

HSP70 基因上游调控序列对 GST 基因在耻垢分枝杆菌中 表达效率的影响*

程继忠 皇甫永穆 海 涛** 梁驹卿 肖 红

(同济医科大学实验医学研究中心医学分子生物学研究室 武汉 430030)

摘 要 将外源基因——日本血吸虫 26kD 抗原(Sj26GST)基因克隆到大肠杆菌-分枝杆菌穿梭质粒中, 构建成四个不同的表达载体, 研究它们在耻垢后分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)中的表达效率。首先将含有结核杆菌热休克蛋白 70(Heat Shock Protein, HSP70)的启动子的质粒 pMT-70 用 NcoI 切, 进行两种不同的修饰后, 得到不同的 SD 序列, 将 Sj26GST 基因克隆进去。再将含 HSP70 启动子和 Sj26GST 基因的片段切下, 克隆到分枝杆菌-大肠杆菌穿梭质粒 pBCG-2000 中, 筛选出不同 SD 序列、不同方向和不同拷贝数的分枝杆菌表达载体四个。所表达的重组天然 Sj26GST(rSj26GST)为可溶性蛋白, 在 SDS-PAGE 上分子量为 26kD 处可见明显的表达蛋白带。通过薄层扫描分析, 发现表达质粒中双拷贝启动子-外源基因组合, 表达效率最高, 是单拷贝组合的 1.6 倍, 占分枝杆菌菌体总蛋白的 28%。而不同的克隆方向和不同的 SD 序列(两者相差 3 个碱基)对表达效率的影响不明显。

关键词 上游调控序列, 表达效率, 分枝杆菌, GST 基因

分类号 R378.91 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0100-07

分枝杆菌又称抗酸杆菌, 因生长缓慢等原因而影响了对它们的深入研究。随着分子生物学技术的发展, 人们对分枝杆菌的遗传背景开始有些认识。近年发展起来的分枝杆菌分子遗传学手段和方法可将外源基因转入 BCG 和其它分枝杆菌^[1], 为将卡介苗(BCG)和其它分枝杆菌发展为多价疫苗载体打下基础。目前, 国外一些学者正利用分枝杆菌的特点, 将数十种外源基因在分枝杆菌中得以表达, 制备基因工程分枝杆菌多价疫苗。我国近年来在这方面的研究也取得了很大的进展, 皇甫永穆等人先后构建出两代大肠杆菌-分枝杆菌穿梭载体, 并将 Sj26GST 基因在分枝杆菌中得到表达^[2]。本文研究了 HSP70 基因上游调控序列对谷胱甘肽-S 转移酶(GST)基因在耻后分枝杆菌(*M. smegmatis*)中表达效率的影响。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和化学试剂

大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 为本室收藏; 质粒 pBCG-2000、pUC19-GST 为本室构建^[3]; *M. smegmatis* mc²155 由美国 Dr. Jacobs 赠送; 质粒 pMT70(含人结核杆菌热休克蛋白 70 的启动子序列)由英国 D. B. Lowrie 提供。Nco I 等 DNA 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、

* 血吸虫病重点研究总理基金资助项目(No. 94-Y-19) ; 国家自然科学基金资助项目(No. 39480022)

** 同济医科大学职业医学研究所

作者还有 郑 波 王光惠

收稿日期 : 1997-07-14 , 修回日期 : 1997-12-15

E. coli Klenow 大片段、Mung bean 核酸酶、dNTP、以及 DNA 和蛋白质分子量标准 ,均购于华美生物工程公司 ;Tsg DNA 聚合酶购于 Gibco 公司。寡核苷酸引物由本校实验医学研究中心分子生物学研究室分子生物学开放实验室合成。

1.2 方法

1.2.1 *E. coli* 质粒 DNA 的制备、纯化、鉴定、重组及转化 :质粒 DNA 提取参照 Birnboim 法 ,用氯化锂和聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA ,其它方法参照文献 [4]。

