

## 天冬酰胺酶介导的分枝杆菌酸适应机制

蔡潇浪<sup>1#</sup>, 吴蓓蓓<sup>2#</sup>, 方扬<sup>1</sup>, 宋厚辉<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>浙江农林大学动物科技学院, 临安 311300

<sup>2</sup>浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051

**摘要:** 【目的】结核分枝杆菌可以在宿主细胞内的酸性环境中长期存活。为了探明天冬酰胺酶 (AnsA) 代谢通道介导的分枝杆菌在酸性环境中的适应机制, 分别通过体内和体外实验, 对 AnsA 的活性、突变体性质进行了分析。【方法】以无致病性的卡介苗分枝杆菌 (*M. bovis* BCG) 为模式菌, 扩增天冬酰胺酶编码基因 *ansA* 并在大肠杆菌中进行表达和纯化, 对 AnsA 的酶学活性进行了分析。在卡介苗分枝杆菌中将 *ansA* 敲除, 对其抗酸、产氨等特性进行了研究。【结果】纯化的重组 AnsA 在体外可以将天冬酰胺分解并产生氨。在酸性培养基中, 分枝杆菌利用天冬酰胺产生的氨, 可以释放到培养基中, 将酸性培养基中和。敲除 *ansA* 后, 卡介苗分枝杆菌在酸性环境中的生长滞后 10 天左右。为了更好的理解天冬酰胺介导的抗酸机制, 绘制了天冬酰胺代谢、氨产生和转运示意图。【结论】结核分枝杆菌的抗酸特性之一是通过分泌氨将周围的酸性环境中和来实现的。氨来源于分枝杆菌 AnsA 对底物天冬酰胺的分解。这为揭示结核分枝杆菌在宿主巨噬细胞内酸性环境中的生存机制提供了线索。

**关键词:** 卡介苗分枝杆菌, 天冬酰胺, 天冬酰胺酶, 酸适应性

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2012) 12-1467-10

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mtb*) 是引起肺结核 (Tuberculosis, TB) 的致病菌, 目前全球大约有 1/3 人口为结核阳性。根据 WHO 最新报告, 2010 年全球大约有 145 万人口死于 TB<sup>[1]</sup>, 其中我国人口结核的感染率居世界第二。

结核分枝杆菌在宿主体内主要感染巨噬细胞, 属于胞内寄生菌且能在宿主细胞酸性溶酶体和吞噬小体内的微环境 (pH 5.5 左右或者更低) 中长期存活<sup>[2]</sup>, 因此对其抗酸机制的了解是阐明其致病和耐药机制的前提。但是, 不同的细菌在进化中形成的抗酸机制不同。比如: 胞外菌幽门螺杆菌

(*Helicobacter pylori*) 和副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 进入宿主体内之后, 可以通过自身的尿素酶将尿素分解并将产生的氨释放到细菌细胞外, 迅速中和消化道内的酸性环境来实现其抗酸生长, 同时利用氨破坏上皮细胞<sup>[3-4]</sup>。而胞内寄生菌单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 则通过精氨酸脱亚氨酶对精氨酸的脱氨基作用适应宿主酸性环境<sup>[5]</sup>。慢性生长的结核分枝杆菌与其它快速生长的胞内和胞外菌又有所不同, 因为结核分枝杆菌需要在酸性环境中存活数月或者数年, 在特定的宿主巨噬细胞内即需要抵抗来自宿主细胞的各

**基金项目:** 国家“863 计划” (2012AA101602); 国家自然科学基金 (30800014); 浙江农林大学人才项目 (2034020075)

\* 通信作者。Tel: +86-571-63741392; E-mail: songhh@zafu.edu.cn

**作者简介:** #共同第一作者。蔡潇浪 (1991–), 男, 浙江瑞安人, 学士, 主要从事病原微生物遗传学研究。吴蓓蓓 (1979–), 女, 浙江苍南人, 博士, 副研究员, 主要从事结核分枝杆菌病原学研究。

**收稿日期:** 2012-06-05; **修回日期:** 2012-07-05



种杀伤因子(如:超氧离子、细胞因子等)<sup>[6]</sup>,还需要从环境中获取营养维持自身生存,更需要耐受来自溶酶体或吞噬溶酶体的酸应激。那么,结核分枝杆菌是如何适应周围的酸性环境呢?

我们在前期的研究工作中发现:结核分枝杆菌能够利用天冬酰胺产生氨,且通过外膜蛋白 OmpATb 输送到细菌细胞外<sup>[7]</sup>。为了进一步阐明“氨”和分枝杆菌的抗酸机制,在本研究中,我们利用无致病性的卡介苗分枝杆菌为模式菌,通过模拟酸性环境和氮源,我们发现卡介苗分枝杆菌产生的氨来自天冬酰胺酶对天冬酰胺的降解作用,这是目前揭示分枝杆菌抗酸机制的最新发现。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 化学试剂、菌株和质粒:**本实验室所用的化学试剂均为分析纯,购自 Sigma、USP 和 BD 等公司。卡介苗分枝杆菌(*M. bovis* BCG)由本实验室的合作实验室(阿拉巴马大学 Niederweis 实验室)提供。大肠杆菌克隆用菌株为 DH5a。质粒 pHL002 (*ansA* 表达载体)、pHL084 (*ansA* 基因敲除载体)由本实验室构建并保存。其中 pHL002 是 pET28 (b) 的衍生质粒, pHL084 是 pML564 的衍生质粒<sup>[7]</sup>。质粒图谱分别如图 1 和图 2 所示。

**1.1.2 细菌培养:**大肠杆菌培养基为 LB 培养基, 37℃ 培养。卡介苗分枝杆菌培养基为 7H9/OADC 培养基(液体)和 7H10/OADC 培养基(固体), 37℃ 培养。筛选用抗生素浓度: Hygromycin (潮霉素, 50–200 µg/mL)。

