

多形汉逊酵母启动子挖掘

纪璐璐^{1,2}, 马小军¹, 高教琪^{1*}, 周雍进¹

(¹中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; ²中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 多形汉逊酵母可以利用甲醇作为唯一碳源和能量来源, 作为构建微生物细胞工厂的潜在宿主, 在代谢工程改造和重组蛋白生产中引起了广泛关注。对于合成生物学和代谢工程改造, 通常需要改变相关基因的转录水平来进行代谢通量调节, 而这一过程需要借助不同种类、不同表达强度启动子。因此, 对汉逊酵母糖酵解途径和活性氧 (ROS) 防御途径相关基因启动子进行挖掘, 将其与 GFPuv 融合, 通过测定荧光值的大小, 比较分析汉逊酵母中这些启动子对不同碳源响应情况及其表达强度。结果鉴定了不同强度甲醇诱导型和组成型启动子, 包括强甲醇诱导型启动子 P_{SOD1}、强组成型启动子 P_{ADH2-1} 和 P_{GAP}、中等强度甲醇诱导型启动子 P_{PGM2}、P_{SOD3} 和 P_{SOD2}、中等强度组成型启动子 P_{PFK2}、P_{GPI} 和 P_{ADH2-2}、弱甲醇诱导型启动子 P_{GSH}、P_{MSR} 和弱组成型启动子 P_{PGM1}、P_{SOD4}、P_{GPX}。这一研究结果将促进多形汉逊酵母在代谢工程改造和相关基础研究中的应用, 为实现汉逊酵母细胞工厂提供理论依据。

关键词: 多形汉逊酵母; 糖酵解; 活性氧; 启动子; 代谢工程; 甲醇

中图分类号: Q819

Promoter evaluation from *Ogataea polymorpha*

Ji Lulu, GAO Jiaoqi, ZHOU Yongjin

(¹Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Ogataea polymorpha* represents a promising host for cell factory construction as its native assimilation of methanol as the sole carbon and energy source, and attracts numerous attentions in metabolic engineering and recombination protein production. As for synthetic biology and metabolic engineering, regulation of pathway flux was achieved at the transcriptional level via multiple promoters with different strengths. Hence, in this study, promoters in glycolysis and reactive oxygen (ROS) defense pathway from *O. polymorpha* was evaluated, and responses to various carbon sources and strengths of these promoters were all analyzed by detecting fluorescence intensity while fusing with GFPuv. Results demonstrated numerous induced and constitutive promoters with different strengths, including strong induced promoter pSOD1, strong constitutive promoter pADH2-1 and pGAP, medium induced promoter pPGM2, pSOD3 and pSOD2, medium constitutive promoter pPFK2, pGPI and pADH2-2, weak induced promoter pGSH, pMSR, and weak constitutive promoter pPGM1, pSOD4, pGPX. All these findings contributed to promoting applications of *O. polymorpha* in metabolic engineering and related fundamental research, and provided theoretical basis for cell factory construction in *O. polymorpha*.

Keywords: *Ogataea polymorpha*; Glycolysis; Reactive oxygen species; Promoters; Metabolic engineering; Methanol

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (21808216); 中国科学院大连化学物理研究所 BioChE-X 项目 (BioChE-X201801);

作者简介: 纪璐璐 (1995-), 女, 山西临汾人, 硕士研究生, 研究方向: 甲醇酵母改造; 高教琪 (联系人), 助理研究员, E-mail: jlgao@dicp.ac.cn

1. 引言

资源短缺和环境恶化迫切需要探索新型能源以满足日益增长的生物炼制需求。甲醇是结构最为简单的饱和一元醇，主要来自煤化工行业的副产物和天然气催化合成^[1, 2]，生产工艺成熟，是一种来源广泛，价格低廉的可替代原料^[3]。而且我国“缺油、少气、富煤”的能源结构特点促使近年来国内甲醇产能和产量大幅增长。与常用的发酵底物糖类相比，甲醇具有更强的还原力，能够为异源产物合成提供更多驱动力^[4]。因此，低价格高效率的甲醇有望成为一种潜在的理想细胞工厂利用底物^[5]。

自然界中，存在一类天然甲醇代谢微生物——甲基营养型微生物，其能够利用各种还原碳化合物（如甲醇等）作为碳源和能量来源^[6]，主要包括甲基营养型细菌和甲醇酵母。目前，已鉴定出四类甲醇酵母，包括巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*），白色念珠菌（*Candida albicans*），多形汉逊酵母（*Ogataea polymorpha*）和甲醇毕赤酵母（*Pichia methanolica*）^[7]。其中，多形汉逊酵母以其独特的甲醇吸收特性^[7]、较短的发酵周期、较高的发酵菌体密度以及耐高温的优良特性，成为外源基因表达及细胞工厂构建的优良宿主。

首先，汉逊酵母作为一种耐热微生物，其最适生长温度为 37~43 °C，最高生长温度可达 48 °C^[8, 9]，45~50 °C 的温度下将葡萄糖和木糖转化为乙醇^[10]。其次，作为异源蛋白生产的优良宿主，汉逊酵母能够避免分泌蛋白的高度糖基化，而且少量的内源蛋白分泌也有利于分泌产物的下游加工过程^[11-13]。最后，多形汉逊酵母还广泛用于过氧化物酶体改造的基础研究^[9]。过氧化物酶体是由一层单位膜包裹的囊泡，在甲醇代谢过程中发挥重要作用。在葡萄糖代谢与甲醇代谢的转换过程中，汉逊酵母细胞内过氧化物酶体的数量、大小、形态以及合成与降解均受到较为严谨的调控过程^[14-16]，使其成为极具吸引力的模型生物，用以研究过氧化物酶体生物发生和降解的分子机制。

