

## 引文格式:

刘亚铭, 王康, 崔玉琳, 等. *Bkt* 基因和 *crtR-B* 基因在集胞藻 PCC 6803 中的重组表达及功能分析 [J]. 集成技术, 2021, 10(5): 96-103.

Liu YM, Wang K, Cui YL, et al. Recombinant expression and functional analysis of *bkt* gene and *crtR-B* gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Journal of Integration Technology, 2021, 10(5): 96-103.

## *Bkt* 基因和 *crtR-B* 基因在集胞藻 PCC 6803 中的 重组表达及功能分析

刘亚铭<sup>1,2</sup> 王 康<sup>1,2</sup> 崔玉琳<sup>1,3</sup> 陈 高<sup>4,5\*</sup> 秦 松<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室 烟台 264003)

<sup>2</sup>(中国科学院大学 北京 101418)

<sup>3</sup>(中国科学院海洋大科学研究中心 青岛 266071)

<sup>4</sup>(山东省农业科学院农作物种质资源研究所 济南 250100)

<sup>5</sup>(山东省作物遗传改良与生态生理重点实验室 济南 250100)

**摘 要** 将雨生红球藻中的  $\beta$ -胡萝卜素酮化酶基因(*bkt*)和  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶基因(*crtR-B*)经密码子优化后,通过自然转化法分别转入集胞藻 PCC 6803 基因组中。高效液相色谱分析显示:转入 *bkt* 基因的细胞产生角黄质的同时,海胆酮含量减少;转入 *crtR-B* 基因的细胞产生金盏花黄质的同时,玉米黄素含量减少。实验结果表明,外源的  $\beta$ -胡萝卜素酮化酶基因将海胆酮转化为角黄质,外源的  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶基因将玉米黄素转化为金盏花黄质。该文利用代谢工程策略,在集胞藻 PCC 6803 中构建类胡萝卜素生物合成途径,为通过代谢工程在集胞藻 PCC 6803 中生产虾青素奠定了基础。

**关键词** 集胞藻 PCC 6803;  $\beta$ -胡萝卜素酮化酶基因(*bkt*);  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶基因(*crtR-B*); 代谢过程  
**中图分类号** Q 7 **文献标志码** A **doi**: 10.12146/j.issn.2095-3135.20210427015

收稿日期: 2021-04-27 修回日期: 2021-05-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(41876188); 山东省自然科学基金项目(ZR2018ZB0210)

作者简介: 刘亚铭, 硕士, 研究方向为微藻合成生物学; 王康, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学和代谢工程; 崔玉琳, 副研究员, 研究方向为分子藻类学和微藻代谢工程; 陈高(通讯作者), 研究员, 研究方向为微生物资源开发与农业应用, E-mail: chengao001@aliyun.com; 秦松(通讯作者), 研究员, 研究方向为海洋藻类学和海岸带生物工程, E-mail: sqin@yic.ac.cn.

## Recombinant Expression and Functional Analysis of *bkt* Gene and *crtR-B* Gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803

LIU Yaming<sup>1,2</sup> WANG Kang<sup>1,2</sup> CUI Yulin<sup>1,3</sup> CHEN Gao<sup>4,5\*</sup> QIN Song<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>(Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

<sup>2</sup>(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101418, China)

<sup>3</sup>(Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

<sup>4</sup>(Institute of Crop Germplasm Resources, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

<sup>5</sup>(Shandong Provincial Key Laboratory of Academy Crop Genetic Improvement, Ecology and Physiology, Jinan 250100, China)

\*Corresponding Author: chengao001@aliyun.com; sqin@yic.ac.cn

**Abstract** The  $\beta$ -carotene ketolase gene (*bkt*) and  $\beta$ -carotene hydroxylase gene (*crtR-B*) from *Haematococcus pluvialis* were codon-optimized and transferred to *Synechocystis* sp. PCC 6803 genome by natural transformation method. High performance liquid chromatography analysis showed that cells transfected with *bkt* gene produced canthaxanthin, while echinone decreased; the cells with *crtR-B* gene produced adonixanthin, while zeaxanthin was reduced. The results showed that the exogenous  $\beta$ -carotene ketolase converted echinone to canthaxanthin and the exogenous  $\beta$ -carotene hydroxylase converted zeaxanthin into adonixanthin. In this paper, the pathway of astaxanthin biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803 was constructed by metabolic engineering strategy, which laid a foundation for astaxanthin production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 with metabolic engineering.

