

星海链霉菌卤化酶重组蛋白在大肠杆菌中可溶表达

王玉梅¹, 赵心清^{*1}, 马昱澍², 魏东芝²

(1. 大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024;

2. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是表达异源蛋白的良好宿主,但常遇到蛋白表达产物不可溶的困难. 在对来自星海链霉菌的卤化酶基因 *sinH* 进行大肠杆菌异源表达时,为克服蛋白表达产物可溶性低的问题,探讨了不同载体对蛋白可溶表达的影响. 利用 pET28a 进行 SinH 表达时不能得到可溶的目标蛋白;使用含有泛素标签及内含肽的载体 pHUIE 实现了卤化酶蛋白 SinH 的可溶表达,但纯化后纯度不高;利用带有链霉菌分子伴侣蛋白基因的载体 pET28a-SinH 与 pETcoco-pL1SL2 在 *E. coli* BL21(DE3)中共表达,在 30 ℃, 0.1 mmol/L IPTG 诱导条件下表达 4 h,成功获得大量可溶蛋白,使用亲和层析(Ni-NTA)纯化,获得了较纯的目标蛋白 SinH,上述研究结果为在大肠杆菌中进行其他链霉菌蛋白的可溶表达提供了参考.

关键词: 卤化酶;星海链霉菌;可溶表达;泛素标签;链霉菌分子伴侣;共表达体系;蛋白纯化

中图分类号: Q786

文献标识码: A

doi:10.7511/dllgxb201403003

0 引言

大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)具有繁殖速度快、培养成本低等优点,被广泛用作多肽、蛋白质的异源表达宿主,但在表达时常出现包涵体的形成造成蛋白不可溶的问题^[1]. 链霉菌基因组 DNA 中 GC 含量较高,其基因组编码的蛋白是多种重要的酶的来源,但链霉菌来源的蛋白在大肠杆菌中的表达产物不可溶的问题限制了对链霉菌蛋白功能的分析^[2]. 应用融合蛋白标签能够促进蛋白的表达和正确折叠^[3],但由于这些融合蛋白都比较大,可能影响目标蛋白的活性,因此需要使用特定的蛋白酶切除融合蛋白,这使得分离成本增加,分离步骤变得复杂. 为解决这些问题,我国学者在证明泛素可提高蛋白可溶表达的基础上^[4],提出将内含肽插入融合蛋白和表达蛋白中间,其中内含肽可以在特定的诱导条件下催化自身从蛋白质的前体中切除,并形成肽键将两侧蛋

白连接形成成熟蛋白^[5],通过改变 pH,在温和的条件下将融合蛋白标签切除,从而实现蛋白的可溶表达和融合蛋白的自剪切^[6],但相关研究在链霉菌蛋白表达中目前没有报道. 此外,国外学者利用含有链霉菌蛋白分子伴侣的载体 pETcoco-pL1SL2,用表达的分子伴侣 GroEL、GroES 与靶蛋白暴露的疏水表面作用防止错误的相互作用^[7-8],在大肠杆菌中成功实现了较大的合成红霉素的聚酮合成酶的其中一个多肽链 DEBS3(332 kDa)的可溶表达^[9],表明链霉菌分子伴侣蛋白对在大肠杆菌中可溶表达链霉菌蛋白具有促进作用.

放线菌是革兰氏阳性细菌,可产生具有抗肿瘤、抗真菌、抗细菌等活性的多种次级代谢产物,其中含有卤素的卤化物广泛存在于放线菌次级代谢产物中^[10-11],这些化合物的形成需要卤化酶的催化,而卤素的存在对这些化合物的活性至关重要^[12-13],因此对卤化酶的酶学性质研究及改造成

收稿日期: 2014-03-05; 修回日期: 2014-04-08.

基金项目: 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室开放课题资助项目;中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室开放课题资助项目(LMB111002).

作者简介: 王玉梅(1988-),女,硕士生,E-mail:wy_wym@126.com;赵心清*(1972-),女,教授,博士生导师,E-mail:xqzhao@dlut.edu.cn.

