

# 基于 *rhaSR* 嵌合操纵子的构建及其在大肠杆菌中表达的研究\*

关梅<sup>1\*\*</sup> 贾坤志<sup>\*\*</sup> 李芳 贺根和 喻富根<sup>\*\*\*</sup> 华子春<sup>\*\*\*</sup>

(南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

**摘要** 通过 PCR 等重组 DNA 技术, 构建了含 *rhaSR* 启动子表达调控元件、RhaR 基因、报告基因 *gst* (谷胱甘肽-S-转移酶) 的两个嵌合操纵子, 并插入大肠杆菌表达载体 pALEX 中构成 pALEX-PR1 和 pALEX-PR2。其中 pALEX-PR2 的 RhaR 基因上游为原有的 SD 序列, 而 pALEX-PR1 的 RhaR 基因上游则插入了增强的 SD 序列。把这两个重组表达质粒分别转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 报告基因 *gst* 能够在 L-鼠李糖诱导下表达, 其表达量是非诱导条件下的 4~5 倍, 且 pALEX-PR1 的表达量是 pALEX-PR2 的 3.14 倍。以上结果表明, *gst* 的表达既受 L-鼠李糖诱导, 同时又受 RhaR 的正调控。SDS-PAGE 结果显示, GST 占大肠杆菌培养物总可溶蛋白的 5.41% (W/W), 平均 1 L 培养物可获得 3.0 mg 纯化的 GST。酶活性分析表明, 所构建的嵌合操纵子表达的 GST 保持了正确的构型且具有很高的活性。

**关键词** *rhaSR*, 嵌合操纵子, SD 序列, 基因表达

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)06-1129-05

## Chimeric Operons Based on *rhaSR* and Their Expression in *Escherichia coli*\*

GUAN Mei<sup>1\*\*</sup> JIA Kun-Zhi<sup>\*\*</sup> LI Fang HE Gen-He YU Fu-Gen<sup>\*\*\*</sup> HUA Zi-Chun<sup>\*\*\*</sup>

(The State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093)

**Abstract** Using gene recombinant techniques, two chimeric operons containing *rhaSR* promoter, RhaR gene, and reporter gene *gst* (glutathione S-transferase) were constructed, and each was inserted into the *E. coli* expression vector pALEX to form pALEX-PR1 and pALEX-PR2. The pALEX-PR2 contained a native SD sequence in the upstream region of *rhaR*, while the pALEX-PR1 contained an enhanced SD sequence. Two plasmids were then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The reporter gene *gst* within both chimeric operons expressed 4 to 5 folds higher with L-rhamnose induction than without the induction. Under the induction of L-rhamnose, the GST expression of the pALEX-PR1 was 3.14 folds than the pALEX-PR2. Our results suggested that the expression of *gst* was positively regulated by the induction of L-rhamnose and the RhaR expressed from the same chimeric operon. Furthermore, SDS-PAGE results showed that GST accounted for about 5.41% (W/W) of the total soluble proteins of the *E. coli* culture. An average of 3.0 mg purified GST was obtained from 1 L culture. The results of enzyme activity analysis showed that the GST expressed by reporter gene *gst* of our chimeric operons kept the correct configuration and high activity.

**Key words**: *rhaSR*, Chimeric operon, SD sequence, Gene expression

在大肠杆菌中, 与 L-鼠李糖转运和代谢相关的基因有 *rhaT*, *rhaSR* 及 *rhaBAD*<sup>[1-3]</sup>。*rhaT* 编码的蛋白负责鼠李糖的运输<sup>[3]</sup>, *rhaBAD* 编码 3 种与鼠李糖代谢有关的蛋白<sup>[1,4]</sup>。最近研究发现, 大肠杆菌 *rhaSR* 操纵子含有两个 L-鼠李糖特异性的激活子 (activator), RhaR 和 RhaS<sup>[5-9]</sup>。RhaR 通过与距 *rhaSR* 转录起始点 -32 到 -82 的序列结合, 来调控 *rhaSR* 的转录<sup>[1,4,9]</sup>。在没有 L-鼠李糖的情况下, RhaR 虽然

