

neering and Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871, China).

Abstract At present, more and more people are interested in studying the interaction between the receptors and their RGD-containing ligands. It is generally thought that the interaction between integrins and adhesive proteins is mediated through the RGD sequence within the adhesive proteins, which may participate in many physiologic process. A major description is given

on the interaction between RGD-containing peptide and Gp II b / III a and its inhibition on platelet aggregation. Also presented is the perspective of RGD-containing peptides or proteins in the study of the relationship of the structure and function of protein and in the pharmaceutical field.

Key words RGD, integrin, GP II b/ III a, platelet aggregation

外源基因在大肠杆菌中表达的研究进展

龙建银 王会信

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 大肠杆菌是外源基因表达的首选体系. 大肠杆菌中外源蛋白可定位于胞内、周质或胞外培养基中. 按照重组蛋白的可能命运, 综述了最近几年大肠杆菌表达体系的研究进展.

关键词 大肠杆菌, 基因表达, 分子伴侣, 分泌

在过去的 20 多年内, 人们已经发展了多种原核、真核表达系统生产外源重组蛋白. 重组蛋白除用于科研外, 也直接用作诊断试剂和蛋白类药物. 迄今为止, 大肠杆菌以其易于操作、遗传背景清楚、发酵成本低等优点依然是重组蛋白生产的首选体系.

作为革兰氏阴性菌的大肠杆菌, 被内膜 (又称质膜) 和外膜隔开形成三个腔 (compartment): 胞内、周质和胞外. 相应地, 在大肠杆菌中表达的外源重组蛋白也可定位于胞内、周质空间或胞外培养基中; 此外, 近年发展起来的表面显示 (surface display) 技术, 还可使重组蛋白定位在大肠杆菌的表面. 这种外源蛋白表达场所的选择主要取决于目的蛋白的类型、数量和纯化要求; 它们有着各自的优势和缺陷. 下面按重组蛋白的可能命运, 综述最近几年大肠杆菌表达体系的研究进展.

1 在胞内直接表达重组蛋白

这是研究最早、采用最多的表达策略, 目前已经积累了许多成功的经验, 具有较丰富的理论指导. 采用较强的启动子, 如 λP_L 、 T_7 或串联启动子, 外源基因可在胞内获得高效表达, 一般占细菌总蛋白的 10% ~ 70%.

1.1 包涵体的形成

胞内表达的最大问题是不溶性包涵体的形成, 虽然这可能为后续的分离纯化带来方便. 通常要采用强变性剂才能溶解包涵体, 溶解后还需复性才能回收正确折叠的重组蛋白; 复性时体积很大, 不易处理, 而且复性效率很低 (< 20%).

包涵体的形成是外源蛋白高效表达时的普

遍现象, 在大肠杆菌的胞内、周质和酵母等其他系统均有报道. 关于包涵体的形成有许多理论, 众说纷纭; 但近年来基于蛋白质折叠的研究给人们提供了有益的启示.

目前普遍认为, 许多蛋白质的天然构象, 并不是自发地一步折叠形成的, 而是在一些辅助蛋白的协助下, 经过许多中间态, 逐步形成的^[1]. 现在已知的参与新生肽链折叠的辅助蛋白有两类. 一类是指那些催化蛋白质特定异构反应的酶, 这些异构反应是某些蛋白质折叠的限速步骤, 称为折叠酶 (foldase). 大肠杆菌中研究最多的折叠酶有催化二硫键形成的二硫键异构酶 DsbA, 催化脯氨酸异构反应的蛋白质脯氨酸顺反异构酶 PPI 等. 最近又发现, 硫氧还蛋白还原酶 TrxB 的缺失突变, 能增强胞内蛋白的二硫键形成, 虽然这种突变对胞内总的氧化还原状态影响不大. 另一类辅助蛋白能保持未折叠或部分折叠蛋白的短暂稳定性, 防止分子内或分子间不合适的相互作用, 但它们并不参与任何共价反应, 称为分子伴侣 (molecular chaperone). 大肠杆菌的分子伴侣主要有 GroES/GroEL、DnaK/DnaJ 等.

