

三孢布拉氏霉类胡萝卜素完整合成途径关键基因的分子克隆与原核表达解析

陈玉杨¹, 邵怡璐¹, 王洁¹, 谭泳芝¹, 邹苑^{1,2}, 郑倩望^{1,2}, 林俊芳^{1,2}, 陈谋通³, 叶志伟^{1,2*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 广东省微生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510642) (3. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东广州 510070)

摘要: 三孢布拉氏霉具有增殖快和单位菌体 β -胡萝卜素产量高等优势, 是工业化生产 β -胡萝卜素的主要微生物菌株之一, 其生产的类胡萝卜素符合食品安全标准, 广泛应用于食品、医药等领域。目前, 天然类胡萝卜素主要通过植物提取和微生物发酵获得, 而微生物发酵具备生产周期短和经济效益高等优势。为了阐明三孢布拉氏霉类胡萝卜素生物合成和构建类胡萝卜素异源表达生成工程菌株, 该文克隆了三孢布拉氏霉类胡萝卜素合成通路关键基因并分析其系统进化, 基于基因功能互补原理对类胡萝卜素合成关键酶进行功能解析。该文成功构建了大肠杆菌产 β -胡萝卜素工程菌 *E. coli*-pAC-car G (1.90 mg·g⁻¹ DCW)、*E. coli*-pAC-car B (0.53 mg·g⁻¹ DCW)、*E. coli*-pAC-car RA (0.27 mg·g⁻¹ DCW) 和 *E. coli*-pAC-car G-car B-car RA (0.33 mg·g⁻¹ DCW); 明确了三孢布拉氏霉 *car G*、*car B* 和 *car RA* 基因依次发挥香叶基香叶基焦磷酸合酶、八氢番茄红素脱氢酶和双功能八氢番茄红素合酶/番茄红素环化酶的活性作用。该文为探究三孢布拉氏霉合成类胡萝卜素的完整代谢机制奠定基础。

关键词: 三孢布拉氏霉; 类胡萝卜素; 关键基因; 异源表达; 大肠杆菌

文章编号: 1673-9078(2026)05-55-63

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.5.0464

Molecular Cloning and Prokaryotic Expression of Key Genes Involved in the Complete Carotenoid Biosynthetic Pathway of *Blakeslea trispora*

CHEN Yuyang¹, SHAO Yilu¹, WANG Jie¹, TAN Yongzhi¹, ZOU Yuan^{1,2}, ZHENG Qianwang^{1,2}, LIN Junfang^{1,2}, CHEN Moutong³, YE Zhiwei^{1,2*}

(1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)(2.Research Center for Micro-ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China) (3.Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology in Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, Key Laboratory of Agricultural Microbiome and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510070, China)

引文格式:

陈玉杨,邵怡璐,王洁,等.三孢布拉氏霉类胡萝卜素完整合成途径关键基因的分子克隆与原核表达解析[J].现代食品科技, 2026,42(5):55-63.

CHEN Yuyang, SHAO Yilu, WANG Jie, et al. Molecular cloning and prokaryotic expression of key genes involved in the complete carotenoid biosynthetic pathway of *Blakeslea trispora* [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(5): 55-63.

收稿日期: 2025-04-02; 修回日期: 2025-06-07; 接受日期: 2025-06-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32272298; 31801918); 广东省自然科学基金项目 (2022A1515010057; 2016A030313404); 以农产品为单元的广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目 (农业微生物) (2024CXTD04)

作者简介: 陈玉杨 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: chenyyangy1@163.com

通讯作者: 叶志伟 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物与微生物工程, E-mail: zhwyw@scau.edu.cn

Abstract: *Blakeslea trispora* is widely used as an industrial microorganism for β -carotene production due to its rapid growth and high carotene yield per unit biomass. Carotenoids synthesized by *B. trispora* are extensively applied in food and pharmaceutical industries because they meet food safety standards. Compared with plant extraction, microbial fermentation offers advantages such as shorter production cycles and higher economic efficiency. To elucidate the carotenoid biosynthetic pathway in *B. trispora* and facilitate the construction of heterologous carotenoid-producing strains, key genes involved in carotenoid biosynthesis were cloned and subjected to phylogenetic analysis. Functional characterization of the encoded enzymes was performed using a functional complementation strategy. Recombinant *Escherichia coli* strains capable of producing β -carotene were successfully constructed, including *E. coli*-pAC-car G ($1.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DCW}$), *E. coli*-pAC-car B ($0.53 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DCW}$), *E. coli*-pAC-car RA ($0.27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DCW}$), and *E. coli*-pAC-car G-car B-car RA ($0.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DCW}$). Functional analysis confirmed that *car G* encodes geranylgeranyl pyrophosphate synthase, *car B* encodes phytoene dehydrogenase, and *car RA* encodes a bifunctional enzyme with phytoene synthase and lycopene cyclase activities. These findings clarify the roles of key carotenoid biosynthetic genes in *B. trispora* and provide a foundation for elucidating its complete carotenoid metabolic pathway and for developing engineered strains for carotenoid production.

Key words: *Blakeslea trispora*; carotenoid biosynthesis; key genes; heterologous expression; *Escherichia coli*

三孢布拉氏霉 (*Blakeslea trispora*) 是接合菌门 (Zygomycetes)、毛霉目 (Mucorales)、笄霉科 (Choanephoraceae) 的丝状真菌, 该菌株为异宗接合菌, 包括正 (+) 和负 (-) 两种单性菌株^[1]。三孢布拉氏霉因生长迅速, 单位菌体类胡萝卜素产量高, 被认为是生产天然类胡萝卜素的理想菌株^[2]。研究表明, 三孢布拉氏霉正菌 (+) 和负菌 (-) 共同培养时会产生三孢酸而显著促进菌株类胡萝卜素合成^[3]。同时, 环境胁迫因素 (例如光照、高盐、氧化剂、低温和营养匮乏等) 能通过多种途径刺激有机体积累更多类胡萝卜素^[4,5]。不同物种合成类胡萝卜素的生物途径存在显著差异, 体现在前体物质的合成途径、基因表达功能以及代谢调控机制等方面^[6,7]。例如, 杜氏藻的类胡萝卜素合成途径与植物更接近, 与细菌更疏远^[8]。研究表明, 三孢布拉氏霉高效的类胡萝卜素生物合成系统归因于其显效的关键酶催化能力^[9], 深入探讨三孢布拉氏霉类胡萝卜素合成途径的分子机制, 能更好的利用其生物合成类胡萝卜素的潜力。

