

普通变形杆菌位置非特异性脂肪酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

卢亚萍^{1,2}, 顾菁¹, 汤彦舛², 吕凤霞², 别小妹², 陆兆新^{2*}

(南京农业大学,¹ 生命科学学院,² 食品科学学院, 南京 210095)

摘要:【目的】本文拟克隆普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 脂肪酶基因, 并实现其在大肠杆菌中的高效表达, 并检验外源表达脂肪酶的催化性质。【方法】通过 PCR 方法, 从 *P. vulgaris* 基因组中扩增其脂肪酶基因 (*PVL*), 并将其开放读码框区域连接到表达载体 pET-DsbA 及 pMBP-P 上, 在大肠杆菌中用 IPTG 诱导表达。我们对培养基组分及培养条件进行优化, 以获得最高的酶产量。用 Ni 柱亲和层析法对所得重组脂肪酶进行纯化, 并考察其酶学性质。【结果】*PVL* 基因编码区含 864 个碱基, 编码含 287 个氨基酸的酶蛋白。该序列在 GenBank 的登录号为 FJ643627。*PVL* 基因在大肠杆菌 BL21 内诱导表达的最佳条件为: 在 pH8.5 的 LB 培养基中添加 15 g/L 葡萄糖及 200 mg/L 氨苄青霉素, 在培养至 OD_{600} 为 1.2 时加入 100 mg/L IPTG, 15℃ 诱导 15 h, 最高酶活达到 192.2 U/mL。通过亲和层析纯化了重组脂肪酶, 得到一个约 31 kDa 的蛋白条带。外源表达的脂肪酶的催化特性与野生菌脂肪酶相似, 具有催化的位置非特异性, 对长链脂肪酸酯亲和性最高。【结论】*PVL* 基因在大肠杆菌中的高效表达为 *P. vulgaris* 脂肪酶的进一步研究与应用奠定基础。

关键词: *Proteus vulgaris* 脂肪酶; 基因克隆; 原核表达; 位置非特异性

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0755-007

脂肪酶 (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) 是广泛存在于自然界的一种水解酶类, 在动植物和微生物的代谢中起着重要的作用。脂肪酶可在油水界面上催化甘油三酯水解、酯化、转酯、酯交换、对映体拆分等化学反应^[1-2], 因此脂肪酶在食品加工、药物制备、洗涤化工、环境治理、皮革加工、造纸、和生物能源等领域具有广泛的应用前景^[1,3]。近年来, 脂肪酶应用的广度和深度日益增加, 不断发现新的脂肪酶以及利用它们开发新产品成为了许多科学家的研究课题。

大部分微生物可以分泌脂肪酶。不同种属的微生物所产生的脂肪酶具有不同的催化特性, 因此人们致力于发现具有不同催化特性 (如耐高温、耐低

温、耐有机溶剂、位置和底物选择性) 的脂肪酶产生菌以满足不同的工业生产需求。本实验室从油菜内生菌中分离了一株产碱性脂肪酶的细菌, 命名为 T6, 经鉴定为普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)。*P. vulgaris* T6 所产脂肪酶可以催化甘油三酯的 3 个酯键水解, 具有催化的位置非特异性^[4]。位置非特异性脂肪酶可以提高脂肪水解和转酯的效率, 更适合某些工业应用。Kim 等首次分离纯化了 *P. vulgaris* 脂肪酶并克隆其基因^[5], 在国内还没有关于 *P. vulgaris* 脂肪酶文献报道。

酶能应用于工业生产的一个最重要的前提是具有高的产量和高的活力。T6 脂肪酶活力较低, 我们将其基因克隆并插入到大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

基金项目: 江苏省高技术计划 (BE2008308); 国家“863 计划” (2008AA10Z309); 江苏省自然科学基金 (BK2007160)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-84396583; E-mail: fmb@njau.edu.cn

作者简介: 卢亚萍 (1978-), 女, 江苏泰州人, 博士, 讲师, 主要从事基因克隆及酶工程领域的研究。

收稿日期: 2009-11-29; **修回日期:** 2010-01-22

的表达载体中进行外源表达。Lee 等将 *P. vulgaris* K80 脂肪酶基因导入载体 pET-22b, 在 D-乳糖诱导下获得高效表达^[6]。本研究将 T6 脂肪酶基因 (PVL) 与 *E. coli* 胞内表达载体 pET-DsbA 及周质空间表达载体 pMBP-P 连接, 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 内表达, 成功获得了重组脂肪酶, 并对表达条件进行了优化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: *Proteus vulgaris* T6 由本实验室分离保存^[4]。

