热带假丝酵母磷酸甘油酸激酶基因启动子功能鉴定

周静雨[1,2]，陈献忠[*1,2]，张利华[1,2]，沈 微[1,2]，樊 游[1,2]
（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：热带假丝酵母是重要的工业生产菌株，但表达系统还不完善导致代谢工程育种手段受到限制。探索新的表达元件对热带假丝酵母的基因工程育种十分重要。本文通过多重序列比对从热带假丝酵母 ATCC 20336 基因组中扩增得到一个具有较高活性的磷酸甘油酸激酶基因（*PGK1*）启动子，以酵母增强型绿色荧光蛋白（*yeGFP3*）作为报告基因，整合到热带假丝酵母基因组上并对其表达活性进行研究。通过分离 300、550、750 bp 和 846 bp4 个长度的启动子片段分别表达 *yeGFP3*，转化 XZX 宿主菌获得 P-1、P-2、P-3 和 P-4 共 4 个转化子。荧光显微镜结果表明，随着启动子长度的截短，荧光逐渐减弱，前 3 个转化子的相对荧光强度分别为 P-4 的 4.98%、9.84%和 48.4%。同时分析了 4 个转化子的 *yeGFP3* 转录水平，转录水平分别为 P-4 的 5.6%、13.8%和 60%。初步判断 PGK1 启动子至少存在 2 个上游激活序列（UAS）。

关键词：热带假丝酵母；磷酸甘油酸激酶；启动子；绿色荧光蛋白；上游激活序列
中图分类号：TQ 920.1　　**文章编号：**1673-1689(2020)03-0095-09　　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.013

Characterization of Phosphoglycerate Kinase Promoter from *Candida tropicalis*

ZHOU Jingyu[1,2]，*CHEN Xianzhong*[*1,2]，*ZHANG Lihua*[1,2]，*SHEN Wei*[1,2]，*FAN You*[1,2]
（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；
2. School of Biotechnology, Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：*Candida tropicalis* is an important industrial strain and can overproduce long chain dicarboxylic acid. However，genetic manipulations were still difficult because of lack of effective expression elements such as promoter and plasmid. Therefore，screening novel promoter is of great significance for metabolic engineering of *C. tropicalis*. In this study，phosphoglycerate kinase gene (*PGK1*) promoter was cloned from *C. tropicalis* ATCC 20336 and its function was investigated. The 846 bp *PGK1* promoter was fused into a *yeGFP3* reporter gene and transformed into *C. tropicalis* XZX host. The results showed that promoter could effectively regulate *yeGFP3* expression. Then，a series of truncated promoters (including 300，550，750 bp) were cloned and used for expression of *yeGFP3* reporter gene in *C. tropicalis*. Transformants harboring various integrative *yeGFP3* reporter gene cassettes were obtained and confirmed. The relative fluorescence intensities of 300，550，750 bp

收稿日期：2018-03-13
基金项目：江苏省基础研究计划（自然科学基金）项目（BK20171138）。
* **通信作者：**陈献忠（1980—），男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事发酵工程专业领域研究。Email: xzchen@jiangnan.edu.cn

promoters were 4.98%, 9.84% and 48.4%, respectively, when using 846 bp *PGK1* promoter as a control. Furthermore, the transcriptional levels of *yeGFP3* in different transformants were detected by RT-qPCR and the results agreed to the fluorescence intensity evaluations. The results indicated that two upstream activation sequences presumably existed in the *PGK1* promoter. In summary, *PGK1* promoter would provide a fundamental expression element for engineering *C. tropicalis* in future.

Keywords: *Candida tropicalis*, phosphoglycerate kinase, promoter, green fluorescent protein, upstream activating sequence

启动子(Promoter)作为基因表达的重要调控元件,对基因的表达水平有着决定性的作用。真核生物启动子结构的复杂性是基因表达多样性的根本[1]。目前,即使是真核生物中研究最为详尽的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),预测和微调启动子的活性仍然非常困难[2-4]。就目前而言,真核生物的代谢工程改造仍然依赖于少量定义明确的内源启动子,如 *GAL1-10*, *TEF* 和 *LEU2* 启动子等[5-7]。

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)作为一种二倍体的非常规酵母,胞内存在一些特殊的代谢途径,能够利用木糖、烷烃和脂肪酸等一些非常规底物作为唯一碳源进行生长,并且在代谢过程中积累一些重要的化工原料,如长链二元有机酸等[8]。因而,热带假丝酵母具有较高的工业应用前景,但是目前可供用作代谢改造的、功能确切的启动子只有少数,如 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*)[9]启动子和异柠檬酸裂解酶(*ICL*)启动子[10]。前者为转录活性较强的组成型启动子,后者为受乙酸盐强烈诱导的诱导型启动子。在微生物代谢途径中,选用不合适的启动子有可能导致代谢途径被限速或中间产物的过量积累,而使用活性适当的启动子可以平衡微生物体内的代谢途径,降低中间产物积累,进而提高热带假丝酵母发酵过程中目的产物的产量和生产效率[11]。因此启动子数量的限制,一定程度上限制了热带假丝酵母代谢工程的研究。

