

基于谷氨酸棒杆菌 NCgl1221 蛋白的新型细菌表面展示系统

姚文娟¹, 范文俊¹, 许小乐¹, 张伟^{1*}, 邓小昭^{2*}

¹南通大学医学院药理学系, 南通 226001

²南京军区疾病预防控制中心, 南京 210002

摘要: 【目的】开发一种新型的大肠杆菌表面展示系统, 为 C 末端截短 NCgl1221 蛋白作为锚定蛋白提供科学依据, 丰富并优化细菌表面展示系统。【方法】扩增 C 末端截短 NCgl1221 序列和 β -淀粉酶基因, 构建融合蛋白表达载体。将重组载体 PET-NA 和空载体 PET-28a 分别转入 Rosetta(DE3) pLysS 中, IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定融合蛋白表达情况。将诱导表达菌株进行免疫荧光染色, 荧光显微镜观察和流式细胞分析检测 β -淀粉酶的展示。酶活测定和淀粉水解分析验证被展示 β -淀粉酶的活性。【结果】融合蛋白成功地在大肠杆菌中表达, 有活性的 β -淀粉酶通过与锚定蛋白 C 末端的融合被展示在了宿主菌表面, 展示 β -淀粉酶的重组菌可以水解利用培养基中的淀粉。【结论】成功开发了一种以 C 末端截短 NCgl1221 为锚定蛋白的新型大肠杆菌表面展示系统, 并以此系统展示了分子量大小为 56 kDa 的活性酶, 为该系统在全细胞催化剂或吸附剂等方面的应用奠定了基础。

关键词: 谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*), β -淀粉酶, 细菌表面展示, NCgl1221

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 02-0177-07

细菌表面展示技术通过 DNA 重组技术将外源蛋白质展示于细菌表面, 是继噬菌体表面展示之后发展起来的一种微生物表面展示技术。细菌表面展示技术于 1986 年由 Freudl 等人首次报道, 近几年来该技术被广泛地应用于生物催化剂、细胞吸附、文库构建和筛选等多项生物技术与工业用途^[1-4]。细菌表面展示系统包括革兰氏阳性菌表面展示和革兰氏阴性菌表面展示, 虽然革兰氏阳性菌细胞壁较厚, 易于操作, 并且外源蛋白质只需通过单个质膜层, 但是早期的研究多集中在革兰氏阴性菌中, 因为多数革兰氏阴性菌, 如大肠杆菌和沙门氏菌的遗传背景比较清楚, 便于控制蛋白质的展示^[5]。在大肠杆菌表面展示系统中, 外膜蛋白、脂蛋白、表面附属物等

都被作为锚定蛋白用于外源蛋白质的表面展示^[5-7]。近几年研究较多的有冰晶核蛋白 (Ice nucleation protein, INP) 和自体转运蛋白 (Autotransporter proteins, ATs), 这两类锚定蛋白虽然能够展示分子量较大且结构复杂的外源蛋白质^[5, 8-9], 但也有其自身的缺点。冰晶核蛋白所展示的外源蛋白种类有限, 主要用于某些真核表面蛋白的展示, 而自体转运蛋白的锚定系统缺乏稳定性, 锚定机制尚存争议, 并且该蛋白大多数来自致病细菌的毒力因子, 缺乏一定的生物安全性^[14]。因此需要开发新的锚定蛋白, 以进一步优化细菌表面展示系统。

谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是一种广泛用于食品工业的微生物, NCgl1221 蛋白是

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 国家“863 计划”(2006AA020301); 国家自然科学基金项目 (30972628)

* 通信作者。Tel: + 86-513-85051728; E-mail: zwei@ntu.edu.cn; njstdyd@163.com

作者简介: 姚文娟 (1983-), 女, 江苏南通人, 讲师, 博士, 从事微生物与生物制药研究。E-mail: juanwenyy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-09-07; 修回日期: 2011-11-14

