

RBS 文库调控重组大肠杆菌 β -胡萝卜素合成途径关键基因提高 β -胡萝卜素合成能力

戴冠苹^{1,2,3*}, 孙涛^{1,2,3*}, 苗良田^{1,2,3}, 李清艳^{2,3}, 肖冬光¹, 张学礼^{2,3}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

戴冠苹, 孙涛, 苗良田, 等. RBS 文库调控重组大肠杆菌 β -胡萝卜素合成途径关键基因提高 β -胡萝卜素合成能力. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1193–1203.

Dai GP, Sun T, Miao LT, et al. Modulating expression of key genes within β -carotene synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli* with RBS library to improve β -carotene production. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1193–1203.

摘要: β -胡萝卜素属于类胡萝卜素家族的一员, 在药品、保健品、化妆品和食品行业有广泛的应用。本研究通过用 RBS 文库对重组大肠杆菌 CAR005 中 β -胡萝卜素合成途径的关键基因 *dxs*、*idi* 和 *crt* 操纵子进行调控来提高 β -胡萝卜素合成能力。研究发现 3 个基因分别用 RBS 文库调控后, 与起始菌株相比 β -胡萝卜素产量最高分别有 7%、11% 和 17% 的提高, 表明使用 RBS 文库调控比使用多个固定强度启动子调控能筛选到更有利于目标产品合成的基因表达强度。三基因组合调控后, β -胡萝卜素产量相对于 CAR005 菌株提高了 35%。同时发现, 单基因文库筛选到的最优强度对于组合调控来说, 未必是最优强度。本研究为利用基因表达调控优化目标产物合成途径提供了一种新的方案。

关键词: β -胡萝卜素, RBS 文库, 基因表达调控, 大肠杆菌

Received: November 9, 2013; **Accepted:** December 13, 2013

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA00800), Tianjin Key Technology R&D Program of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (No. 12ZCZDSY14700), National Natural Science Foundation of China (No. 31100047), the Hundred Talent Program of the Chinese Academy of Sciences.

Corresponding author: Xueli Zhang. Tel/Fax: 86-22-84861983; E-mail: zhang_xl@tib.cas.cn
Qingyan Li. Tel/Fax: 86-22-84861946; E-mail: li_qy@tib.cas.cn

*These authors contributed equally to this work.

国家基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CBA00800), 天津市科技支撑计划重点项目 (No. 12ZCZDSY14700), 国家自然科学基金 (No. 31100047), 中国科学院百人计划资助。

网络出版时间: 2014-02-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130570.html>

Modulating expression of key genes within β -carotene synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli* with RBS library to improve β -carotene production

Guanping Dai^{1,2,3*}, Tao Sun^{1,2,3*}, Liangtian Miao^{1,2,3}, Qingyan Li^{2,3}, Dongguang Xiao¹, and Xueli Zhang^{2,3}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: β -carotene belongs to carotenoids family, widely applied in pharmaceuticals, nutraceuticals, cosmetics and food industries. In this study, three key genes (*dxs*, *idi*, and *crt* operon) within β -carotene synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli* strain CAR005 were modulated with RBS Library to improve β -carotene production. There were 7%, 11% and 17% increase of β -carotene yield respectively after modulating *dxs*, *idi* and *crt* operon genes with RBS Library, demonstrating that modulating gene expression with regulatory parts libraries would have more opportunities to obtain optimal production of target compound. Combined modulation of *crt* operon, *dxs* and *idi* genes led to 35% increase of β -carotene yield compared to parent strain CAR005. The optimal gene expression strength identified in single gene modulation would not be the optimal strength when used in combined modulation. Our study provides a new strategy for improving production of target compound through modulation of gene expression.

Keywords: β -carotene, RBS library, modulation of gene expression, *Escherichia coli*

β -胡萝卜素 (β -carotene) 是类胡萝卜素家族中的典型代表, 是一种优良的天然黄色色素, 在人体和动物体内可以转化为维生素 A, 同时其本身具有良好的预防“3C”即癌症、心血管疾病和白内障的作用, 也能提高机体的免疫功能, 兼具有较高的营养价值和药用价值^[1-4]。世界上已有 50 多个国家地区批准使用, 目前广泛应用于食品、药品、化妆品和保健品行业^[5-6]。随着合成生物学的发展, 通过构建微生物细胞工厂生产生物基化学品因其具有绿色清洁的生产工艺和更高的生产特异性而得到越来越多的关注^[4,7]。

自然界中的多种生物均能合成 β -胡萝卜素^[8-10]。大肠杆菌遗传背景清楚、操作简单, 以大肠杆菌作为出发菌株, 运用代谢工程手段构

建生产类胡萝卜素的基因工程菌, 已成为包括 β -胡萝卜素在内的多种类胡萝卜素产品生产的新模式^[11-15]。对产 β -胡萝卜素大肠杆菌的遗传改造主要集中在过表达大肠杆菌自身的 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸途径 (MEP 途径) 中的关键基因和过表达外源的甲羟戊酸途径 (MVA 途径)。Yuan 等^[11]为了鉴定 MEP 途径的限速步骤, 利用同源重组的方法, 用 T5 启动子在染色体上分别替换了 MEP 途径的各基因的启动子, 发现调控 *dxs*、*idi*、*ispB*、*ispDF* 基因后, β -胡萝卜素产量分别提高了 100%、40%、20%和 40%。用 T5 启动子对这 4 个基因进行组合调控后, β -胡萝卜素产量提高了 6.3 倍, 达到 6 mg/g 干重细胞。Suh^[16]用强启动子 T5 调控 MEP 途径的

