



基于重组技术的低毒力高效大肠杆菌原核表达系统的改造与应用

黄玉欣 李鹏昊 王孟月 吴芃 刘鹏 逢文强* 田克恭*

国家兽用药品工程技术研究中心 河南 洛阳 471000

摘要:【背景】大肠杆菌作为原核表达系统常用宿主菌株,具有培养成本低、周期短和操作性强等优势,但同时也存在着一些不足。【目的】降低大肠杆菌内毒素合成水平及毒力,同时提高其可溶性表达外源蛋白的能力。【方法】利用 CRISPR-Cas 技术敲除大肠杆菌 BL21(DE3)脂多糖生物合成途径中的 *lpxM*, 改变其毒性中心类脂 A 的侧链结构;在基因组中整合表达 *tig* 提供蛋白折叠所需伴侣因子;构建 pET-28a-Rcodon 重组载体,补充蛋白表达所需稀有密码子对应的 tRNA。【结果】*lpxM* 缺失后菌体细胞内毒素合成水平较出发菌株降低 90% 左右;利用改造后的重组菌株和载体,可显著提高鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白的可溶性表达水平;临床安全性试验结果表明,重组菌株 BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 合成内毒素的毒力水平较出发菌株显著降低,表达抗原对应免疫组个体无任何临床免疫副反应出现。【结论】利用重组技术对大肠杆菌原核表达系统进行改造,并用于外源蛋白的低毒力高效可溶性表达,为相关亚单位疫苗的研究奠定了一定的基础。

关键词: 大肠杆菌, 脂多糖, 内毒素, 可溶性表达, 临床安全性

Improving *Escherichia coli* prokaryotic expression system with low virulence and high efficiency by recombination technology

HUANG Yuxin LI Penghao WANG Mengyue WU Peng LIU Peng

PANG Wenqiang* TIAN Kegong*

National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan 471000, China

Abstract: [Background] As a common host used in prokaryotic expression system, *Escherichia coli* owned many advantages like low cultivation cost, short growth period and strong operability while also shared some deficiencies isochronally. [Objective] To decrease the endotoxin biosynthesis and virulence of *E. coli* and improve its exogenous proteins soluble expression ability synchronously. [Methods] *lpxM* gene in lipopolysaccharide biosynthesis pathway of *E. coli* was primarily deleted by CRISPR-Cas technology for lipid A side chain structure modification. Then *tig* gene was integrated expressed in genome of *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ to provide chaperon factor for exogenous proteins. Besides, the recombinant

Foundation items: Zheng Luoxin National Independent Innovation Demonstration Zone First Batch Innovation Leading Industrial Cluster Special Project (181200211700); Luoyang Heluo Talent Program

*Corresponding authors: E-mail: PANG Wenqiang: pangwq123@hotmail.com; TIAN Kegong: vetvac@126.com

Received: 18-02-2020; Accepted: 09-05-2020; Published online: 12-08-2020

基金项目: 郑洛新国家自主创新示范区首批创新引领型产业集群专项(181200211700); 洛阳市河洛英才计划

*通信作者: E-mail: 逢文强: pangwq123@hotmail.com; 田克恭: vetvac@126.com

收稿日期: 2020-02-18; 接受日期: 2020-05-09; 网络首发日期: 2020-08-12

plasmid pET-28a-Rcodon was constructed to supply the rare codon relevant tRNA for protein expression. **[Results]** Bacterial somatic endotoxin level obtained a 90% reduction compared to the original strain after *lpxM* deletion. By utilizing the recombinant host strain and plasmid, expression level of the infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 protein was observably enhanced. Clinical safety evaluation results indicated that the endotoxin virulence of *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ was apparently lower than the original strain and the relevant immunity group showed no clinical symptoms. **[Conclusion]** *E. coli* prokaryotic expression system was remolded by recombinant technologies for low virulence and high soluble expression of the exogenous proteins, which laid a certain foundation for the relevant subunit vaccines investigation.

Keywords: *Escherichia coli*, lipopolysaccharide, endotoxin, soluble expression, clinical safety

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)结构由类脂 A (Lipid A)、核心多糖和 O 特异侧链三部分组成,可在临床上引起较为严重的内毒素反应^[1]。Lipid A 作为 LPS 的毒性中心,共包含有 6 条脂肪酸侧链,其结构中心上最后 2 条脂肪酸侧链分别由其生物合成途径中的 *lpxL* (编码月桂酰基转移酶)和 *lpxM* (编码肉豆蔻酰基转移酶)负责催化合成,并由 *pagP*、*lpxP* 编码的棕榈酰转移酶和 *eptA* 编码的乙醇胺磷酸转移酶进行进一步的加工修饰^[2]。研究表明, Lipid A 发生侧链缺失会使 LPS 表现出不同的生物学活性,如缺失 Lipid A 生物合成途径中的 *lpxM* 可使其缺失一条豆蔻酰化侧链,同时体内外诱导细胞因子和内毒素反应的能力大大降低;而 *lpxL*、*lpxM*、*pagP*、*lpxP* 和 *eptA* 同时敲除后,可产生缺失 2 条侧链的 Lipid IV A,该结构不会引发人的任何内毒素反应,而且该突变株也是目前报道过的 Lipid A 缺失侧链最多且能够正常存活的 *E. coli* 菌株^[3-4]。*E. coli* 基因组相对较小,遗传背景清晰,其基因组编辑相对较易实现。目前, λ -Red、Cre-loxP 重组系统^[5-6]以及 CRISPR-Cas 基因编辑系统^[7]均在 *E. coli* 中得到了成功应用。如 Seo 等^[8]利用 CRISPR-Cas9 系统,将 *E. coli* K12 来源的 *dsrA* 和 *rscB* 在 *E. coli* BL21(DE3)基因组上进行了整合表达,最终实现了菌体细胞对庚酸耐受性的提高。

