

## 优化的复合自动诱导培养基(CAI-4)对外源蛋白在大肠杆菌中表达的影响

徐灵龙<sup>1,2</sup>, 石星明<sup>1</sup>, 王云峰<sup>1\*</sup>, 孙妍<sup>1</sup>, 王玫<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室禽传染病研究室, 哈尔滨 150001)

(<sup>2</sup> 北京爱德士元亨生物科技有限公司, 北京 101300)

**摘要** 【目的】原核表达系统是目前最为广泛使用的一种外源蛋白表达系统。在利用原核表达系统表达目的蛋白的过程中, 可溶性外源蛋白的产量是决定成本和效率的决定性因素。【方法】本项研究中利用本实验室构建的 7 种不同的重组质粒(p-1、p-2、p-3、p-4、p-5、p-6、p-7) 检测其在复合自动诱导培养基中的表达情况, 评价哪一种培养基更适合于外源蛋白的表达, 提高目的蛋白的产量。【结果】结果显示, 这 7 种重组蛋白在复合自动诱导培养基的表达量是普通 LB 培养基的 4~8 倍; 并在此基础上, 对复合培养基的成份进行进一步优化, 形成了一种优化培养基(改良培养基-4), p-1、p-2、p-3 这 3 种融合蛋白在这种改良培养基中的表达量比优化前提高了至少 2 倍。

**关键词:** 蛋白表达; 培养基; 自动诱导; 条件优化

**中图分类号:** R93-3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209(2009)01-0128-07

DNA 测序技术的成熟能够准确地提供来源于不同物种的数以万计的蛋白质编码序列。应用 DNA 重组技术能够把这些编码序列克隆到表达载体上, 实现目的蛋白的表达。最近几年来, 利用基因工程手段生产商业化的蛋白直线上升, 这些表达的重组蛋白已经在工业上以及医学上得到广泛应用<sup>[1-2]</sup>。由于大肠杆菌具有遗传背景清楚、易操作、生长迅速、表达量高、培养成本低等优点, 再加上多年来外源基因表达的经验使其在大多数科研与应用中成为高效表达异源蛋白最常用的原核表达系统。利用大肠杆菌成功表达的重组蛋白包括工业酶类(凝乳酶、淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶等)和治疗性蛋白(非格司亭、生长激素、胰岛素、干扰素等)。

蛋白质是生命活动的真正执行者, 因而对其功

能的研究具有重要的生物学意义和利用价值。我们都知道基因序列只决定蛋白质分子的氨基酸顺序(一维结构)。但是, 蛋白质的功能却与其三维空间结构密切相关。要想在原子、分子的层次上去认识生命过程, 就需要从基因组序列出发, 系统地研究相应的基因表达产物——蛋白质的三维结构与功能。据统计, 截止到 2003 年提交到蛋白质结构数据库(PDB)中的蛋白质有 80% 以上是利用了大肠杆菌表达系统。所以说蛋白质无论是理论上的研究还是工业化生产, 大肠杆菌表达系统都具有举足轻重的地位。

目前, 在大肠杆菌表达系统中, 外源蛋白的表达产量成为其广泛应用的瓶颈。为了提高大肠杆菌的表达效率, 研究者们已经做了大量工作, 取得了很多

基金项目: 国家 863 计划(2006AA10A206)

