

响应面法优化产 XRN1 蛋白发酵培养基^{*}

吴迎春 马琴琴 丁先锋 张 凯 刘立丽 郭江峰^{**}

(浙江理工大学生命科学学院 杭州 310018)

摘要 应用 Plackett-Burman (PB) 设计法对影响 XRN1 蛋白表达的发酵培养基组分进行优化, 选取的 8 个相关因子为酵母提取物、硫酸钙、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、甘油、硫酸钾、磷酸、硫酸铵和氢氧化钾。统计分析表明, 影响 XRN1 蛋白表达的关键因子为酵母提取物、硫酸镁和硫酸钾。在进行最陡爬坡试验逼近 3 个关键因素的最大响应区域的基础上, 采用 Box-Behnken Design 法对发酵培养基组分进行优化, 通过响应面法分析最佳条件为酵母提取物 0.45%、硫酸镁 0.38% 和硫酸钾 1.4%。在最佳培养条件下, 工程菌生物量增加约 0.5 倍, 蛋白表达量提高近 40%。

关键词 XRN1 蛋白 基础盐培养基 响应面分析

中图分类号 Q819

5'-3'核糖核酸外切酶(XRNs)是一个在基因表达过程中与 RNA 代谢和 RNA 干扰等重要功能相关的保守酶大家族, 存在于所有真核生物中, 简称 5PX^[1]。XRN1 能持续降解 5'端单磷酸的 RNA, 而不能对 5'端三磷酸、5'帽子结构、5'羟基的 RNA 发挥作用。在总 RNA 中, rRNA 含量最高, 原核生物的 16S 与 23S rRNA 和真核生物 18S 与 28S rRNA 5'端均为单磷酸, 末端核糖核酸外切酶 XRN1 可将这些 rRNA 降解去除, 而达到富集 mRNA 的目的。

XRN1 是一种高效核糖核酸外切酶, 1978 年首次在酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)中发现以来, 大量研究均致力于 XRN1 生物学功能及 XRN1 突变、缺失对酵母菌自身的影响, 很少有关于 XRN1 重组表达的研究。因此, 利用本实验室前期构建好的真核表达载体 pPIC3.5K-*Xrn1*^[2]筛选出高效表达 XRN1 重组蛋白的体系, 进行扩大培养和诱导表达, 并分离纯化重组蛋白, 鉴定重组酶活性, 为 mRNA 的富集奠定基础。所以, 本研究采用响应面方法(response surface method, RSM)对基础盐培养基进行优化^[3], 以期提高 XRN1 蛋白的表达量, 为后续 XRN1 蛋白的规模化生产提供理

论依据, 其在生物学研究中应用前景十分广泛。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 酿酒酵母 S288c 由同济大学生命科学院李文哲博士惠赠, *Pichia pastoris* GS115、毕赤酵母表达载体 pPIC3.5K 购自 TaKaRa 公司, 真核表达载体 pPIC3.5K-*Xrn1* 由本实验室保存。

1.1.2 酶和试剂 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 蛋白分子量 Marker 购自 Fermentas 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自索莱宝公司。

1.1.3 培养基 YPDS 平板培养基: 1% 酵母提取物, 2% 胰蛋白胨, 2% 葡萄糖, 1 mol/L 山梨醇, 1.5% 琼脂粉。

BMGY 培养基: 1% 酵母提取物, 2% 胰蛋白胨, 10% 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH6.0), 1.34% YNB, 0.00004% Biotin, 1% 甘油 (v/v)。

BMMY 培养基: 除以 0.5% 甲醇代替甘油, 其余成分与 BMGY 相同。

初始发酵盐培养基: 0.4% 酵母提取物, 0.04% 硫酸钙, 0.36% 硫酸镁, 4% 甘油, 1% 硫酸铵, 1% 硫酸钾, 85% 磷酸, 0.07% 氢氧化钾^[4]。

1.2 方法

1.2.1 毕赤酵母工程菌株培养 将保存于 -80℃ 冰

收稿日期: 2012-10-12 修回日期: 2013-02-06

^{*} 国家自然科学基金(11105121)、浙江省重点科技创新团队项目(2012R10033-07)、浙江省教育厅高校科研计划(Y201226241)资助项目

^{**} 通讯作者, 电子信箱: jfguo@zstu.edu.cn

箱的毕赤酵母工程菌株在 YPD 平板上划线培养, 平板上挑取单菌落接种于含 25ml YPD 中, 28 °C、250r/min 下培养过夜, 将种子液按 10% 接种量接入 25ml 基础盐培养基中, 培养 72 h 后将菌悬液作适当稀释, 于波长 600 nm 处测定吸收值 (OD_{600})。用相同稀释倍数的空白培养基作对照, 扣除对照中固形物的吸收, 菌体生物量 $OD_{600} = OD \text{ 值} \times \text{稀释倍数}$ 。