影响 *E. coli* 表达蛋白质的因素较多,其中添加伴侣因子是改善 *E. coli* 细胞内环境、提高蛋白质可

溶性表达的有效方法^[9-10]。韩平等^[11]证明过表达 *tig* 可使 hTNFR1 蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中的可溶性表达水平得到提高。此外,稀有密码子也是制约蛋白质在 *E. coli* 中高效表达的重要因素,补充 *E. coli* 中稀有密码子所对应 tRNA 也能在一定程度上提高目的蛋白的表达效率^[12]。Ivanov 等^[13]在表达 NS5B $\Delta 55$ 蛋白的过程中,通过补充稀有密码子对应的 tRNA,使蛋白表达水平较出发菌株提高了约 29 倍。目前, *E. coli* 表达系统已在多种动物疫病的亚单位疫苗研究方面实现了规模化生产应用。如鸡传染性法氏囊病病毒(Infectious Bursal Disease Virus, IBDV),其保护性抗原蛋白 VP2 已在 *E. coli* 中实现了可溶性表达^[14],但仍有较大部分是以包涵体的形式存在,然而该基因包含多种稀有密码子,致使在 *E. coli* 中进一步提高其表达水平的难度较大^[15]。

为了构建具有低毒力、高可溶性表达能力的 *E. coli* 菌株,本研究利用 CRISPR-Cas 技术敲除 *E. coli* BL21(DE3) LPS 生物合成途径中的 *lpxM*,并通过在基因组中整合表达 *tig*,为蛋白质的有效折叠提供辅助性伴侣分子;此外,还构建 pET-28a-Rcodon 重组载体,以补充蛋白表达所需稀有密码子对应的 tRNA。本研究将改造后宿主菌株和质粒用于 IBDV VP2 蛋白的表达,并对其临床安全性进行考察,以期为大肠杆菌中异源蛋白的表达和相关亚单位疫苗的研究提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒及实验动物

E. coli DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;pCas 温敏型质粒、pTargetF 质粒、pET-28a 质粒均由本研究室保藏。试验动物为 21 日龄 SPF 鸡 25 只,购于北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

IBDV 阳性血清,中国兽医药品监察所;凝胶法鲎试剂,厦门鲎试剂生物科技股份有限公司;细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、细菌总 RNA 快速抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;2 \times TransStart[®] FastPfu PCR SuperMix (-dye)试剂盒、TransScript[®] One-Step RT-PCR SuperMix 试剂盒、

pEASY[®]-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit,北京全式金生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗鼠二抗,赛默飞世尔科技公司;*tig* 编码产物的单克隆抗体,本研究室制备;试验所用引物(表 1)合成、基因合成与测序,苏州金唯智生物科技有限公司。PCR 仪、电泳仪、全自动凝胶成像仪, Bio-Rad 公司;GE AKTA Pure 蛋白质层析纯化系统,通用电气医疗集团生命科学部;高压均质机,ATS 工业系统有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *lpxM* 的敲除与 *tig* 表达盒的整合

将 pCas 载体转入 *E. coli* BL21(DE3)菌株并制备感受态细胞;以 pTargetF 载体为模板,分别使用 sgRNA1-F/sgRNA-R 和 sgRNA-2-F/sgRNA-R 引物组进行 PCR 扩增^[16],PCR 产物经 *Spe* I 酶切消化后进

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

Primers	Sequence (5'→3')	Size (bp)
sgRNA-1-F	ATATATACTAGTGGGACGTTTTGCCGGACGACGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	52
sgRNA-2-F	ATATATACTAGTGATGGATGATCTGTTAGAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	52
sgRNA-R	ATATATACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAG	34
<i>lpxM</i> -L-F	TGCACTATGAAGTATGGATA	20
<i>lpxM</i> -L-R	CCGCGCAATCGTATGATCATAACGTCCCAGCCGTGCCAGA	40
<i>lpxM</i> -L-Rt	ATTCGCGGGATCGAGATCTAACGTCCCAGCCGTGCCAGA	40
<i>lpxM</i> -R-F	TCTGGCACGGCTGGGACGTTATGATCATAACGATTGCGCGG	40
<i>lpxM</i> -R-Ft	CTGAAAGGAGGAACCTATATCATGATCATAACGATTGCGCGG	40
<i>lpxM</i> -R-R	TAATGACGGCGTAGCAGCTG	20
<i>lpxM</i> -RT-F	GGCAAGGGCTGGAGATCATC	20
<i>lpxM</i> -RT-R	GTACCGACTGGATGAATGGT	20
<i>rpoB</i> -RT-F	AGACCGTTTCACCAACCATCC	20
<i>rpoB</i> -RT-R	CGAAGATCGCACGCAGCAGT	20
<i>tig</i> -cassette-F	TCTGGCACGGCTGGGACGTTAGATCTCGATCCCGCGAAAT	40
<i>tig</i> -cassette-R	CCGCGCAATCGTATGATCATGATATAGTTCCTCCTTTCAG	40
<i>tig</i> -RT-F	GAAGCTGAAGACCGTGTT	18
<i>tig</i> -RT-R	TTAAGATTCTTCCGGCTG	18
VP2-F	GGGAATTCCATATGATGACAAACCTGCAAGATCA	34
VP2-R	CCGCTCGAGTTACCTTAGGGCCCCGGATTA	29
Rcodon-F	TAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCT	30
Rcodon-R	ATCATCTTATTAATCAGATAAAATATTCT	30
pETbone-F	AGAAATATTTTATCTGATTAATAAGATGATCAGCTTGTCTGTAAGCGGAT	50
pETbone-R	AGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTATCAAGGGCATCGGTCGAGAT	50

