

大肠杆菌热激反应研究及其在重组蛋白表达中的应用

乐易林

(江苏大学 环境与安全工程学院 生物质能源研究所 江苏 镇江 212013)

摘要: 当大肠杆菌所处的环境温度忽然升高时, 细胞体内会激发热激反应, 体内会迅速合成多种热激蛋白, 由热激转录因子调控的热激蛋白主要包括一些分子伴侣、蛋白降解酶、折叠辅助蛋白等。热激蛋白可以促进蛋白正确折叠, 降解错误折叠的蛋白。主要介绍大肠杆菌热激蛋白的表达调控及其功能, 利用热激转录因子发展的新型温控分泌表达系统及其在蛋白可溶性表达中的应用, 以及热激分子伴侣与重组蛋白共表达的研究进展。

关键词: 大肠杆菌, 表达系统, 热激反应, pHsh 载体, 热激诱导

Heat shock response in *Escherichia coli*: research progress and its application on recombinant protein expression systems

LE Yi-Lin

(Biofuels Institute, School of the Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: The heat shock response (HSR) in *Escherichia coli* is defined as the cellular response to temperature increase. A set of proteins are synthesized when *E. coli* is stressed with elevated temperatures. These proteins are known as heat shock proteins (Hsp) many of which are molecular chaperones, proteases and folding factors. Some of heat shock proteins can

基金项目: 江苏省高校自然科学研究项目(No. 12KJB180002); 镇江市农业科技支撑计划项目(No. NY2012032); 江苏大学高级专业人才科研启动基金项目(No. 10JDG117)

*通讯作者: Tel: 86-511-88796122; 信箱: leyilin@163.com

收稿日期: 2012-12-05; 接受日期: 2013-03-04

promote proper folding of proteins and the degradation of misfolded proteins. This paper introduces the characterization and regulation of the heat shock proteins, the application of heat inducible secretion vector pHsh-ex to recombinant protein expression, and the recent research progress on chaperone co-expression systems.

Keywords: *E. coli*, Expression system, Heat shock response, pHsh vector, Heat shock induction

大肠杆菌生长环境温度的忽然升高, 体内会激发热激反应(Heat shock response), 热激反应是大肠杆菌做出相应的应急反应, 无论是真核生物, 还是原核生物, 热激过程产生的热激蛋白(Heat shock proteins)是对外界环境压力改变的一种应激过程。高温环境下的热激反应系统是最早发现, 深入研究的重要全局调控系统之一, 热激反应中大肠杆菌产生一系列的热激蛋白, 大肠杆菌热激蛋白主要包括一些分子伴侣(DnaK/J, GroEL 等)、ATP-依赖型的蛋白酶(Lon, HslUV, Clp, FtsH, DegP)、折叠辅助蛋白(肽基脯氨酰基顺反异构酶, 巯基二硫键异构酶等)。热激蛋白可以促进蛋白正确折叠, 降解错误折叠的蛋白^[1]。当前, 人们对大肠杆菌热激反应产生的热激蛋白功能进行了很多研究, 随着单基因敲除文库和 DNA 芯片技术的发展, 可以了解大肠杆菌在高温环境中得以生存的分子机理^[2]。

1 大肠杆菌热激反应的研究进展

当大肠杆菌所处的环境温度忽然升高时, 如从 30 °C 迅速升温到 42 °C 时, 细胞体内会激发热激反应, 细胞体内多种热激蛋白被瞬间地大量合成^[3]。这些热激蛋白主要受热激转录因子的调控, Guisbert 等综述 Sigma 32 (σ^{32})介导的热激反应过程, 受 σ^{32} 调控的分子伴侣 DnaK、DnaJ、GrpE、GroEL、GroES 和蛋白降解酶大量合成。大肠杆菌在 30 °C–37 °C 时, 细胞体内 σ^{32} 蛋白编码基因 *rpoH* 转录出来的 mRNA 会形成紧密的二级结构, 而且 σ^{32} 在细胞内的浓度非