1.2.2 目的蛋白表达量的检测 诱导表达后, 收集菌体, 玻璃珠破碎, 经 12000r/min 离心 15 min, 收集上清, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 再用 NTA-Ni 柱进行亲和纯化, 将纯化浓缩后的目的蛋白用 Bradford 法测蛋白浓度, 计算出其蛋白表达量^[5]。

2 结果与分析

2.1 单因子实验确定发酵培养基成分的 2 水平大小

2.1.1 不同浓度酵母提取物对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响 不同浓度酵母提取物对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响如图 1 所示^[6]。由图 1 可见, 当酵母提取物的浓度在 0.3% ~ 0.5% 范围内, 菌株的生物量在其 0.4% 左右达到最大值, 所以在此区域可以取该因素的低水平为 0.3% 和高水平为 0.5%。

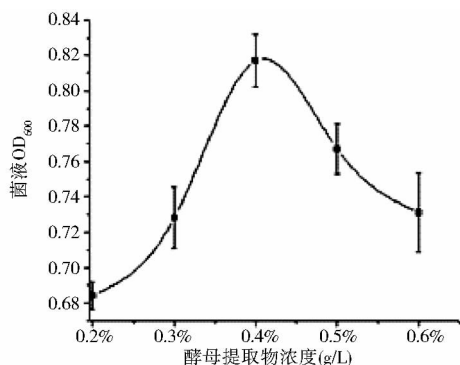


图 1 酵母提取物浓度对菌株生物量的影响
Fig.1 The effect of yeast extract concentration on strain biomass

2.1.2 不同浓度硫酸钙对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响 不同浓度硫酸钙对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响如图 2 所示。由图 2 可见, 当硫酸钙的浓度在 0.03% ~ 0.05% 范围内, 菌株的生物量在 0.04% 左右达到最大值, 所以在此区域内可以取该因素的低水平为 0.03% 和高水平为 0.05%。

2.1.3 不同浓度硫酸镁对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响 不同浓度硫酸镁对 XRN1 蛋白表达菌株生物

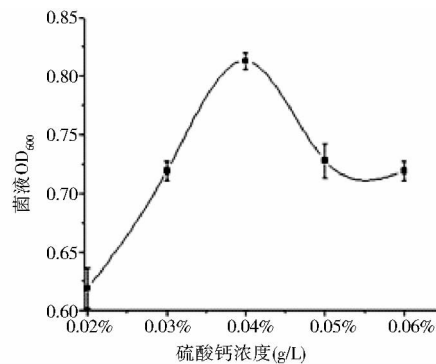


图 2 硫酸钙浓度对菌株生物量的影响
Fig.2 The effect of calcium sulfate concentration on strain biomass

量的影响如图 3 所示。由图 3 可见, 当硫酸镁的浓度在 0.32% ~ 0.36% 范围内, 菌株的生物量在 0.34% 左右达到最大值, 所以在此区域内可以取该因素的低水平为 0.32% 和高水平为 0.36%。

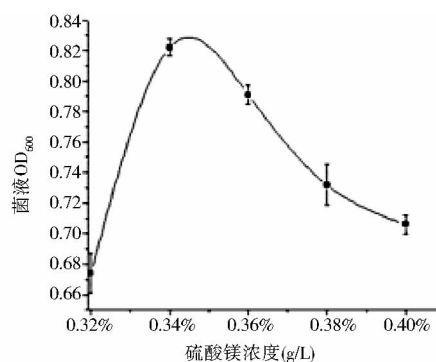


图 3 硫酸镁浓度对菌株生物量的影响
Fig.3 The effect of magnesium sulfate concentration on strain biomass

2.1.4 不同浓度甘油对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响 不同浓度甘油对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响如图 4 所示。由图 4 可见, 当甘油的浓度在 3% ~ 5% 范围内, 菌株的生物量在 4% 左右达到最大值, 所以在此区域内可以取该因素的低水平为 3% 和高水平为 5%。

2.1.5 不同浓度硫酸钾对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响 不同浓度硫酸钾对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响如图 5 所示。由图 5 可见, 当硫酸钾的浓度在 0.8% ~ 1.0% 范围内, 菌株的生物量在 0.9% 左右达到最大值, 所以在此区域内可以取该因素的低水平为 0.8% 和高水平为 1.0%。