也能结合到它的 DNA 识别序列上, 但不能激活 *rhaSR* 的转录<sup>[2,7-9]</sup>。此外, RhaR 对 *rhaSR* 的转录调控是一种正调控<sup>[2,8]</sup>, 即新形成的 RhaR 能促进 *rhaSR* 的进一步转录, 产生更多的 RhaR 和 RhaS。在大肠杆菌中, 当 L-鼠李糖存在时, *rhaSR* 的表达量可增加 440 倍以上。RhaS 与环腺苷酸受体蛋白 (cAMP receptor protein, CRP) 同时结合到与 *rhaSR* 操纵子相邻的 *rhaBAD* 操纵子的启动子上游的远侧调控序列

\* 国家自然科学基金资助 (No. 30370760)

\*\* 两位作者对实验所做的贡献相同

\*\*\* 通讯作者 喻富根 Tel 025-83686755 E-mail fugen@nju.edu.cn; 华子春 Tel 025-83324605 E-mail zchua@nju.edu.cn

收稿日期: 2007-03-28 修回日期: 2007-07-03

上<sup>[14,5,10]</sup>来激活 *rhaBAD* 的转录,以产生代谢 L-鼠李糖所需的酶<sup>[14,5]</sup>;同时它们与 DNA 的结合还抑制 *rhaSR* 的转录<sup>[14,5,9]</sup>(图 1)。



图 1 *rhaSR-rhaBAD* 操纵子之间的调控区(该图引自 Egan<sup>[11]</sup>)

本文利用大肠杆菌 *rhaSR* 操纵子在 L-鼠李糖诱导后,具有的受 RhaR 正调控表达的特性,通过 DNA 重组技术构建了含 *rhaSR* 操纵子表达调控元件、RhaR 基因、报告基因 *gst* 的嵌合操纵子,同时去除了 RhaS 对 *rhaSR* 操纵子的负调控,以期使报告基因 *gst* 在大肠杆菌内实现可调控的高效表达。一旦获得上述的嵌合操纵子,就可以通过把要表达的目的基因取代报告基因,使该目的基因在大肠杆菌内同样实现可调控的高效表达。

通过本项目的实施,有望获得具有自主知识产权的以 *rhaSR* 操纵子为基础的可诱导的重组高效表达系统。该表达体系可用于生产各种蛋白,包括毒性蛋白。同时该表达体系还可以应用于与 *E. coli* 有相同基因表达特性的蓝藻和植物叶绿体中,以获得生产药物、高价值农产品等的新型生物反应器。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 菌株:**克隆宿主菌 *E. coli* Top10( $F^-$ , *mcrAΔ* (*mrr-hsd RMS-mcrBC*),  $\phi 80$ , *lacZΔM15*,  $\Delta lac \times 74$ , *recA1*, *araΔ139Δ* (*ara-leu*) 7697, *galU*, *galK*, *rps*, (*Strr*) *endA1*, *nupG*), DH5 $\alpha$  ( $F^-$ ,  $\phi 80d/lacZΔM15$ ,  $\Delta$  (*lacZYA^- argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*rk^-*, *mk^+*), *phoA*, *supE44*,  $\lambda^-$ , *thi-1*, *gyrA96*,

*relA1*);表达宿主菌 *E. coli* BL21( DE3 ) ( $F^-$ , *ompT*, *hsdS*(*rBB-mB-*), *gal*, *dcm*( DE3 ))均由本实验室保存。

