

# 酿酒酵母中苜蓿源诱导型转录调控工具的构建与应用

冯镁琳<sup>1</sup>, 史彩芳<sup>1</sup>, 王颖<sup>1\*</sup>, 李春<sup>1,2\*</sup>

1 北京理工大学 化学与化工学院 生物化工研究所 医药分子科学与制剂工程工信部重点实验室, 北京 100081

2 清华大学 化学工程系, 北京 100084

冯镁琳, 史彩芳, 王颖, 李春. 酿酒酵母中苜蓿源诱导型转录调控工具的构建与应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 363-375.

FENG Meilin, SHI Caifang, WANG Ying, LI Chun. Construction and application of an inducible transcriptional regulatory tool from *Medicago truncatula* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 363-375.

**摘要:** 基于转录因子的转录调控是广泛应用于微生物细胞工厂的一种有效的调控方式。目前, 已实现应用的酿酒酵母内源天然转录调控元件较少, 且存在基础表达高或动态范围窄等问题, 无法满足异源化合物的特定代谢调控需求。植物中含有丰富的转录调控元件, 但大多元件的序列和功能尚未充分表征和优化, 在微生物细胞工厂中的应用更是处于初级阶段。本研究选取了蒺藜苜蓿中天然调控元件, 包括转录因子 MtTASR2 和 MtTASR3 以及其结合的启动子  $P_{roHMGR1}$ , 对其进行功能表征和工程化改造, 构建了诱导型转录调控工具, 并将其应用于酿酒酵母中  $\beta$ -胡萝卜素异源合成途径的特异性调控, 使  $\beta$ -胡萝卜素产量相比出发菌株提高 7.31 倍。本研究进一步证明了植物源转录调控元件可用于调节酿酒酵母中基因的表达, 为在微生物细胞工厂中的特异性调控和应用提供了新的策略和思路。

**关键词:** 转录因子; 调控元件; 酿酒酵母;  $\beta$ -胡萝卜素; 合成生物学

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901800); 国家自然科学基金(22078020, 22378022)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901800) and the National Natural Science Foundation of China (22078020, 22378022).

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Ying, wy2015@bit.edu.cn; LI Chun, lichun@tsinghua.edu.cn

Received: 2024-03-10; Accepted: 2024-05-15; Published online: 2024-05-16

## Construction and application of an inducible transcriptional regulatory tool from *Medicago truncatula* in *Saccharomyces cerevisiae*

FENG Meilin<sup>1</sup>, SHI Caifang<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1\*</sup>, LI Chun<sup>1,2\*</sup>

1 Key Laboratory of Medicinal Molecule Science and Pharmaceutical Engineering, Ministry of Industry and Information Technology, Institute of Biochemical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

2 Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Abstract:** Transcriptional regulation based on transcription factors is an effective regulatory method widely used in microbial cell factories. Currently, few naturally transcriptional regulatory elements have been discovered from *Saccharomyces cerevisiae* and applied. Moreover, the discovered elements cannot meet the demand for specific metabolic regulation of exogenous compounds due to the high background expression or narrow dynamic ranges. There are abundant transcriptional regulatory elements in plants. However, the sequences and functions of most elements have not been fully characterized and optimized. Particularly, the applications of these elements in microbial cell factories are still in the infancy stage. In this study, natural regulatory elements from *Medicago truncatula* were selected, including the transcription factors MtTASR2 and MtTASR3, along with their associated promoter P<sub>roHMGR1</sub>, for functional characterization and engineering modification. We constructed an inducible transcriptional regulation tool and applied it in the regulation of heterologous  $\beta$ -carotene synthesis in *S. cerevisiae*, which increased the  $\beta$ -carotene production by 7.31 folds compared with the original strain. This study demonstrates that plant-derived transcriptional regulatory elements can be used to regulate the expression of multiple genes in *S. cerevisiae*, providing new strategies and ideas for the specific regulation and application of these elements in microbial cell factories.

**Keywords:** transcription factors; regulatory elements; *Saccharomyces cerevisiae*;  $\beta$ -carotene; synthetic biology

合成生物学与代谢工程的发展推动了微生物细胞工厂的兴起,使其在生物医药、生物燃料等领域得以广泛应用<sup>[1]</sup>。酿酒酵母作为一种模式微生物<sup>[2]</sup>,具有遗传背景清晰、基因操作成熟、培养方式简单等优势,已经实现了多种高附加值化合物的异源合成,例如青蒿酸<sup>[3]</sup>、甘草次酸<sup>[4]</sup>、长春花碱<sup>[5]</sup>等。为了提高微生物细胞工厂中目标化合物的合成效率,传统的代谢调控策略<sup>[6]</sup>包括直接敲除、下调或过表达代谢

途径基因以及关键酶的改造等。然而,由于代谢途径的高度复杂性,这些策略容易导致代谢流失衡,产生中间代谢物积累、辅因子失衡和细胞生长受损<sup>[7]</sup>等问题。

转录调控是酵母内基因表达的主要调节机制之一<sup>[8]</sup>,它通过调节不同基因的转录活性,使细胞可以根据外部或内部环境的变化来调整蛋白质的合成,从而适应不同的生长条件和生物学过程。转录调控系统具有单点调控、多点

调控和动态调控的特点<sup>[9]</sup>,可以同时调节多个基因以实现动态代谢平衡,对其进行设计、改造并应用于目标产物合成途径与代谢网络的调控,有利于构建高效的微生物细胞工厂。

转录因子和启动子序列是转录调控过程中的主要元件<sup>[10]</sup>,二者的相互结合可以促进或抑制基因转录的蛋白质合成。目前,酵母内已发现并实现工程化应用的天然转录调控系统较少,包括铜诱导系统<sup>[11]</sup>的  $P_{CUP1}$  启动子和 ACE1 转录因子、半乳糖诱导系统<sup>[12]</sup>的  $P_{GAL1/2/7/10}$  启动子和 Gal80、Gal4 转录因子等。这些天然的调控系统往往基础表达高、动态范围窄,对于多个通路基因的表达控制并不是最佳选择,通常需要对其进行工程化修饰,以构建低基础表达和宽动态范围的理想调控系统。另一方面,采用内源转录调控元件进行异源途径工程<sup>[13]</sup>可能会对细胞造成代谢负担,使目标化合物的合成与细胞的增殖和生长竞争,当需要正交<sup>[14]</sup>(对天然细胞过程的最小干扰)和时序调控的系统时是不可取的。为了解决上述问题,需要特异的转录因子和启动子元件来控制酵母中基因的表达,使生物量积累与随后的目标产物生产阶段相对分离,实现异源基因的可控表达。

研究表明,植物中的特异性转录因子能选择性调控某种或某些基因的转录表达<sup>[15]</sup>,影响植物适应干旱、高盐、低温、激素、病原反应及生长发育等生物学功能<sup>[16]</sup>,如 WRKY 转录因子家族(WRKY transcription factor family, WRKY)、碱性螺旋-环-螺旋转录因子家族(basic helix-loop-helix transcription factor family, bHLH)、碱性亮氨酸拉链转录因子家族(basic leucine zipper transcription factor family, bZIP)、MYB 转录因子家族(MYB transcription factor family, MYB)、NAC 转录因子家族(NAM, ATAF1/2, and CUC2 transcription factor family,

