

综述

多拷贝策略在小肽表达中的应用

曹艳萍, 单安山, 马清泉, 尹佳佳

东北农业大学动物营养研究所, 哈尔滨 150030

摘要: 基因工程技术已经在大分子多肽表达上得到了广泛的应用。但是小分子多肽不稳定且易降解, 使其表达后很难检测和纯化。多拷贝策略是将目的基因或是含有目的基因的表达盒首尾串联, 而串联构建多拷贝表达载体是目前解决小分子多肽表达量少的有效方法。总结和比较非对称粘性末端互补法、接头连接法、同尾酶法和表达盒串联法在多肽表达方面的应用情况, 为小分子多肽的体外表达提供方法和思路。

关键词: 多拷贝, 串联, 多肽表达, 应用

Application of multi-copies in expression of smaller peptides: a review

Yanping Cao, Anshan Shan, Qingquan Ma, and Jiajia Yin

Institute of Animal Nutrition, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: The technology of genetic engineering has been widely used to express macromolecules such as enzymes. However, it is difficult to detect and purify the micromolecules such as small peptides, because of their instability and degradability. Construction of multi-copy recombinant expression plasmid can be achieved by inserting multiple target genes or expression cassette containing target genes with the same orientation into expression vector. This is effective to increase the expression level of small peptides. In this article we described four methods in order to provide some optional methods and ideas for the expression of active small peptides.

Keywords: multi-copies, in series, expression of polypeptides, application

近年来, 随着基因工程技术的发展, 一些有生物活性的小分子多肽受到了高度的重视, 国内外针对小分子多肽的大量研究表明某些小肽在动物营养

保健、生物制药和临床应用等方面有着广阔的前景。但是由于其分子量小, 在细胞中的稳定性不好, 容易被宿主蛋白酶识别并降解为无活性的寡肽片段^[1], 另

Received: October 23, 2010; **Accepted:** January 5, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31072046), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20092325110009), Scientific Research Fund of Heilongjiang Provincial Education Department (No. 11551z003).

Corresponding author: Anshan Shan. Tel: +86-451-55190685; E-mail: assh@mail.neau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31072046), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20092325110009), 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (No. 11551z003) 资助。

外其表达量也少,在一定程度上制约了小分子多肽的工业化生产。目前,采用构建多拷贝表达载体的策略可以有效提高小分子多肽的表达量和稳定性。Shang 等^[2]分别构建了 2、4 和 8 拷贝的 K6W-泛素重组表达载体,结果发现表达量随拷贝数的增加而增加。多拷贝表达载体的构建方法主要有非对称粘性末端互补法、接头连接法、同尾酶法和表达盒串联法 4 种,每一种的构建方法和适用范围各不相同,应根据实际情况选择适合的方法构建多拷贝基因表达载体。除此之外,也可采用含有卡那霉素抗性基因的表达载体 pPIC3.5K 和 pPIC9K,通过增加的抗遗传霉素抗性,在体内筛选多拷贝插入子。Wang 等^[3]采用该法使人 α -防御素-5 的成熟肽得到了高效表达。本文对多拷贝策略的应用进行了分析和归纳,旨在为人们进一步认识和利用多拷贝策略提供参考。

1 非对称粘性末端互补构建法的应用

非对称粘性末端互补构建法是由限制性内切酶(*Ava* I、*Eco*T 14 I 等)切割目的基因两端酶切位点产生的或人为设计的非对称粘性末端相连形成的。载体和插入片段的摩尔比例以及连接时间不同,得到的多聚体的拷贝数也不同。此法具有连接效率高和操作简单等优点,且构建的多聚体基因片段一般小于 100 bp^[4]。

