

# 在大肠杆菌内引入甲羟戊酸途径高效合成抗疟药青蒿素前体——紫穗槐-4,11-二烯

吴涛<sup>1,2</sup>, 吴胜明<sup>3</sup>, 殷晴<sup>2</sup>, 戴红梅<sup>2</sup>, 李树龙<sup>2</sup>, 董芳庭<sup>3</sup>, 陈必链<sup>1</sup>, 方宏清<sup>2</sup>

1 福建师范大学 生命科学学院, 福州 350108

2 军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071

3 军事医学科学院 国家生物医学分析中心, 北京 100850

**摘要:** 以青蒿素为基础的联合药物治疗法 (ACTs) 被认为是目前治疗恶性疟疾的最有效方法。然而青蒿素供应不足且价格昂贵, 限制了 ACTs 的广泛使用。采用基因工程手段构建异源类异戊二烯生物合成途径, 利用大肠杆菌发酵能高效合成抗疟药青蒿素前体——紫穗槐-4,11-二烯。首先在大肠杆菌 *Escherichia coli* DHGT7 中引入人工合成的紫穗槐-4,11-二烯合酶基因, 利用大肠杆菌内源的法尼基焦磷酸, 成功获得了紫穗槐-4,11-二烯。为提高前体供给, 引入粪肠球菌的甲羟戊酸途径, 紫穗槐-4,11-二烯的产量提高了 13.3 倍, 达到 151 mg/L。进一步研究发现了 3 个限制酶, 分别是紫穗槐-4,11-二烯合酶、HMG-COA 还原酶和甲羟戊酸激酶; 通过调节这些酶的水平, 紫穗槐-4,11-二烯产量提高了 7.2 倍, 在摇瓶中达到 235 mg/L。研究结果为高效生物合成抗疟药青蒿素前体——紫穗槐-4,11-二烯提供了参考。

**关键词:** 紫穗槐-4,11-二烯, 青蒿素, 甲羟戊酸途径, 代谢调控, 生物合成

## Biosynthesis of amorpha-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli* through introducing mevalonate pathway

Tao Wu<sup>1,2</sup>, Shengming Wu<sup>3</sup>, Qing Yin<sup>2</sup>, Hongmei Dai<sup>2</sup>, Shulong Li<sup>2</sup>, Fangting Dong<sup>3</sup>, Bilian Chen<sup>1</sup>, and Hongqing Fang<sup>2</sup>

1 College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

2 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

3 National Center of Biomedical Analysis, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

**Abstract:** Artemisinin-based combination therapies (ACTs) are recommended to be the most effective therapies for the first-line treatment of uncomplicated falciparum malaria. However, artemisinin is often in short supply and unaffordable to most

**Received:** January 15, 2011; **Accepted:** March 4, 2011

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA00801).

**Corresponding author:** Hongqing Fang. Tel: +86-10-66948827; E-mail: fanghongqing@vip.sina.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CBA00801) 资助。

malaria patients, which limits the wide use of ACTs. Production of amorpha-4,11-diene, an artemisinin precursor, was investigated by engineering a heterologous isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. The production of amorpha-4,11-diene was achieved by expression of a synthetic amorpha-4,11-diene synthase gene in *Escherichia coli* DHGT7 and further improved by about 13.3 fold through introducing the mevalonate pathway from *Enterococcus faecalis*. After eliminating three pathway bottlenecks including amorpha-4,11-diene synthase, HMG-CoA reductase and mevalonate kinase by optimizing the metabolic flux, the yield of amorpha-4,11-diene was increased by nearly 7.2 fold and reached at 235 mg/L in shaking flask culture. In conclusion, an engineered *Escherichia coli* was constructed for high-level production of amorpha-4,11-diene.

**Keywords:** amorpha-4,11-diene, artemisinin, mevalonate pathway, metabolic regulation, biosynthesis

青蒿素 (Artemisinin), 一种倍半萜内酯过氧化物, 是我国科学工作者从植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 中分离并鉴定的抗疟有效单体<sup>[1]</sup>。青蒿素与一种或多种其他抗疟药物配伍后得到一种抗疟特效药——以青蒿素为基础的联合药物治疗法 (Artemisinin-based combination therapies, ACTs)。2005 年世界卫生组织 (WHO) 将 ACTs 推荐为治疗非复杂恶性疟疾的第一线用药<sup>[2]</sup>。随着 WHO 的推荐, 青蒿素的市场需求增大、价格迅速上涨, 但青蒿素供应不足, 极大地限制了 ACTs 的广泛使用<sup>[3]</sup>。目前, 从植物中提取仍是获得青蒿素的主要途径。大量种植黄花蒿能提高青蒿素的产量, 但这是与粮食种植争夺有限的土地资源, 且易受气候等外界因素的影响。化学方法合成青蒿素曾被寄予厚望, 但青蒿素具有 7 个手性碳原子, 存在 128 个异构体, 得率低难以产业化<sup>[3]</sup>。利用微生物细胞合成青蒿素是替代植物提取和化学合成的方法之一, 具有很好的应用前景。

