

杨氏柠檬酸杆菌磷脂酶 A1 基因在 *E.coli* 中的表达

姚其玉^{1,2}, 张 梁^{*1,2}, 石贵阳^{1,2}, 顾正华^{1,2}, 丁重阳^{1,2}

(1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为实现磷脂酶 A1 (PLA1) 的异源表达, 将杨氏柠檬酸杆菌 (CICC No.21596) PLA1 基因插入载体 pET28a(+) 中, 构建重组表达质粒 pET28a(+)-*pla1*, 并将重组质粒转入宿主菌 *E.coli* BL21(DE3) 中, 获得重组菌 pET28a(+)-*pla1*/DE3。在 IPTG 诱导作用下经 SDS-PAGE 检测, 发现在重组菌发酵破碎上清液中存在 33 000 大小的蛋白质, 与预期蛋白质大小相符。在硼砂卵黄平板上对重组菌 PLA1 活性进行检测, 结果显示重组菌具有明显的 PLA1 活性, 表明 PLA1 基因在大肠杆菌中得到了表达。经发酵初步优化, 获得摇瓶发酵的最佳诱导表达条件为: 转接体积分数 4%、诱导时机 2 h、IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L、37 °C 诱导培养 8 h。经酸碱滴定法测得最高酶活为 (5.6±0.2) U/mL。

关键词: 杨氏柠檬酸杆菌; 磷脂酶 A1; 表达; 优化; 大肠杆菌

中图分类号: Q 786 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)11—1172—06

Molecular Clone and Expression of Phospholipase A1 Gene from *Citrobacter youngae* in *Escherichia coli*

YAO Qiyu^{1,2}, ZHANG Liang^{*1,2}, SHI Guiyang^{1,2}, GU Zhenghua^{1,2}, DING Chongyang^{1,2}

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: For the heterologous expression of phospholipase A1, the gene of phospholipase A1 from *Citrobacter youngae* (CICC No.21596) was cloned into the expression vector pET28a (+) to construct the recombinant plasmid pET28a(+)-*pla1*. Then the recombinant plasmid was transformed into *E.coli* BL21 (DE3) to achieve the recombinant strain pET28a (+)-*pla1*/DE3. After subsequent induction by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), an approximately 33 000 protein was detected in the cell lysate supernatant by SDS-PAGE. The PLA1 activity was detected in an egg yolk agar plate, indicating that the PLA1 gene was expressed in *E.coli*. The best induction conditions for PLA1 expression were achieved by the optimization of fermentation condition and it was showed as follows, 4% of inoculum amount, 2 h of initial culture, 8 h of induced culture in the presence of 0.4

收稿日期: 2014-03-04

基金项目: 国家 863 计划项目 (2011AA100905); 江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目 (2012-NY-002); 江南大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索项目 (SKLF-ZZA-201201)。

* 通信作者: 张 梁 (1978—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物、酶工程技术方面的研究。

E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

mmol/L of IPTG, and growth at 37 °C. Under the optimized conditions, the maximum PLA1 activity in the supernatant was (5.6± 0.2) U/mL.

Keywords: *Citrobacter youngae*, phospholipase A1, expression, optimization, *E.coli*