1.1.2 主要试剂和仪器: 表达宿主菌为 *E. coli* BL21 及 *E. coli* TOP10F'。大肠杆菌胞内融合表达载体 pET-DsbA 及分泌型载体 pMBP-P 为深圳 Qinbaosheng Biotechnology Co. Ltd. 公司产品。克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。

Pfu DNA 聚合酶、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为上海生工生物工程公司产品。限制性内切酶、T₄ DNA 聚合酶、DNA 分子量标记为大连宝生物公司产品。对硝基苯乙酸酯 (pNPA, C₂)、对硝基苯丁酸酯 (pNPB, C₄)、对硝基苯癸酸酯 (pNPC, C₁₀)、对硝基苯月桂酸酯 (pNPL, C₁₂)、对硝基苯棕榈酸酯 (pNPP, C₁₆) 和对硝基苯硬脂酸酯 (pNPS, C₁₈) 购自 Sigma 公司。引物及 DNA 测序委托上海 invitrogen 公司完成。

1.2 *P. vulgaris* T6 脂肪酶基因克隆

根据 GenBank 中已经登录的 *P. vulgaris* 脂肪酶基因 U33845, 设计引物 PVL-F (5'-GGAAG ATCTATGTCAACTAGATATCCAA-3') 和 PVL-R (5'-TGCTCTAGATTACAGCTTTTTACTTGCTAAGA-3'), 扩增脂肪酶基因的编码区。斜体部分分别为 *Bgl* II 和 *Xba* I 酶切位点, 引物退火温度为 50℃。以 *P. vulgaris* 基因组 DNA 为模板, 用 *Pfu* DNA 聚合酶进行 PCR。PCR 产物中加入 *Taq* DNA 聚合酶, 72℃ 反应 10 min 加 A, 再连接到 pMD19-T 上。连接产物在大肠杆菌 DH5α 中克隆后, 重组质粒 pMD-PVL 送至上海 invitrogen 公司测序。具体操作方法参考分子克隆^[7]。

1.3 重组质粒的构建

测序正确的质粒 pMD-PVL 用 *Bgl* II / *Xba* I 双酶切, 酶切片段纯化后与 *Bam* HI / *Nhe* I 双酶切的表达载体 pET-DsbA 及 pMBP-P 连接, 转化大肠杆菌 DH5α 后提取质粒, 通过 PCR 筛选出阳性克隆, 再

测序进一步验证。

1.4 脂肪酶基因的诱导表达及表达条件优化

重组质粒 pET-PVL 和 pMBP-PVL 通过 CaCl₂ 热击法分别转化到 *E. coli* BL21 和 *E. coli* TOP10F' 中。诱导培养后的 BL21 [pET-PVL] 菌体中加入 10 mL 含有 Triton X-100 的 PBS (pH7.4), 超声破碎后的上清液即为胞内表达重组酶液。TOP10F' [pMBP-PVL] 菌体用 30 mmol/L Tris HCl、20% 蔗糖、1 mmol/L EDTA (pH8.0) 悬浮冰浴 10 min 后离心, 沉淀用 5 mmol/L MgSO₄ 悬浮, 离心所得上清即为周质空间表达的重组酶。

为了提高脂肪酶的产量, 对培养基初始 pH、诱导温度、诱导时机、诱导时间、IPTG 浓度、氨苄青霉素 (Amp) 浓度等主要影响因素进行优化, 确定最佳的诱导表达条件。

1.5 脂肪酶活力测定

对外源表达的脂肪酶进行定性定量测定。将 100 μL 酶液加到罗丹明 B 平板 (含有 1% 橄榄油及 0.001% 罗丹明 B 的 LB 固体培养基) 上, 通过产生的透明水解圈来初步判断酶活的有无。酶活的定量测定通过对硝基苯丁酯法^[8], 以每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量定义为 1 个酶活单位 (U)。