**1.2 卡介苗分枝杆菌 *ansA* 原核表达载体和基因敲除载体的构建**

**1.2.1 *ansA* 原核表达载体:**本研究所用的引物名称和序列如表 1 所示。采用 *ansA* fwd/*ansA* His Rev 引物从卡介苗分枝杆菌基因组中扩增 *ansA* 基因, 利用 *Nco* I/*Hind* I 酶切位点连入 pET28 (b) 中, 命名为 pHL002。卡介苗分枝杆菌与结核分枝杆菌 (H37Rv) 的 *ansA* 同源性 100%。

**1.2.2 *ansA* 基因敲除载体的构建:**采用 *ansA* us fwd/ *ansA* us rev 引物从卡介苗分枝杆菌基因组中扩增 *ansA* 上游同源臂 (1069 bp), 利用 *Spe* I/*Swa* I 酶切位点连入 pML523 中, 命名为 pHL083。然后采

用 *ansA* ds fwd/ *ansA* ds rev 引物从卡介苗分枝杆菌基因组中扩增 *ansA* 下游同源臂 (1014 bp), 利用 *Pac* I/*Nsi* I 酶切位点连入 pHL083 中, 命名为 pHL084。所有插入片段均经过测序验证序列的正确性。

表 1 引物名称和序列

Table1 Primers used in this study	
Primer	Sequence (5'→3')
<i>ansA</i> fwd	AACCATGGGAGCAAACACGTGCGC
<i>ansA</i> His Rev	GCAAGCTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGCCCC AACGGTCGATGACGTCG
<i>ansA</i> us fwd	TGGACTAGTACGTCGAGACGTTCTGCGAACGGTT
<i>ansA</i> us rev	CGCATTAAATAACTCACC GGTCGCCGACGTCAT CGA
<i>ansA</i> ds fwd	TGGTTAATTAATGTCCCTCCAGTAGTGATGACGG TGA
<i>ansA</i> ds rev	TGTATGCATAACGATGTGCTCGTCGGAATACA GAAT

### 1.3 *ansA* 基因敲除和筛选步骤

将 pHL084 质粒(该质粒为温度敏感型质粒, 当温度高于 39℃ 时停止复制)转化入卡介苗分枝杆菌感受态细胞中, 在 7H10/OADC/Hyg 平板上筛选, 用锡箔纸密封后于 35℃ 培养。3–4 周后, 挑选平板上任一单菌落, 在 7H9/OADC/Hyg 液体培养基中摇菌, 待  $OD_{600}$  达到 1.0 左右时候然后稀释成浓度  $1:10^{-1} - 10^{-6}$ , 涂布 7H10/OADC/Hyg 平板, 用锡箔纸密封后于 39℃ 培养。3–4 周后, 挑选平板上单菌落进行菌落 PCR 和 Southern 杂交验证, 此时在基因组水平上发生同源重组: 单交换 (Single cross over, SCO)。然后将任一单交换克隆, 在 7H9/OADC/Hyg 液体培养基中摇菌, 至  $OD_{600}$  达到 1.0 时, 按照  $1:10^{-1} - 10^{-6}$  稀释, 涂布 7H10/OADC/Hyg/2% Sucrose 平板, 用锡箔纸密封后于 39℃ 培养。3–4 周后, 利用荧光(鉴定方法见 1.8)和 Southern 杂交验证, 此时在基因组水平上发生双交换 (Double cross over, DCO)。在双交换菌株中, *ansA* 被 *hyg-gfp* 替代。其中, *hyg* 为潮霉素抗性基因, *gfp* 为绿色荧光蛋白基因。我们这样构建突变株的目的是为了得到 *ansA* 基因缺失株的同时, 也得到能够表达绿色荧光蛋白的标记株, 优点是可以在后续的细胞实验中, 追踪细菌在巨噬细胞中的定位。采用这种策略构建基因缺失株的前提是 *ansA* 及其上下游的基因不能属于同一个操纵子。这一点, 我们已经通过网络服务器对 *ansA* 及其上下游基因进行了操纵子预测 ([http://www.microbesonline.org/about\\_operon](http://www.microbesonline.org/about_operon)).



html), 证实了 *ansA* 及其上下游基因不属于操纵子, 因此本实验采用的构建策略不存在潜在的极性效应。

#### 1.4 卡介苗分枝杆菌感受态细胞的制备

卡介苗分枝杆菌感受态的制备方法采用本实验室报道的方法进行<sup>[8]</sup>。即: 将分枝杆菌在 100 mL 7H9/OADC 液体培养基中培养至  $OD_{600}$  为 0.5, 离心收获菌体, 用 10% 预冷的甘油将菌体洗涤 3 次, 最后用 1 mL 10% 甘油悬浮菌体(感受态细胞)。电穿孔转换参数为: 1000  $\Omega$ , 2.5 kV, 25  $\mu$ F。电击杯宽度为 4 mm。

#### 1.5 天冬酰胺酶的表达和纯化

天冬酰胺酶在大肠杆菌中的表达和纯化参照本实验室报道的方法进行<sup>[7]</sup>。即: 将 pHL002 转化入大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞中, 用 0.1 mmol/L IPTG 诱导过夜(16℃)。采用超声波方法破碎细胞, 利用  $Co^{2+}$  树脂(BD 公司)纯化 AnsA<sub>His</sub>。

#### 1.6 天冬酰胺酶活性分析

在 100  $\mu$ L PBS (pH7.2) 缓冲液中, 加入 2.5 mmol/L 天冬酰胺为底物和 3  $\mu$ g 纯化的天冬酰胺酶。如果天冬酰胺酶具有活性, 将分解天冬酰胺产生氨。产生的氨在溶液中以  $NH_4^+$  离子形式存在, 利用德国拜发公司的氨检测试剂盒检测溶液中氨的浓度, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。该方法的原理是氨可以和试剂盒提供的 2-氧戊二酸盐(2-oxoglutarate) 反应生成谷氨酸盐, 同时将 NADH 氧化成 NAD, 其中 NADH 对 340 nm 的吸收度与氨的浓度成线性关系, 因此可以定量检测反应液或者培养基中氨的浓度。

