

## 研究报告



## 熊蜂生假丝酵母启动子的筛选及强度分析

石依博 张利华 张敏 夏媛媛 杨海泉 沈微 陈献忠\*

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

**摘要:**【背景】熊蜂生假丝酵母(*Starmerella bombicola*)作为一种非常规假丝酵母菌株,因其具备高产槐糖脂生物表面活性剂的能力而受到广泛关注。然而,由于自身的表达系统并不完善,限制了该菌株的代谢工程改造。【目的】克隆、筛选及鉴定新的系列内源启动子表达元件。【方法】通过对比分析熊蜂生假丝酵母全基因组及9种功能已知目的基因信息,并结合启动子预测网站,筛选获得系列启动子候选序列,以*SbGFP*(密码子优化后的酵母增强型绿色荧光蛋白)为报告基因进行整合表达,通过绿色荧光蛋白强度及转录水平分析鉴定启动子强度。【结果】在分别以葡萄糖和油酸作为唯一碳源的情况下,启动子 $P_{TEFI}$ 和 $P_{GPD}$ 在不同碳源培养条件下均显示出较高的转录水平。启动子 $P_{CYP52MI}$ 、 $P_{UGTA1}$ 、 $P_{UGTBI}$ 及 $P_{MOB}$ 在以油酸为唯一碳源时具有弱转录活性,而在以葡萄糖为唯一碳源时则未检测到它们具有转录活性,推测它们是油酸诱导型启动子。进一步利用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)对*SbGFP*进行转录水平分析,检测结果与绿色荧光表达水平一致。【结论】获得了系列熊蜂生假丝酵母内源性启动子,进一步丰富了该菌株的表达元件,为菌株的代谢工程改造及基因的表达与调控奠定了理论基础。

**关键词:** 熊蜂生假丝酵母, 启动子, 密码子优化, 绿色荧光蛋白, 基因表达与调控

Screening and intensity analysis of promoters in *Starmerella bombicola*SHI Yibo ZHANG Lihua ZHANG Min XIA Yuanyuan YANG Haiquan  
SHEN Wei CHEN Xianzhong\*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

**Abstract:** [Background] *Starmerella bombicola*, as an unconventional yeast strain, has attracted wide attention owing to its ability to produce sophorolipids biosurfactant. However, its expression system is not well defined, which limits the development of metabolic engineering. [Objective] A panel of endogenous promoters were cloned and characterized from *S. bombicola*. [Methods] In this study, through the comparative analysis of the whole genome of *S. bombicola* and 9 target genes, combined with the promoter prediction website, a series of promoter candidate sequences were screened and obtained, and *SbGFP* (codon-optimized yeast enhanced green fluorescent protein for *S. bombicola*), as the reporter gene, was integrated and expressed in *S. bombicola*. The promoter strength was identified by analyzing the

**Foundation item:** Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20171138)

\*Corresponding author: Tel: 86-510-85918122; E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

Received: 05-01-2021; Accepted: 29-01-2021; Published online: 16-03-2021

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20171138)

\*通信作者: Tel: 0510-85918122; E-mail: xzchen@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2021-01-05; 接受日期: 2021-01-29; 网络首发日期: 2021-03-16

intensity of green fluorescent protein and its transcriptional levels. **[Results]** When glucose and colleseed oil were respectively used as the sole carbon source, the promoters  $P_{TEF1}$  and  $P_{GPD}$  showed higher transcription levels under both conditions. The promoters  $P_{CYP52M1}$ ,  $P_{UGTA1}$ ,  $P_{UGTB1}$ , and  $P_{MOB}$  had weak transcriptional activity when colleseed oil was used as the sole carbon source, but no transcriptional activity was detected when cultured with glucose. It was speculated that they were colleseed oil-inducible promoters. Transcriptional level of *SbGFP* was further analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR), the result was consistent with the expression level of *SbGFP*. **[Conclusion]** A panel of different promoters were screened and characterized, which would further enrich its expression elements and lay a theoretical foundation for the metabolic engineering for *S. bombicola*.

**Keywords:** *Starmerella bombicola*, promoter, codon optimization, *SbGFP*, gene expression and regulation

熊蜂生假丝酵母(*Starmerella bombicola*)是一种非致病性的单倍体假丝酵母,因其生产的槐糖脂具有良好的降低表面张力和提高溶解性、起泡性及环境友好性等特点而被广泛地应用到农业、医药及食品行业等领域<sup>[1-3]</sup>。该菌株可以利用葡萄糖或油酸作为唯一碳源进行生长,并能在以葡萄糖和油酸为共同碳源的条件下发酵高产槐糖脂。目前,相关的研究已经基本阐明了熊蜂生假丝酵母生物合成槐糖脂的代谢途径,并利用代谢工程的方法提高了槐糖脂产量<sup>[4-6]</sup>。

利用代谢工程或合成生物学手段改造微生物细胞,除了需要优良的底盘细胞外,还要有丰富的合成元件,如启动子、终止子、转录因子等<sup>[7-8]</sup>。其中,启动子作为基因转录的重要组成,对基因的表达和调控起着重要的作用,也是开展代谢工程育种的前提。对于真核生物来讲,正是由于启动子的复杂性,才导致了基因表达的多样性<sup>[9]</sup>。然而,即使对于模式菌株酿酒酵母来说,其启动子挖掘和功能鉴定的研究较为系统,但对于启动子活性的调控和预测也较为困难<sup>[10-12]</sup>。组成型启动子的调控不受外界条件的影响,能够使基因持续表达,具有更好的应用前景。同时,诱导型启动子也会在菌株代谢改造过程中发挥特殊的作用<sup>[13]</sup>。在熊蜂生假丝酵母中,虽已有报道使用的启动子,如磷酸甘油酸激酶基因(*PGKI*)启动子<sup>[14]</sup>、乳清苷5-磷酸脱羧酶基因(*URA3*)启动子<sup>[15]</sup>、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPD*)启动子<sup>[16]</sup>、烯醇化酶基因(*ENO*)启动子及半乳糖激酶基因(*GALK*)半乳糖诱导型启动子等<sup>[17]</sup>,但并未对其强度进行表征。而

在微生物的代谢改造过程中,不同基因表达水平的高低,对代谢中间产物及目的产物的积累有着巨大的影响,因此,选择合适强度的启动子进行基因的表达调节至关重要<sup>[18]</sup>。目前尚未有研究对熊蜂生假丝酵母内源性启动子进行系统的鉴定和分析,因而在很大程度上限制了启动子在菌株改造方面的应用前景。为了进一步探究熊蜂生假丝酵母内源性启动子的转录活性,本文以酵母增强型绿色荧光蛋白作为报告基因<sup>[19]</sup>,对来源于熊蜂生假丝酵母 9 种不同基因启动子进行克隆、筛选及强度分析,以期为其在基因高效表达调控及基因工程改造等领域奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒及引物