NAC)、热激转录因子家族(heat shock factor transcription factor family, HSF)等。植物来源的转录因子一般在酵母单杂交<sup>[17]</sup>和双杂交<sup>[18]</sup>筛选框架中表达,以鉴定和定义互作的启动子或蛋白质,这些实验成功证明了植物源转录因子在酵母中通常具有功能性。目前,植物源转录因子在生物和非生物胁迫中的功能和调控机制已得到深入研究<sup>[19]</sup>,但它们在微生物细胞工厂中的应用研究还处于初级阶段<sup>[20]</sup>,很多相关元件的序列和功能还没有得到充分的鉴定和表征。由于酵母和植物之间有着遥远的亲缘关系<sup>[21]</sup>,酵母内源几乎没有植物转录因子的结合位点,引入植物源转录调控元件不会影响宿主细胞基因的表达,对酵母天然细胞过程干扰最小。因此,植物源的转录调控元件可以作为酵母细胞工厂调控的理想候选基因。Naseri 等<sup>[22]</sup>构建了一套拟南芥来源的人工转录因子(artificial transcription factors/ binding site, ATF/BS),用于正交调控基因表达,并将其整合到毕赤酵母的 *GUT* 位点,结果表明植物源调控元件相比较于强组成型启动子  $P_{GAPDH}$  有更高的转录能力。Srivastava 等<sup>[23]</sup>从野生红豆中分离出 2 个 NAC 家族的转录因子 VuNAC1 和 VuNAC2,引入酿酒酵母中进行诱导表达,提高了菌株对外界胁迫的耐受性,促进了酵母细胞生长。

本研究在酿酒酵母中表征了蒺藜苜蓿来源的天然转录调控元件的功能,并对转录因子和启动子元件进行改造优化,构建了一系列诱导型转录调控工具,最终将其应用于酿酒酵母中  $\beta$ -胡萝卜素的异源合成。研究进一步证明了植物源转录调控元件是在酵母中建立诱导转录单元的有效工具,可用于调节宽量级的基因表达,为植物源转录调控元件在微生物细胞工厂中的特异性调控和应用提供了新的策略和思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株、质粒和培养基

本研究所使用的酿酒酵母出发菌株包括 BY4741、INVSc1、EBY102-124、 $\beta$ -1, 均为实验室保藏菌株; 所使用的质粒包括 POT3-Ura 和 pESC-Ura, 均为实验室保藏质粒; 用于构建和富集质粒的大肠杆菌为 DH5 $\alpha$ 。本研究涉及的所有菌株和质粒均列于表 1。

LB 培养基用于大肠杆菌培养: 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, 配制固体培养基时需添加 20 g/L 琼脂粉, 按需添加 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素。

合成葡萄糖基础培养基(synthetic dextrose minimal medium, SD)用于酵母菌株培养: 无氨基酵母氮源(yeast nitrogen base, YNB) 6.7 g/L, 葡萄糖 20 g/L (配制半乳糖诱导培养基时为半乳糖 20 g/L), 配制固体培养基时需添加 20 g/L 琼脂粉, 缺陷型氨基酸混合物 0.8 g/L, 亮氨酸 60 mg/L, 组氨酸 20 mg/L, 色氨酸 20 mg/L, 尿嘧啶 20 mg/L (以上 4 种氨基酸为可选择的缺陷型), 使用氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.2。

酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基(yeast extract peptone dextrose, YPD)用于酵母菌株发酵生产  $\beta$ -胡萝卜素: 酵母提取物 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 胰蛋白胨 20 g/L, 配制固体培养基时需添加 20 g/L 琼脂粉。

### 1.2 质粒与菌株构建

所有分子操作均按照标准程序进行, 各基因片段使用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 扩增, 各质粒使用 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 进行组装。重组产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 测序验证正确克隆。聚合酶和重组酶均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

所有酿酒酵母工程菌株均通过酵母电转化方法构建, 并在含有相应营养缺陷型标记的固体培养基上选择阳性克隆。以质粒导入的形式构建所有表征荧光表达水平的酵母菌株。生产  $\beta$ -胡萝卜素的工程菌株中各基因表达盒整合至酿酒酵母 *YPRC3* 位点。

### 1.3 工程菌株中的基因诱导表达

半乳糖诱导: 将含有 *P<sub>GALI</sub>* 启动子的重组菌株在含有 20 g/L 葡萄糖的培养基中 30  $^{\circ}$ C 和 200 r/min 培养 24 h, 离心后收集酵母细胞, 用无菌 ddH<sub>2</sub>O 洗涤, 然后将其重新悬浮在含有 20 g/L 半乳糖的培养基中 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h。

低温诱导: 以 EBY102-124 为出发菌株的低温响应菌株, 在 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下发酵 24 h 后, 将发酵温度调整至 24  $^{\circ}$ C 低温诱导, 继续培养 24 h。

$\beta$ -雌二醇诱导: 含有  $\beta$ -雌二醇诱导型启动子的重组菌株, 用 1  $\mu$ mol/L  $\beta$ -雌二醇溶液在发酵周期的 24 h 或 48 h 进行诱导培养。

### 1.4 *OD*<sub>600</sub> 和荧光检测

*OD*<sub>600</sub> 检测: 取适量的菌液稀释一定的倍数, 加入等体积混合均匀的稀释样品, 置于 96 孔白色酶标板检测, 使用酶标仪测定样品在 600 nm 波长下的吸光度, 同组实验的 3 个平行中, 每个平行数据测定 3 次, 取平均值。取信区间为 0.2–1.0, 超出此范围则实际生物量与读数不成线性。