1.2.2 分枝杆菌培养 :*M. smegmatis* mc²155 在 37℃ 培养于含 0.05% Tween-80 的 M7H9 培养基中^[5]。转化子则在含 25mg/L 卡那霉素的 M7H10 固体培养基上筛选。

1.2.3 Sj26GST 基因的 PCR 扩增 :以大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒为模板 ,进行 Sj26GST 基因的扩增。循环温度时间分别为 :第一轮循环前 ,94℃ 预变性 5min ,于 80℃ 加入 Tsg DNA 聚合酶。然后于 94℃ 变性 45s 后于 47℃ 延伸 45s ,再于 60℃ 复性 1min ,依此条件循环 20 次 ,最后一次循环延伸至 10min。反应终止后 ,用酚 :氯仿抽提去掉石蜡油。取 5~10μL 反应混合液在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳 ,检测扩增效果。

1.2.4 分枝杆菌的转化 :从平板上挑取 *M. smegmatis* mc²155 于 100mLM7H9 的液体培养基中 ,37℃ 培养至对数生长期 (OD₆₀₀ 为 0.5~1.0) ,冰浴 2.5h。4℃ ,5 000r/min 离心 10min ,收集细菌 ,沉淀悬浮于 100mL 预冷的 10% 甘油中。4℃ ,3 000r/min 离心 10min ,沉淀悬浮于 50mL 预冷的 10% 甘油中。4℃ ,2000r/min 离心 10min ,沉淀悬浮于 20mL 预冷的 10% 甘油中。4℃ ,1 500r/min 离心 15min。最后 ,将沉淀悬浮于 1.5mL 预冷的 10% 甘油中。此细胞可直接用于电转化。取出 80μL 细胞于 eppendorf 管中 ,加入 2μLDNA (0.1μg) ,冰浴 1min。将 Gene Pulser (基因脉冲仪 Bio-Rad 公司产品) 设置为 2 500V , 25μF ,Gene Controller 设置为 1000 Ohms ,进行电转化 (转化时间常数约为 15~25ms) 。被转化的细菌立即加入 1mL-M7H9 培养基 ,轻轻混匀 ,转入玻璃试管 ,37℃ 温育 2h。取 0.1mL 涂于含 25mg/L 卡那霉素的 M7H10 培养基平板上 ,37℃ 孵育。3~5 d 出现转化子。

1.2.5 *M. smegmatis* mc²155 于 M7H9 液体培养基中 ,37℃ ,150r/min 培养 48~72h。45℃ 诱导 30min ,5000r/min 离心 5min ,沉淀用 1mL 裂解液 (25% 蔗糖 ,50mmol/L EDTA , 50mmol/L Tris-HCl ,pH8.0) 悬浮 ,洗涤两次 ,最后悬浮于 100μL 分枝杆菌裂解液中。加入 2μL 100mmol/L 甲基碘酰氟 (PMSF) 2mg 溶菌酶 ,37℃ 水浴 2h。加入 10% SDS 至终浓度为 1% ,37℃ 水浴至溶液粘稠 ,加入适量去氧胆酸和 DNaseI ,37℃ 水浴 30min ,取出 50μL 用于菌体总蛋白的测定 ,其余加等体积 2×SDS 加样缓冲液 (100mmol/L Tris-HCl , pH6.8 ,10%β-巯基乙醇 ,4% SDS ,0.2% 溴酚蓝 ,20% 甘油) ,100℃ 保温 4min ,取 20 μL 用于 0.1% SDS-12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。用考马斯亮兰染色。

1.2.6 蛋白测定和 SDS-PAGE 蛋白密度扫描 :菌体总蛋白按 Lowry 法测定 ,蛋白质 SDS-PAGE 结果用 dual-wavelength TLC scanner cs-910 图象分析系统在波长为 560nm 处扫描分析。

