

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (12) :1551 – 1559; 4 December 2015  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150130

## 大肠杆菌 BL21 (DE3) 膜组分相关基因的敲除对重组蛋白胞外分泌的影响

朱芸<sup>1</sup>, 周有治<sup>1</sup>, 储建林<sup>1</sup>, 何冰芳<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816

<sup>2</sup>南京工业大学药学院, 江苏 南京 211816

**摘要:** 【目的】探究 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中膜组分相关的脂多糖合成基因 *waaF* 或 *msbB* 的敲除对重组蛋白胞外分泌的影响。【方法】运用 Red 重组技术将 *E. coli* BL21 (DE3) 染色体上的基因 *waaF* 或 *msbB* 敲除, 构建敲除菌株 *E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ )、*E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ )。将本实验室保存的带有  $\beta$ -呋喃果糖苷酶 ( $\beta$ -fructofuranosidase,  $\beta$ -FFase)、青霉素 G 酰化酶 (penicillin G acylase, PGA) 基因的重组质粒 pET-*ffase*、pET-*pga* 分别转入敲除菌株及出发菌株中, 构建工程菌株 *E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) / pET-*ffase*、*E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) / pET-*ffase*、*E. coli* BL21 (DE3) / pET-*ffase*、*E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) / pET-*pga*、*E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) / pET-*pga*、*E. coli* BL21 (DE3) / pET-*pga*。最后通过摇瓶发酵研究敲除菌株对  $\beta$ -FFase、PGA 胞外分泌的影响。【结果】当诱导表达 4 h, 以出发菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 为宿主时,  $\beta$ -呋喃果糖苷酶  $\beta$ -FFase 的胞外分泌量占总表达量的 2.6%, 以敲除菌株  $\Delta msbB$  为宿主时, 胞外分泌量达到 19.7%, 而以敲除菌株  $\Delta waaF$  为宿主时, 胞外分泌量达到 50.9%。另外, 当诱导表达 24 h, 以敲除菌株  $\Delta waaF$  为宿主时, 青霉素 G 酰化酶 PGA 的胞外酶活是出发菌株中的 4.1 倍, 达到 1708 U/L。【结论】本研究成功构建了敲除菌株  $\Delta msbB$  和  $\Delta waaF$ ,  $\Delta msbB$  能明显增强  $\beta$ -FFase 的胞外分泌, 而  $\Delta waaF$  对  $\beta$ -FFase 和 PGA 的胞外分泌均有显著的强化作用。

**关键词:** 大肠杆菌 BL21 (DE3), 膜脂, 基因敲除

中图分类号: Q786 文章编号: 0001-6209 (2015) 12-1551-09

大肠杆菌表达系统是目前基因工程中最常用的重组蛋白表达系统, 它不仅操作简单、成本低廉, 还可以快速大规模地生产目的蛋白。但其胞外分泌能力还是有限, 又因为大肠杆菌胞质内缺乏蛋白质折叠所需的酶和辅因子, 会导致中间体大量积聚, 容易形成包涵体。而重组蛋白若能分泌至周质甚至穿过

细胞外膜直接分泌至胞外培养基中, 可以极大简化下游复性及分离纯化工艺, 减少表达蛋白对宿主菌的毒性和代谢负担。

*Escherichia coli* BL21 (DE3) 是 pET 系统的常用表达宿主菌, pET 系统使用 T7 启动子, 是有史以来在大肠杆菌中克隆表达重组蛋白的功能最强大的系

基金项目: 国家自然科学基金 (21376119); 国家“973”项目 (2011CBA00807)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-58139902; E-mail: bingfanghe@njtech.edu.cn

作者简介: 朱芸 (1990-), 女, 江苏张家港人, 硕士研究生, 主要从事重组蛋白胞外分泌的研究。E-mail: zhuyun2012@hotmail.com

收稿日期: 2015-03-24; 修回日期: 2015-06-24

统。*E. coli* BL21 (DE3) 菌株已经做了一系列的遗传修饰改良。其中通过特异性外膜蛋白分解酶基因 *ompT* 的突变,提高了外源蛋白在表达体系中的稳定性;通过特异性识别 DNA 序列蛋白基因 *hdsS<sub>B</sub>* 的突变,保持了插入 DNA 的稳定性;另外,通过胞嘧啶甲基化酶基因 *dcm* 的突变,更易于获得非甲基化质粒<sup>[1-2]</sup>。然而大肠杆菌对重组蛋白的胞外分泌能力仍然很有限,根据我们所能检索的资料表明:之前的遗传修饰改良尚未涉及到通过敲除 *E. coli* BL21 (DE3) 中脂多糖合成的相关基因 *waaF* 或 *msbB* 来提高大肠杆菌细胞外膜通透性的策略。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性细菌细胞外膜外侧重要的结构和功能分子,一般由三部分组成,由内向外依次是疏水性的类脂 A、核心寡糖和由重复性糖单元构成的 O-抗原<sup>[3-4]</sup>。它的组成和结构与细胞完整性、外膜通透性、菌膜的形成及细菌抗干燥能力等细胞生化特性密切相关<sup>[5-7]</sup>。通过研究 LPS 的合成过程,可以人为地改造其结构,从而改造革兰氏阴性细菌的外膜通透性,同时希望能进一步增强重组蛋白的胞外分泌。*waaF* 基因是 *E. coli* BL21 (DE3) 中脂多糖庚糖转移酶 II 的基因,该酶的作用是将庚糖 II 连接到庚糖 I 上,从而完善脂多糖中核心寡糖的结构。*msbB* 基因是 *E. coli* BL21 (DE3) 中用于类脂 A 生物合成的十四烷酸转移酶的基因,该酶的作用是将十四烷酸添加到类脂 A 的 C3' 位上,成为一条次级脂肪酸链。已有文献报道 [8],敲除 *E. coli* W3110 中类似功能基因 *waaF* 或 *lpxM* 均能导致突变株表现出较高的细胞外膜通透性,且对菌体生长速率影响不大。