1.6 表达产物的分离纯化

用镍离子金属螯合亲和层析纯化表达产物。将重组酶液吸附于镍柱上, 用 30 mmol/L 咪唑溶液 (溶于 50 mmol/L PBS 中) 洗去杂蛋白, 再用 50 - 500 mmol/L 咪唑溶液洗脱, 检测洗脱组分的酶活, 并用 SDS-PAGE 检测纯化产物。

1.7 重组酶酶学性质

在 pH7.4 的 PBS 缓冲液中于不同温度下测定纯化重组脂肪酶的活力, 确定重组脂肪酶最适反应温度。将纯化重组脂肪酶在 PBS 缓冲液中分别于 20 - 60℃ 保温 6 h, 然后测定残余酶活力, 考察重组脂肪酶的温度稳定性。

将纯化重组酶在 pH 6 - 11 的缓冲液中 (Na₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH 6 - 9), Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9 - 11)) 分别测定其脂肪酶活性。将纯化重组脂肪酶在上述缓冲液中室温处理 6 h 后测定残余脂肪酶活力, 考察其 pH 稳定性。

1.8 重组酶催化特异性研究

用薄层层析法 (TLC) 分析酶催化甘油三酯的产物, 从而考察脂肪酶催化脂肪水解的位置特异性。2.5 mL PBS 缓冲液 (pH7.4) 中加入 2 mL 乳化三油酸甘油酯 (终浓度 100 mmol/L) 和 2 mL 酶液, 37℃

温育 4 h 后,用正己烷萃取产物。将 10 μL 反应产物点到硅胶 G 板上(青岛海洋),展层 2 h 左右,展层剂为石油醚:乙醚:乙酸(80:20:0.5)。碘蒸气熏蒸显色。用购自于 Sigma 公司的 1,2-甘油二酯、1,3-甘油二酯、油酸和三油酸甘油酯作为标样,Lipozyme 是已知的 1,3-位置特异性脂肪酶^[9],用作对照。

以不同链长的脂肪酸酯作为底物,检测重组酶对底物的亲和性。取 10 μL 纯化酶液,加入到含各种对硝基苯酯的 PBS 中,40 $^{\circ}\text{C}$ 反应,测定产物对硝基苯酚在 410 nm 处的吸光值。

2 结果和分析

2.1 脂肪酶基因 *PVL* 的克隆及序列分析

通过 PCR 扩增,得到一个约 0.86 kb 的片段,测序验证该片段大小为 864 bp。将该序列在 NCBI 上检索分析,结果显示其序列与 U33845 具有 90% 的相似性,在 GenBank 的登录号为 FJ643627。该基因编码一个含 287 个氨基酸的蛋白质,用 Signal P 软件分析显示该序列不具有可识别的信号肽序列。由基因序列推测的蛋白序列具有脂肪酶的典型特征:即催化中心拥有相似或相同的特征区 GXSXG^[10]。脂肪酶 *PVL* 一级结构保守区 Gly-X-Ser-X-Gly 位于 77-81 位,其中的 Ser 与其余两个活性中心氨基酸,共同组成三连体催化中心 Ser79-Asp232-His254。

2.2 脂肪酶基因 *PVL* 在大肠杆菌内的表达及条件优化

将 *PVL* 基因扩增产物用 *Bgl* II/*Xba* I 双酶切后,与 *Bam* HI/*Nhe* I 双酶切的载体连接,通过克隆并测序验证得到重组表达质粒 pET-DsbA-*PVL* 和 pMBP-*PVL*(图 1)。pET-DsbA 采用 T7 强启动子和 DsbA 基因融合表达,同时选用凝血酶切割位点。DsbA 是近年来发现帮助二硫键形成的重要分子伴侣之一,与 DsbA 融合可实现许多基因的胞内可溶性的高表达(表达量大于 30%),如 IGF-1、IGFBP、EGF、Insulin 等^[11-12]。为了简化表达产物的纯化步骤,该载体添加了 His 标签,使表达产物可以通过 Ni-NTA 层析柱纯化^[13-14]。pMBP-P 采用 *E. coli* *tac* 启动子和分泌型麦芽糖结合蛋白信号肽,同时选用凝血酶切割位点并在 C 端添加 6 个 His 便于采用亲和层析纯化目标蛋白。本实验选用这两种载体来检测 *PVL* 基因在大肠杆菌胞内及周质空间表达的效率。

