

# 大肠杆菌抗氟乙酸变株的选育及应用\*

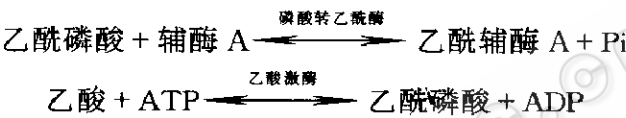
朱彤波 杨蕴刘<sup>1</sup> 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

关键词: 氟乙酸, 乙酸, 磷酸转乙酰酶(PTA), 乙酸激酶(ACK), GL-7ACA 酰化酶

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2000) 01-0100-04

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是表达外源重组蛋白的常用宿主菌之一。在通气培养条件下, 当该菌的生长速率超过一定限度, 三羧酸循环达到饱和时, 细菌体内多余的丙糖会通过磷酸转乙酰酶/乙酸激酶(Pta-Ack)途径, 生成乙酸排出体外, 导致培养基中乙酸的积累。该途径可表示为:



一般条件下, 反应向乙酸生成方向进行。当培养基中葡萄糖等碳源耗尽时, 分泌至培养基中的乙酸又能作为碳源, 通过该途径的逆转, 被细菌重新吸收、利用。研究表明, 培养基中乙酸的积累, 会抑制细菌的生长, 降低细胞得率<sup>[1]</sup>, 还可抑制大肠杆菌中外源重组蛋白的表达<sup>[2-4]</sup>。此外, 乙酸的大量生成使培养基中的部分碳源不能通过三羧酸循环而转化为合成终产物(如外源重组蛋白)的有用中间体, 造成碳源的浪费, 为工业发酵所忌<sup>[5]</sup>。

GL-7ACA 酰化酶是酶法生产 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)的重要工业用酶<sup>[6]</sup>, 编码该酶的基因已被克隆并构建了以 *E. coli* 为宿主的 GL-7ACA 酰化酶基因工程菌<sup>[7,8]</sup>。但在以葡萄糖为碳源的发酵过程中, 发酵液酸度的增加, 导致 GL-7ACA 酰化酶产量的下降(未发表资料)。本文报道氟乙酸抗性菌株的筛选、突变性质分析以及重组质粒上 GL-7ACA 酰化酶基因在这些菌株中表达水平的比较。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒(表 1)

1.1.2 试剂: 苹果酸脱氢酶、柠檬酸合成酶、乙酰磷酸及氟乙酸购自 Sigma Chemical Co., Acetic Acid Test -

表 1 质粒和菌株

菌株和质粒	特征	来源
菌株 <i>E. coli</i> MMR204	recA <sup>-</sup> , srl <sup>+</sup> ::Tn10, ampC <sup>+</sup> ::KAPA,	本实验室
DP8	ack <sup>-</sup> , recA <sup>-</sup> srl <sup>+</sup> ::Tn10, ampC <sup>+</sup> ::KAPA	本研究
DP19	pta <sup>-</sup> , recA <sup>-</sup> srl <sup>+</sup> ::Tn10, ampC <sup>+</sup> ::KAPA	本研究
质粒		
pMR24	Amp <sup>r</sup> , Acy <sup>+</sup>	本实验室

\* 国家“九五”攻关项目(96-102-02-01)和上海市现代生物与新药产业发展基金项目(98-4319135)

作者简介: 朱彤波(1972-), 女, 安徽省太湖县人, 中国科学院上海植物生理研究所博士研究生, 专业方向为分子生物学及生物工程。<sup>1</sup> 通讯作者

收稿日期: 1998-06-02, 修回日期: 1999-03-29

combination 购自 Boehringer Mannheim。Coenzyme A 购自 purum, 丙酮酸钠购自华美生物工程公司, 辅酶 I 购自上海浦江应用生物化学研究所, 还原辅酶 I 二钠盐购自上海丽珠东风生物技术有限公司。其余为国产分析纯试剂。