2003 年, Martin 等<sup>[4]</sup>率先在大肠杆菌中引入人工合成的紫穗槐-4,11-二烯合酶基因 (*ADS*) 并重建酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* H. 来源的甲羟戊酸 (Mevalonate, MVA) 途径, 成功获得了抗疟药青蒿素的前体——紫穗槐-4,11-二烯 (Amorpha-4,11-diene, AD)。之后, 他们通过优化代谢途径酶基因的密码子、增加限速酶的表达水平、消除有毒代谢中间物或副产物的积累以及优化培养基和培养条件等<sup>[5-8]</sup>, 使紫穗槐-4,11-二烯产量极大提高, 摇瓶培养产量为 275 mg/L, 上罐发酵产量达到 27.4 g/L。

2006 年, Lindahl 等<sup>[9]</sup>采用构建质粒表达载体和同源重组基因组两种方法, 在酿酒酵母中引入黄花蒿来源的紫穗槐-4,11-二烯合酶基因, 结果都获得了紫穗槐-4,11-二烯, 且前者产量达到 600  $\mu\text{g/L}$ , 是后者的 6 倍。同年, Ro 等<sup>[10]</sup>通过改造酿酒酵母内源的 MVA 途径, 并引入黄花蒿来源的紫穗槐-4,11-二烯合酶和细胞色素 P450 单加氧酶 (CYP71AV1) 基因, 获得了青蒿素的另一重要前体——青蒿酸 (Artemisinic acid), 产量为 100 mg/L。2008 年, Ro 等<sup>[11]</sup>以酿酒酵母为宿主, 通过单个质粒表达紫穗槐-4,11-二烯合酶、紫穗槐-4,11-二烯氧化酶和细胞色素 P450 还原酶等 3 个植物来源酶的基因, 使青蒿酸产量提高到 1 g/L。这种微生物半合成青蒿素的方法——先通过改造微生物合成途径获得青蒿素的前体紫穗槐-4,11-二烯或青蒿酸等, 再采用相对简单的化学催化步骤可将这些前体转化成青蒿素<sup>[12-13]</sup>, 可以大规模制备青蒿素, 解决资源短缺问题。

大肠杆菌是应用最广泛的原核表达系统, 它具有操作简单、周期短、成本低和产量高等优点。且大肠杆菌遗传背景清楚, 次生代谢产物简单, 目的代谢产物易于分离与纯化。另外, 大肠杆菌内存在以脱氧木酮糖磷酸 (Deoxyxylulose-5-phosphate, DXP) 途径为基础的一类异戊二烯代谢途径, 能合成少量的辅酶 Q 等。因此, 大肠杆菌非常适合作为生物合成类异戊二烯化合物的宿主菌。

本研究在大肠杆菌中引入人工合成的紫穗槐-4,11-二烯合酶基因并构建原核的粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* 来源的 MVA 途径, 获得了抗

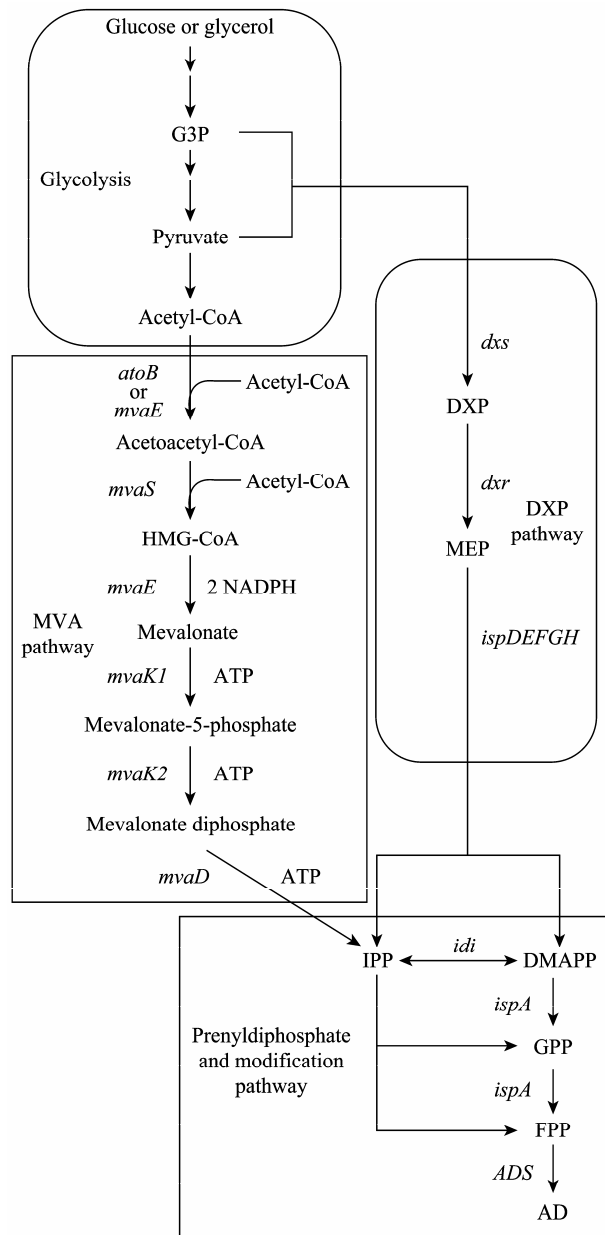


图1 本实验构建的重组菌的紫穗槐-4,11-二烯合成途径  
 Fig. 1 Synthesis of amorpha-4,11-diene in recombination *E. coli* from the building blocks of IPP and DMAPP, which are synthesised using DXP and MVA pathways. The native pathways are in round frames, and the heterologous pathways reconstructed in this paper are in square frames. The abbreviations are used: G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA; IPP, isopentenyl pyrophosphate; DMAPP, dimethyl allyl pyrophosphate; GPP, geranyl pyrophosphate; FPP, farnesyl pyrophosphate; AD, amorpha-4,11-diene.

