

大肠杆菌共表达 *LeGGPS2*、*LePSY1* 和 *crtI* 基因合成番茄红素

陈吉裕, 蒲志群, 肖雅文, 李翠萍, 杜小兵, 苏承刚, 张兴国

南方山地园艺学教育部重点实验室 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715

陈吉裕, 蒲志群, 肖雅文, 等. 大肠杆菌共表达 *LeGGPS2*、*LePSY1* 和 *crtI* 基因合成番茄红素. 生物工程学报, 2012, 28(8): 823-833.
Chen JY, Pu ZQ, Xiao YW, et al. Lycopene synthesis via tri-cistronic expression of *LeGGPS2*, *LePSY1* and *crtI* in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2012, 28(8): 823-833.

摘要: 利用大肠杆菌研究番茄红素的合成, 不仅可以获得副产物少的高产菌株, 而且可以探讨基因或基因簇的功能。文中将番茄 *LeGGPS2* 和 *LePSY1* 的 cDNA 序列, 及欧文氏菌 *crtI* 的编码序列分别添加上核糖体结合位点后, 以单独或组合的方式受控于 T7 启动子和终止子, 在大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中进行表达和诱导番茄红素合成。结果显示, 仅 T7::*crtI*-*LeGGPS2*-*LePSY1* 三价基因共表达时才能合成番茄红素, 且将种子液以 1:50 接种于含 3% 蔗糖的 LB 培养基 (pH 6.8) 中, 于 37 °C 摇 8 h 左右的对数生长期后期加 IPTG 至 80 μmol/L, 30 °C 诱导表达 5 h 的发酵条件下, 获得 2.124 mg/g DCW 的番茄红素。该结果既验证了原核化的番茄 *LeGGPS2* 和 *LePSY1* 基因及与 *crtI* 基因协同作用的功能, 又为在番茄质体中建立独立的番茄红素合成途径奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌, *crtI*-*LeGGPS2*-*LePSY1* 基因共表达, T7/T7RNAP 表达系统, 番茄红素

Lycopene synthesis via tri-cistronic expression of *LeGGPS2*, *LePSY1* and *crtI* in *Escherichia coli*

Jiyu Chen, Zhiqun Pu, Yawen Xiao, Cuiping Li, Xiaobing Du, Chenggang Su, and Xingguo Zhang

Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Studies on lycopene synthesis in *Escherichia coli* were not only able to gain the strains with high yield and less

Received: December 22, 2011; **Accepted:** February 17, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30972008).

Corresponding author: Xingguo Zhang. Tel: +86-23-68250974; E-mail: zhangxg63@163.com

国家自然科学基金 (No. 30972008) 资助。

by-products, but also able to test functions of genes or gene clusters. In this article, the cDNA sequences of tomato *LeGGPS2* and *LePSY1* as well as the coding sequence of *crtI* from *Erwinia uredovora*, each of which was added a ribosome binding site, were controlled by T7 promoter and terminator alone or combined, and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) to induce lycopene synthesis. The results show that only *T7::crtI-LeGGPS2-LePSY1* expressed tri-cistronically could produce lycopene, and 2.124 mg/g dry cell weight of lycopene was obtained when fermented for 5 h at 30 °C after mixing 80 μmol/L IPTG at the later logarithmic phase while the seed broth of 1:50 (*V/V*) was inoculated into LB medium (pH 6.8) containing 3% sucrose and cultured for 8 h at 37 °C. The results confirmed the function of the prokaryonized *LeGGPS2* and *LePSY1* and their synergy with *crtI*, and also laid a foundation to establish an independent lycopene synthetic pathway in the tomato plastid.

Keywords: *Escherichia coli*, tri-cistronic expression of *crtI-LeGGPS2-LePSY1*, T7/T7RNAP expression system, lycopene

番茄红素是抗氧化能力最强的一种类胡萝卜素^[1], 可预防心血管疾病、多种癌症和一些慢性病发生, 近年来成为医学、营养学和食品学研究的热点^[2]。番茄和番茄制品是人们摄取番茄红素的重要来源。然而, 传统育种和核转基因途径在丰量提高番茄的番茄红素含量上均存在难度^[3-4]。大量研究表明, 质体转基因具有表达效率高、不存在共抑制和位置效应、可多顺反子表达等优点^[5]。如果在番茄果实的质体中建立一条与核基因同步表达的番茄红素合成途径, 则可能突破提高番茄红素含量的技术瓶颈。但番茄质体转化耗时长、难度大, 而且真核基因要在质体中表达, 必须进行原核化改造。由于质体起源于蓝细菌, 除部分基因存在内含子外, 其基因的结构与表达机制仍保留原核特性^[6]; 而且质体基因可以在细菌中表达, 细菌的启动子和终止子等控制元件也可以在质体中行使功能^[7]。因此, 预先将原核化的番茄红素合成基因在原核细胞中进行功能验证, 可以避免质体转化的技术风险。

