

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-044

低内毒素大肠杆菌表达体系的构建及应用

孙悦^{1,2}, 陈金平^{1,2}, 苏畅^{1,2}, 李恒^{1,2}, 龚劲松^{1,2*}, 许正宏^{2,3,4}, 史劲松^{1,2}

(¹ 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122; ² 江苏集萃未来食品技术研究所有限公司, 江苏 宜兴 214200; ³ 江南大学生物工程学院, 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122; ⁴ 四川大学轻工科学与工程学院, 四川 成都 610065)

摘要: 大肠杆菌是常用的重组蛋白表达宿主, 但其外膜的内毒素释放可能诱导炎症反应、发热甚至内毒素休克等内毒素相关不良反应, 从而限制其在疫苗抗原等医药重组蛋白生产中的应用。本研究旨在构建低内毒素大肠杆菌表达系统, 并评估其在猪传染性胸膜肺炎候选抗原重组表达中的应用潜力。以 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 为初始菌株, 采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对核心寡糖、O 抗原组装、类脂 A 修饰及表面多糖合成相关通路进行改造, 构建一系列低内毒素候选菌株。相关基因缺失导致初始菌株出现脂多糖结构组装缺陷、胞外多糖中庚糖含量显著下降、脂多糖条带消失和细胞表面粗糙程度增加等现象, 其中低内毒素候选菌株 ETF13 和 ETF15 的裂解上清液中的内毒素含量分别下降 35%、73%。结合内毒素水平和菌株生长状态, ETF13 在低内毒素特征与底盘适用性之间表现出较好平衡, 因此被选为后续重组蛋白表达宿主。以 4 个猪传染性胸膜肺炎亚单位疫苗 ApxI、ApxII、ApxIII 和 OMP 为模型蛋白, 相比于初始菌株, 低内毒素候选菌株 ETF13 的重组蛋白表达能力相当, 纯化后的四个蛋白中内毒素残留含量均下降超过 50%。综上所述, 以上研究结果证明了这种独特的低内毒素大肠杆菌表达体系为医用蛋白的大规模制备提供了新的底盘选择。

关键词: 低内毒素大肠杆菌; 脂多糖; 基因编辑; 亚单位疫苗; 猪传染性胸膜肺炎

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

Construction and application of low-endotoxin *Escherichia coli* expression system

SUN Yue^{1,2}, CHEN Jinping^{1,2}, SU Chang^{1,2}, LI Heng^{1,2}, GONG Jinsong^{1,2*},
XU Zhenghong^{2,3,4}, SHI Jinsong^{1,2}

(¹ School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; ² Institute of Future Food Technology, JITRI, Yixing 214200, China; ³ National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; ⁴ College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu, 610065, China.)

Abstract: *Escherichia coli* is a commonly used host for recombinant protein expression. However, endotoxins

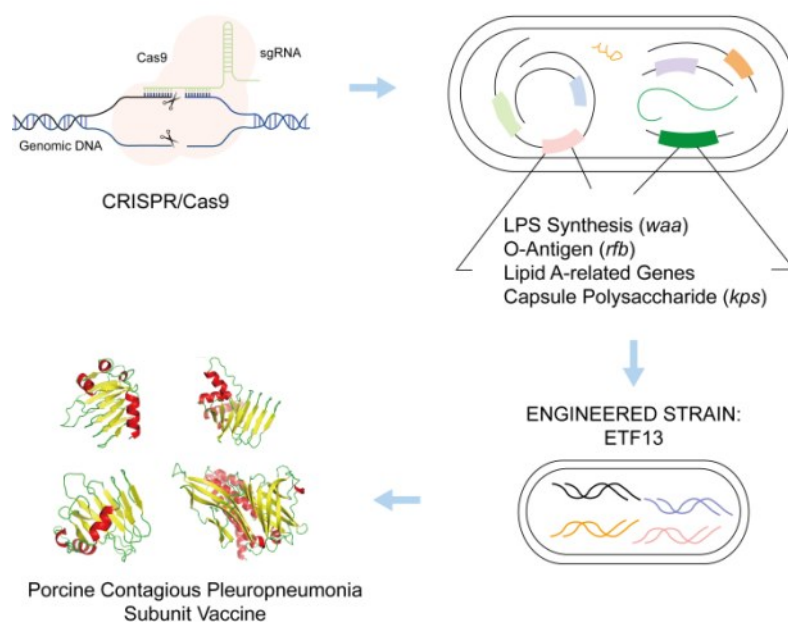
收稿日期: XXXX-XX-XX 修回日期: XXXX-XX-XX

基金项目: 国家重点研发计划 (2024YFA0917900); 国家自然科学基金 (32571699); 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室开放课题基金 (KLCCB-KF202510)

引用本文: 孙悦, 陈金平, 苏畅, 李恒, 龚劲松, 许正宏, 史劲松. 低内毒素大肠杆菌表达体系的构建及应用[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-044

Citation: SUN Yue, CHEN Jinping, SU Chang, LI Heng, GONG Jinsong, XU Zhenghong, SHI Jinsong. Construction and application of low-endotoxin *Escherichia coli* expression system[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-044

released from its outer membrane may induce endotoxin-related adverse reactions, such as inflammatory responses, fever, and even endotoxin shock, thereby limiting its application in the production of biopharmaceutical recombinant proteins, including vaccine antigens. This study aimed to construct a low-endotoxin *E. coli* expression system and evaluate its application potential in the recombinant expression of candidate antigens against porcine pleuropneumonia. Using *E. coli* BL21(DE3) as the parental strain, CRISPR/Cas9-mediated genome editing was employed to modify pathways related to core oligosaccharide biosynthesis, O-antigen assembly, lipid A modification, and surface polysaccharide synthesis, resulting in a series of low-endotoxin candidate strains. These pathway modifications caused defects in lipopolysaccharide structural assembly, a significant decrease in heptose content in extracellular polysaccharides, disappearance of lipopolysaccharide bands, and increased cell surface roughness. Among the candidate strains, the endotoxin levels in the lysate supernatants of ETF13 and ETF15 decreased by 35% and 73%, respectively. Considering both endotoxin levels and strain growth status, ETF13 showed a favorable balance between low-endotoxin characteristics and chassis applicability and was therefore selected as the host for subsequent recombinant protein expression. Using four subunit vaccine candidate antigens against of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, namely ApxI, ApxII, ApxIII, and OMP, as model proteins, ETF13 exhibited recombinant protein expression levels comparable to those of the parental strain. In addition, the residual endotoxin levels in the four purified proteins were reduced by more than 50%. Taken together, these results demonstrate that this engineered low-endotoxin *E. coli* expression system provides a promising alternative chassis for the large-scale production of medical recombinant proteins.