作者以磷酸甘油酸激酶基因(*PGK1*)启动子为研究对象。根据 NCBI 数据库中已公布的 *PGK1* 序列,通过多重序列比对获得启动子上游的保守序列,根据保守序列设计引物 PCR 扩增热带假丝酵母的 *PGK1* 启动子,然后对该启动子的序列进行分析并以 *yeGFP3* 作为报告基因,通过启动子 5′ 端逐步截短,对启动子上游调控元件的功能进行初步鉴定和分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本文中用到的质粒 Ts-*CAT2-gda324-URA3* 和 Ts-*yeGFP3*[12],菌株热带假丝酵母 ATCC 20336、热带假丝酵母 XZX 和大肠杆菌 JM109 均由本研究中心保藏。所涉及到的菌株如表 1 所示:

表 1 本实验所用到的菌株

Table 1 Strains used in this paper

菌株	相关特征	来源
E. coli JM109	*rec*A1 *end*A1 *sup*E44 *hsd*Rl7 *gyr*A96 *thi*A *rel*A1 A (*lac* -*pro*AB)F' (*tra*D36 *pro*AB$^+$*lac*lq *lac*Z DMI5)	CICIM-CU, China
C. tropicalis ATCC20336	*URA3/URA3 CAT/CAT*	ATCC
C. tropicalis XZX	*ura3/ura3 CAT/CAT*	作者所在研究中心保藏
C. tropicalis P-1	*ura3/ura3 cat*::*P300-yeGFP3-T-URA3/CAT*	本研究
C. tropicalis P-2	*ura3/ura3 cat*::*P550-yeGFP3-T-URA3/CAT*	本研究
C. tropicalis P-3	*ura3/ura3 cat*::*P750-yeGFP3-T-URA3/CAT*	本研究
C. tropicalis P-4	*ura3/ura3 cat*::*P846-yeGFP3-T-URA3/CAT*	本研究

实验过程中所用酶类、载体 pMD 19-T Simple、实时荧光定量所用到的试剂盒 Yeast RNAiso Kit、PrimeScript® RT Reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR® *Premix Ex Taq*™ Kit，均购买自 Takara 公司。质粒小提试剂盒、PCR 产物清洗试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒，购自 AxyPrep 公司。

1.2 培养基

LB 培养基：酵母粉 5 g/L，蛋白胨 10 g/L，氯化钠 10 g/L；

MM 培养基：YNB 6.7 g/L，硫酸铵 10 g/L，葡萄糖 20 g/L；

SM 培养基：MM 培养基中添加 0.006 g/dL的尿嘧啶；

氨苄青霉素质量浓度：100 mg/L。

1.3 方法

1.3.1 *热带假丝酵母基因组 DNA 的提取* 热带假丝酵母基因组 DNA 提取方法参考文献[12]进行操作。

1.3.2 *PGK1 启动子的扩增与 yeGFP3 表达盒的构建* *PGK1* 基因的 PCR 扩增：以热带假丝酵母 ATCC 20336 基因组 DNA 为模板，PGKP/PGKT 为引物，PCR 扩增获得 *PGK1* 基因(*P-ORF-T*)。经 AxyPrep 公司的 PCR 产物清洗试剂盒纯化后，连接到 pMD 19-T Simple 载体，得到重组质粒 Ts-*PGK1*。重组质粒送苏州泓迅生物技术有限公司进行测序，得到 *PGK1* 的基因序列。

以热带假丝酵母 ATCC 20336 基因组 DNA 为模板，PGK1/PGK3 和 PGK6/PGK8 为引物，分别扩增 *PGK1* 基因的启动子 *PGK1P*(以下称为 *P846*)和终止子 *PGK1T*(以下称为 *T*)。以质粒 Ts-*yeGFP3* 为模板，PGK4/PGK5 为引物，PCR 扩增报告基因 *yeGFP3*。

将扩增所得的 *P846*、*yeGFP3* 和 *T* 片段等摩尔加入融合 PCR(SOE PCR)反应体系：PrimeSTAR® HS 酶 0.5 μL，5×PrimeSTAR® Buffer 10 μL，dNTPs 4 μL，*P846* 1 μL，*yeGFP3* 2 μL，*T* 1 μL 和 ddH_2O 31.5 μL。反应条件：98 ℃ 3 min；98 ℃ 10 s，55 ℃ 2 min，72 ℃ 2 min，10 个循环；72 ℃ 10 min。以 10 μL 上述融合反应液为模板，重新配置 PCR 反应体系：PrimeSTAR® HS 酶 0.5 μL，5×PrimeSTAR® Buffer 10 μL，dNTPs 4 μL，融合反应液 10 μL，引物 PGK2/PGK7 各 1 μL 和 ddH_2O 22.5 μL。反应条件：98 ℃ 3 min；98 ℃ 10 s，55 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，30 个循环；72 ℃，10 min，获得 *P846-yeGFP3-T* 表达盒。本实验中所用引物见表 2。

