

· 工业生物技术 ·

强化类球红细菌辅因子 NADPH 再生以提高法尼醇的产量

许曼^{1,2,3}, 江贤章^{1,2,3}, 黄建忠^{1,2,3}, 祁峰^{1,2,3}

1 福建师范大学 工业微生物教育部工程研究中心, 福建 福州 350108

2 福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350108

3 福建省现代发酵技术工程中心, 福建 福州 350109

许曼, 江贤章, 黄建忠, 等. 强化类球红细菌辅因子 NADPH 再生以提高法尼醇的产量. 生物工程学报, 2020, 36(1): 90–99.
Xu M, Jiang XZ, Huang JZ, et al. Reinforcement of *Rhodobacter sphaeroides* cofactor NADPH to increase the production of farnesol. Chin J Biotech, 2020, 36(1): 90–99.

摘要: 法尼醇 (Farnesol, FOH) 是由焦磷酸异戊烯基 (IPP) 和焦磷酸二甲基烯丙基 (DMAPP) 合成的法尼酰基焦磷酸盐 (FPP) 去焦磷酸化作用生成的。在类球红细菌中 IPP 和 DMAPP 是由 MEP 途径生成, 而完整的 MEP 途径需要消耗大量的辅因子 NADPH, 增加胞内 NADPH 的量有可能强化 FOH 的合成。文中从增加 NADPH 的生成和降低 NADPH 的消耗这两个策略出发, 分别干扰了编码 6-磷酸葡萄糖异构酶基因 (*pgi*) 和谷氨酸脱氢酶基因 (*gdhA*) 的表达, 同时强化了磷酸戊糖途径中 6-葡萄糖磷酸脱氢酶基因 (*zwf*) 和 6-葡萄糖酸磷酸脱氢酶基因 (*gnd*) 的表达。实验结果表明, 经改造的菌株 NADPH 含量显著增加, 干扰菌株中菌株 RSpgii 的产量较高, 为 3.91 mg/g, 在过表达的菌株中同时过表达 *zwf* 和 *gnd* 基因的重组菌株 (RSzg) 的 FOH 产量提高到了 3.43 mg/g。为了获得 FOH 产量更高的菌株, 以 RSpgii 为出发菌株, 分别与 *zwf* 和 *gnd* 组合调控, 获得的菌株 RSzgpI 的产量达到了最高量为 4.48 mg/g, 是出发菌株 RS-GY2 产率的 2.24 倍。

关键词: 法尼醇, 类球红细菌, RNA 干扰, NADPH

Reinforcement of *Rhodobacter sphaeroides* cofactor NADPH to increase the production of farnesol

Man Xu^{1,2,3}, Xianzhang Jiang^{1,2,3}, Jianzhong Huang^{1,2,3}, and Feng Qi^{1,2,3}

1 Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian, China

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

3 Engineering Research Center of Fujian Modern Fermentation Technology, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian, China

Abstract: Farnesol (FOH) is produced by dephosphorylation of farnesyl diphosphate (FPP) derived from two universal

Received: April 26, 2019; **Accepted:** June 10, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21406130).

Corresponding authors: Feng Qi. Tel:+86-591-22868212; E-mail:f.qi@fjnu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21406130) 资助。

网络出版时间: 2019-07-01

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190628.1634.005.html>

building blocks, dimethylallyl diphosphate (DMAPP) and isopentenyl diphosphate (IPP). In *Rhodobacter sphaeroides* these building blocks are generated by MEP pathway, however, many of the biosynthetic reactions and biotransformations in the MEP pathway are limited by low availability of NADPH. Improvement of the amount of intracellular NADPH may enhance the synthesis of FOH. In this study, we utilized the strategies of increasing the production of NADPH and decreasing the consumption of NADPH. The expression of glucose 6-phosphate isomerase (*pgi*) and glutamate dehydrogenase (*gdhA*) were inhibited by RNA interference, respectively, and overexpression of 6-glucose phosphate dehydrogenase (*zwf*) and 6-glucose phosphate dehydrogenase (*gnd*) in the pentose phosphate pathway were carried out. The results showed that the content of NADPH in the recombinant strains increased significantly, the highest FOH production of RSp_{gii} in the RNA interfered strain was 3.91 mg/g, and the FOH production increased to 3.43 mg/g after *zwf* gene and *gnd* gene has been overexpressed. In order to obtain strains with higher FOH production, we used RSp_{gii} as the starting strain, and *zwf*, *gnd* and co-overexpressed *zwf* + *gnd* gene were overexpressed in RSp_{gii}, respectively. The highest FOH production of the strain RSz_{gpi} reached to 4.48 mg/g which was 2.24 times that of the starting strain RS-GY2.

Keywords: farnesol, *Rhodobacter sphaeroides*, RNA interfering, NADPH

法尼醇 (1-羟基-3, 7, 11-三甲基-2, 6, 10-十二碳三烯; C₁₅H₂₆O, 简称为 FOH) 是一种无环倍半萜, 广泛分布在多种植物精油中, 比如寻常楸、加南芥、茉莉、玫瑰、柠檬草等。因为其独特的甜香味, 常被用来作为化妆品、香皂、芳香油和香水的香料^[1-2]。它还具有信号转导^[3-4]、群体感应^[5-6]等多种生物学功能, 同时 FOH 还可以调控细胞增殖^[7]。FOH 还被用作胃溃疡和维生素合成药物的原料^[8], 因为其能诱导多种肿瘤细胞系的凋亡, 因此其衍生物已成为候选的抗癌药物^[9]。此外, 由于其在水中的溶解性较低, 能量高, 也可以作为生物燃料的替代品^[10]。随着人们对 FOH 的需求日益增长, 且从自然资源中提取的产量极低, 化学合成的纯度低^[11], 用微生物代谢工程生产 FOH 变得十分必要。