行自连接, 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选正确的转化子。

以 *E. coli* BL21(DE3) 菌株的基因组 DNA 为模板, 使用引物组 *lpxM*-L-F/*lpxM*-L-R 和 *lpxM*-R-F/*lpxM*-R-R 分别扩增出 *lpxM* (GenBank 登录号为 CP001509.3, 全长 972 bp) 的上、下游同源臂^[16]; 同源臂连接后与包含 2 组 sgRNA 序列的重组载体 pTargetF::sgRNA1 和 pTargetF::sgRNA2 同时电转化 BL21(DE3)/pCas 感受态细胞。提取转化子基因组 DNA 作为模板, 使用引物组 *lpxM*-L-F/*lpxM*-R-R 进行 PCR 扩增^[16], 产物进行测序验证。

tig 序列(GenBank 登录号 QGL43832.1, 全长 1 299 bp)密码子优化后克隆至 pET-28a 载体, 使用引物组 *tig*-cassette-F/*tig*-cassette-R 以 pET-28a-*tig* 为模板 PCR 扩增^[16]表达盒 *tig*-cassette; 分别使用引物组 *lpxM*-R-F/*lpxM*-R-Ft 和 *lpxM*-L-F/*lpxM*-L-Rt 扩增出 *lpxM* 的上、下游同源臂^[16], 同源臂连接至 *tig*-cassette 表达盒的两端后, 与重组载体 pTargetF-sgRNA1 和 pTargetF-sgRNA2 一同电转化 BL21(DE3) Δ *lpxM* 感受态细胞。使用引物组 *lpxM*-L-F/*lpxM*-R-R, 以转化子基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增^[16], 产物进行测序验证。突变株构建完成后, 包含的 pTargetF 载体通过添加终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG 诱导 8 h 进行消除, 温敏型 pCas 载体于 42 °C 条件下培养过夜进行消除。

1.2.2 反转录 PCR

使用细菌总 RNA 快速抽提试剂盒提取 *E. coli* 的总 RNA, 以提取的总 RNA 为模板, 使用 TransScript® One-Step RT-PCR SuperMix 以编码 RNA 聚合酶 β 亚基的 *rpoB* 作为内参基因进行反转录 PCR。PCR 反应体系(20 μ L): 2 \times TS One-Step Reaction Mix 10 μ L, Trans Script® One-Step Enzyme Mix 0.4 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, RNA 模板 1 μ g, RNase-Free Water 补足至 20 μ L。PCR 反应条件: 45 °C 30 min; 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。反应结束后通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.3 重组表达载体的构建

使用引物组 pETbone-F/pETbone-R, 以 pET-28a 质粒为模板 PCR 扩增 pET-28a 载体的骨架片段^[16]。将包含 7 种 tRNA 的基因序列合成至 pUC57 载体, 并作为模板使用引物组 Rcodon-F/Rcodon-R 进行 PCR 扩增^[16]; 利用 pEASY®-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 将扩增出的 2 种片段进行重组, 重组产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。提取转化子质粒作为模板, 使用引物组 Rcodon-F/Rcodon-R 进行 PCR 扩增^[16], 阳性质粒进行测序验证。

以研究室保藏的 IBDV LYZS 分离毒株的 cDNA 为模板, 使用引物组 VP2-F/VP2-R 扩增 VP2 序列片段(GenBank 登录号为 KF021490.1, 全长 1 359 bp)^[16], 扩增产物回收后与 pET-28a 载体和 pET-28a-Rcodon 重组载体一同使用 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切消化; 酶切产物连接后转化 DH5 α 感受态细胞; 提取转化子的质粒, 使用 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切消化, 酶切正确的重组载体进一步测序验证。

1.2.4 VP2 蛋白的表达与纯化

挑取重组菌株单克隆接种至 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8 左右, 添加终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 于 20 °C 条件下诱导 12 h 结束培养。8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体细胞, 使用缓冲液 A (500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, pH 7.0) 按 1:20 的体积比进行重悬, 高压均质机 800 bar 条件下破碎 5 个循环后, 4 °C、13 500 r/min 离心 30 min 分离上清、沉淀, 用于 SDS-PAGE 检测。VP2 蛋白利用 Ni Sepharose 6 Fast Flow 进行亲和层析纯化, 柱流速 1 mL/min, 缓冲液 A 用于层析柱的平衡; 缓冲液 A 添加 50 mmol/L 咪唑用于洗脱杂蛋白, 添加 0.5 mol/L 咪唑用于洗脱目的蛋白, 洗脱产物收集后进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.5 内毒素检测

采用鲎试剂法检测样品内毒素含量, 根据鲎试剂灵敏度标示值(λ), 将待测样品用细菌内毒素检查用水 2 倍比稀释至合适浓度, 每步稀释均在旋涡混

合器上混匀 30 s 左右。取 0.1 mL 稀释后的蛋白液样品加入 10 mm×75 mm 试管, 并加入 0.1 mL 的 0.25 EU/mL 内毒素标准反应液; 每一稀释梯度的待检样品平行做 4 管, 其中 2 管加入 0.1 mL 细菌内毒素检查用水作为阴性对照。试管中溶液轻轻混匀后, 封闭管口, 垂直放入 37±1 °C 的恒温水浴锅中, 保温 60±2 min, 反应体系在试管底部完全凝固判定为阳性, 未完全凝固或滑落判定为阴性。

1.2.6 琼脂扩散沉淀试验检测抗原效价

称取 1% 的琼脂粉, 加入 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液, 水浴煮沸融化后倒入平皿内, 厚度 2–3 mm, 自然冷却。使用打孔器打出 7 个相邻的梅花孔, 挑出孔内琼脂, 并在火焰上缓慢加热以对孔底边缘进行封闭。将 8 000 r/min 离心 10 min 收集所得菌体细胞, 使用 PBS 缓冲液按照体积比 1:10 重悬, 高压均质机 800 bar 条件下破碎 5 个循环后, 4 °C、13 500 r/min 离心 30 min 分离上清和沉淀。将所得上清缓慢加入外周梅花孔中, 加满为宜, 中间孔加入 IBDV 阳性血清, 尽量避免产生气泡。以 PBS 缓冲液替代抗原作为阴性对照, 阳性对照使用 IBDV 感染细胞裂解液, 中间孔与外周孔之间出现沉淀线判定为一个滴度。

1.2.7 疫苗配制与免疫安全性评价

试验动物为 25 只 21 日龄 SPF 鸡, 分为 5 组, 每组 5 只; 1–2 组分别在 35 000 EU/mL 和 40 000 EU/mL 内毒素含量的配苗条件下, 免疫 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a::VP2 和 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ /pET-28a::VP2 表达的抗原蛋白; 3–4 组按照同等抗原含量条件, 分别免疫 *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a::VP2 和 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ /pET-28a-Rcodon::VP2 表达的抗原蛋白; 5 组免疫等量 PBS 作为阴性对照。抗原添加油佐剂进行疫苗制备^[17], 疫苗免疫采用肌肉注射方式, 免疫剂量为 0.25 mL/羽份; 免疫后每周观察注射部位的副反应情况, 如是否出现局部充血、水肿、硬结或坏死等病理学特征, 以及鸡的行为学特征包括嗜睡、精神萎靡、食欲减退和腹泻等。