为近年来的热点^[14-17]. 本实验室在对大连地区分离的海洋放线菌进行研究的过程中鉴定了一株海洋链霉菌新种星海链霉菌, 并对其基因组序列进行了测定和分析^[18-19]. 星海链霉菌基因组中有一个可能编码黄素依赖型卤化酶的基因 *sinH*, 与具有抗病毒抗补体活性的化合物 complestatin 的生物合成基因簇中卤化酶 ComH^[20] 具有较高的同源性. 为了对该酶的功能进行分析, 需要首先获得可溶的蛋白, 但利用通用 pET28a 载体表达该基因得到的都是不可溶的蛋白. 本文尝试使用含有泛素标签及内含肽的载体 pHUIE 和使用链霉菌分子伴侣两种策略, 研究其对星海链霉菌卤化酶 SinH 可溶表达的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

pET28a 原核表达载体及大肠杆菌菌株 *E. coli* (DE3) 购自 Novagen 公司, pHUIE 原核表达载体由清华大学黄来强教授惠赠, pETcoco-pL1SL2 由英国剑桥大学 Peter Leadlay 教授惠赠, 星海链霉菌 (S187) 为本实验室保存菌种, Ni-NTA 亲和树脂购自 Qiagen 公司.

1.2 pET28a-SinH 重组质粒构建和蛋白表达

1.2.1 pET28a-SinH 原核表达质粒构建 根据卤化酶 SinH 基因开放阅读框设计引物:

S187-SinH-F: 5'-ATAGGATCCATGAC-CCGCCGGGTGA-3'

S187-SinH-R: 5'-ATAAAGCTTCTCGC-CGGTGCCCTGGG-3'

上下游引物分别携带 *Bam*HI、*Hind*III 酶切位点(用下划线标出). 以 S187 基因组作为模板进行 PCR 扩增, 反应体系(50 μ L)如下: 10 倍 PCR 缓冲液 5 μ L, 引物溶液(10 mmol/L)各 2 μ L, dNTPs 溶液(2.5 mmol/L) 4 μ L, DMSO 溶液 0.5 μ L, rTaq 酶 0.5 μ L, 基因组 DNA 1 μ L, 重蒸馏水 35 μ L. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64 ~ 56 $^{\circ}$ C (每 6 个循环降低 2 $^{\circ}$ C) 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 回收 PCR 产物并使用 *Bam*HI、*Hind*III 进行双酶切, 并与同样酶切的 pET28a 过夜连接, 转化后挑取具有卡那霉素抗性的阳性菌落, 抽提质

粒, *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切鉴定并测序, 获得测序正确的重组质粒即 pET28a-SinH.

1.2.2 pET28a-SinH 重组蛋白的诱导表达 将 pET28a-SinH 转化至大肠杆菌菌株 *E. coli* (DE3) 中, 过夜活化后以 2% 体积比转接于 200 mL LB(0.1 g/L 卡那霉素)中, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 2.5 h, 至细菌对数生长期, 加 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L 后 16 $^{\circ}$ C 诱导 3~4 h. 12 000 r/min 离心 10 min 收取菌体, 重悬于冰的 100 μ L PBS 中, 加入 PMSF 至终浓度为 10 mmol/L. 超声破碎至溶液无黏性, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清和沉淀备用. 加入 2 倍加样缓冲液, 煮沸 10 min 变性, 12 000 r/min 离心 10 min. 分别取样品 10 μ L 进行 12% SDS-PAGE 电泳分析.

1.3 pHUIE-SinH 重组质粒构建和蛋白表达及纯化

1.3.1 pHUIE-SinH 原核表达质粒构建 根据卤化酶 SinH 基因及载体设计引物:

pHUIE-SinH-F: 5'-ATAGAATTCATGAC-CCGCCGGGTGA-3'

pHUIE-SinH-R: 5'-ATAAAGCTTTCA-CTCGCCGGTGCCCTGGG-3'

上下游引物分别携带 *Eco*RI、*Hind*III 酶切位点(见引物序列下划线部分). 以 S187 基因组作为模板进行 PCR 扩增, 反应体系、条件, 及重组质粒 pHUIE-SinH 的构建、验证同方法 1.2.1.

