



毕赤酵母截短 *PGK1* 启动子与不同终止子组合调控外源基因表达

张慧杰, 廖思敏, 凌小翠, 冯家勋, 秦秀林*

广西大学生命科学与技术学院, 广西微生物与酶工程技术研究中心, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004

张慧杰, 廖思敏, 凌小翠, 冯家勋, 秦秀林. 毕赤酵母截短 *PGK1* 启动子与不同终止子组合调控外源基因表达. 微生物学报, 2022, 62(7): 2642–2657.

Zhang Huijie, Liao Simin, Ling Xiaocui, Feng Jiayun, Qin Xiulin. Truncated *PGK1* promoter is paired with varied terminators to regulate heterologous gene expression in *Pichia pastoris*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2642–2657.

摘要:【目的】调控多基因表达对于优化代谢途径和合成生物学应用至关重要, 构建不同的启动子和终止子组合, 可作为毕赤酵母代谢途径改造和优化外源基因表达的有力分子调控工具。

【方法】首先, 将毕赤酵母组成型磷酸甘油酸激酶基因的启动子 P_{PGK1} 进行截短, 构建截短启动子分别调控报告基因(绿色荧光蛋白基因 *egfp* 和 β -半乳糖苷酶基因 *lacZ*)表达的毕赤酵母重组菌。检测重组菌的报告基因转录水平、荧光强度和 β -半乳糖苷酶产量。然后, 构建了不同强度启动子和终止子组合(共 27 种组合)调控 *egfp* 表达的重组菌。最后, 选取能调控基因高、中、低表达的 6 个启动子-终止子组合, 调控 β -呋喃果糖苷酶基因表达, 构建 β -呋喃果糖苷酶分泌表达的重组菌。

【结果】构建的截短启动子(P_{PP} 、 P_{PE} 、 P_{PG} 和 P_{PD})的强度是野生型启动子 P_{PGK1} 的 70%–190%, 最强的启动子为 P_{PD} 。分别与 9 个终止子组合时, P_{PG} 、 P_{PE} 和 P_{PD} 启动子驱动 *egfp* 基因表达的最高和最低的相比分别达到 4 倍、7 倍和 10 倍。6 个启动子-终止子组合调控 β -呋喃果糖苷酶分泌表达的重组菌胞外酶产量最高的和最低的相比可达 6 倍。【结论】构建了不同的启动子-终止子组合, 调控基因表达水平最高的和最低的相比达到 10 倍, 可为优化毕赤酵母代谢工程和合成生物学应用中控制不同外源基因的表达量提供有力的分子工具。

基金项目: 国家自然科学基金(31300076); 广西自然科学基金(2019GXNSFAA245001, 2018GXNSFAA281005, 2017GXNSFAA198136); 南京农业大学农业农村部农业环境微生物重点实验室开放课题(KFKT-EM201901)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31300076), by the Guangxi Natural Science Foundation (2019GXNSFAA245001, 2018GXNSFAA281005, 2017GXNSFAA198136) and by the Opening Project of Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology (KFKT-EM201901)

*Corresponding author. Tel: +86-771-3236674; E-mail: xiulinqin@gxu.edu.cn

Received: 28 October 2021; Revised: 15 January 2022; Published online: 27 June 2022

关键词: 毕赤酵母; 终止子; 代谢工程; 合成生物学; β -呋喃果糖苷酶

Truncated *PGK1* promoter is paired with varied terminators to regulate heterologous gene expression in *Pichia pastoris*

ZHANG Huijie, LIAO Simin, LING Xiaocui, FENG Jiayun, QIN Xiulin*

State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Guangxi Research Center for Microbial and Enzyme Engineering Technology, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

Abstract: [Objective] *Pichia pastoris* (syn. *Komagataella phaffii*) has been extensively used as a versatile cell factory for the production of industrial enzymes and chemicals. However, well-tuned co-expression of multiple genes is a common challenge for *P. pastoris* in metabolic engineering and synthetic biology. Therefore, in this work, we constructed a set of terminators and paired them with varied promoters to tune the protein levels in *P. pastoris*. [Methods] We constructed the *P. pastoris* strains expressing reporter genes (*egfp* and *lacZ*) under the control of truncated constitutive 3-phosphoglycerate kinase (*PGK1*) promoters, and then measured the transcript levels of reporter genes, yEGFP fluorescence intensity and β -galactosidase activity of these strains. Next, we created a total of 27 promoter-terminator pairs to regulate the transcription of *egfp*, and used 6 promoter-terminator pairs to alter the secretory expression of β -fructofuranosidase (β -Ffase). [Results] The promoter activities of the truncated *P_{PGK1}* variants (*P_{PP}*, *P_{PE}*, *P_{PG}* and *P_{PD}*) relative to that of the native *P_{PGK1}* ranged from 70% to 190%. Furthermore, when paired with the weak promoter *P_{PG}*, moderate promoter *P_{PE}*, and strong promoter *P_{PD}*, the terminators had the tuning ranges of 4, 7 and 10 folds (comparing between the strongest and weakest terminator), respectively. Finally, we demonstrated the utility of the promoter-terminator pairs for tuning the expression of the industrial enzyme β -Ffase, which showed an overall tuning range of 6 folds. [Conclusion] The promoter-terminator pairs constructed not only provide valuable information for understanding the modulatory roles of terminator regions in gene expression but also serve as a useful toolbox enabling the metabolic engineering of *P. pastoris* and the application of *P. pastoris* in synthetic biology.

Keywords: *Pichia pastoris*; terminator; metabolic engineering; synthetic biology; β -fructofuranosidase

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*, syn. *Komagataella phaffii*) 具有高等真核表达系统的诸多优点, 还可实现高密度发酵, 且分泌到胞外的内源蛋白少^[1], 易于胞外目的蛋白分离纯化, 已成为诸多药品、抗体和外源蛋白的表达平台^[2-3], 被广泛地应用于基础研究和工业生产。随着代谢工程和合成生物学的快速发展^[4-5], 毕

赤酵母已成为新一代的细胞工厂, 而控制基因表达对于优化代谢途径和合成基因网络调控至关重要。因此, 挖掘毕赤酵母表达系统的基因表达调控工具迫在眉睫。

启动子、终止子和转录因子等是代谢途径和合成基因网络高效表达所需优化的重要调控元件。其中, 启动子和终止子分别位于基因编

码框上、下游并调控基因的转录速率和 mRNA 稳定性,它们的强度(活性)与靶基因编码的蛋白表达量直接相关。因此,通过启动子和终止子的改造,可以获得基因表达调控的有力工具。

启动子中含有转录因子(TFS)和其他转录调节因子结合的位点,在调控基因表达时起到关键作用,使其成为代谢工程和合成生物学工具包中的重要元件之一。在毕赤酵母中,通过改造获得序列更短、活性更高的启动子,可以提高重组菌的 α -淀粉酶基因的表达水平^[6]和南极假丝酵母来源的脂肪酶基因的表达量^[7]。近期, *Hansenula polymorpha* 来源的甲醇诱导型启动子 P_{MOX} 也成功用于毕赤酵母表达系统中,并用于调控基因表达。Vogl 等^[8]筛选并构建了毕赤酵母的双向启动子(bidirectional promoter, BDP)文库,应用 BDP 文库对靶基因进行精确调控,优化了多基因的共表达,从而实现了紫杉二烯和 β -胡萝卜素复杂合成代谢途径在酵母细胞中的整合。

终止子也是调控基因表达的重要组件,负责基因的转录终止、释放新生 mRNA、调节 mRNA 的稳定性和半衰期。终止子主要通过调控 mRNA 的稳定性和半衰期,从而间接调节靶蛋白产量^[9],终止子改造也逐渐应用到基因调控和代谢工程领域^[10]。Rajkumar 等^[11]表征了 30 多个组成型和诱导型启动子、终止子,并将这些启动子和终止子进行组合,调控报告基因 *gfp* 的表达,构建了可应用于马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)多基因调控的工具。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,将终止子 *DIT1* 突变后,其活力增加了 500%^[12]。Yamanishi 等^[13]以 P_{TDH3} 为启动子和 *gfp* 为报告基因,检测了 5 302 个终止子的强度,这些终止子强度是对照终止子 T_{PGK1} 的 0.036 到 2.52 倍,可作为酿酒酵母代谢工程改造的基因调控工具。为了挖掘可用于调控毕赤酵母中外源基