**1.1.2 质粒:**pALEX<sup>[11]</sup>由美国哥伦比亚大学 Silverstein 博士惠赠。

**1.1.3 工具酶:**各类限制性内切酶、T4 DNA 连接酶 (TaKaRa);Taq, Rnasir( Promega )。

**1.1.4 引物及测序:**引物(引物序列见表一), pALEX-P 及 pALEX-PR 测序(上海申能博彩生物公司)。

**1.1.5 其他试剂:**GST Sepharose 4B(Pharmacia);柱离心胶回收试剂盒(华舜公司);还原型 GSH(上海生工);CDNB( ICN );L-鼠李糖( Sigma-Aldrich )。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 基于 *rhaSR* 的嵌合操纵子的构建(图 2)

(1) *PrhaSR* 和 *rhaR* 序列片段的克隆:利用 PCR,以 *E. coli* DH5 $\alpha$  为复制模板,对 *PrhaSR*(*rhaSR* 调控区)和 *rhaR* 序列进行克隆。PCR 反应条件为:94℃ 预热 10 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,25 个循环。

(2)含 *PrhaSR* 序列的重组质粒 pALEX-P 的构建:*PrhaSR* 的 PCR 产物经 TBE-agarose 电泳分离回收特异片段,溶解于 DDW 中。取适量 DNA,进行 *Sph* I、*Xba* I 双酶切。质粒 pALEX 同时进行 *Sph* I、*Xba* I 双酶切,分别对酶切的 167bp *PrhaSR* 片段和 6.1 kb 的 pALEX 质粒片段通过柱离心式胶回收试剂盒进行纯化,继而进行 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化 *E. coli* Top10 菌株,用 PCR 法筛选阳性克隆,获得重组质粒 pALEX-P。上海申能博彩公司测序,核对序列。测序引物为 O $\alpha$ (表 1)。

(3)含 *rhaR* 序列的重组质粒 pALEX-PR 的构

表 1 实验所用引物

No.	引物序列 5'-3'	扩增序列
01	ACAT GCATGC TTGTGGTGTATGTGATGCTCACC	Upstream <i>PrhaSR</i> amplification
02	GC TCTAGA TCC TGA TGT CGT CAA CAC GG	Downstream <i>PrhaSR</i> amplification
03	CCAATAACCTAGTATAGGGGAC	Test pALEX-P
04	GCGAATTGCTAAGGAGGAACGGG ATGGCTTTCTGCAATAAC	Upstream <i>rhaR</i> amplification
05	GCGAATTC GTAAGGGAC GGG ATG GCT TTC TG	Upstream <i>rhaR</i> amplification
06	ACGC GTCGAC CAC AATGTG TTACTC TCG ACA CTGG	Downstream <i>rhaR</i> amplification
07	GATCT GATCG AAGGT CGTGG GATC	Test pALEX-PR1 and pALEX-PR2

建引物04、06(表1)扩增的 *rhaR* PCR产物经 TBE-agarose 电泳分离回收特异片段,溶解于 DDW 中,取适量 DNA 进行 *EcoRI*、*SalI* 双酶切。质粒 pALEX-P 也进行 *EcoRI*、*SalI* 双酶切,分别对酶切的 976 bp *rhaR* 片段和 6.0 kb 的 pALEX-P 质粒片段分别进行柱离心式胶回收, T4 DNA 连接酶连接,转化 *E. coli* Top10 菌株,PCR 法筛选阳性克隆,得到含 *rhaSR* 嵌

合操纵子的质粒 pALEX-PR1。pALEX-PR2 的构建同 pALEX-PR1,仅将 PCR 扩增引物 04 换为引物 05。重组质粒以引物 07(表1)为测序引物到上海申能博彩公司测序分析,核对序列。

1.2.2 pALEX-PR1、pALEX-PR2 的表达研究:表达菌基础培养基为 MOPS 缓冲培养基(40mmol/L MOPS, 4mmol/L Tricine, 0.01mmol/L  $FeSO_4$ ,

