

毕赤酵母强启动子 P_{CAT1} 的改造 及转录因子结合位点分析

农璐源, 梁书利

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 本研究通过随机突变对毕赤酵母甲醇诱导型强启动子 P_{CAT1} 进行改造, 以绿色荧光蛋白为表征, 经过高通量筛选, 获得一个活性范围为 25.57%~138.12% 的 P_{CAT1} 启动子库; 通过测序发现活性提高了 38.12% 的 P_{CAT1} 变体 6-39 在 5'-3' 方向上的 -118bp 处的碱基由 A 突变为 G。用转录因子结合位点在线预测软件 MatInspector 分析该 P_{CAT1} 变体的转录因子结合位点变化, 发现该 P_{CAT1} 变体与野生型的 P_{CAT1} 相比, F\$YMCM 结合位点减少, 并且 F\$CSRE 和 F\$YGAL 结合位点增多。接着, 用 MatInspector 分析 16 种毕赤酵母甲醇利用途径基因启动子的转录因子结合位点, 发现转录因子 F\$CSRE 结合位点在甲醇诱导型启动子中分布广泛, F\$YGAL 结合位点仅在组成型的启动子中分布广泛, 推测 F\$CSRE 结合位点的增多最有可能提高 P_{CAT1} 的甲醇诱导活性, 为毕赤酵母甲醇利用途径基因启动子关键位点解析提供参考。

关键词: 毕赤酵母; 启动子; 随机突变; 转录因子结合位点

文章编号: 1673-9078(2021)04-72-78

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0324

Modification of Strong Promoter P_{CAT1} of *Pichia pastoris* and Analysis of Transcription Factor Binding Sites

NONG Lu-yuan, LIANG Shu-li

(Guangdong Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this study, the methanol-inducible strong promoter P_{CAT1} of *Pichia pastoris* was modified by random mutation, characterized by green fluorescent protein. After high-throughput screening, a P_{CAT1} promoter library with an activity range of 25.57%- 138.12% was obtained. It was found that the P_{CAT1} variant 6-39 whose activity increased by 38.12% was mutated from A to G at the -118 bp in the 5'-3'direction. The online prediction software for transcription factor binding sites, MatInspector, was used to analyze the change of transcription factor binding sites of the P_{CAT1} variants. Compared to wild-type P_{CAT1} , the binding site of F\$YMCM of the P_{CAT1} variant was reduced, and the binding sites of F\$CSRE and F\$YGAL increased. Then, the transcription factor binding sites of 16 promoters of the genes involved in methanol utilization pathway of *Pichia pastoris* were analyzed by MatInspector. It was found that the binding sites of the transcription factor, F\$CSRE, were widely distributed in the methanol-inducible promoters, whilst the binding sites of F\$YGAL were extensively distributed only in the constitutive promoter. Thus, the increase of the binding sites of F\$CSRE is most likely to increase the methanol-inducing activity of P_{CAT1} , which provides a reference for the analysis of the key sites of the promoters of the genes for the methanol utilization pathway of *Pichia pastoris*.

Key words: *Pichia pastoris*; promoter; random mutation; transcription factor binding sites

引文格式:

农璐源,梁书利.毕赤酵母强启动子 P_{CAT1} 的改造及转录因子结合位点分析[J].现代食品科技,2021,37(4):72-78

NONG Lu-yuan, LIANG Shu-li. Modification of strong promoter P_{CAT1} of *Pichia pastoris* and analysis of transcription factor binding sites [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 72-78

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 是应用最为广

收稿日期: 2020-04-09

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2019B020210003)

作者简介: 农璐源 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 酶学与酶工程

通讯作者: 梁书利 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酶工程

泛的真核蛋白表达系统之一, 其具有表达量高、适度糖基化、适合高密度发酵、遗传背景清晰等优势。使用强启动子元件提高异源基因的转录水平是提高异源蛋白表达的常用方法。真核生物 II 类启动子的组成部分包括很多短核苷酸序列, 即转录因子结合位点, 主

要可以分为核心元件和上游调控区^[1], 核心元件包括决定转录起始位置的 TATA 盒和转录起始子 (DNA 在此解开并开始转录)^[2], 上游调控区包括 CAAT 盒、GC 盒、减弱子、静息子等等^[3]。

巴斯德毕赤酵母常用的 II 类启动子一般分为诱导型启动子和组成型启动子两类^[4]。毕赤酵母能够有效地以甲醇为唯一碳源, 这是由于毕赤酵母具有甲醇利用途径 (MUT 途径), 其中 MUT 途径的醇氧化酶 1 的启动子 P_{AOX1} 是目前已知的最强的毕赤酵母启动子; 以 P_{AOX1} 为启动子表达异源蛋白, 能够使得异源蛋白在毕赤酵母高效表达。最近, Thomas Vog^[5]等人发现, MUT 途径过氧化物酶基因的启动子 P_{CATI} 在甲醇诱导条件下, 活性与 P_{AOX1} 相当。此外, 由于 P_{CATI} 在低浓度的葡萄糖中也能被有效地激活, 通过 P_{CATI} 过表达促进甲醇诱导的转录因子 (如 $Mxr1p$ 、 $Mit1p$ 等), 可以构建无需甲醇的基于 P_{AOX1} 的毕赤酵母表达系统^[6], 这能够促使工业上使用最强的毕赤酵母启动子 P_{AOX1} 提高目的蛋白产量的同时, 减少易燃易爆的甲醇的使用, 并且该表达系统可以用于食品和医药蛋白的生产。因此, 无论在工业上直接运用 P_{CATI} 表达异源蛋白, 还是构建非甲醇利用型毕赤酵母高表达重组蛋白菌株, 开发活性更强的 P_{CATI} 都具有重要的意义。