类胡萝卜素是由八个异戊二烯单元组成的四萜类化合物, 广泛存在于植物、藻类、水产动物和真菌中^[10], 截至当前, 已有 1 204 种天然类胡萝卜素的分子结构得到解析^[11]。人体无法主动合成类胡萝卜素, 必须通过食物摄取^[12]。类胡萝卜素具有合成维生素 A、抗氧化、抗炎、保护心血管等活性功能^[13,14], 具有重要的生理和健康价值, 广泛应用于食品、化妆品等行业^[15,16]。目前, 市场上主要通过植物提取、化学合成和微生物发酵三种方法获取类胡萝卜素^[17]。类胡萝卜素的含量和种类受到植物的生长环境、品种和季节等的影响, 导致提取和分离过程相对复杂, 效率低^[18]。

天然类胡萝卜素与化学合成的类胡萝卜素在结构、生物活性和生理功能方面可能存在差异, 而化学合成过程产生的副产物存在潜在的安全风险^[19]。微生物发酵生成的类胡萝卜素具有高安全性、高活性等优势^[20], 符合当前人们对食品安全的需求和对健康生活的追求。大肠杆菌是原核生物的典型代表, 具遗传背景清晰、基因组相对简单等优势^[21], 有利于研究外源基因的功能。

该研究采用大肠杆菌表达三孢布拉氏霉合成类胡萝卜素的完整代谢途径, 利用异源表达技术对三孢布拉氏霉类胡萝卜素合成功能酶进行解析。克隆了三孢布拉氏霉合成类胡萝卜素关键基因并对其进行系统进化分析, 构建了系列 β -胡萝卜素合成基因功能互补的大肠杆菌原核表达系统, 利用反相高效液相色谱 (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) 技术对工程菌株菌体提取物进行定性和定量分析, 以期在三孢布拉氏霉合成类胡萝卜素的完整代谢机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

三孢布拉氏霉正菌 (+) (CCTCCAF96002) 和负菌 (-) (CCTCCAF97006) 购于武汉大学中国典型培养物保藏中心; 大肠杆菌 DH5 α 感受态购于上海生工生物有限公司; pAC-BETA 表达质粒由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

Spe I、*Nde* I、*Mlu* I、*Xho* I、*Nco* I 和 *Kpn* I 等

DNA 限制性内切酶, 赛默飞世尔科技公司; Phanta max super-fidelity DNA polymerase(P525)DNA 聚合酶、同源重组试剂盒 (Clonexpress ultra one step cloning kit C116), 南京诺唯赞生物科技有限公司; 克隆载体试剂盒 (pMD™19-T vector cloning kit 6013), 宝日医生物技术(北京)有限公司; 核酸纯化试剂盒 (Hipure gel DNA micro kit D211002)、质粒小提试剂盒 (Hipure plasmid mini kit P100102), 广州美基生物有限公司; 真核生物 RNA 提取试剂盒 (Transzol up plus RNA kit ER501)、反转录试剂盒 (Transscript® one-step gDNA removal and cDNA synthesis super mix AT311), 北京全式金生物技术有限公司; β -胡萝卜素标准品, 上海源叶生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

高效液相色谱仪 LC-2030, 日本岛津制作所; 高速冷冻离心机 5804R, 德国艾本德股份公司; PCR 仪 ETC811, 苏州东胜兴业科学仪器有限公司; 凝胶快速

成像仪 Gel Doc™ XR+, 上海伯乐生命医学产品有限公司; 双层小容量振荡培养箱 MQD-S2R, 上海旻泉仪器有限公司; 生化培养箱 LRH-70, 上海一恒科学仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌器 LS-28HD, 江阴滨江医疗设备有限公司。

1.1.4 引物

该研究所用引物如表 1 所示。

1.2 实验方法

1.2.1 三孢布拉氏霉的培养

分别将三孢布拉氏霉(+)和(-)菌株接种至 PDA 平板培养基 (200 g 去皮土豆的沸水提取物, 20 g·L⁻¹ 葡萄糖、1.5 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、3 g·L⁻¹ KH₂PO₄、2% 琼脂粉), 于 28 ℃培养箱培养 5 d, 待菌丝遍布整块平板后, 分别取菌丝接种到 PDB 培养基 (在 PDA 培养基的基础上去除琼脂粉), 于 28 ℃, 180 r·min⁻¹ 的振荡培养箱内培养 3~5 d。

表 1 引物的具体序列
Table 1 The specific sequences of the primers

引物名称	引物序列 (5'-3')
F-car G	ATGTTGACCTCTAGCAAATCAATTG
R-car G	TTATTCATTGACACTCAAGACATCC
F-car B	ATGTCTGATCAAAAGAAGCATATTGT
R-car B	CTAAATGCGAATATCGTTGCTGT
F-car RA	ATGTCAATACTCACTTATCTGGAATTT
R-car RA	CTAATCAACAAAAAACTCTTAATCTTTCTAGC
F-beta-NdeI-armG	CAATTCAGCGGGTAACCTTGCACATATGATGTTGACCTCTAGCAAATCAATTG
R-beta-SpeI-armG	CTTGAACCCAAAAGGGCGGTAACTAGTTTATTCATTGACACTCAAGACATCC
F-NotI-armRA	GCAGGGAGTGAGAGCGTATCGTGAGCGGCCGCATGTCAATACTCACTTATCTGG
R-MluI-armRA	GCGCCAATCACAACGGTTTTTTTTTCATACGCGTCTAATCAACAAAAAACTCTTAATC
F-car B-XhoI-armY	CAGACGAGATAAAGGATGACTCGAGATGTCTGATCAAAAGAAGCATATTG
R-car B-KpnI-armB	GCAGCGGCGGTTGGCTCATGGTACCCTAAATGCGAATATCGTTGCTG
F-carB-MluI-armRA	GAGTTTTTTTGTGATTAGACGCGTATGTCTGATCAAAAGAAGCATATTG
R-carB-KpnI-armTa	GAACGTCATGGCCGCCGCGGTACCCTAAATGCGAATATCGTTGCTG
F-NcoI-ori-armcmR	CGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAG
R-ori	TGCAAGGTTACCCGCTGAATTG
F-car G-armTET	CAATTCAGCGGGTAACCTTGCAATGTTGACCTCTAGCAAATCAATTG
F-NA-armG	GTCTTGAGTGTCAATGAATAATACCGCCCTTTTGGGTTCAAGC
R-NotI-armNA	CCAGATAAGTGAGTATTGACATGCGGCCGCTCACGATACGCTCTCACTCCCTG
F-pb-seG	ATGGCGACCACACCCGTCCTGTG
F-seBETA	GATGAGACGCTGCATCAGCG
R-crtI	TCATTGCAGATCCTCAATCATCAGGC
F-sebetaB	GCTCTGTTGAGTGTATACAACC
R-sebetaG	AATTGTCCCAAATCGATGCGG