关键基因 *dxs*、*idi* 和 *ispDF* 后, β -胡萝卜素产量比对照提高了 4.5 倍。Yoon 等将 MVA 途经的下游 3 个基因和 β -胡萝卜素合成相关基因以质粒形式在大肠杆菌中过表达, 在外源添加甲羟戊酸的情况下, 产量达 503 mg/L, 含量达 49.3 mg/g 细胞干重^[12-13]。Nam 等以质粒形式过表达 MEP 途径中的 *dxs* 基因和外源 MVA 途径基因, 将 β -胡萝卜素产量提高到 2.47 g/L^[17]。

以前的绝大部分研究都是使用强启动子(如 T7、T5 和 Trc) 来调控 MEP 或 MVA 途径中的关键基因, 从而提高 β -胡萝卜素的合成能力。然而, 研究表明强启动子对于获得目的产物的最大代谢流量来说并不一定是最优的^[18-20]。

我们首次用多个固定强度的调控元件去调控 MEP 途径各基因的表达, 发现 MEP 途径中的关键基因为 *dxs* 和 *idi* 基因; 并且证明使用多个不同强度的调控元件对基因表达进行调控比仅使用强启动子调控更为有效^[21]。我们用同样方法对 β -胡萝卜素合成途径的 5 个模块进行系统研究, 得到 CAR005 菌株, β -胡萝卜素产量达 2.16 g/L, 含量达 60 mg/g 干重细胞^[22]。选取多个固定强度的调控元件虽然比仅使用强启动子更能获得较好的表达强度, 但是由于调控元件的数量和强度范围有限, 往往也并不能获得最优的表达强度。

原核生物 mRNA 上的核糖体结合位点(RBS) 是位于起始密码子 AUG 上游 3-9 个富含嘌呤核苷酸的序列, 与核糖体小亚基 16sRNA 富含嘧啶的序列互补, 是核糖体 RNA 识别和结合的位点。RBS 的序列和蛋白翻译速率密切相关, 能显著影响目的蛋白的表达量。我们前期利用 RBS 文库(序列为 CAGGAGRNNNNNN) 调控了 *E. coli* ATCC 8739 染色体上的 β -半乳糖

苷酶基因 (*lacZ*), 随机选 29 个菌测定 β -半乳糖苷酶活性, 活性范围是 *lacZ* 基因原始启动子经 IPTG 诱导后的 0.17-8.6 倍, 说明 RBS 文库可以有效调控基因, 并且调控范围较大^[23]。本研究拟用 RBS 区文库对 CAR005 中 β -胡萝卜素代谢途径的关键基因进行精确调控, 研究其是否比使用多个固定强度调控元件更有利于 β -胡萝卜素的生产, 同时也为代谢工程中基因表达的精确调控提供一种新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

氯苄青霉素和氯霉素购自上海生工生物工程有限公司; 质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; DNA 回收试剂盒购自美国 Biomiga 公司; PrimeSTAR HS DNA 聚合酶, DNA Marker trans2K, 购自大连宝生物工程公司; 限制性内切酶 *Pac* I、*Bam*H I、*Dpn* I、T4 DNA 连接酶、快连酶、T4 多聚核苷酸激酶购自 NEB 公司; 胡萝卜素标品购自美国 Sigma 公司 (Cat. No. C4582); 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计, Shimadzu UV-2550 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan); PCR 扩增仪, Eppendorf Mastercycler gradient; 全自动凝胶成像系统, AlphaImager HP; 电转仪 MicroPulser; 台式高速离心机, Eppendorf 5415D; 高速冷冻离心机, Thermo Sorvall Evolution RC; 高效液相色谱, Agilent Technologies Series 1200。

1.1.3 菌株

本研究所用的菌株见表 1。

表 1 本研究所用的菌株

Table 1 Strains used in this study

Relative characteristics		Sources
Strains		
M1-93	ATCC 8739, FRT-Km-FRT::M1-93::lacZ	[24]
CAR005	ATCC 8739, <i>ldhA</i> ::M1-93::crtEXYIB, M1-37::dxs, M1-46::idi M1-46::sucAB, M1-46::sdhABCD, M1-46::talB	[22]
dxs15	CAR005, RBSL15::dxs	This work
Idi10	CAR005, RBSL10::idi	This work
crtE3	CAR005, RBSL3::crtE	This work
crtE3-dxs3	crtE3, RBSL3::dxs	This work
crtE3-dxs3-idi20	crtE3-dxs3, RBSL20::idi	This work
Plasmids		
pKD46	<i>bla</i> β <i>exo</i> (Red recombinase), temperature-conditional replicon	[25]
pXZ-CS	<i>bla</i> ; <i>cat-sacB</i> cassette	[26]

