

构建酿酒酵母工程菌合成香紫苏醇

杨薇^{1,2}, 周雍进¹, 刘武军¹, 沈宏伟¹, 赵宗保^{1,3}

1 中国科学院大连化学物理研究所生物技术部, 辽宁 大连 116023

2 营口理工学院化学工程系, 辽宁 营口 115000

3 中国科学院大连化学物理研究所 催化基础研究国家重点实验室, 辽宁 大连 116023

杨薇, 周雍进, 刘武军, 等. 构建酿酒酵母工程菌合成香紫苏醇. 生物工程学报, 2013, 29(8): 1185-1192.

Yang W, Zhou YJ, Liu WJ, et al. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for sclareol production. Chin J Biotech, 2013, 29(8): 1185-1192.

摘要: 香紫苏醇是一种来源于植物的双环二萜醇, 常用于香味成分且具有重要生物学活性。为实现香紫苏醇的微生物生产, 以酿酒酵母为宿主, 表达焦磷酸赖氨酸二萜醇酯合酶和香紫苏醇合酶, 构建香紫苏醇的人工生物合成途径。发现过表达前体代谢关键酶、蛋白质融合增强底物通道效应及去除异源蛋白信号肽等, 有利于香紫苏醇合成。在摇瓶培养条件下, 组合优化得到的工程菌株 S6 的香紫苏醇产量达到 8.96 mg/L。研究结果对其他萜类化合物的异源生物合成具有参考价值。

关键词: 香紫苏醇, 酿酒酵母, 二萜化合物, 生物合成, 合成生物学

Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for sclareol production

Wei Yang^{1,2}, Yongjin Zhou¹, Wujun Liu¹, Hongwei Shen¹, and Zongbao K. Zhao^{1,3}

1 Division of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China

2 Department of Chemical Engineering, Yingkou Institute of Technology, Yingkou 115000, Liaoning, China

3 State Key Laboratory of Catalysis, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning, China

Abstract: Sclareol is a member of labdane type diterpenes mostly used as fragrance ingredient. To enable microbial production of sclareol, synthetic pathways were constructed by incorporating labdenediol diphosphate synthase (LPPS) and terpene synthase (TPS) of the plant *Salvia sclarea* into *Saccharomyces cerevisiae*. It was found that sclareol production could be benefited by overexpression of key enzyme for precursor biosynthesis, construction of fusion protein for substrate channeling, and removal of signal peptides from LPPS and TPS. Under optimal shake flask culture conditions, strain S6 produced 8.96 mg/L sclareol. These results provided useful information for development of heterologous hosts for production of terpenoids.

Keywords: sclareol, *Saccharomyces cerevisiae*, diterpenoids, biosynthesis, synthetic biology

Received: June 5, 2013; **Accepted:** June 25, 2013

Corresponding author: Zongbao K. Zhao. Tel/Fax: +86-411-84379211; E-mail: zhaobz@dicp.ac.cn

萜类化合物广泛存在于植物、动物和微生物中,至今已分离出40余万种。许多萜类化合物是植物生长、发育和一般代谢必不可少的化学物质^[1]。萜类化合物可应用于医药、保健品、香精、香料或农药领域^[2]。然而,大多萜类化合物在其天然生产物种中的含量极低,成为制约它们规模化应用的瓶颈。近年来,合成生物学和代谢工程技术迅速发展,为改造目标分子的天然生产物种或设计异源生产途径提供了可能^[3]。例如,构建微生物“细胞工厂”合成紫穗槐二烯(青蒿素前体)^[4]、紫杉烯(红豆杉醇前体)^[5]和番茄红素^[6]等萜类化合物,取得了令人振奋的结果。

酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 的遗传背景相对清晰,遗传操作平台成熟,生物安全性好。由于其甲羟戊酸(MVA)途径和异戊二烯(PDP)通路活性高, *S. cerevisiae* 是构建萜类化合物异源合成途径的理想宿主之一。例如,经过途径改造的 *S. cerevisiae* 工程菌,合成(*E,E,E*)-香叶基香叶醇、(*E,E*)-法尼醇和丹参酮生物合成前体次丹参酮二烯,产量分别达到3.31 g/L、145.7 mg/L和488 mg/L^[7-10]。此外,异戊二烯合酶亚细胞定位能增加萜类化合物的合成量^[11]。