目前, 随机突变、启动子核心区域改造、启动子转录因子结合位点改造等方法已成功应用于启动子改造。通过随机突变将基因突变引入整个启动子区域的任何位置, 快速构建大规模启动子突变体文库, 结合启动子突变体活性的筛选, 能够对启动子进行定向进化。EP-PCR (Error-prone PCR, 易错 PCR) 是一种简单的体外随机诱变技术, 被认为是获得 DNA 序列多样性的有效方法^[7]。已经有许多研究者对毕赤酵母启动子进行随机突变改造, 并得到了较好的结果, 如 Zhang^[8]等人通过 EP-PCR 改造了毕赤酵母 P_{GCW14} , 并得到了与野生型相比活性提高了 20% 的启动子变体; Qin^[9]等人通过随机突变改造了 P_{GAP} , 到一个转录活力是野生型的约 48 倍的突变启动子。转录因子结合位点

(TFBSs) 是启动子的顺式作用元件, 影响启动子的活性和激活条件^[10]。目前已有许多基于启动子序列的 TFBSs 预测软件, 包括 TESS、TRANSFAC、MatInspector 等。这些软件通过一定的算法, 将输入的启动子序列与数据库中 TFBSs 的位置权重矩阵 (NWM 或 PWM) 进行比较, 推测出启动子序列可能会结合的 TFBSs, 有助于研究启动子元件对于启动子活性的作用^[11]。

在本研究中, 通过 EP-PCR 在 P_{CATI} 序列中随机地引入突变, 用 EGFP 表征 P_{CATI} 变体活性, 并进行高通量筛选, 构建 P_{CATI} 启动子文库; 得到的 P_{CATI} 启动子变体序列通过 TFBSs 预测软件 MatInspector 进行启动子元件分析, 进一步用 MatInspector 分析 P_{AOX1} 、 P_{CATI} 等 16 种 MUT 途径基因启动子的 TFBSs, 探讨转录因子结合位点在 P_{CATI} 启动子变体活性提升中的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 MUT 途径启动子的基因序列

本研究种涉及 16 种 MUT 途径的启动子, 包括 P_{CATI} , P_{AOX1} , P_{AOX2} , P_{FLD1} , P_{FGH1} , P_{FDH1} , P_{ADH2} , P_{DAS1} , P_{DAS2} , P_{DAK1} , P_{TPI1} , P_{FBA1} , P_{FBA2} , P_{FBP1} , P_{TAL1} , P_{PMP20} 。基因序列从 NCBI 数据库中下载得到, 基因 ID 在表 1 种列出, 并且启动子均为酶基因序列的上游 1000 bp, $CAT1$ 、 $AOX1$ 、 $AOX2$ 、 $ADH2$ 、 $DAK1$ 、 $DAS1$ 、 $DAS2$ 、 $FBA1$ 、 $FBA2$ 、 $FBP1$ 、 $FDH1$ 、 $FGH1$ 、 $FLD1$ 、 $PMP20$ 、 $TAL1$ 、 $TPI1$ 的基因编号分别为 PAS_chr2-2_0131、PAS_chr4_0821、PAS_chr4_0152、PAS_chr2-1_0472、PAS_chr3_0841、PAS_chr3_0832、PAS_chr3_0834、PAS_chr1-1_0072、PAS_chr1-1_0319、PAS_chr3_0868、PAS_chr3_0932、PAS_chr3_0867、PAS_chr3_1028、PAS_chr1-4_0547、PAS_chr3_0951、PAS_chr1-1_0072。

1.1.2 菌株、质粒和引物

表1 本研究所使用的菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	来源	用途
大肠杆菌TOP10	本实验室保存	克隆受体菌
毕赤酵母GS115	本实验室保存	毕赤酵母宿主菌
GS115- $P_{CATI-1000}$ -EGFP	本实验室保存	对照菌株
pPICZα- $P_{CATI-1000}$ -HIS4-EGFP	本实验室保存	表达载体
pPIC-EGFP-GADPH	本实验室保存	荧光定量PCR标准质粒

