

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (10) :1221 - 1227; 4 October 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.015

乙酸钙不动杆菌磷脂酶 C 在大肠杆菌中重组表达、纯化及酶学性质分析

汪艳红, 张梁*, 顾正华, 丁重阳, 石贵阳

江南大学, 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

摘要:【目的】构建乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) ATCC17902 磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 的重组大肠杆菌菌株、纯化重组酶并进行酶学性质分析比较。【方法】以 *A. calcoaceticus* ATCC17902 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到两段磷脂酶 C 基因 (PLC1、PLC2), 构建重组大肠杆菌表达质粒并转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 实现 PLC1、PLC2 基因的表达。IPTG 诱导表达后, 经镍柱亲和层析纯化重组蛋白。【结果】成功构建两株产磷脂酶 C 的重组大肠杆菌并纯化, 样品经 SDS-PAGE 分析在 80 kDa 附近均出现显著的特异性条带。NPPC 法测得 PLC1、PLC2 酶活分别为 31160 ± 418 U/mg、 13640 ± 354 U/mg, 最适反应温度分别为 65、50℃, 最适 pH 值分别为 8、7.5。在低于 30℃ 时, pH 值 7-8 时, PLC1、PLC2 重组酶较稳定, 40℃ 处理 30 min, PLC1 酶活稳定而 PLC2 残余酶活低于 25%。Mg²⁺、Ca²⁺ 增强 PLC1、PLC2 的活性, Zn²⁺ 增强 PLC1 酶活性却抑制 PLC2 酶活。底物特异性分析表明 PLC1、PLC2 均水解磷脂酰肌醇 (Phosphatidylinositol, PI), 对其他种类磷脂不能水解或水解程度很低。【结论】本文首次实现了 *A. calcoaceticus* ATCC17902 来源的磷脂酶 C 的重组表达与功能验证, 为其它食品安全性微生物来源的磷脂酶 C 的研究提供了一定的借鉴意义。

关键词: 乙酸钙不动杆菌, 磷脂酶 C, 纯化, 重组表达

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 10-1221-07

磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 是作用于磷脂 C3 位点, 水解磷脂生成甘油二酯和磷酸单脂的一种水解酶。根据水解底物的特异性, 细菌来源的 PLC 可以分为磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC) 及磷脂酰胆碱偏爱性磷脂酶 C (PC-PLC)。其中 PI-PLC 特异性的水解磷脂酰肌醇生成甘油二酯及肌醇-(1, 4, 5) 三磷酸, 后者在钙离子代谢途径中起着重要作

用^[1]。PC-PLC (E. C. 3. 1. 4. 3) 是偏好水解 PC 的一类酶, 也可以水解其它种类磷脂, 如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸等, PC-PLC 是广泛存在于细菌中的一种磷脂酶 C^[2]。由于 PC-PLC 同动物 PLCs 具有高度的结构和催化相似性, 细菌性来源的磷脂酶 C 也用于医学。而且, 随着对 PLC 研究的深入及工业发展的需求, PLC 应用价值已经逐渐从药品研究延伸

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。E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

作者简介: 汪艳红 (1990 -), 女, 江苏人, 硕士研究生, 研究方向为发酵工学。E-mail: 120499.happy@163.com

收稿日期: 2013-12-24; **修回日期:** 2014-03-28

至油脂精炼、食品加工及磷脂改性等领域^[3-6]。而近年 PLC 作为一种新的食品添加剂势必会推动 PLC 的广泛应用和研究。

微生物 PLC 来源广泛,包括细菌及真菌。目前已报道细菌性 PLC 主要来源于病原性微生物,同时该来源的 PLC 作为致病因子的报道也越来越多,如蜡样芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、产气荚膜梭状芽孢杆菌、李斯特菌等 PLC^[7-9]。真菌性来源 PLC 主要有米曲霉及黑曲霉等,该来源 PLC 安全性好,缺点是其不仅水解磷脂,同时水解磷酸单脂,造成食品营养的流失^[4]。因此筛选安全性高的 PLC 和构建食品安全性菌株显得尤其重要。*A. calcoaceticus* ATCC17902 作为非致病菌,全基因组测序已完成。关于其 PLC 的研究鲜见报道,本研究以 *A. calcoaceticus* 作为出发菌株,在大肠杆菌中表达并纯化 PLC1、PLC2,研究该酶最适催化条件及底物特异性,为 PLC 的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) ATCC17902,购自中国普通微生物菌种保藏中心, pET28a (+)、大肠杆菌 JM109、BL21 (DE3) 本实验室保藏, pMD18+ simple 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基: LB 培养基: yeast extract 1%, tryptone 0.5%, NaCl 1%。

