

产鲨烯重组大肠杆菌的构建及发酵研究

厉元, 韩姝, 张伟, 胡又佳, 谢丽萍*

中国医药工业研究总院 上海医药工业研究院, 上海 201203

摘要: 鲨烯是一种在食品、医药等行业有着广泛应用的三萜类化合物。大肠杆菌被认为是非常有潜力的合成鲨烯的底盘细胞。为提高大肠杆菌内鲨烯的合成水平, 以三个诱导型启动子 p3-lac、p6-lac、p10-lac 强度为水平, 以 *dxs*、*idi*、*ispA* 三个 4-磷酸甲基赤藓糖醇途径 (methylerythritol 4-phosphate pathway, MEP) 的限速酶基因作为因素, 进行正交设计, 同时引入鲨烯合酶基因, 构建了 9 株重组菌株进行鲨烯发酵实验。通过绿色荧光蛋白表达水平确定了 p3-lac 启动子强度相对最强, p10-lac 相对最弱。通过分析正交发酵实验数据的极差, 发现 *dxs* 是影响鲨烯产量最主要的因素, 其次是 *ispA*, 最后是 *idi*, 且三个因素最佳水平组合所对应的菌株为 1063/DE3, 产量达到了 450 mg/L。最终获得了一株鲨烯产量相较于出发菌株提高了 681 倍的产鲨烯重组大肠杆菌菌株, 并为提高大肠杆菌内鲨烯产量提供了新的策略。

关键词: 鲨烯; MEP 途径; 限速酶; 启动子强度; 大肠杆菌

中图分类号: Q78 文献标识码: A

Construction and fermentation study of squalene-producing recombinant *Escherichia coli*

LI Yuan, HAN Shu, ZHANG Wei, HU You-jia, XIE Li-ping*

Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China

Abstract: Squalene is a triterpenoid compound which has been widely used in the food and pharmaceutical industries. *Escherichia coli* is considered a highly promising chassis cell for the synthesis of squalene. In order to increase squalene production in *E. coli*, an orthogonal design was conducted using three genes *dxs*, *idi* and *ispA* in MEP pathway as factors and three inducible promoters of different strengths, p3-lac, p6-lac, p10-lac as levels to construct nine recombinant strains for fermentation by inducing squalene synthase gene. The relative strength of the three promoters was determined by the expression level of green fluorescent protein. The p3-lac promoter had the strongest relative strength, while the p10-lac promoter had the weakest relative strength. By analyzing the extreme deviation of the fermentation data, it was found that *dxs* was the most dominant factor affecting squalene yield, followed by *ispA* and *idi*. The strain corresponding to the optimal level combination of the three factors was 1063/DE3, which achieved a yield of 450 mg/L. Overall, an *E. coli* strain with a 681-fold increase in squalene production compared to the original strain has been obtained and a new strategy for increasing squalene production in *E. coli* has been provided in this study.

Key words: squalene; MEP pathway; rate-limiting enzyme; promoter strength; *Escherichia coli*

鲨烯 (Squalene) 最早在角鲨属鲨鱼的肝脏中被发现, 小鳍鸥鲨等鲨鱼的肝油中鲨烯占比约 95%, 这也使得鲨鱼肝油是鲨烯最主要、最易获取的来源^[1]。鲨烯是一种天然的抗氧化剂, 应用非常广泛, 常被用于日化产品中^[2], 对结肠癌等疾病也具有治疗效果, 还可用作疫苗佐剂^[3]。2022 年全球鲨烯市场规模就已达到 1.41 亿美元^[4], 随着鲨烯在日化、医疗、保健品等行业越加广泛地应用, 鲨鱼肝油已经不能满足鲨烯日益增长的市场需求, 寻找新的鲨烯生产方式就变得非常迫切。植物首先被尝试用于生产鲨烯, 橄榄、尖尾芋等多种植物均可合成鲨烯^[5,6], 其中从橄榄油中分离鲨烯率先被用于商业化生产, 但仍然存在纯化成本高, 受植物生长周期影响大, 难以扩大生产规模等问题^[5]。

除了动植物之外, 微生物也具有较大的鲨烯生产潜力, 其主要通过 2-C-甲基 d-赤藓糖醇-4-磷酸途径 (MEP 途径) 和甲羟戊酸途径 (Mevalonate pathway, MVA) 合成鲨烯^[7]。酵母可以通过 MVA 途径合成角鲨烯, 是常用的合成角鲨烯的转基因宿主细胞^[8]。Tominaga、Liu、Paramasivan 等^[9-11]先后分别在酿酒酵母中通过下调 ERG1 基因, 过表达 ANT1 基因, 过表达 tHMG1 和 POS5 基因获得了 475.72 mg/L、1 698.02 mg/L 以及 1.9 g/L 的鲨烯产量。而在大肠杆菌中存在 MEP 通路, 但缺失鲨烯合酶基因, 天然状态下无法合成鲨烯, 通过引入角鲨烯合酶基因, 可以将 MEP 途径产生的两分子法呢基二磷酸 (FPP) 合成一分子角鲨烯^[11]。大肠杆菌因其发酵周期短、培养环境简单等优点, 被认为具有较高的鲨烯生产潜力, Kataami 等^[12]通过在大肠杆菌内表达 hSQS 等方法获得了 230 mg/L 的鲨烯产量。*dxs*、*idi* 以及 *ispA* 被认为是 MEP 途径上的主要限速酶, 过表达这三个酶可减少中间产物的积累, 并使更多碳通量流向鲨烯的合成^[13]。但限速酶的表达强度并不是越高越好, 研究证明, MEP 途径中一些中间代谢产物具有毒性^[14], 且中间产物的积累可能导致反馈抑制等现象出现^[15], 不利于鲨烯的合成。所以 *dxs*、*idi* 以及 *ispA* 采用不同强度启动子进行组合搭配筛选获得最佳组合可以使代谢流达到平衡, 更有利于提高鲨烯产量。

