

• 工业生物技术 •

稳定表达 MVA 途径基因提高番茄红素产量

李贞霞¹, 陈倩倩^{1,2,3}, 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. 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.

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.

摘要: 萜类化合物的直接前体物质异戊烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸酯 (DMAPP) 可以由 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸途径 (MEP 途径) 和甲羟戊酸途径 (MVA 途径) 合成。在已经优化 MEP 合成途径、番茄红素合成途径关键基因表达的重组大肠杆菌 LYC101 中, 引入 MVA 途径基因, 进一步提高重组大肠杆菌合成萜类化合物的能力。质粒 pALV23 和 pALV145 是本实验室在研究 MVA 途径基因协调表达时, 用核糖体结合位点 (RBS) 文库连接 MVA 途径各基因构建质粒文库, 而筛选到的有效提高 β -胡萝卜素产量的质粒。首先比较了两个质粒分别在低产和高产番茄红素的菌株中对番茄红素合成的影响。结果表明, 两个质粒在高、低产番茄红素的菌株中都可以有效提高番茄红素产量。在高产菌 LYC101 中 pALV23 比 pALV145 使番茄红素产量更高。然后, 用 CRISPR-Cas9 系统辅助同源重组的方法, 将 MVA 途径基因和启动子一共 6.7 kb 的条带整合到 LYC101 菌株的染色体上, 得到遗传稳定的菌株 LYC102。LYC102 的番茄红素产率达 40.9 mg/g, 是出发菌株 LYC101 产率的 2.19 倍, 比用质粒表达 MVA 途径基因的菌株提高了 20%。在重组大肠杆菌中同时表达 MVA 途径和 MEP 途径, 可以有效提高萜类化合物产率; 文中构建了不含质粒的、遗传稳定的高产番茄红素菌株, 为产业化合成番茄红素提供基础; 同时构建平台菌株, 可以用于其他萜类化合物合成。

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

Received: July 10, 2018; **Accepted:** September 4, 2018

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: 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

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)。

网络出版时间: 2018-11-01

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20181030.1544.002.html>

Integrating balanced mevalonate pathway into chromosome for improving lycopene production in *Escherichia coli*

Zhenxia Li¹, Qianqian Chen^{1,2,3}, 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: Isoprenoids are all derived from two five-carbon building blocks called isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP), which are synthesized either by the mevalonate (MVA) pathway or 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway. In this study, the MVA pathway genes were integrated into the chromosome of LYC101, in which the expression of key genes in the MEP synthesis pathway and lycopene synthesis pathway were optimized by artificial regulatory parts, to further improve the production of isoprenoids in *Escherichia coli*. The plasmids pALV23 and pALV145 were screened from a plasmid library that constructed by using the RBS library to link the genes of the MVA pathway, which greatly increased the production of β -carotene. The effects of plasmids pALV23 and pALV145 on the lycopene production in low and high lycopene production strain, LYC001 and LYC101, were compared, respectively. The production of lycopene was increased by plasmids pALV23 and pALV145 in both strains. In high lycopene production strain LYC101, pALV23 produced more lycopene than pALV145. Then, the MVA gene together of promoter of pALV23 was integrated into the chromosome of LYC101 at *poxB* site using method of homologous recombination helped by CRISPR-Cas9 system, resulted in genetically stable strain, LYC102. The yield of lycopene of LYC102 was 40.9 mg/g DCW, 1.19-folds higher than that of LYC101, and 20% more than that of LYC101 with pALV23. Simultaneous expression of MVA pathway and MEP pathway in recombinant *E. coli* can effectively increase the yield of terpenoids. In this study, a plasmid-free, genetically stable, high-yielding lycopene strain was constructed, which could be used for industrialization. Also, the platform strain can be used for the synthesis of other terpenoids.

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

番茄红素是类胡萝卜素的一种, 具有强抗氧化性和极强的清除自由基的能力^[1], 对防治前列腺癌、肺癌、乳腺癌等有很好的疗效, 能有效抑制癌细胞扩散^[2-4]。番茄红素除了用于生产保健食品和药品外, 还能添加到冰淇淋、蛋糕等食品中, 提高其营养价值, 具有巨大的市场需求。微生物发酵生产天然番茄红素不受光照、气候、产地等条件的限制, 且产品具有经济、安全等优势, 因此该技术受到国内外市场的广泛青睐。

番茄红素等萜烯类化合物合成的前体物质异戊烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸酯 (DMAPP), 可以经甲羟戊酸途径 (MVA 途径) 和 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸途径 (MEP 途径) 两条途径合成 (图 1)。近年来对重组大肠杆菌提高番茄红素产量的改造主要集中在提高 MEP 途径关键基因表达、引入外源 MVA 途径基因提高前

