

一种低温表达型 T 载体及其应用

何燕斌¹, 齐亚坤¹, 黄霖霆¹, 周蓉¹, 邵蔚蓝²

1 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210046

2 江苏大学 环境与安全工程学院, 江苏 镇江 212000

何燕斌, 齐亚坤, 黄霖霆, 等. 一种低温表达型 T 载体及其应用. 生物工程学报, 2015, 31(12): 1773-1783.

He YB, Qi YK, Huang LT, et al. An expression T-vector and its application at low temperatures. Chin J Biotech, 2015, 31(12): 1773-1783.

摘要: 在现代生物学和生物技术研究中, 通过基因重组表达获得目标蛋白已成为常规技术。因其培养简单、操作方便、遗传背景清楚、克隆表达技术成熟, 大肠杆菌表达系统通常是人们表达重组蛋白的首选。但是在常规温度下进行基因的重组表达, 动、植物和常温微生物的基因产物多数在数小时内变性沉淀; 还有一些重组蛋白对宿主具有细胞毒性, 难以得到重组表达。因此, 我们构建了 1 种新型 T 载体——pEXC-T; 它结合 TA 克隆技术和低温诱导表达功能, 具有表达水平高、操作方便、目标蛋白得到分子伴侣保护和低温保存等特点。采用构建和优化的 pEXC 载体, P1 抗原蛋白、溶血素 PLO 两种不稳定性蛋白在 pEXC 中都实现了高效的可溶性表达。低温表达系统 pEXC 的建立和发展为蛋白质的结构与功能的研究, 以及抗原和药用蛋白的制备提供了便利的途径。

关键词: 大肠杆菌, 表达系统, 低温诱导, 可溶性蛋白

An expression T-vector and its application at low temperatures

Yanbin He¹, Yakun Qi¹, Linting Huang¹, Rong Zhou¹, and Weilan Shao²

1 Department of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, Jiangsu, China

2 School of Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, Jiangsu, China

Abstract: In modern biology and biotechnology research, recombinant gene expression has been the most popular method to obtain the target protein. In recent years, many foreign genes have been efficiently expressed in *Escherichia coli*.

Received: January 20, 2015; **Accepted:** March 13, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31170027).

Corresponding author: Weilan Shao. Tel: +86-25-85891836; E-mail: weilanshao@ujs.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31170027) 资助。

网络出版时间: 2015-10-29

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20151029.1606.001.html>

However, proteins encoded by animal, plant or mesophilic microbial genes often lose activities or become denatured within a few hours at regular growth temperatures for *E. coli*; some other target proteins are toxic to host cells and therefore difficult to be over-expressed. The new T-vector, pEXC-T, was constructed by combining TA cloning and cold-shock induction to obtain high expression levels with low costs. This paper reports the construction of pEXC-T and optimization of induction techniques for gene expression. Two instable proteins were tested and successfully expressed in soluble form by using pEXC vector. The development of pEXC-T offers a convenient technique for the preparations of recombinant proteins to be used in structure/function studies, or as diagnostic markers and medicinal proteins.

Keywords: *Escherichia coli*, expression system, cold-shock induction, soluble protein

大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达系统由表达载体和相应的宿主细胞两部分构成, 是发展最早、应用最广、最容易操作的基因高效表达系统。在大肠杆菌表达系统中, 表达载体通常运用可调控型启动子控制外源基因的表达; 这些启动子的类型对降低被表达的目标蛋白对细胞生长的抑制、减少细胞蛋白酶对目标蛋白的降解, 以及目标蛋白的产量和可溶性等起着至关重要的作用。研究和应用最多的启动子包括 lac、trp、tac、gal、ara 和 T7 启动子。T7 系列载体因表达水平高而广为应用, 但是很多基因在 T7 系列载体中表达时出现包涵体或细胞毒性等问题^[1]。近年发展起来的启动子主要包括由 Sigma 32 (σ^{32}) 调控的热激诱导型启动子 Hsh, 以及通过冷激诱导表达的冷激蛋白基因的启动子。研究发现, 快速降温 (如从 37 °C 降至 10 °C) 可诱导一系列蛋白如 CspA 等蛋白的表达水平瞬时提高^[2-3]。因此, cspA 基因的启动子被应用于表达载体 (如 pCold 等), 在低温下控制基因的重组表达^[4]。由于细胞中的分子伴侣的参与, 冷激蛋白启动子调控的低温基因表达不同于其他启动子调控下的低温表达^[5-6]; 很多 T7 系列载体不能表达的基因, 能够在冷激系统中得到高水平表达或可溶性表达^[7-8]。