常低, 且此时它的半衰期也非常短, 时间不超过 1 min, 所以此时热激蛋白基因转录非常少, 热激蛋白的表达水平也很低, 当温度升高到 42 °C 时, 转录的 mRNA 形成的紧密二级结构被解除, σ^{32} 蛋白的翻译抑制也被解除, 细胞内 σ^{32} 蛋白大量合成, 此时 σ^{32} 调控的热激蛋白会大量合成, 并在短短的 10 min 内使热激蛋白在细胞内的表达水平达到最高峰^[4]。

1.1 大肠杆菌热激转录因子

大肠杆菌中依赖 DNA 的 RNA 聚合酶中全酶($\alpha 2\beta\beta'\sigma$)主要由核心酶($\alpha 2\beta\beta'$)和转录因子 Sigma (σ)亚基所组成, 核心酶($\alpha 2\beta\beta'$)控制转录的延长, σ 因子识别转录的起始位置, 并使 RNA 聚合酶结合在启动子部位。不同的 σ 因子识别不同的启动子, 在大肠杆菌中已经发现存在 7 种转录因子(σ 因子), 分别是 σ^{70} (RpoD)、 σ^{54} (RpoN)、 σ^{38} (RpoS)、 σ^{32} (RpoH)、 σ^{28} (RpoF)、 σ^{24} (又叫 σ^E , RpoE) 和 σ^{19} (FecI), 其中热激转录因子有: σ^{32} (RpoH)、 σ^E (RpoE)、 σ^{54} (RpoN)^[5]和 σ^{38} (RpoS)^[6]。

热激转录因子 σ^{32} 在大肠杆菌热激反应中起着重要的作用, 细胞质中的一些分子伴侣和折叠酶、蛋白降解酶以及一些 DNA 修饰蛋白的合成受 σ^{32} 的调控。温度上升可能会导致核酸配对错误和染色体损伤, 然而在 σ^{32} 转录因子激活后, 受 σ^{32} 调控的热激蛋白可以保护 DNA 和 RNA 免受损伤, 维持基因组的完整性^[4]。此外, 受 σ^{32} 调控的基因所编码的蛋白还包括: 感知细胞质外环境(周质空间)中葡萄糖和金属离子浓度的蛋白; 包膜蛋白的分泌和加工有关的蛋白;

物质运输和能量有关的蛋白; 磷脂的合成以及维持细胞完整性的脂多糖和肽聚糖合成所必需的酶^[4]。而 σ^E 调控的热激蛋白主要是周质空间的一些分子伴侣^[7], σ^{54} 和 σ^{32} 负责 IbpB 蛋白的表达调控, σ^S 负责分子伴侣 CbpA 的表达调控^[8]。

大肠杆菌热激转录因子受到严格的调控。 σ^{32} 的编码基因 *rpoH* 受 3 个启动子的控制, 其中一个启动子被 σ^E -RNA 聚合酶识别, 另外两个启动子被 σ^{70} -RNA 聚合酶识别, 这 3 个启动子都不能被 σ^{32} -RNA 聚合酶识别^[9]。而热激转录因子 σ^E 的编码基因 *rpoE* 中的启动子可以被 σ^E -RNA 聚合酶识别, 控制 *rpoE* 基因的转录, σ^E -RNA 聚合酶又可以识别热激转录因子 σ^{32} 的编码基因 *rpoH* 的启动子, 控制 *rpoH* 基因的转录^[7,10]。

σ^{32} 蛋白的表达过程至少在转录、转录后加工、翻译和翻译后加工 4 个阶段都受到严格调控。在转录阶段, σ^E -RNA 聚合酶负责 σ^{32} 蛋白的编码基因 *rpoH* 的转录; 转录后的 mRNA 在 30 °C–37 °C 形成紧密的二级结构, 阻止 σ^{32} 蛋白的翻译; 翻译后的 σ^{32} 蛋白受分子伴侣 DnaK/J/GrpE 的负调控, 可以被 FtsH 蛋白酶降解^[7]。

