

新型大肠杆菌高效表达载体 pHsh 的构建与应用

蒋钰瑶 何嘉荣 王未未 梅艳珍*

(南京师范大学 生命科学学院 江苏 南京 210046)

摘要: 在现代生物学和生物技术研究中, 通过基因的重组表达获得目标蛋白是一种应用最广泛的方法。因其培养简单、操作方便、遗传背景清楚、克隆表达系统成熟完善, 大肠杆菌表达系统通常是人们表达重组蛋白的首选, 而表达载体在重组蛋白的生产中起决定作用。pHsh 及其衍生质粒是近年发展起来的新型大肠杆菌表达载体, 其调控外源基因表达的原理不同于所有其他表达系统, 并且具有表达水平高、成本低廉等特点。介绍大肠杆菌表达系统的组成和常用表达载体, 并对由 pHsh 系列载体组成的 Hsh 表达体系的构建策略、表达调控机制及其使用方法进行综述。Hsh 表达体系的建立和发展有望从一个不同的角度帮助解决基因的重组表达中常见的表达水平低、诱导剂成本高、包涵体形成等问题。

关键词: 大肠杆菌, 表达系统, pHsh 载体, pHsh-ex 载体, 热激诱导

The approach to high production of recombinant protein via pHsh vectors for *Escherichia coli*

JIANG Yu-Yao HE Jia-Rong WANG Wei-Wei MEI Yan-Zhen*

(Department of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210046, China)

Abstract: For the production of recombinant proteins, *Escherichia coli* is often the first choice because it is easy, fast and inexpensive to cultivate, and its vector systems have been well developed. The regulation system for heterogenic expression plays an important role in producing recombinant proteins. pHsh vectors have been developed by using a heat-shock promoter of *E. coli*, and give advantages in high expression levels, low costs for expression induction, and reducing the formation of inclusion bodies. This paper introduces the construction strat-

*通讯作者: Tel: 86-25-85891936; 信箱: meiyanzhen@gmail.com

收稿日期: 2011-09-03; 接受日期: 2011-11-08

egy, expression mechanism, application of the pHsh vectors.

Keywords: *Escherichia coli*, Expression system, pHsh vectors, pHsh-ex vectors, Heat-shock induction

随着现代生物技术的发展,越来越多的重组蛋白(工具酶、药用蛋白、工业酶、抗原和抗体)在人类保健、农牧业、食品工业、环境保护及化工等产业产生不可替代的作用。如何快速、低成本地获得大量重组蛋白呢?采用基因工程技术是获得大量重组蛋白的重要途径。大肠杆菌(*Escherichia coli*)因其多方面的优势成为蛋白高效表达宿主的首选^[1-2]。*E. coli*的表达系统由表达载体、外源基因和宿主菌组成。其中表达载体是核心,而表达载体的关键在于所使用的启动子及控制这个启动子的调控序列,它们会直接影响到重组蛋白的表达水平和基因表达诱导方式的有效性和经济性^[3]。本文简单介绍了*E. coli*的表达系统和常用载体,并对最新发展的*E. coli*热激表达载体 pHsh 的构建策略、表达机制及其应用进行综述。

1 *E. coli* 常用表达载体

在*E. coli*中,研究和应用最多的是带有 lac/tac/trc 启动子、P_L/P_R启动子、T7 启动子的系列载体(表 1)^[4]。lac/tac/trc 表达载体是通过*E. coli*的 lac 操纵基因来实现表达调控的,是最早建立

并得到广泛应用的表达系统。lac 启动子的代表质粒如 pBR322、pKK223-3; trc 启动子的代表载体如 pTrc; tac 启动子的代表载体如 pGEX。P_L/P_R表达载体是通过热激进行外源基因的诱导表达的。P_L/P_R启动子受基因 cI 所产生的阻遏蛋白抑制。cI 基因的温度敏感型突变体 cI857ts 所产生的阻遏蛋白在较低温度时(30 °C)对 P_L/P_R具有阻遏功能;在较高温度(如 42 °C)时失去活性并且解阻遏^[5]。这类载体包括 pLEX、pJLA503、pBV220 等。T7 启动子来源于*E. coli* T7 噬菌体,由 T7 RNA 聚合酶选择性识别和启动转录。该载体通过控制 T7 聚合酶的合成而进行调控。pET 系列载体是这类表达载体的典型代表。

