

构建大肠埃希菌底盘细胞合成N-糖基化蛋白的研究进展

包紫鑫, 李威, 胡学军, 丁宁*

(大连大学大连市糖重组及重组蛋白修饰重点实验室, 大连 116622)

摘要: N-糖基化是自然界中主要的翻译后修饰之一, 对蛋白质结构和功能的影响十分重要。随着糖工程领域的快速发展, 在大肠埃希菌(*Escherichia coli*)中完成治疗性蛋白的N-糖基化修饰变得更加普遍。利用基因编辑技术对大肠埃希菌基因组进行编辑, 使大肠埃希菌获得新的性状和生产能力, 可以提高目标糖蛋白的产量。本文综述了通过基因编辑技术改造大肠埃希菌基因组来构建大肠埃希菌底盘细胞, 及在此基础上优化N-糖基化效率以提高N-糖基化蛋白产量的研究进展, 为构建具有N-糖基化修饰功能的工程菌株提供依据, 为更好地进行糖蛋白生产, 及进一步高效开发“糖蛋白工厂”提供策略。

关键词: 大肠埃希菌; 基因编辑; 基因组; N-糖基化修饰; 糖基化效率

Advances in the construction of *Escherichia coli* chassis cells for the synthesis of N-glycosylated proteins

BAO Zixin, LI Wei, HU Xuejun, DING Ning*

(Dalian Key Laboratory of Glycan Recombination and Recombinant Protein Modification,
Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract: N-glycosylation is one of the major post-translational modifications in nature, and its effects on protein structure and function are important. With the rapid development in the field of glycoengineering, it has become more common to accomplish N-glycosylation modifications of therapeutic proteins in *Escherichia coli* (*E. coli*). Through the use of gene editing technology, *E. coli* genome can be modified to gain new features and productivity, which can boost the production of target glycoproteins. Using gene editing technology to modify the *E. coli* genome and create *E. coli* chassis cells, as well as improving N-glycosylation efficiency to increase the synthesis of N-glycosylated proteins, are discussed in this study. In addition to providing a foundation for the creation of engineered strains with N-glycosylation modification, this work offers techniques for increasing the efficiency of "glycoprotein factories" and improving glycoprotein output.

Key Words: *Escherichia coli*; gene editing; genome; N-glycosylation; glycosylation efficiency

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)也称大肠杆菌, 是目前研究最清晰、分析最全面的一种微生物。以大肠埃希菌为模式生物进行重组蛋白质糖基化

修饰研究是细菌糖工程领域发展的重要方向之一。N-糖基化修饰可以增强治疗性药物的稳定性、延长血浆半衰期、提高生物活性和免疫原性

收稿日期: 2022-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(32070936, 32270985); 大连市科技创新基金项目(2022JJ13SN070)

第一作者: E-mail: 347101841@qq.com

*通信作者: E-mail: dingning@dlu.edu.cn

等。自2002年Waker等^[1]将空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)的N-糖基化 pgl 基因簇导入大肠埃希菌获得成功后,利用大肠埃希菌生产N-糖基化的重组异源蛋白已经逐步成为现实。尽管该技术具有生长周期短、成本低等优势,但仍存在局限性。目前研究人员依赖于应用多个质粒实现这一过程,即将N-糖基化蛋白合成所需的包含各基因簇的不同质粒共转化入大肠埃希菌。虽然能实现蛋白的N-糖基化修饰,但需要抗生素的选择压力;另一方面寡糖合成所需众多酶蛋白同时表达,导致了表达宿主稳定性差、目的蛋白总表达量低等问题。为了克服上述问题,研究人员不断的将目的基因整合到大肠埃希菌的基因组上以构建适用于表达N-糖基化蛋白的底盘细胞^[2]。2018年,Strutton等^[3]将N-糖基化途径整合入基因组实现了糖蛋白的生产。近几年来,研究人员已通过多种高效、特异的基因组编辑策略构建了不同大肠埃希菌底盘细胞来提高N-糖基化蛋白的产量,详见表1。

1 利用基因组编辑技术高效构建合成N-糖基化蛋白的底盘细胞

应用多种基因编辑方法可在大肠埃希菌基因组中实现无标记突变,主要分为3类:同源重组、位点特异性重组及基于人工核酸内切酶“DNA剪刀”的基因组编辑技术。对于N-糖基化系统而言,现已取得了一定的进展。尽管Strutton等^[3]可通

