大肠杆菌蛋白质分泌机理及其重组蛋白分泌表达新进展

何冰芳， 米 兰， 陈文华

（南京工业大学 生物与制药工程学院，江苏 南京 211800）

摘要：大肠杆菌是表达重组蛋白运用最广泛的宿主之一。异源蛋白在大肠杆菌中的表达往往会形成不溶性的包涵体；表达蛋白如果分泌至周质甚至胞外，不仅能够正确折叠，而且能简化后续的纯化；信号肽在蛋白分泌的过程中起关键作用，本文综述了大肠杆菌的跨膜转运途径与基本分泌系统，阐述了信号肽的结构与序列对重组蛋白分泌能力的影响，以及提高重组蛋白分泌能力的有效策略，总结了大肠杆菌系统成功实现重组蛋白分泌表达的新进展，为工业酶制剂及蛋白质药物相关技术的发展提供指导。

关键词：信号肽；大肠杆菌；转运途径；重组蛋白；分泌系统；高效分泌策略

中图分类号：Q 819 **文献标志码**：A **文章编号**：1673－1689(2012)06－0561－09

Research Advances in Mechanisms of Protein Secretion and Secretory Expression of Recombinant Protein in *E. coli*

HE Bing-fang， *MI Lan*， *CHEN Wen-hua*

(College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 211800, China)

Abstract: *Escherichia coli* has been widely used as a host system to express recombinant proteins. The expression of heterogeneous protein in E. coli tends to form insoluble inclusion bodies, whereas the export of recombinant protein to periplasmic or extracellular of cells has a great facility for folding correctly and simplifying downstream purification. Signal peptides play important roles in extracellular proteins secretion across the membranes. This review summarizes the current knowledge of the mechanism of translocation pathways and several general secretion systems. The effects of signal peptide sequence and structure character on protein secretion efficiency and available strategies developed to enhance secretion of recombinant proteins were also illustrated. Moreover, we discussed the recent advances in successful secretory expression of recombinant proteins in *E. coli*. The future prospects and the guidance for expression technology development of industrial enzyme preparation and protein pharmaceutic are addressed.

Key words: signal peptide, *E. coli*, translocation pathway, recombinant protein, secretory system, efficient secretory strategy

收稿日期：2012－03－02

基金项目：国家973计划项目(2009CB724700)；国家自然科学基金项目(21076106)。

作者简介：何冰芳(1962－)，女，浙江黄岩人，教授，博士研究生导师，主要从事微生物学分子生物学方面的研究。E-mail: bingfanghe@hjut.edu.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蛋白质的分泌系统不仅是蛋白质分选、定位和实现生理功能的前提，更是基因工程及蛋白质工程技术开发的重要手段。人们已经研究出多种原核和真核表达系统用以生产重组蛋白。大肠杆菌表达系统以其遗传背景清楚、操作简单、能在廉价培养基中迅速生长及易于大规模发酵培养等特点而备受关注；目前大肠杆菌体系已用于制备多种酶制剂，甚至一些药用蛋白质，如干扰素、胰岛素和人血清蛋白等，在生物技术领域取得了令人瞩目的成果。

大肠杆菌体系适合于生产翻译后无需修饰加工的蛋白质，且由于大肠杆菌缺乏蛋白折叠过程中需要的辅助因子，往往使中间体大量积聚，易形成包涵体沉淀，还须经过复性等繁琐过程；而周质氧化型的氧化还原环境有利于蛋白质的折叠。如果蛋白质跨过细胞的内膜定位于周质空间，甚至穿过细胞外膜直接分泌至胞外培养基中，可以极大简化下游复性及分离纯化工艺，减少表达蛋白对宿主菌的毒性和代谢负担，显著提高表达量。

1 信号肽结构与功能多样化

1.1 信号肽结构

信号肽是决定分泌蛋白移位信息的一段氨基酸片段，往往位于分泌蛋白的 N 端。普通信号肽长约 10～50 个氨基酸，不同信号肽之间同源性较低，并且可以容忍一定范围内的氨基酸突变[1]。典型信号肽结构特征为：N 端含带正电荷的氨基酸，如赖氨酸和精氨酸，称之为碱性 N 区；中间为以疏水氨基酸（常见有亮氨酸、丙氨酸及异亮氨酸等）为主的疏水核心区，可以形成一段 α 螺旋，称之为疏水 H 区；C 段富含小分子氨基酸，如丙氨酸和甘氨酸等，－1 至－3 位以 A-X-A 结构多见，而 X 则偏好侧链较大的氨基酸，是信号肽酶剪切的部位，亦称加工 C 区。信号肽的结构对分泌有很重要的作用，尤其是疏水区的长度及其疏水性。有研究表明信号肽序列不一定在 N 端，如 α-突触核蛋白的 C 端 99～140 的肽段具有类似信号肽的功能，在切除 N 端 1～60 个氨基酸后仍能被转运到周质空间[2]。

