

大肠杆菌 I 型分泌表达系统研究进展及提高蛋白表达量的策略*

王靖瑶 王天女 卢磊 张帅 赵敏**

(东北林业大学生命科学学院 哈尔滨 150040)

摘要 大肠杆菌是表达重组蛋白最常用的宿主之一。利用大肠杆菌分泌途径胞外表达重组蛋白具有可促进蛋白正确折叠,有效减少包涵体形成,简化纯化工序等诸多优势,近年来备受关注。其中,大肠杆菌 I 型分泌途径具有分泌表达速度快,蛋白活性高,对宿主代谢无影响等特点,是目前应用最广泛的分泌途径之一。综述了大肠杆菌 I 型分泌系统的元件组成和分泌机理及提高 I 型分泌系统蛋白表达量的有效策略,为重组蛋白生产应用提供了理论依据。

关键词 大肠杆菌 胞外表达 重组蛋白 I 型分泌途径 高效分泌策略

中图分类号 Q786

大肠杆菌是用来表达重组蛋白的首选宿主之一。大肠杆菌遗传背景清楚,操作简单,生长周期短,成本低,易于大规模培养^[1],已经用来表达多种酶制剂和药物制剂,目前市场上有 40% 的重组制剂由大肠杆菌表达生产^[2]。即便如此,由于大肠杆菌的翻译后修饰能力较弱,在表达多数结构复杂的蛋白过程中会导致蛋白折叠错误聚集形成无活性的包涵体,严重影响蛋白表达量。目前多数蛋白在大肠杆菌胞内表达,需要通过破碎处理获取目的蛋白,且宿主胞内背景蛋白影响蛋白纯化。但利用大肠杆菌分泌系统表达重组蛋白能提高蛋白稳定性及可溶性,保留蛋白 N 端真实性,减少宿主代谢负担,有效简化蛋白纯化过程,节省生产成本^[3]。本文综述了常用的大肠杆菌 I 型分泌系统及其表达重组蛋白的研究进展,为人们了解大肠杆菌分泌系统的表达机理,更好地选择合适的蛋白表达策略提供参考。

1 大肠杆菌 Type I 分泌途径

1.1 大肠杆菌分泌途径概述

目前已知革兰氏阴性菌的分泌途径共有 6 种^[4],其中 Type I, Type II 是大肠杆菌主要采取的分泌途

径^[5]。大肠杆菌 I 型分泌系统(type I secretion system, TISS)也称 α -溶血素(HlyA)分泌系统,目的蛋白 HlyA 经过由 HlyB, HlyD, TolC 组成中空的跨膜通道直接分泌至胞外。II 型分泌系统是大肠杆菌分泌蛋白的主导分泌途径(main terminal branch, MTB),蛋白借助 Sec 途径,信号识别颗粒(SRP)通路或双精氨酸转移途径(TAT)转运到细胞周质,然后再依赖于膜上特异性分泌装置分泌到胞外^[5]。目前大多数的重组蛋白利用 II 型分泌系统表达,但是由于分泌元件有限,蛋白常常聚集在周质或胞内,还需结合基因化学物理等方法实现分泌^[6]。相比之下, I 分泌系统采取“一步介导式”分泌法,蛋白不经过周质中间体直接分泌,有效减少了两步跨膜带来的损失^[7-8],且周质还原态环境有利于蛋白正确折叠,提高蛋白酶的活性^[3]。

1.2 I 型分泌系统组元件及功能

TISS 系统由可以水解 ATP 提供能量的 ABC 转运子(HlyB),跨越内外膜形成孔道的多聚膜融合蛋白(HlyD),以及外膜蛋白(TolC)组成。HlyB 位于细胞质内,是由相对保守的核酸结合域(nucleotide-binding domain, NBD)以及跨膜域(transmembrane domain, TMD)构成。TMD 参与底物分子的特异性识别^[9];NBD 由催化结构域(catalytic domain),螺旋域(helical domain/ signalling domain)及连接两者的 Q 环和 Pro 环