磷脂酶 A1(phospholipase A1, PLA1, EC3.1.1.32), 是一类水解磷脂生成溶血性磷脂和自由脂肪酸的酶^[1]。PLA1 在工业上被广泛应用于油脂脱胶以及磷脂改性^[2-4], 此外由其催化磷脂水解生成的溶血性磷脂在食品、医药、化工等领域也具有极为广泛的应用^[5-6]。PLA1 的来源渠道比较狭窄, 主要来自蛇的毒液和动物胰脏, 目前还远远不能满足工业化生产的需求。目前已有筛选得到产 PLA1 菌株的报导^[7-8], 但由于野生菌株产酶量往往较低且难以分离纯化, 并且存在一定的食品安全隐患, 因此应用野生菌株产酶的前景大大降低。而微生物来源的酶具有生产周期短、操作简单且可大规模生产等优点, 因此具有很大的应用价值。目前已经有 PLA1 基因在不同宿主菌中异源表达的报导, 例如液化沙雷氏菌 PLA1 基因在大肠杆菌中的表达^[9-10] 以及米曲霉 PLA1 基因在酿酒酵母中的表达^[11], 但酶活力普遍较低。作者以杨氏柠檬酸杆菌为出发菌株, 利用基因工程技术, 将 PLA1 基因转入大肠杆菌中, 以期实现 PLA1 的异源表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 菌种 *Citrobacter youngae*: 保藏于中国工业微生物菌种保藏中心(CICC No.21596); *E.coli* JM109、BL21 (DE3) 菌株及载体 pET28a(+): 均为作者所在实验室保藏。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、DNA marker、Protein marker: 购自宝生物(大连)工程有限公司; T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、Ex *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、pMD19-T(Simple)载体: 购自 TaKaRa 公司; DNA 片段纯化试剂盒、质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒: 均购自北京博大泰克生物技术公司; 50%卵黄: 购自上海江莱生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 引物 上游引物 P₁: CGGGATCCATGCGGG CGATTCTGGGAT *Bam*H I

下游引物 P₂: CCAAGCTTGAAGATATCGTTGA GCATCAGGCC *Hind* III

上述引物由上海生工技术有限公司合成。

1.1.4 培养基 LB 培养基: 1 g/dL 胰蛋白胨、0.5 g/dL 酵母提取物、1 g/dL NaCl, 并调节 pH 至 7.0。制备固体培养基则加入 1.5 g/dL 琼脂。

硼砂卵黄固体培养基: NaCl 0.66 g/dL、硼酸 1.09 g/dL、硼砂 0.19 g/dL、琼脂 1.5 g/dL、卵黄 2 g/dL, pH 7.2~7.4。

1.2 方法

1.2.1 杨氏柠檬酸杆菌 *pla1* 基因的获取 *Citrobacter youngae* 染色体 DNA 的提取操作按照文献 [12] 进行。根据 NCBI 上报导的 *Citrobacter youngae* ATCC 29220 PLA1 基因序列设计引物 P₁ 及 P₂, 利用引物 P₁ 及 P₂ 以杨氏柠檬酸杆菌染色体为模板进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物进行凝胶电泳检测, 并用纯化试剂盒纯化。

1.2.2 重组质粒 pMD19T-*pla1* 的构建 将纯化回收的目的基因片段与 pMD19-T(Simple)连接, 转化大肠杆菌 JM109, 并涂布氨苄 LB 抗性平板, 挑取转化子转接至含氨苄的 LB 培养基中, 提取转化子质粒并用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切验证, 将验证正确的质粒送到上海生工进行测序。将测序正确的重组质粒命名为 pMD19T-*pla1*。

1.2.3 表达重组质粒 pET28a-*pla1* 的构建 提取重组菌 pMD19T-*pla1*/JM109 的质粒, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切, 割胶回收目的片段, 与同样经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切线性化的 pET28a(+)载体 16 °C 过夜连接。将连接产物转化至大肠杆菌 JM109 中, 并涂布卡那霉素抗性平板, 37 °C 培养 10 h, 挑取转化子接种至卡那霉素 LB 培养基中, 培养 12 h, 提质粒并用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切验证, 将验证正确的转化子命名为 pET28a(+)-*pla1*。

1.2.4 重组 PLA1 工程菌的构建 提取 pET28a(+)

