



操纵茶树类黄酮 3'-羟基化酶生物合成 B 环-3',4'-二羟基黄酮类化合物

周天山*, 余有本, 肖斌, 鲍露, 高岳芳

西北农林科技大学园艺学院, 陕西 杨凌 712100

摘要:【目的】操纵茶树类黄酮 3'-羟基化酶, 生物合成 B 环-3',4'-二羟基黄酮类化合物圣草酚、二氢槲皮素和槲皮素。【方法】构建了 4 个茶树类黄酮 3'-羟基化酶基因(*CsF3'H*)和拟南芥的 P450 还原酶基因(*ATR*)融合表达质粒: SUMO-*CsF3'H*[7-517]::*ATR1*[49-688] 3 AA、SUMO-*CsF3'H*[28-517]::*ATR1*[49-688] 3 AA、SUMO-*CsF3'H*[7-517]::*ATR2*[75-711] 3 AA 和 SUMO-*CsF3'H*[28-517]::*ATR2*[75-711] 3 AA, 分别转化大肠杆菌菌株 TOP10、DH5 α 和 BL21, 获得 12 个转化菌株 S1-S12; 构建了茶树类黄酮 3'-羟基化酶基因 *CsF3'H* 表达质粒 pYES-Dest52-*CsF3'H*, 转化酵母菌株 WAT11, 得到转化菌株 S13; 构建了茶树类黄酮 3'-羟基化酶基因 *CsF3'H* 表达质粒 pES-URA-*CsF3'H*, 及茶树黄烷酮 3-羟基化酶基因 *CsF3H* 与拟南芥黄酮醇合成酶基因 *AtFLS* 的融合表达质粒 pES-HIS-*CsF3H*::*AtFLS* 9AA, 二者共转化酵母菌株 WAT11, 获得转化菌株 S14。【结果】转化 SUMO-*CsF3'H*[28-517]::*ATR1*[49-688] 3 AA 质粒的 TOP10 菌株 S6 在 25 °C 条件下发酵, 转化效率最高, 能将 1000 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素、二氢山奈酚和山奈酚, 分别转化生成 287.93 $\mu\text{mol/L}$ 圣草酚、131.76 $\mu\text{mol/L}$ 二氢槲皮素和 188.62 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素。发酵菌株 S13 能分别将 1000 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素、二氢山奈酚和山奈酚, 最多能转化生成 734.32 $\mu\text{mol/L}$ 圣草酚、446.07 $\mu\text{mol/L}$ 二氢槲皮素和 594.64 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素。喂食 S14 发酵菌株 5 mmol/L 的底物柚皮素, 在发酵 36-48 h 中, 最多能生成 1412.16 $\mu\text{mol/L}$ 圣草酚、490.25 $\mu\text{mol/L}$ 山奈酚、445.75 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素、66.75 $\mu\text{mol/L}$ 二氢槲皮素和 73.50 $\mu\text{mol/L}$ 二氢山奈酚。【结论】本研究首次将茶树类黄酮 3'-羟基化酶基因应用于 B 环-3',4'-二羟基黄酮类化合物圣草酚、二氢槲皮素和槲皮素的生物合成。

关键词: 茶树类黄酮 3'-羟基化酶, B 环-3',4'-二羟基黄酮类化合物, 生物合成

类黄酮化合物是普遍存在的植物次生代谢产物, 由苯丙烷代谢途径合成^[1], 其基本的化学结构为 2 个苯环(A 环和 B 环)通过杂环吡喃(C 环)连接, 共 15 个碳组成^[2], 主要包括黄烷酮类、黄酮类、

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-23)

*通信作者。Tel/Fax: +86-29-87082613; E-mail: zhoutianshan@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2016-08-19; 修回日期: 2016-12-01; 网络出版日期: 2016-12-12

二氢黄酮醇类、黄酮醇类、异黄酮类、黄烷醇类及其他类。大量的研究表明,类黄酮化合物具有广泛的生物学功能,如抗氧化、清除自由基和防止心血管疾病等^[3-5],因此类黄酮化合物已成为人类保健食品中的重要成分。从植物中提取和化学合成类黄酮化合物效率低,已无法满足日益扩张的市场需求。随着分子生物学和基因信息学的快速发展,组合生物合成(combinatorial biosynthesis)为类黄酮化合物的生产提供有效方式,且方法简单省去了化学合成中繁琐的步骤^[6-7]。一些原核微生物和真核微生物如大肠杆菌、酵母,已用于类黄酮化合物的生产^[8]。

通过清除自由基或螯合金属离子,类黄酮化合物上的功能性羟基调节着它们的抗氧化能力^[9-10]。根据B环羟基化类型,类黄酮化合物可分为B环4'-单羟基化合物,B环-3',4'-二羟基化合物和B环-3',

4',5'-三羟基化合物。B环4'-羟基来源苯丙烷途径中的对香豆酰辅酶A,而B环3'位、B环3',5'位羟基化分别由2个细胞色素P450酶催化,即类黄酮3'-羟化酶(F3'H)和类黄酮3',5'-羟化酶(F3'5'H)^[11-14]。在类黄酮生物合成途径中,类黄酮3'-羟化酶催化柚皮素、二氢山奈酚和山奈酚的B环3'位羟基化,分别生成圣草酚、二氢槲皮素和槲皮素,如图1所示。

儿茶素属于黄烷醇类化合物,在茶叶中含量为12%~24%(干重)^[16],如此高的含量也预示着茶树类黄酮合成途径中的关键酶具有较强的生物学活性。因此,本试验将茶树类黄酮3'-羟化酶基因、拟南芥的P450还原酶基因、茶树黄烷酮3'-羟化酶基因和拟南芥黄酮醇合成酶基因,以融合表达或共表达方式构建发酵菌株,尝试生物合成圣草酚、二氢槲皮素和槲皮素这3种B环-3',4'-二羟基黄酮类化合物。

