

外源蛋白 (BglS) 在大肠杆菌中的合成、定域和加工*

江 红 陈永青 宋大新 杨 帆

(复旦大学微生物学及微生物工程系, 上海 200433)

提 要

B. subtilis 中编码 β -1,3-1,4 葡聚糖酶的基因 *bglS*, 它的产物在 *E. coli* 中的合成受宿主, 载体和基因片段插入方向的影响。从 *E. coli* 细胞中 BglS 蛋白质定域分析和 SDS-PAGE 中活性酶分子检测发现存在着 32 kD 和 27 kD 两种活性酶分子, 酶分子在周质空间很少停留。这种不同的活性酶分子的出现和分泌特点, 可能与大肠杆菌细胞蛋白质加工和转位的方式有关。

关键词 β -1,3-1,4 葡聚糖酶 (BglS), 外源蛋白, 定域, 加工

大肠杆菌是基因工程中常用的表达系统, 人们期待着有更多的外源蛋白 (foreign proteins) 或称重组蛋白 (recombinant proteins) 能从这些工程菌中大量地合成, 并有效地形成工业化生产。但是, 这个表达系统目前仍面临一些问题: 如外源蛋白不正确折叠, 易生成包含体 (inclusion bodies), 易被降解等。要克服这些弊病需要深入地研究外源蛋白在大肠杆菌中的合成, 定域 (localization) 和加工 (processing) 等基本的规律。有关这方面的综述评论已有报道^[1,2]。本文叙述 *B. subtilis* 中编码 β -1,3-1,4 葡聚糖酶的基因 *bglS* 在大肠杆菌中表达及产物分泌加工的研究, 并对蛋白质跨膜和转位状态 (translocation competence) 等进行了讨论。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *B. subtilis* 1.88 为 *bglS* 基因供体菌, *E. coli* JM 101 为质粒转化受体菌, 基因载体 pUC 19, pBR 325, pIN-III-ompA3, 以上菌株和质粒均为本室保存。

1.1.2 培养基 LB 培养基若需补充抗生

素, 氯霉素和氨苄青霉素分别为 25 μ g/ml 和 50 μ g/ml。

1.2 方法

1.2.1 质粒抽提, 转化, 酶切及片段制备^[3]

1.2.2 枯草杆菌染色体 DNA 制备^[4]

1.2.3 生物素标记的分子杂交^[5]

1.2.4 β -1,3-1,4 葡聚糖酶活性测定 参照文献^[6], 酶活单位定义为在 37°C 和 pH 7.0 条件下每分钟催化分解大麦 β -葡聚糖 (Sigma 公司) 产生 1 μ mol 还原糖 (以葡萄糖为参比) 的酶量为一个酶活力单位, 反应体系底物浓度为 2mg/ml。

1.2.5 大肠杆菌细胞各区域酶液制备^[7]

1.2.6 活性酶分子区带检测 参照文献^[8]方法改进, 在含 SDS 的聚丙烯酰胺凝胶电泳前样品用处理液 100°C 加热 5min。分离胶 10% 含 0.12% 地衣多糖 (酶专一性作用底物) 及 10 μ g/ml 小牛血清白蛋白, 浓缩胶 4.5%。蛋白质在变性条件下电泳完毕, 取下胶于室温用 10 倍胶体积的 0.04mol/L Tris-HCl pH7.0 缓冲液振荡洗涤 3 次, 每次 30min。胶置于 37°C

* 本文属“七五”攻关项目研究课题。

收稿日期: 1991-07-24

修回日期: 1991-12-05

0.04mol/L Tris-HCl pH 7.0 的缓冲液中进行酶反应后(时间视酶活大小而定,一般10—15 h),用0.1% (W/V) 刚果红染色,即可在红色背景上见到透明的区带。

