

# 基于 MS2 噬菌体 *lys* 基因的质粒型条件自溶菌的构建与应用

吕敏佳<sup>1,2</sup>, 刘捷婧<sup>1</sup>, 周于婷<sup>1</sup>, 陈萍<sup>1</sup>, 欧阳永长<sup>\*1</sup>

1 广州医科大学生物化学与分子生物学教研室, 广东 广州 511436

2 广州医科大学附属第二医院 转化医学中心, 广东 广州 510260

吕敏佳, 刘捷婧, 周于婷, 陈萍, 欧阳永长. 基于 MS2 噬菌体 *lys* 基因的质粒型条件自溶菌的构建与应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4598-4607

Lü Minjia, Liu Jiejing, Zhou Yuting, Chen Ping, Ouyang Yongchang. Construction and application of plasmid-based opportunistic autolytic bacteria based on gene *lys* of MS2 bacteriophage[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4598-4607

**摘要:** 【背景】传统外源蛋白的原核表达通常需要以超声破碎或者酶解的方式破碎菌体, 过程比较烦琐。【目的】构建基于 MS2 噬菌体 *lys* 基因的质粒型条件自溶菌, 以简化外源蛋白的获取流程。【方法】从 MS2 噬菌体中克隆 *lys* 基因, 构建重组表达质粒, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中异源表达, 以此构建质粒型条件自溶菌, 通过生长曲线和菌落形成单位反映自溶菌裂解效率, 利用 SDS-PAGE 检测外源蛋白释放情况。【结果】构建了 pBAD-*lys* BL21(DE3)、pBAD-Opti-*lys* BL21(DE3)及 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)这 3 种质粒型条件自溶菌。以上自溶菌在阿拉伯糖诱导后其宿主裂解效率均为 99.99%以上, CFU 结果显示含 pCDF-BAD-Opti-*lys* 质粒的宿主裂解效果更优, 在此自溶菌 BL21(DE3)中表达含 His 标签的重组绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP), 经阿拉伯糖诱导后菌体中约 63.00%以上的 eGFP 释放至胞外, 利用 Ni-NTA 可以直接从培养基中纯化得到约 30 kDa 的单一目的蛋白。【结论】基于 MS2 噬菌体 *lys* 基因成功构建了阿拉伯糖诱导的质粒型条件自溶菌, 此自溶菌能够以自我裂解的方式释放大部分胞内外源蛋白, 简化传统外源蛋白获取流程。

**关键词:** MS2 噬菌体; *lys*; 自溶菌; 蛋白纯化

基金项目: 国家自然科学基金-广东联合基金(U1901210); 广州市科技计划基础与应用基础研究项目(2021020021133); 广东省医学科研基金(B2021421)

Supported by: National Natural Science Foundation of China-Guangdong United Fund (U1901210); Basic and Applied Basic Research Project of Guangzhou Science and Technology Project (2021020021133); Medical Research Fund of Guangdong Province (B2021421)

\*Corresponding author: E-mail: ycouyang@gzhmu.edu.cn

Received: 2022-03-21; Accepted: 2022-05-09; Published online: 2022-06-12

# Construction and application of plasmid-based opportunistic autolytic bacteria based on gene *lys* of MS2 bacteriophage

LÜ Minjia<sup>1,2</sup>, LIU Jiejing<sup>1</sup>, ZHOU Yuting<sup>1</sup>, CHEN Ping<sup>1</sup>, OUYANG Yongchang<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, Guangdong, China

<sup>2</sup> Translational Medicine Center, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong, China

**Abstract: [Background]** Conventional prokaryotic expression of heterologous protein usually requires ultrasonication or enzymolysis to lyse bacteria, the process of which is quite cumbersome. **[Objective]** We aimed to construct a type of plasmid-based opportunistic autolytic bacteria that exploited the lysis (*lys*) gene-mediated autolytic property of MS2 bacteriophage to facilitate the process of obtaining heterologous proteins. **[Methods]** The gene *lys* was cloned from the MS2 bacteriophage into a recombinant expression plasmid, which was heterologously-expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), and a novel type of plasmid-based opportunistic autolytic bacteria was generated. By L-arabinose induction, the lytic efficiency of the above-mentioned bacteria was assessed by growth curves and colony forming units (CFUs). Finally, the release levels of the heterologous protein were examined by SDS-PAGE. **[Results]** Three strains of plasmid-based opportunistic autolytic bacteria, pBAD-*lys* BL21(DE3), pBAD-Opti-*lys* BL21(DE3), and pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3), were constructed. Following L-arabinose induction, all three strains of plasmid-based opportunistic autolytic bacteria achieved over 99.99% lytic efficiency. CFU data indicated that the host carrying pCDF-BAD-Opti-*lys* plasmid had better lytic effect than the other two. Upon L-arabinose-induced lysis of this host strain with heterologous expression of His-tagged enhanced green fluorescent protein (eGFP), more than 63% of eGFP were released to the outside of the cell and a single target protein of approximately 30 kDa was obtained directly from the culture medium by Ni-NTA. **[Conclusion]** In this study, we have successfully constructed a type of *lys*-mediated, plasmid-based opportunistic autolytic bacteria, which is capable of releasing most of the cytosolic heterologous proteins through L-arabinose-induced autolysis, simplifying the traditional process to acquire heterologous proteins.

