

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20150049

巴氏醋杆菌核酸修复酶 UvrA 对大肠杆菌耐受性的影响

郑宇, 陈兴京, 王靖, 牟俊, 王敏

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)具有较高的醋酸耐受性,常用于醋酸的发酵生产.微生物中核酸修复酶 UvrA 与菌体对酸、热等不良环境的耐受性相关,本论文克隆巴氏醋杆菌 AC2005 中的核酸修复酶基因 *uvrA*,并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中重组表达,研究其对大肠杆菌醋酸、低 pH、热和过氧化胁迫条件耐受性的影响.结果表明,分别在 0.5% 醋酸、pH 3、53 °C、0.15% H₂O₂ 这 4 种胁迫条件下处理 40 min 后,重组菌 *E. coli* JM109/pMV24-*uvrA* 的存活率分别是对照菌 *E. coli* JM109/pMV24 的 11.2、4.7、19.2 和 7.5 倍,说明来源于巴氏醋杆菌的核酸修复酶 UvrA 能够提高大肠杆菌对醋酸、低 pH、热与过氧化的耐受性,其原因可能是由于重组表达 UvrA 提高了菌体在不同胁迫条件下对 DNA 的保护或修复能力.

关键词: UvrA; 核酸修复; 巴氏醋杆菌; 大肠杆菌; 耐受性

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2016)01-0031-04

Effect of Repair Excinuclease UvrA from *Acetobacter pasteurianus* on the Tolerance of *Escherichia coli*

ZHENG Yu, CHEN Xingjing, WANG Jing, MOU Jun, WANG Min

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: *Acetobacter pasteurianus* is commonly used for acetic acid fermentation due to its high acetic acid tolerance. Excinuclease UvrA is related with the tolerance of microorganisms to environmental stresses such as acid and heat. In this research, the gene of excinuclease UvrA was cloned from *A. pasteurianus* and expressed in *Escherichia coli* to study its effect on the tolerance of *E. coli* to acetic acid, low pH, heat and peroxide. The result showed that the survival rate of *E. coli* JM109/pMV24-*uvrA* was 11.2, 4.7, 19.2 and 7.5 times of *E. coli* JM109/pMV24, respectively, after the treatment with 0.5% acetic acid, pH 3, 53 °C and 0.15% H₂O₂ for about 40 min. All these demonstrate that the expression of UvrA from *A. pasteurianus* could increase the tolerance of *E. coli* to acetic acid, low pH, heat and peroxide. The reason could be that UvrA has increased the protection or repair ability of the strains under pressure.

Key words: UvrA; nucleotide excision repair; *Acetobacter pasteurianus*; *E. coli*; tolerance

醋酸是一种常见的有机酸,对微生物有较强的毒性,通常 5 g/L 的醋酸就会对普通微生物的生长和代谢产生明显的抑制作用^[1].醋酸菌由于具有较强的醋酸耐受性,常用于醋酸的发酵生产,其中醋杆菌属(*Acetobacter*)和葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)对醋酸耐受能力可达 60 g/L^[2-3].

醋酸菌已知的醋酸耐受分子机制主要有:与乙醇

氧化相关的机制,包括膜结合乙醇脱氢酶(ADH)与乙醛脱氢酶(ALDH)机制^[4];与醋酸同化相关的机制,该过程主要是在乙酰辅酶 A 转移酶 AarC 的作用下氧化醋酸并使其进入乙醛酸循环途径来实现的^[5];通用的应激机制,主要是一些分子伴侣,其作用是在不良环境下保证蛋白的正确折叠^[6];ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白机制,这种转运蛋白起着将醋

收稿日期: 2015-04-10; 修回日期: 2015-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31201406); 天津市应用基础与前沿技术研究计划资助项目(13JCQNJC10000)

作者简介: 郑宇(1980—),男,河北石家庄人,副教授, yuzheng@tust.edu.cn.

