

# 高通量技术在萜类合成酶筛选中的应用

李贝<sup>1,2</sup>, 邓子新<sup>1</sup>, 徐敏<sup>1\*</sup>, 侯安伟<sup>1,3\*</sup>

1 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

2 合成生物学海河实验室, 天津 300308

3 江西省科学院微生物研究所, 江西 南昌 330096

李贝, 邓子新, 徐敏, 侯安伟. 高通量技术在萜类合成酶筛选中的应用[J]. 微生物学报, 2024, 64(2): 408-431.

LI Bei, DENG Zixin, XU Min, HOU Anwei. Application of high-throughput technology in the screening of terpene synthases[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(2): 408-431.

**摘要:** 萜类化合物种类繁多, 生物活性多样, 在食品、药品与化妆品等行业中具有广泛的应用。萜类化合物多来源于植物, 然而随着合成生物学的快速发展, 相较于传统的天然植物提取与化学合成方法, 利用工程微生物进行萜类化合物异源合成的方法显得更为经济与环保。萜类合成酶的催化活性及合成产物的结构特性是萜类化合物异源合成的关键。通过蛋白定向进化与理性设计可以有针对性地优化萜类合成酶的催化性能及产物专一性, 但该方案需要一个特异的筛选方法来实现蛋白突变体库的高通量筛选。近年来, 一系列高通量筛选方法的建立使得萜类合成酶的筛选变得更加灵敏与高效。本文对近期建立的萜类合成酶高通量筛选方法进行了综述, 简要概述了各种筛选方法的基本原理与优缺点, 并对高通量筛选技术在萜类合成酶改造中的应用做出了展望。

**关键词:** 高通量筛选; 萜类合成酶; 定向进化; 萜类化合物

资助项目: 国家自然科学基金(22107038); 合成生物学海河实验室重大攻关类和颠覆性创新项目(22HHSWSS00001, 22HHSWSS00007); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-CXRC-065, TSBICIP-CXRC-076); 江西省科学院项目(2018-XTPH1-02, 2018-YYB-02)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22107038), the Major Project and Innovation Fund of the Haihe Laboratory of Synthetic Biology (22HHSWSS00001, 22HHSWSS00007), the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-CXRC-065, TSBICIP-CXRC-076), and the Project of Jiangxi Academy of Sciences (2018-XTPH1-02, 2018-YYB-02).

\*Corresponding authors. E-mail: HOU Anwei, anwei.hou@tib.cas.cn; XU Min, xumin@tib.cas.cn

Received: 2023-08-09; Accepted: 2023-11-02

# Application of high-throughput technology in the screening of terpene synthases

LI Bei<sup>1,2</sup>, DENG Zixin<sup>1</sup>, XU Min<sup>1\*</sup>, HOU Anwei<sup>1,3\*</sup>

1 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 Haihe Laboratory of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

3 Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, Jiangxi, China

**Abstract:** Terpenoids, a group of natural products possessing diverse chemical structures and biological activities, have been widely used in the production of food additives, medicines, and cosmetics. Terpenoids are mainly produced by plants. With the rapid development of synthetic biology, heterologous production of terpenoids by engineered microbial strains is more economical and environmentally friendly compared with the conventional methods of extraction from plants and chemical synthesis. The catalytic activities of terpene synthases and the structural specificity of their products are pivotal for the heterologous biosynthesis of terpenoids. Directed evolution and rational design can be adopted to optimize the catalytic properties and product profile of target terpene synthases. However, this requires a feasible high-throughput method to screen mutant libraries. In recent years, various high-throughput screening methods have been developed to boost the sensitivity and efficiency in screening terpene synthases. We review recently established high-throughput screening methods for terpene synthases and briefly outline the principles and advantages and disadvantages of each method. Eventually, we envision the future directions of the application of high-throughput screening in the engineering of terpene synthases.

**Keywords:** high-throughput screening; terpene synthase; directed evolution; terpenoid

萜类化合物是自然界中最为丰富的一类天然产物, 在药物、材料、化妆品等领域有广泛研究和应用价值<sup>[1-7]</sup>。萜类化合物主要来源于植物<sup>[8]</sup>, 越来越多的研究表明真菌及细菌也是萜类的重要来源<sup>[9-10]</sup>。所有萜类化合物的基本结构均由通用的五碳前体——异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)及其异构体二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)构成(图1)。DMAPP和IPP在异戊烯基转移酶(prenyltransferase, PT)的催化下, 通常以头尾连接的方式缩合成不同长度的异戊烯基类焦磷酸, 如法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)、香叶基焦磷酸(geranyl diphosphate, GPP)、香叶

基香叶基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)<sup>[11]</sup>。根据其化学结构中存在的五碳单元的数量不同, 萜类化合物被分为半萜(hemiterpenoids, C<sub>5</sub>, 如 isoprene, 图1)、单萜(monoterpenoids, C<sub>10</sub>, 如 limonene)、倍半萜(sesquiterpenoids, C<sub>15</sub>, 如 T-muurolol)、二萜(diterpenoids, C<sub>20</sub>, 如 taxadiene)、二倍半萜(sesterterpenoids, C<sub>25</sub>, 如 mangicdiene)、三萜(triterpenoids, C<sub>30</sub>)、四萜(tetraterpenoids, C<sub>40</sub>)和多萜<sup>[12-13]</sup>。萜类合成酶(terpene synthase, TPS)利用PT合成的链状前体合成萜类的基本骨架, 在萜类化合物的形成和萜类结构的多样性中发挥了至关重要的作用<sup>[14]</sup>。在植物的胞质及真菌中, DMAPP和IPP是由乙酰辅酶A通

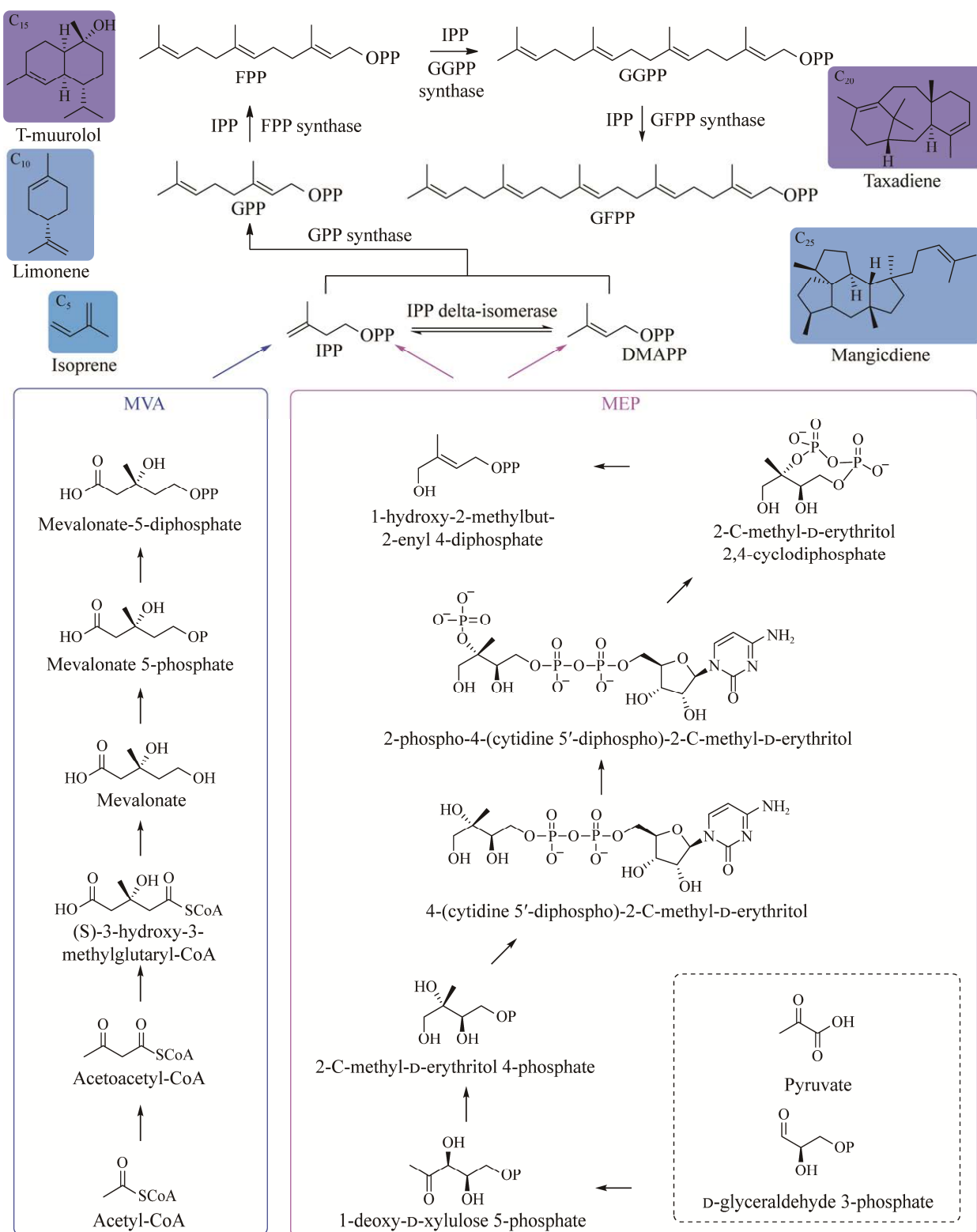


图 1 萜类生物合成示意图

Figure 1 Schematic overview of terpenoid biosynthesis. C<sub>5</sub>: Hemiterpenoids; C<sub>10</sub>: Monoterpenoids; C<sub>15</sub>: Sesquiterpenoids; C<sub>20</sub>: Diterpenoids; C<sub>25</sub>: Sesterterpenoids.

过甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径产生; 在大多数细菌和植物的质体中, DMAPP 和 IPP 则通过丙酮酸和甘油醛-3-磷酸通过磷酸甲基赤藓糖醇(methylerythritol phosphate, MEP)途径产生(图 1)<sup>[15]</sup>。

鉴于萜类化合物在各个行业中的潜在应用价值和效益, 人们对其需求正在迅速攀升。然而受限于产量, 从植物或其他天然来源直接提取的萜类化合物无法满足人们的需求; 而化学合成则因涉及到立体化学复杂性、可能产生副产物和使用有机溶剂造成的环境污染问题, 严重制约了萜类化合物进一步的广泛应用<sup>[16]</sup>。合成生物学的兴起, 为活性天然产物异源生物合成带来了全新的理念与工具, 研究人员利用微生物或植物等同源或异源宿主能够合成各种萜类化合物并优化来提高其生产水平<sup>[17-20]</sup>。同时, TPS 催化性能不仅是萜类化合物异源合成的关键, 而且是萜类化合物高产的主要限制因素之一<sup>[21]</sup>。如天然的 TPS 可能存在催化活性不足或产物特异性低等问题, 不能满足高水平发酵生产的需求。

蛋白的定向进化可以有针对性地改造并优化酶的性能, 但它需要一个合适的高通量分析方法对蛋白突变体库进行筛选, 而筛选方法的建立是制约酶定向进化改造的普遍性瓶颈。目前有很多研究对 TPS 进行了广泛的突变, 揭示了这类酶具有很高的可塑性<sup>[22-23]</sup>。这些突变通常基于蛋白序列比对或结构信息<sup>[24-28]</sup>, 重点对某些特定氨基酸残基进行突变, 而不是对整个蛋白进行随机突变。这主要是由于缺乏简便的方法对 TPS 突变体进行高效地筛选, 因而也限制了对 TPS 突变体潜在催化产物及相关机制的深入研究。

建立针对 TPS 突变体库的系统性高通量筛选方法将有效推进上述领域的发展。此外, 随

着基因测序技术的发展, 大量基因组信息被报道, 其中蕴藏的许多未知功能的 TPS 有待进一步验证和分析, 通过高通量筛选分析技术, 可以快速建立基因与功能之间的联系, 从而推动新型 TPS 的高效挖掘与机制解析。因此, 本文对近年来已报道的高通量筛选 TPS 的方法进行归类总结, 以期后续研究者对相关方法的理性设计和选择提供依据和参考。

## 1 基于萜类底物或产物建立的筛选方法

### 1.1 底物类似物

#### 1.1.1 放射性同位素标记的底物

同位素标记一直是测定酶催化效率的生化分析工具。TPS 的底物——焦磷酸类化合物具有高度的水溶性, 而其产物一般都是脂溶性。因此, 通过简单的有机溶剂萃取即可实现底物与产物的有效分离, 并根据产物中的放射性含量来确定产物的浓度。这种方法可以用于表征 TPS 的各种酶学参数。例如, 可以使用放射性同位素氚(<sup>3</sup>H)标记的 GPP 或者 FPP, 在反应条件下测量一定时间内单萜合成酶与倍半萜合成酶催化底物所生成的产物量。结合 Michaelis-Menten 方程和 Lineweaver-Burk 作图法, 在不同底物浓度下测酶的活力, 可以得到相应的酶反应速度。然后使用反应速度和底物浓度的双倒数作图, 或者拟合 Michaelis-Menten 方程, 可以求出酶对该底物的米氏常数  $K_m$ 、最大反应速率  $V_{max}$  以及催化常数  $k_{cat}$ , 从而可以评估酶的催化性能。

