

细胞焦亡法破碎微生物细胞在合成生物学与代谢工程的应用

王成林^{1,2}, 刘伟丰^{*2,3}, 陶勇^{*2,3}, 刘波⁴

1 中国科学技术大学生命科学与医学部, 安徽 合肥 230052

2 中国科学院微生物研究所 微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学, 北京 100049

4 微元合成生物技术(北京)有限公司, 北京 102209

王成林, 刘伟丰, 陶勇, 刘波. 细胞焦亡法破碎微生物细胞在合成生物学与代谢工程的应用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 340-353.

WANG Chenglin, LIU Weifeng, TAO Yong, LIU Bo. Application of pyroptosis in the disruption of microbial cells in synthetic biology and metabolic engineering[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 340-353.

摘要: 【背景】细胞焦亡是一种细胞程序性死亡。在古菌和细菌中, gasdermin 同源蛋白(GSDM)能够被特定的活化 caspase (protease)酶切, 从而激活类似于细胞焦亡的效应, 产生细胞破碎效果。

【目的】合成生物学、代谢工程和生物制造等应用过程中, 细胞破碎是不可或缺的一步。利用细胞焦亡法破碎细胞取代传统的破碎方法, 可以简化操作、提高生产效益。【方法】在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BW25113 中共表达 protease 和不同来源的 GSDM, 选择有明显细胞焦亡效应即来源 *Runella* sp.的 GSDM 进行蛋白截短改造, 使其在诱导表达蛋白截短体 GSDMJ D 后能直接激活细胞焦亡效应。对 GSDMJ D 进行过表达优化, 获得可控大肠杆菌细胞焦亡菌株。进一步以重组表达蔗糖磷酸化酶为研究模型, 验证本系统应用于细胞破碎释放蛋白的效果。【结果】实现了大肠杆菌中细胞焦亡的人为可控。焦亡菌株在诱导表达焦亡相关蛋白 2 h 后大肠杆菌细胞破碎死亡, 内容物释放。将上述系统和超声法应用于制备蔗糖磷酸化酶粗酶液, 细胞焦亡法制备的粗酶液的相对酶活显著高于超声法制备的粗酶液。在制备粗酶液的菌液 OD_{600} 值为 2.0 时, 细胞焦亡法制备的粗酶液相对酶活最高并且相较于超声法制备粗酶液, 提高了 60%的相对酶活。【结论】细胞焦亡提供了一种更加简单快捷、绿色环保的微生物细胞破碎方式, 为合成生物学与代谢工程的发展奠定了基础。

关键词: 大肠杆菌; 细胞焦亡; 微生物细胞的破碎; 蔗糖磷酸化酶

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103901)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103901).

*Corresponding authors. E-mail: TAO Yong, taoyong@im.ac.cn; LIU Weifeng, liuwfv@im.ac.cn

Received: 2023-03-13; Accepted: 2023-05-08; Published online: 2023-11-14

Application of pyroptosis in the disruption of microbial cells in synthetic biology and metabolic engineering

WANG Chenglin^{1,2}, LIU Weifeng^{*2,3}, TAO Yong^{*2,3}, LIU Bo⁴

1 Department of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230052, Anhui, China

2 Key Laboratory of Microbial Physiology and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 Microcyto Biotechnology (Beijing) Limited Company, Beijing 102209, China

Abstract: **[Background]** Pyroptosis is a form of programmed cell death. Gasdermin (GSDM) can be cleaved by cysteinyl aspartate-specific caspase (protease) in archaea and bacteria, which results in cell disruption, similar to the effects of pyroptosis in eukaryotes. **[Objective]** Cell disruption is a crucial step in synthetic biology, metabolic engineering, and biomanufacturing. Utilizing pyroptosis as a cell disruption method can simplify the operation and improve the production efficiency compared with the conventional methods. **[Methods]** Protease and GSDM from different sources were co-expressed in *Escherichia coli* BW25113. The GSDM with obvious pyroptosis effect from *Runella* sp. was selected for protein truncation, so that it could directly activate pyroptosis effect after inducing the expression of truncated protein (GSDMJ). After overexpression of GSDMJ and optimization, an *E. coli* strain with controllable pyroptosis effect was obtained. Furthermore, sucrose phosphorylase was used to verify the effects of this system and ultrasonic disruption on enzyme activity. **[Results]** The regulation of pyroptosis was successfully implemented in *E. coli*. After the strain was induced to express the pyroptosis-related protein for 2 h, the cells were disrupted and released the contents. The above system and ultrasonic method were applied to the preparation of crude liquid of sucrose phosphorylase. The relative activity of crude enzyme liquid prepared by the pyroptosis method was significantly higher than that of crude enzyme liquid prepared by the ultrasonic method. In the case of OD_{600} 2.0, the crude enzyme liquid prepared by the pyroptosis method had the highest enzyme activity, which increased by 60% compared with that of the crude enzyme liquid prepared by the ultrasonic method. **[Conclusion]** Pyroptosis serves as a simple, fast, and environmentally friendly method for microbial cell disruption, laying a foundation for the development of synthetic biology and metabolic engineering.

Keywords: *Escherichia coli*; pyroptosis; disruption of microbial cells; sucrose phosphorylase

细胞焦亡最初是巨噬细胞受到病原体侵害后的一种激活炎症反应，是一种细胞程序性死亡方式；它的发生依赖于炎性 caspase 的激活，从而对 gasdermin 蛋白家族的多个成员进行剪切，释放 gasdermin 蛋白 N 端结构域形成多聚

体^[1-3]。Gasdermin 蛋白 N 端结构域具有结合膜的活性，其多聚体形成网状结构，从而使得在膜上形成小孔^[4]。由于细胞内外渗透压不同，细胞吸水胀破死亡^[5]。在细菌和古细菌中存在与 gasdermin 同源的基因^[6]。Johnson 等证明来

自微生物细胞的 *gasdermin* 类蛋白具有介导细胞焦亡的功能, 从而确定细胞焦亡也存在于微生物中且原理相同(图 1); 细胞焦亡在原核细胞中可能是一种“防御系统”, 在受到病毒(噬菌体)的攻击中通过细胞焦亡来稳定群体^[7]。

合成生物学利用人工设计的代谢调控通路构建出全新的生物系统^[8]。随着合成生物学的不断发展, 生物系统在生物医药、天然产物合成、工农业、生物能源等诸多领域具有广泛的应用^[9-10]。天然生物系统往往可以被人工改造成生物学工具, 应用于基础研究、生物医药、生物制造和合成生物学等领域。例如, CRISPR 系统常常被改造成基因编辑工具, 在基础研究和应用过程中被广泛使用^[11]。在合成生物学与

代谢工程的应用过程中, 微生物细胞破碎是不可或缺的一步。例如, 在制备蛋白产品或是胞内化合物, 需要通过细胞破碎将蛋白质和产物释放到细胞外, 进行进一步的分离纯化处理^[12-13]。微生物细胞破碎的方式包括机械法和非机械法^[14]。非机械法采用价格较高的溶菌酶等手段, 存在破碎率低等缺陷^[15]。利用机械法包括超声破碎、匀浆机等破碎细胞是当前的主流, 但有些机械法破碎微生物细胞时因温度升高等原因会影响蛋白或化合物的功能^[16]。细胞焦亡法破碎微生物细胞是一种温和、高效的破碎方式, 适用范围广、操作简便。细胞焦亡法破碎微生物细胞在合成生物学与代谢工程中能够优化生产工艺降低生产成本, 绿色节能环保。

