

文章编号:1009-0002(2003)06-0494-05

研究报告

一种高效、稳定的分泌型原核表达载体的构建及应用

杨海杰, 张军, 罗文新, 李少伟, 管保全, 夏宁邵

(厦门大学 生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要: 以本室构建的原核表达载体 pTO-T7 为基础载体, PCR 合成 *ompT* 引导序列, 插入该载体多克隆位点上游, 构建了分泌型原核表达载体 pTO-OT。将 2 个外源基因克隆至 pTO-OT, 2 个重组质粒在大肠杆菌中均得以高效表达, 表达量为 25%~30%。Western 印迹分析证实了重组蛋白在大肠杆菌中表达后可被信号肽酶有效识别, 切割后的重组蛋白具有良好的免疫学活性。对重组表达菌株的连续传代实验证实了该表达载体具有良好的遗传稳定性, 显示了该原核表达载体在基因工程中的应用价值。

关键词: 原核表达载体; 高效表达; 分泌; *ompT*

中图分类号: Q78

文献标识码: A

Construction and application of an efficient, stable secretion prokaryotic expression vector

YANG Hai-jie, ZHANG Jun, LUO Wen-xin, LI Shao-wei, GUAN Bao-quan, XIA Ning-shao

(The Key Laboratory of Minister of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A secretion prokaryotic expression vector, pTO-OT, was constructed based on the high-level expression vector pTO-T7 by inserting *ompT* leader into the MCS of pTO-T7. Two foreign genes were cloned into pTO-OT and could be expressed efficiently in *E.coli*. The ratio of every recombinant protein to total bacteria proteins varied from 25% to 30%. Western blot analysis on the two recombinant proteins suggested that they could be recognized and cut by signal peptidase in *E.coli*, and the mature proteins were immunoactive. The consecutive culture of recombinant engineering strains showed pTO-OT has excellent genetic stability, which suggested pTO-OT is a practical vector in the future genetic engineering.

Key words: prokaryotic expression vector; high-level expression; secretion; *ompT*

利用大肠杆菌生产多肽类药物具有成本低、周期短且不存在病毒致癌基因污染等优点, 故大肠杆菌仍是目前基因工程中生产多肽类药物的主要工程菌之一^[1,2]。多肽类药物生产关键的一环便是选用合适的表达载体; 同时考虑到生物技术的下游工艺, 还要求表达的多肽易于纯化。其中胞外分泌是简化纯化工艺流程的重要途径之一^[3], 目前已建立了多种含原核基因引导序列的分泌型表达载体, 如含 *ompA*、*pelB*、*CBD*、*DsbA/C*、 β -半乳糖酶和碱性磷酸酶等基因的引导序列的表达载体^[4-6], 但多受到通用性、稳定性等因素的困扰, 故目前在发酵工程中实际应用的这类载体并不多^[7]。随着越来越多的多肽类药物被人们发现, 要求人们去建立新的通用性和稳定性俱佳

的原核表达载体, 以适应不同类型基因的表达, 满足发酵工程的实际需要。

OmpT 是大肠杆菌的四种主要的外膜蛋白酶之一, 其蛋白前体相对分子质量为 42 000, 在跨膜时被信号肽酶识别、剪切, 去除其氨基端的 19 个氨基酸残基, 加工成相对分子质量为 40 000 的成熟外膜蛋白酶, 被分泌至细胞外周腔, 定位于细胞膜外侧^[8,9]。由于该蛋白酶在大肠杆菌中表达量很高, 且具有分泌效应, 故可以利用其信号肽序列来构建分泌型原核表达载体。目前已有商业化的含 *ompT* 引导序列的 pET-12 系列表达载体, 但实践显示该载体在 *E.coli* 中表达不够稳定, 且由于其拷贝数低、多克隆位点少, 不便于基因克隆实际操作, 故在基因工程实际生产中应用较少。

近期我们构建了含 Ω 增强子的原核表达载体 pTO-T7^[10], 其调控序列中有一个 Ω 序列和一个 T7

收稿日期: 2003-04-29

基金项目: 国家重点科技攻关计划 (96-920-37-09)

作者简介: 杨海杰 (1972-), 博士研究生

联系作者: 夏宁邵, E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

启动子串联,由于其表达效率高,已被用于外源基因的表达^[1-3]。本研究在保留了Ω增强子的pTO-T7的基础上,在RBS后引入ompT信号肽编码序列,尝试构建了新的分泌型原核表达载体pTO-OT。并将两个不同的外源基因克隆到新载体中,对新载体的有效性、分泌效果及遗传稳定性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌JM101、ER2566株为本室保存;质粒pTO-T7、pMD18T-gp41(HIV)和pMD18T-TPN17(*Treponema pallidum*, T.P.,梅毒螺旋体)由本室构建保存。