大肠杆菌 JM109 及载体 pM19-T Simple 用于重组质粒的构建,含有潮霉素抗性基因的质粒由山东大学宋欣老师惠赠。本研究用到的菌株、质粒见表 1,所用引物见表 2。

### 1.2 培养基及主要试剂和仪器

YPD 培养基(g/L): 酵母粉 10.0, 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0 (固体培养基加入)。LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 琼脂粉 20.0 (固体培养基加入)。潮霉素抗性培养基: 将潮霉素母液加入到冷却至 46 °C 的 YPD 培养基中,终浓度为 0.5 mg/mL。氨苄抗性培养基: 将氨苄青霉素母液加入到冷却至 46 °C 的 LB 培养基中,终浓度为 0.1 mg/mL。

表 1 本研究所用菌株及质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	描述 Description	来源 Source
Strains		
<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214	Host strain	Our lab
<i>Escherichia coli</i> JM109	Used for plasmid construction	Our lab
Plasmids		
Ts- <i>PXA1</i> - <i>hphex</i> - <i>PXA1</i>	Containing homologous arms of <i>PXA1</i> gene for integration expression and hygromycin B resistance gene	This study
Ts- <i>PXA1</i> -Promoter- <i>SbGFP</i> ex- <i>hphex</i> - <i>PXA1</i>	Containing <i>SbGFP</i> expression cassette	This study

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primers name	序列 Sequences (5'→3')	酶切位点 Restriction sites
P <sub>TEF1</sub> -F	TCTAAACTCAAATCTGAGAA <u>ACGCGT</u> GTCTATGGCTTCTGCTTTG	<i>Mlu</i> I
P <sub>TEF1</sub> -R	AGCTCTTCACCCTTGCTCAT <u>GGATCC</u> TTTTCAAATTAAGTTTTTG	<i>Bam</i> H I
P <sub>PGKI</sub> -F	TCTAAACTCAAATCTGAGAA <u>ACGCGT</u> GCTTCCTCAG CTACCAGCGC	<i>Mlu</i> I
P <sub>PGKI</sub> -R	AGCTCTTCACCCTTGCTCAT <u>GGATCC</u> TTTTCTGGTTTGGAGGACC	<i>Bam</i> H I
P <sub>ENO</sub> -F	TCTAAACTCAAATCTGAGAA <u>ACGCGT</u> AATACGAGTTTGGGTCTCAC	<i>Mlu</i> I
P <sub>ENO</sub> -R	AGCTCTTCACCCTTGCTCAT <u>GGATCC</u> AACGGCCATTTCTAATAGAT	<i>Bam</i> H I
P <sub>TDHI</sub> -F	TCTAAACTCAAATCTGAGAA <u>ACGCGT</u> AAGCAAAAAGACATACCAGG	<i>Mlu</i> I
P <sub>TDHI</sub> -R	AGCTCTTCACCCTTGCTCAT <u>GGATCC</u> TCTATAGAAATCTAAACGA	<i>Bam</i> H I
P <sub>GAPD</sub> -F	TCTAAACTCAAATCTGAGAA <u>ACGCGT</u> TGCTACCTTATTGAAGTCTA	<i>Mlu</i> I
P <sub>GAPD</sub> -R	AGCTCTTCACCCTTGCTCAT <u>GGATCC</u> TGTGTAGAGTTGTTTTGT	<i>Bam</i> H I
P <sub>MOB</sub> -F	TCTAAACTCAAATCTGAGAA <u>ACGCGT</u> GACACTATACGAATCAAACA	<i>Mlu</i> I
P <sub>MOB</sub> -R	AGCTCTTCACCCTTGCTCAT <u>GGATCC</u> AGGAGTTTTTGGATTAGTCT	<i>Bam</i> H I
P <sub>UGTA1</sub> -F	TCTAAACTCAAATCTGAGAA <u>ACGCGT</u> CAGATATGCATCAGGGGCAC	<i>Mlu</i> I
P <sub>UGTA1</sub> -R	AGCTCTTCACCCTTGCTCAT <u>GGATCC</u> TGAATATTCGTAGGGAGAAG	<i>Bam</i> H I
P <sub>UGTB1</sub> -F	TCTAAACTCAAATCTGAGAA <u>ACGCGT</u> GAGAGTGGGACCTGATTCAG	<i>Mlu</i> I
P <sub>UGTB1</sub> -R	AGCTCTTCACCCTTGCTCAT <u>GGATCC</u> ATAGGAGACTTTATTGTTTT	<i>Bam</i> H I
P <sub>CYP52M1</sub> -F	TCTAAACTCAAATCTGAGAA <u>ACGCGT</u> CATCGTAGTTGAAGTAGTCG	<i>Mlu</i> I
P <sub>CYP52M1</sub> -R	AGCTCTTCACCCTTGCTCAT <u>GGATCC</u> ATATGTACTTTTCAATATGA	<i>Bam</i> H I
P <sub>PGKI</sub> + <i>SbGFP</i> -F	GGTCCTCCAAACCAGAAAAAGGATCCATGAGCAAGGGTGAAGAGCT	<i>Bam</i> H I
T <sub>PGKI</sub> + <i>SbGFP</i> -R	CTCGCATGTATGCACGTCTAACGCGTTTTGAAAAAATTTATTCTA	
PXA1-F	ATTTTGAGAGTTTGTGACTGCTTTATCAA	
PXA1-R	TGAGATGACACACGTGACATGTCGATCCTA	
Actin-F	GTCATCTGCTCAACGAACTGTAT	
Actin-R	ATGTCCTTCTGAGCGGTCTG	
q- <i>SbGFP</i> -F	ACTACCTTAGCACTCAGA	
q- <i>SbGFP</i> -R	AGCAGTAACGAACTCAAG	

注：酶切位点部分用下划线标出  
Note: The restriction sites introduced into the primers are underlined

DNA 聚合酶、核酸内切酶、荧光定量分析试剂盒、酵母总 RNA 提取试剂盒、DNA Marker, TaKaRa 公司; C112 一步连接酶, 南京诺唯赞医疗科技有限公司; 潮霉素 B, 北京鼎国生物有限公司。电转仪、实时荧光定量基因扩增仪, Bio-Rad 公司; 激光共聚焦显微镜, 徕卡公司; 流式细胞仪, 碧迪公司。

