

# 多个调控元件调控萜类合成途径基因表达提高 $\beta$ -胡萝卜素的生产

赵婧<sup>1,2,3</sup>, 刘怡<sup>1,2,3</sup>, 李清艳<sup>2,3</sup>, 朱欣娜<sup>2,3</sup>, 张学礼<sup>2,3</sup>

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 310018

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

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  $\beta$ -胡萝卜素的生产. 生物工程学报, 2013, 29(1): 41-55.

Zhao J, Liu Y, Li QY, et al. Modulation of isoprenoid gene expression with multiple regulatory parts for improved  $\beta$ -carotene production. Chin J Biotech, 2013, 29(1): 41-55.

**摘要:** 强启动子对于获得目标产物最大代谢流量来说并不一定是最优的; 相比之下, 使用多个具有不同强度的调控元件对基因表达进行调控更有可能获得最优的表达强度。为了对比使用多个调控元件和使用强启动子调控萜类合成途径基因表达对  $\beta$ -胡萝卜素生产的影响, 并通过对关键基因的组合调控提高  $\beta$ -胡萝卜素的生产。文中使用 6 个强度差异很大的人工调控元件, 对萜类合成途径的 8 个基因进行调控。对于不同的基因, 其最适的调控元件强度各不相同。对 8 个基因的调控使  $\beta$ -胡萝卜素产量提高 1.2~3.5 倍。和以前报道不一样的是, 文中发现用适当强度的调控元件对 *dxr*、*ispG* 和 *ispH* 基因进行调控后, 也能提高  $\beta$ -胡萝卜素的生产。对 *dxs* 和 *idi* 基因的组合调控将  $\beta$ -胡萝卜素产量提高了 8 倍, 最终  $\beta$ -胡萝卜素产量达 17.59 mg/g 干重细胞。结果表明使用多个不同强度的调控元件对基因表达进行调控比仅使用强启动子调控更为有效, 为提高目标产品合成能力提供了一种新的基因表达调控方案。

**关键词:** 调控元件, 基因表达调控,  $\beta$ -胡萝卜素, 类异戊二烯, 大肠杆菌

**Received:** September 25, 2012; **Accepted:** November 19, 2012

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA00806), Key Technology R&D Program of Tianjin Municipal Science and Technology Commission, the Hundred Talent Program of the Chinese Academy of Sciences.

**Corresponding author:** Xueli Zhang. Tel/Fax: +86-22-84861983; E-mail: zhang\_xl@tib.cas.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CBA00806), 天津市科技支撑计划, 中国科学院百人计划资助。

# Modulation of isoprenoid gene expression with multiple regulatory parts for improved $\beta$ -carotene production

Jing Zhao<sup>1,2,3</sup>, Yi Liu<sup>1,2,3</sup>, Qingyan Li<sup>2,3</sup>, Xinna Zhu<sup>2,3</sup>, and Xueli Zhang<sup>2,3</sup>

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 310018, 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:** Strong promoters might not be optimal to obtain maximum metabolic flux towards desired products, whereas modulating gene expression with multiple regulatory parts is an option to obtain optimal expression strength. Therefore, we assessed the difference of impact on  $\beta$ -carotene production between modulating isoprenoid gene expression with multiple regulatory parts and strong promoter, to improve  $\beta$ -carotene production through combined modulation of essential isoprenoid genes. Eight isoprenoid genes were modulated with six artificial regulatory parts having a wide range of strengths to assess their effects on  $\beta$ -carotene production. Optimal strength for each isoprenoid gene expression was identified, leading to 1.2 to 3.5-fold increase in  $\beta$ -carotene production. In contrast to previous reports, our work suggests that modulating *dxr*, *ispG* and *ispH* genes with appropriate strengths increase  $\beta$ -carotene production.  $\beta$ -carotene yield reached 17.59 mg/g after combined modulation of *dxs* and *idi* genes, 8-fold higher than that of the parent strain. Modulating gene expression with multiple regulatory parts was better than strong promoter, providing a new gene modulation strategy for targeted biosynthesis.

**Keywords:** regulatory parts, modulation of gene expression,  $\beta$ -carotene, isoprenoid, *Escherichia coli*

$\beta$ -胡萝卜素属于类胡萝卜素家族的一员, 在药品、保健品、化妆品和食品上有广泛的应用<sup>[1-2]</sup>。尽管目前市场上销售的  $\beta$ -胡萝卜素 90%是通过化学合成法获得, 但随着国内外对天然  $\beta$ -胡萝卜素市场需求的增加, 采用微生物发酵法生产具有广阔的应用前景<sup>[2-3]</sup>。很多天然微生物都能合成  $\beta$ -胡萝卜素, 例如三孢布拉氏霉菌 *Blakeslea trispora*、成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 等<sup>[4]</sup>。由于类胡萝卜素合成途径相关基因已经解释清楚, 大肠杆菌遗传背景清晰、操作简单, 以大肠杆菌作为出发菌株, 运用代谢工程手段构建产类胡萝卜素基因工程高产菌株, 成为包括  $\beta$ -胡萝卜素在内的多类胡萝卜素产品开发的新生产途径<sup>[1-3,5-6]</sup>。

异戊烯焦磷酸 (IPP) 和二甲基烯丙基焦磷酸酯 (DMAPP) 是类胡萝卜素来源的两个通用前体。目前已知有两种合成途径: 一种是甲羟戊酸 (Mevalonate) 途径 MVA, 主要存在于古生菌、真菌和植物的胞液或内质网上; 另一种是 MEP (2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸) 途径, 主要存在于细菌和植物体中<sup>[7]</sup> (图 1)。Yoon 等进行了 MVA 途径合成  $\beta$ -胡萝卜素的研究, 他们将 MVA 途径的下游 3 个基因和  $\beta$ -胡萝卜素合成相关基因以质粒形式在大肠杆菌表达, 有效提高了  $\beta$ -胡萝卜素的产量, 在外源添加甲羟戊酸的情况下, 产量达 503 mg/L, 单位细胞含量达 49.3 mg/g 干重细胞。但外源基因的高水平表达抑制了细胞的生长, 并且存在重组细胞不稳定的缺点<sup>[1-3]</sup>。多个