因此，无论是作为高附加值产物和蛋白的异源生产宿主，还是用于研究甲醇与过氧化物酶体代谢的相关机制，均需要在汉逊酵母细胞内进行不同程度的分子改造。特别是在代谢工程改造中，代谢通路基因的简单共表达并不能实现目标产物的高产量，通常需要优化目标产物通路通量来消除动力学瓶颈^[17, 18]。同样，复杂的合成生物学也需要多个基因协调、平衡共表达^[19-21]。为了满足这些需求，需要多种不同强度、不同特性的启动子。汉逊酵母表达系统中应用最多的内源启动子是汉逊酵母甲醇氧化酶（Methanol oxidase）基因启动子 P_{MOX}（P_{AOX}）和组成型强启动子——甘油醛-3-磷酸脱氢酶（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）基因启动子 P_{GAP}^[22]，质膜 H⁺-ATP 酶（Plasma membrane H(+)-ATPase）基因启动子 P_{PMAl} 也在多形汉逊酵母中成功应用于异源蛋白的表达^[13, 23]。但是，总体来说，在汉逊酵母中，可用的内源启动子相对匮乏，无法满足高效遗传改造的需求。

因此，本文挖掘了汉逊酵母糖酵解途径及活性氧（ROS）防御途径相关基因启动子，通过报告基因 GFPuv 检测启动子的表达强度，分析其对不同碳源（葡萄糖和甲醇）响应情况，确定启动子的表达类型与强度，从而拓宽汉逊酵母代谢改造过程中启动子的选择范围，为汉逊酵母利用不同碳源（葡萄糖和甲醇）进行代谢工程改造以及基础应用研究提供参考。

2. 材料与amp;方法

2.1. 试剂与amp;仪器

高保真 PCR 酶 (Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase)、2 × Taq Master Mix (Dye Plus) 和 ClonExpress II One Step Cloning Kit 等购于南京诺唯赞生物科技有限公司 (VAZYME Biotech); T4 DNA 连接酶等购自日本 TAKARA 公司。质粒提取试剂盒、PCR 纯化试剂盒以及胶回收试剂盒购于 OMEGA 和生工生物工程 (上海) 股份有限公司。甲醇、葡萄糖、琼脂粉、无水磷酸二氢钾、各种氨基酸试剂以及各种维他命试剂等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 硫酸铵、硫酸镁以及 Trace metal 溶液中的各种试剂等购自天津市科密欧化学试剂有限公司; 蛋白胨、酵母粉等购自 OXOID 公司。

ZQZY-CF8 三层组合全温震荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; Heraeus Multifuge X1R 离心机, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; Sigma 1-15PK 高速冷冻离心机, 美国 SIGMA 公司; Eppendorf 5425 离心机, 德国艾本德 (Eppendorf) 股份公司; HPX-9052 MBE 电热恒温培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; DW-86L626 超低温保存箱, Haier 公司; 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; TECAN SPARK 酶标仪, 帝肯 (上海) 贸易有限公司; TAKARA PCR 仪, 宝生物工程 (大连) 有限公司。

2.2. 菌株及培养条件

大肠杆菌 DH5 α 菌株用于质粒构建与amp;培养。多形汉逊酵母野生型菌株 NCCY 495-3 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC 2.2412), 作为宿主表达 GFPuv。

DH5 α 菌株在 LB 培养基 (5 g/L 酵母粉, 10 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L NaCl) 中培养。汉逊酵母菌株在 SD 培养基 (20 g/L 葡萄糖, 6.7 g/L YNB) 或基础盐离子培养基 (20 g/L 葡萄糖或 10 g/L 甲醇, 14.4 g/L KH₂PO₄, 2.5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O) 中进行培养, 必要时补充响应的氨基酸成分。细胞均在 37°C, 220 rpm 条件下震荡培养。

2.3. 启动子-GFPuv 表达菌株的构建

表达载体构建流程如图 1 所示。筛选基因起始密码子上游 1000 bp 的序列作为启动子序列, 使用诺唯赞 Super-Fidelity 高保真酶, 进行 PCR 扩增, 所需引物如表 1 所示。以 P_{AOX} 启动子作为对照组。

Table 1 Primer list for expression vector construction

表 1 构建表达载体的引物列表

引物名称	序列 (5'-3')	用途
Primer name	Sequence (5'-3')	Function
AOX1K	GGA agatc GCTGCAGCTTGCATCTCG	AOX 启动子的
pAhpAOX1-R	TTTGTTTTTGTACTTTAGATTGATGTCACCACCG	扩增
AOX-GFPuv-F	CGGTGGTGACATCAATCTAAAGTACAAAACAAAatgagtaa aggagaagaacttttc	GFPuv 的扩增
GFPuv-R	CCG gaattc GCAAATTAAGCCTTCGAGCGTCC	

