

论著·基础研究

## 大肠埃希菌 CLM37 菌株 *Lpp* 基因敲除及胞外表达 *N*-糖基化重组蛋白研究

阮 瑶, 王力凡, 郭龙华, 付 鑫, 丁 宁<sup>#</sup>, 胡学军<sup>#</sup>

大连大学医学研究中心, 大连 116622

**[摘要]** **目的**·构建外膜脂蛋白 *Lpp* (Braun's lipoprotein) 基因缺失的大肠埃希菌菌株, 在该菌株中进行大肠埃希菌胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白研究。**方法**·利用 Red 同源重组系统, 敲除大肠埃希菌 CLM37 基因组上的外膜脂蛋白 *Lpp* 基因; 通过绘制生长曲线, 研究 *Lpp* 基因缺失后对大肠埃希菌生长状态的影响。将受体蛋白表达载体 pIG6-rFn3-Gly 和空肠弯曲杆菌来源的 *N*-糖基化基因簇载体 pACYCpgl 共转化大肠埃希菌 CLM37  $\Delta$  *Lpp*, 研究大肠埃希菌胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白情况。**结果**·获得了 *Lpp* 基因缺失的大肠埃希菌菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp*, 并在该菌株中成功实现了胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白 rFn3-Gly; 相比于菌株 CLM37, 大肠埃希菌 CLM37  $\Delta$  *Lpp* 胞外生产重组蛋白 rFn3-Gly 的总量约提升了 4 倍, 糖基化效率约提高了 6 倍。**结论**·成功构建大肠埃希菌菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp* 并实现了胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白 rFn3-Gly, 提高了糖蛋白产量及糖基化效率。

**[关键词]** *Lpp* 基因; 大肠埃希菌 CLM37; *N*-糖基化蛋白

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.11.006 **[中图分类号]** Q51 **[文献标志码]** A

### Knocking out *Lpp* gene of *E.coli* CLM37 strain and extracellular production of *N*-glycosylated recombinant proteins

RUAN Yao, WANG Li-fan, GUO Long-hua, FU Xin, DING Ning<sup>#</sup>, HU Xue-jun<sup>#</sup>

Medical Research Centre, Dalian University, Dalian 116622, China

**[Abstract]** **Objective**·To construct the *E.coli* CLM37 strain with *Lpp* gene deletion and to study the production of *N*-glycosylated recombinant proteins in this *E.coli* strain. **Methods**·Firstly, Red homologous recombination system was used to knock out the *Lpp* gene from the genome of *E.coli* CLM37. And then, the growth curve was detected to study the effects of deleted *Lpp* gene on the growth states of *E.coli* strain. Finally, the vector pIG6-rFn3-Gly which expresses receptor protein and the vector pACYCpgl, which carries *N*-glycosylation gene cluster that derives from *Campylobacter jejuni*, were co-transformed into *E.coli* CLM37 $\Delta$ *Lpp* to investigate the extracellular production of *N*-glycosylated recombinant proteins. **Results**·The *E. coli* CLM37 $\Delta$ *Lpp* with *Lpp* gene deletion was obtained, and the extracellular production of *N*-glycosylated rFn3-Gly was successfully achieved in this strain. Compared with *E. coli* CLM37, the total amount of rFn3-Gly produced via extracellular production of *E. coli* CLM37 $\Delta$ *Lpp* increased about 4 times, and the glycosylation efficiency increased about 6 times. **Conclusion**·*N*-glycosylated rFn3-Gly was successfully produced via extracellular production in *E. coli* CLM37 $\Delta$ *Lpp*, and the production of interest glycoprotein and the glycosylation efficiency were improved.

**[Key words]** *Lpp* gene; *E.coli* CLM37; *N*-glycoprotein

*N*-糖基化修饰可明显改善药物蛋白的理化性质, 延长其血浆半衰期。目前, 已批准的蛋白治疗药物中有 40% 是糖基化修饰的药物<sup>[1]</sup>, 糖基化修饰可以显著增加药物活性, 改善治疗效果<sup>[2]</sup>。然而, 应用酵母、昆虫、植物及人源细胞株等表达系统<sup>[3]</sup>生产 *N*-糖基化蛋白, 普遍存在周期长、成本高、异质性问题, 不适合大规模生产。

