

利用大肠杆菌高效表达紫芝 *GsSTS50* 基因的筛选研究

孙琳琳, 齐朋燕, 白荣露, 赵春生, 王丽芝*, 韩晓燕*

天津中医药大学中药学院, 天津 301617

摘要: 目的 紫芝 *Ganoderma sinense* 次生代谢产物含量较低, 筛选一种可以显著提高紫芝次生代谢物产量的方法。方法 基于紫芝基因组数据库筛选出编码芳樟醇合酶的基因 *GsSTS50*, 通过改善融合酶、共表达基因和引入异源甲羟戊酸 (mevalonate pathway, MVA) 代谢途径等方法使 *GsSTS50* 基因在大肠杆菌中高效表达, 利用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用 (HS-SPME-GC-MS) 检测大肠杆菌培养物中芳樟醇的含量。结果 优化融合酶的策略, 使大肠杆菌中芳樟醇产量提高了约 4.9 倍; 通过引入异源 MVA 途径, 改造后菌株芳樟醇产量比初始培养提高了约 49 倍; 将多个基因共表达的同时引入异源途径, 优化菌株芳樟醇产量比原始菌株提高了 42 倍。结论 经过改造的重组菌株生产产物的量均有显著提高, 为后续灵芝等担子菌中萜类化合物以及其他萜类物质产量的提升提供了参考。

关键词: 紫芝; 芳樟醇; 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用; 甲羟戊酸代谢途径; 生物代谢

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)02-0626-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.024

Screening strategies for high expression of *GsSTS50* gene of *Ganoderma sinense* in *Escherichia coli*

SUN Linlin, QI Pengyan, BAI Ronglu, ZHAO Chunsheng, WANG Lizhi, HAN Xiaoyan

School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: **Objective** The low content of secondary metabolites of *Ganoderma sinense* has brought some difficulties to the development of monomers, so it is necessary to screen a method that can significantly increase the yield of secondary metabolites of *G. sinense*. **Methods** The *GsSTS50* gene encoding linalool synthetase was selected based on the *G. sinense* gene library. The *GsSTS50* gene was overexpressed in *Escherichia coli* by co-expression and introduction of heterologous mevalonate (MVA) pathway. The linalool content in *E. coli* was determined by HS-SPME-GC-MS. **Results** The yield of linalool and other terpenoids in *E. coli* was increased by about 4.9 times by optimizing the strategy of fusion enzyme. By introducing heterologous MVA pathway, the production of linalool was 49 times higher than that of the original culture. The co-expression of multiple genes at the same time into the heterologous pathway, the yield of the optimized strain was 42 times higher than that of the original strain. **Conclusion** The results showed that the yield of recombinant strains was significantly increased. This study provides a reference for further research on terpenoids and other terpenoids from *G. sinense*.

Keywords: *Ganoderma sinense* Zhao Xu et Zhang.; linalool; HS-SPME-GC-MS; mevalonate pathway; biological metabolism

紫芝 *Ganoderma sinense* Zhao Xu et Zhang 是担子菌亚门非褶菌目的大型药食两用真菌, 属于灵芝科、灵芝属真菌, 在中国有着悠久的药用历史^[1]。《神农本草经》等历代本草均记载其具有止咳平喘、补气血、安神等功效。现代药理研究发现灵芝具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗糖尿病、调血脂、免疫调节、抗病毒、护肝等作用。目前临床中, 灵芝因其不

良反应小、安全性能高等特点主要用来治疗肿瘤和改善糖尿病等症状^[2]。灵芝含有多种活性成分, 主要有萜类、多糖、蛋白质、甾醇、核苷类、氨基酸等物质^[3]。灵芝等衍生品因其功效已成为保健食品和中药产品研发的重要资源, 具有巨大的市场潜力^[4]。

萜类作为灵芝的主要活性成分之一, 含量较低, 提取方法步骤复杂, 规模性开发受到很大限制^[5]。植

收稿日期: 2024-07-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603221)

作者简介: 孙琳琳 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药生物工程与药用菌物的开发。E-mail: sunlinlin0221@163.com

*通信作者: 王丽芝 (1984—), 女, 硕士生导师, 从事中药生物工程与药用菌物的开发。E-mail: lzhwang2009@163.com

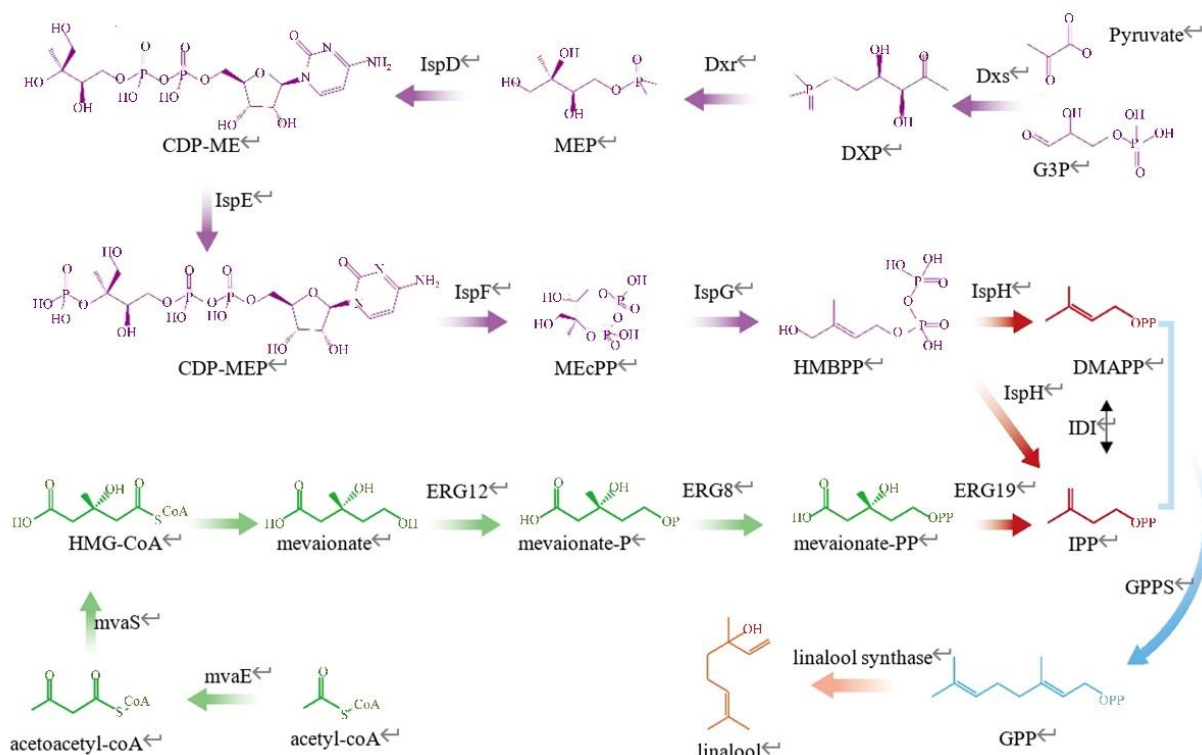
韩晓燕 (1976—), 女, 硕士生导师, 从事中药新型药物载体研究。E-mail: 15022611743@163.com

