

• 农业生物技术 •

## 4-香豆酰-CoA 连接酶 (4CL) 和聚酮合酶 (PKS1) 的融合蛋白在莱茵衣藻中表达促进树莓酮积累

牛文清, 韦航涛, 薛飞燕, 杨明峰

北京农学院 农业农村部华北都市农业重点实验室, 北京 102206

牛文清, 韦航涛, 薛飞燕, 等. 4-香豆酰-CoA 连接酶 (4CL) 和聚酮合酶 (PKS1) 的融合蛋白在莱茵衣藻中表达促进树莓酮积累. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2495-2502.

Niu WQ, Wei HT, Xue FY, et al. Overexpression of a fusion protein of 4-coumaroyl-CoA ligase and polyketide synthase for raspberry ketone production in *Chlamydomonas reinhardtii*. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2495-2502.

**摘 要:** 树莓酮具有重要的医药价值, 如抗流感、预防糖尿病等。为了在莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 中获得树莓酮, 本研究将树莓酮合成的最后两个步骤中的酶, 即 4-香豆酰-CoA 连接酶 (4-coumaroyl-CoA ligase, 4CL) 和聚酮合酶 (Polyketide synthase, PKS1) 通过甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸 (Gly-Ser-Gly, GSG) 三肽接头融合在一起, 构建莱茵衣藻表达载体 pChla-4CL-PKS1。通过电转化的方法将由 PSAD 启动子驱动的融合基因 4CL-PKS1 插入野生型莱茵衣藻 (CC125) 和细胞壁缺失型莱茵衣藻 (CC425) 中。结果在表达 4CL-PKS1 融合蛋白的野生型莱茵衣藻和细胞壁缺失型莱茵衣藻中, 树莓酮含量分别为 6.7  $\mu\text{g/g}$  (鲜重) 和 5.9  $\mu\text{g/g}$  (鲜重), 高于天然植物中树莓酮的含量 (2–4  $\mu\text{g/g}$ )。

**关键词:** 树莓酮, 4-香豆酰-CoA 连接酶, 聚酮合酶, 融合基因

## Overexpression of a fusion protein of 4-coumaroyl-CoA ligase and polyketide synthase for raspberry ketone production in *Chlamydomonas reinhardtii*

Wenqing Niu, Hangtao Wei, Feiyan Xue, and Mingfeng Yang

Key Laboratory for Northern Urban Agriculture of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

**Abstract:** Raspberry ketones have important therapeutic properties such as anti-influenza and prevention of diabetes. In order to obtain raspberry ketone from *Chlamydomonas reinhardtii*, two enzymes catalyzing the last two steps of raspberry ketone synthesis, i.e. 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL) and polyketide synthase (PKS1), were fused using a glycine-serine-glycine (GSG) tripeptide linker to construct an expression vector pChla-4CL-PKS1. The fusion gene 4CL-PKS1 driven by a PSAD

**Received:** August 11, 2020; **Accepted:** November 19, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 21606020, 31370674).

**Corresponding author:** Mingfeng Yang. E-mail: mfyang@bua.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 21606020, 31370674) 资助。

网络出版时间: 2021-02-01

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210201.1106.001.html>

promoter was transformed into a wild-type (CC125) and a cell wall-deficient *C. reinhardtii* (CC425) by electroporation. The results showed the recombinant *C. reinhardtii* strain CC125 and CC425 with 4CL-*PKS1* produced raspberry ketone at a level of 6.7  $\mu\text{g/g}$  (fresh weight) and 5.9  $\mu\text{g/g}$  (fresh weight), respectively, both were higher than that of the native raspberry ketone producing plants (2–4  $\mu\text{g/g}$ ).

**Keywords:** raspberry ketone, 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL), polyketide synthase (*PKS1*), fusion proteins

树莓酮 (Raspberry ketone), 又称覆盆子酮, 是一种烷基酚类化合物的衍生物, 存在于树莓、黑莓、葡萄、苹果以及浆果等多种植物中的香气成分<sup>[1-2]</sup>。树莓酮因其香味独特, 不仅在食品和化妆品领域广泛应用, 更具有重要的药用价值, 如促进脂肪代谢<sup>[3]</sup>、抗癌<sup>[4]</sup>、抑菌<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>等。

