

# 腺嘌呤对大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 及其耐乙酸突变株 DA19 生长和代谢的影响

张晓云 张艳军 李志敏 夏月兰 叶 勤\*

(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 DH5 $\alpha$  和 DA19 在碳源限制的基本培养基中进行分批培养和氮源限制的基本培养基中进行连续培养,发现添加腺嘌呤会使 DH5 $\alpha$  生长改善,乙酸产生减少,对 DA19 的生长和代谢影响不明显。连续培养细胞的蛋白质组分析结果显示,添加腺嘌呤后 DA19 *purH* 表达水平降低,而 DH5 $\alpha$  *purH* 表达水平不变,表明 DH5 $\alpha$  嘌呤核苷酸从头合成能力差,DH5 $\alpha$  *yddS* 表达上调,*gnd* 表达水平稍有提高,细胞生长改善。

**关键词** 大肠杆菌(*Escherichia coli*) 腺嘌呤 乙酸 双向电泳

**中图分类号** Q935 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2007)03-0430-05

细胞内存在多种游离的核苷酸,它们几乎参与细胞所有的生化过程,如参与核酸的生物合成、活化高分子的单体,ATP 是能量代谢中通用的高能化合物,腺苷酸是 3 种重要辅酶的组分,cAMP 和 cGMP 作为调节物质存在等<sup>[1-5]</sup>。因此,核苷酸尤其是腺苷酸在细胞生命活动中起着非常重要的作用,一旦核苷酸供应不足或缺乏,将严重影响细胞生长和代谢。基本培养基是由成分完全明确的化合物组成的,微生物细胞在基本培养基中生长需要合成包括核苷酸在内的所有的细胞组分<sup>[6]</sup>。细胞内嘌呤核苷酸的合成不是先合成嘌呤碱再与核糖和磷酸结合,而是从 5-磷酸-核糖焦磷酸(PRPP)开始,经过一系列的酶促反应,生成次黄嘌呤核苷酸,然后再转变为其它嘌呤核苷酸<sup>[1]</sup>。但是,细胞内除能以简单的前体物质从头合成核苷酸外,尚能由现有的碱基和核苷合成核苷酸,这是对核苷酸代谢的一种补救途径,以便经济地利用已有成分<sup>[2,7-9]</sup>。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由于转化率高是基因工程中最常用的宿主菌之一,但 DH5 $\alpha$  在基本培养基中生长缓慢,而其耐乙酸突变株 DA19 在基本培养基中生长情况大大改善<sup>[10]</sup>。本研究考察了在基本培养基中添加腺嘌呤对 DH5 $\alpha$  和 DA19 生长和代谢的影响,并借助蛋白质组分析手段考察了腺嘌呤对二者的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  [*supE44*  $\Delta$ *lacU169*(80*lacZ* $\Delta$ M15)*hsdR17* *recA1* *endA1*

*gyrA96* *thi-1* *relA1*], DA19 是 DH5 $\alpha$  的耐乙酸突变株,由本实验室筛选<sup>[11]</sup>。二者均于 25% 甘油中 -20 $^{\circ}$ C 冻存。

**1.1.2 培养基**: ① M 培养基:每升含 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 15.12g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g, NaCl 0.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g, CaCl<sub>2</sub> 0.011g, 葡萄糖 2g, 氯化铵 1g, 1% 维生素 B<sub>1</sub> 0.2mL, 微量元素(TE)混合液 0.2mL, pH 7.0。腺嘌呤添加量为 10mg/L。② 微量元素混合溶液:每升包括 FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 80g, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 10g, AlCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10g, CoCl<sub>2</sub> 4g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2g, CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1g, H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0.5g。③ MN 培养基(氮源限制培养基):每升含葡萄糖 8g, 氯化铵 0.3g, 其它成分与 M 培养基相同。

**1.1.3 主要试剂和仪器** 尿素、CHAPS、Ampharmalyte (pH3.5-10)、十二烷基硫酸钠、三羟甲基氨基甲烷、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、N,N',N'-四甲基乙二胺、过硫酸铵、甘氨酸等均为电泳级试剂,购自上海生工生物工程技术服务有限公司,其它试剂均为分析纯。pH4-7 和 pH3-10 线性 pH 梯度干胶条购自安玛西亚公司。双向电泳仪器 Ettan IPGphor 等电聚焦设备、Multiple gel caster(多胶灌胶器)、Ettan DALTsix 系统均购自安玛西亚公司。

