

## *arcA* 基因提高大肠杆菌对有机溶剂的耐受性

张法<sup>1,2</sup> 韩瑞枝<sup>1,2</sup> 许国超<sup>1,2</sup> 董晋军<sup>1,2</sup> 倪晔<sup>1,2\*</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 【目的】将来源于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* JUCT1)的基因 *arcA* (编码精氨酸脱亚胺酶)整合到 *Escherichia coli* JM109(DE3)基因组中,以提高该菌对有机溶剂的耐受性。【方法】以 *P. putida* JUCT1 的基因组为模板扩增基因 *arcA*,并与 pET-20b(+)连接后导入 *E. coli* JM109(DE3)中,验证该基因提高 *E. coli* JM109(DE3)对有机溶剂的耐受性。利用 Red 同源重组的方法将 *arcA* 整合到 *E. coli* JM109(DE3)基因组中。【结果】*E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 在添加了 2.0% (体积比)环己烷、0.1% (体积比)甲苯、4.0% (体积比)萘烷和 0.1% (体积比)丁醇的培养基中培养 8 h 后,其  $OD_{660}$  由初始的 0.2 分别上升到 0.8、0.9、1.8 和 1.3。将 *arcA* 成功整合到 *E. coli* JM109(DE3)基因组中,获得了具有较好遗传稳定性的溶剂耐受 *E. coli* JM109(DE3)宿主菌株。【结论】外源基因 *arcA* 能提高大肠杆菌菌株的有机溶剂耐受性,为工业化应用中耐溶剂微生物菌株的构建提供了实验依据和理论基础。

**关键词:** 精氨酸脱亚胺酶, Red 同源重组, 有机溶剂耐受性, 恶臭假单胞菌, 大肠杆菌

## Enhanced organic solvent tolerance of *Escherichia coli* by *arcA*

ZHANG Fa<sup>1,2</sup> HAN Rui-Zhi<sup>1,2</sup> XU Guo-Chao<sup>1,2</sup> DONG Jin-Jun<sup>1,2</sup> NI Ye<sup>1,2\*</sup>

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] Gene *arcA* encoding arginine deiminase from *Pseudomonas putida* JUCT1 was integrated into the genome of *Escherichia coli* JM109(DE3) to enhance its organic solvent tolerance (OST). [Methods] Using genome of *P. putida* as template, we amplified *arcA* gene and expressed it in strain *E. coli* JM109(DE3). Subsequently, *arcA* gene was integrated into the genome of *E. coli* JM109(DE3) by red-mediated recombination to obtain a strain with an inheritable OST phenotype. [Results] When growing in 2.0% (V/V) cyclohexane, 0.1% (V/V) toluene, 4.0% (V/V) decalin and 0.1%

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 21276112, 31401634); National Basic Research and Development Program of China (No. 2011CB710800); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (No. BK20140135)

\*Corresponding author: Tel: 86-510-85329265; E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

Received: March 25, 2015; Accepted: May 11, 2015; Published online (www.cnki.net): June 02, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21276112, 31401634); 国家 973 计划项目(No. 2011CB710800); 江苏省自然科学基金项目(No. BK20140135)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85329265; E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2015-03-25; 接受日期: 2015-05-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-02

(*V/V*) butanol, the  $OD_{660}$  values of recombinant *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* could reach about 0.8, 0.9, 1.8 and 1.3, respectively. **[Conclusion]** Our results demonstrate that microbial OST could be enhanced by the expression of *arcA* gene. Importantly, this work provides experimental data and molecular basis for constructing OST bacteria for industrial applications.

**Keywords:** Arginine deiminase, Red-mediated recombination, Organic solvent tolerance, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* JM109(DE3)

随着石油、煤炭等能源的极度消耗以及环境污染日益严重, 生物技术在医药、农业、精细化工和能源等领域的应用得到了人们极大的关注。因此, 构建适应工业化要求的微生物细胞工厂具有重要的现实意义。在生物能源和生物催化等应用领域, 微生物宿主细胞的有机溶剂耐受性极为重要。有机溶剂由含有不同化学结构(如苯环、脂肪族醇类等)的化合物组成, 这些化合物聚集在细胞里, 导致细胞内离子和代谢物的丢失, 以及胞内 pH 和细胞膜电势的改变, 最终引起细胞受损甚至死亡<sup>[1-3]</sup>。有报道称有机溶剂对细胞的危害主要取决于其在细胞内的浓度, 且与其 LogP 值密切相关<sup>[4-5]</sup>。LogP 值指有机溶剂在辛醇和水相(1:1)中的分配系数<sup>[6]</sup>。一般而言, LogP 越小, 对细胞的危害越大<sup>[7]</sup>。大多数微生物对有机溶剂的耐受性很低, 甚至 0.1% (体积比)的有机溶剂(如甲苯)就能使细胞致死<sup>[8]</sup>。因此, 研究微生物有机溶剂耐受机制, 提高微生物耐受性具有十分重要的作用。