酸泵出的作用^[7]. 此外, 微生物中 DNA 重组酶(DNA recombinase) RecA、核酸修复酶(excinuclease) UvrA 等与核酸修复相关的蛋白也与菌体对不良环境的耐受性相关. UvrA 是细菌在核酸切除修复中最初的 DNA 损伤感应蛋白. 在变形链球菌(*Streptococcus mutans*)中, UvrA 为酸诱导的, 并且与其适应低 pH 环境有关^[8]. 嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)中过量表达 UvrA 能提高菌体对热、低 pH 的耐受性^[9]; 在瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)中, UvrA 受紫外线、氧化和 pH 诱导, 与该菌的耐酸和抗氧化特性相关^[10].

巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)是醋酸固态发酵过程中重要的产酸菌, 也是国际上醋酸纯种液态发酵常用的菌种之一^[11]. 本文克隆巴氏醋杆菌 AC2005 *uvrA* 基因, 研究其重组表达对大肠杆菌醋酸、低 pH、热及过氧化耐受性的影响, 从而加深对醋酸菌耐受机制的理解, 并且对醋酸发酵菌种的选育及改良具有指导作用.

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与培养基

巴氏醋杆菌(*A. pasteurianus*) AC2005、大肠杆菌(*E. coli*) JM109 均为天津科技大学微生物制药研究室保存. 质粒 pMV24(大肠杆菌与醋酸菌穿梭质粒, 氨苄抗性, 乳糖启动子^[12])由日本 Mizkan Group Corporation 惠赠.

GYE 培养基(20 g/L 葡萄糖、15 g/L 酵母膏、35 g/L 乙醇)用于 *A. pasteurianus* AC2005 的培养; LB 培养基(10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母浸出粉、5 g/L NaCl)用于 *E. coli* JM109 的培养.

1.2 酶与试剂

基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒, 美国 Omega 生物技术公司; 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I、T4 DNA 连接酶、高保真 *Taq* DNA 聚合酶、DNA marker、蛋白 marker, 大连宝生物技术有限公司.

1.3 表达载体的构建

根据 NCBI 网站公布的 *A. pasteurianus* IFO3283-01 *uvrA* 基因序列设计引物, 以 *A. pasteurianus* AC2005 基因组为模板, PCR 扩增获得核酸修复酶基因 *uvrA*, 上游引物 P1: CCGGAATTCGATGAACAC ACAACTTTCTGC, 下游引物 P2: TGCTCTAGA

GATTCGCCGTCAGCATATC. 将 PCR 产物连到 pMD19-T simple vector 后测序, 获得 pMD19-T-*uvrA*. 将测序正确的 pMD19-T-*uvrA* 及质粒 pMV24 分别用 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 酶切产物经纯化回收后, 用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜, 获得重组质粒 pMV24-*uvrA*. 采用化学转化法将质粒 pMV24-*uvrA* 转入 *E. coli* JM109. 引物合成及测序由华大基因公司完成.

1.4 重组蛋白的表达

将获得的大肠杆菌重组菌 *E. coli* JM109/pMV24-*uvrA* 和对照菌 *E. coli* JM109/pMV24 过夜培养, 按 1% 的接种量转接于含有 100 μg/mL 氨苄抗生素的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至 600 nm 下吸光度为 0.6, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 继续培养 5 h 诱导蛋白表达, 收集菌体, 用 SDS-PAGE(分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 5%)检测蛋白的表达情况.

1.5 重组表达 UvrA 对大肠杆菌耐受性的影响

取诱导后的 *E. coli* JM109/pMV24 和 *E. coli* JM109/pMV24-*uvrA* 发酵液, 离心收集菌体, 将菌体分别重悬于含有 0.5% 醋酸、pH 3(用盐酸调节 pH)和含 0.15% H₂O₂^[12]的 LB 培养基中, 在 37 °C、200 r/min 的条件下处理 40 min, 研究重组表达 UvrA 对菌体醋酸、低 pH 和过氧化氢耐受性的影响.

