

重组大肠杆菌表达铜绿假单胞菌溶血性磷脂酶 C

赵金星, 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, 工业生物技术教育部重点实验室, 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 无锡 214122

摘要: 【目的】构建产溶血性磷脂酶 C (Hemolytic Phospholipase C, PLCH) 的重组大肠杆菌 (*Escherich coli*) 菌株, 并初步优化其发酵条件。【方法】首先利用卵黄硼砂平板分离法筛选到一株产磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 活性较高的菌株, 命名为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 41; 进一步以 *P. aeruginosa* 41 基因组 DNA 为模板设计引物, PCR 扩增获得溶血性磷脂酶 C (PLCH) 基因, 构建重组大肠杆菌表达质粒并转化大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3); 筛选转化子并检测 PLC 活性和溶血能力, 并初步优化其发酵条件。【结果】成功构建了重组大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) /pET28a-plcH; 在硼砂卵黄平板上对重组菌进行 PLC 活性测定, 显示重组菌有明显的磷脂酶 C 活性; 在哥伦比亚血琼脂平板上对重组菌进行溶血性试验, 表明 PLCH 具有较强的溶血活性; 初步优化摇瓶发酵条件为: 5% 转接量, 37℃、200 r/min 下培养 4 h 添加 IPTG 至终浓度为 0.9 mmol/L, 转为 25℃、150 r/min 诱导培养 14 h; 优化后重组菌的酶活可达到 722.89 ± 0.47 U/mL。【结论】本文成功构建了一株产溶血性磷脂酶 C 活性较高的重组大肠杆菌菌株, 并通过优化发酵条件使其酶活达到了 722.89 ± 0.47 U/mL, 本实验在国内首次实现了铜绿假单胞菌来源的溶血性磷脂酶 C 基因在大肠杆菌的胞内表达, 该研究为研究磷脂酶 C 产业化奠定了一定的基础。

关键词: 溶血性磷脂酶 C, 铜绿假单胞菌, 大肠杆菌, 基因重组, 溶血活性

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 03-0259-10

磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 定向分解磷脂生成 1,2-甘油二酯和磷酸单酯, 细菌来源的磷脂酶 C 根据底物特异性主要分为磷脂酰特异性磷脂酶 C (Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, PC-PLC) 和磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PI-PLC)。PI-PLC 只专一分解磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸生成 1,2-二乙酰基甘油酯和肌醇-(1,4,5)-三磷酸, 三磷酸肌醇是钙离子代谢的一种重要第二信使。相

比之下, PC-PLC 更倾向于水解磷脂酰胆碱, 但也能水解磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸等磷脂^[1-2]。

PLC 水解产物甘油二酯是一种生理活性物质, 在细胞信号传导途径上起着第二信使的作用, 能激活蛋白激酶 C (Protein Kinase C, PKC) 而引起细胞增殖、分化、收缩、分泌和代谢等功能变化, 此外还具有明显的抗血小板粘附、聚集^[3-5]等功能, 对抗血小板新型药物^[6-9]、抗静脉血栓及高血压^[10] 医疗方面的研究意义重大, 对心脑血管疾病类药物^[11] 的开发

基金项目: 国家“863 计划”(2011AA100905); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”(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资助课题 (SKLF-ZZA-201201)

* 通信作者。Tel: +86-13861707271; E-mail: 13861707271@139.com

作者简介: 赵金星 (1986 -), 男, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程专业。E-mail: zhaojinxing18621@163.com

收稿日期: 2012-09-07; **修回日期:** 2012-12-07

具有一定的潜在意义。随着对 PLC 研究的深入及工业发展的需求, PLC 的应用价值已经逐渐从药品生产延伸至油脂精炼^[12-16]、食品加工、磷脂改性等领域。例如利用磷脂酶 A (Phospholipase A, PLA) 和 PLC 混合物进行酶法脱胶或者说是酶催化精炼, 可以完全除去磷脂, 比水、酸或苛性碱脱胶具有更好的油产率 and 经济效益; 食品工业中 PLC 可用来改善面包的冷冻保存, 生面团烤制时在面包表面产生的老化、缓和梨皮状表皮^[17]等; 而最近 PLC 作为一种新型食品添加剂势必会推动 PLC 的广泛应用和研究。

微生物来源 PLC 较动植物来源 PLC 具有生产周期短、结构简单, 可工业化大规模培养等优势, 但野生菌株产量低、分离纯化耗资大, 使得高纯度 PLC 商业化生产难以实现; 而且大多数来源菌株都具有病原性, 在食品安全性方面存在一定的隐患。因此, 筛选新型磷脂酶 C 基因来源的菌株和构建食品安全性菌株显得尤为重要。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 菌株有铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 41、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 和大肠杆菌 *E. coli* JM109, 为实验室保藏; 质粒有 pET-28a (+) 和 pMD18-Tsimple, 前者为本实验室保藏, 后者购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基: LB 培养基、TB 培养基、卵黄 LB 培养基以及卵黄硼砂培养基的配方参考文献 [1]。哥伦比亚血琼脂培养基: 称取 4.4 g 哥伦比亚血琼脂基础 (购自北京陆桥技术有限责任公司) 加入到 100 mL 去离子水中, 1×10^5 Pa 高压灭菌 20 min, 冷却至 50°C 左右, 加入 5-7 mL 脱纤维绵羊血 (购自广州蕊特生物科技有限公司), 摇匀后倒平板。