\* 通信作者。Tel: +86-451-85935058 E-mail: yfwang@hvri.ac.cn

作者简介: 作者简介 徐灵龙(1982-)男, 黑龙江佳木斯人, 硕士研究生, 从事抗菌肽的研究。

收稿日期: 2008-07-09; 修回日期: 2008-10-16

进展<sup>[3]</sup>,其中包括提高DNA转录水平,增强RNA的翻译效率,促进蛋白质的正确折叠和稳定性等等。然而对于使用大肠杆菌表达系统来说,最有可能极大提高外源蛋白表达量的策略就取决于发酵过程的改善以及利用代谢工程改变宿主代谢途径。高细胞密度培养技术(HCDC)就是应运这一时代要求产生的<sup>[4-7]</sup>。这种技术能够极大地提高外源蛋白的表达水平。本文在Studier<sup>[8]</sup>的研究基础之上,从培养基的组成出发,希望找到了一种既能高效表达外源蛋白,又能实现自动诱导的复合培养基。在极大方便实验室科研人员实际操作的同时,又能够扩大培养满足工业化生产的需求。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和载体** 大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)[F-ompT hsdSB(rB-mB)-gal dcm(DE3)]用于外源蛋白的表达;pET-32a(+)(Novagen, Madison, WI, USA)用于重组质粒的构建;通过pET-32a(+ )构建的7种不同的表达载体(由本实验室构建),分别命名为:p-1、p-2、p-3、p-4、p-5、p-6、p-7。这7种重组质粒表达的重组蛋白分别是:抗菌肽IB、抗菌肽CAP、改良的CAP、ILTV的gC蛋白、gD蛋白、gE蛋白和gJ蛋白。

**1.1.2 培养基** Luria-Bertan(LB)培养基的包括成分(W/V)0.5%酵母提取物,1%胰蛋白胨,1%氯化钠。细菌高密度增殖培养基和复合营养自动诱导培养基(CAI)配制方法见表1。

表1 细菌高密度增殖培养基和复合自动诱导培养基成分比较表(升)

Table 1 The recipes of high-density media and complex auto-inducing media(CAI)(L)

Components	Media of high-density cultures	Complex auto-inducing media(CAI)
Tryptone	10	10
Yeast extract (g)	5	5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	3.55	3.55
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	3.4	3.4
NH <sub>4</sub> Cl(g)	2.68	2.68
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	0.71	0.71
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O(g)	0.493	0.493
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O(g)	0.027	0.27
Glycerol (mL)	20	20
Glucose (g)	0.5	0.5
Lactose (g)	0	2

### 1.2 重组质粒的诱导表达

**1.2.1 LB培养基中的常规诱导表达** 将本实验室

构建的7种重组质粒p-1、p-2、p-3、p-4、p-5、p-6、p-7分别转化*E. coli* BL21(DE3),挑取单克隆接种LB培养基。37℃过夜培养(37℃,250 r/min),次日按1:100的比例加到新鲜的LB培养基中,37℃培养至OD<sub>600</sub> = 0.6~1.0,加入0.8 mmol/L的IPTG继续诱导3 h。

**1.2.2 在复合培养基中的诱导表达** 首先将保存于-80℃的利用细菌高密度增殖培养基(OD<sub>600</sub> 15)培养的细菌保存液按1:1000的接种比例取出10 μL加入到量程为250 mL装有10 mL的复合自动诱导培养基(CAI)的三角瓶中,培养14 h(37℃,250 r/min)。

### 1.3 细菌的裂解与蛋白的提取

培养结束后,培养液于4℃,7000 × g下离心15 min,然后将沉淀悬浮于20 mmol/L的Tris-HCL(pH 7.5)中,在超声波破碎仪下破碎;破碎后4℃,14000 × g下离心20 min,收集上清(可溶蛋白),并将细胞碎片清洗2次,最后溶于含有8 mol/L尿素的Tris-HCL中(包涵体)。

### 1.4 表达蛋白的电泳检测

分别取适量的上清和包涵体,加入等体积的2 × 上样缓冲液,于100℃保温3~5 min;取10 μL,采用标准的SDS-PAGE(12%)方法分析蛋白的表达情况。

### 1.5 总可溶性蛋白和可溶性融合蛋白的定量分析

总的可溶性蛋白可以直接通过核酸蛋白分析仪(eppendorf BioPhotometer)测定;可溶性融合蛋白的量可先通过薄层色谱扫描仪(CS-930 Shimadzu)分析出其在总可溶性蛋白中所占的比例,然后根据总可溶性蛋白的量计算出可溶性融合蛋白的表达量。