该菌的跨膜蛋白,主要用于谷氨酸的转运^[10]。研究证实,NCgl1221 蛋白有四个跨膜区,主要位于蛋白质多肽链的 N 端^[11]。NCgl1221 蛋白有多种突变体,其中包括编码 423 个氨基酸的 C 末端截短 NCgl1221 蛋白,C 末端的缺失并没有影响 NCgl1221 蛋白的跨膜结构和功能^[10],说明 NCgl1221 的 N 端跨膜区具有较强且稳定的锚定功能,符合作为细菌表面展示技术锚定蛋白的条件。本研究以截短 NCgl1221 为锚定蛋白,构建了一种安全且稳定的新型细菌表面展示系统,并成功地在大肠杆菌表面展示了 β -淀粉酶。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 和大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存,大肠杆菌 Rosetta (DE3) pLysS 和 PET-28a 载体购自 Novagen 公司。

谷氨酸棒杆菌于 30℃ 在 LB 培养基中通氧培养。质粒 pMD-cAmylase (含有 β -淀粉酶基因) 由邓小昭研究员惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器:基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、四唑硝基蓝 (NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐 (BCIP) 均购自 Promega 公司。Ex-Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶 *Nde* I、*Bam*HI、*Hind*III 以及 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。DNA 凝胶回收试剂盒和预染蛋白质标准均购自 MBI 公司。鼠抗 FLAG M2 抗体为 Sigma 公司产品,碱性磷酸酶交联的羊抗鼠 IgG 购自 Promega 公司,Alexa Fluor 488 交联的羊抗鼠 IgG (H + L) 为 Molecular Probes 公司产品。引物均由上海英俊公司合成。其它试剂均为国产和进口分析纯。MF51 荧光倒置显微镜 OLYMPUS 产品。流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2 C-末端截短 NCgl1221 序列的扩增

1.2.1 引物:表 1 为本研究中使用的引物。

表 1 PCR 反应中所用的引物

Table 1 Primers used for amplifying the PCR products

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size/bp	Restriction site underlined
N1	5'-GTTGTT <u>CATATGCGT</u> TATTATCAAG-3'	24	<i>Nde</i> I
N2	5'-CACCGTAGTGGGCACTGTCATC-3'	22	
N2a	5'-GCTGCCACCTCCACCGCTACCGCCGCTCCACCGTAGTGGGCACTGTCATC-3'	52	
N2b	5'-GTTGTTGGATCCGCTGCCACCTCCACCGC-3'	29	<i>Bam</i> HI
N3	5'-GTTGTTGGATCCATGGCTCCAATCCCCGG-3'	29	<i>Bam</i> HI
N4a	5'-CTTATCGTCATCCTTGTAAATCTCAATCAAACGGGTTTG-3'	41	
N4b	5'-GTTGTGAAGCTTCTTATCGTCGTCATCCTTG-3'	31	<i>Hind</i> III

1.2.2 C-末端截短 NCgl1221 序列的扩增:提取谷氨酸棒杆菌 ATCC 13869 的基因组 DNA,并以此 DNA 为模板,使用 PCR 方法扩增出 C 末端截短 NCgl1221 序列,引物 N1 引入酶切位点 *Nde* I。PCR 条件为:95℃ 30 s,58℃ 40 s,72℃ 1 min 15 s,26 个循环;72℃ 5 min。PCR 产物割胶回收,再以此为模板,N1 和 N2a 为引物进行 PCR 扩增,利用 N2a 引物引入连接肽序列 (Gly4Ser)₂^[12],PCR 条件为:95℃ 30 s,52℃ 50 s,72℃ 1 min 15 s,30 个循环;72℃ 5 min。以引入连接肽序列的 PCR 产物为模板,使用引物 N1 和 N2b 进行扩增,引物 N2b 引入酶切位点 *Bam*HI,PCR 条件为:95℃ 30 s,56℃ 40 s,72℃ 1 min 26 个循环;72℃ 5 min。终产物经割胶回收,命名为 NL。

1.2.3 β -淀粉酶基因的扩增:以质粒 pMD-

cAmylase 为模板,N3 和 N4a 为引物进行 PCR 扩增,N3 引入酶切位点 *Bam*HI,N4a 引入 FLAG 标签 (DYKDDDDK)。PCR 条件为:95℃ 30 s,53℃ 50 s,72℃ 1 min 30 s,30 个循环;72℃ 5 min。再以 PCR 产物为模板,N3 和 N4b 为引物进行扩增,N4b 引入酶切位点 *Hind*III。PCR 条件为:95℃ 30 s,58℃ 40 s,72℃ 1 min 30 s,26 个循环;72℃ 5 min。终产物经割胶回收,命名为 AF。