1.1.3 主要试剂: 限制性内切酶 *Bam* HI、*Sac* I 购自 Fermentas 公司; T4 DNA 连接酶、*ExTaq* DNA 聚合酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; B 型小量 PCR 产物纯化试剂盒、B 型质粒小量快速提取试剂盒和胶回收试剂盒均为北京博大泰克生物基因技术有限责任公司产品。氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp)、卡那霉素 (Kanamycin, Kana) 购自上海生物工程技术有限公司; p-NPPC 购自 Sigma 公司; 50% 的卵黄液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。

1.1.4 常用溶液: 参考文献 [18]。

1.2 产磷脂酶 C 菌株筛选

1.2.1 初筛: 将菌种库中的细菌从保藏管中接到斜面上进行活化, 从活化后的斜面上用接少量菌体点种至卵黄 LB 平板上, 37°C 培养 12-24 h, 挑取分解圈较大的进行编号保藏。

1.2.2 复筛: 将初筛得到的菌株, 接种至装有 50 mL 的 LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 37°C, 150 r/min 培养 12-24 h, 4500 × g 离心 10 min, 取上清。用 p-NPPC 法测定酶活, 选取酶活较大菌株作为出发菌株 (本文中所有数据, 均通过测定 3 次取其平均值获得)。

1.3 细菌基因组 DNA 的提取

具体方法参见文献 [18]。

1.4 磷脂酶 C 基因的克隆

以 NCBI 上报道的 *P. aeruginosa* PAO1 的 *plcH* (NC_002516.2) 为模板设计 PCR 引物 up/down (表 1)。

表 1 引物

Table 1 Primers

Primers	Primer sequence (5'→3')
up	CGGGATCCATGACCGAAAACTGGAAATTC
down	CGAGCTCTCAGGTCGCTCGCATGTC

以 *P. aeruginosa* 41 的染色体为模板, 以 up/down 为引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为: dNTPs 4 μL、10 × exBuffer 5 μL, 上下游引物各 1 μL, 模板 3 μL, 灭菌的双蒸水 35.5 μL, *ExTaq* 酶 0.5 μL。PCR 扩增条件为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 59°C 退火 60 s, 72°C 延伸 135 s, 30 个循环后 72°C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳进行结果分析, PCR 产物纯化后, 用 T4 DNA 连接酶连接, 插入 pMD18-Tsimple 载体, 转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性克隆。挑取阳性克隆接种至氨苄青霉素抗性 LB 培养基中, 提质粒用 *Sac* I-*Bam* HI 酶切验证。将验证正确的克隆子送到华大基因测序。

1.5 重组大肠杆菌表达质粒的构建

将经 *Sac* I-*Bam* HI 线性化的载体 pET-28a (+) 和经 *Sac* I-*Bam* HI 消化的基因片段用纯化试剂盒纯化后, 按照质量比 1:10 的比例加入 10 μL 连接体系, 于 16°C 培养箱连接过夜。次日 42°C 热击 90 s 后转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。37°C 温育 1 h 涂布终

浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素-LB 抗性平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 h。挑取转化子用 up/down 引物进行菌落 PCR, 挑取菌落 PCR 正确的转化子提取质粒, 然后用 *Sac* I-Bam HI 酶切验证目的基因的大小。将验证正确的转化子送华大基因进行测序。

1.6 重组大肠杆菌的诱导表达及鉴定

取重组菌株 50 μL 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 10 h, 次日以 5% 接种量转接至 50 mL 终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素抗性 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 4 h 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 6 h。

诱导结束后 4500 $\times g$ 离心 10 min 收集菌体, 并用等体积的浓度为 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液重悬菌体, 超声波破碎至澄清收集上清即细胞裂解液。

取 20 μL 细胞裂解液加入 5 μL 的 5 \times loading buffer, 煮沸 10 min, 14000 $\times g$ 离心 10 min。采用 12% 分离胶、5% 浓缩胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 鉴定蛋白表达与否。

1.7 磷脂酶 C 酶活力的测定

1.7.1 硼砂卵黄^[19-20]以及哥伦比亚血琼脂平板法定性测定酶活:取 100 - 200 μL 超声波破碎上清液加入到等距放置在硼砂卵黄或哥伦比亚血琼脂平板上的牛津杯中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 12 - 24 h, 分解圈或溶血圈的大小代表酶活的高低。由于该方法成本低廉, 用的较为广泛。

1.7.2 p-NPPC 法定量测定酶活:p-NPPC^[21-22] 是卵磷脂的一种底物结构类似物, PLC 可以分解其生成对硝基苯酚, 对硝基苯酚是一种黄色物质, 在 410 nm 处有最大吸收。利用分光光度法测定反应液在 410 nm^[22] 处的吸光值, 可反映 PLC 水解 p-NPPC 产生对硝基苯酚的量, 根据对硝基苯酚标准曲线从而定量计算出相应酶活力大小。

反应体系组成: 0.25 mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.2) Buffer, 1 mmol/L 的 ZnCl_2 , 60% 的山梨醇 (w/v), 10 mmol/L 的 p-NPPC。1 mL 反应体系中加入 100 μL 的酶样品溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min^[22]。酶活力单位的定义^[23]: 在 pH 7.2, 温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 每分钟水解 p-NPPC 产生 1 nmol 对硝基苯酚所需的酶的量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.8 重组大肠杆菌生长曲线的测定

