

# 人 $\beta$ 神经生长因子在大肠杆菌中的高表达

张 剑 张林元\* 张锡然 柴建华\*\* 李朝军

(南京师范大学生物系 南京 210097)

**摘 要** 将编码人 $\beta$ 神经生长因子(Hu $\beta$ -NGF)的基因克隆到由 T7 噬菌体启动子控制的 pET11c 大肠杆菌表达载体中,重组质粒经鉴定含有 Hu $\beta$ -NGF 基因,未解聚的表达产物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),结果显示有二聚体 27kD 的蛋白带。而完全解聚的表达产物 SDS-PAGE 显示出一条 13.5kD 单体带。经凝胶电泳扫描,表达带占菌体总蛋白的 14.5%。用兔抗鼠 $\beta$ -NGF 的多克隆抗体进行的 Western-Blot 的结果表明,二聚体同单体都有免疫原性。在生物活性的鉴定中,菌体表达产物可以使小鸡鸡胚的背根神经节产生神经元突起,由此可以证明该表达产物有较高的生物活性。

**关键词** 人 $\beta$ 神经生长因子, Hu $\beta$ -NGF 基因, 基因表达, rHu $\beta$ -NGF, 鸡胚背根神经节

神经生长因子最初是在胚胎交感神经中作为神经营养因子被发现的<sup>[1]</sup>。现已证实 NGF 对神经和非神经组织都起作用。在神经系统中,NGF 对传感器、神经鞘细胞、交感神经及拟付交感神经元起作用,在非神经系统中,NGF 的主要活性作用于免疫系统,对中性粒细胞、单核细胞、嗜碱性细胞和淋巴细胞起作用<sup>[2]</sup>。最初 NGF 来源于成熟鼠的组织<sup>[3]</sup>,后在人的组织中也有发现。NGF 分子量为 13.5kD,沉降系数为 7S,由 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 亚基组成。但只有 27kD 的 $\beta$ 亚基二聚体有生物活性(沉降系数为 2.5S)<sup>[2]</sup>。人 $\beta$ -NGF 是由 241 个氨基酸残基组成的多肽,成熟亚基是在 N 末端 121 氨基酸残基处断开而由 118 氨基酸残基组成的,它含有六个半胱氨酸,并形成三对二硫键<sup>[4]</sup>。它的二聚体(27kD)形成是由两条单体链靠非共价键结合的,非共价键的断裂所造成的二聚体解聚会造成 NGF 生物活性的完全丧失。

大量的 NGF 在前列腺和它的分泌物当中发现,在蛇毒和人的胎盘和精液中也有大量的 NGF<sup>[5,6]</sup>。我们所用 Hu $\beta$ -NGF 基因是从人染色体库中用 PCR 方法得到的,经测序和文献所报道的 Hu $\beta$ NGF 基因序列完全相同,全长为 360bp。为了进一步研究人 $\beta$ 神经生长因子基因表达产物的功能、活性及应用。我们将成熟的 Hu $\beta$ -NGF 基因克隆进带有强启动子的大肠杆菌表达载体中,并得到高表达,而且生物活性很好。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

\* 南京军事医学研究所分子遗传室。

\*\* 复旦大学国家重点实验室。

本文于1996年12月9日收到。

原核高效表达载体 pET11c, 大肠杆菌 BL21 (DE3) 为南京军事医学研究所分子遗传室提供。

## 1.2 酶及主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、蛋白质预染标准分子量、丙烯酰胺、N, N'-双甲叉丙烯酰胺、牛血清白蛋白和 IPTG 均购自 Gibco-BRL 公司。低熔点琼脂糖购自 Sigma 公司。其他常规生化试剂均为国产试剂。兔抗鼠  $\beta$ -NGF 的多克隆抗体为中国药科大学赠。DNA PCR 标准分子量和免疫 ABC 试剂盒-羊抗兔 IgG 购自上海华美生物工程有限公司。

