

## 酵母乙醇提取物对重组大肠杆菌外源蛋白表达的影响

朱岩岩, 熊爱英, 桑秀梅, 王 晶, 王 期, 殷志敏\*

(南京师范大学生命科学学院, 生物化学与生物制品研究所, 江苏省分子医学重点实验室, 南京 210046)

**摘 要:** 酵母乙醇提取物是利用啤酒干酵母经培养发酵后提取的富含多种活性物质的混合物。初步实验研究发现, 该物质对大肠杆菌蛋白表达有明显促进作用。为了进一步研究其对蛋白表达的作用, 以 *E.coli*BL21(DE3)/pGEX-4t-1-ggt 为主要研究菌, 以  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  乳糖作为诱导剂, 研究酵母乙醇提取物对  $\gamma$ -GGT 蛋白表达的作用。研究发现, 分批添加终浓度  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的酵母提纯提取物到  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的乳糖为诱导剂的培养基中可以显著提高  $\gamma$ -GGT 蛋白的表达及宿主菌的生长, 蛋白表达量比  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG 诱导效果高  $10\%\sim 50\%$ , 菌体密度提高  $1.75\sim 3$  倍左右。对于其他的重组蛋白及表达宿主有相似的作用。酵母乙醇提取物与乳糖组成的复合制剂可以有效替代有毒性的 IPTG 作为诱导剂的使用, 为大规模诱导蛋白表达奠定了基础。

**关键词:** 酵母乙醇提取物; 乳糖; 诱导; 蛋白合成

中图分类号: Q78; TQ92

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2016)03-0366-07

### Effect of Yeast extract on heterologous protein production in recombinant *Escherichia coli*

ZHU Yanyan, XIONG Aiyang, SANG Xiumei, WANG Jing, WANG Qi, YIN Zhimin

(School of life Sciences ,Nanjing Normal University, Institute of Biochemistry and Biological Products, Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210046)

**Abstract:** The ethanol extract of yeast contains a variety of active substances extracted from beer yeast. Preliminary study found that the ethanol extract can significantly promote protein expression in *E. coli*. Our laboratory used *E.coli*BL21 (DE3) / pGEX-4t-1-ggt as the main research bacteria and added  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  lactose to the medium as an inducer to study the role of yeast alcohol extract on protein expression of  $\gamma$ -GGT. We found that  $\gamma$ -GGT protein expression yield and the growth of the host bacteria can be significantly improved when the final concentration at  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of yeast extract was batch added into medium containing  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of lactose at different fermentation periods. The results showed that the amount of expressed protein increased by  $10\%\sim 50\%$  comparing with that induced by  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG and cell density increased by  $1.75\sim 3$  times. Similar effect has been shown for different proteins expressed in recombinant *Escherichia coli*. The mixture of ethanol yeast extract and lactose may be the effective alternative inducer to replace toxic IPTG. This result would lay a foundation for large-scale protein expression in the future.

**Key words:** yeast extract; lactose; induce; protein synthesis

最近 30 多年来,随着重组 DNA 技术和分子生物学研究的不断深入,基因表达技术有了很大的提高。人们已经先后研究开发出多种用于表达外源蛋白的表达系统,特别是大肠杆菌外源蛋白表达系统是目前应用最为广泛的表达系统<sup>[1-3]</sup>。目前人们已经成功的在大肠杆菌中表达了多种蛋白产品,包括抗生素、抗肿瘤药物、免疫制剂、激素、蛋白酶制剂

等<sup>[4]</sup>。异丙基- $\beta$ -D 半乳糖苷 (IPTG) 是实验室中常用的表达载体 T7 乳糖启动子高效诱导剂,但是其自身存在毒性,在表达一些应用于人体的重组蛋白时可能会带来一些不利的影晌;另一方面, IPTG 的价格较为昂贵也是限制其大规模使用的重要因素之一<sup>[5]</sup>。乳糖是一种无毒的廉价的二糖,其可在一定程度上代替 IPTG 作为诱导剂使用<sup>[6-8]</sup>。但是由于

收稿日期: 2016-01-19

基金项目: 江苏省科技厅产学研联合创新资金—前瞻性研究项目(BY2013001-03)资助。

作者简介: 朱岩岩, 硕士。E-mail: zhuyy918@163.com

\* 通信作者: 殷志敏, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: yinzhimin@njnu.edu.cn

乳糖自身的性质及发挥诱导作用的方式, 即其必须在  $\beta$ -半乳糖苷透过酶的作用下进入细胞内部, 然后经  $\beta$ -半乳糖苷酶转化为异乳糖后发挥诱导剂的作用<sup>[9-10]</sup>, 诱导过程比较复杂, 诱导效率较低<sup>[11]</sup>; 乳糖作为碳源可以被微生物菌体所降解, 参与糖代谢, 使得其诱导作用较为短暂。

