

细胞工厂与发酵工程

7-脱氢胆固醇合成功能模块与底盘细胞的适配性

张莹, 张璐, 刘夺, 丁明珠, 周晓, 元英进

天津大学化工学院 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

张莹, 张璐, 刘夺, 等. 7-脱氢胆固醇合成功能模块与底盘细胞的适配性. 生物工程学报, 2014, 30(1): 30-42.

Zhang Y, Zhang L, Liu D, et al. Match of functional module with chassis in 7-dehydrocholesterol synthesis. Chin J Biotech, 2014, 30(1): 30-42.

摘要: 利用合成生物技术生产 7-脱氢胆固醇的挑战性在于获得合成功能模块与底盘细胞的适配关系。从更换不同调控强度的启动子和不同改造的酵母底盘两方面, 对二者的适配性进行研究, 以增加 7-脱氢胆固醇产量: 过表达酵母固醇合成途径中的内源基因 *tHMGR* 和 *ERG1*, 敲除非必需基因 *ERG6* 和 *ERG5* 以抑制酵母固醇向麦角固醇的转化, 得到改造后的酵母底盘 SyBE_000956; 利用由强到弱依次为 *TDH3p*、*PGK1p* 和 *TDH1p* 的启动子, 引入人源 C-24 还原酶基因 *DHCR24*, 构建 3 种强度的外源功能模块, 并分别导入 3 种底盘中, 得到 9 种人工合成细胞。结果表明, *TDH3p* 调控的功能模块与底盘细胞 SyBE_000956 具备较好的适配性, 实现 7-脱氢胆固醇产量的提高。为后续的适配性研究提供了理性设计的依据。

关键词: 7-脱氢胆固醇, 合成生物学, 功能模块, 底盘细胞, 适配性

Match of functional module with chassis in 7-dehydrocholesterol synthesis

Ying Zhang, Lu Zhang, Duo Liu, Mingzhu Ding, Xiao Zhou, and Yingjin Yuan

Key Laboratory of Systems Bioengineering of Ministry of Education, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: The key challenge to generate engineered cells by synthetic biology for producing 7-dehydrocholesterol

Received: May 3, 2013; **Accepted:** June 15, 2013

Supported by: National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2012AA02A701), National Natural Science Foundation of China (Foundation for Young Scholars) (No. 21206114), Natural Science Foundation of Tianjin (No. 12JCQNJC03800).

Corresponding author: Xiao Zhou. Tel: +86-22-27406491; Fax: +86-022-27403389; E-mail: zhouriyao@tju.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2012AA02A701), 国家自然科学基金 (No. 21206114), 天津市自然科学基金 (No. 12JCQNJC03800) 资助。

网络出版时间: 2013-10-11

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131011.1835.003.html>

(7-DHC) in a high titer is the match between functional module and chassis. Our study focused on solving this problem by combining different promoters and yeast chassis to increase 7-DHC production. To optimize the chassis in order to accumulate zymosterol, the substrate for 7-DHC synthesis, we overexpressed truncated HMG-CoA reductase (tHmg1p) and squalene epoxidase (Erg1p), both are key genes of yeast endogenous zymosterol biosynthetic pathway. In addition, we knocked out C-24 methyl transferase (Erg6p) and C-22 dehydrogenase (Erg5p) to inhibit the conversion of zymosterol to ergosterol. By introducing heterologous C-24 reductase under three promoters with different strengths, namely *TDH3p*, *PGK1p* and *TDH1p*, we constructed functional modules of diverse activities. Nine engineered cells were generated based on the combination of these three modules and three chassis. The result shows that the engineered cell composed of functional module regulated by *TDH3p* and chassis SyBE_000956 had the highest 7-DHC production, indicating a better match than others. This study provides evidences for importance of match and empirical support for rational design of subsequent researches.

Keywords: 7-dehydrocholesterol, synthetic biology, functional module, chassis, fitness

胆甾相液晶材料在显示、电磁场检测、生物医学等方面均有着广泛的应用。作为胆甾相液晶材料的重要前体物,7-脱氢胆甾醇(7-DHC)需求量巨大,但其来源和产量问题无法满足当前日益增长的需求^[1]。现有的7-DHC生产方法主要是化学全合成,但其工艺流程长、收率低、能耗高、副产物去除过程复杂,且易对环境造成严重的污染^[2-3]。已有研究者实现了利用酶促转化合成7-DHC,虽然反应温和,但底物与酶的成本问题成为限制该技术工业化应用的瓶颈^[4]。

合成生物技术在合成重要产品、生产清洁能源、维护人类健康等方面均取得了令人瞩目的成果,引起极大关注^[5]。利用合成生物技术构建7-DHC人工细胞可以弥补化学法和酶促法的不足,且生产过程绿色清洁,具有很大的优势和广阔的市场前景。目前国内并无利用合成生物技术生产7-DHC的报道,国际上也多以7-DHC为中间产物,进一步合成雄烯二酮等甾体激素类药物,鲜有以7-DHC为目标产物的相关文献。Christine和Markus于2006年公开了酵母中生产7-DHC的方法。通过表达来自小鼠和人的C-8甾醇异构酶、C-5甾醇去饱和酶和甾

醇C24-还原酶的基因,并将*ERG5*和*ERG6*失活且*tHMG1*基因被过表达,获得了能合成7-DHC的酵母菌^[6]。荷兰的Hohmann Hans-Peter等也通过上调*HMG1*的截短基因,失活*ERG5*和*ERG6*,并引入脊椎动物来源的甾醇C24-还原酶,实现了在酵母中生产7-DHC^[7]。

酿酒酵母中存在固醇类物质的合成途径。作为单细胞真核生物,酿酒酵母不仅拥有转录后修饰功能,基因工程操作简单,便于培养和大规模发酵;且遗传背景较清晰,次生代谢产物较单一,能简化代谢工程产物的纯化^[8]。因此酿酒酵母是理想的真核蛋白表达系统之一,适合作为固醇类物质人工合成的底盘细胞。通过对功能模块内启动子、质粒等指标的改变,调节模块与底盘细胞的适配性,从而增加目的产物的产量,是合成生物技术发展中的关键问题^[9-10]。以酿酒酵母为底盘细胞生产7-DHC,国外以基因工程手段为主,并没有对合成功能模块与底盘细胞的适配关系进行研究。因此,以合成生物学为基础,注重挖掘功能模块与底盘细胞间的适配关系,降低酵母底盘细胞的代谢压力,提高与功能模块的适配性,从而增强人

