

## 掺入大肠杆菌膜中的磷脂酰胆碱(PC)影响 青霉素 $\beta$ -内酰胺酶的分泌

蔡雪丽, 李洋, 宣文静, 王行国\*

(湖北大学生命科学学院, 武汉 430062)

**摘要:** 【目的】为了研究磷脂酰胆碱(PC)在原核生物细胞中的生物学作用, 探讨 PC 对细菌膜系统的功能的影响。【方法】使用 p<sup>tac</sup>85 质粒作载体, 将螺旋菌 pcs 基因导入 *E.coli* Top10 细胞构建了 *E.coli* Top10 pcs<sup>+</sup>菌株, 并在特定的条件下培养细菌, 使细菌膜磷脂中合成 30%左右的磷脂酰胆碱。然后再使用抗生素抗性分析、 $\beta$ -内酰胺酶的酶活测定以及 Western blot 杂交技术, 分析质粒编码的 $\beta$ -内酰胺酶从细胞质到细胞间质的分泌情况。【结果】抗生素抗性分析发现, 高浓度的氨苄青霉素抑制 *E.coli* Top10 pcs<sup>+</sup>细菌的生长的氨苄青霉素剂量低于对照组, 其半致死剂量 IC<sub>50</sub> 在 700~800 $\mu$ g/mL 之间。酶活检测显示 *E.coli* Top10 pcs<sup>+</sup>细菌周质内 $\beta$ -内酰胺酶的酶活性只有对照菌株的 1/5, Western blot 进一步分析发现周质内 $\beta$ -内酰胺酶的含量也为对照菌株的 1/5。由此可见, 周质内低含量的 $\beta$ -内酰胺酶是导致 *E.coli* Top10 pcs<sup>+</sup> 细菌氨苄青霉素抗性降低的原因。【结论】掺入细菌膜磷脂双分子层的 PC 影响 $\beta$ -内酰胺酶通过 Sec 转运途径从细胞质分泌到细菌周质空间内, 提示细菌磷脂酰胆碱可能在调节蛋白转运和分泌方面起着重要的作用。

**关键词:** 磷脂酰胆碱;  $\beta$ -内酰胺酶; 氨苄青霉素; 蛋白分泌

中图分类号: Q7, Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0486-06

磷脂酰胆碱(Phosphatidylcholine, PC)是真核生物膜中的主要磷脂组分。除了它在膜上的结构作用外, 磷脂酰胆碱在真核细胞中还涉及到许多其他不同的细胞生命过程。例如, 磷脂酰胆碱对真核细胞的存活是十分重要的, 膜上缺少磷脂酰胆碱的动物细胞则不能存活<sup>[1]</sup>。在哺乳动物中, 磷脂酰胆碱对于低密度脂蛋白(VLDL)的分泌是必需的, 其它的磷脂不能替代磷脂酰胆碱<sup>[2]</sup>。此外, 磷脂酰胆碱还是乙酰甘油(DAG)和磷脂酸(PA)等第二信使的来源<sup>[3]</sup>。相反地, 大多数原核生物膜磷脂中没有磷脂酰胆碱。新近的基因组分析推测, 约 10%的细菌含有磷脂酰胆碱, 而这些细菌绝大多数是与真核生物相关联的共生菌或致病菌<sup>[4]</sup>。有关磷脂酰胆碱在原核生物细胞中的生物学

作用了解较少, 目前主要集中在土壤根瘤菌。例如, 用含有少量的磷脂酰胆碱的 *B. japonicum* pmtA<sup>-</sup>突变株接种寄主植物, 仅形成无效的淡黄棕色根瘤, 寄主叶片淡绿色呈明显的氮饥饿症状并且根瘤的固氮活性只有野生型的 18%<sup>[5]</sup>。接种完全不能合成磷脂酰胆碱的 *S. melitoli* pmtA<sup>-</sup> pcs<sup>-</sup>突变体, 寄主植物则完全不能形成任何固氮根瘤<sup>[6]</sup>。致病菌 *Pseudomonas aeruginosa* pcs<sup>-</sup> 则在冷冻后明显降低其存活率<sup>[7]</sup>。最近在动物的流产杆菌 *Brucella abortus* 的磷脂酰胆碱突变体分析中发现, 磷脂酰胆碱成分对于细菌的毒性是必需的<sup>[8]</sup>。对根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 的磷脂酰胆碱突变体分析也得出相同的结论<sup>[9]</sup>。这些研究首次将膜磷脂跟细菌的毒力联系起来, 提

