

外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达策略

朱红裕, 李强

(清华大学化学工程系生物化工研究所, 北京 100084)

摘要: 长期以来, 大肠杆菌一直是表达外源蛋白的首选表达系统. 但由于外源蛋白在表达过程中容易被宿主细胞蛋白酶降解或者形成包涵体, 其应用受到了限制. 本文综述了在大肠杆菌中表达可溶外源蛋白的策略和进展, 以期提高具有生物活性的外源基因的表达水平.

关键词: 外源蛋白; 可溶性表达; 大肠杆菌

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2006)01-0150-06

1 前言

大肠杆菌具有遗传性状了解透彻、生长快、培养经济、表达水平高、待选质粒和宿主多等特点, 在基因工程技术领域成为首选的表达系统. 但是外源蛋白往往在获得高水平表达的同时, 容易被宿主蛋白酶降解或者形成包涵体. 目前国内外对蛋白质体外复性研究较多, 但其过程往往费时、费力, 且不经济, 因此, 探索外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达具有较高的学术价值和广泛的应用前景.

2 宿主与载体的选择

2.1 宿主的选择

2.1.1 选择有利于外源蛋白可溶性表达的宿主

外源蛋白在大肠杆菌细胞质或细胞周质中表达时, 容易被宿主本身表达的蛋白酶降解. 因此, 选择蛋白酶缺失的宿主非常有利于外源蛋白的表达, 尤其是外源可溶蛋白和分泌表达的蛋白. Ignatova 等^[1]采用不同的大肠杆菌宿主表达青霉素酰化酶, 优化培养基后, 发现蛋白酶缺失的宿主 BL21(DE3)表达该活性可溶蛋白优势明显. Schein 等^[2]发现缺失 lon 蛋白酶的大肠杆菌宿主能显著地提高 RNases 的可溶分泌表达水平. 除此之外, 由于大肠杆菌细胞质环境是还原性的, 不利于形成二硫键, 因此, 如果能构建促进二硫键形成的宿主, 也将有可能极大地提高可溶蛋白的表达水平^[3].

2.1.2 外源蛋白与其他辅助蛋白共表达

在强启动子调控下, 外源蛋白在大肠杆菌中的表达水平往往比较高, 而宿主自身的折叠辅助蛋白(分子伴侣与折叠酶)显然无法满足新生肽段正确折叠的要求. 因此, 共表达分子伴侣和折叠酶就有可能为外源新生肽段提供充分的辅助折叠支持, 进而增加可溶性蛋白的

表达量. 目前用于共表达以增加外源蛋白可溶性的辅助蛋白有 GroEL/ES 和 DnaK-DnaJ-GrpE、引发因子(Trigger factor)、硫氧还蛋白(Thioredoxin)和折叠酶(Foldase)等. 需要注意的是, 应根据外源蛋白的特点有选择性地共表达分子伴侣和折叠酶. 例如在大肠杆菌中共表达热激蛋白 GroEL/ES 能增加某些蛋白(α -1,6-岩藻糖基转移酶^[4]、浸麻芽孢杆菌环式糊精葡聚糖转移酶^[5]、谷氨酸消旋酶^[6]、过氧化物歧化酶^[7]、酪氨酸激酶^[8]、人胶原酶原^[9])的可溶性, 却对其他一些蛋白(人 I 型干扰素受体 2c 亚基的胞外段^[10]、噬菌体 P22 结构蛋白^[11]、人酸性富含胱氨酸分泌型蛋白^[12])无增溶效果. 又如 GroEL/ES 与人酪氨酸激酶 Lck 共表达并不能增加后者的可溶性, 而硫氧还蛋白却能显著地促进该外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达^[13]. 除此之外, 温度也可能会对共表达折叠辅助蛋白的效果产生重要的影响. 例如 preS2-S'- β -半乳糖苷酶与 DnaK 和 DnaJ 分子伴侣共表达, 能在 30~42 °C 范围内提高可溶蛋白的表达水平, 而共表达 GroEL 和 GroES 分子伴侣却只能在 30 °C 条件下取得比较好的效果^[14]. 值得一提的是, 如果将几种折叠辅助蛋白分子同时共表达, 有可能获得比单独表达某种折叠辅助蛋白更好的效果. Jiro 等^[15]将 GroEL/ES, Trx 或 DsbBD 与谷氨酸消旋酶同时共表达, 活性谷氨酸消旋酶的产量上升了 2.2~2.3 倍. 在某些情况下, 共表达那些能增加蛋白可溶性和促进大肠杆菌生长的蛋白也能起到良好的效果. 例如 Kallio 等^[16]在大肠杆菌中共表达透明颤菌血红蛋白, 发现该蛋白对活性蛋白的表达有明显促进作用.