从平板上挑取重组大肠杆菌单菌落接种于装有

30 mL 的 Kana-LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 过夜培养, 按 5% 的转接量转接于若干装有 50 mL 的 Kana-LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养, 定点取样测 OD_{600} 值。以时间为横坐标做该重组菌的生长曲线以及比生长速率曲线。

1.9 诱导剂为 IPTG 情况下, 对重组大肠杆菌诱导条件的初步优化

本实验通过改变单因子的方法对诱导条件进行优化, 以 p-NPPC 法获得的酶活大小作为优化参考标准。

1.9.1 发酵培养基的确定:考察 LB、TB 两种培养基的产酶情况, 诱导方法参考 1.6, 诱导结束时测量发酵液 OD_{600} 值, 并取等 OD_{600} 数和等体积的两种发酵液, 测定酶活力并比较大小, 以确定培养基组分。

1.9.2 诱导剂添加时间的确定:参考重组大肠杆菌生长曲线图, 在重组大肠杆菌生长对数期前、中、后阶段分别添加诱导剂诱导 6 h。取相同体积的菌体稀释至相同 $OD_{600} = 1$ 后进行超声破碎, 以 p-NPPC 法测得的酶活的大小为参考, 来确定诱导剂添加时间。

1.9.3 诱导温度的确定:根据宿主大肠杆菌适宜生长的温度范围及实验室条件, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 1.9.2 中诱导剂添加时间, 并添加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 后分别在 20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 进行诱导表达。实验方法如上, 根据实验结果确定诱导温度。

1.9.4 诱导剂浓度的确定:IPTG 浓度按 0.0 mmol/L、0.3 mmol/L、0.6 mmol/L、0.9 mmol/L、1.2 mmol/L 梯度进行诱导表达。实验方法如上, 根据结果确定诱导剂浓度。

1.9.5 诱导时间的确定:在上述已优化的诱导条件下进行诱导, 分别诱导 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h 后取样破碎, 试验方法如上, 以确定诱导时间。

2 结果和分析

2.1 产磷脂酶 C 菌株的筛选

2.1.1 产磷脂酶 C 菌株的初筛:筛选获得 15 株有单一的较大乳白色沉淀圈; 5 株有混合分解圈, 即内圆是乳白圈, 外圆为半透明圈, 图 1、表 2 为产磷脂酶 C 菌株在卵黄琼脂 LB 培养基上作用 12 h 产生的

分解圈情况。将这 20 株菌株进行斜面保存或甘油管保藏。



图 1 初筛结果

Fig.1 Preliminary screening results on yeast borax plates

表 2 初筛结果

Table 2 Results of preliminary screening

Strain	Diameter of sedimentary zone
PLC1	1.9 cm
PLC3	0.6 cm
PLC4	2.1 cm
PLC5	1.4 cm
PLC6	1.7 cm
PLC7	1.5 cm
PLC8	1.4 cm
PLC9	2.2 cm
PLC12	1.1 cm
PLC10	1.6 cm
PLC11-2	0.8 cm
BC1	1.8 cm
BC2	1.5 cm
BC3	2.4 cm
BC4	1.2 cm
PLC13	inside 1.0 cm, outside 2.8 cm
PLC39	inside 1.1 cm, outside 3.6 cm
PLC40	inside 1.1 cm, outside 3.0 cm
PLC41	inside 1.3 cm, outside 3.3 cm
PLC42	inside 1.2 cm, outside 3.1 cm

2.1.2 产磷脂酶 C 菌株的复筛: 将筛选出的 20 株菌株转接至摇瓶, 培养 12 h, 发酵上清用 p-NPPC 底物法测定酶活, 测定结果如图 2。

对后 5 株菌株进行 16S rDNA 序列对比验证, 确定都为铜绿假单胞菌。根据复筛结果选取 PLC41 为出发菌株, 重新命名为 *P. aeruginosa* 41。

2.2 *plcH* 基因在大肠杆菌中的克隆表达

2.2.1 *plcH* 的克隆与分析: 扩增的琼脂糖电泳图谱如图 3 表明, 在约 2100 bp 处有单一的扩增片段, 与目的基因片段大小 (2193 bp) 基本一致。

验证正确的阳性转化子送上海华大基因进行测序, 测序结果显示目的片段与 *P. aeruginosa* PAO1 的 *plcH* (NC_002516.2) 基因序列相似度达到 99.64%, 蛋白质序列相似度达到 99.86%。

2.2.2 重组表达质粒的构建及验证: 挑取阳性克隆菌的质粒经 *Bam* HI-Sac I 酶切验证, 如图 4, 结果表明目的片段已经成功插入到 pET-28a(+) 中。

2.2.3 重组菌的诱导表达及活性鉴定: 如图 5, 重组菌的可溶性蛋白在硼砂卵黄平板上有明显的乳白色沉淀圈, 证明重组蛋白具备 PLC 活性。如图 6, 在哥伦比亚血琼脂平板上有明显的溶血圈, 证明重组蛋白有溶血性。

进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。图 7 显示, 所构建的重组大肠杆菌 BL21 (DE3) /pET28a-*plcH* 成功表达了相对分子质量约为 78kDa 的蛋白, 与预期值相符, 证明实现了溶血性磷脂酶 C (Hemolytic Phospholipase C, PLCH) 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达。

