

L-异亮氨酸和甘氨酸对大肠杆菌表达与分泌 邻苯二酚 2,3-双加氧酶的作用

夏东翔^{*} 汪美先

(第四军医大学微生物学教研室, 西安 710032)

摘要 证实了甘氨酸与 L-异亮氨酸对大肠杆菌表达邻苯二酚 2,3-双加氧酶(CatO₂ase)的促进作用和甘氨酸促使该酶分泌至胞外培养基中的作用。产酶量高低和分泌量多少与培养基种类、甘氨酸和 L-异亮氨酸的浓度以及培养时间等因素有关。在甘氨酸存在的情况下,胞壁对溶菌酶的敏感性有所增加,超微形态似有变化,还存在其他物质的伴随分泌,故甘氨酸可能是引起细胞壁结构的改变而导致邻苯二酚 2,3-双加氧酶等胞内内容物被动分泌至胞外。

关键词 甘氨酸, 异亮氨酸, 邻苯二酚 2,3-双加氧酶

提高基因工程菌的表达产量并使表达产物分泌,以利于表达产物提纯等后续处理过程,是当前重点研究的课题。在甘氨酸对某些细菌胞外蛋白的蓄积、甘氨酸及其衍生物促进大肠杆菌某些固有胞内酶的产生与释放、L-异亮氨酸和甘氨酸对一些细菌的蛋白产量与释放量提高等方面均已报道^[1-4],但基因工程菌还未见应用。由于邻苯二酚 2,3-双加氧酶(CatO₂ase)能使无色或微褐色的邻苯二酚变成黄色的 2-羟粘糠酸半醛,将底物喷洒表达此酶的菌落或加入菌液中,菌落或菌液立刻呈黄色,具有检测简便、灵敏和快速等优点,故其基因作为一种显色标志基因已被克隆于大肠杆菌的质粒中。本文在研究了 CatO₂ase 在大肠杆菌的表达与定域的基础上^[5],以它作为检测指标来观察这两种氨基酸对基因表达和表达产物分泌的影响,以便为提高外源蛋白在大肠杆菌中的表达及分泌的研究提供一种简便有效的手段。

1 材料和方法

1.1 菌种与细菌培养

Escherichia coli HB101 (pTG206)系自己制备保存。LB、M9 与 BM 培养基均按文献配制^[4,6]。前两种培养基在基因工程研究中较为常用,而 BM 则在研究胞外蛋白蓄积时常用。将 L-异亮氨酸、甘氨酸与培养基分别作高压灭菌(0.7kgf/cm²),临用前加入,测得各培养液酸碱度都在 pH7.4 左右。除受体菌对照之外,其他细菌培养基中皆补充氨苄青霉素(Amp)至 50μg/ml。培养过程与条件参见文献^[5]。

1.2 CatO₂ase 的提取与分析

将细菌培养物离心沉淀,再用 10ml pH7.2、20mmol/L 磷酸缓冲液(PB)洗涤一次,取

^{*} 现地址:军事医学科学院生物工程研究所,北京 100850。

本文于 1992 年 4 月 7 日收到。

培养物上清和洗涤液上清混合液作为胞外酶测定的样品。细菌沉淀用含 1mg/ml 溶菌酶的 TEG 5ml 重悬,冰浴 30 分钟,超声破碎 1 分钟 $\times$ 5 次,再加含 10%丙酮的 PB 5ml 混匀,与底物 0.2mol/L 邻苯二酚溶液反应,将沉淀离心后,上清液所测结果为胞内酶活力。离心条件、酶促反应条件、酶活力测定、蛋白质样品制备与含量测定(Lowry 法)皆参照文献[1,5,7]。

1.3 细菌细胞对溶菌酶敏感性的测定

取不同培养条件的 HB101(pTG206)培养物离心沉淀,分别用 3ml 含与不含 250 μ g/ml 溶菌酶的 pH7.2 100mmol/L PB 重悬,并使 OD₆₀₀ 至 1.0 左右,置 34℃ 温育 30 分钟,然后用 751 型分光光度计测波长为 600nm 处的 OD 值,将 OD 值代入下列公式计算:敏感性=(A-B)/A $\times$ 100%(A 为无溶菌酶反应液的测定值,B 为含溶菌酶反应液的测定值)^[1]。

