

DOI: 10.13376/j.cblls/2022096

文章编号: 1004-0374(2022)07-0871-09

启动子改造优化策略在微生物代谢工程中的应用

许莹^{1#}, 唐丽娟^{1#}, 张部昌², 刘静^{1*}

(1 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2 安徽大学物质科学与信息技术研究院, 合肥 230601)

摘要: 启动子是基因表达必需的顺式作用元件, 在基因转录水平调控中居于至关重要的地位, 启动子活性的强弱直接影响基因表达的水平。在微生物代谢工程途径改造过程中, 常见的策略是利用不同强度的启动子对目的基因表达进行精细的调控, 实现各中间代谢产物在生成与利用之间的协调平衡, 提高代谢产物的合成效率。本文首先简述了启动子的特征与功能, 以及内源性启动子在实际应用上的局限性, 提出了启动子改造及优化的必要性和意义, 重点概述了目前启动子工程领域对启动子进行修饰改造的策略以及获得的研究进展, 并对启动子改造优化在代谢工程和合成生物学领域的应用前景进行了展望。

关键词: 基因调控; 启动子工程; 优化策略; 微生物; 代谢工程

中图分类号: Q78 文献标志码: A

Application of promoter optimization strategies in microbial metabolic engineering

XU Ying^{1#}, TANG Li-Juan^{1#}, ZHANG Bu-Chang², LIU Jing^{1*}

(1 School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2 Institution of Physical Science and Information Technology, Anhui University, Hefei 230601, China)

Abstract: Promoter is a cis-acting element essential for gene expression, and is crucial in the regulation of gene transcription. The strength of promoter activity directly determines the level of gene expression. In microbial metabolic engineering, a common strategy is to use the promoters with different strengths to precisely regulate the expression of target genes, achieving the coordinated balance between the generation and utilization of the intermediate metabolites, and improving the synthesis efficiency of the metabolites. This article briefly introduces the features and functions of promoters, proposes the necessity and significance of promoter modification and optimization, and detailly reviews the strategies and the applications of promoter optimization in metabolic engineering and synthetic biology.

Key words: gene regulation; promoter engineering; optimization strategies; microorganisms; metabolic engineering

为了满足人类对目的代谢产物的需求, 打破细胞代谢中的不平衡状态, 1991年美国著名生化专家Bailey JE首先提出代谢工程(metabolic engineering)的概念^[1]。细胞内整个代谢网络是由若干个较简单的代谢支路组合形成的复杂构造, 对各代谢支路的关键酶的基因表达进行精确的调控, 平衡各中间代谢产物的生成与利用, 已经成为代谢工程研究的重要内容^[2]。微生物基因的表达调控主要发生在转录水平上, 而启动子(promoter)在转录水平调控中居于关键的地位, 启动子活性的强弱直接影响基因表

达的水平^[3]。在代谢工程途径改造中, 需要利用不同强度的启动子对目的基因表达进行精细的调控, 实现代谢平衡, 提高代谢产物的合成^[4-5]。然而, 目前可获得的天然启动子很难满足上述的要求, 在实际应用上具有一定的缺陷性, 因而近些年来对启动子

收稿日期: 2022-02-23; 修回日期: 2022-04-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31800057)

[#]共同第一作者

^{*}通信作者: E-mail: liujing9261@ahau.edu.cn

改造和优化的研究得到越来越多的关注^[6-8]。本文针对微生物代谢工程中天然启动子应用上存在的问题,提出启动子改造优化的必要性,重点综述了目前启动子工程领域对启动子进行修饰改造的策略以及获得的研究进展,并对启动子改造优化在代谢工程和合成生物学领域中的应用前景进行了展望。

1 启动子简介

启动子是精确和特异性启动基因转录过程所必需的 DNA 序列,位于结构基因上游,能够与 RNA 聚合酶 (RNA polymerase, RNAP) 结合并起始 mRNA 的合成。原核生物和真核生物的启动子在结构和序列上具有各自的特征(图 1)。下面分别以两种模式生物——大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中的启动子作为典型代表进行简要介绍。

1.1 原核启动子

原核生物的启动子序列是位于转录起始位点 (transcription start site, TSS) 的 5' 端,覆盖约 40 bp 长的区域,结构上一般包括转录起始位点(记为 +1)、-35 区、-10 区以及 -35 区和 -10 区之间的间隔区域。大肠杆菌作为原核生物中应用最广泛、最成功的表达体系,其启动子的研究最为深入^[9-10]。大肠杆菌启动子 -35 区和 -10 区是两段高度保守的序列,其中 -35 区位于转录起始位点上游 35 bp 处,由 6 个碱基组成,序列一般为 TTGACA; -10 区又称为 Pribnow 盒 (Pribnow box),最初由 David Pribnow 发现并确定为一段富含 AT 碱基对的保守序列,位于转录起始位点上游 10 bp 处,序列一般为 TATAAT。

-35 区和 -10 区之间被 17 bp 的间隔序列所隔开。间隔序列长度对于基因转录十分重要,当间隔区长度长于 18 bp 或短于 16 bp 时, RNA 聚合酶与启动子的亲和性都会显著降低。除此之外,一些启动子还含有特殊结构,如上游启动子元件 (upstream promoter element, UP 元件) 是位于启动子 -40 和 -60 之间一段富含 AT 的序列,能够与 RNA 聚合酶的 α 亚基结合并促进转录^[11]。