酵母提取物 (yeast extract) 是以啤酒酵母或面包酵母为原料, 破壁后, 经蛋白酶解和加热等方法获得的一种混合物。其含有丰富的氨基酸、多肽、核苷酸、碳水化合物、生长因子和微量元素, 被广泛应用于食品、生物发酵、化妆品等领域<sup>[12-14]</sup>。已有研究报道, 某些方法制得的酵母提取物因其含有诱导因子或辅助因子等, 能够引起重组蛋白的大量表达<sup>[15-16]</sup>。

本实验利用一种温和的方法制取了营养物质及活性物质等更加丰富的酵母提取物, 并利用该酵母提取物与乳糖相结合的方式, 提高外源目的蛋白的表达量。在本研究中, 我们使用大肠杆菌 BL21 (DE3)、Rosetta2 作为表达宿主菌, 分别以 pET28a 和 pGEX-4t-1 作为表达载体, 研究多种外源目的基因的蛋白表达情况及该酵母提取物对细菌生长的影响。最终获得最优的使用配比, 尽可能获得较高量的外源目的蛋白, 同时也为今后规模化使用该复合制剂诱导目的蛋白表达提供一条有效、经济、可行的途径。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株与质粒** 实验研究所涉及的菌株及重组表达质粒如表 1 所示。

**1.1.2 培养基与溶液** 酵母培养基 ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 葡萄糖 120, 磷酸氢二钠 20, 磷酸二氢钠 25, 硫酸镁 1。

LB 液体培养基 ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10。

LB 固体培养基 ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 琼脂粉 15。

LBG 液体培养基 ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 葡萄糖 15。

M9 培养基 ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 磷酸氢二钠 15, 磷酸二氢钾 2, 氯化钠 0.5, 氯化铵 1, 蛋白胨 10, 硫酸镁 0.5, 氯化钙 0.01, 甘油 5 mL。

各培养基使用时分别加入卡那霉素或氨苄青霉素, 终浓度为  $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 1.2 方 法

**1.2.1 制备酵母乙醇提取物 (YE)** 取 100 g 啤酒

干酵母, 溶于 2L 的酵母培养基中,  $37^\circ\text{C}$ ,  $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 培养 12 h, 经均质仪破壁后, 上清使用乙醇沉淀, 使上清液中的乙醇浓度为 70%, 分离得到的沉淀物即为酵母乙醇提取物。

**1.2.2 不同重组菌的构建** 利用分子克隆技术, 经 PCR 扩增、酶切、酶连构建表 1 所列的重组表达质粒, 然后将构建成功的重组表达质粒转化到相应的表达宿主菌感受态中, 构建重组菌。

**1.2.3 菌种活化及种子培养** 从  $-80^\circ\text{C}$  甘油保存菌中挑取一环, 划线接种于含有  $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  抗生素的 LB 固体培养基中,  $37^\circ\text{C}$  倒置培养过夜。然后挑取单菌落于含有  $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的抗生素的 4 mL LB 液体培养基中,  $37^\circ\text{C}$ ,  $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养过夜。

**1.2.4 摇瓶发酵培养** 将上述种子液接种于 50 mL 含  $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  抗生素的 LB 或 M9 液体培养基中, 接种量为 2%,  $37^\circ\text{C}$ ,  $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养至菌体对数生长前期, 加入诱导剂或诱导复合制剂,  $30^\circ\text{C}$ ,  $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  继续振荡培养, 诱导产酶。

**1.2.5 菌体密度测定** 菌体密度用浊度法间接测定<sup>[4]</sup>。用紫外分光光度计 (德国 Eppendorf) 测定得到发酵液菌体  $OD_{600}$  吸光值后, 用以下公式换算为菌体干重 (W):  $W (\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) = 0.382 \times OD_{600}$ 。

**1.2.6 重组蛋白百分量分析** 重组的基因工程菌发酵结束后, 从摇瓶发酵液中取 2 mL 测定  $OD_{600}$  吸光值后, 以对照组  $OD_{600}$  为标准, 用 PBS 溶液将各菌液稀释至相同菌体浓度。取稀释后 2 mL 菌液  $4^\circ\text{C}$ ,  $8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清得菌体。将菌体重悬于 1 mL PBS 溶液中, 取 100  $\mu\text{L}$  样品加入 100  $\mu\text{L}$  2X 蛋白上样缓冲液。100 $^\circ\text{C}$  水煮裂解 10 min, 制备样品。取样品 20  $\mu\text{L}$  上样进行 SDS-PAGE 电泳。

考马斯亮蓝染色法<sup>[17]</sup>测定菌体总蛋白后, 采用 BandsScan 软件扫描 SDS-PAGE 电泳图, 分析出每道重组蛋白的菌体总蛋白的百分含量。