σ^E 因子受反 σ^E 因子(Anti- σ^E): RseA 和 RseB 的调控。过量表达 RseA 蛋白时会抑制 σ^E 活力, RseA 是调控 σ^E 因子最主要的蛋白, 位于细胞

内膜中, 在没有热激压力情况下, σ^E 转录因子活力很低, RseA 蛋白的 C 端和周质空间中的 RseB 结合, RseA 蛋白的 N 端则和细胞质中的 σ^E 因子结合。当外界给予热激压力时, 蛋白降解酶 DegS 活性被激活, 降解 RseA 蛋白, 将 σ^E 转录因子释放到细胞质中, σ^E 和 RNA 聚合酶结合从而起始相关热激蛋白的转录^[11]。

1.2 大肠杆菌热激蛋白及其功能

大肠杆菌中受热激转录因子 σ^{32} 调控的分子伴侣有: IbpA、IbpB、GroELS、GrpE、ClpB、FkpB、Hsp33、HtpG、YbbN、DsbC、DnaK、DnaJ (表 1), σ^{32} 还调控一些蛋白降解酶: ClpP、ClpX、FtsH、HflX、HflK、HflC、HslU、HslV、HtpX、Lon、PrfC 等^[4,12]。热激小分子蛋白 IbpA/B 操纵子在转录水平的调控是由 σ^{32} -RNA 聚合酶控制^[13], 而且 IbpA 蛋白的 C 端和 N 端是行使分子伴侣功能的重要性成分^[14], 最近试验表明大肠杆菌热激蛋白 IbpA/B 的缺乏会抑制生物膜的形成^[15]。热激蛋白 IbpA、IbpB、GroEL、DnaK、DnaJ、ClpB、Lon 在热激起始阶段几分钟内 mRNA 转录水平都提高, 40 min 后开始下降^[16]。

周质空间中的分子伴侣 DsbC、DegP、FkpA、Skp 主要受 σ^E 调控(表 1), 其中 DegP 蛋白具有

表 1 大肠杆菌热激转录因子调控的热激蛋白的功能特性			
Table 1 Function of heat shock proteins regulated by <i>E. coli</i> heat shock transcription factor			
热激蛋白	调控转录因子	功能特性	参考文献
Heat shock proteins	Transcription factor	Function	References
IbpA, GroELS, GrpE, ClpB, FkpB, Hsp33, HtpG, YbbN	Sigma 32	分子伴侣	[4,12]
DegP, FkpA, Skp, YacT	Sigma E	分子伴侣	[7]
IbpB	Sigma 32, Sigma 54	分子伴侣	[4–5]
DsbC, DnaK, DnaJ	Sigma 32, Sigma E	分子伴侣	[7,12]
CbpA	Sigma S	分子伴侣	[8]
ClpP, ClpX, FtsH, HflX, HflK, HflC, HslU, HslV, HtpX, Lon, PrfC	Sigma 32	蛋白降解酶	[4,12]
AnsB, DegP, (PtrA), YfgC, ClpX, Lon, YhjJ	Sigma E	蛋白降解酶	[7]
HolC, Mfd, MutL, MutM, RecA, RecJ, RdgB, TopA, XerD	Sigma 32	DNA 修饰	[4,12]
(RecB), (RecD), RecJ, RecR	Sigma E	DNA 重组与修复	[7]