Keywords: Low-endotoxin *Escherichia coli*; Lipopolysaccharide; Gene editing; Subunit vaccine; Porcine contagious pleuropneumonia

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 是目前应用最广泛的原核表达宿主之一, 具有遗传背景清楚、生长速度快、培养成本低和表达系统成熟

等优势^[1-3]。然而, 大肠杆菌细胞壁外膜中的脂多糖 (内毒素) 易在菌体裂解过程中释放, 造成重组蛋白内毒素污染, 限制了该表达体系在疫苗抗

原等蛋白制剂生产中的应用^[4, 5]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)通常由类脂A(lipid A)、核心寡糖和O抗原三部分组成^[6]。类脂A是脂多糖的疏水锚定结构,也是介导内毒素生物活性的关键结构单元。其生物合成以UDP-N-乙酰葡萄糖胺为起始底物,经LpxA、LpxC和LpxD等酶催化形成早期酰基化中间体,随后在LpxH、LpxB和LpxK等酶的作用下形成lipid IV_A;之后,3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖酸(3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid, Kdo)转移酶WaaA将Kdo残基连接至lipid IV_A,生成Kdo₂-lipid IV_A,并进一步由LpxL和LpxM等酰基转移酶参与二级酰基链添加,形成大肠杆菌典型的Kdo₂-lipid A结构^[6, 7]。类脂A的酰基链数目、磷酸化状态和取代基修饰会改变宿主免疫识别强度^[8],长期被认为是降低内毒素活性的核心靶点^[9, 10]。*msbB*基因突变可使脂多糖缺失类脂A中的肉豆蔻酰基,从而降低其炎症刺激能力^[11];在*E. coli* BL21(DE3)中缺失*lpxM*基因,重组蛋白样品诱导树突状细胞活化和成熟的能力也明显降低^[12]。在此基础上,Mamat等构建的低内毒素大肠杆菌可用于重组蛋白生产,为从宿主源头控制内毒素污染提供了重要参考^[13];刘琼等人通过敲除*msbB*和*pagP*基因并过表达*lpxE*和*pagL*基因方式改造*E. coli* BL21(DE3)类脂A结构,降低该工程菌株的内毒素活性^[14]。

除类脂A外,核心寡糖和O抗原也是调控脂多糖完整性及内毒素表型的重要组成部分。核心寡糖连接类脂A与O抗原,是维持脂多糖分子装配和外膜稳定性的关键结构区域;其中Kdo和庚糖等结构单元的缺失会破坏脂多糖结构完整性,影响外膜通透性、细胞表面疏水性和包膜稳定性,并可能改变内毒素相关组分的释放或表面暴露状态^[15, 16]。在核心寡糖形成过程中,RfaD、WaaC、WaaF、WaaP、WaaQ和WaaY等酶参与庚糖供体形成、庚糖转移及内核修饰^[17-19],WaaG、WaaO、WaaV和WaaW等酶则参与外核糖基延伸^[19-21]。O抗原装配涉及聚合、翻转、链长调控和连接等步骤,其中Wzz参与O抗原链长调控,WaaL负责将O抗原连接至类脂A-核心寡糖结构^[22, 23]。此外,WecA可催化N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移至十一异戊烯基磷酸,是肠杆菌共同抗原和部分O抗原脂多

糖合成的起始酶之一^[24, 25]。因此,低内毒素底盘构建应综合考虑类脂A修饰、核心寡糖合成、O抗原组装和细胞表面多糖相关通路^[16]。

目前,低内毒素大肠杆菌底盘已在重组蛋白、rAAV载体和病毒样颗粒等生物制品制备中显示出应用潜力^[13, 26, 27]。但是,低内毒素改造往往伴随细胞包膜结构和生理状态变化,可能影响菌株生长性能和产物表达能力。Kharlampieva等以非甲基化宿主SCS110为底盘,敲除*kdsD*、*gutQ*、*lpxM*、*lpxL*、*lpxP*、*pagP*和*eptA*等脂多糖生物合成相关基因,并引入*msbA52*补偿突变,构建SCS110(8m)菌株;该菌株显著降低了样品中的内毒素水平,但同时表现出生长速率降低和重组蛋白产量下降等问题^[28]。因此,低内毒素底盘构建需要在内毒素水平、生长性能和产物表达能力之间取得平衡,这也是构建实用型大肠杆菌低内毒素表达体系的关键。

本研究以*E. coli* BL21(DE3)为初始菌株,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除脂多糖合成、修饰和O抗原合成相关通路的关键基因,构建低内毒素工程菌株。通过内毒素检测、庚糖含量测定、银染分析、扫描电镜观察以及生长曲线比较,分析不同基因改造对菌株的影响,筛选适用于后续研究的低内毒素底盘菌株,进一步考察低内毒素底盘在猪传染性胸膜肺炎亚单位疫苗候选抗原制备中的应用。以ApxI、ApxII、ApxIII和OMP为目标蛋白,比较改造菌株和初始菌株对重组蛋白的生产性能和内毒素残留的影响,为建立高安全性的抗原制备体系提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本研究所使用的菌株见表1,本研究所使用的质粒见表2,本研究中涉及的寡核苷酸引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.2 培养基及试剂

液态LB培养基配方(g·L⁻¹):胰蛋白胨10、氯化钠10、酵母提取物5;

表1 本研究所涉及的菌株信息

Table 1 Strains used in this study

Name	Description	Source
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) gal dcm (DE3)	EUROSCARF
ETF01	Derived from <i>E. coli</i> BL21(DE3) by deleting the gene cluster containing <i>rfbB</i> , <i>rfbD</i> , <i>rfbA</i>	this study
ETF02	Derived from ETF01 by deleting the gene cluster containing <i>waaA</i> , <i>waaQ</i> , <i>waaG</i> , <i>waaP</i> , <i>waaO</i> , <i>waaY</i> , <i>waaW</i> , <i>waaV</i> , <i>waaL</i> , <i>waaC</i> , <i>waaF</i> , <i>rfaD</i>	this study
ETF06	Derived from ETF02 by deleting the <i>pagP</i> gene	this study
ETF07	Derived from ETF06 by deleting the <i>kdsD</i> gene	this study
ETF10	Derived from ETF07 by deleting the <i>eptA</i> gene	this study
ETF11	Derived from ETF10 by deleting the <i>lpxP</i> gene	this study
ETF12	Derived from ETF11 by deleting the <i>lpxM</i> gene	this study
ETF13	Derived from ETF12 by deleting the gene cluster containing <i>kpsS</i> , <i>kpsC</i> , <i>kpsU</i> , <i>kpsD</i> , <i>kpsE</i> , <i>kpsF</i>	this study
ETF14	Derived from ETF13 by deleting the <i>wzz</i> gene	this study
ETF15	Derived from ETF14 by deleting the <i>wecA</i> gene	this study