2.1.6 不同浓度磷酸对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的

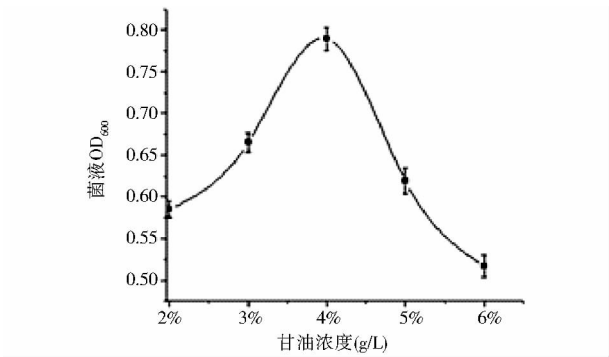


图4 甘油浓度对菌株生物量的影响
Fig.4 The effect of glycerol concentration on strain biomass

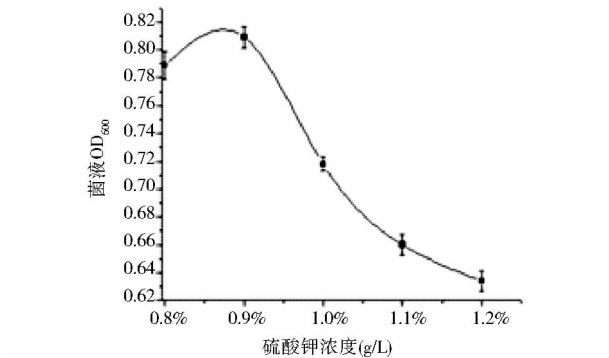


图5 硫酸钾浓度对菌株生物量的影响
Fig.5 The effect of potassium sulfate concentration on strain biomass

影响 不同浓度磷酸对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响如图 6 所示。由图 6 可见,当磷酸的浓度在 83% ~85% 范围内,菌株的生物量在 84% 左右达到最大值,所以在此区域内可以取该因素的低水平为 83% 和高水平为 85%。

2.1.7 不同浓度硫酸铵对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响 不同浓度硫酸铵对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响如图 7 所示。由图 7 可见,当硫酸铵的浓度在 1% ~1.4% 范围内,菌株的生物量在 1.2% 左右达到最大值,所以在此区域内可以取该因素的低水平为 1% 和高水平为 1.4%。

2.1.8 不同浓度氢氧化钾对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响 不同浓度氢氧化钾对 XRN1 蛋白表达菌株生物量的影响如图 8 所示。由图 8 可见,当氢氧化钾浓度在 0.05% ~0.09% 范围内,菌株生物量在 0.07% 左右达到最大值,所以在此区域内可以取该因素的低水

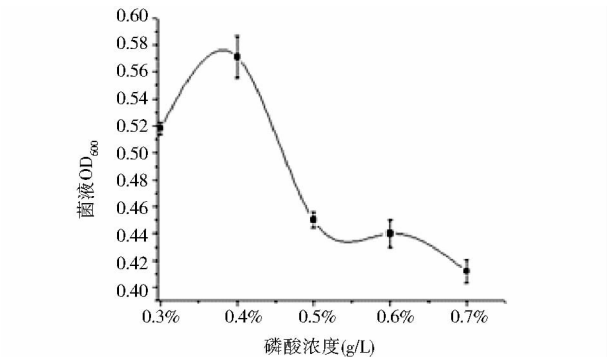


图6 磷酸浓度对菌株生物量的影响
Fig.6 The effect of phosphoric acid concentration on strain biomass

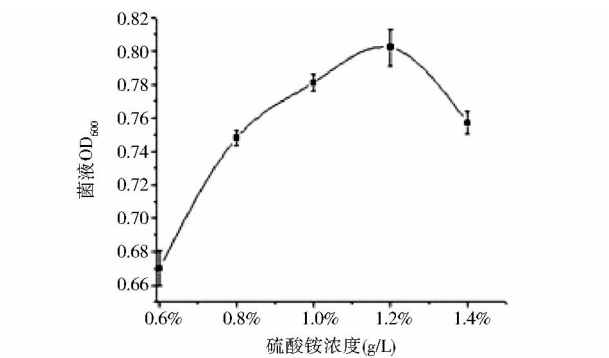


图7 硫酸铵浓度对菌株生物量的影响
Fig.7 The effect of ammonium sulfate concentration on strain biomass