1989年, Inoue等<sup>[6]</sup>筛选获得一株能够耐受50% (体积比)甲苯和高浓度环己烷及二甲苯的 *Pseudomonas putida*, 引起了人们对微生物菌株有机溶剂耐受性的关注, 并不断揭示微生物有机溶剂耐受性机制。这些机制包括: 改变细胞膜疏水性<sup>[9]</sup>, 细胞的形态<sup>[10]</sup>, 以及通过外排泵将胞内有机溶剂排出胞外<sup>[11-12]</sup>等。

提高微生物有机溶剂耐受性的传统方法包括物理或化学法诱变<sup>[13]</sup>、有机溶剂驯化<sup>[14]</sup>等方法, 但这些方法存在周期长和 workload 大等缺陷。基因工程的方法具有操作简单、周期短等优点, 在提高微生物有机溶剂耐受性的研究中发挥了重要作用。Alsaker等<sup>[9]</sup>通过 PlsX (脂肪酸/磷脂生物合成)和

FabF (3-氧酰基-酰载体蛋白合酶II)的高表达来增加丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)细胞膜中饱和脂肪酸的含量, 从而增加细胞膜的致密性, 提高菌株对有机溶剂的耐受性。Okochi等<sup>[15]</sup>通过表达甘露糖的磷酸转移酶系统 ManXYZ 提高 *E. coli* 细胞膜对糖类物质的亲和性, 从而提高了该菌株对己烷的耐受性。本课题组宋亮等<sup>[16]</sup>将来源于 *P. putida* 中编码 3-羟基异丁酸脱氢酶(该蛋白与溶剂外排泵相关)的基因 *mmsB* 在 *E. coli* 中表达, 从而提高了 *E. coli* 对环己烷的耐受性。

本课题组在前期研究中, 通过有机溶剂驯化的方法获得了一株能耐受60% (体积比)环己烷的恶臭假单胞菌 *P. putida* JUCT1 (CCTCC M2011442), 并采用双向电泳技术研究了该菌株在有无溶剂压力下的总蛋白表达水平差异, 发现基因 *arcA* 的表达量上调了2倍以上<sup>[17]</sup>。本研究选取 *arcA* 为目的基因, 考察其在微生物细胞有机溶剂耐受性中的作用。采用基因重组的方法将 *arcA* 导入 *E. coli* JM109(DE3), 结果显示工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 对环己烷(LogP=3.2)、甲苯(LogP=2.5)、萘烷(LogP=4.8)和丁醇(LogP=0.9)等有机溶剂的耐受性有显著提高。并进一步利用 Red 同源重组的方法将该基因整合到 *E. coli* JM109(DE3)基因组中, 构建获得了具有优良遗传稳定性的溶剂耐受 *E. coli* JM109(DE3)宿主菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

*P. putida* JUCT1 和 *E. coli* JM109(DE3)为本实验室保藏; 质粒 pET-20b(+), pMD18-T 分别购自 Novagen、TaKaRa 公司; pKD46、pKD13、pCP20 等基因敲除质粒由耶鲁大肠杆菌库提供。

LB 培养基: 见参考文献[16]。

## 1.2 分子生物学操作

实验中所设计的引物(表 1)由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 基因测序由赛音生物技术(上海)有限公司完成。

## 1.3 *arcA* 基因的重组表达和有机溶剂耐受性验证

**1.3.1 *arcA* 基因重组:** 以 F-*arcA* 和 R-*arcA* 为引物, *P. putida* JUCT1 为模板, PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$ PCR Mix 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ mol/L 混合引物对(F-*arcA* 和 R-*arcA*)各 0.4  $\mu$ L, *P. putida* JUCT1 基因组(100 mg/L) 1  $\mu$ L, ExTaq 酶(200 U) 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 5 min; 98  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 16  $^{\circ}$ C 10 min。经扩增获得长度为 1.3 kb 的 *arcA* 基因。将该基因与 pMD18-T 载体于 16  $^{\circ}$ C 过夜连接, 并热转至 *E. coli* JM109(DE3)中。挑取阳性单克隆子转接至含终浓度为 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基中过夜培养, 提取质粒 pMD18-T-*arcA*。用内切酶 *Nde* I 和 *Hind* III 分别对质粒 pMD18-T-*arcA* 与 pET-20b(+)进行双酶切和连接后,

导入 *E. coli* JM109(DE3), 得到工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA*。将该工程菌于 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 按照 1% (体积比)的接种量转接至含终浓度为 0.2 mmol/L IPTG 的 LB (Amp)培养基。30  $^{\circ}$ C 诱导 4 h 后, 4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀, 然后按照 1:8 (质量体积比)加入磷酸盐缓冲液(20 mmol/L, pH 7.0), 重悬菌体。将菌液于冰上超声破碎(300 W, 超声 1 s 停 3 s, 共 15 min)。破壁结束后, 于 4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min, 取上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 验证。

