

pHsh 载体对外源基因在 *E. coli* 中高效表达的机制探讨

吴华伟^{1*} 邵蔚蓝²

(1. 长江大学 生命科学学院 湖北 荆州 434023)

(2. 南京师范大学 生命科学学院 江苏 南京 210097)

摘要: pHsh 是根据大肠杆菌的热休克反应构建而成的新型表达载体, 受 σ^{32} 调控。正常 *E. coli* 细胞的整个热休克反应持续时间约 12 min, 而在携带有外源基因的高拷贝 pHsh 的 *E. coli* 细胞中, 外源基因却能持续高效表达 4–10 h。为探求外源基因高效表达的机制, 以一个编码木聚糖酶的外源基因为代表, 首先研究了质粒拷贝数对木聚糖酶表达的影响, 接着通过 Western-blot 检测了携带质粒 pHsh-xynIII 和对照组携带 pLac-xynIII 的 *E. coli* 细胞在非诱导条件下(30 °C)和诱导条件下(30 °C→42 °C)胞内 σ^{32} 的差异, 最后测定了不同温度下(30 °C、37 °C、42 °C、30 °C→42 °C)携带质粒(pHsh-xynIII)的 *E. coli* 细胞内稳定状态下热休克的水平(以木聚糖酶活性表征)。研究结果表明外源基因在 pHsh 中的高效表达是与 3 个方面密切相关的: pHsh 质粒的高拷贝数增加了外源基因的剂量; pHsh 的存在使 *E. coli* 细胞内 σ^{32} 的水平较正常 *E. coli* 细胞显著增加了, 并最终增强了 *E. coli* 的热休克反应; 诱导状态下带有 pHsh 重组质粒的 *E. coli* 细胞内稳定状态下的热休克水平明显高于其它温度的水平。

关键词: 大肠杆菌, pHsh 载体, 热休克, σ^{32} , 表达

Mechanism of high level expression of foreign gene caused by pHsh vector in *Escherichia coli*

WU Hua-Wei^{1*} SHAO Wei-Lan²

(1. College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434023, China)

(2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210097, China)

Abstract: pHsh is a novel high level expression vector of *Escherichia coli*, in which the regulatory promoters are recognized by the 32-kD sigma factor (σ^{32}). In normal *E. coli* cells, the total time length of heat-shock response is about 12 min, however, in *E. coli* cells carrying recombinant high-copy pHsh

基金项目: 长江大学博士启动基金项目(No. 801100010112)

* 通讯作者: Tel: 86-716-8066257; 邮箱: wuhuawei-2000@163.com

收稿日期: 2011-01-09; 接受日期: 2011-03-22

vectors, the heat-shock response can sustain 4–10 h. In order to understand the mechanism of high level expression of foreign gene in *E. coli* carrying pHsh vector, we employed *xynIII* gene encoding a xylanase as the representative of foreign genes. Firstly, the effect of copy-number of pHsh on the expression level of *xynIII* gene was tested, then the difference of the concentration of σ^{32} between in the *E. coli* cells harboring pHsh-*xynIII* and in the *E. coli* cells harboring pLac-*xynIII* was assayed by using western-blot under either inducing (30 °C→42 °C) or non-inducing conditions (30 °C). Finally, under different temperatures, the heat-shock level at steady state in recombinant *E. coli* cells harboring pHsh-*xynIII* was evaluated by the xylanase activity. the results showed that the high expression level of foreign genes in pHsh should attribute to the following three aspects: high-copy-number of pHsh enhanced the foreign gene dosage accessible for expression and led to a high productivity; Owing to the present of the pHsh, σ^{32} level in *E. coli* cells was significantly higher than that in *E. coli* cells without pHsh, thus the heat-shock level was significantly enhanced in *E. coli* cells harboring pHsh; The considerable heat-shock level at steady state in recombinant *E. coli* cells harboring pHsh was helpful for high level expression of foreign genes.

