

# 中药萜类成分合成中法尼基二磷酸合成酶基因的克隆及功能表征

张悦<sup>1,2</sup>, 张烽<sup>1</sup>, 张越<sup>1</sup>, 刘超越<sup>1,2</sup>, 张柏林<sup>1,2</sup>, 刘佳<sup>1\*</sup>, 王彩霞<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

**[摘要]** 目的:通过异源表达不同植物来源的法尼基二磷酸合成酶(FPS)编码基因,提高酿酒酵母中法尼基焦磷酸(FPP)的合成效率,进而提高工程酵母合成萜类化合物的产量。方法:采用柱色谱法提取拟南芥、玫瑰、青蒿、积雪草、啤酒花、苜蓿和人参7种的植物根、茎、叶混样RNA,并反转录为互补DNA(cDNA)第一链,基于该7种植物的转录组数据,设计CaFPS、RrFPS、MsFPS、HiFPS、PgFPS、AtFPS和AaFPS基因序列特异性引物,克隆基因全长,对这些基因进行生物信息分析,构建pESC酵母穿梭载体。利用实验室构建的产 $\beta$ -榄香烯酿酒酵母为底盘菌株,异源表达7种不同植物来源的FPS,以 $\beta$ -榄香烯的产量作为评估标准,在实验室先前构建的高产 $\beta$ -榄香烯的酿酒酵母菌株中进行验证。结果:7种基因获得编码区域序列长均为1021 bp,编码301个氨基酸,均与酿酒酵母内源的FPS编码基因ERG20具有相近的亲缘关系。通过在酿酒酵母中异源表达7种基因,筛选出催化异戊烯焦磷酸酯(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)合成FPP效果最佳的基因为RrFPS,过表达RrFPS酿酒酵母菌株YB-1-Rr和YB-3-Rr的 $\beta$ -榄香烯产量分别比对照菌株YB-1和YB-3高231.25%和189.3%。结论:通过比较7种不同植物来源的FPS编码基因的功能,确定了来自玫瑰中的RrFPS基因所编码的蛋白具有最佳的催化能力。该研究为构建高产萜类化合物的工程酵母菌株构建提供了关键基因元件。

**[关键词]** 酿酒酵母; 倍半萜;  $\beta$ -榄香烯; 基因克隆; 法尼基焦磷酸(FPP); 法尼基二磷酸合成酶(FPS)

**[中图分类号]** R277;Q527;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2025)03-0175-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20250380 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20241225.1537.003>

**[网络出版日期]** 2024-12-25 16:25:32

## Cloning and Functional Characterization of Farnesyl Diphosphate Synthase Gene in Biosynthesis of Terpenoid Components in Chinese Materia Medica

ZHANG Yue<sup>1,2</sup>, ZHANG Feng<sup>1</sup>, ZHANG Yue<sup>1</sup>, LIU Chaoyue<sup>1,2</sup>, ZHANG Bolin<sup>1,2</sup>,  
LIU jia<sup>1\*</sup>, WANG Caixia<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
2. School of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to enhance of the farnesyl pyrophosphate(FPP) pool in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologously expressing different farnesyl diphosphate synthases(FPSs) from various plants, thereby increasing the production of terpenoid compounds by the engineered yeast. **Methods:** RNA from mixed samples of roots, stems, and leaves of seven plants including *Arabidopsis thaliana*, *Rosa rugosa*, *Artemisia annua*, *Centella asiatica*, *Humulus lupulus*, *Medicago sativa*, and *Panax ginseng* was extracted by column chromatography and reverse transcribed into the first strand of complementary DNA(cDNA), and based on the transcriptome data of the seven species of plants, sequence-specific primers were designed for CaFPS, RrFPS, MsFPS, HiFPS, PgFPS, AtFPS, and AaFPS, the full-length of the genes was cloned, and the genes were analyzed for bioinformatics in order to construct a pESC yeast shuttle vector. These seven plant-derived FPSs were further heterologously

**[收稿日期]** 2024-11-19

**[基金项目]** 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2024C006YN);国家自然科学基金面上项目(32372305)

**[第一作者]** 张悦,在读硕士,从事酿酒酵母产 $\beta$ -榄香烯的工程调控研究,E-mail:1132385699@qq.com

**[通信作者]** \*刘佳,博士,从事中药生物工程研究,E-mail:liujia85713@163.com;

\*王彩霞,博士,副研究员,从事中药生物工程研究,Email:cxwang@icmm.ac.cn

expressed in the previous constructed  $\beta$ -elemene-producing yeast, and the yield of  $\beta$ -elemene was indicated for their catalytic activities. **Results:** The coding sequences of *CaFPS*, *RrFPS*, *MsFPS*, *HiFPS*, *PgFPS*, *AtFPS*, and *AaFPS* were all of 1 021 bp in length and encoding 301 amino acids, all of which were similarly related to the endogenous FPS-encoding gene (ERG20) in *S. cerevisiae*. After heterologous expression, *RrFPS* was identified as the most effective in catalyzing the synthesis of FPP from isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). Compared to the control strains, the *RrFPS* overexpressed yeast strains YB-1-Rr and YB-3-Rr increased the production of  $\beta$ -elemene by 231.25% and 189.3%, respectively. **Conclusion:** By comparing the functions of FPS-encoding genes from seven different plant sources, it is determined that the protein encoded by the *RrFPS* from *R. rugosa* has the best catalytic ability, which can provide key genetic elements for the construction of engineered yeast strain constructs with high terpenoid production.