按照蛋白质折叠的上述理论, 体内蛋白聚集以致包涵体的形成, 起源于肽链折叠过程中部分折叠的中间态之间的特异性的错误聚合, 而不是形成于成熟的天然态或完全解链的蛋白^[2]. 包涵体的形成与这些折叠中间态的溶解性和稳定性有关. 除了分子伴侣和折叠酶, 影响包涵体形成的因素还有: 蛋白质性质 (形成转角的残基数目、平均带电性等)、生长条件 (宿主、培养温度、培养基组成、pH 等).

1.2 共表达分子伴侣

近年来为克服包涵体的形成, 常用的策略是在表达外源基因的同时, 共表达分子伴侣或折叠酶^[1]. 通常将这些辅助蛋白的基因克隆到相容质粒中或与外源基因构成双顺反子系统实现共表达. 相当多的尝试获得了明显的成功. 例如, 共表达 GroES 和 GroEL (GroES/GroEL) 可显著提高 D-核酮糖 1, 5-二磷酸加氧酶/羧化酶 (rubisco) 的折叠、组装效率,

从而提高可溶性重组蛋白的产量; 也能提高可溶性乙酰辅酶 A 脱氢酶的产量和组装效率. DnaK 的共表达能减小人生长激素 hGH 包涵体的大小并提高其表达水平; 也能提高可溶性原胶原酶的产量.

但也有一些研究发现, 共表达没有明显效果^[1]. 这就提示我们共表达 GroES、GroEL 或 DnaK 可能只在某些情况下有效. 迄今还不能找到一种通用的办法, 来解决所有蛋白的包涵体形成问题.

除了上述从机理方面降低包涵体形成的研究之外, 还有一些从实际的角度, 通过改变包涵体的影响因素加以研究^[1]. 例如降低发酵温度, 现已成为表达的常识. 这些措施包括: a. 降低培养温度到允许的生长温度 (23~30℃); b. 加入不能代谢的糖如蔗糖、棉子糖; c. 更换宿主; d. 降低培养液的 pH 值; e. 在培养基中加入甘氨酸三甲内盐和山梨糖, 使宿主发生渗透压应激; f. 采用丰富培养基; 等等. 当然, 在实际操作中, 这些措施对于不同蛋白效果可能相差甚远, 需要反复摸索条件.

1.3 以融合形成表达重组蛋白

除了直接表达重组蛋白, 也可以将重组蛋白融合在某些易于高效表达和/或纯化的“融合头” (fusion partner) 的 C 端. 融合表达往往可以获得外源基因的高效表达, 减少蛋白酶的降解, 并提供特异、简单的纯化方法. 通过人工设计的蛋白酶切割位点或化学试剂断裂位点, 可以在体外去除融合蛋白 N 端的“融合头”.

研究发现, 重组的融合蛋白通常具有较好的可溶性. 目前较为广泛采用的融合表达系统, 如谷胱甘肽转移酶 GST、麦芽糖结合蛋白 MBP、金黄色葡萄球菌蛋白 A 等系统, 通常都能产生高效表达的可溶性融合蛋白. 最近, Genetics 公司的 LaVallie 等^[3]又发展了硫氧还蛋白 TrxA 融合表达系统. 他们惊人地发现, 将 11 种不同的细胞因子与 TrxA 融合后, 低温下诱导均可获得高效表达, 且大多以可溶

形式存在, 不需切割就有生物活性. 目前, 美国 Invitrogen 公司已经推出了商品化的 TrxA 融合表达系统.

1.4 寡聚蛋白的重组

近年来的另一个趋势是利用大肠杆菌重组寡聚酶或寡聚蛋白. 目前已在 大肠杆菌胞内成功地表达并组装了多种寡聚蛋白, 包括四亚基的血红蛋白^[4]、丙酮酸脱氢酶; 三亚基的复制蛋白 A^[5]; 二亚基的肌球蛋白、肌酸激酶等.

寡聚蛋白的表达与普通蛋白方法相似, 只是多了一步组装过程. 通常采用双顺反子或多顺反子系统, 将不同亚基的基因连同各自的 SD 序列串联在一起, 克隆在同一启动子下游; 或将不同亚基的表达单元, 包括各自的启动子、SD 序列和结构基因串联起来. 为了防止转录过程中的通读, 一般在最后一个基因的 3' 端加上较强的转录终止子. 表达寡聚蛋白的另一种方法是将不同亚基的基因克隆到两个相容表达载体中, 通过共转化实现不同亚基在同一宿主中的共表达. 表达后可以分别纯化不同亚基, 在体外实现装配; 也可以直接纯化在体内可能组装好的寡聚蛋白. 但一般而言, 体内的组装效率不高, 即使在培养基中添加某些必要的辅基, 如血红蛋白所需的血红素.