1.1.3 主要试剂: 限制性内切酶购自 Fermentas; T4 DNA Ligase, Extaq DNA polymerase 购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 快速纯化试剂盒、B 型质粒小量快速提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司; IPTG、氨苄青霉素、卡那霉素购自上海生物工程技术有限公司; p-NPPC、L- α -磷脂酰肌醇 (Phosphatidylinositol, PI) 购自 Sigma 公司; L- α -磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS)、L- α -磷脂酰甘油 (Phosphatidylglycerol, PG)、鞘磷脂 (Sphingomyelin, SM) 购自 Avanti 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细菌基因组 DNA 的提取

具体方法见参考文献 [10]。

1.3 磷脂酶 C 基因的克隆

分别以 NCBI 上报道的 *A. calcoaceticus* PHEA-2 的 PLCN (BDGL_001526)、NPLC (BDGL_002961) 为模板设计 PCR 引物 F-PLC-Sac I/R-PLC-Xho I, 下划线为酶切位点(表 1)。

表 1. 引物
Table 1. Primers

primers	primer Sequence (5'→3')
F-PLC1-Sac I	CGGAGCTCTTGGATCATGATTACACGTCGTAATT
R-PLC1-Xho I	CCGCTCGAGGATCATTGCAGGATCACTAAAGGAG
F-PLC2-Sac I	CGGGATCCATGCATCGTCGGAAATTTCTTTAAAT
R-PLC2-Xho I	CGGCTCGAGAGACTCTAAATAACCCATATATGGA

以 *A. calcoaceticus* ATCC17902 的基因组 DNA 为模板,以 F-PLC-Sac I/R-PLC-Xho I 为引物设计 PCR 扩增。PCR 扩增体系为: dNTPS 4 μ L, 10 \times ExBuffer 5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 模板 0.5 μ L, 灭菌的 ddH₂O 39 μ L, ExTaq 酶 0.5 μ L。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 150 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 结果, 割胶回收目的带后, 用 T4 DNA polymerase 连接, 插入 pMD18+ simple 载体转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性转化子送上海生工测序。

1.4 重组大肠杆菌的构建

将经 Sac I-Xho I 线性化的载体 pET28a (+) 和经 Sac I-Xho I 消化的基因片段用 DNA 片段快速纯化试剂盒纯化后, 按照质量比 1:10 的比例加入 10 μ L 连接体系, 于 16 $^{\circ}$ C 培养箱培养过夜。次日 42 $^{\circ}$ C 热击 90 s 后转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后涂布 30 μ g/mL 卡那霉素-LB 抗性平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 10 h。提取质粒用 Sac I-Xho I 双酶切验证。

1.5 重组大肠杆菌的诱导表达及鉴定

挑取阳性转化子单菌落, 接种于 20 μ L 的 LB (含 30 μ g/mL 卡那霉素) 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜培养, 次日按 2% 的接种量转接于 50 mL LB 抗性液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 OD 至 0.4 - 0.6 时, 添加 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L, 25 $^{\circ}$ C、200 r/min 诱导表达 6 h。诱导结束后 13800 \times g 离心 2 min 收集菌体, 平衡缓冲液洗涤菌体 2 次, 并用平衡缓冲液重悬菌体 OD 至 6, 超声波破碎, 破碎结束后用等体积的平衡缓冲液重悬破碎沉淀(包涵体), 用于蛋白电泳。10% 的凝胶作

为分离胶,电泳结束后用考马斯亮蓝 R250 染色,鉴定重组蛋白表达。

1.6 磷脂酶 C 活力的测定

采用 p-NPPC 法^[11]。反应体系的组成: 0.25 mol/L Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液, 60% 山梨醇 (W/V), 10 mmol/L p-NPPC, 0.5 μ g/mL 酶液, 200 μ L 的反应溶液于 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min。酶活力单位定义: 在 pH 7.2, 37 $^{\circ}$ C 下, 每分钟水解 p-NPPC 生成 1 mmol/L 对硝基苯酚需要的酶量为 1 个酶活力单位 (U)。