苯丙烷代谢途径 (Phenylpropanoid pathway) 是树莓酮生物合成的主要途径<sup>[7]</sup>。该途径为 4-香豆酰辅酶 A 与丙二酰辅酶 A 在苯亚甲基丙酮合酶 (Benzalacetone synthase, BAS) 的催化作用下, 经缩合反应生成对羟基苊丙酮。最后由苊基丙酮还原酶 (Benzalacetone reductase, BAR) 催化还原对羟基苊丙酮, 从而得到树莓酮<sup>[1]</sup>。在底物 4-香豆酰辅酶 A 的合成过程中, 4-香豆酰-CoA 连接酶 (4CL) 起到了至关重要的作用, 因此 4-香豆酰-CoA 连接酶 (4CL) 和苯亚甲基丙酮合酶 (BAS) 是树莓酮合成过程中的两个重要的酶。然而, 天然树莓酮在大多数生产树莓酮植物中的产量较低, 大约只有 2–4  $\mu\text{g/g}$ <sup>[8]</sup>。李斌等<sup>[9]</sup>用甲醇作为提取溶剂, 用热回流的方法从树莓中提取树莓酮, 得到树莓酮产量约为 0.2  $\mu\text{g/g}$ ; 张成涛等<sup>[10]</sup>从红树莓中提取树莓酮, 得到最终产量为 3.32  $\mu\text{g/g}$ , 且从果实中提取树莓酮的成本太高, 不利于树莓的工业化生产。虽然利用化学合成的方法合成树莓酮的产量较高, 王冠<sup>[11]</sup>以天然大茴香醛和天然乙醛为原料, 采用化学方法合成树莓酮, 总得率达到 54.3%; 乞少红<sup>[12]</sup>以丙酮和甲醛为原料, 以浓硫酸为催化剂合成树莓酮, 回收率达 70% 以上, 但化学合成的树莓酮并不是天然树莓酮, 使其在实际应用中受到限制。因此需要付出大量努力来提高其在包括原核生物在内的生物体中的水平。

近年来, 许多微生物表达系统如大肠杆菌、酵母等已经建立。Beekwilder 等<sup>[1]</sup>首次将 4CL 和苯亚甲基丙酮合酶转化到大肠杆菌, 并成功在大肠杆菌中检测到了 5 mg/L 的树莓酮, 并伴有柚皮素的其他杂质产生。Lee 等<sup>[13]</sup>通过酵母构建了树莓酮的合成途径, 产量为 2.8 mg/L; 同时以香豆酸为底物, 使树莓酮产量达到 7.5 mg/L。王程程等<sup>[14]</sup>将 4CL、苊基丙酮合酶和苊基丙酮还原酶 (Raspberry ketone/zingerone synthase, RZS1) 基因转化到大肠杆菌进行发酵, 并成功在大肠杆菌中检测到了 178.13 mg/L 的树莓酮, 但其过程需要连续进行补料分批发酵。

基因融合是将多个基因的编码区相连, 去掉首个基因的终止密码子并连上含有终止密码子的后续基因序列, 在相同调控序列下形成融合基因<sup>[15]</sup>。莱茵衣藻具有易栽培、生长快、光合效率高优点外, 还具有环境友好、易于转基因、代谢途径与高等植物相似等优点, 它是一种理想的重组蛋白反应器和生物表达系统。目前已有关于使用莱茵衣藻进行白藜芦醇的合成和产氢的研究<sup>[16]</sup>。因此, 莱茵衣藻也可能是一种较好的生产树莓酮的生物反应器。

苯亚甲基丙酮合酶 (BAS) 是树莓生物合成途径中的关键酶, 目前还没有从树莓中分离到专门编码苯亚甲基丙酮合酶的基因 BAS, 本实验室前期工作从植物虎杖中克隆到具有 CHS 和 BAS 活性的双功能酶 *PKS1*<sup>[17]</sup>。为了探索利用藻类生产树莓酮的可能, 将 4-香豆酰-CoA 连接酶 (4CL) 和聚酮合酶 (*PKS1*) 通过连接肽融合在一起, 融合蛋白 4CL-*PKS1* 在莱茵衣藻中高效表达, 为生物合成量产树莓酮奠定基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

莱茵衣藻 CC125 (野生型, mt+), CC425 (细胞壁缺失型, *arg2 cw15 mt+ sr-u-2-60*) 和衣藻表达载体 pChlamiRNA3int 由首都师范大学胡勇教授惠赠。衣藻培养条件: TAP 培养基为基本培养基 (CC425 加入精氨酸 200  $\mu\text{g/L}$ ), 在温度为 25  $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  下, 光照 16 h, 暗培养 8 h。

