

R 质粒对大肠杆菌 L-天门冬酰胺酶活力的影响

胡彦民 王春祥* 张秀阁*

(河北师范大学生物系, 石家庄 050016)

摘要 对含有不同 R 质粒的 6 株大肠杆菌 J53 和不含质粒的大肠杆菌 J53 所产生的 L-天门冬酰胺酶的活力进行了比较, 前者的 L-天门冬酰胺酶活力比后者的降低了约 1/2—3/4。消除大肠杆菌 J53 细胞中的 R 质粒后, L-天门冬酰胺酶活力明显增加并与不含质粒的大肠杆菌 J53 的相近。结果表明, 在大肠杆菌内存在的 R 质粒对寄主的 L-天门冬酰胺酶活力具有明显的抑制作用。

关键词 R 质粒; 大肠杆菌; L-天门冬酰胺酶

* 本系 87 级毕业生。

R质粒 (R-plasmid) 主要决定细菌对抗生素产生抗性,但在大肠杆菌细胞内存在的R质粒会改变寄主细胞壁外膜 (outer membrane) 的蛋白质组成和含量^[1]。R质粒在细胞内所表现的其他性状,比如对细菌细胞代谢的影响,是值得关注的问题。

L-天门冬酰胺酶是由大肠杆菌等产生的一种胞内酶。该酶的作用在于将L-天门冬酰胺水解成天门冬氨酸和氨。医学上用L-天门冬酰胺酶治疗白血病。本实验主要探讨大肠杆菌细胞内存在的R质粒对L-天门冬酰胺酶活力的影响,并与不含质粒的同一菌株作了比较。现将初步结果报告如下。

材料与方 法

(一) 菌株和质粒

本实验采用的菌株属于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K12 系列,命名为 J53。将菌株、质粒、抗性标记以及来源列于表 1。

表1 菌株、质粒、抗性标记以及来源

菌株	质粒	抗性标记 ^[2]	来源
<i>E. coli</i> J53	无	无	英国伦敦大学 学院生物系, Ro- wbury 教授实验 室。
<i>E. coli</i> J53	RP ₁	Ap, Km, Tc	
<i>E. coli</i> J53	R6K	Ap, Sm	
<i>E. coli</i> J53	R386	Tc	
<i>E. coli</i> J53	R387	Cm, Sm	
<i>E. coli</i> J53	R27	Tc	
<i>E. coli</i> J53	S-a	Cm, Km, Sm, Su	

注: Ap: 氨苄青霉素; Km: 卡那霉素; Tc: 四环素; Sm: 链霉素; Su: 磺胺

(二) 培养基

1. 牛肉膏蛋白胨液体培养基 (% , 简称 NB): 蛋白胨 1, 牛肉膏 0.3, NaCl 0.5, pH 7.0—7.2。

2. 伊红美蓝培养基 (EMB): 肉汤蛋白胨培养基 100ml (pH7.6), 20% 乳糖溶液 2ml, 2% 伊红溶液 2ml, 0.5% 美蓝溶液 1ml。

(三) 主要试剂和仪器

十二烷基磺酸钠 (SDS) 为 Sigma 产品。奈氏试剂: HgI₂ 57.5g, KI 40g, NaOH 50g, 溶于 500ml 蒸馏水中。以上试剂为国产, 分

析纯。

L-天门冬酰胺为 Sigma 产品,层析纯。考马斯亮蓝 G250, Fluka 产品。牛血清白蛋白为中国医药公司产品。导津 UV-260 紫外分光光度计。GL20A 超速离心机 (湘西仪器厂)。超声波细胞破碎仪 (通化机械厂)。

(四) L-天门冬酰胺酶粗酶液的提取

将 5ml NB 过夜培养的细菌接种于 100 ml NB 中, 37°C 振荡培养 24 小时。将培养物以 4000r/min, 4°C 离心 10 分钟收获细胞。用 100 ml TE 缓冲液 [Tris · HCl 10mmol/L (pH 8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0), pH8.0] 洗涤沉淀以除去多余的蛋白质。以同样的离心方法弃去上清液, 用 0.8ml TE 缓冲液悬浮细胞。利用超声波细胞破碎仪将细胞破碎, 选用最大功率, 在冰浴里破碎四次, 每次 15 秒钟。再以 18000r/min, 4°C 离心 30 分钟。上清液即为 L-天门冬酰胺酶粗酶液, 用于酶活力测定以及蛋白质浓度的测定。

(五) L-天门冬酰胺酶活力

采用奈氏试剂测定法^[3]。

(六) 蛋白质浓度的测定

采用考马斯亮蓝蛋白质浓度测定法^[4]。

(七) 质粒消除

按照 SDS 消除质粒的方法^[5]进行。

结果与讨论

(一) 含有 R 质粒和不含质粒的同种菌株 L-天门冬酰胺酶活力的比较

从含有不同 R 质粒的 6 株 *E. coli* J53 和不含质粒的该菌中提取 L-天门冬酰胺酶, 并测定了酶活力 (表 2)。不含质粒菌的 L-天门冬酰胺酶活力为 6.67, 而含有质粒 RP₁ 等 6 株菌的 L-天门冬酰胺酶的活力比前者的降低了约 1/2—3/4, 表明 R 质粒明显地抑制了 L-天门冬酰胺酶的活力。

