

# 基因改造 *Rhodobacter sphaeroides* 提高 辅酶 Q10 的产量

李力\* 林丹枫 黄建忠

- (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研究中心 福建 福州 350108)

**摘要:** 【目的】通过敲除类球红细菌 2.4.1 基因组中八氢番茄素合成酶基因 *crtB*, 让异戊二烯前体更多流向辅酶 Q10 的合成。引入大肠杆菌编码的分支酸裂解酶基因 *ubiC* 和 4-羟苯甲酸转移酶基因 *ubiA*, 提高 4-羟苯甲酸的合成和与聚异戊二烯的连接, 从而提高类球红细菌的辅酶 Q10 产量。【方法】以自杀型质粒 pSUP202 为载体, 构建包含 *crtB* 基因上游 2.5 kb 片段, 壮观霉素抗性基因, *ubiC*、*ubiA* 基因和 *crtB* 基因下游 2.5 kb 片段的基因置换质粒, 利用结合转移方法转入类球红细菌 2.4.1 中, 利用抗性机制筛选双交换突变株, RT-PCR 方法检测引入的 *ubiC* 和 *ubiA* 基因转录。用 HPLC 方法测定出发菌株和基因改造菌株的辅酶 Q10 产量。【结果】成功构建出基因置换质粒, 筛选出发生基因置换的突变株, RT-PCR 证实了外源基因的转录, 并且突变株辅酶 Q10 的产量比出发菌株提高 40%。【结论】大肠杆菌的 *ubiC* 和 *ubiA* 基因能够利用自身启动子在类球红细菌中表达, 利用基因改造的方法能成功提高类球红细菌的辅酶 Q10 产量。

**关键词:** 辅酶 Q10, 类球红细菌, 基因改造

# Genetic manipulation of *Rhodobacter sphaeroides* for improved production of coenzyme Q10

LI Li\* LIN Dan-Feng HUANG Jian-Zhong

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

(2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

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

**Abstract: [Objective]** The objective of this study was to improve the production of coenzyme Q10 of *Rhodobacter sphaeroides* by replacing *crtB* (encoding phytoene synthase) with *ubiC* and *ubiA* (encoding chorismate pyruvate-lyase and 4-hydroxybenzoate: polyprenyldiphosphate 3-polyprenyltransferase, respectively) from *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . **[Methods]** The plasmid for gene replacement was constructed with a suicide pSUP202 as vector, and its insertions, including the up and down streams of *crtB* in *R. sphaeroides* 2.4.1, spectinomycin resistance gene, *ubiC* and *ubiA* from *E. coli* DH5 $\alpha$  were obtained by PCR. RT-PCR was used to detect the transcription of genes. HPLC was used to quantify the production of coenzyme Q10. **[Results]** The gene replacement mutant of *R. sphaeroides* was constructed, in which the *crtB* was replaced by *ubiC* and *ubiA*. The transcription of heterologous genes was confirmed by RT-PCR. The productivity of gene engineered strain was 1.6 fold of wide type. **[Conclusion]** The strain of *R. sphaeroides* with improved production of coenzyme Q10 was obtained successfully, and the *ubiC* and *ubiA* from *E. coli* could transcript with its native promoter in *R. sphaeroides*.

**Keywords:** Coenzyme Q10, *Rhodobacter sphaeroides*, Gene manipulation

辅酶 Q (Coenzyme Q, CoQ)也被称为泛醌,是普遍存在于各种生物中参与电子传递的一种辅酶。辅酶 Q 的化学结构包括苯醌环结构的母核和聚异戊二烯长链两个部分(图 1)。在不同物种中,聚异戊二烯链的长度不同,因此,辅酶 Q 可以依据异戊二烯的个数称为辅酶 Q<sub>n</sub> (n 代表异戊二烯单体的个数)。例如,在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)中,存在的主要是辅酶 Q6,在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中主要是辅酶 Q8,而在人体中以辅酶 Q10 为主<sup>[1]</sup>。辅酶 Q10 不仅在细胞的呼吸链中通过传递电子来产生 ATP,

为生命活动提供能量,同时能够做为抗氧化剂来清除自由基和再生其它的抗氧化剂,甚至能够影响到细胞中多种基因的表达<sup>[2]</sup>。对于由于直接参与或者间接参与辅酶 Q10 合成基因突变引起的辅酶 Q10 缺陷导致的严重线粒体疾病,口服辅酶 Q10 是一种非常重要的治疗方法<sup>[3]</sup>。口服补充辅酶 Q10 还被推荐用于治疗帕金森病和阿尔茨海默病<sup>[4]</sup>、糖尿病<sup>[5]</sup>、心肌病<sup>[6]</sup>、他汀类药物相关肌病<sup>[7]</sup>。由于辅酶 Q10 对人类健康的益处而受到保健品和药品行业的广泛重视,市场的需求巨大。尽管辅酶 Q10 可以由化学合成的方法生产<sup>[8-10]</sup>,

