

大肠杆菌 α -溶血素分泌途径研究进展*

宿玲恰^{1,2}, 陈晟^{1,2}, 吴敬^{1,2*}

江南大学,¹ 食品科学与技术国家重点实验室,² 生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要: 随着生物技术的不断发展, 大肠杆菌胞外分泌分子机理日渐明晰, 大肠杆菌表达系统成为实现规模化制备胞外重组蛋白的途径之一。本文综述了大肠杆菌 α -溶血素分泌途径的转运机制及应用前景。

关键词: 大肠杆菌, α -溶血素分泌途径, 基质表达, 重组蛋白

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 10-1011-07

在制备重组蛋白的众多表达系统中, 大肠杆菌表达系统凭借培养条件简单、生长周期短、表达效率高、优势被认为是目前实现规模化制备重组蛋白的有效表达系统之一^[1]。根据两层细胞膜结构, 采用大肠杆菌表达系统表达外源蛋白有 3 种定位形式: 胞内表达、周质表达以及胞外基质表达。与胞内及周质空间定位相比, 重组蛋白分泌至胞外基质中, 不仅有助于蛋白的折叠, 降低包涵体的形成几率, 而且由于大量表达的重组蛋白完全脱离微生物菌体, 故不会对菌体生长产生负面影响。更重要的是, 基质分泌免除了通过菌体破碎 (或周质释放) 来回收目的蛋白步骤, 大大减少了宿主菌杂蛋白污染, 简化了下游纯化过程, 提高了蛋白纯化效率。因此, 基质表达在规模化生物产品生产中具有重要的作用^[2-3]。

生理条件下, 大肠杆菌共有 I–V 型 5 种分泌蛋白的方式。目前绝大多数重组蛋白的分泌表达即采用大肠杆菌绝大部分自身蛋白跨膜转运时所采纳的由 SecB 介导的 II 型分泌途径。II 型分泌过程为“两步过渡式”, 先介导蛋白跨内膜于周质, 然后再

跨外膜实现胞外基质分泌, 它是一个涉及到蛋白胞内转运、跨内膜、周质折叠以及跨外膜等相对独立但又相互制约的复杂过程^[4], 而且更重要的是, 重组蛋白常常部分定位在周质空间, 部分定位于胞外^[5-7], 影响了基质分泌表达的水平, 在重组蛋白的规模化应用方面仍有相当的局限性。与 II 型途径不同, I 型分泌途径为“一步介导式”分泌, 胞内合成后的前体目的蛋白将通过一个横跨内外膜的通道, 直接穿越周质空间, 分泌到胞外基质中^[8], 本文就目前革兰氏阴性菌中研究最广泛的 I 型分泌途径——大肠杆菌 α -溶血素分泌途径的胞外转运机制、在重组蛋白分泌表达中的应用及其效能强化等方面的研究进展做简要综述。

1 α -溶血素简介

α -溶血素 (α -hemolysin, HlyA) 是一种存在于能引起人泌尿道感染的大肠杆菌 (uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC) 中的脂质修饰的蛋白质, 其

基金项目: 国家自然科学基金 (31100048); 江苏省科技支撑项目 (BE2012018, BE2012019); 江苏省高校研究生研究创新计划

* 通信作者。Tel/Fax: +86-510-85327802; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

作者简介: 宿玲恰 (1987–), 女, 河北石家庄人, 博士研究生, 主要从事重组蛋白分泌表达的研究。E-mail: sulingqia@126.com

收稿日期: 2013-03-03; **修回日期:** 2013-06-05

在细胞质内合成后,以酰基载体蛋白 ACP 为脂肪酸供体,在酰基转移酶 HlyC 的催化下,在 2 个赖氨酸(K564 和 K690)处进行酰基化,使之被激活成为成熟形式^[9]。成熟的 α -溶血素可整合进入宿主细胞膜,使细胞内容物释放。研究表明, α -溶血素对于大部分哺乳动物细胞(如红细胞、粒细胞等)都具有溶细胞活性和细胞毒性^[10-12]。