**1.2.7  $\gamma$ -GGT 酶活力测定** 按 1.2.6 中方法将菌液稀释至相同菌体浓度后, 取 2 mL 稀释液, 于  $8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 收集菌体。加入 1 mL  $1\times$ PBS 悬浮菌体, 再次离心收集菌体, 重复 2 次以洗净菌体。最后用 1 mL  $1\times$ PBS 再次悬浮菌体。冰上超声破碎细菌, 条件为工作时间 5 s, 间歇时间 5 s, 总时间 3 min, 功率 500 W。超声液以  $12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  转速离心 10 min, 上清液即为粗酶液。测定酶活时, 可稀释适当倍数。

$\gamma$ -GGT 酶活测定是利用南京建成生物工程研究所提供的  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶酶活测定试剂盒。其测定原理是  $\gamma$ -GGT 催化底物反应, 游离出对硝基苯胺;

对硝基苯胺在 410 nm 处有强吸收峰,可直接比色测定吸光度值,从而计算出  $\gamma$ -GGT 的活力。测定组中向 2 mL 的底物基质液中加入稀释好的粗酶液 0.1 mL,对照管中只含有稀释过的粗酶液 0.1 mL,充分

混匀后,37℃水浴 10 min;反应结束后,分别向测定管和对照管中加入 0.2 mL 的终止剂混匀,对照管中再加入 2 mL 的底物基质液,室温放置 5 min,410 nm 波长,1 cm 光经,测定各管的吸光度。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌种和质粒 Strain and plasmid	特征 Relevant characteristics	来源 Source
菌种 Strains		
Dry beer Yeast		Maintained in our laboratory
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	CICIM-CU,China
Rosetta2	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) galdcm(DE3)pLysS pRARE2 <sup>3</sup> (Cam <sup>R</sup> )	CICIM-CU,China
BL21-GGT	<i>E.coli</i> BL21(DE3) with the pGEX-ggt	Maintained in our laboratory
BL21-Ald	<i>E.coli</i> BL21(DE3) with the pET28a-ald	Maintained in our laboratory
BL21-PncB	<i>E.coli</i> BL21(DE3) with the pET28a-pncb	Maintained in our laboratory
BL21-GFP	<i>E.coli</i> BL21(DE3) with the pET28a-gfp	Maintained in our laboratory
Rosetta-HMGB I	Rosetta2 with the pET28a-hmgb I	Maintained in our laboratory
Rosetta-ATA117	Rosetta2 with the pET28a-ata117	Maintained in our laboratory
质粒 Plasmids		
pGEX-4t-1	Amp <sup>r</sup> ,Ptac,lacI,N-GST	CICIM-CU,China
pGEX-ggt	pGEX-4t-1 derivative carrying the ggt gene	Maintained in our laboratory
pET28a	Kan <sup>r</sup> ,Ptac,T7,lacI,N-His,N-Thrombin,N-T7,C-His	CICIM-CU,China
pET28a-fba	pET28a derivative carrying the fba gene	Maintained in our laboratory
pET28a-pncb	pET28a derivative carrying the pncb gene	Maintained in our laboratory
pET28a-hmgb I	pET28a derivative carrying the hmgb I gene	Maintained in our laboratory
pET28a-gfp	pET28a derivative carrying the gfp gene	Maintained in our laboratory
pET28a-ata117	pET28a derivative carrying the ata117 gene	Maintained in our laboratory

表 2 不同培养基及诱导方式列表

Table 2 List of different media and induction methods

组别 Treated group	培养基 Medium	诱导剂 Induction method
1	LB	无 Not
2	LB	1 mmol·L <sup>-1</sup> IPTG
3	LB	2 g·L <sup>-1</sup> lactose+5 g·L <sup>-1</sup> yeast powder
4	LB	2 g·L <sup>-1</sup> Lacoste
5	LB	2 g·L <sup>-1</sup> lactose+5 g·L <sup>-1</sup> YE
6	M9	无 Not
7	M9	1 mmol·L <sup>-1</sup> IPTG
8	M9	2 g·L <sup>-1</sup> lactose+5 g·L <sup>-1</sup> yeast powder
9	M9	2 g·L <sup>-1</sup> Lacoste
10	M9	2 g·L <sup>-1</sup> lactose+5 g·L <sup>-1</sup> YE

注: YE 为本研究中制取的酵母乙醇提取物; Yeast powder 为从英国 OXOID 公司购买的酵母提取物。

Note: YE is the yeast extract from the dry beer yeast by ethanol; Yeast powder is from the OXOID.

