

不同糖发酵条件下酿酒酵母组成型启动子和诱导型启动子评价*

缪晔¹ 苟敏^{2,3} 陈栋¹ 汤岳琴^{2,3**}

¹中石化上海工程有限公司 上海 200120

²四川大学建筑与环境学院 成都 610065

³四川省环境保护有机废弃物资源化利用重点实验室 成都 610065

摘要 木糖是秸秆等纤维素类生物质原料中含量仅次于葡萄糖的第二丰富的糖, 构建可高效发酵木糖的酿酒酵母菌株是提高原料利用率、降低纤维素燃料乙醇生产成本的基础。外源基因的高效表达以及本源基因的调控都需要选择表达强度合适的启动子。基于比较转录组, 在全基因组水平上比较解析酿酒酵母所有基因在发酵葡萄糖、发酵木糖、发酵混合糖(葡萄糖和木糖)条件下的表达强度, 拟为构建木糖利用菌株提供一系列备选的启动子库。结果表明, 碳源种类对酿酒酵母启动子的强度有显著影响, 绝大多数启动子强度受碳源影响显著, 有67个启动子的强度在不同碳源条件下保持了相对稳定; 启动子 P_{TEF1} 和 P_{TEF2} 、 P_{ADH1} 、 P_{CCW12} 和某些核糖体蛋白基因启动子可在构建木糖利用菌株时作为组成型强启动子, 另有中、弱强度的组成型启动子可用于基因表达优化; 启动子 $P_{YNR071C}$ 、 P_{PUT1} 、 P_{DSF1} 等可作为利用木糖时的诱导型启动子, 使基因在有需要的时候才进行表达。本研究在系统解析全基因组启动子强度和碳源种类的关系基础上, 为构建利用不同碳源的酿酒酵母菌株提供了具有不同表达特征的候选启动子库。(图1 表6 参24)

关键词 启动子; 酿酒酵母; 转录组; 木糖利用

CLC TQ92

Genome-wide evaluation of constitutive and inducible promoters in *Saccharomyces cerevisiae* utilizing different carbon sources*

MIAO Pu¹, GOU Min^{2,3}, CHEN Dong¹ & TANG Yueqin^{2,3**}

¹Sinopec Shanghai Engineering Co. Ltd., Shanghai 200120, China

²Environmental Biotechnology Research Center, College of Architecture and Environment, Sichuan University, Chengdu 610065, China

³Sichuan Environmental Protection Key Laboratory of Organic Waste Resource Utilization, Chengdu 610065, China

Abstract Xylose is the second most abundant sugar in lignocellulosic biomass, but it is not a natural carbon source for *Saccharomyces cerevisiae*. To increase the resource utilization efficiency and reduce the cost of bioethanol production, it is crucial to construct strains able to ferment xylose effectively. The efficient expression of exogenous genes and the regulation of native genes require the selection of promoters with appropriate expression strength. However, until now, research on the strength, stability, and inducibility of promoters in *S. cerevisiae*, when fermenting glucose, xylose, or mixed sugars, is very limited. In this study, genome-wide transcriptome data were used to evaluate promoter strength in an industrial xylose-utilizing strain in response to four different carbon source conditions (glucose, xylose, and mixed sugars). The strength of most of the promoters changed when utilizing carbon sources other than glucose, whereas 67 promoters maintained their strength level under different sugar conditions. A series of promoter libraries were generated for genetic engineering. P_{TEF1} , P_{TEF2} , P_{ADH1} , P_{CCW12} , and some ribosomal protein promoters can serve as strong constitutive promoters for xylose-utilizing strain construction. Constitutive media and weak promoters that could be used for strain optimization were summarized. $P_{YNR071C}$, P_{PUT1} , and P_{DSF1} could be used as inducible promoters for xylose fermentation, driving high levels of gene expression only when necessary. The libraries of constitutive and inducible promoters with different strengths provided in this study will be useful for the genetic engineering of xylose-utilizing *S. cerevisiae* strains.

Keywords promoter; *Saccharomyces cerevisiae*; transcriptome; xylose utilization

收稿日期 Received: 2019-07-10 接受日期 Accepted: 2019-08-30

*国家自然科学基金项目(31170093)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170093)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: tangyq@scu.edu.cn)

酿酒酵母作为真核模式生物广泛用于基础研究以及作为平台微生物生产生物燃料和化学品。代谢工程常常需要表达外源基因或者调控内源基因的表达,而启动子的选择对基因的表达调控至关重要^[1]。启动子影响基因的转录水平,影响人工合成途径或本源途径中各基因间协调性,继而影响菌株的代谢功能。在酿酒酵母的基因过程操作中常用的启动子都是内源基因的启动子,它们受转录因子的调控,会对内源信号和环境信号作出响应,基因表达量可能会改变^[2],而碳源会显著影响基因的表达和调控^[3-4]。木糖是秸秆等木质纤维素类物质中仅次于葡萄糖的第二丰富的糖,但它不是酿酒酵母的天然碳源。在利用秸秆等木质纤维素类物质为原料生产燃料乙醇或其他化学品时,木糖的利用对于提升原料利用率和降低生产成本至关重要。但是,重组酿酒酵母在以木糖或混合糖(葡萄糖和木糖)为碳源时的启动子强弱,并没有得到系统的研究。