本研究使用的菌株和质粒如表1所示。

本研究所使用的引物包括: P_{CTA1_S} (TGGTC

ATGAGATCAGATCTCTATGTTGACGGAGAGTGTT

GG), P_{CAT1_D} (TTTAATTGTAAGTCTTGACTAG

AGCAAG), Ori-ga2 (AGATCTGATCTCATGACCAAAATC), α -factor gal (CTCTAGTCAAGACTTACAATTAATGAGATTCCTTCAATTT)。

1.1.3 主要试剂

无水葡萄糖、甘油、甲醇、EDTANa₂、MnSO₄、醋酸锂, 天津大茂化学试剂有限公司; 胰蛋白胨、酵母提取物, Oxoid 公司; YNB 无氨基酵母氮源, BD-Difco 公司; 三羟甲基氨基甲烷、十二烷基磺酸钠, 广州威佳生物技术公司; 酵母基因组 DNA 提取试剂盒 (Yeast DNAiso Kit)、DNA Marker、荧光定量 PCR 试剂盒 (SYBR® Premix Ex Taq™ II)、PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒, TaKaRa 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取试剂盒, 美吉生物公司; KOD FX 高保真聚合酶, 日本东洋纺公司; 预混 PCR 试剂 2×Utaq PCR Mix, 北京庄盟国际生物公司; 限制性内切酶 Fast Digest Restriction Enzymes, Thermo Scientific 公司; 无缝连接酶 (Seamless Assembly Cloning Kit), Clone Smarter 公司; 博莱霉素, Invitrogen 公司; 水饱和酚, 北京普博欣生物有限公司; 乙酸钠, Bio Basic Inc.公司; 焦碳酸二乙酯, Sigma 公司。

1.1.4 培养基的配制

本研究主要使用的培养基 (包括LB、LBLZ、YPD、MD、BMGY、BMMY等) 的配制方法参考美国 Invitrogen公司的毕赤酵母表达手册。

1.2 方法

1.2.1 用 MatInspector 预测启动子的 TFBSs

在 Genomatix 网站 (www.genomatix.de) 的 MatInspector 模块中, 将启动子序列导入, 权重矩阵库 (Matrix library) 选择 11.1 版本, 基因来源选择酿酒酵母 (没有毕赤酵母选择项), 矩阵组 (Matrix group) 选择真菌来源和通用启动子核心元件, 并且将核心相似度设置为 0.75 (最大为 1.0)。导出分析出的启动子 TFBSs。

1.2.2 随机突变 PCAT1 启动子

以 pPICZ α -P_{CAT1-1000}-HIS4-EGFP 为模板, P_{CTA1_S} 和 P_{CAT1_D} 为引物, 加入一定的 8 mM MnSO₄ 溶液, 用 MIX 酶进行 Ep-PCR。为了提高突变率, 以 Ep-PCR 的产物为模板, P_{CTA1_S} 和 P_{CAT1_D} 为引物, 在相同体系中进行二次 Ep-PCR。

50 μ L 的 Ep-PCR 的体系包含了 25 μ L MIX 酶、2 μ L 的引物 P_{CTA1_S} 和 2 μ L 的引物 P_{CAT1_D}、50 ng 的质粒模板 pPICZ α -P_{CAT1-1000}-HIS4-EGFP、4 μ L 8 mM MnSO₄ 溶液并用 ddH₂O 将扩增体系的体积补充至 50

μ L。

Ep-PCR 的程序为: 94 °C 预变性 5 min, 扩增循环 30 次, 72 °C 延伸 10 min 后, 在 4 °C 冰箱中保存; 扩增循环程序为: 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 kb/min。

1.2.3 重组菌株的构建

以 pPICZ α -P_{CAT1-1000}-HIS4-EGFP 为模板, Ori-ga2、 α -factor gal 为引物, 用高保真的 KOD FX 酶扩增表达载体, 50 μ L 的扩增体系为: 25 μ L buffer、1 μ L 的 KOD FX 酶、10 μ L 的 dNTPs、1.5 μ L 的引物 Ori-ga2 和 1.5 μ L 的引物 α -factor gal、50 ng 的质粒模板 pPICZ α -P_{CAT1-1000}-HIS4-EGFP、用 ddH₂O 将扩增体系的体积补充至 50 μ L。扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min, 扩增循环 30 次, 68 °C 延伸 10 min 后, 在 4 °C 冰箱中保存; 扩增循环程序为: 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 1 kb/min。

得到的载体 DNA 通过使用 GeL extraction Kit 试剂盒 (Magen 公司) 纯化后, 用无缝连接酶 (Clone Smarter 公司) 将载体与随机突变的 P_{CAT1-1000} 相连。

构建的重组质粒转化大肠杆菌 *E.coli* 感受态细胞, 用质粒提取试剂盒 (Magen 公司) 纯化重组质粒。

用限制性内切酶 Eam1105I 将重组质粒在 HIS4 位点处线性化, 电击转化毕赤酵母 GS115, 涂布 MD 平板, 将平板在 30 °C 的培养箱中培养 60 h 左右。

1.2.4 重组菌株的高通量筛选

首先用灭菌的牙签挑取单菌落接到装有 150 μ L BMGY 的 96 孔板中, 在 30 °C、1000 r/min 的摇床上培养 24 h 后, 用排枪吸取 3 μ L 的菌液, 转移至装有 150 μ L BMMY 的 96 孔板中, 在 30 °C、1000 r/min 的摇床上培养 48 h 后, 在激发波长为 588 nm, 发射波长为 520 nm 下, 测量孔板中 EGFP 的荧光量。