因表达水平的终止子序列, Ito 等^[10]系统鉴定了 72 个终止子的强度,包括内源性的、酿酒酵母来源的和人工合成的终止子,这些终止子调控基因表达的强调可达到对照的 17 倍。

毕赤酵母中参与甲醇利用途径(methanol utilization pathway, MUT)、糖酵解途径(glycolysis pathway)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)防御相关基因的表达量较高^[14],这些基因的启动子和终止子可作为调控外源基因表达的有用工具。本研究对磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK1)基因的启动子进行截短并对其强度进行鉴定。然后,选择了上述途径相关基因的终止子和毕赤酵母表达系统常用终止子进行强度表征。这 9 个终止子是:醇氧化酶(alcohol oxidase, ID: 8201223)基因终止子 T_{AOX1} 、醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ID: 8200841)基因终止子 T_{ADH2} 、甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase, ID: 8199001)基因终止子 T_{FLD1} 、甲醇脱氢酶(formate dehydrogenase, ID: 8200284)基因终止子 T_{FDH1} 、过氧化氢酶(catalase, ID: 8198267)基因终止子 T_{CAT1} 、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, ID: 8198905)基因终止子 T_{GAP} 、磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, ID: 8197742)基因终止子 T_{PGK1} 、转录增强因子(transcription elongation factor 1, ID: 8198713)基因终止子 T_{TEF1} 和酿酒酵母细胞色素 C (cytochrome C, ID: 853507)基因终止子 T_{CYC1} 。将 3 个强度的启动子分别与不同终止子进行组合,选取其中 6 个组合(调控基因表达量最高和最低相比达到 10 倍),用于调控呋喃果糖苷酶(β -fructofuranosidases, β -Ffase)基因的表达。本工作构建的启动子-终止子组合可以实现目的基因的不同水平的表达,可作为毕赤酵母代谢途径优化和靶基因精确调控的有力工具。

1 材料与方 法

1.1 菌株和培养基

毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 野生型菌株 GS115 保藏于本实验室。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 Trans1-T1 用于基因克隆。

LLB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 使用时添加 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocin。固体培养基添加 1.5% 琼脂。

YPD 培养基(g/L): 胰蛋白胨 20, 酵母提取物 10, 葡萄糖 20。

MD 培养基: 1.34% 酵母氮源基础 (yeast nitrogen base, YNB), 0.000 04% 生物素, 葡萄糖 10 g/L, 1.5% 琼脂。

BMDY 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 胰蛋白胨 20, 1.34% YNB, 葡萄糖 10, 0.000 04% 生物素, 100 mmol/L $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。

BMD 培养基: 1.34% YNB, 10 g/L 葡萄糖, $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素, 100 mmol/L 磷酸钾, pH 6。

1.2 材料和试剂

质粒小规模提取试剂盒、通用型 DNA 纯化回收试剂盒、RNA 提取试剂盒均购自 TIANGEN 公司; 2 \times Phanta[®] Max Master Mix、2 \times Taq Plus Master Mix、Exnase II 工具酶均购自 Vazyme 公司; 限制性内切酶和 1 kb DNA Marker 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; T4 DNA Ligase、PrimeScript[™] RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 购自 TaKaRa 公司; Zeocin[™] 购自 Invitrogen 公司。

1.3 引物和质粒

本研究所用引物见表 1, 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

本研究构建的质粒见表 2。

1.4 截短启动子调控报告基因表达的毕赤酵母重组菌的构建

以毕赤酵母 GS115 基因组总 DNA 为模板, PCR 扩增启动子 P_{PGK1} , 将 P_{PGK1} 克隆至载体

pGHg^[15] 的 *Spe* I / *Not* I 位点, 替换 P_{GAP1} 启动子, 获得酵母增强型绿色荧光蛋白基因 *egfp* 表达质粒 pPHg。利用 PCR 和酶切的方法, 简单快速地将启动子 P_{PGK1} 序列进行截短。首先 PCR 扩增 5'端截短启动子 P_{PP} (1.3 kb), 用 P_{PP} 替换载体 pPHg 中的 P_{PGK1} 启动子构建质粒 pPPHg。然后, 质粒 pPPHg 经 *Cla* I 酶切后自连, 获得含截短启动子 P_{PE} (1.1 kb) 的质粒 pPEHg; 质粒 pPEHg 经 *Xho* I 酶切后自连, 获得含截短启动子 P_{PG} (866 bp) 的质粒 pPGHg。根据已发表的截短的 $PGK1$ 启动子 P_{PD3} 序列^[6], 用引物 PD-F/PGK1-PCR 扩增获得截短启动子 P_{PD} (与 P_{PD3} 序列比对, 缺失第 380 bp 位碱基 C)。将 P_{PD} 替换载体 pPHg 中的 P_{PGK1} 构建质粒 pPDHg。将重组质粒 pPHg、pPPHg、pPEHg、pPGHg、pPDHg 分别用 *Sal* I 线性化后电击法转化菌株 GS115, 构建表达报告基因 *egfp* 的重组毕赤酵母。

用 *Not* I/*Hind* III 双酶切质粒 pGHL^[15], 获得 *lacZ* 基因片段并克隆到质粒 pPHg、pPPHg、pPEHg、pPGHg、pPDHg 的 *Not* I/*Hind* III 位点, 替换其中的 *egfp* 基因, 构建 *lacZ* 基因的表达质粒 pPHL、pPPHL、pPEHL、pPGHL、pPDHL。将重组质粒分别用 *Sal* I 线性化后电击法转化 GS115, 构建表达报告基因 *lacZ* 的重组毕赤酵母。本研究所构建质粒见表 2。

1.5 不同启动子和终止子组合调控外源基因表达重组菌构建

为了便于终止子的克隆, 先构建质粒 pPGHG, 在终止子 5'和 3'端分别加上 *Hind* III 和 *Bam*HI 酶切位点, 便于后续终止子替换。首先, 以 P_{PG} 为启动子, 构建含不同终止子的系列 *egfp* 表达载体 pG-Tx (Tx 代表终止子: T_{ADH2} , T_{FLD1} , T_{PGK1} , T_{GAP} , T_{CAT1} , T_{CYC1} , T_{FDH1} 或 T_{TEF1})。以 pGHG 为模板, 用引物 TCYC1-F/TCYC1-R

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Application
PGK1-F	TCGACTAGTAGTTGGGTATTCAAATAGTTGACTT	Amplification of the <i>PGK1</i> promoter
PGK1-R	AGAATGCGGCCGCTTTCGTAATCAATTGGGCTATG	
PP-F	AACTACCGCATTAGGATCTTCG	Amplification of <i>P_{PP}</i>
PD-F	ACTAGTCGATCGCATTTTGGCCTCA	Amplification of <i>P_{PD}</i>
GFP-F	AATGCGGCCGCATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC	Amplification of the <i>egfp</i> gene
GFP-R	CCCAAGCTTTTATTTGTACAATTCATCCATACC	
BF-F	AATGCGGCCGCATGCCCGTAGATTCTTCTCATAAG	Amplification of the <i>BF</i> gene
BF-R	CCCAAGCTTTCACCTGATCGCTATGCATG	
TADH2-F	CCCAAGCTTGCCGAATAGTTTGTATACGTCTT	Amplification of the <i>ADH2</i> terminator
TADH2-R	CGCGGATCCTTTTAAAATTGAACGGCGACC	
TCAT1-F	CCCAAGCTTGCTAACTATATTTATTATTAATTA	Amplification of the <i>CAT1</i> terminator
TCAT1-R	CGCGGATCCGATTGTGACCTTTGTCTCTAT	
TCYC1-F	CCCAAGCTTCACGTCCGACGGCGGC	Amplification of the <i>CYC1</i> terminator
TCYC1-R	CGCGGATCCAGCTTGCAAATTAAGCCTTCGAG	
TFDH1-F	CCCAAGCTTTTGAAATGTATTTAATTGATATTA	Amplification of the <i>FDH1</i> terminator
TFDH1-R	CGCGGATCCACGATGTACAATCTGAGCTTG	
TFLD1-F	CCCAAGCTTGTGTATAGTCAATAATAGCCGGAGT	Amplification of the <i>FLD1</i> terminator
TFLD1-R	CGCGGATCCATTAATAAGAACAGCTTTTCCCG	
TGAP-F	CCCAAGCTTATCGATTGTATGTGAAATAGCTG	Amplification of the <i>GAP</i> terminator
TGAP-R	CGCGGATCCGTTCAATTATAGATCCACGAGTG	
TPGK1-F	CCCAAGCTTTTAGTTCATATAGTTTGAATTCTGA	Amplification of the <i>PGK1</i> terminator
TPGK1-R	CGCGGATCCCCGGTCCAGGCCATCA	
TTEF1-F	GGATGAATTGTACAAATAAAAGCTTATTGCTTGAAGCTTTAATTTATTT	Amplification of the <i>TEF1</i> terminator
TTEF1-R	TGAAGCTATGGTGTGTGGGGGATCCACAGATTCATTGACTCTATGATCTC	
RT-GAP-F	CGGCATCTTCAGTGTAACCC	Amplification of the <i>GAP</i> gene
RT-GAP-R	GGCTTCCGTGTCCCAAC	
RT-GFP-F	GGCTGACAAACAAAAGAATGG	Amplification of the <i>egfp</i> gene
RT-GFP-R	GGATAAGGCAGATTGAGTGGAT	
RT-LacZ-F	ATACTGTCGTCGTCCTCCCTCAAAC	Amplification of the <i>lacZ</i> gene
RT-LacZ-R	CGGATTCTCCGTGGGAACAA	
RT-BF-F	TGACCTCATCACCTGGAAAGA	Amplification of the β -Ffase gene
RT-BF-R	TGTGGTGGTCGCTTGTCAG	

