

磷脂酶 C 对大肠杆菌细胞膜通透性的影响

刘睿杰, 幸新干, 于榛榛, 芮丽莲, 常明, 金青哲, 王兴国

(食品科学与技术国家重点实验室, 食品安全与营养协同创新中心, 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 本文在大肠杆菌 (*E. coli* BL21 DE3) 中分别克隆表达了产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 和单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 来源的磷脂酶 C (PLC) 基因, 并系统研究了内源表达的重组 PLC 对大肠杆菌 BL21(DE3) 内外膜通透性的影响。结果表明内源表达的产气荚膜梭菌和单核细胞增生性李斯特菌重组 PLC 对宿主菌内膜通透性影响较大, 但对宿主菌外膜通透性的影响相对较弱。此外, 本文对两种不同来源重组表达的磷脂酶 C 蛋白进行了分离纯化, 分析了外源添加重组磷脂酶 C 对大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞膜通透性的影响。结果表明外源 PLC 对大肠杆菌外膜通透性影响较大, 而对内膜通透性影响相对较小。综上所述, 产气荚膜梭菌和单核细胞增生性李斯特菌来源的磷脂酶 C 可以改善大肠杆菌细胞膜的通透性, 为进一步提高大肠杆菌工程菌株蛋白异源表达提供新的思路。

关键词: 磷脂酶 C; 大肠杆菌; 细胞膜; 通透性

文章编号: 1673-9078(2015)7-32-36

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.006

The Effect of Phospholipase C on the Membrane Permeabilization of *Escherichia coli*

LIU Rui-je, XING Xin-gan, YU Zhen-zhen, RUI Li-lian, CHANG Ming, JIN Qing-zhe, WANG Xing-guo

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The phospholipase C proteins from *Clostridium perfringens* (Cp-PLC) and *Listeria monocytogenes* (lm-PLC) were cloned and expressed in *E. coli* BL21 (DE3), and the effect of PLC on the permeability of *E. coli* BL21 membranes was investigated systematically. The recombinant PLCs expressed in *C. perfringens* and *L. monocytogenes* clearly affected the permeability of the inner membrane. In contrast, the permeability of the outer bacterial membrane increased slightly. In addition, the effect of PLC enzymes incorporation on the permeabilization of *E. coli* BL21 membranes was tested, indicating that the addition of PLC enzymes markedly increased the permeabilization of the outer membrane. However, the permeabilization of bacterial inner membrane was not affected to the same extent. More importantly, coexpression of Cp-PLC and lm-PLC in *E. coli* BL21 to increase permeabilization of the host cell membrane opens a promising strategy for enhancing recombinant protein expression.

Key words: phospholipase C; *Escherichia coli*; membrane; permeabilization

磷脂酶 C (PLC) 是一种广泛存在于动植物和微生物细胞中, 能专一性水解磷脂甘油 sn-3 位上甘油磷酸酯键的脂类水解酶。根据其底物特异性可以分为 3 类: 磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC)、磷脂酰胆碱偏好型磷脂酶 C (PC-PLC) 以及非特异性的磷脂酶 C (NPC)。在微生物中, PLC 作为病原菌重要的毒力因子, 通过水解宿主细胞的质膜实现浸染, 如产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)^[1-3] 和单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)^[4-6]。在真核生物中, PLC 水解磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP₂) 生成的三磷

收稿日期: 2014-06-21

作者简介: 刘睿杰 (1981-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 脂质安全

通讯作者: 常明 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 油脂生物加工

酸肌醇 (IP₃) 和甘油二酯 (DAG)。作为胞内重要的信号分子, IP₃ 调节 Ca²⁺ 的释放, 而 DAG 调节蛋白激酶 K (PKC) 的活性, 进而调控细胞的增殖、分化、收缩, 分泌和代谢等功能^[7]。因此, 可以通过抑制 PLC 的活性或阻断 PLC 信号传递路径减小血管张力以及抑制结肠直肠癌细胞的增殖等^[8]。PLC 在食品领域应用十分广泛, 在面包的烘焙应用方面, 可以提高面团的乳化性能、气泡的稳定性以及增大面包体积; 在油脂精炼方面, 可以通过水解磷脂的 Sn-3 位酯键产生 1,2-甘油二酯 (1,2-DAG) 和溶于水的磷酸酯类, 减少皂脚产生, 提高毛油得率; 此外还可以用于乳制品以及功能食品加工等领域^[9-13]。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 内膜 (细胞质膜) 由磷