1.2.2 三孢布拉氏霉cDNA的获取

取新鲜菌丝球作为实验材料,利用真核生物 RNA 提取试剂盒,分别提取三孢布拉氏霉(+)和(-)菌株的总 RNA。使用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,具体步骤参照使用说明书。

1.2.3 目的基因的克隆

以 cDNA 为模板,使用 Phanta max super-fidelity DNA polymerase (P525) 高保真酶扩增 *car G*、*car RA* 和 *car B* 基因。PCR 反应体系:模板 30 ng 引物各 2 μL ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Phanta max mix 25 μL 、加 ddH₂O 至 50 μL 。PCR 反应程序为预变性 (95 $^{\circ}\text{C}$, 3 min), 变性 (95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s), 退火 (T_m-3 $^{\circ}\text{C}$, 15 s), 延伸 (72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s/kb), 后延伸 (72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min), 其中变性、退火和延伸步骤共 30 个循环。PCR 结束后,将得到的 PCR 产物和 DNA 分子标准量,加入到 1% 凝胶琼脂糖凝胶 (0.2 g 琼脂糖粉末,加入 20 mL 纯水,加热溶解,加入 1 μL 核酸染料,混匀后倒入模具中,静置凝固后使用) 的样品孔内,电泳条件为 150 V, 300 mA, 15 min。对比 DNA 分子标准量,观察条带是否符合预期大小,选择大小正确的条带使用核酸纯化试剂盒进行纯化。以目的基因为模板,使用带同源臂的引物,扩增出带同源臂的目的片段,具体操作同上。

1.2.4 系统进化树的构建

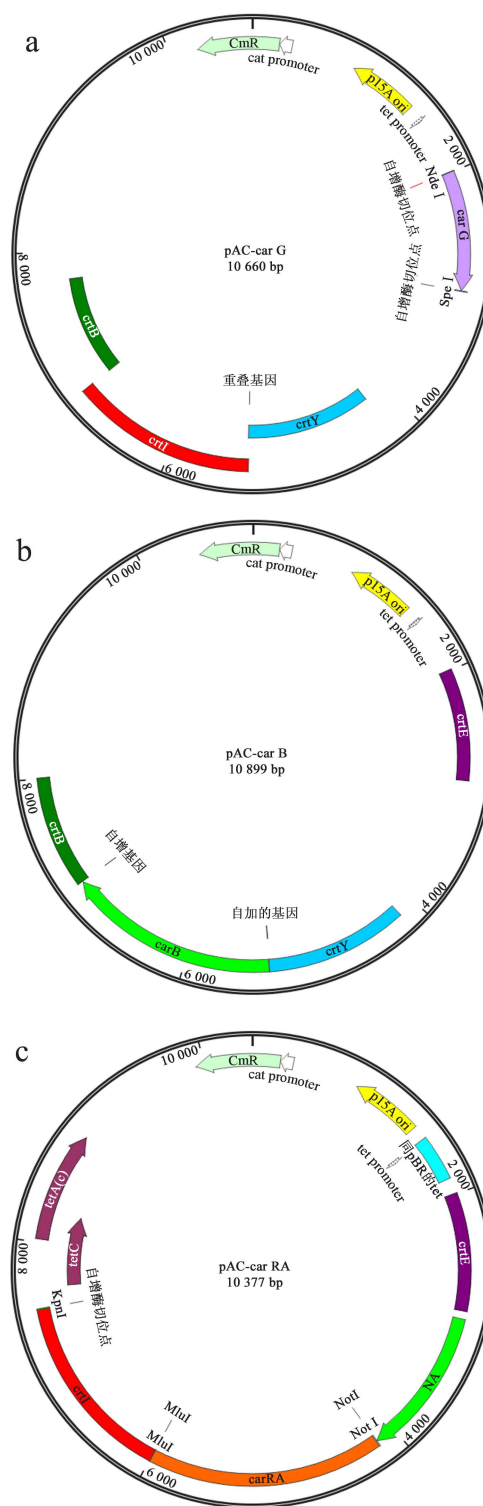
系统进化树 (Phylogenetic tree) 是一种利用树状分支结构来展示不同物种或基因之间进化关系的工具^[22]。该研究使用 MAGE11 软件对三孢布拉氏霉类胡萝卜素合成基因 *car G*、*car RA* 和 *car B* 编码的氨基酸序列及从 NCBI 的 GenBank 数据库中检索的相关物种的氨基酸序列进行对比,采用邻接法 (Neighbor-Joining Method) 构建系统进化树。

1.2.5 表达载体的构建

该研究构建表达载体选用同源重组方法,将目的基因的表达框插入 pAC-BETA 载体的相应位置当中,各表达载体如图 1 所示。酶切体系为原始载体 2 μg 、10 $\times$ Fast Digest Buffer 4 μL 、限制性内切酶 A 和 B 各 2 μL ,加 ddH₂O 补到 40 μL ,混合均匀制备成酶切反应液,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中孵育 2 h。结束后取少量酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,根据 DNA 分子标准量判断酶切后的条带是否正确。利用同源重组试剂盒,将线性化载体与各自带有同源臂的目的基因进行连接,连接反应液组成及连接条件参照说明书。

将连接产物通过热激转化至大肠杆菌感受态细胞,将得到的已复苏菌液均匀涂布于含有 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉

素 (称取 0.25 g 氯霉素溶于 10 mL 无水乙醇,0.22 μm 滤膜过滤除菌后使用) 的 LB 抗性平板 (酵母提取粉 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 胰化蛋白胨 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 2% 琼脂粉, pH 值 7.4) 上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑取转化子进行菌落 PCR 鉴定, 将条带正确的转化子扩大培养, 接种于 5 mL 含 5 μL 氯霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的振荡培养箱中培养 12~16 h。收集菌体提取质粒, 得到的质粒送至测序公司进行测序。



