

还原酶缺陷型大肠杆菌对重组蛋白溶解性的影响

熊 盛¹ 张美英¹ 钱垂文¹ 冉延超¹ 王一飞^{1*} 任向荣² 栗宽源² 余宙耀^{2*}

¹(暨南大学生物医药研究开发基地 广州 510632)

²(解放军 458 医院全军传染病中心 广州 510640)

摘 要 探讨大肠杆菌细胞质氧化还原环境对重组蛋白溶解性的影响。选择含有 1 对二硫键的牛碱性成纤维细胞生长因子(BbFGF)作为简单蛋白的模式分子,选择含有 2 对二硫键的人抗 HBsAg 单链抗体(HBscFv)作为复杂蛋白的模式分子,分别构建表达质粒并转化普通宿主菌和还原酶缺陷型宿主菌 *E. coli* Origami(DE3),比较表达产物的溶解性和纯化产物的活性。结果发现,BbFGF 在普通宿主菌中大部分形成包涵体,在 Origami(DE3)中为可溶性表达,但表达量降低。两种工程菌的表达产物经离子交换和肝素亲和层析两步纯化后,MTT 法测定活性,发现来自还原酶缺陷型宿主菌的 BbFGF 活性高于普通宿主菌表达产物,二者的 ED₅₀ 分别是 1.6 ng/mL 和 2.2 ng/mL;HBscFv 在两种宿主菌中均形成包涵体,包涵体以 6 mol/L 盐酸胍缓冲液溶解后,镍离子螯合亲和层析纯化并透析复性,间接 ELISA 测定抗原结合活性,发现二者活性无明显差异,但在 Origami(DE3)菌体破碎后的上清中可检测到 HBscFv 活性,纯化后产量为 1~2 mg/L,而在普通宿主菌破碎后的上清中检测不到 HBscFv 活性。上述结果说明,改变宿主菌细胞质氧化还原环境对于含有 1~2 对二硫键的重组蛋白的可溶性表达具有明显促进作用。

关键词 还原酶 缺陷 碱性成纤维细胞生长因子 单链抗体 包涵体

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0686-06

到目前为止,大肠杆菌仍是重组蛋白表达的首选表达系统。经过近 20 年的发展,大肠杆菌表达系统的主要改进方向之一是提高重组蛋白在宿主细胞质中的溶解性^[1],这可通过两条途径实现:其一,通过 DNA 重组技术,使目的蛋白与分子伴侣或折叠酶形成融合分子,pET32、pET44 即是这一类表达载体的代表^[2];其二,利用遗传学技术,改变大肠杆菌细胞质的氧化还原环境,即突变其中的还原酶系,这一途径的效果如何还知之甚少。为了探讨细胞质环境对不同类型外源蛋白表达的影响,我们选择前期研究获得的牛碱性成纤维细胞生长因子(Bovine basic Fibroblast Growth Factor, BbFGF)和人源抗 HBsAg 单链抗体(human anti-HBsAg single-chain Fv, HBscFv)作为含有一对二硫键的简单蛋白和含有多对二硫键的复杂蛋白的模式分子,将其分别转入普通大肠杆菌和还原酶系缺陷型大肠杆菌 Origami(DE3)中表达,比较表达产物的溶解性,为其它同类重组蛋白的表达提供借鉴。

BbFGF 是一种具有多种生物活性的非糖基化单链多肽,其开放阅读框编码长 155 个氨基酸残基的

多肽分子,分子中含有 4 个半胱氨酸,其中,C₃₄和 C₁₀₁形成二硫键,而 C₇₈和 C₉₆游离存在。多项研究表明,重组 BbFGF 在大肠杆菌中高表达时,容易部分形成包涵体。定点突变 C₇₈和 C₉₆后,可以一定程度上克服这一问题,但需要改变基因结构,并且突变后的蛋白分子活性降低,不利于该蛋白的药用开发^[3,4]。HBscFv^[5]是一株人源重组小分子抗体,分子中也含有 4 个半胱氨酸,但均参与二硫键形成。由于单链抗体分子中的二硫键为构象和活性所必须,不能通过定点突变减少蛋白在折叠过程中形成错配中间体的可能性和数量,并且,单链抗体本身是一种人工设计的分子,折叠过程中的不确定因素更多,所以 HBscFv 比 BbFGF 更难在大肠杆菌细胞质中获得可溶性表达。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒:质粒 pJN-BbFGF 以 pET3c 衍生

