

# 大肠杆菌的 $\beta$ -半乳糖苷酶高产菌株的组建<sup>1)</sup>

潘星时 张美华 张雅芬 陈瑞冠

(上海市儿科研究所)

目前酶免疫测定法已成为医学及免疫学研究领域中一种新的重要测试手段<sup>[7]</sup>。常用来作为酶标的酶主要有碱性磷酸酯酶<sup>[3]</sup>，辣根过氧化物酶<sup>[5]</sup>及  $\beta$ -半乳糖苷酶<sup>[6]</sup>。

$\beta$ -半乳糖苷酶一般都从大肠杆菌品系 (*E. coli* K12) 中提取制备,所用菌株有 CSH66 即 E7074<sup>[4]</sup>, 3300<sup>[1]</sup>, A324-5<sup>[2]</sup> 等。CSH36 为染色体上乳糖操纵子发生缺失但 F 因子上带有  $\beta$ -半乳糖苷酶结构基因的组成型菌株, 3300 为染色体上乳糖操纵子的调节基因发生突变的组成型菌株, A324-5 为染色体及 F 因子上都带有  $\beta$ -半乳糖苷酶结构基因但调节基因都发生突变的组成型菌株。A324-5 菌的酶产量虽高, 但需在含有琥珀酸盐的基本培养基中才能大量

产生  $\beta$ -半乳糖苷酶,而且此菌繁殖一代的时间为 240 分钟,比大肠杆菌在一般培养基中繁殖一代的时间要长 10 倍左右。

我们在比较了 CSH36 及 CSH66 (即 M 7133) 菌株的  $\beta$ -半乳糖苷酶的产量的基础上,将 CSH66 中带有编码  $\beta$ -半乳糖苷酶的结构基因的原噬菌体  $\lambda$ cI 857 S7 *Plac5iz<sup>+</sup>y<sup>-</sup>* 转移到 CSH36 的染色体上,构成 SIp-1 菌株,它在一般完全培养液中能比原株 CSH36 或 CSH 66 产生出更多的  $\beta$ -半乳糖苷酶。

## 材料和 方法

(一) 菌株 实验用的菌株及组建后的新菌株见表 1。

表 1 实验所用的菌株及组建后的新菌株

菌 株	基 因 型	来 源
CSH36	F' <i>lac I<sup>-</sup> pro A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>/Δ (lac pro), sup E thi<sup>-</sup></i>	中国科学院 微生物研究所菌种保藏委员会
CSH66	F <sup>-</sup> Δ ( <i>lac</i> ), <i>thi</i> ( $\lambda$ cI 857, S7, <i>plac 5 i<sup>-</sup>z<sup>+</sup>y<sup>-</sup></i> )	
SIp-1	F' <i>lac I pro A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>/Δ (lac pro), sup E, thi</i> ( $\lambda$ cI 857, S7, <i>plac 5 i<sup>-</sup>z<sup>+</sup>y<sup>-</sup></i> )	本实验室

(二) 培养基 LB 培养基的成份为每升中含多胺 10 克、酵母抽提物 5 克、氯化钠 5 克, pH7.0, 配制固体培养基时加入 2% 琼脂, 15 磅高压灭菌 20 分钟。20% 乳糖溶液分别灭菌, 在需要时加入。

(三) 新菌株组建的方法 CSH66 菌株是溶源性菌株, 在其染色体上整合的  $\lambda$  原噬菌体除了带有 cI 857 和 S7 这两个突变外, 还带有编码  $\beta$ -半乳糖苷酶的结构基因  $z<sup>+</sup>$ , 至于乳糖操纵子的调节基因已发生组成突变 ( $i<sup>-</sup>$ )。

cI857 突变编码的  $\lambda$  阻遏蛋白对温度敏感, 因而当 CSH 菌株短期接触 43—44°C 这样的高温时, 细菌细胞中  $\lambda$  原噬菌体就会由于  $\lambda$  阻遏蛋白失活而进入营养繁殖期, 从而在短期内形成大量  $\lambda$  噬菌体。(S7) 能阻止正常的大肠杆菌细胞在形成成熟的  $\lambda$  噬菌体之后裂解, 为了

Pan Xingshi et al.: Construction of High Producing Strain of  $\beta$ -galactosidase in *E. coli*