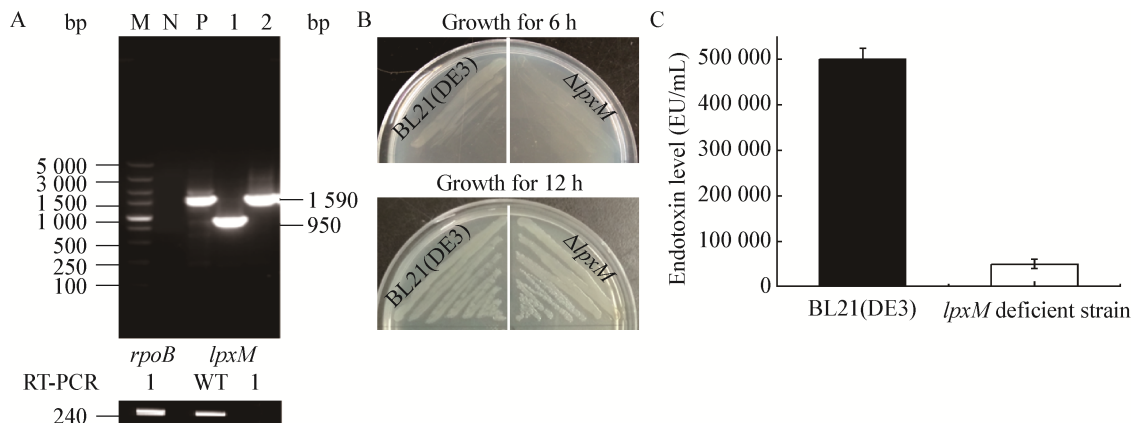
2 结果与分析

2.1 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 突变株的构建与特性分析

lpxM 上、下游同源臂连接后, 与 pTargetF-sgRNA1 和 pTargetF-sgRNA2 载体一同电转化 *E. coli* BL21(DE3)/pCas 感受态细胞, 并通过 PCR 扩增进行转化子筛选。结果发现 1 号转化子基因组 DNA 为模板扩增出的条带大小为 950 bp 左右, 较阳性对照小 640 bp 左右, 经测序验证 *lpxM* 缺失成功, RT-PCR 结果证实其为正确的 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 突变株(图 1A)。平板划线结果表明, *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 突变株培养前期生长速度较野生型 *E. coli* BL21(DE3) 慢, 二者最终平板培养特征无差异(图 1B)。*E. coli* BL21(DE3) 菌株和 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 突变株分别接种试管, 37 °C、220 r/min 培养过夜后收获菌体细胞, 按 1:40 的体积比重悬破碎后分离上清检测内毒素含量; 结果 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 突变株破碎上清内毒素水平较 *E. coli* BL21(DE3) 菌株降低 90% 左右, 二者内毒素水平分别为 5×10^4 EU/mL 和 5×10^5 EU/mL (图 1C)。

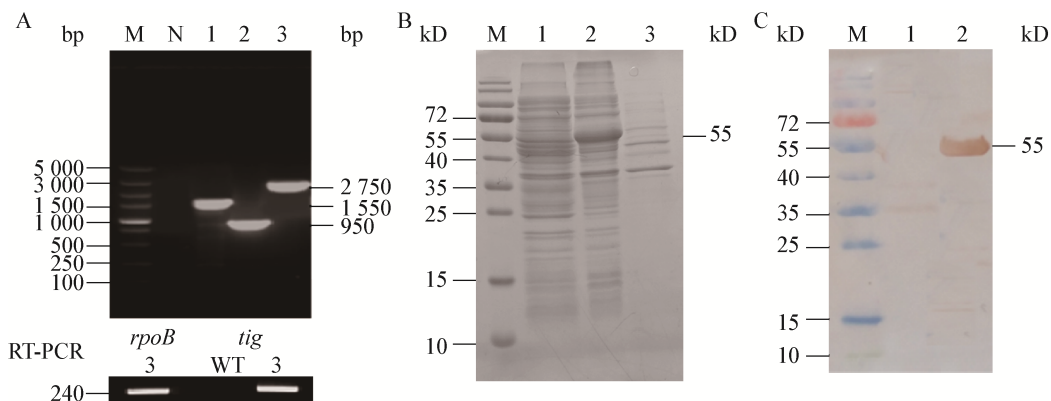
2.2 *tig* 在 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 基因组上的整合表达

lpxM 上、下游同源臂连接至 *tig*-cassette 片段两端后, 与 pTargetF::sgRNA1 和 pTargetF::sgRNA2 载体一同电转化 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ /pCas 感受态细胞, 并通过 PCR 扩增进行转化子筛选。结果发现 3 号重组转化子基因组 DNA 为模板扩增出的片段大小为 2 750 bp 左右, 较 *E. coli* BL21(DE3) 扩增条带大 1 200 bp 左右, 较 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 突变株扩增条带大 1 800 bp 左右, 经测序验证 *tig* 已整合至 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 基因组, RT-PCR 结果证实 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 突变株构建成功(图 2A)。*E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 突变株的摇瓶发酵结果显示, 其菌体细胞的破碎上清中有明显的目的蛋白表达, 大小为 55 kD 左右(图 2B)。以 *tig* 编码产物的单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗鼠二抗进行 Western Blot 分析, 可鉴定出大小为 55 kD 左右的条带(图 2C), 表明 *tig* 成功整合表达。

图1 $\Delta lpxM$ 突变株的构建与特性分析Figure 1 Construction and characterization of $\Delta lpxM$ mutant strain

注: A: M: 5000 bp DNA Ladder; N: 阴性对照; P: *E. coli* BL21(DE3)扩增产物; 1-2: 1号、2号转化子扩增产物。B: *lpxM* 缺失菌株平板培养特征分析。C: *lpxM* 缺失菌株的内毒素合成水平分析