常用的启动子可分为组成型启动子和诱导型启动子两类。组成型启动子在不同的培养条件下强弱稳定,例如糖酵解途径中相关基因的启动子(P_{PGK1} 、 P_{TDH3} 、 P_{TPH1} 、 P_{ENO2} 、 P_{ADHI})和转录延长因子基因的启动子(P_{TEF1} 和 P_{TEF2})^[5]。但通常说的“组成型启动子”,指的培养条件都是以葡萄糖为碳源^[6]。并且,常用的组成型启动子都是强启动子,而代谢途径中的某些基因可能并不需要太高的表达量,用强启动子表达这些基因,会导致产物毒性和由于碳代谢流、辅助因子、ATP的重新分配造成的代谢负担,对细胞的生长有负面影响^[7-8]。诱导型启动子则在特定的培养条件下才有较强的启动基因表达的能力,例如受半乳糖诱导的 P_{GALI} 和 P_{GALI0} 、受铜离子诱导的 P_{CUP1} 和当葡萄糖浓度很低时受诱导的 P_{HXT7} 和 P_{ADH2} ^[7,9]。

目前,为了构建以木质纤维素水解产物为发酵原料的性状优良的菌株,酿酒酵母的少量启动子在不同碳源条件下启动能力的强弱受到一定的关注^[3-4,10]。但是,启动能力已被研究透彻的启动子数量很少,而酿酒酵母作为真核生物不存在多顺反子,在进行基因操作时每个基因都需要启动子,且为避免意料之外的同源重组,需要不同的启动子^[11]。因此,在全基因组水平,系统研究酿酒酵母的启动子在不同碳源条件下的表现,对于构建木糖和混合糖利用工程菌株具有重要意义。目前有关酿酒酵母启动子的大部分研究是在以葡萄糖为碳源条件下进行的^[2,6,9],在木糖为碳源条件下的研究很有限^[10,12-13],而在混合糖(葡萄糖和木糖)条件下的研究尚未见报道。

实验室前期工作中研究了木糖利用菌株KF7M-16在全基因转录水平对不同碳源的响应^[14],本研究利用该菌株在发酵不同碳源(利用单独葡萄糖发酵,利用单独木糖发酵,混合糖发酵时葡萄糖利用阶段,混合糖发酵时木糖利用阶段)时的转录组数据,在全基因水平比较解析了酿酒酵母启动子强弱、稳定性、和可诱导性,以期为酿酒酵母代谢工程提供具备不同特征的候选启动子库。

1 材料与方法

1.1 培养基

2% YPD培养基: 20 g/L蛋白胨, 10 g/L酵母浸出粉, 20 g/L

葡萄糖。

5% YPD培养基: 20 g/L蛋白胨, 10 g/L酵母浸出粉, 50 g/L葡萄糖。

6% YPD培养基: 20 g/L蛋白胨, 10 g/L酵母浸出粉, 60 g/L葡萄糖。

4% YPX培养基: 20 g/L蛋白胨, 10 g/L酵母浸出粉, 40 g/L木糖。

10% YPD培养基: 20 g/L蛋白胨, 10 g/L酵母浸出粉, 60 g/L葡萄糖, 40 g/L木糖。

上述培养基若为固体培养基,则在灭菌前加入20 g/L的琼脂粉。若含有木糖,则木糖需与其他成分分开灭菌。接种后各液体培养基中初始葡萄糖和木糖含量以实际测量值为准。

1.2 菌株及其培养方法

本研究采用的菌株KF7M-16来源于絮凝性工业酿酒酵母KF-7^[15]。将含有*Scheffersomyces stipitis*来源的XYL1和XYL2基因的整合型质粒pIUX1X2XK和含有*Aspergillus aculeatus*来源的BGL1基因的整合型质粒pIWBGL1转化到KF-7中^[16],经筛选后得到KF7M-16。

菌株在2% YPD固体培养基上活化24 h,挑一接种环菌接种到含100 mL 5% YPD培养基的500 mL锥形瓶中,在恒温摇床中以160 r/min和30 ℃预培养16 h,9000 g离心3 min收集菌体。为了避免利用葡萄糖和利用木糖时生长速率的不同对转录组的影响,采用较高的接种量(5 g-细胞干重/L)接种。灭菌水洗涤菌体后分别接种2.5 g菌体至含100 mL 6% YPD培养基、100 mL 4% YPX培养基或者100 mL 10% YPD培养基的300 mL锥形瓶中。发酵在35 ℃的恒温水浴中进行,由HS-6DN磁力搅拌器控制转速在200 r/min。