大肠杆菌生长的临界生长温度为 53 °C^[13], 因此选取 53 °C 作为大肠杆菌热处理的实验温度. 取诱导后的 *E. coli* JM109/pMV24-*uvrA* 发酵液置于 53 °C 水浴中, 200 r/min 的条件下处理 40 min, 以 *E. coli* JM109/pMV24 作为对照, 研究重组表达 UvrA 对菌体热胁迫耐受性的影响.

所有实验均设置 3 个平行.

1.6 菌体存活率的计算

不同胁迫条件下处理后的样品, 用无菌蒸馏水进行 10 倍梯度递增稀释, 吸取适当梯度的菌液 100 μL, 涂布氨苄抗性平板, 于 37 °C 倒置培养 12 h. 利用平板计数法进行活菌计数, 与处理前菌落数相比, 计算出存活率.

2 结果与分析

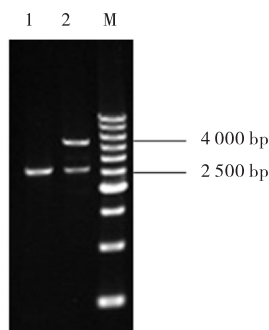
2.1 巴氏醋杆菌 AC2005 *uvrA* 基因的序列分析

质粒 pMD19-T-*uvrA* 测序结果表明, *A. pasteurianus* AC2005 核酸修复酶基因 *uvrA* 全长为 2 514 bp, 编码 837 个氨基酸, 蛋白相对分子质量约为 9.11×10^4 . 与 GenBank 数据库中的巴氏醋杆菌

IFO3283-01 核酸修复酶 *uvrA* 基因 (GenBank : 8435212) 序列进行比对发现, *A. pasteurianus* AC2005 *uvrA* 基因核酸序列与 IFO3283-01 同源性的 93.2%, 氨基酸序列同源性的 98.6%, 说明该扩增核酸序列为巴氏醋杆菌 *uvrA* 基因。

2.2 重组表达载体的构建

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 从质粒 pMD19-T-*uvrA* 中切下 *uvrA* 片段, 并插入到 pMV24 载体上。利用 PCR 和双酶切方法鉴定重组质粒, 如图 1 所示, 以重组质粒为模板 PCR 扩增出 2 500 bp 左右条带; *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切获得 3 800 bp 和 2 500 bp 左右条带, 分别与载体片段和 *uvrA* 基因片段相符。将验证正确的质粒命名为 pMV24-*uvrA*。



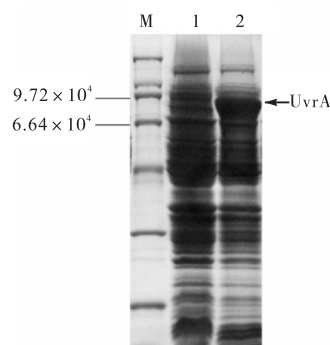
M. Marker (500 ~ 5 000 bp); 1. PCR 扩增产物; 2. pMV24-*uvrA* *EcoR* I /*Xba* I 双酶切产物

图 1 重组质粒 pMV24-*uvrA* 的鉴定

Fig. 1 Identification of pMV24-*uvrA*

2.3 重组表达 UvrA

重组菌 *E. coli* JM109/pMV24-*uvrA* 利用 IPTG 诱导 UvrA 表达, SDS-PAGE 电泳结果如图 2 所示。在相对分子质量约为 9.1×10^4 处有明显的差异性条带, 与 UvrA 相对分子质量相符, 说明目的蛋白在大肠杆菌中实现了重组表达。



M. Marker; 1. *E. coli* JM109/pMV24; 2. *E. coli* JM109/pMV24-*uvrA*

图 2 诱导表达蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE of the expressed protein

