

米黑霉脂肪酶基因的高效表达及活性测定

王 珏, 王 丹, 张 兵, 于洪巍*

(浙江大学 化学工程与生物工程学系, 浙江 杭州 310000)

摘要: 为了实现米黑霉脂肪酶(*Rhizomucor miehei* Lipase, RML)基因在大肠杆菌中的高效表达,并得到大量的具有生物活性的脂肪酶,首先通过3种方式提高RML在大肠杆菌中可溶性蛋白的表达量:1)低温诱导(16℃)RML表达;2)新型分子伴侣(Skp)与RML N端融合表达;3)载体pET32a上的Trx·tag与RML N端融合表达。其次对各蛋白质进行纯化及活性测定,各种条件得到的RML比活在(226±10~247±10) U/mg。蛋白质表达结果显示:经低温诱导RML的效果最好,纯蛋白质量浓度为0.86 mg/mL,表明诱导温度是影响可溶性蛋白质表达量的关键因素;活性测定结果表明,Skp和Trx·tag与目的基因N端的融合没有影响RML活性中心(C末端)对底物的结合和催化能力。因此,RML不仅在大肠杆菌中得到高效表达,并且保持原有生物学活性,在工业生产中有应用价值。

关键词: 米黑霉脂肪酶;大肠杆菌;高效表达;活性

中图分类号:Q 5 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2012)12—1262—07

Overexpression of *Rhizomucor miehei* Lipase and Activity Assay

WANG Jue, WANG Dan, ZHANG Bing, YU Hong-wei*

(Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: In order to overexpress the *Rhizomucor miehei* Lipase (RML) gene and obtain a large number of bioactive proteins in *Escherichia coli*. Firstly, the research improved the amount of the soluble protein through three methods: 1) RML was introduced at 16 °C. 2) RML was fused with a new chaperone (Skp) which was located at the N terminal of RML; 3) RML was fused with the Trx. tag in pET32a and the tag was located at the N terminal of RML. Secondly, the specific activity of purified RML derived from different methods was detected as (226±10~247±10) U/mg. The expression result showed that the low-temperature inducing was best method and the concentration of RML was 0.86 mg/mL. It was proposed that the temperature was the key factor of controlling the amount of soluble protein. The activity test showed that fusion of Skp/Trx·tag and the N terminal of RML did not change the activity center (C terminal) and the catalytic ability of RML. Therefore, the strategy for overexpression of RML in *E. coli* kept the biological activity and was valuable in the practice.

Keywords: *Rhizomucor miehei* Lipase, *E. coli*, overexpression, activity

收稿日期: 2012-01-04

基金项目: 国家 863 计划项目(2010AA101502)。

* 通信作者: 于洪巍(1972—),男,吉林省吉林市人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事酶工程、基因工程、生物信息学方面的研究。E-mail: yuhongwei@zju.edu.cn

米黑霉脂肪酶 (*Rhizomucor miehei* Lipase, RML, Genbank accession no.A34959)是一种具有专一性水解三酰基甘油酯 1,3 位酯键性质的脂肪酶 (E.C.3.1.1.3), 反应得到的二酯和单酯在食品和商业中都具有广泛的应用价值^[1]。RML 来源于真核生物, 目前关于 RML 的表达多集中于研究酵母等真核表达体系, 但无论分泌表达体系还是表面展示技术, 得到的目标蛋白质量都很少, 并且操作复杂, 培养周期长^[2-5]。而大肠杆菌则操作简便, 表达高效且遗传背景清楚, 但往往因缺少蛋白质修饰等功能而使来源于真核的外源基因表达后以不溶的包涵体形式存在^[6]。目前还没有研究报道 RML 在大肠杆菌中的表达情况, 因此克服原核表达体系缺点, 在大肠杆菌中建立使 RML 正确表达的体系, 有利于 RML 的纯化及下游的催化反应, 而以简单经济的方式获得大量目的蛋白质对工业生产具有重要意义。