1.3 RNA的提取及芯片分析

使用宝生物“Yeast RNAiso Kit”试剂盒提取酵母细胞的RNA。芯片实验采用Affymetrix公司7 G平台GeneChip® Yeast Genome 2.0 Array芯片,委托北京博奥生物有限公司进行。用AGCC软件将.DAT文件由图像信号转化为数字信号即.CEL文件。以.CEL文件为源文件进行数据预处理:包括背景校正,将探针信号整合为探针组(Probeset)信号,片间归一化去除非生物学因素带来的样本间变异^[17]。芯片数据已提交GEO数据库(Gene Expression Omnibus),登录号为GSE80748。通过比较同一个基因的表达量变化得到该基因启动子的强度变化。启动子强弱由MAS 5.0信号值表示,每组实验含两个生物学平行,采用其信号值的平均值进行分析,变异系数为标准差与平均值的比值。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源条件下发酵实验结果

在6% YPD和10% YPD培养基中,葡萄糖在前4 h的发酵中被完全消耗,前2 h的葡萄糖消耗速率分别为17.27 g L⁻¹ h⁻¹和16.80 g L⁻¹ h⁻¹。在4% YPX和10% YPD培养基中,木糖在24 h内被消耗完,前8 h的木糖消耗速率分别是2.88 g L⁻¹ h⁻¹和2.20 g L⁻¹ h⁻¹。值得注意的是葡萄糖的存在会抑制木糖的利用,在10% YPD培养基中,前4 h的木糖利用速率为1.38 g L⁻¹ h⁻¹,

4-8 h的木糖利用速率为 $3.03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. 因此, 在10% YPDX培养基中的发酵可分为葡萄糖利用阶段和木糖利用阶段.

根据KF7M-16在不同培养基中的发酵特性设计芯片实验的采样时间. 发酵时间为2 h时收集利用葡萄糖发酵的细胞, 发酵时间为7 h时收集利用木糖发酵的细胞, 实验做两次生物学平行. 从6% YPD培养基中2 h采集的样品用G表示, 采样时发酵液中剩余葡萄糖的浓度为 $16.4 \pm 1.2 \text{ g/L}$, 产生乙醇的浓度为 $16.4 \pm 0.3 \text{ g/L}$, 乙醇收率为 0.46 g/g . 从4% YPX培养基中7 h采集的样品用X表示, 采样时发酵液中剩余木糖的浓度为 $20.4 \pm 0.1 \text{ g/L}$, 产生的乙醇浓度为 6.2 g/L , 乙醇收率为 0.35 g/g . 从10% YPDX培养基中2 h采集的样品用GX1表示, 代表混合糖发酵的葡萄糖利用阶段, 采样时发酵液中剩余葡萄糖浓度为 $37.1 \pm 5.1 \text{ g/L}$, 产生的乙醇浓度为 $17.2 \pm 1.8 \text{ g/L}$, 乙醇收率为 0.44 g/g . 从10% YPDX培养基中7 h采集的样品用GX2表示, 代表混合糖发酵的木糖利用阶段, 采样时发酵液中剩余木糖的浓度为 $19.5 \pm 1.0 \text{ g/L}$, 产生的乙醇浓度为 $27.8 \pm 1.8 \text{ g/L}$, 乙醇收率为 0.38 g/g .

2.2 不同碳源条件下的全基因组启动子差异

为验证芯片结果的可靠性, 利用定量PCR, 以 $ACT1$ 为参比基因, 对 $XDHI$ 和 $SOR/SOR2$ 基因的mRNA进行了定量, 定量结果和芯片结果吻合^[14]. 4个实验组各组的两个生物学平行样本的基因芯片结果有很好的重复性, 以下所有的分析采用两个生物学平行样的平均值进行.

通常酿酒酵母以葡萄糖为碳源, 当其利用木糖发酵时, 启动子的强弱会发生变化. 如图1所示, 与在单独葡萄糖培养基中相比, 偏离趋势线的点所代表的启动子在其他碳源条件下强度增强 (趋势线上方) 或减弱 (趋势线下方). 在混合糖培养基发酵的葡萄糖利用阶段, 各个启动子的强弱与利用单独葡萄糖发酵时相似, 趋势线斜率为1, R^2 值为0.984. 利用单独木糖发酵时, 部分启动子的强弱与利用单独葡萄糖发酵时有明显差异, 趋势线斜率为0.912, 表明全基因组启动子强度较单独葡萄糖发酵时有所下降; R^2 下降为0.867, 表明在两个碳源条件下表达有差异的启动子中有部分启动子偏离趋势线. 在混合糖培养基发酵的木糖利用阶段, 趋势线斜率为0.838, 表明全基因组启动子强度减弱的程度更为明显; R^2 值为0.752, 表明有更多的启动子偏离趋势线, 基因组中启动子对碳源的响应表现出更多种的变化特征.