工合成细胞的鲁棒性，具有很大的研究价值。

7-DHC 在酵母中的生物合成过程见图 1^[7,11-12]，是以酵母固醇为底物，引入 C-24 还原酶将侧链 C-24 位双键还原，并与内源基因 *ERG2* 编码的 C-8 异构酶、*ERG3* 编码的 C-5 脱氢酶共同实现。本研究利用合成生物技术，敲除非必需基因固醇 C-24 甲基转移酶基因 (*ERG6*)、固醇 C-22 脱氢酶基因 (*ERG5*) 以抑制主要竞争路径中麦角固醇的合成^[13-15]，减少酵母固醇向麦角固醇的转化，增加底物的积累；过表达截短的 HMG-CoA 还原酶基因 (*tHMGR*)^[16-17]、

角鲨烯环氧酶基因 (*ERG1*)^[18-19]等基因元件，提高酵母固醇合成途径中限速步骤的酶表达，以调节内源功能模块与底盘细胞的适配性，优化前体酵母固醇的供给代谢；同时引入人源 C-24 还原酶基因 (*DHCR24*)^[20-22]设计并构建 7-DHC 合成外源功能模块。通过对模块内不同强度启动子、不同底盘细胞等参数的考察，从异源基因表达的密码子优化、合成途径的标准化组装、合成途径的精细调控等方面研究外源功能模块与酿酒酵母底盘细胞的适配关系，得到稳定高产 7-DHC 的人工细胞。整体研究思路见图 2。

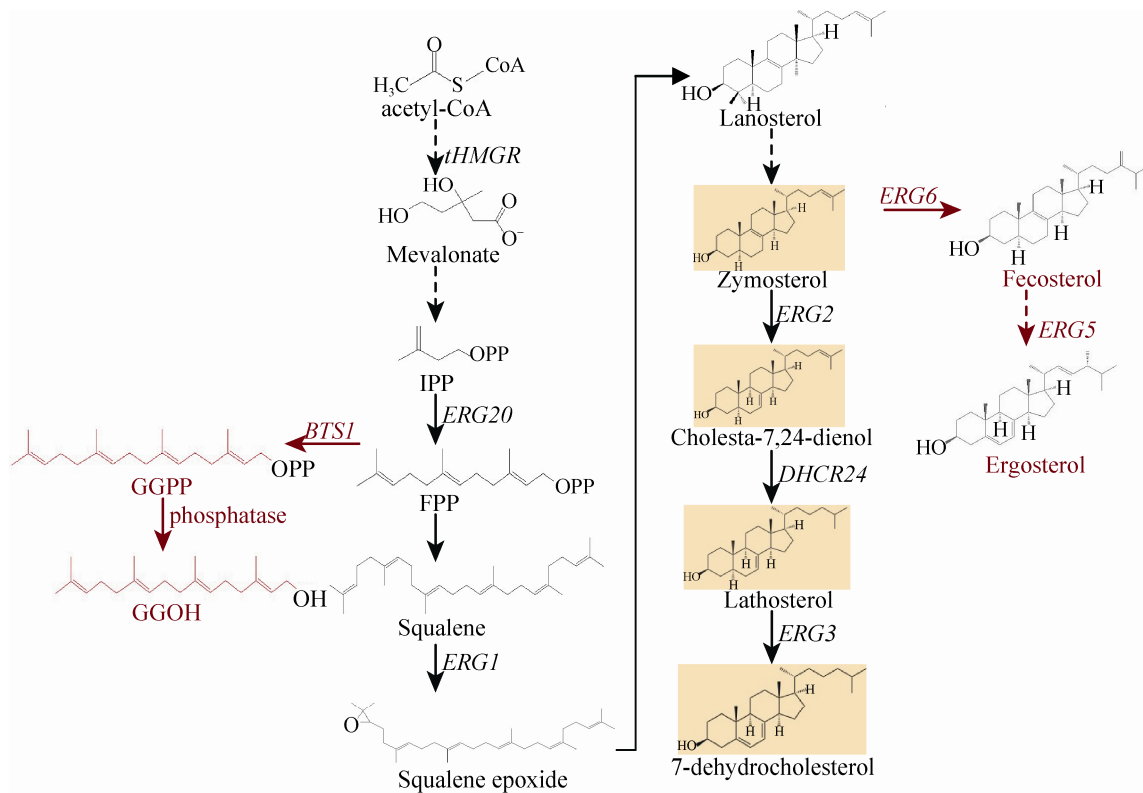


图 1 7-脱氢胆固醇在酵母中的生物合成路径^[7,11-12]

Fig. 1 7-DHC biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*^[7,11-12].