# 1 材料与方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 主要试剂

氨苄青霉素、氯霉素、硫酸卡那霉素, 购自上海生工生物工程有限公司; 质粒小量快速提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; DNA 回收试剂盒购自美国 Biomiga 公司; PrimeSTAR HS DNA 聚合酶, DNA Marker trans2K, 购自大连宝生物工程公司; 限制性内切酶 *Pac* I、*Bam*H I、*Dpn* I、T4 DNA 连接酶、快连酶、T4 多聚核苷酸激酶购

自 NEB 公司; 胡萝卜素标品购自美国 Sigma 公司 (Cat. No. C4582); 其他试剂均为分析纯。

### 1.1.2 仪器与设备

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; 紫外可见分光光度计, Shimadzu UV-2550; 高速冷冻离心机, Thermo Sorvall Evolution RC; 高效液相色谱, Agilent Technologies Series 1200。

### 1.1.3 菌株

本研究所用菌株已经在表 1 中列出。

表 1 本研究所用的大肠杆菌菌株

Table 1 *Escherichia coli* strains used in this work

Strains	Relative characteristics	Sources
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	Wild type	Lab collection
M1-12	ATCC 8739, FRT-Km-FRT::M1-12::lacZ	[15]
M1-64	ATCC 8739, FRT-Km-FRT::M1-64::lacZ	[15]
M1-30	ATCC 8739, FRT-Km-FRT::M1-30::lacZ	[15]
M1-46	ATCC 8739, FRT-Km-FRT::M1-46::lacZ	[15]
M1-37	ATCC 8739, FRT-Km-FRT::M1-37::lacZ	[15]
M1-93	ATCC 8739, FRT-Km-FRT::M1-93::lacZ	[15]
dxs-M1-12-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-12::dxs	This work
dxs-M1-64-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-64::dxs	This work
dxs-M1-30-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-30::dxs	This work
dxs-M1-46-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-46::dxs	This work
dxs-M1-37-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-37::dxr	This work
dxs-M1-93-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-93::dxr	This work
dxr-M1-12-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-12::dxr	This work
dxr-M1-64-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-64::dxr	This work
dxr-M1-30-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-30::dxr	This work
dxr-M1-46-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-46::dxr	This work
dxr-M1-37-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-37::dxr	This work
dxr-M1-93-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-93::dxr	This work
ispD-M1-12-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-12::ispD	This work



续表 1

ispD-M1-64-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-64:: <i>ispD</i>	This work
ispD -M1-30-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-30:: <i>ispD</i>	This work
ispD -M1-46-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-46:: <i>ispD</i>	This work
ispD -M1-37-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-37:: <i>ispD</i>	This work
ispD -M1-93-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-93:: <i>ispD</i>	This work
ispE-M1-12-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-12:: <i>ispE</i>	This work
ispE-M1-64-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-64:: <i>ispE</i>	This work
ispE -M1-30-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-30:: <i>ispE</i>	This work
ispE -M1-46-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-46:: <i>ispE</i>	This work
ispE -M1-37-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-37:: <i>ispE</i>	This work
ispE -M1-93-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-93:: <i>ispE</i>	This work
ispG-M1-12-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-12:: <i>ispG</i>	This work
ispG-M1-64-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-64:: <i>ispG</i>	This work
ispG -M1-30-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-30:: <i>ispG</i>	This work
ispG -M1-46-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-46:: <i>ispG</i>	This work
ispG -M1-37-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-37:: <i>ispG</i>	This work
ispG -M1-93-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-93:: <i>ispG</i>	This work
ispH-M1-12-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-12:: <i>ispH</i>	This work
ispH-M1-64-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-64:: <i>ispH</i>	This work
ispH-M1-30-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-30:: <i>ispH</i>	This work
ispH -M1-46-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-46:: <i>ispH</i>	This work
ispH-M1-37-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-37:: <i>ispH</i>	This work
ispH -M1-93-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-93:: <i>ispH</i>	This work
idi-M1-12-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-12:: <i>idi</i>	This work
idi-M1-64-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-64:: <i>idi</i>	This work
idi -M1-30-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-30:: <i>idi</i>	This work
idi -M1-46-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-46:: <i>idi</i>	This work
idi -M1-37-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-37:: <i>idi</i>	This work
idi -M1-93-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-93:: <i>idi</i>	This work
ispA-M1-12-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-12:: <i>ispA</i>	This work
ispA-M1-64-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-64:: <i>ispA</i>	This work
ispA -M1-30-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-30:: <i>ispA</i>	This work
ispA-M1-46-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-46:: <i>ispA</i>	This work
ispA -M1-37-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-37:: <i>ispA</i>	This work
ispA -M1-93-FKF	MG1655, FRT-Km-FRT::M1-93:: <i>ispA</i>	This work
idi -M1-37-dxs-M1-64-FKF	MG1655, FRT::M1-37:: <i>idi</i> , FRT-Km-FRT::M1-64:: <i>dxs</i>	This work
idi -M1-37-dxs-M1-37-FKF	MG1655, FRT::M1-37:: <i>idi</i> , FRT-Km-FRT::M1-37:: <i>dxs</i>	This work

## 1.2 方法

### 1.2.1 培养基及培养方法

每升 LB 培养基包括 10 g 胰蛋白酶蛋白胨, 5 g 酶酵母提取物和 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  $\mu\text{g/mL}$ 。

好氧培养: 将保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的菌种在加有相应抗生素的平板上活化, 挑单菌落到 4 mL LB 试管中 (15 mm $\times$ 100 mm) 中, 培养含 pTrc99A-M-crt 质粒的菌株的培养基加氨苄青霉素, 培养含 pACYC184-M-crt 质粒的菌株的培养基加氯霉素,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 过夜培养, 1% 的接种量转接到好氧培养基 (相应的抗生素) 中,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养。待生长 2 h 后, 即  $OD_{600}=0.1$  时, 添加终浓度为 1 mmol/L 的诱导剂 IPTG (异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷) 进行诱导。在培养 22 h 后, 收集菌液用于  $\beta$ -胡萝卜素产量的测量。