分子伴侣和蛋白酶功能: 保证折叠的外膜蛋白原体(Protomers)能够安全穿过周质(Periplasm), 同时消除错误折叠的蛋白^[17]。DegP 蛋白在常温下(25 °C)作为分子伴侣帮助蛋白折叠, 而在高温时(37 °C–45 °C)具有蛋白酶功能。周质空间中的 DsbC 蛋白是二硫键异构酶, 催化二硫键的重排, 与 Dsb 家族中其他几个蛋白一起完成二硫键的形成, 二硫键的形成可以稳定蛋白质的三级结构和空间构象, 蛋白质只有形成正确配对的二硫键才能行使其生物学活性, *DsbC* 基因受双启动子控制, 既有被 σ^{32} 识别的启动子序列: CTGGAACCGTAAAAAGACCCATATTCATAACG, 又有被 σ^E 识别的启动子序列: TGAACGCTTACCGTCGCGATCTGTCAATGATGGTG^[6–7]。此外, 还有 *DnaK* 和 *DnaJ* 基因转录也受 σ^{32} 和 σ^E 转录因子的调控。

2 大肠杆菌热激反应在重组蛋白表达中的应用

2.1 利用热激转录因子发展的新型温控分泌表达载体及其在蛋白可溶性表达中的应用

大肠杆菌常用的启动子有 Lac/tac/trc 启动子和 T7 启动子, 由于化学诱导剂价格昂贵, 以及有些诱导剂具有毒性不利于药用蛋白的生产。热激诱导外源蛋白表达时不需要添加昂贵的化学诱导剂, 成本低、无毒性等优点, 使得温控表达系统受到广泛关注。而之前大家熟悉的 P_L/P_R 启动子控制的表达系统的启动子受控于 λ 噬菌体 *cI* 基因产物, 该产物为温度敏感突变体 *cI857(ts)*, 其在 30 °C 下阻遏启动子转录, 42 °C 下解除抑制开启转录^[20], 存在的问题是大体积发酵液快速升温有困难。

最近发展的一个温控表达系统是 pHsh 表达载体^[18–19], 该表达载体的启动子是受热激转录因子 σ^{32} 控制, 含有一个人工合成的受 σ^{32} 转录

因子识别的启动子。以上两个温控表达系统虽然诱导方式都是采用热激方式进行诱导表达, 但最大的区别是调控基因转录的启动子不同, pHsh 表达载体的热激启动子优势如下: 该启动子具有温和性, 使得质粒拷贝数高, 可以增加细胞中外源基因的剂量; 含有热激启动子的 pHsh 质粒的宿主中 σ^{32} 浓度水平较正常细胞的高, 可以增强重组菌的表达水平; 同时含有热激启动子的 pHsh 质粒的细胞中热激诱导后, σ^{32} 能持续维持高水平, 从而有利于外源基因的转录^[18,21]。

已有文献报道 pHsh 表达载体在表达工业酶制剂如木聚糖酶, β -葡萄糖醛酸酶等方面获得了高效表达^[19,21–22]。然而, 我们在大肠杆菌中采用 pHsh 载体表达真菌疏棉状丝胞菌来源的木聚糖酶时, 通过优化基因密码子和翻译区 mRNA 二级结构获得了酶高效表达, 但是表达产物大部分为不溶性产物, 形成大量包涵体^[22]。我们尝试过采用 pET 载体利用 PelB 信号肽进行分泌表达, 但可溶性表达水平并没有提高, 在周质空间形成数个颗粒状包涵体^[23]。

以 pHsh 载体为基础, 发展了一个分泌型表达载体 pHsh-ex (GenBank 登录号: FJ715939), pHsh-ex 表达载体增加了一段信号肽序列 (OmpA 来源的信号肽), 利用该表达载体可方便将其他基因插入到多克隆位点进行分泌表达。采用热激分泌表达载体在周质空间表达疏棉状丝胞菌来源的木聚糖酶时避免了包涵体形成, 获得了可溶性表达^[23]。热激分泌表达系统对真核来源的木聚糖酶实现可溶性表达, 初步分析其作用机理可能存在 3 个主要因素: 采用 σ^{32} 转录因子识别的启动子的温控表达载体 pHsh 在热激诱导表达重组蛋白时, 宿主中可以获得更高浓度的 σ^{32} 蛋白^[23]; 热激诱导过程中伴随热激反应的发生; 分泌表达时, 周质空间的环境有利于一些蛋白的折叠。其具体作用机