香紫苏醇是一种半日花烷型二萜二叔醇,首次在南欧丹参鼠尾草(*Clary sage Salvia sclarea*)中发现,常用于化妆品和香水的香料成分及食品调味材料。由于其具有很强的抗菌活性及对真菌生长和植物生长具有调节作用,香紫苏醇也可应用于农药领域。此外,香紫苏醇对人类白血病细胞^[12]、结肠癌细胞^[13]及异种移植^[13-14]具有细胞毒性。目前,大多以植物香紫苏花序及茎叶为原料提取香紫苏浸膏,进一步纯化得到香紫苏醇。

由于香紫苏生长周期长,且受土地、环境及气候因素影响,不能满足工业生产需求。瑞典科研人员发现了香紫苏醇合成的两个关键酶,焦磷酸赖百当烯二醇酯(LPP)合酶(SsLPPS)和香紫苏醇合酶(SsTPS),分别催化香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)生成LPP及LPP生成香紫苏醇的反应^[15](图1)。以大肠杆菌为宿主,重组真核生物PDP、MVA途径及香紫苏醇的生物合成途径,结合高

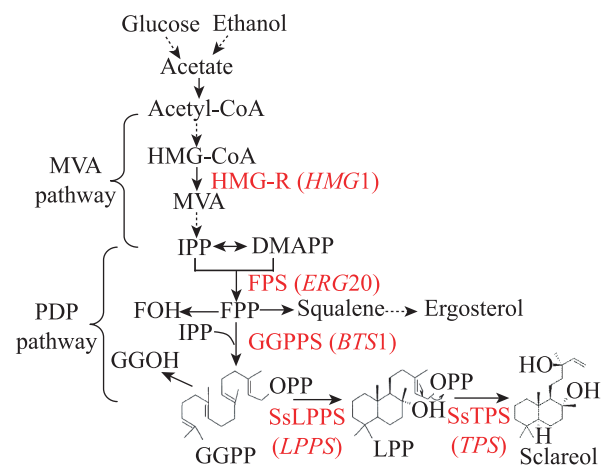


图1 酿酒酵母中香紫苏醇合成策略

Fig. 1 Schematic diagram of sclareol biosynthesis in *S. cerevisiae*. Each solid arrow represents one reaction step, and the dashed arrow indicates several reaction steps. Abbreviations: HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; MVA: mevalonate; IPP, isopentenyl pyrophosphate; DMAPP: dimethylallyl diphosphate; FPP: (*E,E*)-farnesyl diphosphate; FOH: (*E,E*)-farnesol; GGPP: (*E,E,E*)-geranylgeranyl diphosphate; GGOH: (*E,E,E*)-geranylgeraniol; LPP: labdenediol diphosphate; PDP: prenyl diphosphate; HMG-R: HMG-CoA reductase (*HMG1* encoded); FPS: FPP synthase (*ERG20* encoded); GGPPS: GGPP synthase (*BTS1* encoded); SsLPPS: LPP synthase of *S. sclarea* (*LPPS* encoded); SsTPS: terpene synthase of *S. sclarea* (*TPS* encoded). Heterologous genes (*LPPS* and *TPS*) were derived from *S. sclarea* and other genes were cloned from *S. cerevisiae*.

密度发酵技术, 香紫苏醇产量达到约 1.5 g/L^[16]。本实验室最近采用模块化的途径工程策略, 快速有效地在 *S. cerevisiae* 中组装预先设计好的人工生物合成途径^[7]。本文拟利用香紫苏醇合成关键酶的生物学信息, 采用模块途径工程策略, 构建香紫苏醇人工生物合成途径, 探讨过表达代谢关键酶、蛋白质融合及异源蛋白信号肽等因素对 *S. cerevisiae* 工程菌合成香紫苏醇的影响, 为进一步设计萜类化合物高产菌株提供科学参考。