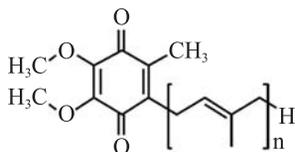


图 1 辅酶 Q 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of coenzyme Q

但商业化生产的途径主要是通过微生物发酵来实现的<sup>[1]</sup>。根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)是最主要的生产菌株,而诱变育种、发酵条件优化和添加前体物等多种策略被应用于提高辅酶 Q10 的生产水平<sup>[11-13]</sup>。

目前,辅酶 Q10 的生物合成途径在多种物种中已经得到阐明。辅酶 Q10 的生物合成可以分为 3 个部分,苯醌环母核的形成,聚异戊二烯的合成及同母核的连接,以及苯醌环的后修饰<sup>[14]</sup>。对于苯醌环的形成,主要由莽草酸或是酪氨酸经过分解得到。4-羟基苯甲酸(*p*-HBA)的形成是合成辅酶 Q10 的第一步。该反应在大肠杆菌中主要通过由 *ubiC* 基因编码的分支酸裂解酶催化进行<sup>[15]</sup>。而聚异戊二烯部分大多通过赤藓糖磷酸途径(MEP)或甲羟戊酸(MVA)途径合成。异戊烯基焦磷酸(Isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲烯丙基二磷酸(Dimethylallyl diphosphate, DMAPP)是异戊二烯单体合成的产物。异戊二烯不仅是辅酶 Q10 的生物合成前体,还是各种萜类化合物的合成前体,包括胡萝卜素、维生素 A 和叶绿素等。研究表明,辅酶 Q10 的合成水平主要取决于合成步骤中两个关键因素,前体物聚十异戊二烯焦磷酸(PPP)的水平 and 催化苯醌环和聚异戊二烯的连接反应。在辅酶 Q10 合成过程中,苯醌环与聚异戊二烯长链相结合的过程为限速反应。经研究表明,在大肠杆菌中,负责该反应的 4-羟基苯甲酸转移酶由 *ubiA* 基因编码,此酶对底物的专一性较低,能

够接受多种长度的聚十异戊二烯焦磷酸,因此增加该酶表达水平是一个可能提高辅酶 Q10 产量的途径,然而,单独提高 *ubiA* 基因并不一定能增加辅酶 Q10 的产量,需要和其它基因的协同作用<sup>[16]</sup>。

*R. sphaeroides* 2.4.1 是类球红细菌的一个模式菌株,其基因组测序工作已经完成<sup>[17]</sup>。类球红细菌辅酶 Q10 的生物合成主要途径见图 2。*R. sphaeroides* 2.4.1 不仅能够产生辅酶 Q10,而且能够合成大量的类胡萝卜素,因而菌体显现为红色。*crtB* 基因编码的一种八氢番茄红素合酶,能催化双牻牛基焦磷酸(Geranylgeranyl diphosphate, GGPP)合成八氢番茄红素(Phytoene),是胡萝卜素合成途径的第一个酶。细胞内它与合成辅酶 Q10 的十异戊烯焦磷酸合酶(Polyprenyldiphosphatesynthase, PPPs)竞争共同的前体物 GGPP。因此,*crtB* 基因的敲除可能阻断或者减少异戊二烯前体流向类胡萝卜素的合成,从而增加辅酶 Q10 的产量。另外,在 *R. sphaeroides* 2.4.1 中引入外源的 4-羟基苯甲酸转移酶 *ubiA* 基因和分支酸裂解酶 *ubiC* 基因以期增加辅酶 Q10 的生物合成水平,本文报道这一研究结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

类球红细菌(*R. Sphaeroides* 2.4.1)<sup>[18]</sup>由美国得克萨斯大学 Samuel Kaplan 教授赠送。大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  和质粒 pBluescript SK+为本实验室保存。大肠杆菌 *E. coli* S17、质粒 pSUP202<sup>[19]</sup>、pHP45 $\Omega$ <sup>[20]</sup>和 pRK415<sup>[21]</sup>由法国 Hannu Myllykallio 教授提供。