**Keywords** *Synechocystis* sp. PCC 6803;  $\beta$ -carotene ketolase gene (*bkt*);  $\beta$ -carotene hydroxylase gene (*crtR-B*); metabolic engineering

**Funding** This work is supported by National Natural Science Foundation of China (41876188), and Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2018ZB0210)

## 1 引言

类胡萝卜素 (Carotenoids) 是一类广泛存在于高等植物、真核微藻和蓝藻光合膜的烯萜类化合物<sup>[1]</sup>, 通常是由 8 个类异戊二烯单位组成的碳氢化合物及其氧化衍生物<sup>[2-3]</sup>。在光合生物中, 其作为捕光色素成分参与光合作用, 并可以通过清除自由基和抗氧化来实现自我保护<sup>[4-5]</sup>。研究表明, 类胡萝卜素在人体健康方面也发挥着重要作用。其中, 一些类胡萝卜素可作为人体内维生素 A 的重要来源; 而大部分的类胡萝卜素有

很强的抗氧化活性<sup>[6]</sup>, 能够增强人和动物的免疫力<sup>[2,7-8]</sup>, 具有多种重要的保健功能和较大的医用价值。例如, 角黄质具有抗氧化、抗癌、提高免疫力, 以及保护皮肤和骨骼健康等作用<sup>[4]</sup>; 金盏花黄质作为虾青素合成的中间产物, 可以通过激活抗氧化防御对出血性脑损伤发挥保护作用, 具有防止脑内出血的潜力<sup>[9]</sup>。

蓝藻, 又称蓝细菌, 是一类能够进行光合作用的原核生物<sup>[10]</sup>。集胞藻 PCC 6803 是研究代谢调控的模式蓝藻, 也是利用合成生物学手段构建细胞工厂的优良底盘<sup>[11-12]</sup>。其既能自养, 又能异养,

并且遗传背景清晰,是最早完成全基因组测序的藻类,具有天然的遗传转化系统<sup>[13]</sup>。集胞藻 PCC 6803 中含有的内源性  $\beta$ -胡萝卜素单酮醇酶能催化  $\beta$ -胡萝卜素转化为海胆酮,但不能将海胆酮进一步转化;而内源性  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶( $\beta$ -Carotene Hydroxylase, CRTR-B)<sup>[14-15]</sup>也只能催化  $\beta$ -胡萝卜素转化为玉米黄素。然而,在雨生红球藻中, $\beta$ -胡萝卜素酮化酶( $\beta$ -Carotene Ketolase, BKT)<sup>[14]</sup>不仅可以催化  $\beta$ -胡萝卜素转化为海胆酮,并进一步转化为角黄质,还可以催化金盏花黄质转化为虾青素; $\beta$ -胡萝卜素羟化酶则可以催化  $\beta$ -胡萝卜素转化为玉米黄素,并催化角黄质转化为虾青素。

为进一步阐明 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因的功能及其作用机制,本文克隆了来自雨生红球藻的  $\beta$ -胡萝卜素酮化酶基因(*bkt*)和  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶基因(*crtR-B*),并在集胞藻 PCC 6803 中表达,实现对集胞藻中类胡萝卜素代谢途径的修饰。本文研究结果为进一步阐明 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因的功能及其作用机制奠定了分子基础,也为研究其他微型藻类中的类胡萝卜素代谢途径提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 集胞藻 PCC 6803 的培养

集胞藻 PCC 6803 购自中国科学院淡水藻种

库,编号 FACHB-898。使用 BG11 培养基培养集胞藻 PCC 6803,培养温度为 $(30\pm 2)$  °C,光照强度为  $50 \mu\text{mol photon}/(\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1})$ ,光/暗周期为 12 h/12 h。

### 2.2 同源重组载体的构建

首先,使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(大连宝生物,中国)提取集胞藻 PCC 6803 的基因组 DNA;然后,利用大肠杆菌 DH-5 $\alpha$ (Invitrogen, 中国)进行 DNA 克隆和质粒构建,并在 37 °C、160 r/min 摇床中培养;最后,使用细菌质粒 DNA 快速提取试剂盒(上海生工,中国)提取重组质粒。

根据集胞藻 PCC 6803 密码子偏好性对来自雨生红球藻的 *bkt* 基因(GenBank: AY603347.1)和 *crtR-B* 基因(GenBank: AF162276.1)进行密码子优化,优化后的 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因由 GenScript 公司合成。p5S1285UD-*bkt* 质粒和 pSKT1T2-*crtR-B* 质粒图谱见图 1。从美国国立生物技术信息中心网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取已知的基因序列,用 Primer 5.0 软件设计引物,本研究中所用引物见表 1(均由北京睿博兴科生物技术有限公司合成)。