表 2 本文中所用引物

Table 2 Primers used in this paper

引物	序列(5′-3′)	酶切位点
URA3-F	TACTCTAACGACGGGTACAAC	-
CATR	TACAACTTAGGCTTAGCATCA	-
CAT2ndU	CTGAAGGCTCCGACATCACC	-
CAT2ndR	CAACCTTGTCGGCGCTGCTA	-
PGK1F(300)	AACTGCAGCATTGAGT GGGTATCACA	*Pst* I
PGK1F(550)	AACTGCAGCAACCCACCATACGTTCA	*Pst* I
PGK1F(750)	AACTGCAGGGTTCTTGCGACACGCTG	*Pst* I
PGKT	AAGTTCC AAAT CATGAAGGTAGAGCTTGTT TTGC	-
PGKP	TTGTTGTGCAATTGTCCAATGTAATAATTTTTCCAT	-
PGK1	AAGTGGAAGGGAAGCTGGTG	-
PGK2	AACTGCAGGTTCCAGATGAGCGAGAC	*Pst* I
PGK3	AATTCTTCACCTTTAGACATTCTGAATAGGCAATTGATAA	-
PGK4	TTATCAATTGCCTATTCAGAATGTCTAAAGGTGAAGAATT	-
PGK5	ATTAGAATAAATATTTCTGATTTATTTGTACAATTCATCCA	-
PGK6	TGGATGAATTGTACAAATAAATCAGAAATATTTATTCTAAT	-
PGK7	GCGTCGACTCGACGATTAAGTTCCAAA	*Sal* I
PGK8	ACGCCAGCTT GCATGCCT	-

注：酶切位点部分用下划线标出

1.3.3 重组质粒 Ts-*CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3* 的构建与转化　*Pst* I/*Sal* I 双酶切 *P846-yeGFP3-T* 表达盒，然后插入到经同样内切酶酶切的载体 Ts-*CAT2-gda324-URA3* 中，替换其中的 *gda324* 片段。之后将连接产物转化 JM109，获得重组质粒 Ts-*CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3*，并通过 *Pst* I 和 *Sal* I 对重组质粒进行酶切验证。然后以质粒 Ts-*CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3* 为模板，CAT2ndU/CAT2ndR 为引物，PCR 扩增 *yeGFP3* 基因整合表达盒 *CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3-CAT2*，经 PCR 产物清洗试剂盒纯化后通过氯化锂转化法[13]转化尿嘧啶营养缺陷型热带假丝酵母宿主 XZX。利用 2 段 *CAT* 基因片段作为同源臂，通过同源重组将 *yeGFP3* 表达盒整合到 *CAT* 位点，经 MM 平板筛得转化子后提取转化子基因组，以 URA3F/CATR 为鉴定引物进行 PCR 验证(图 1)。

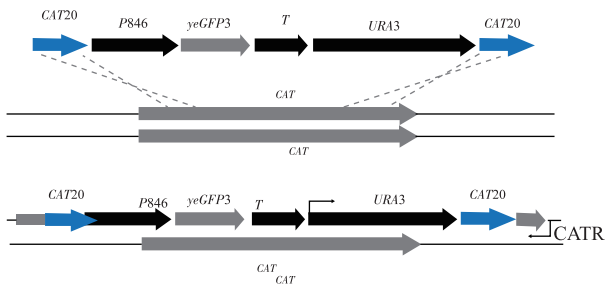


图 1　*yeGFP3* 基因表达盒的转化

Fig. 1　Physical map of the expression cassette and integration of the cassette into the *CAT* locus of *C. tropicalis* XZX

1.3.4 *yeGFP3* 的检测　绿色荧光蛋白在紫外激发光(488 nm)的照射下可发射绿色荧光[14]，根据这一特征对 *yeGFP3* 的表达效果进行检测。将转化子接种到 SM 培养基中，200 r/min，30 ℃培养至对数期(OD_{600}:2~4)，然后置于 4 ℃静置数小时用于稳定绿色荧光蛋白的折叠状态。随后取 1 mL 培养液 12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体，经磷酸盐缓冲液(PBS)清洗菌体 2 次后重悬于 PBS 缓冲液中[15]。通过 Nikon 80i 正置荧光显微镜以 488 nm 的激发光激发后进行荧光观察并拍照记录。

将转化子培养液用 PBS 缓冲液重悬，控制 OD_{600} 在 0.3~0.5，吸取 200 μL 样品至 96 孔黑色酶标板中，将酶标板置于 BioTek Cytation 5 细胞成像微孔板检测系统，在 488 nm/520 nm 处检测荧光强度，并对转化子的荧光信号作定量分析。以出发菌株 XZX 作为阴性对照。

1.3.5 mRNA 提取和实时荧光定量 PCR　根据参考文献[12]对热带假丝酵母转化子进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分析。挑取平板上的热带假丝酵母单菌落接种于液体 SM 培养基中，30 ℃、200 r/min 培养，然后以此作为种子液转接到新鲜的 SM 液体培养基中，待菌体 OD_{600} 值达到 1.5~2.5 后，使用酵母 Total RNA 提取试剂盒提取菌株中总 RNA。使用 PrimeScript® RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒对上述 RNA 进行反转录，获得单链 cDNA。使用 SYBR® *Premix Ex Taq*™ 试剂盒，以 cDNA 作为模板，*ACT* 1 为内参基因，应用 CFX96 Real-Time PCR Detection System 扩增仪进行 RT-qPCR 检测。RT-qPCR 反应按照 95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，40 个循环进行；溶解曲线按照 65 ℃至 95 ℃，每 5 s 升温 0.5 ℃进行绘制。