脂(20%~30%)和蛋白质(50%~70%)组成,具有维持细胞功能、细胞信号传导以及调节细胞周期等重要作用。外膜由脂多糖、磷脂和外膜蛋白组成,具有控制细胞透性、调节 Mg^{2+} 浓度、决定抗原定位等作用。为了研究重组 PLC 对大肠杆菌细胞膜的影响,本文系统研究了 *C.perfringens* 和 *L.monocytogenes* 来源的 PLC 在大肠杆菌细胞中重组表达以及外源添加时,宿主菌内外膜通透性的变化规律,为通过改善宿主工程菌细胞膜透性,以进一步提高重组蛋白的表达水平提供新的解决思路。

1 材料与方法

1.1 原料

大肠杆菌(*E. coli*)BL21(DE3)、产 *C.perfringens*、*L.monocytogenes* 以及质粒 pET-28a 均由本实验室保存。

商品化 PLC 制剂由诺维信(中国)生物技术有限公司馈赠;对硝基磷酸胆碱(p-nitrophenylphosphorylcholine, p-NPPC),考马斯亮蓝 R-250,丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵等均购自 Sigma 上海公司;蛋白分子量标准(低)购自 TaKaRa 大连公司;硫酸卡那霉素购自上海生工生物工程公司;2-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖(ONPG),N-苯基-1-萘胺(NPN)以及常用分析纯试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。亲和层析柱和强阴离子色谱交换柱购自美国通用电气上海公司。

1.2 主要仪器设备

凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),高速离心机(美国 Eppendorf 公司),低温恒温槽(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),超低温冰箱(德国 Thermo 公司),恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司),超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司),pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司),荧光光谱仪(日本 HITACHI 公司),全自动酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)和 AKTA AVANT(美国通用电气公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 *C.perfringens* 和 *L.monocytogenes* 磷脂酶 C 的克隆和表达

分别利用引物 P1a(5'-CGGAATTCATGTGGGATGGAAAGATTGATGGAA-3'EcoRI)和 P1b(5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTATTTTATATTATAAGTT-3'

Not I); P2a(5'-CGGAATTCATGTGTGTGATGAATACCTTACAAA-3'EcoRI)和 P2b(5'-ATGCGGCCGCTTATTCATTTGTTTTTTT-3' Not I)从 *C. perfringens* 和 *L.monocytogenes* 基因组 DNA 中克隆得到 *plc* 基因片段,与表达载体 pET28a 连接,得到重组表达载体 pET-cp 和 pET-lm。最后将重组表达质粒分别转化 *E. coli* BL21 (DE3),进行诱导表达,SDS-PAGE 电泳分析。

1.3.2 重组 PLC 的纯化

分别选择 His Trap HP 亲和层析柱和 Hi Trap Q-Sepharose HP 强阴离子色谱交换柱对重组 PLC 进行纯化。

1.3.3 p-NPPC 法测定重组 PLC 酶活力^[14]

PLC 可以将 p-NPPC 分解为对硝基苯酚,对硝基苯酚在 410 nm 处有最大吸收峰,故通过分光光度计法测定对硝基苯酚的浓度可以计算 PLC 的酶活。酶活单位定义为 pH 7.2、温度为 37 °C 条件下,每分钟水解 p-NPPC 生成 1 nmol 对硝基苯酚所需的酶量为 1 个活力单位(U)。

1.3.4 *E.coli* BL21 (DE3) 内膜通透性变化的测定^[15]

通常宿主菌 β -D-半乳糖苷酶存在于胞内,当细胞内膜透性达到一定水平时,其胞内的 β -D-半乳糖苷酶就会渗透到细胞外。而 ONPG 是 β -D-半乳糖苷酶的底物,水解后生成半乳糖和黄色的邻-硝基苯酚(ONP)。ONP 在 405~420 nm 处有紫外吸收,因此通过根据培养物吸光值的变化可以反映细胞内膜透性的改变。

