

应用 CTB 基因启动子及信号肽 序列构建分泌性表达系统

曹 诚 石成华 李 平 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

摘 要 利用霍乱毒素 B 亚基基因的启动子、信号肽序列及 ctx 操纵子的转录终止信号构建了分泌性表达的质粒载体 pMC05S。 β -半乳糖苷酶基因克隆至霍乱毒素 B 亚基基因的信号肽序列下游后能得到高效分泌性表达。不同的宿主菌和培养成分中对 β -半乳糖苷酶的表达产量有较大的影响,以 MM2 为宿主菌、在玉米浆培养基中 β -半乳糖苷酶的表达产量达 4 100u/ml,产物的大部分分泌至细胞的周质;活力测定的结果与 SDS-PAGE 电泳测定结果基本一致,说明表达的 β -半乳糖苷酶绝大部分都具有酶活性。构建的蛋白质分泌性表达的载体-宿主系统及合适的培养条件为易形成包含体的蛋白质的高效表达提供了一条新的途径。

关键词 霍乱毒素 B 亚基,信号肽,质粒,分泌, β -半乳糖苷酶

基因的高效表达是现代遗传工程的主要任务之一。现在已经有许多适于在原核系统中高效表达外源基因的表达系统,目的基因的表达产物最高可占细菌总蛋白量的 60%以上。但现在应用的启动子均在诱导后短时间内迅速表达大量蛋白,一般都形成包含体,蛋白质呈不溶解状态,失去其生物活性。因此在蛋白表达后必须经过复杂的复性过程才能得到有活性的蛋白产物,并随表达蛋白性质不同,复性的效率差异很大,给活性蛋白的表达带来很大困难。

蛋白质的分泌性表达是避免表达产物形成包含体的有效方法,蛋白表达后分泌至细胞周质或胞外时,处于良好的氧化-还原环境,不易形成包含体。霍乱毒素 B 亚基基因(ctxB)上游存在一个较强的启动子(曹诚等,待发表),在该启动子的控制下,霍乱毒素 B 亚基(CTB)能够在大肠杆菌中高效表达,表达水平可达 100 μ g/ml,且表达产物的 95%以上均分泌至胞外,表达产物的氨基端序列分析表明其信号肽能正确切除^[1],因此 CTB 的信号肽适合用于构建分泌载体。本研究以 ctb 启动子、ctxB 基因的 SD 序列及 ctx 操纵子的转录终止信号为基本元件构建了分泌性表达载体,并实现了 β -半乳糖苷酶基因的分泌性表达。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

质粒 pUC18CTB 为我室构建,是将从霍乱毒素 569B 株克隆的霍乱毒素操纵子的 XbaI-EcoRI 限制性片段克隆至 pUC18 构建的重组质粒,转化大肠杆菌后能高效表达 CTB 且分泌至细胞外;启动子探测载体 pKK232-8 购自 Pharmacia 公司;分泌性表达质粒

载体 pORF' 为本室构建,它含有完整的 β -半乳糖苷酶基因,在基因的 5' 端含有合适的酶切位点,适于融合在 CTB 基因信号肽序列的 3' 端。大肠杆菌 MM2 和 MH3000 均为我室保存菌株。

1.2 酶及其它试剂

限制酶 DNA 连接酶为 Promega 公司产品,PCR 试剂盒为 Cetus 产品,对硝基苯基- β -D-半乳糖苷(pNPG)、X-gal 购自 BRL 公司,用作分子量标准的 β -半乳糖苷酶购自 Sigma 公司。

1.3 PCR 引物

用于扩增含 *ctb* 启动子和信号肽的 DNA 序列的引物之一是 M13 序列分析正引物,另一引物为合成的、与 CTB 信号序列的非编码链互补的 DNA 片段,在该片段的 5' 端含有 StyI、NcoI、BamHI 等酶切位点,方便基因的克隆。该引物的序列为:

P1 5'TGGATCCATGGGCATACGTTGAAGATA 3';

1.4 分子克隆技术

按文献[2]提供的方法进行,细菌周质蛋白按文献[3]抽提,膜相蛋白按文献[2]提取。

1.5 β -半乳糖苷酶的测定

按参考文献[4]进行,反应 30 分钟后加 1/2 体积 1mol/LNa₂CO₃ 终止。1 单位 β -半乳糖苷酶定义为在 28℃ 时每分钟将 1 μ mol 的 pNPG 转化为 4-硝基酚和 β -D-半乳糖的酶量。产生的 4-硝基酚的量可以溶解于 0.3mol/LNa₂CO₃ 的 4-硝基酚为标准测定,也可根据 4-硝基酚的摩尔消光系数计算得到。