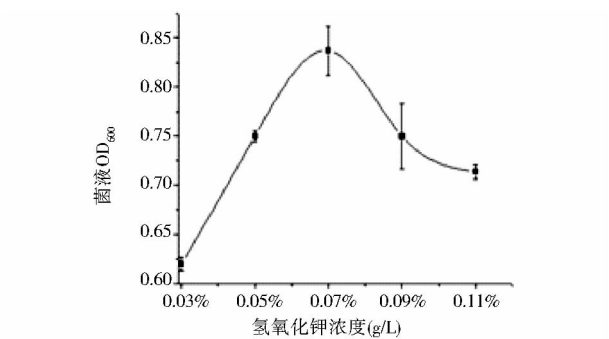


图8 氢氧化钾浓度对菌株生物量的影响
Fig.8 The effect of potassium hydroxide concentration on strain biomass

平为 0.05%、高水平为 0.09%。

依据以上的结果设定相关因素的编码水平如表 1 所示^[7]。

表 1 PB 实验设计各因素水平及编码
Table 1 Levels of variables and coding for PB

相 关 因 素	代码	编码水平	
		- 1	+ 1
酵母提取物 (g/L)	X ₁	0.3%	0.5%
硫酸钙 (g/L)	X ₂	0.03%	0.05%
MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/L)	X ₃	0.32%	0.36%
甘油 (g/L)	X ₄	3%	5%
硫酸钾 (g/L)	X ₅	0.8%	1.0%
磷酸 (g/L)	X ₆	83%	85%
硫酸铵 (g/L)	X ₇	1.0%	1.4%
氢氧化钾 (g/L)	X ₈	0.05%	0.09%

2.2 响应面法优化培养基

2.2.1 Plackett-Burman 法筛选影响发酵培养基的主要因素 依据初始发酵培养基各成分对 XRN1 蛋白表达菌株影响的研究,选用实验次数 N = 12 的实验设计^[8],对酵母提取物(X₁)、硫酸钙(X₂)、MgSO₄ · 7H₂O(X₃)、甘油(X₄)、硫酸钾(X₅)、磷酸(X₆)、硫酸铵(X₇)、氢氧化钾(X₈),8 个实际因素和 3 个虚拟因素进行考察,每个因素分别取低和高 2 个水平,响应值为 OD₆₀₀。平行实验 3 次^[9],具体实验设计和实验结果见表 2。

表 2 Plackett-Burman 实验设计与响应值变化 (N = 12)
Table 2 Design and change of response value for PB (N = 12)

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	OD ₆₀₀
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0.833
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	0.865
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	0.778
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	0.877
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	0.731
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	0.711
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	0.824
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	0.698
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	0.554
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0.684
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0.702
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.785

依据上述结果列出各因素对发酵培养基产 XRN1 蛋白影响情况(表 3)。

由表 3 可以得出,X₁、X₂、X₃ 对提高初始发酵培养基产 XRN1 蛋白有显著负效应,X₄、X₅、X₆、X₇、X₈ 则有显著正效应。这 8 个因素对 XRN1 蛋白量的影响依次为:X₅ > X₃ > X₁ > X₆ > X₇ > X₈ > X₄ > X₂,其中 X₅、X₃、X₁ 对结果的影响相对较大。所以将硫酸钾,硫酸镁,酵母提取物这 3 个因素进一步采用响应面法进行优化,以确定最佳发酵培养条件,而其他 5 因素的取值则根据各

因素效应的正负和大小,正效应的因素均取较高值,负效应的因素均取较低值^[10]。

表 3 各因素对发酵培养基产 XRN1 蛋白影响情况
Table 3 The factors on the fermentation medium of XRN1 protein effect

因素	效应	均方和	影响/%
X ₁ -酵母提取物	-0.044	0.005	6.32
X ₂ -硫酸钙	-0.003	0.000	0.036
X ₃ -MgSO ₄ · 7H ₂ O	-0.069	0.014	15.32
X ₄ -甘油	0.021	0.001	1.46
X ₅ -硫酸钾	0.100	0.032	34.58
X ₆ -磷酸	0.032	0.003	3.23
X ₇ -硫酸铵	0.029	0.002	2.77
X ₈ -氢氧化钾	0.024	0.001	1.80

2.2.2 最陡爬坡逼近最大响应面区域 由 Plackett-Burman 实验分析得出硫酸钾,硫酸镁和酵母提取物为重要因素,其中酵母提取物和硫酸镁对菌株的生长均为负影响,应减少^[11]。而硫酸钾为正影响,应增加。根据各因素效应大小的比例设定其变化方向及步长,考察发酵液 OD₆₀₀ 值的变化趋势,实验设计及结果见表 4。