限制性内切酶和T4 DNA连接酶购自日本TaKaRa公司;蛋白分子量标准、DNA柱式胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程公司;山羊抗人IgG-HRP、显色底物DAB均购自华美生物工程公司。

HIV及T.P.抗体阳性血清及阴性血清均由北京万泰生物药业有限公司提供。

1.2 引物设计及PCR扩增

根据文献报道,设计了3条引物用于ompT引导序列的扩增,热循环数为30,扩增按94℃20s,56℃20s,72℃15s进行。引物序列如下:

F: 5'-CATATGCGGGCGAAACTCTAGGAATAGTCTGACAACCCCTATCGC3'
R: 5'-GGATCCCGTCGACGCAAAAGAGCTGATCGCGATAGGGGTTGTCAG3'
R1: 5'-GGATCCCGTCGATGCAACAGAGCTGATCGCGATAGGGGTTGTCAG3'

1.3 目的基因在大肠杆菌中的表达

表达载体的构建按常规的分子生物学方法操作^[4]。

表达质粒转化*E.coli* ER2566,挑单菌落于LB(Kan^r)培养基中37℃过夜培养,次日按1:100扩种,菌液D_{600nm}值达1.0左右时用IPTG诱导,在28℃表达6h后收获菌体。少量菌体悬于1×SDS样品溶液,煮沸10min后12000g离心,取样进行SDS-PAGE,电泳结果用扫描仪在波长560nm处扫描分析。其余收获的菌体进行超声破碎,12000g离心10min,沉淀溶于与上清等体积的Tris-HCl中,取等量上清和沉淀溶液进行SDS-PAGE。

1.4 重组蛋白的Western印迹分析

含重组蛋白的全菌裂解液经SDS-PAGE分离后,转移到硝酸纤维膜上,封闭后按常规方法进行检测。

1.5 外周腔重组蛋白的分离

渗透压休克法:用30ml 30mmol/L的Tris-HCl(pH8.0)、1mmol/L EDTA、20%蔗糖悬浮1L LB培养的菌体,室温下温育10min;12000g 4℃离心收集菌体,30ml 5mmol/L MgSO₄悬浮菌体,冰浴缓慢摇动10min;12000g 4℃离心收集上清,即为含分泌性重组蛋白的外周腔组分。SDS-PAGE分析结果。

1.6 重组菌株的表达稳定性实验

表达质粒pTO-OT-gp41、pTO-OT-TPN17转化*E.coli* ER2566,挑单菌落于LB(Kan^r)培养基中,37℃培养10h后取样,按1:10000稀释,再培养10h,如此重复稀释培养共3次。同时取以上4次不同阶段的培养液进行稀释,涂含抗性的LB培养板,每板随机挑取25个单菌落,对这200个单菌落进行诱导表达,通过SDS-PAGE分析重组菌株的表达稳定性。

2 结果

2.1 分泌型表达载体pTO-OT的构建

以pTO-T7为基础载体,引入ompT引导序列,构建分泌型表达载体。OmpT信号肽含19个氨基酸残基,考虑到剪切识别氨基酸序列,故在信号肽C端多加了2个氨基酸残基。首先设计了一对引物F和R1,利用PCR合成63bp编码21个氨基酸残基的ompT引导序列,产物克隆到pMD18-T载体中,再用*NheI/BamHI*将ompT前导序列切下,克隆到pTO-T7中,得到新载体pTO-OT1。采用同样方法,用引物F和R得到另一新载体pTO-OT(图1)。

2.2 分泌型表达载体的初步应用

2.2.1 重组表达质粒的构建与表达 为评价这两个新载体的有效性,我们将HIV的膜蛋白gp41基因片段和梅毒螺旋体的膜蛋白TPN17基因克隆到其中。用*BamHI/EcoRI*消化pMD18-T-gp41和pMD18T-TPN17,回收*BamHI/EcoRI*双酶切目的片段,并将纯化后的片段插入*BamHI/EcoRI*消化过的表达质粒pTO-OT和pTO-OT1中,共得到4个重组表达质粒:pTO-OT-gp41(图2)、pTO-OT-TPN17和pTO-OT1-gp41、pTO-OT1-TPN17。

