

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, 福建 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, 表达产量在 25%~34% 之间. Western blot 分析证实了融合蛋白可被大肠杆菌信号肽酶有效地切割, 并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表达稳定性, 显示了其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: Q 75

文献标识码: A

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, 故大肠杆菌是目前基因工程中多肽类药物生产的主要工程菌之一^[1, 2]. 多肽类药物生产关键的一环是选用合适的表达载体; 同时考虑到生物技术下游工艺, 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的一种重要途径^[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 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此类载体并不多^[7]. 这就要求人们去构建更多的通用性、稳定性具佳的表达载体, 以满足不同类型基因的表达.

OmpT 是大肠杆菌的 4 种主要的外膜蛋白酶之一, 其蛋白质前体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, 加工成成熟的外膜蛋白酶, 被分泌至外周腔^[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, 但基因工程的实践显示该载体在 *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 启动子串联, 由于其表达效率高, 已被用于外源基因的表达^[11~13]. 本研究在 pTO-T7 的基础上, 保留了 Ω 增强子, 在 RBS 后引入 ompT 引导序列, 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至新载体中, 对新载体的有效性、分泌效果及表达稳定性进行了研究.

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

受体菌 JM101、ER2566 株为本室保存, 质粒 pTO-T7、pMD 18-T-gp41 (HIV) 和 pMD 18-T-TPN17 (*Treponema pallidum*, T. P.) 由本室构建保存.

1.2 工具酶及生化试剂

限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶购自日

收稿日期: 2003-04-25

基金项目: 国家重点科技(攻关)计划(96-920-37-09)

资助

作者简介: 杨海杰(1972—), 男, 博士.

* Corresponding author: 夏宁邵, 男, 研究员.

E-mail: nsxia@jingxian. xmu. edu. cn.

本 TAKARA 公司,蛋白分子量标准、DNA 柱式胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;山羊抗人 IgG-HRP、显色底物 DAB 均购自华美生物工程公司。

1.3 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℃ 20 s, 56℃ 20 s, 72℃ 15 s 进行。引物序列如下:

F: 5' CATATGCGGGCGAACTCCTAGGAAT
AGTCCTGACAACCCCTATCGC 3'

R: 5' GGATCCCGTCGACGCAAAAGAGCTGAT
CGCGATAGGGGTTGTCAG 3'

R1: 5' GGATCCCGTCGATGCAAAACGAGCTGA
TCGCGATAGGGGTTGTCAG 3'

1.4 血清标本

HIV 及 T. P. (梅毒螺旋体) 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。

1.5 表达载体的构建

按常规的分子生物学方法操作^[14]。

1.6 目的基因在大肠杆菌中的表达

重组质粒转化 *E. coli* ER2566 菌株,挑单菌落于 LB(含 Kan) 培养基中, 37℃ 过夜培养,次日按 1:100 扩种,菌液 OD₆₀₀ 值达 1.0 左右时用 IPTG 诱导,在 28℃ 表达 6 h 后收获菌体。少量菌体悬于 1×SDS 样品溶液,煮沸 10 min 后 12 000 g 离心,取样进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结果用英国 UVI 公司的凝胶成像仪扫描,目的蛋白占全菌蛋白的百分比用 UViband 软件进行分析。其余菌体进行超声破碎,12 000 g 离心 10 min,沉淀溶于与上清液等体积的 Tris-HCl 中,取等量上清液和沉淀溶液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.7 融合蛋白的 Western blot 分析

含融合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。

1.8 外周腔融合蛋白的分离

渗透休克法:用 30 mL 30 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、1 mmol/L EDTA、20% 蔗糖悬浮 1 L LB 培养的菌体,室温下温育 10 min; 12 000 g 4℃ 离心收集菌体,30 mL 5 mmol/L MgSO₄ 悬浮菌体,冰浴缓慢摇动 10 min; 12 000 g 4℃ 离心收集上清液,即为含分泌性融合蛋白的外周腔组分。SDS-PAGE 电泳分析结果。

1.9 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 菌株,挑单菌落于 LB(含 Kan) 培养基中,37℃ 培养 10 h 后取样,按 1:10 000 比例稀释进行再培养 10 h,如此重复稀释培养共 3 次。同时取以上 4 次不同时段的培养液进行稀释,涂含抗性药物(Kan)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 电泳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,考虑到剪切识别氨基酸序列,故在信号肽 C 端多加了 2 个氨基酸序列。首先设计了一对引物 F 和 R1,利用 PCR 合成 63bp 编码 21 个氨基酸的 ompT 引导序列,产物克隆到 pMD 18-T 载体中,再用 *Nhe*I/*Bam*H I 将 ompT leader 切下,克隆到 pTO-T7 中,得到新载体 pTO-OT1(图略)。采用同样方法,用引物 F 和 R,最终得另一新载体 pTO-OT(图 1)。