1.4 蛋白质的 SDS-PAGE

胞外培养基中的蛋白用 10%三氯乙酸(TCA)沉淀^[1,2,7],并将沉淀的蛋白用冷丙酮洗涤一次后真空抽干,重新溶解于电泳载样液中,再用 2mol/L Tris 调节 pH。菌体直接加电泳载样液重悬,两类样品经煮沸变性后上样。分离胶浓度为 10%,用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.5 电镜观察

取 1.5ml 菌液离心收集菌体,加入 3%戊二醛固定液于 4℃ 固定过夜,用 pH7.4、0.1mol/L PB 洗涤两次,加入 3%热琼脂迅速离心,对沉淀剥离修块(每块 1mm³),接着用 1% 锇酸固定液于 4℃ 固定 1.5 小时,再用 pH7.4、0.1mol/L PB 洗涤两次,经乙醇系列脱水后用 Epon812 包埋,用 LKB-E 型切片机切片后经醋酸铀-枸橼酸铅双染液染色,用国产 DXB2-12 型电子显微镜(上海新跃仪表厂)观察并拍照。

2 结 果

2.1 细菌在不同培养基中所产酶的比活性、产酶分布与培养时间的关系

将 HB101(pTG206)菌种分别接入三种培养基中,培养 24 小时,每隔 4 小时测算一次所产酶的比活性、胞内外酶分布比例与菌液浊度,可见使用不同培养基时,酶比活性高低及其高峰出现先后不同,在 LB 培养基中比活性最高,其高峰出现得最早,故后面的研究多采用 LB 培养基进行,而且它也在基因工程研究中最常用。各组内比活性高峰、细菌的生长高峰和胞外酶所占比例的高峰相重或接近(图 1)。

2.2 不同浓度的 L-异亮氨酸和甘氨酸对大肠杆菌表达与分泌 CatO_{ase} 的影响

细菌在用含不同浓度这两种氨基酸的 LB 培养基中培养 12 小时后测定菌液浊度、胞内外酶活性与蛋白含量,结果发现 L-异亮氨酸可明显提高表达产量(以 0.25%浓度为佳)(图 2-a),而甘氨酸除此作用外还能促进表达产物的分泌,在对细菌生长无明显影响的情况下,以 1.0%浓度为佳(图 2-b)。若将 0.25% L-异亮氨酸与不同浓度的甘氨酸配合使用,则能大大提高表达产量,且达到高峰所需甘氨酸浓度有所降低(从 1.0%降至 0.75%),说明是两者各自的作用相加造成,但分泌量比只加甘氨酸时无明显增加(图 2-c)。胞外蛋白含量与胞外酶活性在甘氨酸浓度为 1.0%以下时基本平行,但随着甘氨酸浓