### 1.2 基因置换载体的构建

细菌总 DNA 提取参照 Sambrook 等的方法<sup>[22]</sup>。根据已经公布的 *R. sphaeroides* 2.4.1 基因组序列,

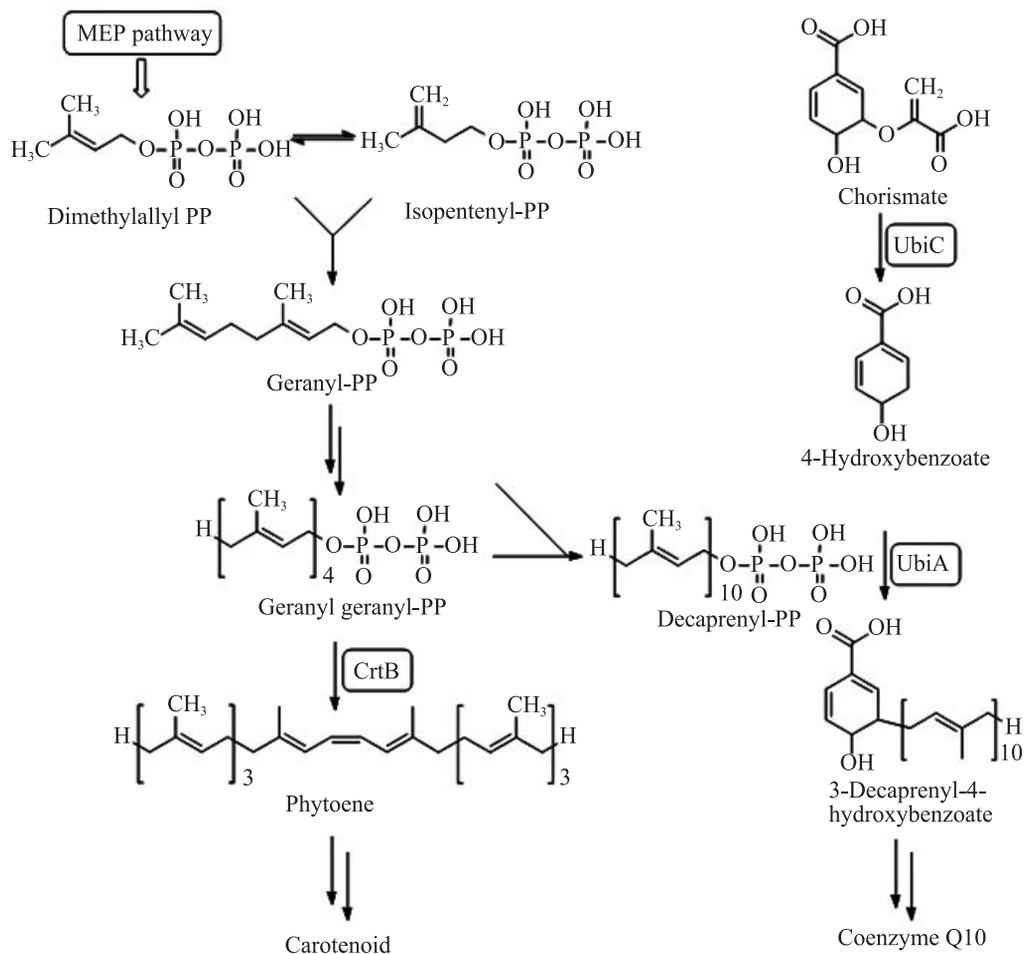


图 2 类球红细菌中辅酶 Q10 和类胡萝卜素的生物合成途径

Fig. 2 Biosynthetic pathway of coenzyme Q10 and carotenoid in *R. sphaeroides*

设计分别扩增 *crtB* 基因的上下游各 2.5 kb 大小片段的引物 *crtBup* 和 *crtBdw*, 扩增产物做为双交换的同源臂。*E. coli* DH5 $\alpha$  是来自 *E. coli* K12 的衍生物, 根据公布的 *E. coli* K12 W3110 中 *ubiC* 和 *ubiA* 基因序列, 设计出扩增包含 *ubiC* 和 *ubiA* 基因及其启动子区域的引物 *ubiCA*。所用引物见表 1。PCR 反应用 KOD plus 酶(TOYOBO 公司), 反应条件依照说明书进行, 退火温度为 56  $^{\circ}$ C。所用仪器为 ABI 2720 PCR 仪(Applied Biosystems)。PCR 产物经测序验证序列的正确性(测序由上海

生工公司完成)。将 *crtBup* PCR 产物用 *Stu* I 酶切处理后与 *EcoR* V 酶切的 pSUP202 质粒连接, 构建质粒 pCIM17。pCIM17 用 *Stu* I 酶切后与同样用 *Stu* I 酶切的 *crtBdw* PCR 产物连接, 构建质粒 pCIM18。pCIM18 用 *Stu* I 酶切并与 *Stu* I 酶切的 *ubiCA* PCR 产物连接成为 pCIM20, pCIM20 再次用 *Stu* I 酶切成具有平端的线性片段, 与用 *Sma* I 酶切下的 pHP45 $\Omega$  质粒中的壮观霉素抗性基因(*aadA*)片段连接, 构建出用于基因置换的载体 pCIM22。

表 1 本研究所用 PCR 引物  
Table 1 Primers used in this study

Primers	Forward (F)	Reverse (R)
crtBup	GCC <u>GAA</u> TTCCTCCGCGCCTCCACGA ( <i>EcoR</i> I)	AT <u>AGG</u> CCTTGGCCTGGACCTCGCTCTATT ( <i>Stu</i> I)
crtBdw	GA <u>AGG</u> CCTACCTCCTCGGAAATGTTGTGC ( <i>Stu</i> I)	GT <u>AAG</u> CTTATGGCCTGCTTCATCTGTCTC ( <i>Hind</i> III)
ubiCA	AT <u>AGG</u> CCTCGATACCCAACAGATGAT ( <i>Stu</i> I)	GGCAACCCAGAAGAAAGC
RSDan	GAGCCACATCACCATCACCACG	GCATCTGAAACAGGCGCAACC
RSDan3-ubia	GCTGTTTGTCTGCTGGTACTGAT	CCGAACAGGATTGCCGTGGATTTA

注: 下划线所示为酶切位点部分, 括号中为限制性内切酶的名称。

Note: The underlined characters are the additional restriction enzyme sites, and in the brackets are the names of the restriction enzymes.

