

# 细胞通透性的改变及其应用\*

罗 杰

(华中科技大学生命科学与技术学院 武汉 430074)

## CELL PERMEABILIZED AND IT'S APPLICATION\*

Luo Jie

(School of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

**关键词:** 细胞通透性, 酶活测定, 酶/蛋白质提取, 产物分泌, 生物转化

**中图分类号:** Q939.97 **文献标识码:** B **文章编号:** 0001-6209 (2001) 03-0386-04

本文综述了细胞通透性的改变及在胞内酶测定、胞内酶/蛋白质提取、细胞代谢产物分泌及生物转化等方面的应用。

### 1 细胞通透性的改变

为了克服由于细胞壁、细胞膜存在而形成的渗透屏障,人们通过物理、化学等方法改变细胞壁、膜的通透性。通过以上处理,渗漏细胞通常仍保持其形态上的完整性,但由于其细胞壁、膜受到了一定的破坏,其对低分子量物质的渗透障碍被部分或完全解除。

细胞通透性改变因不同的微生物类型而有所不同,即使对于同一类型的微生物,也会由于细胞壁、膜的组成和结构不同而有很大差别。另外近期对 *Yarrowia lipolytica* 和 *Torulaspora delbrueckii* 德布有孢酵母的研究表明,细胞通透性的改变随菌龄不同变化不大<sup>[1]</sup>。改变细胞通透性的方法很多,如超声、冻融、有机溶剂(甲苯、二甲亚砷等)、去污剂(如 CTAB、Tween-80 Triton X-100 等)和螯合剂(如 EDTA)处理等。

### 2 应用

#### 2.1 用于胞内酶活力的测定

对于胞内酶的测定,以往常采用机械法进行细胞破碎后测定提取液中的酶活力,不但繁琐费时,结果也不甚准确。Laouar 等研究了包括 Pluronic F-68 在内的各种表面活性剂对测定完整 *S. cerevisiae* 细胞中醇脱氢酶活力的影响。Gowda 等<sup>[2]</sup>用毛地黄苷处理 *Kluyveromyces fragilis*,分别测定其胞内醇脱氢酶(ADH)、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、己糖激酶等酶活力,结果明显高于用匀浆、超声、甲苯自溶及用磷酸钾缓冲液提取等方法。Blankenstein 等<sup>[3]</sup>用非离子型去污剂 Triton X-100 结合毛地黄苷处理 *Candida boidinii*,并在此基础上发展了一套流动注射法半连续测定甲醛脱氢酶(FDH)活力。Alamaee 等用 CTAB、毛地黄苷处理嗜甲基酵母 *Pichia pinus*,细胞干重及蛋白质含量均下降,但所测酶活力高于细胞破碎后所测的结果。另外,用有机溶剂处理后的渗漏细胞也被用来测定胞内半乳糖苷酶和细胞色素 C 氧化酶活力。

#### 2.2 用于胞内酶/蛋白质的提取

绝大多数的重组蛋白质/酶位于胞内,目前工业上多采用机械法(高压匀浆和球磨法等)将细胞破碎

\* 国家九五科技攻关重点资助项目(96-C02-03-01)

作者简介:罗 杰(1971-),男,29岁,讲师。

收稿日期:2000-04-18,修回日期:2000-10-08

后提取,存在着如下缺点:破碎后细胞碎片过多;胞内核酸物质的释放使提取液粘度大大增加;几乎释放了所有胞内可溶性蛋白质,使杂蛋白质含量过大。近年来,化学通透法提取胞内蛋白质/酶因其快速、简便、选择性强等特点逐渐受到人们的重视。

Marvin 等对运用 EDTA 和热冲击处理 *E. coli* 提取周质酶(periplasmic enzymes)进行了研究。Chaib 等用渗透压冲击结合氯仿/胍处理从重组 *E. coli* 中提取人胱氨酸蛋白酶抑制剂 Cystain-C。Novella<sup>[4]</sup>则系统地比较了化学渗漏法,冻融法、超声法对 *E. coli* 青霉素酰化酶的提取效率的影响。超声法提取总蛋白含量最高,但纯化系数极低。溶菌酶加 EDTA 处理后酶活力最高,但纯化系数仍不高。室温下以胍加 EDTA 处理后酶活力保留 80%,杂蛋白含量极低,纯化系数很高。