收稿日期:2014-03-31 修回日期:2014-04-28

* 国家自然科学基金资助项目(31170553, 31200394)

**通讯作者,电子邮箱:82191513@163.com

组成(图1)。NBD 上的特征结构之一为催化结构域上的 Walker A(图1),在普通状态下,Walker A 维持特殊的 3_{10} 螺旋结构,阻止催化域与 ATP 结合,当 HlyA 存在时 Walker A 构象改变,使催化域结合 ATP 发挥水解作用,为 HlyA 蛋白跨膜提供能量。另一特殊结构为螺旋域上由约 30aa 组成的结构可变区(structurally diverse region, SDR),负责特异性识别蛋白信号肽。HlyD 锚定在细胞内膜处,N 端前 60 个氨基酸位于细胞质,其中的 21 个氨基酸形成了高度保守的亲水脂的 α 螺旋,负责 HlyA 信号肽与 HlyD 的相互作用,改变 HlyD 的构象,促进目的蛋白转膜以及 TolC 的组装^[10]。晶体结构显示三聚体蛋白 TolC 呈长约 140Å 的孔道,贯穿外膜和周质,位于外膜的 β -折叠桶结构区形成向外的开口;周质区 α 螺旋组成长 100Å 的圆筒状结构,圆筒直径约为 30Å,呈锥状,在远端(即周质处)几乎呈闭合状态。TolC 蛋白整体结构庞大,容积约有 43 000Å³^[11]。

图1 参考了文献[12],图1中保守基序用彩色标记。

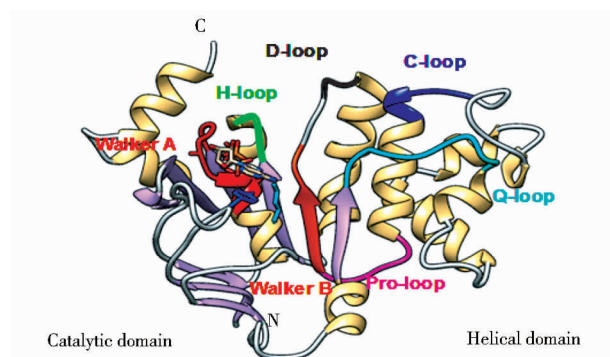


图1 HlyB-NBD 的结构图

Fig.1 Structure of the HlyB-NBD (467-707 aa)

1.3 Type I 分泌机制

HlyA 蛋白包含两个特征结构域,N 端结构域由 9 个两亲性螺旋组成,负责与宿主细胞的疏水膜基质结合;C 端是由 11~17 个富含甘氨酸和精氨酸的 9 肽重复序列(GGXGDXUX;X 为任意氨基酸,U 为疏水氨基酸)随机串联组成的 RTX 结构域(repeats in toxin),能结合游离的 Ca^{2+} ,促进 HlyA 的折叠^[13]。HlyA 在胞内合成后,先后与 HlyD 的胞内 N 端序列及 HlyB(NBD)结合,促使 HlyD 周质区域构象发生改变,形成 HlyD-TolC 复合物,打开 TolC 周质处闭合区,形成连通周质与胞外的蛋白传送通道;同时 HlyA 导致 HlyB 上的 WalkerA(图1)构象发生改变,促使 NBD 催化域与

ATP 的结合及水解,产生能量,促进 HlyA 释放入内膜通道^[10]。 Ca^{2+} 在 HlyA 折叠过程中发挥重要作用^[14],由于胞内的低 Ca^{2+} 环境(约为 300 nmol/L),HlyA 蛋白在胞内一直处于未折叠状态^[15],直到 HlyA 分泌到外膜时,其上的 RTX 结构域结合培养基游离的 Ca^{2+} 引发 HlyA 的快速折叠^[16](图2)。