2 结果

2.1 四种大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒的构建及鉴定

2.1.1 四种大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒的构建 :大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒

pBCG-Sj26 I~IV 的构建如图 1 所示。其过程为：首先用 Nco I 切含人结核杆菌 HSP70

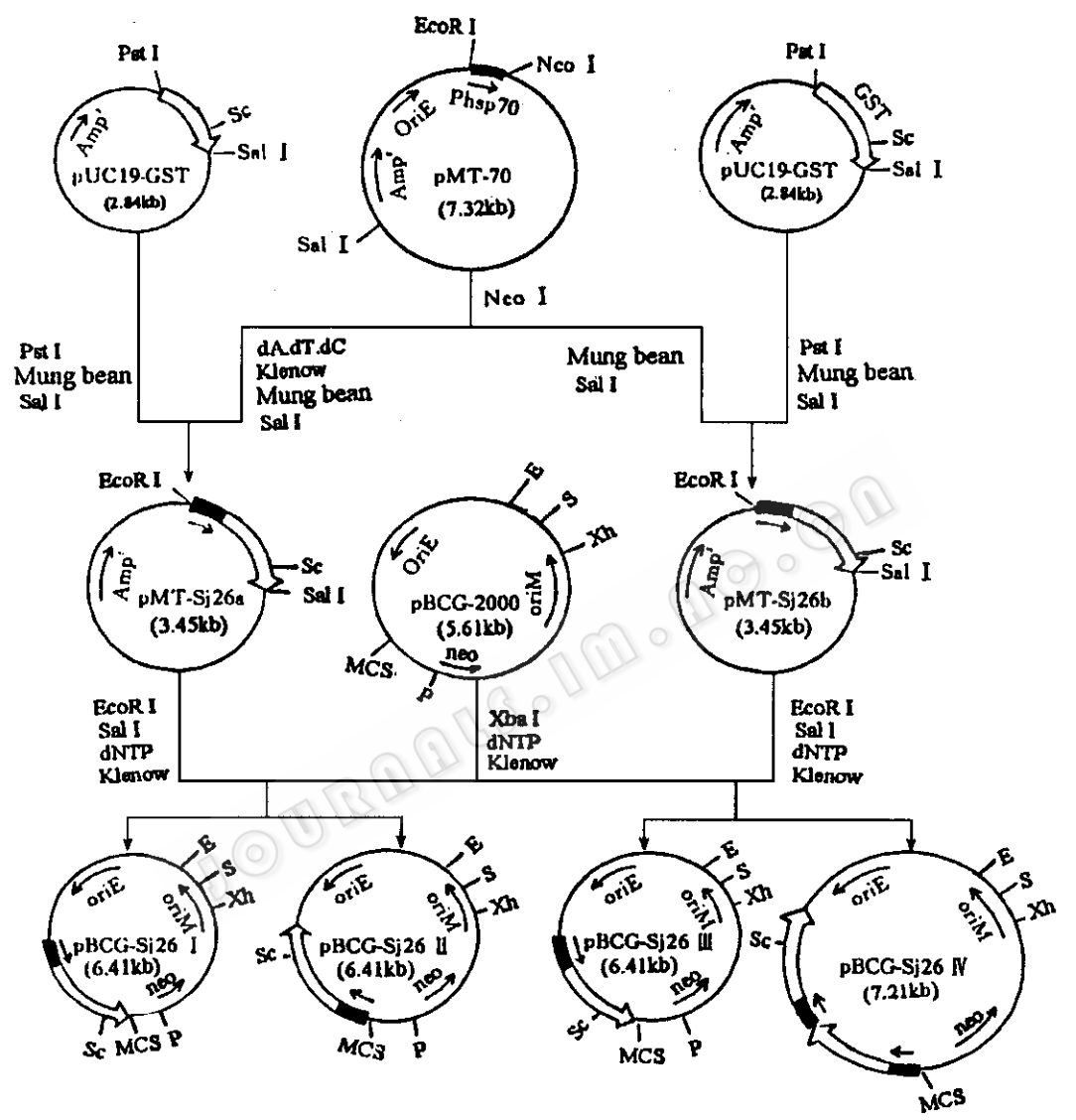


图 1 大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达载体 pBCG-Sj26 I~IV 的构建

Fig.1 Construction of *E. coli*-*mycobacteria* shuttle expression plasmid pBCG-Sj26 I~IV