TA 克隆技术是一种快速方便的基因克隆方

法, 能够在不受酶切位点限制的条件下进行粘性末端连接: *Taq* DNA 聚合酶扩增产生的 PCR 产物的双链两端各带有 1 个 3'端悬挂的 A (腺苷酸), 与末端带有 T (胸腺核苷酸) 的载体进行直接连接^[9]。但是, 市售 T 载体只能作为中间载体, 缺少基因表达元件, 基因克隆成功后还得进行亚克隆, 才能在表达载体中进行表达。最近报道的一种表达型的 T 载体^[10], pETG, 能够在目的基因的克隆表达时结合了 TA 克隆技术。但是由于它来源于 T7 系列载体 pET, 多数蛋白的高效活性表达同样会遇到诱导剂、细胞毒性、产生包涵体等方面的问题。同时, pET 系列载体比较大, 不利于对目标基因进行原位诱变改造和筛选。因此, 我们结合大肠杆菌冷激蛋白启动子受低温诱导实现高效表达的优势和 TA 克隆技术的优势, 首次设计并构建一种兼有 TA 克隆、冷激诱导表达和低温下目标基因活性筛选等多种功能的高效 T 载体, pEXC-T。外源基因通过 TA 克隆技术连接到线性载体 pEXC-T 上产生环状表达质粒, 转化 *E. coli* 后可以使目标基因在新型冷激表达载体 pEXC 中得到高效表达。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* BL21、DH10B、JM109 用

作基因克隆和表达的宿主；*E. coli* 培养在 LB 培养基中，转化子的选择用含有氯霉素 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基，重组酶最高产量测定用含有氯霉素 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 TB 培养基，配方见文献[11]。电转化用 SOC 培养基孵育。质粒 pHsh 由仙奕生物科技 (南京) 有限公司提供。

1.2 基因操作

大肠杆菌基因组 DNA 提取，DNA 的内切酶水解和连接，DNA 片段的分离，感受态细胞的制备以及基因的高效电转化均参考文献[11]。质粒的制备，从琼脂糖凝胶回收 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 DNA 聚合酶购自宝生物工程有限公司；质粒抽提试剂盒、割胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司；ONPG 购自 Omega 公司。文中载体构建及其应用所用的引物如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of primers

Primer	Primer sequence (5'-3')
ori1	CGGTAAGCGGCAGGGTCG
ori2	TTTACCTGTCCGCCTTTCTCC
1	TAATA AGCTTGAAGGCCGCT
2	CTCTCCGCTTCCTCTCTC
3	GAGAGAGGAAGCGGAAGAGATTAAT CATAAATATGAAAA
4	AGCGGCCTTCAAGCTTATTATGCGCA TTCTCATTGCACC
5	ACACCATGAATCACAAAGTTTCTTCG GATACGGAGTAGT
6	TGGTGGTGGTGGTGGTGGTGTCTAGA GGATACATGTGTGG
lacZ-fw	GTCGTT TTACAACGTCGTG
lacZ-rv	TTTTTGGACACCAGACCAACT
p1-fw	TGGCTTGTGGGGCAGTTAC
p1-rv	CGGTTTGGGGACCTTGACTG
p10-fw	AAACGAAAGGCTTTT GCATCG
p10-rv	GGATTGACATTGTCCTCGAC

1.3 pEXC-T 载体的构建

质粒 pEXC-T 载体的构建以表达载体 pHsh-Cm 为基础^[12-13]。首先我们设计了新型 T 载体的前体质粒。前体质粒中保留了 pHsh-Cm 中的氯霉素抗性基因和来源于 pUC18/19 的拷贝数 > 200 的复制元件，消除了质粒复制元件中的 1 个限制性内切酶 *Bfu* I 识别位点，删除 Hsh 启动子和多克隆位点，插入了 1 个大肠杆菌 *cspA* 启动子及其表达元件，并且在启动子和终止子之间插入两个 *Bfu* I 识别位点。前体质粒为环状，转化大肠杆菌后在细胞中可以得到大量复制；用 *Bfu* I 酶对前体质粒进行切割后，即可获得本发明的 T 载体，pEXC-T。

1.3.1 消除目标载体上的 *Bfu* I 酶切位点

对 pHsh-Cm 进行定点诱变的位点为 GTATCCGGTAAG；反向 PCR 所用引物为 ori1 和 ori2 (表 1)。以 pHsh-Cm 为模板进行反向 PCR，然后用 T4 DNA 连接酶对所扩增的线性 DNA 进行环化。

1.3.2 引入启动子

环状质粒扩增方法是本研究组发明的“变性-退火-延伸-连接”四步 PCR 循环，用于从环状质粒扩增出环状质粒 (PPCP) 的新方法^[14]。本实验通过 PPCP 方法将 pHsh-Cm 载体中 Hsh 启动子部分替换成 *cspA* 基因的冷激启动子。操作步骤如下：1) 设计一对引物 (引物 1、2，序列见表 1)，以 pHsh-Cm 为模板，反向 PCR 将 Hsh 启动子部分丢失得到线性化的载体。2) 设计另一对引物 (引物 3、4 序列见表 1)，以大肠杆菌基因组为模板扩增得到两端带有载体同源片段的冷激启动子片段。3) 用 T4 多聚核苷酸激酶对步骤 1)、2) 中获得的 PCR 产物进行 5'端磷酸化，将它们以 1 : 1 混合，再进行“变性-退火-延

伸-连接”四步 PCR 循环,用本课题组特有的耐热性 *Tma* DNA 连接酶进行扩增连接。4) 将步骤 3) 中的产物直接电转化入 *E. coli* 宿主中扩增,得到含有冷激启动子而去掉 Hsh 启动子的质粒。