作者选择大肠杆菌表达体系克隆表达 RML, 并在大肠杆菌中建立提高 RML 可溶性表达的策略, 以期获得大量具有活性的目标蛋白。建立外源基因在原核系统中可溶性表达的方法包括: 优化表达条件、选择合适的菌株、利用融合蛋白、使用分子伴侣等^[7]。作者通过 3 种方式对蛋白质的可溶性表达条件进行优化: 1) 低温诱导蛋白质表达; 2) 选择新型的分子伴侣与目的基因融合表达; 3) 选择不同的大肠杆菌载体表达目的基因。以期利用简单的方式在大肠杆菌中建立高效表达 RML 基因的策略, 并获得大量的具有生物活性的蛋白质, 这对 RML 的工业应用具有很大意义, 同时这些提高外源基因在原核表达体系中蛋白质表达量的策略, 对于其他源于

真核生物的外源基因在大肠杆菌中的表达有一定的借鉴作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

RML 基因(包括编码前导肽部分): 由上海闪晶分子生物科技有限公司合成, 分子伴侣 Skp 基因来源于大肠杆菌 K12 基因组; 菌株 *Escherichia coli* K-12: 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心; 克隆及表达质粒 pET-30a, pET-32a, 宿主菌 *E.coli* BL21: 购于 Novagen (WI) 公司 (Wisconsin, USA)。PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase: 购于 Takara 公司; 限制性内切酶 *Nco*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III 以及 T4DNA 快速连接酶: 均购于生工生物工程(上海)有限公司; PCR 引物: 由上海英俊生物公司合成; 基因组提取试剂盒、PCR Cleanup 试剂盒、质粒提取试剂盒、凝胶纯化试剂盒: 购于 axygen 公司; Ni^{2+} 交换 HisTrap 亲和层析柱(用于纯化蛋白): 购于通用电气医疗集团; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因的克隆 RML 由 70 个前导肽氨基酸和 339 个成熟区氨基酸构成, 全长 1 020 bp(包括终止密码子), 蛋白质相对分子质量大小 37 000。分子伴侣 Skp 由 161 个氨基酸构成, 全长 483 bp(不包括终止密码子), 蛋白质相对分子质量 17 000。分别用大肠杆菌表达载体 pET-30a 和 pET-32a 克隆目的基因, 利用载体上多克隆位点, 选择合适的酶切位点, 用 Primer 软件设计引物, 见表 1。

表 1 用于目的基因克隆的引物序列

Tab.1 Primer for gene cloning

目的基因	引物序列	酶切位点	目的克隆
RML	5'-CGCGCCATGGTGCCAATCAAGAGACAATC-3'	<i>Nco</i> I	pET30a-RML
	5'-GCCGAAGCTTAAGTACAGAGGCCTGTGT-3'	<i>Hind</i> III	
Skp	5'-CGCGGATCCGATGAAAAAGTGGTTATTAGC-3'	<i>Bam</i> HI	pET30a-Skp
	5'-GCGGAATTCTTTAACCTGTTTCAGTACCGG-3'	<i>Eco</i> RI	
RML	5'-GCGGAATTCTGCCAATCAAGAGACAATC-3'	<i>Eco</i> RI	pET30a-Skp-RML
	5'-GCCGAAGCTTAAGTACAGAGGCCTGTGT-3'	<i>Hind</i> III	
RML	5'-CGCGCCATGGTGCCAATCAAGAGACAATC-3'	<i>Nco</i> I	pET32a-RML
	5'-GCCGAAGCTTAAGTACAGAGGCCTGTGT-3'	<i>Hind</i> III	

