

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(5):634-640; 4 May 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 拆分获得(S)-酮基布洛芬脂肪酶基因在枯草芽孢杆菌中的克隆与表达

赵运英<sup>1</sup>, 刘瑞恩<sup>1</sup>, 许丽娟<sup>1</sup>, 史斐斐<sup>1</sup>, 赵玉红<sup>1</sup>, 王善韦<sup>2</sup>, 张金红<sup>1\*</sup>

(南开大学,<sup>1</sup> 生命科学学院,<sup>2</sup> 化学学院, 天津 300071)

**摘要:**【目的】筛选具有不对称拆分消旋酮基布洛芬氯乙酯能力的脂肪酶基因, 构建其表达分泌型工程菌, 并进一步提高该脂肪酶的立体选择性。【方法】以自筛选出的一株具有不对称拆分消旋酮基布洛芬氯乙酯能力的菌株 NK13 为材料, 通过构建其基因组文库, 筛选具有不对称拆分消旋酮基布洛芬氯乙酯能力的脂肪酶基因。通过构建该脂肪酶基因的分泌型诱导表达载体 pHY300-plk-sacR-gene, 将其转入枯草芽孢杆菌 WB600, 获得基因重组菌 WB600 (pHY300-plk-sacR-gene)。用 SDS-PAGE 检测其表达和转化情况, 采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法纯化脂肪酶; 并利用 TLC 和 HPLC 检测该酶的立体选择专一性。【结果】得到了具有专一性拆分获得(S)-酮基布洛芬能力、长度为 633 bp 的脂肪酶基因 (GenBank 登录号为: EU381317)。该脂肪酶在枯草芽孢杆菌 WB600 中得到了分泌表达。TLC 和 HPLC 检测结果显示, 纯化的脂肪酶对底物转化 40 h 时转化率为 30%, 生成(S)-酮基布洛芬的 e. e. % 值最高, 达 60.02%, 与未加 Tween-80 的枯草芽孢杆菌转化子体系相同。而在含 Tween-80 的环境下, 枯草芽孢杆菌表达重组菌对底物转化 36 h 时转化率约为 45%, 生成(S)-酮基布洛芬的 e. e. % 值最高, 达 93.64%, 是野生菌 NK13 的 16 倍。【结论】从 NK13 号菌株中筛选得到的新的脂肪酶具有很高的不对称拆分获得(S)-酮基布洛芬的能力, 实现了 NK13 菌中 633 bp 脂肪酶基因在枯草芽孢杆菌中的分泌表达, 研究证明 Tween-80 能提高该脂肪酶的拆分专一性。

**关键词:** 脂肪酶; 诱导表达; 手性拆分; (S)-酮基布洛芬

**中图分类号:** Q814      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0634-07

酮基布洛芬和萘普生是 2-芳基丙酸类药物家族的主要成员, 是目前处方药和非处方药处方量最大的一类药物之一。因其  $\alpha$  位有一个手性碳原子, 所以存在一对光学对映体 (S-构型和 R-构型)。酮基布洛芬的 (S)-异构体具有较强的消炎止痛作用<sup>[1]</sup>。与其他 2-芳基丙酸类药物不同的是, 酮洛芬的 (R)-异构体也具有药用价值, 它对牙周病的骨质疏松有治疗作用, 可添加于牙膏<sup>[2]</sup>。

化学方法合成的手性药物一般为外消旋体, 用

不同的方法拆分获得的光学纯药物能够提高药效和降低毒性。微生物酶立体选择性水解消旋的 2-芳基丙酸酯可以得到 (S)-2-芳基丙酸<sup>[3]</sup>, 该法制备单一对映体手性化合物具有立体专一性强、拆分效率高、生产条件温和、无环境污染等诸多优点, 已成为近年来研究的热点<sup>[4-5]</sup>。

本实验室前期自筛选得到的一株具有不对称拆分消旋酮基布洛芬氯乙酯的野生菌 *Bacillus megaterium* NK13 中, 存在几种能够拆分外消旋酮基

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (05YFJMJC01100)

\* 通信作者。Tel: +86-22-23508233; E-mail: jinhzhang@nankai.edu.cn

作者简介: 赵运英 (1983-), 女, 山东济南人, 硕士研究生, 研究方向为酶学及酶工程。E-mail: yunying1213@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-09-10; 修回日期: 2010-02-01