首先用 25 mmol/L pH 7.2 的 Tris-HCl 0.5% NaCl 溶液将菌体稀释至 $OD_{600}=0.5$,取 10 μ L 30 mmol/L ONPG 溶液加入 100 μ L 菌液中,于 37 °C 下反应 2 h。最后在 405 nm 下测定吸光度。

1.3.5 *E.coli* BL21(DE3)外膜通透性变化的测定

NPN 在疏水环境中表现出强烈的荧光吸收特性,当 NPN 被加入细胞悬浮液中,其跨过细胞外膜进入内膜疏水环境,从而表现出一定荧光吸收能力。根据荧光吸收能力的大小,可以检测细胞外膜透性的大小。

用 25 mmol/L pH 7.2 的 Tris-HCl 0.5% NaCl 将菌体稀释至 $OD_{600}=0.5$,取 2 mL 菌悬液于比色皿中,用 Tris-HCl 缓冲液补至 3 mL,随后加入 20 μ L 1 mM NPN,立即放入荧光分光光度计,4 min 后记录读数。荧光分光光度计激发波长 350 nm,发射波长 420 nm,缝隙宽度 5 mm。

1.3.6 数据分析

用 EXCEL 软件进行数据分析和作图。每组实验重复三次, 计算平均值和标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 重组 PLC 的表达及纯化

PLC 的酶活与水解 p-NPPC 所产生的对硝基苯酚成线性关系, 绘制标准曲线, 得到回归方程: $y=93.38x-0.011$, $R^2=0.999$, 其中 y 为对硝基苯酚的浓度(nmol/mL), x 为不同浓度对硝基苯酚对应的吸光值。

$$\text{PLC酶活} = \frac{(93.38A - 0.011) V_{\text{总}}}{V_{\text{酶}} \times 30}$$

注: A 为反应后 OD₄₁₀, V 为反应体系总体积, V_酶 为酶液体积。

经过发酵条件优化, 最终使重组 Cp-PLC 的酶活力达到 304.3 ± 10.3 U/mL 以上, 重组 Lm-PLC 的酶活力达到 275.6 ± 9.6 U/mL 以上。随后利用亲和层析和离子交换层析纯化目的蛋白, 最终使 Cp-PLC 的纯度达到了 93.3% 以上, 比活力达到 248.26 U/mg 以上; Lm-PLC 的纯度达到 83% 以上, 比活力达到 471.1 U/mg 以上。

2.2 内源重组 PLC 对 *E.coli* BL21 内外膜通透性的影响

分别对 *E.coli* BL21(pET-Cp) 和 *E.coli* BL21(pET-lm) 进行培养, 研究不同条件下内源重组 PLC 对 *E.coli* BL21(DE3) 细胞膜通透性的影响。

2.2.1 诱导温度对内膜通透性的影响

分别将重组菌液按 2% 接种于含硫酸卡那霉素的 50 mL TB 培养基中, 37 °C, 200 r/min 条件下生长至 OD₆₀₀=1.0 左右。利用终浓度为 8 g/L 的乳糖分别为 18 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C 条件下对 *E.coli* BL21(pET-Cp) 和 *E.coli* BL21(pET-lm) 诱导培养 32 h, 以 *E.coli* BL21(pET-28a) 作为阴性对照。诱导结束后分析内源重组 PLC 对细胞内膜通透性的变化影响(见图 1)。

不同诱导温度对细胞内膜通透性和 PLC 的酶活力产生显著影响。随着诱导温度的上升, Cp-PLC 的酶活力在 30 °C 时达到 304 ± 13.5 U/mL, 在 37 °C 时有所下降。宿主菌内膜的通透性在 30 °C 最大, 37 °C 时有所下降。而 Lm-PLC 在 25 °C 时的酶活力达到 431 ± 5.7 U/mL, 内膜通透性最大。随着诱导温度进一

步升高, 酶活和宿主细胞膜的通透性都有下降。

2.2.2 诱导时间对内膜通透性的影响

分别于 30 °C 和 25 °C 条件下对 *E.coli* BL21(pET-Cp) 和 *E.coli* BL21(pET-lm) 进行诱导, 诱导时间为 0~40 h, 同时以 *E.coli* BL21(pET-28a) 作为阴性对照, 分析不同诱导时间内源重组 PLC 对细胞内膜通透性的变化影响(见图 2)。