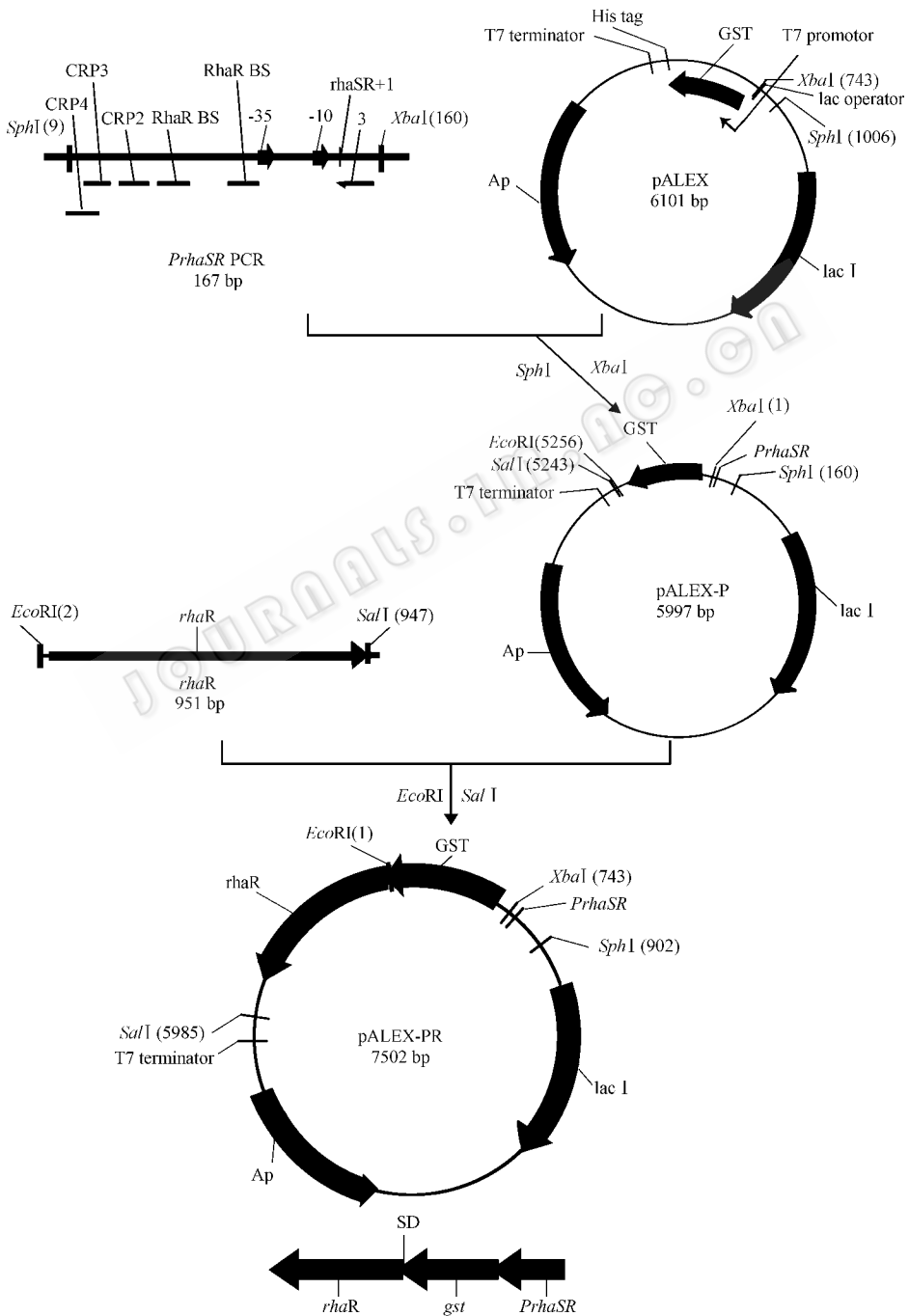


图2 基于 *rhaSR* 的嵌合操纵子的构建

9.5mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.276mmol/L  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0.5mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 0.528mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 50mmol/L  $\text{NaCl}$ ,  $3 \times 10^{-9}$  mol/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $4 \times 10^{-7}$  mol/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $3 \times 10^{-8}$  mol/L  $\text{CoCl}_2$ ,  $10^{-8}$  mol/L  $\text{CuSO}_4$ ,  $8 \times 10^{-8}$  mol/L  $\text{MnCl}_2$ ,  $10^{-8}$  mol/L  $\text{ZnSO}_4$ , 1.32mmol/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 10mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 0.2% Casamino Acids, and 0.002% thiamine) 过夜培养基为含 0.04% 甘油的 MOPS 缓冲培养基, 生长培养基为含 0.4% 甘油的 MOPS 缓冲培养基, 活化以及克隆用培养基为 LB (每升培养基含 50 mg 氨苄青霉素)。

pALEX-PR1 和 pALEX-PR2 分别转化 BL21 (DE3) 表达宿主菌后, 挑单克隆于 37°C 振荡培养过夜, 过夜培养菌经测定  $OD_{600}$  值后, 调至相同的菌密度, 以 1:100 的体积分别接种于新鲜的培养液中, 37°C 培养 2 h 至  $OD_{600}$  为 0.6, 加入 L-鼠李糖至终浓度 0.2% (W/V) 37°C 诱导表达 3 h, 测定  $OD_{600}$  值并调至相同的菌密度, 离心收集相同体积的菌体, 然后用 1:10 体积的 PBS (140mmol/L  $\text{NaCl}$ , 27mmol/L  $\text{KCl}$ , 10mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 重悬菌体, 冰上超声波裂解, 裂解产物于 12000 r/min 离心 20 min, 保留上清, 用于 GST 酶活力分析及 SDS-PAGE 分析。