## 1.2 方法

### 1.2.1 树莓酮植物生产用 4CL-PKS1 表达载体的构建及转化

按照 Horton 等的重叠延伸 (Overlap extension) 方法将 4CL 基因与 PKS1 基因通过连接肽融合在一起<sup>[18]</sup>。首先根据两个基因 cDNA 序列设计重叠延伸引物 (表 1); 用引物 F1 和 P2 扩增烟草 4CL (GenBank 登录号: NM\_001325625.1) cDNA 序列; 用引物 P1 和 R1 扩增虎杖 PKS1 (GenBank 登录号: JQ654448.1) 的 cDNA 序列。最后用引物 F1 和 R1 扩增前两个扩增产物的混合物, 即得到 4CL 和 PKS1 的融合基因。将融合基因连入载体 pChlamiRNA3int 的 *Nde* I 和 *Xba* I 酶切位点, 替换载体原有的 GFP 片段<sup>[19]</sup>, 得到重组质粒 pChla-4CL-PKS1。

质粒转化衣藻参照刘佳等<sup>[20]</sup>的衣藻电转化法。衣藻细胞在液体 TAP 培养基中培养至对数生长期  $OD_{750}=0.6$ , 取 250  $\mu\text{L}$  细胞悬液和线性化质粒放入预冷的 0.4 cm 电击杯 (美国 BTX, 122)

中, 使用电穿孔仪 (BTX EMC399, 126USA) 电转化 (1 800 V/cm, 1 个脉冲, 1 ms)。电转结束后将莱茵衣藻培养于 1 mL TAP 非选择培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴恢复培养 5 min。然后进行光照培养 48 h。在含有 5 mg/mL 巴龙霉素 (Paromomycin, Par) 的 TAP 琼脂平板上筛选转基因藻落。

### 1.2.2 藻落 PCR 验证

参照王亮<sup>[21]</sup>藻落 PCR 验证方法。挑取 1 mL 悬浮液  $OD_{750}=0.6$  在 95  $^{\circ}\text{C}$  下煮 5 min 后放入 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰冻 10 min。将莱茵衣藻从 -80  $^{\circ}\text{C}$  中取出, 待融化后 6 000 $\times$  g 离心 5 min, 取 1  $\mu\text{L}$  上清液作为模板进行藻落 PCR 验证。PCR 的反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min 50 s, 33 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。PCR 使用 PCR 试剂盒 (Transgen Biotech)。测序证实 4CL-GSG-STS 序列正确。

### 1.2.3 莱茵衣藻中树莓酮的提取

将莱茵衣藻培养至对数生长期  $OD_{750}=0.6$ 。离心收集莱茵衣藻沉淀, 共称取 1.0 g, 加入液氮研磨至粉末状。衣藻研磨后加入 100 mL 氯仿, 避光放置 48 h。将液体进行真空抽滤, 并将抽滤后的液体进行 55  $^{\circ}\text{C}$  旋蒸, 后加入 20 mL 60% 的色谱级甲醇溶解, 再加入 5 倍体积的石油醚萃取。接着加入 2 倍体积的乙酸乙酯萃取, 取下层溶液, 进行 55  $^{\circ}\text{C}$  旋蒸, 旋蒸完后用 1 mL 色谱级甲醇溶解, 放入 5 mL 离心管, 6 000 $\times$  g 离心 2 min。离心后用有机滤膜将液体过滤至安瓿瓶, 即可得到树莓酮提取物。

表 1 重叠延伸 PCR 引物序列

Table 1 Primers used in overlap extension PCR

Primer name	Sequences (5'-3')
F1	ATGGAGAAAGATACAAAACAGGTTGACATAATTTTCCGATC
R1	CATCATTCTAGAGTGATGAGCAACTGGTACACTGTGTAGAAC
P1	GCTGCTGGGCTTCCAAATGAAATCTCTACTTCCAGGGTGGTGGTATGGCACCATCGGTCCAG
P2	CTGGACCGATGGTGCCATACCACCACCCTGGAAGTAGAGATTTTCATTGGAAGCCCAGCAGC

Note: F1 and P2 are the upstream and downstream primers of 4CL gene. P1 and R1 are the upstream and downstream primers of PKS1, respectively. P1 and P2 primers have partial overlap to form overlapping regions after amplification of 4CL and PKS1, and P1 and P2 are the sites of linker peptides.