2 重组蛋白分泌到周质

鉴于外源基因在大肠杆菌胞内表达时易于形成包涵体, 而且胞内的折叠组装能力非常有限, 一些学者试图采用分泌途径表达重组蛋白.

严格地讲, 蛋白质跨过细菌的内膜定位于周质空间 (称为转运, translocation) 或穿过细菌外膜到达胞外 (称为外运, export 或 excretion), 都可称为分泌 (secretion), 但在实践中蛋白分泌到胞外的情况在细菌中很少见.

2.1 周质分泌的优缺点

外源蛋白在细菌周质中的成功分泌需要在其 N 端融合一段细菌蛋白的疏水性信号肽,

融合蛋白跨内膜后由细菌的信号肽酶将信号肽切除, 因而周质分泌可获得具有天然一级结构 (不含 N 端多余的甲硫氨酸) 的产物. 同时, 氧化性的周质间隙可以模拟真核细胞的内质网环境, 便于新生肽链折叠成天然结构, 从而获得具有完全生物学活性的重组蛋白. 此外, 周质间隙中蛋白水解酶与胞内相比少得多, 可使产物不易被降解, 因而周质分泌还可提高重组蛋白的稳定性^[6].

虽然周质分泌具有上述优势, 但目前达到工业化生产规模的实例少之又少. 周质分泌最突出的问题是表达量低, 一般仅占细菌总蛋白的 0.3% ~ 4%, 这可能是由于周质空间容量有限以及重组蛋白的不完全跨膜转运; 而表达量稍高时也会发生聚集甚至形成包涵体. 另一个问题是周质的折叠效率仍然有限^[7], 容易发生二硫键错配, 从而影响重组蛋白的产率和生物活性.

相对于胞内直接表达, 周质分泌表达的研究很少. 自从大肠杆菌周质被证明可以组装具有功能性的抗体 Fab、Fv 片段以来, 周质分泌表达一直是抗体基因工程的首选策略. 利用重链、轻链相关部分基因融合而成的双顺反子系统, 已经能生产多种形式的抗体, 包括 Fv、scFv、Fab、F(ab')₂ 等.

2.2 周质蛋白跨细菌内膜的转运和折叠

对于细菌蛋白转运机制的剖析, 将为周质分泌表达提供理论指导. 近 10 年来, 蛋白质的跨膜转运 (translocation) 处于蛋白质化学的研究前沿. 这一研究的内容包括真核细胞中蛋白质跨内质网膜、跨线粒体膜及原核细胞 (以细菌为例) 中的跨内膜转位, 它们的机理非常相似. 关于细菌蛋白转运的很多研究是外源蛋白的分泌表达为模型的.

大肠杆菌分泌蛋白 (包括周质蛋白和外膜蛋白) 的跨内膜转运由一系列结构相关的 Sec 蛋白顺序作用完成. 目前已经发现参与转运的 7 个 Sec 蛋白: SecA、SecB、SecD、SecE、SecF、SecG 和 SecY. 除 SecA 和 SecB 是可溶的胞内蛋白外, 其余都是内膜结合蛋白. SecB

是分泌蛋白广谱的分子伴侣,能使一些前体蛋白维持成转运的感受态(translocation-competent state);而 SecA、SecE 和 SecY 构成催化转运的关键成分——转运酶复合物(translocase complex). SecA 主要负责蛋白转运的起始,它能结合前体蛋白和 ATP,并通过水解 ATP 将前体蛋白转移给 SecE/SecY 复合物;SecE/SecY 在内膜内侧可能形成利于前体蛋白穿过的“通道”,推动前体蛋白在内膜脂双层中的移动.新近发现的 SecG 能增强转运酶的作用;而 SecD 和 SecF 则负责转运后期分泌蛋白的释放^[8,9].