-*pla1*/JM109 的质粒,转化大肠杆菌 DE3,并涂布卡那霉素抗性平板进行筛选。

1.2.5 重组菌的诱导表达及 SDS-PAGE 分析 接种重组菌 pET28a (+)-*pla1*/DE3 以及 pET28a (+)/DE3 于 LB 卡那霉素培养基中,37 °C 培养过夜,第二天以 4% 的接种体积分数转接至 50 mL LB 卡那霉素培养基中,当 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,37 °C 诱导 6 h。诱导结束后离心收集菌体,用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液重悬菌体进行超声波破碎,将破碎液 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液用 10 g/dL 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.6 PLA1 酶活力的测定 采用硼砂卵黄平板法^[10]和酸碱滴定法^[13-14]进行酶活力测定。

1.2.7 重组菌生长曲线的测定 接种大肠杆菌重组菌于 20 mL 含卡那霉素抗性的 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养过夜,以 4% 的接种体积分数转接至 50 mL 含卡那霉素抗性的 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养,定时取样并测 OD₆₀₀ 值。

1.2.8 诱导条件的优化 研究诱导剂加入时机、诱导时间、诱导剂浓度以及诱导温度对产酶的影响。

2 结果与分析

2.1 PLA1 基因扩增及 pMD19T-*pla1* 的构建

杨氏柠檬酸杆菌 PLA1 基因的大小为 870 bp,所设计引物 P₁ 及 P₂ 之间的片段大小为 986 bp,将 PCR 扩增产物进行 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳后,可在 1 000 bp 附近看到清晰的目的条带,见图 1,与预期扩增片段大小相符。与 pMD19-T(Simple)连接后用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切验证,结果见图 2。出现 986 bp 和 2692 bp 两条带,分别对应目的基因片段和载体大小。挑取验证正确的转化子送上海生工测序,测序结果显示,扩增序列与 ATCC29220 的 PLA1 基因序列比对相似度为 90.11%。

2.2 重组质粒 pET28a(+)-*pla1* 的构建

将所构建的 pET28a (+)-*pla1* 重组质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切后得到 pET28a(+)和 PLA1 基因两个片段,大小分别为 5 369 bp 和 986 bp,结果见图 3,表明重组质粒构建成功。

2.3 SDS-PAGE 电泳结果

将构建好的重组质粒 pET28a (+)-*pla1* 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取转化子酶切验证,获得重组菌 pET28a(+)-*pla1*/DE3。接种重组菌

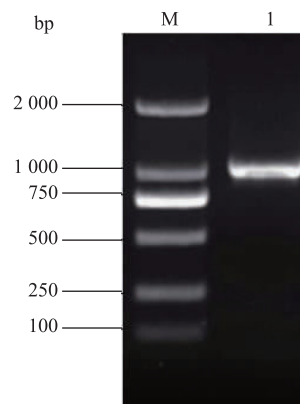


图 1 目的基因 PCR 扩增

Fig. 1 Product of PCR amplification

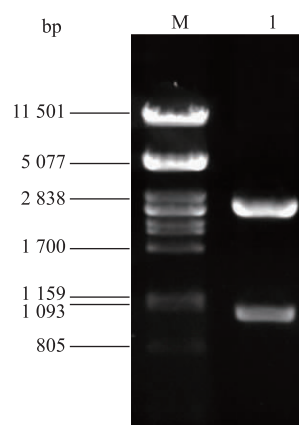


图 2 重组表达载体 pMD19-*pla1* 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant expression vector pMD19-*pla1* by enzyme digestion

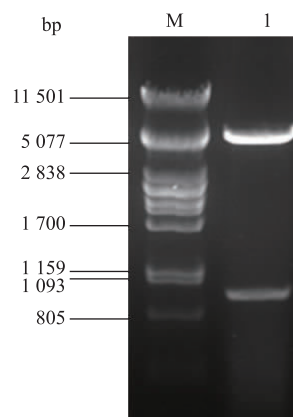
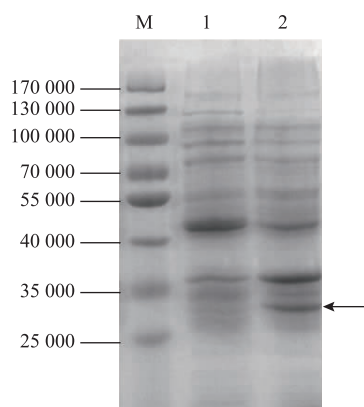