物提取法、化学合成法虽然可以在一定程度上缓解萜类物质的市场需求,但产率低、耗能高、环境污染等问题不容忽视,实现绿色安全生产的目标还需探索和努力。开发一种可持续的微生物合成方法是萜类化合物工业化生产的重要发展趋势^[6-7]。赤芝和紫芝基因组的先后发表将灵芝的研究推进到分子层面,有研究者开始利用基因工程的手段解决灵芝萜类含量低的问题^[8]。本课题组在紫芝基因组和转录组数据分析的基础上,挖掘并克隆鉴定了多个萜类合酶基因。利用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用(HS-SPME-GC-MS)对大肠杆菌培养物的挥发性成分进行分析,发现紫芝中萜类合酶可编码产生多种具有重要功能的产物,例如 Gleenol 具有杀灭白蚁、驱虫和调节植物生长的功能^[9]; β -elemene 具有

抗肿瘤的活性,可以抑制癌细胞增殖,缩短细胞周期,并诱导其凋亡或自噬^[10];芳樟醇是一种重要的香料,多用化妆品和个人护理产品^[11],还可能用作抗抑郁药^[12]。

异戊烯基焦磷酸(isopentenylpyrophosphate, IPP)和二甲丙烯基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)是所有萜类化合物的常见前体^[13]。生物体内合成 IPP 和 DMAPP 的代谢途径主要有 2 种:一种是主要发生在细胞质中的外源甲羟戊酸(mevalonate pathway, MVA)代谢途径,另一种是主要发生在质体中的内源性 4-磷酸甲基赤藓糖醇(methylerythritol 4-phosphate, MEP)途径(图 1)。

突变体大肠杆菌中法尼基焦磷酸合成酶基因 *IspA* (*S80F*) 可降低法呢基焦磷酸(farnesyl



紫色部分-大肠杆菌内源性 MEP 途径;绿色部分-异源 MVA 代谢途径;Dxs-1-脱氧-D-木醛糖-5-磷酸合酶;Dxr-1-脱氧-D-木酮糖 5-磷酸还原异构酶;IspD-4-二磷酸胞基-2-C-甲基-D-赤藓糖醇合成酶;IspE-4-二磷酸胞基-2-C-甲基-赤藓糖醇 2,4-环二磷酸合酶;IspF-4-羟基-3-甲基-2-en-1-酰基二磷酸合酶;IspG-4-羟基-3-甲基-2-en-1-酰基二磷酸合酶;IspH-1-羟基-2-甲基-丁烯基 4-二磷酸还原酶;G3P-D-甘油醛-3-磷酸;DXP-1-脱氧-D-5-磷酸木酮糖;CDP-MEP-cdp-2-C-甲基-D-赤藓糖醇 2-磷酸;MEcPP-2-C-甲基-D-赤藓糖醇-2,4-环二磷酸;HMBPP-1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基 4-二磷酸;HMG-CoA-羟甲基戊二酰辅酶 a; mevalonate-P-甲戊酸 5-磷酸; mevalonate-PP-焦磷酸甲戊酸酯。

Purple part-endogenous MEP pathway in *E. coli*. Green part-metabolic pathway of heterologous MVA; Dxs-1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; Dxr-1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; IspD-4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritolsynthase; IspE-4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol kinase; IspF-2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; IspG-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase; IspH-1-hydroxy-2-methyl-butenyl 4-diphosphate reductase; G3P-D-glyceraldehyde-3-phosphate; DXP-1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; CDP-MEP-cdp-2-C-methyl-D-erythritol 2-phosphate; MEcPP-2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate; HMBPP-1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate; HMG-CoA-hydroxymethylglutaryl-CoA; mevalonate-P-mevalonate 5-phosphate; mevalonate-PP-mevalonate pyrophosphate.

图 1 芳樟醇的生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis pathway of linalool

pyrophosphate, FPP) 通量, 增加二磷酸香叶基 (geranyl diphosphate, GPP) 积累, 增加目标产物含量^[14-15], 且大叶香叶二磷酸合成酶 (AgGPPS2) 具有较高的催化活性^[16]。

Hoshino 等^[17]用芳樟醇合成酶基因从大肠杆菌中共表达突变体法尼基焦磷酸合成酶基因 *IspA* (S80F), 最终使芳樟醇的产量显著提高。Wang 等^[9]利用串联基因表达和启动子工程, 构建了 8 个大肠杆菌重组表达系统, 使紫芝中 Gleenol 的产量提高了 23 倍。不同条件下, AgGPPS 和 *IspA* (S80F) 对大肠杆菌单萜积累的影响不同。Tashiro 等^[18]报道灵芝香叶基焦磷酸 (geranyl pyrophosphate, GPPS) 合成酶与 *IspA* (S80F) 在促进萜烯产量方面无显著差异。Wang 等^[19]通过不同策略增加大肠杆菌中 GPP 的供应来合成芳樟醇。结果表明, 共表达 *IspA* (S80F) 的菌株芳樟醇和神经醇的产量分别为 71.1 mg/L 和 32.3 mg/L。而含有 GPPS 的菌株 WX6637 产生 100.1 mg/L 芳樟醇和 10.2 mg/L 橙花叔醇。