**Keywords:** MS2 bacteriophage; *lys*; autolytic bacteria; protein purification

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等杆菌一直是原核表达系统中常用的蛋白表达宿主<sup>[1-2]</sup>。由于大肠杆菌表达系统具有背景清晰、操作技术简便、培养条件简单、不易污染等优点,成为应用最广泛、最成功的外源基因表达体系,在外源蛋白表达的众多原核表达系统中占有绝对的优势<sup>[3]</sup>。传统外

源蛋白的原核表达及纯化需要经过工程菌株的培养、外源蛋白的诱导表达、菌体回收、菌体破碎及纯化等流程。其中,菌体破碎是获得胞内目的蛋白不可缺少的步骤。目前菌体破碎的方法主要是超声破碎和酶解,但这两种方法在日常应用中易受到限制<sup>[4-6]</sup>。因此,研究一种更加简便的外源蛋白获取技术就显得尤为重要。

大型双链脱氧核糖核酸(double-stranded deoxyribonucleic acid, dsDNA)噬菌体的裂解是通过“多基因裂解系统”来实现的,该系统由内溶酶(endolysin)和穿孔素(holin)组成,通过穿孔素在细胞膜上形成跨膜孔使内溶酶到达细胞壁肽聚糖(peptidoglycan, PG)层而发挥裂解功能,穿孔素作为触发裂解的“定时器”,通过对内溶酶进入 PG 的途径施加精确的时间控制来主动裂解噬菌体<sup>[7]</sup>。相反地,目前还存在一种尚未被广泛研究的噬菌体裂解类型——单基因裂解系统,这种裂解模式被单链脱氧核糖核酸(single-stranded deoxyribonucleic acid, ssDNA)和单链核糖核酸(single-stranded ribonucleic acid, ssRNA)的小单链核酸(single-stranded nucleic acid, ssNA)噬菌体所用,该系统只编码一个单一的裂解蛋白,如 ssDNA 噬菌体  $\phi$ X174 编码的 *E* 基因、ssRNA 噬菌体 Q $\beta$  编码的 *A2* 基因和 MS2 噬菌体的 *lys* 基因<sup>[8]</sup>。ssDNA 噬菌体  $\phi$ X174 编码的 *E* 基因,ssRNA 噬菌体 Q $\beta$  编码的 *A2* 基因通过结合和抑制 PG 前体途径中的几种酶来阻断细菌细胞壁的合成<sup>[9-11]</sup>。这种裂解方式被概括为通过表达“蛋白抗体”抑制 PG 合成从而达到裂解宿主的效果<sup>[12-14]</sup>。MS2 噬菌体的 *lys* 基因裂解功能的分子机制还尚不清楚,但已有研究表明其编码一个 75 个氨基酸的多肽,有一个可有可无、高度碱性的 N-端结构域,可能是一种参与维持细胞壁完整性的蛋白质<sup>[8,15-16]</sup>。MS2 噬菌体的 *lys* 基因未抑制宿主细胞壁 PG 的合成,而是通过与宿主因子 DnaJ 相互作用介导宿主的裂解,由宿主伴侣参与调节 *lys* 基因的功能<sup>[17-18]</sup>。基于上述系统和功能,本研究选择裂解机制较简单直接的 MS2 噬菌体 *lys* 基因作为裂解大肠杆菌的工具,使重组外源蛋白在宿主中表达并简化外源蛋白的获取流程,并进一步为 MS2 噬菌体 *lys* 基因裂解

机制的研究提供原材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

pBAD-HisA 质粒、pCDF-BAD-HisA 质粒(ori: CloDF13)、pET28a-eGFP 质粒均来自本实验室质粒库;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3)感受态细胞均购于北京索莱宝生物科技有限公司。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

内切酶 *Nco* I、*Hind* III 和 T4 DNA ligase, 宝生物工程(大连)有限公司; Ni-IDA-Sefinose<sup>TM</sup> Resin (Settled Resin)、质粒提取试剂盒、阿拉伯糖(L-arabinose)及其他生化试剂,生工生物工程(上海)股份有限公司。

超声破碎仪,SONICS 公司;台式冷冻离心机和全波长扫描式多功能读数仪,赛默飞世尔公司;电热恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;分光光度计,上海精密科学仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 表达载体和质粒型条件自溶菌的构建

将通过 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切的 *lys* 基因克隆到 pBAD-HisA 载体上并进行测序鉴定,经测序验证正确的重组载体命名为 pBAD-*lys* (氨苄抗性, Amp<sup>+</sup>)。

在 *lys* 基因的基础上,根据大肠杆菌的密码子使用频率优化密码子,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成了 Opti-*lys* 基因,该基因片段已克隆到 pUC57 载体上,称为 pUC57-Opti-*lys* 质粒。pBAD-HisA、pCDF-BAD-HisA 和 pUC57-Opti-*lys* 质粒用 *Nco* I 酶和 *Hind* III 酶进行双酶切,酶切产物使用 T4 DNA ligase 连接,转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,筛选阳性克隆并进行测序,经测序验证正确的重组载体分别命名为 pBAD-Opti-*lys* (氨苄抗性, Amp<sup>+</sup>)和 pCDF-BAD-Opti-*lys* (链霉素抗