本研究通过设计并合成三个不同强度的启动子, 以连接绿色荧光蛋白的方式比较其相对强度, 依据 L9 (3⁴) 正交表, 以 *dxs*、*idi*、*ispA* 三个基因为因素, 以启动子强度为水平, 进行三因素三水平的正交实验, 以寻找产量最高的组合, 开发一种高产鲨烯的大肠杆菌。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本文所使用引物见表 1, 融合启动子和转录终止子的序列见表 2, 所使用质粒与菌株见表 3。

本文所用仪器与试剂如下, 感受态 DH5 α (批号: AK1185A)、*Cla*I (批号: AK30630A)、

*Bam*HI (批号: K1081A)、*Nco*I (批号: K8952AA)、*Eco*RI (批号: K1405BA)、*Pst*I (批号: K1201AA)、*Not*I (批号: AL52306A)、*Kpn*I (批号: K2101AA)、*Bgl*II (批号: K9011BA)、DNA 连接酶 (批号: AIF2071A)、PrimeSTAR® Max DNA polymerase (批号: AN50579A)、Ex Taq (批号: AIG0901A)、Infusion 试剂盒 (批号: AL60830A) 均购自大连宝日医生物技术有限公司; 感受态 BL21/DE3 (批号: CB105-02, 天根生化科技(北京)有限公司); 氨苄青霉素 (批号: YK0423B4012J)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) (批号: K80822)、0.45 μ m 微孔滤膜 (批号: F513133-0001) 及 0.22 μ m 微孔滤膜 (批号: F513134-0001) 均购自上海生工生物工程技术有限公司; Taq Master Mix (批号: TE132K7, 南京诺唯赞生物技术股份有限公司); T4 Fast DNA Ligase (批号: B600511)、Hypersil Gold aq 色谱柱 (批号: 25305-012101) 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; DNA 胶回收试剂盒 (批号: AP-PCR-4, 康宁(上海)有限公司); 鲨烯标准品 (批号: CDCT-C16973700, 质量分数 100%, LGC Limited); 正己烷 (批号: 20170629, 分析纯)、乙腈 (批号: 20191129, 分析纯)、丙酮 (批号: 20191216, 分析纯) 均购自国药集团化学试剂有限公司。

酶标仪 (Synergy2, BioTek); HPLC (1200 Infinity, 安捷伦科技(中国)有限公司); 气相色谱柱 (Rxi-5Sil MS, Rxi 公司); 质谱仪 (GCMS-QP2010SE, 岛津)。引物合成以及测序服务由上海生工生物工程技术有限公司提供; 载体 pETDuet-1 为实验室保存; 出发菌株 pETDuet-yss/DE3 及质粒 pETDuet-yss 为本实验室保存。

表 1 引物序列

Table1 Primer sequence

引物编号 Primer number	序列 Sequence
1	CGGCGTAGAGGATCGAGATCGCCATGGAAAAATTTATTGCTTATT
2	GGCAATATCAAACCTCATTAGAAAACCTCCTTAGCATG
3	CATGCTAAGGAGGTTTTCTAATGAGTTTTGATATTGCC
4	CGTTTTATTTGATGCCTGGTTATGCCAGCCAGGCCTTGA
5	TCAAGGCCTGGCTGGCATAACCAGGCATCAAATAAAACG
6	CTTTCGTTTTATTGATGCCTGGTTATGCCAGCCAGGCCTTGA
7	CGGCGTAGAGGATCGAGATCGCCATGGTTGACAATTAATCATCCGGC
8	GTATTTGGCAATATCAAACCTCATTAGAAAACCTCCGCAGC
9	GCTGCGGAGGGTTTTCTAATGAGTTTTGATATTGCCAAATAC
10	CGGCGTAGAGGATCGAGATCGCCATGGTTTCAATTAATCATCCGGC
11	GTATTTGGCAATATCAAACCTCATTAGAAAACCTTCCCTCAGC
12	GCTGAGGAAAGTTTTCTAATGAGTTTTGATATTGCCAAATAC

