

毕赤酵母中Tet-on诱导系统的开发与优化

邹弘毅，梁书利*

(华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 511400)

摘要：基因表达精准调控对于高效能细胞工厂构建至关重要，基于非营养源的小分子诱导系统在基因表达调控具有广泛的应用潜力。该研究在巴斯德毕赤酵母中开发了基于强力霉素响应的 Tet-on 诱导系统，并进一步对该系统的各个元件进行优化。通过筛选合适的核心启动子序列、优化控制 *rtTA* 表达的启动子、转录激活结构域优化以及构建 *rtTA* 突变体，最终得到一系列的可响应强力霉素的诱导型启动子。其中基于 *rtTA-V10* 的 Tet-on 诱导系统拥有较低的本底水平泄露（荧光值为野生型菌株的 1.05 倍），而在添加强力霉素后，荧光强度的动态范围达到了 52.76 倍。而基于 *rtTA-VPR* 的 Tet-on 诱导系统在各种碳源条件下都表现出良好的表达强度，甲醇条件下达到了 P_{AOXI} 的 111.16%，在甘油、乙醇、葡萄糖条件下达到了 P_{GCW14} 的 110.65%、106.05%、112.24%。通过添加不同浓度的诱导剂即可以实现基因的精细化调控，这为毕赤酵母代谢工程和合成生物学领域中基因表达精准调控提供有力的遗传操作工具。

关键词：Tet-on 系统；毕赤酵母；启动子

文章编号：1673-9078(2025)04-163-171 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.0389

Development and Optimization of a Tet-on Inducible System in *Komagataella phaffii*

ZOU Hongyi, LIANG Shuli*

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 511400, China)

Abstract: Precise regulation of gene expression is crucial for the construction of high-performance cell factories, and non-nutrient source-based small molecule inducible system has a wide range of application potential in the regulation of gene expression. In this study, a Tet-on inducible system based on doxycycline response was developed in *Komagataella phaffii* and every elements of the system were further optimized. A series of inducible promoters that can respond to doxycycline were eventually obtained by screening appropriate core promoter sequences, optimizing the promoters that regulate *rtTA* expression, optimizing the transcriptional activation domains, and creating *rtTA* mutants. Among them, the Tet-on inducible system based on *rtTA-V10* had a low background level leakage (fluorescence value was 1.05 times that of wild-type strains), and a dynamic range of fluorescence intensity reached 52.76 times after the addition of doxycycline. The *rtTA-VPR*-based Tet-on inducible system showed good expression intensity under various carbon source conditions, reaching 111.16% of P_{AOXI} under methanol condition, and 110.65%, 106.05%, 112.24% of P_{GCW14} under the glycerol, ethanol and glucose condition,

引文格式：

邹弘毅,梁书利.毕赤酵母中Tet-on诱导系统的开发与优化[J].现代食品科技,2025,41(4):163-171.

ZOU Hongyi, LIANG Shuli. Development and optimization of a tet-on inducible system in *Komagataella phaffii* [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 163-171.

收稿日期：2024-03-27

基金项目：国家自然科学基金面上项目（32272276）

作者简介：邹弘毅（1999-），男，硕士研究生，研究方向：酶学与酶工程，E-mail：202120149848@mail.scut.edu.cn

通讯作者：梁书利（1985-），男，博士，教授，研究方向：酶学与酶工程，E-mail：shuli@scut.edu.cn

respectively. Precise gene regulation can be achieved by adding different concentrations of inducers, which provides a powerful genetic manipulation tool for precise gene expression regulation in the fields of *Komagataella phaffii* metabolic engineering and synthetic biology.

Key words: Tet-on system; *Komagataella phaffii*; promoters

巴斯德毕赤酵母是应用最为广泛的真核外源蛋白表达系统之一，已经有超过 5 000 种异源蛋白在毕赤酵母种实现表达^[1-5]，在合成功能化合物中也表现了一定的潜力^[6-8]。该菌株对营养要求低，生长快，可以进行高密度发酵，可实现蛋白分泌的一系列优势使其广泛应用于工业生产。虽然在表达外源蛋白上存在一定的优势，但是其在目前在蛋白生产过程中常常需要依靠甲醇来诱导，而甲醇属于易燃易爆且有毒的物质，这大大限制了该菌株在食品和饲料行业的应用。基于上述问题，近些年来研究人员针对毕赤酵母开发了一系列非甲醇诱导型和组成型启动子。Liu 等^[9]解析了毕赤酵母鼠李糖代谢途径并挖掘得到了特异性响应鼠李糖的启动子。Karaoglan 等^[10]利用乙醇诱导型 P_{ADH3} 来驱动木聚糖酶 *xyl*n，其表达水平高于 P_{AOX1} 和 P_{GAP} 。Neetu 等^[11]通过利用磷酸烯醇丙酮酸羧激酶启动子 P_{EPCK} 在毕赤酵母中开发了以乙醇和谷氨酸钠为诱导剂的诱导系统，其诱导表达蛋白的水平甚至优于 P_{AOX1} ，Zhang 等^[12]利用内源的组成型启动子 P_{GCW14} 实现了透明质酸酶的高效生产。但是由于非甲醇诱导型启动子的相关研究目前尚显不足，而组成型启动子的应用范围相对有限，其表达强度与 P_{AOX1} 相比也存在显著差距。因此在毕赤酵母中开发一套新型的正交且能在不同碳源条件下实现高度诱导效果的诱导系统是研究者广泛关注并亟待解决的关键问题。

