

赵烨清, 石 莉, 欧阳臻, 等. 化学-渗透压法温和破碎处理下大肠杆菌细胞胞内蛋白质的释放率[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(19): 146-149.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.19.032

化学-渗透压法温和破碎处理下大肠杆菌细胞胞内蛋白质的释放率

赵烨清, 石 莉, 欧阳臻, 闻崇炜

(江苏大学药学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 恰当的细胞破碎工艺是获取胞内蛋白质的必需环节, 然而现有细胞破碎技术仍有较多不足。为了研究合适的细胞破碎方法, 拟通过化学法与渗透压法的联用, 建立化学-渗透压法温和高效破碎大肠杆菌细胞的新工艺。结果表明: (1) 单用化学法处理大肠杆菌细胞, 最高仅能释放 37.3% 的胞内蛋白质, 而化学-渗透压法最高可以释放 84.2% 的胞内蛋白质; 对渗透压处理环节进行优化后, 胞内蛋白质释放率提高至 93.1% 及以上; (2) 以优化的化学-渗透压法释放重组原动蛋白 2 β (PK2 β) 工程菌细胞的胞内蛋白质, 其中 70.5% ~ 80.2% 重组 PK2 β 呈可溶性, 而超声法处理的样品中不含有可溶性重组 PK2 β , 表明化学-渗透压法不仅简便高效、成本低廉, 而且有利于保留可溶性重组蛋白质, 而超声破碎法会导致可溶性蛋白发生变性沉淀而增加蛋白质分离的难度。综合分析可知, 化学-渗透压法在基因工程及生物工程中具有良好的应用前景。

关键词: 化学-渗透压法; 细胞破碎; 温和高效; 胞内蛋白质; 可溶性

中图分类号: Q939.97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)19-0146-04

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, 简称 *E. coli*) 是基因工程与生物工程中表达重组蛋白质最常用的宿主菌。重组蛋白质通常被表达在 *E. coli* 胞内, 必须进行细胞破碎后才能进行相应的分离纯化^[1]。现有的细胞破碎方法分为机械法、化学法、物理法及生物酶法四大类, 在实际应用中这些方法仍有较多不足。例如, 机械法破碎效率高, 但是需要高速珠磨机、高压匀浆机等贵重设备, 同时由于发热大, 可能重组蛋白质的生物活性^[2-3]; 化学法简便, 但所用有机溶剂及变性剂也可能影响重组蛋白质的生物活性^[4-5]; 物理法条件温和, 但破碎效率较

低^[6]; 生物酶法条件温和、破碎效率较高, 但碎菌成本较高^[7]。由此可见, 开发温和且具有高破碎效率的简便工艺在基因工程及生物工程中有较高的应用价值。

形态结构学研究表明, *E. coli* 细胞壁是由脂多糖层、磷脂层与肽聚糖层组成的复合结构, 具备较强的抗拉伸与抗剪切能力。渗透压法利用渗透压差破碎细胞, 条件温和, 可以很好地保留蛋白质的生物活性, 但是作用力较弱, 不足以完全破碎 *E. coli* 细胞壁, 目前仅用于释放出周质空间的蛋白质^[8]。本试验拟研究将化学法与渗透压法联用 (本研究均简称为化学-渗透压法), 从而实现既高效彻底破坏 *E. coli* 细胞壁, 又完全释放胞内蛋白质, 同时能保留蛋白质生物活性的可能性。本研究为该法处理 *E. coli* BL21 (DE3)、重组原动蛋白 2 β (PK2 β) 工程菌的试验结果。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli BL21 (DE3) 为笔者所在研究室保存, 重组质粒 pET-28-PK2 β 为笔者所在研究室构建, 按常规方法转化获得相应重组工程菌^[9]。

学报: 理学版, 2013, 51(4): 724-726.

