

## 研究简报

含  $P_R$  启动子的原核高效表达载体的构建及应用\*

陈建军 孙 苗 陈常庆 卢 芳

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

王德宝

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

**摘要** 组建了一个仅含  $P_R$  启动子的原核高效表达载体 pRC, 它同时含有 cI 调控基因、多酶切位点和两个强的转录终止序列. 现已成功地用于表达重组人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ )、重组人白细胞介素-3 (hIL-3) 和抗溶菌酶 (HEL) 抗体 Fd 基因, 表达量均占菌体总蛋白的 36% 以上. 同时还研究了不同的宿主菌和原核增强子序列等因素对  $P_R$  启动子载体表达的影响. 此外, 还比较了分别以  $P_R$ 、 $P_L$  或  $P_R P_L$  作为启动子时表达 hTNF- $\alpha$  的情况, 结果表明, 单用  $P_R$  或  $P_L$  启动子可获得与使用  $P_R P_L$  串联启动子一样的高效表达.

**关键词** 启动子, 载体构建, 表达研究, 增强子

**学科分类号** Q78

在以大肠杆菌为宿主的基因工程表达系统中, 温控启动子较为常用. 因为温控启动子具有高效、低成本和易于操作等优点, 因而倍受人们青睐. 早在 1979 年, Bernard 等<sup>[1]</sup>就构建了一个含  $P_L$  启动子的载体, 并以此载体表达了 trpA 基因, 目标蛋白表达量占总蛋白的 1% ~ 6%. 之后, 采用温控启动子的载体日益增多, 表达量也逐步提高. 1990 年, 侯云德实验室以  $P_R P_L$  为启动子成功构建了温控的高效表达载体 pBV 220<sup>[2]</sup>, 采用这个高效表达载体, 外源基因一般都能得到很高的表达, 从而在国内得到了较广泛的应用. 我们实验室在表达人白细胞介素-3 (hIL-3) 和人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ ) 时, 曾经使用了单独的  $P_L$  启动子而获得了很高的表达<sup>[4,5]</sup>; 李伯良等<sup>[6]</sup>在表达牛生长激素释放因子时, 也使用单独的  $P_L$  启动子而获得很高的表达. 但迄今为止, 尚未见到单独使用  $P_R$  启动子获得如此高效表达的报道. 单独的  $P_R$  启动子是否如单独的  $P_L$  启动子或  $P_R P_L$  串联启动子一样, 也能指导外源基因获得高效表达呢? 为了解答这个问题, 我们构建了一个以单独的  $P_R$  为启动子的表达载体 pRC, 并用它对 hTNF- $\alpha$ 、hIL-3 和抗溶菌酶 (HEL) 抗体 Fd 片段等基因进行了表达, 结果均得到了高效表达, 其中 HEL 抗体 Fd 片段是我们首次进行表达的. 同时, 我们还研究了不同的宿主菌和原核增强子序列等因素对  $P_R$  启动子载体表达的影响.

人们一般认为, 增加启动子的数目, 可提高表

达效率<sup>[2,3]</sup>, 事实上究竟如何? 虽然使用温控启动子指导外源基因得到高效表达的报道已不少<sup>[2,4~6]</sup>, 但迄今为止尚未见到对比研究  $P_R$ 、 $P_L$  和  $P_R P_L$  启动效率的报道. 本文报道了  $P_R$ 、 $P_L$  和  $P_R P_L$  指导 hTNF- $\alpha$  表达时的表达效率的对比研究, 结果表明它们均能指导 hTNF- $\alpha$  获得高效表达.

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 JM109、YK537、TG1、DH5 $\alpha$  和 BL21 等均由本室保存; 质粒 pHE6<sup>[7]</sup> 由美国约翰霍普金斯大学公共卫生学院 Milman 博士惠赠, pKKH 质粒<sup>[8]</sup> 由本室保存. 重组 hTNF- $\alpha$ 、hIL-3 基因及 pSB92/hTNF- $\alpha$  表达质粒均由本室重组和保存<sup>[5,6]</sup>. HEL 单抗 Fd 基因是从法国 Marie-Paule Lefranc 教授惠赠的 pSW<sub>1</sub>Fab<sup>[9]</sup> 上通过 PCR 扩增 Fab 上的 Fd 部分得到带 EcoRI + BamHI 双酶切位点的 Fd 基因片段 (含 pelB、V<sub>H</sub>、CH<sub>1</sub>).