1.3.2 pHUIE-SinH 重组蛋白的诱导表达 将 pHUIE-SinH 转化至大肠杆菌 *E. coli* (DE3) 中, 过夜活化后以 2% 体积比转接于 200 mL LB(0.1 g/L 氨苄青霉素)中, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 2.5 h, 至细菌对数生长期, 加 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L 后 16 $^{\circ}$ C 分别诱导 4、8 及 24 h. 利用 1.2.2 描述的方法进行蛋白电泳检测.

1.3.3 SinH 重组蛋白的纯化 选择最优条件(16 $^{\circ}$ C, 0.4 mmol/L IPTG 诱导 8 h)大量诱导 SinH 蛋白, 超声破碎后, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 30 min, 上清使用 0.45 μ m 水系膜过滤, 收集的蛋白样品 4 $^{\circ}$ C 保存. 使用 Ni-NTA 亲和树脂纯化带有组氨酸标签的卤化酶 SinH 蛋白, 上样后先使用 10 倍柱体积含 50 mmol/L 咪唑的缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, 0.3 mol/L NaCl, pH

8.5)洗去结合力弱的杂蛋白,然后使用 10 倍柱体积含 20 mmol/L 咪唑的剪切缓冲液(PBS 缓冲液+40 mmol/L Bis-Tris,pH6.0)冲洗,接下来封闭室温保存 4 h,使用 5 倍柱体积的含20 mmol/L咪唑的剪切缓冲液洗脱自剪切下的目标蛋白,最后使用含有 200 mmol/L 咪唑的剪切缓冲液洗脱结合的组氨酸标签.4 ℃保存目标蛋白并进行 SDS-PAGE 电泳检测,将得到的酶液进行除盐和 PEG20000 浓缩得到酶储液,并使用考马斯亮蓝法进行蛋白定量.

1.4 共表达

1.4.1 共表达系统的构建及诱导表达 将分子伴侣质粒 pETcoco-pL1SL2 转化至 *E. coli* (DE3) pET28a-SinH 中,挑取具有抗卡那霉素、氯霉素和氨苄青霉素的单个克隆作为共表达系统,过夜活化后以 2 %体积比转接于 200 mL LB (0.1 g/L 卡那霉素、0.025 g/L 氯霉素、100 g/L 氨苄青霉素)中,37 ℃继续培养 2.5 h,至细菌对数生长期,加 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L 后分别诱导 4、8 和 24 h,利用 1.2.2 描述的方法进行蛋白电泳检测.

1.4.2 重组蛋白的纯化 选择最优条件(30 ℃,0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h)大量诱导 SinH 蛋白,超声破碎后,4 ℃,12 000 r/min 离心 30 min,上清使用 0.45 μm 水系膜过滤,收集的蛋白样品 4 ℃保存.使用 AKTA purifier 100 蛋白层析仪,Ni-NTA 亲和树脂预装柱纯化带有组氨酸标签的卤化酶 SinH 蛋白,1 mL/min 上样后先使用含 25 mmol/L 咪唑的缓冲液 A(25 mmol/L Tris-HCl,0.5 mol/L NaCl,pH 7.5)洗去结合力弱的杂蛋白,然后用含有 200 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 冲洗柱子,洗脱结合力强的目的蛋白,4 ℃保存并进行 SDS-PAGE 电泳检测.

2 结果与讨论

2.1 pET28a-SinH 重组蛋白表达

2.1.1 pET28a-SinH 原核表达质粒构建和验证 根据卤化酶基因及 pET28a 的碱基序列设计引物,PCR 获得目标片段,*Bam*HI、*Hind*III 双酶切后与 pET28a 载体连接,转化后提取质粒进行双酶切验证,电泳图如图 1 所示,酶切获得载体骨架

和约 1.5 kb 的卤化酶片段,插入片段测序结果显示卤化酶片段完全正确,共 1 530 bp,编码 510 个氨基酸,且没有点突变及移码突变,表明 pET28a-SinH 表达载体构建成功.