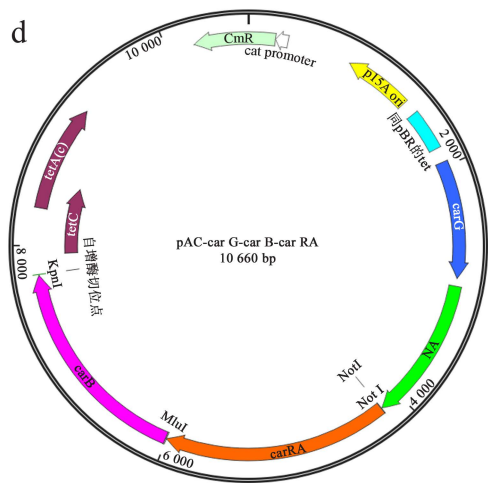


图 1 各大肠杆菌表达载体的示意图

Fig.1 Schematic diagrams of various *E. coli* expression vectors
注: a: 表达载体 pAC-car G; b: 表达载体 pAC-car RA; c: 表达载体 pAC-car B; d: 表达载体 pAC-car G-car B-car RA。

1.2.6 转化子色素的提取

将工程菌株 *E. coli*-pAC-car G、*E. coli*-pAC-car B、*E. coli*-pAC-car RA、*E. coli*-pAC-car G-car B-car RA 分别以 1% 的接种量接种于含有 60 mL LB 液体培养基（含 60 μ L 氯霉素）中，在 37 $^{\circ}$ C，200 r $\cdot$ min $^{-1}$ 的振荡培养箱中培养 12 h 后，加入 60 mL LB 液体培养（含 60 μ L 氯霉素），继续培养 12 h。参照文献^[23]的方法提取工程菌株的类胡萝卜素。具体步骤如下：1、收集 50 mL 发酵液，在 4 $^{\circ}$ C，8 000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 的条件下离心 10 min，丢弃上清液；2、用超纯水重新悬浮沉淀菌体，随后在 4 $^{\circ}$ C，8 000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 的条件下离心 10 min，丢弃上清液；3、加入 500 μ L 丙酮，涡旋振荡分散沉淀物，丙酮能破坏大肠杆菌的细胞壁，使类胡萝卜素释放出来并溶解在丙酮里；4、在 55 $^{\circ}$ C 的金属浴中处理 15 min，每隔 5 min 振荡一次；5、在 4 $^{\circ}$ C，最高转速的条件下离心 10 min，收集上清液；6、剩余的沉淀物按照步骤 3~5 重复处理一次；7、收集所有的上清液并用丙酮定容到 1 mL，保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。再取 50 mL 发酵液，测定其菌体干质量，按照步骤 1~2 进行处理，将得到的菌体沉淀物在 65 $^{\circ}$ C、避光的条件下烘干至恒重，记录质量。

1.2.7 色素提取物的RP-HPLC分析

β -胡萝卜素标准品配制：准确称取 2 mg 的类胡萝卜素标准品，使用丙酮定容到 20 mL，制成 0.1 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的标准品母液。依次稀释成浓度为 1.25、2.5、5、10、20 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 的标准品溶液，经过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤，进行 RP-HPLC 检测。得到 β -胡萝卜素标准曲线为： $Y=12\ 105X-2\ 561.3$ ， $R^2=0.999\ 5$ 。

参照文献^[24]的实验方法，确定色谱条件：色谱柱，J&K Scientific C18 反相柱（250 $\times$ 4.6 mm, 5.0 μ m）；紫外检测波长，450 nm；流动相，甲醇：乙腈：CH₂Cl₂=85:12:3（V/V/V）（含 0.4 g $\cdot$ L $^{-1}$ 抗坏血酸）；流量，1 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ；柱温，30 $^{\circ}$ C；进样量，20 μ L。

1.2.8 数据分析

根据样品中 β -胡萝卜素的质量浓度和细胞干质量（Dry Cell Weight, DCW），计算每克细胞干质量的 β -胡萝卜素含量（mg $\cdot$ g $^{-1}$ DCW）。每个样品 3 个平行，使用 GraphPad Prism 8 软件分析数据及绘图。图中不同字母表示有显著性差异（ $P<0.05$ ）。

2 结果与讨论

2.1 三孢布拉氏霉的培养及总RNA的获取

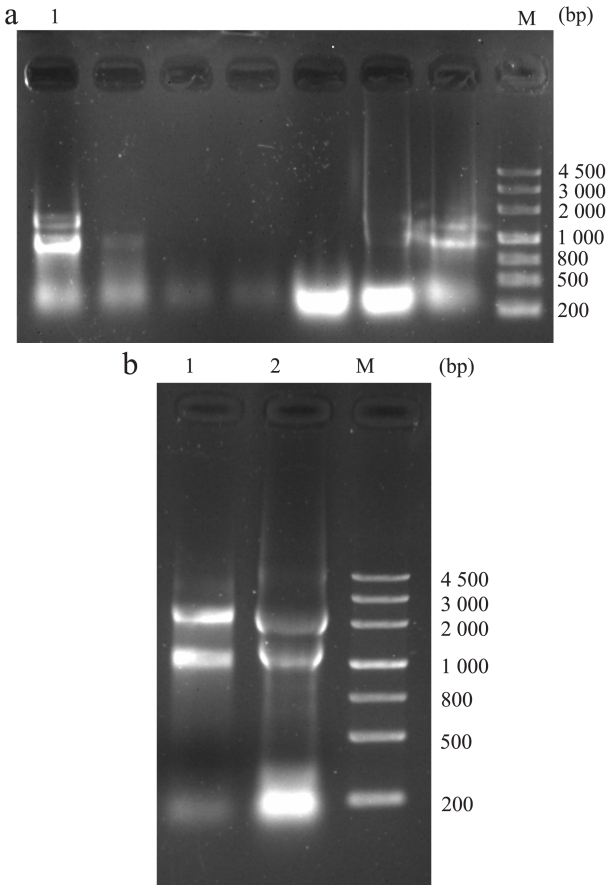


图 2 三孢布拉氏霉 (+) 和 (-) 菌株总 RNA 电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of total RNA from *B. trispora* (+) and *B. trispora* (-)

注: a 中泳道 1 为三孢布拉氏霉 (+) 提取总 RNA, b 中泳道 1、2 为三孢布拉氏霉 (-) 提取总 RNA, 两个泳道 M 为 DNA 分子标准量。

利用真核生物 RNA 提取试剂盒提取三孢布拉氏霉的总 RNA，因三孢布拉氏霉分为正 (+) 和负 (-)

两种单性菌株,对两株菌株单独提取 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2 所示。提取的总 RNA 具有三条条带,条带明亮清晰,没有明显弥散条带或杂质条带,说明提取的 RNA 完整性高,可用作反转录 PCR 的模板。