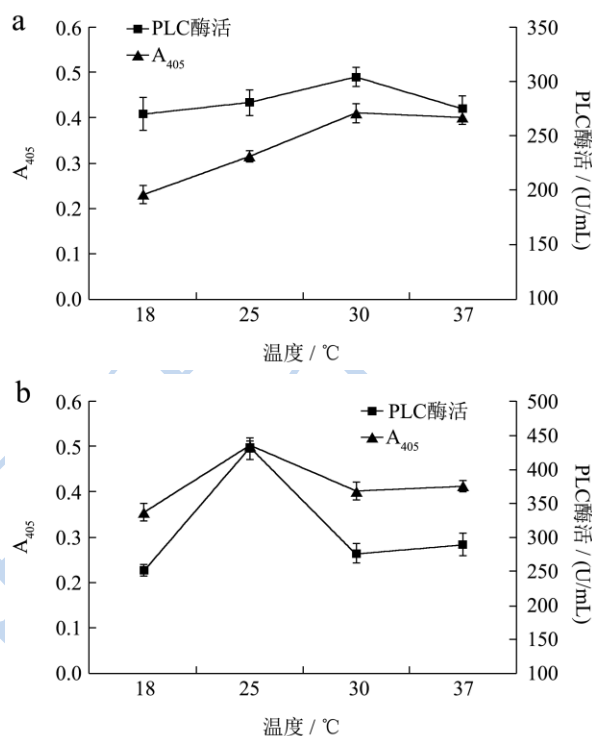


图1 Cp-PLC (a) 和 Lm-PLC (b) 诱导温度对细胞内膜通透性的影响

Fig.1 The effect of *Clostridium perfringens* phospholipase C (Cp-PLC) (a) and *Listeria monocytogenes* (lm)-PLC (b) induction temperature on the permeabilization of the inner membrane

在图 2 中, *E.coli* BL21(pET-Cp) 诱导 32 h 时, 酶活达到最大值, 为 375 ± 10.2 U/mL。随着诱导时间的延长开始降低。内膜通透性则随着诱导时间的延长持续增长, 0~16 h 增长较快, 随后增长速率逐渐变缓, 32 h 后内膜通透性趋于稳定。而 *E.coli* BL21(pET-lm) 在 0~24 h, 酶活和内膜通透性都呈增长趋势, 在 24 h 内源重组 PLC 酶活达到最大值 (674 ± 20.4 U/mL)。随后, 酶活和内膜通透性逐渐下降, 32 h 之后趋于稳定。

2.2.3 内源表达重组 PLC 对宿主菌 *E.coli* BL21 外膜通透性的影响

根据上述结果, 分别选择 30 °C 诱导 Cp-PLC 表达 32 h, 25 °C 诱导表达 Lm-PLC 表达 26 h, 分析宿主菌外膜通透性的变化。结果如图 3 所示, Cp-PLC 和 Lm-PLC 对外膜的通透性影响相对较小。

