片段QsuB相连;得到重组质粒pHY-R55-QsuB;

[0048] 9. 将步骤(8)得到的重组质粒pHY-R55-QsuB电转入地衣芽胞杆菌PCA20::PbsdB-gfp中,以四环抗生素作为筛选标记,随后,通过引物pHY-F/R菌落PCR筛选得到阳性转化子,从而成功得到原儿茶酸生物传感器的地衣芽胞杆菌菌株PCA20::PbsdB-gfp/R55-QsuB。

[0049] 上述实施例1所用引物如下:

[0050] T5-F:ACAAATCTCCCCCTTTGTTG

[0051] T5-R:AAGAGCAGAGAGGACGGATTTCC

[0052] QsuB-F:ACAAAGGGGAGATTTGTATGCGTACATCCATTGCCACTG

[0053] QsuB-R:TCCGTCCTCTCTGCTCTTCTAGTTGGGGATTCCCCGCTCGAG

[0054] pHY-F:GTTTATTATCCATACCCTTAC

[0055] pHY-R:CAGATTTCTGTGATGCTTGTC

[0056] 10. 种子准备:从甘油管以体积百分比1%将步骤9得到的工程菌株PCA20::PbsdB-gfp/R55-QsuB和对照菌株PCA20::PbsdB-gfp/pHY300分别接种于装有5mL LB培养基中,230r/min、温度37℃,培养12小时,然后将菌种活化后的菌液以体积百分比按1%接种量接种于50mL LB的种子发酵培养基于230r/min、37℃中培养10小时,得到种子培养的菌液。

[0057] 所述的对照菌株PCA20::PbsdB-gfp/pHY300,是将空载载体pHY300转入PCA20::PbsdB-gfp中获得。

[0058] 11. 菌株发酵:将种子培养的菌液以接种量为3% (体积百分比) 加入装有50mL原儿茶酸发酵培养基的500mL三角瓶中,然后转速230r/min,温度37℃,发酵培养72小时,每隔12小时,检测GFP的荧光水平和PCA产量,检测结果见图2。

[0059] 由图2的结果,我们可以发现,与对照菌株PCA20::PbsdB-gfp/pHY300相比,PCA20::PbsdB-gfp/R55-QsuB随着PCA的逐渐积累,有效地启动GFP的表达,并随着PCA的进一步积累,GFP的荧光强度逐渐上升。

[0060] 该结果表明PCA是激活转录因子BsdA的信号分子,我们成功基于转录因子BsdA开发PCA的细胞生物传感器,用偏于读取的GFP荧光强度响应PCA的含量。

[0061] 12. GFP检测:取0.2mL发酵液于2mL EP管,加入1.8mL PBS缓冲液,用可见光分光光度计测其生物量(OD₆₀₀)。然后用PBS缓冲液将发酵液相应稀释到终浓度(OD₆₀₀)为1,终体积2mL,随后7000rpm,2min,接着用2mL PBS缓冲液重悬,重复一次,最后用酶标仪检测其荧光强度。

[0062] 13. PCA检测:采用高效液相色谱(HPLC)检测原儿茶酸。检测条件为:使用Agilent 1260高效液相色谱仪,色谱柱为C18柱(4.6mm ID×250mm,5μm),流动相为100%甲醇/0.1%甲酸=1/4,流速0.6mL/min,柱温30℃,进样量10.0μL,检测波长为224nm,检测时间为20min。根据原儿茶酸标准品制作的标准曲线计算出发酵液中原儿茶酸的产量。

[0063] 实施例2:

[0064] 原儿茶酸生物传感器用于原儿茶酸高产菌株诱变育种的快速筛选:

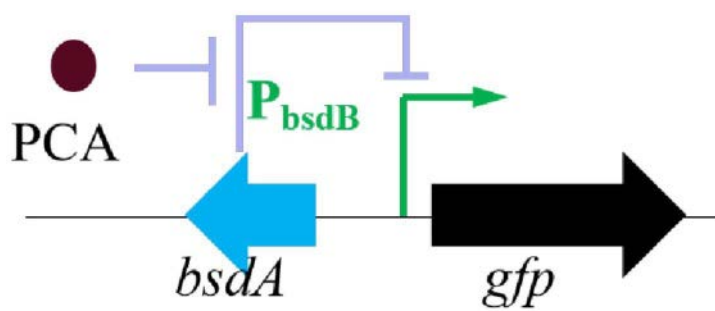
[0065] 1. 首先,菌株PCA20::PbsdB-gfp/R55-QsuB经活化培养后制成菌悬液,均匀加入到已经灭菌的平板中(不加盖),在超净工作台中经30W紫外灯照射一定时间(40s)后,将平板内的菌液抽取移入灭菌的1.5mL离心管内,并立即放入冰水混合物中。然后,在黑暗条件下,将菌液涂布于带有四环素抗性的平板上,37℃恒温静置培养24-36h。

[0066] 2. 挑取单菌落在新的带有四环素抗性的平板上逐一划线,并分别接种到含有1mL

原儿茶酸发酵培养基的96孔板中,同时出发菌株PCA20::PbsdB-gfp/R55-QsuB(CK)作对照,一起于37℃、230rpm条件下培养24h后,使用酶标仪测定GFP表达强度。