荧光检测: 取 100  $\mu$ L 的发酵液加入 96 孔黑色酶标板中, 将酶标板置于酶标仪载板台上进行荧光强度的检测。设置检测参数: 绿色荧光蛋白的激发波长为 405 nm, 发射波长为 525 nm。同组实验的 3 个平行中, 每个平行数据测定 3 次, 取平均值。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Original strain	Characteristic	Source
DH5 $\alpha$	<i>Escherichia coli</i>	<i>F-<math>\phi</math>80 lac Z<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math> (lacZYA-arg F) U169 endA1 recA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44<math>\lambda</math>-thi-1 gyrA96 relA1 phoA</i>	Lab store
POT3-Ura	DH5 $\alpha$	<i>Amp<sup>r</sup></i>	Lab store
pESC-Ura	DH5 $\alpha$	<i>Amp<sup>r</sup></i>	Lab store
BY4741	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>MATa Ura3<math>\Delta</math>0 Leu2<math>\Delta</math>0 His3<math>\Delta</math>1 met15<math>\Delta</math>0, SY022</i>	Lab store
INVSc1	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> His3<math>\Delta</math>1Leu2 Trp 1-289 Ura3-52</i>	Lab store
EBY102-124	EBY100	<i><math>\Delta</math>Aga1::P<sub>GAL1</sub>-Aga1_Leu2</i> <i><math>\Delta</math>GAL4::P<sub>GAL10</sub>-GgbAS-P<sub>ACT1</sub>-GAL4M9_Trp1</i> <i><math>\Delta</math>GAL80::P<sub>GAL1</sub>-Aga2-CGT</i> <i>NTS::P<sub>TPH1</sub>-tHMG1-P<sub>TEF1</sub>-Erg20-P<sub>GPM1</sub>-Erg9-P<sub>TYSI</sub>-Erg1_HygR</i>	Lab store
$\beta$ -1	BY4742	<i>YPRC3::P<sub>TEF1</sub>-crtE-T<sub>TEF1</sub>-P<sub>FBA1</sub>-crtI-T<sub>FBA1</sub>-P<sub>TEF2</sub>-crtYB-T<sub>TEF2</sub>_Ura3</i>	Lab store
B01	BY4741	<i>POT3-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
B02	BY4741	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
B03	BY4741	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR3Y-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
I01	INVSc1	<i>POT3-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
I02	INVSc1	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
I03	INVSc1	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR3Y-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E01	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E02	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E03	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR3Y-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
ConMt	EBY102-124	<i>POT3_Ura3</i>	This study
TsetMt	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E04	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-sP<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E05	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-P<sub>roHMG1A</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E06	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-P<sub>roHMG1B</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E07	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-P<sub>roHMG1C</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E08	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-P<sub>roHMG1D</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E09	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-P<sub>roHMG1E</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E10	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>GAL1</sub>-MtTASR2Y-P<sub>roHMG1F</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
E12	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>Estro</sub>-MtTASR2Y-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
FacstASR2Y	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>Estro</sub>-MtTASR2Y*-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
Facs1-20	EBY102-124	<i>POT3-P<sub>Estro</sub>-MtTASR2Y*<sup>1-20</sup>-P<sub>roHMG1</sub>-eGFP-T<sub>CYCL1</sub>_Ura3</i>	This study
$\beta$ -2	$\beta$ -1	<i>YPRC3::P<sub>Estro</sub>-MtTASR2Y*<sup>11</sup>-P<sub>roHMG1</sub>-crtE-T<sub>TEF1</sub>-P<sub>FBA1</sub>-crtI-T<sub>FBA1</sub>-P<sub>TEF2</sub>-crtYB-T<sub>TEF2</sub>_Ura3</i>	This study
$\beta$ -3	$\beta$ -1	<i>YPRC3::P<sub>TEF1</sub>-crtE-T<sub>TEF1</sub>-P<sub>Estro</sub>-MtTASR2Y*<sup>11</sup>-P<sub>roHMG1</sub>-crtI-T<sub>FBA1</sub>-P<sub>TEF2</sub>-crtYB-T<sub>TEF2</sub>_Ura3</i>	This study
$\beta$ -4	$\beta$ -1	<i>YPRC3::P<sub>TEF1</sub>-crtE-T<sub>TEF1</sub>-P<sub>FBA1</sub>-crtI-T<sub>FBA1</sub>-P<sub>Estro</sub>-MtTASR2Y*<sup>11</sup>-P<sub>roHMG1</sub>-crtYB-T<sub>TEF2</sub>_Ura3</i>	This study

## 1.5 转录组样品准备与分析方法

将待送转录组酵母菌株培养过夜，以初始  $OD_{600}$  为 0.1 接种至 SD/-Trp/-His/-Leu/-Ura 培养基

中，30 °C、200 r/min 培养 24 h 后，更换培养温度为 24 °C 继续培养 24 h。5 000 r/min 离心 2 min 收集菌体，5 min 之内使用液氮速冻，放

置超低温冰箱暂存, 由北京博云华康基因科技有限公司 DNBSEQ 测序平台进行转录组测序。获得可信的测序结果后, 采用 DEseq2 进行差异基因表达分析, 通过火山图查看基因在 2 个差异比较样品中表达水平的差异。

## 1.6 突变体文库的构建与筛选

使用即用型易错 PCR 试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司)对转录因子 MtTASR2Y 进行连续 3 轮易错 PCR 扩增; 在两侧设计方向相反的引物使用聚合酶扩增载体。将随机突变得到的片段与带有重叠区的线性化载体一起电转化至酿酒酵母中, 利用其质粒缺口修复功能组装成完整的质粒表达盒, 在酵母中构建突变体文库。

将酵母文库细胞培养过夜, 以初始  $OD_{600}$  为 0.1 接种至 SD/-Trp/-His/-Leu/-Ura 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 24 h 后, 加入  $\beta$ -雌二醇诱导剂继续培养 24 h。5 000 r/min 离心 2 min 收集细胞, 用无菌磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 3 次, 并将酿酒酵母细胞稀释至  $10^7$ /mL。使用细胞分选仪 BD FACSArica III 对发绿色荧光的阳性细胞进行分离, 分选出绿色荧光强度高的细胞并接种在 SD/-Trp/-His/-Leu/-Ura 固体培养基上, 以获得单菌落。

将单个菌落挑入含有 1.0 mL SD/-Trp/-His/-Leu/-Ura 液体培养基的 96 深孔板中进行重新筛选, 每组实验设置 3 个平行。发酵条件为 30 °C、200 r/min, 24 h 后加入  $\beta$ -雌二醇诱导剂。48 h 后取不同体积的发酵液, 使用酶标仪测量  $OD_{600}$  和荧光强度。

## 1.7 发酵产物的处理与检测

$\beta$ -胡萝卜素的提取采用酸热法<sup>[24]</sup>, 处理过程中需避光进行, 具体过程为: 取 1–2 mL 发酵菌液 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清; 加入 1 mL 无菌水水洗, 12 000 r/min 离心 2 min 后弃

上清; 加入 1 mL 的 3 mol/L 盐酸, 使用涡旋仪振荡重悬细胞, 沸水浴 3 min 后立即冰浴 2 min, 12 000 r/min 离心 2 min 后弃上清; 加入 1 mL 无菌水进行水洗, 12 000 r/min 离心 2 min 吸弃上清; 加入 1 mL 丙酮, 使用涡旋仪充分振荡 30 min (每隔 10 min 反转几次)直至细胞无色。12 000 r/min 离心 2 min 后将萃取液使用 0.22  $\mu$ m 有机相滤膜过滤, 并转移至液相小瓶中。

使用 Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪检测  $\beta$ -胡萝卜素产量。所用色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m), 柱温为 40 °C。流动相比比例为甲醇: 乙腈: 异丙醇=3:5:2, 流速为 1 mL/min。检测采用紫外检测器(diode array detector, DAD), 测定波长为 453 nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 苜蓿源调控元件的获取及诱导型转录调控工具的构建

通过文献调研, 获得了与萜类化合物合成相关的蒺藜苜蓿源转录调控元件, 包括转录因子 MtTASR2<sup>[25]</sup>和 MtTASR3<sup>[26]</sup>以及对应结合的特异性启动子  $P_{roHMGR1}$ , 在蒺藜苜蓿中激活 3 种细胞色素 P450 酶 CYP716A12、CYP72A67、CYP72A68 和  $\beta$ -香树脂醇合酶等相关酶基因的表达。利用在线密码子分析网站(<http://www.jcat.de/>)将转录因子进行酿酒酵母密码子优化, 优化后得到的序列分别命名为 MtTASR2Y、MtTASR3Y。选择酵母内源诱导型强启动子  $P_{Gal1}$  来启动转录因子的表达, 苜蓿源启动子激活绿色荧光蛋白(eGFP)的表达, 采用单拷贝质粒 POT3 作为表达载体, 酿酒酵母作为宿主菌株, 具体基因线路如图 1 所示。在没有半乳糖诱导的情况下, 转录因子不表达, 启动子  $P_{roHMGR1}$  不启动, 从而不激活下游基因绿色荧光蛋白的