**1.1.3 培养基:**选择培养基、N8-2 培养基、限制培养基参见文献[9]。发酵使用 LB 培养基。高压灭菌后加入单独灭菌的葡萄糖溶液使终浓度为 0.2%。

## 1.2 方法

**1.2.1 乙酸分泌量的测定:**参见 Acetic Acid Test-combination 之说明。

**1.2.2 GL-7ACA 化酶活力的测定:**参见文献[10]。

**1.2.3 无细胞抽提液的制备:**将在限制培养基中生长至对数期的菌液 50mL 于 4℃ 经 5000r/min 离心 10min(Beckman 离心机, JA-20 转头), 弃上清, 用 15mL 磷酸钠缓冲液(10mmol/L, 含 10mmol/L  $MgCl_2$ , 1mmol/L EDTA, pH7.2~7.5)洗涤两次, 再加入缓冲液, 使菌体浓度达 4~5mg(细胞干重)/mL。然后用超声波破碎仪分别处理菌悬液 3、5 和 7min, 再将经不同时间处理的细胞悬液于 4℃ 15000r/min 离心 60min, 取上清液贮存于 -20℃ 待测酶活。

**1.2.4 PTA 活力的测定:**参见文献[6]。

**1.2.5 ACK 活力的测定:**根据 Lipmann 及 Tuttle 的方法<sup>[11]</sup>, 参照 Rose 等的具体操作<sup>[12]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 氟乙酸抗性菌种的筛选

**2.1.1 初筛:**将在 LB 培养基中生长至对数期的 *E. coli* MMR204 以每平板  $5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^8$  和  $5 \times 10^9$  个菌的浓度涂布在分别含 10mmol/L、25mmol/L 和 50mmol/L 氟乙酸的以丙酮酸钠为单一碳源的选择培养基平板上, 于 37℃ 培养约 72 h。挑选出其中生长较好、菌落较大的单菌落于含 50mmol/L 氟乙酸的选择平板上反复划线纯化, 共选出稳定的对氟乙酸具有抗性的突变株 163 株。再将它们与亲株 MMR204 一起接种到以乙酸钠代替丙酮酸钠作单一碳源的选择培养基平板上。结果如表 2 所示, 按其生长特性, 可将突变菌株分为两类: 第 I 类在乙酸钠培养基中基本无生长; 第 II 类生长缓慢, 与培养 24h 即可形成菌落的亲株 MMR204 比较, 此突变株需在 48h 后才有模糊的菌落出现。

**2.1.2 复筛:**挑选 I、II 类抗氟乙酸突变菌共 25 株, 测定它们在 N8-2 培养基中的乙酸积累量。结果发现第 I 类突变株乙酸的相对积累量在 6.26%~18.8% 之间, 其中 DP19 菌株的产乙酸量仅为 MMR204 的 6.26%。而第 II 类突变株的乙酸积累量与亲株相似。其中 DP8 的产乙酸量与 MMR204 几乎相等。

### 2.2 DP8、DP19 与亲株 MMR204 在不同培养基中生长速率之比较(见表 2)

**2.2.1 在以乙酸钠为单一碳源的固体选择培养基上的生长:**如前所述, MMR204 可在 24~48h 内长出菌落。DP8 则延迟至 48~72h 方有细小菌落出现, DP19 在该培养基上观察不到生长。这说明氟乙酸抗性菌株利用乙酸盐的能力均受到了不同程度的影响。

**2.2.2 在 LB 培养基中的生长:**在 LB 固体培养基上生长时, 可观察到 DP19 在平板上出现菌落的时间慢于 MMR204, DP8 在平板上出现菌落的时间与 MMR204 相同。

表 2 亲株及氟乙酸抗性菌在不同培养基中的生长比较

菌 种	含氟乙酸 选择培养基	丙酮酸钠 培养基	乙酸钠 培养基	LB 培养基	乙酸积累 相对量/%
<i>E. coli</i> MMR204	-	+	+	+	100
I 类氟乙酸抗性株 (以 DP19 为代表)	+	+	-	+/-	6.26
II 类氟乙酸抗性株 (以 DP8 为代表)	+	+	+/-	+	98

