基于启动子定向进化的葡萄糖-6-磷酸异构酶高效分泌表达体系的构建

游文慧[1,2]，付　刚[2,3,4,5*]，张大伟[1,2,3,4,5,6*]

（1. 大连工业大学 生物工程学院，辽宁 大连　116034；2. 中国科学院 天津工业生物技术研究所，天津　300308；
3. 中国科学院大学，北京　10004；4. 低碳合成工程生物学全国重点实验室 中国科学院工业生物技术研究所，天津　300308；
5. 国家合成生物技术创新中心，天津　300308；6. 天津科技大学 生物工程学院，天津　300457）

摘　要　为提升诱导型启动子 P_{malA} 的表达强度并实现目标蛋白的高效胞外表达，基于前期所构建的麦芽糖诱导型表达系统（MATE 表达系统），通过易错 PCR 构建启动子突变文库，并以绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein，GFP）为报告蛋白筛选高表达突变体，获得突变位点位于-35 区域的增强型启动子 M3。以 M3 为调控元件构建目标酶葡萄糖-6-磷酸异构酶（Pgi）表达载体，融合 Sec 型信号肽 AmyS 实现其胞外分泌表达。通过添加不同碳源进行诱导表达优化，筛选出适配性最优条件后，在 3 L 发酵罐中进行高密度发酵，Pgi 产量达 7.26 g/L。功能验证表明，本体系表达的 Pgi 催化活性与大肠埃希菌（*Escherichia coli*）对照表达体系相当，说明该系统在提升表达强度的同时保持了蛋白功能的稳定性。本研究构建了一个优化后的高效 MATE 表达体系，为代谢工程中关键酶的高效表达提供了可行路径，并为枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）在工业酶制剂开发中的应用提供了支撑。

关键词　枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）；MATE 表达系统；启动子突变；葡萄糖-6-磷酸异构酶；培养基优化

中图分类号　Q939.9　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1005－7021（2026）02－0014－11

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2026.02.002

Development of an Efficient Secretory Expression System for Glucose-6-Phosphate Isomerase Based on Promoter Directed Evolution

YOU Wen-hui[1, 2], FU Gang[2, 3, 4, 5*], ZHANG Da-wei[1, 2, 3, 4, 5, 6*]

(1. *School of Bio-Engineering, Dalian University of Technology, Dalian* 116034;
2. *Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin* 300308;
3. *University of Chinese Academy of Science, Beijing* 100049; 4. *Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Synthesis Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin* 300308;
5. *National Center of Technology Innovation for Synthetic Biology, Tianjin* 300308;
6. *College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin* 300457)

Abstract　To enhance the transcriptional strength of the inducible promoter P_{malA} and achieve efficient extracellular expression of target proteins, in this study, error-prone PCR was employed to construct a promoter mutant library based on a previously established maltose-inducible expression system (MATE expression system). Using green fluorescent protein (GFP) as a reporter protein, a high-expression mutant designated as M3, harboring a single-base substitution in the-35 region, was identified. The mutant promoter M3 was then utilized as a regulatory element to construct a recombinant expression vector for glucose-6-phosphate isomerase (phospho-glucose isomerase, Pgi), which

基金项目：中国科学院战略性先导科技专项（XDC0120203）；天津市科技计划项目（24ZYCGYS00690）

作者简介：游文慧　女，硕士研究生。主要研究方向为枯草芽孢杆菌表达系统。E-mail：youwh24@tib.cas.cn

* 通讯作者。付刚，男，副研究员，硕士。主要研究方向为枯草芽孢杆菌表达系统构建与微生物代谢工程。E-mail：fu_g@tib.cas.cn

张大伟，男，研究员，博士。主要研究方向为微生物代谢工程与合成生物学。Tel：022-24828749，E-mail：zhang_dw@tib.cas.cn

收稿日期：2025-05-20

中国知网　https://www.cnki.net

was fused at its N-terminus to the Sec-type signal peptide AmyS to facilitate secretion. To further optimize inducible expression, various carbon sources were evaluated, and the optimal condition was applied in a 3-L bioreactor for high-density fermentation, yielding a maximum Pgi titer of 7.26 g/L. Functional assays confirmed that the catalytic activity of Pgi expressed in this system was comparable to that of the control produced in *Escherichia coli*, indicating that enhanced expression did not compromise protein functionality. This study establishes an optimized and efficient MATE-based expression system, offering a feasible strategy for high-level expression of key enzymes in metabolic engineering and supporting the application of *Bacillus subtilis* in the development of industrial enzyme preparations.

Keywords *Bacillus subtilis*; MATE expression system; promoter mutation; glucose-6-phosphate isomerase; medium optimization

微生物表达系统在合成生物学与代谢工程领域中占据重要地位,广泛应用于重组蛋白生产、代谢通路构建及高值产物合成等领域[1]。当前常用的表达宿主包括大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等[2]。酵母类真核宿主因具备真核修饰系统,适用于复杂蛋白表达,并在疫苗与治疗性蛋白制备中得到广泛应用,但由于其培养周期较长、发酵条件较为苛刻,成本相对较高[3-4]。相比之下,大肠埃希菌作为一种安全的原核表达宿主,具有表达速度快、遗传操作简便等优势[5],但因其表达产物多为胞内包涵体,且含有内毒素,限制了其在医药和食品领域的应用。而枯草芽孢杆菌因其具有无毒、强分泌能力、适用于高密度发酵等优势[6],被认定为公认安全(Generally Recognized As Safe,GRAS)菌株,是一种安全可靠的蛋白表达平台[7]。在高效表达体系中,启动子作为调控转录效率的重要元件,其构型及序列组成直接决定基因表达的启动频率[8]。在枯草芽孢杆菌中,虽然已开发出如 P_{43}、P_{spac}、P_{xyl} 等一系列常用启动子,但仍存在诱导条件受限、表达强度不足等问题[9-11]。P_{malA} 启动子源于麦芽糖代谢途径,属于诱导型启动子,具备诱导响应灵敏、背景低的特点,在可控表达系统中具有良好的应用前景。前期天津工业生物技术研究所张大伟团队开发了一种基于麦芽糖操纵子操作子(*malO* 操作子)的麦芽糖诱导型表达系统(MATE 表达系统)[12]通过优化 *malO* 在启动子中的排列位置并对关键调控元件进行定向改造,分别构建了麦芽糖诱导激活的 MATE-ON 系统与麦芽糖可抑制表达的 MATE-OFF 系统,从而实现在枯草芽孢杆菌中对目标基因表达的高精度、双向调控[12],为本研究提供了稳定、精确且高效的表达平台。近年来,随着表达调控精细化需求的提升,随机突变联合筛选的非定向进化策略被广泛用于启动子活性优化。易错 PCR 作为一类基于 DNA 聚合酶低保真扩增机制的突变方式,因其操作简便、可控性好,被广泛应用于启动子和酶蛋白活性区域的多态构建与筛选中[13-14]。通过易错 PCR 构建启动子突变库,并结合报告蛋白如绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)或荧光素酶进行表达强度筛选,已被证实是一种可行的表达元件优化策略,在多种表达系统中展现出良好的效果[15-16]。葡萄糖-6-磷酸异构酶(Phosphoglucose isomerase, Pgi)作为连接糖酵解与磷酸戊糖途径的关键酶,催化果糖-6-磷酸与葡萄糖-6-磷酸之间的可逆转化,在细胞碳流调节中发挥着枢纽作用[17-18]。近年来,随着一碳资源高值化利用研究的推进,Pgi 在多种体外糖类合成和一碳化合物转化体系中被广泛应用,常作为连接不同碳代谢模块的关键酶之一。例如,Wang 等[19]构建的体外多酶催化体系中,Pgi 参与催化淀粉和焦磷酸的转化反应,为后续合成甘油醛-3-磷酸等三碳中间体提供反应基础,展现了其在非传统碳源转化中的应用潜力。在此基础上,Cai 等[20]提出并构建了人工合成淀粉路径(Artificial Starch Anabolic Pathway, ASAP),该体系由 11 种酶组成,可在体外高效实现从二氧化碳到淀粉的合成,效率显著高于植物体内合成过程。Pgi 在该系统中作为连接糖酵解模块与合成模块的重要节点,其表达水平和催化性能直接影响碳流分配与产物合成。这一研究进一步印证了 Pgi 在体外合成体系中的广泛适用性和功能价值。已有研究在大肠埃希菌中实现了 Pgi 的表达[21],但表达产物多为胞内形式,常出现包涵体积累、纯化难度大等问题,且