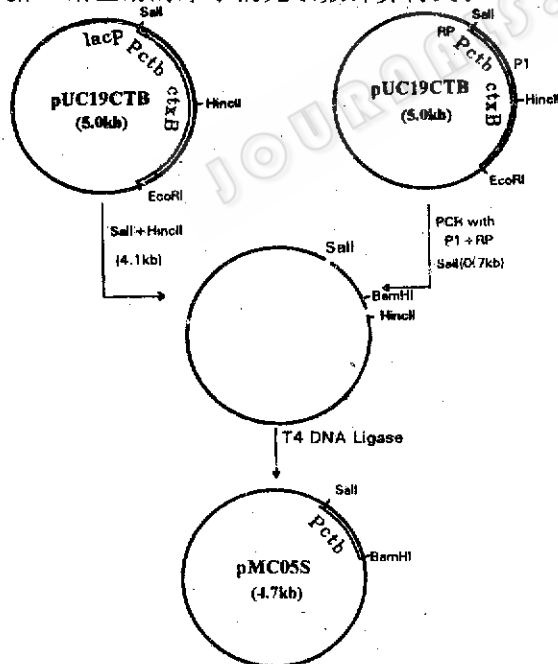


图 1 适于克隆基因分泌性表达的质粒载体 pMC05S 的构建

Fig. 1 The construction of secretion expression plasmid pMC05S

2 结果与讨论

2.1 分泌性表达质粒载体的构建

为了实现外源基因的高效分泌性表达,在构建分泌性表达质粒载体时,不仅采用了 *ctb* 启动子及信号肽序列,还尽可能地使质粒与高效表达 CT-B 的重组质粒 pUC18CTB 一致,保留 *ctx* 的转录终止序列及 *ctxB* 基因上游可能存在的其它调控序列。

以质粒 pUC18CTB 为模板,以 M13/pUC 序列分析正引物和合成引物为引物,扩增出 750bp、含 *ctb* 启动子及编码 B 亚基信号肽序列的 DNA 片段,扩增的 DNA 经纯化后用 SalI 酶切后克隆至 pUC18CTB 的 SalI-HincII 位点 (SalI 切开后用 HincII 酶切),构建质粒 pMC05S (图 1),pMC05S 经酶切鉴定正确,其中经 PCR 扩增的 750bpDNA 片

段经 DNA 序列分析,结果与文献报道完全一致(结果未列出)。pMC05S 含有 *ctb* 启动子、信号肽序列及转录终止序列,适合作分泌性表达载体。

质粒 pMC05S 在 CTB 信号肽序列下游含 BamHI、SstI、NcoI 等三个酶切位点,要引入一个多克隆位点区(MCS)并不困难,但是,在除 BamHI 切点以外的切点插入外源基因都会使表达蛋白的 N 端附加多个外源氨基酸,可能影响甚至改变表达产物的生物学活性。现在 DNA 合成已经十分方便,当目的基因 5' 端没有合适的酶切位点时,可以通过合成 Linker 来实现基因融合。

2.2 β -半乳糖苷酶的分泌性表达

β -半乳糖苷酶是一个分子量达 116kDa 的大蛋白,分子内含有多个 Cys 残基,有活性的 β -半乳糖苷酶是上五个相同亚基形成的聚合体,其活性可以通过测定它水解对硝基苯基- β -D-半乳糖苷形成的对硝基苯酚的量来测定。故 β -半乳糖苷酶不仅分子量大,活性容易测定,而且其活性依赖于高级结构,是分泌载体研究中的合适模型。

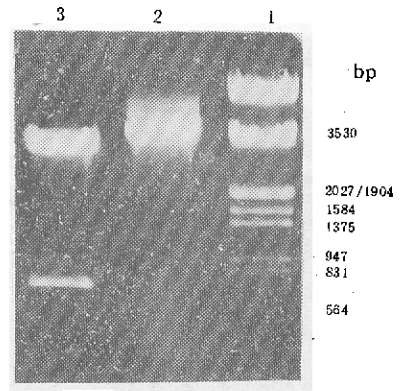


图 2 质粒 pMC05S 的酶切鉴定。

Fig. 2 Plasmid pMC05S was ascertained by restriction endonuclease digestion
1. λ (Hind III + EcoRI), 2. pMC05S(BamHI)
3. pMC05S(BamHI + SalI)