13 AGCTCAGGATCCTTTCAATTTAATCATCCGGC
 14 TGACGTGTTCCGTTTGCATTAGAACTTTCCTCAGCATG
 15 CATGCTGAGGAAAGTTTCTAATGCAAACGGAACACGTCA
 16 CGTTTTATTTGATGCCTGGTTATTTAAGCTGGGTAAATG
 17 CATTACCAGCTTAAATAACCAGGCATCAAATAAACG
 18 AGCTCAGAATTCTATAAACGCAGAAAGGCCA
 19 AGCTCAGGATCC TTGACAATTAATCATCCGGC
 20 ATGACGTGTTCCGTTTGCATTAGAAACCCTCCGCAGC
 21 GCTGCGGAGGGTTTCTAATGCAAACGGAACACGTAT
 22 AGCTCAGGATCCAAAAAATTTATTTGCTTATT
 23 AAATGACGTGTTCCGTTTGCATTAGAAAACCTCCTTAGC
 24 GCTAAGGAGGTTTTCTAATGCAAACGGAACACGTCAATT
 25 ACTGCTGCAG TTTCAATTTAATCATCCGGC
 26 AGTTGCTGCGGAAAGTCCATTAGAACTTTCCTCAGCATG
 27 CATGCTGAGGAAAGTTTCTAATGGACTTTCGCAGCAACT
 28 CGTTTTATTTGATGCCTGGTTATTTATTACGCTGGATG
 29 CATCCAGCGTAATAAATAACCAGGCATCAAATAAACG
 30 AGCTCAGCGCCGCTATAAACGCAGAAAGGCCAC
 31 ACTGCTGCAG AAAAAATTTATTTGCTTATT
 32 AGTTGCTGCGGAAAGTCCATTAGAAAACCTCCTTAGCATG
 33 CATGCTAAGGAGGTTTTCTAATGGACTTTCGCAGCAACT
 34 ACTGCTGCAG TTGACAATTAATCATCCGGC
 35 AGTTGCTGCGGAAAGTCCATTAGAAACCCTCCGCAGCATG
 36 CATGCTGCGGAGGGTTTTCTAATGGACTTTCGCAGCAACT
 37 ACTACAGATCTATGGGAAAACCTCATCGAACT
 38 ACTACGGTACCCTAATCTCTCAGAGGAAAC

表 2 融合启动子序列和转录终止子序列

Table 2 Fusion promoter sequence and transcription terminator sequence

名称	序列
Name	Sequence
融合启动子	p3-lac AAAAAATTTATTTGCTTATTAATTCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAGGAATTG TGAGCGGATAACAATTCGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATG AAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGCTAAGGAGGTTTTCTAATG TTGACAATTAATCATCCGGCTCGTAATGTTTGTGGAGGAATTGTGAGCGGATAA
	Fusion promoter p6-lac CAATTCGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTT CGTACTGAAACATCTTAATCATGCTGCGGAGGGTTTTCTAATG TTTCAATTTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAGGAATTGTGAGCGGATAA
	p10-lac CAATTCGGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTT CGTACTGAAACATCTTAATCATGCTGAGGAAAAGTTTCTAATG
终止子	CCAGGCATCAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTT
Terminators	dpl ATCTGTTGTTTGTGCGTGAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCG GGTGGGCCTTCTGCGTTTATA

表 3 质粒与菌株

Table 3 Plasmids and strains

名称 Name	相关特征 Related characteristic	来源 Source
<i>E. coli</i> DH5 α	F- ϕ 80 lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺) phoA, supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -	大连宝日医生物有 限公司
BL21(DE3)	F-ompThsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)	天根生化科技(北 京)有限公司
pETDuet-yss/DE3	BL21(DE3)/pETDuet-yss	本实验构建
333/DE3	BL21(DE3)/333	本实验构建
菌株 366/DE3	BL21(DE3)/366	本实验构建
Strains 31010/DE3	BL21(DE3)/31010	本实验构建
636/DE3	BL21(DE3)/636	本实验构建
6610/DE3	BL21(DE3)/6610	本实验构建
6103/DE3	BL21(DE3)/6103	本实验构建
10310/DE3	BL21(DE3)/10310	本实验构建
1063/DE3	BL21(DE3)/1063	本实验构建
10106/DE3	BL21(DE3)/10106	本实验构建
pETDuet-1	ColE1 origin; AmpR; PT7	本实验室保存
pETDuet-yss	ColE1 origin; AmpR; PT7::yss	本实验室保存
333	ColE1 origin; AmpR; p3-lac::dxs; p3-lac::idi; p3-lac::ispA; PT7:: yss	本实验构建
366	ColE1 origin; AmpR; p3-lac::dxs; p6-lac::idi; p6-lac::ispA; PT7:: yss	本实验构建
31010	ColE1 origin; AmpR; p3-lac::dxs; p10-lac::idi; p10-lac::ispA; PT7:: yss	本实验构建
质粒 636	ColE1 origin; AmpR; p6-lac::dxs; p3-lac::idi; p6-lac::ispA; PT7:: yss	本实验构建
Plasmids 6610	ColE1 origin; AmpR; p6-lac::dxs; p6-lac::idi; p10-lac::ispA; PT7:: yss	本实验构建
6103	ColE1 origin; AmpR; p6-lac::dxs; p10-lac::idi; p3-lac::ispA; PT7:: yss	本实验构建
10310	ColE1 origin; AmpR; p10-lac::dxs; p3-lac::idi; p10-lac::ispA; PT7:: yss	本实验构建
1063	ColE1 origin; AmpR; p10-lac::dxs; p6-lac::idi; p3-lac::ispA; PT7:: yss	本实验构建
10106	ColE1 origin; AmpR; p3-lac::dxs; p3-lac::idi; p6-lac::ispA; PT7:: yss	本实验构建