图 3 重组表达载体 pMD19-*pla1* 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant expression vector pET28a-*pla1* by enzyme digestion
pET28a(+)-*pla1*/DE3,经 IPTG 诱导,离心收集菌体并超声波破碎后进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图

4. 在 33 000 处有明显蛋白质条带,初步说明 PLA1 基因在大肠杆菌中得到了表达。



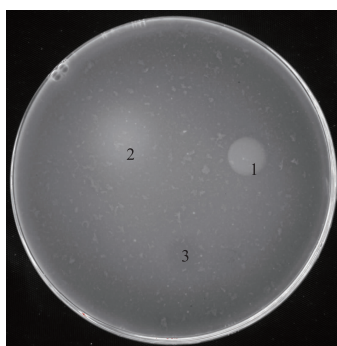
1:pET28a/DE3 破碎液上清液;2:pET28a-pla1/DE3 破碎液上清液

图 4 重组菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE of expressed protein

2.4 重组菌酶活力检测

接种 pET28a(+)-pla1/DE3 和 pET28a(+)/DE3, 经 IPTG 诱导后离心收集菌体并超声波破碎。将获得的破碎液于 12 000 r/min 离心 20 min, 各取 100 μ L 点到放置有牛津杯的硼砂卵黄平板上, 37 $^{\circ}$ C 放置 8 h 观察酶活力情况, 其结果见图 5。从图 5 可以看出, 重组菌 pET28a(+)-pla1/DE3 破碎液在卵黄平板上可产生明显的白色晕圈, 而其对照 pET28a(+)/DE3 并没有产生晕圈, 说明 PLA1 在重组菌中得到了表达。



1:PET28a(+)-pla1/DE3 破碎液上清液;2:PET28a(+)-pla1/DE3 发酵液上清液;3:PET28a(+)/DE3 破碎液上清液

图 5 重组菌磷脂酶 A1 活力检测

Fig. 5 Detetion of the recombinant *E.coli* PLA1 activity

2.5 重组菌生长曲线的测定

通过测定重组菌的生长曲线可清楚地分析重组菌的生长状态,从而可以更好地确定诱导剂加入的时机,生长曲线见图 6。从图 6 可以看出,重组菌

接种后的 0~1 h 为延滞期,1~6 h 为对数生长期,之后进入稳定期。

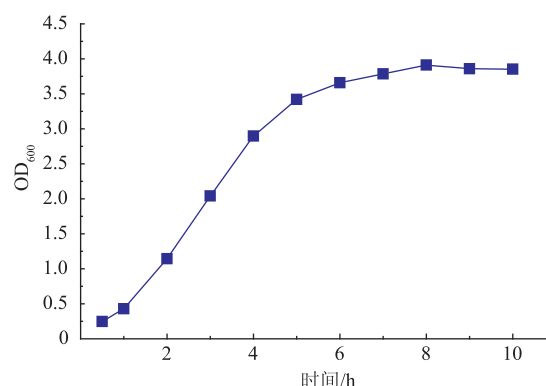


图 6 重组菌 pET28a-pla1/DE3 生长曲线

Fig. 6 Growth curve of recombinant strains pET28a-pla1/DE3

2.6 重组菌诱导条件的优化

2.6.1 诱导时机对酶活力的影响 分别选取重组菌生长对数期不同时间段添加诱导剂进行诱导,研究其对产酶活力的影响,结果见图 7。在菌体转接 2 h 后,诱导所产酶活力最高。诱导剂加入的时间过早,会影响菌体的生长和产酶能力;诱导剂加入时间过晚,细胞活力会降低,从而影响重组菌的表达。