过“克隆整合”位点特异重组,将寡糖转移酶转移至大肠埃希菌基因组,展示了基因编辑技术在糖蛋白合成中的可行性,但是单独运用此技术通常面临编辑效率低、抗生素依赖性强、重组位点存在脱靶效应等问题。目前许多研究者对基因编辑技术正进一步的优化、完善,以实现高效的无痕敲除,从而构建合成N-糖基化蛋白的底盘细胞,如Egger等^[4]将 λ -red重组系统和特定位点的归巢核酸内切酶I-Sce I结合起来,构建了新质粒“All-in-One”,使基因重组过程只需4步便可完成,无需抗生素标记,显著加快基因组整合新菌株的产生(表1)。

高效的基因无痕敲除技术主要通过多种编辑策略联合应用来实现。晁双英等^[10]总结了常用基因编辑技术和复合基因编辑技术的基本原理及应用,可为原核生物基因编辑方法的选择提供依据。另外,针对不同的大肠埃希菌株也可以选择不同的基因组编辑工具以提高效率,比如基于CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)的pCas/pTargetF系统在大肠埃希菌MG1655中广泛应用;pEcCas/pEcgRNA可以高效地对BL21(DE3)进行基因组编辑^[11]。然而,CRISPR/Cas系统应用的最大阻碍之一是“体型”过大。有研究则系统性地表征了一种极小型CRISPR核酸酶——AsCas12f1(422个氨基酸)的DNA识别和切割机制,并探究了其作为一种新型基因编辑工具的可能性,成功地在细菌和哺乳动

表1 应用不同基因编辑技术构建合成N-糖基化蛋白底盘细胞

大肠埃希菌株	方法	被修饰的蛋白质	糖链来源	产量	参考文献
CLM24	“Clonetegration” site-specific recombination	AcrA	<i>C. jejuni</i> hexasaccharide	The glycosylation efficiency increased by 85%	[3]
MG1655	λ -red	spDsbA-MBP-hGHV ^{138DQNA142}	<i>C. jejuni</i> heptasaccharide	5.7±0.2 mg/L(-2-fold greater)	[5]
BL21(DE3) HMS174(DE3)	λ -Red+I-Sce I	GFP	—	—	[4]
(APEC) χ 7122	λ -red+suicide vector, pSECpgl	NetB	<i>C. jejuni</i> heptasaccharide	Improved	[6]
SDB1	λ -red+suicide vector, pSECpgl	G-SodB、G-FlpA、G-ExoA	<i>C. jejuni</i> heptasaccharide	Increase glycosylation efficiency at 30 °C	[7]
Falcon	λ -red+CRISPR	ExoA	<i>S. pneumoniae</i> Serotype 4	glycosylation expression>95%	[8]
EagleSparrowhawk	λ -red+CRISPR	AcrA	<i>S. pneumoniae</i> Serotype 4	4× and 14× more glycans than the base strain	[9]

物细胞中实现了高效的基因编辑^[12]。目前基因编辑技术在设计、编码启动子、核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)等糖工程元件方面,需要大量计算机辅助设计工具,存在无法满足普适性序列设计需求的困境。近来, Yang等^[13]开发了首个面向微生物遗传操作的全流程自动化高通量编辑序列设计在线工具AutoESD(<https://autoesd.biodesign.ac.cn/>),使基因编辑获得了更高的技术迭代能力。

精确的基因编辑技术为构建糖合成底盘细胞和探索聚糖功能提供了巨大的机会。虽然将不同来源的基因簇敲入工程菌株基因组中是复杂的过程,但数据显示以大肠埃希菌为底盘细胞是代谢工程的最佳选择,且在糖蛋白合成领域日益显示出了巨大的潜力^[10,14,15]。目前,基因编辑技术还没有完全普及应用于N-糖基化蛋白底盘细胞的构建研究,仍需结合新型基因编辑工具对大肠埃希菌基因组进一步改造,以实现高效的蛋白质N-糖基化定向修饰,从而实现均一性糖蛋白的生产。

2 适用于N-糖基化蛋白合成的大肠埃希菌底盘细胞构建

本部分综述了近来对大肠埃希菌菌株进行基因添加、移除、上调或降低的情况,以推进菌株适应性进化,提高糖基化效率,最终合成多种治疗性重组N-糖基化蛋白(图1)。目前还没有公认的适用于糖工程研究的大肠埃希菌底盘细胞库,重