2.2 载体的选择

2.2.1 启动子的选择

目前有许多启动子应用于外源蛋白的表达. 选择启动子可溶性表达外源蛋白, 需要从启动子强度、漏表

达程度、诱导性以及经济因素等各方面加以考虑。如果外源蛋白分泌表达, 蛋白表达速率必须加以优化, 以防止大肠杆菌的转运系统达到饱和状态^[17]。因此, 需要选择的启动子的强度应尽量与宿主细胞的转运能力保持一致。如果所表达的外源蛋白对细胞的生长有毒害作用, 应尽量选择高度可抑制性和诱导性启动子, 以减少对宿主细胞的不利影响。另外, 还需要从经济和启动子诱导的操作性角度选择合适的启动子。目前应用相当广泛的 PET 系统, 调控紧密, 能使克隆到 T7 启动子下游的外源目的基因在 IPTG(或乳糖)诱导下大量表达。但外源蛋白的过量表达往往形成包涵体, 高水平的 mRNA 也容易导致核糖体的破坏和细胞死亡, 而且 T7RNA 聚合酶可能导致质粒和外源基因表达的不稳定^[18]。专门用于外源蛋白低温诱导的温度敏感型启动子冷激蛋白 CspA 能在适当低温条件下达到较高的可溶蛋白表达水平^[19]。Csp 启动子比较适用于那些易形成包涵体或不稳定基因产物的外源蛋白的表达。除此之外, 阿拉伯糖启动子、pH 启动子、渗透压启动子、溶氧启动子等也日益为人们所重视, 并且有的已经成功应用于大规模生产过程^[18]。

2.2.2 构建融合蛋白

通过增加连接体(Linker)而改变蛋白序列有可能改善蛋白折叠、提高蛋白的溶解性、增强抗蛋白酶降解性、增加蛋白产量以及在培养基中分泌表达。而对于那些外源小分子量蛋白或某些分子量较大蛋白的片段, 只能考虑构建融合蛋白才能顺利表达。大肠杆菌麦芽糖结合蛋白(MBP)与目的蛋白融合表达, 除了易于分离和提高目的蛋白稳定性外, 还常具有在细胞周质分泌表达的优点。Clement 等^[20]将重组单链抗体(scFvs)的 C 末端与 MBP 融合后在细胞质内表达, 发现融合蛋白的可溶性和稳定性均比未融合蛋白有了显著的提高。Spangfort 等^[21]将 HIV 人 T 淋巴细胞受体 CD4 与麦芽糖结合蛋白融合表达(LB 培养基, 30 °C), 发现融合表达产物可溶, 并被转运到细胞周质。多聚组氨酸(Polyhistidine)与外源蛋白融合后能通过固定离子亲和层析给外源蛋白的分离纯化带来极大便利, 但组氨酸的数目与融合部位对融合蛋白的表达水平及其溶解性有显著影响^[22]。硫氧还蛋白(Thioredoxin)与许多外源蛋白融合后能促进外源蛋白的可溶性表达, 这种效应在较低温度下尤为显著^[23]。其他可供选择的融合蛋白还有钙调蛋白结合蛋白(Calmodulin-binding peptide)、DsbA 和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)及天然大肠杆菌蛋白 NusA, GrpE, BFR 等^[24,25]。需要注意的是, 温度可能对融合蛋白可溶性表达的效果有重大影响^[26]。另外, 以融合蛋白方式表达外源蛋白有三点需要慎重考虑: 首先, 融合表达会增加一个切除融

合片断的程序, 该程序往往需要昂贵的高特异性的因子, 相应地增加了成本; 其次, 即使是较高特异性的因子也往往会对目的蛋白发生作用, 造成目的蛋白损失和杂蛋白增多; 最后, 即使融合蛋白表达的水平较高, 经过各种分离程序之后, 目的蛋白的量可能非常有限。

2.2.3 分泌表达

由于大肠杆菌的细胞质是一个还原性环境, 外源蛋白在细胞质内往往难以正确折叠。分泌表达外源蛋白能简化蛋白纯化工艺, 除此之外, 由于分泌表达后信号序列的切除, 外源蛋白前端的甲硫氨酸残基不复存在, 保证了外源蛋白 N-端的纯正性。然而外源蛋白分泌表达是一个非常复杂的过程, 常常会遇到诸如不完全的跨内膜转运^[18]、转运装置的容量不足^[17,27]以及蛋白降解等问题^[28]。许多因素, 包括外源蛋白的大小^[29,30]、氨基酸组成^[31]及导肽的类型^[32]都会对蛋白的转运造成影响。为获得外源蛋白的高效分泌表达, 应尽量优化翻译水平, 使其与大肠杆菌的转运装置的容量保持一致。共分泌表达分子伴侣或向培养基中加入低分子量的添加剂, 往往会提高外源蛋白在细胞周质内分泌表达的水平^[33-35]。