性, Sm<sup>+</sup>)。

将质粒 pBAD-*lys*、pBAD-Opti-*lys* 和 pCDF-BAD-Opti-*lys* 分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 挑取阳性克隆后得到 pBAD-*lys* BL21(DE3)、pBAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 和 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 这 3 种质粒型条件自溶菌。

### 1.2.2 质粒型条件自溶菌裂解效率的测定

分别取 1 mL 构建成功的质粒型条件自溶菌培养过夜的菌液接种于含有相应抗生素(氨苄青霉素 50 μg/mL、链霉素 50 μg/mL)的 2 瓶 50 mL LB 液体培养基中, 37 °C、185 r/min 继续培养 2.5 h 后, 混匀 2 瓶菌液, 而后将菌液平分, 设置①号对照组和②号实验组, ②号实验组加入终浓度为 0.2% 的阿拉伯糖, ①号对照组加入等体积的灭菌去离子水, 在 37 °C、185 r/min 培养, 分别于 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 h 测定菌液  $OD_{600}$ , 以裂解时间为横坐标、 $OD_{600}$  为纵坐标, 绘制生长曲线图。分别于 1、2、3 h 取 100 μL 菌液稀释成适当梯度后涂布平板, 次日观察平板菌落生长情况, 计算菌落形成单位(CFU), 并计算 3 种质粒型条件自溶菌的裂解率, 计算公式为: 裂解率(%)=[1-(实验组/对照组)]×100。

### 1.2.3 不同浓度的阿拉伯糖对 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 生长的影响

按照 1.2.2 方法, 分别使用终浓度为 0.2%、0.02% 和 0.002% 的阿拉伯糖对 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 进行诱导裂解, 绘制不同浓度诱导下 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 的生长曲线。

### 1.2.4 质粒型条件自溶菌的诱导表达和胞内 eGFP 释放的检测

将 pET28a-eGFP 质粒转化条件自溶菌 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 中, 活化过夜, 次日取 1 mL 菌液接种于含有相应抗生素(氨苄

青霉素 50 μg/mL、链霉素 50 μg/mL)的 50 mL LB 液体培养基中, 接种 2 瓶, 37 °C、185 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.1–0.3 后, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG), 37 °C 诱导表达至  $OD_{600}$  为 0.2–0.6 后, 混匀 2 瓶菌液, 而后将菌液平分, 取其中 1 瓶加入终浓度为 0.2% 的阿拉伯糖, 剩下 1 瓶作为对照。37 °C 继续培养, 分别于 1、2、3 h 测定菌液  $OD_{600}$ , 检测自溶菌表达 eGFP 后, 阿拉伯糖诱导裂解宿主情况。分别取阿拉伯糖诱导表达 1、2、3 h 后的菌液, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 后, 保存上清 A, 另外取 1 mL 菌液冰上超声破碎(破碎 3 s, 停 3 s, 共 5 min), 4 °C、1 2000 r/min 离心 2 min 后保存上清液 B, 对照组菌液于 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 后, 保存上清 C。分别取 100 μL 上清液, 在激发波长 488 nm、发射波长 510 nm 的条件下检测 eGFP 荧光强度, 并计算胞内 eGFP 的释放率, 计算公式为: 释放率(%)=实验组上清中 eGFP 荧光强度/实验组破碎后上清中 eGFP 荧光强度×100。

### 1.2.5 Ni-NTA 纯化 eGFP 蛋白

将条件自溶菌 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 诱导表达 3 h 后的实验组菌液于 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 收集离心后的上清液(上清 A), 使用 0.22 μm 一次性针头过滤器过滤上清 A, 在滤液中加入 1% 的 1 mol/L Tris-HCl 溶液(pH 8.0)和 300 mmol/L NaCl 制备纯化样品。用 2 倍 Ni-NTA 体积的 Binding Buffer (1% 1 mol/L Tris-HCl 溶液(pH 8.0)平衡柱子, 控制流速为 0.5 mL/min (大概 1–2 s 一滴), 加入纯化样品, 用 2 倍 Ni-NTA 体积的 Washing Buffer (1% pH 8.0 的 1 mol/L Tris-HCl 溶液, 20 mmol/L imidazole, 300 mmol/L NaCl)洗脱杂蛋白, 用 Elution Buffer (1% pH 8.0 的 1 mol/L Tris-HCl 溶液, 200 mmol/L imidazole, 300 mmol/L NaCl)

洗脱目的蛋白。采用 SDS-PAGE 的方法对洗脱后的目的蛋白质进行检测分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒型条件自溶菌的构建

利用 *Nco* I 和 *Hind* III 对 *lys* 基因及根据大肠杆菌密码子使用频率优化后的 *Opti-lys* 基因进行酶切, 并将酶切后的 *lys* 基因或 *Opti-lys* 基

因克隆到质粒 pBAD-HisA 和 pCDF-BAD-HisA (实验室自建载体) 上, 质粒经生物工程(上海)股份有限公司测序确认, 质粒图谱如图 1 所示, *lys* 或 *Opti-lys* 的表达由阿拉伯糖启动子调控, pBAD-*lys* 和 pBAD-*Opti-lys* 携带 ColE1 复制子, pCDF-BAD-*Opti-lys* 携带 CloDF13 复制子。将上述 3 种质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3) 获得质粒型条件自溶菌。