2.2 *car G*、*car RA*和*car B*基因的克隆

分别以三孢布拉氏霉(+)和(-)菌株的 RNA 为模板进行反转录,反转录得到的 RT-PCR 产物为扩增目的基因的模板,分别扩增 *car G*、*car B* 和 *car RA* 基因,扩增引物为: F/R-*car G*、F/R-*car B* 和 F/R-*car RA*,基因 *car G*、*car B* 和 *car RA* 的大小分别为: 963、1 749 和 1 827 bp。如图 3 所示,对比条带大小无误,使用核酸纯化试剂盒进行纯化。6 个片段分别克隆到 pMDTM-19T 载体中,得到 6 个克隆载体送测序公司进行测序。测序结果显示,三孢布拉氏霉(+)和(-)菌株在这三个基因的碱基序列上没有任何差异,即氨基酸序列没有差异,所以后续实验中只采用三孢布拉氏霉(+)菌株的序列进行。

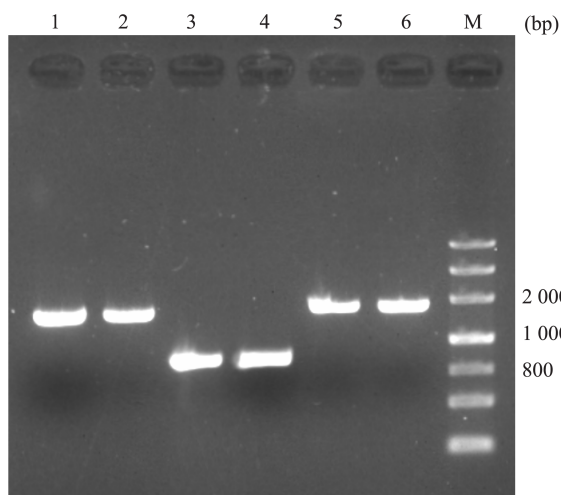


图 3 三孢布拉氏霉(+)和(-)菌株 *car G*、*car B* 和 *car RA* 基因的克隆

Fig.3 Cloning of *car G*, *car B*, and *car RA* genes from *B. trispora* (+) and *B. trispora* (-)

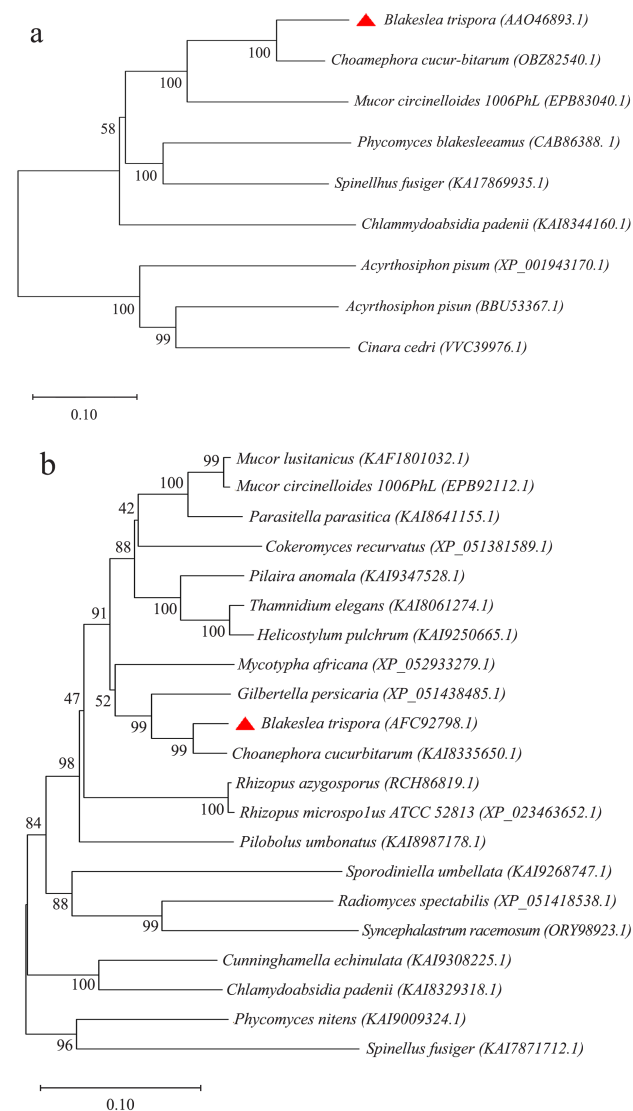
注:泳道 1 为三孢布拉氏霉(+)克隆的 *car B* 基因,泳道 2 为三孢布拉氏霉(-)克隆的 *car B* 基因,泳道 3 为三孢布拉氏霉(+)克隆的 *car G* 基因,泳道 4 为三孢布拉氏霉(-)克隆的 *car B* 基因,泳道 5 为三孢布拉氏霉(+)克隆的 *car RA* 基因,泳道 6 为三孢布拉氏霉(-)克隆的 *car RA* 基因,泳道 M 为 DNA 分子标准量。

2.3 Car G、Car RA和Car B的系统进化树分析

如图 4 所示,红色三角形标记表示香叶基香叶基焦磷酸合酶(Car G)、八氢番茄红素脱氢酶(Car

B)和双功能八氢番茄红素合酶/番茄红素环化酶(Car RA)在系统进化树的位置,不同物种氨基酸序列的 GenBank 登录号显示在相应物种名称的后面。三孢布拉氏霉的 Car G、Car B、Car RA 均与瓜笄霉(*Choanephora cucurbitarum*)对应的类胡萝卜素合成酶的亲缘关系最接近。瓜笄霉与三孢布拉氏霉同属于接合菌门的丝状真菌,瓜笄霉的基因组测序结果表明,接合菌门的真菌在三孢酸合成相关的基因(如 *tsp1*、*tsp2*、*tsp3* 和 *acaA*)、 β -胡萝卜素生物合成基因(如 *car B* 和 *car RA*)等具有一定的保守性^[25],但在进化过程中可能也出现了分化。由于基因复制、突变、环境压力等因素的影响,不同物种中类胡萝卜素合成的关键酶虽然具有一定的保守性^[26],但是它们的功能可能因物种不同甚至是同一物种不同部位而存在差异,例如番茄中有三种 *PSY* 基因(*PSY1*、*PSY2* 和 *PSY3*),它们在果实、叶片和根部中表现出组织特异性^[27]。