除了上述 Sec 蛋白外,参与转运的还有以下分子伴侣:GroES/GroEL、DnaK/DnaJ 和 Ffh/Ffs.其中 Ffh 和 Ffs 分别是哺乳动物细胞中信号识别颗粒 SRP 和 SRP 的 7S RNA 在大肠杆菌中的同源产物,它们形成 Ffh/Ffs 核蛋白体复合物.这些胞内的分子伴侣可能参与维持前体蛋白的稳定性^[9].

二硫键是分泌蛋白的典型特征,对于分泌蛋白的稳定性起重要作用.大肠杆菌中二硫键的形成发生在周质空间,是由周质蛋白 DsbA 催化完成的;内膜蛋白 DsbB 能调节 DsbA 的作用.最近新发现的周质蛋白 DsbC,被证明负责二硫键的重排^[10].

2.3 周质分泌表达的影响因素

影响周质分泌表达水平的因素很多,主要包括:启动子、信号肽、蛋白质本身特点、宿主、生长条件等.

许多研究发现,采用很强的启动子如 P_L 、 T_7 等,重组蛋白虽可获得高效转录,但往往以未切去信号肽的前体分子形式聚集在胞内或结合在内膜内侧,因此分泌表达大都采用中等强度的启动子如 lac、trc、ara 等.信号肽的选择有时能显著地影响分泌表达水平.目前采用的信号肽一般来自大肠杆菌的外膜蛋白(如外膜蛋白 A OmpA、OmpF、 λ 噬菌体受体 LamB、热稳定肠毒素 ST II 等)或周质蛋白(如碱性磷酸酶 PhoA、麦芽糖结合蛋白 MBP、DsbA 等),此外金黄色葡萄球菌蛋白 A 和胡

萝卜软腐欧文氏果胶酶裂解酶(PelB)的信号肽也常被采用.许多研究显示,信号肽的效率依靶蛋白而异,迄今还未发现能高效介导所有靶蛋白转运的信号肽.据此,许多学者认为蛋白跨膜转运效率还与成熟蛋白的一级结构有关.目前已经发现了一些能干扰转运的“抑制序列”,如 N 端信号肽之后 20~30 个残基以内碱性氨基酸特别是 Arg 的存在,会降低前体分子的切割效率,使其滞留在内膜上^[11].不同宿主分泌表达的能力也不尽相同,目前已有许多蛋白酶缺陷型的宿主问世,它们往往能获得稳定性较高的分泌表达水平.影响分泌的还有细菌的生长条件,包括培养温度、诱导剂浓度、培养基组成等,这与胞内表达时的规律类似.目前在周质分泌表达时,大多倾向采用较低的生长温度,中等的诱导剂浓度和较丰富的培养基.

2.4 共表达分子伴侣或折叠酶

分泌表达的复杂性表现在其不可预测性,很可能在上述所有因素被优化后,表达水平仍然很低.基于多种蛋白质的研究使人们认识到,周质分泌的限速步骤在于蛋白质跨内膜的转运.因此许多学者尝试通过共表达参与跨膜转运的分子伴侣或 Sec 蛋白,改善转运通路,以期提高分泌表达水平.有些结果是令人鼓舞的,有些则无明显效果.

分子伴侣 GroES/GroEL、SecB 的共表达对提高周质分泌水平无明显作用,这已得到癌胚抗原单链 Fv 抗体片段研究和 G-CSF 研究的支持. DnaK/DnaJ 的共表达可增强前体分子的可溶性,而且 DnaK 的贡献要大于 DnaJ^[12].共表达 SecE/SecY 能提高某些前体分子的切割效率,如使成熟 IL-6 的产量提高近 11 倍^[13].

基于 α -淀粉酶/牛胰蛋白酶抑制剂 RBI 的研究表明, DsbA 的共表达虽能改善周质蛋白的折叠,但对产量的影响并不大;而共表达 DsbA 辅以在培养基中添加还原型谷胱甘肽 GSH,控制氧还电势,则可使 RBI 的表达提高近 14 倍^[14].这一结果说明,在培养基补充

的 GSH 可渗透到周质中, 进而使氧化性蛋白折叠过程中错配的二硫键得以还原, 从而提高具有天然构象的重组蛋白的产率. Pluckthun 等^[15]采用共表达 DsbA 辅以 σ^{32} 基因的共表达以诱导热休克应激反应, 使得 T 细胞受体的分泌表达明显提高.