### 1.2.2 $\beta$ -胡萝卜素产量的检测方法

通过测定丙酮萃取的  $\beta$ -胡萝卜素在 453 nm 下的吸收来确定  $\beta$ -胡萝卜素产量<sup>[2]</sup>。取 2 mL 培养的菌液于 14 000 r/min 离心 3 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, 将含有  $\beta$ -胡萝卜素的上清转入新的离心管中。紫外分光光度计 453 nm 下测定  $\beta$ -胡萝卜素吸收值, 并计算其对细胞浊度 ( $OD_{600}$ ) 的相对值, 表示单位菌体  $\beta$ -胡萝卜素的相对产量。除此之外, 用高效液相色谱测定  $\beta$ -胡萝卜素的绝对产量。检测条件: VWD 检测器, Symmetry C18 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为甲醇: 乙腈: 二氯甲烷 (21 : 21 : 8), 流速 1.0 mL/min,

柱温  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 检测波长 450 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  $\beta$ -胡萝卜素标准品构建 HPLC 标准曲线。

### 1.2.3 表达外源胡萝卜素基因的质粒构建

构建用于表达外源胡萝卜素基因的质粒 pTrc99A-M 和 pACYC184-M (图 2)。以质粒 pTrc99A 的 DNA 为模板, 通过引物 99A-F1-Pac I -Spe I -Nde I /99A-R1-Pac I 扩增 DNA 片段 1 (表 2), 使得 Pac I、Spe I 和 Nde I 酶切位点位于 pTrc99A 质粒 lacI 基因的前面, Pac I 酶切位点位于转录终止子 rrnB 的后边。将片段 1 用 Dpn I 进一步酶切, 并用 T4 多聚核苷酸激酶磷酸化。以质粒 pTrc99A 的 DNA 为模板, 通过引物 99A-F2/99A-R2 扩增 DNA 片段 2 (表 2), Dpn I 酶切, 并在快连酶作用下与磷酸化的 DNA 片段 1 连接, 转化大肠杆菌 trans10 感受态细胞, 在含有终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$  的氨苄青霉素 LB 培养基上过夜培养。挑选 5 个克隆, 提取质粒 DNA, 并用 Pac I、BamH I 进行酶切验证。将正确的阳性克隆命名为 pTrc99A-M。同样的方法, 以质粒 pACYC184 的 DNA 为模板, 通过引物 184-F2/184-R2 扩增 DNA 片段 3 (表 2), Dpn I 酶切, 并在快连酶作用下与磷酸化的 DNA 片段 1 连接, 并用 Pac I 和 BamH I 进行酶切验证。将正确的阳性的克隆命名为 pACYC184-M。

成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 中  $\beta$ -胡萝卜素合成基因 (*crtEXYIB*) 是成簇存在的<sup>[16]</sup>。因此以成团泛菌 CGMCC No. 1.2244 的基因组 DNA 为模板, 通过引物 crt-cluster-f/crt-cluster-r 扩增  $\beta$ -胡萝卜素合成基因操纵子 (*crtEXYIB*) (表 2),