2.3 不同碳源条件下的组成型启动子筛选

组成型启动子应该在不同碳源条件下强度稳定^[18]. 用启动子在4种碳源条件下强度的变异系数作为评价启动子稳定性的指标, 各个变异系数区间的启动子数量如表1所示. 绝大多数启动子的变异系数在0.1-0.5之间. 变异系数小于0.05的启动子有67个, 可视在在不同碳源条件下强度稳定, 作为组成型启动子使用, 其名称和平均强度如表2所示.

表2所列的启动子强度跨度很大. 其中, 强度最强的转录延长因子基因的启动子 (P_{TEF1} 和 P_{TEF2}), 和紧随其后的乙醛脱

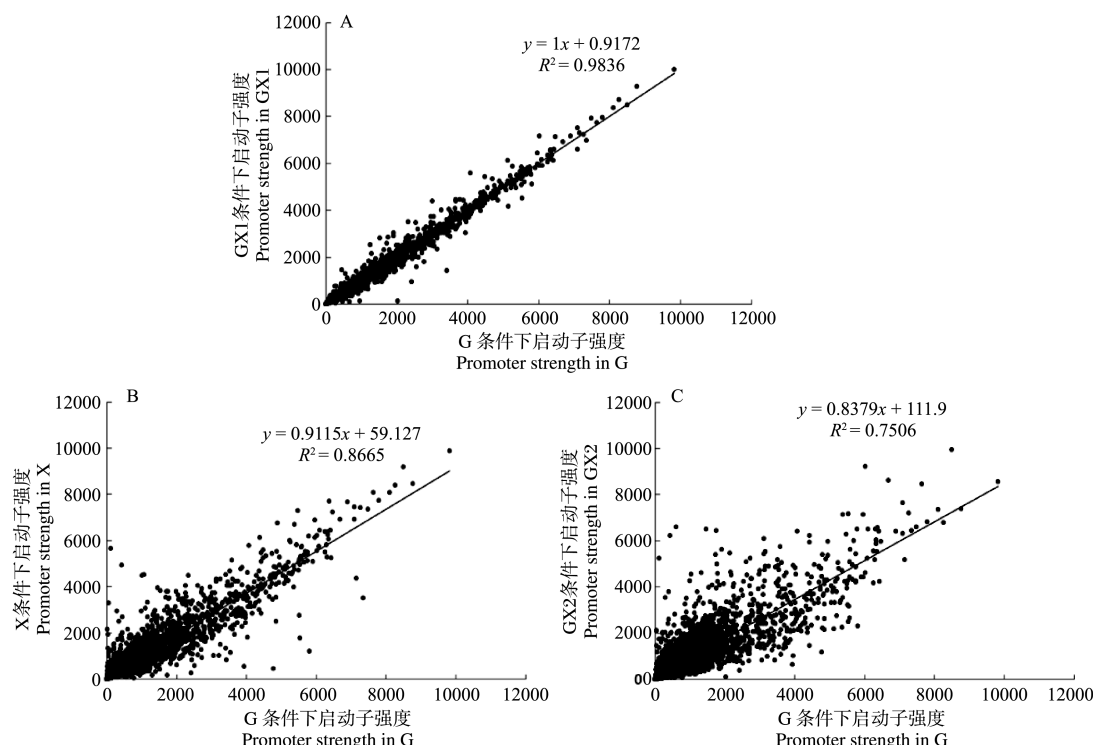


图1 与利用单独葡萄糖发酵 (G) 相比, (A) 混合糖培养基发酵的葡萄糖利用阶段 (GX1), (B) 利用单独木糖发酵 (X) 时, (C) 混合糖培养基发酵的木糖利用阶段的全基因组启动子强度差异. 启动子强度由MAS 5.0信号值表示.

Fig. 1 Promoters' expression changes of (A) glucose fermentation phase in the mixed sugar (GX1), (B) xylose fermentation state in the xylose alone medium (X), (C) xylose fermentation phase in the mixed sugar (GX2), compared to the glucose fermentation state in the glucose alone medium (G). The expression levels are represented by MAS 5.0 signal.

表1 不同变异系数区间的启动子数量
Table 1 The number of promoters in different interval of variation coefficient

变异系数 Variation coefficient	<0.05	0.05-0.1	0.1-0.2	0.2-0.5	0.5-1	>1
启动子个数 Amount of promoters	67	591	1835	2100	184	18

变异系数由8张芯片（含两次生物学平行）的MAS 5.0信号值获得。
The coefficient of variation is obtained from the MAS 5.0 signal value of eight chips (including two biological parallels).

氢酶基因启动子 (P_{ADH1}) 都是常用的组成型启动子. 此外, 细胞壁甘露糖蛋白基因的启动子 (P_{CCW12})、核糖体蛋白基因启动子 (P_{RPL10} 、 P_{RPS31} 、 P_{RPS21B})、肽基脯氨酰异构酶基因启动子 (P_{CPR1}) 也可作为候选的强启动子. 可以看出位列前10位的启动子中有一半是核糖体蛋白的启动子, 表明核糖体蛋白的表达受碳源种类影响较弱.