表 4 最陡爬坡实验设计与结果
Table 4 Experimental design and results of steepest ascent

试验号	X ₁ /%	X ₃ /%	X ₅ /%	OD ₆₀₀
1	0.60	0.40	0.80	0.675
2	0.50	0.38	0.90	0.770
3	0.40	0.36	1.00	0.790
4	0.30	0.34	1.10	0.820
5	0.20	0.32	1.20	0.809
6	0.10	0.30	1.30	0.730

由表 4 可知,最优浓度可能在实验 4 和实验 5 之间,且第四组最高,故以实验 4 的条件为响应面实验的中心点。

2.2.3 响应面分析确定最大响应值 根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,综合 Plackett-Burman 实验确定的主要因素和最陡爬坡实验确定的中心点进行中心组合实验,中心点重复 5 次,用以估计实验误差。实验设计的因素及水平见表 5。

表 5 Box-Behnken 实验因素水平
Table 5 Variables and levels for Box-Behnken design

因素	水平		
	- 1	0	+ 1
X ₁ -酵母提取物	0.10	0.30	0.50
X ₃ -MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.30	0.34	0.38
X ₅ -硫酸钾	0.60	1.10	1.60

根据 Box-Behnken Design 实验设计原理^[12],进行 3 因素 3 水平的响应面分析实验,17 个试验点给出的实验结果如表 6 所示。17 个试验点可以分为 2 类:其一是析因点,自变量取值在 X_1 、 X_3 、 X_5 所构成的三维顶点,共有 12 个析因点;其二是零点,为区域的中心点,零点实验重复 5 次,用以估计实验误差。

表 6 Box-Behnken 实验设计及实验结果

Table 6 Design and results of Box-Behnken experiments

试验号	X_1	X_3	X_5	OD_{600}
1	1	0	1	0.734
2	-1	1	0	0.880
3	-1	0	1	0.850
4	-1	-1	0	0.790
5	0	0	0	0.821
6	0	0	0	0.814
7	1	0	-1	0.736
8	0	0	0	0.809
9	0	0	0	0.825
10	0	-1	0	0.765
11	0	1	1	0.831
12	1	1	0	0.765
13	0	0	0	0.813
14	0	-1	-1	0.735
15	0	1	-1	0.788
16	1	-1	0	0.722
17	-1	0	-1	0.754

2.3 Box-Behnken Design 实验数据分析

利用 Design Expert 8.0 软件,对 Box-Behnken 实验结果进行二次多项回归拟合,实验因子对响应值的影响可用以下二次多元回归方程表示: $Y = -0.36422 + 0.85875X_1 + 4.42813X_3 + 0.31256X_5 - 1.46875X_1X_3 - 0.24500X_1X_5 + 0.16250X_3X_5 - 0.48000X_1^2 - 4.96875X_3^2 - 0.11480X_5^2$,方差分析见表 7^[13]。

由表 7 可知,所选模型的不同处理间差异极显著 ($P < 0.0001$),说明用回归方程描述各因子与响应面之间的关系时,其应变量与全体自变量之间的线性关系显著,即该实验方法可靠。 X_1 、 X_3 、 X_5 、 X_1X_3 、 X_1X_5 、 X_1^2 、 X_3^2 P 值均小于 0.05,说明这些因素对模型显著。失拟项 0.1562 > 0.05,失拟项差异不显著,说明该方程对实验拟合情况好,实验误差小。预测 R^2 值为 0.9836 也能合理地说明校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9624$ 值的变化,因此可以利用该回归方程确定最佳发酵条件^[14]。