表 2 本研究所使用的质粒

Table 2 Plasmids used in this study

Plasmids	Description	Sources or references
pGHg	The <i>egfp</i> gene expressing plasmid, P_{GAP} - <i>egfp</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	[15]
pPHg	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the promoter P_{PGK1} , P_{PGK1} - <i>egfp</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pPPHg	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PP} , P_{PP} - <i>egfp</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pPEHg	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} , P_{PE} - <i>egfp</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pPGHg	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} , P_{PG} - <i>egfp</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pPDHg	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} , P_{PD} - <i>egfp</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pPHL	Plasmid containing <i>lacZ</i> gene under the control of the promoter P_{PGK1} , P_{PGK1} - <i>lacZ</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pPPHL	Plasmid containing <i>lacZ</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PP} , P_{PP} - <i>lacZ</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pPEHL	Plasmid containing <i>lacZ</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} , P_{PE} - <i>lacZ</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pPGHL	Plasmid containing <i>lacZ</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} , P_{PG} - <i>egfp</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pPDHL	Plasmid containing <i>lacZ</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} , P_{PD} - <i>lacZ</i> - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pG-T _{PGK1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} with terminator T_{PGK1} , P_{PG} - <i>egfp</i> - T_{PGK1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pG-T _{AOX1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} with terminator T_{AOX1} , P_{PG} - <i>egfp</i> - T_{AOX1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pG-T _{TEF1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} with terminator T_{TEF1} , P_{PG} - <i>egfp</i> - T_{TEF1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pG-T _{ADH2}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} with terminator T_{ADH2} , P_{PG} - <i>egfp</i> - T_{ADH2} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pG-T _{GAP}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_G with terminator T_{GAP} , P_{PG} - <i>egfp</i> - T_{GAP} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pG-T _{CYC1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} with terminator T_{CYC1} , P_{PG} - <i>egfp</i> - T_{CYC1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pG-T _{FLD1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} with terminator T_{FLD1} , P_{PG} - <i>egfp</i> - T_{FLD1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pG-T _{CAT1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} with terminator T_{CAT1} , P_{PG} - <i>egfp</i> - T_{CAT1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pG-T _{FDH1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} with terminator T_{FDH1} , P_{PG} - <i>egfp</i> - T_{FDH1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pE-T _{PGK1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} with terminator T_{PGK1} , P_{PE} - <i>egfp</i> - T_{PGK1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pE-T _{AOX1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} with terminator T_{AOX1} , P_{PE} - <i>egfp</i> - T_{AOX1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pE-T _{TEF1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} with terminator T_{TEF1} , P_{PE} - <i>egfp</i> - T_{TEF1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pE-T _{ADH2}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} with terminator T_{ADH2} , P_{PE} - <i>egfp</i> - T_{ADH2} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pE-T _{GAP}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} with terminator T_{GAP} , P_{PE} - <i>egfp</i> - T_{GAP} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pE-T _{CYC1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} with terminator T_{CYC1} , P_{PE} - <i>egfp</i> - T_{CYC1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study

(待续)

(续表 2)

pE-T _{FLD1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} with terminator T_{FLD1} , P_{PE} - <i>egfp</i> - T_{FLD1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pE-T _{CAT1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} with terminator T_{CAT1} , P_{PE} - <i>egfp</i> - T_{CAT1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pE-T _{FDH1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} with terminator T_{FDH1} , P_{PE} - <i>egfp</i> - T_{FDH1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-T _{PGK1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{PGK1} , P_{PD} - <i>egfp</i> - T_{PGK1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-T _{AOX1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{AOX1} , P_{PD} - <i>egfp</i> - T_{AOX1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-T _{TEF1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{TEF1} , P_{PD} - <i>egfp</i> - T_{TEF1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-T _{ADH2}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{ADH2} , P_{PD} - <i>egfp</i> - T_{ADH2} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-T _{GAP}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{GAP} , P_{PD} - <i>egfp</i> - T_{GAP} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-T _{CYC1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{CYC1} , P_{PD} - <i>egfp</i> - T_{CYC1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-T _{FLD1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{FLD1} , P_{PD} - <i>egfp</i> - T_{FLD1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-T _{CAT1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{CAT1} , P_{PD} - <i>egfp</i> - T_{CAT1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-T _{FDH1}	Plasmid containing <i>egfp</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{FDH1} , P_{PD} - <i>egfp</i> - T_{FDH1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-BF-T _G	Plasmid containing <i>PoFF32A</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{GAP} , P_{PD} -BF- T_{GAP} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-BF-T _P	Plasmid containing <i>PoFF32A</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{PGK1} , P_{PD} -BF- T_{PGK1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-BF-T _T	Plasmid containing <i>PoFF32A</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{TEF1} , P_{PD} -BF- T_{TEF1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pG-BF-T _A	Plasmid containing <i>PoFF32A</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PG} with terminator T_{AOX1} , P_{PG} -BF- T_{AOX1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pE-BF-T _A	Plasmid containing <i>PoFF32A</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PE} with terminator T_{AOX1} , P_{PD} -BF- T_{AOX1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study
pD-BF-T _A	Plasmid containing <i>PoFF32A</i> gene under the control of the truncated promoter P_{PD} with terminator T_{AOX1} , P_{PD} -BF- T_{AOX1} - Zeo^R - <i>His4</i>	This study

扩增 T_{CYC1} 序列; 其他 7 个终止子用 GS115 总 DNA 为模板扩增获得。最后, 将 8 个终止子序列分别替换载体 pPGHG 上的 T_{AOX1} , 构建系列重组质粒 pG-Tx。用 P_{PE} 启动子替换质粒 pG-TT 上的 P_{PG} 启动子, 构建含不同终止子的系列载体 pE-Tx。用 P_{PD} 启动子替换质粒 pG-TT 上的 P_{PG} 启动子, 构建含不同终止子的载体 pD-Tx。质粒 pG-Tx 经 *Sal* I 线性化后电击法转化 GS115, 构建重组菌 G-ADH2、G-FLD1、G-PGK1、G-GAP、G-CAT1、G-CYC1、G-FDH1、G-TEF1。

以质粒 pPIC9k-*PoFF32A*^[16]为模板, 用引物 BF-F/BF-R 扩增含信号肽编码序列的呋喃果糖苷酶(β -Ffase)基因 *PoFF32A* 序列, 将该序列克隆到 pD-Tx (Tx= T_{GAP1} 、 T_{PGK1} 和 T_{TEF1})、pG-T_{AOX1}、pE-T_{AOX1} 和 pD-T_{AOX1} 质粒的 *Not* I/*Hind* III 位点, 替换原质粒上的 *egfp*, 分别构建 *PoFF32A* 表达质粒 pD-BF-T_G、pD-BF-T_P、pD-BF-T_T、pG-BF-T_A、pE-BF-T_A 和 pD-BF-T_A。将重组质粒经 *Sal* I 线性化后电击法转化 GS115, 构建表达 β -Ffase 基因并使产物分泌的