#### 1.7 Southern 杂交

利用 Southern 杂交鉴定基因缺失株采用文献报道的方法进行<sup>[9]</sup>。其中探针为 *ansA* 上游同源臂, 标记采用地高辛方法(Roche 公司), 探针标记和检测参照试剂盒提供的说明书进行。卡介苗分枝杆菌基因组利用 *Nru* I 酶切后采用真空转印法到杂交膜上, 显色采用 NBT/BCIP。

#### 1.8 报告基因检测

*ansA* 基因敲除载体 pHL084 含有两个报告基因, 分别为 *xylE* 和 *gfp*。其中 *xylE* 为儿茶酚双加氧酶基因, 表达产物可以将无色的邻苯二酚(Catechol)氧化成黄褐色的醌类物质, 菌落在平板上表现为黄褐色。*gfp* 为绿色荧光蛋白编码基因, 菌

落在平板上表现为绿色荧光。*ansA* 基因单交换株在邻苯二酚存在的条件下表现为肉眼可见的黄褐色, 荧光显微镜下为绿色荧光。双交换株在邻苯二酚存在的条件下不发生任何颜色变化, 但为绿色荧光。通过菌落在平板上的颜色转换可以快速区分单交换和双交换, 加速基因缺失株的筛选过程。筛选用的邻苯二酚浓度为 100 mmol/L, 用 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液(pH 7.2)配制, 于 4℃ 避光保存, 使用时直接滴在菌落或者喷洒在菌落上面。GFP 荧光菌落利用 Olympus 荧光体视显微镜(SZX-46)进行观察和照片拍摄。

#### 1.9 卡介苗在酸性培养基中的氮源利用实验

利用 HdB<sup>[10]</sup> 培养基为基础培养基, 碳源为甘油, 氮源为 15 mmol/L 天冬酰胺, pH 为 5.5。卡介苗种子液先在 7H9/OADC/Tween 80 培养基中培养至  $OD_{600}$  约为 2-3。然后离心收集菌体, 并用灭菌水(含 0.1% Tween 80)洗涤 3 次, 去除原始培养基中的营养成分, 转接于 250 mL 上述 HdB 培养基中, 起始  $OD_{600}$  为 0.01, 连续培养 4 周, 每天取 1 mL 检测  $OD_{600}$ 、pH 和氨的浓度。其中 pH 和氨的浓度检测需要将菌液用 0.2  $\mu$ m 滤器过滤后取无菌滤液进行。pH 检测采用酸度计(VWR), 氨的浓度检测采用酶动力学方法(见 1.6)。

## 2 结果

#### 2.1 天冬酰胺酶在大肠杆菌中的表达、纯化和活性分析

为了检测天冬酰胺酶的活性, 首先我们构建了分枝杆菌天冬酰胺酶原核表达载体为 pHL002(图 1-A), 并在大肠杆菌中对卡介苗分枝杆菌天冬酰胺酶进行了表达, 并用  $Co^{2+}$  树脂对表达产物进行了纯化。结果表明: 分枝杆菌天冬酰胺酶在大肠杆菌中以可溶性形式进行表达, 不形成包涵体(图 1-B)。从超声波裂解物的上清液中纯化的 rAnsA<sub>His</sub> 在 SDS-PAGE 胶上为单一条带, 大小与预期完全一致, 且能把天冬酰胺分解产生氨(图 1-C), 这说明纯化的天冬酰胺酶具有生物学活性。此外, 由于在本实验进行期间, 缺乏天冬酰胺酶抗体进行 Western 验证, 我们直接将图 1C 中纯化的 34 kDa 的蛋白条带从胶上切割下来, 胰酶处理后, 送往中科院上海生化细胞所蛋白质组研究分析中心进行质谱分析, 结果表明纯



化的 rAnsA<sub>His</sub> 可以被胰酶切割成 11 个肽段, 肽段序列可以完全映射到 AnsA 的参考蛋白序列上 (图 1-

D), 说明大肠杆菌表达的重组天冬酰胺酶完全正确。

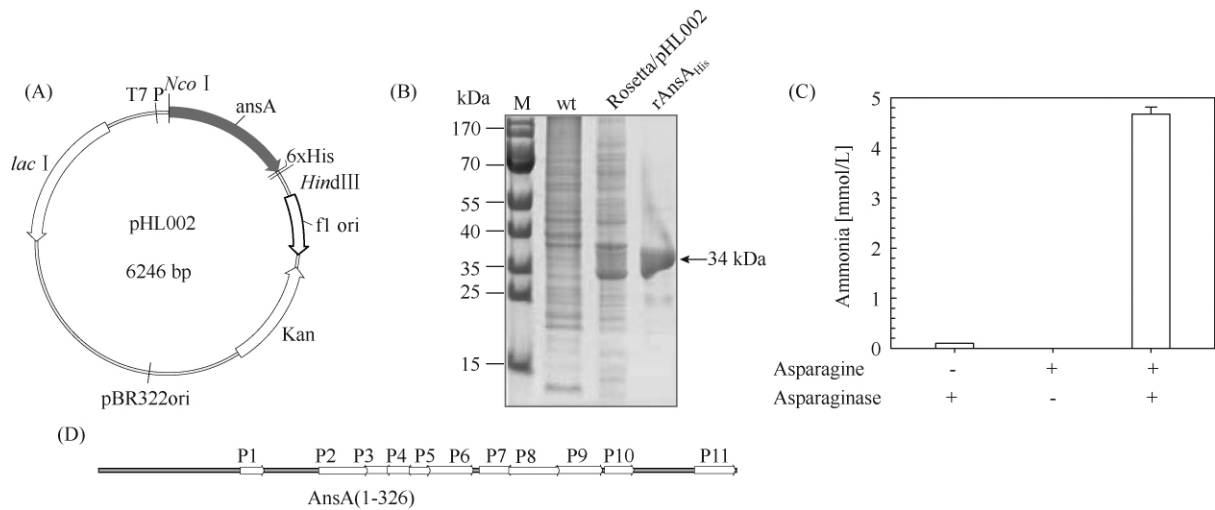


图 1 天冬酰胺酶在大肠杆菌中的表达、纯化和活性分析

Fig. 1 Expression, purification and enzymatic characterization of AnsA.