1) 复旦大学遗传学研究所陈中孚老师参加本工作讨论, 致谢。

本文于 1987 年 7 月 27 日收到。

取得 $\lambda$ 噬菌体,这时需要在细菌悬液中加入少量氯仿,使细菌细胞裂解并释放出 $\lambda$ 噬菌体。为将原噬菌体  $\lambda cI857 S7 Plac 5 i^-z^+y^-$  从 CSH66 转移到 CSH66 CSH36 菌株中,先将 CSH66 接种于 25 毫升 LB 培养液中,30°C 静止培养过夜。次日按 1:20 量接种于新鲜 LB 培养液中,30°C 振荡培养 2.5 小时,当  $A_{600}$  达 0.4 时,转移到 43—44°C 水浴中振摇 20 分钟,然后在 37°C 中继续摇瓶培养 3 小时,使 CSH 菌株的细胞中形成大量 $\lambda$ 噬菌体。此时加入氯仿 0.25 毫升,充分混和 10 秒钟后离心除去氯仿。取 1 毫升上清液(用带有 *sup F* ( $S_{11}3$ ) 的 CSH 25,  $\lambda cI 857 S7$  能在其体内形成噬菌体),每毫升中含  $2.5 \times 10^{10}$  噬菌体,与 1 毫升 CSH36 菌悬液 ( $A_{600}$  约为 0.4) 混和,放 30°C 静止培养过夜。次日在 LB 琼脂平板上划线分离单菌落。由于凡溶源有  $\lambda cI 857 Plac 5 i^-z^+y^-$  的细菌在 42°C 中细胞中能形成大量 $\lambda$ 噬菌体而死亡,为了鉴别所分离的单菌落是否是溶源性细菌,随机取 30 个单菌落,分别点种于两个 LB 琼脂平板上,一个放 30°C,一个放 42°C 培养过夜。次日选留仅能在 30°C 生长而 42°C 不生长的菌落 26 个,作进一步酶产量的检测。

(四)  $\beta$ -半乳糖苷酶的分析方法 参照文献 [4],取活化斜面菌接种于 25 毫升 LB 培养液中,30°C 静止培养过夜,次日以 1:25 比例再接入新鲜 LB 培养液中,放 30°C 旋转振荡培养 5.5 小时。先测定培养菌悬液的  $A_{600}$  值,然后吸取一定量的菌液 (5—10 微升),用 Z 缓冲液 (0.06 M  $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$ 、0.04 M  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 、0.01 M KCl、0.001 M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.05 M 巯基乙醇,加水至 1 立升, pH 7.0) 补充体积到 2 毫升。28°C 预热 10 分钟,加入 0.4 毫升邻硝基苯  $\beta$ -D-半乳糖苷 ( $\beta$ -ONPG,用 0.1 M 磷酸缓冲液配制成 4 mg/ml),摇匀,在 28°C 中反应 25 分钟后,用 1 毫升 1 M  $Na_2CO_3$  溶液中止反应,并测定  $A_{420}$  及  $A_{550}$  值。

单位  $A_{600}$  值酶单位按下列公式计算:

$$\text{单位} = 1000 \times \frac{A_{420} - 1.75 \times A_{550}}{t \times v \times A_{600}}$$

$A_{420}$  及  $A_{550}$  为反应混合物的读数;  $1.75 \times A_{550}$  相当于反应混合物中细胞碎片所造成的读数偏差;  $t$  为分析中反应时间(分);  $v$  为分析时培养物体积;  $A_{600}$  为分析所用培养物浊度。

按下列公式计算每毫升培养物中酶单位:

$$\text{酶单位/ml} = \frac{A_{420} - 1.75 \times A_{550}}{0.0045 \times t \times v}$$

## 结 果

### (一) 组建菌株及原株的 $\beta$ -半乳糖苷酶的产量的比较

将 25 个溶源有  $\lambda cI 857 S7 Plac 5$  的 CSH 36 细菌的单菌落,在 LB 液中培养后,测定各菌单位  $A_{600}$  值的酶单位,其中 1 株菌单位在 2,000 以下,2 株单位在 2000—2500 之间,7 株单位在 2500—3000 之间,8 株单位在 3000—3500 之间,3 株单位在 3500—4000 之间,1 株单位在 4500—5000 之间,2 株单位在 5400—5500 之间,其中单位最高的一株定名为 SIp-1,作为新组建的菌株和原株的产酶量进行比较,结果列于表 2。

表 2 SIp-1 及 CSH36、CSH66 的  $\beta$ -半乳糖苷酶的产量

菌 株	酶单位/ml 培养液	酶单位/mg 蛋白 <sup>1)</sup>
CSH36	1,056	9,026
CSH66	2,296	21,458
SIp-1	7,576	51,189

1) 按  $A_{600}$  为 1.4 相当于每毫升培养液中含  $1 \times 10^9$  个细菌,这时每毫升约含 150 微克蛋白<sup>[4]</sup>,将单位  $A_{600}$  值酶单位换算酶单位/mg 蛋白。

从表 2 可见,每毫升培养液中酶单位 SIp-1 比原株 CSH36 和 CSH66 分别高 617% 和 230%,如果根据培养液的  $A_{600}$  值换算成每毫克细菌蛋白中  $\beta$ -半乳糖苷酶的活力单位计算,SIp-1 仍然比原株 CSH36 和 CSH66 分别高 467% 和 138%。