重组毕赤酵母菌株: PD-TG、PD-TP、PD-TT、PG-TA、PE-TA 和 PD-TA。

1.6 重组毕赤酵母的 yEGFP 荧光强度测定

毕赤酵母重组菌经 48 孔深孔板高能量培养^[17], BMD 培养基 28 °C、340 r/min 培养 36 h 后, 取 30 μ L 菌液至装有 170 μ L PBS 的 96 孔酶标板中, 使用多功能酶标仪(BioTek Synergy H1)检测 GFP 荧光强度(激发波长: 485 nm, 发射波长: 515 nm, 增益: 90)。检测 GFP 荧光强度时, 以不表达 *egfp* 的重组菌 G/PEH 为对照除去背景干扰。荧光强度 F/OD_{600} (RFU/ OD_{600}) 为荧光值与对应细胞密度 OD_{600} 的比值, 以荧光强度表征启动子或终止子强度。

1.7 重组毕赤酵母中基因转录水平的检测

将重组毕赤酵母菌在 YPD 液体培养基中培养 36 h 后, 用 RNA 提取试剂盒提取重组毕赤酵母菌的总 RNA, 然后用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒反转录获得 cDNA。最后用 SYBR[®] Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus)(2 \times) 进行 RT-qPCR, 以 *GAPDH* 基因作为内参基因, RT-qPCR 所用引物见表 1。

1.8 重组毕赤酵母摇瓶培养产 β -Ffase

将重组毕赤酵母菌株在 YPD 平板培养, 28 °C 培养到长出单菌落; 挑取单菌落于含有 5 mL YPD 培养基的试管中活化过夜; 以 4% 的接种量接种于含 50 mL BMDY 培养基的 500 mL 三角瓶中, 250 r/min、28 °C 培养 60 h, 每隔 12 h 取样测定 OD_{600} 和 β -Ffase 活力, 补加葡萄糖至终浓度为 1%、pH 试纸测定 pH 值并用 5 mol/L KOH 调 pH 至 6.0 左右。

1.9 呋喃果糖苷酶酶活检测

重组毕赤酵母的呋喃果糖苷酶(β -Ffase)酶活测定采用 DNS 法^[16], 以 0.2 mol/L 柠檬酸-磷酸缓冲液(pH 5.5)稀释粗酶液, 以 20%蔗糖为

底物, 于 40 °C 反应 15 min。每分钟从蔗糖底物中释放出 1 μ mol 还原糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位。

重组毕赤酵母的 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, Gal)酶活力测定参照毕赤酵母表达系统操作手册(*Pichia* expression kit, Invitrogen)。酶活力单位指在 28 °C 条件下, 每分钟水解 1 nmol ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)所需的酶量。

2 结果与分析

2.1 截短 *PGK1* 启动子构建及强度表征

毕赤酵母 3-磷酸甘油酸激酶(3-phosphoglycerate kinase, PGK1)基因启动子(P_{PGK1})是组成型强度中等的启动子^[18], 其序列较长(约 2 kb)不便于表达框的构建和启动子的改造。因此, 在避免启动子活性降低的情况下, 截短了 P_{PGK1} 序列, 构建了启动子 P_{PP} 、 P_{PE} 、 P_{PG} 和 P_{PD} (图 1A)。

利用启动子 P_{PP} 、 P_{PE} 、 P_{PG} 和 P_{PD} 驱动基因 *egfp* 在毕赤酵母中的表达, 通过检测毕赤酵母重组菌的 yEGFP 比荧光强度表征对应启动子强度。含不同启动子重组菌的比荧光强度与 *egfp* 的 mRNA 水平相关, 说明重组菌之间绿色荧光蛋白水平的差异是由 mRNA 水平的差异引起的, 且启动子的强度由强至弱依次为: P_{PD} 、 P_{PE} 、 P_{PP} 、 P_{PGK1} 、 P_{PG} 。与野生型启动子 P_{PGK1} 相比, P_{PG} 启动子强度下降了 30%; P_{PP} 、 P_{PE} 、 P_{PD} 启动子强度分别提高了约 10%、40%、90%; 4 个截短启动子的强度是启动子 P_{PGK1} 的 70%–190%; 这 4 个启动子调控表达的 yEGFP 荧光强度, 强启动子 P_{PD} 是弱启动子 P_{PG} 的 2.7 倍; 在不同启动子调控下, yEGFP 荧光强度与 *egfp* 的 mRNA 水平相关(图 1B)。

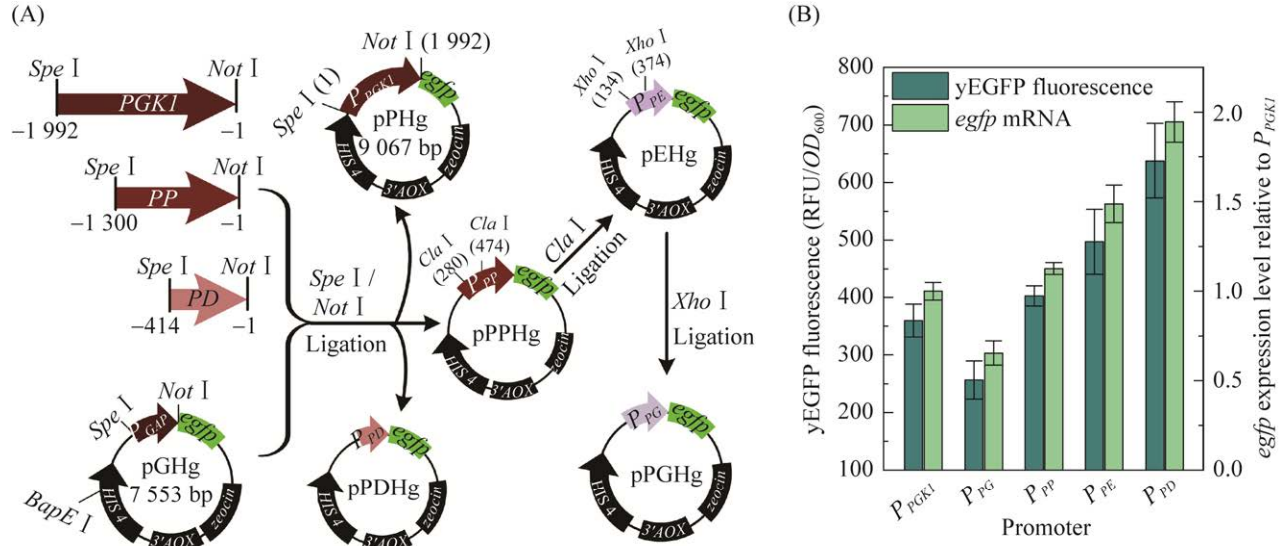


图 1 P_{PGK1} 截短启动子构建及其在毕赤酵母中驱动 $egfp$ 基因表达的强度的表征

Figure 1 Construction of the truncated P_{PGK1} variants and characterization of their strength in driving the expression of gene $egfp$ in *P. pastoris*. A: schematic representation of the construction of the truncated promoters; B: initial characterization of the truncated promoters using $egfp$ as reporter gene.

