

甲羟戊酸途径限速步骤研究及其在产番茄红素重组大肠杆菌中的应用

李贞霞¹, 陈倩倩^{1,2}, 唐金磊^{2,3}, 李清艳^{2,3}, 张学礼^{2,3}

1 河南科技学院 园艺园林学院, 河南 新乡 453000

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

李贞霞, 陈倩倩, 唐金磊, 等. 甲羟戊酸途径限速步骤研究及其在产番茄红素重组大肠杆菌中的应用. 生物工程学报, 2020, 36(1): 77-89.

Li ZX, Chen QQ, Tang JL, et al. Role of rate-limiting step of mevalonate pathway in improving lycopene production in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2020, 36(1): 77-89.

摘要: 甲羟戊酸途径 (MVA 途径) 被引入重组大肠杆菌中, 能够提高重组大肠杆菌中萜类化合物的合成能力。但因重组大肠杆菌中萜类化合物合成途径中间产物积累, 导致细胞生长和萜类化合物合成受到限制。本研究在稳定表达 MVA 途径以及优化 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸途径 (MEP 途径)、番茄红素合成途径关键基因表达的重组大肠杆菌 LYC103 中, 用质粒高表达 MVA 途径和番茄红素合成途径关键基因, 挖掘该途径的限速步骤。结果表明, *ispA*、*crtE*、*mvaK1*、*idi* 和 *mvaD* 基因过表达后, 细胞生长没有明显变化, 番茄红素产量依次提高了 13.5%、16.5%、17.95%、33.7% 和 61.1%, 说明这几个基因可能是合成番茄红素的限速步骤。*mvaK1*、*mvaK2*、*mvaD* 三个基因在同一操纵子上, 用 mRNA 稳定区 (RNA stabilizing region) 进行启动子文库 (mRSL) 调控 *mvaK1*, 相当于对 3 个基因同时调控。用高效基因组编辑技术 (CAGO) 对 *mvaK1* 基因的 mRNA 稳定区进行启动子文库的调控, 得到菌株 LYC104。番茄红素产量与对照菌株 LYC103 相比增加了 2 倍, 细胞生长提高了 32%。然后, 利用 CRISPR-Cas9 技术在染色体 *lacZ* 位点整合 *idi* 基因, 得到 LYC105 菌株。与出发菌株 LYC103 相比, 细胞生长提高了 147%, 番茄红素产量增加了 2.28 倍。本研究在染色体上具有完整 MVA 途径的基础上, 利用质粒高表达单个基因挖掘限速步骤, 用同源重组方法整合限速基因、解除限速, 为代谢工程构建高产菌株提供新策略。

关键词: 番茄红素, 甲羟戊酸途径, CRISPR-Cas9 系统, 大肠杆菌

Received: May 13, 2019; **Accepted:** August 30, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31770059, 31770105), the STS Project of the Chinese Academy of Sciences (No. KFJ-SW-STS-164), Key Projects of Henan Provincial Universities (No. 18A210015).

Corresponding authors: Qingyan Li. Tel/Fax: +86-22-84861946; E-mail: li_qy@tib.cas.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31770059, 31770105), 中国科学院 STS 项目 (No. KFJ-SW-STS-164), 河南省高等学校重点项目 (No. 18A210015) 资助。

网络出版时间: 2019-10-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191010.0957.005.html>

Role of rate-limiting step of mevalonate pathway in improving lycopene production in *Escherichia coli*

Zhenxia Li¹, Qianqian Chen^{1,2}, Jinlei Tang^{2,3}, Qingyan Li^{2,3}, and Xueli Zhang^{2,3}

1 School of Horticulture and Garden, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453000, Henan, 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: The introduction of the mevalonate pathway (MVA pathway) in recombinant *Escherichia coli* can improve the synthesis of terpenoids. But the imbalance expression of MVA pathway genes and accumulation of intermediates inhibit cell growth and terpenoids production. In this study, each gene of MVA pathway and key genes of lycopene synthesis pathway were cloned in plasmid to express in the recombinant *E. coli* LYC103 with optimizing the expression of the key genes of the 2-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway (MEP pathway), chromosome recombinant MVA pathway and the lycopene synthesis pathway. The results showed that the overexpression of *ispA*, *crtE*, *mvaK1*, *idi* and *mvaD* genes did not affect the cell growth, while lycopene production increased by 13.5%, 16.5%, 17.95%, 33.7% and 61.1% respectively, indicating that these genes may be the rate-limiting steps for the synthesis of lycopene. *mvaK1*, *mvaK2*, *mvaD* of MVA pathway were the rate-limiting steps and were in an operon. The *mvaK1*, *mvaK2*, *mvaD* operon was regulated by mRS (mRNA stabilizing region) library in front of *mvaK1*, obtaining strain LYC104. Lycopene yield of LYC104 was doubled and cell growth was increased by 32% compared with the control strain LYC103. CRISPR-cas9 technology was used to integrate *idi* into chromosome at *lacZ* site to obtain LYC105 strain. Cell growth of LYC105 was increased by 147% and lycopene yield was increased by 2.28 times compared with that of LYC103. In this study, each gene of lycopene synthesis pathway was expressed in plasmid to certify the rate-limiting gene based on the complete MVA pathway on the chromosome. Then the rate-limiting gene was integrated in chromosome with homologous recombination to release the rate-limiting, which providing a new strategy for the construction of high-yield strains for metabolic engineering.

Keywords: lycopene, mevalonate pathway, CRISPR-Cas9 system, *Escherichia coli*

在自然界中,类胡萝卜素是一类重要的萜类化合物,在许多光合生物(包括细菌、藻类和高等植物)和一些非光合生物中都可以合成^[1]。番茄红素是一种 C40 的类胡萝卜素,作为天然萜类色素,可以从西瓜、番茄等植物的成熟果实中获得。由于番茄红素含有特殊的分子结构,具有很强的消除抗氧化能力和自由基能力,其抗氧化能力分别是胡萝卜素和维生素 E 的 3.2 倍和 100 倍^[2]。番茄红素可以预防皮肤癌、乳腺癌、肺癌和肝癌^[3-4]等疾病。因此,番茄红素能够被广泛应用于保健食品、制药和化妆品行业。

异戊烯焦磷酸 (IPP) 和二甲丙烯焦磷酸酯 (DMAPP) 是合成番茄红素等萜类化合物的前体物质^[5]。在自然界中存在 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸 (MEP) 和甲羟戊酸 (MVA) 两条途径(图 1)合成 IPP 和 DMAPP^[6-7]。大肠杆菌自身具有

MEP 途径,可以合成萜类化合物的前体物质 IPP 与 DMAPP,还可以在大肠杆菌中引入外源甲羟戊酸途径 (MVA 途径) 来提高萜类化合物的前体物质供给。将合成番茄红素的外源基因导入大肠杆菌中,分别是 GGPP 合成酶 *CrtE* (Geranylgeranyl pyrophosphate synthase)、八氢番茄红素合成酶 *CrtB* (Phytoene synthase)、八氢番茄红素脱氢酶 *CrtI* (Phytoene desaturase),经缩合、脱氢、环化等反应生成番茄红素^[8],使不能直接生产类胡萝卜素的大肠杆菌具有合成类胡萝卜素的能力。