表2 本研究所涉及的质粒信息

Table 2 Plasmids used in this study

Name	Description	Source
pET-28a-ApxI	Expression vector, ColE1 ori, T7 promoter, T7 terminator, Kan ^r	this study
pET-28a-ApxII	Expression vector, ColE1 ori, T7 promoter, T7 terminator, Kan ^r	this study
pET-28a-ApxIII	Expression vector, ColE1 ori, T7 promoter, T7 terminator, Kan ^r	this study
pET-28a-OMP	Expression vector, ColE1 ori, T7 promoter, T7 terminator, Kan ^r	this study

固态 LB 培养基配方 (g·L⁻¹): 胰蛋白胨 10、氯化钠 10、酵母提取物 5、琼脂粉 20;

SDS-PAGE 电泳缓冲液: 0.25 M Tris、1.92 M 甘氨酸、1% SDS;

Tris-HCl 缓冲液: 25 mM Tris-HCl、300 mM NaCl, pH 7.8;

洗脱缓冲液: 25 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 300 mM 咪唑, pH 7.8;

固定液: 30% 乙醇, 10% 冰醋酸;

氧化液: 30% 乙醇, 10% 冰醋酸, 0.7% 过碘酸;

银氨溶液: 9% 0.1 mol·L⁻¹ NaOH, 3.2g·L⁻¹ AgNO₃, 80.64% 去离子水, 1.3% 氨水。所有试剂需要现用现配, 边搅拌边加入硝酸银溶液, 注意在通风橱中进行;

显色液: 0.025 g·L⁻¹ 柠檬酸, 0.01% 甲醛。

上述试剂购自国药集团化学试剂有限公司; 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、同源重组试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株摇瓶培养

将生长状态良好的单克隆菌落, 接入 10 mL 加入含相应抗生素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、220 rpm 条件下振荡培养 12 h。按 2% (v/v) 的接种比例转接至 50 mL LB 液体培养基中, 继续振荡培养 12 h。用于内毒素检测的菌株在 37 °C、220 rpm 条件下培养 12 h 后收集菌体; 用于蛋白表达的菌株则在培养过程中监测 OD₆₀₀, 当 OD₆₀₀ 约为 0.8 时, 向培养体系加入 0.5 mM IPTG 之后在 25 °C、220 rpm 条件下培养 12 h, 离心收集菌体用于后续内毒素检测和蛋白纯化。

1.2.2 蛋白纯化和含量检测

发酵培养结束后, 离心收集菌体沉淀, 用 Tris-HCl 缓冲体系洗涤菌体两次, 将菌体浓缩至原体积的约 1/3, 经超声破碎离心处理获得含有目的蛋白的上清液。采用 HisSep Ni-NTA 6FF 亲和层析柱分离纯化蛋白, 使用含 10 mmol·L⁻¹ 咪唑去杂缓冲液洗脱杂蛋白, 含 300 mmol·L⁻¹ 咪唑的洗脱缓冲

液洗脱目的蛋白, 利用 SDS-PAGE 进行分子量验证与纯度鉴定。

纯化蛋白的浓度标定采用 BCA 蛋白质定量试剂盒, 使用酶标仪测定样品于 562 nm 处的吸光度值。每个样品均进行三次平行测定, 结果以重复测定的平均值表示。

1.2.3 基因编辑

取 *E. coli* BL21 (DE3) 电转感受态细胞, 分别加入 1000 ng 打靶质粒 (sgRNA) 与 500 ng 修复模板, 冰浴 10 min。将混合体系转移至预冷电击杯中, 在 1.8 kV、脉冲时间 5 ms 条件下电击处理。电击后立即加入 900 μ L LB 液体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、220 rpm 条件下振荡复苏 2 h。菌液经低速离心, 弃去上清; 用少量残余菌液重悬沉淀, 均匀涂布于含有相应抗生素的 LB 固体平板上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 根据菌落生长情况挑取单菌落, 用于后续测序验证或菌株保藏^[29]。

1.2.4 内毒素定量检测

采用鲎试剂法检测样品的内毒素水平。用于菌株裂解上清液内毒素水平检测时, 将各菌株在相同培养条件下培养 12 h 后离心收集菌体, 弃去上清, 并称取菌体湿重。随后使用细菌内毒素检查用水重悬菌体, 经超声破碎后离心收集裂解上清液。裂解上清液经适当稀释后用于内毒素检测, 检测结果按照对应菌体湿重进行归一化。用于纯化蛋白内毒素残留检测时, 将纯化后的蛋白样品进行适当稀释后检测内毒素含量, 并根据 BCA 法测定的蛋白浓度换算为单位蛋白质量中的内毒素残留量。对于工作标准品, 使用细菌内毒素检查用水逐级稀释, 制备 5、0.5、0.05 及 0.01 EU $\cdot$ mL⁻¹ 的标准溶液以构建标准曲线。将供试溶液、供试品阳性对照 (供试溶液与最高浓度标准液按 9:1 体积比混合)、各梯度标准液及阴性对照 (检查用水), 分别与鲎试剂按 1:1 (V/V) 比例充分混匀。将反应体系转移至 96 孔板中 (每组设双孔平行), 置于 BioProbe VI 细菌内毒素检测系统内完成检测与分析^[13]。

1.2.5 脂多糖提取与定量

1.2.5.1 脂多糖提取

采用热酚-水法提取大肠杆菌脂多糖^[30]。发酵结束后, 统一各组菌液生物量, 离心收集菌体并

使用 15 mL ddH₂O 重悬。向体系中加入等体积 90% (V/V) 热苯酚, 于 68 $^{\circ}$ C, 150 r $\cdot$ min⁻¹ 水浴振荡 1 h。冷却至室温后, 4 $^{\circ}$ C 条件下离心 20 min 完成相分离, 上层水相仍继续静置 4 h, 使白色悬浮物沉降至水相澄清。取上层澄清液于去离子水中充分透析。截留液经冷冻干燥 48 h 后获得脂多糖粗提物。为进一步纯化脂多糖, 取适量脂多糖粗提物复溶至 Tris-HCl 缓冲液, 依次加入 DNase I、RNase A 和蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 条件下反应, 随后加入水饱和酚终止酶反应并沉淀蛋白, 离心后取上清液透析 24 h。透析液冷冻干燥后, 采用氯仿-甲醇混合液去除残留脂类杂质, 再经离心、洗涤和冷冻干燥, 获得纯化脂多糖样品。