A: The *ansA* gene from *M. bovis* BCG was cloned into pET28 (b) vector under T7 promoter via *Nco* I / *Hind* III.

B: SDS-PAGE separation of the purified rAnsA<sub>His</sub>.

C: Enzymatic activity of the purified AnsA (Asparaginase) in the presence of asparagine. Ammonia concentration in these samples was determined using an enzymatic method based on the synthesis of glutamate from 2-oxoglutarate and ammonia by glutamate dehydrogenase.

D: Trypsin treated rAnsA<sub>His</sub> (from Fig. 1B) was analyzed by LCQ/LTQ mass spectrometer. Peptide fragments (P1-P11) were mapped to AnsA reference protein by Build Summary software.

## 2.2 卡介苗分枝杆菌 *ansA* 基因缺失株的筛选

*ansA* 基因缺失株的构建采用温敏质粒 pHL084 (图 2-A) 转化卡介苗分枝杆菌后逐步筛选得到。基于 pHL084 质粒的特性, 突变株的筛选采用颜色 (荧光) 和 Southern 杂交两种方法平行进行。首先根据菌落在平板上的颜色反应, 单交换和双交换菌落在

显微镜下都呈现绿色荧光, 而野生型菌落不呈现荧光。其中单交换菌落在喷洒无色的邻苯二酚之后, 将在 5min 之内变为黄褐色 (图 2-B, SCO/XylE), 而野生型和双交换菌株不发生颜色变化, 由此可以在平板上几百个克隆中快速锁定阳性克隆。单交换和双交换突变株的进一步确认采用 Southern 杂交方

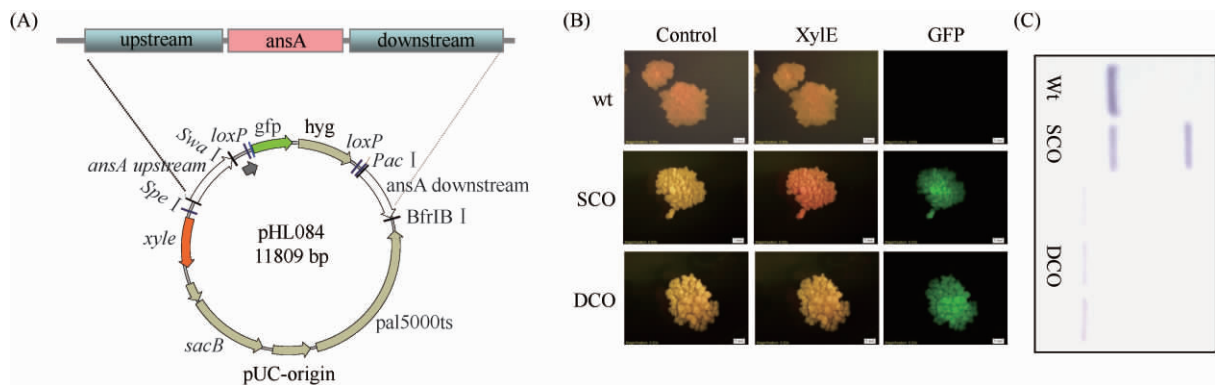


图 2 卡介苗分枝杆菌突变株菌落的荧光鉴定

Fig. 2 Plasmid construction and *M. bovis* BCG (*DansA*) mutants verification.

The homo-arms of upstream and downstream regions of *ansA*, reporter marker *xylE* and counter selection marker *sacB* were illustrated in the plasmid pHL084 (A). *M. bovis* BCG wt, single cross over (SCO) and double cross over (DCO) were screened according to expression of XylE and GFP (B). The SCO and DCO mutants were further verified by Southern-blot (C).



法。在尼龙膜上,野生型和双交换都仅出现一条带,而单交换有两条带,其中单交换的一条带与野生型大小一致(图 2-C),双交换条带比野生型小。Southern 杂交结果表明(图 2-C): *ansA* 缺失株构建正确。

### 2.3 卡介苗分枝杆菌在酸性培养基中对天冬酰胺的利用

结核分枝杆菌可以在宿主巨噬细胞内的酸性环境中长期存活。在这种特定的微环境中,分枝杆菌需要从宿主细胞中获取其赖以生存的营养物质。我们在前期工作中发现结核分枝杆菌在酸性培养基中仅能利用天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺四种氨基酸,同时产生碱性物质伴随培养液 pH 升高<sup>[7]</sup>,其中氨的产生与天冬酰胺有关。我们猜测,氨可能来自于天冬酰胺酶对天冬酰胺的降解作用。为此,我们对卡介苗天冬酰胺酶缺失株、突变株和互补株在 HdB (pH 5.5) 培养基中的生长、pH 和氨的动态变化进行了分析。结果表明:当天冬酰胺酶基因被敲除后,卡介苗在分枝杆菌中的生长大大减弱,与野生型相比在液体培养基中滞后了大约 10 天(图 3-A, Mut.),而且突变株的生长伴随着 pH 的升高(图 3-B)和氨的产生(图 3-C),但与野生型相比

明显滞后了 10 天左右。这说明分枝杆菌在酸性环境中的生长需要中和环境中的  $H^+$ ,而中和  $H^+$  需要产生碱性物质;如果不能中和  $H^+$ ,分枝杆菌将失去在酸性环境中的生长能力,这一点与我们的前期结果完全一致<sup>[7]</sup>。在本实验中,HdB 培养基的唯一氮源为天冬酰胺,因此可以确定氨来自于天冬酰胺酶对天冬酰胺的分解。但是分解的氨,是否能够完全中和溶液中的  $H^+$  并引起溶液 pH 升高呢? 为此,我们直接对 HdB (pH 5.5) 进行了酸碱滴定实验。我们发现,将 HdB 液体培养基从 pH 5.5 滴定到 pH 7.5 时,大约需要 16 mmol/L 的氨水(图 3-D)。在本实验中, HdB 培养基中天冬酰胺的浓度为 15 mmol/L,在分枝杆菌存在的条件下,最高可以检测到大约 20 - 25 mmol/L 的氨(接近理论值 30 mmol/L),并且当氨的产生达到峰值时,pH 的升高也达到峰值。随后氨的浓度逐渐下降,pH 也逐渐下降。这说明在培养后期,分泌到细胞外的氨又重新被分枝杆菌当做氮源利用,这一点也与本实验室的前期研究结果一致<sup>[7]</sup>。有趣的是,天冬酰胺酶被敲除后,卡介苗分枝杆菌的生长并没有彻底停止,这说明分枝杆菌还有其它产生氨或者碱性物质的备用途径(见讨论部分)。