大肠埃希菌是生产重组蛋白的最常见宿主, 具有生

长快、周期短、成本低和适合工业化生产等优点。目前, 通过将来源于空肠弯曲杆菌的 *N*-糖基化基因簇 (protein glycosylation locus, *pgl*) 转移到大肠埃希菌体内, 成功地实现了 *N*-糖基化修饰外源重组蛋白<sup>[4]</sup>, 结束了大肠埃希菌体内无法生产 *N*-糖基化重组蛋白的历史。此过程是在大肠埃希菌质周腔内完成的: 首先在内膜内侧的 *pglDEF* 及 *pglA*、*pglC*、*pglH*、*pglI* 等糖基转移酶的共同作用下生

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (31370937) (National Natural Science Foundation of China, 31370937)。

**[作者简介]** 阮 瑶 (1990—), 女, 硕士生; 电子信箱: ruanyao17@foxmail.com。

**[通信作者]** 丁 宁, 电子信箱: dingning0606@foxmail.com。胡学军, 电子信箱: xuejun.hu3@foxmail.com。<sup>#</sup> 为共同通信作者。

成寡糖链, 后由翻转酶 *pglK* 将糖链翻转至质周腔, 然后在寡糖转移酶 *pglB* 作用下将糖链转移至受体蛋白的特定寡糖识别位点上<sup>[5]</sup>。在此过程中, 目标蛋白会在有限的质周腔空间内不断累积, 增加了菌体的代谢负担, 不利于提高外源蛋白的产量及 *N*-糖基化修饰效率。而且, 有研究表明在大肠埃希菌质周腔中重组蛋白的表达量往往远低于胞内表达<sup>[6]</sup>, 该系统表达 *N*-糖基化重组蛋白的方式在一定程度上限制了 *N*-糖基化蛋白总量的获得。

近些年的研究表明, 通过在大肠埃希菌胞外表达重组蛋白可以大幅度提高重组蛋白的总表达量, 同时还可以简化后续重组蛋白的分离纯化步骤<sup>[6-7]</sup>。通常通过敲除细胞膜相关蛋白等实现胞外生产重组蛋白, 其中通过敲除外膜脂蛋白 *Lpp* (Braun's lipoprotein) 基因对细胞的生长状态影响非常小, 并且能高效促进外源蛋白的泄露, 特别是对小分子重组蛋白非常有效<sup>[8]</sup>。*Lpp* 基因的敲除可使细菌外膜变松散, 有利于质周腔内的蛋白泄漏到胞外, 成功实现胞外生产重组蛋白。一方面, 可以减轻菌体代谢的压力, 增加重组蛋白的总表达量; 同时蛋白纯化过程中也无须进行菌体破碎、反复离心等复杂步骤, 可显著提高工作效率, 降低成本。

表 1 关键质粒和大肠埃希菌菌株  
Tab 1 Important plasmids and strains

菌株和质粒	相关信息	来源
大肠埃希菌 CLM37	<i>W3110</i> , $\Delta wecA$	苏黎世联邦理工学院
pKD46	由阿拉伯糖启动子控制的 <i>Red</i> 同源重组辅助质粒, 温度敏感型, 氨苄青霉素抗性	大肠杆菌遗传库中心 (耶鲁大学)
pKD13	提供抗性片段的模板质粒, 温度敏感型, 氨苄青霉素、卡那霉素抗性	大肠杆菌遗传库中心 (耶鲁大学)
pCP20	抗性消除质粒, 表达翻转酶重组酶 <i>FLP</i> , 温度敏感型, 氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素抗性	大肠杆菌遗传库中心 (耶鲁大学)
pIG6-rFn3-Gly	表达载体, 携带 <i>OmpA</i> 信号肽, 表达重组蛋白 rFn3-Gly 至质周腔, 氨苄青霉素抗性	本实验室保存
pACYC <i>pgl</i>	携带空肠弯曲杆菌糖基化基因簇 <i>pgl</i> , 氯霉素抗性	苏黎世联邦理工学院

1.1.2 引物 实验中涉及的引物见表 2。

表 2 实验中所用引物序列  
Tab 2 Primer sequences used in the study

引物种类	引物序列 (5' → 3')
敲除引物	
p1-For	<u>gctacatggagattaactcaatctagagggtattaactgtcaaacatgagaattaa</u>
p1-Rev	<u>cgcacaatgtgcgccattttcacttcacaggtagtctgtaggctggagctgcttc</u>
p2-For	<u>ctcaacataaaaaactttgtgtaatactgttaacgcctacatggagattaactcaatct</u>
p2-Rev	<u>acgcagtagcgggttaacgcgcagacaaaaaaatggcgcacaatgtgcgccatttttc</u>
检测引物	
j-For	catctcgcaacgtaccgaccgctgatgaa
j-Rev	atgcatacacactgcagcaggtttacg