本实验以编码紫芝芳樟醇合酶基因 (*GsSTS50*) 为研究对象, 在大肠杆菌中构建了芳樟醇的合成途径, 并对芳樟醇产物的含量进行了探索。为了显著增加 IPP 和 DMAPP 的前体供应, 解决内源性 MEP 途径前体供应不足这一问题, 本实验在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中引入了异源 MVA 代谢途径, 同时构建了 GPPS 与 *IspA* (S80F) 共表达的融合表达系统以提高 GPP 的合成和利用。本实验还比较 3 种不同来源的异戊烯基二磷酸 (isopentenyl diphosphate, IDI) 异构酶对最终产物含量的影响。本研究为进一步改良紫芝中萜类物质资源提供了参考, 也为紫芝中其余活性成分的高效生产奠定了初步基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

紫芝菌株 CGMCC5.00 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心, 由天津中医药大学王丽芝教授鉴定为紫芝 *G. sinense* Zhao Xu et Zhang。HP-5 ms 型毛细管柱 (30 m×250 μm×0.25 μm) 购自美国安捷伦公司。固相微萃取头二乙烯苯/碳氧基/聚二甲基硅氧烷 (DVB/CAR/PDMS) 购自美国 Supelco 公司。限制性内切酶购自美国 New England Biolabs 公司和北京 Takara 公司。TIANprep 迷你质粒试剂盒购自北京天根生物技术公司。QIAquick 凝胶提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司。Pyrobest DNA 聚合酶、DNA 连接试剂盒 Ver.2.1 和 T4 DNA 连接酶购自北

京 Takara 公司。pGEM®-T Easy vector 购自 Promega corporation 公司。SolarGelRed 核酸凝胶染色剂 (10 000×) 购自 Solarbio 公司。Seamless Cloning Kit 购自江苏 Beyotime Biotechnology 公司。对照品芳樟醇 (L812404), 质量分数大于 98%, 购自上海麦克林公司。

1.2 仪器

HNY-213C 型恒温培养振荡器 (天津欧诺公司); MPS-2XT 型顶空进样 (德国哲斯泰公司); Agilent 7890-7000D 型 GC-MS (美国安捷伦公司); Veriti™ 96 型孔热循环仪 (中国赛默飞世尔科技有限公司); UV-6100PCS 型紫外分光光度计 (上海美谱达公司); Scientz-IIID 型超声波细胞粉碎机 (新芝生物公司)。

2 方法

2.1 质粒构建

经 PCR 扩增获得基因 *GsSTS50*, 将其连接到 pET28a 上获得重组质粒 pB101 (pET28a-*GsSTS50*)。基因 GPPS (GenBank 号 AAN01134.1) 由 Azenta 公司 (中国苏州) 通过密码子优化合成。在 pB101 的基础上, 采用重叠延伸 PCR 方法, 将 GPPS 基因与 *GsSTS50* (OR192772.1) 基因通过不同的连接体 (GSG)_n, *n*=1, 2, 3 串联后连接到 pET28a 载体上得到重组质粒 pB201 (pET28a-GPPS-GSG-*GsSTS50*)、pB202 (pET28a-GPPS-GSGGSG-*GsSTS50*)、pB203 (pET28a-GPPS-GSGGSGGSG-*GsSTS50*)、pB204 (pET28a-*GsSTS50*-GSG-GPPS)、pB205 (pET28a-*GsSTS50*-GSGGSG-GPPS)、pB206 (pET28a-*GsSTS50*-GSGGSGGSG-GPPS)。通过重叠延伸 PCR 对 *IspA* 基因进行定点突变得得到 *IspA* (S80F), 将 *IspA* (S80F) 和 *GsSTS50* 基因串联后连接到 pET28a 载体上获得 pB207[pET28a-*IspA*(S80F)-*GsSTS50*] 和 pB208[pET28a-*GsSTS50*-*IspA* (S80F)]。将编码焦磷酸异戊烯基异构酶的基因 (*IDII*, NP_015208.1)、二磷酸戊酸脱羧酶基因 (*ERG19*, CAA66158.1)、磷酸戊酸激酶的基因 (*ERG8*, NP_013947.1) 和甲戊酸激酶基因 (*ERG12*, NP_013935.1) 串联后连接到载体 pET28a 上得到质粒 pB301 (pET28a-*IDII*-*ERG19*-*ERG8*-*ERG12*)。将 *IDII* 分别用大肠杆菌 *IDI* 和 *GlIDI* (编码灵芝焦磷酸异戊烯基异构酶) 基因替换, 得到质粒 pB302 (pET28a-大肠杆菌 *IDI*-*ERG19*-*ERG8*-*ERG12*) 和 pB303 (pET28a-*GlIDI*-*ERG19*-

ERG8-ERG12)。将 pET3b-*ES* 质粒中扩增的 *mvaE* (acetyl-CoA/HMG-CoA, 编码粪肠球菌的乙酰辅酶 a 乙酰转移酶/HMG-CoA 还原酶) 和 *mvaS* (HMG-CoA synthase, 编码粪肠球菌的 HMG-CoA 合成酶) 基因片段与 pACYCDuet-1 载体连接, 得