要的原因是在所选宿主中生产所需聚糖的必要条件是存在适量的活性糖供体及其转运体、内源基因的转录活性,以及整合外源基因的核苷酸成分等,这些都会影响菌株的生产能力。将合成糖蛋白的代谢途径整合至大肠埃希菌基因组中是减少菌株代谢负担的良好策略;底盘菌株还需被深度改造以适应外源“新途径”的代谢需求,如加强前体或辅助因子的充足供应、底物的有效流入或产物的有效流出,以及途径中多种酶的功能性表达^[16]。另外,大肠埃希菌菌株基因组存在着天然内毒素、竞争性干扰因子等不良因素,因此需对其进行“设计-构建-测试-学习”的编辑策略,以调整代谢途径提高糖基化效率,产生均质的目标糖蛋白。

2.1 大肠埃希菌基因组敲除

底盘工程细胞的构建可以通过敲除相关通路基因来减少代谢非必需基因,或增加聚糖前体的产生等,同时保持细菌的正常活性。在大肠埃希菌工程菌株中,蛋白质糖基化修饰受脂质载体可用量及核苷酸激活的糖底物可用量的影响。因此提高蛋白质糖基化效率的可行策略是优化这些关键反应中间体及其相关生物合成途径的水平^[17],主要包括4个方面:降低内毒素、去除竞争通量、糖前体的生物合成和细胞结构改造。

2.1.1 降低内毒素

内毒素是存在于革兰氏阴性菌细胞壁上的一种脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),主要由特异多

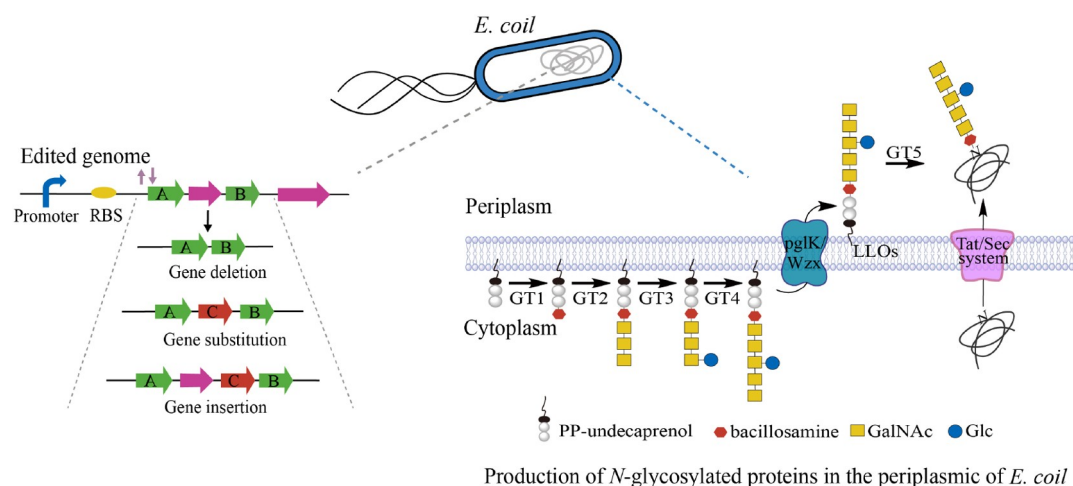


图1 大肠埃希菌生产N-糖基化重组蛋白机制示意图

糖、非特异核心多糖和脂质A组成。阻碍脂质A核心寡糖的生物合成可以防止O-抗原的耦合,从而增加在脂质A上新合成聚糖的数量,并显示在细胞表面^[18]。*lpxL*、*lpxM*、*pagP*、*lpxP*、*eptA*、*kdsD*和*gutQ*基因等与LPS生物合成高度相关。研究显示,7个基因不可逆的缺失会破坏LPS核心区域3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸的生物合成,大大减少了最终产物内毒素残留。同时通过CRISPR/Cas9与同源定向修复结合,特异性的突变脂质A脂肪酸链合成的*msbA52*和*msbA148*基因可使大肠埃希菌K-12和BL21(DE3)来源的细胞保持活力^[19]。另有实验证实,将外源基因表达框的3~5个拷贝整合到细菌LPS相关基因座中,不仅可以提高靶蛋白的产量,还可以减少内毒素的产生^[20]。