### 1.2.4 树莓酮产物高效液相色谱检测

使用配有 Agilent ZORBAX SB-C18 250 mm 反相色谱柱的 Water 1525 高效液相色谱仪。设定方法：流动相 A 甲醇和 B 水，流速 1 mL/min，梯度洗脱条件 A 0–10 min、0%，A 10–26 min、30%，A 26–28 min、30%。树莓酮最大吸收波长 275 nm。标准曲线的绘制：将树莓酮标品稀释为 1 000  $\mu\text{g/mL}$ 、500  $\mu\text{g/mL}$ 、250  $\mu\text{g/mL}$ 、125  $\mu\text{g/mL}$ 、64.5  $\mu\text{g/mL}$  不同浓度，依次进样绘制标准曲线。

### 1.2.5 树莓酮产物质谱检测

为了在线 HPLC-MS 分析，液相色谱在 Agilent 1290 infinity II 212 HPLC 系统上进行<sup>[9]</sup>。优化的质谱检测条件为：电喷雾离子源 (ESI)；正离子扫描；多反应监测 (MRM)；电喷雾电压 (IS) 5 500 V；雾化气压力 (GSI) 448.175 kPa；气帘气压力 (CUR) 68.95 kPa；辅助气压力 (GS2) 448.175 kPa；离子源温度 (TEM) 550  $^{\circ}\text{C}$ ；定性离子对、定量离子对、碰撞气能量 (CE) 及去簇电压。

## 2 结果与分析

### 2.1 融合基因表达载体构建和衣藻转化

首先将 4CL 和 PKS1 的 cDNA 序列通过重叠

延伸方法融合在一起，然后 PCR 扩增 4CL-PKS1，连入载体 pChlamiRNA3int 得到表达 4CL 和 PKS1 融合蛋白的重组质粒 pChla-4CL-PKS1 (图 1)。

载体中 PSAD 启动子是衣藻内源启动子，可以驱动 4CL 和 PKS1 融合基因在莱茵衣藻中高效表达。氨基糖苷 3'-磷酸转移酶 (aphVIII) 具有抗巴龙霉素的特性，可作为转基因衣藻的选择标记。从转化衣藻中提取基因组 DNA 和总 RNA，能够扩增出全长 4CL-PKS1 基因。测序后表明，融合基因在转基因衣藻基因组已经成功整合并能够正常转录表达。

### 2.2 树莓酮的提取和鉴定

为了检测树莓酮在转基因衣藻中的积累情况，从莱茵衣藻中提取树莓酮，并用高效液相色谱 (HPLC) 测定树莓酮的含量。转基因莱茵衣藻 CC125 与 CC425 在 HPLC 图谱中有较高的树莓酮峰 (保留时间为 22 min)，而野生型衣藻则未检测到树莓酮峰 (图 2)。通过对衣藻提取物进行全扫描 LC-MS 分析发现有一个明显的树莓酮峰 (165, 已加氢) (图 3A)；多反应监测 (MRM) 扫描显示该树莓酮的产物离子峰 (119 和 147) (图 3B)。因此，质谱分析确认转基因衣藻产生了树莓酮。

