

# 液化沙雷氏菌磷脂酶 A<sub>1</sub> 的克隆表达及乳糖自诱导发酵

延晋雷, 张梁, 顾正华, 丁重阳, 石贵阳

江南大学食品科学与技术国家重点实验室 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122

延晋雷, 张梁, 顾正华, 等. 液化沙雷氏菌磷脂酶 A<sub>1</sub> 的克隆表达及乳糖自诱导发酵. 生物工程学报, 2013, 29(6): 853-856.  
Yan JL, Zhang L, Gu ZH, et al. Cloning, expression of phospholipase A<sub>1</sub> from *Serratia liquefaciens* and auto-induction fermentation by lactose. Chin J Biotech, 2013, 29(6): 853-856.

**摘要:** 为了利用大肠杆菌高效生产重组磷脂酶, 克隆了液化沙雷氏菌磷脂酶 A<sub>1</sub> 的编码基因 *pla*, 分别使用 pET-28a(+) 和 pET-20b(+) 载体, 实现了磷脂酶 A<sub>1</sub> 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的功能表达。重组菌利用载体 pET-28a(+) 在原始信号肽的介导下胞外 PLA<sub>1</sub> 酶活达 40.8 U/mL, 占总酶活的 91%。重组菌转接至优化后的发酵诱导培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 葡萄糖 0.8 g/L, 乳糖 5 g/L, 25 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>; 菌体生长 6 h 后, 添加 7.5 g/L 的甘氨酸, 37 °C 恒温发酵 24 h, 重组菌胞外 PLA<sub>1</sub> 酶活达到 128.7 U/mL。

**关键词:** 液化沙雷氏菌, 磷脂酶 A<sub>1</sub>, 自诱导, 分泌表达

## Cloning, expression of phospholipase A<sub>1</sub> from *Serratia liquefaciens* and auto-induction fermentation by lactose

Jinlei Yan, Liang Zhang, Zhenghua Gu, Zhongyang Ding, and Guiyang Shi

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** To produce recombinant phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) by *Escherichian coli*, the *pla* gene encoding PLA<sub>1</sub> was

**Received:** January 4, 2013; **Accepted:** March 6, 2013

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA100905), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-11-0665), Research Program of Sate Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University (No. SKLF-ZZA-201201).

**Corresponding author:** Liang Zhang. Tel: +86-510-85918235; E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA100905), 教育部“新世纪优秀人才支持计划” (No. NCET-11-0665), 江南大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题 (No. SKLF-ZZA-201201) 资助。

网络出版时间: 2013-05-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130517.1339.001.html>

amplified from *Serratia liquefaciens* by PCR and cloned into two vectors pET20-b(+) and pET28-a(+). The two recombinant plasmids were then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) individually to express PLA<sub>1</sub>. *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*pla* yielded extracellular PLA<sub>1</sub> with an activity of 40.8 U/mL in batch cultivations of shaken flasks by auto-induction, which was accounted for 91% of total enzyme activity. On the basis of primal auto-induction medium, the optimized fermentation medium of PLA<sub>1</sub> contained tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, glucose 0.8 g/L, lactose 5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mmol/L and 1 mmol/L MgSO<sub>4</sub> (final concentration). Glycine (7.5 g/L) was added 6 h after inoculated. After incubated at 37 °C for 24 h, extracellular enzyme activity reached 128.7 U/mL.