1.2 真核启动子

真核生物中则以酵母菌的启动子研究的最为清楚,真核启动子由核心启动子 (core promoter) 和 UP 元件组成^[12-13]。核心启动子由 TATA 盒 (TATA box)、TF II B 识别元件 (transcription factor for RNA polymerase II B recognition element)、起始子 (initiator, Inr) 和下游启动子元件 (downstream promoter element, DP 元件) 4 个元件构成,它们位于转录起始位点的上游 40 bp 到下游 40 bp 之间。但在酿酒酵母中,大部分启动子元件都已退化,仅有 20% 的基因启动子还存在着 TATA 盒,共同序列为 TATA (A/T) A (A/T) (A/G),并且酿酒酵母启动子的 TATA 盒位置具有可变性,一般位于起始子上游的 40~120 bp 处^[12, 14]。位于核心启动子 TATA 盒上游的 UP 元件是一段保守的调控区域,分为上游激活序列 (upstream activation sequences, UAS) 和上游抑制序列 (upstream repression sequences, URS),可分别特异性结合转录激活因子和转录抑制因子,从而促进或抑制 RNA 聚合酶的结合效率,实现对下游基因转录水平的调节^[15]。上游激活序列最先在酵母中被发现,如半乳糖代谢酶基因 *Gal* 的上游激活序列由 4 个相连的 17 bp 序列

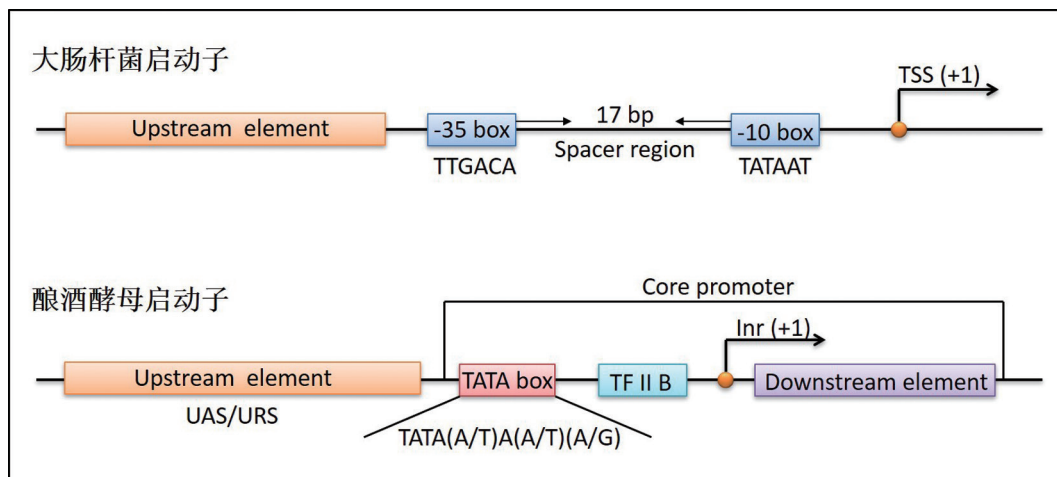


图1 大肠杆菌和酿酒酵母中启动子的结构特征示意图

组成;精氨酸酶基因 *Car1* 的上游激活序列为一段 13 bp 的序列。上游激活序列一般位于转录起始位点上游的 100~500 bp 之间,距离过远就会失去促进转录的活性^[16]。

2 代谢工程中启动子改造优化的必要性

2.1 常用的天然启动子

启动子根据其作用方式的不同,一般可分为组成型启动子 (constitutive promoter) 和诱导型启动子 (inducible promoter)。组成型启动子在启动基因转录时,不需要转录调控因子 (transcriptional regulator) 的参与。而诱导型启动子需要转录调控因子与诱导物 (inducer) 的联合作用,才能实现对基因转录过程的启动或调节。转录调控因子的作用一般分为正调控模式 (positive regulation) 和负调控模式 (negative regulation), 分别对应目的基因转录强度的增强 (激活) 或削弱 (抑制)。诱导物一般包括外加化学试剂或代谢物分子等化学诱导物和温度、光、压力等物理诱导物。

大肠杆菌表达系统中常用的天然启动子大多都是诱导型启动子,主要包括乳糖或 IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)诱导的 P_{lac} 启动子^[17]、色氨酸诱导的 P_{trp} 启动子^[18]、IPTG 诱导的 P_{T7} 噬菌体启动子^[19]、L-阿拉伯糖诱导的 $P_{BAD}(P_{arab})$ 启动子^[20] 和四环素诱导的 P_{tetA} 启动子^[21] 等(表 1)。而酿酒酵母表达系统中常用的天然启动子主要包括组成型 P_{TEF1} 启动子^[22]、 P_{ADH1} 启动子^[23]、 P_{TPH1} 启动子^[24]、 P_{HXT7} 启动子^[24]、 P_{TDH3} 启动子^[25]、 P_{PGK1} 启动子^[23], 以及半乳糖和葡萄糖诱导的 P_{GALI} 启动子^[26] 和 P_{GALI0}

启动子^[26](表 1)。

2.2 天然启动子在代谢工程中应用的局限性

在特定的合成途径中,不同的基因需要进行不同程度的表达,才能实现各代谢支路的平衡,最终提高目的产物的产量。然而,大多数天然启动子无论强度还是灵活性都很难满足要求,主要原因是:(1) 首先,许多细胞内源基因的启动子由于受到自身复杂代谢网络的调控,表达效率难以提高,而外源基因的启动子由于遗传背景的限制,在异源宿主中活性低、通用性差;(2) 其次,某个天然启动子只能对某个特定的基因进行固定强度的表达,但是在合成途径改造中,不同的基因需要不同程度的表达,从而达到代谢平衡状态,降低或阻止中间产物以及毒性物质的积累;(3) 再次,虽然诱导型启动子可以通过添加不同浓度的诱导剂来实现基因不同程度的表达,但是这种调节的范围很有限,多数诱导型启动子仍只能实现是与非的基因表达,无法满足精细调控的需要。同时,诱导剂使用还可能对细胞产生一定的毒性作用,价格也较昂贵,增加了实验的成本。

