

• 综述 •

# 酵母中性位点的挖掘及应用研究进展

王政<sup>1,2</sup>, 王健<sup>1</sup>, 张璇<sup>2</sup>, 李金山<sup>2\*</sup>, 郑迎迎<sup>2\*</sup>

1 吉林大学 生物与农业工程学院, 吉林 长春 130022

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

王政, 王健, 张璇, 李金山, 郑迎迎. 酵母中性位点的挖掘及应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 1780-1788.

WANG Zheng, WANG Jian, ZHANG Xuan, LI Jinshan, ZHENG Yingying. Research progress in the mining and application of neutral sites in yeast[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 1780-1788.

**摘要:** 酵母是代谢工程中生产蛋白质、化学品和植物天然产物的重要宿主, 挖掘多样化的酵母中性位点对复杂产物的高效细胞工厂的构建和优化具有重要的意义。本文归纳总结了酵母染色体上中性位点的筛选标准、表征手段、强度影响因素, 介绍了其在合成生物学和生物制造领域中的应用, 并对未来的研究方向进行了展望, 为利用中性位点进行酵母细胞工厂的构建优化提供了理论支撑。

**关键词:** 中性位点; 荧光蛋白; 酵母; 细胞工厂

## Research progress in the mining and application of neutral sites in yeast

WANG Zheng<sup>1,2</sup>, WANG Jian<sup>1</sup>, ZHANG Xuan<sup>2</sup>, LI Jinshan<sup>2\*</sup>, ZHENG Yingying<sup>2\*</sup>

1 College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, Jilin, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** Yeast is a valuable host organism for protein, chemical, and plant natural product production in metabolic engineering. The development of neutral sites in yeast holds great significance for the construction and optimization of efficient cell factories. This review summarizes the screening standards, characterization methods, influencing factors, and applications of neutral sites in synthetic biology. Additionally, it discusses the future research directions, providing theoretical support and practical guidance for the construction and

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103200); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-KJGG-013, TSBICIP-KJGG-009, TSBICIP-KJGG-027)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103200) and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-013, TSBICIP-KJGG-009, TSBICIP-KJGG-027).

\*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Yingying, zheng\_yy@tib.cas.cn; LI Jinshan, li\_js@tib.cas.cn

Received: 2024-11-13; Accepted: 2025-02-24; Published online: 2025-02-24

optimization of yeast cell factories utilizing neutral sites.

**Keywords:** neutral site; fluorescent protein; yeast; cell factory

酵母因其强大的分泌能力、完善的翻译后修饰和细胞器系统、简易的遗传操作和廉价培养体系以及公认的食品安全性能等优点，常被应用于异源蛋白的生产过程<sup>[1-3]</sup>。异源蛋白基因在酵母中的表达有2种方式：基因组整合表达和游离质粒表达。基因组整合表达的方式因其菌种稳定传代和蛋白稳定表达的优势而在工业生产中备受青睐<sup>[4]</sup>。异源基因在酵母基因组中的整合可采取非同源重组和同源重组这2种方式。在非同源重组过程中，外源基因通常以任意拷贝数随机整合至基因组的任意位置，可能带来遗传信息不清晰、染色体不稳定的问题，进而影响菌株生长和表达稳定性；同源重组则可将外源基因整合至基因组特定位点，有效避免对基因组产生的未知扰动，是细胞工厂构建中常用的整合方式。基因组中同源重组位点的选择对基因表达水平和菌株的生长通常具有较大的影响，常用的重组位点通常位于缺陷型基因的原位或附近，可供选择的位点有限，限制了微生物代谢工程的发展。因此，挖掘更多具有不同转录水平的基因组整合位点具有重要的意义。

## 1 中性位点

### 1.1 中性位点的定义

中性位点指在基因组中可以插入外源基因而不会影响宿主细胞适应性或生长性能的一段DNA序列。中性位点通常位于基因组的非编码区，不直接参与重要生理过程中的基因表达和调控<sup>[5-6]</sup>。