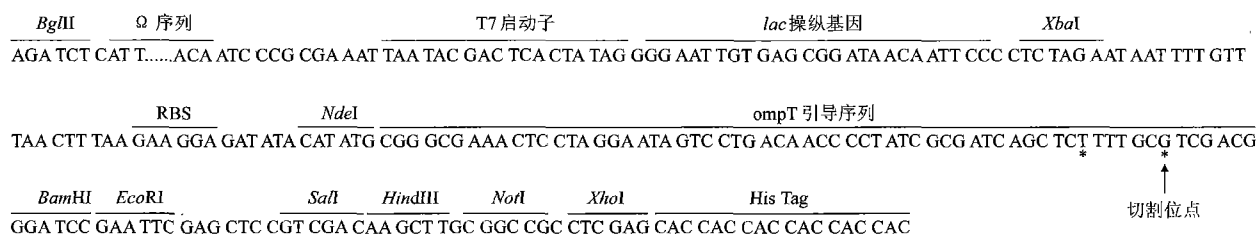


图1 pTO-OT表达载体的克隆表达区
*: pTO-OT1在此处相应的核苷酸分别为G和A

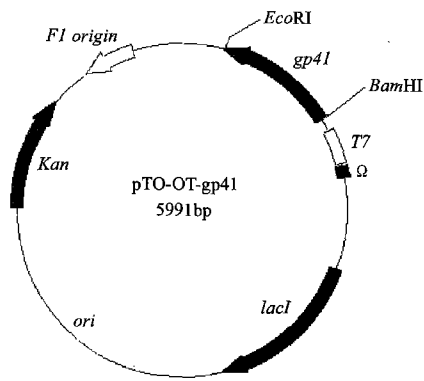


图2 pTO-OT-gp41质粒示意图

所有表达质粒转化受体菌 *E.coli* ER2566, 用 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导工程菌的表达, SDS-PAGE 分析各重组蛋白的表达情况。结果 pTO-OT1-gp41 和 pTO-OT1-TPN17 未见明显表达, 而 pTO-OT-gp41 和 pTO-OT-TPN17 目的产物 gp41 和 TPN17 的表达量分别占菌体总蛋白的 25% 和 30% (图 3)。其中明显可见 gp41 有相对分子质量分别为 18 000 和 20 000 的两种产物, 前者与非融合的 gp41 理论分子质量一致, 表明是剪切掉 OmpT 信号肽后的 gp41 产物; 而后者是带有 OmpT 信号肽的 gp41 融合产物。同样, pTO-OT-TPN17 的表达产物亦存在两种大小分别为 17 000 和 19 000 的产物。

用渗透休克法分离大肠杆菌外周腔的重组蛋白, 结果仅得到少量的分泌性 gp41 和 TPN17, 表明这两种表达的重组蛋白主要存在于胞内。对胞内目的蛋白的存在形式的分析显示, 可溶性的 gp41 和 TPN17 分别占到总目的蛋白的 30% 和 20%, 其余均为包含体重组蛋白, 其中剪切形式的目的蛋白主要为可溶性形式。该结果反映了新表达载体 pTO-OT 可以高效地表达外源蛋白, 同时又能有效地对外源蛋白进行剪切。用 His 柱对胞内可溶性重组蛋白 gp41 和 TPN17 进行纯化, 目的产物的纯度可达 90% 以上 (图 3)。

2.2.2 免疫印迹分析重组蛋白的生物学活性 用 pTO-OT 高效表达的重组蛋白 gp41 和 TPN17 (全菌裂解液) 经 12% SDS-PAGE 分离后, 电转至硝酸纤维素膜上, 进行免疫印迹分析, 结果如图 4 所示。gp41 具两条活性带, 分别位于 18 000 和 20 000 处, 前者为不含 OmpT 信号肽的胞内 gp41 蛋白, 后者则对应胞内未经过加工的 OmpT 信号肽和 gp41 的融合蛋白; 同样 TPN17 亦有大小分别为 17 000 和 19 000