2.1.2 去除竞争通量

在开发糖工程底盘菌株时,经常引入的突变之一是删除表达O-抗原连接酶的*waaL*基因,以阻断脂联多糖(lipid-linked oligosaccharide, LLO)向LPS外核心糖的非特异性转移^[21]。虽然这对糖工程改造不是必需的,但它大大增加了可以被O-寡糖基转移酶聚合并转移到目标蛋白的LLO含量。一些途径酶如大肠埃希菌的肠杆菌共同抗原(enterobacterial common antigen, ECA)基因簇编码的WecB和WecG酶,它们分别竞争有限的尿苷二磷酸-N-乙酰氨基葡萄糖胺(uridine diphosphate-N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc)和负载N-乙酰氨基葡萄糖胺(N-acetylglucosamine, GlcNAc)的十一烯基焦磷酸(undecaprenylpyrophosphate, Und-PP)中间体,从而耗尽重要的底物池,或以其他方式将中间产物转化为非必需的最终产物^[5]。因此,Yates等^[5]删除了ECA基因簇中的*wzzE-yifK*基因簇,以消除其对目标多糖组装的影响。此外十一烯基磷酸 α -N-乙酰葡萄糖胺基转移酶基因*wecA*的敲除也可以消除ECA的产生,还可以确保还原糖不被GlcNAc取代。

2.1.3 糖前体的生物合成

通过重新编程大肠埃希菌天然代谢网络,可引导更多的碳通量用于糖核苷酸的合成,如核苷酸激活前体中的单糖被糖基转移酶添加到Und-PP连接单糖中,可提高LPS合成过程中糖前体的产量。Jiang等^[22]通过结合 λ -Red重组系统和CRISPR/

Cas9系统连续无痕地敲除*zwf*、*pfkAB*、*pykFA*和*gldA*基因,为葡萄糖的转运和磷酸化保留了更多的磷酸烯醇式丙酮酸酯;同时敲除*nagB*基因消除了UDP-GlcNAc合成途径中 β -D-果糖-6-磷酸和D-葡萄糖胺6-磷酸之间的无效循环。另外使用建模和模拟退火相结合方法,通过实验验证了 Δgnd 和 $\Delta sdhC \Delta gnd$ 可显著增加野生菌株聚糖的生物合成^[17]。

2.1.4 细胞结构改造

通常,外源途径的优化表达会导致目标产物在底盘细胞内的积累,对细胞生长和代谢产生有害影响。对于底盘细胞来说,脂质成分的改变,如改变细胞膜的通透性或耐受性,可以导致目标产物产量的提高。阮瑶等^[23]通过敲除外膜LPP脂蛋白,构建了适合胞外生产N-糖基化重组蛋白的大肠埃希菌株CLM37 Δlpp ,成功进行了N-糖基化重组蛋白的细胞外生产,提高了蛋白收率和糖基化效率。

除此之外,通过删除表达糖链相关脱水酶基因(如 Δgmd)能促进聚糖产量的提高;通过改变氧化条件(如 $\Delta dsbC$ 、 $\Delta dsbB$)来调节蛋白二硫键的合成速率也能优化不同蛋白糖基化的效率^[24,25]。还有其他优化糖合成的待敲除基因正处于探索阶段。

2.2 大肠埃希菌基因组添加或取代

为了使改造后的大肠埃希菌适用于糖蛋白生产,菌株应积累足量的代谢前体,可通过将“必要”基因置于大肠埃希菌基因组上创造一种“即插即用”的体系来实现。大肠埃希菌蛋白质糖基化有两种必需的酶。一种是寡糖转移酶(oligosaccharyltransferase, OST),将聚糖转移至靶蛋白的特定位点。Strutton等^[3]通过在大肠埃希菌基因组上插入密码子优化的弯曲杆菌OST *pglB*,创建了一个适用于构建糖蛋白生产平台的菌株。另一种是参与聚糖合成的糖基转移酶(glycosyltransferases, GT),如*C. jejuni pgl*基因簇,将其取代部分基因组已被证明可以减轻宿主的负担,最终提高糖基化效率。基因组整合还可以用来减少基因操作的总数量,例如通过将一个被删除的基因替换为一个被上调的靶基因,可同时达到两个目的。用这种方法进行基因组整合可以增加异源途径的产量^[26]。

在大肠埃希菌K-12菌株中, 有多个非必需多糖生物合成基因簇, 比如促进胞外多糖合成相关基因: *wca*操纵子、*pgaABCD*操纵子、*dfc*操纵子、*yjbEFGH*操纵子、参与O-抗原合成的基因簇等^[27], 可被替换为正交糖基化组分, 用于外源糖链的生物合成和特异性糖链与靶蛋白的结合。