本研究以常用表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 为出发菌株,通过 Red 同源重组技术分别敲除其脂多糖合成的相关基因 *waaF* 或 *msbB* 来构建细胞膜渗漏突变菌株,同时成功将其应用于提高多功能果糖苷酶和青霉素 G 酰化酶的胞外分泌效率,为后期将这两种敲除菌株应用于增强其他重组蛋白的胞外分泌奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和试剂:**大肠杆菌 BL21 (DE3) 由本实验室保存。“大肠杆菌基因删除试剂盒”购自

江苏锐阳生物科技有限公司,主要包括:质粒 pKD46 (同源重组辅助质粒,温度敏感型复制子,含有受 *P<sub>araB</sub>* 启动子调控的 Red 重组酶基因,L-阿拉伯糖诱导后表达 Gam、Bet 和 Exo 3 种  $\lambda$  噬菌体重组酶);抗性片段 *dif-Gm<sup>r</sup>-dif* (两侧带有 *dif* 位点的庆大霉素抗性基因片段,*dif* 位点能够由大肠杆菌自身所含有的 Xer 重组酶进行识别,从而实现靶基因突变后抗性基因的消除)。质粒 pET-*ffase* 由本实验室保存,带有自身信号肽的  $\beta$ -呋喃果糖苷酶的基因<sup>[9-10]</sup> 克隆入表达载体 pET-22b (+) 中。质粒 pET22b-*pga* 由本实验室保存,来源于大肠杆菌的青霉素 G 酰化酶基因<sup>[11]</sup> 克隆入表达载体 pET-22b (+) 中。

各种限制性内切酶、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及 pMD18-T 均购自 TaKaRa 公司,L-阿拉伯糖购自南京都莱生物技术有限公司,蔗糖购自西陇化工股份有限公司,2-硝基-5-苯乙酰胺基苯甲酸 (NIPAB) 购自 Sigma 公司。本实验室所用到的培养基为 LB、LB + Glucose (1 g/L) 和 SOC (用于大肠杆菌电转化之后的恢复培养)。实验中氨苄青霉素 (Amp)、庆大霉素 (Gm) 在培养基中的终浓度分别为 100、30 mg/L。

**1.1.2 引物:**从 NCBI 获得 *E. coli* BL21 (DE3) 中的 *waaF* 基因序列和 *msbB* 的基因序列,设计引物 *waaF-F* 和 *waaF-R* 用于扩增 *waaF* 的基因序列;引物 *msbB-F* 和 *msbB-R* 用于扩增 *msbB* 的基因序列。反向 PCR 引物 *fxwaaF-F* 和 *fxwaaF-R* 用于去除 *waaF* 中部部分序列,分别扩增 *waaF* 基因两端长约 220 bp 的同源序列;反向 PCR 引物 *fxmsbB-F* 和 *fxmsbB-R* 用于去除 *msbB* 中部部分序列,分别扩增 *msbB* 基因两端长约 210 bp 的同源序列。引物 *waaF-4F* 和 *waaF-4R* 是 *waaF* 基因同源序列上下游的鉴定引物,用于检测 *waaF* 是否被敲除;引物 *msbB-4F* 和 *msbB-4R* 是 *msbB* 基因同源序列上下游的鉴定引物,用于检测 *msbB* 是否被敲除;本研究中使用的引物序列见表 1。本研究中所用引物和测序工作由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

### 1.2 敲除 *waaF*、*msbB* 的线性打靶片段的制备

用引物 *waaF-F* 和 *waaF-R* 扩增 *E. coli* BL21 (DE3) 染色体 DNA 上的 *waaF* 基因片段,PCR 产物克隆入质粒 pMD18-T 载体中,获得重组质粒 pMD18T-*waaF*。以该重组质粒为模板,用反向 PCR 引物 *fxwaaF-F* 和 *fxwaaF-R* 进行反向 PCR 扩增,获

得两端分别带有约 220 bp 同源臂, 中间为 pMD18-T 骨架的线性片段。接着将反向 PCR 产物与 *dif-Gm<sup>r</sup>-dif* 片段通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 获得重组质粒 pMD18T-*waaF'* (*dif-Gm<sup>r</sup>-dif*)。重组质粒 pMD18T-*waaF'* (*dif-Gm<sup>r</sup>-dif*) 用 *EcoR* I、*Hind* III 进行双酶切, 胶回收 *waaF'* (*dif-Gm<sup>r</sup>-dif*) 线性片段, 最后用引物 *waaF-F* 和 *waaF-R* 扩增即可得敲除 *waaF* 的线性打靶片段, 该线性打靶片段由 *dif-Gm<sup>r</sup>-dif* 片段 (约 1.0 kb) 及其两端各带有约 220 bp 的同源臂组成。敲除 *msbB* 的线性打靶片段的制备方法同上。相应地, 敲除 *msbB* 的线性打靶片段由 *dif-Gm<sup>r</sup>-dif* 片段 (约 1.0 kb) 及其两端各带有约 210 bp 的同源臂组成。

表 1. 本研究中使用的引物  
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>waaF-F</i>	TTGCTGAAGGTGTAACGGA
<i>waaF-R</i>	CCGTGACAGCTTCTCTTTGTAA
<i>msbB-F</i>	ACTTGAACCTATCATCAGCGC
<i>msbB-R</i>	TCCGAAACTGGAAAAGCAT
<i>fxwaaF-F</i>	TGTTGCCCTTGTATGGTCC
<i>fxwaaF-R</i>	TGACCGAGAGGCATAGGAA
<i>fxmsbB-F</i>	AGCTTTTTCCCAGTCGTCC
<i>fxmsbB-R</i>	GATGATCTGTAGAGGCGG
<i>waaF-4F</i>	TTGTTGGCTTCCGCTATTT
<i>waaF-4R</i>	CATCCGTCAGACTTCTCTT
<i>msbB-4F</i>	TTACTAACCAGATGCCGAC
<i>msbB-4R</i>	GATTCTTGCGATTCCCAC

