

# 酿酒酵母基因转录区核小体缺乏序列对人干扰素 $\alpha$ -2b基因表达的影响\*

王淑妍,李宏

(内蒙古大学物理科学与技术学院,呼和浩特 010021)

**摘要:**基因编码序列中同义密码子的使用与基因表达紧密相关。将人干扰素 $\alpha$ -2b基因编码序列中的密码子替换成酿酒酵母高表达基因的最适同义密码子,并通过RT-qPCR、蛋白质印迹分析和ELISA等方法对比分析了IFN $\alpha$ -2b基因的表达水平。结果显示,优化后IFN $\alpha$ -2b基因的mRNA相对表达水平和蛋白质表达水平显著提高。已知酿酒酵母基因转录调控区 $\pm 1$ 核小体和它们之间的核小体缺乏区域(NDR)在基因表达调控中具有重要作用,为了考察NDR序列长度对外源基因表达水平的影响,选取了6个酵母基因的转录调控区,以该区域内 $\pm 1$ 核小体和它们之间的NDR序列作为外源基因的转录调控序列,构建了IFN $\alpha$ -2b基因表达系统。结果显示:在构建的6个调控序列中,将长NDR序列剪短后,IFN $\alpha$ -2b基因的mRNA相对表达水平和蛋白质表达水平显著降低;将短NDR序列加长后,IFN $\alpha$ -2b基因的mRNA相对表达水平和蛋白质表达水平显著提高。研究表明,以 $\pm 1$ 核小体和NDR序列为转录调控序列构建的表达体系可以调控外源基因的表达水平,该方法为调控外源基因表达提供了一种新的研究思路。

**关键词:**酿酒酵母;人干扰素 $\alpha$ -2b;密码子优化;核小体缺乏区域;基因表达与调控

**中图分类号:**Q812;Q61 **文献标志码:**A

基因表达调控是人们一直关注的热点问题<sup>[1]</sup>。基因表达是一个复杂的调控过程,通过不同的调控机制确保基因在细胞内表达的时间、地点和方式的精确控制。这些机制包括转录调控、mRNA稳定性和降解,以及染色质重塑等<sup>[2-4]</sup>。在转基因工程中,多数研究都是基于基因转录区域的一维序列信息,探讨序列中的调控元件与外源基因表达水平的关系,目的是尽可能地提高外源基因的表达水平<sup>[5-7]</sup>。目前,转基因技术多使用微生物工程菌作为宿主。然而,在以真核生物为工程菌的技术中,对于转基因表达调控机制的理解仍是当前研究的难点。

核小体是构成真核生物染色质的基本结构单位,核小体由约147 bp的DNA以左手超螺旋的形式缠绕在组蛋白八聚体周围而形成<sup>[8-9]</sup>。酿酒酵母转录起始位点(Transcription start site, TSS)的上下游存在两个定位良好的核小体,分别称为-1核小体和+1核小体。 $\pm 1$ 核小体之间是一个长度可变的核小体缺乏区域(Nucleosome-depleted region, NDR)<sup>[10-11]</sup>。大多数基因的TSS位于NDR的下游或+1核小体内, $\pm 1$ 核小体以及它们之间的NDR序列对基因表达调控具有重要影响<sup>[12-14]</sup>。对于酿酒酵母<sup>[15]</sup>、果蝇<sup>[16]</sup>、线虫<sup>[17]</sup>、植物<sup>[18]</sup>和人<sup>[19]</sup>全基因组的核小体定位图谱研究揭示,大多数酵母基因

\* 收稿日期:2024-10-17;修回日期:2025-01-16

基金项目:国家自然科学基金项目(31860304)

作者简介:王淑妍(1990—),女,山西长治人,2017级博士研究生。主要从事基因克隆与表达调控的研究。

E-mail: wsykk0914@126.com

通信作者:李宏(1959—),男,内蒙古锡林浩特人,教授,博士。主要从事理论生物物理与生物信息学的研究。

E-mail: ndlihong@imu.edu.cn

和高等真核生物中的许多基因在转录起始位上游存在一个核小体缺乏区域。NDR是基因转录起始的重要功能元件,富含转录因子(Transcription factor, TF)结合位点。NDR通过与TF结合启动基因转录,TF与NDR的结合速率决定了基因的转录效率<sup>[20-21]</sup>。因此,TF与DNA的结合速率与NDR序列的长度紧密关联<sup>[22]</sup>。

干扰素 $\alpha$ -2b(Interferon alfa-2b, IFN $\alpha$ -2b)是一种具有抗病毒、抗肿瘤、抗增殖、免疫调节等多种生物活性的细胞因子,常用于临床疾病治疗<sup>[23]</sup>。表达人干扰素 $\alpha$ -2b的工程菌主要有大肠杆菌、酵母菌,也有在人或小鼠细胞中表达人干扰素 $\alpha$ -2b的研究。目前,在酵母菌中,大多数研究主要以毕赤酵母GS1115为宿主表达人干扰素 $\alpha$ -2b,以酿酒酵母菌为宿主表达人干扰素 $\alpha$ -2b的研究很少。本研究以酿酒酵母为宿主,以基因转录调控区 $\pm 1$ 核小体和它们之间的NDR序列作为转基因的调控序列,以密码子优化后的IFN $\alpha$ -2b基因编码序列作为目的基因,构建了酿酒酵母转基因表达系统,探索NDR序列的长度对转基因表达的影响。

## 1 IFN $\alpha$ -2b基因密码子优化及胞内表达

### 1.1 IFN $\alpha$ -2b基因密码子优化

基于课题组前期研究给出的酿酒酵母高表达基因相对同义密码子使用值(Relative synonymous codon usage, RSCU)<sup>[24]</sup>,对IFN $\alpha$ -2b基因编码序列进行同义密码子替换,以提高IFN $\alpha$ -2b基因的表达水平,RSCU值见表1。在表1中,RSCU值最高的同义密码子称为最适同义密码子。例如精氨酸(Arg)有6个同义密码子,其中:同义密码子aga的RSCU值最高(4.93),称为最适同义密码子;其次为cgt(0.91),称为次最适同义密码子;cga和cgg的RSCU值为0,称为稀有密码子。