目前, FOH 的生物合成途径在植物和微生物中都已基本阐明。植物中 FOH 合成酶或微生物中混杂的磷酸酶可以通过法尼酰基焦磷酸盐 (FPP) 的去磷酸化作用生成 FOH^[12]。FPP 是由 FPP 合成酶通过 1 个二甲基丙烯焦磷酸盐(DMAPP)和 2 个异戊基焦磷酸盐(IPP)的头尾缩合形成的^[13]。这两种物质的合成有两种途径: 一条是 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸 (2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphates, MEP) 途径; 另一条是甲羟戊酸 (Mevalonate, MVA) 途径^[14-15]。之前的实验表明过表达 MEP 途径中的关键酶可以提高 FOH 的水平, 其中王崇

龙等以 *Escherichia coli* 为出发菌株, 通过过表达 *ispA* 同时导入外源 MVA 途径, 发酵 48 h 后, 使得 FOH 产量达到了 135mg/L^[12]。除此之外, 实验还表明, FPP 的可用性对 FOH 的合成具有重要意义, 增加 FPP 池的大小可以促进微生物高水平地生产 FOH。而参与 FPP 的生物合成酶经常参与生成与还原的盐酸酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH) 相当的代谢物, 并在其中发挥着主导作用^[16]。类球红细菌作为辅酶 Q10 的天然生产者, 拥有完整的 MEP 途径。但是, 想要提高微生物体内 FOH 的产量, 微生物体内的还原辅因子 NADPH 量是远远不够的。而在工业应用中, 需要还原辅因子如 NADH 和 NADPH 的生物合成过程, 如果我们以等摩尔的量投入, 将会非常昂贵。我们以类球红细菌为出发菌株, 利用生物工程手段, 增加 NADPH 在全细胞系统中的可用性, 从而提高 FOH 的产量 (图 1)。6-磷酸葡萄糖异构酶 (*pgi*)^[18]和谷氨酸脱氢酶 (*gdhA*) 是两个依赖 NADPH 的脱氢酶, 弱化这两个基因的表达, 将会减小 NADPH 辅因子的消耗; 6-葡萄糖磷酸脱氢酶(*zwf*)^[19]和 6-葡萄糖酸磷酸脱氢酶(*gnd*)^[20]的表达会增加 NADPH 的量, 强化这两个基因的表达, 会增加 NADPH 辅因子的量; 本实验的研究目的是通过干扰 *pgi* 基因和 *gdhA* 基因的表达, 强化 *zwf* 基因和 *gnd* 基因, 从而提高类球红细菌中 NADPH 的水平, 达到强化 MEP 途径, 增加 FPP 前体供应, 从而提高 FOH 产量的作用。

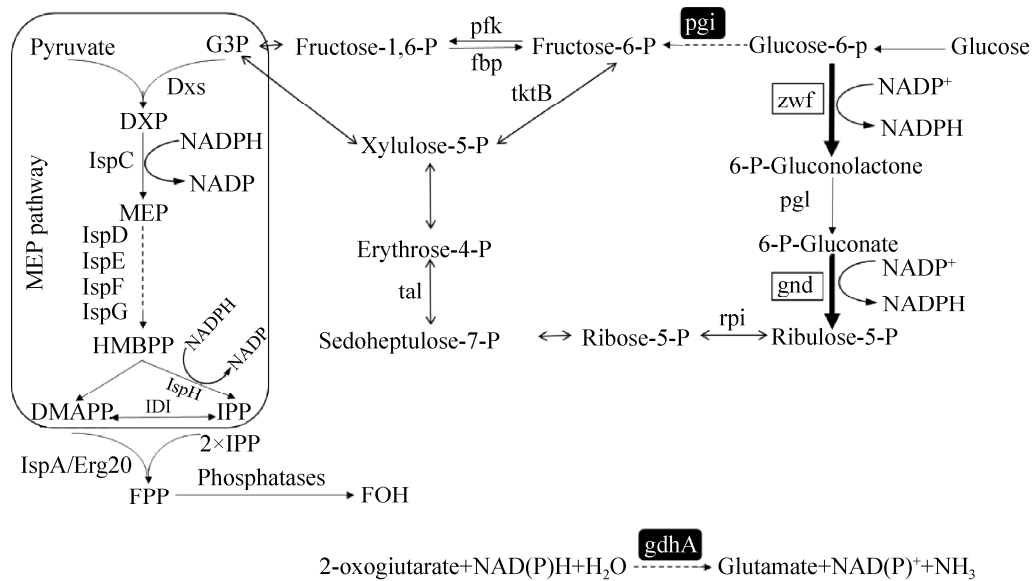


图1 类球红细菌中 FOH 的合成途径及磷酸戊糖途径

Fig. 1 Biosynthetic pathway of FOH and pentose phosphate pathway in *R. sphaeroides*.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* T1 用于质粒的克隆, *E. coli* S17-1 用双亲本的接合, 类球红细菌 *R. sphaeroides* 用于基因改造和 FOH 的生产; 质粒 pBBR1MC-2, 所有的菌株见表 1。

1.1.2 主要的试剂和仪器

所有的限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司; Q5 超保真 DNA 聚合酶购自 NEB 公司; 质粒提取和胶回收试剂盒购自 Omega 公司; NADP/NADPH 定量试剂盒购自美国 Sigma 公司; 卡那霉素购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 其他试剂为国产或进口分析纯。气相色谱检测器为 Agilent 7890A 型。

1.1.3 培养基和培养条件

大肠杆菌在 LB 培养基 (NaCl 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取粉 5g/L) 中培养, 培养条件是 37 °C、220 r/min; *R. sphaeroides* 种子培养基 (3.5 g/L (NH₄)₂SO₄、2 g/L 酵母提取物、0.75 g/L 玉米浆粉、10 g/L 葡萄糖、2 g/L NaCl、0.75 g/L K₂HPO₄、0.75 g/L