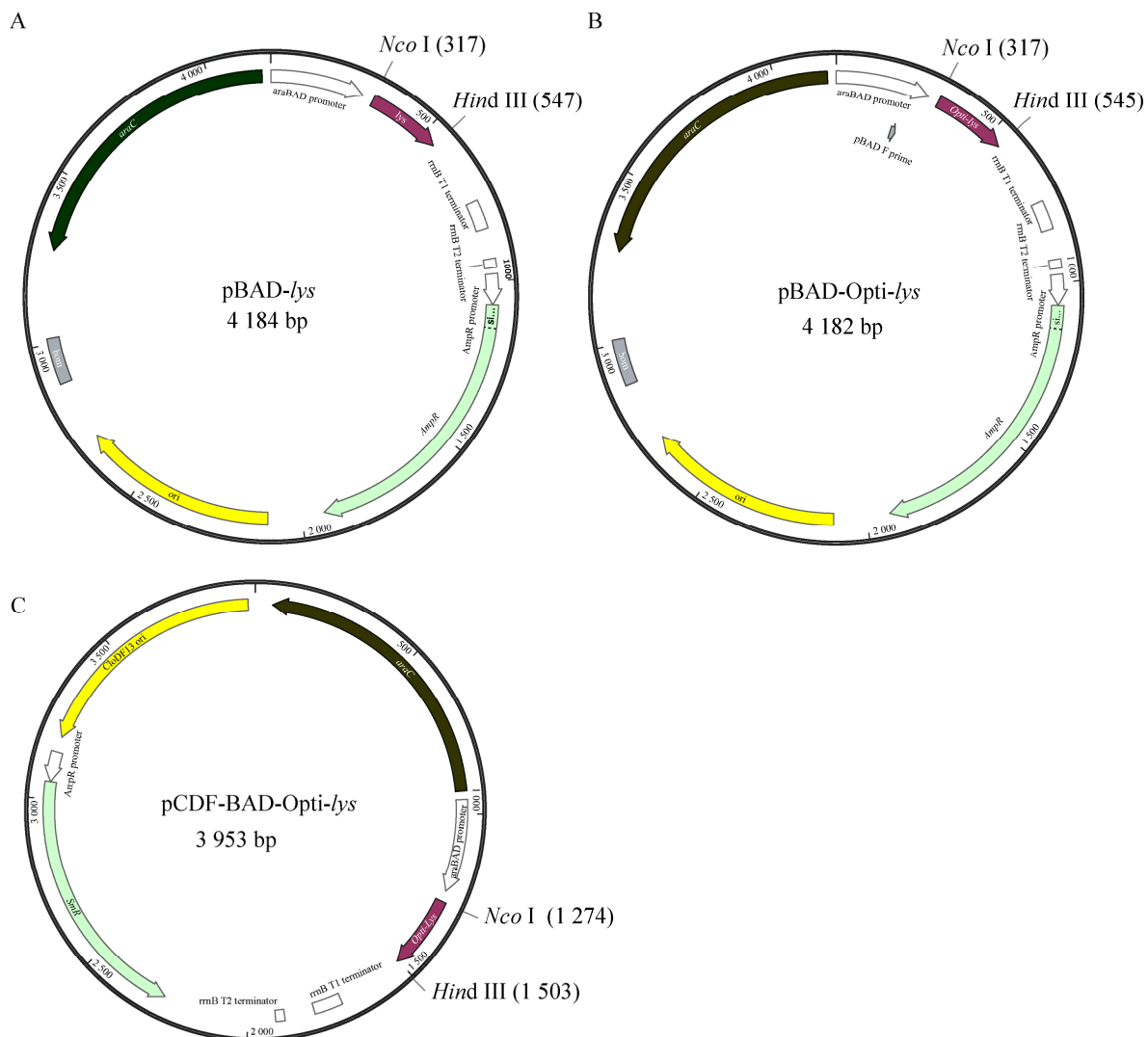


图 1 表达载体的质粒图谱 A: pBAD-*lys* 质粒图谱; B: pBAD-*Opti-lys* 质粒图谱; C: pCDF-BAD-*Opti-lys* 质粒图谱

Figure 1 Plasmid diagram of expression vectors. A: Plasmid diagram of pBAD-*lys*; B: Plasmid diagram of pBAD-*Opti-lys*; C: Plasmid diagram of pCDF-BAD-*Opti-lys*.