1.3 表达载体的构建和鉴定

通过 *Nde* I、*Bam*HI 和 *Hind*III 限制酶切位点分别将 PCR 产物 NL 和 AF 双酶切后连入表达载体 PET-28a 中,将连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α 进行扩增,50 mg/L 卡那抗性进行筛选,随机挑选菌落进行菌落 PCR 鉴定,并进行酶切鉴定,送上海英俊有限公司测序。测序正确的质粒命名为 PET-NA。

1.4 蛋白表达的 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定

将质粒 PET-28a 和 PET-NA 分别转入表达菌株 Rosetta (DE3) pLysS 中, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 于 18°C 诱导培养。转入 PET-28a 的重组菌为阴性对照。收集菌体进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定融合蛋白的表达情况, 一抗为 1:5 000 浓度稀释的鼠抗 FLAG M2 抗体, 二抗为 1:5 000 浓度稀释的碱性磷酸酶交联的羊抗鼠 IgG 抗体。具体方法参见 Cao^[12] 等的研究。

1.5 免疫荧光显微镜观察

将诱导 10 h 的重组菌离心收集菌体, 并将菌体重悬于含 10 g/L 牛血清白蛋白的 PBS 中, 使 OD_{600} 为 1.0, 于室温放置 30 min, 再加入一抗 (1:500 浓度稀释的鼠抗 FLAG 抗体), 室温放置 1.5 h。PBS 洗涤菌体后, 加入二抗 (1:300 浓度稀释的 Alexa Fluor 488 交联的羊抗鼠 IgG), 室温放置 1.5 h。最后将菌体用 PBS 洗涤 5 次, 置于荧光倒置显微镜下观察, 激发波长为 494 nm。

1.6 流式细胞分析

诱导 10 h 的重组菌株按照 1.6 方法进行免疫荧光染色, 并稀释成 10^6 细胞/毫升后在流式细胞仪上进行分析, 该仪器装备有 15-mW、488-nm 的制冷氩离子激光器。流速为 100–300 细胞/秒, 530 nm 的带通滤片用来收集绿色荧光 (FL1 通道)。

1.7 β -淀粉酶活性测定

离心收集不同诱导时间的菌液和重组菌体, 测定 OD_{600} 值, 并将菌体重悬于 1 mL ddH₂O 中, 用于检测全细胞催化剂的 β -淀粉酶活性。取 5 mL 浓度为 2% (w/v) 的可溶性淀粉溶液, 加入 1 mL 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) 混匀, 37°C 放置 5 min。在混合物中加入 100 μ L 的菌液, 37°C 放置 30 min。混合物煮沸 10 min 以终止反应, 用 DNS 法测定产生的还原糖量。一个酶活力单位定义为在上述反应条件下每小时水解淀粉释放 1 mg 麦芽糖所需要的酶量。

1.8 重组菌水解淀粉分析

将经诱导的重组菌接种至 100 mL 含终浓度为 15 g/L 可溶性淀粉的 LB 培养基中, 置于 250 mL 摇瓶中 37°C 培养。于不同培养时间离心取培养基上清, 用于检测总糖量即淀粉水解情况。总糖量的测定采用苯酚-硫酸法, 该法先将培养基中的多糖水解成单糖, 单糖再与苯酚生成橙黄色化合物, 通过比色法测定, 具体方法参见 Dubois 等人的报道^[13]。

2 结果

2.1 重组载体的构建

利用 PCR 方法分别扩增出带有连接肽的 C 末端截短 NCgl1221 序列和带有 FLAG 标签的 β -淀粉酶基因序列, 这两个序列的大小分别为 1300 bp 和 1524 bp。将这两段序列分别经 *Nde* I–*Bam*HI 和 *Bam*HI–*Hind*III 双酶切后装入 PET-28a 载体, 构建重组表达载体 PET-NA。重组质粒 PET-NA 经酶切鉴定后可分别得到 1300 bp 和 1524 bp 的条带, 说明两段 DNA 序列已装入 PET-28a 中。测序结果也进一步证实, 重组表达载体 PET-NA 构建成功。