表1 酿酒酵母高表达基因同义密码子的RSCU值<sup>[24]</sup>

Table 1 RSCU values of the synonymous codons for high expressive genes of *Saccharomyces cerevisiae*

氨基酸	密码子	RSCU	氨基酸	密码子	RSCU	氨基酸	密码子	RSCU	氨基酸	密码子	RSCU
Arg	cga	0	Leu	cta	0.48	Ser	tca	0.21	Val	gta	0.08
	cgc	0.03		ctc	0.05		tcc	2.23		gtc	1.61
	cgg	0		ctg	0.09		tcg	0.03		gtg	0.16
	cgt	0.91		ctt	0.13		tct	3.11	gtt	2.15	
	aga	4.93		tta	0.91		agc	0.18	Gly	gga	0.06
	agg	0.13		ttg	4.34		agt	0.24		ggc	0.20
Thr	aca	0.21	Pro	cca	3.41	Ala	gca	0.20	ggg	0.04	
	acc	1.83		ccc	0.03		gcc	1.20	ggt	3.70	
	acg	0.06		ccg	0.03		gcg	0.05	Cys	tgc	0.25
	act	1.90		cct	0.54		gct	2.55		tgt	1.75
Asn	aac	1.62	His	cac	1.43	Asp	gac	1.18	Phg	ttc	1.51
	aat	0.38		cat	0.52		gat	0.82		ttt	0.49
Gln	caa	1.95	Glu	gaa	1.77	Tyr	tac	1.68	Trp	tgg	1.00
	cag	0.05		gag	0.23		tat	0.32			
Ile	ata	0.06	Ter	taa	2.42	Met	atg	1.00			
	atc	1.60		tag	0.23	Lys	aaa	0.46			
	att	1.34		tga	0.35	aag	1.54				

人IFN $\alpha$ -2b基因编码序列的密码子优化方法如下:根据表1中的酿酒酵母最适同义密码子,替换人IFN $\alpha$ -2b基因编码序列中的对应同义密码子。优化过程中避免出现常用酶切位点,若酶切位点出现在前1个密码子的第3位和后1个密码子的第1位,则将前一个最适同义密码子替换为次最适同义密码子。整个优化过程共替换了91个同义密码子(见图1)。通过密码子适应指数(Codon adaptation index, CAI)评估IFN $\alpha$ -2b基因的表达水平。结果显示,优化前IFN $\alpha$ -2b基因的CAI为0.083,优化后为0.912,表明优化后的表达水平显著提高。优化前的基因简称为IFNO,优化后的基因简称为IFNM。

IFNM	ATGTGTGACTTCCCACAAACCTCAGTCTTTCGGGTCCAGAACAACTTTGATGTTGTTCGGCTCAAAATGAGAAAGA	72
IFNO	ATGTGTGACTTCCCTCAAACCCAGAGCCCTGGGTAGCAGGAGACCTTGATGCTTCTTCGGCTCAGATGAGGAGA	72
IFNM	ATCTCTTTGTTCTCTTCCTTTGAAGGACAGACACCGACTTCCGGTTTCCCAACAAGAACAAATTTGGTAACCAATTC	144
IFNO	ATCTCTCTTTTCTCTCTGCTTTGAAGGACAGACATGACTTTCGATTTCCCAAGGAGCAGTTTGGCAACCAATTC	144
IFNM	CAAAAGGCTGAAACTATCCCAAGTTTTCGACCAAAATGATCCAAACAATCTTCAAATCTTTCTACTAAGGAC	216
IFNO	CAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCCTCCATTCAGATGATCCAAACAATCTTCAAATCTTTGAGCAGAAAGGAC	216
IFNM	TCCCTCTGCTGCTTGGGACCAAACTTTGTTTCGACAACTTCTACACTGAATTTGTACCAACAATGAAACACTTC	288
IFNO	TCAATCTGCTGCTTGGGATTCAGACCCCTCCATTCAGAAATTTCTACACTGAATTTGTACCAACAATGAAACACTTC	288
IFNM	GAAGCCTGTGTATCCAAGGTGTTGGTGTACTGAAACTCCATTCGATGAAGGAACACTCTATCTTCGCTGTT	360
IFNO	GAAGCCTGTGTGATACAAGGGGTGGGGTTCAGAGAACTCCCTGATGAAGGAACACTCTATCTTCGCTGTTG	360
IFNM	AGAAAATACTTCCAAAGAATCACTTTGTAATCTGAAAGAAAGAAATACTCTCCATCTGCTTTCGGCAACTTGT	432
IFNO	AGGAAAATACTTCCAAAGAATCACTTCTCTATCTGAAAGAAAGAAATAGAGCCCTTCTGCTTTCGGCAACTTGT	432
IFNM	AGAGCTGAAATATGAGATCCTTCTCTTTGTCTACTAACTTTCGAAGAACTTTTTCAGATCCAAGGAATA	500
IFNO	AGAGGAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTTGTCAAGAACTTTCGAAGAAAGTTTAAAGAGTAAGGAATG	500

图1 优化前和优化后的人IFN $\alpha$ -2b基因编码序列比对

Fig. 1 Comparison of the coding sequences of human IFN $\alpha$ -2b gene before and after optimization

## 1.2 菌株和培养基

用于IFN $\alpha$ -2b基因胞内表达分析的酿酒酵母菌INVSc1和质粒pYES2购自武汉森灵生物科技有限公司,用于质粒构建和转化的大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞购自Takara公司,用于酿酒酵母的繁殖的YPD培养基购自上海生物工程有限公司,用于酿酒酵母转化子筛选的SD-Ura培养基购自Takara公司。