ADH1-1p-F	AAGTTTACTCATATATACTTgcctttcgtctgaagctgc	ADH2-1 启动子
GFP-ADH1-R	tccagtgaaaagtcttctcctttactcattttaaattgattgattgattgatagaaggatgcctaag	的扩增
ADH-2-1K	GGA <u>agatct</u> CGATTTCGAGCTCCGACAGATTTAC	ADH2-2 启动子
pAHpADH-2-R	GGTTGGTGCTGATTTTGCGAAC	的扩增
ADH-2-GFPuv-F	TCCAGCTGGTTCGCAAATCAGCACCAACCatgagtaaaggagaa gaactttcactg	GFPuv 的扩增
PFK-1-1K	GGA <u>agatct</u> GTTGTACGACCTGATCTCAGAAGCAC	PFK1 启动子的
pAHpPFK-1-R	ACAGTTATCTTTAGCGGTTTCGCC	扩增
PFK-1-GFPuv-F	CATTATATTATATAAGGGCGAAACCGCTAAAGATAACTG Tatgagtaaaggagaagaactttc	GFPuv 的扩增
GFPuv-R	CCG <u>gaattc</u> GCAAATTAAGCCTTCGAGCGTCC	
PFK2p-F	AAGTTTACTCATATATACTTaatgctaccgtctatacagaaatggt	PFK2 启动子的
GFP-PFK2-R	tccagtgaaaagtcttctcctttactcattggcatcaaatgggaatctcgtctc	扩增
PGI1p-F	AAGTTTACTCATATATACTTcactctctcggagagagaagtaattgag	PGI 启动子的扩
GFP-PGI-R	tccagtgaaaagtcttctcctttactcattttaaattgctaagtatattatctgatgtttaaattgag attcc	增
PGM1K	GGA <u>agatct</u> AGTTGTTCGGTTTCTGGTCTGTCTTC	PGM1 启动子的
pAHpPGM-R	TTTGACTGATAACTGAAAATAAATGAAGAAATGTTGTTC C	扩增
PGM-1-GFPuv-F	GGAACAACATTTCTTCATTTATTTTCAGTTATCAGTCAAA atgagtaaaggagaagaactttc	GFPuv 的扩增
GFPuv-R	CCG <u>ggtacc</u> GCAAATTAAGCCTTCGAGCGTCC	
PGM2p-F	AAGTTTACTCATATATACTTtccagaaactaaccactaaactgttactatc	PGM2 启动子的
GFP-PGM2-R	tccagtgaaaagtcttctcctttactcatgttttctgaatcagctaacgcaattatttc	扩增
GAP1p-F	AAGTTTACTCATATATACTTtgcgtaaggaaatgctgactctctc	GAP 启动子的
GFP-GAP-R	tccagtgaaaagtcttctcctttactcatttgtttctatattatcttctactaaagcaattgataat gttg	扩增
SOD1p-F	AAGTTTACTCATATATACTTtgtattcgttgccactgtgcaaag	SOD1 启动子的
GFP-SOD1-R	TCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATggtgctagttgatca attgtattgttagtag	扩增
SOD2p-F	AAGTTTACTCATATATACTTtctgttgatgatcacattcgtgg	SOD2 启动子的
GFP-SOD2-R	TCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATgaaaggatgctcgaga ataaaaaaatttagtgaac	扩增
SOD3p-F	AAGTTTACTCATATATACTTggtagtataaatctccagcccctgg	SOD3 启动子的
GFP-SOD3-R	TCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATcaagccctgattccat cttgeg	扩增
SOD-4-1K	AagtttactcatatatactTTGAATTGTGCCAGCAAAGCGTTG	SOD4 启动子的
pAHpSOD-4-R	TTTCGTTAGAAGTTTAAGAAATTGAGATTGTTTCGGAG	扩增
SOD-4-GFPuv-F	CTCCGAACAATCTCAATTTCTTAAACTTCTAACGAAAATG AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAG	GFPuv 的扩增
GPX1K	AAGTTTACTCATATATACTTCAAGAGGAAAACAAAACAA ACAGCGGAG	GPX 启动子的
pAHpGPX-R	TTGTAGATGACCCCCCAACGGTG	扩增

GPX-GFPuv-F	ATTGCACCGTTGGGGGGTCATCTACAAATGAGTAAAGGA GAAGAACTTTTCACTGGAG	GFPuv 的扩增
GLR1K	AagtttactcatatatacttCGAGGACACCGTGCAATATCTC	GLR 启动子的
pAHpGLR-R	TCTTTTTAGCATACTTTTTTATGAGTCGCAATTTTC	扩增
GLR-GFPuv-F	TATTTGAAATTGCGACTCATAAAAAAGTATGCTAAAAAG AATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAG	GFPuv 的扩增
GSH1p-F	AAGTTTACTCATATATACTTacaattacgtggaaccactcatcc	GSH 启动子的
GFP-GSH-R	TCCAGTGA AAAAGTTCTTCTCCTTACTCATgggtgtctaaattgatt gtaatttaataatttcgc	扩增
MSR1K	AagtttactcatatatactTTCCATCCACGTTCTTCACTGTTG	MSR 启动子的
pAHpMSR-R	AAAAAATAGAGGATAAATTTATTGTGGCTCGC	扩增
MSR-GFPuv-F	ATGCGAGCCACAATAAATTTATCCTCTATTTTTTatgagtaaa ggagaagaacttttctg	GFPuv 的扩增
CX-F	GATGGTAAGCCCTCCCGTATCG	验证引物
CX-R	GTATATTACATATATTTCAAGGACCGACACTCCTACC	
ppi-F	AagtttactcatatatactACTCACGTTAAGGGATTTTG	目标片段（启动
ppi-R	CagcactatctagaagctgTATCCAAAGATGTTGATCTAG	子-GFPuv）片
		段的扩增
pHpgRNA-F	CAGCTTTCTAGATAGTGC	载体骨架的扩增
pHpgRNA-R	AGTATATATGAGTAAACTTGGTC	

PCR 扩增得到的启动子及 GFPuv 片段进行融合 PCR 得到启动子-GFPuv 片段，通过 T4 DNA 连接酶（日本 TAKARA 公司）或诺唯赞一步克隆酶（ClonExpress II One Step Cloning Kit, VAZYME Biotech）进行连接，转化到大肠杆菌进行筛选与培养采用相应抗生素（博来霉素及氨苄青霉素）筛选，得到的克隆转化子进行验证，并提取质粒酶切验证，再送往上海生工进行基因测序；获得的正确质粒通过电转化^[24]的方法转化至汉逊酵母 NCYC 495-3，进行筛选。