1.2.5 毕赤酵母重组菌株的摇瓶发酵

经过高通量筛选后, 挑取荧光量有变化的酵母单菌落接种于 10 mL BMGY 液体培养基中, 在 30 °C, 250 r/min 的摇床中培养 16~18 h; 控制起始 OD₆₀₀ 为 1, 将菌体转接至 25 mL BMMY 培养基, 在 30 °C, 250 r/min 摇床中培养; 每隔 24 h 取样, 测量发酵液的 OD₆₀₀ 和上清液荧光量, 并补加 250 μ L 甲醇, 摇瓶发酵进行 120 h;

1.2.6 重组菌株基因拷贝数的测定

用相对定量的方法测定酵母转化子的 EGFP 拷贝数。首先按照 Yeast DNAiso Kit 说明书提取重组菌株的基因组 DNA, 以管家基因 GAPDH 为内参, 将标准质粒 (pPICZ α -EGFP-GAPDH) 稀释为浓度 10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³, 重组菌株的基因组 DNA 稀释为 1 ng/mL; 以稀释的标准质粒和稀释的基因组 DNA 为样品, 按照

SYBR® Premix Ex Taq™ II 荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司) 的说明配置荧光定量 PCR 体系; 用 7500 Real Time PCR System (Life Technologies 公司) 进行实时荧光定量 PCR, 测量 Ct 值 (Cycle threshold, 循环阈值), 每一个样品平行测量三次, 计算平均值, 通过测量的平均 Ct 值计算基因的拷贝数。通过下式计算基因拷贝数。

$$\Delta Ct = Ct_{(EGFP)} - Ct_{(GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(样品)} - \Delta Ct_{(标准质粒)}$$

$$\text{拷贝数 (或相对转录水平)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

1.2.7 基因转录水平的检测

首先, 提取菌株的总 RNA, 通过反转录得到 cDNA, 通过实时荧光定量 PCR 检测转录水平的变化。提取总 RNA 的方法如下: 取 10 OD₆₀₀ 发酵至 120 h 的发酵液, 在室温, 12000 r/min 下离心 2 min; 倒弃上清, 用 PBS 7.4 缓冲溶液重悬菌体, 在室温, 12000 r/min 下离心 2 min; 将菌体在液氮中放置 30 min 后, 转移至 -80 °C 冰箱中冷冻放置 30 min; 在离心管中加入 600 μL 酚: 氯仿 (1:1), 400 μL AE 缓冲液和 50 μL 10% SDS, 并将菌体加入混合液, 剧烈振荡, 重悬菌体; 将混合液在 65 °C 恒温器中振荡 15 min, 在冰上静置 5 min; 在 4 °C, 12000 r/min 的离心机中离心 10 min, 将所有的上清转入装有 300 μL 氯仿的离心管中, 剧烈振荡混匀; 在 4 °C, 12000 r/min 的离心机中离心 10 min, 取 400 μL 上清液至装有 40 μL 3 M NaAc (pH 5.2) 和 1 mL 无水乙醇的离心管中, 混匀后置于 -20 °C 冰箱中, 沉淀 30 min; 在 4 °C, 12000 r/min 的离心机中离心 10 min, 倒弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇, 重悬沉淀; 在 4 °C, 12000 r/min 的离心机中离心 10 min, 倒弃上清, 在室温下晾干 3 min, 加入 100 μL DEPC 水 (用 DEPC 处理过的水) 溶解沉淀; 测定 RNA 的浓度, 取 1 μg 的 RNA 样品进行电泳。

使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒将 RNA 进行反转录, 荧光定量 PCR 的检测方法参考 1.2.6。令对照 GS115-P_{CAT1-1000}-EGFP 的转录水平为 1, 通过 1.2.6 中的公式计算 ΔCt, 并根据下式计算样品的转录水平。

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(样品)} - \Delta Ct_{(对照)}$$

2 结果与讨论

2.1 酵母转化子的高通量筛选

通过两次连续的 EP-PCR, 向启动子 P_{CAT1-1000} 序列引入随机突变, 从转化平板上挑取了 1500 个酵母转化子, 选择单位 OD₆₀₀ 的荧光量有变化的转化子进行

复筛和拷贝数的测定, 然后从中选取了 19 个转化子进行进一步分析, 这 19 株菌株的单位 OD₆₀₀ 的荧光量在 25.57%~138.12% 之间 (图 1)。

从图 1 中可以看出, 尽管大部分的经过随机突变的 P_{CAT1} 变体活性下降, 但筛选得到一株毕赤酵母转化子的 EGFP 荧光量显著的提高, 将该转化子命名为 6-39。