[8] 庄雅玲, 郭月雄, 郭宗甫. 中草药白花水竹草 (*Tradescantia albiflora* Kunth) 降低血液尿酸之功能及抗氧化性研究[C]//中国畜牧兽医学会中兽医分会学术年会. 兰州, 2015.

[9] 林夏斌, 黄华达, 黄怀妹, 等. 白花拟万代兰 (*Vandopsis undulata*) 组培苗的增殖、生根与炼苗[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 56-59.

[10] 杨 涛, 钱 蕾, 吕永桂, 等. 丰花月季低成本组织培养快繁的研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 53-55.

[11] 黎海利, 谭飞理, 刘锴栋, 等. 聚花过路黄的组织培养和快速繁殖[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 51-53.

收稿日期: 2016-05-04

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81573529); 江苏大学高层次人才启动基金 (编号: 1281370001); 江苏省 2015 年度普通高校研究生实践创新计划 (编号: SJLX15_0512); 江苏大学第 14 批大学生科研立项项目 (编号: 14A441)。

作者简介: 赵烨清 (1992—), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事食源性功能肽的研发工作。E-mail: 18796020517@163.com。

通信作者: 闻崇炜, 博士, 副教授, 主要从事食源性功能肽的研发工作。E-mail: wenchw@ujs.edu.cn。

[3] Faden R B. The author and typification of *Tradescantia zebrina* (Commelinaceae)[J]. Kew Bulletin, 2008, 63(4): 679-680.

[4] 王大绍. 曲膝水竹草及水竹草属在我国的传播、危害和防治[C]//第十届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集. 哈尔滨, 2012.

[5] 樊效琪, 徐亚铭, 刘星谱. 水竹草抗肿瘤成分的研究, 中成药, 1992, 14(2): 34-35.

[6] 杨春欣. 水竹草抗心律失常成分的分离及鉴定, 天然产物研究与开发, 1996, 8(3): 17-19.

[7] 汤 峰, 吴静义, 张 剑, 等. 水竹叶的化学成分[J]. 吉林大学

蛋白胨、酵母膏,购自 Oxoid 公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、考马斯亮蓝、卡那霉素、二硫苏糖醇 (DTT),购自 BBI 公司 (Bio Basic Inc.);溴酚蓝,购自 AMRESCO 公司;十二烷基硫酸钠 (SDS) (生物技术级),购自 Merck 公司;丙烯酰胺 (超级纯)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 (超级纯)、乙二胺四乙酸 (EDTA, 分析纯),购自生工生物工程 (上海)股份有限公司;Triton X-100 (化学纯),购自国药集团化学试剂有限公司;三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸、过硫酸铵、N,N,N',N'-四甲基乙二胺、乙醇、冰醋酸等其他试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;琼脂粉 (进口分装),购自中国医药 (集团) 上海化学试剂公司;蛋白分子量标准 Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, 购自 MBI 公司,含有 10、15、25、35、40、50、70、100、140、260 ku 的条带。

1.2 试验方法

1.2.1 大肠杆菌培养和收集 *E. coli* BL21 (DE3) 采用一步法培养:将 *E. coli* BL21 (DE3) 甘油菌冻存液按 1% 比例接种到新鲜 LB 培养基 (含 1% 蛋白胨、0.5% 酵母膏、1% NaCl) 中,37 ℃、250 r/min 过夜培养 15 h。培养液于 10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,菌体保存于 -20 ℃ 备用。

重组 PK 2 β 的 *E. coli* BL21 (DE3) 工程菌采用两步法培养:取 3 μ L 重组工程菌冻存液接种到 3 mL 新鲜 LB 培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素) 中,37 ℃、250 r/min 过夜培养 15 h 获得种子。随后将种子液按照 1% 比例接种到新鲜 LB 培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素) 中,37 ℃、250 r/min 继续培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 达到 0.6 左右,加诱导剂后继续振荡培养 4 h。培养液于 10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,菌体保存于 -20 ℃ 备用。