## 2 结果和分析

### 2.1 验证CAI表达外源蛋白的有效性

将7种重组质粒分别转入*E. coli* BL21(DE3)中,在CAI中诱导表达。从SDS-PAGE电泳结果中观察到外源蛋白的表达(图1),分子量大小分别为18.6、21、21.5、35、41.7、53和58 kDa。由此可以证明使用这种复合自动诱导培养基能够实现外源蛋白的表达。

### 2.2 LB培养基与CAI对可溶性外源蛋白表达量的影响

使用LB和CAI进行目的基因的表达,通过核酸蛋白分析仪和薄层色谱扫描仪最终计算出可溶性融合蛋白的数值(表2)。从结果可以看出,与LB培养基相比这7种融合蛋白总的可溶性蛋白产量都有大幅度增加,并且在CAI中可溶性融合蛋白在总可

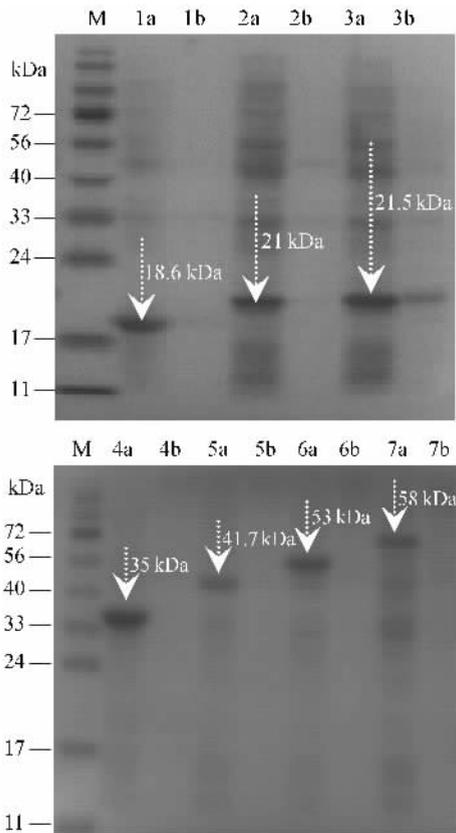


图1 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expressed fusion proteins in *E. coli* BL21 (DE3). M: PageRuler™ Prest. Prot. Ladder (Fermentas); Lanes 1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a and 7a are soluble proteins of P-1, P-2, P-3, P-4, P-5, P-6, P-7; Lanes 1b, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b and 7b are the corresponding insoluble proteins.

表2 可溶性性融和蛋白的数值

Table 2 The value of soluble fusion proteins

Sample No.	Total soluble protein (g/L)		Percentage of soluble fusion protein in total soluble protein/%		α (soluble fusion protein) (g/L)	
	LB	CAI	LB	CAI	LB	CAI
P-IBP-CAP	2.148	9.785	53.2	56.3	1.143	5.653
P-SCAP	1.384	9.175	40.2	43.8	0.556	4.286
P-gC	1.325	6.490	38.9	41.8	0.515	3.835
P-gD	1.627	8.750	38.4	42.0	0.625	2.726
P-gE	2.084	6.475	30.8	30.0	0.642	2.625
P-gF	1.424	7.480	40.0	45.0	0.570	2.914
P-gJ	1.769	10.04	19.0	26.4	0.336	1.975

霉素的有效浓度必须提高到 300 μg/mL,这样就给我们表达卡那霉素抗性的重组质粒带来困难,所以这种培养基只适合表达含有氨苄抗性的重组质粒,不具有通用性。故采用折衷的方法,使用 CAI-3 作为我们进一步的研究对象。