KH₂PO₄、0.1 g/L FeSO₄ 和 0.3 g/L MgSO₄、1 g/L 烟酸和 1 g/L 生物素, 最终用 10 mol/L NaOH 调 pH 为 6.1–6.3, 在 32 °C 中培养; 生产 FOH 的培养基由 4 g/L (NH₄)₂SO₄、32.5 g/L 葡萄糖、3.25 g/L NaCl、1.2 g/L KH₂PO₄、1.4 g/L FeSO₄ 和 9.8 g/L MgSO₄、3.9 g/L 玉米浆粉组成, 最后用 10 mol/L NaOH 将 pH 值调至 6.2–6.3。所有使用的质粒都是卡那霉素抗性, 培养基中卡那霉素终浓度为 50 μg/mL。

1.2 方法

1.2.1 载体的构建

pBBR1MCS2-pgii 和 pBBR1MCS2-gdhAi 载体的构建: 以类球红细菌的基因组作为模板, 用含有相应的限制性酶切位点的引物 (pgiiL-F/pgiiL-R, pgiiS-F/pgiiS-R, gdhAL-F/gdhAL-R, gdhAS-F/gdhAS-R) 分别扩增出与 *pgi* 和 *gdhA* 基因相对应的两段反向重复序列 *pgiL* 和 *pgiS*、*gdhAL* 和 *gdhAS*, 较长的片段 *pgiL* 和 *gdhAL* 包含 548 bp, 较短的片段 *pgiS* 和 *gdhAS* 包含 498 bp, 较长的片段中多出的 50 bp 形成发夹结构。然后用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 消化较长的片段 *pgiL* 和 *gdhAL*, *Eco*R I 和 *Sal* I 消化较短的片段 *pgiS* 和 *gdhAS*。然后将限制性内切酶消化的两段 PCR 产物与用 *Bam*H I

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in the study

Strain	Description	Reference
<i>E. coli</i> S17-1	RP4-2. Tc::Mu-Km::Tn7	[23]
<i>E. coli</i> DH5 α	F- λ -endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+)	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK λ - rpsL(StrR) endA1 nupG Invitrogen	Invitrogen
<i>R. sphaeroides</i> -GY2	CoQ10 high-yield mutant strain obtained from <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	this study
RSpgii	<i>R. sphaeroides</i> -GY2 RNAi-pgi	this study
RSgdhAi	<i>R. sphaeroides</i> -GY2 RNAi-gdhA	this study
RSz	<i>R. sphaeroides</i> -GY2 with overexpressed zwf	this study
RSg	<i>R. sphaeroides</i> -GY2 with overexpressed gnd	this study
RSzg	<i>R. sphaeroides</i> -GY2 with overexpressed zwf and gnd	this study
RSzpi	<i>R. sphaeroides</i> -GY2 RNAi-pgi and with overexpressed zwf	this study
Rsgpi	<i>R. sphaeroides</i> -GY2 RNAi-pgi and with overexpressed gnd	this study
RSzgp	<i>R. sphaeroides</i> -GY2 RNAi-pgi and with overexpressed zwf and gnd	this study
Plasmids	Description	Reference
pYC6a	Ptac promoter, AmpR	this study
pBBR1MCS2	low-copy cloning vector, KanR	[24]
pBBR1MCS2-tac	pBBR1MCS2 containing tac promoter	this study
pBBR1MCS2-pgii	pBBR1MCS2-tac containing pgii	this study
pBBR1MCS2-gdhAi	pBBR1MCS2-tac containing gdhAi	this study
pBBR1MCS2-NouCDi	pBBR1MCS2-tac containing NouCDi	this study
pBBR1MCS2-zwf	pBBR1MCS2-tac containing zwf from <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	this study
pBBR1MCS2-gnd	pBBR1MCS2-tac containing gnd from <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	this study
pBBR1MCS2-zwf-gnd	pBBR1MCS2-tac containing zwf and gnd from <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	this study
pBBR1MCS2-pgii-zwf	pBBR1MCS2-pgii containing zwf from <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	this study
pBBR1MCS2-pgii-gnd	pBBR1MCS2-pgii containing gnd from <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	this study
pBBR1MCS2-pgii-zwf-gnd	pBBR1MCS2-pgii containing zwf and gnd from <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	this study

和 *Sal* I 消化后的载体 pBBR1MCS2 连接, 形成一个称为 pBBR1MCS2-pgii 和 pBBR1MCS2-gdhAi 的质粒, RNA 干扰图和原理图如图 2 所示。

过表达 *zwf*、*gnd*、*zwf-gnd* 载体的构建: 以类球红细菌的基因组作为模板, 用带有相应同源臂的引物 *zwf*-F/*zwf*-R 和 *gnd*-F/*gnd*-R, 分别扩增出带有相应同源臂的 *zwf* 基因和 *gnd* 基因序列, 然后用 Gibson assembly 试剂将扩增出来的 *zwf* 和 *gnd* 分别与骨架 pBBR1MCS2z (引物为 pBBR1MCS2z-F/pBBR1MCS2z-R) 和骨架 pBBR1MCS2g (引物为 pBBR1MCS2g-F/pBBR1MCS2g-R) 连接起来, 形成质粒 pBBR1MCS2-zwf 和 pBBR1MCS2-gnd; 共过表达 *zwf* 基因和 *gnd* 基因的质粒的构建, 分别用 overlapzwf-F/overlapzwf-R 和 overlapgnd-F/overlapgnd-R 扩增出带有相应同源臂的 *zwf* 基因和 *gnd* 基因序列, 用 pBBR1MCS2zg-F/pBBR1MCS2zg-R 为引物, 质粒 pBBR1MCS2 为模板扩增出骨架

pBBR1MCS2zg, 然后用 Gibson assembly 试剂将这 3 个片段连接起来, 连成的质粒为 pBBR1MCS2-zwf-gnd, 结构图如图 2 所示。