1.3 *E. coli* BL21 (DE3) 中 *waaF*、*msbB* 基因的敲除  
具体敲除方法参考文献 [12]。

1.4 敲除菌株 ( $\Delta waaF$ 、 $\Delta msbB$ ) 的生长曲线测定  
分别挑取出发菌株 *E. coli* BL21 (DE3)、敲除菌株 *E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) 和 *E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) 的单菌落接种于 50 mL 液体 LB 培养基或液体 LB + Glucose (1 g/L) 培养基, 37 °C、200 r/min 过夜培养后, 按 2% 的接种量转接到 100 mL 液体 LB 培养基或液体 LB + Glucose (1 g/L) 培养基中, 37 °C 200 r/min 继续培养, 每隔 2 h 测定菌的  $OD_{600}$ 。

1.5  $\beta$ -呋喃果糖苷酶、青霉素 G 酰化酶在出发菌株和敲除菌株中的表达

将重组质粒 pET-*ffase*、pET-*pga* 分别转入敲除

菌株及出发菌株中, 得到重组菌株 *E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) /pET-*ffase*、*E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) /pET-*ffase*、*E. coli* BL21 (DE3) /pET-*ffase*、*E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) /pET-*pga*、*E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) /pET-*pga*、*E. coli* BL21 (DE3) /pET-*pga*。

将以上 6 种重组菌接种于含 100 mg/L Amp 的液体 LB + Glucose (1 g/L) 培养基中, 37 °C 培养过夜, 次日再以 2% 的接种量将过夜菌液接种到新鲜的含 100 mg/L Amp 的液体 LB + Glucose (1 g/L) 培养基中, 37 °C 培养至  $OD_{600}$  为 1.0 左右。含有  $\beta$ -呋喃果糖苷酶基因的 3 种重组菌株加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 30 °C 诱导。含有青霉素 G 酰化酶基因的 3 种重组菌株加入终浓度为 5 g/L 的乳糖, 25 °C 诱导。取 1 mL 发酵液作为样品, 离心取上清作为胞外酶液, 沉淀用 1 mL ddH<sub>2</sub>O 重悬后超声破碎, 再次离心取上清作为胞内酶液。获得的胞外、胞内酶液用于 SDS-PAGE 分析及酶活测定。

## 1.6 酶活测定

1.6.1  $\beta$ -呋喃果糖苷酶的酶活测定: 在 pH6.5, 50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的缓冲溶液中, 30 °C 下催化 342 g/L 蔗糖水解, 以每分钟生成 1  $\mu$ g 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U, 即  $\mu$ g/min)。催化生成的葡萄糖由 SBA-40E 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所) 测定。

1.6.2 青霉素 G 酰化酶的酶活测定: 采用 2-硝基-5-苯乙酰胺基苯甲酸 (NIPAB) 为底物的比色法进行青霉素 G 酰化酶酶活的测定<sup>[13-14]</sup>。在 pH7.5, 50 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的缓冲溶液中, 37 °C 下催化 2 g/L NIPAB, 以每分钟生成 1  $\mu$ mol 5-氨基-2-硝基苯甲酸 (ANBA) 所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U, 即  $\mu$ mol/min)。由 Power Wave™ 微孔板扫描分光光度计 (BioTek) 进行测定。

## 2 结果

### 2.1 应用 Red 重组系统和 Xer 重组系统进行基因敲除的策略

本研究所使用的基因敲除策略如图 1 所示, 包括如下步骤: 从大肠杆菌 BL21 (DE3) 染色体上 PCR 扩增目的突变基因 *waaF*、*msbB*, 并将其克隆入 pMD18-T 载体中分别获得重组质粒 pMD18T-*waaF* 和 pMD18T-*msbB*。以该重组质粒为模板, 通过反向