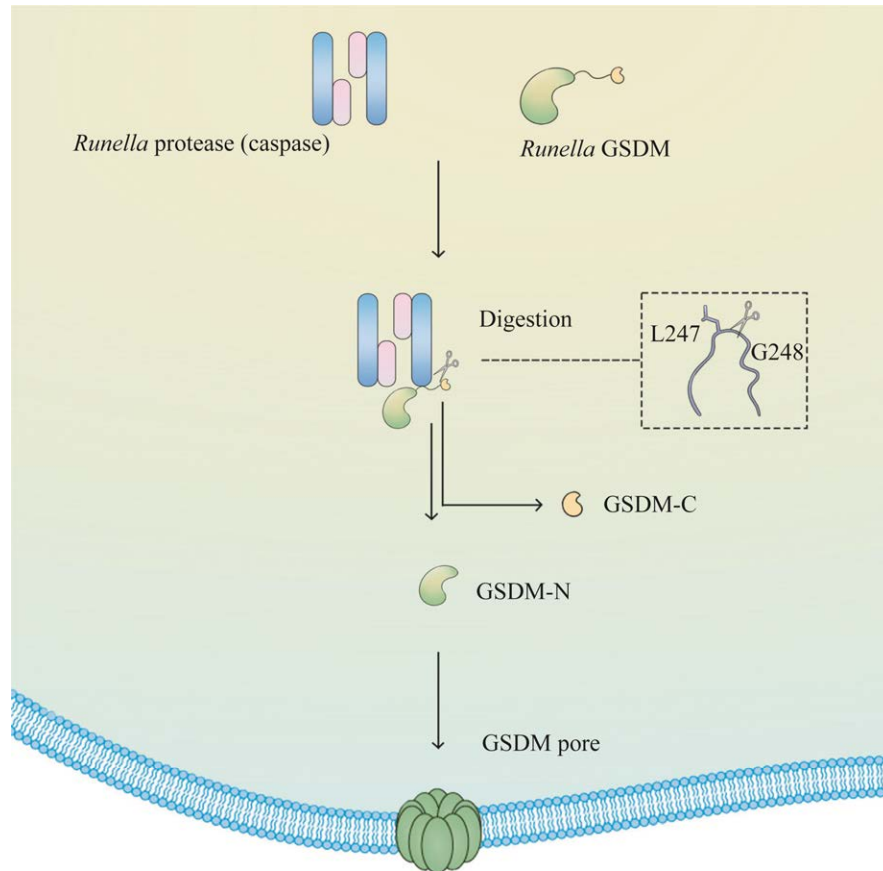


图 1 细胞焦亡法破碎微生物细胞原理图

Figure 1 Schematic of pyroptosis fragmentation of microbial cells.

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 样品

本工作中使用的所有菌株和质粒见表 1。用大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 构建质粒, 以 *E. coli* BW25113 为相应蛋白表达及应用的宿主。所采用载体 pLB1s 和 pYB1k 为 araBAD 启动子及 *rrnB* 终止子, 载体 pSL91c 使用组成型表达的 119 启动子。编码 *Bradyrhizobium tropiciagri*、*Vitiosangium sp.*、*Desulfuromonadales* 和 *Runella*

sp.这 4 种来源的 gasdermin (GSDM)基因以及 *Runella* 来源的 protease 基因均由南京金斯瑞生物科技有限公司人工合成。编码蔗糖磷酸化酶 (sucrose phosphorylase, BASP)的基因由通用生物(安徽)股份有限公司人工合成。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、高保真 DNA 聚合酶和 Gibson 试剂盒, Vazyme Biotech 公司; 蔗糖、葡萄糖、果糖和纤维二糖, 上海盛思生化有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; DNS 溶液, 深

表 1 本研究中使用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Source
Strain		
BW25113	Wild type	This laboratory
B1	BW25113 harboring pLB1s-RP and pSL91c-BGSDM	This study
B2	BW25113 harboring pLB1s-RP and pSL91c-VGSDM	This study
B3	BW25113 harboring pLB1s-RP and pSL91c-DGSDM	This study
B4	BW25113 harboring pLB1s-RP and pSL91c-RGSDM	This study
B9K	BW25113 harboring pYB1k-RP and pSL91c-RGSDM	This study
BJS	BW25113 harboring pLB1s-RGJD	This study
BJK	BW25113 harboring pYB1k-RGJD	This study
BUK	BW25113 harboring pUB1k-RGJD	This study
BJKBP	BW25113 harboring pYB1k-RGJD and pSL91c-BASP	This study
Plasmid		
pLB1s	Expression vector	Laboratory
pYB1k	Expression vector	Laboratory
pUB1k	Expression vector	Laboratory
pSL91c	Expression vector	Laboratory
pSL91c-BGSDM	pSL91c containing GSDM gene from <i>Bradyrhizobium tropiciagri</i>	This study
pSL91c-VGSDM	pSL91c containing GSDM gene from <i>Vitiosangium sp.</i>	This study
pSL91c-DGSDM	pSL91c containing GSDM gene from <i>Desulfuromonadales</i>	This study
pSL91c-RGSDM	pSL91c containing GSDM gene from <i>Runella sp.</i>	This study
pLB1s-RP	pLB1s containing protease gene from <i>Runella sp.</i>	This study
pYB1k-RP	pYB1k containing protease gene from <i>Runella sp.</i>	This study
pLB1s-RGJD	pLB1s containing GSDMJD gene from <i>Runella sp.</i>	This study
pYB1k-RGJD	pYB1k containing GSDMJD gene from <i>Runella sp.</i>	This study
pUB1k-RGJD	pUB1k containing GSDMJD gene from <i>Runella sp.</i>	This study
pSL91c-BASP	pSL91c containing BASP gene from <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	This study

圳市文乐生物科技有限公司。凝胶电泳仪, Bio-Rad 公司; 酶联免疫检测仪, 上海旦鼎国际贸易有限公司; 多功能高真空镀膜仪和日立冷场发射扫描电镜, Hitachi 公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0。M9 无机盐溶液(g/L): 十二水合磷酸氢二钠 17.0, 磷酸二氢钾 3.0, 氯化铵 1.0, 氯化钠 0.5^[17-18]。氯霉素(50 mg/mL)、硫酸链霉素(50 mg/mL)或卡那霉素(50 mg/mL)根据需要添加至培养基中。