1.2.5.2 银染显色分析

脂多糖冻干样品经去离子水复溶至 1.0 mL, 利用 SDS-PAGE 分离样品组分。电泳结束后, 改用银染法显色。凝胶依次使用固定液固定 20 min、氧化液氧化 20 min, 去离子水洗涤 20 min, 随后于新配制的银氨溶液中孵育 5 min, 水洗后转入显色液, 待脂多糖条带清晰后立即弃去显色液终止反应, 并用去离子水洗涤凝胶^[18]。

1.2.5.3 半胱氨酸-硫酸法庚糖定量

庚糖是构建大肠杆菌完整脂多糖分子结构与稳定外膜所必需的关键组分, 其含量的高低直接影响脂多糖的完整性, 因此通过检测脂多糖纯品中庚糖的含量, 可以间接反映改造菌株与初始菌株之间的脂多糖结构差异。取脂多糖冻干样品复溶溶液 50 μ L, 冰浴条件下依次加入 450 μ L 预冷的稀硫酸 (硫酸: 水 = 6: 1, V/V) 与 5 μ L 新配制的 6% (W/V) 半胱氨酸盐酸盐溶液。混匀后冰水浴孵育 3 min, 随即转移至 100 $^{\circ}$ C 金属浴加热 20 min。待反应冷却 1 h, 吸取 150 μ L 反应液并转移至 96 孔板中, 利用酶标仪分别检测体系在 505 nm 与 545 nm 波长下的吸光度值。通过计算吸光度差值 ($\Delta A = A_{505\text{nm}} - A_{545\text{nm}}$), 对各菌株脂多糖中的庚糖相对含量进行定量比较^[31]。

1.2.6 数据分析

所有实验均至少独立重复 3 次, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示。两组之间的差异采用 Excel (Microsoft Office 365) 中的双侧 t 检验进行统计学分析; 多组数据比较采用单因素方差

分析进行分析。以 $p < 0.05$ 作为差异具有统计学意义的判定标准, 显著性水平用星号表示: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, ns表示差异无统计学意义。

2 结果和分析

2.1 大肠杆菌脂多糖敲除菌株的构建

本研究以 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株为底盘细

胞, 采用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑方法, 对 O 抗原合成、核心寡糖装配、类脂 A 修饰及细胞表面多糖相关通路的关键基因敲除, 以构建低内毒素表达体系。

根据 NCBI 和文献报道, 如图 1(a), *rfbB*、*rfbD* 和 *rfbA* 等基因涉及 dTDP-鼠李糖的合成, 阻断该基因簇可干扰 O 抗原的形成。本研究将其敲除, 构建 ETF01。在此基础上, 进一步敲除与脂多糖核心寡糖装配及 O 抗原连接相关的 *waaA*、*waaQ*、*waaG*、*waaP*、*waaO*、*waaY*、*waaW*、*waaV*、*waaL*、*waaC*、*waaF*、*rfaD*、

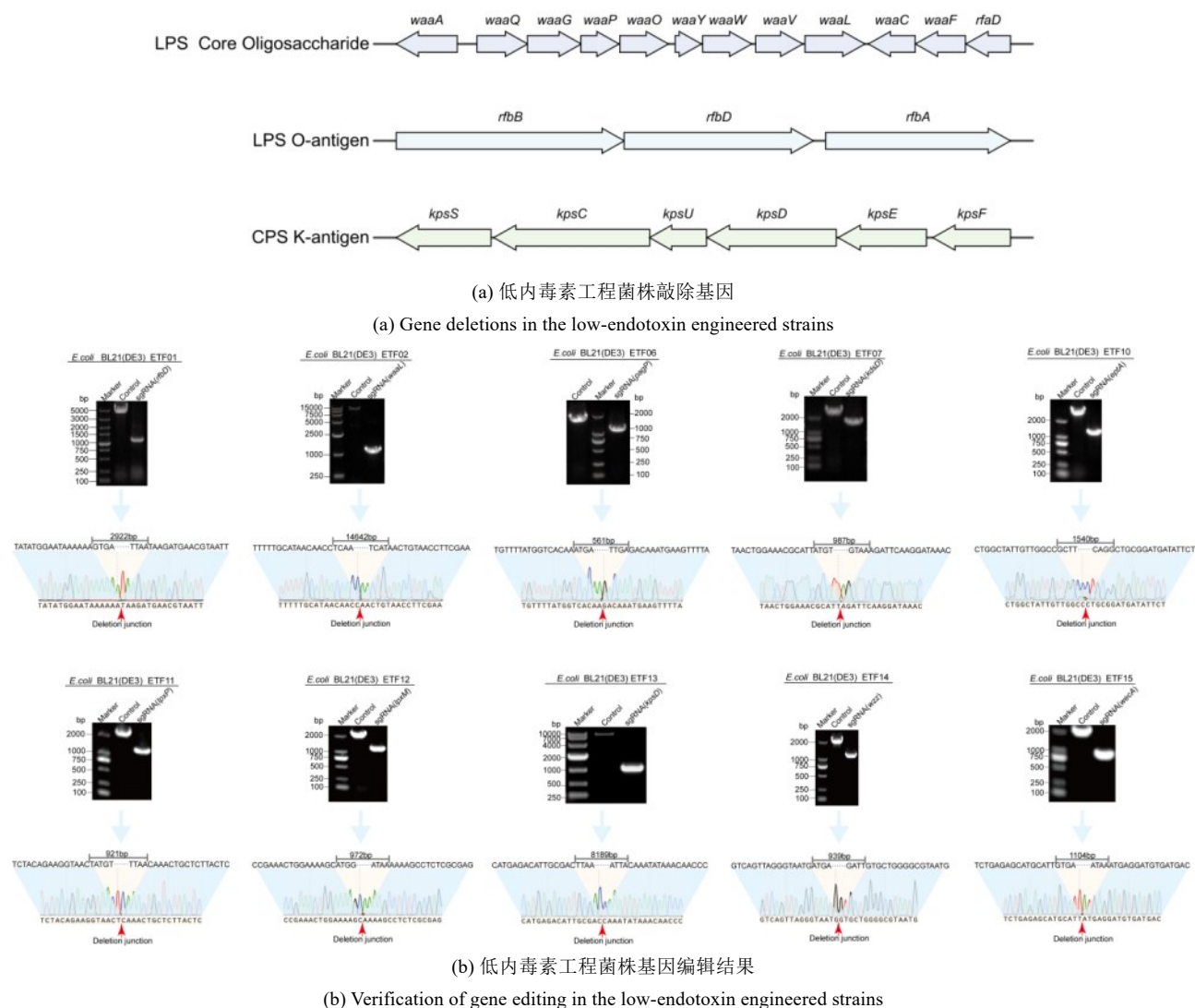


图1 低内毒素工程菌株构建

(a)低内毒素工程菌株敲除基因;(b)不同低内毒素候选菌株的菌落PCR和Sanger测序验证结果。M表示DNA marker,单位为bp。

Fig. 1 Construction of the low-endotoxin engineered strains

(a) Genes deleted in the low-endotoxin engineered strains; (b) validation of the low-endotoxin candidate strains by colony PCR and Sanger sequencing. M, DNA marker; fragment sizes are indicated in bp.