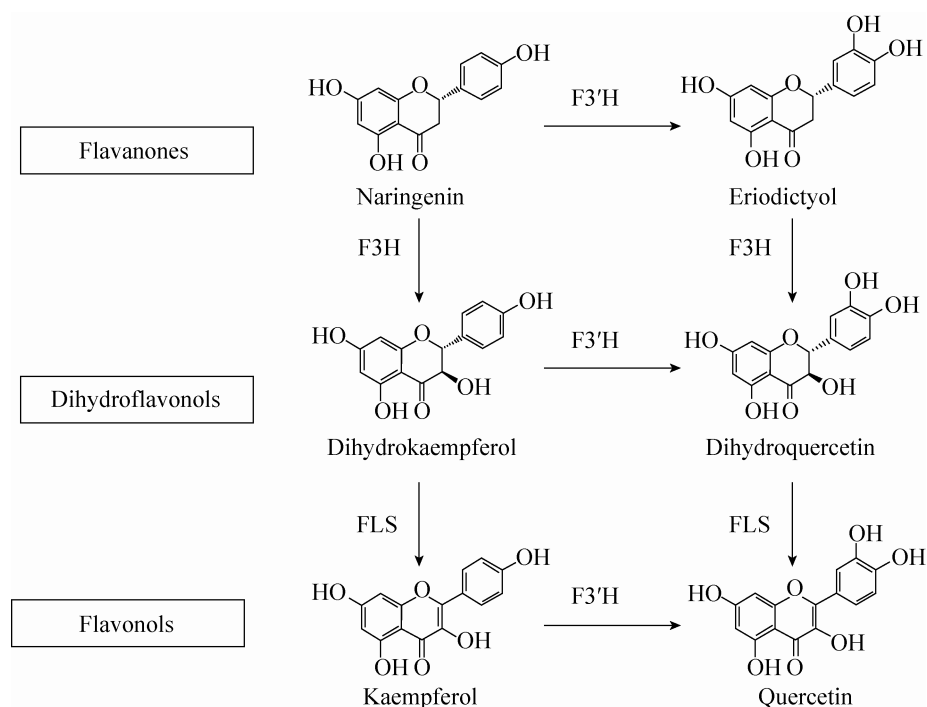


图1. B环-3',4'-二羟基黄酮类化合物生物合成途径^[15]

Figure 1. The biosynthetic pathway of B-3',4'-dihydroxylated flavones. F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase; F3H: flavanone 3-hydroxylase; FLS: flavonol synthase^[15].

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料：茶树良种乌牛早的新梢(一芽一叶)采自西北农林科技大学西乡茶叶试验站种质资源圃，拟南芥叶片采自本实验室种植的 *Col-0* 生态型拟南芥植株。所采摘的叶片立即投入液氮冷冻，再放入 -80°C 冰箱保存备用。

1.1.2 菌株：*Escherichia coli* TOP10、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 和 *Saccharomyces cerevisiae* WAT11，质粒 pYES-Dest52、pES-URA 和 pES-HIS 为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂：柚皮素[(\pm)-naringenin]、圣草酚[(\pm)-eriodictyol]、二氢山奈酚[(\pm)-dihydrokaempferol]、山奈酚(kaempferol)、二氢槲皮素(dihydroquercetin)、槲皮素(quercetin)购自 Sigma-Aldrich 公司(USA)。

1.2 基因克隆

按照 TaKaRa RNAiso Plus Total RNA 试剂盒操作说明，分别从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和茶树(*Camellia sinensis*)叶片中提取总 RNA，采用 TaKaRa PrimeScriptTM RT reagent kit 合成 cDNA 第一链。

根据 NCBI 登录的拟南芥细胞色素 P450 还原酶基因(*ATR*)、黄酮醇合成酶基因(*FLS*)序列和茶树

的类黄酮 3'-羟基化酶基因(*F3'H*)、黄烷酮 3-羟基化酶基因(*F3H*)的序列，设计 PCR 引物(表 1)。

50 μL PCR 反应体系含 10 μL 5 \times HF PCR 缓冲液、4 μL dNTPs (浓度为 10 mmol/L)、2.5 μL 上、下游引物(浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)、4 μL cDNA (浓度为 50 ng/ μL)、0.5 μL Phusion[®] High-Fidelity DNA 聚合酶和 26.5 μL ddH₂O。PCR 反应程序为： 98°C 3 min； 98°C 20 s， 63°C 30 s， 68°C 60 s，35 个循环； 68°C 5 min；反应产物 4°C 保存。

扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，按照天根 DNA 回收试剂盒操作说明回收 PCR 产物，再采用 Invitrogen INC 公司的 TOPO Cloning Kit 将 PCR 产物连接到 pENTR 载体上，接着转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞， 37°C 倒置培养 12–16 h。菌液 PCR 筛选阳性克隆，由天根质粒提取试剂盒提取质粒，送华大基因测序验证。

1.3 表达载体构建

ExpressoTM T7 sumo cloning kit (Lucigen)被用来构建表达质粒，1.2 中经测序确认的 pENTR 质粒被用作 DNA 模板。

CsF3H 与 *ATR1* 融合：采用两轮 PCR 的方法，将 *CsF3H* 和 *ATR1* 融合在一起，连接序列为编码 3 个氨基酸(Gly-Ser-Gly)的基因序列，引物如表 2

表 1. 用于基因克隆的引物
Table 1. Primers used for cloning process

Access Nos.	Primers	Sequences (5'→3')
KT180309	CsF3'H pENTR F	<u>CACCATG</u> ACTTCCTTAGCTTTTGTC
	CsF3'H pENTR R	TTAGGCCCCGATACACATGGGGTG
U84260.1	AtFLS pENTR F	<u>CACCATG</u> GAGGTCGAAAGAGTCC
	AtFLS pENTR R	TCAATCCAGAGGAAGTTTATTGAG
AY641730.1	CsF3H pENTR F	<u>CACCATG</u> GCGCCAACAACAACGC
	CsF3H pENTR R	TCAAGCAAAAATCTCATCAGTGC
NM 118585.3	ATR1 pENTR F	<u>CACCATG</u> ACTTCTGCTTTGTATGCTTCCG
	ATR1 pENTR R	TCACCAGACATCTCTGAGGTATCTTCC
NM 119167.3	ATR2 pENTR F	<u>CACCATG</u> TCTCTTCTTCTTCTTCGTCAAC
	ATR2 pENTR R	TTACCATACATCTCTAAGATATCTTCCAC

Underlined sequence indicates the 4 base pair sequences necessary for directional cloning on the 5' end of the forward primer.