### 1.3 熊蜂生假丝酵母内源性启动子重组质粒构建

熊蜂生假丝酵母内源性启动子序列的获取: 从 NCBI 数据库中下载该菌种全基因组序列(GenBank 登录号为 BCGO0000000.1)及基因 *TEF1* (GenBank 登录号为 MG719756)、*GAPD* (GenBank 登录号为 MG719759)、*ENO* (GenBank 登录号为 MG719760)、*PGKI* (GenBank 登录号为 KT284719)、*TDHI* (GenBank 登录号为 KM355971)、*CYP52MI* (GenBank 登录号为 EU552419)、*UGTA1* (GenBank 登录号为 HM440973)、*UGTB1* (GenBank 登录号为 HM440974)及 *MOB* (GenBank 登录号为 KM596776) 编码序列。将各基因编码序列与全基因组进行对比分析, 确定其在基因组的具体位置, 并选取各基因编码序列起始密码子上游约 1 500 bp 左右 DNA 序列作为其启动子功能区域。通过设计特异性引物(表 1), 以熊蜂生假丝酵母基因组为模板, 通过 PCR 反应最终获得 9 种启动子序列产物。密码子偏好性分析和密码子优化后的 *SbGFP* 基因序列以及终止子  $T_{PGKI}$  由苏州金唯智公司化学合成。将 *SbGFP* 基因及终止子  $T_{PGKI}$  片段与启动子  $P_{PGKI}$  进行融合 PCR 扩增, 最终得到  $P_{PGKI}$  驱动增强型绿色荧光蛋白表达盒  $P_{PGKI}$ -*SbGFP*- $T_{PGKI}$ , 以本实验室前期所构建的含有 *PXA1* 基因同源臂及潮霉素抗性基因(*HPH*)为筛选标记的整合型质粒 *Ts-PXA1-hphex-PXA1* 为出发载体, 经 *Mlu* I 酶切后回收, 与前述的绿色荧光蛋白表达盒经 C112 一步连接酶连接后, 转化 *E. coli* JM109, 并涂布于氨苄青霉素选择平板, 最终获得整合型启动子绿色荧光报告载体 *Ts-PXA1-P<sub>PGKI</sub>-SbGFPex-hphex-PXA1*, 以该启动子绿色荧光报告载体为骨架, 将该载体经内切酶 *Mlu* I 和 *Bam* H I 共同消化, 与上述同样方法获得的其余 8 种基因启

动子产物分别进行一步连接, 获得重组质粒并转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中, 最终获得包括启动子  $P_{PGKI}$  在内的 9 个整合型启动子绿色荧光报告载体(图 1), 并送苏州金唯智生物技术有限公司进行测序验证。

### 1.4 熊蜂生假丝酵母的转化及阳性转化子的获取

以上述构建好的质粒作为模板, 以 *PXA1*-F 和 *PXA1*-R 为引物分别进行 PCR 获得目的基因表达盒片段, 经 PCR 产物清洗试剂盒纯化后采用高效电击转化法<sup>[20]</sup>转化野生型熊蜂生假丝酵母, 将目的基因片段整合到 *PXA1* 基因位点。电转化条件为: 1 mm 转化杯, 电压 1.5 kV。转化细胞液加入 YPD 培养基, 30 °C 培养 16–18 h, 取适量菌体涂布至含有潮霉素的抗性平板, 30 °C 继续培养 3 d, 将长出的菌落提取基因组 DNA(转化子基因组 DNA 提取方法根据参考文献[14]进行), 以 *PXA1*-F 和 *PXA1*-R 为引物进行 PCR 验证, 获得阳性转化子。

### 1.5 重组菌株绿色荧光蛋白的观察及测定

根据酵母增强型绿色荧光蛋白在蓝色光(488 nm)照射时显示绿色的特性<sup>[21]</sup>, 对各重组菌株

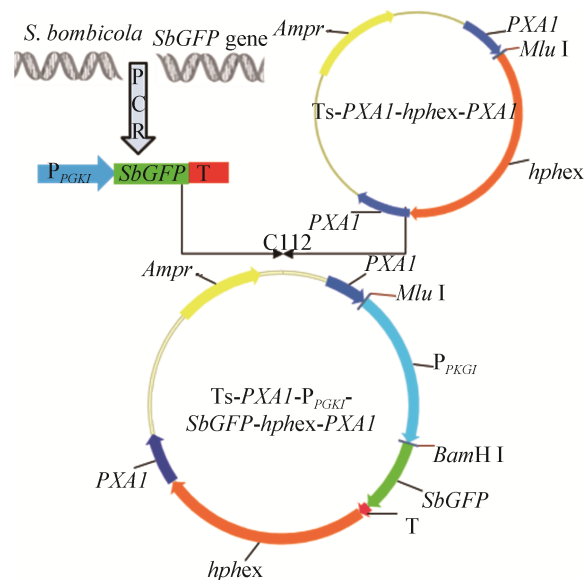


图 1 *Ts-PXA1-P<sub>PGKI</sub>-SbGFPex-hphex-PXA1* 重组质粒构建图

Figure 1 Construction of recombinant plasmid *Ts-PXA1-P<sub>PGKI</sub>-SbGFPex-hphex-PXA1*

进行荧光强度的检测。将重组菌株接种至 10 mL YPD 液体培养基中, 30 °C 200 r/min 培养过夜后, 分别转接至 50 mL 以葡萄糖和油酸为唯一碳源的液体培养基中, 30 °C 200 r/min 培养 8 h,  $OD_{600}$  达到 1.0 后 4 °C 冰箱放置 2 h。收集 1 mL 菌体于 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min, 并用 PBS 缓冲液洗涤菌体 2–3 次, 最终稀释到适宜菌浓度制片。使用激光共聚焦显微镜进行绿色荧光观察, 参数设置为: 激发波长 488 nm, 发射波长 510 nm。按上述方法获得各重组菌株浓度适宜的菌悬液, 使用流式细胞仪进行上样测定其荧光强度, 检测条件为: FITC 通道, 激发波长 488 nm (Blue Laser 照射), 发射波长 530 nm。以出发菌株作为对照。

### 1.6 重组菌株总 RNA 的提取及转录水平分析

取上述条件培养 8 h 的重组菌株菌液, 根据酵母总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 并按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书进行逆转录。以 *Actin* 激动蛋白为参照基因, 逆转录得到的 cDNA 为模板, 以 Actin-F/Actin-R 及 q-SbGFP-F/q-SbGFP-R 为特异性引物对(表 2), 按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)说明书, 使用 CFX96 进行 *SbGFP* 转录水平测定分析, 每组 3 个平行样本。RT-qPCR 反应体系及条件根据参考文献[14]进行, 并利用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法对基因的转录水平进行分析<sup>[22]</sup>。