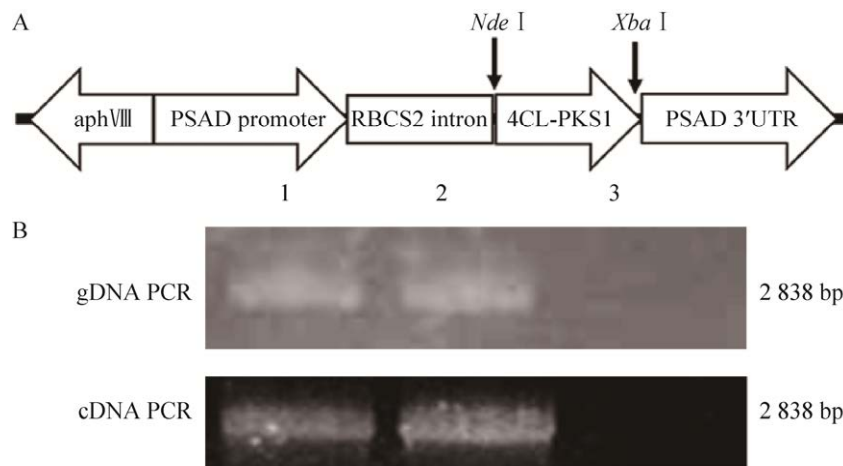


图 1 融合基因表达载体图及电泳图

Fig. 1 Schematic diagram and electrophoregram of fusion gene. (A) Schematic diagram of pChla-4CL-PKS1. The fusion gene 4CL-PKS1 was cloned between the *Nde* I and *Xba* I restriction sites of the *Chlamydomonas* expression vector pChlamiRNA3int, resulting in plasmid pChla-4CL-PKS1. (B) electrophoregram of pChla-4CL-PKS1. Lanes 1 and 2 are the bands of the fusion gene 4CL-PKS1 of the transgenic *Chlamydomonas* CC125 and CC425 respectively, the size of the fusion gene is 2 838 bp; lane 3 is non-transgenic algae.

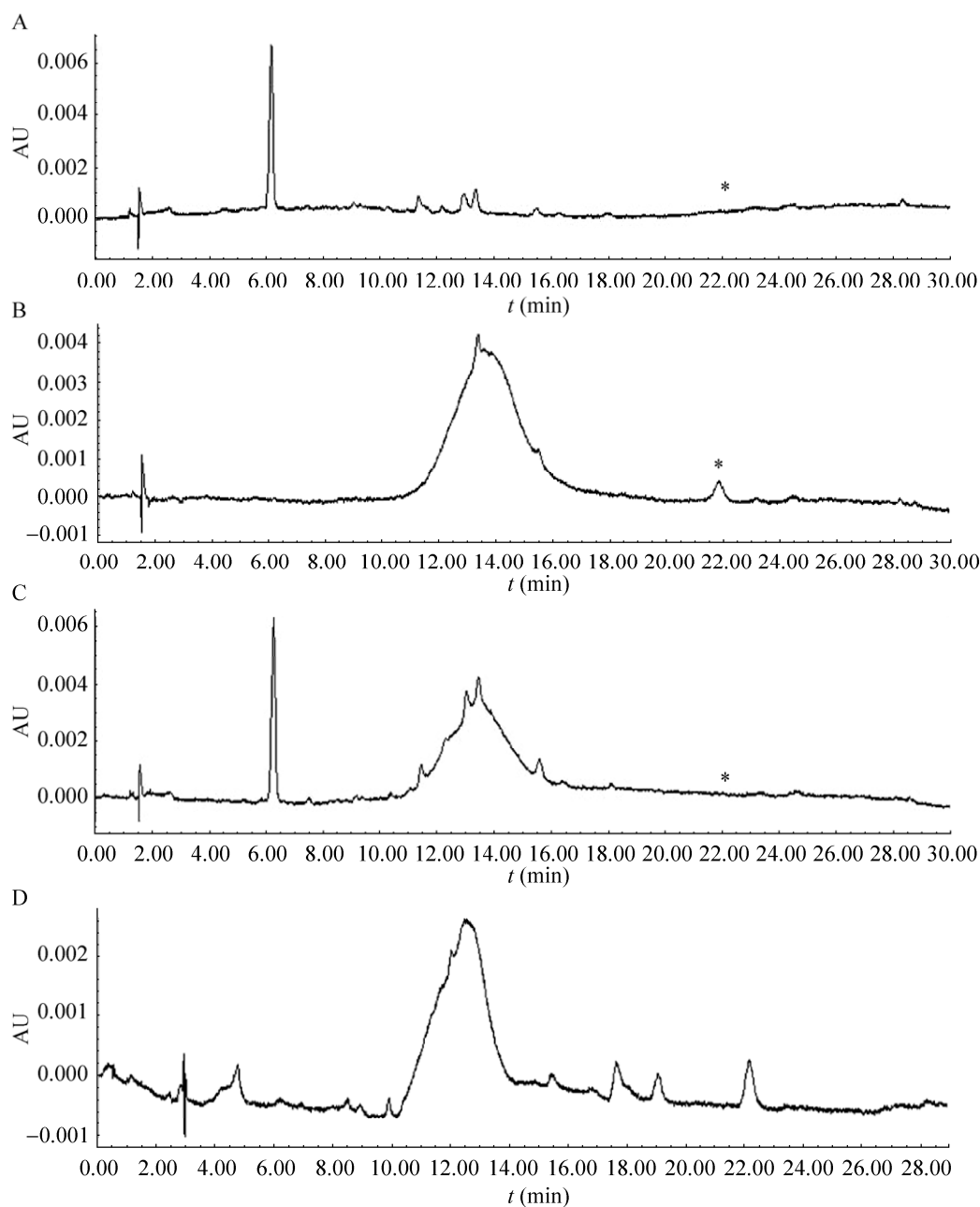


图 2 树莓酮 HPLC 色谱图

Fig. 2 Production of raspberry ketone in *Chlamydomonas* analyzed by HPLC. (A) Strain CC425. (B) Strain CC425t (strain CC425 transformed with 4CL-PKS1). (C) Strain CC125. (D) Strain CC125t (Strain CC125 transformed with 4CL-PKS1). An asterisk designates retention time of raspberry ketone.