注: 敲除引物中下划线部分为与质粒 pKD13 中 *kan* 基因两端序列相同的序列, 未划线部分为与 CLM37 菌株中 *Lpp* 基因编码区域两端序列相同的序列。

大肠埃希菌 CLM37 菌株是最早用于 *N*-糖基化重组蛋白的工程菌株之一<sup>[4]</sup>, 是将大肠埃希菌 W3110 菌株中的 *WecA* (undecaprenyl-phosphate-*N*-acetylglucosamine phosphotransferase) 基因敲除后获得的菌株。在大肠埃希菌中, *WecA* 酶作为十一异戊二烯磷酸酯-*N*-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶而参与 *O*-抗原多糖的合成, *WecA* 基因敲除后可确保来源于空肠弯曲杆菌的 *N*-糖基化机制在大肠埃希菌体内正确进行重组蛋白的 *N*-糖基化修饰。本研究拟通过敲除大肠埃希菌 CLM37 外膜脂蛋白 *Lpp* 基因, 评估该基因敲除后对菌株生长的影响, 进而通过共表达来源于空肠弯曲杆菌的 *N*-糖基化基因簇和携带寡糖转移酶识别位点的重组人纤连蛋白 III 型结构域 (rFn3-Gly) 模式蛋白基因, 进行胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白的研究, 并研究对重组蛋白 *N*-糖基化效率影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 实验中涉及的关键质粒和菌株见表 1。

1.1.3 试剂 *Taq* DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker、DL10000 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; *L*-阿拉伯糖 (终浓度为 10 mmol/L)、硫酸卡那霉素 (终质量浓度为 50 μg/mL)、氨苄青霉素 (终质量浓度为 100 μg/mL)、氯霉素 (终质量浓度为 34 μg/mL) 及辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 均购自生工生物工程 (上海) 有限公司; 抗 FLAG M1 单克隆抗体购于 Sigma 公司; 限制性内切酶 *Dpn* I 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 凝集素 SBA 购于 Vector 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen Biosciences 公司; 所用引物合成及基因测序由常州基宇生物科技有限公司完成。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 *Lpp* 基因的敲除

(1) 扩增含有 *Lpp* 基因同源臂和 *kan* 基因的 PCR 片段 延长同源臂, 提高同源重组的效率, 先后以 p1-For 和 p1-Rev, p2-For 和 p2-Rev 为引物, pKD13 为模板, 采用套式 PCR 法进行扩增, 获得含有与 *Lpp* 基因上、下游各 72 bp 同源的 *kan* 抗性基因的片段, 经琼脂糖凝胶电泳、切胶回收, 再用限制性内切酶 *Dpn* I 消化、回收后用于 *Lpp* 基因敲除。

(2) *Lpp* 基因敲除 将能诱导表达 Red 重组酶的质粒 pKD46 热激转化大肠埃希菌 CLM37 后, 将以上制备的含有 *Lpp* 基因上、下游同源臂的 *kan* 基因的 PCR 片段电击转化菌株 CLM37/ pKD46, 30 ℃ 培养 1 h, 取菌液涂布于含 *L*-阿拉伯糖、硫酸卡那霉素、氨苄青霉素的 LB 平板上, 30 ℃ 培养过夜。在此过程中, 由转入的两端带有 FRT 位点的 *kan* 基因替换 *Lpp* 基因。用检测引物 j-For、j-Rev 对长出的单菌落进行 PCR 验证, j-For、j-Rev 是分别距 *Lpp* 基因上、下游 704、243 bp 的序列, 长度都为 30 bp, 委托常州基宇生物科技有限公司测序。为了去除质粒 pKD46, 挑取阳性单克隆于 42 ℃ 培养 12 h, 于含氨苄青霉素的 LB 平板上划线培养, 质粒 pKD46 含有温度敏感型复制子, 在高于 37 ℃ 的条件下培养一段时间后该质粒就会丢失<sup>[9]</sup>。如果平板上没有长出菌落, 则证明菌落中的 pKD46 质粒已经丢失, 获得敲除 *Lpp* 基因后的菌株 CLM37 Δ *Lpp::kan*。