酶活力单位(U)定义为:在上述情况下, $\gamma$ -GGT

每分钟催化产生 1 $\mu$ mol 的对硝基苯胺为一个酶活单位。

计算公式为:  $\gamma$ -GGT 活力 (U·L<sup>-1</sup>) = (测定 OD 值 - 对照 OD 值)  $\times$  232.56  $\times$  稀释倍数。

**1.2.8** 不同培养基和诱导方式对  $\gamma$ -GGT 蛋白表达的影响 分别用含 50 mg·L<sup>-1</sup> 氨苄青霉素的 LB 和 M9 培养基培养基因工程菌 *E.coli* BL21(DE3)/pGEX-4t-1-ggt,并设置不同的诱导方式,每隔 1h 取样测定菌体密度及酶的活力,发酵 12 h 后进行 SDS-PAGE 检测。培养基和诱导方式如表 2 所示。

**1.2.9** 不同浓度的 YE 对  $\gamma$ -GGT 蛋白表达的影响 将酵母乙醇提取物 (YE) 的含量分别设定为 0、3、5、8、10、15、20 g·L<sup>-1</sup>, M9 培养基中其它成分及含量不变。以含有 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导剂的 M9 培养基为对照,发酵 12 h 后进行 SDS-PAGE 检测,结合 BandsScan 软件计算目的蛋白表达量并测定酶活。

**1.2.10** 酵母乙醇提取物 (YE) 添加方式对  $\gamma$ -GGT 蛋白表达的影响 分别在 2 g·L<sup>-1</sup> 乳糖和 5 g·L<sup>-1</sup> YE

共同诱导 0、2、4、5、6、8 h 时加入  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 YE 到 M9 发酵培养基中,  $30^\circ\text{C}$  诱导发酵 12h 后进行 SDS-PAGE 检测, 结合软件计算目的蛋白表达量并测定菌体密度和目的蛋白活力。

**1.2.11 酵母乙醇提取物 (YE) 在 5 L 发酵罐实验中对目的蛋白表达的影响** 将 LB 种子液按照 2% 的接种量接种于 4 L 的 M9 发酵培养基中,  $37^\circ\text{C}$ 、 $240 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ vvm}$  培养至菌体对数生长前期, 加入  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  乳糖和  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 YE,  $30^\circ\text{C}$ 、 $320 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $0.8 \text{ vvm}$  诱导  $\gamma$ -GGT 目的蛋白表达, 诱导 4 h 后再加入  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  YE 继续诱导蛋白表达。以  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG 诱导剂作为对照, 每隔 1 h 取样测定菌体密度, 酶活力及蛋白表达量。

**1.2.12 酵母乙醇提取物 (YE) 对其他目的蛋白表达的影响** 分别以表 1 中所列举的醛缩酶 Ald、 $\omega$ -转氨酶 ATA117、GFP、PncB 等重组蛋白为目的蛋白, 使用 M9 培养基作为发酵培养基, 按照终浓度  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 YE 添加量添加到  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  乳糖诱导的发酵培养基中, 以 IPTG 诱导剂作为对照组, 研究 YE 对菌体密度及蛋白表达量的影响。

**1.2.13 酵母乙醇提取物 (YE) 对其他宿主菌生长的影响** 选用其他常用的原核表达宿主菌枯草芽孢杆菌及谷氨酸棒状杆菌作为实验菌, 按照上述的最优添加方式, 研究 YE 对其他宿主细菌的生长及目的蛋白表达的影响。

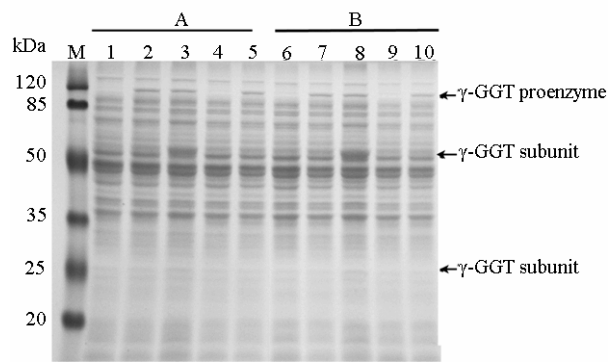
## 2 结果与分析

### 2.1 酵母乙醇提取物 (YE) 的制备

将  $100 \text{ g}$  啤酒干酵母溶于  $2 \text{ L}$  的酵母培养基中, 振荡培养 12 h 后, 破壁处理, 使用终浓度 70% 的酒精沉淀后, 分离得到的沉淀物即为酵母乙醇提取物 YE。经 HPLC 测定, 该 YE 中富含烟酰胺、烟酸、 $\text{NAD}^+$ 、 $\text{NADH}$ 、果糖-6-磷酸、果糖-1,6-二磷酸, 3-磷酸甘油醛、甘氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、维生素及多种微量元素等具有促进外源微生物菌体生长及蛋白快速合成的促进因子。

### 2.2 不同培养基和诱导方式对 $\gamma$ -GGT 蛋白表达的影响

分别用含有  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  氨苄青霉素的 LB 和 M9 培养基培养 *E.coli* BL21(DE3)/pGEX-4t-1-ggt, 并设置  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG、 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  乳糖、 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  乳糖+ $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  YE、 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  乳糖+ $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  yeast powder 4 种诱导方式, 发酵 12 h 后的 SDS-PAGE 检测结果及菌体生长曲线如图 1 和图 2 所示。