根据树莓酮标准品的液相色谱结果得到标准曲线  $y=4\,825x-14\,983$  ( $R^2=0.999\,3$ ), 转基因衣藻树莓酮的峰面积定量分析得到转基因莱茵衣藻 CC125 的树莓酮含量为  $(6.7\pm1.2)\,\mu\text{g/g}$  (鲜重), 在转基因 CC425 中的含量为  $(5.9\pm1.3)\,\mu\text{g/zg}$  (鲜重)。两种

转基因衣藻的树莓酮含量有些差异, 但是没有达到显著水平 ( $P>0.05$ )。这些结果表明, 在本来不含树莓酮的藻类植物中, 把树莓酮合成途径中的两个重要基因融合后在衣藻中表达, 可以产生树莓酮, 并能在衣藻细胞中积累。

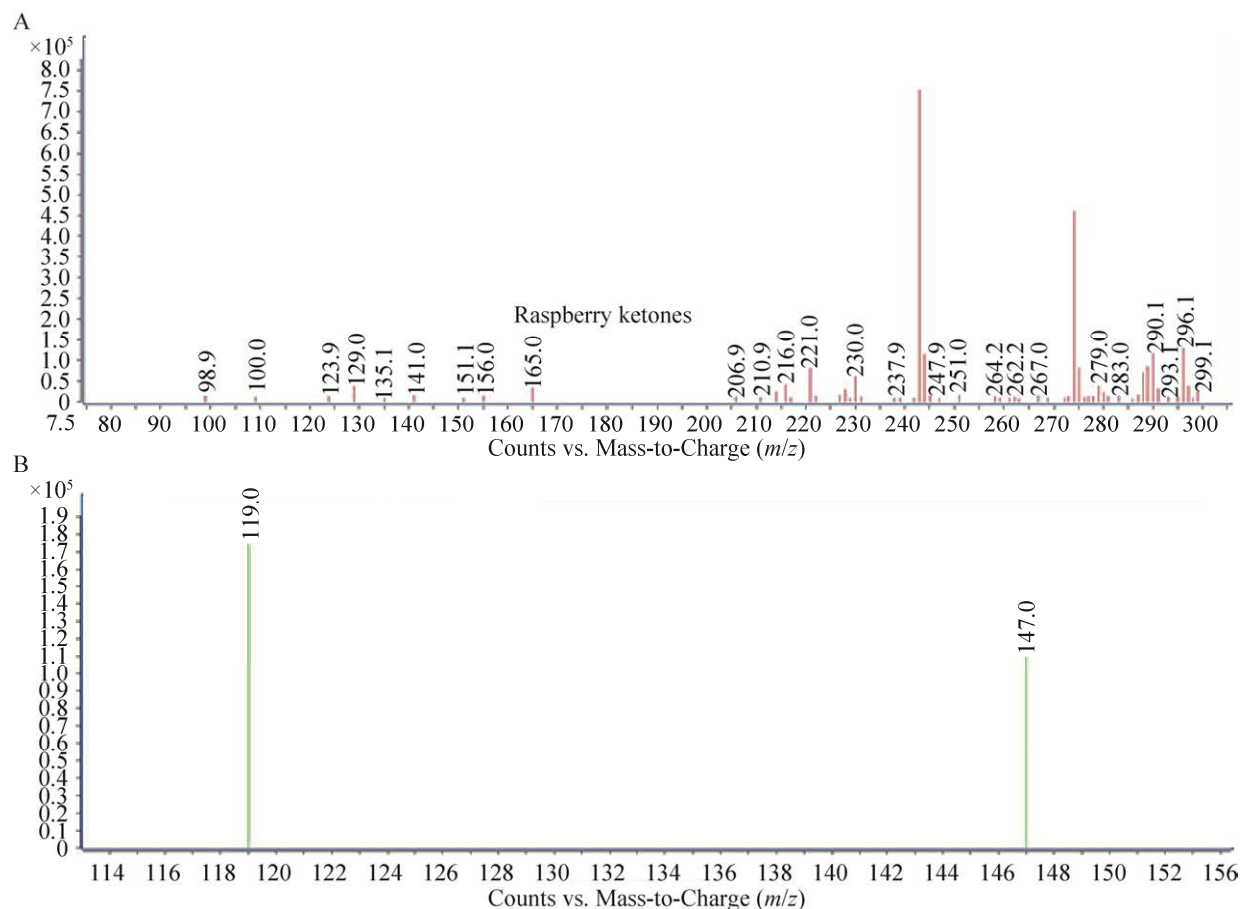


图3 树莓酮二级质谱扫描图

Fig. 3 Identification of raspberry ketone by HPLC-MS. (A) The raspberry ketone peak (165) was shown in Full Scan LC-MS. (B) The product ion peaks of raspberry ketone (119 and 147) were shown in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) scan.