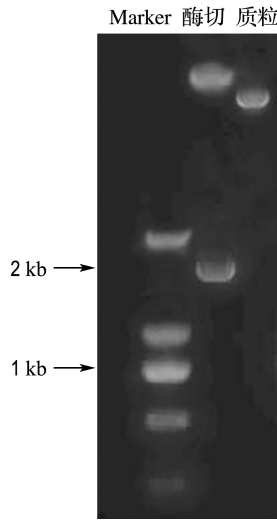
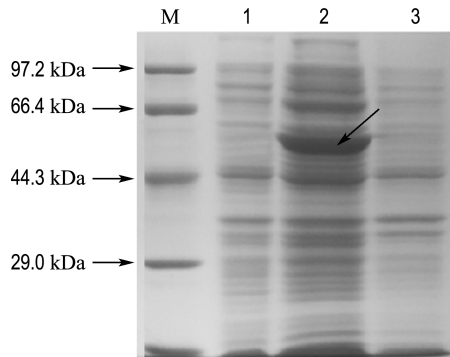


图 1 重组质粒 pET28a-SinH 双酶切鉴定电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of restriction enzyme digestion analysis of pET28a-SinH recombinant plasmid

2.1.2 pET28a-sinH 重组蛋白的不可溶表达 将正确构建的 pET28a-SinH 质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中,进行蛋白的诱导表达,SDS-PAGE 蛋白电泳图如图 2 所示,诱导表达的 SinH 蛋白均形成包涵体,检测不到可溶目标蛋白,且通过改变诱导温度,优化诱导剂 IPTG 浓度及诱导时间也未得到可溶蛋白(数据未列出),这一结果



M TaKaRa 蛋白相对分子质量标准(低);1 空载 pET28a 菌体;2 pET28a-SinH 菌体沉淀;3 pET28a-SinH 菌体上清;箭头表示 SinH 蛋白
图 2 pET28a-SinH 重组蛋白表达
Fig. 2 Expression of pET28a-SinH recombinant protein

可能是由于大肠杆菌表达系统蛋白表达过快,形成蛋白过多未能够及时进行正确的蛋白折叠,且不适合异源表达链霉菌这一类 GC 含量较高的基因.

2.2 pHUIE-SinH 重组蛋白表达和纯化

2.2.1 pHUIE-SinH 原核表达质粒构建和验证
根据卤化酶基因及 pHUIE 的碱基序列设计引物,PCR 获得目标片段,*Eco*RI、*Hind*III 双酶切后与 pHUIE 载体连接,转化后提取质粒进行双酶切验证,电泳图如图 3 所示,测序结果表明 pHUIE-SinH 表达载体构建成功.

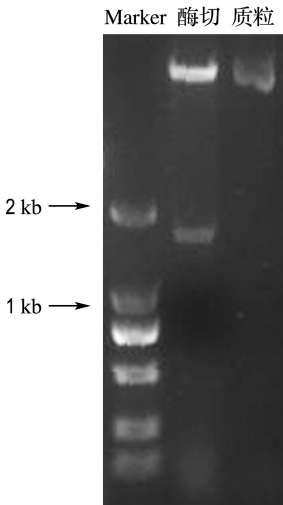
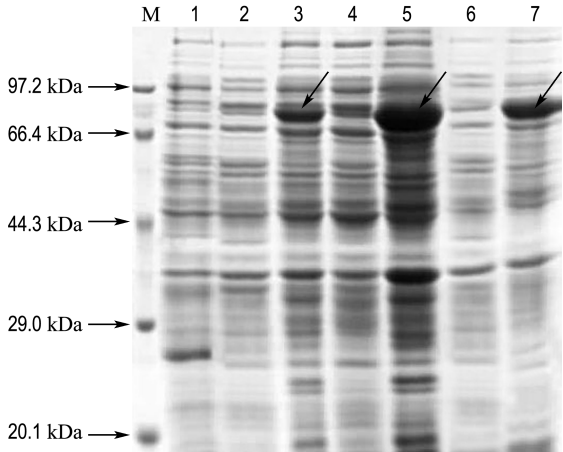