Note: A: M: 5000 bp DNA Ladder; N: Negative control; P: Amplification product of *E. coli* BL21(DE3); 1-2: Amplification products of transformant 1 and 2. B: Plate culture characteristics of *lpxM* deficient strain. C: Endotoxin synthesis level analysis of *lpxM* deficient strain

图2 *tig* 在 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 基因组上的整合表达与鉴定Figure 2 Integrated expression and validation of *tig* in genome of *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$

注: A: M: 5000 bp DNA Ladder; N: 阴性对照; 1-3: *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 、*E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 扩增产物。B: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 1-2: *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 、*E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 分离上清; 3: *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 分离沉淀。C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 1-2: *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 、*E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 分离上清显色

Note: A: M: 5000 bp DNA Ladder; N: Negative control; 1-3: Amplification products of *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ and *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$. B: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 1-2: Separation supernatants of *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ and *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$; 3: Separation precipitate of *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$. C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 1-2: Separation supernatants of *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ and *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ coloured

2.3 pET-28a-Rcodon 重组表达载体的构建

根据 pET-28a-Rcodon 重组载体的构建原理示意图(图 3A), 以 pET-28a 为模板扩增 *ori* 和 *Lac I* 元件区间以外的骨架部分, 大小为 4 300 bp 左右(图 3B); 以 pUC57-Rcodon 为模板扩增出包含 7 种 tRNA

编码基因的序列片段, 大小为 2 800 bp 左右(图 3B), 片段两端分别带有 20 bp 与 pET-28a 骨架同源的序列。使用 pEASY®-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 将 pET-28a 的骨架片段与包含 tRNA 编码基因的片段进行重组, 重组体系转化 *E. coli* DH5 α 感受态

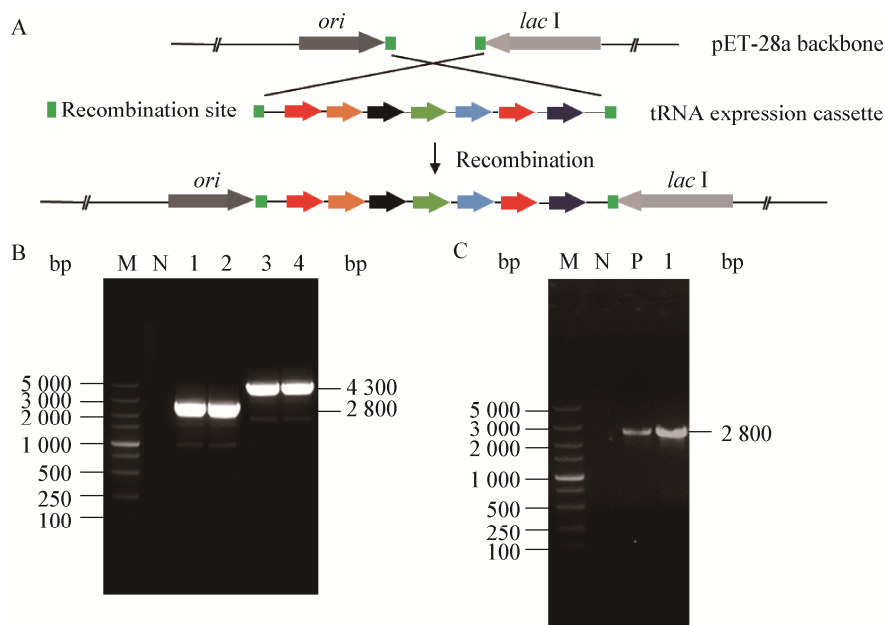


图3 pET-28a-Rcodon 重组表达载体的构建与验证

Figure 3 Construction and validation of the recombinant plasmid pET-28a-Rcodon

注: A: pET-28a-Rcodon 重组载体构建示意图。B: M: 5000 bp DNA Ladder; N: 阴性对照; 1-2: tRNA 编码序列片段; 3-4: pET-28a 载体骨架片段。C: M: 5000 bp DNA Ladder; N: 阴性对照; P: 阳性对照; 1: 转化子

Note: A: Construction schematic diagram of the recombinant plasmid pET-28a-Rcodon. B: M: 5000 bp DNA Ladder; N: Negative control; 1-2: tRNA coding fragment; 3-4: pET-28a backbone fragment. C: M: 5000 bp DNA Ladder; N: Negative control; P: Positive control; 1: Transformant

细胞后进行转化子的筛选,提取转化子质粒作为模板进行 PCR 扩增,可得到大小为 2 800 bp 左右的目的片段(图 3C),阳性质粒通过测序对比,确认构建成功。

2.4 VP2 蛋白的表达与纯化

重组载体 pET-28a-VP2 转化 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 和 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 感受态细胞, pET-28a-Rcodon-VP2 转化 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 感受态细胞,并通过摇瓶发酵对 VP2 蛋白的表达及其 AGP 效价进行检测。SDS-PAGE 结果表明,VP2 蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)和 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 菌株中均有较大部分以包涵体形式存在,部分为可溶性表达,蛋白大小为 40 kD 左右,AGP 效价均为 1:64;在 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 菌株中,VP2 蛋白的可溶性表达水平有所提高,其 AGP 效价为 1:128;而 pET-28a-Rcodon-VP2 转化 *E. coli*

BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 菌株的发酵上清中,VP2 蛋白的可溶性表达量较 pET-28a-VP2 载体又有部分提高,AGP 效价达到 1:256 (图 4A、B)。不同宿主菌株来源的 VP2 蛋白纯化后,均可得到纯度较高的目的蛋白(图 4C)。

2.5 临床安全性评价

不同宿主来源的 VP2 蛋白纯化后制备疫苗,其中 *E. coli* BL21(DE3)和 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 宿主对应免疫组(组 1 和组 2)的内毒素配苗含量分别为 35 000 EU/mL 和 40 000 EU/mL,前者疫苗注射后免疫组个体的免疫部位出现较轻微的肌肉充血、水肿和硬结,并有轻度的腹泻、精神萎靡和食欲减退等副反应症状,后者免疫组个体与阴性对照组均无明显临床症状出现(表 2)。此外,*E. coli* BL21(DE3)和 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 宿主通过不同表达载体表达的抗原蛋白,纯化后按照相同抗原含量进行疫苗制备(组 3 和组 4),其内毒素含量检测结果分别为