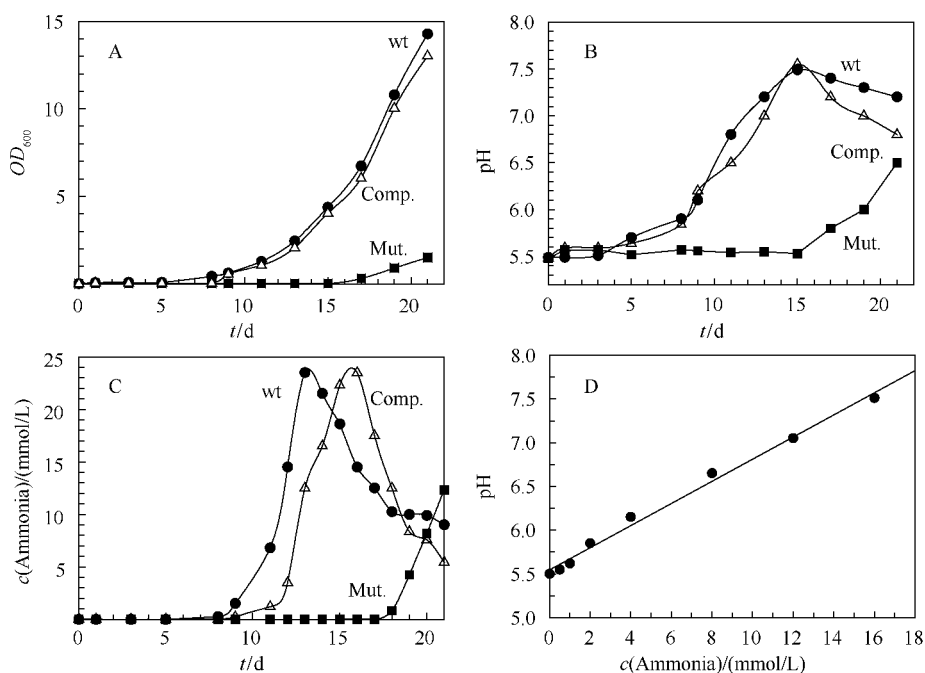


图 3 卡介苗分枝杆菌天冬酰胺酶突变株菌落的抗酸生长

Fig. 3 Growth capability of *ansA* knocked out *M. bovis* BCG in acidic medium. OD<sub>600</sub> (A), pH (B) and ammonia (C) were measured as described in text. Titration of HdB (pH 5.5) medium was carried out by addition of ammonia and pH was quantified (D). wt: wild type *M. bovis* BCG; Mut.: *M. bovis* BCG ( $\Delta ansA$ ); Comp.: Complemented strain of the *M. bovis* BCG ( $\Delta ansA$ ).



## 2.4 分枝杆菌抗酸生长代谢示意图

本研究中我们证实了卡介苗分枝杆菌通过天冬酰胺酶分解天冬酰胺产生氨进行抗酸生长,在前期研究中我们发现结核分枝杆菌产生的天冬酰胺通过外膜蛋白 OmpATb 释放到培养液中<sup>[7]</sup>。除了天冬酰胺酶代谢通路之外,分枝杆菌还存在其它产氨机制。同样,除了 OmpATb 之外,分枝杆菌可能还需要借助其它分泌蛋白将氨分泌到细胞外,为了进一步从全局代谢水平了解结核分枝杆菌的抗酸机制,结

合目前已有知识,我们绘制了结核分子杆菌中氨的产生机制示意图(图 4-A,相关蛋白命名参照结核分枝杆菌 H37Rv 实验室菌株)。由于卡介苗分枝杆菌和结核分枝杆菌基因组同源性 99.9% 以上,因此该示意图对两个菌都适用,二者在酸性培养基中仅能利用天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)或谷氨酰胺(Gln)(图 4-B)。图 4-B 为卡介苗分枝杆菌在 HdB (pH 5.5) 中的生长曲线;关于结核分枝杆菌在 HdB (pH 5.5) 中的生长曲线见文献<sup>[7]</sup>。