**[Keywords]** *Saccharomyces cerevisiae*; sesquiterpenes;  $\beta$ -elemene; gene cloning; farnesyl pyrophosphate (FPP); farnesyl diphosphate synthase (FPS)

倍半萜类化合物是一种重要的天然有机物,广泛分布于植物界,尤其在木兰目、芸香目、山茱萸目及菊目植物中尤为丰富<sup>[1]</sup>,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎等生理活性<sup>[2]</sup>。在生物合成的过程中,倍半萜的合成主要分为2个步骤,即异戊二烯单元的生成和倍半萜骨架的构建。其中,法尼基焦磷酸(FPP)是合成萜类化合物的重要前体<sup>[3]</sup>,萜类化合物来源于异戊烯焦磷酸酯(IPP)和二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)2种结构单元<sup>[4]</sup>。在酿酒酵母中,内源*ERG20*基因编码的法尼基二磷酸合成酶(FPS)催化IPP和DMAPP合成单萜类化合物前体番叶基焦磷酸(GPP),随后催化GPP合成FPP<sup>[5]</sup>。

通过外源引入不同的倍半萜合酶,经过后续的修饰,最终可生成多样化的倍半萜类化合物<sup>[6]</sup>。目前,异源合成倍半萜类化合物在酿酒酵母菌株中已成功实现,但在这一过程中仍需要克服如萜烯合酶的低酶促能力、代谢负担和竞争等许多挑战<sup>[7]</sup>。其中代谢竞争普遍存在,是产量较低的主要因素,研究人员通过分析整个代谢途径,抑制竞争性代谢通路并提高前体化合物的通量,异源表达不同植物来源的FPS编码基因,以提高酿酒酵母中FPP的合成效率<sup>[8]</sup>。 $\beta$ -榄香烯是一种温郁金中提取的高效、低毒、广谱的抗癌活性天然萜类化合物<sup>[9]</sup>。在酿酒酵母中, $\beta$ -榄香烯的生物合成主要依赖于甲羟戊酸(MVA)途径,该途径中的关键基因*ERG13*、*ERG12*、*ERG8*、*ERG19*和*IDI1*编码的蛋白共同作用促进代谢流向IPP<sup>[10-11]</sup>,随后*ERG20*基因编码的FPS催化IPP与DMAPP经两步催化最终合成萜类化合物前体FPP<sup>[12]</sup>。

本研究从拟南芥<sup>[13]</sup>、玫瑰<sup>[14]</sup>、青蒿<sup>[15]</sup>、积雪草<sup>[16]</sup>、啤酒花<sup>[17]</sup>、苜蓿<sup>[18]</sup>和人参<sup>[19]</sup>共7种植物中克隆出能够编码FPS的基因*CaFPS*、*RrFPS*、*MsFPS*、*HiFPS*、*PgFPS*、*AtFPS*和*AaFPS*。系统地对这7个基因进行了进化树分析和序列比对,并将这些基因

转化至酿酒酵母中异源表达,筛选出表达效果最佳的基因,并在前期构建的高产 $\beta$ -榄香烯酿酒酵母菌株中进行验证,鲨烯和麦角固醇是支路途径中的化合物,检测其含量能有效观察前体FPP的代谢流向,故进一步检测支路途径中鲨烯、麦角固醇的含量。可为后续构建高产萜类化合物的工程酵母菌株提供关键的基因元件。

## 1 材料

ScanDrop 100型超微量紫外-可见分光光度计(德国Analytikjena公司),AG 22331 Hamburg型聚合酶链式反应(PCR)仪(德国Eppendorf公司),ChemiDocXRS+Image LabTM型高灵敏度化学发光凝胶成像系统(武汉佰真生物科技有限公司),GCMS-7000型气相色谱质谱联用仪(安捷伦科技有限公司)。

葡萄糖、半乳糖、酵母粉、胰蛋白胨、琼脂粉、氨苄青霉素、酵母缺陷型培养基(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G8150、D8310、LP0021B、LP0042B、A8190、A1170、S6100),鲨烯、麦角固醇、 $\beta$ -榄香烯对照品(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为SS9920、SE8200、SE9240,纯度均>98%),聚乙二醇、醋酸锂、*N,O*-双(三甲基硅烷基)乙酰胺(阿拉丁生化科技有限公司,批号分别为P103725、L102778、T109041),PCR Master Mix(2 $\times$ )(赛默飞世尔科技有限公司,批号00528778),DNA纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒、T4 DNA连接酶、Trans5K DNA Marker、RNA提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号分别为EG101-01、EM101-02、FL101-01、BM141-01、ER101-01),反转录试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号KR118-01]。用于质粒构建的菌株为大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,购自北京唯地生物科技股份有限公司,用于载体构建的pESC-his质粒空载体为实验室自制,用于转化的酿酒酵母菌株YB-1(缺陷型为YPD+G418)、YB-3(缺陷型为SD-trp+G418)均为本实验室自制。拟南芥

(*Arabidopsis thaliana*)、玫瑰(*Rosa rugosa*)、青蒿(*Artemisia annua*)、积雪草(*Centella asiatica*)、啤酒花(*Humulus lupulus*)、苜蓿(*Medicago sativa*)和人参(*Panax ginseng*)盆栽植物,购自淘宝,由中国中医科学院中药研究所生物技术中心主任孙伟教授鉴定植物基原准确。

## 2 方法

**2.1** 7种植物的总RNA提取及互补DNA(cDNA)合成 分别采摘新鲜的拟南芥、玫瑰、青蒿、积雪草、啤酒花、苜蓿和人参7种植物根、茎、叶,在液氮中研磨制成混样细粉,依据RNA提取试剂盒说明书,采用柱层析法分别提取拟南芥、玫瑰、青蒿、积雪草、啤酒花、苜蓿和人参总RNA。ScanDrop 100型超微量紫外-可见分光光度计检测RNA浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA条带完整性,置于-80℃备用。

