

# GL-7-ACA酰化酶基因克隆及在大肠杆菌中的表达

杨蕴刘 恽定芳 关颖谦 彭惠林 陈剑民  
何云生 焦瑞身

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

本文报道了利用BamHI酶解的载体 pBR322 DNA 与Sau3A部分酶解的假单胞菌P<sub>8</sub>.130 染色体DNA片段构建重组质粒,并用<sup>32</sup>P标记的寡核苷酸探针从3205个含有外源片段的重组质粒中检测得到7株阳性克隆株。进一步经<sup>125</sup>I-标记的抗体/抗原放射免疫反应、GL-7-ACA 酰化酶活力测定以及酶反应产物的纸谱色层分析,由上述7株阳性株中鉴定出3株能在大肠杆菌中表达酰化酶活力的基因克隆株。对该3株菌的重组质粒——pMR 5、pMR 6和pMR 7 DNA的初步凝胶电泳分析表明,pMR 5和pMR 7质粒中插入片段的分子量为6.8kb,质粒pMR 6则带有5.7kb的外源片段。实验还比较了重组质粒pMR 5在8株不同的大肠杆菌宿主菌中,GL-7-ACA酰化酶的表达水平。

**关键词** 头孢菌素酰化酶;基因克隆;7-氨基头孢烷酸

随着青霉素、头孢菌素等半合成抗生素工业的发展,有关利用青霉素酰化酶及头孢菌素酰化酶产生6-氨基青霉烷酸(6-APA)和7-氨基头孢烷酸(7-ACA)的研究,受到人们的关注。杨胜利和吴汝平等<sup>[1,2]</sup>在国内首次成功地进行了青霉素酰化酶基因的分子克隆及其在大肠杆菌宿主中的高效表达。近年来不少报道<sup>[3-5]</sup>指出假单胞菌属的某些菌株具有头孢菌素酰化酶的活力,根据底物的差异性,可将头孢菌素酰化酶活性分成两种类型,一种是头孢菌素酰化酶,水解头孢菌素C(CPC)的侧链,直接生成7-ACA,但至今尚未得到产酶活力较高的菌株。另一种是GL-7-ACA酰化酶,使戊二酰头孢烷酸(GL-7-ACA)水解为7-ACA。另一方面,研究表明<sup>[6-11]</sup>CPC可被不同来源的D-氨基酸氧化酶(D-AAO)氧化脱氨成为GL-7-ACA。因此,CPC经D-AAO酶促反应转化为GL-7-ACA,该产物再在酰化酶作用下

产生7-ACA的两步酶法反应在发展半合成头孢菌素的中间体方面具有重要意义。本文报道了以pBR322为载体从假单胞菌菌株的染色体DNA上克隆GL-7-ACA酰化酶基因及其在大肠杆菌中表达的研究。

## 材料和方法

### (一)细菌菌株、质粒和培养条件

实验中使用的细菌菌株和质粒见表1。

上述菌株均在肉汤(tryptone 1%,酵母粉0.5%,NaCl 1%,pH7.4)或肉汤固体培养基(含琼脂1.5%)上生长,带质粒的菌株培养在含适当药物浓度的培养基

本文于1990年4月23日收到。

在本研究工作过程中,上海第三制药厂惠赠假单胞菌130菌株;上海细胞生物学研究所王应魁先生帮助合成寡核苷酸探针;上海生物化学研究所李载平、周光宇先生等给予实验材料方面的支援,特此表示感谢。

中：氨苄青霉素，50μg/ml；四环素，20μg/ml。大肠杆菌培养温度为37℃，假单胞菌在28℃条件下培养。

(二)生化试剂

限制酶、T4DNA连接酶、牛肠磷酸脂酶及T4聚核苷酸激酶等主要从华美公司、Boehringer Mannheim及BRL等公

司购得。<sup>125</sup>I为北京原子能研究所产品。 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP购自Amershem公司。

(三)DNA操作和其他分析方法

1. 假单胞菌细胞染色体DNA及质粒DNA快速抽提：分别按文献报道的方法<sup>[20,21]</sup>进行。质粒DNA的超离心制备，酶切片段的蔗糖密度梯度离心，琼脂

表 1 菌株和质粒  
Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains & plasmids	遗传标记 Genetic markers	来源 Source	文献 Reference
Strains			
<i>Pseudomonas</i>			
sp.821	Acy <sup>+</sup>	This Lab.	
sp.130	Acy <sup>+</sup>	Shanghai	
<i>Escherichia coli</i>		Ph. Fac. No.3	
C600	thr, leu, thi, sup, tonA		[12]
HB101	pro, thi, leu, str, recA, hsdR, hsdM		[13]
A56	trpE, recA56	Yang Shengli	[14]
YS1		Chen Xiaokang	
ED6054		Chen Xiaokang	
K802	gal, met, supE, hsdR		[15]
W3110	thy		[16]
LE392	gal, supE, supF, hsdR		[17]
JM83	ara, Δ(lac-pro), str, thi, φ 30dIacZΔM15		[18]
Plasmids			
pBR322	Amp <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>		[19]
pMR5	Amp <sup>r</sup> , Acy <sup>+</sup>	This study	
pMR6	Amp <sup>r</sup> , Acy <sup>+</sup>	This study	
pMR7	Amp <sup>r</sup> , Acy <sup>+</sup>	This study	