## 1.3 质粒的构建

质粒 DNA 的制备, 酶解, 重组质粒的构建及酶谱分析, 均按文献 [7] 的方法进行。

## 1.4 菌株的诱导表达及表达产物的制备

将表达菌株接种入 LB 培养基中, 37℃ 培养过夜, 然后将过夜菌以 1:50 的比例分别接种入 3 管 5ml 新鲜培养基中, 37℃ 震荡培养至  $OD = 0.5$  时每管加入 IPTG 至终浓度为 1mmol / ml, 37℃ 诱导培养 8h, 在不同时间段分别取样, 并分别收集菌体, 同时测  $OD$  值。

## 1.5 SDS-PAGE<sup>[7]</sup>

取上述 8h 的诱导物 1.5ml, 离心, 取沉淀, 加入 PBS 缓冲液洗沉淀一次, 然后加入 2 倍样品缓冲液适量, 100℃ 煮沸 5min, 电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色。

## 1.6 Western-Blot<sup>[7]</sup>

首先进行常规电泳, 随后用 Pharmacia 的 Multiphora Electro-Phoresis system 转移仪将蛋白带转移到 Bio-Rad 的硝酸纤维素膜上, 然后用牛血清白蛋白封闭 1h, 洗涤后加入一抗(兔抗鼠  $\beta$ -NGF 的多克隆抗体), 4℃ 过夜, 用华美生物工程公司的羊抗兔作为二抗, 然后按免疫 ABC 试剂盒说明进行电泳, 用 4-氯-1-萘酚作为辣根过氧化物酶的显色底物。

## 1.7 rHu $\beta$ NGF 生物活性的鉴定

首先将诱导培养的重组菌体液经离心取沉淀, 然后用 PBS 洗三次, 后用 50mmol / L 醋酸钠 (pH4.5) / 0.15mmol / L NaCl 裂解液悬浮沉淀, 再进行超声破碎, 收集上清, -20℃ 冻存备用。取 9d 龄的种鸡蛋孵化的鸡胚, 分离出鸡胚背根神经节, 并将背根神经节接种于涂有鼠尾胶原的 10ml 细胞培养瓶中, 37℃ 温孵 30~60min, 待神经节贴壁后, 取大约 10ng / mL, 100ng / mL 的 rHu $\beta$ -NGF 分别加入 4ml DMEM 培养基 (pH7.2~7.4), 将培养基除菌过滤加入培养瓶中, 于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 的二氧化碳孵箱中培养 24h, 用相差显微镜观察结果并照相。

## 1.8 rHu $\beta$ -NGF 表达水平的检测

用 Bio-Rad 的 GS-700 Imaging Densitometer 扫描仪进行凝胶扫描。

# 2 结果

## 2.1 重组质粒的构建

将从人染色体库中用 PCR 方法得到的人  $\beta$ -NGF 基因进行序列分析, 同报道的序列完全相同, 用 NdeI 和 BamHI 双酶切得到 360bp 的 Hu $\beta$ -NGF 基因, 低熔点琼脂糖回收片段, 然后将此片段插入 pET11c 表达载体的 NdeI 和 BamHI 酶切位点, 用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶进行连接, 16℃ 连接过夜。随后转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 挑取转化子进行快速鉴定, 并用

NdeI 和 BamHI 同时酶切转化重组子, 取酶切后有 360bp 小片断的重组子, 确认为重组质粒, 并命名为 pEZ01。

## 2.2 表达菌株的 SDS-PAGE电泳的初步鉴定

将 Hu $\beta$ -NGF 的表达菌株 *E. coli* BL21(pEZ01) 和载体对照菌株 *E. coli* BL21(pET11c) 在 37℃ 培养至  $OD_{600} = 0.5$ , 然后加入 IPTG 诱导 8h。作为非诱导对照的上述菌株不加 IPTG, 37℃ 进行培养。所制备的菌体蛋白进行 12% 的尿素 SDS-PAGE 分离, 经染色和脱色后, 在未完全解聚的诱导表达菌株样品 (电泳载样缓冲液中不加尿素) 中可以看出一条明显的表达带, 分子量为 27kD (图 1-A), 同 NGF 二聚体分子量相当, 而在未完全解聚的对照菌株样品 (图 1-B) 中未见 27kD 带。在非诱导菌也有 27kD 条带 (图 2-B), 但亮度较诱导菌株样品弱。在完全解聚的诱导表达菌株样品 (电泳载样缓冲液中加入 6mol/L 尿素) 中有一明显条带对应着 13.5kD, 这同 NGF 单体的分子量相当, 在完全解聚的对照菌株中未见有 13.5kD 分子量

