

李晓丹,夏冰,汪仁. 重组酿酒酵母磷酸胆碱胞苷转移酶(CCT 酶)基因的工程菌稳定性研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):49-50,69.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.014

# 重组酿酒酵母磷酸胆碱胞苷转移酶(CCT 酶)基因的工程菌稳定性研究

李晓丹,夏冰,汪仁

(江苏省中国科学院植物研究所,江苏南京 210014)

**摘要:**为了进一步研究基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-29a-cct 在培养基中传代 50 次过程中菌种的稳定性,通过将菌体和菌落的形态、质粒的稳定性、质粒酶切图谱和重组 CCT 酶的表达量及活性作为指标进行考察,来评价该工程菌的稳定性。结果显示,重组 CCT 酶基因的工程菌在转接 50 次的过程中质粒稳定性高,其保有率为 90%,表达产物可达发酵液总蛋白的 15% 以上。该菌在第 50 代后仍具有转化活性,说明工程菌转化活性稳定。

**关键词:**磷酸胆碱胞苷转移酶(CCT 酶);质粒稳定性;工程菌稳定性;转化活性

**中图分类号:** Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0049-02

大肠杆菌遗传背景清楚,生长迅速,发酵周期短,是基因工程的主要受体菌,已得到广泛应用。然而,克隆有外源基因的重组质粒转化到大肠杆菌细胞之后,会产生一系列的负面生理效应,从而影响其稳定性。外源基因表达后,增加了细胞的代谢负担,质粒稳定性会下降<sup>[1]</sup>。一般来说,丢失质粒的细胞往往比含有质粒的细胞具有更高的生长速率<sup>[2]</sup>。基因工程菌的质粒不稳定现象在生产实践中普遍存在,这导致对它的应用受到一定的限制。通常质粒稳定性的高低是影响发酵产量的重要因素,质粒丢失会导致所表达的蛋白产量下降,进而影响发酵产物的收率,还可能造成较大的经济损失。

磷酸胆碱胞苷转移酶(CCT 酶)可直接催化胞苷三磷酸(CTP)和磷酸胆碱合成胞二磷胆碱。在之前的研究中,本课题组已克隆到酿酒酵母磷酸胆碱胞苷转移酶基因(*cct*)并插入表达载体 pET29a(+)中,成功构建了重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-29a-cct,获得了具有催化活性的工程菌株<sup>[3]</sup>。该工程菌株具有较好的工业应用前景,为确保生产中菌种的稳定性,进一步对该重组工程菌的稳定性进行研究具有相当重要的实际意义。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料和培养基

重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-29a-cct 由江苏省中国科学院植物研究所分子实验室构建。除发酵培养基外,使用的皆为 LB 培养基,发酵培养基配方:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 24.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.9 g, NaCl 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0 g, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, 酵母粉 5.0 g, 蛋白胨 5.0 g, pH 值调至 7.2, 121 ℃ 灭菌

20 min。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌种的传代** 将保存于 -80 ℃ 冰箱中的原始菌株大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-29a-cct 划线于含卡那霉素(50 μg/mL)的 LB 固体培养基上,再挑取单菌落接种于液体培养基中,37 ℃ 振荡过夜。按 1% 接种量将过夜培养物转接于不含抗生素的 LB 液体培养基中,37 ℃ 培养 12 h,每转接 1 次计传代 1 次,共转接 50 次。分别取第 10、20、30、40、50 次的转接培养物 500 μL,加入甘油(终浓度为 30%),保存于 -80 ℃ 冰箱中,备用。

**1.2.2 工程菌形态的观察** 取样后菌体用生理盐水洗涤 3 次后,再用少量的生理盐水悬浮。制片并进行革兰氏染色,于光学显微镜下观察。

**1.2.3 平板稀释计数法** 将连续摇瓶培养试验转接的第 10、20、30、40、50 代取样进行平板稀释检测质粒的缺失程度。检测时,取菌液 1 mL 用无菌水逐级稀释,取 3 个合适的梯度,分别涂在固体选择性培养基和非选择性培养基平板上,每个处理 3 次重复。倒置在 37 ℃ 培养箱中培养过夜,计算培养皿中的菌落数,根据选择性培养基中的菌落数与非选择性培养基中菌落数的比值,即可计算出质粒的缺失率。