## 2. 结果与分析

### 2.1 绿色荧光蛋白基因 *SbGFP* 在熊蜂生假丝酵母的异源表达

不同生物密码子使用的偏好性差异较大, 因此, 在异源表达某种基因时, 密码子优化作为一种较为常用且有效的策略被采用<sup>[23]</sup>。前期的实验过程中, 我们首次尝试了将本实验室保存的热带假丝酵母为宿主优化后的 *CtGFP* 基因在熊蜂生假丝酵母中进行整合表达, 发现该基因在正常转录的情况下未能显示出绿色荧光。推测可能是同属不同种之间的微生物密码子偏好性不同, 导致该绿色荧光蛋白基因无法在熊蜂生假丝酵母中正常表达。根据熊蜂

生假丝酵母密码子偏好性分析数据, 将绿色荧光蛋白基因进行密码子优化后人工合成, 优化后的基因命名为 *SbGFP*。将该基因与已报道的启动子  $P_{PGKI}$  及  $T_{PGKI}$  终止子进行融合 PCR, 最终获得片段  $P_{PGKI}$ -*SbGFP*- $T_{PGKI}$ , 将该片段插入到质粒 Ts-*PXA1*-*hphex*-*PXA1* 中, 获得重组质粒。PCR 获得完整基因整合表达盒后, 电转至野生型熊蜂生假丝酵母菌株, 将长出的单菌落提取基因组并进行 PCR 验证, 最终获得阳性转化子。划线分离得到的单菌落接种至 5 mL YPD 培养基中培养后, 制片在激光共聚焦显微镜下观察, 结果表明经密码子优化后的酵母增强型绿色荧光蛋白 *SbGFP* 基因能够在熊蜂生假丝酵母中成功表达, 而且可以作为报告基因进行后续实验(图 2)。同时, 密码子优化策略为外源基因在熊蜂生假丝酵母中的表达提供了可行的途径。

### 2.2 熊蜂生假丝酵母系列内源性启动子质粒及重组菌株鉴定

通过软件对比分析以及启动子在线网站 Softberry 分析(<http://www.softberry.com/>)设计特异性引物, 以 *S. bombicola* ATCC 22214 基因组为模

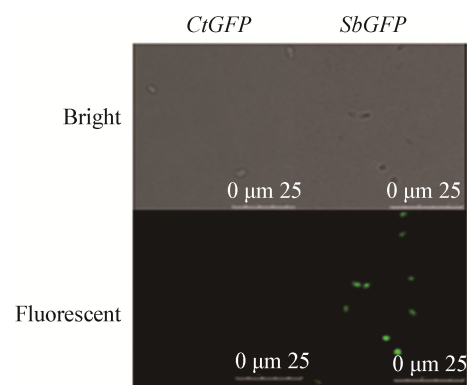


图 2 熊蜂生假丝酵母整合表达密码子优化后的酵母增强型绿色荧光蛋白基因

Figure 2 Integration expression of codon optimization yeast-enhanced green fluorescent protein gene in *S. bombicola*

注: *CtGFP* 为热带假丝酵母密码子优化后的 *yeGFP*; *SbGFP* 为熊蜂生假丝酵母优化后的 *yeGFP*

Note: *CtGFP*: Codon optimized *yeGFP* for *Candida tropicalis*; *SbGFP*: Codon optimized *yeGFP* for *S. bombicola*



板, PCR 扩增得到其余 8 种基因启动子 DNA 片段, 分别编号为  $P_{TEF1}$ 、 $P_{GPD}$ 、 $P_{ENO}$ 、 $P_{TDHI}$ 、 $P_{MOB}$ 、 $P_{CYP52M1}$ 、 $P_{UGTA1}$  和  $P_{UGTB1}$ 。将 2.1 中所构建的 Ts-*PXA1*- $P_{PGKI}$ -*SbGFPex-hphex-PXA1* 重组质粒, 经 *Mlu* I 和 *Bam* H I 双酶切线性化回收大片段, 与上述所获得的各启动子片段经 C112 一步连接酶试剂盒连接后, 转化至 *E. coli* JM109 细胞, 涂布 LB+Amp 平板, 提取质粒经酶切及测序鉴定后最终获得重组质粒(图 3A、3B)。

以构建的重组质粒为模板, 以 *PXA1*-F/*PXA1*-R 为引物对 PCR 扩增获得各表达盒片段进行胶回收, 经去离子水溶解后转化熊蜂生假丝酵母野生型菌株, 用潮霉素平板筛选转化子, 将长出的转化子培养后提取基因组 DNA, 并用 *PXA1*-F/*PXA1*-R 引物对进行验证, 阳性转化子可以扩增得到 5 000 bp 左右的目的条带, 而出发菌株则只能扩增出 *PXA1* 基因完整条带(图 3C)。将验证正确的阳性转化子根据启动子进行命名。

### 2.3 翻译水平及转录水平表征各启动子分析

将获得的系列酵母转化子单菌落接种至以葡萄糖为唯一碳源的 YPD 培养基中培养 8 h, 取菌液制片, 用激光共聚焦显微镜定性分析, 观察到不同启动子表达绿色荧光蛋白的荧光强度差异较大。其中, 启动子  $P_{TEF1}$ 、 $P_{GPD}$  及  $P_{ENO}$  在荧光显微镜视野

下显示出强荧光强度, 启动子  $P_{PGKI}$ 、 $P_{TDHI}$  荧光强度则相对较弱(图 4A), 而启动子  $P_{CYP52M1}$ 、 $P_{UGTA1}$ 、 $P_{UGTB1}$  及  $P_{MOB}$  则在该培养条件下未显示出绿色荧光。由于上述未显示转录活性启动子的基因来自槐糖脂合成代谢途径, 主要涉及脂肪酸的氧化及葡萄糖基的转移, 因此推测这几种启动子为油酸诱导型启动子。接下来, 以油酸为碳源将重组菌株培养 8 h 后制片观察。 $P_{CYP52M1}$ 、 $P_{UGTA1}$ 、 $P_{UGTB1}$  和  $P_{MOB}$  转化子显示出微弱荧光(图 4B), 因此判断其为油酸诱导型启动子。