Keywords: *Escherichia coli*, pHsh vector, Heat-shock, Sigma32, Expression

在原核基因表达中,带有不同类型可调控启动子的大肠杆菌表达系统已经被相继开发使用,其中最常用的是 *lac/tac/trc*、*p_L/p_R* 和 T7 系统,它们的启动子活性直接或间接接受 *lacI* 阻遏蛋白的控制,目的基因的表达一般用价格较昂贵的化学诱导剂来诱导^[1–3]。pHsh 是启动子完全不同于上述 3 类的高效表达载体,其独特的热激启动子是根据 *E. coli* 中热休克蛋白基因启动子的保守序列设计而成的。以前的研究表明,很多外源基因能在 pHsh 中获得比在 *lac/tac/trc*、*p_L/p_R* 和 T7 载体中更高的表达量,同时,目的基因是通过热激诱导,用它来表达那些需求量巨大的工业酶能降低成本,有很好的应用前景^[4–6]。

Hsh 热激启动子主要受 *E. coli* RNA 聚合酶的 σ 因子—— σ^{32} 的控制。在 30 °C–37 °C 时,细胞内 σ^{32} 的分子数很少,胞内对应的热休克水平很低,当温度升到 42 °C–50 °C 时,胞内 σ^{32} 水平大大增加,此时胞内热休克基因的水平大大增加,在短短的 5–12 min 内达到最高峰,这是热休克反应最典型的标志。随后 σ^{32} 的水平、活性受到热休克反应自身产物(热休克蛋白 DnaK、DnaJ、GrpE)的负调控而迅速下降,热休克基因的表达也迅速下降,直至热休克蛋白稳定在一个新的比较恒定的水平^[7–9],上述热休克反应的整个过程作为一种生理现象已经被研究的非常透彻了,但是从来都没有任何研究者尝试

利用热休克反应来构建大肠杆菌表达系统,阻碍他们这么做的主要原因可能是因为热休克反应从发生到关闭这一过程的时间太短,不足以使外源基因得到持续地表达,而笔者的尝试却获得了成功。因此,文章主要探寻导致外源基因在 pHsh 中得到持续高效表达的因素。

本文从不同角度做了一些探索性的工作,首先,把控制 pHsh 质粒高拷贝数的复制子换成了中低拷贝的复制子,考察拷贝数对外源基因在 pHsh 中的表达有何影响;其次,也是最重要的,通过 Western-Blot 比较携带有插入外源基因的 pHsh 的大肠杆菌在热激状态下胞内 σ^{32} 水平和正常的大肠杆菌在热激状态下 σ^{32} 水平的差异;最后考察了不同温度下携带有插入外源基因的 pHsh 的大肠杆菌胞内稳定状态下热休克水平(以外源基因的表达量表征)的相对多少。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和培养条件: 大肠杆菌 JM109 购自 Promega 公司,大肠杆菌 K12 (ATCC10789)购自武汉大学菌种保藏中心。带有极耐热木聚糖酶基因 *xynIII* 的重组质粒 pHsh-*xynIII* 为本实验室保存。

常规的大肠杆菌培养均在 LB 液体培养基中于

适当温度下 200 r/min 振荡通风进行, 当用于基因表达时, 诱导前在 30 °C 培养, 诱导通过热激进行, 即把培养物迅速转到 42 °C 水浴摇床中诱导基因的表达。氨苄青霉素(终浓度 100 mg/L)加入到相应的选择性培养基中。细胞的生长通过测定 OD_{600} 监测。

1.1.2 主要试剂: 抗大肠杆菌 RNA 聚合酶亚基 Sigma 32 的单克隆抗体购于美国 Neoclone 生物技术公司; 二抗为山羊抗小鼠的辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体购自于 KPL 公司; Biotrace PVDF (0.45 μ m)膜购自于美国 Millipore 生命科学公司; 脱脂奶粉为光明牌; 辣根过氧化物酶标记的抗体显色液 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 购自 Promega 公司; 预染蛋白质 Marker 购自于南京生兴生物技术有限公司。质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒、限制性内切酶、修饰酶和 DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 所用载体的构建: 以 pHsh-*xynIII* 为模板, 利用突变引物实施反向 PCR 以在 pHsh 的复制子序列区引入突变。突变引物为: 5'-GACAGTATTTGGTATCTG-3'和 5'-CTTCTAGTGTAGCCGTAG-3', 下划线的碱基就是突变的碱基。扩增条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C 210 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物回收后磷酸化, T4 DNA 连接酶自身环化后电转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 转化子提取质粒后经测序鉴定, 获得的质粒命名为 pHsh-*xynIII*-low copy。