度继续增高则胞外蛋白含量增长幅度大于酶活性增长幅度,对照此时细菌生长状态,认为可能是细胞结构受部分破坏所致,这可为合理选择甘氨酸浓度作参考。

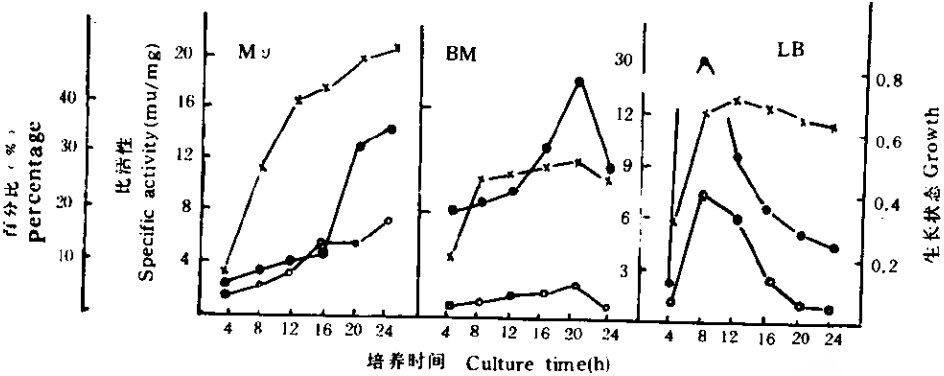


图1 细菌在不同培养基中生长状态与所产酶的比活性、产酶分布的关系
Fig. 1 Growth, specific activity and distribution of bacterium in different media
×-×-×生长状态(菌液 1/4 稀释后的 OD₆₀₀值) Growth (OD₆₀₀ value after 1/4 Dilution);
●-●-●酶的比活性 Specific activity of CatO₂ase;
○-○-○胞外酶占总酶量的百分比 Percentage of extracellular CatO₂ase.

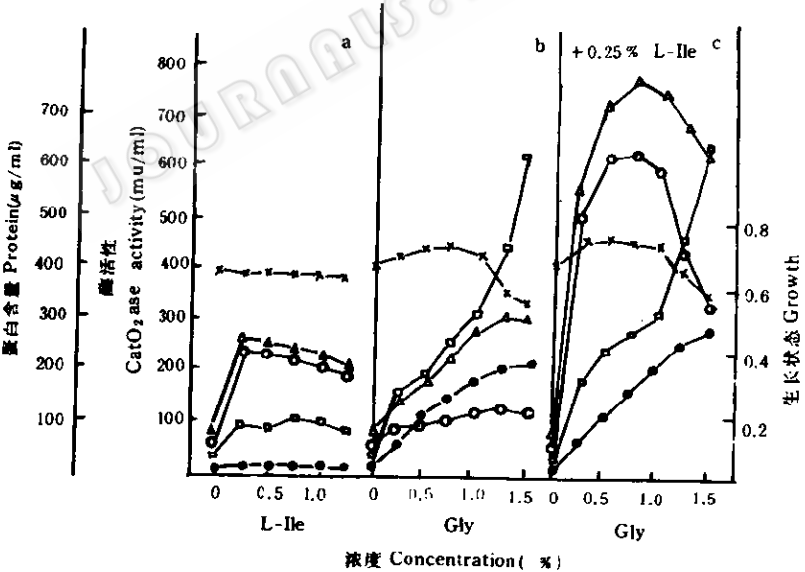


图2 不同浓度 L-异亮氨酸和甘氨酸对大肠杆菌表达与分泌 CatO₂ase 的影响
Fig. 2 Effect of different L-Ile and Gly concentration on CatO₂ase expression and excretion in *E. coli*
●-●-●胞外酶活性 Extracellular activity; ○-○-○胞内酶活性 Cellular activity;
△-△总酶活性 Total activity; □-□胞外蛋白含量 Extracellular protein;
×-×细菌生长状态(菌液 1/4 稀释后的 OD₆₀₀值) Growth (OD₆₀₀ value after 1/4 Dilution).

2.3 不同培养时相 L-异亮氨酸和甘氨酸对大肠杆菌表达与分泌 CatO₂ase 的影响

分别以含三种不同成分(图 3)的 LB 培养基培养 HB101 (pTG206),在不同时相测定细菌生长状况、胞内外酶产量和胞外蛋白含量,结果可见无论哪一组,在培养 16 小时左右,其 CatO₂ase 的表达量达到高峰,而在有甘氨酸的后两组,则 CatO₂ase 的分泌量在 16—20 小时达高峰。