Lee 等^[5]采用非对称粘性末端法构建了 cGnRH-II 的 4 拷贝重组表达载体,并在大肠杆菌 TOP10F 中进行了表达。胡学军等^[6]以人工合成的胸腺素 a1 基因为模型,采用限制酶 *Eco*T 14 I 识别序列 CCAAGG 为小肽两末端序列,利用其酶切后产生非镜像粘性末端,一次连接反应就构建出了一系列不同基因拷贝数的表达载体,并且在大肠杆菌 BL21(DE3) 中都得到了高效表达。贾秀娟等^[7]在对糖尿病合并症有积极防治意义的 C 肽的两端各设计了一个 *Sfi* I (5'-GGCCNNNNNGGCC) 的酶切位点,酶切后产生非回文的粘性末端利于 C 肽基因片段的串联,另外在 C 肽的两端分别加上 *Kpn* I、*Pst* I 酶

切位点,与经 *Kpn* I、*Pst* I 酶切的载体 PET-30a 相连接,成功构建了 5 拷贝的重组表达载体 PET-30a-C5,经转化诱导表达后,融合蛋白占超声上清总蛋白的 40%~50%。除用特定的限制酶酶切产生非对称粘性末端以外,也可以人工设计非对称粘性末端。Tian 等^[8]根据 LfcinB15-W4, 10 氨基酸序列,按照大肠杆菌密码子偏爱性设计合成其编码基因,人工设计非对称粘性末端 5'-CCGA/5'-TCGG,在 T4 DNA 连接酶作用下首尾串联成 1~7 拷贝和 9 拷贝的多聚体编码序列,结果发现不同拷贝数的多聚体基因序列都得到了特异性诱导表达,且四聚体融合蛋白表达水平最高,表达量为 10 mg/L。Tian 等^[9]利用粘性末端法分别构建了 1~6 拷贝的 LH 串联基因,并且发现 2 拷贝在大肠杆菌 *E. coli* C43 中得到了高效表达,表达量为 11.3 mg/L。Jain 等^[10]设计了带有非对称粘性末端的引物 (5'-TGGAATTCGCCCTTACGCGATATCCGTTAA/5'-GCCCCGGGACAAAAATTAGGATCCAATCGCTAGCTGTGACAAGAGGTTCGTTGCC),克隆了编码人 gp41 基因的保守区序列,并且构建了 3 和 5 拷贝的重组表达载体。Wang 等^[11]同样采用粘性末端互补法构建了 2、4、6、8 拷贝的 CAME 表达载体,并对 4 拷贝的重组表达载体进行了表达,表达量为 86 mg/L。由此可见,粘性末端互补法也是构建多拷贝过程中常用的方法和行之有效的方法之一,特别是适合于目的基因碱基数少的单体的多聚体的构建,但是不同聚合度的多聚体的形成较随机。

2 同尾酶法的应用

同尾酶是指两种不同的限制性内切酶,它们可以识别不同的酶切位点而产生相同的粘性末端,例如 *Bgl* II (5'-AGATCT) 和 *Bam*H I (5'-GGATCC)。利用这一性质对重组载体进行单酶切和双酶切,产生的线性化重组载体和插入片段具有相同的粘性末端,有助于多拷贝表达载体的构建,同尾酶法在构建多聚体的精确度上具有优势。

王震等^[12]利用同尾酶的方法构建了产甘油假丝

酵母甘油合成关键酶基因 CgGPD1 的不同拷贝数的表达载体,并且研究结果发现在相同的 NaCl 或葡萄糖质量浓度下,胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶 (GPDH) 的活性随着 CgGPD1 的拷贝数的增加而增加,但表达量没有提高。马精彩等^[13]通过基因重组技术,将从 pPIC9-Hirudin 中扩增出的 α -factor-Hirudin 插入到载体 pAO815 中,并构建了多拷贝水蛭素重组表达载体 pAO815-(α -Hirudin)₃,转化 GS115 后得到了高效表达,表达量达 1 600 U/mL,且表达产物具有良好的抗凝血活性。汪小福等^[14]采用同尾酶的方法构建了不同拷贝数的刺肩蝥 (Thanatin) 串联融合表达载体,目的在于增加抗菌肽的表达丰度和抗菌肽的稳定性。胡金川^[15]同样采用该法通过多次酶切、连接分别构建了 1~8 拷贝的肽抗生素 hPAB- β ,并将其转化到大肠杆菌 JM109 中进行了表达,结果发现 3 拷贝的表达量最高且较稳定。扈进冬等^[16]利用同尾酶法成功构建了天蚕素 B 基因 (Cecropin B) 的 3 拷贝表达载体,为 Cecropin B 的进一步研究和开发打下了基础。Rao 等^[17]利用同尾酶法构建了 hPAB- β 的 2~8 拷贝的多聚体,其中 3 拷贝的表达量为 680 mg/L,比单体表达量提高了 10 倍多。同尾酶法在构建多拷贝时虽然反复酶切连接较繁琐,但是其构建的多聚体较精确,利于后期的筛选。另外,为了避免反复酶切连接,也可以先将带有同尾酶酶切位点的目的单体进行自连,利用双酶切筛选构建正确的多聚体再与载体相连,这样就可以减少酶切和连接的次数。