waaL、*waaC*、*waaF*和*rfaD*基因簇，构建ETF02。该基因簇的缺失可同时影响Kdo与类脂A连接、核心寡糖合成及O抗原装配，是降低脂多糖的关键。随后，围绕Kdo前体合成和类脂A结构修饰过程，依次敲除*pagP*、*kdsD*、*eptA*、*lpxP*和*lpxM*等基因，但因为这些基因分散分布在大肠杆菌基因组中，因此分别设计针对每个基因的打靶质粒进行基因敲除，分别构建改造菌株ETF06、ETF07、ETF10、ETF11和ETF12。

在上述脂多糖结构改造基础上，继续针对细胞表面多糖相关通路进行改造。虽然*kpsSCUDEF*构成的基因簇主要参与大肠杆菌荚膜多糖（K抗原）合成、组装和转运，且该基因簇的表达在原始菌株中处于沉默状态，但考虑到*kpsU*基因具有Kdo活化功能，本研究进一步敲除*kpsSCUDEF*基因簇，构建ETF13，以探究其对内毒素水平的潜在影响。随后，分别敲除参与O抗原链长调控的*wzz*基因和参与肠杆菌共同抗原及部分O抗原合成起始步骤的*wecA*基因，构建ETF14和ETF15。

菌落PCR和Sanger测序结果显示，上述各目标基因及基因簇均敲除成功[图1(b)]，最终获得10个具有不同的基因缺失的低内毒素候选菌株（各菌株基因型见表1）。

2.2 改造菌株脂多糖组分的检测

鲎试剂法作为药典规定的内毒素检测方法，可用于比较不同改造阶段底盘菌株的内毒素水平，超声破碎后的裂解上清液反映细胞破碎后可释放的总内毒素含量。检测结果显示，在裂解上清液中，相较于初始菌株*E. coli* BL21（DE3），ETF01、ETF02和ETF06的内毒素检测值有所下降，说明O抗原相关糖基前体合成、脂多糖核心寡糖装配及类脂A修饰等结构靶点的改造能够影响菌株裂解上清液中的内毒素水平。进一步敲除Kdo前体合成相关基因*kdsD*后，ETF07的内毒素检测值明显升高，说明该阶段改造可能引发细胞外膜结构改变，影响内毒素相关成分的表面暴露或释放。继续进行类脂A修饰及细胞表面多糖相关通路改造后，内毒素检测值显著降低，并维持在较低水平，改造菌株ETF13呈现较好的低内毒素特征，其裂解上清液内毒素水平较初始菌株下降35%；最终

敲除*wecA*后获得的改造菌株ETF15的裂解上清液内毒素降幅达73%，为所有受试菌株中最低[图2(a)]。

为了进一步定量分析各改造菌株的胞外脂多糖的含量差异，利用半胱氨酸-硫酸法测定各菌株胞外脂多糖中庚糖的相对含量。结果显示，构建ETF02~15候选菌株的胞外脂多糖中庚糖含量较初始菌株*E. coli* BL21（DE3）降低超过80%[图2(b)]，证实脂多糖核心寡糖合成基因簇的缺失直接影响了脂多糖结构的完整性。SDS-PAGE银染结果与此类似，与初始菌株*E. coli* BL21（DE3）相比，ETF02~15改造菌株的类脂A条带均缺失[图2(c)]。以ETF13作为测试菌株，扫描电镜观察结果显示该菌株的细胞表面更加粗糙[图2(d)]，这一结果说明了脂多糖合成障碍会破坏细胞包膜的整体性，可能削弱菌株形成生物膜的能力。综合裂解上清液内毒素残留检测、脂多糖提取物的庚糖含量测定、银染分析和扫描电镜结果，与脂多糖合成相关基因缺失显著抑制了内毒素的合成。

2.3 改造菌株生长曲线绘制

为评估低内毒素改造对底盘菌株生长的影响，分别绘制各菌株生长曲线^[28]（图3）。结果显示ETF01的生长趋势与初始菌株*E. coli* BL21（DE3）基本一致，说明dTDP-鼠李糖合成基因簇的缺失未对菌株生长造成显著影响。ETF02及其衍生菌株的生长速率与菌体量均出现不同程度下降，与类脂A、核心寡糖和O抗原合成及装配相关基因缺失导致工程菌株出现严重的生理缺陷有关。该结果与前述扫描电镜结果观察到的细胞表型一致，细胞外膜完整性受损导致菌株生长能力下降。综合考虑各个衍生菌株的内毒素含量以及生长特性，本研究最终确立ETF13作为后续实验的基础底盘菌株。

2.4 低内毒素大肠杆菌在表达猪传染性胸膜肺炎亚单位疫苗中的应用

为评估低内毒素大肠杆菌菌株ETF13作为重组蛋白表达宿主的应用潜力，本研究选取胸膜肺炎放线杆菌（*Actinobacillus pleuropneumoniae*）的

