

大肠杆菌抗铜蛋白高表达的条件

刘志培

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

Brown N L

(英国伯明翰大学生物系 伯明翰)

含有抗铜质粒 pRJ1004 的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 可以在含有 20mmol /L 的 LB 培养基中生长, 菌落呈深棕色, 其原因是由于一种“修饰铜”沉淀的结果^[1]。以同位素⁶⁴Cu 所做的试验表明, 抗性菌株比敏感菌株积累铜少, 其抗性机制是减少吸收^[2~3]。质粒 pRJ1004 含一个抗铜基因组: *pcoABCDRE*^[4], 其中 *pcoABCDE* 为结构基因, *pcoRS* 为调节基因。 *pcoABCD* 的基因产物和丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) 的 *copABCD*^[5~6] 基因产物很相似, 有很高的氨基酸序列同源性^[1]。而后者的菌落在含铜平板上则呈深蓝色, 且细胞中可积累比敏感菌株更多的铜, 可达细胞干重的 0.3%^[7]。 *copABCD* 基因产物在细胞中的分布及功能都已研究得比较清楚, 它们都是铜结合蛋白^[8~9]。大肠杆菌的抗铜机制显然与此不同, 因而其 *pcoABCD* 基因产物在细胞中的分布与功能也可能不同, 此外它还含有一个额外的抗铜基因 *pcoE*^[10]。为了研究这些抗铜蛋白的特性与功能, 有必要对它们进行提取纯化, 但在一般抗性细胞中其含量都比较低; 而如果将这些基因克隆到高表达载体, 则可以大大提高它们在细胞总蛋白量中的比例, 易于提取纯化。本文的目的在于确定各种抗铜蛋白高表达的条件, 选择其中的 PcoC 和 PcoE 进行试验。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

本研究中所有试验均使用大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株^[11] [*E. coli* BL21 (DE3)]。高表达质粒 pT7-Sc:*pcoC* 和 pUC18:*pcoEop* 由 Brown NL 构建。

1.2 培养基

本研究所用培养基为 LB、TB 和 M9^[12]。

1.3 细胞的诱导

对于 PcoC 的诱导用 IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷), 对于 PcoE 的诱导用 CuSO_4 。将新鲜培养物接种培养基, 摇床 (37℃) 培养到 OD_{600} 0.4 ~ 0.6 之间时, 加入一定量的诱导物, 再继续培养一定时间。

1.4 样品的处理、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

按文献[13]进行, 所用标准蛋白为 Bio-rad 公司产品。

2 结果和讨论

2.1 PcoC 高表达的最佳条件

2.1.1 不同浓度 IPTG 对 PcoC 高表达的影响: 为了获得比较理想的 IPTG 诱导效果, 进行了不同浓

度 IPTG 对细胞的诱导试验。结果(图 1)表明, IPTG 的浓度达 0.1 mmol/L 时 PcoC 就可以达到比较理想的表达, 此时其他杂蛋白的含量也相对较少, 再提高 IPTG 浓度则无更好的诱导效果。

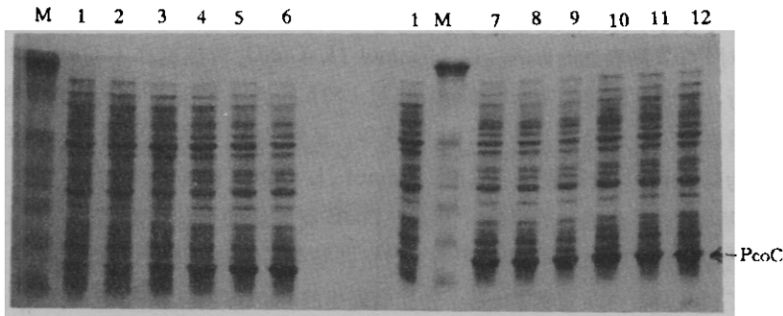


图 1 不同浓度 IPTG 对 PcoC 的诱导

IPTG 浓度(mmol/L): 1, 0; 2, 0.01; 3, 0.02; 4, 0.05; 5, 0.08; 6, 0.1;
7, 0.2; 8, 0.5; 9, 0.8; 10, 1.0; 11, 2.0; 12, 5.0; M, 标准蛋白。

2.1.2 不同诱导时间对 PcoC 高表达的影响: 为了找到 IPTG 对细胞表达 PcoC 的最佳诱导时间, 以 0.1 mmol/L 的 IPTG 对细胞作不同时间的诱导。结果表明, 在诱导的最初阶段, 随着时间的延长, PcoC 的表达越来越高, 到 $75 \sim 90 \text{ min}$ 时达到最大表达, 进一步延长诱导时间, 则 PcoC 的表达反而减少, 由此可见用 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 PcoC 的高表达, 以 $1.25 \sim 1.50 \text{ h}$ 为宜。

2.1.3 不同培养基对 PcoC 高表达的影响: 以 LB、TB 和 M9 三种培养基, 用 0.1 mmol/L 的 IPTG 对 PcoC 高表达进行了 1.5 h 的诱导试验。结果表明, TB 培养基虽然可以形成最多的 PcoC, 但同时也形成了很多杂蛋白, 不利于 PcoC 的提取纯化; 用 LB 培养基也可以诱导形成较多的 PcoC 但杂蛋白较少; 而用 M9 培养基, 则不利于 PcoC 的高表达。