表 1 本文所用菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains/plasmids	Description	Source
Strains		
BY4741ML	<i>MATa; his3Δ1; ura3Δ0</i>	Lab collection
S1	BY4741ML containing pSclaerol-1	This study
S2	BY4741ML containing pSclaerol-2	This study
S3	BY4741ML containing pSclaerol-3	This study
S4	BY4741ML containing pSclaerol-4	This study
S5	BY4741ML containing pSclaerol-5	This study
S6	BY4741ML containing pSclaerol-4 and p424-tHMG1	This study
Plasmids		
pMD19-T	Cloning vector, Amp ^r	TaKaRa
pMD19-T-LPPS	pMD19-T carrying <i>LPPS</i>	TaKaRa
pMD19-T-TPS	pMD19-T carrying <i>TPS</i>	TaKaRa
pYX212	Expression vector/shuttle vector, <i>ura3</i> , Amp ^r	Lab collection
pSclaerol-1	pYX212 carrying <i>LPPS</i> and <i>TPS</i>	This study
pSclaerol-2	pYX212 carrying BTS1-ERG20 (fusion gene), <i>LPPS</i> and <i>TPS</i>	This study
pSclaerol-3	pYX212 carrying BTS1-ERG20 (fusion gene), ^a <i>tLPPS</i> and ^b <i>tTPS</i>	This study
pSclaerol-4	pYX212 carrying BTS1-ERG20 (fusion gene), <i>LPPS-TPS</i> (fusion gene)	This study
pSclaerol-5	pYX212 carrying BTS1-ERG20 (fusion gene), ^a <i>tLPPS</i> - ^b <i>tTPS</i> (fusion gene)	This study
p424	Expression vector/shuttle vector, <i>his3</i> , Amp ^r	Lab collection
p424- ^c tHMG1	p424 carrying truncated <i>HMG1</i>	Lab collection

^a*tLPPS* was truncated 63 aa from N-terminal of SsLPPS; ^b*tTPS* was truncated 51 aa from N-terminal of SsTPS; ^ctHMG1 was truncated 529 aa from N-terminal of HMGR.

1 材料与方法

1.1 材料

本文所用菌株列于表 1。香紫苏醇、GOH、FOH 和 GGOH 购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。PrimeSTAR HS DNA 聚合酶购自大连宝生物公司。引物由北京鼎国昌盛生物技术公司合成。全基因合成及测序由大连宝生物公司完成。DNA 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司。其他试剂购自当地供应商。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养

S. cerevisiae 在 30 °C、200 r/min 下培养。营养缺陷型菌株筛选采用 SD 培养基 (2% 葡萄糖, 0.67% 含 (NH₄)₂SO₄ 的酵母氮源, 不添加氨基酸)。摇瓶培养采用 YPD 培养基 (2% 葡萄糖, 2% 蛋白胨和 1% 酵母浸膏)。

E. coli 在 37 °C、200 r/min 下培养。重组菌株筛选采用 LB 培养基 (1% NaCl, 1% 胰蛋白胨, 0.5% 酵母浸膏, 100 μg/mL 氨苄青霉素添)。

所有培养基均经 120 °C、20 min 灭菌处理。

1.2.2 *S. cerevisiae* 对香紫苏醇的耐受性分析

将 *S. cerevisiae* 菌株分别在添加了 0 mg/L、30.9 mg/L、308.5 mg/L 和 925.5 mg/L 香紫苏醇的 YPD 培养基中培养, 通过监测细胞密度分析其生长情况。

1.2.3 全基因合成

SsLPPS 和 SsTPS 基因序列经过密码子优化网站 (<http://www.jcat.de/Start.jsp>) 优化, 使密码子更适合在 *S. cerevisiae* 中表达。优化后的序列由大连宝生物公司合成, 分别克隆到 pMD19-T 载体上, 得到重组质粒 pMD19-T-LPPS 和 pMD19-T-TPS。全合成的基因用测序引物 pMD18-F (5'-GCCTCTTCGCTATTACGCCA-3') 和 pMD18-R (5'-CACTCATTAGGCACCCAGG-3') 进行测序验证。