**Keywords:** *Serratia liquefaciens*, phospholipase A<sub>1</sub>, auto-induction, secretional expression

磷脂酶 A<sub>1</sub> (Phospholipase A<sub>1</sub>, PLA<sub>1</sub>, EC 3.1.1.32) 能专一性水解天然磷脂 Sn-1 位酰基, 产生 Sn-2 位酰基溶血性磷脂和脂肪酸<sup>[1]</sup>, 其在油脂脱胶行业具有极高的应用价值<sup>[2-3]</sup>。微生物来源的 PLA<sub>1</sub> 有生产周期短、结构简单、易于工业化规模培养等优点, 但野生菌株产量低、分离纯化困难, 而且在食品安全方面存在一定的隐患<sup>[4-5]</sup>。因此, 构建高产 PLA<sub>1</sub> 的工程菌并努力提高其产量势在必行。本研究采用基因工程手段, 从前期筛选到的一株产 PLA<sub>1</sub> 菌株 *S. liquefaciens* 着手, 克隆到其 PLA<sub>1</sub> 基因, 成功构建了两株高产 PLA<sub>1</sub> 的工程菌, 并采用乳糖自诱导方式对重组菌高产 PLA<sub>1</sub> 进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒及培养基

菌种 *S. liquefaciens* 保藏于中国工业微生物菌种保藏中心 (CICC No.21538), 大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109、BL21(DE3) 和质粒 pET-28a(+), pET-20b(+) 均为本实验室保藏。

种子培养基、发酵培养基见参考文献[6]。

### 1.2 PLA<sub>1</sub> 基因的克隆

根据 NCBI 数据库公布的 *S. liquefaciens* 的 PLA<sub>1</sub> 的基因序列 (GenBank Accession No. M23640.1) 设计 2 对引物: P1 (5'-CGGAATTCTCG GCATGAGTATGCCTTTAA-3') 和 P2 (5'-CCAAG CTTTTGCTCCTTAGCCATCATCAG-3'), 扩增去除

信号肽的 PLA<sub>1</sub> 基因 *dpla*: P3 (5'-CGGAATTCAGTA TGCTTTGAGTTTTACCTCTGC-3') 和 P4 (5'-CC AAGCTTCGTTACTGCTGTCCGTATTGC-3'), 扩增完整的 PLA<sub>1</sub> 基因 *pla* (下划线分别表示 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切位点)。

### 1.3 重组 PLA<sub>1</sub> 工程菌的构建

将 PCR 得到的目的基因 *pla* 和 *dpla*, 与相应载体 pET-20b(+) 或 pET-28a(+) 连接后, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 构建重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET20b-*dpla* 和 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*pla*。所运用的基因操作技术按参考文献[7]进行。

### 1.4 重组菌的诱导表达及目的蛋白分析

重组菌由种子培养基转接入发酵培养基进行诱导表达<sup>[6]</sup>。分别收集发酵上清液 (检测胞外酶), 超声波破碎上清液 (检测胞内酶, 超声波破碎条件: 40% 功率, 工作 5 min) 以及沉淀 (检测包涵体), 进行 SDS-PAGE 电泳分析<sup>[8]</sup>。

### 1.5 PLA<sub>1</sub> 酶活力的测定

选用卵黄平板法<sup>[9]</sup>和酸碱滴定法<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 PLA<sub>1</sub> 基因的克隆及序列分析

*S. liquefaciens* 的 *pla* 基因全长 963 bp, 编码 320 个氨基酸, 其中 N 端的 1~23 位氨基酸为疏水性的信号肽序列 (<http://www.expasy.org>), 193~197 位含有脂肪酶的保守序列-Gly-X<sub>1</sub>-Ser-X<sub>2</sub>-Gly-。进行

Blast 分析, 该蛋白的氨基酸序列与 *Serratia* sp. MK1 (GenBank Accession No. U37262.2) 和 *Yersinia enterocolitica* (GenBank Accession No. NC008800.1) 来源的 PLA<sub>1</sub> 分别有 92% 和 80% 的同源性。而与另外一株 *Serratia liquefaciens* (GenBank Accession No. M23640.1) 的 PLA<sub>1</sub> 同源性仅为 78%。