的两条活性带。该结果进一步证实了用分泌型表达载体 pTO-OT 表达的外源蛋白可以获得两种形式, 且这两种形式的蛋白均有免疫学活性。

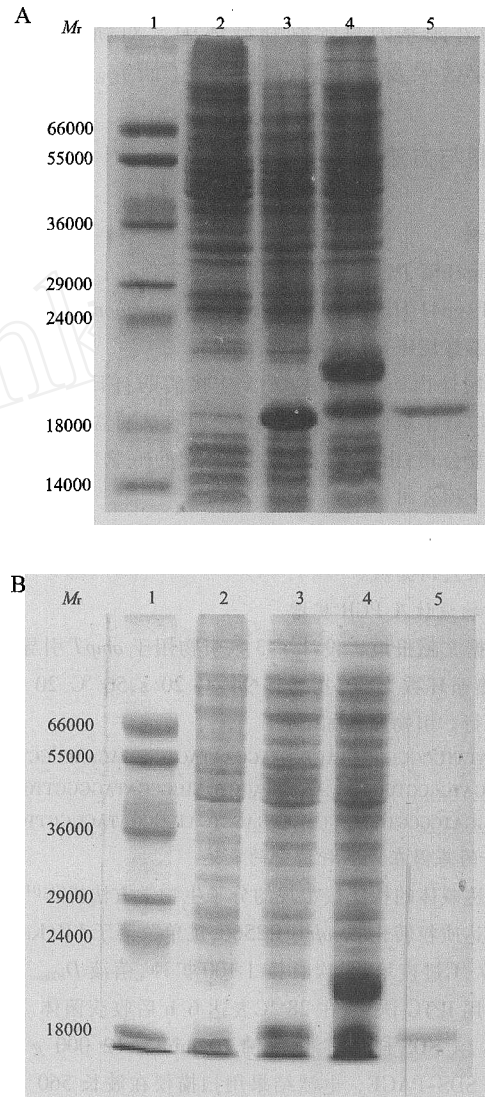


图3 SDS-PAGE 分析大肠杆菌表达 gp41(A) 和 TPN17(B) 重组蛋白
A: 1.蛋白质标准; 2.pTO-OT1-gp41; 3.对照 pTO-T7-gp41;
4.pTO-OT-gp41; 5.纯化的 gp41
B: 1.蛋白质标准; 2.pTO-OT1-TPN17; 3.对照 pTO-T7-TPN17;
4.pTO-OT-TPN17; 5.纯化的 TPN17

2.2.3 连续扩大培养过程中的质粒表达稳定性检测

对 4 批培养液涂板所得的 200 个单菌落的表达进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示所有 200 个工程菌 (含重组质粒 pTO-OT-gp41 或 pTO-OT-TPN17 各 100 株) 均可以稳定表达 gp41, 具体表现在各工程菌株的表达产量及表达的 SDS-PAGE 蛋白条带模式无明显差异 (图略)。工程菌持续培养 40 h 后重组质粒仍未出现质粒丢失现象, 提示新载体 pTO-OT 具有良好的遗传稳定性和表达稳定性。

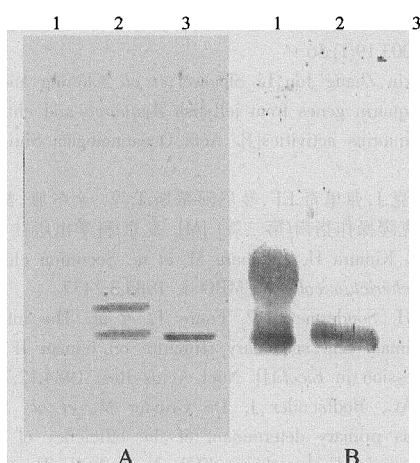


图4 重组蛋白 gp41 和 TPN17 的免疫印迹分析
A: 1.对照 pTO-OT;2.pTO-OT-gp41;3.纯化的 gp41
B: 1.pTO-OT-TPN17;2.纯化的 TPN17;3.对照 pTO-OT

3 讨论

我们构建了新型原核表达载体 pTO-OT, 并将 pTO-OT 应用于多个外源基因的表达。pTO-OT 保留了基础载体 pTO-T7 以下特点: ①调控序列中有一个 Ω 序列和一个 T7 启动子串联, 使目的基因在 *E. coli* 中得到高效、稳定的表达; ②多克隆位点(MCS)包括 7 个常用的酶切位点, 便于外源基因三种形式阅读框的插入, 并可根据不同的需要选择进行融合表达或者非融合表达; ③融合表达蛋白的 C 端可以加上 His 标签, 可采用整合凝胶亲和和层析纯化目的蛋白。

