

一种带增强子的原核高效表达载体的构建及初步应用

罗文新 张 军 杨海杰 李少伟 谢小燕 逢淑强 李少菁 夏宁邵

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 厦门 361005)

摘 要 构建的 pTO-T7 大肠杆菌高效融合表达载体,调控序列中有一个 Ω 序列和一个 T7 启动子串联;多克隆位点(MCS)包括 8 个常用酶切位点,可进行融合表达或者非融合表达,根据不同的需要加以选择;融合蛋白 N 端为 T7g10 的 12 个起始氨基酸,C 端为 His 标签,含 *kan* 抗性基因作为选择标记。将增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因克隆至 pTO-T7 载体,在 *E. coli* 中的表达结果表明,融合 EGFP 达到菌体总蛋白量的 50% 以上,90% 以上的融合蛋白以可溶性形式存在,融合后的 EGFP 仍保持原有的荧光性质。与同时构建的不含 Ω 序列的 pT-T7 载体的表达产量的比较研究结果表明, Ω 序列在 pTO-T7 载体中能显著提高表达效率。

关键词 表达载体 Ω 序列 T7 启动子 增强型绿色荧光蛋白

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0578-04

目前绝大多数重要的目的基因都是在大肠杆菌中表达的。为了获得高水平的基因表达产物,人们通过综合考虑控制转录、翻译、蛋白质稳定性及向胞外分泌等诸多方面的因素,设计出了许多具有不同特点的表达载体,以满足表达不同性质、不同要求的目的基因的需要^[1~4]。

增强子是基因表达的重要调节元件,目前在病毒、植物、动物和人类正常细胞里都发现有增强子存在。在原核细胞中也发现类增强子序列^[5]。 Ω 序列是烟草花叶病毒(TMV)的 5'端非翻译区的一段 68bp 序列,Gallie^[6]等报道 Ω 序列在植物、动物、*E. coli* 细胞的体内和体外翻译中都能提高翻译效率。 Ω 序列已广泛应用于构建植物表达载体,增强外源基因在植物中的表达,但目前尚未见用 Ω 序列构建 *E. coli* 表达载体的报道。

本研究尝试对 pET24(+)载体的转录调控区进行改造,以 T7 启动子和 Ω 序列为调控元件构建了两种 *E. coli* 融合蛋白表达载体,并通过增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的表达检测其表达效率。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 JM101、BL21(DE3) 株为本室保存,质粒 pET11a 购自于 Biolab 公司,pET24(+)购自于

Novagen 公司,pBPF-Omega-7 由中国科学院遗传所赠送,pRSETA-EGFP 由本室构建保存。

1.2 酶及其它生化试剂

限制酶、T4 DNA 连接酶和 Klenow 大片段购自美国 Promega 公司,DNA 柱式胶回收试剂盒购于上海华舜生物工程公司。

1.3 表达载体的构建

按常规的分子生物学方法操作^[7]。

1.4 目的基因在大肠杆菌中的表达

表达载体转化 *E. coli* BL21(DE3) 菌株,挑单菌落于 LB(含 Kan 100 ug/mL)培养基中,37℃ 过夜培养,次日按 1:100 扩种,菌液 OD_{600} 值达 0.8 左右,0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导,在 30℃ 表达 6 h 后收获菌体。少量菌体悬于 1×SDS 样品溶液,煮沸 10 min 后 12000 g 离心 10 min,取 10 μ L 进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳,电泳结果用扫描仪在波长为 560 nm 处扫描分析。其余收获的菌体进行超声破碎,15000 r/min 离心 10 min,沉淀溶于与上清等体积的 Tris-HCl 中,取等量上清和沉淀溶液进行 SDS-PAGE 电泳。