pHsh-*xynIII* 的热激启动子通过 2 轮反向 PCR 被换成 *lac* 启动子。第 1 轮 PCR 是将 Hsh 启动子完全换成 *lac* 启动子, 所用 2 个引物分别为: 5'-GGAAA CATTATGTTGATCCAATGACCTGTTA-3'和 5'-CCC ACATGTAAACTCTTCCGCTTCCTCT-3', 扩增条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 210 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物回收后磷酸化, T4 DNA 连接酶自身环化后电转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 获得的重组质粒作为第 2 轮 PCR 的模板, 在 *lac* 启动子下游引入 *lac* 操纵基因序列。所用的 2 个引物分别为: 5'-GATAACAATTTACACAAGGA

GATATACCCATGG-3'和 5'-CGCTCACAATTCCAC ACAACATAATGTTTCCCCC-3', 扩增程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 210 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物回收后磷酸化, T4 DNA 连接酶自身环化后转化 *E. coli* JM109, 获得的质粒经测序确认后命名为 pLac-*xynIII*。

1.2.2 用于 Western-Blot 分析的样品制备: pHsh-*xynIII* 和 pLac-*xynIII* 分别转化 *E. coli* K12, 对于每一种重组细胞, 各自从平板上随机挑取 3 个转化子接种到装有 2.5 mL LB 的试管中, 放置于 30 °C 培养。经过 8 h 的培养后每支试管里培养物的细胞密度被测量, 并分别取 1 mL 收集在预冷的 1.5 mL Eppendorf 管中, 在冰上放置片刻后于 4 °C、10 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清后细胞沉淀用冰冷的 TE buffer 洗涤 1 次, 再次离心后细胞沉淀立即用一定体积(所加体积根据测得的样品的细胞密度, 使每个样品的 OD_{600} 值保持一致)的 SDS-PAGE sample buffer 重悬, 沸水中水浴 10 min 以充分裂解细胞并使蛋白质变性。裂解液在 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后取上清, 准备用于 Western-Blot 分析。

含有 pHsh-*xynIII* 或 pLac-*xynIII* 的 *E. coli* K12 分别在 LB 中于 30 °C 下过夜培养, 次日分别以 1% 的接种量接种到 100 mL 新鲜的 LB 培养基中, 混匀后这两组培养液被分别分装到 6 根试管中, 每根试管装液量为 2.5 mL。把这两组细胞放置于 30 °C 下培养并监测培养液的 OD_{600} 值, 当 OD_{600} 值达到 0.7 左右时, 装有两组细胞的试管迅速放置于 42 °C 水浴摇床中实施热激诱导。从此刻开始记时, 分别在 0 min、6 min、20 min、1 h、2 h、6 h 时从每组中取出 1 根试管, 并放置在 -70 °C 冰冻乙醇中以迅速终止细胞的生命活动。当这些样品在冰水中解冻之后, 从每根试管中取出 1 mL 培养物在 4 °C、10 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清后细胞沉淀用冰冷的 TE buffer 洗涤一次, 再次离心后细胞沉淀立即用一定体积(所加体积根据测得的样品的细胞密度, 使每个样品的 OD_{600} 值保持一致)的 SDS-PAGE sample buffer 重悬, 沸水中水浴 10 min 以充分裂解细胞并使蛋白质变性。裂解液在 4 °C、12 000 r/min

离心 10 min 后取上清准备用于 Western-Blot 分析。

1.2.3 Western-Blot 分析: 样品在 12% 的 SDS-PAGE 胶中于恒压 120 V 电泳直到预染蛋白质 Marker 处于分离胶中合适的位置, 电泳结束后裁取适当凝胶, 用北京六一电泳仪厂转印仪恒流 250 mA、1.5 h 转移到预先处理过的 PVDF 膜上, 转移后的 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭后, 以抗大肠杆菌 RNA 聚合酶亚基 σ^{32} 的单克隆抗体 (1:1 000 稀释) 为一抗, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠的 IgG (1:3 000 稀释) 为二抗, 用 TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 试剂进行显色, 条带为蓝色。