2 结 果

2.1 β -1,3-1,4 葡聚糖酶在 *E. coli* 中的合成与性质

2.1.1 BglS 的来源

BglS 是枯草杆菌 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶基因 (*bglS*) 的产物。将 pFG1^[6] 中含 *bglS* 的 2.7 kb EcoRI 片段与 pUC 19 连接, 构建成 pCSH102 与 pCSH103 杂种质粒, 两者的片段插入方向相反, 另外经 PstI 与 EcoRI 双酶切得到的 1.5 kb *bglS* 片段与 pUC 19 又组建成 pCSA201, 分别转化 *E. coli* JM101, 均表达出 β -1,3-1,4 葡聚糖酶活性。再将 2.7kb *bglS* 片段插入 pIN-III-ompA 分泌载体下游, 获得 *bglS* 基因在 *E. coli* 中得到表达的杂种质粒 pIN-III-ompA-*bglS*。用 DEAE 滤膜插片胶

中制备 2.7kb *bglS* 片段, 用生物素标记方法进行分子杂交(图 1), 证实 BglS 是来自 *B. subtilis* 的。

2.1.2 *bglS* 基因产物在 *E. coli* 中的合成与性质 带有 *bglS* 基因的 7.1kb 片段插入 pBR325 得到的 pFG1, 转化 *E. coli* JM 101 后合成的 β -葡聚糖酶水平较低, 37℃, 振荡培养 24 h, 胞外酶活性仅 1.1×10^{-2} U/ml。而含 *bglS* 基因片段缩小到 2.7 kb 并与 pUC 19 连接而成的 pCSH102, pCSH103 表达的酶活性均较 *E. coli* JM101/pFG1 高得多, 当再次缩短到 1.5kb 时, 与 *E. coli* JM101/pCSH 102, JM101/pCSH103 相差不多。而 2.7kb *bglS* 基因插入 pIN-III-ompA 信号肽下游, 在诱导情况下, 其酶活性是 pCSH 102 的 5 倍, 是 pCSA 201 的 2 倍(表 1)。

表 1 带有不同质粒的 *E. coli* JM101 中 β -1,3-1,4-葡聚糖酶活性的表达水平

Table 1 Expression Levels of β -1,3-1,4-glucanase activity in *E. coli* JM101 Containing various plasmid

质 粒 Plasmid	β -葡聚糖酶活性 β -glucanase activity(U/ml)	插入片段 Insert fragment (kb)
pBR325	0	
pIN-III-ompA3	0	
pUC19	0	
pFG1	1.1×10^{-2}	7.1
pCSH102	0.217	2.7
pCSH103	0.638	2.7
pCSA201	0.400	1.5
pIN-III-ompA- <i>bglS</i>	0.981	2.7

从表 1 可见各种杂种质粒表达的 *bglS* 基因产物水平都不同, 插入方向, 片段长度及载体都是影响因素。

2.2 BglS 在 *E. coli* 细胞中的定域

2.2.1 不同宿主对 *bglS* 基因表达及产物分布的影响 为研究不同宿主对表达及产物分布的影响, 我们选择了 3 种宿主 JM 101, CJ 236, HB 101, 对 pCSH 103 中 *bglS* 产物合成及分布作了分析(表 2), (表 2 中测酶样品是在细菌里生长 8h 的培养物)。

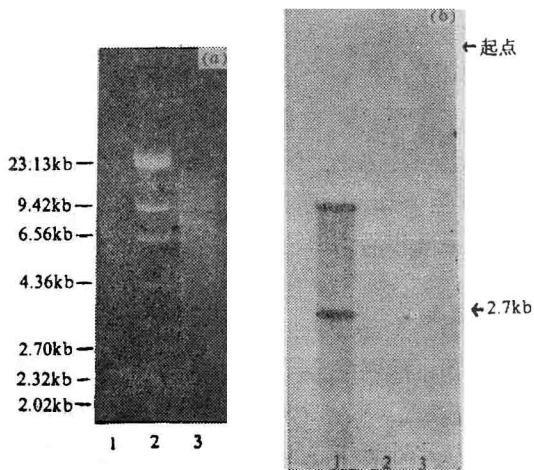


图 1 DNA 印迹分析

Fig. 1 Southern blot analysis

(a) 1.0% 琼脂糖电泳

1.0% agarose gel

(b) 以生物素标记的 2.7kb *bglS* 基因为探针的 DNA 印迹转移

Southern transfer probed by Biotin-2.7kb *bglS* gene

1: pCSH14 EcoRI 2: λ DNA HindIII 3: *B. subtilis* genomic DNA EcoRI

表 2 pCSH103 在 *E. coli* 不同宿主中 β -1,3-1,4-葡聚糖酶水平及细胞中的定域

Table 2 Levels of β -1,3-1,4-glucanase activity and its cellular localization in different *E. coli* hosts containing pCSH 103