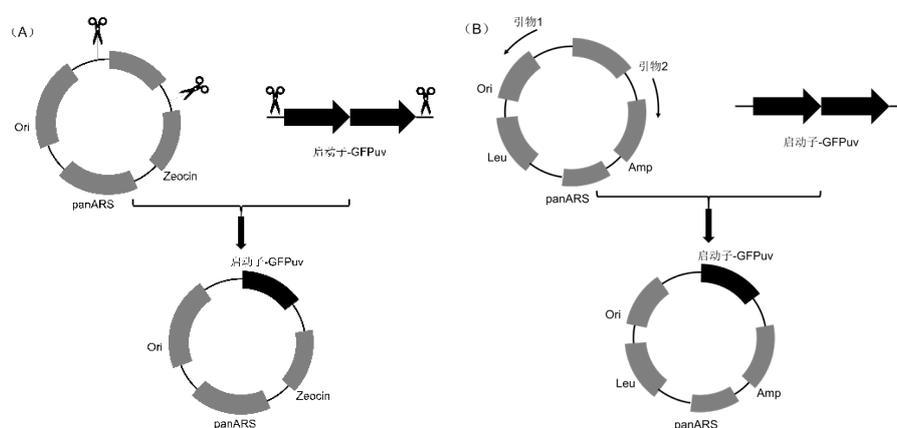


图 1 重组质粒构建策略图（Ori：大肠杆菌复制起始位点；panARS：酵母复制起始位点；Zeocin：博来霉素；Amp：氨苄青霉素；Leu：亮氨酸筛选标记）（A）酶切连接；（B）诺唯赞一步克隆酶组装

Fig. 1 Recombinant plasmid construction strategy map

2.4. 报告基因活性检测

汉逊酵母 GFPuv 表达菌株在 37 °C 条件下基础盐培养基（葡萄糖为碳源）预培养 48h，以不含碳源基础盐培养基洗涤细胞两次，初始 OD₆₀₀=0.1 转接至 20 ml 以葡萄糖为碳源的基础盐培养基，初始 OD₆₀₀=0.2 转接至 20 ml 以甲醇为碳源的基础盐培养基。根据文献报道，绿色荧光蛋白的荧光值一般在 16~18 h 达到最大^[25]，但考虑到汉逊酵母在甲醇培养基中生长较为缓慢，因此，在葡萄糖培养基中，在 24 h，48 h 及 72 h 取样检测生物量 OD₆₀₀ 及荧光值，在甲醇培养基中，在 72 h 取样检测生物量 OD₆₀₀ 及荧光值。取稀释至 0.2~0.8 的细胞培养液 2 mL 使用紫外分光光度计在 600 nm 处检测吸光度；细胞洗涤一次且稀释至 OD₆₀₀ 约为 1，取 200 μL 至 96 孔板使用酶标仪（TECAN SPARK）进行检测。

3. 结果与讨论

3.1. 糖酵解途径及 ROS 防御途径启动子挖掘

汉逊酵母菌株 DL-1 和菌株 NCYC 495 均进行了全基因组测序与分析^[15, 26]，我们根据基因组序列信息，通过 Blast 对比得到汉逊酵母中目标基因的序列信息。酵母启动子长度可能存在较大差异。酿酒酵母启动子长度的中位数为 455 bp，但也使用过其他长度如 800 bp、1000 bp 等，启动子长度因基因种类、功能不同而存在差异^[27]。毕赤酵母使用 1000 bp 长度或者从起始密码子与上游基因之间的序列作为启动子^[18, 28]。本文使用起始密码子上游 1000 bp 序列作为汉逊酵母启动子，并利用 SnapGene 软件设计相应目标启动子的上下游引物。

本文筛选汉逊酵母糖酵解途径及活性氧（ROS）防御途径启动子，以 GFPuv 为报告基因，构建不同启动子驱动的表达载体，以不同碳源（葡萄糖与甲醇）为底物，摇瓶培养，以荧光值大小评价启动子表达强度，具体实验流程如图 2 所示。

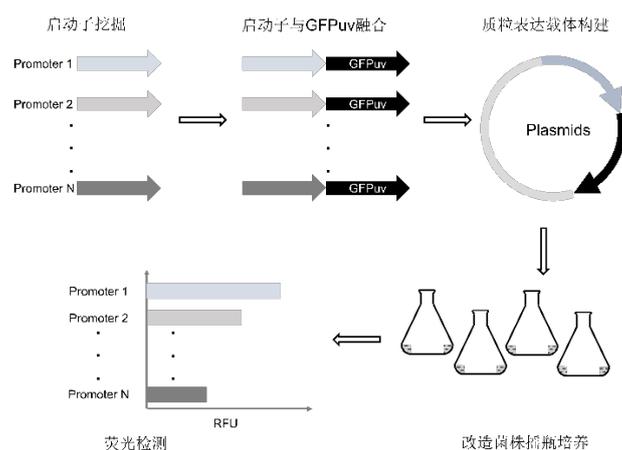


图 2 实验流程示意图（挖掘多形汉逊酵母启动子，将其与 GFPuv 融合，构建汉逊酵母启动子驱动 GFPuv 表达的载体，并转化至汉逊酵母，以不同碳源为底物检测荧光值）

Fig. 2 Overview of experimental flow (Screen the promoters in *O. polymorpha*, fused them to reporter protein, and reconstruct the expression vector, then transform it into *O. polymorpha* to detect the fluorescence under different carbon source)

3.2. GFPuv 激发光谱与发射光谱

GFPuv 是绿色荧光蛋白 GFP 的一种变体, 本实验中, 我们使用 GFPuv 作为报告基因用以启动子表达水平的检测。为此, 我们对报告基因 GFPuv 的激发光谱与发射光谱进行了全波长扫描, 以确定 GFPuv 的最大激发波长与发射波长。