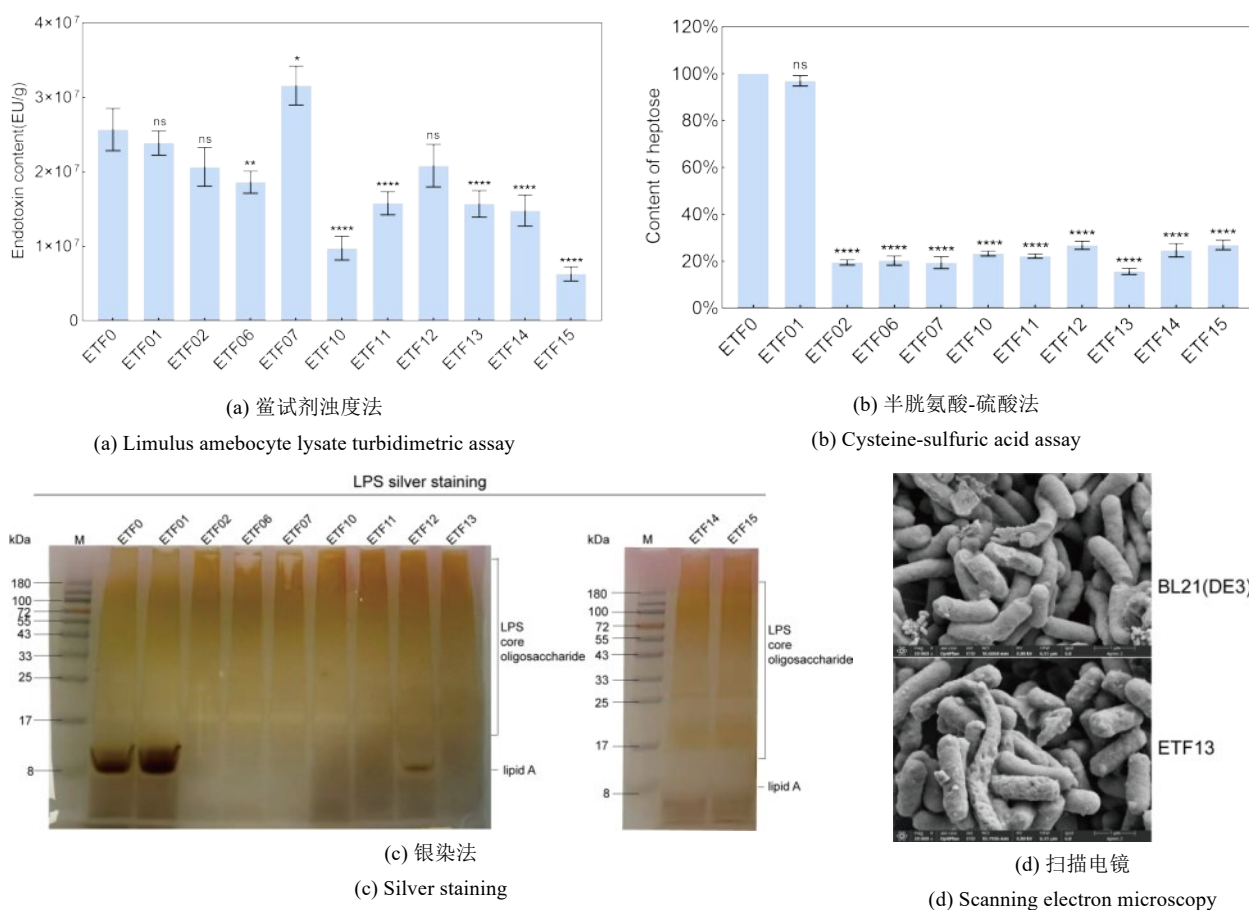


图2 脂多糖合成缺陷菌株的表征

Fig. 2 Characterization of lipopolysaccharide synthesis-defective strains

(a)采用鲎试剂浊度法检测不同改造菌株裂解上清液中的内毒素水平,内毒素水平按照菌体湿重进行归一化,EU·g⁻¹表示每克湿菌体对应的内毒素水平。(b)采用半胱氨酸-硫酸法测定不同改造菌株脂多糖中庚糖的相对含量。(c)采用SDS-PAGE结合银染法分析不同改造菌株脂多糖的条带变化,M为蛋白质分子量标准,单位为kDa。(d)采用扫描电镜观察初始菌株*E. coli* BL21(DE3)和低内毒素候选菌株ETF13的细胞表面形态。数据以平均值±标准差表示,n=3。显著性水平以星号表示:* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$,**** $p < 0.0001$,ns表示差异无统计学意义。

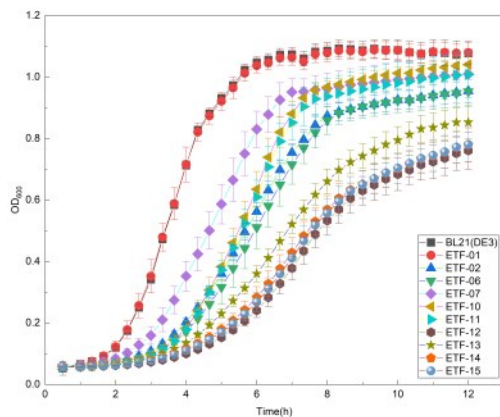


图3 脂多糖合成缺陷菌株的生长曲线

不同低内毒素候选菌株在LB培养基中的生长曲线。OD₆₀₀表示600 nm处的菌体吸光值,用于反映菌株生长状态。数据以平均值±标准差表示,n=3。

Fig. 3 Growth curves of lipopolysaccharide synthesis-defective strains

Growth curves of different low-endotoxin candidate strains in LB medium. OD₆₀₀ represents the optical density of the cultures at 600 nm and was used to monitor bacterial growth. Data are presented as the mean ± standard deviation (SD), n=3.

核心保护性抗原 ApxI、ApxII、ApxIII 及外膜蛋白 (OMP) 作为目标蛋白^[32]。与初始菌株相比, 尽管低内毒素大肠杆菌 ETF13 表现出明显的生长缺陷, 但是该候选菌株的蛋白表达能力并未受到明显影响 [图4(a)]。如图4(b)所示, ETF13 表达 ApxI、ApxII、ApxIII、OMP 四个重组蛋白的表达量分别是 $70.59 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $45.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $43.12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和

$99.08 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 与初始菌株没有统计学差异。进一步评估了 ETF13 菌株表达重组蛋白的内毒素残留, 通过镍柱分别纯化了在 *E. coli* BL21 (DE3) 和 ETF13 菌株中表达的四个蛋白。结果显示与 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株表达的蛋白内毒素含量相比, ETF13 菌株表达蛋白的内毒素含量显著下降, ApxI、ApxII、ApxIII 和 OMP 四个重组蛋白的内毒