PCR 体系: 0.1 μg 模板, 10 μL 5 $\times$ Primer STARTM 缓冲液 (包括 Mg^{2+} puls), 4 μL dNTP (每种浓度均为 2.5 mmol/L), 引物终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 高保真酶 Primer STARTM HS DNA polymerase 1.25 U, 加水补足 50 μL 。扩增目的基因 PCR 程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环结束后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min。将 PCR 产物以 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳, 用 PCR 纯化回收试剂盒进行纯化回收。纯化后的 PCR 产物用相应的限制性内切酶进行 3~4 h 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 的酶切, 后与同样经过酶切的载体进行连接。然后将连接产物转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 涂布于 LB 平板 (1 g/dL 蛋白胨, 0.5 g/dL 酵母粉, 1 g/dL NaCl, 1.5 g/dL 琼脂粉, 含与载体相对应抗生素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16~20 h。挑取单克隆鉴定并测序, 确定目标克隆。其中, 克隆 pET30a-Skp-RML 的构建见图 1。

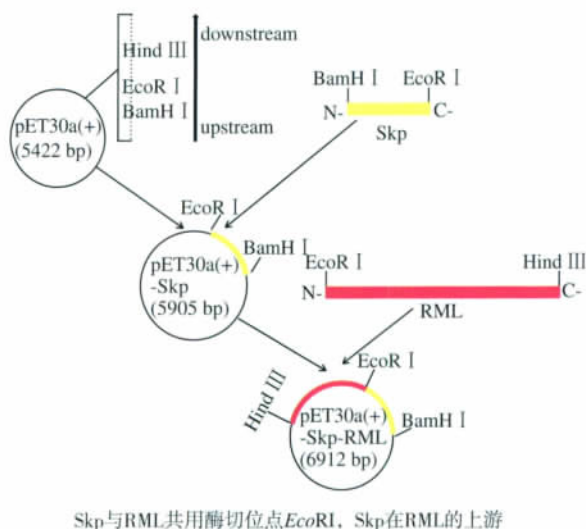


图1 目的克隆 pET30a-Skp-RML 的构建过程

Fig.1 Construction of plasmid pET30a-Skp-RML

1.2.2 蛋白质的诱导、纯化及活性测定 将目标克隆于 5 mL LB 液体培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12~16 h, 以体积分数 2% 的接种量将菌种转接于 50 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 达到 0.5~0.6, 加入 IPTG, 至终浓度达 0.1 mmol/L, 然后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h 或 16 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16~20 h 诱导蛋白质表达。离心收集菌体沉淀, 用磷酸缓冲液清洗菌体。然后将菌体重悬于 4 mL Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0) 中, 超声破碎菌体细胞, 将破碎液离心, 分别收集上清液和沉淀, 用 SDS-PAGE 检测蛋白质表达情况。利用 Ni^{2+} 交换 HisTrap 亲和层析柱纯化目标蛋白质 [8], 并用

SDS-PAGE 检测。纯化后的蛋白质溶液于 595 nm 测定紫外吸收值, 并通过蛋白质质量浓度标准曲线计算 (蛋白浓度标准曲线用 BSA 试剂盒测定) 实际蛋白质质量浓度。用碱式滴定法测定酶活性, 反应体系为: 底物橄榄油乳化液 4 mL, 磷酸盐缓冲液 5 mL, 混合均匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min, 加入 10 μL 纯化后的酶液 (保证蛋白质质量远远小于底物量) 开始反应, 反应 15 min 后加入 10 mL 乙醇终止反应。加入 2~3 滴酚酞, 用事先配好的 NaOH 溶液滴定。所有实验重复 3 次, 根据蛋白质质量浓度计算酶的比活, 最终结果为平均值, 并计算标准偏差。酶活定义: 每分钟催化底物释放出 1 μmol 脂肪酸的酶量为 1 个脂肪酶活力单位 (U)。

2 结果与讨论

2.1 重组子的克隆

扩增编码脂肪酶 RML 和分子伴侣 Skp 基因的 PCR 结果见图 2。分别于 1 020 bp 和 483 bp 位置有条带; 鉴定阳性克隆 pET30a-RML, pET30a-Skp-RML 及 pET32a-RML 的结果见图 3, 表明实验得到了阳性克隆。