为了对绿色荧光蛋白表达强度进行定量分析, 将重组菌株分别以油酸或葡萄糖为唯一碳源培养 8 h 后, 收集菌体稀释至适宜菌株浓度, 经流式细胞仪检测其荧光强度值。结果显示绿色荧光强度与激光共聚焦显微镜观察结果一致。一般情况下组成型启动子在不同碳源中的转录活性相对稳定<sup>[24]</sup>, 但是在以油酸为唯一碳源进行培养时, 从图 5A、5B 对比可以看出, 除了  $P_{TDHI}$  以外,  $P_{TEF1}$ 、 $P_{GPD}$ 、 $P_{PGKI}$  和  $P_{ENO}$  的转录活性均呈现下降趋势。这表明当培养基中不存在葡萄糖时, 这类启动子的转录活性会受到一定程度的影响, 可能是因为熊蜂生假丝酵母在以油酸为唯一碳源时菌体自身代谢调节所致。对于  $P_{CYP52M1}$ 、 $P_{UGTA1}$ 、 $P_{UGTB1}$  及  $P_{MOB}$  启动子, 在油酸培

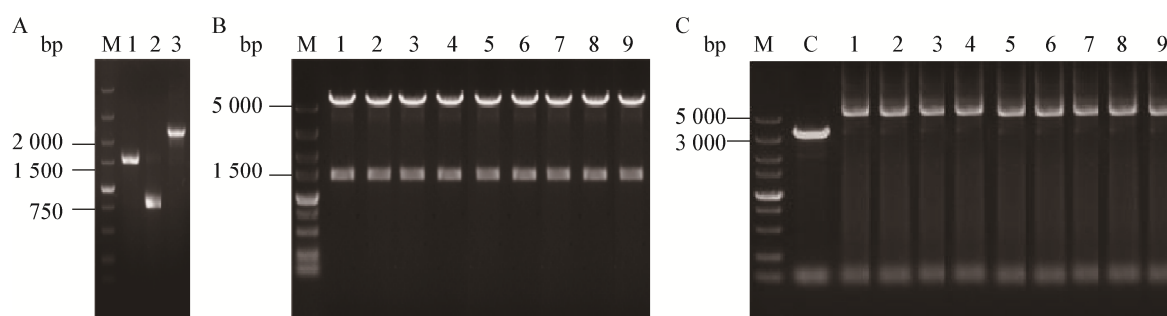


图 3 绿色荧光蛋白载体及转化子的鉴定

Figure 3 Identification of green fluorescent protein vectors and transformants

注: A: 1: 启动子  $P_{PGKI}$  PCR 产物; 2: *SbGFP* PCR 产物; 3:  $P_{PGKI}$ -*SbGFP*-T 融合 PCR 产物。B: 1-9: 各重组质粒 Ts-*PXA1*-Promoters-*SbGFPex-hphex-PXA1* *Bam* H I/*Mlu* I 酶切鉴定图。C: *S. bombycolia* 菌株 *PXA1* 基因 PCR 产物; 1-9: 分别为转化子  $P_{PGKI}$ 、转化子  $P_{TEF1}$ 、转化子  $P_{GPD}$ 、转化子  $P_{ENO}$ 、转化子  $P_{TDHI}$ 、转化子  $P_{CYP52M1}$ 、转化子  $P_{UGTA1}$ 、转化子  $P_{UGTB1}$ 、转化子  $P_{MOB}$  PCR 产物。M: DLS000 DNA Marker

Note: A: 1: PCR production of promoter  $P_{PGKI}$ ; 2: PCR production of *SbGFP*; 3: PCR production of  $P_{PGKI}$ -*SbGFP*-T. B: 1-9: Recombinant plasmid Ts-*PXA1*-Promoters-*SbGFPex-hphex-PXA1* *Bam* H I/*Mlu* I. C: PCR production of *PXA1* in *S. bombycolia*; 1-9: PCR production of transformants  $P_{PGKI}$ ,  $P_{TEF1}$ ,  $P_{GPD}$ ,  $P_{ENO}$ ,  $P_{TDHI}$ ,  $P_{CYP52M1}$ ,  $P_{UGTA1}$ ,  $P_{UGTB1}$ ,  $P_{MOB}$ . M: DLS000 DNA Marker

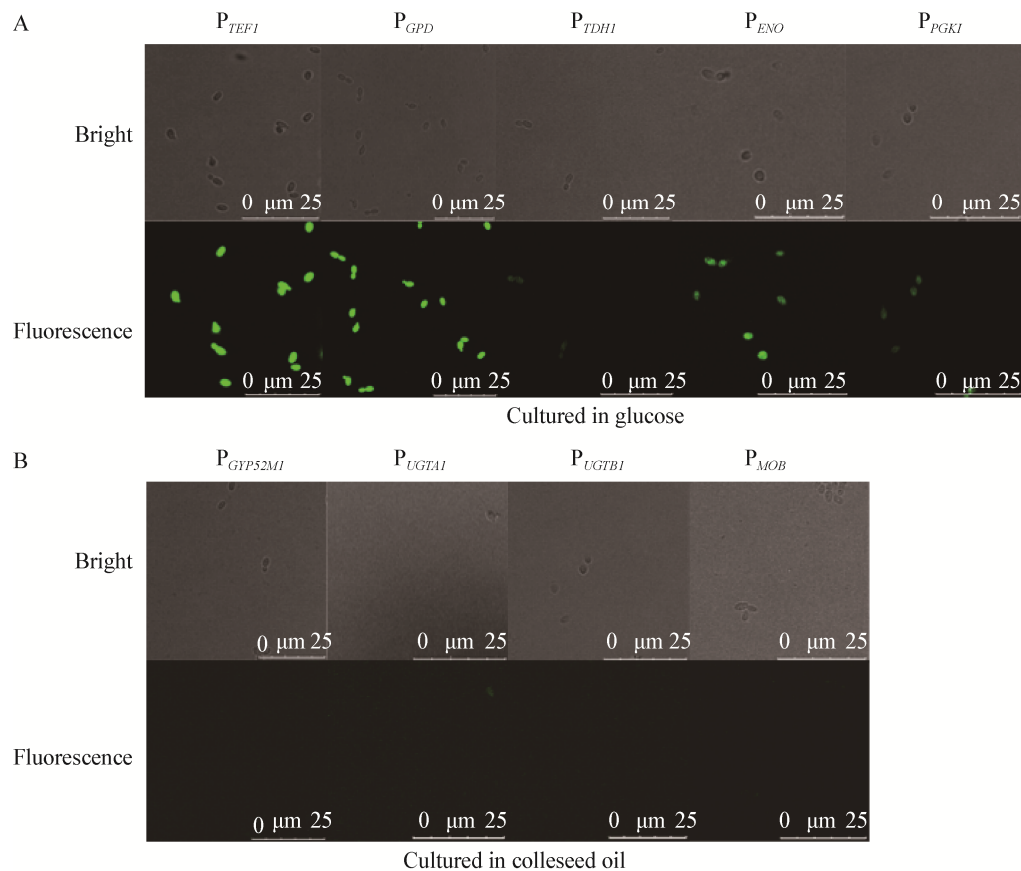


图4 各转化子菌株绿色荧光蛋白观察图

**Figure 4 Observation of *SbGFP* of transformant strains**

注: A、B 分别为转化子在以葡萄糖和油酸为唯一碳源培养时激光共聚焦观察图

Note: A, B: Observation of transformants when cultured in glucose and in colseed oil, respectively