## 1.3 优化前和优化后IFN $\alpha$ -2b基因的克隆

将优化前和优化后的IFN $\alpha$ -2b基因送往上海生物工程有限公司合成,分别命名为pUC57-IFNO和pUC57-IFNM。以这两个质粒为模板,用引物GS、GX通过PCR扩增IFN $\alpha$ -2b基因片段,反应程序为:94℃预变性5min,随后进行35个循环(94℃变性15s,60℃退火30s,72℃延伸1min)。回收目的片段后,使用T<sub>4</sub>DNA连接酶将其连接至pMD19-T质粒,并转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞获取阳性克隆,最终获得的质粒命名为pMD19T-IFNO和pMD19T-IFNM。

## 1.4 目的基因重组表达载体的构建

使用Kpn I和Xba I内切酶酶切质粒pMD19T-IFNO、pMD19T-IFNM和pYES2,回收目的片段。使用T<sub>4</sub>DNA连接酶将IFNO和IFNM基因片段连接至质粒pYES2,获得的质粒命名为pYES2-IFNO和pYES2-IFNM。IFN $\alpha$ -2b基因克隆与表达所用引物见表2。

## 1.5 目的基因转化酿酒酵母INVSc1细胞及筛选阳性克隆

通过PEG/LiAc法分别将质粒pYES2-IFNO、pYES2-IFNM和pYES2分别转化至酿酒酵母IN-

VSc1感受态细胞,涂布SD-Ura选择培养基,28℃培养倒置培养2~3d,然后使用菌液PCR法鉴定阳性克隆。选取阳性克隆于YPD培养基,28℃培养至对数期,收集菌体。

表2 IFN $\alpha$ -2b基因克隆与表达所用引物序列  
Table 2 Sequence of primers used in this study

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	功能
IFN $\alpha$ -2b	GS	AAGGCGATTAAGTTGGGTA	IFN $\alpha$ -2b基因扩增
	GX	ACAGGAACAGCTATGACCATGATTA	
	qO-F	ACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGG	IFN $\alpha$ -2b基因mRNA转录水平分析
	qO-R	CACACAGGCTTCCAGGTCATTTCAG	
	qM-F	GACAGACACGACTTCGGTTTCCC	
	qM-R	GTTTCGTCCCAAGCAGCAGAGG	
$\beta$ -Actin	actin-F	TCCCAGGTATTGCCGAAAGAATGC	内参基因
	actin-R	GAACCACCAATCCAGACGGAGTAC	
pYES2	pYES2-F	TCGCAATGGGAAGCTCCA	线性化pYES2
	pYES2-R	GCTATTGAAGTGCAAGATGG	
AUR	AUR1-F	CGCCCCACACAGACATCTAACA	AUR基因扩增
	AUR1-R	GCTTCAACAGAGGAAAGAATAACGC	

## 1.6 目的基因转录水平检测

使用Yeast total RNA isolation kit(Takara)提取酵母RNA,并用PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara)将RNA逆转录为cDNA。反转录在42℃条件下反应15 min,85℃反应5 s。以cDNA为模板,使用TB Green Premix Ex Taq II(Takara)进行qPCR,反应在Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR仪上完成。qPCR条件:95℃变性30 s,随后95℃变性5 s,60℃变性30 s,共扩增40个循环;溶解曲线温度变化为65~95℃,每0.5℃递增一次,持续10 s。 $CT \geq 37$ 视为无效,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA相对表达量,每个样品设3个生物学重复。

## 1.7 目的基因蛋白表达检测

在4℃条件下,8000×g离心1 min收集细胞,并用无菌PBS(pH 7.4)清洗两次。使用酵母总蛋白提取试剂盒提取酿酒酵母总蛋白,通过BCA法(Takara)测定蛋白浓度。将等量蛋白煮沸5 min后,在12.5% SDS-PAGE胶中分离并转移至PVDF膜。室温下用5%脱脂奶粉封闭1 h,随后加入GFP兔单克隆抗体(1:5000, Abcam),4℃孵育过夜。次日,用HRP标记的山羊抗兔IgG(1:5000, Abcam)孵育1 h,清洗3次后,使用ECL试剂盒(Bio-Rad)检测信号,并通过VILBER Fusion FX6系统成像分析。

