

利用重组噬菌体诱导表达的大肠杆菌表达系统

陈长征 黄 华 杨新颖 夏其昌 李伯良* 王应睐

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 将编码噬菌体 T7 RNA 聚合酶的基因克隆至噬菌体 M13 mp18RF DNA 中, 置于 lac 启动子的控制之下, 得到了可表达 T7 RNA 聚合酶的重组噬菌体 M13HEP。利用该噬菌体感染含 T7 启动子表达质粒的宿主菌以提供 T7 RNA 聚合酶, 可以诱导 T7 启动子控制下的外源基因的表达。该噬菌体诱导表达系统已成功地表达了多种外源基因, 特别是一些表达产物对宿主菌有毒性的基因。同时, 通过细菌接合将 F' 因子从大肠杆菌 XL1-blue 转至大肠杆菌 HMS174, 构建了新的大肠杆菌菌株 HMS174F', 使得 T7 表达质粒构建、表达及单链制备可以在同一菌株中完成, 得到了一个完整的 T7 表达系统。

关键词 T7 RNA 聚合酶, 噬菌体, T7 启动子, 大肠杆菌表达

利用大肠杆菌高效表达外源蛋白已成为生物化学、细胞生物学及蛋白质结构功能等研究的一个重要手段。但是大多数现有的表达系统在克隆构建过程中及诱导表达前会有一些程度的表达泄漏, 从而可能引起外源表达产物对宿主细胞的毒性效应, 导致这些基因的表达质粒构建及表达都很难实现。

近年来发展起来的 T7 RNA 聚合酶—启动子系统是一个较好的大肠杆菌表达系统^[1~4]。由于 T7 启动子专一地被 T7 RNA 聚合酶识别而不被大肠杆菌 RNA 聚合酶识别, 因此该系统不仅能高效表达外源基因, 而且可以在不含 T7 RNA 聚合酶的大肠杆菌中安全地进行表达质粒的克隆操作^[5]。但是在表达质粒转化含 T7 RNA 聚合酶的宿主菌时, 由于 T7 RNA 聚合酶的微量组成性表达, 仍会遇到由于产物毒性引起的转化菌不稳定, 甚至不能获得转化菌的情况。为解决这一问题, Studier 等利用含 T7 RNA 聚合酶基因的 λ 噬菌体诱导靶基因表达^[1,5], 但是该噬菌体操作较麻烦。本文通过将 T7 RNA 聚合酶基因克隆至 M13mp18 中置于 lac 启动子的控制下, 构建了可以用于诱导 T7 表达质粒进行表达的噬菌体 M13HEP, 同时构建了适合于 T7 表达质粒克隆操作及 M13HEP 诱导表达的菌种 HMS174F', 从而建立了较为简便、完善的大肠杆菌 T7 表达系统。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌种

质粒 pGP1-2 (Tabor, S. 惠赠) 含有 T7 RNA 聚合酶基因。噬菌体 M13mp18RF DNA 为本组保存。质粒 pCZmCa、pCZmCb 为 T7 启动子控制下的小鼠 cAMP 依赖蛋白激酶催化亚基基因 α 、 β 的表达质粒, 均为本组构建。大肠杆菌 BL21 (DE3) 为 T7 系统表达宿主菌, 是含 T7 RNA 聚合酶基因的 λ 溶源菌。大肠杆菌 HMS174 (F⁻, recA1, hsdR, rif^r) 为 T7 表达质粒的克隆宿主菌。大肠杆菌 XL1-blue (recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17,

* 通信联系人。

本文于 1995 年 9 月 11 日收到。

supE44, relA1, lac [F'ProAB, lacI^s, z△ M15, Tn10 (tet^r)] 提供 F' 因子。

1.2 酶和化学试剂

DNA 限制酶、T4 DNA 连接酶为 New England Biolabs、Boehringer Mannheim 或 GIBCO BRL 公司产品。Agarose 为 GIBCO BRL 产品。PEG-8000、Acrylamide、Bisacrylamide、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 为 Sigma 公司产品。

1.3 基因重组克隆技术

质粒提取、限制酶酶切反应、琼脂糖电泳、DNA 片段回收、DNA 连接、质粒转化等均按照分子克隆手册略作修改进行^[6]。

1.4 大肠杆菌 HMS174F' 菌种的构建

按文献所述方法^[7]，通过细菌接合将大肠杆菌 XL1-blue 的 F' 因子转移至大肠杆菌 HMS174，从而得到新的 T7 克隆菌株 HMS174F'，基因型为：recA1, hsdR, rif^r[F' proAB, lacI^s, z△ M15, Tn10 (tet^r)]。

1.5 噬菌体制备

接种 2%JM105 过夜菌及 0.1%噬菌体 M13HEP 于 1L LB 培养基，37℃培养过夜，8 000r/min (室温) 离心 20min 分离上清液，加入 0.2 倍体积的 PEG/NaCl 溶液 (1.6mol/L NaCl, 13%PEG-8000)，0℃保温 1h，10 000r/min (4℃) 离心 30min，尽可能去净上清，将沉淀溶解于 10ml TBS 缓冲液中 (50mmol/L Tris · HCl pH7.5, 150mmol/L NaCl)，离心弃去不溶物。10ml 上清液中加入 0.2 体积的 PEG/NaCl 溶液，0℃保温 1h，15 000r/min (4℃) 离心 20min，将沉淀溶解于 10ml TBS 中，加入 0.02%NaN₃，测定噬菌体的滴度，4℃保存。通常每升培养液可以得到约 10¹⁴噬菌体，4℃可以稳定保存^[6]。

1.6 在 BL21 (DE3) 中表达外源基因

BL21 (DE3) 为 λ 噬菌体 DE3 的溶源菌，含有 lac UV5 控制的 T7 RNA 聚合酶基因，可以通过 IPTG 诱导 T7 RNA 聚合酶的表达。将含外源基因的 T7 表达质粒转化 BL21 (DE3)，接种单克隆于 LB/Ap (50μg/ml) 培养过夜，2%接种 3ml 新鲜 LB/Ap)，37℃培养 2~3h 至 A₆₀₀=0.3~0.5，加 IPTG 至 0.5mmol/L，37℃培养 3h，取样测 A₆₀₀，收集表达菌。按照每 0.1 OD 样品加入 10μl 水和等体积 2× SDS-PAGE 上样缓冲液的比例悬溶样品，煮沸 5min，取 20μl 上样，进行 SDS-PAGE 分析鉴定表达结果。

1.7 利用噬菌体 M13HEP 诱导表达外源基因

利用 HMS174F' 为宿主菌构建表达质粒并表达，或将表达质粒转化其它含有 F' 因子的大肠杆菌菌株，挑取单克隆接种于 2ml LB/Ap (50μg/ml)，37℃培养过夜。接种 2%过夜菌于 5ml 新鲜的 LB/Ap 培养基，37℃培养 2~3h 至 A₆₀₀ 约为 0.5，加入约 10⁹pfu M13HEP 噬菌体及 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L，37℃表达 3h，取样测 A₆₀₀，收集表达菌。SDS-PAGE 样品的制备同上。

1.8 外源表达产物性质分析

收集表达菌按每 0.1OD 菌加 10μl 水的比例悬浮表达菌，超声波破菌，15 000r/min (4℃) 离心 15min，吸出上清加入等体积的 2× SDS-PAGE 上样缓冲液，沉淀悬浮在与上清等体积的水及 2×SDS-PAGE 上样缓冲液中，煮沸 5min，取 20μl 上样，进行 SDS-PAGE 分析，以确定表达产物的溶解性。

1.9 SDS-PAGE 凝胶电泳

15%聚丙烯酰胺凝胶电泳按照 Laemmli 方法进行，用考马斯亮蓝染色^[6]。

2 结果

2.1 噬菌体诱导表达的大肠杆菌 T7 表达系统构建

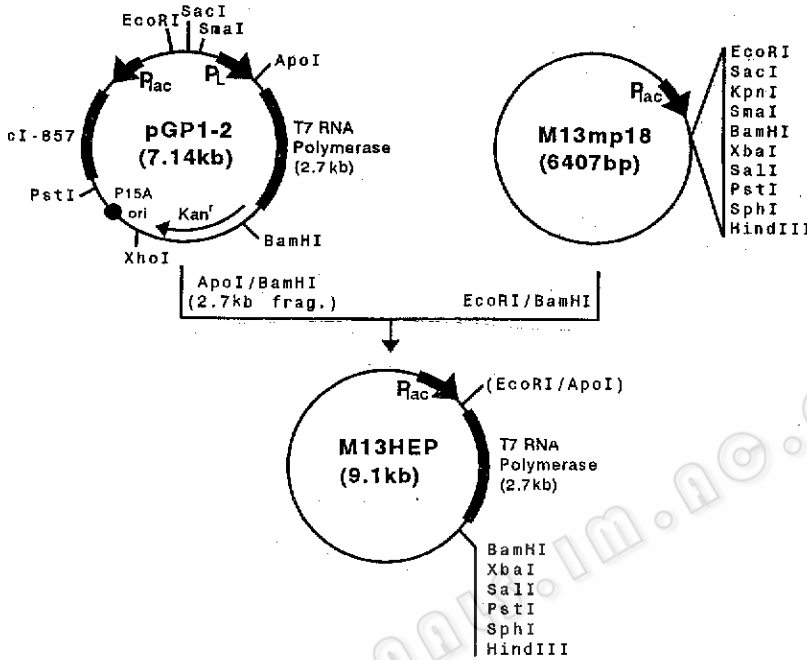


图 1 噬菌体 M13HEP 的构建
Fig. 1 Construction of phage M13HEP

2.1.1 噬菌体 M13HEP 的构建：利用限制酶 Apo I 和 BamH I 从质粒 pGP1-2 中切出长度约 2.7kb 包括 T7 RNA 聚合酶结构基因及其上下游序列的 DNA 片段，并克隆到噬菌体 M13mp18RF DNA 的 EcoR I 和 BamH I 位点之间，将 T7 RNA 聚合酶基因置于 lac 启动子的控制之下，得到了含有 T7 RNA 聚合酶基因的重组噬菌体 M13HEP

(图 1)。利用 M13HEP 感染雄性大肠杆菌，可以通过 IPTG 诱导表达 T7 RNA 聚合酶，为宿主菌提供 T7 RNA 聚合酶，从而诱导宿主菌中表达质粒 T7 启动子控制下的外源基因的表达。

2.1.2 宿主菌 HMS174F' 的构建：由于 T7 启动子不被大肠杆菌 RNA 聚合酶识别，因而 T7 系列表达质粒在大肠杆菌菌株（不含 T7 聚合酶）中不存在表达泄漏，可以安全地进行重组克隆操作。一般 T7 系列表达质粒的克隆操作在大肠杆菌 HMS174 中更为稳定。为使该表达系统更为完善、方便，通过细菌接合将 F' 因子从大肠杆菌 XL1-blue 中转移至大肠杆菌 HMS174 中，使该菌成为雄性菌株，同时还具有 Tc 抗性。新构建的菌株 HMS174F' 不仅可以用于 T7 表达质粒的克隆操作，同时还可以利用噬菌体 M13HEP 诱导外源基因表达，以及利用 helper phage 诱导产生单链用于测序、突变等操作，而 Tc 抗性特征则有利于该菌的筛选。

2.2 利用噬菌体 M13HEP 诱导外源基因的表达

为研究所构建表达系统的功能，利用噬菌体 M13HEP 进行了 T7 表达质粒的诱导表达研究。含小鼠 cAMP 依赖的蛋白激酶催化亚基 α (mC α) 和 β (mC β) 基因的 T7 表达质粒 (图 2) 均已在大肠杆菌 BL21 (DE3) 得到了表达。其中由于表达产物毒性的原因，pCZmC β 对 T7 表达菌 BL21 (DE3) 的转化效率极低，所得转化子的稳定性也极差且表达效率很低 (结果未显示)。为此将表达质粒 pCZmC α 和 pCZmC β 分别转化宿主

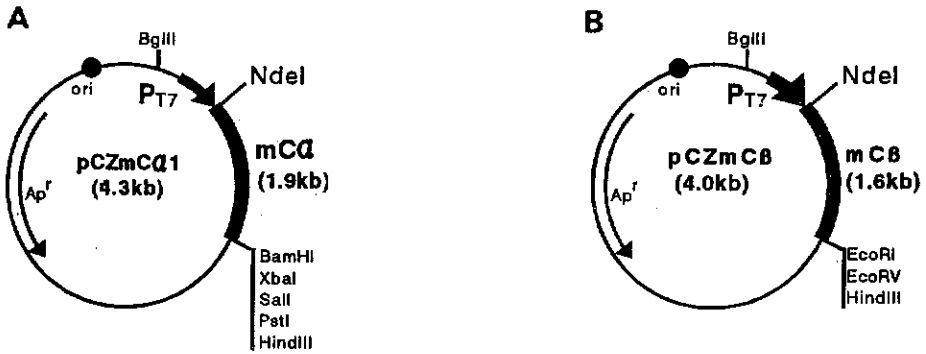


图 2 构建的基因表达质粒

Fig. 2 Constructed expression plasmids for production of mature mC α and mC β in *E. coli*

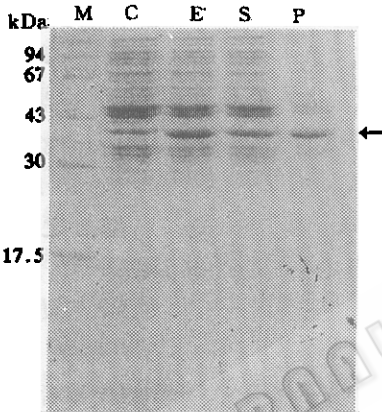


图 3 噬菌体 M13HEP 诱导表达 mC β 基因

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the heterologous protein expressed in *E. coli* HMS174F' harboring the plasmid pCZmC β induced by M13HEP infection

- C. Bacteria sample before induced;
- E. Bacteria sample after induced;
- S. Supernatant of expressed bacteria;
- P. Pellet of expressed bacteria;
- M. Molecular weight marker.

HMS174F'，利用噬菌体 M13HEP 进行了诱导表达研究。表达结果说明利用噬菌体 M13HEP 可以稳定地诱导表达 mC β ，SDS-PAGE 分析可以观察到一分子量约为 40kDa 的诱导表达条带，表达量约占全菌总蛋白的 6%左右，表达产物有相当一部分是可溶性的（图 3）。活性分析表明，表达产物有明显激酶活性（数据未显示）。说明该诱导表达系统可以方便地用于毒性基因的表达。

pCZmC α 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中可以稳定高效表达，表达率可达全菌总蛋白的 23%。而利用现系统进行 M13HEP 诱导表达，mC α 表达量亦达到全菌总蛋白的 12%（图 4）。两种条件下可溶性表达产物的含量基本相同，且表达产物均有明显的蛋白激酶活力。上述结果表明利用噬菌体 M13HEP 不仅可诱导毒性基因的表达，还可以用于其它非毒性基因的表达，该诱导系统已成功地应用于多种外源基因的表达。另据实验观察发现，不加 IPTG 而只加入噬菌体 M13HEP 就可以观察到诱导表达产

物。分析其原因，可能是由于 lac 启动子不能完全被抑制，因而在未加 IPTG 的情况下就有一定量 T7RNA 聚合酶表达，而且 T7 RNA 聚合酶的活性极高，其微量表达足以诱导外源基因的表达。

3 讨 论

T7 表达系统是通过诱导细胞内的 T7 RNA 聚合酶的表达而实现的，目前，提供 T7 RNA 聚合酶的方式主要有两种：一是双质粒系统，利用含 T7 聚合酶基因的相容性质粒

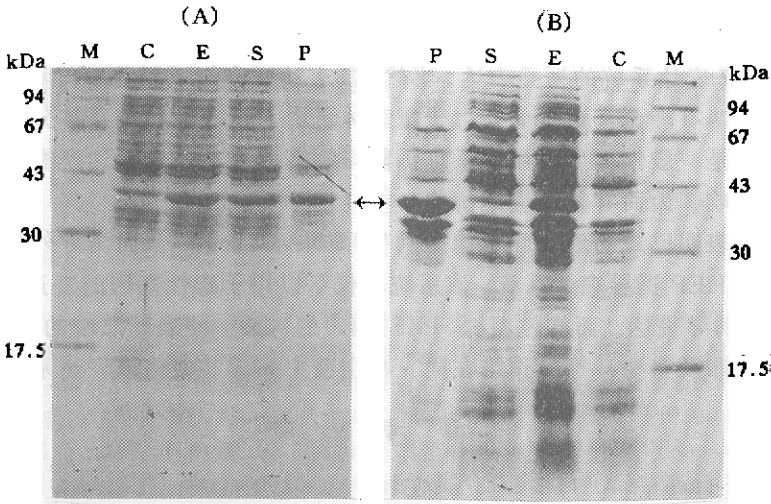


图 4 重组 mC α 产物的诱导表达比较

Fig. 4 Comparison of the mC α expressed in *E. coli* HMS174F' (A) OR BL21 (DE3) (B) harboring the plasmid pCZmC α .

C. Bacteria sample before induced; E. Bacteria sample after induced; S. Supernatant of expressed bacteria; P. Pellet of expressed bacteria; M. Molecular weight marker.

提供可诱导表达的 T7 RNA 的聚合酶^[3]；另一是 DE3 溶源菌系统，通过含 T7 RNA 聚合酶基因的 λ 噬菌体 DNA 溶源整合在大肠杆菌菌株染色体 DNA 上而提供可诱导的 T7 RNA 聚合酶^[5]。这些系统各有其优缺点，不过都能有效地表达许多外源基因。但由于上述提供 T7 RNA 聚合酶的方式不可避免地会有组成性 T7 RNA 聚合酶的表达，从而使外源基因在诱导前有一定泄漏表达，因而如果待表达基因的产物对细胞有毒性则会引起转化菌的不稳定，表达极低，甚至难以获得转化的表达菌。

较为常见的是外源基因产物对菌株仅有微弱毒性。在这种情况下表达质粒仍可以稳定地转化表达菌，转化效率不会降低，并且可以得到高效表达。但是当该菌株经过几天的保存后，则不能诱导表达出相应蛋白或表达效率大幅下降。在这种情况下，由于高表达克隆不能稳定保存，因而必须经常进行转化和筛选。

另一种情况是外源基因产物的毒性较强，这些基因虽然克隆入 T7 表达质粒，但是却不能稳定转化含 T7 RNA 聚合酶的表达宿主菌。这种情况是较为普遍的，估计约有 5% 的基因在利用 T7 系统进行表达时会遇到上述问题^[3]。在这种情况下，往往可以观察到表达质粒的转化效率大大下降，有时得到的转化子虽仍然保持抗性，但是由于含有缺失或突变，因而不能表达出相应产物。

迄今为止，虽然已设计了多种方法来解决毒性基因的表达问题^[5]，但最根本的解决方法应是将 T7 RNA 聚合酶基因移出表达菌，待诱导表达时再导入，从而消除表达泄漏。如有利用含 T7 RNA 聚合酶基因的重组 λ 噬菌体感染表达菌 (CE6) 进行诱导^[5]，但由于 λ 噬菌体操作较麻烦，对使用的菌株有限制，且对细菌的生长周期有较大的影响，因而该方法一直没有得到广泛的应用。本文利用重组 M13 噬菌体来提供 T7 RNA 聚合酶。由于 M13 噬菌体易操作，对细菌的生长周期也影响不大，可以感染所有雄性大肠杆菌，因而利用重组 M13 HEP 诱导 T7 系列表达质粒的外源基因表达具有操作简便，适用范围广等

特点。根据对多种基因表达的结果表明,该系统除可以应用毒性基因的表达外,还可以广泛应用于 T7 表达系统的诱导表达。当然,其表达效率与双质粒系统和 BL21 (DE3) 溶源菌系统相比略有降低,这可能是由于噬菌体蛋白大量表达和噬菌体分泌影响了外源基因的表达,但是一般情况下利用该系统仍能得到高效表达,对表达产物的溶解性、活性也未有明显影响,因而有普遍应用价值。

上述结果表明已成功地构建了能提供 T7 RNA 聚合酶,从而诱导外源基因表达的重组噬菌体 M13HEP 诱导表达系统。该系统不仅可以用于毒性基因的表达,还可以广泛应用 T7 系统的诱导表达。而雄性菌株 HMS174F' 的构建,使表达质粒的构建、诱导表达、单链制备(测序及突变)等操作均在同一宿主菌中完成,使得该表达系统更为完善。

参 考 文 献

- (1) Studier F W, Moffatt B A. *J Mol Biol*, 1986, **189**: 113~130.
- (2) Tabor S, Richardson C C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 1074.
- (3) Tabor S. *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FA *et al.* eds. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1990, pp. 16. 2. 1~16. 2. 11.
- (4) Rosenberg A H, Lade B H, Chui D S *et al.* *Gene*, 1987, **56**: 125~135.
- (5) Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J *et al.* *Methods in Enzymology*, 1990, **185**: 60~89.
- (6) Sambrook J, Fritsch E F, Mariatis T. *Molecular cloning. A laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- (7) Miller J M. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1972.
- (8) Laemmli U K. *Nature*, 1970, **227**: 680~685.

A T7-promoter Based *Escherichia coli* Expression System Induced with Bacteriophage M13HEP

Chen Changzheng Huang Hua Yang Xinying

Xia Qichang Li Boliang Wang Yinglai

(Shanghai Institute of Biochemistry Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract The bacteriophage M13HEP which can express T7 RNA polymerase under the control of lac promoter was constructed by cloning the T7 RNA polymerase gene into phage M13mp18 RF DNA. Heterologous genes under the control of T7 promoter can be induced by introducing T7 RNA polymerase to the cells through M13HEP phage infection. Many heterologous genes were successfully expressed by using this phage M13HEP induction system, especially some gene products to be expressed are toxic to host strain BL21 (DE3). A new *E. coli* strain HMS174F' was also constructed by transfer F' pilli from *E. coli* XL1-blue to *E. coli* HMS174. It made T7 expression plasmid construction, expression and single strand DNA rescue can be performed in the same *E. coli* strain.

Key words T7 RNA polymerase, bacteriophage, T7 promoter expression