### 1.2 中性位点的筛选和鉴定表征

中性位点的获取通常分为3个步骤：候选中性位点的筛选、报告基因的插入、中性位点的鉴定和性质表征。

首先进行候选中性位点的筛选，通常在基因组中的基因间隔区上进行。根据两侧翼基因

的转录方向，基因间隔区分为3种类型：HH (head-to-head，包含2个启动子)、HT或TH (head-to-tail或tail-to-head，包含1个启动子和1个终止子)、TT (tail-to-tail，包含2个终止子) (图1)。侧翼基因的启动子或终止子序列是侧翼基因表达的重要元件，为避免干扰，筛选候选中性位点时需确保基因间隔区的长度大于两元件长度之和。根据酵母中启动子和终止子的一般长度，上述3类间隔区长度需至少分别大于1 200、1 000、800 bp 才可被选作候选中性位点<sup>[7-8]</sup>。为方便操作，亦可统一选取长度大于1 500 bp 的间隔区域作为候选中性位点。本课题组依此标准在乳酸克鲁维酵母中选择间隔长度大于1 500 bp 的间隔区域作为候选中性位点，筛选出232个候选中性位点进行后续鉴定表征。Yu等<sup>[8]</sup>在多形汉逊酵母中，筛选长度超过1 500 bp 的 HT、TH 和 HH 型或超过1 200 bp 的 TT 型的共36个基因间隔区作为候选中性位点进行鉴定表征。Ruan等<sup>[9]</sup>在巴斯德毕赤酵母中，选择间隔区长度超过2 100 bp 的 HH 型、超过1 850 bp 的 HT 和 TH 型或超过1 600 bp 的 TT 型区间共102个作为候选中性位点。Kong等<sup>[10]</sup>在酿酒酵母中，筛选长度超过1 200 bp 的基因间隔区作为候选中性位点，同时还指出，着丝粒和端粒的染色体结构通常不稳定，候选中性位点的筛选应避开这2处结构。

在基于染色体位置和基因间隔区长度的2个原则初步确定候选位点后，需利用CRISPR-Cas9等基因组编辑手段，在候选位点处重组整合报告基因。易于进行异源基因整合等遗传操作是中性位点必要的序列特征，异源基因插入效率应不显著低于传统缺陷型基因整合位点。许俊浩<sup>[11]</sup>测试27个候选位点，其中整合效率大于90%的有19个，后续选择这19个位点为候选中性位点。对于酿酒酵母等传统酵母，同源重组效率高，报告基因易于整合；对于乳

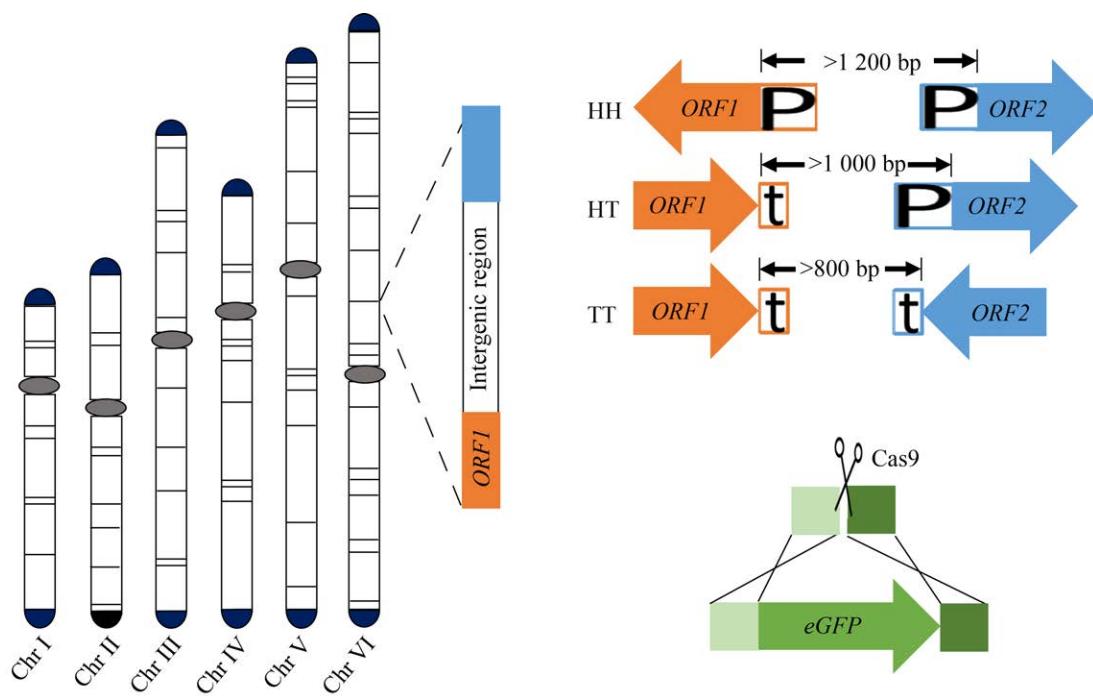


图 1 乳酸克鲁维酵母中候选中性位点的筛选标准及筛选方法 P: 启动子; t: 终止子。

Figure 1 Screening criteria for candidate neutral sites in *Kluyveromyces lactis*. P: Promoter; t: Terminator.