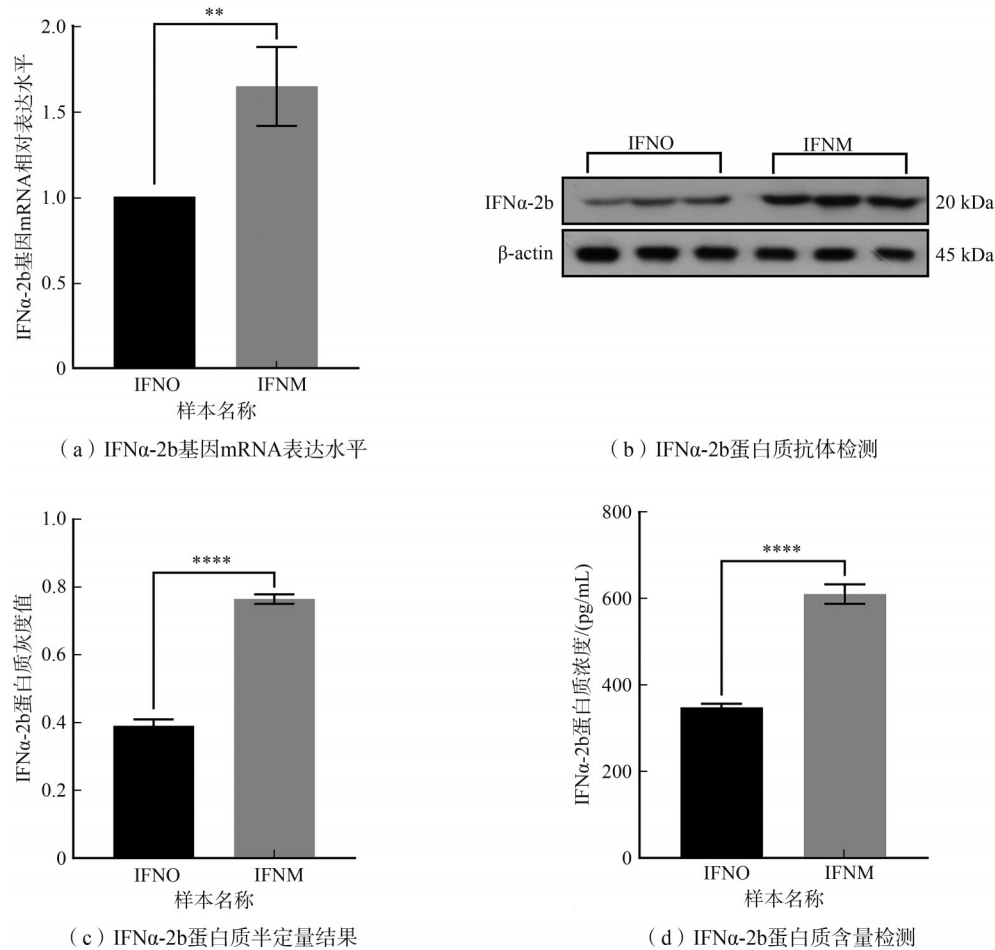
## 1.8 目的基因蛋白定量分析

使用IFN $\alpha$  ELISA试剂盒,参照说明书检测样品中IFN $\alpha$ -2b蛋白质的浓度。使用PBS对样品进行1/100稀释,并进行重复分析。根据稀释说明生成IFN $\alpha$ -2b的标准曲线。使用多功能酶标仪在450 nm处读取样品的OD值。IFN $\alpha$ -2b的单位显示为pg/mL。每个样品设置3个生物学重复。

## 1.9 结果

本研究使用酿酒酵母基因最适同义密码子和次最适同义密码子( $RSUC \geq 1$ )优化了IFN $\alpha$ -2b基因的编码序列,并导入酿酒酵母INVScl做胞内表达分析。采用RT-qPCR法检测了密码子优化前后IFN $\alpha$ -2b基因mRNA的相对表达水平。如图2(a)所示,优化后IFN $\alpha$ -2b基因mRNA的相对表达

水平是优化前的1.6倍, $t$ 检验结果显示差异显著。随后,使用Western blot和ELISA试剂盒检测了IFN $\alpha$ -2b蛋白质表达量。通过WB分析,在重组酿酒酵母INVSc1细胞中检测到了约20 kDa的蛋白质产物,与IFN $\alpha$ -2b基因的氨基酸序列分子量一致。从图2(b)和图2(c)可知,IFN $\alpha$ -2b基因在酿酒酵母中获得了表达。使用IFN $\alpha$ -2b Elisa试剂盒检测了IFN $\alpha$ -2b蛋白质的含量。图2(d)显示,优化后IFN $\alpha$ -2b蛋白质表达量是优化前的1.75倍,配对样本 $t$ 检验结果显示两者之间的差异极显著( $P < 0.05$ )。IFN $\alpha$ -2b蛋白质表达水平与mRNA相对表达水平趋势一致,说明使用课题组先前给出的酿酒酵母高表达基因的RSUC值来优化外源基因编码序列的方法有效可行。



采用配对 $t$ 检验评估组间统计学意义,结果显示为平均值 $\pm$ 均值标准误。显著性水平表示为: $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$ 。

图2 IFN $\alpha$ -2b基因在酿酒酵母INVSc1中的表达

Fig. 2 Analysis of IFN $\alpha$ -2b gene expression in *S. cerevisiae* INVSc1

## 2 NDR调控IFN $\alpha$ -2b基因表达的分析

### 2.1 IFN $\alpha$ -2b基因转录系统的构建

根据课题组前期关于NDR与外源基因表达水平间关系的研究结果<sup>[25]</sup>,使用前期研究所选取的6个酿酒酵母基因转录区 $\pm$ 1核小体序列和NDR序列作为IFN $\alpha$ -2b基因的调控序列。其中长NDR序列3条,称为L-NDR;短NDR序列3条,称为S-NDR。6个基因的转录调控序列信息见表3。

为了确保+1核小体位置不变,在IFN $\alpha$ -2b基因编码区上游插入MF $\alpha$ 1基因(GenBank: Z73543.1)的信号肽序列,并选用CYC1-ter序列作为终止序列,以消除基因3'UTR对IFN $\alpha$ -2b表达的影响。+1

核小体的中心位置参考 Brogaard 等<sup>[26]</sup>的注释,转录调控序列来源于酿酒酵母基因组数据库(R64 版本)。IFN $\alpha$ -2b 基因转录系统见图 3。

表 3 酿酒酵母中 6 个基因的核小体位置信息

Table 3 Nucleosome position information for six genes in *Saccharomyces cerevisiae*

基因	染色体	TSS	-1N/bp	+1N/bp	ATG	NDR/bp	NDR+/NDR-/bp
YBL071W-A	chr II	89874	-231	+124	89978	208	128
YBL032W	chr II	160091	-307	+60	160184	218	138
YBL025W	chr II	171419	-314	+49	171481	214	134
YAL030W	chr I	87251	-220	+61	87286	134	214
YAR008W	chr I	158851	-210	+60	158966	123	203
YAR027W	chr I	183620	-184	+59	183770	95	175



图 3 IFN $\alpha$ -2b 基因调控序列结构

Fig. 3 Regulatory sequence structure of IFN $\alpha$ -2b gene

## 2.2 NDR 序列的改造

为了考察 NDR 长度对 IFN $\alpha$ -2b 基因表达水平的影响,根据课题组先前研究方法改造了 NDR 序列的长度,具体改造方法见 Wang 等<sup>[25]</sup>的研究。NDR- 和 NDR+ 序列的长度信息见表 3。

## 2.3 菌株和培养基

酿酒酵母 BY4741 购自武汉森灵生物科技有限公司,用于 AUR 基因的克隆和核小体缺乏区域调控 IFN $\alpha$ -2b 基因表达的研究。质粒和培养基同 1.2 节。