2 结果与讨论

2.1 *PGK1* 基因的克隆

参照 GenBank 中已公布的 5 株假丝酵母属菌株中的 *PGK1* 基因序列(登录号：FM992693.1、CP017628.1、

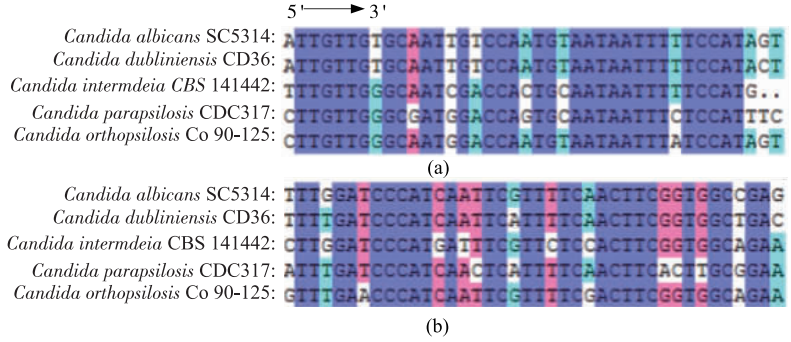
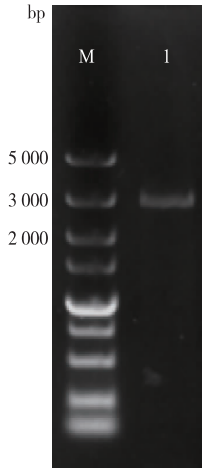


图 2　5 株假丝酵母 *PGK1* 基因多重序列比对

Fig. 2　Multiple sequence alignment of five *PGK1* genes

LT635760.1、HE605202.1 和HE681724.1),分别截取5 株菌的 *PGK1* 结构基因上游约 1 200 bp 序列进行多重序列比对,经过比对获得一段同源性极高的序列(图 2(a)),在此基础上设计 *PGK1* 基因上游引物 PGKF。以同样方法设计终止子下游引物 PGKR(图 2(b))。

以热带假丝酵母 ATCC 20336 基因组 DNA 为模板,PGKF/PGKR 为引物,PCR 扩增获得一段长度为 3 000 bp 的片段(图 3),将片段连接到 pMD 19-T Simple 载体中,然后进行测序分析。对上述基因的测序结果进行分析,发现该基因的编码区与 *Candida albicans* SC5314 和 *Candida dubliniensis* CD36 菌株的碱基序列相似度为 81.8%,氨基酸相似度为 92%;与 *Candida parapsilosis* CDC317 和 *Candida orthopsilosis* Co 90-125 菌株的碱基序列相似度为 78%,氨基酸相似度为 91%;与 *Candida intermedia* CBS 141442 菌株的碱基序列相似度为 76%,氨基酸相似度为 86.8%。因此可以判断所扩增得到的基因为 *PGK1*。



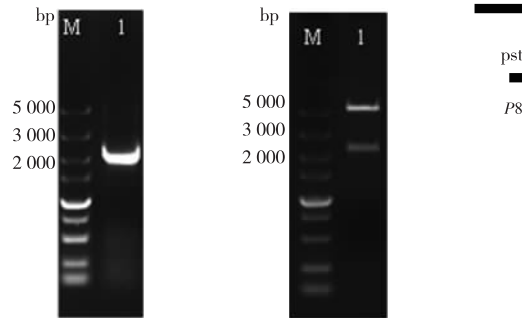
M: DL 5 000 markers; 1: PCR production of PGK1

图 3 *PGK1* 基因克隆与电泳分析

Fig. 3 Amplification of *PGK1* gene

2.2 *PGK1* 启动子的功能鉴定

重组质粒 Ts-*CAT2-P-yeGFP3-T-URA3* 构建过程如图 4(c)所示。分别 PCR 扩增报告基因 *yeGFP3*、*PGK1* 的启动子 *P846* 和终止子 *T*,通过融合 PCR 构建 *yeGFP3* 表达盒 *P846-yeGFP3-T*(图 4(a))。用表达盒替换载体 Ts-*CAT2-gda324-URA3* 中的 *gda324* 片段,获得重组质粒 Ts-*CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3*。用 *Pst* I 和 *Sal* I 对重组质粒进行双酶切,得到 5 kb 的载体片段和 2.1 kb 的 *yeGFP3* 表达盒片段(图 4(b))。将构建完成的表达盒通过氯化锂转化法转化 XZX 菌株并筛选获得转化子,阳性转化子命名为 *C. tropicalis* P-4(图 6,泳道 4)。在荧光显微镜下观察到 P-4 菌株具有清晰的绿色荧光(图 7),由此可以确认 *PGK1* 启动子具有活性。