3 接头连接法的应用

接头连接法是以自带粘性末端的接头为媒介将目的基因连接在一起形成串联的重复单元,从而达到构建多拷贝表达载体的目的。该方法操作简单,连接效率较高。蒋燕明等^[18]分别设计了 4 段 DNA 片段 XH1、XH2、EX1、EX2,退火连接形成 2 个接头 XH 和 EX,分别连到载体 pPIC9K 信号肽处的酶切位点 *Xho* I 与 *Eco*R I 之间,成功构建了多拷贝表达载体 pPEX9K。Tian^[19]设计了带有 *Bam*H I 和

Hind III 酶切位点的接头,成功构建了 2~7 及 9 拷贝的 LfcinB15-W4,10 重组表达载体。Jiang 等^[20]采用接头法成功构建了 4~8 拷贝的 CSEnc 重组表达载体。接头连接法操作简单,通过控制连接时间和接头的比例一次就能构建不同拷贝数的多聚体。同非对称粘性末端法一样,该法也适用于分子量较小的单体。

4 表达盒串联法的应用

表达盒是指包括启动子、信号肽、外源基因和终止子在内的完整的表达调控序列。多拷贝表达盒串联法是将完整的表达盒串联,是表达盒的多拷贝,而不是目的基因的多拷贝,适用于二硫键数目较多的或是大分子蛋白的多拷贝构建,降低了二硫键复杂性和构象折叠的难度,通过此法构建的多拷贝重组表达载体表达时,各个单一表达盒同时进行表达,表达产物是目的蛋白单体。

易俊波等^[21]将脑钠肽基因 (BNP) 连接到经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切的 pCW111 载体之后,转化大肠杆菌培养,提取质粒用 *Eco*R V 和 *Ssp* I 酶切得到含有完整 BNP 的表达盒,另用 *Eco*R V 单酶切所提质粒,再用 ALP 去磷酸化,并将 BNP 表达盒与之连接构建 2 和 3 拷贝表达载体,结果发现 2 拷贝的表达量高于 3 拷贝的表达量,Mansur 等^[22]采用表达盒构建法成功构建了 4 和 6 拷贝的胰岛素原 (MPI) 重组表达载体,转入毕赤酵母菌 GS115 中得到表达,最高表达量为 259 mg/L。Lee 等^[23-25]同样采用表达盒串联法构建了含有不同拷贝数的 Buforin II 表达盒的重组表达载体,并将其转化至大肠杆菌 BL21 中进行了表达,结果显示 12 拷贝的表达量最高,约为 250 mg/L。表达盒串联法更适用于大分子蛋白的多拷贝构建。井申荣等^[26]在体外构建了人的白细胞介素-10 的重组表达载体 pAO815-aIL-10,并用 *Bgl* II 和 *Bam*H I 双酶切获得目的基因重组表达盒 (AOX-aIL-10),再连接到 *Bam*H I 酶切位点处,依次构建多拷贝重组表达载体

pAO815-(AOX-aIL-10)_n, 结果发现 4 拷贝和 8 拷贝的重组表达载体在毕赤酵母中的表达量最高, 为 (8.25±1.65) mg/L。何成等^[27]将表达盒 (5'AOX-HBsAg-TT) 重复导入载体, 成功构建了乙肝表面抗原 (HBsAg) 的不同拷贝数的重组表达载体, 经转化、诱导表达发现 HBsAg 表达量与拷贝数呈显著正相关 ($t=8.714$, $P<0.05$)。Dheepak 等^[28]采用同样的方法表达了红酵母的环氧化物水解酶。由此可见, 增加目的基因的拷贝数在一定程度上可以明显提高其表达量。