**1.2.4 质粒酶切图谱的鉴定** 采用碱裂解方法从第 10、20、30、40、50 代菌体中提取质粒,0.75% 琼脂糖凝胶电泳检测。为确定 CCT 酶编码基因的稳定性,进一步将各代菌所提质粒用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.5 重组 CCT 酶的表达稳定性及酶活鉴定** 取 0、10、20、30、40、50 代菌种,分别接种于液体 LB 培养基中,37 ℃ 振荡过夜培养,转接于新鲜的发酵培养基中,37 ℃ 培养 3~5 h,加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L) 30 ℃ 诱导表达 10 h,取 1 mL 菌液,于 12 000 r/min 离心 2 min,收集菌体并重悬于 500 μL 1×SDS 加样缓冲液,沸水浴中煮沸 10 min 以充分裂解细胞,12 000 r/min 室温离心 10 min,使细胞碎片及 DNA 等沉淀,取适量溶液上样,SDS-PAGE 分析。粗酶液制备及酶活测定方

收稿日期:2015-01-19

基金项目:江苏省科技支撑计划-社会发展(编号:BE2012751)。

作者简介:李晓丹(1981—),女,江苏南京人,硕士,助理研究员,研究方向为微生物学。E-mail: molecularlab@163.com。

通信作者:汪仁,博士,副研究员,研究方向为分子生物学。E-mail: jswangren@aliyun.com。

法参考文献[3]。

2 结果与分析

2.1 工程菌形态

将取样的各代菌体进行革兰氏染色,光学显微镜下可见形态均匀一致的革兰氏阴性短杆菌,划线培养未见杂菌生长,菌体和菌落的形态均正常。

2.2 种子液选择压力对质粒稳定性的影响

通过添加抗生素可选择性使得只有那些保留相应质粒的细胞才能够生长,采取施加选择压力可以用来消除重组质粒的分配性不稳定。在种子培养基中分别添加终浓度为 0、10、20、50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素,37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 24 h 后,采用平板稀释计数法考察工程菌质粒的缺失情况,结果见表 1。

表 1 种子液中卡那霉素浓度对质粒稳定性的影响		
卡那霉素浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$D_{600\text{ nm}}$	质粒保有率 (%)
0	5.6	89.2
10	5.4	95.5
20	5.5	100.0
50	5.4	100.0

从表 1 中可以看出,当种子培养基中没有添加抗生素时,质粒有一定程度的丢失,当卡那霉素浓度大于 20  $\mu\text{g/mL}$  时,质粒保有率为 100%。

2.3 重组质粒的稳定性

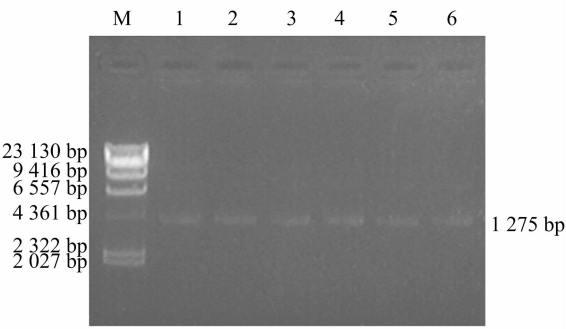
在无选择压力的培养条件下,若重组菌丢失质粒,由于其没有额外的代谢负担,随着传代次数的增加最终可取代带有质粒的工程菌,从而导致发酵失败,因此还需检测在无选择压力的培养基中工程菌中重组质粒的稳定性。

试验结果表明,经传代 10 次后,工程菌中的质粒保有率为 100%,20 代后工程菌中质粒的保有率开始下降,第 20 代为 98%,第 30 代为 95%,第 40 代为 92%,50 代后的菌种质粒保有率仍保持 90%,表明工程菌在未加抗生素的培养基中传代,重组质粒仍可以在工程菌中稳定存在。

由图 1 可以看出,工程菌在传代 50 次后仍带有质粒,说明重组质粒在工程菌中稳定性较好。为确定 CCT 酶编码基因在反复传代后的稳定性,将从各代菌体中提取的质粒用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后,上样,用 0.75% 琼脂糖凝胶电泳。由于原始质粒 pET-29a-*cct* 上 CCT 酶的编码基因为 1 275 bp,质粒 pET29a(+) 全长位 5 371 bp,从图 2 可见,在 1.3 kb 和 5.3 kb 处各有 1 个条带,这与理论值相符。质粒电泳和酶切验证的结果表明:经传代后的工程菌保留了原重组质粒,质粒骨架与重组基因的大小均未发生改变,说明工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-29a-*cct* 人工传代 50 次后,质粒仍稳定存在。