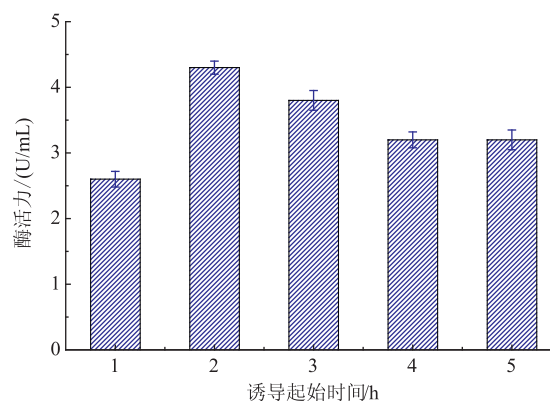


图 7 诱导时机对产酶的影响

Fig. 7 Effect of induction initial time on PLA1 production

2.6.2 诱导温度对酶活力的影响 大肠杆菌的最适生长温度为 37 $^{\circ}$ C, 最佳诱导温度随产物不同而异。一般来说,在 25~37 $^{\circ}$ C 诱导表达,外源蛋白易于以活性状态存在;37 $^{\circ}$ C 以上诱导,则易形成包涵体^[15-16]。因此作者选取 25、30、37 $^{\circ}$ C 三个温度研究温度对产酶水平的影响,结果见图 8。随着诱导温度的升高,酶活力也随之升高,在 37 $^{\circ}$ C 时酶活达到最高,因此选取最佳诱导温度为 37 $^{\circ}$ C。

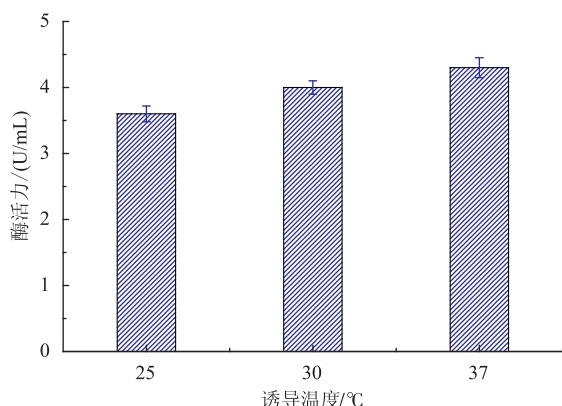


图8 诱导温度对产酶的影响

Fig. 8 Effect of induction temperature on PLA1 production

2.6.3 诱导剂浓度对酶活力的影响 IPTG 是一种作用极强的诱导剂,但高浓度 IPTG 对重组菌的生长具有抑制作用,再加上 IPTG 本身价格昂贵,因此选择一个合适的 IPTG 的浓度是非常必要的。为研究 IPTG 浓度对产酶的影响,作者选取 0.1~0.6 mmol/L 之间 6 个不同 IPTG 浓度对重组菌进行诱导表达。由图 9 可以看出,IPTG 浓度对产酶水平影响不是很大,在 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L 时酶活力最大,因此确定该重组菌的最适 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L。

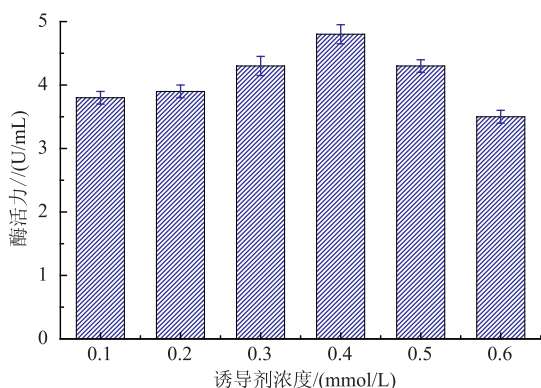


图9 IPTG 浓度对产酶的影响

Fig. 9 Effect of IPTG concentration on PLA1 production

2.6.4 诱导时间对酶活力的影响 分别选择诱导时间 2、4、6、8、10、12 h, 研究其对菌体产酶活力的影响,结果见图 10。随着时间的延长,酶活力不断上升,在 8 h 时酶活力达到最高值,之后酶活力稍有下降。