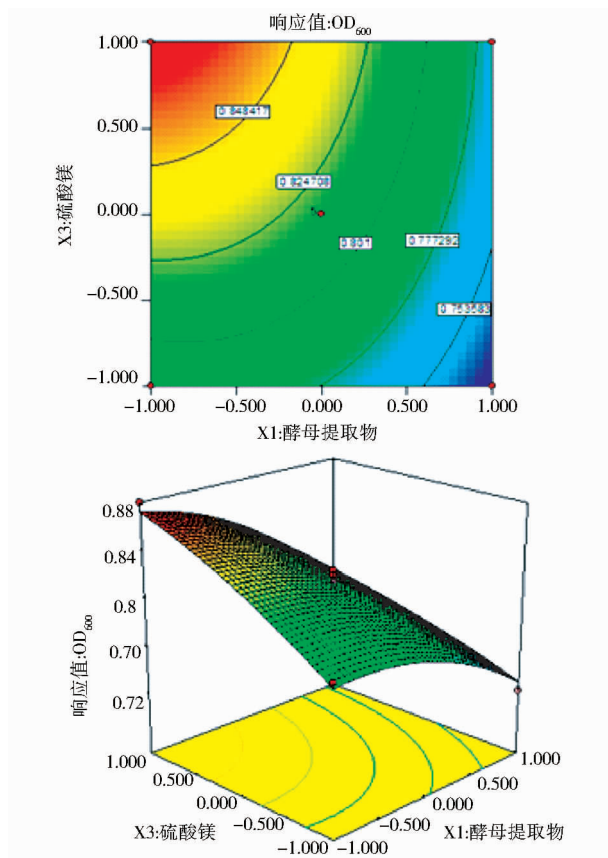
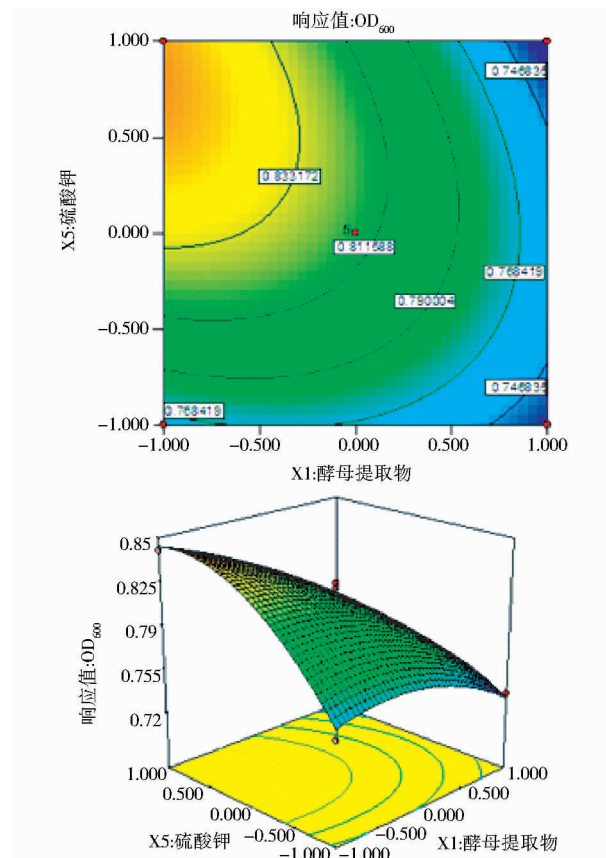
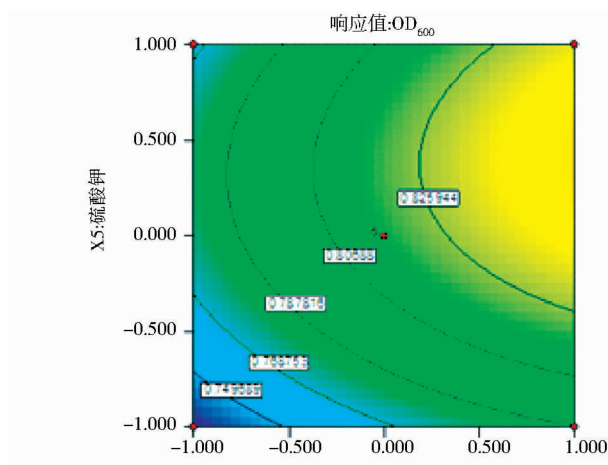
根据上述回归方程及回归模型方程分析表绘出双因子效应分析图和相应等高图见图 9、图 10 和图 11。

表 7 回归模型的方差分析

Table 7 Variance analysis of regression model

方差来源	均方和	自由度	均方	F 值	$P_r > F$	显著性
模型	0.033	9	0.0036	46.55	<0.0001	显著
X_1	0.013	1	0.013	160.76	<0.0001	
X_3	0.0079	1	0.0079	101.59	<0.0001	
X_5	0.0035	1	0.0035	44.62	0.0003	
X_1X_3	0.0006	1	0.0006	7.07	0.0325	
X_1X_5	0.0024	1	0.0024	30.73	0.0009	
X_3X_5	0.0000	1	0.0000	0.54	0.4860	
X_1^2	0.0016	1	0.0016	19.87	0.0029	
X_3^2	0.0003	1	0.0003	3.41	0.1075	
X_5^2	0.0035	1	0.0035	44.39	0.0003	
残差	0.0005	7	0.0000			
失拟项	0.0004	3	0.0001	3.03	0.1562	不显著
纯误差	0.0002	4	0.0000			
校正总和	0.033	16				
R^2_{Adj}	0.9624					
R^2_{Pred}	0.8096					
R^2	0.9836					
C.V/%	1.12					