1.2.2 常规化学-渗透压法 包括化学法预处理、渗透压法 2 个环节,具体操作如下:(1)称取适量冻存 *E. coli* 菌体,按每 30 mg 菌体分别加入 1 mL EDTA 碎菌液或 2.5 mL Triton

X-100 碎菌液,4 ℃ 混匀过夜,然后于 10 000 r/min 离心 5 min,收集菌体备用;(2)取上述化学法预处理所得菌体,按每 30 mg 菌体加 1 mL 高渗液的比例重悬,室温放置 20 min,8 000 r/min 离心 10 min,再按每 30 mg 菌体加 1 mL 低渗液的比例重悬,室温放置 20 min,8 000 r/min 离心 10 min;(3)继续按步骤(2)重复处理残留菌体 2~4 次。分别收集所得上清与沉淀菌体,待分析。

化学预处理液含适量 EDTA 或 Triton X-100, 0.05 mol/L Tris·HCl (pH 值 8.0) 及 0.10 mol/L NaCl。低渗液含 0.02 mol/L Tris·HCl (pH 值 8.0)、0.002 5 mol/L EDTA (pH 值 8.0)。在低渗液中加入 20% 蔗糖作为渗透压稳定剂,即得高渗液。

1.2.3 改进化学-渗透压法 具体操作流程同“1.2.2”节;化学预处理液成分同“1.2.2”节;低渗液成分同“1.2.2”节;高渗液中改用 35% 蔗糖或 20% PEG 8000 为渗透压稳定剂。

1.2.4 超声破碎法 按吴蕾等所述流程^[10-11]并略作修改:取 50 mg 菌体重悬于预冷的低渗液中,冰浴中用超声破碎仪 (购自宁波新芝生物科技股份有限公司) 处理 (功率 300 W, 每次超声破碎 25 s, 暂停 25 s, 超声 20 次)。取适量样品于 13 000 r/min 离心 10 min,分出上清与沉淀,待分析。

1.2.5 蛋白质电泳 按常规方法^[12]进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析,其中浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 10%。电泳结束后凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色,脱色后的凝胶用成像系统拍照保存待分析。

1.2.6 胞内蛋白质释放率计算 样品中蛋白质含量与电泳对应条带及染色后条带深浅呈线性关系,因此可通过分析染色后条带的灰度值计算蛋白质含量^[13]。SDS-PAGE 凝胶图像用 Quantity One™ v 4.5 软件 (购自 Bio-Rad Laboratories Inc.) 进行各条带的灰度值分析定量,按照以下公式计算胞内蛋白质释放率:

$$\text{胞内蛋白质释放率} = \frac{\text{上清蛋白灰度值} \times \text{上清稀释倍数}}{\text{上清蛋白灰度值} \times \text{上清稀释倍数} + \text{沉淀蛋白灰度值} \times \text{沉淀稀释倍数}} \times 100\%。$$

1.2.7 大肠杆菌菌落形成单位 (colony forming unit assay, 简称 CFU) 检测 参照 Sahoo 等所述流程并略作修改:用含有 1.5% 琼脂粉的新鲜 LB 固体培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素) 制备平板,将对照菌液与化学-渗透压法处理所得菌液适当稀释后涂平板,于 37 ℃ 培养箱倒置培养 16 h,取出平板,计算所得菌落数量^[14-15]。

1.2.8 大肠杆菌形态观察 *E. coli* 细胞按邹如意等所述方法^[16]进行固定,用扫描电镜技术 (scanning electron microscope, 简称 SEM) 直接观察 *E. coli* 细胞处理前后的形态,所用仪器为日立公司的 S-4800 型场发射扫描电子显微镜,放大倍数为 2 000 倍。