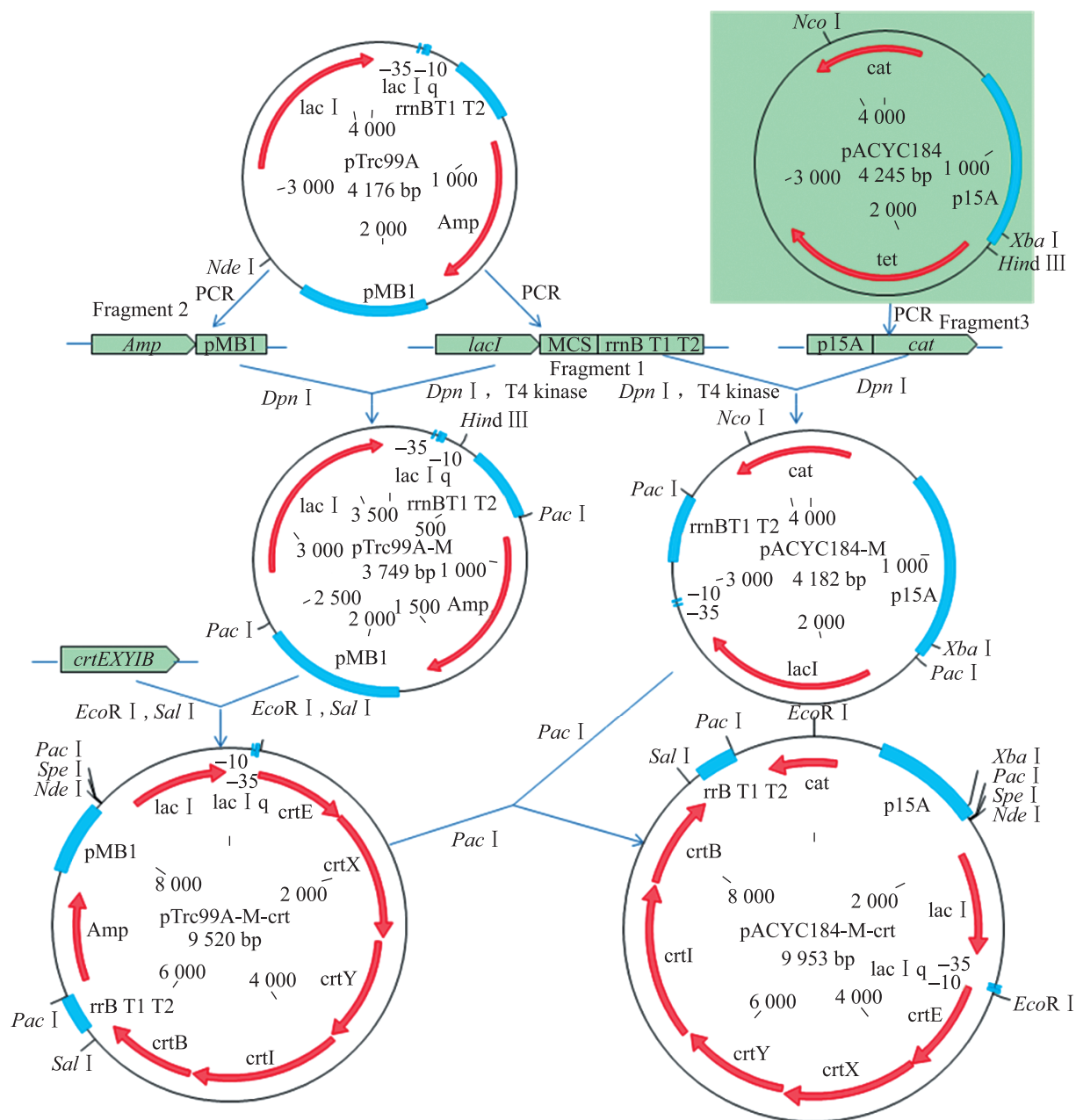


图 2 携带  $\beta$ -胡萝卜素合成基因的质粒构建示意图

Fig. 2 Construction of plasmids containing carotenogenic genes for  $\beta$ -carotene production.

将纯化后的 *crtEXYIB* 片段及 pTrc99A-M 质粒经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切, 在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 °C 连接, 得到质粒 pTrc99A-M-crt。同样的方法, 将该片段及 pACYC184-M 质粒用 *Pac* I 酶切, 纯化回收, 在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 °C 连接, 得到质粒 pACYC184-M-crt (图 2)。

#### 1.2.4 用不同的调控元件在大肠杆菌中对类异戊二烯基因的表达进行调控

用 6 个不同强度 (M1-12, M1-64, M1-30, M1-46, M1-37 and M1-93) 的人工启动子调控元件对大肠杆菌 MEP 途径的 7 个基因 (包括 *dxs*, *dxr*, *ispDF*, *ispE*, *ispG*, *ispH*, *idi* 和 *ispA*) 和 *ispA* 基因在染色体水平上进行调控。相对于大肠杆菌中诱导后 *lacZ* 启动子, 调控元件的强度 M1-12、M1-64、M1-30、M1-46、M1-37 和 M1-93 分别是它的 0.1、0.4、0.8、1.7、2.5 和 5 倍<sup>[15]</sup>。按照 Lu 等描述的方法, 通过一对通用引物, 利用不同强度的调控原件调控每个基因的<sup>[15]</sup>(图 3)。上游引物 gene-up-FRT, 包括调控基因原始调控区域外的 50 个碱基和与 FRT 序列同源的 20 个碱

基。下游引物为 gene-RBS-down, 包括和大肠杆菌 *lacZ* 基因的核糖体结合位点同源的 15 个碱基和待调控基因起始密码子后的 50 个碱基 (图 3, 表 2)。对于 *dxs* 基因, 使用 *dxs*-up-FRT/*dxs*-RBS-down 引物 (表 2), 以信使 RNA 稳定区文库 1 (M-Lib1) 中的相应重组菌株的基因组 DNA 扩增 DNA 片段<sup>[15]</sup>, 将片段电转入含有 pKD46 的大肠杆菌 MG1655 感受态细胞中, 在含有 50 µg/mL 卡那霉素的 LB 平板中过夜培养, 挑选单克隆, 用引物 *dxs*-up-FRT/*dxs*-381-down 进行 PCR 验证 (表 2)。验证正确的克隆, 将其命名为 *dxs*-M1-12-FKF、*dxs*-M1-64-FKF、*dxs*-M1-30-FKF、*dxs*-M1-46-FKF、*dxs*-M1-37-FKF 以及 *dxs*-M1-93-FKF。采用同样的方法调控其他基因, 所用引物序列在表 2 中列出。为了在同一重组大肠杆菌中同时调控 MEP 途径中的多个关键基因, 根据 Datsenko 描述方法<sup>[17]</sup>去除 *idi*-M1-37-FKF 中的 FRT-Km-FRT, 得到 *idi*-M1-37, 然后按照上述一步调控方法用 M1-64 和 M1-37 启动子调控 *idi*-M1-37 的 *dxs* 基因。将质粒 pACYC184-M-crt 转入所有调控过的重组菌株中, 用于检测 β-胡萝卜素产量。

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this work

Primers	Sequences (5'-3')
<i>dxs</i> -up-FRT	ACTACATCATCCAGCGTAATAAATAAACAAATAAGTATTAATAGGCCCTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>dxs</i> -RBS-down	GTGGAGTCGACCAAGTGCCAGGGTCGGGTATTTGGCAATATCAAACTCATAGCTGTTCTCTGGTT
<i>dxs</i> -381-down	GATGGAGGTTGATGAATGC
<i>dxr</i> -up-FRT	ATCGGCTGGCGGCGTTTTGCTTTTATTCTGTCTCAACTCTGGATGTTTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>dxr</i> -RBS-down	GTGCTGCAACCAATCGAGCCGGTCGAGCCCAGAATGGTGAGTTGCTTCATAGCTGTTTCTCTGGTT

