

破菌时可自动降解宿主核酸的大肠杆菌 BL21(DE3)的 *lpxM* 突变株构建

张君^{1,2}, 方宏清¹, 戴红梅¹, 谢达平³, 陈惠鹏¹

1 军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071

2 湖南科技职业学院 长沙 410004

3 湖南农业大学理学院, 长沙 410128

摘要: 研究利用 Red 同源重组技术对常用大肠杆菌表达宿主菌 BL21(DE3)进行改良, 构建破菌时可自动降解宿主核酸的大肠杆菌表达宿主菌, 该菌株可望有助于解决因破菌时宿主菌染色体核酸释放给后续纯化重组蛋白工作带来的困难。将 N 端连有 OmpA 的信号肽的 *S. aureus* nucleaseB(nucB)表达框整合至 *E. coli* BL21(DE3)的 *lpxM* 位点, 改造后菌株(称为 BLN)经诱导能表达 nucB, 并分泌至周质空间, 这样可使宿主核酸免受该酶“毒性”影响, 菌体裂解后, nucB 释放, 能自动降解宿主核酸。BLN 菌体生长状态以及表达外源重组蛋白的能力与出发菌基本一致。

关键词: *E. coli* BL21(DE3), Red 同源重组系统, *lpxM*, 金黄色葡萄球菌核酸酶

Constructing Modified Protein-producing *Escherichia coli* Capable of Autohydrolysing Host Nucleic Acid During Cell Lysis

Jun Zhang^{1,2}, Hongqing Fang¹, Hongmei Dai¹, Daping Xie³, and Huipeng Chen¹

1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2 Hunan Vocational College of Science and Technology, Changsha 410004, China

3 School of Biological Sciences, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: We used Red recombination system to construct a modified *E. coli* protein-producing strain capable of autohydrolysing host nucleic acid. *E. coli* BL21(DE3), a common protein-producing strain, was used as starting material. The modified *E. coli* expression host had a staphylococcal nuclease expression cassette within the host chromosome *lpxM* locus. The *Staphylococcus aureus* nuclease was expressed as a fusion to the ompA signal peptide, and was translocated to the periplasm of the cell, protecting the host nucleic acid from the toxic activity during growth. The nuclease was released during cell lysis and subsequently hydrolyzed host nucleic acid in the lysate. Results show that the modified strain had sufficient nuclease activity to completely autohydrolyze the host chromosomal DNA and produced same amount of recombinant proteins as the original strain.

Keywords: *E. coli* BL21(DE3), red homologous recombinant, *lpxM* gene, *Staphylococcus aureus* nuclease

Received: April 9, 2007; Accepted: April 26, 2007

Corresponding author: Hongqing Fang. Tel: +86-10-66948824; Fax: +86-10-63833521; E-mail: fanghongqing@vip.sina.com
Huipeng Chen. Tel: +86-10-66948801; E-mail: chenhp@nic.bmi.ac.cn

以大肠杆菌为宿主菌大规模胞内表达重组蛋白, 纯化目的重组蛋白前, 需破碎菌体, 此时高分子量的宿主菌染色体核酸释放至裂解液中, 导致其黏度显著增加, 给后续纯化工作带来困难, 并影响蛋白产量。目前降低破菌液粘度的方法有两种: 一种为添加外源核酸酶, 如 Benzonase[®], 系来自 *Serratia marcescens*, 经基因工程改进的核酸内切酶^[1]。其缺点在于费用过高不适宜于大规模生产。另一种方案是改造基因工程菌, 使之能自动降解宿主染色体核酸。Boynnton 等^[2]在 *Pseudomonas putida* 基因组中整合了金黄色葡萄球菌核酸酶基因, 显著降低了细胞裂解液粘度; Cooke 等^[3]对 *E. coli* JM107 也做了类似改造。这种改造菌株使之能表达外源核酸酶的方法, 避免了因添加外源重组蛋白带来的高成本。

本文欲对常用表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 进行改造, 使之成为破菌时可自动降解宿主核酸的大肠杆菌表达宿主菌。LpxM 系大肠杆菌脂质 A 合成酶之一。已有文献报道, 使 *E. coli* BL21(DE3) 的 *lpxM* 基因失活不会影响菌体生长和表达重组蛋白的能力^[4], 且应用该缺失突变株作为受体菌生产的重组蛋白, 引发内毒素反应的可能性将大大降低^[5, 6]。因此, 本文利用 Red 同源重组技术将 N 端连有 ompA 的信号肽的 *Staphylococcus aureus* nucleaseB(nucB) 表达框整合^[7] 至常用表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 的 *lpxM* 位点, 使表达产物可分泌至周质空间样可使宿主核酸免受该酶“毒性”影响。一旦破菌, NucB 释放出来, 可随即降解破菌液中的宿主核酸。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