疟药青蒿素前体——紫穗槐-4,11-二烯的高表达。与文献报道相比,本研究避开了众所周知的真核生物来源的基因在原核细胞表达的各种难题。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株、质粒和培养基

宿主菌 *E. coli* DHGT7 为本室构建,表达载体 pAOC3ANL 为本实验构建;粪肠球菌与质粒载体 pET28a、pACYCDuet-1 和 pET3b 由本室保存;菌株 *E. coli* DH5a 和 BL21(DE3) 购于北京全式金生物技术公司。

LB 培养基 (10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L NaCl) 用于大肠杆菌普通培养; FM2G 培养基 (15 g/L 胰蛋白胨, 12 g/L 酵母提取物, 3 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 g/L NaCl, 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 0.2% 葡萄糖, 1.5% 甘油) 用于摇瓶发酵。

#### 1.1.2 主要试剂

Prime STAR<sup>TM</sup> HS DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购于宝生物工程公司;质粒提取试剂盒和 DNA 片段胶回收试剂盒购于北京博大泰恒生物技术公司; IPTG 购于 Promega 公司; L-阿拉伯糖购于 Merck 公司; 标准品石竹烯 ((-)-trans-Caryophyllene) 购于 Sigma-Aldrich 公司。其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

#### 1.1.3 相关基因的获得

*ADS* 根据文献[14]提供的基因序列进行全基因合成。*mvaE* 和 *mvaS* 根据已公布的基因序列 (GenBank Accession No. AF290092.1), *MD* (包含连续排列在基因组上 4 个酶的基因: *idi*、*mvaK2*、*mvaD* 和 *mvaK1*) 和 *ispA* 根据已公布的基因序列 (GenBank Accession No. AE016830.1) 分别设计引物 (表 1), 以粪肠球菌的染色体 DNA 为模板 PCR 扩增获得。基因和引物由上海生工生物工程公司合

成, 基因测序由北京中科希林公司完成。

### 1.2 载体构建、目的基因表达

采用常用分子克隆技术, 如 PCR 扩增、酶切、连接和转化等构建质粒表达载体 (表 2), 具体方法参考文献[15]。

将表达载体转化宿主菌 *E. coli* DHGT7, 接入含相应抗生素 (Kn、Cm 均为 25 μg/mL) 的液体 LB 培养基中, 37 °C 培养至 OD<sub>600</sub>=0.3~0.4, 加入 0.2% L-阿拉伯糖诱导, 继续培养 4~5 h。取菌体全蛋白作 SDS-PAGE 分析, 具体方法参考文献[15]。

表 1 本文使用的引物

Table 1 Primers used in this study

| Primers (5'-3')  | Function                    |
|--|-----------------------------|
| ADS5: GGATCC <u>CATATGGCACTTACAGAAGAAAAACCTAT</u>              | To amplify <i>ADS</i>       |
| ADS3: AATGGATCCTCAGATACTCATAGGAT                               |                             |
| mvaE5: GGATCC <u>CATATGAAAAACAGTAGTTATTATTGATGC</u>            | To amplify <i>mvaE</i>      |
| mvaE3: TTTGGATCCGCGGCCCAATTGCTCGAGTTATTGTTTCTTAAATCATTAAAATAGC |                             |
| mvaS5: TATCTCGAGTAAGGAGGATATTTAGATGACAATTGGGATTGATAAAAATTAG    | To amplify <i>mvaS</i>      |
| mvaS3: AATGGATCCTTAGTTTCGATAAGAGCGAACGG                        |                             |
| MD5: GGATCC <u>CATATGAATATAAAAAACAAGGCCTCGGT</u> C             | To amplify <i>MD</i>        |
| MD3: AATGGATCCTTAACGTTTTGCGAAAACAGTGCTGTG                      |                             |
| MK3: AATGGATCCTTACTTTTTTCACCTCTAATGATTG                        | To amplify <i>mvaK1</i>     |
| ispA5: GGATCC <u>CATATGACGAATTTT</u> AGTCAACAGCATTACC          | To amplify <i>ispA</i>      |
| ispA3: TTTGGATCCGCGGCCCAATTGCTCGAGCTATCTCAATTGTAAGTGAACAAG     |                             |
| PC5: GGAATTCCTCACACTGCTTCCGGTAGT                               | To amplify pAOC3ANL         |
| PC3: ACATGCATGCATCTCGACCGATGCCCTT                              |                             |
| E35: AGGAATGGTGCATGCAAGG                                       | To amplify MCS for pAOC3ANL |
| E3AN: GGGAAATTC GCGGCCGCTCATATCATCGATGGGCCCGGATATAGTTCCTCCTT   |                             |

The coding regions are indicated by bold letters, the restriction sites are underlined.