布洛芬氯乙酯的酶<sup>[6]</sup>。通过构建 NK13 基因组文库,筛选得到了其中一个新的脂肪酶基因。将该基因与果聚糖蔗糖酶基因(*sacB* 基因)的启动子-信号肽序列(称为 *sacR*)构建能诱导表达的外泌型重组载体,并进一步研究了外泌酶的拆分能力,从而为光学纯 2-芳基丙酸类药物的生产提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** pMD19-T simple vector, 购自 TaKaRa 公司; 各种限制性内切酶, DNA Marker, 碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase), T<sub>4</sub> DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶, DNA 凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 溶菌酶, RNase, 蛋白酶 K, 购自北京鼎国生物技术公司; 电转化仪为 BioRad 公司生产; Water 600E 型高效液相色谱仪为 Dikma 公司生产; PCR 仪为 ASTEC-BIO 公司生产; 紫外检测仪为上海顾村光电仪器厂。

**1.1.2 菌株和质粒:** *Bacillus megaterium* NK13 菌株, 本实验室从生产奈普生药厂附近的土壤中分离得到; pUC18, 本实验室保存; *E. coli* DH5 $\alpha$ , 本实验室保存; 枯草芽孢杆菌 AS I. 1176, 高才昌教授、张秀明老师惠赠; 枯草芽孢杆菌受体菌 WB600、pHY300-plk 质粒, 购自中国高校工业微生物资源数据平台; pET-NK-lipase 质粒, 本实验室构建。

**1.1.3 培养基:** LB 培养基用于菌体的培养, SOC 培养基用于转化后菌体复苏。NK13 菌株液体培养基: 葡萄糖: 1.2%; 蛋白胨: 0.5%; NaCl: 1%; pH7.0。

### 1.2 脂肪酶基因的筛选

*Sau*3AI 部分酶切 NK13 基因组 DNA, 琼脂糖凝胶回收 2-4 kb DNA 片段, 质粒 pUC18 经 *Bam*H I 酶切后用去磷酸化酶(CIAP)处理。回收 DNA 片段和酶切后的去磷酸化载体以 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接后, 用电转化方法<sup>[7]</sup>转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 涂布在含有三丁酸甘油酯和罗丹明 B 的 Amp 抗性 LB 平板上培养, 构建基因文库, 筛选有水解圈的阳性克隆(pUC-NK 质粒), 送 TaKaRa 公司进行测序。

### 1.3 诱导型表达分泌载体的构建

**1.3.1 脂肪酶基因的 PCR 扩增:** 根据该脂肪酶基因的测序结果设计引物: 上游引物(5'-CCGCTCGAGGAAGCAAACCATAATCCG G-3')和下游引物(5'-CGGGATCCGAGCCTGTCTTGTCCAAC-3'), 并分别引入 *Xho* I 和 *Bam*H I 两个酶切位点。以 pUC-NK 质粒为

模板, 通过 PCR 扩增成熟脂肪酶的基因序列。PCR 条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 10 min。

**1.3.2 *sacB* 基因启动子及信号肽序列(*sacR*)的 PCR 扩增:** 根据已发表的 *sacB* 基因<sup>[8]</sup>的全序列设计引物, 上游引物(5'-CGGGATCCAAAGCTTATCA CATATACCTGCCG-3')引入 *Bam*H I、*Hind*III 的酶切位点, 下游引物(5'-CTGCAGACTCGAGCGCAAACGCTTGA GTTGC-3')引入 *Pst* I、*Xho* I 的酶切位点。以枯草芽孢杆菌 AS I. 1176 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *sacR* 序列。PCR 条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 10 min。

**1.3.3 诱导分泌型载体的构建过程:** pHY300-plk-*sacR*-gene 载体的构建过程见图 1。首先将 PCR 扩增得到的 *sacR* 进行 T-A 克隆, 然后用 *Hind* III 和 *Pst* I 双酶切阳性 T-A 克隆质粒和 pUC18 质粒, 将 *sacR* 片段克隆入 pUC18 载体中。*Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切 pUC18-*sacR* 阳性克隆质粒和脂肪酶基因的 PCR 扩增产物, 分别回收两种 DNA 片段后进行连接反应, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 构建 pUC18-*sacR*-gene。提取 pUC18-*sacR*-gene 质粒和 pHY300-plk 质粒, 分别用 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切后回收 pHY300-plk 质粒和酶切后的 1200 bp 的 *sacR*-gene 两种 DNA 片段, 连接并转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。提取转化子单菌落质粒, 双酶切法电泳检测鉴定阳性转化子。提取 pHY300-plk-*sacR*-gene 质粒, 用化学法<sup>[9-10]</sup>转化枯草芽孢杆菌 WB600, 获得枯草芽孢杆菌 WB600 转化子(重组菌)。