5 多拷贝表达策略的研究展望

基因工程技术在食品、药品、动物营养等各个领域已得到广泛应用, 而小分子多肽的表达也成为了近几年生物技术工作者所研究的热点问题, 但是由于小分子多肽自身所存在的问题使其表达量较少, 因此, 构建多拷贝表达载体来解决这一问题显现出了广阔的前景。研究发现采用多拷贝策略在一定程度上能提高小分子多肽的表达量^[29], Kim 等^[30]构建了 2、4、8、12、16 和 32 拷贝的 Histonin 表达载体, 结果发现 12 拷贝的表达量最高, 可达 168 mg/L。因此, 通过对表达载体上游顺式作用元件进行改造, 构建目的基因串联表达方式小分子多肽的高效表达提出了新的思路和方法。根据目的蛋白的大小和所含二硫键的数目选择合适的多拷贝构建方法, 使目的蛋白的表达量有很大的提高, 为目的基因异源表达的工业化生产提供技术支持。多拷贝表达策略虽然能在一定程度上提高目的蛋白的表达量, 但也不是绝对的, 即表达量和拷贝数不成正比, Zhong 等^[31]分别构建了 2、4、8 拷贝的 hBD2 表达载体, 并且在 *E. coli* BL21 中进行了表达, 结果却发现 2 拷贝的表达量最高, 为 760 mg/L。其具体原因和机理有待于进一步探讨和研究。

以上 4 种构建多拷贝的方法并不是单独存在的, 它们之间有着一定的联系。在利用表达盒方法构建多拷贝时就可以在表达盒的两端引入同尾酶,

将表达盒首尾串联起来后再直接连入表达载体, 或者也可以通过接头连入表达载体; 另外, 在采用接头连接法构建多拷贝时也可将同尾酶引入目的片段的两端, 连接构建目的基因的多聚体后利用接头将其连入表达载体; 也可通过非对称粘性末端法构建目的基因的多聚体, 再通过接头将其连入载体。本课题组正采用同尾酶和接头连接两种方法构建鸡 β -防御素 6 的多拷贝表达载体, 有望得到高效表达。由此可见, 根据蛋白的特性, 选择一种或结合两种合适的构建多拷贝方法对突破小肽表达量小的瓶颈有重大意义。

REFERENCES

- [1] Liao SQ, Zhou ST, Zeng JY. The progress on biological antimicrobial peptides. *Gansu Med J*, 2009, 28(1): 16–20. 廖世奇, 周思彤, 曾家豫. 生物抗菌肽的研究进展. *甘肃医药*, 2009, 28(1): 16–20.
- [2] Shang F, Guo WM, Taylor A, et al. Dose dependent effects of dominant-negative K6W-ubiquitin: construction of mini-genes that encode multiple copies to K6W-ubiquitin. *FASEB J*, 24: 1b91.
- [3] Wang AP, Wang S, Shen MQ, et al. High level expression and purification of bioactive human α -defensin 5 mature peptide in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(5): 877–884.
- [4] Zhang J, Yang YL, Tian ZG, et al. The construction strategy for tandem polypeptide genes. *China Biotechnol*, 2009, 29(8): 107–112. 张军, 杨雅麟, 田子罡, 等. 多肽串联基因构建策略. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(8): 107–112.
- [5] Lee SJ, Lee JH, Jin HJ, et al. A novel technique for the effective production of short peptide analogs from concatameric short peptide multimers. *Mol Cells*, 2000, 10(2): 236–240.
- [6] Hu XJ, Zhang ZC, Bao YM, et al. A series of pET-derived vectors for high-level expression of the gene of multiple copies smaller peptide in *E. coli*. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2002, 18(3): 287–292. 胡学军, 张志超, 包永明, 等. 小肽多拷贝基因表达载体的构建及其高效表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18(3): 287–292.