表 2 本文使用的菌株和质粒

Table 2 Strains and plasmids used in this study

| Strains and plasmids     | Relevant characteristics   |
|--------------------------|--|
| Strains                  |  |
| <i>E. coli</i> DH5α      | F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ80 <i>dlacZ</i> M15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ <sup>-</sup> |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])  |
| <i>E. coli</i> DHGT7     | <i>E. coli</i> DH5α Δ <i>ptsG</i> <i>araB::T7RNAP-tetA</i>   |
| Plasmids                 |  |
| pET28a                   | High copy number cloning vector; pBR322 origin; T7 promoter; Kn <sup>r</sup>   |
| pET28-ADS                | pET28a derivative containing synthetic <i>ADS</i>  |
| pET28-ispA-ADS           | pET28-ADS derivative containing <i>ispA</i>  |
| pET28-E                  | pET28a derivative containing <i>mvaE</i>   |
| pET28-E-ADS              | pET28-E derivative containing <i>ADS</i>   |
| pET28-E-MK-ADS           | pET28-E-ADS derivative containing <i>mvaK1</i>   |
| pET3b                    | Cloning vector; pBR322 origin; T7 promoter; Ap <sup>r</sup>  |
| pACYCDuet-1              | Low copy number cloning vector; P15A origin; T7 promoter; Cm <sup>r</sup>  |
| pAOC3ANL                 | pACYCDuet-1 derivative containing engineered MCS; Cm <sup>r</sup>  |
| pAOC3-ES-MD              | pAOC3ANL derivative containing <i>mvaE</i> , <i>mvaS</i> and <i>MD</i> operon  |
| pAOC3-ES-MD-ispA-ADS     | pAOC3-ES-MD derivative containing <i>ispA</i> and <i>ADS</i>   |

### 1.3 摇瓶培养方法

挑取新转化的单克隆, 接入含相应抗生素的液体 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜。取过夜培养菌液转接 40 mL 抗性 FM2G 培养基, 使初始菌体浓度为  $OD_{600}=0.05$ , 37 °C、220 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.3~0.4 时, 加入 0.2% L-阿拉伯糖或 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 并加入 20% (V/V) 无菌的十二烷覆盖在培养基的表面<sup>[5]</sup>, 随后转至 30 °C 继续培养 48~60 h。选取不同时间点测定菌体浓度和紫穗槐-4,11-二烯产量。

### 1.4 GC-MS 法测定 AD 含量

#### 1.4.1 仪器设备和样品处理

气相色谱-质谱联用仪: HP6890 气相色谱和飞行时间质谱 (Waters 公司); 色谱柱: DB-5 (30 m×250  $\mu$ m×0.25  $\mu$ m, Agilent 公司)。

样品处理方法: 培养液离心分层, 取 10  $\mu$ L 十二烷层溶液加入到 190  $\mu$ L 含 10  $\mu$ g/mL 石竹烯为内标物的乙酸乙酯溶液中, 涡旋混匀。

#### 1.4.2 样品检测条件

气相色谱条件: 载气: 氦气; 流速: 1.0 mL/min; 程序升温: 70 °C 保持 1 min, 15 °C/min 升温至 285 °C, 保持 2 min, 30 °C/min 升温至 310 °C; 进样口温度: 150 °C; 进样方式: 不分流进样; 进样量: 0.3  $\mu$ L。

质谱条件: 电离方式: 电子轰击电离 (EI); 电离能量: 70 eV; 电子源温度: 220 °C; 扫描模式: 全扫描。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达 ADS 产紫穗槐-4,11-二烯

将全基因合成的 ADS 克隆到质粒载体 pET28a 上, 得到表达载体 pET28-ADS; 转化 *E. coli* DHGT7, 以 pET28a 为对照, 进行 SDS-PAGE 分析, 结果在约 56 kDa 处有可见的紫穗槐-4,11-二烯合酶 (ADS) 的条带 (图 2)。

新转化的菌株 pET28-ADS/DHGT7 进行摇瓶培养, 采用 GC-MS 法测定紫穗槐-4,11-二烯的含量。通过 GC 检测, 分别在 8.42 min 和 8.83 min 出现

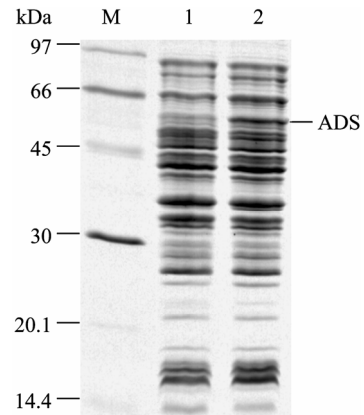


图 2 ADS 诱导表达的菌体全蛋白 SDS-PAGE 分析结果  
Fig. 2 SDS-PAGE analysis showing the expressing of the synthetic ADS gene in DHGT7. M: protein marker; 1: pET28a/DHGT7; 2: pET28-ADS/DHGT7.