### 2.3.3 补加酵母提取物和胰蛋白酶的浓度

向改良培养基-3 中补加了 1 倍浓度的酵母提取物和胰蛋白酶,形成了改良培养基-4(CAI-4),经诱

导后发现,蛋白表达产量与改良培养基-3 相比又有较大幅度的提高(如表 6)。

为了直观看出对复合自动诱导培养基优化的效果,我们根据表 3、表 4、表 5 以及表 6 中可溶性融合蛋白的结果绘制成图 3。从图中可以看出对 CAI 中的甘油浓度、缓冲液缓冲能力、酵母提取物含量等成分的优化,使可溶性外源蛋白的表达量提高了 2 以上。

## 2.3 复合自动诱导培养基的优化

### 2.3.1 增加甘油浓度

甘油是诱导后期良好的碳源,添加甘油使其浓度由原来的 0.5% 增加为 2.5%,形成改良培养基-1(CAI-1)。含有 p-1、p-2 和 p-3 三种质粒的重组菌在改良培养基-1 中的可溶性融合蛋白表达量都得到了提高(表 3)。

### 2.3.2 增强培养基的缓冲能力

首先,把改良培养基-1 中磷酸盐的浓度由 50 mmol/L 增加到 100 mmol/L,形成改良培养基-2(CAI-2),诱导以后发现,蛋白的表达量得到了大幅度提高(如表 4)然后,我们往改良培养基-1 中添加了适当浓度的 2 种物质——六水琥珀酸钠(5.40 g/L)和二水柠檬酸钠(0.30 g/L),形成改良培养基-3(CAI-3),诱导以后发现改良培养基-2 的蛋白表达量略高于改良培养基-3(如表 5)。不过经随后的研究发现,高磷酸盐浓度能够提高重组质粒的卡那霉素抗性,在 100 mmol/L 磷酸盐浓度的培养基中,卡那

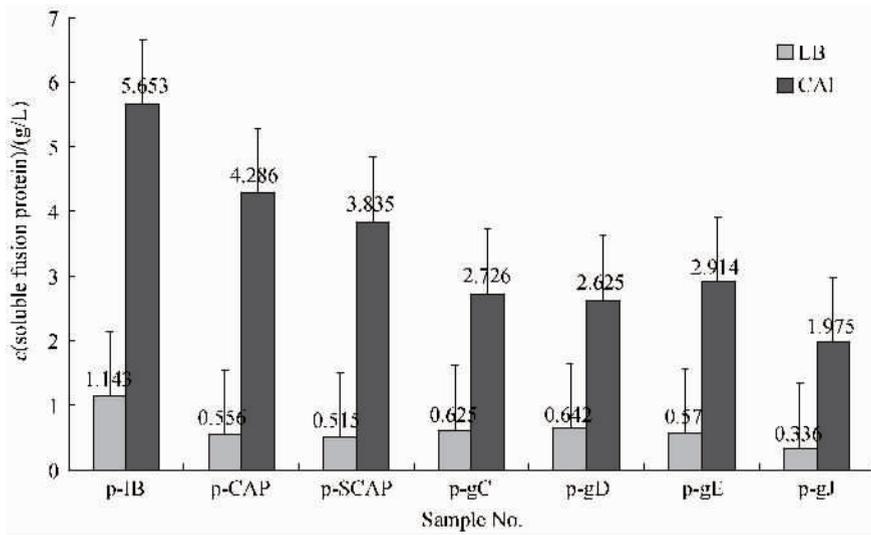


图2 可溶性融合蛋白表达量的比较

Table 2 Comparison of the value of soluble fusion proteins.

表3 改良培养基-1对可溶性融合蛋白的影响

Table 3 Effect of CAI-1 on expression level of soluble fusion proteins

Sample No.	Total soluble protein (g/L)		Percentage of soluble fusion protein in total soluble protein/%		$\alpha$ (soluble fusion protein) (g/L)	
	CAI-1	CAI	CAI-1	CAI	CAI-1	CAI
p-IB	13.07	9.785	61.0	56.3	7.973	5.653
p-CAP	12.37	9.175	47.0	43.8	5.813	4.286
p-SCAP	11.64	6.490	42.6	41.8	4.959	3.835