宿主菌 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)、*Staphylococcus aureus* 为本室保存。质粒 pKD4、pCP20 由军事医学科学院生物工程研究所王芃博士惠赠; pKOBEG 由 Institut Pasteur 提供; 质粒 pUC-LR-Kan 以 pUC18 为基础, 系本室构建; 质粒 pETompnucB 和 pLR-K-nucB 为本次实验构建; pET-uox 由本室以 pET22b 为基础构建并保存。

1.1.2 主要试剂

Lysostaphin 购自 Bio Basic Inc., Triton X-100 购

自 SIGMA 公司; RNase、Dnase I、Proteinase K、溶菌酶购自 AMRESCO 公司; 其他各种工具酶购自 TaKaRa 公司; 质粒快速抽提试剂盒及诱导剂 IPTG 购自 Promega 公司; 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.1.3 引物设计

用于构建 pLR-K-nucB: P9: 5'-GGACTAGT GATCCCGCGAAATTAATACGAC-3 (下划线部分是 *Spe* I 位点); P10: 5'-GG GGTACC ATCCGGATA-TAGTTCCTCCTTTC-3 (下划线部分是 *Kpn* I 位点)。用于敲入后鉴定: L3: 5'-TAGCGAATACATTCCTG-AGTTTGA-3; L4: 5'-ATTTGCGCCGGTTTGCGA-3; LS: 5'-CACAGAGGTGTTGATTCGCG-3; 用于扩增 *ompnucB*: NucB1: 5'-AGTGGCACTGGCT-GGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCTCACAAA CAGATAACGGCGTA-3 (黑体部分与 *ompA* 的信号肽序列互补配对); NucB2: 5'-CGGGATCCTTATTG-ACCTGAATCAGCGTTGT-3 (下划线部分是 *Bam*H I 位点); Omp1: 5'-GGAATTCATATGAAAAAGAC-AGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTT T-3 (黑体部分与 NucB1 引物互补配对; 下划线部分是 *Nde* I 位点); Omp2: 与 Omp1 基本相同, 仅阴影部分为突变位点(A G)。

1.2 *nucB* 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达

1.2.1 PCR 扩增带信号肽序列的 *nucB*

以 *S. aureus* 染色体 DNA 为模板, 通过两次 PCR, 在 *nucB* 上游加上 *ompA* 蛋白的信号肽基因。ompA 信号肽序列: ATGAAAAAGACAGCTATCGCGAT-TGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGC GCAGGCC; 由 21 个氨基酸残基组成; 第一次 PCR 以 NucB1 和 NucB2 为引物, *S. aureus* 染色体 DNA 为模板, 1% 琼脂糖凝胶电泳回收约 500 bp 片段; 第二次 PCR 以 Omp1 和 NucB2 为引物, 第一次 PCR 产物为模板, 1% 琼脂糖凝胶电泳回收约 500 bp 片段。

1.2.2 构建 *ompnucB* 表达载体、重组蛋白的表达

将 *ompnucB* 的酶切产物分别与同样处理的载体 pET22b 连接。转化 *E. coli* DH5 α , 菌落 PCR 筛选重组子, 经测序分析从中获得序列完全正确的重组质粒, 命名为 pETompnucB; 将重组质粒 pETompnucB 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中, 然后接入含有 100

$\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 在 37°C 培养至 OD_{600} 0.4~0.8 加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L), 继续培养 4~5 h。5000 g 离心 5 min 收集菌体, 参照文献[8]或者按 Novagen 公司《pET 系统操作手册》(第 10 版)渗透休克法抽提周质蛋白, 用作 SDS-PAGE 和活性分析。

1.3 构建 BLN

1.3.1 构建 pLR-K-nucB

以 pETompnucB 为模板, P9、P10 为引物, PCR 扩增下包括 T7 启动子和终止子的 ompnucB 序列; PCR 扩增产物经 *Kpn* I、*Spe* I 双酶切后, 与经同样双酶切的 pUC-LR-Kan^[4](在 pUC18 基础上, 构建的一个带有 *lpxM* 上下游各 500 bp 左右的同源臂、具有 FRT 位点的卡那霉素抗性基因以及若干限制性内切酶位点的质粒载体, 经 *EcoR* V 酶切, 即可拿到线性打靶片段, 为在 *lpxM* 位点敲入基因提供方便)连接, 得 pLR-K-nucB。