内标物石竹烯 (IS) 和紫穗槐-4,11-二烯 (AD) 的保留峰 (图 3A)。对样品 AD 作 MS 检测, 质谱图与紫穗槐-4,11-二烯的标准图谱比对, 二者一致 (图 3B、C)。根据内标石竹烯的浓度对样品 AD 含量进行定量, 结果摇瓶培养 48 h 的紫穗槐-4,11-二烯产量仅为 11.3 mg 石竹烯当量/L。我们推测大肠杆菌内源的 FPP 水平太低, 限制了紫穗槐-4,11-二烯的产量。由于大肠杆菌仅存在 DXP 途径, 为避免对内源途径的影响, 后面引入了异源的 MVA 途径来提高前体供给。

### 2.2 构建异源 MVA 途径

以低拷贝质粒 pACYCDuet-1 的骨架为基础, PCR 扩增质粒 pET3b 的多克隆位点 (MCS), 并通过 PCR 引物引入 *Not* I 和 *Apa* I 限制性酶切位点, 将 PCR 扩增的 MCS 序列连接到 pACYCDuet-1 的 *Sph* I 和 *Eco*R I 之间, 构建了一个具有特殊 MCS 的质粒载体 pAOC3ANL, 用于多基因合成途径的构建。

将粪肠球菌来源的 *mvaE*、*mvaS*、*MD* 和 *ispA* 与 ADS 分别构建在质粒载体 pAOC3ANL 和 pET28a 上, 得到表达载体 pAOC3-ES-MD 和 pET28-ispA-ADS, 共转化 *E. coli* DHGT7, 摇瓶培养 48 h 紫穗槐-4,11-二烯产量达到 151 mg/L, 是利用内源 FPP 的 13.3 倍。