Note: $P < 0.01$ indicates a very significant differences, $P < 0.05$ indicates significant differences

图9 $Y = f(X_1, X_3)$ 响应面相应等高图和立体分析图Fig. 9 Response surface plot and contour plot of the function $Y = f(X_1, X_3)$ 图10 $Y = f(X_1, X_5)$ 响应面相应等高图和立体分析图Fig. 10 Response surface plot and contour plot of the function $Y = f(X_1, X_5)$ 图11 $Y = f(X_3, X_5)$ 响应面相应等高图和立体分析图Fig. 11 Response surface plot and contour plot of the function $Y = f(X_3, X_5)$

根据上述回归方程作出响应面分析,此回归模型得出 Box-Behnken Design 实验的最优结果为酵母提取

物 0.45%、硫酸镁为 0.38%、硫酸钾为 1.4%,此条件下蛋白表达量提高近 40%。

3 结 论

本实验在基础发酵培养基上,采用 Plackett-Burman 设计方法从 11 种影响菌株产量的发酵培养基中确定酵母提取物、硫酸镁和硫酸钾为最重要的影响因素。为了以最合理简便的方法寻找响应面实验的中心点,采用最陡爬坡实验逼近中心点并进一步采用 Box-Behnken Design 响应面方法分析,得出回归模型存在最优结果为酵母提取物 0.45%、硫酸镁为 0.38%、硫酸钾为 1.4%^[15]。

毕赤酵母工程菌经过 72 h 发酵的光密度值 OD_{600} 达到 0.837,蛋白表达量比优化前提高近 40%,在蛋白水平上实现了 XRN1 产量的大幅提高^[16]。因此,经优化后所得的培养基廉价易得,生产成本低,适合工业化高密度发酵生产的需求,为毕赤酵母产 XRN1 蛋白的研究和工业化生产奠定了基础^[17]。

参考文献

- [1] Chang J H, Xiang S, Xiang K, et al. Structural and biochemical studies of the 5'→3' exonuclease Xrn1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 18: 270-278.
- [2] Interthal H, Bellocq C, Bähler J, et al. A role of Sep1 (= Kem1, Xrn1) as a microtubule-associated protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Embo Journal*, 1995, 14(6): 1057-1066.
- [3] 曹小红, 蔡萍, 李凡, 等. 利用响应面法优化 *Bacillus natto* TK-1 产脂肽发酵培养基. *中国生物工程杂志*, 2007, 27: 59-65.
Cao X H, Cai P, Li F, et al. Medium optimization for lipopeptide produced by *Bacillus natto* TK-1 using response surface methodology. *China Biotechnology*, 2007, 27: 59-65.
- [4] 孔静静, 王长城, 杨海麟, 等. 产 HSA-CP 融合蛋白毕赤酵母的发酵条件优化. *生物加工过程*, 2009, 7: 25-28.
Kong J J, Wang C C, Yang H L, et al. Fermentation conditions of optimization of HSA-CP fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2009, 7: 25-28.
- [5] 严慧玲, 蓝东明, 王永华, 等. 响应面法优化 CALA 在毕赤酵母中的组成型表达. *现代食品科技*, 2011, 27: 972-976.
Yan H L, Lan D M, Wang Y H, et al. Optimization of the fermentation conditions of *Candida antarctica* Lipase A in *Pichia pastoris* using response surface methodology. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27: 972-976.
- [6] Kenna M, Stevens A, Mccammon M, et al. An essential yeast gene with homology to the exonuclease encoding XRN1/KEM1 gene also encodes a protein with exonuclease activity. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, 13: 341-350.
- [7] 张智, 朱宏亮, 钮宏禹, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产蛋白酶发酵条件. *食品科学*, 2008, 29: 400-404.
Zhang Z, Zhu H L, Niu H Y, et al. Optimization of fermentation production conditions of protease by *Bacillus subtilis* with response surface methodology. *Food Science*, 2008, 29: 400-404.
- [8] 汪彬彬, 车振明. Plackett-Burman 和 Box-Behnken Design 实验设计法优化华根霉产糖化酶发酵培养基的研究. *食品科技*, 2011, 36: 41-45.
Wang B B, Che Z M. Optimization of *Rhizopus* fermentation medium for glucoamylase production by Plackett-Burman and Box-Behnken design. *Food Science and Technology*, 2011, 36: 41-45.
- [9] 陈琳, 孟祥晨. 响应面法优化植物乳杆菌代谢产细菌素的发酵条件. *食品科学*, 2011, 32: 176-180.
Cheng L, Meng X C. Optimization of fermentation conditions of *Lactobacillus plantarum* for bacteriocin production by response surface methodology. *Food Science*, 2011, 32: 176-180.
- [10] Puranik V, Mishra V, Fatima S, et al. Development and optimization of protein rich germinated bengal gram pickle using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science and Engineering*, 2011, 1: 191-200.
- [11] 陆文渊, 成浩, 王丽鸳, 等. 响应面法优化茶氨酸生物合成基因工程菌发酵条件的研究. *食品科学*, 2008, 29: 243-247.
Lu W Y, Cheng H, Wang L Y, et al. Response surface methodology for optimization of fermentation conditions of genetically engineered *Escherichia coli* Strain for biosynthesis of theanine. *Food Science*, 2008, 29: 243-247.
- [12] Renne R, Covarrubias S, Gaglia M, et al. Coordinated destruction of cellular messages in translation complexes by the gammaherpesvirus host shutoff factor and the mammalian exonuclease Xrn1. *PLoS Pathogens*, 2011, 7: 1-15.
- [13] 刘寅, 张永光, 张汝兵, 等. 响应面法优化产酸丙酸杆菌丙酸发酵条件的研究. *食品工业科技*, 2010, 31: 167-170.
Liu Y, Zhang Y G, Zhang R B, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of propionic acid by propionic bacterium *Acidi propionici* using response surface methodology. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31: 167-170.
- [14] Bashkurov V I, Solinger J A, Heyer W D, et al. Identification of functional domains in the Sep1 protein (= Kem1, Xrn1), which is required for transition through meiotic prophase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma*, 1995, 104: 215-222.
- [15] 赵沁沁, 刘军, 徐爱才, 等. 响应面法优化酿酒酵母工程菌产甜蛋白, monellin 发酵培养基. *中国酿造*, 2011, 9: 50-55.
Zhao Q Q, Liu J, Xu A C, et al. Optimization of fermentation medium of sweet protein monellin produced by engineering strain of *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *China Brewing*, 2011, 9: 50-55.