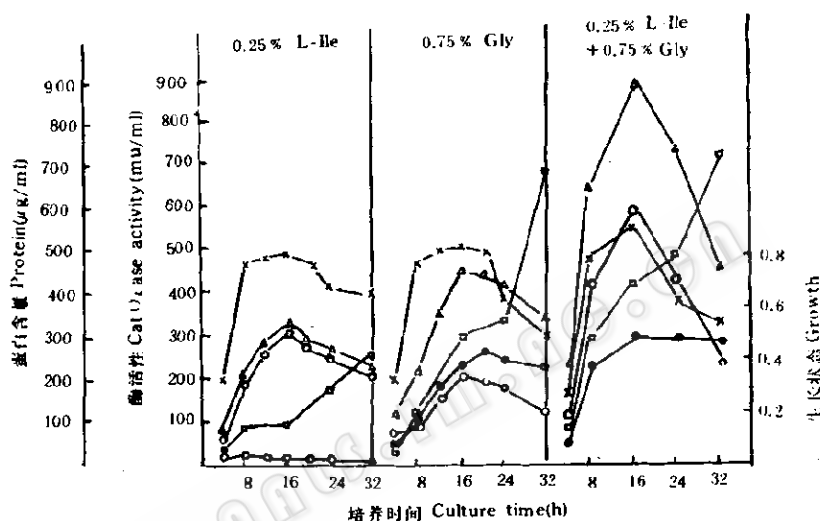


图 3 不同培养时相 L-异亮氨酸和甘氨酸对大肠杆菌表达与分泌 CatO₂ase 的影响(图例同上图)

Fig. 3 Effect of L-Ile and Gly on CatO₂ase expression and excretion at different culture time

The symbols are the same as in Fig. 2.

2.4 不同培养基中的 L-异亮氨酸与甘氨酸对大肠杆菌表达与分泌 CatO₂ase 的影响

从前面结果可以看出,甘氨酸具有较强的促进大肠杆菌表达与分泌 CatO₂ase 的作用,若与 L-异亮氨酸联合使用,则促表达作用更为明显。表 1 示三种培养基分别加 0.75% 甘氨酸或加 0.75% 甘氨酸与 0.25% L-异亮氨酸时胞外 CatO₂ase 的含量和总 CatO₂ase 表达量,从中可见无论用哪一种培养基,甘氨酸和 L-异亮氨酸的作用都是存在的。

2.5 细菌细胞对溶菌酶敏感性的测定结果(图 4)

比较 HB101 (pTG206) 在不同培养成分培养不同时间相对溶菌酶的敏感性,结果发现在含 0.75% 甘氨酸培养 16 小时时该菌对溶菌酶的敏感性最高,这正好与加甘氨酸后 CatO₂ase 的表达和分泌高峰相重叠。

表 1 不同培养基中甘氨酸与 L-异亮氨酸作用的比较

Table 1 Effect of Gly and L-Ile in different media

培养基 Medium	12 小时(h)			24 小时(h)		
	生长状态	胞外量(%)	总量	生长状态	胞外量(%)	总量
	Growth (1/4 OD ₆₀₀) [*]	Extra. (%) (mu/ml) ^{**}	Total	Growth (1/4 OD ₆₀₀)	Extra. (%) (mu/ml)	Total
LB	0.660	18.31(20.6)	88.92	0.610	19.56(25.6)	76.50
M9	0.788	11.38(15.1)	75.27	0.940	23.43(24.2)	96.73
BM	0.500	15.67(21.5)	72.49	0.535	18.00(25.5)	70.50
LB+Gly	0.723	194.41(55.8)	348.42	0.648	232.10(58.3)	397.96
M9+Gly	0.835	138.57(51.1)	270.86	0.735	426.58(67.5)	631.59
BM+Gly	0.525	206.65(65.8)	313.84	0.470	233.72(77.3)	302.44
LB+Ile+Gly	0.708	234.52(35.9)	652.45	0.519	285.18(44.7)	638.52
M9+Ile+Gly	0.775	198.62(38.9)	510.29	0.777	470.32(52.6)	894.27
BM+Ile+Gly	0.570	245.91(43.0)	572.12	0.623	290.27(47.2)	615.34

* 菌液 1/1 稀释后的 OD₆₀₀值 OD₆₀₀ value of 1/4 diluted bacterium suspension;

** CaOase 活性, CaOase activity;

Extra.: Extracellular; Gly:0.75%; L-Ile:0.25%.