2.2.4 密码子的使用

密码子的使用对外源基因的表达水平有重要的影响。研究人员已经对蛋白表达过程中稀有密码子替换的效应进行了深入的研究, 但并没有获得一致性的结论。稀有密码子存在对某些蛋白质的表达具有负面影响^[36], 这种负面效应可能缘于某些 tRNA 相对不足, 或者是密码子-反密码子配对的能量差异。在转录过程中稀有密码子的位置以及转录的速率都会影响密码子的翻译。虽然在某些情况下, 密码子的优化可以获得更高水平的蛋白表达, 但研究人员发现, 基因的表达水平并非总是受稀有密码子的限制^[37], 而且 tRNA 的丰度也未必与密码子的使用相关联^[38]。值得注意的是, 在某些基因中使用稀有密码子能显著降低肽链的延伸速率, 从而有利于新生肽段的正确折叠, 提高外源活性蛋白的表达^[39]。然而, 对于特定外源蛋白的表达, 一个密码子优化的程序可能是有益的, 因为经过优化的基因序列往往能提高 mRNA 二级结构的稳定性。

3 培养条件与诱导方法的选择

3.1 降低培养温度

最适合大肠杆菌生长的温度在 37~39 °C 之间, 在此温度下表达外源蛋白极易生成包涵体。低温培养条件下表达外源蛋白能有效地增加可溶蛋白的比例。表 1 表明不同外源蛋白在大肠杆菌中低温表达时, 可溶蛋白表达水平将明显提高。由表可见, 降低培养温度能增加不同

来源的外源蛋白可溶性. 但培养温度也有一个下限, 一般为 8~10℃, 因为在此温度以下, 大肠杆菌将停止生长, 蛋白也基本上停止表达. 定点突变可能会对表达可溶蛋白的温度选择有重要影响. Mainfroid 等^[47]发现人丙糖磷酸异构酶 37℃下能在大肠杆菌中可溶表达, 而丙糖磷酸异构酶的两个突变体 Met14Gln 和 Arg98Gln 却在 37℃下形成没有活性的包涵体, 在 28℃下才获得可溶表达. 在某些情况下, 不同的培养温度都能表达可溶性

蛋白, 但是降低培养温度具有 3 个优势: 首先, 低温下培养基中的氧气溶解性更高, 高密度培养时, 能有效防止菌体厌氧生长, 防止对菌体生长和外源蛋白表达有抑制作用的乙酸的生成; 其次, 低温培养时, 抗生素的半衰期更长, 质粒稳定性也可能会相应增加; 最后, 降低培养温度能降低可溶蛋白降解速率, 提高可溶蛋白的稳定性.

表 1 温度对外源蛋白在大肠杆菌中可溶性表达的影响

Protein	Promoter	Temperature (°C)	Effect
Ricin A chain ^[40]	P _L	37 or 42	Soluble at 37 °C; aggregated at 42 °C
Yeast- α -glucosidase ^[41]	tac	22 or 37	5-fold increase in activity at 22 °C
Human interferon- γ ^[42]	trp	30 or 37	16.5-fold less insoluble at 30 °C
Human interferon- α ^[42]	T7	30 or 37	2.5~3.0-fold more soluble at 30 °C
Murine protein Mx ^[42]	trp	30 or 37	50% soluble at 30°C; insoluble at 37 °C
Gloshedobin ^[43]	T7	15~40	More soluble at lower temperatures
D-carbamoylase ^[44]	T7, tac	25 or 37	4.5-fold increase in activity at 25 °C
Isopenicillin-N-synthase ^[45]	T7	25 or 37	10%~29% more soluble at 25 °C
D-amino acid oxidase ^[46]	T7	15, 28 or 37	More soluble at 15 and 28 °C

降低培养温度能提高外源蛋白可溶性的原因目前还没有满意的解释. 不少研究人员认为, 低温能降低蛋白质合成的速率, 改变多肽折叠的动力学, 从而导致正确折叠的蛋白增加^[48]. 但是, 蛋白表达速率与蛋白可溶性之间并不存在必然的联系. Schein 等^[42]通过改变 SD 序列与起始密码子 ATG 之间的距离来改变 Mx 蛋白合成的速率, 发现该蛋白在 37℃都会形成包涵体, 而底物不足导致蛋白合成速率下降时, 并不能获得外源蛋白可溶性表达量的增加^[49]. 低温培养更有利于可溶性蛋白表达的另一个原因可能是外源蛋白在低温下表达时, 蛋白区室化效率更高^[2], 也可能在较低温度下, 与蛋白折叠和蛋白聚合相关的蛋白的表达更有利于菌体形成稳定的可溶性蛋白^[50].