### 1.2 培养方法

将 -20 $^{\circ}$ C 保存的菌种 1mL 接入装有 30mL LB 培养基的 250mL 摇瓶中,转速 250r/min,30 $^{\circ}$ C 培养 12h。然后转接 3mL 于 100mL M 培养基(或添加腺嘌呤的 M 培养基)中,相同条件 DA19 培养 10h, DH5 $\alpha$  培养 17h,作为发酵罐培养二级种子。

基金项目 国家 863 计划(2002AA217021)

\* 通讯作者, Tel 86-21-64252095, Fax 86-21-64252250, E-mail: qye@ecust.edu.cn

作者简介 张晓云(1975-),女,山东省莱西市人,生物化工专业博士。E-mail: zhangxiaoyungu@126.com

收稿日期 2006-11-13, 接受日期 2007-01-12, 修回日期 2007-02-13

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

分批培养在 5 L 玻璃发酵罐( RIBE-5-III )中进行 ,装液量 2.5L ,接种量 200mL ,搅拌转速 500r/min ,培养温度 30℃ ,通气量 4L/min ,用 2mol/L NaOH 和 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 控制 pH7.0 ,采用国家生化工程技术研究中心( 上海 )开发的 Tophawk 控制软件。

连续培养也在 5L 玻璃发酵罐中进行 ,初始装添加或不添加腺嘌呤的 MN 培养基 2.5L。培养至稳定期后 ,蠕动泵控制流加进发酵罐的新鲜培养基及抽出培养液的流速 ,使连续培养总体积控制在 2.1L。取样测定 OD<sub>600</sub>、葡萄糖浓度、pH 以及副产物乙酸、丙酮酸和乙醇的浓度 ,连续 3 次不变即认为到达稳态。

1.3 双向电泳

1.3.1 样品的制备 :一定体积的发酵液于 4℃、8000r/min 离心 15min ,弃上清液。菌体用 40mmol/L Tris-HCl ( pH7.4 4℃ )洗涤 3 次 ,再重悬于相同的洗液中。于冰水浴上用超声波粉碎机破碎  $\phi 6$  变幅杆 ,功率 200W ,工作时间 3s ,间歇时间 10s ,工作 35 次 。4℃ 15000r/min 离心 20min ,收集上清液。 - 70℃ 超低温冰箱冻存。根据 Brandford 法测定蛋白浓度。

1.3.2 双向电泳 :在 Ettan IPGphor 等电聚焦设备 ( Amersham Pharmacia )上 ,用 24cm pH4-7 线性 pH 梯度干胶条 ( Amersham Pharmacia ) ,按照表 1 所示程序进行干胶条的再水化和样品的等电聚焦 ( IEF )电泳。每根胶条的极限电流是 50 $\mu$ A。

IEF 电泳结束后 ,胶条分别在含 1% DTT 和 2.5% 碘乙酰胺的平衡储液中平衡 15min。然后转移到 Ettan DALTsix 系统 ( Amersham Pharmacia )中用 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳 ,采用恒功率的方式 ,每块凝胶的功率设定为 20W。电泳结束后 ,凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色 ,并用 Imagemaster 软件分析 ,计算目标点的体积占有检测到的点的总体积的百分比 ,然后转换为占上样总干重的百分比。每个样品做 3 个平行实验 ,计算平均值。以 DH5 $\alpha$  各蛋白质点在 M 培养基中的表达水平为对照 ,如果表达水平超过对照的 1.5 倍 ,表达发生了变化 ;如果表达水平超过对照的 2 倍 ,表达发生了显著变化。采用肽指纹图谱 ( PMF )鉴定蛋白质点。

表 1 再水化和等电聚焦程序

Table 1 The protocol of rehydration and IEF				
Step	Voltage	Gradient type	Duration or volt-hours	Function
Rehydration	0	—	8h	rehydration
S1	30	Step-S1-hold	240vhr	desalination
S2	500	Step-S2-hold	500vhr	desalination
S3	1000	Step-S3-hold	1000vhr	Increasing voltage
S4	8000	Step-S4-hold	56000vhr	focus