1.2 方法

1.2.1 培养基

LB 培养基：每升培养基包含 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物和 5 g 氯化钠；氨苄青霉素、氯霉素终浓度分别为 100、34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。LB 固体培养基含 1.5% 的琼脂。

无盐蔗糖培养基：每升培养基包含 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物和 10% 的蔗糖。无盐蔗糖固体培养基含 1.5% 的琼脂。好氧培养：将保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的菌种在 LB 平板上划线活化，挑取单菌落接种到 15 mm \times 100 mm 试管 (含 4 mL LB 培养基) 中， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养 24 h，1% 的接种量转接到 100 mL 三角瓶 (含 10 mL LB 培养基) 中， $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养 24 h。收集菌液用于测定 β -胡萝卜素含量。

1.2.2 RBS 文库调控 β -胡萝卜素合成途径关键基因

本研究通过两步同源重组的方法构建基因

的 RBS 文库，获得的重组菌株中无抗生素基因和 FRT 序列残留^[24]。第一步同源重组，在将要调控的基因 ATG 的前面插入一个 *cat-sacB* 基因片段。第二步同源重组中，*cat-sacB* 基因簇被带有 RBS 文库的 DNA 片段取代。含 RBS 文库的 DNA 片段是由一对长引物，以 M1-93 基因组 DNA 为模板，PCR 扩增而来；上游引物包括待调控基因原始启动子外的 50 bp 碱基和与 M1-93 的人工启动子同源的 20 bp 碱基。下游引物包括待调控基因的起始密码子后的 50 bp 碱基 (基因的正 1 到 +50 区)、RBS 区兼引物片段 (CAGGAGRNNNNNN) 和与 M1-93 的人工启动子同源的 21 bp 碱基。两步同源重组的步骤见图 1。克隆的筛选是通过在含有蔗糖的无盐 LB 培养基中培养完成的。在蔗糖存在的情况下，表达 *sacB* 基因的菌株因为在培养过程中积累果聚糖对细胞产生毒性而被杀死。*cat-sacB* 基因簇被替换掉的细胞通过富集而被筛选出来^[21-23]。

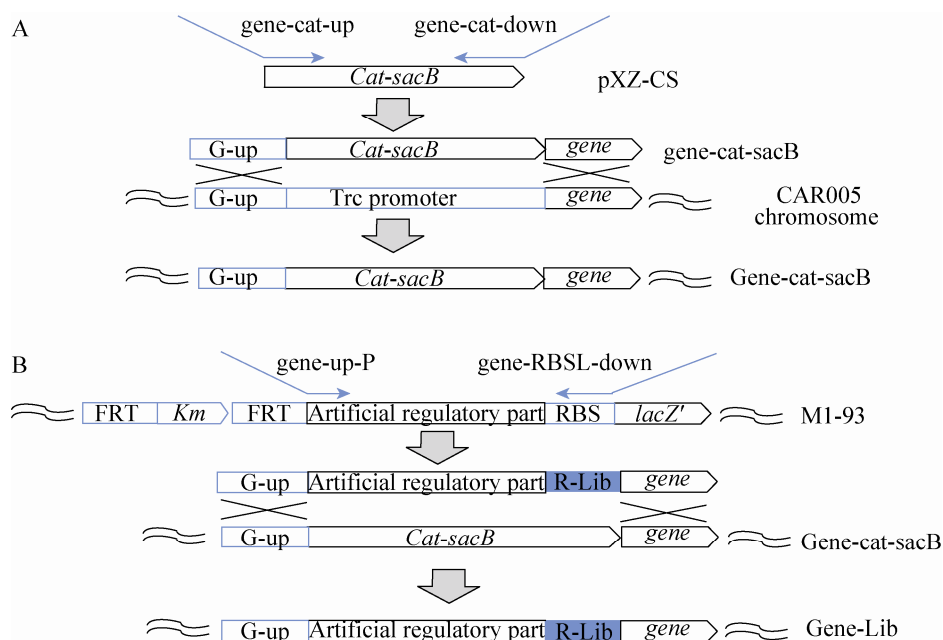


图1 RBS文库构建流程图 (A: 第一步同源重组; B: 第二步同源重组)

Fig. 1 Modulation of gene expression with RBS library by the two-step recombination method. (A) The first recombination step. (B) The second recombination step.

对于 *dxs* 基因, 使用 *dxs-cat-F/dxs-cat-R* 引物 (表 2), 以 pXZ-CS^[26] 为模板, PCR 扩增出 DNA 片段, 将该片段纯化后电转入含有 pKD46^[25] 的待调控菌株 CAR005 的感受态细胞中, 在含有氨苄青霉素、氯霉素的 LB 平板中培养过夜。挑选单克隆, 用引物 *cat-up/dxs-381-down* 进行 PCR 验证 (表 2), 验证正确的克隆命名为 *Dxs-cat-sacB*。另外, 使用 *dxs-up-p/dxs-RBSL-down* 引物 (表 2), 以 M1-93 菌株的基因组 DNA 模板, PCR 扩增出 RBS 库片段, 将该片段纯化后电转入 *Dxs-cat-sacB* 的感受态细胞中, 在 250 mL 三角瓶 (含 50 mL 无盐蔗糖培养基) 中培养 12 h。然后将菌液稀释、涂布到 2 个无盐蔗糖平板上, 37 °C 过夜培养。每个平板得到 300 个左右重组子, 共 600 个左右重组子。随机挑取 100 个克隆分别在氯霉素平板和 LB 平