### 1.3 基因置换突变株的构建和验证

对类球红细菌的遗传操作主要参考 Donohue 等的方法<sup>[23]</sup>, 并略做修改。将 *R. sphaeroides* 2.4.1 和含有 pCIM22 质粒的 *E. coli* S17 分别在 LB 培养基(10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母粉, 10 g NaCl, 蒸馏水 1 mL, pH 7.0)中培养过夜(分别为 32 °C 和 37 °C), 然后接种到新鲜的 LB 培养基中, 生长到  $OD_{600} \approx 0.6$ , 离心收集菌体, 二者以 1:10 (V/V)的比例混合在一起, 用新鲜的 LB 洗 2 次, 重悬在 500  $\mu$ L 的 LB 里, 然后涂布到固体 LB 平板上, 32 °C 倒置培养 6 h。将培养基表面的菌洗脱至含有 1 mL Sistrom's 培养基的离心管中(Sistrom's 培养基参照文献[24])。4 °C、12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 加入 500  $\mu$ L 冰预冷的 Sistrom's 培养基, 用振荡器振荡, 混匀细菌。离心 0.1 mL 的 Sistrom's 重悬细菌后涂布在含有终浓度为 200 mg/L  $\text{Na}_2\text{TeO}_4$  和 100 mg/L 壮观霉素的 Sistrom's 平板上, 32 °C 培养 2–3 d。将长出的接合子分别同时接种到含有氨基青霉素和壮观霉素的 LB 平板上, 筛选出能够在壮观霉素中生长而不能在氨基青霉素中生长的突变株。

对于突变株的验证采用 PCR 方法, 根据 *crtB* 基因的上下游序列, 设计引物 RSDan (表 1), 以突变株和出发菌株的总 DNA 为模板进行扩增, 由于突变株中的 *crtB* 基因被壮观霉素抗性基因

及大肠杆菌的 *ubiC* 和 *ubiA* 基因所置换, 产物的大小不同, 以此来验证基因置换的发生。

### 1.4 类球红细菌的发酵培养

培养基和发酵条件参照文献[13], 菌种在种子培养基(每升含胰蛋白胨 15 g, 大豆蛋白胨 15 g 和 NaCl 5 g) 32 °C、220 r/min 条件下摇床培养 36 h 后按照 5% (V/V)接种量接种至发酵培养基(每升含糖浆 20 g, 酵母提取物 15 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g, Vitamin B<sub>1</sub> 0.008 g)中培养 48 h。为准确测定菌株发酵水平, 每个样品做 3 个平行。

### 1.5 *ubiC* 和 *ubiA* 基因转录的 RT-PCR 验证

RNA 的提取采用一步法总 RNA 提取试剂 Redzol (北京赛百盛公司): 取 1 mL 发酵液 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min 后弃上清, 加入 1 mL 的 Redzol 溶液, 在均质器中(Precellys 24, Bertin 公司)以 6 500 Hz 频率振动 20 s, 间歇 20 s, 再以相同的频率振荡 20 s。取出样品立即放在冰上冷却至 0 °C。快速加入 200  $\mu$ L 氯仿, 振荡后 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 在上清液中加入 200  $\mu$ L 的乙醇混匀后取出 600  $\mu$ L 混合液加入硅胶膜离心纯化柱内, 在冰上静置 1 min 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min。往纯化柱中加入 600  $\mu$ L RNA 洗涤液, 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min。将纯化柱放入新的离心管内, 4 °C、12 000 r/min 离

心 1 min, 以彻底去除 RNA 洗涤液。将纯化柱放入新的离心管中, 往纯化柱膜内加入 50  $\mu\text{L}$  的 DEPC 处理水, 冰上静置 1 min。 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 1 min, 收集洗脱液体。

RNA 的逆转录反应采用试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific), 约 3  $\mu\text{L}$  经 DNase I (Fermentas 公司) 酶处理后的 RNA 样品和 1  $\mu\text{L}$  随机引物混和, 用 DEPC 处理的水补足至 12  $\mu\text{L}$ , 再依次加入 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$ Reaction buffer, 1  $\mu\text{L}$  Ribolock Ribonuclease Inhibitor (20 U/ $\mu\text{L}$ )和 2  $\mu\text{L}$  10 mmol/L dNTP Mix, 1  $\mu\text{L}$  RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{L}$ ),  $25\text{ }^\circ\text{C}$  5 min 后  $42\text{ }^\circ\text{C}$  反应 60 min,  $70\text{ }^\circ\text{C}$  水浴 5 min 终止反应, 合成的 cDNA 可直接用于 PCR 反应。

PCR 验证 *ubiA* 基因的转录, 根据 *ubiA* 的基因序列, 在其内部设计一对引物(表 1), 20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系中含 1  $\mu\text{L}$  上述的逆转录产物, 引物各 50 pmol/L, dNTPs 10 mmol/L, *Taq* 酶 1 U (Fermentas 公司)。反应条件为:  $94\text{ }^\circ\text{C}$  4 min;  $94\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $55\text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$  1 min, 共 30 个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$  5 min。