1.4 其它分析方法

菌体浓度测定采用浊度法 培养液适当稀释后 ,在 600nm 测定其光密度( OD<sub>600</sub> ) ,在一定的范围内 OD<sub>600</sub> 与菌体干重成线性关系。葡萄糖浓度用葡萄糖试剂盒测定。乙酸浓度和丙酮酸浓度用离子色谱法测定 ( Dionex ICS1500 离子色谱仪 ,Ionpac AS11-HC 4mm  $\times$  250mm 阴离子分析柱 ,Ionpac AG11-HC 4mm  $\times$  50mm 保护柱 ,电导检测器 )。乙醇浓度用气相色谱法测定。

2 结果

2.1 腺嘌呤对碳源限制分批培养的影响

为了考察在基本培养基中腺嘌呤对 DH5 $\alpha$  与 DA19 生长和代谢的影响 ,分别在添加和不添加腺嘌呤的 M 培养基中进行发酵罐分批培养 ,结果如图 1 和表 2 所示。

由图 1-A 可以看出 ,添加腺嘌呤后 DH5 $\alpha$  细胞密度增加、生长加快 ,乙酸最高浓度明显降低 ,尤其

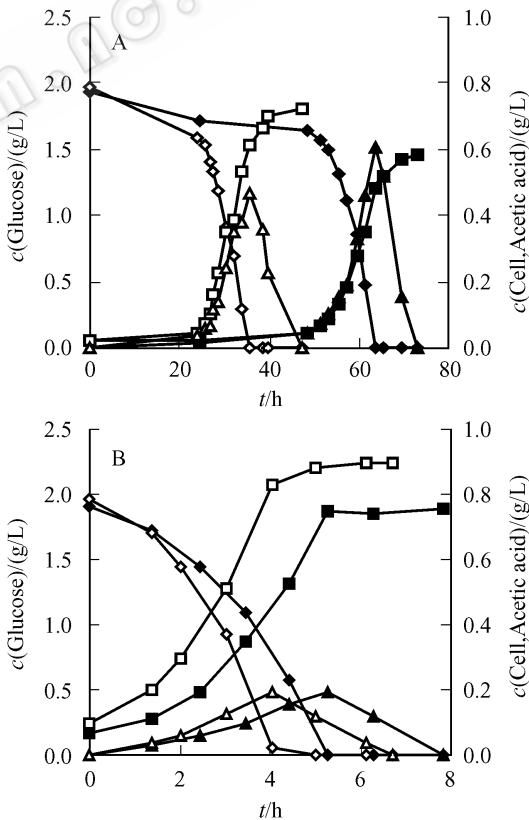


图 1 腺嘌呤对 DH5 $\alpha$  ( A )和 DA19( B )分批培养生长、葡萄糖消耗及乙酸生成的影响

Fig. 1 Effects of adenine on growth , glucose consumption and acetic acid production for DH5 $\alpha$  ( A ) and DA19 ( B ) cultured in M medium. Filled and open symbols respectively denote the data obtained in the absence and presence of adenine. ■ □ dry cell weight ; ▲ △ acetic acid ; ◆ ◇ glucose.

是延迟期明显缩短,发酵时间也大大缩短。根据表2,添加腺嘌呤后 DH5 $\alpha$  的最大比生长速率( $\mu_m$ )增加一倍,菌体对葡萄糖的得率( $Y_{X/G}$ )增加 25%,而单位菌体的乙酸生产( $Y_{A/X}$ )和乙酸比生成速率( $Q_A$ )分别降低了 40%和 10%,葡萄糖的比消耗速率( $Q_G$ )增加了 26%。

由图 1-B 可以看出,添加腺嘌呤对 DA19 影响甚微,葡萄糖消耗时间缩短主要是由于接种量高所致,而生长速率和产乙酸积累没有显著变化。表 2 显示添加腺嘌呤对 DA19 的各项参数没有明显影响。添加腺嘌呤后,DH5 $\alpha$  与 DA19 之间的差别显著减小。不添加腺嘌呤时,DH5 $\alpha$  的  $Y_{A/X}$  是 DA19 的 4.7 倍, $Y_{X/G}$  是 DA19 的 66.7%,而添加腺嘌呤后  $Y_{A/X}$  是 DA19 的 3 倍, $Y_{X/G}$  是 DA19 的 78.9%。