收稿日期 2003-03-10,修回日期 2003-06-10。

基金项目 国家 863 高技术研究项目(No. 2001AA215041)及广州市科技局重大攻关项目(No. 99-2-010-01)基金资助。

* 通讯作者。Tel 86-20-85222706; Fax 86-20-85220908; E-mail xs123@263.net

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

质粒 pJN982^[6] 为载体而构建,含有 *BbFGF* 编码序列;质粒 pQE-HBscFv 源自 pQE-40 携有 *HBscFv* 编码序列,这两种质粒均为 *Amp* 抗性质粒。宿主菌 *E. coli* BL21(DE3) 购自 Novagen 公司,基因型为 F^- *OmpT hsd SB(rB^- , MB^-) dcm gal λ(DE3), *E. coli* Origami(DE3) 购自 Novagen 公司,基因型为 $\Delta ara^- leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 galE galK rpsL F' [lac^- (lacI^q) pro] gor522 :: Tn10(Tc^R) trxB::kan(DE3)$, *E. coli* M15[pREP] 购自 QIAGEN 公司,表型为 : Na^s , Str^s , Rif^s , Thi^- , lac^- , Ara^+ , Gal^+ , Mtl^- , F^- , $RecA^-$, Uvr^+ , Lon^+ 。*

1.1.2 主要试剂:质粒提取试剂盒购自上海华舜生物工程公司;诱导剂 IPTG 购自 Promega 公司;层析基质 Bio Rex70 购自 Bio-Rad 公司;Heparin Hyper D 购自 Kronlab 公司;His-TrapTM 镍离子螯合柱、SP-sepharose CL-4B 购自 Pharmacia 公司;MTT 购自 Sigma 公司;重组 HBsAg 购自中山生物工程公司;兔抗 HBscFv 由本室自制;其它化学试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 工程菌构建:质粒提取及转化大肠杆菌均参照文献 7 进行。

1.2.2 BbFGF 的表达:工程菌 BL[pJN-BbFGF] 新鲜培养物单菌落接种 2mL 含抗生素的 LB 培养基,37℃、220r/min 振荡培养过夜;第 2 天按 1:100 比例转入 200mL 含相同抗生素的 2×YT 培养基中,振荡培养 4h 至 OD_{600} 为 1.0,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,诱导 4h 后离心收集菌体,超声破碎,收集沉淀和上清,供表达分析或小量纯化用。工程菌 Origami[pJN-BbFGF] 以相同条件培养,并诱导目的蛋白表达。

1.2.3 BbFGF 的纯化^[8]:含 BbFGF 的组分上样 Bio Rex70,缓冲液洗去未交换的蛋白,用含 0.6mol/L NaCl 的 PBS 洗脱目的蛋白;然后上样 Heparin Hyper D,用含 0.6mol/L NaCl 的 PBS 洗脱未结合的蛋白,收集含 1.2mol/L NaCl 的缓冲液洗脱组份,得到 BbFGF 重组产物。凝胶光密度扫描结果表明,重组 BbFGF 纯度大于 96%。

1.2.4 BbFGF 的活性测定 MTT 法 参照文献 9 进行。

1.2.5 HBscFv 的表达:工程菌 M15[pQE-HBscFv] 单菌落接种 5mL 含 100mg/L Amp,25 mg/L Kana 的 LB 培养基中,37℃振荡培养过夜;第 2 天按 1:100 比例转入 200 mL 含相同抗生素的 2×YT 培养基中,振荡培养 4h 至 OD_{600} 为 1.0,加入 IPTG 至终浓度为 1

mmol/L,诱导 6 h 后离心收集菌体^[10]。工程菌 Origami[pQE-HBscFv] 接种于含 100 mg/L Amp 的培养基中,相同条件培养,并诱导目的蛋白表达。

1.2.6 HBscFv 的纯化^[10,11]:诱导后的菌体超声破碎,离心收集沉淀,溶解于含 6mol/L GuHCl 的变性缓冲液中,上样 His-TrapTM 镍离子螯合柱,收集目的峰,然后使用优化的透析工艺,分步透析复性。位于上清中的 HBscFv 先以 SP-sepharose CL-4B 柱初步纯化,然后以 His-TrapTM 镍离子螯合柱精制。