TetR 家族是一个在细菌中普遍存在的转录调节子家族，目前包含 2 000 多个成员，超过 100 种以上的 TetR 蛋白结晶被解析并上传于 PDB 数据库^[13]。在大肠杆菌中第一个被证实的 TetR 家族蛋白是 Tn10，它调控编码抗药必须的四环素溢出泵基因的表达。在四环素不存在的情况下，TetR 结合在四环素操纵子 *tetO* 上，从而抑制四环素溢出泵基因的转录。当存在四环素时，四环素与 TetR 结合并改变其构象，TetR 会 *tetO* 操纵序列脱离从而实现下游基因转录。基于 TetR 家族，Gossen 等先后在真核细胞中开发了可调控基因表达的 Tet-off^[14]和 Tet-on^[15]转录调控系统，其中，Tet-on 系统是将 TetR 参与四环素诱导的抑制反应中的关键的 4 个氨基酸残基进行

突变，突变后导致 TetR 蛋白发生反向的反应，即在四环素存在的条件下，目的基因能够表达蛋白，而缺失四环素时，目的基因无法表达，以此在真核细胞中实现了目的基因精确地表达调控^[16]。

该研究首次在毕赤酵母中开发了 Tet-on 诱导系统，使用 *EGFP/mCherry* 蛋白表征该系统的诱导性能，通过系统优化整个系统各个组分元件，最终得到了一系列在不同碳源下都可以响应强力霉素的启动子，为毕赤酵母这一工业菌株提供了一套可行的调控工具。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 菌株与引物

本研究使用的菌株汇总见表 1，Tet-on 诱导系统原始质粒 pVG4.1 由华南理工大学生物学科与工程学院潘力教授课题组惠赠，*rtTA-V10* 以及 *rtTA-V16* 的基因序列由北京擎科生物科技股份有限公司合成，用于菌株构建的相关引物见表 2。

表 1 本研究使用的菌株
Table 1 The strains used in this research

菌株 / 质粒	来源
大肠杆菌 <i>E. coli Top10F</i>	本实验室保存
毕赤酵母 <i>K. phaffii GS115</i>	本实验室保存
PpIC9K- P_{AOX1} -EGFP/ <i>mCherry</i>	本实验室保存
<i>GS115-P_{AOX1}-mCherry</i>	本实验室保存
<i>GS115-P_{GCW14}-mCherry</i>	本实验室保存
<i>GS115-P_{TEF1}-mCherry</i>	本实验室保存

1.1.2 主要试剂

无水葡萄糖、甘油、甲醇、乙醇、NaCl、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 ，天津大茂化学试剂有限公司；Yeast extract，英国 Oxoid 公司；tryptone、Peptone、YNB 无机氮源，美国 BD-Difco 公司；KOD FX 高保真聚合酶，日本东洋纺公司；2×Utaq PCR Mix，北京庄盟国际生物公司；质粒提取试剂盒，天根生化科技（北京）有限公司；限制性核酸内切酶，Thermo Scientific 公司；Uniclone One Step 酶，北京金沙生物科技有限公司。

表 2 本研究使用的引物

Table 2 The primers used in this research

Primer names	Primer sequences (5'- 3')	Description
Tet-on-F	GATTTTGGTCATGAGATCAGATCTCGGAGAATATGGAGCTTCATC	Tet-on 启动子上游扩增引物
Tet-on-R	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGGCGCGCGGTGATGTCTGCT CAAGCGGGGT	Tet-on 启动子下游扩增引物
Amplify-minCAT1-F	ATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCTAGCCTGCCGCAAT CGGTAA	CAT1 核心启动子上游扩增引物
Amplify-minCAT1-R	CTCGCCCTTGCTCACCATGGCGCGCTTTAATTGTAAGTCTT GACTAGAGCAAG	CAT1 核心启动子下游扩增引物
Amplify-minGAP-F	ATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCATAATAGCGGGCGG ACGCA	GAP 核心启动子上游扩增引物
Amplify-minGAP-R	CTCGCCCTTGCTCACCATGGCGCGCATAGTTGTTCAATTG ATTGAAATAG	GAP 核心启动子下游扩增引物
Amplify-YPT1-F	GGATTTTGGTCATGAGATCAGATCTAGAGAGTTGCTGCC AAGAAT	P _{YPT1} 启动子上游扩增引物
Amplify-YPT1-R	TGTCCAGTCTAGACATGGTGAATTCGACTGCTATTATCTC TGTGTGTATG	P _{YPT1} 启动子上游扩增引物
Amplify-ADH3-F	GGATTTTGGTCATGAGATCAGATCTTCTGACGGTACTA GAGGACT	P _{ADH3} 启动子上游扩增引物
Amplify-ADH3-R	TGTCCAGTCTAGACATGGTGAATTCGTAAGTAAA TAAGATAAAAG	P _{ADH3} 启动子上游扩增引物
Amplify-GCW14-F	GGATTTTGGTCATGAGATCAGATCTCAGGTGAACCCACC TAACTATTTTTA	P _{GCW14} 启动子上游扩增引物
Amplify-GCW14-R	TGTCCAGTCTAGACATGGTGAATCTTTTGTGTTGAG TGAAGCGAGT	P _{GCW14} 启动子上游扩增引物
Amplify-V10-F	CGCTTGAGCAGACATCACCGAATTCACCATGTCTAGAC TGGACAAGAGC	RtTA-V10 基因上游扩增引物
Amplify-V10-R	AGAGAGATTCTTCTGCTGTACTAGTGGATCCTTACTTAG TTACCCGGGGAGCATGTCAA	RtTA-V10 基因下游扩增引物
Amplify-V16-F	CGCTTGAGCAGACATCACCGAATTCACCATGTCTAGAC TGGACAAGAGCAAAaTCATAA	RtTA-V16 基因上游扩增引物
Amplify-MitAD-F	CCTTTTCGGCCTGGAACATAATCATATGTGGCCTGGAGAAA CAGCTAAAGTGCGAAAGCGGCGGGCCGGTTAACAACCTCC ATGAAGGATT	Mit1AD 上游扩增引物
Amplify-MitAD-R	AGAGAGATTCTTCTGCTGTACTAGTGGATCCTTACTTAGTT ACTCCTCGACATTCCAGTAATC	Mit1AD 下游扩增引物
Amplify-VPR-F	CCTTTTCGGCCTGGAACATAATCATATGTGGCCTGGAGAAAC AGCTAAAGTGCGAAAGCGGCGGGCCGGCTGATGCTCTCG ACGACTTTG	VPR 上游扩增引物
Amplify-VPR-R	AGAGAGATTCTTCTGCTGTACTAGTGGATCCTTACTTAG TCAGAAGAGTGATGTATCAAAGATTG	VPR 下游扩增引物