糖凝胶电泳见文献[22]。

2. DNA的限制酶酶解、T4DNA连接酶反应、牛肠磷酸脂酶的脱磷反应等：均根据该酶生产厂提供的方法。

3. 寡核苷酸探针：(1)5'-CCTAT-AAACCGAGAAGCAAT-3'，(2)5'-CCTCAGGCCTCGTATCGCCT-3'由中国科学院细胞生物研究所王应魁先生合成。用 $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP标记寡核苷酸的方法及菌落原位杂交步骤按文献介绍的方法进行<sup>[23]</sup>。

4. GL-7-ACA酰化酶高纯度IgG及

<sup>125</sup>I免疫探针制备、同位素<sup>125</sup>I放射免疫探针检测GL-7-ACA酰化酶蛋白的步骤：参照关颖谦等介绍的方法<sup>[24,25]</sup>。

5. 大肠杆菌感受态细胞制备及质粒DNA的转化条件：按文献要求进行<sup>[26]</sup>。

6. GL-7-ACA酰化酶活力测定及酰化酶反应产物7-ACA的纸谱色层分析：参阅文献[3]。

结 果

(一)重组质粒构建

假单胞菌 *Pseudomonas* sp.130(以下简称 Ps.130 菌株)为 GL-7-ACA 酰化酶基因的供体菌株,该菌株在肉汤培养液中,28℃ 振荡培养 50h,每升培养液产酰化酶 20 至 30 单位。实验采用 *E.coli* C600 为宿主菌, pBR322 为载体的“鸟枪法”技术从假单胞菌 Ps.130 的染色体 DNA 上进行 GL-7-ACA 酰化酶基因的分子克隆。按照图 1 流程构建重组质粒并筛选带有酰化酶基因片段的克隆株。

从假单胞菌 Ps.130 菌株抽提细胞染色体 DNA 并用限制酶 *Sau* 3A 部分降解(图版 I-1),经降解的 DNA 样品溶液通过 10—40% 蔗糖密度梯度离心后(图版 I-2),收集分子量大于 4kb 的酶解片段(图版 I-3)。载体质粒 pBR322 用 *Bam*HI 完全酶解,为减少载体分子本身的连接环化,进一步用牛肠磷酸脂酶(CIP)处理以去掉 5' 端的磷酸基团。将 *Sau* 3A 酶切的 Ps.130 菌株的 DNA 片段与 *Bam*HI 全酶解并经去磷酸化的 pBR322 DNA 混合, T4DNA 连接酶连接,反应混合液转化 *E.coli* C600 感受态细胞。首先在含 50μg/ml 氨苄青霉素的肉汤琼脂平板上选择 *Amp*<sup>r</sup> 转化子,然后根据插入钝化原理,从 6500 个 *Amp*<sup>r</sup> 转化子中筛选得到带有外源片段的 *Amp*<sup>r</sup> *Tc*<sup>r</sup> 重组子 3205 个,插入重组频率接近 50%。

## (二)克隆株的 <sup>32</sup>P-寡核苷酸探针检测

为了从 3205 个带外源 DNA 片段的转化子中鉴别出带有 GL-7-ACA 酰化酶基因片段的克隆株,将上述 *Amp*<sup>r</sup> *Tc*<sup>r</sup> 转化子移种到铺在肉汤固体培养基表面的硝酸纤维素(NC)膜上,37℃ 生长过夜后,带菌滤膜用 0.5mol/L NaOH 处理, DNA 经碱变性并固定在 NC 膜上,用 <sup>32</sup>P-标记的两段各 20 碱基的寡核苷酸探针进行原位杂交。这两个寡核苷酸顺序是根据 Matsuda

等<sup>[4]</sup>报道的有关 GL-7-ACA 酰化酶基因的部分 DNA 顺序资料而合成的。结果在被检测的 3205 个菌落中发现 7 个同位素显迹的阳性菌株并把这些菌编号为 MR1 至 MR7,其所含的重组质粒相应为 pMR1 至 pMR7。