中国知网 https://www.cnki.net

其含有内毒素,不利于后续应用[22]。因此,构建一种高效、可分泌、适用于工业化表达的系统具有重要意义。本研究在前期 MATE 表达系统的基础上,利用易错 PCR 对 P_{malA} 启动子进行优化筛选,获得表达能力显著提升的突变体 M3,并将其用于驱动 Pgi 的异源表达。通过在 Pgi 的 N 端融合信号肽实现其高效的胞外分泌表达,并结合发酵条件优化,获得了表达量高、酶活稳定的 Pgi 蛋白,该表达体系不仅可用于提升 Pgi 在一碳利用及体外合成路径中的应用效率,也为其他工业酶的高效表达提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒来源 本研究使用的表达宿主为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) MATE01(*B. S. 1A751ΔmalA-Ter amyE*::P_{malA}-*malR-malP*),由天津淳瑶生物科技有限公司赠予。大肠埃希菌 DH5α 用于质粒构建,大肠埃希菌 BL21(DE3)用于对照组表达与酶活测定。表达载体为 pMATE06,由天津淳瑶生物科技有限公司赠予。

1.1.2 培养基(g/L) LB 培养基:酵母浸粉 5,蛋白胨 10,NaCl 10;2×SR 发酵培养基:酵母浸粉 50,蛋白胨 30,KH_2PO_4 6,HCl 调 pH 至 7.2。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 $MnCl_2$、$MgCl_2$(阿拉丁试剂有限公司);2×Primer star mix(宝日医生物技术有限公司);ClonEExpress Ⅱ(诺唯赞生物科技股份有限公司);质粒小提试剂盒(Omega,Bio-Tek);Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、Ni-琼胶糖凝胶 6FF(北京索莱宝科技有限公司)。PCR 仪(GET3XG,柏恒科技有限公司);紫外可见光分光光度计(UPW19M0116,翱艺仪器(上海)有限公司);3 L 全自动发酵系统(BIOTECH-BG,上海保兴生物设备工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 启动子突变文库构建与筛选 以 pMATE06 质粒中的 P_{malA} 启动子为模板,设计覆盖启动子上下游区域的特异性引物进行易错 PCR 反应,扩增启动子片段。PCR 反应中加入适量 $MnCl_2$ 和 $MgCl_2$ 调节聚合酶保真性。扩增产物经琼脂糖凝胶纯化后,与线性化载体 pMATE06-GFP 进行 Gibson 组装(Gibson-Assenbly)的无缝克隆。组装产物直接转化至枯草芽孢杆菌感受态细胞中,铺板于含 100 μg/mL 博来霉素及 3%(质量浓度)麦芽糖的 LB 平板,37 ℃静置培养 15 h。挑取不同荧光强度的单菌落,于紫外照射灯下观察 GFP 表达情况,筛选高荧光突变体。挑选高荧光突变体进行扩大培养,提取质粒后进行测序分析。经多克隆验证后,选取表达水平较高、序列稳定的突变体 M3 用于后续构建 Pgi 表达载体。突变体 M3 序列信息:5′-CTTTTGTCCCCTGCCTTTTCTAA-ATTCACGCACAATTGGATGTTTTATATAAATGAT-TATAAATAATTCGGCATGTATCCGAATCGTACAA-AAGAACCTTTTCATAAGAATTGGAAGGGCGTATA-TTCACTTAAAATTCACAGTTGGTGAGACTTTAAGA-TTACAAAAAAGGTAAAAAAACCAAATCTCTCAGA-CATAAGGCAAATGAGAAATTTCTCGTGCTTGGTG-AAAAAACACTAAAGTTGATCAAATGACCTACGCC-AAACGTGGTACGGGACGAGCTAGTGATCTCATGG-TATAAATGGAATTGTTTTTAAATAGAAGGAGGTC-GTCAT-3′。

1.2.2 Pgi 表达载体的构建与菌株构建 以优化后的 M3 启动子为表达调控元件,PCR 扩增来源于大肠埃希菌的 *pgi* 基因(编码葡萄糖-6-磷酸异构酶),引物两端添加与 pMATE06 骨架序列相同的同源臂。将 *pgi* 片段通过 Gibson 组装方式插入 pMATE06-M3 载体中,构建重组表达质粒 pMATE06-M3-Pgi。构建完成后的重组质粒先转入 DH5α 扩增,挑取阳性克隆后提取质粒,送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。将验证后的表达质粒转化至枯草芽孢杆菌感受态细胞中,铺板筛选阳性克隆后用于发酵表达。

1.2.3 枯草芽孢杆菌摇瓶发酵表达 摇瓶诱导实验:在 250 mL 三角瓶中加入 30 mL 2×SR 培养基,接种 1%(体积分数)的枯草芽孢杆菌菌液,添加 3%(质量浓度,下同)麦芽糖和 1% 碳源,博来霉素终浓度 100 μg/mL,37 ℃、220 r/min 培养 48 h。通过 SDS-PAGE 分析表达情况。

1.2.4 枯草芽孢杆菌高密度发酵 使用 3 L 发酵罐进行枯草芽孢杆菌高密度补料连续发酵。底料(950 g)为 2×SR 发酵培养基,接种量为 5%(质量分数),初始条件为 37 ℃,pH 7.0(氨水与磷酸调控),转速 300 r/min,通气量 1 VVM,溶氧保持在 20% ~40%。当 OD_{600} ≥30 时,逐步提高