图 3 重组质粒 pHUIE-SinH 双酶切鉴定电泳图
Fig. 3 Electrophoresis of restriction enzyme digestion analysis of pHUIE-SinH recombinant plasmid

2.2.2 pHUIE-SinH 重组蛋白的可溶表达
泛素(Ub)是一种存在于大多数真核细胞的高度保守小蛋白,相对分子质量约为 8.5 kDa,其作为融合标签能够提高蛋白的产量,促进蛋白可溶^[21]. 本实验通过将 SinH 与融合蛋白泛素连接,促进该蛋白的可溶表达,同时使用内含肽将目标蛋白和融合蛋白连接,通过改变 pH,即可在温和的条件下切除较大的融合蛋白,获得目标蛋白. 星海链霉菌卤化酶 SinH 的可溶表达情况如图 4 所示,诱导 8 h 可以获得一定量的可溶蛋白. 本实验还尝试用 SUMO(small ubiquitin-related modifier)作为融合标签进行卤化酶 SinH 的可溶表达,但可溶表达量较 pHUIE-SinH 重组可溶目标蛋白少(数据未列出),因此只对含有泛素标签的重组蛋白进行了纯化.

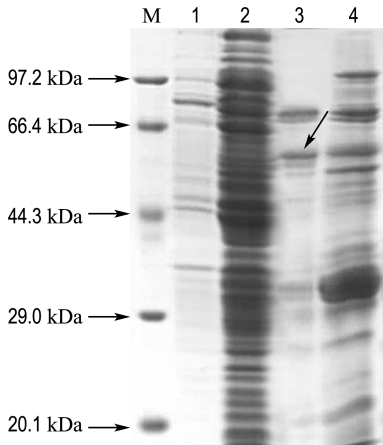


M TaKaRa 蛋白相对分子质量标准(低);1 空载体对照(BL21+ pHUIE);2 4 h 上清;3 4 h 沉淀;4 8 h 上清;5 8 h 沉淀;6 24 h 上清;7 24 h 沉淀;箭头表示 SinH 不可溶蛋白

图 4 利用 pHUIE-SinH 载体进行重组蛋白 SinH 的表达

Fig. 4 Expression of recombinant protein SinH by using pHUIE-SinH

2.2.3 pHUIE-SinH 重组蛋白的纯化
使用 pHUIE-SinH 载体,利用 0.4 mmol/L IPTG,在 16 ℃诱导 8 h 获得大量可溶蛋白后进行蛋白的纯化,SDS-PAGE 电泳图如图 5 所示,分离后能够去除大部分杂蛋白,但仍有部分未进行自剪切的蛋白杂质,因此纯化效率及纯度较低.

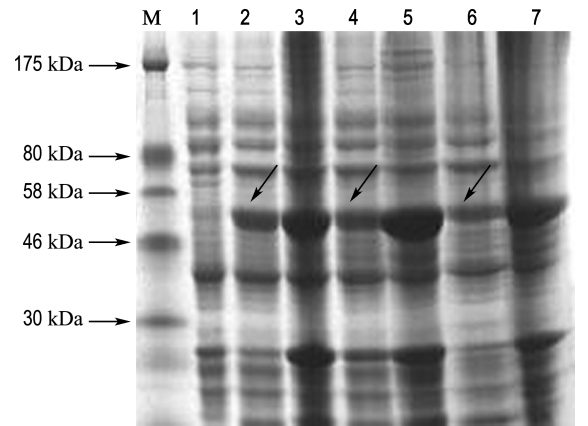


M TaKaRa 蛋白相对分子质量标准(低);1 空载;2 上清;3 自剪切后含 20 mmol/L 咪唑的剪切缓冲液的洗脱峰;4 含 200 mmol/L 咪唑的剪切缓冲液的洗脱峰;箭头表示 SinH 蛋白