养的条件下显示出微弱的荧光强度。此外,为了更好地分析所筛选的启动子在转录水平上的差异,在分别以油酸和葡萄糖为碳源的培养条件下,30℃、200 r/min 培养 8 h 后取样提取各重组菌株总 RNA 通过逆转录获得 cDNA, 然后进行 RT-qPCR 分析。结果显示,绿色荧光蛋白强度的高低与其转录水平一致(图 5C、5D)。这表明启动子在基因转录起始过程中发挥重要作用,进而影响基因的表达量。

## 2.4 不同培养时间启动子活性分析

微生物在不同的生长时期,由于自身代谢条件的变化及转录因子的调控,相同基因的表达水平会发生一定的改变<sup>[25]</sup>。为了进一步分析所筛选启动子在不同培养时间转录活性的变化,将各转化子菌株在以葡萄糖和油酸为共同碳源的条件连续培养

80 h。每隔 8 h 取样进行荧光强度测定。从图 6 可以得出,不同启动子在不同生长时期的转录活性发生了改变,其中启动子  $P_{TEF1}$  在培养 8 h 时转录活性最高,培养到 16 h 时转录活性骤降,后期转录活性维持在一定水平。这可能是细胞在生长后期,细胞活性降低导致。启动子  $P_{GPD}$ 、 $P_{PGK1}$  及  $P_{ENO}$  则是呈现先上升后下降的趋势。而对于槐糖脂代谢途径中的诱导型启动子,除了  $P_{UGTA1}$  随着培养时间的延长转录活性有所提高外, $P_{CYP52M1}$  及  $P_{UGTB1}$  转录活性持续保持在较低水平。从整个培养时期来看,启动子  $P_{TEF1}$ 、 $P_{GPD}$ 、 $P_{ENO}$  和  $P_{PGK1}$  都呈现出相对较强的转录活性,而  $P_{CYP52M1}$ 、 $P_{UGTA1}$ 、 $P_{UGTB1}$  及  $P_{MOB}$  启动子活性较弱。有文献报道,当某些基因高水平表达时会对菌体自身产生严重代谢负担或毒性<sup>[26]</sup>,

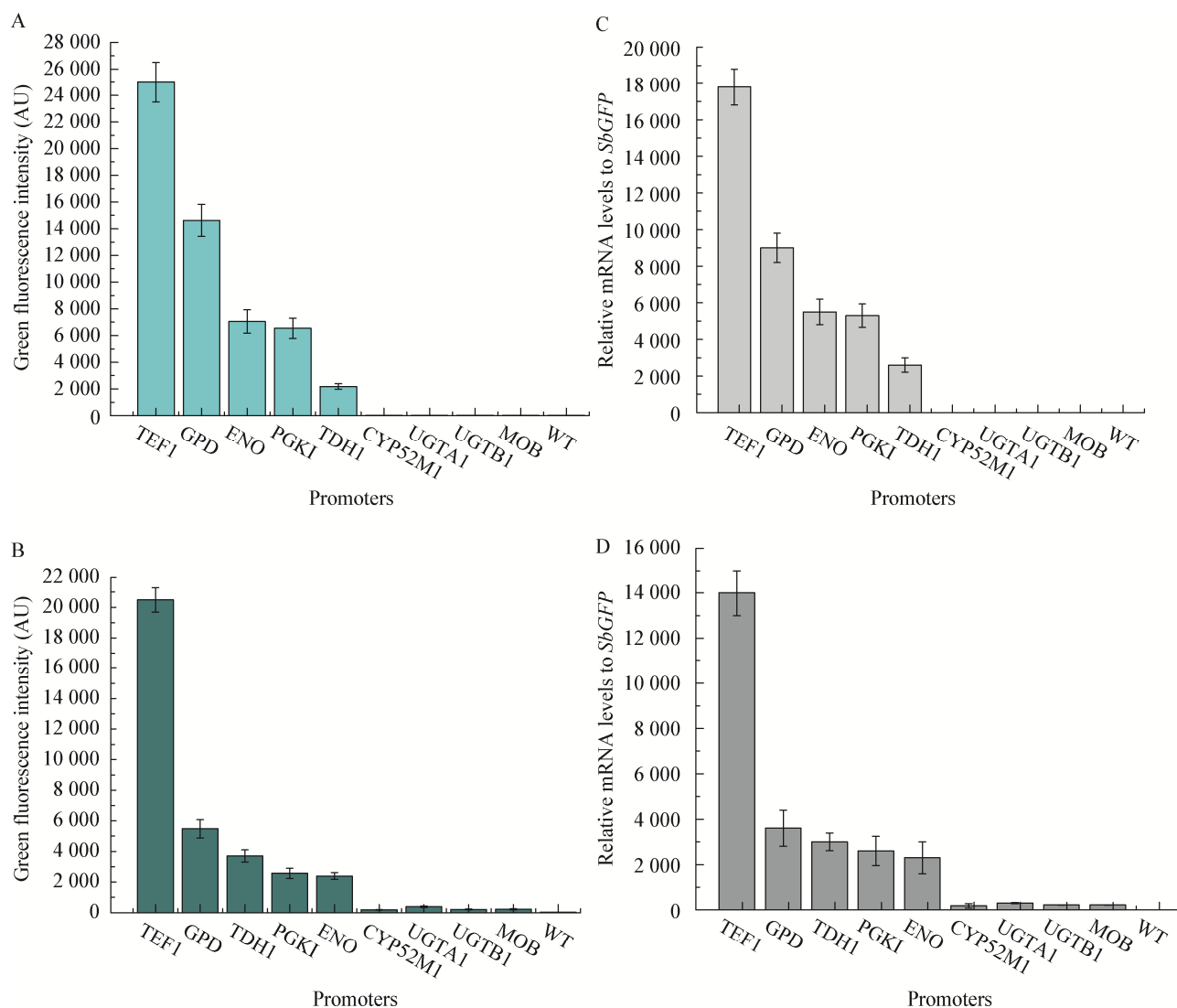


图5 熊蜂生假丝酵母重组菌株 *SbGFP* 表达水平及转录水平分析

Figure 5 Analysis of expression and transcription levels of *SbGFP* in recombinant strains of *S. bombylica*