表 2. 用于构建表达质粒的引物

Table 2. The primers used for constructing expression plasmids

Primers	Sequences (5'→3')
CsF3'H[7-517] sumo F	<u>CGCGAACAGATTGGAGGT</u> GCAACTCTATTTCTCACA
CsF3'H [28-517] sumo F	<u>CGCGAACAGATTGGAGGT</u> CGTCGCAACCGCAGCCAC
CsF3'H[7/28-517]::ATR1 mid R	ATCCGCCGTCGTTTT <i>ACCCGA</i> ACCCGACCCGAGTCC
CsF3'H::ATR1[49-688] mid F	GGACTCGGGTCGGGT <i>GTTTCGGGT</i> AAAACGACGGCGGAT
ATR1 [49-688] sumo R	<u>GTGGCGGCCGCTCTATT</u> ACCAGACATCTCTGAGGTATCTTCC
CsF3'H [7/28-517]::ATR2 mid R	ATTCCCAGAACC <i>CGGAACCCGA</i> ACCCGACCCGAGTCC
CsF3'H::ATR2[75-711] mid F	GGACTCGGGTCGGGT <i>GTTTCGGGT</i> TCCGGTTCTGGGAAT
ATR2[75-711] sumo R	<u>GTGGCGGCCGCTCTATT</u> ACCATACATCTCTAAGATATCTTCC
CsF3H sumo F	<u>CGCGAACAGATTGGAGGT</u> GCGCCAACAAACGCTTACG
CsF3H::AtFLS mid 9 AA R	GACTCTTTCGACCTC <i>ACCACCGGAGCCACCAGAGCC</i> ACCGCTAGCAAAAATCTCATC
CsF3H::AtFLS mid 9 AA F	GATGAGATTTTGTCTAGCGGTGGCTCTGGTGGCTCCGGTGGTGAGGTCGAAAGAGTC
AtFLS sumo R	<u>GTGGCGGCCGCTCTATT</u> ATCAATCCAGAGGAAGTTTATT
CsF3'H EcoR I F	GAATTC ATGACTTCCTTAGCTTTTGTTT
CsF3'H Spe I R	ACTAGT TTAGGCCCGATACACATGGGGTG
CsF3H::AtFLS EcoR I F	GAATTC CGCGCCAACAACAACGCTTACG
CsF3H::AtFLS Spe I R	ACTAGT TTCAATCCAGAGGAAGTTTATT

Underlined sequence indicates the sequences necessary for performing enzyme-free cloning. The linker sequences of the fusion cDNA are indicated in italic. Boldface indicates restriction enzyme cleavage site.

所示。第 1 轮 PCR 中,引物 CsF3'H[7-517] sumo F 与 CsF3'H[7/28-517]::ATR1 mid R 配合,或引物 CsF3'H[28-517] sumo F 与 CsF3'H[7/28-517]::ATR1 mid R 配合,扩增 *CsF3'H* 引物 CsF3'H::ATR1[49-688] mid F 与 ATR1[49-688] sumo R 配合扩增 *ATR1*。第 2 轮 PCR 中,混合第 1 轮 PCR 中的 2 个产物作为 DNA 模板,引物 CsF3'H[7-517] sumo F 和 ATR1[49-688] sumo R 配合,或引物 CsF3'H[28-517] sumo F 和 ATR1[49-688] sumo R 配合,扩增融合的 *CsF3'H::ATR1* 3 AA,融合的 PCR 产物按试剂盒说明连接到 SUMO 载体上,得到重组质粒 SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR1[49-688] 3 AA 和 SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA。采用相同的方法,将 *CsF3'H* 与 *ATR2* 融合,获得重组质粒 SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR2[75-711] 3 AA 和 SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR2[75-711] 3 AA。另外还扩增了通过编码 9 个氨基酸(Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly)基因片段连接的 *CsF3H::AtFLS*

融合 cDNA,并插入到 SUMO 质粒中,得到重组质粒 SUMO-CsF3H::AtFLS 9 AA。

按 Invitrogen 公司 LR Clonase® II Plus Enzyme Mix 试剂盒说明,通过 LR 交换反应,将克隆质粒 pENTR 上的目的基因转移到载体 pYES-Dest52 上,获得酵母表达质粒 pYES-Dest52-CsF3'H。

为将 *CsF3'H* 和 *CsF3H::AtFLS* 9 AA 分别连接到酵母共表达载体 pES-URA 和 pES-HIS 上,引入了 *EcoR* I 和 *Spe* I 两个酶切位点,再分别以 pENTR-CsF3'H 和 SUMO-F3H::FLS 9 AA 为模板,构建了表达质粒 pES-URA-CsF3'H 和 pES-HIS-CsF3H::AtFLS 9AA。

E. coli BL21、TOP10、DH5 α 和 *S. cerevisiae* WAT11 被用作表达菌株,分别转化以上不同质粒,其中酵母转化采用 ZYMO RESEARCH 公司的 Frozen-EZ Yeast Transformation II™ 试剂盒。再由不同的抗生素或营养缺陷培养基筛选获得不同生物发酵菌株(表 3),所有菌株都经测序验证。

表 3. 所构建的生物发酵菌株

Table 3. Construction of strains used for fermentation

No.	Expressing plasmids	Transformed strains
S1	SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR1[49-688] 3 AA	<i>E. coli</i> BL21
S2	SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA	<i>E. coli</i> BL21
S3	SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR2[75-711] 3 AA	<i>E. coli</i> BL21
S4	SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR2[75-711] 3 AA	<i>E. coli</i> BL21
S5	SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR1[49-688] 3 AA	<i>E. coli</i> Top10
S6	SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA	<i>E. coli</i> Top10
S7	SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR2[75-711] 3 AA	<i>E. coli</i> Top10
S8	SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR2[75-711] 3 AA	<i>E. coli</i> Top10
S9	SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR1[49-688] 3 AA	<i>E. coli</i> DH5 α
S10	SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA	<i>E. coli</i> DH5 α
S11	SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR2[75-711] 3 AA	<i>E. coli</i> DH5 α
S12	SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR2[75-711] 3 AA	<i>E. coli</i> DH5 α
S13	pYES-Dest52-CsF3'H	<i>S. cerevisiae</i> WAT11
S14	pES-URA-CsF3'H、pES-HIS-CsF3'H::AtFLS 9AA	<i>S. cerevisiae</i> WAT11

1.4 生物发酵

大肠杆菌发酵：将转化菌株 S1-S12，分别接入带有相应的抗生素 LB 液体培养基中，37 °C 培养过夜；第 2 天，取若干份 50 mL 加有抗生素的 LB 液体培养基，分别接入转化菌株 S1-S12 的种液 1 mL，37 °C 培养至 OD_{600} 达到 0.6 时，向其中添加 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L，转入 25 °C 或 30 °C 振荡培养；诱导 2 h 后，向菌液中加入相应的底物(柚皮素或二氢山奈酚或山奈酚)，所有底物都用 DMSO 溶解。