MCS: Multiple cloning site, containing H: HindIII; B: BamHI; S: SalI; X: XbaI, E: EcoRI, Ev: EcoR V; Xh: XhoI; P: PstI, K: KpnI, Sm: SmaI, Sa: SacI; Sc: ScaI.
OriE: *E. coli* plasmid replicon, OriM: Mycobacterial plasmid replicon, Phsp 70: human *M. tuberculosis* heat shock protein 70, GST: Glutathione S-transferase gene.
MCS: 多克隆位点, 包括 H: HindIII; B: BamHI; S: SalI; X: XbaI; E: EcoRI; OriE 及 OriM 分别为大肠杆菌和分枝杆菌复制起始点, Phsp70: 人结核杆菌热休克蛋白 70 启动子, GST: 谷胱甘肽-S-转移酶基因。
⇒ 为 GST 基因, ■ 为 Phsp70。

启动子的质粒 pMT-70, 末端分别用 Mung Bean 核酸酶和 Klenow DNA 聚合酶、dCTP、dATP、dTTP 修饰, 用 SalI 切后回收 2.8kb 含人结核杆菌 HSP70 启动子的基因片段; 再用 Pst I 和 Sal I 切质粒 pUC19-GST, 得到编码 Sj26GST 的 DNA 片段(654bp), 末端用 Mung Bean 核酸酶修饰, 然后将所分离的两个片段连接重组, 得到重组质粒 pMT-Sj26a、pMT-Sj26b。该质粒中 HSP70 与 Sj26GST 融合编码基因完全取代分枝杆菌 pMT-70 中 HSP70 的编码基因, 两者 SD 序列不同。然后, 用 Xba I 切 *E. coli*-分枝杆菌穿梭质粒 pBCG-2000(图 2), 其中 EcoRI, XhoI, PstI 为 2 个酶切位点, 各酶切 DNA 片段大小理论值分别为: EcoRI 2620, 2994; XhoI 2355, 3259; PstI 4842, 772; HindIII, BamHI, XbaI 为单一酶切位点, 其 DNA 片段均为 5614bp, 得到一大片段, 末端用 Klenow DNA 聚合酶和 dNTP 单核苷酸修饰; 将质粒 pMT-Sj26a、pMT-Sj26b 用 EcoRI 和 SalI 双酶切, 得到含分枝杆菌 HSP70 的启动子及其控制下的 Sj26GST 基因的 800bp DNA 片段, 末端用 Klenow DNA 聚合酶和 dNTP 单核苷酸修饰, 然后分别在 T4 DNA 连接酶作用下与 pBCG-2000 进行连接, 最终筛选出四种大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG-Sj26 I~IV。酶切图谱见图 3。其中 XbaI, ScaI, BamHI, KpnI 均为单一酶切位点, pBCG-Sj26 I~III 酶切后 DNA 大小为 6410bp, pBCG-Sj26IV 酶切后 DNA 大小为 7210bp, EcoRI 为双酶切位点, pBCG-Sj26I-III 酶切后 DNA 大小为 3420bp 和 2990bp, pBCG-Sj26IV 酶切后 DNA 大小为 4220bp 和 2990bp。

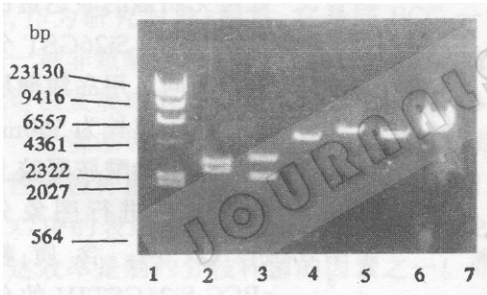


图 2 大肠杆菌-分枝杆菌穿梭载体 pBCG-2000 的酶切图谱分析

Fig.2 Restriction analysis of *E. coli*-*Mycobacteria* shuttle expression plasmid pBCG-2000

1. λ DN/HindIII; 2. pBCG-2000/EcoRI; 3. pBCG-2000/XhoI; 4. pBCG-2000/PstI; 5. pBCG-2000/HindIII; 6. pGEX(4900bp)/BamHI; 7. pBCG-2000/XbaI.