转录；一旦加入半乳糖诱导  $P_{Gal1}$  启动子表达，转录因子与苜蓿源启动子结合，激活  $P_{roHMGR1}$ ，进而实现绿色荧光蛋白的表达。绿色荧光蛋白的表达水平以单位荧光强度来衡量，使用诱导与不诱导时单个细胞荧光强度的差异评估苜蓿源转录调控工具的程度，详见公式(1)。

$$\text{调控强度} = \frac{\text{诱导菌株荧光强度} / \text{诱导菌株 } OD_{600} - \text{不诱导菌株荧光强度} / \text{不诱导菌株 } OD_{600}}{\text{不诱导菌株荧光强度} / \text{不诱导菌株 } OD_{600}} \quad (1)$$

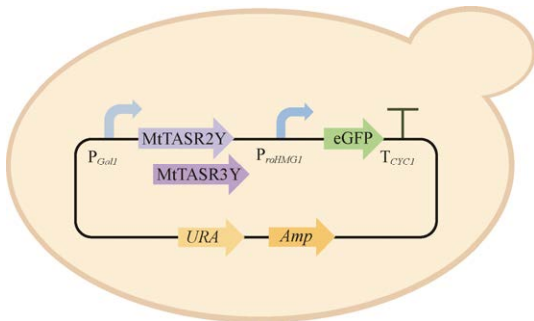


图 1 诱导型转录调控工具构建示意图  
Figure 1 Schematic diagram of inducible transcriptional regulatory tools construction.

## 2.2 诱导型转录调控工具的功能表征

将上述构建的诱导型转录调控质粒分别转入酿酒酵母工程菌株 EBY102-124、单倍体菌株 BY4741、二倍体菌株 INVSc1 中，以只表达苜蓿源启动子  $P_{roHMGR1}$ ，不表达转录因子的菌株 E01、B01、I01 为对照，对元件 MtTASR2Y- $P_{roHMGR1}$  (菌株 E02、B02、I02)，MtTASR3Y- $P_{roHMGR1}$  (菌株 E03、B03、I03) 进行功能验证。将上述工程菌株分别接种到 5 mL SD/-Trp/-His/-Leu/-Ura 液体培养基中进行试管发酵，发酵初始碳源为葡萄糖，发酵初始  $OD_{600}$  控制为 0.1，每株菌设置 3 个平行。培养 24 h 后，以 BY4741、INVSc1 为底盘菌的工程菌更换半乳糖诱导型培养基培养，以 EBY102-124 工程菌为底盘菌的工程菌调整发酵温度为 24 °C 低温诱导。培养 48 h 后，取 100  $\mu$ L 发酵液加入 96 孔黑色酶标板中进行  $OD_{600}$  检测及荧光检测，获得转录因子诱导表达后的荧光数据。如图 2A 所示，仅含启动子  $P_{roHMGR1}$  的菌株诱导后的单位荧光强度略微下降，表明单独的苜蓿源启动子不发挥诱导

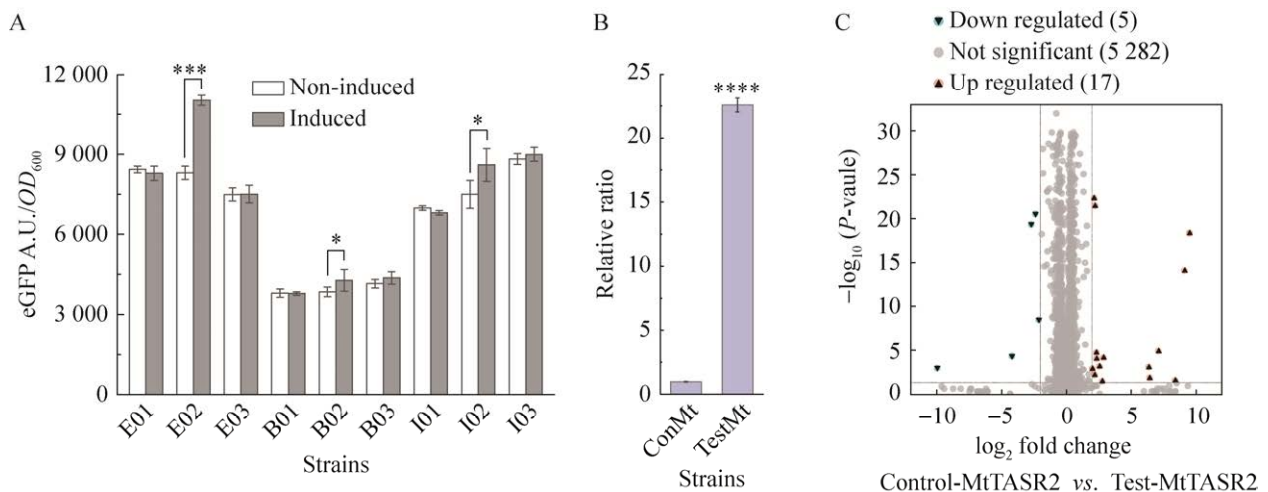


图 2 诱导型转录调控工具功能验证 A: 稳定性验证; B: MtTASR2Y 在酿酒酵母中的相对表达量; C: 差异表达基因火山图。

Figure 2 Functional verification of inducible transcriptional regulatory tools. A: Stability verification; B: Relative ratio of MtTASR2Y in *S. cerevisiae*; C: Volcano map of differentially expressed genes. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

激活功能。菌株 E02、B02、I02 诱导后单位荧光强度增加,诱导型转录调控工具的调控强度分别为 32.88%、11.38%和 14.67%,证实了 MtTASR2Y- $P_{roHMGR1}$  调控元件为诱导激活型转录调控元件,且在不同底盘中性能稳定,特别是在 EBY102-124 底盘中诱导激活效果最佳。而菌株 E03、B03、I03 诱导后的单位荧光强度与不诱导时趋于一致,可能是由于物种差异、蛋白结构差异或者细胞环境的差异所致。当苜蓿源转录因子 MtTASR3Y 被引入酿酒酵母中时,无法与酵母细胞内部的转录机制有效地配合,导致 MtTASR3Y 不能正常发挥其在植物中的功能,故不对其进行下一步研究。

为证明转录调控元件 MtTASR2Y 为特异性调控因子,进一步考察其是否不结合酿酒酵母内源启动子,只特异性地结合苜蓿源启动子  $P_{roHMGR1}$ 。构建了仅用启动子  $P_{Gall}$  表达转录因子 MtTASR2Y 的质粒,并将其和空载体 POT3 共同转入 EBY102-124 菌株中,用荧光定量 PCR 验证转录因子是否能正确表达。如图 2B 所示,含转录因子的实验组菌株 TestMt,其转录因子表达量显著高于空白对照菌株 ConMt,这表明在强诱导型启动子  $P_{Gall}$  的作用下,转录因子能够顺利激活。进一步利用转录组测序方