1.2.7 HBscFv 的活性测定:间接 ELISA 法^[12]。包被有 HBsAg 的酶标板加入 HBscFv 样品,以免抗 HBscFv 作为第一抗体,HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为第二抗体,TMB 显色,酶标仪 450 nm/630 nm 波长测定吸光度。

2 结果

2.1 工程菌构建

质粒 pJN-BbFGF 转化 *E. coli* BL21(DE3) 后,得工程菌 BL[pJN-BbFGF] 转化 *E. coli* Origami(DE3) 后,得工程菌 Origami[pJN-BbFGF]。Fig. 1 是质粒 pJN-BbFGF 的结构示意图,目的基因位于 T7 噬菌体启动子的下游,IPTG 诱导宿主菌含有的溶源噬菌体(DE3) 上的 T7RNA 聚合酶表达,从而启动 BbFGF 的转录和翻译,表达分子量为 20kD 的 BbFGF 融合蛋白;质粒 pQE-HBscFv 转化 *E. coli* M15[pREP] 后,得工程菌 M15[pQE-HBscFv] 转化 *E. coli* Origami(DE3) 后,得工程菌 Origami[pQE-HBscFv]。Fig. 2 是质粒 pQE-HBscFv 的结构示意图,目的基因由 T5 噬菌体启动子控制,在启动子下游含有 *LacO* 序列,所以目的基因也受 IPTG 诱导表达。另外,在 HBscFv 的 N 末端含有 6×His 标签,可以应用 IMAC 纯化目的蛋白。

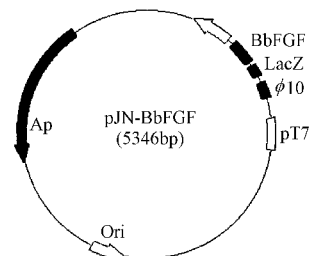


图 1 表达质粒 pJN-BbFGF 结构

Fig. 1 Structure of the expression plasmid pJN-BbFGF

2.2 BbFGF 在两种宿主菌中的表达

分别诱导两种 BbFGF 工程菌,超声破碎后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。Fig. 3 是

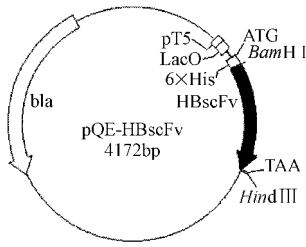


图 2 表达质粒 pQE-HBscFv 结构

Fig. 2 Structure of the expression plasmid pQE-HBscFv

pJN-BbFGF在 *E. coli* BL21(DE3)中表达后的蛋白图谱,其中 Lane2 是诱导后菌体破碎的上清, Lane3 是菌体破碎后的沉淀,从图中可以看出, BbFGF 在 *E. coli* BL21(DE3)中主要以包涵体形式存在,凝胶光密度扫描结合蛋白定量分析结果表明, 65%目的蛋白以包涵体形式存在; pJN-BbFGF 转化至氧化还原缺陷型大肠杆菌 Origami(DE3)后,表达产物为可溶蛋白, Fig. 4 是含有 BbFGF 表达质粒的 *E. coli* Origami(DE3)菌体破碎后不同组份的 SDS-PAGE 图谱,其中 Lane2 是菌体破碎后的上清, Lane3 是菌体破碎后的沉淀,可见目标蛋白位于上清中,含量占可溶性蛋白的 11.6%。

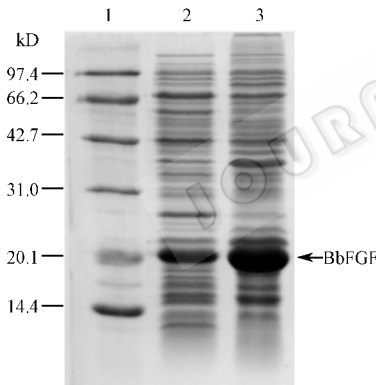


图 3 BbFGF 在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达性质

Fig. 3 Character of BbFGF in *E. coli* BL21(DE3)