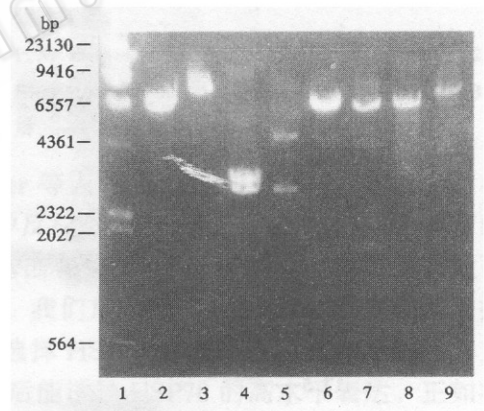


图 3 大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达载体 pBCG-Sj26II 和 PBCG-Sj26 IV 的酶切图谱分析

Fig.3 Restriction analysis of *E. coli*-*Mycobacteria* shuttle expression plasmid pBCG-Sj26

1. λ DN/Hind III; 2, 3. pBCG-Sj26II. IV/XbaI; 4, 5. pBCG-Sj26II. IV/EcoRI; 6, 7. pBCG-Sj26II. IV/BamHI + KpnI; 8, 9. pBCG-Sj26II. IV/ScaI.

2.1.2 四种穿梭表达质粒 Sj26GST 基因的 PCR 扩增: 以 pBCG-Sj26I~IV 为模板, 以下列寡核苷酸为引物:

5'-CCCGCTGCAGATGTCCCCTATACTAGGTTAT-3'

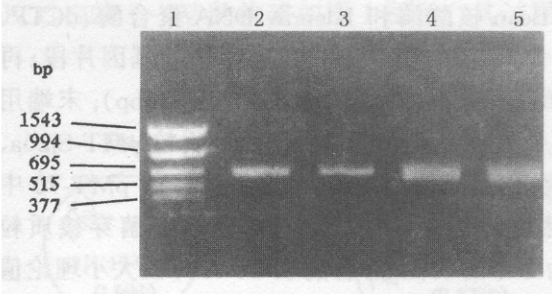


图 4 GST 编码基因的 PCR 扩增

Fig.4 PCR amplification of GST encoding gene

1.分子量标准;2~5. 分别以 pBCG-Sj26 I~IV 为模板的 GST 编码基因的 PCR 扩增产物

1.PCR molecular marker; 2~5. Amplified PCR products of GST encoding gene by using plasmid pBCG-Sj26 I~IV as templets respectively.

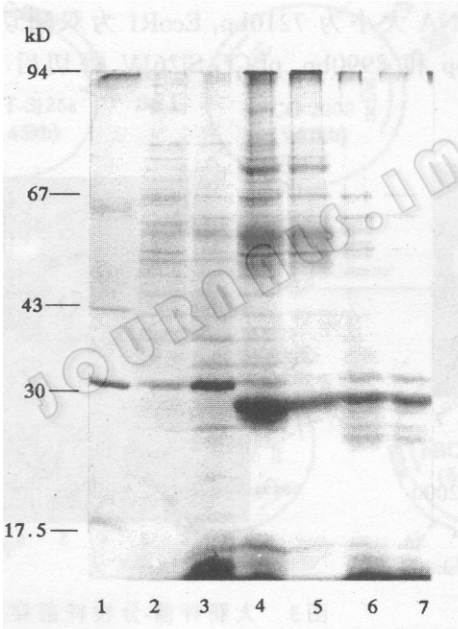


图 5 GST 基因在 *M. smegmatis mc*²155 中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE of Sj26GST expressed in *Mycobacteria smegmatis mc*² 155

1.分子量标准;2. 耻垢分枝杆菌菌体总蛋白;3. 含 pBCG-2000 的耻垢分枝杆菌的菌体总蛋白;4~7. 分别含 pBCG-Sj26IV, pBCG-Sj26III, pBCG-Sj26II; pBCG-Sj26 I 的耻垢分枝杆菌的菌体总蛋白

1. molecular marker; 2. Total bacterial protein of *M. smegmatis mc*² 155; 3. Total bacterial protein of *M. smegmatis mc*² 155 containing pBCG-2000; 4~7. Total bacterial protein of *M. smegmatis mc*² 155 containing pBCG-Sj26IV, pBCG-Sj26III, pBCG-Sj26II, pBCG-Sj26I, respectively.