通过基因编辑将所需的糖基化途径重新组合到大肠埃希菌基因组位点后, 只需转化入编码受体蛋白的单个质粒就可以生产不同糖蛋白, 这些菌株的糖基化效率可达到或接近100%, 可与质粒系统获得的最佳糖基化效率相媲美^[28]。

2.3 大肠埃希菌基因上调

利用逆代谢工程策略, 可选择出特定蛋白从而构建更有效的大肠埃希菌宿主菌株以高效生产糖蛋白。Pandhal等^[29]通过基因组DNA库筛选来识别基因(*malQ*、*rseP*、*ptsA*、*rffE*和*dxs*), 虽然没有显著提高糖基化效率, 但这些基因在大肠埃希菌中的过度表达增加了异源表达的*C. jejuni*聚糖和整体糖蛋白的产量。其中*ptsA*基因是编码磷酸烯醇式丙酮酸酯依赖的磷酸转移酶系统酶 I, 它在大肠埃希菌细胞中过表达使得糖蛋白AcrA的产量几乎增加了7倍。*dxs*基因是编码1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶, 其过表达可促使十一异戊烯磷酸的产生, 参与细菌表面多糖的合成^[30]。Wzx蛋白是Und-pp连接的低聚糖重复单元在内膜翻转中的核心角色, 在正常条件下, Wzx翻转酶的表达量非常有限, 过表达*wzx*基因通常可以在很大程度上弥补原本效率低下的翻转, 还可以消除生长缺陷, 提供一种提高外源寡糖重复单元产量的手段^[31]。

大肠埃希菌基因组庞大, 有多种可促进糖蛋白合成的基因, 如WecA蛋白是一种完整的膜蛋白, 作为GlcNAc-1-磷酸转移酶参与ECA和O-抗原脂多糖的生物合成, 有研究表明其过度表达可提高糖基化效率^[32]; 在鸟苷二磷酸甘露糖途径中编码磷甘露酶的*manB*基因和甘露糖-1-磷酸肌基转移酶的*manC*基因的过度表达可将Man3GlcNAc2聚糖的产量增加约50倍, 达到13.9 $\mu\text{g/L}$ ^[33]; 异柠檬酸裂解酶是乙醛酸途径中的一个关键酶, 通过在大肠埃希菌中过表达, 其糖基化效率提高了3倍^[34]。值得注意的是, GalU是合成糖链前体UDP-葡萄糖的关键酶, 也是唯一阻止糖链合成的非致命性敲除

蛋白质^[17]。

3 以大肠埃希菌为底盘细胞高效生产N-糖基化蛋白的优化策略

为了优化大肠埃希菌底盘细胞生产N-糖基化蛋白的产量, 通常需要对通路中每个基因的表达进行微调, 可通过使用不同强度的启动子、核糖体结合位点或通过改变通路中每个基因的拷贝数来实现, 同时优化表达条件以达到最佳产量。

作为基因转录的“开关”, 启动子在调控基因表达和恢复代谢通量方面发挥着重要作用。当外源性代谢途径被纳入基因组时, 基因表达可能因拷贝变化而减少, 在这种情况下, 需要编辑整合适当强度的启动子, 以调节基因表达达到所需的拷贝水平^[10]。Yang等^[35]开发了一种新的PLICable启动子工具箱, 它可以从十个启动子(T7、A3、lpp、tac、pac、Sp6、lac、npr、trc和syn)中鉴定出最适合蛋白质高水平生产的启动子。Yates等^[5]将N-糖基化途径基因簇整合至大肠埃希菌基因组后, 在组成型启动子家族BBa_J23100-J23119中筛选了J23110, 使得N-糖基化效率提高了82%。Jiang等^[22]设计构建了一个糖链合成优化的底盘菌株, 应用了中等强度的启动子P11-BCD15来生产糖缀合物, 明显提高了糖缀合物的修饰效率(最高可达90.7%)及产率(38.6 mg/L)。另外, 双启动子或多启动子整合到基因组内也可以提高蛋白质糖基化效率及糖蛋白的表达量。

RBS是调节翻译效率的关键元件, RBS的序列很大程度上决定了翻译起始率。Chen等^[36]运用了RBS工程方法重新设计RBS, 较原始菌株有更高的翻译效率, 改善了玉米黄质的糖基化。同时在大肠埃希菌中, 通过RBS文库设计优化还促进了番茄红素、异戊二烯、氢溴酸等产量的提高^[37-39]。另外, 2019年Jervis等^[40]开发了机器学习算法, 以实现对大型组合RBS库的代表性子集RBS序列-表型关系进行建模, 从而可以准确预测最佳生产者。在此基础上, Zhang等^[41]使用高斯过程回归, 对体内测试的遗传变异设计使用上置信界多臂老虎机算法, 得到高翻译起始率的RBS, 超过基准RBS达34%。这为大肠埃希菌中糖蛋白的高效生产奠定了基础, 有望加速其工业化生产进程。