近年来,多个研究组对提高重组大肠杆菌中类胡萝卜素产量进行了研究,主要包括 MEP 途径研究^[9-13]、中央代谢途径改造^[14-18]、引入 MVA 途径增加前体物质供应^[19-23]等几个方面。通过 MVA 途径增加萜类化合物前体物质供应,提高重组大肠杆菌类胡萝卜素产量已经有较为详细研究。

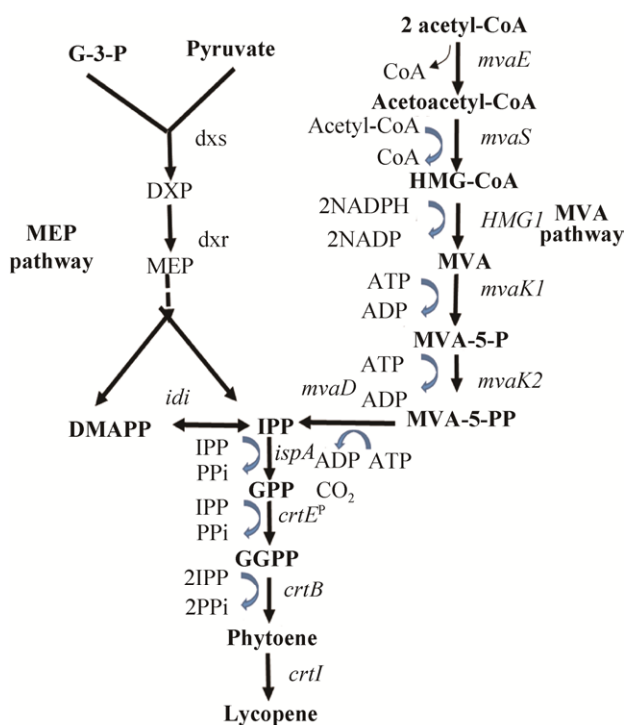


图 1 重组大肠杆菌中番茄红素合成途径

Fig. 1 Lycopene synthetic pathway in recombinant *E. coli*. ---► represents multi-steps reaction.

Vadali 等将 MVA 途径基因引入大肠杆菌, 增加番茄红素合成前体物质 IPP 和 DMAPP 供应, 番茄红素产量提高一倍^[19]。Yoon 等将 MVA 途径的后半部分几个基因引入大肠杆菌中, 并通过增加 MVA 途径中间产物甲羟戊酸, 成功提高番茄红素产量^[20-21]。Anthony 等发现 MVA 途径中甲羟戊酸激酶 (MK) 是一种限速酶^[24], 通过改变限速基因启动子和质粒拷贝数, 目标产物产量提高了 7 倍。但是, 有研究表明甲羟戊酸途径酶表达不平衡可以抑制细胞生长^[5,19]。Pitera 等过表达 MVA 途径上游的几个基因, MVA 途径中间体羟甲基戊二酰辅酶 A (HMGCoA) 积累, 抑制了细胞生长^[5,25]。冯凡等将 MVA 途径分成 3 个代谢元件模块, 并通过调控元件的表达来增强模块功能, 从而使异戊二烯的产量得到提高^[26]。Ye 等将 MVA 途径分成两个模块在染色体上进行整合, 并对两个模块

建库调控, β -胡萝卜素产量提高了 51%^[23]。Wei 等将 MVA 途径分成上下游两个模块基于染色体多位点整合策略, 提高大肠杆菌合成番茄红素的产量^[27]。Ye 等构建 MVA 途径的乙酰辅酶 A 乙酰转移酶/HMG-CoA 还原酶基因 (*mvaE*) 和 *mvaS* 基因等 5 个基因的 RBS 文库, 根据菌株颜色, 筛选到使 β -胡萝卜素产量提高的质粒^[22]。然后将得到协调表达的 MVA 途径基因整合到产番茄红素的重组大肠杆菌的染色体上, 使番茄红素产量提高了 1.19 倍^[5]。

本研究对所得的 LYC102 菌株进行调控得到 LYC103 菌株^[5,28]。LYC103 菌株中 MEP 途径经过精确调控^[13,18,29], 并且在染色体上含有完整的 MVA 途径基因^[5,28]。MVA 途径基因虽然经过 RBS 建库协调表达, 但是可能因为本菌株是单拷贝的染色体表达, 而 Ye 文献^[22]中是多拷贝的质粒表达, 并且本菌株 MVA 途径操纵子又经过了更换启动子的改造, 所以 MVA 途径可能重新出现限速步骤。另外, 在 LYC103 中添加了 MVA 途径, 进一步增加了 IPP/DMAPP 的供应, 下游也可能成为限速步骤, 因此, 确保整合 MVA 途径的菌株中前体物质的平衡供给, 同时寻找并解除下游合成途径中的限速步骤。本研究首次在染色体整合完整 MVA 途径基因的基础上, 将 MVA 途径中的 5 个基因进行研究, 本方法优于对 MVA 途径 5 个基因同时进行研究。另外对番茄红素合成途径下游的异戊烯基焦磷酸异构酶 (*idi*)、香叶醇转移酶 (*ispA*)、GGPP 合成酶基因 (*crtE*) 以单基因、多基因组合等方法在重组大肠杆菌中过量表达, 从而寻找新的限速步骤, 研究细胞生长和番茄红素产量的变化, 并进一步提高番茄红素产量。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen

公司; 氨苄青霉素、氯霉素和 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; DNA Marker、EasyTaq PCR SuperMix DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司; Gold View I 型核酸染色剂, 购自北京索莱宝科技有限公司; PhusionTM 超保真 DNA 聚合酶购自 NEB 公司^[28]; 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养方法

LB 培养基、LB 固体培养基和发酵用的 LB+2% 甘油培养基配制见参考文献[5,32-33]。氨苄青霉素 (Amp)、硫酸卡那霉素 (Kan)、氯霉素

(Cam)终浓度分别为 100、50 和 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的菌种在 LB 平板上划线活化, 按照参考文献方法培养菌体, 用于番茄红素产量测定^[5]。

1.2.2 番茄红素产量测定方法

测定番茄红素产量时, 先取 500 μL 待测菌液, 参考文献所述方法处理样品, 并用液相色谱测定番茄红素产量^[5,29]。

1.2.3 构建单基因质粒菌株

采用环形聚合酶延伸克隆(Circular polymerase extension cloning, CPEC)^[34]的方法构建质粒 (图 2), 以质粒 pSC103 为模板, 通过引物 99A-cpec-F/99A-cpec-R, 扩增质粒骨架, 得到正确的片段大小后, 回收 PCR 所得骨架。提取 LYC103 菌株