2.6 蛋白质的 SDS-PAGE

从图 5 可见,培养基含甘氨酸与否对胞外蛋白电泳图谱有显著影响。在含甘氨酸组,除了目的基因表达产物外,还有其他蛋白伴随分泌,尤其是小分子物质。看来这种分泌是一种非选择性的被动分泌,故应摸索条件使伴随分泌蛋白的种类和量减少。

2.7 形态学观察结果

取上述各培养条件的细菌经革兰氏染色后在光镜下观察,未见革兰氏染色性有明显改变,各培养条件之间形态差异也不大。继而选用这些细菌样品进行电镜观察,可见在含甘氨酸的培养基中,胞壁与外膜结构松散,模糊起层,尤以用 M9 培养基加甘氨酸或 M9 培养基+L-异亮氨酸+甘氨酸培养 24 小时者为甚(图 6),这时的胞外酶量和总产酶量也较其他组高,说明甘氨酸的确能引起外膜或胞壁结构的某些变化而促进表达和分泌。

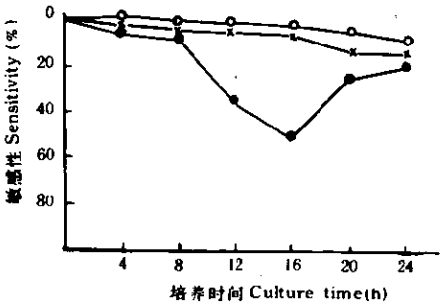


图 4 细菌培养不同时相对溶菌酶的敏感性

Fig. 4 Sensitivity of bacterium cells to lysozyme at various intervals during cultivation

○ LB; × LB+0.25%L-Ile; ● LB+0.75%Gly; △ LB+0.25%L-Ile+0.75%Gly.

异也不大。继而选用这些细菌样品进行电镜观察,可见在含甘氨酸的培养基中,胞壁与外膜结构松散,模糊起层,尤以用 M9 培养基加甘氨酸或 M9 培养基+L-异亮氨酸+甘氨酸培养 24 小时者为甚(图 6),这时的胞外酶量和总产酶量也较其他组高,说明甘氨酸的确能引起外膜或胞壁结构的某些变化而促进表达和分泌。

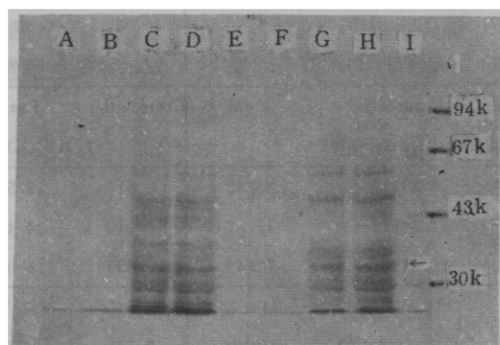


图 5 胞外蛋白质的 SDS-PAGE 分析

A—D/E—H:细菌在含不同培养成分的 LB/M9 培养基中培养 12/24 小时。

A/E:LB/M9;B/F:加入 0.25% L-Ile;C/G:加入 0.75%Gly;

D/H:加入 0.25%L-Ile 和 0.75%Gly ;I 为分子量标记;

箭头所指为 CatO₂ase 的 35k 道尔顿的亚基。

Fig. 5 SDS-PAGE of extracellular proteins

A D/E H: bacterium growing in LB/M9 medium with different

additives for 12/24 hours. A/E:LB/M9 only; B/F: +0.25%L-Ile ;C/G:

+0.75%Gly; D/H: +0.25%L-Ile +0.75%Gly; I: Molecular weight marker

of standard proteins; Arrow: 35K Dalton subunit of CatO₂ase.