### 2.3 集胞藻 PCC 6803 的转化和突变株的筛选

离心收集处于对数生长期的集胞藻 PCC 6803 藻株,其在 730 nm 处的光密度(Optical Density, OD)值约为 0.6,使用新鲜的 BG11 培

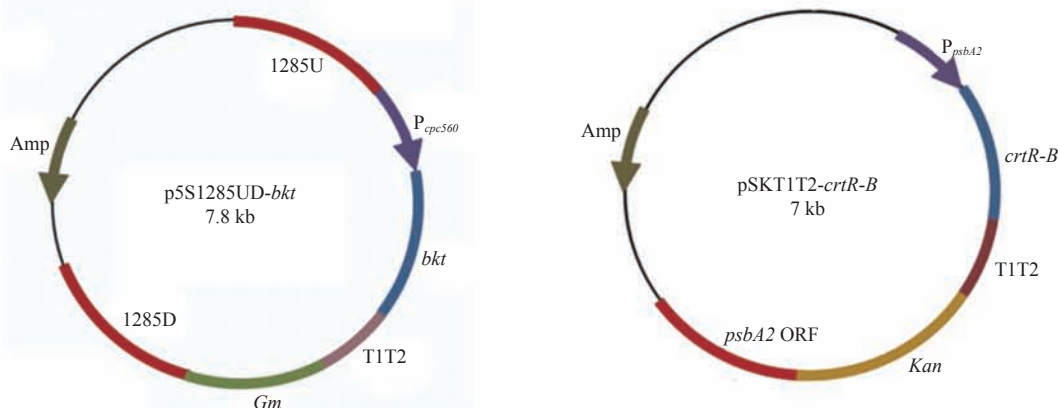


图 1 p5S1285UD-*bkt* 和 pSKT1T2-*crtR-B* 质粒图谱

Fig. 1 Plasmid maps of p5S1285UD-*bkt* and pSKT1T2-*crtR-B*

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	核苷酸序列(5'-3')	用途
<i>psbA2</i> -F	CTTCATATGCCGCGGATGACAACGACTCTCCAAC	扩增 <i>psbA2</i> 下游同源臂
<i>psbA2</i> -R	AGTGAGCTCTTAACCGTTGACAGCAGG	
P <sub><i>psbA2</i></sub> -F	GATGTCGACGCTTTAGCGTTCCAGTG	扩增 <i>psbA2</i> 启动子
P <sub><i>psbA2</i></sub> -R	CATTTGGTTATAAT TCCTTATGTAT	
P <sub><i>cpc560</i></sub> -F	GATGTCGACGCTTTAGCGTTCCAGTG	扩增 <i>cpc560</i> 启动子
P <sub><i>cpc560</i></sub> -R	CATTTGGTTATAATTCCTTATGTAT	
<i>crtR-B</i> -F	ACACCTCGCACTGGACCCT	扩增 <i>crtR-B</i> 基因
<i>crtR-B</i> -R	GTATAGCGTGATGCCAGCC	
<i>bkt</i> -F	CAATCTTGTCAGCATTCCGC	扩增 <i>bkt</i> 基因
<i>bkt</i> -R	CAGGAAGCTCATCACATCAGAT	
1285U-F	ATAGAGCTCTTTAGTGAAAAAFAATTGAC	1285 上/下游同源臂检测
1285D-R	ATAGAGCTCGTCATCAGCCAGCAAAATTGC	
<i>bkt</i> /RT-F	GGAAGCAGCAGCCTATTACA	检测 <i>bkt</i> 的转录
<i>bkt</i> /RT-R	ACTCGTCTTTGCCCTGAACC	
<i>crtR-B2</i> -F	TCGGACCTCCTCCTCACCTACA	检测 <i>crtR-B</i> 的转录
<i>crtR-B2</i> -R	GACTCGTGCCAGATTGCCTTGT	
T1T2-F	TCAGGTACCTTCGATCGTTAGCGCCAA	检测 T1T2 终止子
T1T2-R	TCAGTCGACATGGGGATCAGCGCTAAAT	