利用大肠杆菌等原核生物发酵制备番茄红素, 具有高效和副产物少等优点, 已得到深入研究^[8-9]。大肠杆菌不能合成进入番茄红素合成途径的前体物质牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸

(GGPP), 但能产生合成 GGPP 的前体物质法尼基焦磷酸 (FPP), 故需导入包括牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶基因在内的多个外源基因才能塑建番茄红素合成途径^[10]。目前应用最多的是来自欧文氏菌 *Erwinia uredovora* 的分别编码牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶、八氢番茄红素合成酶和八氢番茄红素脱氢酶的 *crtE*、*crtB* 和 *crtI* 基因^[11]。不仅获得了合成番茄红素的高产菌株^[10-12], 而且所建立的原核表达模式还可以用来验证新克隆的相关基因的功能^[13-14]。除采用野生型 *crtE*、*crtB* 和 *crtI* 基因外, 利用 *Lac* 乳糖操纵子^[8] 和 T7/T7RNAP 转录系统^[15] 可以更高效地促进和调控番茄红素合成。由于真核化的 T7/T7RNAP 系统是目前最具有发展潜力的质体转基因高效表达调控系统^[16-17], 因此, 本文利用 T7/T7RNAP 原核表达系统来验证由番茄 *LePSY1* 和 *LeGGPS2* 基因及欧文氏菌 *crtI* 基因构成的 *T7::crtI-LeGGPS2-LePSY1::Ter* 多顺反子结构的功能。结果显示, 添加上核糖体结合位点 (rbs) 的 *LePSY1* 和 *LeGGPS2* 的 cDNA 序列及 *crtI* 的编码区序列, 单独或组合后受控于 T7 启动子和终止子, 在含有 T7RNAP 基因的大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中能够表达出预期大小的目的蛋白, 且表达的

LePSY1 和 *LeGGPS2* 蛋白可协同 *crtI* 酶催化合成番茄红素。该研究证实了原核化的 *LePSY1* 和 *LeGGPS2* 基因的功能, 获得了利用 *T7::crtI-LeGGPS2-LePSY1::Ter* 基因簇合成番茄红素的大肠杆菌菌株, 为今后利用该基因簇在番茄质体中建立番茄红素合成途径奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄 *Solanum lycopersicon* L. cv Ailsa Craig 和含有 *crtI* 基因的 pMD-*crtI* 载体由重庆大学陈国平教授惠赠。大肠杆菌菌株 XL1-Blue 和 BL21 (DE3) 购自北京鼎国生物技术有限责任公司。载体 pET32a (+) 购自 Novagen 公司。SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、柱式质粒小抽提量试剂盒购自上海生工生物工程有限公司, 并委托该公司合成引物和测序。工具酶购自宝生物 (大连) 工程公司。IPTG (异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷) 为 Sigma 公司产品。其他所需试剂均为国产分析纯。

1.2 *LeGGPS2*、*LePSY1* 和 *crtI* 基因的克隆及其表达载体构建

用 Plant RNAzol 试剂 (鼎国生物技术有限责任公司) 从番茄红熟果实中提取总 RNA, 经 M-MLV 逆转录酶和 Oligo (dT21) 引物合成 cDNA 第一链。参照番茄品种 MoneyMaker 的牻牛儿基牻牛儿焦磷酸合成酶基因 *LeGGPS2* (GenBank Accession No. DQ267903) 序列设计 PCR 引物 1 和引物 2, 用 PrimStar HS DNA 聚合酶从 cDNA 中扩增 1 109 bp 大小片段。PCR 反应条件为: 95 °C 变性 2 min, 1 个循环; 95 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min 20 s, 3 个循环; 95 °C 变性 10 s, 57 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min 20 s,

27 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物电泳分离和纯化后, 用 *Nde* I 酶切 20 h, 再经 85 °C 水浴变性 5 min 后立即冰浴 2 min, 使切下的 9 bp 片段呈单链, 而 1 099 bp 的片段保持双链结构; 如此处理, 既省时又避免电泳纯化带来 DNA 损失。将该酶切产物与 pET32a(+) 载体经 *Hind* III 酶切后补平, 再经 *Nde* I 酶切后电泳分离和纯化的 5 384 bp 片段按 3 : 1 的比例混合, 用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接 16 h, 转化大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞, 用引物 2 和引物 3 (位于载体 T7 启动子的上游) 从 Amp 抗性平板上筛选 PCR 产物为 1 202 bp 大小的阳性克隆 pT7-*LeGGPS2* (6 483 bp), 再经酶切和测序鉴定。