## 2.2 质粒型条件自溶菌的裂解效率

与含有相同表达载体而不添加诱导剂的自溶菌大肠杆菌 BL21(DE3) (CK 组)相比, 经过阿拉伯糖(终浓度为 0.2%)诱导 0.5 h 后的自溶菌 pBAD-*lys* BL21(DE3)、pBAD-Opti-*lys* BL21(DE3)和 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)的  $OD_{600}$  均开始下降(图 2), 菌液逐渐澄清, 开始出现裂解, 其生长受到了显著的抑制, 而且在阿拉伯糖(终浓度为 0.2%)诱导 1、2、3 h 后的 CFU/100  $\mu$ L 均显著下降, 裂解率均能达到 99.99%以上, 其中, pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)相较于 pBAD-*lys* BL21(DE3)和 pBAD-Opti-*lys* BL21(DE3)而言, 裂解宿主的效果更显著(表 1)。

## 2.3 不同浓度阿拉伯糖诱导的 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)生长曲线

与 CK 组相比, 加入终浓度为 0.2%、0.02%和 0.002%的阿拉伯糖诱导 0.5 h 后, pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)的  $OD_{600}$  均出现明显下降, 效果基本相同(图 3)。表明不同浓度的阿拉伯糖(终浓度为 0.2%、0.02%和 0.002%)对 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)质粒型条件自溶菌裂解的影响不显著。

## 2.4 条件自溶菌 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)中重组绿色荧光蛋白(eGFP)的表达和释放

### 2.4.1 胞内 EGFP 释放的检测

与含有相同表达载体而不添加诱导剂的自

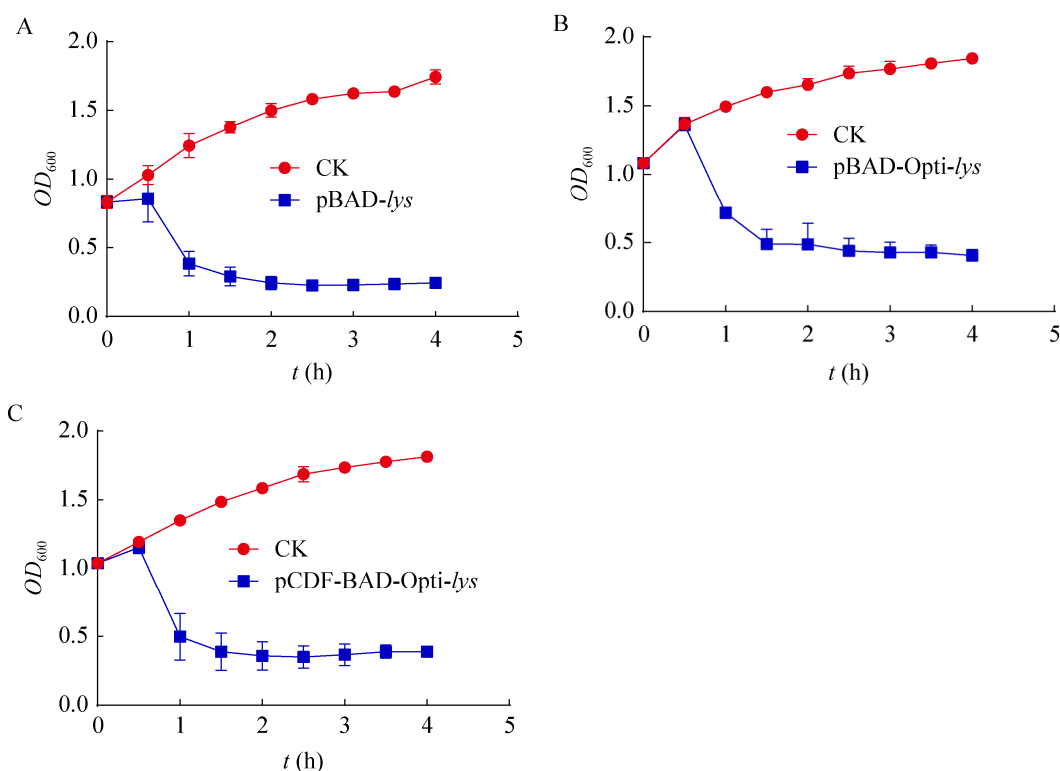


图 2 阿拉伯糖诱导质粒型条件自溶菌裂解 0-4 h 的生长曲线 A: pBAD-*lys* BL21(DE3)生长曲线; B: pBAD-Opti-*lys* BL21(DE3)生长曲线; C: pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)生长曲线

Figure 2 Growth curves of L-arabinose induced plasmid-mediated opportunistic autolyzed bacteria lysed from 0-4 h. A: Growth curves of pBAD-*lys* BL21(DE3); B: Growth curves of pBAD-Opti-*lys* BL21(DE3); C: Growth curves of pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3).

表 1 阿拉伯糖对质粒型条件自溶菌的裂解作用

Table 1 Splitting action of L-arabinose induced plasmid-mediated opportunistic autolyzed bacteria ( $n=3$ )

Time (h)	pBAD- <i>lys</i> BL21(DE3)			pBAD-Opti- <i>lys</i> BL21(DE3)			pCDF-BAD-Opti- <i>lys</i> BL21(DE3)		
	CK	0.2% L-arabinose	Lysis rate (%)	CK	0.2% L-arabinose	Lysis rate (%)	CK	0.2% L-arabinose	Lysis rate (%)
1	(2.03±0.50) ×10 <sup>9</sup>	(2.04±0.80) ×10 <sup>4*</sup>	99.99	(3.53±0.26) ×10 <sup>11</sup>	(4.26±0.24) ×10 <sup>4**</sup>	99.99	(1.08±0.18) ×10 <sup>11</sup>	(1.24±0.49) ×10 <sup>4**</sup>	99.99
2	(1.95±0.04) ×10 <sup>10</sup>	(3.60±1.18) ×10 <sup>3**</sup>	99.99	(3.39±0.86) ×10 <sup>11</sup>	(5.46±0.13) ×10 <sup>4**</sup>	99.99	(2.04±0.08) ×10 <sup>11</sup>	(2.32±0.93) ×10 <sup>3**</sup>	99.99
3	(4.58±0.38) ×10 <sup>11</sup>	(1.00±0.10) ×10 <sup>3**</sup>	99.99	(1.72±0.52) ×10 <sup>11</sup>	(5.10±0.50) ×10 <sup>3*</sup>	99.99	(1.92±0.48) ×10 <sup>11</sup>	(1.70±0.72) ×10 <sup>3**</sup>	99.99