1.2 典型信号肽序列及预测

信号肽没有严格的宿主专一性；已报道的大肠杆菌表达系统的信号肽主要包括：来自大肠杆菌的外膜蛋白的信号肽（如外膜蛋白 A-OmpA 、OmpF、λ 噬菌体受体 LamB、热稳定肠毒素 StII 等）或周质蛋白的信号肽（如碱性磷酸酶 PhoA、麦芽糖结合蛋白 MalE 、DsbA 等），胡萝卜软腐欧文氏果胶酶裂解酶（PelB）的信号肽也常被采用[3]，常见信号肽的氨基酸序列见表 1[4]。

表 1 大肠杆菌表达系统中常用的典型信号肽

Tab. 1 Representative signal sequences used for the proteins secretory in *Escherichia coli*

信号肽（来源）	信号肽氨基酸序列
OmpA （outer-membrane protein A）	MKKTAIAIAVALAG-FATVAQA
PelB (pectate lyase B)	MKYLLPTAAAGLLL-LAAQPAMA
OmpF （outer-membrane protein F）	MMKRNILAVIV-PALLVAGTANA
LamB （λ receptor protein）	MMITLRKLPLA-VAVAAGVMSAQA
StII （heat-stable enterotoxin 2）	MKKNIAFLLASMFVFSI-ATNAYA
PhoA （alkaline phosphatase）	MKQSTIALALLPLLFT-PVTKA
PhoE （outer-membrane pore protein E）	MKKSTLALV-VMGIVASASVQA
OmpC （outer-membrane protein C）	MKVKVLSLLVPALLVA-GAANA
OmpT (protease VII)	MRAKLLGIVLTTPI-AISSFA
MalE （maltose-binding protein）	MKIKTGARILALSALTT-MMFSASA
LTB （heat-labile enterotoxin subunit B）	MNKVKCYVLFTALLSS-LYAHG

不同的外源基因往往适合于采用不同的表达载体系统，同样有效的信号肽也因表达蛋白而异。除了上述信号肽外，高效的信号肽也正在被不断被研究和挖掘出来。另外可用相关软件从基因组中快速地预测出信号肽[5]，结果可信度也比较高，比如基于神经网络和隐马尔科夫模型的 SignalP 和 TatP 软件[6-8]。

1.3 信号肽功能的多样性

信号肽序列不仅会影响蛋白靶向转运，信号肽切割、甚至切割后进程；信号肽序列的编码信息比我们普遍的认识要复杂的多，仍被不断发现具有新的功能。信号肽决定了靶向途径的选择，新生肽选

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

择与 SRP 还是伴侣分子作用取决于信号肽的性质。到达质膜后，信号肽也会选择通过不同的易位子。有研究表明信号肽的拓扑结构会影响前体蛋白通过易位子的效率，比如前体蛋白 N 端形成环形结构能促进易位子门控通道的打开[1]。

有些信号肽除了引导跨膜转运外还有其他的功能；如在信号肽被切割之前，延长信号肽与易位子的作用时间能影响蛋白合成后的加工，如折叠、伴侣分子的结合以及跨膜区域的整合。Szabady 等发现大肠杆菌自主转运蛋白 EspP 信号肽的 N 端比典型信号肽多出一段伸长区，该部分切除后不影响信号肽引导前体蛋白通过内膜，但会明显影响蛋白 C 端折叠后插入外膜[9]。有些信号肽被切割后仍能发挥着部分生物功能。例如 HIV-1 外壳蛋白 p-gp160 的信号肽在被信号肽酶剪切以后释放至细胞质，通过与钙调蛋白的相互作用会抑制钙调蛋白依赖的相关通路[10]。

2 大肠杆菌跨膜转运机制

原核生物中，接近 20%的蛋白质需要跨膜转运来通过细胞质膜，包括水解酶类、细胞毒素、胶质及生长因子等，因此大肠杆菌细胞已具备一定的蛋白转膜通道或通过引导形成一定的转膜通道；而对真核细胞而言，除了帮助蛋白跨膜转运外，还必须准确地分选蛋白至亚细胞定位。相关转运途径的剖析有力推动了基因工程技术的发展。