2.2 融合蛋白的表达及鉴定

将重组载体 PET-NA 导入表达菌株 Rosetta (DE3) pLysS 中进行诱导表达, 以空载体 PET-28a 导入菌株作为阴性对照。重组菌株于 18°C 诱导培养, 0 h、4 h、10 h 离心取菌体, 裂解菌体进行全菌蛋白的 SDS-PAGE 鉴定。带有连接肽的 C 末端截短 NCgl1221 蛋白的分子量大小为 48 kDa, 带有 FLAG 标签的 β -淀粉酶的分子量大小为 56 kDa, 因此, 融合蛋白的分子量大小应为 104 kDa。结果显示, 导入空载体的重组菌株检测不到蛋白质的表达, 导入重组载体 PET-NA 的重组菌在诱导后 4 h 和 10 h 均能检测到融合蛋白质的表达, 在 104 kDa 处出现明显的

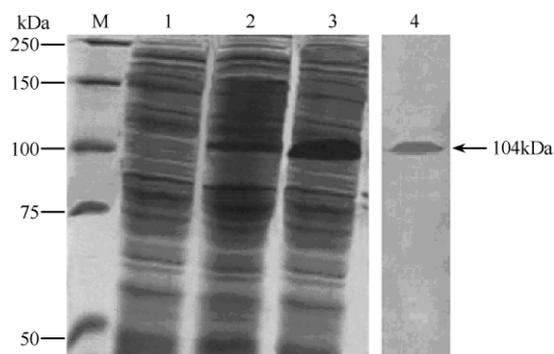


图1 融合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

Fig. 1 The SDS-PAGE and Western blot analysis of the fusion protein. M, marker proteins with the sizes shown. 1, *E. coli* cells transformed with PET-NA without IPTG induction; 2, *E. coli* cells transformed with PET-NA after 4 h of IPTG induction; 3, *E. coli* cells transformed with PET-NA after 10 h of IPTG induction; 4, Western blot analysis of the fusion protein using the primary mouse anti-FLAG M2 and the secondary goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase.

蛋白表达条带(见图1),与预期理论值相符。诱导后4 h检测到的蛋白条带较弱,而诱导后10 h蛋白质表达量明显增加,出现较浓的蛋白条带(见图1)。进一步进行 Western blot 检测,结果显示,在预期大小的位置出现明显的条带(见图1),说明该融合蛋白成功地在大肠杆菌中得到表达。

2.3 β -淀粉酶在大肠杆菌表面的展示

为证实 β -淀粉酶在大肠杆菌表面表达和展示,采用免疫荧光和流式细胞分析进行鉴定。前述实验结果表明,诱导 10h 后的融合蛋白表达量较高,因此选择诱导 10h 的重组菌进行免疫荧光和流式细胞分析。收集重组菌进行免疫荧光染色,采用一抗鼠抗 FLAG 抗体和二抗 Alexa Fluor 488 交联的羊抗鼠 IgG,并以同样染色的 PET-28a 导入菌株作为阴性对照。荧光倒置显微镜观察结果显示(图2),导入 PET-NA 的重组菌经诱导后能被一抗和二抗免疫标记上,并发出绿色荧光,而阴性对照在激发波长下不发荧光,说明带有 FLAG 标签的 β -淀粉酶在大肠杆菌表面得到了正确的表达和展示。为进一步确认 β -淀粉酶的表面展示,将免疫标记好的细菌进行流