表4 改良培养基-2对可溶性融合蛋白的影响

Table 4 Effect of CAI-2 on expression level of soluble fusion proteins

Sample No.	Total soluble protein (g/L)		Percentage of soluble fusion protein in total soluble protein/%		$\alpha$ (soluble fusion protein) (g/L)	
	CAI-1	CAI-2	CAI-1	CAI-2	CAI-1	CAI-2
p-IB	13.07	16.54	61.0	58.3	7.973	9.643
p-CAP	12.37	17.18	47.0	46.4	5.813	7.972
p-SCAP	11.64	16.21	42.6	43.1	4.959	6.987

表5 改良培养基-3对可溶性融合蛋白的影响

Table 5 Effect of CAI-3 on expression level of soluble fusion proteins

Sample No.	Total soluble protein (g/L)		Percentage of soluble fusion protein in total soluble protein/%		$\alpha$ (soluble fusion protein) (g/L)	
	CAI-3	CAI-2	CAI-3	CAI-2	CAI-3	CAI-2
p-IB	15.57	16.54	59.1	58.3	9.202	9.643
p-CAP	16.96	17.18	45.9	46.4	7.785	7.972
p-SCAP	16.17	16.21	42.7	43.1	6.905	6.987

表6 改良培养基-4对可溶性融合蛋白的影响

Table 6 Effect of CAI-4 on expression level of soluble fusion proteins

Sample No.	Total soluble protein (g/L)		Percentage of soluble fusion protein in total soluble protein/%		$\alpha$ (soluble fusion protein) (g/L)	
	CAI-3	CAI-4	CAI-3	CAI-4	CAI-3	CAI-4
p-IB	15.57	21.82	59.1	57.1	9.202	12.46
p-CAP	16.96	20.42	45.9	44.7	7.785	9.128
p-SCAP	16.17	22.76	42.7	39.4	6.905	8.967

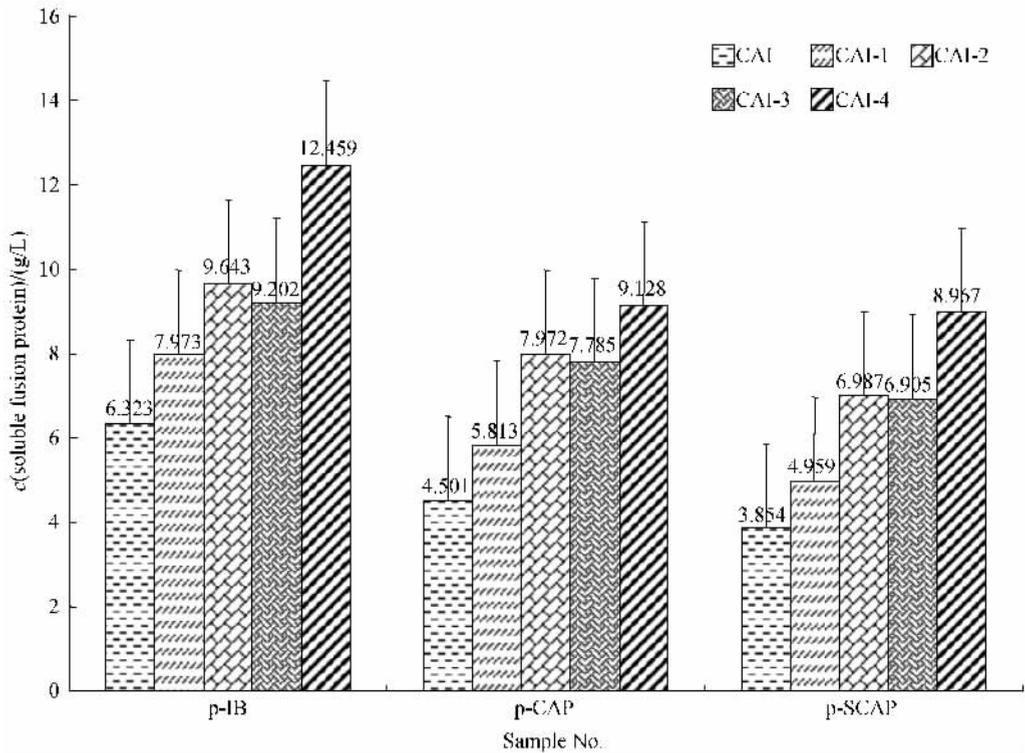


图3 不同的复合自动诱导培养基对可溶性融合蛋白表达量的影响

Fig.3 The influence of different CAI on the value of soluble fusion proteins.