+; 正常生长, 24h 内可观察到菌落; +/-; 生长缓慢, 菌落出现时间慢于正常生长的菌株, 在 48 至 72h 之间; -; 不能生长。

从 *E. coli* MMR204、DP8、DP19 在含 0.2% 葡萄糖的 LB 液体培养基中的生长曲线 (图 1) 可以看出, DP8 的生长速率和生物量与 MMR204 相似, 而 DP19 最终能达到的生物量与 MMR204 相似, 但进入对数期的时间比 MMR204 明显滞后。

2.3 氟乙酸抗性菌株突变型的确定、

使 DP8、DP19 及 MMR204 在限制培养基中生长至对数期, 收取细胞样品, 经超声处理和离心, 再测定无细胞抽提液中 ACK 及 PTA 的酶活。表 3 的测定结果说明, 所得两类变种与其亲株 MMR204 的产酶状况截然不同。其中 DP19 的 PTA 活力比 MMR204 有较大幅度下降, ACK 活力却有所提高; DP8 的 ACK 活力明显低于亲本菌株, PTA 活力几乎不变。综合上述产乙酸水平、生长特性以及 PTA/ACK 活力, 与文献[9]的报道相比较, 证明 DP19 属于 PTA 缺陷型氟乙酸抗性株, 而 DP8 为 ACK 缺陷型氟乙酸抗性株。

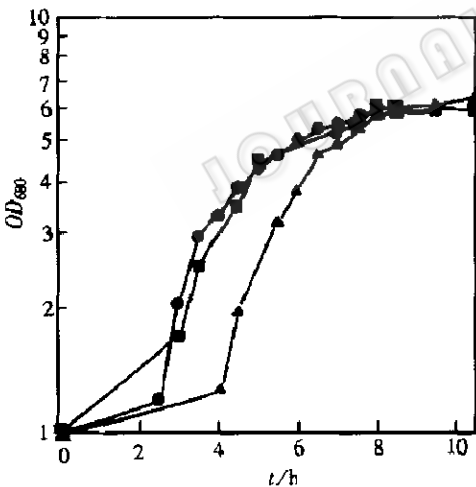


图 1 *E. coli* MMR204 及 DP8、DP9 在含 0.2% 葡萄糖 LB 中生长比较

—●—MMR204; —▲—DP19; —■—DP8.

表 3 DP8、DP19 和 MMR204 的 PTA、ACK 酶活力比较

菌株	PTA 酶活* /(U/mg)	ACK 酶活 /(U/mg)
MMR204	6.83	1.06
DP19	0.16	2.35
DP8	5.45	0.61

\* 以上酶活指每毫克细胞干重的酶活力, 均为经五次重复实验所得的平均值。

2.4 MMR204(pMR24)及 DP19(pMR24)的发酵及乙酸分泌量比较

将 MMR204(pMR24)及 DP19(pMR24)的种子液以 1% 接种量转接于含 0.2% 葡萄糖的 LB 发酵液, 于 37℃ 振荡培养。按一定时间间隔取样, 测其 OD<sub>680</sub> 及乙酸含量。结果如图 2 所示。DP19 在发酵液中进入对数期的时间慢于 MMR204, 而乙酸分泌量明显低于 MMR204。它们能达到的最终生物量相似。生长曲线显示它们均有二次生长, 且二次