## 2.4 酿酒酵母整合型表达载体构建

以酿酒酵母 BY4741 基因组 DNA 为模板,使用引物 AUR-F 和 AUR-R 通过 PCR 扩增 AUR 基因,并在两端添加 Hpa I 和 SnaB I 酶切位点。用 Hpa I 和 SnaB I 分别酶切质粒 pYES2 和 AUR 基因,回收线性载体 pYES2 和目的片段,再用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶将两者连接,获得质粒 pYES2-AUR。随后,利用 Clon Express® Ultra One Step Cloning Kit(诺唯赞)将 6 条 NDR-/NDR+-IFN 序列克隆至 pYES2-AUR 载体上,构建单拷贝整合表达载体 pYES2-AUR-NDR-IFN。

## 2.5 目的基因转化酿酒酵母及筛选阳性克隆

使用限制性内切酶 EcoR I 线性化 pYES2-AUR-NDR-IFN 质粒。参照 Gietz 等<sup>[27]</sup>的 LiAc 法,使用 Yeast Transformation System 2 将线性化的 pYES2-AUR-NDR-IFN 导入酿酒酵母 BY4741 感受态细胞,线性化的 pYES2-AUR-NDR-IFN 片段以 AUR 基因为同源臂,通过同源重组的方式整合到酿酒酵母 BY4741 的第 II 条染色体上,然后在 SD-Ura 琼脂培养基上筛选阳性克隆。

## 2.6 目的基因拷贝数的测定

选取阳性克隆,经 PCR 法检测后,采用绝对定量 PCR 法,以酿酒酵母单拷贝管家基因 TUB1 为内参基因绘制标准曲线并确定目的基因的拷贝数。绝对定量 PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,循环 40 次,并进行 95~65 °C 溶解曲线分析,设置 3 个生物重复。

## 2.7 目的基因转录水平检测

方法同 1.6 节。

## 2.8 目的基因蛋白定量分析

方法同1.8节。

## 2.9 数据统计分析

使用GraphPad Prism 8.0软件对试验数据进行统计分析,数据结果使用平均值±标准差表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

## 2.10 实验结果

### 2.10.1 酿酒酵母中人IFN $\alpha$ -2b基因拷贝数分析

如图4(a)所示,通过同源重组将人IFN $\alpha$ -2b基因整合到酿酒酵母第XI染色体上的AUR基因位点。从图4(b)发现,重组酿酒酵母菌株中有501 bp的DNA片段,而对照组中没有,结果初步表明IFN $\alpha$ -2b基因整合到了酿酒酵母染色体上。进一步Sanger测序证明目的基因序列与IFN $\alpha$ -2b序列一致,表明IFN $\alpha$ -2b基因成功整合。以单拷贝TUB1基因为参照,采用绝对qPCR法测定酿酒酵母中IFN $\alpha$ -2b编码序列的拷贝数,如图4(c)所示,证明IFN $\alpha$ -2b基因以单拷贝的形式存在于酿酒酵母基因组中。