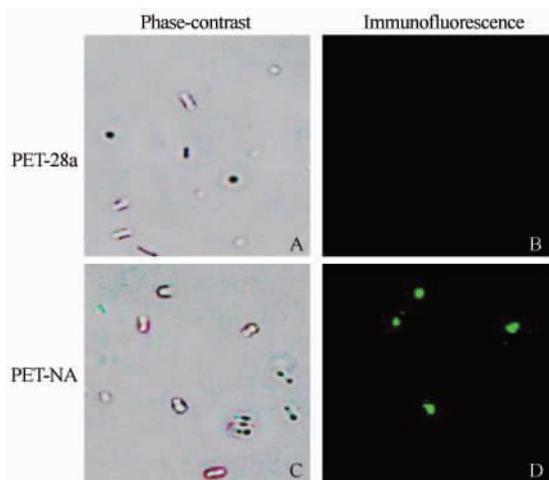


图2 荧光显微镜观察 β -淀粉酶在大肠杆菌表面的展示
Fig.2 The display of β -amylase on *E. coli* cell surface as observed by fluorescence microscopy (400 \times). A: the phase-contrast micrograph of *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS cells harboring PET-28a; B: the immunofluorescence micrograph of *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS cells harboring PET-28a; C, the phase-contrast micrograph of *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS cells harboring PET-NA; D, the immunofluorescence micrograph of *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS cells harboring PET-NA. Cells were labeled with mouse anti-FLAG M2 antibody, followed by Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG.

式细胞分析,结果显示(图3),导入 PET-NA 重组菌的荧光强度要明显强于阴性对照菌株,该结果进一步说明了导入 PET-NA 的重组菌成功地被一抗和二抗标记, β -淀粉酶在大肠杆菌表面正确地表达和展示,和免疫荧光结果一致。由此可见, C 末端截短 NCgl1221 蛋白具有较强的锚定结构域,可在大肠杆菌中作为载体蛋白用于展示外源蛋白质。

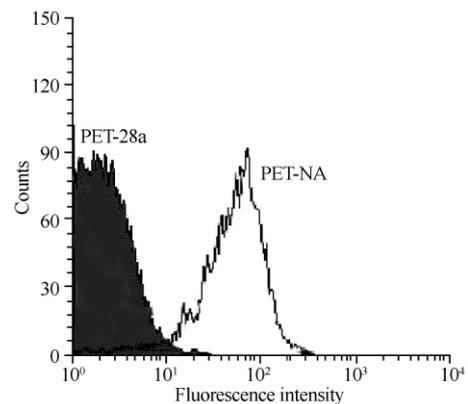


图3 重组大肠杆菌的流式细胞分析

Fig.3 Flow cytometric analysis of recombinant *E. coli* cells. Cells were labeled with mouse anti-FLAG M2 antibody, followed by Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG. Shaded area cells harboring the empty plasmid PET-28a; Unshaded area cells harboring the plasmid PET-NA.

2.4 重组菌 β -淀粉酶活性的测定

为验证展示于大肠杆菌表面的 β -淀粉酶是否具有活性,收集 IPTG 不同诱导时间的重组菌进行全细胞酶活测定。结果如图4所示,导入 PET-NA

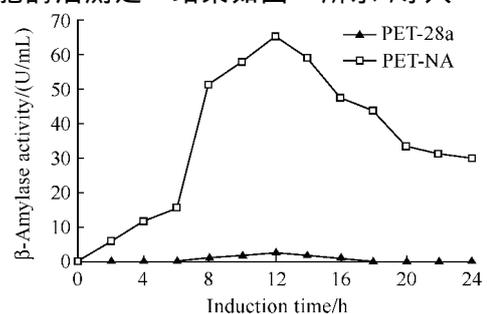


图4 不同诱导时间下重组菌的 β -淀粉酶活性

Fig.4 The activity of β -amylase displayed on the *E. coli* cell surface under different induction time. The recombinant *E. coli* cells harboring PET-28a (diamonds) or PET-NA (squares) were collected every 2 h after IPTG induction to determine β -amylase activity. The activity was quantitatively measured by the DNS method. The data points represent the mean value and standard deviation of three independent experiments.