当通路中一个或多个底物,或中间体都参与宿主生物的正常代谢时,低基因拷贝数有一定的优势,尽管伴随产量减少的问题,但可以通过改造或引入额外的启动子元件,或根据需要调整基因拷贝数来解决^[5,42]。实验证明,当30 °C时 $pglB$ 基因簇整合到大肠埃希菌菌株SDB1的基因组中,需要有一个以上的 $PglB$ 拷贝可用,才能获得更高的糖基化效率及产量。另外数据显示,温度、诱导时间都影响 $PglB$ 对其底物糖基化的能力^[7,43];并且通过密码子优化提高 $PglB$ 的表达量也可以提高糖基化效率^[32]。

对于蛋白 N -糖基化修饰来说,目前主要在周质腔中完成将糖链转移至受体蛋白的过程,因此选择合适的信号肽将目的蛋白定位至周质,且提高目的蛋白的周质分泌量也是提高糖基化效率及产量的一种方法。比如,通过一般分泌途径(Sec 依赖途径)、双精氨酸易位途径(Tat 依赖途径)和信号识别粒子途径(Srp 途径)这三个不同输出途径的信号肽分别将蛋白质靶向周质并与 N -聚糖受体肽标签结合使用,会产生细菌 N -糖基化效率及产量的不同^[44]。

另外,糖蛋白的产量也受不同表达部位的影响^[45]。培养条件、环境压力或代谢负担在不同的表达部位对于糖蛋白的影响是完全不同的。还可以通过自动诱导替代异丙基硫代半乳糖苷诱导^[46]、在生长培养基中添加 $GlcNAc$ ^[43]、在 $\Delta dsbB$ 菌株中添加化学氧化剂胱氨酸^[25]等方法实现糖蛋白产量的增加。此外,借助基于流式细胞术的荧光筛选及对细胞进行全面的数学描述以精确调控糖基化修饰,可以实现异源宿主中糖蛋白产量的优化。

4 展望

大肠埃希菌底盘细胞构建技术的迅猛发展为糖蛋白合成带来了新的机遇。但因为涉及到基因工程、代谢工程、合成生物学等多个领域,也具有很大的挑战性。在糖基化修饰中,唾液酸化尤为重要,因为唾液酸位于糖基末端,并具有与细胞和分子相互作用相关的独特负电荷部分,可以增加药物的稳定性和生物活性。目前研究显示唾液酸修饰糖基化的效率不高,很难达到100%,这

导致唾液酸修饰的糖基化重组蛋白的均质化、规模化生产非常困难^[47]。 $nanKET4$ 基因簇是大肠埃希菌基因组中的一段保守序列,参与唾液酸的分解代谢。因此,Zhu等^[47]提出了在大肠埃希菌基因组中敲入唾液酸合成途径相关基因簇 $neuBCA$ 的同时敲除 $nanKET4$ 基因簇,从而提高唾液酸修饰效率。同时将唾液酸化 N -糖基化过程所需的唾液酸合成与修饰功能模块、寡糖合成功能模块、寡糖修饰重组蛋白功能模块等整合到大肠埃希菌基因组,通过协调各模块功能,有望构建出可高效、工业化生产 N -糖基化重组蛋白的底盘细胞^[48]。

Lu等^[14]描述了人乳低聚糖合成的微生物工程路线,主要提供了针对宿主菌株的选择及适应不同的代谢途径生产人乳低聚糖的路线,给我们带来很多启发和借鉴。虽然不确定的代谢模式和合适宿主菌株的选择仍是当前构建大肠埃希菌底盘菌株中的难点,而且针对异源途径/模块的功能、特性还有待探索,但是近来开发的基于图数据库的大肠埃希菌的代谢调控知识图谱ERMer(*E. coli* regulation miner)给未来糖工程菌株的开发提供一个弯道超车的机会,使我们看到操纵细胞/生物体内糖基化及利用糖工程底盘细胞生产治疗性糖蛋白等生物制剂的良好前景。