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒 P3、P6、P10 的构建方法

按表 2 合成 p3-lac、p6-lac、p10-lac 三片段后, 分别将其与合成的 EGFP 绿色荧光蛋白

基因通过 overlap PCR 的方式进行连接，随后通过 infusion 的方式分别克隆到通过 *Cla*I 和 *Bam*HI 双酶切去除 T7 启动子的 pETDuet-1 载体上，构建 P3、P6、P10 质粒。

1.2.2 含不同启动子的 *dxs*、*idi*、*ispA* 表达盒片段构建方法

提取大肠杆菌染色体基因组，分别设计引物（见表 1），PCR 扩增 *dxs*、*ispA* 和 *idi* 三个基因（以 K12MG1655 为模板，用表 1 引物进行分别扩增，基因登录号分别 *dxs*: ID945060、*idi*: ID949020、*ispA*: ID 945064）。在生工合成 dp1 等序列，将 *dxs*、*idi*、*ispA* 与 dp1 分别进行 overlap PCR 得到片段 *dxs*-dp1、*idi*-dp1 和 *ispA*-dp1。将 p3-lac、p6-lac、p10-lac 与 *dxs*-dp1、*idi*-dp1、*ispA*-dp1 再次通过 overlap PCR 连接得到启动子强度不同的表达盒：p3-lac-*dxs*-dp1、p6-lac-*dxs*-dp1、p10-lac-*dxs*-dp1、p3-lac-*idi*-dp1、p6-lac-*idi*-dp1、p10-lac-*idi*-dp1、p3-lac-*ispA*-dp1、p6-lac-*ispA*-dp1、p10-lac-*ispA*-dp1。

1.2.3 含 *dxs*、*idi*、*ispA* 三基因的重组质粒构建方法

按照 L9 (3⁴) 正交表设计基因组合，将含有不同基因的三个表达盒通过 overlap PCR 的方式连接成一个片段，随后通过 infusion 的方式克隆到去除 T7 启动子的 pETDuet-1 载体的第一个多克隆位点上，随后在第二个多克隆位点插入合成的鲨烯合酶 *yss* 基因。

1.2.4 重组菌株构建方法

取 10 μ L 构建好的重组质粒，加入到冰浴至融化的 100 μ L 感受态 DH5 α 或 BL21/DE3 中，轻敲混匀后冰浴 30 min，随后使用 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 45 s，并再次冰浴 5 min，加入 900 μ L LB 培养基后 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 培养 1 h，随后均匀涂布到含 100 mg/L 氨苄青霉素的固体 LB 平板中，37 $^{\circ}$ C 静置培养 16 h，随机挑选 5 个单菌落进行测序。

1.2.5 菌株发酵培养方法

将保存的菌液按照 1%的比例接种到含 100 mg/L 氨苄青霉素的 10 mL LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C 220 r/min 培养 12 h，随后按 1%的比例接种到含 100 mg/L 氨苄青霉素的合适体积 LB 培养基中，在摇瓶中以 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 培养约 1.5 h 至 OD₆₀₀ 达到 0.6，随后加入终浓度为 0.1 mmol 的 IPTG，30 $^{\circ}$ C 180 r/min 培养 48 h 获取发酵液。

1.2.6 荧光蛋白表达水平测定方法

收集 10 mL 发酵完的菌液，5 500 r/min 离心 10 min。将收集到的菌体沉淀使用 10 mL PBS 洗涤三次，每次洗涤后均 5 500 r/min 离心 10 min。将洗涤好的菌体沉淀使用 10 ml PBS 进行重悬，测定其在 600 nm 处的吸光度值，并使用 PBS 稀释调整至 OD₆₀₀=1，随后取 100 μ L 稀释好的菌液到 96 孔板中，使用酶标仪在 485 nm 激发光与 528 nm 吸收光条件下测定吸光度。

1.2.7 鲨烯表达水平测定及产物验证方法

收集 10 mL 诱导完的菌液，5 500 r/min 离心 10 min，随后使用 1% (W/V) NaCl 溶液洗涤菌体沉淀，再使用 1 mL 1% (W/V) NaCl 溶液重悬菌体沉淀。加入 5 mL 丙酮并涡旋混匀后，将菌液超声 30 min 以充分提取鲨烯。向超声完的菌液中加入 2 mL 正己烷，颠倒混匀后 5 500 r/min 离心 15 min，转移上层的正己烷萃取液至 5 mL 离心管中，并使用真空干燥箱充分挥干。向挥干的离心管中加入 500 μ L 20 : 80 (V/V) 的乙腈-丙酮混合溶液，充分振荡溶解后使用 0.22 μ m 滤膜进行过滤，用于 HPLC 以及 GC-MS 测定。