基金项目: 国家自然科学基金(30570009); 湖北大学重点基金(080-095152)

\*通讯作者。Tel: +86-27-88661237-8066; E-mail: xgw569@hotmail.com

作者简介: 蔡雪丽(1983-), 女, 湖北襄樊人, 硕士, 研究方向为生化与分子生物学。E-mail: shirley-635@163.com

收稿日期: 2007-09-11; 修回日期: 2008-11-01

示磷脂酰胆碱在细菌与真核生物共生以及病原菌的致病过程中起着非常重要的作用。

为了深入探索磷脂酰胆碱在原核生物细胞中的生物学功能,我们实验室已成功克隆了螺旋菌(*B.burgdorferi*、*B.afzelii*)磷脂酰胆碱合成酶(Pcs)基因并将其导入大肠杆菌中进行了有效的表达,使大肠杆菌膜磷脂中含有新合成的磷脂酰胆碱<sup>[10,11]</sup>。在已有的工作基础上,本文进一步报道 *pcs*<sup>+</sup>细菌膜中新合成的磷脂酰胆碱影响青霉素β-内酰胺酶(EC 3.5.2.6)从细胞质分泌到周质空间,导致细菌对氨苄青霉素的抗性减弱。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验菌株:**质粒 pET125 和 p<sup>tac</sup>85 为实验室保藏。大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)Top10 菌株购自 Invitrogen 公司。实验菌株 *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>和对照菌 *E.coli* Top10/p<sup>tac</sup>85 为本实验构建。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**氨苄青霉素钠购自 Amresco 公司;β-内酰胺酶单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;HRP-标记的羊抗小鼠 IgG 抗体购自 Novogene 公司;报春花碱购自 Sigma 公司;硅胶-60板购自 Merck 公司;其它化学试剂均为国产分析纯。日本岛津公司的紫外分光光度计;北京六一仪器厂的 DYY-2C 电泳仪;温州新芝科学仪器厂的凝胶成像分析系统;上海天能公司的 Tanon GIS 凝胶图像处理系统。

### 1.2 *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 和 Top10/p<sup>tac</sup>85 菌株的构建

以插有克隆的 *B.burgdorferi pcs* 基因(705bp)的重组质粒 pET125 DNA 为模板,使用人工合成的引物 pcsF1(5'-GAACAGGATCCATGAAAAATATCAATTTGATT-3')和 pcsR1 (5'-ATATTGTCGACTTATTTCTTGTTTTATAAG-3')作引物对,PCR 扩增出两端分别带有 *Bam*H 和 *Sal* 酶切位点(下划线处)的 *pcs* 结构基因的 DNA 片段。PCR 的扩增参数为 95 5min, 95 30s, 55 30s, 72 1min, 35 个循环, 72 5min。PCR 产物经凝胶电泳回收后用限制性内切酶 *Bam*H 和 *Sal* 消化。将带有粘性末端的 DNA 片段插入 p<sup>tac</sup>85 表达载体<sup>[12]</sup>的 *Bam*H 和 *Sal* 位点,构建成重组质粒 ptac66。然后采用常规氯化钙法分别将重组质粒 ptac66 和质粒 p<sup>tac</sup>85 转化 *E.coli* Top10 细菌,氨苄青霉素平板筛选后即获得 *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>和 Top10/p<sup>tac</sup>85 菌株,后者作为对照用菌株。