续表 2

dxr-320-down	CAAGCGTAGGTAACAGCCC
ispD-up-FRT	TGCCTGACGCGTCGAAGCGCGCACAGTCTGCGGGGCAAAACAATCGATAAGTGTA GGCTGGAGCTGCTTC
ispD-RBS-down	AATCCGGCCCGCCGAACACGGCGCAAACATCCAAATGAGTGGTTGCCATAGCTGT TTCCTGGTT
IspD-251- down	TCATCACCGCCATCTACA
ispE-up-FRT	ACGGTGGTCAACGCATCAAGTTAAAAATGGATAACTGGATAGTGAAATAA GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ispE-RBS-down	ATGTATAAAACAGATTAAAGTTTTGCCGGAGAGGGCCACTGTGTCCGCAT AGCTGTTTCCTGGTT
IspE-369-down	TGATTTAATGCCACCAGGAC
ispG-up-FRT	GCCGAACAATCACCGGCGCAGTAACAGACGGGTAACGCGGGAGATTTTCGTGTA GGCTGGAGCTGCTTC
ispG-RBS-down	ACGTAAATACGTGTTGATTTTCTACGTTGAATTGGAGCCTGGTTATGCAT AGCTGTTTCCTGGTT
ispG-305-down	ACGCCGTATTCCGCTACT
ispH-up-FRT	TCATTTTGATATTGAAGTGCTGGAAATCGATCCGGCACTGGAGGCGTAAC GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ispH-RBS-down	CGGTCTACCCCGGCACAAAACACGCGGGTTGGCCAACAGGATCTGCAT AGCTGTTTCCTGGTT
ispH-395-down	CCCATTGTCCCTTCCACT
idi-up-FRT	TCACTTGGTTAATCATTTCACTCTTCAATTATCTATAATGATGAGTGATCGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
idi-RBS-down	CCCGTGGAACCTCCCTGTGCATTCAATAAAATGACGTGTTCCGTTTGCATAGCTGTT TCCTGGTT
idi-483-down	CGTGGCATCAATACCGTGTA
ispA-up-FRT	CTGACAATGAAGACGCCTCTCTAACCCCTTTTACACCGGACAATGAGTAA GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
ispA-RBS-down	GCCTGGTTGGCCTGCTTAACGCAGGCTTCGAGTTGCTGCGGAAAGTCCATAGCTGT TTCCTGGTT
IspA-282-down	CAGATCGTCATCATCCATTG
99A-F1-Pac I-Spe I-Nde I	TTAATTAAGTAGTCATATGGGCATGCATTACGTTGACA
99A-R1-Pac I	TTAATTAA AGAAACGCAAAAAGGCCATC
99A-F2	CATTCAAATATGTATCCGCTCA
99A-R2	CGCAGGAAAGAACATGTGAG
184-F2	GGGAGAGCCTGAGCAAAC
184-R2	CGATGATAAGCTGTCAAACATGA
crt-cluster-f	CTGTGAATTCAAGGAGATATACCATGATGACGGTCTGTGCAGAA
crt-cluster-r	TTGCAGTCGACGCTGCGAGAACGTCA

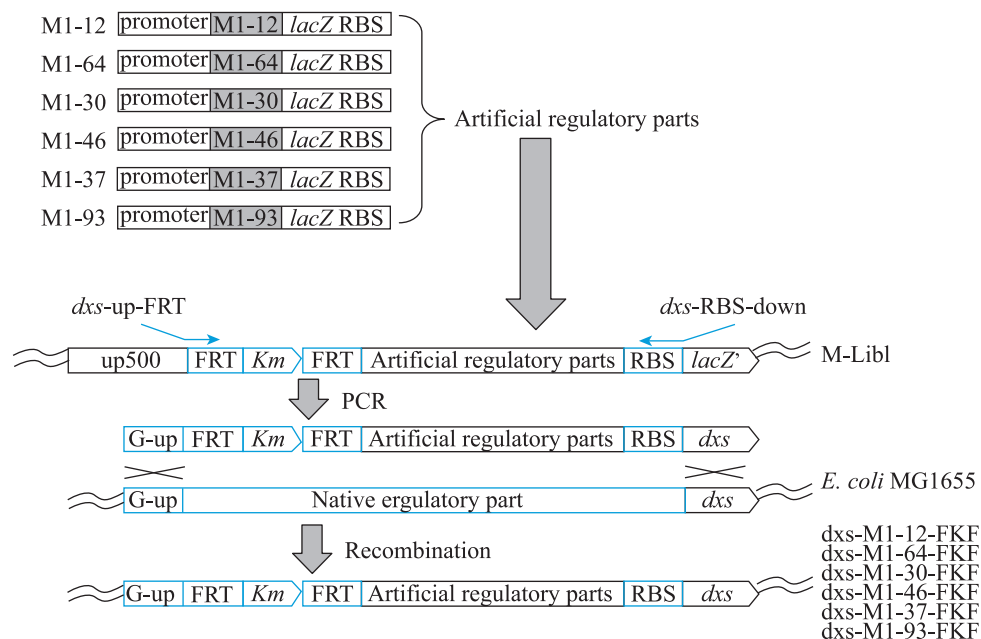


图3 用6种不同强度调控元件调控 *dxs* 基因表达的示意图

Fig. 3 Modulation of *dxs* gene expression with six artificial regulatory parts.

## 2 结果与分析

### 2.1 表达载体的构建

为了有效表达外源基因,本研究通过PCR的方法,重新构建了两个表达载体 pTrc99A-M 和 pACYC184-M,这两个质粒具有相同的启动子和多克隆位点,具有不同的复制起始位点、抗性基因和不同的拷贝数,利用这两个质粒可以有效比较相同条件下,不同拷贝数的外源基因对目标产物的影响。按照图2所示构建质粒。

质粒构建成功后,限制性内切酶 *Pac* I 分别酶切两个质粒,验证是否为正确连接。结果如图4所示, pTrc99A-M 经 *Pac* I 酶切后得到大小为 1 771 bp 和 1 978 bp 的条带(图4A)。pACYC184-M 经限制性内切酶 *Pac* I 酶切的大小为 1 978 bp 和 2 204 bp 的条带(图4B)。结果与预期一致,说明质粒构建成功。

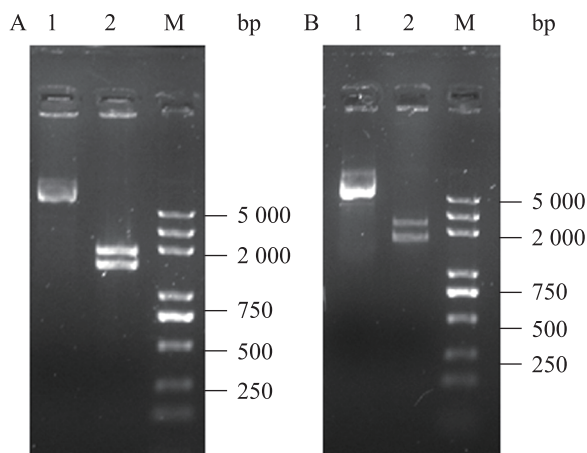


图4 重组质粒 pTrc99A-M 和 pACYC184-M 的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of pTrc99A-M and pACYC184-M by restriction endonuclease digestion. (A) M: DNA marker trans2K; 1: pTrc99A-M; 2: pTrc99A-M digested with *Pac* I. (B) M: DNA marker trans2K; 1: pACYC184-M; 2: pACYC184-M digested with *Pac* I.