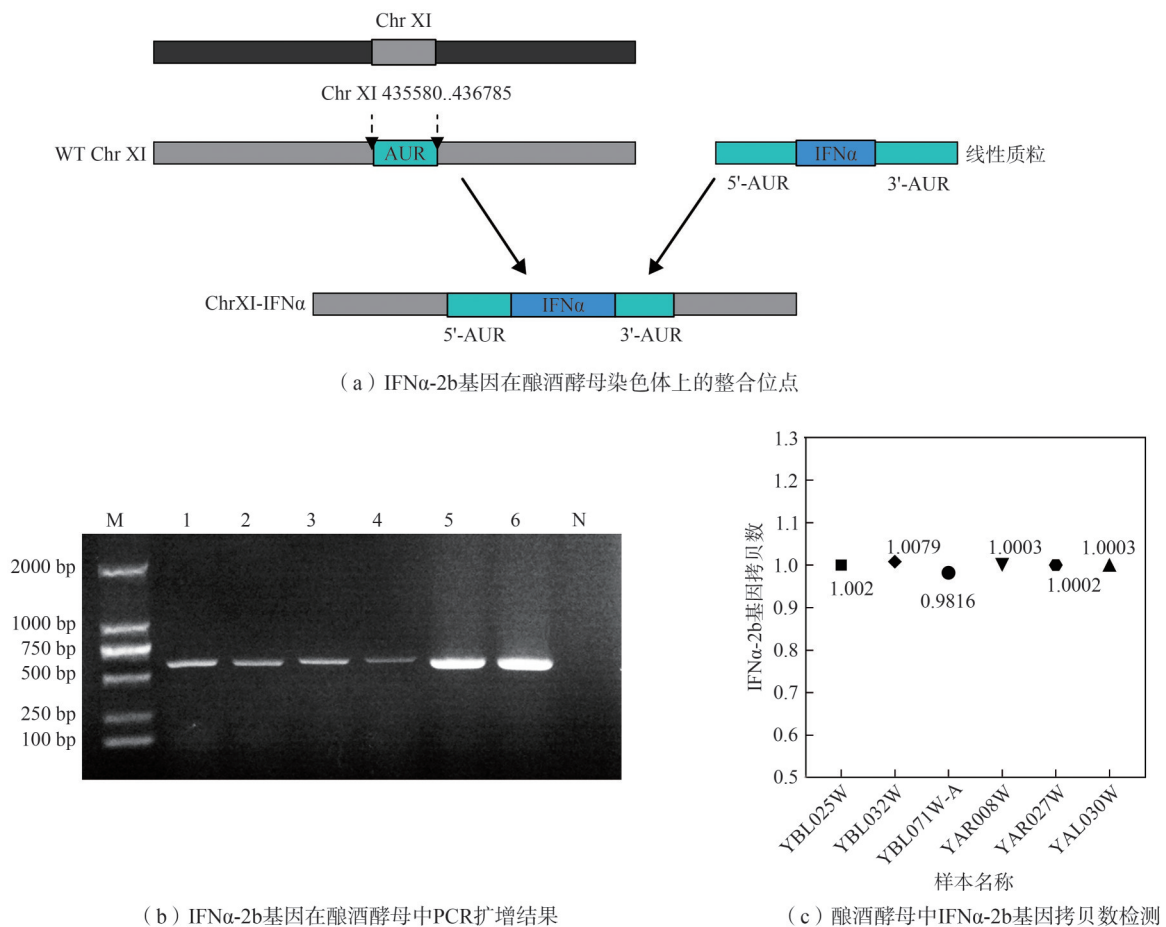


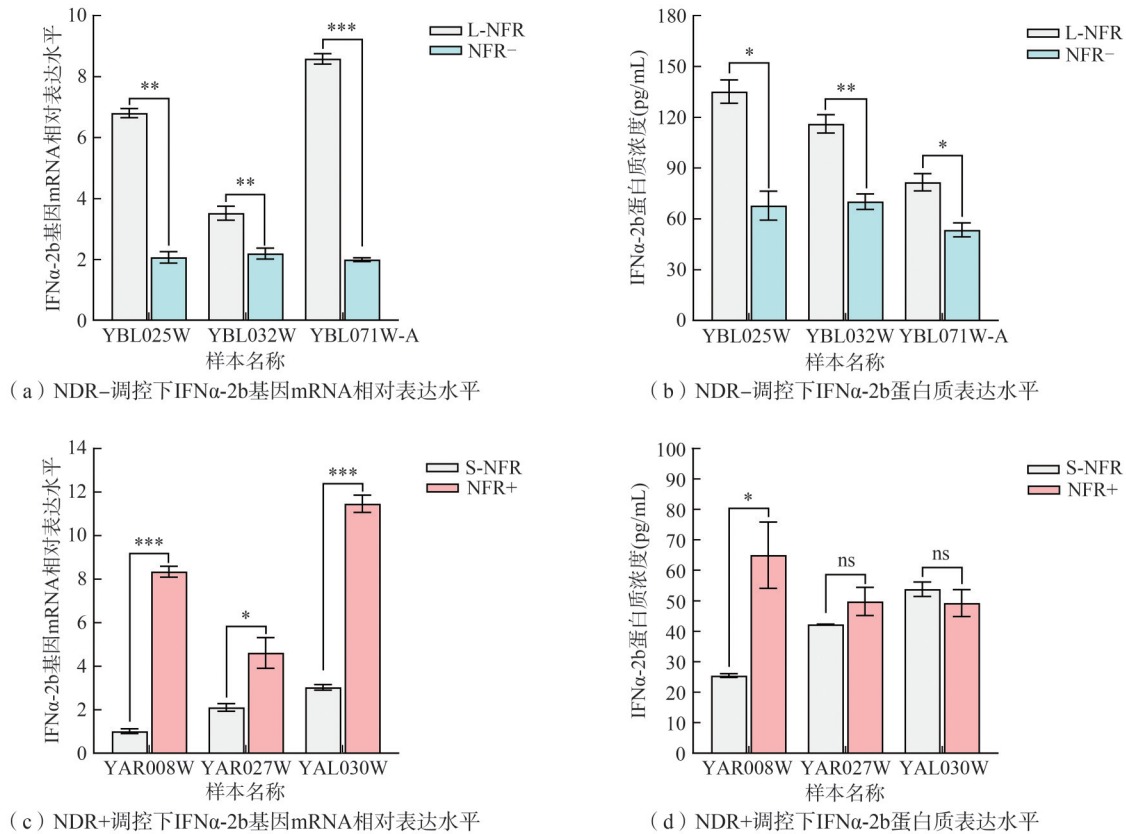
图4 酿酒酵母中IFN $\alpha$ -2b基因检测

Fig. 4 Detection of IFN $\alpha$ -2b gene in *S. cerevisiae*

### 2.10.2 NDR序列长度影响IFN $\alpha$ -2b基因的表达水平

为了考察NDR序列长度的改变对IFN $\alpha$ -2b基因表达水平的影响,分析了NDR序列长度改变前后IFN $\alpha$ -2b基因表达水平的变化。采用qPCR法检测了YBL025W, YBL032W和YBL071W-A转录调控序列中L-NDR和NDR-两种结构以及YAR008W, YAR027W和YAL030W转录调控序列中S-NDR和NDR+两种结构调控下IFN $\alpha$ -2b基因mRNA相对表达水平。使用ELISA试剂盒检测了

转录调控序列 L-NDR 和 NDR- 序列以及 S-NDR 和 NDR+ 序列调控下 IFN $\alpha$ -2b 蛋白质表达水平。如图 5(a) 所示,在 YBL025W, YBL032W 和 YBL071W-A 转录调控序列中,与 L-NDR 序列相比,在 NDR- 序列调控下,IFN $\alpha$ -2b 基因 mRNA 的相对表达水平分别降低了 3.29 倍、1.6 倍和 4.31 倍,配对样本 *t* 检验结果显示两者之间的差异显著 ( $P < 0.05$ )。如图 5(b) 所示,IFN $\alpha$ -2b 蛋白质表达水平分别降低了 1.99 倍、1.65 倍和 1.53 倍,配对样本 *t* 检验结果显示两者之间的差异显著 ( $P < 0.05$ )。



采用配对 *t* 检验评估组间统计学意义,结果显示为平均值 $\pm$ 均值标准误。显著性水平表示为:\* $P < 0.05$ ;\*\* $P < 0.01$ ;\*\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$ ,ns 表示不显著。

图 5 NDR 序列的长度对 IFN $\alpha$ -2b 基因表达水平的影响

Fig. 5 Effect of NDR length on IFN $\alpha$ -2b gene expression levels

在 YAR008W、YAR027W 和 YAL030W 转录调控序列中,与 S-NDR 序列相比,在 NDR+ 序列调控下 IFN $\alpha$ -2b 基因 mRNA 相对表达水平和蛋白质表达水平均获得了提高。如图 5(c) 所示,IFN $\alpha$ -2b 基因的 mRNA 相对表达水平分别提高了约 8.24 倍、2.19 倍和 3.79 倍,配对样本 *t* 检验结果显示两者之间的差异显著。从图 5(d) 中发现,在 YAR008W 中 IFN $\alpha$ -2b 蛋白质表达水平提高了约 2.55 倍。配对样本 *t* 检验结果显示,在 YAR027W 和 YAL030W 中,IFN $\alpha$ -2b 蛋白质表达水平的差异不显著 ( $P > 0.05$ )。这些结果表明,改变 NDR 序列长度对外源基因的表达水平有一定的影响。当 NDR 序列剪短到 150 bp 以下时,能下调外源基因的表达水平。当 NDR 序列加长到 150 bp 时,能上调外源基因的表达水平。