### 1.3 细菌磷脂酰胆碱的鉴定

细菌在含有 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养,待 Top10 *pcs*<sup>+</sup> 细菌生长到 OD<sub>600</sub> 为 0.6 时加入终浓度为 1%胆碱和 0.5mmol/L IPTG,然后诱导培养 4h。收集 5mL 菌体并用 0.9%生理盐水离心洗涤 3 次,然后向菌体沉淀中加入 1 mL 氯仿:甲醇(2:1)溶液,充分震荡 0.5h,15000×g 离心 10min,回收液相。向液相中加入 0.2 倍体积的 0.9%生理盐水涡悬几秒钟,5000×g 离心 10min 分成两相,移去上相,将下相的氯仿溶液置于通风橱中干燥,底部的黄色透明物质即为磷脂。用 20μL 氯仿溶解磷脂。分别用氯仿:甲醇(1:1)溶液,2%硼酸乙醇溶液预跑硅胶-60板后,将提取的磷脂溶液点样在硅胶板上,用展层剂(氯仿:甲醇:水:三乙胺=1.5:1.75:0.35:1.5)进行 TLC 层析。使用鸡蛋黄磷脂酰胆碱作对照。层析完毕后干燥并用报春花碱磷脂显色剂染色,最后在紫外灯下观察结果并拍照。

### 1.4 氨苄青霉素的抗性检测

将灭菌的、大小相同的圆形小滤纸置于不同浓度的氨苄青霉素溶液中浸湿,然后按照氨苄青霉素浓度大小的顺序依次放置在涂满 *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 和 Top10/p<sup>tac</sup>85 细菌的 LB 平板上,37 培养 12h 后观察并测量抑菌圈的大小,并以此来判断细菌对氨苄青霉素的抗药性。氨苄青霉素抑制细菌的半致死剂量 IC<sub>50</sub> 的测量则使用 OD<sub>600</sub> 进行生长测定,即以 LB 培养到对数期加 1%胆碱和 0.5mmol/L IPTG 诱导 4h 的细菌作为出发菌株,按 1:100 接种到含不同浓度(0~1800μg/mL)氨苄青霉素、1%胆碱和 0.5 mmol/L IPTG 的 LB 培养基中,37 培养 12h,测定 OD<sub>600</sub> 吸光值,最后用 OD<sub>600</sub> 吸光值对氨苄青霉素浓度作图,求出 IC<sub>50</sub> 值。

### 1.5 细菌周质蛋白与细胞质蛋白的提取

采用渗透休克法或称“冷休克”的方法<sup>[13]</sup>提取周质蛋白,即将培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.9 的细菌用含有 1mmol/L EDTA 和 20%蔗糖的 25mmol/L Tris-马来酸缓冲液(pH7.0)悬浮,并在室温放置 20min,使菌体发生质壁分离。通过离心去除上清液,并迅速向菌体沉淀中加入含 0.4%硫酸链霉素的 0.05mol/L MgCl<sub>2</sub> 进行悬浮,并置 0 20min 使细胞壁破裂释放周质蛋白。4 15000×g 离心 20min 回收上清液,即为周质蛋白。其菌体沉淀用 Tris-马来酸缓冲液悬浮,并超声波处理破碎细胞,4 15000×g 离心 20min 后收获上清液即为细胞质蛋白。使用 Bradford 方法<sup>[14]</sup>测定总蛋白的浓度。

### 1.6 $\beta$ -内酰胺酶的活性测定

根据文献[15]报道的方法测定 $\beta$ -内酰胺酶的活性。由于 $\beta$ -内酰胺酶裂解青霉素的 $\beta$ -内酰胺环形成青霉噻唑酸，碘与青霉噻唑酸反应形成无色的碘-青霉素裂解酸复合物，因而使得碘在 620nm 处吸光值下降。根据在 620nm 测得的 $\Delta 620\text{nm}$  值推算出碘的消耗量，再依据 1mol 青霉噻唑酸消耗 4mol 碘算出反应体系中的底物量。 $\beta$ -内酰胺酶活力单位定义为 30 条件下 1h 水解 1 $\mu\text{mol}$  青霉素所需要的酶量为一个活力单位(U)。最后，根据测得的粗酶液中蛋白质总浓度并按照酶比活力=酶活力(U)/蛋白量(mg)的定义计算出  $\beta$ -内酰胺酶比活(U/mg)。