2 α -溶血素分泌途径的胞外转运机制

2.1 α -溶血素分泌途径的组成元件

将 α -溶血素转运至胞外的途径俗称 α -溶血素分泌途径,属于革兰氏阴性菌的 I 型分泌途径^[8]。大肠杆菌 α -溶血素分泌途径涉及 3 个组分:HlyB、HlyD、TolC。HlyB 属于 ATP 结合蛋白(ATP-binding cassette, ABC)家族,位于大肠杆菌细胞膜内膜上,为该途径特异性组成成分,它含有 2 个重要的结构:① N 末端的由 6 个 α -螺旋跨膜片段组成的跨膜区(transmembrane domain, TMD),该结构与蛋白识别有关^[13-14];② C 末端的核苷酸结合域(nucleotide binding domain, NBD),转运时,与 ATP 水解相偶联^[15-16]。HlyD 属于膜融合蛋白(membrane fusion protein, MFP),也是该途径特异性通道蛋白,含有两个重要的区域:区域 A 和区域 B。区域 A 处于 HlyD 的 C 末端,由 33 个氨基酸组成 1 个螺旋-环-螺旋的结构。研究表明,Leu475、Glu477 和 Arg478 对于

HlyD 的功能有着至关重要的作用,其中最后 1 个精氨酸(Arg478)可能与 α -溶血素的释放有关;对于区域 B,位置为 127 到 170 位氨基酸残基,与外膜蛋白 TolC 高度同源,转运时,与 TolC 结合形成转运通道^[17-18]。TolC 属于多系统通用外膜蛋白(outer membrane protein, OMP),以三聚体的形式,通过 β -桶(β -barrel)结合于外膜上,在周质空间的部分组成了长为 10 nm、直径为 3.5 nm 的 α -螺旋形的管状^[19]。除 α -溶血素之外,TolC 还参与抗菌素、重金属离子、有机溶剂等小分子物质的转运^[20]。

2.2 α -溶血素分泌途径的信号肽

与 II 型分泌途径不同, α -溶血素分泌途径中的信号肽(HlyAs)位于 α -溶血素的 C 端,由 60 个左右的氨基酸残基组成。通过定点突变、圆二色谱、核磁共振等技术研究表明,信号肽中含有一段保守序列,组成螺旋-接头-螺旋的二级结构,其中两亲的螺旋和接头结构在信号肽的识别中具有至关重要的作用,而第 2 个螺旋结构对转运过程没有明显的作用^[21-22]。转运过程结束后,信号肽不会被切除^[23]。

2.3 α -溶血素分泌途径介导蛋白胞外分泌的过程

HlyB 和 HlyD 一般以稳定的内膜复合物形式存在,当 α -溶血素 C 末端信号肽与 HlyB-D 复合物结合后,可诱导 HlyD 三聚体与 TolC 接触,形成桶状复合物,HlyD 的螺旋卷曲结构与 TolC 作用,使 TolC 在周质空间末端的螺旋卷曲结构松开,从而打开连接