## (三)GL-7-ACA 酰化酶蛋白的放射免疫鉴定

上述用 <sup>32</sup>P 同位素标记寡核苷酸探针检测得到的 7 株阳性菌株所含的重组质粒中,插入片段是否包括了酰化酶基因表达所需的完整顺序,需作进一步鉴定。首先考察重组质粒 pMR1 至 pMR7 在 *E.coli* C600 宿主菌中酰化酶蛋白的表达与否,为此,将带这些质粒的 *E.coli* C600 (即 MR1 至 MR7)涂布到覆盖在含 50μg/ml *Amp* 的肉汤固体平板表面的 NC 上,生长过夜。由于在大肠杆菌中,表达的产物一般并不分泌到细胞外而仍存在于细胞内,因此需用氯仿裂解细胞以释放出胞内蛋白并固定在 NC 膜上,然后,以纯化的 Ps.130 菌株的 GL-7-ACA 酰化酶的 IgG 和 <sup>125</sup>I-蛋白 A 相继处理 NC 膜,当有 GL-7-ACA 酰化酶抗原蛋白产生时,就会与 IgG、<sup>125</sup>I-蛋白 A 结合成复合物,在 X-感光胶片上呈现放射自显影斑(图 2)。从显迹结果可知,MR 5、MR 6 和 MR 7 3 个克隆化菌株与 GL-7-ACA 酰化酶亲株菌 Ps.130 及另一产酶菌株 Ps.821 一样,具有较强的放射免疫反应,其余的 4 株克隆株以及不带重组质粒的宿主菌 *E.coli* C600 均无明显反应。

## (四)克隆菌株 GL-7-ACA 酰化酶活力测定

为了确定所得克隆株的 GL-7-ACA 酰化酶活力,按 Shibuya 等<sup>[3]</sup>报道的方法将细胞培养液与酶反应底物 GL-7-ADCA 一起保温,当菌株表现酰化酶活力

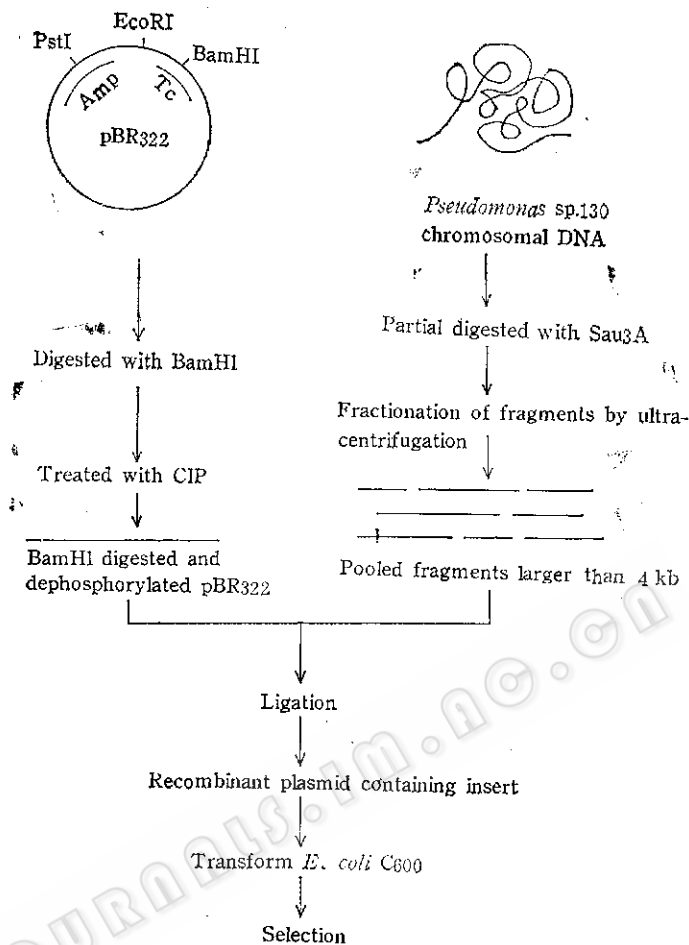


图1 GL-7-ACA酰化酶基因克隆流程

Fig. 1 Scheme for GL-7-ACA acylase gene cloning

时, 就会使底物GL-7-ADCA的戊二酰基侧链水解, 生成戊二酸和7-ADCA, 7-ADCA母核上游离的氨基与加入的显色剂对-二甲氨基苯甲醛(PDAB)反应生成Schiff's碱呈黄色, 通过分光光度测定法即可知酶活力的强弱。从表2的数据可以看出, 作为基因克隆宿主菌的 *E. coli* C600以及带重组质粒 pMR1至pMR4的 *E. coli* C600(即MR1至MR4)均不显示酰化酶活力。重组质粒 pMR5与pMR7在 *E. coli* C600宿主菌(即MR5和MR7)中所表达的酰化酶活力与亲株菌 *Ps. 130* 相当, 而MR6的产酶水平仅仅是MR5和MR7的五分之一。这些数据与上述放射免