1.2 菌株和表达载体的构建

试验中所使用的引物见表 2。质粒的构建依据同源重组的原理^[19]。利用引物 NcoI-F 和 XhoI-R 构建 NcoI-BGSDM-XhoI 片段, Nco I、Xho I 酶切质粒 pSL91c 后得到质粒 pSL91c 骨架片段。NcoI-BGSDM-XhoI 片段和质粒 pSL91c 骨架片段利用 Gibson 组装成质粒 pSL91c-BGSDM。同样的方法将 VGSDM (*Vitiosangium* sp.来源)、DGSDM (*Desulfuromonadales* 来源)和 RGSDM (*Runella* sp.来源)构建到质粒 pSL91c 上。利用引物 NcoI-Ru protease-R 和 XhoI-Ru protease-F 构建 NcoI-RP-XhoI 片段, Nco I、Xho I 酶切质粒 pLB1s 和 pYB1k 后得到质粒 pLB1s 骨架片段和质粒 pYB1k 骨架片段。

NcoI-RP-XhoI 片段利用 Gibson 分别与质粒 pLB1s 骨架片段和质粒 pYB1k 骨架片段组装成质粒 pLB1s-RP 和 pYB1k-RP。利用引物 RGSDM jd-F 和 XhoI-Ru GSDM jd-R 构建质粒 pLB1s-RGJD 和 pYB1k-RGJD。测序正确后将不同来源 GSDM 基因的质粒 pSL91c-GSDM 与质粒 pLB1s-RP 共转入 BW25113 中构建出菌株 B1、B2、B3 和 B4。将质粒 pYB1k-RP 和 pSL91c-RGSDM 共转入 BW25113 构建出菌株 B9K。将质粒 pLB1s-RGJD、pYB1k-RGJD 和 pUB1k-RGJD 分别转入 BW25113 中构建出菌株 BJS、BJK 和 BUK。利用引物 NcoI-BasPase-F 和 XhoI-BasPase-R 构建质粒 pSL91c-BASP, 转入菌株 BJK 中构建出 BJKBP。

1.3 菌株诱导生长曲线

按照 1%接种量将菌株 B1、B2、B3 和 B4 接种在添加氯霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和硫酸链霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液体 LB 培养基中; 将菌株 B9K 接种在添加氯霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和卡那霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液体 LB 培养基中; 将菌株 BJS 接种在添加硫酸链霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液体 LB 培养基中; 将菌株 BJK 和 BUK 接种在添加卡那霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液体 LB 培养基中。37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养至生长稳定期即 12 h 后加入诱导剂(终浓度为

表 2 本研究中使用的引物

Table 2 Primer used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
RGSDM jd-F	CTCGAGGGTAGATCTGGTACTA	22
NcoI-F	GCTAACAGGAGGAATTAACC	20
XhoI-R	TAGTACCAGATCTACCCTCGAG	22
XhoI-Ru GSDM jd-R	TAGTACCAGATCTACCCTCGAGTTACAGAACACGGTTGAAGTCTTG	46
NcoI-Ru protease-R	GCTAACAGGAGGAATTAACCATGTCAACATTAATAACC	39
XhoI-Ru protease-F	TAGTACCAGATCTACCCTCGAGTTAGGTCGTCTTTTGAAG	41
NcoI-BasPase-F	GCTAACAGGAGGAATTAACCATGAAAAACAAGGTGCAGCTC	41
XhoI-BasPase-R	TAGTACCAGATCTACCCTCGAGTCAGGCGACGACAGGCGGATT	43

0.2%的阿拉伯糖), 继续 37 °C、220 r/min 摇床培养。每 2 h 记录下菌液 OD_{600} 值, 观察在加入诱导剂后菌株 OD_{600} 值的变化并绘制成菌株诱导生长曲线图。

1.4 扫描电镜观察

菌株 B4 在 1.3 所述的条件下培养, 分别在加入诱导剂后 0.5、1、2、6 和 12 h 取样进行扫描电镜观察。制样: 取约 20–30 μL 菌体于离心管中, 用戊二醛重悬, 在室温中至少静置 30 min 后放置于 4 °C 冰箱中 8 h 以上。吸出戊二醛固定液, 加入去离子水浸泡样品 4 min, 5 000 r/min 离心 2 min; 吸出去离子水, 再加入去离子水浸泡 5 min, 5 000 r/min 离心 2 min; 吸出去离子水, 再加入去离子水浸泡 6 min, 5 000 r/min 离心 2 min; 吸出去离子水, 加入 50%乙醇浸泡 14 min; 吸出乙醇, 加入 70%乙醇浸泡 14 min; 吸出大部分乙醇, 留取约 100 μL 70%乙醇重悬, 将菌液滴入滤纸包裹的载玻片上(纸包); 将纸包放置于培养皿中, 加入 85%乙醇浸泡 14 min; 倒出乙醇, 加入 95%乙醇浸泡 14 min; 倒出乙醇, 加入 100%乙醇浸泡 15 min (100%乙醇浸泡过程重复 3 次); 取出纸包, 烘干; 取出纸包中的载玻片在多功能高真空镀膜仪中镀膜; 利用扫描电镜观察大肠杆菌细胞表面形态和结构^[20]。

1.5 焦亡菌株破碎细胞后胞外可溶性蛋白含量检测

按照 1%接种量将菌株 B4 接种在添加氯霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和硫酸链霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液体 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床培养 3 h 后放入 25 °C、220 r/min 摇床中培养 12 h, 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。利用 M9 盐溶液溶解菌体后分成两组, 一组加入诱导剂诱导菌株发生细胞焦亡; 另一组控制试验条件与前一组相同但不加入诱导剂。将两组菌液放置于 37 °C、220 r/min 摇床培养, 每 2 h

取 1 mL 菌液, 5 000 r/min 离心 10 min 取上清, 利用 BCA 法测定上清中可溶性蛋白含量。

1.6 活菌计数检测

选取菌株 B9K 和 BJK 进行活菌计数检测。菌株在 1.3 所述的条件下培养, 在培养 12 h 和加入诱导剂继续诱导 12 h 分别取 1 mL 菌液作为样品。各样品菌液连续稀释 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 倍。取各稀释倍数的 200 μL 菌液均匀地涂布在相应氯霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或卡那霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的固体 LB 平板上, 放置于 37 °C 培养箱中培养 12 h 后取出计数^[21]。

1.7 SDS-PAGE 检测

按照 1%接种量将菌株 B4、B9K、BJS、BJK 和 BUK 接种在添加相应氯霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、硫酸链霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)或卡那霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液体 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床培养 12 h 后加入诱导剂(终浓度为 0.2%的阿拉伯糖), 诱导表达 12 h 后 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 进行 SDS-PAGE。按照 1%接种量将菌株 BJKBP 接种在添加氯霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和卡那霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的液体 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床培养 3 h 后放入 25 °C、220 r/min 摇床中培养 12 h, 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 进行 SDS-PAGE^[22]。

1.8 不同方法制备蔗糖磷酸化酶粗酶液的相对酶活比较

菌株 BJKBP 在与上述 SDS-PAGE 的相同培养条件下培养并收集菌体。不同生物量的菌体溶于 1 mL M9 盐溶液中制备成 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 OD/mL (OD_{600})菌液, 再分别利用细胞焦亡法或超声法破碎菌株细胞制备蔗糖磷酸化酶粗酶液。蔗糖磷酸化酶粗酶液根据反应体系[500 μL 10%蔗糖、480 μL 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)、20 μL 粗酶液]在 37 °C 反应釜中反应 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min 取