- [7] Jia XJ, Yang JK, Cai SB, et al. Construction and expression of multi-copied human C-peptide gene in *Escherichia coli*. *J Capital Med Univ*, 2007, 28(3): 287–291.
贾秀娟, 杨金奎, 柴三葆, 等. 多拷贝人 C 肽基因的构建及其原核表达研究. *首都医科大学学报*, 2007, 28(3): 287–291.
- [8] Tian ZG, Teng D, Yang YL, et al. Multimerization and fusion expression of bovine lactoferricin derivative LfcinB15-W4, 10 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(1): 117–124.
- [9] Tian ZG, Dong TT, Yang YL, et al. Expression of antimicrobial peptide LH multimers in *Escherichia coli* C43(DE3). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 83(1): 143–149.
- [10] Jain S, Patrick AJ, Rosenthal KL. Multiple tandem copies of conserved gp41 epitopes incorporated in gag virus-like particles elicit systemic and mucosal antibodies in an optimized heterologous vector delivery regimen. *Vaccine*, 2010, 28(43): 7070–7080.
- [11] Wang YQ, Cai JY. High-level expression of acidic partner-mediated antimicrobial peptide from tandem genes in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 141(2/3): 203–213.
- [12] Wang Z, Rao ZM, Zhuge B, et al. Construction of multicopies vectors of key enzymes gene GPD1 in glycerol synthesis of *Candida glycerolgenesis* and its expression in *Escherichia coli*. *J Food Sci Biotechnol*, 2008, 27(5): 50–56.
王震, 饶志明, 诸葛斌, 等. 产甘油假丝酵母甘油合成关键酶基因 CgGPD1 多拷贝表达载体的构建及其在大肠杆菌中的表达. *食品与生物技术学报*, 2008, 27(5): 50–56.
- [13] Ma JC, Cao XN, Xiong WL, et al. Construction of a multi-copy secretory expression vector and hirudin expression in *Pichia pastoris*. *Tianjin Med J*, 2010, 38(2): 112–114.
马精彩, 曹晓娜, 熊蔚俐, 等. 多拷贝水蛭素基因在毕赤酵母中的分泌型表达. *天津医药*, 2010, 38(2): 112–114.
- [14] Wang XF, Liu RH, Chen XY, et al. Construction of vectors for expression of cleavable tandem repeat Thanatin fusion protein in plants. *Hereditas*, 2007, 29(6): 758–764.
汪小福, 刘仁虎, 陈笑芸, 等. 可剪切多拷贝抗菌肽融合表达载体的构建. *遗传*, 2007, 29(6): 758–764.
- [15] Hu JC. Design, expression and purification of tandem multimers of peptide antibiotic hPAB- β [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2004.
胡金川. 肽抗生素 hPAB- β 多拷贝串联体的设计、表达与纯化[D]. 重庆: 第三军医大学, 2004.
- [16] Hu JD, Wu YZ, Zhang GZ, et al. The construction of repeats copy expression vector of cecropin B in *Pichia pastoris*. *Shandong Sci*, 2008, 21(5): 21–24.
扈进冬, 吴远征, 张广志, 等. 天蚕抗菌肽 B 基因在毕赤酵母中多拷贝表达载体的构建. *山东科学*, 2008, 21(5): 21–24.
- [17] Rao XC, Hu JC, Li S, et al. Design and expression of peptide antibiotic hPAB- β as tandem multimers in *Escherichia coli*. *Peptides*, 2005, 26(5): 721–729.
- [18] Jiang YM, Yang ZH, Ran YL, et al. Construction of a new multi-copy *Pichia* expression vector. *J Guangxi Med Univ*, 2005, 22(4): 511–513.
蒋燕明, 杨治华, 冉宇靓, 等. 一种新型多拷贝毕赤酵母表达载体的构建. *广西医科大学学报*, 2005, 22(4): 511–513.
- [19] Tian ZG. Multimerization and fusion expression of antimicrobial Peptide LfcinB15-W4, 10[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2006.
田子罡. 抗菌肽 LfcinB15W4, 10 多拷贝表达载体的构建及融合表达[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [20] Jiang SW, Trujillo MA, Eberhardt NL. An efficient method for generation and subcloning of tandemly repeated DNA sequences with defined length, orientation and spacing. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(16): 3278–3279.
- [21] Yi JB, Mai ZG, Lu HR, et al. Construction and expression of recombinant expression vector for multi-copy B-type natriuretic peptide gene. *Chin J Biologicals*, 2008, 21(12): 1062–1065.
易俊波, 买制刚, 卢海蓉, 等. 多拷贝脑钠肽基因表达质粒的构建及其表达. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(12): 1062–1065.
- [22] Mansur M, Cabello C, Hernández L, et al. Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(5): 339–345.
- [23] Lee JH, Kim MS, Cho JH, et al. Enhanced expression of tandem multimers of the antimicrobial peptide buforin II in *Escherichia coli* by the DEAD-box protein and *trxB* mutant. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(6): 790–796.