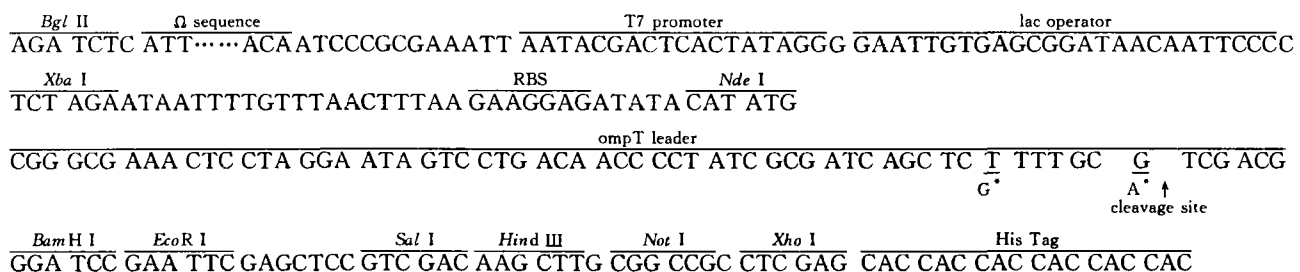


图 1 pTO-OT 表达载体的克隆表达区

*: pTO-OT1 此处相应的核苷酸分别为 G 和 A

Fig. 1 Cloning and expression region of vector pTO-OT

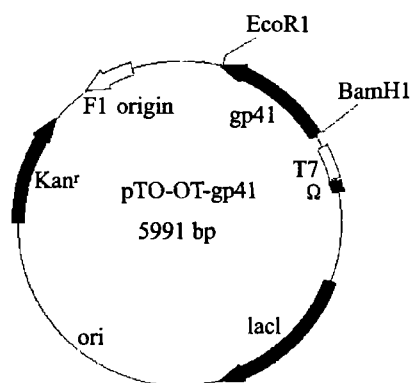


图 2 pTO-OT-gp41 质粒图

Fig. 2 The schematic diagram of plasmid pTO-OT-gp41

2.2 分泌型表达载体的初步应用

1) 重组质粒的构建与表达

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 BamH I/EcoR I 消化 pMD 18-T-gp41 和 pMD 18-T-TPN17,回收 BamH I/EcoR I 双酶切后的目的片段,并将纯化后的片段插入 BamH I/EcoR I 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)、TPN17 和 pTO-OT1-gp41、TPN17.

所有表达质粒转化 *E. coli* ER2566,用 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导工程菌的表达,SDS-PAGE 分析各融合蛋白的表达情况.结果 pTO-OT1-gp41 和 pTO-OT1-TPN17 未见明显表达,而 pTO-OT-gp41 和 pTO-OT-TPN17 得以高效表达(图 3).凝胶扫描后经 UViband 软件分析可知,目的产物 gp41 和 TPN17 表达产量分别占菌体总蛋白的 25%和 34%.其中可见 gp41 有两种不同大小的产物,即分子量为 18 kD 和 20 kD 的两种产物,前者与非融合的 gp41 分子量理论一致,表明是剪切掉 OmpT 信号肽后的 gp41 产物,后者则是带有 OmpT 信号肽的 gp41 融合产物.同样 pTO-OT-TPN17 的目的产物亦存在 17 kD 和 19 kD 的两种大小形式.

用渗透休克法分离大肠杆菌外周腔蛋白,结果仅得到少量的分泌性 gp41 和 TPN17,表明这两种表达的融合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 28%和 20%,其余均为包含体融合蛋白,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,同时又能对外源蛋白进行有效地剪切.用 His 柱对胞内可溶性融合蛋白 gp41 和 TPN17 进行纯化,目的产物纯度可达 90%以上