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains	Relative characteristics	Sources
<i>E. coli</i> MG1655- ΔpoxB	<i>E. coli</i> MG1655, <i>poxB</i> was replaced by <i>cam</i> marker and N20PAM	[30]
LYC001	ATCC 8739, M1-37:: <i>dxs</i> , M1-46:: <i>idi</i> , M1-93:: <i>crtEIB</i>	[5, 29]
LYC103	LYC102, <i>ldhA</i> :: <i>trc</i> :: <i>crtEIB</i>	[28]
LYC104	LYC103, <i>mRSL-7</i> :: <i>mvaK1</i>	[28]
LYC105	LYC104, <i>LacZ</i> :: <i>trc</i> :: <i>idi</i>	[28]
Plasmids		
pRed_Cas9	Kan, derived from pKD46, <i>exo</i> , <i>bet</i> , <i>gam</i> , arabinose operon, Cas9	[5, 31]
pCAGO	Amp, derived from pKD46, <i>exo</i> , <i>bet</i> , <i>gam</i> , arabinose operon, Cas9, gRNA	[30]
pLacZ-N20	Cat, derived from pACYC184-gRNA, gRNA with N20 and homologous arms of <i>LacZ</i>	Lab collection, [28]
pLacZ-N20- <i>trc-idi</i>	Cat; <i>trc</i> promoter followed by pSC103 amplified from pSC103- <i>idi</i> cloned into pLacZ-N20	[28]
pSC103	Low copy plasmid, <i>ori</i> and <i>rep A</i> from p SC102, <i>bla</i> ; <i>trc</i> promoter and <i>rrn</i> terminator from pTRC99A, <i>cat</i> from p ACYC184	Lab collection
pSC103- <i>idi</i>	<i>idi</i> , from <i>Bacillus subtilis idi</i> in pSC103	[28]
pSC103- <i>crtE</i>	<i>crtE</i> , from <i>Pantoea agglomerans</i> in pSC103	[28]
pSC103- <i>mvaK1</i>	<i>mvaK1</i> , from <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>mvaK1</i> in pSC103	[28]
pSC103- <i>ispA</i>	<i>ispA</i> , from <i>Pantoea agglomerans</i> , <i>ispA</i> in pSC103	[28]
pSC103- <i>mvaE</i>	<i>mvaE</i> , from <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>mvaS</i> in pSC103	[28]
pSC103- <i>mvaS</i>	<i>mvaS</i> , from <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>mvaS</i> in pSC103	[28]
pSC103- <i>mvaK2</i>	<i>mvaK2</i> , from <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>mvaK2</i> in pSC103	[28]
pSC103- <i>mvaD</i>	<i>mvaD</i> , from <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>mvaD</i> in pSC103	[28]

DNA 基因组作为模板,用 MvaE-cpec-F/MvaE-cpec-R、Ef-MvaS-cpec-F/Ef-MvaS-cpec-R、Sp-MK1-cpec-F/Sp-MK1-cpec-R、Sp-MvaK2-cpec-F/Sp-MvaK2-cpec-R 和 Sp-MvaD-cpec-F/Sp-MvaD-cpec-R 为引物,扩增 MVA 途径中的 5 个基因,分别是 *mvaE*、*mvaS*、*mvaK1*、*mvaK2* 和 *mvaD* 基因条带;用 99A-F/99A-R 为引物扩增合成番茄红素下游的 3 个基因,分别是 *idi*、*crtE* 和 *ispA* 基因条带,得到正确大小的片段后,回收片段,然后分别和骨架用摩尔比 1:1 的连接体系,使用 CPEC 的 PCR 程序进行扩增,电转化将连接产物转入 LYC103 菌株,涂 cam 板(氯霉素平板),挑单克隆用引物 99A-F 和相应下游引物验证,验证正确的克隆接菌送测序,将测序正确的质粒分别命名为质粒 pSC103-*mvaE*、pSC103-*mvaS*、pSC103-*mvaK1*、pSC103-*mvaK2*、pSC103-*mvaD*、pSC103-*idi*、pSC103-*crtE* 和 pSC103-*ispA*。构建菌株及所用质粒见表 1。

1.2.4 大肠杆菌转化方法

根据文献制备电转化感受态细胞,转化质粒和条带,完成转化^[35]。

1.2.5 *mvaK1* 启动子文库建立

CRISPR/Cas9 主要是利用靶点特异性的 RNA (Guide RNA, gRNA) 和 Cas9 核酸酶对特定基因位点进行切割导致突变。随着该技术的

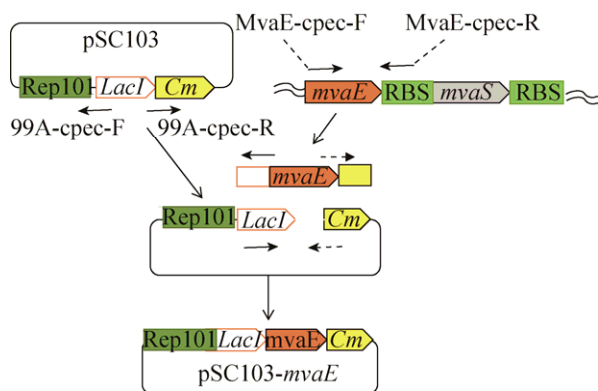


图 2 CPEC 构建质粒

Fig. 2 Construction of plasmid using CPEC.

发展,已经成功在多个物种染色体上实现基因敲除、整合、突变等^[5,30,31,36]。Zhao 等构建了一步法 CRISPR/Cas9 高效基因组编辑技术(CAGO),该方法可以在基因组任意位点实现非脱靶编辑。整个过程仅需要一个片段和一个通用 pCAGO 质粒,无需构建新的 gRNA 质粒^[30]。本研究用 CAGO 技术,对 *mvaK1* 构建 mRS(mRNA 稳定区)启动子文库^[37]。MvaST-594-I-F/MvaST-BsaI-CGCT-R 引物,以 LYC103 菌株基因组为模板,扩增得 500 bp 左右条带,作为同源重组的上同源臂。设计简并引物 MvaK1-mRSL-down (NNNNNNNNNNNNNNNNNN),本引物包括 50 bp 下同源臂片段、18 个兼并碱基(mRS 文库区)和扩增 M1-P 的 20 bp 同源区。以 MvaK1-mRSL-down/Refull_BsaI_F 为引物,以 *E. coli* MG1655- Δ *apoxB* 基因组为模板,扩增约 1.2 kb 条带,该片段包括氯霉素抗性基因、Cas9 识别序列、启动子文库和下游 50 bp 同源臂。两片段以等摩尔混合进行 Golden Gate 连接^[38],连接后用于一步同源重组。将得到的重组条带,转化含带有 pCAGO 质粒的 LYC103 菌株,30 °C、75 r/min 复苏 4 h,涂含有 34 μ g/mL 氯霉素的 LB 平板,30 °C 培养过夜。随机挑选 14 个单克隆进行验证,验证引物为 Mvas-1000-I-F/Mvak1-316-I-r,得到 1.6 kb 条带即为正确。挑选正确的菌株于 37 °C 进行摇瓶发酵,测定番茄红素产量。将产量最高菌株按照 Zhao 的方法^[30],去除 cam 抗性基因及多余序列,得到除启动子之外没有多余序列的菌株 LYC104。LYC104 菌株构建流程如图 3 所示,其中 L-short 和 mRS 文库区属于 M1-P 的一部分。敲除 marker 后,在 *mvaK1* 基因前仅留 M1-P 启动子序列。

1.2.6 CRISPR-Cas9 技术辅助整合 *idi* 基因

采用 CRISPR-Cas9 系统辅助整合 *idi* 基因^[31]。首先构建质粒 pLacZ-N20-trc-*idi*,以 pLacZ-N20 质粒为模板,用 lacZ-B-BsaI-F2/lacZ-B-BsaI-R2 为引物,PCR 扩增骨架,以 pSC103-*idi* 质粒为模板,用 P_{trc}-BsaI-AGCT-F/BS-*idi*-BsaI-R 为引物,