2.4 UvrA 重组表达对大肠杆菌耐受性的影响

为研究 UvrA 对菌体相关胁迫条件耐受性的影响, 分别比较了在 0.5% 醋酸 (pH 3)、利用 HCl 调节 pH 至 3、53 °C、0.15% H_2O_2 这 4 种不同胁迫条件下重组菌 *E. coli* JM109/pMV24-*uvrA* 与对照菌 *E. coli* JM109/pMV24 的活菌数, 结果见表 1。

表 1 不同胁迫条件对大肠杆菌活菌数的影响

Tab. 1 The influence of different stress conditions on viable count of *E. coli*

胁迫条件	菌株	活菌数/mL ⁻¹		
		0 min	20 min	40 min
醋酸 (0.5%)	<i>E. coli</i> JM109 (pMV24)	$(1.65 \pm 0.09) \times 10^7$	$(4.30 \pm 0.73) \times 10^3$	$(8.30 \pm 0.64) \times 10^2$
	<i>E. coli</i> JM109 (pMV24- <i>uvrA</i>)	$(1.47 \pm 0.10) \times 10^7$	$(7.10 \pm 0.85) \times 10^4$	$(8.40 \pm 0.71) \times 10^3$
HCl (pH 3)	<i>E. coli</i> JM109 (pMV24)	$(1.23 \pm 0.11) \times 10^7$	$(5.10 \pm 0.76) \times 10^5$	$(1.69 \pm 0.10) \times 10^5$
	<i>E. coli</i> JM109 (pMV24- <i>uvrA</i>)	$(1.30 \pm 0.09) \times 10^7$	$(1.95 \pm 0.06) \times 10^6$	$(8.30 \pm 0.77) \times 10^5$
温度 (53 °C)	<i>E. coli</i> JM109 (pMV24)	$(1.71 \pm 0.13) \times 10^7$	$(7.30 \pm 0.93) \times 10^5$	$(4.40 \pm 0.62) \times 10^4$
	<i>E. coli</i> JM109 (pMV24- <i>uvrA</i>)	$(1.52 \pm 0.08) \times 10^7$	$(6.20 \pm 0.81) \times 10^6$	$(7.70 \pm 0.77) \times 10^5$
H_2O_2 (0.15%)	<i>E. coli</i> JM109 (pMV24)	$(1.46 \pm 0.12) \times 10^7$	$(1.20 \pm 0.01) \times 10^5$	$(1.01 \pm 0.07) \times 10^4$
	<i>E. coli</i> JM109 (pMV24- <i>uvrA</i>)	$(1.59 \pm 0.09) \times 10^7$	$(5.00 \pm 0.74) \times 10^5$	$(8.20 \pm 0.81) \times 10^4$

由表 1 可知: 在大肠杆菌中重组表达来源于巴氏醋杆菌的核酸修复酶 UvrA 明显提高了菌株对醋酸、低 pH、热、过氧化胁迫条件的耐受性。在醋酸、低 pH、热、过氧化这 4 种胁迫条件下, 重组表达 UvrA 的大肠杆菌 JM109 (pMV24-*uvrA*) 的存活率均高于对照菌株 JM109 (pMV24)。在 0.5% 醋酸浓度条件下处理 20 min 和 40 min, 重组菌的存活率分别是对照菌的 18.5 倍和 11.2 倍; 在 pH 3 条件下, 分别是对照菌

的 3.7 倍和 4.7 倍; 在 53 °C 条件下, 分别是对照菌的 9.5 倍和 19.2 倍; 在 0.15% H_2O_2 条件下, 分别是对照菌的 3.9 倍和 7.5 倍。

3 讨论

醋酸作为一种常见的有机酸, 当其体积分数高于

0.5%, 就会抑制普通微生物的生长. 由表 1 得出, 0.5% 醋酸处理 40 min, 对照菌与重组菌的存活率分别为 0.005% 与 0.056%, 而用 HCl 调节至相同 pH 条件下对照菌与重组菌的存活率分别为 1.37% 与 6.39%, 说明与相同 pH 的 HCl 相比, 醋酸对菌体的存活率影响更大. 醋酸对菌体的毒性不仅仅是由于低 pH 导致的, 醋酸对菌体生长的毒性作用主要是由于醋酸分子作为亲脂性分子进入细胞, 使胞内酸性化环境加剧, 产生解偶联作用并破坏跨膜质子梯度, 从而抑制菌体生长^[14].