GFPuv 激发与发射光谱如图 3 所示, 根据光谱图可以看出, 激发和发射光谱的最大峰分别在 396 nm 和 510 nm 处, 得到的激发波长和发射波长与之前的报道^[29]一致。因此, 此实验中我们使用 396 nm 作为激发波长, 510 nm 作为发射波长。

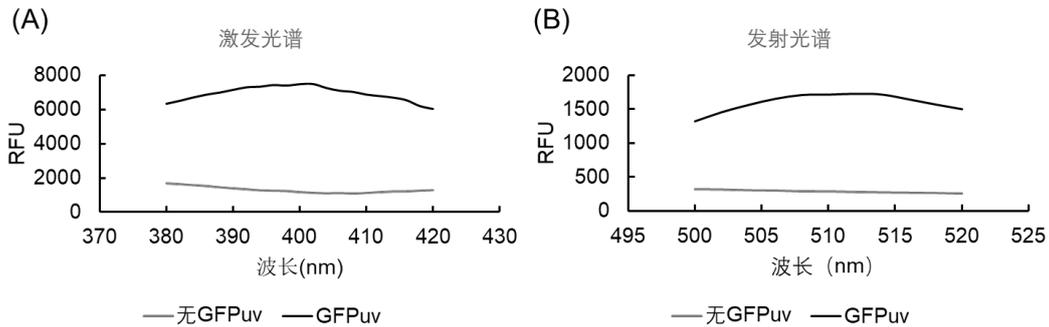


图 3 报告基因 GFPuv 激发光谱与发射光谱 (A: GFPuv 激发光谱; B: GFPuv 发射光谱)

Fig. 3 Excitation and emission spectra of reporter gene GFPuv

3.3. 糖酵解途径启动子筛选

多形汉逊酵母糖代谢途径如图 4 (A) 所示, 我们筛选出代谢过程中所涉及部分基因的启动子, 构建不同的质粒表达载体, 通过检测其荧光值, 我们可以得到不同启动子的表达强度, 为汉逊酵母代谢工程改造提供更多调控元件。

3.3.1. 葡萄糖条件启动子表达

通过报告基因 GFPuv 表达检测启动子的强度, 菌株以葡萄糖作为碳源, 在基础盐培养基中进行培养, 用酶标仪检测 24 h, 48 h 及 72 h 时的荧光强度。糖代谢途径涉及的启动子表达 GFPuv 的强度如图 4(B)(D)所示。

葡萄糖条件下, 启动子 P_{ADH2-1} 与 P_{GAP} 驱动的 GFPuv 荧光强度最高, 且表达强度分别是相同条件下 P_{AOX} 的 9 倍 (如图 4D) 和 7 倍 (如图 4B)。其中, 启动子 P_{ADH2-1} 在 48 h 时表达水平最高, 启动子 P_{GAP} 在 72 h 时表达水平略高于 48 h 时的表达水平。启动子 P_{AOX1} 与 P_{PFK2} 驱动的报告基因表达相当, 不足 P_{GAP} 表达强度的 20%。启动子 P_{GPI} 与 P_{PGM1} 表达强度则更弱, 并且启动子 P_{PGM1} 其表达强度随培养时间的增加而减弱。

3.3.2. 甲醇条件启动子表达

选定的糖酵解途径启动子克隆到绿色荧光蛋白 GFPuv, 并以甲醇为碳源培养菌株, 并检测培养 72 h 报告基因荧光强度, 结果如图 4(C)所示。

以甲醇为唯一碳源培养 72 h, 启动子 P_{ADH2-1} 与 P_{GAP} 驱动的 GFP_{uv} 表达与葡萄糖条件相比基本相当, 无明显差异且表达水平高, 与 P_{AOX} 在甲醇条件下的表达强度相当。启动子 P_{ADH2-1} 与 P_{GAP} 表现为强组成型表达。启动子 P_{AOX} 甲醇条件下驱动 GFP_{uv} 表达远高于葡萄糖条件 (约 10 倍), 表现出明显的强甲醇诱导型。启动子 P_{PGM2} 在甲醇条件表达水平约为葡萄糖条件的 4 倍, 同样表现为甲醇诱导型, 但其表达强度远低于 P_{AOX} 启动子。启动子 P_{PFK2} 及 P_{GPI} 在两种碳源 (葡萄糖和甲醇) 条件下, 表达水平无明显差异, 为组成型表达, 但表达强度分别为 P_{GAP} 启动子的 20 % 和 10 %。