板上进行初筛, 90% 以上都为重组成功菌株 (不能在氯霉素平板上生长)。随机选 5 个菌株测序, RBS 区域的序列各不相同, 表明库的多样性比较丰富。

随机挑选 30 个单克隆, 用引物 *p-yanzheng/dxs-381-down* (表 2) 进行 PCR 验证, 挑选 15 个验证正确、颜色比较黄的克隆命名为 *dxs1*、*dxs2*、...、*dxs15*, 用于测定 β -胡萝卜素产量。采用同样的方法调控 *idi* 基因和 *crt* 操纵子, 所用的引物序列见表 2。

1.2.3 RBS 文库组合调控 β -胡萝卜素合成途径关键基因

采用上述两步同源重组法, 对 β -胡萝卜素合成途径中的 3 个关键基因 (包括 *dxs*、*idi* 和 *crt* 操纵子) 进行组合调控。组合调控方法为: 选取单基因调控后产量提高最高的菌株 *crtE3*

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this work

Primers	Sequences (5'-3')
Modulation of <i>dxs</i> gene with RBS library	
<i>dxs</i> -cat-F	ACTACATCATCCAGCGTAATAAATAAACAAATAAGTATTAATAGGCCCTG TGTGACGGAAGATCACTTCGCA
<i>dxs</i> -cat-R	GTGGAGTCGACCAGTGCCAGGGTCGGGTATTTGGCAATATCAAACTCAT TTATTTGTTAACTGTTAATTGTCCT
<i>dxs</i> -up-p	ACTACATCATCCAGCGTAATAAATAAACAAATAAGTATTAATAGGCCCTG TTATCTCTGGCGGTGTTGAC
<i>dxs</i> -RBSL-down	GTGGAGTCGACCAGTGCCAGGGTCGGGTATTTGGCAATATCAAACTCATNNNN NNYCTCCTGGTTTAAACGTACATG
<i>cat</i> -up	ATGAAACCGCTGATTGCATCTA
<i>p</i> -yanzheng	TTATCTCTGGCGGTGTTGAC
<i>dxs</i> -381-down	GATGGAGGTTGATGAATGC
Modulation of <i>idi</i> gene with RBS library	
<i>idi</i> -cat-F	TCACTTGGTTAATCATTTCCTTCAATTATCTATAATGATGAGTGATC TGTGACGGAAGATCACTTCGCA
<i>idi</i> -cat-R	CCCGTGGGAACCTCCCTGTGCATTCAATAAAATGACGTGTTCCGTTTGCAT TTATTTGTTAACTGTTAATTGTCCTTG
<i>idi</i> -up-p	TCACTTGGTTAATCATTTCCTTCAATTATCTATAATGATGAGTGATC TTATCTCTGGCGGTGTTGAC
<i>idi</i> -RBSL-down	CCCGTGGGAACCTCCCTGTGCATTCAATAAAATGACGTGTTCCGTTTGCATNNNN NNYCTCCTGGTTTAAACGTACATG
<i>idi</i> -483-down	CGTGGCATCAATACCGTGTA
Modulation of <i>crt</i> operon with RBS library	
<i>ldhA</i> -cat-F	ATTAAATTTGAAATTTTGTAATAATTTTTAGTAGCTTAAATGTGATTCATGTG ACGGAAGATCACTTCGCA
<i>crtE</i> -cat-R	GCATCGCTGTGTATGAAATTGACGTGTTGTTCTGCACAGACCGTCATCAT TTATTTGTTAACTGTTAATTGTCCTTG
<i>ldhA</i> -up-p	TTCAATTAATTTGAAATTTTGTAATAATTTTTAGTAGCTTAAATGTGATT CATTATCTCTGGCGGTGTTGAC
<i>crtE</i> -RBSL-down	GCATCGCTGTGTATGAAATTGACGTGTTGTTCTGCACAGACCGTCATCAT NNNNNNYCTCCTGGTTTAAACGTACATG
<i>crtE</i> -340-down	CGACATGTTACCATACTG

为出发菌株,对 *dxs* 基因进行 RBS 文库调控,挑选 30 个验证正确、颜色较黄的克隆命名为 *crtE3-dxs1*、*crtE3-dxs2*、...、*crtE3-dxs30*,用于测定 β -胡萝卜素产量。同时,使用引物 *dxs*-up-p/*dxs*-381-down (表 2) 以 *dxs* 单基因 RBS

文库调控后产量最高的菌株 *dxs15* 为模板,PCR 扩增出 DNA 片段,利用该调控元件调控 *crtE3* 菌株的 *dxs* 基因,筛选验证正确的菌株,命名为 *crtE3-dxs15A*,用于测定 β -胡萝卜素产量。采用同样的方法,选取 *crt* 操纵子和 *dxs* 基因组组合调