上清, 利用 DNS 法测定上清中果糖含量的吸光值(A_{540})。蔗糖和磷酸在蔗糖磷酸化酶的作用下生成 G-1-P 和果糖(图 2), 利用 DNS 法测定果糖含量的吸光值(A_{540})来比较超声法和细胞焦亡法制备粗酶液的相对酶活^[23-24]。

2 结果与讨论

2.1 细胞焦亡相关基因的选择

为了筛选出合适的细胞焦亡介导蛋白 GSDM, 本研究克隆了 *Bradyrhizobium tropiciagri*、*Vitiosangium sp.*、*Desulfuromonadales* 和 *Runella sp.* 这 4 种不同来源的 GSDM 及 *Runella sp.* 来源的 protease, 并分别构建质粒。将带有不同来源 GSDM 基因的质粒 pSL91c-GSDM 与质粒 pLB1s-RP 共转入 BW25113, 获得菌株 B1、B2、B3 和 B4。

试验结果表明, 菌株 B1、B2 和 B3 在加入诱导剂后菌液的 OD_{600} 值未见明显变化; 而菌株 B4 在加入诱导剂后菌液的 OD_{600} 值迅速下降, 并在诱导 2 h 后下降到最低点(图 3)。推测原因是当 *Runella sp.* 来源的 GSDM 和 protease (菌株 B4) 共表达时, 引发了细胞焦亡效应, 导致菌株细胞破碎, 使菌液的光密度降低。

2.2 菌株细胞焦亡的验证

为了进一步验证细胞是否发生焦亡, 对菌

株 B4 诱导前后的细胞进行了扫描电镜观察^[25]。观察结果显示, 菌株 B4 诱导前细胞形态饱满完整, 未发现细胞形态的改变(图 4A); 菌株 B4 诱导 0.5 h 后大量的细胞开始发生形态上的变化, 细胞呈现透明状且形态结构发生扭曲变形, 可见多处破损甚至出现细胞碎片(图 4B); 利用细胞计数器对诱导前后细胞进行计数, 诱导前共发现 370 个细胞(图 4C); 诱导 0.5 h 后细胞大量减少, 仅发现 80 个细胞, 其中有 72 个细胞呈现透明状并且形态结构发生扭曲变形(图 4D)。

对诱导后的菌株细胞进一步放大观察, 发现膜结构已被破坏, 细胞破裂(图 4E)。膜上形成了直径大约为 20 nm 的孔隙(图 4F)。试验结果表明, 菌株 B4 诱导后能在细胞膜上形成孔隙, 这些孔隙使得细胞吸水胀破, 进而导致细胞破碎。结合上述试验结果, 验证了菌株 B4 在诱导表达焦亡相关蛋白后能引发细胞焦亡效应, 导致菌株细胞破碎。

菌株 B4 在诱导发生细胞焦亡后菌株细胞破碎。为了确定菌株细胞破碎后细胞内容物的去向, 本研究设计了焦亡菌株破碎细胞后胞外可溶性蛋白含量检测试验。

试验结果显示, 菌株 B4 诱导发生细胞焦亡后, 细胞破碎, 上清中的蛋白含量显著提高。在 6 h 后, 上清中的蛋白含量最多达到 450 mg/L。

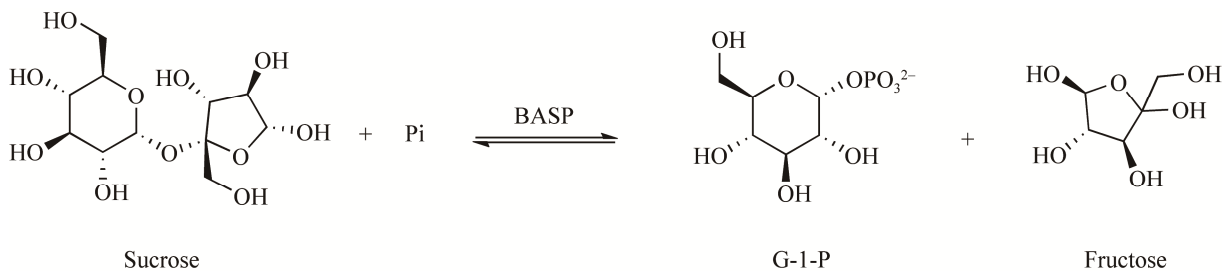


图 2 BASP 的酶促反应

Figure 2 Enzymatic reaction of BASP.

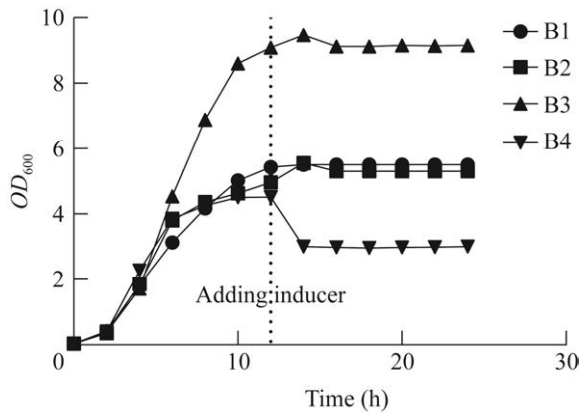


图3 各菌株诱导生长曲线图

Figure 3 Induction growth curve of each strain.

而菌株 B4 非诱导细胞焦亡时,上清中的蛋白含量未发生明显变化,保持在 50 mg/L (图 5)。以上结果验证了菌株 B4 经诱导后引起焦亡效应。在细胞发生破碎的同时,细胞内容物可以有效释放到培养基(胞外)中。

2.3 菌株细胞焦亡的优化

为了进一步提高菌株发生细胞焦亡的效率,本研究通过增加载体拷贝数的方式提高 protease 的表达量,构建质粒 pYB1k-RP,并和质粒 pSL91c-RGSDM 共转入 BW25113,获得菌株 B9K。同时对 *Runella* sp.来源的 GSDM 进行截短改造,获得截短体 GSDMJ D。在诱导表达 GSDMJ D 后,直接引发细胞焦亡,从而使得细胞破碎。将截短体分别克隆至具有不同拷贝数的载体得到质粒 pLB1s-RGJD、pYB1k-RGJD 和 pUB1k-RGJD,并分别转入 BW25113,获得菌株 BJS、BJK 和 BUK。

将上述菌株诱导后进行 SDS-PAGE 分析。根据 SDS-PAGE 图(图 6)显示,GSDM 蛋白分子量为 30 kDa。诱导发生焦亡后,GSDM 蛋白条带大小由 30 kDa 变为 28 kDa,表明其 C 端小肽被降解;且在提高 protease 的表达后,可溶性的 GSDM 的 C 端小肽完全降解。电泳图 5B 中未见

到明显的 GSDMJ D 蛋白条带,这可能是由 GSDMJ D 引发焦亡后细胞迅速破碎并未积累一定量的 GSDMJ D 所引起的。

对上述重组菌株进行诱导生长曲线测试,结果显示(图 7),各菌株在加入诱导剂诱导发生焦亡后,菌液的 OD_{600} 值急剧下降,并在诱导 2 h 后菌液的 OD_{600} 值下降到最低点。其中,菌株 B9K、BJK 和 BUK 菌液的 OD_{600} 值最低点低于菌株 B4、BJS 的菌液的 OD_{600} 值最低点。然而,菌株 BUK 在其菌液的 OD_{600} 值下降到最低点后出现了回升现象,进一步基因测序结果表明菌株 BUK 出现了突变,因此不适合作为大肠杆菌细胞焦亡菌株。