2.1 大肠杆菌穿越质膜基本途径

大肠杆菌表达系统中，分泌蛋白穿越质膜的基本分泌途径以 Sec 或 Tat 这两种系统为主。另一种 YidC 系统不常见，主要负责协助蛋白插入质膜。

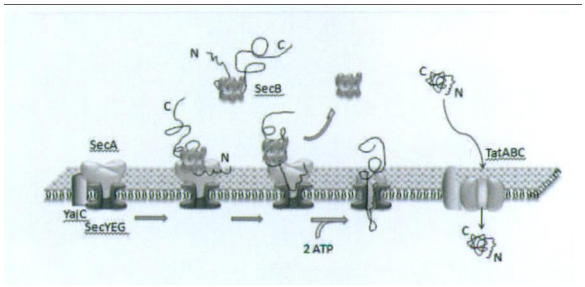


图 1 Sec 与 Tat 跨质膜转运途径

Fig. 1 Translocation machineries of the Sec and Tat pathway

Sec 途径：即一般分泌途径（general secretory pathway，GSP 或 Sec 途径）。大肠杆菌的绝大多数分泌性蛋白质以线状伸展的形式通过膜上的 Sec 体系进行转运。该系统由蛋白定位复合物，动力蛋白以及嵌膜的蛋白通道组成。Sec 移位酶是现在研究最为透彻的一种质膜移位子（translocon），它是由运输通道及辅助蛋白组成的一个大型质膜蛋白复合体。这些蛋白包括 SecY、SecE、SecG、SecA、SecD、SecF 和一个周质空间结合的 ATP 酶，SecA 提供转运过程中的能量。膜蛋白三聚体 SecYEG 及水解 ATP 的动力蛋白 SecA 构成了 Sec 转运酶的核心（图 1），SecYEG 三聚体再二聚化形成转运通道；SecD 和 SecF 为两种疏水蛋白，推测在蛋白质跨内膜转运的后期发挥作用，参与前体蛋白质分子的释放。SecB 存在于革兰氏阴性菌中，具有两种功能：(1)作为分子伴侣与新合成的蛋白结合，使这个分泌复合体达到一种伸展和可分泌的状态；(2)与 SecA 蛋白特异结合。完成转移后，前肽中的信号序列便被膜肽酶切除。成熟多肽被释放到周质中。

Tat 途径：即双精氨酸转运途径（twin arginine translocation，Tat）。Tat 转运系统进行折叠态的蛋白转运，Tat 体系的能量来源于膜两侧的 H+电化学梯度。Tat 体系信号肽在其 N 区域有一个保守的通用模体，即 S/T-R-R-x-F-L-K [11]，其中双精氨酸残基（R-R）基本不变，x 通常为极性氨基酸。模体中的第二位 R 可以被赖氨酸替换[12]，Tat 体系信号肽比 Sec 体系信号肽平均长 14 个氨基酸残基，其延长部分可能是由于其伸展的 N 区域所致[13]。Tat 体系信号肽 H 区的疏水性往往没有 Sec 体系信号肽强，常富含 Gln 和 Thr。

大肠杆菌的 Tat 体系由 4 个膜蛋白构成：TatA、TatB、TatC 和 TatE（图 1），胞质侧具有一个两性螺旋 TatC 是一个跨膜蛋白，最新的研究表明 TatC 跨膜螺旋与膜脂双层相互作用促使了 TatABC 核心复合物的形成；TatBC 复合物用于识别信号序列，而 TatA 是稳定复合物的必需组分；被转运的目的蛋白质最初和 TatBC 复合物结合，然后招募 TatA，从而组装成有活性的转运体[13]，并利用质子梯度提供跨膜的能量。尽管在大肠杆菌中少量的分泌蛋白依赖 Tat 途径，然而，Tat 体系的功能却是不能替代的，该体系转运的底物多为氧还活性蛋白，这些蛋白质是呼吸链电子传递的组分，对大肠杆菌的能量代谢起着重要作用。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Sec 与 Tat 途径的异同点见表 2，基于两种途径跨膜转运的动力来源的不同，依赖 ATP 的 Sec 转运酶受叠氮化钠抑制[14]，而 Tat 途径不受 ATP 影响，可以此鉴别这两种途径。也可通过敲除各转运途径中关键组分基因的缺陷性宿主来鉴别[15]。

表 2 Sec 与 Tat 途径的异同点

Tab. 2 Comparation of Sec pathway with Tat pathway

途径	相同点	不同点				
		保守模体	信号肽残基	体系组分	能量来源	前体结构
Sec	1. 含信号肽，区域结构类似； 2. 信号肽被切除； 3. 成熟蛋白运输到外周质或胞外	N 端含碱性氨基酸	30 个氨基酸左右	secYEG，secA，secB，secDF，	ATPase	伸展状
Tat		S/T-R-R-x-F-L-K	平均比 Sec 多 14 个氨基酸	tatA，tatB，tatC，tatD，tatE	△pH 质子梯度	折叠需辅因子