2 结果与分析

2.1 化学法预处理 *E. coli* 菌体

按“1.2.2”节所述,用 10~30 mmol/L EDTA 与 0.25%~1.25% Triton X-100 预处理 *E. coli* 菌体,结果表明,以上 2 种试剂分别可以释放出 2.42%~11.8% 与 12.5%~37.3% 的胞内蛋白质,25 mmol/L EDTA 与 1.00% Triton X-100 为各组的较优处理 (图 1)。EDTA 与 Triton X-100 分别为温和

的螯合剂与表面活性剂,分别作用于细胞壁中的脂多糖层与磷脂层。由图 1 还可以看出,Triton X-100 的释放率高于 EDTA,可能因为 EDTA 除去脂多糖层后,磷脂层仍保持完整,胞内蛋白质不易透过;而 Triton X-100 除去磷脂层后,脂多糖层有较多间隙,胞内蛋白质较易透过。

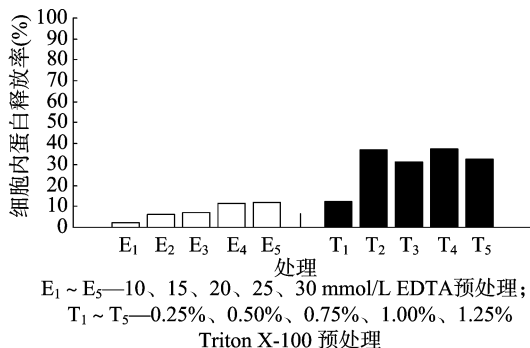


图1 化学法预处理 *E. coli* 菌体结果

2.2 常规化学-渗透压法破碎 *E. coli* 菌体

为了提高胞内蛋白质释放率,将化学法预处理法与常规渗透压法联用,以 20% 蔗糖为渗透压稳定剂,进行 3 次渗透

压法处理。结果表明,化学法预处理提高了后续渗透压法的破碎效率,不仅释放出 *E. coli* 周质空间的蛋白质,而且释放出大量胞内蛋白质。其中,EDTA + 20% 蔗糖处理可释放出 16.9% ~ 35.7% 的胞内蛋白质;Triton X-100 + 20% 蔗糖处理可释放出 37.6% ~ 84.2% 的胞内蛋白质;25 mmol/L EDTA 与 1.00% Triton X-100 分别为各组的较优处理(图 2)。形态结构学研究表明, *E. coli* 细胞具有外膜、内膜的双层膜结构,影响了高渗液与低渗液进入细胞内部,因此单用渗透压法不能完全破碎细胞。而化学法预处理可以使外膜与内膜产生缺陷,有利于随后的高渗液、低渗液迅速进入细胞,细胞来不及发生相应形变而被完全破碎。

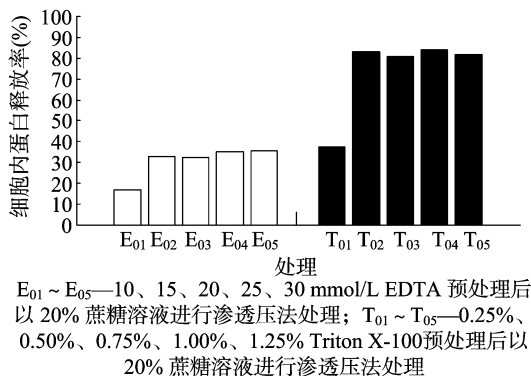


图2 常规渗透压法破碎预处理 *E. coli* 菌体结果

2.3 改进的化学-渗透压法破碎 *E. coli* 菌体

改进渗透压稳定剂与增加处理次数可以提高渗透压法碎菌的效率,因此,分别配制含有 35% 蔗糖、20% PEG 8000、20% PEG 4000 的高渗液进行细胞破碎。如图 3 所示:各高渗液的碎菌效率排序依次为 35% 蔗糖、20% PEG 8000 > 20% PEG 4000 > 20% 蔗糖;5 次渗透压法碎菌效率比 3 次渗透压法高 6.9% ~ 46.7%。