酵母发酵：将转化菌株 S13 (或 S14)，接入 15 mL SD-Urail (或 SD-Urail-His)液体培养基中，30 °C 振荡培养 24 h；再将以上菌液全部转入 50 mL 含 20 g/L 葡萄糖的 SD-Urail 液体培养基中，30 °C 振荡培养 24 h；1600×g、5 min 离心收集酵母细胞，弃去上清，细胞沉淀用 20 mL 含 20 g/L 半乳糖的 SD-Urail (或 SD-Urail-His)液体培养基重新悬浮；1600×g、5 min 离心再次收集酵母细胞，弃去上清，细胞沉淀用含 20 g/L 半乳糖

的 SD-Urail (或 SD-Urail-His)液体培养基悬浮，并将 OD_{600} 调至 0.4 左右；以上悬浮液 16 °C 振荡培养 12 h 后，向菌液中加入相应的底物(柚皮素或二氢山奈酚或山奈酚)。

1.5 发酵产物提取与分析

添加底物后的 2、4、6、8、10、12、24、36、48 和 60 h，分别取 1 mL 发酵菌液，加入 1 mL 100% 的甲醇，涡旋振荡提取 5 min，再 13500×g 离心 10 min，取出上清，经 0.2 μ m 膜过滤，上液相分析。

液相分析条件：选用 SHIMADZU 公司 LC-20AT 液相色谱，SPD-M20A 检测器，色谱柱为 Gl Sciences Inc 公司的 Wondasil C₁₈，5 μ m，4.6 mm×150 mm。分析条件为：A 相为乙腈，B 相为水，梯度洗脱，A 相在 10 min 内由 10%增至 40%，再在 5 min 内由 40%上升至 60%，而后在 2 min 内降至 10%；流速 1.0 mL/min，柱温保持在 25 °C；检测波长 280 nm。定性定量方法：以标品的保留时间和 UV 吸收光谱进行定性；以标品的标准曲线进行定量。

2 结果和分析

2.1 圣草酚、二氢槲皮素和槲皮素生物合成

2.1.1 大肠杆菌发酵: CsF3'H 属于细胞色素 P450 酶^[15], 其 N 端有一段与细胞膜结合区域, 这将影响其在 *E. coli* 中的表达, 同样拟南芥细胞色素 P450 还原酶(ATR)也存在这样的膜结合区域, 因此为使它们在 *E. coli* 中表达出活性, 就需删去这一部分序列。根据 TMHMM 软件预测并参照文献[17], 构建 4 个 *CsF3'H::ATR* 基因融合表达质粒, 如图 2 所示。

将图 2 所示的 4 个重组质粒, 分别转入 *E. coli* TOP10、*E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21 菌株中。培养至菌液 OD₆₀₀ 达到 0.6 时, 加入 IPTG 诱导。2 h 后, 分别喂食底物柚皮素、二氢山奈酚和山奈酚,

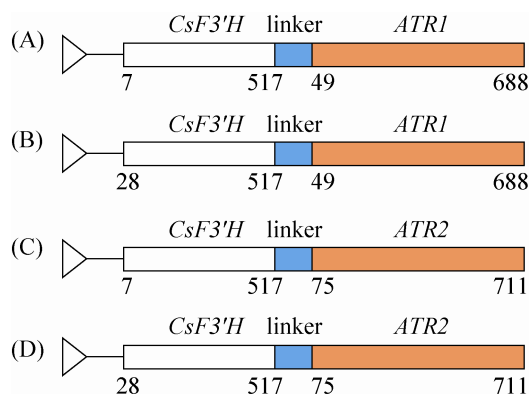


图 2. *CsF3'H* 与 *ATR* 基因融合表达质粒构建

Figure 2. Constructing plasmid of fusion gene *CsF3'H::ATR*. A: SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR1[49-688] 3 AA; B: SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA; C: SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR2[75-711] 3 AA; D: SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR2[75-711] 3 AA. SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR1[49-688] 3 AA indicates construction of gene ensembles encoding CsF3'H[7-517] and ATR1[49-688]. Numbers correspond to the amino acids encoded by the first and last codons of the gene sequences. The other plasmids can be deduced by analogy.

设定 25 °C 和 30 °C 两组温度振荡发酵, 24 h 后液相检测其相应的产物圣草酚、二氢槲皮素和槲皮素生成情况。结果发现, 转化 *E. coli* BL21 所有的菌株(S1-S4)都没有发现相应的产物生成; 表达质粒 SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR1[49-688] 3 AA 和 SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR2[75-711] 3 AA 转化的所有菌株(S1、S3、S5、S7、S9 和 S11)也没检测到相应的产物; 表达质粒 SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA 和 SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR2[75-711] 3 AA 转化 TOP10、DH5 α 菌株(S6、S8、S10 和 S12)产物生成情况如图 3 所示。从图 3 中可以看出, 25 °C 培养与 30 °C 相比, 各菌株生成相应的产物量要高出 10-20 倍; 与表达质粒 SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR2[75-711] 转化的菌株(S8 和 S12)相比, SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA 转化的菌株(S6、S10)生成相应产物量要高出 1 倍左右, 同 DH5 α 转化的菌株(S10、S12)比较, TOP10 转化的菌株(S6、S8)生成相应产物的量要略高些。3 个底物相比, 1000 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素最多能生成 287.93 $\mu\text{mol/L}$ 圣草酚; 1000 $\mu\text{mol/L}$ 二氢山奈酚最多能转化生成 131.76 $\mu\text{mol/L}$ 二氢槲皮素; 1000 $\mu\text{mol/L}$ 山奈酚最多能转化生成 188.62 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素, 这一结果与前期酶学分析表明柚皮素是 CsF3'H 最适底物的结果^[15]相吻合。

2.1.2 酵母菌株发酵: 酵母菌株 *S. cerevisiae* WAT11 整合有拟南芥 P450 还原酶基因^[18], 是异源表达植物细胞色素 P450 酶的良好宿主^[11-12,19]。本试验以转化的酵母菌株 pYES-Dest52-CsF3'H WAT11(S13)作为发酵菌株, 按 1.4 方法进行诱导。12 h 后, 分别添加柚皮素、二氢山奈酚、山奈酚至终浓度 1000 $\mu\text{mol/L}$, 再分别于添加底物后的 12、24、36、48、60 h 取样分析, 结果如图 4 所示。从图中可以发现, 随着发酵的进行, 各产物