在 5 mL 容量瓶中定容含 5 mg 鲨烯标准品的 20 : 80 (V/V) 的乙腈-丙酮混合溶液作为母液，随后将母液分别稀释到 2、4、10、20、40、100、200、300、400 mg/L 制备鲨烯标准溶液，用 0.22 μ m 滤膜进行过滤后用于绘制 HPLC 标准曲线。

使用 Hypersil Gold aq (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 色谱柱搭建 HPLC 系统，使用 98% (V/V) 的乙腈溶液以 1 mL/min 的流速平衡色谱柱 60 min，再按照由大到小的梯度浓度进样鲨烯标准溶液，每次进样后使用 98% (V/V) 的乙腈溶液以 1 mL/min 的流速洗脱 20 min，随后进样鲨烯样品，每次进样后使用 98% (V/V) 的乙腈溶液以 1 mL/min 的流速洗脱 40 min，检测完成后以 1 mL/min 的流速使用 90% (V/V)、50% (V/V)、10% (V/V)、50% (V/V)、90% (V/V) 甲醇溶液分别平衡 30 min，并最终使用 90% (V/V) 的甲醇溶液保存 HPLC 柱。

使用 Rxi-5ms (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) 色谱柱及 SHIMADZU GCMS-QP2010SE 质谱仪搭建 GC-MS 系统，按如下条件进行鲨烯标准品及发酵产物的定性验证。分离条件：进样口温度：280 $^{\circ}$ C, 30 min 的温度梯度：开始于 200 $^{\circ}$ C 维持 2 min，20 $^{\circ}$ C/min 加热柱温到 250 $^{\circ}$ C，最终维持 250 $^{\circ}$ C 在 20.5 min；检测模式：EI 模式；进样量：1 μ L。

2 结果

2.1 启动子强度比较

将构建好的 P3、P6、P10 质粒分别转化 BL21/DE3 菌株中，构建 P3E、P6E、P10E 重组菌株，并进行诱导发酵，随后对发酵好的菌液进行荧光测定。EGFP 的表达强度与启动子的强度呈正相关，但是即使没有 IPTG 的诱导，EGFP 也会发生泄露表达，所以每个菌株均发酵三个平行组，其中一组作为空白组不进行诱导，另外两组的荧光强度在扣除空白组的本底荧光强度后进行统计。

发酵结果显示，p3-lac 启动子的强度最高，所对应的 P3E 菌株荧光强度为 7 401.5（见图 1），是含有 p6-lac 启动子的 P6E 菌株的 2.97 倍，是含有 p10-lac 启动子的 P10E 菌株的 21.74 倍，所以三个启动子的相对强度为 p3-lac>p6-lac>p10-lac。

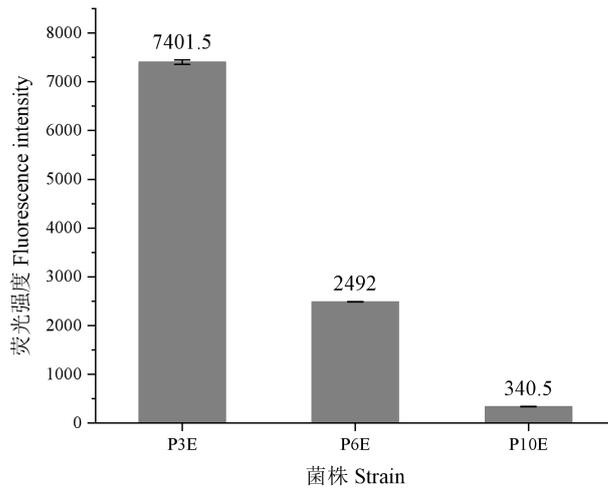


图 1 各菌株荧光强度

Fig. 1 Fluorescence intensity of strains

2.2 启动子和关键酶基因组合搭配的正交实验设计及重组菌株的构建和验证

三个不同强度的启动子 p3-lac、p6-lac、p10-lac 与三个不同基因 *dxs*、*idi*、*ispA* 可以对应组成 27 种组合，为了减少不必要的工作量，本文即将启动子强度作为水平，不同基因作为因素，采取 L9 (3⁴) 的正交表设计正交实验，如正交实验设计表（见表 4），共构建 9 种重组质粒（见图 2），并将构建好的重组质粒转化进 BL21/DE3 菌株中以构建重组菌株。

对构建好的 9 个重组质粒进行酶切验证。使用 *Nco*I 与 *Not*I 进行双酶切，DNA 凝胶电泳结果如图 3，在 Marker 所指示的 3 000~5 000 bp 以及 5 000~8 000bp 范围内，均存在一个明显条带，与线性化 pETDuet-1 载体以及 *dxs*-*idi*-*ispA* 表达盒大小相符，证明 *dxs*、*idi* 与 *ispA* 已经成功构建到重组质粒中。使用 *Bgl*II 与 *Kpn*I 进行双酶切，DNA 凝胶电泳结果如图 4，在 Marker 所指示的 1 000~2 000 bp 以及 8 000 bp 以上范围内，均存在一个明显条带，与线性化 pETDuet-1 载体以及 *yss* 表达盒大小相符，证明 *yss* 已经成功构建到重组质粒中。