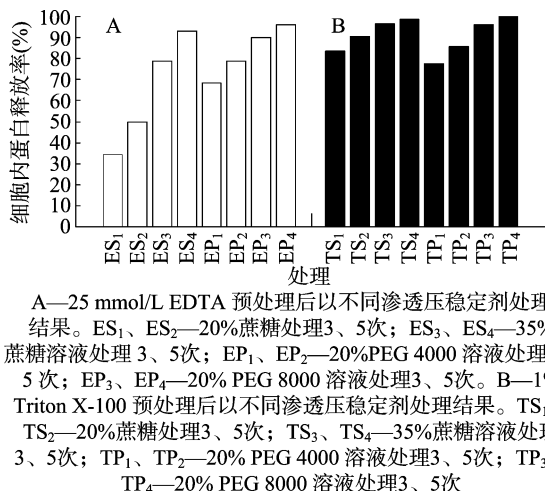


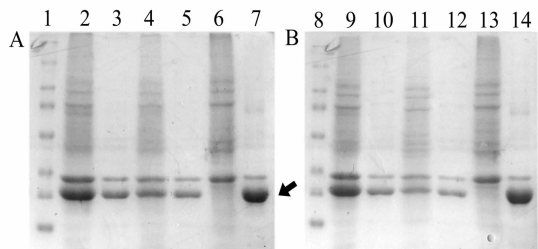
图3 改进的渗透压法破碎预处理 *E. coli* 菌体结果

综上所述,化学-渗透压法的最优条件为 25 mmol/L EDTA 预处理 *E. coli* 菌体,再以 35% 蔗糖或 20% PEG 8000 为渗透压稳定剂进行 5 次渗透压法处理;或以 1% Triton X-100 预处理 *E. coli* 菌体,再以 35% 蔗糖或 20% PEG 8000 为渗透压稳定剂进行 3、5 次渗透压法处理,胞内蛋白质释放率分别可以达到 93.1%、100.0%。

2.4 改进的化学-渗透压法破碎重组 PK2 β 工程菌

以上述改进的化学-渗透压法处理重组 PK2 β 工程菌,对 SDS-PAGE 凝胶进行定量分析表明,25 mmol/L EDTA + 35% 蔗糖、25 mmol/L EDTA + 20% PEG 8000 处理分别可以释放 96.4%、91.3% 的胞内蛋白质;1% Triton X-100 + 35% 蔗糖、1% Triton X-100 + 20% PEG 8000 处理分别可以释放 99.0%、94.3% 的胞内蛋白质;以超声破碎法处理重组工程菌,胞内蛋白质释放率为 92.5%。因此可见,改进的化学-渗透压法的破碎效率与目前常用的超声破碎法相当。

SDS-PAGE 结果还显示,化学-渗透压法破碎工程菌后所得上清及沉淀中均含有重组 PK2 β ,上清中含有的可溶性重组 PK2 β 占总量的 70.5% ~ 80.2%;而在超声破碎法中,处理相同样品后,重组 PK2 β 均在沉淀中,上清中未见可溶性重组 PK2 β (图 4)。由此表明,超声破碎法不仅损伤重组蛋白质^[17],同时会使可溶性重组蛋白质变性沉淀,从而增加后续蛋白质分离的难度。