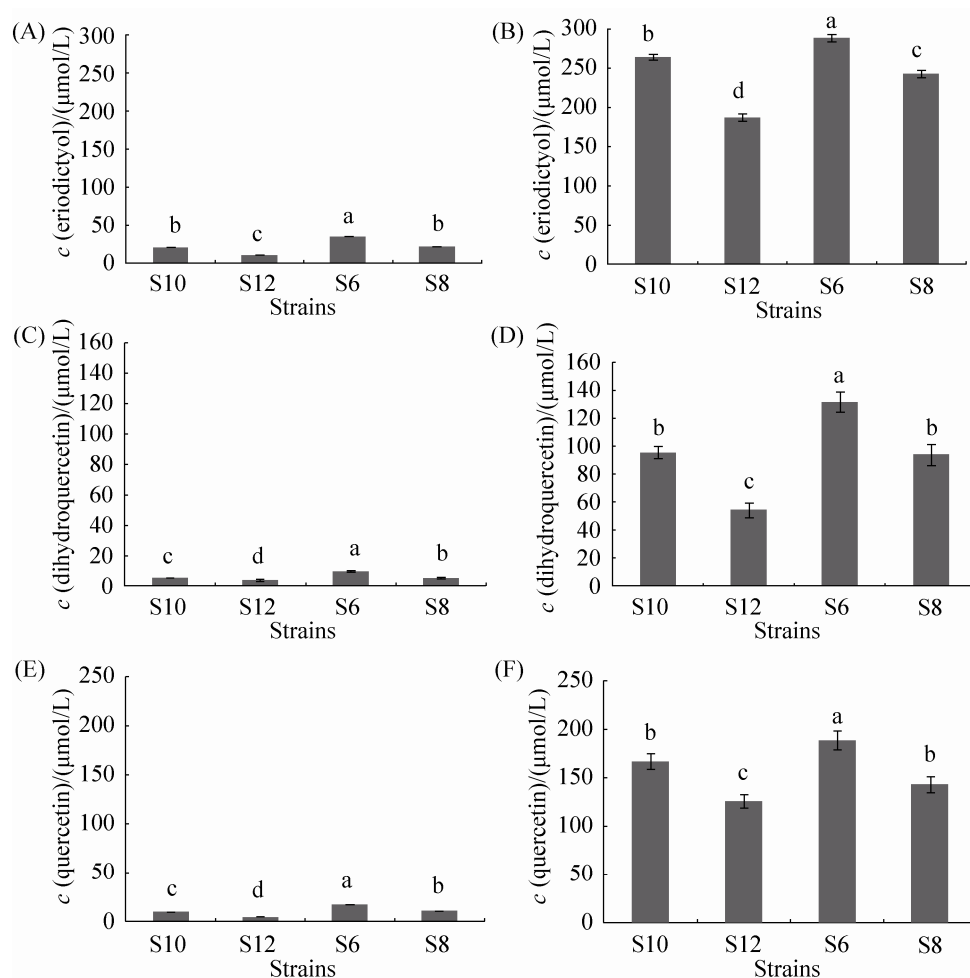


图 3. 转化 *CsF3H* 与 *ATR* 基因融合表达质粒菌株生成产物量

Figure 3. Content of product from different bacterial strains transformed fusion gene *CsF3H::ATR* plasmids. Products from the strains incubated at 30 °C with naringenin (A), dihydrokaempferol (C) and kaempferol (E) as substrates; products from the strains incubated at 25 °C with naringenin (B), dihydrokaempferol (D) and kaempferol (F) as substrates. Duncan's multiple range test ($P < 0.05$, $n=3$). Bars superscripted by different letters are significantly different at the 0.05 probability level.

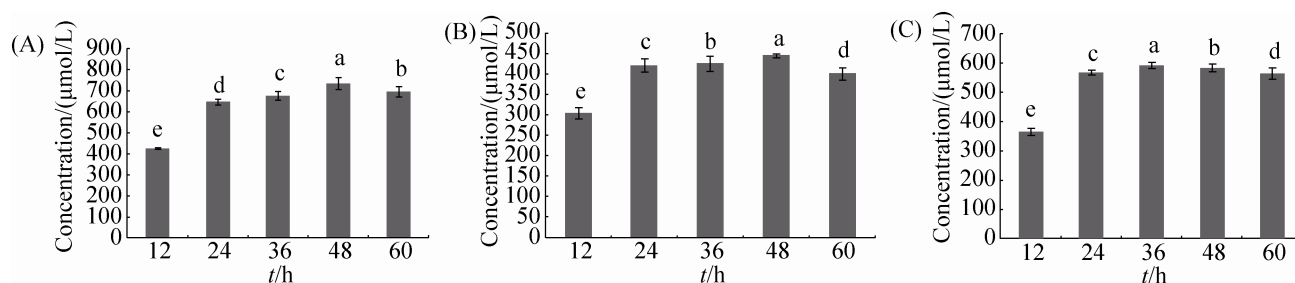


图 4. 菌株 S13 生物发酵过程中产物变化

Figure 4. Products accumulation in strain S13 bioconversion. A: eriodictyol; B: dihydroquercetin; C: quercetin. Duncan's multiple range test ($P < 0.05$, $n=3$). Bars superscripted by different letters are significantly different at the 0.05 probability level.

的积累呈现先增加后降低的趋势, 最高积累量在 36–48 h。1000 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素最多能转化生成 734.32 $\mu\text{mol/L}$ 圣草酚; 1000 $\mu\text{mol/L}$ 二氢山奈酚最多能转化生成 446.07 $\mu\text{mol/L}$ 二氢槲皮素; 1000 $\mu\text{mol/L}$ 山奈酚最多能转化生成 594.64 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素。显然, 这要高于大肠杆菌的生物转化量(图 3)。

2.2 以柚皮素为底物生物合成槲皮素

在 2.1 中, 分别以二氢山奈酚和山奈酚为底物

生物合成了二氢槲皮素和槲皮素, 但柚皮素是类黄酮生物途径中最先合成的化合物, 是生物合成其他黄酮类化合物的底物^[20]。因此, 本试验分别将 CsF3'H、CsF3H::AtFLS 9 AA 连接到酵母共表达载体 pES-URA 和 pES-HIS 上, 并同时转化 WAT11 菌株, 培养诱导并喂食 5 mmol/L 底物柚皮素, 以尝试由柚皮素为底物生物合成槲皮素, 结果如图 5 所示。从图中可以看出, 生成的产物中