表3考察了其他常用的组成型启动子在不同碳源条件下的强度, 可以看出虽然总体而言它们的强度较为稳定, 但大部分启动子 (P_{TDH3} 、 P_{PGK1} 、 P_{TPI1} 、 P_{ENO2}) 在混合糖培养基发酵的木糖利用阶段强度有所减弱, 而启动子 P_{YEF3} 在利用单独木

糖发酵时强度有所增强.

另外, 表2提供了许多中等强度的启动子 (如 P_{PDA1} 、 P_{SNA3} 、 P_{ACPI}) 和弱启动子, 当过高的基因表达量会造成细胞代谢负担和产物毒性时, 可以考虑使用这些启动子. 一个代谢途径通常涉及到几个乃至十几个基因, 在菌株构建时, 每个基因表达的相对强度对菌株的性状很大影响, 最优的性状往往需要这些基因的表达量高低配合^[19-20], 而表2列出的启动子可以作为代谢途径优化时的参考.

同时由表2可以看出, 这些启动强度比较稳定的启动子启动的基因大多属于细胞为了维持最基本的生命活动所必需的基因, 明显不同于表3中所列出的常用启动子, 它们多属于糖酵解途径中需大量表达的基因的启动子.

2.4 诱导型启动子

在不同碳源条件下强度的变异系数大于0.8的启动子有47个, 对它们进行考察有助于发掘出各个碳源条件下的诱导型启动子.

表4列出了一类特殊的启动子, 它们在利用葡萄糖发酵时强度很弱, 但在利用木糖发酵时强度受到诱导, 尤其是

表2 组成型启动子列表及其强度
Table 2 List of constitutive promoters and their strength

启动子 Promoter	强度 Strength	变异系数 Variation coefficient	启动子 Promoter	强度 Strength	变异系数 Variation coefficient
<i>TEF1</i> /// <i>TEF2</i>	7978	0.0406	<i>FRA2</i>	722	0.0350
<i>ADH1</i>	7976	0.0493	<i>DOS2</i>	721	0.0381
<i>CCW12</i>	7275	0.0194	<i>MRPL25</i>	680	0.0178
<i>RPL10</i>	6343	0.0290	<i>CBC2</i>	651	0.0494
<i>RPS31</i>	6311	0.0371	<i>YBR255C-A</i>	614	0.0494
<i>RPS21B</i>	6252	0.0486	<i>MRPL35</i>	588	0.0296
<i>CPR1</i>	5756	0.0333	<i>RTG2</i>	586	0.0423
<i>RPS23A</i> /// <i>RPS23B</i>	5586	0.0292	<i>CAB1</i>	579	0.0495
<i>HPF1</i>	5535	0.0373	<i>NOT3</i>	514	0.0367
<i>RPL43A</i> /// <i>RPL43B</i>	5366	0.0366	<i>PPM1</i>	507	0.0423
<i>YMR122W-A</i>	5149	0.0439	<i>DET1</i>	495	0.0459
<i>IPP1</i>	4494	0.0460	<i>VPS35</i>	491	0.0417
<i>RPS27B</i>	4284	0.0436	<i>YCK1</i>	458	0.0451
<i>HOM6</i>	3694	0.0412	<i>SCO1</i>	455	0.0369
<i>PDA1</i>	3609	0.0370	<i>DGR2</i>	415	0.0394
<i>SCS2</i>	2800	0.0483	<i>WHI3</i>	358	0.0476
<i>SNA3</i>	2771	0.0233	<i>VPS34</i>	335	0.0441
<i>ACPI</i>	2357	0.0295	<i>EXO5</i>	331	0.0374
<i>SUI1</i>	2117	0.0476	<i>IVY1</i>	305	0.0471
<i>YIM1</i>	1981	0.0334	<i>SET1</i>	298	0.0450
<i>ADE16</i>	1854	0.0440	<i>YGR169C-A</i>	287	0.0496
<i>CDC42</i>	1282	0.0362	<i>NDD1</i>	282	0.0354
<i>RPB2</i>	1197	0.0380	<i>YPR089W</i>	226	0.0345
<i>TPD3</i>	1172	0.0348	<i>UBR2</i>	210	0.0490
<i>POP2</i>	1106	0.0472	<i>CUE3</i>	178	0.0498
<i>MGR2</i>	974	0.0499	<i>ABZ1</i>	173	0.0246
<i>PTC3</i>	971	0.0485	<i>YDR444W</i>	173	0.0410
<i>PBP4</i>	930	0.0488	<i>PGD1</i>	172	0.0186
<i>TOM70</i>	927	0.0410	<i>SAP30</i>	161	0.0369
<i>PTM1</i>	914	0.0332	<i>AKR2</i>	133	0.0471
<i>AIP1</i>	890	0.0411	<i>NNF2</i>	124	0.0396
<i>CDC11</i>	886	0.0498	<i>SRN2</i>	124	0.0416
<i>LCB3</i>	829	0.0471	<i>ALR2</i>	107	0.0420
<i>RML2</i>	827	0.0346			

启动子强度由4种碳源条件下的平均MAS 5.0信号值表示。
The promoter strength is expressed by the average MAS 5.0 signal value under four carbon sources.