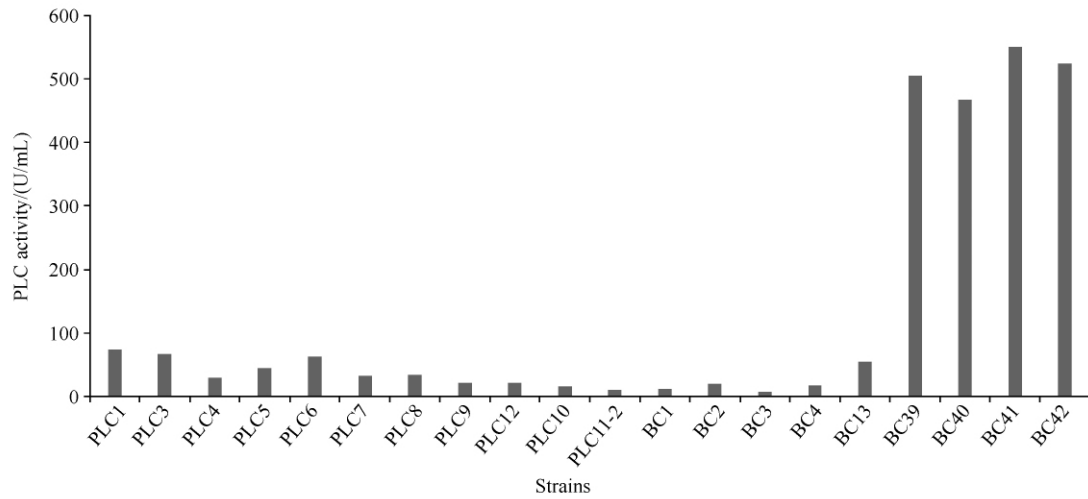


图 2 复筛结果

Fig. 2 Results of rescreening

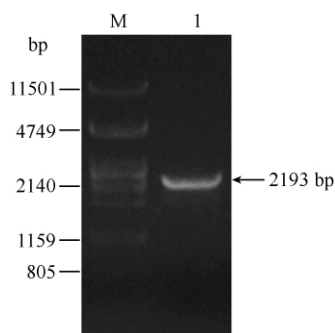


图 3 *plcH* 的 PCR 电泳结果

Fig. 3 PCR product of *plcH*. M. Marker; 1. *plcH*.

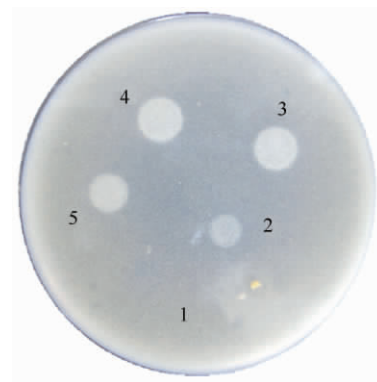


图 5 重组蛋白活性检测

Fig. 5 Analysis of induced PLC activity. 1: DE3/pET28a; 2, 3 and 4: DE3/pET28a-*plcH*; 5: *P. aeruginosa* 41.

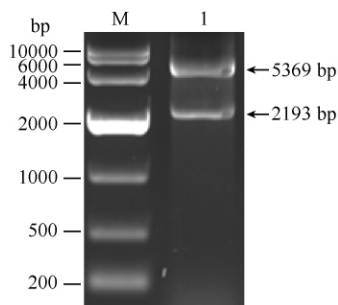


图 4 pET28a-*plcH* 用 *Bam* HI-*Sac* I 酶切验证

Fig. 4 pET28a-*plcH* by *Bam* HI-*Sac* I. M. Marker; 1. pET28a-*plcH*.

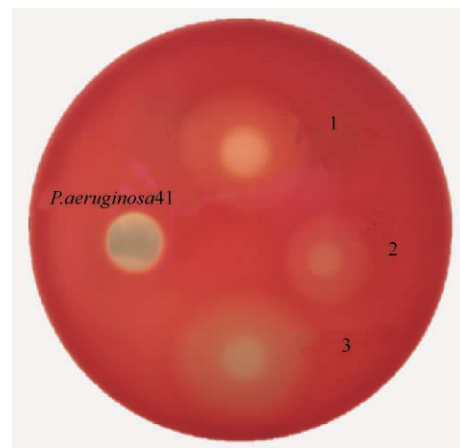


图 6 重组蛋白溶血性检测

Fig. 6 Analysis of induced PLC hemolytic activity. 1, 2, 3: *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*plcH*.

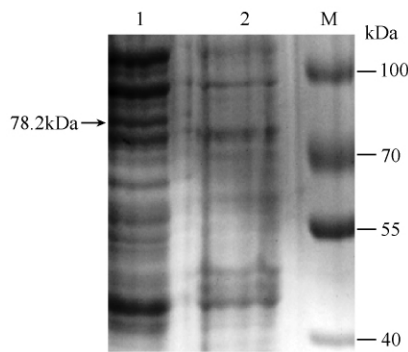


图7 PLCH在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达的 SDS-PAGE

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of recombinant PLCH in *E. coli* BL21 (DE3). 1. BL21 (DE3) /pET28a-plcH; 2. BL21 (DE3) /pET28a; 3. Marker.