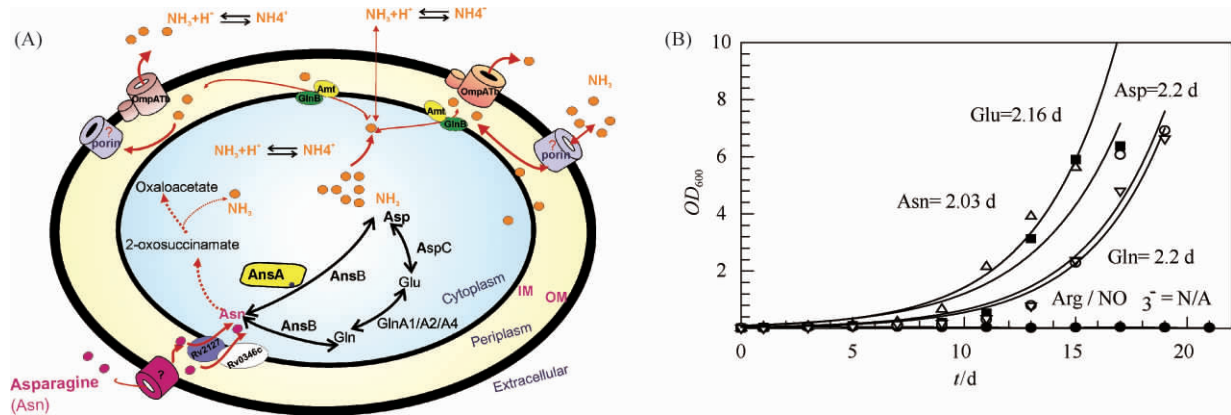


图 4 分枝杆菌氨产生机制和抗酸示意图

Fig. 4 Demonstration of ammonia generation and growth of mycobacteria in acidic medium. A: The concept model of ammonia generation and secretion by mycobacteria. IM: Inner membrane; OM: outer membrane; Asn (Asparagine); AnsA (Asparaginase), AnsB (Asparagine synthetase); Asp (Aspartate); AspC (Aspartate aminotransferase); Glu (Glutamic acid); Glutamine (Gln); GlnA1/A2/A4 (Glutamine synthetase A1/A2/A4); Amt (Ammonia transporter); GlnB (PII protein). B: Growth of *M. bovis* BCG in HdB (pH 5.5) medium supplemented with Asn, Glu, Asp, Gln, Arg, or Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) as the sole nitrogen source. Curves from other 15 natural amino acids were excluded due to invisible growth. Doubling time (d) for each nitrogen source is indicated as shown.

## 3 讨论

在静止期的巨噬细胞中,结核分枝杆菌可以阻碍吞噬小体和溶酶体的融合。但是,在  $\gamma$ -IFN 等细胞因子的刺激下,吞噬小体可以加速和溶酶体融合,并释放各种因子试图“清除”入侵的结核分枝杆菌,包括:超氧离子、泛素肽、金属离子<sup>[11-12]</sup>、水解酶、质子流等<sup>[6]</sup>。但是结核分枝杆菌也在进化中形成了“反清除”机制。其中,酸适应几乎是所有通过呼吸道和消化道感染的致病菌采取的“反清除”策略之一。

在酸性条件下,结核分枝杆菌内一些与破坏宿主溶酶体相关的基因表达会上调,包括: aprA/B/C 系统 (Acid and phagosome regulated A/B/C)<sup>[13]</sup> 以及

可以引起溶酶体膜裂解的 ESAT-6 (Early secreted antigen-6)<sup>[14]</sup>、Mg<sup>2+</sup> 转运蛋白<sup>[6]</sup> (MgtC) 和膜蛋白 Rv3671c 等<sup>[15]</sup>,同时分枝杆菌还产生碱性物质中和微环境中的酸性。在中性培养基中,结核分枝杆菌和卡介苗分枝杆菌可以利用除了天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺和谷氨酸之外的多种氨基酸(如:精氨酸、丝氨酸)和硝酸盐;但是在酸性培养基中只能利用天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺和谷氨酸,并伴随溶液 pH 的升高。这是因为分枝杆菌在精氨酸、丝氨酸和硝酸盐代谢中不能产生碱性物质,因此无法中和酸性环境(图 4-B)。有趣的是我们仅在以天冬酰胺为唯一氮源的培养基中检测到了氨的存在。对于以天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)或谷氨酰胺(Gln)为唯一氮源的培养基,虽然我们发现当分枝杆菌生长后,培养液 pH 也升高,但是我们检测不到



氨。这说明当以天冬氨酸、谷氨酸或谷氨酰胺为唯一氮源时,分枝杆菌产生了另外一种不同于氨的碱性物质? 我们曾经利用质谱和核磁共振对培养液进行了分析,但都找不到在以天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)或谷氨酰胺(Gln)为唯一氮源条件下,足以引起 pH 升高的碱性物质(结果未列出)。那么,是不是在以天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)或谷氨酰胺(Gln)为唯一氮源时,虽然不产生碱性物质,但是分枝杆菌过多的消耗了细胞外的  $H^+$  而导致了 pH 升高呢? 或者说胞外的  $H^+$  通过质子泵运送到胞内后,和胞内产生的  $NH_3$  结合生成  $NH_4^+$  (图 4A),胞内的  $NH_4^+$  来不及输送到细胞外,就被细胞利用产生其他氨基酸呢? 关于这一解释,目前尚缺乏直接的实验证据。

其实,结核分枝杆菌利用天冬酰胺作为氮源产生氨,早在 50 年前就有报道<sup>[16-17]</sup>,但是当时基于分子生物学发展的局限和基因组信息的缺乏,研究人员只是发现了这种产氨现象,但对于天冬酰胺的代谢机理和氨的作用机制并没有进行深入研究。直到 1980 年, Gordon 等<sup>[18]</sup> 人在《Nature》杂志上发文表明,氨在结核分枝杆菌感染的巨噬细胞内可以阻止溶酶体和吞噬小体的融合,并指出分枝杆菌中的氨可能来自于氨基类物质的代谢。后来越来越多的证据表明:结核分枝杆菌产生的氨是其抗酸生长和影响破坏巨噬细胞溶酶体和吞噬小体融合的关键因素<sup>[19]</sup>,而且分枝杆菌中氨转运受到多基因调控<sup>[20]</sup>。近期,我们在研究中也发现结核分枝杆菌产生的氨可能通过 OmpATb (Rv0899) 分泌到细胞外<sup>[7]</sup>,这一发现很快被国外同行认可,并拓展成 Rv0899 的结构在固氮细菌中普遍存在<sup>[21]</sup>,并与氨的分泌有关。

通过比较基因组学发现,天冬酰胺酶广泛存在于多种细菌中(比如:大肠杆菌)。为何结核分枝杆菌利用天冬酰胺酶分解天冬酰胺,产生的氨能够分泌到细胞外,且能引起液体培养基中 pH 升高,而大肠杆菌等却没有发现这种现象? 可能的原因有:(1) 结核分枝杆菌为慢性生长菌(复制一代需要约 18-24 h),体内物质合成速度较慢,但是天冬酰胺酶活性很高(图 1-C),并能在短时间内产生大量的氨,为了避免氨的累积对细胞的损伤,因此多余的氨