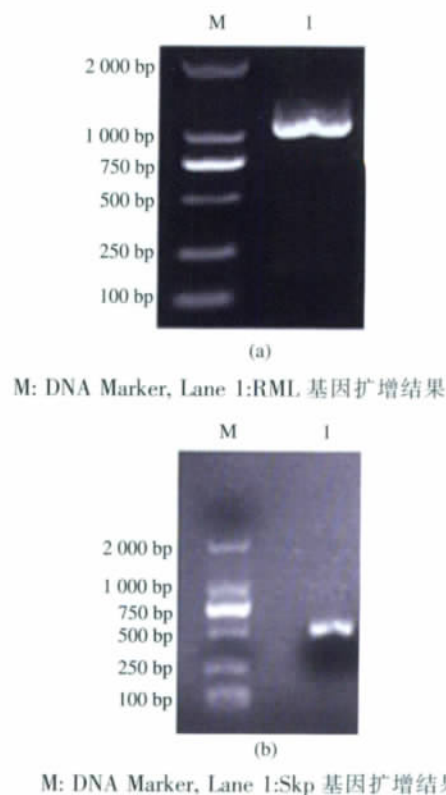
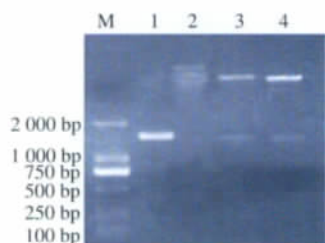


图2 RML、Skp 基因扩增产物鉴定图谱

Fig.2 Identification of PCR for Skp



(a)

M:DNA Marker, Lane 1:PCR 扩增全基因 Skp-RML 结果; Lane 2:质粒 pET30a; Lane 3,4:重组子 pET30a-Skp-RML 酶切验证(BamH I/Hind III)



(b)

M:DNA Marker, Lane 1:PCR 扩增全基因 RML 结果; Lane 2:质粒 pET30a; Lane 3:质粒 pET32a; Lane 4:重组子 pET30a-RML 酶切验证(NcoI/HindIII); Lane 5:重组子 pET32a-RML 酶切验证(Nco I /Hind III)

图 3 重组子 pET30a-Skp-RML、重组子 pET30a-RML、重组子 pET32a-RML 的鉴定
Fig.3 Identification of recombinant:pET30a-Skp-RML, Identification of recombinants:pET30a-RML and pET32a-RML

2.2 pET30a-RML 的常温诱导及低温诱导表达

RML 克隆于载体 pET30a 上,于 37 ℃诱导 4 h,蛋白质表达结果见图 4 中第 1~3 泳道所示。其中第 1 泳道为重组子 pET30a-RML 于 37 ℃培养未诱导的样品,用于做对照;第 2 泳道为菌体经诱导破碎后得到的可溶性蛋白质样品;第 3 泳道为菌体经诱导破碎后存在于沉淀物中的蛋白质样品,均在 42 000 的位置有条带,如图中亮点标记所示。结果显示,可溶性 RML 的表达量远远小于包涵体部分,表达效果不理想。

改变诱导条件,于 16 ℃诱导蛋白质 20 h 以上,SDS-PAGE 检测蛋白质表达结果见图 4 中第 4~6 泳道所示。第 4 泳道为重组子 pET30a-RML 于 16 ℃培养未诱导对照,RML 经低温诱导后可溶性蛋白质(第 5 泳道)得到了明显提高,同时,包涵体量(第 6 泳道)相应减少,说明低温诱导可以明显提高 RML 在大肠杆菌中的可溶性蛋白质的表达量。随着诱导温度的降低,可溶性蛋白质量占总蛋白质量的

比例可达到约 50%。

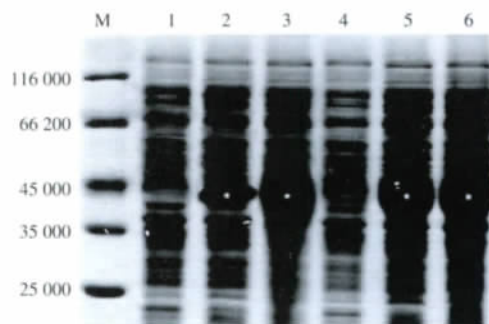


图 4 SDS-PAGE 检测 pET30a-RML(37 ℃)和 pET30a-RML(16 ℃)蛋白质表达情况

Fig.4 SDS-PAGE for expression of pET30a-RML (37 ℃) and pET30a-RML (16 ℃)