2.2 革兰氏阴性菌中蛋白质跨越外膜的主要分泌系统

除了分泌蛋白穿越质膜的基本途径外，革兰氏阴性菌要实现胞外分泌还需要跨过外膜。现有研究推测有六个主要分泌系统，详见下面分述。大肠杆菌中的重组蛋白主要以Ⅰ型和Ⅱ型系统分泌至胞外；Ⅲ和Ⅳ型分泌系统主要与细胞间的物质转运相关，往往分泌到真核宿主中；Ⅴ型和Ⅵ型分泌系统主要适合于具有内部信号结构域的蛋白转运。

Ⅰ型分泌系统是 ATP-结合盒(ABC)类型的载体，以细菌致病性相关的毒素和降解酶的分泌为主[18]；也称 α-溶血素(HlyA)途径，由 ABC 转位酶-HlyB、膜融合蛋白-HlyD 和外膜蛋白-TolC 组成，由 ATP 水解提供能量，ABC 转位酶识别位于 α-溶血素(HlyA)羧基端的约 60 个氨基酸的信号序列，引发上述 3 种蛋白装配成转运复合体，形成一个连续性的跨越内膜、胞周质和外膜的中空导管，不经过周质中间体直接将 HlyA 分泌至胞外。

Ⅱ型分泌系统主要负责许多 Sec 或 Tat 依赖底物跨外膜的直接转运。可通过整合一个的外膜蛋白-分泌素(secretin)来实现。分泌素是个稳定的多聚体，通过外膜形成跨膜孔道。分泌素常需要一个引导蛋白(pilot)以便正确插入到外膜中[16]。

Ⅲ型分泌系统涉及宿主病原体的相互作用，蛋白前体从细菌胞质直接转运到宿主的细胞质。通过该系统分泌的蛋白质被认为不在周质空间停留[17]。

Ⅳ型分泌系统与 DNA 转化系统具有同源性。底物蛋白首先通过 Sec 系统分泌并跨膜，也可像Ⅲ型底物被直接分泌到真核宿主的细胞质[17]。

Ⅴ型分泌系统是一种自主转运系统，该蛋白质能直接指导自身跨越外膜进行分泌。蛋白前体包含 N 端 Sec 依赖性信号序列、内部乘客结构域(passenger domain)和信号肽 C 端结构域。底物先通过 Sec 途径到周质空间，随后 C 端插入到外膜中，在 N 端蛋白分泌到细胞表面后并从 C 端结构域上切割下来，而 C 端仍留在外膜中[18]。

Ⅵ型分泌系统是 2006 年由 Mekalanos 等从霍乱弧菌和绿脓杆菌中鉴定出来[19]。该型系统的组分结构分析表明与 T4 噬菌体的尾穗高度相似[20]；且该型底物 N 端缺乏信号肽序列。

3 影响重组蛋白表达分泌能力的因素与高效分泌策略

从以上大肠杆菌中蛋白质跨越外膜的主要分泌系统的分析看来，重组蛋白的分泌应该主要从Ⅰ型和Ⅱ型分泌系统实现跨越外膜；例如外源蛋白与 α-溶血素(HlyA)信号序列融合同样可以被分泌至胞外，但通过该系统分泌的蛋白仍然带有一段信号序列，需要在体外进行剪切。Ⅱ型系统还需要多个蛋白质组成特异性通道或通过一些非特异性的机制将胞周质蛋白分泌出来，例如辅助表达 kil，tolAIII，BRP 基因等协助释放(见图 2)。

3.1 信号肽的序列与重组蛋白分泌能力

信号肽 N 区的正电荷和 H 区的疏水核心对蛋白的分泌起着决定性的作用。信号肽 N 端：① 增强信号肽 N 端的正电荷有利于重组蛋白的分泌率[21]；② 将起始密码子改为较为稀有的缬氨酸增加信号肽的外泌强度；③ 信号肽 N 端多肽的 PI 值和亲水性与采取通过何种分泌途径有关[22] ④ 最新

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

研究表明，信号肽 N 端编码区的 RNA 自由能 ΔGRNA 不仅影响翻译效率，也会影响 Tat 途径的转运效率[22]。信号肽疏水 H 区：增加信号肽疏水区的长度和疏水性有利于重组蛋白的表达[21]。信号肽加工 C 区：①极性的 C 端可能会降低剪切加工效率；② 改变信号肽 C 区末尾切割位点的氨基酸，有可能提高重组蛋白的外泌效率[23]。例如：利用肠毒素信号肽（LTA）分泌表达重组人表皮生长因子（Human Epidermal Growth Factor，rhEGF）的研究表明，中间疏水区引入极性氨基酸，可能增加了与质膜的亲和性，而引起胞质内蛋白前体的累积；而信号肽 C 区氨基酸替换（Pro-1Asn/Ala，Leu-3Ser/Ala），有利于信号肽的剪切。实际上，各区的理化性质之间的平衡才是最重要的[24]。但是目前，仍没有一个信号肽或相关的表达策略能成功分泌任意给定的重组蛋白。这表明重组蛋白的折叠与分泌与其蛋白质自身结构密切相关。