基于天然启动子在学习上的限制性,改造和筛选新型的合成启动子变得尤为必要。2005 年,Alper 等^[27] 首次提到了启动子工程 (promoter engineering) 的概念,指出启动子可以像蛋白质工程那样进行改造,建立具有宽范围遗传调控的启动子文库,从而达到系统性的改善。启动子工程领域的主要研究内容就是克服天然启动子在学习上的缺陷,改造和筛选符合代谢工程研究所需的功能优良的启动子,更加灵活和精细地调控基因表达,为代谢工程进行途径改造提供强有力的调控工具^[27]。

表1 大肠杆菌和酿酒酵母表达系统中常用的天然启动子

表达系统	启动子	启动子来源	启动子类型	参考文献
大肠杆菌	P_{lac}	乳糖操纵子	诱导型(IPTG/乳糖)	[17]
	P_{trp}	色氨酸操纵子	诱导型(色氨酸)	[18]
	P_{T7}	噬菌体T7 RNA聚合酶	诱导型(IPTG)	[19]
	P_{BAD}	阿拉伯糖操纵子	诱导型(L-阿拉伯糖)	[20]
	P_{tetA}	四环素外排ABC转运蛋白	诱导型(四环素)	[21]
酿酒酵母	P_{GALI}	半乳糖激酶	诱导型(半乳糖和葡萄糖)	[26]
	P_{GALI0}	UDP-葡萄糖-4-差异构酶	诱导型(半乳糖和葡萄糖)	[26]
	P_{TEF1}	翻译延伸因子	组成型	[22]
	P_{ADH1}	乙醇脱氢酶	组成型	[23]
	P_{TPH1}	磷酸丙糖异构酶	组成型	[24]
	P_{HXT7}	己糖转运蛋白	组成型	[24]
	P_{TDH3}	磷酸丙糖脱氢酶	组成型	[25]
	P_{PGK1}	3-磷酸甘油酸激酶	组成型	[23]

3 代谢工程中启动子改造的策略及应用

3.1 杂合启动子

构建杂合启动子 (hybrid promoter) 是启动子改造中较早使用的策略, 将两种或两种以上不同启动子元件融合组装形成一个新的启动子, 以提高转录效率或获得新的启动子调控特征。例如, P_{lacI} 和 P_{trc} 启动子都是由大肠杆菌 P_{lacUV5} 和 P_{trp} 启动子通过人工构建的杂合启动子, 它们均受 IPTG 诱导调节, 且启动能力比两个亲本都强^[28-29]。其中, P_{lacI} 启动子的 -20 区到起始位点的区域来自 P_{trp} 启动子, 其余部分来自于 P_{lacUV5} 启动子^[30]; 而 P_{trc} 启动子由 P_{lacUV5} 启动子的 -10 区和 P_{trp} 启动子的 -35 区构成^[31]。L- 鼠李糖诱导的 $rhaP_{BAD}$ 启动子是大肠杆菌中另一典型的杂合启动子, 由大肠杆菌磷酸调控体系中的 P_{BAD} 启动子和 L- 鼠李糖诱导的 P_{rhaB} 启动子的特征序列拼接而成。 $rhaP_{BAD}$ 启动子在大肠杆菌中是一个非常好的, 严谨调控外源基因表达的工具^[32]。

FadR 是大肠杆菌中生物燃料硬脂酸酯 (fatty acid ethyl ester, FAEE) 生物合成过程中的一个配体响应调控因子, 在没有 FAEE 情况下, FadR 与自身启动子 P_{fadBA} 结合, 导致 RNA 聚合酶不能结合到启动子区域, 基因不能表达; 添加 FAEE 后, FadR 被释放下来, RNA 聚合酶正常结合, 基因得到表达^[33]。由于启动子 P_{fadBA} 在宿主菌中的调控能力有限, 研究者将 FadR 的结合序列与噬菌体 P_{λ} 启动子和 T7 启动子分别融合, 得到杂合启动子 P_{LR} 和 P_{AR} , 利用红色荧光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 基因作为报告基因, 检测发现荧光强度分别提高 10 倍和 25 倍; 随后, 将 P_{AR} 和 P_{LR} 与 P_{lacUV5} 启动子再进行融合, 得到三个新的启动子 P_{FL1} 、 P_{FL2} 及 P_{FL3} 。将这些杂合启动子应用于 FAEE 生物合成中的关键步骤, 使大肠杆菌生产 FAEE 的产量提高了 3 倍, 达到 1.5 g/L^[34]。研究者通过监测前体物质的消耗速率与若干个中间体产生与降解的速率之间的变化曲线, 证实 FAEE 产量的提高是由于这些启动子的使用, 从而实现了对整个生物合成路径的动态调控, 提高了细胞代谢的平衡状态, 而不仅仅是强启动子的原因^[34]。