枯草芽孢杆菌基因组 DNA 的提取、质粒的提取、*E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞的氯化钙法制备和转化、DNA 片段的酶切、回收和连接等操作均按分子克隆实验指南<sup>[11]</sup>及相应产品说明书进行。

### 1.4 表达产物的鉴定

挑取阳性重组子 37 °C 培养 12 h 后按 5% 接种量转入 LB 培养基中, 37 °C, 250 r/min 培养 2 h 后加入蔗糖溶液至终浓度为 2% 进行诱导培养。培养 24 h 后, 取 1 mL 菌液离心后分别收集上清和菌体。上清液用反透析法进行浓缩, 菌体先加溶菌酶进行破壁, 然后分别将两者与上样缓冲液混合, 沸水浴 5-10 min 后用 SDS-PAGE 鉴定表达产物。同时, 采用乙酸对硝基苯酯法对发酵液中的脂肪酶活性进行检测。

### 1.5 脂肪酶的纯化

挑取 pET 转化子接种于 LB 液体培养基, 37 °C、

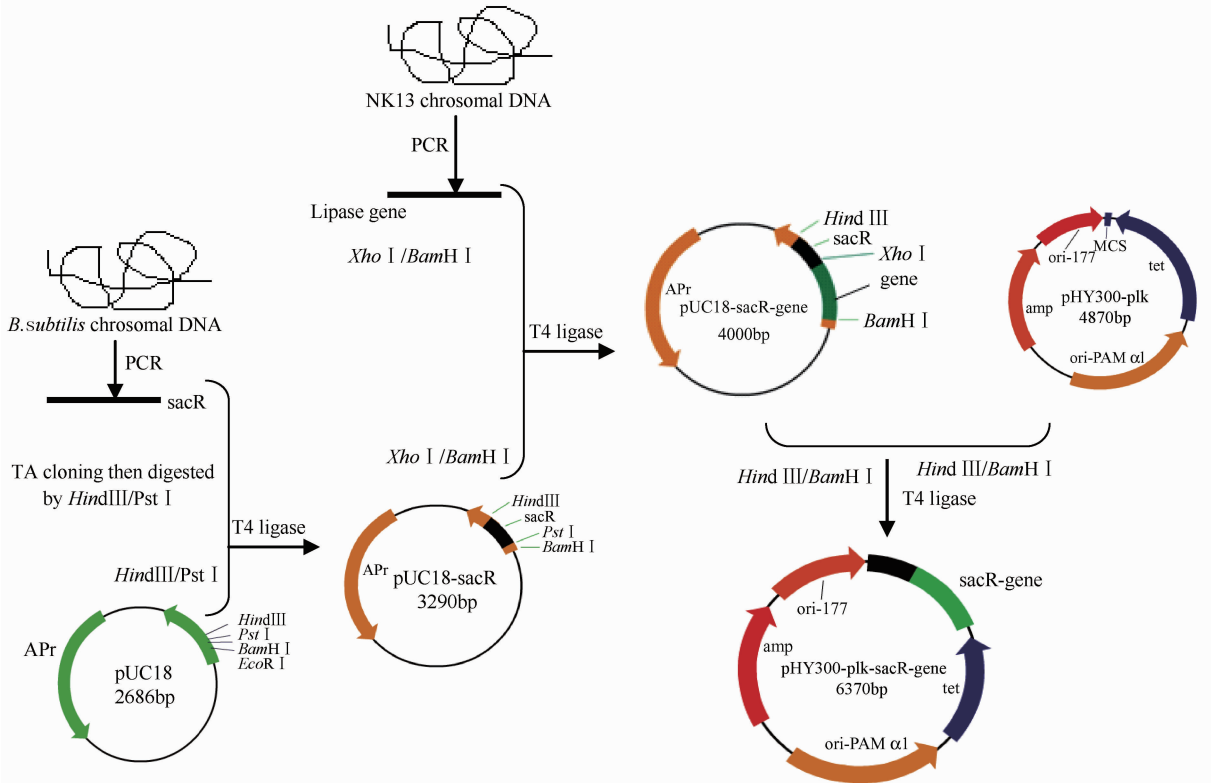


图1 诱导分泌型载体的构建

Fig. 1 Construction of the inducible secretion vector.