Karp 等在研究 GPP 和里那基(linalyl)焦磷酸酯类似物对单萜环化酶的抑制作用时, 使用(<sup>3</sup>H) GPP 对 2 种代表性的单萜合酶——柠檬烯合酶和冰片基(bornyl)焦磷酸合酶进行了酶

动力学表征<sup>[29]</sup>。反应中添加纯化酶引发反应，产物则通过液体闪烁计数来进行定量。Picaud 等在纯化鉴定重组紫穗槐-4,11-二烯合酶(amorpha-4,11-diene synthase, ADS)研究中，采用(1-<sup>3</sup>H) FPP 和(1-<sup>3</sup>H) GPP 进行动力学分析<sup>[30]</sup>。ADS 是倍半萜合酶，可将 FPP 转化为 amorpha-4,11-diene；在 Mn<sup>2+</sup>存在而 Mg<sup>2+</sup>或 Co<sup>2+</sup>缺失的条件下，GPP 是 ADS 的底物。Karp 等和 Picaud 等研究的  $K_m$  常数都是由 Lineweaver-Burk 图确定。此外，在倍半萜合成酶 5-*epi*-马兜铃烯合酶(5-*epi*-aristolochene synthase)、豆腐柴螺二烯合酶(premnaspodiene synthase)以及  $\gamma$ -葎草烯合酶( $\gamma$ -humulene synthase)动力学分析中，研究者也利用(1-<sup>3</sup>H) FPP 检测反应速率，通过闪烁计数来测量放射性，并由 Michaelis-Menton 方程与数据的直接拟合确定动力学常数<sup>[27,31]</sup>。

放射性同位素标记建立的方法检测方便，可以成为一种较好的高通量筛选方法。目前，该方法仅限于 TPS 反应动力学常数表征，这主要是由于现有的 TPS 催化活性筛选需要较高的底物浓度，而过高浓度的放射性底物会给实验人员带来辐射伤害的风险，这限制了该方法的应用范围。然而，在实验设计中可以将放射性底物与未标记的底物按一定比例混合，在提高底物浓度的同时将放射性控制在安全的范围内，再建立反应体系并根据产物放射性的差异来判断酶催化活性的变化。

### 1.1.2 烯醇甲基醚底物类似物

基于颜色和荧光变化对 TPS 进行筛选是一种非常直观的高通量筛选方法，但 TPS 催化反应底物与产物本身可能是无色或者是缺乏荧光，这种情况下可以使用可产生有色反应的替代底物来建立筛选系统。Lauchli 等合成了一种含末端烯基甲醚的焦磷酸化合物 **1**，与倍半萜合酶的天然底物 FPP 类似<sup>[32]</sup>。TPS 催化底

物 **1** 可以释放出甲醇，具体表现为底物 **1** 脱去焦磷酸基团经过中间体 **2** 环化后，烯基甲醚部分生成碳正离子 **3**，该碳正离子可被水淬灭生成半缩醛 **4**，随即自发分解成醛 **5**，并释放出一当量的甲醇；甲醇在醇氧化酶(alcohol oxygenase)作用下可以转化为甲醛，甲醛与 purpald 试剂反应，可以生成蓝紫色环化产物 **6** (图 2)<sup>[32]</sup>。化合物 **6** 在 550 nm 处呈现最大吸收，利用酶标仪检测吸光值可以计算出甲醇的浓度及底物 **1** 的转化率，从而实现对 TPS 的高通量筛选。该方法测定的甲醇有效浓度范围是 20–250 mmol/L<sup>[32]</sup>。

Lauchli 等利用该筛选方法对 2 种倍半萜合酶进行定向进化，筛选得到了具有天然催化活性的耐热萜类合酶 BcBOT2 (presilphiperfolan-8 $\beta$ -ol synthase)；他们通过易错 PCR (error-prone PCR, epPCR)构建了 1 个库容量约 2 800 的 BcBOT2 突变体库，以 **1** 为底物筛选出热处理后仍保持活性的突变体蛋白；经 2 轮定向进化后，BcBOT2\_9D6 的热稳定性增加约 12 °C，而其催化活性并未损失。该筛选方法还促进了第 2 种酶 SSCG\_02150 [(-)- $\delta$ -cadinene synthase]的表达纯化和反应条件的优化<sup>[32]</sup>。此外，Lauchli 等利用该方法将 1 个多产物萜类合成酶 Cop2 转化为高选择性的突变体，同时还保持了酶的催化活性<sup>[33]</sup>。Cop2 的主产物为  $\alpha$ -cadinol (46.3%) 和 germacrene D-4-ol (28.8%)。该团队采用 epPCR 构建了 1 个库容量约 3 000 的 Cop2 突变体库。以 **1** 为底物对突变体库进行筛选，获得了突变体 17H2 在保持催化活性的同时，提高了产物的选择性，使得 germacrene D-4-ol 在产物中所占比例上升到 77%。序列分析鉴定了 17H2 中的 3 个点突变，研究者通过单点突变证明这 3 个点突变是通过协同作用来提高 17H2 对 germacrene D-4-ol 的产物选择性<sup>[33]</sup>。

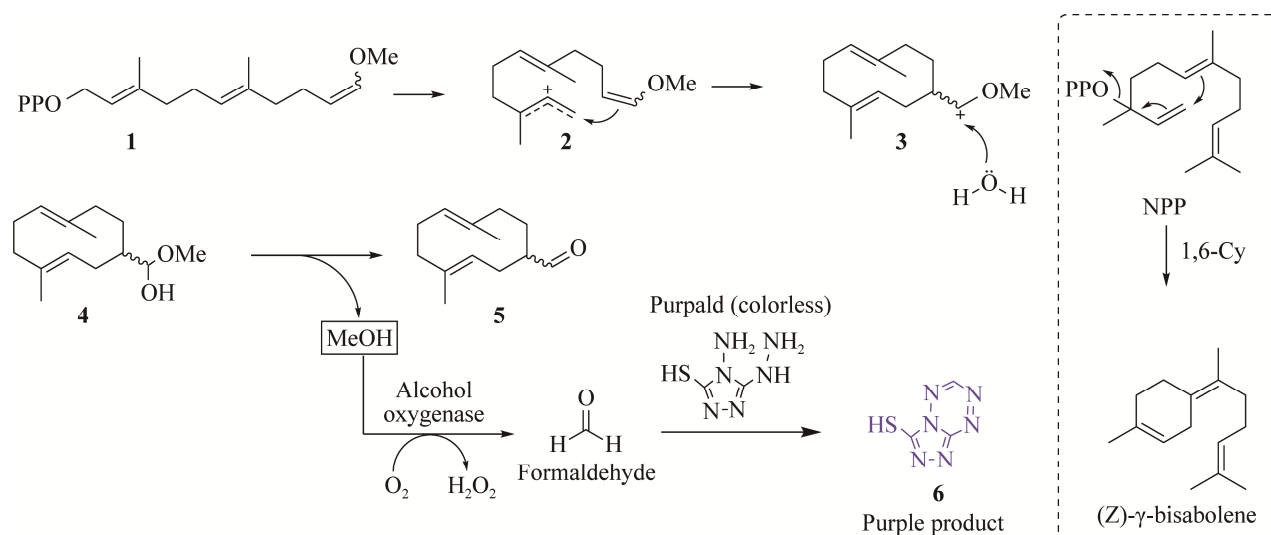


图 2 FPP 类似物 **1** 在 TPS 作用下的环化机制及其副产物甲醇的酶联法显色原理<sup>[32]</sup>

Figure 2 The cyclization mechanism of FPP analogue **1** under the action of TPS and the enzyme-coupled assay for the quantification of the by-product methanol<sup>[32]</sup>.

以上几种酶的定向进化表明, 这种基于底物 **1** 的高通量筛选方法在倍半萜类合成酶突变体筛选中具有一定的通用性。然而需要指出的是, 底物 **1** 只有在末端双键成环后才会释放出甲醇, 因而它仅可用于筛选某些特定环化方式的 TPS (如 1,11-环化), 针对不同环化方式的 TPS (如 1,6-环化, 图 2), 需要重新设计合成出相应烯基甲醚类底物类似物。除此之外, 这种烯基醚键的结构在酸性条件下不稳定, 在酶反应条件的优化应用中也存在一定的局限性。

## 1.2 基于焦磷酸建立的筛选方法

### 1.2.1 孔雀石绿和磷酸水解酶检测焦磷酸

焦磷酸 (inorganic pyrophosphate, P<sub>i</sub>) 是 TPS 催化反应完成后的主要副产物, 可以通过磷酸水解酶和孔雀石绿 (malachite green, MG) 检测产物中的焦磷酸。该方法目前主要用于纯化的 TPS 的活性筛选。由 TPS 产生的 P<sub>i</sub> 经焦磷酸酶 (inorganic pyrophosphatase, iPPase) 分解, 产生 2 个单分子磷酸 (monophosphate, Pi)。Pi 进一步与钼酸盐结合, 在酸性条件下形成磷钼酸盐

复合物, 然后与 MG 形成绿色复合物。在酸性条件下, 显色复合物保持稳定, 颜色的深浅与磷酸盐的含量成正比<sup>[34]</sup>, 再通过光谱仪读取 623 nm 处吸光度, 即可测量焦磷酸含量 (图 3)。

Alemdar 等通过使用焦磷酸酶和 MG 组合的方法, 测定了重组酶  $\alpha$ -葎草烯合酶 ( $\alpha$ -humulene synthase, HUM) 对单萜前体 (2E)-GPP 和 (2Z)-橙花基焦磷酸 (neryl diphosphate, NPP) 以及倍半萜前体 (2E, 6E)-FPP 转化的动力学参数, 并用气质联用仪 (gas chromatography mass spectrometry, GC-MS) 验证了该方法的准确性; 该研究通过检测焦磷酸盐的形成来间接检测萜烯产量, 验证了 MG 检测方法可应用于测定 TPS 活性<sup>[35]</sup>。他们预测该方法不仅是一种测定酶反应动力学参数的潜在有用技术, 而且可以作为一种通用的高通量筛选方法, 快速确定酶的底物特异性并优化反应条件<sup>[35]</sup>。

Pegan 等比较了包括 MG 法在内的 4 种常用焦磷酸的释放及检测方法 (图 3, 图 4)<sup>[34]</sup>。一种是化学发光法, 使用 ATP 硫酸腺苷转移酶催化

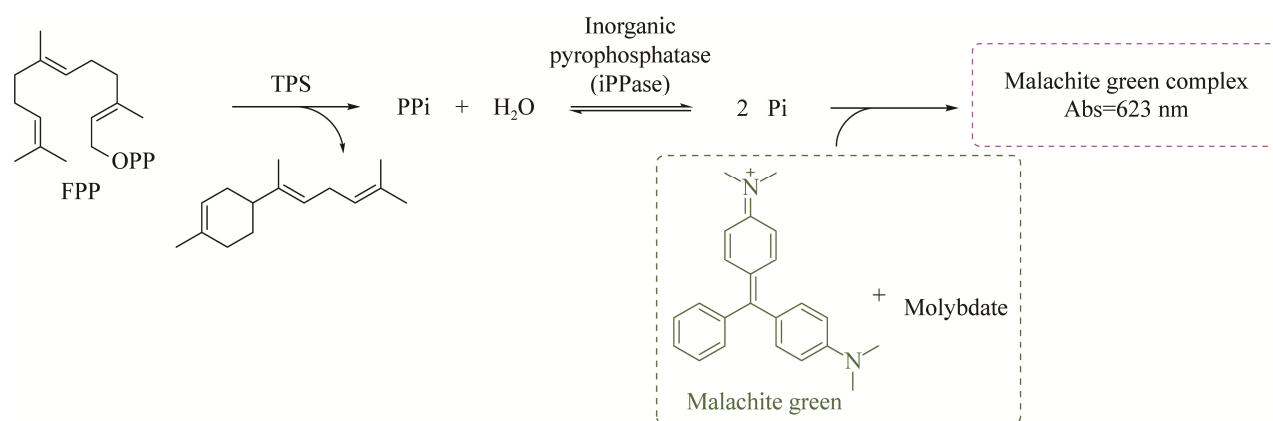


图3 孔雀石绿法测定 TPS 催化反应副产物焦磷酸<sup>[34]</sup>

Figure 3 The pyrophosphate/malachite green assay for determination of the by-product inorganic pyrophosphate from TPS catalyzed reaction<sup>[34]</sup>.