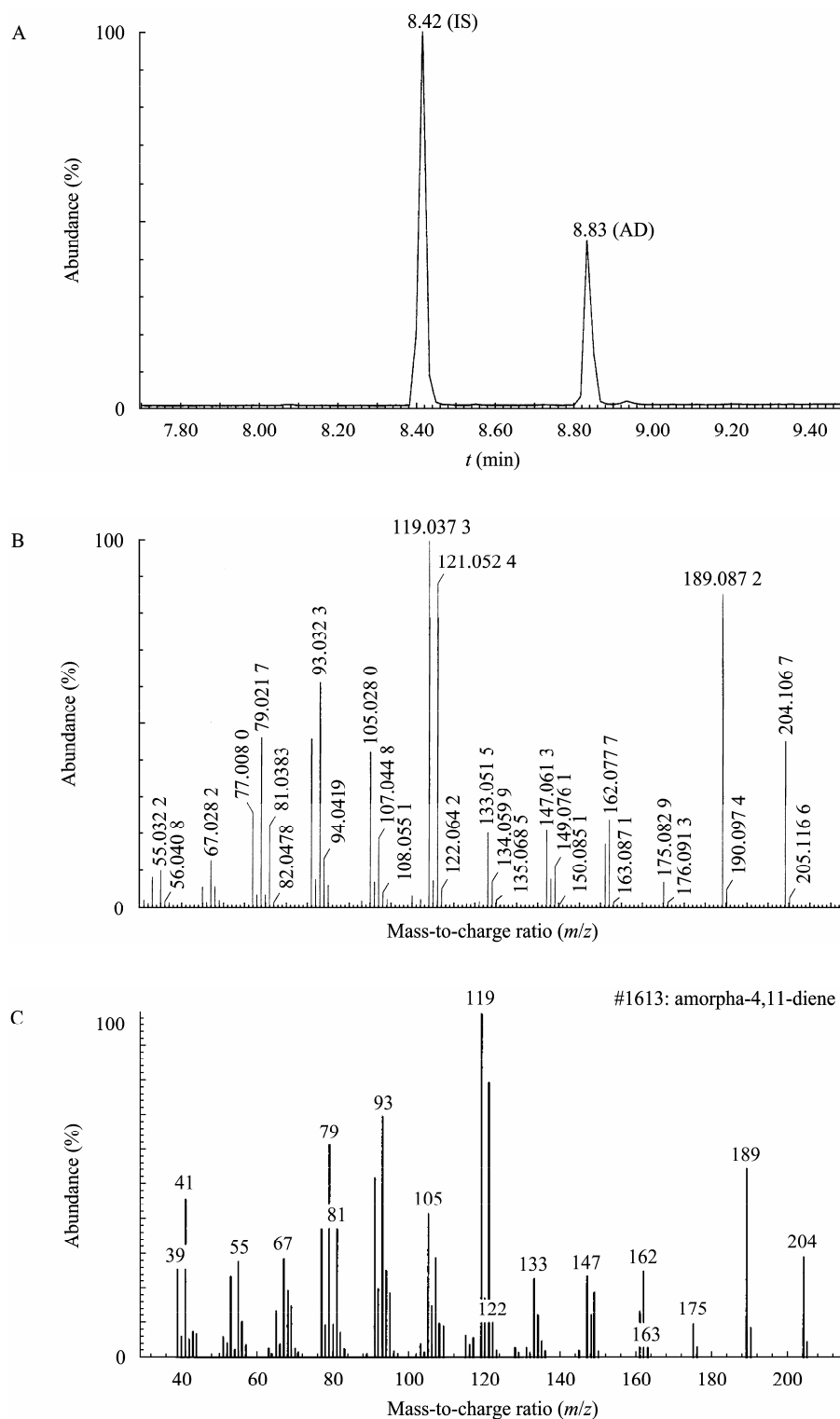


图3 紫穗槐-4,11-二烯的GC-MS测定结果

Fig. 3 GC-MS analysis of amorpho-4,11-diene produced by pET28-ADS/DHGT7. (A) Total ion chromatogram of pET28-ADS/DHGT7. (B) Mass spectrum of the peak of retention time at 8.83 min in A. (C) Mass spectrum of amorpho-4,11-diene<sup>[16]</sup>.

### 2.3 优化紫穗槐-4,11-二烯合成途径

为进一步提高紫穗槐-4,11-二烯的产量, 必须消除代谢途径的限制因素, 如提高限制酶的水平、消除毒性中间物或副产物等, 因此我们作了如下优化。

将整个紫穗槐-4,11-二烯合成途径的基因构建到单个质粒载体 pAOC3ANL 上, 得到表达载体 pAOC3-ES-MD-ispA-ADS (图 4), 转化 *E. coli* DHGT7, 紫穗槐-4,11-二烯产量为 32.5 mg/L, 仅为使用 2 个质粒共表达时的 1/5, 菌体的生长也受到严重抑制 (图 5A)。我们推断这是因为当使用 2 个质粒共表达时 ADS 是构建在高拷贝的 pET28a 上, 而以单个质粒表达时 ADS 是构建在低拷贝的 pAOC3ANL 上, 间接地降低了 ADS 的拷贝数, 使得胞内 FPP 累积, 引起内源 FPP 合成途径的反馈调控作用, 从而抑制菌体生长。

因此, 我们提高了 ADS 的拷贝数, 将 pET28-ADS 与 pAOC3-ES-MD-ispA-ADS 共转化 *E. coli* DHGT7, 结果紫穗槐-4,11-二烯产量提高了 4.3 倍, 达到 140 mg/L (图 5B), 菌体生长抑制也得到一定程度的缓解。

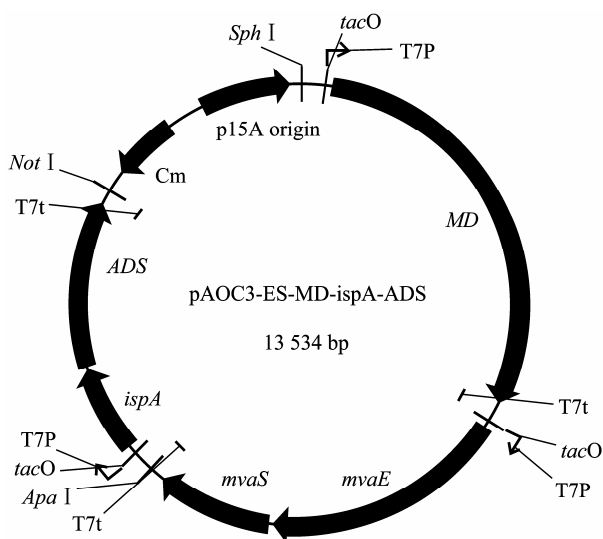


图 4 表达载体 pAOC3-ES-MD-ispA-ADS 的示意图  
Fig. 4 Map of plasmid pAOC3-ES-MD-ispA-ADS. T7P and T7t represent the T7 promoter and T7 terminator respectively.

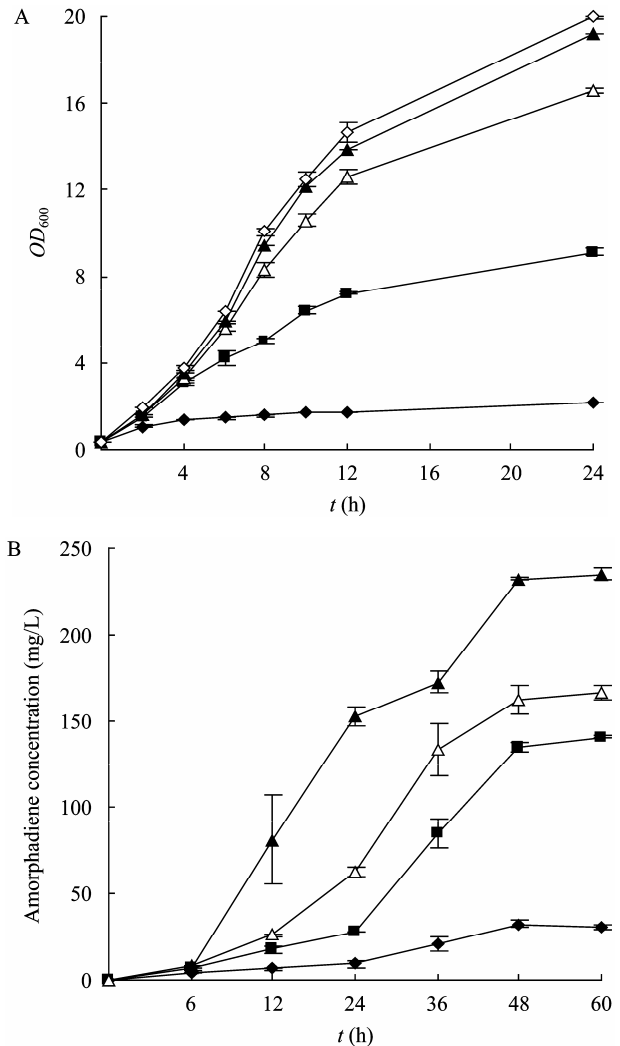


图 5 菌体生长曲线 (A) 和紫穗槐-4,11-二烯产量测定曲线 (B)