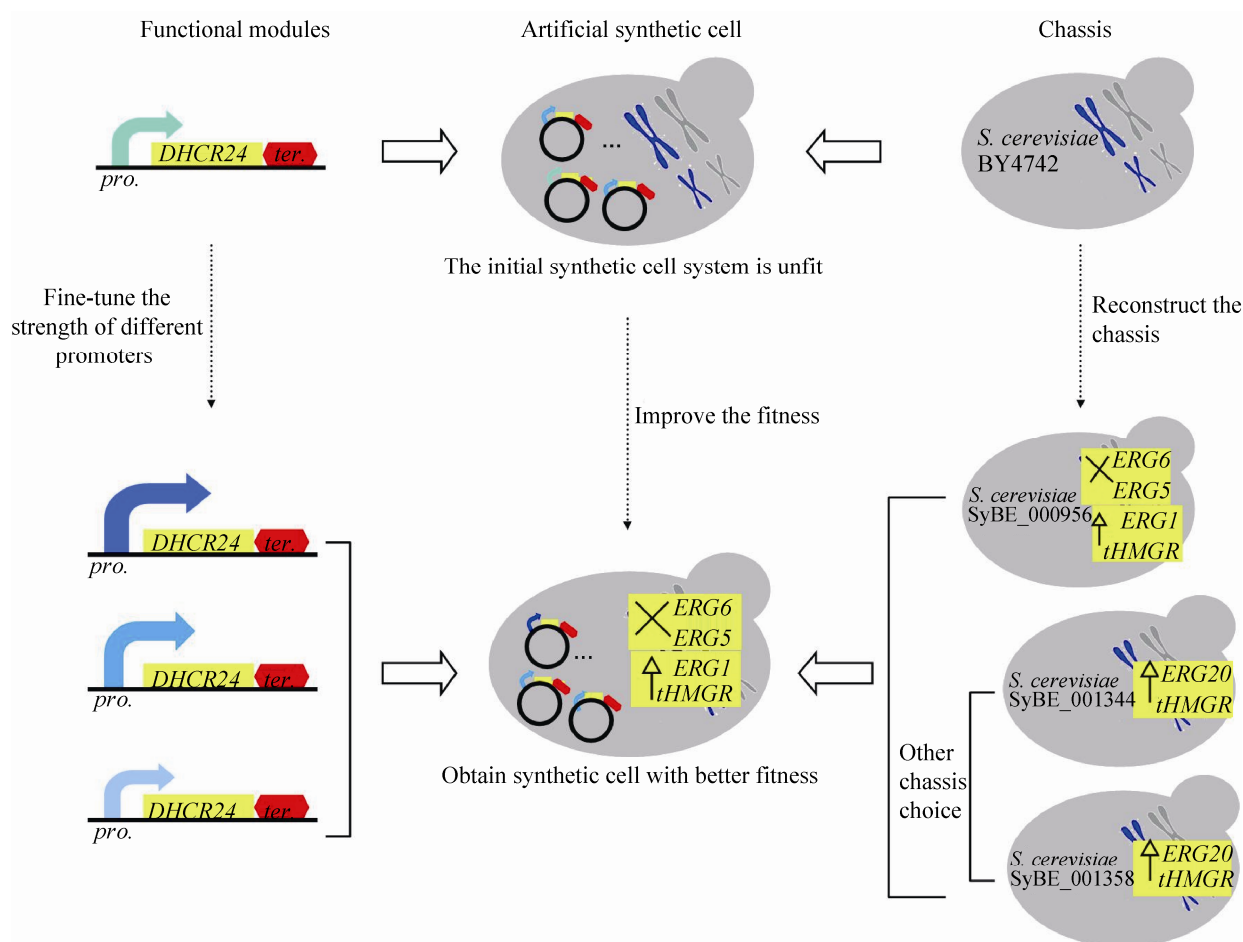


图2 本研究整体思路

Fig.2 Research purpose in this study.

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、培养基

大肠杆菌 *Escherichia coli* BMDH5 α 购于博迈德公司。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YSG50 由美国伊利诺伊大学香槟分校赵惠民教授馈赠^[23]，W303a、BY4742、YML 和 SyBE_001344、SyBE_001358 均由本实验室保存。本研究所用酵母细胞见表 1。

本研究所用质粒包括大肠杆菌质粒

pSB1A2、pUC18，酵母整合型质粒 pRS403，酵母复制型质粒 pRS425 和 pYES2 均为本实验室保存。

大肠杆菌 BMDH5 α 的保存和培养用 LB 培养基 (10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L NaCl; 固体培养基添加 1.5% 琼脂粉), 筛选大肠杆菌转化子用含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基。酵母菌保存和培养用 YPD 培养基 (10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 细菌蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖; 固体培养基添加 2% 的琼脂粉),

表 1 本研究所用酵母细胞

Table 1 Yeast cells used in this study

Yeast cells	Genotype
YSG50	<i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , <i>ade3Δ22</i> , <i>ura3-1</i> , <i>his3-11,15</i> , <i>trp1-1</i> , <i>leu2-3,112</i> and <i>can1-100</i>
W303a	<i>MATa</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>can1-100</i> , <i>ura3-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>his3-11,15</i>
BY4742	<i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>
YML	BY4742, <i>erg6::KanMX</i>
SyBE_001344	YSG50, <i>his::pRS403-TDH3p-ERG20-CYC1t</i> , <i>trp::pRS304-TDH3p-tHMGR-CYC1t</i>
SyBE_001358	W303a, <i>his::pRS403-TDH3p-ERG20-CYC1t</i> , <i>trp::pRS304-TDH3p-tHMGR-CYC1t</i>

酵母重组菌株筛选用 SC drop-out 培养基 (6.7 g/L 酵母氮源 2 g/L drop-out 氨基酸混合物, 20 g/L 葡萄糖; 固体培养基添加 2% 的琼脂粉)。

1.2 工具酶和试剂

本研究所用限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、高保真 Fast *Pfu* DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶均购自 Fermentas 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、普通质粒提取试剂盒、酵母质粒提取试剂盒均购自天根公司; 醋酸锂购自天津苏庄化学试剂厂; 酵母氮源、PEG4000 购自北京鼎国生物技术有限责任公司; 蛋白胨、酵母提取物购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 葡萄糖、NaCl、KOH 购自北方天医化学试剂厂; 琼脂粉购自天津英博生化试剂有限公司; 甲醇购自康科德公司; 正己烷购自天津大茂化学试剂厂; 7-脱氢胆甾醇标准品、衍生化试剂 MSTFA、吡啶购自 Sigma 公司。

1.3 基因元件的引物设计、PCR 扩增与合成

为实现标准化组装, 采用 biobrick 同尾酶的方法构建质粒^[24]。对内源基因 *tHMGR*、启动子 *TDH3p*、终止子 *PGK1t* 进行引物设计, 5'端分别引入 *EcoR*、*Xba* 两个限制性酶切位点, 3'端分别引入 *Pst*、*Spe* 两个酶切位点。内源

基因 *ERG1*、启动子 *PGK1p*、终止子 *PGK1t* 的引物设计, 5'端分别引入 *Sac*、*Xho* 两个限制性酶切位点, 3'端分别引入 *BamH*、*Sal* 两个酶切位点。使用酵母选择标记 *LEU* 实现内源基因 *ERG5* 的敲除, 根据 GenBank 中酿酒酵母 *ERG5* 上下游的基因序列设计引物, 选择标记 *LEU* 的 5'端、3'端分别引入 34 bp、38 bp 的同源臂。内源基因、启动子、终止子均以 GenBank 中酿酒酵母 S288c 的基因组为模板, 进行高保真的 PCR 扩增。选择标记以含有该标记的酵母质粒 pRS425 为模板, 进行高保真的 PCR 扩增。本研究所用引物见表 2。