中国知网 https://www.cnki.net

搅拌转速至 900 r/min,发酵总时长为 60 h。发酵过程中每 3 h 取样,测定 OD_{600} 和残糖浓度,并收集上清液用于表达分析。补料依据残糖浓度控制,补加液为 300 g/L 麦芽糖、100 g/L 甘露糖、300 g/L 酵母粉和 180 g/L 胰蛋白胨混合溶液。

1.2.5 蛋白提取、定量与酶活测定 发酵结束后,发酵液经 4 ℃、4 000 r/min 离心 30 min 收集胞外上清。直接使用 Ni^{2+} 亲和层析柱进行纯化。层析柱用预冷的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,pH 8.2)平衡后加载样品,分别使用 20、40、60、80 mmol/L 的咪唑对杂蛋白进行梯度洗脱,最后使用 300 mmol/L 的咪唑洗脱得到目的蛋白。使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒进行浓度测定,测定方法严格按照说明书进行。酶活通过与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)偶联的检测体系进行测定,依据反应中 NADH 的生成速率在 340 nm 波长下的吸光值变化进行监测。反应体系总容量为 1 mL,包含以下组分:100 mmol/L HEPES 缓冲液(pH 7.5)、100 mmol/L NaCl、5 mmol/L $MgCl_2$、10 μmol/L $ZnCl_2$、2 mmol/L NAD^+、4 mmol/L 果糖-6-磷酸(F-6-P)以及 20 U/mL G6PDH。加入等蛋白量待测酶液(Pgi)后,30 ℃条件下启动反应,实时监测反应速率。通过改变 F-6-P 的浓度(0.02 ~ 2.00 mmol/L)测定米氏动力学参数。

1.2.6 SDS-PAGE 分析与图像处理 吸取等量蛋白样品至 12% 聚丙烯酰胺凝胶中,160 V 恒压下电泳跑样约 50 min。电泳结束进行考马斯亮蓝染色 30 min,染色结束后使用脱色液进行重复洗脱至条带清晰可见。条带光密度值使用 ImageJ 1.53f 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 易错 PCR 改造 MATE 表达系统启动子区域与高强度启动子的筛选

为增强 MATE 表达系统在枯草芽孢杆菌中的启动子驱动强度,以表达载体 pMATE06 所携带的 P_{malA} 启动子为突变对象,构建启动子突变文库并筛选高表达型突变体。P_{malA} 为麦芽糖诱导型启动子,具有可调表达能力,在实际应用中其表达强度仍有进一步优化空间。因此,本研究以 P_{malA} 启动子为突变对象,通过易错 PCR 方法进行非理性进化,筛选获得表达增强型启动子变体。

首先,设计覆盖 P_{malA} 启动子区域的上下游特异引物,建立以 pMATE06 中 P_{malA} 为模板的易错 PCR 反应体系。通过优化反应体系中 Mg^{2+}(4.0 mmol/L)和 Mn^{2+}(0.3 mmol/L)浓度,诱导 DNA 聚合酶在扩增过程中引入适度的随机碱基错配,从而得到突变片段。对所得的 PCR 产物进行凝胶回收后,与线性化的 pMATE06 载体骨架按照两端序列同源性进行连接,采用 Gibson 组装构建重组质粒。为了能够最大限度保留突变多样性,进一步提高筛选效率,选择将组装产物直接转化至表达菌感受态细胞中。与此同步,另设一组转化含原始 P_{malA} 启动子的未突变型 pMATE06-GFP 质粒作为对照组,用于后续荧光筛选的表达水平比较。所有转化反应平行铺板于含 3% 麦芽糖的 LB 平板中,37 ℃培养并诱导表达。由于启动子活性差异导致 GFP 表达水平不同,菌落在荧光激发下呈现出明显的绿色荧光强度差异(图 1A)。在紫外照射灯照射下对平板进行拍照,通过调整图像对比度突出荧光显著增强的单克隆,标记 96 个单克隆并挑至 96 孔深孔板中进行发酵培养,37 ℃、800 r/min 培养 24 h,通过酶标仪测定 OD_{600} 和 488 nm 激发光下的荧光值,结果如图 1B 所示,初步筛选得到多个潜在高表达型启动子突变体。

随后,将筛选获得的阳性克隆培养并提取质粒,对启动子突变序列进行测序分析。结果显示,表达水平较高的突变体中,突变主要集中于启动子的-35 和-10 核心元件区域,突变类型以碱基替换为主。例如,荧光最强的突变体 M3 在-35 区域发现了一处关键碱基替换(将对照组序列中的 TGTTACGG 突变为 TGGTACGG),另一高强度突变体 M8 在核糖体结合位点(RBS)区域出现了碱基替换(将原序列 AAGGAGG 突变为 GAGGAGG)。此外,还有突变体 M5 在-10 元件区域发生了碱基突变(将对照组序列中的 GTATAAAT 突变为 GTATATAT)。为进一步比较不同突变体的表达能力,将筛选获得的多个荧光较强突变体接种于 250 mL 摇瓶中进行发酵。发酵结束后测定菌液在 488 nm 激发光下的荧光强度,并结合 OD_{600} 校正后进行定量分析。结果如图 1C 所示,各突变体 GFP 表达水平表现出明显差异,其中突

中国知网 https://www.cnki.net

变体 M3 的荧光强度最高，显著高于原始启动子构建的对照组。综上所述，通过对 P_{malA} 启动子进行易错 PCR 改造并结合平板初筛与摇瓶定量筛选，成功获得了一个在 MATE 表达系统中具有强启动子驱动能力的突变体，为后续外源蛋白的稳定表达提供了高效的启动子元件。

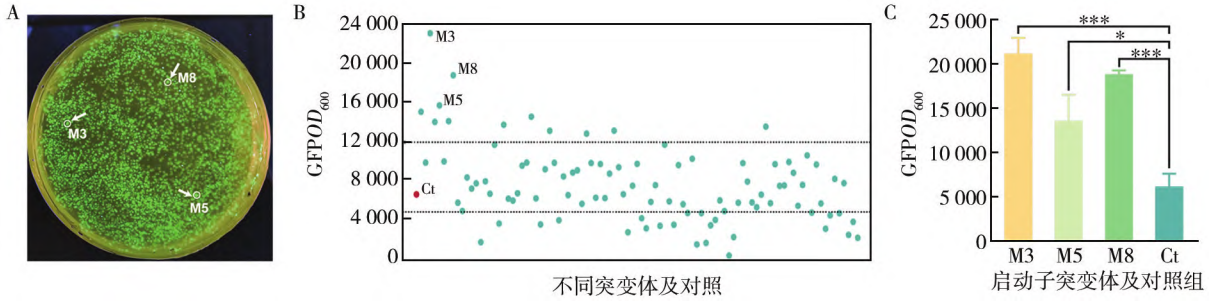


图 1 启动子突变体的筛选及验证

Fig. 1 Screening and validation of promoter mutants

A：突变体转化平板图；B：不同突变体孔板发酵荧光筛选；C：高荧光突变体 GFP 表达水平分析（M3、M5、M8：筛选所得 P_{malA} 突变体，Ct：P_{malA} 对照组）。每个样品三组平行，数据采用 t 检验进行统计分析。＊＊＊$P<0.001$，＊＊$P<0.01$，极显著差异；＊$P<0.05$，显著差异；ns：$P\geqslant0.05$，差异不具有统计学意义。图 4 同