控后产量最高的菌株为出发菌株,对 *idi* 基因进行 RBS 文库调控。

1.2.4 β -胡萝卜素产量的检测方法

通过测定丙酮萃取的 β -胡萝卜素在 453 nm 下的吸光度来确定 β -胡萝卜素产量。取 500 μ L 菌液于 14 000 r/min 离心 3–5 min, 无菌水清洗后, 用 1 mL 丙酮悬浮沉淀, 在 55 $^{\circ}$ C 黑暗条件下萃取 15 min, 然后将样品在 14 000 r/min 下离心 10 min, 将含有 β -胡萝卜素的上清转入新的离心管中。紫外分光光度计 453 nm 下测定 β -胡萝卜素吸光度值, 并计算其对细胞浊度 (OD_{600}) 的相对值, 表示单位菌体 β -胡萝卜素的相对产量。

2 结果与分析

2.1 关键基因 *dxs*、*idi* 和 *crt* 操纵子单独调控

我们构建产 β -胡萝卜素重组大肠杆菌 CAR005 时, 发现 *dxs*、*idi* 和 *crt* 操纵子是 β -胡萝卜素合成途径中的关键基因。本研究从 CAR005 出发, 使用两步同源重组方法 (图 1), 分别构建了 *dxs*、*idi* 和 *crt* 操纵子的 RBS 文库, 分别随机挑选 15 个菌株, 测定 β -胡萝卜素产量, 以验证 RBS 文库调控是否优于固定强度调控, 并进一步提高重组菌株中 β -胡萝卜素产量, 结果见图 2。

由图 2 可知, 3 个基因构建 RBS 文库后, 都筛选到 β -胡萝卜素产量提高的菌株, *dxs* 基因调控后, β -胡萝卜素产量最高菌株为 *dxs15*, 相对于 CAR005 产量提高了 7%。*idi* 基因调控后, β -胡萝卜素产量最高菌株为 *idi10*, 相对于 CAR005 产量提高了 11%。*crt* 操纵子调控后, β -胡萝卜素产量最高菌株为 *crtE3*, 相对于 CAR005 产量提高了 17%。不过 *crt* 操纵子基因

调控后菌体生长有所下降。因为出发菌株 CAR005 中 *dxs*、*idi* 和 *crt* 操纵子的调控元件为固定强度中选出的最优强度, RBS 文库调控后均得到 β -胡萝卜素产量提高的菌株, 表明 RBS 文库调控相对于多个固定强度调控, 能筛选到更有利于 β -胡萝卜素合成的表达强度。单基因调控 β -胡萝卜素产量最高菌株的 RBS 序列见表 3。

2.2 *crt* 操纵子和 *dxs* 基因组合调控结果

三基因分别调控后, 调控 *crt* 操纵子的文库中挑到产量最高的菌株 *crtE3*, 产量相对于 CAR005 提高了 17%, 而另外两个基因文库调控后产量最高的分别提高了 7% 和 11%, 因此从 *crtE3* 出发, 文库调控 *dxs* 基因。同时, 用 *dxs* 的 RBS 文库中产量最高的菌株 *dxs15* 的调控元件去调控 *crtE3* 中的 *dxs* 基因。由图 3 可知, 组合调控 *crt* 操纵子和 *dxs* 基因后, 只有 *crtE3-dxs3* 和 *crtE3-dxs4* 产量比 *crtE3* 略高, β -胡萝卜素产量分别是 CAR005 的 1.19 倍和 1.18 倍, 表明在 *crtE3* 菌株中, *dxs* 基因的表达强度已经不是 β -胡萝卜素合成的限制因素。另外, *dxs15* 的调控元件调控 *crtE3* 的 *dxs* 基因后, β -胡萝卜素产量相对于 CAR005 只提高了 8%, 而相对于 *crtE3* 产量反而有所下降。表明单基因文库筛选到的最优强度对于组合调控来说, 未必是最优的强度。 β -胡萝卜素产量最高菌株 *crtE3-dxs3* 的 *dxs* 基因的 RBS 序列见表 3。

2.3 *crt* 操纵子、*dxs* 和 *idi* 基因组合调控结果

选取两基因组合调控 β -胡萝卜素产量最高的菌株 *crtE3-dxs3* 为出发菌株, 进一步使用 RBS 文库及 *idi* 的 RBS 文库中产量最高的菌株 *idi10* 的调控元件去调控 *idi* 基因。由结果可知 (图 4), 组合调控 *crt* 操纵子、*dxs* 和 *idi* 基因后, β -胡