选择人体来源的 C-24 还原酶 (DHCR24), 在 GenBank 中查找相应氨基酸序列, 根据底盘酵母偏好性进行密码子优化, 优化后的核苷酸序列与终止子 *PGK1t* 的核苷酸序列相连, 并在 5'端分别引入 *EcoR*、*Xba* 两个限制性酶切位点, 3'端分别引入 *Pst*、*Spe* 两个酶切位点, 全合成该基因。合成的基因片段通过 *Hind*、*BsrG* 两个酶切位点, 连接于穿梭载体 pYES2 上。

1.4 功能模块的构建

EcoR、*Pst* 酶切 PCR 产物 *PGK1t*, 并与相同酶切的质粒 pSB1A2 连接, 构建质粒

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
<i>tHMGR</i> -U	GGAATTCGCAGGCACGTCTAGAATGGACCAATTGGT
<i>tHMGR</i> -D	GCGACTAGTGTTAGGATTTAATGCAGGTGACGG
<i>ERG1</i> -U	GGAGCTCATAAGTCGTCTCGAGATGTCTGCTGTTAACGTTGCAC
<i>ERG1</i> -D	GCCGCGTCGACCTTAACCAATCAACTCACCAAACA
<i>1TDH3p</i> -U	GGAATTCGCAGGCACGTCTAGATAAAAAACACGCTTTTTTCAGTT
<i>1TDH3p</i> -D	CGCGCGCGACTAGTGTGTTGTTTGTGTTATGTGTGTTTATTTCG
<i>1PGK1p</i> -U	GGAATTCCTCCGCGCACGTCTAGATATTTAGATTCTGACTTCAACTC
<i>1PGK1p</i> -D	GGGCCCCGCGCGACTAGTGTGTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAGAT
<i>1TDH1p</i> -U	GGAATTCCTCCGGGCACGTCTAGATGTATATGCTCATTACACTCTATATCA
<i>1TDH1p</i> -D	GCCCCGCGGACTAGTGTGTTTGTGTTGTAATTTAGTGA
<i>2PGK1p</i> -U	GGAGCTCCTTAGTCCCCTCGAGTATTTAGATTCTGACTTCAACTC
<i>2PGK1p</i> -D	GGGGGGCGGTTCGACCTGTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAGAT
<i>1PGK1t</i> -U	GGAATTCCTCCGGGCACGTCTAGAATTGAATTGAATTGAAATCGATAG
<i>1PGK1t</i> -D	CCCGCTGCAGAAGGATCCTACTAGTGAACGAACGCAGAATTTTCG
<i>2PGK1t</i> -U	GGAGCTCCTTGATGCCCTCGAGAATTGAATTGAATTGAAATCGATAG
<i>2PGK1t</i> -D	CGGGATCCCGTCGACAAACGAACGCAGAATTTTCG
<i>LEU</i> -U	TGCTATTCCAATAGACAATAAATACCTTTTAACATTAAGCAAGGATTTCTTAACTTC
<i>LEU</i> -D	TATGATTTATTGTCTGGACAAAGTTCTGTTTTTCCCAATGTCTGCCCTAAGAAGAT

pSB1A2-*PGK1t*后,使用 *EcoR*、*Xba* 酶切该质粒。*EcoR*、*Spe* 酶切 PCR 产物 *tHMGR*, 与酶切后的质粒 pSB1A2-*PGK1t* 连接, 构建质粒 pSB1A2-*tHMGR-PGK1t*。再次 *EcoR*、*Spe* 酶切 PCR 产物 *TDH3p*, 与使用 *EcoR*、*Xba* 酶切的质粒 pSB1A2-*tHMGR-PGK1t* 连接, 构建质粒 pSB1A2-*TDH3p-tHMGR-PGK1t*。*EcoR*、*Spe* 酶切该质粒, 得到 *TDH3p-tHMGR-PGK1t* 片段, 与相同酶切的质粒 pRS403 连接, 构建功能模块 pRS403-*TDH3p-tHMGR-PGK1t*, 命名为 SyBE_000916。

Sac、*Sal* 酶切 PCR 产物 *PGK1t*, 并与

相同酶切的质粒 pUC18 连接, 构建质粒 pUC18-*PGK1t*后,使用 *Sac* 和 *Xho* 酶切该质粒。*Sac* 和 *Sal* 酶切 PCR 产物 *ERG1*, 并与酶切后的质粒 pUC18-*PGK1t* 连接, 构建质粒 pUC18-*ERG1-PGK1t*。再次 *Sac*、*Sal* 酶切 PCR 产物 *PGK1p*, 与使用 *Sac*、*Xho* 酶切的质粒 pUC18-*ERG1-PGK1t* 连接, 构建质粒 pUC18-*PGK1p-ERG1-PGK1t*。*Xho*、*Hind* III 酶切该质粒, 得到 *PGK1p-ERG1-PGK1t* 片段, 并与相同酶切的质粒 pRS425 连接, 构建质粒 pRS425-*PGK1p-ERG1-PGK1t*。*Apa*、*Sal* 酶切该质粒, 得到 *PGK1p-ERG1-PGK1t* 片段, 并

与 *Apa*、*Xho* 酶切后的质粒 pRS403-*TDH3p-tHMGR-PGK1t* 连接, 得到内源功能模块 pRS403-*PGK1p-ERG1-PGK1t-TDH3p-tHMGR-PGK1t*, 命名为 SyBE_000923。

EcoR、*Spe* 酶切 PCR 产物 *TDH3p*, 与使用 *EcoR*、*Xba* 酶切的质粒 pYES2-*DHCR24-PGK1t* 连接, 构建外源功能模块 pYES2-*TDH3p-DHCR24-PGK1t*, 命名为 SyBE_000937。同理, 启动子可替换为 *PGK1p*、*TDH1p*, 得到包含不同启动子的外源功能模块分别命名为 SyBE_000938、SyBE_000939。本研究构建的功能模块见表 3。

1.5 DNA 操作

大肠杆菌的转化参照文献[25]进行。构建的功能模块通过 LiAc 法^[26]导入不同的底盘酵母细胞内, 利用营养缺陷型培养基筛选转化子, 提取酵母基因组, 通过 PCR 检测目的片段的存在, 从而确定阳性克隆。