160 r/min 培养 12 h 后转接二级, 培养至  $OD_{600} = 0.6$  时, 加 IPTG 诱导。超声波法破碎经 IPTG 诱导 4 h 的 pET 转化子菌体, 得 pET 转化子粗酶液。采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法纯化 pET 转化子粗酶液中的脂肪酶, 并进行底物的转化, 以 TLC 和 HPLC 检测转化率和产物的光学纯度。

### 1.6 薄层层析法检测脂肪酶对酮基布洛芬氯乙酯转化率

重组子诱导培养 13 h 后, 加入酮基布洛芬氯乙酯(终浓度 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 间隔 2 h 取出一份加入盐酸和乙酸乙酯萃取, 取有机相, 进行薄层层析 (TLC), 紫外下观察并计算转化率。

用毛细管分别吸取待测样品, 点样于硅胶板, 以酮基布洛芬及酮基布洛芬氯乙酯为标准样品对照, 在石油醚: 乙酸乙酯: 乙酸 = 90: 10: 0.5 (体积比) 的溶剂系统中上行展开。通风橱自然挥发溶剂, 紫外分析仪下观察转化结果。其中, 硅胶板为: 60 GF254 硅胶与 0.25% 羧甲基纤维素钠水溶液以 1: 3 (M: V) 的比例研磨后铺制。

本实验室前期构建的 pET 转化子, 用 IPTG 诱导 4 h 后加入底物, 在相同条件下进行检测。

### 1.7 高压液相色谱 (HPLC) 检测产物光学纯度

分别将层析板上与酮基布洛芬对应的点挖下放

到离心管中, 再加 1 mL 乙酸乙酯充分振荡提取; 12000 r/min 离心 10 min 后取上清液作为 HPLC 检测样品。在 CHIROBIOTIC V 柱上, 以四氢呋喃: 柠檬酸 + 柠檬酸钠 (pH6.3, 0.05 mol/L) = 10: 90 缓冲液为流动相检测酮基布洛芬的光学纯度 (e. e. 值)。进样量 20  $\mu\text{L}/\text{次}$ , 流速 1 mL/min, 检测波长为 260.4 nm。

## 2 结果

### 2.1 脂肪酶基因的筛选

从构建的基因文库中筛选得到一株具有水解三丁酸甘油酯能力的阳性克隆, 测序结果显示阳性克隆质粒中插入的外源片段长度为 2826 bp, 其中 633 bp 的 ORF 编码的氨基酸序列含有脂肪酶的保守序列 G/A-X-S-X-G (该酶为 AHSMG) 和信号肽, 将其碱基序列与 NCBI 的 GenBank 数据库中的基因序列进行比对, 没有发现同源性序列; 又将其编码的氨基酸序列与 NCBI 中 GenBank 数据库中的蛋白质序列进行比对, 发现其与 *Bacillus subtilis* 的 esterase (GenBank 登录号为 NP388716) 的同源性最高, 仅为 85%, 说明该基因为一新的脂肪酶基因 (GenBank 登

录号为 EU381317)。

## 2.2 脂肪酶的表达及蛋白检测

将获得的枯草芽孢杆菌 WB600 重组菌诱导培养后的发酵液 4 ℃ 离心收集上清液采用 SDS-PAGE 方法进行分析,同时以菌体沉淀和带有空质粒的宿主菌作对照,结果如图 2 所示。从电泳图谱看到目的蛋白分子量约为 20 kDa(泳道 1),而对对照菌株此处无蛋白带,说明脂肪酶基因在 *sacR* 的引导下实现了分泌表达。