由以上 3 种常用启动子调控的表达载体存在以下几点不足: (1) 表达效果方面, lac、P_L载体表达水平低于 T7 载体,但是 T7 载体本底表达水平高,在生产对宿主菌有毒性的蛋白时会影响细胞生长。(2) 诱导剂方面, lac 载体需要诱导剂诱导,因诱导剂价格昂贵不宜用于工业酶的生产,同时有些诱导剂具有一定的毒性不宜用于药用蛋白的生产。T7 表达载体的诱导依赖于溶源性*E. coli*细胞中的 lac 和 P_L启动子,当其依赖于 lac 时同样

| 表 1 <i>E. coli</i> 常用启动子及特点 | | | |
|---|---------------------------------------|----------------------|---|
| Table 1 Promoters used for the high-level expression of genes in <i>E. coli</i> | | | |
| 启动子 Promoter | 调控基因 Regulation | 诱导剂 Induction | 不足之处 Problems |
| <i>lac</i> | <i>lacI</i> , <i>lacI^q</i> | IPTG, thermal | Low-level expression relative to other systems; Leaky expression |
| <i>trp</i> | <i>lacI</i> , <i>lacI^q</i> | Trpstarvation IAA | Leaky expression |
| <i>tac</i> | <i>lacI</i> , <i>lacI^q</i> | IPTG, thermal | Leaky expression |
| λ P _L | <i>λcI</i> ts857 | Thermal | Induction cannot be performed at low temperatures; Partial induction cannot be achieved |
| <i>T7</i> | <i>lacI</i> , <i>lacI^q</i> | IPTG, thermal | Leaky expression; Difficult to achieve high cell densities |
| <i>ara</i> | <i>araC</i> | L-arabinose | Few vector available; Catabolite repressed by glucose |

存在诱导剂问题。(3) 诱导方法方面, P_L 载体可通过热激诱导来避免诱导剂的问题, 但是一般认为, 使大体积发酵液快速升温有困难, 并且 *E. coli* 的宿主蛋白酶会被诱导表达从而对目标蛋白产生降解作用。T7 载体依赖于 P_L 时存在同样的问题。

近年发展起来的热激表达载体 pHsh 的调控机理不同于以上表达载体, 常见表达载体都通过阻遏蛋白进行调控, 而 pHsh 载体通过 Sigma 因子的替换来控制目标基因的表达。由 pHsh 系列载体组成的 Hsh 表达体系避免了使用化学诱导剂, 而且目标蛋白的群体表达量(mg/L)一般也高于 T7 载体^[5]。

2 由 pHsh 系列载体组成的 Hsh 表达体系

2.1 pHsh 热激表达载体的构建策略

pHsh 载体是 Shao's 研究组首次构建的, 其调控原理是基于 *E. coli* 细胞内由 Sigma 因子 σ^{32} 所调控的热休克蛋白的表达这一生理现象^[5-8]。

在 *E. coli* 中, 热休克蛋白的启动子(热激启动子)由 σ^{32} 和 *E. coli* RNA 聚合酶核心酶组成的 *E. coli* RNA 聚合酶全酶来识别和启动。当带有热