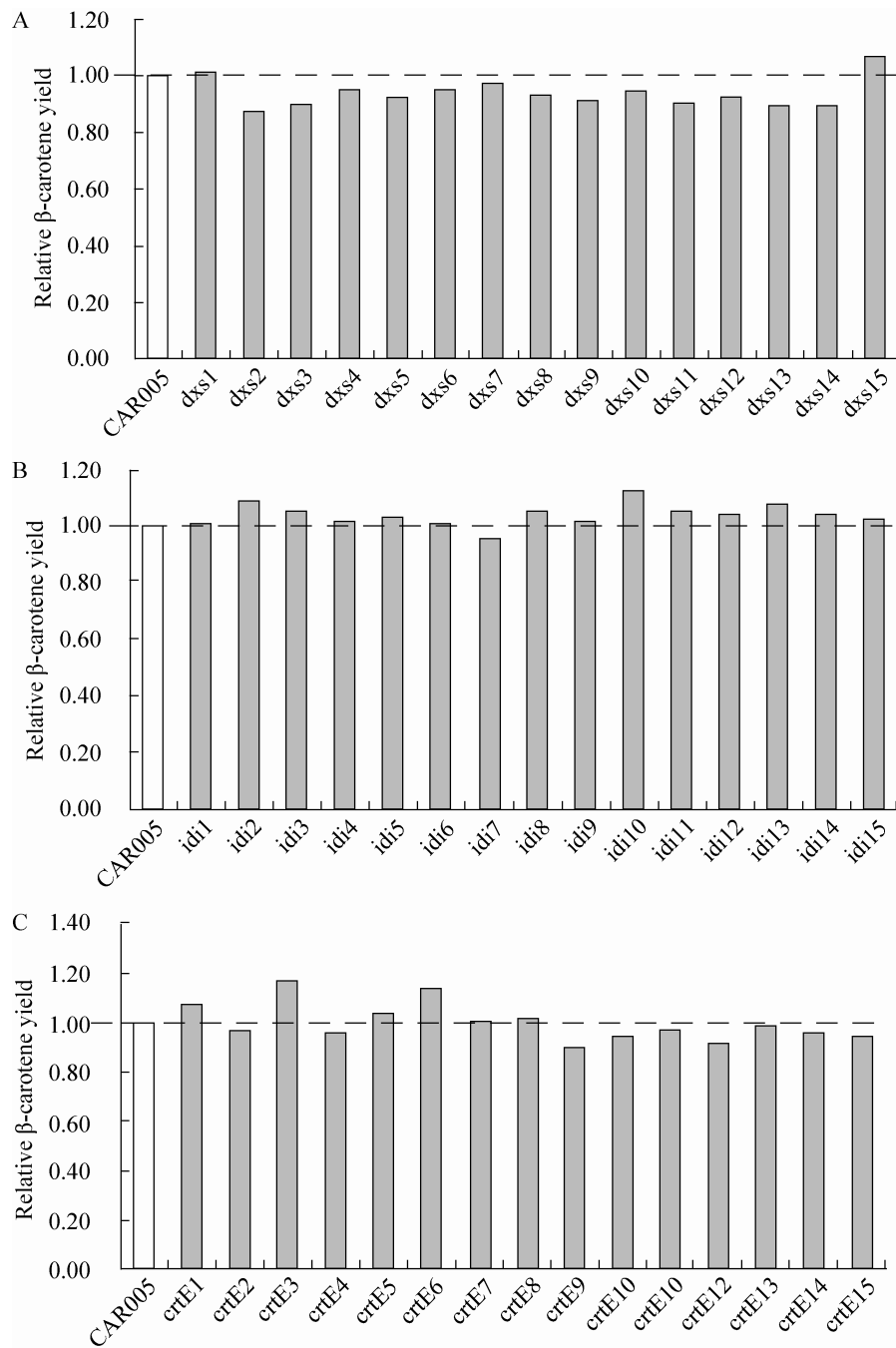
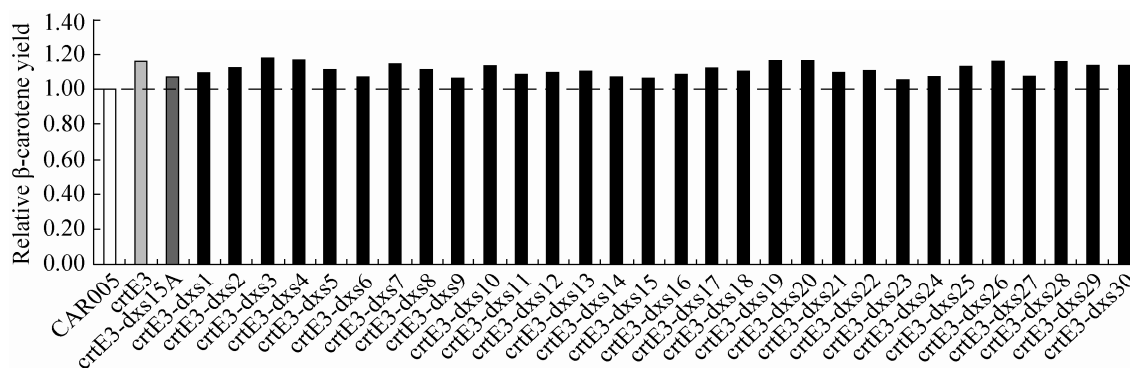
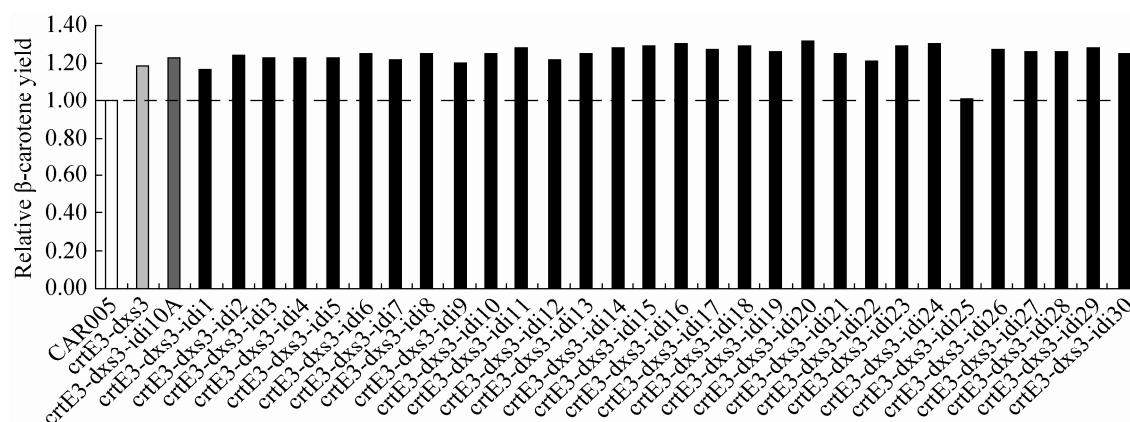