**1.3.2 重组 *E. coli* 菌株的有机溶剂耐受性验证:** *E. coli* 为有机溶剂敏感型菌株<sup>[16]</sup>。将工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 与携带有空白质粒的 pET-20b(+)对照菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)分别于 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 按照 1% (体积比)的接菌量转接至含终浓度为 0.2 mmol/L IPTG 的 LB (Amp)中, 30  $^{\circ}$ C、120 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.2 时, 分别向培养基中加入 2.0% (体积比)环己烷、0.1% (体积比)甲苯、4.0% (体积比)萘烷和 0.1% (体积比)丁醇, 30  $^{\circ}$ C 继续培养, 并在  $OD_{600}$  下监测菌体生长情况。

表 1 实验中所用的引物  
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')
F- <i>Bgl</i> II	CAAC <u>AGATCT</u> ATTCCGGGGATCCGTCGACC ( <i>Bgl</i> II)
RM- <i>Bgl</i> II	CTGTCTCTTGATCAGTTCTTGATCCCCTGC
FM- <i>Bgl</i> II	GCAGGGGGATCAAGAAGCTGATCAAGAGACAG
R- <i>Bgl</i> II	CCAAC <u>AGATCT</u> GTAGGCTGGAGCTGCTTCG ( <i>Bgl</i> II)
F- <i>arcA</i>	GGAATTCC <u>ATATGATG</u> TCCGCTGAAAAACAGAAGT ( <i>Nde</i> I)
R- <i>arcA</i>	TCCCCA <u>AGCTT</u> TAGTAGTTGATCGGGTCGCGCA ( <i>Hind</i> III)
<i>endA</i> -F	CCAAAACAGCTTTCGCTACGTTGCTGGCTCGTTTAAACACCGAGTAAGTGAGATCTATTCCGGGGATCCG
<i>endA</i> -R	GGTTGTACGCGTGGGGTAGGGGTTAACAAAAAGAATCCCGCTAGTGTAGGCAAAAAACCCCTCAAGACCC
C- <i>endA</i> -F	CTTCTCTGATCTGGCTGATTGCATA
Mid-R	GCCGGCTTCGGAGTGGACAC

注: 下划线为限制性酶切位点。

Note: Underlined bold nucleotides: Restriction enzyme recognition sites.

## 1.4 *E. coli* JM109(DE3)基因组中 *arcA* 的整合表达和菌株耐受性验证

**1.4.1 利用 Red 同源重组的方法将 *arcA* 基因整合至 *E. coli* JM109(DE3)基因组:** 将含有反转录酶识别位点(Flippase recognition target, FRT)的卡那霉素的(Kan)片段 FRT-Kan (1.4 kb)连接至 pET-20b(+), 命名为 pET-20b(+)-FRT-Kan-T7-*arcA*-Tet, 并按照 Koma 等<sup>[18]</sup>描述的方法将 FRT-Kan-T7-*arcA*-Tet 整合到 *E. coli* JM109(DE3)基因组中。抗性标记 Kan 片段来源于质粒 pKD13, 以 *E. coli* JM109(DE3)基因组中的非必需基因 *endA* 为插入位点, 以 *endA*-F 和 *endA*-R 为引物扩增总长约为 3 kb 片段 FRT-Kan-T7-*arcA*-Tet, 并按照同源重组的方法将该片段插入到 *endA* 位点, 以 C-*endA*-F 和 Mid-R 为验证引物来验证 FRT-Kan-T7-*arcA*-Tet 成功取代 *endA* 位点。然后利用含有翻转酶重组酶 (Flipase recombination enzyme, FLP)质粒 pCP20, 在 FLP 重组酶的作用下 FRT 位点自身发生同源重组, 从而消除一个 FRT 位点及抗性基因, 并以 C-*endA*-F 和 Mid-R 为引物验证 Kan 的消除, 得到重组菌株 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ )。

**1.4.2 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ )重组蛋白表达和耐受性验证:** 将重组菌 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ )与对照菌 *E. coli* JM109(DE3)分别于 37 °C、200 r/min 培养过夜, 按照 1% (体积比)的接种量转接至含终浓度为 0.2 mmol/L IPTG 的 LB 培养基中, 30 °C、120 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 0.2 时, 向培养基中加入 2.0% (体积比)环己烷、0.1% (体积比)甲苯、4.0% (体积比)萘烷和 0.1% (体积比)丁醇, 30 °C 继续培养, 并在  $OD_{600}$  下监测菌体生长情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 *arcA* 基因的重组表达

图 1 为扩增获得的来源于 *P. putida* JUCT1 基因组的 *arcA* 基因的核酸电泳图, 从图 1 中可以看出, *arcA* 基因长度约为 1.3 kb。经测序验证, 该基因序列完全正确。将 *arcA* 与载体 pET-20b(+)-连接后导入

*E. coli* JM109(DE3)中, 获得工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA*。

工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 经 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h, 离心收集菌体后经 SDS-PAGE 验证蛋白表达情况。如图 2 所示, *arcA*

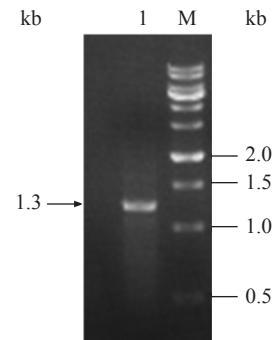


图 1 *arcA* 基因的 PCR 产物

Figure 1 PCR product of *arcA*

Note: M: Marker; 1: *arcA*.