宿主 Host <i>E. coli</i>	β -葡聚糖酶活性 β -glucanase activity (%)			总酶量 Total enzyme (U/ml)
	胞外 extracellular	周质空间 periplasmic	胞内 intracellular	
CJ236	56.5	1.1	42.3	8.3×10^{-1}
JM101	58.0	0.0	42.0	6.95×10^{-1}
HB101	72.7	7.3	20.0	2.54×10^{-1}

从表 2 可见, 宿主对酶分布, 表达均有影响。在宿主 CJ 236 中很低, 仅为 JM 101 的 1.2%, HB101 中酶产量也较低, 仅为 JM101 的 3.7%。虽宿主不同, 但 BglS 均可输出到胞外, 在宿主 CJ236, JM101 约为 57%, 而在宿主 HB 101 中为 72%。但是, 都有一个明显的特点即 BglS 蛋白停留在周质空间的量均占很小的比例。

2.2.2 *bglS* 基因片段插入方向对表达及产物分布的影响 2.7kb *bglS* 基因在 pUC19 上有两个插入方向, 构成两种杂种质粒 pCSH 102, pCSH103。插入方向对酶表达量有影响, 培养 48h, pCSH 103 表达量是 pCSH 102 的 3 倍, 前者分泌到胞外的比例也较高, 培养 6h, JM101/pCSH103 有 27% 分泌到胞外, JM101/pCSH 102 则为 23%。培养 10 h, 则分别为 71% 和 35%。由此可见片段插入方向会影响酶的量 and 分布 2.7 kb 已含 *bglS* 自己的启动子, 只是插入方向不同会受载体的影响。

2.3 BglS 在大肠杆菌中的加工

有一系列的酶包括淀粉酶, 脱氢酶等均可在含十二烷基硫酸钠 (SDS) 的聚丙烯酰胺凝胶中经电泳后移去 SDS, 可直接在含底物的胶中进行酶反应, 通过产物染色或未反应底物染色就可直接在聚丙烯酰胺凝胶上测出活性酶分子区带。利用类似方法, 我们将 β -1,3-1,4-葡聚糖酶样品经含地衣多糖的凝胶电泳分离, 振荡洗脱 SDS 后, 酶蛋白活性复性后反应一定

时间, 用 0.1% 刚果红染色即可在红色背景上看见透明的酶区带。从区带可见 *B. subtilis* 1.88 仅存在一种有活性的酶分子, 而在大肠杆菌中则存在两种活性分子, 其中一种与基因供体菌大小相同为 32 kD, 另一种则分子量为 27 kD (图 2)。含 *bglS* 基因的各种杂种质粒如 pCSH 103, pCSA 201, pIN-III-ompA-*bglS* 在大肠杆菌中均如此, 这种现象首先在胞外酶电泳时发现。从透明带粗细看大肠杆菌中大部分酶分子为 27kD, 只较少一部分为 32kD, 说明 *bglS* 基因产物在大肠杆菌中加工情况与 *B. subtilis* 1.88 有所不同, 除被信号肽酶加工外, 还存在着另一次加工即切掉了 5kD 小肽。这切去 5kD 小肽的加工发生在大肠杆菌的细胞质中, 因为在细胞内同样存在 27kD 的酶分子。