1. Molecular weight standard ; 2. Supernatant of the bacteria lysate ; 3. Pellet of the bacteria lysate

2.3 BbFGF 的纯化与活性测定

分别破碎两种 BbFGF 工程菌,超声破碎后,离心收集上清,上清液经过阳离子交换和肝素亲和层析两步纯化后,都可以得到纯度超过 96%的目的蛋白。MTT 法活性测定结果表明,二者均有促有丝分裂活性, Fig. 5 是活性测定曲线,经计算,来自 Origami(DE3)的 BbFGF 的 ED₅₀ 是 1.6ng/mL,来自 BL21(DE3)的 BbFGF 的 ED₅₀ 是 2.2 ng/mL,活性略低于 Origami(DE3)表达产物。但在实验中发现, Origami(DE3)中 BbFGF 的表达量明显较低,不同菌落的表

达量在 5% ~ 10% 之间,而 BL21(DE3)表达 BbFGF 的表达量在 15% ~ 23% 之间,二者差异明显(SDS-PAGE 原始结果未显示)。

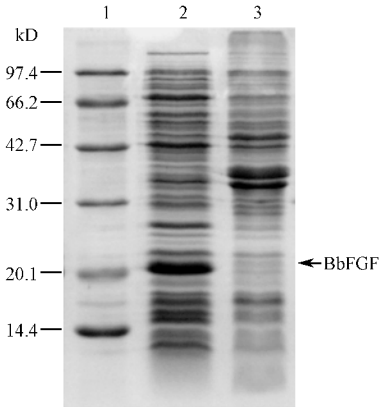


图 4 BbFGF 在 *E. coli* Origami(DE3)中的表达性质

Fig. 4 Character of BbFGF in *E. coli* Origami(DE3)

1. Molecular weight standard ; 2. Supernatant of the bacteria lysate ; 3. Pellet of the bacteria lysate

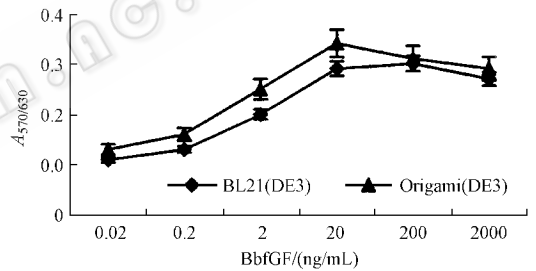


图 5 两种来源 BbFGF 的生物活性测定结果

Fig. 5 Bioactivity of BbFGF produced from two strains of *E. coli*

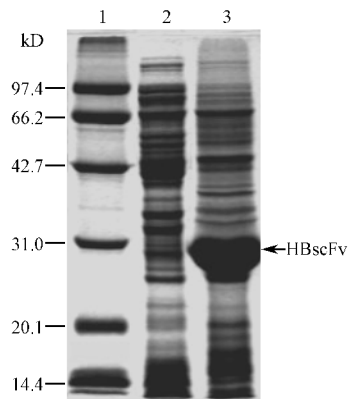


图 6 HBscFv 在 *E. coli* M15[pREP4] 中的表达性质

Fig. 6 Character of HBscFv in *E. coli* M15[pREP4]

1. Molecular weight standard ; 2. Supernatant of the bacteria lysate ; 3. Pellet of the bacteria lysate

2.4 HBscFv 在两种宿主菌中的表达

© 中国生物工程菌 M15[pQE-HBscFv] 经诱导培养后,表达

大量重组蛋白,但以包涵体形式存在。Fig. 6 是 M15 [pQE-HBscFv] 诱导后菌体的上清和沉淀的 SDS-PAGE 分析结果,可见目的蛋白 HBscFv(28kD) 位于沉淀中。工程菌 Origami [pQE-HBscFv] 以相同条件培养并诱导,收集菌体后超声破碎,SDS-PAGE 分析目的蛋白性质,结果发现 HBscFv 在 *E. coli* Origami (DE3) 中仍然以包涵体形式存在。Fig. 7 中 Lane2 是菌体破碎后的上清, Lane3 是菌体破碎后的沉淀,可以看出 HBscFv 位于沉淀中,但在上清的相应位置也有增粗的蛋白带,含量占可溶性总蛋白的 4.7%, 为了确定该条带性质,对上清进行活性测定。