1.7 磷脂酶 C 底物特异性分析

采用无机定磷法^[12]。反应体系组成: 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液, 250 μ g/mL 磷脂 (约 0.3 mmol/L), 20 U 酶液 (酶活由 NPPC 法测得), 200 μ L 的反应溶液于 37 $^{\circ}$ C 温育, 于不同反应时间的反应液中加入 1 mL 氯仿: 甲醇 (2:1) 溶液混匀, 13800 \times g 离心 10 min, 取 300 μ L 上层水相测定可溶性磷含量。

1.8 磷脂酶 C 的纯化

将重组大肠杆菌接种于 LB 液体培养基中, 按上述方法诱导表达。冷冻离心收集菌体, 用结合缓冲液洗涤 1 次, 离心, 并用结合缓冲液重悬菌体, 超声波破碎所得粗酶液, 用于镍柱亲和层析, 穿透峰和洗脱峰用 NPPC 法和 SDS-PAGE 分析。上样前预先 5 CV 平衡缓冲液平衡亲和柱, 上样后以 10 CV 结合缓冲液洗脱杂蛋白, 再以 10 CV 洗脱缓冲液洗脱重组蛋白。平衡缓冲液: 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mol/L NaCl; 结合缓冲液: 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑; 解析缓冲液: 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑。

2 结果和分析

2.1 磷脂酶 C 基因在大肠杆菌中的重组表达

2.1.1 磷脂酶 C 基因的克隆及分析: A. *calcoaceticus* PLC1、PLC2 的 PCR 产物测序结果中, PLC1 与 BDGL_001526 碱基相似度为 90.21%, 蛋白序列相似度为 96.53%; PLC2 与 BDGL_002961 碱基序列相似度为 92.13%, 蛋白序列相似度为 97.23%。

2.1.2 重组表达质粒的构建: 挑取阳性转化子提取质粒, 用 Sac I/Xho I 双酶切验证, 目的条带大小分

别为 5.4、2.2 kb, 与预期相符。

2.1.3 重组大肠杆菌的诱导表达及重组磷脂酶 C 的纯化: 重组菌株经诱导表达后, 与对照菌株相比, 有外源目的蛋白形成, 条带大小与预期的分子量一致, 约为 80 kDa。实验过程中发现 pET28a-A. *cal* PLC1-DE3 发酵过程中有大量的包涵体形成, 发酵条件优化后仍大量存在包涵体。而 pET28a-A. *cal* PLC2-DE3 在 25 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下菌液破碎澄清, 蛋白电泳发现包涵体量很少, 外源蛋白几乎都是以可溶性胞内蛋白存在。

2.2 重组磷脂酶酶学性质的分析

2.2.1 最适反应温度的测定: 将 PLC1、PLC2 纯酶液分别置于 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 $^{\circ}$ C 下反应并测定酶活力, 以测得的最高酶活力为 100% 计算相对酶活, 结果见图 1-A。

由图分析可知, PLC1、PLC2 最适反应温度分别为 65、50 $^{\circ}$ C。PLC1 在 35 - 70 $^{\circ}$ C 反应温度下酶活稳定, 相对酶活 70% 以上, 而 PLC2 的反应温度最适值比 PLC1 狭窄, 为 45 - 60 $^{\circ}$ C。高于 70 $^{\circ}$ C 时, PLC1、PLC2 酶活均显著性降低。

2.2.2 最适 pH 值分析: 分别用 0.25 mol/L pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液、0.25 mol/L pH 6.5、7 的磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液及 0.25 mol/L pH 7.5、8、8.5、9 的 Tris-HCl 缓冲液配置底物反应液, 测其酶活力, 并以酶活力最大值为 100% 计算相对酶活, 结果见图 1-B。

由图可知, PLC1、PLC2 酶的最适反应 pH 分别为 8.5、7.5。当 pH 为 6 时, PLC1、PLC2 酶活分别为最高值的 4.32%、14.59%, 损失大于 80%。可知, PLC1 较 PLC2 更适合在偏碱性 pH 范围内工作。

2.2.3 热稳定性分析: 将酶液分别置于 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90 $^{\circ}$ C 金属浴 30 min, 然后 37 $^{\circ}$ C 反应测剩余酶活力, 并以未保温时的酶活力为 100% 计算相对酶活, 结果见图 1-C。