### 1.6 辅酶 Q10 的提取和产量测定

类球红细菌辅酶 Q10 的提取: 取 5 mL 发酵液离心弃上清, 加入 7 mL 甲醇重悬菌体,  $55\text{ }^\circ\text{C}$  温浴 5 min。加入 14 mL 的氯仿充分振荡, 然后离心取上清液至另一离心管中, 加入液体总体积 1/5 的 0.58% NaCl 溶液混匀然后静置, 保留下层有机相, 蒸干后加入 2 mL 乙醇溶解样品供测试。

样品的辅酶 Q10 含量用 HPLC 测定, Waters alliance 2690 高效液相色谱仪, Waters 996 PDA 二极管阵列检测器, Waters Millennium 32 工作站。色谱柱为 Agilent TC-C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 甲醇:乙醇(Merck, HPLC 级)=30:70 (V/V)等度洗脱, 流速为 1 mL/min, 检测波长 275 nm。通过与

辅酶 Q10 标准品(Sigma 公司)的峰面积比较定量来计算出发菌株和基因改造菌株的产量。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因置换载体的验证

通过多步的克隆实验, 最终成功获得基因置换的质粒, 质粒验证结果见图 3, 用 *Hind* III 酶切质粒, 得到约 2.0、2.7、4.5 和 7.8 kb 的 4 条带, 与预期的酶切结果一致。用 *Eco*R I 酶切, 结果得到了约 3.2、4.8、和 9.0 kb 大小的 3 条产物, 与预期的条带大小一致。证明基因置换载体 pCIM22 已构建成功。

### 2.2 类球红细菌 *crtB* 基因置换突变株的获得和验证

类球红细菌 *crtB* 基因置换示意图见图 4, 挑选能在壮观霉素培养基上生长而不能在氨苄青霉素培养基上生长的结合转移子, 摇瓶培养后提取其总 DNA。用 RSDan 为引物进行 PCR 扩增, 并以 *R. sphaeroides* 2.4.1 做为对照。PCR 产物的电泳图谱(图 5)显示, 以 *R. sphaeroides* 2.4.1 为模板

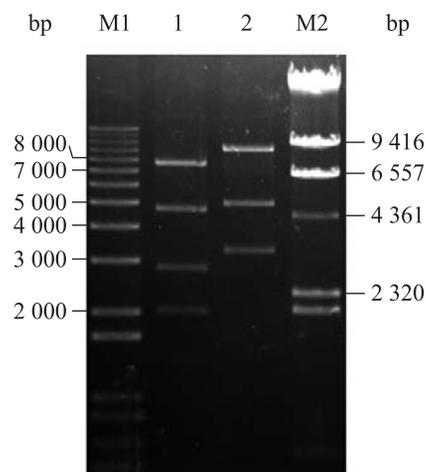


图 3 pCIM22 的 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切分析

Fig. 3 Digestion of pCIM22 with *Hind* III and *Eco*R I

注: M1: 1 kb ladder plus; 1: pCIM22 用 *Hind* III 的酶切结果; 2: pCIM22 用 *Eco*R I 酶切的结果; M2:  $\lambda$ *Hind* III.

Note: M1: 1 kb ladder plus; 1: pCIM22 digested with *Hind* III; 2: pCIM22 digested with *Eco*R I; M2:  $\lambda$ *Hind* III.

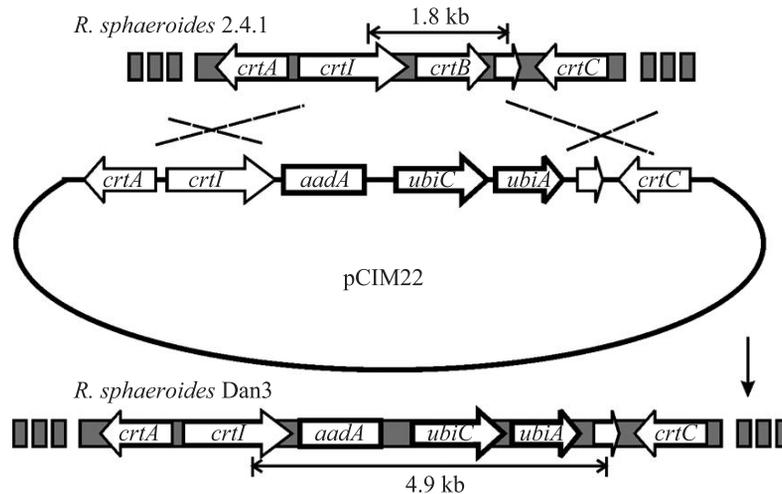
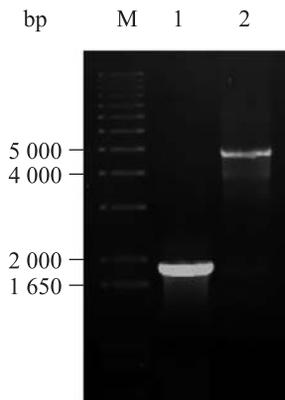


图 4 类球红细菌的基因置换示意图

Fig. 4 Strategy of replacement of *crtB* in *R. sphaeroides* 2.4.1

注: 类球红细菌 2.4.1 基因组上的 *crtB* 被壮观霉素抗性基因、*ubiC* 基因和 *ubiA* 基因所替换构成突变株类球红细菌 Dan3。图中标识了用引物 RSDan 在类球红细菌 2.4.1 和 Dan3 上分别扩增出 1.8 kb 和 4.9 kb 大小的片段。

Note: *CrtB* in the chromosome of *R. sphaeroides* 2.4.1 was replaced by *aadA*, *ubiC* and *ubiA*. The mutant was named as *R. sphaeroides* Dan3. The sizes of PCR products from *R. sphaeroides* 2.4.1 and *R. sphaeroides* Dan3 with primers of RSDan were indicated.