**1.2.3 SDS-PAGE 对 GST 表达量的分析:** 取上述制备好的细菌裂解上清 30 $\mu\text{L}$ , 加入 10 $\mu\text{L}$  4 $\times$  SDS 凝胶加样缓冲液, 煮沸后取 30 $\mu\text{L}$  用于 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 分离胶浓度为 15%, 堆积胶浓度为 5%, 100 V 恒电压电泳 3 h, 考马斯亮蓝法染色 SDS-PAGE 凝胶后, 用 UVP 白光/紫外光透射仪扫描, 并用 Grab-it 2.5 和 Gelwork software 数字化蛋白条带的密度, 分析某一条蛋白带在总可溶性蛋白中所占的比例。

**1.2.4 GST 酶活力的分析:** 取 50 $\mu\text{L}$  新鲜制备的上述细菌裂解上清, 加入到 1.5 mL 的 GST 测活底物溶液 (0.1 mol/L K-PBS pH 6.5, 1.0mmol/L 还原型 GSH, 1.0mmol/L CDNB) 中, 在紫外分光光度计 UV-2201 上, 立即测定其在 5 min 内的  $OD_{340}$  值。每隔一分钟记录一个数值, 然后用  $OD_{340}$  对时间进行作图, 其斜率  $\Delta OD_{340}/\Delta \text{min}$  用于指示具有生物活性的 GST 相对含量。

**1.2.5 GST 亲和层析:** 取 L-鼠李糖诱导表达的 200 mL 培养基于 10000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 重悬于 10 mL PBS 中, 冰上超声波裂解, 上清全部上样于 Glutathione Sepharose 4B 柱。利用 GST 与 GSH

之间的特异性结合作用, 除去污染蛋白。层析按照 Pharmacia 操作指南进行, 收集洗脱峰后, 以 BSA 浓度梯度作标准曲线, Bradford 方法测定洗脱蛋白的浓度。

## 2 结果及分析

### 2.1 嵌合操纵子具有受鼠李糖诱导的表达特性

对培养基中含 0.2% L-鼠李糖及不含 L-鼠李糖的 BL21/pALEX-PR1 表达上清进行 SDS-PAGE 检测, 结果如图 3 所示。泳道 1 在 28kD 附近有明显的 GST 蛋白条带, 表达水平为占菌体总蛋白的 5.41% (W/W), 而泳道 3 在 28 kD 附近几乎看不到 GST 蛋白条带, 说明构建好的嵌合操纵子具有受 L-鼠李糖诱导表达的特性。