M: 标准蛋白; A: LB 培养基; B: M9 培养基; 1~10: 对应表 2 中的组别  
M: Protein marker; A: LB medium; B: M9 medium; 1-10: Corresponding to the 1-10 treatments in table 2  
图 1 不同培养基和不同诱导方式对  $\gamma$ -GGT 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 SDS-PAGE analysis of the expression of  $\gamma$ -GGT protein in different media and different induction methods

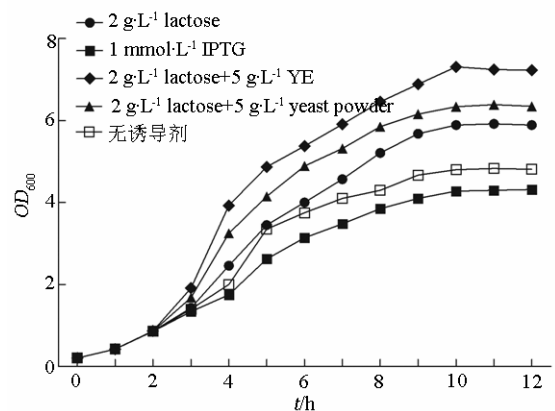
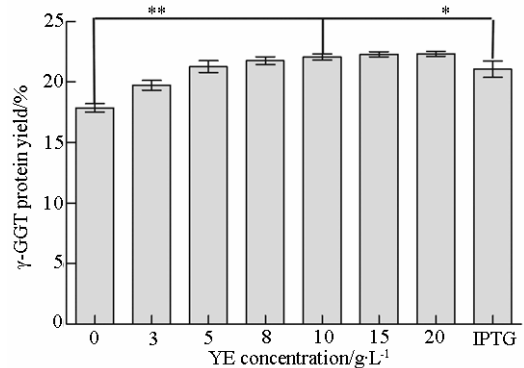


图 2 不同诱导方式对 *E.coli* BL21(DE3)/pGEX-4t-1-ggt 生长的影响

Figure 2 Growth pattern comparison with different inducers of the *E.coli* BL21(DE3)/pGEX-4t-1-ggt.



\*\* 为 0.01 水平上的显著性差异; \* 为 0.05 水平上的显著性差异

\*\* refers to significant difference at the 0.01 level; \* refers to significant difference at the 0.05 level

图 3 不同浓度 YE 对  $\gamma$ -GGT 蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of YE concentration on  $\gamma$ -GGT protein production in M9 medium

在含有乳糖或IPTG等诱导剂的LB和M9培养基中， $\gamma$ -GGT重组蛋白均有合成。单独乳糖诱导的蛋白表达量不如IPTG诱导表达的多；且添加有YE的乳糖诱导效果比加有酵母粉的乳糖效果好，甚至比使用IPTG诱导表达的蛋白多1倍。经测定在M9培养基中使用添加有YE的乳糖诱导处理组的酶活力最高，达600 U·L<sup>-1</sup>。YE对菌体的生长也有明显促进作用，可使菌体量在M9培养基中较IPTG诱导处理组提高96%。

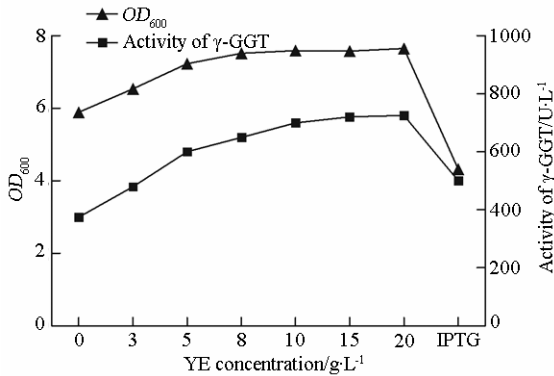


图4 M9培养基中YE含量对菌体光密度值和 $\gamma$ -GGT蛋白酶活力的影响

Figure 4 Effect of YE concentration in M9 medium on the optical density of bacterial cell and the activity of  $\gamma$ -GGT

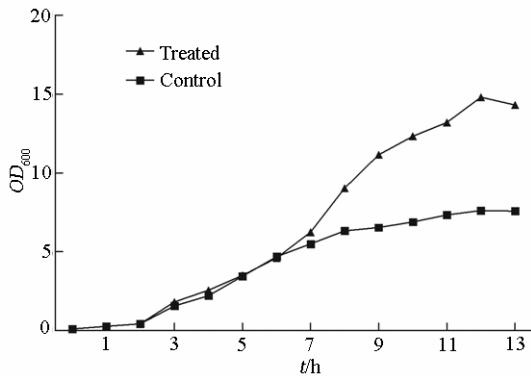


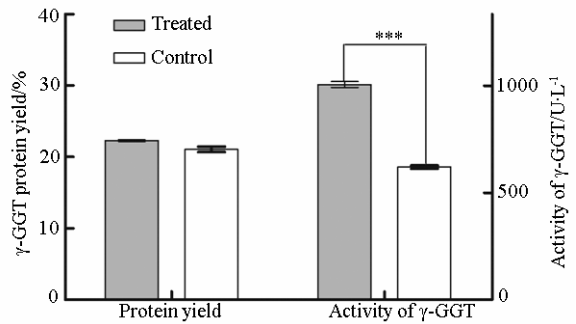
图5 5L发酵罐中不同诱导方式对菌体生长的影响  
Figure 5 Growth pattern comparison with different inducers of the recombinant *E.coli* in the 5L fermenter