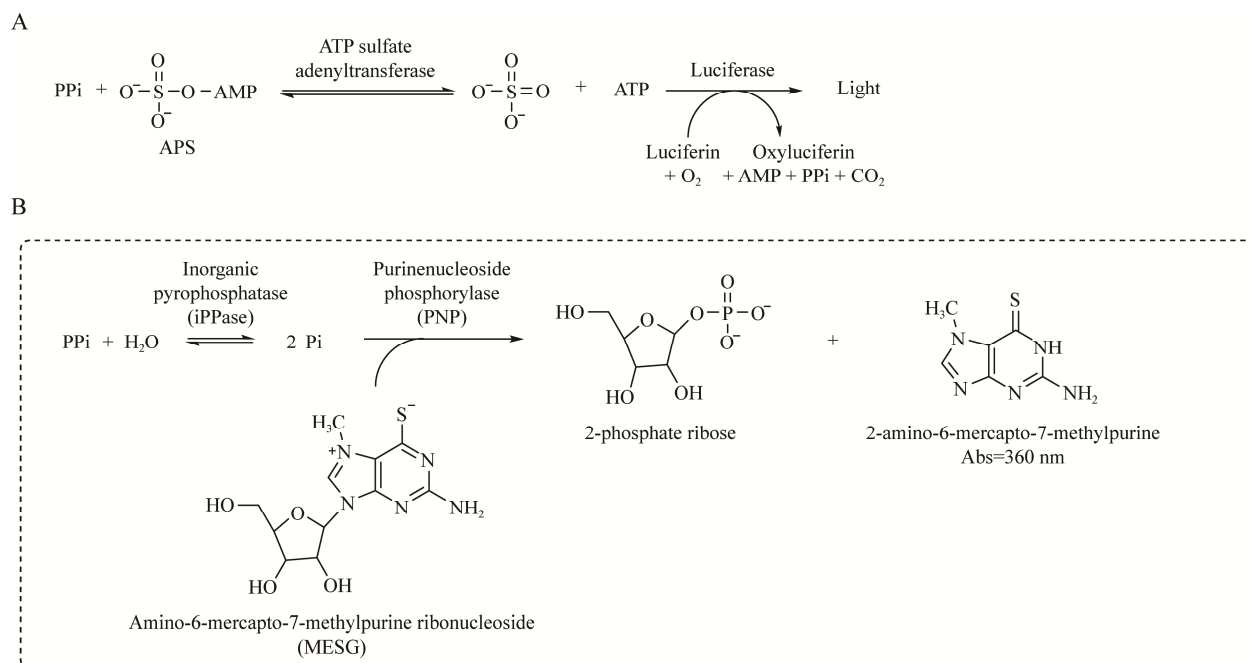


图4 焦磷酸盐测定方法<sup>[34]</sup>

Figure 4 Methods for detection of pyrophosphate<sup>[34]</sup>. A: Adenylyltransferase-luciferase based assay. B: Purine nucleoside phosphotylase-2-amino-6-mercapto-7-methyl purine (MESG)-based assay.

腺嘌呤 5'-磷酸硫酸盐(adenine 5'-phosphosulfate, APS)和 PPi 产生 ATP。ATP 经荧光素酶催化与荧光素反应,从而进行发光(图 4A)。该检测方法要求持续产生 ATP,并在低浓度下进行检测。另外一种是基于磷酸结合蛋白的荧光检测法。Pais 等

通过改造大肠杆菌磷酸结合蛋白(phosphate binding protein, PBP),在其磷酸结合位点的边缘附近引入半胱氨酸,并在该半胱氨酸上共价标记上 N-[2-(1-马来亚胺基)乙基]-7-(二乙基氨基)香豆素-3-甲酰胺 {N-[2-(1-maleimidyl)ethyl]-7-

(diethylamino)coumarin-3-carboxamide, MDCC)} 荧光发色基团, 该发色团在蛋白与 Pi 结合后因为周边微环境的变化而产生荧光信号。将其与焦磷酸水解酶耦合, 则可以测定焦磷酸的含量。由于 MDCC-PBP 能够紧密结合 Pi ( $K_d$  约  $0.1 \mu\text{mol/L}$ ), 该方法具有较高的灵敏度。MDCC-PBP 无法从商业途径获取, 在实验室中制备的步骤较为繁琐<sup>[36]</sup>。第 3 种是氨基-6-巯基-7-甲基嘌呤核糖核苷 (amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside, MESG)测定法; 该方法和 MG 法一样基于比色法检测 PPI; Pi 与 MESG 在嘌呤核苷磷酸化酶(purine nucleoside phosphorylase, PNP)催化下反应形成产物 2-氨基-6-巯基-7-甲基嘌呤, 通过检测在 360 nm 波长处增加的吸光度即可测定 Pi 的浓度(图 4B); 通过比较成本与普适性等因素, Pegan 等认为 MG 法测定 Pi 的潜力最大, 可以应用于高通量筛选<sup>[34]</sup>。最终 Pegan 等开发了针对烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶(nicotinate mononucleotide adenylyltransferase)和 *O*-琥珀酰苯甲酰辅酶 A 合成酶(*O*-succinylbenzoyl-CoA synthetase)的一种 384 孔板的全自动 MG 测定法, 使用相对简单的自动化液体工作站在 10 h 内可以完成超过 200 000 个酶反应的筛选<sup>[34]</sup>。

Vardakou 等首次利用 2 种成熟的技术(放射性同位素和 GC-MS)验证了 MG 方法可用于表征 TPS 反应动力学, 并展示了其应用于高通量筛选的潜力<sup>[37]</sup>。他们通过检测 Pi 对应 TPS 催化反应产生的 PPI 的量, 用每秒产生的 PPI (相当于消耗的 FPP)对 TPS 酶浓度作图, 并通过线性回归分析, 计算表观催化常数( $k_{\text{cat ap}}$ ), 该值等于线性范围内酶活曲线的斜率(图 5)。实验室利用 MG 法针对不同批次 *Artemisia annua* 法尼烯合成酶( $\beta$ -farnesene synthase, AaFS)的  $k_{\text{cat ap}}$  进行检测均获得了相似的结果, 证明了 MG 法测定的

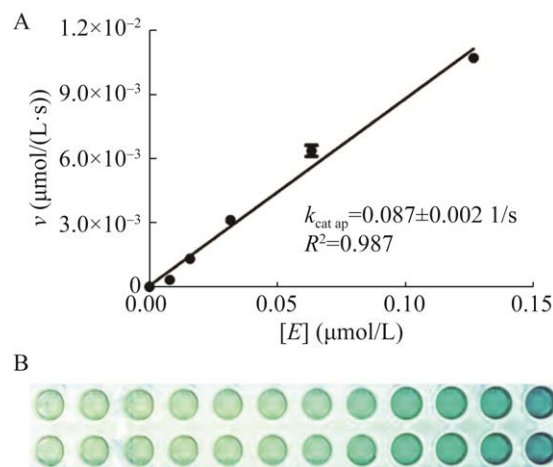


图 5 用孔雀石绿法测定的酶活性的线性范围<sup>[37]</sup>  
Figure 5 Linear range of enzymatic activity by the MG assay<sup>[37]</sup>. A: PPI produced (equivalent to consumed FPP) per second vs. AaFS enzyme concentration. The reaction was terminated with the addition of malachite green solution after 15 min incubation at room temperature. The calculated slope after linear regression is equivalent to the  $k_{\text{cat}}$  apparent of the enzyme. B: A typical colorimetric response generated 15 min following the addition of malachite green solution.

实用性。同时, Vardakou 等选用 3 种机制不同的天然酶 AaFS、AaADS 与 TEAS 进行了平行实验, 证实了 MG 法可以用于测定不同 TPS 的稳态动力学常数。他们与已建立的方法——放射性同位素方法[(1-<sup>3</sup>H)FPP]和 GC-MS 分析方法实验结果进行直接比较, 发现 3 种方法测算出的催化效率( $k_{\text{cat}}/K_M$ )几乎相同, 证明了 MG 测定法作为一种用于 TPS 表征的检测方法的可靠性。该方法的检测限以反应体系中最低 FPP 浓度表示, 约为  $3 \mu\text{mol/L FPP}$ <sup>[37]</sup>。

Vardakou 等随后用该方法对法尼烯合成酶的突变体库进行筛选。使用该方法对 AaFS 的 88 个突变体与高、中、低活性的已知突变体及空载体等对照进行筛选, 最终获得了 13 个高活性突变体。这些突变体的催化活性及合成产物通



过 GC-MS 进行了验证, 并通过测序确定了碱基的突变位点<sup>[37]</sup>。

### 1.2.2 焦磷酸检测试剂盒

市面上已有焦磷酸盐检测试剂盒, 可用于检测 PPi, 从而用于 TPS 释放焦磷酸盐的动力学表征。许金坤等在研究单萜合酶 *S*-柠檬烯合酶突变体时, 使用的 BIOMOL<sup>®</sup> Green 试剂盒采用孔雀石绿比色法测定 TPS 催化反应中释放的焦磷酸, 从而分析酶活性<sup>[38]</sup>。有的倍半萜合酶研究用市售的分子探针 P<sub>i</sub>Per<sup>™</sup> 焦磷酸盐检测试剂盒(P<sub>i</sub>Per<sup>™</sup>, Invitrogen), 该试剂盒提供了一种超灵敏的检测方法, 通过荧光产物试卤灵(resorufin)的形成来检测溶液中的游离焦磷酸盐(图 6)。因为试卤灵有很强的吸收能力, 所以可以用荧光法或分光光度法进行测定。在应用中, 无机焦磷酸酶将 PPi 转化为 2 分子的 Pi。接下来在 Pi 的存在下, 麦芽糖磷酸化酶将麦芽糖转化为葡萄糖-1-磷酸和葡萄糖。然后, 葡萄糖氧化酶将葡萄糖转化为葡萄糖酸内酯和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。最后, 在辣根过氧化物酶(horseradish

peroxidase, HRP)催化下, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 Amplex Red 试剂 10-乙酰基-3,7-二羟基吩噻嗪(10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine)反应, 生成荧光产物试卤灵。由此产生的荧光或吸光值的增加与样品中 PPi 的量成正比。该试剂盒通过荧光或吸收光法可检测低至 0.8 μmol/L 或 3 μmol/L 的 PPi。

由于常用的工程菌如大肠杆菌和酵母都含有内源性的焦磷酸水解酶, TPS 反应底物中焦磷酸基团能够被这些酶水解脱去, 直接用细胞裂解液筛选会有非常强的背景干扰, 一般需要使用纯化的蛋白进行活性筛选和检测, 因而限制了该方法的进一步应用。

### 1.3 DPPH 试剂检测单萜产物

Behrendorff 等使用疏水染料 2,2-二苯基-1-苦基肼(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)比色法检测单萜, 开发了一种筛选单萜生物合成的高通量方法<sup>[39]</sup>。DPPH 是一种稳定的自由基, 在 517 nm 处具有很强的吸收, 其在 517 nm 处的吸光值随着自由基交换质子成比例地降低, 导致颜色由紫色变为黄色(图 7)<sup>[39]</sup>。DPPH 可用于

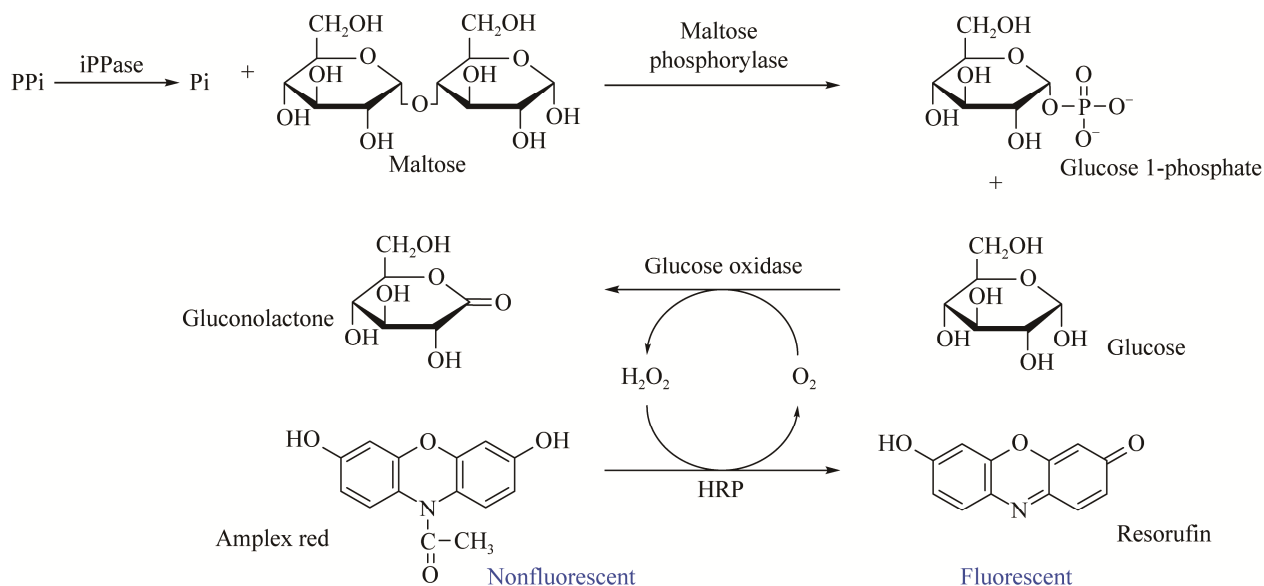


图 6 P<sub>i</sub>Per<sup>™</sup> 测定焦磷酸盐机理

Figure 6 Principle of the P<sub>i</sub>Per<sup>™</sup> pyrophosphate assay.