1.2.4 不同温度下 *E. coli* JM109 (pHsh-*xynIII*) 热休克水平的测定: 热休克水平以表达的外源基因 *xynIII* 木聚糖酶的活性来衡量。重组 *E. coli* JM109 (pHsh-*xynIII*) 在 TB 培养基中分别于 30 °C、37 °C、42 °C 及热激 (30 °C → 42 °C) 这 4 个不同的培养条件下培养, 不同时间取样测定培养物细胞密度和木聚糖酶活性, 木聚糖酶活性测定方法参见文献 [5]。

2 结果与分析

2.1 拷贝数对外源基因表达的影响

pHsh 载体的拷贝数为 500–700 个/细胞, 其复制子是来源于 pUC19 的 ColE1 复制子, 它最初是由 pBR322 载体的复制子衍生而来, 与 ColE1 复制子只相差 1 个碱基^[10–11], 研究将 pUC19 中的第 1 942 位碱基“A”突变成了“G”, 突变后拷贝数降低到 15–20 个。拷贝数改变前后 *xynIII* 基因表达的结果如图 1 所示, 高拷贝质粒所表达的酶最高活性为 946 U/mL, 而低拷贝质粒所表达的酶最高活性为 203 U/mL, 高拷贝大约为低拷贝的 5 倍。这说明拷贝数对 Hsh 系统的高效表达起到很重要的贡献, 这也暗示了热激启动子可能不如 T7、 p_L/p_R 等强启动子强大, 在那些拥有强启动子的表达载体里, 复制子所控制的拷贝数一般都是中低拷贝, 若换作了高拷贝复制子, 则细胞的生长完全受到抑制或者质粒变得非常不稳定。从结果看, 拷贝数发生改变后, 细胞的生长并没有因为拷贝数的增加而受到抑制。携带有低拷贝质粒的重组菌在诱导后 3 h 表达的酶活

性基本上达到高峰值, 在随后的几小时里, 酶活性增长非常缓慢, 几乎不变。但是在高拷贝的重组菌中, 从诱导开始一直到第 7 小时, 酶活性仍然在稳步地上升, 从这个现象可以推断拷贝数的变化可能导致 *E. coli* 的热休克反应时间较之正常状态下延长了。

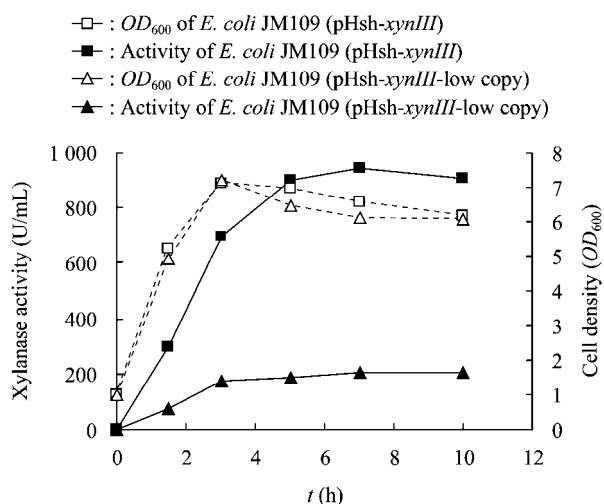


图 1 拷贝数的变化对重组 *E. coli* JM109(pHsh-*xynIII*) 表达效果的影响

Fig. 1 The effect of plasmid copy-number on the expression level of *xynIII* gene in recombinant *E. coli* JM109

2.2 pHsh 载体对不同条件下重组 *E. coli* 细胞内 σ^{32} 水平的影响

在正常情况下, *E. coli* 细胞内的热休克反应从开始到关闭期时间仅仅 20 min 左右, 而当 pHsh 存在于 *E. coli* 细胞中时, 外源基因的活性达到高峰需要 5–9 h^[6], 这暗示着带有 pHsh 的 *E. coli* 细胞中的热休克反应和正常细胞有差异。而控制热休克反应的关键因子是 σ^{32} , 因此文章想探究 pHsh 质粒的存在是否会使胞内的 σ^{32} 比正常水平要高。为了避免其它因素的干扰, 选用野生型的 *E. coli* K 12 菌株作为宿主细胞, 选择 pLac-*xynIII* 作为对照质粒转化到 *E. coli* K 12 菌株中, pHsh-*xynIII* 和 pLac-*xynIII* 的不同仅仅在于热激启动子换成了 *lac* 启动子。通过 Western-Blot, 在非诱导温度 30 °C 和热激条件下, 上述两类不同 *E. coli* K 12 细胞内 σ^{32} 的变化如图 2 所示。在非诱导条件下, 随机挑取的 3 个菌株里面,