Fig. 5 Growth curves and amorphadiene production analysis of engineered strains. (A) Growth curves of *E. coli* DHGT7 showing the inhibition effect was eliminated by increasing another high copy of limiting enzymes gene. (B) Amorphadiene production was measured from *E. coli* DHGT7 containing different expressing vectors. The symbols represent host cell *E. coli* DHGT7 containing different expressing vectors: pAOC3-ES-MD-ispA-ADS (◆); pET28-ADS and pAOC3-ES-MD-ispA-ADS (■); pET28-E-ADS and pAOC3-ES-MD-ispA-ADS (Δ); pET28-E-MK-ADS and pAOC3-ES-MD-ispA-ADS (▲); and pAOC3ANL (◇).

据 Pitera 等<sup>[6]</sup>报道, HMG-CoA 还原酶是类异戊二烯化合物生物合成过程中的关键酶, 它催化 HMG-CoA 转化为甲羟戊酸的反应是不可逆的, HMG-CoA 还原酶活性不足会导致 HMG-CoA 在胞

内累积产生毒性。因此, 我们提高 HMG-CoA 还原酶水平, 构建了表达载体 pET28-E-ADS, 与 pAOC3-ES-MD-ispA-ADS 共转化 *E. coli* DHGT7, 结果菌体生长抑制得到进一步缓解, 紫穗槐-4,11-二烯产量也再次提高。

另据 Anthony 等<sup>[7]</sup>报道, 提高胞内甲羟戊酸激酶 (MK) 的水平可以极大地提高紫穗槐-4,11-二烯产量。因此我们构建了表达载体 pET28-E-MK-ADS, 与 pAOC3-ES-MD-ispA-ADS 共转化 *E. coli* DHGT7, 结果紫穗槐-4,11-二烯产量达到 235 mg/L, 是优化前的 7.2 倍, 菌体生长抑制基本消除。

#### 2.4 不同宿主合成紫穗槐-4,11-二烯

为考察优化过的紫穗槐-4,11-二烯合成途径对不同宿主的影响, 我们以菌株 *E. coli* BL21(DE3) 为宿主, 共转化表达载体 pET28-E-MK-ADS 和 pAOC3-ES-MD-ispA-ADS, 摇瓶培养 60 h 的紫穗槐-4,11-二烯产量为 201 mg/L, 菌体生长正常。说明我们构建青蒿素前体的合成途径对不同的大肠杆菌具有通用性。

### 3 讨论

本研究以基因组改造过的菌株 *E. coli* DHGT7 为宿主, 构建质粒载体引入异源的类异戊二烯合成途径, 成功合成了目的产物青蒿素前体——紫穗槐-4,11-二烯, 产量达到 235 mg/L, 是 Kong 等<sup>[17]</sup>报道的国内最高产量的近 2 倍, 稍低于 2009 年 Tsuruta 等<sup>[8]</sup>报道的最高产量 275 mg/L。同时, 我们以 *E. coli* BL21(DE3) 为宿主, 也获得了紫穗槐-4,11-二烯。说明我们构建的青蒿素前体的合成途径对不同的大肠杆菌具有通用性。

大肠杆菌能通过内源的 DXP 途径合成 FPP, 但水平较低。我们在大肠杆菌中引入人工合成的紫穗槐-4,11-二烯合酶基因, 内源的 FPP 不足限制了紫穗槐-4,11-二烯产量, 因此提高胞内 FPP 水平是提高紫穗槐-4,11-二烯产量的关键。为了避免对内源 DXP 途径的干扰, 我们引入了粪肠球菌来源的 MVA 途

径, 以提高胞内 FPP 的水平, 使紫穗槐-4,11-二烯产量提高了 13.3 倍, 达到 151 mg/L。

在类异戊二烯合成途径中, 中间代谢产物如 HMG-CoA、IPP、DMAPP 和 FPP 等积累, 会抑制菌体的生长<sup>[6]</sup>。Anthony 等<sup>[7]</sup>证明甲羟戊酸激酶是合成途径的限速酶, 提高胞内甲羟戊酸激酶的水平可以极大地提高紫穗槐-4,11-二烯产量; 而当甲羟戊酸激酶不足时, 会导致甲羟戊酸的积累, 但甲羟戊酸几乎不影响菌体生长。我们通过提高紫穗槐-4,11-二烯合酶、HMG-CoA 还原酶和甲羟戊酸激酶等 3 个酶的水平, 使紫穗槐-4,11-二烯产量提高了 7.2 倍。