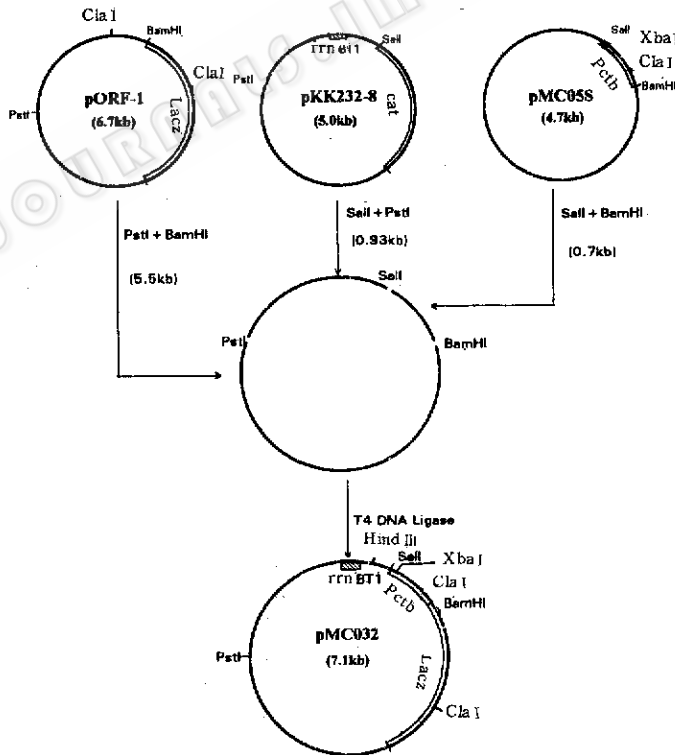


图 3 质粒 pMC032 的构建

Fig. 3 Construction of plasmid pMC032

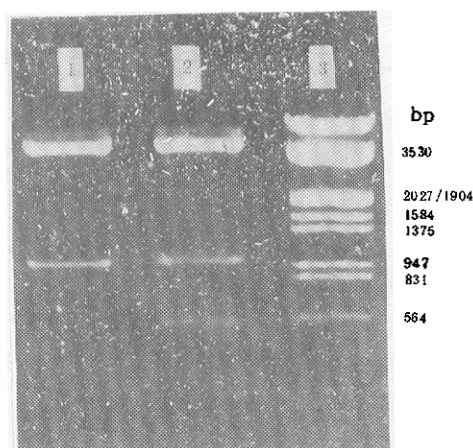


图 4 质粒 pMC032 的酶切鉴定

Fig. 4 Plasmid pMC032 was confirmed by restriction endonuclease digestion

1. λ (Hind III + EcoRI), 2. pMC032(ClaI + XbaI),
3. pMC032(ClaI)

将质粒 pMC05S 用 SalI-BamHI 双酶切,回收 750bp DNA 片段;质粒 pKK232-8 用 SalI 及 PstI 双酶切,回收 800bp DNA 片段,质粒 pORF1 用 BamHI 和 PstI 双酶切,回收 4.1kb 大片段;三个片段连接,转化,挑选 Amp 抗性转化子,得到质粒 pMC032(图 3),pMC032 含有 *ctb* 启动子及信号肽序列,且 β -半乳糖苷酶基因序列与 *ctxB* 信号肽序列的阅读框架相同,故该重组质粒转化大肠杆菌后 β -半乳糖苷酶基因应能分泌性表达。

质粒 pMC032 经酶切鉴定(图 4)正确后转化 MM2,涂布在含有 X-gal 的 LB(Ap)平板上,37℃培养 12 小时后出现蓝色菌落。由于 MM2 含 $\Delta(\text{ArgF lac})\text{U169}$ 缺失,在 X-gal 平板上不能出现蓝色菌落。表明在含 CTB 启动子的载体中, β -半乳糖苷酶可以表达,而且表达产物具有生物活性。