以 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, Gal)基因 ($lacZ$)为第二报告基因,对截短启动子可靠性和适用性进行验证。在启动子 P_{PG} 、 P_{PP} 、 P_{PE} 、 P_{PD} 的调控下, Gal 的酶产量随着启动子强度的增加而增加, Gal 酶产量变化范围与 yEGFP 荧光强度的基本一致(达到野生型 P_{PGK1} 启动子强度的 65%–170%);这 4 个启动子调控表达的 Gal 酶产量,强启动子 P_{PD} 是弱启动子 P_{PG} 的 2.6 倍;不同启动子调控下, Gal 酶产量与 $lacZ$ 的 mRNA 水平相关(图 2)。

利用 2 个报告基因对截短启动子进行了系统表征,证实截短启动子 P_{PE} 、 P_{PG} 、 P_{PD} 对不同基因表达调控的普遍适用性。与野生型启动子 P_{PGK1} 相比, P_{PG} 、 P_{PE} 、 P_{PD} 长度分别缩短了 57%、45%和 79%; P_{PG} 、 P_{PE} 、 P_{PD} 启动子强度约是 P_{PGK1} 的 70%、140%和 180%。

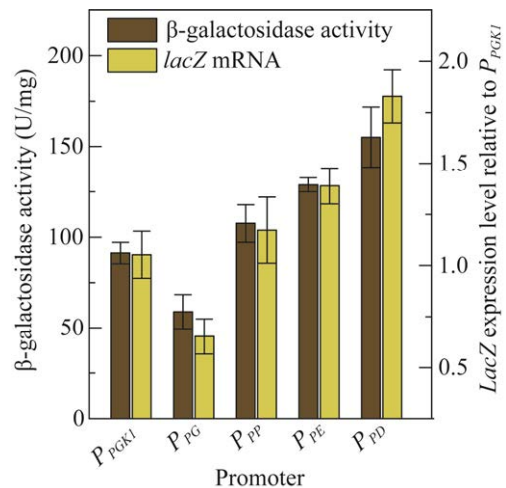


图 2 不同截短启动子构建的重组菌的 β -半乳糖苷酶基因表达水平和酶产量的检测

Figure 2 Measurement of β -galactosidase (Gal) production and $lacZ$ mRNA level under the control of the truncated promoters (P_{PG} , P_{PE} and P_{PD}) in the engineered *P. pastoris* strains.

2.2 弱启动子和不同终止子组合调控 *egfp* 的表达

毕赤酵母 Mut 途径、PPP 途径和 ROS 途径的基因表达量较高, 这些基因的终止子可以作为调控靶基因过表达的调控元件^[14]。我们选取了 3 个强度的组成型启动子 P_{PG} (弱)、 P_{PE} (中) 和 P_{PD} (强) 分别与 9 个终止子 T_x (T_x 代表: T_{AOX1} 、

T_{ADH2} 、 T_{FLD1} 、 T_{PGK1} 、 T_{GAP} 、 T_{CAT1} 、 T_{CYC1} 、 T_{FDH1} 和 T_{TEF1}) 进行组合, 调控 *egfp* 的表达, 以研究不同强度启动子与终止子组合调控靶基因表达的能力。对应重组菌(G- T_x 、E- T_x 和 D- T_x) 构建过程如图 3A 所示。通过检测报告蛋白 yEGFP 荧光强度, 研究不同启动子-终止子组合调控外源基因表达的能力。

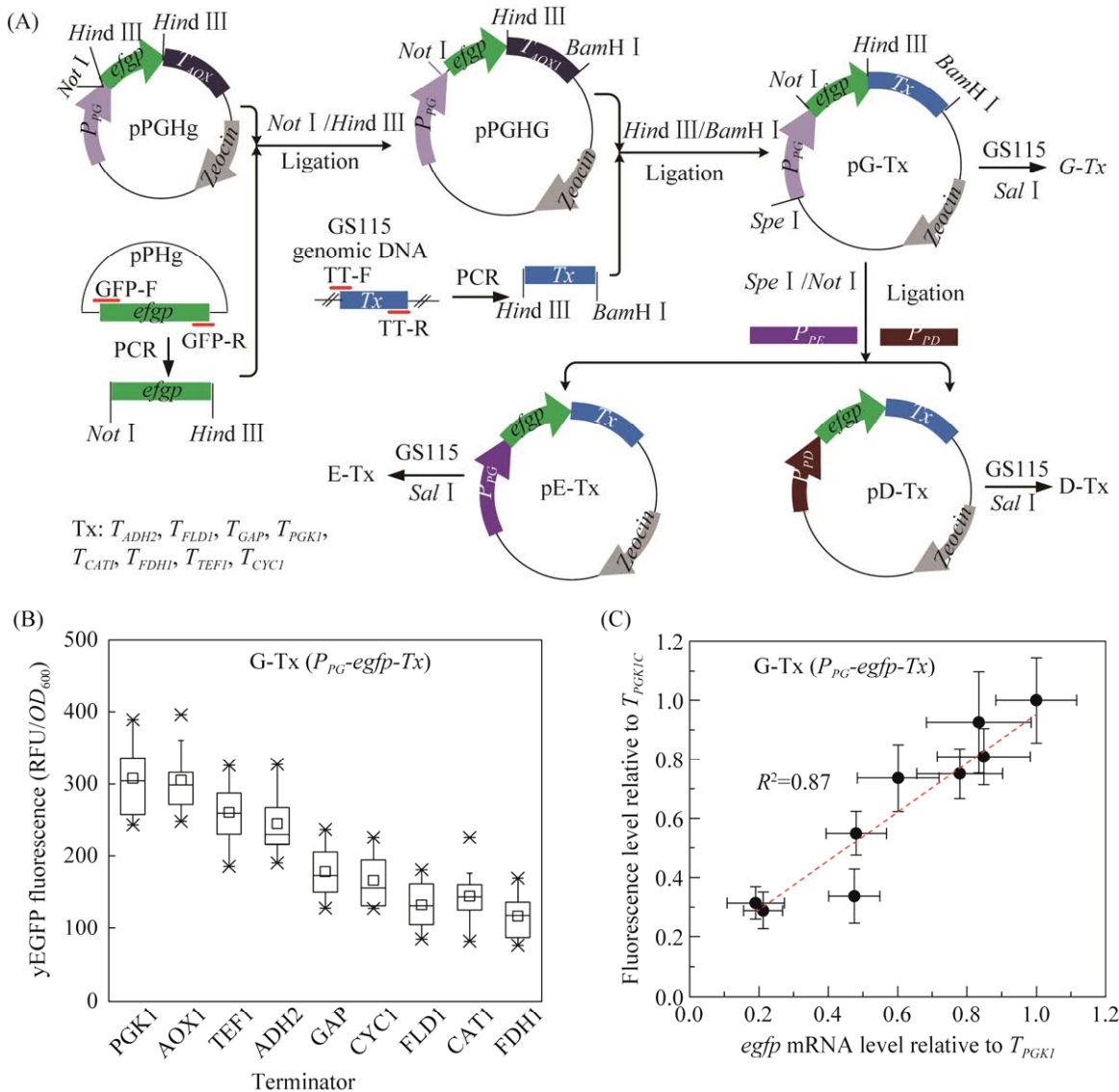


图 3 弱启动子 P_{PG} 与不同终止子组合调控 *egfp* 基因表达的毕赤酵母重组菌的荧光强度检测

Figure 3 Fluorescence output of *Pichia pastoris* recombinants expressing *egfp* gene under the control of the weaker promoter P_{PG} paired with various terminators. A: schematic diagram of the construction of *P. pastoris* recombinants expressing *egfp* gene under control of varied promoter paired with 9 terminators; B: box plot diagram of yEGFP fluorescence of G- T_x transformants; C: *egfp* transcript abundance versus yEGFP fluorescence intensity are plotted.

我们构建了弱启动子 P_{PG} 分别与 9 个终止子组合调控 *egfp* 表达的重组菌 G-T_X, 每个组合分别挑选 10 个转化子, 利用 48 深孔板培养 36 h, 检测其荧光强度并进行统计分析。在 9 个终止子中, 启动子 P_{PG} 与 T_{PGK1} 、 T_{AOXI} 组合时, 重组菌 yEGFP 荧光强度最高; 其次是与 T_{TEF1} 组合; 与 T_{CAT1} 、 T_{FDHI} 的组合调控能力最弱(图 3B)。

分别选取各组合重组菌中荧光强度最高且 *egfp* 基因拷贝数为 1 的 3 个转化子用摇瓶培养进行复筛, 设 3 次生物学重复。重组菌 G-T_X 摇瓶培养 36 h, 测定 yEGFP 荧光强度, 提取 RNA 检测 *egfp* 基因转录水平。 P_{PG} 为截短的 *PGK1* 基因启动子, 将 P_{PG} 与自身基因终止子 T_{PGK1} 组合(P_{PG} - T_{PGK1})作为对照, 比较各组合调控 *egfp* 表达的强度。摇瓶培养后检测结果显示, 各组合重组菌 G-T_X 的荧光强度与 48 深孔板初筛结果基本一致(图 3C)。 P_{PG} 与 9 个终止子组合调控强度由高到低为: T_{PGK1} 、 T_{AOXI} 、 T_{TEF1} 、 T_{ADH2} 、 T_{GAP} 、 T_{CYC1} 、 T_{FLD1} 、 T_{CAT1} 和 T_{FDHI} 。各组合调控的 *egfp* 转录水平与 yEGFP 荧光强度相关性较好, 调控强度是对照组合(P_{PG} - T_{PGK1})的 25%–100% (表 3); 其中 P_{PG} - T_{PGK1} 组合的强度是 P_{PG} - T_{FDHI} 组合的 4 倍, 即 P_{PG} -T_X 组合的调控范围跨度为 4 倍。