A: Mutant transformation plate plot; B: Fermentation fluorescence screening of different mutant well plates; C: Analysis of GFP expression level of highly fluorescent mutants (M3, M5, M8: P_{malA} mutants obtained from the screening, Ct: P_{malA} control group). Each sample was tested in three replicates, the data were analyzed using the t-test. ＊＊＊$P<0.001$, ＊＊$P<0.01$, representing extremely significant differences; ＊$P<0.05$, representing significant differences; ns indicates $P\geqslant0.05$, representing no statistically significant difference. same as figure 4

2.2 Pgi 表达载体的构建及表达测试

为进一步验证所获启动子突变体在外源蛋白表达中的效果，选择 Pgi 作为目标蛋白进行表达测试。Pgi 是糖代谢途径的关键连接酶，在合成生物学、体外糖类合成及一碳化合物利用等领域具有重要应用价值，高效表达 Pgi 对于相关途径的构建及优化具有重要应用价值。因此，将 Pgi 作为测试蛋白可有效反映启动子驱动能力对关键酶表达的实际影响。

以优化筛选获得的高强度启动子 M3 作为调控元件，构建 Pgi 的表达载体。首先从大肠埃希菌中扩增 *pgi* 基因，在其 N 端融合来源于枯草芽孢杆菌 α-淀粉酶（AmyS）的信号肽序列，用于引导其分泌表达，同时分别在 N 端和 C 端融合 T7 tag 和 6 His tag，以增强翻译效率并便于后续蛋白的纯化与检测。再将含有融合序列的 *pgi* 片段通过 Gibson 组装方式分别插入至线性化的 pMATE06 和 pMATE06-M3 载体中，完成重组质粒 pMATE06-Pgi 和 pMATE06-M3-Pgi 的构建。将组装产物转化至大肠埃希菌 DH5α 中进行扩增，挑选单克隆进行质粒提取，并通过启动子至 *pgi* 连接区域的特异引物进行双向测序验证。测序结果表明，两组构建体的 *pgi* 插入方向及序列均正确无误，突变启动子 M3 保持了预期的突变位点，未发生额外碱基变化，保证了后续表达实验的准确性。

随后，将测序验证正确的重组表达质粒分别转化至表达菌感受态细胞中。以 3% 麦芽糖作为诱导剂，分别接种实验组（P_{malA}-M3 启动子）与对照组（P_{malA} 启动子）于 2 × SR 发酵培养基中，37 ℃、220 r/min 振荡培养 48 h。发酵终止后，通过 SDS-PAGE 检测目标蛋白 Pgi 的表达情况。SDS-PAGE 结果如图 2 所示，在 64 kDa 附近均检测到明显条带（Pgi 的分子量为 61.5 kDa，其 N 端和 C 端分别融合 T7 tag 和 6 × His tag，融合后分子量为 64.3 kDa），对应于其理论分子量。相比对照组，实验组在该位置条带颜色显著加深，表明突变启动子 M3 具有更强的表达驱动能力。进一步对目的条带进行光密度值分析，结果显示 M3 启动子驱动下的 Pgi 表达强度为对照组的1.85倍左右。

以上结果表明，通过构建 Pgi 表达质粒并对表达情况进行比对验证，证实了 M3 突变型启动子在实际蛋白表达中具有显著增强的转录和翻译驱动能力，较原始 P_{malA} 启动子更具应用潜力。

中国知网 https://www.cnki.net

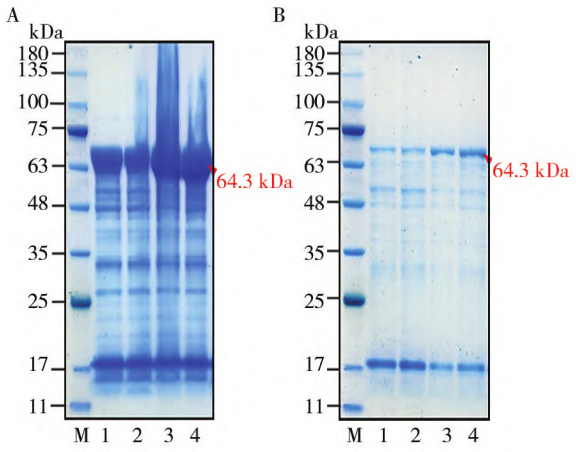


图 2 启动子突变后 Pgi 发酵培养表达情况

Fig.2 Expression of Pgi during fermentation after promoter mutation

A:胞外上清表达情况;B:胞内全菌表达情况;1、2:P_{malA} 对照组;3、4:P_{malA}-M3 突变组;M:Marker(11 ~ 180 kDa)

A: Expression in extracellular supernatant; B: Expression in intracellular; 1, 2: P_{malA} control group; 3, 4: P_{malA}-M3 mutant group; M: Marker(11-180 kDa)

2.3 培养基碳源优化对 Pgi 表达的影响

在诱导目的蛋白表达时,麦芽糖兼具“调控因子”与“可代谢碳源”双重角色,其不仅可以激活启动子启动,还可以作为菌体可利用的碳源。在发酵过程中,麦芽糖若作为碳源被过度消耗于细胞生长,可能会削弱其作为诱导剂的调控效果,从而影响目标蛋白的表达效率。因此,为改善诱导表达系统的稳定性和表达强度,在固定麦芽糖浓度(3%)作为诱导剂的条件下,进一步探索添加不同碳源对启动子驱动目标蛋白 Pgi 表达的影响。

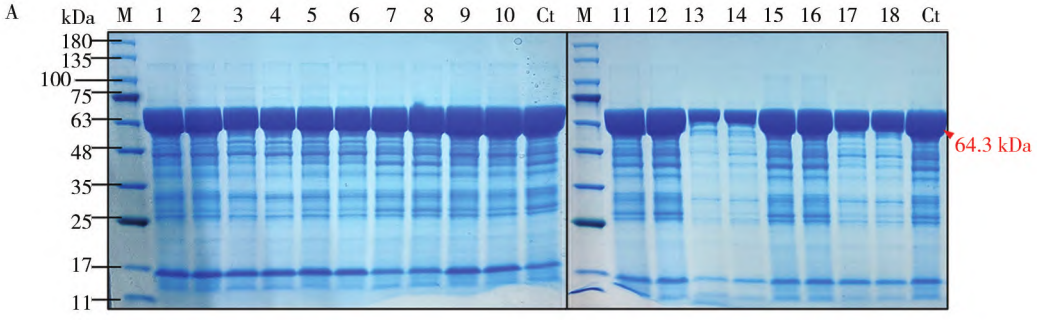
以 2 × SR 发酵培养基为基础,分别添加 1 g/L的木糖、乳糖、海藻糖、甘露糖、蔗糖、山梨醇、纤维二糖、阿拉伯树胶和熊果苷共九种不同碳源,设麦芽糖单独诱导为对照组。37 ℃、220 r/min 发酵 48 h。发酵结束后,通过 SDS-PAGE 对表达情况进行分析。如图 3 所示,所有实验组均在约 64 kDa 附近检测到 Pgi 蛋白条带,且条带强度存在差异。对目的条带进行光密度值分析,结果显示,当添加甘露糖作为碳源时,Pgi 的表达水平最好。