表 4 三因素三水平正交实验设计表

Table 4 Three-factor three-level orthogonal experimental design table

质粒 Plasmid	基因 Gene		
	<i>dxs</i>	<i>idi</i>	<i>ispA</i>
333	p3-lac+ <i>dxs</i> +dp1	p3-lac+ <i>idi</i> +dp1	p3-lac+ <i>ispA</i> +dp1
366	p3-lac+ <i>dxs</i> +dp1	p6-lac+ <i>idi</i> +dp1	p6-lac+ <i>ispA</i> +dp1
31010	p3-lac+ <i>dxs</i> +dp1	p10-lac+ <i>idi</i> +dp1	p10-lac+ <i>ispA</i> +dp1
636	p6-lac+ <i>dxs</i> +dp1	p3-lac+ <i>idi</i> +dp1	p6-lac+ <i>ispA</i> +dp1
6610	p6-lac+ <i>dxs</i> +dp1	p6-lac+ <i>idi</i> +dp1	p10-lac+ <i>ispA</i> +dp1
6103	p6-lac+ <i>dxs</i> +dp1	p10-lac+ <i>idi</i> +dp1	p3-lac+ <i>ispA</i> +dp1

10310	p10-lac+dxs+dp1	p3-lac+idi+dp1	p10-lac+ispA+dp1
1063	p10-lac+dxs+dp1	p6-lac+idi+dp1	p3-lac+ispA+dp1
10106	p10-lac+dxs+dp1	p10-lac+idi+dp1	p6-lac+ispA+dp1

图 2 质粒构建示意图

Fig. 2 Schematic diagram of plasmid construction

图 3 重组质粒 *Nco*I、*Not*I 双酶切电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of recombinant plasmid double enzyme digested by *Nco*I and *Not*I

图 4 重组质粒 *Bgl*II、*Kpn*I 双酶切电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of recombinant plasmid double enzyme digested by *Bgl*II and *Kpn*I

2.3 重组菌株鲨烯产量比较及发酵产物验证

大肠杆菌自身并不含鲨烯合酶基因，所以在自然状态下不能合成鲨烯，本研究所使用的出发菌株是本实验室保存的 pETDuet-yss/DE3 菌株，所用的重组表达质粒 pETDuet-yss 是通过在 pETDuet 质粒上的 T7 启动子后插入鲨烯合酶基因 *yss* 构建获得（见图 5），因而具备合成鲨烯的能力。

由于诱导型启动子可能存在一定量的泄露表达，即使不对 *dxs*、*idi*、*ispA*、*yss* 基因进行诱导表达，也会有一定量的鲨烯产生，因此每个重组菌株均发酵三个平行组，其中一组作为空白组不进行诱导，另外两组的鲨烯产量在扣除空白组的鲨烯产量后进行统计。

出发菌株 pETDuet-yss/DE3 菌株的鲨烯产量测得为 0.66 mg/L，另外 9 株重组菌发酵结果如鲨烯产量表（见图 6）所示，产量最高的重组菌株为 1063/DE3，达到了 450 mg/L，相较于出发菌株提高了 681 倍，产量最低的重组菌株是 366/DE3，产量为 19.44 mg/L，是 1063/DE3 的 4.32%，相较于出发菌株提高了 28 倍，全部使用强启动子的重组菌株为 333/DE3，产量为 30.24 mg/L，是 1063/DE3 的 6.72%。统计极差分析表（见表 5）可见，结合 *dxs*、*idi*、*ispA* 三个因素的 R 值可知，*dxs* 是影响鲨烯产量最主要的因素，其次是 *ispA*，最后是 *idi*。结合三因素三水平平均值图（见图 7）可见，*dxs* 因素的最佳水平为 p10-lac，*idi* 因素的最佳水平为 p6-lac，*ispA* 因素的最佳水平为 p3-lac，所以三个因素最佳组合所对应的菌株为 1063/DE3，这也与发酵结果相符。

对鲨烯表达量最高的 1063/DE3 发酵产物进行 HPLC 及 GC-MS 分析，并与标准品相对照，HPLC 结果如图 8 所示，在鲨烯标准品（见图 8A）中存在保留时间为 14.258 min 的主

峰，此峰即为鲨烯，而在 1063/DE3 发酵产物（见图 8B）中也存在保留时间约为 14.3 min 的峰。在 GC-MS 结果中可见，鲨烯标准品（见图 9 A）与 1063/DE3 发酵产物（见图 9 C）中均出现了保留时间约为 14 min 的单一峰，且质谱分析出二者主峰对应的分子量也均为 410，与鲨烯分子量相符，拟合出相似度最高的结构也均为鲨烯的正确结构（见图 9 B、D），进一步证明 1063/DE3 发酵产物为鲨烯。