1.2.4 重组质粒构建

本文所用质粒列于表 1。重组质粒构建均采用模块途径工程策略的方法^[7]。具体步骤为: 第一步, 用高保真聚合酶进行 PCR (反应条件: 95 °C 5 min; 98 °C 10 s, 68 °C 4 min, 35 个循环; 68 °C 10 min) 克隆各模块的不同 DNA 片段, 包括启

动子、功能基因、终止子和用于重组的重叠序列; 第二步, 通过高效的多片段融合 PCR (共两轮: 前一轮反应条件: 95 °C 5 min; 98 °C 10 s, 68 °C 6 min, 15 个循环; 72 °C 10 min; 后一轮反应条件: 95 °C 5 min; 98 °C 10 s, 68 °C 6 min, 35 个循环; 72 °C 10 min) 方法在体外将模块的不同片段融合连接^[17]; 第三步, 利用 *S. cerevisiae* 高效地重组性能, 将不同模块的 DNA 片段及线性化的表达载体 pYX212 (*Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切) 转化到胞内进行同源重组, 并在相应营养缺陷型平板上筛选。从表型正确的克隆中提取重组质粒, 进一步测序验证各模块间拼接的准确性。

1.2.5 香紫苏醇的提取与检测

将测序正确的载体分别转化 *S. cerevisiae* BY4741ML, 得到工程菌株 S1-S6 (图 2)。

将 *S. cerevisiae* 工程菌株发酵醪液与等体积正己烷混和, 在 30 °C 下处理 30 min。室温下在玻璃瓶离心 (1 800 r/min) 处理 8 min, 取上层有机相, 浓缩后重悬于正己烷中, 待测。

香紫苏醇含量利用气相色谱 (GC7890F) 系统分析。采用 SE-54 型毛细管色谱柱 (0.25 mm×30 m), 分析条件为: 柱温 250 °C, 进样口温度 270 °C, 检测器温度 290 °C, 载气流速 1.6 mL/min。在此分析条件下, 香紫苏醇的保留时间为 8.3 min。

2 结果

2.1 *S. cerevisiae* 的香紫苏醇耐受性

文献报道, 香紫苏醇具有植物病原真菌灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 的抗菌活性^[18]。为验证香紫苏醇对真菌酿酒酵母的抗菌活性, 考察 *S. cerevisiae* BY4741ML 对香紫苏醇的耐受性。

与对照相比, *S. cerevisiae* 在外加 925.5 mg/L 香紫苏醇的培养基中生长受到抑制, 但抑制率仅为 14.3%。可见, 菌株耐受性应不会成为香紫苏醇异源合成途径功能体现的制约因素。

2.2 PDP 通路的影响

增加前体供给是一种常用且有效的促进目标产物合成的策略。以往实验证实, 过表达 PDP 通路的关键酶法尼基焦磷酸 (FPP) 合酶 (FPPS, *ERG20* 编码) 或 GGPP 合酶 (GGPPS,

BTS1 编码) (图 1), 或同时过表达上述两个酶, 均有利于工程菌株产生二萜化合物次丹参酮二烯^[7]。菌株 S2, 过表达 FPPS 和 GGPPS 融合蛋白 (两蛋白之间用柔性连接肽 GGGs 连接) 及过表达异源的 SsLPPS 和 SsTPS 蛋白, 而对照株菌株 S1 仅过表达 SsLPPS 和 SsTPS (图 2)。实验中未检测到菌株 S1 合成香紫苏醇 (GC 检测限约 0.1 mg/L), 而菌株 S2 香紫苏醇产量达到 (2.05±0.46) mg/L。