5'-GTCGTCGACTTATTTTGGAG-GATGGTCGC-3'

PCR 扩增产物为 654bp 的 Sj26GST 全长序列, 含起始密码子 AUG 和终止密码子 UAA^[8]。与预期结果一致。PCR 产物琼脂糖电泳见图 4。结果表明 Sj26kD 基因已分别被克隆到 pBCG-Sj26I~IV 穿梭表达质粒中。

2.2 日本血吸虫 26kD 抗原在 *M. smegmatis* 中表达效率的比较及其含量测定

四种穿梭表达质粒在分枝杆菌中表达 Sj26GST 的情况见图 5。含质粒 pBCG-Sj26 I~IV 的耻垢分枝杆菌收菌前, 于

45℃ 水浴 30min, 进行诱导。经过 SDS-PAGE, 在分子量 26kD 处可见明显的表达蛋白带, 与天然 Sj26GST 分子量相同。用岛津薄层扫描仪于波长为 560nm 处对聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白带进行图象分析。表明, 含质粒 pBCG-Sj26GSTIV 的分枝杆菌表达 Sj26GST 的量最高, 占菌体总蛋白的 28%, 另外三种质粒的表达量占菌体总蛋白的 14%~18%, 结果见图 6。用 Lowry 法测分枝杆菌的菌体蛋白分别为 12g/L, 在含 pBCG-Sj26GST 的细菌中 Sj26GST 表达量每升菌体蛋白为 3.4g。

3 讨论

基因工程技术的应用促使疫苗的研究发展,作为疫苗载体,分枝杆菌有一定的优势,如:生产工艺简单、价廉、不需纯化及后期处理;性稳定易保存;可口服和注射两用;BCG 本身就是很好佐剂;一次接种可同时长期预防血吸虫病和结核病;BCG 是 WHO 规定全球婴儿出生后必须接种的两种疫苗之一,全国已建立接种网,在广大地区易于推广。这些优势使分枝杆菌载体疫苗较病毒、裸露 DNA 和沙门氏菌等载体疫苗更受青睐^[6]。目前已得到多种 BCG 疫苗,实验证明有较好的保护力。但分枝杆菌特殊的菌体成分,使很多能在其它菌属(如大肠杆菌)中简便易行的基因操作方法不能行之有效的用于分枝杆菌,限制了人们对它的有效利用。同时由于 BCG 生长缓慢,需 15~18h 一代,培养时间长,不易操作,因而我们用 *M. smegmatis* 这种生长相对较快、电转化效率较高的突变株,作为研究对象;而且,它是同 BCG 一样,也是一种非致病菌和强的细胞免疫佐剂,故将来也可被发展成为一种疫苗载体。