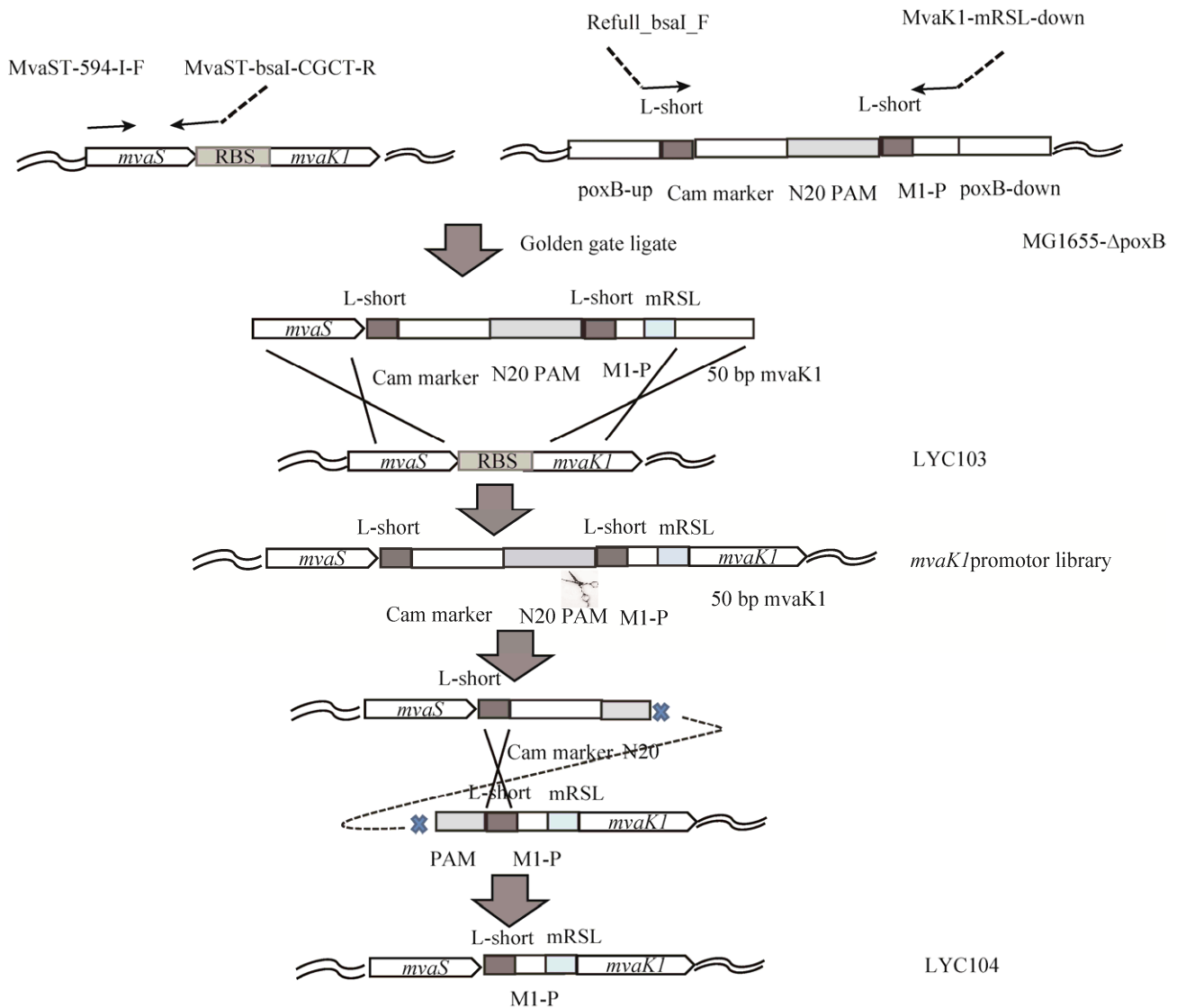


图3 LYC104 构建流程图

Fig. 3 Construction of LYC104.

扩增 *trc-idi* 条带，两片段以等摩尔混合进行 Golden Gate 连接，并加入 *Dpn I* 酶消化模板，然后将连接产物转化感受态 *Trans-T1*，涂于含有 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *cam* 的 LB 平板，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。用 *P15A-yz-up/99A-CPEC-R* 验证得到 2 kb 条带即为正确。在 LYC104 菌株中转化 *pRed_Cas9* 和 *pLacZ-N20-trc-idi* 质粒，阿拉伯糖来诱导 *cas9* 表达，切割染色体上 *LacZ* 的 N20 区域；*pLacZ-N20-trc-idi* 提供上下同源臂、*trc* 启动子和

idi 基因进行染色体整合。整合后用 *99A-F/LacZ-yz-down* 引物进行验证，测序正确菌株命名为 LYC105。验证引物见表 2。

2 结果与分析

2.1 单基因质粒构建

通过将番茄红素合成基因过表达的形式来寻找番茄红素合成途径中的限速步骤。以 *pSC103* 质粒为模板扩增大小为 5 kb 的骨架，以 LYC103

菌株 DNA 基因组为模板,将 *mvaE*、*mvaS*、*mvaK1*、*mvaK2* 和 *mvaD* 基因以及 *idi*、*ispA* 和 *crtE* 基因进行 PCR 扩增,依次得到片段大小为 2 412 bp、1 152 bp、879 bp、954 bp、1 011 bp、1 049 bp、900 bp 和 919 bp。核酸电泳图如图 4 所示。采用 CPEC 方

法将单个基因连接到中 pSC103 质粒上,然后电转化菌株 LYC103,取阳性单克隆用 99A-F 和扩增相应基因的下游引物进行菌落 PCR,验证正确连接质粒。将 PCR 验证正确质粒送样测序,测序正确的质粒分别依照表 1 中的质粒名称进行命名。

表 2 本研究所用的引物^[28]

Table 2 Primers used in this work^[28]