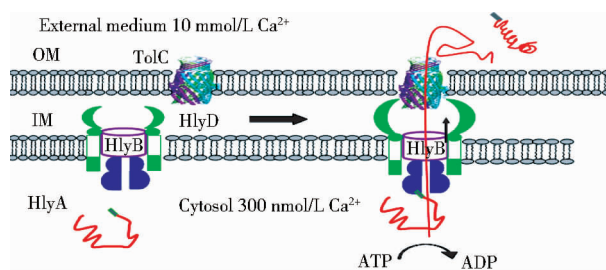


图2 *Escherichia coli* I 型分泌系统模型

Fig.2 The model of Type I secretion system of *E. coli*

The figure is created according to the model proposed from Kanonenberg et al^[16]. The substrate is shown in red and secretion sequence is highlighted in grey

1.4 大肠杆菌 I 型分泌系统的应用

大肠杆菌 I 型分泌系统在免疫生产领域中应用最为广泛,利用溶血素系统表达的抗原可直接从胞内分泌至胞外,不用细胞分裂传递抗原,因此已被表达于多种减毒菌株中作为活疫苗呈递异源抗原^[17]。一些工业用酶制剂也可以通过 I 型分泌系统得到表达,表1 是通过融合 HlyA 信号肽成功实现胞外分泌表达异源蛋白的实例。本课题组试图利用 I 型分泌系统实现 CotA 蛋白在大肠杆菌的分泌表达。CotA 蛋白是具有漆酶活性的芽孢杆菌外壁蛋白,可降解木质素,酚类等多种底物,并且具有耐高温,强碱和有机溶剂等优势,是具有工业应用前景的酶。然而 CotA 蛋白嵌合在芽孢外壁上,不利于蛋白的分离纯化。CotA 蛋白在大肠杆菌中大多以包涵体的形式表达,仅有少量蛋白为活性蛋白^[18-19],因此利用溶血素分泌系统表达 CotA 蛋白对蛋白质的正确折叠和提高可溶性蛋白表达量具有很好的作用。

2 提高大肠杆菌 I 型分泌系统表达蛋白量的方法

大肠杆菌 I 型分泌系统表达重组蛋白的分泌效率受多种因素影响。在分泌未饱和的情况下,提高外源蛋白的表达量可增加其分泌量;但在分泌饱和的情况下,还需要进一步协调外源蛋白的翻译率与转运率之间的关系,其中提高蛋白的转运效率(即分泌元件的改造),降低蛋

白折叠率是提高表达蛋白量最有效的途径。

2.1 表达元件对蛋白分泌的影响

2.1.1 HlyAs 的改造 HlyA 的 C 末端碱基对溶血素折叠速度及活性蛋白分泌量十分重要^[33-34]。Sanchez-Magraner 等^[13]发现 HlyAs 上游的 RTX 域参与了膜蛋白的识别,与单独信号肽相比,增加上游 RTX 域可提高蛋白分泌量^[35]。Kenny 等^[35]将融合凝乳酶原蛋白(prochymosin)的 HlyAs 信号肽长度减少后(由 218aa 提高到 113aa),蛋白的分泌效率明显降低;将融合蛋白 lacZ-HlyA 的 HlyAs 信号肽从 23 kDa 增加至 81 kDa 时蛋白成功分泌。原因可能是 RTX 域的扩展减缓了蛋白的折叠速度,避免分泌通路堵塞,从而提高蛋白分泌量。

2.1.2 HlyD 的改造 HlyD 是由胞质域(1~60aa),跨膜域(59~80aa)及周质域(81~478aa)组成。缺失 N 端 40aa 后 HlyA 不分泌^[36];L127-L170 缺失后 HlyA 停止分泌,HlyD 的 Leu475, Glu477, Arg478 位点突变后 HlyA 分泌量降低,其中 Arg478 可能参与 HlyA 转运后的释放^[37]。Pimenta 等^[38]发现引入突变 L165Q, V334I, V349-I(图 3)导致 HlyA 的分泌量及活性降低,从而揭示了 HlyD 的完整性对 HlyA 的分泌及转运后的正确折叠均有影响。