Note: \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

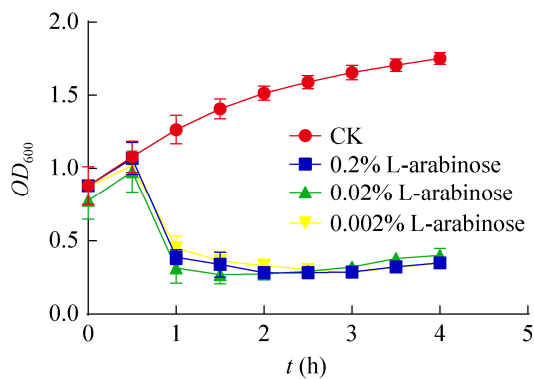
图 3 不同浓度阿拉伯糖对 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)生长的影响

Figure 3 Effects of varying L-arabinose concentrations on the growth of pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21 (DE3).

溶菌大肠杆菌 BL21(DE3) (CK 组)相比,加入阿拉伯糖(终浓度为 0.2%)诱导 1、2、3 h 后, pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)胞外培养基中 eGFP 荧光强度明显增加( $P<0.01$ ),而且从宿主胞内释放到培养基中的 eGFP 释放率分别为 44.75%、

59.42%和 63.47% (表 2)。这就初步表明了 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)能够在阿拉伯糖的诱导下自我裂解,释放其胞内表达的外源蛋白。

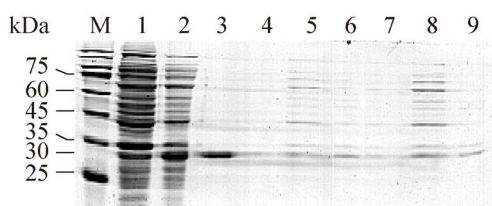
#### 2.4.2 胞外培养基中 eGFP 蛋白的纯化

在 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)中表达外源蛋白 eGFP,加入阿拉伯糖诱导 3 h 后,利用 Ni-NTA 对菌液上清中的 eGFP 进行纯化。如图 4 所示,与 CK 组(泳道 4、7,菌种本身存在 eGFP 本地表达)相比,加入阿拉伯糖诱导后 1、3 h 菌液上清中的蛋白显著增加(泳道 5、8),约为超声破碎组上清中的 eGFP 蛋白表达量的一半(泳道 6、9,稀释至 1/2),与表 2 的结果一致。Ni-NTA 法对诱导裂解 3 h 的菌液上清进行纯化,结果得到发绿色荧光的蛋白,SDS-PAGE 显示约 30 kDa,可以确定为重组表达的 eGFP。这就表明经过阿拉伯糖诱导后, pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)能够裂解宿主释放 eGFP,而且能纯化此目的蛋白 eGFP。

表 2 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)裂解释放的宿主 eGFP (pET28a-eGFP)的荧光强度Table 2 Fluorescence intensity of eGFP released by host after pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) lysis ( $n=3$ )

Time (h)	CK	Induced by 0.2% L-arabinose		Target protein release rate (%)
		Supernatant	Supernatant ultrasonication	
1	1.66±0.07	78.16±0.02****	174.66±0.49	44.75
2	4.70±0.17	130.16±1.96****	219.06±0.54	59.42
3	8.56±0.11	149.56±0.81****	235.66±0.16	63.47

Note: \*\*\*\*:  $P<0.01$ .



**图 4 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3)自溶菌中的 eGFP 的表达与纯化** 1: 无 IPTG 诱导; 2: IPTG 诱导 1.5 h; 3: Ni-NTA 纯化后的上清; 4: 未经阿拉伯糖诱导裂解 1 h 的上清; 5: 阿拉伯糖(终浓度 0.2%)诱导裂解 1 h 的上清; 6: 阿拉伯糖(终浓度 0.2%)诱导裂解 1 h 菌体超声破碎后的上清(稀释至 1/2); 7: 未经阿拉伯糖诱导裂解 3 h 的上清; 8: 阿拉伯糖(终浓度 0.2%)诱导裂解 3 h 的上清; 9: 阿拉伯糖(终浓度 0.2%)诱导裂解 3 h 菌体超声破碎后的上清(稀释至 1/2)