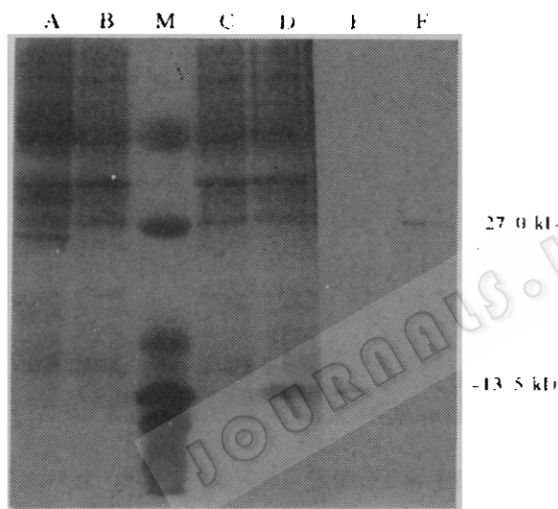


图 1 rHu $\beta$ -NGF 表达产物的尿素 SDS-PAGE 电泳和免疫印迹

Fig.1 Urea SDS-PAGE for the expression of rHu $\beta$ -NGF

A: Nonreduced *E. coli* BL21(pEZ01) expression protein (induced 8h); B, C: *E. coli* BL21(pET11c); M: Protein prestained marker (43kD, 29kD, 18, 4kD, 14.3kD, 3kD, 2.3kD); D: Reduced rHu $\beta$ -NGF expression protein (induced 8h); E: Western-Blot of reduced *E. coli* BL21(pEZ01) expression protein; F: Western-Blot of nonreduced *E. coli* BL21(pEZ01) expression protein.

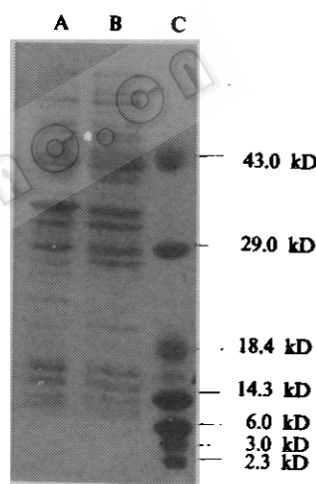


图 2 rHu $\beta$ -NGF 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of rHu $\beta$ -NGF expression protein

A: *E. coli* BL21(pET11c); B: Nonreduced expression protein of *E. coli* BL21 (pEZ01); C: Protein prestained marker (43.0kD, 29.0 kD, 18.4 kD, 14.3 kD, 3.0 kD, 2.3kD)

的明显条带。经光密度扫描测定, 完全解聚的 rHu $\beta$ -NGF 表达产物占菌体总蛋白的 14.5%。

## 2.3 表达产物的免疫鉴定

按照材料和方法中所述进行 Western-Blot 分析, 发现在未解聚的菌裂解液中有 27kD 的免疫特异性吸附带, 在完全解聚的表达菌株裂解液中也有 13.5kD 分子量的免疫特异性

吸附带。

鼠 $\beta$ -NGF同人 $\beta$ -NGF有 90% 的同源性,因此我们选用了兔抗鼠 $\beta$ -NGF的多克隆抗体,免疫所用的 $\beta$ -NGF为从小鼠颌下腺中提取的。Western-Blot显示在 27kD 和 13.5kD 分别有免疫结合印迹,而杂带几乎没有。