图 5 pETDuet-yss 质粒示意图

Fig. 5 Schematic diagram of the pETDuet-yss plasmid

图 6 重组菌鲨烯产量

Fig. 6 Squalene production of recombinant strains

表 5 统计极差分析表

Table 5 Statistical range analysis

项 Item	水平 Level	dxs	idi	ispA
K 值 K Value	3	80	458.31	658.58
	6	400.05	523.18	482.84
	10	1 005.53	504.09	344.16
K 值平均值 K value average	3	26.67	152.77	219.53
	6	133.35	174.39	160.95
	10	335.18	168.03	114.72
最佳水平 Best level		10	6	3
R 值 R value		308.51	21.62	104.81
水平数量 Number of levels		3	3	3
每水平重复数 (r) Number of repetitions per level (r)		3	3	3

图 7 K 值平均值

Fig. 7 K value average

图 8 鲨烯标品与 1063/DE3 发酵产物 HPLC 图谱

Fig.8 HPLC chromatogram of squalene standard and 1063/DE3 fermentation product

注：A：鲨烯标品；B：1063/DE3 发酵产物。

Note: A: Squalene standard; B: 1063/DE3 fermentation product.

图 9 鲨烯标品与 1063/DE3 发酵产物 GC-MS 图谱

Fig.9 GC-MS chromatogram of squalene standard and 1063/DE3 fermentation product

注：A, B：鲨烯标品；C, D：1063/DE3 发酵产物。

Note: A, B: Squalene standard; C, D: 1063/DE3 fermentation product.

3 讨论与结论

本研究中鲨烯产量最高的 1063/DE3 菌株中，三个基因的相对启动强度分别为弱、中、强，而全部使用相对较强启动子的菌株 333/DE3 菌株的产量仅为 1063/DE3 菌株的 6.72%。这也证实了在优化代谢通路的策略中，单一启动子的强度与产量之间并不一定存在正相关关系，产量的提高是多个基因综合调控的结果，所以找到启动子与限速酶之间的最佳搭配使代谢流达到平衡，更有利于提高目标产物产量。

本研究中所构建的三个启动子 p3-lac、p6-lac、p10-lac，其相对强度区别较大，比值为 21.74 : 7.32 : 1。虽然 1063/DE3 菌株所对应的是本研究中鲨烯合成水平最高的启动子-基因组合，但如果进一步构建数量更多、强度区别更小的启动子，可能存在更优的启动子-基因组合，鲨烯合成水平也可能会有进一步的提高。后续研究可以参考 Cordoba 等的工作^[6]，通过改变启动子-10 区和-35 区的保守序列等策略，构建包含一系列不同强度启动子的启动子库，再将其与待调控基因相搭配，采用响应面法等统计学方法可以进一步寻找更高产的启动子-基因组合。

在本研究中，*dxs* 的启动子强度与鲨烯产量呈现负相关关系，而 Lin 等^[7]在研究中发现，*dxs* 的过表达会显著降低蓝藻中柠檬烯的产量，并使菌体生长缓慢，柠檬烯与鲨烯共享了 MEP 代谢通路，所以在本研究中，*dxs* 的过表达也可能对产鲨烯大肠杆菌产生毒性。另外，我们在研究中还发现，非诱导条件下，*dxs* 基因所对应的启动子强度越高，菌体生长越缓慢。可能的原因是本研究所使用的启动子存在泄露表达的情况，p3-lac、p6-lac、p10-lac 启动子均为在组成型启动子中插入 lac 操纵子改造而成乳糖诱导型启动子，并且在进行绿色荧光蛋白诱导表达实验时发现，即使不使用 IPTG 进行诱导，目的基因也会有一定程度的泄露表达，所以可能是泄露表达的 *dxs* 对菌体生长造成了影响。

而在研究中发现，非诱导条件下，*dxs* 基因所对应的启动子强度越高，菌体生长越缓慢，可能是泄露表达的 *dxs* 对菌体生长造成了影响。所以在后续研究中，可以将 p3、p6、p10 启动子改造为异丙苯甲酸酯诱导启动子、 ϵ -己内酰胺诱导启动子等更加高效、严谨、低诱导成本的诱导型启动子^[18]。

过往的一些研究显示, 二甲基焦磷酸烯丙基 (Dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP) 在调节 MEP 途径碳通量上起到了非常重要的作用, 即使提高 DMAPP 前体物质的供应, 也会因为负反馈抑制的存在而导致 DMAPP 浓度保持不变^[19,20], 提高 *ispA* 表达水平可以使 DMAPP 向下游 FPP 转换, 减少 DMAPP 的积累, 从而使鲨烯的产量提高, 这也与本研究 *ispA* 启动子强度与鲨烯产量呈正相关这一结果相符。

在本研究中, 鲨烯合酶来源于耶氏酵母, 通过导入鲨烯合酶, 使大肠杆菌拥有了合成鲨烯的能力, 但其催化效率仍有进一步提高的空间, 在以往的研究中, 经过酶活优化的 *T. elongatus* BP-1 的催化效率就比本研究中所使用的鲨烯合酶提高了 3.5 倍^[12], 在进一步的实验中, 可以比较多种不同来源的鲨烯合酶的活性, 以及通过定向进化等手段进一步提高特异性、稳定性等^[21], 使鲨烯合成的代谢通路更加高效且稳定。