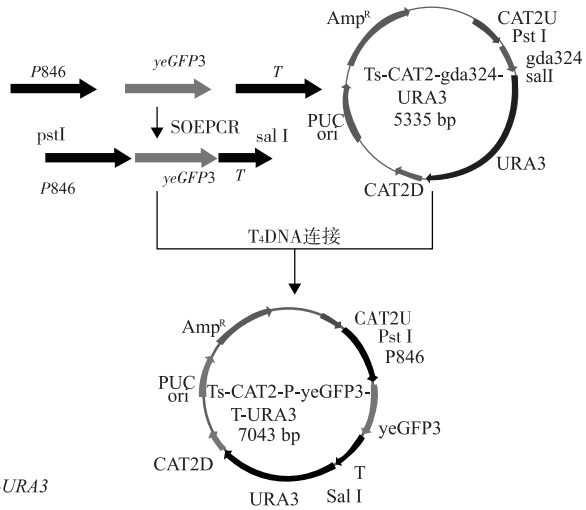


M: DL 5 000 markers; 1: Electrophoresis of P846-yeGFP3-T cassette

(a) *P846-yeGFP3-T*表达盒的融合构建

M: DL 5 000 markers; 1: Ts-CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3/Pst I and Sal I

(b) Ts-*CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3* 的酶切验证



(c)重组质粒Ts-CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3 的构建流程

图 4 *P846-yeGFP3-T* 表达盒的融合构建、Ts-*CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3* 的酶切验证、重组质粒 Ts-CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3 的构建流程

Fig. 4 Construction of *P846-yeGFP3-T* cassette by SOE PCR, Restriction analysis of plasmid Ts-*CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3* and construction of the recombinant plasmid Ts-*CAT2-P846-yeGFP3-T-URA3*

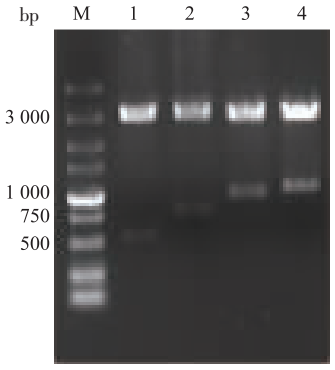
2.3 启动子的截短与 *yeGFP3* 表达盒构建

通过在线启动子分析网站 promoter 2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/) 分析 *PGK1* 启动子序列，分析结果显示在启动子−500 bp 处存在一个可能的功能元件，在−139 bp 处存在一个可能的 TATA 框，−84 bp 处和−240 bp 处存在 2 个可能的 CAAT 框。因此将 *PGK1* 启动子划分为 300 bp(以下称该长度启动子为 *P300*)、550 bp(以下称该长度启动子为 *P550*) 和 750 bp (以下称该长度启动子为 *P750*)3 个长度进行分析。

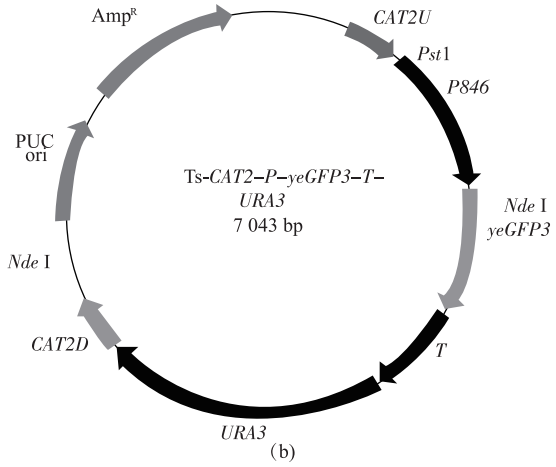
分别以 PGK1F(300)/PGK7、PGK1F(550)/PGK7 和 PGK1F(750)/PGK7 为引物，重组质粒 Ts−*CAT2*−*P846*−*yeGFP3*−*T*−*URA3* 为模板，PCR 扩增得到不同长度 *PGK1* 启动子调控下的 *yeGFP3* 表达盒，用 *Pst* I/*Sal* I 双酶切后连接到经同样内切酶酶切的载体 Ts−*CAT2*−*gda324*−*URA3* 中，分别构建重组质粒 Ts−*CAT2*−*P300*−*yeGFP3*−*T*−*URA3*、Ts−*CAT2*−*P550*−*yeGFP3*−*T*−*URA3* 和 Ts−*CAT2*−*P750*−*yeGFP3*−*T*−*URA3*。用 *Pst* I/*Nde* I 双酶切，得到启动子加部分 *yeGFP3* 的片段，大小依次为 530、780、980 bp 和 1 076 bp，和 2 段约 3 000 bp 的片段(因大小相差过小电泳难以分开，图 5)。分别以上述 3 个重组质粒为模板，CAT2ndU/CAT2ndR 为引物，扩增 *yeGFP3* 表达盒 *CAT2*−*P300*−*yeGFP3*−*T*−*URA3*−*CAT2*、*CAT2*−*P550*−*yeGFP3*−*T*−*URA3*−*CAT2* 和 *CAT2*−*P750*−*yeGFP3*−*T*−*URA3*−*CAT2*。