进一步对菌株 B9K 和 BJK 进行活菌计数检测,菌株 BJK 诱导前活菌数为 2.25×10^9 CFU/mL (图 8A);诱导 12 h 后活菌数为 6.5×10^4 CFU/mL (图 8B);死亡率为 99.997%。菌株 B9K 诱导前活菌数为 3.9×10^9 CFU/mL (图 8C);诱导 12 h 后活菌数为 1.37×10^6 CFU/mL (图 8D);死亡率为 99.965%。上述结果表明,虽然菌液 OD_{600} 值未发生变化,但大部分细胞已经死亡。试验结果验证了细胞焦亡法能有效使大肠杆菌破碎死亡,焦亡菌株 BJK 的效果更为显著。此外,根据诱导生长曲线和基因测序显示,本菌株性质稳定,不易发生突变。综上所述,菌株 BJK 是作为可控细胞焦亡的最优菌株。

2.4 不同方法制备蔗糖磷酸化酶粗酶液的相对酶活比较分析

为了验证细胞焦亡法破碎细胞对胞内产物的影响,本研究在制备蔗糖磷酸化酶粗酶液的应用中,对比了细胞焦亡法破碎和超声破碎得到的粗酶液的相对酶活。将表达蔗糖磷酸化酶的质粒 pSL91c-BASP 转入焦亡菌株 BJK 中,构建出菌株 BJKBP。根据菌株 BJKBP 的 SDS-PAGE 图显示,BASP 蛋白分子量约 55 kDa (图 6)。菌

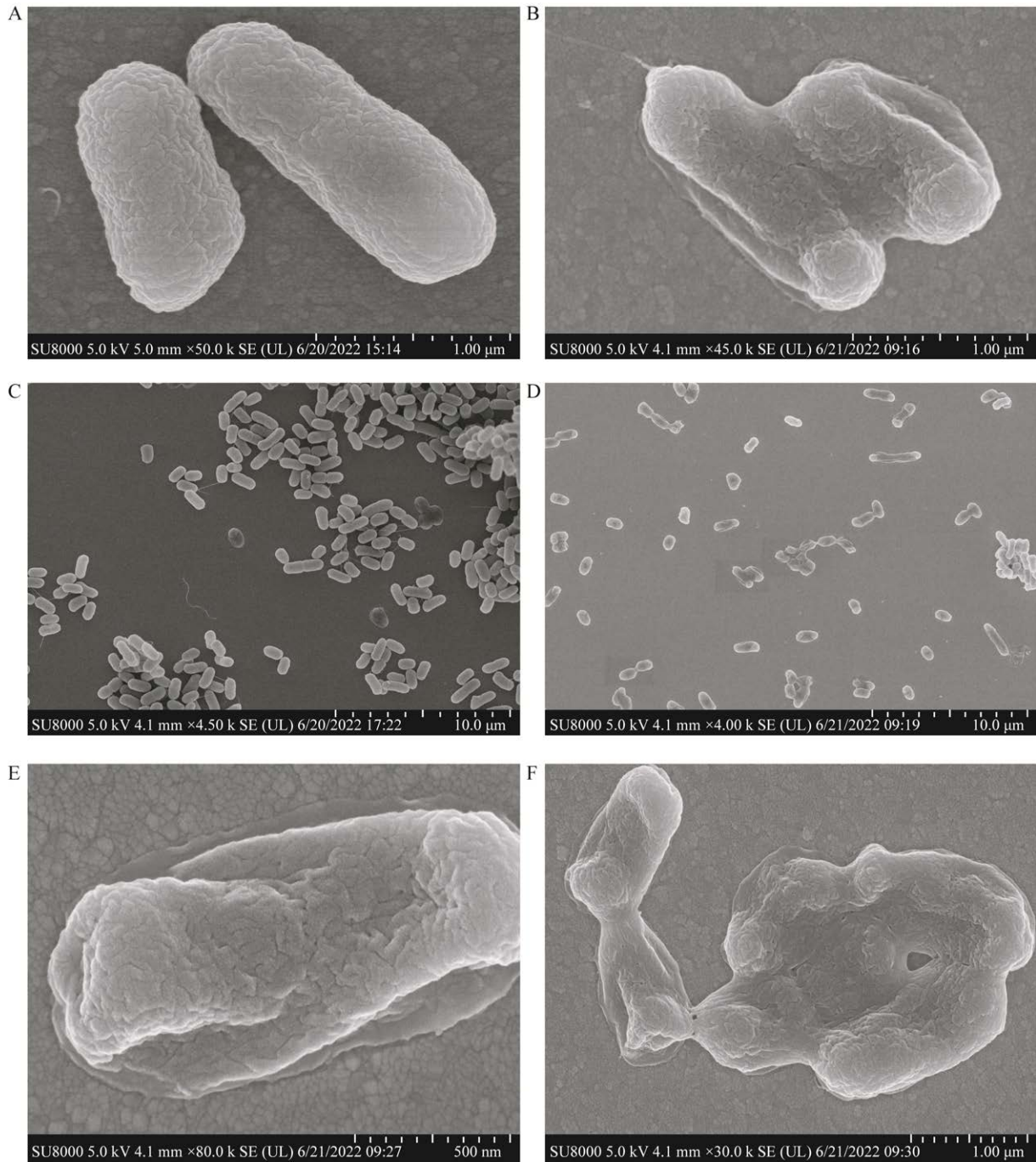


图 4 扫描电镜下菌株 B4 细胞的形态结构 A: 诱导前菌株 B4 细胞的形态结构. B: 诱导 0.5 h 后菌株 B4 细胞的形态结构. C: 诱导前菌株 B4 细胞群的形态结构. D: 诱导后菌株 B4 细胞群的形态结构. E: 诱导后菌株 B4 细胞的膜结构. F: 诱导后菌株 B4 细胞的膜孔结构

Figure 4 Morphological structure of strain B4 cells under scanning electron microscope. A: Morphological structure of B4 cells before induction. B: Morphological structure of B4 cells after induction for 0.5 h. C: Morphological structure of B4 cells before induction. D: Morphological structure of B4 cells after induction. E: Membrane structure of B4 cells after induction. F: Membrane pore structure of B4 cells after induction.

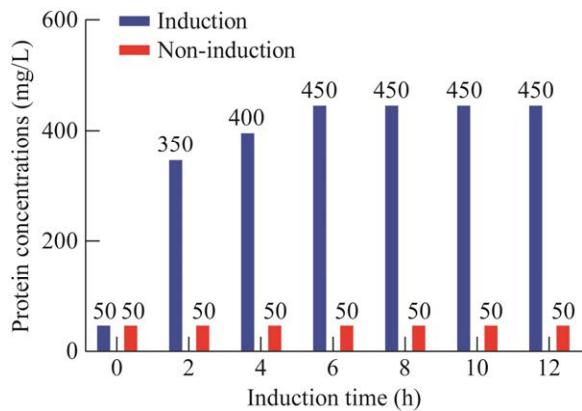


图5 菌株 B4 诱导与非诱导细胞焦亡的胞外可溶性蛋白含量分析

Figure 5 Analysis of extracellular soluble protein content in induced and non-induced pyroptosis of strain B4.