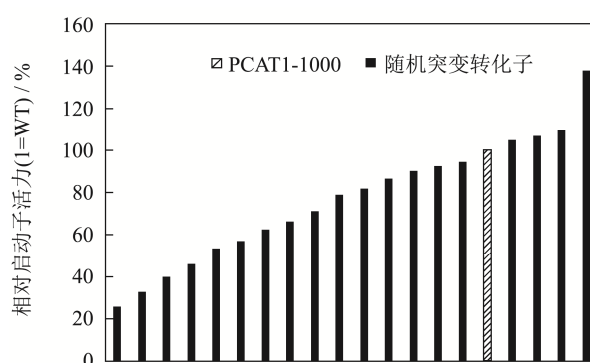


图 1 随机突变转化子的相对启动子活力

Fig.1 Relative promoter activity of random mutant transformants

2.2 6-39 号菌株的摇瓶发酵

将 GS115-P_{CAT1-1000}-EGFP 和 6-39 号菌株在摇瓶中进行发酵。重组菌株经甲醇诱导发酵 120 h, 上清液中单位 OD₆₀₀ 的荧光量如图 2 所示, 6-39 号菌株的上清液荧光量明显高于 GS115-P_{CAT1-1000}-EGFP, 其中, 当发酵至 120 h 时, GS115-P_{CAT1-1000}-EGFP 的上清液单位 OD₆₀₀ 荧光量为 10423.44±115.06 RFU, 6-39 号菌株上清液的单位 OD₆₀₀ 荧光量达到了 14397.2±1054.18 RFU, 可见比 6-39 号菌株表达 EGFP 的能力相比于 GS115-P_{CAT1-1000}-EGFP 提高了 38.12%。

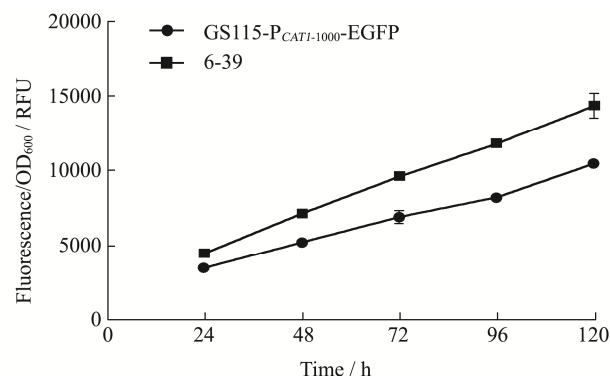


图 2 突变菌株的摇瓶发酵

Fig.2 Shake flask fermentation of mutant strains

2.3 6-39 号菌株的拷贝数测定

为了证明异源蛋白表达量的增多是由于启动子活力的增强, 而不是由于拷贝数的增加引起的, 测定了

GS115- $P_{CAT1-1000}$ -EGFP 和 6-39 号菌株的拷贝数, 通过 RT-PCR 测量的 Ct 值, 计算菌株的基因拷贝数。计算出的菌株 EGFP 拷贝数如图 3 所示, $P_{CAT1-1000}$ -EGFP 和 6-39 号菌株的拷贝数分别为 1.24 和 1.14, 由于基因拷贝数为整数, 因此 $P_{CAT1-1000}$ -EGFP 和 6-39 号菌株的拷贝数都为 1, 说明 EGFP 表达量的变化不是由拷贝数变化引起的。

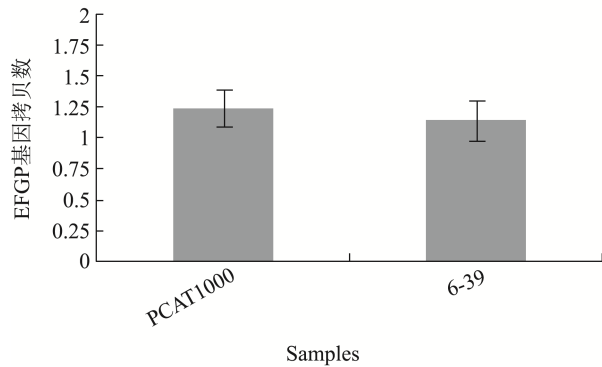


图 3 重组菌株的 EGFP 拷贝数测定

Fig.3 EGFP copy number of the recombinant strains

2.4 6-39 号菌株的转录水平测定

提取了对照和6-39号菌株在摇瓶中甲醇诱导发酵 120 h的RNA, 测量了6-39号菌株EGFP的转录水平, 并与对照做比较。提取的GS115- $P_{CAT1-1000}$ -EGFP和6-39号菌株的RNA样品进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 如图4所示, 其中GS115- $P_{CAT1-1000}$ -EGFP简写为 $P_{CAT1-1000}$ -EGFP。

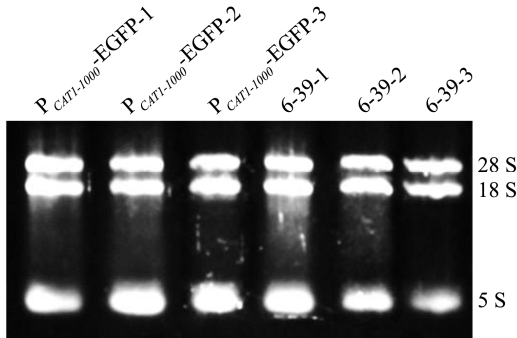


图 4 RNA 样品琼脂糖凝胶电泳图

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of RNA samples

从图中可以看出, 28 S、18 S、5 S的条带都比较清晰, 说明提取的RNA完整性较好, 提取过程中降解程度低。将提出的RNA进行反转录, 得到cDNA, 通过荧光定量 PCR 进行转录水平的测定, 将GS115- $P_{CAT1-1000}$ -EGFP的EGFP转录水平设为1, 6-39号的菌株转录水平如图5所示。