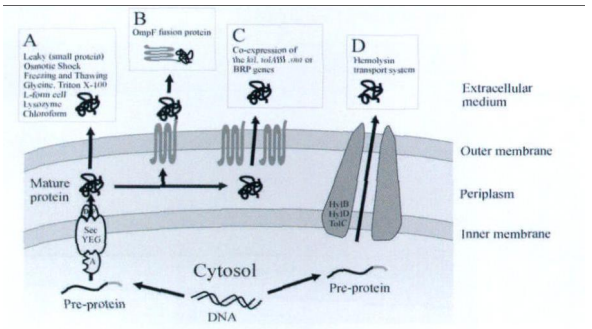


图 2　大肠杆菌分泌表达的膜转运方式与策略[4]

Fig. 2　Strategies for the secretory production of recombinant-proteins in *Escherichia coli*

3.2　共表达策略对重组蛋白分泌能力的影响

大肠杆菌的重组蛋白的分泌主要从 Ⅰ 型和 Ⅱ 型分泌系统实现跨膜转运。而 Ⅱ 型分泌系统先是依靠 Sec 或 Tat 途径进入周质空间，还需要 12～16 个蛋白质组成外膜通道，由于大肠杆菌跨外膜转运装置不完善，蛋白输出能力低，通过共表达参与跨膜转运或辅助蛋白 *kil*，*tol*AIII，BRP 基因能够协助重组蛋白的转运和释放（图 2）。Miksch[25] 等将 β-葡聚糖酶与大肠杆菌素释放基因（*kil*）共表达，共表达 *kil* 时大肠杆菌外膜通透性明显增加，并促进周质蛋白质直接分泌到胞外，显著提高了 β-葡聚糖酶的分泌表达量。

3.3　融合表达策略对重组蛋白分泌能力的影响

根据大肠杆菌分泌系统的特点，毒素、外膜蛋白及外泌蛋白-溶血素的融合表达策略也可以实现重组蛋白的胞外表达。例如，将人 β-内啡肽融合 OmpF 后可以将其分泌至胞外[26-27]，Fernandez 及 Li 等利用融合溶血素成功实现了活性 scFv 抗体和人白细胞介素-6 的分泌表达[28-29]。

3.4　表达宿主对重组蛋白分泌能力的影响

宿主菌株型对分泌功能的也有影响：L2 型菌株（缺乏细胞壁和胞周质）已用于青霉素酰基转移酶、链激酶、微小抗体的分泌表达，但因为这些菌株有生长受损性，培养条件苛刻，不能耐受高密度发酵，目前 L2 型菌株难以适合产业化。另外，用机械法（超声），物理（溶氧量，温度，PH 等），化学（添加甘氨酸，TritonX-100，Ca＋等），酶制剂（溶菌酶）等手段能增加细胞外膜的通透性，还可以用热休克，冻融的方法来增强胞外分泌。

4　信号肽介导重组蛋白的分泌实例

现在已有大量文献报道信号肽介导重组蛋白分泌到大肠杆菌的周质空间，甚至实现了胞外分泌。表达的蛋白从细菌来源的酶到人源的生长因子等，具有广泛的多样性。人们直接采用大肠杆菌的通用信号肽或相关酶类的自带信号肽实现了重组蛋白的分泌表达，有的采用了特殊蛋白因子共表达或融合表达的方式成功实现了重组蛋白的分泌表达，最新研究的部分实例汇总于表 3 与表 4。

表 3　大肠杆菌中重组蛋白胞外分泌表达实例

Tab. 3　Recent examples of fusion protein expression for extracellular protein production in *E. coli*

分泌蛋白	信号肽	宿主菌	分泌量	参考文献
Tong 2000[30]	OmpA	*E. coli* JM105	16 mg/L	
Thermobifida fusca hydrolase (TfH)	OmpA	*E. coli* TG1	8 U/ml，almost 100% secreted	Dresler 2006[31]