由图可知, PLC2 热稳定较 PLC1 好, 在 40 $^{\circ}$ C 下处理 30 min, PLC2 残余酶活为 78.3%, PLC1 仅剩 21.14%。由此可见, PLC1 热稳定性较差, 高温下酶活力丧失严重。

2.2.4 pH 耐受性分析: 将酶液分别置于上述相应的 pH 缓冲液中于 4 $^{\circ}$ C 放置过夜, 并测剩余酶活力, pH 7.2 处理下的酶液酶活力 (100%) 大小作为对照, 计算相对酶活, 结果见图 1-D。

由图可知,PLC1 酶在 pH5.5-9 内、PLC2 酶在 pH 7.5-8 内较为稳定,当 pH 值低于 5 时,PLC1、PLC2 相对酶活力剩余均在 40% 以下。PLC1 在碱性环境下酶活稳定,在 pH 值为 9 时,残余酶活高于 70%。PLC2 稳定 pH 范围较窄,pH 低于 8 时,酶稳定性显著减低,故该酶保存在偏碱性环境内酶活较

为稳定。

2.2.5 金属离子对酶活的影响:分别添加 $MgCl_2$ 、 $ZnCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $NiCl_2$ 、 $CuCl_2$ 等二价金属离子至终浓度为 0.1、0.5、1.5 mmol/L 测定酶活力,并计算相应的酶活,结果见图 2。

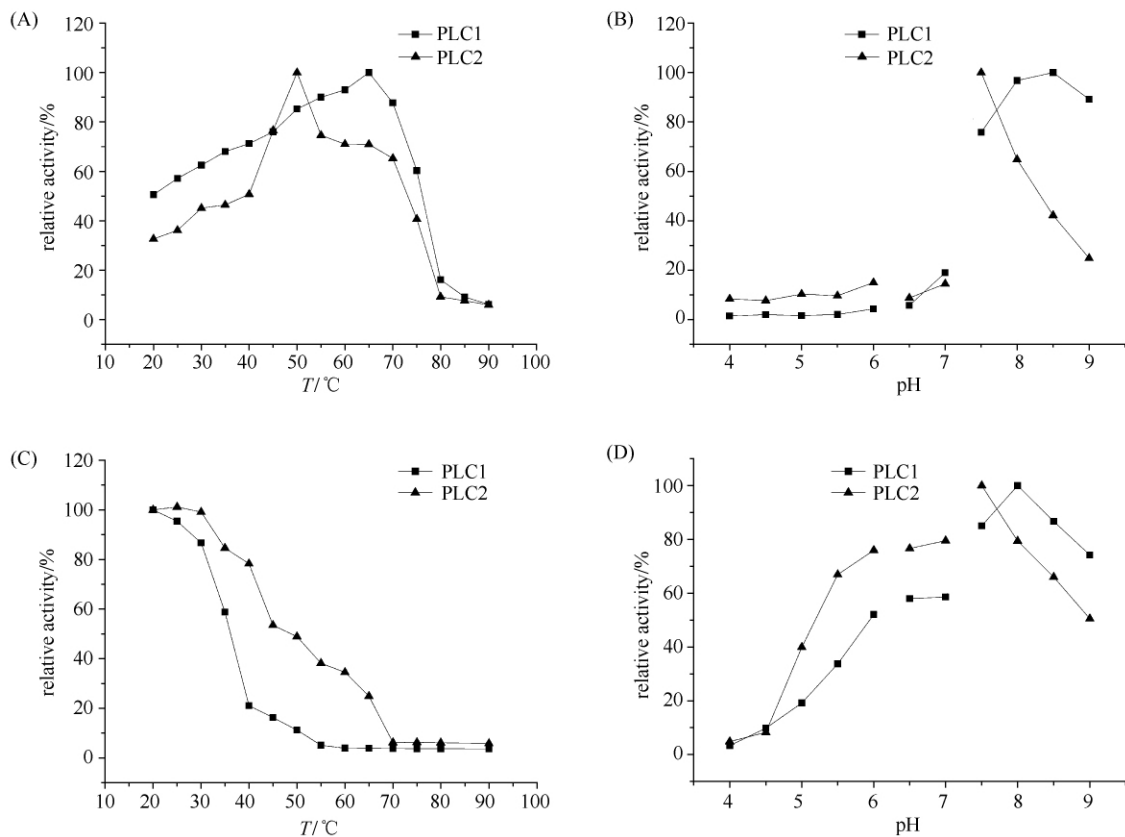


图 1. 温度、pH 对酶活的影响

Figure 1. Effect of temperature and pH on PLC1 and PLC2 enzyme activity.