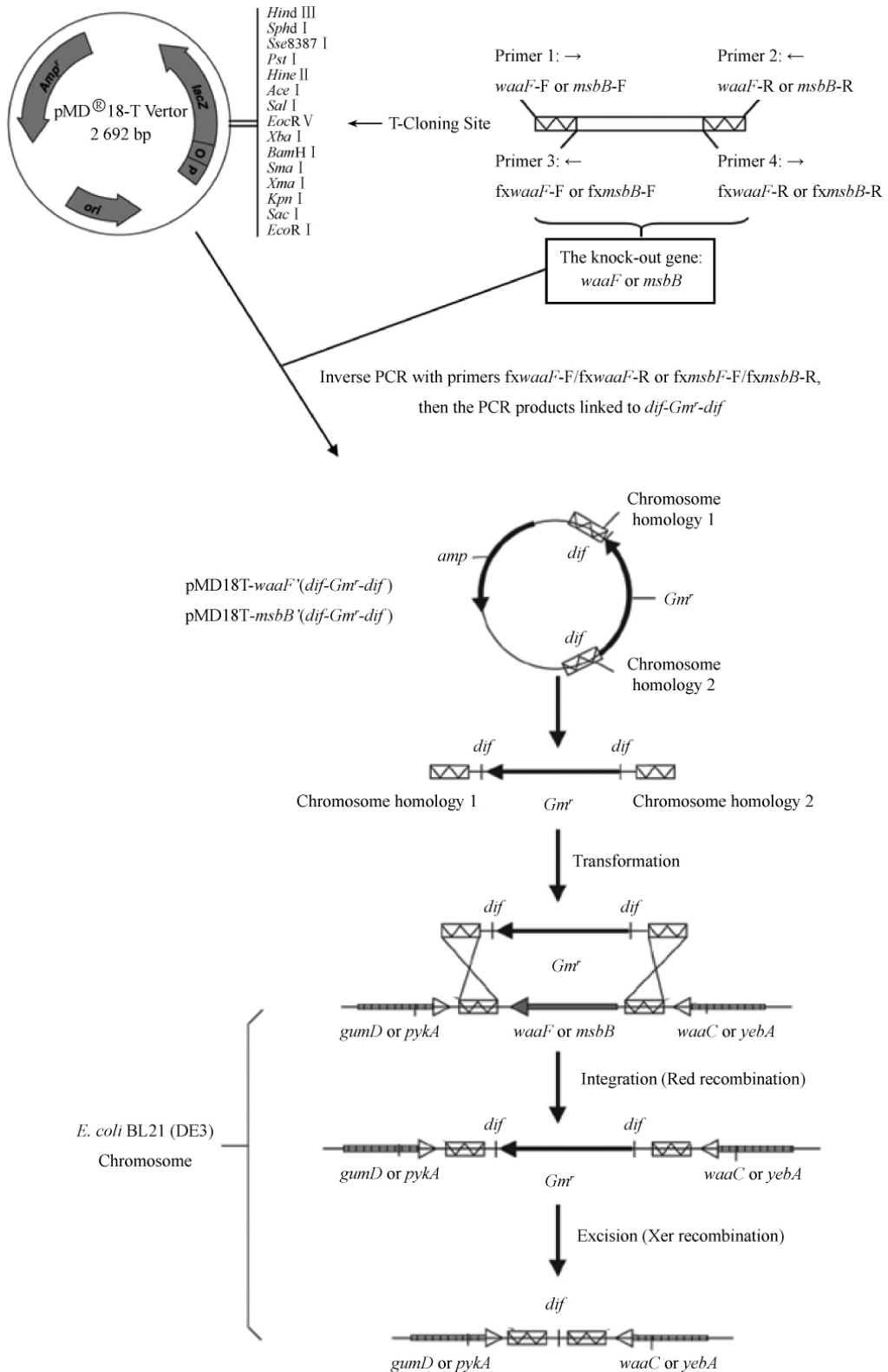


图 1. 本研究中基因敲除策略图

Figure 1. Strategy of genes knock-out in this study.

PCR 扩增两端分别带有约 200 bp 同源臂, 中间为 pMD18-T 骨架的线性片段, 之后将反向 PCR 产物与抗性片段 *dif-Gm<sup>r</sup>-dif* 连接, 可分别获得含有“同源臂 1-*dif-Gm<sup>r</sup>-dif*-同源臂 2”的打靶片段的重组质粒 pMD18T-*waaF'* (*dif-Gm<sup>r</sup>-dif*)、pMD18T-*msbB'* (*dif-Gm<sup>r</sup>-dif*)。将打靶片段从质粒上回收下来, 电转化至含同源重组辅助质粒 pKD46 的出发菌株 (*E. coli* BL21 (DE3)) 感受态中, 线性打靶片段两端的同源臂与 BL21 (DE3) 染色体上的目的突变基因 *waaF*、*msbB* 在 Red 重组酶的作用下进行双交换, 使得目的突变基因被线性打靶片段替换掉, 这种突变株再在自身 Xer 重组酶的介导下进行两个 *dif* 位点的重组从而消除庆大霉素抗性基因和一个 *dif* 位点。

## 2.2 *waaF*、*msbB* 敲除菌株的构建

为了验证已进行 *waaF*、*msbB* 敲除操作的菌株, 用引物 *waaF*-IF 和 *waaF*-IR 进行菌落 PCR 鉴定, 成

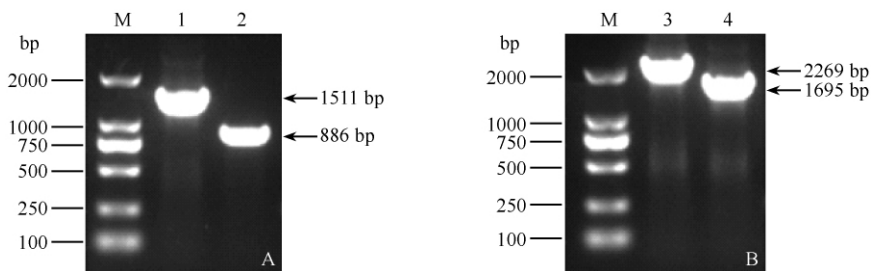


图 2. *waaF*、*msbB* 敲除菌株的菌落 PCR 鉴定

Figure 2. Characterization of defined *waaF* or *msbB* knock-out mutants by colony-PCR analysis. M: DNA marker; lane 1: the colony-PCR product of BL21 (DE3) using primers *waaF*-IF and *waaF*-IR; lane 2: the colony-PCR product of  $\Delta waaF$  using primers *waaF*-IF and *waaF*-IR; lane 3: the colony-PCR product of BL21 (DE3) using primers *msbB*-IF and *msbB*-IR; lane 4: the colony-PCR product of  $\Delta msbB$  using primers *msbB*-IF and *msbB*-IR.