Primers	Sequences (5'-3')
99A-cpec-F	TGTTTTGGCGGATGAGAGAA
99A-cpec-R	GGTCTGTTTC CTGTGTGAAA TTG
MvaE-cpec-F	CAATTTTACA CAGGAAACAG ACC ATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGCATT
MvaE-cpec-R	TTCTCTCATCCGCCAAAACATTATTGTTTTCTTAAATCAT TAAAAATAGC C
Ef-MvaS-cpec-F	CAATTTTACACAGGAAACAGACCATGACAATTGGGATTGATAAAATTAGT
Ef-MvaS-cpec-R	TTCTCTCATCCGCCAAAACATTAGTTTCGATAAGAGCGAACG
Sp-MK1-cpec-F	CAATTTTACA CAGGAAACAG ACC ATGACAAAAAAGTTGGTGTGC
Sp-MK1-cpec-R	TTCTCTCATC CGCCAAAACA TTACAGGCTCTCTATCCATGTCTG
Sp-MvaK2-cpec-F	CAATTTTACACAGGAAACAGACCATGATTGCTGTAAAACCTTGCG
Sp-MvaK2-cpec-R	TTCTCTCATCCGCCAAAACATTACGATTGTCGTCATGTCCTAT
Sp-MvaD-cpec-F	CAATTTTACACAGGAAACAGACCATGGATAGAGAGCCTGTAACAGTACG
Sp-MvaD-cpec-R	TTCTCTCATCCGCCAAAACATTAACAGCAATCATCTTGACTCAAAT
99A-F	TTGCGCCGACATCATAAC
99A-R	CTGCGTTCTGATTTAATCTG
MvaST-594-I-F	CCGTATCCTATGGTTCGATGGT
MvaST-BsaI-AGCG-R	CCAGGTCTCAAGCGTTAGTTTCGATAAGAGCGAACGGTAT
MvaK1-mRSL-down	TCTTACTATGTGCCTGACCGACCAACTTTTTTTGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAAT (N18) GGCTCAATTATATCAACG
Refull_BsaI_F	CCAGGTCTCACGCTTTATCTCTGGCGGTGTTGACACTGGAGCAC
Mvak1-316-I-r	GAACGCAGGCTTCTGTGATA
lacZ-B-BsaI-F2	CCAGGTCTCACCAG AATAACCGGGCAGGCCAT
lacZ-B-BsaI-R2	CCAGGTCTCA AGCTGTTTCCTGTGTGAAAATTGT
Ptrec-BsaI-AGCT-F	CCAGGTCTCA AGCT GGCATGCATTTACGTTGACA
BS-idi-BsaI-R	CCAGGTCTCACTGG TTATCGCACA CTATAGCTTG ATGTATT
P15A-yz-up	TTTATCTCTTCAAATGTAGCACCT
LacZ-yz-down	ATGGTGAACATGATGCCGACA

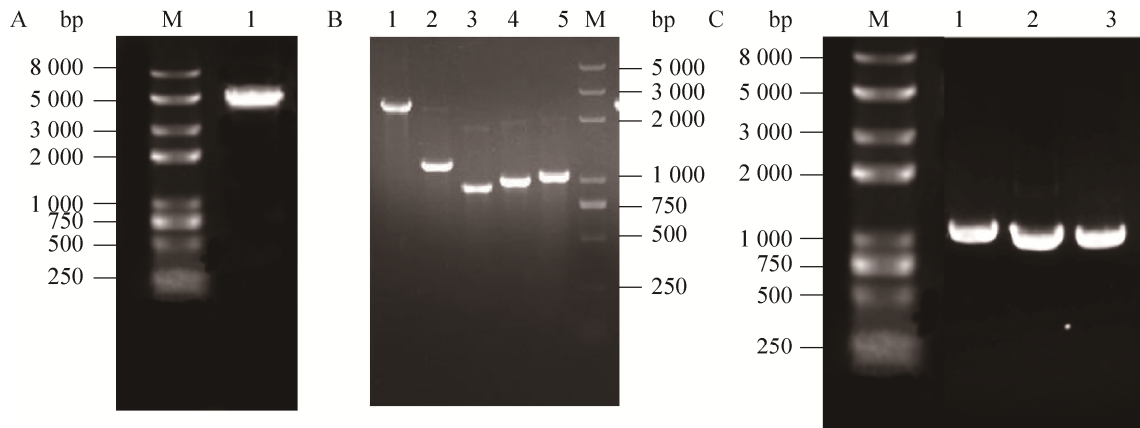


图4 PCR验证单基因质粒构建

Fig. 4 Certification of single gene plasmid construction by PCR. (A) M: Trans 2000 plus II; 1: Backbone. (B) M: Trans 2000 plus; 1: *mvaE*; 2: *mvaS*; 3: *mvaK1*; 4: *mvaK2*; 5: *mvaD*. (C) M: Trans 2000 plus II; 1: *idi*; 2: *ispA*; 3: *crtE*.

2.2 单基因过表达对番茄红素产量的影响

将所构建的单基因质粒转入含有 MVA 途径的 LYC103 番茄红素菌株, 发酵测定细胞生长和番茄红素产量, 发酵结果如图 5 所示; 过表达 *mvaS* 番茄红素产量和单位细胞产率明显降低, 分别是 LYC103 的 51% 和 62%; 过表达 *mvaE* 番茄红素产量和单位细胞产率有一定降低, 说明当前条件下再表达 MVA 途径的前两个基因, 可能会使 MVA

途径中间体物质积累, 进一步影响类胡萝卜素的合成和细胞生长。

质粒过表达 *ispA*、*crtE*、*mvaK1*、*idi* 和 *mvaD* 基因后, 番茄红素产量相对于 LYC103 依次提高了 13.5%、16.5%、17.95%、33.7% 和 61.1%。其中含有 pSC103-*idi* 质粒的番茄红素单细胞产量最高, 从 32.95 mg/g 增加到 53.52 mg/g DCW, 是对照菌株的 1.63 倍。文献报道大肠杆菌引入 MVA

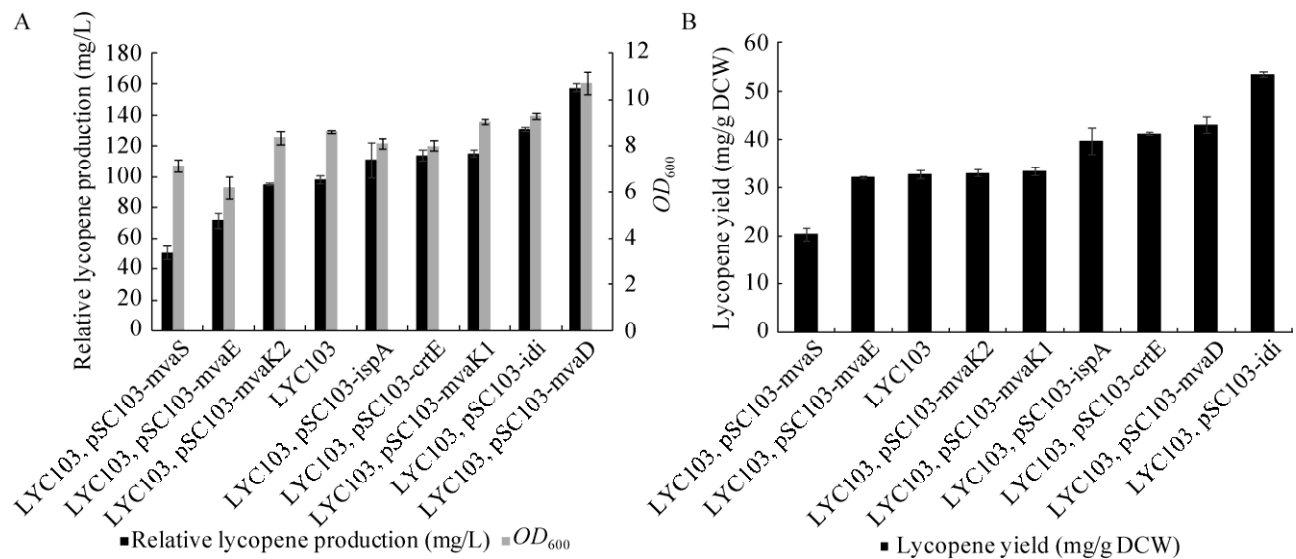


图5 过表达单基因菌株的番茄红素产量

Fig. 5 Lycopene production by strains with single gene plasmids.