1.5 融合 EGFP 蛋白的荧光强度和荧光性质分析

菌体超声破碎后的上清用荧光全谱仪(俄罗斯 Lumex 公司)检测融合 EGFP 蛋白的荧光强度及荧光性质。

2 结果

2.1 表达载体 pT-T7、pTO-T7 的构建

2.1.1 表达载体 pT-T7 的构建 pET24(+)是一个转录载体 ,由 T7 启动子起始转录 ,多克隆位点具有 7 个常用酶切位点 ,便于外源基因的插入 ,但载体中无核糖体结合位点 ,转录产物不能进一步翻译 ,因此不能用作表达载体。pET11a 是 pET 系统的一个表达载体 ,具有核糖体结合位点 ,但只有一个单一的 BamHI 外源基因插入位点 ,非常不利于各种外源基因的克隆表达。我们利用基因工程技术 ,将这两个

载体的优点结合在一起 ,构建了 pT-T7 融合蛋白原核表达载体(图 1)。用 BglII/BamHI 双酶切从质粒 pET11a 上切下约 150bp 片段 ,其中包括 T7 启动子、rbs、T7 标签等序列 ,相同酶切的 pET24(+)载体则无 T7 启动子序列。将 150bp 片段插入相同酶切的 pET24(+)载体 ,得到表达载体 pT-T7。

2.1.2 表达载体 pTO-T7 的构建 :为了使载体的表达效率得到进一步提高 ,我们尝试在 T7 启动子前面另外插入一个增强子 ,即 Ω 序列 ,构建一个新的原核表达载体 pTO-T7(图 1)。

用 BglII/BamHI 双酶切从质粒 pET11a 上切

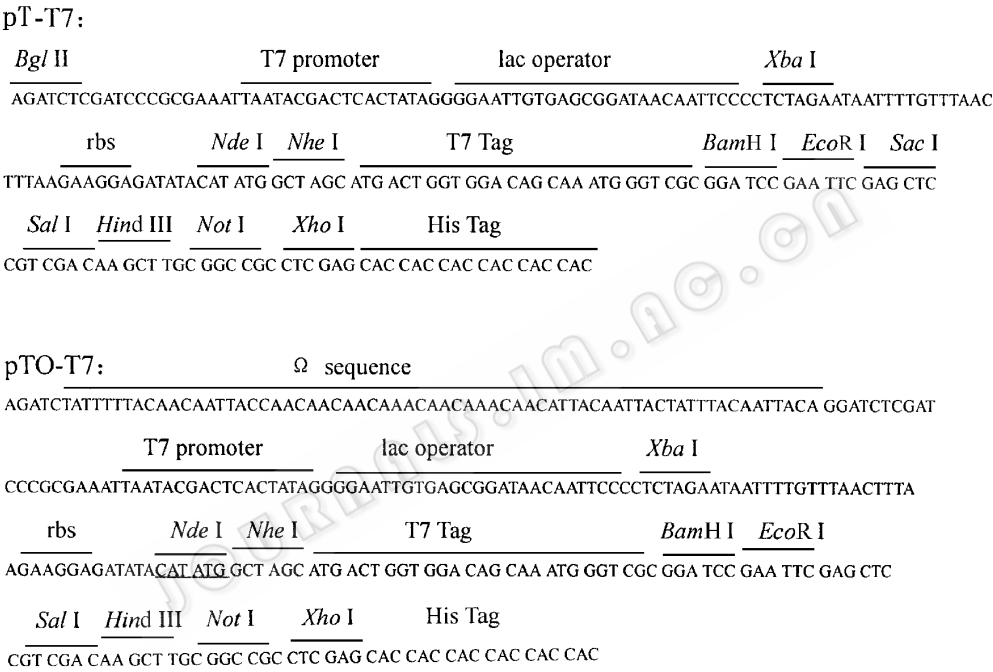


图 1 pT-T7 和 pTO-T7 表达载体的克隆表达区

Fig.1 Cloning and expression regions of vectors pT-T7 and pTO-T7

下约 150bp 片段 ,将此片段插入 BamHI 单酶切 pBPF-Omega-7 所获载体 ,构成亚克隆质粒 pBPF11a。用 Xho I 酶切 pBPF11a ,Klenow 补平 ,再用 BamHI 酶切 ,回收约 220bp 片段 ,用 Bgl II 酶切 pET24(+) ,Klenow 补平 ,再用 BamHI 酶切 ,回收载体 ,220bp 片段插入载体即得表达载体 pTO-T7。