### 1.7 Western blot

使用 4% 浓缩胶、15% 分离胶跑 SDS-PAGE 凝胶电泳，每个蛋白样品上样量均为 8 $\mu\text{g}$  蛋白。电泳完毕后，使用湿式电泳转移仪在 100mA 稳流下转移 90min，将蛋白样品从凝胶转移至硝酸纤维素膜上。转移缓冲液为 20mmol/L Tris-HCl(pH8.3)，140mmol/L 甘氨酸和 20% 甲醇溶液。转移后的膜先用含 1% BSA 的 TBST(10mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L NaCl 和 0.1% Tween-20)4 封闭过夜，再用终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的  $\beta$ -内酰胺酶单克隆抗体溶液室温孵育 2h，用 TBST 漂洗 3 次，每次 15min，然后将膜放在 1:1000 稀释的 HRP-偶联的羊抗鼠 IgG 多克隆抗体溶液中室温孵育 2h。再用 TBST 漂洗 3 次，每次 15min。用 DAB 显色液(含 0.03% DAB, 0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  的 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.6))显色，并用清水冲洗终止反应。最后，通过拍照记录辣根过氧化物酶(HRP)活性显色结果。

## 2 结果

### 2.1 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 细胞膜中磷脂酰胆碱的表达

以重组质粒 pET125 DNA 为模板、*pcsF1* 和 *pcsR1* 作引物对，PCR 扩增出两端分别带有 *Bam*H I 和 *Sal* 的 *pcs* 结构基因 DNA 片段(728bp)。通过限制性内切酶 *Bam*H 和 *Sal* 消化后，将 705bp 的螺旋菌 *pcs* 基因插入带有氨苄青霉素抗性基因的 *p*<sup>tac</sup>85 表达载体，获得大约 5.8 kb 的重组质粒 *ptac66*。然后将重组质粒 *ptac66* 和质粒 *p*<sup>tac</sup>85 分别转化 *E. coli* Top10 细菌，抗生素筛选和质粒 DNA 酶切分析验证，获得 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 和 Top10/*p*<sup>tac</sup>85 菌株。经过一系列的表达优化，发现将 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 细菌先培养至  $OD_{600}$  至 0.6~0.9 时，在培养基中加入 1% 胆碱和

0.5mmol/L IPTG 37 $^{\circ}\text{C}$  诱导 4h，细菌膜磷脂中磷脂酰胆碱的合成量达最高，约占总磷脂的 30%。图 1 显示 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>、Top10/*p*<sup>tac</sup>85 和 Top10 菌株在加入

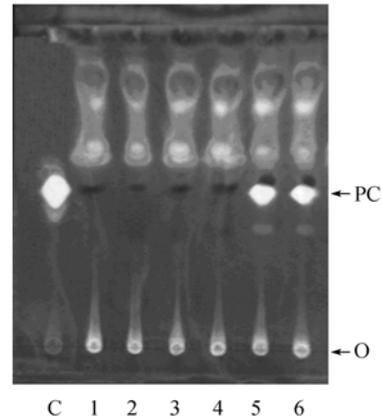


图 1 三种大肠杆菌膜磷脂的 TLC 分析

Fig. 1 TLC analysis of membrane phospholipids in three *E. coli* strains. C. egg phosphatidylcholine; 1, 2. *E. coli* Top10; 3, 4. Top10/*ptac85*; 5, 6. Top10 *pcs*<sup>+</sup>; O. spotting site; PC: phosphatidylcholine.