干扰强化的质粒构建, 分别以 pBBR1MCS2-zwf、pBBR1MCS2-gnd 和 pBBR1MCS2-zwf-gnd 为模板, tac-F/trrnB-R 为引物, 分别扩增出带有 tac 启动子和 trrnB 终止子的 *zwf*、*gnd* 和 *zwf+gnd* 的基因序列, 然后用限制性内切酶 Age I 消化扩增出来的片段和质粒 pBBR1MCS2-pgii, 最后用 T4 DNA 连接酶连接, 分别形成质粒 pBBR1MCS2-pgii-zwf、pBBR1MCS2-pgii-gnd 和 pBBR1MCS2-pgii-zwf-gnd。结构图如图 2 所示, 所有质粒见表 1, 引物见表 2。

1.2.2 工程菌株的构建和验证

将含有相应质粒的供体菌 S17-1 接种在含有卡那霉素抗性的液体 LB 中 37 °C 过夜培养, 以 10% 的接种量转接到含有相应抗性的新鲜 LB 中, 37 °C

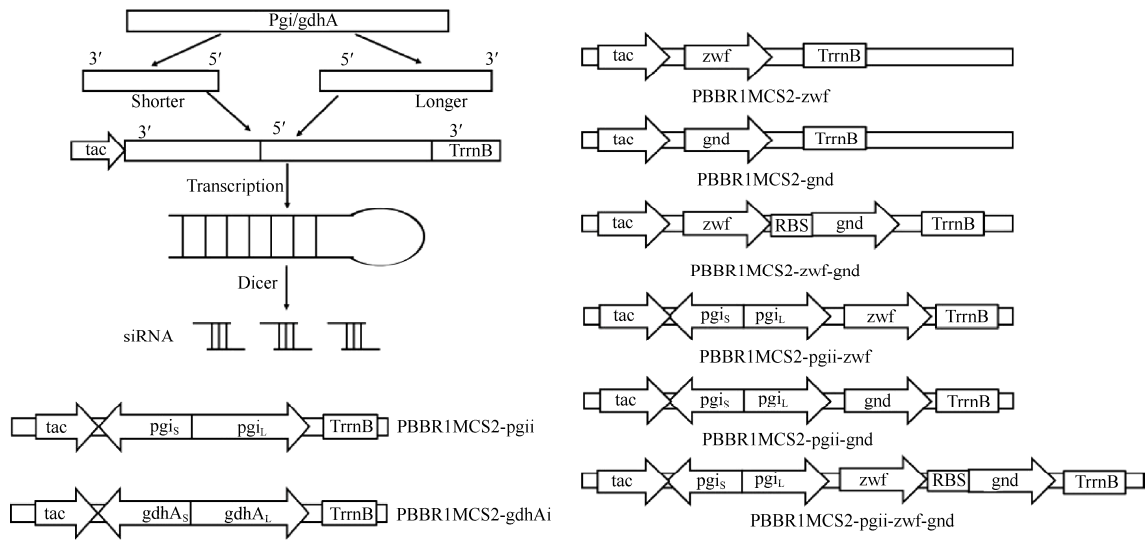


图 2 RNA 干扰原理图和质粒结构简图

Fig. 2 Schematic diagram of RNA interference and brief architecture of vectors.

表 2 引物序列

Table 2 Primers used in the study

Primers	Sequence (5'-3')
pgiiL-F	CCGGAATTCGCCTCGAAGACCTTCACCAC
pgiiL-R	CGCGGATCCGCTGGTAGAAGGCGTGCTG
pgiiS-F	CCGGAATTCGAAGCGCTGGATGGCCG
pgiiS-R	TTCCGCGCCGCTATGGCCGACGTCGACGCTGGTAGAAGGCGTGCTG
gdhAiL-F	CCGGAATTCGAGGAGTGTCCGCCACTGGAT
gdhAiL-R	CGCGGATCCACCTTCCGCCCCGTGCCAG
gdhAiS-F	CCGGAATTCGACGCGGACTTTGTGCGAGG
gdhAiS-R	TTCCGCGGCCGCTATGGCCGACGTCGACCACCTTCCGCCCCGTGCCAG
NouCDiL-F	CCGGAATTCATCCGGCCTTCTTCCGCAT
NouCDiL-R	CGCGGATCCGCGGTGGCCCTCGATCTG
NouCDiS-F	CCGGAATTCATGGGACGCGATGGTGCG
NouCDiS-R	TTCCGCGGCCGCTATGGCCGACGTCGACGCGGTGGCCCTCGATCTG
pBBR1MCS2z-F	GCTGGCGCGAGATCCGCTGACTCGAGGGTAGATCTGGTAC
pBBR1MCS2z-R	GGAATGACTCTCGAAACCATGGTTAATTCCTCCTGTTACG
zwf-F	CGTAACAGGAGGAATTAACCATGGTTTCGAGAGTCATTCCGG
zwf-R	GTACCAGATCTACCCTCGAGTCAGCGGATCTCGCGCC
pBBR1MCS2g-F	TCAAGCGCCTCACGCGCTAACTCGAGGGTAGATCTGGTAC
pBBR1MCS2g-R	AGAAATGCCAGCTTGGCCATTAGGTTAATTCCTCCTGTTACG
gnd-F	CGTAACAGGAGGAATTAACCTAATGGCCAAGCTGGCATTCT
gnd-R	GTACCAGATCTACCCTCGAGTTAGCGCGTGAGGCGCTTG
pBBR1MCS2zg-F	TCAAGCGCCTCACGCGCTAACTCGAGGGTAGATCTGGTAC
pBBR1MCS2zg-R	GGAATGACTCTCGAAACCATGGTTAATTCCTCCTGTTACG
overlapzwf-F	CGTAACAGGAGGAATTAACCATGGTTTCGAGAGTCATTCCGG
overlapzwf-R	AGAAATGCCAGCTTGGCCATCTCCTCAGCGGATCTCGCG
overlapgnd-F	CGCGAGATCCGCTGAAGGAGATGGCCAAGCTGGCATTCT
overlapgnd-R	GTACCAGATCTACCCTCGAGTTAGCGCGTGAGGCGCTTG
tac-F	TGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTCACAGCTAACACCACGTCGT
trrnB-R	TATGTCTATTGCTGGTTACCGGTAAGGCCAGTCTTTCGACTG
V-F	GGCCTCAGGCATTTGAGAAG
V-R	CAACTAATCGCCTTGCAGC