1.6 产物提取方法

将筛选出的阳性克隆接种到种子培养基中, 30 °C 传代培养, 待种子培养至第 3 代时转接到发酵培养基中, 使发酵初始 OD_{600} 为 0.2。30 °C 培养 72 h 后取出发酵液, 1 000 r/min 离

心 2 min, 弃上清液留下层沉淀, 反复水洗 2 次后收集细胞, 用液氮冷冻并研磨; 称取 200 mg 研磨后细胞加入甲醇配制的 1.5 mol/L KOH, 在 85 °C 恒温水槽中进行皂化反应 90 min; 然后加入 1 mL 正己烷, 漩涡振荡混合均匀, 1 000 r/min 离心 5 min, 取上清液真空冷冻干燥, -40 °C 下保存在 1 mL 离心管中备用。向离心管中加入 50 μ L 吡啶, 80 μ L N-甲基-N-三甲基硅基三氟乙酰胺 (MSTFA), 在 30 °C 恒温水槽中进行衍生化反应 30 min^[27]。

1.7 GC-TOF/MS 检测

对提取的产物进行气相色谱-飞行时间质谱 (GC-TOF/MS) 分析检测。分析条件如下: 仪器为 Waters 公司的 GC-TOF/MS (Waters Corp., USA); 硅胶毛细管柱为 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m DB-5MS, J&W Scientific, Folsom。电离方式为电子轰击电离 EI+, 电子束能量 70 eV, 离子化电流 40 μ A。质谱扫描范围在 50~800 m/z, 离子源温度为 250 °C, 进样口温度为 260 °C, 氦气 (99.999 5%) 用作载气, 91 kPa 恒压模式下操作。柱温在 70 °C 保持 2 min, 以 30 °C/min 的速度升至 250 °C, 然后以 10 °C/min 的速度升到 280 °C, 在 280 °C 维持 15 min; 再以 5 °C/min 的速度升到 290 °C, 在 290 °C 维持 5 min。

2 结果与分析

本研究对表 1 所列酵母细胞进行改造, 得到改造后底盘细胞 SyBE_000954 (YML, *erg5::LEU2*); 引入内源功能模块 SyBE_000916、SyBE_000923 以调节模块与底盘的适配性, 获得酵母细胞 SyBE_000955 (SyBE_000954, *HIS::SyBE_000916*) 和 SyBE_000956 (SyBE_000954,

表 3 本研究所构建的功能模块

Table 3 Functional modules constructed in this study

Functional modules	Description
SyBE_000916	pRS403- <i>TDH3p-tHMGR-PGK1t</i>
SyBE_000923	pRS403- <i>PGK1p-ERG1-PGK1p-TDH3p-tHMGR-PGK1t</i>
SyBE_000937	pYES2- <i>TDH3p-DHCR24-PGK1t</i>
SyBE_000938	pYES2- <i>PGK1p-DHCR24-PGK1t</i>
SyBE_000939	pYES2- <i>TDH1p-DHCR24-PGK1t</i>

HIS:: SyBE_000923)。在此基础上引入人源 C-24 还原酶构建外源功能模块, 得到 9 株 7-DHC 人工合成细胞, 如表 4 所示。

2.1 主要竞争途径麦角固醇合成的抑制

在酿酒酵母的代谢中, 麦角固醇的生物合成是主要途径。因此为了提高底物酵母固醇浓度, 需抑制酵母固醇向麦角固醇的转化。以酿酒酵母 *ERG6* 单敲菌 YML 为酵母细胞, 采用同源重组实现内源基因 *ERG5* 的敲除, 获得麦角固醇合成途径中的底盘细胞。通过 PCR 扩增将 *ERG5* 基因序列前后的同源臂引入酵母选择标记 *LEU*, PCR 产物转化底盘细胞 YML, 利用营养缺陷互补在 SC drop-out 培养基上筛选转化子, 提取酵母基因组。以 *LEU* 的特异引物进行 PCR 反应, 检验选择标记 *LEU* 的存在, 从而确定阳性克隆。改造后的底盘细胞命名为 SyBE_000954。

对原始菌株 BY4742 和改造后底盘细胞 SyBE_000954 的发酵产物进行 GC-TOF/MS 检测。各发酵产物对比见图 3。结果发现,

表 4 本研究所构建的人工合成细胞

Table 4 Artificial synthetic cell obtained in this study

Synthetic cell	Genotype
SyBE_000969	SyBE_000956, SyBE_000937
SyBE_000970	SyBE_000956, SyBE_000938
SyBE_000971	SyBE_000956, SyBE_000939
SyBE_000978	SyBE_001344, SyBE_000937
SyBE_000979	SyBE_001344, SyBE_000938
SyBE_000980	SyBE_001344, SyBE_000939
SyBE_000987	SyBE_001358, SyBE_000937
SyBE_000988	SyBE_001358, SyBE_000938
SyBE_000989	SyBE_001358, SyBE_000939

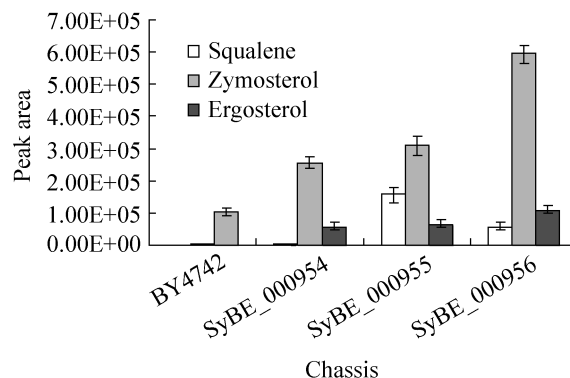


图 3 不同酵母细胞发酵产物的对比

Fig.3 Comparison of product in different yeast cells.