到质粒 pAC-*ES*。pAC-*ES* 载体与 *GsSTS50* 基因得到质粒 pB310。将 *GsSTS50*-(*GSG*)₂-*GPPS* 和 *IspA*(*S80F*)-*GsSTS50* 基因片段分别与 pAC-*ES* 载体连接, 得到质粒 pB320 和 pB330。本研究使用的所有引物列于表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	序列 (5'-3')
z-50-L1-F	GCGTTTCGTCAGAACGGCTCTGGTATGCTGGCTACTCTCTCGCC
z-50-L2-F	CAGAACGGCTCTGGCGGTTCTGGCATGCTGGCTACTCTCTCGC
z-50-L3-F	GGTTCTGGCGGTTCCGGTGGCTCCGGTATGCTGGCTACTCTCTCGCC
f-50-L1-R	AAAATCAAATTCCATACCAGAGCCAGGTTGATAGCCCAGCTC
f-50-L2-R	TTCCATGCCAGAACCGCCAGAGCCAGGTTGATAGCCCAGCTC
f-50-L3-R	ACCGGAGCCACCGGAACCGCCAGAACCGGTTGATAGCCCAGCTC
z-50-R	CCAAGCTTTTAAGGTTGATAGCCCAGCTCAGC
f-50-F	CGGGATCCATGCTGGCTACTCTCTCG
50- <i>EcoRI</i> -F	CGGAATTCGTAAGGAGATATACATATGCTGGCTACTCTCTCGCC
50- <i>HindIII</i> -R	CCCAAGCTTTTAAGGTTGATAGCCCAGCTCAGC
50- <i>BamHI</i> -F	CTGGATCCGGTACTAGTATGCTGGCTACTCTCTCTCGCC
50- <i>EcoRI</i> -R	GCGAATTCGCATTAAGGTTGATAGCCCAGCTCAGC
50- <i>BamHI</i> -F	CGGGATCCATGCTGGCTACTCTCTCTCGC
50- <i>HindIII</i> -R	CCCAAGCTTTTAAGGTTGATAGCCCAGCTCAGC
50- <i>BglII</i> -F	AAGGAGATATACATATGGCAATGCTGGCTACTCTCTCTCGC
50- <i>PvuI</i> -R	AGGGTACCGACGTCAGCGATTTAAGGTTGATAGCCCAGCTCAGC

2.2 重组表达体系在大肠杆菌中的表达

将重组质粒 pB101 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 得到重组菌株 B101 作为本实验的对照菌株。将 pB201、pB202、pB203、pB204、pB205、pB206、pB207、pB208 分别转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 得到重组菌株 B201、B202、B203、B204、B205、B206、B207、B208。将重组质粒 pB301 分别与 pB310、pB320、pB330 组合转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 得到重组菌株 B311、B321、B331。将重组质粒 pB302 分别与 pB310、pB320、pB330 组合转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 得到重组菌株 B312、B322、B332。将重组质粒 pB303 分别与 pB310、pB320、pB330 组合转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 得到重组菌株 B313、B323、B333。将上述重组菌株分别置于 37 °C 培养 12~16 h, 取单菌落接种于 10 mL 的 Luria Bertani (LB) 液体培养基中。将重组大肠杆菌菌株在 37 °C、220 r/min 条件下培养 16 h。将培养过夜的菌液按 5 % 的比例转移到新培养基中, 在相同条件下继续生长。然后取样品测定菌液在 600 nm 波长处对应的吸光度 (*A*)。当 *A*_{600nm} 值为 0.8 左右时, 在培养液中加入异丙基 β-*D*- 硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-*D*-

thiogalactopyranoside, IPTG) 对其诱导, 终浓度为 0.5 mmol/L。在恒温培养振荡器中, 25 °C, 220 r/min, 培养 24 h。实验过程中, 适当添加以下抗生素终质量浓度: 氯霉素 25 mg/L, 卡那霉素 30 mg/L, 氨苄西林 50 mg/L。

2.3 芳樟醇的测定

2.3.1 供试品溶液的制备 取培养后的菌液 30 mL, 4 °C、5 000 r/min 离心 20 min。取 8 mL 离心后的上清液转移至 20 mL 顶空进样瓶中, 即得供试品溶液。

2.3.2 对照品溶液的制备 称取对照品芳樟醇 20 mg, 使用正己烷定容于 5 mL 量瓶中, 得到含 4 mg/mL 芳樟醇的对照品溶液。

2.3.3 GC-MS 条件 GC-MS 系统采用 HP-5ms 型毛细管柱 (30 m×250 μm×0.25 μm), 进样温度为 250 °C, 进样方式为固相微萃取 (SPME) 脱附。氮气流速设为 1 mL/min。加热程序 60 °C 保温 2 min, 然后以 6 °C/min 的速率升温至 250 °C, 250 °C 保温 3 min, 总运行时间为 36.67 min, 允许溶剂延迟 2 min 后获取质谱数据。质谱条件: 电子电离源, 离子源温度 230 °C, 质量选择检测器 (MSD) 在 70 eV 下工作, 挥发性化合物扫描范围 *m/z* 30~500。气相色谱图见图 2。

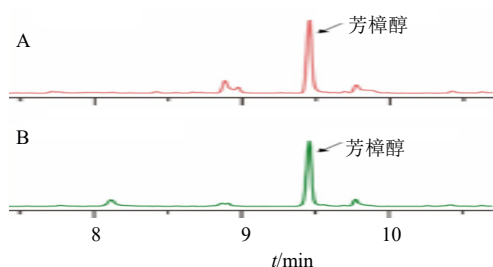


图 2 菌株 B101 (A) 和芳樟醇对照品 (B) 的气相色谱图
Fig.2 Gas chromatograms of strain B101 (A) and linalool standard (B)

2.3.4 线性方程的绘制 对“2.3.2”项芳樟醇对照品溶液分别使用正己烷稀释至质量浓度为 0.01、0.05、0.1、0.5、1.25 mg/L，以进样量对浓度峰面积进行回归处理，以峰面积为纵坐标 (Y)，以芳樟醇质量浓度为横坐标 (X) 绘制的标准曲线 $Y=4.911\ 75\times 10^9 X+3.755\times 10^8$ ， $R^2=0.982\ 9$ 。

2.3.5 方法学考察^[20] 取供试品溶液连续进样 6 次，结果显示芳樟醇的峰面积 RSD 值为 2.2%；将供试品溶液在室温下 0、2、4、6、10、12、24 h 后进样检测，结果显示芳樟醇峰面积的 RSD 值为