和 pTO-T7 相比, 新构建的表达载体 pTO-OT 还具有以下优点: ①pTO-OT 所表达的融合蛋白的 N 端仅含有 4 个载体来源的氨基酸残基(Ser-Thr-Gly-Ser); ②利用 OmpT 信号肽可使外源基因产物直接分泌到 *E. coli* 外周腔, 对那些在胞内表达且表达产物对细菌有毒性的外源基因来说, 利用新载体可能会减弱其毒性、提高其表达量; ③外周腔蛋白酶活性低于胞内, 将有助于利于提高重组蛋白的稳定性^[15]。

用 pTO-OT 构建的两个表达质粒 pTO-OT-gp41, pTO-OT-TPN17 在大肠杆菌中均得以高效表达, 表达产量在 25%~50%之间。目的产物存在两种大小形式, 表明信号肽可被大肠杆菌的信号肽酶有效识别。未被剪切的目的产物主要以不溶性形式存在, 提示过高的产物量影响了目的产物的正确折叠及信号肽酶的作用。对重组蛋白 gp41 和 TPN17 进行免疫印迹分析, 表明利用 pTO-OT 表达的两种形式

的重组蛋白具相应的免疫反应性, 从而进一步验证了利用 pTO-OT 表达的外源蛋白具有生物学活性。

重组菌株的表达稳定性实验证实我们构建的表达载体适用于发酵工程, 是一种具有实际应用价值的基因工程载体。两个外源基因在 pTO-OT 的表达尝试证实了该载体是一种高效、稳定的分泌型表达载体, 提示该载体可以被推广应用于基因工程。除此, 我们还将纯化的重组蛋白 HIV gp41 用于 HIV 的血清学诊断, 发现 gp41 对抗 HIV 血清产生良好的特异性和敏感性免疫反应。目前正在利用该载体对多个基因进行克隆、表达, 以进一步验证该载体的通用性。

最初我们在利用 Oligo 软件设计 *ompT* 引导序列引物的时候, 为了回避引物过高的 loop 值及 PCR 扩增时的二聚化现象, 故在保证其氨基酸编码序列不变的条件下, 对下游引物做了两个碱基的改动。利用 F 和 R1 扩增得到了 *ompT* 引导序列 1, 将该目的片段亚克隆至 pTO-T7 得到 pTO-OT1。但两个外源基因 gp41、TPN17 克隆至 pTO-OT1 后均未见明显表达, SDS-PAGE 分析时未见特异性表达条带。我们利用 GeneQuest 2.5 软件对 *ompT* 引导序列 1 和天然 *ompT* 引导序列的 mRNA 二级结构进行预测, 发现前者的二级结构总能量(-12.84 kcal/mol)高于后者的总能量(-13.99 kcal/mol)。但同核糖体结合位点(RBS)序列相连后, 前者的二级结构总能量(-14.63 kcal/mol)却低于后者的总能量(-12.75 kcal/mol)。故此, 我们推测可能是由于 pTO-OT1 中 RBS+*ompT* mRNA 的稳定结构, 对 mRNA 的翻译造成了阻碍, 从而影响了融合于其后的外源基因的表达。mRNA 二级结构可能影响 AUG 起始密码子和 RBS 在一些研究中已有报道^[16-19]。此外, 我们并不排除密码子嗜性对目的基因表达水平产生不利影响之可能性: pTO-OT1 上的 *ompT* 序列非天然的 *ompT* 序列, 对其密码子的改变亦可能影响目的产物的表达水平。以上研究表明, 表达载体 pTO-OT1 和 pTO-OT 在核苷酸水平上的细微差异可以直接影响外源基因的表达, 体现在 mRNA 翻译水平的调控上或密码子的选择上。它提醒人们在从事基因工程时, 不仅要考虑氨基酸的编码情况, 还应注意到核苷酸水平如密码子的应用、mRNA 二级结构对目的基因表达的潜在影响。