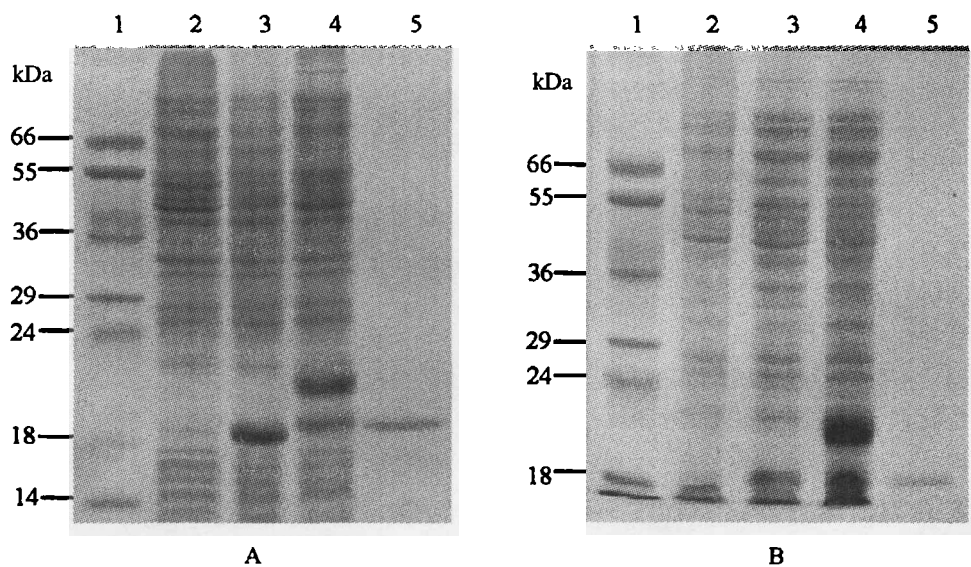


图 3 SDS-PAGE 分析大肠杆菌表达 gp41 和 TPN17 融合蛋白

A): 1. Molecular marker; 2. pTO-OT1-gp41; 3. pTO-T7-gp41 as a control; 4. pTO-OT-gp41; 5. purified gp41.
B): 1. Molecular marker; 2. pTO-OT1-TPN17; 3. pTO-T7-TPN17 as a control; 4. pTO-OT-TPN17; 5. purified TPN17

Fig. 3 Expression of the fused gp41 and TPN17 from pTO-OT-gp41 和 pTO-OT-TPN17 (12% SDS-PAGE)

(图 3)。

2) Western blot 分析融合蛋白的生物学活性

对用 pTO-OT 高效表达的融合蛋白 gp41 和 TPN17(全菌裂解液)经 12% SDS-PAGE 分离后,电转至硝酸纤维膜上,进行免疫印迹分析,结果如图 4 所示。和对照相比, gp41 具两条活性带,分别位于 18 kD 和 20 kD 处,18 kD 为不含 OmpT 信号肽的胞内 gp41 蛋白,而 20 kD 处的条带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 亦在 17 kD 和 19 kD 出现两条活性带。该结果进一步证实了用分泌型表达载体 pTO-OT 表达外源蛋白,可以获得两种形式的蛋白,且这两种形式的蛋白均有免疫学活性。

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 个重组菌(含重组质粒 pTO-OT-gp41 或 pTO-OT-TPN17 各 100 株)均可以稳定表达 gp41 或 TPN17(表 1)。工程菌持续培养 40 h 后仍未出现质粒丢失现象,提示新载体 pTO-OT 具有良好的表达稳定性和遗传稳定性。

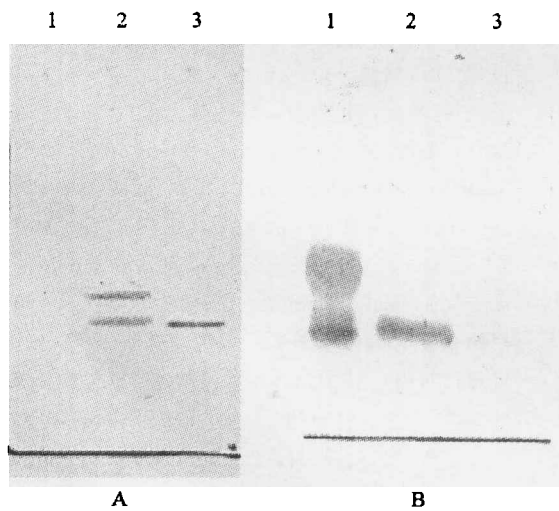


图 4 融合蛋白 gp41 和 TPN17 的 Western blot 分析

A): 1. pTO-OT as a control; 2. pTO-OT-gp41; 3. purified gp41

B): 1. pTO-OT-TPN17; 2. purified TPN17; 3. pTO-OT as a control

Fig. 4 Western blot of recombinant proteins gp41 and TPN17 expressed in ER2566/ pTO-OT

表 1 连续扩大培养的重组菌表达稳定性分析

Tab. 1 Expression stability of consecutive culture of recombinant strains

重组菌	稳定表达菌株数与总菌株数之比 * (%)			
	batch 1	batch 2	batch 3	batch 4
gp41	100	100	100	100
TPN17	100	100	100	100