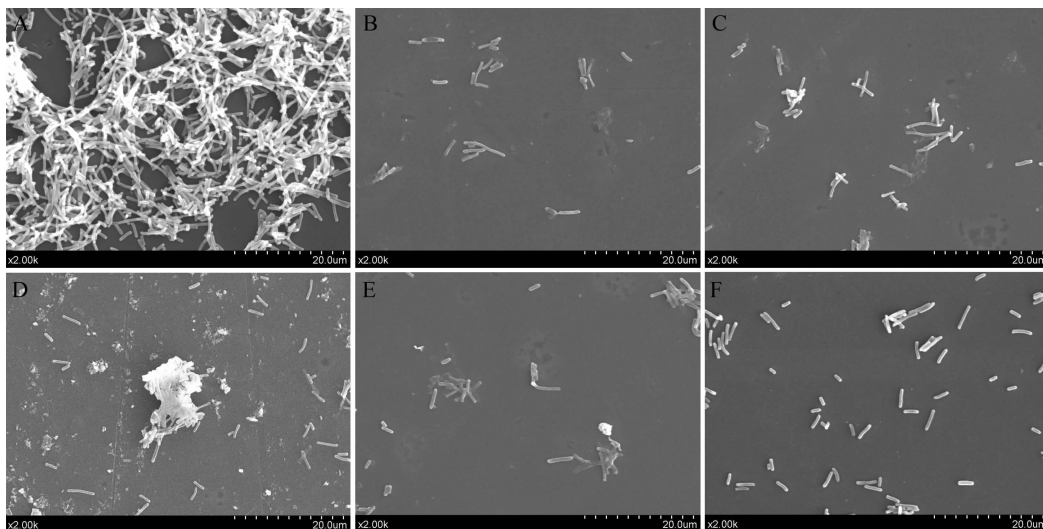
A—泳道1—蛋白分子量标准;泳道2、3—1% Triton X-100+20%PEG 8000 处理后所得上清、沉淀;泳道4、5—1% Triton X-100 + 35%蔗糖处理后所得上清、沉淀;泳道6、7—超声法处理后所得上清、沉淀。B—泳道8—蛋白分子量标准;泳道9、10—25 mmol/L EDTA + 20% PEG 8000 处理后所得上清、沉淀;泳道11、12—25 mmol/L EDTA + 35% 蔗糖处理后所得上清、沉淀;泳道13、14—超声法处理后所得上清、沉淀。箭头所指为重组PK2 β 条带

图4 化学-渗透压法大规模破碎重组 PK2 β 工程菌结果

以菌落形成单位(CFU)检测与扫描电子显微镜(SEM)观察化学-渗透压法处理对工程菌细胞的影响。菌落数量检测结果表明,化学-渗透压法处理后样品所产生的克隆数仅为对照组的 1% 以下,表明该方法可以完全破碎工程菌细胞。SEM 结果显示,破碎前大肠杆菌细胞形态完整,而化学-渗透压法处理后大肠杆菌几乎完全被破碎,留下很多无定形细胞残片;超声法处理后大肠杆菌发生断裂,留下很多短棒状细胞残片(图 5)。由此表明,化学-渗透压法与超声法的碎菌机制不同,从而产生不同的破碎效果。

3 讨论与结论

温和高效地破碎大肠杆菌细胞是获取其胞内蛋白质的必经流程,但现有的细胞破碎工艺仍有较多不足,影响了基因工程及生物工程的发展。为了便于后续分离及获取有生物活性的重组蛋白,目前常用共表达分子伴侣蛋白质、二硫键异构酶或脯氨酸异构酶,或构建带金黄色葡萄球菌蛋白 A、谷胱甘肽-S-转移酶、大肠杆菌麦芽糖结合蛋白 malE、大肠杆菌硫氧还蛋白的融合蛋白以提高重组蛋白质的可溶性^[18-21]。本研究结果表明,即使有可溶性蛋白表达出来,超声破碎法也可能导致可溶性蛋白质被变性沉淀,从而使后续分离复杂化并



A—完整工程菌细胞；B—1%Triton X-100与35%蔗糖破碎细胞；C—1%Triton X-100与20% PEG 8000破碎细胞；D—25 mmol/L EDTA与35%蔗糖破碎细胞；E—25 mmol/L EDTA与20%PEG 8000破碎细胞；F—超声法破碎细胞