## 2.4 表达产物的生物活性

按照材料和方法中所述,我们分别进行了三组样品的测试,分别为加入约为 10ng / ml 和 100ng / ml 的 rHu $\beta$ -NGF 表达产物,及一组空白对照,生物活性测试表明:鸡胚背根神经节在无 $\beta$ -NGF 的对照培养中完全无突起生长,而在培养液含 10ng / ml 的 rHu $\beta$ -NGF 时,感觉神经元长出的突起又长、又密。在含 100ng / ml rHu $\beta$ -NGF 产物的培养液中,也有突起长出,但较含 10ng 级的突起要短和稀。这说明随着 rHu $\beta$ -NGF 浓度的升高,长出的突起长度和密度都会减少(图 3)。

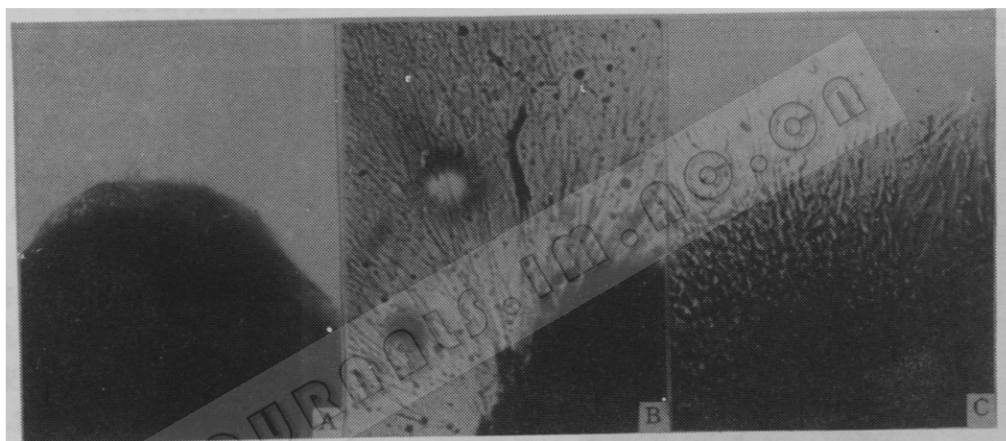


图 3 rHu $\beta$ -NGF 表达产物的生物活性鉴定

Fig.3 Biological activity demonstration of rHu $\beta$ -NGF expression protein

A: Without rHu $\beta$ -NGF; B: About 10ng / ml rHu $\beta$ -NGF; C: About 100ng / ml rHu $\beta$ -NGF.

## 3 讨论

Alessandro Negro 等人曾对 Hu $\beta$ -NGF 在大肠杆菌中的表达进行过研究,但表达产量仅有 3%,并且其中只有 0.2% 有生物活性,他们选用的表达载体是由  $P_{RPL}$  启动子控制的<sup>[8]</sup>。而我们获得的 Hu $\beta$ -NGF 在大肠杆菌中的表达产量高达 14.5%,这同我们所用的表达载体是由 T7 噬菌体强启动子和终止子控制的表达载体有关。文献中曾报道鼠的 NGF 在大肠杆菌中的表达量只有 0.1%<sup>[9]</sup>。但鼠的 NGF 和人的 NGF 基因有很高的同源性,但在表达产量上确有如此大的差距,这很可能与他们的基因组成存在某种联系。

NGF 的生物活性鉴定原来一直依靠血浆凝集块进行,它需要常规培养液及公鸡血浆和凝血酶,并且容易出现假阳性的结果。本文的生物活性鉴定方法是采用柳川等报道的改进后的测定方法<sup>[10]</sup>,将 9d 龄的鸡胚背根神经节接种在涂胶的培养瓶中,然后加入含 rHu $\beta$ -NGF 产物的 DMEM 培养液,在无血清和无血浆的条件下,进行培养后观察结果。空