按照反转录试剂盒说明,以总RNA 1 μL为模板反转录合成第一链cDNA,-20℃保存备用。

**2.2** FPS编码基因的克隆 根据拟南芥、玫瑰、青蒿、积雪草、啤酒花、苜蓿和人参的全基因组测序数据,对其基因组数据库进行分析,获得*AtFPS*(GenBank登录号 At4g17190)、*RrFPS*(GenBank登录号 KP768082.1)、*AaFPS*(GenBank登录号 AF112881.1)、*CaFPS*(GenBank登录号 AY787627.1)、*HiFPS*(GenBank登录号 AB053487.1)、*MsFPS*(GenBank登录号 GU361537.1)和*PgFPS*(GenBank登录号 DQ087959.1)基因的完整开放阅读框(ORF),利用NCBI 263.0软件在线设计该7对基因的全长引物,利用PrimerPremier 5.0设计特异性cDNA反转录上下游引物(Tm约为55)。引物由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成,序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Gall	上游 TTCAAAAATCTTACTTTTTTTTGG	27
Cyc1	下游 CTTGAGCGTCCAAA	16
Gall-AtFPS	上游 TAACGTCAAGGAGAAAAACATGCTTGACTACAATGTACGC	41
Cyc1-AtFPS	下游 TTTGGGACGCTCGAAGCTACTTTTCGGTTAGAGCGGAT	38
Gall-RrFPS	上游 TTTTCGGTTAGAGCGGATATGAGCAATTTAAGAGCCAAGT	40
Cyc1-RrFPS	下游 CTACTTCTGCCTCTTGTATATCTTTTTTCGGTTAGAGCGGAT	43
Gall-AaFPS	上游 TAACGTCAAGGAGAAAAACATGAGTAGCATCGATCTGAA	40
Cyc1-AaFPS	下游 CTACTTTTGCCTCTTGTAGATTTTATTTTCGGTTAGAGCGGAT	43
Gall-CaFPS	上游 TAACGTCAAGGAGAAAAACATGAGCGATCTGAAGACCAGG	41
Cyc1-CaFPS	下游 CTACTTTTGCCTCTTGTATATCTTTTTTCGGTTAGAGCGGAT	40
Gall-HiFPS	上游 TAACGTCAAGGAGAAAAACATGAGTGGTTAAGGTCAAAATTC	44
Cyc1-HiFPS	下游 TTACTTCTGCCTCTTGTAGATCTTTTCGGTTAGAGCGGAT	40
Gall-MsFPS	上游 TAACGTCAAGGAGAAAAACATGGCAGATCTCAAGTCCACATTC	44
Cyc1-MsFPS	下游 CTACTTCTGCCTCTTGTAAATTTTTTCGGTTAGAGCGGAT	41
Gall-PgFPS	上游 TAACGTCAAGGAGAAAAACATGAGCGATCTGAAGACGAGATT	43
Cyc1-PgFPS	下游 TTACTTTTGCCTTATATATCTTTTTTCGGTTAGAGCGGAT	41

以拟南芥、玫瑰、青蒿、积雪草、啤酒花、苜蓿和人参cDNA为模板进行PCR扩增,PCR体系为98℃预变性2 min,98℃变性10 s,53℃退火5 s,72℃延伸30 s,35个循环,72℃最后延伸5 min,4℃保存。(后续PCR体系均一致)以实验室自制pESC-his质粒空载为模板进行反向扩增片段,将所得目的基因经1%的琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收扩增目的片段并利用凝胶回收试剂盒纯化,再于50℃与载体连接45 min,将连接产物转化至大肠杆菌DH5α感

受态细胞中,涂布于含100 mg·L<sup>-1</sup>氨苄青霉素的LB平板上37℃培养12~16 h。通过菌落PCR检测选取阳性克隆送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

**2.3** 生物信息学分析 将酿酒酵母内源*ERG20*基因完整开放阅读框用DNAMAN软件翻译转化成蛋白序列,在线blast其全长序列,搜索*ERG20*基因的同源序列。使用在线软件Protparam(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)分析*ERG20*理化参

数; TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析跨膜区; SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 在线预测蛋白质的二级结构, 利用 SWISS-MOEL (<https://www.Swissmodel.expasy.org/>) 在线软件预测获得 ERG20 编码蛋白的三级结构。利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.Cbs.Dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽分析; 利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 使用 CDD 工具进行单条蛋白结构域预测; 使用 ProtCompv. 9.0 软件 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>) 工具进行亚细胞定位预测; 使用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列多重序列比对; 使用 MEGA 11 软件构建系统进化树, bootstrap 为 500。

**2.4 异源 FPS 编码基因的酵母转化** 用 YPD 培养基活化 YB-1 菌株, 使紫外-可见分光光度计 600 nm 下吸光度  $A_{600\text{nm}}$  为 0.3, 按照  $1 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  接种到装有 YPD 液体培养基 80 mL 的三角瓶中,  $30^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养至  $A_{600\text{nm}}$  为 0.7~1.0。采用醋酸锂法制备酵母感受态<sup>[20]</sup>, 将 2.2 项下构建的质粒转入制备好的酵母感受态中, 孵育 2 h 后涂布在 SD-His+G418 缺陷型培养基中,  $30^\circ\text{C}$  培养 48 h 后筛选阳性转化子, 挑取单克隆至 SD-His+G418 缺陷型培养液中过夜培养, 挑取单克隆菌液进行菌落 PCR, 选择阳性菌株送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

**2.5 酿酒酵母高产  $\beta$ -榄香烯菌株 FPS 编码基因的验证** 将筛选出表达量较高的 FPS 基因, 导入到实验室构建的高产  $\beta$ -榄香烯的菌株 YB-3 中进行进一步验证。用 YPD 活化 YB-3 菌株, 使其  $A_{600\text{nm}}$  为 0.3, 按照  $1 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  接种到装有 YPD 液体培养基 80 mL 的三角瓶中,  $30^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养至  $A_{600\text{nm}}$  为 0.7~1.0。将 2.4 项下酵母转化筛选所得表达量最佳的基因质粒转入制备好的酵母感受态中, 孵育 2 h 后涂布在 SD-Trp-His+G418 缺陷型培养基中,  $30^\circ\text{C}$  培养 48 h 后筛选阳性转化子, 挑取单克隆至 SD-Trp-His+G418 缺陷型培养液中过夜培养, 取单克隆菌液进行菌落 PCR 检测, 选择阳性菌株送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

## 2.6 发酵及产物的提取

**2.6.1 种子液的制备** 取出 YB-1、YB-3 菌株, 在 YPD 固体培养基中划线培养,  $30^\circ\text{C}$  培养 48 h 后挑取单菌落于装有 YPD 液体培养基 80 mL 的摇瓶中, 在

摇床中  $30^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 36 h, 即得种子液。

**2.6.2 摇瓶发酵** 将 2.6.1 项下制备好的 2 个菌株的种子液分别接种至 25 mL 的 YPD 液体培养基中,  $30^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养 12 h 后加入正十二烷 2.5 mL<sup>[21]</sup>,  $30^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养 5 d 后进行产物提取(每个发酵样品 3 个平行)。