表 2 腺嘌呤对 *E. coli* DH5 $\alpha$  和 DA19 分批培养特性的影响

Table 2 Effects of adenine on the growth performances of <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ and DA19 cultured in M medium						
Strains	Adenine	$\mu_m$ ( $h^{-1}$ )	$Y_{X/G}$ ( $g/g$ )	$Q_G$ ( $g/g \cdot h$ )	$Y_{A/X}$ ( $g/g$ )	$Q_A$ ( $g/g \cdot h$ )
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	-	0.16	0.24	0.61	1.31	0.21
	+	0.35	0.30	0.77	0.79	0.19
<i>E. coli</i> DA19	-	0.48	0.36	1.33	0.28	0.14
	+	0.53	0.38	1.39	0.26	0.14

+ , - : With or without adenine in medium ;  $Q_A$  ,  $Q_G$  : results of the exponential phase.

2.2 腺嘌呤对氮源限制连续培养的影响

2.2.1 对生长特性的影响 :在以氮源为限制性底物的基本培养基中,以相近的稀释率( $D = 0.13h^{-1}$ )连续培养 DH5 $\alpha$  和 DA19 结果如表 3。可以看出,添加腺嘌呤对 DH5 $\alpha$  的影响较大,葡萄糖比消耗速率( $Q_G$ )和乙酸的比生成速率( $Q_A$ )都降低,而菌体对葡萄糖的得率( $Y_{X/G}$ )和丙酮酸比生成速率( $Q_{pyr}$ )却增加,而添加腺嘌呤仅使 DA19 丙酮酸的生成有较明显增加。

表 3 腺嘌呤对 *E. coli* DH5 $\alpha$  和 DA19 在 MN 培养基中连续培养代谢特性的影响

Table 3 Effects of adenine on the growth performances of continuous cultures of *E. coli* DH5 $\alpha$  and DA19 in the MN medium limited by nitrogen source

Strains	Adenine	$Y_{X/G}$ / ( $g/g$ )	$Q_G$ / ( $g/g \cdot h$ )	$Y_{A/X}$ / ( $g/g$ )	$Q_A$ / ( $g/g \cdot h$ )	$Y_{pyr/X}$ / ( $g/g$ )	$Q_{pyr}$ / ( $g/g \cdot h$ )	$Y_{eth/X}$ / ( $g/g$ )
DH5 $\alpha$	-	0.181	0.708	0.777	0.099	1.477	0.189	0.058
	+	0.197	0.666	0.577	0.076	1.502	0.197	0.066
DA19	-	0.223	0.600	0.525	0.070	0.820	0.110	0
	+	0.219	0.612	0.539	0.072	1.287	0.172	0

2.2.2 对蛋白表达的影响 :图 2 是 DH5 $\alpha$  和 DA19 连续培养到达稳态后细胞裂解液的双向电泳图谱,扫描后每张图谱由软件可以检测到约 800 个蛋白质