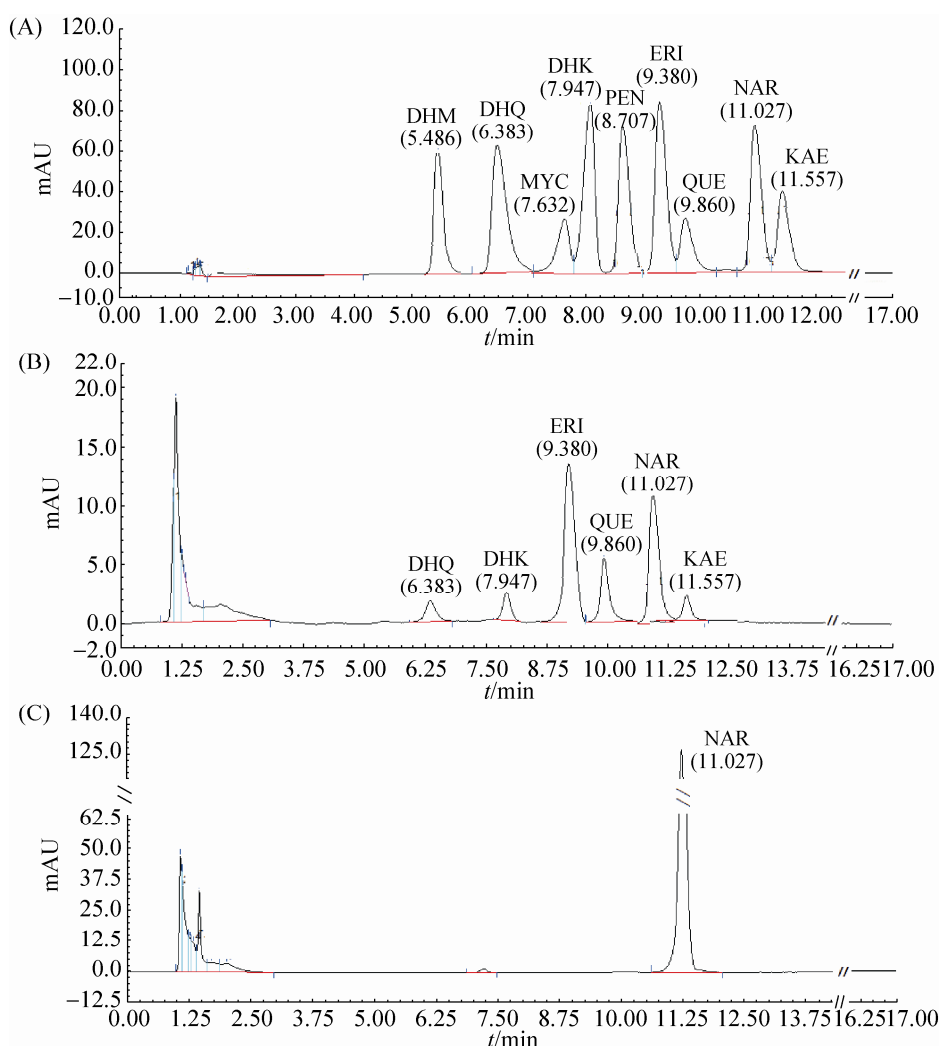


图 5. 共表达酵母菌株 S14 生成产物液相色谱图

Figure 5. HPLC chromatograms of products from strain S14 co-transformed pES-URA-CsF3'H and pES-HIS-CsF3H::AtFLS 9 AA. A: standards; B: the strain WAT11 co-transformed with pES-URA-CsF3'H and pES-HIS-CsF3H::AtFLS 9 AA; C: the strain WAT11 co-transformed with pES-URA and pES-HIS. DHM: dihydromyricetin; DHQ: dihydroquercetin; MYC: myricetin; DHK: dihydrokaempferol; PEN: pentahydroxyflavonone; ERI: eridictyol; QUE: quercetin; NAR: naringenin; KAE: kaempferol.

不仅有二氢槲皮素和槲皮素, 还有圣草酚、二氢山奈酚、山奈酚。这是因为 CsF3H::AtFLS 9 AA 可以直接以柚皮素为底物, 转化生成二氢山奈酚和山奈酚; CsF3'H 可以将柚皮素转化生成圣草酚, 整个代谢流并没有持续向槲皮素合成方向流动。

由图 6 可见, 圣草酚积累量最多, 在 48 h 达到 1412.16 $\mu\text{mol/L}$; 其次是山奈酚, 在 36 h 达到 490.25 $\mu\text{mol/L}$; 再次是槲皮素, 在 48 h 达到 445.75 $\mu\text{mol/L}$ 。在 48 h 时, 二氢槲皮素和二氢山奈酚积累量达到最高值, 分别为 66.75 $\mu\text{mol/L}$ 和 73.50 $\mu\text{mol/L}$ 。