体物质供应方面。另外, 近年来部分研究组通过代谢流分析等研究了非代谢途径基因表达水平对萜类化合物产量的影响^[5-9]。Alper 等利用代谢流分析, 验证了敲除谷氨酸脱氢酶基因 (*gdhA*)、丙酮酸脱氢酶基因 (*aceE*)、转醛醇酶基因 (*talB*)、甲酸脱氢酶基因 (*fdhF*) 对番茄红素产量的影响, 发现同时敲除 *gdhA*、*aceE* 和 *fdhF*, 产量提高 37%^[5]。Choi 等发现高表达磷酸果糖激酶基因 (*pfkA*)、6-磷酸葡萄糖异构酶基因 (*pgi*)、果糖-二磷酸醛缩酶 II 基因 (*fbaA*)、磷酸甘油醛异构酶基因 (*tpiA*)、异柠檬酸脱氢酶基因 (*icdA*) 和苹果酸脱氢酶基因 (*mdh*) 可以提高番茄红素产量, *fbaA*、*tpiA* 和 *mdh* 效果最明显。*gdhA* 和 2,3-二磷酸甘油酸磷酸变位酶基因 (*gpmAB*) 双敲除, 同时高表达 *mdh* 和磷酸烯醇丙酮酸合成酶基因 (*pps*), 番茄红素产量达到 283 mg/L^[6]。Farmer 等

通过高表达 *pps*, 平衡磷酸烯醇丙酮酸 PEP 和 3-磷酸甘油醛 (G3P) 供应提高番茄红素产量^[7]。Sun 等调控 MEP 途径关键基因、中央代谢途径和 ATP 合成途径关键基因表达, 进一步提高番茄红素产量^[8]。Wu 等通过增加产番茄红素大肠杆菌株细胞膜的含量, 增加菌体承载番茄红素的能力进一步提高番茄红素产量^[9]。

将 MVA 途径基因引入大肠杆菌可以提高萜类化合物前体物质供应, 提高番茄红素产量^[10-14]。含有来自链霉菌属 (*Streptomyces* sp. CL190) 的整个 MVA 途径的重组大肠杆菌, 番茄红素产量是仅含有 MEP 途径的重组大肠杆菌的 2 倍。但是, 甲羟戊酸途径酶的高水平表达可能抑制细胞生长^[11]。Pitera 等发现过表达乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶基因 (*atoB*)、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 合成酶基因 (*mvaS*) 和羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原

酶 1 (*hmg1*), 可以使 MVA 途径中间体羟甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMGCoA) 积累, 从而抑制了细胞生长^[15]。当使用 MVA 途径增加紫穗槐二烯产量时, 由 *erg12* 编码的甲羟戊酸激酶 (MK) 被鉴定为另一种限速酶^[16]。因此, MVA 途径各基因平衡表达, 减少 MVA 途径有毒中间产物积累, 成为提高番茄红素产量的重要手段。

Ye 等用 II 型限制性内切酶基础上的模块 (Type II s restriction based combinatory modulation, TRCM) 构建 MVA 途径 5 个基因的 RBS 文库, 根据菌株颜色, 筛选到分别使 β -胡萝卜素产量提高 86% 和 96% 的质粒^[17]。本研究从已经精细调控 MEP 途径基因的产番茄红素菌株 LYC101 出发, 研究 MVA 途径协调表达对番茄红素产量的影响, 并整合 MVA 途径基因使其稳定表达, 提高番茄红素的产量和产率。

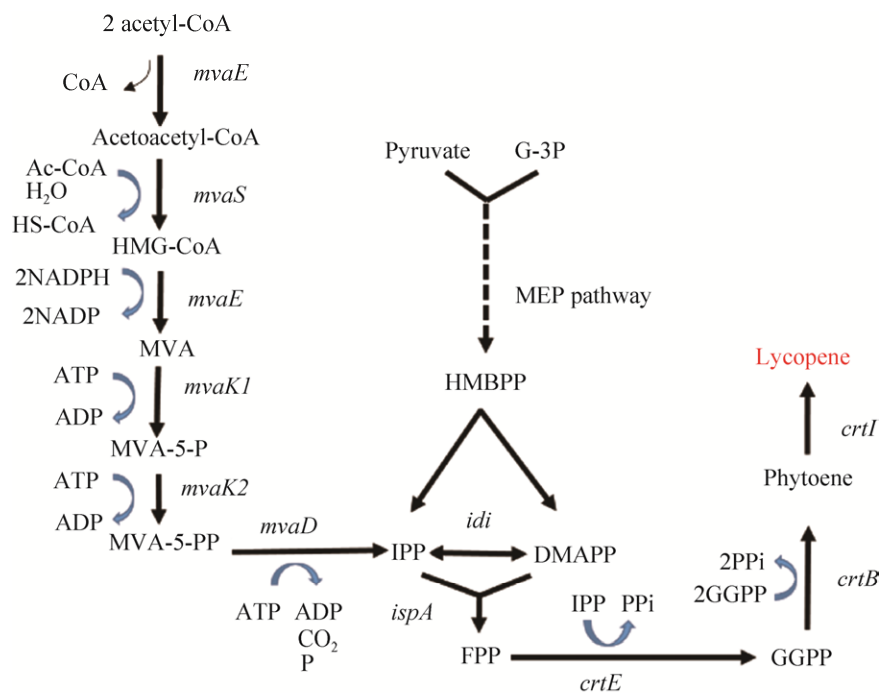


图 1 重组大肠杆菌中番茄红素合成途径(---►表示包含多步催化反应)

Fig. 1 Construction of lycopene synthetic pathway in *E. coli* through MVA and MEP pathway. ---► represents multi-steps reaction.