图 5 PCR 验证 *R. sphaeroides* 2.4.1 和突变株Fig. 5 Confirmation of *R. sphaeroides* 2.4.1 and *R. sphaeroides* Dan3 by PCR

注: M: DNA 标准 1 kb ladder plus; 1: 以 *R. sphaeroides* 2.4.1 总 DNA 为模板的 PCR 产物; 2: 以 *R. sphaeroides* Dan3 总 DNA 为模板的 PCR 产物。

Note: M: 1 kb ladder plus; 1: PCR product with total DNA of *R. sphaeroides* 2.4.1 DNA as template; 2: PCR product with total DNA of *R. sphaeroides* Dan3 as template.

的产物大小为 1.8 kb 左右, 而结合转移子的产物大小约为 4.9 kb, 与预计相符, 证明双交换筛选成功, 并将此基因置换突变株命名为 *R. sphaer-*

*oides* Dan3。

在培养突变株的过程中, 我们发现在 LB 平板上, 基因置换突变株 *R. sphaeroides* Dan3 的颜色已经从野生型 *R. sphaeroides* 2.4.1 的红色变成了浅绿色。类球红细菌的红色主要由大量的胡萝卜素所引起的, *crtB* 基因的敲除导致了胡萝卜素合成的降低, 因而红色减弱或者消失; 同时, 合成其它萜类化合物的异戊二烯前体增加, 可能包含叶绿素的合成增加, 因而, 菌体显现为绿色。菌体颜色的改变也证实了基因置换突变株构建成功。

### 2.3 *R. sphaeroides* Dan3 中 *ubiC-ubiA* 连锁基因的转录

在成功构建出基因置换突变株基础上, 要研究所引入的来源于大肠杆菌中的分支酸裂解酶基因和 4-羟苯甲酸转移酶基因能否转录和表达, 由于原核生物中蛋白的表达调控主要在于转录水平, 因此采用 RT-PCR 的方法验证外源基因的转录。*ubiA* 位于 *ubiC* 的下游, 并且共用一个启动

子区域, 因此, 检测 *ubiA* 的转录与否就可以验证这两个基因的转录。设计特异性引物 RSDan3-*ubiA* (表 1), 以发酵 24、48、72 h 的菌株 RNA 反转录生成的 cDNA 为模板, 电泳结果 (图 6) 显示扩增出与预计片段大小相符合的产物, 证实了所导入的 *ubiA* 基因在突变株 *R. sphaeroides* Dan3 中, 在发酵 24、48、72 h 的时候, 都有一定的转录, 并且转录的 mRNA 逐渐减少。图中基因组 DNA 作为 PCR 的阳性对照, 而以 24、48、72 h 这 3 个时间段的 RNA 为模板, 未扩增出条带, 证明 3 个模板中无基因组 DNA 的污染。RT-PCR 结果证明所引入的来自大肠杆菌的基因依靠自身启动子能够正常转录。

#### 2.4 *R. sphaeroides* Dan3 中辅酶 Q10 的产量提高

应用有机溶剂破壁和萃取的方法, 从出发菌株 *R. sphaeroides* 2.4.1 和基因改造菌株

*R. sphaeroides* Dan3 中提取辅酶 Q10, 并经过 HPLC 检测辅酶 Q10 的含量, 计算菌株的生产量。从 HPLC 图中 (图 7) 可以发现突变株 *R. sphaer-*



图 6 PCR 验证 *ubiA* 的转录

#### Fig. 6 Confirmation of the transcription of *ubiA* in *R. sphaeroides* Dan3 by PCR

注: M: DNA 分子量标准 1 kb ladder plus; 1: 以类球红细菌 Dan3 总 DNA 为模板的阳性对照; 2、3 和 4: 发酵 24、48 和 72 h 的 RT-PCR 产物; 5、6 和 7 分别是以发酵 24、48 和 72 h 提取的 RNA 为模板的阴性对照。

Note: M: 1 kb ladder plus; 1: Positive control with total DNA of *R. sphaeroides* Dan3 as template; 2, 3 and 4: The products of RT-PCR of *R. sphaeroides* Dan3 cultured for 24 h, 48 h and 72 h, respectively; 5, 6 and 7: The negative controls with RNA extracted from *R. sphaeroides* Dan3 cultured for 24 h, 48 h and 72 h, respectively as PCR templates.