初步表达试验采用的条件为:在含 5 g/L 葡萄糖和 100 mg/L Amp 的 LB 培养基中发酵,在 OD_{600}

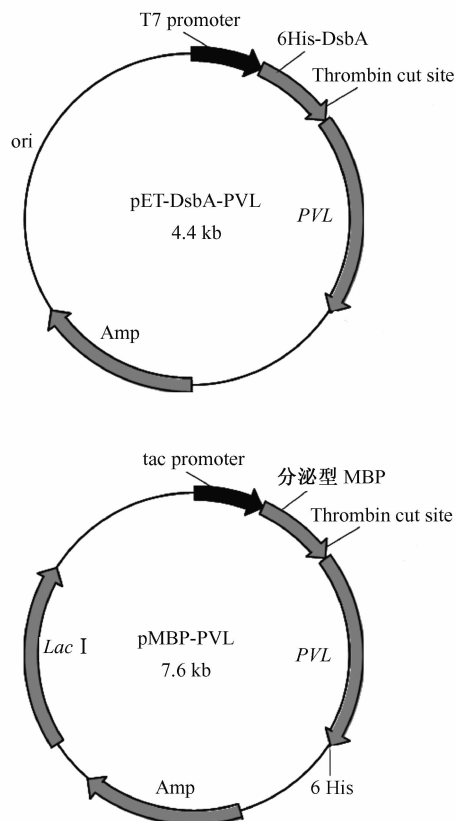


图 1 重组质粒 pET-DsbA-*PVL* 及 pMBP-*PVL* 的物理图谱
Fig. 1 Physical maps of recombinant plasmids pET-DsbA-*PVL* and pMBP-*PVL*.

为 0.6 时加入 100 mg/L IPTG,30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 3 h,收集菌体检测酶活。酶液在罗丹明 B 平板上都能产生明显的水解圈。BL21 [pET-DsbA-*PVL*] 菌体破碎后存在大量的包涵体,酶活约 20 U/mL 发酵液。Top10F' [pMBP-*PVL*] 表达的酶活为 30 U/mL,与野生菌 *Proteus vulgaris* 脂肪酶表达水平相当。当诱导温度降低时 pET-DsbA-*PVL* 包涵体减少,可溶性脂肪酶活力大幅度提高,而 pMBP-*PVL* 的表达量没有显著变化。

本实验对影响表达的主要因素做了优化(图 2),在上述的初步表达实验条件下检测不同温度对诱导表达的影响。在最佳诱导温度下,考察了诱导时机、葡萄糖浓度、Amp 浓度、IPTG 浓度及培养基初始 pH 值对产酶的影响。每考查一个因素时,利用上一个因素的最佳水平做培养条件。由此确定了 pET-DsbA-*PVL* 诱导表达的最佳条件为:在 pH 8.5 的 LB 培养基(含 15 g/L 葡萄糖及 200 mg/L Amp)中, OD_{600} 为 1.2 时,加入 IPTG 至终浓度为 100 mg/L,15 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 15 h,脂肪酶的酶活最高达到 192.2 U/mL,比原始菌株提高 5 倍。外源蛋白表达量占 *E. coli* BL21 胞内总蛋白的 40%。SDS-PAGE 显示,在