1% 胆碱和 0.5mmol/L IPTG 37 $^{\circ}\text{C}$  诱导 4h 后的细胞膜磷脂的 TLC 分析结果。从图 1 中可以看出，在相同的条件下培养 *E. coli* Top10、Top10/*ptac85* 仅含有磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)和脑磷脂(CL)，并没有 PC 的表达；而 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 除了 PE、PG 和 CL 之外还有明显的 PC 出现。实验结果表明，*E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 细菌中表达的磷脂酰胆碱合成酶能有效地将细胞内的 CDP-二酰基甘油(CDP-DAG)与外源的胆碱缩合成磷脂酰胆碱。细菌生长调查发现，37 条件下在液体 LB 培养基中培养，*E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 细菌的生长曲线与对照用的 Top10/*ptac85* 没有明显的区别。

### 2.2 高浓度的氨苄青霉素抑制 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 细菌的生长

*E. coli* Top10 菌株本身不含任何抗性基因，由于 *p*<sup>tac</sup>85 表达质粒上含有抗生素标记基因 *bla*，因此该质粒转化的细菌 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 和 Top10/*ptac85* 都应该表达  $\beta$ -内酰胺酶和显示氨苄青霉素抗性。与预期结果一致，*E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 和 Top10/*ptac85* 均不显示任何卡那霉素和四环素抗性，仅显示氨苄青霉素抗性。但两种细菌显示的氨苄青霉素抗性的程度不同，氨苄青霉素的浓度高达 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  条件下，*E. coli* Top10/*ptac85* 仍未显示可见的抑菌圈，而 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 在氨苄青霉素的浓度为 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  条件下显示可见的抑菌圈，当氨苄青霉素的浓度增至 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  或 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，透明的抑菌圈则非常明显，且抑菌圈随着氨苄青霉素的浓度增加而增大。

为了进一步证实两种细菌对氨苄青霉素的抗性程度不同,用在含有 1%胆碱 0.5mmol/L IPTG 诱导 4h 的细菌作为出发菌株,在含有胆碱、IPTG 和不同浓度(0~1800μg/mL)的氨苄青霉素的 LB 培养基中培养,12h 后测定  $OD_{600}$  吸光值,实验结果见图 2。与滤纸平板法检测的结果一致,1800μg/mL 氨苄青霉素对 *E.coli* Top10/ptac85 没有明显的抑制作用。与 Top10/ptac85 对照不同,随着氨苄青霉素浓度的递增,测得的 Top10 *pcs*<sup>+</sup>细菌  $OD_{600}$  值逐渐减小,说明氨苄青霉素对该细菌生长的抑制作用随着剂量的增加而增大。当氨苄青霉素浓度超过 1000μg/mL 后,Top10 *pcs*<sup>+</sup>细菌基本上停止生长。根据图 2 的结果,推算出氨苄青霉素对 Top10 *pcs*<sup>+</sup>细菌的半致死剂量  $IC_{50}$  为 700~800μg/mL。

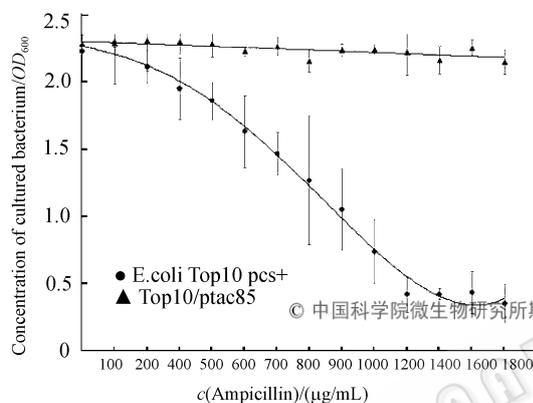


图 2 氨苄青霉素抗性试验结果

Fig. 2 Ampicillin resistance assay of *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> and Top10/p<sup>tac</sup>85.  $OD_{600}$  indicated *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> and Top10/p<sup>tac</sup>85 growing at 37 °C for 12 hours in LB medium containing ampicillin of different concentrations.

