

## 受溶氧浓度调控的新型大肠杆菌表达系统\*

童 芹 杨胜利 龚 毅\*\*

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘 要** 利用透明颤菌(*Vitreoscilla sp.*)的血红蛋白基因在大肠杆菌中的转录过程受环境溶氧浓度调控,在贫氧条件下基因转录被激活的性质,构建了一个在贫氧条件下能高效表达外源基因的新型大肠杆菌表达系统。该表达系统包括一个含血红蛋白基因启动子元件控制 T7RNA 聚合酶基因表达的低拷贝质粒的宿主菌 GJ100 和另一个 T7 启动子控制外源基因表达的质粒载体。研究结果表明大肠杆菌本身的硫氧还蛋白,原核生物的金黄色葡萄球菌 A 蛋白 IgG 结合区(ZZ),真核生物的蛇神经毒素融合蛋白,鲑鱼降钙素六聚体,人白细胞介素 II 和人尿激酶原等基因均能在该系统中获得高效表达。重组蛋白表达的水平可达细胞总蛋白的 30% 以上。

**关键词** 表达系统,启动子,调控模式

**分类号** Q552 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0322-26

大肠杆菌外源基因表达系统是基因工程疫苗、药物、动植物生长因子和工具酶等生物技术产品研究开发的关键技术之一。在产业化生产中,对外源基因表达调控模式的选择显得十分重要。化学诱导模式由于诱导剂的加入将导致生产成本大大上升,温度调控模式由于大体积发酵罐升温缓慢,调控不够灵敏。相比之下溶氧浓度调控模式适合于产业化生产过程。

透明颤菌能够产生一种功能类似于真核生物血红蛋白的蛋白质 VHb, VHb 的主要生物学功能是提高细菌对氧的利用率,帮助细菌在贫氧条件下生长。研究表明:VHb 蛋白由血红蛋白基因编码,共有 145 个氨基酸。在大肠杆菌中具有类似血红蛋白的生物学功能<sup>[1~4]</sup>。血红蛋白基因的表达是在转录水平上受溶氧浓度调控的,在贫氧条件下血红蛋白基因的启动子被激活<sup>[5]</sup>。本文以血红蛋白基因的启动子元件为基础构建了一个受溶氧浓度调控的新型大肠杆菌外源基因表达系统,使其表达水平能达到占细胞总蛋白的 30% 以上。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

1.1.1 菌种和质粒: *E. coli* BL21, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* JM109, 噬菌体  $\lambda$ (CE6),

\* 国家高技术研究发展计划项目(No. 102-11-02-01)。

\*\* 通讯作者。

收稿日期:1998-04-07, 修回日期:1999-04-05。

M13(BM21), 质粒 pWSK129 均由本室保存。质粒 GJ100, pTG107, pZZ-CA6, pZZ-CM11, pZZ-proUK, pIL2 均由本实验室构建。

流加培养基料培养基(g/L):蛋白胨 16, 酵母膏 10, NaCl 15。

流加培养补料培养基(g/L):碳源-葡萄糖 200, 氮源-蛋白胨 16, 酵母膏 10。

1.1.2 酶和试剂: 限制酶和 DNA 连接酶购于 Promega 公司, 其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 提取纯化, 限制酶切, DNA 连接, 大肠杆菌转化, 按 Maniatis 等<sup>[6]</sup>方法。

1.2.2 SDS-聚丙烯酰胺电泳按 Sambrook 等<sup>[6]</sup>方法, 考马氏亮蓝染色后用 CS930 扫描仪进行光密度扫描。

1.2.3 PCR 按照 Saiki 等<sup>[6]</sup>方法。

1.2.4 DNA 序列测定按照 Sanger 等<sup>[6]</sup>方法。

2 结 果

2.1 表达系统的构建

受溶氧浓度调控的大肠杆菌表达系统由宿主菌 GJ100 和由 T7 启动子控制的外源基因表达载体两部分构成, GJ100 中含有的质粒 pTQ107 通过以下构建过程得到:

合成寡聚核苷酸片段 A 和 B<sup>[7]</sup>, C 和 D<sup>[8]</sup>:

A:GGGCAATTCGAGGCCCTTTCGTCTTCAAG

B:TTGCTGGTCTAACATGAGGGTGGATCCGGG

C:CCCGGATCCAGGAGGACTAAATGAACACGATTAACATCGCTAAG

D:GCTGAAGCTTTTACGCGAACGCGAAGTCCAAGCTTCCC

以寡聚核苷酸片段 A 和 B 为引物, 透明颤菌染色体 DNA 为模板, 用 PCR 方法扩增出透明颤菌血红蛋白启动子基因片段, 以寡聚核苷酸片段 C 和 D 为引物, 噬菌体 λ(CE6) DNA 为模板, 用 PCR 方法扩增出 T7RNA 聚合酶基因。透明颤菌血红蛋白启动子基因片段插入 M13(BM21)的 EcoRI, BamHI 位点, 再将 T7RNA 聚合酶基因从紧接其后 BamHI、HindIII 位点插入。核苷酸序列测定结果表明上述 PCR 产物序列正确。将含有启动子基因和 T7RNA 聚合酶基因的 EcoRI-HindIII 片段装入 pWSK129 的 EcoRI-EcoRV 位点中。构成质粒 pTQ107。将质粒 pTQ107 转化大肠杆菌 BL21, 构建成宿主菌 GJ100。

将外源基因片段插入复制子类型与 pWSK129 不同、含有 T7 启动子的各种相应的表达载体(如 pET 系列表达载体), 再转化进入宿主菌 GJ100 中。即构成受环境溶氧浓度调控的新型大肠杆菌外源基因表达系统。

该表达系统工作原理如图 1 所示。

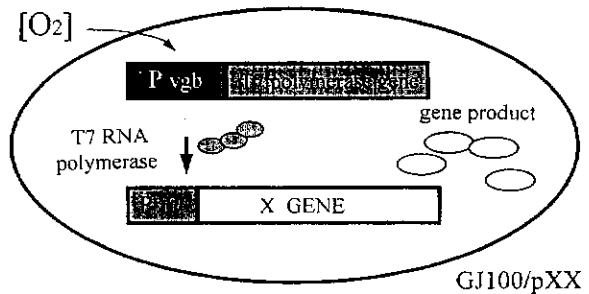


图 1 构建受环境溶氧浓度调控的新型大肠杆菌外源基因表达系统

Fig. 1 A new system for expressing heterologous gene in *E. coli* regulated by the consistence of dissolved oxygen in the environment

## 2.2 表达系统调控规律研究

以表达蛇神经毒素融合蛋白基因工程菌 GJ100/pZZ-CM11 为例对上述表达系统的调控规律进行验证。按 1% 比例将 GJ100/pZZ-CM11 过夜菌接入 5L 发酵罐中, 在不加任何化学诱导剂条件下 37℃ 通气培养, 溶氧饱和度保持在 90% 以上, 3h 后取样观察目的蛋白 ZZ-CM11 表达情况。然后间歇开闭通气阀门, 使溶氧饱和度维持在 2%~20% 的范围内, 在控氧后的 1、2、4 和 24h 分别取样, 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定目的蛋白的表达情况。结果表明, 在充分供氧的情形下, 目的蛋白表达不明显; 而在充分供氧 3h 后开始控制低溶氧饱和度的情形下, 控氧 1h 后目的蛋白即开始有明显表达。重组蛋白表达的水平可达细胞总蛋白的 47% 以上。

## 2.3 表达系统的适用范围研究

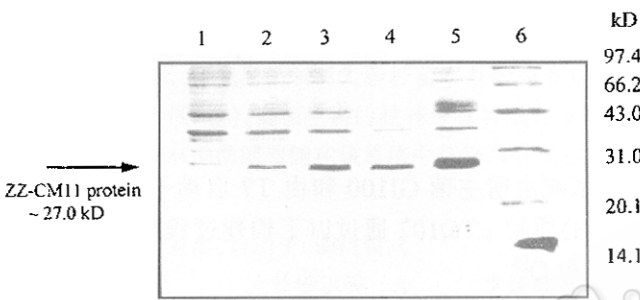


图 2 控氧条件下蛇神经毒素融合蛋白基因的表达

Fig. 2 SDS-PAGE for detection of CM-11 expression regulated by the concentration of dissolved-oxygen in the environment

1. Normal oxygen condition; 2. 1h under oxygen-limited condition; 3. 2h under oxygen-limited condition; 4. 4h under oxygen-limited condition; 5. 24h under oxygen-limited condition; 6. Protein molecular weight marker.