1.3%。每个重组质粒做 3 次平行实验，每个菌液制备 3 份供试品溶液，测定芳樟醇质量分数，结果显示其 RSD 值为 2.57%。

2.3.6 样品的测定^[20] 取各菌株样品，在 50 °C 孵育 20 min，提取 15 min，250 °C 分解 5 min，提取前和解吸后纤维老化 3 min。按照“2.3.3”项条件进样，并测定芳樟醇含量。

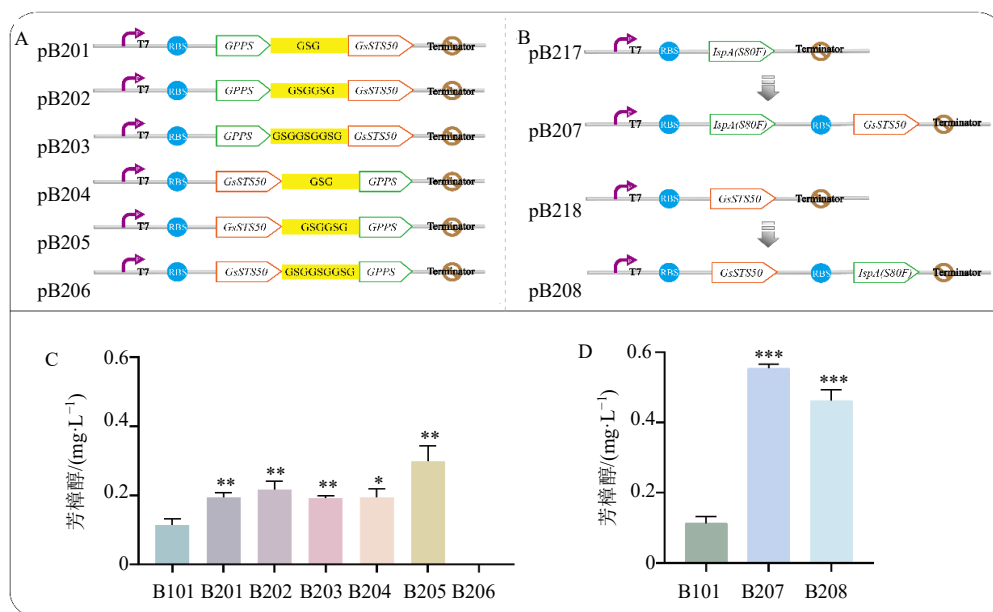
3 结果与分析

3.1 紫芝芳樟醇合成酶 (GsSTS50) 的克隆与功能鉴定

GsSTS50 基因全长 969 bp，编码 323 个氨基酸，以 pET28a 为空白对照，采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对蛋白表达情况进行检测，发现重组菌株 B101 在相对分子质量为 35 000 附近有一个特异性蛋白带，与目标蛋白大小一致。按照“2.3”项方法，采用 HS-SPME-GC-MS 进行分析，利用芳樟醇标准曲线进行计算，结果显示未进行基因改造的对照菌株 B101 中芳樟醇产量为 0.113 mg/L。

3.2 基于多种基因融合表达在大肠杆菌中合成芳樟醇

首先，将 GsSTS50 与 GPPS 融合 (图 3-A)，转



A-GPPS 与 GsSTS50 融合表达载体构建示意图，其中 GPPS 是来自大冷杉的香叶酰焦磷酸合成酶；B-IspA (S80F) 与 GsSTS50 共表达载体的构建示意图，IspA (S80F) 是来自大肠杆菌的法尼基焦磷酸合成酶，含有 S80F 突变。C-GPPS 和 GsSTS50 融合表达体系中芳樟醇产量。D-IspA (S80F) 和 GsSTS50 的共表达系统中芳樟醇的产生。与对照组 (B101) 相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

A-Schematic diagram of construction of fusion expression vector of GPPS and GsSTS50. GPPS is geranyl pyrophosphate synthase from *Abies grandis*. B-Schematic diagram of construction of co-expression vector of IspA(S80F) and GsSTS50. IspA(S80F) is farnesyl pyrophosphate synthase from *E. coli* contains S80F mutation. C-Yield of linalool in fusion expression system of GPPS and GsSTS50. D-Production of linalool in co-expression system of IspA(S80F) and GsSTS50. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs control group (B101).

图 3 基于多种基因融合表达在大肠杆菌中合成芳樟醇

Fig. 3 Linalool synthesized in *E. coli* based on multiple gene fusion expression

入 DH5 α 感受态获得菌株, 经摇瓶发酵后, 用 GC-MS 检测产物。与对照菌株 B101 相比, 构建的融合蛋白表达菌株的产物含量除 B206 外均有所增加(图 3-C)。当融合蛋白中间的连接子序列为(GSG) $_2$ 时, 相应菌株的芳樟醇产物量较高, 说明 6 个氨基酸的连接子序列可能更适合本实验中融合蛋白的表达。其中, 菌株 B205 在连接子序列为(GSG) $_2$ -GPPS 时, *GsSTS50* 基因位于质粒中的连接子位置的最前面时表达效果最好。经摇瓶发酵 24 h 后, 优化后的芳樟醇融合质粒重组菌株的累积芳樟醇产物量是对照菌株 B101 的 2.6 倍。

将 *IspA* (S80F) 插入 pET28a-*GsSTS50* 载体中 *GsSTS50* 基因的前后(图 3-B), 转化大肠杆菌 BL21(DE3)构建重组菌株 B207 和 B208。通过 HS-SPME-GC-MS 对重组质粒大肠杆菌培养物进行分析, 发现 2 种菌株的芳樟醇产量进一步提高(图 3-D), 分别是对照菌株 B101 的 4.9 倍和 4.1 倍。