2.3 不同浓度YE对 $\gamma$ -GGT蛋白表达及酶活影响

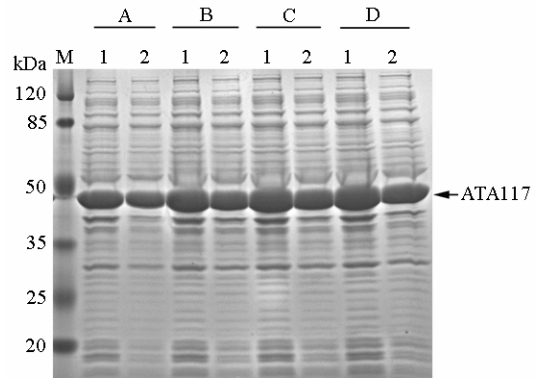
分别使用0、3、5、8、10、15和20 g·L<sup>-1</sup>的YE与2 g·L<sup>-1</sup>乳糖结合共同诱导 $\gamma$ -GGT重组蛋白表达，M9培养基的其他成分及诱导条件保持不变。发酵12h后进行酶活测定和蛋白表达量分析。

从图3和图4可以看出，菌体的OD<sub>600</sub>和 $\gamma$ -GGT蛋白表达量及酶活力在一定范围内均随着M9培养基中YE添加量增加而增加，当YE含量为10 g·L<sup>-1</sup>时，OD<sub>600</sub>达到7.590，是以IPTG为诱导剂处理组

的1.75倍；其蛋白表达量占总蛋白的22.15%，酶活力达到720 U·L<sup>-1</sup>；分别比只用乳糖和IPTG诱导后产生的蛋白活力高1.92倍和1.44倍。当YE的添加量继续增加至15和20 g·L<sup>-1</sup>时，OD<sub>600</sub>和酶活力及蛋白表达量不再大幅增加。可以看出，YE的添加不仅能够促进细胞增长，提高菌体密度，而且能够显著提高 $\gamma$ -GGT蛋白的表达量及活力，且以YE 10 g·L<sup>-1</sup>的添加量最佳。



\*\*\*为0.001水平上的显著性差异  
\*\*\* refers to significant difference at the 0.001 level  
图6 不同诱导方式对 $\gamma$ -GGT蛋白表达及酶活力的影响  
Figure 6 Effect of different inducers on the protein production and the activity of  $\gamma$ -GGT

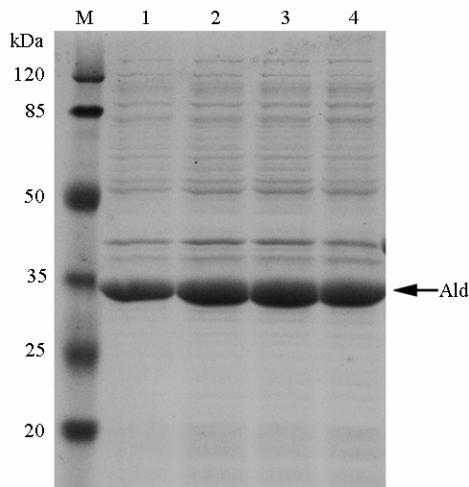


M: 标准蛋白; A: 对照组; B-D: 实验组; 1: 全菌蛋白; 2: 上清蛋白  
M: protein marker; A: control group; B-D: treated group; 1: whole cell protein; 2: soluble protein

图7 YE对ATA117蛋白表达的SDS-PAGE分析  
Figure 7 SDS-PAGE analysis of the expression of ATA117 protein with the yeast extract

2.4 YE添加方式对 $\gamma$ -GGT蛋白表达的影响

以一次添加终浓度10 g·L<sup>-1</sup>的YE作为对照，分两次添加等量的YE，总加入量与对照组相同。结果表明起始诱导4h后再添加5 g·L<sup>-1</sup> YE目的蛋白表达量比对照组的提高10%，酶活力提高8%，菌体量并没有显著性增加（图谱未给出）。表明YE的分批添加方式对蛋白的表达量有促进作用，这为大规模生产提供了重要的理论基础。