1 材料与方法

1.1 试剂

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; 质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; Trans 2K Plus DNA Marker、EasyTaq PCR SuperMix DNA 聚合酶购自北京全式金生物工程公司; PrimeSTARTM HS DNA 聚合酶和 DNase I (Recombinant DNase I, RNase-free, Cat, No 2270 A) 购自宝生物工程 (大连) 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; 番茄红素标品购自美国 Sigma 公司 (Cat. No. 75051); 其他试剂均为分析纯。

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。实时定量 PCR 仪, CFX connectTM Real-Time system (Bio-Rad, Hercules, USA)。

1.3 菌株与质粒

本研究所用菌株和质粒见表 1。

1.4 方法

1.4.1 培养基及培养方法

LB 培养基: 1 L 培养基包含 10 g 胰蛋白胨、

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains	Description	Sources
LYC001	ATCC 8739, M1-37:: <i>dxs</i> , M1-46:: <i>idi</i> , M1-93:: <i>crtEIB</i>	[8]
LYC101	ATCC 8739, <i>ldhA</i> :: <i>trc</i> :: <i>crtEIB</i> , M1-37:: <i>dxs</i> , M1-46:: <i>idi</i> , M1-46:: <i>sucAB</i> , M1-46:: <i>sdhABCD</i> , M1-46:: <i>talB</i> , mRSL-4:: <i>ispG</i> , mRSL-14:: <i>ispH</i>	Lab collection
LYC001-pALV23	LYC001 with plasmid of pALV23	This work
LYC001-pALV145	LYC001 with plasmid of pALV145	This work
LYC101-pALV23	LYC101 with plasmid of pALV23	This work
LYC101-pALV145	LYC101 with plasmid of pALV145	This work
LYC102	LYC101, <i>poxB</i> ::ALV23	This work
Plasmids		
pRed_Cas9	<i>kan</i> , derived from pKD46, <i>exo</i> , <i>bet</i> , <i>gam</i> , arabinose operon, Cas9 from, pCas9, temperature-conditional replicon	Lab collection
pALV23	<i>cat</i> , plasmid from pACYC184-AL-mva	This work
pALV145	<i>cat</i> , plasmid from pACYC184-AL-mva	This work
pACYC184-gRNA	<i>cat</i> , derived from pACYC184-M, gRNA with N20	Lab collection
pPoxB-N20	<i>cat</i> , derived from pACYC184-gRNA, gRNA with N20 and homologous arms of <i>poxB</i>	This work
pPoxB-ALV23	<i>cat</i> ; <i>trac</i> promoter followed by ALV23 amplified from pALV23 cloned into pPoxB-N20	This work

5 g 酵母提取物和 5 g 氯化钠；氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素终浓度分别为 100、34、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。LB 固体培养基含 1.5% 的琼脂。

LB+2% 甘油培养基：1 L 培养基包含 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、5 g 氯化钠和 20 mL 甘油。

1.4.2 番茄红素产量测定方法

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+2% 甘油培养基) 中， $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、250 r/min 培养 24 h。收集菌体用于测定番茄红素含量。每个待测样品分别有 3 个平行样，实验结果取自 3 个平行的平均值。

测定番茄红素产量时，先取 500 μL 待测菌液，于 13 000 r/min 离心 5 min，无菌水清洗后，用 1 mL 丙酮悬浮沉淀，在 $55\text{ }^\circ\text{C}$ 黑暗条件下萃取 15 min，然后将样品在 14 000 r/min 下离心 10 min，含有番茄红素的上清过滤后用于测定番茄红素产量。用高效液相色谱测定番茄红素的浓度^[12]。检测条件：VWD 检测器，Symmetry C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)，流动相为甲醇：乙腈：二氯甲烷 (21：21：8)，流速 1.0 mL/min，时间 20 min，柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$ ，检测波长 480 nm。每个待测样品分别有 3 个平行样，实验结果取自 3 个平行的平均值。用购自 Sigma 公司的番茄红素标准品构建 HPLC 标准曲线。单位细胞干重 (DCW) 用 1 $OD_{600}=0.343\text{ g}$ 干细胞来换算。

1.4.3 整合质粒构建

用 Golden Gate 方法构建质粒^[17-18]，首先构建 pPoxB-N20 质粒，用于将外源基因通过 *cas9* 辅助方法插入到重组大肠杆菌的丙酮酸氧化酶基因 (*poxB*) 位点。以 pACYC184-gRNA 质粒为模板，以 N20-B-F1/N20-B-R1 扩增质粒骨架、以

poxB-N20-B-F2/N20-B-R2 为引物扩增含 *poxB* 基因上的 N20 片段的骨架，用 poxB-*bsaI*-F1/poxB-*bsaI*-R1 扩增待整合区域，将 3 个片段用 Golden Gate 方法进行连接，得到 pPoxB-N20 质粒，构建流程见图 2。其中 poxB-N20-B-F2 引物上含 *cas9* 识别的 *poxB* 基因的一段与 GCC 相邻的 20 个碱基 (CGCCGACACGTTAGTGCTACT)，通过 PCR 将这 20 个碱基连接到 gRNA 上，用于识别目标 DNA，并对其进行切割。

