

# 一种高效、稳定的可溶性原核表达载体的构建及应用

高闪电,常惠芸,独军政,丛国正,邵军军,林 彤

(中国农业科学院 兰州兽医研究所,国家口蹄疫参考实验室,家畜疫病病原生物学国家重点实验室,  
农业部畜禽病毒学重点开放实验室,甘肃 兰州 730046)

**摘要:**以 O 型口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 基因重组克隆载体 pGEM-OVPI 为模板,设计表达引物,经 PCR 扩增获得上游带有 PelB 信号肽编码序列的 VP1 C 端编码区,将其克隆至该表达载体 pET-30a(+) 中,构建了可溶性原核表达载体 pET-30a-PelB-VP1C。将 VP1 全长编码区替换 VP1C,获得重组原核表达载体 pET-30a-PelB-VP1。将两种重组质粒分别转化大肠杆菌工程菌株 BL21-(DE3)-plysS,经 IPTG 诱导表达,实现了 VP1 全长及其 C 端的可溶性表达,以金属离子螯合层析法分别对表达的 VP1 及其 C 端融合蛋白进行纯化,SDS-PAGE 显示纯化的目的蛋白分别在 32 ku 和 20 ku 处有单一目的条带,具有较高的纯度。Western blot 分析,VP1 蛋白及其 C 端均可与牛 O 型口蹄疫病毒阳性血清反应。对重组菌株的连续传代实验证实了该可溶性表达载体的遗传稳定性,显示了该可溶性原核表达载体在蛋白可溶性表达中的应用价值。

**关键词:**口蹄疫病毒;原核表达;可溶性;信号肽

**中图分类号:**R392.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)06-0046-04

## Construction and Application of an Efficient, Stable Soluble Prokaryotic Expression Vector

GAO Shan-dian, CHANG Hui-yun, DU Jun-zheng, CONG Guo-zheng, SHAO Jun-jun, LIN Tong

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary  
Etiological Biology, National FMD Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese  
Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** In this study, the recombinant cloning vector pGEM-OVPI was used as template for PCR to get the coding region of VP1 C terminus, and the coding region of PelB signal peptide coding region was added to the upstream of VP1C, then the fragment was cloned to prokaryotic expression vector to get recombinant expression plasmid pET-30a-PelB-VP1C. The VP1C fragment was replaced by the VP1 coding fragment to get pET-30a-PelB-VP1 expression plasmid. The E. Coli BL21-(DE3)-plysS was transformed respectively and solubly expressed fused VP1 and VP1 C terminus. Purified VP1 and VP1 C terminus were obtained by Ni-NTA His Bind Resin affinity chromatography and a single clear band of 32 ku and 20 ku appeared respectively in the SDS-PAGE gel. Western blot analysis showed that purified VP1 and VP1 C terminus could react with bovine antiserum against FMDV of serotype O. The consecutive culture of recombinant strains showed pET-30a-PelB-VP1C and pET-30a-PelB-VP1 has excellent stability, which had practical value in soluble protein expression.

**Key words:** Foot-and-mouth disease virus; Prokaryotic expression; Soluble protein expression; Signal peptide

大肠杆菌具有遗传背景清晰、生长周期短、培养经济、表达水平高、待选载体和宿主广泛等优点,一直是外源蛋白的首选表达系统<sup>[1,2]</sup>。蛋白的表达受到目的蛋白的结构、表达宿主的选择、表达载体的选择、培养条件和诱导方法等多方面因素的影响,任何环节都

可能降低蛋白的表达效率<sup>[3]</sup>。外源蛋白在高水平表达的同时,容易被宿主细胞蛋白酶降解或形成无活性的包涵体,需经进一步复性才能得到有活性的蛋白<sup>[4]</sup>。包涵体蛋白的体外复性过程费时、费力,而且蛋白活性恢复率较低,从而限制了目的蛋白的进一步

收稿日期:2009-08-03

基金项目:国家“十一五”重大科技支撑计划(2006BAD06A14)

作者简介:高闪电(1980-),男,河北石家庄人,研究实习员,硕士,主要从事动物病毒分子生物学研究。

通讯作者:常惠芸(1965-),女,河南许昌人,研究员,博士,主要从事病毒分子生物学研究。

应用<sup>[5]</sup>。因此,寻找一种稳定的可溶性蛋白表达系统,成为发酵工程亟待解决的问题。目前,研究人员利用 PelB、OmpA、OmpC、OmpT、OmpF、St<sup>-</sup>、PhoA、LamB、LTB 等诸多蛋白信号肽,成功实现了下游融合蛋白的可溶性表达<sup>[6]</sup>。

PelB(Pectate lyase B)是存在于纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)和胡萝卜软腐欧文氏菌(*E. carotovora*)中的一种果胶裂解酶,可作用于聚半乳糖醛酸的-1,4-糖苷键使其水解。PelB 蛋白前体含 374 个氨基酸残基,相对分子量约为 40.3 ku,其中前 22 个氨基酸残基为其信号肽,在蛋白加工成熟时被信号肽酶识别、剪切,生成相对分子量约为 38.1 ku 的成熟蛋白,定位于核周质中<sup>[7]</sup>。本研究通过分子生物学方法,将 PelB 信号肽的编码 DNA 片段融合到具有有型特异性的 O 型口蹄疫病毒(FMDV)结构蛋白 VP1<sup>[8]</sup> C 端编码 DNA 片段上,然后插入原核表达载体 pET-30a(+ )多克隆位点上游,构建了重组原核表达载体 pET-30a-PelB-VP1C,然后利用 O 型 FMDV VP1 全长编码区替换 VP1 C 片段,获得了重组原核表达载体 pET-30a-PelB-VP1。转化菌经 IPTG 诱导,分别实现了 VP1 C 端及其全长

的部分可溶性表达,并对载体的稳定性进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、菌株与试剂材料

含有 O 型 FMDV 结构蛋白 VP1 的重组克隆载体 pGEM-OVP1、原核表达载体 pET-30a(+),牛 O 型 FMDV 阳性及阴性血清,均由本实验室保存。大肠杆菌感受态细胞 BL21-(DE3)-plysS、限制性核酸内切酶、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、DNA 片段纯化试剂盒、大肠杆菌 BL21(DE3)pLys<sup>-</sup>、质粒提取试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;低分子量蛋白 Maker 购自中国科学院上海生物化学研究所;异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、丙烯酰胺、Tris、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵、TEMED、硝酸纤维素膜、透析袋等均均为国产或进口分析纯。蛋白纯化试剂盒 ProBond<sup>TM</sup> Purification System 为 Invitrogen 公司产品。

### 1.2 引物设计

根据 PelB 的信号肽编码序列和 O 型 FMDV 结构蛋白 VP1 编码区,委托上海生工生物工程有限公司合成以下引物(表 1)。

表 1 扩增 VP1 和带有 PelB 信号肽编码区的 VP1 C 端编码片段的引物

Tab.1 Primers for amplification of VP1, VP1C with PelB signal sequence

引物 Primer names	Oligo Nucleotide sequences
VP11(+)	5'-CCGCGATCC <sub>BamH I</sub> ACCACCTCTGCGGGCG-3
VP1C1(+)	5'-CCGCGATCC <sub>BamH I</sub> GTCCCGAACGGGCGC-3
PelB2 扩(+)	5'-TATA CATATG <sub>Nde I</sub> AAATACCTATTGCTACGGCAGCCGCTGGATTGTATTAC <sub>-3</sub>
PelB1 扩(+)	5'-GCTGGATTGTATTAC <sub>-3</sub> TCCTGCCCAACC ACCGAT <sub>-3</sub> GCCCATGGATGGATCC <sub>BamH I</sub> GTCC-3
VP12(-)	5'-CCGCTCGAG <sub>Xho I</sub> TGAAGCTGTTTTCG-3

### 1.3 原核表达载体的构建

以重组克隆载体 pGEM-OVP1 为模板,分别利用 VP11(+)/VP12(-)、VP1C1(+)/VP12(-) 两对引物扩增 VP1 及其 C 端的编码片段,回收目的片段,然后以 VP1 C 端编码片段为模板,以 PelB1 扩(+)/VP12(-)、PelB2 扩(+)/VP12(-) 引物分两次扩增获得上游含有 PelB 的信号肽编码序列的 VP1 C 端编码 DNA

片段,回收经 NdeI 和 XhoI 进行双酶切消化,然后与经过同样处理的原核表达载体 pET-30a(+ )连接获得重组表达载体 pET-30a-PelB-VP1C。然后将 pET-30a-PelB-VP1C 质粒经 BamH I 和 XhoI 进行双酶切处理,插入经过同样酶切处理的 VP1 编码片段,获得重组表达载体 pET-30a-PelB-VP1。上述两种重组表达载体均经 PCR、酶切、测序进行鉴定,其克隆表达区见图 1。

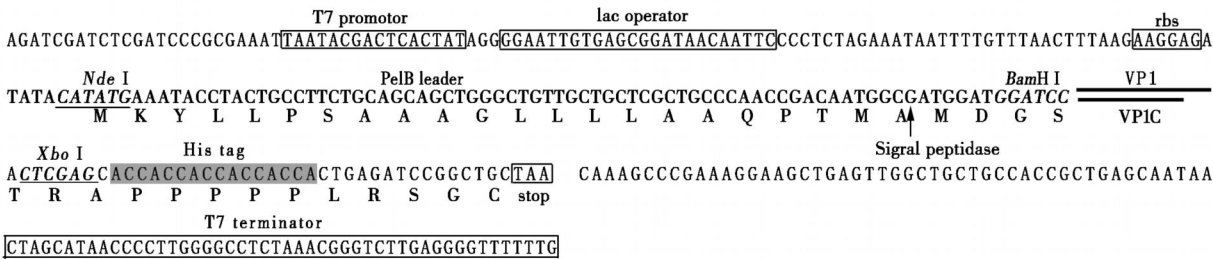


图 1 重组表达载体 pET-30a-PelB-VP1 和 pET-30a-PelB-VP1C 克隆表达区

Fig.1 Cloning and expression region of pET-30a-PelB-VP1 and pET-30a-PelB-VP1C

### 1.4 重组蛋白的诱导表达、纯化与反应原性分析

取测序正确的 pET-30a-PelB-VP1 和 pET-30a-

PelB-VP1C 重组菌原菌液按 1:100 转接于含 50 mg/L Kana 的 LB 培养基中,置 37℃ 220 r/min 的条件下培

养至 A 值为 0.4 ~ 0.6 后,加 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L,继续培养 4 ~ 6 h 后进行 SDS-PAGE 分析目的蛋白的诱导表达情况。确认目的蛋白表达后,依上述方法接菌,各诱导 200 mL。4 ~ 6 500 g 离心 15 min 收集菌体,完全重悬于 20 mL PBS 中,充分混匀,加溶菌酶至终浓度为 100  $\mu$ g/mL,30  $^{\circ}$ C 温育 15 min,在冰上超声波处理 20 min,然后 10 000 g,4  $^{\circ}$ C 离心 10 min,将上清和沉淀制样进行电泳进行可溶性分析。然后按 ProBond<sup>TM</sup> Purification System 操作说明书对含有目的蛋白的上清部分进行纯化并经 SDS-PAGE 观察。蛋白纯化后,取未诱导的 pET-30a-PelB-VP1 和 pET-30a-PelB-VP1C 重组菌、纯化的 VP1 和 VP1C 制样电泳,电转印于硝酸纤维素膜上进行 Western blot 检测纯化蛋白的反应原性,一抗用 1 500 稀释的牛 O 型 FMDV 阳性血清,二抗用 1 15 000 稀释的辣根过氧化物酶标记兔抗牛 IgG(Sigma),同时设阴性血清对照。

### 1.5 重组菌株的表达稳定性分析

将 pET-30a-PelB-VP1 重组菌原菌液按 1 100 稀释摇培,连续 3 次,然后取不同时段的菌液,涂布含 Kana 抗性的培养板,每板随机挑取 10 个单菌落进行摇培、诱导表达,然后经 SDS-PAGE 分析重组菌株的表达稳定性。按同样方法,对 pET-30a-PelB-VP1C 重组菌的表达稳定性进行分析。

## 2 结果与分析

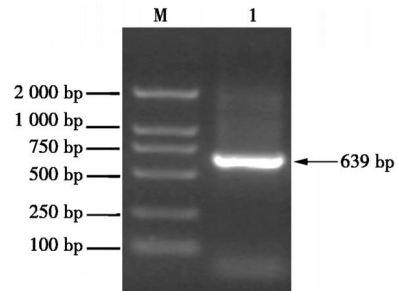
### 2.1 原核表达载体的构建

以 pGEM-OVP1 为模板,利用 VP11 (+)/VP12 (-) 扩增得到 VP1 的编码片段,大小为 639 bp;利用 VP1C1 (+)/VP12 (-) 引物扩增得到 375 bp 的 VP1C 端的编码片段(图 2);以 VP1 C 端编码片段为模板,以 PelB1 扩 (+)/VP12 (-)、PelB2 扩 (+)/VP12 (-) 两对引物扩增分别得到 417 bp (amplicon 1)、455 bp (amplicon 2) 的 DNA 片段(图 3),其中 amplicon 2 含有完整的 PelB 信号肽和 VP1C 编码序区。将 amplicon 2 构建于 pET-30a 载体,获得阳性克隆 pET-30a-PelB-VP1C,将 VP1 编码区替换 VP1C 编码区后获得阳性克隆 pET-30a-PelB-VP1。序列测定结果显示,重组表达质粒 pET-30a-PelB-VP1C 和 pET-30a-PelB-VP1 均含有正确的读码框。

### 2.2 重组蛋白的诱导表达与纯化与反应原性分析

取 pET-30a-PelB-VP1 和 pET-30a-PelB-VP1C 重组菌诱导表达各时间段样品进行 SDS-PAGE,结果显示两重组菌诱导裂解物分别在 32 ku 和 20 ku 处可见特异的蛋白条带,与预期大小一致,阴性对照未出现表达条带,而且两重组菌均在诱导 6 h 时表达量最大。

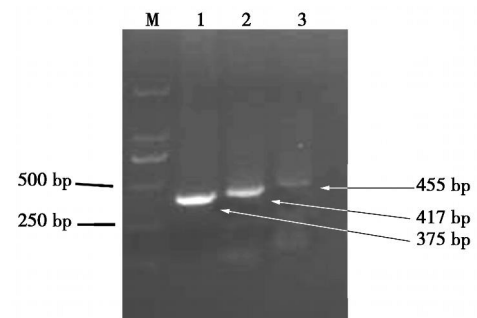
可溶性分析显示表达产物以可溶性和包涵体两种形式存在,分别收集超声后上清进一步用金属离子螯合层析法进行纯化,SDS-PAGE 结果显示纯化的目的蛋白均为较为清晰的单一条带(图 4,5)。Western blot 结果显示,纯化的 VP1 及 VP1C 均可与牛 O 型 FMDV 阳性血清反应,而不与阴性血清反应。未诱导的 pET-30a-PelB-VP1 和 pET-30a-PelB-VP1C 重组菌与阴性血清、阳性血清均无特异反应条带出现(图 6)。



M. DL-2000 DNA 标准;1. PCR 产物。M. DL-2000 Marker;1. PCR product.

图 2 VP1 编码片段的扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of VP1 fragment

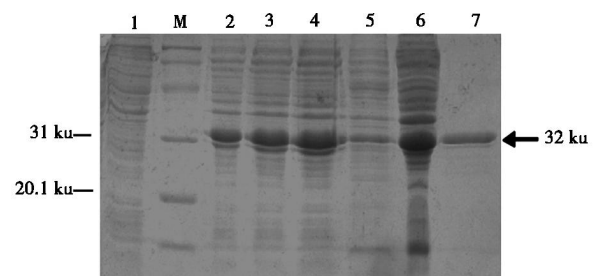


M. DL-2000 DNA 标准;1. VP1C;2. 扩增子 1;3. 扩增子 2。

M. DL-2000 Marker;1. VP1C;2. Amplicon 1;3. Amplicon 2.

图 3 VP1C 及 PelB-VP1C 编码片段的扩增结果

Fig. 3 PCR amplification of VP1C and PelB-VP1C



M. 蛋白分子质量标准;1. 阴性对照;2 ~ 4. 4 ~ 6 h 的 pET-30a-PelB-VP1 转化菌诱导物;5. 超声后上清;6. 超声后沉淀;7. 上清纯化产物。

M. Protein Marker;1. Negative control;2 - 4. 4 - 6 hours pellets from pET-30a-PelB-VP1 transformant;5. Supernatant after sonication;6. Deposition after sonication;7. Purified product from supernatant.

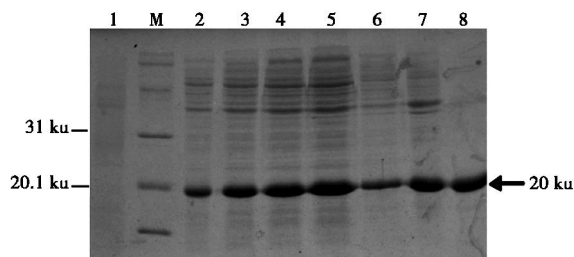
图 4 VP1 表达产物的可溶性分析和纯化

Fig. 4 Solubility analysis and protein purification of expressed VP1

### 2.3 重组菌株的表达稳定性分析

对 3 批 pET-30a-PelB-VP1 和 pET-30a-PelB-VP1C 重组菌培养液涂板所得的各 30 个克隆进行诱导后 SDS-PAGE 分析,结果显示 60 个工程菌均可稳定表

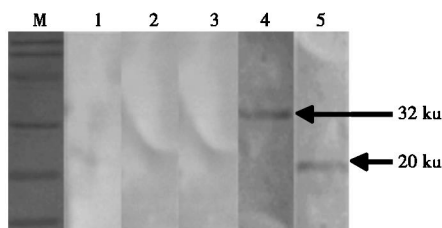
达 VP1 或 VP1C,具体表现在各工程菌株表达的蛋白量和 SDS-PAGE 蛋白条带无明显差异。工程菌在 3 代后质粒仍未出现丢失现象,提示重组表达载体具有良好的遗传稳定性和表达稳定性。



M. 蛋白分子质量标准;1. 阴性对照;2~5. 3~6 h 的 pET-30a-PeIB-VP1C 转化菌诱导物;6. 超声后上清;7. 超声后沉淀;8. 上清纯化产物。  
M. Protein Marker;1. Negative control;2~5. 3~6 hours pellets from pET-30a-PeIB-VP1C transformant;6. Supernatant after sonication;7. Deposition after sonication;8. Purified product from supernatant.

图5 VP1 C 端表达产物的可溶性分析和纯化

Fig. 5 Solubility analysis and protein purification of expressed VP1 C terminus



M. 蛋白分子质量标准;1. 菌体蛋白对照;2,3. VP1、VP1C 与阴性血清的反应性;4,5. VP1、VP1C 与阳性血清的反应性。  
M. Protein marker;1. The reactivity of tropina with FMDV positive antiserum;2,3. The reactivity of VP1 and VP1C with FMDV negative serum;4,5. The reactivity of VP1 and VP1C with FMDV positive antiserum.

图6 纯化蛋白的 Western blot 分析

Fig. 6 Western blot analysis of purified protein

### 3 讨论

蛋白质可溶性表达的优点在于纯化方便、避免蛋白酶降解、保持蛋白 N 端氨基酸序列和蛋白结构的正确性。蛋白的可溶性表达可通过多种途径实现,包括利用不同启动子调节蛋白的表达速率从而避免包涵体的形成、使用不同的宿主菌、降低诱导温度和诱导剂的浓度、分子伴侣的共表达,另外还可通过使蛋白分泌表达于核周质和培养基中以实现其可溶性。在核周质中很少存在菌体蛋白污染,纯化方便<sup>[6]</sup>。另外,核周质氧化性相对较强的环境利于蛋白质中二硫键的形成。在革兰氏阴性菌,主要有三种类型的分泌表达方式 (type I、type II、type III)<sup>[9,10]</sup>。其中,型 II 分泌表达应用较为广泛。这一类型的蛋白在加工成熟前带有指导蛋白质跨膜转移和定位的 15~30 个氨基酸残基的疏水信号肽,经 Sec 蛋白转运途径转运至核周质,然后进一步加工为成熟蛋白<sup>[11]</sup>。目前诸多蛋白信号肽已成功用于重组蛋白的分泌表达,这些信号肽都具有 N、H、C 结构域,其中

N 结构域的氨基酸多带正电,后面紧接 10~20 个氨基酸的 H 结构域。C 结构域最后三个氨基酸多为 Ala-X-Ala,含有能被信号肽酶识别切割的氨基酸序列<sup>[6]</sup>。

在本研究中,我们利用引物定点突变的原理,利用 PCR 获得了带有 PeIB 信号肽编码区的 O 型 FMDV 结构蛋白 VP1 C 端 DNA 片段,利用 *Nde* 和 *Xho* 这两个酶切位点,将其克隆至原核表达载体 pET-30a(+) 中,成功构建了重组表达载体 pET-30a-PeIB-VP1C,实现了 VP1 C 端的可溶性表达。为方便用于其他基因的表达,我们在 PeIB 信号肽编码序列后插入了 *Bam*H 酶切位点,这样将其中的 VP1C 编码序列切除,就可插入目的基因。随后利用该载体构建了 pET-30a-PeIB-VP1 重组表达载体,同样,实现了 VP1 蛋白可溶性表达。在载体的构建中,我们保留了 pET-30a(+) 载体下游的 His 标签,在收集目的蛋白组分后利用金属离子螯合的办法进一步纯化,获得的目的蛋白纯度较高。重组菌在冻存后复苏一般存在质粒丢失现象,不过,利用冻存的质粒重新转化表达菌,可马上用于目的蛋白表达。目前,含有菌体蛋白信号肽编码序列的表达载体很多,Peal-PeIB、pET-22b(+) 等原核表达载体均含有 PeIB 信号肽编码序列,但商品化的载体比较昂贵,一种载体也未必能够适用于所有基因的表达。本研究中的信号肽插入方法也适用于含有其他信号肽载体的构建,例如,OnmpA、OnmpC、OnmpT、OnmpF、St<sub>1</sub>、PhoA、LamB、LTB 等。

### 参考文献:

- [1] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(5): 411 - 421.
- [2] Swartz J R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12(2): 195 - 201.
- [3] Makrides S C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli* [J]. *Microbiol Rev*, 1996, 60(3): 512 - 538.
- [4] Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli* [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(11): 1399 - 1408.
- [5] Singh S M, Panda A K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins[J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, 99(4): 303 - 310.
- [6] Choi J H, Lee S Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(5): 625 - 635.
- [7] Lei S P, Lin H C, Wang S S, et al. Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase[J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(9): 4379 - 4383.
- [8] 周建华, 丛国正, 高闪电, 等. FMDV OA/58 病毒株 VP1 蛋白结构构建与 B 细胞抗原表位的预测[J]. *华北农学报*, 2007, 22(4): 176 - 179.
- [9] Pugsley A P. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria[J]. *Microbiol Rev*, 1993, 57(1): 50 - 108.
- [10] Mergulho F J, Summers D K, Monteiro G A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Adv*, 2005, 23(3): 177 - 202.
- [11] Mori H, Ito K. The Sec protein-translocation pathway [J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(10): 494 - 500.