途径后,会因为 MVA 途径各基因表达不协调引起中间代谢物积累,包括甲羟戊酸及其多种衍生物的生成会产生细胞毒性,从而影响细胞生长^[24-25]。过表达 *mvaK1*、*mvaK2*、*mvaD* 可以减少 MVA 等中间代谢物积累,促进细胞生长,因此本研究中质粒表达 *mvaK1*、*mvaK2*、*mvaD* 基因,菌株番茄红素单位细胞产量都有一定提高(图 5B);另外,MVA 途径的引入同时也提高了前体物质 IPP 的积累,*idi* 基因过量的表达来平衡 IPP 和 DMAPP 的量,*ispA* 基因过量表达可以减少 IPP 积累和平衡外源 MVA 途径。促使下游产物的顺利合成,使番茄红素产量提高。

2.3 *mvaK1*-mRSL 文库的构建

基因以质粒形式在大肠杆菌中表达时会因为质粒不稳定影响番茄红素的产量,还会造成代谢负荷等弊端^[39-40]。产番茄红素的重组大肠杆菌 LYC103 中,*mvaK1*、*mvaK2*、*mvaD* 三个基因在同一操纵子上,用启动子的 mRNA 稳定区(mRS)文库调控 *mvaK1*,相当于对 3 个基因同时调控。本研究采用 CAGO 技术一步同源重组方法在染色体上直接对 *mvaK1* 基因进行调控,在 mRNA 稳定区设计简并引物构建 mRS 文库。

首先准备重组片段。图 6A 中 1、2 泳道为重组片段的上同源臂的 PCR 验证条带,3、4 泳道

为重组片段中下同源臂、*cam* 抗性基因、gRNA-PAM 的 PCR 验证条带。用 Golden Gate 方法将两片段以等摩尔混合,用 T4 DNA 连接酶和 *Bsa* I 酶切连接。得到约 1.7 kb 片段(见图 6B),直接转化带有 pCAGO 质粒的 LYC103 感受态,在含有 *amp* 和 *cam* 抗生素的 LB 固体平板上筛选。然后随机选单克隆用 *cat-up/ Mvak1-316-I-r* 进行 PCR 验证,得到约 1.6 kb 的条带为正确克隆,部分 PCR 验证电泳结果见图 6C,挑正确的单克隆接菌发酵。

2.4 *mvaK1* 启动子文库建立对番茄红素产量的影响

随机选取 14 株在 mRNA 稳定区文库调控 *mvaK1* 基因正确的菌株进行发酵,结果见图 7。调控 *mvaK1* 基因后,番茄红素产量为 56.08–196.07 mg/L,单位细胞产量为 25.35–73.69 mg/g。其中番茄红素产量最高的菌株是 LYC103-*mvaK1*-7,番茄红素产量是对照的 2 倍;*OD*₆₀₀ 从 8.65 提高到 11.38,提高了 32%,*mvaK1* 基因的调控使细胞生长变快,减少了中间产物的积累和细胞毒性。

mvaK1、*mvaK2*、*mvaD* 三个基因的协调表达提高了前体物质 IPP 和 DMAPP 的供应,使番茄红素产量得到进一步的提高。

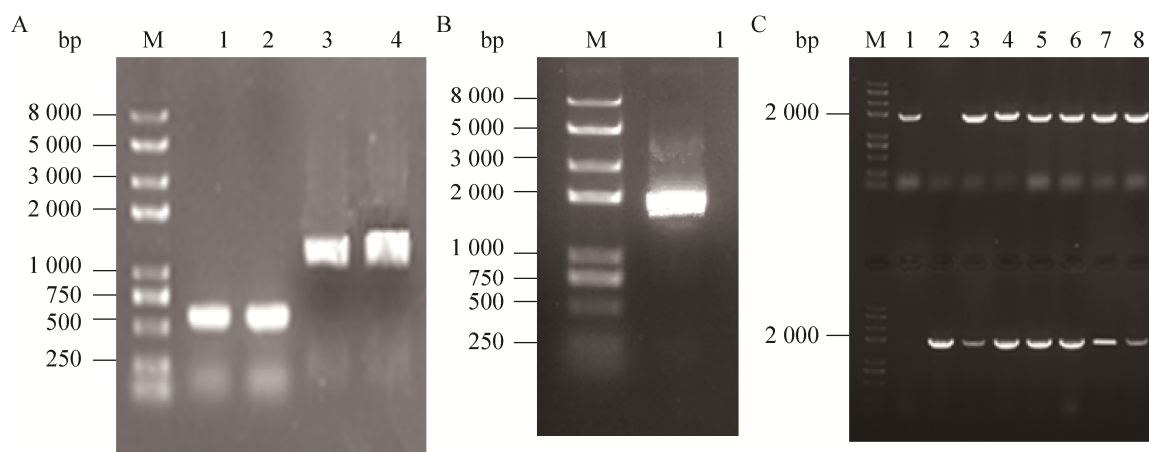


图 6 *mvaK1*-mRSL 文库的构建及验证

Fig. 6 Construction and certification of *mvak1*-mRSL library. (A) Certification of the fragments for preparing recombinant sequence. (B) Certification of recombinant sequence. (C) Certification of the stains after recombination.

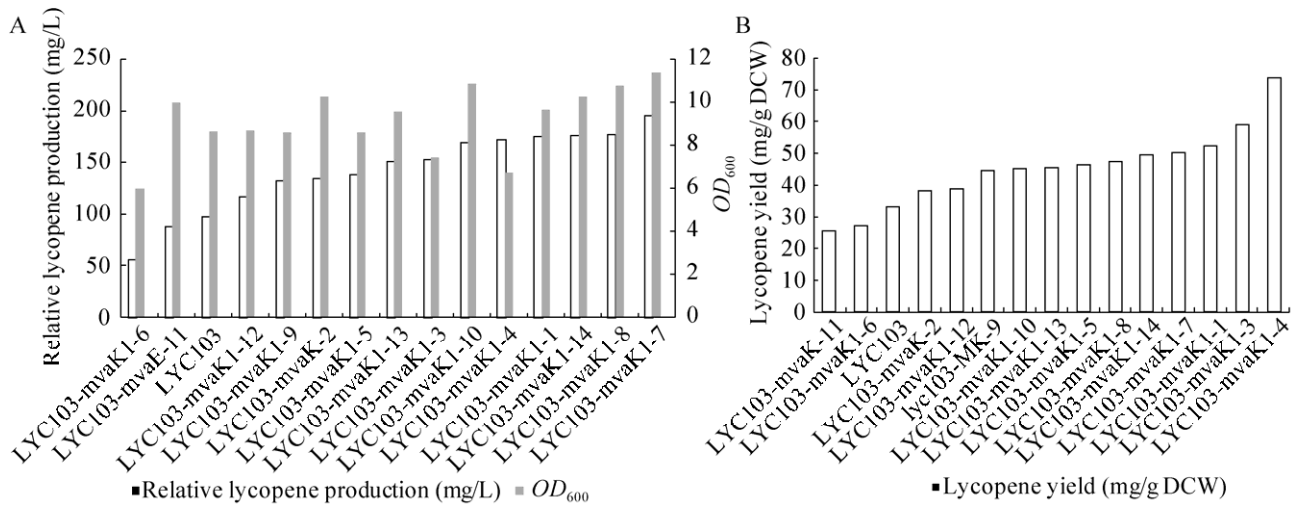


图7 *mvaK1* 启动子文库对番茄红素产量的影响
Fig. 7 Effect of *mvaK1* promoter library on lycopene yield.