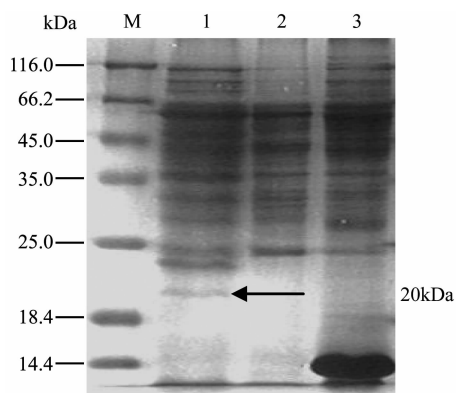


图 2 *B. subtilis* WB600 中表达的脂肪酶的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of lipase gene expressed in *B. subtilis* WB600. M: Protein Marker (SM0431); 1: Culture supernatant of *B. subtilis* WB600 harboring lipase; 2: Control culture supernatant of *B. subtilis*; 3: Cell proteins of *B. subtilis* WB600 secreting lipase treated with lysozyme.

发酵液的酶活力测定结果显示酶活最高出现在诱导培养后的 18 h,此时酶比活力高达  $8.08 \times 10^2$  U/mg,酶比活力较粗酶提高了约 16 倍,进一步说明该脂肪酶基因成功分泌到了细胞外。

## 2.3 枯草芽孢杆菌 WB600 重组菌对酮基布洛芬氯乙酯的手性拆分

2.3.1 枯草芽孢杆菌 WB600 重组菌在不含 Tween-80 的环境下转化酮基布洛芬氯乙酯:转化结果如图 3 所示,结果说明枯草芽孢杆菌转化子和 pET 转化子对酮基布洛芬氯乙酯转化率都随时间的延长而提高。

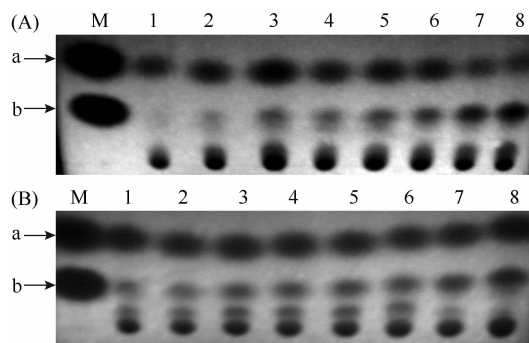


图 3 未加 Tween-80 时转化子中脂肪酶对酮基布洛芬氯乙酯的转化结果

Fig. 3 The transformal result for ketoprofen chloroethyl ester when there is no Tween-80. a: ketoprofen chloroethyl ester; b: ketoprofen. (A): The transformal result of WB600 recombinant M: Marker; 1-8: the transformed products at 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 20 h. (B): The transformal result of pET recombinant M: Marker; 1-8: the transformed products at 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 20 h.

TLC 分别回收两种转化子的转化产物,进行 HPLC 检测。综合分析 TLC 和 HPLC 的检测结果显示枯草芽孢杆菌表达重组菌对底物的转化率在 10 h 达 33%,生成(S)-酮基布洛芬的 e. e. % 值最高,达 60.52%;相同条件下,pET 表达重组菌 6 h 的转化率达到 25%,生成(S)-酮基布洛芬 e. e. % 值最高,达 85.24%;二者同 NK13 粗酶液的最高 5.84% 的 e. e. % 相比,分别高出 9 倍和 13 倍。

表 1 未加 Tween-80 时的脂肪酶表达菌株对酮基布洛芬氯乙酯的转化效率和 ee 值

Table 1 The result of transformation and enantiomeric excess when there is no Tween-80

Strains	<i>Bacillus subtilis</i> WB600 recombinant				<i>Escherichia coli</i> BL21 recombinant				
Conversion time/ h	8	10	12	14	4	6	8	10	20
Conversion rate/ %	28	33	40	60	15	25	30	38	56
e. e. %	40.12	60.52	46.20	30.58	81.28	85.24	82.80	72.48	54.06

2.3.2 枯草芽孢杆菌 WB600 重组菌在含 Tween-80 的环境下转化酮基布洛芬氯乙酯:枯草芽孢杆菌转化子用蔗糖诱导培养 10 h 时,加入终浓度为 1% 的 Tween-80 后继续培养 3 h,按照不含 Tween-80 环境的相同条件进行转化;pET 转化子用 IPTG 诱导 2 h 后加入终浓度为 1% 的 Tween-80,再继续培养 2 h,