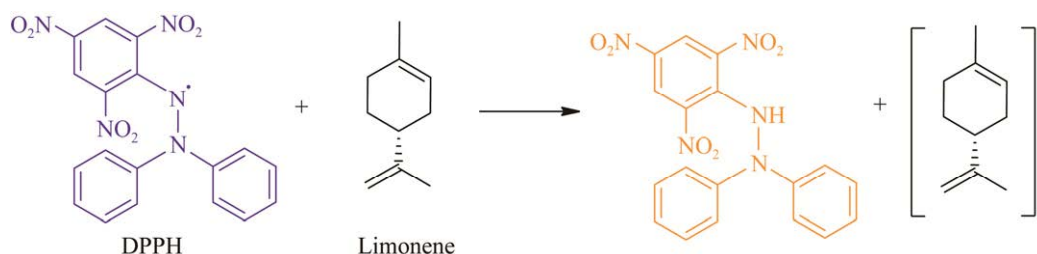


图 7 DPPH 反应机制<sup>[39]</sup>

Figure 7 The DPPH reaction mechanism<sup>[39]</sup>.

准确定量生物分子中的可氧化基团, 并已广泛用于评估复杂混合物如植物油的抗氧化能力, 而植物油中通常含有高浓度的单萜<sup>[40-42]</sup>。

由于自由基反应需要在非质子溶剂中进行, 因此他们选取对微生物毒性较低的十二烷<sup>[43-45]</sup>作为萜类产物的提取溶剂, 并优化反应条件, 以确保可以利用 DPPH 试剂检测出单萜化合物; 然而该方法的检测灵敏度因不同的单萜而有所差别。例如, 月桂烯和  $\gamma$ -萜品烯的检测限为 10  $\mu\text{mol/L}$  和 15  $\mu\text{mol/L}$ , 而柠檬烯的检测限则为 200  $\mu\text{mol/L}$ 。值得注意的是, DPPH 与微生物其他发酵产物及培养基可能会有背景反应, 使该方法不能用于定量分析, 仅适合作为初级筛选中的定性分析。Behrendorff 等将此方法用于检测酿酒酵母中柠檬烯的合成, 由此确定了柠檬烯合成的最佳柠檬烯合酶和发酵条件<sup>[39]</sup>。

## 2 基于减弱底物细胞毒性的高通量体内筛选系统

### 2.1 类异戊二烯前体毒性

异戊烯基焦磷酸前体(萜类合成前体 IPP、DMAPP 和 FPP)的固有毒性会抑制菌体的生长; 当这些前体被 TPS 消耗时, 菌株的正常生长得以恢复<sup>[46]</sup>。例如在大肠杆菌中, 天然 MEP 途径<sup>[47]</sup>或外源 MVA 途径关键酶的过表达可以提高萜类化合物的产量<sup>[6,21,48-49]</sup>; 但是, MEP 和 MVA

途径中关键酶的过度表达积累的 IPP 会严重地抑制宿主大肠杆菌的生长; 这种前体积累产生的毒性可以通过引入外源 TPS 将过量的 IPP 转化为萜烯来缓解<sup>[48]</sup>。Keasling 实验室的 Withers 等利用异戊烯基焦磷酸的毒性, 以及功能性表达 TPS 可以克服毒性的原理, 开发了一种筛选 TPS 基因的新方法<sup>[50]</sup>。他们将质粒 pMBI 导入到大肠杆菌 DH10B 中, pMBI 上携带编码甲羟戊酸激酶(mevalonate kinase)等蛋白的关键基因, 它们可以将培养基中补加的 MVA 转化为异戊烯基类焦磷酸前体从而抑制细胞生长; 利用该大肠杆菌对枯草芽孢杆菌 6051 的基因组文库进行筛选, 发现 *yhfR* 和 *nudF* 这 2 个基因可以恢复大肠杆菌的生长, 进一步的体外实验证实 YhfR 可以直接利用 IPP 产生异戊烯醇<sup>[50]</sup>。该检测方法主要是利用外源酶消耗过量底物来恢复细胞生长, 酶的具体产物及催化活性无法准确表征。

### 2.2 FPP 的毒性

Keasling 实验室的 Martin 等和 Withers 等设计并优化了基于前体毒性的筛选方法<sup>[48,50]</sup>, Dantas 实验室的 Kwak 等开发了一种功能宏基因组高通量筛选系统<sup>[51]</sup>。他们引入了由酿酒酵母 *ERG12*、*ERG8*、*MVD1* 和大肠杆菌 *idi* 和 *ispA* 组成的合成 MBIS 操纵子, 受  $P_{lacUV5}$  启动子的调控, 在培养基中添加异丙基硫代- $\beta$ -半乳糖苷(isopropylthio- $\beta$ -galactoside, IPTG)后, 确保大肠

杆菌中异戊烯基焦磷酸的过量产生。为了与含有卡那霉素抗性和 pBR322 复制子的宏基因组文库质粒(pZE21)兼容,该合成操纵子被克隆至携带氯霉素抗性和 p15A 复制子的 pA5c 载体上。由此产生的质粒 pA5c-MBIS 使大肠杆菌能够通过 IPTG 诱导将外源添加的 MVA 转化为 FPP (图 8)。

此外,该实验室还构建了 2 个对照质粒,确定添加 MVA 的最佳浓度,以此作为筛选编码 TPS 基因的选择压力<sup>[51]</sup>。其中,他们以携带 *Abies grandis* 的红没药烯合酶(bisabolene synthase, AgBis)作为阳性对照<sup>[49,52]</sup>,用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因替换 AgBis 作为阴性对照,最终确定 MVA 的最佳筛选浓度为 8 mmol/L。此外,他们对宿主菌株和筛选流程进行了优化。在致死胁迫下的自发突变可能让大肠杆菌对过量的异戊烯基焦磷酸的毒性产生免疫<sup>[53]</sup>。为了在筛选过程中最大限度地降低自发突变频率,他们采用了一种新的大肠杆菌宿主菌株 LowMut。LowMut 菌株中大多数与实验无关的基因包括插入序列(insertion sequence, IS)元件和易错 DNA 聚合酶等均被敲除<sup>[54-56]</sup>,能够显著减少自发突变引起的假阳性。利用含有 pA5c-MBIS 质粒的菌株 LowMut,他们对构建于 pZE21 质粒上的人类粪便和土壤宏

基因组文库进行了筛选,并以 pZE21-AgBis 和 pZE21-GFP 分别作为阳性和阴性对照。通过这种方法,Dantas 实验室从人类粪便宏基因组文库中发现了新的  $\beta$ -法尼烯合成酶 TS10F1,在重组酿酒酵母中成功地利用葡萄糖生产  $\beta$ -法尼烯<sup>[51]</sup>。

### 3 竞争类胡萝卜素高通量筛选

#### 3.1 竞争类胡萝卜素前体供给

竞争类胡萝卜素前体供给的高通量筛选的原理是:类胡萝卜素同样使用异戊二烯基焦磷酸盐(FPP 和 GGPP)作为其生物合成的底物(图 9A);引入外源 TPS 表达时,竞争性消耗底物,会引起类胡萝卜素的产量变化,从而使菌体的颜色发生改变。理论上,任何外源 TPS 的活性都可以通过菌落的颜色深浅来进行评估。

Umeno 实验室利用这种策略开发了一种简单的 TPS 体内活性筛选方法<sup>[57]</sup>。他们分别构建了筛选质粒 pAC-MN 和 pAC-EBI。其中, pAC-MN 质粒表达来源于金黄色葡萄球菌的 *crtM* 和 *crtN* 基因,可以将 FPP 转化为黄色的 C<sub>30</sub>类胡萝卜素二萜膜孢子烯(diaponeurosporene) (图 9)<sup>[58-59]</sup>。由于细胞中不存在 GGPP 底物,二萜合酶(diterpene synthase, DTSP)的活性不影响该质粒编码的 C<sub>30</sub>类胡萝卜素的合成。该质粒主要用于以 FPP 为底物的倍半萜合酶(sesquiterpene

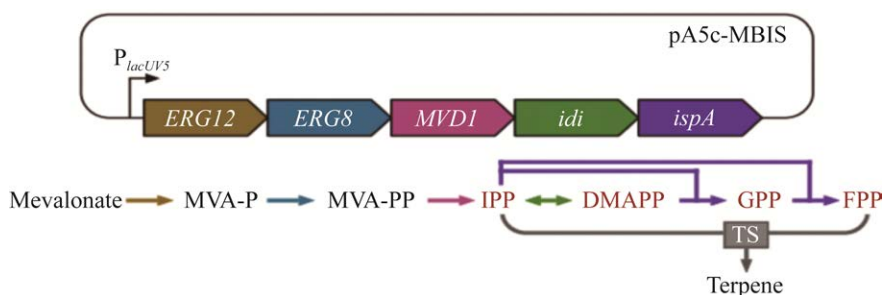


图 8 pA5c-MBIS 质粒结构<sup>[51]</sup>

Figure 8 Structure of pA5c-MBIS plasmid<sup>[51]</sup>. The synthetic operon overexpressing the prenyl pyrophosphate precursors is driven by the IPTG-inducible  $P_{lacUV5}$  promoter.

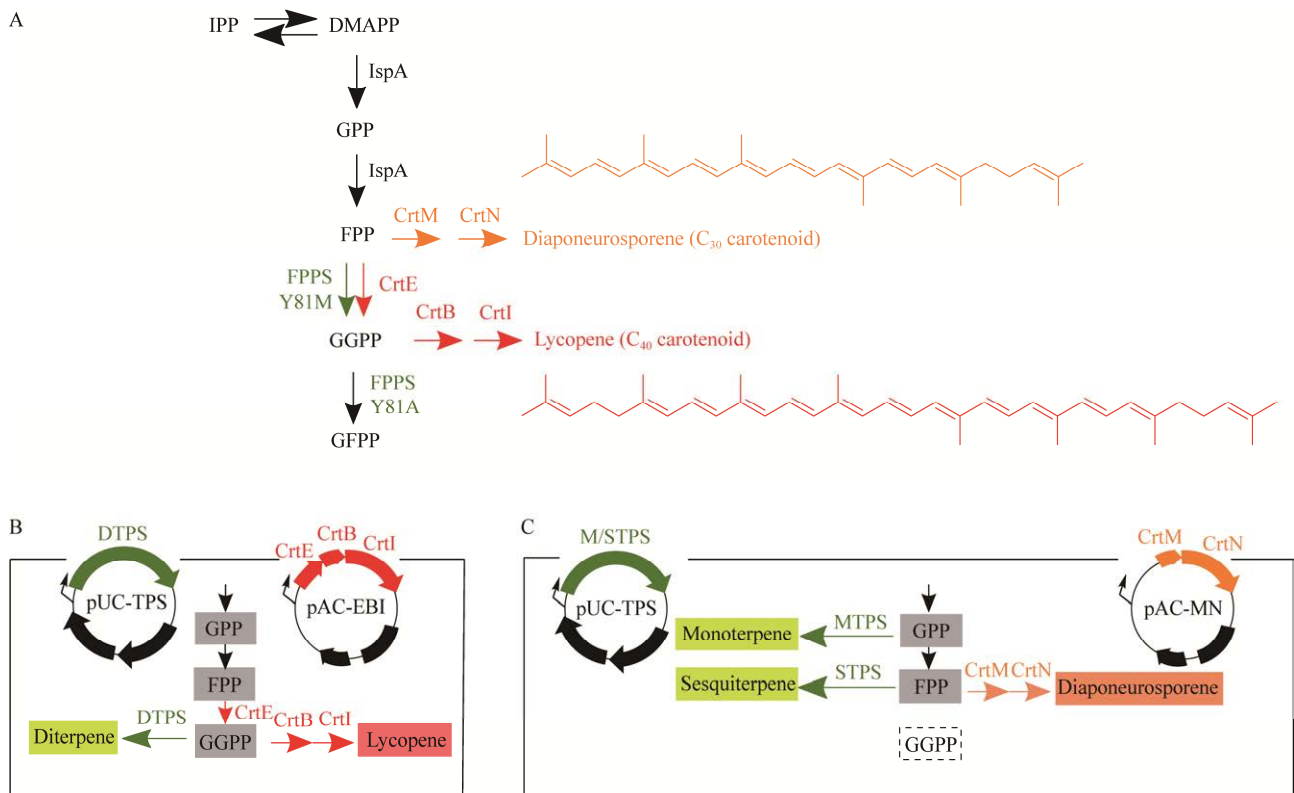


图 9 类胡萝卜素途径与 TPS 竞争异戊二烯基焦磷酸前体<sup>[57]</sup>

Figure 9 Carotenoid pathways compete with TPS for isoprenyl pyrophosphate precursors<sup>[57]</sup>. A: Carotenoid pathways compete with TPSs for isoprenyl pyrophosphate precursors. B: DTPS competes for GGPP with C<sub>40</sub> carotenoid enzymes. C: MTPS or STPS competes for FPP with C<sub>30</sub> carotenoid enzymes.

synthase, STPS)的筛选, STPS 直接与 CrtM 竞争 FPP, 从而减少黄色 C<sub>30</sub>类胡萝卜素的生成。理论上, 单萜合酶(monoterpene synthase, MTPS)也可以通过捕获内源性 GPP/FPP 合酶(IspA)释放的中间体 GPP 来减少 C<sub>30</sub>类胡萝卜素产生。