## 2.2 重组菌的诱导表达及目的蛋白分析

将构建的两株重组菌经种子培养基活化后, 分别转接入发酵诱导培养基培养 24 h, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*pla* 在 33 kDa 处检测到一条明显的特异性条带, 与报道的目标蛋白大小一致; 而 *E. coli* BL21(DE3)/pET20b-*dpla* 则几乎看不到目的蛋白。进一步分析重组菌 PLA<sub>1</sub> 在细胞表达各部位的分布情况, 目的蛋白几乎全部位于胞外上清液, 且 PLA<sub>1</sub> 在大肠杆菌的表达不形成包涵体。

通过检测细胞内外可溶性 PLA<sub>1</sub> 的酶活力可知 (图 1), 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*pla* 的胞外 PLA<sub>1</sub> 酶活达 40.8 U/mL, 占总酶活的 91%, 同 SDS-PAGE 的检测结果基本一致。

## 2.3 重组菌产 PLA<sub>1</sub> 的自诱导发酵

大肠杆菌的 pET 表达系统是通过 Lac 乳糖操纵

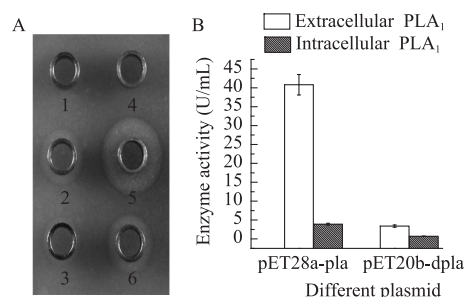


图 1 重组菌产 PLA<sub>1</sub> 的酶活检测

Fig. 1 Detection of enzyme activity of PLA<sub>1</sub> in *E. coli*. (A) Detection of enzyme activity on yolk plate. 1, 4: control; 2, 3: extracellular and intracellular PLA<sub>1</sub> of *E. coli* BL21(DE3)/pET20b-*dpla*; 5, 6: extracellular and intracellular PLA<sub>1</sub> of *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*pla*. (B) Detection of enzyme activity by acid-base titration.

子调控目的蛋白的表达, Studier 认为蛋白胨中含有痕量乳糖, 可以诱发目的蛋白的非特异性表达, 从而对重组菌生长造成一定的代谢压力<sup>[6]</sup>, 而且本研究的 PLA<sub>1</sub> 还有一定的细胞毒性<sup>[11]</sup>。为了克服这个缺陷, 本研究选用乳糖自诱导发酵。即在发酵培养基中添加少量葡萄糖, 在细胞生长初期抑制目的蛋白的非特异性表达; 当葡萄糖消耗殆尽, 重组菌直接利用乳糖诱导生产 PLA<sub>1</sub>。前期研究表明, 运用这种乳糖自诱导获得的菌体量和产酶水平分别是传统 IPTG 诱导的 2.21 和 2.46 倍 (数据未显示)。进一步优化得到较优的发酵诱导培养基, 其配方为: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 葡萄糖 0.8 g/L, 乳糖 5 g/L, 25 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>。重组菌自诱导发酵, 胞外 PLA<sub>1</sub> 酶活最高达 78.3 U/mL。

已有报道<sup>[12]</sup>甘氨酸可以促进大肠杆菌的分泌水平, 其主要机理是破坏了细胞壁肽聚糖的结构, 增加了细胞的通透性。在细胞生长对数后期 (接种 6 h) 添加不同浓度的渗透性物质甘氨酸考察对重组菌生长和产 PLA<sub>1</sub> 的影响。结果如图 2 所示, 7.5 g/L 甘氨酸既可以显著提高胞外 PLA<sub>1</sub> 的产酶水平, 又能维持一定的菌体量。此时, 胞外 PLA<sub>1</sub> 酶活最高达 128.7 U/mL, 是优化前初始培养基的 3.2 倍。

近年来, 随着 PLA<sub>1</sub> 在食品、医药、饲料等领域的广泛应用, 国内外学者对提高微生物产 PLA<sub>1</sub>

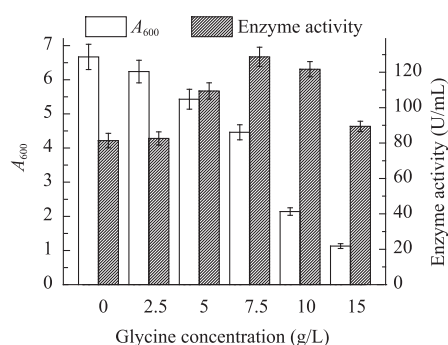


图 2 甘氨酸浓度对菌体生长和产 PLA<sub>1</sub> 的影响

Fig. 2 Effect of glycine concentration on growth of *E. coli* and PLA<sub>1</sub> production.