### 1.2 酶及试剂

各种工具酶均购自 Boehringer mannheim 公司, 其他试剂均购自 Promega 公司和华美公司.

### 1.3 分子克隆技术及 SDS-PAGE 分析等

均参照文献 [10] 有关方法进行.

\* 国家“863”(九·五)计划资助项目 (1030104).

收稿日期: 1998-08-20, 修回日期: 1998-12-23

1.4 含外源基因的表达载体在大肠杆菌中的表达

含有外源基因表达载体的大肠杆菌于 30℃ 活化过夜后, 1: 100 稀释到 LB 培养液中, 继续在 30℃ 摇床培养至对数生长中期, 迅速转到 42℃ 摇床培养 4 h, 离心收集菌体.

1.5 生物学活性的检测

hTNF- $\alpha$  与 HEL 单抗 Fd 的表达产物为可溶性蛋白, 菌体经超声破碎离心后, 取上清测活; hIL-3 的表达产物为包涵体, 菌体超声破碎后保留沉淀, 然后用 8 mol/L 脲变性, 再稀释复性后测活; 用 L929 细胞测 hTNF- $\alpha$  活性, 用 TF-1 细胞<sup>3</sup>H 掺入法测 hIL-3 的活性, 再以溶菌酶为底物, 用 ELISA 法测抗溶菌酶抗体 Fd 基因产物的结合活性.

2 实验结果

2.1 高效表达质粒 pRC 的构建与鉴定

如图 1 所示. 我们用 *Pvu* I 和 *Bgl* II 双酶切消化 pHE6, 然后在低熔点琼脂糖上回收 2.43 kb 的大片段, 它含有部分抗氨苄青霉素基因和 pUC8 的

Origin, 以及  $\lambda$  噬菌体的 cIts857 基因和 P<sub>R</sub> 启动子; 用 *Bam* H I 切 pKKH, 经 Klenow 酶补平, 再用 *Pvu* I 切, 然后回收约 0.97 kb 的小片段, 含有 rrnB 核糖体转录终止信号, 部分多酶切位点 (*Sal* I、*Pst* I、*Hind* III) 及另外一部分氨苄青霉素抗性基因; 再合成了两条部分配对引物 (P1: 5'-AA AGA TCT TAA AAA TTA ACT TTA CGA AGG AGG AAT-3', P2: 5'-TT GGA TCC TCG AGC CAT GGG AAT TCC TCC TTC GT-3'), 通过 Klenow 补平后, 再用 *Bgl* II 单酶切并回收, 得到一条约 50 bp 的包含 SD 序列 (AAG GAG)、原核翻译增强子序列 (TTA ACT TTA)<sup>[11]</sup> 及部分多酶切位点 (*Eco*R I、*Nco* I、*Xho* I、*Bam* H I) 的小片段. 将以上三个片段混合在一起, 加 T4 DNA 连接酶等, 16℃ 保温 10 h 后, 转化大肠杆菌 JM109, 在氨苄青霉素平板上筛选转化菌, 然后用少量快抽法提取质粒, 作内切酶鉴定. 多酶切位点上的 *Eco*R I、*Nco* I、*Xho* I、*Bam* H I、*Sal* I、*Pst* I 在新质粒上都是单一切点, 酶切后得 3.45 kb 的一个片段, *Pvu* I 和 *Bgl* II 同时酶切, 可得到