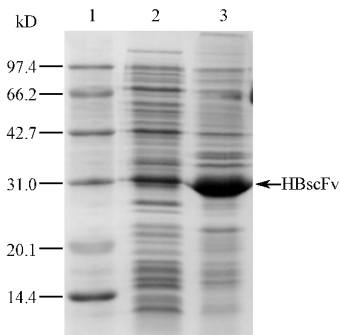


图 7 HBscFv 在 *E. coli* Origami(DE3) 中的表达性质

Fig. 7 Character of HBscFv in *E. coli* Origami(DE3)

1. Pellet of the bacteria lysate ; 2. Supernatant of the bacteria lysate ; 3. Molecular weight standard

2.5 HBscFv 的纯化与活性测定

收集两种工程菌破碎后的组分,上清调整蛋白浓度,使其一致,然后直接测定活性。发现 M15 [pQE-HBscFv] 的上清中检测不到 HBscFv 活性 ($A_{450/630} = 0.05$, 与阴性对照相当),而在 Origami [pQE-HBscFv] 菌体破碎后的上清中可检测到较弱的 HBscFv 活性 ($A_{450/630} = 0.21$)。Fig. 8 中空心柱是等量菌体可溶性总蛋白的活性测定结果,可见二者差异明显。对 Origami [pQE-HBscFv] 上清中的 HBscFv 进行纯化,产量为 1 ~ 2mg/L。

将两种菌体破碎后的沉淀溶解于变性缓冲液中,纯化并透析复性后,调整蛋白浓度一致,测定活性,结果也示于 Fig. 8 中(实心柱),可以看出,两种工程菌表达的 HBscFv 包涵体经复性后,均有抗原结合活性,二者相比较,活性无明显差异。

3 讨论

在大肠杆菌细胞质中,至少有 5 种蛋白质可以

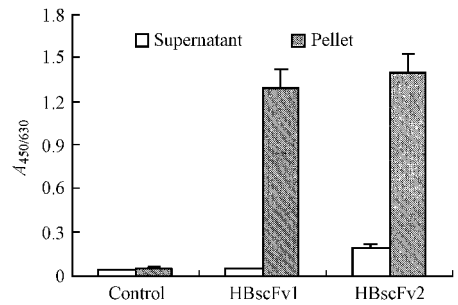


图 8 两种 HBscFv 的抗原结合活性

Fig. 8 Bioactivity of recombinant HBscFvs produced from two strains of *E. coli*

HBscFv1, HBscFv produced from M15 [pQE-HBscFv]
HBscFv2, HBscFv produced from Origami [pQE-HBscFv]

将瞬时形成的二硫键还原^[13]。这 5 种蛋白质分别是 thioredoxins1、2 和 glutaredoxins1、2、3,这两类蛋白质又需要硫氧还蛋白还原酶和谷胱甘肽还原酶使其保持在还原状态,因此,通过遗传工程手段全部或部分突变这些“破坏”二硫键的蛋白后,可在一定程度上促进外源蛋白在胞质中的正确折叠。

E. coli Origami(DE3) 是一种硫氧还蛋白还原酶基因(Thioredoxin reductase, *trxB*) 和谷胱甘肽还原酶基因(Glutathione reductase, *gor*) 均被插入失活的新型宿主菌,该宿主菌细胞质中的氧化还原电势较高,有利于外源重组蛋白在细胞质中形成正确空间构象。有研究表明,一些结构复杂的酶蛋白在这种氧化还原缺陷型宿主菌中也可部分形成正确构象^[14]。本文的研究结果发现, pJN-BbFGF 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达时,产物大部分形成包涵体,但在 *E. coli* Origami(DE3) 中可获得可溶性表达;而结构复杂的单链抗体在氧化还原缺陷型宿主菌中的表达产物主要以包涵体的形式存在,另有少量蛋白可以正确折叠,以活性形式存在于细胞质中,但其表达量极低,只相当于包涵体表达量的 3% ~ 6%(包涵体复性后,产量可达 30 ~ 35mg/L^[10]),说明改变细胞质氧化还原环境可克服一些简单蛋白高表达过程中形成的包涵体,但对于含有多对二硫键的复杂蛋白,只能获得部分正确折叠的蛋白,仍无法实现可溶性高效表达的目标。

蛋白质的折叠是一个复杂的生化过程,涉及到多种蛋白和辅助因子的参与,克服一种影响因素可能促进某些重组蛋白的折叠,但无法设计一种适用于所有重组蛋白的“万能”表达系统。因此,在需要