55 kDa处有一明显的表达条带,其大小与 DsbA-PVL

融合蛋白理论分子量相符(图 3-A)。

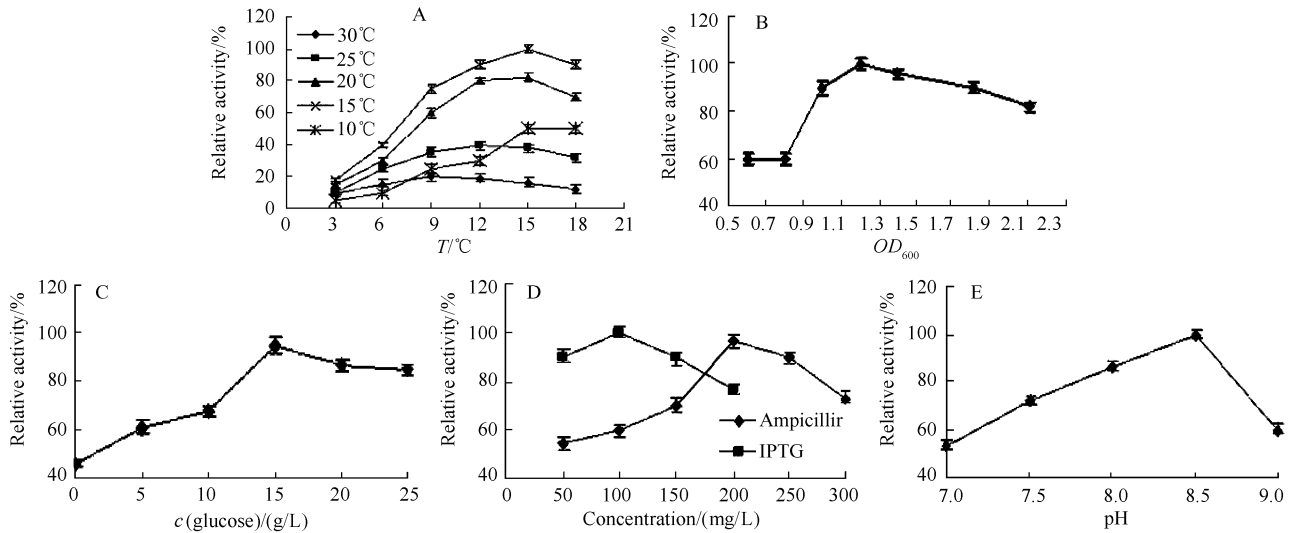


图 2 诱导温度 (A)、添加诱导物的时机 (B)、葡萄糖 (C)、Amp 和 IPTG 的浓度 (D),以及培养基初始 pH 值 (E) 对 pET-PVL 在 BL21 内表达量的影响

Fig. 2 A Effect of growth temperature on recombinant lipase production. The optimal temperature was 15°C. B, Effect of different OD_{600} at induction time on lipase activity. Maximal activity was obtained by adding IPTG at OD_{600} of 1.2. C, Effect of different concentrations of glucose on lipase production. 15 mg/mL glucose was most suitable for promoting lipase yield. D, Effect of different concentrations of IPTG and ampicillin on lipase production. 100 μ g/mL IPTG and 200 μ g/mL Amp were most suitable. E, Effect of different pH of LB on lipase production. The optimal pH was 8.5.

2.3 表达产物的纯化

通过亲和层析的方法,利用 Ni 柱来纯化表达的融合蛋白。将样品加到清洗平衡好的 Ni 柱上,用 50 mmol/L、100 mmol/L 和 150 mmol/L 的咪唑洗脱时,收集液中都能检测到酶活,酶活主要集中在 150 mmol/L 咪唑洗脱液中。对酶活较高的收集液进行 SDS-PAGE 电泳,得到约 55 kDa 的融合蛋白条带,用凝血酶切割 DsbA 分子伴侣后的收集液为一条约 31 kDa 的成熟脂肪酶 PVL(图 3-B)。

2.4 重组酶学性质研究

考察了温度、pH 对纯化后所得纯脂肪酶酶活的影响。结果显示该脂肪酶最适温度为 50°C,在 55°C 以下酶较稳定,50°C 保温 6 h 后,残余酶活超过 80% (图 4-A)。其最适 pH 为 9.0,在 pH 7-10 范围内都比较稳定,残余酶活超过 80% (图 4-B)。该结果与 *P. vulgaris* 野生型脂肪酶基本相同^[4],PVL 基因在 *E. coli* 内可表达出与原酶性质相仿的脂肪酶。

2.5 重组酶催化特异性研究

用薄层层析法分析重组脂肪酶催化的位置选择性。如图 5,该脂肪酶水解产生了 1,3-甘油二酯和 1,2-甘油二酯,而对照 Lipozyme 只能产生 1,2-甘油二酯,说明在 *E. coli* 中表达的脂肪酶能够水解甘油三酯的 3 个酯键,具有催化的位置非特异性。

为了考察重组脂肪酶对脂肪酸链长的选择性,用 10 mmol/L 的对硝基苯乙酯、对硝基苯丁酸酯、对硝基苯癸酸酯、对硝基苯月桂酸酯、对硝基苯棕榈酸酯、对硝基苯硬脂酸酯作为底物,检测重组脂肪酶对不同底物的催化能力,结果如图 6。重组脂肪酶具有较为广泛的底物范围,其中对长链脂肪酸酯的催化效率最高,即对长链脂肪酸有最高的亲和性。