综上所述,在 IPTG 的添加终浓度为 0.4 mmol/L,诱导温度 37℃、诱导时机为接种后 2 h、诱导时间 8 h 时,大肠杆菌重组菌产 PLA1 水平达到最高,通过酸碱滴定法测得最高酶活力为 (5.6±0.2) U/mL。

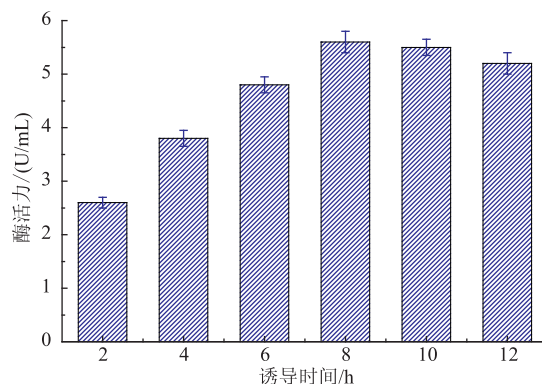


图10 诱导时间对产酶的影响

Fig. 10 Effect of induction time on PLA1 production

3 结 语

近年来,随着 PLA1 的应用范围不断扩大,国内外关于 PLA1 的研究也在不断增加,但关于 PLA1 异源表达的报导仍然很少。目前 PLA1 异源表达的宿主菌主要是大肠杆菌,1988 年 Givskov^[9] 等从 *Serratia liquefaciens* 中获得了 PLA1 基因,并在大肠杆菌中得到了表达,最高酶活力达到 1 U/mL;1999 年 Jae Kwag^[10] 等从 *Serratia* sp.MK1 中获得了 PLA1 基因,并在大肠杆菌中表达;2007 年国内付建红^[17] 等从新疆天山一号冰川冻土中筛选到一种产低温碱性磷脂酶 A1 的耐冷居全沙雷氏菌 *Serratia* sp. xjF1,并将提取该菌的磷脂酶 A1 基因在大肠杆菌中表达,最高酶活力可达 4.3 U/mL。以上在大肠杆菌表达的 PLA1 基因的来源菌均是液化沙雷氏菌属,目前其它菌来源的 PLA1 基因在大肠杆菌的表达研究还很少,本研究首次实现了杨氏柠檬酸杆菌来源的 PLA1 基因在大肠杆菌的表达,对于研究 PLA1 生产菌株具有一定的指导意义。

作者成功克隆了杨氏柠檬酸杆菌 PLA1 基因,通过载体 pET28a(+),成功构建了表达 PLA1 的工程化大肠杆菌。通过对诱导时机、诱导剂浓度、诱导时间以及诱导温度对 PLA1 酶活力影响的研究,得到了该工程菌的最佳诱导发酵条件。在最佳诱导条件下培养该工程菌,最高酶活力可达到 (5.6±0.2) U/mL。该重组菌产生的 PLA1 重组蛋白质的 C 端具有 HIS 融合标签,为其下游的分离纯化提供了方便。后续工作将利用 C 端的 HIS 融合标签对表达的蛋白质进行分离纯化,以研究该 PLA1 的酶学性质,并将该 PLA1 基因在枯草芽孢杆菌、毕赤酵母以及乳酸克

鲁维酵母等更加优越安全的表达系统中进行表达,以期获得产量更高且更加安全的 PLA1 活性蛋白质。

参考文献:

- [1] Gregory S, Terry K. Phospholipase A1[J]. **Int J Mol Sci**, 2011, 12(1):588-612.
- [2] WANG Yong, ZHAO Mouming, SONG Keke, et al. Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 (Lecitase Ultra)[J]. **Food Chemistry**, 2010, 121(4):1066-1072.
- [3] De Maria L, Vind J, Oxenboll K M, et al. Phospholipases and their industrial applications [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007, 74(2):290-300.
- [4] 黄丹, 马美湖, 蔡朝霞, 等. 磷脂酶 A1 改性制备高乳化性蛋黄粉的工艺条件优化[J]. 食品科学, 2010, 31(6):20-25.
HUANG Dan, MA Meihu, CAI Zhaoxia, et al. Phospholipase A1 modification for preparation of egg yolk powder with high emulsifying properties[J]. **Food Science**, 2010, 31(6):20-25. (in Chinese)
- [5] 李永端, 谷克仁. 溶血磷脂的性能与应用[J]. 油脂工程, 2007(4):55-57.
LI Yongrui, GU Keren. Study on properties and application of lysophospholipids [J]. **Cereals and Oils Processing**, 2007(4):55-57. (in Chinese)
- [6] 管伟举, 谷克仁. 溶血磷脂在面包中应用研究[J]. 粮食与油脂, 2007(4):26-28.
GUAN Weiju, GU Keren. Study on application of lysophospholipids in bread[J]. **Cereal and Oils**, 2007(4):55-57. (in Chinese)
- [7] 付建红, 唐辉桂, 姚斌, 等. 一株产低温碱性磷脂酶 A1 耐冷细菌的筛选及发酵条件的初步研究[J]. 工业微生物, 2008, 38(5):12-16.
FU Jianhong, TANG Huijia, YAO Bin, et al. Screening of psychrotrophic bacteria producing cold-adapted alkaline phospholipase A1 and preliminary studies on its fermentation conditions[J]. **Industrial Microbiology**, 2008, 38(5):12-16. (in Chinese)
- [8] Nishihara M, Kamata M, Koyama T, et al. New phospholipase A1-producing bacteria from a marine fish[J]. **Marine Biotechnol**, 2008, 10(4):382-387.
- [9] Givskov M, Olsen L, Molin S. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for extracellular phospholipase A1 from *Serratia liquefaciens*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1988, 170(12):5855-5862.
- [10] Song J K, Kim M K, Rhee J S. Cloning and expression of the gene encoding phospholipase A1 from *Serratia* sp. MK1 in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Biotechnology**, 1999, 72(1):103-114.
- [11] Watanabe I, Koishi R, Yao Y, et al. Molecular cloning and expression of the gene encoding a phospholipase A1 from *Aspergillus oryzae*[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 1999, 63(5):820-826.
- [12] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南(5 版)[M]. 北京:科学出版社, 2008.
- [13] Shiba Y, Ono C, Fukui F, et al. High-level secretory production of phospholipase A1 by *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2001, 65(1):94-101.
- [14] 李脉, 杨继国, 杨博. 磷脂酶 A1 酶活测定方法的研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(8):80-82.
LI Mai, YANG Jiguo, YANG Bo. Study on measurement of the enzymatic activity of phospholipase A1 [J]. **Modern Food Science and Technology**, 2007, 23(8):80-82. (in Chinese)
- [15] 解庭波. 大肠杆菌表达系统的研究进展[J]. 长江大学学报, 2008, 5(3):77-82.
XIE Tingbo. The studies on *E.coli* as an expression system[J]. **Journal of Yangtze University**, 2008, 5(3):77-82. (in Chinese)
- [16] LIANG Rubin, LIU Xipeng, LIU Jianhua, et al. A T7-expression system under temperature control could create temperature-sensitive phenotype of target gene in *Escherichia coli*[J]. **J Microbiol Methods**, 2007, 68(3):497-506.
- [17] FU Jianhong, HUANG Huoqing, MENG Kun, et al. A novel cold-adapted phospholipase A1 from *Serratia* sp. xjF1: gene cloning, expression and characterization[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2008, 42(2):187-194.