2.1.3 HlyB 的改造 Blight 等^[39]利用化学诱变方法突变 HlyB,发现 N 端(1~25aa)对 HlyB 功能影响不大, Gly408 突变为 Asp 后, HlyA 仅在低温条件下分泌,位于 ATP 结合位 WalkerB(图 1)附近的 Pro624 经突变为 Leu 后,影响 ATP 水解。Sheps 等^[40]提出突变 HlyB 的 ATP 结合域(467~707aa)可弥补 HlyA 信号肽缺失对蛋白分泌的影响。Sugamata 等^[24]通过易错 PCR 引入了 HlyB 的 L448F, G654S 突变位点后(图 4),使异源蛋白枯草芽孢杆菌蛋白酶(subtilisin E)分泌量提高 15~27 倍。同样文献[28]利用易错 PCR 结合定向进化改造 HlyB 元件,获得了提高异源蛋白环糊精葡聚糖转移酶(CGTase)分泌量的 5 个突变株(图 4),其中 1 株的突变位点位于 NBD 的 WalkerB 附近,其余 4 株突变位点均位于 HlyB 的 TMD 域,揭示了 ATP 结合位 WalkerB(625~630aa)以及 TMD 域对分泌的重要性。V162A, V621A 突变对 CGTase 的分泌量提高最为明显(分别为 217% 和 130%)。值得一提的是突变子 903-05A 序列仅引入了 3 个沉默突变位点(t3007c, t483c, t639a),不存在氨基酸替换,而 CGTase 的分泌量提高了 56%^[28],可能是由于沉默突变引入了稀有密码子,从而降低蛋白翻译率^[41],减少包涵体的形成^[42]。文献[28]尝试利

用该系统分泌表达其他蛋白,发现角质酶(cutinase),人类肿瘤蛋白(c-Myc)在野生型菌株中不分泌,而在 V162A, L448F 突变株中成功分泌;L448F 突变子使 PTEN(肿瘤抑制因子)的蛋白活性提高了 10 倍^[24]。Zaitseva 等^[12]研究发现 HlyB 的 Pro-loop(621~625aa)(图 1)在蛋白转运过程中尤其是 TMD 与 NBD 的相互作用上发挥了重要作用,推测该区域的深入研究有助于提高蛋白分泌水平。

2.1.4 TolC 的改造 Vakharia 等^[43]对 TolC 进行改造,引入了 L42P, S257P, T140A, G147D, A343T, A360T 突变位点后, HlyA 的活性及分泌量降低,其中 L42, S257 位于 TolC 的膜外 β 域,参与蛋白转运后的释放; T140, G147, A343, A360 位于 TolC 周质 α 螺旋域,与 TolC 孔道的开放及 HlyB/D 相互作用有关。

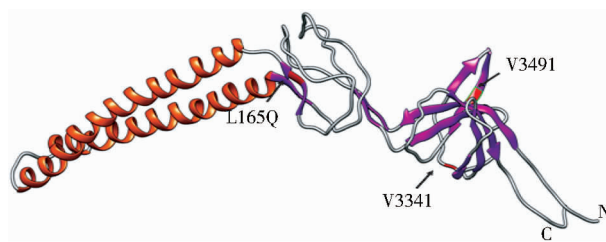


图 3 HlyD 突变位点

Fig. 3 Mutation sites in HlyD mutants

Representation of the three-dimensional structure of hlyD with secondary structure colored differently (orange: helix; violet: strand; gray: coil) and the variant region in red