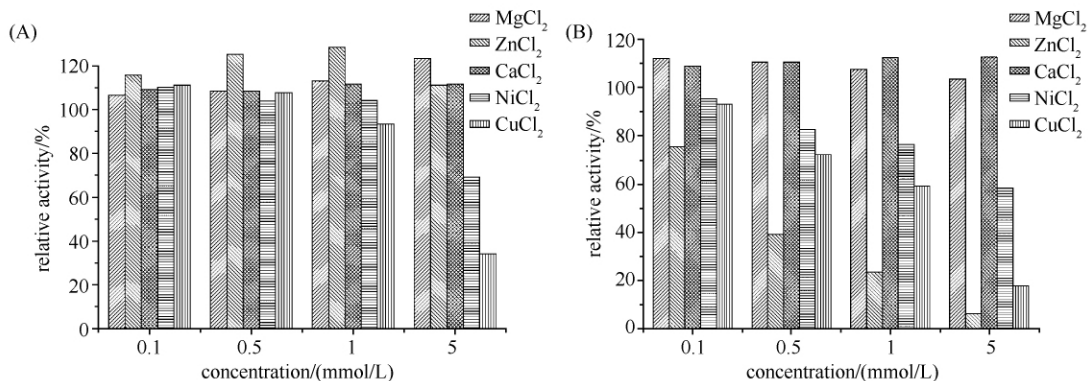


图 2. 金属离子对 PLC1 (A)、PLC2 (B) 酶活的影响

Figure 2. Effect of metal ions on PLC1 (A) and PLC2 (B) enzymes activity.

由图 2 可知, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对 PLC1、PLC2 酶活有促进作用。当 Zn^{2+} 浓度为 0.1 mol/L 时, PLC1、PLC2 的相对酶活分别为 128.54%、22%, 可见 Zn^{2+} 显著的促进了 PLC1 的活性却抑制 PLC2 的活性。低浓度的 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 对 PLC1、PLC2 不敏感, 而高浓度的 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 对 PLC1、PLC2 抑制明显。

2.3 重组 PLC 底物特异性分析

以 PC、PI、PS、PG、SM、NPPC 为底物, 研究 PLC1、PLC2 的底物特异性, PLC1、PLC2 底物特异性结果见表 2。

表 2. PLC1、PLC2 底物特异性

Table 2. Substrate specificity of PLC1 and PLC2

substrate	PC	PI	PS	PG	SM	NPPC
PLC1, PLC2	-	+	-	-	-	+

Unhydrolysable substrate was marked with minus, and hydrolysable substrate was marked with plus.

其中, PLC1、PLC2 均可水解 PI, 其中 PLC2 对其水解活性较大, 反应 1 h 水解 PI 为 4.48 nmol, PLC1 微弱的水解 PI, 反应 1 h 水解 PI 为 0.36 nmol。对于其他磷脂, PLC1、PLC2 均未表现出水解。实验过程发现 PLC1、PLC2 可以高效水解 NPPC (酶活分别为 31160 ± 418 U/mg、 13640 ± 354 U/mg), 但是不能在卵黄平板上形成沉淀圈, 该现象目前很少报道, 说明 PLC 不仅识别磷脂的亲水头部磷酸极性基团, 同时识别疏水碳端尾链, 推测 PLC1、PLC2 可以水解小分子类磷脂或者可溶性磷脂。

2.4 PLC1、PLC2 序列比较

PLC1、PLC2 的氨基酸序列同源性很高 (PLC1、PLC2 氨基酸序列的登陆号分别为 BDGL_001526、BDGL_002961), 整段序列相似性达到 56.4%。两个蛋白序列中 NH_2 末端序列同源性在最高, 而 N-端相似性是 61%, C-端同源性 47%。PLC1、PLC2 的部分性质很相似, 两个蛋白的相对分子量非常相近 ($MW_{(PLC1)} = 80.9$ kDa, $MW_{(PLC2)} = 80.4$ kDa), pI 也相似 ($pI_{(PLC1)} = 5.98$, $pI_{(PLC2)} = 6.28$), 均是酸性蛋白。而 PLC1 经 Signal P 预测含有 22 个氨基酸的信号肽, 这点在实验中得到 SDS-PAGE 验证, pET28a-A. cal PLC1-DE3 发酵上清液中含有外源分泌蛋白, 检测到目的蛋白带, 并测到酶活, 而 pET28a-A. cal PLC1-DE3 发酵上清液中无目的蛋白且测不到酶活, 重组蛋白 N 端带有 His-tag 并成功用亲和柱纯化。