注：A、B 分别为转化子在以葡萄糖和油酸培养时的绿色荧光强度；C、D 分别为转化子在以葡萄糖和油酸培养时的转录水平分析；AU：自定义单位

Note: A, B: Green fluorescence intensity cultured in glucose and colseed oil, respectively; C, D: Transcription level of the transformants cultured in glucose and colseed oil, respectively; AU: Arbitrary units

可以采用弱启动子进行表达来降低对菌体生长带来的不利影响。同时，在构建代谢途径时也可以利用不同启动子之间的组合达到不同基因的最佳表达水平，从而达到菌体高产代谢产物的目的<sup>[27-28]</sup>。

### 3 讨论与结论

熊蜂生假丝酵母作为一种非模式菌株，以往的研究大多集中于阐明槐糖脂的中心代谢途径及关

键基因的功能上，但因其遗传背景并不十分清晰，一定程度上限制了该菌株的遗传改造。启动子作为基因表达过程中十分重要的顺式作用元件，在表达系统构建和菌株代谢工程改造中扮演着不可或缺的角色。本文以密码子优化后的酵母增强型绿色荧光蛋白作为报告基因，对熊蜂生假丝酵母内源性启动子如糖酵解途径及槐糖脂代谢途径中关键基因的



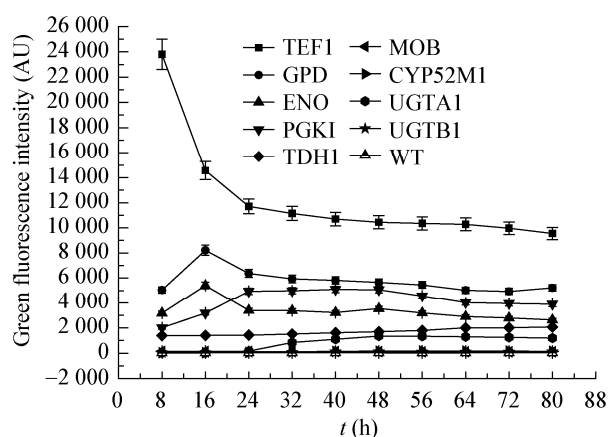


图6 不同培养时间转化子绿色荧光强度

Figure 6 Green fluorescence intensity of transformants at different culture time

注: WT: 野生型熊蜂生假丝酵母; TEF1: 在 *PXAI* 位点整合  $P_{TEF1}$ -*SbGFP* 表达盒的转化子, 其余同理; AU: 自定义单位

Note: WT: Wild-type *S. bombicola*; TEF1: Transformant integrated the  $P_{TEF1}$ -*SbGFP* expression cassette into the *PXAI* locus, and the rest are the same; AU: Arbitrary units

启动子进行克隆及表征。已有的研究表明, 启动子的转录活性会根据不同的培养条件及培养阶段而发生改变。因此, 筛选不同强度的启动子, 可以更好地满足调节不同代谢途径基因表达水平的需求。

本实验中组成型启动子  $P_{TEF1}$  及  $P_{GPD}$ , 相比于其他启动子如  $P_{PGKI}$ 、 $P_{ENO}$  和  $P_{TDH1}$ , 在不同碳源及不同生长周期内均具有强转录活性且相对稳定。因此, 这类启动子可以在以葡萄糖或其他廉价碳源为底物的条件下, 极大程度地提高目的基因的表达水平。也有研究表明, 在酿酒酵母中随着培养基中葡萄糖的消耗, 糖酵解途径中启动子  $P_{PGKI}$  和  $P_{TDH3}$  的强度也会下降<sup>[29]</sup>。在枯草芽孢杆菌中通过不同强度启动子串联或者启动子突变的方法, 可以进一步提高启动子的强度<sup>[30]</sup>。然而在酿酒酵母中, 通过对3个上游激活元件的串联和  $P_{TEF1}$  核心功能区序列结合形成的杂交启动子, 其强度高于天然的  $P_{TEF1}$ <sup>[31]</sup>。另外, 人工合成启动子在合成生物学领域的应用也有一定的发展<sup>[32]</sup>。因此可以借助不同的策略构建启动子文库, 进一步获得不同强度的启动子。

为了实现目的关键代谢基因表达水平的动态

调控, 从而精确控制目的产物的生成和积累, 诱导型启动子的应用也变得越来越广泛。诱导型启动子含有顺式作用元件, 可以在特定诱导物存在的条件下与转录因子结合起到对基因表达开关的作用, 从而使得目的产物积累。因此, 可以利用诱导型启动子使菌体的生长与目的产物生产阶段分开, 从而达到在特定时期生产某种产物的目的。本实验所涉及的槐糖脂代谢途径中的诱导型启动子如  $P_{CYP52M1}$  等, 可为目的基因的表达调控提供新的表达元件和工具。此外, 由于槐糖脂代谢途径中关键基因启动子活性较低, 也可以利用所筛选的强启动子进行表达, 从而提高槐糖脂的产量。槐糖脂的生物合成涉及葡萄糖和油酸的共同代谢, 尤其是涉及细胞色素氧化酶、葡萄糖基转移酶及相应的辅酶因子, 这也就意味着在进行菌株改造的过程中必须全面考虑细胞的代谢平衡, 因此在后续的菌株改造过程中, 可以利用不同强度启动子组合应用来调控基因的表达水平。

熊蜂生假丝酵母菌全基因组序列信息虽已公开发表, 但是功能已知的基因序列相对较少, 因此仍需要进一步全面地挖掘基因组信息。有文献报道, 于酿酒酵母中利用转录组基因芯片的方法在不同碳源发酵条件下对启动子进行表征<sup>[33]</sup>, 其结果的准确性也十分可靠。因此, 利用转录组学的手段及新一代测序技术<sup>[34]</sup>, 并借助生物信息学数据分析的方法<sup>[35]</sup>, 对不同条件下的基因转录水平进行分析, 将更有利于探究菌株在不同生长条件下基因的表达调节及代谢调控。也有文献报道, 通过对熊蜂生假丝酵母中槐糖脂合成关键基因 *Bro1* 的敲除, 分析其对自身基因如脂肪酸 $\beta$ 氧化途径及 $\omega$ 氧化途径转录组水平的变化, 来探究该基因的缺失对槐糖脂合成途径的影响<sup>[17]</sup>。因此可以进一步通过分析该文献中基因转录水平数据如 *fox2*、*pot1*、*slat* 及 *sble* 等基因, 获得其可能的高强度启动子, 同时转录组学分析也为如何提高槐糖脂的产量提供了一个新的思路与途径。