法<sup>[27]</sup>对转录因子表达后差异基因进行分析。结果表明(图 2C),相比于空白对照菌株,表达了转录因子 MtTASR2Y 的实验组菌株下调基因较少,说明苜蓿源转录因子 MtTASR2Y 可以在酿酒酵母中发挥功能,具有一定的正交性,推测其可能对苜蓿源启动子具有特定的结合和识别能力。

### 2.3 启动子序列优化

转录因子通过与启动子上顺式作用元件的结合来调节下游基因的表达,是基因表达调控中的关键因素。启动子上通常包含多个转录因子结合位点<sup>[28]</sup>,通过截短可以去除非关键序列,提高转录因子在特定位点结合的亲和性,减少潜在的交叉反应和非特异性结合,使得转录因子更专注于与目标位点相互作用。为获得更为精细的调控模块,对启动子  $P_{roHMGR1}$  进行 2 轮逐次截短,获得 P-A 至 P-F 系列启动子,并构建质粒转入酿酒酵母 EBY102-124,分别获得 E05、E06、E07、E08、E09、E10 菌株。此外,还验证了文献报道<sup>[25]</sup>的在烟草原生质体中与 MtTASR2Y 结合的 181 bp 序列  $sP_{roHMGR1}$  (菌株 E04)。发酵结果如图 3 所示,与菌株 E02 相比,诱导后菌株 E04-E10 荧光强度均降低,表明转录因子 MtTASR2Y 在酿酒酵母内对截短后

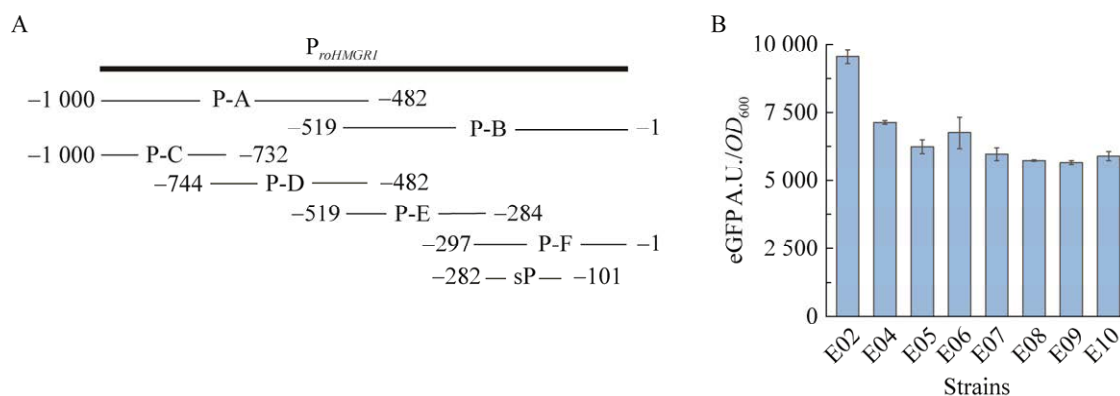


图 3  $P_{roHMGR1}$  启动子截短示意图(A)及菌株荧光表达水平(B)

Figure 3 Schematic diagram of the truncated  $P_{roHMGR1}$  (A) and fluorescent expression levels of strains (B).



的特异性启动子亲和性较低,因此全长的启动子  $P_{roHMGR1}$  对于 MtTASR2Y 转录因子在酿酒酵母内发挥转录活性是必需的。

## 2.4 转录因子优化与改造

利用半乳糖诱导型启动子  $P_{GALI}$  激活诱导型转录调控工具,会导致转录因子 MtTASR2Y 不同程度的泄露表达<sup>[29]</sup>,使菌株存在绿色荧光本底信号。相比之下,雌二醇诱导型启动子  $P_{Estro}$  是一种响应  $\beta$ -雌二醇诱导物的调控元件<sup>[30]</sup>,不受酿酒酵母内源基因调控网络的影响且不扰动内源代谢通路,使用  $1 \mu\text{mol/L}$  的  $\beta$ -雌二醇能够诱导目的基因高表达。因此,使用  $\beta$ -雌二醇诱导型启动子  $P_{Estro}$  (菌株 E12) 替换启动苜蓿源转录因子的半乳糖诱导型启动子  $P_{GALI}$ ,以减少菌株的背景表达。发酵结果表明(图 4A),菌株 E02 对应的诱导型转录调控工具调控强度为 32.14%;而在 E12 菌株中, MtTASR2Y 的表达由  $\beta$ -雌二醇诱导型启动子  $P_{Estro}$  诱导,表达效果更佳,对应的诱导型转录调控工具调控强度为 47.51%,因此后续实验选用  $\beta$ -雌二醇诱导型启动子  $P_{Estro}$  激活诱导型转录调控工具。同时,可以观察到菌株 E12 的本底荧光没有大幅度下降,可能是由于启动子  $P_{roHMGR1}$  的本底表达而不是转录因子 MtTASR2Y 的泄露表达引起的。

基于高通量筛选的非理性改造是当前改造诱导调控元件的普遍策略,由于其简单高效的特点而备受青睐。本研究通过对调控工具中的 MtTASR2Y 进行 3 轮易错 PCR 随机突变<sup>[31]</sup>,以绿色荧光蛋白表达水平来评估调控作用,构建了一个突变体文库质粒,并将其转入酿酒酵母,利用流式细胞分选技术对文库菌株进行高通量筛选,获得了约含 7 000 个苜蓿源转录因子 MtTASR2Y 突变体文库 FacsTASR2Y。从突变体文库中随机挑选了 475 个转化子,进行 96 深孔板发酵验证,其中最后一个孔为对照菌株。

培养 48 h 后,检测所有菌株  $OD_{600}$  和绿色荧光强度。结果显示(图 4B),构建的突变体文库拓宽了绿色荧光蛋白的表达范围,约 81.26% 的突变体菌株的单位荧光强度高于未突变的对照菌株。在这些突变体菌株中,挑选出单位荧光强度最高的 20 株突变体菌株进行了 2 轮发酵验证(图 4C),与对照菌株 E12 相比,菌株 Facs11 诱导后单位荧光强度有显著提高,进一步增强了苜蓿源转录调控工具的调控强度。菌株 Facs11 中的转录因子突变体 MtTASR2Y\* 和其原始序列的氨基酸序列比对结果如图 5 所示,为进一步分析 MtTASR2Y 的结构及功能提供了基础。

## 2.5 转录因子调控工具的应用

基于优化的苜蓿源转录因子调控工具,将其应用于菌株代谢通路中的通量控制。酿酒酵母中  $\beta$ -胡萝卜素通过甲羟戊酸途径(mevalonate pathway, MVA)<sup>[32]</sup>,由牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP)合酶(*crtE*)、八氢番茄红素去饱和酶(*crtI*)以及双功能八氢番茄红素合酶和番茄红素环化酶(*crtYB*)等外源基因<sup>[33]</sup>的共表达合成(图 6A)。当在酿酒酵母 BY4742 基因组上使用组成型启动子  $P_{TEF1}$ 、 $P_{FBA1}$ 、 $P_{TEF2}$  分别表达 *crtE*、*crtI* 和 *crtYB* 这 3 个基因时,菌株  $\beta$ -1 产生  $(5.2 \pm 0.5) \text{ mg/L}$  的  $\beta$ -胡萝卜素(图 6B)。