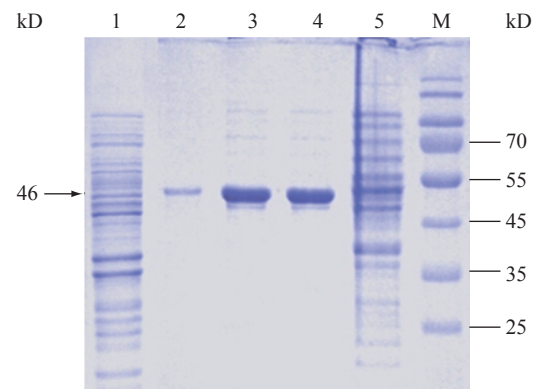


图 2 基因 *arcA* 的重组表达产物

Figure 2 SDS-PAGE analysis of recombinant expression of *arcA*

注: M: Marker; 1: *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-经诱导的全细胞; 2: *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 经诱导的沉淀; 3: *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 经诱导的上清; 4: *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 经诱导的全细胞; 5: *E. coli* JM109(DE3)未经诱导的全细胞。

Note: M: Marker; 1: Total protein of *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+) with induction; 2: *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* insoluble protein after induction; 3: *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* soluble protein after induction; 4: *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* total protein after induction; 5: Total protein of *E. coli* JM109(DE3) without induction.

基因表达的蛋白精氨酸脱亚胺酶大小约为 46 kD, 且为可溶性表达。结果说明来源于 *P. putida* JUCT1 的 *arcA* 在 *E. coli* 中表达良好, 为工程菌的有机溶剂耐受性验证提供了依据。

## 2.2 工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 的溶剂耐受性

将携带空白质粒的对照菌株 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+) 和工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 分别在 LB (Amp) 中培养至  $OD_{660}$  达到 0.2 时, 添加不同浓度的有机溶剂, 每小时取样测生长曲线。实验结果如图 3 所示, *E.*

*coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 在添加了 2.0% (体积比) 环己烷、0.1% (体积比) 甲苯、4.0% (体积比) 萘烷和 0.1% (体积比) 丁醇的培养基中培养 8 h 后, 其  $OD_{660}$  由初始的 0.2 分别上升到 0.8、0.9、1.8 和 1.3。对照组 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+) 在 4.0% (体积比) 萘烷的  $OD_{660}$  为 0.8, 而在 2.0% (体积比) 环己烷、0.1% (体积比) 甲苯和 0.1% (体积比) 丁醇中完全停止生长。说明该工程菌对这 4 种有机溶剂均具有一定的耐受性, 特别是对环己烷( $\text{Log}P=3.2$ )、甲苯( $\text{Log}P=2.5$ )以及毒性较大的丁醇( $\text{Log}P=0.9$ )尤为明显。