1.3.3 引入 *Bfu* I 酶切位点

设计引物 5、6 (序列见表 1), 同样通过定向克隆技术在 *cspA* 启动子后面引入 2 个 *Bfu* I 酶切位点, 从而形成序列 *cspA* promoter-NF-*Bfu* I -gene-*Bfu* I -His-Tag, 分析和验证多个转化子中质粒的序列, 选择序列正确的质粒用作 pEXC-T 的前体质粒。

1.3.4 制备 pEXC-T 载体

将上述前体质粒导入大肠杆菌细胞, 培养细胞后从中提取纯化前体质粒; 用 *Bfu* I 切割前体质粒, 通过琼脂糖凝胶电泳分离和回收的 2 422 bp 线性化 DNA 片段, 即为具有低温冷激诱导表达元件、3'末端带 T 的 pEXC-T 载体。用 TE 缓冲液溶解 T 载体, 于 -20 °C 保存。

1.4 以 *lacZ* 为报告基因测定冷激诱导表达条件

1.4.1 重组质粒 pEXC-*lacZ* 的构建

pEXC-T 载体是本身携带有起始密码子 ATG 的成熟 T 载体; 所以, 用具有 3'末端转移酶活性的 *Ex Taq* DNA 聚合酶扩增目标基因, 拟克隆表达的目标基因可以是去除翻译起始密码子的开放阅读框, 即始于 5'端的起始密码子 ATG 之后的第 2 个密码子, 直至终止密码子 TAA、TAG 或 TGA。如果要在 3'端融合组氨酸标签 (His-Tag) 以便后期纯化, 有必要去除终止密码子, 但需要考虑 3'端克隆时引入的 3'端悬挂的 A 所带来的移码突变。扩增得到的片段与 pEXC-T 进行连接后, 转化感受态细胞, 将转化菌液涂

布于带有氯霉素抗性的 LB 平板上, 37 °C 培养 15-20 h, 挑选平板上的转化子, 进行质粒分离纯化和序列测定分析。

根据大肠杆菌 *E. coli* 的 β -D-半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23) 的编码基因 *lacZ* (GenBank 登录号为 945006) 序列设计引物 *lacZ*-fw、*lacZ*-rv。以大肠杆菌基因组为模板扩增得到的 3'端带有 A 的基因 *lacZ* 片段, PCR 参数: 95 °C 5 min, 加 *Ex Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司) 98 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 3 min, 循环 30 次; 72 °C 保温 10 min。PCR 扩增结束后, 电泳检测并将 PCR 目标条带割胶回收纯化, 以适量比例与 pEXC-T 载体直接连接。连接液转化大肠杆菌 DH10B (*lacZ* 基因缺陷型菌株) 感受态细胞后, 经抗生素筛选、酶切鉴定、PCR 鉴定筛选出含有 *lacZ* 基因的阳性克隆。

1.4.2 酶活性测定

β -D-半乳糖苷酶活性测定采用分光光度法, 以邻硝基苯 β -D-半乳糖苷 (ONPG) 作为 β -半乳糖苷酶的底物, 测定反应体系中黄色产物邻硝基酚 (ONP) 的生成量。反应体系为 1 mL, 内含 0.1 mol/L PBS (pH 7.0), 1 mmol/L MgSO₄, 5 mmol/L DTT, 4 mg/mL ONPG (底物过量), 37 °C 恒温水浴预热 10 min 后, 加入 100 μ L 酶液, 空白对照中不加酶, 补加等体积的缓冲液, 37 °C 恒温反应 10 min 后, 立即加入 0.5 mL 1 mol/L Na₂CO₃ 终止反应, 用分光光度计在 420 nm 处测定其吸收值, 计算相对于空白对照的差异值。

β -D-半乳糖苷酶酶活单位定义: 每分钟催化邻硝基苯 β -D-半乳糖苷 (ONPG) 水解生成 1 μ mol 邻硝基酚所需要的酶量定义为一个活性单位。用 ONP 作标准曲线, 蛋白质浓度用 Bradford 法测定。

1.5 pEXC 表达系统表达条件的优化

以 β -D-半乳糖苷酶基因 *lacZ* 为报告基因, 将克隆构建的质粒 pEXC-*lacZ* 电转化至大肠杆菌 DH10B 宿主菌中, 并研究冷激系统诱导表达的温度、冷激诱导的时机以及诱导后的表达时间长短对外源蛋白表达的影响, 通过检测 β -D-半乳糖苷酶的活性来探索最佳的表达条件。

在 pEXC 中 *lacZ* 表达的最佳诱导温度的测定: 当培养基为 LB 时, 在重组细胞的细胞密度为 OD_{600} 为 1.8 时开始, 在 10–25 °C 等不同的温度条件下瞬间降温冷激诱导 24 h, 记录细胞的密度并离心收获细胞, 测定重组 β -D-半乳糖苷酶的活性。最佳诱导时机的测定: 当培养基为 LB 时, 在重组细胞的细胞密度 OD_{600} 值为 0.4–2.4 的范围内, 分别选取不同菌龄的大肠杆菌在 16 °C 下冷激诱导 24 h, 记录细胞的密度并离心收获细胞, 测定重组 β -D-半乳糖苷酶的活性。考察最佳诱导时间: 当培养基为 LB 时, 在重组细胞的细胞密度 OD_{600} 值为 1.8 时开始诱导并计时, 离心收获不同诱导时间的细胞并记录细胞的密度, 测定重组 β -D-半乳糖苷酶的活性。