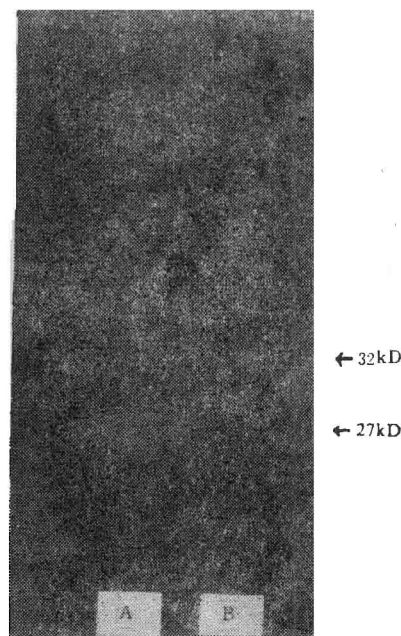


图 2 SDS-PAGE 上的胞外酶

Fig. 2 SDS-PAGE of exocellular enzyme

A: *E. coli* JM101/pCSA201 B: *B. subtilis* 1.88

3 讨 论

3.1 从芽孢杆菌中分离出降解 β -1,3-1,4 混合键连接而成的葡聚糖的酶以及编码这种酶的基因产物在大肠杆菌中的合成已有报道^[9,10], 但各有不同。我们从 *B. subtilis* 1.88 中克隆

到的 *bglS* 基因在 *E. coli* 表达出的产物,发现它除了有与出发菌株相同的被信号肽酶加工后的成熟蛋白以外,还有一个小分子活性蛋白,二者相差 5kD。根据蛋白质在细胞中定域分析,大肠杆菌合成这种外源蛋白后,均有相当部分通过细胞质膜直接分泌到胞外,也有不少依然留在胞内,但停留在周质空间的一般在 5% 以下。细胞内与细胞外 27kD 分子的存在很可能是蛋白酶水解 32kD 分子形成的。Amey Lo 等^[1]也曾报道,一种枯草杆菌的 β -1,4-葡聚糖酶在 *E. coli* 中表达,不仅存在去除信号肽的 52.2 kD 分子还有被蛋白酶切后的 35.8 kD 分子。而在供体菌中加工情况更为复杂,不仅存在 52.2kD 还有 35.6,35.2,34.0,32.0kD 分子,在我们的出发菌株中尚未发现这种情况。

3.2 我们研究中发现细胞质中存在这么多的加工后成熟分子,是否说明加工后,蛋白质在跨膜时发生了停滞,促使一部分成熟蛋白滞留胞内,但是根据蛋白输出内膜与合成偶联的观点分析,新生多肽合成一部分后,信号肽酶即在内膜上切除N端信号肽,蛋白质随即跨膜而合成还在继续,待合成完毕在周质或内膜上折叠成天然状态。一些大肠杆菌蛋白质,仅在多肽未折叠成天然状态时才可顺利输出,若已在胞质形成天然折叠态则不被输出内膜。 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的情况可能就是这样即一部分新生肽未折叠,切除信号序列后,处于开放式构型(open conformation)的转位状态(translocation competence)可正确跨过内膜,另一部分可能在切除信号序列时已经部分折叠并呈现非

转位状态,因而不能跨内膜,则停留在胞质。这种现象的存在也可能是蛋白质合成速度太快以至切除信号肽后蛋白质来不及跨膜,就已正确折叠成成熟分子,即蛋白质跨膜是受速度限制的。再一种可能是 β -葡聚糖酶被另一种不同的信号肽酶剪切。大肠杆菌存在另外两种信号肽酶,其中一种剪切脂蛋白的信号肽,在切点后需要一个甘油酯修饰的 Cys 残基^[2],但从已报道的 β -葡聚糖酶序列中并不存在这一修饰残基。可在体外正确加工麦芽糖结合蛋白质的第三种信号肽酶^[3]已找到,只是它在细胞中的定位及在正常输出途径中的功能未搞清,因此我们在胞内发现成熟蛋白质的存在仍是个谜。

参 考 文 献

- 1 Shatzman A R. *Current Opinion in Biotechnology*, 1990; 1:5
- 2 陈永青,刘坚. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16(1): 36
- 3 彭秀玲,袁汉英. 基因工程实验技术. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1987:1—142
- 4 宋大新,张胜妹,黄兴奇. 复旦学报(自然科学版), 1989; 28(4):386
- 5 何笑松,生物工程学报, 1986;2:1
- 6 Borriess R, Baumlein H, Hofemeister J. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985; 22:63
- 7 Cornelius P et al. *Mol Gen Genet*, 1982;186:507
- 8 Beguin P. *Anal Biochem*, 1983; 131: 333
- 9 Cantwell B A, McConnell D J. *Gene*, 1983;23:211
- 10 Avelino Bueno, Carlos R, Vazquez De Aldana et al. *J Bacteriol*, 1990; 172: 2160
- 11 Amey Lo, Ron M, Mackay V et al. *Appl Environ Microbiol*, 1988; 54: 2287
- 12 Inouye S, Hsu C-P S, Itakura K et al. *Science*, 1983; 221: 59
- 13 Ray P,Dev I, McGregor C et al. *Curr Topics Microbiol Immunol*, 1986; 125: 75