3 讨 论

在大肠杆菌表达研究中,除了非分泌型表达已知的缺点^[8]之外,还存在人和动物血清中抗大肠杆菌抗原成分的抗体对工程菌裂解产物的免疫学检测所带来的非特异性干扰。若从胞外培养基中提取表达产物,就能避免或减少这种干扰。甘氨酸的促分泌作用与目前其他解决大肠杆菌表达产物分泌的方法相比,具有简便、经济、适应面广的优点,只需根据不同的表达产物与宿主菌株选择合适的甘氨酸浓度和培养时间等即可,故可以较快地投入商业生产。

本文结果显示,L-异亮氨酸主要是提高表达产量。Miyashiro 等^[1]在研究 L-异亮氨酸对短小杆菌(*Bacillus brevis*) N. 47 的作用时发现,在蛋白质合成增加时 L-异亮氨酸从培养基中消耗的很快,故供给 L-异亮氨酸仅限于更有效地合成蛋白质,但 L-异亮氨酸的浓度并不需要太高,这点似可用反馈抑制来解释。在本研究中,从细菌生长状态、胞外蛋白电泳及形态观察等方面来看,加 L-异亮氨酸与否无明显差别,故根据现有条件还难说清 L-异亮氨酸的作用机制。关于甘氨酸增加表达产量的机制,有学者^[2,3]认为甘氨酸可通过抑制蛋白酶来保护某些细菌所产蛋白质的活性。我们认为,或许还由于胞壁通透性增加,而导致胞内外物质交换,尤其是对营养物质的摄取造成。

有关甘氨酸的促分泌机制,从其他报道归结起来就是甘氨酸干扰细胞壁肽聚糖层的合成,引起细胞壁结构发生改变,导致了各种蛋白质、包括酶的释放^[1,3,4,9]。其证据为:(1)

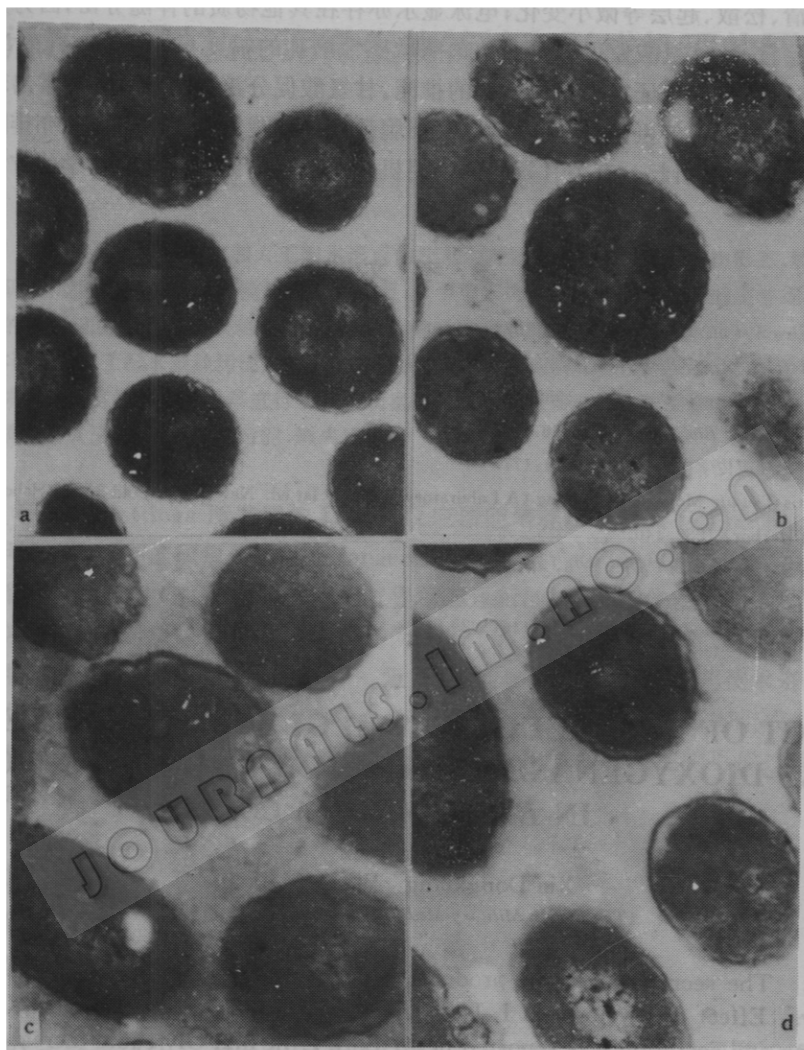


图 6 HB101(pTG206)在不同成分的 M9 培养基中培养 24 小时后的电镜照片 (3×10^3)