2.3 中强度启动子和不同终止子组合调控 *egfp* 的表达

构建中强度启动子 P_{PE} 与 9 个终止子组合调控 *egfp* 表达的重组菌 E-T_X, 每个组合分别挑

选 10 个转化子, 通过 48 深孔板培养检测其荧光强度。初筛结果显示, 在 P_{PE} 调控下, 与终止子 T_{AOXI} 和 T_{ADH1} 的组合, 重组菌 yEGFP 荧光强度显著高于其他组合重组菌; 与 T_{TEF1} 和 T_{FDHI} 的组合调控能力最弱(图 4A)。各组合重组菌 E-T_X 摇瓶复筛结果与 48 深孔板初筛结果基本一致。 P_{PE} 与 9 个终止子组合调控强度由高到低为: T_{AOXI} 、 T_{ADH2} 、 T_{GAP} 、 T_{CAT1} 、 T_{PGK1} 、 T_{CYC1} 、 T_{FLD1} 、 T_{TEF1} 和 T_{FDHI} 。各组合调控的 *egfp* 转录水平与 yEGFP 荧光强度相关性较好, 调控强度是对照组合(P_{PE} - T_{PGK1})的 30%–210% (表 3); 其中 P_{PE} - T_{AOXI} 组合的强度是 P_{PE} - T_{FDHI} 组合的 7 倍, 即 P_{PE} -T_X 组合的调控范围跨度为 7 倍。

2.4 强启动子和不同终止子组合调控 *egfp* 的表达

构建强启动子 P_{PD} 与 9 个终止子组合调控 *egfp* 表达的重组菌 D-T_X, 每个组合分别挑选 10 个转化子, 通过 48 深孔板培养检测其荧光强度。初筛结果显示, 在 P_{PD} 调控下, 与终止子 T_{AOXI} 和 T_{ADH1} 的组合, 重组菌 yEGFP 荧光强度显著高于其他组合重组菌; 与终止子 T_{TEF1} 和 T_{FDHI} 的组合, 调控能力最弱(图 5A)。各组合重组菌 E-T_X 摇瓶复筛结果与 48 深孔板初筛结果基本一致。 P_{PD} 与 9 个终止子组合调控强度与 P_{PE} 启动子的结果相似。各组合调控的 *egfp* 转录水平与 yEGFP 荧光强度相关性较好, 调控强度是对照组合(P_{PD} - T_{PGK1})的 25%–250% (表 3); 其中

表 3 启动子-终止子组合调控 *egfp* 表达重组菌的相对荧光强度

Table 3 Relative fluorescence intensity from *egfp* expression strains with different promoter and terminator cassette

Promoters	Terminators								
	T_{AOXI}	T_{ADH2}	T_{GAP}	T_{CAT1}	T_{PGK1}	T_{CYC1}	T_{FLD1}	T_{TEF1}	T_{FDHI}
P_{PG}	93%	75%	74%	31%	100%	55%	34%	81%	29%
P_{PE}	220%	142%	109%	105%	100%	88%	83%	55%	41%
P_{PD}	248%	180%	148%	78%	100%	78%	76%	46%	33%

Fluorescence intensity relative to T_{PGK1} .

P_{PD} - T_{AOX1} 组合的强度是 P_{PD} - T_{FDH1} 组合的 10 倍, 即 P_{PG} - T_X 组合的调控范围跨度为 10 倍。

2.5 不同启动子和终止子组合调控外源蛋白分泌表达

来源于草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*) 菌

株 GXU20 的呋喃果糖苷酶(β -fructofuranosidase, β -Ffase)能高效转移果糖生成新低聚果糖(neo-fructooligosaccharides, neo-FOS)^[16]。Neo-FOS 较其他 FOS 甜度更高, 在双歧杆菌增殖方面表现更优异, 其市场需求与日俱增。利用毕赤酵

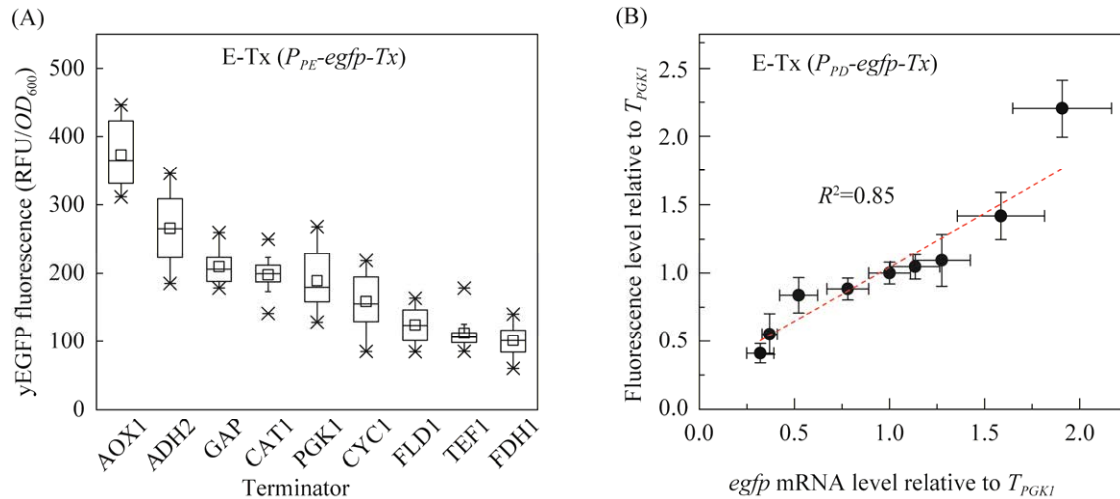


图 4 中强度启动子 P_{PE} 与不同终止子组合调控 $egfp$ 表达的毕赤酵母重组菌的荧光强度检测

Figure 4 Fluorescence output of recombinant *Pichia pastoris* expressing $egfp$ gene under the control of the moderate strength promoter P_{PG} paired with varied terminators. A: box plot diagram of yEGFP fluorescence of E-Tx transformants; B: $egfp$ transcript abundance versus yEGFP fluorescence intensity are plotted.

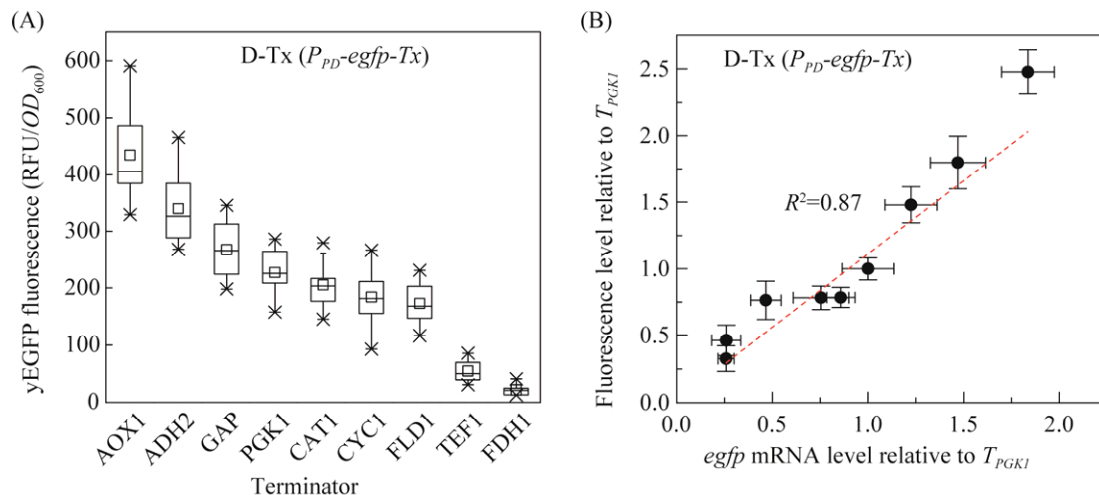


图 5 强启动子 P_{PD} 与不同终止子组合调控 $egfp$ 表达的毕赤酵母重组菌的荧光强度检测

Figure 5 Fluorescence output of recombinant *Pichia pastoris* expressing $egfp$ gene under the control of the strong promoter P_{PD} paired with varied terminators. A: box plot diagram of yEGFP fluorescence of D-Tx transformants; B: $egfp$ transcript abundance versus yEGFP fluorescence intensity are plotted.