2.2 表达载体 pT-T7、pTO-T7 的初步应用

2.2.1 融合表达载体 pT-T7G、pTO-T7G 的构建 :为了易于检测外源蛋白的表达情况及 N-端融合的 12 个氨基酸对外源蛋白活性的影响情况 ,我们在这两个载体中表达了增强型绿色荧光蛋白(EGFP) ,此蛋白的少量表达可使菌体呈现绿色 ,直接用菌体即可检测蛋白的激发波长和发射波长有无变化 ,并

且能够进行荧光定量。用 BamHI/Hind III 从质粒 pRSETA-EGFP 切下约 720bp 的 EGFP 基因片段 ,分别克隆到相同酶切的 pT-T7、pTO-T7 载体 ,得到表达质粒 pT-T7G、pTO-T7G(图 2)。

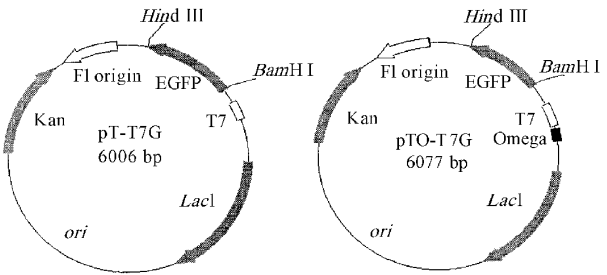


图 2 pT-T7G、pTO-T7G 的质粒图

Fig.2 Plasmids of pT-T7G and pTO-T7G

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2.2.2 pT-T7G、pTO-T7G 质粒使融合 EGFP 在 *E. coli* 中表达 EGFP 通过 pT-T7G 和 pTO-T7G 质粒在 *E. coli* 中的表达结果见图 3,在 SDS-PAGE 胶上分子量约 30 kD 处有明显的表达条带。对凝胶的扫描和图像分析结果表明,pT-T7G 所表达的融合 EGFP 蛋白占菌体总蛋白的 21% 左右,而 pTO-T7G 中所表达的融合蛋白占菌体总蛋白的 50% 以上。

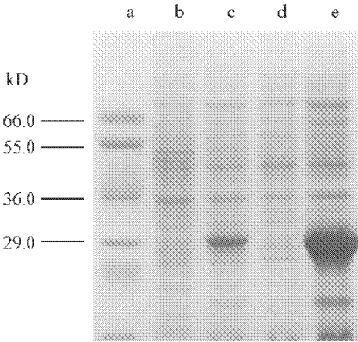


图 3 pT-T7G、pTO-T7G 表达的融合 EGFP 蛋白(12% SDS-PAGE)

Fig.3 Expression of fused-EGFP from pT-T7G and pTO-T7G(12% SDS-PAGE)

- a. Molecular marker ;
- b. Control of pT-T7 ;
- c. Fused-EGFP expressed from pT-T7G ;
- d. Control of pTO-T7 ;
- e. Fused-EGFP expressed from pTO-T7G

pT-T7G 表达的菌液稀释至 OD_{600} 为 0.141 , pTO-T7G 表达的菌液稀释至 OD_{600} 为 0.071 ,然后将稀释菌液分别进行超声处理及离心,上清和沉淀溶于等量 Tris.HCl 中,各取 30 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示(图 4),二者均约有 90% 的融合 EGFP 蛋白位于上清,即呈可溶性形式存在。

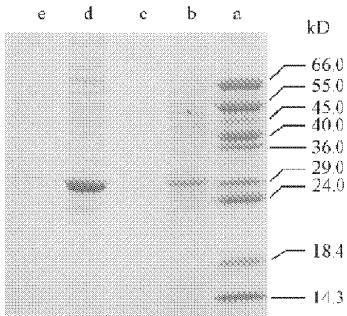


图 4 pT-T7G、pTO-T7G 表达的融合 EGFP 的可溶性分析(12% SDS-PAGE)