理还在深入研究,以往研究表明采用温控表达载体进行热激诱导外源蛋白表达时可以提高可溶性蛋白的表达量,Soares 等在表达生长激素时进行热激诱导时获得可溶性表达^[24],即使采用 T7 启动子表达系统,在添加 IPTG 诱导后进行热激培养也可以提高可溶性蛋白的表达水平^[25]。

2.2 共表达热激分子伴侣在重组蛋白表达中的应用

大肠杆菌表达系统过量表达蛋白时常遇到的问题易形成包涵体。医药工业常用酶、抗体蛋白等在大肠杆菌中过量表达时主要以包涵体形式存在,表达产物需要经过变性、复性等处理,从而增加生产成本。包涵体的形成原因复杂,针对包涵体形成的原因进行了很多研究^[26]。已发展的常用的大肠杆菌可溶性表达策略有:(1) 改变培养条件,通过优化培养基,降低培养温度来减缓蛋白合成速度,从而提高可溶性蛋白含量;(2) 融合一些多肽标签;(3) 共表达分子伴侣;(4) 分泌表达;(5) 优化基因的密码子;(6) 选用不同的表达系统等方法^[27-29]。

人们利用热激蛋白的折叠功能,对热激分子伴侣共表达时促进蛋白可溶性表达方面进行了很多研究。针对一些易形成包涵体的重组蛋白,通常采取以下方式进行共表达研究:(1) 共表达一个热激分子伴侣或共表达几个分子伴侣;(2) 在周质空间中和在细胞质中表达时选择不同的分子伴侣进行共表达。由于重组蛋白特性的复杂性,还没有一个通用的方法对所有蛋白都可以获得过量可溶性表达。通过共表达一个细胞质中的热激分子伴侣,如: IbpA、IbpB、DnaK、DnaJ、GroEL 等,可以达到促进蛋白可溶性表达的目的^[30-31]。人们也探讨了共表达几个分子伴侣 DnaK-DnaJ-GrpE 或 GroEL-GroES 在促进重组蛋白可溶性表达中的应用^[32]。早在 1989 年,人们第一次利用热激分子伴侣

GroELS 蛋白折叠功能共表达 GroELS 时,获得寡聚蛋白 (Rubisco) 的可溶性表达^[33]。共表达热激蛋白 IbpA、IbpB 时可以提高重组蛋白的表达量,以及保护重组蛋白不被蛋白酶降解,IbpA 和 IbpB 可以结合到错误折叠的蛋白中,使其重新获得正确折叠状态^[34]。大肠杆菌周质空间是一个氧化环境,周质空间存在的一些分子伴侣有利于新生肽链的正确折叠,将蛋白分泌到周质空间中进行表达也是人们选择的一个常用表达方式。而且有研究表明外源蛋白在周质空间过量表达时也会形成包涵体,实验表明在周质空间进行表达时,与周质空间的热激分子伴侣 Skp、FkpA 等进行共表达可以提高一些蛋白的可溶性表达水平。Ow 等将分子伴侣 Skp 和 FkpA 与重组人源单链可变区抗体(ScFv antibody)进行共表达时可以提高其可溶性水平^[35]。共表达周质空间分子伴侣 FkpA 也可以达到提高单链 T 细胞受体在周质空间中可溶性表达水平^[36]。