2.3 诱导剂为 IPTG 情况下,重组大肠杆菌摇瓶诱导条件的优化

2.3.1 发酵培养基的确定:结果显示(表3),LB培养基的产酶量明显高于TB培养基,因此选择LB培养基作为发酵培养基。分析原因,有可能是TB培养基中的高浓度磷酸盐对磷脂酶C表达具有抑制作用。

表3 发酵培养基的选择

Table 3 The choice of Fermentation medium

Medium	OD_{600}	PLC activity (U/ $1OD_{600}$)	PLC activity (U/mL)
LB	3.19	104	360
TB	4.67	35	160

2.3.2 重组菌生长曲线和比生长速率曲线的测定:结果显示(图8),0-1.5 h为适应期,1.5-9 h为对数生长期,4 h左右为对数中期。

2.3.3 IPTG 浓度的确定:由图9-A可见在IPTG浓度为0.9 mmol/L时达到最大,达到230 U/mL左右。故诱导剂浓度选为0.9 mmol/L。

2.3.4 诱导剂添加时间的确定:如图9-B可见酶活力在对数中期4 h达到最大值,达到280 U/mL左右。故诱导剂添加时间为转接后4 h。

2.3.5 诱导温度的确定:结果如图9-C,酶活在

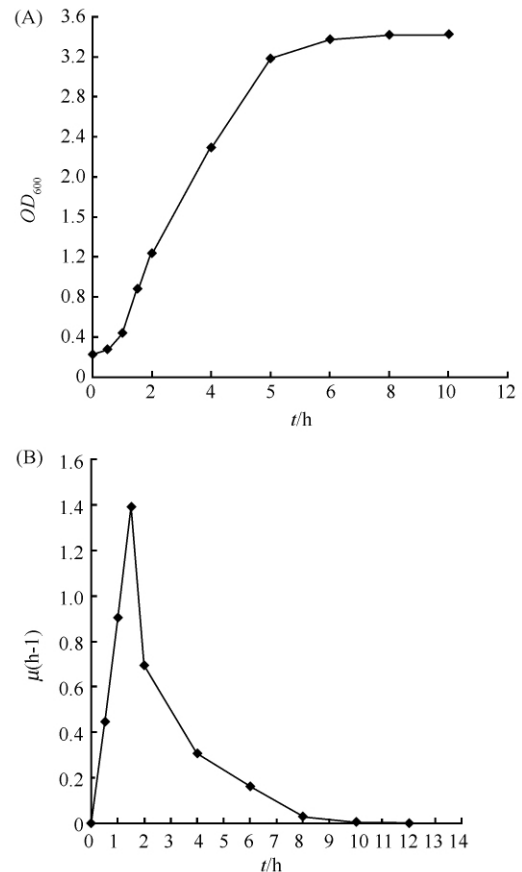


图8 重组菌生长和比生长速率曲线

Fig. 8 Specific growth rate curve and culture curve of the recombination strain.

25℃时达到最大,可达到330 U/mL左右。故选取发酵产酶的温度为25℃。

2.3.6 诱导时间的确定:结果如图9-D,酶活在第14 h达到最大值,可达到720 U/mL左右。故诱导时间选为14 h。

2.3.7 重组大肠杆菌产酶特性:综上所述,重组大肠杆菌诱导条件为:取重组菌株50 μ L加入到30 mL的Kana-LB培养基中,于37℃、200 r/min振荡培养10 h,次日以5%转接量接种至50 mL的Kana-LB培养基中,37℃、200 r/min培养4 h后,添加IPTG至终浓度为0.9 mmol/L,并25℃、150 r/min诱导培养14 h。在此诱导条件下,酶活力可达到722.89 \pm 0.47 U/mL。