受溶氧浓度调控的大肠杆菌表达系统能适用于各种外源基因, 能表达外源基因的工程菌在贫氧诱导 10h 后, 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测目的蛋白, 表明重组蛋白表达的水平均可达细胞总蛋白的 30% 以上, 与其它表达系统对外源基因的表达水平相当。现已成功表达了金黄色葡萄球菌 A 蛋白 IgG 结合区 (pZZ-c), 大肠杆菌硫氧还蛋白 (ThrxA), 蛇神经毒素融合蛋白 (pZZ-CM11), 鲑鱼降钙素六聚体

(pZZ-CA6), 人白细胞介素 II (IL2) 和人尿激酶原 (pZZ-proUK) 等基因。金黄色葡萄球菌 A 蛋白 IgG 结合区 (pZZ-c), 蛇神经毒素融合蛋白 (pZZ-CM11), 鲑鱼降钙素六聚体 (pZZ-CA6), 人白细胞介素 II (IL2) 等基因的表达, 参见图 2, 图 3。

## 2.4 表达系统的稳定性研究

基因工程菌 GJ100 中所含有质粒 pTQ107 在无选择压力条件下, 具有较好的稳定性。将 GJ100 的单菌落接入 3mL LB 培养基中, 37℃ 培养 20h, 稀释后涂布 LB 营养平板。随机取 100 个单菌落接种于含抗生素 LB 平板上, 根据生长的菌落数目, 计算质粒的丢失率, 重复上述过程 15 次以上。质粒的丢失率均为零。

## 3 讨 论

用血红蛋白基因的启动子直接控制外源基因也可实现由环境溶氧浓度来调控基因表达, 但血红蛋白基因的启动子在大肠杆菌细胞内强度较弱, 外源基因表达水平较低, 应用价值不大<sup>[9]</sup>。所以本文的技术方案是通过构建含血红蛋白基因的启动子控制 T7RNA 聚合酶基因表达的低拷贝质粒 (<5 拷贝/细胞) 的宿主菌和另一个由 T7 启动子控制表达目

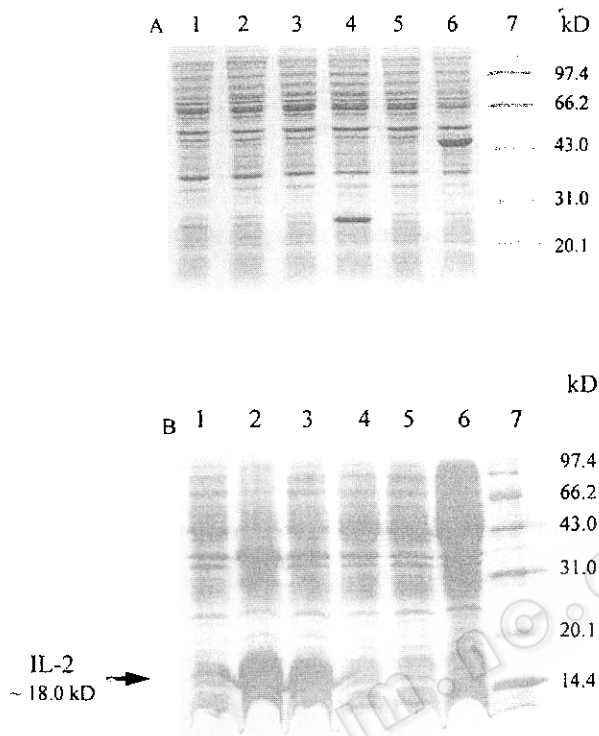


图3 金黄色葡萄球菌 A 蛋白 IgG 结合区, 鲑鱼降钙素六聚体融合基因和人白细胞介素 II 的表达

Fig.3 SDS-PAGE for detection of the expression of human IL-2 gene and salmon calcitonin hexa-polymer gene