### 3 讨论

利用基因重组技术将 4-香豆酰-CoA 连接酶 (4CL) 和聚酮合酶 (PKS1) 基因转入衣藻, 成功构建转基因藻株。通过液相色谱和质谱检测到转基因莱茵衣藻中含有树莓酮产物, 表明融合基因 4CL-PKS1 已成功转入莱茵衣藻并获得表达。本实验利用莱茵衣藻作为生物反应器, 选择甲醇作为提取溶剂提取树莓酮, 在没有底物诱导和激素刺激的情况下, 转基因莱茵衣藻树莓酮的最终产量按鲜重计算 CC125 藻株产量是 6.7  $\mu\text{g/g}$ , CC425 藻株产量是 5.9  $\mu\text{g/g}$ , 按衣藻培养体积计

算 CC125 藻株产量是 22.33  $\mu\text{g/L}$ , CC425 藻株产量是 19.67  $\mu\text{g/L}$ 。虽然野生型莱茵衣藻中树莓酮的含量略高于细胞壁缺失型, 但在实际操作中细胞壁缺失型莱茵衣藻比野生型的电转化率更高, 且细胞壁薄更容易破碎, 因此在工业生产中可能会有优先选择。转基因莱茵衣藻中树莓酮的含量比从红树莓果实<sup>[10]</sup>中提取的含量 (3.32  $\mu\text{g/g}$ ) 提高 2 倍多, 但是仍然明显低于采用微生物发酵法得到的树莓酮<sup>[1-13]</sup>。

本实验成功利用莱茵衣藻生产制备树莓酮, 但树莓酮的提取效率受提取时间、提取温度、莱茵衣藻 OD 值等因素的影响, 需要优化用衣藻生

产树莓酮的整体工艺,包括底物添加、培养条件、提取工艺等。目前关于使用莱茵衣藻生产树莓酮工艺的研究尚未见报道,而本实验展现了利用莱茵衣藻作为反应器生产制备树莓酮的工业化生产前景。