1.1.3 培养基

BMGY 液体培养基：1% (m/V) Yeast extract, 2% (m/V) Peptone, 1.34% (m/V) YNB, 10% (V/V) 1 mol/L pH 值 6.0 的 KH₂PO₄/K₂HPO₄ 缓冲液, 1% (V/V) glycerol。

BMMY 液体培养基：1% (m/V) Yeast extract,

2% (m/V) Peptone, 1.34% (m/V) YNB, 10% (V/V) 1 mol/L pH 值 6.0 的 KH₂PO₄/K₂HPO₄ 缓冲液, 1% (V/V) methanol。

BMEY 液体培养基：1% (m/V) Yeast extract, 2% (m/V) Peptone, 1.34% (m/V) YNB, 10% (V/V) 1 mol/L pH 值 6.0 的 KH₂PO₄/K₂HPO₄ 缓冲液,

1% (V/V) ethanol。

BMDY 液体培养基: 1% (m/V) Yeast extract, 2% (m/V) Peptone, 1.34% (m/V) YNB, 10% (V/V) 1 mol/L pH 值 6.0 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液, 1% (m/V) glucose。

LB 液体培养基: 0.5% (m/V) Yeast extract, 1% (m/V) tryptone, 1% (m/V) NaCl。

1.2 实验方法

1.2.1 大肠杆菌重组载体的构建

以引物 Tet-on-F 和 Tet-on-R 扩增 Tet-on 启动子序列, 使用限制性核酸内切酶 *Bgl*II 和 *Eco*RI 对载体 PpIC9K-P_{AOXI}-EGFP 进行双酶切, 将上述片段通过凝胶回收后, 使用 Uniclone One Step 同源重组酶进行同源重组, 将重组质粒通过化学转化法转化至大肠杆菌 *E. coli* 感受态细胞, 随后将鉴定为阳性的转化子保种, 提取质粒并测序, 其余质粒构建方式同上。

1.2.2 重组毕赤酵母菌株的构建

选择合适的限制性核酸内切酶对载体进行单酶切, 使用 PCR 产物回收试剂盒对酶切体系进行纯化回收, 取 10 μL 纯化回收产物分别加入 80 μL 毕赤酵母 *GS115* 感受态细胞中, 随后按照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册培养手册中的步骤, 通过电击法进行酵母细胞转化, 随后将细胞涂布于 MD 平板上, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 3~4 d。挑取重组菌株菌落为模板, 进行菌落 PCR 验证以筛选出阳性转化子。

1.2.3 毕赤酵母菌株摇瓶发酵

1) 选择阳性菌株接种在 5 mL BMGY 培养基中于 30 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 的摇床中预培养 20~24 h;

2) 控制接种的初始 $\text{OD}_{600}=1.0$, 将菌液接种于 25 mL BMMY (或其他碳源) 培养基中于 30 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 的摇床中培养;

3) 每 24 h 吸取 250 μL 发酵液, 测量菌株 OD_{600} , 同时补加 1% 体积分数的甲醇或是其他碳源 (甘油、乙醇、葡萄糖), 甲醇诱导周期为 120 h, 其他碳源诱导周期为 48 h。

1.2.4 毕赤酵母菌株的孔板发酵以及荧光测定

1) 选择阳性菌株接种在 5 mL BMGY 培养基中于 30 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 的摇床中预培养 20~24 h;

2) 吸取 20 μL 预培养菌液, 接种于装有 800 μL

BMMY 培养基的 48 孔板中培养 24 h;

3) 吸取适量菌液, 并将所取得的菌液在 5000 r/min 下离心 5 min, 用 1 mL PBS (pH 值 7.4) 清洗细胞两次, 并将菌液稀释至 OD_{600} 为 0.6~0.8;

4) 量取 200 μL 菌液于 96 孔的酶标板中, 随后使用酶标仪检测荧光 (相对荧光单位 RFU) 和光密度 (OD_{600}), EGFP 的激发和发射波长为 488/520 nm, mCherry 的激发和发射波长为 561/600 nm。

1.2.5 统计学分析

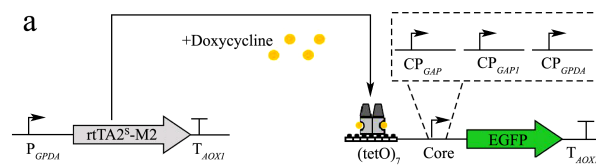
使用 Origin 2024 进行数据统计分析, 每次实验测试 3 组平行数值, 所有的数据均以均值标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 Tet-on诱导系统质粒的设计与构建

在外源添加强力霉素存在的情况下, rtTA 会与 TetO 操纵子序列结合并招募内源的 RNA 聚合酶进而激活下游基因转录。通常情况下核心启动子 CR (Core promoter) 的序列会影响 RNA 聚合酶的结合以及后续转录过程中的转录起始与延伸, 因此核心启动子的选择是该系统能否正确发挥功能的关键点。如图 1a 所示, 三种核心启动子被选择用于体系的评估 (cP_{GPD} 、 cP_{GAP} 、 cP_{CATI}), 通过 *Sac*I 和 *Pte*I 双酶切构建含有不同的核心启动子的报告质粒并转化至毕赤酵母 *GS115* 感受态细胞中, 得到菌株 *GS115*-Tet-on- cP_{gpdA} -EGFP、*GS115*-Tet-on- cP_{GAP} -EGFP、*GS115*-Tet-on- cP_{CATI} -EGFP。