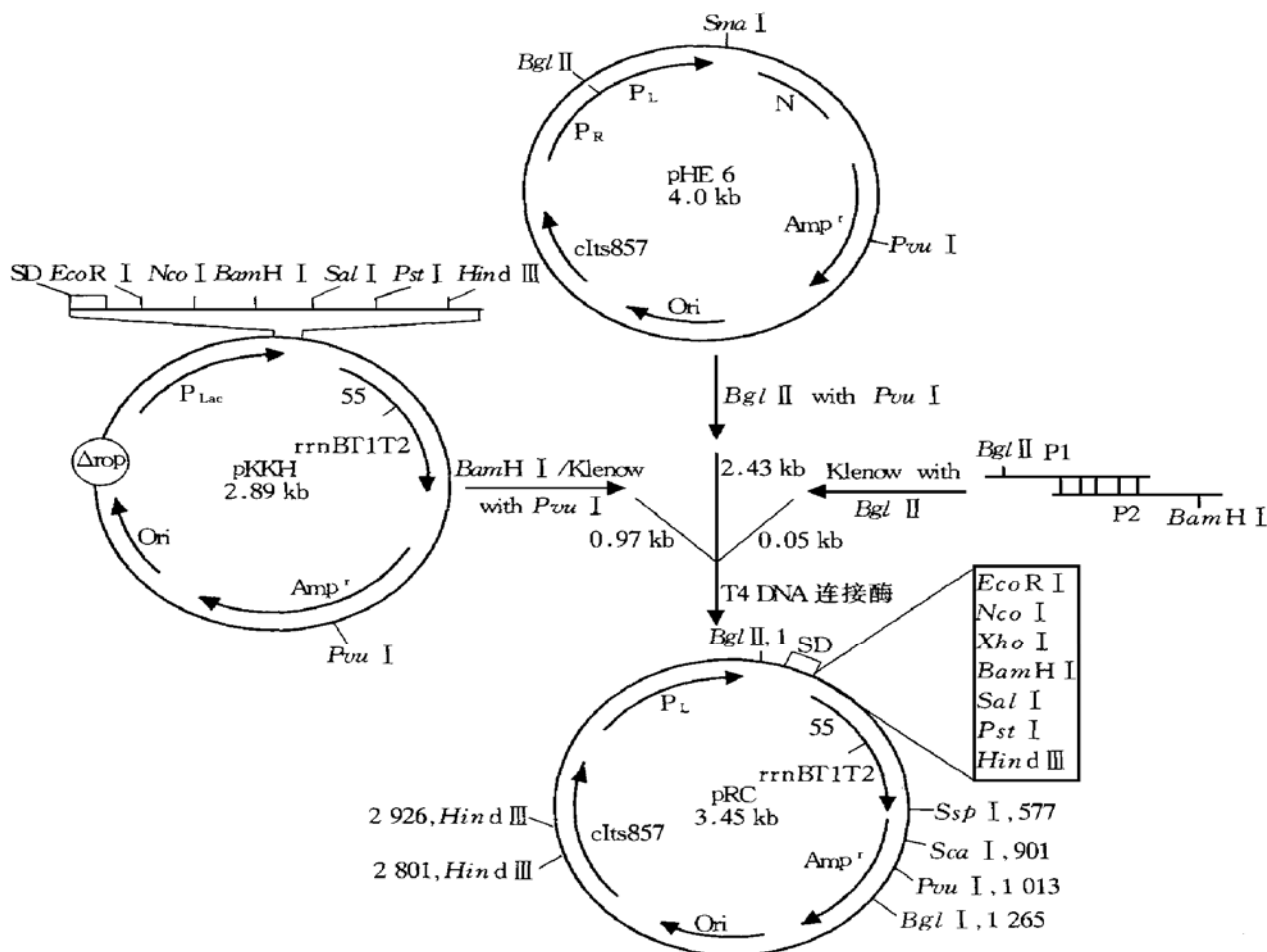


图 1 表达质粒 pRC 的构建

2.44 kb 和 1.01 kb 的两个片段, 与预期的完全一致. 同时用 *Hind* III 等酶进行消化, 均得到与预期完全一样的结果, 证明所得到的质粒即是我们所希望的.

## 2.2 质粒 pRC 中各元件的排列位置

质粒 pRC 以 *Bgl* II 位点的第一个 A 开始, 按顺时针方向依次由以下部分组成: a. 原核翻译增强子序列、SD 序列及多克隆位点; b. 核糖体 *rrnB* 基因终止信号; c. pBR322 第 4245 ~ 3735 位; d. pUC18 第 2066 ~ 680 位; e.  $\lambda$  噬菌体 *cIts857* 基因及  $P_R$  启动子, 共计 3 445 bp. pRC 的结构图谱如图 1.

## 2.3 应用 pRC 表达外源基因

将 hTNF- $\alpha$ 、hIL-3 和抗溶菌酶 Fd 基因 cDNA (带有起始密码 ATG) 均通过 *Eco*R I / *Bam*H I 位点, 分别插入 pRC 的  $P_R$  启动子下游, 组成质粒 pRC/hTNF- $\alpha$ 、pRC/hIL-3、pRC/Fd. 将上述质粒转化的 YK537 菌株先在 LB 培养基中于 30 $^{\circ}$ C 培养至对数生长期, 迅速转至 42 $^{\circ}$ C 诱导 4 h, 离心收集菌体.