SyBE_000954 的麦角固醇 (Ergosterol) 含量低于 BY4742, 而酵母固醇 (Zymosterol) 的含量在 SyBE_000954 中明显高于 BY4742。这说明内源基因 *ERG6* 编码的固醇 C-24 甲基转移酶、*ERG5* 编码的固醇 C-22 脱氢酶催化的反应是麦角固醇生物合成途径中的重要限速步骤^[14], 对它们的敲除可以有效抑制麦角固醇的合成, 增加 7-DHC 的合成底物酵母固醇的积累。

2.2 内源功能模块与底盘细胞的适配关系

研究表明, *HMGR* 是酵母甲羟戊酸途径中的第一个限速酶, 是固醇类物质代谢中的重要调控靶点^[28]。*HMGR* 在麦角固醇含量高时会受到反馈抑制, 过表达截短的 *HMGR* (*tHMGR*) 可以解除途径中的反馈抑制^[29], 虽能大量积累前体物鲨烯, 但对后续固醇类的产量无较大影响。因此, 本工作以鲨烯为节点, 将底物酵母固醇合成路径分为上游和下游两部分, 研究内源功能模块与底盘细胞的适配性。

2.2.1 上游路径的优化

以功能模块 SyBE_000916 转化底盘细胞 SyBE_000954, 利用营养缺陷互补在 SC drop-out 培养基上筛选转化子, 提取酵母基因组。分别

以 *TDH3p* 的正向引物和 *tHMGR* 的反向引物、*tHMGR* 的正向引物和 *PGK1t* 的反向引物进行 PCR 反应,检测目的基因 *tHMGR* 的存在。改造后的酵母细胞命名为 SyBE_000955。

将对照菌株 SyBE_000954 和改造后酵母细胞 SyBE_000955 的发酵产物进行 GC-TOF/MS 检测,结果见图 3。由图可知,与 SyBE_000954 相比, SyBE_000955 的发酵产物中含有较多鲨烯 (Squalene),而酵母固醇、麦角固醇等固醇类物质的产量并无明显增加。这表明内源基因 *tHMGR* 的上调虽然会促进固醇前体物鲨烯的生成,但鲨烯的大量积累导致原有代谢路径的平衡被破坏,造成代谢流不通顺,鲨烯无法继续转化,因此对固醇类物质产量的增加影响较小^[17]。

2.2.2 下游路径的优化

为促进鲨烯的代谢以进一步增加底物积累,过表达酵母固醇合成途径中的另一关键基因 *ERG1*^[19]。用功能模块 SyBE_000923 转化底盘细胞 SyBE_000954,利用营养缺陷互补在 SC drop-out 培养基上筛选转化子,提取酵母基因组。分别以 *PGK1p* 的正向引物和 *ERG1* 的反向引物、*ERG1* 的正向引物和 *PGK1t* 的反向引物、*TDH3p* 的正向引物和 *tHMGR* 的反向引物、*tHMGR* 的正向引物和 *PGK1t* 的反向引物进行 PCR 反应,检测目的基因 *ERG1* 和 *tHMGR* 的存在。改造后的酵母细胞命名为 SyBE_000956。

将对照菌株 SyBE_000955 和改造后酵母细胞 SyBE_000956 的发酵产物进行 GC-TOF/MS 检测,结果见图 3。由图可知,与 SyBE_000955 相比, SyBE_000956 中鲨烯含量降低,而酵母固醇的含量明显提高。这说明过表达内源基因

ERG1 编码的角鲨烯环氧酶,可以促进鲨烯向酵母固醇的转化^[15];功能模块 SyBE_000923 的引入,将内源基因 *tHMGR* 和 *ERG1* 同时上调,会使整个代谢路径达到新的平衡,从而优化底物酵母固醇的供给代谢,加强与底盘细胞的适配关系。

2.3 外源功能模块与酵母细胞的适配

以优化后的 SyBE_000956 和本实验室已有的 SyBE_001344、 SyBE_001358 为酵母细胞,研究外源功能模块与底盘的适配性。将构建的外源功能模块 SyBE_000937、 SyBE_000938、 SyBE_000939 分别转化酵母细胞 SyBE_000956、 SyBE_001344、 SyBE_001358,利用营养缺陷互补在 SC drop-out 培养基上筛选转化子,提取酵母质粒。以 *DHCR24* 的特异引物进行 PCR 反应,验证 *DHCR24* 的存在,从而确定阳性克隆。得到的 9 种 7-脱氢胆固醇人工合成细胞分别命名为 SyBE_000969、 SyBE_000970、 SyBE_000971、 SyBE_000978、 SyBE_000979、 SyBE_000980、 SyBE_000987、 SyBE_000988、 SyBE_000989。

对上述 9 种人工合成细胞的发酵产物进行 GC-TOF/MS 检测,其中 SyBE_000969 发酵产物的气质图见图 4B。从图 4B 可以看出, SyBE_000969 的发酵产物在保留时间 22.62 min 检测到的物质与标准品 7-DHC 的保留时间(图 4A) 相同。对该组分进行质谱分析,与标准品 7-DHC 的碎片峰(图 4A) 一致,证明该物质即为 7-DHC。经定性分析,另外 8 种人工合成细胞的发酵产物均为 7-DHC。