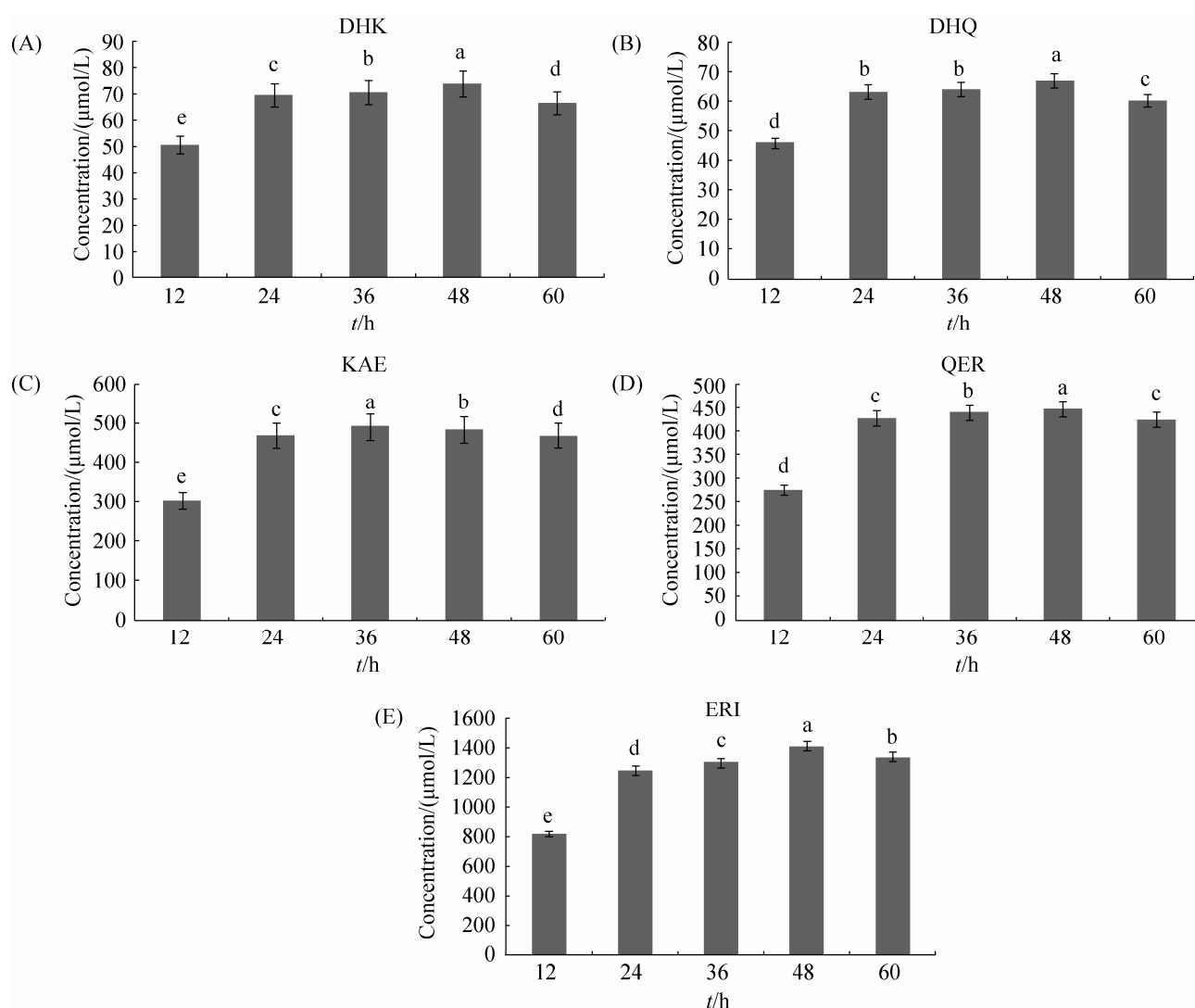


图 6. 酵母共表达菌株 S14 生物发酵过程中各产物量变化

Figure 6. Products accumulation in coexpression strain S14 bioconversion. DHQ: dihydroquercetin; DHK: dihydrokaempferol; ERI: eriodictyol; QUE: quercetin; KAE: kaempferol. Duncan's multiple range test ($P < 0.05$, $n=3$). Bars superscripted by different letters are significantly different at the 0.05 probability level.

3 讨论

大肠杆菌是用于微生物代谢工程的常用宿主,许多重要的植物源天然产物由大肠杆菌发酵生物合成^[21-24]。产率低是采用大肠杆菌重组技术的缺陷,现已通过系统生物学的方式克服^[25]。但在大肠杆菌中表达具有膜结合区域的细胞色素 P450 酶,仍然具有挑战性^[17,26],这也使得无法采用重组大肠杆菌来合成一些生物活性物质。阻止植物 P450 酶在大肠杆菌中表达,主要有两个因素:一方面,大肠杆菌中缺乏满足真核细胞色素 P450 酶电子传递的 P450 还原酶^[27];另一方面,由于大肠杆菌缺失内质网膜,导致 P450 酶的跨膜信号区域与宿主不亲和^[28-29]。

本试验中,将 CsF3'H 和拟南芥的 P450 还原酶(ATR1 和 ATR2)的跨膜区域敲除,再用接头将它们连接起来,进行融合表达。在 4 个基因融合表达质粒中, SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA 和 SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR2[75-711] 3 AA 转化的菌株(S6、S8、S10 和 S12)表达出活性, SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR1[49-688] 3 AA 和 SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR2[75-711] 3 AA 转化的菌株(S5、S7、S9 和 S11)则没有表达出活性。这可能是由于在后二者的构建中, P450 酶的跨膜区域未敲除完全之故。大肠杆菌菌株 BL21 是常用的表达重组蛋白的菌株,而 TOP10 和 DH5 α 则是用于克隆的菌株。本试验结果显示,4 个基因融合表达质粒在 BL21 菌株中都未表达出活性,而转化 SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA 或 SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR2 [75-711] 3 AA 的 TOP10 和 DH5 α 菌株(S6、S8、S10 和 S12)都检测出活性。在大肠杆菌中表达 P450 酶生物合成异黄酮的研究中^[30],也发现转化的 TOP10、DH5 α 和

JM109 菌株活性远远高于转化的 BL21 菌株的现象。另外,发酵温度对菌株的活性影响较大(图 3),这是因为在较高的温度如 30 °C 异源表达时,易产生包涵体从而导致酶的活性降低。

采用酵母菌株表达 CsF3'H 生物合成圣草酚、二氢槲皮素和槲皮素的效率,比大肠杆菌的效率要高(图 3 和图 4),其转化圣草酚、二氢槲皮素和槲皮素的量分别是大肠杆菌的 2.55 倍、3.39 倍和 3.15 倍。不过,酵母的生物发酵相对大肠杆菌来说,其发酵周期长,且需要更换液体培养基。

4 结论

为生物合成圣草酚、二氢槲皮素和槲皮素,分别以大肠杆菌和酵母作为发酵菌株进行生物合成。在大肠杆菌生物合成中,构建了 4 个茶树类黄酮 3'-羟基化酶基因(CsF3'H)和拟南芥的 P450 还原酶基因(ATR)融合表达质粒: SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR1[49-688] 3 AA、SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA、SUMO-CsF3'H[7-517]::ATR2[75-711] 3 AA 和 SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR2[75-711] 3 AA,分别转入大肠杆菌菌株 TOP10、DH5 α 和 BL21 中表达。转化 SUMO-CsF3'H[28-517]::ATR1[49-688] 3 AA 载体的 TOP10 菌株在 25 °C 下发酵,转化效率最高,能将 1000 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素、二氢山奈酚和山奈酚,分别转化生成 287.93 $\mu\text{mol/L}$ 圣草酚、131.76 $\mu\text{mol/L}$ 二氢槲皮素和 188.62 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素。以酵母菌株 pYES-Dest52-CsF3'H WAT11 作为发酵菌株,分别将 1000 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮素、二氢山奈酚和山奈酚,最多能转化生成 734.32 $\mu\text{mol/L}$ 圣草酚、446.07 $\mu\text{mol/L}$ 二氢槲皮素和 594.64 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素。

以 5 mmol/L 柚皮素为底物,喂食 pES-URA-

CsF3'H 和 pES-HIS-CsF3H::AtFLS 9AA 共表达酵母菌株 WAT11, 生物合成槲皮素, 在发酵 36–48 h 中, 最多能生成 1412.16 $\mu\text{mol/L}$ 圣草酚、490.25 $\mu\text{mol/L}$ 山奈酚、445.75 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素、66.75 $\mu\text{mol/L}$ 二氢槲皮素和 73.50 $\mu\text{mol/L}$ 二氢山奈酚。