## 2.2 外源胡萝卜素基因表达质粒的构建

大肠杆菌本身没有合成  $\beta$ -胡萝卜素的能力, 但是引入 *crtEBIY* 基因后, 大肠杆菌就可以生产  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[18]</sup>。按照图 2 所示, 克隆成团泛菌 CGMCC No. 1.2244 的  $\beta$ -胡萝卜素合成基因操纵子, 构建 pTrc99A-M-crt 和 pACYC184-M-crt 质粒, 用于生产  $\beta$ -胡萝卜素。

重组质粒 pTrc99A-M-crt 构建成功后, 经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切验证, 得到大小分别为 5 804 bp 和 3 716 bp 的条带 (图 5A), 且测序正确; 重组质粒 pACYC184-M-crt 经限制性内切酶 *Pac* I 酶切的大小为 7 749 bp 和 2 204 bp 的条带 (图 5B)。结果与预期一致, 并测序正确, 说明质粒构建成功。

## 2.3 不同质粒对 $\beta$ -胡萝卜素产量的影响

因为 pTrc99A-M-crt 和 pACYC184-M-crt 拷

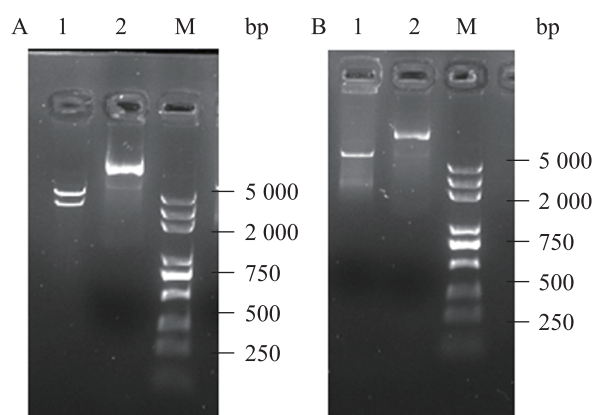


图 5 重组质粒 pTrc99A-M-crt 和 pACYC184-M-crt 的酶切鉴定

Fig. 5 Identification of pTrc99A-M-crt and pACYC184-M-crt by restriction endonuclease digestion. (A) M: DNA marker trans2K; 1: pTrc99A-M-crt digested with *EcoR* I and *Sal* I; 2: pTrc99A-M-crt. (B) M: DNA marker trans2K; 1: pACYC184-M-crt digested with *Pac* I; 2: pACYC184-M-crt.

贝数不同, 对于  $\beta$ -胡萝卜素生产的影响必然不同。所以将这两个质粒转化大肠杆菌 MG1655, 以确定不同拷贝数对  $\beta$ -胡萝卜素产量的影响。

结果表明 (图 6), 虽然 pTrc99A-M-crt 的拷贝数比 pACYC184-M-crt 高, 但是当大肠杆菌 MG1655 中含有 pACYC184-M-crt 质粒时, 产量是含 pTrc99A-M-crt 的大肠杆菌的 1.69 倍。说明并不是基因表达越高, 产量就越高。Albermann 等得到的类似研究结果, 他们在研究番茄红素基因的不同表达水平对番茄红素产量的影响时, 发现番茄红素基因低水平表达, 更有利于番茄红素的产生<sup>[19]</sup>。

## 2.4 调控萜类合成途径基因的表达来提高 $\beta$ -胡萝卜素产量

用 6 个强度的人工调控元件, 对大肠杆菌 MG1655 的 MEP 途径的 7 个基因和 *ispA* 基因调控, 将得到的菌株转化 pACYC184-M-crt。1 mmol/L IPTG 诱导基因表达后, 测定  $\beta$ -胡萝卜素的产量。结果表明, 不同调控元件对 8 个基因

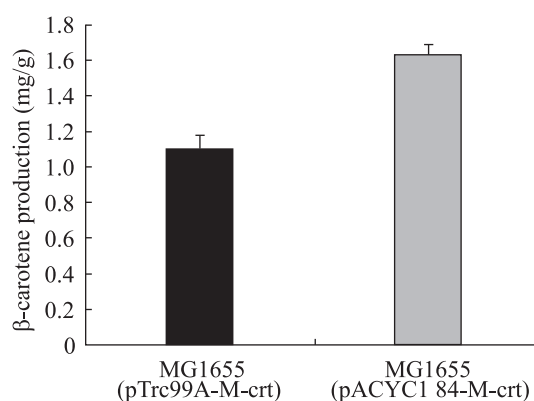


图 6 转化不同拷贝数质粒后  $\beta$ -胡萝卜素产量的比较  
Fig. 6 Comparison of  $\beta$ -carotene production by MG1655 transformed with pACYC184-M-crt and pTrc99A-M-crt.

进行调控,  $\beta$ -胡萝卜素的产量发生了显著的变化(图 7), 每一个基因的最适调控强度也各不相同(图 7 和表 3)。

*dxs* 和 *idi* 被认为是类异戊二烯合成途径中 2 个主要的限速步骤, 所以增加这两个酶的活性来提高类胡萝卜素的产量是一个通用的策略<sup>[17-20]</sup>。与之前的工作相符, 我们发现调控 *dxs* 和 *idi* 基因比调控 *dxr*、*ispDF*、*ispE*、*ispG* 和 *ispH* 在提高  $\beta$ -胡萝卜素产量方面更为有效。用 M1-37 调控元件调控 *dxs* 基因, 使得  $\beta$ -胡萝卜素的产量是