值得指出的是, 在大肠杆菌中引入异源的 MVA 途径合成类异戊二烯需要消耗大量的乙酰辅酶 A, 但这并不会对菌体生长产生不利影响, 也不会因为乙酰辅酶 A 不足降低产物产量。Tabata 等<sup>[18]</sup>在大肠杆菌中构建甲羟戊酸合成途径, 以内源的乙酰辅酶 A 为底物合成甲羟戊酸的产量达到 47 g/L。Choi 等<sup>[19]</sup>和 Kang 等<sup>[20]</sup>也分别利用大肠杆菌内源的乙酰辅酶 A 合成 PHB 达到 89.8 g/L 和细胞干重的 85.8%。

另外, 我们以低拷贝的质粒载体 pACYCDuet-1 为基础, 构建了具有特殊多克隆位点的表达载体 pAOC3ANL。采用单个低拷贝质粒载体表达整个合成途径的基因, 用另一相容的高拷贝表达载体 pET28a 来增加限速酶基因的拷贝数, 协调合成途径的表达, 避免了多质粒载体的不相容性影响。

我们采用 FM2G 培养基摇瓶培养, 在其表面覆盖 20% 的十二烷, 这是因为目的产物紫穗槐-4,11-二烯在水相中易挥发, 超过 97% 的紫穗槐-4,11-二烯可被覆盖在培养基表面的十二烷有机层“捕获”<sup>[5]</sup>, 而十二烷本身不会被菌体代谢, 且对菌体的生长无副作用<sup>[21]</sup>。Newman 等<sup>[5]</sup>利用这种含十二烷的两相分配封闭反应器获得紫穗槐-4,11-二烯产量达到 0.5 g/L。

本研究构建的合成紫穗槐-4,11-二烯的工程菌以阿拉伯糖为诱导物, 避免了文献中大量采用的



IPTG 诱导的缺点。IPTG 是有毒且有异味的物质，不适宜在大规模工业化生产中应用。而阿拉伯糖则不存在上述缺点，而且来源丰富，在规模化生产上将具有明显的优势。

本研究利用大肠杆菌为宿主，构建异源紫穗槐-4,11-二烯从头合成途径，并对合成途径进行优化，通过提高紫穗槐-4,11-二烯合酶、HMG-COA 还原酶和甲羟戊酸激酶等 3 个酶的水平，消除了抑制菌体生长的不利因素，使紫穗槐-4,11-二烯产量达到 235 mg/L。继续对培养基和培养条件等进行优化，或通过上罐发酵，将获得更高的紫穗槐-4,11-二烯产量。这为高效生物合成抗疟药青蒿素前体——紫穗槐-4,11-二烯奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 1985, 228(4703): 1049–1054.
- [2] Olumese P. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World Health Organization Press, 2006: 1–2.
- [3] White NJ. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science*, 2008, 320(5874): 330–334.
- [4] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796–802.
- [5] Newman JD, Marshall J, Chang M, et al. High-level production of amorpha-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95(4): 684–691.
- [6] Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, et al. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2007, 9(2): 193–207.
- [7] Anthony JR, Anthony LC, Nowroozi F, et al. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene. *Metab Eng*, 2009, 11(1): 13–19.
- [8] Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, et al. High-Level production of amorpha-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2009, 4(2): e4489.
- [9] Lindahl AL, Olsson ME, Mercke P, et al. Production of the artemisinin precursor amorpha-4,11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(8): 571–580.
- [10] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 2006, 440(7086): 940–943.
- [11] Ro DK, Ouellet M, Paradise EM, et al. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. *BMC Biotechnol*, 2008, 8: 83.
- [12] Acton N, Roth RJ. On the conversion of dihydroartemisinic acid into artemisinin. *J Org Chem*, 1992, 57(13): 3610–3614.
- [13] Haynes RK, Vonwiller SC. Cyclic peroxyacetal lactone, lactol and ether compounds: US, 5420299. 1995-05-30.
- [14] Wallaart TE, Bouwmeester HJ. DNA encoding amorpha-4,11-diene synthase: EP, 0982404. 2000-03-01.
- [15] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1232–1235.
- [16] Bouwmeester HJ, Wallaart TE, Janssen MH, et al. Amorpha-4,11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis. *Phytochemistry*, 1999, 52(5): 843–854.
- [17] Kong JQ, Wang W, Wang LN, et al. The improvement of amorpha-4,11-diene production by a yeast-conform variant. *J Appl Microbiol*, 2009, 106(3): 941–951.
- [18] Tabata K, Hashimoto S. Production of mevalonate by a metabolically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(19): 1487–1491.
- [19] Choi JI, Lee SY. High level production of supra molecular weight poly(3-hydroxybutyrate) by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2004, 9(3): 196–200.
- [20] Kang Z, Wang Q, Zhang HJ, et al. Construction of a stress-induced system in *Escherichia coli* for efficient polyhydroxyalkanoates production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(2): 203–208.
- [21] Daugulis AJ, Janikowski TB. Scale-up performance of a partitioning bioreactor for the degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Sphingomonas aromaticivorans*. *Biotechnol Lett*, 2002, 24(8): 591–594.