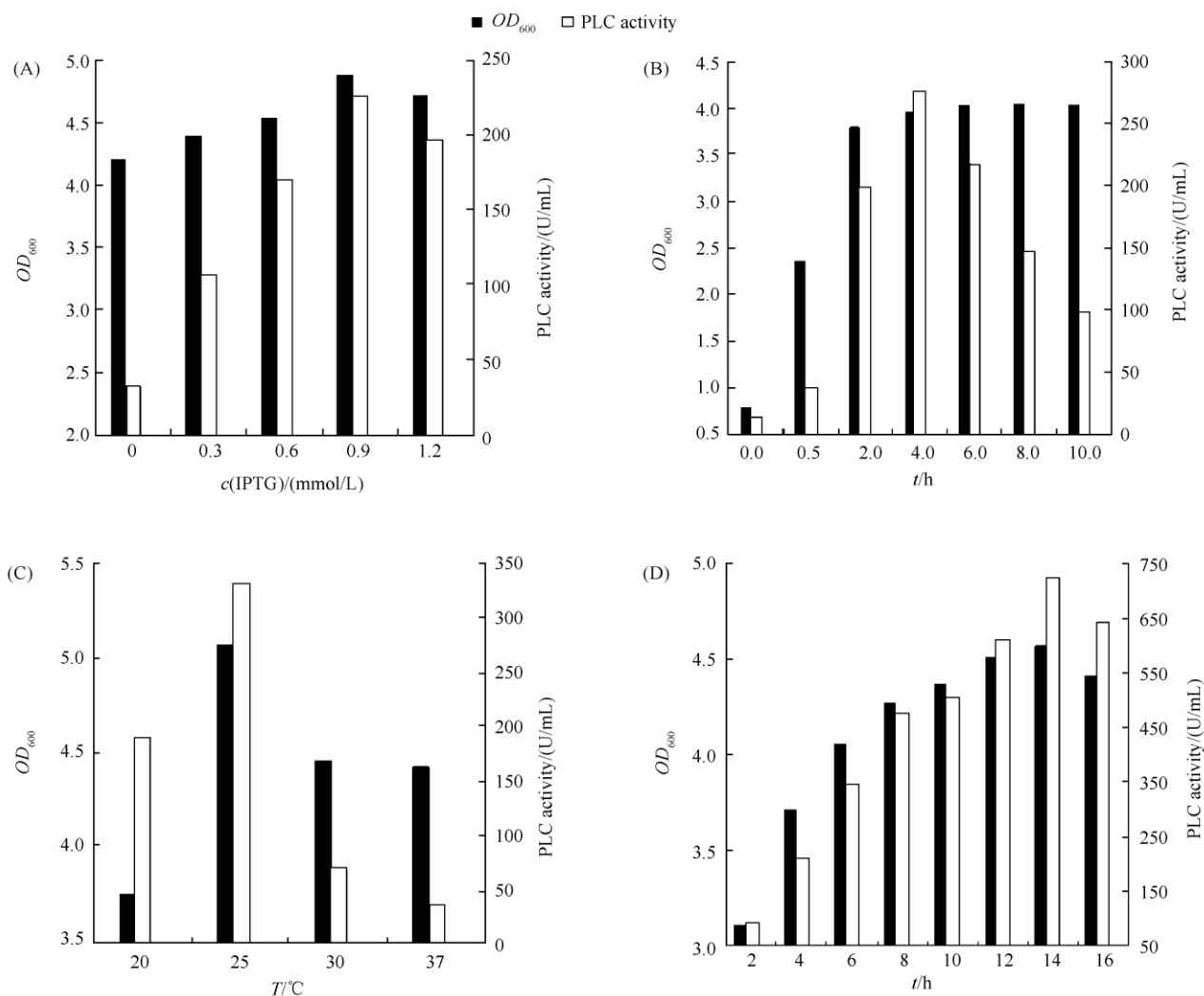


图9 诱导剂浓度(A)、诱导剂添加时间(B)、诱导温度(C)和诱导时间(D)分别对酶活力的影响

Fig. 9 Effect of inducer concentration (A), induction chance (B), (C) and induction time (D) on enzyme activity.

3 讨论

近年来,随着磷脂酶 C 在食品、医药、饲料等领域的广泛应用,国内外学者对磷脂酶 C 进行了大量的研究。国内研究起步较晚,但也取得了一定的成果,例如 2005 年陈涛等人对筛选到的产 PLC 菌株 *Bacillus cereus* Shenzhen 754-1 进行 3 次紫外线和两次 Co60- γ 射线诱变处理,选出 3 株高酶活的诱变株,酶活达到 14.878、16.450、16.400 U/mL^[24]; 2007 年高林^[1]对 *Bacillus cereus* Shenzhen 754-1 进行培养条件的优化产酶水平提高至 26 U/mL; 2010 年詹逸舒筛选到一株 *Bacillus cereus* Z-13 优化后卵黄

琼脂杯碟法测定磷脂酶 C 产生的沉淀圈(乳白色沉淀圈)直径可达 30 mm,酶活 23.31 U/mL^[25]。国外对磷脂酶 C 的研究一直处于领先,例如 1982 年 Vasil^[26]等人构建了一株 *P. aeruginosa* PAO2003 (pVB81)-CT,酶活达到了 442.8 U/mL; 1990 年 Ostroff^[27]等人将构建的重组质粒 pGEM2/PLC-H 导入到 *E. coli* BL21 (DE3) 中,成功得到了一株产溶血性磷脂酶 C 的菌株,该菌株磷脂酶 C 的活性可达到 166.7 U/ml。1997 年 Cota-Gomez^[28]等人成功构建了 *E. coli* BL21 (DE3) pGEM::plcHR,该菌株产溶血性磷脂酶 C,酶活可以达到 24.1 U/毫克蛋白。本文在成功筛选到一株 PLC 酶活较高的铜绿假单胞菌基础上,PCR 扩增获得溶血性磷脂酶 C (PLCH)

基因,构建了产 PLC 重组大肠杆菌,在较优的培养和诱导条件下,重组大肠杆菌磷脂酶 C 的酶活达到 722.89 ± 0.47 U/mL。

据报道^[29-30],*P. aeruginosa* 含有多个与编码磷脂酶 C 有关的基因,它们是 *plcH*, *plcR*, *plcN* 和 *plcB*, 编码的蛋白分别是 PLCH, PLCR (包括 PLCR1 和 PLCR2), PLCN 和 PLCB, 其中只有 PLCH 具有溶血性,而 PLCR 没有任何的磷脂酶 C 活性。而且比较其作用底物发现,PLCH 可以分解磷脂酰胆碱 (Phosphatidyl choline, PC) 和鞘磷脂 (Sphingomyelin, SM), PLCN 可以分解磷脂酰胆碱 (PC) 和磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS), PLCB 可以分解磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidyl ethanolamine, PE)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 和鞘磷脂 (SM)。另外,鉴于 PLCH 在医学方面也具有重要的应用价值,如有明显的抗血小板粘附、聚集等功能,这对抗血小板新型药物、抗静脉血栓及高血压医疗方面的研究有重大意义。因此,本研究选取溶血性磷脂酶 C (PLCH) 作为研究对象。本实验成功构建了表达溶血性磷脂酶 C (PLCH) 的重组大肠杆菌,并通过在哥伦比亚血琼脂平板上对重组菌进行溶血性试验,证明 PLCH 有溶血活性。