图5显示, 6-39号菌株相比于对照转录水平提高了8.60倍, 由于6-39号菌株的拷贝数为1, 这说明 $P_{CAT1-6-39}$ 的甲醇诱导活力相比于 $P_{CAT1-1000}$ 显著增加。

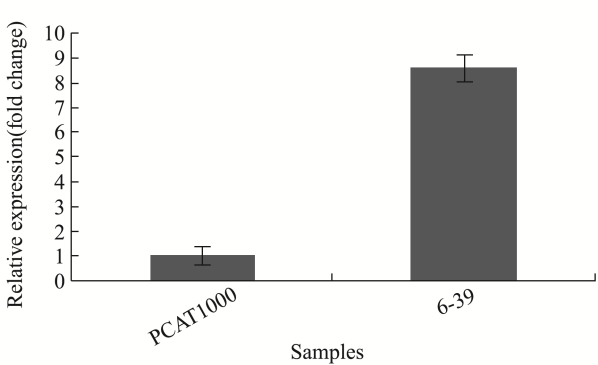


图 5 6-39 和对照的转录水平差异

Fig.5 Differences in transcription levels between 6-39 and control

2.5 PCAT1-6-39 序列 TFBSs 分析

扩增图 1 中的转化子的异源蛋白表达盒部分, 并对其启动子进行测序, 测序结果发现大部分的 $CAT1$ 启动子变体序列突变了 5 个以上的位点, 而荧光强度提高了 38%的 6-39 号菌株只有一处突变, 其-118 bp 位置由 A 突变为 G, 该现象说明-118 bp 位置由 A 突变为 G 是正向的突变。用在线预测软件 MatInspector 对 $P_{CAT1-1000}$ 和 $P_{CAT1-6-39}$ 的 TFBSs 进行分析, 在-118 bp 位由 A 突变为 G 涉及的 TFBSs 在表 2 中列出。

表 2 $P_{CAT1-1000}$ 和 $P_{CAT1-6-39}$ 在-118 bp 位置涉及的 TFBSs

Table 2 TFBSs involved in $P_{CAT1-1000}$ and $P_{CAT1-6-39}$ at -118 bp

TFBSs	$P_{CAT1-1000}$	$P_{CAT1-6-39}$
GATA.01	1	1
MIG3.01	1	1
MCM1.01	1	0
CSRE.01	0	1
GAL4.01	0	1

从表 2 中可以发现, $P_{CAT1-6-39}$ 少了一个 MCM 1.01 结合位点, 并且多了一个 CSRE.01 结合位点和一个 GAL 4.01 结合位点, CSRE.01 结合位点和 GAL 4.01 结合位点属于 F\$CSRE 和 F\$YGAL 矩阵族, MCM 1.01 结合位点属于 F\$YMCM 矩阵族, Ozg^[12]对毕赤酵母 P_{GAP} 的研究发现, 重复 F\$CSRE 和 F\$YGAL 结合位点能够提高 P_{GAP} 的甲醇诱导活性, 提示 CSRE.01 和 GAL4.01 结合位点的增多可能也会促进 P_{CAT1} 的甲醇诱导活性。

2.6 MUT 途径基因启动子 TFBSs 分析

为进一步探讨 CSRE.01 和 GAL4.01 结合位点在启动子 $P_{CAT1-6-39}$ 活性提升中的作用, 用 MatInspector 对 16 种 MUT 途径中的启动子进行分析, 其中 P_{AOX1} 、

P_{CAT1} 、 P_{PMP20} 、 P_{FLD1} 、 P_{FDHI} 、 P_{DAS1} 、 P_{DAS2} 为强甲醇诱导型启动子, P_{FGH1} 、 P_{DAK1} 、 P_{TAL1} 、 P_{FBA2} 、 P_{AOX2} 为弱甲醇诱导型启动子, P_{ADH2} 、 P_{TPI1} 、 P_{FBA1} 、 P_{FBP1} 为组成型的启动子。

检索到的 TFBSs 矩阵族分布于启动序列之上, 如图 6 所示, 其中不同颜色的矩形代表不同的 TFBSs,

F\$表示为真菌来源的矩阵族, O\$为通用的启动子核心元件 (如 TATA 盒等)。

来自 72 种矩阵族的 TFBSs 能够结合于这 16 个启动子上,但是从不同启动子 TFBSs 的分布上看,该 16 种启动子序列未发现明显的同源性,并且同类的启动子之间也没有明显相似的 TFBSs 分布。