为消除 *kan* 抗性基因, 将抗性基因消除质粒 pCP20 热激转化菌株 CLM37 Δ *Lpp::kan*, 挑取转化子于 42 ℃ 培养 24 h; 在此过程中, 质粒 pCP20 热诱导表达 FLP 重组酶, 使 *kan* 基因两侧的 FRT 位点自身发生同源重组, 从而消除一个 FRT 位点及 *kan* 基因, 同时含有温度敏感型复制子<sup>[9]</sup>的质粒 pCP20 也逐渐丢失。取菌液涂布于无抗性的 LB 平板上, 37 ℃ 培养过夜, 然后分别于含氨苄青霉素的 LB 平板与含硫酸卡那霉素的 LB 平板上划线培养; 如果 2 种不同抗性的 LB 平板上都没有长出菌落, 则证明该菌落中 *kan* 基因可能已经消除, 而 pCP20 质粒也已经丢失。用检测引物 j-For、j-Rev 对长出的单菌落进行 PCR 鉴定, 委托常州基宇生物科技有限公司测序。最终获得敲除 *Lpp* 基因且无 *kan* 基因标记的菌株 CLM37 Δ *Lpp*。

1.2.2 检测 *Lpp* 基因、*kan* 基因缺失后对菌株生长状态的影响 为检测缺失 *Lpp* 基因、*kan* 基因是否会对菌株的生长状态产生影响, 选取未敲除 *Lpp* 基因的菌株 CLM37、只敲除 *Lpp* 基因的菌株 CLM37 Δ *Lpp::kan* 及随后又消除 *kan* 基因的菌株 CLM37 Δ *Lpp* 于自动诱导培养基<sup>[9]</sup>中 37 ℃ 连续培养 36 h, 定点检测吸光度值 [*D*(600 nm)],

重复检测 3 次, 绘制生长曲线。

1.2.3 大肠埃希菌胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白 为研究大肠埃希菌胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白, 采用本实验室保存的载体 pIG6-rFn3-Gly 与载体 pACYC*pgl*<sup>[10]</sup> 共转化菌株 CLM37 Δ *Lpp* 进行研究。载体 pIG6-rFn3-Gly 携带可编码寡糖转移酶识别位点 (DQNAT) 的人纤维连接蛋白 III 型结构域 (*Fn3*) 基因, 其上游编码的 *ompA* 信号肽可将 rFn3-Gly 定位于质周腔, 并在其下游引入了可编码 6 个组氨酸残基的碱基序列, 用于重组蛋白分离纯化; 载体 pACYC*pgl* 携带来源于空肠弯曲杆菌的 *pgl* 基因簇, 其编码的糖基转移酶、寡糖翻转酶及寡糖转移酶共同作用可将糖链移至受体蛋白 rFn3-Gly 的天冬酰胺 (DQNAT) 上。将共转化有 pIG6-rFn3-Gly 和 pACYC*pgl* 质粒的菌株 CLM37 Δ *Lpp* 接种于含有氨苄青霉素、氯霉素的 300 mL 新鲜自动诱导培养基中, 28 ℃ 条件下连续培养 36 h, 收取菌液后离心, 分离菌体沉淀与上清, 进行下一步表达分析。

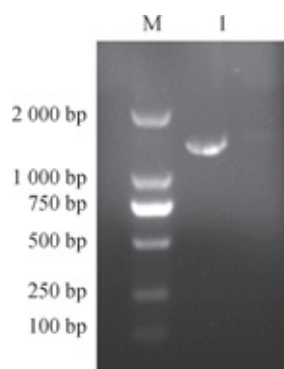
1.2.4 大肠埃希菌胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白检测 为检测 CLM37 Δ *Lpp* 胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白情况, 采用未敲除 *Lpp* 基因的大肠埃希菌 CLM37 作为对照菌株, 先使用抗 FLAG M1 单克隆抗体作为一抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 作为二抗进行 Western blotting 分析, 测定菌体与上清中重组蛋白 rFn3-Gly 的表达及糖基化情况。其中, 用 80 μL 缓冲液溶解 *D*(600 nm) 为 1 的菌体后与 80 μL 上清分别加 20 μL Loading buffer 制样, 各吸取 15 μL 上样。重组蛋白 rFn3-Gly 在质周腔内脱去 *ompA* 信号肽后暴露出 DYKD-flag 标签, 其可与抗 FLAG M1 单克隆抗体特异性结合<sup>[11]</sup>。重组蛋白 rFn3-Gly 相对分子质量为 12 800, 被 *N*-糖基化修饰后相对分子质量增大为 14 200, 通过对比相对分子质量的大小确定重组蛋白 rFn3-Gly 是否糖基化。为进一步确定 rFn3-Gly 是否糖基化, 将以上纯化的样品用凝集素 (soybean agglutinin lectin, SBA) 进一步进行常规凝集素印迹检测<sup>[12]</sup>。通过蛋白灰度分析, 对比菌株 CLM37 Δ *Lpp*、菌株 CLM37 生产重组蛋白 rFn3-Gly 及其糖基化情况。