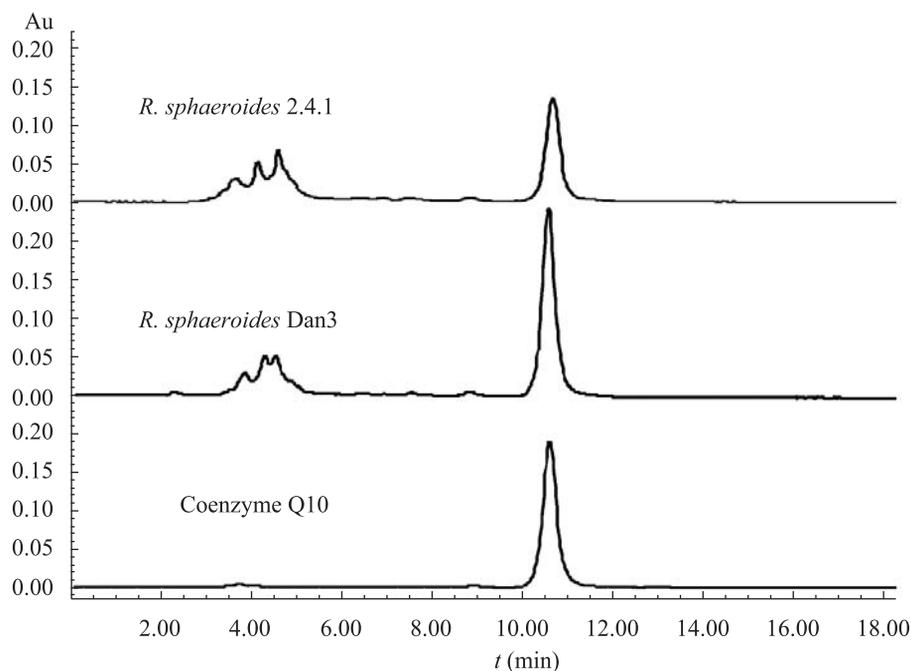


图 7 基因改造类球红细菌辅酶 Q10 的 HPLC 分析

#### Fig. 7 Analysis of coenzyme Q10 from the *R. sphaeroides* by HPLC

注: 辅酶 Q10 的出峰时间在 10.7 min 左右。

Note: The retention time of coenzyme Q10 was ca. 10.7 min.

*oides* Dan3 的辅酶 Q10 的峰面积大于出发菌株。经过和辅酶 Q10 标准品的峰面积定量计算, 突变株比出发菌株的辅酶 Q10 产量提高了 75.29%, 从 15.053 1 mg/L 提高到 26.387 0 mg/L。证明通过基因置换的手段, 在切断合成胡萝卜素分支途径 *crtB* 基因的同时, 添加 *ubiC* 和 *ubiA* 基因, 增强了辅酶 Q10 的生物合成水平。

### 3 讨论

随着人类对自身健康要求的不断提高, 对辅酶 Q10 重要性的认识也在增加, 因此市场对辅酶 Q10 的需求日益增加。目前微生物发酵是辅酶 Q10 的主要生产方式, 对菌种的改造成为提高产量和降低生产成本的重要工作。诱变育种仍然是目前生产菌种的主要来源。然而, 传统的诱变育种费时费力, 因此通过基因改造手段来提高辅酶 Q10 的产量成为研究工作者所追求的一种策略。目前的主要工作集中在大肠杆菌的代谢工程方面, 由于大肠杆菌中天然产生的辅酶 Q 为 Q8, 因此, 一般要先敲除内源的八异戊二烯二磷酸合成酶(Octaprenyl diphosphate synthase, *IspB*)基因, 引入合成十异戊二烯二磷酸合成酶(Decaprenyl diphosphate synthase, *Dds*)基因, Takahashi 等从 *Paracoccus denitrificans* 中克隆了 *dps* 基因, 然后转入大肠杆菌中表达, 从而生产出辅酶 Q10<sup>[25]</sup>。为了提高大肠杆菌生产辅酶 Q10 的能力, 引入并高表达赤藓糖磷酸途径(MEP)或甲羟戊酸(MVA)途径合成更多的异戊二烯前体成为基因改造的一个重要途径。Zahiri 等在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中引入了 *Agrobacterium tumefaciens* 的十异戊二烯二磷酸合成酶基因(*ddsA*)后, 又在大肠杆菌中表达了异源的甲羟戊酸途径的多个基因, 使得产量提高了 1.9 倍<sup>[26]</sup>。提高大肠杆菌自身的一些合成基因的表达也是提高辅酶 Q10 产量的一种策略, Zhang 等研究发现, 用 pET28 载体表达 *A. tumefaciens* 的 *dps* 基因基础上, 共表达 *ubiC*