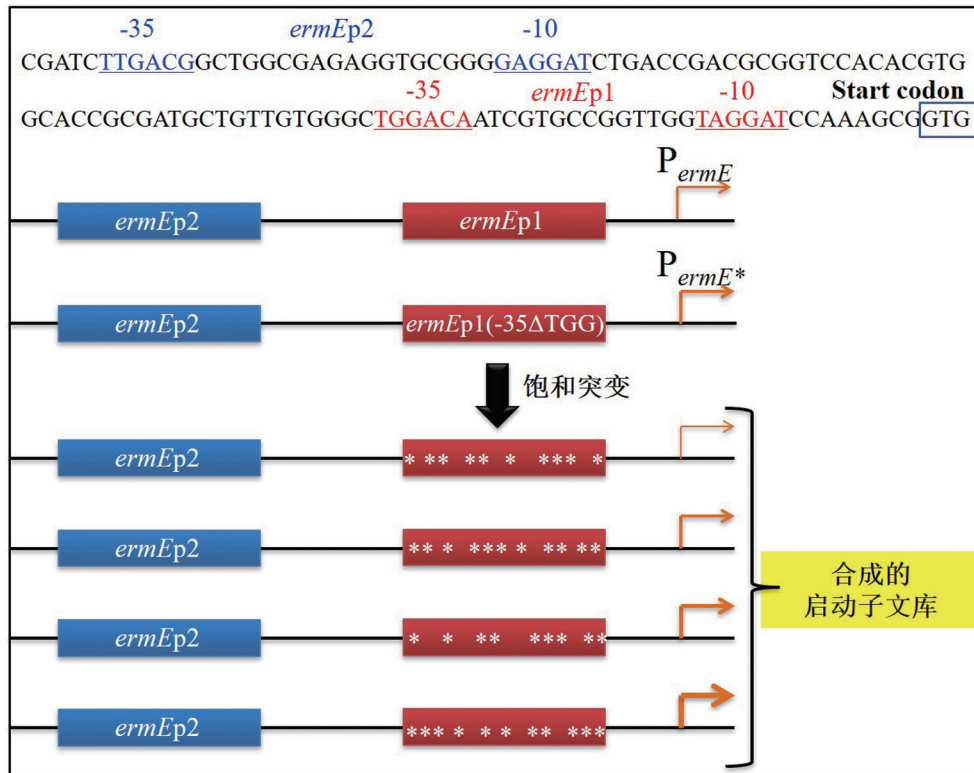
3.2 饱和突变

饱和诱变 (saturation mutagenesis) 是指对基因的某一特定局部小区域内的碱基进行所有类型的突变。原核启动子 -35 区和 -10 区的碱基序列具有高度的保守性, 因而它们之间的间隔区域 (spacer

region) 中碱基的种类和数量对启动子的活性起重要作用, 如果发生改变会影响其控制的基因表达的程度。基于这个原理, 研究者们通过设计简并引物 (degenerate primer), 对启动子 -35 区和 -10 区的间隔区域进行随机突变, 使诱导的点突变在其中尽可能稠密地分布, 以至于接近饱和状态, 从而构建包括各种活性程度不同的突变启动子文库。

头孢菌素 C 酰化酶 (CCA) 能够催化头孢菌素 C (CPC) 转化为 7-氨基头孢菌素酸 (7-ACA), 是一步酶法生产 7-ACA 的关键酶^[35]。为了在大肠杆菌中提高 CCA 的表达量, Nie 等^[35] 通过设计简并引物对 T7 启动子的序列进行饱和突变, 得到 24 个合成的启动子文库, 其中最强启动子可使 CCA 的表达量提高 1.3 倍。饱和突变策略同样适用于真核启动子的优化筛选, 例如, Blount 等^[36] 对酿酒酵母中的组成型启动子 P_{FY1p} 的 48 bp 核心启动子序列进行饱和突变, 筛选得到 36 个具有不同活性的合成启动子文库。

蓝晶盐单胞菌 (*Halomonas bluephagnesis*) 是工业上高效生产可生物降解塑料家族聚羟基烷酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHAs) 的菌株^[37-38]。Shen 等^[39] 通过设计简并引物, 对蓝晶盐单胞菌中最强启动子 P_{porin} 的核心区域, 即 -35 区至转录起始位点的区域进行饱和突变, 得到 95 个合成启动子的人工启动子文库。利用超荧光绿色荧光蛋白 (superfolder green fluorescence protein, sfGFP) 基因作为报告基因, 他们发现这些启动子控制的相对转录强度范围从 40~140 000, 最大相差 3 500 倍之大; 通过筛选, 该启动子文库可使蓝晶盐单胞菌生产聚 (3-羟基丁酸酯-co-4-羟基丁酸酯) (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate, 3HB-co-4HB) 的产率达到 1.59 g/L/h, 相当于 100 g/L 的细胞干重中 3HB-co-4HB 聚酯占比 80%。 P_{ermE} 启动子是糖多孢红霉菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 中红霉素生物合成基因簇上的抗性基因启动子, 由 $ermEp1$ 和 $ermEp2$ 两个启动子的特征区域重叠组成, 研究人员对 $ermEp1$ 的 -35 区 TGG 进行缺失, 得到活性更高的 P_{ermE^*} 启动子, 成为产抗生素类放线菌中应用最广泛的强启动子之一^[40-41] (图 2)。Siegl 等^[42] 又通过设计简并引物, 对 $ermEp1$ 的 -35 区和 -10 区的上游、间隔区及下游序列进行饱和突变, 得到强度变化从 2%~319% 的合成启动子文库, 其中最强启动子 P21 可在变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 中将次级代谢产物淡黄霉素 (Flaviolin) 的产量提高 3.3 倍 (图 2)。