### 3 讨论

大肠杆菌表达系统现在已经成为最为广泛使用的一种原核表达系统,其表达的可溶性重组蛋白(无论是理论研究还是工业化生产)的产量多少已经成为这个表达系统成功应用的瓶颈。我们从这一研究角度出发,对复合培养基各组成成分功能进行了一系列的分析,发现这种培养基中的甘油浓度、酵母提取物含量以及缓冲液缓冲能力对于改进这种复合自动诱导培养基的配方,提高蛋白表达量至关重要。

在复合培养基中有3种碳源——葡萄糖、乳糖和甘油,葡萄糖是大肠杆菌最偏爱的碳源,并且还与其它碳源存在竞争关系,也就是说当葡萄糖存在时,其被大肠杆菌优先利用,直到其被耗尽时,才代谢其他碳源,这也就是“自动诱导”培养基形成的理论基础。所以对于这种类型培养基来说葡萄糖是诱导前期的最佳碳源。当葡萄糖被耗尽时,乳糖代谢生成诱导剂——半乳糖,但是大肠杆菌不能利用半乳糖,这就造成了能源极大浪费,影响大肠杆菌诱导后期的生长以及蛋白的表达量。有研究表明<sup>[9]</sup>,甘油可以作为诱导后期良好的碳源,从而促进菌的生长,提高蛋白的表达量;并且伴随着最近几年来甘油价格的大幅下降,甘油作为大肠杆菌发酵培养的碳源而备受青睐。添加甘油使其浓度由原来的0.5%增加为2.5%,形成改良培养基-1,含有p-1、p-2和p-3

三种质粒的重组菌在改良培养基-1中的可溶性融合蛋白表达量都得到了提高。可是诱导结束后发现这3种重组菌的培养基pH值都降到4.8以下,这样酸性的条件下对蛋白的表达非常不利(蛋白表达的最适pH值在6.0~7.5左右)。经分析发现,共有2种方法可以解决这种问题:一是增加原来培养基中缓冲液的磷酸盐浓度由原来的50 mmol/L增加到100 mmol/L形成改良培养基-2;二是添加某些能够增强培养基缓冲能力的物质形成改良培养基-3。诱导以后发现改良培养基-2的蛋白表达量略高于改良培养基-3。可是改良培养基-2只适合表达含有氨苄抗性的重组质粒,不具有通用性。故采用折衷的方法,使用改良培养基-3作为我们进一步的研究对象。葡萄糖在这种复合自动诱导培养基中起到了重要作用,同时也是诱导前的最佳碳源,不过葡萄糖的存在还会带来一些负面影响。葡萄糖在代谢过程中会产生乙酸这样的短链酸类物质,早在1990年就有文献报道<sup>[10]</sup>,短链酸能够降低RNA、DNA、蛋白质以及酯类的合成速率。并且乙酸浓度在0.5 g/L的情况下就能严重影响菌的生长<sup>[11]</sup>。在查阅文献的过程中,我们发现酵母提取物除了能够减少乙酸形成之外,还能够增加菌密度、阻止靶蛋白的降解、增强发酵培养基的缓冲能力等多种作用<sup>[12-14]</sup>。借鉴于2×YT(含有10 g酵母提取物、16 g胰蛋白胍)TRB(含有24 g酵母提取物、12 g胰蛋白胍)以及MBL培