1.3.2 Red 基因的诱导表达和感受态细胞的制备

参见文献[9,10]相关内容。

1.3.3 线性打靶 DNA 制备和电击转化

用 *EcoR* V 酶切 pLR-K-nucB, 1%琼脂糖凝胶电泳回收约 3500 bp 片段; 再用 *Dra* I 酶切, 目的在于消化残留的质粒, 减少假阳性; 电击方法条件见文献[9,10]。进行 PCR 鉴定: 分别用出发菌 BL21(DE3)和 *lpxM*: :nucBkan^r BL21(DE3)为模板, 先用与 *lpxM* 两端同源 L3 和 L4 作为引物进行 PCR; 另一种方法是用与 *lpxM* 上游同源的一段序列 LS 与 P10 一起作为引物进行 PCR。

1.3.4 卡那霉素抗性基因的去除

方法参见文献[4]相关内容; PCR 鉴定方法分别用出发菌 BL21(DE3)和 BLN 为模板, 用与 *lpxM* 两端同源 L3 和 L4 作为引物进行 PCR。

1.4 BLN 相关鉴定

1.4.1 核酸酶活性检测

取 $1\ \mu\text{L}$ 周质蛋白样品, 加 $1\ \mu\text{g}$ *S. aureus* 染色体 DNA 混匀, 室温, 放置 30 min 后, 1%琼脂糖凝胶电泳, 观察核酸电泳条带。

1.4.2 BLN 裂解后自动降解染色体 DNA 能力检测

酶法裂解菌体——分别将 *E. coli* BL21(DE3)和 BLN 按 1.2.2 所述诱导表达, 培养至饱和, 离心收集菌体, 用含溶菌酶(终浓度 1 mg/mL)和 0.5% Triton

X-100 的菌体裂解液重悬菌体, 37°C 分别水浴 5 min、10 min 和 15 min 后; 加 Proteinase K, 55°C 水浴 10 min; 酚氯法抽提破菌液中 DNA, 作 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 观察核酸电泳条带。超声波裂解菌体——用 IPTG 诱导表达, 离心收集菌体后, 超声破菌, 37°C 水浴 5 min, 其它操作同前。

1.4.3 菌体生长曲线

分别挑 *E. coli* BL21(DE3)和 BLN 单克隆至 5 mL LB 培养基中, 37°C , 220 r/min, 培养, 待 A_{600} 至约 10 时, 1/100 接种至装有 50 mL LB 培养基中, 分别于 30°C 和 37°C 振荡培养, 转速 220 r/min, 每隔 1 h, 取样测 OD_{600} , 作出曲线。

1.4.4 BLN 表达外源重组蛋白能力

将重组质粒 pET-uox 分别转化到 *E. coli* BL21(DE3)和 BLN 中, 用 IPTG 诱导重组蛋白表达, 之后取样进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 nucB 基因在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达

2.1.1 构建 ompnucB 表达载体

用酶切连接方式构建重组质粒, 经 PCR 以及双酶切鉴定后, 送公司测序, 测序结果起始密码子和翻译框架与预先设计一致, pETompnucB 表达载体构建成功。所克隆 *nucB* 与 NCBI 公布的 *S. aureus nuc* 基因比较, 推断本实验所用 *S. aureus* 菌株可能为 V8 菌株或与 V8 菌株亲缘性较近。

2.1.2 pETompnucB 诱导表达

pETompnucB 转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 在含有 $100\ \mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的液体 LB 培养基 IPTG 诱导重组质粒表达, 以空质粒 pET22b 转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞作为空白对照, 离心收集菌体, 提取周质蛋白, 做 15%SDS-PAGE 分析。结果 20 kD 处未见目的条带。

2.1.3 定点突变改善 ompnucB 的表达

用 DnaStar 软件对 *ompnucB* 的 RNA 转录产物的二级结构进行分析, 推测其二级结构可能干扰核糖体结合位点, 进而影响表达^[11]。因此, 尝试将 ompA 信号肽第 6 个碱基 A 定点突变为 G, 没有改变氨基酸残基。应用 DnaStar 软件对突变前后 *ompnucB* RNA 二级结构进行了分析。突变前核糖体结合位点处, 与附近碱基发生配对, 形成了茎环结构, 可能