表3 其他常用组成型启动子在不同碳源条件下的强度
Table 3 Strength of other commonly-used constitutive promoters under different carbon sources conditions

启动子 Promoter	强度 Strength (MAS 5.0 信号值 Signal value)				变异系数 Variation coefficient
	G	GX1	GX2	X	
<i>TDH3</i>	9831	10005	8553	9876	0.0704
<i>PGK1</i>	8780	9279	7393	8466	0.0887
<i>TPI1</i>	7487	7927	6605	7350	0.0733
<i>ACT1</i>	6263	6344	5556	6376	0.0621
<i>ENO2</i>	6430	6589	4233	5245	0.1921
<i>PDC1</i>	5237	5303	5064	5997	0.0748
<i>YEF3</i>	3847	3752	4079	4760	0.1220

不同碳源下的启动子强度是两次生物学平行的平均值，而变异系数由8张芯片（含两次生物学平行）的MAS 5.0信号值获得。
The promoter strength under different carbon sources is the average value of two biological parallels, and the coefficient of variation is obtained from the MAS 5.0 signal value of eight chips (including two biological parallels).

表4 在利用木糖发酵时强度受到诱导的启动子
Table 4 Promotors induced during xylose fermentation

启动子 Promoter	强度 Strength (MAS 5.0 信号值 Signal value)				变异系数 Variation coefficient
	G	GX1	GX2	X	
<i>YNR071C</i>	104	271	5235	5641	0.885
<i>PUT1</i>	387	359	3804	1298	0.919
<i>DSF1</i> /// <i>YNR073C</i>	43	43	2122	1934	0.933
<i>PRM10</i>	63	114	1166	395	0.959
<i>PCK1</i>	58	50	170	997	1.192
<i>MMP1</i>	84	43	773	289	0.923
<i>FMP48</i>	38	66	514	438	0.805
<i>TAT1</i>	39	53	174	692	1.053
<i>RG12</i>	50	62	555	221	0.881
<i>FAT3</i>	40	37	210	386	0.825
<i>SFC1</i>	18	15	99	343	1.086

不同碳源下的启动子强度是两次生物学平行的平均值，而变异系数由8张芯片（含两次生物学平行）的MAS 5.0信号值获得。
The promoter strength under different carbon sources is the average value of two biological parallels, and the coefficient of variation is obtained from the MAS 5.0 signal value of eight chips (including two biological parallels).

P_{YNR071C}，在利用木糖发酵时可作为强启动子使用。脯氨酸脱氢酶基因启动子*P_{PUT1}*和甘露醇脱氢酶基因启动子*P_{DSF1}*可在利用木糖发酵时作为中等强度的启动子。其他启动子在利用木糖发酵时仍是弱启动子，但强度比在利用葡萄糖发酵时高出一个数量级。利用这些启动子可以对基因的表达量进行动态控制，例如在以混合糖为底物时，可控制目标基因在利用葡萄糖生长的阶段表达量很低，从而不对细胞造成代谢负担，不影响细胞的生长，而在利用木糖生产目标代谢产物时，基因得到高表达（具体的表达量大小可控），从而达到提高产量和产率的目的。

由表4也可以看出，这些受木糖诱导的启动子，启动的基因较多和物质转运相关。当木糖为碳源时，细胞可能更倾向于从胞外获得一些物质的供给。

表5和表6列出了另外两类特殊的启动子，它们在利用葡萄糖发酵时强度弱，分别在混合糖培养基发酵的木糖利用阶段（GX2）和在单独木糖培养基中（X）强度受到诱导。热击蛋白基因的启动子*P_{HSP30}*在混合糖培养基发酵的木糖利用阶

表5 在混合糖培养基发酵的木糖利用阶段强度受到诱导的启动子
Table 5 Promotors induced in xylose fermentation phase during the fermentation of mixed sugars

启动子 Promoter	强度 Strength (MAS 5.0 信号值 Signal value)				变异系数 Variation coefficient
	G	GX1	GX2	X	
<i>HSP30</i>	606	1096	6602	2136	0.870
<i>INO1</i>	383	428	2585	513	0.927
<i>STL1</i>	41	93	2094	30	1.524
<i>STR3</i>	372	406	1852	190	0.925
<i>FMP16</i>	179	285	1603	466	0.852
<i>SPG1</i>	33	93	1458	302	1.172
<i>RAD59</i>	255	193	1257	240	0.875
<i>UGX2</i>	192	233	1187	257	0.845
<i>YCT1</i>	105	92	721	99	1.053
<i>SPG4</i>	36	60	679	172	1.051
<i>MET28</i>	104	113	678	139	0.888
<i>PNS1</i>	133	198	646	77	0.823
<i>SIP18</i>	78	140	562	124	0.834
<i>HSP32</i> /// <i>HSP33</i> /// <i>SNO4</i>	47	62	486	146	0.935
<i>MUP3</i>	75	76	451	83	0.909
<i>DAK2</i>	17	17	421	44	1.430
<i>PHO89</i>	51	32	370	47	1.217

不同碳源下的启动子强度是两次生物学平行的平均值，而变异系数由8张芯片（含两次生物学平行）的MAS 5.0信号值获得。
The promoter strength under different carbon sources is the average value of two biological parallels, and the coefficient of variation is obtained from the MAS 5.0 signal value of eight chips (including two biological parallels).