参考文献

- [1] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999,10:411

- [2] Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*[J]. *Micobiol Rev*, 1996,60:512
- [3] Blight MA, Chervaux C, Holland IB. Protein secretion pathway in *Escherichia coli*[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1994,5(5):468
- [4] Wickner W, Driessen AJM, Hartl FU. The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane [J]. *Annu Rev Biochem*, 1991,60:101
- [5] Stader JA, Silhavy TJ. Engineering *Escherichia coli* to secrete heterologous gene products[J]. *Methods Enzymol*, 1990,185:166
- [6] Morganti L, Soares CR, Affonso R, *et al.* Synthesis and characterization of recombinant, authentic human prolactin secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli*[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1998,27(P1):63
- [7] Gayda RC, Henderson GW, Markovitz A. Neuroactive drugs inhibit trypsin and outer membrane protein processing in *Escherichia coli* K-12[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76:2138
- [8] Bolla JM, Lazdunski C, Inouye M, *et al.* Export and secretion of overproduced OmpA- β -lactamase in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Lett*, 1987,224(1):213
- [9] Sandkvist M, Bagbasarian M. Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria[J]. *Curr Opin Biotechnol Rev*, 1996, 7: 505
- [10] 罗文新, 张军, 杨海杰, 等. 一种带增强子的原核表达载体的构建及初步应用[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(5):578
- [11] 李少伟, 张军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片断的聚合现象研究[J]. *生物工程学报*, 2002, 463
- [12] 罗文新, 陈敏, 程通, 等. 橙色荧光蛋白 GFPxm 的改造[J]. *生物工程学报*, 2003,19(1):56
- [13] Luo Wenxin, Zhang Jun, Li Shaowei, *et al.* Cloning and expression of aequorin genes from jellyfish *Aequorea* and characterization of aequorins activities[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2001, 21(4):574
- [14] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆操作指南(第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1992
- [15] Ghayeb J, Kimura H, Takahara M, *et al.* Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*[J]. *EMBO J*, 1984,3:2437
- [16] Tessier LH, Sondermeyer P, Faure T, *et al.* The influence of mRNA primary and secondary structure on human IFN- γ gene expression in *E.coli*[J]. *Nucl Acids Res*, 1984,12:7663
- [17] Looman AC, Bodlaender J, De Gruyter M, *et al.* Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in *Escherichia coli*[J]. *Nucl Acids Res*, 1986,14: 5481
- [18] Lee N, Zhang SQ, Cozzitorto J, *et al.* Modification of mRNA secondary structure and alteration of the expression of human interferon alpha 1 in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1987,58(1):77
- [19] Preibisch G, Ishihara H, Tripiet D, *et al.* Unexpected translation initiation within the coding region of eukaryotic genes expressed in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1988,72:179

(上接第 488 页)

- [10] Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, *et al.* A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2000,408(6815):982
- [8] Frenkel D, Dewachter I, Van Leuven F, *et al.* Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease by EFRH-phage immunization[J]. *Vaccine*, 2003,21(11-12):1060
- [9] McLaurin J, Cecal R, Kierstead ME, *et al.* Therapeutically effective antibodies against amyloid- β peptide target amyloid- β residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis [J]. *Nature Medicine*, 2002,8:1263
- [10] Trojanowski JQ. Emerging Alzheimer's disease therapies: focusing on the future[J]. *Neurobiology Aging*, 2002,23:985
- [11] Bruce-Keller AJ, Estus S. Concern over the amyloid vaccine: amyloid heterogeneity and Fc receptor signaling [J]. *Neurobiol Aging*, 2002,23(5):667
- [12] Lemere CA, Spooner ET, Leverone JF, *et al.* Intranasal immunotherapy for the treatment of Alzheimer's disease: *Escherichia coli* LT and LT(R192G) as mucosal adjuvants[J]. *Neurobiol Aging*, 2002,23(6):991
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [14] Wood SJ, Wetzel R, Martin JD, *et al.* Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide β /A4[J]. *Biochemistry*, 1995,34:724
- [15] Lemere CA, Maron R, Selkoe DJ, *et al.* Nasal vaccination with beta-amyloid peptide for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *DNA Cell Biol*, 2001,20:705
- [16] Wilcock DM, Gordon MN, Ugen KE, *et al.* Number of A β inoculations in APP+PS1 transgenic mice influences antibody titers, microglial activation, and congophilic plaque levels [J]. *DNA Cell Biol*, 2001,20(11):731
- [17] Spooner ET, Desai RV, Mori C, *et al.* The generation and characterization of potentially therapeutic A β antibodies in mice: differences according to strain and immunization protocol [J]. *Vaccine*, 2002,21:290
- [18] Abe K, Saito H. Amyloid beta neurotoxicity not mediated by the mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat hippocampal and cortical neurons[J]. *Neuroscience Letters*, 2000, 292:1
- [19] Robinson SR, Bishop GM, Munch G. Alzheimer vaccine: amyloid-beta on trial[J]. *Bioessays*, 2003,25(3):283
- [20] Nicoll JAR, Wilkinson D, Holmes C, *et al.* Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report[EB/OL]. *Nature Medicine Advanced Online Publication*, 2003-03-17