3 讨论

本实验主要研究了非致病菌 *A. calcoaceticus* 来源的磷脂酶 C (PLC1、PLC2) 在大肠杆菌中重组表达及部分酶学性质, 并比较了 PLC1、PLC2 的氨基酸序列。PLC1、PLC2 的氨基酸同源性很高, 相同氨基酸达到 56.4%, 相对分子量及 pI 也非常相近。NPPC 法测得 PLC1、PLC2 酶活分别为 31160 ± 418 U/mg、 13640 ± 354 U/mg。酶学性质结果显示最适反应温度分别为 65、50℃, 最适 pH 值分别为 8、7.5, PLC1 在碱性范围内酶活很稳定。 Zn^{2+} 抑制 PLC2 的活性, 该性质与 PLC1 及大多 PLC 性质不一样, 如来源荧光假单胞菌^[13]、蜡样芽孢杆菌^[14]、蕈状芽孢杆菌^[15]及产气荚膜梭菌梭状芽孢杆菌^[16]等菌磷脂酶 C, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 促进 PLC1、PLC2 的酶活性。本实验结果与之前文献报道的 *A. calcoaceticus* PLC 相对分子量差异很大 (25 - 35 kDa), 且本文的 PLC1、PLC2 不具有溶血性, 在卵黄平板上也没有沉淀圈形成^[17-19], 推测可能是原始菌来源不同, 本文是从土壤中分离得到, 后者 *A. calcoaceticus* 是从病人身上分离纯化得到。

与 PLC2 相比, PLC1 对应的重组菌表达过程中形成了大量的包涵体, 可能是由于 PLC1 带有信号肽, 在蛋白表达过程大肠杆菌不能完全识别 PLC1 信号肽导致。PLC2 作为胞内磷脂酶 C, 与之前报道的细菌性磷脂酶 C 均为胞外酶不同, 这点与真核生物相似。目前, 国内研究的磷脂酶 C 产生菌主要有蜡样芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、蕈状芽孢杆菌等致病菌^[20-23], 本实验在国内外首次实现了对非致病细菌的磷脂酶 C 基因的外源表达, 对 PLC 应用于食品添加剂的安全应用具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K, Nakamura Y. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Progress in Lipid Research*, 2010, 49 (4): 429-437.
- [2] Ramrakhiani L, Chand S. Recent progress on phospholipases: different sources, assay methods, industrial potential and pathogenicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 164 (7): 991-1022.