干扰了表达; 突变后, 核糖体结合位点已展开。用引物 *Omp2* 和 *NucB2*, 重新 PCR 扩增, 构建表达载体, 测序正确, 命名为: pETompnucB2, 转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 经 IPTG 诱导表达, 同样提取周质蛋白, 做 15%SDS-PAGE 分析, 结果在约 20 kD 处可见目的表达条带(图 1)。

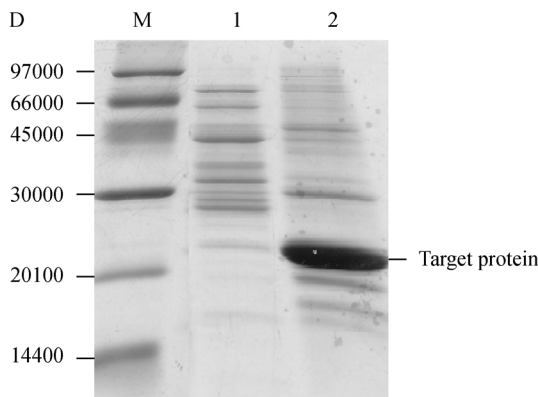


图 1 *ompnucB2* 诱导表达的 SDS-PAGE 分析结果
Fig. 1 SDS-PAGE analysis showing the expressing of *ompnucB2* in periplasmic extracts

M: molecular weight marker; 1: pET22b/BL21(DE3);
2: pETompnucB2/BL21(DE3)

2.2 构建 BLN

2.2.1 构建 pLR-K-nucB

按 1.3.1 所述方法构建 pLR-K-nucB。PCR 鉴定, 酶切鉴定, 并测序分析, 结果正确, 质粒 pLR-K-nucB 构建成功, 其示意图见图 2。

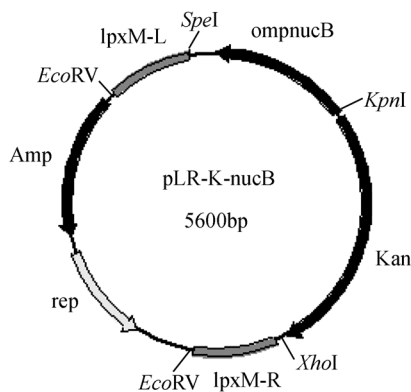


图 2 质粒 pLR-K-nucB

Fig. 2 Map of plasmid pLR-K-nucB

2.2.2 线性打靶 DNA 制备和电击转化

酶切 pLR-K-nucB, 得到线性打靶片段, 将酶切

产物电击转化至已含有 pKOBEG 的 BL21(DE3)电感受态中。在含有卡那霉素的 LB 平板上, 37°C 筛选阳性克隆。由于 pKOBEG 为温度敏感型质粒, 37°C 培养后, 不具有氯霉素抗性的克隆就是已经丢失 pKOBEG 的重组子。

PCR 鉴定首先用 L3 和 L4 作为引物, 分别用出发菌 BL21(DE3)和 *lpxM::nucBkan^r* BL21(DE3)为模板进行 PCR, 出发菌为 900 bp 条带, 阳性克隆在 2500~5000 bp 位置间有一特异性亮带, 说明 *kan-nucB* 片段已插入染色体中; 再用 LS 和 P10 作为引物, 出发菌无任何条带, 阳性克隆在 1000~2500 bp 间有一特异性条带, 进一步证明目的片段插入位置正确, 插入方向也正确。图略。

2.2.3 去除卡那霉素片段

利用 pCP20 所表达的 FLP 重组酶, 使染色体上两个 FRT 位点间的卡那霉素抗性基因丢失。经筛选后得到对氨基青霉素和卡那霉素均敏感的菌株为去除 pCP20 质粒和 Kan 基因的菌株。以 L3、L4 为引物作菌落 PCR 鉴定, 扩增到约 2 kb 片段, 与预期结果一致。至此, BLN 菌株构建成功。

2.3 nucB 活性检测

分别取 1 μ L *E. coli* BL21(DE3)、pET22b/BL21(DE3)、pLR-K-nucB/BL21(DE3)、pETompnucB2/BL21(DE3)以及 BLN 经 IPTG 诱导后所提周质蛋白样品, 加 1 μ g *S. aureus* 染色体 DNA 混匀, 室温放 30 min 后, 1%琼脂糖凝胶电泳, 观察核酸电泳条带(图 3)。