酸克鲁维酵母等同源重组效率低的非传统酵母菌株<sup>[12]</sup>,可通过构建 $\Delta Ku70$ 或 $\Delta Ku80$ 缺陷型菌株,或过表达 $ScRAD52$ 或 $ScRAD51$ ,增强菌株的同源重组能力,提升候选中性位点的编辑效率<sup>[13-14]</sup>。另外,针对同源重组效率较低的酵母宿主,采用非同源末端连接介导的基因整合策略,利用荧光报告基因,可同步实现报告基因的整合与中性位点的筛选表征。Liu 等<sup>[15]</sup>通过非同源重组的方式在解脂耶氏酵母基因组中随机整合 $eGFP$ 基因表达盒以构建荧光表达文库,随后利用流式细胞仪分选获得高荧光表达菌株,经测序获得 $eGFP$ 插入位置即为候选中性位点。

最后,对插入报告基因的重组菌株进行培养以鉴定和表征中性位点。重点考察以下 2 个特征:(1) 插入外源基因后对细胞适应性和生长影响最小,菌株生长曲线与野生型菌株没有显著区别。Kong 等<sup>[10]</sup>在表征过程中发现插入异源基因影响菌株生长,推测是外源基因破坏了必

需基因的调节序列。(2) 在中性位点处表达的报告基因需具有一定的遗传稳定性和表达稳定性,一般用报告基因的稳定表达水平表征中性位点的强度<sup>[16]</sup>。Gao 等<sup>[17]</sup>将筛选到的候选中性位点插入红色荧光蛋白,在非选择性培养基中连续转移 30 代后,所有菌落均呈现红色荧光,证明了中性位点的遗传稳定性。Liu 等<sup>[6]</sup>在酿酒酵母中筛选到的 2 个中性位点 Int4 和 Int17 处插入 $URA3$ ,利用 5-氟乳清酸(5-fluoroorotic acid, 5-FOA)的致死性考察 $URA3$ 基因在中性位点处的稳定性,5 次转接后 $URA3$ 仍稳定存在,证实了中性位点基因的遗传稳定性。

综上所述,可以利用基因间序列的长度及其染色体位置、报告基因整合效率、重组菌株生长特性、报告基因遗传稳定性和表达强度共 6 个关键因素筛选和鉴定用于外源基因表达的中性位点。利用上述组合方法已成功鉴定出毕赤酵母、酿酒酵母基因组中的百余个中性位点<sup>[8,10,13]</sup>(表 1)。

**表 1 酵母中性位点的鉴定和表征**

Table 1 Identification and characterization of neutral sites in yeast

Strain	Gene integration technology	Characterized product	Neutral sites/Candidate sites	Reference
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CRISPR-Cas9	eGFP, fatty alcohols	30/58	[10]
<i>Ogataea polymorpha</i>	CRISPR-Cas9	eGFP, fatty alcohols	18/36	[8]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Non-homologous recombination	eGFP, lycopene	17/-	[15]
<i>Pichia pastoris</i>	CRISPR-Cpf1	eGFP, astaxanthin, biomass	102/-	[9]
<i>Pichia pastoris</i>	CRISPR-Cas9	eGFP, fatty alcohols	46/53	[13]

## 2 影响中性位点基因表达强度的因素

### 2.1 染色体结构的影响

染色质结构会影响染色质上基因启动子的空间结构，干扰转录因子和 RNA 聚合酶的结合，从而阻碍转录过程的进行，这是造成中性位点基因表达差异的重要因素<sup>[18]</sup>，具体表现为开放的染色质结构通常与活跃的基因转录相关，而紧密的染色质结构则抑制转录活性<sup>[19]</sup>。

除此之外，染色质的动态重塑也会影响基因的表达。多种机制(如组蛋白修饰、染色质重塑复合体的作用等)可导致染色质结构发生动态调整，这些结构重塑会影响 RNA 聚合酶或转录因子的功能，造成转录的障碍。例如，组蛋白的乙酰化修饰通常与基因的激活相关<sup>[20]</sup>，而不同种类和位置的甲基化则可能与转录抑制或激活相关<sup>[21]</sup>。

端粒和着丝粒独特的染色质结构显著影响染色质上基因的稳定性和表达水平。端粒位置效应表现为处于端粒序列附近的基因的表达受到抑制。对酿酒酵母转录组分析发现，端粒附近 20 kb 范围内基因的平均表达水平仅为非端粒基因的 20%<sup>[22]</sup>。张文政等<sup>[23]</sup>整理表征了 444 个低表达位点，发现低表达位点在端粒位置的分布较为集中。类似地，着丝粒附近区域基因的表达水平和稳定性也较低，这可能是多种因素共同作用的结果，包括细胞周期的调控、着丝