Figure 4 Expression and purification of eGFP in pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) autolyzed bacteria. Lane 1: Mycelium of pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) before IPTG induction; Lane 2: Mycelium of pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) after IPTG inducing 1.5 h; Lane 3: L-arabinose induced pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) lysis for 3 h after the supernatant of the medium purified by Ni-NTA; Lane 4: Medium supernatant of pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) cultured for 1 h without L-arabinose induction; Lane 5: Medium supernatant after 1 h of pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) lysis induced by L-arabinose (final concentration 0.2%); Lane 6: Supernatant of mycelium of pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) after 1 h of L-arabinose induction after ultrasonic fragmentation; Lane 7: Medium supernatant of pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) cultured for 3 h without L-arabinose induction; Lane 8: Medium supernatant after 3 h of pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) lysis induced by L-arabinose (final concentration 0.2%); Lane 9: Supernatant of mycelium of pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) after 3 h of L-arabinose induction after ultrasonic fragmentation

### 3 讨论

本研究基于 MS2 噬菌体 *lys* 基因对宿主的裂

解能力, 构建了 pBAD-*lys* BL21(DE3)、pBAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 和 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 这 3 种质粒型条件自溶菌, 通过阿拉伯糖诱导 *lys* 基因的表达, 启动自溶菌的自溶程序, 并对 3 种质粒型条件自溶菌的裂解效率进行测定, 结果表明三者均具有 99.99% 以上的裂解率; 在此基础上, 对诱导剂阿拉伯糖的使用浓度进行了进一步的分析, 证明阿拉伯糖浓度的改变不能显著影响三者的裂解效率。有研究指出密码子的偏好性对蛋白的表达有直接的影响, 能通过 tRNA 在翻译水平上改变蛋白的翻译速度, 这种利用密码子偏好性构建的机制能够加快蛋白的合成<sup>[19-21]</sup>。在本研究的自溶菌构建过程中, 根据大肠杆菌密码子的使用频率, 对 *lys* 基因进行了优化, 设计合成了 Opti-*lys* 基因, 结果表明优化后的 Opti-*lys* 基因对宿主的裂解效率优于 *lys* 基因。同时, 由于复制子相同的载体在复制后往往会出现潜在的竞争, 从而导致其在复制后出现基因不均等表达、丢失等问题, 非常不利于载体的共存<sup>[22-23]</sup>。因此, 本研究将 MS2 噬菌体中的 *lys* 基因克隆到不同复制子类型的载体上, 使得条件自溶性宿主能够与商品化的多种载体如 pET 系列载体相容, 解决了相同复制子导致的互斥问题。本研究为菌体破碎提供了一种新的更简便的方法, 为外源蛋白的原核表达提供了新的思路, 为功能性重组蛋白产品商业化发展提供了新材料和新技术, 同时为进一步研究 *lys* 基因的作用及新型抗菌药物的开发奠定了基础。

在成功构建了质粒型条件自溶菌的基础上, 本研究利用构建的 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 表达 eGFP 蛋白, 并成功从胞外培养基中获取并纯化出了 eGFP 蛋白, 而且外源蛋白的转入并不影响此自溶菌的裂解。这证明利用条件自溶菌表达并直接从培养基中纯化重



组蛋白的方法是可行的。然而,实验结果也表明与超声破碎方法比较,宿主经诱导自溶后释放至胞外培养基中的重组蛋白并不充分,只占总蛋白的 63.00%左右,其原因可能与 *lys* 基因的裂解机制相关。*lys* 导致宿主细菌壁出现孔状结构,释放内容物,但不会完全使宿主裂解成碎片,而是形成菌影<sup>[16]</sup>。因此,与超声破碎方法相比较,*lys* 裂解宿主并不完全,导致部分重组表达的蛋白不能完全释放到培养基中,仍被截留在宿主内。有研究通过对 ØX174 噬菌体裂解基因 *E* 进行基因重排,从而增强了其溶菌效率,是否能够通过对本研究中的裂解基因 *lys* 进行基因重排,从而增强其溶菌效率还需要进一步研究<sup>[24]</sup>。然而也有研究指出,菌影由于具有与活菌相同的细胞形态和天然的表面抗原结构,所以具有与活菌相似的免疫特性,能够通过一种类似自然感染的方式被人体摄入并被巨噬细胞等抗原递呈细胞吞噬,从而产生强烈的免疫应答,以多种方式来增强 DNA 疫苗的免疫活性,而 *lys* 基因编码的裂解蛋白被指出可能用于制备这种菌影<sup>[25-26]</sup>。由此推测,本研究构建的基于 *lys* 基因的质粒型条件自溶菌在自溶后形成的菌影可以用来增强 DNA 疫苗的免疫活性,但是否具备这一功能,还需要进一步的实验进行验证。