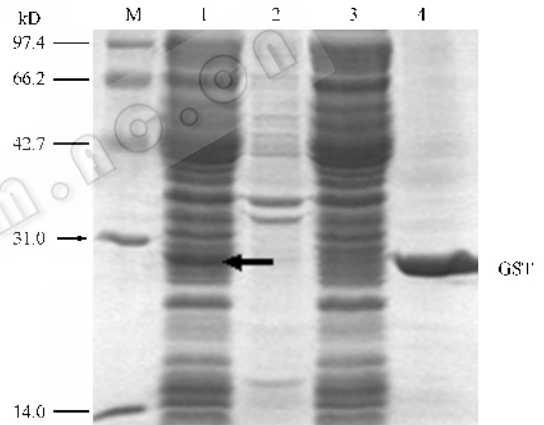


图 3 pALEX-PR1 上的嵌合操纵子在诱导与非诱导下的 SDS-PAGE 表达结果

M: Marker; 1. pALEX-PR1 诱导表达上清; 2. pALEX-PR1 诱导表达沉淀; 3. pALEX-PR1 非诱导表达上清; 4. 纯化的 GST 蛋白

### 2.2 GST 的表达量受到表达自同一嵌合操纵子的 RhaR 的正调控

图 4 结果表明, 在 0.2% L-rhamnose 诱导时, 对同一重组质粒, GST 的表达量比非诱导时可提高 4.6 倍, pALEX-PR1 中 GST 的表达水平比 pALEX-PR2 高 3.14 倍。可见, 本实验构建的 rhaSR 嵌合操纵子, 在大肠杆菌中受 rhamnose 诱导后, 仍然具有受 RhaR 正调控表达的特性。

### 2.3 嵌合操纵子的表达产物 GST 是可溶性的, 而且有很高的生物活性

SDS-PAGE 结果表明, pALEX-PR1 表达的 GST 基本上只出现在上清中, 因而是可溶性的。数字化密度分析显示 GST 占总可溶性蛋白的 5.41%

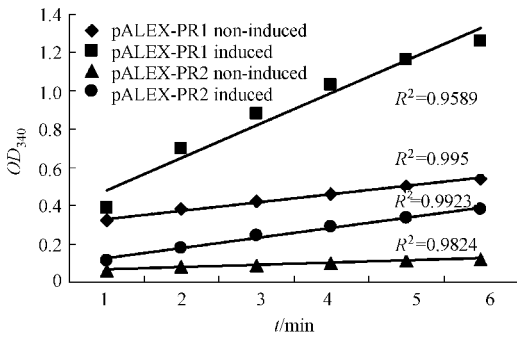


图4 GST酶活力分析

(W/W)(图3)。通过GST亲和层析,1L培养液中收集的菌体,可得到纯品GST 3.0mg(两次实验的平均值)。pALEX质粒中的*gst*基因含T7启动子,用IPTG诱导后*gst*基因有极高的表达量,但表达产物GST主要以不溶性的包涵体形式存在,生物活性很低。通过与相同浓度的pALEX表达的GST的酶活力对比分析表明(图5),本实验所构建的嵌合操纵子表达的GST蛋白具有很高的活性,即pALEX-PR1中表达的GST蛋白质大多以生物活性形式存在。