培养基(含有30 g 酵母提取物、20 g 胰蛋白胨)中酵母提取物和胰蛋白胨的组成特点,我们往改良培养基-3中补加了一倍浓度的酵母提取物和胰蛋白胨,形成了改良培养基-4。经诱导后发现,蛋白表达产量与改良培养基-3相比又有较大幅度的提高。

从培养基成本上来看,按照培养基各组成成分的当前价格计算,1 L的改良培养基-4的成本在20元左右,LB培养基的成本在7.5元左右,可是LB培养基的诱导时需要添加1 mmol/L左右浓度的IPTG,所以总成本也在20元左右。通过对复合自动诱导培养基的成分优化,形成了的高效培养基——改良培养基-4能够较大幅度的提高外源蛋白的产量。p-IB、p-CAP和p-SCAP在改良培养基-4中的表达量与在LB相比分别提高了10.9倍,16.4倍和17.4倍,且成本却与LB培养基相当;利用统计学分析得到这两种培养基的显著性水平为 $P = 0.004834$ 小于0.01,差异极为显著,由此可以明显看出这种复合培养基的优越性。另外这种复合培养基很容易放大培养满足工业化生产的要求,国外学者Giomarelli<sup>[15]</sup>利用复合营养自动诱导培养基(CAI)在发酵罐中成功实现其外源蛋白的高效表达,其表达量与标准培养基LB相比提高了45倍。本文是在复合营养自动诱导培养基(CAI)的基础上进行的一系列优化,虽然目前还没有这一系列优化培养基发酵罐放大培养的表达量数据,但经测算,如果使用改良后的培养基其表达量一定会远大于45倍。本培养基还有一个明显优势就是能够实现外源蛋白的自动诱导,这种复合培养基中各成分的代谢差异促使了细胞的高密度培养,当细胞培养的密度接近于饱和时,培养基中的成分—乳糖又能自动诱导外源蛋白的表达,而无需监视细胞生长状态以及手动添加诱导剂IPTG,极大方便了实验室操作;另外这种培养基还具有以下几个优点(1)使用乳糖代替了传统的诱导剂IPTG,一方面大大节约了培养基成本(如上分析),另一方面替换了有毒物质IPTG的使用,更适合于医药领域的应用(2)加速平行筛选克隆,简单的接种培养,容易自动化高通量地验证蛋白的表达与可溶情况(3)这种新型培养基的复合成分能够抑制重组蛋白的提前表达,这对于表达对细胞有毒性的蛋白极为有利(4)便于进行蛋白的结构分析(如 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $^{13}\text{C}$ 标记的甘油用于NMR分析等)。

自动化和微型化已经成为后基因组时代高通量研究工程的两种关键因素。我们所形成的这种复合培养基完全符合自动化微型化的要求,为大肠杆菌表达系统的更广泛应用奠定良好的工作基础。可以

这么说,这种复合的自动诱导培养基的出现对于大肠杆菌表达系统来说具有革新的意义。

致谢 本研究过程中得到了周艳君老师的耐心指导和史春林、韩文雄同学的热心帮助,在此表示感谢。

## 参考文献

- [1] Pavlou AK, Reichert JM. Recombinant protein therapeutics——success rates, market trends and values to 2010. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(12): 1513–1519.
- [2] Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J, MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Review*, 2005, 24(4): 501–519.
- [3] Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2005, 115(2): 113–128.
- [4] Babu KR, Swaminathan S, Marten S, et al. Production of interferon-alpha in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53(6): 655–660.
- [5] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnology*, 1996, 14(3): 98–105.
- [6] Kleman GL, Strohl WR. Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. *Curr Opin Biotechnol*, 1994, 5(2): 180–186.
- [7] Riesenber D. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1991, 2(3): 380–384.
- [8] Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41(1): 207–234.
- [9] Luo Q, Shen YL, Wei DZ, et al. Optimization of culture on the overproduction of TRAIL in high-cell-density culture by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(2): 184–191.
- [10] Cherrington CA, Hinton M, Chopra I. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1990, 68(1): 69–74.
- [11] Nakano K, Rischke M, Sato S, et al. Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 48(5): 597–601.
- [12] Panda AK, Khan RH, Mishra KB, et al. Influences of yeast extract on specific cellular yield of Ovine growth hormone during fed-batch fermentation of *Escherichia coli*. *Bioprocess Engineering*. 2000, 22(5): 379–383.
- [13] Yoon SK, Kang WK, Park TH. Fed-batch operation of recombinant *Escherichia coli* containing trp promoter with controlled specific growth rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 43(10): 995–999.