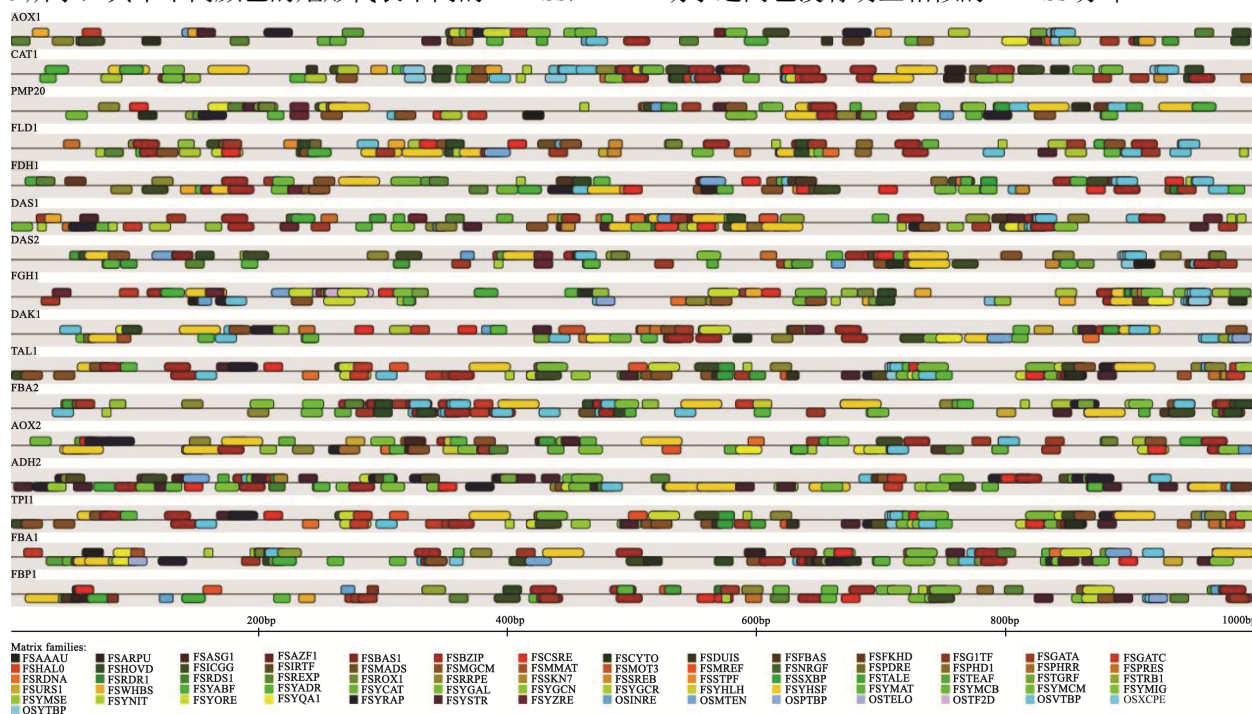


图6 MUT途径中的启动子的TFBSs分布

Fig.6 TFBSs distribution of promoters in the MUT pathway

2.5 中的实验发现 F\$CSRE 和 F\$YGAL 结合位点的增多, 以及 F\$YMCM 结合位点的减少可能能够提高 P_{CAT1} 的甲醇诱导活力, F\$YMCM、F\$CSRE 和 F\$YGAL 结合位点在 16 个启动子上的出现个数在表 3 中列出。

转录因子 F\$YMCM 是酵母细胞代谢周期的调节剂, 其结合于启动子上对于启动转录的调节作用尚未被阐明。从表 3 中可以看出, 大部分的 MUT 途径启动子都能够结合 F\$YMCM, 其中 P_{CAT1} 启动子上的 F\$YMCM 结合位点最多, 能够结合 5 个 F\$YMCM, 此外强甲醇诱导启动子 P_{AOX1}、强甲醇诱导启动子 P_{FDH1}、以及弱甲醇诱导启动子 P_{FBA2} 具有 4 个 F\$YMCM 结合位点, 组成型启动子 P_{TPH}、弱甲醇诱导启动子 P_{TAL1}、强甲醇诱导启动子 P_{DAS2} 上不结合 F\$YMCM, 这说明 F\$YMCM 结合位点可能不直接影响甲醇诱导型启动子的强弱。

CSRE (Carbon source-responsive element) 是启动子的碳源响应元件^[13], 从表 3 中可以看出绝大部分 MUT 途径的启动子都能够结合 CSRE 转录因子, 并且大部分的启动子有两个的 FSCSRE 结合位点, 仅有

弱甲醇诱导启动子 P_{FBA2} 上不结合 F\$CSRE, 并且强启动子 P_{FDHI} 上具有 7 个 F\$CSRE 结合位点, 这说明转录因子 CSRE 很可能对 MUT 途径启动子普遍具有激活作用。然而, 强启动子 P_{AOXI} 上仅有一个 F\$CSRE 结合位点, 这说明该结合位点的个数与启动子甲醇诱导活力之间不存在线性的相关性。

Gal4 是酿酒酵母中的转录激活蛋白, 并且 Gal4 参与酿酒酵母的半乳糖代谢; 但是毕赤酵母无法代谢半乳糖, 因此该转录因子可能负责调节新陈代谢中的其他途径。从表 3 中可以看出, F\$Y\$GAL 的结合位点在组成型启动子和弱甲醇诱导型启动子中出现更频繁, 在弱甲醇诱导启动子 P_{TALI}、弱甲醇诱导启动子 P_{FBA1} 和组成型启动子 P_{TPH} 上具有 5 个 F\$Y\$GAL 的结合位点, 大部分强甲醇诱导型启动子上并不结合转录因子 F\$Y\$GAL, 这说明 F\$Y\$GAL 可能不参与毕赤酵母启动子的甲醇诱导激活, 因此 P_{CAT1}-6-39 的甲醇诱导活性增强可能与 F\$Y\$GAL 结合位点的增加无关。