然后构建用于重组的 pPoxB-ALV23 质粒。用 poxB-*bsaI*-F2/poxB-*bsaI*-R2 对 pPoxB-N20 质粒进行扩增，得到含同源重组的 *poxB* 同源臂和 *cas9* 识别位点的 N20 的片段。用 MVA-*bsaI*-F/MVA-*bsaI*-R 扩增 pALV23 质粒，得到 pALV23 质粒上 MVA 途径几个基因及其启动子序列，将两片段用 Golden Gate 方法进行连接，得到 pPoxB-ALV23，用于在 LYC101 中进行同源重组。构建菌株及所用质粒见表 1。本研究所用引物序列见表 2。

1.4.4 CRISPR-Cas9 系统辅助基因整合

根据 Zhao 等文献报道^[19]，用 CRISPR-Cas9 系统辅助整合 MVA 途径基因。在 LYC101 菌株中转化 pRed_Cas9 和 pPoxB-ALV23 质粒，然后用阿拉伯糖诱导 *cas9* 表达，对染色体 *poxB* 的 N20 区域进行切割，pPoxB-ALV23 提供 *poxB* 同源臂和 MVA 途径基因及启动子进行整合。整合后用 *mvaE*-430-r/*poxB*-yz-up 引物进行验证，整合成功、测序正确菌株命名为 LYC102。验证引物见表 2。

2 结果与分析

2.1 质粒表达 MVA 途径基因对番茄红素产量的影响

为了消除 MVA 途径中间产物积累对细胞生长的影响，本研究室用 TRCM 方法，通过构建

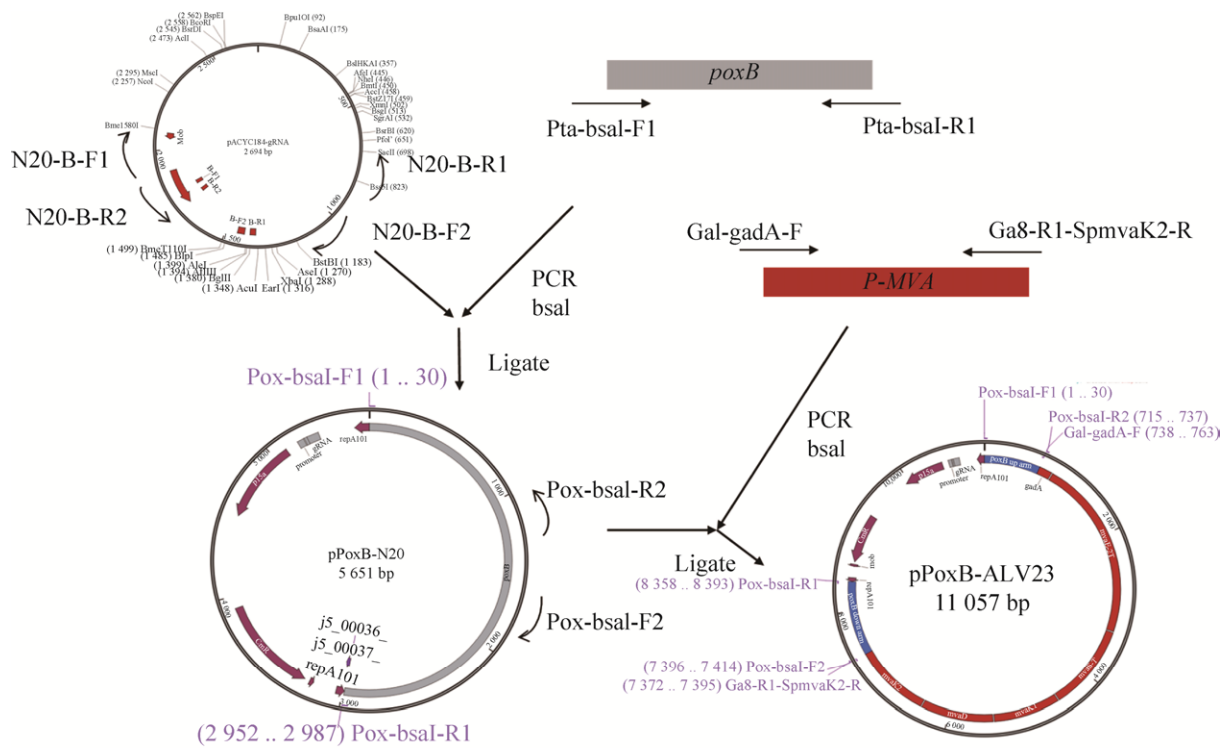


图 2 质粒构建流程图

Fig. 2 Construction of plasmid.