大多数天然 C<sub>40</sub>类胡萝卜素的底物是 GGPP 如番茄红素, 大肠杆菌合成番茄红素需要表达 3 个基因 *crtE*、*crtB* 和 *crtI* (图 9)。pAC-EBI 质粒上携带有来自菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*)的 *crtE*、*crtB* 和 *crtI* 基因, 这 3 个基因的表达受半乳糖启动子调控。通过表达 GGPP 合酶(CrtE), 大部分内源性 FPP 被转化为 GGPP。由于 GGPP 既可以用作 DTPS 的底物, 也可以作为 C<sub>40</sub>类胡萝卜素番茄红素途径(CrtB 和 CrtI)的底物, 因而

pAC-EBI 质粒主要用于以 GGPP 为底物的 DTPS 的筛选。DTPS 直接与 CrtB 竞争底物 GGPP, 从而减少 C<sub>40</sub>类胡萝卜素番茄红素的生成。

Umeno 实验室以香叶醇合成酶(geraniol synthase, GES)、马兜铃烯合成酶(5-epi-aristolochenesynthase, TEAS)与紫杉二烯合成酶(taxadiene synthase, TXS)分别代表单、倍半和二萜类合酶, 也对 FPP 合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPPS)及其突变体(FPPS<sub>Y81A</sub> 和 FPPS<sub>Y81M</sub>)<sup>[60]</sup>进行了测试, 利用类胡萝卜素途径中的各种底物, 探索用不同底物筛选 MTPS、STPS 和 DTPS 活性的可能性, 结果证明该方法可以用于高通量检测各种 TPS 或异戊烯基转移酶的活性, 并且获得了高活性 TEAS<sup>[57]</sup>。

由于 GGPP 合成酶(CrtE)的转化率远远高于 TPS, FPP 都会被 CrtE 转化为 GGPP 而不能被 STPS 所利用, 所以这套方法也可以用来筛选区分 MTPS/STPS 和 DTPS。此外, 通过改变质粒中相关酶的催化活性, Umeno 实验室继续优化构建了蒎烯合酶(pinene synthase, PS)突变体的筛选系统<sup>[61]</sup>。

### 3.2 类胡萝卜素显色

角鲨烯合成酶(squalene synthase, SQS)是甾体合成中的第一个关键酶, 具有非常独特和复杂的作用机制, 在过去的 50 年里吸引了广泛的研究。SQS 在进化上与类胡萝卜素合成酶有关, 特别是金黄色葡萄球菌中的脱氢角鲨烯

(dehydrosqualene, DSQ)合成酶(CrtM)<sup>[58-59]</sup>。SQS 介导 2 个 FPP 的缩合形成前角鲨烯焦磷酸盐(presqualene diphosphate, PSPP), 随后利用 NADPH 催化 PSPP 的重排和还原, 生成角鲨烯(squalene, SQ)<sup>[62-64]</sup>。CrtM 催化反应的第一步与 SQS 相同: CrtM 将 2 个 FPP 分子缩合生成 PSPP 中间体。不同之处在于, 第二步反应中 CrtM 在没有 NADPH 的情况下可以催化 PSPP 产生 DSQ。CrtN 可以利用 DSQ 为底物<sup>[65]</sup>合成 C<sub>30</sub> 类胡萝卜素二萜膜孢子烯和/或 diapo-番茄红素(diapolycopene), 也可以催化 SQ 去饱和生成 DSQ。相反, CrtI 仅使用 DSQ, 而不能利用 SQ (图 10)。因此, CrtI 可以严格地区分 DSQ 和 SQ。

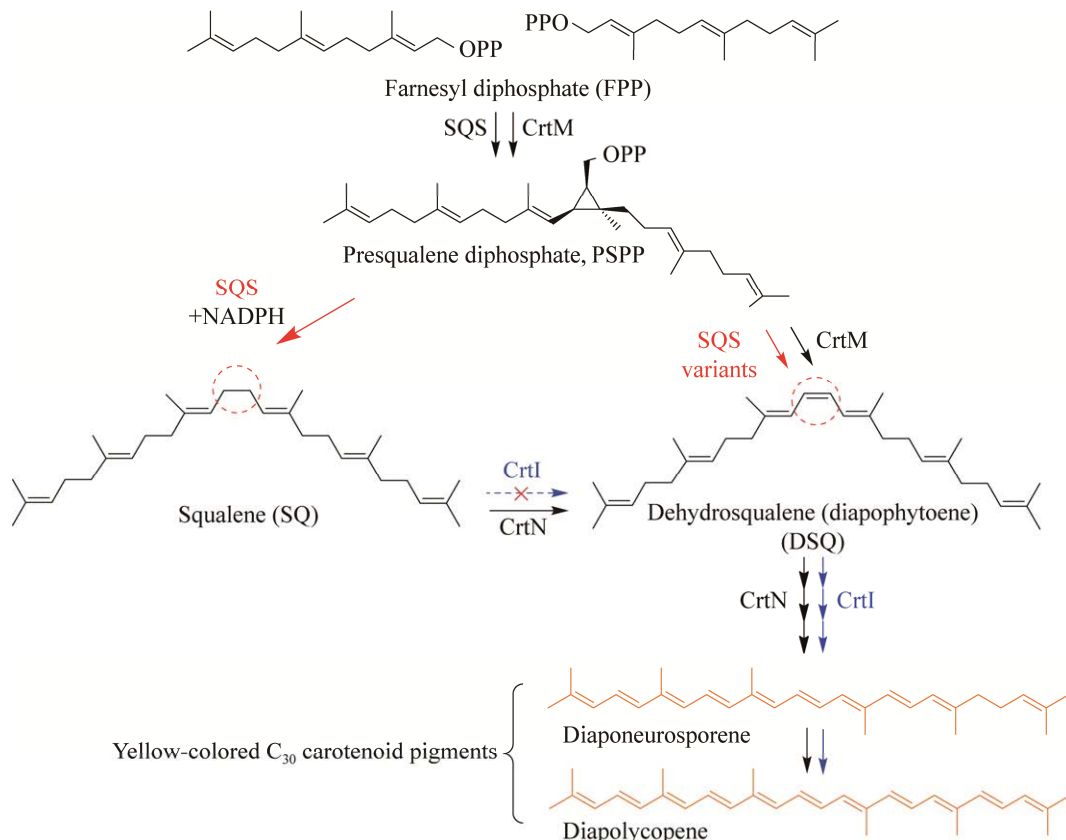


图 10 角鲨烯和脱氢角鲨烯的形成及其转化为类胡萝卜素的反应途径<sup>[66]</sup>

Figure 10 Formation of squalene (SQ) and dehydrosqualene (DSQ) and their conversion into carotenoid pigments<sup>[66]</sup>.

鉴于这些结果, 在表达 *CrtI* 的细胞中, 色素的形成(菌落的颜色)可以用于分离具有 DSQ 合酶活性的 SQS 突变体。

基于 *CrtI* 的选择性, Umeno 实验室建立了高通量筛选的方法通过定向进化将 SQS 改造成可以生成 DSQ 的酶, 并分析其中关键的氨基酸突变位点<sup>[66]</sup>。Umeno 实验室选择来自酵母、人类和细菌的 SQS, 在编码 *hsqs*、*ysqs* 和 *tsqs* 的基因中通过 epPCR 引入随机突变, 并将突变基因克隆到 pACYC 载体中, 构建 pAC-*hsqs*、pAC-*ysqs* 和 pAC-*tsqs* 突变体库。随后再将质粒突变体库导入含有 pUCara-*crtI* 质粒的大肠杆菌表达宿主中, 经 L-阿拉伯糖诱导表达 *CrtI*, 培养后筛选黄色菌落。由此产生的突变体的遗传分析显示, 多种突变的氨基酸可以有效地将 SQS 转化为“脱氢角鲨烯合成酶”, 并且这些突变位点都集中在 NADPH 结合位点的附近<sup>[66]</sup>。

Leonard 等也利用类胡萝卜素的显色机制对 GGPP 合成酶(geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS)进行了筛选<sup>[67]</sup>。由于 GGPPS 缺乏合适的蛋白结构作为参考, Leonard 等对其采用随机突变, 然后用高通量方法筛选 GGPPS 突变体。他们利用由 *crtB* 和 *crtI* 组合生成的番茄红素作为指标。在该体系中, 野生型 GGPPS 的表达产生浅红色的菌落, 经诱变后改良的 GGPPS 突变体可以提高番茄红素的产量, 这样通过颜色的深浅即可以筛选出活性提高的 GGPPS 突变体<sup>[67]</sup>。

## 4 基于融合蛋白可溶性表达的高通量筛选

蛋白质重组表达过程中, 常见的问题包括蛋白折叠错误和以包涵体形式聚集沉淀。其中一些蛋白的溶解性可以通过改变表达或纯化的

条件来提高<sup>[68]</sup>, 但有些蛋白则是由于其三维结构和氨基酸序列的特征导致其在水溶液中溶解性较差, 对于这些蛋白质, 已有研究证实可以通过突变蛋白中的一个或几个氨基酸残基显著提高其体外溶解性, 并且不影响其结构和功能<sup>[69-71]</sup>。然而如何确定特定的氨基酸突变能够提高蛋白质的可溶性是非常困难的, 尤其是在蛋白质结构未知的情况下。如果可以构建可溶性蛋白的筛选方法, 就有可能快速筛选到蛋白质的可溶性形式。正因如此, Maxwell 等在大肠杆菌中开发了一套体内筛选蛋白可溶性突变体的方法<sup>[72]</sup>。该方法是将目的蛋白融合到氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)的 N 端, 不溶性蛋白与 CAT 融合后会在细胞中沉淀, 导致细胞内活性 CAT 浓度降低, 从而对氯霉素的抗性减弱。相反, 可溶性蛋白与 CAT 融合时, 则会显示出较高的氯霉素抗性。基于这一融合筛选系统, Maxwell 等成功地筛选出了人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)整合酶催化结构域的可溶性突变体<sup>[72]</sup>。

通过该方法建立的融合蛋白, 同样可以用于筛选 TPS。Keasling 实验室将 CAT 基因克隆到 pTrc99A 载体中得到 pTrcCAT, 构建了倍半萜合酶(+)- $\delta$ -杜松萜类合酶[(+)- $\delta$ -cadinene synthase, CAD]的筛选系统<sup>[22]</sup>。利用 epPCR 对编码 CAD 的基因进行随机突变, 并将得到的突变体——CAT 融合蛋白进行 CAT 活性筛选。抑制 90%克隆生长的氯霉素浓度( $IC_{90}$ )为 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 利用该浓度的氯霉素进行筛选, 可以排除 CAT 活性较差的融合克隆(可溶性较差突变体), 并筛选出 CAT 活性提高的融合克隆(可溶性较好突变体)。Keasling 实验室通过初步的氯霉素活性筛选后, 使用 GC-MS 测定每个克隆的倍半萜产量, 鉴定了 CAD 的一个突变体 L405S, 它产生一种新的产物吉玛烯 D-4-醇(germacrene D-4-ol)。以 L405S 突变

体为模板,进行第二轮 epPCR,筛选并分离出双突变体 N403K/L405S,产生了更多的 germacrene D-4-ol。重复以 N403K/L405S 突变体进行第三轮筛选时,并未获得 germacrene D-4-ol 产量继续提高的突变体。最终经过 CAT 活性筛选结合 GC-MS 检测,从突变体库中分离得到了 21 个不同的突变体,产生不同比例的(+)- $\delta$ -cadinene 和 germacrene D-4-ol。该方法虽然可以快速筛除 TPS 突变体库中的无义突变,但却无法应用于高催化活性及产物专一的 TPS 的定向筛选。

## 5 基于生物传感器的高通量筛选

生物传感器是微生物体内广泛存在的一套响应系统,它们能够识别并响应细胞内特定的代谢物,并转化成特定的信号输出(如荧光)。生物传感器中最主要的一类是转录调控因子,它们可以感知细胞内小分子的浓度<sup>[73]</sup>,并且控制报告蛋白的表达。当转录因子被效应分子诱导后,报告蛋白产生的响应信号与代谢物浓度呈正相关,常用的报告蛋白为荧光蛋白。荧光报告蛋白的主要优势是可以通过荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting)实现单细胞水平的高通量筛选,这显著提高了分析大量突变酶或细胞的效率<sup>[74]</sup>。目前生物传感器已被广泛用于细胞内代谢产物的定性与定量分析<sup>[75-78]</sup>,并且开发出细胞生物传感器用于工业生产上的化学品检测<sup>[74,79-80]</sup>。

异戊二烯是重要的萜类化合物结构单元, Kim 等开发了一种可以高通量筛选异戊二烯合成酶的全细胞生物传感器,这个生物传感器能够监测单个细菌细胞内异戊二烯的浓度,并且大肠杆菌发出的绿色荧光强度与胞内的异戊二烯浓度呈正相关<sup>[81]</sup>。该生物传感器由来自皮氏罗尔斯顿氏菌(*Ralstonia pickettii*) PKO1 的 XylIR 家族转录调控因子 TbuT [调节甲苯-苯利用(*tbu*)