3.2 培养基的组成

培养基的组成对可溶外源蛋白的表达有显著影响. 由于复合培养基成分复杂, 在发酵过程中很难准确分析哪些成分对菌体细胞生长和蛋白表达有重要影响, 所以一般推荐使用合成培养基. 但合成培养基往往又存在菌体生长较慢和菌体浓度较低的问题, 因此研究人员为此做了许多卓有成效的工作^[51]. 一般来讲, 在表达外源蛋白时, 要尽量避免由于营养物质缺乏导致的菌体生长抑制的情况发生. 外源蛋白的表达显著地受葡萄糖浓度的影响, 虽然葡萄糖比较适合作为菌体生长的碳源, 但在诱导表达时期, 需尽量保持低水平的葡萄糖. 以甘油代替葡萄糖作为表达外源蛋白的碳源是解除葡萄糖效应的有效途径之一^[52]. 在诱导时期, 流加营养物质也有可能显著提高可溶蛋白的表达量^[53,54].

在某些情况下, 向培养基中添加蛋白抑制剂也能提高可溶蛋白量. Palva 等^[55]在培养基中添加蛋白酶抑制剂, 对生产来自枯草杆菌的干扰素非常有效. Slabaugh 等^[56]将核苷酸还原酶抑制剂羟基脲添加到培养基中, 发现核苷酸还原酶亚基 vvR1 量明显上升. 如果外源蛋白在细胞周质表达, 向培养基中添加适当浓度的某些非代谢性糖类(比如蔗糖)也可能有利于可溶蛋白的表达. 当外源蛋白在细胞质表达时, 非代谢性糖类由于细胞膜的阻碍不能扩散到细胞质中, 但这些糖类的存在会增加培养基的渗透压, 进而导致细胞质内渗透压防护剂(比如甘氨酸-三甲胺乙内酯)的积累, 这种渗透压保护剂与周质中的非代谢性糖类一样, 能抑制细胞质中外源蛋白的聚合, 从而提高可溶蛋白的表达水平^[57]. 外源蛋白二硫键的形成是一个酶依赖性反应过程, 向培养基中添加适量的金属离子, 可能提高这些酶类的活性, 因此也有可能增加可溶蛋白的表达量^[43]. 某些外源蛋白的活性和稳定性与某些金属离子密切相关, 因此向培养基中添加外源蛋白所需金属离子也可能提高蛋白的可溶性和稳定性^[58].

另外, 良好的通气能有效降低培养基中对菌体表达蛋白有重要影响的 CO₂ 和乙酸的浓度, 也有可能获得高产量的活性蛋白^[59]. 在蛋白表达过程中, 培养基的 pH 值也会对可溶蛋白的表达产生重要影响, 需要根据菌体和目的蛋白的特点选择合适的 pH 值.

3.3 诱导条件

在大肠杆菌中表达可溶性外源蛋白时, 诱导时机和诱导剂的用量必须严格控制. 在摇瓶培养时, 普遍认为

在低菌体浓度下诱导比较合适,因为在低菌浓度下菌体处于对数生长期,生长活跃,有利于表达可溶性蛋白.然而,如果能保证合理的补料与充分的通气,在较高菌浓度下诱导也同样可能获得可溶蛋白的高效表达.工业上往往采用高菌浓度补料诱导制备大量可溶蛋白,比如纤维原细胞生长因子—皂苷融合蛋白的生产就是采用补料方法达到 $A_{600}=85$ 的高菌浓度后,在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用 IPTG 诱导表达,分离纯化后 $1 A_{600}$ 单位可溶性丝毒素达到了 2.2 mg/L ^[60].也可考虑在高菌浓度下低温诱导采用冷激启动子高效表达可溶性蛋白.诱导剂种类及其浓度都会对外源蛋白表达产生重要影响,应根据所采用的表达系统(比如启动子的强弱)和外源蛋白的特点优化选择^[48,52].在某些情况下,诱导剂的流加能显著提高可溶蛋白的表达水平^[46].Saraswat 等^[61]以乳糖流加诱导的方式表达重组人白细胞介素-2,发现乳糖流加诱导的可溶重组人白细胞介素-2 的表达水平(9.3 g/L)显著高于一次性乳糖流加诱导的表达水平(5.4 g/L).