株 BJKBP 表达蔗糖磷酸化酶后, 利用细胞焦亡法和超声法制备成粗酶液。

结果显示, 在制备粗酶液的生物量即菌液 OD_{600} 值为 1.0、2.0、4.0 和 6.0 时, 细胞焦亡法制备的粗酶液的相对酶活显著高于超声法制备粗酶液的相对酶活。在制备粗酶液的菌液 OD_{600} 值为 2.0 时, 细胞焦亡法制备的粗酶液相对酶活最高, 且比超声法制备粗酶液的相对酶活提高了 60%。在制备粗酶液的菌液 OD_{600} 值为 8.0、10.0 时, 蔗糖磷酸化酶酶量充足, 细胞焦亡法制备的粗酶液与超声法制备的粗酶液的相对酶活相同(图 9)。试验结果表明, 细胞焦亡法破碎

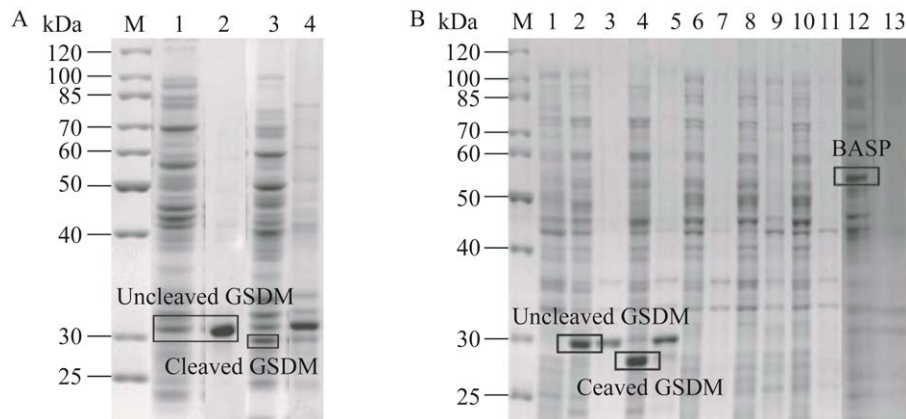


图6 各菌株表达目的蛋白的 SDS-PAGE 分析 A: 菌株 B4 诱导表达目的蛋白前后的 SDS-PAGE 分析. M: Protein Marker; 1: 菌株 B4 诱导表达目的蛋白前的可溶性提取物; 2: 菌株 B4 诱导表达目的蛋白前的不可溶性提取物; 3: 菌株 B4 诱导目的蛋白表达后的可溶性提取物; 4: 菌株 B4 诱导目的蛋白表达后的不可溶性提取物. B: 菌株 B9K、BJS、BJK、BUK 和 BJKBP 诱导表达目的蛋白前后的 SDS-PAGE 分析. M: Protein Marker; 1: 对照; 2-3: 诱导前菌株 B9K 目的蛋白表达(依次为可溶性提取物和不可溶性提取物, 后述同理); 4-5: 诱导后菌株 B9K 目的蛋白表达; 6-11: 诱导后菌株 BJS、BJK 和 BUK 目的蛋白表达; 12-13: 菌株 BJKBP 目的蛋白表达

Figure 6 SDS-PAGE analysis of the target protein expressed by each strain. A: SDS-PAGE analysis of strain B4 before and after expression of target proteins. M: Protein Marker; 1: Soluble extract before the expression of target protein induced by strain B4; 2: The insoluble extract before the target protein was induced by strain B4; 3: Soluble extract of strain B4 after induction of target protein expression; 4: Insoluble extract of target protein expression induced by strain B4. B: SDS-PAGE analysis of strains B9K, BJS, BJK, BUK and BJKBP before and after expression of target proteins. M: Protein Marker; 1: Control *E. coli* BW 25113; 2-3: Expression of B9K target protein before induction (soluble extract and insoluble extract in turn, the same as the following); 4-5: B9K target protein expression after induction; 6-11: Expression of BJS, BJK and BJK target proteins after induction; 12-13: Expression of strain BJKBP target protein.

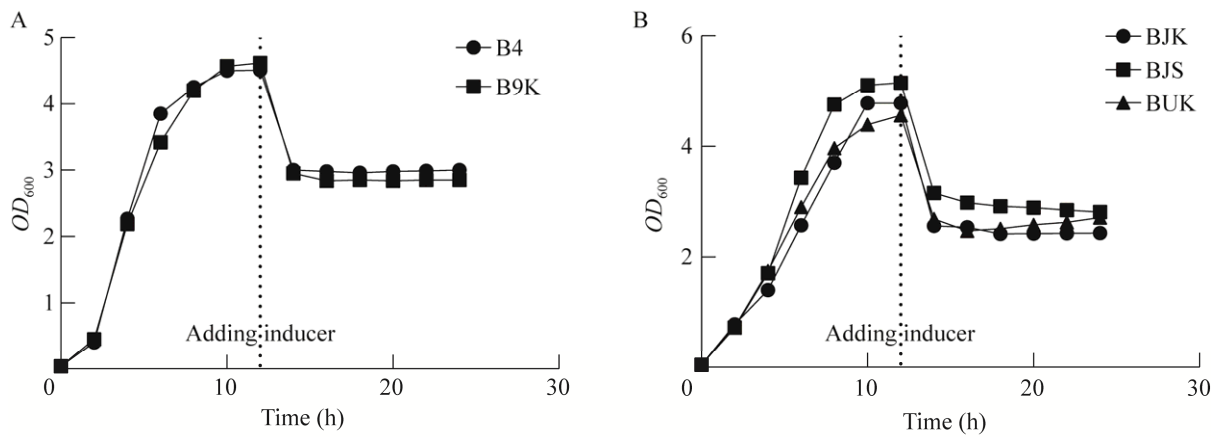


图 7 各菌株诱导生长曲线图 A: 菌株 B4 和 B9K 诱导生长曲线图. B: 菌株 BJS、BJK 和 BUK 诱导生长曲线图

Figure 7 Induction growth curve of each strain. A: Strain B4 and B9K induced growth curve. B: Strain BJS, BJK and BUK induced growth curve.