粒结构的完整性、细胞分裂的调控、蛋白质-DNA 复合体的形成，以及基因表达调控等<sup>[24]</sup>。

### 2.2 毗邻基因的影响

中性位点转录强度会受其毗邻基因转录强度的影响。一方面，中性位点基因会与毗邻基因竞争局部转录元件，在转录水平彼此干扰、相互影响，类似于启动子干扰现象<sup>[25]</sup>。另一方面，空间位置上串联基因的转录有连锁效应，毗邻基因的转录强度会通过该连锁效应对中性位点基因的转录强度造成影响<sup>[26]</sup>。本课题组的研究也验证了这一结论，转录水平较高的基因，其毗邻位置是表达的热点(数据未发表)。

Gui 等<sup>[27]</sup>发现，当 eGFP 表达盒整合到富含必需基因的基因组区域时，其表达往往处于较低水平。进一步的研究表明，整合到富含必需基因处的中性位点会导致整合基因的转录活性降低，这可能与必需基因较强的转录竞争能力相契合。Chen 等<sup>[28]</sup>考察了酵母染色体的 482 个不同中性位点处蛋白表达的稳定性，研究发现必需基因池附近的中性位点处的基因表达水平稳定，“噪音”少。

### 2.3 与复制起点之间距离的影响

与原核生物不同，酵母等高等真核生物 DNA 的复制通常起始于离散的染色体位点，称为复制起点<sup>[29]</sup>。每个染色体通常有多个复制起始位点，以确保基因组在合理的时间内完成复制<sup>[30]</sup>。

在靠近复制起点的中性位点上，基因表达

水平通常较高且稳定，因为这些区域在细胞分裂时更容易复制和传递，不易丢失<sup>[31]</sup>。张文政等<sup>[23]</sup>在酿酒酵母基因组中表征了 428 个中性位点，发现具有最高转录活性的 2 个中性位点距离最近的复制起点小于 400 bp。

## 2.4 培养基碳源的影响

碳源通过激活特定的转录因子，进一步调控与糖吸收和代谢相关基因的表达<sup>[32-34]</sup>。不同类型的碳源激活不同的信号通路，调控内源代谢网络。这种与碳源代谢相关的基因的表达可能会影响其相邻中性位点处基因的表达。Ruan 等<sup>[9]</sup>发现以葡萄糖作为碳源时，一些中性位点处荧光蛋白表达水平显著大于其他位点，但在以甲醇为碳源的条件下，这些位点的基因表达水平与其他位点没有显著差异，推测这些中性位点与碳源代谢相关基因距离较近。相反，Yu 等<sup>[8]</sup>分别使用以葡萄糖、木糖或甲醇为碳源的合成培养基，结果显示中性位点基因表达表现出相似的水平。Wu 等<sup>[35]</sup>也发现，碳源的种类不会导致不同候选位点之间的基因表达水平差异，这可能是由于选择的中性位点与受碳源调节基因的位置较远。

## 3 中性位点的应用

### 3.1 构建稳定高效的蛋白表达菌株

研究发现，酵母不同中性位点上基因转录水平存在差异，Wu 等<sup>[35]</sup>表征了 10 个不同中性位点，在这些中性位点上表达荧光蛋白的相对荧光强度差异最大达 13.2 倍。转录水平较高的中性位点通常被称作表达热点(hot spot)，在这些热点中插入异源蛋白基因，可构建高效的蛋白表达菌株，显著提升异源蛋白生产水平<sup>[36]</sup>。本课题组在乳酸克鲁维酵母中进行异源蛋白的基因组整合表达，异源蛋白除了整合在常规位点 Lac4 处，还额外整合在高强度中性位点处，显著提升了基因剂量效应，使蛋白表达水平提高 2 倍以上(未发表成果)。