## 2.4 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

将菌体裂解后, 表达产物进行 15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 然后考马斯亮蓝染色, 结果如图 2. 可以看到 42 $^{\circ}$ C 诱导后, pRC/hTNF- $\alpha$  出现一条 17 ku 的主带, pRC/hIL-3 出现一条约 15 ku 的主带, pRC/Fd 则出现一条约 26 ku 的主带, 均与预期的一致. 光密度扫描结果表明, 表达的 hTNF- $\alpha$ 、hIL-3 和 Fd 的量分别占菌体总蛋白的 68.4%、36.5% 和 48.5%.

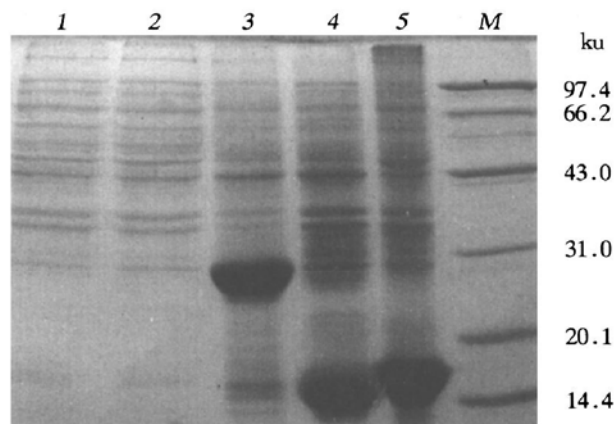


图 2 应用 pRC 表达外源基因产物的 SDS PAGE 分析

1: YK537; 2: pRC/YK537; 3: pRC-Fd/YK537; 4: pRC-hIL-3/YK537; 5: pRC-hTNF- $\alpha$ /YK537; M: 分子量标准.

## 2.5 表达产物的提取与鉴定

用超声波破菌, 然后用如前所述的方法进行活性鉴定. 结果测得 hTNF- $\alpha$  的活性为  $1.35 \times 10^9$  U/L 菌液, hIL-3 的活性为  $1.8 \times 10^7$  U/L 菌液, 而抗 HEL 单抗 Fd 基因产物对溶菌酶只有较弱的结合活性, 可能是因为缺少抗体轻链导致结合能力下降.

## 2.6 宿主菌的选择对表达效率的影响

我们将 pRC/hTNF- $\alpha$  分别转化至大肠杆菌 JM109、YK537、TG1、DH5 $\alpha$  和 BL21 中进行表达, 结果发现它们的表达效率均差不多, 说明该载体能适应多种宿主菌, 宿主菌的选择对其表达效率的影响不大.

## 2.7 有无原核翻译增强子序列对表达的影响

我们在构建 pRC 载体时引入了一个 9 核苷酸的原核翻译增强子序列<sup>[11]</sup>, 为了了解该序列是否真在 pRC 载体中起到了相应的作用, 我们又从 pRC 中去除了该序列. 具体方法是, 合成一段带 *Bgl* II 和 *Eco*R I 双酶切位点的片段 (即 5'-AA AGA TCT TAA AAA ACT AGT AAG GAG GAA TTC AA-3'). 为了鉴定的方便, 我们用 *Spe* I 酶切位点取代了原来的 9 核苷酸增强子序列. 我们将 pRC/hTNF- $\alpha$  用 *Eco*R I / *Bgl* II 双酶切后回收大片段, 与经 *Eco*R I / *Bgl* II 双酶切的上述小片段连接, 然后用 *Spe* I 对得到的重组子进行酶切鉴定, 得到了去掉增强子序列的表达质粒 pRC'/hTNF- $\alpha$ . 再将 pRC/hTNF- $\alpha$  与 pRC'/hTNF- $\alpha$  均转入 YK537 中进行表达 (42 $^{\circ}$ C 诱导 4 h), 表达结果如图 3. 经黑度扫描发现表达量均在 68% 左右, 可见有无该增强子序列, 表达效率均差不多.