2.3.1 不同强度启动子的影响

研究表明,功能模块中启动子的强度对于目标产物产量的优化具有重要影响。Siavash

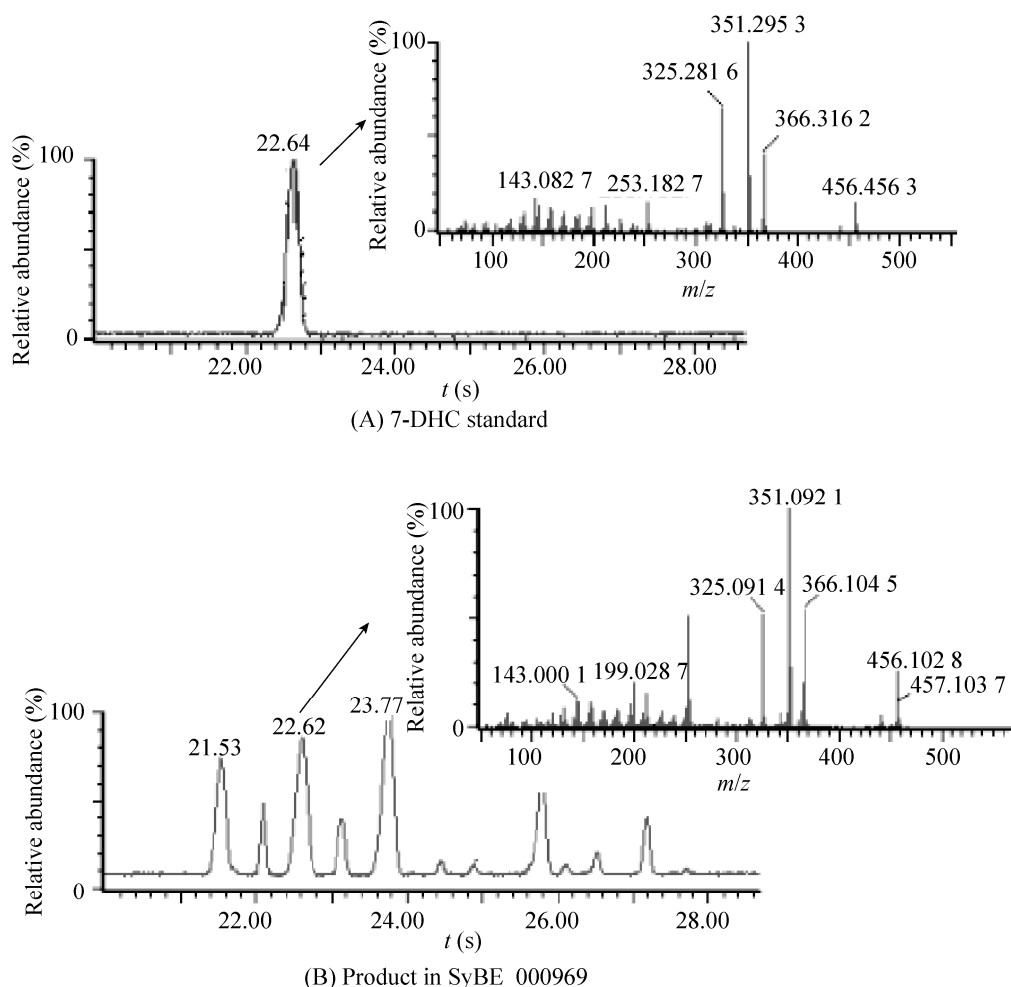


图 4 7-DHC 标准品、SyBE_000969 发酵产物的气质检测图

Fig.4 GC-MS identification of 7-DHC and product in SyBE_000969.

Partow 等发现,在发酵培养基中葡萄糖尚未耗尽时,启动子 *TDH3p*、*PGK1p* 的调控强度大体相同,而当葡萄糖耗尽时 *PGK1p* 的调控强度略大于 *TDH3p*^[30]。然而 Sun 的研究表明, *TDH3p* 为强启动子, *PGK1p* 仅为中强型启动子^[31]。由此可见,相同启动子在不同培养条件和表达体系中的调控强度不完全一致,这可能跟外源功能模块中启动子与底盘细胞的适配程度、目标产物的差异等因素有关。

本研究根据 7-DHC 标准曲线,对上述人工合成细胞中的 7-DHC 进行定量分析,分析结果见图 5。可以看出,在相同底盘细胞的情况下,外源功能模块中启动子调控强度的不同会影响外源基因的表达量,其中 *TDH3p* 调控的基因 *DHCR24* 表达量最高, *PGK1p* 居中,受 *TDH1p* 控制的基因表达量最低。结果说明受 *TDH3p* 调控的 7-脱氢胆甾醇合成功能模块与底盘细胞的适配性最佳, *PGK1p* 的调控强度居中, *TDH1p*

调控的功能模块与酵母底盘的适配性最差。

2.3.2 不同酵母细胞的影响

由图 5 可以看出, 不同酵母细胞与外源功能模块的适配性对 7-DHC 的合成产生重要的作用。以 SyBE_000956 为底盘的人工合成细胞, 7-DHC 含量较高; 以 SyBE_001344、SyBE_001358 为底盘的人工合成细胞, 7-DHC 产量相对较低, 且两种底盘对产量的影响稍有差异, 以 SyBE_001358 为底盘的人工细胞, 7-DHC 产量最低。分析原因, 可能是由于 SyBE_001344 和 SyBE_001358 两种底盘中麦角固醇合成途径未受抑制, 酵母固醇向麦角固醇转化导致。Souza 等和 Denis Pompon 等在分别研究能够生产胆固醇的酵母工程菌时, 也都发现敲除了内源基因 *ERG6* 和 *ERG5* 的酵母菌株能够更稳定的合成胆固醇^[15,22]。此外, 由于 SyBE_001344 和 SyBE_001358 两种底盘过表达了内源基因 *ERG20*, 使 FPP 产量提高并向萜类物质 GGPP 方向转化, 不利于底物酵母固醇的积累。Zhou 等在萜类合成的研究中便发现, 内源

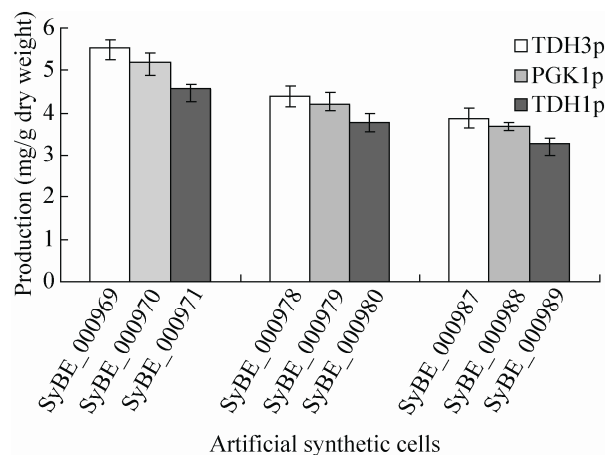


图 5 9 种人工合成细胞的 7-DHC 产量

Fig. 5 7-DHC production of different artificial synthetic cells.

基因 *ERG20* 与 *BTS1* 的融合表达, 可以有效提高 FPP 由 GGPP 向次丹参二烯的转化^[32]。这也是造成以 SyBE_001344、SyBE_001358 为底盘的人工合成细胞中 7-DHC 产量较低的原因。但与 3 种底盘细胞适配性最强的功能模块均为启动子 *TDH3p* 所调控, 体现出功能模块与底盘细胞适配关系的规律性。

3 结论

在底盘细胞相同的情况下, 外源功能模块中启动子的调控强度会影响外源基因的表达。与启动子 *PGK1p*、*TDH1p* 相比, *TDH3p* 调控的 7-脱氢胆甾醇合成功能模块与底盘细胞的适配性最佳。

受同一启动子调控的功能模块与不同底盘细胞的适配性不同。以 SyBE_000956 为底盘的人工细胞具有更强的适配性, 其 7-DHC 产量最高。

REFERENCES

- [1] Li PJ, Zhao CS, Li J. Synthesize of cholesteric liquid crystal. Chem Eng, 2005(1): 57-58 (in Chinese).
李佩瑾, 赵春山, 李佳. 胆甾相液晶的合成. 化学工程师, 2005(1): 57-58.
- [2] Wei CJ, Tan TW. Prospect for production of vitamin D₃. Chem Ind Eng Prog, 2003, 22(10): 1098-1101 (in Chinese).
韦昌金, 谭天伟. 维生素 D₃ 合成新工艺的初步设想. 化工进展, 2003, 22(10): 1098-1101.
- [3] Huang SH, He XP, Yu PP, et al. Study on the transformation of cholesterol to 7-dehydrocholesterol by 7,8-dehydrogenase from shrimps' Y-organ. J Anhui Agri Sci, 2011, 39(25): 15397-15399 (in Chinese).