共表达分子伴侣的经验性很强, 因为分子伴侣对“底物”蛋白具有一定的特异性, 虽然其机制尚不明确. 如 Knappik 等^[16]在研究 McPC603 抗体的周质表达时发现, 共表达 DsbA 和/或 PPI 对 Fab 片段的产量没有影响, 只对单链 Fv 抗体片段的表达有较小影响; 又如共表达 SecE/SecY 对 G-CSF 则无明显效果^[12]. 目前尚未在周质中发现能提高转运效率的通用分子伴侣, 虽然已经有实验证明其存在的可能性^[15].

随着对分泌过程认识的深入, 对分泌系统的改造将产生能高效分泌特定蛋白的宿主菌株, 这些菌株能表达多种分泌因子以协助外源蛋白的分泌. 虽然这种对分泌系统的改造非常诱人, 但这方面的成功例子极少, 而且有可能仅限于某些特定的目的蛋白.

3 重组蛋白分泌到胞外培养基中

如此看来, 胞外培养基可能是重组蛋白最佳的去处. 重组蛋白分泌到胞外不仅可以形成包括链间二硫键在内的正确折叠的空间结构, 而且由于胞外的容量非常巨大, 可以避免许多积累在胞内时的问题(如聚集、包涵体形成等); 胞外分泌还可使重组蛋白的下游纯化较为简单, 便于其规模的放大处理^[17].

正常情况下大肠杆菌的实验室菌株并不将蛋白分泌到培养基中, 但是目前已经发展了几个使外源蛋白分泌到培养基中的系统. 目前这些系统主要有: 细菌素释放蛋白(bacteriocin release protein, BRP)系统; α -溶血素(haemolysin A, HlyA)系统.

3.1 细菌素释放蛋白系统

细菌素(bacteriocin)是由产细菌素的细菌菌株产生并释放的抗生素蛋白. 大肠杆菌中

细菌素的释放依赖于 BRP 基因的表达. 通过激活宿主细胞 SOS 反应, 诱导 BRP 基因的表达, 不仅可以导致细菌素的合成和释放, 而且通常还会引起宿主细菌的裂解.

目前已经发现了多种来源的细菌素释放蛋白, 分别来自以下质粒: pColE1 (kil 基因产物)、pColE2-P9 (celB 产物)、pColE3-CA38 (hic 产物)、pColA-CA31 (cal 产物) 和 pCloDF13 (基因 H 产物). 它们都是 3 ku 左右的小肽, 具有较高的序列同源性, 功能类似, 可以互换. BRP 的确切作用机理仍不清楚. 有研究显示, BRP 的活化可诱导磷脂酶 A 的活化, 使外膜发生短暂的紊乱, 从而使周质蛋白渗漏到培养基中^[18].

许多学者将 BRP 基因克隆到相容质粒中或构成双顺反子系统. 通过共表达 BRP 基因(如 kil 基因和 H 基因等), 已经成功地将多种在周质中分泌表达的外源蛋白分泌到胞外培养基中, 如 hGH^[19]、TNF- α 、小鼠 IL-2^[20]、 α -半乳糖苷酶、IgG 的 Fc 区段, 等等. 这一系统的缺陷是 BRP 的诱导表达可能会影响工程菌的生长, 如生长变慢甚至部分裂解.

3.2 α -溶血素系统

HlyA 系统是研究得较为清楚的大肠杆菌分泌系统. 通常将外源基因融合在 HlyA 的 N 端, 利用 HlyA 能直接从胞内转运到达胞外的特点, 将重组融合蛋白分泌到培养基中. 这一系统的独特之处在于重组蛋白能直接从胞内转运到胞外而不需要周质这一中间状态, 此外, 分泌的信号序列位于 C 端且在转运后不被切除.

HlyA 的分泌需要与其相关的内膜蛋白 HlyB、HlyD 以及内源性外膜蛋白 TolC 的参与. HlyA C 端 23 ku 的 218 个残基, 包含了 HlyA 有效分泌的所有信息^[17]. 通过缺失突变, 目前已经将 HlyA 的信号序列定位在 C 端的最后 46~50 个残基内, 降低了“融合头”的大小.