用引物 4 和引物 5 自 pMD-*crtI* 中扩增 1 498 bp 大小的八氢番茄红素脱氢酶基因 *crtI*; PCR 反应条件为: 95 °C 变性 2 min, 1 个循环; 95 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 3 个循环; 95 °C 变性 10 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 40 s, 27 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物纯化后, 用 *Nde* I 酶切, 再经变性使 9 bp 小片段单链化后, 将 1 489 bp 的片段与上述 pET32a (+) 载体的酶切大片段连接, 转化大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞, 用引物 5 和引物 3 筛选 PCR 产物为 1 592 bp 大小的 Amp 抗性阳性克隆 pT7-*crtI* (6 873 bp), 再经酶切和测序鉴定。

参照番茄 Ailsa Craig 的八氢番茄红素合成酶基因 *LePSY1* (GenBank Accession No. Y00521、X60441 和 M84744) 序列设计引物 6 和引物 7, 自上述 cDNA 中扩增 1 248 bp 大小带; PCR 反应条件为: 95 °C 变性 2 min, 1 个循环; 95 °C 变性 10 s, 52 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 3 个循环; 95 °C 变性 10 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C

延伸 1 min 20 s, 27 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物纯化后,用 *Nhe* I 酶切,再经变性使 8 bp 小片段单链化后,将 1 240 bp 的片段与 pT7-crtI 载体经 *Nde* I 酶切后补平、再经 *Nhe* I 酶切后的 5 394 bp 片段相连接,转化大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞,用引物 7 和引物 3 筛选 PCR 产物为 1 352 bp 大小的 Amp 抗性阳性克隆 pT7-LePSY1 (6 634 bp),再经酶切和测序鉴定。

pT7-crtI 载体经 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切后,回收 6 850 bp 大片段,与 pT7-LeGGPS2 的 *Xba* I 和 *Xho* I 酶切 1 154 bp 小片段相连,得到重组载体 pT7-crtI-LeGGPS2。该载体经 *Nhe* I 和 *Xho* I 酶切后,回收 7 984 bp 大片段,与 pT7-LePSY1 的 *Xba* I 和 *Xho* I 酶切 1 305 bp 小片段相连,得到重组载体 pT7-crtI-LeGGPS2-LePSY1。该载体经 *Hind* III 酶切,回收 8 563 bp 大片段,自环化后得到重组载体 pT7-crtI-LePSY1。其中,二价和三价基因表达载体同其单基因表达载体一样,均由 T7 启动子和 T7 终止子 (Ter) 控制,且每个基因带有独立和相同的核糖体结合位点 (图 2A)。所有载体均经过 PCR 扩增和酶切鉴定。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Sequences (5'-3')	Restriction enzyme
1	cgggatcc <u>atatg</u> agatctatgaacctgt	<i>Nde</i> I
2	<u>gctagct</u> taattttgacgattagcaatg	<i>Nhe</i> I
3	aagctccccgcgaaattaatacgac	-
4	gctcgag <u>catatg</u> aatagaactacagtaattgg	<i>Nde</i> I
5	catgctagctcaagccagatcctccag	<i>Nhe</i> I
6	tgctgttgccttgattggttg	-
7	tgggctagcttattcttgaagagaggca	<i>Nhe</i> I

The underlined sequences indicate restriction enzyme site.

1.3 目的基因的原核表达分析

将构建的 pT7-LeGGPS2、pT7-crtI、pT7-LePSY1、pT7-crtI-LePSY1、pT7-crtI-LeGGPS2-LePSY1 和对照载体 pET32a (+) 分别转化进 BL21 (DE3) 后,在 LB 含 100 mg/L Amp 培养基中培养过夜,作为种子液。在初始表达条件下,即将种子液以 1 : 50 接种于 20 mL 含 Amp 100 mg/L 的 LB 培养基中,37 °C 摇菌 8 h 后,加 IPTG 至 20 μmol/L,30 °C 表达 6 h 离心收集菌体,观察是否显红色,分析蛋白表达水平;对能产生番茄红素的菌株进行优化发酵条件。

1.4 番茄红素的提取及测定方法

1.4.1 标准曲线制定

按国标 GB/T14215-93 方法,以苏丹 I 替代易被氧化的番茄红素制作标准曲线。所得图 1 标准曲线的回归方程为: $A=0.2340C+0.0014$, $R^2=0.9999$; 其中 A 为 485 nm 处的吸光度值, C 为番茄红素浓度。

1.4.2 菌液干重的测定

取菌液 1 mL 至已称重 (精确至 0.0001 g) 的 1.5 mL 离心管中,13 000 r/min 离心 3 min 收集菌体,弃上清液,用灭菌水洗 1 次,105 °C 干燥

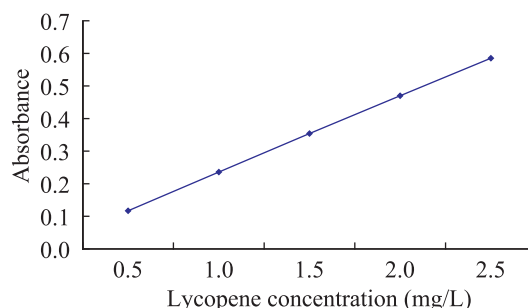


图 1 番茄红素浓度与 485 nm 吸光度的标准曲线

Fig. 1 Standard curve between lycopene concentration and absorbance at 485 nm.