1.6 pEXC 表达系统的应用效果试验

1.6.1 抗原蛋白 P1 的高效表达与分离纯化

肺炎支原体 *Mycoplasma pneumoniae* 是引起肺炎的主要致病菌^[15-17], 而 P1 蛋白是肺炎支原体决定黏附作用和毒力的关键蛋白^[18-19]。根据 *p1* 基因 (GenBank 登录号为 CP002077) 序列设计引物 *p1-fw*、*p1-rv*, 扩增 P1 成熟肽的编码基因。以肺炎支原体基因组为模板扩增得到的 3' 端带有 A 的 *p1* 基因片段。PCR 扩增结束后, 电泳检测并将 PCR 目标条带割胶回收后, 以适量比例与 pEXC-T 载体连接。连接液转化 BL21 感受态细胞后, 经抗生素筛选、酶切鉴定、菌落

PCR 鉴定筛选出含有 *p1* 基因的阳性克隆。

质粒转化和诱导表达的方法: 将构建好的重组质粒 pEXC-*p1* 转化到大肠杆菌 BL21 中, 挑取单菌落接入含有氯霉素 (Cm) 的 LB 培养液; 37 °C 培养至 OD_{600} 为 1.5–2.0 时, 迅速转入 16 °C 水浴摇床, 200 r/min 继续培养 16–24 h, 离心收集菌体细胞。

重组蛋白的纯化: 由于 pEXC 表达系统含有 His-tag, 所以可以采用 Ni 亲和层析纯化重组蛋白。将离心收集的细胞用 50 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 重悬, 经高压细胞破碎仪破碎细胞, 13 000 r/min 离心 15 min, 离心上清液进行 Ni 柱亲和层析, 经咪唑梯度洗脱, 完成 P1 重组蛋白的纯化, 重组蛋白达到电泳均一。

1.6.2 溶血素的高效表达试验

化脓隐秘杆菌 *Arcanobacterium pyogenes* 属于革兰氏阳性短棒状杆菌, 是牛、羊和猪等重要经济动物的条件性致病菌, 寄生于上呼吸道和消化道的黏膜处, 可引起多种器官和黏膜的化脓性感染, 给养殖业造成严重的经济损失^[20-21]。溶血素 (Pyolysin, PLO) 是化脓隐秘杆菌的外毒素^[22-23]。在常温的表达系统中, *plo* 基因的表达伴随着包涵体的产生, 难以进行可溶性表达^[24-25]。根据基因 *plo* (GenBank 登录号为 HQ637573) 序列设计引物 *plo-fw*、*plo-rv*, 以化脓隐秘杆菌基因组为模板, 方法同上, 筛选获得含有 *plo* 基因片段的表达质粒 pEXC-*plo*。同样将质粒 pEXC-*plo* 转化大肠杆菌 JM109, 按 pEXC 表达载体使用方法表达获得目标蛋白。

2 结果

2.1 pEXC-T 载体的构建

经过基因序列定点诱变消除了 pHsh-Cm 中

原有的 *Bfu* I 酶切位点, 并以冷激启动子替换了热激启动子、加入两个背向定位的 *Bfu* I 酶切位点, 我们成功地获得环状质粒 Pre-pEXC-T。在大肠杆菌中大量制备的 Pre-pEXC-T 经 *Bfu* I 酶切, 得到 2.4 kb 大小的片段为成熟的 pEXC-T 载体。pEXC-T 的性能具有以下特征: 结合了 TA 克隆技术、低温诱导表达功能、小型和超高拷贝优势的表达载体。新型冷激表达型 T 载体 pEXC-T 的结构特征包括: 含有冷激启动子 Csp promoter 及其上下游调控区、N 端融合短肽 NF、C 端有 His-Tag、不依赖于 ρ 因子的 GAAA 终止子, 以及来源于 pUC19 的超高拷贝复制元件 (图 1A)。

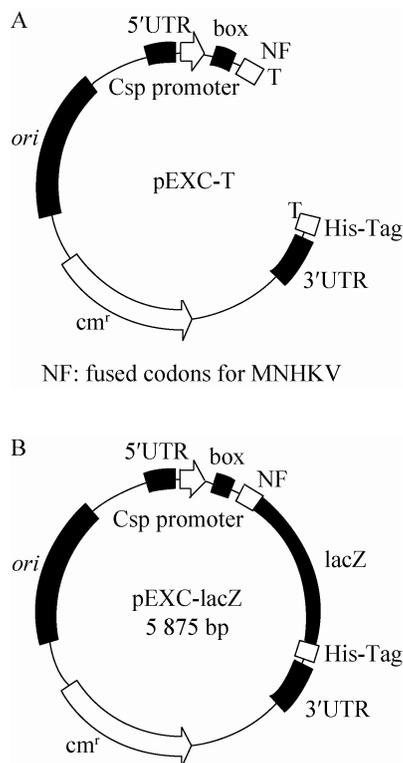


图 1 成熟 pEXC-T 载体 (A) 和重组质粒 pEXC-lacZ (B) 的结构图

Fig. 1 The map of pEXC-T vector (A) and plasmid pEXC-lacZ (B).