本实验在国内首次实现了铜绿假单胞菌来源的溶血性磷脂酶 C 基因在大肠杆菌的胞内表达,该研究对国内开发磷脂酶 C 生产菌株有一定的指导意义,但在重组磷脂酶 C 的结构和功能以及性质的方面还有待进一步研究。后续工作将以重组磷脂酶 C 的纯化和功能的研究为主,并进行工艺放大实验,以期得到更高的酶活。

参考文献

- [1] 高林. 磷脂酶 C 高产菌株的筛选、鉴定和培养条件的优化研究. 安徽农业大学的硕士学位论文, 2007.
- [2] Wang X, Peng Z. New Member of PLC Family: PLCE1. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2008, 5 (4): 332-335. (in Chinese)
王 晓 亮, 彭 志 海. 磷 脂 酶 C 家 族 新 成 员-磷 脂 酶 CE1. 医学分子生物学杂志, 2008, 5 (4): 332-335.
- [3] Chen M, Song J, Wang X, Wang C, Sun S, Chen T. Study on the antiplatelet effect of phospholipase C: release function and metabolism. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2003, 19 (12): 1340-1344. (in Chinese)
陈明锴, 宋建华, 王歆, 王常高, 孙松柏, 陈涛. 磷脂酶 C 抗血小板功能的研究 II—对血小板释放和代谢的作用. 中国药理学通报, 2003, 19 (12): 1340-1344.
- [4] Chen T, Song J, Wang X, Wang C, Sun S. Study on the antiplatelet effects of phospholipase C I—The effects of PLC on platelet aggregation and adhesion. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2003, 19 (10): 1107-1111. (in Chinese)
陈涛, 宋建华, 陈明锴, 王歆, 王常高, 孙松柏. 磷脂酶 C 抗血小板功能的研究 I—对血小板聚集率和吸附率的作用. 中国药理学通报, 2003 19 (10): 1107-1111.
- [5] 陈明锴. 磷脂酶 C 抗血小板功能及其机制的研究. 武汉大学的博士学位论文, 2002.
- [6] Liu Q, Bai L. Advance in the research of phospholipase B and its action on *Candida albicans*. *Department of Medical Microbiology and Immunology*, 2008, 8 (6): 1050-1052. (in Chinese)
刘奇, 白丽. 白色念珠菌磷脂酶 B 的研究进展. 中国热带医学, 2008, 8 (6): 1050-1052.
- [7] Chen M, Chen W, Song J, Tong X, Chen T. Effects of phospholipase C on experiment thrombosis and fibrinolytic activity. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2002, 18 (4): 477-479. (in Chinese)
陈明锴, 陈蔚, 宋建华, 童骁, 陈涛. 磷脂酶 C 对实验性血栓形成和纤溶功能的影响. 中国药理学通报, 2002, 18 (4): 477-479.
- [8] Song J, Chen M, Wang C, Sun S, Chen T. The effects of PLC on the ultrastructure of platelets. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2003, 19 (02): 146-149. (in Chinese)
宋建华, 陈明锴, 王常高, 孙松柏, 陈涛. 磷脂酶 C 对家兔血小板聚集和超微结构的影响. 中国药理学通报, 2003, 19 (02): 146-149.
- [9] Wang C, Chen M, Gao L, Song J, Sun S, Chen T. Study on selection of strain with high production phospholipase C and its anti-platelet function. *Natural Production Research and Development*, 2003, 15 (4): 345-348. (in Chinese)
王常高, 陈明锴, 高林, 宋建华, 孙松柏, 陈涛. 高产磷脂酶 C 菌株筛选及其抗血小板功能的研究. 天然产物研究与开发, 2003, 15 (4): 345-348.
- [10] Wang P, Ling Z. Research progress of relationship between hypertension and phospholipid inositol-specific phospholipase C. *Journal of Chongqing Medical University*, 2002, 27 (3): 364-368. (in Chinese)