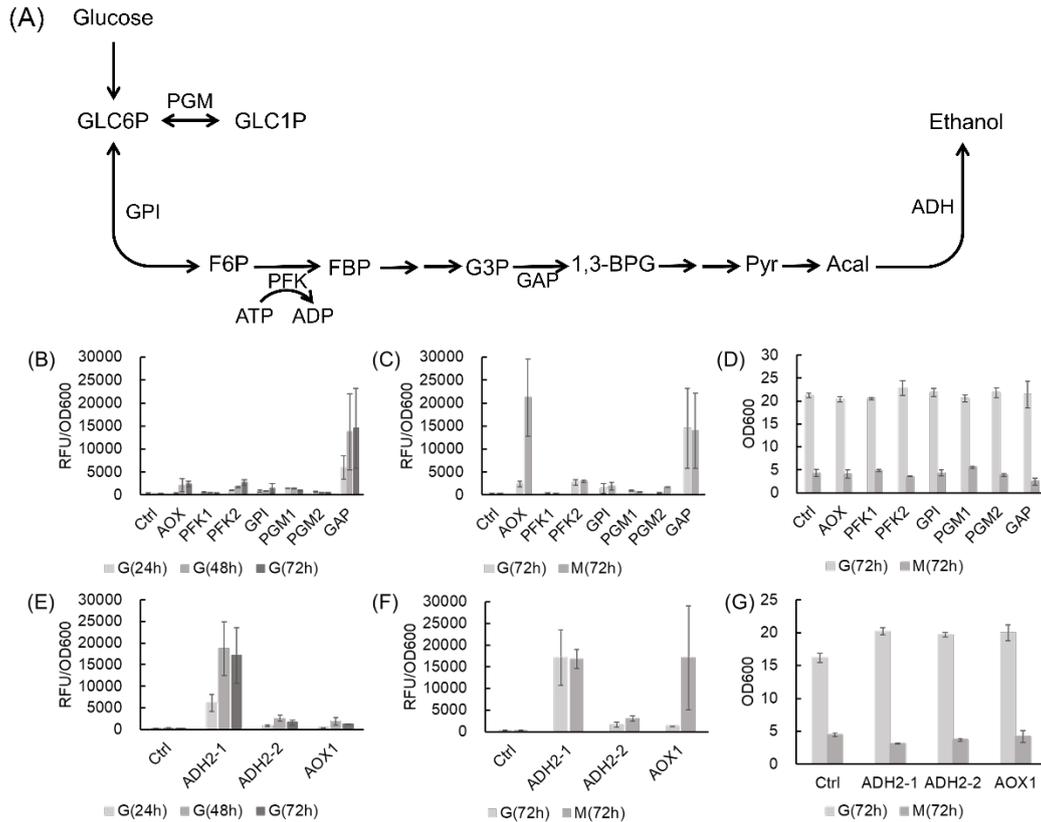


图 4 汉逊酵母糖代谢途径启动子及其表达水平

Fig. 4 Sugar metabolism pathway promoters and expression level

(A) 糖代谢途径示意图 (GLC6P: 6-磷酸葡萄糖; GLC1P: 1-磷酸葡萄糖; F6P: 6-磷酸果糖; FBP: 1,6-二磷酸果糖; G3P: 3-磷酸甘油醛; 1,3-BPG: 1,3-二磷酸甘油酸; Pyr: 丙酮酸; Acal: 乙醛; PGM: 磷酸甘油酸变位酶; GPI: 6-磷酸葡萄糖异构酶; PFK: 6-磷酸果糖激酶; GAP: 3-磷酸甘油醛脱氢酶; ADH: 乙醛脱氢酶); 通过启动子-GFPuv 报告基因评估不同碳源条件糖代谢途径启动子强度, GFPuv 荧光强度通过酶标仪 (TECAN SPARK) 进行定量检测并且通过各个时间点的 OD₆₀₀ 进行归一化 (B) (E) 葡萄糖条件下不同启动子 24 h, 48 h, 72 h 表达 GFPuv 的荧光值; (C) (F) 不同碳源条件下 72 h 时不同启动子表达 GFPuv 的荧光值; (D) (G) 终点 (72 h) 菌株生物量。

3. 4. ROS 防御途径启动子筛选

甲基营养酵母在甲醇氧化、氧化磷酸化及其它代谢过程中会产生过氧化氢 (H₂O₂) 和活性氧, 为防止其对细胞成分造成不可逆氧化损伤^[15], 细胞会启动活性氧防御机制, 以消除其影响。ROS 防御机制如图 5(A)所示。

3.4.1. 葡萄糖条件启动子表达

以 ROS 途径涉及启动子驱动报告基因 GFPuv 表达, 葡萄糖条件下荧光检测结果如图 5 (B) 所示。根据数据显示结果, 我们可以发现, 以葡萄糖为碳源对汉逊酵母进行摇瓶培养, 四种超氧化物歧化酶驱动的报告基因均有表达, 只是表达强度存在明显差异, 其中以 P_{SOD1} 表达强度最高, 相比同样条件下 P_{AOX} 驱动的报告基因表达高约 2 倍。而 P_{SOD2}, P_{SOD3}, P_{SOD4} 启

动的 GFPuv 表达则明显弱于 P_{AOX} 驱动的报告基因表达，约为 P_{AOX} 的 50%，且 P_{SOD3} 随培养时间的增加，其表达强度呈下降趋势。启动子 P_{GLR}，P_{MSR} 在葡萄糖条件下基本无荧光表达。

3.4.2. 甲醇条件启动子表达

以 ROS 防御途径涉及启动子驱动报告基因 GFPuv 表达，甲醇条件下荧光检测结果如图 5 (C) 所示。根据荧光值检测结果，除启动子 P_{GLR} 外，活性氧防御途径涉及的启动子在以甲醇为唯一碳源，启动子均可以启动报告基因的表达，显示出荧光值的差异。其中，以 P_{SOD1} 为启动子，荧光值的检测结果显示最大，约为对照组 P_{AOX} 的 1.5 倍，是葡萄糖条件表达强度的 5 倍多，表现出明显的甲醇诱导作用，属于强甲醇诱导型启动子，与之前的研究结果^[15]一致，但与巴斯德毕赤酵母^[18]中超氧化物歧化酶 (SOD) 启动子的表达强度则明显不同。启动子 P_{SOD3} 也表现为明显的甲醇诱导特性，但表达强度弱，约为 P_{AOX} 的 20%。P_{SOD2}，P_{MSR} 表达则更弱。启动子 P_{SOD4} 表达也较弱，但在两种碳源 (葡萄糖和甲醇) 表达相当，为组成型表达。

ROS 防御途径主要的生化功能是活性氧的解毒，可能是由于细胞在葡萄糖消耗过程中产生的活性氧及在甲醇氧化过程中产生的 H₂O₂ 对细胞产生压力与毒性，促进途径中基因表达。因此，细胞中的活性氧可以作为 P_{SOD1} 的激活剂，在各种胁迫条件下激活相应转录因子从而促进基因表达。