利用 EGFP 荧光蛋白表征 Tet-on 系统的诱导水平, 将上述菌株在 BMMY 培养基中培养 24 h 后测试荧光水平, 从图 1b 发现菌株 *GS115*-Tet-on- cP_{GAP} -EGFP 在添加 10 $\mu\text{g/mL}$ 强力霉素后表现出 20.17 倍的动态范围 (即诱导表达水平相对于未诱导表达水平), 而菌株 *GS115*-Tet-on- cP_{gpdA} -EGFP 和 *GS115*-Tet-on- cP_{CATI} -EGFP 没有表现出明显的诱导效果。由图 1c 所示, 菌株 *GS115*-Tet-on- cP_{GAP} -EGFP 在不添加诱导剂时, 其荧光值相较于野生型 *GS115* 菌株有 2.54 倍的本底表达水平, 后续需要对该系统进行优化以降低基础本底表达。



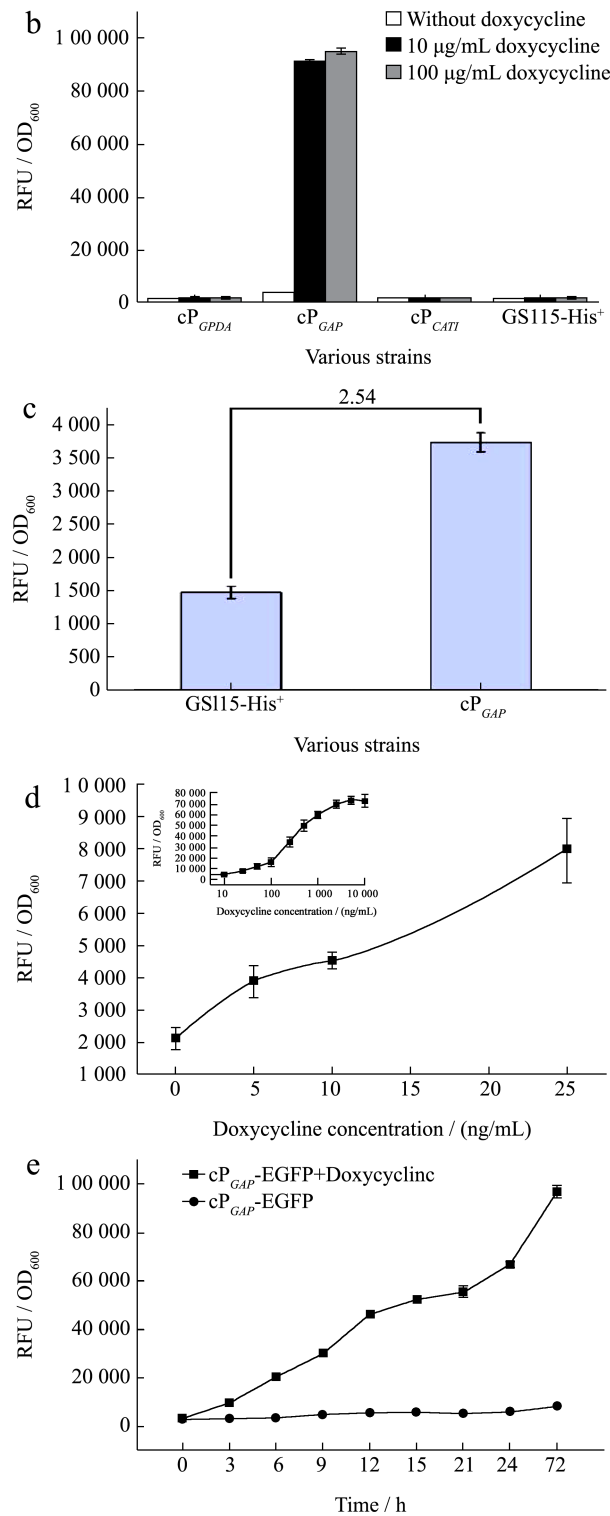


图1 核心启动子的选择与Tet-on系统的表征

Fig.1 Selecting appropriate core promoter sequences and characterization of tet-on systems

注：(a) 优化核心启动子的示意图；(b) 不同核心启动子对外源信号的影响；(c) 菌株背景荧光表达水平；(d) 不同诱导剂浓度下菌株的荧光值；(e) 不同诱导时间下菌株的荧光。

为了量化 Tet-on 系统的响应特性，测试了添加不同浓度的强力霉素以及在不同诱导时间下菌株 *GS115-Tet-on-cP_{GAP}-EGFP* 的荧光强度。如图 1d 所示，随着诱导剂浓度增加，菌株的荧光值也随之增加，添加 5 ng/mL 的诱导剂即可以检测到菌株荧光值上升，这表明 Tet-on 系统在毕赤酵母中具有超高的灵敏度；随着诱导剂浓度提高，一直到 2 500 ng/mL，荧光值达到了峰值并饱和。如图 1e 所示，添加诱导剂 3 h 后即可检测到荧光增加，这说明 Tet-on 系统在毕赤酵母中具有超快的响应速度。而随着诱导时间增加，菌株的荧光值也在不断地增加，直到 72 h 仍然有诱导的效果，这也说明该系统可以持续发挥作用，有应用于异源蛋白的表达的潜力。以上结果说明了 Tet-on 系统在毕赤酵母中具有良好诱导性能，通过调节诱导剂浓度以及诱导时间，可以实现目的基因的精准调控。