培养基调整细胞浓度至  $OD_{730}=2.5$ , 备用。将上述得到的质粒通过自然转化法<sup>[16]</sup>转化至处理好的藻细胞中。在含有 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  庆大霉素和 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素的 BG11 固体培养基上, 对转化后的集胞藻 PCC 6803 分别进行筛选。同时, 将转化初始质粒 p5S1285UD<sup>[17]</sup>和 pSKT1T2<sup>[16]</sup>的突变株设为对照组。

#### 2.4 突变株的验证

对于突变株的 DNA 水平验证, 提取集胞藻 PCC 6803 野生型和突变株基因组 DNA, 通过聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)验证目的基因的转入情况, 引物见表 1。

具体地, 先使用植物 RNA 提取试剂盒(Omega, 中国)提取集胞藻 PCC 6803 野生型和突变株的总 RNA; 然后, 通过 cDNA 合成试剂盒(大连宝生物, 中国)将 mRNA 反转录为 cDNA; 最后, 以 cDNA 作为模板, 分别用引物 *bkt*-RT-F/*bkt*-RT-R 和 *crtR-B2*-F/*crtR-B2*-R 检验 *bkt*

基因和 *crtR-B* 基因 RNA 水平的表达。

#### 2.5 生长曲线的测定

取处于对数生长期的集胞藻, 调节初始接种浓度  $OD_{730}$  值为 0.5, 每 24 h 取样 1 次, 用普析 Tu-1810 紫外分光光度计测定  $OD_{730}$  值, 绘制生长曲线。其中, 实验组和对照组各设置 3 个平行。

#### 2.6 色素分析

本文使用的类胡萝卜素标准品购自 Sigma(中国)。参照 Baroli 等<sup>[18]</sup>的方法, 用丙酮提取色素, 并通过 Thermo Fisher UltiMate-3000 液相色谱仪(配置 UV-可见检测器)对色素进行分离和鉴定。其中, 色谱柱使用 C18 反相柱, Acclaim 120A (5  $\mu\text{m}\times 4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$ )。流动相比例参数、流速以及梯度洗脱时间均参照文献[18]的方法设定。

#### 2.7 统计分析

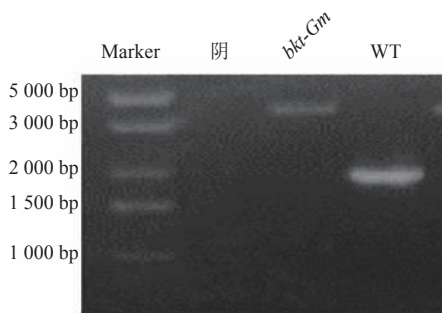
所有实验重复 3 次, 数据表示为 3 次实验的平均值士标准偏差。使用 SPSS 软件进行信度检

测。当  $P < 0.05$  时, 认为在统计学上具有显著性差异。

### 3 结果与分析

#### 3.1 突变株的构建和鉴定

本实验构建的表达载体 p5S1285UD-*bkt* 和 pSKT1T2-*crtR-B* 如图 1 所示。其中, p5S1285UD-*bkt* 质粒中含有 1 000 bp 上游同源臂 (1285U, GenBank: NC\_017277.1) 和 1 000 bp 下游同源臂 (1285D), 并使用从 pFastBacI 质粒 (Invitrogen) 克隆庆大霉素抗性基因作为选择标记基因。在 pSKT1T2-*crtR-B* 质粒中,  $P_{psbA2}$  启动子和由引物  $P_{psbA2}$ -F/ $P_{psbA2}$ -R 扩增的 *psbA2* 开放阅读框作为上下游同源臂。另外, 在 pSKT1T2-*crtR-B* 质粒中以卡那霉素抗性基因作为选择标记基因。经过转化和抗生素筛选后, 采用 PCR 验证目的基因的转入情况, 分别检测野生型和突变株基因组 DNA 中外源序列是否进行同源重组。当使用引物 1285U-F/1285D-R 对整个同源交换片段进行检验时, 在 *bkt-Gm* 突变株中扩增出预期的 4.9 kb 条带, 而在对照组中仅扩增出 2.0 kb 条带 (图 2(a)), 表明 *bkt-Gm* 突变株中包含 *Gm* 基因和 *bkt* 基因的外源基因表达盒已经整合到基因组 DNA 中。同样, 如图 2(b), 当用引