## REFERENCES

- [1] Beekwilder J, Van Der Meer IM, Sibbesen O, et al. Microbial production of natural raspberry ketone. *Biotechnol J*, 2007, 2(10): 1270-1279.
- [2] Lee J. Further research on the biological activities and the safety of raspberry ketone is needed. *NFS J*, 2016, 2: 15-18.
- [3] Morimoto C, Satoh Y, Hara M, et al. Anti-obese action of raspberry ketone. *Life Sci*, 2005, 77(2): 194-204.
- [4] 黎庆涛, 王远辉, 王丽. 树莓功能因子研究进展. *中国食品添加剂*, 2011, (2): 172-77.  
Li QT, Wang YH, Wang L. Investigative progress of functional factors in raspberry. *China Food Addit*, 2001, (2): 172-177 (in Chinese).
- [5] 孟宪军, 杨磊, 李斌. 树莓酮对高血脂症大鼠血脂及炎症因子的影响. *食品科学*, 2012, 33(13): 267-270.  
Meng XJ, Yang L, Li B. Effect of raspberry ketone on lipid metabolism and inflammatory factors in hyperlipidemic rats. *Food Sci*, 2012, 33(13): 267-270 (in Chinese).
- [6] Storozhok NM, Gureeva NV, Khalitov RA, et al. Antioxidant activity of synthetic analogs and pure active principles of *rhodiola rosea* and raspberry ketone. *Pharm Chem J*, 2012, 45(12): 732-735.
- [7] Borejsza-Wysocki W, Hrazdina G. Biosynthesis of *p*-hydroxyphenylbutan-2-one in raspberry fruits and tissue cultures. *Phytochemistry*, 1994, 35(3): 623-628.
- [8] Larsen M, Poll L, Callesen O, et al. Relations between the content of aroma compounds and the sensory evaluation of 10 raspberry varieties (*Rubus idaeus* L). *Acta Agric Scand*, 1991, 41(4): 447-454.
- [9] 李斌, 王小杰, 杨磊, 等. HPLC-MS/MS 法测定树莓中树莓酮含量的研究. *生物技术进展*, 2013, 3(6): 439-442.  
Li B, Wang XJ, Yang L, et al. Determination of raspberry ketone in raspberry by HPLC-MS/MS. *Curr Biotechnol*, 2013, 3(6): 439-442 (in Chinese).
- [10] 张成涛, 万国盛, 赵余庆, 等. 红树莓果实中鞣花酸和树莓酮的含量测定. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(19): 140-143.  
Zhang CT, Wan GS, Zhao YQ, et al. Determination of the content of ellagic acid and raspberry ketone in red raspberry (*Rubus corchorifolius*) fruit. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2013, 19(19): 140-143 (in Chinese).
- [11] 王冠. 一种天然覆盆子酮的合成方法研究. *香料香精化妆品*, 2017, 8(4): 14-16, 20.  
Wang G. Study on synthesis of natural raspberry ketone. *Flavour Fragr Cosmet*, 2017, 8(4): 14-16, 20 (in Chinese).
- [12] 乞少红. 4-对羟基苯基-2-丁酮的合成. *河北化工*, 2004, (2): 35, 37.  
Qi SH. Synthesis of 4-parahydroxy-phenyl-2-butanone. *Hebei Chem Eng Ind*, 2004, (2): 35, 37 (in Chinese).
- [13] Lee D, Lloyd NDR, Pretorius IS, et al. Heterologous production of raspberry ketone in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* via pathway engineering and synthetic enzyme fusion. *Microb Cell Factor*, 2016, 15: 49.
- [14] 王程程, 郑璞, 陈鹏程, 等. 重组大肠杆菌发酵生产树莓酮. *食品与发酵工业*, 2019, 45(9): 9-14.  
Wang CC, Zheng P, Chen PC, et al. Production of raspberry ketone by recombinant *Escherichia coli*. *Food Ferment Ind*, 2019, 45(9): 9-14 (in Chinese).
- [15] 武东亮, 郭三堆. 融合基因研究进展. *生物技术通报*, 2001, (2): 5-7.  
Wu DL, Guo SD. The advances in research of fused gene. *Biotechnol Inf*, 2001, (2): 5-7 (in Chinese).

- [16] 蒋欣芩. 莱茵衣藻光控系统的构建及其在产氢中的应用[D]. 深圳: 深圳大学, 2017.
- Jang XC. Construction of *chlamydomonas reinhardtii* lighting control system and its application in producing hydrogen[D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2017 (in Chinese).
- [17] Ma LQ, Guo YW, Gao DY, et al. Identification of a *Polygonum cuspidatum* three-intron gene encoding a type III polyketide synthase producing both naringenin and p-hydroxy-benzalacetone. *Planta*, 2009, 229(5): 1077-1086.
- [18] Horton RM, Hunt HD, Ho SN, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, 77(1): 61-68.
- [19] Xiang C, Liu J, Ma LQ, et al. Overexpressing codon-adapted fusion proteins of 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL) and stilbene synthase (STS) for resveratrol production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol*, 2020, 32(3): 1669-1676.
- [20] 刘佳, 何炫程, 项晨, 等. 一种高效的莱茵衣藻电转化方法. 北京农学院学报, 2019, 34(2): 5-9.
- Liu J, He XC, Xiang C, et al. An efficient electroporation electroporation transformation method for *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Beijing Univ Agric*, 2019, 34(2): 5-9 (in Chinese).
- [21] 王亮. CrKin13 在衣藻鞭毛组装与解聚中功能和机制的研究[D]. 北京: 清华大学, 2013.
- Wang L. Function and mechanism of CrKin13 underlying flagellar assembly and disassembly in *Chlamydomonas*[D]. Beijing: Tsinghua University, 2013 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)