2.2 rtTA表达水平的优化

转录因子表达水平不足可能会影响 Tet-on 系统的激活效率，而转录因子的过表达可能会影响菌株的正常生长和代谢，因此适配的 *rtTA* 表达水平是提升 Tet-on 诱导系统性能的另一关键点。图 2a 所示，原始 Tet-on 质粒中的 *rtTA* 的启动子是曲霉来源的 *P_{GPD}*，将其替换为内源三种不同转录强度的组成型启动子 *P_{YPTI}*、*P_{ADH3}*、*P_{GCW14}*，通过 *Bgl*II 和 *Eco*RI 双酶切构建含有不同的核心启动子的报告质粒，得到菌株 *GS115-P_{YPTI}-rtTA-EGFP*、*GS115-P_{ADH3}-rtTA-EGFP*、*GS115-P_{GCW14}-rtTA-EGFP*。

结果如图 2b 所示，菌株 *GS115-P_{YPTI}-rtTA-EGFP* 在不添加诱导剂时本底水平与原始菌株相近，添加诱导剂后荧光强度仅为原始菌株 65% 左右，*P_{YPTI}* 先前被报道属于弱启动子^[17]，这使得 *rtTA* 的表达水平较低，在添加诱导剂后的动态范围降低（11.39 倍）。菌株 *GS115-P_{ADH3}-rtTA-EGFP*、*GS115-P_{GCW14}-rtTA-EGFP* 在诱导情况下荧光强度与原始菌株相近，本底水平却远高于对照菌株（1.90、2.27 倍），*P_{ADH3}*^[10] 和 *P_{GCW14}*^[18] 属于强组成型启动子，此时 *rtTA* 表达水平过量，导致了系统相对较高的本底水平，这也使得相关菌株的动态范围降低（10.96、9.11 倍）。同时使用过强的启动子驱动转录因子表达也会占用细胞资源，会造成菌株的代谢负荷^[19]，因此选用中等强度的启动子驱动 *rtTA* 的表达以实现高诱导强度与低本底水平之间平衡。

2.3 rtTA变体与转录激活域的优化

荧光报告蛋白 *EGFP* 表现出相对较高的基线水平,不利于我们对 Tet-on 诱导系统的诱导效率的评估,同时也为了确证 Tet-on 系统在表达不同蛋白时都有普适性,如图 3a 所示,将最初的 *EGFP* 报告蛋白替换为 *mCherry* 报告蛋白。通过 *PteI* 和 *AgeI* 双酶切构建含有 *mCherry* 报告蛋白的质粒,得到菌株 *GS115-rtTA-mCherry*。