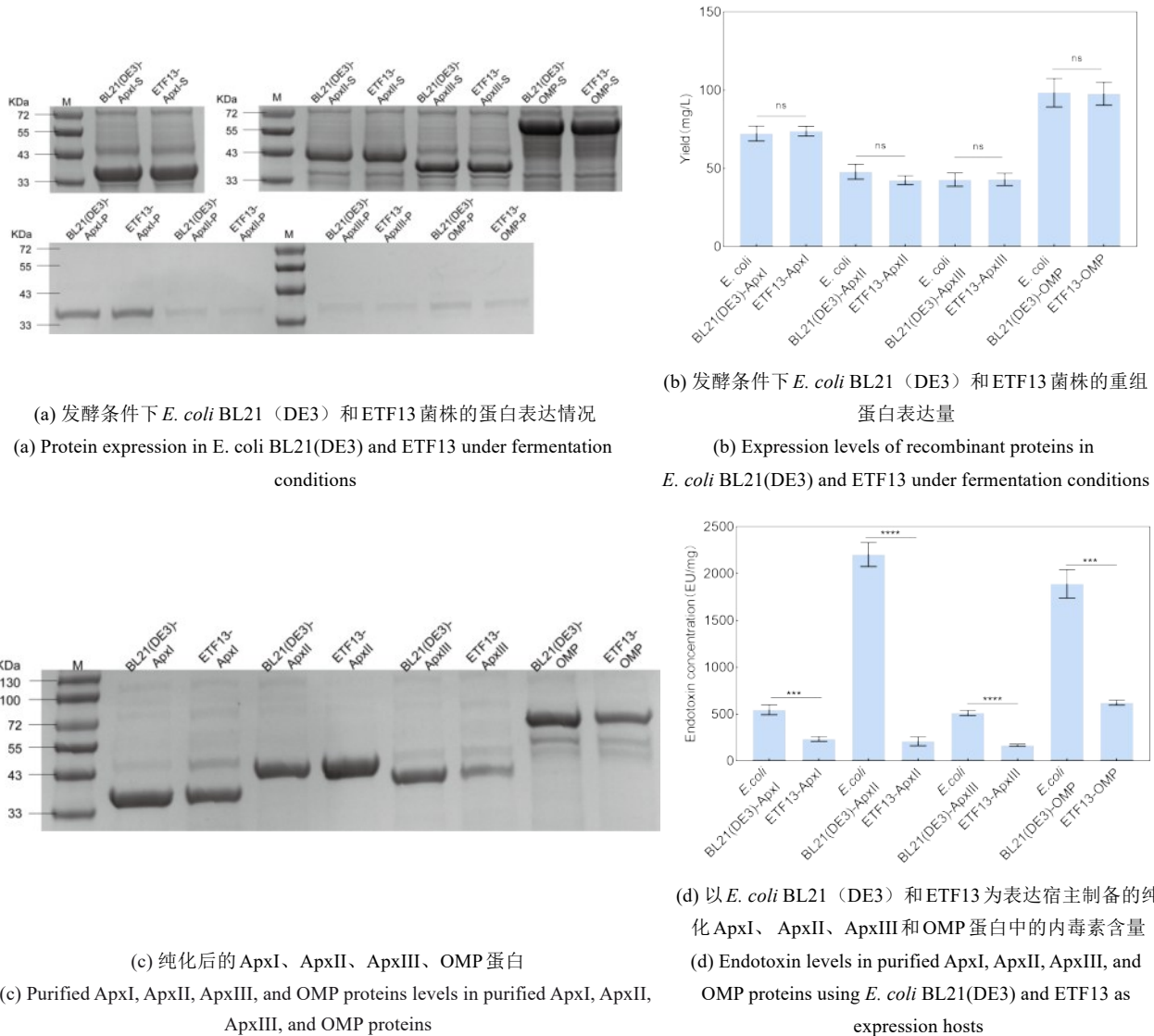


图4 猪传染性胸膜肺炎亚单位疫苗候选蛋白表达水平及内毒素含量

Fig. 4 Expression levels and endotoxin contents of candidate proteins for the porcine pleuropneumonia subunit vaccine

(a)在相同发酵诱导条件下,初始菌株 *E. coli* BL21(DE3)和低内毒素候选菌株 ETF13 中 ApxI、ApxII、ApxIII 和 OMP 可溶性表达情况。所有样品在裂解前均浓缩 3 倍。(b)*E. coli* BL21(DE3)和 ETF13 中 ApxI、ApxII、ApxIII 和 OMP 重组蛋白的表达量。(c)纯化后的 ApxI、ApxII、ApxIII 和 OMP 蛋白 SDS-PAGE 分析;(d)以 *E. coli* BL21(DE3)和 ETF13 为表达宿主制备的纯化 ApxI、ApxII、ApxIII 和 OMP 蛋白中的内毒素含量。ApxI、ApxII 和 ApxIII 分别表示胸膜肺炎放线杆菌毒素 ApxI、ApxII 和 ApxIII;OMP 表示外膜蛋白。S:裂解液可溶性组分(上清);P:裂解液不溶性组分(沉淀);M:蛋白质分子量标准,单位为 kDa。纯化蛋白内毒素残留量根据 BCA 法测定的蛋白浓度进行归一化,表示单位蛋白质质量中对应的内毒素水平。数据以平均值 $\pm$ 标准差表示, $n = 3$ 。显著性水平以星号表示 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns 表示差异无统计学意义。)

素含量分别下降了2.3倍、10.5倍、3.0倍和3.0倍[图4(c, d)]。

文献报道的低内毒素大肠杆菌通过敲除*kdsD*、*gutQ*、*lpxM*、*lpxL*、*lpxP*、*pagP*和*eptA*等脂多糖生物合成相关基因,并引入*msbA52*补偿突变,显著降低了内毒素水平,但同时伴随生长速率降低和重组蛋白产量下降等问题^[28]。相比之下,本研究构建的ETF13虽然也存在一定的生长能力下降,但ApxI、ApxII、ApxIII和OMP等候选抗原的可溶性表达未受到明显影响,且纯化蛋白中的内毒素残留明显降低,最高降幅达90.48%。综上,ETF13在低内毒素特征和重组蛋白表达适用性之间具有较好的平衡,可作为低内毒素重组蛋白表达的候选底盘菌株。

3 结 论

大肠杆菌凭借生长快、培养成本低、遗传操作成熟,长期被用作重组蛋白和疫苗候选抗原的生产宿主。但作为革兰阴性菌,其外膜脂多糖容易在菌体破裂时对产物产生污染,限制了其在疫苗等医药重组蛋白生产中的应用。

本研究以*E. coli* BL21 (DE3)为初始菌株,敲除参与脂多糖合成、修饰及荚膜多糖相关通路的关键基因或基因簇,构建一系列低内毒素候选改造菌株。内毒素检测、庚糖含量测定、SDS-PAGE银染和扫描电镜结果表明,不同结构靶点的改造对脂多糖完整性和菌株表面结构产生了不同影响。核心寡糖装配及O抗原连接相关基因簇的缺失是导致脂多糖庚糖含量下降和类脂A条带缺失的关键步骤,表明该阶段改造影响了脂多糖分子结构的完整性。随后针对类脂A修饰及细胞表面多糖相关通路的改造,影响内毒素检测水平和细胞表面形态,但也增加菌株生长负担。改造菌株ETF15的裂解上清液内毒素降低效果最为显著,较初始菌株下降了73%,但结合生长曲线结果,ETF15的生长状态不及ETF13。ETF13完成了O抗原相关基因簇、脂多糖核心寡糖相关基因簇、类脂A修饰相关基因以及*kps*表面多糖相关基因簇的连续改造,裂解上清液内毒素水平较初始菌株下降35%,同时保持了相对较好的生长性能。因此,选择ETF13作为后续异源蛋白表达的基础菌株。