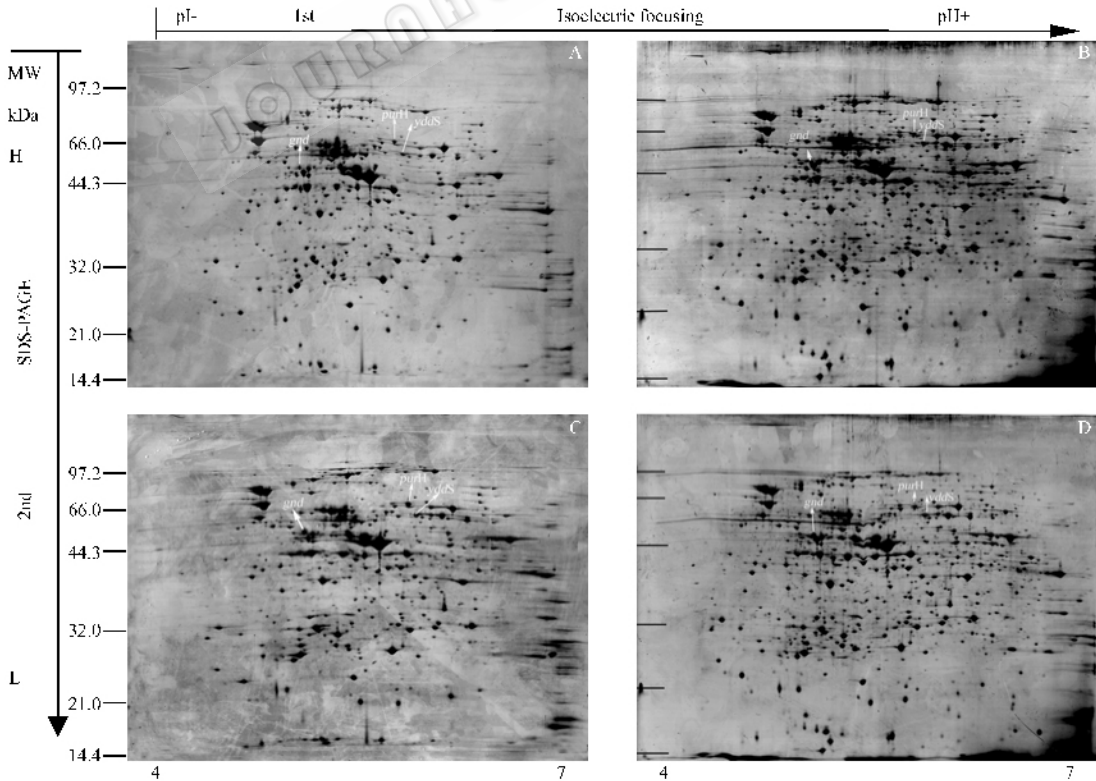


图 2 在 M 培养基中连续培养 *E. coli* DH5 $\alpha$  (A, -A ; B, +A) 和 DA19 (C, -A ; D, +A) 细胞可溶性蛋白的双向电泳图  
Fig.2 The 2-DE gels of the cell lysate of *E. coli* DH5 $\alpha$  (A, without adenine ; B, with adenine) and DA19 (C, without adenine ; D, with adenine) continuously cultured in the MN medium.

点。通过软件分析发现 ,DH5 $\alpha$  和 DA19 有 3 个表达具有差异的蛋白质点 ,在添加腺嘌呤后 ,表达水平发生不同的改变 ,导致 DH5 $\alpha$  和 DA19 这 3 个点的表达水平相当( 表 4 )。这是添加腺嘌呤后菌株间表达差

异变化最大( 从有差异变为无差异 ) ,并且菌株自身表达水平变化也较大( 除 *gnd* 外另外两点的变化是最大的 )的 3 个点。这 3 个点的肽指纹图谱鉴定蛋白质结果如表 4。

表 4 腺嘌呤对蛋白表达水平的影响

Table 4 The effects of the adenine on the protein expression

Function	Gene name	Protein	DH5 $\alpha$		DA19	
			- A	+ A	- A	+ A
Amino acid transport and metabolism	<i>yddS</i>	putative ABC transporter periplasmic binding protein	1	1.54	1.60	1.61
Nucleotide transport and metabolism	<i>purH</i>	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	1	1.12	1.89	1.13
Carbohydrate transport and metabolism	<i>gnd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase ,	1	1.30	1.52	1.55

在 MN 培养基中添加腺嘌呤对 DA19 *yddS* 的表达水平没有明显影响 ,而 DH5 $\alpha$  *yddS* 的表达水平增加至与 DA19 相当。添加腺嘌呤对 DH5 $\alpha$  *purH* 的表达水平没有影响 ,但 DA19 的 *purH* 的表达水平在添加腺嘌呤后明显降低 ,与 DH5 $\alpha$  的表达量基本一致 ,表明 DH5 $\alpha$  和 DA19 的嘌呤核苷酸的合成情况不同。在 MN 培养基中添加腺嘌呤后 ,DH5 $\alpha$  磷酸戊糖途径的 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶( *gnd* )的表达水平稍有提高 ,而 DA19 没有改变 ,导致 DH5 $\alpha$  和 DA19 的 *gnd* 表达差异减小。