的重组菌在整个诱导时间中均显示较高的 β -淀粉酶活性, 而导入空载体 PET-28a 的重组菌则没有检测到 β -淀粉酶活性, 说明展示于大肠杆菌表面的 β -淀粉酶具有正确的折叠方式和构象。随着诱导时间的延长, 导入 PET-NA 重组菌的 β -淀粉酶活性也逐渐增强, 直至诱导 12 h 后达到最高活性 64.6 ± 4.1 U/mL, 随后酶活性有所下降, 在诱导 20 h 后酶活性基本达到平稳。同时, 对残余菌液进行 OD_{600} 值测定, 以观察融合蛋白的表达对大肠杆菌生长的影响。导入 PET-NA 的重组菌在诱导 0 h、8 h、16 h 和 24 h 的 OD_{600} 分别为 0.25 ± 0.3 、 3.4 ± 0.5 和 3.0 ± 0.6 , 导入空载体的重组菌分别为 0.28 ± 0.3 、 4.0 ± 0.7 和 3.7 ± 0.4 。

2.5 重组菌水解淀粉分析

为进一步验证重组大肠杆菌具有水解淀粉的能力, 我们将 IPTG 诱导 12 h (酶活力较高) 的重组菌在含可溶性淀粉的培养基中进行培养, 并定量检测培养基中总糖量的变化。结果如图 5 所示, 表面展示活性 β -淀粉酶的重组大肠杆菌表现出较高的淀粉水解活性, 培养基中的总糖量在培养 3 h 后有明显的下降, 培养 12 h 后残余糖量为 5.8 ± 1.6 g/L。对照组导入空载体 PET-28a 的重组菌仅显示微弱的淀粉水解, 培养 12 h 后仍有大量残余的糖, 残余总糖量为 12.2 ± 0.8 g/L。

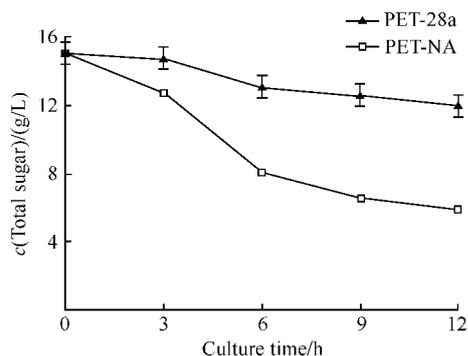


图 5 重组大肠杆菌水解淀粉情况

Fig. 5 Starch hydrolysis profile by recombinant *E. coli*. The recombinant *E. coli* cells harboring PET-28a (diamonds) or PET-NA (squares) were cultured in 100 ml LB medium with 15 g/L starch at 37°C. The medium was collected every 3 h to determine the amount of total sugar. The data points represent the mean value and standard deviation of three independent experiments.

3 讨论

细菌表面展示技术能够在活细菌表面表达外源

重组蛋白质或多肽, 在微生物学、分子生物学、免疫学和生物工艺学等方面都有重要的应用价值, 而大肠杆菌是该技术中最常使用的宿主菌株。目前, 研究人员已经开发出多种类型的锚定蛋白用于大肠杆菌的表面展示, 如外膜蛋白 Omp1、OmpC、OprF、PgsA, 以及脂类蛋白 INP、Lpp-OmpA 等^[14]。外膜蛋白是大肠杆菌表面展示系统中应用最广泛的一种锚定蛋白, 因为其展示外源蛋白的种类较其它锚定蛋白多^[14]。在绝大部分大肠杆菌表面展示系统中, 目的蛋白均融合于锚定蛋白的 C 端进行表达和展示, 因为 C 末端融合可以表达分子量较大的外源蛋白, 例如: INP、PgsA、Omp1 均可以展示分子量大于 50 kDa 的目地蛋白^[14], 这就大大扩展了大肠杆菌表面展示的应用范围。