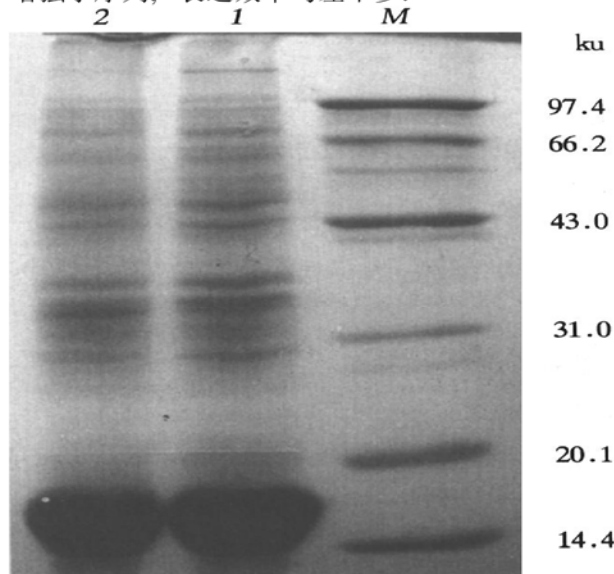


图 3 有无原核翻译增强子对 hTNF- $\alpha$  表达水平的影响  
1: pRC/hTNF- $\alpha$ ; 2: pRC'/hTNF- $\alpha$ ; M: 分子量标准.

2.8 P<sub>R</sub> P<sub>L</sub> 启动子及 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 串联启动子的效率比较

为了进行对比研究, 我们又通过设计引物 PCR 扩增 pHE6 上的 P<sub>L</sub> 启动子, 然后通过 *Bgl* II 单酶切位点插入 pRC/hTNF-α 上的 *Bgl* II 位点, 再通过 P<sub>L</sub> 内部的限制酶 *Hind* III 位点与 pRC/hTNF-α 上 *Bam*HI 位点进行双酶切鉴定, 根据酶切片段大小筛选到 P<sub>L</sub> 与 P<sub>R</sub> 串联的目的质粒 pRLC/hTNF-α, 如图 4a. 再将这两种表达质粒及我室构建的单用 P<sub>L</sub> 启动子的 pSB92/hTNF-α 表达质粒<sup>[5]</sup> (该表达质粒除启动子与前两个表达质粒不同之外, 其他元件基本相同) 均转入 YK<sub>537</sub> 中进行表达 (表达条件相同), 表达结果如图 4b, 可见单用 P<sub>R</sub> 或

P<sub>L</sub> 启动子时的表达效率还略高于 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 串联启动子的表达效率. 此外, 我们还将它们的表达产物进行活性测定 (3 × 3 次), 结果发现 pRC/hTNF-α 和 pSB92/hTNF-α 的表达效率按生物活性计算也高于 pRLC/hTNF-α (表 1). 其中, 以 P<sub>R</sub> 启动子的效率为最高.

表 1 pRC/hTNF-α, pSB92/hTNF-α 和 pRLC/hTNF-α 的表达效率的比较

质粒	启动子	宿主菌	目标蛋白占总蛋白百分率/%	hTNF-α 的活性/U·L <sup>-1</sup>
pRC/hTNF-α	P <sub>R</sub>	YK <sub>537</sub>	68.5	1.35 × 10 <sup>9</sup>
pRLC/hTNF-α	P <sub>R</sub> P <sub>L</sub>	YK <sub>537</sub>	64.8	1.06 × 10 <sup>9</sup>
pSB92/hTNF-α	P <sub>L</sub>	YK <sub>537</sub>	67.6	1.24 × 10 <sup>9</sup>

3 讨 论

1988 年 Olins 等<sup>[12]</sup> 发现从 T7 噬菌体的 gene10 分离出来的核糖体结合位点 (RBS) (命名为 g10-L) 能在 *E. coli* 中提高翻译效率. 后来他们<sup>[11]</sup> 从 g10-L 中找到一段 9 核苷酸序列 (UUAACUUUA), 将该 9 核苷酸片段置于人工合成的 RBS 的上游时可使 lac Z 基因的翻译效率提高 110 倍, 但对转录没有增强作用; 而且将其中的前 7 核苷酸片段 (UUAACUU) 置于起始密码后面时, 也能提高翻译效率, 这表明这个序列有原核翻译增强子的作用. 他们推测该序列可能与 *E. coli* 的 16S rRNA 的 458~466 位 (AAUUGAAAU) 发生相互作用, 但发现该序列并不能代替 SD 序列的作用, 因为缺少 SD 序列时该序列就无法起始转录. 同时, 他们认为该序列并非因富含 AU 导致 mRNA 翻译起始区二级结构自由能降低而提高翻译效率的. 因此, 他们推测该序列可能是通过提高 mRNA 与核糖体的亲和力来提高翻译起始效率的. 我们在构建 pRC 载体时, 按文献 [11] 所说的方法, 将该 9 核苷酸序列同样置于距 SD 序列两核苷酸处的上游位置, 结果发现加入该 9 核苷酸序列并不能进一步提高我们载体的表达效率 (图 3). 为了了解该翻译增强子序列对翻译起始过程是否起到了一定作用, 我们将 pRC/hTNF-α 和 pRC' /hTNF-α 同时以相同的 A 值 (A 值为 0.5~0.6) 进行诱导, 分别于 1、2、3、4 h 取样, 然后收集相同体积培养物, 将菌体裂解后走 SDS-PAGE. 结果发现两者在不同时间段表达量均差不多, 说明它们的翻译起始效率及最终的表达效率都差不多. 之所以出现这