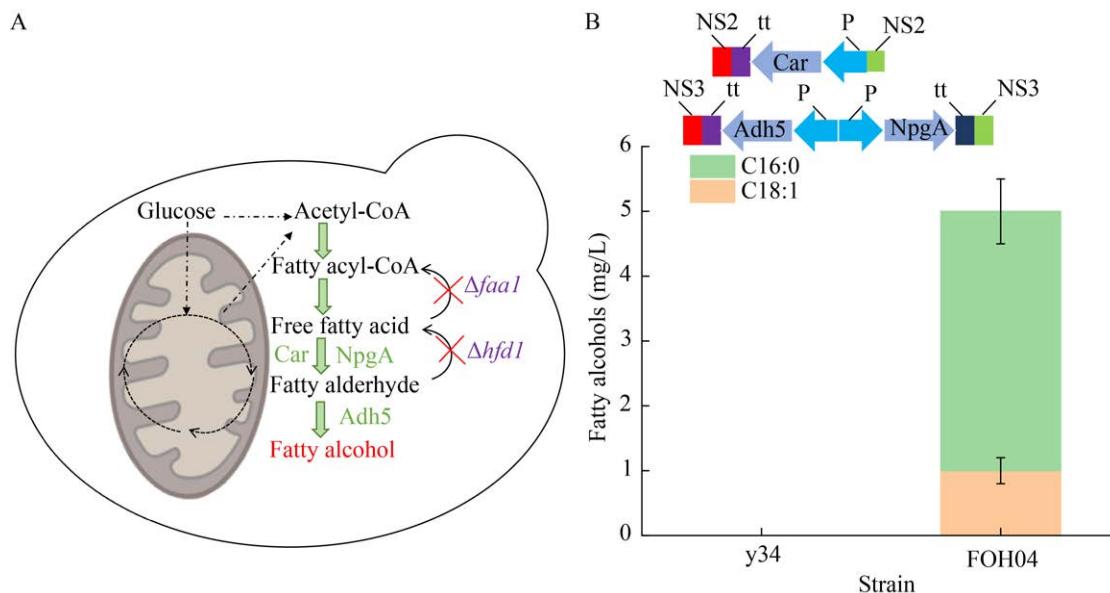
除了中性位点之间蛋白表达强度存在差异之外，中性位点和非中性位点之间也存在表达强度差异。Ruan 等<sup>[9]</sup>在毕赤酵母中获得了最优中性位点 P1NS4，在 P1NS4 上蛋白表达效果优于常用的缺陷型整合位点 His4。本课题组在乳酸克鲁维酵母中筛选获得的 D08954 和 A11088 位点，在这 2 个位点上整合荧光蛋白的表达强度均优于常用整合位点 Lac4 位点(未发表成果)。

在工业放大生产中，除高表达水平外，高遗传稳定性和表达稳定性也非常关键。本课题组构建的乳酸克鲁维酵母中性位点整合菌株，转接 5 次后的发酵生物量与野生型菌株无异，蛋白表达水平亦无明显下降，验证了该菌株中性位点作为菌株异源蛋白表达位点的传代和生产稳定性(未发表成果)。

### 3.2 中性位点用于构建化学品的生物合成途径

随着煤、石油和天然气资源的日渐枯竭，二氧化碳等温室气体排放持续增加，传统方法生产化学品带来的能源和环境问题成为人类面临的最严峻问题之一。将化学品的生物合成途径整合至微生物基因组的中性位点，构建化学品生产的微生物细胞工厂是目前公认的绿色高效的解决方案。

Yu 等<sup>[8]</sup>通过将脂肪醇合成途径的 3 个基因 *Car*、*NpgA*、*Adh5* 分别整合至多形汉逊酵母基因组中性位点 NS2 和 NS3 处，使得脂肪醇产量达到 4.5 mg/L (图 2)。Cai 等<sup>[13]</sup>通过在毕赤酵母中将 3 个启动子与 3 个中性位点排列组合，用于过表达脂肪醇合成基因 *FaCoAR*，最终产物浓度范围达 12.6–380 mg/L，表明中性位点可灵活地应用于基因表达水平的调节。Kong 等<sup>[10]</sup>通过将脂肪酰基 CoA 还原酶基因 (*Mafar1*) 整合至酿酒酵母的 30 个中性位点处，成功实现了脂肪醇的异源合成，产量达到 20–110 mg/L。



**图 2 中性位点整合新合成途径基因的多形汉逊酵母细胞工厂生产脂肪醇<sup>[8]</sup>** A: 脂肪醇生物合成新途径。Car: 小鼠羧酸还原酶; NpgA: 构巢曲霉 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶; Adh5: 酿酒酵母醇脱氢酶 5。B: 多形汉逊酵母细胞工厂生产脂肪醇。y34: 阴性对照菌株不产生脂肪醇; FOH04: 脂肪醇生产菌株; P: 启动子; tt: 终止子; NS2: 中性位点 2; NS3: 中性位点 3。

Figure 2 *Ogataea polymorpha* cell factory that integrating genes of the newly designed pathway at neutral sites produces fatty alcohols<sup>[8]</sup>. A: Newly constructed biosynthetic pathway of fatty alcohol. Car: Carboxylic acid reductase from *Mus musculus*; NpgA: 4'-phosphopantetheinyl transferase from *Aspergillus nidulans*; Adh5: Alcohol dehydrogenase 5 from *Saccharomyces cerevisiae*. B: The production of fatty alcohols in *Ogataea polymorpha* strain. y34: The negative control strain; FOH04: Fatty alcohol producing strain; P: Promoter; tt: Terminator; NS2: Neutral site 2; NS3: Neutral site 3.