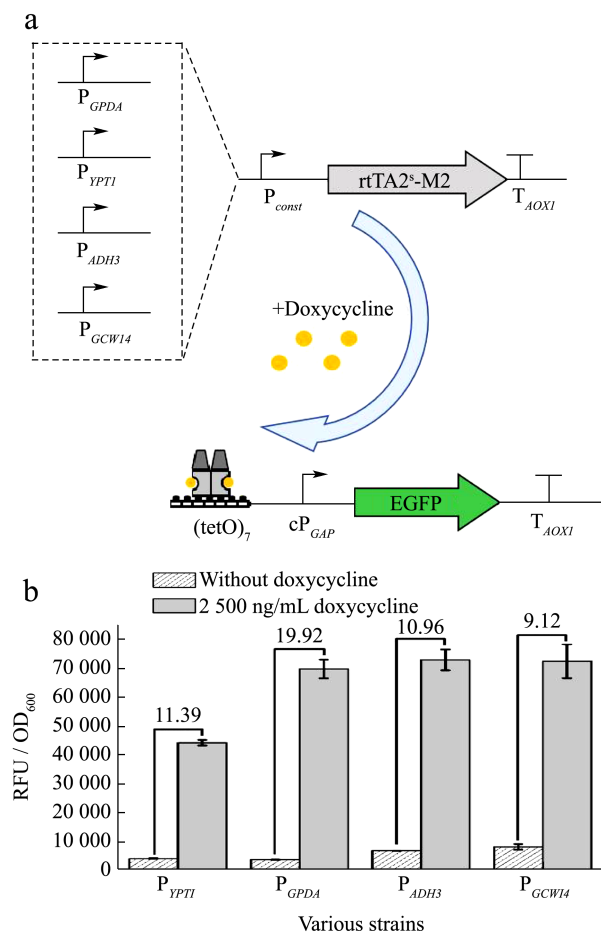


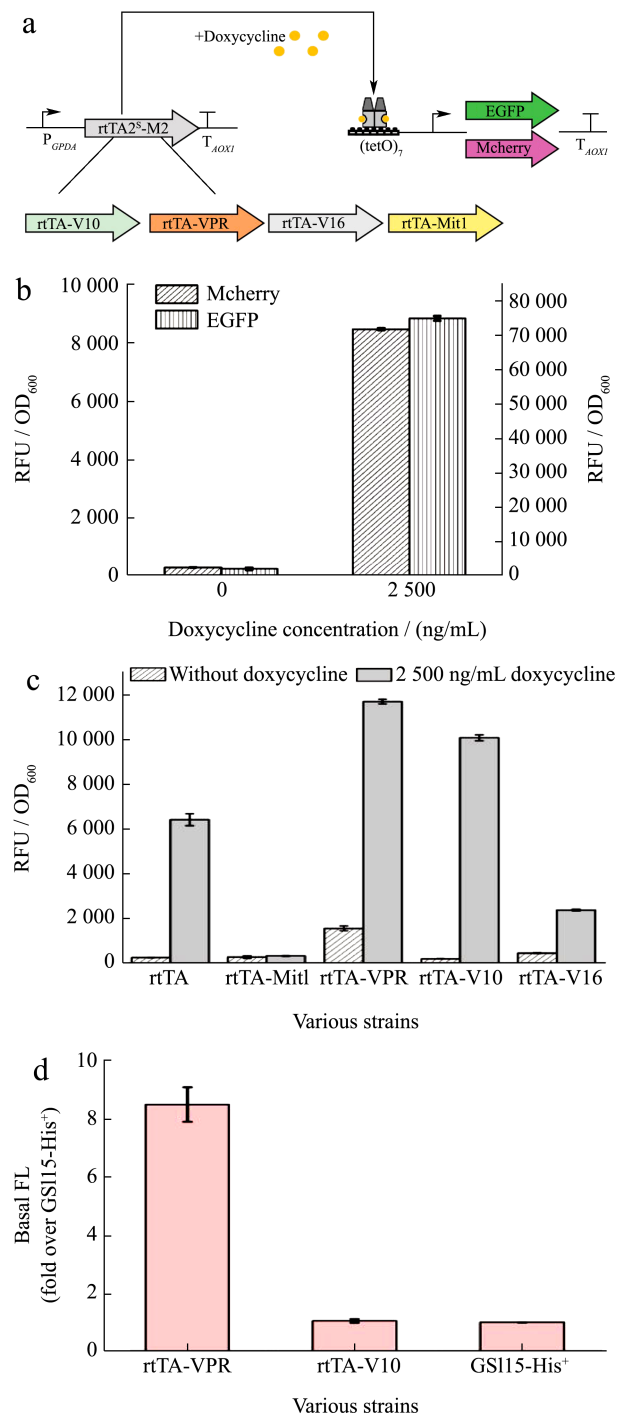
图 2 rtTA 启动子的选择

Fig.2 Selecting appropriate promoter for rtTA

注: (a) rtTA 不同启动子的示意图; (b) 不同启动子对外源信号的影响。

如图 3b 所示, Tet-on 系统无论是驱动 *EGFP* 还是 *mCherry* 表达都有比较高的动态范围,但是 *EGFP* 基线表达水平 (2 000) 远远高于 *mCherry* (200), 为了减少实验误差, 后续选用 *mCherry* 作为 Tet-on 系统的报告蛋白。转录激活因子对 RNA 聚合酶的招募效果也是影响整个系统的转录强度的关键, *rtTA* 的突变体 *rtTA-V10* 和 *rtTA-V16* 在哺乳动物细胞中展现出更加优越的诱导效果^[20]。由杂交三元激活剂 VP64、p65 AD 和 Epstein-Barr 病毒 R

反式激活剂 (Rta) 组成的杂交三元活化剂 VP64-p65-Rta (VPR) 结构域在 CRISPR 介导的转录激活系统中被证明可以发挥更好的激活效果^[21,22]。同时参与毕赤酵母甲醇代谢调控的 *Mit1* 转录因子可以促进 Pol II 型 RNA 聚合酶的招募^[23,24]。如图 3a 所示, 将 rtTA 蛋白替换为其他四种 *rtTA* 的变体 *rtTA-V10*、*rtTA-V16*、*rtTA-VPR*、*rtTA-Mit1*, 通过 *EcoRI* 和 *SpeI* 双酶切构建质粒, 得到菌株 *GS115-rtTA-V10-mCherry*、*GS115-rtTA-V16-mCherry*、*GS115-rtTA-VPR-mCherry*、*GS115-rtTA-Mit1-mCherry*。



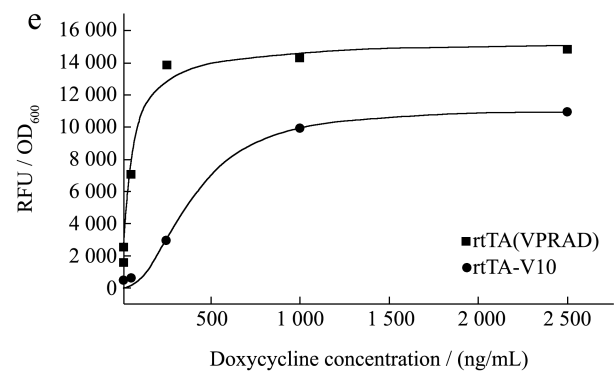


图 3 优化转录激活结构域与选择 rtTA 突变体

Fig.3 Refining transcriptional activation domains and creating rtTA mutants

注：(a) 不同转录激活域、rtTA 变体和报告蛋白的示意图；(b) 不同报告蛋白对外源信号的影响；(c) 不同转录激活域、rtTA 变异体对外源信号的影响；(d) 菌株的背景荧光表达水平；(e) 整个体系对不同浓度强力霉素的响应曲线。

如图 3c 所示，菌株 *GS115-rtTA-V10-mCherry* 在添加诱导剂后，荧光强度达到了对照菌株的 157%。菌株 *GS115-rtTA-VPR-mCherry* 在添加诱导剂后，荧光值在所有测试菌株中达到了最大值，为对照组的 183%。菌株 *GS115-rtTA-V16-mCherry* 在添加诱导剂后，荧光值只有对照菌株的 37%，而菌株 *GS115-rtTA-Mit1-mCherry* 几乎完全丧失了对诱导剂的响应。

如图 3d，测试了菌株 *GS115-rtTA-V10-mCherry* 和菌株 *GS115-rtTA-VPR-mCherry* 在不添加强力霉素时的基础表达情况，*GS115-rtTA-V10-mCherry* 表现出 1.05 倍的本底表达水平，而 *GS115-rtTA-VPR-mCherry* 有比较明显的泄露表达，达到了 8.5 倍的本底表达水平。