图 5 重组蛋白 SinH 的纯化
Fig. 5 Purification of recombinant protein SinH

2.3 共表达体系蛋白的表达和纯化

2.3.1 共表达体系重组蛋白的诱导表达 考虑大肠杆菌表达链霉菌蛋白速度较快不利于蛋白的正确折叠,而分子伴侣能够在肽链形成天然构象前识别未折叠的肽链,与它们形成复合物防止蛋白质中心的疏水区瞬间暴露而导致的错误折叠^[22],本实验构建导入分子伴侣 pL1SL2 共表达体系进行重组蛋白的诱导表达,SDS-PAGE 蛋白电泳图如图 6 所示,导入分子伴侣的共表达体系能够产生可溶蛋白,且通过对诱导时间的比较得出诱导表达 4 h 即可获得较多的可溶蛋白,可以此条件进行诱导蛋白的大量培养并进行分离纯化。



M NEB marker;1 空载体对照(BL21+pET28a);2 4 h 上清;3 4 h 沉淀;4 8 h 上清;5 8 h 沉淀;6 24 h 上清;7 24 h 沉淀;箭头表示 SinH 可溶蛋白

图 6 共表达体系 BL21 + pET28a-SinH + pETcoco-pL1SL2 重组蛋白表达

Fig. 6 Expression of recombinant protein by BL21 + pET28a-SinH + pETcoco-pL1SL2 coexpression system

2.3.2 共表达体系重组蛋白的纯化 30 ℃ 下使用 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 表达重组蛋白,然后使用亲和层析 Ni 柱进行目标蛋白的分离纯化,如图 7. 上样后使用含有 25 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 洗脱结合力弱的杂蛋白,然后使用含 200 mmol/L 咪唑的缓冲液 A 洗脱通过组氨酸标签结合的目标蛋白,接下来将各部分的样品进行 SDS-PAGE 蛋白电泳检测,电泳图如图 8 所示. 亲和层析分离蛋白 SinH, Ni 柱能够有效结合含有组氨酸标签的目标蛋白,使用含低浓度咪唑的缓冲液

A 能够洗脱绝大多数结合力弱的杂蛋白,使用含高浓度咪唑的缓冲液 A 能够洗脱目标蛋白,获得较纯目标蛋白 SinH.

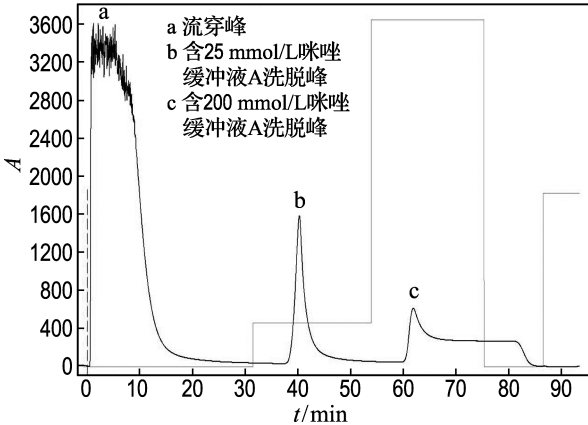
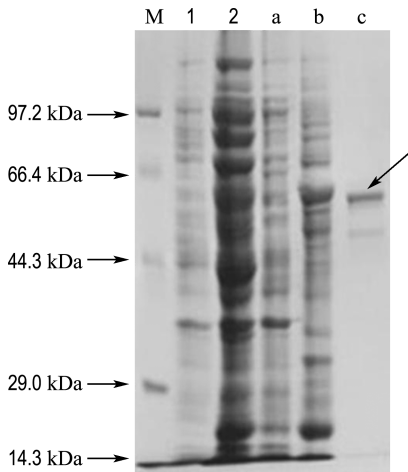


图 7 亲和层析 Ni-NTA 纯化蛋白 SinH
Fig. 7 Purification of SinH by Ni-NTA affinity chromatography