不同碳源对表达体系影响差异的可能原因在于其代谢通路与可利用性差异。甘露糖可通过枯草芽孢杆菌的磷酸转运系统迅速转化为甘露糖-6-磷酸,进入糖酵解通路,有助于提升胞内能量水平和蛋白合成能力;而部分碳源(如山梨醇、阿拉伯树胶等)代谢效率较低或利用率有限,可能无法有效支持菌体代谢,从而导致表达水平下降。综上所述,在 3% 麦芽糖诱导条件下,添加 1%(质量浓度)可代谢碳源可增强目标蛋白的表达效率,其中甘露糖表现出最优的表达促进效果。

2.4 Pgi 酶活测定结果与分析

基于前期的启动子筛选与培养基优化实验结果,本研究在 MATE 表达系统中构建了以突变启动子 M3 为调控元件的高效表达体系,并成功实现了 Pgi 的高水平表达。SDS-PAGE 结果显示,该体系在蛋白表达量方面显著优于原始启动子系统,但蛋白表达水平的提升是否以功能损失为代价,仍需通过功能性验证进一步明确。因此,以 ASAP 途径中所使用的大肠埃希菌表达体系为对照,系统比较了两种宿主中表达的 Pgi 蛋白的催化活性。

由于所表达的 Pgi 在发酵结束后,大部分以可溶状态分泌于胞外发酵液中,因此,在样品处理时,直接选取发酵上清液作为蛋白来源,通过 Ni^{2+} 亲和层析法进行纯化。这种方法避免了细胞破碎步骤,简化了下游操作流程,同时降低了杂蛋白背景,提高了目标蛋白的纯化效率与活性保持率。



中国知网 https://www.cnki.net

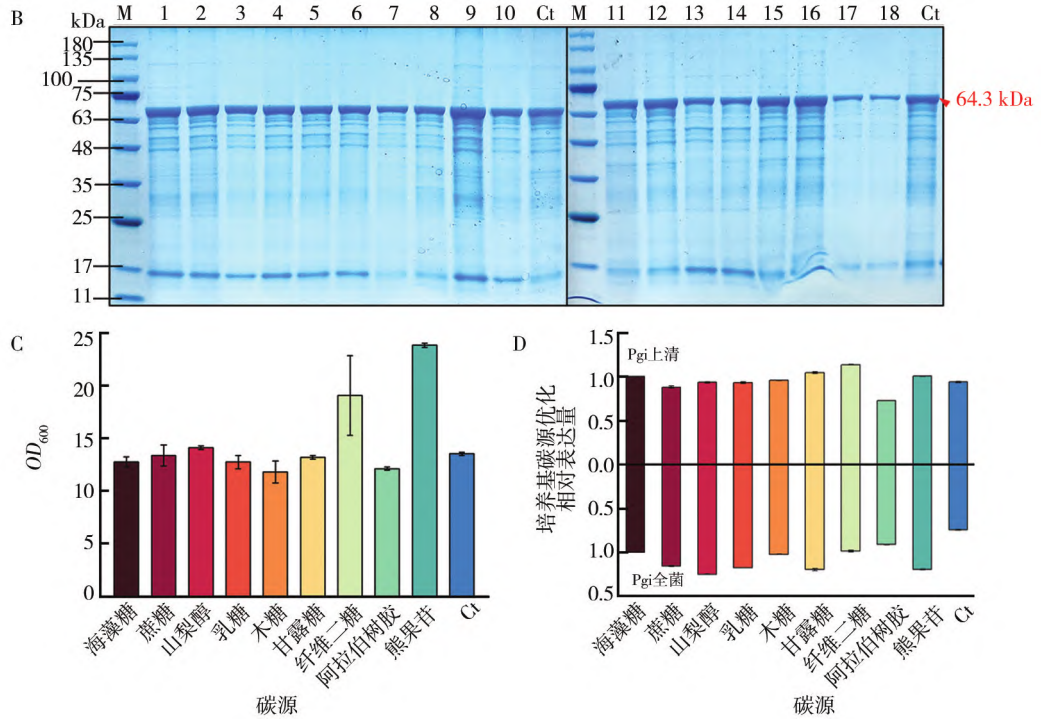


图 3 培养基碳源优化发酵 Pgi 结果

Fig. 3 Results of fermentation of Pgi with optimized medium carbon source

A:胞外上清表达情况;B:胞内全菌表达情况;1、2:海藻糖; 3、4:蔗糖; 5, 6:山梨醇; 7、8:乳糖; 9、10:木糖; 11、12:甘露糖; 13、14:纤维二糖; 15、16:阿拉伯树胶; 17、18:熊果苷;C:各实验组终止发酵时 OD_{600};D:基于蛋白条带光密度值的 Pgi 相对表达量分析

A:Expression in extracellular supernatant; B:Expression in whole-cell lysate; 1,2:Trehalose; 3,4:Sucrose; 5,6:Sorbitol; 7,8:Lactose; 9,10:Xylose; 11,12:Mannose; 13,14:Cellobiose; 15,16:Gum arabic; 17,18:Arbutin; C:OD_{600} values of each experimental group at the end of fermentation; D:Relative expression levels of Pgi determined by densitometric analysis of protein bands

将两种宿主来源的 Pgi 蛋白分别纯化后,采用 Bradford 法对蛋白浓度进行测定,取等量蛋白样品,在相同的酶活检测体系下进行催化性能比较,结果如图 4 所示,MATE 表达系统所获得的 Pgi 在实现高水平分泌表达的同时,催化活性与大肠埃希菌表达体系产物基本一致,未观察到显著的酶活下降或功能损失。该结果表明,本研究基于 MATE 表达系统构建的表达平台不仅有效提升了 Pgi 的表达水平,同时保持了其天然构象与酶学性能。两种体系所得 Pgi 蛋白在催化活性上的一致性进一步验证了以 M3 突变启动子为核心的诱导型表达系统在功能表达方面的可靠性与稳定性。