A; 1. GJ100; 2. GJ100 under oxygen-limited conditions; 3. GJ100/pZZ-c; 4. GJ100/pZZ-c under oxygen-limited conditions; 5. GJ100/pZZ-CA6; 6. GJ100/pZZ-CA6 under oxygen-limited conditions; 7. Protein molecular weight marker.

B; 1. GJ100/IL2; 2. GJ100/IL2 under oxygen-limited conditions; 3. BL21(de3)/IL2 induced by IPTG; 4. BL21(de3)/IL2; 5. BL21(de3); 6. GJ100; 7. Protein molecular weight marker

的基因的高拷贝(100~200 拷贝/细胞)质粒来建立表达系统, 这样构建成的目的基因表达系统在调控模式上遵循 Vgb 基因启动子的规律, 在目的基因的表达水平上能与现有表达系统的最高水平相当, 适用于大体积高密度发酵生产重组蛋白, 有较大的应用前景。

贫氧条件对大肠杆菌生长速率, 生长密度的影响可以通过将血红蛋白基因整合到大肠杆菌染色体上得以解决。血红蛋白基因的整合型宿主在低氧的环境下具有生长优势, 可降低细胞生长和产物对溶氧的敏感程度和过程耗能, 适合基因工程菌的高密度表达<sup>[9]</sup>。pTQ107 需与目的基因表达载体共转化大肠杆菌所带来的不便也可以通过将 pTQ107 上的血红蛋白启动子及其控制下的 T7RNA 聚合酶基因一起整合到大肠杆菌染色体上得以解决。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] K. L. Dikshilt, D. A. Webster. *Gene*, 1988, **70**:377~386.
- [ 2 ] C. Khola, J. E. Bailey. *J. Bacteriol*, 1989, **171**:5995~6004.
- [ 3 ] S. K. Magnolo, D. L. Leenutaphong, J. A. Denodena *et al.* *Bio/Technology*, 1991, **9**:473~476.
- [ 4 ] J. A. Demodena, S. Gutierrez, J. Velasco *et al.* *Bio/Technology*, 1993, **11**:926~929.
- [ 5 ] C. Khosla J. Bailey, *Nature*. 1988, **331**(18):633~635.
- [ 6 ] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manua* Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988.
- [ 7 ] S. Wakabayashi, H. Matsubara, D. A. Webster *et al.* *Nature*, 1986, **322**(6078):481~483.
- [ 8 ] F. Miao, D. S. Kompala. *Ann. Biochem. Eng. Symp.*, 1991, **21**:24~43.
- [ 9 ] 吴 奕, 杨胜利. *生物工程学报*, 1997, **13**:101~105.

## A New System for Expressing Heterologous Gene in *Escherichia coli* Regulated by the Dissolved Oxygen Consistence in the Environment\*

Tong Qin Yang Shengli Gong Yi

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

**Abstract** The expression of *Vitreosilla* hemoglobin gene (*vgb*) is regulated by the dissolved oxygen consistence in *E. coli*. The gene transcription is activated under the condition of the oxygen-limited. A new system for expressing heterologous gene in *E. coli* regulated by dissolved oxygen consistence was constructed. It includes a host bacteria GJ100, which contains T7 RNA polymerase gene controlled by *vgb* promoter, and an expression vector on which the heterologous gene is under the control of T7 promoter. The results indicated that *E. coli* thioredoxin A, IgG binding domain of *Staphylococcus* protein A (ZZ), snake neurotoxin, salmon calcitonin hexa-polymer, human interleukin II (IL2) and human pro-urokinase genes could be expressed efficiently. The expression level of all genes is more than 30% of total cellular protein.

**Key words** Expression system, promoter, regulatory mode

\* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 102-11-02-01).