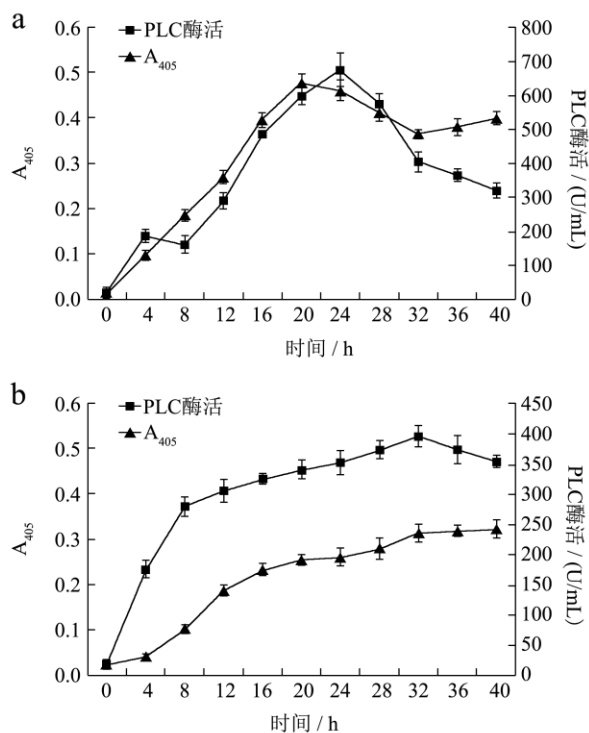


图2 Cp-PLC (a) 和Lm-PLC (b) 诱导时间对细胞内膜通透性的影响
Fig.2 The effect of Cp-PLC (a) and Lm-PLC (b) induction time on permeabilization of the inner membrane

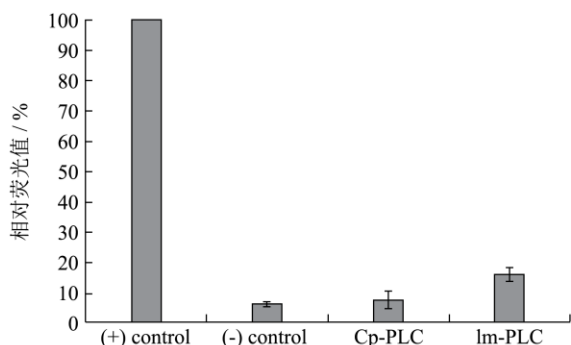


图3 内源 PLC 对细胞外膜通透性的影响
Fig.3 The effect of endogenous expression of PLC on the permeabilization of the outer membrane

2.3 外源 PLC 对 *E.coli* BL21 内外膜通透性的影响

培养 *E.coli* BL21 (DE3) 至 $OD_{600}=0.5$ 左右, 取 10 ml 菌液 4000g 离心收集, 用 25 mmol/L pH 7.2 的 Tris-HCl 0.5% NaCl 重悬两次, 最后用 25 mmol/L pH 7.2 的 Tris-HCl-0.5% NaCl 稀释至 $OD_{600}=0.5$, 2 mL 菌悬液加 1 mL 缓冲液作阴性对照, 2 mL 菌悬液煮沸 5 min 后补加 1 mL 缓冲液作阳性对照。

2.3.1 外源 PLC 浓度的影响

取 2 mL 菌悬液分别加入 10 U、50 U、100 U、300

U、500 U 的商品化 PLC、重组 Lm-PLC 和重组 Cp-PLC, 37 °C 下反应 2 h, 8000 g 离心 5 min 收集菌体, 用 3 mL 缓冲液洗涤 2 次后分析不同酶量对细胞外膜通透性的影响(见图 4)。结果表明, 随着磷脂酶 C 的增加, 细胞外膜的通透性不断增大。当酶活大于 200 U 时, Cp-PLC 和 Lm-PLC 对细胞外膜通透性的影响趋于最大。

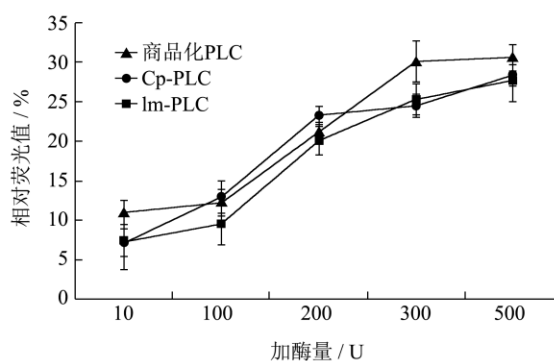


图4 加酶量对细胞外膜通透性的影响

Fig.4 The effect of enzyme concentrations on the permeabilization of the outer membrane

2.3.2 外源 PLC 反应时间的影响

分别加入适量的商品化 PLC、重组 Lm-PLC 和重组 Cp-PLC, 在 37 °C 下反应 1 h、2 h、3 h、5 h 和 8 h。8000 g 离心 5 min 收集菌体细胞, 用 3 mL 缓冲液洗涤 2 次。分析不同反应时间重组 PLC 对大肠杆菌外膜通透性的影响(见图 5)。结果表明, 随着反应时间的延长, 外膜通透性不断增加, Cp-PLC 和 Lm-PLC 在反应 3 h 后达到最大, 而商品化 PLC 在 5 h 后才达到最大值。