白对照组的培养瓶中有6个背根神经节,无一个有阳性反应。因此可以说我们的活性测定结果去除了血浆成份中激素及其他活性物质的干扰,结果可靠。

**致谢** 感谢中国药科大学刘晓军博士及南京军事医学研究所分子遗传室的部分科研人员给与我的帮助。

### 参 考 文 献

- [1] Montalcini L, Hamburger R V. *EMBO J*, 1987, **5**: 1145~1154.
- [2] Ullrich A, Gray A, Berman C *et al.* *Nature*, 1983, **303**: 821.
- [3] Iwane M, Kitamura Y, Kaisho Y. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **171**: 116~122.
- [4] Missile C, Borri F, Sigala S *et al.* *Endocrinology*, 1994, **135**: 290.
- [5] Bradshaw R A. *Ann Rev Biochem*, 1978, **47**: 191~216.
- [6] Korsching S, Thoenen H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **80**: 3513~3516.
- [7] Sambrook T, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1982. 880~897.
- [8] Negro A, Martini I, Bigon E. *Gene*, 1992, **110**: 251~256.
- [9] Hu G L, Neet K E. *Gene*, 1988, **70**: 57~65.
- [10] 柳川, 李晋萍, 华仲慰, 等. 军事医学科学院院刊, 1987, **17**: 26~37.

## THE HIGH EXPRESSION OF HUMAN $\beta$ -NERVE GROWTH FACTOR IN *E. COLI*

Zhang Jian Zhang Lingyuan\* Zhang Xiran Chai Jianhua\*\* Li Chaojun

(Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

**Abstract** The Hu $\beta$ -NGF gene encoding the  $\beta$  subunit of mature human nerve growth factor was cloned into the pET11c vector under the control of T7 bacteriophage promoter. The SDS-PAGE electrophoresis results of nonreduced recombinant products showed a clear band corresponding to homodimeric (27kD) form of the molecule. But the SDS-PAGE results of reduced expression protein showed a single band corresponding to monomeric form of Hu $\beta$ -NGF (13.5kD). It represented approximately 14.5% of the total cellular protein. Both of them were immunopositive on Western-Blots with rabbit anti-m $\beta$ -NGF polyclonic antibodies. And the recombinant product was biologically active on cultured chicken dorsal root ganglion neurons. So it demonstrated the feasibility of synthesizing the biologically active forms of Hu $\beta$ -NGF in *E. coli*.

**Key words** Hu $\beta$ -NGF, Hu $\beta$ -NGF gene, Gene expression, rHu $\beta$ -NGF, Chicken dorsal root ganglion neurons

\* Nanjing Military Medical Institute.

\*\* National Key Lab., Fudan university.

# 类产碱假单胞菌耐热碱性脂肪酶 基因的克隆\*

翁丽星<sup>1,2</sup> 胡志浩<sup>1</sup> 邓子新<sup>1</sup> 施巧琴<sup>2</sup> 吴松刚<sup>2</sup> 李阜棣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 华中农业大学生命科技学院 武汉 430070)

(<sup>2</sup> 福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

**摘 要** 将类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligene*)总 DNA 经 Sau3AI 部分酶解后的 35~50 kbDNA 片段与经 BamHI 线性化及 CIAP 处理过的粘粒 pIJ285 连接,以大肠杆菌 LE392 为受体,构建类产碱假单胞菌的基因文库。通过三丁酸甘油酯平板和橄榄油平板法检测克隆子,获得一株具有耐热碱性脂肪酶活性的菌株 LE392(pHZ1401)。随后将 pHZ1401 上的外源 DNA 片段进行亚克隆,从而获得了具有脂肪酶活性的菌株 HB101(pHZ1402)和 HB101(pHZ1403),它们分别携带有 2.9 kb 和 3.0 kb 的外源片段。两外源片段约有 2 kb 的重叠区。HB101(pHZ1403)所分泌的脂肪酶活性比 HB101(pHZ1402)高 4 倍,是出发菌的 5 倍。