3 结论

随着人们对大肠杆菌热激反应的深入研究,可以了解更多受热激转录因子表达调控的热激蛋白。此外,已发现一些热激蛋白基因(*DnaK*、*DnaJ*、*DsbC* 和 *IbpB* 等)受多个转录因子的调控^[5,7,12]。对细胞质和周质空间的一些热激蛋白的功能特性也有深入研究,利用共表达热激分子伴侣(如: *DnaK*、*GroEL*、*Skp* 和 *FkpA* 等)可以促进外源蛋白正确折叠,获得外源蛋白高水平可溶性表达^[37]。同时也发现,分子伴侣的作用取决于蛋白的特异性,不同的分子伴侣对蛋白辅助折叠效率有差异。因此,对已鉴定的热激蛋白功能特性的研究,以及发展分子伴侣共表达系统,将有利于探索外源蛋白可溶性表达的新策略。

参 考 文 献

- [1] Leichert LI. Proteomic methods unravel the protein quality control in *Escherichia coli*[J]. Proteomics, 2011, 11(15): 3023–3035.
- [2] Murata M, Fujimoto H, Nishimura K, et al. Molecular strategy for survival at a critical high temperature in *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20063.
- [3] Arsène F, Tomoyasu T, Bukau B. The heat shock response of *Escherichia coli*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 55(1/3): 3–9.
- [4] Guisbert E, Yura T, Rhodius VA, et al. Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2008, 72(3): 545–554.
- [5] Kuczyńska-Wisńik D, Laskowska E, Taylor A. Transcription of the *ibpB* heat-shock gene is under control of sigma(32)- and sigma(54)-promoters, a third regulon of heat-shock response[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 284(1): 57–64.
- [6] Muffler A, Barth M, Marschall C, et al. Heat shock regulation of sigma S turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by sigmaS and sigma32 in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(2): 445–452.
- [7] Rhodius VA, Suh WC, Nonaka G, et al. Conserved and variable functions of the sigma E stress response in related genomes[J]. PLoS Biology, 2006, 4(1): e2.
- [8] Yamashino T, Kakeda M, Ueguchi C, et al. An analogue of the DnaJ molecular chaperone whose expression is controlled by sigma s during the stationary phase and phosphate starvation in *Escherichia coli*[J]. Molecular Microbiology, 1994, 13(3): 475–483.
- [9] Erickson JW, Vaughn V, Walter WA, et al. Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene[J]. Genes & Development, 1987, 1(5): 419–432.
- [10] Rouvière PE, De Las Peñas A, Meccas J, et al. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, σ^E , in *Escherichia coli*[J]. The EMBO Journal, 1995, 14(5): 1032–1042.
- [11] Alba BM, Gross CA. Regulation of the *Escherichia coli* σ^E -dependent envelope stress response[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(3): 613–619.
- [12] Nonaka G, Blankschien M, Herman C, et al. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress[J]. Genes & Development, 2006, 20(13): 1776–1789.
- [13] Gaubig LC, Waldminghaus T, Narberhaus F. Multiple layers of control govern expression of the *Escherichia coli* *ibpAB* heat-shock operon[J]. Microbiology, 2011, 157(1): 66–76.
- [14] Strozecka J, Chrusciel E, Gorna E, et al. Importance of the N- and C-terminal regions of IbpA, the *Escherichia coli* small heat shock protein, for chaperone function and oligomerization[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(4): 2843–2853.
- [15] Kuczyńska-Wisńik D, Matuszewska E, Laskowska E. *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA and IbpB affect biofilm formation by influencing the level of extracellular indole[J]. Microbiology, 2010, 156(1): 148–157.
- [16] Valdez-Cruz NA, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA. Molecular responses of *Escherichia coli* caused by heat stress and recombinant protein production during temperature induction[J]. Bioengineered Bugs, 2011, 2(2): 105–110.
- [17] Krojer T, Sawa J, Schäfer E, et al. Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP[J]. Nature, 2008, 453(7197): 885–890.
- [18] 蒋钰瑶, 何嘉荣, 王未未, 等. 新型大肠杆菌高效表达载体 pHsh 的构建与应用[J]. 微生物学通报, 2012, 39(3): 394–400.
- [19] Wu H, Pei J, Jiang Y, et al. pHsh vectors, a novel expression system of *Escherichia coli* for the large-scale production of recombinant enzymes[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(6): 795–801.
- [20] Villaverde A, Benito A, Viaplana E, et al. Fine regulation of *ci857*-controlled gene expression in continuous culture of recombinant *Escherichia coli* by temperature[J]. Applied and Environmental