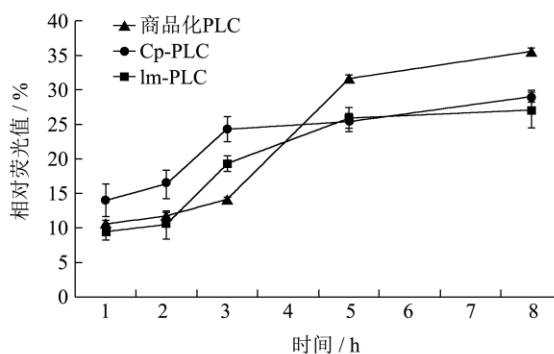


图5 反应时间对细胞外膜通透性的影响

Fig.5 The effect of reaction time on the permeabilization of the outer membrane

2.3.3 外源 PLC 反应温度的影响

加入适量的商品化 PLC、重组 Lm-PLC 和重组 Cp-PLC, 分别在 18 °C、25 °C、30 °C 和 37 °C 条件下反应一定时间。8000 g 离心 5 min 收集菌体细胞, 用 3 mL 缓冲液洗涤 2 次, 分析不同反应温度对大肠杆菌

细胞外膜通透性的影响(见图6)。随着温度的上升,外膜通透性不断提高。

2.3.4 外源 PLC 对细胞内膜通透性的影响

分别加入2,000 U的商品化 PLC、重组 Lm-PLC 和重组 Cp-PLC,于 37 °C 反应 5 h,测定细胞内膜通透性的变化。结果表明相对阴性对照的吸光值(0.221±0.02),添加了商品化 PLC、重组 Lm-PLC 和重组 Cp-PLC 样品的吸光值分别上升为 0.290±0.05、0.330±0.07 和 0.340±0.03。

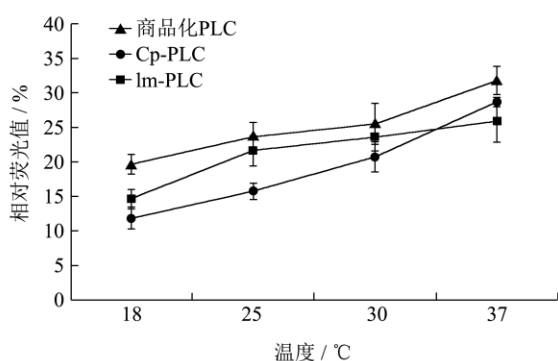


图6 反应温度对细胞外膜通透性的影响

Fig.6 The effect of reaction temperature on the permeabilization of the outer membrane

综上所述,通过对不同来源的 PLC 对 *E.coil* BL21 (DE3)内外膜通透性的研究发现,重组 PLC 无论是在内源表达还是在外源添加的条件下,都会对宿主菌的细胞膜通透性造成一定影响,质膜的通透性大小与重组 PLC 的酶活变化正相关。

3 结论

本文系统地研究了 Cp-PLC、Lm-PLC 和商品化 PLC 对 *E.coli* BL21(DE3)膜通透性的影响,结果表明通过内源表达或外源添加产气荚膜梭菌和单核细胞增生性李斯特菌重组 PLC,都会对宿主菌细胞膜通透性产生显著影响。内源表达磷脂酶 C 对宿主菌内膜通透性影响较大,而外源 PLC 对大肠杆菌外膜通透性影响较大。值得注意的是,随着磷脂酶 C 反应时间和酶量的增加,大肠杆菌细胞膜通透性逐步趋于最大,但不会完全被破坏。因此,通过 PLC 的共表达,适当改善宿主菌细胞膜的通透性,可以为进一步提升基因工程菌株的蛋白表达水平提供新的解决思路。

参考文献

[1] Songer J G. Bacterial Phospholipases and Their Role in Virulence [J]. Trends in Microbiology, 1997, 5(4): 156-161
 [2] Monturiol-Gross L, Flores-D íz M, Pineda-Padilla MJ, et al. Clostridium Perfringens Phospholipase C Induced ROS