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

续表 3

分泌蛋白	信号肽	宿主菌	分泌量	参考文献
Fernandez 2000[32]	OmpA	*E. coli* HB2151	Hemolysin system	
Human β-endorphin	OmpF hybrid	*E. coli* BL21(DE3)	Hybrid proteins in medium	Jeong 2002[33]
Matsumoto 2002[34]	PelB	*E. coli* BL21(DE3)	2 200 U/mL	
Lin 2001[35]	Native	*E. coli* HB101, MDΔP7	3-fold faster in translocation rate	
Phytase	Native	*E. coli* BL21(DE3)	50 U/mL	Miksch 2002[36]
Phytase	Native	*E. coli* BL21(DE3)	120 U/mL	Kleist 2003[37]
Heat stable alkaline protease	Native	*E. coli* XL1-Blue	1 500 U/mL	Fu 2003[38]
Human C-reactive protein	PhoA (ALP)	*E. coli* JM109	Kil coexpression	Tanaka 2002[39]
Taq I restriction endonuclease	MBP hybrid	*E. coli* XL1-Blue	30 000 U/L	Toksoy 2002[40]
Human interleukin 6	HlyA	*E. coli* XL1-Blue	70.4 ng/mL, hemolysin system	Li 2002[41]

表 4 大肠杆菌中重组蛋白分泌至周质空间一览表

Tab. 4 Representative secretory production of recombinant proteins in *E. coli*

分泌蛋白	信号肽	宿主菌	分泌量	参考文献
Wong 2003[42]	OmpA	*E. coli* JM101	Proteolysis	
Loo 2002[43]	OmpA	*E. coli* BL21(DE3)	8 mg/L	
Human nerve growth factor β	OmpT	*E. coli* JM109	Dsb protein coexpression	Kurokawa 2001[44]
Penicillin G acylase	Native	*E. coli* HB101	DegP protein coexpression	Lin 2001[45]
Penicillin acylase	Native	*E. coli* CC118	Tat pathway	Angelini 2001[46]
Mouse endostatin	PhoA	*E. coli* DH5α	40 mg/L	Xu et al. 2002[47]
Human cytochrome P4501A1	PhoA	*E. coli* TB1	4 500 nmol/L	Kaderbhai 2000[48]
Human leptin	Endoxylanase	*E. coli* BL21(DE3)	41% of total proteins	Jeong and Lee 2000[49]
Alkaline phosphatase	Endoxylanase	*E. coli* HB101	5.2 g/L	Choi 2000[50]
Human granulocyte colonystimulating Factor	Endoxylanase	*E. coli* BL21(DE3)	22% of total proteins	Jeong 2001[51]
Yim 2001[52] Green fluorescent protein (GFP)	TorA	*E. coli* MC4100	Tat pathway	Barrett 2003[53]; Santini 2001[54];
Human proinsulin	SpA	*E. coli* AF1000	4.6 mg/L	Mergulhao 2003[55]
Arthrobacter levan fructotransferase	LacZ derived secretion motif	*E. coli* JM109	2 g/L	Lee et al. 2001[56]

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5 结 语

过去的几十年里已经见证了跨膜转运机制和蛋白分泌机制研究的显著进展，信号肽的提出不仅为蛋白质的研究开辟了新的领域-蛋白质的空间属性，更为基因工程与蛋白质工程技术的应用提供了有效手段；目前，大肠杆菌的分泌表达系统已在基因工程技术领域得到了广泛的应用，然而相当的重组蛋白的大规模表达还存在众多的技术瓶颈，例如分泌表达量低、周质空间的重组蛋白还需要分离纯化等问题。随着对大肠杆菌分泌系统相关机理认识的深化，更加高效信号肽的发现与设计，以及蛋白质自身结构对分泌影响的相关理论的发展和完善，各种酶类及其药用蛋白的产业化具有更广阔的前景。

参考文献(References)：

[1] Hegde R S, Bernstein H D. The surprising complexity of signal sequences[J]. **Trends in Biochemical Sciences**, 2006, 31 (10): 563－571.

[2] Ren G, Wang X, Hao S, et al. Translocation of α-Synuclein expressed in *Escherichia coli*. [J]. **Journal of bacteriology**, 2007, 189(7): 2777－2786.

[3] 韦雪芳. 信号肽及其在蛋白质表达中的应用. 生物技术通报[J]. 2006, 6: 38－42.
WEI Xue-fang. Signal Sequence and its application to protein expression[J]. **Biotechnology Bulletion**, 2006, 6: 38－42. (in Chinese)

[4] Choi J H, Lee S Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2004, 64: 625－635.

[5] Watanabe K, Tsuchida Y, Okibe N, et al. Scanning the corynebacterium glutamicum R genome for high-efficiency secretion signal sequences[J]. **Microbiology-Sgm**, 2009, 155: 741－750.

[6] Bagos P G, Nikolaou E P, Liakopoulos T D, et al. Combined prediction of tat and sec signal peptides with hidden markov models. **Bioinformatics**, 2010, 26(22): 2811－2817.

[7] Bendtsen J D, Nielsen H, Widdick D, et al. Prediction of twin-arginine signal peptides[J]. **Bmc Bioinformatics**, 2005, 6－10.