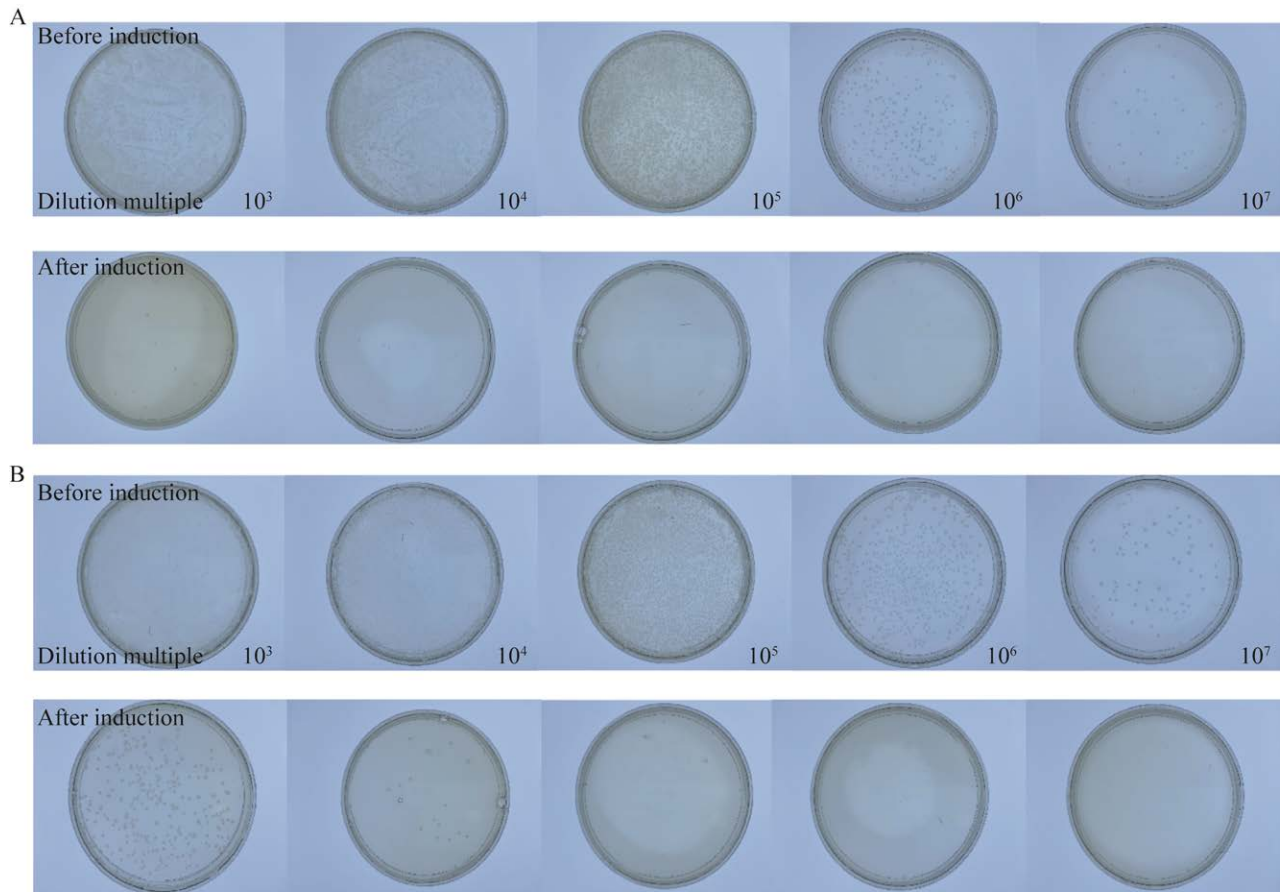


图 8 菌株 BJK (A)和 B9K (B)发生焦亡前后的活菌计数统计

Figure 8 Count statistics of live bacteria before and after pyroptosis of strains BJK (A) and B9K (B).

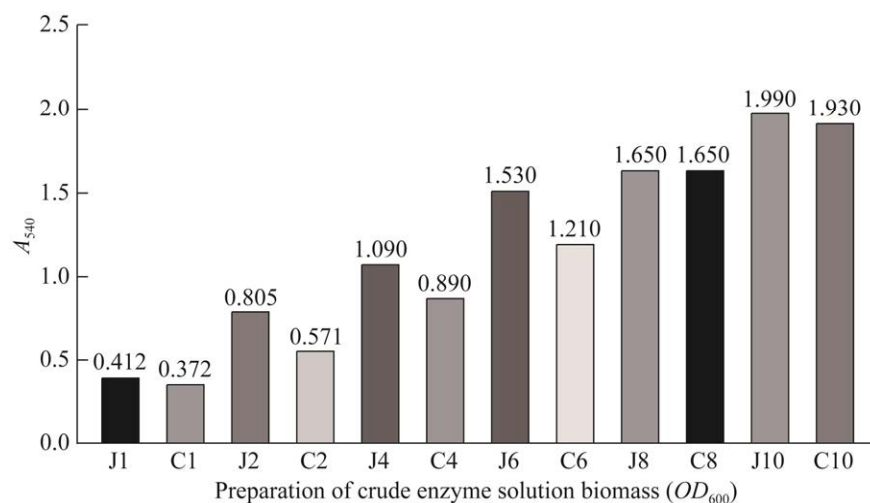


图9 不同方式制备的蔗糖磷酸化酶粗酶液的相对酶活 以换算为稀释前 540 nm 光吸收值为相对酶活。J1–J10: 利用细胞焦亡法制备粗酶液用于反应, 制备粗酶液的菌液的 OD_{600} 值为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0; C1–C10: 超声法制备粗酶液用于反应, 制备粗酶液的菌液的 OD_{600} 值为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0

Figure 9 Relative enzyme activity of crude sucrose phosphorylase solution prepared by different methods. J1–J10: The crude enzyme solution was prepared by cell pyroptosis method for reaction. The OD_{600} values of the bacterial solution for preparing the crude enzyme solution were 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, and 10.0; C1–C10: The crude enzyme solution was prepared by ultrasonic method for the reaction. The OD_{600} values of the crude enzyme solution were 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, and 10.0.

大肠杆菌后内容物释放且更好地保留了胞内产物的活性。并且此方法仅需在表达相关酶后, 加入诱导剂即可破碎细胞用于检测酶活, 极大地减少了工作量, 优化了生产工艺。综上所述, 细胞焦亡法破碎微生物细胞可取代超声破碎成为代谢工程与合成生物学中的重要技术手段。

3 结论

本研究验证了细胞焦亡确实可以使大肠杆菌细胞破碎。该细胞焦亡系统具有严谨且破碎效率高等特性。焦亡菌株在诱导表达焦亡相关蛋白 2 h 后大肠杆菌细胞破碎死亡, 内容物释放。Protease 处理后的 GSDM 和 GSDMJ D 的表达水平对焦亡具有重要影响。通过进一步的表

达优化, 最终获得可控细胞焦亡的最优菌株 BJK。另一方面, 将上述系统和超声法应用于制备蔗糖磷酸化酶粗酶液中, 细胞焦亡法制备的粗酶液的相对酶活显著高于超声法制备粗酶液的相对酶活。在制备粗酶液的菌液 OD_{600} 值为 2.0 时, 细胞焦亡法制备的粗酶液相对酶活最高, 并且比超声法制备粗酶液的相对酶活提高 60%。细胞焦亡法仅需加入诱导剂诱导一定时间, 即可破碎微生物细胞制备成粗酶液, 操作简单快捷, 极大地减少了工作量, 优化了生产工艺。综上所述, 细胞焦亡法可以取代传统的微生物细胞破碎方式。在合成生物学与代谢工程中, 细胞焦亡法破碎微生物细胞会逐渐成为新的生物学技术手段, 让生物合成取代化学合成并成为主流。