实验证明, C 端带有 HlyA 信号序列的重组融合蛋白并不具有任何毒性. 这一信号序列

已经成功用于几十种蛋白的正确分泌, 如 OmpF、 β -氯霉素乙酰转移酶、PhoA、二氢叶酸还原酶、IL-1 α 等. HlyA 分泌产生的融合蛋白几乎都能发生正确的折叠和组装, 并保持天然的酶活力和生物活性^[17].

这一系统的缺陷是存在于融合蛋白 C 端的 HlyA 信号序列, 虽然它可能并不干扰融合蛋白生物活性. 这一信号序列可以通过人工设计的蛋白酶切点, 在体外实行切割.

综上所述, 经过 20 多年的研究, 大肠杆菌表达系统已经成为基因工程的首要体系. 但不论外源蛋白定位在什么地方, 都有其自身的缺陷. 最近几年关于蛋白质合成、折叠和组装的研究进展, 使得人们能对这一体系进行多方面的改造, 以便能在细菌胞内、周质间隙或胞外培养基中获得高效表达、可溶、正确折叠的重组蛋白. 但是目前外源基因的表达仍是经验性很强的工作, 可预测性较差. 只有彻底地了解蛋白质的体内合成和折叠过程, 才可能使人们按照自己的意愿生产重组蛋白, 更好地为人类服务.

参 考 文 献

1 Hockney R C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. Trends in Biotech, 1994, **12** (11): 456~ 463

2 李 满. 大肠杆菌中重组蛋白包含体的形成机制及其影响因素. 生物工程进展, 1992, **12** (1): 34~ 37

3 LaVallie E R, DiBlasio E A, Kovacic S *et al.* A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. Bio/Technology, 1993, **11** (2): 187~ 193

4 Shen T J, Ho N T, Simplaceanu V *et al.* Production of unmodified human adult hemoglobin in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90** (17): 8108~ 8112

5 Henriksen L A, Umbrich C B, Wold M S. Recombinant replication protein A: expression, complex formation and functional characterization. J Biol Chem, 1994, **269** (15): 11121~ 11132

6 Stader J A, Silhavy T J. Engineering *Escherichia coli* to secrete heterologous gene products. Methods in Enzymol, 1990, **185**: 166~ 187

7 Wulfig C, Pluckthun A. Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1994, **12** (5): 685~ 692

8 Tokuda H. Biochemical characterization of the presecretory

protein translocation machinery in *Escherichia coli*. FEBS Lett, 1994, **346** (1): 65~ 68

9 Arkowitz R A , Bassilana M . Protein translocation in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 1994, **1197** (3): 311~ 343

10 Creighton T E, Zapun A, Darby N J. Mechanisms and catalysts of disulphide bond formation in proteins. Trends in Biotech, 1995, **13** (1): 18~ 23

11 Ayala M, Balint R F, Larrick J W *et al.* Variable region sequence modulates periplasmic export of a single-chain Fv antibody fragment in *Escherichia coli*. Biotechniques, 1995, **18** (5): 832~ 841

12 Perez Perez J, Martinez Caja C, Barbero J L *et al.* DnaK/ DnaJ supplementation improves the periplasmic production of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Comm, 1995, **210** (2): 524~ 529

13 Perez Perez J, Marquez G, Barbero J L *et al.* Increasing the efficiency of proteins export in *Escherichia coli*. Bio/Technology, 1994, **12** (2): 178~ 180

14 Wunderlich M, Glockshuber R. *In vitro* control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide isomerase (DsbA). J Biol Chem, 1993, **268** (33): 24547~ 24550

15 Wulfig C, Pluckthun A. Correctly folded T-cell receptor fragments in the periplasm of *Escherichia coli*. J Mol Biol, 1994, **242** (3): 655~ 669

16 Knapik A, Krebber C, Pluckthun A. The effect of folding catalysts on the *in vivo* folding process of different antibody fragments expressed in *Escherichia coli*. Bio/Technology, 1993, **11** (1): 77~ 83

17 Blight M A, Holland I B. Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. Trends in Biotech, 1994, **12** (11): 450~ 455