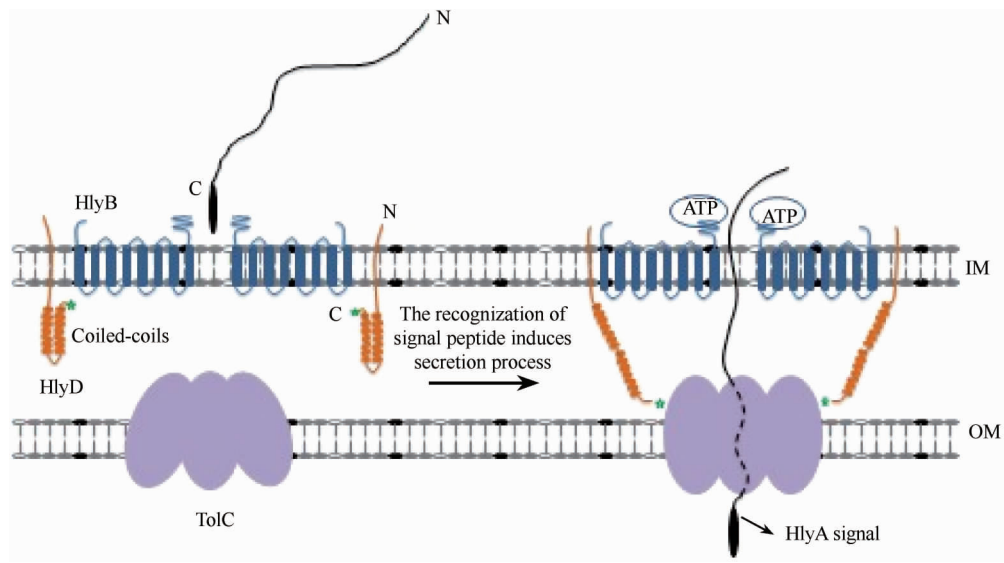


图 1. α -溶血素分泌途径介导的胞外蛋白分泌过程^[8]
Figure 1. Protein secretion process via α -hemolysin secretion pathway^[8].

内外膜的跨膜转运通道,目的蛋白自 C-末端开始穿过通道从 HlyB-D 转移到 TolC,进而分泌至胞外。当 α -溶血素分泌至胞外后,转运蛋白即恢复到原始状态(图 1)^[4, 8]。在转运过程中,除 HlyB 中的核苷酸结合域水解 ATP 供能以外,质子推动力(proton motive force, PMF)也可以提供部分能耗,并且在转运起始阶段起着关键性的协助作用。研究表明,其他外源蛋白在 C 末端融合 α -溶血素的信号肽(HlyAs)时也可以通过该途径实现胞外分泌表达^[8]。

2.4 α -溶血素分泌途径转运蛋白后的折叠过程

在蛋白折叠方面,过去几十年也取得了一定的进展。研究发现,在转运过程中,目的蛋白是以未折叠的形式转运的^[25],之后目的蛋白的折叠可能由其 C 末端区域诱发或者细胞表面的脂多糖可能提供了一个有利于蛋白折叠的环境^[26]。在对溶血素的相关研究中,发现膜融合蛋白 HlyD 的完整性直接或间接地影响了转运过程中或之后 HlyA 的折叠^[27]。此外,此过程虽然不经历周质空间步骤,同样可以实现含有二硫键蛋白的胞外分泌表达,研究资料显示分泌蛋白中的二硫键可能是在转运通道或胞外形成的,与二硫键(disulfide bond, Dsb)形成伴侣家族无关^[28]。然而,迄今为止,还没有关于二硫键形成及蛋白折叠具体过程的报道。

3 采用 α -溶血素分泌途径进行重组蛋白的胞外分泌表达

随着对 α -溶血素分泌途径研究的不断深入,人们发现其在分泌外源蛋白方面的优势越显突出:①分泌方式为“一步跨两膜”,没有周质空间的积累;②可分泌的蛋白分子量范围很广(50 - 4000 氨基酸)^[4, 8];③具有基质分泌的传统优势。因此,20 世纪 90 年代起,国内外学者已开始尝试利用该途径进行重组蛋白的分泌表达。

然而,由于对 α -溶血素分泌途径目前只发现存在于能引起人泌尿道感染的大肠杆菌中,而且目的蛋白被 α -溶血素分泌途径通道蛋白识别及转运需要其 C 末端具有该途径特征性信号肽,因此人们在采用该途径分泌外源蛋白时,需要共表达特异性转运蛋白 HlyB 和 HlyD,目标蛋白的 C 末端需要融合 α -溶血素的信号序列。