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this work

Primers	Sequences (5'-3')
N20-B-F1:	CCAGGTCTCAGTGCGCCATGAGAACGAACCATTTG
N20-B-R1:	CCAGGTCTCAGCTAAGATCTGACTCCATAACAGAGTACTCGC
poxB-N20-B-F2:	CCAGGTCTCATAGCCGCCGACACGTTAGTGCTACTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGC
N20-B-R2:	CCAGGTCTCAACCGCTGGCTAAATACGGAAGGATCT
Pox-bsaI-F1	CCAGGTCTCACGGT GCTGACGCGCGATGTAACCGCGGTGATTA
Pox-bsaI-R1	CCAGGTCTCAGCACCGAAATGGATATCGTTCGGGTTTGATTTTCATCGCCA
Pox-bsaI-F2	CCAGGTCTCA CCAG TGGTACGCCAACGGTGTGG
Pox-bsaI-R2	CCAGGTCTCA GAGC ATCATCGGGCATAAGGCGATTAT
Gal-gadA-F	CCAGGTCTCA GCTCGGGCGATTTTTATTACGATAATAAAG
Ga8-R1-SpmvaK2-R	CCAGGTCTCA CTGGTTACGATTTGTCGTCATGTCCTAT
P15A-YZ-Up	TTTATCTCTTCAAATGTAGCACCT
mvaE-430-r	AGGCATCCGTTAACCCATC
poxB-yz-up	ATATCGCGCCGGCAATAT

RBS 文库, 将来源于粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* CGMCC No.1.2135 的乙酰辅酶 A 乙酰转移酶/HMG-CoA 还原酶基因 (*mvaE*) 和 *mvaS* 基因, 以及来源于肺炎链球菌 *Streptococcus*

pneumoniae CGMCC No.1.8722 的甲羟戊酸激酶基因 (*mvaK1*)、磷酸甲羟戊酸激酶基因 (*mvaK2*) 和甲羟戊酸 5-焦磷酸脱羧酶基因 (*mvaD*) 用不同 RBS 连接到同一质粒上, 得到使 MVA 途径协调

表达、从而 β -胡萝卜素产量提高的一系列质粒^[17]，其中 pALV23 和 pALV145 使 β -胡萝卜素产量最高，为了研究 MVA 途径基因在重组大肠杆菌中对番茄红素产量的影响，本研究将这两个质粒转化到两株产番茄红素重组大肠杆菌 LYC001 和 LYC101 中进行研究。LYC001 是在整合来自成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 的 *crtEIB* 基因的基础上，分别用 M1-37 和 M1-46 启动子对 MEP 途径的 *idi* 和 *dxs* 进行调控的菌株，而 LYC101 是在 LYC001 基础上对中央代谢途径基因和 MEP 途径关键基因 *ispG* 和 *ispH* 进一步调控所得，LYC101 的番茄红素产量远远高于 LYC001 菌株^[9,20]。用这两株菌为出发菌株，研究两个质粒分别对两株菌番茄红素产量的应用，考察质粒在高、低产菌株作用是否相同。

结果如图 3 所示，LYC101 中 MEP 途径协调表达，消除中间体 HMBPP 积累引起的细胞毒性，细胞生长略优于 LYC001，细胞 OD_{600} 比 LYC001 高 16.5%，而番茄红素产量是 LYC001 的 3.75 倍。将 pALV23 和 pALV145 转化 LYC001 和 LYC101 菌株后，对细胞生长没有太大影响（图 3A）。将

pALV23 和 pALV145 转化 LYC001 后，番茄红素产量分别提高了 1.98 倍和 2.9 倍，分别为 14.87 mg/g DCW 和 19.45 mg/g DCW，两个质粒对番茄红素产量提高与 Ye 文献中对 β -胡萝卜素产量提高结果一致，pALV145 质粒提高类胡萝卜素产量效果优于 pALV23 质粒。将 pALV23 和 pALV145 转化 LYC101 后，番茄红素产量分别提高了 83% 和 37%，分别为 34.12 mg/g DCW 和 25.66 mg/g DCW。pALV23 质粒提高番茄红素产量效果优于 pALV145 质粒，因为 LYC101 番茄红素产量高于 LYC001，推测在类胡萝卜素产量不同的不同菌株中，使类胡萝卜素产量更高的 MVA 途径各基因表达比例并不相同，所以在低产类胡萝卜素菌株中，pALV145 质粒优于 pALV23，而在高产类胡萝卜素的菌株中，结果相反，可能和代谢流和代谢中间体积累有关。

2.2 MVA 途径基因整合质粒构建

因为质粒表达基因时，往往因为质粒不稳定而使质粒大量丢失，从而影响工程菌目标产物的产量^[21]，为了使 MVA 途径基因稳定表达，本研究将 MVA 途径基因整合到 LYC101 的 *poxB* 位点。