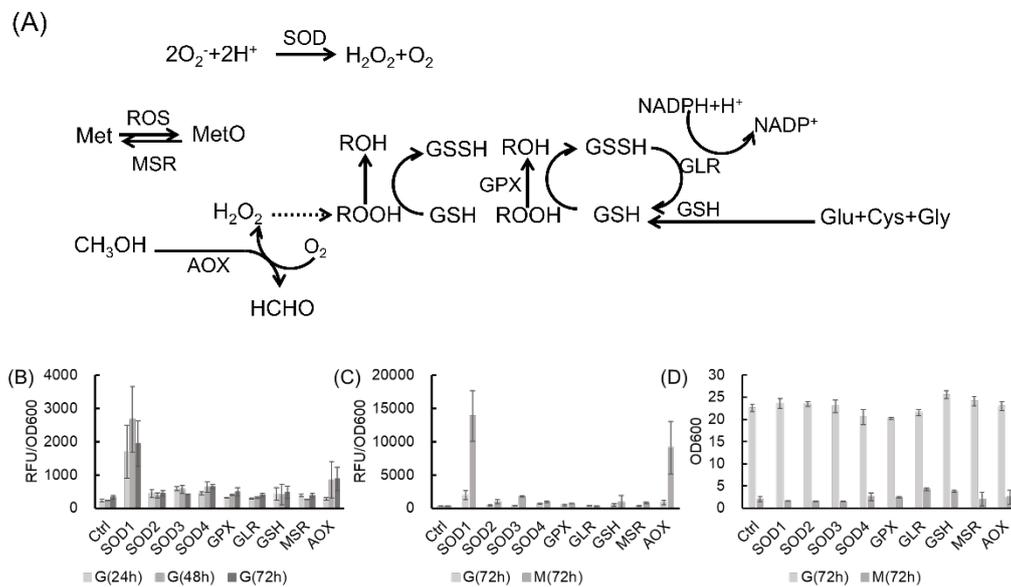


图 5 汉逊酵母活性氧防御机制启动子及其表达水平

Fig. 5 ROS defense pathway promoters and expression level

(A) 汉逊酵母活性氧防御机制 (SOD: 超氧化物歧化酶, 有四种, 分别为: 超氧化物歧化酶 (Mn), 超氧化物歧化酶 (Fe-Mn), 超氧化物歧化酶, 超氧化物歧化酶 (Cu-Zn); GPX: 谷胱甘肽过氧化物酶; GLR: 谷胱甘肽还原酶; GSH: 谷胱甘肽合成酶) (B) 葡萄糖条件下不同启动子 24 h, 48 h, 72 h 表达 GFPuv 的荧光值; (C) 不同碳源条件下 72 h 时不同启动子表达 GFPuv 的荧光值; (D) 终点 (72 h) 菌株生物量。

4. 结论与展望

本文通过挖掘糖酵解途径和 ROS 防御途径关键基因启动子，鉴定了系列可用于代谢工程改造的不同强度启动子：甲醇诱导型表达启动子（ P_{PGM2} , P_{SOD1} , P_{SOD2} , P_{SOD3} , P_{GSH} , P_{MSR} ），以 P_{SOD1} 表达强度最高， P_{SOD3} , P_{PGM2} 次之，其它启动子表达强度则很弱；组成型表达启动子（ P_{PFK2} , P_{GPI} , P_{PGM1} , P_{ADH2-1} , P_{ADH2-2} , P_{GAP} , P_{GPX} , P_{SOD4} ），其中以 P_{ADH2-1} , P_{GAP} 表达水平最高，其余启动子表达水平均较弱（表 2）。强启动子对于蛋白以及异源代谢途径的表达具有重要作用。同时，弱启动子可用于合成生物学应用中多基因共表达的平衡，代谢途径过程中转录水平的精细调节，以及代谢改造工程中旁路基因的弱化表达。

启动子长度对于途径的组装及表达尤为重要，其直接决定了基因表达盒的大小，从而影响了酵母转化效率与整合效率。本文选用 1000 bp 长度的启动子进行活性检测，初步筛选获得了若干可用于后续代谢工程改造的启动子种类。但为了减少 PCR 扩增的突变概率和尽可能缩短基因表达盒大小，后续实验研究需要借助启动子分析软件对其功能区进行分析与预测，指导启动子的截短实验，期望得到最短序列启动子而使得基因表达水平较高；同时，在对短序列启动子表达强度检测时，将报告基因的表达与酵母的生长相偶联，得到不同启动子在细胞生长的不同时期的表达情况。

综上所述，作为重要的甲醇酵母，多形汉逊酵母能够天然利用葡萄糖、木糖和甲醇等多种碳源，为其成为理想细胞工厂的底盘细胞奠定了良好基础。特别是，在以甲醇作为碳源进行高附加值化学品生产的过程中，甲醇诱导型的启动子对基因在甲醇条件下的表达具有重要的指导作用。因此，本文的研究结果将为促进汉逊酵母葡萄糖代谢与甲醇代谢转换奠定了理论基础，拓展了汉逊酵母代谢工程应用的底物谱，也为实现甲醇生物转化以及甲醇代谢基础研究提供参考和应用工具。

Table 2 Grouping of *O. polyporpha* Glycolysis and ROS defense promoters

表 2 汉逊酵母糖酵解和活性氧防御途径启动子分类

	组成型表达	甲醇诱导型表达
强启动子	P_{ADH2-1} 、 P_{GAP}	P_{SOD1} 、 P_{AOX}
中等强度启动子	P_{PFK2} 、 P_{GPI} 、 P_{ADH2-2}	P_{PGM2} 、 P_{SOD3} 、 P_{SOD2}
弱启动子	P_{PGM1} 、 P_{SOD4} 、 P_{GPX}	P_{GSH} 、 P_{MSR}
无活性启动子	P_{PFK1} 、 P_{GLR}	

注：启动子强度定义：表达强度介于空白对照组 2~5 倍为弱启动子；介于 5~15 倍为中等强度启动子；>15 倍则为强启动子；且甲醇条件表达强度大于葡萄糖条件表达强度的 2 倍定义为诱导型表达。

参考文献

- [1] 刘爽；高教琪；薛闯, *et al.* 多形汉逊酵母提高生长性能的培养基优化. 生物加工过程 2020, 18(1), 117-126.
- [2] Zhou, Y. J.; Kerkhoven, E. J.; Nielsen, J. Barriers and opportunities in bio-based production of hydrocarbons.