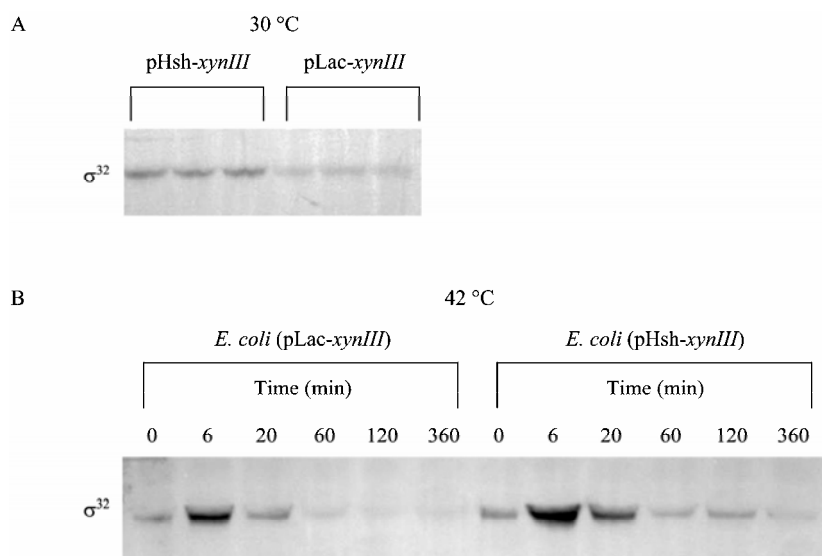


图2 Western-Blot 显示的在热激条件下和非热激条件下带有 pLac-xynIII 的 *E. coli* 细胞和带有 pHsh-xynIII 的 *E. coli* 细胞内 σ^{32} 的浓度的变化

Fig. 2 Western-Blot of σ^{32} in *E. coli* K-12 cells carrying Hsh vector or pLac vector under inducing or non-inducing conditions
 Note: A: Detection of σ^{32} in 6 transformants grown at 30 °C; B: The variation of σ^{32} concentration in the cells subjected to heat-shock induction.

带有 pHsh-xynIII 的 *E. coli* 细胞内的 σ^{32} 的浓度明显高于对照 *E. coli* 细胞内的浓度(图 2A)。图 2B 中, 在热激条件下, 两种细胞内 σ^{32} 的浓度都是在 6 min 达到最高, 1 h 后回到特定温度下的稳定水平, 这和正常的热休克反应的趋势完全相同。和笔者预料完全一致的是: 在同一时间点, 携带 pHsh-xynIII 的 *E. coli* 细胞内 σ^{32} 的浓度都明显高于携带 pLac-xynIII 的 *E. coli* 细胞内 σ^{32} 的浓度, 这至少说明在带有 pHsh-xynIII 的 *E. coli* 细胞内的热休克反应的水平更高, 持续时间很可能会更长。因此, 带有 pHsh-xynIII 的 *E. coli* 细胞拥有比普通 *E. coli* 更强或者更长的热休克反应是 Hsh 系统高效的一个重要原因。

2.3 不同温度下稳定状态的热休克水平对外源基因在 pHsh 中高效表达的贡献

在 *E. coli* 细胞内, 不论何时 σ^{32} 总是存在的, 这也表示热休克基因启动子控制下的热休克基因一直都在表达, 只是在不同的温度下 σ^{32} 存在的量、活性和稳定性有较大差别, 同一温度下热休克水平是比较恒定的, 这就是所谓的特定温度下热休克的稳定状态(Steady state)。在带有重组 pHsh 的 *E. coli*