相对于中性或碱性环境, 细胞内部的酸化将导致菌体 DNA 上更多嘌呤与嘧啶的丢失^[15], 从而导致 DNA 的损伤. 类似的, 热^[16]与过氧化^[17]等应激条件也同样会造成 DNA 的损伤, 从而给菌体带来伤害. 生物体内会产生一些机制来抵消这些持续的损伤, 其中核酸切除修复(NER)是 DNA 为保持其完整性而常用的一种机制, 参与该机制的蛋白主要有 UvrA、UvrB 和 UvrC^[18]. UvrA、UvrB 主要参与最初 DNA 损伤的检测与鉴定, UvrB、UvrC 则主要执行这些损伤的去除与重新合成^[19], 所以说, UvrA 蛋白是细菌在核酸切除修复并检测各种结构无关的病变中的最初 DNA 损伤感应蛋白. 已有研究^[8-10]表明, 细菌中核酸修复酶 UvrA 与菌体耐酸、耐热和抗氧化等特性相关, 本文在大肠杆菌中重组表达来源与巴氏醋杆菌的核酸修复酶 UvrA 基因, 从而提高了宿主菌对醋酸、低 pH、热和过氧化的耐受性, 这也从另一方面说明醋酸等胁迫条件可能通过影响 DNA 的复制或者修复导致菌体活性降低, 而巴氏醋杆菌 UvrA 相关的核酸修复机制与其醋酸耐受性有关.

参考文献:

- [1] Conner D E, Kotrola J S. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions[J]. Applied Environment Microbiology, 1995, 61(1): 382-385.
- [2] Azuma Y, Hosoyama A, Matsutani M, et al. Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(17): 5768-5783.
- [3] Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, et al. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(2): 195-200.
- [4] Trček J, Jernejc K, Matsushita K. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression[J]. Extremophiles, 2007, 11(4): 627-635.
- [5] Nakano S, Fukaya M. Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: Molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(1): 54-59.
- [6] Akiko O K, Wang Y, Sachiko K, et al. Cloning and characterization of *groESL* operon in *Acetobacter aceti*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 94(2): 140-147.
- [7] Matsushita K, Inoue T, Adachi O, et al. *Acetobacter aceti* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(13): 4346-4352.
- [8] Hanna M N, Ferguson R J, Li Y H, et al. *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(20): 5964-5973.
- [9] Yamamoto N, Kato R, Kuramitsu S. Cloning, sequencing and expression of the *uvrA* gene from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8[J]. Gene, 1996, 171(1): 103-106.
- [10] Cappa F, Cattivelli D, Cocconcilli P S. The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(10): 1039-1047.
- [11] Matsutani M, Hirakawa H, Saichana N, et al. Genome-wide phylogenetic analysis of differences in thermotolerance among closely related *Acetobacter pasteurianus* strains[J]. Microbiology, 2012, 158(1): 229-239.
- [12] Okamoto-Kainuma A, Wang Y, Kadono S, et al. Cloning and characterization of *groESL* operon in *Acetobacter aceti*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 94(2): 140-147.
- [13] 焦凌霞. *DnaK* 基因调控酸土脂环酸芽孢杆菌嗜酸耐热生理特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [14] 郑宇, 姜春悦, 陈兴京, 等. 醋酸对巴氏醋杆菌生长和代谢活性的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(9): 149-153.

(下转第 45 页)