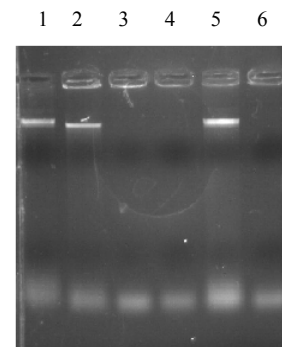


图 3 降解 *S.aureus* 染色体 DNA 琼脂糖电泳结果

Fig. 3 Agarose gel analysis showing the periplasmic extracts hydrolyzing *S. aureus* chromosomal DNA

1: *S. aureus* chromosomal DNA; 2: pET22b/BL21(DE3); 3: pETompnucB2/BL21(DE3); 4: pLR-K-nucB/BL21(DE3); 5: *E. coli* BL21(DE3); 6: BLN

结果如图示: *E. coli* BL21(DE3)和 pET22b/BL21(DE3) 的周质蛋白, 不能降解染色体 DNA, 仍可见清晰染色体 DNA 条带; 而 BLN、BL21(DE3)/pLR-K-nucB 以及 BL21(DE3)/pETompnucB2 可将 *S. aureus* 染色体 DNA 完全降解。

2.4 BLN 裂解后自动降解宿主染色体 DNA

2.4.1 酶法裂解菌体

用含 0.5% Triton X-100 的菌体裂解液重悬经 IPTG 诱导菌体, 加溶菌酶, 37°C 分别水浴 5 min、10 min 和 15 min 后, 抽提基因组 DNA。1% 琼脂糖电泳分析, BLN 能在短时间内自动降解宿主基因组 DNA, 5 min 即降解完全。

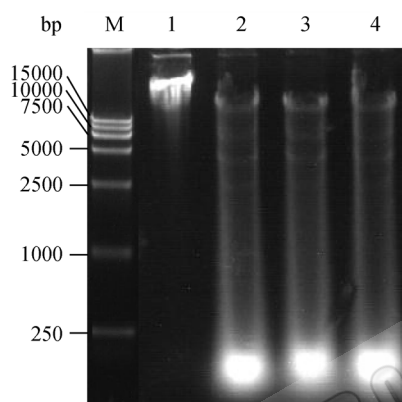


图 4 酶法裂解菌体后自动降解宿主基因组 DNA

Fig. 4 The auto-hydrolysis of host chromosomal DNA by BLN (cell lysed using lysozyme and Triton X-100)

M: DL15000 DNA marker. Nucleic acid extracts of cell lysates of; 1: *E. coli* BL21(DE3) (incubated for 15 min); 2: BLN (incubated for 5 min); 3: BLN (incubated for 10 min); 4: BLN (incubated for 15 min)

2.4.2 超声波裂解菌体

超声破菌, 水浴 5 min 后, 提取基因组 DNA, 1% 琼脂糖电泳分析结果如图 5。因为菌体是超声破菌, 两菌株均出现大片核酸降解带; 但在 *E. coli* BL21(DE3) 的破菌液中仍可见基因组 DNA 条带, 而 BLN 的基因组 DNA 已被降解。

2.5 BLN 菌体生长及表达外源重组蛋白

BLN 无论是在 37°C 还是在 30°C 下培养均与出发菌 *E. coli* BL21(DE3) 生长状态基本一致(图略)。重组质粒 pET-UOX 以 pET22b 为载体构建而成, 将重组质粒分别转化到 *E. coli* BL21(DE3) 和 BLN 中, IPTG 诱导表达后, 取全菌, 超声破菌, 分别收集上清和沉淀, 作 20% Tricine SDS-PAGE 分析。结果见

图 6, 可以看出 *lpxM* 基因失活后不影响其表达水平以及可溶性。

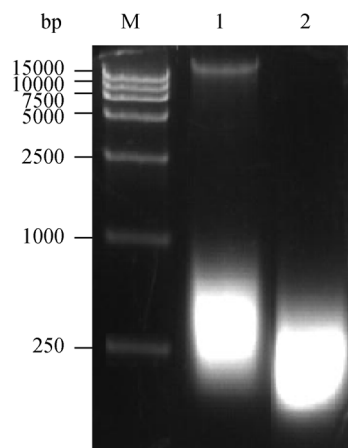


图 5 超声裂解菌体后自动降解宿主基因组 DNA

Fig. 5 The auto-hydrolysis of host chromosomal DNA by BLN (cell lysed using ultrasonic)