3.1 医学方面

关于 α -溶血素途径分泌重组蛋白目前主要集中在免疫学和疫苗中的应用,其中,最重要的是用于呈递活体细菌疫苗中的异源抗原^[29-33]。已有研究表明,减毒的活体细菌疫苗是异源抗原良好的载体,相比其他分泌途径, α -溶血素分泌途径对异源抗原大小没有限制,可将其从胞内直接分泌至胞外,刺激宿主的免疫系统产生免疫效应,从而克服了靠细胞裂解发挥作用的局限性^[8]。例如:1996 年, Gentshev I 等将李斯特菌素基因在减毒沙门氏菌中进行了分泌表达,在小鼠中取得了有效的保护性免疫效果^[31];2005 年,他们又将 HlyA 操纵子连接至载体 pMOhly,再与 C-raf 家族中丝氨酸-苏氨酸激酶基因连接,转化至减毒沙门氏宿主菌中,胞外蛋白表达量达到 2 - 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在含肿瘤的野生型小鼠体内产生了特异性的 C-Raf 抗体和 T 细胞反应,更重要的是,此疫苗可以减弱肿瘤的增长^[32]。

3.2 酶制剂方面

相对于免疫学方面的应用, α -溶血素分泌途径在酶制剂表达方面的研究相对较少。工业酶通过大肠杆菌 I 型途径分泌必须以非致病性大肠杆菌作为宿主菌,目前这些研究中的目标蛋白多为蛋白酶和酯键水解酶类^[13, 34-36]。例如,2009 年, Narayanan N 等成功地采用 α -溶血素途径将南极假丝酵母脂肪酶 B 进行了胞外可溶性表达,解决了胞内和周质表达存在的错误折叠、不稳定等问题,且得到了比采用大肠杆菌其它分泌系统更好的胞外表达效果,同时对细胞生理未产生明显的影响^[35]。本研究团队在前期工作中成功地采用 α -溶血素途径进行了角质酶的高效分泌型表达,其胞外产酶量达到了 II 型途径分泌量的 2.5 倍^[37]。这些成功的事例预示着大肠杆菌 I 型分泌途径在工业酶研制中的应用范围将可能进一步拓宽。

需要指出的是,由于信号序列在转运结束后不切除,因此需要考虑信号肽是否会对蛋白的生物活性产生不利影响。若无影响可不切除,否则可通过以下 2 种方式切除信号肽获取天然成熟蛋白:1,在目标蛋白和信号肽之间插入外膜蛋白酶(outer membrane protein T, ompT)特异性切割位点,在蛋白跨越外膜时将信号肽切除;2,在目标蛋白和信号肽之间插入具有位点特异性的蛋白酶(如烟草蚀纹病毒蛋白酶)识别序列,在蛋白分泌后采用特定的蛋

白酶将信号肽切除。

4 采用 α -溶血素分泌途径分泌外源重组蛋白的效能强化

由于大肠杆菌自身的蛋白分泌能力较低,因此在提高外源蛋白的胞外生产水平时,强化分泌过程尤为重要。针对 α -溶血素途径分泌重组蛋白,目前主要集中在转运元件的改造和重组目标蛋白的改造两方面。

4.1 转运元件的改造

尽管目前关于 α -溶血素分泌途径的转运元件中涉及蛋白识别和转运的关键区域研究较多且较为清晰,但对于如何强化其胞外转运能力的报道很少,且均为特异性转运蛋白 HlyB 和 HlyD 的定向改造。2005 年, Sugamata 等对转运蛋白 HlyB/D 进行突变,得到了能够使模型蛋白枯草杆菌蛋白酶 E 胞外分泌量提高 27 和 15 倍的突变体,经分析其关键突变位点分别为 HlyB 中的 L448F 和 HlyD 中的 G654S^[34],但对不同模型蛋白的分泌增强效应不尽相同,且与培养温度有关,其机理规律还在探索之中。2010 年, Low 等以环糊精葡萄糖基转移酶作为报告蛋白,通过对 HlyAs₆₁、HlyB 和 HlyD 进行改造,通过筛选得到了 5 株比原始分泌量提高 35% - 217% 的突变体,并且突变位点均位于 HlyB 的跨膜结构区,揭示了该区域对于提高分泌水平的重要性,并且在角质酶的分泌表达中得到了验证^[13]。