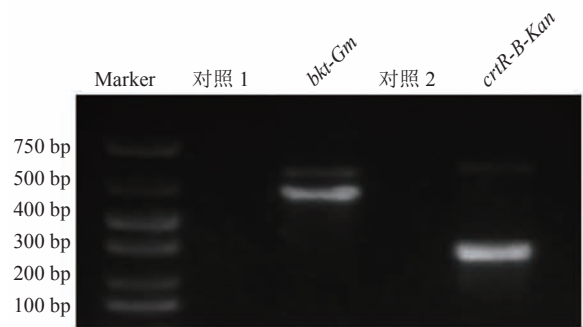


(a) *bkt-Gm* 突变株的 PCR 鉴定

阴: 不加任何模板的空白对照; WT: 野生型集胞藻 PCC 6803

物  $P_{psbA2}$ -F/ $P_{psbA2}$ -R 对整个同源交换片段进行检验时, 在 *crtR-B-Kan* 突变株中扩增出预期的 4.1 kb 条带, 而在对照组中仅扩增出 1.5 kb 条带, 这表明 *crtR-B-Kan* 突变株的基因组 DNA 中已经整合了包含 *crtR-B* 基因和 *Kan* 基因的外源基因表达盒。同时, 测序结果也表明, *crtR-B* 基因和 *bkt* 基因已经整合到集胞藻 PCC 6803 基因组 DNA 中。

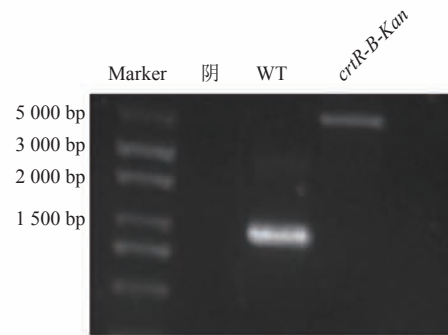
为了进一步验证 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因转录水平的表达, 从野生型和突变株中提取总 RNA。如图 3 所示, 在 *bkt-Gm* 突变株和 *crtR-B-Kan* 突变株中分别扩增出代表 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因的大约 410 bp 和 258 bp 的条带, 而在对照组中没有观察到条带, 说明整合到基因组中的 *bkt* 基



对照 1: 转入空质粒 p5S1285UD 的突变株; 对照 2: 转入空质粒 pSKT1T2 的突变株

图 3 RNA 水平鉴定

Fig. 3 The identification of mutant in RNA level



(b) *crtR-B-Kan* 突变株的 PCR 鉴定

图 2 DNA 水平鉴定

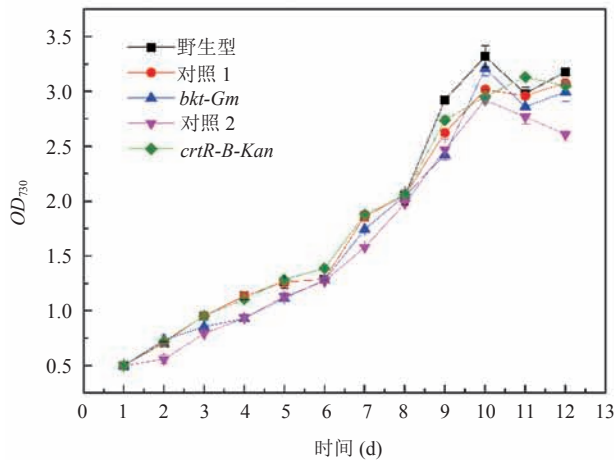
Fig. 2 The identification of mutant in DNA level



因和 *crtR-B* 基因被转录。这表明, *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因完全转入集胞藻 PCC 6803, 且具有表达活性, *bkt-Gm* 突变株和 *crtR-B-Kan* 突变株已构建成功。

### 3.2 正常培养条件下藻株的生长情况

为了检测转入 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因是否对藻株的生长产生影响, 本文检测了野生型与突变株在正常培养条件下的生长情况。图 4 结果显示, 野生型和突变株的生长速率相似, 表明转入 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因对集胞藻的生长基本没有影响。