生长出现的时间与发酵液中乙酸含量下降(可能代表乙酸被重新利用)的时间相对应。

2.5 pMR24 上 GL-7ACA 酰化酶基因在不同宿主中的表达

将携带 pMR24 的 DP8、DP19 及 MMR204 经活化后以 1% 接种量接种于含 0.2% 葡萄糖的 LB 发酵液,于 37℃ 培养。10h 后开始每隔 5h 取样并测定酰化酶活力。由图 3 可以看出,pMR24 上 GL-7ACA 酰化酶基因在低产乙酸的 PTA 缺陷型氟乙酸抗性株 DP19 中所表达的酰化酶活力较亲株 MMR204 提高近一倍。由于两者的生物量相同(见图 1, 2),因此单位菌体产酶活力的增加表明重组质粒 pMR24 上 GL-7ACA 酰化酶基因表达水平的提高。而 ACK 缺陷型氟乙酸抗性菌 DP8 与 MMR204 比较,酰化酶活力提高不很明显。

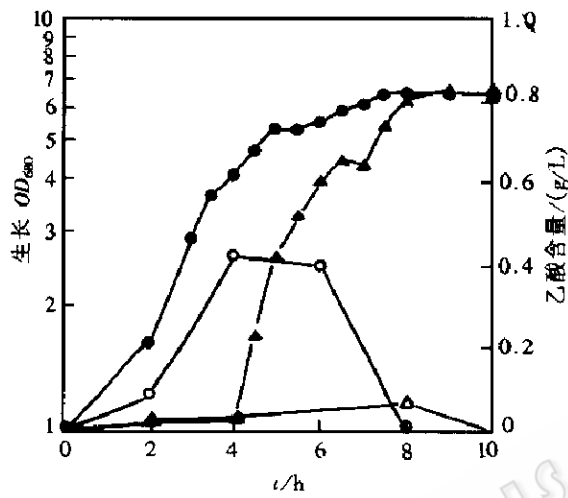


图2 MMR204(pMR24)及DP19(pMR24)在含0.2%葡萄糖中生长及乙酸分泌比较  
—●—MMR204 的生长曲线;—▲—DP19 的生长曲线;  
—○—MMR204 的乙酸积累;—△—DP19 的乙酸积累。

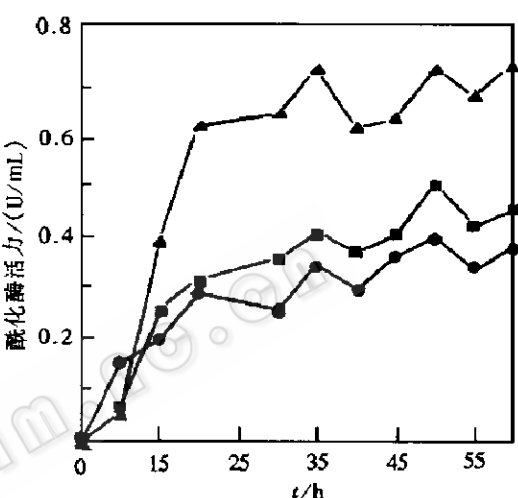


图3 MMR204 及 DP19、DP8 在含 0.2% 葡萄糖 LB 中表达 GL-7ACA 酰化酶比较  
—●—MMR204;—▲—DP19;—■—DP8。

3 讨论

通气条件下以大肠杆菌为宿主发酵生产外源重组蛋白时,乙酸在发酵液中的积累直接影响重组蛋白发酵单位的提高<sup>[1~4]</sup>。目前已知细菌细胞产生乙酸的主要途径是 Pta-Ack 途径。氟乙酸是乙酸类似物,可由 Pta-Ack 途径被细菌转化为氟化柠檬酸(fluoro-citrate)而导致细菌细胞的死亡。故筛选对氟乙酸具有抗性的突变株,就可能得到 Pta-Ack 途径发生了缺陷、因而乙酸积累降低的细菌菌株<sup>[13]</sup>。