继续培养至对数生长期;受体菌 *R. sphaeroides* 接种在无抗的液体 LB 中于 30 °C 培养 24 h 后转接到新鲜的 LB 培养基中,继续培养至对数生长期,将受体菌和供体菌转移到 1.5 mL 的离心管中,7 000 r/min 离心 3 min,用新鲜的 LB 洗 2 次,然后分别用 300 μ L 和 200 μ L 的新鲜 LB 重悬受体菌和供体菌,将受体菌和供体菌按 6:1 的体积比混匀后点在无抗的 LB 平板上,于 30 °C 恒温培养箱中培养大约 20 h,最后用 1 mL 预冷的 1 \times Sistrom's 培养基洗脱到预冷的 1.5 mL 的离心管中,4 °C 5 000 r/min 离心 2 min 后去上清,用约 1 mL 的预冷的 1 \times Sistrom's 洗涤 2 次后用 100 μ L 预冷的 1 \times Sistrom's 培养基重悬,最后涂布在含有卡那霉素抗性和终浓度为 150 mg/L K_2TeO_3 的平板上,30 °C 恒温培养 35 d 直至长出黑色的接合子。用验证引物和单酶切验证黑色的接合子,根据 PCR 和测序结果验证质粒是否转入成功。

1.2.3 转录组水平的分析

提取所有干扰菌株中总的 RNA,用 DNA 酶消化所提取 RNA 中的基因组,用逆转录试剂盒将去除基因组后的 RNA 反转录成 cDNA,最后用 Power SYBR Green PCR 试剂进行 qPCR。每个反应混合物包括 RT 反应液 2 μ L (模板浓度为 50 ng/ μ L),引物分别 1 μ L, SYBR Premix Ex Taq II 12.5 μ L,用水补足到 25 μ L。每个反应做 3 组平行,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}(-\Delta\Delta C_t=[C_{t(target)}-C_{t(ref)}]_{sample}-[C_{t(target)}-C_{t(ref)}]_{WT})$ 相对法对基因进行定量分析^[21]。

1.2.4 NADP/NADPH 的测定

收集发酵 48 h 后菌液 1 mL (约 1×10^5 个细胞)用预冷的 PBS 清洗 2 遍之后,2 000 r/min 离心 5 min,去除上清。加入 300 μ L NADP/NADPH 缓冲液,于 -80 °C 条件下反复冻融 2 次,每次冻 20 min,然后涡旋振荡 10 s,13 000 $\times g$ 离心 10 min 后,将上清转移到干净的离心管中,取 50 μ L 转移到 96 孔板中,然后再加入 100 μ L 反应混合液,混匀后在室温下反应 5 min,最后加入 10 μ L 显色剂,在室温的条件下反应约 4 h 后,测其在 450 nm 处的吸光值,

得到细胞内 NADP 的总量;取 200 μ L 上清液到干净的离心管中,在 60 °C 的水浴锅中加热 30 min,立刻将样品放在冰上冷却,快速离心,然后取 50 μ L 的样品于 96 孔板中,加入 100 μ L 反应混合液,混匀后在室温下反应 5 min,最后加入 10 μ L 显色剂,在室温的条件下反应约 4 h 后,测其在 450 nm 处的吸光值,即得细胞内 NADPH 的量。

1.2.5 FOH 的产量测定

由于 FOH 具有挥发性,为了减少 FOH 的挥发在发酵培养液里加入了体积比为 15% 的癸烷^[22]。发酵 48 h 后,收集癸烷相,以 8 000 $\times g$ 离心 10 min,去除细胞碎片,取 1 mL 的上清,过滤膜,采用配备火焰离子化检测器 (FID) 的安捷伦技术 7890A 气相色谱仪对 FOH 的产率进行了定量。样品以 1:10 的比例注入,在 19091J HP-5 柱 (30 m 长;0.32 mm 内径);以流速为 1.0 mL/min 的氮气为载气,入口压力为 39 psi。喷油器初始温度为 250 °C,柱式烘箱设置为 80 °C。然后以 10 °C/min 的速度增加到 250 °C,并保持 1 min。FOH 的标准样品购自 Sigma-Aldrich 公司 (中国上海)。

2 结果与分析

2.1 载体的验证

经过 PCR、酶切酶连等多步实验,最终成功地获得了干扰质粒,用 *Bam*H I 单酶切原始质粒和构建成功的质粒,分别得到一条约 6.5 kb 和 6.6 kb 的条带,构建成功的质粒比原始质粒多约 100 bp,与预期的单酶切结果一致;经 PCR、Gibson assembly 试剂组装得到强化的质粒,将阳性克隆用引物 tac-F/trrnB-R 进行菌落 PCR 验证,分别得到条带大小为 1 972 bp (RSz)、1 386 bp (RSg)、2 670 bp (RSzg),与预期结果一致,质粒测序结果与原序列系列比对一致;干扰串联强化的质粒验证,将转化后长出来的阳性克隆用验证引物 V-F/V-R 进行 PCR 验证,得到长度分别为 2 402 bp (RSzpi)、1 816 bp (RSgpi)、3 037 bp (RSzgpi) 的条带与实验结果一致,测序结果与原序列比对一致,干扰串联强化

质粒构建成功。

2.2 类球红细菌工程菌株的验证

挑选黑色的结合子，转接到含有卡那霉素抗性的液体 LB 中，提取质粒，然后分别用单酶切、*tac-F/trrnB-R* 和 *V-F/V-R* 这两对引物去 PCR 验证，最后得出单酶切重组质粒之后的条带比原始质粒长约 100 bp，*tac-F/trrnB-R* 扩增出来的片段分别为 1 972 bp (RSz)、1 386 bp (RSg)、2 670 bp (RSzg)，验证引物 *V-F/V-R* 扩增出来的条带大小分别为 2 402 bp (RSzpi)、1 816 bp (RSgpi)、3 037 bp (RSzspi)，以上结果均与前面实验结果相符，工程菌株构建成功。