[8] Petersen T N, Brunak H, Heijne G V, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. **Nature Methods**, 2011, 8(10): 785－786.

[9] Szabady R L, Peterson J H, Skillman K M, et al. An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America[J]. **Pnas**, 2005, 102(1): 221－226.

[10] Martoglio B, Graf R., Dobberstein B. Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin [J]. **EMBO**, 1997, 16(22): 6636－6645.

[11] Berks B C. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors[J]. **Molecular microbiology**, 1996, 22 (3): 393－404.

[12] Ize B, Gerard F, Wu L F. In vivo assessment of the Tat signal peptide specificity in *Escherichia coli*[J]. **Archives of Microbiology**, 2002, 178(6): 548－553.

[13] 何正祥，张部昌，马清钧. 大肠杆菌蛋白质转运体系[J]. 生命的化学，2005，25(2)：83－85.
HE Zheng-xiang, ZHANG Bu-chang, MA Qing-jun. Tat Translocation system in *E. coli*. [J]. **Chemistry of Life**, 2005, 25 (2): 83－85.

[14] Oliver D B, Cabelli R J, Dolan K M, et al. Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1990, 87(21): 8227－8231.

[15] Esbelin J, Martin C, Forano E, et al. Differential translocation of green fluorescent protein fused to signal sequences of Ruminococcus albus cellulases by the Tat and Sec pathways of *Escherichia coli*[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2009, 294 (2): 239－244.

[16] Pugsley A P. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria[J]. **Microbiological Reviews**, 1993, 57

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(1): 50－108.

[17] Iewin B. 细胞[M]. 北京: 科学出版社, 2009. 934－936.

[18] Veiga E, Lorenzo V D, Fernández L A. Autotransporters as scaffolds for novel bacterial adhesins: surface properties of *Escherichia coli* cells displaying jun/fos dimerization domains[J]. **Journal of bacteriology**, 2003, 185(18): 5585－5590.

[19] Pukatzki S, Ma A T, Sturtevant D, et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2006, 103(5): 1528－1533.

[20] Leiman P G, Basler M, Ramagopal U A, et al. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2009, 106(11): 4154－4159.

[21] Sagiya Y, Yamagata H, Udaka S. Direct high-level secretion into the culture medium of tuna growth hormone in biologieally active form by Bacillus brevis [J]. **Appl Mierobiol Biotechnol**, 1994, 42 (223) : 358－363.

[22] Lee S J, Han Y H, Kim Y O, et al. Novel GFP expression using a short N-terminal polypeptide through the defined twin-arginine translocation (Tat) pathway[J]. **Molecules and Cells**, 2011, 32(4): 349－358.

[23] Pratap J, Dikshit K L. Efficient of signal peptide changes on the extracellular processing of streptokinase form *Escherichia coli* requirement for secondary structure at the cleavage junction [J]. **Mol Gen Genet**, 1998, 258: 326－333.

[24] Morioka-Fujimoto K, Marumoto R, Fukuda T. Modified enterotoxin signal sequences increase secretion level of the recombinant human epidermal growth factor in *Escherichia coli* [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1991, 266(3): 1728－1732.

[25] Miksch G, Neitzel R, Fiedler E, et al. Extracellular production of a hybrid beta-glucanase from Bacillus by *Escherichia coli* under different cultivation conditions in shaking cultures and bioreactors[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1997, 47: 120－126.

[26] Jeong K, LeeS Y. Excretory production of human β-endorphin into culture medium by using outermembrane protein Fas a fusion partner in recombinant *Escherichia coli*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68: 4979－4985.

[27] Nagahari K, Kanaya S, Munakata D, et al. Secretion into the culture medium of a foreign gene product from *Escherichia coli*: use of the ompF gene for secretion of humanβ -endorphin[J]. **EMBO**, 1985, 16: 3589－3592.

[28] Fernandez L A, Sola I, Enjuanes L, et al. Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the super-natants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 66: 5024－5029.

[29] Li Y, Chen C X, Von Specht B, et al. Cloning and hemolysin-mediated secretory expression of a codon-optimized synthetic human interleukin-6 gene in *Escherichia coli*. **Gene**, 2002, 25: 437 －447.

[30] Tong L, Lin Q, Wong W K R, et al. Extracelllular expression, purification, and characterization of a winter flounder anti-freeze polypeptide form *Escherichia coli*[J]. **Protein Expr Purif**, 2000, 18: 175－181.

[31] Dresler K, Van Den Heuvel J, Müller R J, et al. Production of a recombinant polyester-cleaving hydrolase from thermobifida fusca in *Escherichia coli*[J]. **Bioprocess Biosyst Eng**, 2006, 29: 169－183.

[32] Fernandez L A, Sola I, Enjuanes L, De Lorenzo V. Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 66: 5024－5029.