相同条件下对酮基布洛芬氯乙酯进行转化。两种转化子中含 Tween-80 的体系下转化酮基布洛芬氯乙酯的 TLC 和 HPLC 检测结果如图 4 和表 2。

两种转化子在 Tween-80 转化体系下的结果显示,枯草芽孢杆菌表达重组菌对底物转化 36 h 时转化率约为 45%,生成(S)-酮基布洛芬的 e. e. % 值最

高,达 93.64%;相同条件下 pET 表达重组菌 8 h 时转化率接近 30%,生成(S)-酮基布洛芬 e. e. % 值最高达到 88.12%。

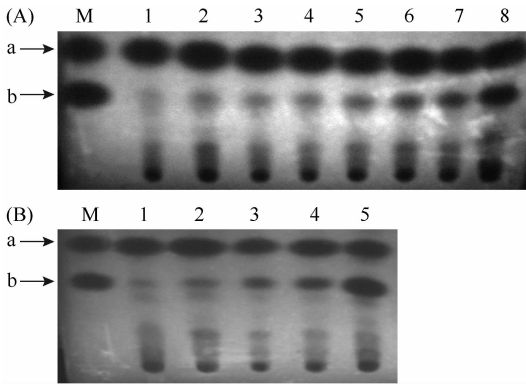


图 4 加 Tween-80 时转化子中脂肪酶对酮基布洛芬氯乙酯的转化结果

Fig. 4 The transformal result for ketoprofen chloroethyl ester when there is Tween-80. a: ketoprofen chloroethyl ester; b: ketoprofen. (A): The transformal result of WB600 recombinant M: Marker; 1-8: the transformed products at 15 h,18 h,21 h,24 h,27 h,30 h,33 h,36 h. (B): The transformal result of pET recombinant M: Marker; 1-5: the transformed products at 4 h,6 h,8 h,10 h,20 h.

结果说明,含有 1% Tween-80 的转化体系能显著提高枯草芽孢杆菌表达重组菌拆分获得的(S)-酮基布洛芬的光学纯度,但 Tween-80 的加入对 pET 转化子的转化率和(S)-酮基布洛芬光学纯度影响不大。

## 2.4 脂肪酶的纯化及对酮基布洛芬氯乙酯的拆分

2.4.1 脂肪酶的纯化:将非变性 PAGE 纯化后的脂肪酶进行 SDS-PAGE 检测,结果如图 5。

从图 5 的泳道 3 可以看出,通过非变性 PAGE 制备的脂肪酶已经成功得到纯化。

2.4.2 纯化的脂肪酶对底物的转化:用纯化的脂肪酶对底物酮基布洛芬氯乙酯进行转化。分别在转化 16 h、40 h、64 h 后取出样品进行 TLC 和 HPLC 检测,结果如图 6 和表 3。从图 6 和表 3 可以看出,纯化的脂肪酶对底物酮基布洛芬氯乙酯转化 40 h 时转化率为 30%,e. e. % 值最高,达 60.02%。这同枯草芽孢杆菌转化子在不含 Tween-80 的体系中对底物的转化相同,并且在 64 h 时转化率为 40%,e. e. % 值仍然保持在较高的 58.88%。

表 2 加 Tween-80 时的脂肪酶表达菌株对酮基布洛芬乙酯的转化效率和 ee 值

Table 2 The result of transformation and enantiomeric excess when there is Tween-80

Strains	<i>Bacillus subtilis</i> WB600 recombinant				<i>Escherichia coli</i> BL21 recombinant			
Conversion time/ h	27	30	33	36	6	8	10	20
Conversion Rate/ %	20	30	36	45	15	30	38	61
e. e. %	71.48	73.29	83.33	93.64	81.2	88.12	81.58	79.34

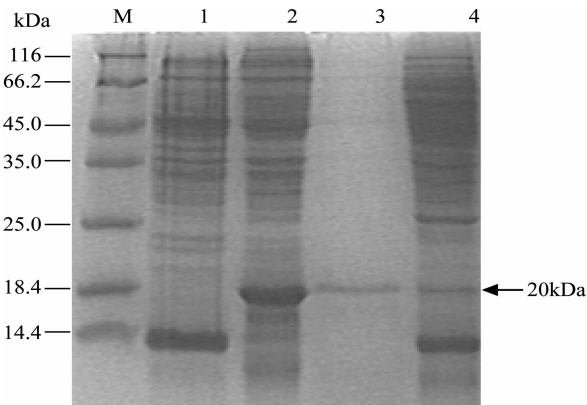


图 5 纯化的脂肪酶的 SDS-PAGE

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified lipase. M: Protein Marker (SM0431); 1: Cell proteins of *E. coli* BL21 with plasmid pET treated with lysozyme; 2: Crude enzymes of pET recombinant treated with ultrasonic; 3: Purified lipase; 4: Cell proteins of NK13 treated with lysozyme and ultrasonic.