2.4 重组载体的构建



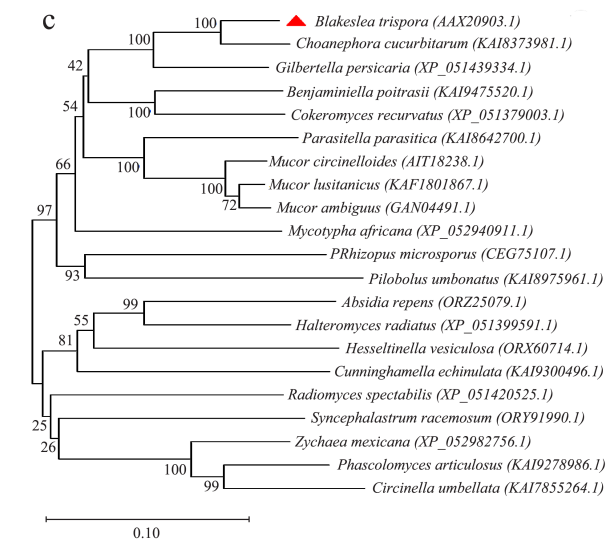


图 4 三孢布拉氏霉类胡萝卜素合成关键酶的系统进化树
Fig.4 Phylogenetic tree of key enzymes involved in carotenoid biosynthesis in *B. trispora*

注：a 为 Car RA，b 为 Car G，c 为 Car B。0.10 代表氨基酸替换率，平均每 10 个氨基酸位点中有 1 个氨基酸发生了替换。

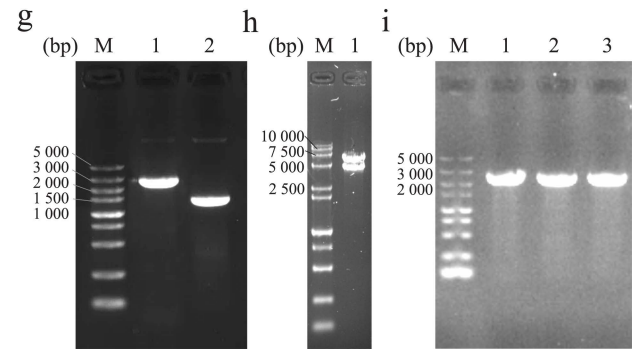
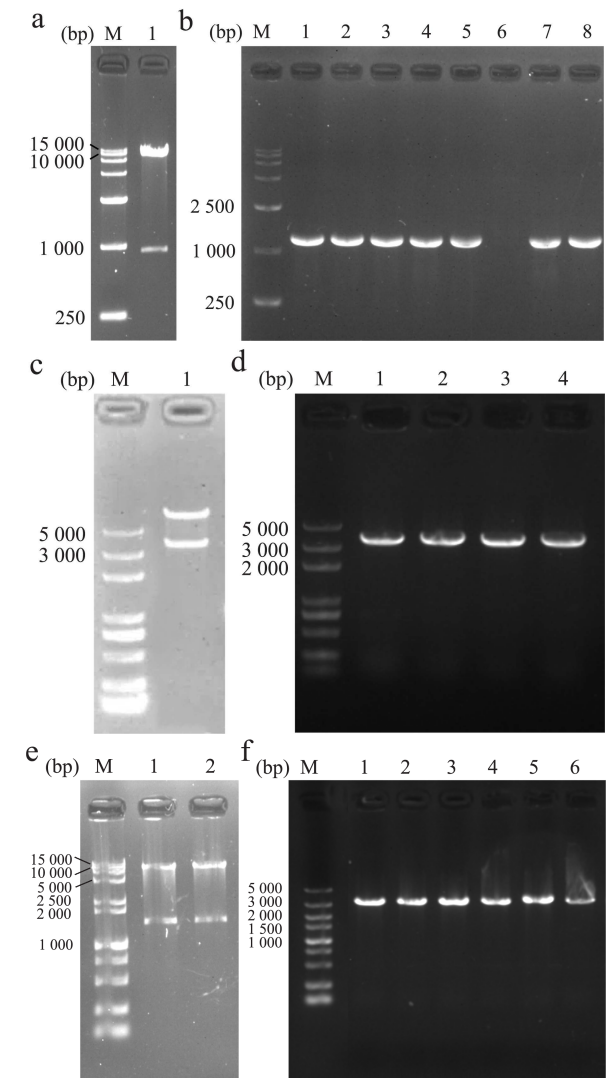


图 5 各工程菌株构建时酶切载体及菌落 PCR 鉴定电泳图
Fig.5 Electrophoresis diagrams for enzyme digestion of vectors and colony PCR identification during the construction of engineered bacterial strains

注：a、c、e、h 为载体酶切，b 为 *E. coli*-pAC-car G 工程菌转化子的菌落 PCR 鉴定，d 为 *E. coli*-pAC-car RA 工程菌转化子的菌落 PCR 鉴定，f 为 *E. coli*-pAC-car B 工程菌转化子的菌落 PCR 鉴定，g 为 car G 基因前（泳道 1）后（泳道 2）部分片段扩增，i 为 *E. coli*-pAC-car G-car RA-car B 工程菌转化子的菌落 PCR 鉴定。

该研究基于基因功能互补原理，对三孢布拉氏霉合成类胡萝卜素的关键酶进行了功能鉴定。初始表达质粒为 pAC-BETA，该质粒含有草生欧文氏杆菌（*Pantoea agglomerans*）的番茄红素环化酶（crt Y）、八氢番茄红素脱氢酶（crt I）和八氢番茄红素合酶（crt B）的表达框。构建 pAC-car G、pAC-car B、pAC-car RA 时，依次利用限制性内切酶 *Nde* I/*Spe* I、*Kpn* I/*Xho* I、*Mlu* I/*Not* I 进行酶切，分别得到 9 685、9 140、8 550 bp 的线性化载体；使用引物 F-beta-NdeI-armG/R-beta-SpeI-armG、F-car B-XhoI-armY/R-car B-KpnI-armB、F-NotI-armRA/R-MluI-armRA 分别扩增含有同源臂的 *car G*、*car B* 和 *car RA* 基因。通过同源重组法将目的基因和线性化载体连接起来，转化到大肠杆菌感受态，过夜培养后挑取转化子进行菌落 PCR 鉴定，分别使用 F-pb-seG/R-carG、F-seBETA/R-carB、F-carRA/R-crtI 引物对 pAC-car G、pAC-car B 和 pAC-car RA 表达载体进行鉴定，成功扩增出 1 114、3 032、3 312 bp 的片段（图 5b、5d、5f），对鉴定正确的转化子进行提取质粒，送测序公司进行测序。测序结果显示，三个表达载体均构建成功，其工程菌株分别命名为 *E. coli*-pAC-car G、*E. coli*-pAC-car B、*E. coli*-pAC-car RA。构建 pAC-car G-car B-car RA 时，在 pAC-car RA 的表达质粒上，利用限制性内切酶 *Mlu* I/*Kpn* I 获得线性化载体，使用引物 F-carB-MluI-armRA/R-carB-KpnI-armTa 扩增带有同源臂的 *car B* 基因，连接产物进行同源重组和转化，鉴定引物为 F-sebetaB/R-car B，