2.2 β -D-半乳糖苷酶表达质粒 pEXC-lacZ 的构建

以大肠杆菌的基因组 DNA 为模板进行 β -D-半乳糖苷酶基因片段 PCR 扩增, 获得约 3 kb 的单一电泳条带。将 PCR 产物与 pEXC-T 链接获得 5.5 kb 大小的重组质粒, 序列测定验证后将其命名为 pEXC-lacZ, 其结构见图 1B。

2.3 冷激诱导表达的条件优化

2.3.1 温度影响

以 *lacZ* 基因的表达水平考察最佳诱导温度。当培养基为 LB 时, 在 37 °C 重组细胞的细胞密度 OD_{600} 值为 1.8 时开始, 分别在 16 °C、20 °C、25 °C 的水浴中快速降温, 并在相应的温度下继续培养, 其间定时取样测定重组 β -D-半乳糖苷酶的活性。结果表明, 在 16 °C 时, β -D-半乳糖苷酶的比酶活 (每毫克总蛋白具有的活性单位) 达到最高; 而 20 °C 诱导表达时, 虽然比酶活不如 16 °C, 但是由于细胞生长较快, 细胞密度较高, 该酶的总活性 Sum (每毫升菌液具有的活性单位) 更高。在温度达到 25 °C 诱导表达时, 比酶活和酶的产量均有明显下降 (图 2)。

2.3.2 诱导时机影响

以 pEXC 表达 *lacZ* 基因为例来考察最佳诱导时机。当培养基为 LB 时, 在 37 °C 重组细胞的细胞密度 OD_{600} 值为 0.8–2.4 的范围内, 分别选取不同菌龄的大肠杆菌在 16 °C 下冷激诱导 24 h, 收获细胞并测定 β -D-半乳糖苷酶活性, 结果表明不同时期的重组细胞在 16 °C 下低温培养 24 h 后, 重组细胞都已进入平台期且细胞密度大致相似, OD_{600} 值达到 4.0 左右。酶活性检测结果表明 β -D-半乳糖苷酶的比酶活随着诱导时细胞密度 OD_{600} 从 0.8 增加至 1.8, 表达产生的 β -D-半乳糖苷酶的比酶活显著增加; 而 OD_{600}

达到或超过 2.2 以后再进行诱导表达, β -D-半乳糖苷酶的活性开始下降 (图 3)。因此最佳诱导时机在细胞密度 OD_{600} 值为 1.8 左右。

2.3.3 冷激诱导时间影响

以 pEXC 表达 *lacZ* 基因为例来考察最佳诱导时间。当为 LB 培养基时, 在重组细胞的细胞密度 OD_{600} 值为 1.8 时开始诱导并计时, 诱导不

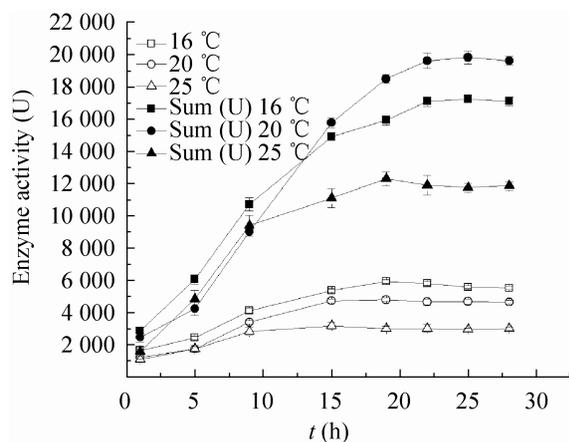


图 2 不同温度诱导表达产生的 β -D-半乳糖苷酶的活性

Fig. 2 The effects of temperature on recombinant β -galactosidase gene expression. Enzyme activities were calculated as U per mg protein (empty symbols) or per mL culture (solid symbols).

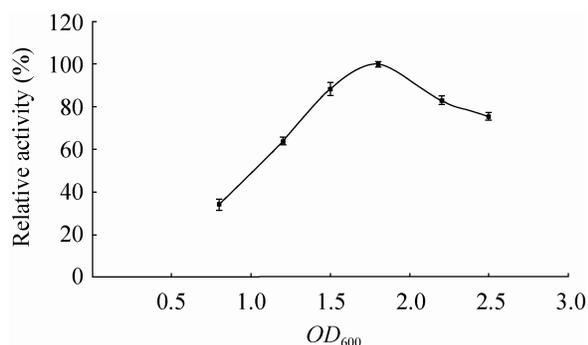


图 3 诱导时机对 *lacZ* 基因表达的影响

Fig. 3 Effects of induction time on *lacZ* gene expression.