**关键词** 类产碱假单胞菌,耐热碱性脂肪酶,基因克隆

碱性脂肪酶是在碱性条件下水解脂肪分子中甘油酯键的一种酶<sup>[1]</sup>,水解脂肪后的产物为甘油二酯、甘油一酯、脂肪酸和甘油。它是一种重要的工业酶类,应用于食品加工、制药、皮革脱脂和洗涤等许多行业。因此,提高这类酶的产量有重要的应用价值。另外,对脂肪酶这类“界面酶”的催化作用方式和结构模型等分子机理的了解甚少,而仅用生化手段对它们进行分析有一定的难度。目前,人们已把注意力集中到克隆和鉴定脂肪酶基因,研究其表达调控方式,以提高脂肪酶的产量。并寄望通过分析脂肪酶的一级结构,揭示脂肪酶结构和功能间的关系。类产碱假单胞菌产生的脂肪酶具有耐热性能好和耐碱性强的优点,比一般的中性脂肪酶具有更广泛的用途。在自然条件下,该菌的酶产量低,利用常规育种方法难以满足工业化生产的要求。因此,我们尝试了利用分子遗传操作技术,克隆类产碱假单胞菌产酶基因,以便对该基因进行深入分析的工作。本文即报道这方面的克隆结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒:** 类产碱假单胞菌(*pseudomonas pseudoalcaligene*)由福建师范大学生物工程学院提供。大肠杆菌 BHB2688、BHB2690 用来提取  $\lambda$  噬菌体包装蛋白,大肠杆菌

\* 国家自然科学基金委员会杰出青年科学基金、国家教委跨世纪人才基金和福建师大资助课题。

本文于1996年6月24日收到。

LE392、HB101 作为克隆宿主<sup>[2]</sup>, 粘粒 pIJ285 (3.8 kb, 具 cos 位点和氨苄青霉素抗性基因) 和质粒 pUC118 (作为亚克隆载体) 的图谱和特征分别见文献 [2] 和 [3]。

**1.1.2 培养基及培养条件:** 大肠杆菌用 LB 及 LA 培养<sup>[4]</sup>, 适当时候, 添加 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的氨苄青霉素, 培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。类产碱假单胞菌亦能在 LA 培养基上生长, 最适产酶培养基为发酵培养基 (%) : 黄豆饼粉 2.5, 玉米浆 1.0, 小麦粉 1.0,  $\text{NaNO}_3$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5, pH9.4~9.6, 培养温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 。

**1.1.3 酶和试剂:** Sau3AI、BamHI、 $T_4$  DNA ligase、CIAP 和 RNase 等工具酶均购自 Promega、Gibco-BRL 和 Boehringer 等公司。氨苄青霉素和罗丹明 B 购自华美生物技术公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 基因文库的构建方法:** 见文献 [2]。

**1.2.2 阳性重组子的脂肪酶活性的筛选及脂肪酶活性的检测:** 以三丁酸甘油酯平板法<sup>[1]</sup> 进行初筛, 以橄榄油平板法<sup>[5]</sup> 进行复筛。以 NaOH 直接滴定法<sup>[1]</sup> 定量检测脂肪酶活力。

**1.2.3 阳性重组子的亚克隆:** 见文献 [2]。

## 2 结果

### 2.1 基因文库

**2.1.1 用两个溶源菌制备包装提取物:** 先对大肠杆菌 BHB2688 和 BHB2690 进行  $\lambda$  噬菌体溶源状态的检查。这两株菌保持温度敏感和紫外线敏感, 则可将它们进行诱导, 制备包装蛋白提取物。包装提取物用  $\lambda$  噬菌体 DNA 进行效价测定, 结果为  $7.8 \times 10^8$ 。

**2.1.2 类产碱假单胞菌总 DNA 的分级离心<sup>[2]</sup>:** 分离提纯该菌的总 DNA<sup>[6]</sup>。建立部分酶切条件, 根据酶切后片段主要集中在 35~50 kb 的条件对总 DNA 进行大量酶解, 经 10%~40% 蔗糖梯度超离心, 异丙醇沉淀, 分部收集 35~50kb 的 DNA 片段。