野生菌的 3.5 倍, 这也是所有调控过的菌株中效果最好的(表 3)。调控 *idi* 和 *ispA* 基因使得  $\beta$ -胡萝卜素的产量有了中等程度的提高, 是野生菌的 2.1 和 2.3 倍(表 3)。调控 *dxr*、*ispDF*、*ispE*、*ispG* 和 *ispH* 基因后,  $\beta$ -胡萝卜素的产量是野生菌的 1.2 到 1.4 倍。我们也用 HPLC 检测了  $\beta$ -胡萝卜素产量最高的菌株(含有 pACYC184-M-crt 质粒的 *dxs*-M1-37-FKF 菌株)。结果表明  $\beta$ -胡萝卜素是单一的类胡萝卜素化合物, 产量为 7.8 mg/g 干重细胞。

表 3 调控萜类合成途径基因后  $\beta$ -胡萝卜素的相对产量

Table 3 Relative  $\beta$ -carotene production of engineered *E. coli* after modulating isoprenoid gene expression

Strain <sup>a</sup>	$OD_{453}/OD_{600}$	Relative $\beta$ -carotene production
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	0.09±0.01	1.0
<i>dxs</i> -M1-37-FKF <sup>b</sup>	0.32±0.11	3.5
<i>dxr</i> -M1-12-FKF <sup>b</sup>	0.13±0.00	1.4
<i>ispD</i> -M1-93-FKF <sup>b</sup>	0.12±0.03	1.4
<i>ispE</i> -M1-30-FKF <sup>b</sup>	0.13±0.01	1.4
<i>ispG</i> -M1-37-FKF <sup>b</sup>	0.10±0.05	1.2
<i>ispH</i> -M1-64-FKF <sup>b</sup>	0.11±0.02	1.2
<i>idi</i> -M1-37-FKF <sup>b</sup>	0.20±0.00	2.1
<i>ispA</i> -M1-30-FKF <sup>b</sup>	0.21±0.07	2.3
<i>idi</i> -M1-37- <i>dxs</i> -M1-64-FKF	0.49±0.004	5.4
<i>idi</i> -M1-37- <i>dxs</i> -M1-37-FKF	0.71±0.033	8.0

<sup>a</sup> All strains were transformed with pACYC184-M-crt.

<sup>b</sup>  $OD_{453}/OD_{600}$  value was for the highest one among the 6 engineered strains modulated with varied strength.

Yuan 等<sup>[2]</sup>的研究表明, 用高强度的 T5 启动子调控 MEP 途径的 *dxs*、*ispDF*、*ispE* 和 *idi* 这 4 个基因时,  $\beta$ -胡萝卜素产量分别提高了 100%、40%、20%和 40%; 但用高强度的 T5 启动子调控 *dxr*、*ispG* 和 *ispH* 基因时,  $\beta$ -胡萝卜素产量反而下降了。本研究使用了 6 个具有不同强度的人

工调控元件对 MEP 途径的这 7 个基因进行调控, 发现用适当强度的调控元件对 *dxr*、*ispG* 和 *ispH* 基因进行调控后, 也能够提高  $\beta$ -胡萝卜素的产量(分别提高了 40%、20%和 20%)。另外, 我们调控 *dxs*、*ispDF*、*ispE* 和 *idi* 这 4 个基因,  $\beta$ -胡萝卜素产量提高的幅度比用 T5 的更大, 分别提高



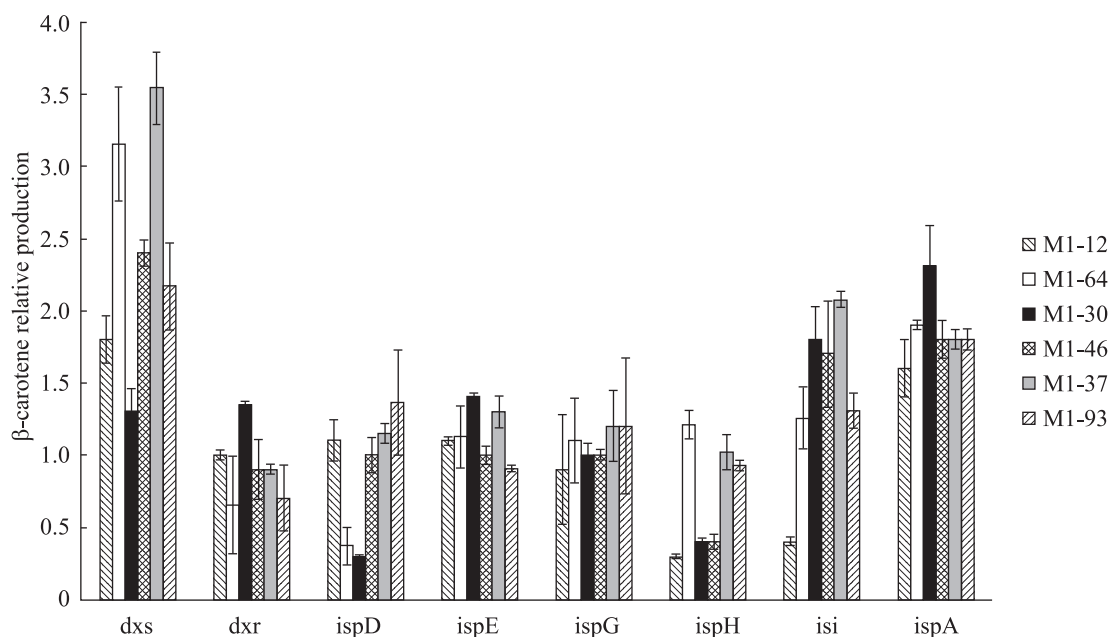


图7 调控萜类合成途径基因后  $\beta$ -胡萝卜素的相对产量 (和野生型大肠杆菌 MG1655 相比较)

Fig. 7 Relative  $\beta$ -carotene production after modulating isoprenoid gene expression, which was compared with the wild type *E. coli* MG1655. All strains were transformed with pACYC184-M-crt.