将被释放到细胞外。而大肠杆菌等快速生长菌(复制一代需要 30-40 min 或 1-2 h),体内代谢活动旺盛,产生的氨很快参与到细胞内氨基酸的合成代谢活动中,体内不存在氨的累积现象,因此分泌到细胞外的氨数量几乎为零。(2) 在酸性环境中,不同的细菌抗酸机制是不一样的。比如:沙门氏菌通过质子泵  $F_1F_0$ ATPase 维持细胞内的酸碱平衡<sup>[22]</sup>;幽门螺杆菌通过尿素酶分解尿素产生的氨来中和消化道内的酸性环境<sup>[23]</sup>;血链球菌(*Streptococcus sanguis*) 通过分解精氨酸产生氨<sup>[24]</sup>。而在本文中,分枝杆菌可以利用天冬酰胺产生氨。因此,氨的产生是细菌抗酸生长的特性之一。

根据结核分枝杆菌特有的、而在其他革兰氏阳性菌中不具备的细胞双层膜结构<sup>[25]</sup>,我们绘制了天冬酰胺介导的氨产生示意图(图 4-A)。该示意图的依据如下:(1) 一般来说,革兰氏阳性菌只有一层膜,不存在外膜和内膜之分。但是,结核分枝杆菌是革兰氏阳性菌中的特例,具有类似于革兰氏阴性菌的内膜和外膜<sup>[25]</sup>,因此该示意图为双层膜结构;(2) 氨为小分子物质,可以穿过细胞的磷脂双层膜<sup>[26]</sup>,因此氨在胞内和胞外均出现;(3) 氨转运蛋白 Amt 为内膜蛋白,在三界(Kingdom)生物中都存在<sup>[27]</sup>,因此在内膜位置体现了 Amt/GlnB 复合体;(4) 我们在前期研究中发现,外膜蛋白 OmpATb 也参与了氨的转运<sup>[7]</sup>;因此在外膜位置体现了 OmpATb;(5) 天冬酰胺的转运蛋白 Rv2127 和 Rv0346c 源自基因组注释,可能为内膜蛋白,因此天冬酰胺的转运体现了这两种蛋白。至于是否还需要其它外膜蛋白协助尚不清楚,因此用“?”表示;(6) 天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)在分枝杆菌细胞内存在互换循环依据来自于 BioCyc 数据库对结核分枝杆菌代谢途径的注释(<http://www.biocyc.com/MTBRV/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=ASPASN-PWY>)。

在该示意图中,天冬酰胺(Asn)通过膜蛋白被转运到细胞内,在天冬酰胺酶(AnsA)的作用下产生氨( $NH_3$ )和天冬氨酸(Asp)。但是将天冬酰胺酶基因敲除后,将卡介苗分枝杆菌培养 18 天后仍然能检测到氨的存在,这说明天冬酰胺还有产生氨的备用途径,或许通过草酰琥珀酸盐(2-oxosuccinamate)途



径(图4-A)。结核分枝杆菌在酸性条件下可以利用的四种氨基酸:天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)或谷氨酰胺(Gln)在分枝杆菌细胞内存在互换循环。在以天冬酰胺为唯一氮源时,多余的氨通过氨转运内膜蛋白 Amt/GlnB 复合体<sup>[28-29]</sup>和外膜蛋白 OmpATb<sup>[7]</sup>等输送到分枝杆菌细胞外。至于结核分枝杆菌中是否存在类似于耻垢分枝杆菌中的穿孔外膜蛋白(porin),该蛋白在不需要任何能量的条件下可以转运氨基酸、糖、无机盐等各种亲水物质<sup>[30]</sup>,目前尚不清楚。

本研究通过天冬酰胺酶首次揭示了分枝杆菌的产氨机理,产生的氨可以将周围的酸性环境中和,这为今后进一步通过感染细胞生物学实验研究分枝杆菌在巨噬细胞内的抗酸和在溶酶体、吞噬小体内的定位和迁移机制奠定了基础。

## 参考文献

- [1] WHO report 2011 global tuberculosis control. 2011: 1-246.
- [2] Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *Journal of Immunology*, 1998, 160 (3): 1290-1296.
- [3] Sidebotham RL, Baron JH. Hypothesis: *Helicobacter pylori*, urease, mucus, and gastric ulcer. *Lancet*, 1990, 335 (8683): 193-195.
- [4] Osawa R, Okitsu T, Morozumi H, Yamai S. Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2): 725-727.
- [5] Chen J, Cheng C, Xia Y, Zhao H, Fang C, Shan Y, Wu B, Fang W. Lmo0036, an ornithine and putrescine carbamoyltransferase in *Listeria monocytogenes*, participates in arginine deiminase and agmatine deiminase pathways and mediates acid tolerance. *Microbiology*, 2011, 157 (Pt 11): 3150-3161.
- [6] Vandal OH, Nathan CF, Ehrt S. Acid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191 (15): 4714-4721.
- [7] Song H, Huff J, Janik K, Walter K, Keller C, Ehlers S, Bossmann SH, Niederweis M. Expression of the ompATb operon accelerates ammonia secretion and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to acidic environments. *Molecular Microbiology*, 2011, 80 (4): 900-918.
- [8] Song H, Wolschendorf F, Niederweis M. Construction of unmarked deletion mutants in mycobacteria. In T. Parish, and A. Brown (Eds): *Mycobacteria protocols*. Humana Press, Ottawa, 2008, 279-295.
- [9] Stephan J, Stemmer V, Niederweis M. Consecutive gene deletions in *Mycobacterium smegmatis* using the yeast FLP recombinase. *Gene*, 2004, 343: 181-190.
- [10] Smeulders MJ, Keer J, Speight RA, Williams HD. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (1): 270-283.
- [11] Wolschendorf F, Ackart D, Shrestha TB, Hascall-Dove L, Nolan S, Lamichhane G, Wang Y, Bossmann SH, Basaraba RJ, Niederweis M. Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108 (4): 1621-1626.
- [12] Botella H, Peyron P, Levillain F, Poincloux R, Poquet Y, Brandli I, Wang C, Tailleux L, Tilleul S, Charriere GM, Waddell SJ, Foti M, Lugo-Villarino G, Gao Q, Maridonneau-Parini I, Butcher PD, Castagnoli PR, Gicquel B, de Chastellier C, Neyrolles O. Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe*, 2011, 10 (3): 248-259.
- [13] Abramovitch RB, Rohde KH, Hsu FF, Russell DG. aprABC: a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. *Molecular Microbiology*, 2011, 80 (3): 678-694.
- [14] Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G, Frenkiel TA, Gordon SV, Hewinson RG, Burke B, Norman J, Williamson RA, Carr MD. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *The EMBO Journal*, 2005, 24 (14): 2491-2498.
- [15] Vandal OH, Pierini LM, Schnappinger D, Nathan CF,