## 2.3 出发菌株 (BL21 (DE3)) 与敲除菌株 ( $\Delta msbB$ 、 $\Delta waaF$ ) 的生长曲线

脂多糖结构的改变, 可能导致大肠杆菌细胞外膜的结构和功能不完整, 使得其生长受到一定抑制。为此测定了出发菌株 BL21 (DE3) 和敲除菌株  $\Delta msbB$ 、 $\Delta waaF$  分别在液体 LB 培养基 (图 3-A)、液体 LB + Glucose (1 g/L) 培养基 (图 3-B) 中的生长曲线。结果表明: 在所试 2 种培养基中, 敲除菌株  $\Delta msbB$  与出发菌株 BL21 (DE3) 的生长状况基本保持一致, 没有明显差异。但是敲除菌株  $\Delta waaF$  的生长却受到一定抑制。另外, 3 种菌株在液体 LB + Glucose (1 g/L) 培养基中生长较 LB 培养基中好, 说明一定量的葡萄糖对它们的生长有促进作用。

功敲除 *waaF* 基因并消除抗性基因和一个 *dif* 位点后的重组子 ( $\Delta waaF$ ) 获得 886 bp 的条带 (图 2 中的泳道 2), 而出发菌株 BL21 (DE3) 获得 1511 bp 的条带 (图 2 中的泳道 1); 相应地, 用引物 *msbB*-IF 和 *msbB*-IR 进行菌落 PCR 鉴定, 成功敲除 *msbB* 基因并消除抗性基因和一个 *dif* 位点后的重组子 ( $\Delta msbB$ ) 获得 1695 bp 的条带 (图 2 中的泳道 4), 而出发菌株 BL21 (DE3) 获得 2269 bp 的条带 (图 2 中的泳道 3)。为了进一步证实核酸序列, 将最后的重组子  $\Delta waaF$ 、 $\Delta msbB$  分别使用鉴定引物 *waaF*-IF/*waaF*-IR、*msbB*-IF/*msbB*-IR 进行扩增, 然后将 PCR 产物送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序, 测序结果经 Vector NTI 软件进行序列比对, 与预测的一致。之后, 另外分别设计了 *waaF*、*msbB* 同源臂上下游引物进行交叉验证, 结果与原来一致。这表明我们已经成功地构建了大肠杆菌 BL21 (DE3) 的 *waaF*、*msbB* 敲除菌株, 分别记为  $\Delta waaF$  和  $\Delta msbB$ 。

## 2.4 $\beta$ -呋喃果糖苷酶在敲除菌株中的胞外分泌效果

为了验证敲除菌株 ( $\Delta msbB$ 、 $\Delta waaF$ ) 对  $\beta$ -呋喃果糖苷酶 (约 55 kDa) 胞外分泌效率的影响, 将果糖苷酶分别在菌株 *E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) 和 *E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) 中诱导表达 4 h, 表达样品的 SDS-PAGE 结果见图 4, 酶活结果见表 2。

从图 4-A 中可见,  $\beta$ -呋喃果糖苷酶  $\beta$ -FFase 的胞外分泌量在以下 3 种菌株中依次明显增大, 即 BL21 (DE3) <  $\Delta msbB$  <  $\Delta waaF$ , 说明本实验构建的敲除菌株  $\Delta waaF$  和  $\Delta msbB$  均能显著提高果糖苷酶的胞外分泌量; 而从图 4-B 中还可以看到,  $\beta$ -FFase 的胞内表达量在以下 3 种菌株中依次明显减小, 即 BL21

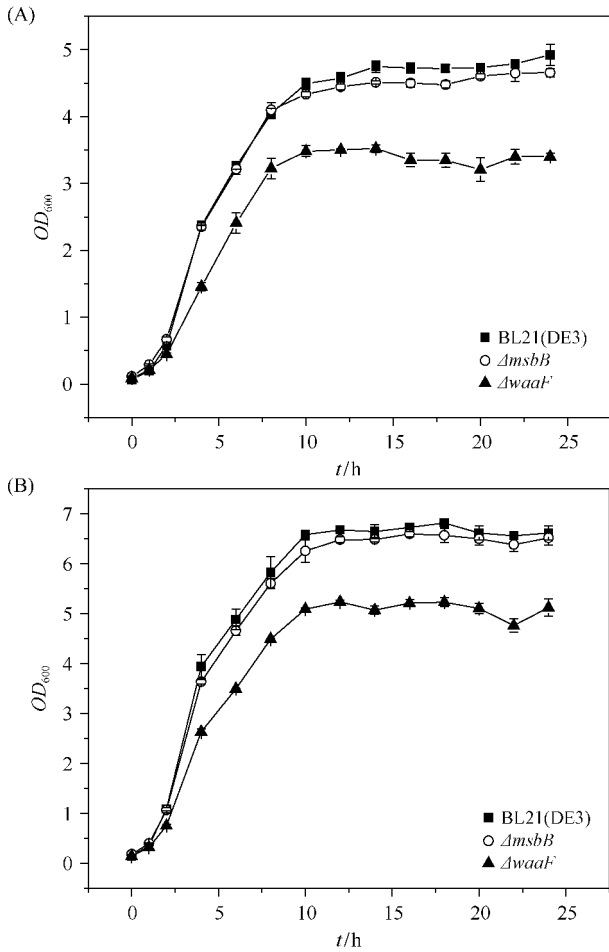


图 3. 出发菌株 (BL21 (DE3)) 与敲除菌株 ( $\Delta msbB$ 、 $\Delta waaF$ ) 分别在液体 LB 培养基 (A) 和液体 LB + Glucose (1 g/L) 培养基 (B) 中的生长曲线

Figure 3. The growth curve of BL21 (DE3),  $\Delta msbB$  and  $\Delta waaF$  in LB medium (A) or LB + Glucose (1 g/L) medium (B).