母分泌表达 β -Ffase, 可为 neo-FOS 生产奠定基础。因此, 以来源于草酸青霉的 β -Ffase 作为模式蛋白, 研究不同启动子-终止子组合对外源基因的调控能力。从上述 27 个组合中, 我们选取调控范围跨度较大的 6 个组合 (P_{PG} - T_{AOXI} 、 P_{PE} - T_{AOXI} 、 P_{PD} - T_{AOXI} 、 P_{PD} - T_{GAP1} 、 P_{PD} - T_{PGK1} 和 P_{PD} - T_{TEF1}) 进一步验证。这 6 个组合在调控 *egfp* 表达时, yEGFP 荧光强度最高的和最低的相比达到 10 倍。将这 6 个组合用于调控 β -Ffase 分

泌表达, 构建对应重组菌: PG-TA、PE-TA、PD-TA、PD-TG、PD-TP 和 PD-TT。

各组合重组菌摇瓶培养实验结果表明, 不同强度启动子与终止子组合调控 β -Ffase 基因 (*PoFF32A*) 表达, 不影响重组菌的生长(图 6A)。强启动子 P_{PD} 与不同终止子组合时, 随着终止子强度增强, β -Ffase 酶产量呈上升趋势; 强终止子 T_{AOXI} 与不同启动子组合时, 随着启动子强度增强 β -Ffase 酶产量也呈上升趋势(图 6B)。各

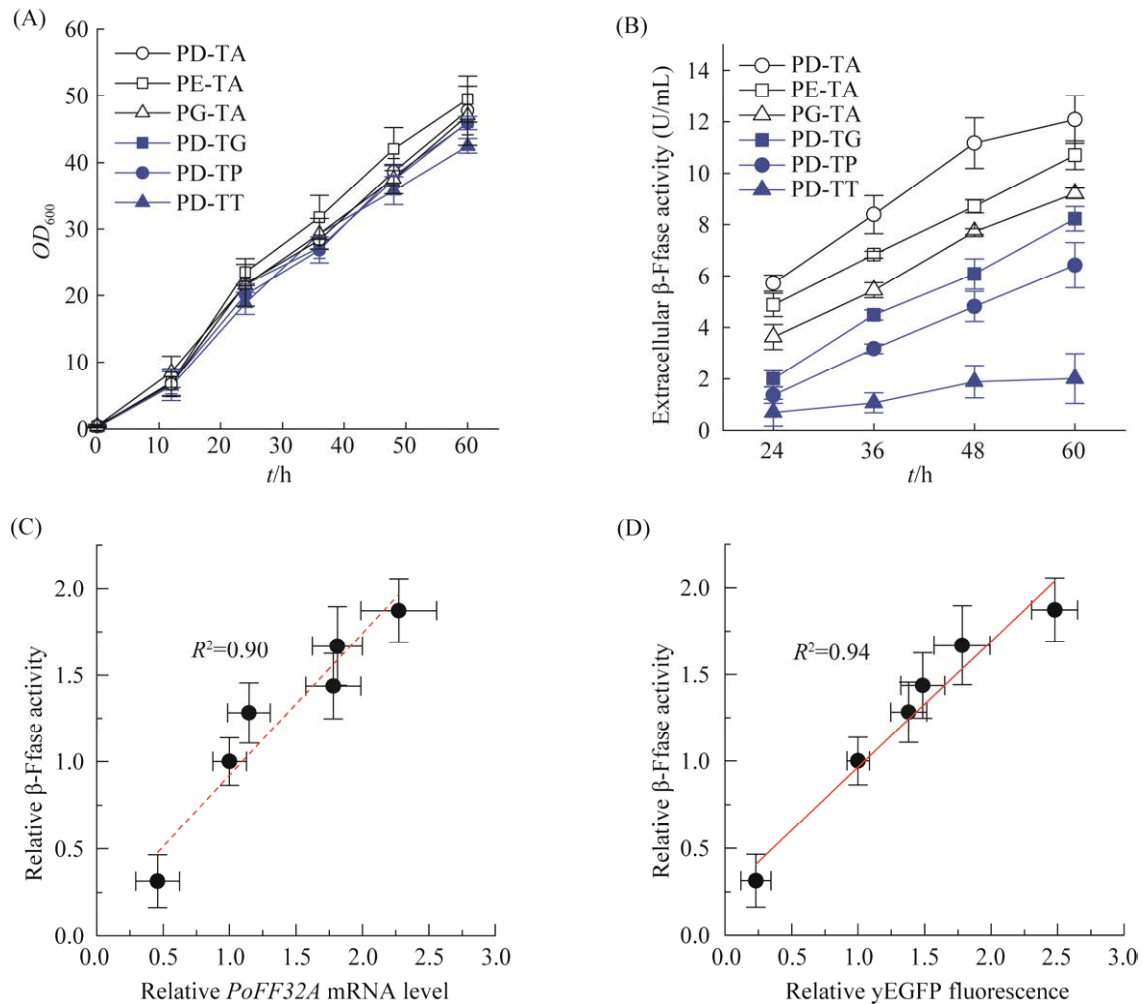


图 6 启动子与终止子组合调控 β -Ffase 在毕赤酵母中的分泌表达

Figure 6 Influence of promoter and terminator combinations on β -Ffase secretory expression in *Pichia pastoris*. A: growth of recombinant strains expressing *PoFF32A* gene using under the control of varied promoter paired with T_{PGK1} or T_{AOXI} terminator; B: extracellular β -Ffase activity of recombinant strains in shake flask; C: *PoFF32A* transcript abundance versus β -Ffase activity are plotted; D: yEGFP fluorescence versus β -Ffase activity are plotted.

组合调控的 *PoFF32A* 转录水平与 β -Ffase 酶产量相关性较好, 调控范围在对照组合 PD-TP (P_{PD} - T_{PGK1}) 的 30%–180%; 其中最强组合 PD-TA 的胞外 β -Ffase 酶产量是最弱组合 PD-TT 的 6 倍(图 6C)。

在同一系列启动子-终止子组合调控下, *egfp* 基因表达水平与 *PoFF32A* 基因表达水平相关性较好; yEGFP 基因表达水平的调控范围达到 10 倍, 而 β -Ffase 分泌表达水平的调控范围相对变窄, 仅达到 6 倍(图 6D)。结果表明, 这些组合对不同基因具有较一致的调控能力, 均能实现对目的基因的较强的表达调控, 不管其表达产物是在胞内还是在胞外, 可作为代谢工程改造的有力基因调控工具。

3 讨论

控制基因表达对于优化代谢途径和合成基因网络至关重要。近几年, 研究人员展示了合成生物学组件(主要是启动子和终止子)在酵母表达系统中的潜在适用性和应用前景^[19]。毕赤酵母可利用的启动子和终止子有限, 而代谢工程改造常涉及多个基因的表达调控, 这就无法避免相同启动子和终止子序列的多次使用, 导致细胞内重复序列发生同源重组, 造成遗传的不稳定, 影响内源和外源基因表达。构建强度和序列不同的启动子和终止子组合, 可作为毕赤酵母代谢途径改造和合成生物应用的有力工具。

本研究构建了毕赤酵母截短的 *PGK1* 启动子 P_{PE} 、 P_{PG} 和 P_{PD} , 这些组成型启动子强度是野生型启动子强度的 70%–190%, 其中强启动子 P_{PD} 强度是弱启动子 P_{PG} 的 2.7 倍。这些启动子的长度较 P_{PGK1} 缩短了至少 45%, 便于启动子的改造和外源基因表达框的构建。Arruda 等^[6]报道的截短 *PGK1* 启动子(P_{PD3}), 其强度与 P_{PGK1} 相比无差异。相同启动子表征的强度不同, 主