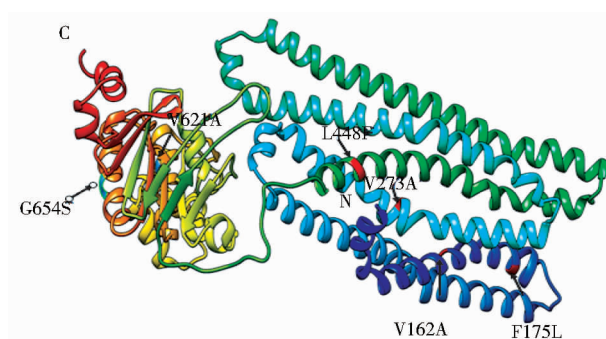


图 4 HlyB 突变位点

Fig. 4 Mutation sites in HlyB mutants

The HlyB protein is rainbow colored and the C- and N-terminal are marked. V621A and G654S are in NBD domain; L448F, V162A, F175L and V273A are in TMD domain

2.2 异源蛋白基因水平优化

由于大肠杆菌 I 型分泌系统表达元件数量有限,通过优化乘客蛋白(passenger protein)的折叠率可提高活

性蛋白的分泌量。Nakano 等^[44]将二氢叶酸还原酶 DHFR(dihydrofolate reductase) C 末端 β 片层上的氨基酸 Ile155 突变为 Lys 后,成功地实现了蛋白分泌。Bakkes 等^[31]将原核类麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MalE)上影响蛋白折叠率的相关基因突变后,胞外分泌量显著提高至 15 mg/L。文献[32]验证了此方法同样适用于真核类蛋白,实验组突变哺乳动物肠脂肪酸结合蛋白(intestinal fatty acid binding protein, IFABP),蛋白折叠率降低了 100 倍,分泌量从 0 提高至 6 mg/L。最近有学者提出共表达起到稳定蛋白作用的分子伴侣 ddFKBP 可代替突变折叠相关基因来降低蛋白的折叠率(destabilizing domain FKBP)^[45-47],进而提高蛋白分泌量。

宿主和目的基因的密码子偏爱性差异会影响蛋白的正确折叠和分泌,对异源蛋白进行密码子优化可提高蛋白的分泌量。Li 等^[25]根据大肠杆菌密码子偏好性替换了人白细胞介素-6(hIL-6) cDNA 序列中 36% 的密码子,经密码子优化后的序列构建的融合蛋白(hIL-6Ec-HlyAs)分泌量是初始融合蛋白(hIL-6-HlyAs)的 3 倍。Nakano 等^[44]发现引入 5 个稀有密码子后的 HlyA 分泌量提高了 8 倍,并且提出某些特定区域密码子的优化可能与蛋白折叠率及对底物的特异性的识别有关,所以通过优化密码子来提高蛋白活性可能是一个很好的选择。

质粒本身的拷贝数及大小也会影响蛋白的分泌量。研究发现中度拷贝质粒(15~60) HlyA 的分泌量是低拷贝质粒(11)分泌量的两倍^[47];环糊精葡聚糖转移酶(CGTase)在双质粒系统(pCGT-As/pBAD-BD)的分泌量是单质粒系统(pCGT-AsBD)分泌量的 4 倍^[29]。

2.3 培养条件优化

大肠杆菌的诱导条件如温度, IPTG 浓度, 诱导时间, 培养方式等都会影响蛋白的分泌量^[48]。研究发现不同的重组蛋白的最佳培养条件也不同,其中的特征及规律仍需进一步探索。Pimenta 等^[38]发现随培养基 Ca^{2+} 浓度的增加, HlyA 的分泌量及活性也随之增加,因此优化体外 Ca^{2+} 浓度来提高重组蛋白分泌量具有一定的研究价值。诱导温度的选择对蛋白的分泌量影响很大,例如人类肿瘤蛋白 c-Myc 只在低温条件下(23℃)分泌^[24];而脂肪酶 PalB-HlyA 及肿瘤抑制因子 PTEN 的最佳分泌温度是 37℃。Low 等^[29]指出培养基 TB 的某些成分有利于蛋白分泌,因此可选择 TB 代替 LB 来培养菌株。与摇瓶培养比较,生物反应器条件下蛋白的