将菌株 Facs11 中的转录调控工具(MtTASR2Y\*<sup>11</sup>- $P_{roHMGR1}$ )整合至以 BY4742 为底盘的菌株  $\beta$ -1 基因组上,逐一替换 *crtE*、*crtI* 和 *crtYB* 的启动子(分别获得菌株  $\beta$ -2- $\beta$ -4)。对工程菌株发酵培养 120 h,在 48 h 添加  $\beta$ -雌二醇诱导剂,发酵结果如图 6B 所示。菌株  $\beta$ -2、 $\beta$ -3 和  $\beta$ -4 未添加  $\beta$ -雌二醇诱导时, $\beta$ -胡萝卜素产量分别为  $(10.9 \pm 0.7) \text{ mg/L}$ 、 $(11.8 \pm 0.9) \text{ mg/L}$  和  $(6.0 \pm 0.6) \text{ mg/L}$ ;添加  $\beta$ -雌二醇诱导后, $\beta$ -胡

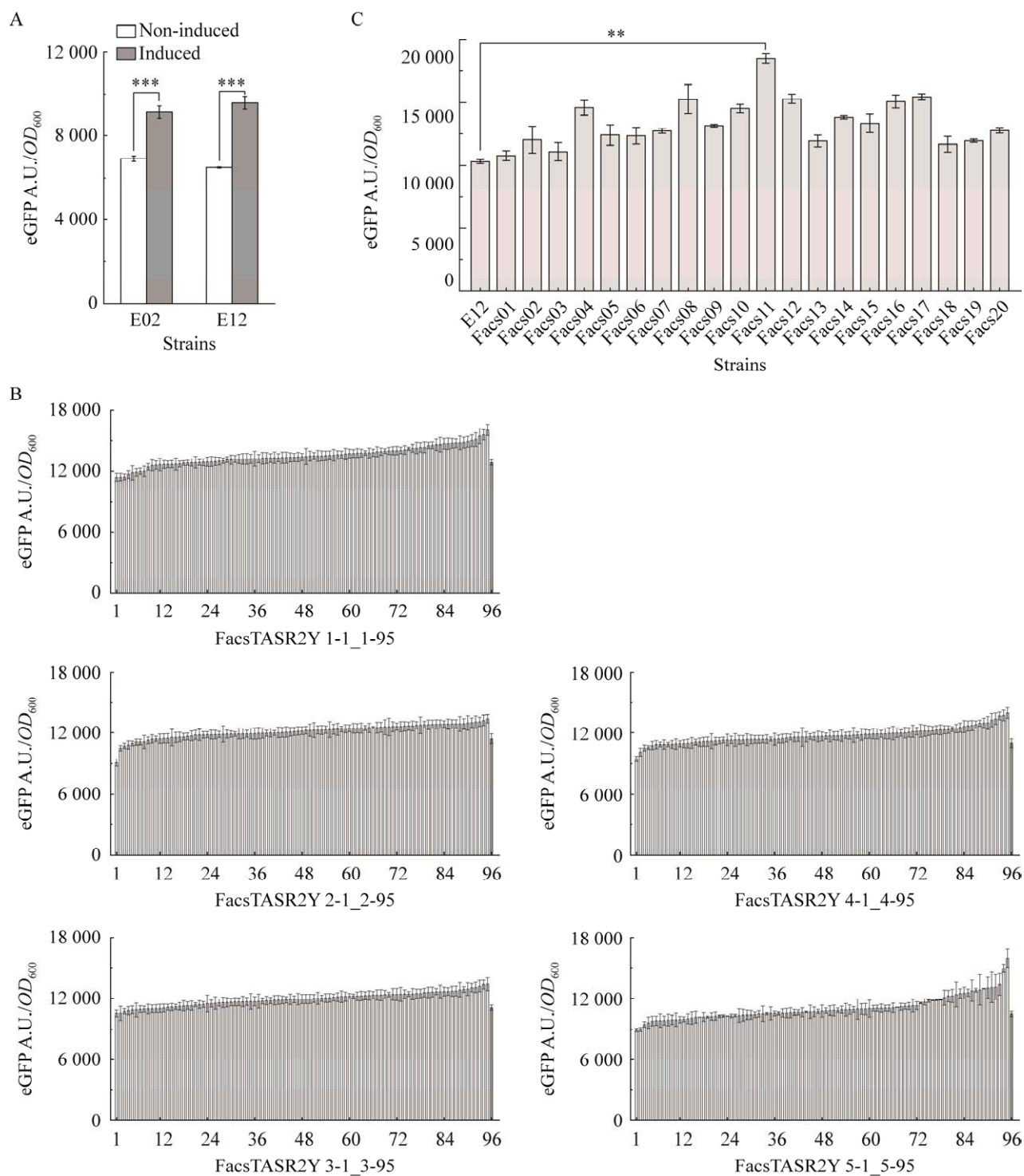


图4 转录因子 MtTASR2Y 的优化与改造 A: 更换 MtTASR2Y 启动子的菌株荧光表达水平; B: 突变体菌株荧光表达水平; C: 突变体菌株 2 轮筛选。

Figure 4 Optimization and modification of transcription factor MtTASR2Y. A: Fluorescent expression levels with replacing the promoter of MtTASR2Y; B: Fluorescence expression levels of mutant strains; C: Secondary screening of mutant strains. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

MtTASR2Y	1	M E E I N N S A M K V S S S I S S W L S D L E M D E Y N I F A E E C N L N F L D A D V G G F L S N D I S N V F Q E Q N K	60
MtTASR2Y*	1	M E E I N N S A M K V S S S I S S W L S D L E M D E Y N I F A E E C N L N F L D A E V G G F L S N D I S N V F Q E Q N E	60
MtTASR2Y	61	Q Q C L S L G S T F H E T I D N S D K N N E S L S P S F Q F Q V P S F D N P P N S S P T N S K E N I E T I P L S P T D L	120
MtTASR2Y*	61	Q Q C L S L G S T F H E T I D N S D K N N E S L S P S F Q F Q V P S F D N P P N S S P T N S K E N I E T I P L S P T D L	120
MtTASR2Y	121	E N M N H S T E T S K G S L E N K K L E T K T S K S K R P R A H G R D H I M A E R N R R E K L T Q S F I A L A A L V P N	180
MtTASR2Y*	121	E N M N H S T E T S K G S W E N K K L E T K T S V S K R P R A H G R D H I M A E R I R R E R L T Q S F I A L A A L V P N	180
MtTASR2Y	181	L K K M D K L S V L I D T I K Y M K E L K N R L E D V E E Q N K K T K K K S S T K P C L C S D E D S S S C E D N I E C V	240
MtTASR2Y*	181	L K K M D K L S V L I D T I K Y M K E L K N R L E D V E E Q N K K T K K K S S T K P C L C S D E D S S S C E D N I E C V	240
MtTASR2Y	241	V G S P F Q V E A R V L G K Q V L I R I Q C K E H K G L I V K I M V E I Q K F Q L F V V N N S V L P F G D S T L D I T I	300
MtTASR2Y*	241	V G S P F Q V E A R V L G K Q V L I R I Q C K E H K G L S V K I M V V I Q K F Q L F V V N N S V L P F G D S T L D I T I	300
MtTASR2Y	301	I A Q L G E G Y N L S I K E L V K N V R M A L L K F T S S	329
MtTASR2Y*	301	I A Q L G E G Y N L S I K E L V K N V R M A L L K F T S S	329

图5 转录因子 MtTASR2Y 及其突变体 MtTASR2Y\* 氨基酸序列比对

Figure 5 Transcription factor MtTASR2Y and its mutant MtTASR2Y\* amino acid sequences alignment.