M TaKaRa 蛋白相对分子质量标准(低);1 空载;2 上清(BL21+pET28a-SinH+pETcoco-pL1SL2 30 ℃ 4 h 上清);a 流穿峰;b 含 25 mmol/L 咪唑缓冲液 A 洗脱峰;c 含 200 mmol/L 咪唑缓冲液 A 洗脱峰;箭头表示 SinH 蛋白

图 8 共表达体系重组蛋白 SinH 的纯化
Fig. 8 Purification of recombinant protein SinH of coexpression system

3 结 论

首次使用融合蛋白标签泛素及内含肽实现了星海链霉菌卤化酶 SinH 的可溶表达,同时通过改变缓冲液的 pH(pH 8.0 至 pH 6.0)实现了融

合蛋白标签的切除,该方法为低成本地使用融合蛋白标签提供了参考.利用含有链霉菌分子伴侣的载体 pETcoco-pL1SL2 获得了较多的可溶蛋白 SinH,通过条件优化(30 ℃,0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h),蛋白的可溶表达量达到最高,使用亲和层析(Ni-NTA)实现了目标蛋白的纯化,获得了较纯的 SinH 重组蛋白.本文的结果为使用大肠杆菌进行其他链霉菌蛋白的异源表达提供了参考.

致谢:清华大学黄来强教授惠赠了 pHUIE 表达载体,剑桥大学 Peter Leadlay 教授惠赠了链霉菌分子伴侣表达载体 pETcoco-pL1SL2.

参考文献:

- [1] Sevillano L, Diaz M, Santamaria R I. Stable expression plasmids for *Streptomyces* based on a toxin-antitoxin system [J]. **Microbial Cell Factories**, 2013, **12**:39.
- [2] 万娟,邓会群,张碧乾,等. 分子伴侣协助下抗肿瘤抗生素美达霉素生物合成中的糖基转移酶 Med-ORF8 的原核表达[J]. 微生物学通报, 2011, **38**(2):221-227.
WAN Juan, DENG Hui-qun, ZHANG Bi-qian, *et al.* Prokaryotic expression of a glycosyltransferase Med-ORF8 involved in an antitumor antibiotic medermycin biosynthesis aided by the molecular chaperone [J]. **Microbiology**, 2011, **38**(2):221-227. (in Chinese)
- [3] Esposito D, Chatterjee D K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags [J]. **Current Opinion in Microbiology**, 2006, **17**(4):353-358.
- [4] Wang Z, Li H, Guan W, *et al.* Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility [J]. **Protein Express and Purification**, 2010, **73**(2):203-208.
- [5] 李燕,张洁,卢琳,等. 内含肽介导的蛋白质亲和纯化[J]. 江西科学, 2013, **31**(4):453-455.
LI Yan, ZHANG Jie, LU Lin, *et al.* Intein-mediated protein affinity purification [J]. **Jiangxi Science**, 2013, **31**(4):453-455. (in Chinese)
- [6] Wang Z, Li N, Wang Y, *et al.* Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification [J]. **Protein Express and Purification**, 2012, **82**(1):174-178.
- [7] Weissman J S, Hohl C M, Kovalenko O, *et al.* Mechanism of GroEL action:productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES [J]. **Cell**, 1995, **83**(4):577-587.
- [8] Xu Z, Horwich A L, Sigler P B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP) 7 chaperonin complex [J]. **Nature**, 1997, **388**(6644):741-750.
- [9] Betancor L, Fernandez M J, Weissman K J, *et al.* Improved catalytic activity of a purified multienzyme from a modular polyketide synthase after coexpression with *Streptomyces* chaperonins in *Escherichia coli* [J]. **ChemBioChem**, 2008, **9**(18):2962-2966.
- [10] Lam K S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes [J]. **Current Opinion in Microbiology**, 2006, **9**(3):245-251.
- [11] Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, *et al.* Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives [J]. **Microbiological Research**, 2013, **168**(6):311-332.
- [12] GAO Peng, HUANG Ying. Detection, distribution, and organohalogen compound discovery implications of the reduced flavin adenine dinucleotide-dependent halogenase gene in major filamentous actinomycete taxonomic groups [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2009, **75**(14):4813-4820.
- [13] Zhu T, Cheng X, Liu Y, *et al.* Deciphering and engineering of the final step halogenase for improved chlortetracycline biosynthesis in industrial *Streptomyces aureofaciens* [J]. **Metabolic Engineering**, 2013, **19**:69-78.
- [14] 唐晓敏,徐俊. 微生物卤代酶研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2008, **33**(11):641-644.
TANG Xiao-min, XU Jun. Advance in research on the halogenase from microorganism [J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2008, **33**(11):641-644. (in Chinese)
- [15] 李航,朱丽,陈代杰. 参与抗生素生物合成的 FADH₂ 依赖型卤化酶研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2010, **35**(1):1-6.
LI Hang, ZHU Li, CHEN Dai-jie. Recent developments of FADH₂-dependent halogenases involved in the biosynthesis of antibiotics [J].