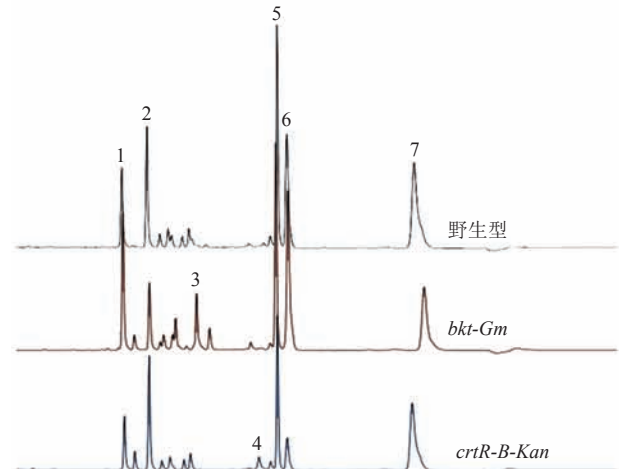
注: 误差棒为 3 次重复实验平均值的标准误差

图 4 正常培养条件下野生型、*bkt-Gm* 突变株和 *crtR-B-Kan* 突变株的生长曲线

Fig. 4 The growth curve of wild strain, *bkt-Gm* mutants and *crtR-B-Kan* mutants under normal condition

### 3.3 野生型和突变株的色素差异

高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 检测结果 (图 5) 显示, *bkt-Gm* 突变株产生了角黄质, 其含量为  $(1.38 \pm 0.07)$  mg/g, 且海胆酮含量下降为  $(7.72 \pm 0.29)$  mg/g、 $\beta$ -胡萝卜素含量下降为  $(13.12 \pm 0.49)$  mg/g (表 2); 而 *crtR-B-Kan* 突变株中检测出金盏花黄质, 其含量为  $(0.98 \pm 0.04)$  mg/g, 且玉米黄素含量下降为  $(4.18 \pm 0.09)$  mg/g、 $\beta$ -胡萝卜素含量下降为  $(12.80 \pm 0.14)$  mg/g (表 2)。



1. 蓝藻叶黄素; 2. 玉米黄素; 3. 角黄质; 4. 金盏花黄质; 5. 叶绿素 a;

6. 海胆酮; 7.  $\beta$ -胡萝卜素

图 5 HPLC 检测来自集胞藻 PCC 6803 野生型、*bkt-Gm* 突变株和 *crtR-B-Kan* 突变株的类胡萝卜素

Fig. 5 HPLC analysis of pigment production from the *Synechocystis* sp. PCC 6803 wild type, *bkt-Gm* mutants and *crtR-B-Kan* mutants

表 2 色素含量

Table 2 The content of pigment

藻株	$\beta$ -胡萝卜素 (mg/g, DW)	玉米黄素 (mg/g, DW)	海胆酮 (mg/g, DW)
野生型	$14.80 \pm 0.24^*$	$5.39 \pm 0.07^*$	$9.53 \pm 0.38^*$
<i>bkt-Gm</i>	$13.12 \pm 0.49^*$	$5.12 \pm 0.03^*$	$7.72 \pm 0.29^*$
<i>crtR-B-Kan</i>	$12.80 \pm 0.14^*$	$4.18 \pm 0.09^*$	$9.35 \pm 0.34^*$

注: DW 表示干重; \*  $P < 0.05$

## 4 讨论

集胞藻 PCC 6803 中含有一种  $\beta$ -胡萝卜素单酮醇酶基因 (GenBank: NC\_000911), 其编码的酶能从氧气 ( $O_2$ ) 中转移氧原子来氧化 C4 位的  $\beta$ -胡萝卜素<sup>[19]</sup>,  $\beta$ -胡萝卜素单酮醇酶通常能将  $\beta$ -胡萝卜素转化为海胆酮<sup>[20]</sup>。 $\beta$ -胡萝卜素酮化酶 (BKT) 被认为是一种与  $\beta$ -胡萝卜素单酮醇酶具有相同功能的酶, 参与  $\beta$ -胡萝卜素合成虾青素。虽然二者都是  $\beta$ -胡萝卜素酮化酶, 但在催化机理上不同<sup>[21]</sup>。其中, BKT 是在  $\beta$ -胡萝卜素的 2 个  $\beta$ -

紫罗兰酮环中各插入 1 个酮基<sup>[22]</sup>, 而  $\beta$ -胡萝卜素单酮醇酶是在  $\beta$ -胡萝卜素的 2 个  $\beta$ -紫罗兰酮环之一插入 1 个酮基以合成海胆酮<sup>[21,23]</sup>。本文研究结果表明, 来自雨生红球藻的 BKT 可以在集胞藻中利用海胆酮进一步合成角黄质。