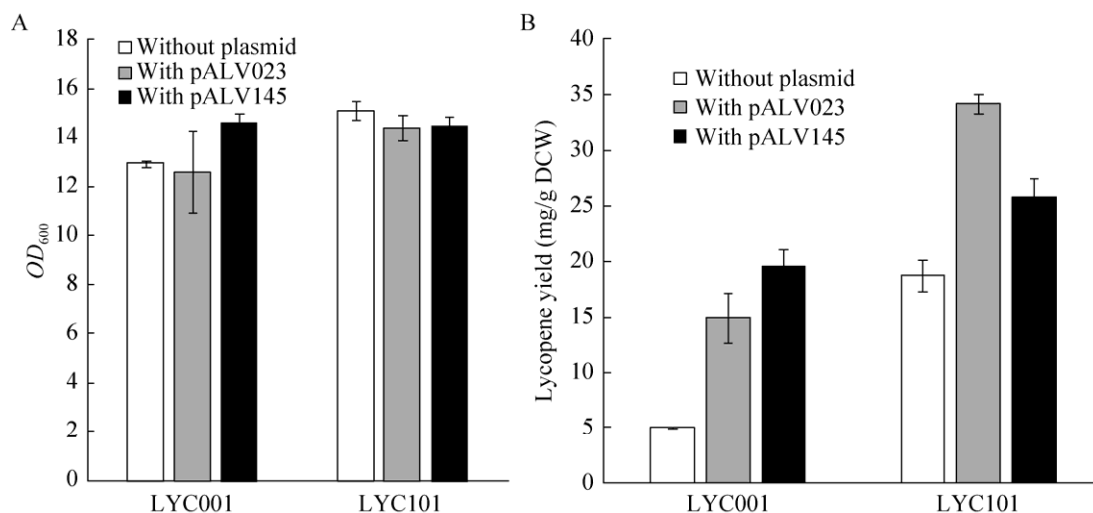


图 3 MVA 质粒在产番茄红素菌株中验证

Fig. 3 Lycopene production and cell growth of strains with pALV23 and pALV145. (A) Cell growth. (B) Lycopene yield.

分别扩增出构建 *poxB*-N20 质粒的 3 个条带, 结果如图 4A 所示, 分别得到 2.2 kb 的骨架 1 和 400 bp 的骨架 2, 以及 2.9 kb 的 *poxB* 基因片段。将 3 个片段用 Golden Gate 方法连接后, 取阳性克隆用 P15A-YZ-Up/*Pox*-*bsaI*-R2 引物进行菌落 PCR, 验证构建成功质粒, 结果如图 4B 所示, PCR 得到 1.25 kb 条带, 序列正确的质粒为 *poxB*-N20。

PCR 方法扩增 pALV23 质粒上 MVA 途径几个基因及其启动子序列; 用 PCR 方法扩增含 *poxB*-N20 质粒, 得到含 *poxB* 同源臂和 *poxB* 基因中间一段 gRNA 识别序列的 N20 片段, 将两片段

用 Golden Gate 方法进行连接。将阳性克隆用 P15A-YZ-Up/*mvaE*-430-r 进行 PCR 验证, 结果如图 4C 所示, 约 1.85 kb 条带为正确克隆, 得到 p*PoxB*-ALV23, 用于整合 MVA 途径基因。

2.3 CRISPR-Cas9 系统辅助整合 MVA 途径基因提高 β -胡萝卜素产量

CRISPR-Cas9 系统是一种强大的基因组编辑工具, 利用靶点特异性的 RNA (Guide RNA, gRNA) 将 Cas9 核酸酶带到基因组上的具体靶点, 从而对特定基因位点进行切割。本研究根据 Zhao 等文献报道, 用 CRISPR-Cas9 系统辅助技术整合基因^[19]。