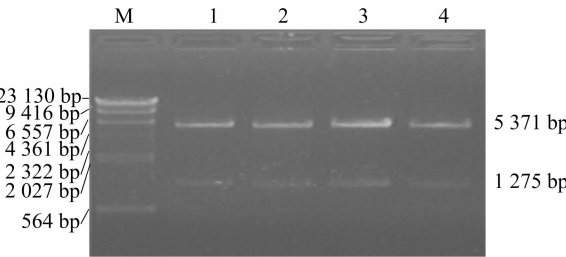
2.4 CCT 酶的表达及活性稳定性

电泳的结果(图 3)显示,在 50 ku 附近有 1 条带,和 CCT 酶分子量理论值相符合,各代之间无明显差异。电泳结果表明,工程菌在传代 50 次的过程中,CCT 酶的表达稳定,CCT 酶的表达量占发酵液中总蛋白的 15% 以上。酶活检测显示工程菌粗酶液在第 50 代后仍具有活性,酶活为 0.04 U/mL,说明该工程菌的 CCT 酶活性稳定。



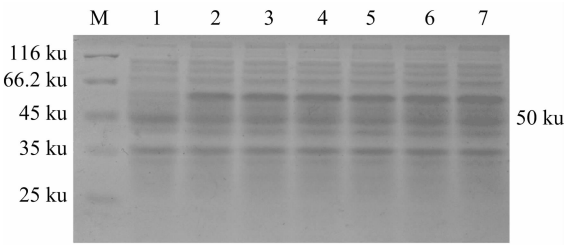
M—marker; 1—0 代工程菌提取的质粒条带; 2~6—10~50 代工程菌提取的质粒条带

图 1 各代工程菌质粒琼脂糖凝胶电泳图



M—marker; 1—0 代工程菌提取质粒双酶切条带; 2、3、4 分别为 10、30、50 代工程菌提取质粒双酶切条带

图 2 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图



M—蛋白质 marker; 1—未诱导对照; 2 至 7 分别为 0、10、20、30、40、50 各代工程菌全蛋白

图 3 各代工程菌全蛋白 SDS-PAGE 电泳图

3 讨论

在本实验室成功构建获得了具有磷酸胆碱胞苷转移酶催化活性的基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-29a-*cct* 后,为进一步了解该工程菌的稳定性,本研究通过多次传代来考察该工程菌中重组质粒的稳定性,同时鉴定了该工程菌在反复传代后外源蛋白的表达及其活性的稳定性。

质粒的不稳定性可分为 2 种——结构不稳定性和分裂不稳定性。在本研究采用的试验方法和条件下,该基因工程菌在连续传代 50 次后,提取质粒酶切验证后证明外源基因片断没有丢失,说明该质粒具有结构稳定性;但是在无抗生素选择压力的培养条件下,传代 20 代后开始出现质粒丢失的细胞,连续传代 50 次后,约有 90% 的细胞含有正常质粒,该基因工程菌表现出一定的分裂不稳定性。为了保证该基因工程菌的正常生长及 CCT 酶的表达,在种子液中添加卡那霉素可以在一定程度上保证该基因工程菌的稳定性。因此该基因工程菌在质粒稳定性方面满足工业化生产的要求,可以应用于扩大生产。

表 4 因素互作对玉米产量的影响效应

施磷水平 ( $X_1$ )	不同施钾量下的玉米产量					不同施氮水平量下的玉米产量				
	2	1	0	-1	-2	2	1	0	-1	-2
-2	6 824.10	9 617.55	11 529.45	12 559.65	12 708.30	9 561.15	10 545.30	11 529.45	12 513.60	13 497.90
-1	8 283.90	10 483.95	11 802.30	12 239.10	11 794.20	10 818.15	11 310.30	11 802.30	12 294.45	12 786.60
0	9 743.850	11 350.35	12 075.30	11 918.55	10 880.10	12 075.30	12 075.30	12 075.30	12 075.30	12 075.30
1	11 203.80	12 216.75	12 348.15	11 598.00	9 966.00	13 332.45	12 840.30	12 348.15	11 856.15	11 364.00
2	12 663.60	13 083.15	12 621.15	11 277.30	9 052.05	14 589.45	13 605.30	12 621.15	11 636.85	10 652.70

施钾水平 ( $X_2$ )	不同密度水平下的玉米产量				
	2	1	0	-1	-2
-2	13 533.90	11 939.85	10 880.10	10 354.80	10 363.95
-1	13 462.50	12 423.30	11 918.55	11 948.10	12 512.10
0	12 509.55	12 025.20	12 075.30	12 659.70	13 778.55
1	10 674.90	10 745.40	11 350.35	12 489.75	14 163.45
2	7 958.55	8 584.05	9 743.85	11 438.10	13 666.65

16 072.35 kg/hm<sup>2</sup>, N、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、K<sub>2</sub>O 的最佳比例为 1.00 : 0.20 : 0.33。综合得出的最佳施肥量是适合该区域玉米生态系统的推荐施肥量<sup>[3]</sup>。