活性及生长量相对较高^[24]。

3 结论与展望

大肠杆菌溶血素分泌途径由于其分泌蛋白快速直接,纯化效率高等优势倍受关注。近几年来不同物种的重组蛋白已在大肠杆菌中成功分泌表达,但表达水平基本维持在 10 mg/L,限制了其大规模生产商业化的应用。今后可从以下三个方向进行研究:(1)研究 I 型分泌系统表达元件的关键位点及与蛋白相互作用的机制,提高蛋白的转运效率;(2)探索影响目标蛋白折叠率的关键基因,降低蛋白折叠率;(3)总结分泌量达最大时的蛋白的特征及规律,拓宽应用范围。随着对大肠杆菌 I 型分泌系统机理的深化认识,高效溶血素信号肽的设计,以及发展蛋白自身结构对分泌影响的理论,各种药物蛋白及酶类产品产业化的前景会更广阔,利用大肠杆菌 I 型分泌系统大量分泌表达活性蛋白即将实现。

参考文献

- [1] 何冰芳, 米兰, 陈文华. 大肠杆菌蛋白质分泌机理及其重组蛋白分泌表达新进展. 食品与生物技术学报, 2012, 31(6): 561-569.
He B F, Mi L, Chen W H. The secretion mechanism of protein from *E. coli* and recent advancements of recombinant protein expression. J Food Sci Biotechnol, 2012, 31(6): 561-569.
- [2] Ni Y, Chen R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. Biotechnol Lett, 2009, 31: 1661-1670.
- [3] Yoon S H, Kim S K, Kim J F. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Recent Pat Biotechnol, 2010, 4: 23-29.
- [4] 訾祯祯, 杨志伟. 细菌蛋白分泌途径的研究进展. 生物技术通报, 2011, 8: 44-54.
Zi Z Z, Yang Z W. Protein secretion pathways in bacterial cells. Biol Bull, 2011, 8: 44-54.
- [5] Mergulhão F J, Summers D K, Monteiro G A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. Biotechnol Adv, 2005, 23(3): 177-202.
- [6] Badyakina A O, Nesmeyanova M A. Biogenesis and secretion of overproduced protein in recombinant strains of *Escherichia coli*. Process Biochem, 2005, 40: 509-518.
- [7] Chen S, Liu Z, Chen J, et al. Study on improvement of extracellular production of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by *Escherichia coli*. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 165: 666-675.
- [8] Yamabhai M, Emrat S, Sukasem S, et al. Secretion of recombinant *Bacillus* hydrolytic enzymes using *Escherichia coli*