本研究开发了一种 C 末端融合的新型大肠杆菌表面展示系统, 该系统以跨膜蛋白 NCgl1221 的突变体-C 末端截短 NCgl1221 为锚定蛋白。NCgl1221 蛋白是一种来自食品工业微生物的膜蛋白, 具有较好的生物安全性。表面展示系统中的锚定蛋白必须具有锚定功能较强的结构域, NCgl1221 蛋白是一种跨膜蛋白, 并且其 C 末端缺失的突变体仍然具有稳定的跨膜结构^[10], 说明 NCgl1221 蛋白的 N 端跨膜区具有较强的锚定功能, 能够将外源蛋白稳定地锚定于细胞表面, 符合作为细菌表面展示技术锚定蛋白的条件。因此, 我们将分子量大小为 56 kDa 的 β -淀粉酶作为目的蛋白, 融合于截短 NCgl1221 蛋白的 C 末端进行表达和展示, 在截短 NCgl1221 蛋白和 β -淀粉酶之间装有连接肽序列, 以便两个蛋白可以各自充分折叠, β -淀粉酶末端连有 FLAG 标签, 用于分析酶的表面展示。SDS-PAGE 和 Western blot 结果均显示融合蛋白成功地在大肠杆菌中表达, 免疫荧光和流式细胞分析进一步证实了融合蛋白的表达, 并显示 β -淀粉酶在大肠杆菌表面得到正确的表达和展示, 说明 C 末端截短 NCgl1221 蛋白可以作为锚定蛋白用于大肠杆菌的表面展示, 其跨膜结构并没有因为融合外源蛋白而受到影响。对重组菌 OD_{600} 值的测定结果表明, 融合蛋白的表达对大肠杆菌生长有抑制作用, 尤其是诱导培养 16 h 后, 表达融合蛋白的重组菌的 OD_{600} 值明显低于对照菌株, 这可能是由于融合蛋白在大肠杆菌细胞膜上的大量表达对其生长产生了抑制作用。为进一步验证展示出的 β -淀粉酶是否具有活性, 我们对重组菌全细胞的酶

活性进行了检测,同时检测了重组菌在培养过程中水解利用淀粉的情况。随着 IPTG 诱导时间的延长,β-淀粉酶活性也逐渐增加,因为 β-淀粉酶的表达量得到增强,诱导 12 h 时活性达到最高,随后酶活性减弱并趋于平稳,可能原因是融合蛋白在细胞膜上的表达受到限制,以及细菌的代谢产物或培养基中的某些离子在长时间培养过程中抑制了 β-淀粉酶的活性。在淀粉水解分析中,我们选择了 β-淀粉酶活性较高的重组菌株,和对照菌株相比,重组菌能大量水解淀粉,培养 12 h 后重组菌的残余糖量仅是对照菌的 1/2,说明展示 β-淀粉酶的重组菌能大量水解淀粉并利用水解产物麦芽糖,培养基中的总糖量明显下降,因而新型表面展示系统是成功的。对照菌株也有微弱的淀粉水解,可能是由于培养过程中产生的热量使部分淀粉发生了水解。

总之,本研究开发了一种新的以 C 末端截短 NCgl1221 为锚定蛋白的大肠杆菌表面展示系统,成功地将有活性的 β-淀粉酶展示在了大肠杆菌表面,该系统可以展示分子量大于 55 kDa 的目的蛋白。本研究不仅开发了一种新的锚定蛋白,并且构建了安全而稳定的大肠杆菌表面展示系统。