[0067] 3.重复步骤1-2,直到筛选GFP的荧光强度显著高于出发菌株PCA20::PbsdB-gfp/R55-QsuB的突变体。

[0068] 4.将上述步骤3筛选到突变体D1-8,D5-36菌株与对照菌株PCA20::PbsdB-gfp/R55-QsuB进行原儿茶酸发酵,72小时发酵取样,并检测原儿茶酸的产量和GFP的荧光强度(图3)。由图3可知,突变体D1-8,D5-36菌株相比于对照菌株PCA20::PbsdB-gfp/R55-QsuB,使原儿茶酸的产量分别提高21.85%,11.64%。该结果表明,我们成功用原儿茶酸生物传感器快速筛选原儿茶酸诱变育种突变体,并成功获得原儿茶酸高产的突变体D1-8。



Protocatechuic acid Biosensor

图1

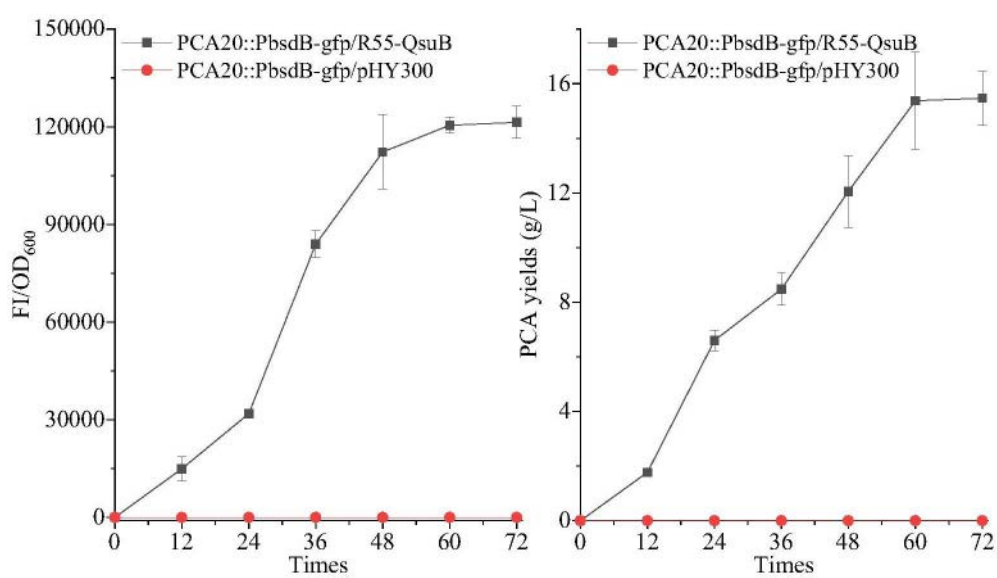


图2

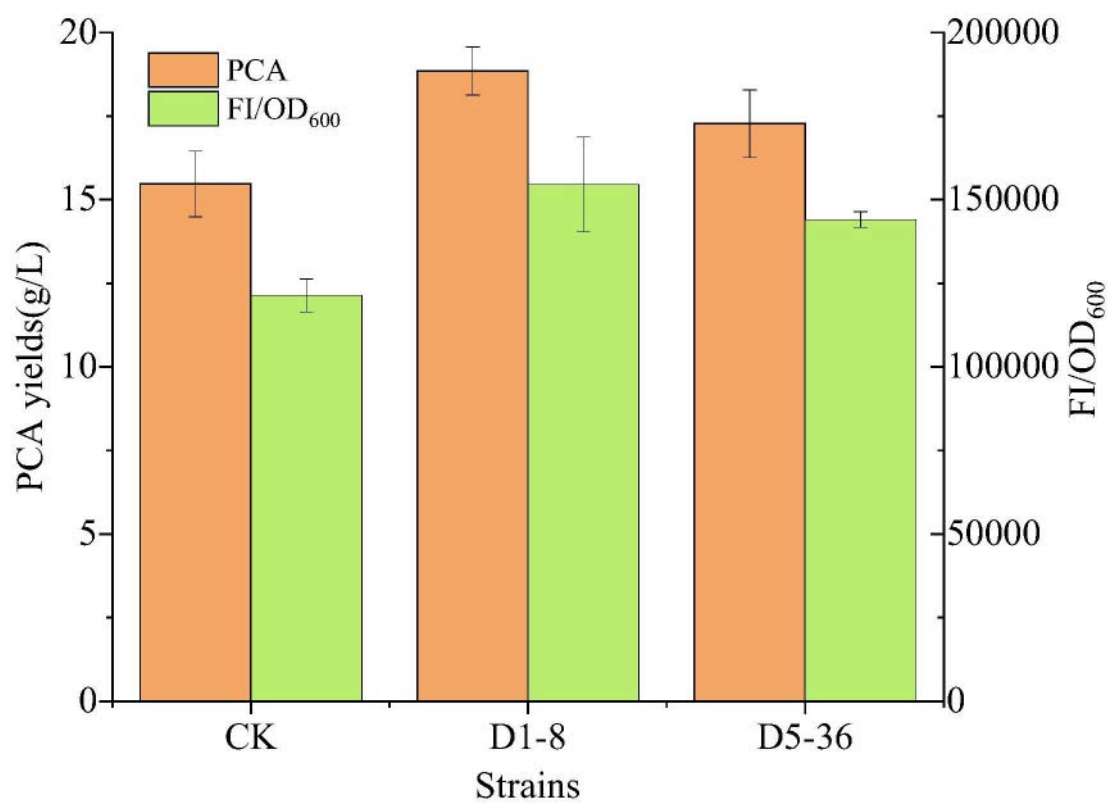


图3