2.4 *yeGFP3* 基因表达盒的转化与鉴定

分别将 4 个不同长度启动子调控下的 yeGFP3



(a)



(b)

M: DL 5 000 markers; 1: Ts−*CAT2*−*P300*−*yeGFP3*−*T*/*Pst* I and *Nde* I; 2: Ts−*CAT2*−*P550*−*yeGFP3*−*T*/*Pst* I and *Nde* I; 3: Ts−*CAT2*−*P750*−*yeGFP3*−*T*/*Pst* I and *Nde* I; 4: Ts−*CAT2*−*P846*−*yeGFP3*−*T*/*Pst* I and *Nde* I

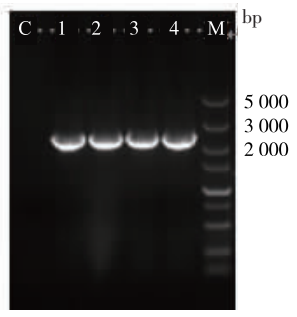
图 5 重组质粒的酶切验证

Fig. 5 Restriction analysis of recombinant plasmids

表达盒转化 XZX 菌株，用 MM 平板筛选转化子，提取转化子基因组，使用 URA3F/CATR 引物进行 PCR 验证，阳性转化子可扩增得到 2.3 kb 的条带，而 XZX 菌株则无特异性扩增条带(图 6)。分别命名阳性转化子为 P−1、P−2、P−3 和 P−4。

2.5 转录水平和翻译水平表征各截短启动子的强度

PGK1 启动子为组成型启动子，能够在菌体生长过程中稳定的进行表达，且不需要添加诱导物。在 SM 液体培养基中分别培养 P−1、P−2、P−3、P−4 和出发菌株 XZX 至 OD_{600} 2~4，然后用荧光显微镜观察记录各转化子中 *yeGFP3* 基因的表达情况并进行定性分析。荧光显微镜结果显示，*yeGFP3* 在 P−1 和 P−

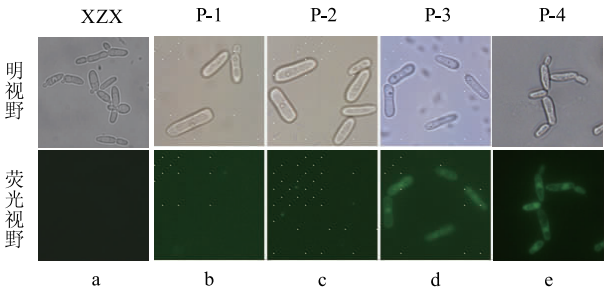


M: DL5 000 markers; C−4: PCR using the genome DNA of different transformants as template; C: XZX; 1: P−1; 2: P−2; 3: P−3; 4: P−4.

图 6 截短启动子的 *yeGFP3* 表达盒整合转化子的 PCR 鉴定

Fig. 6 Identification of truncated promoter cassette by PCR

2 菌株中表达极弱,几乎无法观察到荧光;P-3 菌株中 *yeGFP3* 表达水平较高,在紫外激发光下可以看见明显的绿色荧光;而在 P-4 中 *yeGFP3* 表达水平最高,能够清晰的观察到强烈的绿色荧光(图 7)。荧光检测结果显示,*PGK1* 启动子序列越完整,细胞的荧光强度越强。

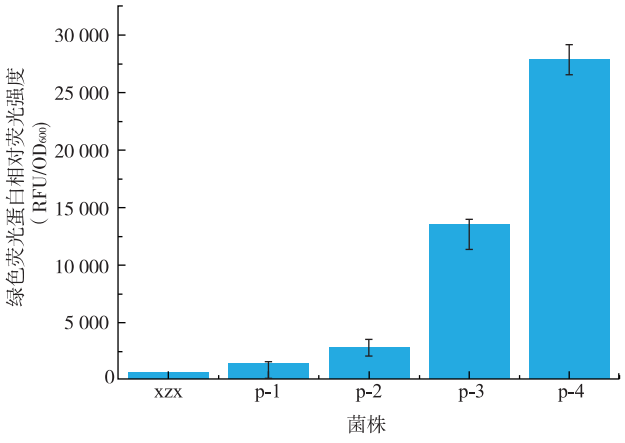


a: *C.tropicalis* XZX; b: *C.tropicalis* P-1; c: *C.tropicalis* P-2; d: *C.tropicalis* P-3; e: *C.tropicalis* P-4.