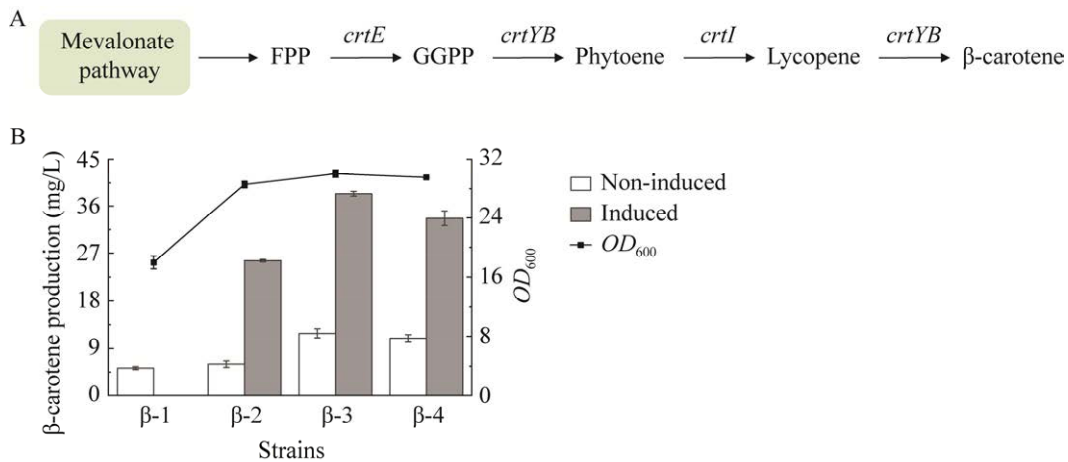


图6 诱导型转录调控工具调控  $\beta$ -胡萝卜素生物合成 A:  $\beta$ -胡萝卜素的合成途径; B: 工程菌株发酵结果。

Figure 6 Inducible transcriptional regulatory tools regulating  $\beta$ -carotene biosynthesis. A: Pathway of  $\beta$ -carotene synthesis; B: Fermentation results of engineered strains. FPP: Farnesyl diphosphate; GGPP: Geranylgeranyl diphosphate; *crtE*: GGPP synthase; *crtYB*: Bifunctional phytoene synthase and lycopene cyclase; *crtI*: Phytoene desaturase.

胡萝卜素产量分别为(25.7 $\pm$ 0.2) mg/L、(38.4 $\pm$ 0.5) mg/L和(33.6 $\pm$ 1.4) mg/L, 与各自未加入诱导剂的对照组相比,  $\beta$ -胡萝卜素产量分别提高了2.35、3.24和5.59倍。此外, 相较于使用组成型启动子的  $\beta$ -1 菌株, 引入苜蓿源转录调控工具的  $\beta$ -2、 $\beta$ -3 和  $\beta$ -4 菌株,  $\beta$ -胡萝卜素产量分别提高了4.89、7.31和6.41倍, 说明构建的苜蓿源诱导型转录调控工具可实现基因的有效表达,

并且能动态调控异源化合物的合成。

### 3 讨论与结论

酿酒酵母作为重要的真核生物模型<sup>[34]</sup>, 被广泛应用于微生物细胞工厂的构建。基因表达水平的微调对构建高效微生物细胞工厂至关重要, 其中转录因子和启动子作为主要转录调控元件是精确调控目的基因及代谢产物表达的有

力工具。然而, 酵母内天然调控元件较少, 通常受到其转录能力的限制, 应用时容易影响酵母内源调控网络, 并且无法时空调控单一或多个基因的表达。本研究使用来自蕈藜苜蓿的转录因子和启动子, 在酿酒酵母不同底盘中进行了功能表征, 构建了一套在酵母中稳定表达的苜蓿源诱导型转录调控工具 MtTASR2Y- $P_{roHMGR1}$ 。通过对苜蓿源转录因子、启动子元件的改造与优化, 拓宽了该工具的调控范围, 丰富了酿酒酵母中可用的诱导型转录调控元件。选取优化的苜蓿源诱导型转录调控工具, 用于合成  $\beta$ -胡萝卜素的酿酒酵母细胞工厂的构建中, 使  $\beta$ -胡萝卜素产量提高 4.89–7.31 倍, 最高产量为(38.4±0.5) mg/L。本研究进一步证明了植物源调控元件在酿酒酵母中构建诱导型转录调控工具的有效性, 能实现基因表达的正交、可控调节, 为其在微生物细胞工厂中的特异性调控和应用提供了新的策略和思路。

本研究中转录因子 MtTASR2Y 对酿酒酵母内的多个基因存在影响, 其在酵母内的功能值得更深入地探究。此外, 对启动子  $P_{roHMGR1}$  以及筛选的转录因子突变体 MtTASR2Y\* 进行结构分析, 并通过理性改造以进一步提高诱导型转录调控工具的调控精度和效率。这些工作将有助于深入挖掘植物源调控元件在微生物细胞工厂中的应用潜力, 并为合成生物学领域的研究和工程应用提供更多可能性。