至恒重,重复3次。所得质量差为1 mL菌液的干重。

1.4.3 番茄红素的提取与测定

收集2 mL菌液的菌体,用灭菌水洗1次,加400 μL 丙酮,黑暗中50 $^{\circ}\text{C}$ 浸提15 min,13 000 r/min离心10 min收集上清液,重复浸提1次。将提取液按适当比例稀释,测定在485 nm波长处的吸光度值。按所得回归方程计算出番茄红素量,以mg/g DCW (Dry cell weight) 单位表示。

1.5 培养条件的优化

取5 mL过夜培养的菌液至50 mL含100 mg/L Amp的LB培养基中再培养约8 h,以获得足够量的种子液。在相同种子液及初始表达条件(同1.3)下摸索培养条件,均重复3次。

1.5.1 最佳诱导时期和表达时间的筛选

取种子液400 μL 接入装有20 mL附加3%蔗糖和100 mg/L Amp的LB培养基的三角瓶(100 mL)中。分别在摇菌6 h、8 h、10 h、12 h时加IPTG至20 $\mu\text{mol/L}$,再于30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导5 h,取样提取番茄红素,确定最佳诱导时期。

采用上述方法接种,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌8 h时加IPTG至20 $\mu\text{mol/L}$,再于30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导3 h、5 h、7 h、9 h时取样提取番茄红素,确定最佳表达时间。

1.5.2 适宜碳源及其浓度的筛选

在LB培养基中分别添加30 g/L葡萄糖、蔗糖、麦芽糖,筛选出适宜碳源。在含1%、3%、5%、7%适宜碳源的LB中,筛选出适宜的工作浓度。

1.5.3 适宜培养温度的确定

摇菌8 h后加IPTG至20 $\mu\text{mol/L}$,分别在25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导5 h,取样提取番茄红素,确定适宜的培养温度。

1.5.4 培养基适宜pH值的确定

将加3%蔗糖的LB培养基的pH值分别调至6.4、6.6、6.8、7.0、7.2,摇菌8 h后加IPTG至20 $\mu\text{mol/L}$,诱导培养5 h后提取番茄红素,确定适宜的pH值。

1.5.5 IPTG适宜浓度的筛选

摇菌8 h后分别添加IPTG至0、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$,诱导5 h后,取样提取番茄红素,筛选最佳IPTG诱导浓度。

1.6 SDS-PAGE电泳

将分别含pET32a (+)与构建的5个载体的菌株,用1.3所述方法于50 mL培养基和37 $^{\circ}\text{C}$ 培养8 h后,各取500 μL 至1.5 mL灭菌离心管中作为非诱导对照,在剩余菌液中加IPTG至0.5 mmol/L,两者再同时于30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导10 h。将诱导后的菌液于8 000 r/min离心10 min收集菌体,加5 mL PBS缓冲液洗1次,再离心弃上清液,加5 mL PBS缓冲液重悬,以功率为15%开3 s关4 s的方式于冰上超声波破碎25 min。将破碎后的菌液于8 000 r/min离心10 min,取其上清1 mL至1.5 mL离心管中再经16 000 r/min离心20 min,取10 μL 作为上清液样本;同时取其沉淀少量至新的离心管中,加10 μL 无菌水,作为细胞碎片样本。另外,将非诱导对照离心后,取少量沉淀加无菌水,作为未诱导样本。将三者加上样缓冲液后煮沸10 min,进行SDS-PAGE电泳,经考马斯亮蓝染色后拍照。

2 结果与分析

2.1 重组载体与目的基因表达水平

测序结果显示, *crtI* 基因序列完全同预期; *LeGGPS2* 与番茄品种 Moneymaker 的 *LeGGPS2* 有 7 个碱基的差异, 所推导的氨基酸序列之间有 2 个残基的不同; 而 *LePSY1* 完全同 M84744, 但

不同于 Y00521 和 X60441 的序列, 且由 pT7-*crtI* 载体的 *Nde* I 酶切补平端与引物 6 的 5'端相连后, 恢复 *Nde* I 位点及该基因的翻译起始密码子 ATG (序列略)。pT7-*crtI*-*LePSY1*、pT7-*crtI*-*LeGGPS2* 和 pT7-*crtI*-*LeGGPS2*-*LePSY1* 载体 (图 2A) 经 PCR 扩增和酶切检测, 均鉴定为阳性 (结果略)。