### 3.3 多位点整合构建天然产物细胞工厂

微生物细胞工厂构建的核心是产物合成代谢途径中的多个基因在生产菌种中的整合和表达。要实现细胞工厂中底物的高转化率，需要精确控制产物合成途径中各步骤的酶的表达水平，以减少中间代谢产物累积，降低细胞负荷，最终提高细胞工厂的发酵生产性能<sup>[37]</sup>。不同中性位点上基因表达水平的差异，可用于代谢途径中不同酶蛋白的协同表达和代谢途径的精准调控，构建用于生物制造的高效稳定的微生物细胞工厂<sup>[38]</sup>。

Ruan 等<sup>[9]</sup>将 *AaCrtZ* 和 *HpCrtW* 基因分别整合至 2 个中性位点，获得中间产物玉米黄质和角质素，并最终成功生产了 13.29 mg/L 的虾青素。Mikkelsen 等<sup>[39]</sup>在酿酒酵母中构建抗癌活性

物质吲哚硫昔的合成途径，将途径中 22 个基因整合入酿酒酵母的中性位点，产物最高水平达到 1 mg/L，且生产菌株的生长未受显著影响，产物产量稳定。Liu 等<sup>[6]</sup>在酵母的中性位点上构建血根碱(24 个表达盒)和阿马碱(29 个表达盒)的从头生物合成途径，在摇瓶中生产异育亨宾生物碱产量达 119.2 mg/L (含 61.4 mg/L 阿马碱)，这是迄今为止报道的单萜吲哚生物碱(monoterpene indole alkaloids)的最高产量。许俊浩<sup>[11]</sup>将文多灵生物合成途径所需的 7 个基因全部整合到毕赤酵母中性位点上，实现文多灵的人工生物合成，产量达 0.24 mg/L。

酵母中挖掘的中性位点及应用实例如表 2 所示。

**表 2 酵母中性位点的应用实例**

Table 2 Application examples of yeast neutral sites of neutral sites in yeast

Strains	Neutral sites	Applications & Case studies	References
<i>Ogataea polymorpha</i>	NS2, NS3	Successfully engineered for fatty alcohol production (4.5 mg/L)	[8]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	B-3, F-17	Lycopene biosynthesis regulated by combinatorial promoter-terminator configurations, resulting in threefold yield variation (1.19–3.61 mg/g dry cell weight)	[15]
<i>Pichia pastoris</i>	P1NS27, P4NS14 PIV-3, PIV-9, PIV-16	Methanol-based biosynthesis of astaxanthin (13.29 mg/L) Combinatorial neutral sites and promoter library implementation enabled dual regulation of gene expression and metabolic flux, achieving 30-fold fatty alcohol yield variation (12.6–380 mg/L)	[9] [13]
	Int11, Int32, Int33, Int34, Int37, Int42, Int45, Int48	Full integration of the 7 gene vindoline biosynthetic pathway into neutral sites, coupled with enhanced methylation supply, achieved a final titer of 0.24 mg/L	[11]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NSIX-1, NSIX-2, NSVIII-1 Int4, Int5, Int7, Int9, Int10, Int11, Int12, Int14, Int16, Int17, Int18, Int19 XII-1, XII-5, XII-2, XII-4	Fatty alcohol production at 105.7, 90.7, and 80.3 mg/L via three distinct neutral sites <i>De novo</i> biosynthesis pathway for sanguinarine and ajmalicine constructed at neutral loci, yielding 119.2 mg/L total isohydrostachine alkaloids (including 61.4 mg/L ajmalicine) in shake flasks Anticancer indole glucosinolate pathway engineered by integrating 22 genes into neutral loci, achieving a maximum titer of 1 mg/L	[10] [6] [39]

## 4 结语与展望

近年来,酵母中性位点在筛选、鉴定和应用方面取得了显著进展,但未来仍存在诸多发展空间。生物大数据的获取和解析结合人工智能手段将有助于更高效和准确地预测中性位点,降低筛选鉴定工作量;多组学分析将保障不同培养条件和工业生产环境下中性位点处基因的传代稳定性和表达稳定性,以及更高效地利用中性位点实现多基因代谢途径的精准调控等。未来,基于新中性位点的鉴定和表征,结合基因编辑技术、组学技术、高通量筛选和人工智能分析方法,可用于实现更加复杂和精细的基因调控,推动酵母细胞工厂在生物制药、生物能源、食品工业等领域的应用和发展。