外源基因在分枝杆菌中的有效表达是基因工程分枝杆菌多价疫苗发挥作用的基础。Stover 等人^[7]发现破伤风毒素 C(Tox C)在 BCG 中的表达量低,不能激发机体产生免疫保护反应,可见提高外源基因在分枝杆菌的表达效率是制约分枝杆菌的因素之一。而外源基因在原核生物中的高效表达是由高效可控的启动子、适当的 SD 序列等因素共同决定的。我们用人结核杆菌 HSP70 启动子来控制日本血吸虫抗原基因在分枝杆菌中的表达。选择 HSP70 启动子作为调控元件是因为它属于细菌中高效启动子,且在被巨噬细胞吞噬后能诱导 HSP70 的高水平表达。正如在 *E. coli* 中的 *tac* 启动子可用 IPTG 来控制外源基因的表达一样,分枝杆菌的 HSP70 启动子也可通过加热或过氧化物诱导表达^[8]。这将增加载体在分枝杆菌中的稳定性,减少外源蛋白表达对宿主细胞生长产生的影响以及减少宿主细胞蛋白酶对所表达蛋白的降解作用。除了高效转录之外,指导蛋白质高效翻译的 SD 序列也很重要。SD 序列位于起始密码 AUG 上游 3~9 个核苷酸处,与 16SrRNA 3'端的序列互补,SD 序列的组成、它与 AUG 间的距离及其周围的序列对蛋白质的翻译起重要作用^[9]。为了探讨 SD 序列、外源基因的克隆方向和拷贝数对表达的影响,我们用人结核杆菌 HSP70 启动子和日本血吸虫抗原基因构建了四个不同的分枝杆菌表达载体,并对其在分枝杆菌中的表达作了比较。

从图 1 可见,pBCG-Sj26 I、II 和 pBCG-Sj26III、IV 之间的区别在于目的基因起始密码 ATG 与 HSP70 启动子内的 SD 序列长短不一样,质粒 I、II 较质粒 III、IV SD 序列长三个碱基,这三个碱基是质粒 pMT-70 NcoI 切后经 Klenow DNA 聚合酶加脱氧胞苷三磷

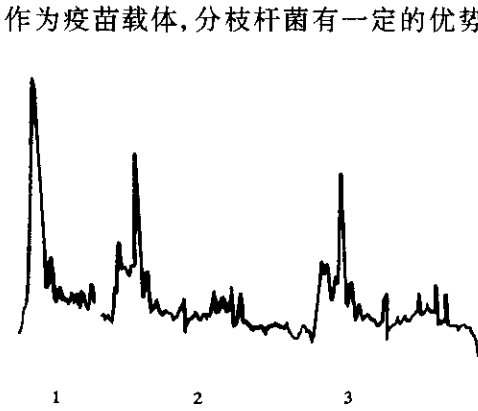


图 6 GST 基因在 *M. smegmatis mc² 155* 中表达后的 SDS-PAGE 薄层扫描分析

Fig.6 Quantification of expressed protein by densitometer scanning of the SDS-PAGE

1. 含 pBCG-Sj26IV 的耻垢分枝杆菌;2. 含 pBCG-Sj26 II 的耻垢分枝杆菌;3. 含 pBCG-Sj26III 的耻垢分枝杆菌。

1. *M. smegmatis mc² 155* containing pBCG-Sj26IV;2. *M. smegmatis mc² 155* containing pBCG-Sj26II;3. *M. smegmatis mc² 155* containing pBCG-Sj26III.

酸、脱氧腺苷三磷酸和脱氧胸苷三磷酸、(dCTP、dATP 和 dTTP)产生的 ,并与质粒 pUC19-GST Pst I 切后用 Mung Bean 核酸酶修饰所产生的脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)一起形成两个 ATG。质粒 I 与 III、质粒 II 与 IV 之间 HSP70-Sj26 的插入方向相反 ,其中质粒 IV 为反向双拷贝。通过 PCR 和酶切图谱(图 2、图 3)分析 ,结果与预期一致。以四种质粒为模板 ,经 PCR 扩增出大小为 654bp 的 DNA 片段 ,pBCG-Sj26 II 和 pBCG-Sj26IV 的比较可见后者较前者分子量大 ,EcoR I 和 Sca I (Sj26GST 基因有一个位点)切后的两个片段的电泳图证实了 pBCG-Sj26IV 中的双拷贝 HSP70-Sj26。将分枝杆菌 pBCG-Sj26 I~IV 分别电转化 *M. smegmatis* mc²155 得到表达 Sj26GST 的分枝杆菌疫苗。所表达的天然重组 Sj26GST(rSj26GST)为可溶性蛋白 ,分子量为 26kD 处可见明显的表达蛋白带。提示生长缓慢的人结核杆菌 HSP70 的启动子能被快速生长的 *M. smegmatis* RNA 聚合酶所识别。含质粒 IV 的 *M. smegmatis* 表达效率最高 ,通过薄层扫描分析 ,其表达效率占菌体总蛋白的 28% ,其余三种质粒转化的细菌的表达效率无明显差异 ,占菌体总蛋白的 14%~18%。Hantzopoulos 等人用 N2 逆转录病毒双拷贝载体(double-copy ,DC)表达腺苷脱氨酶 ,发现其转录和表达效率明显强于单拷贝载体^[10]。本实验说明 :外源基因在 *M. smegmatis* 中的表达与其拷贝数有关 ,而与克隆的方向无明显关系。人结核杆菌 HSP70 启动子与目的基因之间的 SD 序列的 3 个碱基改变 ,对表达的影响不大。