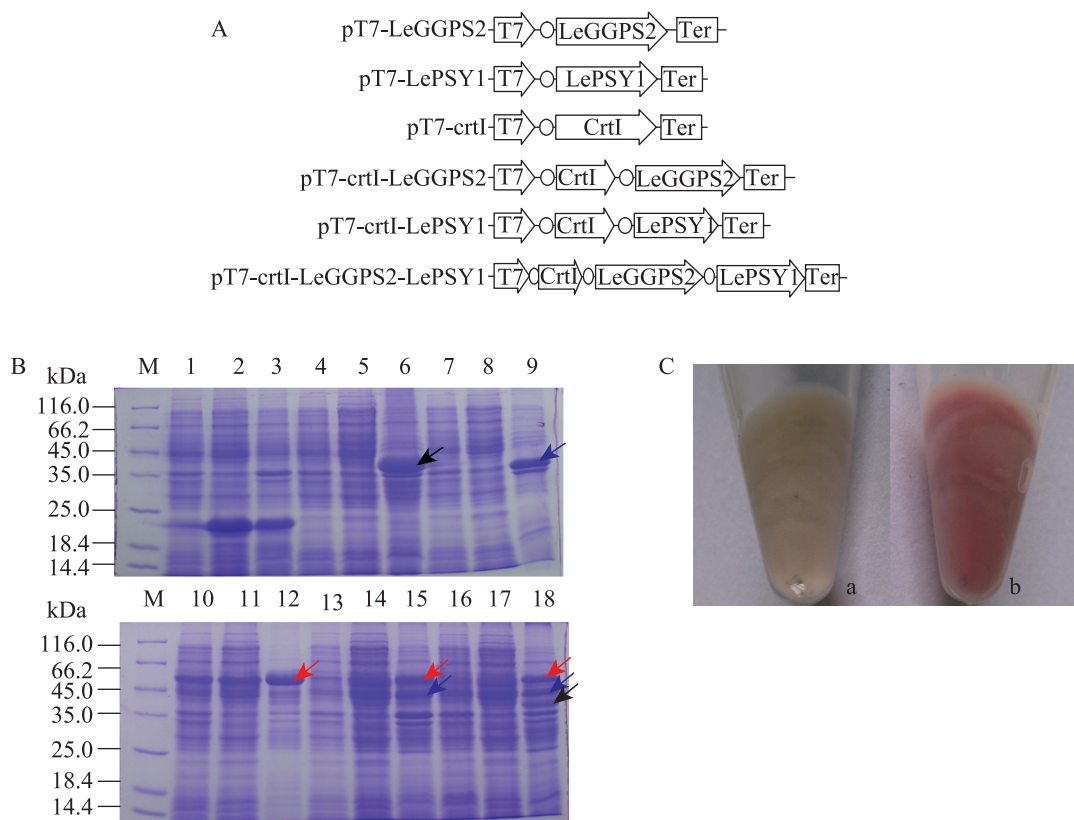


图 2 载体结构与目的基因的表达

Fig. 2 Physical maps of vectors and the expression of the target genes. (A) Physical maps of the vectors. (B) Protein profiles of the gene expression from the five constructed vectors and pET32a(+) as a control. (C) IPTG induced lycopene synthesis. T7: T7 promoter; LeGGPS2: tomato geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene 2; crtI: phytoene dehydrogenase gene of *Erwinia herbicola*; LePSY1: tomato phytoene synthase gene 1; o (before the genes in the map): ribosome binding site; Ter: T7 terminator; M: protein molecular weight marker; 1-3: pET32a(+); 4-6: pT7-*LeGGPS2*; 7-11: pT7-*LePSY1*; 10-12: pT7-*crtI*; 13-15: pT7-*crtI*-*LePSY1*; 16-18: pT7-*crtI*-*LeGGPS2*-*LePSY1*; 1,4,7,10,13,16: whole cell lysates without IPTG induction; 2,5,8,11,14,17: soluble supernatants with IPTG induction; 3,6,9,12,15,18: insoluble cell debris with IPTG induction; a: pET32a(+); b: pT7-*crtI*-*LeGGPS2*-*LePSY1*.