M: DL15000 DNA marker. Nucleic acid extracts of cell lysates of; 1: *E. coli* BL21(DE3); 2: BLN

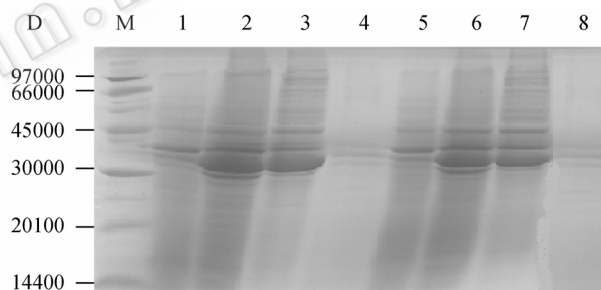


图 6 表达尿酸氧化酶的 SDS-PAGE 结果

Fig. 6 SDS-PAGE analysis showing the expression of recombinant urate oxidase in both BL21(DE3) and BLN.

Lanes 1~4: expression in BL21 (DE3); Lane 1: total cell proteins as the control (pET22b); lane 2, lane 3 and lane 4: total cell proteins, soluble fraction and insoluble fraction of pET-UOX, respectively.

Lanes 5~8: expression in BLN; lane 5: total cell proteins as the control (pET22b); lanes 6, 7 and 8: total cell proteins, soluble fraction and insoluble fraction of pET-UOX, respectively

3 讨论

为解决菌体裂解液由于宿主染色体释放而导致的高粘度的问题, 本文对 *E. coli* BL21(DE3) 进行改造, 使之成为破菌时可自动降解宿主核酸的大肠杆菌表达宿主菌。pET22b 使用 T7 启动子, 系 *E. coli* BL21(DE3) 常用表达载体。以往研究中, 对 NucB 在大肠杆菌中的表达, 使用的是 P_{lac} 启动子^[7] 或 P_{tac} 启动子^[3], 本研究首次使用 T7 启动子实现 NucB 的分

泌表达。通过两次 PCR 将 *OmpA* 信号肽基因序列加至 *nucB* 基因序列上游, 然后连接至 pET22b。所构建的 pETompnucB 重组质粒, 未能在 BL21(DE3)中获得有效表达。推测其转录产物 mRNA 的二级结构可能干扰核糖体结合位点, 进而影响表达^[11]。应用 DnaStar 软件分析指导, 尝试将 *OmpA* 信号肽基因序列第 6 个碱基 A 改变为 G, 在没有改变氨基酸残基的情况下, 使核糖体结合位点的二级结构发生改变。结果突变后的 *nucB* 基因在 BL21(DE₃)中能获得表达, 并分泌至周质空间。

Red 同源重组系统介导 K12 大肠杆菌菌株进行同源重组时所需同源序列仅 30~50 bp, 这样只需一步 PCR, 即可拿到两端带有同源臂、中间有筛选标记的敲除片段^[10,12,13]。但 BL21(DE3)系 *E. coli* B 菌株, red 同源重组系统介导非 K12 大肠杆菌菌株进行同源重组时效率较低(原因不详)^[14,15]。我们曾试图用传统的 36 bp 同源序列对 BL21(DE3) 进行同源重组, 结果失败, 但同样 36 bp 同源臂对 *E. coli* DH5a(K12 菌株)却有效, 这说明用短的同源序列对非 K12 的大肠杆菌进行同源重组时效率确实很低。因此我们决定使用约 500 bp 长度的同源臂, 以确保其同源重组效率。应用先前构建好带有 500 bp 同源臂的打靶载体, 将 *nucB* 基因的表达元件插入到 *lpxM* 基因中, 获得 *nucB* 基因表达, 同时使 *lpxM* 基因失活, 产生低内毒素活性的非肉豆蔻酰化的脂多糖^[5,6]。当目的基因插入 *lpxM* 位点后, 利用 FLP 重组酶删除 kan 基因^[16], 获得了改构的 BL21 菌株, 我们命名为 BLN 菌株。

当所构建工程菌 BLN 经 IPTG 或乳糖诱导表达重组蛋白时, *nucB* 基因也被诱导, 相对较低水平表达并分泌至周质空间。这样低水平表达可使宿主表达目的重组蛋白时尽可能少的受其影响; 分泌至周质空间, 可使宿主核酸免受该酶“毒性”影响, 一旦破菌, NucB 释放出来, 可随即降解宿主核酸。