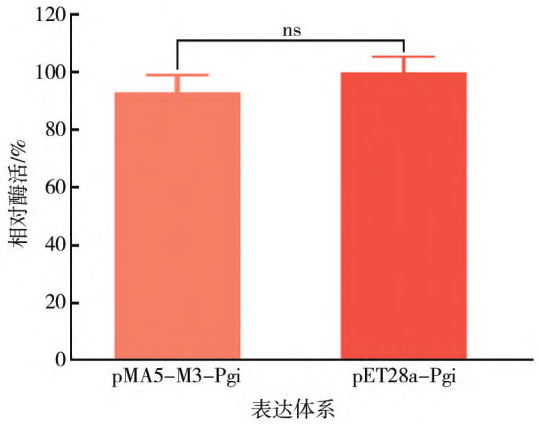


图 4 Pgi 相对酶活分析结果

Fig. 4 Analysis of relative Pgi enzymatic activity

pMATE06-M3-Pgi 为 MATE 表达系统中 Pgi 的相对酶活性,pET28a-Pgi 为大肠埃希菌表达体系中 Pgi 的相对酶活性

pMATE06-M3-Pgi represents the relative enzymatic activity of Pgi in the MATE expression system, whereas pET28a-Pgi represents the relative enzymatic activity of Pgi in the *Escherichia coli* expression system

2.5 高密度发酵中 Pgi 蛋白的表达分析

为了进一步提升 Pgi 的表达量并评估其在放大培养条件下的表达稳定性,在 3 L 发酵罐中进行高密度发酵试验。发酵罐采用 2×SR 液体培养

中国知网 https://www.cnki.net

基作为底料,在添加基础诱导剂麦芽糖(3%)条件下,再添加至 1% 的甘露糖作为辅助碳源以维持诱导剂浓度的稳定性,从而减少麦芽糖的过度消耗,延长表达窗口期。种子液通过多级放大进行制备。首先,将 pMATE06-M3-Pgi 表达菌的冻存菌株划线接种于含 100 mg/mL 博来霉素的 LB 固体培养基上,37 ℃培养 12 h,获得单菌落。随后挑取单菌落接种于试管中培养 12 h,作为一级种子液。依次使用 250 mL 和 500 mL 摇瓶按照培养体积为 30 mL 和 100 mL 进行扩大培养,每个规格的摇瓶均设置 3 瓶平行培养,以提高种子液总量并保证接种稳定性。最后,将 3 瓶 500 mL 摇瓶中获得的种子液合并,作为最终的种子液,按 5%(体积分数)接种至发酵罐中。发酵罐中总培养体系为 2 kg,其中底料为 950 g,对应接种量为 50 g。初始培养温度 37 ℃,使用氨水和磷酸联合调节,控制 pH 在 7.0,通气量为 1 VVM,初期搅拌速度 300 r/min,以促进菌体生长。当发酵液 OD_{600} 持续升高至 30 以上时逐步提高转速,后期最高可达 900 r/min,以维持溶氧,确保菌体正常生长及目的蛋白稳定表达。发酵过程中以残糖浓度为补料参考指标,当发酵液中残糖浓度低于 1% 时,通过蠕动泵加入配比为 300 g/L 麦芽糖、100 g/L 甘露糖、300 g/L 酵母粉及 180 g/L 大豆蛋白胨的补料,维持残糖浓度在1% ~2%,同时每24h补加 500 μL 博来霉素维持质粒稳定性。

整个发酵过程中,每 3 h 定时取样,记录 OD_{600}、残糖浓度及发酵液 pH 等参数(图 5),收集胞外发酵液上清用于 SDS-PAGE 分析和蛋白定量。菌体生长曲线显示,前 24 h 菌体处于快速增长期,OD_{600} 于 24 h 时达 65 以上,36 h 后进入稳定期,至 48 h 时基本保持不变。SDS-PAGE 结果如图 6 所示,在胞外发酵液上清中,目的蛋白 Pgi 在发酵后期逐渐积累,并在 48 h 达到表达峰值,其后未见明显变化,说明表达系统趋于稳定。条带分布清晰,蛋白以胞外可溶形式表达,无包涵体形成迹象。

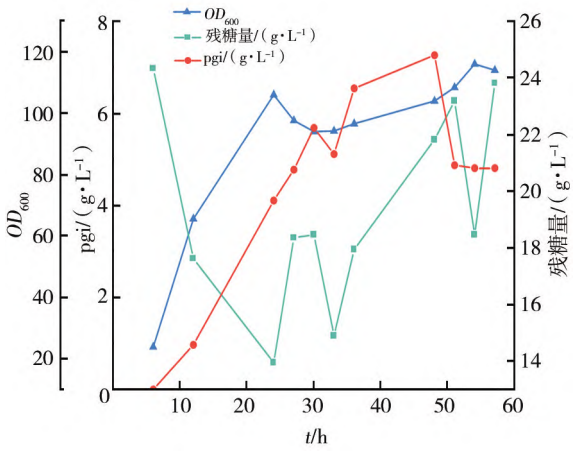


图 5 Pgi 发酵总体参数

Fig. 5 Overall parameters of Pgi fermentation

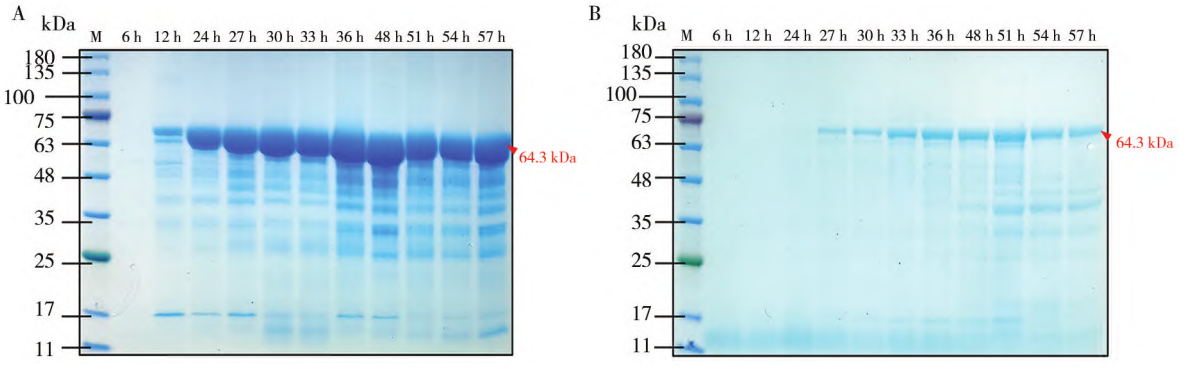


图 6 SDS-PAGE 分析发酵过程中各时间点中 Pgi 在胞外上清液中的量(A)和 Pgi 在胞内的量(B)

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of Pgi levels in the extracellular supernatant (A) and intracellular fraction (B) at different time points during fermentation