图 2 RBS 文库调控 *dxs*, *idi* 和 *crt* 操纵子后 β -胡萝卜素相对产量 (A: RBS 文库调控 *dxs* 基因; B: RBS 文库调控 *idi* 基因; C: RBS 文库调控 *crtE* 操纵子)

Fig. 2 Relative β -carotene production by *E. coli* strains after modulating *dxs*, *idi* and *crt* operon of strain CAR005 with RBS libraries. β -carotene yield was compared to parent strain CAR005. (A) Modulating *dxs* gene. (B) Modulating *idi* gene. (C) Modulating *crtE* operon.

表 3 代表性菌株的 *dxs*、*idi* 和 *crt* 基因的 RBS 序列Table 3 RBS sequence of *dxs*, *idi* and *crt* genes of representative strains

Strains	Gene	Sequence ^a
dxs15	<i>dxs</i>	<u>CAGGAGGGTAGACATG</u>
idi10	<i>idi</i>	<u>CAGGAGGTACATAATG</u>
crtE3	<i>crtE</i>	<u>CAGGAGGAACGGCATG</u>
crtE3-dxs3	<i>dxs</i>	<u>CAGGAGACACTGTATG</u>
crtE3-dxs3-idi20	<i>idi</i>	<u>CAGGAGACTGAAGATG</u>

^a The RBS sequences are underlined.图 3 *crt* 操纵子和 *dxs* 基因组合调控后 β -胡萝卜素相对产量Fig. 3 Relative β -carotene yield after combined modulation of *crt* operon and *dxs* genes expression.图 4 *crt* 操纵子、*dxs* 和 *idi* 基因组合调控后 β -胡萝卜素相对产量Fig. 4 Relative β -carotene yield after combined modulation of *crt* operon, *dxs* and *idi* genes expression.

胡萝卜素产量有明显提高,所选的 30 个菌株中,28 个菌株的 β -胡萝卜素产量均高于出发菌株 crtE3-dxs3。产量最高菌株 crtE3-dxs3-idi20 的 β -胡萝卜素产量是 CAR005 的 1.32 倍。另外, *idi* 单基因 RBS 文库得到的最优强度调控 crtE3-dxs3 的 *idi* 基因后, β -胡萝卜素产量仅为 CAR005 的 1.23 倍,远低于文库调控所得的最高产量菌株,进一步说明单基因文库筛选到的最优强度对于组合调控来说,未必是最优强度。

将所有 RBS 文库调控中产量最高的菌株,一起做 3 个重复,结果见图 5。由结果可知,建库时只挑一个克隆去培养测定的结果与 3 次重复结果基本是一致,说明建库时挑多个克隆、不设重复去筛选高产菌株的方法可行。经 RBS 文库组合调控 β -胡萝卜素合成途径中的 3 个关键基因后, β -胡萝卜素产量相对于出发菌株提高

了 35%。 β -胡萝卜素产量最高菌株 crtE3-dxs3-idi20 的 *idi* 基因的 RBS 序列见表 3。

3 结论

本文利用 RBS 文库调控的方法对 β -胡萝卜素合成途径中的 3 个关键基因 *dxs*、*idi* 和 *crt* 操纵子进行了单基因调控和组合调控,使 β -胡萝卜素产量提高了 35%。研究发现,使用 RBS 文库调控比使用多个固定强度调控的效果更好,能筛选到更有利于目标产品合成的基因表达强度。同时发现,单基因文库筛选到的最优强度对于组合调控来说,未必是最优强度。本研究为利用基因表达调控优化目标产物合成途径提供了一种新的方案。

REFERENCES

- [1] Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, et al. Intake of carotenoids and retino in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(23): 1767-1776.
- [2] Malvy DJM, Burtschy B, Arnaud J, et al. Serum beta-carotene and antioxidant micronutrients in children with cancer. *Int J Epidemiol*, 1993, 22(5): 761-771.
- [3] Street DA, Comstock GW, Salkeld RM, et al. Serum antioxidants and myocardial infarction are low levels of carotenoids and alpha-tocopherol risk factors for myocardial infarction. *Circulation*, 1994, 90(3): 1154-1161.
- [4] Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, et al. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm*, 2008, 5(2): 167-190.
- [5] Cane DE. Biosynthesis meets bioinformatics. *Science*, 2000, 287(5454): 818-819.
- [6] Lange BM, Rujan T, Martin W, et al. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(24): 13172-13177.