18 Luirink J, Watanabe T, Wu H C *et al.* Modification, processing and subcellular localization in *Escherichia coli* of the pCloDF13-encoded bacteriocin release protein fused to mature portion of β -lactamase. J Bacteriol, 1987, **169** (5): 2245~ 2250

19 Hsiung H M, Cantrell A, Luirink J *et al.* Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. Bio/Technology, 1989, **7** (3): 267~ 271

20 Steidler L, Fiers W, Remaut E. Efficient specific release of periplasmic proteins from *Escherichia coli* using temperature induction of cloned *kil* gen of pMB9. Biotech Bioeng, 1994, **44** (9): 1074~ 1082

Advances in the Study of Foreign Gene Expression in *E. coli*. LONG Jianyin, WANG Huixin (Beijing Institute of Basic Medical

Sciences, Beijing 100850, China).

Abstract *E. coli* is still the first choice of host when foreign gene is expressed. Heterologous proteins could be expressed directly in the cytoplasm, secreted into the periplasmic space or

extracellular medium. Recent developments on *E. coli* expression system are covered, according to the possible destiny of foreign proteins.

Key words *E. coli*, gene expression, molecular chaperone, secretion

钙的光释放技术及其在细胞研究中的应用

徐建华 瞿安连 康华光

(华中理工大学生物物理与生物化学研究所, 武汉 430074)

摘要 Ca^{2+} 的光释放技术通过光解作用使预先引入细胞内的光敏感性螯合剂对 Ca^{2+} 的亲性和改变, 从而实现对细胞内游离钙离子浓度的调控, 有助于阐明 Ca^{2+} 作为第二信使对电兴奋性、肌肉收缩、神经分泌等细胞功能的调制作用。

关键词 光敏感性螯合剂, 细胞内钙离子浓度, 光释放

Ca^{2+} 的光释放技术 (photorelease technique) 是将负载或未负载 Ca^{2+} 的光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂引入细胞, 再用特定波长的光束照射, 令其光解产生与 Ca^{2+} 亲和性更高或更低的产物, 从而导致细胞内 Ca^{2+} 浓度的降低或升高。由于 Ca^{2+} 是细胞信号系统中的重要环节, 调节着肌肉收缩、分泌活动、电兴奋性等诸多重要的细胞功能, 而光释放技术能主动调节 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 有助于揭示 Ca^{2+} 的调制作用, 所以它虽是在 80 年代后期出现, 却已在细胞研究中得到较广泛应用^[1]。控制 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的其他方法包括: 显微注射钙盐, 用药理手段从胞内钙库释放 Ca^{2+} , 利用离子电泳、电穿孔 (electroporation) 等输入 Ca^{2+} , 激活电压依赖性钙通道等。但光释放技术在效应的特异性、重现性、可靠性, 细胞完整性的保持, 空间上的明确性, 效果的快速以及使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化维持足够长时间等方面, 均表现了巨大的优势^[1]。尽管这一技术在国内尚未开展, 但是, 鉴于它的广泛应用前景和钙信号系统在细胞功能中的重要意义, 本文特予介绍。

1 光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂

Ca^{2+} 的光释放技术的实质在于特定光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂 (photosensitive Ca^{2+} chelators) 的应用。理想的光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂应具有如下特点^[1]: a. 易于引入细胞内; b. 负载 Ca^{2+} 的能力足够大, 引入细胞后将不干扰静息 Ca^{2+} 水平; c. 在化学上和光分解上稳定; d. 光解时能迅速改变自由 Ca^{2+} 水平; e. 高量子效应和光吸收率; f. 光照产物或光解后的缓冲混合体系, 应能继续缓冲 Ca^{2+} , 且维持 Ca^{2+} 在新水平; g. 螯合剂或光解产物应该无毒。如此理想的螯合剂并不存在, 不过目前所用光敏感性 Ca^{2+} 螯合剂如硝基 (nitr) 类化合物、DM-硝基苯基 (DM-nitrophen) 和叠氮 (diaz) 类化合物均已具备了上述主要特点。

1.1 nitr 类化合物

1986 年, Tsien 和 Zucker 在 Ca^{2+} 螯合剂 1, 2-双(O-氨基苯氧基) 乙烷-N, N, N', N'-四乙