* 每种重组菌每批(连续 4 批)挑取 25 个单菌落进行诱导表达,并进行 SDS-PAGE 分析,产物分子量大小正确、产量和阳性对照相比无明显变化者视为稳定表达菌株

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 个常用酶切位点,便于外源基因 3 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,可采用金属螯合亲和层析纯化目的蛋白。

和 pTO-T7 相比,新载体 pTO-OT 具有以下优点:1) pTO-OT 所表达的融合蛋白的 N 端仅含有载体来源的 4 个氨基酸残基(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,将有助于提高融合蛋白的稳定性^[15]。

用 pTO-OT 构建的两个表达质粒 pTO-OT-gp41、TPN17 在大肠杆菌中均得以高效表达,表达产量在 25%~34%之间。目的产物分子量存在两种大小形式,表明信号肽可被大肠杆菌的信号肽酶有效地识别。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。对融合蛋白 gp41 和 TPN17 进行的 Western blot 分析,证实了利用新载体 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表明了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,还将纯化的融合蛋白 HIV gp41 用于 HIV 的血清学诊断,发现 gp41 对抗 HIV 血清可产生良好的特异性和敏感性免疫反应。目前我们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。

最初利用 Oligo 软件设计 ompT 引导序列引物时,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前提下,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 leader 1,将该片段克隆至 pTO-T7 得到 pTO-OT1。但两个外源基因 gp41、TPN17 克隆至 pTO-OT1 后却未见明显表达。于是我们利用 GeneQuest 2.5 软件对 ompT leader 1 和天然 ompT 引导序列的 mRNA 二级结构进行分析,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,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,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*, 1999,10:411-421.
- [2] Makrides S C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli* [J]. *Micobiol Rev*, 1996,60:512-538.
- [3] Blight M A, Chervaux C, Holland I B. Protein secretion pathway in *Escherichia coli*[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1994,5(5):468-474.
- [4] Wickner W,Driessen A J M, Hartl F U. The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane[J]. *Annu Rev Biochem*, 1991,60:101-124.
- [5] Stader J A, Silhavy T J. Engineering *Escherichia coli* to secrete heterologous gene products [J]. *Methods Enzymol*, 1990,185:166-187.
- [6] Morganti L, Soares C R, 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(Pt1):63-70.
- [7] Gayda R C, Henderson G W, Markovitz A. Neuroactive drugs inhibit trypsin and outer membrane protein processing in *Escherichia coli* K-12 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979,76:2138-2142.
- [8] Bolla J M, Lazdunski C, Inouye M, et al. Export and secretion of overproduced OmpA-beta-lactamase in *Escherichia coli*[J]. *FEBS Lett*, 1987,224(1):213-218.
- [9] Sandkvist M, Bagbasarian M. Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria [J]. *Curr Opin Biotechnol*, rev. 1996,7:505-511.
- [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):578-581.
- [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*,2002,18(4):463-467.
- [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):56-62.
- [13] Luo Wenxin, Zhang Jun, Li Shaowei, et al. Cloning and expression of aequorin genes from jellyfish *Aequorea* and characterization of aequorin activities[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2001,21(4):574-556.
- [14] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T,等.分子克隆操作指南(第二版)[M].金冬雁,黎孟枫,等译.北京:科学出版社,1992.
- [15] Gh-rayeb J, Kimura H, Takahara M, et al. Secretion cloning vectors in *Escherichia coli* [J]. *EMBO J*, 1984,3:2437-2442.
- [16] Tessier L H, Sondermeyer P, Faure T, et al. The influence of mRNA primary and secondary structure on human IFN-gamma gene expression in *E. coli*[J]. *Nucl Acids Res*, 1984,12:7663-7675.
- [17] Looman A C, 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*, 1986,14:5481-5497.

- [18] Lee N, Zhang S Q, 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):77-86.
- [19] Preibisch G, Ishihara H, Tripier D, et al. Unexpected translation initiation within the coding region of eukaryotic genes expressed in *Escherichia coli* [J]. *Gene*, 1988,72:179-186.

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 Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A prokaryotic secretion expression vector, pTO-OT, was constructed based on expression vector pTO-T7 by inserting ompT leader sequence into the MCS of pTO-T7. Two foreign genes were cloned into pTO-OT and could be expressed efficiently in *E. coli*. Ratios of each recombinant protein to total bacteria proteins varied from 25% to 34%. Western blot analysis on the two recombinant proteins suggested that they could be 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 expression stability, which suggested pTO-OT was a practical vector for genetic engineering.

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