研究了 SD 序列、外源基因的克隆方向和拷贝数对表达的影响 ,为外源基因在分枝杆菌中的表达提供了依据。而启动子、转录终止序列和菌属间“密码偏爱”对分枝杆菌表达的影响尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Matsuo K ,Ymaguchi R ,Yamazaki A *et al.* *J Bacteriol* ,1988 ,**170** :3847~3854.
- [2] Huangfu Y M ,Zhang D J ,Cheng J Z *et al.* *Journal of Tongji Medical University* .1995 ,**15** (3) :138~142.
- [3] 程继忠 ,皇甫永穆 ,梁驹卿等. *同济医科大学学报* ,1996 ,**25** (3) :173~179.
- [4] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989 :97~118.
- [5] Horwitz M A ,Lee B W E ,Dillon B J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1995 ,**92** :1530~1534.
- [6] Stover C K ,Bansak G P ,Hanson M S *et al.* *J Exp Med* ,1993 ,**178** :197~209.
- [7] Stover C K ,de la Cruz V F ,Fuerst T R *et al.* *Nature* ,1991 ,**351** :456~460.
- [8] Aldovini A ,Young R A. *Nature* ,1991 ,**351** (6) :479~482.
- [9] Shine J ,Dalgarno L. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1974 ,**71** (4) :1342~1346.
- [10] Hantzopoulos P A ,Sullenger B A ,Ungers G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1989 ,**86** :3519~3523.

STUDY OF HSP70 GENE UPSTREAM REGULATION ELEMENT ON EXPRESSION EFFICIENCY OF GST GENE IN *M. SMEGMATIS*

Cheng Jizhong Huangfu Yongmu Hai Tao Liang Juqing Xiao Hong

(Department of Medical molecular Biology , Research Center of Experimental Medicine ,
Tongji Medical University , Wuhan 430030)

Abstract Four different experssion vectors were constructed by cloning foreign gene which encode *Schistosoma japonicum* 26kD antigen (Sj26GST) into *Escherichia coli*-*Mycobacteria* shuttle plasmid pBCG-2000 and investigated their expression efficiency in mycobacteria smegmatis. The plamid which contains promoter of human mycobacterial tuberculosis heat shock protein 70 was firstly digested with Nco I and modified with two different ways to lead to two kinds of SD sequences , and ligated with Sj26GST encoding gene. Then ,the DNA fragment contained HSP70 promoter and Sj26GST gene was obtained and cloned into *E. coli*-*mycobacteria* shuttle plasmid pBCG-2000 ,and finally four recombinant mycobacterial expression vectors that differenciatiated in SD seugence , orientation and copy number were selected. The expressed native recombinant Sj26GST(rSj26GST) was solube and could be observed on SDS-PAGE about at the molecular weight of 26kD obviously. Analysis with protein density scanning indicated :the expression efficiency that contaning double-copy promoter-foreign gene vector was the highest and the expressed protein which was about 1.6 times than others was 28% of total protein of *Mycobacteria smegmatis* . The cloned direction and SD sequence had no significant effect on expression efficiency.

Key words Upstream regulation sequence , Expression efficiency , *Mycobacteria* , Glutathione S-transferase gene

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39480022)