- expression systems. *J Biotechnol*, 2008, 133: 50-57.
- [9] Delepelaire P. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1694: 149-161.
- [10] Holland I B, Schmitt L, Young J. Type I protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol Membr Biol*, 2005, 22(1-2): 29-39.
- [11] Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, et al. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 2000, 405: 914-919.
- [12] Zaitseva J, Jenewein S, Oswald C, et al. A molecular understanding of the catalytic cycle of the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33: 990-995.
- [13] Sanchez-Magraner L, Viguera A R, Garcia-Pacios M, et al. The calcium-binding C-terminal domain of *Escherichia coli* alpha-hemolysin is a major determinant in the surface-active properties of the protein. *J Biol Chem*, 2007, 282(16): 11827-11835.
- [14] Ludwig A, Jarchau T, Benz R, et al. The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca^{2+} -dependent binding to erythrocytes. *Mol Gen Genet*, 1988, 214: 553-561.
- [15] Jones H E, Holland I B, Campbell A K. Direct measurement of free Ca^{2+} shows different regulation of Ca^{2+} between the periplasm and the cytosol of *Escherichia coli*. *Cell Calcium*, 2002, 32: 183-192.
- [16] Kanonenberg K, Schwarz Christian K W, Schmitt L. Type I secretion systems-a story of appendices. *Res Microbiol*, 2013, 3: 1-9.
- [17] Gentschev I, Dietrich G, Goebel W. The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol*, 2002, 10(1): 39-45.
- [18] Mohammadian M, Fathi-Roudsari M, Mollania N, et al. Enhanced expression of a recombinant bacterial laccase at low temperature and microaerobic conditions; purification and biochemical characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37: 863-869.
- [19] Martins L O, Soares C M, Pereira M M, et al. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J Biol Chem*, 2002, 277(21): 18849-18859.
- [20] Fernandez L A, Sola I, Enjuanes L, et al. Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(11): 5024-5029.
- [21] Bisi D C, Lampe D J. Secretion of anti-*Plasmodium* effector proteins from a natural *Pantoea agglomerans* isolate by using pelB and hlyA secretion signals. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(13): 4669-4675.
- [22] Narayanan N, Khan M, Chou C P. Enhancing functional expression of heterologous lipase B in *Escherichia coli* by extracellular secretion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37: 349-361.
- [23] Gomez-duarte O G, Pasetti M, Santiago A, et al. Expression, extracellular secretion, and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 in *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun*, 2001, 69(2): 1192-1198.
- [24] Sugamata Y, Shiba T. Improved secretory production of recombinant proteins by random mutagenesis of hlyB, an alpha-hemolysin transporter from *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(2): 656-662.
- [25] Li Y, Chen C X, Specht B U, et al. Cloning and hemolysin-mediated secretory expression of a codon-optimized synthetic human interleukin-6 gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2002, 25: 437-447.
- [26] 宁亚蕾, 周立雄, 张卫军, 等. 利用 α -溶血素系统分泌表达重组人白介素. *免疫学杂志*, 2008, 24(4): 380-384.
Ning Y L, Zhou L X, Zhang W J, et al. Extracellular secretion of recombinant hIL-6 utilizing UPEC α -hemolysin (HlyA) system. *J Immunol*, 2008, 24(4): 380-384.
- [27] Su L, Chen S, Yi L, et al. Extracellular overexpression of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by alpha-hemolysin secretion system in *E. coli* BL21 (DE3). *Microb Cell Fact*, 2012, 11: 1-8.
- [28] Low K O, Mahadi N M, Rahim R A, et al. Enhanced secretory production of hemolysin-mediated cyclodextrin glucanotransferase in *Escherichia coli* by random mutagenesis of the ABC transporter system. *J Biotechnol*, 2010, 150: 453-459.
- [29] Low K O, Mahadi N M, Rahim R A, et al. An effective extracellular protein secretion by an ABC transporter system in *Escherichia coli*: statistical modeling and optimization of cyclodextrin glucanotransferase secretory production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38: 1587-1597.
- [30] 张兆山. 大肠杆菌 α -溶血素分泌表达系统的构建及应用初探. 北京: 军事科学医学院生物工程研究所, 2004.
Zhang Z S. Study of construction and application of the recombinant secretion plasmid based on α -hemolysin secretion system. Beijing: Institute of Biological Engineering of the Military Academy of Medical Sciences, 2004.
- [31] Bakkes P J, Jenewein S, Smits S H, et al. The rate of folding dictates substrate secretion by the *Escherichia coli* hemolysin type I secretion system. *J Biol Chem*, 2010, 285(52): 40573-40580.
- [32] Schwarz C K, Landsberg D, Lenders C, et al. Using an *E. coli* Type I secretion system to secrete the mammalian, intracellular protein IFABP in its active form. *J Biotechnol*, 2012, 159: 155-161.
- [33] Jumpertz T, Chervaux C, Racher K, et al. Mutations affecting the extreme C terminus of *Escherichia coli* haemolysin A reduce haemolytic activity by altering the folding of the toxin. *Microbiology*, 2010, 156: 2495-2505.
- [34] Kenny B, Chervaux C, Holland I B. Evidence that residues -15 to -46 of the haemolysin secretion signal are involved in early steps in secretion, leading to recognition of the translocator. *Mol*