本研究采用文献所述方法消除 LYC103-*mvaK1-7* 中 *cam* 抗性基因, 得到不含任何抗生素的标记的菌株, 命名为 LYC104。

2.5 单基因质粒转化 LYC104 菌株对番茄红素产量的影响

LYC104 中 *mvaK1*、*mvaK2*、*mvaD* 经过了文库

调控后, 番茄红素产量得到提高, 验证了 *mvaK1*、*mvaK2*、*mvaD* 为当前菌株的限速步骤并消除限速。为了研究在 LYC104 中 *crtE*、*idi* 和 *ispA* 基因是否同样为限速步骤, 本研究在 LYC104 中用单基因质粒过表达 *crtE*、*idi* 和 *ispA* 基因, 结果如图 8 所示。添加 pSC103-*crtE* 和 pSC103-*ispA* 后, 番茄红素产

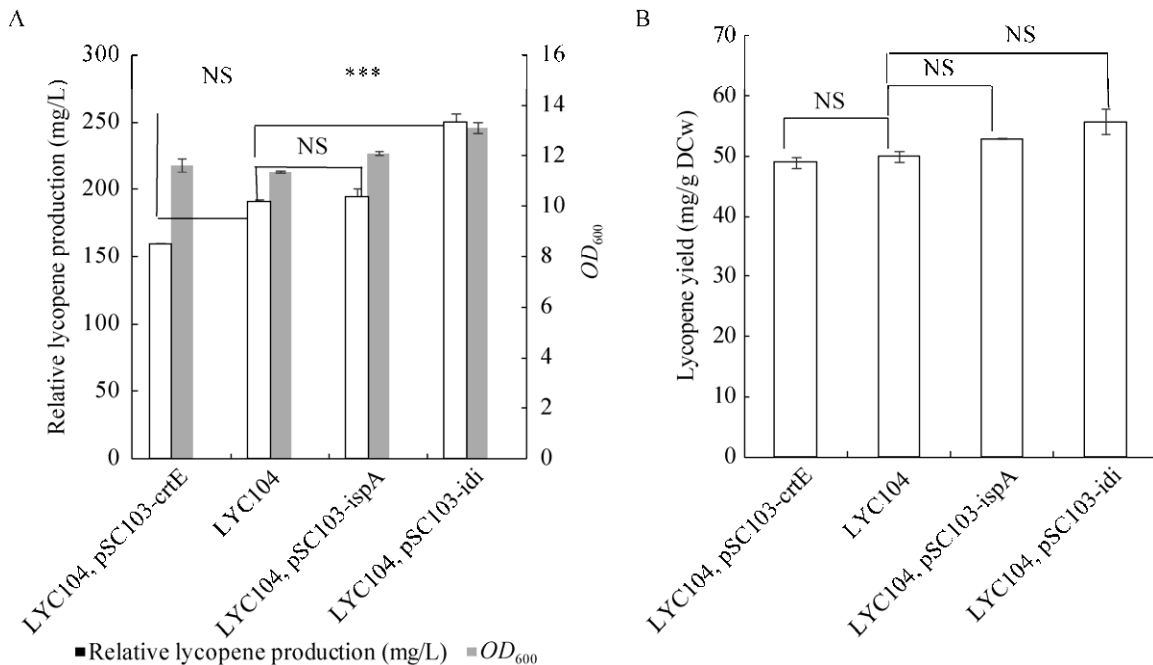


图8 单基因质粒转化 LYC104 菌株对番茄红素产量的影响

Fig. 8 Effect of single gene plasmid transformed LYC104 strain on lycopene production. NS: not significant; *** significant difference.

量和 LYC104 相比没有明显差别($P>0.05$), 而添加 pSC103-*idi* 质粒后番茄红素菌株细胞生长最好、番茄红素产量最高。细胞 OD_{600} 是 LYC104 的 1.15 倍, 番茄红素产量提高了 34.4%, 说明在建库调控的番茄红素高产菌株 LYC104 中, *idi* 依然是限速步骤。因为 LYC104 中 MVA 途径得到进一步优化表达, 而使 MVA 途径催化乙酰辅酶 A 转化为 IPP 增加, 需要继续高表达 *idi* 基因来平衡两者之间的转化。

表 3 调控 *idi* 基因对番茄红素产量的影响

Table 3 Effect of regulating *idi* gene on lycopene yield

Strains	OD_{600}	Dry cell weight (g/L)	Relative lycopene production (mg/L)	Increase of lycopene yield
LYC103	8.66±0.07	3.25±0.06	97.93±2.61	1.00
LYC104	11.37±0.05	4.26±0.17	191.74±1.15	1.95
LYC105	21.40±0.08	5.65±0.03	223.12±4.75	2.28

3 结论

本研究在染色体含有 MVA 和 MEP 两个途径的重组番茄红素菌株 LYC103 基础上, 通过以单质粒表达的形式将 MVA 途径中的 *mvaS*、*mvaE*、*mvaK1*、*mvaK2* 和 *mvaD* 五个基因以及番茄红素合成途径下游的 *idi*、*ispA* 和 *crtE* 三个基因进行过表达, 系统研究了各基因表达对番茄红素产量和细胞生长的影响。结果表明, 限制番茄红素产量和细胞生长的主要因素是前体供应不足和代谢过程中有毒中间体的过度积累, MVA 途径后半部分基因和 *idi* 基因高表达, 能明显提高番茄红素产量和细胞生长。与之前研究结果类似^[41-42]。

本研究中 *mvaK1*、*mvaK2*、*mvaD* 三个基因在同一个操纵子中且位置相邻, 对 *mvaK1* 基因进行调控, 相当于对后面两个基因也进行了调控。本研究对 *mvaK1* 基因的 mRNA 稳定区进行了启动子文库的调控, 其番茄红素产量相比对照菌株 LYC103 增加了 2 倍, 细胞生长提高了 32%。调控 *mvaK1*、*mvaK2*、*mvaD* 基因后, 可以减少有毒中间物质 HMG1-CoA 的积累, 从而增加细胞生长

2.6 调控 *idi* 基因对番茄红素产量的影响

为了稳定表达 *idi* 基因, 本实验 CRISPR-Cas9 基因编辑技术在 LYC104 菌株的 *LacZ* 位点对 *idi* 基因进行染色体整合, 验证测序正确后, 将该菌株命名为 LYC105。发酵结果见表 3, 与出发菌株 LYC103 相比, LYC105 的细胞生长提高了 147%, 番茄红素产量增加了 2.28 倍; 与对照菌株 LYC104 相比, LYC105 的细胞生长提高了 90.1%, 番茄红素产量增加了 1.95 倍。结果见表 3。