图5 重组PK2 β 工程菌破碎前后的SEM照片

需要额外的复性环节。

本研究建立的化学-渗透压法具有简便高效、成本低廉、易于操作及放大的优点,可以完全破碎重组 PK2 β 工程菌细胞,并且获得 70.5%的可溶性重组 PK2 β ,为后续大量制备该蛋白提供了便利。同时该法也可用于破碎其他工程菌细胞,有利于保持其他可溶性重组蛋白质的活性,因此在基因工程及生物工程中具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Peternel S. Bacterial cell disruption: a crucial step in protein production[J]. New Biotechnology, 2013, 30(2): 250-254.
- [2] 吴蕾,洪建辉,甘一如,等. 高压匀浆破碎释放重组大肠杆菌提取包含体过程的研究[J]. 高校化学工程学报, 2001, 15(2): 191-194.
- [3] Feliu J X, Cubarsi R, Villaverde A. Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 58(5): 536-540.
- [4] 刘建荣,王慧,赵晓瑜,等. 化学渗透法破碎基因重组 *E. coli* 提取重组人 SOD 包含体和复性[J]. 高校化学工程学报, 2011, 25(1): 96-102.
- [5] 沈徐凯,周斌,王云艳,等. 丙酮破碎法提取重组大肠杆菌表达的转谷氨酰胺酶原[J]. 生物技术通报, 2011(5): 223-226.
- [6] 刘冬,吴亚丽,张丽君,等. 重组降血压肽基因工程菌破碎方法研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2006, 27(3): 53-56.
- [7] 郭芳芳,应琦,张充,等. 重组脂肪氧合酶基因工程菌破碎条件优化及其酶活力测定方法研究[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 160-165.
- [8] 孙健,杨志建,许国旺,等. 粪产碱杆菌青霉素 G 酰化酶的分离提取[J]. 工业微生物, 2006, 36(1): 11-15.
- [9] 闻崇炜,刘瑞江,毛春友,等. 响应面分析法优化重组原动蛋白 2 β 诱导条件的研究[J]. 生物技术通报, 2012(5): 173-178.
- [10] 吴蕾,雷鸣,洪建辉,等. 超声破碎重组大肠杆菌释放包含体的过程研究[J]. 化学工业与工程, 2002, 19(6): 422-425.
- [11] 林莉萍,董墨思,解婉莹,等. α -半乳糖苷酶基因工程菌细胞破碎条件的筛选[J]. 农业科技与装备, 2014, 244(10): 37-39.
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [13] 闻崇炜,毛春友,胡萍萍,等. Tricine 蛋白质电泳定量检测溶菌酶方法的研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(5): 290-292.
- [14] Sahoo M K, Sinha B, Marbaniang M, et al. Transition metal catalyzed mineralization of Calcon and bioassay of the mineralized solutions by *Escherichia coli* colony forming unit assay[J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 209(41): 147-154.
- [15] Zhukova L V, Kiwi J, Nikandrov V V. TiO₂ nanoparticles suppress *Escherichia coli* cell division in the absence of UV irradiation in acidic conditions[J]. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 2012, 97(9): 240-247.
- [16] 邹如意,李妍,邹珍友,等. 用扫描电镜观察不镀膜对大肠杆菌损伤和图像的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(32): 15692-15693.
- [17] Peternel S, Komel R. Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells[J]. Microbial Cell Factories, 2010, 9(1): 1-16.
- [18] Sørensen H P, Mortensen K K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2005, 4(1): 1.
- [19] Martínez-Alonso M, Vera A, Villaverde A. Role of the chaperone DnaK in protein solubility and conformational quality in inclusion body-forming *Escherichia coli* cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 273(2): 187-195.
- [20] Mentel M, Iancu I, Szabo C Z K, et al. Co-expression of human WDRI gene with a chaperone increases its protein solubility[J]. Romanian Journal of Biochemistry, 2013(1): 39-51.
- [21] Sabate R, De Groot N S, Ventura S. Protein folding and aggregation in bacteria[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(16): 2695-2715.