**2.6.3 产物提取与预处理** 将 2.6.2 项下发酵后的菌液转移至 50 mL 离心管中,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min (离心半径 8 cm, 下同), 取上层有机相<sup>[22]</sup>, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 取 50  $\mu\text{L}$  进行产物检测(样品浓度过高可加正己烷稀释)<sup>[23]</sup>, 用于检测  $\beta$ -榄香烯。将摇瓶中发酵结束的菌液充分混匀后取菌液(下层水相) 1 mL,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min, 去上清, 加入 0.5 g 玻璃珠和乙酸乙酯 300  $\mu\text{L}$ , 涡旋混匀, 70 Hz 研磨 960 s (每 120 s 停 10 s), 再加入乙酸乙酯 700  $\mu\text{L}$ , 超声(频率 80 kHz, 功率 80 W) 萃取 30 min,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 取上清液 50  $\mu\text{L}$  蒸发至干, 加入 *N,O*-双(三甲基硅基)三氟代乙酰胺 50  $\mu\text{L}$ ,  $80^\circ\text{C}$  衍生化反应 30 min, 用于气相色谱-质谱法(GC-MS)检测鲨烯、麦角固醇的含量。

## 2.7 $\beta$ -榄香烯、鲨烯、麦角固醇的定量分析

**2.7.1 对照品溶液的配制** 取  $\beta$ -榄香烯对照品, 加正十二烷溶解, 配制质量浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液, 并梯度为系列对照品溶液, 按 2.7.2 项下方法检测, 制作回归曲线为  $Y=0.000\ 1X+0.946\ 4$ , 回归系数  $R^2=0.999\ 1$ , 线性范围 0~50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取鲨烯对照品, 加乙酸乙酯溶解, 配制质量浓度为  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液, 并梯度稀释为系列对照品溶液, 按 2.7.2 项下方法检测, 制作回归曲线为  $Y=7 \times 10^{-5}X+2.348\ 2$ , 回归系数  $R^2=0.998\ 7$ , 线性范围 0~50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 取麦角固醇对照品, 加乙酸乙酯溶解, 配制质量浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液, 并梯度为系列对照品溶液, 按 2.7.2 项下方法检测, 制作回归曲线为  $Y=0.001\ 8X-0.332\ 6$ , 回归系数  $R^2=0.999\ 7$ , 线性范围 0~50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.7.2 检测条件**  $\beta$ -榄香烯: 色谱条件为 Agilent HP-5 毛细管柱(0.25 mm $\times$ 30 m, 0.25  $\mu\text{m}$ ), 载气为氦气, 流速  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 进样口温度  $280^\circ\text{C}$ , 不分流进样, 进样量 1  $\mu\text{L}$ , 程序升温(起始温度  $80^\circ\text{C}$  保持 1 min; 以  $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速度升温至  $180^\circ\text{C}$ , 保持 3 min; 以  $20^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速度升温至  $280^\circ\text{C}$ , 保持 6 min); 质谱条件为电子轰击离子源(EI), 电子能量 70 eV, 离子源温度  $230^\circ\text{C}$ , 四极杆温度  $150^\circ\text{C}$ , 加速电压 5 kV, 多反应监测(MRM)模式扫描( $m/z$  161.1~93.1), 溶剂延迟 3 min, 质谱扫描范围为  $m/z$  40~450。

鲨烯、麦角固醇:色谱条件为Agilent HP-5毛细管柱(0.25 mm×30 m, 0.25 μm),载气为氦气,流速1.5 mL·min<sup>-1</sup>,进样口温度300 °C,不分流进样,进样量1 μL,程序升温(起始温度80 °C,保持1 min;以20 °C·min<sup>-1</sup>的速度升温至280 °C,保持15 min;以20 °C·min<sup>-1</sup>的速度升温至300 °C,保持5 min),质谱条件为电子轰击离子源(EI),电子能量70 eV,离子源温度230 °C,四极杆温度150 °C,加速电压8 kV,MRM模式扫描(鲨烯 *m/z* 136.9~95.1,麦角固醇 *m/z* 336.8~69.1),溶剂延迟5 min,质谱扫描范围为 *m/z* 40~450。

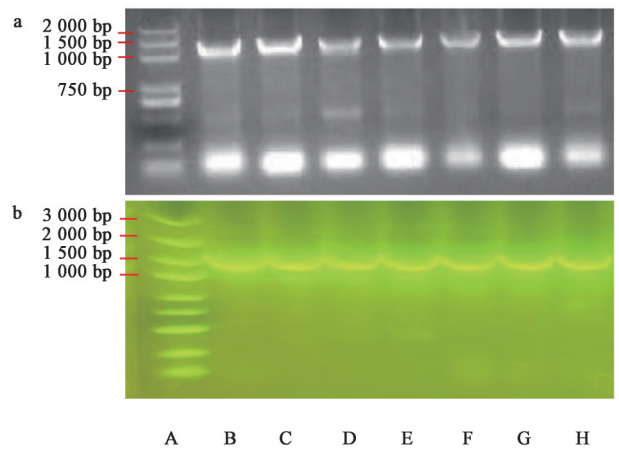
**2.8 统计学分析** 采用SPSS 23.0进行数据分析,Shapiro-Wilks检验进行正态分布检验,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析,两两比较用*t*检验,不符合正态分布的资料使用非参数检验。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 7种植物的FPS编码片段扩增和质粒的构建

拟南芥、玫瑰、青蒿、积雪草、啤酒花、苜蓿和人参总RNA测量吸光度 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 均在2.0~2.4,表明样品纯净,无蛋白质或者DNA污染,可用于反转录和PCR全长扩增。以反转录获得的7种植物的cDNA为模板进行PCR扩增,克隆获得的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,在1 000~2 000 bp有单一且明亮的条带,条带大小符合预期。对PCR产物进行测序,扩增得到的目的基因序列长度为1 021 bp,编码301个氨基酸,分别为*CaFPS*、*RrFPS*、*MsFPS*、*HiFPS*、*PgFPS*、*AtFPS*和*AaFPS*,与扩增载体连接后进行测序,测序结果显示克隆基因与目的基因氨基酸序列一致,使用质粒小提试剂盒获得质粒pESC-his-Pgal1-*AtFPS*-Tcyc1、pESC-his-Pgal1-*RrFPS*-Tcyc1、pESC-his-Pgal1-*AaFPS*-Tcyc1、pESC-his-Pgal1-*CaFPS*-Tcyc1、pESC-his-Pgal1-*HiFPS*-Tcyc1、pESC-his-Pgal1-*MsFPS*-Tcyc1和pESC-his-Pgal1-*PgFPS*-Tcyc1。见图1。