和 *ubiA* 基因, 摇瓶培养中的辅酶 Q10 产量提高了 5 倍<sup>[16]</sup>。

尽管对大肠杆菌的基因工程改造能够提高其辅酶 Q10 的产量, 然而目前的生产水平和天然的辅酶 Q10 菌种相比还较低, 同时发酵生产中还可能混有辅酶 Q9、Q8 等成分, 增加了提取纯化的成本, 因此不适合于工业生产应用。对市场上生产辅酶 Q10 的主要菌种类球红细菌的深入研究具有重要意义。目前, 这方面的工作主要集中在诱变育种和发酵工艺方面<sup>[12-13,27]</sup>。用基因置换等手段改造类球红细菌生产辅酶 Q10 尚未见报道。本研究以一株产辅酶 Q10 的类球红细菌模式菌株出发, 借鉴了辅酶 Q10 代谢工程研究的结果, 利用一步基因置换突变实验就获得了敲除(减少)流向类胡萝卜素的异戊二烯前体的代谢流, 并表达了来自大肠杆菌的分支酸裂解酶基因 *ubiC* 和 4-羟苯甲酸转移酶基因 *ubiA*, 辅酶 Q10 产量提高了 75.29%, 从 15.053 1 mg/L 提高到 26.387 0 mg/L。目前用摇瓶发酵 48 h 所测试的产量远未达到工业生产水平, 然而本研究为天然辅酶 Q10 生产菌株的基因改造提供了思路, 并且发酵水平可能随着培养基优化和补料发酵等手段的应用有很大的提升空间。

### 参 考 文 献

- [1] Cluis CP, Burja AM, Martin VJ. Current prospects for the production of coenzyme Q10 in microbes[J]. Trends in Biotechnology, 2007, 25(11): 514-521.
- [2] Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2001, 20(6): 591-598.
- [3] Quinzii CM, Hirano M. Coenzyme Q and mitochondrial disease[J]. Developmental Disabilities Research Reviews, 2010, 16(2): 183-188.
- [4] Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2004, 36(4): 381-386.

- [5] Hodgson JM, Watts GF, Playford DA, et al. Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 56(11): 1137–1142.
- [6] Folkers K, Vadhanavikit S, Mortensen SA. Biochemical rationale and myocardial tissue data on the effective therapy of cardiomyopathy with coenzyme Q10[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(3): 901–904.
- [7] Caso G, Kelly P, McNurlan MA, et al. Effect of coenzyme Q10 on myopathic symptoms in patients treated with statins[J]. *The American Journal of Cardiology*, 2007, 99(10): 1409–1412.
- [8] Oh ET, Kim HJ, Oh JT, et al. Synthesis of coenzyme Q10[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012, 2012(26): 4954–4962.
- [9] Lipshutz BH, Lower A, Berl V, et al. An improved synthesis of the “miracle nutrient” coenzyme Q10[J]. *Organic Letters*, 2005, 7(19): 4095–4097.
- [10] Lipshutz BH, Mollard P, Pfeiffer SS, et al. A short, highly efficient synthesis of coenzyme Q(10)[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(48): 14282–14283.
- [11] Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, et al. Production of ubiquinone-10 using bacteria[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 1998, 44(1): 19–26.
- [12] Ha SJ, Kim SY, Seo JH, et al. Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for coenzyme Q10 production by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(5): 974–980.
- [13] Yen HW, Shih TY. Coenzyme Q10 production by *Rhodobacter sphaeroides* in stirred tank and in airlift bioreactor[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2009, 32(6): 711–716.
- [14] Choi JH, Ryu YW, Seo JH. Biotechnological production and applications of coenzyme Q10[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(1): 9–15.
- [15] Nichols BP, Green JM. Cloning and sequencing of *Escherichia coli* *ubiC* and purification of chorismate lyase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(16): 5309–5316.
- [16] Zhang D, Shrestha B, Li Z, et al. Ubiquinone-10 production using *Agrobacterium tumefaciens* *dps* gene in *Escherichia coli* by coexpression system[J]. *Molecular Biotechnology*, 2007, 35(1): 1–14.
- [17] Mackenzie C, Choudhary M, Larimer FW, et al. The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1[J]. *Photosynthesis Research*, 2001, 70(1): 19–41.
- [18] Suwanto A, Kaplan S. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes[J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(11): 5850–5859.
- [19] Anthamatten D, Hennecke H. The regulatory status of the *fixL*- and *fixJ*- like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*[J]. *Molecular & General Genetics : MGG*, 1991, 225(1): 38–48.
- [20] Fellay R, Frey J, Krisch H. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of gram-negative bacteria[J]. *Gene*, 1987, 52(2-3): 147–154.
- [21] Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, et al. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria[J]. *Gene*, 1988, 70(1): 191–197.
- [22] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. New York: cold spring harbour laboratory press, 2001.
- [23] Donohue TJ, Kaplan S. Genetic techniques in Rhodospirillaceae[J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 204: 459–485.
- [24] Sistrom WR. A requirement for sodium in the growth of *Rhodopseudomonas spheroides*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1960, 22(3): 778–785.
- [25] Takahashi S, Nishino T, Koyama T. Isolation and expression of *Paracoccus denitrificans* decaprenyl diphosphate synthase gene for production of ubiquinone-10 in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 16(2): 183–190.
- [26] Zahiri HS, Yoon SH, Keasling JD, et al. Coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli* strains engineered with a heterologous decaprenyl diphosphate synthase gene and foreign mevalonate pathway[J]. *Metabolic Engineering*, 2006, 8(5): 406–416.
- [27] Kien NB, Kong IS, Lee MG, et al. Coenzyme Q10 production in a 150-l reactor by a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(5): 521–529.