为进一步量化表达产量,以 BSA 标准曲线为参考,对 48 h 时的发酵上清液中总蛋白浓度进行测定。结果如图 7 所示,目的蛋白产量达到 7.26 g/L(由于目的蛋白表达量较高,其对应的灰度值已超出 BSA 标准工作曲线的线性范围(0.5 ~ 2.5 g/L),因此基于标准曲线外推得到估算值 7.26 g/L,)远高于摇瓶表达水平。结合灰度分析结果,高密度发酵条件下 Pgi 蛋白的表达强度较摇

中国知网 https://www.cnki.net

瓶条件提高了约 3.5 倍,表现出良好的可放大性。

综上所述,基于优化启动子和碳源策略构建的表达系统不仅在摇瓶水平下实现了高效表达,在 3 L 发酵罐中同样展现出良好的表达稳定性与产量优势,且目的蛋白可大量分泌于胞外,更便于下游纯化处理。

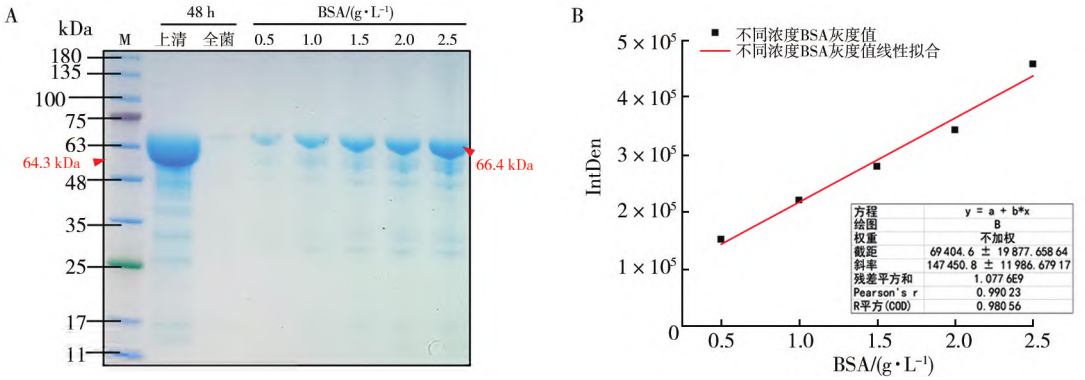


图 7 发酵 48 h 时 Pgi 表达定量分析

Fig. 7 Quantitative analysis of Pgi expression at 48 h of fermentation

A:SDS-PAGE 分析 48 h 时表达情况及 BSA 定量标准条带(0.5 ~ 2.5 g/L);B:BSA 浓度与条带灰度值的标准曲线

A: SDS-PAGE analysis of Pgi expression at 48 h and BSA standard bands (0.5-2.5 g/L) for quantification; B: Standard curve of BSA concentration versus band intensity

3 讨 论

启动子在重组蛋白表达系统中起着关键的转录调控作用。通过对启动子序列进行微调以增强其转录驱动能力,是提高目标基因表达水平的常用策略之一[23]。在具体研究中,除理性设计策略外,通过引入随机突变并结合功能筛选进行改造的定向进化方法,也常用于启动子的优化研究中[24]。本研究通过易错 PCR 方法对麦芽糖诱导型启动子 P_{malA} 进行随机突变,构建突变文库,并通过 GFP 报告系统进行表达强度筛选。结合测序分析表明,表达增强显著的突变体(如 M3)中的突变多集中于启动子的-35 和-10 区域,而这些区域正是 RNA 聚合酶 σ 因子识别的核心元件。表明即使没有特意靶向功能位点,易错 PCR 引入的非定向突变仍可能通过自然选择富集于功能关键区域,从而实现启动子功能增强。这一观察印证了启动子活性与其核心元件碱基组成之间的直接关联,也说明在表达调控设计中,适当结合随机突变与表型筛选依然是高效且可推广的策略。同时,突变启动子 M3 在驱动 GFP 与 Pgi 表达时均表现出较强的表达能力,表明其在不同下游基因背景下具有一定的通用性。由于启动子的表达增强效应常受到 mRNA 二级结构、核糖体结合效率等因素的共同影响,其驱动不同蛋白时的表达效率并不总是具有一致性[25]。在本研究中,M3 突变对不同编码序列的表达均起到增强作用,表明其功能增强主要来源于启动子本身的转录效率提高,并非来源于与下游序列的协同效应。

为了实现蛋白的高效分泌,本研究在 Pgi 的 N 端融合了来源于枯草芽孢杆菌 α-淀粉酶 AmyS 的 Sec 型信号肽。结果显示,表达产物主要存在于胞外发酵上清中,胞内未检测到明显沉积,说明该信号肽能够有效引导 Pgi 经 Sec 通路实现胞外分泌。已有研究表明,Sec 通路是枯草芽孢杆菌中主导性的蛋白分泌机制,约 90% 以上的分泌蛋白依赖该通路进行胞外转运,其适配效率受信号肽结构特征及目标蛋白折叠状态的影响[26-28]。天津工业生物技术研究所张大伟团队此前构建了 *Bacillus subtilis* Sec 型信号肽文库,系统筛选了 173 个来源于枯草芽孢杆菌的 Sec 型信号肽,并发现 AmyS 自身信号肽在同源宿主中具备较高的分泌兼容性,验证了该类内源信号肽在枯草芽孢杆菌表达体系中的有效性[29]。本研究选用 AmyS 信号肽作为引导序列,也获得了良好的分泌效果,进一步证明其在 MATE 表达系统中适用于异源蛋白的胞外表达构建。

在 MATE 表达系统中,麦芽糖同时承担诱导剂和碳源的功能,但其在宿主细胞中被快速代

中国知网 https://www.cnki.net

谢,限制了诱导作用的持续时间,进而降低了基因表达强度并影响表达的稳定性。因此,本研究引入额外碳源以优化诱导阶段的碳源结构。结果表明,在培养基中补充 1% 甘露糖可提升目标蛋白的表达水平。尽管麦芽糖成本更低,但由于其兼具诱导剂与碳源的双重作用,若进一步提高其浓度,可能会因代谢加速而缩短诱导持续时间,进而影响蛋白可溶性。鉴于目前 3% 麦芽糖已实现良好的诱导效果,继续提高浓度反而可能会导致目的蛋白得率下降。相比之下,甘露糖作为辅助碳源可提供能量支持,且不干扰麦芽糖介导的诱导过程,有助于增强系统的表达稳定性与效率。类似的调控优化在其他诱导型表达系统中也被广泛应用,如在 IPTG 诱导系统中,通过添加甘油或葡萄糖来动态调节碳流结构,也可有效缓解诱导剂被迅速消耗的风险[30]。因此,结合本研究结果,进一步验证了诱导剂与补充碳源功能分离的策略在优化诱导表达体系中的有效性。部分启动子在高密度发酵条件下可能因代谢负荷、氧转移率或调控反馈等因素而发生表达漂移,导致表达效率下降[31]。在 3 L 高密度发酵体系中,基于 M3 启动子的表达系统仍能实现较高水平的表达,表明 M3 启动子在不同培养规模下表现出良好的稳定性和适应性。这一特点对表达平台的中试扩展与工业放大应用具有实际价值。此外,由于表达增强可能伴随过量折叠负荷或分泌通路饱和,从而导致功能异常,因此在表达体系优化过程中需始终关注产物的功能完整性[32-33]。根据酶活测定结果,在本研究体系中表达的 Pgi,其催化活性水平与以大肠埃希菌作为表达宿主所表达的 Pgi 基本一致。表明在启动子增强与表达量提升的同时,蛋白的天然结构与功能未受到明显影响。从结果层面支持了优化后的枯草芽孢杆菌 MATE 表达系统在维持蛋白功能方面的适配性。