参 考 文 献

- [1] Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 485–493.
- [2] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013: 162750.
- [3] Kumar S, Gupta A, Pandey AK. Calotropis procera root extract has the capability to combat free radical mediated damage. *ISRN Pharmacology*, 2013, 2013: 691372.
- [4] Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 2003, 22: 19–34.
- [5] Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 1998, 18(12): 1995–2018.
- [6] Wang YC, Chen S, Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(4): 949–956.
- [7] Wang AM, Zhang FK, Huang LF, Yin XP, Li HF, Wang QY, Zeng ZW, Xie T. New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, 4(10): 847–856.
- [8] Trantas EA, Koffas MA, Xu P, Ververidis F. When plants produce not enough or at all: metabolic engineering of flavonoids in microbial hosts. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 7.
- [9] Kumar S, Mishra A, Pandey AK. Antioxidant mediated protective effect of *Parthenium hysterophorus* against oxidative damage using *in vitro* models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 13: 120.
- [10] Kumar S, Pandey A K. Phenolic content, reducing power and membrane protective activities of *Solanum xanthocarpum* root extracts. *International Journal of Plant Research*, 2013, 26(1): 301–307.
- [11] Wang YS, Xu YJ, Gao LP, Yu O, Wang XZ, He XJ, Jiang XL, Liu YJ, Xia T. Functional analysis of flavonoid 3', 5'-hydroxylase from tea plant (*Camellia sinensis*): critical role in the accumulation of catechins. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 347.
- [12] Olsen KM, Hehn A, Jugdé H, Slimestad R, Larbat R, Bourgaud F, Lillo C. Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 21.
- [13] Brugliera F, Barri-Rewell G, Holton TA, Mason JG. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Ht1* locus of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal*, 1999, 19(4): 441–451.
- [14] Schoenbohm C, Martens S, Eder C, Forkmann G, Weissshaar B. Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme. *Biological Chemistry*, 2000, 381(8): 749–753.
- [15] Zhou TS, Zhou R, Yu YB, Xiao Y, Li DH, Xiao B, Yu O, Yang YJ. Cloning and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase gene from tea plant (*Camellia sinensis*). *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(2): 261.
- [16] 宛晓春. 茶叶生物化学. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 9–10.
- [17] Leonard E, Yan YJ, Koffas MAG. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(2): 172–181.
- [18] Pompon D, Louerat B, Bronine A, Urban P. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in Enzymology*, 1996, 272: 51–64.
- [19] Teoh KH, Polichuk DR, Reed DW, Nowak G, Covello PS. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. *FEBS Letters*, 2006, 580(5): 1411–1416.
- [20] Kim DH, Kim BG, Jung NR, Ahn JH. Production of genistein from naringenin using *Escherichia coli* containing isoflavone synthase-cytochrome P450 reductase fusion protein. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(12): 1612–1616.
- [21] Draths KM, Knop DR, Frost JW. Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(7): 1603–1604.
- [22] Huang QL, Roessner CA, Croteau R, Scott AI. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2001, 9(9): 2237–2242.
- [23] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(7): 796–802.
- [24] Pfeifer BA, Admiraal SJ, Gramajo H, Cane DE, Khosla C. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science*, 2001, 291(5509): 1790–1792.
- [25] Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(5): 612–616.
- [26] Chang MCY, Keasling JD. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(12): 674–681.
- [27] Sevrioukova IF, Li HY, Zhang H, Peterson JA, Poulos TL.

- Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(5): 1863–1868.
- [28] Barnes HJ, Arlotto MP, Waterman MR. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 α -hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(13): 5597–5601.
- [29] Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE. Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2000, 81(3): 183–190.
- [30] Leonard E, Koffas MAG. Engineering of artificial plant cytochrome P450 enzymes for synthesis of isoflavones by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(22): 7246–7251.

Engineering of a flavonoid 3'-hydroxylase from tea plant (*Camellia sinensis*) for biosynthesis of B-3',4'-dihydroxylated flavones

Tianshan Zhou^{*}, Youben Yu, Bin Xiao, Lu Bao, Yuefang Gao

College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

Abstract: [Objective] A flavonoid 3'-hydroxylase from tea plant was engineered to synthesize B-3',4'-dihydroxylated flavones such as eriodictyol, dihydroquercetin and quercetin. **[Methods]** Four artificial P450 constructs harboring both flavonoid 3'-hydroxylase gene from *Camellia sinensis* (*CsF3'H*) and P450 reductase gene from *Arabidopsis thaliana* (*ATR1* or *ATR2*) were introduced into *Escherichia coli* strains TOP10, DH5 α and BL21, resultantly engineering strains S1 to S12. The plasmid pYES-Dest52-CsF3'H harboring *CsF3'H* gene was introduced into yeast *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 designated as strain S13. The plasmid pES-HIS-CsF3H::AtFLS 9 AA was constructed through fusing flavanone 3-hydroxylase gene from *Camellia sinensis* (*CsF3H*) and flavonol synthase gene from *Arabidopsis thaliana* (*AtFLS*). Plasmid pES-URA-CsF3'H and pES-HIS-CsF3H::AtFLS 9 AA were then co-introduced into yeast *S. cerevisiae* WAT11 designated as strain S14. **[Results]** Strain S6 generated highest bioconversion efficiency at 25 °C among all *E. coli* strains during 24 h fermentation. Supplemented with 1000 μ mol/L naringenin, dihydrokaempferol and kaempferol, the maximum amounts of eriodictyol, dihydroquercetin and quercetin produced by strain S13 were 734.32 μ mol/L, 446.07 μ mol/L and 594.64 μ mol/L respectively. Supplemented with 5 mmol/L naringenin, the maximum amounts of eriodictyol, kaempferol, quercetin, dihydroquercetin and dihydrokaempferol produced by strain S14 were 1412.16 μ mol/L, 490.25 μ mol/L, 445.75 μ mol/L, 66.75 μ mol/L and 73.50 μ mol/L during 36–48 h fermentation respectively. **[Conclusion]** CsF3'H was engineered for biosynthesis of B-3',4'-dihydroxylated flavone.

Keywords: flavonoid 3'-hydroxylase from *Camellia sinensis*, B-3',4'-dihydroxylated flavones, biosynthesis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology System (CARS-23)

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-29-87082613; E-mail: zhoutianshan@nwsuaf.edu.cn

Received: 19 August 2016; Revised: 1 December 2016; Published online: 12 December 2016