经 IPTG 诱导表达后, 对照 pET32a(+) 无目的条带, 而分别含有 pT7-*LeGGPS2*、pT7-*crtI*、pT7-*LePSY1*、pT7-*crtI*-*LePSY1*、pT7-*crtI*-*LeGGPS2*-*LePSY1* 载体的工程菌均有宽且亮的目的条带 (箭头所指), 说明目的蛋白均得到表达; 其中, *LeGGPS2*、*LePSY1* 和 *crtI* 表达的蛋白分别为 39.019 kDa、46.745 kDa 和 54.839 kDa, 均与预期大小相符。未诱导的与诱导后的菌体同样有相应的表达蛋白带, 但前者明显比后者弱。各菌诱导后, 3 个目的基因表达的蛋白在沉淀中比在上清液中的带要亮, 说明有较多的目的蛋白形成了包涵体 (图 2B)。

发酵结果显示, 仅含 pT7-*crtI*-*LeGGPS2*-*LePSY1* 的菌株经诱导后收集的菌体呈红色, 而含其他载体的菌株诱导培养后均为菌体本色 (图 2C), 表明仅含有 pT7-*crtI*-*LeGGPS2*-*LePSY1* 的菌株能合成番茄红素。

2.2 诱导时期和表达时间对番茄红素含量的影响

表 2 可见, 培养 6 h 时, 即在工程菌处于对数生长中期时诱导, 番茄红素含量相对来说最低; 培养 8 h 时诱导, 番茄红素含量最高, 此时 OD_{600} 值在 3.00 左右, 且菌体生长处于对数生长后期; 培养 10 h 和 12 h 时, 菌体 OD_{600} 值均接近 5.00, 即细菌生长处于稳定期, 此时诱导的番茄红素含量虽比在对数生长中期诱导的番茄红素含量多, 但明显比在对数生长后期诱导时的含量少。因此, 含有 pT7-*crtI*-*LeGGPS2*-*LePSY1* 的工程菌表达番茄红素时添加 IPTG 诱导的最佳时期为对数生长后期。

如表 3 所示, 摇菌 8 h 时添加 IPTG 诱导后

的 0~5 h 内, 番茄红素含量随时间延长而增加, 且于 5 h 时达到最高, 但随后反而减少。这可能是由于诱导 5 h 后菌体衰老, 代谢废物增加, pH 值改变, 影响了番茄红素合成和稳定。因此, IPTG 诱导 5 h 是最佳诱导时间。

表 2 诱导时期对番茄红素含量的影响

Table 2 Effects of the inducing phases on the lycopene content of the bacteria

Culture time before inducing (h)	OD_{600} before inducing	Lycopene content (mg/g DCW)
6	2.012	(0.350±0.026) d
8	2.937	(1.036±0.007) a
10	4.898	(0.661±0.018) b
12	4.923	(0.447±0.012) c

Different letters in the third column indicate difference of significant levels.

表 3 诱导时间对番茄红素含量的影响

Table 3 Effects of the inducing time on the lycopene content of the bacteria

Inducing time (h)	Lycopene content (mg/g DCW)
0	(0.443±0.004) d
3	(0.537±0.007) c
5	(1.036±0.007) a
7	(0.609±0.013) b
9	(0.404±0.010) e

Different letters in the second column indicate difference of significant levels.

2.3 碳源及其浓度对番茄红素含量的影响

由表 4 可见, 工程菌在添加葡萄糖和麦芽糖的培养基中生长速度比在添加蔗糖中的快, 但前两者培养的菌体的番茄红素含量远远低于以蔗糖为碳源的菌体的番茄红素含量, 故选择蔗糖作

为该工程菌的适宜碳源。

蔗糖含量从 1% 到 5% 时, 每升菌液干重也随之增长, 但当蔗糖含量到 7% 时, 菌体干重反而减少, 而番茄红素含量以 3% 蔗糖时为最高 (表 5)。

表 4 不同碳源对番茄红素含量的影响

Table 4 Effects of different carbon sources on the lycopene content of the bacteria

Carbon source	Cell weight (g/L)	Lycopene content (mg/g DCW)
Sucrose	1.2	(1.059±0.007) a
Glucose	2.4	(0.286±0.007) c
Maltose	2.1	(0.348±0.004) b

Different letters in the third column indicate difference of significant levels.

表 5 蔗糖浓度对番茄红素含量的影响

Table 5 Effects of sucrose concentration on the lycopene content of the bacteria

Sucrose concentration (%)	Cell weight (g/L)	Lycopene content (mg/g DCW)
1	1.2	(0.932±0.011) c
3	1.2	(1.087±0.014) a
5	1.5	(0.792±0.006) d
7	0.8	(0.966±0.011) b

Different letters in the third column indicate difference of significant levels.

2.4 培养温度对番茄红素含量的影响

表 6 显示, 30 °C 培养条件下, 工程菌产生的番茄红素量最高。25 °C 培养时菌体干重与在 30 °C 时差别不大, 但番茄红素含量明显偏低; 37 °C 培养时的菌体最多, 但番茄红素含量最低。

表 6 培养温度对番茄红素含量的影响

Table 6 Effects of culture temperature on the lycopene content of the bacteria

Temperature (°C)	Cell weight (g/L)	Lycopene content (mg/g DCW)
25	1.1	(0.703±0.031) b
30	1.2	(1.110±0.011) a
37	1.7	(0.491±0.030) c

Different letters in the third column indicate difference of significant levels.