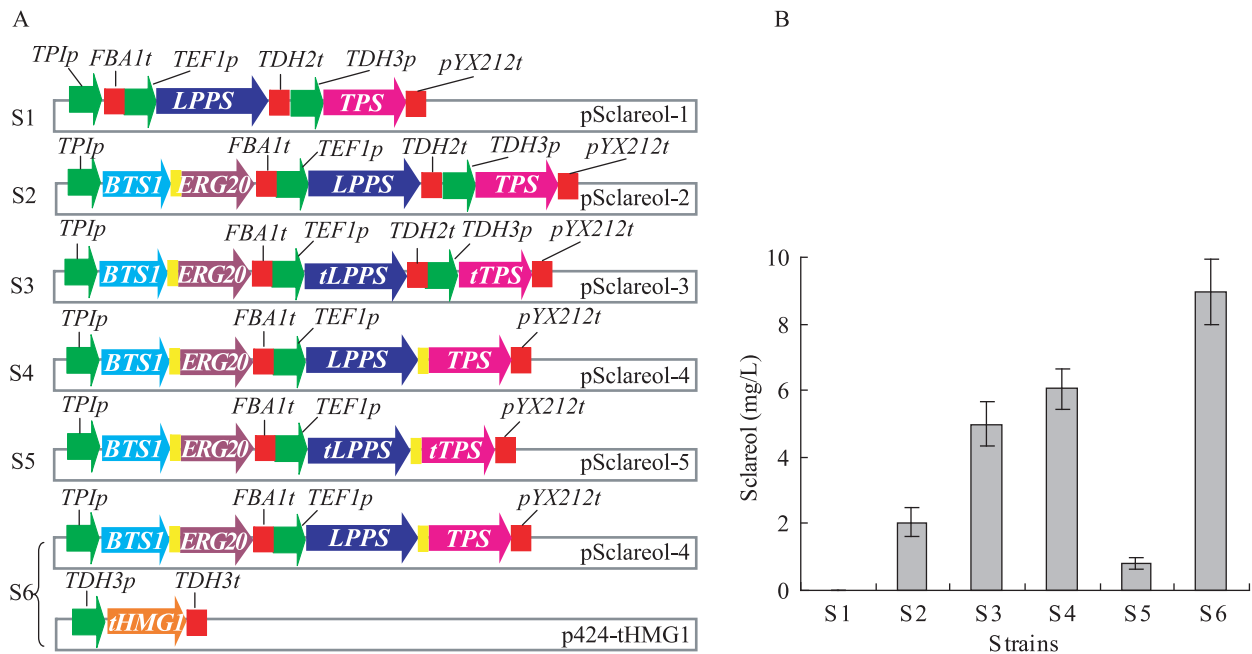


图 2 不同酿酒酵母菌株的重组质粒 (A) 和香紫苏醇产量 (B)

Fig. 2 Recombinant plasmids (A) and sclareol production (B) of different *S. cerevisiae* strains. (A) Genes (arrows with white gene name): *BTS1*: encoding for GGPP synthase; *ERG20*: encoding for FPP synthase; *LPPS*: encoding for LPP synthase; *TPS*: encoding for terpene synthase; *tLPPS*: encoding for truncated LPP synthase; and *tTPS*: encoding for truncated terpene synthase; *tHMG1*: encoding for HMG-CoA reductase; promoters (green arrows): *TPIp*, *TEF1p* and *TDH3p*; terminators (red rectangles): *FBA1t*, *TDH2t*, *pYX212t* and *TDH3t*; linker peptide (yellow rectangles): glycine-glycine-glycine-serine (GGGS). Heterologous genes (*LPPS*, *TPS*, *tLPPS* and *tTPS*) were derived from *S. sclarea*; other genes, promoters and terminators were cloned from *S. cerevisiae*. (B) *S. cerevisiae* cells at 30 °C, 200 r/min for 48 h, and the culture broth was used for extraction of sclareol. Each result represents the average of three independent clones.

2.3 异源蛋白信号肽对香紫苏醇合成的影响

通过网站 TargetP1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 ChloroP1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 对 SsLPPS 和 SsTPS 进行信号肽预测,并结合过去的实验结果^[15],推测 N-末端分别含有 63 个氨基酸和 50 个氨基酸组成的信号肽。菌株 S3,过表达去除信号肽的 SsLPPS (tSsLPPS) 和 SsTPS (tSsTPS) 及融合蛋白 GGPPS-FPPS (图 2)。实验发现,菌株 S3 香紫苏醇产量达到 (5.00 ± 0.66) mg/L,是携带信号肽表达菌株 S2 产量的 2.4 倍。可见,去除异源酶的信号肽,有利于其在 *S. cerevisiae* 中发挥功能。