参考文献

- [1] Wacker M, Linton D, Hitchen PG, et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, 2002, 298(5599): 1790-1793
- [2] Sjöberg G, Guevara-Martínez M, van Maris AJA, et al. Metabolic engineering applications of the *Escherichia coli* bacterial artificial chromosome. *J Biotechnol*, 2019, 305: 43-50
- [3] Strutton B, Jaffé SRP, Pandhal J, et al. Producing a glycosylating *Escherichia coli* cell factory: the placement of the bacterial oligosaccharyl transferase $pglB$ onto the genome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 686-692
- [4] Egger E, Tauer C, Cserjan-Puschmann M, et al. Fast and antibiotic free genome integration into *Escherichia coli* chromosome. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16510
- [5] Yates LE, Natarajan A, Li M, et al. Glyco-recoded *Escherichia coli*: recombineering-based genome editing of native polysaccharide biosynthesis gene clusters. *Metab*

- Eng, 2019, 53: 59-68
- [6] Mauri M, Sannasiddappa TH, Vohra P, et al. Multivalent poultry vaccine development using protein glycan coupling technology. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1): 193
- [7] Terra VS, Mauri M, Sannasiddappa TH, et al. PglB function and glycosylation efficiency is temperature dependent when the pgl locus is integrated in the *Escherichia coli* chromosome. *Microb Cell Fact*, 2022, 21(1): 6
- [8] Samaras JJ, Mauri M, Kay EJ, et al. Development of an automated platform for the optimal production of glycoconjugate vaccines expressed in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1): 104
- [9] Kay EJ, Mauri M, Willcocks SJ, et al. Engineering a suite of *E. coli* strains for enhanced expression of bacterial polysaccharides and glycoconjugate vaccines. *Microb Cell Fact*, 2022, 21(1): 66
- [10] 晁双英, 胡学军. 基因编辑技术在大肠杆菌中的应用. *生物工程学报*, 2022, 38(4): 1446-1461
- [11] Li Q, Sun B, Chen J, et al. A modified pCas/pTargetF system for CRISPR-Cas9-assisted genome editing in *Escherichia coli*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2021, 53(5): 620-627
- [12] Wu Z, Zhang Y, Yu H, et al. Programmed genome editing by a miniature CRISPR-Cas12f nuclease. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(11): 1132-1138
- [13] Yang Y, Mao Y, Wang R, et al. AutoESD: a web tool for automatic editing sequence design for genetic manipulation of microorganisms. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W75-W82
- [14] Lu M, Mosleh I, Abbaspourrad A. Engineered microbial routes for human milk oligosaccharides synthesis. *ACS Synth Biol*, 2021, 10(5): 923-938
- [15] Matsumoto T, Tanaka T, Kondo A. Engineering metabolic pathways in *Escherichia coli* for constructing a "microbial chassis" for biochemical production. *Bioresource Tech*, 2017, 245: 1362-1368
- [16] Liu J, Wu X, Yao M, et al. Chassis engineering for microbial production of chemicals: from natural microbes to synthetic organisms. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 66: 105-112
- [17] Wayman JA, Glasscock C, Mansell TJ, et al. Improving designer glycan production in *Escherichia coli* through model-guided metabolic engineering. *Metab Eng Commun*, 2019, 9: e00088
- [18] Jorgenson MA, Young KD. Interrupting biosynthesis of O antigen or the lipopolysaccharide core produces morphological defects in *Escherichia coli* by sequestering undecaprenyl phosphate. *J Bacteriol*, 2016, 198(22): 3070-3079
- [19] Mamat U, Wilke K, Bramhill D, et al. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microb Cell Fact*, 2015, 14(1): 57
- [20] Wang K, Zhou L, Chen T, et al. Engineering for an HPV 9-valent vaccine candidate using genomic constitutive over-expression and low lipopolysaccharide levels in *Escherichia coli* cells. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1): 227
- [21] Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, et al. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(8): 3016-3021
- [22] Jiang X, Bai J, Yuan J, et al. High efficiency biosynthesis of O-polysaccharide-based vaccines against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polym*, 2021, 255: 117475
- [23] 阮瑶, 王力凡, 郭龙华, 等. 大肠埃希菌CLM37菌株Lpp基因敲除及胞外表达N-糖基化重组蛋白研究. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018, 38(11): 1306-1311
- [24] Valderrama-Rincon JD, Fisher AC, Merritt JH, et al. An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(5): 434-436
- [25] Pratama F, Linton D, Dixon N. Genetic and process engineering strategies for enhanced recombinant N-glycoprotein production in bacteria. *Microb Cell Fact*, 2021, 20(1): 198
- [26] Perlova O, Fu J, Kuhlmann S, et al. Reconstitution of the myxothiazol biosynthetic gene cluster by Red/ET recombination and heterologous expression in *Myxococcus xanthus*. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(12): 7485-7494
- [27] Ionescu M, Belkin S. Overproduction of exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K-12 *rpoS* mutant in response to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(2): 483-492
- [28] Natarajan A, Jaroentomeechai T, Li M, et al. Metabolic engineering of glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Emerg Top Life Sci*, 2018, 2(3): 419-432
- [29] Jaffe SR, Strutton B, Pandhal J, et al. Inverse metabolic engineering for enhanced glycoprotein production in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol*, 2015, 1321: 17-35
- [30] Strutton B, Jaffe S, Evans C, et al. Engineering pathways in central carbon metabolism help to increase glycan production and improve N-Type glycosylation of recombinant proteins in *E. coli*. *Bioengineering*, 2019, 6(1): 27
- [31] Hong Y, Liu MA, Reeves PR. Progress in our understanding of Wzx flippase for translocation of bacterial membrane lipid-linked oligosaccharide. *J Bacteriol*, 2018, 200(1): e00154-17
- [32] Pandhal J, Desai P, Walpole C, et al. Systematic metabolic engineering for improvement of glycosylation efficiency