同时间后收获细胞并测定记录重组细胞密度和重组 β -D-半乳糖苷酶的总酶活。结果表明: 重组细胞在低温环境下, 经过约 4-5 h 的调整期后进入对数生长期, 而在低温培养 28 h 后进入平稳期, 并维持继续培养至 48 h, 细胞密度变化不很明显; 而冷激诱导后重组酶的总酶活也伴随着菌体细胞密度的不断增加而不断提高。在诱导后 10 h 内酶活性随着细胞密度快速上升, 14 h 后上升速度趋于缓慢, 在 24 h 达到最高点, 并维持至 48 h 基本不变 (图 4)。因此, 最适诱导时间在 12-24 h 范围内。但在具体运用时, 诱导时间可以根据发酵规模、蛋白的稳定性等因素进行调整。

综上所述, 外源基因在 pEXC 载体中的最佳表达条件是 (LB 培养基): 菌体在 37 °C 下生长, 待长至细胞密度 OD_{600} 值为 1.5-1.8 时迅速降温至 16-20 °C, 并维持在低温继续培养 12-24 h。

2.4 pEXC-T 外源基因表达应用实例

分别以肺炎支原体基因组、化脓隐秘杆菌基因组 DNA 为模板进行 *p1* 和 *plo* 基因的扩增,

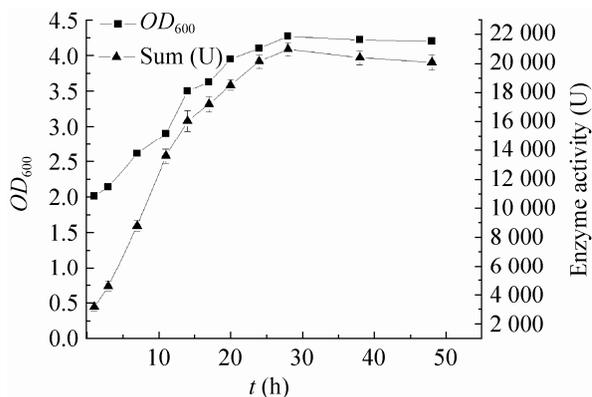


图 4 诱导后培养时间对 *lacZ* 基因表达的影响

Fig. 4 Effects of incubation time after induction of *lacZ* gene expression.

将 PCR 产物连接至冷激表达型 T 载体 pEXC-T, 成功构建了表达质粒 pEXC-*p1* 和 pEXC-*plo*。

用质粒 pEXC-*p1* 转化 *E. coli* BL21, pEXC-*plo* 转化大肠杆菌 JM109, 以环化的载体 Pre-pEXC-T 作为对照, 并按 pEXC 表达系统使用方法进行冷激诱导和低温表达, 然后收集菌体细胞进行 SDS-PAGE 分析, 从电泳图谱上可以看出, 与对照相比较, 含有重组质粒 pEXC-*p1* 的 *E. coli* 在分子质量 26 kDa 处有明显的蛋白表达条带; 含有 pEXC-*plo* 的 *E. coli* 在分子质量 66 kDa 处有明显的蛋白表达条带 (图 5)。由此可知, *p1*、*plo* 基因通过冷激表达系统 pEXC 在 *E. coli* 中都实现了可溶性表达。通过高压破碎将冷激诱导表达的 pEXC-*p1* 菌体细胞裂解, 离心后取上清液进行 Ni 柱亲和层析, SDS-PAGE 检测结果表明, 经纯化获得电泳均一的重组蛋白 P1。

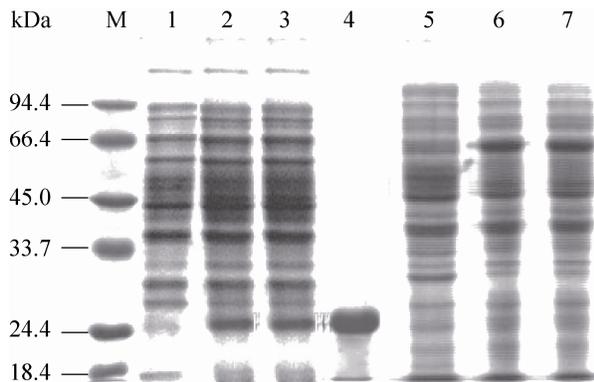


图 5 蛋白质 P1 和 PLO 的基因表达及 P1 纯化的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of P1 and PLO expression and P1 purification. M: protein marker; 1: cell-free extract of *E. coli* BL21/Pre-pEXC-T; 2: total cellular protein of *E. coli* BL21/pEXC-*p1*; 3: supernatant cellular protein of *E. coli* BL21/pEXC-*p1*; 4: the purified recombinant P1 protein; 5: cell-free extract of *E. coli* JM109/Pre-pEXC-T; 6: total cellular protein of *E. coli* JM109/pEXC-*plo*; 7: supernatant cellular protein of *E. coli* JM109/pEXC-*plo*.