*ermE*启动子(P_{ermE})包括*ermEp1* (红色标记的-10区和-35区)和*ermEp2* (蓝色标记的-10区和-35区)两个启动子特征区; *ermEp1* -35区TGG缺失突变后得到活性更强启动子 P_{ermE^*} ; *ermEp1*序列经饱和和突变后得到强度大小不同的合成启动子文库。

图2 *ermE*启动子的结构和改造策略示意图

3.3 易错PCR

易错 PCR 技术 (error-prone PCR, EP-PCR) 是在采用 DNA 聚合酶进行目的基因扩增时, 通过调整反应条件, 如提高镁离子浓度、加入锰离子、改变体系中 4 种的 dNTPs 浓度或运用低保真度 DNA 聚合酶等, 来改变扩增过程中的突变频率, 从而以一定的频率向目的序列中随机引入突变。通过易错 PCR 对原始启动子序列进行随机突变, 构建启动子文库, 再结合特定的报告基因的表达实现高通量筛选, 可获得强度范围宽泛的启动子集合, 该方法目前已经成为启动子定向改造策略中常用的方法。

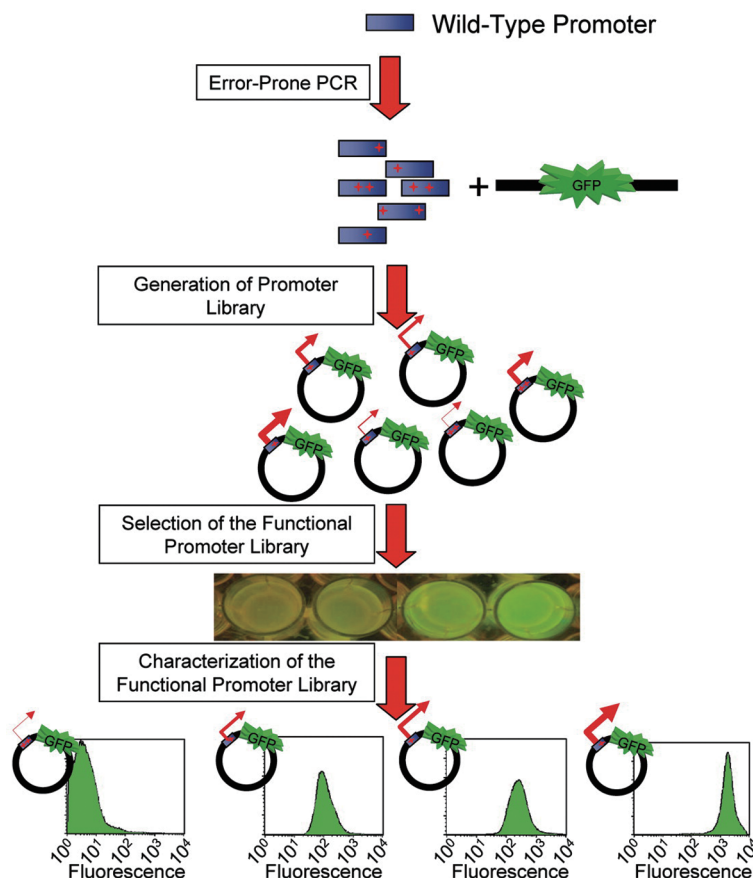
Alper 等^[27] 在大肠杆菌中通过易错 PCR, 对噬菌体 P_L - λ 启动子进行随机突变, 筛选得到包括 200 个活性范围宽泛的启动子文库 (图 3); 利用绿色荧光蛋白基因作为报告基因, 启动子的强度变化可达到 196 倍, 同时荧光定量 RT-PCR 检测发现 *gfp* 的表达水平可提高至 325 倍, 而利用氯霉素抗性基因 *cat* 作为报告基因, 该启动子文库的表达范围仍能提高 26 倍。Cui 等^[43] 利用易错 PCR 对酿酒酵母中 PGK1 启动子进行随机突变, 构建了包含 28 个突变的 PGK1 启动子文库, 通过绿色荧光强度的监

测发现, 相对原始 PGK1 启动子, 该启动子文库控制的转录强度范围从 0.1% ~141%; 利用该启动子文库对酿酒酵母中的乙醇乙酰转移酶 (alcohol acetyltransferases) 基因 *ATF1* 进行过量表达, 最高可使菌株生产乙酸乙酯的产量提高 27.22 倍。Sengupta 等^[44] 通过易错 PCR 对模式蓝藻细长聚球藻 (*synechococcus elongatus*) 中的两个天然强启动子 P_{rbcL} (来源于编码核酮糖 -1, 5- 二磷酸羧化酶 / 加合酶的基因启动子) 和 P_{cpb} (来源于编码藻蓝蛋白 β -1 亚基的基因启动子) 上游 300 bp 的序列进行随机突变, 构建得到包括 48 个突变的启动子文库, 其调控强度的范围变化可达 2 个数量级, 并且该启动子文库中大多数启动子在异源宿主大肠杆菌中仍具有很强的表达能力。

3.4 串联重复启动子

天然启动子大多数以单拷贝的形式发挥起始转录的作用, 然而单拷贝状态通常很难达到高效转录的目的。为了获得活性更强的启动子, 研究者们对启动子进行串联重复, 以增加启动子或其核心序列的拷贝数, 从而强化基因的表达。