### 2.3 *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>细菌周质中β-内酰胺酶的活性

为了调查 *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>氨苄青霉素抗性降低的原因,分别从 *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>和 Top10/p<sup>tac</sup>85 细菌的周质中抽提周质蛋白,检测β-内酰胺酶的活性并进行比较。在相同的酶反应条件下,测得 Top10 *pcs*<sup>+</sup>周质蛋白中β-内酰胺酶的酶比活为  $1.3 \times 10^3$  U/mg,而 Top10/p<sup>tac</sup>85 细菌周质蛋白中β-内酰胺酶的酶比活则为  $5.8 \times 10^3$  U/mg,后者是前者的 4.5 倍。

为了进一步弄清楚造成两种细菌周质蛋白中 β-内酰胺酶活力不同的原因,分别抽提两种细菌的周质蛋白和细胞质蛋白,然后取相同量的蛋白(8μg)上样,经 15% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移至硝酸纤维素膜上,用抗β-内酰胺酶的小鼠单克隆抗体与膜上

蛋白杂交,结果见图 3。从图 3 可以看出,29kDa 的β-内酰胺酶主要存在于细菌的周质蛋白中,而 32kDa 的β-内酰胺酶原则主要存在于细胞质内。蛋白杂交带密度扫描分析显示, *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>细胞质中的β-内酰胺

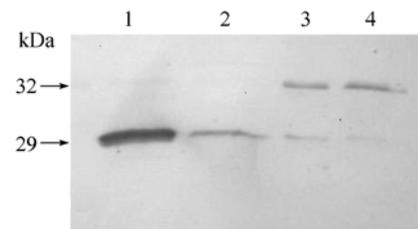


图 3 免疫印迹结果

Fig. 3 Western blot of β-lactamase. 1. β-lactamase in periplasm of *E.coli* Top10/p<sup>tac</sup>85; 2. β-lactamase in periplasm of *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>; 3. β-lactamase in cytoplasm of *E.coli* Top10/p<sup>tac</sup>85; 4. β-lactamase in cytoplasm of *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>.

酶原的相对含量比 Top10/p<sup>tac</sup>85 多 24%,但周质蛋白中的β-内酰胺酶相对含量仅为后者的 17.5%。两者周质蛋白中 5 倍酶量的差异与两者 4.5 倍酶活的差别相吻合,说明细菌周质中β-内酰胺酶含量较少是 *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>周质蛋白中的β-内酰胺酶酶比活低的主要原因,也即是导致细菌青霉素抗性降低的主要因素。

本实验所用的表达载体 ptac85 质粒携带的 amp<sup>r</sup> 基因来源于 pBR322 质粒<sup>[12]</sup>。质粒 pBR322 携带的 bla 基因编码青霉素β-内酰胺酶蛋白,该蛋白含有 286 氨基酸残基,其 N-端为 23 个氨基酸残基组成的信号肽<sup>[16]</sup>。β-内酰胺酶前体蛋白位于细胞质内,而具有水解青霉素活性的β-内酰胺酶则位于细菌周质内<sup>[17]</sup>。由于β-内酰胺酶 N-端含有一个典型的、由 1 个精氨酸与 12 个疏水性氨基酸组成的信号序列,因此前体蛋白可通过 Sec 途径<sup>[18,19]</sup>转运到周质空间内并经信号肽酶切除信号肽形成有活性的β-内酰胺酶。*E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>周质内β-内酰胺酶的酶比活大约是对照菌株 Top10/p<sup>tac</sup>85 的 1/5,而细胞周质中β-内酰胺酶的含量也仅为对照菌株的 1/5,但细胞质内β-内酰胺酶原蛋白含量则差异不显著。很明显, *E.coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup>青霉素抗性减弱的主要原因是细胞周质中β-内酰胺酶的含量减少。引起细菌周质中β-内酰胺酶含量减少的原因可能有 L (1) β-内酰胺酶不能有效地从细胞质通过内膜转运至周质内; (2) 周质内的β-内酰胺酶从外膜泄露到细胞外。后一种可能性虽不能完全排除,但似