**3.2 系统进化树分析** 利用MEGA 11软件构建系统进化树,结果发现克隆的7个FPS编码基因与酿酒酵母内源的*ERG20*基因均具有相近的亲缘关系,其中*CaFPS*与*PgFPS*聚为一支,具有100%的相似性;*MsFPS*、*AaFPS*、*HiFPS*、*RrFPS*和*AtFPS*聚集在5个不同的分支中,他们和内源的*ERG20*基因可信度相近,可视为同工酶。7个基因蛋白序列比对结果显示,保守的和相似的氨基酸残基相似度分别为75%和50%以上。FPS的5个保守结构域分别为底



注:A. Trans5K DNA Marker; B. *AtFPS*; C. *RrFPS*; D. *AaFPS*; E. *CaFPS*; F. *HiFPS*; G. *MsFPS*; H. *PgFPS*

图1 7种FPS编码基因的琼脂糖凝胶电泳(a)及菌落PCR琼脂糖凝胶电泳(b)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis(a) and colony PCR agarose gel electrophoresis(b) of 7 FPS coding genes

物结合袋、富天冬氨酸区1、催化位点、底物-mg2c结合位点和富天冬氨酸区2。高度保守的第一和第二天冬氨酸富区[DD(XX)2-4D]位于结构域II和结构域V。见图2、图3。

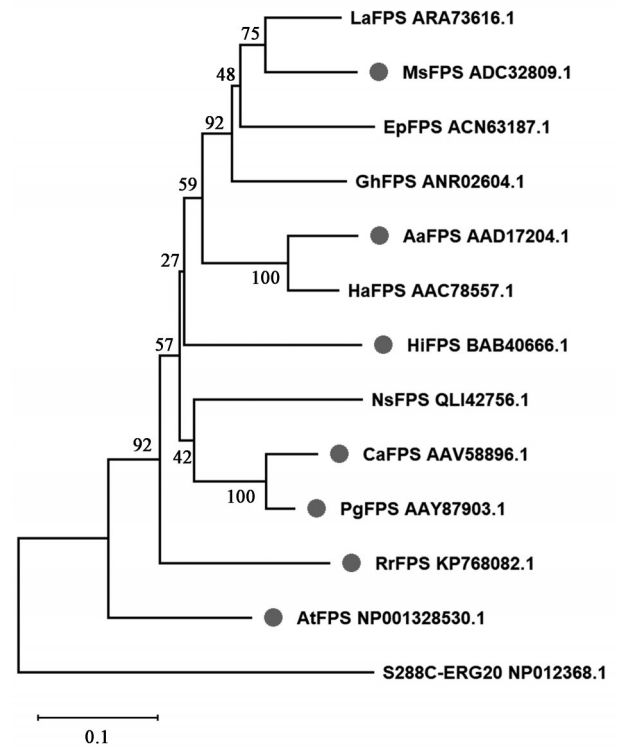
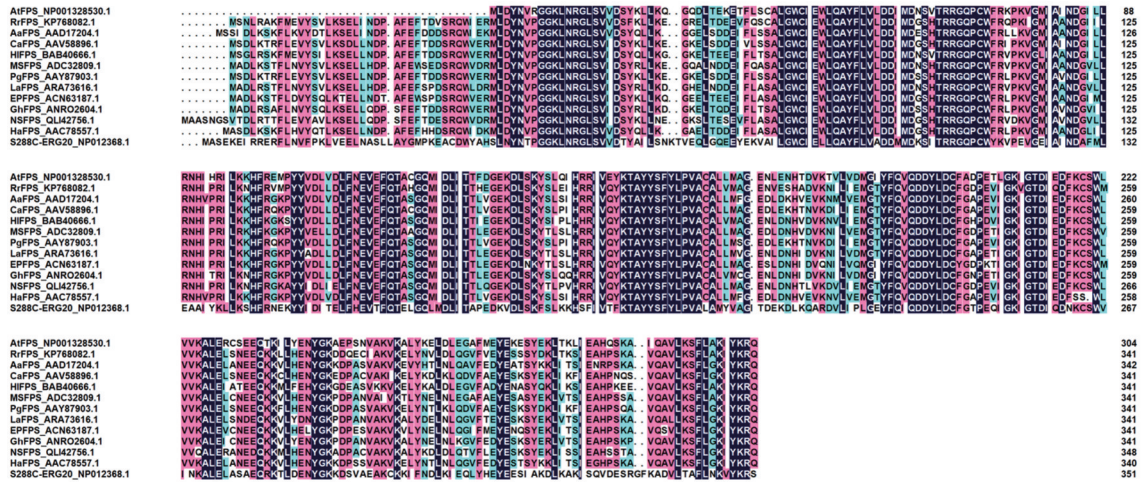


图2 7种基因间亲缘关系的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of relationships among 7 genes

**3.3 酿酒酵母发酵产物检测** 将3.1中构建的质粒转入酿酒酵母YB-1菌株中,挑取单克隆进行菌落PCR检测,目的条带在1 000~1 500 bp,测序结果显



注:保守的氨基酸残基为深蓝色,相似的残基为粉红色和蓝色;I~V:保守结构域

图3 不同植物来源的FPS蛋白序列比对

Fig. 3 Sequence alignment of FPS protein from different plant sources

示目的基因没有碱基突变。阳性菌株命名为YB-1-At、YB-1-Rr、YB-1-Aa、YB-1-Ca、YB-1-Hi、YB-1-Ms和YB-1-Pg。以上菌株同YB-1菌株经发酵后,产物分布见图4。YB-1菌株发酵产物与β-榄香烯对照品的保留时间和质谱碎片信息一致。定量分析显示,以YB-1-Rr产β-榄香烯的浓度最高,较YB-1菌株提高231.25%,YB-1-Pg生成β-榄香烯也比YB-1菌株高219.35%。与YB-1比较,7种菌株中鲨烯和麦角固醇含量有所提升,说明旁途径中化合物的含量也有所提高。见表2及增强出版附加材料。说明玫瑰中RrFPS编码的蛋白催化前体物质产β-榄香烯能力高于其他几种基因所编码的蛋白。