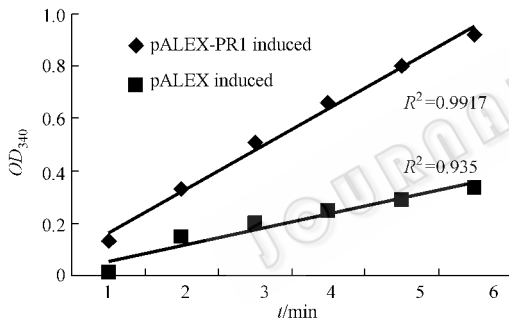


图5 L-rhamnose诱导pALEX-PR1与IPTG诱导pALEX表达所得的GST酶活力对比分析

### 3 讨论

从GST酶活力分析结果说明,通过重组DNA技术构建的含*rhaSR*操纵子表达调控元件、RhaR基因、报告基因*gst*的嵌合操纵子,在大肠杆菌中具有受L-鼠李糖诱导表达的特性。由于增强型SD序列的存在,可以提高RhaR的翻译量,而含增强型SD序列的嵌合操纵子上*gst*的表达量比含原有SD序列的嵌合操纵子上*gst*的表达量明显提高,说明本实验所构建的基于*rhaSR*的嵌合操纵子仍然具有受RhaR正调控表达的特性,即嵌合操纵子中*rhaR*基因的表达量越高,则*gst*的表达量也越高。

利用T7启动子已经构建了具有极高表达效率的系统,但T7表达系统有很明显的缺点,它的表达产物往往以包涵体形式存在,生物活性也大大降低<sup>[12,43]</sup>。SDS-PAGE及GST亲和层析分析结果显示,本实验所构建的基于*rhaSR*的嵌合操纵子的*gst*表达产物是可溶性的,而且保持了应有的正确构象和酶活力,这些与预期的结果相吻合。但GST的表达量不是很高,所以要想获得可诱导的高效表达系统,仍需进一步改进。

由于RhaT运输L-鼠李糖进入细胞内,因此其数量的多少可能影响嵌合操纵子的表达水平。此外,用来表达的宿主菌基因组中含有*rhaSR*和*rhaBAD*,即在L-鼠李糖存在时,宿主菌基因组将表达出大量的RhaS,激活*rhaBAD*的转录,产生代谢L-鼠李糖所需的酶<sup>[2,3,4,10]</sup>;而L-鼠李糖的代谢产物会抑制*rhaSR*的转录<sup>[2,3,4]</sup>,同时也可能抑制以*rhaSR*为基础的嵌合操纵子的表达水平<sup>[10]</sup>。考虑到上述原因,本实验室考虑继续开展以下工作:1)构建含*rhaT*的嵌合操纵子,以期增加把L-鼠李糖运输入细胞的RhaT的数量;2)敲除大肠杆菌基因组中*rhaSR*和*rhaBAD*的功能,以消除它们对嵌合操纵子表达的影响。

### 参考文献

- [1] Egan S M, Schleif R F. J Mol Biol, 1993, **234**: 87 ~ 98.
- [2] Tobin J F, Schleif R F. J Mol Biol, 1987, **196**(4): 789 ~ 799.
- [3] Via P, Badia J, Baldoma L, et al. Microbiology, 1996, **142**(7): 1833 ~ 1840.
- [4] Holcroft C C, Egan S M. J Bacteriol, 2000, **182**(12): 3529 ~ 3535.
- [5] Holcroft C C, Egan S M. J Bacteriol, 2000, **182**(23): 6774 ~ 6782.
- [6] Wickstrum J R, Egan S M. J Bacteriol, 2004, **186**(18): 6277 ~ 6285.
- [7] Egan S M, Bhende P M. J Bacteriol, 2000, **182**(17): 4959 ~ 4969.
- [8] Tobin J F, Schleif R F. J Mol Biol, 1990, **211**(1): 75 ~ 89.
- [9] Wickstrum J R, Santangelo T J, Egan S M. J Bacteriol, 2005, **187**: 6708 ~ 6718.
- [10] Khlebnikov A, Skaug T, Keasling J D. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002, **29**: 34 ~ 37.
- [11] Panagitis C A, Silverstein S J. Gene, 1995, **164**: 45 ~ 47.
- [12] Zang Y H, Zhang X, Jiang X L, et al. Appl Microbiol Biot, 2007, **74**(4): 836 ~ 842.
- [13] Razeghifard M R. Protein Express Purif, 2004, **37**(1): 180 ~ 186.