高表达一种新的复杂蛋白时,常常要通过“trial-and-error”来选择合适的表达系统,并结合宿主菌遗传特性的改造和培养条件的优化来进行。

本文应用 *E. coli* Origami(DE3) 表达 BbFGF 时, 获得可溶性目的蛋白, 但表达量下降, 由此而产生的问题是: BbFGF 的可溶性表达是否因目的蛋白的表达量下降而引起? 更进一步, 表达量的下降是否因为细胞质氧化还原环境的改变而致? 对于 BL [pJN-BbFGF] 来说, 曾尝试改变诱导条件来降低目的蛋白表达量, 但仍无法改变目的蛋白形成包涵体这一特性。至于表达量下降与还原酶缺陷之间的关系, 从本文结果看, 似乎二者之间存在一定联系, 进一步结论有待更多实验结果证实。

本文所表达的 HBscFv 是一株重组人源小分子抗体。重组抗体适合在高等哺乳动物细胞表达系统中表达, 但其大规模培养技术在国内进展缓慢, 如何高效廉价生产重组抗体是制约抗体工程发展的最后一道瓶颈。本株 HBscFv 曾在多种大肠杆菌表达系统中表达, 但均形成包涵体。本文的研究在可溶性表达方面有所突破, 如果能结合其它影响因素, 比如: 优化工程菌的培养条件^[15], 或者利用低表达的兼容质粒, 适当提高宿主菌胞质中分子伴侣和/或折叠酶的含量, 都有可能进一步提高大肠杆菌胞质中活性分子的比例, Kurokawa 等就利用 DsbC 促进了 hNGF 在大肠杆菌周质腔中的可溶性表达^[16]。如果这些方案能获得预期结果, 则对重组抗体和其它药用蛋白的工程化意义重大。

致谢: 感谢暨南大学生物工程研究所张玲老师协助进行 BbFGF 的纯化工作。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**: 411 - 421
- [2] Http://www.novagen.com
- [3] Fox G M, Schiffer S G, Rohde M F *et al.* Production, biological activity, and structure of recombinant basic fibroblast growth factor and an analog with cysteine replaced by serine. *J Biol Chem*, 1988, **263** (34): 18452 - 18458
- [4] Rinas U, Tsai L B, Lyons D *et al.* Cysteine to serine substitutions in basic fibroblast growth factor: effect on inclusion body formation and proteolytic susceptibility during *in vitro* refolding. *Biotechnology (N Y)*, 1992, **10**(4): 435 - 440
- [5] REN X R(任向荣), GAO H(高辉), SU K Y(粟宽源) *et al.* Construction and nucleotide sequence assay of human anti-HBs variable region single-chain antibody gene. *Journal of Biomedical Engineering (生物医学工程杂志)*, 2000, **17**(4): 484 - 486
- [6] XIONG Sh(熊盛), LIN J(林剑), HONG An(洪岸) *et al.* Construction and application of a pET3c derivative. *Pharmaceutical Biotechnology (药物生物技术)*, 2001, **8**(1): 4 - 7
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Knoerzer W, Binder H P, Schneider K *et al.* Expression of synthetic genes encoding bovine and human basic fibroblast growth factor (bFGFs) in *Escherichia coli*. *Gene*, 1989, **75**(1): 21 - 30
- [9] Kajio T, Kawahara K, Kato K. Quantitative colorimetric assay for basic fibroblast growth factor using bovine endothelial cells and heparin. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1992, **28**(1): 9 - 14
- [10] XIONG Sh(熊盛), REN X R(任向荣), YAN X(严兴) *et al.* Purification of an anti-HBsAg scFv and measurement of its affinity constant. *Chinese Journal of Pathophysiology (中国病理生理杂志)*, 2002, **18**(9): 1069 - 1073
- [11] Tsumoto K, Shinoki K, Kondo H *et al.* Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent - application to a human single-chain Fv fragment. *J Immunol Methods*, 1998, **219**(1 - 2): 119 - 129
- [12] Sanchez L, Ayala M, Freyre F *et al.* High cytoplasmic expression in *E. coli*, purification, and *in vitro* refolding of a single chain Fv antibody fragment against the hepatitis B surface antigen. *J Biotechnol*, 1999, **72**(1 - 2): 13 - 20
- [13] Prinz W A, Aslund F, Holmgren A *et al.* The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem*, 1997, **272**(25): 15661 - 15667
- [14] Bessette P H, Aslund F, Beckwith J *et al.* Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**(24): 13703 - 13708
- [15] Ito M, Nagata K, Kato Y, Oda Y *et al.* Expression, oxidative refolding, and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16-kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. *Protein Expr Purif*, 2003, **27**(2): 272 - 278
- [16] Kurokawa Y, Yanagi H, Yura T. Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2001, **276**(17): 14393 - 14399