集胞藻 PCC 6803 中含有  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶基因 (*crtR*, GenBank: NP\_440788.1), 负责将 1 个羟基引入  $\beta$ -胡萝卜素的  $\beta$ -紫罗兰酮环<sup>[24]</sup>中。CRTR 能够催化  $\beta$ -胡萝卜素形成玉米黄素, 并在集胞藻 PCC 6803 中合成蓝藻叶黄素。 $\beta$ -胡萝卜素羟化酶 (CRTR-B) 是一种来自雨生红球藻的虾青素合成途径中的关键酶, 可将 2 个羟基引入  $\beta$ -胡萝卜素中<sup>[14]</sup>。在虾青素合成途径中, CRTR-B 负责将  $\beta$ -胡萝卜素转化为  $\beta$ -隐黄质, 并进一步转化为玉米黄素, 最终将角黄素转化为虾青素。尽管 CRTR-B 和 CRTR 都被称为  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶, 但来自陆生植物和绿藻的  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶由 *crtR-B* 基因编码<sup>[25-26]</sup>, 而蓝藻  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶由 *crtR* 基因编码, 且系统发育上与 *crtR-B* 无关<sup>[27]</sup>。本文研究结果显示, 来自雨生红球藻的 CRTR-B 可以在集胞藻中利用玉米黄素进一步合成金盏花黄质。

类胡萝卜素已被广泛认为是安全的天然抗氧化剂和抗癌剂。而不同的微藻产生不同结构的类胡萝卜素是由具有特定催化功能的类胡萝卜素合成酶决定。深入了解微藻中类胡萝卜素的生物合成机制既有利于促进其在食品和制药行业的生产和应用, 也为下一步在集胞藻中合成虾青素, 构建性能优良的藻株奠定基础。

## 5 结 论

通过在集胞藻 PCC 6803 中分别转入来自雨生红球藻的 *bkt* 基因和 *crtR-B* 基因, 采用 HPLC 检测色素组成发现, 外源基因的表达对集胞藻 PCC 6803 类胡萝卜素的合成产生了影响。转入

*bkt* 基因的细胞产生角黄质的同时海胆酮含量下降, 表明是外源的  $\beta$ -胡萝卜素酮化酶将海胆酮转化为角黄质; 转入 *crtR-B* 基因的细胞产生金盏花黄质的同时玉米黄素含量下降, 表明是外源的  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶将玉米黄素转化为金盏花黄质。本文结果表明, 分别来自雨生红球藻和集胞藻 PCC 6803 的不同  $\beta$ -胡萝卜素酮化酶和  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶具有不同的功能, 仅依靠来自集胞藻 PCC 6803 的  $\beta$ -胡萝卜素酮化酶和  $\beta$ -胡萝卜素羟化酶无法合成虾青素。本实验初步揭示了集胞藻 PCC 6803 中类胡萝卜素代谢机制, 为通过基因工程手段在集胞藻 PCC 6803 细胞内积累虾青素奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] 刘龙军, 魏东, 梁晓芸, 等. 利用微藻生产特种天然类胡萝卜素的研究进展 [J]. 海洋科学, 2006, 30(9): 63-68.  
Liu LJ, Wei D, Liang XY, et al. Advances on the production of special natural carotenoids by microalgae [J]. Marine Sciences, 2006, 30(9): 63-68.
- [2] Gong MY, Bassi A. Carotenoids from microalgae: a review of recent developments [J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(8): 1396-1412.
- [3] D'Alessandro EB, Antoniosi Filho NR. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: a review [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016, 58: 832-841.
- [4] Huang JJ, Lin SL, Xu WW, et al. Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton [J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(5): 597-618.
- [5] 杜晓凤, 邹宁, 孙东红, 等. 温度和光径对微绿球藻生长及营养成分含量的影响 [J]. 海洋科学, 2014, 38(4): 50-54.  
Du XF, Zou N, Sun DH, et al. Effect of temperature and optical path on growth rate and accumulation of nutrients of *Nannochloropsis* sp. [J]. Marine Sciences, 2014, 38(4): 50-54.
- [6] 李庆昌, 邓素贞, 刘贤德, 等. 雌雄波纹巴非蛤不同组织中总类胡萝卜素含量比较分析 [J]. 海洋科学, 2017, 41(11): 102-106.  
Li QC, Deng SZ, Liu XD, et al. Analysis of total carotenoid content in different tissues of male and female *Paphia undulate* [J]. Marine Sciences, 2017, 41(11): 102-106.