- 王鹏飞, 凌宗秀. 磷脂肌醇特异的磷脂酶 C 与高血压关系的研究进展. 重庆医科大学学报, 2002, 27 (3): 364-368.
- [11] Liu Z, Huang Y, Hu S. A study on the relationship between phospholipase C and essential hypertension. *Chinese Journal of Hypertension*, 2000, 8 (4): 312-314. (in Chinese)
刘忠, 黄元伟, 胡申江. 磷脂酶 C 信号途径在高血压发病中作用探讨. 中华高血压杂志, 2000, 8 (4): 312-314.
- [12] Zhou Z, Li J, Zhang J, Luo Q. The developing status, problem and countermeasure investigation of the vegetable oil industry in China. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27 (32): 92-97. (in Chinese)
周振亚, 李建平, 张晴, 罗其友. 中国植物油产业发展现状、问题及对策研究. 中国农学通报, 2011, 27 (32): 92-97.
- [13] Liu C, Yang M, Huang F. Review on recent development in vegetable degumming. *Innovational Edition of Farm Products Processing*, 2010, 7 (7): 47-49. (in Chinese)
刘昌盛, 杨涓, 黄洪洪. 食用植物油脱胶技术研究进展. 农产品加工·创新版, 2010, 7 (7): 47-49.
- [14] Meng Q, Wen Q. Improving refining yield of crude oil by using phospholipase C to hydrolyze soybean gums. *China Oils and Fats*, 2006, 31 (1): 36-38. (in Chinese)
孟庆飞, 温其标. 磷脂酶 C 水解大豆油磷脂提高油脂精炼率的研究. 中国油脂, 2006, 31 (1): 36-38.
- [15] Liu X, Yuan C. Advancement of studying on soybean phospholipid. *China Food Additives*, 2001, (4): 15-19. (in Chinese)
刘小杰, 袁长贵. 大豆磷脂的研究进展. 中国食品添加剂, 2001, (4): 15-19.
- [16] Yang L, Meng Q. Progress on phospholipase A2. *Food and Drug*, 2007, 9 (7): 52-54. (in Chinese)
杨磊, 孟庆雄. 磷脂酶 A2 的研究进展. 食品与药品 A, 2007, 9 (7): 52-54.
- [17] 长崎咏子, 深泽彻也, 小野泰典. 磷脂酶 C 及其含的食品用酶制剂以及食品原料的处理法. 中国专利: 102174488, 2011-9-7.
- [18] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 2-137.
- [19] Chrisope GL, Fox CW, Marshall RT. Lecithin agar for detection of microbial phospholipases. *Applied Environmental Microbiology*, 1976, 31: 784-786.
- [20] Gubash SM. Improved egg-yolk agar plate medium for the detection of clostridial phospholipase C activity. *Research in Microbiology*, 1991, 142 (1): 87-93.
- [21] Peng Y, Zhou D. The method of phospholipase C assay and application. *Journal of Harbin Institute of Technology*. 1989, 6 (3): 34-38. (in Chinese)
彭愈生, 周定. 磷脂酶 C 活性测定方法及其应用的研究. 哈尔滨工业大学学报, 1989, 6 (3): 34-38.
- [22] Kurioka S, Matsuda M. Phospholipase C assay using p-nitrophenylphosphoryl-choline together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. *Analytical Biochemistry*, 1976, 75: 281-289.
- [23] Berka RM, Vasil ML. Phospholipase C (heat-labile) hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterization. *Journal of Bacteriology*, 1982, 152: 239-245.
- [24] Chen T, Wang C, Liu X, He D. The mutation of high phospholipase C productivity strain. *Natural Product Research and Development*. 2005, 17 (6): 712-716. (in Chinese)
陈涛, 王常高, 刘晓辉, 何东平. 高产磷脂酶 C 菌株的诱变选育. 天然产物研究与开发, 2005, 17 (6): 712-716.
- [25] 詹逸舒. 产磷脂酶 C 菌株的筛选及其酶学性质的研究. 湖南农业大学的硕士学位论文, 2010.
- [26] Vasil ML, Berka MR, Gray GL, Nakai H. Cloning of a phosphate-regulated hemolysin gene (phospholipase C) from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1982, 152: 431-440.
- [27] Ostroff RM, Vasil AI, Vasil ML. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172 (10): 5915-5923.
- [28] Cota-Gomez A, Vasil AI, Kadurugamuwa J, Beveridge TJ, Schweizer HP, Vasil ML. PlcR1 and PlcR2 are putative calcium-binding proteins required for secretion of the hemolytic phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 1997, 65: 2904-2913.
- [29] Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball G, Wilgerman PJ, Vasil ML. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* required for phospholipid chemotaxis. *Molecular Microbiology*. 2004, 53 (4): 1089-1098.
- [30] Berka RM, Vasil ML. Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterization. *Journal of Bacteriology*, 1982, 152: 239-245.

Expression of hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*

Jinxing Zhao, Liang Zhang^{*}, Zhenghua Gu, Zhongyang Ding, Guiyang Shi

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

Abstract: [Objective] In this study, we constructed a recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) strain to produce hemolytic phospholipase C and optimized the fermentation conditions. [Methods] We screened a high phospholipase C activity strain, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) 41, through yolk borax plate method, and cloned the hemolytic phospholipase C gene (*plcH*) from it. The *plcH* was inserted into pET-28a (+) and then obtained the recombinant expression plasmid (pET28a-*plcH*). We selected the correct recombinant plasmid and transformed it into *E. coli* BL21 (DE3). Furthermore, we determined the PLC activity and hemolytic activity in positive transformants on yolk borax plate and columbia blood agar plate. Finally, we optimized the fermentation conditions. [Results] We successfully constructed a recombinant *E. coli* strain (*E. coli* BL21 (DE3)/pET28a-*plcH*) that showed significant phospholipase C activity. Moreover, hemolytic phospholipase C of the recombinant strain showed strong hemolytic activity. The enzyme activity of phospholipase C was 722.9 ± 0.47 U/mL with 5% of inoculation amount, 200 r/min for 4 hours at temperature of 37, induced by 0.9 mmol/L IPTG for 14 hours. [Conclusion] We constructed a recombinant *E. coli* strain with high hemolytic phospholipase C activity under optimized fermentation conditions. It is the first time in domestic to successfully clone and express phospholipase C gene from *P. aeruginosa* in *E. coli*. These research results are helpful to advance the industrialization and application of phospholipase C.

Keywords: Hemolytic phospholipase C, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, Genetic recombination, Hemolytic activity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA100905), by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-11-0665) and by the Research Program of State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University (SKLF-ZZA-201201)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-13861707271; E-mail: 13861707271@139.com

Received: 7 September 2012 / Revised: 7 December 2012