2.3 pET30a-Skp-RML 和 pET32a-RML 的常温诱导表达

低温诱导可以明显提高 RML 在大肠杆菌中可溶蛋白的表达量,然而低温诱导的时间是常温诱导的 5 倍左右,在工业应用中,诱导周期过长会造成更多能量的消耗,因此,若能在保证常温诱导的条件下,提高 RML 可溶性蛋白质表达量是有意义的。作者通过分子伴侣的使用和改变表达载体两种方式来达到预期目的。图 5 显示出分子伴侣 Skp 与 RML 融合表达并于 37 ℃诱导后得到的可溶性蛋白质表达量(泳道 4 所示:分子伴侣 Skp 大小 17 000,与 RML 在 pET30a 上融合表达后大小约为 59 000;泳道 3 为重组子 pET30a-Skp-RML 经培养未诱导的对照)和 RML 构建于载体 pET32a,与其自带标签 Trx-tag 融合表达后,于 37 ℃诱导得到的可溶性蛋白质表达量(泳道 6 所示:Trx-tag 大小 12 000,与 RML 在 pET32a 上融合表达后大小约为 55 000;泳道 5 为重组子 pET32a-RML 经培养未诱导的对照)均大于第 2 泳道所显示的重组子 pET30a-RML 在同样诱导条件下的表达量(泳道 2 所示:蛋白质相对分子质量为 42 000;泳道 1 为重组子 pET30a-RML 经培养未诱导的对照),蛋白质条带如图中亮点所示。这一结果说明,在克隆过程中,引入合适的辅助蛋白质可以提高目的蛋白质正确折叠的效率,进而提高可溶蛋白质的表达量,尽管这一途径得到的效果低于低温诱导得到的效果,但是构建克隆表达 RML 的不同载体可以保证一个相对短周期的菌株培养诱导时间,这在工业应用中可以节省能量的消耗。

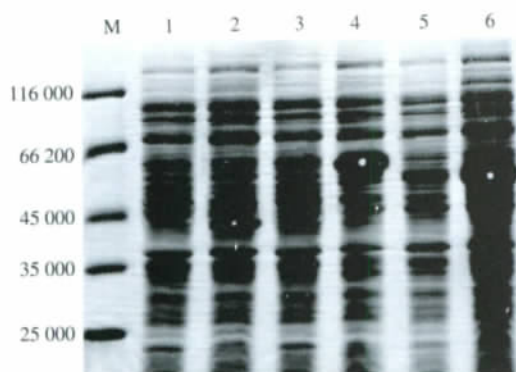


图5 SDS-PAGE 检测 pET30a-RML、pET30a-Skp-RML 及 pET32a-RML 常温诱导表达情况

Fig.5 SDS -PAGE for expression of pET30a -RML、pET30a-Skp-RML and pET32a-RML(37 °C)

2.4 蛋白质的纯化及比活测定

利用 Ni^{2+} 交换 HisTrap 亲和层析柱纯化各种条件下得到的蛋白质, 然后用 SDS-PAGE 进行检测, 见图 6。各蛋白质纯化条带见亮点标记: 泳道 1 为重组子 pET30a-RML 于 37 °C 诱导表达的纯蛋白质, 泳道 2 为重组子 pET30a-RML 于 16 °C 诱导表达的纯蛋白质, 泳道 3 为重组子 pET30a-Skp-RML 于 37 °C 诱导表达的纯蛋白质, 泳道 4 为重组子 pET32a-RML 于 37 °C 诱导表达的纯蛋白质。图 6 显示, 优化 RML 在大肠杆菌中的表达条件对提高 RML 可溶性蛋白质表达量有明显提高, 尤其以第 2 泳道代表的低温诱导的 RML 纯蛋白质表达量的提高程度最为显著。此外, 研究测定各蛋白质质量浓度, 将其分别稀释至 0.1 mg/mL 左右, 利用碱式滴定法测定比活, 结果见表 2。