- Chinese Journal of Antibiotics**, 2010, **35**(1):1-6.
(in Chinese)
- [16] Xiao Y, Li S, Niu S, *et al.* Characterization of tiacumicin B biosynthetic gene cluster affording diversified tiacumicin analogues and revealing a tailoring dihalogenase [J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2011, **133**(4):1092-1105.
- [17] Lang A, Polnick S, Nicke T, *et al.* Changing the regioselectivity of the tryptophan 7-halogenase PrnA by site-directed mutagenesis [J]. **Angewandte Chemie International Edition**, 2011, **50**(13):2951-2953.
- [18] ZHAO Xin-qing, LI Wen-jun, JIAO Wen-ce, *et al.* *Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., isolated from marine sediment [J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2009, **59**(Pt 11):2870-2874.
- [19] ZHAO Xin-qing, YANG Tian-hong. Draft genome sequence of the marine sediment-derived actinomycete *Streptomyces xinghaiensis* NRRL B24674^T [J]. **Journal of Bacteriology**, 2011, **193**(19):5543.
- [20] Chiu H T, Hubbard B K, Shah A N, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2001, **98**(15):8548-8553.
- [21] Catanzariti A M, Soboleva T A, Jans D A, *et al.* An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins [J]. **Protein Science**, 2004, **13**(5):1331-1339.
- [22] 聂忠清, 吴永刚, 蒙建洲. 分子伴侣的功能和应用 [J]. **生命科学**, 2006, **18**(1):84-89.
- NIE Zhong-qing, WU Yong-gang, MENG Jian-zhou. The function and application of molecular chaperone [J]. **Chinese Bulletin of Life Sciences**, 2006, **18**(1):84-89. (in Chinese)

Soluble expression of halogenase SinH from *Streptomyces xinghaiensis* in *Escherichia coli*

WANG Yu-mei¹, ZHAO Xin-qing^{*1}, MA Yu-shu², WEI Dong-zhi²

(1. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: *Escherichia coli* (*E. coli*) is a good host for expression of heterologous proteins, but insoluble protein products are often obtained. In order to overcome the problem of low soluble expression, halogenase gene *sinH* from *Streptomyces xinghaiensis* is expressed by *E. coli*, the effect of different vectors on the solubility is discussed. No soluble target protein is detected when it is expressed using pET28a, whereas by using expression vector pHUIE containing ubiquitin tag and intein, soluble target protein is obtained and purified, but the purity is low. The coexpression system containing pET28a-SinH and pETcoco-pL1SL2, which carries genes encoding *Streptomyces* chaperonin, is constructed in *E. coli* BL21(DE3), and the optimized induction condition is established as 0.1 mmol/L IPTG for induction, and expression time is 4 h under 30 °C. The target protein is purified by affinity chromatography Ni-NTA, and pure SinH protein is obtained. The above research results provide basis for further exploration of soluble protein expression of *Streptomyces* in *E. coli*.

Key words: halogenase; *Streptomyces xinghaiensis*; soluble expression; ubiquitin tag; *Streptomyces* chaperonin; coexpression system; protein purification