- Microbiology, 1993, 59(10): 3485–3487.
- [21] 王卓, 裴建军, 李华钟, 等. 极耐热性 β -葡萄糖醛酸酶的高效表达和酶学性质及其应用[J]. 生物工程学报, 2008, 24(8): 1407–1412.
- [22] Yin E, Le Y, Pei J, et al. High-level expression of the xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(2): 275–280.
- [23] Le Y, Peng J, Wu H, et al. An approach to the production of soluble protein from a fungal gene encoding an aggregation-prone Xylanase in *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18489.
- [24] Soares CRJ, Ueda EKM, Oliveira TL, et al. Distinct human prolactin (hPRL) and growth hormone (hGH) behavior under bacteriophage lambda PL promoter control: Temperature plays a major role in protein yields[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 133(1): 27–35.
- [25] Chen J, Acton TB, Basu SK, et al. Enhancement of the solubility of proteins overexpressed in *Escherichia coli* by heat shock[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2002, 4(6): 519–524.
- [26] Zhao Y, He W, Liu WF, et al. Two distinct states of *Escherichia coli* cells that overexpress the recombinant heterogeneous β -galactosidase[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(12): 9259–9268.
- [27] Hatayama K, Asaoka Y, Hoya M, et al. Effective expression of soluble aglycosylated recombinant human Fc γ receptor I by low translational efficiency in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 94(4): 1051–1059.
- [28] Subedi GP, Satoh T, Hanashima S, et al. Overproduction of anti-Tn antibody MLS128 single-chain Fv fragment in *Escherichia coli* cytoplasm using a novel pCold-PDI vector[J]. Protein Expression and Purification, 2012, 82(1): 197–204.
- [29] Thomson NM, Saika A, Ushimaru K, et al. Efficient production of active polyhydroxyalkanoate synthase in *Escherichia coli* by coexpression of molecular chaperones[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(6): 1948–1955.
- [30] Kang DG, Kim CS, Seo JH, et al. Coexpression of molecular chaperone enhances activity and export of organophosphorus hydrolase in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Progress, 2012, 28(4): 925–930.
- [31] Haacke A, Fendrich G, Ramage P, et al. Chaperone over-expression in *Escherichia coli*: apparent increased yields of soluble recombinant protein kinases are due mainly to soluble aggregates[J]. Protein Expression and Purification, 2009, 64(2): 185–193.
- [32] Thomas JG, Baneyx F. Protein folding in the cytoplasm of *Escherichia coli*: requirements for the DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES molecular chaperone machines[J]. Molecular Microbiology, 1996, 21(6): 1185–1196.
- [33] Goloubinoff P, Christeller JT, Gatenby AA, et al. Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP[J]. Nature, 1989, 342(6252): 884–889.
- [34] Han MJ, Park SJ, Park TJ, et al. Roles and applications of small heat shock proteins in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 88(4): 426–436.
- [35] Ow DS, Lim DY, Nissom PM, et al. Co-expression of Skp and FkpA chaperones improves cell viability and alters the global expression of stress response genes during scFvD1.3 production[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9(1): 22.
- [36] Gunnarsen KS, Lunde E, Kristiansen PE, et al. Periplasmic expression of soluble single chain T cell receptors is rescued by the chaperone FkpA[J]. BMC Biotechnology, 2010, 10(1): 8.
- [37] Yan X, Hu S, Guan YX, et al. Coexpression of chaperonin GroEL/GroES markedly enhanced soluble and functional expression of recombinant human interferon-gamma in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(3): 1065–1074.