P_{epo} 是埃博霉素生物合成基因簇上的原始启动



噬菌体 P_L - λ 启动子的核心序列经易错PCR引入随机突变后,利用绿色荧光蛋白基因(GFP)作报告基因,筛选得到荧光强度不同(即代表启动子强度不同)的合成启动子文库。

图3 易错PCR策略构建噬菌体 P_L - λ 启动子突变文库示意图^[27]

子,其核心区域包括两组 -35 区和 -10 区特征序列,类似于上述 P_{ermE} 启动子^[45]。Yue 等^[46]通过对 P_{epo} 启动子上 221 bp 长度的核心序列(即翻译起始位点上游 -389 bp 至 -171 bp,记为 cP_{epo})进行串联重复,得到 $1cP_{epo}$ - P_{epo} 、 $2cP_{epo}$ - P_{epo} 和 $3cP_{epo}$ - P_{epo} 三个改造串联启动子,其中 $1cP_{epo}$ - P_{epo} 活性较原始启动子提高 71%, $2cP_{epo}$ - P_{epo} 提高 3.5 倍,而 $3cP_{epo}$ - P_{epo} 活性较 $2cP_{epo}$ - P_{epo} 只有微弱提高。3-羟基丙酸(3-hydroxypropionic acid, 3-HP)是 2004 年美国能源部提名的 12 种高价值可再生化学品之一,可通过大肠杆菌^[47]、谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)^[48]和肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[49]等多种微生物进行生物合成。Zhao 等^[50]在肺炎克雷伯菌中首先通过对一系列组成型和诱导型启动子进行筛选,发现 IPTG 诱导的大肠杆菌 P_{lac} 启动子能够最高效地过量表达乙醛脱氢酶 $PuuC$,从而催化 3-HP 的生物合成;随后,他们将 P_{lac} 启动子进行不同拷贝的重复排列组装(2~5 个)得到一系列串联启动子,

通过检测发现,3 个串联的 P_{lac} 启动子过量表达 $PuuC$ 时,可使 3-HP 的产量达到 102.61 g/L,这是目前为止 3-HP 微生物合成的最高水平。

3.5 转录因子结合位点的修饰

转录因子结合位点(transcription factor binding site, TFBS)是转录因子调节基因表达时,与基因启动子上特定序列结合的区域。因此,启动子改造研究也经常与转录因子结合位点的优化相结合。例如,将转录因子结合位点直接添加在启动子上,或者将启动子上已包含的转录因子结合序列进行去除或突变,都可以实现调节启动子强度的目的。

Hartner 等^[51]利用生物信息学分析毕赤酵母中广泛应用的 P_{AOXI} 启动子特征序列,预测出与 P_{AOXI} 启动子调控相关的 TFBS。他们一方面通过对可能起抑制作用的 TFBS 进行缺失,得到的突变启动子文库调控荧光强度范围为原始 P_{AOXI} 启动子的 6%~166%;另一方面,通过对可能起促进作用的 TFBS 进行加倍,使得启动子活性最高提高了约 3 倍。

Wu 等^[52]在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中将启动子 P_{gamA} 中转录因子 GamR 的结合位点 $gamO2$ 插入到 P_{veg} 启动子中, 构建了能够响应胞内 6-磷酸氨基葡萄糖 (glucosamine-6-phosphate, GlcN6P) 的合成启动子。Wang 等^[53]对天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中启动子 $kasOp$ 序列中的两个调控因子 ScbR/ScbR2 的结合序列 (位于转录起始位点上游 222~242 bp) 进行去除, 得到活性增强的 $kasOp3$; 之后, 他们在 $kasOp3$ 的基础上对另一个 ScbR 的结合序列 (位于 -35 和 -10 间隔区) 进行随机突变, 筛选获得更强启动子 $kasOp^*$, 其活性高于链霉菌中广泛使用的强启动子 $ermEp^*$ 和 SF14p。在大肠杆菌 MarRAB 操纵子中, MarR 能够结合 $PmarO$ 启动子区的两段序列 (Binding box I 和 Binding box II), 从而抑制 RNA 聚合酶的正常结合, 导致基因转录受阻, 而水杨酸 (salicylic acid, SA) 作为 MarR 结构上的配体能够解离 MarR 与 $PmarO$ 启动子的结合^[54-55]。Zou 等^[56]在大肠杆菌中将 $PmarO$ 启动子上 Binding box I 和 Binding box II 分别克隆在组成型启动子 pL 和诱导型启动子 S14 的不同位置, 得到一系列活性不同的杂合启动子, 这些启动子的转录活性可严格受到 MarR 及其配体水杨酸的调控。

4 总结与展望

启动子是基因表达调控的一种顺式作用元件, 对微生物代谢途径的平衡起着重要作用。早期, 科学家们分别对原核生物和真核生物启动子的结构进行了详尽的研究, 帮助我们更加深入地理解启动子的序列特征、转录因子结合位点以及不同启动子调控作用之间的相互关系, 为现代启动子工程领域奠定扎实的理论基础^[27]。利用合理的启动子工程的方法, 首先能够对启动子进行随机突变, 构建强度范围较宽泛的启动子文库, 不但能够达到高效的基因过表达, 还能够实现对各个重要代谢支路的平衡调节; 其次, 对启动子或其核心序列进行串联排列, 得到活性增强的启动子, 也是有效的改造方法; 还可通过将两种以上的启动子元件进行组装, 或者将特异性的转录因子结合位点融合到启动子区域, 构建杂合启动子, 来提高启动子活性; 最后, 对转录因子结合位点进行直接修饰, 改变转录因子与启动子之间的相互作用, 同样能够实现对启动子活性的调节。