途径]及受 TbuT 激活的启动子  $P_{tbuA1}$ <sup>[82-83]</sup>组成。转录调控因子 TbuT 具有广泛的效应分子,如单取代苯衍生物、乙苯、三氯乙烯与异戊二烯,效应分子与 TbuT 结合后,可以激活  $P_{tbuA1}$  启动子,启动下游 *tbuA1UBVA2C* 操纵子的转录,产生苯-3-单加氧酶,从而可以氧化降解相应的效应分子(图 11A)。Kim 等首先构建了一个含有 TbuT 转录调节因子和 GFP 荧光蛋白的质粒(IspGESS<sub>HCE</sub>),荧光蛋白的表达受到启动子  $P_{tbuA1}$  的控制,而 TbuT 的表达受组成型启动子  $P_{HCE}$  调控(图 11B)。TbuT 蛋白在没有其效应物的情况下无法结合 DNA 启动  $P_{tbuA1}$  启动子的转录,而在效应分子(如异戊二烯)的存在下, TbuT 可以激活  $P_{tbuA1}$  启动子并使 *egfp* 转录而产生荧光(图 11C)。然而将该质粒导入大肠杆菌细胞后,该系统在响应胞内异戊二烯浓度时表现不佳。然后,通过使用诱导型的  $P_{TRC}$  启动子取代  $P_{HCE}$  启动子控制 *tbuT* 的转录(质粒 IspGESS<sub>TRC</sub>),来提高 *egfp* 的表达水平,并且实验证实含有 IspGESS<sub>TRC</sub> 质粒的大肠杆菌可以对不同浓度的异戊二烯产生不同强度的荧光反应,检测限为 0.05 mmol/L,线性范围为 0.05–2.00 mmol/L。另外,通过将 eGFP 报告蛋白替换为超折叠 GFP (sfGFP)报告蛋白,进一步改造 IspGESS<sub>TRC</sub> 质粒,得到了 IspGESS<sub>TRCSF</sub> 质粒来提升荧光检测的灵敏度。为了提高系统的稳定性与检测限,将质粒上的 IspGESS<sub>TRCSF</sub> 生物传感器元件整合到大肠杆菌染色体上,但改造后的大肠杆菌对异戊二烯(0.05–2.00 mmol/L)无荧光响应。为了提高大肠杆菌整合系统的检测灵敏度, Kim 等进一步构建了基于 T7 RNA 聚合酶(T7 RNAP)介导的转录级联报告系统,该系统在大肠杆菌基因组插入的外源 T7 RNA 聚合酶基因上游引入  $P_{tbuA1}$  启动子及 TbuT 的结合位点,并额外引入质粒用于表达 TbuT 和 sfGFP (图 11D)。在该体系中,异戊二烯与 TbuT 结合后

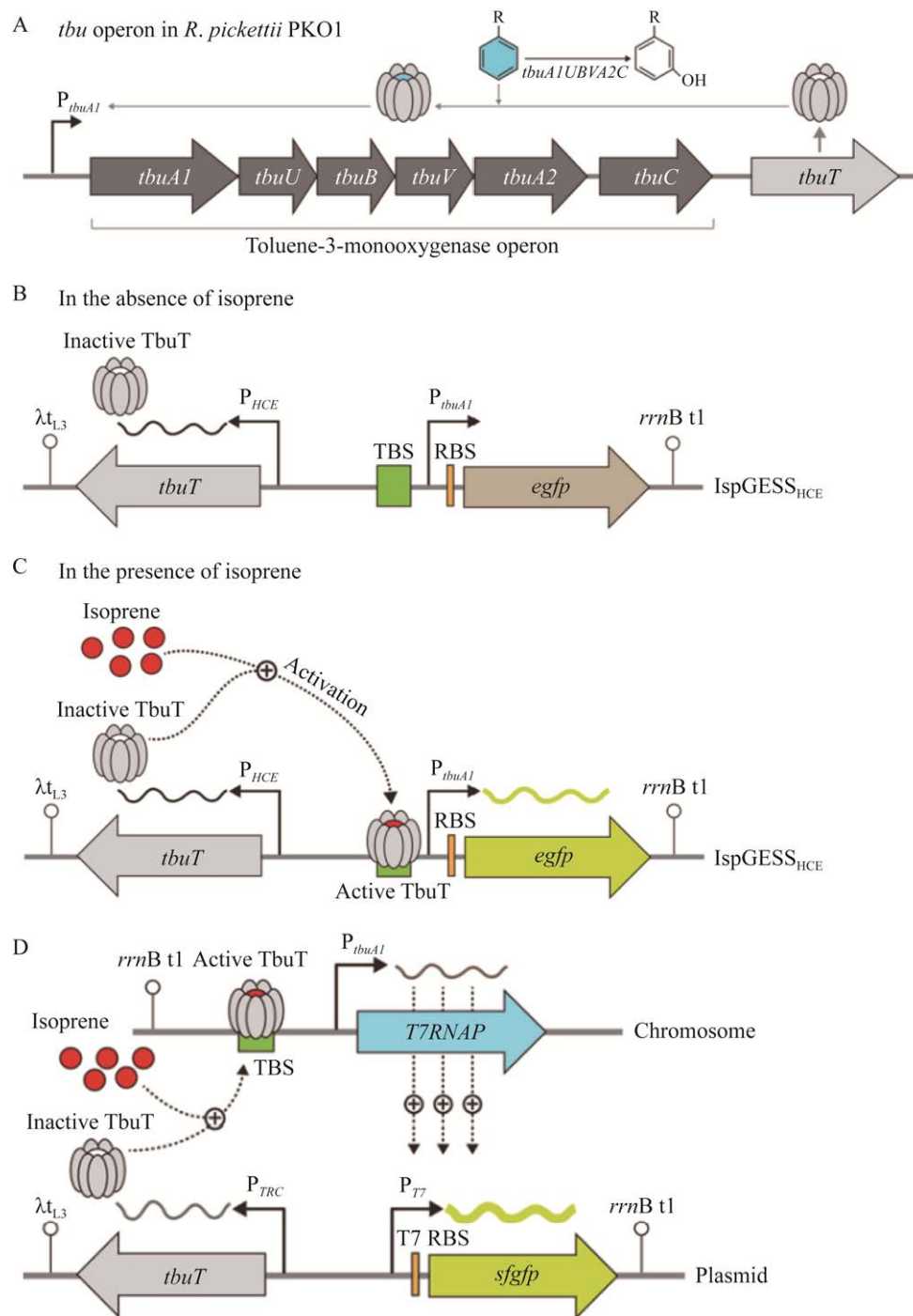


图 11 异戊二烯生物传感器 IspGESS 的示意图<sup>[81]</sup>

Figure 11 Schematic view of a genetically encoded isoprene biosensor, IspGESS<sup>[81]</sup>. A: Regulation of the *tbu* operon by TbuT in the *Pseudomonas pickettii* PKO1 chromosome. B: Organization of IspGESS. The genes (*tbuT*, *egfp*), promoters ( $P_{HCE}$ ,  $P_{tbuA1}$ ), and terminators (*rrnB t1*,  $\lambda t_{L3}$ ) are indicated by thick arrows, bent arrows, and stem loops, respectively. The TbuT-binding site (TBS) and ribosome-binding site (RBS) are represented by light green and orange boxes, respectively. C: Proposed mechanism for the IspGESS. D: Schematic representation of T7IspGESS.



激活  $P_{ibuA1}$  启动子, 启动大肠杆菌 BL21(DE3) 细菌染色体上的 T7 RNAP 转录表达, 而 T7 RNAP 可以激活 T7 启动子增加 *egfp* 或 *sfgfp* 的转录与表达(图 11D)。该级联系统进一步提高了荧光响应强度。由于  $P_{TRC}$  启动子经常用于构建异戊二烯生产途径相关的质粒, Kim 等对  $P_{TRC}$  启动子进行正交替, 通过筛选 BioBrick 库中的启动子, 发现  $J_{23100}$  启动子活性最优。最终构建的整合在大肠杆菌染色体上的报告系统  $IspGESS_{J23100SF}$  可以对 0.05–8.00 mmol/L 浓度范围内的异戊二烯产生线性的荧光响应。这是目前第一个将萜类化合物与生物传感器相结合的高通量筛选系统案例<sup>[81]</sup>。

## 6 基于自动化平台的高通量筛选

前文描述了多种高通量筛选 TPS 的研究方法, 包括基于焦磷酸盐释放的比色法<sup>[37]</sup>, 基于化学合成修饰底物环化释放副产物的比色法<sup>[32]</sup>, 基于荧光信号的生物传感器<sup>[81]</sup>等, 然而这些高通量的方法无法确定 TPS 催化合成的具体萜类产物, 需要通过进一步的 GC-MS 分析来进行验证, 而且这类方法无法实现对多个不同萜类产物的高通量筛选。

Scrutton 实验室通过使用自动化平台串联 GC-MS, 结合数据自动提取技术对萜烯合成酶突变体库进行筛选, 能够高效地鉴定出萜类产物<sup>[84]</sup>。这种自动化平台将标准的摇瓶培养缩小到 96 孔深孔板来培养, 并同时覆盖十二烷用于萜烯类产物的提取, 然后利用自动化液体工作站进行诱导、产物提取与样品预处理, 并进行后续 GC-MS 分析及数据自动提取, 该系统在 2.5 d 内可以实现 288 个样品(3 块 96 孔板)从单克隆到代谢产物数据的处理<sup>[85]</sup>。利用该自动化平台, Scrutton 实验室系统分析了萜烯合酶中的关键催化位点对产物谱的影响<sup>[84]</sup>。该筛选方法

可以适用于各种不同的萜类合成酶突变体库的筛选, 但通量较低且对设备的要求很高。

武汉大学刘天罡教授实验室与美国田纳西大学陈峰教授实验室合作, 使用高产萜类前体的酵母表达系统和高通量自动化平台实现了对嵌合萜类合酶功能的快速验证<sup>[86]</sup>。他们在前期构建的高产萜类化合物的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) YZL141 的基础上<sup>[87]</sup>, 过量表达了 GFPP 合成酶和嵌合萜类合酶, 构建了一个高产二倍半萜的酵母底盘细胞。该底盘一方面提高了 GFPP 的代谢通量, 使得嵌合的二倍半萜合酶的功能可以得到快速鉴定, 另一方面有助于释放嵌合的二萜合酶利用 GFPP 的潜力, 使得嵌合的二萜合酶在合成二萜的同时还可以合成二倍半萜<sup>[86]</sup>。此外, 他们利用高通量自动化平台批量构建嵌合萜类合酶的酵母工程菌株。他们首先对 74 个候选嵌合萜类合酶基因进行密码子优化与基因合成, 然后分别插入到 pYJ117 中, 利用机器人自动化高通量平台进行转化及菌落挑取; 该平台的应用大大加快了嵌合萜类合酶功能的鉴定<sup>[86]</sup>。通过设计高效的前体供应酵母底盘并串联高通量自动化平台, 他们确定了 34 个新的活性嵌合萜类合酶, 这远远超过了已知功能的嵌合萜类合酶的数量。这一方法可用于其他嵌合萜类合酶或相关萜类生物合成酶的快速鉴定与表征<sup>[86]</sup>。

此外, 刘天罡实验室使用米曲霉(*Aspergillus oryzae*, AO)作为底盘开发了一种高通量自动化合成平台, 用于快速组装真菌来源的萜类基因簇并筛选其编码的化合物<sup>[88]</sup>。工作站中含有几个模块, 包括真菌萜类基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs)的生物信息学分析、酵母体内自动组装构建质粒库、AO 底盘中重构 BGCs、AO 菌株的高通量发酵与产物提取以及结构和生物活性表征(图 12)。AO 底盘中优化了甲羟戊酸途

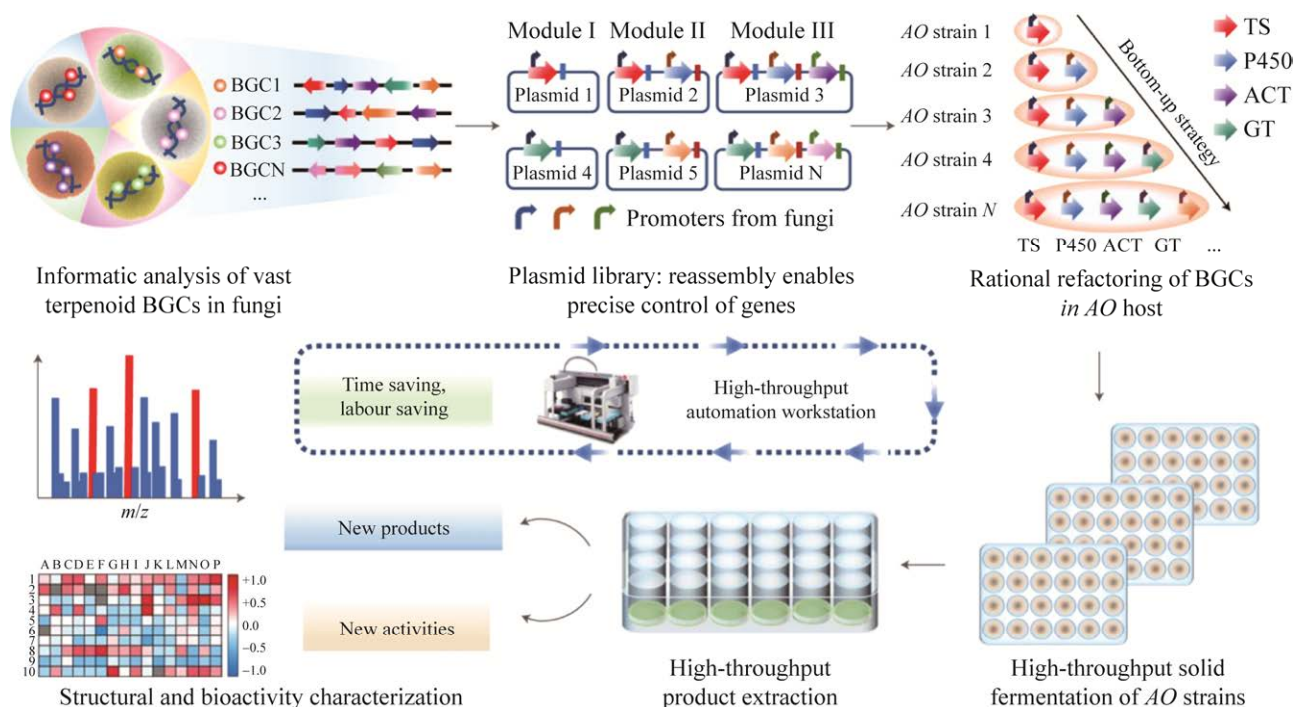


图 12 高通量自动化合成工作站概览<sup>[88]</sup>

Figure 12 Overview of automated and high-throughput biofoundry workflow<sup>[88]</sup>.