2.2 PcoE 的高表达条件

2.2.1 诱导物—— CuSO_4 浓度对 PcoE 高表达的影响: 以不同浓度的 CuSO_4 对细胞进行诱导处理,

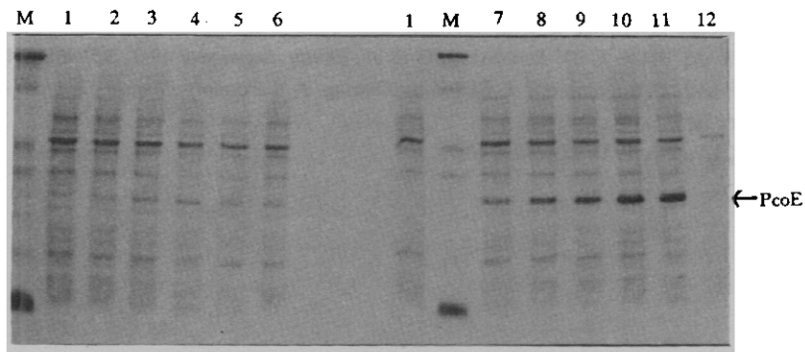


图 2 CuSO_4 浓度对 PcoE 高表达的影响

CuSO_4 浓度(mmol/L): 1, 0; 2, 0.01; 3, 0.02; 4, 0.05; 5, 0.08; 6, 0.1;
7, 0.2; 8, 0.5; 9, 0.8; 10, 1.0; 11, 2.0; 12, 5.0; M, 标准蛋白。

图2的结果表明,在低 CuSO_4 浓度时,几乎没有 PcoE 的表达,随着浓度的提高,表达也随之增加,在 1 mmol/L 时已达到了很好的表达,但同时还有较高的杂蛋白,而在 2.0 mmol/L 时则杂蛋白的含量较少;进一步提高浓度则 PcoE 的表达反而减少,在 5.0 mmol/L 时由于 CuSO_4 的毒性引起细胞死亡,高表达急剧下降。因而可以认为以 CuSO_4 诱导 PcoE 的高表达,以 2.0 mmol/L 为宜。

2.2.2 诱导时间对 PcoE 高表达的影响:以 2.0 mmol/L CuSO_4 对细胞作不同时间的诱导,结果表明,随着诱导进行,高表达的效果不断提高,在经过 1.50 h 的诱导之后, PcoE 的高表达已比较理想,同时杂蛋白的含量也较少;而经过 1.75 ~ 2.0 h 的诱导,虽然 PcoE 高表达更高,但杂蛋白的含量也随之提高。因此认为对于 PcoE 的高表达,以用 2.0 mmol/L CuSO_4 诱导处理 1.50 h 为宜。

2.2.3 不同培养基对 PcoE 高表达的影响:为确定 PcoE 高表达的最佳培养基,选用 LB、TB 和 M9 三种培养基进行诱导试验。结果表明, PcoE 在 M9 培养基中不能很好地表达,而在 TB 中虽有很好的高表达,但形成了很多杂蛋白;只有 LB 是一种比较理想的 PcoE 高表达培养基。

从以上的结果可以看出,对于 PcoC 的高表达,以 LB 为培养基、0.1 mmol/L IPTG 诱导 1.5 h 为理想;对于 PcoE 的高表达,以 LB 为培养基、2.0 mmol/L CuSO_4 诱导 1.50 h 为理想。

参 考 文 献

- [1] Brown N L, Lee B T O, Silver S. Bacterial Transport of and Resistance to Copper. In: Siegel H ed. Metal Ions in Biological System. vol 30. New York: Marcel Dekker, 1993. 405 ~ 435.
- [2] Rouch D A, Camakaris J, Lee B T O et al. *J Gen Microbiol*, 1985, 131: 939 ~ 943.
- [3] Rouch D A, Lee B T O, Camakaris J. Genetic and Molecular Basis of Copper Resistance in *Escherichia coli*. In: Winge D R and Hamer DH ed. Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry. New York: Alan R Liss, 1989. 439 ~ 446.
- [4] Silver S, Lee B T O, Brown N L et al. Bacterial Plasmid Resistance to Metal Ions. In: Wehch A J and Chapman S K ed. Chemistry of Copper and Zinc Triads. London: The Royal Society of Chemistry, 1993. 38 ~ 53.
- [5] Bender C L, Cooksey D A. *J Bacteriol*, 1987, 169: 470 ~ 474.
- [6] Mellano M A, Cooksey D A. *J. Bacteriol*, 1988, 170: 2879 ~ 2885.
- [7] Cooksey D A, Azad H R. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 274 ~ 279.
- [8] Cha J S, Cooksey D A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 8915 ~ 8919.
- [9] Cooksey D A. *Mole Microbiol*, 1993, 7: 1 ~ 8.
- [10] Brown N L, Rouch D A, Bee B T O. *Plasmid*, 1992, 27: 14 ~ 47.
- [11] Shuttleworth W A, Hough C D, Bertrand K D et al. *Protein Engineering* 1992, 5(5): 461 ~ 466.
- [12] Maniatis U, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- [13] Leamml U K. *Nature*, 1970, 227: 680 ~ 687.

CONDITIONS FOR THE OVEREXPRESSIONS OF COPPER – RESISTANT PROTEINS FROM *ESCHERICHIA COLI*

Liu Zhipei

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Brown N L

(*School of Biological Sciences, The University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, UK*)

Abstract There were five copper-resistant proteins encoded in the copper resistant plasmid pRJ1004 from *Escherichia coli*. The conditions for the overexpressions of two of the five, PcoC and PcoE, were reported in this paper. For the overexpression of PcoC using IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) as inducer, the best conditions were: medium, LB; IPTG concentration, 0.1 mmol /L; inducing time, one and half hours. For the overexpression of PcoE using CuSO₄ as inducer, the best conditions were: medium, LB; CuSO₄ concentration, 2.0 mmol /L; inducing time, one and half hours.

Key words *Escherichia coli*, Copper-resistant proteins, Overexpression