4 通过改变蛋白结构增加可溶性

自从包涵体被发现以来,其形成原因一直是研究人员探讨的焦点,实现外源蛋白的可溶性表达也依赖于对该问题的解答.降低培养温度并不能促进所有外源蛋白的可溶性表达,人们也无法解释 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时某些外源蛋白完全可溶的情况,而对这些蛋白进行定点突变却能在所有温度下获得可溶性表达.值得注意的是,虽然定点突变可能增加外源蛋白的可溶性,但不能简单地将这种效应归因于蛋白疏水性和某些特定氨基酸含量的改变.这种可溶蛋白的增加也可能是突变后外源蛋白对蛋白降解的稳定性的增加或者与分子伴侣相互作用增强的次级效应所致^[62].Murby 等^[63]在大肠杆菌中表达人呼吸道合胞病毒主要糖蛋白的 101 个氨基酸片段时,将该片段的若干个苯丙氨酸残基进行了突变,发现病毒糖蛋白片段的溶解性和对蛋白酶的稳定性有了显著的提高,而且突变后的蛋白片段与原蛋白片段具有相同的抗原性和二级结构.定点突变还可能改变温度对蛋白可溶性的效应.需要引起注意的是,虽然可以通过突变导致蛋白降解的位点来提高外源蛋白对蛋白酶的稳定性,但是这种突变可能会对蛋白活性造成极大影响^[64].目前,研究人员已经开始根据已知蛋白的结构和活性特征,利用计算机有针对性地对蛋白突变进行设计,大大地提高了获得具有高活性和高稳定性蛋白的效率和可能性^[65,66].

5 结论与展望

外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达是一个系统

工程,其中包含许多环节,环环相扣,任何一个环节的瓶颈都会对可溶蛋白的表达效率产生不良影响.因此,需要在研究过程中积累经验,并及时汲取相关领域研究的最新进展,找出制约可溶蛋白表达的关键因素,以期做到“对症下药”和“有的放矢”.

在过去的几十年里,人们对蛋白质体内折叠过程、包涵体形成机理的研究日益深入,基因工程手段也日臻成熟,使大量表达外源活性蛋白成为可能,各种生物活性蛋白需求的迅猛增长也促进了研究方法和技术手段的进步.毫无疑问,随着蛋白质折叠调节机制、蛋白质体内复性机理等方面的探索和经验积累,在大肠杆菌中可溶性表达外源蛋白的技术将会越来越成熟,成本也将逐渐降低,并最终造福整个人类社会.

参考文献:

- [1] Ignatova Z, Mahsunah A, Georgieva M, et al. Improvement of Posttranslational Bottlenecks in the Production of Penicillin Amidase in Recombinant *Escherichia coli* Strains [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(2): 1237-1245.
- [2] Schein C H, Boix E, Haugg M, et al. Secretion of Mammalian Ribonucleases from *Escherichia-coli* Using the Signal Sequence of Murine Spleen Ribonuclease [J]. Biochem. J., 1992, 283: 137-144.
- [3] Derman A I, Prinz W A, Belin D, et al. Mutations that Allow Disulfide Bond Formation in the Cytoplasm of *Escherichia-coli* [J]. Science, 1993, 262: 1744-1747.
- [4] Agatha B, Montserrat L, Eduardo G J. *In vivo* Chaperone-assisted Folding of α -1,6-Fucosyltransferase from *Rhizobium* sp. [J]. Chem. Bio. Chem., 2003, 4: 531-540.
- [5] Kwon M J, Park S L, Kim S K, et al. Overproduction of Bacillus Macerans Cyclodextrin Glucanotransferase in *E-coli* by Coexpression of GroEL/ES Chaperone [J]. J. Microbiol. Biotechnol., 2002, 12(6): 1002-1005.
- [6] Ashiuchi M, Yoshimura T, Kitamura T, et al. *In vivo* Effect of GroESL on the Folding of Glutamate Racemase of *Escherichia coli* [J]. J. Biochem., 1995, 117: 495-498.
- [7] Battistoni A, Carri M T, Steinkuhler C, et al. Chaperonins Dependent Increase of Cu, Zn Superoxide Dismutase Production in *Escherichia coli* [J]. FEBS Lett., 1993, 322: 6-9.
- [8] Caspers P, Stieger M, Burn P. Overproduction of Bacterial Chaperones Improves the Solubility of Recombinant Protein Tyrosine Kinase in *Escherichia coli* [J]. Cell. Mol. Biol., 1994, 40: 635-644.
- [9] Lee S C, Olins P O. Effect of Overproduction of Heat Shock Chaperons GroESL and DnaK on Human Procollagenase Production in *Escherichia coli* [J]. J. Biol. Chem., 1992, 267: 2849-2852.
- [10] Yoon S, Hirata R, Da Silva A, et al. Cloning and Expression of Soluble Recombinant Protein Comprising the Extracellular Domain of the Human Type I Interferon Receptor 2c Subunit (IFNAR-2c) in *E-coli* [J]. Biotechnol. Lett., 2002, 24(17): 1443-1448.
- [11] Gordon C L, Sather S K, Casjens S, et al. Selective *in vivo* Rescue by GroEL/GroES of Thermolabile Folding Intermediate to Phage P22 Structural Proteins [J]. J. Biol. Chem., 1994, 269: 27941-27951.
- [12] Schneider E L, Thomas J G, Bassuk J A, et al. Manipulating the Aggregation and Oxidation of Human SPARC in the Cytoplasm of *Escherichia coli* [J]. Nat. Biotechnol., 1997, 15: 581-585.