## 4 结论

本研究基于 MS2 噬菌体的 *lys* 基因构建了 pBAD-*lys* BL21(DE3)、pBAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 和 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 这 3 种质粒型条件自溶菌,三者均能在阿拉伯糖的诱导作用下有效裂解宿主菌,裂解效率均能达到 99.99% 以上,而且优化后的 Opti-*lys* 基因对宿主的裂解效果更优。阿拉伯糖诱导 pCDF-BAD-Opti-*lys* BL21(DE3) 的裂解能使胞内约 63.00% 以上的

eGFP 蛋白释放至培养基中,镍亲和层析柱可直接从培养基中纯化 eGFP,简化了传统外源蛋白的获取流程。

## REFERENCES

- [1] Porowińska D, Wujak M, Roszek K, Komoszyński M. Prokaryotic expression systems[J]. Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej: Online, 2013, 67: 119-129
- [2] 黄浩, 王阳, 堵国成, 康振. 重组蛋白微生物表达系统的研究进展[J]. 生物产业技术, 2019(3): 36-43  
Huang H, Wang Y, Du GC, Kang Z. Research progress in microbial expression systems for recombinant protein production[J]. Biotechnology & Business, 2019(3): 36-43 (in Chinese)
- [3] 祁浩, 刘新利. 大肠杆菌表达系统和酵母表达系统的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(17): 4-6, 52  
Qi H, Liu XL. Research progress of expression systems of *Escherichia coli* and yeast[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(17): 4-6, 52 (in Chinese)
- [4] Walther C, Dürauer A. Microscale disruption of microorganisms for parallelized process development[J]. Biotechnology Journal, 2017, 12(7)
- [5] Haddad L, Babaeipour V, Mofid MR. The effect of cell disruption techniques and chaotropic agents on the downstream purification process of mecasermin produced as inclusion body in *E. coli*[J]. Research in Pharmaceutical Sciences, 2015, 10(6): 553-561
- [6] Walther C, Kellner M, Berkemeyer M, Brocard C, Dürauer A. A microscale bacterial cell disruption technique as first step for automated and miniaturized process development[J]. Process Biochemistry, 2017, 59: 207-215
- [7] Chamakura KR, Young R. Single-gene lysis in the metagenomic era[J]. Current Opinion in Microbiology, 2020, 56: 109-117cell
- [8] Chamakura K, Young R. Phage single-gene lysis: finding the weak spot in the bacterial cell wall[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(10): 3350-3358
- [9] Bernhardt TG, Roof WD, Young R. Genetic evidence that the bacteriophage φX174 lysis protein inhibits cell wall synthesis[J]. PNAS, 2000, 97(8): 4297-430
- [10] Zheng Y, Struck DK, Young R. Purification and functional characterization of phiX174 lysis protein E[J]. Biochemistry, 2009, 48(22): 4999-5006
- [11] Bernhardt TG, Wang IN, Struck DK, Young R. A protein antibiotic in the phage Qβ virion: diversity in lysis

- targets[J]. *Science*, 2001, 292(5525): 2326-2329
- [12] Witte A, Bläsi U, Halfmann G, Szostak M, Wanner G, Lubitz W. Phi X174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli*[J]. *Biochimie*, 1990, 72(2/3): 191-200
- [13] Reed CA, Langlais C, Kuznetsov V, Young R. Inhibitory mechanism of the Q $\beta$  lysis protein A2[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 86(4): 836-844
- [14] Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation[J]. *Microbiological Reviews*, 1992, 56(3): 430-481
- [15] Berkhout B, De Smit MH, Spanjaard RA, Blom T, Van Duin J. The amino terminal half of the MS2-coded lysis protein is dispensable for function: implications for our understanding of coding region overlaps[J]. *The EMBO Journal*, 1985, 4(12): 3315-3320
- [16] Chamakura KR, Edwards GB, Young R. Mutational analysis of the MS2 lysis protein L[J]. *Microbiology: Reading, England*, 2017, 163(7): 961-969
- [17] Chamakura KR, Tran JS, Young R. MS2 lysis of *Escherichia coli* depends on host chaperone DnaJ[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(12): e00058-e00017
- [18] Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, 63(22): 2560-2570
- [19] Chamakura KR, Tran JS, O'Leary C, Lisciandro HG, Antillon SF, Garza KD, Tran E, Min L, Young R. Rapid *de novo* evolution of lysis genes in single-stranded RNA phages[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 6009
- [20] Hanson G, Collier J. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(1): 20-30
- [21] Tuller T, Waldman YY, Kupiec M, Ruppin E. Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy[J]. *PNAS*, 2010, 107(8): 3645-3650
- [22] 杨云彭, 马晓焉, 霍毅欣. 密码子优化策略在异源蛋白表达中的应用[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(12): 2227-2237
- Yang YP, Ma XY, Huo YX. Application of codon optimization strategy in heterologous protein expression[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(12): 2227-2237 (in Chinese)
- [23] Kerrigan JJ, Xie Q, Ames RS, Lu Q. Production of protein complexes via co-expression[J]. *Protein Expression and Purification*, 2011, 75(1): 1-14
- [24] Veltkamp E, Stuitje AR. Replication and structure of the bacteriocinogenic plasmids clo DF13 and CoI E1[J]. *Plasmid*, 1981, 5(1): 76-99
- [25] 赵丹, 郑文浩, 焦红梅, 李国才. 菌影作为疫苗佐剂的潜力及其机制的研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33(4): 461-464
- Zhao D, Zheng WH, Jiao HM, Li GC. Progress in research on potential and mechanism of bacterial ghosts as adjuvant[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2020, 33(4): 461-464 (in Chinese)
- [26] 靳小攀, 季守平. 细菌菌影在 DNA 疫苗研究中的作用[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(7): 92-96
- Jin XP, Ji SP. Research in bacterial ghost as DNA vaccine delivery system[J]. *China Biotechnology*, 2010, 30(7): 92-96 (in Chinese)