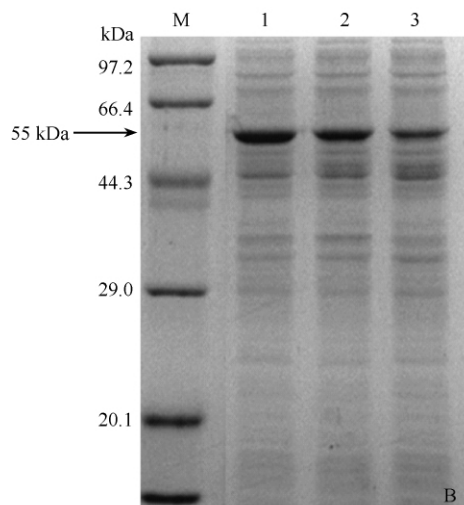
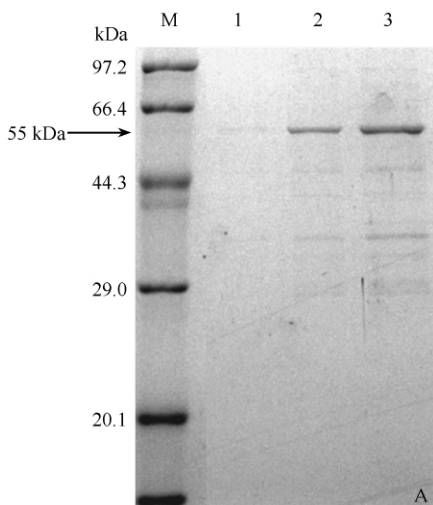


图 4.  $\beta$ -呋喃果糖苷酶  $\beta$ -FFase 在重组菌株中胞外 (A) 和胞内 (B) 表达产物的 SDS-PAGE 图

Figure 4. SDS-PAGE analysis of extracellular (A) and intracellular (B) proteins of recombinants. M: protein marker; lane 1: *E. coli* BL21 (DE3) /pET-*ffase*; lane 2: *E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) /pET-*ffase*; lane 3: *E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) /pET-*ffase*.

(DE3)  $> \Delta msbB > \Delta waaF$ , 推测敲除菌株中有更多的  $\beta$ -FFase 渗漏到了胞外培养基中。从表 2 中可以看出, 以出发菌株 BL21 (DE3) 为宿主时,  $\beta$ -FFase 的胞外分泌量占总表达量的 2.6%, 以敲除菌株  $\Delta msbB$  为宿主时,  $\beta$ -FFase 的胞外分泌量占总表达量的 19.7%, 以敲除菌株  $\Delta waaF$  为宿主时,  $\beta$ -FFase 的胞外分泌量占总表达量的 50.9%。但是同时可以发现, 使  $\beta$ -FFase 胞外分泌效果更加显著的  $\Delta waaF$  也受到了较大的生长抑制, 诱导 4 h 后其  $OD_{600}$  的值只有出发菌株 BL21 (DE3) 的 72.6%。

## 2.5 青霉素 G 酰化酶在敲除菌株中的胞外分泌效果

为了验证敲除菌株 ( $\Delta msbB$ 、 $\Delta waaF$ ) 对青霉素 G 酰化酶 (含 2 个亚基, 其中  $\alpha$  亚基分子量约 25 kDa,  $\beta$  亚基分子量约 62 kDa) 胞外分泌效率的影响, 将青霉素 G 酰化酶分别在菌株 *E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) 和 *E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) 中诱导表达 4、8、12、16、20 和 24 h, 发酵液上清的酶活比较结果见图 5, SDS-PAGE 结果见图 6。

从图 5 和图 6 中可明显看到: 青霉素 G 酰化酶 PGA 在出发宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达时有少量分泌到胞外; 在以敲除菌株 *E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) 作为宿主菌时, 对 PGA 的胞外分泌影响不显著; 而以敲除菌株 *E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) 作为宿主菌时, 诱导表达 12 h 后, PGA 的胞外酶活大大提高, 诱导表达 24 h 达到了出发宿主菌中的 4.1 倍。表明 *waaF* 的敲除改变了大肠杆菌细胞外膜的通透性, 使更多的 PGA 通过细胞外膜渗漏到了培养基中。

表 2.  $\beta$ -呋喃果糖苷酶  $\beta$ -FFase 在重组菌株中的胞外及胞内酶活

Table 2. Extracellular and intracellular enzyme activity of beta-fructofuranosidase in recombinant strains

Strains	$OD_{600}$	Extracellular activity / [U / (mL · $OD_{600}$ ) ]	Intracellular activity / [U / (mL · $OD_{600}$ ) ]	The ratio of extracellular activity to the total / %
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) /pET- <i>ffase</i>	4.256	54	1982	2.6
<i>E. coli</i> BL21 ( $\Delta$ <i>msbB</i> ) /pET- <i>ffase</i>	3.824	353	1438	19.7
<i>E. coli</i> BL21 ( $\Delta$ <i>waaF</i> ) /pET- <i>ffase</i>	3.088	787	760	50.9

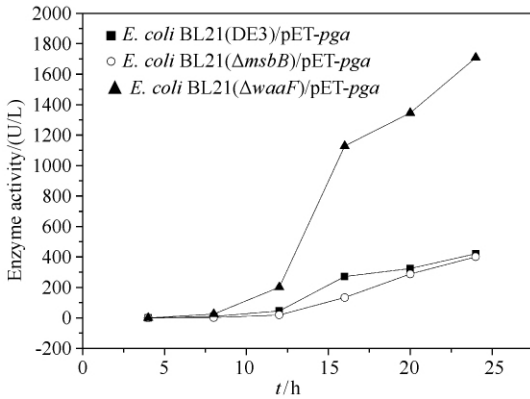
图 5. 青霉素 G 酰化酶 PGA 在出发菌株 (BL21 (DE3)) 及敲除菌株 ( $\Delta$ *msbB*、 $\Delta$ *waaF*) 中诱导表达不同时间的胞外酶活

Figure 5. The extracellular PGA activity of recombinants at different induced times.