- [3] Yang B, Zhou R, Yang JG, Wang YH, Wang WF. Insight into the enzymatic degumming process of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2008, 85 (5) : 421-425.
- [4] 长崎咏子, 深泽彻也, 小野泰典. 磷脂酶及含其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.
- [5] 周恒宇. 磷脂酶 C 在 INS-1 细胞胰岛素分泌信息传导途径中的作用. 重庆医科大学硕士学位论文, 2009.
- [6] Liu YG, Cao GQ. Application of soybean phospholipid and its modified products in cosmetics. *Detergents&Cosmetics*, 2006, 29 (8) : 28-30. (in Chinese)
刘亚文, 曹光群. 大豆磷脂及其改性产物在化妆品中的应用. 日用化学品科学, 2006, 29 (8) : 28-30.
- [7] Elleboudy N, Aboulwafa M, Hassouna N. Phospholipases C from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* isolates, chromosome-mediated enzymes with roles in virulence. *Turkish Journal of Biology*, 2013, 37 (4) : 433-442.
- [8] Fach P, Guillou JP. Detection by in vitro amplification of the alpha - toxin (phospholipase C) gene from *Clostridium perfringens*. *Journal of Applied Microbiology*, 1993, 74 (1) : 61-66.
- [9] Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13 (1) : 122-143.
- [10] 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.
- [11] Kurioka S, Matsuda M. Phospholipase C assay using p-nitrophenylphosphorylcholine together with sorbitol and its application to studying the metal and detergent requirement of the enzyme. *Analytical Biochemistry*, 1976, 75 (1) : 281-289.
- [12] Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 1959, 234 (3) : 466-468.
- [13] Crevel I, Sally U, Carne A, Katan M. Purification and Properties of Zinc-metallophospholipase C from *Pseudomonas fluorescens*. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 224 (3) : 845-852.
- [14] Little C, Otnäss AB. The metal ion dependence of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 1975, 391 (2) : 326-333.
- [15] Wang CG, Chen MK, Chen T. Improved purification and some properties of a novel phospholipase C from *Bacillus mycoides* strain 970. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4 (5) : 396-399.
- [16] Titball RW. Bacterial phospholipases C. *Microbiological Reviews*, 1993, 57 (2) : 347-366.
- [17] Lehmann V. Production of phospholipase C in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, 1971, 79 (6) : 789-793.
- [18] Lehmann V. The nature of phospholipase C from *Acinetobacter calcoaceticus*: effects on whole red cells and red cell membranes. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, 1973, 81 (4) : 419-426.
- [19] Lehmann V. Properties of purified phospholipase C from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, 1973, 80 (6) : 827-834.
- [20] 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. 安徽农业大学硕士学位论文, 2007.
- [21] Zhao JX, Zhang L, Gu ZH, Ding ZY, Shi GY. Expression of hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (3) : 259-268. (in Chinese)
赵金星, 张梁, 顾正华, 等. 重组大肠杆菌表达铜绿假单胞菌溶血性磷脂酶 C. 微生物学报, 2013, 53 (3) : 259-268.
- [22] Liu FF, Zhang L, Gu ZH, Ding ZY, Shi GY. Cloning and heterologous expresse in *E. coli* of phospholipase C gene from *Bacillus cereus*. *Food Science*, 2013, 34 (11) : 182-187. (in Chinese)
刘菲菲, 张梁, 顾正华, 等. 蜡状芽孢杆菌磷脂酶 C 基因在大肠杆菌中的异源表达. 食品科学, 2013, 34 (11) : 182-187.
- [23] 詹逸舒. 产磷脂酶 C 菌株的筛选及其酶学性质的研究. 湖南农业大学硕士学位论文, 2010.

Overexpression, purification and characterization of phospholipase C from *Acinetobacter calcoaceticus*

Yanhong Wang, Liang Zhang*, Zhenghua Gu, Zhongyang Ding, Guiyang Shi

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

Abstract: [Objective] In this study, we constructed two recombinant *Escherichia coli* strains to produce phospholipase C (PLC) from *Acinetobacter calcoaceticus*. The recombinant enzymes were purified to homogeneity and characterized. [Methods] We cloned the PLC encoding gene *plc1*, *plc2* from genome DNA of *A. calcoaceticus* ATCC17902. The amplified fragments were inserted into pET28a(+) to obtain expression plasmids. *E. coli* BL21 (DE3) harboring the above plasmids were cultivated and induced with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside to express PLCs. The recombinant PLCs were purified by affinity chromatography and their catalytic properties were characterized. [Results] Two PLCs from *A. calcoaceticus* were cloned and functional expressed in *E. coli*. The recombinant enzymes have activities of 31160 ± 418 U/mg for PLC1 and 13640 ± 354 U/mg for PLC2, when using *p-nitrophenyl* phosphorycholine as substrate. The purified PLC1 and PLC2 exhibited optimum temperature at 65°C and 50°C , respectively. Their optimal pH were 8 and 7.5, respectively. PLC2 was stable under 40°C and pH at 8, whereas the residual activity of PLC1 was less than 25% in the same condition. Mg^{2+} and Ca^{2+} stimulated two enzymes activity, whereas Zn^{2+} stimulated PLC1 and inhibited PLC2. PLC1 and PLC2 hydrolyzed phosphatidylinositol. [Conclusion] It is the first time to express and characterize the PLC gene from *A. calcoaceticus* ATCC17902. These research results provide reference for the study of food-safety microbiological PLC.

Keywords: *Acinetobacter calcoaceticus*, phospholipase C, purification, genetic recombination

(本文责编: 张晓丽)

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. E-mail: 13861707271@139.com

Received: 24 December 2013 / Revised: 28 March 2014