乎可能性不大, 因为即使泄露到胞外,  $\beta$ -内酰胺酶仍具有催化活性, 不应明显降低细菌对青霉素的抗性。与对照菌株比较, 遗传上唯一不同点是 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 细胞内含有的 ptac85 质粒上携带有一个 *pcs* 基因, 由于 *pcs* 基因的表达产物能有效地将外源的胆碱和细胞内的 CDP-二酰基甘油缩合成磷脂酰胆碱, 因此 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 细胞膜磷脂中含有一定量的磷脂酰胆碱(参见图 1)。或许正是这些新合成的磷脂酰胆碱占据了细胞膜上部分磷脂酰乙醇胺或磷脂酰甘油的位置, 使膜通道蛋白在磷脂双层结构中的排列组合或与其它分子之间的相互作用发生了变化, 影响了 Sec 转运系统的功效, 结果导致  $\beta$ -内酰胺酶的分泌受阻。Nesmeyanova MA 小组曾报道缺少磷脂酰乙醇胺或磷脂酰甘油都会影响胞外碱性磷酸酶的分泌<sup>[20, 21]</sup>。在根瘤农杆菌 *A. tumefaciens* 中, 由于 *pmtA* 或 *pcs* 基因突变使磷脂酰胆碱的合成受阻, 结果造成 IV 分泌系统中 B2、B8 等蛋白的缺失<sup>[9]</sup>。由此可见, 构成细胞膜双脂层的磷脂成分对于蛋白质的分泌起着十分重要的作用。任何磷脂成分的变动都会打破膜磷脂固有的平衡, 影响各类通道蛋白在膜磷脂双层膜中的插入、排列组合或相互作用。

在动植物中, 磷脂酰胆碱含量丰富, 约占总磷脂的 50% 以上。它是构成细胞膜磷脂双脂层的主要构件, 在质膜的外层小叶上尤其丰富。不过, 这种在广泛 pH 范围内呈中性或两性离子的磷脂分子仅出现在约 10% 的细菌中, 而含有磷脂酰胆碱的细菌绝大多数是与真核生物相关联的共生或寄生菌<sup>[4]</sup>。虽然磷脂酰胆碱与磷脂酰乙醇胺都是两性离子的磷脂分子, 但两者分子之间仍存在明显的差异, 即后者头部较小、具有与其它阴离子磷脂分子乃至脂多糖形成氢键的能力。越来越多的证据显示, 磷脂酰胆碱与磷脂酰乙醇胺在功能上并不能相互替代, 我们的实验结果也支持这一点。在含有磷脂酰胆碱的细菌中, 细菌或许通过少量磷脂酰胆碱的掺入, 改变细胞膜双脂层的性质, 使细胞膜的转运功能、渗透性能以及外层分子的组成发生变化, 以适应与真核宿主相互作用而共生或寄生。我们推测磷脂酰胆碱不仅仅影响胞外蛋白的分泌, 很可能还会影响到细菌细胞膜的通透性以及细胞壁外层分子的组成。因此, 利用 *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> 作为模式菌株, 进一步深入研究磷脂酰胆碱的生物学功能将有助于我们了解细菌与真核生物之间的相互作用。

## 参 考 文 献

- [1] Esko JD, Wermuth MM, Raetz CR. Thermolabile CDP-choline synthetase in an animal cell mutant defective in lecithin formation. *J Biol Chem*, 1981, 256(14): 7388-7393.
- [2] Yao ZM, Vance DE. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 1988, 263(6): 2998-3004.
- [3] Exton JH. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1212(1): 26-42.
- [4] Sohlenkamp C, Lopez-Lara IM, Geiger O. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog Lipid Res*, 2003, 42(2): 115-162.
- [5] Minder AC, de Rudder KE, Narberhaus F, et al. Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. *Mol Microbiol*, 2001, 39(5): 1186-1198.
- [6] de Rudder KE, Lopez-Lara IM, Geiger O. Inactivation of the gene for phospholipid N-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: phosphatidylcholine is required for normal growth. *Mol Microbiol*, 2000, 37(4): 763-772.
- [7] Wilderman PJ, Vasil AI, Martin WE, et al. *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. *J Bacteriol*, 2002, 184(17): 4792-4799.
- [8] Comerci DJ, Altabe S, de Mendoza D, et al. *Brucella abortus* synthesizes phosphatidylcholine from choline provided by the host. *J. Bacteriol*, 2006, 188(5): 1929-1934.
- [9] Wessel M, Klusener S, Godeke J, et al. Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* requires phosphatidylcholine in the bacterial membrane. *Mol Microbiol*, 2006, 62(3): 906-915.
- [10] 王行国, 宣文静, 常玲, 等. F15L 和 K207E 突变与 *Borrelia* 螺旋菌磷脂酰胆碱合成酶的生物活性. 武汉大学学报[*Journal of Wuhan University (science)*], 2005, 51(S2): 233-237.
- [11] Wang X-G, Scagliotti JP, Hu LT. Phospholipid synthesis in *Borrelia burgdorferi*: BB0249 and BB0721 encode functional phosphatidylcholine synthase and phosphatidylglycerolphosphate synthase proteins. *Microbiology*, 2004, 150: 391-397.
- [12] Marsh P. ptac-85, an *E. coli* vector for expression of non-fusion proteins. *Nucleic Acids Res*, 1986, 14: 3603.
- [13] Nossal NG, Heppel LA. The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *Biol. Chem*, 1966, 241: 3055-3062.
- [14] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of pro-