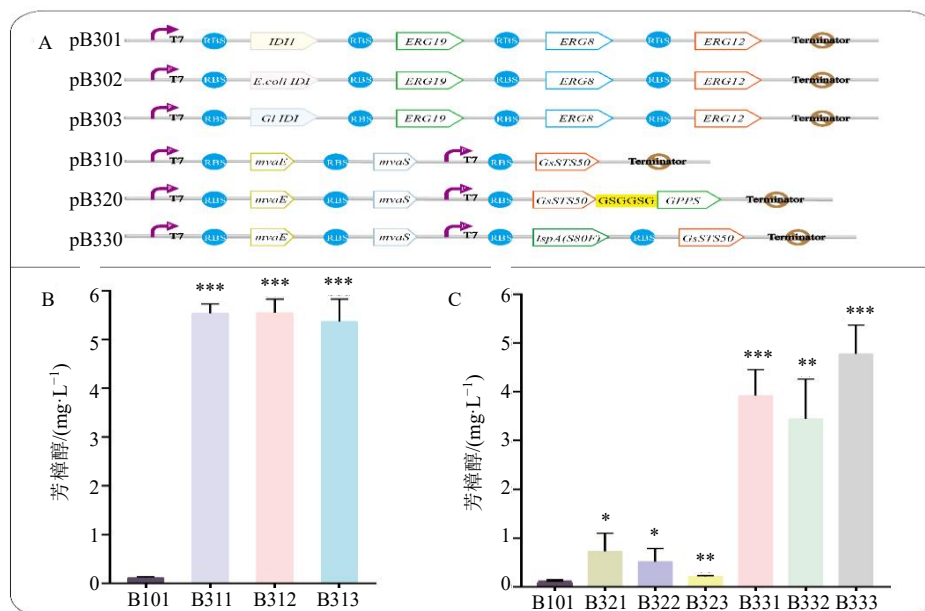
3.3 基于异源 MVA 代谢途径的大肠杆菌合成芳樟醇

本实验部分构建的相关载体如图 4-A 所示。质粒 pB310 分别与 MVA 途径下游的质粒 pB301、

pB302 和 pB303 结合, 共转化为菌株 BL21 (DE3), 得到工程菌株 B311、B312 和 B313, 用 GC-MS 检测产物。结果表明, 引入外源 MVA 代谢途径后, 重组菌株的芳樟醇产量明显提高(图 4-B)。菌株 B311、B312 和 B313 的芳樟醇产量相近, 其中, 与没有 MVA 代谢途径的原始菌株 B101 相比, 菌株 B311、B312 和 B313 的产物量增加了约 49 倍, 达到 5.55 mg/L。

本研究在异源 MVA 的基础上, 分别引入了 *GsSTS50*-(GSG) $_2$ -GPPS、*IspA*(S80F)-*GsSTS50*。质粒 pB320 和 pB330 分别与质粒 pB301、pB302 和 pB303 结合携带 MVA 下游途径基因, 共同转化进菌株 BL21 (DE3), 最后对产物进行 GC-MS 检测。结果显示, 当 GPPS 融合到含有异源 MVA 途径的芳樟醇表达菌株中时, 芳樟醇的产物量明显降低(图 4-C)。菌株 B323 的产物量低于未经异源 MVA 代谢途径的菌株 B205。菌株 B321 的产物量略高于菌株 B205。但这仍远低于引入 *AgGPPS* 前菌株 B311、B312 和 B313 的芳樟醇产量。

与引入前含有异源 MVA 途径的芳樟醇表达菌株 B311、B312 和 B313 相比, B331、B332 和 B333



A-异源 MVA 代谢途径载体构建示意图; B-异源 MVA 代谢途径引入菌株的芳樟醇产量; C-在含有异源 MVA 代谢途径的基础上, 引入 GPPS 和 *IspA*(S80F)后的表达菌株产生芳樟醇; 与对照组 (B101) 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A-Schematic diagram of vector construction of heterologous MVA metabolic pathway; B-Production of linalool by strains introduced with heterologous MVA metabolic pathway; C-Production of linalool by expression strain after introducing GPPS and *IspA*(S80F) on basis of containing heterologous MVA metabolic pathway; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group (B101).

图 4 基于异源 MVA 代谢途径的大肠杆菌生产芳樟醇

Fig. 4 Production of linalool by *E. coli* based on heterologous MVA metabolic pathway

菌株的芳樟醇产物量均有不同程度的降低。另一方面,与仅导入 *IspA* (S80F) 的芳樟醇表达菌株 B207 相比,同时包含异源 MVA 代谢途径和 *IspA* (S80F) 转化背景的芳樟醇表达菌株的芳樟醇产量均有不同程度的提高(图 4-C)。其中,菌株 B333 的芳樟醇产量增加最多,是未引入异源 MVA 代谢途径的菌株 B207 (芳樟醇含量为 0.554 mg/L) 的 8.6 倍,与原菌株 B101 相比,其芳樟醇产量增加了 42 倍。

4 讨论

目前已从灵芝中获取 470 多种天然化合物,包括萜类化合物、生物碱类等化合物,临床中用于糖尿病和恶性肿瘤的治疗^[2],其萜类化合物可以用于治疗慢性疾病^[21]。Chen 等^[22]总结了来自多种数据库的研究,许多体外研究和体内动物模型发现,灵芝具有抗氧化、抗高血压、降血糖、调血脂、抗炎等特征,但临床试验中对改善健康的情况并不一致。在这些作用中,其对 2 型糖尿病或高血糖患者的降血糖作用是很显著的。越来越多的证据表明,灵芝这一真菌有潜力成为一种有前途的抗病毒药物,可以治疗多种病毒性疾病,如登革热病毒、肠病毒 71 型和新型冠状病毒^[23-24]。为了保证灵芝的安全性和有效性,促进功能性食品和保健品的商业化发展,还需要对灵芝的生物治疗成分进行更多的研究^[25]。