以猪传染性胸膜肺炎候选保护抗原ApxI、

ApxII、ApxIII和OMP为目标蛋白,证实了低内毒素工程菌株ETF13具备高效的异源蛋白可溶性表达能力。该菌株的成功构建与应用,为兽用亚单位疫苗相关重组蛋白的低内毒素化制备提供了全新宿主平台^[33],也为同类工程菌株的改造与应用提供了可借鉴的技术思路,对推动兽用生物制品的高质量发展具有重要的理论与实践意义。

致谢:本研究得到国家重点研发计划(2024YFA0917900)、国家自然科学基金(32571699)、江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室开放课题基金(KLCCB-KF202510)的资助。感谢相关实验平台在样品检测与仪器使用方面提供的支持,感谢课题组成员在实验实施和论文撰写过程中给予的帮助。

参 考 文 献

- [1] ROSANO G L, CECCARELLI E A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 172.
- [2] MARCO A D. Recent advances in recombinant production of soluble proteins in *E. coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2025, 24(1).
- [3] OVERTON T W. Recombinant protein production in bacterial hosts[J]. *Drug Discovery Today*, 2014, 19(5): 590-601.
- [4] PETSCH D, ANSPACH F B. Endotoxin removal from protein solutions[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 76(2-3): 97-119.
- [5] RIETSCHER E T, CAVAILLON J M. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin[J]. *Microbes Infect*, 2003, 5(15): 1407-1414.
- [6] RAETZ C R H, WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2002, 71: 635-700.
- [7] WHITFIELD C, TRENT M. Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides [M]. KORNBERG R D. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 83. Palo Alto; Annual Reviews. 2014: 99 - 128.
- [8] FU Y, KIM H, LEE D S, et al. Structural insight into TLR4/MD-2 activation by synthetic LPS mimetics with distinct binding modes[J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 4164.
- [9] NEEDHAM B D, TRENT M S. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(7): 467-481.
- [10] DI LORENZO F, DUDA K A, LANZETTA R, et al. A journey from structure to function of bacterial lipopolysaccharides[J]. *Chemical Reviews*, 2022, 122(20): 15767-15821.
- [11] SOMERVILLE J E, JR., CASSIANO L, BAINBRIDGE B, et al. A novel *Escherichia coli* lipid A mutant that produces an antiinflammatory lipopolysaccharide[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1996, 97(2): 359-365.

- [12] COGNET I, DE COIGNAC A, MAGISTRELLI G, et al. Expression of recombinant proteins in a lipid A mutant of *Escherichia coli* BL21 with a strongly reduced capacity to induce dendritic cell activation and maturation[J]. Journal of Immunological Methods, 2003, 272(1-2): 199-210.
- [13] MAMAT U, WILKE K, BRAMHILL D, et al. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 57.
- [14] LIU Q, LI Y, ZHAO X, et al. Construction of *Escherichia coli* mutant with decreased endotoxic activity by modifying lipid A structure[J]. Marine Drugs, 2015, 13(6): 3388-3406.
- [15] WANG Z, WANG J, REN G, et al. Influence of core oligosaccharide of lipopolysaccharide to outer membrane behavior of *Escherichia coli*[J]. Marine Drugs, 2015, 13(6): 3325-3339.
- [16] MOFFATT C B, PLAMAN B A, ROWE S J, et al. Inhibiting lipopolysaccharide biogenesis: the more you know the further you go[J]. Annual Review of Biochemistry, 2025, 94(1): 137-160.
- [17] YETHON J A, HEINRICHS D E, MONTEIRO M A, et al. Involvement of *waaY*, *waaQ*, and *waaP* in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(41): 26310-26316.
- [18] WANG Z, FAN F, WANG J, et al. Engineering *Escherichia coli* to produce *Bordetella pertussis* oligosaccharide with multiple trisaccharide units[J]. Metabolic Engineering, 2022, 69: 147-162.
- [19] HEINRICHS D E, YETHON J A, WHITFIELD C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30(2): 221-232.
- [20] WHITFIELD C, TRENT M. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides[J]. Annual Review of Biochemistry, 2014, 83: 99-128.
- [21] QIAN J, GARRETT T, RAETZ C. *In Vitro* assembly of the outer core of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium*[J]. Biochemistry, 2014, 53(8): 1250-1262.
- [22] KALYNYCH S, MORONA R, CYGLER M. Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2014, 38(5): 1048-1065.
- [23] ASHRAF K U, NYGAARD R, VICKERY O N, et al. Structural basis of lipopolysaccharide maturation by the O-antigen ligase[J]. Nature, 2022, 604(7905): 371-376.
- [24] LEHRER J, VIGEANT K A, TATAR L D, et al. Functional characterization and membrane topology of *Escherichia coli* WecA, a sugar-phosphate transferase initiating the biosynthesis of enterobacterial common antigen and O-antigen lipopolysaccharide[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(7): 2618-2628.
- [25] RAI A K, MITCHELL A M. Enterobacterial common antigen: synthesis and function of an enigmatic molecule[J]. mBio, 2020, 11(4): 1914-1920.
- [26] ZHENG Q, WANG T, ZHU X, et al. Low endotoxin *E. coli* strain-derived plasmids reduce rAAV vector-mediated immune responses both *in vitro* and *in vivo*[J]. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 2021, 22: 293-303.
- [27] SHEN X, YANG Y B, GAO Y, et al. Lipid A-modified *Escherichia coli* can produce porcine parvovirus virus-like particles with high immunogenicity and minimal endotoxin activity[J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23: 222.
- [28] KHARLAMPIEVA D D, BOBROVSKY P A, GRAFSKAIA E N, et al. An *Escherichia coli* strain for plasmid DNA production with a low endotoxin level[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2024, 60(6): 1147-1152.
- [29] JIANG Y, CHEN B, DUAN C, et al. Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system[J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(7): 2506-2514.
- [30] DAVIS M R J, GOLDBERG J B. Purification and visualization of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria by hot aqueous-phenol extraction[J]. Journal of Visualized Experiments, 2012, (63): 3916.
- [31] EMIOLA A, ANDREWS S S, HELLER C, et al. Crosstalk between the lipopolysaccharide and phospholipid pathways during outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(11): 3108-3113.
- [32] MEILI SHAO, YONG WANG, CHUNLAI WANG, et al. Evaluation of multicomponent recombinant vaccines against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2010, 52(1): 52.
- [33] CARDOSO V M, PAREDES S A H, CAMPANI G, et al. ClearColi as a platform for untagged pneumococcal surface protein A production: cultivation strategy, bioreactor culture, and purification[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(3): 1011-1029.



通讯作者: 龚劲松(1986—),男,教授,博士,博士生导师。研究方向为医药中间体及功能性化学品绿色生物制造。
E-mail: gjs713@163.com



第一作者: 孙悦(2000—),女,硕士研究生。研究方向为微生物与生化药学。
E-mail: 6233304013@stu.jiangnan.edu.cn