Production and Cytotoxicity Require PKC, MEK1 and NFκB Activation [J]. PLoS One, 2014, 9(1): 86475

- [3] Fatmawati NN, Sakaguchi Y, Suzuki T, et al. Phospholipase C Produced by Clostridium Botulinum Types C and D: Comparison of Gene, Enzymatic, and Biological Activities with Those of Clostridium Perfringens Alpha-toxin [J]. Acta Med Okayama, 2013, 67(1): 9-18
 [4] Blank BS, Abi Abdallah DS, Park JJ, et al. Misregulation of the Broad-range Phospholipase C Activity Increases the Susceptibility of Listeria Monocytogenes to Intracellular Killing by Neutrophils [J]. Microbes Infect, 2014, 16(2): 104-113
 [5] Lam GY, Fattouh R, Muise AM, et al. Listeriolysin O Suppresses Phospholipase C-mediated Activation of the Microbicidal NADPH Oxidase to Promote Listeria Monocytogenes Infection [J]. Cell Host Microbe, 2011, 10(6): 627-634
 [6] Bai F, Chen J, Chen Q, et al. A single Substitution in 5'-untranslated Region of plcB is Involved in Enhanced Broad-range Phospholipase C Activity in Listeria Monocytogenes Strain H4 [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011, 43(4): 275-283
 [7] Charlotte M V. Phospholipase C [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2012, 740: 235-254
 [8] Tasma I, Brendel V, Whitham S A, et al. Expression and Evolution of the Phosphoinositide-specific Phospholipase C Gene Family in Arabidopsis Thaliana [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2008, 46(7): 627-637
 [9] 芮丽莲,余榛榛,梁丽,等.产气荚膜梭菌磷脂酶 C 的重组表达及其脱胶应用[J].中国油脂,2014,39(5):66-70
 RUI Li-lian, YU Zhen-zhen, LIANG Li, et al. Recombinant Expression of Clostridium Perfringens Phospholipase C and Its Application in Degumming [J]. China Oils and Fats, 2014, 39(5): 66-70
 [10] 余榛榛,芮丽莲,梁丽,等.金黄色葡萄球菌磷脂酶 C 克隆表达及其脱胶应用[J].粮食与油脂,2014,27(4):10-14
 YU Zhen-zhen, RUI Li-lian, LIANG Li, et al. Recombinant Expression of Staphylococcus Aureus Phospholipase C and Its Application in Degumming [J]. China Oils and Fats, 2014, 27(4): 10-14
 [11] 何金铮.脂蛋白相关磷脂酶 A2 与动脉粥样硬化相关研究进展[J].心血管病学进展,2010,31(4):603-606
 HE Jin-zheng. Research Progress in Relationship Between Lipoprotein-associated Phospholipase A2 and Atherosclerosis [J]. Adv. Cardiovasc. Dis., 2010, 31(4):603-606

- [12] 赵金星,张梁,顾正华,等.重组大肠杆菌表达铜绿假单胞菌溶血性磷脂酶 C[J].微生物学报,2013,53(3):259-268
ZHAO Jin-xing, ZHANG Liang, GU Zheng-hua, et al. Expression of Hemolytic Phospholipase C from *Pseudomonas Aeruginosa* in *Escherichia coli* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(3): 259-268
- [13] 杨娇,金青哲,王兴国.磷脂酶 C 用于大豆油脱胶的工艺优化[J].中国油脂,2012,37(12):14-17
YANG Jiao, JIN Qing-zhe, Wang Xing-guo. Process Optimization of Degumming Soybean Oil by Phospholipase C [J]. China Oils and Fats, 2012, 37(12): 14-17
- [14] Wang D, Zhang M, Bian H, et al. Changes of Phospholipase A2 and C Activities during Dry-cured Duck Processing and Their Relationship with Intramuscular Phospholipid Degradation [J]. Food Chemistry, 2014, 15 (145): 997-1001
- [15] Aragão EA, Chioato L, Ward RJ. Permeabilization of *E. coli* K12 Inner and Outer Membranes by Bothropstoxin-I, A LYS49 Phospholipase A2 from Bothrops Jararacussu [J]. Toxicon., 2008, 51(4): 538-546

现代食品科技