### 3 结果与讨论

在外源基因表达的研究中,人们通常从基因转录区域一维序列信息的角度来探讨基因调控元件与基因表达水平的关系。本研究基于课题组前期研究给出的酿酒酵母高表达基因的相对同义密码子使用值(RSCU 值),将 IFN $\alpha$ -2b 基因的编码序列进行了密码子优化,结果表明 IFN $\alpha$ -2b 基因的表达水平显著提高,表明课题组前期研究提出的密码子优化方法有效可行。

然而,仅从一维DNA序列的角度出发,通过优化组合基因序列中的各个调控元件来探讨基因表达效率存在一定的局限性。为了更全面地探索和理解真核生物基因表达调控机制,还需要从核小体的角度进行研究。真核生物染色体由核小体组成<sup>[28]</sup>。核小体能降低启动子DNA的可及性,从而阻碍转录因子与调节元件的结合<sup>[29]</sup>。研究表明,大多数基因核小体缺乏区域的长度小于150 bp,且在基因表达调控中具有重要作用<sup>[30-32]</sup>。与许多真核生物一样,酿酒酵母中基因表达的调控是一个涉及许多因素的复杂过程,包括核小体的结构和定位<sup>[33]</sup>。

本课题组前期研究提出了一种基于-1核小体、+1核小体及核小体缺失区域(NDR)序列的外源基因表达调控方法。研究表明,酿酒酵母基因转录起始区域中-1核小体与+1核小体之间的NDR序列长度与基因表达水平存在显著相关性<sup>[25]</sup>。基于前期研究结果,以-1核小体、NDR序列和+1核小体作为转录调控序列,构建了IFN $\alpha$ -2b基因表达系统,探讨NDR长度对IFN $\alpha$ -2b基因表达水平的影响。研究发现,当长NDR长度剪短80 bp至小于150 bp时,IFN $\alpha$ -2b的相对mRNA表达量和蛋白质表达量均显著降低。相反,当短NDR长度延长80 bp至大于150 bp时,IFN $\alpha$ -2b的mRNA相对表达水平和蛋白质表达水平均显著增加。这些结果表明,NDR序列的长度是调控外源基因表达的关键因素,增加NDR序列的长度可以提高外源基因的表达水平。相反,剪短NDR序列的长度可以降低外源基因的表达水平。这一现象与NDR长度影响转录因子结合密切相关。较长的NDR促进转录因子有效结合,提升基因表达量;较短的NDR降低结合效率,导致基因表达下降。

一般来说,NDR的长度与转录效率相关。较长的NDR通常与较高的基因表达相关,而较短的NDR往往对应较低的表达水平。Kubik等<sup>[13]</sup>的研究也表明,酿酒酵母基因转录调控区NDR序列的长度小于300 bp,并且与其相关的基因多为高表达基因。课题组前期理论研究发现,TSS上游-1核小体位置的改变会导致基因的转录效率发生改变,且NDR序列长度与基因转录效率有正相关关系<sup>[22]</sup>,这与Kubik等<sup>[13]</sup>提出的观点相似。不同之处在于,我们认为基因转录效率主要与-1核小体的位置和NDR序列的长度有关。NDR序列长时,基因转录效率高,而当NDR序列短时,基因的转录效率低。我们发现,改变NDR序列的长度可以调控外源基因的表达水平。缩短NDR序列会使-1核小体向上游移动,暴露更多DNA以供转录因子(TF)结合,但此过程耗能较高,降低了TF结合效率和基因转录效率。延长NDR序列则扩展了TF结合的空间,减少了一核小体移动的需求,从而降低能耗并提高转录效率。本研究基于前期理论成果,通过实验验证了 $\pm 1$ 核小体与NDR序列对外源基因表达的调控作用,为从核小体阵列角度调控基因表达提供了新思路。

本研究初步探讨了酿酒酵母基因转录调控区NDR长度与外源基因表达之间的关系。目前,尚无法确定酿酒酵母基因的NDR结构是否适用于其他物种的基因组,但已有证据表明NDR在整个进化过程中高度保守。因此,未来还需进一步深入研究,将这一设计思路应用于其他基因组的转基因调控。

## 参考文献:

- [1] MEHROTRA R, YADAV A, BHALOTHIA P, et al. Evidence for directed evolution of larger size motif in *Arabidopsis thaliana* genome[J]. The Scientific World Journal, 2012, 2012: 983528.
- [2] LEE T I, YOUNG R A. Transcriptional regulation and its misregulation in disease[J]. Cell, 2013, 152(6): 1237-1251.
- [3] GARNEAU N L, WILUSZ J, WILUSZ C J. The highways and byways of mRNA decay[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, 8(2): 113-126.
- [4] KOUZARIDES T. Chromatin modifications and their function[J]. Cell, 2007, 128(4): 693-705.
- [5] BOREJSZA-WYSOCKA E, NORELLI J L, ALDWINCKLE H S, et al. Stable expression and phenotypic impact of *attacin E* transgene in orchard grown apple trees over a 12 year period[J]. BMC Biotechnology, 2010, 10: 41.