参考文献

- [1] Freudl R , MacIntyre S , Degen M , Henning U. Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Molecular Biology* , 1986 , 188 (3) : 491-494.
- [2] Benhar I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances* , 2001 , 19 : 1-33.
- [3] Tateno T , Fukuda H , Kondo A. Production of L-Lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying α-amylase on its cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2007 , 74 (6) : 1213-1220.
- [4] Thai CK , Dai H , Sastry MSR , Sarikaya M , Schwartz DT , Baneyx F. Identification and characterization of Cu₂O- and ZnO-binding polypeptides by *Escherichia coli* cell surface display: toward an understanding of metal oxide binding. *Biotechnology and Bioengineering* , 2004 , 87 (2) : 130-137.
- [5] Samuelson P , Gunneriusson E , Nygren PA , Ståhl S. Display of proteins on bacteria. *Journal of Biotechnology* , 2002 , 96 (2) : 129-154.
- [6] He MX , Feng H , Zhang YZ. Construction of a novel cell-surface display system for heterologous gene expression in *Escherichia coli* by using an outer membrane protein of *Zymomonas mobilis* as anchor motif. *Biotechnology Letters* , 2008 , 30 (12) : 2111-2117.
- [7] Yim SK , Kim DH , Jung HC , Pan JG , Kang HS , Ahn T , Yun CH. Surface display of heme- and diflavin-containing cytochrome P450 BM3 in *Escherichia coli*: a whole cell biocatalyst for oxidation. *Journal of Microbiology and Biotechnology* , 2010 , 20 (4) : 712-717.
- [8] Nishimura K , Tajima N , Yoon YH , Park SY , Tame JR. Autotransporter passenger proteins: virulence factors with common structural themes. *Journal of Molecular Medicine* , 2010 , 88 (5) , 451-458.
- [9] 郭恒,刘娟,李慧萍,王学林,孙树民,张茂林,高丽芳,徐德启,刘明远. 基于冰核蛋白的狂犬病毒糖蛋白细菌表面展示. *动物医学进展 (Progress in Veterinary Medicine)* 2010 31(S):51-54.
- [10] Nakamura J , Hirano S , Ito H , Wachi M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Applied Environmental Microbiology* , 2007 , 73 (14) : 4491-4498.
- [11] Yao WJ , Deng XZ , Liu M , Zheng P , Sun ZH , Zhang Y. Expression and localization of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 protein encoding an L-glutamic acid exporter. *Microbiological Research* , 2009 , 164 (6) : 680-687.
- [12] Cao P , Zhang SQ , Zhang J , Wang M. Construction and characterization of a bi-functional EGFP/sBAFF fusion protein. *Biochimie* , 2006 , 88 (6) : 629-635.
- [13] Dubois M , Gilles KA , Hamilton JK , Reberse PA , Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* , 1956 , 28 (3) : 350-356.
- [14] Bloois EV , Winter RT , Kolmar H , Fraaije MW. Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* , 2011 , 29 (2) : 79-86.

A novel bacterial cell-surface display system based on NCgl1221 from *Corynebacterium glutamicum*

Wenjuan Yao¹, Wenjun Fan¹, Xiaole Xu¹, Wei Zhang^{1*}, Xiaozhao Deng^{2*}

¹ Department of Pharmacology, Nantong University Medical College, Nantong 226001, China

² Center of Disease Prevention and Control, Nanjing Command, Nanjing 210002, China

Abstract: [Objective] To develop a novel *Escherichia coli* cell surface display system by using C-terminally truncated NCgl1221 as the anchoring protein, which greatly enriched or optimized the bacterial displayed systems. [Methods] We amplified the sequence of C-terminally truncated NCgl1221 and β -amylase, and constructed the fusion expression vector. Then we transformed the recombinant plasmids PET-NA and PET-28a into Rosetta (DE3) pLysS. The fusion protein expression was induced by IPTG and identified by SDS-PAGE and Western blot analysis. The IPTG induced strains were immunostained and investigated by fluorescence microscope and flow cytometry to detect the displayed β -amylase. Finally, we analyzed the activity of β -amylase and starch hydrolyzation in order to determine whether the displayed β -amylase has the activity or not. [Results] The fusion protein was successfully expressed in *E. coli*, and the active β -amylase was displayed on the cell surface by fusing it to the C terminus of the anchor. The recombinant strain displaying β -amylase can utilize soluble starch in the medium. [Conclusion] A novel *E. coli* surface display system by using C-terminally truncated NCgl1221 as the anchor motif was successfully developed. The active enzyme with a molecular size of 56 kDa was displayed on *E. coli* by this system, which provided the basis for the application of the system in whole-cell biocatalyst or biosorbent.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, β -amylase, cell-surface display, NCgl1221

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA020301) and by the National Natural Science Foundation of China (30972628)

* Corresponding authors. Tel: + 86-513-85051728, E-mail: zwei@ntu.edu.cn, njsdyd@163.com

Received: 7 September 2011 / Revised: 14 November 2011

勘 误

发表在《微生物学报》2011年第51卷第7期第876—890页中的文章“南海北部陆坡神狐海域 HS-PC500 岩心微生物多样性”出现了两处错误。(1)第886页中有2大段内容重复;(2)第886页中右栏第5行,“ β -变形菌”应为“ δ -变形菌”。特此更正,请读者谅解!

目前,已经更正了《微生物学报》网刊上的内容,国内外各大数据库也会陆续进行更正。

第一作者:焦露; 责任作者:苏新

《微生物学报》编辑部

2011年12月