**3.4 RrFPS基因在YB-3底盘菌株中验证** 以实验室前期保存酿酒酵母YB-3为底盘菌株,导入RrFPS质粒,得到菌株YB-3-Rr、YB-3-Rr菌株的发酵产物中,β-榄香烯产量较对照YB-3菌株提高189.03%,与YB-1底盘菌株所得结果一致。YB-3底盘菌株是在YB-1底盘菌株中整合了多个中心代谢途径基因、MVA途径关键限速酶基因和β-榄香烯合酶基因。与YB-3菌株比较,YB-3-Rr菌株与鲨烯和麦角固醇都有所降低,说明在前体通量比较充足的情况下引入RrFPS基因后,更多的代谢流向β-榄香烯,见表3及增强出版附加材料。

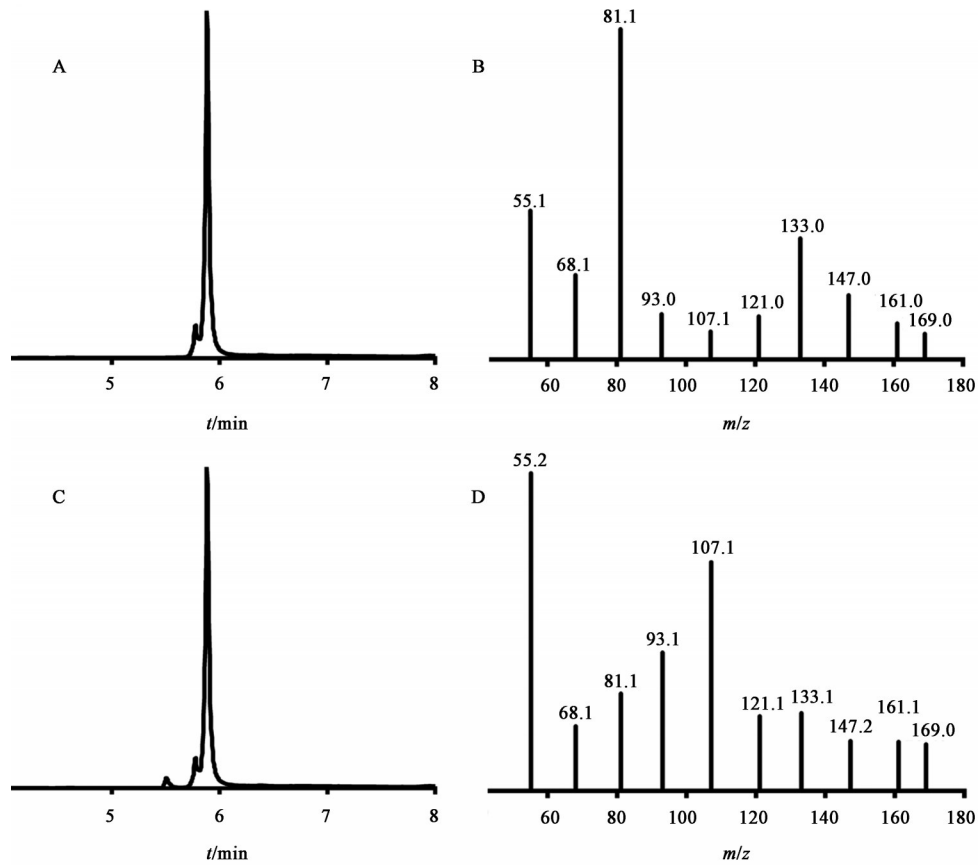
### 4 讨论

酿酒酵母中的ERG20基因编码FPS,由于该基因控制着代谢中间体向各种萜类化合物合成的流量,因此被认为是萜类化合物生产中的限速步骤<sup>[24-25]</sup>。研究人员采用了多种策略来操纵ERG20基因,以提高萜类化合物的产量。一种方法是通过

突变ERG20基因来改变其底物特异性或催化效率<sup>[26]</sup>,研究表明,在酿酒酵母突变ERG20位点可以提高单萜和二萜类化合物的产量<sup>[27-28]</sup>,但对于增加倍半萜类化合物的产量还没有相关研究。本研究克隆了7种不同植物来源的FPS编码基因,并以β-榄香烯的产量进行表征,成功筛选出表达量较高的RrFPS,有效提高酿酒酵母中β-榄香烯的产量,这对于微生物细胞工厂的生产具有重要意义。同时,观察到在提高前体FPP的供应后,鲨烯和麦角固醇的滴度有所降低,这可能是因为更多的代谢流向了β-榄香烯的合成。

FPP是多种生物分子(如类固醇、类胡萝卜素、萜类化合物等)的合成前体<sup>[29]</sup>。FPS的编码基因在多种生物体中已被克隆和表达,研究其在不同组织和发育阶段的表达模式,有助于理解其在生物体内的功能和调控机制<sup>[30]</sup>。通过基因工程手段调控植物中的FPS,可以提高植物次生代谢产物的产量,如提高药用植物中有效成分的含量,具有重要的农业和药用价值。因此在植物中克隆FPS基因并筛选表达量较高的FPS对多种生物分子产量提升具有重要意义。

此外,本研究还揭示了代谢流的重新分配对于提高目标产物产量的潜在影响,与WEI等<sup>[31]</sup>从人参中克隆FPS的编码基因并在大肠杆菌中验证其活性的研究相比,本研究不仅在酿酒酵母中验证了多个植物来源的FPS的编码基因,而且还实现了在酿酒酵母中β-榄香烯产量的显著提升。与PADDON等<sup>[32]</sup>从玫瑰中鉴定出RrFPS基因的研究相比,本研究进一步探索了RrFPS基因在酿酒酵母中的实际