2.4 异源酶融合

将代谢途径中催化相邻的两个或两个以上反应的酶融合表达,可增加代谢途径通量^[7,19]。进一步融合异源酶或去除信号肽的截短异源酶,以确定其对香紫苏醇合成的影响。菌株 S4 和 S5 在过表达融合蛋白 GGPPS-FPPS 的基础上,分别过表达融合蛋白 LPPS-TPS 和 tLPPS-tTPS (图 2)。实验发现,菌株 S4 香紫苏醇产量达到 (6.05 ± 0.59) mg/L,是菌株 S3 的 1.21 倍。然而,菌株 S5 仅获得 (0.81 ± 0.15) mg/L 香紫苏醇,明显低于菌株 S3。

2.5 MVA 途径对香紫苏醇合成的影响

羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR, *HMG1* 编码) 是 MVA 途径的限速酶。相对于完整的 HMGR,去除了 N-端 529 aa 调控序列的 HMGR (tHMGR, *tHMG1* 编码) 更有利于促进人工生物合成途径的活性^[7,20]。因此,在菌株 S4 的基础上进一步过表达 tHMGR,得到菌株 S6 (图 2)。实验发现,菌株 S6 香紫苏醇产量达到

(8.96 ± 0.96) mg/L,是菌株 S4 的 1.48 倍,是当前香紫苏醇产量较高的 *S. cerevisiae* 工程菌。

3 讨论

本文以 *S. cerevisiae* BY4741ML 为宿主,构建香紫苏醇的人工生物合成途径。共构建了 6 株重组菌株 S1 至 S6,经过摇瓶发酵后,对其香紫苏醇的产量进行比较,结果如图 2 所示。可见,仅引入异源的香紫苏醇合成两个关键酶 LPPS 和 TPS 的菌株 S1,未见香紫苏醇产生 (检测限 0.1 mg/L);然而,增加二萜化合物前体合成的 PDP 通路中相应关键酶,即 FPPS 和 GGPPS,使菌株 S2 的香紫苏醇产量达到 (2.05 ± 0.46) mg/L,说明前体代谢流的加强,可为人工生物合成途径提供更多前体,并且过表达融合蛋白 GGPPS-FPPS 更有利于代谢流流向 GGPP。实验还发现,菌株 S1 中可检测到 (0.08 ± 0.02) mg/L 的 FPP 水解副产物 FOH,而菌株 S2 则未检测到 FOH。通过去除异源酶的 N-端信号肽,即过表达 tLPPS 和 tTPS,菌株 S3 的产量相对菌株 S2 提高 144%,可能因为信号肽去除后更有利于蛋白表达,或它们在 *S. cerevisiae* 中的活性更高。菌株 S4 和 S5 分别表达融合的全长和融合的去 N-端信号肽的异源酶,即分别为 LPPS-TPS 和 tLPPS-tTPS,经过香紫苏醇的产量比较,相对菌株 S3,菌株 S4 的产量提高 21%,而菌株 S5 反而降低 84%。其中,菌株 S4 产量提高可能是由于蛋白质融合拉近了反应活性中心的距离,使前一步反应的产物易于到达下一步反应的活性中心,从而减少底物扩散。文献报道,将双酶催化的反应转化为一个双功能蛋白催化后,产量可增加 30% 以上^[21]。奇怪的是,菌株 S5 却没有取得很好的结果,推测

可能由于截短 N 端序列的两蛋白融合后, 导致 C-端蛋白 (TPS) 的空间构型发生变化, 降低了催化活性。为进一步提高产量, 构建了菌株 S6, 即在前面较高产量的菌株 S4 中进一步过表达 MVA 途径的关键酶 HMGR 的催化部分 (tHMGR), 相对菌株 S4, 香紫苏醇的产量提高 48%。文献构建了香紫苏醇大肠杆菌工程菌株, 结合高密度发酵技术, 产量已达到约 1.5 g/L^[16]。因此, 尚需要进一步改造相关途径或采用发酵工程技术, 以提高 *S. cerevisiae* 工程菌株香紫苏醇产量。