3 讨论

为了提高 *P. vulgaris* T6 所产位置非特异性脂肪酶 (PVL) 的活性,本文研究了该基因在外源宿主中的表达。通过 PCR 扩增、克隆及测序等步骤,得到 PVL 的编码基因,其开放读码框 (ORF) 长 864 bp,编码一个含 287 个氨基酸的酶蛋白。该序列与 GenBank 中已有的 *P. vulgaris* 脂肪酶基因具有 90% 的相似性。

大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚,培养条件简单,培养周期短,质粒稳定性好等优点,适合很多外源基因的表达。脂肪酶基因在大肠杆菌的表达已有很多报道^[15-16],但是脂肪酶基因在大肠杆菌内表达时往往容易形成包涵体^[17-18],需要复杂的包涵体复性过程。本研究选用 pET-DsbA 和 pMBP-P 两个载体,分别研究 PVL 基因在大肠杆菌胞内以及周

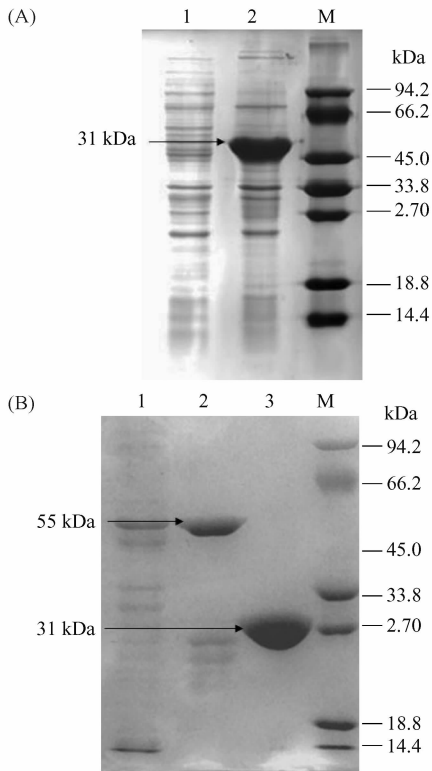


图3 pET-DsbA-PVL 在 BL21 内表达 (A) 及纯化产物 (B) 的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 3 SDS-PAGE of the expression products (A) and its purification (B) of BL21 [pET-DsbA-PVL]. A: 1, Extracts of BL21 with pET-DsbA; 2, Extracts of BL21 with pET-DsbA-PVL; M, marker. B: 1, Extracts of BL21 [pET-DsbA-PVL] cells; 2, Affinitive purified proteins by His-chelating affinity chromatography; 3, Digestion of recombinant protein with thrombin; M, marker.

质空间表达的情况。实验结果显示, PVL 胞内表达也会形成包涵体, 当诱导温度降低时, 包涵体的量会明显下降, 酶活大大提高。在 15°C 诱导时, 几乎不产生包涵体, 每毫升发酵液的酶活达到近 200 U。pMBP 载体利用麦芽糖分泌信号肽, 可以将 PVL 基因表达产物成功引入周质空间, 但是表达水平较低, 可能与启动子的效率、信号肽的效率及质粒的拷贝数等因素有关。pMBP-PVL 的成功表达显示该载体可以作为该基因的定点突变及定向进化等研究的备用载体。

本文还研究了影响脂肪酶基因在 *E. coli* BL21 内表达的主要因素, 对其进行了优化, 确定表达最佳条件, 即: 在 pH 8.5、含 15 g/L 葡萄糖及 200 mg/L Amp 的 LB 培养基中, 培养至 OD_{600} 为 1.2 时, 加入 IPTG 至终浓度为 100 mg/L, 15°C 诱导培养 15 h, 脂肪酶的酶活达到 192.2 U/mL, 比原始菌株提高 5 倍多。