2.5 培养基 pH 对番茄红素含量的影响

工程菌在所设的 5 个 pH 值的培养基中均能正常生长, 但 pH 在 6.6 以下时, 不利于番茄红素合成; pH 6.8 时, 番茄红素产量最高; pH 值在 7.0 和 7.2 时略有降低 (表 7)。

表 7 培养基 pH 值对番茄红素含量的影响

Table 7 Effects of pH value of the medium on the lycopene

pH	Cell weight (g/L)	Lycopene content (mg/g DCW)
6.4	1.1	(0.429±0.011) d
6.6	1.2	(0.589±0.022) c
6.8	1.2	(1.033±0.018) a
7.0	1.2	(0.918±0.014) b
7.2	1.3	(0.898±0.013) b

Different letters in the third column indicate difference of significant levels.

2.6 IPTG 浓度对番茄红素含量的影响

表 8 可见, IPTG 不加时存在泄露; 0~60 μmol/L 范围内, 番茄红素含量随 IPTG 浓度的增加而增加, 至 80 μmol/L 时达到最高, 但加至 100 μmol/L 时又降低。这可能和 T7 强启动子、酶的活性和可溶性有关。

表 8 IPTG 浓度对番茄红素合成的影响
Table 8 Effects of IPTG concentration on the lycopene content of the bacteria

IPTG concentration ($\mu\text{mol/L}$)	Lycopene content (mg/g DCW)
0	(0.468 \pm 0.011) f
20	(1.064 \pm 0.018) e
40	(1.176 \pm 0.018) c
60	(1.448 \pm 0.007) b
80	(2.124 \pm 0.034) a
100	(1.125 \pm 0.011) d

Different letters in the second column indicate difference of significant levels.

3 讨论

本研究将由 T7 启动子控制的 *LeGGPS2*、*LePSY1*、*crtI*、*crtI-LePSY1* 和 *crtI-LeGGPS2-LePSY1* 基因 (图 2A) 分别转化进大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中, 均能表达出预期大小的目的蛋白 (图 2B), 但仅 *crtI-LeGGPS2-LePSY1* 共表达时才能合成番茄红素 (图 2C), 表明这 3 个基因的共表达盒构建正确, 而且真核基因 *LeGGPS2* 和 *LePSY1* 在组织结构和表达方式上得到了正确的原核化转换, 所表达的蛋白具有预期的功能。由于原核细胞和植物质体的基因表达机制具有相似性, 因此, 如果今后将 *T7::crtI-LeGGPS2-LePSY1::Ter* 基因导入番茄质体, 并通过整合进核基因组的、表达后定位于质体的 T7RNAP 专一性诱导表达, 可望在番茄质体中建立一条完整的番茄红素合成途径, 促进番茄红素的合成。

本研究利用 *T7::crtI-LeGGPS2-LePSY1::Ter* 基因在 BL21 (DE3) 中和优化的发酵条件下合成番茄红素的最高含量为 2.124 mg/g DCW。该水

平虽然比 Matthews 等直接利用野生型 *crtE-crtB-crtI* 基因簇获得的 (160 \pm 32) $\mu\text{g/g}$ DCW 的产量高^[18], 但比刘敏等采用 T7/T7RNAP 系统表达 *crtE-crtB-crtI* 基因簇获得的 5.8 mg/g DCW 产量低^[15], 更显著低于 Alper 等的 18 mg/g DCW^[10]和 Yuan 等的 22 mg/g DCW^[12]。究其原因, 既可能是由于 T7/T7RNAP 系统活性过强, 所表达的 *LeGGPS2*、*LePSY1* 和 *crtI* 蛋白较多地形成了包涵体 (图 2B), 也可能是由于合成番茄红素的前体物质 FPP 不足而引起的^[18]。其中, 前者的解决方法可以通过降低 IPTG 使用浓度或采用弱启动子以降低目的蛋白的表达水平, 或改善目标酶的可溶性; 后者可以通过导入 *dxs*^[19]、*idi*^[8] 等基因来增加 FPP 量, 或者按 Vadali 等的方式, 在菌株中建立甲羟戊酸途径以协同已存在的非甲羟戊酸途径来促进前体物合成^[17]。此外, *LeGGPS2* 和 *LePSY1* 在番茄中为质体定位蛋白, 在被转运进质体并切除质体定位信号肽后方能成为成熟蛋白, 但在本研究中是否由于原核表达未切除该信号肽而导致 2 个酶的活性及工程菌株合成番茄红素的能力偏低, 尚有待证实。