Fig.4 Solubility analysis of fused-EGFP expressed from pT-T7G and pTO-T7G(12% SDS-PAGE)

- a. Molecular marker ;
- b, d. Fused-EGFP in supernatant expressed from pT-T7G and pTO-T7G ;
- c, e. Fused-EGFP in precipitate expressed from pT-T7G and pTO-T7G

2.2.3 融合 EGFP 的荧光性质分析:菌体超声上清用荧光全谱仪进行融合蛋白的荧光性质测定,结果表明(图 5), OD_{600} 为 0.141 时,pT-T7G 表达的可溶

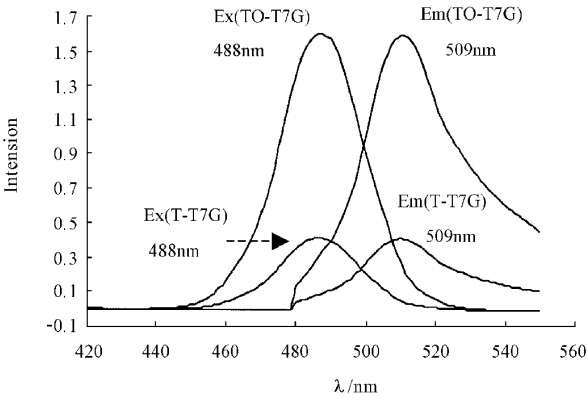


图 5 pT-T7G、pTO-T7G 表达的菌体超声上清中的融合 EGFP 蛋白荧光测定

Fig.5 Fluorescence detection of fused-EGFP expressed from pT-T7G and pTO-T7G in supernatant

性融合 EGFP 蛋白在激发波长 488 nm、发射波长 509 nm 处的荧光强度为 0.41。 OD_{600} 为 0.071 时,pTO-T7G 表达的可溶性融合 EGFP 蛋白在激发波长 488 nm、发射波长 509 nm 处的荧光强度为 1.61。由此表明 pTO-T7G 表达的可溶性融合 GFP 蛋白量远高于 pT-T7G 表达的可溶性融合 EGFP 蛋白量。融合后的 EGFP 蛋白仍保持原有的激发波长和发射波长,表明 N 端融合的 12 个氨基酸并未影响 EGFP 的荧光性质。

3 讨论

我们构建的 pTO-T7 原核表达载体有以下特点:1. 调控序列中有一个 Ω 序列和一个 T7 启动子串联,使目的基因在 *E. coli* 中得到高效(最高可达 50% 以上)而稳定的表达;2. 多克隆位点(MCS)包括 8 个常用酶切位点,便于外源基因三种形式阅读框的插入,并可根据不同的需要选择进行融合表达或者非融合表达;3. 融合表达的蛋白 N 端为 T7g10 的 12 个起始氨基酸,此短肽能增强翻译效率且对表达蛋白的功能影响极小,非融合表达的天然蛋白则无此短肽,利于作为药物的蛋白的表达;4. 融合表达蛋白的 C 端可以加上 His 标签,便于融合蛋白的进一步纯化;5. 含 kan 抗性基因作为选择标记,亦有利于筛选与 Ap 等不同抗性载体共转化的菌株。

pTO-T7G 的表达产量大于 50%,表达效率是 T-T7G 的 2 倍以上,这两个载体的唯一差别是前

者的调控区中增加了一个Ω序列,可见Ω序列在此载体中能显著增强表达效率。在多种植物表达载体中Ω序列都位于启动子的下游,其对翻译的增强机制可能是阻止 mRNA 二级结构的形成,或者成为一个核糖体结合位点^[7~11]。此外,突变分析表明,在植物系统中Ω序列第 63~65 位的 AUU 密码子处能起始非正规翻译。即带有Ω序列的 mRNA 能同时结合两个核糖体分子,其中一个结合于下游的 AUG 起始密码子,另一个结合在Ω序列的 AUU 密