如图 3e、3f 所示，为了量化该系统对强力霉素的响应特性，测定了两个菌株在强力霉素添加质量浓度在 0~2 500 ng/mL 范围内的荧光曲线，将归一化的荧光数据与 Hill 方程进行拟合。基于 *rtTA-V10* 的 Tet-on 系统敏感度相较于 *rtTA-VPR* 更低， EC_{50} 值（能引起 50% 最高响应的浓度）为 399.24 ng/mL，但是拥有更低的本底表达水平，动态范围达到了最高的 52.76 倍，因此可以利用该启动子表达一些需要严格控制表达强度的基因，可以最大限度地减少泄露表达的问题。而基于 *rtTA-VPR* 的 Tet-on 系统敏感度更高， EC_{50} 值为 47.59 ng/mL，同时也伴随着较高本底表达水平，高度敏感的诱导系统系统可能更有利于菌株的工业化生产，当限制诱导剂浓度时，它仍然能提供严格控制和强大的最大表达水平。

表 3 最佳拟合的Tet-on诱导系统性能参数

Table 3 Best fitting of Tet-on induction system performance parameters

菌株	希尔系数	EC_{50} /(ng/mL)	MAX	动态范围
<i>GS115-rtTA-V10-mCherry</i>	2.17	399.25	11 146.16	52.46
<i>GS115-rtTA-VPR-mCherry</i>	0.94	47.59	15 408.62	7.53

注：希尔系数：根据拟合曲线预测得到的希尔系数； EC_{50} ：达到预测的最高荧光强度一半时的强力霉素浓度添加量；MAX：预测的最高的荧光强度；动态范围：最高荧光强度与基础荧光强度的比值。

2.4 Tet-on诱导系统表达强度强度的评估

一个有效的诱导表达系统，必须包含几个关键特征，包括低泄漏表达、较宽的动态范围、合适的灵敏度和足够的表达强度，上述实验对 Tet-on 系统的泄露表达，动态范围和灵敏度进行了表征，为了量化 Tet-on 系统在毕赤酵母中实际的表达强度水平，选取了毕赤酵母的最常用的甲醇诱导型启动子 P_{AOXI} 和实验室前期表征的强组成型启动子 P_{GCW14} 以及目前用于异源蛋白表达的常见的 P_{TEF1} ^[25] 与本研究开发的 Tet-on 诱导系统进行比较。

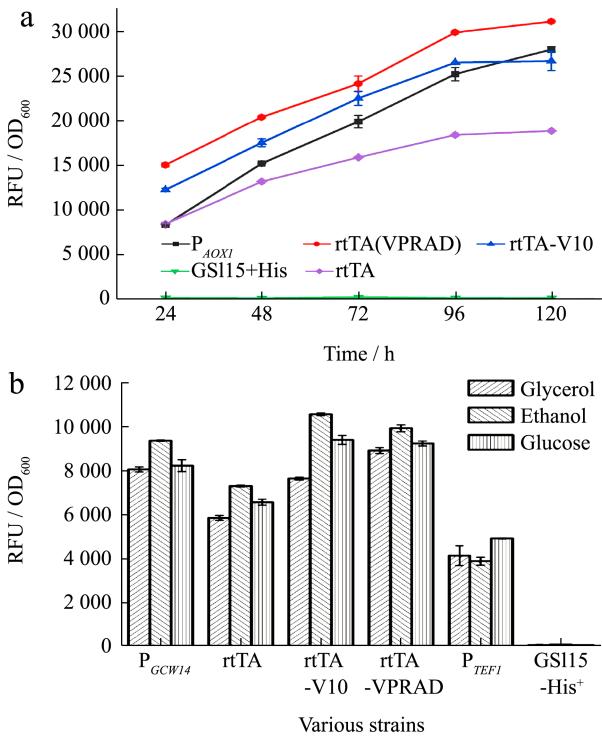


图 4 Tet-on 诱导系统表达强度强度的评估

Fig.4 Evaluation of the expression intensity of Tet-on induction system

注：(a) 甲醇培养下菌株的荧光强度；(b) 菌株在甘油、乙醇、葡萄糖下的荧光强度。

将上述菌株在 BMMY 培养基中培养 120 h 后测试荧光水平, 或是在 BMGY、BMEY、BMDY 中培养 48 h 后测试荧光水平。图 4a 结果表明, 菌株 *GS115-rtTA-mCherry*、*GS115-rtTA-V10-mCherry*、*GS115-VPR-mCherry* 在添加诱导剂后在以甲醇为唯一碳源的培养基培养 120 h 后荧光强度达到了 *GS115-P_{AOXI}-mCherry* 的 67.23%、95.38%、111.16%。如图 4b 所示, 在甘油, 乙醇, 葡萄糖条件下这 3 个菌株荧光值达到了 *GS115-P_{GCW14}-mCherry* 的 72.47%、94.83%、110.65%; 78.04%、112.84%、106.05%; 79.65%、114.20%、112.24%, 此外三个菌株的荧光值远高于菌株 *GS115-P_{TEFI}-mCherry*。以上结果说明经过优化的 Tet-on 系统的表达强度可以与内源强启动子相媲美, 相较于甲醇启动子需要在甲醇为唯一碳源下才能诱导, 组成型启动子缺乏可调控的问题, Tet-on 系统调节方式更加可控, 只需要添加诱导剂便可以控制下游基因表达。