图 7 热带假丝酵母转化子中绿色荧光蛋白的检测

Fig. 7 Observation of yeGFP3 in *C. tropicalis* XZX

使用 BioTek Cytation 5 细胞成像微孔板检测系统对 4 个转化子中绿色荧光蛋白的表达水平进行定量分析,检测结果与荧光显微镜观察结果一致,P-1、P-2 和 P-3 菌株中的相对荧光强度较 P-4 菌株低,分别为 P-4 菌株的 4.98%、9.84%和 48.4%(图 8)。

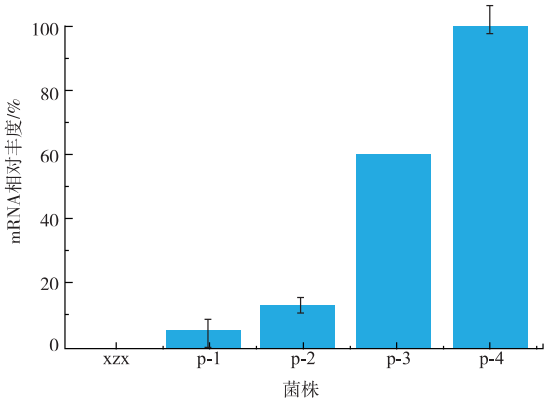


启动子强度定义为 RFU/CD_{600}(即相对荧光单位除以相应的 OD_{600})。误差线为标准差

图 8 热带假丝酵母转化子的相对荧光强度(RFU/OD_{600})

Fig. 8 Relative fluorecence intensity of the five strains

由于转化子 P-1 和 P-2 所表达的绿色荧光极为微弱,为进一步确定 550 bp 以下的启动子片段是否具有转录活性,并分析不同长度启动子调控下的蛋白表达水平与 mRNA 转录水平是否一致,分别提取上述 5 株菌的总 RNA,并进行 RT-qPCR 分析。RT-qPCR 实验结果显示 P-1 和 P-2 菌株中 *PGK1* 启动子仅有较低的转录活性,转化子中 *yeGFP3* 的转录水平分别为 P-4 菌株的 5.6%、13.8%,而 *yeGFP3* 在 P-3 菌株中的转录水平达到了 P-4 菌株的 60%(图 9)。该数据与 BioTek Cytation 5 细胞成像微孔板检测系统结果一致。



菌株 P-4 的转录水平定义为 100%。利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法对基因的转录水平进行分析。误差线为标准差

图 9 不同热带假丝酵母转化子中 *yeGFP3* 基因的 mRNA 相对丰度分析

Fig. 9 mRNA levels of different *yeGFP3* genes in transformants

3 结 语

GFP 作为一种从水母中克隆得到的荧光蛋白,无需辅助因子,经紫外光激发即可发射绿色荧光[16],被广泛用于启动子的功能研究。本文选用密码子优化的酵母增强型 *GFP*(*yeGFP3*)作为报告基因[17],对热带假丝酵母的 *PGK1* 启动子功能进行鉴定。

PGK1 是糖酵解途径中的关键酶,在糖酵解第 2 个阶段的第 2 步中催化 1,3-二磷酸甘油酸转变 3-磷酸甘油酸并产生 1 分子 ATP。*PGK1* 启动子在酵母中具有较强的启动活性,在酵母代谢改造中常被用作强启动子启动外源基因的转录[18]。且 *PGK1* 启动子是组成型启动子,可以在廉价碳源如葡萄糖中稳定表达外源蛋白,不需要添加诱导物,因此选择热带假丝酵母中的 *PGK1* 启动子为研究对象。根据在线启动子分析网站(http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/)对 *PCK1* 启动子调控元件的预测结果,以 XZX 为出发菌株,构建了 P-1、P-2、P-3 和 P-4 四株重组菌,分别以不同长度(300、550、750 bp 和 846 bp)的 *PGK1* 启动子来调控 *yeGFP3* 表达。通过比较 4 株重组菌中 *yeGFP3* 的表达差异来探索 *PGK1* 启动子的调控元件所在区域。实验结果显示:550 bp

以下的 *PGK1* 启动子片段转录活性极低且重组菌的荧光微不可查，推测在–550 bp 以下无功能元件或者在–550 bp 处功能元件被截断，以至于未能发挥应有的辅助转录功能；750 bp 的 *PGK1* 启动子片段有较明显的转录活性且重组菌的荧光清晰可见，该结果可证明–750 bp 之前确有功能元件且为 UAS，但具体序列大小与存在位置需后续实验做进一步的确认；最后 846 bp 的 *PGK1* 启动子片段具有高于 750 bp 的转录活性且重组菌荧光信号稳定，可能在 750 bp 上游至少还有 1 个 UAS。因此初步判断 *PGK1* 启动子中至少存在 2 个 UAS。

外源基因的转录是一个较为复杂的过程，基于分离不同长度的启动子功能的比较研究，下一步的工作是对 *PGK1* 启动子的 2 个可能的 UAS 进行详细分析，分离获得明确的功能序列。再对 *PGK1* 启动子进行改造，将获得的 UAS 分别在 *PGK1* 上游进行串联表达，得到一个转录活性更强的杂合启动子，为以后在热带假丝酵母中高效表达外源基因奠定基础。

参考文献：

[1] HUSSAIN M S, GAMBILL L, SMITH S, et al. Engineering promoter architecture in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. **ACS Synthetic Biology**, 2015, 5(3): 213-223.

[2] BLAZECK J, GARG R, REED B, et al. Controlling promoter strength and regulation in *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic hybrid promoters[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2012, 109(11): 2884-2895.

[3] CURRAN K A, CROOK N C, KARIM A S, et al. Design of synthetic yeast promoters via tuning of nucleosome architecture[J]. **Nature Communications**, 2014, 5(5): 4002-4009.