## 2 结果

### 2.1 *Lpp* 基因的敲除

2.1.1 扩增含有 *Lpp* 基因同源臂和 *kan* 基因的 PCR 片段 作为模板的 *kan* 基因长度为 1 323 bp, 经敲除引物 p1-For、p1-Rev 和 p2-For、p2-Rev 进行套式 PCR 扩增后, 其两侧的同源臂长度分别延长 72 bp。因此, 经 2 次 PCR 扩增后, 最后所得 PCR 片段应为 1 467 bp (图 1), 所扩增的 PCR 产物与理论值大体一致。

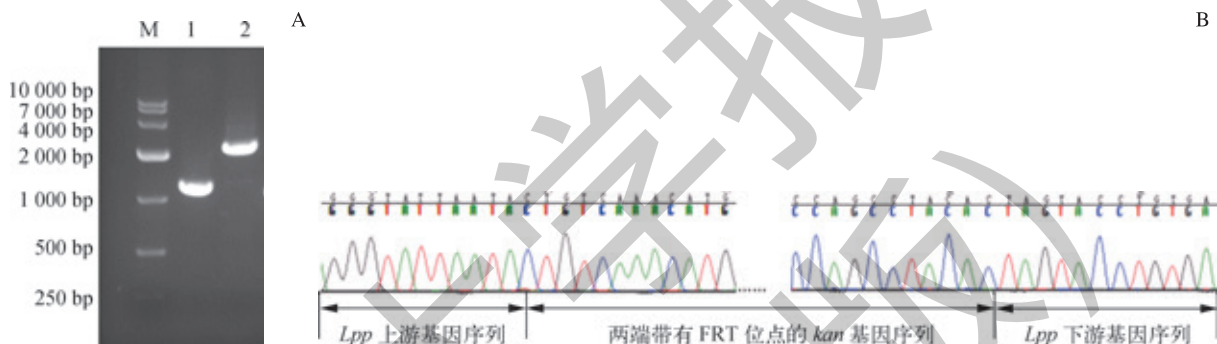




注: M. DL2000 DNA Marker; I. *kan* 基因扩增产物。

图 1 含有 *kan* 基因和 *Lpp* 同源臂的 PCR 产物电泳

Fig 1 Gel electrophoresis of products of homologous regions with *kan* amplified by PCR



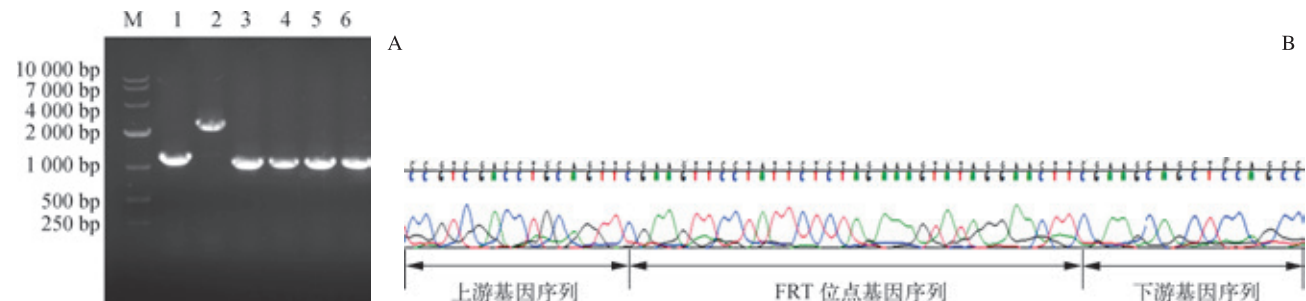
注: A. *Lpp* 基因敲除的 PCR 鉴定 (M. DL10000 DNA Marker; 1. *E. coli* CLM37 扩增产物; 2. *E. coli* CLM37  $\Delta$  *Lpp::kan* 扩增产物); B. *Lpp* 基因敲除的测序鉴定。