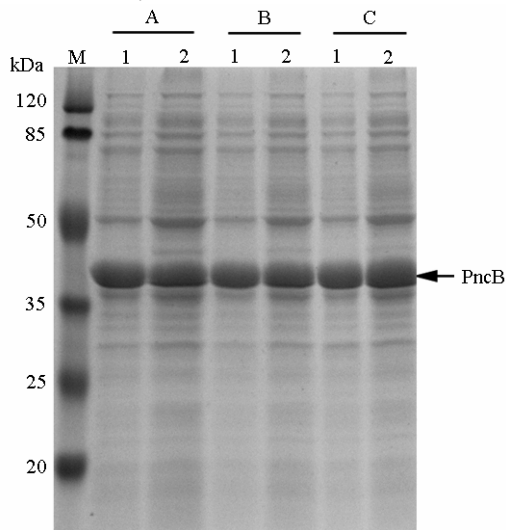


M: 标准蛋白; 1: 对照组; 2~4: 实验组

M: protein marker; 1: control group; 2-4: treated group

图 8 YE 对 Ald 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Figure 8 SDS-PAGE analysis of the expression of Ald protein with the yeast extract



M: 标准蛋白; A~C: 分别诱导 3、4 和 8 h; 1: 对照组; 2: 实验组

M: protein marker; A-C: 3、4 和 8 h with the different inducers; 1: control group; 2: treated group

图 9 YE 对 PncB 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Figure 9 SDS-PAGE analysis of the expression of PncB protein with the yeast extract

### 2.5 YE 在 5 L 发酵罐实验中的应用

将 *E.coli*BL21(DE3)/pGEX-4t-1-ggt 的 LB 种子液按照 2% 的接菌量接种于 5 L 的 M9 发酵培养基中, 培养至菌体生长量达到最佳密度时, 加入  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  乳糖和  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 YE 复合诱导剂, 继续诱导 4 h 后补加  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 YE 继续诱导蛋白表达, 并以  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG 诱导剂作为对照。

经放大培养后, YE 的添加对菌体生长和蛋白表达具有明显的促进作用(见图 5 和图 6)。与 IPTG

对照组相比, 菌体密度提高 1 倍, 蛋白表达量占总蛋白的百分比虽没有显著增高, 但单位体积的酶活力提高 90%, 约  $1032 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这为下一步的工业化应用奠定基础。

### 2.6 YE 对其他目的蛋白表达及菌体的影响

选用其他来源的重组蛋白进一步验证 YE 对蛋白表达及菌体生长的作用。选取醛缩酶 Ald、 $\omega$ -转氨酶 ATA117、GFP、PncB 等重组蛋白作为目标蛋白, 使用 M9 培养基, 以  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG 作为对照组, 按上述最优化的实验方法添加 YE, 分析蛋白表达及菌体的生长情况, 部分 SDS-PAGE 分析如图 7~图 9。

通过对其他重组蛋白的研究, 我们发现该酵母乙醇提取物对实验中所涉及的乳糖诱导的重组蛋白的表达都有促进作用, 诱导效果与对照组 IPTG 诱导相同, 甚至更好; 而且对大肠杆菌 BL21 或 Rosetta 等宿主菌有明显的促生长作用。该研究进一步验证了 YE 与乳糖形成的复合试剂具有比 IPTG 相同或更好的诱导效果, 而且对菌体的生长有促进作用。

### 2.7 酵母乙醇提取物(YE)对其他宿主菌生长影响

枯草芽孢杆菌和谷氨酸棒状杆菌也是原核表达系统中常用的宿主菌, 选用实验室常用的 *B.subtilis* 168 和 *C.glutamicum* ATCC13032 作为宿主菌, 研究酵母乙醇提取物 YE 对其生长的影响。研究发现, 添加相同量的 YE 对两者的生长都有促进作用, 尤其是对枯草芽孢杆菌的生长更为明显,  $OD_{600}$  比对照组提高了 2.3 倍(生长曲线结果未给出)。

## 3 讨论

乳糖作为一种无毒廉价的二糖, 可被用于 T7、*Ptac* 及 *Plac* 等乳糖启动子的蛋白表达诱导剂。但是由于其自身存在的缺陷及作用机理的复杂性, 使得乳糖的诱导效率及诱导效果比 IPTG 诱导低很多。虽然 IPTG 是一种常用的有效的蛋白表达诱导剂, 但是其对人体具有潜在的毒性而且价格昂贵, 使得其在大规模生产及某些蛋白合成中的使用受到限制。酵母乙醇提取物是一种从酵母细胞及其发酵液中提取出的天然的高活性营养物质, 其可被菌体完全吸收, 无任何毒副作用。已有研究表明酵母提取物的成分影响外源重组蛋白的表达<sup>[18]</sup>。

本研究主要是利用啤酒干酵母, 通过一种新的温和的方法制取了一种含有多种营养物质的混合物。该酵母乙醇提取物富含多种涉及菌体生长、蛋白合成及微量活性物质的成分。研究发现, 将该酵母乙醇提取物分批加入到含有乳糖作为诱导剂的