(二) 消除质粒

为了证明 R 质粒对 L-天门冬酰胺酶活力的抑制作用, 利用 SDS 对含有 R 质粒的菌株进行处理。结果表明, 能被 SDS 消除掉的质粒为

表2 含质粒菌和不含质粒菌的L-天门冬酰胺酶活力比较

菌株及质粒	NH ₄ ⁺ 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	酶活单位 (u/ml)	蛋白质浓度 (mg/ml)
<i>E. coli</i> J53	2.00	6.67	1.50
<i>E. coli</i> J53 RP ₄	0.79	2.63	2.17
<i>E. coli</i> J53 R6K	1.07	3.57	2.40
<i>E. coli</i> J53 R386	0.86	2.87	2.37
<i>E. coli</i> J53 R387	0.47	1.57	2.14
<i>E. coli</i> J53 R27	0.56	1.87	2.43
<i>E. coli</i> J53 S-a	1.02	3.40	2.09

以上实验数据为3次重复实验的平均值。

R6K、Sa、R387, 用浓度为8%的SDS培养细菌48小时, 质粒消除的效果最好。利用链霉素作为抗性标记, 在含链霉素的EMB培养基上不再生长的菌落, 表明质粒已被消除。

(三) 消除质粒后的大肠杆菌的L-天门冬酰胺酶活力的变化

选择3株消除了R质粒的菌株, 测定它们L-天门冬酰胺酶的活力。从表3可以看出, R6K和S-a被消除之后, 该菌的L-天门冬酰胺酶活力比含质粒时提高了约1倍, 并与不含质

表3 质粒消除后的菌株L-天门冬酰胺酶活力的变化

菌株	质粒	酶活力单位	蛋白质浓度 (mg/ml)
<i>E. coli</i> J53	无	6.67	1.50
<i>E. coli</i> J53	R6K	3.57	2.40
<i>E. coli</i> J53	R6K被消除	7.10	1.43
<i>E. coli</i> J53	R387	1.57	2.14
<i>E. coli</i> J53	R387被消除	6.53	1.33
<i>E. coli</i> J53	S-a	3.40	2.09
<i>E. coli</i> J53	S-a被消除	6.84	1.51

质粒消除菌的测定数据为3株菌的三次实验的平均值。

粒的菌相近。R387被消除之后, 酶活力也有了大幅度的提高。大肠杆菌由于失去了R质粒而使L-天门冬酰胺酶活力恢复正常。

(四) L-天门冬酰胺酶的活力与蛋白质浓度之间的关系

与含有质粒的菌相比, 不含质粒菌的L-天门冬酰胺酶活力最高, 而粗酶液中蛋白质浓度却最低(表2); 被消除了质粒的菌, 随着酶活力的提高, 蛋白质浓度明显下降(表3)。由此可以推测, 质粒的存在可能是增加了质粒编码的蛋白质的含量从而降低了寄主L-天门冬酰胺酶的合成。

总之, 从以上结果可以看出, 在大肠杆菌细胞内存在的R质粒除了赋予细菌抗生素抗性外, 还明显地抑制了寄主细胞L-天门冬酰胺酶的活性, 使该酶活力降低了约2—3倍。质粒对L-天门冬酰胺酶活力的这种抑制作用有待于进一步的研究。

目前, 人们比较注重新性状质粒的挖掘, 而忽略已知质粒的其他性状的发现。本实验说明了质粒在细菌代谢中的作用, 从而揭示R质粒可能有的新性状。

参 考 文 献

1. Rossouw F T and R J Rowbury: *Journal of Applied Bacteriology*, 56: 63—79, 1984.
2. Hardy K: Plasmid, IRL Press, Oxford, England, p. 41, 1987.
3. 中山大学生物系生化微生物学教研室编: 生化技术导论, p. 66, 人民教育出版社, 1978.
4. 李琳等: 植物生理学通讯, 6: 51—55, 1980.
5. Munemitsu Tomoeda et al.: *J. Bacteriol.*, 95: 1078—1089, 1968.

THE EFFECT OF R-PLASMID ON L-ASPARAGINASE ACTIVITY OF *ESCHERICHIA COLI*

Hu Yanmin Wang Chunxiang Zhang Xiuge

(Biology Department, Hebei Teacher's University, Shijiazhuang 050016)

L-asparaginase activity produced by six *E. coli* J53 strains containing different plasmids and plasmidfree *E. coli* J53 strain was compared. The enzyme activity of the plasmid-

bearing strains was about 2—4 times lower than that of the plasmid free ones. Curing the R plasmids from *E. coli* J53, the activity of L-asparaginase increased and was close to that of the plasmid free strain. It is proved that the remarkable inhibition of L-asparaginase activity results from the presence of the plasmid in *E. coli*.

Key words R-plasmid; *Escherichia coli*; L-asparaginase