为进一步定量测定 β -半乳糖苷酶的表达产量,将 MM2(pMC032)接种 LB 肉汤管培养过夜,按 2%接种到 20ml YM 培养基中,37℃摇床培养,每 4 小时取样,超声破碎后测定 β -半乳糖苷酶的表达产量(图 5),可见在细胞的对数生长期, β -半乳糖苷酶的表达产量随细菌的增殖而增加,8 小时后细菌生长开始进入稳定期,这时 β -半乳糖苷酶的表达仍然继续增多,说明单个细胞内的 β -半乳糖苷酶表达增加。到 16 小时产量达到峰值(4 100u/ml)。但继续培养,细菌生长进入衰亡期, β -半乳糖苷酶的表达产量随活菌数的减少而迅速降低,至 40 小时只有 45u/ml。说明一旦细胞死亡, β -半乳糖苷酶被迅速降解或失去活性。

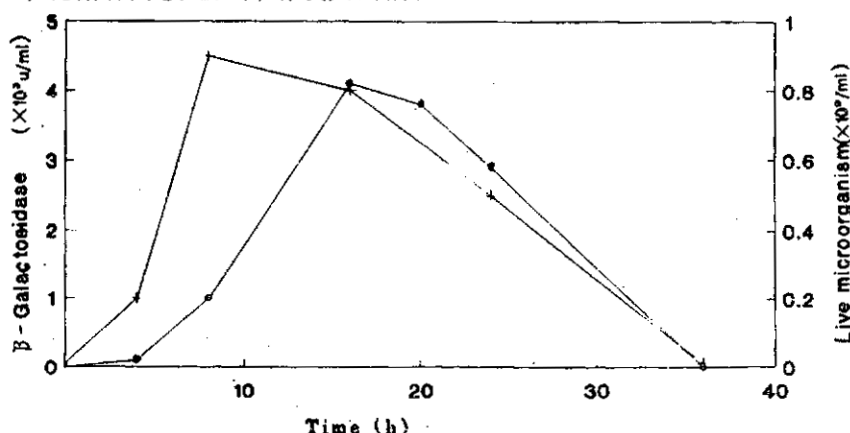


图 5 MM2(pMC032)培养中 β -半乳糖苷酶表达产量与培养时间的关系

Fig. 5 The time course of the fermentation of *E. coli* MM2(pMC032)

—●—: The expression level of β -galactosidase, —×—: Bacterial number in 1 ml of the culture

比较 MM2(pMC032)在 LB 和玉米浆培养基中表达水平的差异(表 1),在 16 小时时活菌数没有明显差异,但在玉米浆培养基中 β -半乳糖苷酶的表达产量较在 LB 培养基中高出近 10 倍;使用 JM101 为宿主菌时, β -半乳糖苷酶基因的表达产量只相当 MM2 宿主菌的 1/15,说明培养基成分及宿主菌对 *ctb* 启动子的强度有很大影响,这可能与 *ctb* 启动子的调控方式有关。

工程菌表达的 β -半乳糖苷酶中,胞外分泌不到 0.1%(玉米浆培养基 16 小时胞外 2.6u/ml)。但使用 LB 培养基在对数期时胞外分泌量的比率较高(1%),在培养基中的浓度也只有 3.5u/ml。细菌经超声破碎,离心后分别测定上清(细胞质相)和沉淀(膜相)中 β -半乳糖苷酶的活性,结果表明 90%左右的酶活性位于膜相,膜相蛋白的 SDS-PAGE 也表明表达的 β -半乳糖苷酶位于膜相(图 6B)。使用 Triton X100 等表面活性剂能使之部分溶解(表 1)。膜相中 β -半乳糖苷酶比活性达 80-100 单位/ μ g,和从野生型大肠杆菌中纯化的 β -半乳糖苷酶比活相同,排除了形成包含体的可能。因此绝大部分表达产物分泌至胞膜,并与质膜结合。文献报道 β -半乳糖苷酶大量分泌性表达对细菌具有致死效应^[5],其原因可能与其分泌后结合至质膜上破坏膜的功能有关。TK1046(pMC032)能够分泌性表达 β -半乳糖苷酶是细胞生长进入稳定期后细胞迅速死亡的原因。

将 MM2(pMC032)在 YM 培养基培养 15 小时的培养产物超声破碎,取 10 μ l 上样进行 PAGE 电泳(图 6A),表明 β -半乳糖苷酶占细菌总蛋白的 5%;若以 1 μ g 商品化的 β -半乳糖苷酶为标准,可求得工程菌 β -半乳糖苷酶的表达产量达 30 μ g/ml。膜相蛋白的 SDS-PAGE 见图 6B。

表 1 不同培养基对 β -半乳糖苷酶表达产量及定位的影响

Table 1 The effect of media and host strains on the expression level of β -galactosidase

Medium	Strain	The β -galactosidase expression level(u/ml)*			
		Total cell lysate	Medium	Membrane phase	3% triton extract
Corn liquid	MM2	4 100	2.6	3 503	1 150
L broth	MM2	477	3.5	380	85
Corn liquid	JM101	290	<1	250	72

*: The expression level were assayed after 16 hours fermentation. Total cell lysates were prepared by ultrasonic. Membrane phase was appeared as precipitate, and can partly be solubilized in 3% Triton X100.