细胞中, 同样 σ^{32} 的水平在不同温度下也一样差别很大, 所以在热激启动子控制下的外源基因在不同温度下也应该有不同的表达水平。本文用外源基因 xynIII 表达的木聚糖酶活性来表征热休克水平, 重组 *E. coli* JM109 (pHsh-xynIII) 分别在 30 °C、37 °C、42 °C 下恒温培养, 并以 30 °C 培养一定时间后继续于 42 °C 热激诱导的状态作为对照, 测定重组菌不同温度下培养表达的木聚糖酶活性。结果如图 3, 30 °C、37 °C、42 °C、诱导状态(30 °C→42 °C)时, 重组菌表达的最高酶活分别为 78、435、619 和 971 U/mL, 以 30 °C 的水平为基准, 37 °C 是它的 5.57 倍, 42 °C 是它的 7.9 倍, 诱导状态是它的 12.4 倍。随着温度的上升, 酶活所体现出来的热休克水平显著提高, 不同温度下的培养虽然不是真正意义上的热休克条件, 但是很显然热休克反应仍然维持着一定的水平, 这个水平完全取决于温度这个因素。从结果看, 即使是在 37 °C, 它所体现出来的热休克水平也达到了诱导状态下即真正意义上的热休克水平的 44.8%。当然有了热激这个过程后, 热休克的水平还是明显高于没有热激过程的, 如诱导状态是 42 °C 时的 1.57 倍。从细胞的生长情况来

看, 30 °C 和 37 °C 时生长最旺盛, 诱导状态和 42 °C 时生长依次受到抑制, 一直处于 42 °C 时受到的抑制最明显, 显然生长的抑制是受到外源基因表达的影响。总而言之, 较高温度下处于稳定状态的热休克水平也在 pHsh 质粒高水平表达外源基因方面做出了重要贡献。

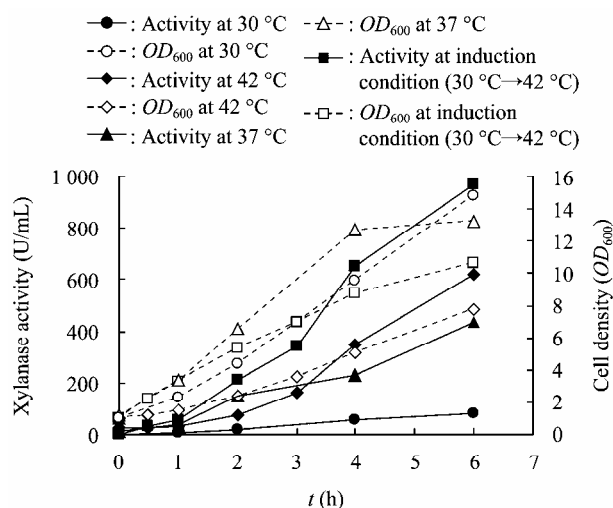


图3 不同温度下重组 *E. coli* JM109 (pHsh-*xynIII*) 的表达曲线

Fig. 3 The expression time-course of *xynIII* gene in the *E. coli* JM109 (pHsh-*xynIII*) at different temperature

3 讨论

在常用的大肠杆菌表达载体中, 绝大部分载体的复制子无非来源于 2 类: 一种是来源于 pBR322 的 ColE1 复制子和 pACYC184 的 p15A 复制子, 它们代表的每个细胞内的拷贝数分别为 15–20 个和 10–12 个。pHsh 载体使用的是经过突变后的 ColE1 复制子, 该复制子由于缺少了控制拷贝数的 *rop* 基因, 使每个细胞内的拷贝数达到了 500–700 个, 即使 Hsh 启动子不够强大, 这么高的拷贝数也足以使外源基因得到高效表达。

在 30 °C 时, 每个 *E. coli* 细胞内的 σ^{32} 分子大约有 50 个, σ^{70} 分子大约 3 000 个, 此时和 RNA 聚合酶结合的大部分都是 σ^{70} , 所以热休克基因的表达水平很低。当温度上升到 42 °C 时, 编码 σ^{32} 的基因 *rpoH* 转录出来的 mRNA 5'端形成的二级结构由于热的作用

用被打开, σ^{32} 的表达量增加到原来的 12 倍, 同时 σ^{70} 在高温下容易失活, 此时和 RNA 聚合酶结合的大部分都是 σ^{32} , 所以热休克基因的表达水平快速增加, 产生的热休克蛋白主要作为分子伴侣和蛋白酶行使功能, 其中主要的伴侣系统是 DnaK 分子伴侣, 它们帮助热失活的蛋白折叠恢复生物活性, 而与它们结合的无法恢复活性的有害蛋白质成为了热休克产生的蛋白酶(如 lon、FtsH)的底物, 将它们彻底降解。当这些受热引起的对细胞的损害解除后, 获得自由的 DnaK 分子伴侣将 σ^{32} 从 RNA 聚合酶中招募回来, 同时一些失活的 σ^{70} 也在 DnaK 分子伴侣的帮助下恢复活性重新与 RNA 聚合酶结合, 此时, 热休克反应到了所谓的关闭期, 关闭后的热休克基因的表达水平恢复到了稳定状态, 这是正常 *E. coli* 细胞内热休克反应的运转情况^[7–9]。