THE SYNTHESIS, LOCALIZATION AND PROCESSING OF FOREIGN PROTEIN (BgLS) IN *ESCHERICHIA COLI*

Jiang Hong, Chen Yongqing, Song Daxin, Yang Fan

(Department of Microbiology and Microbial Technology, Fudan University, Shanghai 200433)

ABSTRACT

A β -1,3-1,4-glucanase is encoded by *bglS* gene from *B. subtilis*. The synthesis of the

gene product BglS in *E. coli* is affected by various hosts, different vectors and orientation of the gene fragment.

By protein localization analysis and zymogram analysis of active enzyme molecules, we have found that the enzyme has two active molecules (32 kD and 27 kD) in *E. coli* and the amount of the enzyme in the periplasmic space is very small. The presence of different active products and the specificity of secretion pattern in *E. coli* may be due to the difference between *E. coli* and *B. subtilis* in the protein processing and translocation.

Key words β -1,3-1,4-glucanase, foreign protein, translocation, processing

活性氧对巨噬细胞呼吸爆发影响及云芝多糖的保护作用*

李 军 周 玫 陈 媛

(第一军医大学脂质过氧化损伤研究组, 广州 510515)

提 要

用化学发光法观察到叔丁基氢过氧化物对培养的小鼠腹腔巨噬细胞呼吸爆发有强烈的抑制作用。云芝多糖经腹腔注射后,能增强巨噬细胞呼吸爆发功能对叔丁基氢过氧化物损伤的抵抗力。云芝多糖处理的巨噬细胞谷胱甘肽过氧化物酶基础活力显著提高,在叔丁基氢过氧化物作用下,云芝多糖处理的巨噬细胞仍有较高的谷胱甘肽过氧化物酶活力。说明巨噬细胞的免疫功能与谷胱甘肽过氧化物酶活力有关,非特异性免疫多糖可提高细胞抗氧化能力,减轻活性氧损伤作用。

关键词 呼吸爆发,叔丁基氢过氧化物,谷胱甘肽过氧化物酶

免疫刺激剂云芝多糖 (polysaccharide, PSK) 是从云芝菌丝体 (*Coriolus versicolor*) 里提取的一种蛋白多糖。能提高巨噬细胞的免疫功能及恢复带瘤宿主的免疫功能^[1]。但活性氧介导的脂质过氧化对巨噬细胞免疫功能损伤与 PSK 抗脂质过氧化保护作用尚未见报道。因此,为阐明活性氧及巨噬细胞免疫功能损伤及探讨 PSK 的抗损伤作用,我们以叔丁基氢过氧化物 (tert-butylhydroperoxide) 作为膜脂质过氧化损伤的引发剂,采用化学发光 (chemiluminescence, CL) 法研究了活性氧对巨噬细胞呼吸爆发功能的影响和 PSK 的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 试剂 luminol 购自 Merck 公司;

tert-butylhydroperoxide (tbOOH), PMA, glutathione reductase (type III), NADPH (type I) 均购自 Sigma 公司; reduced glutathione 购自 B. D. H 公司; PSK 由本校营养研究室惠赠。

1.2 腹腔巨噬细胞分离及培养 选取五周龄 NIH 雄性小鼠,每日腹腔注射 1.5% PSK 0.2ml, 连续 1 天、3 天或 9 天,对照组给予等量生理盐水,于停止注射第 3 天乙醚麻醉小鼠,用 RPMI-1640 液冲洗腹腔收集巨噬细胞。细胞用 RPMI-1640 10% 灭活牛血清培养,于 37℃ 孵育第 12h 更换含一定浓度的 tbOOH 全培养基。各指标以蛋白质含量或显微镜下细胞数表示,蛋白质含量按 Lowry^[2] 等方法测定。

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-07-31 修回日期: 1991-10-31。