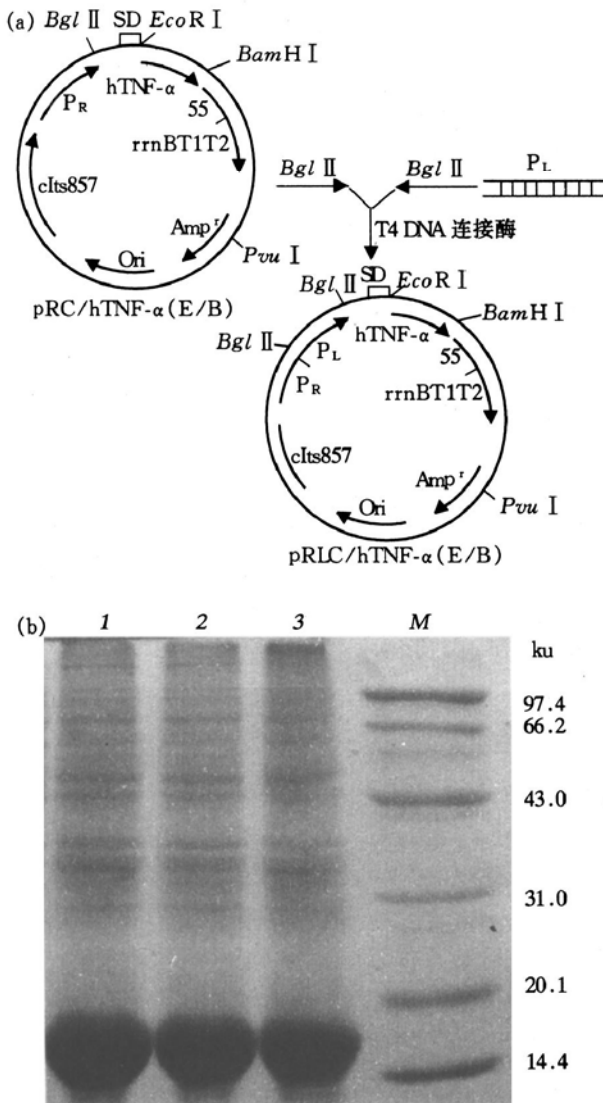


图 4 使用 P<sub>R</sub>, P<sub>L</sub> 或 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 作为启动子对 hTNF-α 表达水平的影响

(a) 表达质粒 pRLC/hTNF-α 的构建; (b) pRC/hTNF-α, pSB92/hTNF-α 和 pRLC/hTNF-α 的表达. 1: pRC/hTNF-α; 2: pSB92/hTNF-α; 3: pRLC/hTNF-α; M: 分子质量标准.

种情况, 可能是因为我们选择的 SD 序列与 mRNA 翻译起始区 (TIR) 一、二级结构等因素 (我们分析过 pRC' 与 pRC 翻译起始区的二级结构自由能, 发现它们的自由能差不多: 分别为 -9.6 kJ/mol 和 -10.0 kJ/mol) 已经使翻译过程能高效地起始和进行了, 而核糖体的数目又是有限的, 再引进翻译增强子序列后就难以进一步提高其翻译效率了. 即使如此, 但我们推测含有该序列的 pRC 在表达那些原本表达量很低的外源基因时, 可能会比不含该序列的 pRC' 更有效些. 至于具体结果如何, 还有待实验证明.