3 讨论

*purH* 编码磷酸核糖氨基咪唑羧基酰胺转甲基酶( AICAR 转甲酰基酶 ) ,是嘌呤核苷酸从头合成途径的一个酶。在没有外源嘌呤和嘌呤核苷酸时 ,细胞会利用 PP 途径的磷酸核糖与 ATP 的反应产物——磷酸核糖焦磷酸( PRPP )通过从头合成途径合成嘌呤核苷酸<sup>[1]</sup>。在不添加腺嘌呤的 MN 培养基中 ,DH5 $\alpha$  *purH* 的表达水平低于 DA19 ,表明其嘌呤核苷酸的从头合成能力比较差。存在外源嘌呤碱时 ,细胞从头合成途径被关闭 ,首先利用补救合成途径——主要是在磷酸核糖转移酶的作用下合成嘌呤核苷酸<sup>[1,7-9]</sup>。在 MN 培养基中添加腺嘌呤后 ,DH5 $\alpha$  通过补救合成途径利用外源腺嘌呤合成嘌呤核苷酸满足细胞合成需要 ,弥补了 DH5 $\alpha$  嘌呤核苷酸从头合成能力的不足 ,因此菌体得率提高。而 DA19 在没有添加腺嘌呤时 *purH* 表达水平高于 DH5 $\alpha$  ,通过从头合成途径合成的嘌呤核苷酸可以满足细胞生长的需求 ;添加外源腺嘌呤时 ,从头合成途径的 *purH* 表达水平降低 ,通过补救合成途径利用外源腺嘌呤合成嘌呤核苷酸。从头合成途径和补救途径合成嘌呤核苷酸都需要 PRPP ,因此腺嘌呤的添加不会导致

DA19 对 PRPP 的需求量发生明显改变 ,*gnd* 表达没有明显改变 ,PP 途径的流量没有明显变化。DH5 $\alpha$  嘌呤核苷酸从头合成能力不足 ,因此不添加腺嘌呤时对 PRPP 的需求量不高。但存在外源腺嘌呤时 ,可以通过磷酸核糖转移酶合成嘌呤核苷酸。胞内 PRPP 合成酶受到去阻遏调节 ,胞内 PRPP 的水平提高<sup>[7]</sup> ,因此 *gnd* 表达水平略有提高 ,PP 途径流量增加 ,酵解途径流量相应减少 ,因此菌体生长增加而乙酸产生减少。添加腺嘌呤后二者丙酮酸比生成速率均增加 ,推测是嘌呤从头合成途径流量减少或完全受阻 ,因而从头合成嘌呤核苷酸所需甘氨酸减少 ,由 3-磷酸甘油酸进入甘氨酸的流量减少 ,导致添加腺嘌呤后丙酮酸积累增加。

大肠杆菌感知到外界环境中氮源限制后胞内谷氨酰胺的浓度会下降 ,从而激活氮调节蛋白( NtrC )的转录 ,改善生长缓慢的状况<sup>[12]</sup>。Zimmer 等<sup>[13]</sup>认为大肠杆菌在氮饥饿的条件下会尽最大能力来利用所有的含氮物质作为抵抗不利环境的第一选择 ,包括通过多组分的 ATP 结合转运系统和离子偶联运输机制 ,前者对底物具有很高的亲和力而后者亲和力较低。Hua 等<sup>[14]</sup>的结果也表明 ,在基本培养基中大肠杆菌转运系统 *yddOPQRS* 受到氨离子限制的强烈诱导 ,表明某些含氮代谢物通过该转运系统运输的可能性。*yddS* 是 *yddOPQRS*( 同名为 *ddpXABCD* ) 转移系统的周质结合蛋白 ,推测参与二肽的运输 ,同时具有二肽酶的作用<sup>[15]</sup>。在氮源限制条件下 ,DH5 $\alpha$  和 DA19 参与氨基酸和多肽运输的基因——*yddS* 均受诱导 ,但表达水平是不同的 ,表明二者利用含氮物质的能力不同。在 MN 培养基中 ,DH5 $\alpha$  *yddS* 表达水平较 DA19 低 ,表明其摄取含氮物质的能力较差 ,不能充分满足生长需求 ,因此 DH5 $\alpha$  生长较 DA19 差。添加腺嘌呤后 ,DH5 $\alpha$  *yddS* 的表达水平提高 ,对

细胞释放到周质中的二肽等含氮物质的摄取能力增强,可以更充分地满足细胞生长的需求,因此添加腺嘌呤后 DH5 $\alpha$  生长改善。腺嘌呤对 DA19 *yddS* 的表达水平没有明显影响,表明无论添加腺嘌呤与否,DA19 通过这种高亲和力的氮源摄取系统摄取的含氮物质都可以充分满足细胞生长的需求。