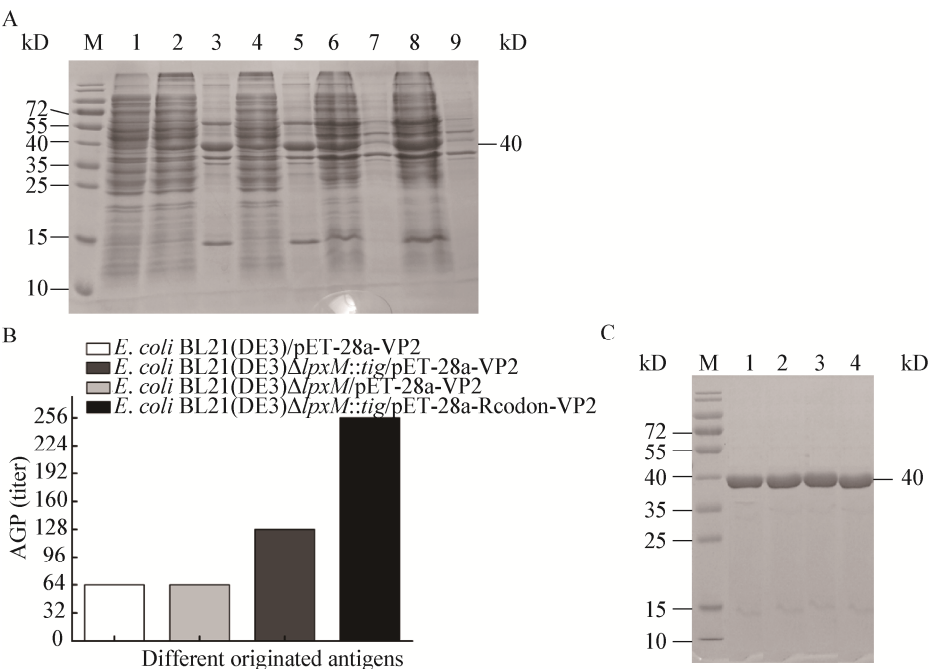


图 4 VP2 蛋白的表达纯化与 AGP 效价检测
Figure 4 Expression, purification and AGP titer detection of VP2 protein

注：A：M：PageRuler™ Prestained Protein Ladder；1：E. coli BL21(DE3)/pET-28a-VP2 未诱导分离上清；2-9：E. coli BL21(DE3)/pET-28a-VP2、E. coli BL21(DE3) ΔlpxM/pET-28a-VP2、E. coli BL21(DE3) ΔlpxM::tig/pET-28a-VP2、E. coli BL21(DE3) ΔlpxM::tig/pET-28a-Rcodon-VP2 诱导分离上清与沉淀。B：不同宿主来源 VP2 抗原蛋白 AGP 检测结果。C：M：PageRuler™ Prestained Protein Ladder；1-4：E. coli BL21(DE3)/pET-28a-VP2、E. coli BL21(DE3) ΔlpxM/pET-28a-VP2、E. coli BL21(DE3) ΔlpxM::tig/pET-28a-VP2、E. coli BL21(DE3) ΔlpxM::tig/pET-28a-Rcodon-VP2 来源 VP2 纯化蛋白

Note: A: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 1: Uninduced separation supernatant of E. coli BL21(DE3)/pET-28a-VP2; 2-9: Induced separation supernatants and debris of E. coli BL21(DE3)/pET-28a-VP2, E. coli BL21(DE3) ΔlpxM/pET-28a-VP2, E. coli BL21(DE3) ΔlpxM::tig/pET-28a-VP2 and E. coli BL21(DE3) ΔlpxM::tig/pET-28a-Rcodon-VP2. B: AGP detection results of different hosts derived VP2 proteins. C: M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 1-4: Purified VP2 protein derived from E. coli BL21(DE3)/pET-28a-VP2, E. coli BL21(DE3) ΔlpxM/pET-28a-VP2, E. coli BL21(DE3) ΔlpxM::tig/pET-28a-VP2 and E. coli BL21(DE3) ΔlpxM::tig/pET-28a-Rcodon-VP2

表 2 临床免疫安全性评价
Table 2 Clinical immune safety evaluation

免疫组 Immune group	表达宿主菌株与载体 Host strain and plasmid	内毒素含量 Endotoxin level (EU/mL)	免疫鸡临床安全性评价结果 Clinical safety evaluation result of immunized chickens
1	E. coli BL21(DE3)/pET-28a-VP2	35 000	免疫部位有较轻微的肌肉充血、水肿和硬结，免疫个体有轻度的腹泻、精神萎靡和食欲减退等症状 The immune site has mild muscle congestion, edema and induration, and the immune individual has mild diarrhea, mental malaise, anorexia and other symptoms
2	E. coli BL21(DE3) ΔlpxM/pET-28a-VP2	40 000	无明显临床症状出现 No significant clinical symptoms
3	E. coli BL21(DE3)/pET-28a-VP2	5 000	无明显临床症状出现 No significant clinical symptoms
4	E. coli BL21(DE3) ΔlpxM::tig/pET-28a-Rcodon-VP2	1 000	无明显临床症状出现 No significant clinical symptoms
5	阴性对照 Negative control	—	无明显临床症状出现 No significant clinical symptoms

注：—：无该项数据
Note: —: No relevant statistics

5 000 EU/mL (组 3)和 1 000 EU/mL (组 4), 免疫动物后均无明显临床症状出现(表 2)。该试验结果指示, *lpxM* 缺失后宿主菌株合成内毒素的毒力水平显著下降, 利用所构建突变株表达的抗原蛋白进行纯化更有利于内毒素的去除。