本研究筛选得到的启动子丰富了合成生物学元件,具有良好的应用前景,为启动子的改造及熊蜂生假丝酵母在基因工程改造和基因表达调控方面奠定了理论基础。

## REFERENCES

- [1] Daverey A, Pakshirajan K, Sumalatha S. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater[J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2011, 13(3): 481-488
- [2] Pekin G, Vardar-Sukan F, Kosaric N. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey[J]. Engineering in Life Sciences, 2005, 5(4): 357-362
- [3] Develter DWG, Laurysen LML. Properties and industrial applications of sophorolipids[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2010, 112(6): 628-638
- [4] Ciesielska K, Roelants SLKW, Bogaert INA, Waele S, Vandenberghe I, Groeneboer S, Soetaert W, Devreese B. Characterization of a novel enzyme—*Starmerella bombicola* lactone esterase (SBLE)—responsible for sophorolipid lactonization[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(22): 9529-9541
- [5] Saerens KMJ, Roelants SLKW, Van Bogaert INA, Soetaert W. Identification of the UDP-glucosyltransferase gene *UGTA1*, responsible for the first glucosylation step in the sophorolipid biosynthetic pathway of *Candida bombicola* ATCC 22214[J]. FEMS Yeast Research, 2011, 11(1): 123-132
- [6] Saerens KMJ, Zhang JX, Saey L, Van Bogaert INA, Soetaert W. Cloning and functional characterization of the UDP-glucosyltransferase UgtB1 involved in sophorolipid production by *Candida bombicola* and creation of a glucolipid-producing yeast strain[J]. Yeast: Chichester, England, 2011, 28(4): 279-292
- [7] Xiong XC, Chen SL. Expanding toolbox for genes expression of *Yarrowia lipolytica* to include novel inducible, repressible, and hybrid promoters[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(8): 2208-2213
- [8] Yamanishi M, Katahira S, Matsuyama T. TPS1 Terminator increases mRNA and protein yield in a *Saccharomyces cerevisiae* expression system[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011, 75(11): 2234-2236
- [9] Shabbir Hussain M, Gambill L, Smith S, Blenner MA. Engineering promoter architecture in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(3): 213-223
- [10] Curran KA, Crook NC, Karim AS, Gupta A, Wagman AM, Alper HS. Design of synthetic yeast promoters via tuning of nucleosome architecture[J]. Nature Communications, 2014, 5: 4002
- [11] Blazeck J, Garg R, Reed B, Alper HS. Controlling promoter strength and regulation in *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic hybrid promoters[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(11): 2884-2895
- [12] Nevoigt E, Kohnke J, Fischer CR, Alper H, Stahl U, Stephanopoulos G. Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5266-5273
- [13] Hubmann G, Thevelein JM, Nevoigt E. Natural and modified promoters for tailored metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1152: 17-42
- [14] Zhang JR. Metabolic engineering of *Starmerella bombicola* for producing acid-type sophorolipid[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2019 (in Chinese)  
张疆睿. 代谢工程改造熊蜂生假丝酵母生产酸型槐糖脂[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2019
- [15] Van Bogaert INA, De Maeseneire SL, Develter D, Soetaert W, Vandamme EJ. Development of a transformation and selection system for the glycolipid-producing yeast *Candida bombicola*[J]. Yeast: Chichester, England, 2008, 25(4): 273-278
- [16] Lodens S, Roelants SLKW, Luyten G, Geys R, Coussemant P, De Maeseneire SL, Soetaert W. Unraveling the regulation of sophorolipid biosynthesis in *Starmerella bombicola*[J]. FEMS Yeast Research, 2020, 20(3): foaa021
- [17] Liu J, Li JS, Gao N, Zhang XY, Zhao GQ, Song X. Identification and characterization of a protein Bro1 essential for sophorolipids synthesis in *Starmerella bombicola*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2020, 47(4/5): 437-448
- [18] Lee JW, Kim TY, Jang YS, Choi S, Lee SY. Systems metabolic engineering for chemicals and materials[J]. Trends in Biotechnology, 2011, 29(8): 370-378
- [19] Cormack BP, Bertram G, Egerton M, Gow NAR, Falkow S, Brown AJP. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*[J]. Microbiology, 1997, 143(2): 303-311
- [20] Saerens KMJ, Saey L, Soetaert W. One-step production of unacetylated sophorolipids by an acetyltransferase negative *Candida bombicola*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2011, 108(12): 2923-2931
- [21] Rosochacki SJ, Matejczyk M. Green fluorescent protein as a molecular marker in microbiology[J]. Acta Microbiologica Polonica, 2002, 51(3): 205-216
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [23] Quax TEF, Claessens NJ, Söll D, Van Der Oost J. Codon bias as a means to fine-tune gene expression[J]. Molecular Cell, 2015, 59(2): 149-161

- [24] Keren L, Zackay O, Lotan-Pompan M, Barenholz U, Dekel E, Sasson V, Aidelberg G, Bren A, Zeevi D, Weinberger A, et al. Promoters maintain their relative activity levels under different growth conditions[J]. *Molecular Systems Biology*, 2013, 9: 701
- [25] Sun J, Shao ZY, Zhao H, Nair N, Wen F, Xu JH, Zhao HM. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(8): 2082-2092
- [26] Williams TC, Espinosa MI, Nielsen LK, Vickers CE. Dynamic regulation of gene expression using sucrose responsive promoters and RNA interference in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 1-10
- [27] Lee ME, Aswani A, Han AS, Tomlin CJ, Dueber JE. Expression-level optimization of a multi-enzyme pathway in the absence of a high-throughput assay[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(22): 10668-10678
- [28] Du J, Yuan YB, Si T, Lian JZ, Zhao HM. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(18): 177-209
- [29] Peng BY, Williams TC, Henry M, Nielsen LK, Vickers CE. Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 91
- [30] Zhang K, Su LQ, Duan XG, Liu LN, Wu J. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 32
- [31] Tang RQ, Xiong L, Bai FW, Zhao XQ. Activity comparison of the artificial hybrid promoter with its native promoter in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(1): 120-128 (in Chinese)  
唐瑞琪, 熊亮, 白凤武, 赵心清. 酿酒酵母人工杂合启动子与天然启动子活性比较[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(1): 120-128
- [32] Yu JH, Ma WW, Wang ZW, Chen T, Zhao XM. Progress in synthetic promoter library[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(1): 198-204 (in Chinese)  
余君涵, 马雯雯, 王智文, 陈涛, 赵学明. 人工合成启动子文库研究进展[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(1): 198-204
- [33] Lovén J, Orlando DA, Sigova AA, Lin CY, Rahl PB, Burge CB, Levens DL, Lee TI, Young RA. Revisiting global gene expression analysis[J]. *Cell*, 2012, 151(3): 476-482
- [34] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621-628
- [35] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data[J]. *Nature Precedings*, 2010: 1