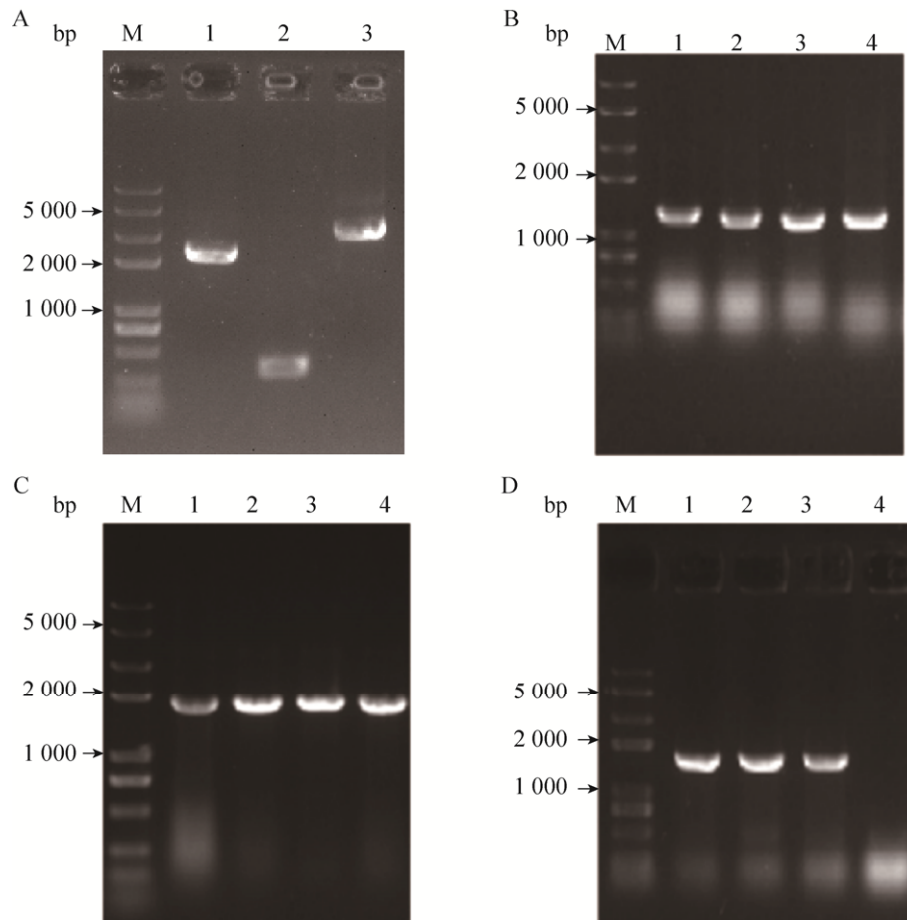


图 4 构建质粒验证及重组验证

Fig. 4 Certify the correct plasmid and stain after MVA genes integrated. (A) PCR of backbone 1, backbone 2 and *poxB* gene for p*PoxB*-N20. (B) PCR verification of p*PoxB*-N20. (C) PCR verification of p*PoxB*-ALV23. (D) PCR verification of the recombination.

在 LYC101 菌株中转化 pRed_Cas9 和 pPoxB-ALV23 质粒, 然后用阿拉伯糖诱导 *cas9* 表达, 对染色体 *poxB* 的 N20 区域进行切割, pPoxB-ALV23 提供 *poxB* 同源臂和 MVA 途径基因及启动子进行整合。将诱导整合后菌液稀释涂含阿拉伯糖和氯霉素、硫酸卡那霉素平板, 用 *mvaE*-430-r/*poxB*-*yz-up* 引物对生长出的菌落进行验证, 结果如图 4D 所示, PCR 验证得到 1.5 kb 的条带, 说明整合成功。将 PCR 验证正确菌株, 用 PCR 扩增完整 MVA 基因片段送样测序, 测序完全正确菌株为 MVA 途径整合到 LYC101 的 *poxB* 位点的菌株。因为质粒不稳定, 将本菌株在不加抗生素的 LB 液体培养基中培养 24 h, 在 LB 平板上划线得到单菌落; 挑取单菌落分别在 LB 平板和 LB+氯霉素平板上划线, 在 LB 平板上生长而在 LB+氯霉素平板上不生长的菌落为质粒丢失成功菌株, 命名为 LYC102。

2.4 MVA 途径添加对番茄红素产量的影响

将整合成功菌株 LYC102 和出发菌株 LYC101 发酵, 比较整合 MVA 途径对番茄红素产量的影响。

结果如图 5 所示, 将质粒 pALV23 的 MVA 途径基因整合后菌株 LYC102 细胞生长略有降低, OD_{600} 从 15.02 降低到 12.6, 降低了 12%, 细胞生长变慢可能和 MVA 途径基因表达不够协调有关, MVA 途径各基因表达不协调引起中间代谢物积累, 产生细胞毒性, 从而部分限制细胞生长^[15]。LYC102 的番茄红素产量明显提高, 从单位细胞产量 18.68 mg/g 增加到 40.93 mg/g, 增加了 1.19 倍, 比用质粒表达 MVA 途径基因的菌提高了 20%。LYC101 菌株中 MEP 途径和中央代谢途径已经进行过精确调控, 经 MEP 途径有效合成了萜类化合物合成的直接前体物质 IPP 和 DMAPP, 番茄红素产量达到 18.68 mg/g DCW, 添加 MVA 途径后, 增加了 IPP 和 DMAPP 的供应, 番茄红素产率达 40.9 mg/g。进一步提高了番茄红素的单位细胞产量。

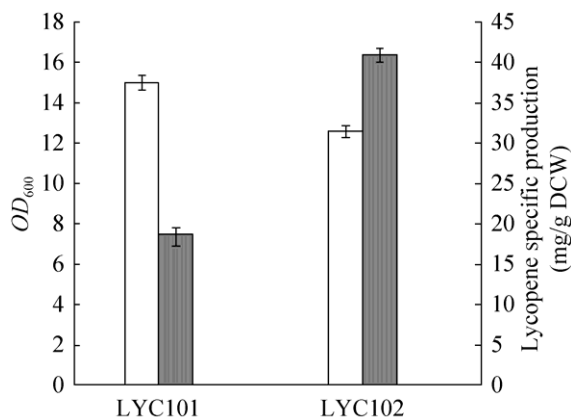


图 5 MVA 途径基因整合后菌株番茄红素产量及生长
Fig. 5 Lycopene production and cell growth after integrating MVA genes.