3 讨论与结论

E. coli 作为一种商品化的表达宿主, 具有较为清晰的遗传代谢背景, 通过基因组修饰对其生物合成途径进行改造, 理论上是一种可以从根源弥补 *E. coli* 表达系统不足之处的方法。在 *E. coli* 的 LPS 结构组成中, Lipid A 是主要毒力来源^[1]。为了从根源上降低 *E. coli* 的内毒素合成水平, 本研究利用 CRISPR-Cas 技术敲除了 *E. coli* BL21(DE3)菌株 Lipid A 合成途径(https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?eb100540+ECD_00180)中的 *lpxM*, 使其内毒素水平降低了 90%左右, 同时菌体生长也受到了一定的影响, 但该菌株表达 IBDV VP2 蛋白的能力与野生型 BL21(DE3)无明显差异。此外, 本研究还发现 *E. coli* BL21(DE3)菌株缺失 *lpxM* 后, 外源 DNA 无法再通过化学转化导入菌体细胞, 只能通过电转化来进行; 这可能是由于突变菌株细胞壁结构的变化所导致, 但本研究未通过 H 质子核磁共振^[18]对突变株的 LPS 结构进行对比分析, 后续可围绕该方面进一步展开研究。

E. coli 表达系统可实现蛋白质快速、高效的表达, 但也存在着一些问题, 如缺乏转录后修饰、蛋白无法进行有效折叠以及易形成包涵体等^[19]。近年来, 已有许多研究者从多方面对 *E. coli* 表达系统进行了优化, 如提高表达载体的稳定性^[20]、添加分子伴侣以提高目的蛋白的可溶性^[9,21]和添加可溶性标签^[22]等。这些方法都在不同程度上改善和提高了蛋白质在 *E. coli* 中的可溶性表达, 但有些优化策略在增加蛋白可溶性的同时也增加了下游蛋白纯化或发酵过程的负担。有研究表明, 伴侣蛋白 TF 可以显著抑制大肠杆菌表达重组蛋白过程中包涵体的形成^[23]。因此, 为了提高 *E. coli* 表达系统对外源蛋

白的可溶性表达能力, 本研究将 TF 蛋白的编码基因 *tig* 整合至 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 突变株的基因组上, 并通过 VP2 蛋白的表达来对其进行考察。结果发现 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 突变株对 IBDV VP2 蛋白的可溶性表达能力较出发菌株 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM$ 显著提高。本研究采用组成型表达的方式将 *tig* 在宿主菌株的基因组上进行整合表达, 避免了利用载体表达伴侣蛋白所需要的二次诱导步骤, 在一定程度上提高了蛋白表达工艺的稳定性。

基于加强基因转译通量的思路, 本研究将包含 7 种 tRNA 序列的基因片段整合至 pET-28a 载体, 以考察在外源蛋白表达过程中补充稀有密码子对应的 tRNA 是否有助于目的蛋白表达量的提高。为此, 本研究将 IBDV 的 VP2 序列克隆至 pET-28a-Rcodon 重组载体上, 然后电转化入 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 宿主菌株, 并进行摇瓶发酵考察, 结果发现 VP2 蛋白的表达量较 pET-28a 载体表达时有明显的提高, 表明本研究构建的 pET-28a-Rcodon 重组载体在蛋白表达方面较原始载体 pET-28a 有一定的优势。鲎试剂法是一种检测革兰氏阴性细菌内毒素含量的常用方法, 但该方法无法识别由 *E. coli* 毒性中心 Lipid A 结构改变而引起的毒力变化^[24]。因此, 本研究通过临床免疫试验对所构建的 *E. coli* BL21(DE3) $\Delta lpxM::tig$ 突变株合成内毒素的毒力进行考察, 结果该突变株表达的抗原蛋白所含内毒素的毒力水平较出发菌株显著降低, 免疫动物后无任何临床副反应出现, 降低了下游蛋白纯化工艺中内毒素去除的难度与成本, 使抗原蛋白的生物安全性得到了提高。综上, 本研究构建了一株具有低内毒素合成水平、高可溶性表达能力的宿主菌株, 并通过表达载体的优化实现了外源蛋白在宿主菌株中的高水平可溶性表达, 为大肠杆菌源亚单位疫苗的开发与产业化奠定了一定的基础。

REFERENCES

- [1] Liu ZY, Li YP. Biological activity and mechanism of bacterial lipopolysaccharide[J]. Medical Recapitulate,