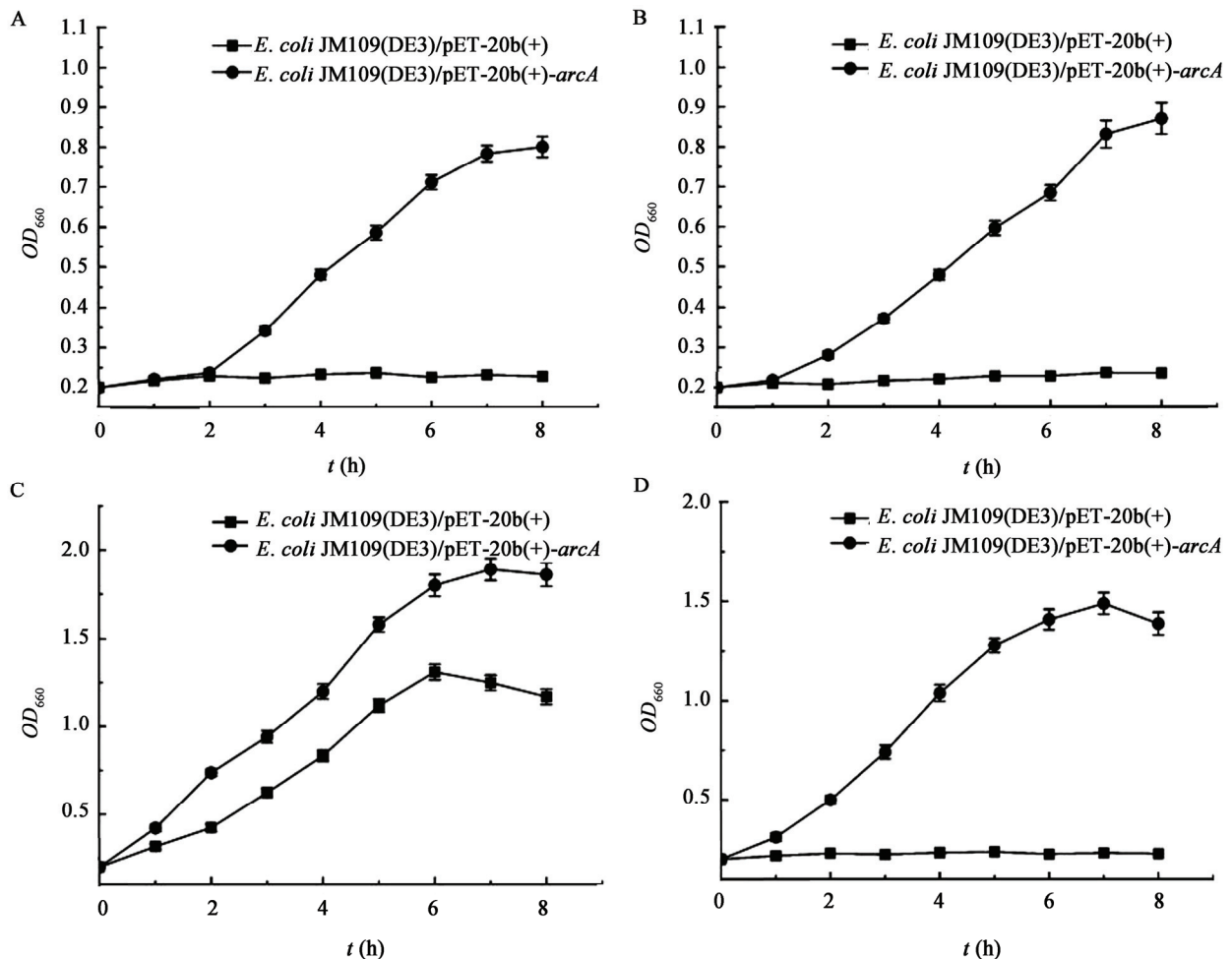


图 3 添加不同有机溶剂对工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 细胞生长的影响

Figure 3 Effect of different organic solvent on cell growth of *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA*

注: A: 2.0% (体积比) 环己烷; B: 0.1% (体积比) 甲苯; C: 4.0% (体积比) 萘烷; D: 0.1% (体积比) 丁醇。

Note: A: 2.0% (V/V) cyclohexane; B: 0.1% (V/V) toluene; C: 4.0% (V/V) decalin; D: 0.1% (V/V) butanol.



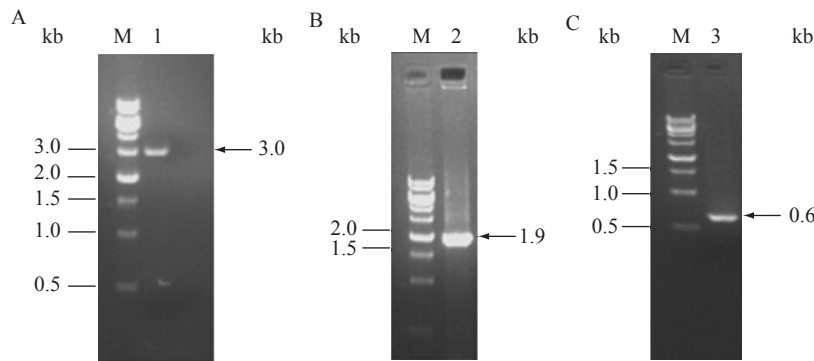


图4 FRT-Kan-T7-*arcA* 片段的扩增及插入后 PCR 验证

Figure 4 PCR amplification of FRT-Kan-T7-*arcA* and verification of insertion gene

注: M: Marker; 1: FRT-Kan-T7-*arcA*; 2: 基因整合到基因组后的 PCR 验证; 3: Kan 抗性基因的敲除。

Note: M: Marker; 1: FRT-Kan-T7-*arcA*; 2: The verification of insertion gene; 3: The elimination of resistance gene Kan by PCR verification.

### 2.3 *arcA* 在 *E. coli* JM109(DE3) 基因组中的整合表达

利用 Red 同源重组的方法将基因 *arcA* 重组整合到 *E. coli* JM109(DE3) 的基因组中。如图 4 所示: 以 *endA-F* 和 *endA-R* 为引物扩增获得的长度约为 3 kb 的带有同源臂的 FRT-Kan-T7-*arcA* 片段(图 4A); 以 *C-endA-F* 和 *Mid-R* 为引物扩增获得的 FRT-Kan-T7-*arcA* 成功插入到 *E. coli* JM109(DE3) 染色体中的长度约为 1.9 kb 条带(图 4B); 以 *C-endA-F* 和 *Mid-R* 为引物扩增获得的消除 Kan 后的 FRT 基因的长度约为 0.6 kb (图 4C)。