4.2 重组蛋白的折叠速率

提高目标蛋白的胞外分泌水平不仅与分泌系统的转运效能有关,目标蛋白的性质也是重要因素之一。研究表明,目标蛋白的折叠速率对于其通过 α -溶血素途径转运的效率具有重要的影响。Bakkes 等研究者选择麦芽糖结合蛋白(MalE)为模型蛋白,通过研究影响其折叠速率的几种突变体的分泌表达情况,表明降低折叠速率可以提高分泌效率^[38]。由于上述模型蛋白为细菌来源的且天然为分泌型蛋白,为进一步研究该理论的普遍适用性, Schwarz 等选取了哺乳动物老鼠来源的细胞浆的肠脂肪酸结合蛋白作为研究对象,表明其野生型不能通过 α -溶血素途径分泌,而低折叠速率的突变体则可通过 α -溶血素途径分泌至胞外,并且得到了正确折叠的、具有生物活性的目标蛋白^[39],该项报道表明重组蛋白本

身在其分泌型表达时亦有可能起着决定性作用,对进一步揭示该途径的转运机制和其实际应用均具有重要的指导意义。

5 展望

大肠杆菌是大多数科学研究中表达重组蛋白的首选宿主菌,然而,薄弱的蛋白分泌能力在一定程度上限制了其大规模应用。重组蛋白的胞外分泌表达是一项涉及分子机理和实际经验的工作,目前人们已经开发了多种强化蛋白分泌过程的方法,但达到工业化生产规模的较少,该技术进一步的发展还需依赖对转运机制的深入研究。大肠杆菌的 α -溶血素分泌途径具有组成元件简单、一步跨两膜的独特优势,虽然相对于 II 型分泌系统,报道较少,但已对于其分泌机制及其应用有了较为广泛的研究。我们认为今后将着重向以下 2 个方向发展:① 研究蛋白转运过程中通道蛋白之间以及通道蛋白与目标蛋白之间相互作用的关键位点及其动态反应过程,同时也为理性设计提高该途径的分泌效能提供理论依据;② 通过不同目标蛋白分泌水平的报道以及我们的实验积累发现,该途径应用局限的主要原因有可能是存在底物特异性,即不同蛋白能否分泌或分泌量差别较大,因此探究该途径所能转运的底物特征及规律,有助于深入了解该途径分泌机制,也能够为拓宽其实际应用提供更明确的指导。相信随着科学研究的不断深入, α -溶血素分泌途径的分子机制越来越清晰,实际应用也会越来越广泛。

参考文献

- [1] Jong WSP, Sauri A, Luirink J. Extracellular production of recombinant proteins using bacterial autotransporters. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(5): 646-652.
- [2] Yoon SH, Kim SK, Kim JF. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent Patents on Biotechnology*, 2010, 4(1): 23-29.
- [3] Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(5): 625-635.
- [4] Mergulhao FJM, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 2005, 23(3): 177-202.