如前述, β -半乳糖苷酶分泌性表达水平过高对细胞具有致死效应,在研究中我们也发现将质粒 pMC032 转化至大肠杆菌 MH3000 不能得到转化子。但是以 MM2 为宿主时细菌能够生长并表达有活性的 β -半乳糖苷酶,这可能因为 MM2(pMC032)培养至 8 小时时 β -半乳糖苷酶表达水平仍很低,故对细菌的生长影响较小,当 β -半乳糖苷酶大量表达时(8 小时以后)细胞即经过一个较短的稳定期后进入衰亡期,也说明 β -半乳糖苷酶的大量分泌性表达对细菌具有的致死作用。此外也可能与 MM2 含外膜蛋白 B 含 *ompBcsI* 突变有关。

综上所述,我们成功地构建了适于蛋白质分泌性表达的载体、宿主系统,探索了合适的培养条件,使 1043 个氨基酸残基的 β -半乳糖苷酶基因能够得到较高水平的表达,且表达产物绝大部分具有生物学活性。如果将该系统用于表达分子量较小、结构相对简单的蛋白质时,可能进一步提高外源基因的表达产量。

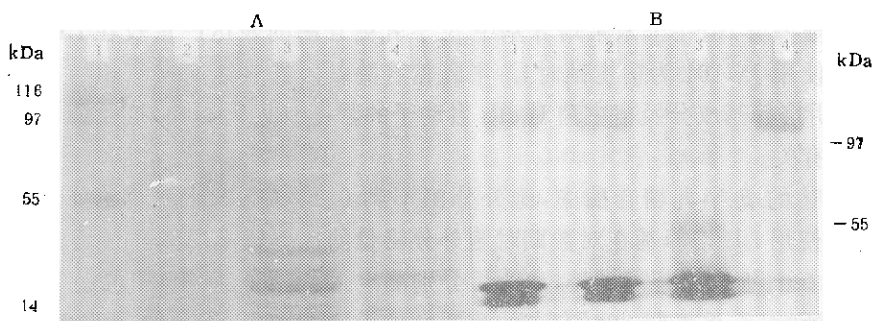


图 6 工程菌 MM2(pMC032)表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 6 SDS-PAGE of recombinant *E. coli* MM2(pMC032)

- A 1. Molecular weight standard, 2. Total cell lysate(TCL) of MM2(pMC032)prepared by ultrasonic,
3. Same as A2 except lysed by SDS, 4. TCL of MM2(pMC18CTB).
B 1& 2. Protein in membrane phase, 3. Molecular weight standard, 4. β -galactosidase(Sigma)

参 考 文 献

- [1]马清钧等. 中国科学(B辑), 1989, 4: 394.
[2]Sambrook J *et al.* in Molecular Cloning, New York; Cold Spring Harbor, 1989.
[3]Neu H C, J Biol Chem, 1965; 240: 3685
[4]Malamy M *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1961, 5: 104.
[5]Weinstock G M. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80: 4432.

Construction of A Secreting Expression System by Using Promoter and Signal Peptide Sequence of Cholera Toxin B Subunit Gene

Cao Cheng Shi Chenghua Li Ping Ma Qingjun

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract A secreting expression vector pMC05S was constructed taking advantage of the promoter, signal peptied and transcription terminator of cholera toxin B subunit gene, and β -galactosidase was over-expressed in *E. coli* and most of it was secreted into periplasma when the lacZ gene was inserted downstream of signal sequence of pMC05S. The yield of β -galactosidase by engineered *E. coli* reaches 30 μ g/ml and the specific activity reaches 4 100 u/ml, so most of galactosidase produced retained activity of the enzyme. The appropriate host strain and medium were also investigated. This system provides a new approach for the expression of the proteins easy to form inclusion bodies.

Key words Cholera toxin B subunit, signal peptide, plasmid, secretion, β -galactosidase