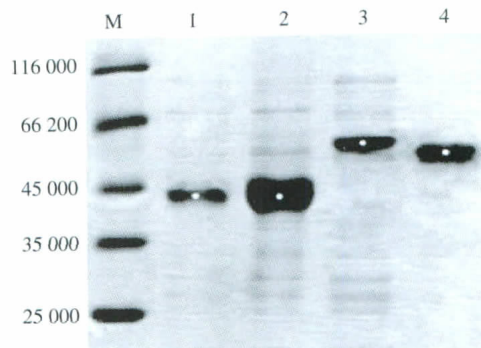


图6 SDS-PAGE 检测 pET30a-RML (37 °C)、pET30a-RML (16 °C)、pET30a-Skp-RML (37 °C) 及 pET32a-RML(37 °C) 目标蛋白的纯化结果

Fig.6 SDS-PAGE for the expression of pET30a-RML(37 °C), pET30a-RML (16 °C), pET30a-Skp-RML(37 °C) and pET32a-RML(37 °C) after the purification

由表 2 数据可知, 3 种提高 RML 在大肠杆菌中可溶性蛋白表达量的方法都行之有效, 在蛋白质纯化前后, 用 SDS-PAGE 检测可溶性蛋白质表达量, 都可以看到明显的变化。并且通过目标蛋白质质量浓度的测定, 与 37 °C 诱导 pET30a-RML 表达得到的可溶蛋白质量相比, 16 °C 诱导 RML 表达可溶性蛋白质量提高了 5.6 倍; 37 °C 诱导 pET32a-RML 表达的可溶 RML 提高了 1.6 倍; 37 °C 诱导 pET30a-Skp-RML 表达可溶性蛋白量提高了 1.15 倍。此外, 不同条件下得到的 RML 比活相差不大, 范围在 $(226 \pm 10 \sim 247 \pm 10)$ U/mg 之间, 这一结果说明: 各种条件下得到的 RML 保留了相对独立的空间构象和生物活性。

表 2 目标蛋白比活测定

Tab.2 Specific activity of target protein

目标克隆	纯化后质量浓度/(mg/mL)	稀释后质量浓度/(mg/mL)	脂肪酸释放量/ (μmol /15 min)	蛋白质比活/ (U/mg)
pET30a-RML(37 °C)	0.130	0.095	3.22	226 ± 10
pET30a-RML(16 °C)	0.860	0.095	3.34	235 ± 10
pET30a-Skp-RML(37 °C)	0.280	0.100	3.55	237 ± 10
pET32a-RML(37 °C)	0.340	0.083	3.08	247 ± 10

3 结 语

大肠杆菌表达体系具有生长快, 操作简便, 遗传背景清楚的优点, 但其缺少源于真核生物的外源蛋白质表达所需的翻译后修饰、糖基化等过程, 使

很多外源蛋白质于大肠杆菌中表达时, 常常会形成不溶性的包涵体, 而有活性的可溶蛋白质量却极少, 从而限制了大肠杆菌表达体系的应用^[9]。作者以源于米黑霉的脂肪酶 RML 作为研究对象, 首次检测并报道其在大肠杆菌中的蛋白质表达情况, 并建

立提高 RML 于大肠杆菌中可溶性蛋白质表达量的策略。研究从控制菌株代谢和构建不同表达载体两条途径着手,通过 3 种方式不同程度的提高了 RML 在大肠杆菌中可溶蛋白表达量。其中降低诱导温度,延长诱导时间,控制菌体代谢的方式作用效果最明显,可溶性蛋白质表达量提高 5.6 倍。因为常温诱导条件下,大肠杆菌中表达的蛋白质会折叠成对热不稳定的中间体,就会促成包涵体的形成,而低温的条件下,菌体生长速度、代谢速度都会减慢,使其有更充足的时间进行蛋白质的组装,帮助外源蛋白质正确折叠^[10-11],说明诱导温度的是决定外源蛋白表达效果的重要因素。