### 3 讨论

本研究以常用表达菌株大肠杆菌 BL21 (DE3) 为出发菌株, 通过敲除其脂多糖合成的相关基因

*waaF* 或 *msbB* 来增强细胞外膜的通透性, 进一步提高重组蛋白的胞外分泌能力, 并在  $\beta$ -呋喃果糖苷酶  $\beta$ -FFase 和青霉素 G 酰化酶 PGA 的胞外分泌中得到了成功应用。然而大肠杆菌 BL21 (DE3) 的改造却存在一定的难度。白光兴等<sup>[15]</sup> 报道, Red 重组系统在不同菌株中的作用效果不同, 难以在 BL21 (DE3) 中实现基因敲除。张君等<sup>[16]</sup> 构建了上下游各 500 bp 左右同源片段 (一般同源臂长度为 40 - 60 bp) 的打靶载体才使 *E. coli* BL21 (DE3) 中类脂 A 合成相关基因 *lpxM* 发生插入失活。本研究采用相似策略构建了上下游各 200 bp 左右的同源片段成功实现了 BL21 (DE3) 中 *waaF*、*msbB* 基因的敲除。

本研究通过在 LB 培养基中添加少量的葡萄糖能较显著地促进敲除菌的生长。从生长曲线可见: 在 LB 培养基中, 敲除菌株  $\Delta$ *waaF* 与出发菌株 BL21 (DE3) 相比生长  $OD_{600}$  下降了约 26%, 而在 LB + Glucose (1 g/L) 培养基中下降了约 19%, 有了明显的改善。敲除菌株生长受到抑制的情况在文献 [17] 中也有报道: 敲除菌株  $\Delta$ *lpp* (胞壁质脂蛋白基因) 和  $\Delta$ *pal* (肽聚糖相关外膜蛋白基因) 在 MR

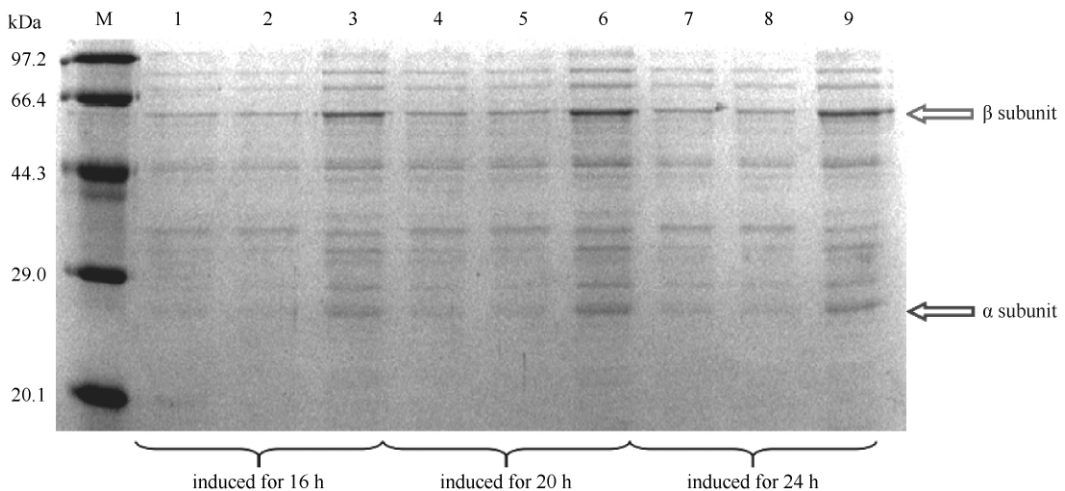


图 6. 青霉素 G 酰化酶 PGA 在重组菌株中胞外表达产物的 SDS-PAGE 图

Figure 6. SDS-PAGE analysis of extracellular proteins of recombinants. M: protein marker; lane 1, 4 and 7: *E. coli* BL21 (DE3) /pET-*pga*; lane 2, 5 and 8: *E. coli* BL21 ( $\Delta$ *msbB*) /pET-*pga*; lane 3, 6 and 9: *E. coli* BL21 ( $\Delta$ *waaF*) /pET-*pga*.

(Modified R) 培养基中生长受到限制,但是在 TB (Terrific Broth) 培养基中其生长恢复。今后可以利用相关培养环境的调整策略来弥补  $\Delta waaF$  的生长不足。