扩增片段长度为 1 848 bp。得到正确的转化子后, 利用限制性内切酶 *Nco* I/*Not* I 获得线性化载体 (图 5h), 使用引物 F-carG-armTET/R-carG 扩增带有同源臂的 *car G* 基因, F-*Nco*I-ori-armcmR/R-ori 引物扩增 *car G* 基因前部分片段, F-NA-armG/R-*Not*I-armNA 引物扩增 *car G* 基因后部分片段 (图 5g), 将三个带同源的基因片段和线性化载体进行同源重组和转化, 过夜培养后挑取转化子进行菌落 PCR 鉴定, 鉴定引物为 F-carG/R-sebetaG, 扩增长度为 2 372 bp (图 5i)。得到正确的工程菌株命名为 *E. coli*-pAC-car G-car B-car RA, 保存好菌种, 用于后续实验。

2.5 转化子 β -胡萝卜素含量的测定

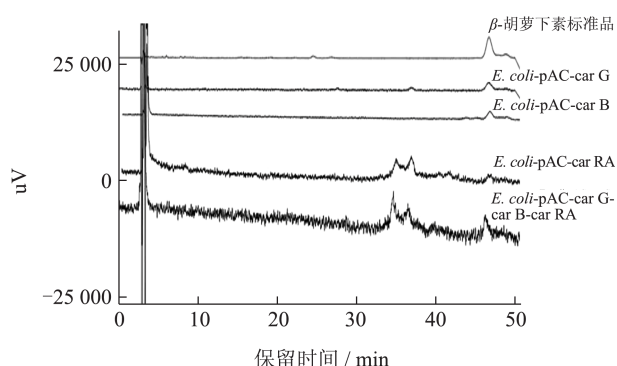


图 6 各转化子 HPLC 色谱图

Fig.6 HPLC chromatograms of various transformants

注: β -胡萝卜素的保留时间为 46.390 min; 各大肠杆菌工程菌的 β -胡萝卜素样品保留时间为 46.288~46.544 min 之间。

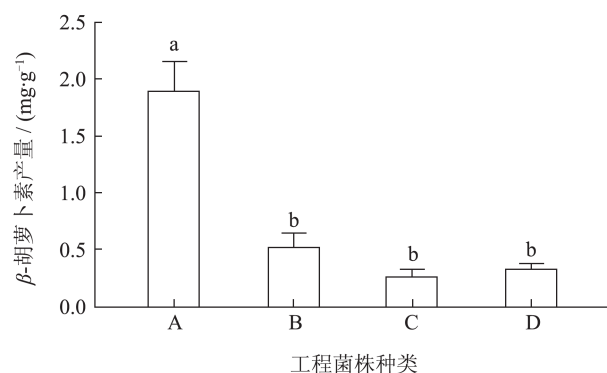


图 7 各转化子 β -胡萝卜素含量图

Fig.7 β -Carotene content comparison chart of transformants

注: A 为 *E. coli*-pAC-car G; B 为 *E. coli*-pAC-car B; C 为 *E. coli*-pAC-car RA, D 为 *E. coli*-pAC-car G-car B-car RA。图中不同小写字母表示工程菌株之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

利用 LB 培养基发酵工程菌株 *E. coli*-pAC-car G、*E. coli*-pAC-car B、*E. coli*-pAC-car RA 和 *E. coli*-pAC-car G-car RA-car B, 培养 24 h 后提取菌体内的类胡萝卜素进行 RP-HPLC 检测。结果表明, 以上工程菌株

均可以合成 β -胡萝卜素, 如图 6 所示, β -胡萝卜素标准品的保留时间为 46.390 min, 工程菌株提取物样品的保留时间在 46.288~46.544 min 之间, 可确定样品中含有 β -胡萝卜素。如图 7 所示, *E. coli*-pAC-car G 的产量最高, 达到 1.90 mg·g⁻¹ DCW; 其次是 *E. coli*-pAC-car B, 产量为 0.53 mg·g⁻¹ DCW; 再次是 *E. coli*-pAC-car G-car RA-car B, 产量为 0.33 mg·g⁻¹ DCW; 产量最低的是 *E. coli*-pAC-car RA, 产量为 0.27 mg·g⁻¹ DCW。明确 Car G 负责将法尼基焦磷酸生成香叶基香叶基焦磷酸, Car B 负责将八氢番茄红素生成番茄红素, Car RA 是双功能八氢番茄红素合酶/番茄红素环化酶, 负责将香叶基香叶基焦磷酸生成八氢番茄红素以及将番茄红素环化成 β -胡萝卜素。该研究首次将三孢布拉氏霉合成 β -胡萝卜素的完整代谢通路在大肠杆菌中同时进行表达, 为异源宿主生产 β -胡萝卜素提供新的选择。然而, 所构建的原核表达工程菌株的类胡萝卜素产量较低, 原因可能是来自三孢布拉氏霉的真核基因在原核生物中的表达存在一定的表达量和活性限制^[28,29], 可通过密码子优化和合成调控元件、调整启动子和转录元件等策略来提高真核生物基因在原核生物中的表达水平^[30,31]。

3 结论

该研究通过提取三孢布拉氏霉的 RNA 并将其反转录为 cDNA, 成功克隆了三孢布拉氏霉合成类胡萝卜素的三个关键基因 (*car G*、*car RA* 和 *car B*) 并分析系统进化。构建了类胡萝卜素合成基因功能互补的大肠杆菌表达系统, 利用 RP-HPLC 技术对菌体提取物进行了定性和定量分析。结果显示, 三孢布拉氏霉的 *car G*、*car RA* 和 *car B* 基因均能使宿主细胞中积累类胡萝卜素。其中, *E. coli*-pAC-car G 工程菌株的 β -胡萝卜素产量为 1.90 mg·g⁻¹ DCW, *E. coli*-pAC-car RA 工程菌株的 β -胡萝卜素产量为 0.27 mg·g⁻¹ DCW, *E. coli*-pAC-car B 工程菌株的 β -胡萝卜素产量为 0.53 mg·g⁻¹ DCW。此外, 基于三孢布拉氏霉类胡萝卜素合成完整代谢通路的工程菌株 *E. coli*-pAC-car G-car B-car RA 的 β -胡萝卜素产量为 0.33 mg·g⁻¹ DCW。结果表明, 三孢布拉氏霉的 *car G*、*car B* 和 *car RA* 基因均能独立和组合地在宿主细胞大肠杆菌中发挥相应的催化功能以积累 β -胡萝卜素; 明确三孢布拉氏霉 *car G*、*car B* 和 *car RA* 基因依次发挥香叶基香叶基焦磷酸合酶、八氢番茄红素脱氢酶和双功能八氢番茄红素合酶/番茄红素环化酶的活性作用, 为生产 β -胡萝卜素提供新的选择, 丰富了异源系统工程菌株生产新型的高价值的化合物所需的基因库。