大多数基因工程代谢修饰策略都能提高目标化合物的产率。Pang 等^[26]发现全长 *HMGR* 基因在产柠檬烯菌株中的过表达使 *D*-柠檬烯和 *L*-柠檬烯的产量提高了近 10 倍。Kildegaard 等^[11]截断了 *ERG9* 的天然启动子或将其替换为 *PERG1* 型或 *PERG11* 型,所得菌株的 β -胡萝卜素滴度增加了 2-2.5 倍。本研究认为中间体和单萜烯的积累对细胞产生了不同的细胞毒性,抑制了代谢途径的产生效率,可以通过提高细胞耐受性来进一步优化菌株。除了两相发酵系统外,外排泵系统还可以通过过表达/定向进化膜转运蛋白和激活/抑制外排调节因子来促进有毒化合物的流出^[27-29]。提高底盘细胞对有毒产物的抗性,通过过表达活性氧物种相关调控酶或转录调控因子调控细胞内活性氧物种,来获得耐受性提高的突变菌株^[30]。适应进化在实验室研究中经常使用,该方法广泛应用于菌株的发育和优化,主要是利用特定选择压力去筛选具有有利表型的突变体^[31]。引入 *GPPS* 后,连接子的长度和蛋白质连接的顺序影响了氨基酸折叠和最终融合蛋白表

达,推测这是菌株 B206 表达性能较差的原因之一。引入 *IspA* (S80F) 突变体可以减少竞争路线 *FPP* 的流量,提高 *GPP* 对芳樟醇的转化效率,从而提高萜类化合物的产量。采用上述代谢转化策略后,芳樟醇的产物含量明显高于对照品系。但产量仍处于较低水平,其原因可能是内源性 *MEP* 途径在大肠杆菌中提供前体的能力有限。为了确定消除 *DMAPP* 对 *GPP* 的瓶颈是否会进一步增加芳樟醇的产量,进一步选择产量较高的融合表达质粒 *pET28a-GsSTS50-(GSG)₂-GPPS* 和共表达质粒 *pET28a-IspA(S80F)-GsSTS50* 用于后续实验的生产。前体物质供给不足是限制大肠杆菌生产的主要步骤之一,提高前体物质供给可以显著提高菌株的产物含量^[32-33]。推测可能是由于大肠杆菌细胞内代谢网络较为复杂,转化后细胞内 *FPP* 含量过低,且各基因表达水平不同,导致毒性中间代谢物积累,导致细胞毒性增大,抑制底盘细胞生长。大肠杆菌需要基本水平的 *FPP* 来维持自身生命活动的正常生长^[34]。结果表明,引入外源 MVA 途径可以加强前体供给,增加代谢流量,是增加单萜类化合物产量的有效方案。这一结果与前人的研究趋势一致,引入 MVA 途径和共表达 *IspA* (S80F) 来提升单萜类化合物产量^[15,17]。本研究选取来源于大肠杆菌、酿酒酵母和紫芝的 *IDI* 基因。将每个 *IDI* 基因构建成重组表达载体,与其他基因一起转入大肠杆菌中表达。经 MVA 途径增强的菌株 B311、B312 和 B313 均能获得较高的芳樟醇产量,且 3 种菌株的产物含量无明显差异。在本实验中,摇瓶发酵后,共表达 *IspA* (S80F) 的菌株似乎比含有 *AgGPPS* 的菌株具有更好的表达效果,并且芳樟醇产量更高。除了目标产物和测定条件的差异外,融合表达和共表达的效果也可能存在差异。

灵芝拥有丰富的酶和可用于治疗的化合物库,可以成为蛋白质和生物活性化合物的可持续来源。将异源基因整合到同源重组通路中或利用非同源末端连接抑制剂可以提高灵芝的 *HR* 效率。但是自身强大的调控网络和低同源重组的频率是限制灵芝创新分子工具和开发精确遗传标记的关键瓶颈。现代合成生物学提供了有助于加速精确的多基因靶向、编辑和解开灵芝的生物合成机制^[35]。基于靶向基因组编辑的半理性进化策略,包括 RNA 干扰 (RNAi) 辅助基因组进化 (RAGE)、CRISPR-Cas9 和同源定向修复辅助基因组规模工程方法

(CHAnGE)、多功能全基因组 CRISPR 系统 (MAGIC) 和具有短的、可跟踪的、集成的细胞条形码 (MAGESTIC) 的多路精确基因组编辑等^[36]。利用这些工具,可以获得耐受性提高的工程菌株,有望分析萜类化合物细胞毒性的分子机制,促进目标化合物的高效生产以及代谢工程转化的研究^[37]。