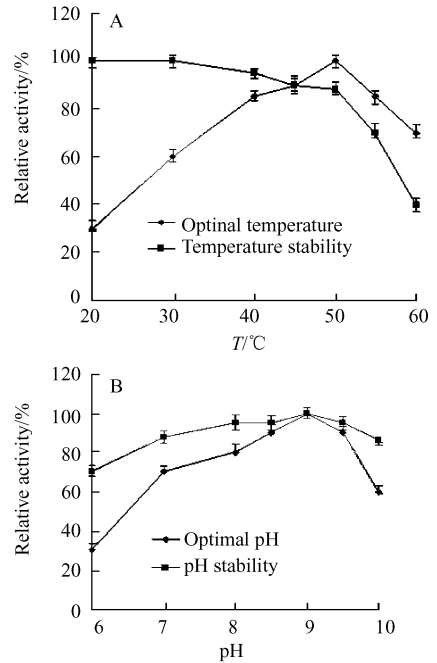


图4 温度 (A) 和 pH (B) 对重组脂肪酶活力和稳定性的影响

Fig. 4 Effects of temperature (A) and pH (B) on activity and stability of the lipase expressed in *E. coli*.

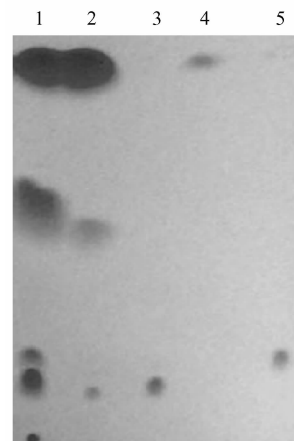


图5 纯化重组脂肪酶催化的位置特异性

Fig. 5 Thin-layer chromatography of the hydrolysis products obtained after triolein catalysis by the lipase from BL21 [pET-PVL] cells. 1, The hydrolysis products of triolein catalyzed by lipase from BL21 [pET-PVL] cells; 2, The hydrolysis products of triolein catalyzed by Lipozyme; 3, 1, 2-diolein; 4, triolein; 5, 1, 3-diolein.

用 Ni 柱亲和层析的方法对表达的 DsbA-PVL 进行了纯化, 并且切除了分子伴侣 DsbA, 得到了电泳纯的 PVL 蛋白。对该蛋白进行酶学性质研究, 结果显示外源表达的脂肪酶与原酶在温度、pH、催化

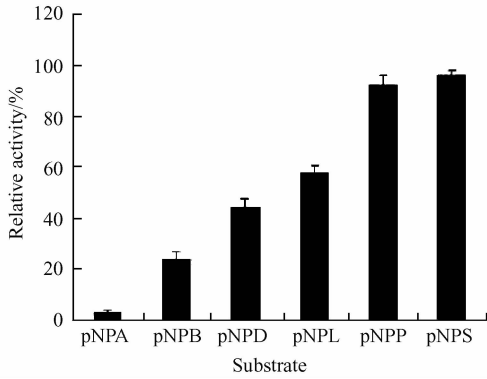


图6 重组脂肪酶对不同链长脂肪酸酯的催化活性

Fig. 6 Hydrolysis activity of PVL to some fatty acid esters of different chain length.