2.3 干扰后 *pgi* 基因和 *gdhA* 基因的转录组水平分析

为了评价 *pgi* 基因和 *gdhA* 基因干扰后的转录水平，采用实时荧光定量 PCR 对两株干扰株进行分析。

分别挑取 3 个验证正确的接合子接种在含有卡那霉素抗性的液体 LB 中，30 °C、220 r/min 培养 24 h 后分别提取其总 RNA，反转录等一系列操作之后，采用了 q-PCR 的方法，分别测定了干扰株 RSp_{gii} 和 RSg_{nhAi} 中 *pgi* 基因和 *gdhA* 基因的转录水平，本实验以出发菌株 RS-GY2 中相对应的基因丰度为 1，来计算改造以后基因的相对转录水平。

图 3 是干扰后的转录水平分析结果，由图 3 可知，与出发菌株相比，RSp_{gii} 和 RSg_{dhAi} 中 *pgi* 基因和 *gdhA* 基因的相对转录水平均有不同程度的下降。由图 3A 可知，RSp_{gii}-2 和 RSp_{gii}-3 干扰株 *pgi* 基因的转录水平明显下调，分别为出发菌株的 0.19 和 0.18；*gdhA* 基因的转录水平同样也下调比较明显，由图 3B 可知，RSg_{dhAi}-2 和 RSg_{dhAi}-3 的转录水平为出发菌株的 0.10 和 0.15；实验结果表明，干扰菌株已经构建成功。

2.4 NADPH 的测定及结果分析

分别取发酵 48 h 后的发酵液，经多步处理后，

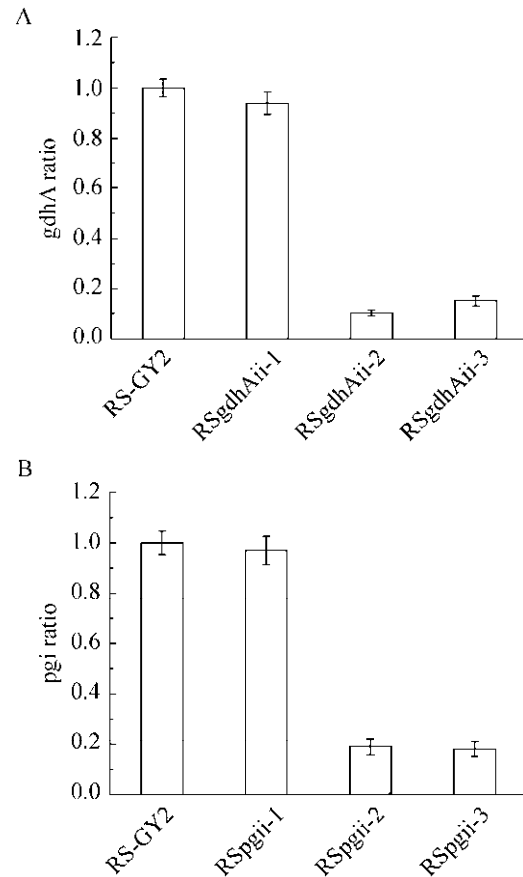


图 3 qRT-PCR 检测干扰菌株目的基因的转录特征
Fig. 3 Quantitative RT-PCR analysis of the transcriptional profiles strains. The relative transcript levels *pgi* gene (A) and *gdhA* gene (B).

测其生物体内 NADP/NADPH。分析结果见表 3，由表 3 可知，两株干扰菌株中，RSg_{dhAi} 胞内 NADPH 的量与出发菌株相比，基本保持不变，而干扰株 RSp_{gii} 中 NADPH 比出发菌株提高了 12.16%；三组过表达菌株中，RSg 胞内 NADPH 提高了 23.65%，RSzg 胞内 NADPH 的量比原始菌株高出了 0.42 pmol，为 5.62 pmol，而 RSz 胞内 NADPH 的量与原始菌株相比无明显变化；在干扰强化的菌株中，RSz_{gpi} 胞内 NADPH 的量达到了最大，是原始菌株胞内 NADPH 的 1.35 倍，RSz 胞内的 NADPH 的量则减少到了 4.84 pmol，RSg 胞内的 NADPH 的量基本不变。*pgi* 基因编码的是 6-磷酸葡萄糖异构酶，当 *pgi* 基因的转录水平受到抑制，6-磷酸葡萄糖转变为 6-磷酸果糖的

表 3 胞内 NADPH 的浓度与 NADPH/NADP⁺的比例Table 3 The concentrations of NADPH and ratios of NADPH/NADP⁺

	RS-GY2	RSgpii	RSgdhAi	RSz	RSg	RSzg	RSzpi	RSgpi	RSzgpi
NADP _(Total) (pmol)	21.12±0.21	19.77±0.15	22.65±0.23	17.4±0.10	26.29±0.24	25.01±0.09	17.13±0.11	17.12±0.1	17.34±0.16
NADPH(pmol)	5.2±0.02	5.83±0.13	5.14±0.15	4.92±0.08	6.43±0.09	5.62±0.2	4.84±0.14	5.1±0.02	7.02±0.11
NADPH/NADP	0.33±0.01	0.42±0.02	0.29±0.01	0.39±0.01	0.32±0.00	0.29±0.01	0.39±0.01	0.42±0.00	0.68±0.02

反应受到限制,将导致代谢向磷酸戊糖途径转变,同时 *zwf* 和 *gnd* 也是磷酸戊糖途径中的相关基因,所以当干扰 *pgi* 基因串联共过表达 *zwf* 和 *gnd* 之后,胞内的 NADPH 的积累量达到了最大。