激启动子的 pHsh 重组质粒的 *E. coli* 细胞在 30 °C 培养时, 细胞内只有很少量的 σ^{32} 分子, 此时 pHsh 上的热激启动子只有极低的转录活性, 在它控制下的目的基因也只有极少量的表达。当重组细胞受到热激, 温度快速上升到 42 °C 以后, 细胞内的 σ^{32} 分子的数量急剧增加, 此时热激启动子的活性被完全激发, 目的基因得到大量表达^[6-8]。以 σ^{32} 所专门识别的热休克蛋白基因启动子的保守序列设计而成的热激启动子(Hsh promoter)为基础, 构建了含有 Hsh promoter、不依赖于 ρ 因子的 GAAA 终止子、SD 序列、多克隆位点、来源于 pUC19 的高拷贝 ColE1 复制子、氨苄青霉素抗性基因的新型热激表达载体 pHsh, 如图 1 所示^[8]。

该载体构建的创新之处在于首次利用 *E. coli* 热休克蛋白基因的启动子的保守序列设计了热休克启动子(Hsh promoter), 在此基础上, Shao's 研究组发展出一套系列新型的 *E. coli* 表达系统载体 (GenBank 登录号 FJ571619、FJ571621、FJ715938、FJ715939), 建立了新型 pHsh 系统体系。

2.2 外源基因在 pHsh 载体中高效表达的机制

外源基因在 pHsh 载体中高效表达的机制与下列因素密切相关: (1) 热激启动子具有温和性,

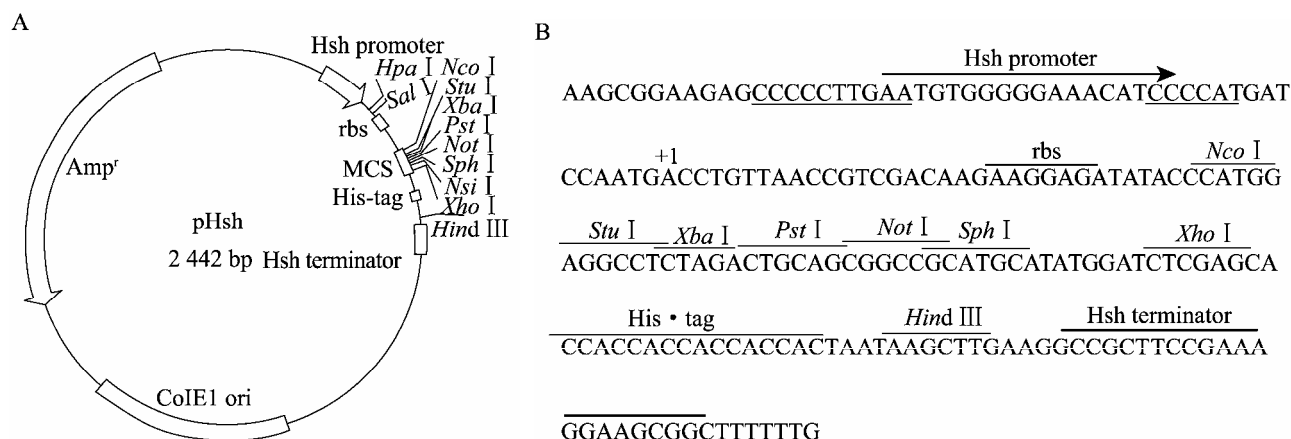


图 1 pHsh 结构示意图(A)及调控区序列(B)

Fig. 1 The map of characteristic elements of the pHsh expression vector (A) and the DNA sequence of Hsh promoter, terminator, MCS used in pHsh (B)

能够承受来源于 pUC19 的极高拷贝数复制元件, 从而最大限度地增加了细胞中外源基因的剂量; (2) pHsh 的存在使 *E. coli* 细胞内 σ^{32} 较正常 *E. coli* 细胞大量增加, 并最终增强了重组菌的表达水平; (3) 带有 pHsh 质粒的重组细胞经热激诱导后, σ^{32} 能持续维持高水平而大量转录目的基因^[5,7]。