## 作者贡献声明

王政、张璇:实验操作、数据管理、初稿

写作;郑迎迎、李金山、王健:方案设计、经费支持、监督指导、稿件润色修改。

## 作者利益冲突公开声明

没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## REFERENCES

- [1] CELLO J, PAUL AV, WIMMER E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template[J]. Science, 2002, 297(5583): 1016-1018.
- [2] COS O, RAMÓN R, MONTESINOS JL, VALERO F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review[J]. Microbial Cell Factories, 2006, 5: 17.
- [3] 贺铁凡,徐沙,张阁元,中西秀树,高晓冬.重构酿酒酵母N-糖基化途径生产人源化糖蛋白[J].微生物学报,2014,54(5): 509-516.  
HE T, XU S, ZHANG GY, NAKANISHI H, GAO XD. Reconstruction of N-glycosylation pathway for producing human glycoproteins in *Saccharomyces*

- cerevisiae*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(5): 509-516 (in Chinese).
- [4] CHEN N, WANG JY, ZHAO YY, DENG Y. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of glucaric acid at high titer[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 67.
- [5] NG AH, BERLA BM, PAKRASI HB. Fine-tuning of photoautotrophic protein production by combining promoters and neutral sites in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. strain PCC 6803[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(19): 6857-6863.
- [6] LIU TF, GOU YW, ZHANG B, GAO R, DONG C, QI MM, JIANG LH, DING XW, LI C, LIAN JZ. Construction of ajmalicine and sanguinarine *de novo* biosynthetic pathways using stable integration sites in yeast[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(5): 1314-1326.
- [7] KRISTIANSSON E, THORSEN M, TAMÁS MJ, NERMAN O. Evolutionary forces act on promoter length: identification of enriched *cis*-regulatory elements[J]. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(6): 1299-1307.
- [8] YU W, GAO JQ, ZHAI XX, ZHOU YJ. Screening neutral sites for metabolic engineering of methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2021, 6(2): 63-68.
- [9] RUAN SP, YANG YX, ZHANG XY, LUO GJ, LIN Y, LIANG SL. Screening and characterization of integration sites based on CRISPR-Cpf1 in *Pichia pastoris*[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2024, 9(4): 759-765.
- [10] KONG SJ, YU W, GAO N, ZHAI XX, ZHOU YJ. Expanding the neutral sites for integrated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2022, 369(1): fnac081.
- [11] 许俊浩. 毕赤酵母整合位点挖掘及其在组装天然产物合成途径的应用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2022.
- XU JH. Study on *Pichia pastoris* integration site mining and its application in assembling natural products synthesis pathway[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2022 (in Chinese).
- [12] 刘士琦, 荣兰新, 赵柄祥, 卢志慧, 赵禹, 肖冬光, 于爱群. 乳酸克鲁维酵母作为微生物细胞工厂的应用研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(15): 357-366.
- LIU SQ, RONG LX, ZHAO BX, LU ZH, ZHAO Y, XIAO DG, YU AQ. Advances in the application of *Kluyveromyces lactis* as a microbial cell factory[J]. Food Science, 2022, 43(15): 357-366 (in Chinese).
- [13] CAI P, DUAN XP, WU XY, GAO LH, YE M, ZHOU YJ. Recombination machinery engineering facilitates metabolic engineering of the industrial yeast *Pichia pastoris*[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(13): 7791-7805.
- [14] LIU Q, SHI XN, SONG LL, LIU HF, ZHOU XS, WANG QY, ZHANG YX, CAI MH. CRISPR-Cas9-mediated genomic multiloci integration in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(1): 144.
- [15] LIU XQ, CUI ZY, SU TY, LU XM, HOU J, QI QS. Identification of genome integration sites for developing a CRISPR-based gene expression toolkit in *Yarrowia lipolytica*[J]. Microbial Biotechnology, 2022, 15(8): 2223-2234.
- [16] REIDER APEL A, D'ESPAUX L, WEHRS M, SACHS D, LI RA, TONG GJ, GARBER M, NNADI O, ZHUANG W, HILLSON NJ, KEASLING JD, MUKHOPADHYAY A. A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(1): 496-508.
- [17] GAO JC, ZUO YM, XIAO F, WANG YL, LI DF, XU JH, YE CF, FENG LJ, JIANG LJ, LIU TF, GAO D, MA B, HUANG L, XU ZN, LIAN JZ. Biosynthesis of catharanthine in engineered *Pichia pastoris*[J]. Nature Synthesis, 2023, 2(3): 231-242.
- [18] LI B, CAREY M, WORKMAN JL. The role of chromatin during transcription[J]. Cell, 2007, 128(4): 707-719.
- [19] RITTENHOUSE NL, DOWEN JM. Cohesin regulation and roles in chromosome structure and function[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2024, 85: 102159.
- [20] AALFS JD, KINGSTON RE. What does 'chromatin remodeling' mean?[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000, 25(11): 548-555.
- [21] GREER EL, SHI Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance[J]. Nature Reviews Genetics, 2012, 13(5): 343-357.
- [22] WYRICK JJ, HOLSTEDE FC, JENNINGS EG, CAUSTON HC, SHORE D, GRUNSTEIN M, LANDER ES, YOUNG RA. Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast[J]. Nature, 1999, 402(6760): 418-421.
- [23] 张文政, 唐继军, 李炳志, 元英进. 酿酒酵母基因组位置效应对外源基因表达的影响[J]. 生物工程学报, 2016, 32(7): 901-911.
- ZHANG WZ, TANG JJ, LI BZ, YUAN YJ. Effect of integration loci of genome on heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(7): 901-911 (in Chinese).
- [24] HEDOUIN S, LOGSDON GA, UNDERWOOD JG, BIGGINS S. A transcriptional roadblock protects yeast centromeres[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(14): 7801-7815.
- [25] PANDE A, BROSIUS J, MAKALOWSKA I, MAKALOWSKI W, RAABE CA. Transcriptional interference by small transcripts in proximal promoter regions[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(3): 1069-1088.
- [26] EBISUYA M, YAMAMOTO T, NAKAJIMA M, NISHIDA E. Ripples from neighbouring transcription[J]. Nature Cell Biology, 2008, 10: 1106-1113.
- [27] GUI Q, DENG SY, ZHOU ZZ, CAO WF, ZHANG X, SHI WJ, CAI XJ, JIANG WB, CUI ZF, HU Z, CHEN XS. Transcriptome analysis in yeast reveals the externality of position effects[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(8): 3294-3307.
- [28] CHEN XS, ZHANG JZ. The genomic landscape of position effects on protein expression level and noise in yeast[J]. Cell Systems, 2016, 2(5): 347-354.