本研究构建的敲除菌株均可增强  $\beta$ -呋喃果糖苷酶  $\beta$ -FFase 的胞外分泌。在以敲除菌株  $\Delta msbB$  或  $\Delta waaF$  为宿主菌时,  $\beta$ -FFase 的胞外分泌量大大提高,其胞外分泌量占总表达量的比率分别是出发菌株中的 7.6 倍和 19.6 倍。而  $\Delta waaF$  还可以增强青霉素 G 酰化酶 PGA 的胞外分泌。以  $\Delta waaF$  为宿主菌时,诱导表达 24 h 的胞外酶活可达到 1708 U/L,是出发菌株中的 4.1 倍。推测  $msbB$  和  $waaF$  的敲除确实改变了大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的脂多糖结构,特别是  $\Delta waaF$  菌株的细胞外膜通透性得到了较显著的提高,这为细胞膜渗漏突变菌株 *E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) 和 *E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) 在增强重组蛋白胞外分泌的应用奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Young RA, Davis RW. Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. *Science*, 1983, 222 (4625): 778-782.
- [2] Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, 33(1): 103-119.
- [3] Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*, 1985, 49(1): 1-32.
- [4] Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2009, 1794(5): 808-816.
- [5] Lau PCY, Lindhout T, Beveridge TJ, Dutcher JR, Lam JS. Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(21): 6618-6631.
- [6] Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 1994, 264 (5157): 382-388.
- [7] Vanderlinde EM, Muszyński A, Harrison JJ, Koval SF, Foreman DL, Ceri H, Kanningberg EL, Carlson RW, Yost CK. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, deficient in 27-hydroxyoctacosanoate-modified lipopolysaccharide, is impaired in desiccation tolerance, biofilm formation and motility. *Microbiology*, 2009, 155 (9): 3055-3069.
- [8] Ma P, Hu XQ, Chen JZ, Wang XY. The effect of the structure of lipopolysaccharide on the permeability of *Escherichia coli* cell membranes. *Microbiology China*, 2011, 38(8): 1307-1315.
- [9] 何冰芳, 陈文华, 米兰, 吴珊珊, 朱芸, 陈珊珊. 强分泌性信号肽增强小肽模序及其应用. 中国: 201310162455. 9. 2013-5-3.
- [10] 何冰芳, 王瑞, 吴薛明, 周晨, 吴斌. 耐有机溶剂糖苷酶 Fru6 及其突变体和应用. 中国: 201210185733. 8. 2012-10-17.
- [11] Cheng TF, Chen ML, Zheng HB, Wang JG, Yang S, Jiang WH. Expression and purification of penicillin G acylase enzymes from four different micro-organisms, and a comparative evaluation of their synthesis/hydrolysis ratios for cephalosporin. *Protein Expression and Purification*, 2006, 46(1): 107-113.
- [12] Zhou L, Niu DD, Li N, Chen XZ, Shi GY, Wang ZX. Multiple gene inactivation approach in *Escherichia coli* mediated by a combination of Red recombination and Xer recombination. *Microbiology China*, 2010, 37(6): 923-928. (in Chinese)  
周丽, 牛丹丹, 李宁, 陈献忠, 石贵阳, 王正祥. 基于 Red 重组系统和 Xer 重组系统的大肠杆菌多基因删除方法. 微生物学通报, 2010, 37(6): 923-928.
- [13] Kasche V, Haufler U, Markowsky D, Melnyk S, Zeich A, Galunsky B. Penicillin amidase from *E. coli* enzyme heterogeneity and stability. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1987, 501(8): 97-102.
- [14] Shi XJ, Wang YH, Zhang SL, Chu J, Zhuang YP. Evaluation and improvement of determination of penicillin G acylase activity using NIPAB method. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2008, 39(9): 659-661. (in Chinese)  
施晓捷, 王永红, 张嗣良, 储炬, 庄英萍. NIPAB 法测定青霉素 G 酰化酶活力的分析和改进. 中国医药工业杂志, 2008, 39(9): 659-661.
- [15] Bai GX, Sun ZW, Huang Y, Yu WY. Deletion of *clpP* in chromosome of *E. coli* by Red recombination. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 21(1): 35-38. (in Chinese)  
白光兴, 孙志伟, 黄莺, 俞炜源. 利用 Red 重组系统对大肠杆菌 *ClpP* 基因的敲除. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(1): 35-38.



[16] Zhang J, Fang HQ, Dai HM, Xie DP, Chen HP. Constructing modified protein-producing *Escherichia coli* capable of autohydrolysing host nucleic acid during cell lysis. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24 (1) : 46-52. (in Chinese)  
张君, 方宏清, 戴红梅, 谢达平, 陈惠鹏. 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. *生物工程学报*, 2008, 24 (1) : 46-52.

[17] Chen ZY, Cao J, Xie L, Li XF, Yu ZH, Tong WY. Construction of leaky strains and extracellular production of exogenous proteins in recombinant *Escherichia coli*. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7 (4) : 360-370.

## Effects of knockout genes related to outer membrane on extracellular secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Yun Zhu<sup>1</sup>, Youzhi Zhou<sup>1</sup>, Jianlin Chu<sup>1</sup>, Bingfang He<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing, 211816, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing Tech University, Nanjing, 211816, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] We knocked out the genes related to lipopolysaccharide in outer membrane of *Escherichia coli* BL21 (DE3) to study the effects on extracellular secretion of recombinant proteins. [Methods] We generated *waaF* or *msbB* knockout mutants [*E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) or *E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ )] of *E. coli* BL21 (DE3) by using lambda-Red recombination system. Then, we transformed recombinant plasmids pET-*ffase* or pET-*pga* into *E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ), *E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) and *E. coli* BL21 (DE3) respectively, to generate the engineering strains *E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) / pET-*ffase*, *E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) / pET-*ffase*, *E. coli* BL21 (DE3) / pET-*ffase*, *E. coli* BL21 ( $\Delta msbB$ ) / pET-*pga*, *E. coli* BL21 ( $\Delta waaF$ ) / pET-*pga* and *E. coli* BL21 (DE3) / pET-*pga*. Finally, we studied the effects of mutants on extracellular secretion of beta-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26, beta-FFase) and penicillin G acylase (EC 3.5.1.11) in shaking flask fermentation. [Results] After induced expression for 4 hours, up to 19.7% of the beta-FFase activity was found in the culture medium with the *msbB* deletion mutant, and 50.9% with the *waaF* deletion mutant, compared to the original 2.6%. Besides, after induced expression for 24 hours, up to 1708 U/L extracellular activity of penicillin G acylase was found in the culture medium with the *waaF* deletion mutant, which was 4.1 times of the original. [Conclusion] Knockout mutants ( $\Delta msbB$  and  $\Delta waaF$ ) had significantly higher excretion of beta-FFase and the *waaF* deletion mutant had higher excretion of penicillin G acylase.

**Keywords:** *Escherichia coli* BL21 (DE3), membrane lipid, gene knock-out

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21376119) and by the National Program on Key Basic Research Project (2011CBA00807)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-58139902; E-mail: bingfanghe@njtech.edu.cn

Received: 24 March 2015/Revised: 24 June 2015