参考文献

- [1] 付金菊.基于三孢布拉霉诱变高产番茄红素突变株的色素合成调控机制研究[D].新乡:河南师范大学,2018:3.
- [2] WANG H B, HE F, LU M B, et al. High-quality lycopene overaccumulation via inhibition of γ -carotene and ergosterol biosyntheses in *Blakeslea trispora* [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 435-442.
- [3] SANDMANN G. Carotenoids and their biosynthesis in fungi [J]. Molecules, 2022, 27(4): 1431.
- [4] YE Z W, JIANG J G, WU G H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: progresses and prospects [J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(4): 352-360.
- [5] ZHAO Y, LI S L, CHEN H Y, et al. Enhancement of carotenoid production and its regulation in edible mushroom *Cordyceps militaris* by abiotic stresses [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 148: 109808.
- [6] LIANG M H, HE Y J, LIU D M, et al. Regulation of carotenoid degradation and production of apocarotenoids in natural and engineered organisms [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2021, 41(4): 513-534.
- [7] LIANG M H, XIE S R, CHEN H H, et al. *DbMADS* regulates carotenoid metabolism by repressing two carotenogenic genes in the green alga *Dunaliella* sp. FACHB-847 [J]. Journal of Cellular Physiology, 2023, 238(6): 1324-1335.
- [8] CHEN H H, LIANG M H, YE Z W, et al. Engineering the β -carotene metabolic pathway of microalgae *Dunaliella* to confirm its carotenoid synthesis pattern in comparison to bacteria and plants [J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(2): e04322-e04361.
- [9] ROUKAS T. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trisporain* submerged fermentation [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016(Early Online): 1-10.
- [10] LIU C, HU B, CHENG Y L, et al. Carotenoids from fungi and microalgae: a review on their recent production, extraction, and developments [J]. Bioresource Technology, 2021, 337: 125398.
- [11] XIE Z T, MI B Q, LU Y J, et al. Research progress on carotenoid production by *Rhodospiridium toruloides* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 7.
- [12] LI Y L, ZHAO Y N, ZHANG H Z, et al. The application of natural carotenoids in multiple fields and their encapsulation technology: a review [J]. Molecules, 2024, 29(5): 967.
- [13] KABIR M T, RAHMAN M H, SHAH M, et al. Therapeutic promise of carotenoids as antioxidants and anti-inflammatory agents in neurodegenerative disorders [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 146: 112610.
- [14] ALTHRWI H N, ABDEL R R F, SOLIMAN G A, et al. Protective effect of beta-carotene against myeloperoxidase-mediated oxidative stress and inflammation in rat ischemic brain injury [J]. Antioxidants, 2022, 11(12): 2344.
- [15] BORBAC M, GABRIELAD M S A, CONTESSAC R, et al. Influence of β -carotene nanoemulsions on technological parameters and stability in food matrices [J]. Food and Bioprocess Technology, 2023, 16(11): 2430-2442.
- [16] IMBIMBO P, GIUSTINO E, FERRARA A, et al. Unveiling the potential of pseudococcomyxa simplex: a stepwise extraction for cosmetic applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 309.
- [17] GUPTA I, ADIN S N, PANDA B P, et al. β -Carotene-production methods, biosynthesis from *Phaffia rhodozyma*, factors affecting its production during fermentation, pharmacological properties: a review [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2022, 69(6): 2517-2529.
- [18] OSAMEDE A J, SIVAPRAGASAM N, ALI R A, et al. Sustainable green extraction of anthocyanins and carotenoids using deep eutectic solvents (DES): a review of recent developments [J]. Food Chemistry, 2024, 448: 139061.
- [19] DUAN X Y, XIE C D, HILL D R A, et al. Bioaccessibility, bioavailability and bioactivities of carotenoids in microalgae: a review [J]. Food Reviews International, 2024, 40(1): 230-259.
- [20] WATCHARAWIPAS A, RUNGUPHAN W. Red yeasts and their carotenogenic enzymes for microbial carotenoid production [J]. Fems Yeast Research, 2023, 23: 1-17.
- [21] RUIZ N, SILHAVY T J. How *Escherichia coli* became the flagship bacterium of molecular biology [J]. Journal of Bacteriology, 2022, 204(9): 1-9.
- [22] KAPLI P, YANG Z H, TELFORD M J. Phylogenetic tree building in the genomic age [J]. Nature Reviews. Genetics, 2020, 21(7): 428-444.
- [23] 叶志伟.杜氏藻类胡萝卜素合成关键酶基因的分子克隆及外源表达系统的构建[D].广州:华南理工大学, 2012:93.
- [24] INBARA B S, LU H, HUNG C F, et al. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum linnaeus* by HPLC-DAD-APCI-MS [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 47(4): 812-818.
- [25] MIN B, PARK J, PARK H, et al. Genome analysis of a zygomycete fungus *Choanephora cucurbitarum* elucidates necrotrophic features including bacterial genes related to plant colonization [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 40432.
- [26] REBELO B A, FARRONA S, VENTURA M R, et al. Canthaxanthin, a red-hot carotenoid: applications, synthesis, and biosynthetic evolution [J]. Plants (Basel), 2020, 9(8): 1039.
- [27] 芦小单.龙胆八氢番茄红素合成酶(PSY)基因的克隆与功能分析[D].长春:东北师范大学,2018:31.
- [28] TRINQUIER A, DURAND S, BRAUN F, et al. Regulation of RNA processing and degradation in bacteria [J]. Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms, 2020, 1863(5): 194505.
- [29] WANG C, LIU H. Factors influencing degradation kinetics of mRNAs and half-lives of microRNAs, circRNAs, incRNAs in blood *in vitro* using quantitative PCR [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 7259.
- [30] VAKNIN I, WILLINGER O, MANDL J, et al. A universal system for boosting gene expression in eukaryotic cell-lines [J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 2394.
- [31] DUAN Y T, ZHAI W J, LIU W J, et al. Fine-tuning multi-gene clusters via well-characterized gene expression regulatory elements: case study of the arginine synthesis pathway in *C. glutamicum* [J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(1): 38-48.