这些启动子的设计方法, 不仅在微生物代谢工程的各领域得到成功应用, 而且基于启动子的基因

高效及精准表达调控在合成生物学中具有举足轻重的地位^[6, 8]。目前, 启动子工程改造领域已经取得较多的研究进展, 但仍有很多方面的问题值得关注和探讨: 例如, 研究者们可以提高生物信息学分析的比重, 通过前期全面地预测启动子结构或功能方面的数据, 有利于后期筛选出更具改造优化潜力的启动子; 又如, 研究者们大多侧重于启动子强度的提高, 然而在微生物代谢中, 整个代谢网络的和谐流畅需要依赖于代谢途径中各个支路的相互协调与配合, 有时为了取得整体平衡, 可能需要弱化某个环节的启动子强度或者在时空尺度上加以精确调控等。除此之外, 仍有很多问题需要进一步研究, 例如, 在不同微生物种属之间具有广谱通用性的启动子仍不多见; 能够响应更多化学分子与物理信号的新诱导型启动子仍有待发现等等。因而, 未来启动子工程领域的主要任务, 不仅是利用已有的设计策略为人类提供更加丰富的微生物代谢产物, 而且要开发更加高效的启动子改造策略, 例如建立便捷的启动子预测分析结合高通量筛选的方法以缩减和优化启动子筛选的过程, 开发更加直接系统的转录因子修饰方法, 以及运用复合的启动子改造策略以提高单一策略的局限性等。

[参 考 文 献]

- [1] Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. Science, 1991, 252: 1668-75
- [2] Choi KR, Jang WD, Yang D, et al. Systems metabolic engineering strategies: integrating systems and synthetic biology with metabolic engineering. Trends Biotechnol, 2019, 37: 817-37
- [3] Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. ACS Chem Biol, 2008, 3: 64-76
- [4] Choi KR, Jiao S, Lee SY. Metabolic engineering strategies toward production of biofuels. Curr Opin Chem Biol, 2020, 59: 1-14
- [5] Kang NK, Baek K, Koh HG, et al. Microalgal metabolic engineering strategies for the production of fuels and chemicals. Bioresour Technol 2022, 345: 126529
- [6] Xu N, Wei L, Liu J. Recent advances in the applications of promoter engineering for the optimization of metabolite biosynthesis. World J Microbiol Biotechnol, 2019, 35: 33
- [7] Jin LQ, Jin WR, Ma ZC, et al. Promoter engineering strategies for the overproduction of valuable metabolites in microbes. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103: 8725-36
- [8] Cazier AP, Blazeck J. Advances in promoter engineering: novel applications and predefined transcriptional control. Biotechnol J, 2021, 16: e2100239
- [9] Wang Y, Wang H, Wei L, et al. Synthetic promoter design in *Escherichia coli* based on a deep generative network.