- [29] STRUHL K, STINCHCOMB DT, SCHERER S, DAVIS RW. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(3): 1035-1039.
- [30] YUAN ZN, LI HL. Molecular mechanisms of eukaryotic origin initiation, replication fork progression, and chromatin maintenance[J]. Biochemical Journal, 2020, 477(18): 3499-3525.
- [31] WANG D, GAO F. Comprehensive analysis of replication origins in *Saccharomyces cerevisiae* genomes[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2122.
- [32] PRIELHOFER R, CARTWRIGHT SP, GRAF AB, VALLI M, BILL RM, MATTANOVICH D, GASSER B. *Pichia pastoris* regulates its gene-specific response to different carbon sources at the transcriptional, rather than the translational, level[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 167.
- [33] TURCOTTE B, LIANG XB, ROBERT F, SOONTORNGUN N. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast[J]. FEMS Yeast Research, 2010, 10(1): 2-13.
- [34] ROBERTS GG, HUDSON AP. Transcriptome profiling of *Saccharomyces cerevisiae* during a transition from fermentative to glycerol-based respiratory growth reveals extensive metabolic and structural remodeling[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2006, 276(2): 170-186.
- [35] WU XL, LI BZ, ZHANG WZ, SONG K, QI H, DAI JB, YUAN YJ. Genome-wide landscape of position effects on heterogeneous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 189.
- [36] BABAEI M, SARTORI L, KARPUKHIN A, ABASHKIN D, MATROSOVA E, BORODINA I. Expansion of EasyClone-MarkerFree toolkit for *Saccharomyces cerevisiae* genome with new integration sites[J]. FEMS Yeast Research, 2021, 21(4): foab027.
- [37] DU MY, ZHANG Q, BAI L. Three distinct mechanisms of long-distance modulation of gene expression in yeast[J]. PLoS Genetics, 2017, 13(4): e1006736.
- [38] 王冬, 戴住波, 张学礼. 酵母人工合成细胞生产植物源天然产物[J]. 微生物学报, 2016, 56(3): 516-529.  
WANG D, DAI ZB, ZHANG XL. Production of plant-derived natural products in yeast cells: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(3): 516-529 (in Chinese).
- [39] MIKKELSEN MD, BURON LD, SALOMONSEN B, OLSEN CE, HANSEN BG, MORTENSEN UH, HALKIER BA. Microbial production of indolylglucosinolate through engineering of a multi-gene pathway in a versatile yeast expression platform[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(2): 104-111.