## REFERENCES

- [1] 李秋阳, 孙文涛, 秦磊, 吕波, 李春. 天然产物生物合成与微生物制造的挑战[J]. 中国生物工程杂志, 2024, 44(1): 72-87.  
LI QY, SUN WT, QIN L, LÜ B, LI C. Challenges in the biosynthesis of natural products and microbial manufacturing[J]. China Biotechnology, 2024, 44(1): 72-87 (in Chinese).
- [2] NIELSEN J. Yeast systems biology: model organism and cell factory[J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(9): e1800421.
- [3] PADDON CJ, WESTFALL PJ, PITERA DJ, BENJAMIN K, FISHER K, MCPHEE D, LEAVELL MD, TAI A, MAIN A, ENG D, POLICHUK DR, TEOH KH, REED DW, TREYNOR T, LENIHAN J, JIANG H, FLECK M, BAJAD S, DANG G, DENGROVE D, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. Nature, 2013, 496: 528-532.
- [4] ZHU M, WANG CX, SUN WT, ZHOU AQ, WANG Y, ZHANG GL, ZHOU XH, HUO YX, LI C. Boosting 11-oxo- $\beta$ -amyirin and glycyrrhetic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via pairing novel oxidation and reduction system from legume plants[J]. Metabolic Engineering, 2018, 45: 43-50.
- [5] ZHANG J, HANSEN LG, GUDICH O, VIEHRIG K, LASSEN LMM, SCHRÜBBERS L, ADHIKARI KB, RUBASZKA P, CARRASQUER-ALVAREZ E, CHEN L, D'AMBROSIO V, LEHKA B, HAIDAR AK, NALLAPAREDDY S, GIANNAKOU K, LALOUX M, ARSOVSKA D, JØRGENSEN MAK, CHAN LJG, KRISTENSEN M, et al. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine[J]. Nature, 2022, 609: 341-347.
- [6] CHEN RB, YANG S, ZHANG L, ZHOU YJ. Advanced strategies for production of natural products in yeast[J]. iScience, 2020, 23(3): 100879.
- [7] JIANG SY, SI T, DAI JB. Whole-genome regulation for yeast metabolic engineering[J]. Small Methods, 2020, 4(2): 1900640.
- [8] DENG C, WU YK, LV XQ, LI JH, LIU YF, DU GC, CHEN J, LIU L. Refactoring transcription factors for metabolic engineering[J]. Biotechnology Advances, 2022, 57: 107935.
- [9] 王晨, 赵雨佳, 李春, 周晓宏. 动态转录调控微生物代谢途径研究进展[J]. 化工进展, 2019, 38(9): 4238-4246.  
WANG C, ZHAO YJ, LI C, ZHOU XH. Advances in dynamic transcriptional regulation of microbial metabolic pathways[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2019, 38(9): 4238-4246 (in Chinese).
- [10] LEAVITT JM, TONG A, TONG J, PATTIE J, ALPER HS. Coordinated transcription factor and promoter engineering to establish strong expression elements in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Journal, 2016, 11(7): 866-876.
- [11] ŽUNAR B, MOSRIN C, BÉNÉDETTI H, VALLÉE B. Re-engineering of CUP1 promoter and Cup2/Ace1 transactivator to convert *Saccharomyces cerevisiae* into a whole-cell eukaryotic biosensor capable of detecting 10 nM of bioavailable copper[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 214: 114502.
- [12] JOHNSTON M, FLICK JS, PEXTON T. Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of *GAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular and Cellular Biology, 1994, 14(6): 3834-3841.
- [13] TOMINAGA M, KONDO A, ISHII J. Engineering of synthetic transcriptional switches in yeast[J]. Life, 2022, 12(4): 557.
- [14] MACHENS F, BALAZADEH S, MUELLER-ROEBER B, MESSERSCHMIDT K. Synthetic promoters and transcription factors for heterologous protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Frontiers in

- Bioengineering and Biotechnology, 2017, 5: 63.
- [15] BLANC-MATHIEU R, DUMAS R, TURCHI L, LUCAS J, PARCY F. Plant-TFClass: a structural classification for plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2024, 29(1): 40-51.
- [16] STRADER L, WEIJERS D, WAGNER D. Plant transcription factors-being in the right place with the right company[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2022, 65: 102136.
- [17] BERENSON A, LANE R, SOTO-UGALDI LF, PATEL M, CIAUSU C, LI ZR, CHEN YL, SHAH S, SANTOSO C, LIU X, SPIROHN K, HAO T, HILL DE, VIDAL M, FUXMAN BASS JI. Paired yeast one-hybrid assays to detect DNA-binding cooperativity and antagonism across transcription factors[J]. Nature Communications, 2023, 14: 6570.
- [18] FEUER E, ZIMRAN G, SHPILMAN M, MOSQUINA A. A modified yeast two-hybrid platform enables dynamic control of expression intensities to unmask properties of protein-protein interactions[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(8): 2589-2598.
- [19] JIANG JJ, MA SH, YE NH, JIANG M, CAO JS, ZHANG JH. WRKY transcription factors in plant responses to stresses[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2017, 59(2): 86-101.
- [20] WANG MZ, QIU XX, PAN X, LI CL. Transcriptional factor-mediated regulation of active component biosynthesis in medicinal plants[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2021, 22(6): 848-866.
- [21] DELAUX PM, SCHORNACK S. Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes[J]. Science, 2021, 371(6531): eaba6605.
- [22] NASERI G, PRAUSE K, HAMDO HH, ARENZ C. Artificial transcription factors for tuneable gene expression in *Pichia pastoris*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 676900.
- [23] SRIVASTAVA R, SAHOO L. Cowpea NAC transcription factors positively regulate cellular stress response and balance energy metabolism in yeast via reprogramming of biosynthetic pathways[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(9): 2286-2307.
- [24] 王瑞钊, 潘才惠, 王颖, 肖文海, 元英进. 高产  $\beta$ -胡萝卜素酿酒酵母菌株的设计与构建[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(7): 83-91.
- WANG RZ, PAN CH, WANG Y, XIAO WH, YUAN YJ. Design and construction of high  $\beta$ -carotene producing *Saccharomyces cerevisiae*[J]. China Biotechnology, 2016, 36(7): 83-91 (in Chinese).
- [25] MERTENS J, POLLIER J, VANDEN BOSSCHE R, LOPEZ-VIDRIERO I, FRANCO-ZORRILLA JM, GOOSSENS A. The bHLH transcription factors TSAR1 and TSAR2 regulate triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*[J]. Plant Physiology, 2015, 170(1): 194-210.
- [26] RIBEIRO B, LACCHINI E, BICALHO KU, MERTENS J, ARENDT P, VANDEN BOSSCHE R, CALEGARIO G, GRYFFROY L, CEULEMANS E, BUITINK J, GOOSSENS A, POLLIER J. A seed-specific regulator of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*[J]. The Plant Cell, 2020, 32(6): 2020-2042.
- [27] CUI DY, LIU L, ZHANG XY, LIN LC, LI X, CHENG T, WEI CH, ZHANG Y, ZHOU Z, LI W, ZHANG CY. Using transcriptomics to reveal the molecular mechanism of higher alcohol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Bioscience, 2023, 51: 102227.
- [28] ZHANG L, SONG ZQ, LI FF, LI XX, JI HK, YANG SS. The specific MYB binding sites bound by TaMYB in the GAPCp2/3 promoters are involved in the drought stress response in wheat[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 366.
- [29] ZHANG J, CAI YQ, DU GC, CHEN J, WANG M, KANG Z. Evaluation and application of constitutive promoters for cutinase production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Microbiology, 2017, 55(7): 538-544.
- [30] ZHOU T, LIANG ZY, MARCHISIO MA. Engineering a two-gene system to operate as a highly sensitive biosensor or a sharp switch upon induction with  $\beta$ -estradiol[J]. Scientific Reports, 2022, 12: 21791.
- [31] ZHU LW, XIA ST, WEI LN, LI HM, YUAN ZP, TANG YJ. Enhancing succinic acid biosynthesis in *Escherichia coli* by engineering its global transcription factor, catabolite repressor/activator (Cra)[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 36526.
- [32] GUO Q, PENG QQ, LI YW, YAN F, WANG YT, YE C, SHI TQ. Advances in the metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* for the production of  $\beta$ -carotene[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2024, 44(3): 337-351.
- [33] LÓPEZ J, BUSTOS D, CAMILO C, ARENAS N, SAA PA, AGOSIN E. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the overproduction of  $\beta$ -ionone and its precursor  $\beta$ -carotene[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 578793.
- [34] MALC<sub>1</sub> K, WATTS E, ROBERTS TM, AUXILLOS JY, NOWROUZI B, BOLL HO, NASCIMENTO CZSD, ANDREOU A, VEGH P, DONOVAN S, FRAGKLOUDIS R, PANKE S, WALLACE E, ELFICK A, RIOS-SOLIS L. Standardization of synthetic biology tools and assembly methods for *Saccharomyces cerevisiae* and emerging yeast species[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(8): 2527-2547.