码子,两处都能起始翻译^[11]。而在 pTO-T7 载体中Ω序列位于 T7 启动子的上游,亦能显著增强表达效率,此结果显然不能用上述机制加以解释。增强子的作用原理有两种假说^[12]: 1. 增强子为转录因子提供进入启动子区的位点 2. 增强子能改变染色质的构象,染色质的局部结构的变化决定了 DNA 对转录因子的接受效率。因此推测在 pTO-T7 载体中Ω序列的增强作用在于提高转录的效率,从而间接提高翻译水平,其具体机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Hunter T ,Hunter G J. *Biotechniques* ,1998 ,24(2):194~196
[2] Barriault D ,Sylvestre M ,Antonie Van Leeuwenhoek ,1999 ,75(4) 293~297
[3] Hosfield T ,Lu Q. *Biotechniques* ,1999 ,27(1) 58~60
[4] Wyborski D L ,Bauer J C ,ZHENG C F *et al.* *Protein Expr Purif* ,1999 ,16(1) :1~10
[5] 何忠效 ,静国忠 ,许佐良等.现代生物技术概论 北京 北京师范大学出版社 ,1999 ,pp. 9~10
[6] Daniel R G ,David E S ,Hohn W W *et al.* *Nucl Acids Res* ,1987 ,15(8) 8693~8710
[7] 萨姆布鲁克 J ,弗里奇 E F ,曼尼阿蒂斯 T. 著 ,金冬雁 ,黎孟枫等译.分子克隆操作指南(第二版) 北京 科学出版社 ,1992
[8] Gallie D R ,Sleat D E ,Watts J W *et al.* *Nucl Acids Res* ,1987 ,15(8) 3257~3273
[9] Sleat D E ,Gallie D R ,Jefferson R A *et al.* *Gene* ,1987 ,217 217~225
[10] Mitsuhara I ,Ugaki M ,Hirochika H *et al.* *Plant Cell Physiol* . ,1996 ,37(1) :49~59
[11] Schmitz J ,Prufer D ,Rlhde W *et al.* *Nucl Acids Res* ,1996 ,24(2) 257~263
[12] 朱玉贤 ,李 毅编著.现代分子生物学 北京 高等教育出版社 ,1998 ,p. 195

Construction and Application of an *Escherichia coli* High Effective Expression Vector with an Enhancer

LUO Wen-Xin ZHANG Jun YANG Hai-Jie LI Shao-Wei
XIE Xiao-Yan PANG Shu-Qiang LI Shao-Jin XIA Ning-Shao

(Ministry of Education ,Cell Biology and Tumor Cell Engineering Laboratory ,Xiamen University ,Xiamen 361005)

Abstract In this study ,we constructed a high effective fusion expression-vector in *E. coli* . This vector pTO-T7 ,was characterized as :(1) an enhancer from tobacco mosaic virus (TMV) ,Ω sequence ,was ligated in front of a T7 promoter in the regulatory sequence ;(2) the multicloning sites include eight restriction enzyme sites. It can facilitate fusion or non-fusion expression ;(3) the N terminal of a fusion protein starts with the first 12 amino acids of T7 gene 10 ,and the C terminal is the hexahistidine tag ;(4) kanmycin resistance gene was used as a selective marker. EGFP gene was inserted into pTO-T7 vector as a reporter gene. Expression data showed that fused-EGFP accounted to more than 50 % of the total *E. coli* protein ,and more than 90 % of which was soluble. The fluorescence characters of fused-EGFP were also studied. The expression yeild of target gene from plasmid pTO-T7 compared with that from pT-T7 without Ω sequence suggested that Ω sequence in pTO-T7 can improve the expression of target gene significantly.

Key words Expression vector ,Ω sequence ,T7 promoter ,enhanced green fluorescent protein