- [ 14 ] Jung G , Deneffe P , Becquart J , et al. High cell density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human interleukin-1beta. *Ann Inst Pasteur Microbiol* , 1988 , 139( 1 ) : 129 – 146.
- [ 15 ] Giomarelli B , Schumacher KM , Taylor TE , et al. Recombinant production of anti-HIV protein , griffithsin , by auto-induction in a fermentor culture. *Protein Expression and Purification* , 2006 , 47( 1 ) : 194 – 202.

## Culture optimization for protein expression in *Escherichia coli*

Linglong Xu<sup>1,2</sup> , Xingming Shi<sup>1</sup> , Yunfeng Wang<sup>1\*</sup> , Yan Sun<sup>1</sup> , Mei Wang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Division of Avian Infectious Diseases , National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology , Harbin Veterinary Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Harbin 150001 , China )

(<sup>2</sup> Beijing IDEXX YunFeng Laboratories , Co. , Ltd. Beijing 101300 , China )

**Abstract [ Objective ]** We developed a new culture-complex auto-inducing media ( CAI ) for heterogenous protein expression in *Escherichia coli* . **[ Methods ]** To test expression efficiency in the CAI , we constructed seven different plasmids named p-1 , p-2 , p-3 , p-4 , p-5 , p-6 and p-7. These plasmids were transformed into *E. coli* BL21 , then expressed in both Luria-Bertani media LB and CAI. To improve the expression level even more , we analyzed the composition of the CAI and optimized the culture. **[ Results ]** The expression levels of seven fusion proteins in CAI were four times higher than those in Luria-Bertani. Through a series of changes we formed a new optimized culture ( CAI-4 ). **[ Conclusion ]** Comparing to the expression levels of these fusion proteins ( P-1 , P-2 , P-3 ) in CAI , the expression levels of fusion proteins in CAI-4 increased 2-fold.

**Keywords :** protein expression ; culture ; auto-induction ; condition optimization

( 本文责编 张晓丽 )

Supported by National Programs for High Technology Research and Development of China ( 2006AA10A206 )

\* Corresponding author. Tel : + 86-451-85935058 ; E-mail : yfwang@hvri. ac. cn ; gztong@hvri. ac. cn

Received : 9 July 2008 / Revised : 16 October 2008

## 《微生物学报》对摘要的写作要求

2007 年 12 月修定

1. 研究报告摘要 : 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 , 并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围 , 采用的手段和方法 , 得出的结果和重要的结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要 : 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点 : 英文摘要的内容应与中文摘要一致 , 但比中文摘要更详尽。要求在文中给出 [ Objective ] [ Methods ] [ Results ] [ Conclusion ] 等 words。英文摘要完成后 , 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的 , 即使学术上可以达到刊出的水平 , 本刊也将推迟发表。
  - ( 1 ) 在英语摘要中 , 不要使用任何汉字字符 , 包括标点、括号、温度、希腊字母等。
  - ( 2 ) 建议使用第一人称 , 以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
  - ( 3 ) 建议用主动语态 , 被动语态表达拖拉模糊尽量不用 , 这样可以免好多长句 , 以求简单清晰。
  - ( 4 ) 摘要应当使用过去时态 , 语法正确 , 句子通顺。
  - ( 5 ) 摘要中不用缩写语 , 除非是人人皆知的 , 如 : DNA , ATP 等。
  - ( 6 ) 句子的开头处最好不要使用数字。