本研究通过一系列的优化和改造,提供了一种可以显著提高灵芝中萜类化合物含量的方法。虽然灵芝中富含的物质具有良好的临床效果,但其作用机制的研究目前处于初步阶段^[38],猜测可能是由于灵芝中物质的含量过低,提取步骤较为复杂,产量低的原因。因此,提高灵芝中物质产量,对未来研究灵芝在提取物的作用机制奠定了实验基础,也为现代医学治疗疾病提供了更多药物基础^[39-40]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xie Y K, Su Y F, Wang Y R, *et al.* Structural clarification of mannoglucan GSBP-2 from *Ganoderma sinense* and its effects on triple-negative breast cancer migration and invasion [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 269(Pt 1): 131903.
- [2] Liu C W, Song X M, Li Y Z, *et al.* A comprehensive review on the chemical composition, pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(8): 1983-2040.
- [3] 吕晶雪, 郎岩, 吴庆红, 等. 灵芝的主要活性成分及生物活性研究进展 [J]. *山东化工*, 2024, 53(5): 54-56.
- [4] Zhang X Q, Xu Z Y, Pei H S, *et al.* Intraspecific variation and phylogenetic relationships are revealed by ITS1 secondary structure analysis and single-nucleotide polymorphism in *Ganoderma lucidum* [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169042.
- [5] Cheng B H, Lin C Y, Yeh T F, *et al.* Potential source of S-(+)-linalool from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaf: Essential oil profile and enantiomeric purity [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(31): 7623-7628.
- [6] Serra S, Fuganti C, Brenna E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances [J]. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(4): 193-198.
- [7] Zebec Z, Wilkes J, Jervis A J, *et al.* Towards synthesis of monoterpenes and derivatives using synthetic biology [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 34: 37-43.
- [8] Chen S L, Xu J, Liu C, *et al.* Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 913.
- [9] Wang Q, Qi P Y, Zhao C S, *et al.* Tandem expression of *Ganoderma sinense* sesquiterpene synthase and IDI promotes the production of gleenol in *E. coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(23): 7779-7791.
- [10] Chen P, Li X J, Zhang R N, *et al.* Combinative treatment of β -elemene and cetuximab is sensitive to KRAS mutant colorectal cancer cells by inducing ferroptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transformation [J]. *Theranostics*, 2020, 10(11): 5107-5119.
- [11] Kildegaard K R, Adiego-Pérez B, Doménech Belda D, *et al.* Engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of astaxanthin [J]. *Synth Syst Biotechnol*, 2017, 2(4): 287-294.
- [12] dos Santos É R Q, Maia J G S, Fontes-Júnior E A, *et al.* Linalool as a therapeutic and medicinal tool in depression treatment: A review [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2022, 20(6): 1073-1092.
- [13] Wang Q, Cao R, Zhang Y N, *et al.* Biosynthesis and regulation of terpenoids from basidiomycetes: Exploration of new research [J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 150.
- [14] Mendez-Perez D, Alonso-Gutierrez J, Hu Q J, *et al.* Production of jet fuel precursor monoterpenoids from engineered *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(8): 1703-1712.
- [15] Chen F, Li W, Jiang L Z, *et al.* Functional characterization of a geraniol synthase-encoding gene from *Camptotheca acuminata* and its application in production of geraniol in *Escherichia coli* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(9): 1281-1292.
- [16] Burke C, Croteau R. Geranyl diphosphate synthase from *Abies grandis*: cDNA isolation, functional expression, and characterization [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 405(1): 130-136.
- [17] Hoshino Y, Moriya M, Matsudaira A, *et al.* Stereospecific linalool production utilizing two-phase cultivation system in *Pantoea ananatis* [J]. *J Biotechnol*, 2020, 324: 21-27.
- [18] Tashiro M, Kiyota H, Kawai-Noma S, *et al.* Bacterial production of pinene by a laboratory-evolved pinene synthase [J]. *ACS Synth Biol*, 2016, 5(9): 1011-1020.
- [19] Wang X, Wu J, Chen J M, *et al.* Efficient biosynthesis of R-(-)-linalool through adjusting the expression strategy and increasing GPP supply in *Escherichia coli* [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(31): 8381-8390.
- [20] Zhu Y J, Xu J, Sun C, *et al.* Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11087.
- [21] Yin Y J, Zhou H, Zhang J J, *et al.* Isolation and Characterization of *trans-p*-hydroxycinnamoyl monoterpenoids from *Ganoderma sinensis* [J]. *Chem*

- Biodivers*, 2023, 20(4): e202300022.
- [22] Chen S W, Tomlinson B, Chan P, *et al.* The beneficial effects of *Ganoderma lucidum* on cardiovascular and metabolic disease risk [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 1161-1171.
- [23] Jin X Z, Ruiz Beguerie J, Sze D M Y, *et al.* *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) for cancer treatment [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 4(4): CD007731.
- [24] Xiong W, Yang C, Xia J, *et al.* G. lucidum triterpenes restores intestinal flora balance in non-hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: Evidence of 16S rRNA sequencing and network pharmacology analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1197418.
- [25] El Sheikha A F. Nutritional profile and health benefits of *Ganoderma lucidum* Lingzhi, reishi, or mannentake as functional foods: Current scenario and future perspectives [J]. *Foods*, 2022, 11(7): 1030.
- [26] Pang Y R, Zhao Y K, Li S L, *et al.* Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce limonene from waste cooking oil [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 241.
- [27] Foo J L, Leong S S J. Directed evolution of an *E. coli* inner membrane transporter for improved efflux of biofuel molecules [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(1): 81.
- [28] Wang J F, Xiong Z Q, Li S Y, *et al.* Enhancing isoprenoid production through systematically assembling and modulating efflux pumps in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(18): 8057-8067.
- [29] Zhang C Q, Chen X X, Stephanopoulos G, *et al.* Efflux transporter engineering markedly improves amorphadiene production in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(8): 1755-1763.
- [30] Gómez-Pastor R, Pérez-Torrado R, Cabisco E, *et al.* Reduction of oxidative cellular damage by overexpression of the thioredoxin *TRX2* gene improves yield and quality of wine yeast dry active biomass [J]. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 9.
- [31] Wu T, Liu J F, Li M J, *et al.* Improvement of sabinene tolerance of *Escherichia coli* using adaptive laboratory evolution and omics technologies [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 79.
- [32] Wang C L, Liwei M, Park J B, *et al.* Microbial platform for terpenoid production: *Escherichia coli* and yeast [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2460.
- [33] Chang M C, Eachus R A, Trieu W, *et al.* Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(5): 274-277.
- [34] Zhou J, Wang C L, Yang L Y, *et al.* Geranyl diphosphate synthase: An important regulation point in balancing a recombinant monoterpene pathway in *Escherichia coli* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2015, 68: 50-55.
- [35] Azi F, Wang Z, Chen W H, *et al.* Developing *Ganoderma lucidum* as a next-generation cell factory for food and nutraceuticals [J]. *Trends Biotechnol*, 2024, 42(2): 197-211.
- [36] Roy K R, Smith J D, Vonesch S C, *et al.* Multiplexed precision genome editing with trackable genomic barcodes in yeast [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(6): 512-520.
- [37] Wang Q J, Zhao X Y, Jiang Y, *et al.* Functions of representative terpenoids and their biosynthesis mechanisms in medicinal plants [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(12): 1725.
- [38] Oke M A, Afolabi F J, Oyeleke O O, *et al.* *Ganoderma lucidum*: Unutilized natural medicine and promising future solution to emerging diseases in Africa [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 952027.
- [39] Liang C Y, Tian D N, Liu Y Z, *et al.* Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 174: 130-141.
- [40] 康佳茜. 灵芝总皂苷类化合物的提取纯化及其抗氧化、抑癌活性研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2022.

[责任编辑 时圣明]