图 2 *Lpp* 基因敲除的鉴定

Fig 2 Identification of knock-out *Lpp* gene

为消除 *kan* 基因, 将抗性基因消除质粒 pCP20 热激转化菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp::kan*, 于热诱导后的平板上随机挑取 10 个单菌落, 分别于含氨苄青霉素的 LB 平板与含硫酸卡那霉素的 LB 平板上划线培养, 其中有 5 个单菌落在 2 种不同抗性的 LB 平板上都没有生长, 证明这些菌落中的 pCP20 质粒已丢失, *kan* 基因可能已经消除。为进一步检测 *kan* 基因是否已经消除, 以未消除 *kan* 基因的菌株 CLM37 $\Delta$ *Lpp::kan* 作为阳性对照, 用检测引物 j-For、j-Rev 对以上 5 个单菌落进行 PCR 验证。在菌株

CLM37  $\Delta$  *Lpp::kan* 中, 去除同源序列后整合到基因组上的序列长度为 1 323 bp; 消除一个 FRT 位点及 *kan* 基因后, 剩余的带有一个 FRT 位点的序列长度为 101 bp, 因此用引物 j-For、j-Rev 进行 PCR 扩增后, *kan* 基因消除前后的条带大小应分别为 2 330 bp、1 108 bp。如图 3A 所示, 所扩增的 PCR 产物与理论值大体一致。初步证实以上 5 个单菌落中的 *Lpp* 基因均已被 *kan* 基因替换。该结果经测序 (图 3B) 证明, 成功敲除了 CLM37  $\Delta$  *Lpp::kan* 基因组上的 *kan* 基因, 获得菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp*。



注: A. *kan* 基因敲除的 PCR 鉴定 (M 为 DL10000 DNA Marker; 1、3 ~ 6 为 5 个菌落 *E. coli* CLM37  $\Delta$  *Lpp* 扩增产物; 2 为 *E. coli* CLM37  $\Delta$  *Lpp::kan* 扩增产物); B. *kan* 基因敲除的测序鉴定。

图 3 *kan* 基因消除的鉴定

Fig 3 Identification of knock-out *kan* gene

## 2.2 检测 *Lpp* 基因、*kan* 基因敲除后对菌株生长状态的影响

为检测先后敲除 *Lpp* 基因、*kan* 基因是否会对菌株的生长状态产生影响, 以在自动诱导培养基中的培养时间为横轴, 以 3 种菌株 CLM37、CLM37  $\Delta$  *Lpp::kan* 及 CLM37  $\Delta$  *Lpp* 在各个时间点测得的 *D* (600 nm) 平均值为纵轴绘制生长曲线。结果显示 (图 4), 敲除 *Lpp* 基因、*kan* 基因后对大肠埃希菌的生长基本没有影响, 说明 CLM37  $\Delta$  *Lpp* 可作为工程菌株进行 *N*-糖基化重组蛋白研究。

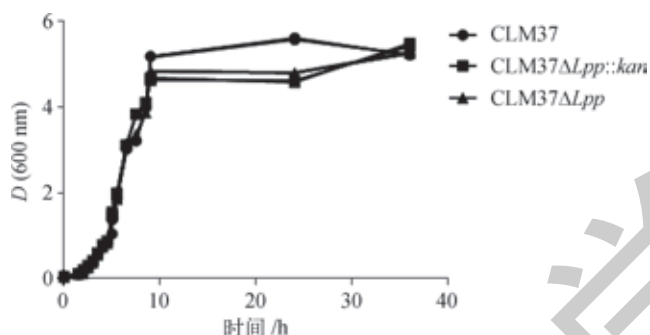
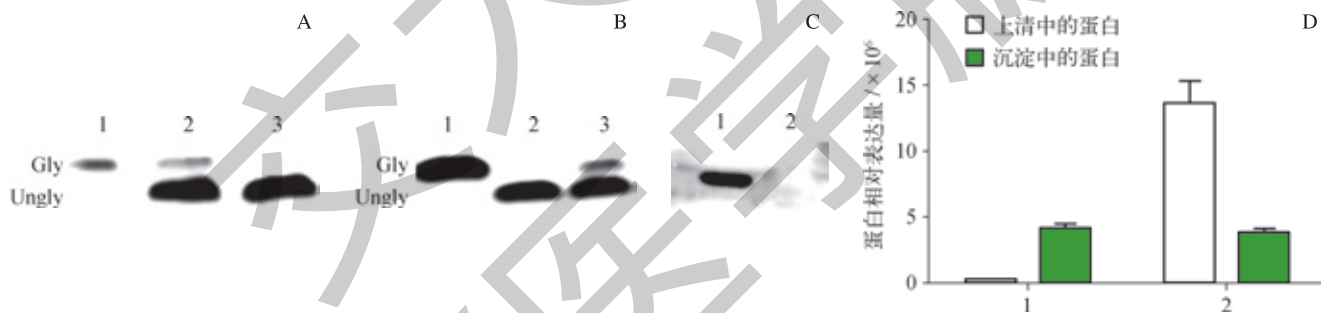