本研究基于对诱导型启动子 P_{malA} 的优化,结合信号肽设计与培养条件调控,构建了一个高表达强度、分泌效率稳定且具备放大适应性的重组蛋白表达系统。该体系在 Pgi 表达验证中表现出较好的表达水平与功能保持能力,证明了优化后的 MATE 表达系统具有作为高效工业酶表达平台的应用潜力。

参考文献:

[1] Sahreen S, Sharif S, Ahmad H, et al. Comparison of host expression systems used for efficient recombinant proteins production: Host expression system for recombinant proteins production[J]. Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: B. Lifeand Environmental Sciences, 2023, 60(1): 5-28.

[2] Mallu MR, Golamari SR, Kotikalapudi S, et al. Overview of bacterial and yeast systems for protein expression[J]. Journal of Pharmaceutical Research International, 2021, 33: 113-118.

[3] Kulagina N, Besseau S, Godon C, et al. Yeasts as biopharmaceutical production platforms[J]. Frontiers in Fungal Biology, 2021, 2: 733492.

[4] Garvey M. Non-mammalian eukaryotic expression systems yeast and fungi in the production of biologics[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(11): 1179.

[5] 李幽幽, 扶星星, 朱玲, 等. 大肠杆菌表达动物病毒样颗粒疫苗的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2024, 54(7): 955-961.

[6] 王雪艳,杨睿,苗华彪,等. 饲用益生菌制剂凝结芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌益生性能的体外评估[J]. 饲料工业, 2025, 46(17): 129-135.

[7] Xiang M, Kang Q, Zhang D. Advances on systems metabolic engineering of *Bacillus subtilis* as a chassis cell[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2020, 5(4): 245-251.

[8] 喻林兵, 郑丽圆, 李宛莹, 等. 原核启动子文库构建的研究进展[J]. 工业微生物, 2023, 53(3): 97-103.

[9] Mao X, Huang Z, Sun G, et al. High level production of diacetylchitobiose deacetylase by refactoring genetic elements and cellular metabolism[J]. Bioresource Technology, 2021, 341: 125836.

[10] 王杰, 王晨, 杜燕, 等. 枯草芽孢杆菌表达和分泌异源蛋白的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2815-2826.

[11] 聂珂珂, 刘英, 王仕楷, 等. 异源蛋白在枯草芽孢杆菌中高效表达策略研究进展[J]. 生物加工过程, 2025, 23(2): 212-225.

[12] Fu G, Yue J, Wen J, et al. An operator-based expression toolkit for *Bacillus subtilis* enables fine-tuning of gene expression and biosynthetic pathway regulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(15): e2119980119.

[13] Lane MD, Seelig B. Advances in the directed evolution of proteins[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2014, 22: 129-136.

[14] Currin A, Parker S, Robinson CJ, et al. The evolving art of creating genetic diversity: From directed evolution to synthetic biology[J]. Biotechnology Advances, 2021, 50: 107762.

[15] Miao CC, Han LL, Lu YB, et al. Construction of a high-expression system in *Bacillus* through transcriptomic profiling and

中国知网 https://www.cnki.net

promoter engineering[J]. Microorganisms,2020,8(7): 1030.
[16] Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 172.
[17] Boteva E, Doychev K, Kirilov K, et al. Deglycation activity of the *Escherichia coli* glycolytic enzyme phosphoglucose isomerase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 257: 128541.
[18] Usui Y, Hirasawa T, Furusawa C, et al. Investigating the effects of perturbations to pgi and eno gene expression on central carbon metabolism in *Escherichia coli* using ^{13}C metabolic flux analysis[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 87.
[19] Wang W, Yang J, Sun YX, et al. Artificial ATP-free *in vitro* synthetic enzymatic biosystems facilitate aldolase-mediated C-C bond formation for biomanufacturing [J]. ACS Catalysis, 2020, 10(2): 1264-1271.
[20] Cai T, Liu D, Liu Y, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide [J]. Science, 2022, 377 (6611): 603-608.
[21] Wang Y, Zhang YHP. Overexpression and simple purification of the *Thermotoga maritima* 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Escherichia coli* and its application for NADPH regeneration [J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8(1): 30.
[22] Zhang ZX, Nong FT, Wang YZ, et al. Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: Alleviating the host burden and enhancing protein activity[J]. Microbial cell factories, 2022, 21(1): 191.
[23] Rao Y, Wang J, Yang X, et al. A novel toolbox for precise regulation of gene expression and metabolic engineering in *Bacillus licheniformis* [J]. Metabolic Engineering, 2023, 78: 159-170.
[24] Huttanus HM, Triozzi JL, Feng S, et al. Targeted mutagenesis and high-throughput screening of diversified gene and promoter libraries for isolating gain-of-function mutations[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 102388.
[25] Bach S, Demper JC, Biedenkopf N, et al. RNA secondary structure at the transcription start site influences EBOV transcription initiation and replication in a length-and stability-dependent manner[J]. RNA biology, 2021, 18(4): 523-536.
[26] Yang H, Qu J, Zou W, et al. An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(18): 6607-6626.
[27] Neef J, van Dijl JM, Buist G. Recombinant protein secretion by *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*: Pathways, applications, and innovation potential[J]. Essays in Biochemistry, 2021, 65(2): 187-195.
[28] Put H, Gerstmans H, Vande Capelle H, et al. *Bacillus subtilis* as a host for natural product discovery and engineering of biosynthetic gene clusters[J]. Natural Product Reports, 2024, 41 (7): 1113-1151.
[29] Fu G, Liu J, Li J, et al. Systematic screening of optimal signal peptides for secretory production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(50): 13141-13151.
[30] da Silva AJ, de Souza Cunha J, Hreha T, et al. Metabolic engineering of *E. coli* for pyocyanin production[J]. Metabolic Engineering, 2021, 64: 15-25.
[31] Ni C, Dinh CV, Prather KLJ. Dynamic control of metabolism [J]. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2021, 12(1): 519-541.
[32] Lozano Terol G, Gallego-Jara J, Sola Martínez RA, et al. Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 682001.
[33] Song Y, Nikoloff JM, Zhang D. Improving protein production on the level of regulation of both expression and secretion pathways in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(7): 963-977.

中国知网 https://www.cnki.net