将重组菌 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) 在 0.2 mmol/L IPTG 的 LB 中培养 4 h 后, 离心收集菌体后经 SDS-PAGE 验证蛋白表达情况。如图 5 所示, *arcA* 基因的表达产物大部分以可溶性形式存在, 仅有少量的包涵体生成。说明 *arcA* 基因能成功在 *E. coli* JM109(DE3) 的染色体上进行可溶性表达。

### 2.4 重组菌 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) 的溶剂耐受性

将重组菌 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) 与对照菌 *E. coli* JM109(DE3) 分别于 LB 中培养至  $OD_{660}$  为 0.2 时, 添加不同浓度的有机溶剂继续培养, 生长曲线见图 6。 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) 在 2.0% (体积比) 环己烷、0.1% (体积

比) 甲苯、4.0% (体积比) 萘烷和 0.1% (体积比) 丁醇培养 8 h 后, 其  $OD_{660}$  由初始的 0.2 分别上升到 0.7、0.8、1.7 和 1.2。而对照组 *E. coli* JM109(DE3) 在 4.0% (体积比) 萘烷的  $OD_{660}$  为 1.1, 而在 2.0% (体积比) 环己烷、0.1% (体积比) 甲苯和 0.1% (体积比) 丁醇中基本停止生长。结果表明, 该 *arcA* 整合菌株具有和

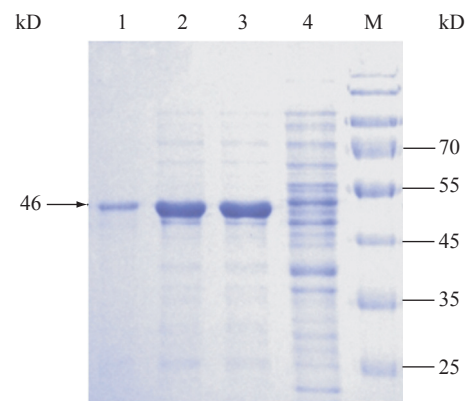


图5 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) 的蛋白表达

Figure 5 Proteins expression of *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ )

注: M: Marker; 1: *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) 经诱导的沉淀; 2: *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) 经诱导的上清; 3: *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) 经诱导的全细胞; 4: *E. coli* JM109(DE3) 未诱导的全细胞。

Note: M: Marker; 1: *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) insoluble protein after induction; 2: *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) soluble protein after induction; 3: *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ ) total protein after induction; 4: Total protein of *E. coli* JM109(DE3) without induction.