- Microbiol, 1994, 11: 99-109.
- [35] Kenny B, Haigh R, Holland I B. Analysis of the haemolysin transport process through the secretion from *Escherichia coli* of PCM, CAT or beta-galactosidase fused to the Hly C-terminal signal domain. Mol Microbiol, 1991, 5(10): 2557-2568.
- [36] Pimenta A L, Young J, Holland I B, et al. Antibody analysis of the localisation, expression and stability of HlyD, the MF Pcomponent of the *E. coli* haemolysin translocator. Mol Gen Genet, 1999, 261: 122-132.
- [37] Schulein R, Gentschev S, Schlör I, et al. Identification and characterization of two functional domains of the haemolysin translocator protein HlyD. Mol Gen Genet, 1994, 245: 203-211.
- [38] Pimenta A L, Racher K, Jamieson L, et al. Mutations in HlyD, part of the type I translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin. J Bacteriol, 2005, 187(21): 7471-7480.
- [39] Blight M A, Pimenta A L, Lazzaroni J C, et al. Identification and preliminary characterization of temperature-sensitive mutations affecting HlyB, the translocator required for the secretion of haemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. Mol Gen Genet, 1994, 245: 431-440.
- [40] Sheps J A, Cheung I, Ling V. Hemolysin transport in *Escherichia coli* point mutants in HlyB compensate for a deletion in the predicted amphiphilic helix region of the HlyA signal. J Biol Chem, 1995, 270(24): 14829-14834.
- [41] Lee P S, Lee K H. Engineering HlyA hypersecretion in *Escherichia coli* based on proteomic and microarray analyses. Biotechnol Bioeng, 2005, 89: 195-205.
- [42] Prateek G, Kelvin H L. Silent mutations result in HlyA hypersecretion by reducing intracellular HlyA protein aggregates. Biotechnol Bioeng, 2008, 101(5): 967-974.
- [43] Vakharia H, German G J, Misra R. Isolation and characterization of *Escherichia coli* tolC mutants defective in secreting enzymatically active alpha-hemolysin. J Bacteriol, 2001, 183(23): 6908-6916.
- [44] Nakano H, Kawakami Y, Nishimura H. Secretion of genetically-engineered dihydrofolate reductase from *Escherichia coli* using an *E. coli* alpha-hemolysin membrane translocation system. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37(6): 765-771.
- [45] Herm-Gotz A, Agop-Nersesian C, Munter S, et al. Rapid control of protein level in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*. Nat Methods, 2007, 4: 1003-1005.
- [46] Armstrong C M, Goldberg D E. An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. Nat Meth, 2007, 4: 1007-1009.
- [47] Banaszynski L A, Chen L C, Maynard-Smith L A, et al. A rapid reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. Cell, 2006, 126: 995-1004.
- [48] Sørensen H P, Mortensen K K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J Biotechnol, 2005, 115: 113-128.

Research Advances in Secretary Production of Recombinant Protein Using *Escherichia coli* Type I Secretion System and Strategies for Enhancement of Secretion of Type I Pathway

WANG Jing-yao WANG Tian-nv LU Lei ZHANG Shuai ZHAO Min

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract *Escherichia coli* is one of the most commonly used hosts for recombinant protein production. Extracellular protein expression in *E. coli*, which is favored by its improved correct folding of target protein, reduced formation of inclusion bodies and simplified purification process, is attracting increasing attention. Among all the secretion systems of *E. coli*, the type I secretion system has become one of the most popular secretion pathways due to its fast secretion speed, high expression ability and harmlessness to cell physiology. The components and mechanism of type I pathway of *E. coli* and efficient strategies for enhancing secretion efficiency of recombinant protein are summarized, which provides the theoretical basis for production of recombinant protein.

Key words *Escherichia coli* Extracellular expression Recombinant protein Type I secretion pathway Efficient secretory strategy