2.3 pHsh 表达载体与常用表达载体效果的比较

已有文献报道证实了 pHsh 载体的有效性。吴华伟等选取 pTrc99A、pJLA503、pET-28a(+) 作为 lac/tac/trc、 p_L/p_R 、T7 三类表达系统代表, 在它们和 pHsh 中分别插入编码双活性耐热木糖苷酶/阿拉伯糖苷酶的基因 *xarB* 或编码极端耐热木聚糖酶的基因 *xynIII*, 获得的重组菌在各自的最适条件下诱导表达并进行了表达水平的比较。虽然 pHsh 的热激启动子的转录强度可能低于 T7 启动子, 但是由于调控严谨, 细胞生长良好, pHsh 得到的重组蛋白的总产量(如 U/L)通常高于这 T7 载体的产量。当用 *xarB* 基因作比较时, 在 pHsh 中的表达水平是 pTrc99A 的 3.6 倍, 是 pET-28a(+) 的 1.5 倍; 当用 *xynIII* 基因作比较时, 在 pHsh 中的表达水平分别是 pJLA503、pET-28a(+) 的 2.4 倍和 16.4 倍^[7]。

2.4 pHsh 表达载体在不同宿主中表达效果的比较

表达宿主菌株的选择是重组蛋白表达过程中很重要的因素之一。吴华伟等将重组质粒 pHsh-*xynB* 分别在 *E. coli* JM109、BL21、HB101、DH5、SURE 中诱导表达后测定重组酶的活性。结果如表 2 所示, pHsh 对于 *E. coli* 宿主类型没有特殊的要求^[5]。重组酶在宿主 BL21 中表达相对较高, 可能因为 BL21 是蛋白酶(*lon* 基因编码)缺陷型菌株, 减少了宿主蛋白酶对目标产物的降解。

表 2 不同宿主对重组 pHsh-*xynB* 质粒表达的影响
Table 2 Effect of different hosts on the expression of *xynB* gene by pHsh-*xynB*

| 宿主 Host | 相对酶活 Relative activity (%) |
|------------|-------------------------------|
| JM109 | 100.0 |
| BL21 | 111.0 |
| HB101 | 98.6 |
| DH5 | 104.0 |
| SURE | 90.0 |

3 分泌型热激载体 pHsh-ex

3.1 pHsh-ex 热激表达载体的构建策略

已经有许多基因通过使用 Hsh 表达体系的载体获得了高效表达^[9-20]。然而, 来源于嗜热真菌疏棉状丝孢菌(*Thermomyces lanuginosus*)的木聚糖酶基因(*xynA2*)利用 pHsh 载体在 *E. coli* 细胞中进行表达时产生大量的包涵体^[16]。Shao's 研究组对该基因在 *E. coli* 中表达采取了多方面的措施来解决包涵体的问题。比如采用 pET 载体, 通过低温诱导、与分子伴侣共表达和控制培养条件如培养基等都没有解决包涵体的问题^[16]。有研究表明将重组蛋白分泌到周质空间有利于获得可溶性表达, 蛋白能获得正确的折叠^[21-24]。为了解决包涵体问题, Shao's 研究组将 OmpA 蛋白的信号肽 DNA 序列插入到载体 pHsh 中, 构建了分泌型载体 pHsh-ex (GenBank 登录号 FJ715939), 如图 2 所示, 成功实现了 *T. lanuginosus* 木聚糖酶的可溶性高效表达^[25-26]。

3.2 与常规表达载体效果的比较

pET 系统是 *E. coli* 克隆和表达重组蛋白的最强大系统, 乐易林等^[25-26]将 pHsh-ex 与其进行了比较。质粒 pET-*xynA2* (含有 *pelB* 信号肽 DNA 序列)转化到 *E. coli* 中, 通过添加 IPTG 进行诱导, 无论是 37 °C 还是 20 °C 诱导培养时, 都产生大量的包涵体。在 37 °C 和 20 °C 下重组木聚糖酶