[4] NEVOIGT E, KOHNKE J, FISCHER C R, et al. Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72(8): 5266-5273.

[5] GAILLARDIN C, RIBET AM. LEU2 directed expression of β-galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*[J]. **Current Genetics**, 1987, 11(5): 369-375.

[6] MUMBERG D, MÜLLER R, FUNK M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds[J]. **Gene**, 1995, 156(1): 119-122.

[7] SCHNEIDER J C, GUARENTE L. Vectors for expression of cloned genes in yeast: regulation, overproduction, and underproduction [J]. **Methods in Enzymology: Elsevier**, 1991, 194: 373-388.

[8] LIU S, JIAO P, CAO Z. Metabolism and beta-oxidation of alkane-utilizing *Candida tropicalis*[J]. **Acta Microbiologica Sinica** 2002, 42(1): 125-128.

[9] JEON W Y, YOON B H, KO B S, et al. Xylitol production is increased by expression of codon-optimized *Neurospora crassa* xylose reductase gene in *Candida tropicalis*[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2012, 35(1-2): 191-198.

[10] ATOMI H, UMEMURA K, HIGASHIJIMA T, et al. The upstream region of the isocitrate lyase gene (*UPR–ICL*) of *Candida tropicalis* induces gene expression in both *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by acetate via two distinct promoters[J]. **Archives of Microbiology**, 1995, 163(5): 322-328.

[11] SUN J, SHAO Z, ZHAO H, et al. Cloning and characterization of a panel of constitutive promoters for applications in pathway engineering in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2012, 109: 2082-2092.

[12] ZHANG L, CHEN X, CHEN Z, et al. Development of an efficient genetic manipulation strategy for sequential gene disruption and expression of different heterologous *GFP* genes in *Candida tropicalis* [J] **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016, 100 (22): 9567-9568.

[13] XIANG Zhen, CHEN Xianzhong, ZHANG Lihua, et al. Development of a genetic transformation system for *Candida tropicalis* based on a reusable selection marker of *URA3* gene[J]. **Hereditas**, 2014, 36(10): 1053-1061.(in Chinese)

[14] CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. **Science**, 1994, 263 (5148): 802-805.

[15] XU Dan, LU Xinyao, ZHUGE Bin, et al. Development and verification of an integrative vector for the industrial osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(8): 842-848.(in Chinese)

[16] YANG Mingyu, LIU Xiang, ZHU Huashuo, et al. Using green fluorescent protein as a reporter gene to detect transgenic plant[J].

Journal of Food Science and Biotechnology. 2008,27(2):98-102.(in Chinese)

[17] CORMACK B P,BERTRAM G,EGERTON M,et al. Yeast-enhanced green fluorescent protein (*yEGFP*):a reporter of gene expression in *Candida albicans*[J]. **Microbiology**,1997,143(Pt 2)(2):303-311.

[18] ARRUDA A,REIS V C B,BATISTA V D F,et al. A constitutive expression system for *Pichia pastoris* based on the *PGK1* promoter[J]. **Biotechnology Letters**,2016,38(3):509-517.

科　技　信　息

欧盟批准可可果肉、果肉汁和浓缩果肉汁作为新型食品投放市场

2020年2月17日,欧盟发布条例(EU)2020/206,批准来自第三国的传统食品可可(Theobroma cacao L.)果肉(pulp)、果肉汁(pulp juice)和浓缩果肉汁(concentrated pulp juice)作为新型食品投放欧盟市场,本条例自发布之日起第20天生效。

法规(EU)2017/2470附件修订如下:

批准新食品	新型食品的使用条件	额外的特定标签要求
可可果肉、果肉汁和浓缩果肉汁	未标明	在含有该成分的食品标签上注明该新型食品为"可可果肉"(cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp)、"可可果肉汁"(cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp juice)或"可可浓缩果肉汁"(cocoa (*Theobroma cacao* L.)concentrated pulp juice),取决于使用的形式。

批准新食品	额外的特定标签要求
可可果肉、果肉汁和浓缩果肉汁	**描述/定义:** 传统食品是可可(*Theobroma cacao* L)植物的果肉,种子中含有水、粘液和酸性物质。 可可果肉是通过将可可豆荚切开,从果壳和豆类中分离得到的,然后将果肉进行巴氏灭菌和冷冻。 可可果肉汁和/或可可浓缩果肉汁是在加工(酶处理、巴氏灭菌、过滤和浓缩)后生产的。 可可果肉、果肉汁、浓缩果肉汁的典型成分数据: 蛋白质/(g/hg):0.0–2.0 总脂肪/(g/hg):0.0–0.2 总糖/(g/hg):>11.0 糖度/°糖度:≥14 pH:3.3–4.0 **微生物标准:** 总板数(有氧):<10 000 cfu/g 肠杆菌科:≤10 cfu/g 沙门氏菌:25 g不存在

[信息来源]厦门WTO/TBT-SPS通报咨询工作站. 欧盟批准可可果肉、果肉汁和浓缩果肉汁作为新型食品投放市场[EB/OL]. (2020-2-26). http://swj.xm.gov.cn/xmtbt-sps/show.asp?id=61274