在考察自动降解宿主核酸能力时, 我们选用两种破菌方式——酶法和超声波裂解法。主要考虑到, 当较小量抽提蛋白时, 为尽可能多地获取活性的可溶的蛋白, 常使用温和的非机械的破菌方法, 如用溶菌酶配合非离子去污剂破菌, 或用 BugBuster 等商品化的蛋白抽提试剂。因此, 我们用含非离子去污剂(Triton X-100)和溶菌酶的破菌缓冲液温和破裂菌体, 然后 37℃短时间水浴, 待 NucB 发挥作用后, 提取裂解液中核酸, 1%琼脂糖电泳分析, 结果显示:

BLN 菌体裂解液中已基本不含大分子量的核酸。从不同时间取样分析, NucB 起效很快, 在 5 min 内即能达到完全降解宿主染色体核酸的效果。考虑到大规模生产中一般应用超声波破碎菌体来获取目的蛋白, 因此我们同样也用超声破菌, 然后 37℃短时间水浴, 提取裂解液中核酸, 1%琼脂糖电泳分析。因超声波能断裂染色体核酸, 因此, 无论是 BL21(DE3)还是 BLN 均出现核酸降解带, 但可以发现, BL21(DE3)的破菌液中仍存在高分子量的核酸, 而 BLN 破菌液中不存在高分子量的核酸, 应为 NucB 作用的结果。以上两个实验结果可较全面的说明, 我们已构建的 BLN 工程菌在破菌后能自动降解细胞内释放的核酸。

在 30℃和 37℃条件下, 振荡培养出发菌 BL21(DE3)和改造后菌种 BLN, 证实其生长状态并未受影响。进一步分别在 BL21(DE3)和 BLN 中表达重组尿酸氧化酶, 结果显示, 重组蛋白能在 BLN 中正常表达, 且表达水平与出发菌基本一致。

本文成功地改造了常用表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), 获得了新型宿主菌 BLN, 该菌株破菌后自动降解细胞内释放出的核酸, 同时导致 *lpxM* 基因插入失活, 产生低内毒素活性的脂多糖^[4]。改造后菌株生长特性和表达重组蛋白的能力和出发菌株一致, 为其进一步在大规模生产中应用打下了基础。

REFERENCES

- [1] Soren M, Givskov M, Riise E. Production in *Escherichia coli* of extracellular *Serratia spp.* hydrolases. US Patent, 1990, 5: 173-418.
 - [2] Boynton ZL, Koon JL, Brennan EM, Clouart JD, Horowitz DM, Gerngross TU and Huisman GW. Reduction of cell lysate viscosity during processing of Poly(3-Hydroxyalkanoates) by chromosomal integration of the staphylococcal nuclease gene in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 1524-1529.
 - [3] Cooke GD, Cranenburgh RM, Hanak JAJ, Ward JM. A modified *Escherichia coli* protein production strain expressing staphylococcal nuclease, capable of autohydrolysing host nucleic acid. *J Biotechnol*, 2003, 101: 229-239.
 - [4] Zhang J, Fang HQ, Xie DP, Liu ZM, Chen HP. Construction of a Mutant *E. coli* BL21(DE3) with inactivated *lpxM*. *Letters in Biotechnology*, 2006, 17(4): 489-492.
- 张君, 方宏清, 谢达平, 刘志敏, 陈惠鹏. 大肠杆菌 BL21(DE3) *lpxM* 突变株的构建. 生物技术通讯, 2006,