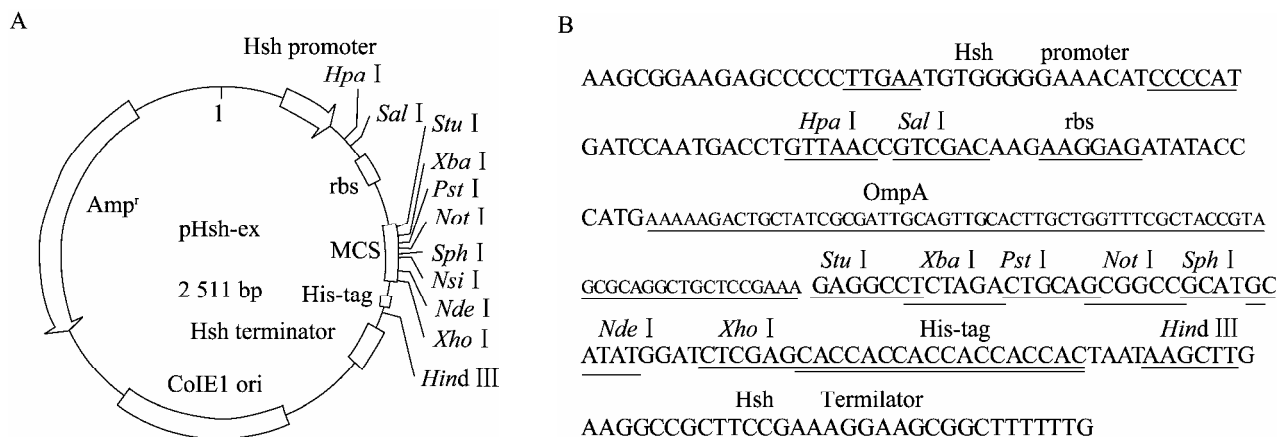


图 2 pHsh-ex 结构示意图(A)及调控区序列(B)

Fig. 2 The map of characteristic elements of the pHsh-ex expression vector (A) and the DNA sequence of Hsh promoter, terminator, MCS used in pHsh-ex (B)

的表达水平分别为 23.5 U/mL 和 35.8 U/mL。而质粒 pHsh-ex-xynA2 在 *E. coli* 中表达时并没有发现包涵体的形成, 且重组木聚糖酶的表达水平达到 220.5 U/mL^[26]。

4 热激载体的使用策略

无论用哪一种表达载体, 构建好的高效表达质粒都不宜保存在重组细胞中, 都应当从细胞中将质粒提取并纯化后保存在 TE 缓冲液中。进行诱导表达后的细胞中的质粒不可再次提取使用。

热激启动子调控基因表达的严谨性与培养温度密切相关。研究发现, 在未经过热激诱导的条件下, 转化子的培养温度越高本底表达水平越高^[5] (图 3)。因此, 在 pHsh 中进行的表达质粒的构建、目标基因的诱变、诱导前质粒的转化等操作, 重组细胞都应该在 30 °C 以下培养以避免基因过早表达, 使细胞长时间处于表达压力下生长导致基因修饰或质粒丢失。

为了保证外源基因的稳定表达, 在使用热激载体 pHsh、pHsh-ex 时要注意: (1) 温度。热激诱导前培养温度不要超过 30 °C (如果表达的基因细胞毒性较强可再适当降低培养温度), 热激诱导温度为 37 °C–42 °C; (2) 质粒。表达质粒勿长

时间保存在细胞中, 需从 30 °C 以下培养的菌中提取; (3) 时间。可加大接种量如挑取多个克隆, 减少热激诱导前培养时间或传代次数。

重组菌用 LB 培养基培养时, pHsh 载体的最佳诱导时机在 OD_{600} 为 0.7–0.8 之间, 最适诱导时间为 6–9 h^[5,7]。pHsh-ex 载体的最佳诱导时机在 OD_{600} 为 2.0–3.0 之间, 最适诱导时间为 2–3 h^[25–26]。因为载体 pHsh 是在 *E. coli* 胞内表达异源蛋白而载体 pHsh-ex 是在周质空间中表达可溶性异源蛋白。异源蛋白的分泌表达会影响 *E. coli* 的生长, 所以载体 pHsh 与载体 pHsh-ex 的诱导方式不完全相同。一般情况下, 载体 pHsh 的表达水平要高于载体 pHsh-ex。如果使用 TB 或其他高浓度培养基, 诱导表达时的最适细胞密度需要重新选择。