Lutzer<sup>[5]</sup>将化学通透与高压匀浆相结合,提取胞内蛋白质取得了较好的效果。最近 Falconer 等用 EDTA(0.3 mmol/L)和胍(6 mol/L)处理 *E. coli* 细胞,30 min 内几乎 100% 的可溶性蛋白释放到胞外。目前对于含有重组蛋白的 *E. coli* 细胞的化学通透研究正在进行中。Nagiak 等<sup>[6]</sup>在实际发酵条件下对 *E. coli* 生长和胞内蛋白释放的研究表明:0.4 mol/L 胍与 0.5% Triton X-100 连用,1 h 内可释放 75% 的胞内蛋白,除去溶剂后细胞生长仍可得到恢复。Gehmlich 等<sup>[7]</sup>将重组 *E. coli* 细胞冻干后用胍-盐酸、Triton X-100 处理,经微滤得到链激酶。酶收率 82%,纯度 46%。

Virta 等<sup>[8]</sup>向 *E. coli* 和 *B. subtilis* 中导入来自 *Oerskovia xanthineolytica* 的具有融菌作用的葡聚糖酶基因。Park 等<sup>[9]</sup>利用基因工程技术破坏 *S. cerevisiae* 中与细胞壁形成有关的 KNR4 基因,重组细胞的通透性明显提高,可用于进行外源蛋白质的生产。Fleer 等将带有破坏掉 PDR1、EGR4 基因的质粒导入 *S. cerevisiae* 中替换原来的正常基因,重组细胞用于生物活性物质的筛选、生物催化和代谢途径研究。

### 2.3 增加代谢产物的分泌

Takeshige 等<sup>[10]</sup>将静止期的 *S. cerevisiae* 用甲苯、乙醇和 Triton X-100 处理后加入到含甲基乙基磺酸盐的培养基中培养,其乙醇产量大大提高。Werf 等用 0.15% 的 Triton X-100 渗漏处理 *Pseudomonas pseudocaligenes* 后生产苹果酸。Avchieva 等<sup>[11]</sup>在用 *Candida lipolytica* 两步培养生产柠檬酸时,于第二步加入 DM-SO 诱导柠檬酸的合成与分泌,并进行连续化生产研究。

Zhong 等<sup>[12]</sup>以 DMSO 处理 *Parax notoginseng*,结果表明将悬浮细胞在含有 1% DMSO 的培养基中培养,胞外人参皂甙含量达到 136 mg/L。Choi 等<sup>[13]</sup>将 *Gossypium arboreum* 细胞经 DMSO 渗漏处理后进行固定化连续培养,棉子酚产量提高 30%,加上诱导子的作用,产率提高 20 倍。Park 等<sup>[14]</sup>先将 *Coleus blumei* 在低浓度(0.1%)的 DMSO 中驯化,然后在含有渗漏浓度(0.5%)DMSO 培养其中培养,迷迭香酸(rosmarinic acid)的产量大幅提高,且 65% 以上分泌到胞外。