结合 F\$YMCM 结合位点、F\$CSRE 结合位点和 F\$YGAL 结合位点在 MUT 途径启动子上的出现个数统计, 推测 F\$CSRE 结合位点的增多最有可能与

P_{CAT1}-6-39 号菌株甲醇诱导活性增多相关。

表 3 F\$YMCM、F\$CSRE 和 F\$YGAL 结合位点在 MUT 途径启动子上的出现个数

Table 3 Number of occurrences of F\$YMCM, F\$CSRE and F\$YGAL binding sites on the MUT pathway promoters

Matrix Family	F\$YMCM	F\$CSRE	F\$YGAL
在几种启动子中共有	13	15	8
P _{AOX1}	4	1	0
P _{TAL1}	0	5	5
P _{FBA2}	4	0	0
P _{AOX2}	2	3	0
P _{ADH2}	2	4	3
P _{TPI1}	0	5	5
P _{FBA1}	1	3	5
P _{FBP1}	1	5	2
P _{CAT1}	5	3	0
P _{PMP20}	2	4	1
P _{FLD1}	2	3	0
P _{FDH1}	4	7	1
P _{DAS1}	2	3	0
P _{DAS2}	0	4	0
P _{FGH1}	1	3	2
P _{DAK1}	2	3	0

3 结论

本研究通过 EP-PCR 改造了毕赤酵母 P_{CAT1} 启动子, 得到了一个活力范围在 25.57%~138.12%的 P_{CAT1} 启动子变体文库; 其中 6-39 号菌株在摇瓶水平下, 甲醇诱导 120 h, 表达 EGFP 的能力相比于对照提高了 38.12%, 转录水平提高了 8.60 倍; 通过测序发现 P_{CAT1}-6-39 相比于对照, 其序列-118 bp 的碱基由 A 突变为 G; 通过 MatInspector 对毕赤酵母 MUT 途径中的 16 个启动子以及 P_{CAT1}-6-39 进行了 TFBSs 分析, 发现 MCM1.01、CSRE.01 和 GAL4.01 的结合位点可能影响 P_{CAT1} 的启动子活性, 其中转录因子 CSRE 的结合位点的增多最有可能提高 P_{CAT1} 的甲醇诱导活性。研究结果为毕赤酵母表达外源蛋白及代谢工程提供了可用的强启动子元件, 并有助于解析毕赤酵母甲醇利用途径基因启动子的关键位点。

参考文献

[1] Danilo Porro, Brigitte Gasser, Tiziana Fossati, et al. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2011, 89(4): 939-948

[2] Veeresh Juturu, Jin Chuan Wu. Heterologous Protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications [J]. Chem Bio Chem, 2018, 19(1): 7-21

[3] Gancedo J M. Yeast carbon catabolite repression [J]. Microbiology and Molecular Biology Review, 1998, 2(62): 334-360

[4] 金晓媚, 马雁冰. 用于异源基因表达的毕赤酵母启动子研究进展[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(3): 71-74

JIN Xiao-mei, MA Yan-bing. Research progress of *Pichia pastoris* promoter for heterologous gene expression [J]. Journal of Microbiology, 2015, 35(3): 71-74

[5] Thomas Vogl, Lukas Sturmberger, Thomas Kickenweiz, et al. A toolbox of diverse promoters related to methanol utilization: functionally verified parts for heterologous pathway expression in *Pichia pastoris* [J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(2): 172-186

[6] Thomas Vogl, Lukas Sturmberger, Pia C Fauland, et al. Methanol independent induction in *Pichia pastoris* by simple derepressed overexpression of single transcription factors [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(4): 1037-1050

[7] Xu N, Wei L, Liu J. Recent advances in the applications of promoter engineering for the optimization of metabolite biosynthesis [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2019, 35(2): 33

[8] Zhang X, Zhang X, Liang S, et al. Key regulatory elements of a strong constitutive promoter, P_{GCW14}, from *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology Letters, 2013, 35: 2113-2119

[9] Qin Xiu-lin, Qian Jiang-chao, Yao Gao-feng, et al. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(11): 3600-3608

[10] Portela R M C, Vogl T, Ebner K, et al. *Pichia pastoris* alcohol oxidase 1 (AOX1) core promoter engineering by high resolution systematic mutagenesis [J]. Biotechnology Journal, 2018, 13(3): e1700340

[11] Cartharius K, Frech K, Grote K, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites [J]. Bioinformatics (Oxford, England), 2005, 21(13): 2933-2942

[12] Ozge Ata, Roland Prielhofer, Brigitte Gasser, et al. Transcriptional engineering of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology & Bioengineering, 2017, 114(10): 2319-2327

(下转第 71 页)