- [5] Yamabhai M, Emrat S, Sukasem S, Pesatcha P, Jaruseranee N, Buranabanyat B. Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli* expression systems. *Journal of Biotechnology*, 2008, 133 (1): 50-57.
- [6] Chen S, Liu ZG, Chen J, Wu J. Study on Improvement of extracellular production of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165 (2): 666-675.
- [7] Li ZF, Gu ZB, Wang M, Du GC, Wu J, Chen J. Delayed supplementation of glycine enhances extracellular secretion of the recombinant α -cyclodextrin glycosyltransferase in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85 (3): 553-561.
- [8] Gentschev I, Dietrich G, Goebel W. The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends in Microbiology*, 2002, 10 (1): 39-45.
- [9] Worsham LMS, Trent MS, Earls L, Jolly C, Ernst-Fonberg ML. Insights into the catalytic mechanism of HlyC, the internal protein acyltransferase that activates *Escherichia coli* hemolysin toxin. *Biochemistry*, 2001, 40 (45): 13607-13616.
- [10] Sanchez SA, Vazquez R, Mate S, Bakas L, Gratton E, Herlax V. Effects of α -hemolysin from *E. coli* on erythrocytes from different species. *Biophysical Journal*, 2011, 100 (3): 339-339.
- [11] Dhakal BK, Mulvey MA. The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host and Microbe*, 2012, 11 (1): 58-69.
- [12] Bhakdi S, Mackman N, Nicaud JM, Holland IB. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infection and Immunity*, 1986, 52 (1): 63-69.
- [13] Low KO, Mahadi NM, Rahim RA, Rabu A, Abu Bakar FD, Murad AMA, Illias RM. Enhanced secretory production of hemolysin-mediated cyclodextrin glucanotransferase in *Escherichia coli* by random mutagenesis of the ABC transporter system. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150 (4): 453-459.
- [14] Gentschev I, Goebel W. Topological and functional studies on HlyB of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, 1992, 232 (1): 40-48.
- [15] Schmitt L, Benabdelhak H, Blight MA, Holland IB, Stubbs MT. Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 330 (2): 333-342.
- [16] Damas JM, Oliveira ASF, Baptista AM, Soares CM. Structural consequences of ATP hydrolysis on the ABC transporter NBD dimer: Molecular dynamics studies of HlyB. *Protein Science*, 2011, 20 (7): 1220-1230.
- [17] Schulein R, Gentschev I, Schlör S, Gross R, Goebel W. Identification and characterization of two functional domains of the hemolysin translocator protein HlyD. *Molecular and General Genetics*, 1994, 245 (2): 203-211.
- [18] Schulein R, Gentschev I, Mollenkopf HJ, Goebel W. A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Molecular and General Genetics*, 1992, 234 (1): 155-163.
- [19] Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 2000, 405 (6789): 914-919.
- [20] Lee VT, Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes and Development*, 2001, 15 (14): 1725-1752.
- [21] Gray L, Baker K, Kenny B, Mackman N, Haigh R, Holland IB. A novel C-terminal signal sequence targets *Escherichia coli* haemolysin directly to the medium. *Journal of cell science*. 1989, 11 (Sup): 45-57.
- [22] Hui D, Morden C, Zhang F, Ling V. Combinatorial analysis of the structural requirements of the *Escherichia coli* hemolysin signal sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (4): 2713-2720.
- [23] Felmlee T, Pellett S, Lee EY, Welch RA. *Escherichia coli* hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *Journal of bacteriology*, 1985, 163 (1): 88-93.
- [24] Thanabalu T, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *Embo Journal*, 1998, 17 (22): 6487-6496.
- [25] Thomas S, Jümpertz T, Bakkes P, Smits S, Schmitt L. HlyA from *E. coli* is secreted in an unfolded state and requires the C-terminal located amino acids for its lytic function. *International Journal of Medical Microbiology*, 2011, 301: 81-82.