- [6] YE L P, QIAN Q J, ZHANG Y Y, et al. Analysis of the sericin1 promoter and assisted detection of exogenous gene expression efficiency in the silkworm *Bombyx mori* L[J]. Scientific Reports, 2015, 5:8301.
- [7] JAKOČIŪNAS T, BONDE I, HERRGÅRD M, et al. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Metabolic Engineering, 2015, 28:213-222.
- [8] HOLDE K E. Chromatin[M]. Berlin: Springer, 1989:335-408.
- [9] CUTTER A R, HAYES J J. A brief review of nucleosome structure[J]. FEBS Letters, 2015, 589(20 Pt A):2914-2922.
- [10] YUAN G C, LIU Y J, DION M F, et al. Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*[J]. Science, 2005, 309(5734):626-630.
- [11] LEE C K, SHIBATA Y, RAO B, et al. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide[J]. Nature Genetics, 2004, 36(8):900-905.
- [12] LEE W, TILLO D, BRAY N, et al. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast[J]. Nature Genetics, 2007, 39(10):1235-1244.
- [13] KUBIK S, BRUZZONE M J, JACQUET P, et al. Nucleosome stability distinguishes two different promoter types at all protein-coding genes in yeast[J]. Molecular Cell, 2015, 60(3):422-434.
- [14] QIU H F, BIERNAT E, GOVIND C K, et al. Chromatin remodeler Ino80C acts independently of H2A. Z to evict promoter nucleosomes and stimulate transcription of highly expressed genes in yeast[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(15):8408-8430.
- [15] MOYLE-HEYRMAN G, ZAICHUK T, XI L Q, et al. Chemical map of *Schizosaccharomyces pombe* reveals species-specific features in nucleosome positioning[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(50):20158-20163.
- [16] CHEREJI R V, KAN T W, GRUDNIEWSKA M K, et al. Genome-wide profiling of nucleosome sensitivity and chromatin accessibility in *Drosophila melanogaster*[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(3):1036-1051.
- [17] VALOUEV A, ICHIKAWA J, TONTHAT T, et al. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning[J]. Genome Research, 2008, 18(7):1051-1063.
- [18] VERA D L, MADZIMA T F, LABONNE J D, et al. Differential nuclease sensitivity profiling of chromatin reveals biochemical footprints coupled to gene expression and functional DNA elements in maize[J]. The Plant Cell, 2014, 26(10):3883-3893.
- [19] BARSKI A, CUDDAPAH S, CUI K R, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome[J]. Cell, 2007, 129(4):823-837.
- [20] LAI W K M, PUGH B F. Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2017, 18(9):548-562.
- [21] SOUDET J, STUTZ F. Regulation of gene expression and replication initiation by non-coding transcription: A model based on reshaping nucleosome-depleted regions[J]. BioEssays, 2019, 41(11):e1900043.
- [22] 孟虎. 核小体序列的进化及核小体参与基因表达调控的机制[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2017.
- [23] GISSLINGER H, KLADE C, GEORGIEV P, et al. Event-free survival in patients with polycythemia vera treated with ropeginterferon alfa-2b versus best available treatment[J]. Leukemia, 2023, 37(10):2129-2132.
- [24] 李宏, 罗辽复. 基因表达水平与密码子使用的关系及其预测[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1995(5):544-561.
- [25] WANG S Y, LI H, LI X L. Effect of the nucleosome-depleted region in the transcribed regions of *Saccharomyces cerevisiae* genes on exogenous gene expression[J]. Applied Sciences, 2024, 14(23):11339.
- [26] BROGAARD K, XI L Q, WANG J P, et al. A map of nucleosome positions in yeast at base-pair resolution[J]. Nature, 2012, 486(7404):496-501.
- [27] GIETZ R D, SCHIESTL R H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. Nature Protocols, 2007, 2(1):31-34.
- [28] JIANG C Z, PUGH B F. Nucleosome positioning and gene regulation: Advances through genomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(3):161-172.

- [29] VAN BAKEL H, TSUI K, GEBBIA M, et al. A compendium of nucleosome and transcript profiles reveals determinants of chromatin architecture and transcription[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(5): e1003479.
- [30] SHAN X Y, ROBERTS C, LAN Y M, et al. Age alters chromatin structure and expression of SUMO proteins under stress conditions in human adipose-derived stem cells[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 11502.
- [31] LIELEG C, KRIETENSTEIN N, WALKER M, et al. Nucleosome positioning in yeasts: Methods, maps, and mechanisms[J]. *Chromosoma*, 2015, 124(2): 131-151.
- [32] STRUHL K, SEGAL E. Determinants of nucleosome positioning[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(3): 267-273.
- [33] ZHANG Y, LIU T, MEYER C A, et al. Model-based analysis of ChIP-seq(MACS)[J]. *Genome Biology*, 2008, 9(9): R137.

(责任编辑 刘俊杰)

## Effect of Nucleosome-Depleted Region in the Gene Transcription Region of *Saccharomyces cerevisiae* on IFN $\alpha$ -2b Gene Expression

WANG Shuyan, LI Hong

(School of Physical Science and Technology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

**Abstract:** The use of synonymous codons in gene coding sequences is closely related to gene expression. To optimize the expression of the human interferon  $\alpha$ -2b gene in *S. cerevisiae*, we substituted the codons of this gene with those that are optimally synonymous with codons of highly expressed genes. Then, we compared the expression levels of IFN $\alpha$ -2b using RT-qPCR, western blot analysis, and ELISA. The results showed that the relative mRNA expression level and protein expression level of human interferon  $\alpha$ -2b gene were significantly increased after optimization. It is known that the  $\pm 1$  nucleosomes and the nucleosome-depleted region (NDR) between the *S. cerevisiae* genes have important roles in gene expression. To examine the effect of NDR sequence length on transgene expression, we chose the  $\pm 1$  nucleosomes and the nucleosome free sequences between the transcriptional regulatory regions of six *S. cerevisiae* genes as transcriptional regulatory sequences of transgene. Then, the codon-optimized human interferon  $\alpha$ -2b gene expression system was constructed. The results showed that the relative mRNA expression level and protein expression level of the IFN $\alpha$ -2b gene were significantly reduced after the long NDR was shortened. After the short NDR was lengthened, the relative mRNA expression level and protein expression level of IFN $\alpha$ -2b gene were significantly increased. It is shown that the constructed expression system with  $\pm 1$  nucleosomes and NDR sequences as transcriptional regulatory sequences can regulate the expression of transgene. Our method provides a new research idea for regulating transgene expression.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*; human interferon  $\alpha$ -2b; codon optimization; nucleosome depleted region; gene expression and regulation