表6 在利用单独木糖发酵时强度受到诱导的启动子
Table 6 Promotors induced when xylose was used as the sole sugar

启动子 Promoter	强度 Strength (MAS 5.0 信号值 Signal value)				变异系数 Variation coefficient
	G	GX1	GX2	X	
<i>MAL12</i> /// <i>MAL32</i>	46	41	150	3281	1.495
<i>SOR1</i> /// <i>SOR2</i>	25	18	92	2160	1.513
<i>PRY2</i>	441	338	462	2001	0.805
<i>SUT1</i>	206	193	541	1517	0.842
<i>AGX1</i>	190	189	272	1485	0.971
<i>FBP1</i>	39	60	236	1339	1.216
<i>FDH1</i>	58	58	146	1126	1.231
<i>HXT15</i> /// <i>HXT16</i>	12	13	14	536	1.505

不同碳源下的启动子强度是两次生物学平行的平均值，而变异系数由8张芯片（含两次生物学平行）的MAS 5.0信号值获得。
The promoter strength under different carbon sources is the average value of two biological parallels, and the coefficient of variation is obtained from the MAS 5.0 signal value of eight chips (including two biological parallels).

段可作为强启动子使用。麦芽糖代谢基因的启动子（*P_{MAL12}*和*P_{MAL32}*）和山梨糖醇脱氢酶基因的启动子（*P_{SOR1}*和*P_{SOR2}*）在单独木糖培养基中可作为中等强度的启动子使用，但其强度在混合糖培养基发酵的木糖利用阶段并没有受到诱导。这些启动子可满足基因在不同条件下差异表达的需要。

由表5还可以看出，排在前10位的启动子启动的基因中有7个为胁迫响应基因。在混合糖发酵时，当葡萄糖消耗结束进入木糖发酵阶段时，细胞表现出受到了环境胁迫，这些响应胁迫的基因开始高表达。原因之一可能是由于葡萄糖发酵产生乙醇积累，乙醇对细胞产生胁迫，而当木糖为唯一碳源发酵时无上述现象。表6中列出的只在木糖发酵过程强度提升的启动子，其启动的相关基因和木糖转运、木糖还原、甾醇

转运、糖异生相关。这些结果进一步表明,即使都是在利用木糖的状态,混合糖和单独木糖条件对细胞的影响差异显著,从而影响启动子的表现。

3 讨论

利用重组酿酒酵母菌株KF7M-16在不同碳源条件下(利用单独葡萄糖发酵,利用单独木糖发酵,混合糖培养基发酵的葡萄糖利用阶段,混合糖培养基发酵的木糖利用阶段)的转录组数据,在全基因组水平筛选了组成型启动子和诱导型启动子。

启动子是基因编码区上游的可以和RNA聚合酶以及转录因子结合的序列,是代谢工程中调控基因表达量的重要工具。通过在全基因组水平对启动子在不同碳源条件下的强度进行比较,发现许多启动子的强度会随着条件的改变而改变,这与较多文献报道^[3-4, 21-22]一致。为了构建(改造)代谢途径,常常需要不同强度,不同类型(强度随条件而改变)的启动子。

组成型启动子 P_{TEF1} 、 P_{TEF2} 和 P_{ADHI} 可以在不同的碳源条件下保持较强的启动能力,它们的稳定性高于其他常用的强启动子如 P_{TDH3} 、 P_{PGK1} 、 P_{TPI1} 、 P_{ENO2} 。之前亦有文献报道 P_{TDH3} 和 P_{PGK1} 的强度会在葡萄糖被消耗完之后下降^[4]。本研究得到的强度由强到弱的一系列组成型启动子,可满足基因操作中对不同基因表达量的需求。

由于可以实现基因表达量的动态调控,近年来诱导型启动子受到了较多的关注^[23]。诱导型启动子中含有顺式作用元件(*cis-acting element*),可在一定条件下与转录因子结合,使得诱导型启动子对基因表达有开关的作用。诱导型启动子的使用可以使细胞生长阶段和产物生成阶段分开。本研究筛选的一系列在利用木糖发酵时强度受到诱导的启动子,如 $P_{YNR071C}$ 等,鲜见文献报道,为基因表达量的动态调控提供了新工具。