总之,腺嘌呤对 DH5 $\alpha$  的生长和代谢有明显的影响而对 DA19 影响不明显。蛋白质组分析结果发现,添加腺嘌呤后 DH5 $\alpha$  和 DA19 *purH*、*yddS*、*gnd* 表达发生不同的改变,反映了腺嘌呤对 DH5 $\alpha$  和 DA19 的不同影响。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 沈 同,王镜岩.生物化学(下).第二版.北京:高等教育出版社,1990:302-308.
- [ 2 ] Begley TP, Kinsland C, Mehl RA. The biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotides in bacteria. *Vitam Horm*, 2001, **61**:103-119.
- [ 3 ] Wang L, Hashimoto Y, Tsao CY. Cyclic AMP (cAMP) and cAMP Receptor Protein Influence both Synthesis and Uptake of Extracellular Autoinducer II in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2005, **187**(6):2066-2076.
- [ 4 ] D'Ari R, Jaffé A, Boulou P. Cyclic AMP and cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1988, **170**(1):65-70.
- [ 5 ] Calcott PH. Cyclic AMP and cyclic GMP control of synthesis of constitutive enzymes in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*. 1982, **128**(4):705-712.
- [ 6 ] Zhang J, Greasham R. Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999, **51**:407-421.
- [ 7 ] Hochstadt-Ozer J, Stadtman ER. The regulation of purine utilization in bacteria II adenine phosphoribosyltransferase in isolated membrane preparations and its role in transport of adenine across the membrane. *J Biol Chem*. 1971, **246**(17):304-5311.
- [ 8 ] Nygaard P, Duckert P, Saxild HH. Role of Adenine deaminase in purine salvage and nitrogen metabolism and characterization of the *ade* gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. 1996, **178**(3):846-853.
- [ 9 ] Kocharian SM, Kocharian AM, Meliksetian G O. Mutants of *Escherichia coli* K-12 utilizing adenine via a new metabolic pathway. *Genetika*. 1982, **18**:906-915.
- [ 10 ] 朱才庆,叶 勤.大肠杆菌 DH5 $\alpha$  及其耐乙酸突变株生长和产乙酸规律.华东理工大学学报. 2004, **30**:51-56.
- [ 11 ] 朱才庆,叶 勤.大肠杆菌 DH5 $\alpha$  耐乙酸突变株的选育及其代谢特性研究.微生物学报. 2003, **43**:460-465.
- [ 12 ] Ikeda TP, Shauger AE, Kustu S. *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation. *J Mol Biol*. 1996, **259**:589-607.
- [ 13 ] Zimmer DP, Soupene E, Lee HL. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, **97**(26):14674-14679.
- [ 14 ] Hua Q, Yang C, Oshima T. Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol*. 2004, **70**(4):2354-2366.
- [ 15 ] Lessard IA, Pratt SD, McCafferty DG. Homologs of the vancomycin resistance D-Ala-D-Ala dipeptidase VanX in *Streptomyces toyocaensis*, *Escherichia coli* and *Synechocystis*: attributes of catalytic efficiency, stereoselectivity and regulation with implications for function. *Chem Biol*. 1998, **5**(9):489-504.

## Effects of adenine on the growth and metabolism of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ and its acetate-tolerant mutant DA19

ZHANG Xiao-yun, ZHANG Yan-jun, LI Zhi-min, XIA Yue-lan, YE Qin\*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract**: Batch cultures of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and DA19 in carbon source limited defined media and continuous cultures in nitrogen source limited defined media were performed to compare the metabolism in both strains. DH5 $\alpha$  showed improved growth and less acetic acid production after supplementation of adenine, but adenine had little effects on the metabolism of DA19. The proteomic analysis showed that expression of *purH* was down regulated in DA19 by addition of adenine while was unchanged in DH5 $\alpha$ , suggesting that the de novo synthesis ability of purine nucleotide in DH5 $\alpha$  was poorer than that in DA19. Supplementation of adenine resulted in enhanced expression of *gnd* and *yddS* in DH5 $\alpha$ , and thus improved the growth.

**Keywords**: *Escherichia coli*; adenine; acetic acid; two-dimensional electrophoresis