要原因可能是: 两个研究中启动子所调控表达的基因不同, 本研究用 yEGFP 荧光强度和 Gal 酶产量来表征启动子强度, 而 Arruda 等用胞外 α -淀粉酶产量表征; 报告基因表达框整合位点也不同, 本研究中表达框整合在基因组的 *His4* 基因位点, Arruda 等将表达框整合在 *PGK1* 基因位点。已有研究发现, 外源基因整合位点会影响毕赤酵母重组蛋白的产量^[20]。

我们选取了毕赤酵母的 9 个终止子, 分别与弱(P_{PG})、中(P_{PE})和强(P_{PD})启动子组合调控外源基因的表达, 这 27 个组合可以在较宽广的范围实现基因连续调控。分别与 9 个终止子组合时, P_{PG} 、 P_{PE} 和 P_{PD} 启动子调控 *egfp* 基因表达水平最高的和最低的比分别达到 4 倍、7 倍和 10 倍, 强启动子的调控强度变化范围远大于弱、中启动子的。同一终止子分别与 3 个启动子组合时, 大部分终止子与强启动子组合的调控强度高于与弱、中启动子组合的。这说明, 当强启动子与不同终止子组合调控时, 启动子通过影响基因的转录水平来调控基因表达, 且发挥着主导作用。同一启动子与不同终止子组合调控时, 重组菌的 *egfp* 基因转录水平与 yEGFP 荧光强度相关性较好, 这说明终止子通过影响基因的 mRNA 量来调控基因的表达, 而 mRNA 量的变化很可能与终止子调控 mRNA 半衰期有关^[13]。本研究也表征了一个酿酒酵母的常用终止子 T_{CYC1} , 在毕赤酵母表达系统中 T_{CYC1} 强度比大多数内源性终止子弱, 尽管其在酿酒酵母中具有较高的强度^[21]。这很可能是因为在酿酒酵母和毕赤酵母中, 基因表达的调节机制不同。

启动子工程应用于代谢工程改造和合成生物学的相关研究已有较多报道, 但对于终止子及其与启动子组合调控的研究较少。我们构建的这些启动子-终止子组合在调控不同基因

(*egfp* 和 *lacZ*)表达时都有效,从中选择了 6 个组合用于调控 β -Ffase 的分泌表达,以验证其调控基因表达能力。在这 6 个启动子-终止子组合调控下,胞内表达的 yEGFP 和 Gal 酶产量变化范围达到 10 倍(对照组合的 25%–250%),而分泌表达的 β -Ffase 酶产量变化范围变窄,仅为 6 倍(对照组合的 30%–180%)。这是因为,与胞内表达相比,胞外表达重组酶的酶产量不仅与其编码基因的 mRNA 量相关,分泌途径中的蛋白质折叠、修饰、降解和转运都影响着其最终酶产量的高低^[22]。同一系列启动子-终止子组合调控下,胞外的 β -Ffase 还要经历复杂的分泌途径。在这个过程中部分重组酶 β -Ffase 很可能来不及折叠而被降解,或转运、分泌速率较低而滞留胞内,最终导致胞外酶产量比实际的总酶产量低。上述结果证明,通过选择合适的启动子-终止子组合,可以达到目的蛋白的较高表达量。因此,我们通过构建和检测不同的启动子-终止子组合,可以实现目的基因的不同水平的表达,获得了毕赤酵母代谢途径优化和靶基因精确调控的有力工具。

参考文献

- [1] Mattanovich D, Graf A, Stadlmann J, Dragosits M, Redl A, Maurer M, Kleinheinz M, Sauer M, Altmann F, Gasser B. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8: 29.
- [2] Zhu TC, Sun HB, Wang MY, Li Y. *Pichia pastoris* as a versatile cell factory for the production of industrial enzymes and chemicals: current status and future perspectives. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(6): 1800694.
- [3] Viridi V, Palaci J, Laukens B, Ryckaert S, Cox E, Vanderbeke E, Depicker A, Callewaert N. Yeast-secreted, dried and food-admixed monomeric IgA prevents gastrointestinal infection in a piglet model. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(5): 527–530.
- [4] Patra P, Das M, Kundu P, Ghosh A. Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnology Advances*, 2021, 47: 107695.
- [5] Peña DA, Gasser B, Zanghellini J, Steiger MG, Mattanovich D. Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 2–15.
- [6] Arruda A, Reis VCB, Batista VDF, Daher BS, Piva LC, De Marco JL, De Moraes LMP, Torres FAG. A constitutive expression system for *Pichia pastoris* based on the PGK1 promoter. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(3): 509–517.
- [7] Nong LY, Zhang YM, Duan YH, Hu SL, Lin Y, Liang SL. Engineering the regulatory site of the catalase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(12): 2703–2709.
- [8] Vogl T, Kickenweiz T, Pitzer J, Sturmberger L, Weninger A, Biggs BW, Köhler EM, Baumschlager A, Fischer JE, Hyden P, Wagner M, Baumann M, Borth N, Geier M, Ajikumar PK, Glieder A. Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization. *Nature Communications*, 2018, 9: 3589.
- [9] Curran KA, Karim AS, Gupta A, Alper HS. Use of expression-enhancing terminators in *Saccharomyces cerevisiae* to increase mRNA half-life and improve gene expression control for metabolic engineering applications. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 88–97.
- [10] Ito Y, Terai G, Ishigami M, Hashiba N, Nakamura Y, Bamba T, Kumokita R, Hasunuma T, Asai K, Ishii J, Kondo A. Exchange of endogenous and heterogeneous yeast terminators in *Pichia pastoris* to tune mRNA stability and gene expression. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(22): 13000–13012.
- [11] Rajkumar AS, Varela JA, Juergens H, Daran JMG, Morrissey JP. Biological parts for *Kluyveromyces marxianus* synthetic biology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 97.
- [12] Ito Y, Kitagawa T, Yamanishi M, Katahira S, Izawa S, Irie K, Furutani-Seiki M, Matsuyama T. Enhancement of protein production via the strong DIT1 Terminator and two RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36997.
- [13] Yamanishi M, Ito Y, Kintaka R, Imamura C, Katahira S, Ikeuchi A, Moriya H, Matsuyama T. A genome-wide activity assessment of terminator regions in *Saccharomyces cerevisiae* provides a terminatome toolbox. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(6): 337–347.

- [14] Vogl T, Sturmberger L, Kickenweiz T, Wasmayer R, Schmid C, Hatzl AM, Gerstmann MA, Pitzer J, Wagner M, Thallinger GG, Geier M, Glieder A. A toolbox of diverse promoters related to methanol utilization: functionally verified parts for heterologous pathway expression in *Pichia pastoris*. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(2): 172–186.
- [15] Qin XL, Qian JC, Yao GF, Zhuang YP, Zhang SL, Chu J. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3600–3608.
- [16] Xu QS, Zheng XQ, Huang MP, Wu M, Yan YS, Pan JM, Yang Q, Duan CJ, Liu JL, Feng JX. Purification and biochemical characterization of a novel β -fructofuranosidase from *Penicillium oxalicum* with transfructosylating activity producing neokestose. *Process Biochemistry*, 2015, 50(8): 1237–1246.
- [17] Qin X, Qian J, Xiao C, Zhuang Y, Zhang S, Chu J. Reliable high-throughput approach for screening of engineered constitutive promoters in the yeast *Pichia pastoris*. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52(6): 634–641.
- [18] De Almeida JRM, De Moraes LMP, Torres FAG. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGK1*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 2005, 22(9): 725–737.
- [19] 赵禹, 赵雅坤, 刘士琦, 李建, 李圣龙, 肖冬光, 于爱群. 非常规酵母的分子遗传学及合成生物学研究进展. *微生物学报*, 2020, 60(8): 1574–1591. Zhao Y, Zhao YK, Liu SQ, Li J, Li SL, Xiao DG, Yu AQ. Advances in molecular genetics and synthetic biology tools in unconventional yeasts. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(8): 1574–1591. (in Chinese)
- [20] Schwarzhans JP, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T, Kalinowski J, Friehs K. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 84.
- [21] Curran KA, Morse NJ, Markham KA, Wagman AM, Gupta A, Alper HS. Short synthetic terminators for improved heterologous gene expression in yeast. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(7): 824–832.
- [22] Sun ZH, Brodsky JL. Protein quality control in the secretory pathway. *The Journal of Cell Biology*, 2019, 218(10): 3171–3187.

(本文责编 李磊)