[33] Jeong K J, Lee S Y. Excretory production of human β- endorphin into culture medium by using outer membrane protein F as a fusion partner in recombinant *Escherichia coli*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68: 4979－4985.

[34] Matsumoto T, Katsura D, Kondo A, et al. Efficient secretory overexpression of bacillus subtilis pectate lyase in *Escherichia coli* and single-step purification[J]. **Biochem Eng**, 2002, 12 (3): 175－179.

[35] Lin W, Huang S, Chou CP. High-level extracellular production of penicillin acylase by genetic engineering of *Escherichia coli*[J]. **Chem Technol Biotechnol**, 2001, 76: 1030－1037.

[36] Miksch G, Kleist S, Friehs K, et al. Overexpression of the phytase from *Escherichia coli* and its extracellular production in bioreactors[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2002, 56: 685－694.

[37] Kleist S, Miksch G, Hitzmann B, et al. Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fedbatch fermentation strategies[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2003, 61: 456－462.

[38] Fu Z, Hamid S B A, Razak C A N, et al. Secretory expression in *Escherichia coli* and single-step purification of a heat-stable alkaline protease[J]. **Protein Expr Purif**, 2003, 28: 63－68.

[39] Tanaka T, Horio T, Matuo Y. Secretory production of recombinant human C-reactive protein in *Escherichia coli*, capable of

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

binding with phosphorylcholine,and its characterization[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2002,295(1):163－6.

[40] Toksoy E,Onsan Z I,Kirdar B. High-level production of TaqI restriction endonuclease by three different expression systems in *Escherichia coli* cells using the T7 phage promoter[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2002,59:239－245.

[41] Li Y,Chen C X,Von Specht B,et al. Cloning and hemolysin-mediated secretory expression of a codon-optimized synthetic human interleukin-6 gene in *Escherichia coli*[J]. **Gene**, 2002, 25:437－447.

[42] Wong W R,Ali A B, Ma M C. Cloning,expression,and characterization of diuretic hormone manduca diuresin from Manduca sexta in *Escherichia coli*[J]. **Protein Expr Purif**, 2003, 29:51－57.

[43] Loo T, Patchett M L, Norris G E, et al. Using secretion to solve a solubility problem: high-yield expression in *Escherichia coli* and purification of the bacterial glycoamidase PNGase F[J]. **Protein Expr Purif**, 2002, 24:90－98.

[44] Kurokawa Y,Yanagi H,Yura T et al. Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in *Escherichia coli*[J]. **Biol Chem**, 2001,276:14393－14399.

[45] Lin W,Huang S,Chou C P. DegP-coexpression minimizes inclusion-body formation upon overproduction of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2001,73:484－492.

[46] Angelini S,Moreno R,Gouffi K,et al. Export of thermus thermophilus alkaline phosphatase via the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*[J]. **FEBS Lett**, 2001,506:103－107.

[47] Xu R,Du P,Fan J J,Zhang Q,et al. High-level expression and secretion of recombinant mouse endostatin by *Escherichia coli*[J]. **Protein Expr Purif**, 2002, 24:453－459.

[48] Kaderbhai M A,Ugochukwu C C,Lamb D C,et al. Targeting of active human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) to the periplasmic space of *Escherichia coli*[J]. **Biochem Biophys Res Comm**, 2000 ,279:803－807.

[49] Jeong K J,Lee S Y. Secretory production of human leptin in *Escherichia coli*[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2000,67:398－407.

[50] Choi J H,Jeong K J,Kim S C,et al. Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the Bacillus sp Endoxylanase signal sequence[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2000,53:640－645.

[51] Jeong K J,Lee S Y. Secretory production of human granulocyte colony-stimulating factor in *Escherichia coli*[J]. **Protein Expr Purif**, 2001,23(2):311－8.

[52] Yim S C,Jeong K J,Chang H N,et al. High level secretory production of human G-CSF by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*[J]. **Bioproc Biosystems Eng**, 2001,24:249－254.

[53] Barrett C M L,Ray N,Thomas J D,et al. Quantitative export of a reporter protein,GFP,by the twinarginine translocation pathway in *Escherichia coli*[J]. **Biochem Biophys Res Comm**, 2003, 304:279－284.

[54] Santini C,Bernadac A,Zhang M,et al. Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock [J]. **J Biol Chem**, 2001,276(11):8159－64.

[55] Mergulhao F J M,Monteiro G A,Larsson G,et al. Medium and copy number effects on the secretion of human proinsulin in *Escherichia coli* using the universal stress promoters uspA and uspB[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2003,61(5-6):495－501.

[56] Lee S Y. High cell density cultivation of *Escherichia coli*[J]. **Trends Biotechnol**, 1996, 14:98－105.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net