- 17(4): 489–492.
- [5] Somerville JEJ, Cassiano L, Bainbridge B, Cunningham MD and Darveau RP. A novel *Escherichia coli* lipid A mutant that produces an antiinflammatory lipopolysaccharide. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 359–365.
- [6] Cogneta I, Coignaca AB, Magistrellia G, Jeannina P, Aubrya JP, Maisnier-Patina K, Carona G, Chevalierb S, Humberta F, Nguyena T, Becka A, Velina D, Delneste Y, Malissarda M, Gauchata JF. Expression of recombinant proteins in a lipid A mutant of *Escherichia coli* BL21 with a strongly reduced capacity to induce dendritic cell activation and maturation. *J Immunol Methods*, 2003, **272**: 199–210
- [7] Takahara M, Hibler DW, Barr PJ, Gerlt JA, Inouye M. The OmpA signal peptide directed secretion of staphylococcal nuclease by *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1985, **260**: 2670–2674.
- [8] Tarragona-Fiol A, Taylerson CJ, Ward JM, Rabin BR. Production of mature bovine pancreatic ribonuclease in *Escherichia coli*. *Gene*, 1992, **118**: 239–245.
- [9] Chaveroche K, Ghigo JM, d'Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: E97.
- [10] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6640–6645.
- [11] Looman AC, Bodlaender J, Gruyter M, Vogelaar A, Van Knippenberg PH. Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 1986, **14**: 5481–5497.
- [12] Yu D, Ellis MH, Lee EC, Jenkins NA, Copeland NG, Court DL. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **11**: 5978–5983.
- [13] Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene*, 2000, **246**: 321–330.
- [14] Friedman DI, Court DL. Bacteriophage lambda: alive and well and still doing its thing. *Curr Opin Microbiol*, 2001, **4**: 201–207.
- [15] Derbise A, Lesic B, Dacheux D, Ghigo JM, Carniel E. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, **38**, 113–116.
- [16] Cherepanov P, Wackernagel W. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Fip-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 1995, **158**: 9–14.

湖泊水华疯长的启示和进行生物防治研究的途径

水华或水花(water flower)是水域富营养化造成的恶果,也是水域遭受污染而造成的,给湖泊等水域带来灾难性严重后果,造成重大经济损失,给生活带来诸多不便。这是世界性治污的重大课题。江苏大湖水华(主要是蓝藻)的疯长是最典型的一例,引起国家的高度重视。多年来,有关研究单位花了很大工夫对水华进行治理,但只治标,未能治本,没有想到水华在大湖暴长如此之快!从长远计,如何有效治理水华的发生与发展呢?《生物工程学报》(21(4):584,2005)作了一些报道,这里再补充几点供研究参考。应从两方面着手:一、多途径解决水域富营养化问题:减排与防治同时并重,也就是说,控制各类废弃物的排放,并控制水华的猛长,这是基础条件;与此同时还要变有害为无害,实现水华(蓝藻)资源化(蓝藻富含蛋白质,其含量相当于大豆的40%,还富含氨基酸、维生素),可形成“再生产业”。尽最大的可能实现废弃物循环利用,为循环经济服务。二、有效运用生物技术控制水域富营养化以达到清除水华(蓝藻)的目标。任何机械捕捞水华藻体的方法,只是应急之策,不能治本。因此,采用生物治理水华的方法具有重要价值:1.富营养化问题。除了“节能减排”措施之外,生物酶的植酸酶不论源于微生物或“工程微生物”或“工程植物”,均有利于治理水域富营养化成分如磷等。2.充分利用水华(蓝藻)的拮抗微生物以治理水华:国内外研究者已找到细菌或真菌对水华蓝藻有裂解作用。3.水华蓝藻存在专一性藻病毒,有可能将其研制成“灭藻病毒制剂”,专一性地治理其寄主藻群,而不伤害其他水生生物。4.微生物组合技术用于治理水华,有研究者将某些微生物如光合细菌、硝化细菌等组合起来,对氮氮转化效果明显,充分证明这类微生物组合技术对治理富营养化水体切实可行。5.“酶可邦”(micopan)治水华技术已在实践中得到应用。北京酶邦生物工程有限公司开发的“酶可邦”产品(实质上是有益微生物和酶有机地结合在一起成为发挥各微生物功能作用的群体)在治理富营养化水体方面显示卓越的功效。不论在河流、湖泊或养殖场方面的治理均取得明显效果。其明显的特点是:(1)具有消化水体蓝藻的能力,也即“以水体藻类为食”,大大减少藻体的生存和繁衍;(2)“酶可邦”产品对水体富营养物质如磷、氮等逐渐快速减少或去除,使水体藻类失去生长必备的条件,而逐渐走向衰亡;(3)水体环境改善,水“自净”能力得到提高,水体生态环境大为改善。实践证明,“酶可邦”已在中国开始治理小型水体,取得令人满意的效果。此外,有报道称我国改性黏土治理有害水华获得了重大突破(邢桂方,2006)。

总之,水体富营养化、水华疯长给水体生态构成严重威胁,居民生活或安全受到直接或间接的影响,但是对水体富营养化和水华的防治也是有办法、有希望的,充分发挥生物-微生物技术的特定功能,在实践中有效运用必有所获。然而,对其在不同水体生态环境中的表现力和持续性还有待做深入的探究。

(柯 为)