Nature Energy 2018, 3 (11), 925-935.

- [3] Price, J. V.; Chen, L.; Whitaker, W. B., *et al.* Scaffoldless engineered enzyme assembly for enhanced methanol utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, 113 (45), 12691-12696.
- [4] Whitaker, W. B.; Sandoval, N. R.; Bennett, R. K., *et al.* Synthetic methylotrophy: engineering the production of biofuels and chemicals based on the biology of aerobic methanol utilization. *Current Opinion in Biotechnology* 2015, 33, 165-75.
- [5] 高教琪, 段兴鹏, 周雍进. 酵母细胞工厂生产脂肪酸及其衍生物. *生物加工过程* 2018, 16(1), 19-30.
- [6] Pfeifenschneider, J.; Brautaset, T.; Wendisch, V. F. Methanol as carbon substrate in the bio-economy: Metabolic engineering of aerobic methylotrophic bacteria for production of value-added chemicals. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2017, 11 (4), 719-731.
- [7] Duan, X.; Gao, J.; Zhou, Y. J. Advances in engineering methylotrophic yeast for biosynthesis of valuable chemicals from methanol. *Chinese Chemical Letters* 2018, 29 (5), 681-686.
- [8] Ishchuk, O. P.; Voronovsky, A. Y.; Abbas, C. A., *et al.* Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance. *Biotechnol Bioeng* 2009, 104 (5), 911-919.
- [9] Zutphen, T. v.; Baerends, R. J.; Susanna, K. A., *et al.* Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC Genomics* 2010, 11, 1-12.
- [10] Suwannarangsee, S.; Kim, S.; Kim, O. C., *et al.* Characterization of alcohol dehydrogenase 3 of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012, 96 (3), 697-709.
- [11] Voronovsky, A. Y.; Rohulya, O. V.; Abbas, C. A., *et al.* Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan. *Metab Eng* 2009, 11 (4-5), 234-242.
- [12] Gellissen, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000, 54, 741-750.
- [13] 赵禹; 赵雅坤; 刘士琦, *et al.* 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.
- [14] Saraya, R.; Krikken, A. M.; Kiel, J. A., *et al.* Novel genetic tools for *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res* 2012, 12 (3), 271-278.
- [15] Ravin, N. V.; Eldarov, M. A.; Kadnikov, V. V., *et al.* Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics* 2013, 14, 837.
- [16] Sakai, Y.; Oku, M.; van der Klei, I. J., *et al.* Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1763 (12), 1767-1775.
- [17] Stephanopoulos, G. Synthetic biology and metabolic engineering. *ACS Synth Biol* 2012, 1 (11), 514-525.
- [18] Vogl, T.; Sturmberger, L.; Kickenweiz, T., *et al.* A Toolbox of Diverse Promoters Related to Methanol Utilization: Functionally Verified Parts for Heterologous Pathway Expression in *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol* 2016, 5 (2), 172-186.
- [19] Brophy, J. A.; Voigt, C. A. Principles of genetic circuit design. *Nat Methods* 2014, 11 (5), 508-520.
- [20] Nielsen, A. A.; Segall-Shapiro, T. H.; Voigt, C. A. Advances in genetic circuit design: novel biochemistries, deep part mining, and precision gene expression. *Curr Opin Chem Biol* 2013, 17 (6), 878-892.
- [21] Guo, X.; Shen, H.; Liu, Y., *et al.* Enabling Heterologous Synthesis of Lupulones in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol* 2019, 188 (3), 787-797.
- [22] Wagner, J. M.; Alper, H. S. Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genet Biol* 2016, 89, 126-136.
- [23] Cox, H.; Mead, D.; Sudbery, P., *et al.* Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the PMA1 promoter. *Yeast* 2000, 16, 1191-1203.
- [24] Klaas Nico Faber, P. H., Wim Harder, Marten Veenhuis, Geert A. B. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *current genetics* 1994, 25, 305-310.

-
- [25] Li, J.; Wang, S.; VanDusen, W. J., *et al.* Green Fluorescent Protein in *Saccharomyces cerevisiae*: Real-Time Studies of the GAL1 Promoter. 2000, 70 (2), 187-196.
- [26] Riley, R.; Haridas, S.; Wolfe, K. H., *et al.* Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, 113 (35), 9882-9887.
- [27] Kristiansson, E.; Thorsen, M.; Tamas, M. J., *et al.* Evolutionary forces act on promoter length: identification of enriched cis-regulatory elements. *Mol Biol Evol* 2009, 26 (6), 1299-1307.
- [28] Xu, N.; Zhu, J.; Zhu, Q., *et al.* Identification and characterization of novel promoters for recombinant protein production in yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* 2018, 35 (5), 379-385.
- [29] Nakatani, T.; Yasui, N.; Tamura, I., *et al.* Specific modification at the C-terminal lysine residue of the green fluorescent protein variant, GFPuv, expressed in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 2019, 9 (1), 4722.