事实上, 载体能否实现高表达, 不仅要求有强启动子, 同时要求载体的其他组成部分也要合适 (如载体的大小、SD 序列、翻译起始区的一、二级结构、转录终止序列及复制子等), 而且外源基因的核苷酸序列 (尤其 5' 端) 也要有利于高效表达. 我们认为, 只要载体的基本构造合理, 则无论使用 P<sub>R</sub>、P<sub>L</sub> 还是 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 串联启动子, 都能获得高效表达——因为无论 P<sub>R</sub> 还是 P<sub>L</sub> 都已经是强启动子, 因此串联与否并不影响表达效率, 我们的工作证实了这一点. 一般而言, 表达载体不宜过大, 以 2.5~5.0 kb 为佳, 太大的载体, 既不利于自身复制, 也会在表达较小的外源基因时, 难以进行重组体筛选; 而且不利于表达过大的外源基因, 所以载体上不必要的部分最好去掉, 才能更好地用于表达外源基因. 因此从该意义上而言, 单独使用 P<sub>R</sub> 或 P<sub>L</sub> 启动子将可能使载体更加精干. 当然, 对于两个启动效率较弱的启动子而言, 串联起来效果或许会好些.

### 参 考 文 献

- Bernard H U, Remaut E, Hersfield M V, *et al.* Construction of plasmid cloning vehicles that promote gene expression from the bacteriophage lambda P<sub>L</sub> promoter. *Gene*, 1979, **5** (1): 59~76
- 张智清, 姚立红, 侯云德 (Zhang Z Q, Yao L H, Hou Y D). 含 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用. *病毒学报* (*Chin J Virol*), 1990, **6** (2): 111~116
- 隋广超, 胡美浩 (Sui G C, Hu M H). 影响大肠杆菌中外源基因表达的因素. *生物化学与生物物理进展* (*Prog Biochem Biophys*), 1994, **12** (2): 128~132
- 高长寿, 毛申兰, 俞 樱等 (Gao C S, Mao S L, Yu Y, *et al.*) 一种新型人肿瘤坏死因子突变体在大肠杆菌中的高效表达. *生物化学与生物物理学报* (*Acta Biochimica et Biophysica Sinica*), 1996, **28** (1): 49~55
- 杨立宏, 陈常庆, 高 冕等 (Yang L H, Chen C Q, Gao M, *et al.*) 人白细胞介素-3 基因翻译起始区的改造提高其在大肠杆菌中的表达水平. *生物工程学报* (*Chin J Biotech*), 1995, **11** (4): 297~303
- 李伯良, 杨新颖, 江智宏等 (Li B L, Yang X Y, Jiang Z H, *et al.*) 易于基因产物加工和快速纯化的融合表达载体. *生物工程学报* (*Chin J Biotech*), 1994, **10** (3): 206~212
- Milman G, Scott A L, Cho M S, *et al.* Carboxyl-terminal domain of the Epstein Barr virus nuclear antigen is highly immunogenic in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82** (18): 6300~6304
- Jing Guozhong, Huang Zhen, Liu Zhige, *et al.* Plasmid pKKH: an improved vector with higher copy number for expression of foreign genes in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 1993, **15** (5): 439~442
- Hoogenboom H R, Griffiths A D, Johnson K S, *et al.* Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acid Res*, 1991, **19** (15): 4133~4137
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. Press, 1989. 1~887
- Olins P O, Rangwala S H. A Novel Sequence Element Derived from Bacteriophage T7 mRNA Acts as an Enhancer of Translation of the lacZ Gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1989, **264** (29): 16973~16976
- Olins P O, Devine C S, Rangwala S H, *et al.* The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in *Escherichia coli*. *Gene (Amst)*, 1988, **73** (1): 227~235

**Construction and Application of A High Level Expression Vector Containing P<sub>R</sub> Promoter.** CHEN Jian-Jun, SUN Miao, CHEN Chang-Qing, LU Fang (*Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China*); WANG De-Bao (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

**Abstract** A high level expression vector pRC has been constructed, which contains P<sub>R</sub> promoter, cIts857 gene, multiple cloning sites (MCS) and two strong transcription terminators. With this vector, hTNF- $\alpha$ , hIL-3 and anti-HEL McAb Fd genes have been expressed successfully, and their products each account for more than 36% of the total cell proteins. At the same time, it has been studied whether such factors as prokaryon enhancer sequence and different strains affect the expression level of P<sub>R</sub> promoter vector. Furthermore, the inductive efficiency was compared among P<sub>R</sub>, P<sub>L</sub> and P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> promoter, and the result has showed that P<sub>R</sub> or P<sub>L</sub> is as strong as P<sub>R</sub>P<sub>L</sub>. **Key words** promoter, vector construction, expression research, enhancer