3 结论

诱导型启动子的严格调控模式有利于实现细胞生长和生产解耦, 大多数天然诱导系统都是受营养源(碳源、氮源)调控。虽然响应营养源的调控系统具有结构简单, 操作方便的优点, 但是也存在一些问题, 如往往需要配合特定的培养基, 同时也易受其他营养源影响等, 这使得这些天然的诱导系统在生产中受到限制。本研究首次巴斯德毕赤酵母开发了 Tet-on 诱导系统, 随后对该系统各个元件进行优化, 包括核心启动子替换, 维持合适的 rtTA 的表达水平, 替换报告蛋白, 以及选择 rtTA 的突变体和替换激活结构域, 成功地构建了一系列可以受强力霉素诱导的启动子。其中基于 *rtTA-V10* 的诱导系统在没有诱导剂下显示出极低的本底水平(1.05 倍本底表达水平), 而添加诱导剂后其动态范围达到了 52.76 倍, 利用该启动子可以最大限度地减少泄露表达的问题。基于 *rtTA-VPR* 诱导系统则拥有最高的转录强度和更高的敏感度, 在甲醇为碳源下其表达强度达到了 *P_{AOXI}* 的 111.16%, 在甘油、乙醇、葡萄糖下达到了 *P_{GCW14}* 的 110.65%、106.05%、112.24%, 高度敏感的诱导系统可能更有利于菌株的工业化生产。总而言之, 该研究首次在巴斯德毕赤酵母中引入了 Tet-on 诱导系统, 通过在不同时间添加不同浓度的诱导剂可以精确调控下游基因转录水平, 这为毕赤酵母代谢工程改造及基因表达网络调控提供了一个可选择的工具。

参考文献

- [1] ROSMEITA C N, BUDIARTI S, MUSTOPA A Z, et al. Expression, purification, and characterization of self-assembly virus-like particles of capsid protein I1 hpv 52 in *Pichia pastoris* gs115 [J]. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology, 2023, 21(1): 126.
- [2] ESKANDARI A, NEZHAD N G, LEOW T C, et al. Current achievements, strategies, obstacles, and overcoming the challenges of the protein engineering in *Pichia pastoris* expression system [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2024, 40(1): 39.
- [3] LIANG J, HE S, SUN J, et al. Secretory production and characterization of a highly effective chitinase from streptomyces coelicolor a3(2) m145 in *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology Journal, 2024, 19(2): e2300402.
- [4] PIBOONPOCANUN S. Recombinant production of food allergens in yeast *Pichia pastoris* [J]. Methods in molecular Biology (Clifton, N.J.), 2024, 2717: 29-40.
- [5] ZHAO L, LI L, HU M, et al. Heterologous expression of the novel dimeric antimicrobial peptide lig in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Biotechnology, 2024, 381: 19-26.
- [6] FENG L, XU J, YE C, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for the production of triacetic acid lactone [J]. Journal of Fungi, 2023, 9(4): 494.
- [7] LUO G, LIN Y, CHEN S, et al. Overproduction of patchoulol in metabolically engineered *Komagataella phaffii* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(4): 2049-2058.
- [8] ZHANG X, CHEN S, LIN Y, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for high-level production of lycopene [J]. Acs Synthetic Biology, 2023, 12(10): 2961-2972.
- [9] LIU B, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Discovery of a rhamnose utilization pathway and rhamnose-inducible promoters in *Pichia pastoris* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27352.
- [10] KARAOGLAN M, KARAOGLAN F E, INAN M. Comparison of *adh3* promoter with commonly used promoters for recombinant protein production in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2016, 121: 112-117.
- [11] RAJAK N, DEY T, SHARMA Y, et al. Unlocking nature's toolbox: Glutamate-inducible recombinant protein production from the *Komagataella phaffii* pepck promoter [J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 66.
- [12] ZHANG Y S, GONG J S, JIANG J Y, et al. Engineering protein translocation and unfolded protein response enhanced human ph-20 secretion in *Pichia pastoris* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 16.

- [13] YU Z, REICHHELD S E, SAVCHENKO A, et al. A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the tetr family transcriptional regulators [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 400(4): 847-864.
- [14] GOSSEN M, BUJARD H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(12): 5547-5551.
- [15] GOSSEN M, FREUNDLIEB S, BENDER G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells [J]. Science (New York, N.Y.), 1995, 268(5218): 1766-1769.
- [16] DAS A T, TENENBAUM L, BERKHOUT B. Tet-on systems for doxycycline-inducible gene expression [J]. Current Gene Therapy, 2016, 16(3): 156-167.
- [17] SEARS I B, O'CONNOR J, ROSSANESE O W, et al. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 1998, 14(8): 783-790.
- [18] LIANG S, ZOU C, LIN Y, et al. Identification and characterization of p_{gcw14}: A novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(11): 1865-1871.
- [19] NASERI G, PRAUSE K, HAMDO H H, et al. Artificial transcription factors for tuneable gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 676900.
- [20] ZHOU X, VINK M, KLAVER B, et al. Optimization of the tet-on system for regulated gene expression through viral evolution [J]. Gene Therapy, 2006, 13(19): 1382-1390.
- [21] BOEHM S, SPLITH V, RIEDMAYR L M, et al. A gene therapy for inherited blindness using dcas9-vpr-mediated transcriptional activation [J]. Science Advances, 2020, 6(34): 5614.
- [22] FISHER M A, CHAUDHRY W, CAMPBELL L A. Gesicles packaging dcas9-vpr ribonucleoprotein complexes can combine with vorinostat and promote hiv proviral transcription [J]. Molecular Therapy Methods & Clinical Development, 2024, 32(1): 101203.
- [23] WANG X, WANG Q, WANG J, et al. Mit1 transcription factor mediates methanol signaling and regulates the alcohol oxidase 1 (*aox1*) promoter in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(12): 6245-6261.
- [24] POODEH S H, SIADAT S O R, ARJMAND S, et al. Improving *aox1* promoter efficiency by overexpression of mit1 transcription factor [J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(10): 9379-9386.
- [25] STADLMAYR G, MECKLENBRAEUKER A, ROTHMUELLER M, et al. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 150(4): 519-529.