- [7] Eggersdorfer M, Wyss A. Carotenoids in human nutrition and health [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2018, 652: 18-26.
- [8] 李庆昌, 刘坦, 陈小明, 等. 织锦巴非蛤斧足颜色与总类胡萝卜素含量相关分析 [J]. 海洋科学, 2016, 40(10): 120-125.  
Li QC, Liu T, Chen XM, et al. Correlation analysis of the color and total carotenoid content in *Paphia textile* foot tissue [J]. Marine Sciences, 2016, 40(10): 120-125.
- [9] Iwata S, Imai T, Shimazawa M, et al. Protective effects of the astaxanthin derivative, adonixanthin, on brain hemorrhagic injury [J]. Brain Research, 2018, 1698: 130-138.
- [10] 王秀秀, 章军. 基于 LC-MS/MS 技术对蓝藻 *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 细胞膜的蛋白质组学研究 [J]. 海洋科学, 2012, 36(9): 39-44.  
Wang XX, Zhang J. LC-MS/MS analysis of plasmic membrane proteins in *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 [J]. Marine Sciences, 2012, 36(9): 39-44.
- [11] Angermayr SA, Gorchs Rovira A, Hellingwerf KJ. Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products [J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(6): 352-361.
- [12] Hagemann M, Hess WR. Systems and synthetic biology for the biotechnological application of cyanobacteria [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 94-99.
- [13] Carroll AL, Case AE, Zhang A, et al. Metabolic engineering tools in model cyanobacteria [J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 47-56.
- [14] Jia DJ, Fan LM, Shen JL, et al. Genetic transformation of the astaxanthin biosynthetic genes *bkt* and *crtR-B* into apple tree to increase photooxidation resistance [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 243: 428-433.
- [15] Tan CP, Zhao FQ, Su ZL, et al. Expression of  $\beta$ -carotene hydroxylase gene (*crtR-B*) from the green alga *Haematococcus pluvialis* in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Journal of Applied Phycology, 2007, 19(4): 347-355.
- [16] Chen G, Chen J, He QF, et al. Functional expression of the *Arachis hypogaea* L. Acyl-ACP thioesterases *AhFatA* and *AhFatB* enhances fatty acid production in *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. Energies, 2017, 10(12): 2093.
- [17] Ranade S, Zhang Y, Kaplan M, et al. Metabolic engineering and comparative performance studies of *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains for effective utilization of xylose [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1484.
- [18] Baroli I, Do AD, Yamane T, et al. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress [J]. The Plant Cell, 2003, 15(4): 992-1008.
- [19] Harker M, Hirschberg J. Biosynthesis of ketocarotenoids in transgenic cyanobacteria expressing the algal gene for  $\beta$ -C-4-oxygenase, *crtO* [J]. FEBS Letters, 1997, 404(2): 129-134.
- [20] Mochimaru M, Masukawa H, Takaichi S. The cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 has two distinct  $\beta$ -carotene ketolases: *CrtO* for echinenone and *CrtW* for ketomyxol synthesis [J]. FEBS Letters, 2005, 579(27): 6111-6114.
- [21] Choi SK, Nishida Y, Matsuda S, et al. Characterization of  $\beta$ -carotene ketolases, *CrtW*, from marine bacteria by complementation analysis in *Escherichia coli* [J]. Marine Biotechnology, 2005, 7(5): 515-522.
- [22] Kathiresan S, Chandrashekar A, Ravishankar GA, et al. Regulation of astaxanthin and its intermediates through cloning and genetic transformation of  $\beta$ -carotene ketolase in *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of Biotechnology, 2015, 196-197: 33-41.
- [23] Breitenbach J, Gerjets T, Sandmann G. Catalytic properties and reaction mechanism of the *CrtO* carotenoid ketolase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Arch Archives of Biochemistry and Biophysics, 2013, 529(2): 86-91.
- [24] Lagarde D, Vermaas W. The zeaxanthin biosynthesis enzyme  $\beta$ -carotene hydroxylase is involved in myxoxanthophyll synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. FEBS Letters, 1999, 454(3): 247-251.
- [25] Chang JJ, Thia C, Lin HY, et al. Integrating an algal  $\beta$ -carotene hydroxylase gene into a designed carotenoid-biosynthesis pathway increases carotenoid production in yeast [J]. Bioresource Technology, 2015, 184: 2-8.
- [26] Nogueira M, Enfissi EMA, Welsch R, et al. Construction of a fusion enzyme for astaxanthin formation and its characterisation in microbial and plant hosts: a new tool for engineering ketocarotenoids [J]. Metabolic Engineering, 2019, 52: 243-252.
- [27] Linden H. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 1999, 1446(3): 203-212.