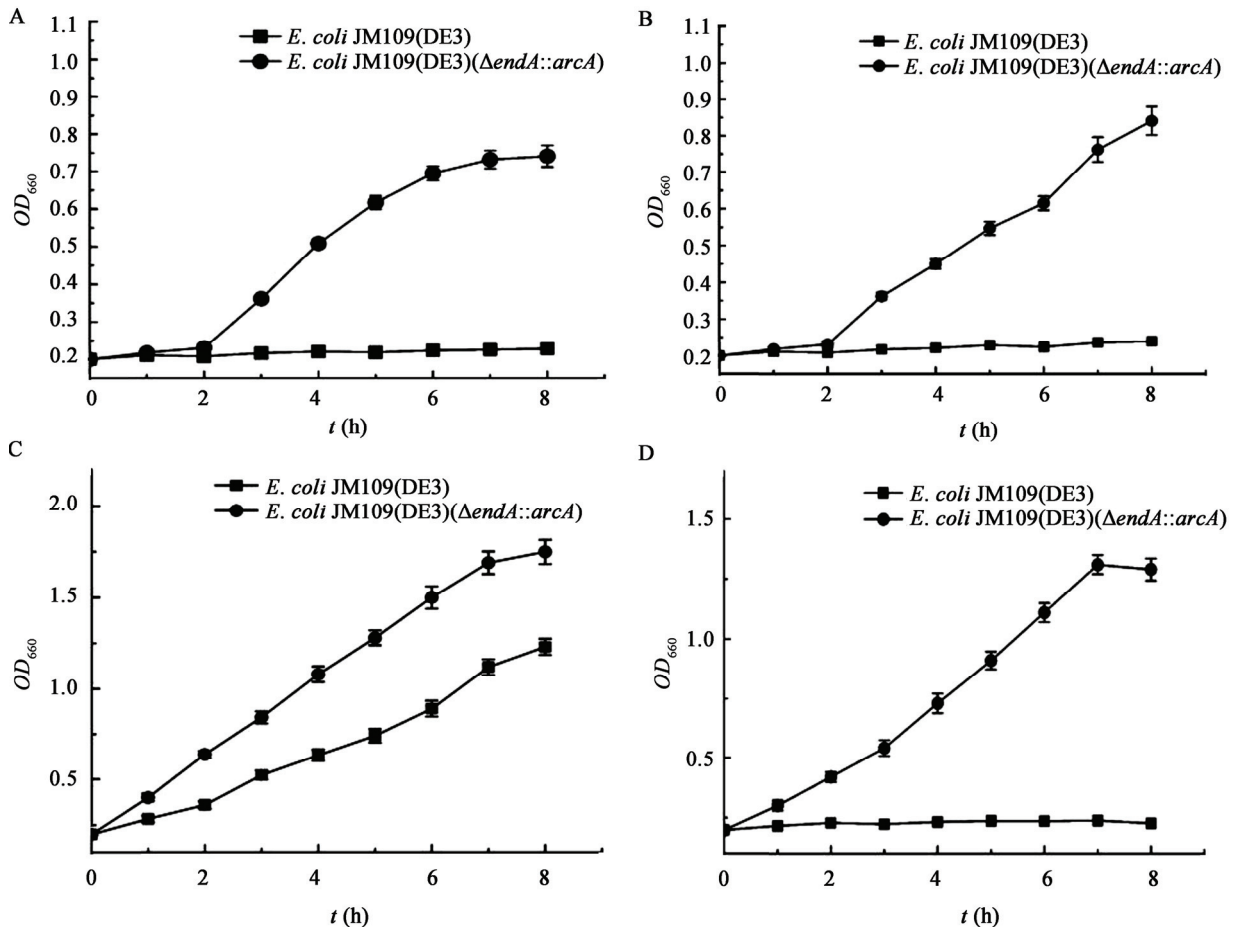


图6 添加不同有机溶剂对重组菌 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ )细胞生长的影响

Figure 6 Effect of different organic solvent on cell growth of *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ )

注: A: 2.0% (体积比)环己烷; B: 0.1% (体积比)甲苯; C: 4.0% (体积比)萘烷; D: 0.1% (体积比)丁醇。

Note: A: 2.0% (V/V) cyclohexane; B: 0.1% (V/V) toluene; C: 4.0% (V/V) decalin; D: 0.1% (V/V) butanol.

工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 基本相同的有机溶剂耐受性。

将 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ )和 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 分别传代培养6代,在添加了2.0% (体积比)环己烷、0.1% (体积比)甲苯、4.0% (体积比)萘烷和0.1% (体积比)丁醇的培养基中培养8 h后测  $OD_{660}$ ,结果见表2。在传代6次后,重组菌 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ )在上述溶剂中的菌浓  $OD_{660}$  分别为0.8、0.9、1.7和1.2,与第1代菌株相比没有下降( $OD_{660}$  分别为0.7、0.8、1.7和1.2);而 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 在6次传代后的生长情况和第1代菌株相比均有不

同程度的下降, $OD_{660}$  分别为0.6、0.6、1.3和0.9(第1代  $OD_{660}$  分别为0.8、0.9、1.8和1.3)。结果表明:重组菌 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta endA::arcA$ )在溶剂耐受性研究中表现出较好的遗传稳定性,而 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 在传代过程中对上述有机溶剂的耐受性有一定下降,推测质粒在细胞传代过程中的遗传不稳定性及其给细胞带来的生理负担是主要原因<sup>[19-20]</sup>。

### 3 结论

本实验利用基因工程手段,将 *arcA* 基因以重组质粒的形式在 *E. coli* JM109(DE3)中表达,且该基因的表达产物精氨酸脱亚胺酶在 *E. coli* JM109(DE3)

表2 传代菌株 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 和 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta$ *endA::arcA*)的有机溶剂耐受性研究( $OD_{660}$ )  
Table 2 Organic solvent tolerance of *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* and *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta$ *endA::arcA*) over 6 generations ( $OD_{660}$ )

传代 Subculture	<i>E. coli</i> JM109(DE3)/pET-20b(+)- <i>arcA</i>				<i>E. coli</i> JM109(DE3)( $\Delta$ <i>endA::arcA</i> )			
	环己烷 Cyclohexane	甲苯 Toluene	萘烷 Decalin	丁醇 Butanol	环己烷 Cyclohexane	甲苯 Toluene	萘烷 Decalin	丁醇 Butanol
1	0.8	0.9	1.8	1.3	0.7	0.8	1.7	1.2
2	0.8	0.9	1.7	1.2	0.8	0.9	1.8	1.3
3	0.8	0.8	1.7	1.2	0.7	1.0	1.9	1.4
4	0.7	0.7	1.5	1.1	0.9	0.8	1.8	1.3
5	0.6	0.6	1.4	1.0	0.8	0.9	1.7	1.2
6	0.6	0.6	1.3	0.9	0.8	0.9	1.7	1.2

获得良好的可溶性表达,并能显著提高工程菌对环己烷、甲苯、萘烷和丁醇等有机溶剂的耐受性。但由于质粒在微生物的遗传中具有不稳定性、易丢失等缺点,并且质粒的存在增加了微生物的代谢压力,导致工程菌株在保藏过程中易发生功能衰退<sup>[19-20]</sup>。因此,本研究进一步采用 Red 同源重组的方法将基因 *arcA* 插入 *E. coli* JM109(DE3)的基因组中,获得了具有良好遗传稳定性的 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta$ *endA::arcA*),并证明其具有和工程菌 *E. coli* JM109(DE3)/pET-20b(+)-*arcA* 相同的溶剂耐受性。