- 2010, 16(2): 166-169 (in Chinese)
刘中原, 李延平. 细菌脂多糖的生物活性及作用机制[J]. 医学综述, 2010, 16(2): 166-169
- [2] Holst O, Ulmer AJ, Brade H, Flad HD, Rietschel ET. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1996, 16(2): 83-104
- [3] Somerville Jr JE, Cassiano L, Bainbridge B, Cunningham MD, Darveau RP. A novel *Escherichia coli* lipid A mutant that produces an antiinflammatory lipopolysaccharide[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1996, 97(2): 359-365
- [4] Mamat U, Wilke K, Bramhill D, Schromm AB, Lindner B, Kohl TA, Corchero JL, Villaverde A, Schaffer L, Head SR, et al. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14(1): 57
- [5] Bubnov DM, Yuzbashev TV, Vybornaya TV, Netrusov AI, Sineoky SP. Development of new versatile plasmid-based systems for λ Red-mediated *Escherichia coli* genome engineering[J]. Journal of Microbiological Methods, 2018, 151: 48-56
- [6] Yu BJ, Sung BH, Koob MD, Lee CH, Lee JH, Lee WS, Kim MS, Kim SC. Minimization of the *Escherichia coli* genome using a Tn5-targeted Cre/loxP excision system[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(10): 1018-1023
- [7] Ou XY, Wu XL, Peng F, Zeng YJ, Li HX, Xu P, Chen G, Guo ZW, Yang JG, Zong MH, et al. Metabolic engineering of a robust *Escherichia coli* strain with a dual protection system[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(12): 3333-3348
- [8] Seo JH, Baek SW, Lee J, Park JB. Engineering *Escherichia coli* BL21 genome to improve the heptanoic acid tolerance by using CRISPR-Cas9 system[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2017, 22(3): 231-238
- [9] Song XF, Lv TH, Chen JF, Wang J, Yao LS. Characterization of residue specific protein folding and unfolding dynamics in cells[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(29): 11363-11366
- [10] Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis[J]. Annual Review of Biochemistry, 2013, 82: 323-355
- [11] Han P, Gai YM, Zhu BW, Zhang DW. Soluble expression and purification of hTNFR1 in *Escherichia coli*[J]. Current Biotechnology, 2018, 8(3): 246-253 (in Chinese)
韩平, 盖园明, 朱蓓薇, 张大伟. hTNFR1 在大肠杆菌中可溶性表达及纯化[J]. 生物技术进展, 2018, 8(3): 246-253
- [12] Mei JJ. Effect of rare codon on the expression of foreign protein in *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbes and Infections, 1999(1): 24-27 (in Chinese)
梅俊杰. 稀有密码子对大肠埃希菌表达外源蛋白的影响[J]. 国外医学(微生物学分册), 1999(1): 24-27
- [13] Ivanov AV, Korovina AN, Tunitskaya VL, Kostyuk DA, Rechinsky VO, Kukhanova MK, Kochetkov SN. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2006, 48(1): 14-23
- [14] Pan QX, Zhu XD, Ouyang W, Wang XL, Xia XX, Bi ZW, Zhu YM, Dong CH, Wang YS. Codon optimization of VP2 gene of infectious bursal disease virus and its expression in *Escherichia coli*[J]. Chinese Veterinary Science, 2013, 43(3): 271-276 (in Chinese)
潘群兴, 朱向东, 欧阳伟, 王晓丽, 夏兴霞, 毕振威, 诸玉梅, 董晨红, 王永山. 鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 基因密码子的优化及其在大肠杆菌中的表达[J]. 中国兽医科学, 2013, 43(3): 271-276
- [15] Kumar CS, Hazarika NMJ, Kumar S. Analysis of synonymous codon usage in the VP2 protein gene of infectious bursal disease virus[J]. Archives of Virology, 2015, 160(9): 2359-2366
- [16] Wang YH, Gao XJ, Yao YL, Zhang YJ, Lv CC, Sun Z, Wang YZ, Jia XR, Zhuang JS, Xiao Y, et al. The dynamics of Chinese variant porcine epidemic diarrhea virus production in Vero cells and intestines of 2-day old piglets[J]. Virus Research, 2015, 208: 82-88
- [17] Zhang XK, Sun JZ, Bai CY. Infectious bursal disease virus subunit antigen-containing vaccine composition, preparation method and application thereof: CN, CN201210494909.8[P]. 2014-06-11 (in Chinese)
张许科, 孙进忠, 白朝勇. 含鸡传染性法氏囊病病毒亚单位抗原的疫苗组合物及其制备方法和应用: 中国, CN201210494909.8[P]. 2014-06-11
- [18] Ke Y, An YQ. Lipopolysaccharide core type of *Escherichia coli* and its detection method[J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2000, 28(4): 90-94 (in Chinese)
柯岩, 安云庆. 大肠杆菌脂多糖核心型及其检测方法[J]. 微生物学免疫学进展, 2000, 28(4): 90-94
- [19] Su P, Gong GL. Research progress on optimizing the expression of exogenous proteins in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(2): 16-23 (in Chinese)
苏鹏, 龚国利. 优化大肠杆菌表达外源蛋白的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 16-23

- [20] Jiang WH, Liu YL, Jiang MF. Research progress on expression vector stability in *E. coli* system[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(5): 25-31 (in Chinese)
江伟华, 刘益丽, 江明锋. 大肠杆菌外源蛋白表达载体稳定性的研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(5): 25-31
- [21] Wang YF, Zhou YP, Zhang XZ, Li SJ, Ma CJ, Huang HB, Hao YQ. Soluble expression promotion of *Mycoplasma bovine* membrane protein by four types molecular chaperones in *Escherichia coli*[J]. Journal of China Agricultural University, 2018, 23(12): 75-83 (in Chinese)
王艳芳, 周雅坪, 张新竹, 李松建, 麻昌姣, 黄海碧, 郝永清. 四种分子伴侣促进牛支原体膜蛋白在大肠杆菌中可溶性表达研究[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(12): 75-83
- [22] Yu B, Cheng AC, Wang MS. Advances and prospect of soluble expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2008(10): 19-21 (in Chinese)
余波, 程安春, 汪铭书. 大肠杆菌中重组蛋白可溶性表达的研究进展及展望[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008(10): 19-21
- [23] Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 884-889
- [24] Ding JL, Ho B. Endotoxin detection-from *Limulus* amebocyte lysate to recombinant factor C[A]//Wang XY, Quinn PJ. Endotoxins: Structure, Function and Recognition[M]. Dordrecht: Springer, 2010: 187-208

2021 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-3)

序号	活动名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
23	中国微生物学会第十二次全国会员代表大会暨 2021 年学术年会	中国微生物学会	2021 年 10 月 29 日— 11 月 2 日	800	云南 昆明	杨海花 王旭 010-64807200
24	第二十三次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	2021 年 10— 11 月	600	天津	马挺 13902089678
25	第四届合成微生物学与生物制造学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	2021 年 11 月	300	广东 广州	刘建忠 020-84110115
26	微生物资源学术研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	待定	500	浙江 杭州	李学伟 15911158308
27	第二届全国根际微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	2021 年 11 月	300	江苏 南京	张瑞福 18705198006
28	第十四届全国土壤微生物学术讨论会暨第七届全国微生物肥料生产技术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	2021 年 11 月	350	广东 广州	姜昕 马鸣超 010-82108702, 82105091
29	2021 年生物制品年会	中国微生物学会生物制品专业委员会	2021 年 11 月	3 000	江苏 南京	毛群颖 18810054059
30	工业发酵过程优化控制年会	中国微生物学会生化过程模型与控制委员会	2021 11—12 月	年200	广州 珠海	夏建业 13761030390
31	干扰素与细胞因子在临床与基础中的新进展	中国微生物学会干扰素与细胞因子专业委员会	2021 年 11 月	200	江苏 苏州	潘健 15150137126
32	新发病毒免疫培训班	中国微生物学会病毒学专业委员会	待定	300	线上	吴莹 15901455682