了 250%、40%、40%和 110%。除此之外，我们还首次对 *ispA* 基因进行调控，发现其使  $\beta$ -胡萝卜素产量提高了 130%，表明该酶可能也是萜类化合物合成途径的一个关键限速步骤。本研究的结果表明使用多个不同强度的调控元件对基因表达进行调控比仅使用强启动子调控更为有效。

## 2.5 组合调控萜类合成途径关键基因的表达来提高 $\beta$ -胡萝卜素产量

通过利用不同调控元件调控 MEP 途径各基因，发现对 *dxs* 和 *idi* 基因调控后， $\beta$ -胡萝卜素的产量提高最大，因此将 *idi* 基因调控效果最好的菌株 *idi*-M1-37-FKF 的 *FRT-km-FRT* 敲除，然后用 M1-64 和 M1-37 调控 *dxs* 基因，将得到菌株转化 pACYC184-M-crt 后测定  $\beta$ -胡萝卜素产量。对

大肠杆菌 MG1655 进行 *dxs* 和 *idi* 组合调控后， $\beta$ -胡萝卜素产量分别比野生菌提高了 5.5 倍和 8 倍 (图 8 和表 3)。用 HPLC 测定  $\beta$ -胡萝卜素产量最高菌株 *idi*-M1-37-*dxs*-M1-37-FKF (pACYC184-M-crt)，产量为 17.59 mg/g 干重细胞。

Yuan 等用 T5 启动子对 *dxs*、*ispDF*、*ispB* 和 *idi* 这 4 个基因进行组合调控后， $\beta$ -胡萝卜素产量提高了 6.3 倍，达到 6 mg/g 干重细胞<sup>[2]</sup>。Suh 用强启动子 T5 调控 MEP 途径的关键基因 *dxs*、*idi*、*ispDF* 后， $\beta$ -胡萝卜素产量比对照提高了 4.5 倍<sup>[8]</sup>。本研究使用多个不同强度的调控元件对 *dxs* 和 *idi* 基因表达进行组合调控后， $\beta$ -胡萝卜素产量提高了 8 倍，效果同样比仅使用强启动子调控更好。

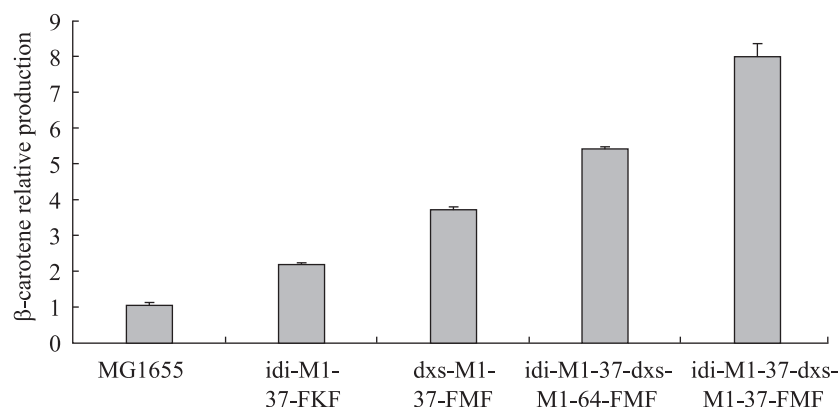


图8 组合调控 *dxs* 和 *idi* 基因后  $\beta$ -胡萝卜素的相对产量 (和野生型大肠杆菌 MG1655 相比较)

Fig. 8 Relative  $\beta$ -carotene production after combined modulation of *dxs* and *idi* gene expression, which was compared with the wild type *E. coli* MG1655. All strains were transformed with pACYC184-M-crt.

### 3 结论

本文将  $\beta$ -胡萝卜素合成途径导入大肠杆菌, 并用多个调控元件对大肠杆菌 MEP 途径的 7 个基因和 *ispA* 基因进行表达调控, 发现  $\beta$ -胡萝卜素产量提高的幅度比使用 T5 强启动子的效果要好。和以前报道不一样的是, 我们发现用适当强度的调控元件对 *dxr*、*ispG* 和 *ispH* 基因进行调控后, 也能够提高  $\beta$ -胡萝卜素的产量。另外, 我们对 *dxs* 和 *idi* 基因进行组合调控后, 将  $\beta$ -胡萝卜素产量提高了 8 倍, 也比使用 T5 强启动子的效果要好。结果表明使用多个不同强度的调控元件对基因表达进行调控比仅使用强启动子调控更为有效, 为使用基因表达调控优化目标产品合成途径的效率提供了一种新的方案。

### REFERENCES

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Yoon SH, Lee SH, Das A, et al. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of beta-carotene in *E. coli*. *J Biotechnol*, 2009, 140(3/4): 218–226.
- [4] Mehta BJ, Obraztsova IN, Cerdá-Olmedo E. Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of  $\beta$ -carotene and lycopene. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(7): 4043–4048.
- [5] Albermann C, Trachtmann N, Sprenger GA. A simple and reliable method to conduct and monitor expression cassette integration into the *Escherichia coli* chromosome. *Biotechnol J*, 2010, 5(1): 32–38.
- [6] Lemuth K, Steuer K, Albermann C. Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for improved *in vivo* biosynthesis of astaxanthin. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 29.
- [7] Lee PC, Schmidt-Dannert C. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids

- in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(1/2): 1–11.
- [8] Suh W. High isoprenoid flux *Escherichia coli* as a host for carotenoids production. *Methods Mol Biol*, 2012, 834: 49–62.
- [9] Pfleger BF, Pitera DJ, Smolke CD, et al. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(8): 1027–1032.
- [10] Kim SW, Kim JB, Ryu JM, et al. High-level production of lycopene in metabolically engineered *E. coli*. *Process Biochem*, 2009, 44(8): 899–905.
- [11] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(36): 12678–12683.
- [12] Solem C, Jensen PR. Modulation of gene expression made easy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 68(5): 2397–2403.
- [13] Meynial-Salles I, Cervin MA, Soucaille P. New tool for metabolic pathway engineering in *Escherichia coli*: one-step method to modulate expression of chromosomal genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 71(4): 2140–2144.
- [14] Jensen PR, Hammer K. The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 64(1): 82–87.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6640–6645.
- [18] Kajiwarra S, Fraser PD, Kondo K, et al. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1997, 324(Pt 2): 421–426.
- [19] Albermann C. High versus low level expression of the lycopene biosynthesis genes from *Pantoea ananatis* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(2): 313–319.
- [20] Das A, Yoon SH, Lee SH, et al. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(3): 505–512.

(本文责编 陈宏宇)