本实验通过上述方法,得到两类 Pta-Ack 途径缺陷的 *E. coli* 突变株:一类为 ACK 缺陷型,另一类为 PTA 缺陷型。以 DP19 为代表的 PTA 缺陷型变株在发酵过程中,乙酸积累量仅为亲株的 6.26%,而 ACK 突变型菌株的乙酸积累量并不降低。Bauer 等<sup>[9]</sup>认为这是由于该类变株中积累的乙酰磷酸(acetyl phosphate, AcP)不稳定,易自行分解产生乙酸的缘故。以 PTA 缺陷型菌株作为宿主,外源 GL-7ACA 酰化酶的发酵单位提高近一倍。这可能是低产乙酸菌株部分消除了原宿主分泌的大量乙酸对外源重组基因表达的阻抑作用。Nystrom 还指出,PTA 活力的降低,会影响 PTA 缺陷型细胞内乙酰辅酶 A 向 AcP 的转化,AcP 作为一个全局调控因子,可能影响细胞内多个基因的表达<sup>[14]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Yang X M. *J Biotech*, 1992, **23**:271~289.
- [2] Konstantinov K, Kishimoto M, Seki T, *et al.* *Biotech Bioeng*, 1990, **36**: 750~758.
- [3] Jensen E B, Carlsen S. *Biotech Bioeng*, 1989, **36**: 11~21.
- [4] Majewski R A, Domach M M. *Biotech Bioeng*, 1989, **35**: 732~738.
- [5] Nakagawa S, Oda H, Anazawa H. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(12)L: 2263~2267.
- [6] Matsuda A, Matsuyama K, Yamamoto K, *et al.* *J Bacteriol*, 1987, **169**(12): 5815~5820.
- [7] 杨蕴刘, 恽定芳, 关颖谦, 等. 生物工程学报, 1991, **7**(2):99~107.
- [8] 彭惠玲, 杨蕴刘, 焦瑞身, 等. 工业微生物, 1992, **22**(3):1~7.
- [9] Bauer K. A, Ben-bassat A, Dawson M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**(5): 1296~1302.
- [10] 魏中获, 杨蕴刘, 金志坤, 等. 中国专利, 公开号 1995CN1104255A.
- [11] Lipmann F, Tuttle L C. *J Biol Chem*, 1945, **159**: 21~28.
- [12] Rose I A, Grunberg-Manago M, Korey S R, *et al.* *J Biol Chem*, 1954, **271**: 737~756.
- [13] Mayer M A G, Bronnenmeier K, Schwarz W H, *et al.* *Microbiol*, 1995, **141**: 2891~2896.
- [14] Nystrom T. *Mol Microbiol*, 1994, **12**(5): 833~843.

## THE SELECTION OF FLUOROACETATE-RESISTANT MUTANT FROM *E. COLI* MMR204 AND ITS INFLUENCE ON THE EXPRESSION OF HETEROLOGOUS GL-7ACA ACYLASE\*

Zhu Tongbo Yang Yunliu Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

**Abstract:** In the cultivation of gene engineered strain of *Escherichia coli* on glucose medium, excretion and accumulation of acetic acid inhibit not only cell growth but also the the expression of heterologous protein. It is obvious that the desirable host strain maintaining acetate at a low level is one of the approaches to increase the production of recombinant protein. The present article deals with the selection of mutants of *E. coli* DP19, DP8, which grow on the medium containing pyruvate as the sole carbon source in the presence of 50mmol/L fluoroacetic acid. It is shown that mutant DP19 is defective in its phosphotransacetylase(PTA) activity and accumulates less acetate in the medium, while DP8 is defective in acetate kinase (ACK) and accumulates similar level of acetate comparing with its parent. Using *pta*<sup>-</sup> mutant *E. coli* DP19 as host, the expression of GL-7ACA acylase gene on the recombinant plasmid pMR24 is improved, and the yield of enzyme activity in flask fermentation is about twice as much as its parent.

**Key words:** Fluoroacetic acid, Acetic acid, phosphotransacetylase (PTA), Acetate kinase (ACK), GL-7ACA acylase

\* Supported by Chinese National Programs for Science and Technology Development(96-102-02-01) and Shanghai Fund for Biotechnology and Pharmaceuticals Development(98-4319135)