的水平进行了大量研究<sup>[13-15]</sup>。本研究克隆到 *Serratia liquefaciens* 来源的 PLA<sub>1</sub> 基因并在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得了高水平的分泌表达,具有一定工业化应用潜力。

### 3 结论

本研究成功构建了两株表达 *Serratia liquefaciens* 磷脂酶 A<sub>1</sub> 的重组大肠杆菌,并比较了它们的表达量和分泌水平。重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET28a-*pla* 获得了较高的表达量,优化乳糖自诱导发酵培养基,并在接种 6 h 后添加 7.5 g/L 的甘氨酸,37 °C 恒温发酵 24 h, PLA<sub>1</sub> 胞外酶活达 128.7 U/mL。

### REFERENCES

- [1] Gregory S, Terry K. Phospholipases A<sub>1</sub>. Int J Mol Sci, 2011, 12(1): 588–612.
- [2] Jianhong F, Huoqing H, Kun M, et al. A novel cold-adapted phospholipase A<sub>1</sub> from *Serratia* sp. xjF1: gene cloning, expression and characterization. Enzyme Microb Technol, 2008, 42(2): 187–194.
- [3] Gurralla S, Kavith G, Nitin W. Efficient immobilization of lecithase in gelatin hydrogel and degumming of rice bran oil using a spinning basket reactor. J Am Oil Chem Soc, 2008, 85(8): 739–748.
- [4] Maria L, Vind J, Oxenboll K, et al. Phospholipases and their industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(2): 290–300.
- [5] Ramrakhiani L, Chand L. Recent progress on phospholipases: different sources, assay methods, industrial potential and pathogenicity. Appl Biochem Biotech, 2011, 164(7): 991–1022.
- [6] Studier F. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expres Purif, 2005, 41(1): 207–234.
- [7] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harb Lab Press, 1989: 20–25.
- [8] Dan M, Michael T, Wayne L, et al. Refolding, purification, and activation of miniplasminogen and microplasminogen isolated from *E. coli* inclusion bodies. Protein Expres Purif, 2007, 52(2): 395–402.
- [9] Jae S, Myung K, Joon R. Cloning and expression of the gene encoding phospholipase A<sub>1</sub> from *Serratia* sp. MK<sub>1</sub> in *Escherichia coli*. J Biotechnol, 1999, 72(1–2): 103–114.
- [10] Jiguo Y, Yonghua W, Bo Y, et al. Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. Food Technol Biotech, 2006, 44(1): 101–104.
- [11] Givskov M, Olsen L, Molin S. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for extracellular phospholipase A<sub>1</sub> from *Serratia liquefaciens*. J Bacteriol, 1988, 170(12): 5855–5862.
- [12] Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64(5): 625–635.
- [13] Jae S, Joon R. Simultaneous enhancement of thermostability and catalytic activity of phospholipase A<sub>1</sub> by evolutionary molecular engineering. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(3): 890–894.
- [14] Shiba Y, Ono C, Fukui F, et al. High-Level Secretory production of phospholipase A<sub>1</sub> by *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(1): 94–101.
- [15] Jianhong F, Huoqing H, Kun M, et al. A novel cold-adapted phospholipase A<sub>1</sub> from *Serratia* sp. xjF1: gene cloning, expression and characterization. Enzyme Microb Technol, 2008, 42(2): 187–194.

(本文责编 陈宏宇)