*arcA* 基因编码的精氨酸脱亚胺酶可催化精氨酸水解途径的第一步反应,该途径将精氨酸最终降解的同时生成等摩尔的 ATP<sup>[21]</sup>。有机溶剂通过细胞膜进入到微生物细胞后,通常会造造成细胞代谢紊乱、蛋白错误折叠等损伤,细胞在进行生物修复时需要大量消耗胞内的能量。因此,推测精氨酸脱亚胺酶可为细胞在有机溶剂胁迫条件下进行生物修复提供能量补充,从而提高了微生物细胞的有机溶剂耐受性。

本文利用基因工程的方法提高了 *E. coli* JM109(DE3)有机溶剂耐受性,并利用 Red 同源重组的方法将 *arcA* 整合至 *E. coli* JM109(DE3)的基因组中,获得了能稳定遗传的重组菌 *E. coli* JM109(DE3)( $\Delta$ *endA::arcA*)。该研究为提高工业化应用菌株的有机溶剂耐受性提供实验依据和理论指导。

## 参考文献

- [1] Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons[J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(2): 201-222
- [2] Wang YL. Study on organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K12[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science and Technology, 2008 (in Chinese)  
王永乐. 大肠杆菌对有机溶剂的耐受性研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2008
- [3] Wang XX, Wang SH, Li W, et al. Tolerant mechanisms of bacteria to organic solvents[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(5): 641-649 (in Chinese)  
王鑫昕, 王少华, 李维, 等. 细菌的有机溶剂耐受机制[J]. 生物工程学报, 2009, 25(5): 641-649
- [4] de Bont JAM. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis[J]. Trends in Biotechnology, 1998, 16(12): 493-499
- [5] Kieboom J, Dennis JJ, Zylstra GJ, et al. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(24): 6769-6772
- [6] Inoue A, Horikoshi K. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene[J]. Nature, 1989, 338(6212): 264-266
- [7] Rutherford BJ, Dahl RH, Price RE, et al. Functional genomic study of exogenous n-butanol stress in *Escherichia coli*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 1935-1945
- [8] Sardesai Y, Bhosle S. Tolerance of bacteria to organic solvents[J]. Research in Microbiology, 2002, 153(5): 263-268
- [9] Alsaker KV, Paredes C, Pampoutsakis ET. Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: gene-expression-based systems analysis of butanol, butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(6): 1131-1147
- [10] Zhang HF, Chong HQ, Ching CB, et al. Engineering global transcription factor cyclic Amp receptor protein of *Escherichia coli* for improved 1-butanol tolerance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(4): 1107-1117
- [11] Tsukagoshi N, Aono R. Entry into and release of solvents by *Escherichia coli* in an organic-aqueous two-liquid-phase system and substrate specificity of the AcrAB-TolC solvent-extruding pump[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(17): 4803-4810
- [12] Rojas A, Segura A, Guazzaroni ME, et al. *In vivo* and *in vitro* evidence that TtgV is the specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*[J].



- Journal of Bacteriology, 2003, 185(16): 4755-4763
- [13] Hermann M, Fayolle F, Marchal R, et al. Isolation and characterization of butanol-resistant mutants of *Clostridium acetobutylicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(5): 1238-1243
- [14] Lin YL, Blaschek HP. Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 45(3): 966-973
- [15] Okochi M, Kurimoto M, Shimizu K, et al. Increase of organic solvent tolerance by overexpression of *manXYZ* in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(6): 1394-1399
- [16] Song L, Ni Y, Sun ZH. Organic-solvent-tolerant mechanisms of *Pseudomonas putida* based on proteomic analysis[J]. Microbiology China, 2012, 39(4): 468-476 (in Chinese)  
宋亮, 倪晔, 孙志浩. 基于蛋白质组学的假单胞菌耐溶剂机制研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(4): 468-476
- [17] Ni Y, Song L, Qian XH, et al. Proteomic analysis of *Pseudomonas putida* reveals an organic solvent tolerance-related gene *mmsB*[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55858
- [18] Koma D, Yamanaka H, Moriyoshi K, et al. A convenient method for multiple insertions of desired genes into target loci on the *Escherichia coli* chromosome[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 815-829
- [19] Wang ZJ, Xiang L, Shao JJ, et al. Effects of the presence of ColE1 plasmid DNA in *Escherichia coli* on the host cell metabolism[J]. Microbial Cell Factories, 2006, 5(1): 34
- [20] Diaz RJC, Hernández ME. Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2000, 20(2): 79-108
- [21] Waŭpen CV, Piérard A, Kley-Raymann M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway[J]. Journal of Bacteriology, 1984, 160(3): 928-934



(上接 p.8)

## 征稿简则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>