**2.1.3 包装、感染:** 经 BamHI 消化、纯化、脱磷酸的 pIJ285 载体与合适大小的外源片段以 9:1 的分子比连接、包装。取少量包装反应物感染在 TB 中生长过夜的大肠杆菌 LE392 的新鲜培养液, 从而获得 1 000 多个重组子。

### 2.2 酶活检测

从 1000 个重组子中初筛出四个具有

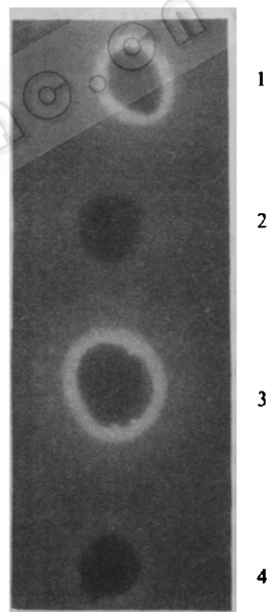


图 1 分别携带 pHZ1402 和 pHZ1403 的大肠杆菌菌株的脂肪酶活性

1. HB101 (pHZ1402); 2. 在初筛板上有水解圈而在复筛板上无桔黄色荧光圈的一个亚克隆子; 3. HB101 (pHZ1403); 4. 大肠杆菌 HB101。

Fig.1 Lipase activity of *E. coli* carrying pHZ1402 and pHZ1403 respectively

1. HB101 (pHZ1402); 2. A subclone which has a halo on the tributyrin agar plate and no orange fluorescent halo on olive oil and Rhodamine-B agar plate; 3. HB101 (pHZ1403); 4. *E. coli* HB101.

水解透明圈的重组子。将它们进行复筛后,发现只有 LE392 (pHZ1401) 在紫外 350nm 波长具有桔黄色荧光圈,而作为负对照的 LE392 则不显示这种荧光圈。

### 2.3 pHZ1401 的亚克隆

对 pHZ1401 的初步酶切分析揭示,此质粒携带了约 45kb 来自类产碱假单胞菌的 DNA 片段。将 pHZ1401 用 *Sau3AI* 酶切,以 pUC118 为载体进行亚克隆,从获得的转化子中初筛出 7 个能分解三丁酸甘油酯的菌落,经复筛确证其中二株在橄榄油平板出现桔黄色荧光圈,它们是 HB101 (HZ1402) 和 HB101 (pHZ1403)。后者形成的荧光圈比前者荧光圈大得多,因而似乎具有更强酶活(图 1)。

### 2.4 亚克隆子外源片段的酶切分析

分别用 *EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *XbaI*, *SalI*, *PstI* 和 *HindIII* 八种内切酶对 pHZ1402 和

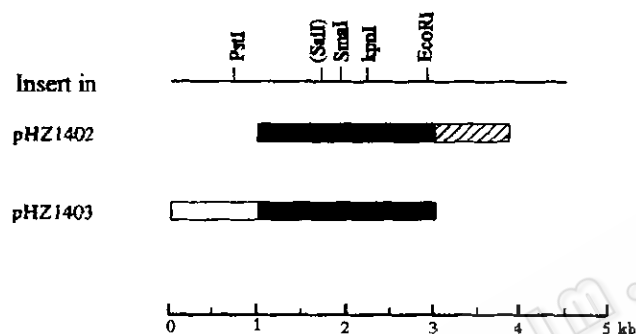


图2 pHZ1402和pHZ1403的限制酶图谱

Fig.2 Restriction maps of pHZ1402 and pHZ1403

培养 24 h 后,可以看到,HB101 (pHZ1403) 产生的水解圈最大,HB101 (pHZ1402) 次之,作为对照的类产碱假单胞菌最小,大肠杆菌 HB101 则无脂肪酶活性。