### (二) 培养液中加入乳糖对 SIp-1 及 CSH36 和 CSH66 产 $\beta$ -半乳糖苷酶的影响

野生型的大肠杆菌在含有乳糖的 LB 培养

液中会大量合成 $\beta$ -半乳糖苷酶,而 $\beta$ -半乳糖苷酶组成型菌株在不含乳糖的LB培养液中即能大量合成 $\beta$ -半乳糖苷酶。表3是比较在LB培养液中加入0.4%乳糖对CSH36、CSH66和Slp-1这三株组成型菌株产酶的影响。当LB培养液中加入乳糖时,CSH66特别是Slp-1菌株的产酶量下降,但对CSH36却没有影响。此外,乳糖能明显地降低CSH36和Slp-1这两个菌株的生长量(前者降低1/3,后者降低1/4)。

表3 添加乳糖对酶产量的影响

菌株	培养基	酶单位/单位 A <sub>600</sub> 值
CSH36/LB		4,360
CSH36/LB + 0.4% 乳糖		4,670
CSH66/LB		10,340
CSH66/LB + 0.4% 乳糖		6,060
Slp-1/LB		24,770
Slp-1/LB + 0.4% 乳糖		8,180

## 讨 论

从表2可见组建的新菌株Slp-1的 $\beta$ -半乳糖苷酶的产量比原种高,显然是与细菌细胞中 $\beta$ -半乳糖苷酶的结构基因拷贝数增多有关。CSH36、CSH66及Slp-1均为 $\beta$ -半乳糖苷酶的组成型菌株,酶的产生不需诱导,而且Slp-1和CSH66一样,当培养液中存在乳糖时, $\beta$ -半乳糖苷酶的产量反而下降。堀内等人分离的

一株过量产生 $\beta$ -半乳糖苷酶的大肠杆菌E203产量比Fowler所用的A324-5低,而且需要在培养基中添加诱导物才能大量产生 $\beta$ -半乳糖苷酶。A324-5在一般培养基中酶产量很低(每毫克蛋白仅3000—7000酶单位<sup>[2]</sup>)。Slp-1在LB培养基中生长产酶量虽仅为A324-5最高产酶量的三分之二,但因培养基成份简单,细菌生长迅速,有利于大量制备廉价的 $\beta$ -半乳糖苷酶。我们曾试图用带有克隆 $\beta$ -半乳糖苷酶结构基因的多拷贝质粒的大肠杆菌来制备 $\beta$ -半乳糖苷酶,但由于宿主细胞中质粒很不稳定,使 $\beta$ -半乳糖苷酶的产量受到影响。至于是否能通过高温(43—44℃)诱导使原噬菌体活化,并在短时间内大量扩增 $\beta$ -半乳糖苷酶结构基因的拷贝数,从而使 $\beta$ -半乳糖苷酶的产量提高,工作尚在进行之中。

## 参 考 文 献

- [1] Craven, G. R. et al.: 1965. *J. Biol. Chem.*, 240: 2468.
- [2] Fowler, A. V.: 1972. *J. Bacteriol.*, 112: 856.
- [3] Kearney, J. F. et al.: 1979. *J. Immunol.*, 123: 1548.
- [4] Miller, J. H.: 1978. *In: Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 352.
- [5] Nakane, P. K. et al.: 1974. *J. Histochem. and Cytochem.*, 22: 1084.
- [6] Schuurs, A. H. W. M. et al.: 1977. *Clin. Chim. Acta*, 81: 1.
- [7] Sullivan, M. J. O' et al.: 1981. *In: Immunochemical Techniques, Part B*, in *Methods Enzymology*, Langone, J. J. ed., 73: 147.

(上接第21页)

异,是核型非常相似的近缘种。灰头鸮和黄喉鸮仅有2对V形染色体(相当于中部或亚中部着丝点染色体),把它们的核型与表3描述的4种鸮相比较,概观6种鸮在核型上的亲缘关系,似乎灰头鸮和黄喉鸮最为原始,次为金胸鸮和黄鸮,小鸮和三道眉草鸮比较特化。

## 参 考 文 献

- [1] 王应祥等: 1982. *动物学研究*, 3(3): 217—224.

- [2] 王应祥: 1984. *动物学研究*, 5(1) 增刊: 74—78.
- [3] Hammar, B. et al.: 1975. *Hereditas*, 80: 177—184.
- [4] Hirschi, M. et al.: 1972. *Cytologia*, 37: 525—529.
- [5] Levan, A. et al.: 1964. *Hereditas*, 52: 201—220.
- [6] Ray-Chaudhuri, R.: 1973. *In Cytotaxonomy and vertebrate evolution* (Ed. by A. B. Chiarelli and E. Cappanna), Academic press, London-New York.
- [7] Takagi, N. and M. Sasak: 1974. *Chromosoma (Berl.)*, 46: 91—120.
- [8] Udagawa, T.: 1954. *Annot. Zool. Japan.*, 27: 91—96.
- [9] Yamashina, Y.: 1951. *Papers Coord. Com. Res. Genet.*, 11: 27—28.