REFERENCES

- [1] LIU X, XIA SY, ZHANG ZB, WU H, LIEBERMAN J. Channelling inflammation: gasdermins in physiology and disease[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(5): 384-405.
- [2] 王锐, 付萍. 细胞焦亡的发生机制研究[J]. *医学信息*, 2021, 34(11): 43-46.
WANG R, FU P. Study on the mechanism of pyroptosis[J]. *Medical Information*, 2021, 34(11): 43-46 (in Chinese).
- [3] 胡颖超, 杨硕. 细胞焦亡的研究进展[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(8): 1245-1251.
HU YC, YANG S. Research progress on pyroptosis[J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences Edition)*, 2021, 41(8): 1245-1251 (in Chinese).
- [4] LIU X, ZHANG ZB, RUAN JB, PAN YD, MAGUPALLI VG, WU H, LIEBERMAN J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 153-158.
- [5] SHI JJ, ZHAO Y, WANG K, SHI XY, WANG Y, HUANG HW, ZHUANG YH, CAI T, WANG FC, SHAO F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-665.
- [6] DORON S, MELAMED S, OFIR G, LEAVITT A, LOPATINA A, MAI KR, AMITAI G, SOREK R. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome[J]. *Science*, 2018, 359(6379): eaar4120.
- [7] JOHNSON AG, WEIN T, MAYER ML, DUNCAN-LOWEY B, YIRMIYA E, OPPENHEIMER-SHAANAN Y, AMITAI G, SOREK R, KRANZUSCH PJ. Bacterial gasdermins reveal an ancient mechanism of cell death[J]. *Science*, 2022, 375(6577): 221-225.
- [8] SLEATOR RD. Synthetic biology: from mainstream to counter-culture[J]. *Archives of Microbiology*, 2016, 198(7): 711-713.
- [9] 陈涛, 崔真真, 户文亚, 王智文, 赵学明. 代谢工程发展 30 年[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1477-1493.
CHEN T, CUI ZZ, HU WY, WANG ZW, ZHAO XM. Thirty years development of metabolic engineering: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(5): 1477-1493 (in Chinese).
- [10] 严伟, 信丰学, 董维亮, 周杰, 章文明, 姜岷. 合成生物学及其研究进展[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(5): 1-9.
- YAN W, XIN FX, DONG WL, ZHOU J, ZHANG WM, JIANG M. Synthetic biology and research progress[J]. *Journal of Biology*, 2020, 37(5): 1-9 (in Chinese).
- [11] HASHEMI A. CRISPR-Cas9/CRISPRi tools for cell factory construction in *E. coli*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(7): 96.
- [12] 吴蕾, 洪建辉, 甘一如, 张瑛. 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.
WU L, HONG JH, GAN YR, ZHANG Y. Study on recombinant *E. coli* by disruption in a high pressure homogenizer[J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2001, 15(2): 191-194 (in Chinese).
- [13] 姚洪文, 范玉梅, 郭素格. 纳米级微生物细胞破碎机在酱油生产中的应用[J]. *中国酿造*, 2005, 24(5): 30-34.
YAO HW, FAN YM, GUO SG. Application of nanometer grade microorganism cell crushing machine in soy sauce production[J]. *China Brewing*, 2005, 24(5): 30-34 (in Chinese).
- [14] GUREVICH GA, FIKHTE BA, USHAKOV VM. Microbial cell breakdown for use in research, food, drugs etc. mfr.[P]. SU626118-A, 1978-09-25.
- [15] WU T, JIANG Q, WU D, HU Y, CHEN SG, DING T, YE XQ, LIU DH, CHEN JCl. What is new in lysozyme research and its application in food industry? a review[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 698-709.
- [16] ZHOU W, WU SL, ZHAO YY, ZHANG H, CUI ZK. Microorganism cell breaker comprises crushing box body comprising base and crushing chamber provided with cell crushing component comprising ultrasonic vibration component and cell crushing groove rotatably connected with base[P]. CN214991557-U, 2021-12-03.
- [17] 张红, 林金连, 胡定行, 刘贵友, 孙磊. 大肠杆菌高密度发酵表达 4-羟基苯乙酸酯 3-羟化酶及咖啡酸的高效生物合成[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(9): 3466-3477.
ZHANG H, LIN JL, HU DH, LIU GY, SUN L. High-density fermentation of *Escherichia coli* to express 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase and efficient biosynthesis of caffeic acid[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(9): 3466-3477 (in Chinese).
- [18] WANG L, ZHENG P, HU MR, TAO Y. Inorganic phosphate self-sufficient whole-cell biocatalysts containing two co-expressed phosphorylases facilitate

- cellobiose production[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2022, 49(3): kuac008.
- [19] MEARLS EB, OLSON DG, HERRING CD, LYND LR. Development of a regulatable plasmid-based gene expression system for *Clostridium thermocellum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(18): 7589-7599.
- [20] CZERWIŃSKA-GŁÓWKA D, KRUKIEWICZ K. Guidelines for a morphometric analysis of prokaryotic and eukaryotic cells by scanning electron microscopy[J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3304.
- [21] 苏梦缘, 伍新叶, 朱曦, 王茜瑛, 邵嫻, 李克克, 梁运祥, 李英俊. 微生态制剂活菌的计数方法分析[J]. *中南农业科技*, 2022(3): 139-143.
- SU MY, WU XY, ZHU X, WANG XY, SHAO Y, LI KK, LIANG YX, LI Y. Analysis of counting method of viable bacteria in microecological preparations[J]. *South-Central Agricultural Science and Technology*, 2022(3): 139-143 (in Chinese).
- [22] 常胜合, 舒海燕, 秦广雍, 李宗伟, 李宗义, 王雁萍, 杨天佑, 陈林海. 凝胶电泳蛋白质染色方法研究进展[J]. *河南农业科学*, 2006, 35(5): 8-12.
- CHANG SH, SHU HY, QIN GY, LI ZW, LI ZY, WANG YP, YANG TY, CHEN LH. Advances in methods of protein bands staining on SDS-PAGE[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2006, 35(5): 8-12 (in Chinese).
- [23] 陈显玲, 宋连萍, 周燕妮, 王海芳, 谭夏云, 苏龙. 蔗糖磷酸化酶产生菌的筛选及其催化合成 α -熊果苷条件优化[J]. *中国酿造*, 2022, 41(3): 117-124.
- CHEN XL, SONG LP, ZHOU YN, WANG HF, TAN XY, SU L. Screening of sucrose phosphorylase producing strain and enzymatic synthesis conditions optimization of α -arbutin[J]. *China Brewing*, 2022, 41(3): 117-124 (in Chinese).
- [24] 杨林莉, 夏媛媛, 陈献忠. 蔗糖磷酸化酶的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4904-4917.
- YANG LL, XIA YY, CHEN XZ. Research progress on sucrose phosphorylase[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4904-4917 (in Chinese).
- [25] ZHANG YB, LIU XY, WANG YF, JIANG PP, QUEK SY. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Food Control*, 2016, 59: 282-289.