- [24] Lee JH, Minn I, Park CB, et al. Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*. *Prot Expr Purif*, 1998, 12(1): 53–60.
- [25] Lee JH, Kim JH, Hong SS, et al. Multimeric expression of the antimicrobial peptide buforin II in *Escherichia coli* by fusion to a cysteine-rich acidic peptide. *J Microbiol Biotechnol*, 1999, 9(3): 303–310.
- [26] Jing SR, Zou QM, Hong Y, et al. Construction of multiple copy expression cassette for expression of human interleukin-10 in *Pichia pastoris*. *Chin J Biologicals*, 2007, 20(2): 81–86.
井申荣, 邹全明, 洪愉, 等. 白细胞介素-10 基因多拷贝表达盒的构建及在毕赤酵母中的表达. *中国生物制品学杂志*, 2007, 20(2): 81–86.
- [27] He C, Cai PP, Lou JR. Construction of recombinant plasmid with multi-copy expression cassette for high expression of HBsAg in *Pichia pastoris*. *Chin J Biologicals*, 2008, 21(3): 207–211.
- 何成, 蔡蓓蓓, 楼觉人. 多拷贝重组 HBsAg 质粒的构建及在毕赤酵母中的高效表达. *中国生物制品学杂志*, 2008, 21(3): 207–211.
- [28] Dheepak M, Roth R, Lalloo R, et al. Multi-copy expression and fed-batch production of *Rhodotorula araucariae* epoxide hydrolase in *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79(2): 235–244.
- [29] Goto Y, Carter D, Guderian J, et al. Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania amastigotes*. *Am Soc Microbiol*, 2010, 78(5): 2138–2145.
- [30] Kim JM, Jang SA, Yu BJ, et al. High-level expression of an antimicrobial peptide histonin as a natural form by multimerization and furin-mediated cleavage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(1): 123–130.
- [31] Zhong ZX, Xu ZN, Peng L, et al. Tandem repeat *mhBD2* gene enhance the soluble fusion expression of hBD2 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 71(5): 661–667.

~~~~~

### 本 期 广 告 索 引

| 企 业              | 版 位 | 企 业               | 版 位 |
|------------------|-----|-------------------|-----|
| GE Healthcare 公司 | 封 底 | 生物谷网站             | 内 页 |
| 宝生物工程 (大连) 有限公司  | 封 二 | 艾本德 (上海) 国际贸易有限公司 | 内 页 |
| 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司 | 扉 一 | 镇江东方生物工程公司        | 内 页 |
| 安琪酵母股份有限公司       | 内 页 |                   |     |