综上, 本研究通过绿色荧光蛋白的表达水平确定三个诱导型启动子 p3-lac、p6-lac、p10-lac 的相对强度, 启动子的相对强度为 p3-lac > p6-lac > p10-lac, 随后通过正交实验的方法, 确定了 *dxs*、*idi*、*ispA* 三个 MEP 途径的限速酶与不同启动子强度的最佳搭配, 找到了 1063/DE3 这一株高产菌株, 使大肠杆菌内鲨烯产量达到 450 mg/L, 相较于出发菌株提高了 681 倍。

参考文献

- 1 Hadinoto S, Idrus S, Smith H, et al. Characteristics squalene of smallfin gulper shark (*Centrophorus moluccensis*) livers from Aru Islands, Mollucas, Indonesia [J]. J Phys Conf Ser, 2020, 1463: 012021.
- 2 Gohil N, Bhattacharjee G, Khambhati K, et al. Engineering strategies in microorganisms for the enhanced production of squalene: advances, challenges and opportunities [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7: 50.
- 3 Tateno M, Stone BJ, Srodulski SJ, et al. Synthetic biology-derived triterpenes as efficacious immunomodulating adjuvants [J]. Sci Rep, 2020, 10: 17090.
- 4 Markets and Markets. Squalene Market by Source (Animal Source (Shark Liver Oil), Vegetable Source (Olive Oil, Palm Oil, Amaranth Oil), Biosynthetic (GM Yeast]), End-use Industry (Cosmetics, Food, and Pharmaceuticals), and Region-Global Forecast to 2028 [EB/OL]. (2023-09-25) [2024-04-12]. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/squalene-market-542345.html>.
- 5 Lozano-Grande MA, Gorinstein S, Espitia-Rangel E, et al. Plant sources, extraction methods, and uses of squalene [J]. Int J Agron, 2018, 2018: 1829160.
- 6 Wang P, Ya C, Peng LC, et al. Study on the chemical constituents from the petroleum ether extract of *Alocasia cucullata* (Lour.) Schott and their breast cancer cell cytotoxicity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2024, 36: 72-77.

- 7 Paramasivan K,Mutturi S.Recent advances in the microbial production of squalene[J].World J Microbiol Biotechnol,2022,38:91.
- 8 Cheng L, Ji T,Zhang M,et al.Recent advances in squalene:Biological activities,sources,extraction,and delivery systems[J].Trends Food Sci Tech,2024,146:104392.
- 9 Tominaga M,Miyazaki K,Hataya S,et al.Enhanced squalene production by modulation of pathways consuming squalene and its precursor[J].J Biosci,2022,134:1-6.
- 10 Liu GS,Li T,Zhou W,et al.The yeast peroxisome:a dynamic storage depot and subcellular factory for squalene overproduction[J].Metab Eng,2020,57:151-161.
- 11 Paramasivan K,HN PK,Mutturi S.Systems-based *Saccharomyces cerevisiae* strain design for improved squalene synthesis[J].Biochem Eng J,2019,148:37-45.
- 12 Katabami A,Li L,Iwasaki M,et al.Production of squalene by squalene synthases and their truncated mutants in *Escherichia coli*[J].J Biosci,2015,119:165-171.
- 13 Ghimire GP,Nguyen HT,Koirala N,et al.Advances in biochemistry and microbial production of squalene and its derivatives[J].J Microbiol Biotechnol,2016,26:441-451.
- 14 Li Q,Fan F,Gao X,et al.Balanced activation of IspG and IspH to eliminate MEP intermediate accumulation and improve isoprenoids production in *Escherichia coli*[J].Metab Eng,2017,44:13-21.
- 15 Hartmann M,Hemmerlin A,Gas-Pascual E,et al.The effect of MEP pathway and other inhibitors on the intracellular localization of a plasma membrane-targeted,isoprenylable GFP reporter protein in tobacco BY-2 cells[J].F1000Res,2013,2:170.
- 16 Cordoba E,Salmi M,León P.Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants[J].J Exp Bot,2009,60:293329-43.
- 17 Lin PC,Zhang F,Pakrasi HB.Enhanced limonene production in a fast-growing cyanobacterium through combinatorial metabolic engineering[J].Metab Eng Commun,2021,12:e00164.
- 18 Huimin YU,Yukun ZHENG,Yan DU,et al.Microbial promoter engineering strategies in synthetic biology[J].Synth Biol(合成生物学),2021,2:598-611.
- 19 Wolfertz M,Sharkey TD,Boland W,et al.Biochemical regulation of isoprene emission[J].Plant Cell Environ,2003,26:1357-1364.
- 20 Wolfertz M,Sharkey TD,Boland W,et al.Rapid regulation of the methylerythritol 4-phosphate pathway during isoprene synthesis[J].Plant Physiol,2004,135:1939-1945.
- 21 Kaur J,Sharma RDirected evolution:an approach to engineer enzymes[J].Crit Rev

Biotechnol,2006,26:165-199.

收稿日期: 2024-03-12 接受日期: xxxx-xx-xx

*通信作者 Tel: 15221895313; E-mail: xieliping@sinopharm.com