- [26] Holland IB, Schmitt L, Young J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (Review). *Molecular Membrane Biology*, 2005, 22 (1-2): 29-39.
- [27] Pimenta AL, Racher K, Jamieson L, Blight MA, Holland IB. Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin. *Journal of bacteriology*, 2005, 187 (21): 7471-7480.
- [28] Fernandez LA, de Lorenzo V. Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway. *Molecular Microbiology*, 2001, 40(2): 332-346.
- [29] Ning Y, Zhou L, Zhang W, Lu D, Xiao B, Mao X, Zou Q. Extracellular secretion of recombinant Hil-6 utilizing UPEC α -hemolysin (HlyA) system. *Immunological Journal*, 2008, 24(4): 489-507. (in Chinese)
宁亚蕾, 周立雄, 张卫军, 鲁东水, 肖斌, 毛旭虎, 邹全明. 利用 α -溶血素系统分泌表达重组人白介素-6. 免疫学杂志, 2008, 24(4): 489-507.
- [30] Zhu C, Ruiz-Perez F, Yang Z, Mao Y, Hackethal VL, Greco KM, Choy W, Davis K, Butterson JR, Boedeker EC. Delivery of heterologous protein antigens via hemolysin or autotransporter systems by an attenuated ler mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vaccine*, 2006, 24(18): 3821-3831.
- [31] Gentschev I, Mollenkopf H, Sokolovic Z, Hess J, Kaufmann SH, Goebel W. Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. *Gene*, 1996, 179(1): 133-140.
- [32] Gentschev I, Fensterle J, Schmidt A, Potapenko T, Troppmair J, Goebel W, Rapp UR. Use of a recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice. *Bmc Cancer*, 2005, 5.
- [33] Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, Neuhaus B, Maier E, Benz R, Goebel W, Fensterle J, Rapp UR. Use of the alpha-hemolysin secretion system of *Escherichia coli* for antigen delivery in the *Salmonella typhi* Ty21a vaccine strain. *International Journal of Medical Microbiology*, 2004, 294(6): 363-371.
- [34] Sugamata Y, Shiba T. Improved secretory production of recombinant proteins by random mutagenesis of hlyB, an alpha-hemolysin transporter from *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (2): 656-662.
- [35] Narayanan N, Khan M, Chou CP. Enhancing functional expression of heterologous lipase B in *Escherichia coli* by extracellular secretion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2010, 37(4): 349-361.
- [36] Gentschev I, Hess J, Goebel W. Change in the cellular localization of alkaline phosphatase by alteration of its carboxy-terminal sequence. *Molecular and General Genetics*, 1990, 222(2-3): 211-216.
- [37] Su LQ, Chen S, Yi L, Woodard RW, Chen J, Wu J. Extracellular overexpression of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by alpha-hemolysin secretion system in *E. coli* BL21 (DE3). *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 8.
- [38] Bakkes PJ, Jenewein S, Smits SHJ, Holland IB, Schmitt L. The rate of folding dictates substrate secretion by the *Escherichia coli* hemolysin type 1 secretion system. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(52): 40573-40580.
- [39] Schwarz CKW, Landsberg CD, Lenders MHH, Smits SHJ, Schmitt L. Using an *E. coli* type 1 secretion system to secrete the mammalian, intracellular protein IFABP in its active form. *Journal of Biotechnology*, 2012, 159(3): 155-161.

Advance on *Escherichia coli* α -hemolysin secretion pathway—A review

Lingqia Su^{1,2}, Sheng Chen^{1,2}, Jing Wu^{1,2}*

¹ State Key Laboratory of Food Science and Technology, ²School of Biotechnology and Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract:In recent years, with the development of biotechnology, the molecular mechanism of the secretion pathways in *Escherichia coli* is clearer and clearer, and it becomes one of the most effective methods to use *E. coli* expression system for extracellular production of recombinant proteins. This review discusses recent advances in the secretion mechanism and application of *E. coli* α -hemolysin secretion pathway.

Keywords: *Escherichia coli*, α -hemolysin secretion pathway, extracellular expression, recombinant protein

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100048), by the Science and Technology Support Project of Jiangsu Province (BE2012018, BE2012019) and by the Research and Innovation Project for College Graduates of Jiangsu Province (Lingqia, Su)
* Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85327802;E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn
Received: 3 March 2013/Revised: 5 June 2013

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2013 年 10 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 – 1956	半年刊	1 – 4	1 – 2
1957 – 1958	季刊	5 – 6	1 – 4
1959	季刊	7	1 – 2
1959 – 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 – 4
1963 – 1965	季刊	9 – 11	1 – 4
1966	季刊	12	1 – 2
1966 – 1972	停刊 6 年半		
1973 – 1988	季刊	13 – 28	1 – 4
1989 – 2007	双月刊	29 – 47	1 – 6
2008 – 2012	月刊	48 – 52	1 – 12
2013	月刊	53	1 – 10