径, 可以高效生产萜类化合物, 能够有效挖掘真菌基因组中的沉默 BGCs、解析其生物合成途径。高通量自动化合成平台使用先进的液体处理技术进行快速 PCR 扩增、使用酵母同源重组构建质粒并转化 *AO* 原生质体以重构萜类 BGCs。研究人员使用高通量自动化工作站重建了 39 个萜类 BGCs, 同时将 39 个 BGCs 中的关键酶进行进一步地重组拼装形成 208 个工程菌株, 产生了 185 种不同的萜类化合物, 其中 Mangicol J 在体外和体内都显示出了良好的抗炎活性。*AO* 底盘工程菌株提供了一个简易的平台, 可以快速鉴定参与 Mangicol J 及其家族成员合成的蛋白, 揭示其可能的生物合成途径<sup>[88]</sup>。高通量自动化工作站搭配米曲霉底盘能够高效推进丝状真菌中活性萜类化合物的基因组挖掘和生物合成途径解析。

## 7 其他

萜类合成酶的底物非常类似, 其催化产生的产物多样性取决于底物结合部位周围的氨基酸残基。针对这些氨基酸残基进行突变通常会形成不同的萜类产物, 但目前尚无有效的分析方法来预测或确定关键氨基酸位点的突变对产物谱的影响。

Keasling 实验室以来源于 *Abies grandis* 的倍半萜合酶  $\gamma$ -humulene 合酶<sup>[24,89]</sup>为模型, 着重研究了其活性位点中的可塑性残基<sup>[90]</sup>。 $\gamma$ -humulene 合酶可以利用 FPP 产生 52 种不同的倍半萜。Keasling 实验室首先利用 TEAS 合酶的晶体结构作为模板, 建立了  $\gamma$ -humulene 合酶的结构模型, 并选择活性口袋中的 19 个氨基酸残基进行饱和突变, 确定了  $\gamma$ -humulene 合酶中的关键活

性位点残基。然后，他们根据饱和突变的结果及产物，建立了数学模型，并进一步利用该模型对已鉴定的可塑性残基进行系统重组，成功构建了 7 种主产物单一的突变体，这些突变体蛋白均保持了与野生型类似的催化活力<sup>[90]</sup>。这种系统重组的方法能够快速有效地改变酶的特异性，而且不需要进行大量的筛选。然而，该方法在初始阶段需要足够的突变体库数据来建立可靠的数学模型。

## 8 结语

本文系统性地梳理了萜类合成酶相关的高通量筛选方法，这些方法可以有效地提高 TPS 突变体的筛选效率。然而，这些方法在实际应用中也存在一些局限性(表 1)，例如放射性同位素方法，其使用范围仅限于一些酶动力学参数

的表征；而其他方法如副产物焦磷酸的检测，虽然通用性较高，但是对于特异性产物的区分能力较差，从而限制了其应用范围。另外，根据前体的细胞毒性、类胡萝卜素显色及 CAT 的融合蛋白表达系统等筛选方法也存在一定的局限性，因为它们也无法对不同的萜类产物进行区分。基于生物传感器的高通量筛选方法目前的通用性有限，但它是一个值得深入研究和优化的筛选系统，若能通过对调控蛋白进行突变改造使它能选择性地响应某些特定的萜类化合物，将是一个非常具有应用前景的高通量筛选方法。此外，随着计算机及工业技术的发展，高通量筛选方法将朝着更加自动化和智能化的方向发展，这将为 TPS 的性能优化和功能拓展提供更多的可能性，并为萜类化合物的合成和应用提供更广阔的前景。

表 1 高通量筛选方法的比较

Table 1 The comparison of the high-throughput screening methods

Methods	Application	Advantages	Disadvantages
Radioisotope-labeled substrates	Determination of kinetic parameters of TPS	Convenient	Risk of radiation injury; Substrate needs to be synthesized
FPP analog containing a vinyl methyl ether functionality	Sesquiterpene syntheses of specific cyclization modes	High versatility and specificity	Substrate is unstable under acidic conditions and needs to be synthesized
Malachite green and phosphate hydrolase assay pyrophosphate, and pyrophosphate assay kit	Characterization of TPS reaction kinetics	High versatility	Needs purified proteins and can't distinguish the specific products
DPPH reagent	Monoterpene	Convenient for qualitative analysis	High background
Based on substrate toxicity to cells	Almost all TPS	Cell-based screening and very convenient	Can't distinguish the specific products
Competition for carotenoids biosynthetic pathway	Various TPS or prenyltransferase	Color-based screening and very convenient	Can't distinguish the specific products
Based on soluble expression of fusion proteins	Detection of the mutants' solubility	Convenient	Not closely related to protein activity
Biosensor-based screening	Almost all TPS	Convenient and specific	The biosensors are limited and not sensitive
Based on automation platforms	All TPS	High versatility	High cost on instrument
Computer modeling prediction	All TPS	Convenient and specific	Adequate mutation data is essential for constructing the model, and the model needs to be rebuilt for different TPS

## 参考文献

- [1] DEWICK PM. The biosynthesis of C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> terpenoid compounds[J]. *Natural Product Reports*, 2002, 19(2): 181-222.
- [2] FRAGA BM. Natural sesquiterpenoids[J]. *Natural Product Reports*, 2008, 25(6): 1180-1209.
- [3] GAO Y, HONZATKO RB, PETERS RJ. Terpenoid synthase structures: a so far incomplete view of complex catalysis[J]. *Natural Product Reports*, 2012, 29(10): 1153-1175.
- [4] FARALDOS JA, WU S, CHAPPELL J, COATES RM. Conformational analysis of (+)-germacrene A by variable-temperature NMR and NOE spectroscopy[J]. *Tetrahedron*, 2007, 63(32): 7733-7742.
- [5] RO DK, PARADISE EM, OUELLET M, FISHER KJ, NEWMAN KL, NDUNGU JM, HO KA, EACHUS RA, HAM TS, KIRBY J, CHANG MCY, WITHERS ST, SHIBA Y, SARPONG R, KEASLING JD. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast[J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [6] AJIKUMAR PK, XIAO WH, TYO KEJ, WANG Y, SIMEON F, LEONARD E, MUCHA O, PHON TH, PFEIFER B, STEPHANOPOULOS G. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2010, 330(6000): 70-74.
- [7] PERALTA-YAHYA PP, ZHANG FZ, del CARDAYRE SB, KEASLING JD. Microbial engineering for the production of advanced biofuels[J]. *Nature*, 2012, 488(7411): 320-328.
- [8] THOLL D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2015, 148: 63-106.
- [9] YAMADA Y, KUZUYAMA T, KOMATSU M, SHIN-YA K, OMURA S, CANE DE, IKEDA H. Terpene synthases are widely distributed in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(3): 857-862.
- [10] DICKSCHAT JS. Bacterial terpene cyclases[J]. *Natural Product Reports*, 2016, 33(1): 87-110.
- [11] CHRISTIANSON DW. Roots of biosynthetic diversity[J]. *Science*, 2007, 316(5821): 60-61.
- [12] CHEN F, THOLL D, BOHLMANN J, PICHERSKY E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2011, 66(1): 212-229.
- [13] DUDAREVA N, NEGRE F, NAGEGOWDA DA, ORLOVA I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2006, 25(5): 417-440.
- [14] CHRISTIANSON DW. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(17): 11570-11648.
- [15] RINALDI MA, FERRAZ CA, SCRUTTON NS. Alternative metabolic pathways and strategies to high-titre terpenoid production in *Escherichia coli*[J]. *Natural Product Reports*, 2022, 39(1): 90-118.
- [16] FORDJOUR E, MENSAH EO, HAO YP, YANG YK, LIU XX, LI Y, LIU CL, BAI ZH. Toward improved terpenoids biosynthesis: strategies to enhance the capabilities of cell factories[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9(1): 1-33.
- [17] NAGEGOWDA DA, GUPTA P. Advances in biosynthesis, regulation, and metabolic engineering of plant specialized terpenoids[J]. *Plant Science*, 2020, 294: 110457.
- [18] LV XM, XU HM, YU HW. Significantly enhanced production of isoprene by ordered coexpression of genes *dxs*, *dxr*, and *idi* in *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(6): 2357-2365.
- [19] YANG JM, XIAN M, SU SZ, ZHAO G, NIE QJ, JIANG XL, ZHENG YN, LIU W. Enhancing production of bio-isoprene using hybrid MVA pathway and isoprene synthase in *E. coli*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e33509.
- [20] KIM JH, WANG CL, JANG HJ, CHA MS, PARK JE, JO SY, CHOI ES, KIM SW. Isoprene production by *Escherichia coli* through the exogenous mevalonate pathway with reduced formation of fermentation byproducts[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 214.
- [21] ANTHONY JR, ANTHONY LC, NOWROOZI F, KWON G, NEWMAN JD, KEASLING JD. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(1): 13-19.
- [22] YOSHIKUNI Y, MARTIN VJJ, FERRIN TE, KEASLING JD. Engineering cotton (+)- $\delta$ -cadinene synthase to an altered function: germacrene D-4-ol synthase[J]. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(1): 91-98.
- [23] O'MAILLE PE, MALONE A, DELLAS N, ANDES

- HESS B, SMENTEK L, SHEEHAN I, GREENHAGEN BT, CHAPPELL J, MANNING G, NOEL JP. Quantitative exploration of the catalytic landscape separating divergent plant sesquiterpene syntheses[J]. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4(10): 617-623.
- [24] LITTLE DB, CROTEAU RB. Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases  $\delta$ -selinene synthase and  $\gamma$ -humulene synthase[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 402(1): 120-135.
- [25] SEEMANN M, ZHAI GZ, de KRAKER JW, PASCHALL CM, CHRISTIANSON DW, CANE DE. Pentalenene synthase. Analysis of active site residues by site-directed mutagenesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(26): 7681-7689.
- [26] SEGURA MJR, JACKSON BE, MATSUDA SPT. Mutagenesis approaches to deduce structure-function relationships in terpene synthases[J]. *Natural Product Reports*, 2003, 20(3): 304-317.
- [27] GREENHAGEN BT, O'MAILLE PE, NOEL JP, CHAPPELL J. Identifying and manipulating structural determinates linking catalytic specificities in terpene synthases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(26): 9826-9831.
- [28] VEDULA LS, JIANG J, ZAKHARIAN T, CANE DE, CHRISTIANSON DW. Structural and mechanistic analysis of trichodiene synthase using site-directed mutagenesis: probing the catalytic function of tyrosine-295 and the asparagine-225/serine-229/glutamate-233-Mg<sup>2+</sup>B[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 469(2): 184-194.
- [29] KARP F, ZHAO YX, SANTHAMMA B, ASSINK B, COATES RM, CROTEAU RB. Inhibition of monoterpene cyclases by inert analogues of geranyl diphosphate and linalyl diphosphate[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 468(1): 140-146.
- [30] PICAUD S, OLOFSSON L, BRODELIUS M, BRODELIUS PE. Expression, purification, and characterization of recombinant amorpha-4,11-diene synthase from *Artemisia annua* L.[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005, 436(2): 215-226.
- [31] YOSHIKUNI Y, DIETRICH JA, NOWROOZI FF, BABBITT PC, KEASLING JD. Redesigning enzymes based on adaptive evolution for optimal function in synthetic metabolic pathways[J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15(6): 607-618.
- [32] LAUHLI R, RABE KS, KALBARCZYK KZ, TATA A, HEEL T, KITTO RZ, ARNOLD FH. High-throughput screening for terpene-synthase-cyclization activity and directed evolution of a terpene synthase[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2013, 52(21): 5571-5574.
- [33] LAUHLI R, PITZER J, KITTO RZ, KALBARCZYK KZ, RABE KS. Improved selectivity of an engineered multi-product terpene synthase[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2014, 12(23): 4013-4020.
- [34] PEGAN SD, TIAN Y, SERSHON V, MESECAR AD. A universal, fully automated high throughput screening assay for pyrophosphate and phosphate release from enzymatic reactions[J]. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2010, 13(1): 27-38.
- [35] ALEMDAR S, KÖNIG JC, SEIDEL K, KIRSCHNING A, SCHEPER T, BEUTEL S. Substrate specificity of  $\alpha$ -humulene synthase from *Zingiber zerumbet* Smith and determination of kinetic constants by a spectrophotometric assay[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2018, 18(9): 654-658.
- [36] PAIS JE, BOWERS KE, STODDARD AK, FIERKE CA. A continuous fluorescent assay for protein prenyltransferases measuring diphosphate release[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 345(2): 302-311.
- [37] VARDAKOU M, SALMON M, FARALDOS JA, O'MAILLE PE. Comparative analysis and validation of the malachite green assay for the high throughput biochemical characterization of terpene synthases[J]. *MethodsX*, 2014, 1: 187-196.
- [38] 许金坤, 艾莹, 徐经纬, ROBA Ahmed, 王建辉, 佟丽, 杨冬. 通过 S-柠檬烯合酶突变体的动力学分析揭示萜烯合酶进化的机制[J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 53(6): 668-673.
- XU JK, AI Y, XU JW, ROBA A, WANG JH, TONG L, YANG D. Kinetics of S-limonene synthase mutants reveals a novel evolutionary mechanism of terpene synthases[J]. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science Edition)*, 2017, 53(6): 668-673 (in Chinese).
- [39] BEHRENDORFF JB, VICKERS CE, CHRYSANTHOPOULOS P, NIELSEN LK. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl as a screening tool for recombinant monoterpene biosynthesis[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 76.
- [40] CHOI HS, SONG HS, UKEDA H, SAWAMURA M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils

- and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(9): 4156-4161.
- [41] TEPE B, AKPULAT HA, SOKMEN M, DAFERERA D, YUMRUTAS O, AYDIN E, POLISSIOU M, SOKMEN A. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey[J]. *Food Chemistry*, 2006, 97(4): 719-724.
- [42] TUNDIS R, LOIZZO MR, BONESI M, MENICHINI F, MASTELLONE V, COLICA C, MENICHINI F. Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of citrus aurantifolia Swingle, *C. aurantium* L., and *C. bergamia* Risso and Poit. peel essential oils[J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(1): H40-H46.
- [43] BRENNAN TCR, TURNER CD, KRÖMER JO, NIELSEN LK. Alleviating monoterpene toxicity using a two-phase extractive fermentation for the bioproduction of jet fuel mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(10): 2513-2522.
- [44] KIM EM, EOM JH, UM Y, KIM Y, WOO HM. Microbial synthesis of myrcene by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(18): 4606-4612.
- [45] XIE XK, KIRBY J, KEASLING JD. Functional characterization of four sesquiterpene synthases from *Ricinus communis* (castor bean)[J]. *Phytochemistry*, 2012, 78: 20-28.
- [46] SIKKEMA J, de BONT JA, POOLMAN B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(11): 8022-8028.
- [47] KIRBY J, KEASLING JD. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, 60: 335-355.
- [48] MARTIN VJJ, PITERA DJ, WITHERS ST, NEWMAN JD, KEASLING JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(7): 796-802.
- [49] PERALTA-YAHYA PP, OUELLET M, CHAN R, MUKHOPADHYAY A, KEASLING JD, LEE TS. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel[J]. *Nature Communications*, 2011, 2: 483.
- [50] WITHERS ST, GOTTLIEB SS, LIEU B, NEWMAN JD, KEASLING JD. Identification of isopentenol biosynthetic genes from *Bacillus subtilis* by a screening method based on isoprenoid precursor toxicity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(19): 6277-6283.
- [51] KWAK S, CROOK N, YONEDA A, AHN N, NING J, CHENG JY, DANTAS G. Functional mining of novel terpene synthases from metagenomes[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 104.
- [52] BOHLMANN J, CROCK J, JETTER R, CROTEAU R. Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (*E*)- $\alpha$ -bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(12): 6756-6761.
- [53] SWINGS T, van den BERGH B, WUYTS S, OEYEN E, VOORDECKERS K, VERSTREPEN KJ, FAUVART M, VERSTRAETEN N, MICHIELS J. Adaptive tuning of mutation rates allows fast response to lethal stress in *Escherichia coli*[J]. *eLife*, 2017, 6: e22939.
- [54] CSÖRGO B, FEHÉR T, TÍMÁR E, BLATTNER FR, PÓSFÁI G. Low-mutation-rate, reduced-genome *Escherichia coli*: an improved host for faithful maintenance of engineered genetic constructs[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 11.
- [55] PÓSFÁI G, PLUNKETT G III, FEHÉR T, FRISCH D, KEIL GM, UMENHOFFER K, KOLISNYCHENKO V, STAHL B, SHARMA SS, de ARRUDA M, BURLAND V, HARCUM SW, BLATTNER FR. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2006, 312(5776): 1044-1046.
- [56] UMENHOFFER K, FEHÉR T, BALIKÓ G, AYAYDIN F, PÓSFÁI J, BLATTNER FR, PÓSFÁI G. Reduced evolvability of *Escherichia coli* MDS42, an IS-less cellular chassis for molecular and synthetic biology applications[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 38.
- [57] FURUBAYASHI M, IKEZUMI M, KAJIWARA J, IWASAKI M, FUJII A, LI L, SAITO K, UMENO D. A high-throughput colorimetric screening assay for terpene synthase activity based on substrate consumption[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e93317.
- [58] WIELAND B, FEIL C, GLORIA-MAERCKER E, THUMM G, LECHNER M, BRAVO JM, PORALLA K, GÖTZ F. Genetic and biochemical analyses of the

- biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(24): 7719-7726.
- [59] PELZ A, WIELAND KP, PUTZBACH K, HENTSCHEL P, ALBERT K, GÖTZ F. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(37): 32493-32498.
- [60] OHNUMA S, NARITA K, NAKAZAWA T, ISHIDA C, TAKEUCHI Y, OHTO C, NISHINO T. A role of the amino acid residue located on the fifth position before the first aspartate-rich motif of farnesyl diphosphate synthase on determination of the final product[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(48): 30748-30754.
- [61] TASHIRO M, KIYOTA H, KAWAI-NOMA S, SAITO K, IKEUCHI M, IJIMA Y, UMENO D. Bacterial production of pinene by a laboratory-evolved pinene-synthase[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(9): 1011-1020.
- [62] PANDIT J, DANLEY DE, SCHULTE GK, MAZZALUPO S, PAULY TA, HAYWARD CM, HAMANAKA ES, THOMPSON JF, HARWOOD HJ Jr. Crystal structure of human squalene synthase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(39): 30610-30617.
- [63] LIU CA, JENG WY, CHANG WJ, KO TP, WANG AHJ. Binding modes of zaragozic acid A to human squalene synthase and staphylococcal dehydrosqualene synthase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(22): 18750-18757.
- [64] LIU CI, JENG WY, CHANG WJ, SHIH MF, KO TP, WANG AHJ. Structural insights into the catalytic mechanism of human squalene synthase[J]. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 2014, 70(2): 231-241.
- [65] FURUBAYASHI M, LI L, KATABAMI A, SAITO K, UMENO D. Construction of carotenoid biosynthetic pathways using squalene synthase[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(3): 436-442.
- [66] FURUBAYASHI M, LI L, KATABAMI A, SAITO K, UMENO D. Directed evolution of squalene synthase for dehydrosqualene biosynthesis[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(18): 3375-3381.
- [67] LEONARD E, AJIKUMAR PK, THAYER K, XIAO WH, MO JD, TIDOR B, STEPHANOPOULOS G, PRATHER KLJ. Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(31): 13654-13659.
- [68] SCHEIN CH. Solubility as a function of protein structure and solvent components[J]. *Bio/Technology* (Nature Publishing Company), 1990, 8(4): 308-317.
- [69] DALE GE, BROGER C, LANGEN H, ARCY AD, STÜBER D. Improving protein solubility through rationally designed amino acid replacements: solubilization of the trimethoprim-resistant type S1 dihydrofolate reductase[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1994, 7(7): 933-939.
- [70] LEISTLER B, PERHAM RN. Solubilizing buried domains of proteins: a self-assembling interface domain from glutathione reductase[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(10): 2773-2781.
- [71] NIEBA L, HONEGGER A, KREBBER C, PLÜCKTHUN A. Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved *in vivo* folding and physical characterization of an engineered scFv fragment[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1997, 10(4): 435-444.
- [72] MAXWELL KL, MITTERMAIER AK, FORMAN-KAY JD, DAVIDSON AR. A simple *in vivo* assay for increased protein solubility[J]. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 1999, 8(9): 1908-1911.
- [73] van ROSSUM T, KENGEN SWM, van der OOST J. Reporter-based screening and selection of enzymes[J]. *The FEBS Journal*, 2013, 280(13): 2979-2996.
- [74] BINDER S, SCHENDZIELORZ G, STÄBLER N, KRUMBACH K, HOFFMANN K, BOTT M, EGGELING L. A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level[J]. *Genome Biology*, 2012, 13(5): R40.
- [75] van der MEER JR, BELKIN S. Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(7): 511-522.
- [76] DIETRICH JA, McKEE AE, KEASLING JD. High-throughput metabolic engineering: advances in small-molecule screening and selection[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79: 563-590.
- [77] ZHANG J, JENSEN MK, KEASLING JD. Development of biosensors and their application in metabolic engineering[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 28: 1-8.
- [78] ROGERS JK, TAYLOR ND, CHURCH GM.

- Biosensor-based engineering of biosynthetic pathways[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 84-91.
- [79] JHA RK, KERN TL, FOX DT, STRAUSS CEM. Engineering an *Acinetobacter* regulon for biosensing and high-throughput enzyme screening in *E. coli* via flow cytometry[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(12): 8150-8160.
- [80] SIEDLER S, STAHLHUT S, MALLA S, MAURY J, NEVES AR. Novel biosensors based on flavonoid-responsive transcriptional regulators introduced into *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 21: 2-8.
- [81] KIM SK, KIM SH, SUBHADRA B, WOO SG, RHA E, KIM SW, KIM H, LEE DH, LEE SG. A genetically encoded biosensor for monitoring isoprene production in engineered *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(10): 2379-2390.
- [82] OLSEN RH, KUKOR JJ, KAPHAMMER B. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO<sub>1</sub>[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(12): 3749-3756.
- [83] BYRNE AM, KUKOR JJ, OLSEN RH. Sequence analysis of the gene cluster encoding toluene-3-monooxygenase from *Pseudomonas pickettii* PKO<sub>1</sub>[J]. *Gene*, 1995, 154(1): 65-70.
- [84] LEFERINK NGH, DUNSTAN MS, HOLLYWOOD KA, SWAINSTON N, CURRIN A, JERVIS AJ, TAKANO E, SCRUTTON NS. An automated pipeline for the screening of diverse monoterpene synthase libraries[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 11936.
- [85] JERVIS AJ, CARBONELL P, VINAIXA M, DUNSTAN MS, HOLLYWOOD KA, ROBINSON CJ, RATTRAY NJW, YAN CY, SWAINSTON N, CURRIN A, SUNG R, TOOGOOD H, TAYLOR S, FAULON JL, BREITLING R, TAKANO E, SCRUTTON NS. Machine learning of designed translational control allows predictive pathway optimization in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(1): 127-136.
- [86] CHEN R, JIA QD, MU X, HU B, SUN X, DENG ZX, CHEN F, BIAN GK, LIU TG. Systematic mining of fungal chimeric terpene synthases using an efficient precursor-providing yeast chassis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(29): e2023247118.
- [87] KANG W, MA T, LIU M, QU JL, LIU ZJ, ZHANG HW, SHI B, FU S, MA JC, LAI LTF, HE SC, QU JN, AU SWN, KANG BH, YU LAU WC, DENG ZX, XIA J, LIU TG. Modular enzyme assembly for enhanced cascade biocatalysis and metabolic flux[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4248.
- [88] YUAN YJ, CHENG S, BIAN GK, YAN P, MA ZN, DAI W, CHEN R, FU S, HUANG HW, CHI HM, CAI YS, DENG ZX, LIU TG. Efficient exploration of terpenoid biosynthetic gene clusters in filamentous fungi[J]. *Nature Catalysis*, 2022, 5(4): 277-287.
- [89] STEELE CL, CROCK J, BOHLMANN J, CROTEAU R. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*)[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(4): 2078-2089.
- [90] YOSHIKUNI Y, FERRIN TE, KEASLING JD. Designed divergent evolution of enzyme function[J]. *Nature*, 2006, 440(7087): 1078-1082.