注:A.β-榄香烯对照品色谱;B.β-榄香烯对照品质谱;C.YB-1发酵产物色谱;D.YB-1发酵产物质谱

图4 YB-1菌株发酵产物的确定

Fig. 4 Determination of fermentation products of YB-1 strain

表2 7种基因的导入对YB-1菌β-榄香烯、鲨烯、麦角固醇产量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of 7 genes on production of β-elemene, squalene and ergosterol in YB-1 strain ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

菌株	β-榄香烯/mg·L <sup>-1</sup>	鲨烯/mg·L <sup>-1</sup>	麦角固醇/mg·L <sup>-1</sup>	A <sub>600nm</sub>
YB-1	14.06±0.46	1.41±0.03	3.35±0.07	5.77±0.29
YB-1-At	17.38±0.30 <sup>2)</sup>	1.71±0.06 <sup>1)</sup>	5.16±0.44 <sup>2)</sup>	6.29±0.01 <sup>2)</sup>
YB-1-Rr	30.50±0.45 <sup>2)</sup>	1.97±0.12 <sup>1)</sup>	7.96±0.04 <sup>2)</sup>	6.53±0.03 <sup>2)</sup>
YB-1-Aa	24.95±0.31 <sup>2)</sup>	1.18±0.02 <sup>1)</sup>	3.08±0.77 <sup>2)</sup>	6.12±0.03 <sup>2)</sup>
YB-1-Ca	24.62±0.14 <sup>2)</sup>	1.79±0.01 <sup>1)</sup>	5.20±0.04 <sup>2)</sup>	6.50±0.01 <sup>2)</sup>
YB-1-Hi	19.24±0.46 <sup>2)</sup>	2.93±0.06 <sup>1)</sup>	6.78±0.63 <sup>2)</sup>	6.69±0.26 <sup>2)</sup>
YB-1-Ms	18.28±0.15 <sup>2)</sup>	1.56±0.07 <sup>1)</sup>	5.28±0.75 <sup>2)</sup>	5.90±0.23 <sup>2)</sup>
YB-1-Pg	29.17±0.94 <sup>2)</sup>	2.06±0.03 <sup>1)</sup>	4.91±0.01 <sup>2)</sup>	6.41±0.35 <sup>2)</sup>

注:与YB-1比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01

应用,并优化了β-榄香烯的生产。有学者通过优化MVA途径及改造中心代谢增强前体和辅因子供给,下调竞争途径关键基因表达水平和改造启动子来提高萜类化合物前体FPP的供应,有效改变代谢流向,减少鲨烯和麦角固醇等竞争性产物的生成,几种策略联合使用对FPP的合成效果明显<sup>[33-34]</sup>,后续

表3 RrFPS基因的导入对YB-3菌β-榄香烯、鲨烯、麦角固醇产量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of RrFPS gene on production of β-elemene, squalene and ergosterol in YB-3 strain ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

菌株	β-榄香烯/mg·L <sup>-1</sup>	鲨烯/mg·L <sup>-1</sup>	麦角固醇/mg·L <sup>-1</sup>	A <sub>600nm</sub>
YB-3	54.52±0.43	2.50±0.04	38.72±0.06	11.45±0.86
YB-3-Rr	101.61±0.58 <sup>2)</sup>	2.32±0.12 <sup>1)</sup>	35.56±0.15 <sup>2)</sup>	12.48±0.09 <sup>2)</sup>

注:与YB-3比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01

实验可以将RrFPS与上述策略联用,能有有效的提高β-榄香烯的产量。

综上,本研究通过异源表达7种植物中编码FPP的基因,最终确定导入RrFPS基因的酿酒酵母具有最高的β-榄香烯产量,这为构建高产倍半萜类化合物的工程酵母菌株提供了新的策略。然而本研究的局限性在于,仅在酿酒酵母体内验证了这7种基因的表达,而对于这些基因的体外功能验证还有待进一步探索。此外,尽管观察到了代谢流的变化,但对于这些变化背后的分子机制和调控网络的理解仍然有限。未来应该重点对这些基因的体外功能、代谢流变化的分子机制和酵母菌株的优化