5 结论

Hsh 表达体系中的载体分子量较小, 易于进行分子操作, 本底表达低, 重组蛋白产量高, 细胞生长一般高于 T7 和其他表达体系的载体, 且由于通过热激诱导外源基因表达, 避免了使用 IPTG 等化学诱导剂。随之建立的大体积发酵液热激诱导新技术克服了 P_L 系统不能快速升温的弱点。分泌型热激载体 pHsh-ex 还有效地解

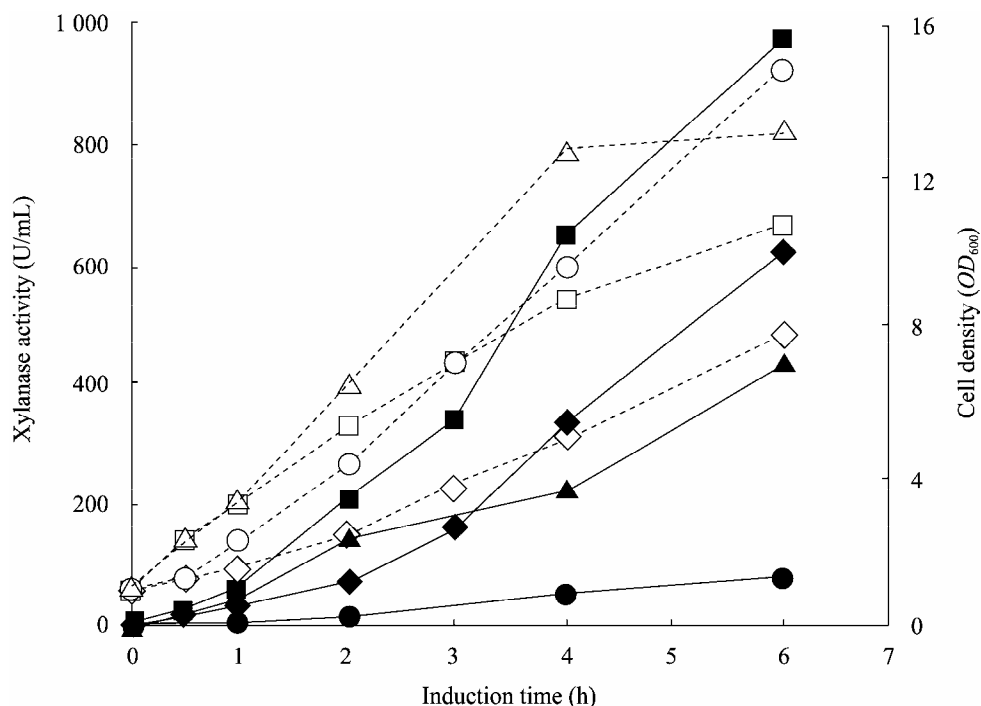


图3 不同温度下基因利用 pHsh 载体在 *E. coli* 中表达曲线

Fig. 3 The gene expression in pHsh vectors in *E. coli* grown in Terrific Broth

注: 不同温度下 *E. coli* 细胞密度和木聚糖酶活, 30 °C (-○-, -●-), 37 °C (-△-, -▲-), 42 °C (-◇-, -◆-), 30 °C 培养 42 °C 热激 (-□-, -■-).

Note: The cell density (empty) and xylanase activity (solid) in the culture of pHsh-xynIII transformed *E. coli* grown at constant temperature of 30 °C (-○-, -●-), 37 °C (-△-, -▲-), 42 °C (-◇-, -◆-), or at the temperature shifted from 30 °C to 42 °C (-□-, -■-).