- [13] Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Maekawa T, et al. Increase of Solubility of Foreign Proteins in *Escherichia coli* by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin [J]. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 25328–25331.
- [14] Thomas J G, Baneyx F. Protein Folding in the Cytoplasm of *Escherichia coli* Cells Overproducing Heat-shock Proteins [J]. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271: 11141–11147.
- [15] Jiro K, Yasunori E. Improvement of Productivity of Active Form of Glutamate Racemase in *Escherichia coli* by Coexpression of Folding Accessory Proteins [J]. *Biochem. Eng.*, 2002, 10: 39–45.
- [16] Kallio P T, Bailey J E. Intracellular Expression of Vitreoscilla Hemoglobin (VHb) Enhances Total Protein Secretion and Improves the Production of α -Amylase and Neutral Protease in *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnol. Prog.*, 1996, 12: 31–39.
- [17] Mergulhao F J M, Monteiro G A, Larsson G, et al. Evaluation of Inducible Promoters on the Secretion of a ZZ-proinsulin Fusion Protein [J]. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2003, 38: 87–93.
- [18] Baneyx F. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* [J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, 10: 411–421.
- [19] Vasina J A, Baneyx F. Expression of Aggregation-prone Recombinant Proteins at Low Temperatures: A Comparative Study of the *Escherichia coli* *cspA* and *tac* Promoter Systems [J]. *Protein Express. Purific.*, 1997, 9: 211–218.
- [20] Clement J M, Jehanno M, Popescu O, et al. Expression and Biological Activity of Genetic Fusions between MalE, the Maltose Binding Protein from *Escherichia coli* and Portions of CD4, the T-Cell Receptor of the AIDS Virus [J]. *Protein Express. Purific.*, 1996, 8: 319–331.
- [21] Spangfort M D, Ipsen H, Sparholt S H, et al. Characterization of Purified Recombinant Bet v 1 with Authentic N-Terminus, Cloned in Fusion with Maltose-binding Protein [J]. *Protein Express. Purific.*, 1996, 8: 365–373.
- [22] Mohanty A K, Wiener M C. Membrane Protein Expression and Production: Effects of Polyhistidine Tag Length and Position [J]. *Protein Express. Purific.*, 2004, 33: 311–325.
- [23] Lee C, Lee S G, Takahashi S, et al. The Soluble Expression of the Protein Using Fusion Partners: Thioredoxin, Maltose Binding Human Rennin Binding a Comparison of Ubiquitin, Protein and NusA [J]. *Biotechnol. Biopro. Eng.*, 2003, 8(2): 89–93.
- [24] Vavis G D, Elisee C, Newham D M, et al. New Fusion Protein Systems Designed to Give Soluble Expression in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 65(4): 382–388.
- [25] Terpe K. Overview of Tag Protein Fusions: From Molecular and Biochemical Fundamentals to Commercial Systems [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 60: 523–533.
- [26] Picking W L, Mertz J A, Marquart M E, et al. Cloning, Expression, and Affinity Purification of Recombinant Shigella Flexneri Invasion Plasmid Antigens IpaB and IpaC [J]. *Protein Express. Purific.*, 1996, 8: 401–408.
- [27] Rosenberg H E. Isolation of Recombinant Secretory Proteins by Limited Induction and Quantitative Harvest [J]. *Biotechniques*, 1998, 24: 188–191.
- [28] Huang H C, Sherman M Y, Kandror O, et al. The Molecular Chaperone DnaJ Is Required for the Degradation of a Soluble Abnormal Protein in *Escherichia coli* [J]. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 3920–3928.
- [29] Koster M, Bitter W, Tommassen J. Protein Secretion Mechanisms in Gram-negative Bacteria [J]. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2000, 290: 325–331.