开展相关研究,以期进一步提高 $\beta$ -榄香烯的产量和生产效率。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] LIU C L, XUE K, YANG Y, et al. Metabolic engineering strategies for sesquiterpene production in microorganism[J]. Crit Rev Biotechnol, 2022, 42(1): 73-92.
- [2] 杨立苑,程菊,陈建军,等. 倍半萜类化合物生物学活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(5): 289-298.  
YANG L Y, CHENG J, CHEN J J, et al. Biological activities of sesquiterpenoids: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(5): 289-298.
- [3] 陈新,李玲玲,吕慧贞,等. 法呢基焦磷酸(FPP)的生物合成及其分子调控[J]. 生物技术通报, 2007, (2): 67-71.  
CHEN X, LI L L, LYU H Z, et al. The biosynthetic pathway and molecular regulation of farnesyl diphosphate (FPP) [J]. Biotechnol Bull, 2007, (2): 67-71.
- [4] MA S M, GARCIA D E, REDDING-JOHANSON A M, et al. Optimization of a heterologous mevalonate pathway through the use of variant HMG-CoA reductases [J]. Metab Eng, 2011, 13(5): 588-597.
- [5] 李荣生,王冬,石玉松,等. 动态调控酿酒酵母 *ERG20* 基因表达提高单萜化合物的生产[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(4): 897-905.  
LI R S, WANG D, SHI Y S, et al. Dynamic control of *ERG20* expression to improve production of monoterpenes by engineering *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(4): 897-905.
- [6] LOU T T, LI A N, XU H C, et al. Structural insights into three sesquiterpene synthases for the biosynthesis of tricyclic sesquiterpenes and chemical space expansion by structure-based mutagenesis[J]. J Am Chem Soc, 2023, 145(15): 8474-8485.
- [7] CAO Y, ZHANG H, LIU H, et al. Biosynthesis and production of sabinene: Current state and perspectives [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(4): 1535-1544.
- [8] SCALCINATI G, PARTOW S, SIEWERS V, et al. Combined metabolic engineering of precursor and co-factor supply to increase  $\alpha$ -santalene production by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microb Cell Fact, 2012, 11: 117.
- [9] 黄汉昌,姜瑞瑞,张明贤.  $\beta$ -榄香烯的分析检测方法及其制备技术研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(2): 116-120.  
HUANG H C, JIANG R R, ZHANG M X. The progress on analytical methods and isolated techniques on the development of  $\beta$ -elemene [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2011, 28(2): 116-120.
- [10] VERWAAL R, WANG J, MEIJNEN J P, et al. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(13): 4342-4350.
- [11] 晁二昆,钱广涛,孙梦楚,等. 酿酒酵母细胞中 $\beta$ -香树脂醇代谢流调控的研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3819-3825.  
CHAO E K, QIAN G T, SUN M C, et al. Regulation of  $\beta$ -mercuryl alcohol metabolic flow in *Saccharomyces cerevisiae* cells [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(16): 3819-3825
- [12] KIM O T, AHN J C, HWANG S J, et al. Cloning and expression of a farnesyl diphosphate synthase in *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. Mol Cells, 2005, 19(2): 294-299.
- [13] CUNILLERA N, ARRÒ M, DELOURME D, et al. Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes [J]. J Biol Chem, 1996, 271(13): 7774-7780.
- [14] WEI G, CHEN Y, WANG J, et al. Molecular cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase from *Rosa rugosa* Thunb associated with salinity stress [J]. PeerJ, 2024, 12: e16929.
- [15] CHEN D, YE H, LI G. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation [J]. Plant Sci, 2000, 155(2): 179-185.
- [16] LIU F, LIU S C, QI Y K, et al. Enhancing trans-nerolidol productivity in *Yarrowia lipolytica* by improving precursor supply and optimizing nerolidol synthase activity [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(48): 15157-15165.
- [17] OKADA, YUKIO, MANABU S, et al. Molecular cloning and expression of farnesyl pyrophosphate synthase gene responsible for essential oil biosynthesis in hop (*Humulus lupulus*) [J]. J Plant Physiol, 2001, 158(9): 1183-1188.
- [18] SUNN Y, LONG R, KANG J, et al. Molecular cloning and characterization of three isoprenyl diphosphate synthase genes from alfalfa [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(2): 2035-2044.
- [19] KIM, O T, BANG K H, JUNG S J, et al. Molecular characterization of ginseng farnesyl diphosphate synthase gene and its up-regulation by methyl jasmonate [J]. Biol Plant, 2010, 54(1): 47-53.
- [20] STARK M J R. The awesome power of yeast genetics-practical approaches and recipes for success: Methods in yeast genetics: A cold spring harbor laboratory course manual, 2000 edition [J]. J Cell Sci, 2001, 114(14): 2551-2552.
- [21] 宋叶华,沈宏伟,杨薇,等. 酿酒酵母工程菌高密度培养生产香紫苏醇[J]. 生物工程学报, 2015, 31(1): 147-151.  
SONG Y H, SHEN H G, YANG W, et al. High cell density culture of an engineered yeast strain for sclareol production [J]. Chin J Biotechnol, 2015, 31(1): 147-151.
- [22] 黄红萍,谢钰航,黄若晨,等. 桉烷型倍半萜类化合物生物活性研究进展[J]. 中成药, 2024, 46(10): 3387-3392.  
HUANG H P, XIE Y H, HUANG R C, et al. Research progress of biological activity of sesquiterpene compounds

- [J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(10): 3387-3392.
- [23] ZHANG J, WANG X, ZHANG X Y, et al. Sesquiterpene synthase engineering and targeted engineering of  $\alpha$ -santalene overproduction in *Escherichia coli*[J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(13): 6871-6888.
- [24] 邢敏钰, 冉滢侨, 谭丹. 酿酒酵母中萜类化合物的生物合成与代谢调控研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1661-1693.
- XING M Y, RAN G Q, TAN D. Advances in the biosynthesis and metabolic regulation of terpenoids in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chin J Biotechnol, 2024, 40(6): 1661-1693.
- [25] 李晓东, 杨成帅, 王平平, 等. 构建酿酒酵母细胞工厂从头合成倍半萜类化合物 $\alpha$ -新丁香三环烯和 $\beta$ -石竹烯[J]. 合成生物学, 2021, 2(5): 792-803.
- LI X D, YANG C S, WANG P P, et al. Production of sesquiterpenoids  $\alpha$ -neoclovene and  $\beta$ -caryophyllene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Synth Biol, 2021, 2(5): 792-803.
- [26] ZHAO J Z, LI C, ZHANG Y, et al. Dynamic control of *ERG20* expression combined with minimized endogenous downstream metabolism contributes to the improvement of geraniol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microb Cell Fact, 2017, 16(1): 17.
- [27] FISCHER M J, MEYER S, CLAUDEL P, et al. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast[J]. Biotechnol Bioeng, 2011, 108(8): 1883-1892.
- [28] DONG H, CHEN S, ZHU J, et al. Enhance production of diterpenoids in yeast by overexpression of the fused enzyme of *ERG20* and its mutant *mERG20*[J]. J Biotechnol, 2020, 307: 29-34.
- [29] TIPPMANN S, SCALCINATI G, SIEWERS V, et al. Production of farnesene and santalene by *Saccharomyces cerevisiae* using fed-batch cultivations with RQ-controlled feed[J]. Biotechnol Bioeng, 2016, 113(1): 72-81.
- [30] CAO X, YIN T, MIAO Q, et al. Molecular characterization and expression analysis of a gene encoding for farnesyl diphosphate synthase from *Euphorbia pekinensis* Rupr [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2): 1487-1492.
- [31] WEI J, LIU H, LIU M, et al. Oleanolic acid potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells [J]. Oncol Rep, 2012, 28(4): 1339-1345.
- [32] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. Nature, 2013, 496(7446): 528-532.
- [33] LIU, Q, ZHANG G, SU L Q, et al. Reprogramming the metabolism of oleaginous yeast for sustainably biosynthesizing the anticarcinogen precursor germacrene A [J]. Green Chem, 2023, 25(20): 7988-7997.
- [34] PARAMASIVAN K, RAJAGOPAL K, MUTTURI S. Studies on squalene biosynthesis and the standardization of its extraction methodology from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 187(3): 691-707.

[责任编辑 李嘉麟]