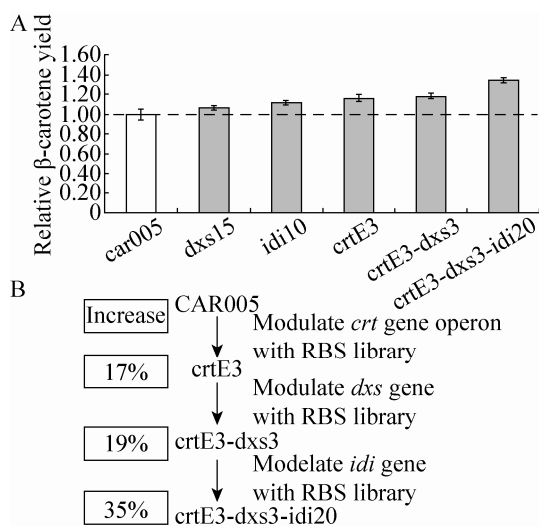


图 5 调控 β -胡萝卜素合成途径关键基因后 β -胡萝卜素的相对产量

Fig. 5 Relative β -carotene yield of engineered *E. coli* strains after modulating key β -carotene synthesis genes expression. Three repeats were performed for each strain, and the error bars represented standard deviation.

- [7] Zhang XL. Twenty years development of metabolic engineering--a review. *Chin J Biotech*, 2009, 25(9): 1285–1295 (in Chinese).
张学礼. 代谢工程发展 20 年. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1285–1295.
- [8] Mehta BJ, Obratsova IN, Cerdá-Olmedo E. Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(7): 4043–4048.
- [9] Hu X, Ma X, Tang P, et al. Improved β -carotene production by oxidative stress in *Blakeslea trispora* induced by liquid paraffin. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(4): 559–563.
- [10] Moline M, Libkind D, van Broock M. Production of torularhodin, torulene, and beta-carotene by *Rhodotorula* yeasts. *Methods Mol Biol*, 2012, 898: 275–283.
- [11] Yuan LZ, Rouvière PE, LaRossa RA, et al. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metab Eng*, 2006, 8(1): 79–90.
- [12] Yoon SH, Park HM, Kim JE, et al. Increased β -carotene production in recombinant *Escherichia coli* harboring an engineered isoprenoid precursor pathway with mevalonate addition. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(3): 599–605.
- [13] Yoon SH, Lee SH, Das A, et al. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β -carotene in *E. coli*. *J Biotechnol*, 2009, 140(3): 218–226.
- [14] Albermann C, Trachtmann N, Sprenger GA. A simple and reliable method to conduct and monitor expression cassette integration into the *Escherichia coli* chromosome. *Biotechnol J*, 2010, 5(1): 32–38.
- [15] Lemuth K, Steuer K, Albermann C. Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for improved *in vivo* biosynthesis of astaxanthin. *Microb Cell Fact*, 2011, 10(1): 29.
- [16] Suh W. High isoprenoid flux *Escherichia coli* as a host for carotenoids production. *Methods Mol Biol*, 2012, 834: 49–62.
- [17] Nam HK, Choi JG, Lee JH, et al. Increase in the production of β -carotene in recombinant *Escherichia coli* cultured in a chemically defined medium supplemented with amino acids. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(2): 265–271.
- [18] Pflieger BF, Pitera DJ, Smolke CD, et al. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(8): 1027–1032.
- [19] Kim SW, Kim JB, Ryu JM, et al. High-level production of lycopene in metabolically engineered *E. coli*. *Process Biochem*, 2009, 44(8): 899–905.
- [20] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(36): 12678–12683.
- [21] Zhao J, Liu Y, Li QY, et al. Modulation of isoprenoid gene expression with multiple regulatory parts for improved beta-carotene production. *Chin J Biotech*, 2013, 29(1): 41–55 (in Chinese).
赵婧, 刘怡, 李清艳, 等. 多个调控元件调控萜类合成途径基因表达提高 β -胡萝卜素的生产. *生物工程学报*, 2013, 29(1): 41–55.
- [22] Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17: 42–50.
- [23] Chen J, Zhu X, Tan Z, et al. Activating C4-dicarboxylate transporters DcuB and DcuC for improving succinate production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(5): 2197–2205.
- [24] Lu J, Tang J, Liu Y, et al. Combinatorial modulation of galP and glk gene expression for improved alternative glucose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(6): 2455–2462.
- [25] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [26] Tan Z, Zhu X, Chen J, et al. Activating phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in combination for improvement of succinate production. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(16): 4838–4844.

(本文责编 郝丽芳)