- Ehrt S. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine*, 2008, 14 (8) : 849-854.
- [16] Long ER (1958) : Utilization of nitrogen for growth. In E. R. Long (Ed.) : *The chemistry and chemotherapy of tuberculosis*. The Williams & Wilkins Company, London, pp. 80-85.
- [17] Lyon RH, Hall WH, Costas-Martinez C. Effect of L-asparagine on growth of *Mycobacterium tuberculosis* and on utilization of other amino acids. *Journal of Bacteriology*, 1974, 117 (1) : 151-156.
- [18] Gordon AH, Hart PD, Young MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature*, 1980, 286 (5768) : 79-80.
- [19] Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies WA, de Jong G, Reiner NE. Attenuation of HLA-DR expression by mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* is related to intracellular sequestration of immature class II heterodimers. *Journal of Immunology*, 1998, 161 (9) : 4882-4893.
- [20] Amon J, Brau T, Grimath A, Hanssler E, Hasselt K, Holler M, Jessberger N, Ott L, Szokol J, Titgemeyer F, Burkovski A. Nitrogen control in *Mycobacterium smegmatis*: nitrogen-dependent expression of ammonium transport and assimilation proteins depends on the OmpR-type regulator GlnR. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (21) : 7108-7116.
- [21] Marassi FM. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0899 defines a family of membrane proteins widespread in nitrogen-fixing bacteria. *Proteins*, 2011, 79 (10) : 2946-2955.
- [22] Foster JW. Salmonella acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173 (21) : 6896-6902.
- [23] Sachs G, Scott D, Weeks D, Melchers KN. The importance of the surface urease of *Helicobacter pylori*: fact or fiction? *Trends in Microbiology*, 2001, 9 (11) : 532-534.
- [24] Quivey RG, Kuhnert WL, Hahn K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2001, 12 (4) : 301-314.
- [25] Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105 (10) : 3963-3967.
- [26] Antonenko YN, Pohl P, Denisov GA. Permeation of ammonia across bilayer lipid membranes studied by ammonium ion selective microelectrodes. *Biophysical Journal*, 1997, 72 (5) : 2187-2195.
- [27] Zheng L, Kostrewa D, Berneche S, Winkler FK, Li XD. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101 (49) : 17090-17095.
- [28] Amon J, Titgemeyer F, Burkovski A. A genomic view on nitrogen metabolism and nitrogen control in mycobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 17 (1) : 20-29.
- [29] Gruswitz F, O'Connell J, 3rd, Stroud RM. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104 (1) : 42-47.
- [30] Song H, Niederweis M. Uptake of sulfate but not phosphate by *Mycobacterium tuberculosis* is slower than that for *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (5) : 956-964.



# Asparaginase mediated acid adaptation of mycobacteria

Xiaolang Cai<sup>1#</sup>, Beibei Wu<sup>2#</sup>, Yang Fang<sup>1</sup>, Houhui Song<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Zhejiang Agriculture & Forestry University, Lin'an 311300, China

<sup>2</sup>Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

**Abstract:** [Objective] *Mycobacterium tuberculosis* can survive inside host cells for a long time. To elucidate the acid adaptation mechanism mediated by the asparagine (Asn) metabolic pathway, the activity of asparaginase (AnsA) and growth of mycobacteria were characterized. [Methods] The nonpathogenic *M. bovis* BCG was used as a model strain to characterize AnsA function. The recombinant AnsA was further expressed in *E. coli*, purified by Co<sup>2+</sup> charged resin, and analyzed by enzymatic method. *M. bovis* BCG mutant (*DansA*) was constructed by homologous recombination. The growth and ammonia generation by *M. bovis* BCG wild type and mutant were evaluated in acidic medium. [Results] Ammonia was detected in the presence of AnsA and Asn. Deletion of *ansA* significantly delayed the growth of *M. bovis* BCG for 10 days in acidic medium. Asn was used by *M. bovis* BCG to produce ammonia, increasing pH. [Conclusion] The acid adaptation of *M. bovis* BCG was mediated by ammonia, the metabolic product of asparagine. This provides new clue to uncover the survival mechanism of *M. tuberculosis* inside the acidic niche environment of host macrophage.

**Keywords:** *M. bovis* BCG, asparagine, asparaginase, acid adaptation

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA101602), by the National Natural Science Foundation of China (30800014) and by the Zhejiang Agriculture & Forestry University Talent Starting Program (2034020075)

\* Corresponding author. Tel: +86-571-63741392; E-mail: songhh@zafu.edu.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 5 June 2012/Revised: 5 July 2012

## 科学出版社新书推介(2012年9、10月)

### 中国微生物基因组研究



作者:喻子牛,邵宗泽,孙明; ISBN:9787030357236; 定价:190; 开本:16; 装帧:平装; 页码:692; 初版时间:2012-10-1

**内容简介:**《中国微生物基因组研究》由我国从事微生物基因组研究的专家们结合自己的研究领域撰写的综述论文组成,反映了我国微生物基因组研究的过去、现在,并指出了未来尚需研究的方向。共分为真细菌基因组(包括人畜病原真细菌,农用真细菌,环境真细菌,冶金、食品真细菌基因组)、古生菌基因组、真核微生物基因组、病毒基因组、微生物基因组研究方法五个部分。

订购方式 1:网上购书

淘宝商城科学出版社旗舰店:<http://kxcbs.tmall.com/>

卓越亚马逊:<http://www.amazon.cn/>

当当网:<http://www.dangdang.com/>

京东图书:<http://book.360buy.com/>

订购方式 2:电话购书

联系人:科学出版社 贾海涛 13501022258 010-64017321

订购方式 3:邮件购书

生物分社:lifescience@mail.sciencep.com; 贾海涛:jiahaitao@mail.sciencep.com