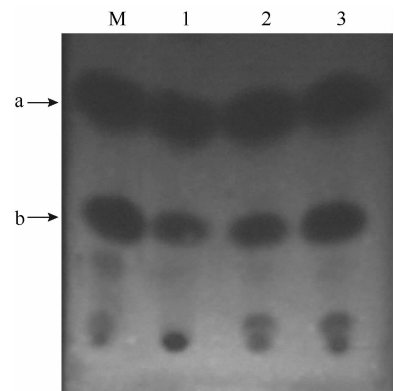


图 6 纯化的脂肪酶对酮基布洛芬乙酯的转化结果

Fig. 6 The transformal result for ketoprofen chloroethyl ester by purified lipase. a: ketoprofen chloroethyl ester; b: ketoprofen; M: Marker. 1-3: the transformed products at 16 h,40 h,64 h.

表3 纯化脂肪酶对酮基布洛芬乙酯的转化效率和 ee 值

Table 3 The transformation and enantiomeric excess of ketoprofen chloroethyl ester by purified lipase

Conversion time/ h	16	40	64
Conversion rate/ %	25	30	40
e. e. %	8.60	60.02	58.88

### 3 讨论

脂肪酶(lipase, EC3. 1. 1. 3)属于丝氨酸水解酶,是一类能在油水界面上水解甘油三酯酯键的酶的总称,广泛应用于食品、生物医药、化工、化妆品以及生物柴油等传统与现代工业<sup>[12,13]</sup>。酶法拆分中多使用水解酶类,其中脂肪酶(lipase, EC3. 1. 1. 3)应用较多。在非水相手性药物合成中,脂肪酶能催化酯水解、酯交换、氨解等反应,可拆分外消旋醇类、酸类、酯类和胺类,已成为制备光学纯手性药物的重要手段<sup>[14]</sup>。国外对脂肪酶的研究报道较多,而国内这方面的研究起步较晚,不同微生物产的脂肪酶在酶活、酶学性质及应用领域等方面都存在很大的差异。

本实验室前期的研究结果显示,NK13 野生菌中可能存在几种不同拆分能力的酯酶/脂肪酶<sup>[6]</sup>,几种酶的综合作用造成了该菌株的高转化率低光学纯度(5.84%)。前期已在NK13中获得了拆分得到(S)-ketoprofen 过量的酯酶基因(DQ196347),该酯酶基因的 pET 表达重组子转化得到(S)-酮基布洛芬过量最高达到 55.46%,是野生菌的 10 倍;本文研究的脂肪酶(GenBank 登录号为 EU381317)是从NK13 菌株中获得的第二个具有不对称拆分外消旋酮基布洛芬氯乙酯能力的酶,该脂肪酶基因的 pET 表达重组子转化得到(S)-酮基布洛芬过量最高达到 85.24%。

由于酮基布洛芬氯乙酯粘度大、难溶于水,所以反应速度受到严重限制。研究者试图通过添加不同表面活性剂提高脂肪酶催化活性。已有相关文献报道<sup>[15]</sup>不同的表面活性剂对脂肪酶的活性和立体选择性具有不同的影响,其中 Triton X-100 和 Tween-80 对提高脂肪酶的活性和立体选择性都具有明显的促进作用。我们的研究表明,转化体系中含有

1% Tween-80 可以显著改善立体选择性,使生成的(S)-酮基布洛芬的光学纯度达 93% 以上;进一步优化转化条件,必将为用工程菌生产(S)-酮基布洛芬提供重要的科学依据。