2.5 工程菌中 FOH 产量的增加

由于 FOH 具有挥发性,我们预先在培养基上层覆盖一层癸烷,发酵 48 h 后,取癸烷相过滤膜后,利用高效气相进行检测,再根据标准曲线计算出各个菌株的产量。我们分别在发酵 0、12、24、36 和 48 h 覆盖 9 mL 的癸烷,待发酵 48 h 后,分离癸烷相,取 1 mL 测其产量。结果如图 4 所示,图 4A 表示的是干扰菌株 FOH 的产量,由图可知,不同时间段开始覆盖癸烷的数据表明发酵开始时覆盖癸烷测得的产量最高,说明癸烷的产生是伴随着菌的生长;在相同的条件下,干扰后的菌株较出发菌株 RS-GY2 分别提高了 57.51% 和 51.31%,且干扰株 RSgpii FOH 的产量比干扰株 RSgdhAi 的产量略高了 4.09%;图 4B 表示的是不同的强化菌株在不同时间段覆盖癸烷后 FOH 的产量,其中同时强化 *zwf* 和 *gnd* 这两个基因,FOH 的产量相较于出发菌株显著性提高,比出发菌株提高了 59.09%,达到了 44.18 mg/L,单独强化 *zwf* 和 *gnd* 的菌株产量都有提高,分别为 35.93 mg/L 和 40.20 mg/L,其中 RSg 的产量较 RSz 产量高 11.88%。

为了进一步提高 FOH 的产量,我们以干扰之后产量较高的 RSgpii 菌株作为出发菌株,分别与 *zwf* 和 *gnd* 组合调控,观察组合调控后对 FOH 产量的影响。在发酵前分别在每个培养基中覆盖 9 mL 的癸烷,发酵 48 h 之后测其 FOH 的产量,结果见图 5。由图可知,组合调控后,FOH 的产量较出发菌株 RSgpii 的产量都有所提高,RSzpi

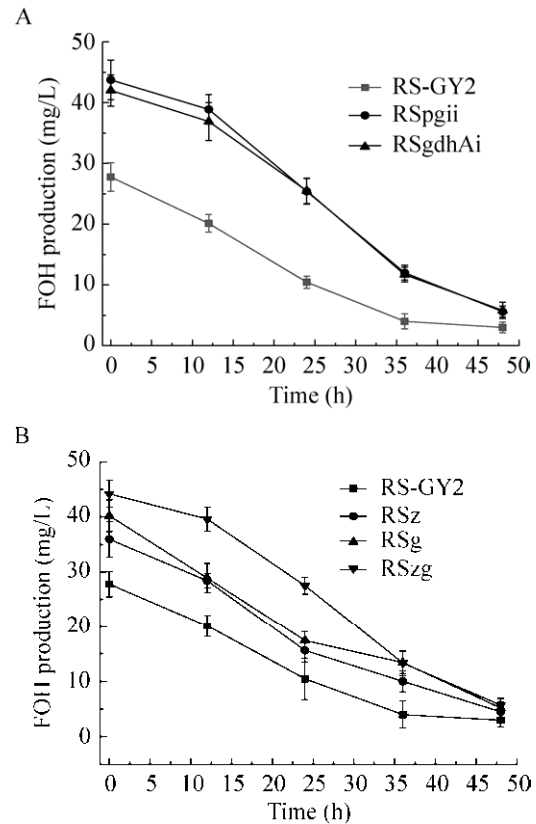


图 4 重组菌株不同时间段覆盖癸烷后 FOH 产量

Fig. 4 The production of farnesol from the recombinant strains covered with decane in different time. Farnesol production of RNA interference *pgi* and *gdhA* (A) and overexpression *zwf*, *gnd*, *zwf+gnd* (B) covered with decane in different times.

的产量为 49.88 mg/L, DCW 为 11.77 g/L, RSgpii 的产量为 54.59 mg/L, DCW 为 13.53 g/L, RSzgpi 的产量为 52.29 mg/L, DCW 为 11.67 g/L, 其中 RSgpi 的产量最高,为原始菌株 RS-GY2 的 1.97 倍,但是 RSgpi 的生物量较高为 13.53 g/L,产率为 4.04 mg/g,比 RSzgpi 和 RSzpi 的产率低,RSzgpi 和 RSzpi 的产率分别为 4.48 mg/g 和 4.29 mg/g。实验结果表明,增加胞内的 NADPH 的量可以增

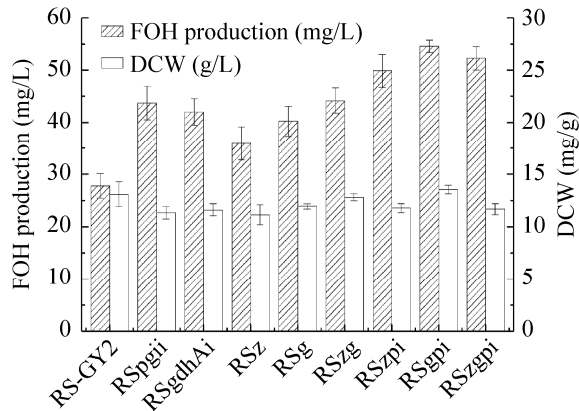


图5 发酵48 h后各重组菌株中FOH产量及其生物量
Fig. 5 The production of the FOH in different recombinant strains and biomass accumulation (DCW) upon incubation for 48 h.