本研究结果显示, 菌体处于对数生长后期时用 IPTG 进行诱导比较适合 (表 2), 可能是因为该时期的细胞处于“活力”最旺的时期, 菌体生长、代谢和蛋白合成能力比较旺盛, 中间代谢物比较稳定, 有丰富的代谢中间产物用于番茄红素合成。这与 Ruther 等研究玉米黄素原核合成的结果相一致^[20]。值得注意的是, 在未添加 IPTG 诱导时, 含 *T7::crtI-LeGGPS2-LePSY1* 基因的工程菌能表达一定量的目的蛋白 (图 2B), 也能合成番茄红素 (表 8), 表明 T7/T7RNAP 表达系统存

在泄露；这与刘敏等^[15]利用带有 T7 启动子和欧文氏菌 *crtE*、*crtB*、*crtI* 的 BL21 (DE3) 表达番茄红素情况相似。此外，本研究添加的 IPTG 浓度极低 (表 8)，只需 0.08 mmol/L 即可，而高浓度的 IPTG 反而不利于合成番茄红素。Kim 等发现不添加 IPTG 的本底表达即可满足合成番茄红素所需蛋白，而添加 IPTG 后反而使得番茄红素产量变低^[8]。Yoon 等也发现无 IPTG 诱导 *crtE-crtB-crtI* 表达合成的番茄红素量是用 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导合成量的 2 倍^[9]。这可能是由于目的蛋白表达过量或过快时容易形成包涵体所致 (图 2B)^[8-11]。

本研究的工程菌在以蔗糖为碳源时，番茄红素含量最高 (表 4)，但蔗糖浓度并非越高越好 (表 5)，这可能是因为“葡萄糖效应”，即当碳源浓度超过一定浓度，细胞反而会因为“负担过重”，超过自身的氧化能力，从而抑制菌体生长或影响蛋白的表达^[21]；此外，蔗糖含量过高会赋予培养基过高的渗透压，影响细菌的生长和代谢。

REFERENCES

- [1] Sandmann G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. Arch Biochem Biophys, 2001, 385(1): 4-12.
- [2] Giovannucci E. A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. Exp Biol Med, 2002, 227(10): 852-859.
- [3] Fraser PD, Romer S, Shipton CA, et al. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(2): 1092-1097.
- [4] Wan Q, Zhang XG, Song M. Fruit-specific RNAi-mediated *Lcy* gene silencing enhances content of lycopene in tomatoes. Chin J Biotech, 2007, 23(3): 429-433.
- [5] Magee AM, Coyne S, Murphy D, et al. T7 RNA polymerase-directed expression of an antibody fragment transgene in plastids causes a semi-lethal pale-green seedling phenotype. Transgenic Res, 2004, 13(4): 325-337.
- [6] Kahlau S, Aspinall S, Gray JC, et al. Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes. J Mol Evol, 2006, 63(2): 194-207.
- [7] Hibberd JM, Linley PJ, Khan MS, et al. Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. Plant J, 1998, 16(5): 627-632.
- [8] Kim SW, Kim JB, Ryu JM, et al. High-level production of lycopene in metabolically engineered *E. coli*. Proc Biochem, 2009, 44(8): 899-905.
- [9] Yoon SH, Kim JE, Lee SH, et al. Engineering the lycopene synthetic pathway in *E. coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea ananatis*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(1): 131-139.
- [10] 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.
- [11] Fraser PD, Misawa N, Linden H, et al. Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. J Biol Chem. 1992, 267(28): 19891-19895.
- [12] 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.
- [13] Li ZH, Matthews PD, Burr B, et al. Cloning and characterization of a maize cDNA encoding

- phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Mol Biol*, 1996, 30(2): 269–279.
- [14] Zhu XF, Suzuki K, Okada K, et al. Cloning and functional expression of a novel geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(3): 357–361.
- [15] Liu M, Li RG, DU GC, et al. Studies of *Escherichia coli* accumulating lycopene and its culturing conditions. *China Biotechnol*, 2006, 26(8): 47–51.
刘敏, 李荣贵, 杜桂彩, 等. 累积番茄红素的大肠杆菌工程菌及其培养条件的研究. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(8): 47–51.
- [16] Maliga P. Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(1): 20–28.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Wang CW, Oh MK, Liao JC. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 62(2): 235–241.
- [20] Ruther A, Misawa N, Böger P, et al. Production of zeaxanthin in *Escherichia coli* transformed with different carotenogenic plasmids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48(2): 162–167.
- [21] Lau J, Tran C, Licari P, et al. Development of a high cell-density fed-batch bioprocess for the heterologous production of 6-deoxyerythronolide B in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2004, 110(1): 95–103.