图 4 大肠埃希菌 CLM37 菌株生长曲线图

Fig 4 Diagram of growth curves of *E. coli* CLM37

## 2.3 大肠埃希菌胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白检测

为研究大肠埃希菌胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白情况, 将带有载体 pIG6-rFn3-Gly 与 pACYC*pgl* 的菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp* 置于含有氨苄青霉素、氯霉素的新鲜自动诱导培养基中, 28 °C 条件下连续培养 36 h, 收取菌液后离心, 分离菌体与上清。以大肠埃希菌 CLM37 作为对照菌株进行凝集素印迹检测和 Western blotting 分析。菌体与上清中重组蛋白 rFn3-Gly 的表达及糖基化情况见图 5。经自动诱导培养 36 h 后, 由于菌株 CLM37 部分细菌细胞膜破裂, 导致上清中泄露少量重组蛋白 rFn3-Gly, 而大部分重组蛋白存在于菌体沉淀中, 只有部分被糖基化 (图 5A); 相对比而言, 菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp* 生产的重组蛋白在上清中分布较多, 且全部被糖基化。经进一步的灰度分析, 与菌株 CLM37 相比, 菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp* 生产所得的重组蛋白 rFn3-Gly 的总量提升了 4 倍; 而且, 菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp* 上清中重组蛋白 rFn3-Gly 的产量约为菌体沉淀中的 6 倍, 且上清中的重组蛋白 rFn3-Gly 全部被 *N*-糖基化修饰。以上凝集素印迹检测和 Western blotting 分析结果表明, 通过 *Lpp* 基因敲除, 可大幅度提高大肠埃希菌胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白的产量。



注: A. Western blotting 分析 *E. coli* CLM37 表达的重组蛋白 rFn3-Gly 糖基化情况 (Gly、Ungly 分别代表已糖基化与未糖基化的 rFn3-Gly; 1. 上清中的蛋白; 2. 沉淀中的蛋白; 3. 未糖基化的 rFn3-Gly); B. Western blotting 分析 *E. coli* CLM37  $\Delta$  *Lpp* 表达的重组蛋白 rFn3-Gly 糖基化情况 (1. 上清中的蛋白; 2. 未糖基化的 rFn3-Gly; 3. 沉淀中的蛋白); C. 利用 SBA 凝集素印迹检测糖基化情况 (1. 纯化后的上清中糖基化的 rFn3-Gly; 2. 纯化后未糖基化的 rFn3-Gly); D. 灰度值分析 (1. *E. coli* CLM37 表达的蛋白; 2. *E. coli* CLM37  $\Delta$  *Lpp* 表达的蛋白)。

图 5 重组蛋白 rFn3-Gly 胞外表达结果分析

Fig 5 Results of extracellular expression of recombinant protein rFn3-Gly

## 3 讨论

近几年来, 通过菌体泄漏胞外表达重组蛋白成为大肠埃希菌生产外源蛋白的一个重要方法, 有利于提高重组蛋白产量, 并且可省略菌体破碎步骤, 减少致热原污染, 方便分离纯化。目前, 已有研究证明, 通过组合敲除 *mrcA* 基因、*mrcB* 基因、*pal* 基因和 *Lpp* 基因等不同基因<sup>[6]</sup>, 可促进大肠埃希菌中生成的重组蛋白向膜外泄漏。本研究选择的重组蛋白 rFn3-Gly 相对分子质量较小 (12 800),