当正常 *E. coli* 细胞内增加了带有外源基因的 pHsh 质粒后, 上述热休克反应的正常运行受到了干扰。质粒的存在使细胞中能被 σ^{32} 识别的热激启动子大大增加, 此时和每个热激启动子结合的 σ^{32} -RNA 聚合酶分子数相应减少, 那么最后 DnaK 分子伴侣的量相应也会减少, Toshifumi Tomoyasu 等的实验已经证明了 DnaK、DnaJ 的减少又会增加 σ^{32} 的水平从而增强或延长热休克过程, 但是 DnaK 分子的量的降低在 2-D 胶上的结果并不像笔者预期的那么明显^[12]。在本文的研究中, 无论在何温度下, 携带 pHsh 的 *E. coli* 细胞内 σ^{32} 的水平会比正常 *E. coli* 细胞内的高, 这一点已经得到了证实。

前面提到的热休克反应存在着“稳定状态”, 此时 σ^{32} 的水平相对恒定。由于大多数研究者感兴趣的是热休克反应的调控过程, 并没有实验证据显示不同温度下这种稳定状态下热休克水平的差异, 笔者测定了不同温度下带有重组质粒 pHsh-*xynIII* 的 *E. coli* 细胞内表达的重组酶的活性来间接表征稳定状态下的热休克水平, 结果发现这个水平随着温度上升而增加, 并且是相当可观的, 在结果 2.3 中, 37 °C 的酶活几乎有热激状态下酶活的一半。

总之, 外源基因在 pHsh 载体中获得的高效表达应归因于以下 3 点: (1) pHsh 质粒的高拷贝数增

加了外源基因的剂量; (2) pHsh 的存在使 *E. coli* 细胞内 σ^{32} 的水平较正常 *E. coli* 细胞增加了, 并最终增强了 *E. coli* 的热休克反应; (3) 带有 pHsh 重组质粒的 *E. coli* 细胞内稳定状态下可观的热休克水平。

参 考 文 献

- [1] Makrides S. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*[J]. Microbiol Rev, 1996, 60(3): 512–538.
- [2] Olins PO, Lee SC. Recent advances in heterologous gene expression in *Escherichia coli*[J]. Curr Opin Biotechnol, 1993, 4(5): 520–525.
- [3] Hasan N, Szybalski W. Construction of *lacI*ts and *lacI*ts expression plasmid and evaluation of the thermosensitive *lac* repressor[J]. Gene, 1995, 163(1): 35–40.
- [4] Yin EK, Le YL, Pei JJ, et al. High-level expression of the xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2008, 24(2): 275–280.
- [5] Wu HW, Pei JJ, Wu GG, et al. Overexpression of GH10 endoxylanase XynB from *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial application[J]. Enzyme Microb Technol, 2008, 42(3): 230–234.
- [6] 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]. Biotechnol Lett, 2010, 32(6): 795–801.
- [7] Arsène F, Tomoyasu T, Bukau B. The heat shock response of *Escherichia coli*[J]. Int J Food Microbiol, 2000, 55(1/3): 3–9.
- [8] Straus DB, Walter WA, Gross CA. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of sigma 32[J]. Nature, 1987, 329(6137): 348–351.
- [9] Zhao K, Liu MZ, Burgess RR. The global transcriptional response of *Escherichia coli* to induced σ^{32} protein involves σ^{32} regulon activation followed by inactivation and degradation of σ^{32} *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2005, 280(18): 17758–17768.
- [10] Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors[J]. Gene, 1985, 33(1): 103–119.
- [11] Bolivar F, Rodriguez RL, Greene RP, et al. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system[J]. Gene, 1977, 2(2): 95–113.
- [12] 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.

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定详见我刊到主页(<http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>), 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请登陆我刊主页的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 请在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn。