维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:1009-0002(2007)02-0339-03

综 述

多基因在大肠杆菌中的共表达策略

耿风廷,赵晓瑜,高珊
河北大学 生命科学学院,河北 保定 071002

[摘要] 多基因共表达在多领域有重要的应用价值,大肠杆菌共表达系统包括多顺反子系统和双质粒系统,两者各有优缺点。多顺反子系统不需外界2种抗生素的同时存在,但操作较为复杂。通常认为,具有相同复制子的质粒是不相容的,但近来的实验表明,在双抗生素的选择压力下,不相容的双质粒系统也能稳定传代,且操作简单,周期较短。双质粒系统已经应用于生产、医学等各个领域。

[关键词] 共表达;大肠杆菌;多顺反子;双质粒
[中图分类号] Q786 [文献标识码] A

The Strategy of Coexpression in *Escherichia coli*

GENG Feng-ting, ZHAO Xiao-yu, GAO Shan
College of Life Scinece, Hebei University, Baoding 071002, China

[**Abstract**] Coexpression of genes has showed its important value in many domains. There are mainly two strategies to coexpress proteins in *E.coli*. One is to use a bicistronic vector, which is generated by cloning two target genes into one plasmid. The other strategy relies on the two-plasmid coexpression system in which foreign genes are cloned in two different vectors. The first strategy is no need for existence of two antibiotics, but it is more complex than the second one. It has been considered that the two plasmids having the same replicon are incompatibility, but the resent experiments show that two plasmids carrying the same replicon can still coexist in *E.coli*, if under the selection pressure of two antibiotics, so the second one is more simple and convenient than the first one. Now the two-plasmid coexpression system is applied to many domains, such as production, the science of diagnosing, treating, or preventing disease.

[**Key words**] coexpression; *Escherichia coli*; bicistronic; two-plasmid

1 共表达的应用

从20世纪70年代初期基因克隆技术建立至今,短短几十年的时间,基因克隆技术发展十分迅猛,迄今已有很多外源基因被克隆到不同的表达载体中,进行各种研究,以期为人类造福。

但是,很多生物学功能并不是由一个基因或一种蛋白来控制和完成的,它需要多个相关基因或蛋白的共同作用。近几年,越来越多的科学家开始把目光转移到将多个外源基因在同一细胞内共同表达的研究上来。

同时转移并表达多个外源基因在各个领域都有重要的应用价值。比如,在基因治疗领域[1],尤其在针对疾病发展的各个环节设计的联合基因治疗方案中,获得多个外源基因的高效转移与表达具有重要意义;在化工生产领域,多个外源基因的共表达可以有效地节约生产成本、提高产量,是生物技术在重要化工原料生产中应用的又一新尝试,具有重大的经济效益和社会效益;在农业生产与病虫害防治[2]、环境治理、毒理学等其他方面,多基因共表达也有很大的应用前景。

那么,多基因共表达具体有什么作用呢?概括来说,它常常用来解决4类问题:①酶与辅酶共表达获得活性蛋白质;②生物功能相关蛋白质的共表达;③增加外源蛋白质的可溶性,如与伴侣分子共表达[3];④增加外源蛋白的产量。

1.1 酶与辅酶的共表达

有的酶在单独存在的情况下不具有催化活性,只有与辅酶结合时,才能表现出催化能力,因此通过酶与辅酶的共表达,可以实现二者的有效结合,共同作用,催化酶促反应。

例如肉碱脱水酶及其辅因子的共表达。肉碱(肉毒碱,维生素 B_T)目前已经广泛应用于食品、医疗保健等领域,而制备肉碱的方法中以用肉碱脱水酶对巴豆甜菜碱的转化最为常用。但是单独的肉碱脱水酶没有活性,需要一个低分子量辅因子,该辅因子的加入能再现无活性脱辅基肉碱脱水酶的活性,目前已经克隆得到编码脱辅基肉碱脱水酶的基因 *cai*B 和编码该酶的辅因子合成酶的基因 *cai*E,采取在同一细胞中将2个基因共表达的方法,可以得到高活性的重组肉碱脱水酶[4]。

1.2 生物功能相关蛋白质的共表达

有些蛋白之间的功能是相互关联的,例如催化一个反应体系不同步骤的各个酶,前一个反应的产物是后一个反应的底物。

杜丽琴等[5]利用多顺反子手段,将3-磷酸甘油脱氢酶基因(*gpd1*)和3-磷酸甘油酯酶基因(*hor2*)串连到启动子下游,实现

[收稿日期] 2006-08-24
[基金项目] 河北省教育厅资助项目(2004307)
[作者简介] 耿风廷(1982-),男,硕士研究生
[通讯作者] 赵晓瑜,(E-mail)uyoaix@yahoo.com.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

了2个基因的共表达，从而在大肠杆菌中构建了一条由葡萄糖经糖酵解途径生成磷酸二羟丙酮(DHAP)，再经3-磷酸甘油脱氢酶和3-磷酸甘油酯酶共同作用生成甘油的代谢途径，使本不产甘油的大肠杆菌能发酵生成甘油。

1.3 增加外源蛋白质的可溶性

外源蛋白在大肠杆菌中高表达时往往形成无活性的包涵体，包涵体大多是蛋白质在过量表达过程中不正确折叠产生的，正确构象的形成往往需要在体外进行变性和复性，而蛋白质的复性过程十分复杂，在方法上缺少一定的规律可循，特别是分子较大以及二硫键较多的分子，复性更加困难，有的甚至难以复性。分子伴侣可以促进其他蛋白质的正确折叠，如果将分子伴侣基因与外源蛋白基因共存表达，可能会有效地促进外源蛋白形成正确的构象，提高其活性，减少包涵体的形成，为基因工程下游的处理带来很大方便。周颖等[6]实现了分子伴侣SecB基因与人淋巴毒素(lymphotoxin，LT)基因在大肠杆菌中的共表达，提高了LT基因在大肠杆菌中的可溶性表达。

1.4 增加外源蛋白的产量

通过与某些酶或蛋白共表达，从而可以提高外源蛋白本身的表达量。Sanchez等[7]通过将吡啶核苷酸转氢酶(UdhA)与聚-β-羟基丁酸酶(PHB)共表达，使得PHB的产量显著提高。

2 大肠杆菌中外源基因共表达的策略

现有的大肠杆菌共表达系统主要分为2类，一类是多顺反子表达系统，另一类是双质粒表达系统。

2.1 多顺反子表达系统

多顺反子表达系统就是将多个目的基因克隆于同一表达载体[8]，包括多启动子表达系统和单启动子表达系统。

2.1.1 多启动子表达系统 将带有各自独立启动子的多个表达盒构建于一个载体上，转录出多种不同的mRNA，并翻译出不同的蛋白质。这种共表达的方法简单，但容易出现启动子之间的干扰现象，一个外源基因的表达经常会影响到另一个基因的表达。

2.1.2 单启动子表达系统 构建由单个启动子启动不同基因表达的多顺反子，在多顺反子中，外源基因含有各自的RBS序列及翻译起始、终止信号，能独立翻译出外源基因。比如，可以将第一个基因的终止密码突变或者删除，使其读码框与第二个基因的起始密码相连，或通过连接子相连，并能正确通读，连接子多为中性疏水氨基酸，适当的连接子有利于蛋白的正确折叠及产生各自独立的功能。

但该方法也存在一些问题，如果一个基因的构象发生改变，则会使另一个基因的功能受到影响。另外，如果2个基因产物的细胞定位不同，也会影响基因的正常功能。

2.2 双质粒共表达系统

双质粒共表达系统是将2个外源基因分别构建到不同的载体中去，然后通过2个载体在大肠杆菌中的共同表达来实现2个外源基因的共表达。根据载体选择的不同，双质粒共表达系统可以分为复制子不同的相容性双质粒和复制子相同的不相容性双质粒。

2.2.1 相容性双质粒共表达系统 相容质粒是指复制子(replicon)不同的2种质粒，由于2个载体各自复制子不同，因此在大肠杆菌中可以共存。Johnston等[9]在构建pRSET/pRM1相容性双质粒共表达体系的研究中提出，2个载体都要带有T7启动子，并且还要带有不同的抗性；最重要的一点，就是2个载体的复制子不能相同，这样才能保证在传代过程中不会发生质粒的丢失。

但是目前大部分商品化表达载体均为ColE1/pMB1复制子，所以不同复制子的2种载体不容易得到，这会给研究工作带来一些麻烦。

2.2.2 不相容性双质粒共表达系 在传统概念中，复制子相同的2种质粒在宿主菌内使用相同的复制系统，属于不相容质粒，当它们被导入同一细胞时，会在复制及随后分配到子细胞的过程中彼此竞争，发生质粒复制的不均等分配，导致2种质粒拷贝数的严重失衡[10]，几代之后其中一种质粒就可能丢失，因此这样的2种质粒不能在同一菌株中共存，所以在最初研究双质粒共表达的时候都是选择复制子不同的2种质粒。

但是上述观点并未考虑到外界选择压力(如抗生素)对质粒拷贝数的影响。在2种抗生素选择压力同时存在的情况下，只有具有这2种质粒的子代细菌能够存活，丢失其中任何一种质粒的子代细菌都会因为失去该质粒所携带的抗性而被相应的抗生素杀死，因此，虽经反复传代，在存活下来的细菌中大多数也应同时含有2种质粒，并均能有效表达所携带的外源基因[11]。

目前也有研究支持这一观点。杨巍等[12]利用不相容双质粒系统，将DNA撕裂因子(DNA fragmentation factor，DFF)的2个亚基DFF45和DFF40的基因分别克隆到卡那霉素抗性表达载体pET-28a(+)和氨苄青霉素抗性表达载体pET-21a(+)中，得到了pET28a-DFF40和pET21a-DFF40，利用其不同抗性，将两者共同转化大肠杆菌BL21 (DE3)，工程菌经IPTG诱导实现了DFF45和DFF40的共表达；将共转化子在同时含有卡那霉素和氨苄青霉素的液体培养基中连续培养14 h，仍有75%以上的细菌可以同时耐受2种抗生素，即同时含有pET28a-DFF40和pET21a-DFF40，说明利用2个具有不同抗性的不相容载体进行蛋白表达的方法是可行的。

另外，范立强等[4]在关于大肠杆菌肉碱脱水酶基因*caiB*及其辅酶合成因子基因*caiE*的共表达研究中，对相容和不相容这2种双质粒系统进行了比较，用ColE1复制子、卡那霉素抗性质粒pET28a(+)和ColE1复制子、氨苄青霉素抗性质粒pET22b(+)分别构建表达质粒pET28-caiB和pET22-caiE，用p15A复制子的质粒pACYC184构建四环素抗性表达质粒p15A-caiE，验证了在2种抗生素并存的选择压力下，2种相容质粒(pET28-caiB和p15A-caiE)和2种不相容质粒(pET28-caiB和pET22-caiE)在细胞内共存及其携带的基因*caiB*和*caiE*共表达的情况，证明了2种相容质粒和2种不相容质粒确实都能在宿主菌中共存，且两者转化得到的共转化子的数目相近；并且证明了含相容质粒菌体的存活率(同时含双质粒的菌占后代活菌的比例)不是恒定的，与含不相容质粒的共转化子一样，两者的存活率都随培养时间的延长而降低，说明相容性双质粒在传代过程中也存在分配的不均一性，隔时转换培养基培养的双质粒稳定性远高于连续培养的双质粒稳定性，进一步说明新鲜培养基中相对高的抗生素能杀死细菌传代中那些丢失了1种或2种抗性质粒的菌，双抗生素持续筛选可保证相容性或(和)不相容性双质粒在大肠杆菌中的共存。

综上所述，由于目前很难找到复制子不同的2种载体，因此比较2种双质粒表达系统，不相容双质粒系统更具有简便性与

维普资讯 http://www.cqvip.com

实用性。

3 不相容双质粒系统的影响因素

3.1 质粒的选择

虽然不管2种质粒的复制子是否相同，只要带有不同的抗性,就有可能在双抗生素环境压力下共存,但是除了考虑不同的抗性外,2个质粒还要保证外源基因的高效表达，表达量不高则实验意义不大;另外要避免2个基因表达时出现包涵体,如果表达的蛋白一个是融合的,而另外一个则形成了包涵体,那么就会给后续的实验带来很多不便。因此,在质粒的选择上,不能只考虑抗性不同就能在大肠杆菌中共存，还要为基因工程下游研究做好准备。

3.2 转化

双质粒共转化有2种方法，一种是将2种携带外源基因的质粒同时转化大肠杆菌感受态细胞，转化时,2种质粒的量不能相差太多,最好是等量转化。另一种是先将其中的一个质粒转到大肠杆菌感受态细胞中，然后再将这个重组菌制备成感受态细胞,将另外一个质粒转进来[6],这种方法的周期较第一种方法要长,但是转化效率较高。

3.3 培养时间

虽然在外界抗生素压力的存在下2种不相容质粒能够在大肠杆菌中共存,但是,由于抗生素会随着时间的延长慢慢失效,所以,在转化过程中,重组菌在双抗性固体培养基上或液体培养基中的培养时间不能太长,一般不超过14 h[12],否则随着抗生素量的逐渐减少,会出现质粒丢失的现象,但14 h对于细菌的正常生长、传代、诱导、表达来说都已足够。另有研究证明,如果将重组菌每隔12 h按1:100的接种量在双抗性液体培养基中传代1次,那么48 h后仍有大部分细菌为双抗性,说明丢失质粒的细菌会被新鲜培养基中相对高浓度的抗生素杀死，从而保证数次传代后大多数后代菌仍为共转化子。

4 共表达系统的选用

大肠杆菌中的共表达系统有多顺反子和双质粒2种,其中,多顺反子表达系统,尤其是单启动子表达系统,操作过程比较复杂,需要考虑到外源基因连接时不能出现读码框的移位。另外,要将2种重组蛋白质分别表达时还须重新构建表达载体,如Henricksen等[13]为了研究复制蛋白A的3个亚基在大肠杆菌中表达时的相互关系,构建了7个表达载体,包括3个单顺反子、3个双顺反子和1个三顺反子。但是多顺反子表达系统也有它的优点，那就是只要把外源基因成功地连接到表达载体中就能稳定传代,不需要2种抗生素的同时存在,并且在蛋白表达过程中不须考虑太多因素。

相对于多顺反子表达载体来说,双质粒系统虽然需要外界2种抗生素的存在,但是操作简单易为,周期较短。另外,由于已有研究证明了相容质粒和不相容质粒都能在大肠杆菌中共存,不需要考虑目前商品化表达载体复制子的单一性，所以双质粒系统是大肠杆菌中共表达最常用的系统。

但还是应该根据具体的实验情况来选择合适的共表达策略,而且不一定只局限于一种方法的应用。有研究表明,多顺反子和双质粒共表达系统可以同时应用。Hannemann等[14]在研究15β-羟化酶(CY106A2)时提出,该酶的活性在肾上腺铁氧还蛋白(Adx)和肾上腺铁氧还蛋白还原酶(AdR)的共同作用下能获得提高。Hannemann等构建了一个Adx和AdR共表达的多顺反子表达载体,将CY106A2构建到另一表达载体中,利用2个表达载体抗性的不同,实现了三者在大肠杆菌中的共表达。

参考文献

[1] 孟文彤，刘霆，李建军，等. 慢性髓系白血病初诊患者M-BCR/ABL与M-BCR/ABL融合基因转录子共表达的临床意义[J]. 四川大学学报，2006,37(1):97

[2] 于彦春，张光恒，郭龙彪，等. CecropinB与Xa21基因共表达提高转基因水稻白叶枯病抗性[J]. 中国水稻科学，2006,20(1):105

[3] Schlapschy M, Grimm S, Skerra A. A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli* [J]. Protein Eng Des Sel, 2006,19(8): 385

[4] 范立强，袁勤生，吴祥甫. 双质粒系统共表达大肠杆菌肉碱脱水酶基因*cai*B及其辅酶合成因子*cai*E [J]. 生物化学与生物物理学报，2002,34(1):104

[5] 杜丽琴，韦宇拓，陈发忠，等. 酿酒酵母gpd1和hor2基因在大肠杆菌中的共表达[J]. 生物工程学报，2005,21(3):385

[6] 周颖，张青，殷长传，等. 分子伴侣SecB基因与人淋巴毒素基因在大肠杆菌中的共表达[J]. 生物工程学报，1997,13(4):433

[7] Sanchez AM, Andrews J, Hussein I, *et al.* Effect of overexpression of a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (UdhA) on the production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Prog, 2006,22(2):420

[8] Rozzelle JE, Dauber DS, Todd S, *et al.* Macromolecular inhibitors of HIV-1 protease[J]. J Biol Chem, 2000,275:7080

[9] Johnston K, Clements A, Ravichandran N, *et al.* Coexpression of proteins in bacteria using T7-based expression plasmid: Expression of heteromeric cell-cycle and transcriptional regulatory complexes [J]. Protein Expression Purification, 2000,20:435

[10] 庞永奇，贾洪革，方荣祥，等. 利用不相容质粒共转化大肠杆菌对Cre重组酶体内重组活性的可视检测[J]. 微生物学报，2005,45(1):125

[11] Dionisi HM, Checa SK,Krapp AR, *et al.* Cooperration of the DnaK and GroE chaperone systems in the folding pathway of plant ferredoxin-$NADP^+$ reductase expressed in *Escherichia coli* [J]. Eur J Biochem, 1999,251:724

[12] Yang W, Zhang L, Lu ZG, *et al.* A new method for protein coexpression in *Escherichia coli* using two incompatible plasmids [J]. Protein Expression Purification, 2001,22:472

[13] Henricksen LA, Umbricht CB, Wold MS, *et al.* Recombinant replication protein A: Expression, complex formation, and functional characterization[J]. J Biol Chem, 1994,269:11121

[14] Hannemann F, Virus C, Bernhardt R, *et al.* Design of an *Escherichia coli* system for whole cell mediated steroid synthesis and molecular evolution of steroid hydroxylases[J]. J Biotechnol, 2006, 124:172