和番茄红素的产量。

添加 MVA 途径并协调表达, 进一步增加了 IPP 的合成, 文献报道大量积累 IPP, 会产生细胞毒性, 从而影响细胞生长和萜类物质的合成^[43-44], 在重组番茄红素菌株 LYC104 基础上对 *idi* 基因进行染色体整合, 来解决前体物质 IPP 和 DMAPP 供应不平衡等问题, 番茄红素产量增加了 127%。与以前文献报道完全用质粒表达 MVA 途径基因相比^[19-23], 本研究所得菌株 LYC105 性状更稳定, 添加单个基因研究限速步骤的方法更简单, 为重组大肠杆菌表达多个外源基因的研究提供新思路。

REFERENCES

- [1] Wang F, Jiang JG, Chen Q. Progress on molecular breeding and metabolic engineering of biosynthesis pathways of C₃₀, C₃₅, C₄₀, C₄₅, C₅₀ carotenoids. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(3): 211-222.
- [2] Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 274(2): 532-538.
- [3] Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Cancer

- chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(3): 475–510.
- [4] Seren S, Lieberman R, Bayraktar UD, et al. Lycopene in cancer prevention and treatment. *Am J Ther*, 2008, 15(1): 66–81.
- [5] Li ZX, Chen QQ, Tang JL, et al. Integrating balanced mevalonate pathway into chromosome for improving lycopene production in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2019, 35(3): 404–414 (in Chinese). 李贞霞, 陈倩倩, 唐金磊, 等. 稳定表达MVA途径基因提高番茄红素产量. *生物工程学报*, 2019, 35(3): 404–414.
- [6] Lv XM, Wang F, Zhou PP, et al. Dual regulation of cytoplasmic and mitochondrial acetyl-CoA utilization for improved isoprene production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Commun*, 2016, 7: 12851.
- [7] Zebec Z, Wilkes J, Jervis AJ, et al. Towards synthesis of monoterpenes and derivatives using synthetic biology. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 34: 37–43.
- [8] Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, et al. Elucidation of the erwinia-uredovora carotenoid biosynthetic-pathway by functional-analysis of gene-products expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1990, 172(12): 6704–6712.
- [9] Jin YS, Stephanopoulos G. Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2007, 9(4): 337–347.
- [10] Wang CL, Maratukulam PD, Lum AM, et al. Metabolic engineering of an aerobic sulfate reduction pathway and its application to precipitation of cadmium on the cell surface. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(10): 4497–4502.
- [11] Farmer WR, Liao JC. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(5): 533–537.
- [12] Matthews PD, Wurtzel ET. Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53(4): 396–400.
- [13] Li QY, Fan FY, Gao X, et al. Balanced activation of IspG and IspH to eliminate MEP intermediate accumulation and improve isoprenoids production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2017, 44: 13–21.
- [14] Alper H, Miyaoku K, Stephanopoulos G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(5): 612–616.
- [15] Alper H, Jin YS, Moxley JF, et al. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2005, 7(3): 155–164.
- [16] Choi HS, Lee SY, Kim TY, et al. *In silico* identification of gene amplification targets for improvement of lycopene production. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(10): 3097–3105.
- [17] Farmer WR, Liao JC. Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2001, 17(1): 57–61.
- [18] Zhao J, Li QY, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production. *Metab Eng*, 2013, 17: 42–50.
- [19] Vadali RV, Fu YC, Bennett GN, et al. Enhanced lycopene productivity by manipulation of carbon flow to isopentenyl diphosphate in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(5): 1558–1561.
- [20] Yoon SH, Park HM, Kim JE, et al. Increased beta-carotene production in recombinant *Escherichia coli* harboring an engineered isoprenoid precursor pathway with mevalonate addition. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(3): 599–605.
- [21] Yoon SH, Lee YM, Kim JE, et al. Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 94(6): 1025–1032.
- [22] Ye LJ, He P, Li QY, et al. Type II restriction based combinatory modulation technique for metabolic pathway optimization. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 47.
- [23] Ye LJ, Zhang CZ, Bi CH, et al. Combinatory optimization of chromosomal integrated mevalonate pathway for β -carotene production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 202.
- [24] 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 amorpho-4,11-diene. *Metab Eng*, 2009, 11(1): 13–19.
- [25] 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.
- [26] Feng F, Xu Y, Tao Y, et al. Improving isoprene production by engineered heterologous mevalonate pathway in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2015, 31(7): 1073–1081 (in Chinese).
冯凡, 许杨, 陶勇, 等. 提高大肠杆菌通过 MVA 途径合成异戊二烯. *生物工程学报*, 2015, 31(7): 1073–1081.
- [27] Wei YL, Mohsin A, Hong Q, et al. Enhanced production of biosynthesized lycopene via heterogenous MVA pathway based on chromosomal multiple position integration strategy plus plasmid systems in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2018, 250: 382–389.
- [28] Chen QQ. Study and regulation of lycopene synthesis gene in *Escherichia coli*[D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2019 (in Chinese).
陈倩倩. 番茄红素合成基因在大肠杆菌中的调控研究[D]. 新乡: 河南科技学院, 2019.
- [29] Sun T, Miao LT, Li QY, et al. Production of lycopene by metabolically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(7): 1515–1522.
- [30] Zhao DD, Feng X, Zhu XN, et al. CRISPR/Cas9-assisted gRNA-free one-step genome editing with no sequence limitations and improved targeting efficiency. *Sci Rep*, 2017, 7: 16624.
- [31] Zhao DD, Yuan SL, Xiong B, et al. Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 205.
- [32] Dong Y, Hu KL, Li XL, et al. Improving β -carotene production in *Escherichia coli* by metabolic engineering of glycerol utilization pathway. *Chin J Biotech*, 2017, 33(2): 247–260 (in Chinese).
董悦, 胡坤乐, 李兴林, 等. 代谢工程改造甘油代谢途径提高 β -胡萝卜素产量. *生物工程学报*, 2017, 33(2): 247–260.
- [33] Zhao J, Liu Y, Li QY, et al. Modulation of isoprenoid gene expression with multiple regulatory parts for improved β -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.
- [34] Quan JY, Tian JD. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat Protoc*, 2011, 6(2): 242–251.
- [35] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Huang PT, trans. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 99–102 (in Chinese).
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. *分子克隆实验指南*. 黄培堂, 译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 99–102.
- [36] Ma YW, Zhang LF, Huang XX. Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J*, 2014, 281(23): 5186–5193.
- [37] Lu J, Tang JL, 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.
- [38] Engler C, Marillonnet S. Generation of families of construct variants using golden gate shuffling//Lu C, Browse J, Wallis J, eds. *cDNA Libraries*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 729: 167–181.
- [39] 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(3/4): 218–226.
- [40] Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem Biol*, 2008, 3(1): 64–76.
- [41] Sandmann G, Albrecht M, Schnurr G, et al. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1999, 17(6): 233–237.
- [42] Klein-Marcuschamer D, Ajikumar PK, Stephanopoulos G. Engineering microbial cell factories for biosynthesis of isoprenoid molecules: beyond lycopene. *Trends Biotechnol*, 2007, 25(9): 417–424.
- [43] 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.
- [44] Sivy TL, Fall R, Rosenstiel TN. Evidence of isoprenoid precursor toxicity in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(12): 2376–2383.

(本文责编 陈宏宇)