3 讨论

动植物和常温微生物的基因所编码的蛋白质不够稳定, 多数蛋白在异源表达后的数小时内变性。同时, 许多蛋白对重组细胞的生长具有抑制或毒害作用, 因而难以得到重组表达。因此, 构建低温的外源基因表达系统, 高效率地表达一些不稳定性外源蛋白, 一直是人们研究的热点。大肠杆菌的最适生长温度是 37 °C, 低温环境 (10–20 °C) 下大肠杆菌的生长速度缓慢, 细胞内多数基因的表达水平下降^[27]。但是细胞中有一组基因对冷激过程发生应答反应, 它们受冷激诱导表达产生一类冷激蛋白 (Cold shock proteins) 包括 CspA、CspB、CspG 和 CsdA 等^[2]。其中, *cspA* 基因表达水平最高: 在温度从 37 °C 降至 10 °C 后的 1.5 h 内可达到细胞总蛋白的 13%^[3]。

cspA 基因的启动子是强启动子^[26], 我们利用该启动子以及上游调控序列替换 pHsh 载体的 Hsh 启动子, 结合两个背向的 *Bfu* I 酶切位点构建了低温表达型 T 载体, pEXC-T。与 T7 或 lac 启动子相比, pEXC-T 具有以下特点: 首先 pEXC 中的基因表达不需要化学品诱导, 并且外源基因可在低温下持续表达, 表达产物受到分子伴侣的保护, 克服了 T7 启动子和其他强启动子带来的外源蛋白构象改变易产生包涵体的不足。与市场现有的冷激表达载体 pCold 系统比较, pEXC-T 具有以下优势: 1) 提供了 1 种冷激诱导型 T 载体, 能够简化操作、提高连接率、一步完成基因克隆和表达质粒的构建, 并且能够通过基因产物活性进行基因文库的构建和筛选; 2) 质粒小, 有利于通过反向 PCR 技术对目标基因进行原位诱变和修饰; 3) 利用了 pUC19

载体中的高拷贝数的复制元件,能够在冷激启动子介导的高效表达的基础上,通过基因剂量进一步提高表达水平^[13]。

大肠杆菌的冷激蛋白是在冷激启动后的 1–2 h 内瞬时表达,产生 RNA、DNA 或者蛋白质等生物大分子的分子伴侣后就恢复正常的生命活动^[26–29]。在 pEXC 表达系统中,报告基因 *lacZ* 的表达在低温诱导后的 10 h 内呈现递增的趋势,当达到 14 h 后增速趋缓。在重组蛋白稳定性较好的前提下,长时间的低温表达更有利于重组蛋白的积累,并有利于降低生物活性蛋白的细胞毒性。诱导表达的时机和诱导的温度对基因表达水平有较大的影响,但是表达系统 pEXC 对于温度的控制范围和诱导时间都较为宽泛,给实际应用带来了方便。

TA 克隆技术利用 *Taq* DNA 聚合酶在 PCR 扩增过程中会在 DNA 片段的两个 3'端加上 A,可以直接与两端带有 T 的载体 DNA 连接。这不仅缩减了限制性内切酶的选择和操作步骤,而且可以避免目标基因的相互连接和载体的自身环化,从而大大提高基因克隆的成功率。但是市场上销售的 T 载体只用于 PCR 克隆;基因经过克隆和序列测定后必须再次克隆到表达载体中才可能获得基因产物的表达。新型 T 载体 pEXC-T 将冷激诱导表达特性与 TA 克隆技术结合起来,为研究工作提供了很大方便。

肺炎支原体 P1 蛋白和化脓隐秘杆菌中溶血素 PLO 都是易于变性的抗原性蛋白,通常在大肠杆菌中表达后很快失活,然而,在低温环境下,一方面由于温度较低,对于常温蛋白的稳定性具有显著作用;另一方面,冷激诱导产生的一些冷休克蛋白,如 CspA、CspB 和 CspG 等对目标蛋白具有一定的保护作用。此外,低温

环境也可以抑制宿主蛋白酶的活性,从而减少目标蛋白的降解。因此,低温环境下,重组蛋白可以得到有效表达和生物活性的保存。在用 pEXC-T 对基因进行 TA 克隆的同时,目标基因得到了有效的表达,可以通过基因产物的活性进行基因文库的构建,尤其是 cDNA 文库的构建和活性筛选。因此,pEXC-T 的构建和基因表达诱导条件的优化为稳定性差的酶、抗原或生物活性蛋白的基因克隆和重组表达提供了一个有效途径,为低温酶的工业生产和科学研究打下基础。通过冷激调控蛋白的表达,无需添加化学类诱导剂,避免试剂对细胞的毒性作用,是适用于药蛋白的基因表达的技术路径。

REFERENCES

- [1] Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1996, 60(3): 512–538.
- [2] Graumann P, Marahiel MA. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch Microbiol*, 1996, 166(5): 293–300.
- [3] Wouters JA, Rombouts FM, de Vos WM, et al. Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(10): 4436–4442.
- [4] Qing GL, Ma LC, Khorchid A, et al. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(7): 877–882.
- [5] Graumann P, Marahiel MA. Effects of heterologous expression of CspB, the major cold shock protein of *Bacillus subtilis*, on protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 1997, 253(6): 745–752.
- [6] Feller G, Zekhnini Z, Lamotte-Brasseur J, et al. Enzymes from cold-adapted microorganisms—the class C beta-lactamase from the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. *Eur J*