另一方面,考虑到低温诱导会延迟菌株生长时间 5 倍左右,某种程度上对实验流程及工业应用造成不便。因此,作者建立的 RML 于大肠杆菌中可溶性表达策略还包括以常温诱导为基础,构建不同的克隆表达载体。首先,分子伴侣是一类辅助蛋白质,其帮助相作用的目标蛋白质正确折叠和组装^[12],其中 Skp 源于大肠杆菌 K12,与多数分子伴侣相比,蛋白质相对分子质量较小,不会对载体造成太大负担,是近两年新发现的一种能够帮助目的蛋白质正确折叠及可溶性表达的一种新的标签。而本研究选择分子伴侣 Skp 与 RML 于载体 pET30a 中融合表达不同于文献^[13]报道的双质粒的共表达,融合表达操作简单,也使得外源蛋白质可溶性表达量在同样条件下提高了 1.15 倍。此外,许多蛋白质要求形成稳定的二硫键才能形成天然空间结构,否则这些蛋白质可能被降解或者会形成包涵体,RML 也需要 3 对二硫键才可构成稳定的构象^[5],但大肠杆菌细胞

质中的氧化还原势不利于形成稳定的二硫键^[14],而载体 pET32a 上的 Trx·Tag 可以催化目的蛋白质中的二硫键在大肠杆菌细胞质中的生成,并且本身就是一种溶解性高的多肽序列。有学者证明,在 *E.coli* 中以不溶形式存在的蛋白质与硫氧还蛋白 (Trx·Tag) 融合后,可增加蛋白质可溶性^[15]。因此作者将 RML 构建于载体 pET32a,与 Trx·Tag 融合表达,常温诱导后发现,目标蛋白质可溶量提高 1.6 倍,效果更甚于使用分子伴侣的研究,说明选择一些成熟的,功能明确的辅助蛋白,对外源蛋白质的折叠表达更为有效。

维持蛋白质的活性是保证酶生产成本的重要条件之一,而目的蛋白质与其他片段的融合表达,可能会影响目的蛋白质活性中心对底物的结合及催化能力。而本研究所涉及的提高 RML 在大肠杆菌中可溶性蛋白质表达量的方式都没有影响 RML 对油脂的催化作用,原因是 RML 的活性催化中心位于三级结构的 C 末端^[16],而在与辅助蛋白质融合表达时,是以其 N 末端进行融合表达,所以避免了融合片段对 RML 活性中心的影响,从而保证 RML 的催化能力。由此可见,在建立源于真核生物的外源基因在大肠杆菌中可溶性表达的体系时,不仅要有多条途径着手(诱导条件的优化、载体构建手段等),还要适当规避一切有可能影响目的蛋白质本身性质的因素,才能建立合理的体系以达到研究预期的目的并赋有价值。本研究一方面为 RML 更广泛的工业应用奠定基础,更一方面对于其他源于真核生物的外源基因在大肠杆菌中的表达提供理论依据,具有借鉴意义。

参考文献:

- [1] Rafael C R, Roberto F L. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2010, 64(1-2): 1-22.
- [2] Boel E, Høge-Jensen B, Christensen M, et al. *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor[J]. **Lipids**, 1988, 23(7): 701-706.
- [3] Høge-Jensen B, Andreaseu F, Christensen T et al. *Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is produced and secreted from transformed *Aspergillus oryzae*[J]. **Lipids**, 1989, 24(9): 781-785.
- [4] ZHANG Wei-guo, HAN Shuang-yan, WEI Dong-zhi, et al. Functional display of *Rhizomucor miehei* lipase on surface of *Saccharomyces cerevisiae* with higher activity and its practical properties [J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2008, 83(3): 329-335.
- [5] HAN Zhen-lin, HAN Shuang-yan, LIN Ying. Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide

- bond and displaying on the yeast cell surface[J]. **Appl Microbiology Biotechnol**, 2009, 85(1):117-126.
- [6] ZHANG Yang, David R O, Kimyen B Nguyen, et al. Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*[J]. **Protein Expression and Purification**, 1998, 12(2):159-165.
- [7] 朱红裕, 李强. 外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达策略[J]. 过程工程学报, 2006, 6(1):150-155.
- ZHU Hong-yu, LI Qiang. The strategy of soluble expression of protein in *E. coli* [J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**, 2006, 6(1):150-155. (in Chinese)
- [8] 陈艳, 孙建义, 赵学新. *Bacillus amyloliquefaciens* 中性植酸酶基因的原核表达及蛋白纯化和性质[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2):60-64, 72.
- CHEN Yan, SUN Jian-yi, ZHAO Xue-xin. Expression of neutral phytase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Food science and biotechnology**, 2005, 24(2):60-64, 72. (in Chinese)
- [9] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. **Curr Opin Biotechnol**, 1999, 10(5):411-421.
- [10] 曾沃坦, 单永强, 王晓霞, 等. 重组人瘦素蛋白在大肠杆菌中的低温自诱导表达、纯化和活性鉴定[J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(5):443-446.
- ZENG Wo-tan, SHAN Yong-qiang, WANG Xiao-xia, et al. The low temperature expression, purification and activity assay of recombinant human leptin protein in *E. coli*[J]. **Journal of Military Medical Science Academy of the PLA**, 2008, 32(5):443-446. (in Chinese)
- [11] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南, 三版(下册)[M]. 北京: 科学出版社, 2005:1-224.
- [12] Ellis J. Proteins as molecular chaperones[J]. **Nature**, 1991, 328(6129):378-379.
- [13] Deb K C, Dominic E. Enhanced soluble protein expression using two new fusion tags[J]. **Protein Expression and Purification**, 2006, 46(1):122-129.
- [14] Lavallie E, Diblasio E, Kovacic S. An *Escherichia-coli* expression system that allow high-level soluble production of heterologous proteins[J]. **Protein Engineering**, 1993, 6(S):30-30.
- [15] Vassel B, Hecht H J, Schmid R D, Schomburg D. 3d-Structures of the lipase from *Rhizomucor-Miehei* at different temperatures and computer modeling of a complex of the lipase with *Trilauryl glycerol*[J]. **Journal of Biotechnology**, 1993, 28(1):99-115.

科 技 信 息

<http://www.foodmate.net/news/yujing/2012/11/218591.html>

美国农业部公布 2011 年有机产品调查结果

10月4日, 美国农业部(USDA)公布了 2011 年有机产品的调查结果。该调查(COPS)由美国农业部统计局(NASS)和美国农业部风险管理局(RMA)共同实施, 涉及美国 50 个州, 涵盖了生产认证有机农作物和牲畜的所有经营者。

2011 年获认证有机产品调查内容包括: 有机农作物的种植面积、产量和销售数据, 有机牲畜产品的库存量和销售数据, 此外还包括: 农场土地数据、联邦农业项目、认证有机农场的市场操作等。

与传统作物相比, 玉米在销售上引领有机农田作物, 2011 年超过 1.015 亿美元, 其他超过 5000 万美元的销售额的只有苜蓿干草和冬小麦, 分别为 6950 万美元和 5400 万美元的销售额。有机奶是销售额最高的牲畜商品, 为 7.65 亿美元, 其他重要的有机畜产品为鸡蛋和肉鸡, 分别是 2.76 亿美元和 1.15 亿美元的销售额。

2000 年美国农业部有机标准委员会针对“有机”概念制定了国家标准, 标准规定有机食品在生产过程中不允许使用常规农药、有机肥料、污水污泥类肥料、除草剂、杀虫剂、基因工程(生物技术)、抗生素、生长调节剂和辐照; 有机动物的饲养必须使用有机饲料并给予室外活动空间; 在有机农作物收获前, 土壤中未使用违禁物质的时间至少为 3 年。

[信息来源] United States Department of Agriculture. USDA Releases Results of the 2011 Certified Organic Production Survey [EB/OL]. (2012-10-4).