M9 培养基中,可显著提高蛋白的总体表达量,并促进菌体的生长,蛋白表达效果达到甚至超过 IPTG 诱导的蛋白表达的效果,可使大肠杆菌表达产物增加 10%~50%。

Fu 等<sup>[16]</sup>、Studier 等<sup>[19]</sup>和 Grossman 等<sup>[20]</sup>也观察到,培养基中的酵母提取物可以促进 T7 乳糖启动子操纵的大肠杆菌表达目的蛋白。Grossman 和 Dubendorff<sup>[21]</sup>把酵母提取物促进外源蛋白表达的现象归因于需要 cAMP 参与的渗漏表达。本研究使用的酵母乙醇提取物促进外源蛋白表达的作用机理还不是很清楚,可能也与 cAMP 参与的渗漏表达有关,这也可能是该提取物中的某些活性物质在乳糖诱导时发挥协助作用。目前其作用机理仅限于猜测,具体的表达机制还有待进一步研究。

使用酵母乙醇提取物与乳糖相结合的诱导方式,不仅可以显著促进菌体的生长并提高目的蛋白的表达量,还可以有效替代有毒性的 IPTG 而作为诱导剂使用,免除了产品在 IPTG 后处理的要求并且明显减少了产品的生产成本;同时,为大规模微生物发酵、蛋白质生产及生物酶制备提供了新的方法和思路,对发酵产业具有深远影响。

## 参考文献:

- [1] NUC P, NUC K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*[J]. Postepy Biochemii, 2006, 52(4): 448-456.
- [2] DONG X, TANG B, LI J, et al. Expression and purification of intact and functional soybean (*Glycine max*) seed ferritin complex in *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, 18(2): 299-307.
- [3] XIE T B. The research progress of *E.coli* expression system[J]. Journal of Yangtze university, 2008(3): 77-82.
- [4] XIA Y. Effects of interrupting branch pathways of glycolysis on heterologous protein expression in *Escherichia coli*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.
- [5] DONOVAN R S, ROBINSON C W, GLICK B R. Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1996, 16(3): 145-154.
- [6] WU Y F, ZHANG S Q, GAO X Y, et al. Expression of recombinant protein from pET plasmid using lactose as inducer[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science), 2002, 25(1): 89-93.
- [7] FENG X J, HE J X, PING Z Z, et al. Comparison expressions of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in *Escherichia coli* from two pET plasmids using lactose as inducer[J]. Science & Technology of Food Industry, 2008, 29(1): 80-83.
- [8] TIAN H, TANG L, WANG Y, et al. Lactose induction increases production of recombinant keratinocyte growth factor-2 in *Escherichia coli*[J]. International Journal of Peptide Research & Therapeutics, 2011, 17(2): 123-129.
- [9] HSU C C, FOX C F. Induction of the lactose transport system in a lipid-synthesis-defective mutant of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1970, 103(2): 410-416.
- [10] NEUBAUER P, HOFMANN K, HOLST O, et al. Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1992, 36(6): 739-744.
- [11] KILIKIAN B V, SUÁREZ I D, LIRIA C W, et al. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction[J]. Process Biochemistry, 2000, 35(9): 1019-1025.
- [12] WANG X D, YAN B. The production and application of yeast extract[J]. China Food Safety, 2010(10): 43-45.
- [13] HAMMAD S A R, ALI O A M. Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract[J]. Annals of Agricultural Sciences, 2014, 59(1): 133-145.
- [14] AHMED R Z, AHMED N. Effect of yeast extract on fluoranthene degradation and aromatic ring dioxygenase expressing bacterial community structure of a fluoranthene degrading bacterial consortium[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 88(1): 56-61.
- [15] NAIR R, SALVI P, BANERJEE S, et al. Yeast extract mediated autoinduction of lacUV5 promoter: an insight[J]. New Biotechnology, 2009, 26(6): 282-288.
- [16] FU X Y, WEI D Z, TONG W Y. Effect of yeast extract on the expression of thioredoxin-human parathyroid hormone from recombinant *Escherichia coli*[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2006, 81(12): 1866-1871.
- [17] LI J W. Biochemistry experiment principle and method [M]. Beijing: Peking University Press, 1994.
- [18] ZHANG J, REDDY J, BUCKLAND B, et al. Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations: studies on yeast extract for a recombinant yeast fermentation process[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2003, 82(6): 640-652.
- [19] STUDIER F. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures[J]. Protein Expression & Purification, 2005, 41(1): 207-234.
- [20] GROSSMAN T H, KAWASAKI E S, PUNREDDY S R, et al. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability [J]. Gene, 1998, 209(s 1/2): 95-103.
- [21] DUBENDORFF J W, STUDIER F W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor[J]. Journal of Molecular Biology, 1991, 219(1): 45-59.