用 NaOH 直接滴定法检测酶活,将 HB101 (pHZ1403)、HB101 (pHZ1402) 接种于 LB, 37℃ 摇床 220 r/min 培养 16 h,酶活分别为 102 u/ml, 25 u/ml。类产碱假单胞菌接种于液体发酵培养基, 28℃ 摇床 (220 r/min) 培养 32 h,酶活为 20 u/ml。因此, HB101 (pHZ1403) 所分泌的酶的活性为 HB101 (pHZ1402) 的 4 倍,而比正对照菌株类产碱假单胞菌所分泌的酶的活性高 5 倍。

## 3 讨论

对脂肪酶的定性检测只用三丁酸甘油酯平板是不够的,因为在该平板上酯酶也可产生透明水解圈,影响挑选。用这种平板初筛是因为它比橄榄油平板易于制作且培养时间短,可较快地检出含酯酶或脂肪酶的菌株。再通过复筛得到真正含脂肪酶基因的菌株。

从获得的这两株工程菌的发酵实验结果看出酶活存在差异。因为检测的均为发酵液中的脂肪酶活力,所以这个差异也可能是由于分泌量不同造成的。通过限制酶酶切分析, pHZ1403 (6.2kb) 与 pHZ1402 (6.1kb) 的外源片段中含 2kb 的重叠区,它一定包含了脂肪酶的结构基因(图 2)。究竟是 pHZ1403 存在位于结构基因上游的正调控基

pHZ1403 进行酶切分析,制作的酶切图谱如图 2 所示, pHZ1402 和 pHZ1403 上所携带的外源片段中含约有 2kb 的重叠区,很显然脂肪酶的结构基因就在这 2kb 的 DNA 内。

### 2.5 酶活检测

将类产碱假单胞菌、HB101 (pHZ1402)、HB101 (pHZ1403) 及 HB101 分别点种于不加氨苄青霉素的三丁酸甘油酯平板上, 37℃



因还是 pHZ1402 存在位于结构基因下游的负调控基因,或是克隆的外源 DNA 片段的大小与酶分泌量有关等问题还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 施巧琴. 微生物学通报, 1981, 8(3): 108~110.
- [2] [美]J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著 (金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1995.
- [3] Zhou X F, Deng Z X, Hopwood D A *et al.* *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(7): 2096~2099.
- [4] [英]霍甫伍德等著 (邓子新, 唐纪良译). 链霉菌遗传操作实验手册. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1989. 169.
- [5] Chung G H, Lee Y P, Jeohn G H *et al.* *Agric Biol Chem*, 1991, 55(9): 2359~2365.
- [6] 蔡良琬. 核酸研究技术(上册). 北京: 科学出版社, 1987. 6.

## CLONING AND EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI* OF AN ALKALINE AND THERMOSTABLE EXOLIPASE FROM *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES*

Weng Lixing<sup>1,2</sup> Hu Zhihao<sup>1</sup> Deng Zixin<sup>1</sup> Shi Qiaoqin<sup>2</sup> Wu Songgang<sup>2</sup> Li Fudi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070)

(<sup>2</sup>Fujian Normal University, Fuzhou 350007)

**Abstract** A gene coding for an alkaline and thermostable exolipase of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* was cloned into *Escherichia coli* LE392 by inserting Sau3 AI-generated DNA fragments into the BamHI site of pIJ285. Four colonies with esterase and lipase activities on the tributyrin agar plate were isolated by screening the constructed *pseudomonas pseudoalcaligenes* genomic library. Only one out of the four positive colonies showed lipase activity on the agar plate containing olive oil and Rhodamine-B. Subclones of the 45 kb insert carrying lipase gene was obtained in *E. coli* HB101 using pUC118 as a vector, two of which (HB101 (pHZ1402) and HB101 (pHZ1403)), retained lipase activity, but the level seems to be different. They carried 3.0 kb and 2.9 kb inserts with a 2 kb overlapping sequence. The lipase activity of HB101 (pHZ1403) is about 4 times higher than that of HB101 (pHZ1402), as 5 times as that of original strain *P. pseudoalcaligenes*.

**Key words** *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, Alkaline thermostable exolipase, Cloning