- [30] Palacios J L, Zaror I, Martinez P, et al. Subset of Hybrid Eukaryotic Proteins is Exported by the Type I Secretion Systems of *Erwinia chrysanthemi* [J]. *J. Bacteriol.*, 2001, 183: 1346–1358.
- [31] Kajava A V, Zolov S N, Kalinin A E, et al. The Net Charge of the First 18 Residues of the Mature Sequence Affects Protein Translocation Across the Cytoplasmic Membrane of Gram-negative Bacteria [J]. *J. Bacteriol.*, 2000, 182: 2163–2169.
- [32] Nielsen H J, Engelbrecht J, Brunak S, et al. Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Signal Peptides and Prediction of Their Cleavage Sites [J]. *Protein Eng.*, 1997, 10: 1–6.
- [33] Bothmann H, Pluckthun A. The Periplasmic *Escherichia coli* Peptidylprolyl Cistrans-isomerase FkpA I Increased Functional Expression of Antibody Fragments with and without Cis-proteins [J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 17100–17105.
- [34] Joly J C, Leung W S, Swartz J R. Overexpression of *Escherichia coli* Oxidoreductases Increases Recombinant Insulin-like Growth Factor — I. Accumulation [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 2773–2777.
- [35] Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, et al. Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK–dnaJ–grpE and GroEL–groES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen Cryj2 in *Escherichia coli* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 1694–1699.
- [36] Kane J E. Effects of Rare Codon Clusters on High Level Expression of Heterologous Proteins in *Escherichia coli* [J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1995, 6: 494–500.
- [37] Holm L. Codon Usage and Gene Expression [J]. *Nucl. Acid R.*, 1986, 14: 3075–3087.
- [38] Bonekamp F, Dalboge H, Christensen H, et al. Translation Rates of Individual Codons Are Not Correlated with Trna Abundance or with Frequencies of Utilization in *Escherichia coli* [J]. *J. Bacteriol.*, 1989, 171: 5812–5816.
- [39] Guisez Y, Robbens J, Remaut E, et al. Folding of the MS2 Coat Protein in *Escherichia coli* Is Modulated by Translational Pauses Resulting from mRNA Secondary Structure and Codon Usage: A Hypothesis [J]. *J. Theor. Biol.*, 1993, 162: 243–252.
- [40] Piatak M, Lane J A, Laird W, et al. Expression of Soluble and Fully Functional Ricin A Chain in *Escherichia coli* Is Temperature Sensitive [J]. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263: 4837–4843.
- [41] Kopetzki E, Schumacher G, Buckel P. Control of Formation of Active Soluble or Inactive Insoluble Baker's Yeast α -Glucosidase PI in *Escherichia coli* by Induction and Growth Conditions [J]. *Mol. Gen. Genet.*, 1989, 216: 149–155.
- [42] Schein C H, Noteborn M H M. Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Is Favored by Lower Growth Temperatures [J]. *Bio-technology*, 1988, 6: 291–294.
- [43] Yang Q, Xu J, Li M, et al. High-level Expression of a Soluble Snake Venom Enzyme, Gloshebobin, in *E. coli* in the Presence of Metal Ions [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2003, 25: 607–610.
- [44] Chao Y P, Chiang C J, Lo T E, et al. Overproduction of D-Hydantoinase and Carbamoylase in a Soluble Form in *Escherichia coli* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 54: 348–353.
- [45] Sim B J, Doreen S, Tan H, et al. Production of High Levels of Soluble Recombinant Streptomyces Clavuligerus Isopenicillin N Synthase in *Escherichia coli* [J]. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1996, 2: 71–83.