- Biochem, 1997, 244(1): 186–191.
- [7] Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, et al. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. Trends Biotechnol, 2000, 18(3): 103–107.
- [8] Russell NJ. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications//Antranikian G. Biotechnology of Extremophiles. Heidelberg: Springer, 1998, 61: 1–21.
- [9] Holton TA, Graham MW. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. Nucl Acids Res, 1991, 19(5): 1156.
- [10] Zhong X, Zhai C, Chen L, et al. Construction of directional T vector for gene cloning and expression. Chin J Biotech, 2013, 29(4): 510–519 (in Chinese).
钟星, 翟超, 陈亮, 等. 构建定向 T 载体用于基因克隆和表达. 生物工程学报, 2013, 29(4): 510–519.
- [11] Wrba A, Jaenicke R, Huber R, et al. Lactate dehydrogenase from the extreme thermophile *Thermotoga maritima*. Eur J Biochem, 1990, 188(1): 195–201.
- [12] 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. Biotechnol Lett, 2010, 32(6): 795–801.
- [13] Jiang YY, He JR, Wang WW, et al. The approach to high production of recombinant protein via pHsh vectors for *Escherichia coli*. Microbiol China, 2012, 39(3): 394–400 (in Chinese).
蒋钰瑶, 何嘉荣, 王未未, 等. 新型大肠杆菌高效表达载体 pHsh 的构建与应用. 微生物学通报, 2012, 39(3): 394–400.
- [14] Le YL, Chen HY, Zagursky R, et al. Thermostable DNA ligase-mediated PCR production of circular plasmid (PPCP) and its application in directed evolution via *In situ* error-prone PCR. DNA Res, 2013, 20(4): 375–382.
- [15] Klement E, Talkington DF, Wasserzug O, et al. Identification of risk factors for infection in an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract disease. Clin Infect Dis, 2006, 43(10): 1239–1245.
- [16] Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 697–728.
- [17] Waring AL, Halse TA, Csiza CK, et al. Development of a genomics-based PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a large outbreak in New York State. J Clin Microbiol, 2001, 39(4): 1385–1390.
- [18] Pauli BU, Knudson W. Tumor invasion: a consequence of destructive and compositional matrix alterations. Hum Pathol, 1988, 19(6): 628–639.
- [19] Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, et al. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma Pneumoniae*. Nucl Acids Res, 1996, 24(22): 4420–4449.
- [20] Jost BH, Post KW, Songer JG, et al. Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from the porcine gastric mucosa. Vet Res Commun, 2002, 26(6): 419–425.
- [21] He X, Yuan J, Wang H, et al. *In vitro* expression of pneumolysin and identification of its biological activity. Acta Acad Med Mil Tert, 2011, 33(3): 237–240 (in Chinese).
贺潇, 袁军, 王虹, 等. 肺炎链球菌溶血素的体外表达及活性鉴定. 第三军医大学学报, 2011, 33(3): 237–240.
- [22] Jost BH, Songer JG, Billington SJ. Identification of a second *Arcanobacterium pyogenes* neuraminidase and involvement of neuraminidase activity in host cell adhesion. Infect Immun, 2002, 70(3): 1106–1112.
- [23] Guo WJ, Zhao JC, Liu YC, et al. The research progress of purulent secret coli virulence factors. Chin J Vet Med, 2010, 46(1): 52–53 (in Chinese).
郭文洁, 赵敬翠, 刘耀川, 等. 化脓隐秘杆菌毒力因子的研究进展. 中国兽医杂志, 2010, 46(1):

- 52–53.
- [24] Jost BH, Trinh HT, Songer JG, et al. Immunization with genetic toxoids of the *Arcanobacterium pyogenes* cholesteroldependent cytolysin, pyolysin, protects mice against infection. *Infect Immun*, 2003, 71(5): 2966–2969.
- [25] Meng XL, Mu XL, Liu XD, et al. Expression of *Arcanobacterium pyogenes* pyolysin in *Escherichia coli* and the hemolytic activity identification. *Chin J Prev Vet Med*, 2013, 35(6): 477–480 (in Chinese).
孟祥莉, 母晓宇, 刘晓丹, 等. 化脓隐秘杆菌溶血素蛋白的原核表达及其溶血活性鉴定. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(6): 477–480.
- [26] Barria C, Malecki M, Arraiano CM, et al. Bacterial adaptation to cold. *Microbiology*, 2013, 159(12): 2437–2443.
- [27] Giangrossi M, Exley RM, Le HF, et al. Different *in vivo* localization of the *Escherichia coli* proteins CspD and CspA. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 202(2): 171–176.
- [28] Fang L, Jiang W, Bae W, et al. Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37 °C by mRNA stabilization. *Mol Microbiol*, 1997, 23(2): 355–364.
- [29] Diwa A, Bricker AL, Jain C, et al. An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes Dev*, 2000, 14(10): 1249–1260.

(本文责编 郝丽芳)