特异性方面很相似,几乎保留了原酶的性质,适用于脂肪的彻底水解反应。

本研究所取得的结果为进一步研究、改造脂肪酶 PVL, 实现大规模发酵生产奠定了基础。

参考文献

- [1] Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysis: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, 1999, 53: 315 – 351.
- [2] Boland W, Frobl C, Lorenz N. Esterolytic and Lipolytic Enzymes in Organic Synthesis. *Synthesis*, 1991, 12: 1049 – 1072.
- [3] Pandey A, Benjamin S, Soccol R. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, 29: 119 – 131.
- [4] 房耀维. *Proteus vulgaris* T6 脂肪酶分子定向进化研究. 南京农业大学博士学位论文, 2006.
- [5] Kim HK, Lee JK, Kim H, Oh TK. Characterization of an alkaline lipase from *Proteus vulgaris* K80 and the DNA sequence of the encoding gene. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 135: 117 – 121.
- [6] Lee HW, Yoon SJ, Kim HK, Park KM, Oh TK, Jung JK. Overexpression of an alkaline lipase gene from *Proteus vulgaris* K80 in *Escherichia coli* BL21/pKLE. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 1543 – 1547.
- [7] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] Lee DW, Koh YS, Kim KJ, Kim BC, Choi HJ, Kim DS, Suhartono MT, Pyun YR. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 179: 393 – 400.
- [9] Rahman RNZRA, Baharum SN, Basri M, Salleh AB. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. *Analytical Biochemistry*, 2005, 341: 267 – 274.
- [10] Pleiss J, Fischer M, Peiker M, Thiele C, Schmid RD. Lipase engineering database understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, 10: 491 – 508.
- [11] Qiu J, Swartz JR, Georgiou G. Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Applied and Environment Microbiology*, 1998, 64 (12): 4891 – 4896.
- [12] Zhang Y, Olsen DR, Nguyen KB, Olson PS, Rhodes ET, Mascarenhas D. Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purification*, 1998, 12 (2): 159 – 165.
- [13] Jaroslaw O, Krzysztof K, Pawe? S. Construction, purification, and functional characterization of His-tagged *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purification*, 2006, 46: 309 – 315.
- [14] Nils HS, Karsten N, Dietmar S. Expression, purification, and aggregation studies of His-tagged thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Protein Expression Purification*, 2004, 34: 103 – 110.
- [15] Cho AR, Yoo SK, Kim EJ. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 186: 235 – 238.
- [16] Lorenzo MD, Hidalgo A, Haas M, Bornscheuer UT. Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli*. *Applied and Environment Microbiology*, 2005, 71: 8974 – 8977.
- [17] Ogino H, Katou Y, Akagi R, Mimitsuka T, Hiroshima S, Gemba Y, Doukyu N, Yasuda M, Ishimi K, Ishikawa H. Cloning and expression of gene, and activation of an organic solvent-stable lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Extremophiles*, 2007, 11: 809 – 817.
- [18] Traub PC, Schmidt-Dannert C, Schmitt J, Schmid RD. Gene synthesis, expression in *E. coli*, and in vitro refolding of *Pseudomonas* sp. KWI 56 and *Chromobacterium viscosum* lipases and their chaperones. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55: 198 – 204.

Cloning and expression of non-position-specific lipase gene from *Proteus vulgaris*

Yaping Lu^{1,2}, Jing Gu¹, Yanchong Tang², Fengxia Lv², Xiaomei Bei², Zhaoxin Lu^{2*}

(¹College of Life Sciences, ²College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [**Objective**] To produce *Proteus vulgaris* lipase (PVL) in large quantities, we cloned and expressed the lipase gene in *Escherichia coli*. [**Methods**] We cloned PVL gene by PCR method and then inserted the open reading frame of PVL gene into pET-DsbA and pMBP-P vectors. PVL gene was expressed in *E. coli* with the introduction of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). We also studied the optimal culture conditions, including the concentrations of glucose, IPTG and ampicillin, induction temperature, and pH value of the medium. The characteristics of recombinant lipase were examined after affinitive purification by His-chelating affinity chromatography. [**Results**] The open reading frame of PVL gene consisted of 864 base pairs, encoding a protein of 287 amino acids. The sequence was deposited to GenBank with the accession number FJ643627. The gene was expressed in *E. coli* and active lipase was obtained from *E. coli* BL21 cells by the induction of IPTG, and the lipase production reached 192.2 U/mL in BL21 [pET-PVL] after culture for 15 h at 15°C. The maximum production was obtained by culturing BL21 cells in LB medium (pH8.5) with 15 mg/mL glucose and 200 mg/L ampicillin, as well as adding 100 mg/L IPTG at OD_{600} of 1.2. A single protein band of 31 kDa was displayed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) after affinitive purification. The properties of lipase expressed in *E. coli* were similar to the native one, which could hydrolyze all three esters of triglyceride. [**Conclusion**] We have succeeded in over-expressing the lipase gene from *P. vulgaris* in *E. coli*, and this research has laid a foundation for improvement and industrial application of this lipase.

Keywords: *Proteus vulgaris* lipase; gene cloning; prokaryotic expression; non-positional specificity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2008AA10Z309), the High-Tech Development Program of Jiangsu Province (BE2008308) and the Natural Science Fund of Jiangsu Province (BK2007160)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84396583; E-mail: fmb@njau.edu.cn

Received: 29 November 2009/Revised: 22 January 2010

《微生物学报》综述文章投稿要求

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,本刊提出以下几点要求,欢迎大家根据要求踊跃投稿。

1. 本刊主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 综述的选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 参考文献应控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
5. 应结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
6. 欢迎投送"能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义"的述评类文章。