### 2.4 用于生物转化

牛乳清中乳糖的利用近年来一直令人关注。Bachhawat 等<sup>[15]</sup>用 0.1% CTAB 处理静止期的 *K. fragilis*,渗漏细胞可直接用于乳糖水解。Tomaska 等<sup>[16]</sup>将用氯仿/乙醇处理后的 *K. marxianus* 固定于果胶酸钙后用于乳糖水解。经过 55 个批次后乳糖水解率仍然高于 80%,连续生产时水解率在 11 d 内保持不变。Somkwitui 等利用 SDS、Tween-80、Brij35 等对 *S. thermophilus* 细胞进行短期渗漏处理,Triton X-100 和 SDS 在低浓度(0.025%)时就能使半乳糖苷酶活力提高 7~8 倍,且不造成细胞溶解。而用 Triton X-100 处理的细胞对乳糖的水解转化率最高(87%)。将渗漏细胞直接用琼脂糖凝胶固定化后加入含 5% 乳糖的牛奶中,乳糖水解率达到 90% 以上。经过处理后细胞在 5~6 h 间处于生长停滞阶段,因此不会在水解乳糖过程中产生乳酸而污染乳制品。Siso 等<sup>[17]</sup>将 *K. lactis* 固定于玉米渣后用 70% 的乙醇处理,固定化细胞装入填充床反应器进行水解乳糖实验,水解率超过 90%,与未处理的细胞相比乳糖水解速度大大加快,水解程度提高。同时,水解产生的葡萄糖和半乳糖不被渗漏细胞利用,因而可以作为甜味剂或微生物的营养物使用。

嗜甲基酵母(如毕赤酵母、汉逊酵母、假丝酵母)在有  $O_2$  的条件下,其胞内醇氧化酶(AOXase)能将甲醇氧化为甲醛,同时产生  $H_2O_2$ 。但由于胞内过氧化氢酶的存在(酶活力为醇氧化酶的 200~400 倍),产

生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  被立即分解,并不能生成  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。用化学通透法有选择性地使 *Pichia pastoris* 细胞中的过氧化氢酶渗出,同时加入过氧化氢酶的选择性抑制剂叠氮化钠,使得醇氧化酶比活力提高了一倍。此外,叠氮化钠的加入还起到了稳定醇氧化酶的作用。利用该法生产  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,最高浓度可达到  $80 \text{ mmol/L}$  [18]。

Liu 等 [19] 用乙醇和异丙醇处理导入胞内醛酮转移酶的重组 *S. cerevisiae*,由丙酮醛合成 S-丙醇酰谷胱甘肽。在  $4^\circ\text{C}$  下,用 40% 乙醇和异丙醇处理 10 min,渗漏细胞产物生成的初速度分别为未经处理的对照细胞的 364 和 582 倍,为使用等量细胞提取的醛酮转移酶时产物生成速度的 2.5 ~ 3.5 倍。渗漏细胞经反复使用后仍保持较高的活性。

Jang 等 [20] 将 *Zymomonas mobilis* 经 CTAB 处理后,用卡拉胶固定化连续生产山梨醇,产量为  $6.51 \text{ g/L}$ ·h,且在 30 d 的连续生产中无变化。Rehr 等将用阳离子性去污剂 CTAB 处理后的 *Z. mobilis* 在 30% (w/v) 的葡萄糖、果糖混合物中连续培养,山梨醇和葡萄糖酸产量均达到  $295 \text{ g/L}$ 。

Prabhune 等 [21] 将经过 CTAB 处理后的 *E. coli* 细胞用戊二醛固定化后包埋于聚丙烯酰胺中,由青霉素 G 酶法生产 6-氨基青霉烷酸 (6-APA)。转化率达到 95 ~ 100%,转化时间缩短 1/3,固定化细胞使用 90 个批次后酶活力无明显损失。Acai 等将 *Trigonopsis variabilis* 和 *Pseudomonas* sp. 进行渗漏处理后固定于果胶酸钙中由头孢菌素-C 合成 7-ACA。Chan 等 [22] 用 0.1% 己烷处理 *Cryptococcus neoformans* 细胞,由正十五烷生产正十三烷-1,13-二羧酸,转化率大大提高。渗漏细胞固定化后连续生产时产量提高 4 倍。利用 Amberlite XAD-2 对正十三烷-1,13-二羧酸-进行原位提取后,该方法将可用于大规模生产。

## 2.5 其他

Fernandez 等 [23] 用甲苯-乙醇破坏 *Schizosaccharomyces pombe* 的胞内海藻糖池 (internal trehalose pool),然后通过外加海藻糖研究海藻糖对胞内酶的热稳定作用。经 CTAB 渗漏处理后的 *K. fragilis* 还被用来替代纯酶对乙醇、葡萄糖、乳糖进行酶法分析。