- 黄时海, 何鑫平, 于配配, 等. 虾 Y-器官 7、8-脱氢酶转化胆固醇为 7-脱氢胆固醇研究. 安徽农业科学, 2011, 39(25): 15397–15399.
- [4] Xia XB, Wu KY, Li XP, et al. Research progress on biological synthesis of 7-dehydrocholesterol. Sci Tech Food Ind, 2009, 30(11): 339–342.
夏小斌, 吴孔阳, 李湘萍, 等. 生物法合成 7-脱氢胆固醇研究进展. 食品工业科技, 2009, 30(11): 339–342.
- [5] Liu D, Du J, Zhao GR, et al. Applications of synthetic biology in medicine and energy. CIESC J, 2011, 62(9): 2391–2397.
刘夺, 杜瑾, 赵广荣, 等. 合成生物学在医药及能源领域的应用. 化工学报, 2011, 62(9): 2391–2397.
- [6] Christine L, Markus V. Preparation of 7-dehydrocholesterol and/or the biosynthetic intermediates and/or secondary products thereof in transgenic organisms: US, 2006/0240508. 2006-10-26.
- [7] Hohmann HP, Lehmann M, Merkamm M, et al. Production of non-yeast sterols by yeast: US, 20120231495. 2012-09-13.
- [8] Kong JQ, Shen JH, Huang Y, et al. Production of amorpho-4,11-diene in engineered yeasts. Acta Pharm Sin, 2009, 44(11): 1297–1303 (in Chinese).
孔建强, 沈君豪, 黄勇, 等. 酵母工程菌制备紫穗槐-4,11-二烯的研究. 药科学报, 2009, 44(11): 1297–1303.
- [9] Keasling JD. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. Metab Eng, 2012, 14(3): 189–195.
- [10] Yadav VG, De Mey M, Lim CG, et al. The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. Metab Eng, 2012, 14(3): 233–241.
- [11] Lees ND, Skaggs B, Kitsch DR, et al. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisia*. Lipids, 1995, 30(3): 221–226.
- [12] Dai ZB, Liu Y, Huang LQ, et al. Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng, 2012, 109(11): 2845–2853.
- [13] Zhang ZY, He XP, Li WW, et al. Regulation role of sterol C-24 methyltransferase and sterol C-8 isomerase in the ergosterol biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae*. Acta Microbiol Sin, 2009, 49(8): 1063–1068 (in Chinese).
张振颖, 何秀萍, 李巍巍, 等. 甾醇 C-24 甲基转移酶和甾醇 C-8 异构酶在酿酒酵母麦角甾醇生物合成中的调控作用. 微生物学报, 2009, 49(8): 1063–1068.
- [14] Catherine D, Roberto S, Eric D, et al. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. Nat Biotechnol, 1998, 16: 186–189.
- [15] Cleiton MS, Tatjana ME, Harald P, et al. A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance. Metab Eng, 2011, 13: 555–569.
- [16] John ED, Gabriel CW, Malmirchegini GR, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. Nat Biotechnol, 2009, 27(8): 753–761.
- [17] Polakowski T, Ulf S, Christine L. Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 66–71.
- [18] Lin XS, Jiang HW, Zhang Y. Study on biosynthesis of ergosterol in yeast and its gene regulation. J Biol, 2010, 27(6): 83–86 (in Chinese).
林晓珊, 江宏文, 张毅. 酵母麦角固醇生物合成及其基因调控的研究. 生物学杂志, 2010, 27(6): 83–86.
- [19] Markus V, Ulf S, Christine L. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res, 2003, 4: 87–95.
- [20] Hou FF, Liu ZQ, Liu JL, et al. Progress in study on

- 3 β -hydroxysteroid- Δ 24 reductase (DHCR24). *Chin J Cell Biol*, 2010, 32(6): 942–950 (in Chinese).
侯芳芳, 刘振青, 刘剑利, 等. 24-脱氢胆固醇还原酶 DHCR24 的研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(6): 942–950.
- [21] Florence MS, Cathy C, Coralie V, et al. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 143–149.
- [22] Denis P, Bruno D, Roberto S. Cholesterol-production yeast strains and uses thereof: US, 2009/0239837. 2009-09-24.
- [23] Shao ZY, Zhao H, Zhao HM. DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(2): 1–10.
- [24] Reshma PS, Drew E, Thomas FK. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *J Biol Eng*, 2008, 2(5): 1–12.
- [25] Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 29.
- [26] Gietz RD, Woods RA. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol*, 2006, 313: 107–120.
- [27] Zhou X, Zhou J, Tian HC, et al. Dynamic lipidomic insights into the adaptive responses of *Saccharomyces cerevisiae* to the repeated vacuum fermentation. *Omics J Integr Biol*, 2010, 14(5): 563–574.
- [28] Yang H, Gao YG, Li FY, et al. Research progress on biosynthetic pathway of terpenoids containing ginsenoside and the HMGR. *China Biotechnol*, 2008, 28(10): 130–135 (in Chinese).
杨鹤, 郜玉钢, 李璠瑛, 等. 人参皂苷等萜类化合物生物合成途径及 HMGR 的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(10): 130–135.
- [29] 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.
- [30] Siavash P, Verena S, Sara B, et al. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2010, 27: 955–964.
- [31] Sun J, Shao ZY, Zhao H, et al. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(8): 2082–2092.
- [32] Zhou YJ, Gao W, Rong QX, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 3234–3241.

(本文责编 陈宏宇)