- in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(3): 472-476
- [33] Glasscock CJ, Yates LE, Jaroentomeechai T, et al. A flow cytometric approach to engineering *Escherichia coli* for improved eukaryotic protein glycosylation. *Metab Eng*, 2018, 47: 488-495
- [34] Pandhal J, Ow SY, Noirel J, et al. Improving N-glycosylation efficiency in *Escherichia coli* using shotgun proteomics, metabolic network analysis, and selective reaction monitoring. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(4): 902-912
- [35] Yang J, Ruff AJ, Hamer SN, et al. Screening through the PLICable promoter toolbox enhances protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol J*, 2016, 11(12): 1639-1647
- [36] Chen X, Lim X, Bouin A, et al. High-level *de novo* biosynthesis of glycosylated zeaxanthin and astaxanthin in *Escherichia coli*. *Bioresour Bioprocess*, 2021, 8(1): 67
- [37] Li M, Chen H, Liu C, et al. Improvement of isoprene production in *Escherichia coli* by rational optimization of RBSs and key enzymes screening. *Microb Cell Fact*, 2019, 18(1): 4
- [38] Jiang P, Fang H, Zhao J, et al. Optimization of hydrogenobyrinic acid biosynthesis in *Escherichia coli* using multi-level metabolic engineering strategies. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 118
- [39] Cheng T, Wang L, Sun C, et al. Optimizing the downstream MVA pathway using a combination optimization strategy to increase lycopene yield in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2022, 21(1): 121
- [40] Jervis AJ, Carbonell P, Vinaixa M, et al. Machine learning of designed translational control allows predictive pathway optimization in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(1): 127-136
- [41] Zhang M, Holowko MB, Hayman Zumpe H, et al. Machine learning guided batched design of a bacterial ribosome binding site. *ACS Synth Biol*, 2022, 11(7): 2314-2326
- [42] Tyo KEJ, Ajikumar PK, Stephanopoulos G. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 760-765
- [43] Kämpf MM, Braun M, Sirena D, et al. *In vivo* production of a novel glycoconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a in recombinant *Escherichia coli*: identification of stimulating factors for *in vivo* glycosylation. *Microb Cell Fact*, 2015, 14(1): 12
- [44] Fisher AC, Haitjema CH, Guarino C, et al. Production of secretory and extracellular N-linked glycoproteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(3): 871-881
- [45] Goormans AR, Snoeck N, Decadt H, et al. Comprehensive study on *Escherichia coli* genomic expression: does position really matter? *Metab Eng*, 2020, 62: 10-19
- [46] Ding N, Yang C, Sun S, et al. Increased glycosylation efficiency of recombinant proteins in *Escherichia coli* by auto-induction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(1): 138-143
- [47] Zhu J, Ruan Y, Fu X, et al. An engineered pathway for production of terminally sialylated N-glycoproteins in the periplasm of *Escherichia coli*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 313
- [48] 朱彤, 吴边. 合成微生物组: 当"合成生物学"遇见"微生物组学". *科学通报*, 2019, 64(17): 1791-1798