- [16] Wei S, Cheng X, Huang L, et al. Medium optimization for acarbose production by *Actinoplanes* sp. A56 using the response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 9 (13):1949-1954.
- [17] Zhang Y, Li Q, Wang D, et al. Optimization of succinic acid fermentation with *Actinobacillus succinogenes* by response surface methodology (RSM). *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2012, 13 (2):103-110.

Expression of XRN1 Protein and Optimization of Fermentation Medium with Response Surface Method

WU Ying-chun MA Qin-qin DING Xian-feng ZHANG Kai LIU Li-li GUO Jiang-feng

(College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Response surface method (RSM) was used to optimize the fermentation medium of XRN1 protein expression. The Plackett-Burman design was used to evaluate the effects of eight factors, including yeast extract, calcium sulfate, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, glycerol, potassium sulfate, phosphoric acid, ammonium sulfate and potassium hydroxide. The statistical analysis revealed that the key factors influencing XRN1 protein expression were yeast extract, magnesium sulfate and potassium sulfate. The path of steepest ascent was used to define optimal response region for these three factors, then the optimal level combinations of factors were obtained through Box-Behnken design, the optimal conditions were as follows: yeast extract 0.45%, magnesium sulfate 0.38%, and potassium sulfate 1.4%. Under optimal conditions, biomass of yeast could increase by 0.5 fold and expression of XRN1 protein could increase by 40%.

Key words XRN1 protein Base salt medium Response surface method

GE 携手范德堡大学深入探究结肠癌

近日,范德堡大学(Vanderbilt University)和GE全球研发中心达成合作,共同在细胞水平上更深入地探究结肠肿瘤如何形成并发展。这项研究获得美国国立卫生研究院(NIH)375万美元的资金支持,项目为期5年,该研究将测试GE革命性的癌症标测技术。这一资助是美国国立卫生研究院单细胞分析项目的组成部分,旨在探究单细胞独一无二的特征,并为在细胞水平上进行基于疾病机制的药物治疗提供基础。这一合作项目将探究结肠干细胞对肿瘤的成因和演变,以及与相关疾病的信号转导途径。作为一个自动化平台,GE癌症标测技术能在单一组织样本上探测和分析多达60种不同的疾病标记,其中包含蛋白质和信使核糖核酸。同步研究几十种疾病标志的能力为研究癌症提供了一个更全面的认识。