Fig. 6 Electron micrograph of HB101(pTG206) growing in M9 medium containing different additives for 24 hours (amplified for 3×10^4 times)

a: M9; b: M9 + 0.25% L-Ile; c: M9 + 0.75% Gly; d: M9 + 0.25% L-Ile + 0.75% Gly.

形态学变化,在双糖乳酸杆菌(*Lactobacillus cellobiosus*)、短小杆菌 No. 47 和大肠杆菌可见细胞肿胀,形态不一,且短小杆菌 No. 47 对革兰氏染色变成阴性及对溶菌酶变得敏感等变化早于对照组;(2) 细胞壁肽聚糖成分的改变,双糖乳酸杆菌生长在含甘氨酸的培养基中时,甘氨酸参入到肽聚糖前体中的量恰好等于丙氨酸的减少量,而在短小杆菌 No. 47,细胞壁丙氨酸含量减少并不同时伴有甘氨酸的参入,故甘氨酸似乎是抑制了丙氨

酸参入细胞壁。本研究发现,大肠杆菌生长于含甘氨酸的培养基后,电泳下可见胞壁与外膜结构不清、松散、起层等微小变化;电泳显示亦存在其他物质的伴随分泌;因为大肠杆菌的肽聚糖层较薄,甘氨酸使得胞壁对溶菌酶敏感性增加的幅度不如在短小杆菌 No. 47 那么明显,这些结果初步证实了其他学者的推测。甘氨酸促分泌的酶活性高峰常出现于对数生长末期,并早于胞外蛋白含量高峰,以及细胞超微结构观察未见溶解现象亦排除了甘氨酸作用系细菌自溶引起。有关甘氨酸的作用机理有必要借助膜分子生物学的方法作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Miyashiro S *et al.* *Agric Biol Chem.* 1980, **44**:105.
- [2] Hara T *et al.* *Agric Biol Chem.* 1983, **47**:2237.
- [3] Ikura Y *et al.* *Agric Biol Chem.* 1985, **49**:3057.
- [4] Ikura Y. *Agric Biol Chem.* 1986, **50**:2747.
- [5] 夏东翔,等.遗传学报, 1992, **19**(2):177.
- [6] Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)* 1st ed. New York, Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982. 440.
- [7] Udaoka S. *Agric Biol Chem.* 1976, **40**:523.
- [8] 陈永青,等.生物化学与生物物理进展, 1989, **16**:36.
- [9] Hammes W *et al.* *J Bacteriol.* 1973, **116**:1029.

EFFECT OF L-ISOLEUCINE AND GLYCINE ON CATECHOL 2,3-DIOXYGENASE EXPRESSION AND EXCRETION IN *ESCHERICHIA COLI*

Xia Dongxiang* Wang Meixian

(The Fourth Military Medical University Xi'an 710032)

Abstract The secretion of gene products expressed in *E. coli* is a problem noticeable nowadays. Effect of glycine and L-Isoleucine on catechol 2,3-dioxygenase (CatO₂ase) expression and secretion was reported here. Both L-Ile and Gly could increase CatO₂ase production, Gly could also cause expressed product excreted into the culture medium. The effect of Gly and L-Ile was related to the composition of culture medium, the concentration of Gly and L-Ile and the culture time. The sensitivity to lysozyme of bacterium cells grown in the Gly containing medium was a little higher and electron micrograph of bacteria grown in Gly-containing medium showed morphological changes of cell wall and outer membrane. This may have been due to interference with peptidoglycan synthesis by the Gly, and cause passability increase, as reported in other bacterium strains.

Key words Isoleucine, Glycine, Catechol 2,3-dioxygenase

* Present address: Molecular Genetics Center, P.O. Box 130(8) Beijing 100850