Richards 等 [24] 在进行以磺胺嘧啶作为佐剂增强甲氧苄氨嘧啶对甲氧苄氨嘧啶耐药性病原菌 *Enterococcus faecalis* 463 杀菌作用的研究中发现,磺胺嘧啶本身并不能对 *E. faecalis* 463 产生作用,但却能通过破坏细菌的细胞壁使细胞对甲氧苄氨嘧啶的吸收增加 6 倍,最终导致细胞 ATP 的释放并发生超结构损伤而失去耐药性。

## 3 展望

细胞的通透性改变已被广泛应用,但仍有不完善之处。目前在通透性改变的机理方面研究进展不大,大多数应用还停留在依靠经验和通过实验摸索的阶段。若能对通透剂与细胞壁、膜作用机制有较深入的了解,就可以根据不同的需要选择特定的通透剂及其作用方式及强度,避免选择时的盲目性。另外,在通过内源因素(如通过改变基因组成)实现细胞通透性的可控调节方面也有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Christova N, Tuleva B, Galabova D. *Biotechnol Tech*, 1996, 10(2): 77 ~ 78.
- [2] Gowda L R, Joshi M S, Bhat S G. *Anal Biochem*, 1988, 175: 531 ~ 536.
- [3] Blankenstein G, Kula M R. *Anal Chim Acta*, 1991, 248: 371 ~ 378.
- [4] Novella I S, Fargues C, Grevillot G. *Biotech Bioeng*, 1994, 44: 379 ~ 382.
- [5] Lutzer R G, Robinson C W, Glick B R. *Proc 6th Euro Cong Biotechnol*, 1994, 909 ~ 912.
- [6] Naglak T J, Wang H Y. *Biotech Bioeng*, 1992, 39: 732 ~ 740.
- [7] Gehmlich I, Pohl H D, Knorre W A. *Bioproc Eng*, 1997, 17: 35 ~ 38.
- [8] Virta M, Aekerman K E O, Saviranta P, et al. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, 782 ~ 800.
- [9] Park S M, Song Y H, Kim S H, et al. *Biotech Lett*, 1998, 20: 511 ~ 514.
- [10] Takeshige K, Ouchi K. *J Ferm Bioeng*, 1995, 79: 11 ~ 16.

- [11] AVchieva P B, Vinarov A Y. *Biotehnologiya*, 1992, 1: 46 ~ 48.
- [12] Zhong J J, Meng X D, Zhang Y H, et al. *Biotech Tech*, 1997, 11: 241 ~ 243.
- [13] Choi H J, Tao B Y, Okos M R. *Biotech Prog*, 1995, 11: 306 ~ 311.
- [14] Park C H, Martinez B C. *Biotech Bioeng*, 1992, 40: 459 ~ 464.
- [15] Baehhawat N, Gowda L R, Bhat S G. *Proc Biochem*, 1996, 31(1): 21 ~ 25.
- [16] Tomaska M, Gemeiner P, Materlin I, et al. *Biotech Appl Biochem*, 1995, 21(3): 347 ~ 356.
- [17] Siso M I G, Torres A R. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16: 303 ~ 310.
- [18] Zhang M, Wang H Y. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16: 10 ~ 17.
- [19] Liu Y, Hama H, Fujita Y, et al. *Biotech Bioeng*, 1999, 64: 54 ~ 60.
- [20] Jang K H, Jung S J, Chang H S, et al. *Proc Biochem*, 1996, 31(5): 485 ~ 492.
- [21] Prabhune A A, Rao B S, Pundle A V, et al. *Enzyme microb Technol*, 1992, 14(2): 161 ~ 163.
- [22] Chan E C, Kuo J. *Enzyme Microb Technol*, 1997, 20: 585 ~ 589.
- [23] Fernandez J, Soto T, Vicente-Soler T. *Can J Microbiol*, 1995, 41(10): 936 ~ 941.
- [24] Richards R M E, Xing J Z. *J Antimicrob Chemother*, 1995, 36: 607 ~ 618.