### 参考文献

- [1] Hutt AJ, Caldwell J. The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Pharmacokin*, 1984, 9:371.
- [2] Famaey J P, Paulus HE. Therapeutic Applications of NSAIDs. New York: Marcel Dekker, 1992.
- [3] 胡艾希,曹声春,董先明,文凌飞. 2-芳基丙酸类消炎药的酶催化拆分研究进展. 中国医药工业杂志(*Chinese Journal of Pharmaceuticals*), 2001, 6(32): 284-287.
- [4] Wang YH, Li QS, Zhang ZM, Ma JT, Feng Y. Solvent effects on the enantio-selectivity of the thermophilic lipase QLM in the resolution of (R,S)-2-octanol and (R,S)-2-pentanol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 56(2-3):146~150.
- [5] Li N, Keiji S. Performance of an emulsion enzyme membrane reactor combined with premix membrane emulsification for lipase-catalyzed resolution of enantiomers. *Journal of Membrane Science*, 2008, 314(1-2): 183-192.
- [6] Zhang JH, Guan R, Tan ZL, Yu YT, Hou ZB, Qi Z, Wang SW. Purification and properties of Lipases/Esterases from a bacillus strain for enantioselective resolution of (S)-Ketoprofen. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 2005, 33(4):435~445.
- [7] Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 精编分子生物学实验指南, 颜子颖,王海林译.北京:科学出版社,2001.
- [8] Michel S, Dominique L C. *Mol Gen Genet*, 1985, 200:220~228.
- [9] Harwood CR, Cutting SM. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. 1<sup>st</sup> ed. London: Wiley-Interscience Publication, 1990.
- [10] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *B. subtilis* by deoxyribonucleate.
- [11] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南, 第3版. 黄培堂等译.北京:科学出版社,2002.

- [12] Proceeding of National Academy of Science USA, 1958, 44(3):1072-1078.
- [13] Bei JL, Wang JW, Wang XZ, Long QX, Yang L, Deng YY. High expression of LIP1 in *Pichia pastoris*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003, 35(4):366-370.
- [14] Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4):390-397.
- [15] Ghanem A, Aboul-Enein HY. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymm*, 2004, 15(21):3331-3351.
- [16] Kim GJ, Choi GS, Kim JY, Lee JB, Jo DH, RYU YW. Screening, production and properties of a stereospecific esterase from *Pseudomonas* sp. S34 with high selectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 17:29-38.

## Cloning and expression of a lipase gene in *Bacillus subtilis*

Yunying Zhao<sup>1</sup>, Ruien Liu<sup>1</sup>, Lijuan Xu<sup>1</sup>, Feifei Shi<sup>1</sup>, Yuhong Zhao<sup>1</sup>, Shanwei Wang<sup>2</sup>, Jinhong Zhang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, <sup>2</sup>College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** [Objective] We screened a new lipase gene to asymmetrically hydrolyze the *rac*-ketoprofen Chloroethyl ester, to construct a secretive expression strain and to improve its enantioselectivity. [Method] Strain NK13 was screened for asymmetrically hydrolyzing the *rac*-ketoprofen Chloroethyl ester. We prepared NK13 chromosomal DNA library to screen the lipase gene. An inducible secretion vector (pHY300-plk-sacR-gene) was developed based on the sequence that was ligated by the lipase gene and the regulatory region and the signal sequence (sacR) of the *SacB* gene. Transforming *Bacillus subtilis* WB600 with this vector, we attained a new recombinant strain. The expression of the lipase gene was analyzed by SDS-PAGE. The lipase was purified through native PAGE. The ability of enantioselected Ketoprofen Chloroethyl ester of the recombinant was identified by thin-layer chromatography (TLC) and HPLC. [Results] A 633bp lipase gene with enantioselectivity was attained (GeneBank accession number: EU381317). SDS-PAGE analysis showed that the expression of the inserted lipase gene could be induced by addition of sucrose into the medium. The results of TLC and HPLC showed that the highest enantiomeric excess of (S)-Ketoprofen was 93.64% at 36 h, and the conversion rate was about 45% of the *Bacillus subtilis* recombinant strain by adding Tween-80. The enantiomeric excess of (S)-Ketoprofen of was 16 times of that of NK13. For the purified lipase the highest enantiomeric excess was 60.22% at 40 h and the conversion rate was about 30%, which was same to the recombinant strain without Tween-80. [Conclusion] The lipase screened from NK13 had high ability to hydrolyze the *rac*-ketoprofen Chloroethyl ester to (S)-Ketoprofen. The 633 bp lipase gene of NK13 was induced to secretively express. By adding Tween-80, the enantioselectivity of the lipase was improved.

**Keywords:** lipase; inducible expression; enantioselectivity; (S)-ketoprofen

(本文责编:王晋芳)