3 结论与讨论

本试验所建立的效应模型拟合性较好,比较综合地反映了施磷量、施钾量、密度、施氮量 4 项栽培措施对玉米产量的影响效应;4 项栽培措施对玉米产量的影响效应从大到小依次为密度>施磷量>施钾量>施氮量,说明玉米的栽培密度对产量影响效应最大,在玉米栽培中可作参考。本试验结果表明,在单因素情况下,密度( $X_3$ )对玉米产量影响最大,其次是施磷量( $X_1$ )和施钾量( $X_2$ ),施氮量( $X_4$ )对产量的影响不显著。在 2 因素互作的情况下,施磷量和施钾量互作( $X_1X_2$ )、施磷量和施氮量互作( $X_1X_4$ )、施钾量和密度互作( $X_2X_3$ )对产量的影响显著,说明同时增施磷肥、钾肥、氮肥中任意 2 种肥料可以相互促进吸收利用,从而提高肥料的利用率,提高产量。小区试验各处理间产量差异显著,说明不同肥效有本质区别。由回归方程获得最佳施肥量为: N 345 kg/hm<sup>2</sup>、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 67.5 kg/hm<sup>2</sup>、K<sub>2</sub>O112.5 kg/hm<sup>2</sup>、密度 52 500 株/hm<sup>2</sup>,最佳玉米产量是 16 072.35 kg/hm<sup>2</sup>,N、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、K<sub>2</sub>O 最佳比例为 1.00 : 0.20 : 0.33。综合得出的最佳各因素组合是适合该区域玉米生态系统的推荐组合。通过田间试验及数据统计分析获得的施磷量、施钾量、密度、施氮量 4 项栽培措施对玉米产量影响的回归方程,全面分析每个因素及 2 个因

素互作对玉米产量的影响,通过回归方程分析各处理的理论产量与实际产量吻合度较好,可以作为实际生产中的栽培方案。

参考文献:

[1] 丁希泉. 农业应用回归设计[M]. 长春:吉林科学技术出版社, 1986:123-151.

[2] 于培彦. 二次通用旋转组合设计频数分析方法的改进[J]. 西北农业学报,1994,3(4):70-73.

[3] 张 昊,郝春雷,霍剑锋,等. 赤峰地区滴灌条件下玉米最佳施肥效应研究[J]. 作物杂志,2013,11(6):99-103.

[4] 王兴仁,张福锁. 现代肥料试验设计[M]. 北京:中国农业出版社,1996:93-95.

[5] 王兴仁,陈新平,张福锁,等. 施肥模型在我国推荐施肥中的应用[J]. 植物营养与肥科学报,1998,4(1):67-74.

[6] 黄绍文,孙桂芳,金继运,等. 氮、磷和钾营养对优质玉米籽粒产量和营养品质的影响[J]. 植物营养与肥科学报,2004,10(3):225-230.

[7] 武 际,郭熙盛,王文军,等. 磷钾肥配合施用对玉米产量及养分吸收的影响[J]. 玉米科学,2006,14(3):147-150.

[8] 王宜伦,韩燕来,张 许,等. 氮磷钾配比对高产夏玉米产量、养分吸收积累的影响[J]. 玉米科学,2009,17(6):88-92.

[9] 吕泰宗,王月福,王铭伦,等. 氮磷钾配施对花生产量的影响及效应分析研究[J]. 中国农学通报,2013,29(3):136-140.

[10] 金继运,何 萍. 氮钾互作对春玉米生物产量及其组分动态的影响[J]. 玉米科学,1999,7(4):57-60,72.

(上接第 50 页)

基因工程菌产业化应用的最大障碍在于保存及培养过程中表现出的传代不稳定性。试验结果表明,本实验室构建的酵母磷酸胆碱胞苷转移酶工程菌在传代过程中的质粒未发生明显丢失,也未发现质粒结构不稳定,而且传至 50 代次后仍保留重组质粒,并保持原代菌种的卡那霉素抗性、生物催化活性及其他生理特征,表明此工程菌适合于工业化生产。

参考文献:

[1] Tierny Y, Hounsai C G, Hornez J P. Effects of a recombinant gene

product and growth conditions on plasmid stability in pectinolytic *Escherichia coli* cells[J]. Microbios,1999,97(386):39-53.

[2] Yazdani S S, Mukherjee K J. Continuous culture studies on the stability and expression of recombinant streptokinase in *Escherichia coli*; Stability and expression of streptokinase in continuous culture[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering,2002,24(6):341-346.

[3] 李晓丹,夏 冰,汪 仁. 酿酒酵母磷酸胆碱胞苷转移酶基因(*cct*)的克隆表达及活性测定[J]. 药物生物技术,2014,21(2):99-102.