REFERENCES

- [1] Bohlmann J, Keeling CI. Terpenoid biomaterials. *Plant J*, 2008, 54(4): 656–669.
- [2] Misawa N. Pathway engineering for functional isoprenoids. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(5): 627–633.
- [3] Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, et al. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm*, 2008, 5(2): 167–190.
- [4] Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(7): 796–802.
- [5] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330(6000): 70–74.
- [6] 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.
- [7] Zhou YJ, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(6): 3234–3241.
- [8] Tokuhiko K, Muramatsu M, Ohto C, et al. Overproduction of geranylgeraniol by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(17): 5536–5543.
- [9] Ohto C, Muramatsu M, Obata S, et al. Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae* for production of prenyl alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82(5): 837–845.
- [10] Dai Z, Liu Y, Huang L, et al. Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(11): 2845–2853.
- [11] Farhi M, Marhevka E, Masci T, et al. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids. *Metab Eng*, 2011, 13(5): 474–481.
- [12] Dimas K, Kokkinopoulos D, Demetzos C, et al. The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines. *Leuk Res*, 1999, 23(3): 217–234.
- [13] Dimas K, Hatziantoniou S, Tseleni S, et al. Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells *in vitro* and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice. *Apoptosis*, 2007, 12(4): 685–694.
- [14] Mahaira LG, Tsimplouli C, Sakellaridis N, et al. The labdane diterpene sclareol (labd-14-ene-8, 13-diol) induces apoptosis in human tumor cell lines and suppression of tumor growth *in vivo* via a p53-independent mechanism of action. *Eur J Pharmacol*, 2011, 666(1/3): 173–182.
- [15] Schalk M. Method for producing sclareol. WO, 2009101126.2009-08-20.
- [16] Schalk M, Pastore L, Mirata MA, et al. Toward a biosynthetic route to sclareol and amber odorants. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(46): 18900–18903.
- [17] Yu JH, Hamari Z, Han KH, et al. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene

- manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, 2004, 41(11): 973–981.
- [18] Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, et al. NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol*, 2005, 139(1): 341–352.
- [19] Dueber JE, Wu GC, Malmirchegini GR, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(8): 753–759.
- [20] Donald KA, Hampton RY, Fritz IB. Effects of overproduction of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on squalene synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(9): 3341–3344.
- [21] Varman AM, Xiao Y, Leonard E, et al. Statistics-based model for prediction of chemical biosynthesis yield from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 45.

(本文责编 陈宏宇)

~~~~~

### 英国投资 6 000 万英镑助推合成生物学研究

近日，英国大学与科学大臣戴维·威利茨宣布投入超 6 000 万英镑支持合成生物学发展，确保英国在该领域的全球领导地位。英国政府早前就将合成生物学列入 8 大重点发展的科学技术之一，并在英国生命科学战略中强调了这方面研究的重要性。2011 年，合成生物学的市场价值约为 11 亿英镑，预计到 2016 年将增至 72 亿。

这项资助主要分为以下 6 个方面：1) 生物技术与生物科学研究理事会 (BBSRC)，工程与物理科学研究理事会 (EPSRC) 出资 100 万英镑支持科学家加入国际联盟，预计到 2017 年共同完成酵母基因组的合成。2) BBSRC、EPSRC 和技术战略委员会共同出资 1 000 万英镑，建立一个有关合成生物学的多伙伴创新和知识中心，总部设于伦敦帝国学院。其主要目的是作为产业转化的引擎，整合大学和产业界在合成生物学方面的基础研究成果，并向产业化的生产工艺和产品转化。3) BBSRC 和 EPSRC 还将投资 2 000 万英镑用于建设一系列新的多学科研究中心。4) 由 BBSRC 管理的 1 000 万英镑将作为合成生物学的种子基金，鼓励企业进行商业化研究。5) 1 800 万英镑支持 DNA 合成研究。6) 200 万英镑用于支持合成生物学领域的培训项目。

(来源：中国科学报；日期：2013-08-09)