决了外源基因在 *E. coli* 中表达形成包涵体的问题。总之, Hsh 表达系统不仅为解决包涵体这一问题提供了新的方法, 而且达到了低成本高产这一要求, 在工业酶的生产中具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*[J]. Poostepy Biochem, 2006, 52(4): 448-456.
- [2] Dong X, Tang B, Li J, et al. Expression and purification of intact and functional soybean (Glycine max) seed ferritin complex in *Escherichia coli*[J]. Journal Microbiology Biotechnology, 2008, 18(2): 299-307.
- [3] 戎晶晶, 刁振宇, 周国华. 大肠杆菌表达系统的研究进展[J]. 药物生物技术, 2005, 12(6): 416-420.
- [4] 任增亮, 堵国成, 陈坚, 等. 大肠杆菌高效表达重组蛋白策略[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(9): 103-109.
- [5] 吴华伟. 新型大肠杆菌表达系统 Hsh 系统的研究[D]. 南京: 南京师范大学博士学位论文, 2007.
- [6] Shao WL, Wu HW, Pei JJ. Novel expression vector system regulated by sigma32 and methods for using it to produce recombinant protein[P]: US patent, US 2007/ 0254335A1.2007-11-07.
- [7] Wu HW, Pei JJ, 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.
- [8] 吴华伟, 邵蔚蓝. 表达载体 pHsh 对大肠杆菌热休克系统中负调控机制的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(6): 79-84.

- [9] 诸葛斌, 堵国成, 沈微, 等. 利用温控载体构建碱性果胶酯裂解酶工程菌[J]. 微生物学报, 2008, 46(4): 657–659.
- [10] 乐易林, 邵蔚蓝. 极端耐热纤维素酶 Cel74 的表达、纯化与特性[J]. 生物加工过程, 2009, 7(3): 64–67.
- [11] 李平, 景庆庆, 邵蔚蓝. 海栖热袍杆菌来源的极端耐热碱性果胶裂解酶的表达、纯化及定性[J]. 生物工程学报, 2009, 25(2): 223–229.
- [12] 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.
- [13] 张晓梅, 诸葛斌, 谢涛, 等. 产 1,3-丙二醇新型重组大肠杆菌 JM109(pHsh-dhaB-yqhD)的构建及其转化甘油[J]. 化工学报, 2006, 57(12): 2920–2925.
- [14] Pei JJ, Shao WL. Purification and characterization of an extracellular α -L-arabinosidase from a novel isolate *Bacillus pumilus* ARA and its over-expression in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2008, 78(1): 115–121.
- [15] Wu HW, Pei JJ, Wu GG, et al. Over-expression of GH10 endoxylanase XynB from *T. maritima* in *E. coli* by a novel vector with potential for industrial application[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(3): 230–234.
- [16] Yin EK, Le YL, Pei JJ, 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.
- [17] Xue YM, Wu AL, Zeng HY, et al. High-level expression of an α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* for the production of xylobiose from xylan[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(5): 351–356.
- [18] Xue YM, Yu JJ, Song XF, et al. Over-expression of xylanolytic α -glucuronidase from *Thermotoga maritima* in the pHsh system of *Escherichia coli* for the production of xylobiose from xylan[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(14), 2454–2461.
- [19] 吴华伟. 海栖热袍菌极耐热纤维二糖磷酸化酶在大肠杆菌中的克隆和表达[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(11): 2640–2642.
- [20] 诸葛斌, 堵国成, 诸葛健, 等. 重组菌产碱性果胶酯裂解酶酶学性质研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(1): 121–125.
- [21] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10(5): 411–421.
- [22] Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(5): 625–635.
- [23] de Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8(1): 26.
- [24] Mergulhão FJM, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(3): 177–202.
- [25] 乐易林. 基于大肠杆菌 pHsh 系统的基因可溶性表达和定向进化新技术[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2009.
- [26] Le YL, Peng JJ, Wu HW, 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.