3 讨论

本研究利用从 RBS 文库中筛选到的、使 MVA 途径协调表达、利于 β -胡萝卜素合成的质粒 pALV23 和 pALV145 研究其对重组大肠杆菌产番茄红素的影响。结果表明, 两个质粒在高、低产番茄红素的菌株中都可以有效提高番茄红素产量, 但是, 在高低产菌株中, 两个质粒反应不同。在低产菌株 LYC001 中, pALV145 质粒菌株番茄红素产量高于 pALV23 质粒菌株; 而在高产菌株 LYC101 中, pALV23 质粒菌株番茄红素产量高于 pALV145 质粒菌株。pALV23 和 pALV145 是从 DXS37-idi46 菌株中筛选而来, 和 LYC001 基因型比较相似^[8,22], 所以 pALV23 和 pALV145 在 LYC001 中的表现和在 DXS37-idi46 一致, 即 pALV145 使 LYC001 和 DXS37-idi46 产类胡萝卜素的量高于 pALV23。而在番茄红素产量较高的菌株 LYC101 中, pALV23 和 pALV145 质粒对类胡萝卜素产量的影响与它们在 DXS37-idi46 影响相反, 在 DXS37-idi46 中产量低的 pALV23, 反而在 LYC101 中得到较高的类胡萝卜素产量。LYC101 与 DXS37-idi46 相比, 不仅 MEP 途径和类胡萝卜素合成途径进行过精确调控, 中央代谢

途径的关键基因也进行过调控,菌株环境发生了改变,所以两个质粒在菌株中反应也会不同。另外,pALV23和pALV145中MVA途径各基因RBS理论强度存在差别^[17],推测pALV23前两个基因RBS强度较高,可能是pALV23质粒在高产菌中利于类胡萝卜素产量提高的关键因素。

本研究中MVA途径基因整合后与MVA基因质粒存在相比,番茄红素产量提高20%,推测是质粒在LYC101中不稳定引起的。Ye等研究发现^[21],用质粒表达外源基因时,发酵24h,90%以上菌株质粒丢失;因此,本研究中因为质粒不稳定性,MVA途径基因在质粒上以多拷贝形式存在时反而比染色体整合、单拷贝形式存在时番茄红素产量更低。

另外,目前在大肠杆菌进行无痕同源重组通常是用*red*重组酶辅助,*sacB*进行反筛^[22-23]。该方法需要进行两步同源重组,并且因为*sacB*基因不是一个完全致死基因,如果插入片段较大,整合很困难,在反筛时很难得到整合成功菌株。本研究用CRISPR-Cas9技术辅助将MVA途径基因和启动子一共6.7kb条带一次性整合到LYC101菌株的染色体上,因为6.7kb整合片段和同源臂在质粒上,在诱导过程中持续提供待整合片段,大大提高了整合效率^[19]。

本研究通过同源重组将平衡表达的MVA途径基因整合到LYC101中,得到遗传稳定的菌株LYC102,番茄红素产率达40.9mg/g,是出发菌株LYC101产量的2.19倍,比用质粒表达MVA途径基因的菌株提高了20%。在重组大肠杆菌中同时表达合成萜类化合物前体物质的MVA途径和MEP途径,可以有效提高番茄红素产量;本研究构建了不含质粒的、遗传稳定的高产番茄红素菌株,为产业化合成番茄红素提供基础;同时构建平台菌株,可以用于其他萜类化合物合成。

REFERENCES

[1] Mohamadin AM, Elberry AA, Mariee AD, et al.

Lycopene attenuates oxidative stress and heart lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in rats: a biochemical study. *Pathophysiology*, 2012, 19(2): 121–130.

- [2] Chen P, Zhang WH, Wang X, et al. Lycopene and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94: e1260.
- [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] 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.
- [6] 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.
- [7] Farmer WR, Liao JC. Precursor balancing for metabolic engineering of lycopene production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*, 2001, 17(1): 57–61.
- [8] Sun T, Miao LT, Li QY, et al. Production of lycopene by metabolically-engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(7): 1515–1522.
- [9] Wu T, Ye LJ, Zhao DD, et al. Engineering membrane morphology and manipulating synthesis for increased lycopene accumulation in *Escherichia coli* cell factories. *3 Biotech*, 2018, 8(6): 269–276.
- [10] 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.
- [11] Vadali RV, Fu Y, 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Ye LJ, He P, Li QY, et al. Type II restriction based combinatorial modulation technique for metabolic pathway optimization. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 47.
- [18] Hillson NJ, Rosengarten RD, Keasling JD. j5 DNA assembly design automation software. *ACS Synth Biol*, 2012, 1(1): 14–21.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Ye LJ, Zhang CZ, Bi CB, et al. Combinatorial optimization of chromosomal integrated mevalonate pathway for β -carotene production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 202.
- [22] 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.
- [23] Dai GP, Miao LT, Sun T, et al. Production of coenzyme Q₁₀ by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2015, 31(2): 206–219 (in Chinese).
戴冠苹, 苗良田, 孙涛, 等. 代谢工程改造大肠杆菌生产辅酶 Q₁₀. *生物工程学报*, 2015, 31(2): 206–219.

(本文责编 陈宏宇)