- tein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [15] Naomi ZYK. Simple photometric assay of  $\beta$ -lactamase activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1972, 2: 356–359.
- [16] Sutcliffe JG. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75: 3737–3741.
- [17] Koshland D, and Botstein D. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell*, 1980, 20: 749–760.
- [18] Lee VT, Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes and Development*, 2001, 15: 1725–1752.
- [19] Pohlschroder M, Hartmann E, Hand NJ, et al. Diversity and Evolution of protein translocation. *Annu. Rev. Microbiol*, 2005, 59: 91–111.
- [20] Mikhaleva NI, Golovastov VV, Zolov SN, et al. Depletion of phosphatidylethanolamine affects secretion of *Escherichia coli* alkaline phosphatase and its transcriptional expression. *FEBS Lett*, 2001, 493(2-3): 85–90.
- [21] Anisimova EA, Badyakina AO, Vasileva NV, et al. Changes in the composition of anionic membrane phospholipids influence protein secretion and cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2005, 74: 179–184.

## Incorporation of phosphatidylcholine into *Escherichia coli* membrane affects secretion of penicillin $\beta$ -lactamase

Xueli Cai, Yang Li, Wenjing Xuan, Xinguo Wang\*

(Faculty of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** [Objective] To study the biological function of phosphatidylcholine in bacteria, the bacterial *pcs* gene was inserted into pTac85 plasmid. Then *E. coli* Top10 *pcs* was constructed via the transformation of the recombinant plasmid. Phosphatidylcholine (30%) in total phospholipids was achieved when the bacterial cells were incubated in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 1% choline and induced by 0.5 mmol/L isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) for 4–8 hours at 37 °C. [Methods] Ampicillin inhibition of *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> was tested at first, and then  $\beta$ -lactamase activity in periplasm was examined. Finally Western blot was used to detect the amount of  $\beta$ -lactamase in both bacterial periplasm and cytoplasm. [Results] Antibiotic tests showed that high concentrations of ampicillin inhibited the growth of *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> with an IC<sub>50</sub> of 70–800  $\mu$ g/mL. Active assays revealed that the  $\beta$ -lactamase activity in periplasm was only 1/5 of that for the control strain *E. coli* Top10/p<sup>tac</sup>85. Western blotting confirmed that the low activity of  $\beta$ -lactamase in *E. coli* Top10 *pcs*<sup>+</sup> resulted from a lower amount of  $\beta$ -lactamase in its periplasm. [Conclusion] Our results demonstrated that the phosphatidylcholine incorporated into bacterial membrane retarded secretion of *Escherichia coli* penicillin  $\beta$ -lactamase from cytoplasm into periplasm, which suggested that phosphatidylcholine might play a role in the regulation of protein secretion in those bacteria able to synthesize phosphatidylcholine.

**Keywords:** Phosphatidylcholine;  $\beta$ -lactamase; protein secretion; Ampicillin

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570009) and the Emphasis Foundation of Hubei University (080-095152)

\*Corresponding author. Tel: +86-27-88661237-8066; Email: xgw569@hotmail.com

Received: 11 September 2007/ Revised: 1 November 2007