Nambu-Nishida等根据酿酒酵母发酵单独葡萄糖和发酵单独木糖条件下的转录组的基因芯片数据,筛选出了木糖发酵条件下强度分别为高、中、低的29个启动子,利用lacZ报告基因方法评估了这29个启动子的强弱,结果和基因芯片结果^[13]基本保持一致。该研究表明,基因芯片的结果用于启动子的筛选具有较好的准确性。因此,本研究所得的结果可以为用代谢工程的方法构建木糖利用菌株提供重要参考。当然,由于本研究所搜集数据的局限性和芯片数据在归一化过程中可能产生的误差^[24],本研究所推荐的之前少有文献报道的启动子,在使用前还需对其强度和特征进行进一步的验证。

参考文献 [References]

- Lee JW, Kim TY, Jang YS, Choi S, Lee SY. Systems metabolic engineering for chemicals and materials [J]. *Trends Biotechnol*, 2011, **29**: 370-378
- Sun J, Shao Z, Zhao H, Nair N, Wen F, Xu JH, Zhao H. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, **109**: 2082-2092
- Weinhandl K, Winkler M, Glieder A, Camattari A. Carbon source dependent promoters in yeasts [J]. *Microb Cell Fact*, 2014, **13**: 5
- Peng B. Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities [J]. *Microb Cell Fact*, 2015, **14**: 91
- Da SN, Srikrishnan S. Introduction and expression of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2011, **12**: 197-214
- Partow S, Siewers V, Bjørn S, Nielsen J, Maury J. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 2010, **27**: 955-964
- Williams TC, Espinosa MI, Nielsen LK, Vickers CE. Dynamic regulation of gene expression using sucrose responsive promoters and RNA interference in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microb Cell Fact*, 2015, **14**: 43
- Lee SK, Chou H, Ham TS, Lee TS, Keasling JD. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, **19**: 556
- Shen MW, Fang F, Sandmeyer S, Da Silva NA. Development and characterization of a vector set with regulated promoters for systematic metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yeast*, 2012, **29**: 495
- Xiong L, Zeng Y, Tang RQ, Alper HS, Bai FW, Zhao XQ. Condition-specific promoter activities in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microb Cell Fact*, 2018, **17**: 58
- Redden H, Alper HS. The development and characterization of synthetic minimal yeast promoters [J]. *Nat Commun*, 2015, **6**: 7810
- Lu C, Jeffries T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**: 6072-6077
- Nambu-Nishida Y, Sakihama Y, Ishii J, Hasunuma T, Kondo A. Selection of yeast *Saccharomyces cerevisiae* promoters available for xylose cultivation and fermentation [J]. *J Biosci Bioeng*, 2018, **125**: 76-86
- Zeng WY, Tang YQ, Gou M, Xia ZY, Kida K. Transcriptomes of a xylose-utilizing industrial flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain cultured in media containing different sugar sources [J]. *AMB Express*, 2016, **6**: 51
- Kida K, Morimura S, Sonoda Y. Repeated-batch fermentation process using a flocculating yeast constructed by protoplast fusion [J]. *J Ferment Bioeng*, 1992, **74**: 169-173
- Li YC, Mitsumasu K, Gou ZX, Gou M, Tang YQ, Li GY, Wu XL, Akamatsu T, Taguchi H, Kida K. Xylose fermentation efficiency and inhibitor tolerance of the recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain NAPX37 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, **100**: 1531-1542
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high

- density oligonucleotide array probe level data [J]. *Biostatistics*, 2003, **4**: 249-264
- 18 Keren L, Zackay O, Lotanpompan M, Barenholz U, Dekel E, Sasson V, Aidelberg G, Bren A, Zeevi D, Weinberger A. Promoters maintain their relative activity levels under different growth conditions [J]. *Mol Syst Biol*, 2013, **9**: 701
- 19 Du J, Yuan Y, Si T, Lian J, Zhao H. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, **40**: 177-209
- 20 Lee ME. Expression-level optimization of a multi-enzyme pathway in the absence of a high-throughput assay [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**: 10668-10678
- 21 Tirosh I, Wong KH, Barkai N, Struhl K. Extensive divergence of yeast stress responses through transitions between induced and constitutive activation [J]. *PNAS*, 2011, **108**: 16693-16698
- 22 Costenoble R, Picotti P, Reiter L, Stallmach R, Heinemann M, Sauer U, Aebersold R. Comprehensive quantitative analysis of central carbon and amino-acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* under multiple conditions by targeted proteomics [J]. *Mol Syst Biol*, 2011, **7**: 464
- 23 Hubmann G, Thevelein JM, Nevoigt E. Natural and modified promoters for tailored metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]//Mapelli V. Yeast Metabolic Engineering. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). New York: Humana Press, 2014
- 24 Lovén J, Orlando DA, Sigova AA, Lin CY, Rahl PB, Burge CB, Levens DL, Tong IL, Young RA. Revisiting global gene expression analysis [J]. *Cell*, 2012, **151**: 476-482