通过 *Lpp* 基因敲除实现了高效胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白, 为生产 *N*-糖基化的糖疫苗和其他 *N*-糖基化重组蛋白提供可借鉴思路。有研究表明, 通过敲除 *Lpp* 基因改造的菌株可高效胞外生产相对分子质量 70 000 以下的重组蛋白; 随着重组蛋白相对分子质量的增加, 泄露效率逐渐降低<sup>[8]</sup>。可通过敲除以上其他基因, 进一步提高膜外泄露效率。

目前, 除了敲除 *Lpp* 基因外, 还可以通过敲除其他膜相关蛋白 *ompA*、*tolA*、*oppA*、*dppA*、*mrcA* 和 *mrcB* 等

基因实现胞外生产重组蛋白。这些蛋白单基因敲除均不显著影响菌体生长。其中敲除 *omp A* 及 *tol A* 基因, 能有效地胞外生产重组蛋白, 但是泄露效率均明显小于敲除 *Lpp* 基因的效率, 约低 35%<sup>[8]</sup>。

本研究利用 Red 同源重组系统成功敲除了大肠埃希菌 CLM37 中的外膜脂蛋白 *Lpp* 基因, 并消除了 *kan* 基因, 获得了菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp*。通过绘制生长曲线, 表明 *Lpp* 基因缺失后对于菌株的生长状态几乎没有影响。通过利用菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp* 胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白, 提高了蛋白的表达量及糖基化效率; 相比于未敲除 *Lpp* 基因

的菌株 CLM37, 其重组蛋白 rFn3-Gly 的产量约提升了 4 倍, 糖基化效率约提高了 6 倍。可能是由于未被糖基化的 rFn3-Gly 稳定性比糖基化修饰后的 rFn3-Gly 差, 而被上清中的一些蛋白酶降解, 这样有利于得到均质性较好的 *N*-糖基化蛋白。

综上所述, 通过敲除外膜脂蛋白 *Lpp* 基因, 构建了适合胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白的大肠埃希菌菌株 CLM37  $\Delta$  *Lpp*, 并在该菌株中成功实现了胞外生产 *N*-糖基化重组蛋白, 提高了蛋白的产量及糖基化效率, 为 *N*-糖基化重组蛋白药物及糖疫苗等生产研究奠定了基础。

### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(10): 992-1000.
- [2] Lusch A, Kaup M, Marx U, et al. Development and analysis of  $\alpha$  1- antitrypsin neoglycoproteins: the impact of additional *N*-glycosylation sites on serum half-life[J]. Mol Pharm, 2013, 10(7): 2616-2629.
- [3] Elizabeth H. Carbohydrate analysis throughout the development of a protein therapeutic[J]. Glycoconj J, 2010, 27(2): 211-225.
- [4] Wacker M, Linton D, Hitchen PG, et al. *N*-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*[J]. Science, 2002, 298(5599): 1790-1793.
- [5] 刘志成, 潘超, 朱力, 等. 原核生物糖基转移酶 *PglL* 的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2016, 27(5): 724-727.
- [6] Chen ZY, Cao J, Xie L, et al. Construction of leaky strains and extracellular production of exogenous proteins in recombinant *Escherichia coli*[J]. Microb Biotechnol, 2014, 7(4): 360-370.
- [7] Zhou YL, Lu ZH, Wang X, et al. Genetic engineering modification and fermentation optimization for extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(4): 1545-1556.
- [8] Gao W, Yin J, Bao LC, et al. Engineering extracellular expression systems in *Escherichia coli* based on transcriptome analysis and cell growth state[J]. ACS Synth Biol, 2018, 7(5): 1291-1302.
- [9] 张雪, 温廷益. Red 重组系统用于大肠杆菌基因修饰研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12): 89-93.
- [10] Ding N, Yang CG, Sun SX, et al. Increased glycosylation efficiency of recombinant proteins in *Escherichia coli* by auto-induction[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485 (1): 138-143.
- [11] Hu XJ, Hortiguera MJ, Robin S, et al. Covalent and oriented immobilization of scFv antibody fragments via an engineered glycan moiety[J]. Biomacromolecules, 2013, 14(1): 153-159.
- [12] Adrian JJ, Jonathan AB, Andrew JL, et al. Characterization of the structurally diverse *N*-linked glycans of campylobacter species[J]. J Bacteriol, 2012, 194(9): 2355-2362.

[收稿日期] 2018-05-15

[本文编辑] 吴 洋