Influence of the Reductase Deficient *Escherichia coli* on the Solubility of Recombinant Proteins Produced in It

XIONG Sheng¹ ZHANG Mei-Ying¹ QIAN Chui-Wen¹ RAN Yan-Chao¹ WANG Yi-Fei^{1*}
REN Xiang-Rong² SU Kuan-Yuan² YU Zhou-Yao^{2*}

¹(Biomedical Research & Development Center , Jinan University , Guangzhou 510640 , China)

²(Center of Infectious Diseases , The 458th Hospital of PLA , Guangzhou 510602 , China)

Abstract The cytoplasm of *E. coli* is a reducing environment where cysteines do not engage in disulfide bonds. Any disulfide bonds that do appear are rapidly reduced through the action of disulfide reducing enzymes such as thioredoxin and glutaredoxin. To study the influence of *E. coli* cytoplasm on the solubility of recombinant proteins produced in it, bovine fibroblast growth factor (BbFGF), with single disulfide bond, and anti-HBsAg single-chain Fv (HBscFv), with two disulfide bonds, were selected as the pattern molecules of simple protein and complex protein, respectively. pJN98-BbFGF, a BbFGF expressing plasmid based on the vector pET3c, was constructed and transformed into normal host BL21(DE3) and a reductase deficient strain, *E. coli* Origam(DE3). At the same time, pQE-HBscFv, a HBscFv expressing plasmid was constructed and transformed into M15 [pREP4] and Origam(DE3). The recombinant BbFGF and HBscFv were produced in 2 types of bacteria and their solubilities and bioactivities were determined, respectively. It was found that the majority of BbFGF had formed inclusion body in the cytoplasm of BL21(DE3) and all of them turned into soluble protein in Origam(DE3). It was also found the productivity of BbFGF in Origami (DE3) was 5% ~ 10% of the total protein and the value was 15% ~ 23% in BL21(DE3). BbFGFs produced in 2 recombinant bacteria were purified by cation exchange and heparin affinity chromatography. MTT assay revealed that the bioactivity of BbFGF purified from Origam(DE3) was higher than its counterpart from BL21(DE3). The ED₅₀ of BbFGFs from different bacteria was 1.6ng/mL and 2.2ng/mL, respectively. As far as HBscFvs, both of them formed inclusion body in the cytoplasm of M15 [pQE-HBscFv] and Origami [pQE-HBscFv]. The inclusion body was solubilized in 6mol/L GuHCl, purified with a His-TrapTM column and then refolded by dialysis step-by-step against buffers containing downtrend concentration of GuHCl. Indirect ELISA was applied to determine the HBsAg binding activity of HBscFvs. It was found there was no obvious difference between the bioactivity of refolded HBscFvs produced from 2 recombinant bacteria. On the other hand, the supernatant of Origami [pQE-HBscFv] lysate displayed weak bioactivity and its counterpart from M15 [pQE-HBscFv] displayed without any bioactivity. The soluble HBsFv in the cytoplasm of Origami [pQE-HBscFv] was purified by cation exchange and immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and the yield was 1 ~ 2mg/L. Those results suggested that modification of the redox environment of *E. coli* cytoplasm greatly improved the solubility of recombinant disulfide-bonded proteins produced in it. In the next step, we had like to co-express of molecular chaperones or refoldase to raise the yield of soluble recombinant proteins, as well as optimizing the culture condition of the "oxidizing" *E. coli*.

Key words reductase, deficient, bFGF, single-chain Fv, inclusion body

Received : 03-10-2003

This work was supported by Grant of National " 863 " High-tech Project (No. 2001AA215041) and Key Grant Project of Guangzhou Municipal Department of Science and Technology (No. 99-2-010-01).

* Corresponding author. Tel 86-20-85222706 ; Fax 86-20-85220908 ; E-mail xsh123@263.net