- [46] Zhu H Y, Li Q. Induction Strategies for Improving Soluble Fractions of D-amino Acid Oxidase Expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-DAAO [A]. The Eighth China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering [C]. 2004. 180.
- [47] Mainfroid V, Terpstra P, Beauregard M, et al. Three hTIM Mutants that Provide New Insights on Why TIM Is a Dimer [J]. *J. Mol. Biol.*, 1996, 257: 441–456.
- [48] Donovan R S, Robinson C W, Glick B R. Review: Optimizing Inducer and Culture Conditions for Expression of Foreign Protein under the Control of the Lac Promoter [J]. *J. Ind. Microbiol.*, 1996, 16: 145–154.
- [49] Horn U, Strittmayer W, Krebber A, et al. High Volumetric Yields of Functional Dimeric Miniantibodies in *Escherichia coli*, Using an Optimized Expression Vector and High-cell-density Fermentation under Non-limited Growth Conditions [J]. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 1996, 46: 524–532.
- [50] Carter P, Kelley R F, Rodrigues M L, et al. High-level *Escherichia coli* Expression and Production of a Bivalent Humanized Antibody Fragment [J]. *Bio-technology*, 1992, 10: 163–167.
- [51] Lee S Y. High Cell-density Culture of *Escherichia coli* [J]. *Trends Biotechnol.*, 1996, 14(3): 98–105.
- [52] Donovan R S, Robinson C W, Glick B R. Optimizing the Expression of a Monoclonal Antibody Fragment under the Transcriptional Control of the *Escherichia coli* Lac Promoter [J]. *Can. J. Microbiol.*, 2000, 46(6): 532–541.
- [53] Lee H W, Yoon S J, Kim H K, et al. Overexpression of an Alkaline Lipase Gene from *Proteus vulgaris* K80 in *Escherichia coli* BL21/pKLE [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2000, 22: 1543–1547.
- [54] Hoffmann F, van den Heuvel J, Zidek N, et al. Minimizing Inclusion Body Formation during Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* at Bench and Pilot Plant Scale [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, 34: 235–241.
- [55] Palva I, Lehtovaara P, Kèèriäinen L, et al. Secretion of Interferon by *Bacillus-subtilis* [J]. *Gene*, 1983, 22: 229–235.
- [56] Slabaugh M B, Davis R E, Roseman N A, et al. Vaccinia Virus Ribonucleotide Reductase Expression and Isolation of the Recombinant Large Subunit [J]. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268: 17803–17810.
- [57] Kagawa N, Cao Q W. Osmotic Stress Induced by Carbohydrates Enhances Expression of Foreign Proteins in *Escherichia coli* [J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, 393(2): 290–296.
- [58] Han N S, Tao B Y. A Simple Method to Expression Soluble, Highly Active Cyclodextrin Glycosyltransferase in Recombinant *E. coli* [J]. *Biotechnol. Tech.*, 1999, 13: 631–635.
- [59] Schein C H, Kashiwagi K, Fujisawa A, et al. Secretion of Mature IFN-alpha-2 and Accumulation of Uncleaved Precursor by *Bacillus-subtilis* Transformed with a Hybrid Alpha-amylase Signal Sequence-IFN-alpha-2 Gene [J]. *Bio-technology*, 1986, 14: 719–725.
- [60] McDonald J R, Org M, Shen C, et al. Large-scale Purification and Characterization of Recombinant Fibroblast Growth Factor—Saporin Mitotoxin [J]. *Protein Express. Purific.*, 1996, 8: 97–108.
- [61] Saraswat V, Lee J W, Kim D Y, et al. Synthesis of Recombinant Human Interleukin-2 via Controlled Feed of Lactose-complex Media in Fed Bath Cultures of *Escherichia coli* BL21(DE3)[PET-G3IL2] [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2000, 22: 261–265.
- [62] Nygren P A, Stahl S, Uhlen M. Engineering Proteins to Facilitate Bioprocessing [J]. *Trends Biotechnol.*, 1994, 12: 184–188.
- [63] Murby M, Samuelsson E, Nguyen T N, et al. Hydrophobicity Engineering to Increase Solubility and Stability of a Recombinant Protein from Respiratory Syncytial Virus [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1995, 230: 38–44.
- [64] Schein C H, Haugg M. Deletions at the C-terminus of Interferon-gamma Reduce RNA-binding and Activation of Double-stranded-RNA Cleavage by Bovine Seminal Ribonuclease [J]. *Biochem. J.*, 1995, 307: 123–127.
- [65] Mary A D, Loren L L, Homme W H. Computational Design of a Biologically Active Enzyme [J]. *Science*, 2004, 304: 1967–1971.
- [66] Reinhard S, Franz X S. De Novo Design of an Enzyme [J]. *Science*, 2004, 304: 1916–1917.

Strategies for Expression of Soluble Heterologous Proteins in *Escherichia coli*

ZHU Hong-yu, LI Qiang

(Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: *Escherichia coli* has long been the primary expression system for the synthesis of heterologous proteins, but its utility is limited because many heterologous proteins are either prone to be degraded by the cellular proteases or to accumulate in insoluble form, typically as inclusion bodies. This paper reviews recent advances in the strategies for expression soluble heterologous proteins in *Escherichia coli* so as to improve the recovery yield of heterologous gene products in a biologically active form.

Key words: heterologous protein; soluble expression; *Escherichia coli*