加FOH的产量,当 pgi 基因的表达受到干扰,6-磷酸葡萄糖无法正常地向6-磷酸果糖转变,积累6-磷酸葡萄糖,过表达的 zwf 基因和 gnd 基因会加速6-磷酸葡萄糖向6-磷酸葡萄糖内酯方向转变,产生大量的NADPH,从而增强MEP途径的表达水平,增加FPP的前体供应,促进FPP向FOH转化,使得类球红细菌FOH的产量增加。

3 讨论

随着人们对FOH重要性的认知逐渐增加,市场对FOH的需求也越来越大。目前微生物发酵是FOH的主要生产方式,利用生物工程手段定向改造菌株为提高产量、降低成本提供了有效的方法。到目前为止,研究者已通过多个方面来提高FOH的产量。Ohto等通过在 $E. coli$ 中过表达 idi 和 $ispA$ 这两个基因后使得其产量达到了 $389 \mu\text{g/L}$ ^[23]。据报道,在添加油脂和洗涤剂条件下,酿酒酵母SQ合酶缺失突变体在培养过程中产生 28 mg/L 的FOH。阻断SQ合成会增加细胞内FPP水平,导致FOH的形成。本实验以类球红细菌作为出发菌株,通过增加NADPH的量,从而增加MEP途径强度,使得FPP池增加,最终达到提高类球红细菌产法尼醇能力的目的。实验结果表明,在干扰 pgi 基因的表达的前提下,同时过表达 zwf 基因

和 gnd 基因后,法尼醇的产量达到了最大为 52.29 mg/L ,产率达到了 4.48 mg/g ,产量相比与出发菌株RS-GY2提高了约88.3%。由于 pgi 的表达受到抑制,使得6-磷酸葡萄糖向6-磷酸果糖的转变受到影响,胞内积累大量的6-磷酸葡萄糖,当同时过表达 zwf 基因和 gnd 基因后,6-磷酸葡萄糖通过磷酸戊糖途径转移,碳代谢流向磷酸戊糖方向转变,磷酸戊糖途径通量的提高使得胞内NADPH的积累量达到最大;同时使得MEP途径的起始原料3-磷酸甘油醛的量增加,从而达到增强MEP途径的强度,使FPP池增加,最终增加法尼醇的积累量。

王崇龙等利用 $E. coli$ 为出发菌株,通过过表达 $ispA$ 同时导入外源MVA途径,发酵48 h后,FOH产量达到了 135 mg/L ^[12]。虽然我们摇瓶发酵48 h后测得的FOH产量较低,但是本文的工作为使用代谢工程改造微生物提高FOH的产量提供了新的思路。由于FOH是易挥发的物质,癸烷覆盖之后,只需要从癸烷相提取FOH,避免了产物抽提等多步复杂的工作,操作简单。随着发酵工艺、调控策略、培养基等的不断优化,利用类球红细菌生产FOH的产量还将会有很大的提升。

REFERENCES

- [1] Lapczynski A, Bhatia SP, Letizia CS, et al. Fragrance material review on farnesol. Food Chem Toxicol, 2008, 46(S1): S149-S156.
- [2] Lee H, Finckbeiner S, Yu JS, et al. Characterization of (E, E)-farnesol and its fatty acid esters from anal scent glands of nutria (*Myocastor coypus*) by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-infrared spectrometry. J Chromatogr A, 2007, 1165(1/2): 136-143.
- [3] Lorek J, Pöggeler S, Weide MR, et al. Influence of farnesol on the morphogenesis of *Aspergillus niger*. J Basic Microbiol, 2008, 48(2): 99-103.
- [4] Correll CC, Ng L, Edwards PA. Identification of farnesol as the non-sterol derivative of mevalonic acid

- required for the accelerated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem*, 1994, 269(26): 17390–17393.
- [5] Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 2982–2992.
- [6] Scheper MA, Shirliff ME, Meiller TF, et al. Farnesol, a fungal quorum-sensing molecule triggers apoptosis in human oral squamous carcinoma cells. *Neoplasia*, 2008, 10(9): 954–963.
- [7] Shirliff ME, Krom BP, Meijering RA, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(6): 2392–2401.
- [8] Muramatsu M, Ohto C, Obata S, et al. Various oils and detergents enhance the microbial production of farnesol and related prenyl alcohols. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106(3): 263–267.
- [9] Goldberg L, Haklai R, Bauer V, et al. New derivatives of farnesylthiosalicylic acid (salirasib) for cancer treatment: Farnesylthiosalicylamide inhibits tumor growth in nude mice models. *J Med Chem*, 2009, 52(1): 197–205.
- [10] Renninger NS, Mcphee DJ, Renninger NS, et al. Fuel compositions comprising farnesane and method of making and using same: WO2008/045555. 2007-10-09.
- [11] Wang CL, Kim JY, Choi ES, et al. Microbial production of farnesol (FOH): Current states and beyond. *Proc Biochem*, 2011, 46(6):1221–1229.
- [12] Wang CL, Yoon SH, Shah AA, et al. Farnesol production from *Escherichia coli* by harnessing the exogenous mevalonate pathway. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107(3): 421–429.
- [13] Anderson MS, Muehlbacher M, Street IP, et al. Isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase. An improved purification of the enzyme and isolation of the gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1989, 264(32): 19169–19175.
- [14] Rohdich F, Hecht S, Gartner K, et al. Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1158–1163.
- [15] Bloch K, Chaykin S, Phillips AH, et al. Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenyl pyrophosphate. *J Biol Chem*, 1959, 234: 2595–2604.
- [16] Asadollahi MA, Maury J, Moller K, et al. Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ERG9 repression on sesquiterpene biosynthesis. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99 (3): 666–677.
- [17] Chemler JA, Fowler ZL, McHugh KP, et al. Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Metabol Eng*, 2010, 12(2): 96–104.
- [18] Canonaco F, Hess TA, Heri S, et al. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 204(2): 247–252.
- [19] Choi JC, Shin HD, Lee YH. Modulation of 3-hydroxyvalerate molar fraction in poly (3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) using *Ralstonia eutropha* transformant co-amplifying *phbC* and NADPH generation-related *zwf* genes. *Enzyme Microbial Technol*, 2003, 32(1): 178–185.
- [20] Lim SJ, Jung YM, Shin HY, et al. Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon. *J Biosci Bioeng*, 2002, 93(6): 543–549.
- [21] Arocho A, Chen BY, Ladanyi M, et al. Validation of the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagn Mol Pathol*, 2006, 15(1): 56–61.
- [22] Song LS. Detection of farnesyl diphosphate accumulation in yeast *ERG9* mutants. *Anal Biochem*, 2003, 317(2): 180–185.
- [23] Ohto C, Muramatsu M, Obata S, et al. Prenyl alcohol production by expression of exogenous isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase genes in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(1): 186–188.

(本文责编 陈宏宇)