- Nucleic Acids Res, 2020, 48: 6403-12
- [10] Krefft D, Prusinowski M, Maciszka P, et al. T7-lac promoter vectors spontaneous derepression caused by plant-derived growth media may lead to serious expression problems: a systematic evaluation. *Microb Cell Fact*, 2022, 21: 13
- [11] Ross W, Aiyar SE, Salomon J, et al. *Escherichia coli* promoters with UP elements of different strengths: modular structure of bacterial promoters. *J Bacteriol*, 1998, 180: 5375-83
- [12] Tang H, Wu Y, Deng J, et al. Promoter architecture and promoter engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolites*, 2020, 10: 320
- [13] Feng X, Marchisio MA. *Saccharomyces cerevisiae* promoter engineering before and during the synthetic biology era. *Biology (Basel)*, 2021, 10: 504
- [14] Blazeck J, Alper HS. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnol J*, 2013, 8: 46-58
- [15] Redden H, Alper HS. The development and characterization of synthetic minimal yeast promoters. *Nat Commun*, 2015, 6: 7810
- [16] Deng J, Wu Y, Zheng Z, et al. A synthetic promoter system for well-controlled protein expression with different carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2021, 20: 202
- [17] Browning DF, Godfrey RE, Richards KL, et al. Exploitation of the *Escherichia coli lac* operon promoter for controlled recombinant protein production. *Biochem Soc Trans*, 2019, 47: 755-63
- [18] Landberg J, Mundhada H, Nielsen AT. An autoinducible trp-T7 expression system for production of proteins and biochemicals in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117: 1513-24
- [19] Wang W, Li Y, Wang Y, et al. Bacteriophage T7 transcription system: an enabling tool in synthetic biology. *Biotechnol Adv*, 2018, 36: 2129-37
- [20] Yang J, Kim N, Park W, et al. Optimization of protein trans-splicing in an inducible plasmid display system for high-throughput screening and selection of soluble proteins. *Enzyme Microb Technol*, 2022, 153: 10991
- [21] Schulte M, Sterzenbach T, Miskiewicz K, et al. A versatile remote control system for functional expression of bacterial virulence genes based on the *tetA* promoter. *Int J Med Microbiol*, 2019, 309: 54-65
- [22] Gu X, Zhao J, Wang H, et al. ATMT transformation efficiencies with native promoters in *Botryosphaeria kuwatsukai* causing ring rot disease in pear. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34: 179
- [23] Xiong L, Zeng Y, Tang RQ, et al. Condition-specific promoter activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 58
- [24] Chen H, Zhu C, Zhu M, et al. High production of valencene in *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 195
- [25] Duveau F, Toubiana W, Wittkopp PJ. Fitness effects of cis-regulatory variants in the *Saccharomyces cerevisiae* TDH3 promoter. *Mol Biol Evol*, 2017, 34: 2908-12
- [26] Alison GL, Xue Y, Song R, et al. Insights into bidirectional gene expression control using the canonical GAL1/GAL10 promoter. *Cell Rep*, 2018, 25: 737-48
- [27] Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 12678-83
- [28] Mann EA, Brosius J, Ptashne M. Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*, 1983, 25: 167-78
- [29] de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M. The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80: 21-5
- [30] Deng C, Li J, Shin HD, et al. Efficient expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Geobacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli* by promoter engineering and downstream box evolution. *J Biotechnol*, 2018, 266: 77-83
- [31] Zhao M, Yuan Z, Wu L, et al. Precise prediction of promoter strength based on a *de novo* synthetic promoter library coupled with machine learning. *ACS Synth Biol*, 2021, 11: 92-102
- [32] Kelly CL, Liu Z, Yoshihara A, et al. Synthetic chemical inducers and genetic decoupling enable orthogonal control of the *rhaBAD* promoter. *ACS Synth Biol*, 2016, 5: 1136-45
- [33] Cronan JE. The *Escherichia coli* FadR transcription factor: too much of a good thing? *Mol Microbiol*, 2021, 115: 1080-5
- [34] Zhang F, Carothers JM, Keasling JD. Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 354-9
- [35] Nie Z, Luo H, Li J, et al. High-throughput screening of T7 promoter mutants for soluble expression of cephalosporin C acylase in *E. coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 190: 293-304
- [36] Blount BA, Weenink T, Vasylechko S, et al. Rational diversification of a promoter providing fine-tuned expression and orthogonal regulation for synthetic biology. *PLoS One*, 2012, 7: e33279.
- [37] Wang Z, Zheng Y, Ji M, et al. Hyperproduction of PHA copolymers containing high fractions of 4-hydroxybutyrate (4HB) by outer membrane-defected *Halomonas bluephagenesis* grown in bioreactors. *Microb Biotechnol*, 2022, 15: 1586-97
- [38] Wang Z, Qin Q, Zheng Y, et al. Engineering the permeability of *Halomonas bluephagenesis* enhanced its chassis properties. *Metab Eng*, 2021, 67: 53-66
- [39] Shen R, Yin J, Ye JW, et al. Promoter engineering for enhanced P(3HB-co-4HB) production by *Halomonas bluephagenesis*. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 1897-906
- [40] Bibb MJ, White J, Ward JM, et al. The mRNA for the 23S rRNA methylase encoded by the *ermE* gene of *Saccharopolyspora erythraea* is translated in the absence of a conventional ribosome-binding site. *Mol Microbiol*, 2010, 14: 533-45
- [41] Ren CY, Liu Y, Wei WP, et al. Reconstruction of secondary

- metabolic pathway to synthesize novel metabolite in *Saccharopolyspora erythraea*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 628569
- [42] Siegl T, Tokovenko B, Myronovskiy M, et al. Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes. *Metab Eng*, 2013, 19: 98-106
- [43] Cui DY, Zhang Y, Xu J, et al. PGK1 promoter library for the regulation of acetate ester production in *Saccharomyces cerevisiae* during Chinese Baijiu fermentation. *J Agric Food Chem*, 2018, 66: 7417-27
- [44] Sengupta A, Madhu S, Wangikar PP. A library of tunable, portable, and inducer-free promoters derived from Cyanobacteria. *ACS Synth Biol*, 2020, 9: 1790-801
- [45] Zhu LP, Yue XJ, Han K, et al. Allopatric integrations selectively change host transcriptomes, leading to varied expression efficiencies of exotic genes in *Myxococcus xanthus*. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 105
- [46] Yue XJ, Cui XW, Zhang Z, et al. Effects of transcriptional mode on promoter substitution and tandem engineering for the production of epothilones in *Myxococcus xanthus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102: 5599-610
- [47] Cheng Z, Jiang J, Wu H, et al. Enhanced production of 3-hydroxypropionic acid from glucose via malonyl-CoA pathway by engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2016, 200: 897-904
- [48] Chen Z, Huang J, Wu Y, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the production of 3-hydroxypropionic acid from glucose and xylose. *Metab Eng*, 2017, 39: 151-8
- [49] Kumar V, Park S. Potential and limitations of *Klebsiella pneumoniae* as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source. *Biotechnol Adv*, 2018, 36: 150-67
- [50] Zhao P, Ma C, Xu L, et al. Exploiting tandem repetitive promoters for high-level production of 3-hydroxypropionic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103: 4017-31
- [51] Hartner FS, Ruth C, Langenegger D, et al. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: e76
- [52] Wu Y, Chen T, Liu Y, et al. Design of a programmable biosensor-CRISPRi genetic circuits for dynamic and autonomous dual-control of metabolic flux in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: 996-1009
- [53] Wang W, Li X, Wang J, et al. An engineered strong promoter for Streptomyces. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79: 4484-92
- [54] Deochand DK, Grove A. MarR family transcription factors: dynamic variations on a common scaffold. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2017, 52: 595-613
- [55] Will WR, Fang FC. The evolution of MarR family transcription factors as counter-silencers in regulatory networks. *Curr Opin Microbiol*, 2020, 55: 1-8
- [56] Zou Y, Li C, Zhang R, et al. Exploring the tunability and dynamic properties of MarR-PmarO sensor system in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, 2021, 10: 2076-86