疫反应的结果(图2)相一致, 也就是说, 将重组质粒pMR5、pMR6和pMR7引入到大肠杆菌中, 来源于假单胞菌的GL-7-ACA酰化酶基因片段能表达具有催化活性的酰化酶蛋白。另一方面, 带有pMR1至pMR4的大肠杆菌菌株既不产生放射免疫反应, 也不具备催化底物GL-7-ADCA水解作用的酶反应活性, 因此, 由 $^{32}\text{P}$ -寡核苷酸杂交法检测得到的重组质粒pMR1至pMR4的插入片段上可能并未包括酰化酶基因表达所需的全部DNA顺序。

#### (五) GL-7-ACA酰化酶反应产物的纸谱分析

当分别用GL-7-ADCA和GL-7-ACA

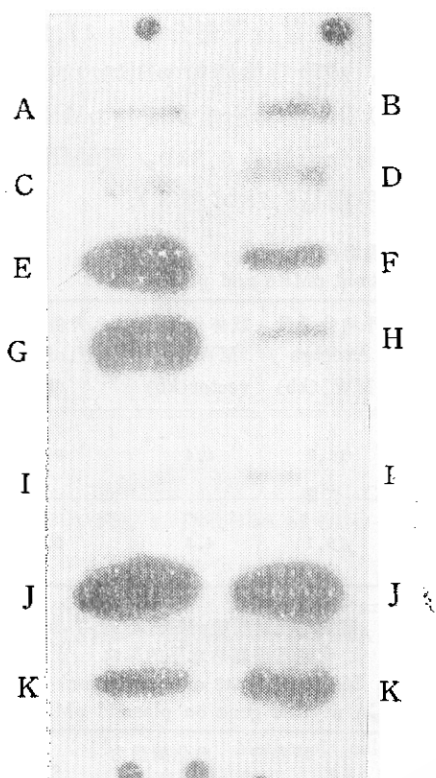


图 2 带重组质粒菌株表达产物的放射免疫反应  
Fig.2 Radio-immunological assay for acylase activity by the parent strain and *E.coli* C600 harboring various recombinant plasmids

A. *E.coli* C600 harboring plasmid pMR1;  
B. pMR2; C. pMR3; D. pMR4; E. pMR5;  
F. pMR6; G. pMR7; H and I. *E.coli* C600  
J. *Pseudomonas* sp. 130; K. *Pseudomonas* sp. 821

为反应底物时,在酰化酶的催化下,能将它们水解成戊二酸和相应的 7-ADCA 和 7-ACA,反应混合物经纸层析溶剂展层后,上述化合物移行到不同的位置上。由于底物 GL-7-ADCA, GL-7-ACA 和产物 7-ADCA, 7-ACA 分子中的酰胺键有较强的紫外吸收,因此,在 312nm 紫外光下可以检测到层析斑点。实验对具有酰化酶活力的克隆株的酶反应产物进行了纸谱色层分析与亲株菌 Ps.130 作了比较。结果(图 3)说明菌株 MR5 和 MR7(即 *E.coli* C600/pMR5 和 *E.coli* C600/pMR7)与

GL-7-ADCA 或 GL-7-ACA 反应后,混合物的纸层析行为与亲株菌 Ps.130 相同, GL-7-ADCA 及 GL-7-ACA 分别被降解为 7-ADCA 和 7-ACA,鉴于 MR6(*E.coli* C600/pMR6)的产酶活力较低,对其酶反应产物未作分析。当 *E.coli* C600 与 GL-7-ACA 一起保温时,并无 7-ADCA 或 7-ACA 生成。

#### (六)重组质粒 DNA 的初步电泳比较

我们对三株具有 GL-7-ACA 酰化酶活力的克隆株 MR5、MR6 和 MR7 所带质粒 DNA 进行了琼脂糖凝胶电泳比较。图版 I-4 是从这三株菌中抽提的质粒 DNA 在 0.7% 琼脂糖凝胶板上的泳动位置并与载体质粒 pMR322 作比较。结果说明 pMR5 和 pMR7 的泳动位置相同,而 pMR6 的分子量略小,以后的实验分析证明 pMR5 和 pMR7 中插入片段的大小,酶切图谱以及片段的插入方向完全一样(另文发表),同时,分别带该二质粒的 *E.coli* C600 (即 MR5 和 MR7 菌株)的 GL-7-ACA 酰化酶活力水平相似(表 2)。此外,初步的酶切分

表 2 GL-7-ACA 酰化酶基因克隆株的产酶活力  
Table 2 GL-7-ACA acylase activity of recombinant clones

菌 株 Strains	酶活力 Enzyme activity (u/L medium)
<i>Pseudomonas</i> sp.821	7
<i>Pseudomonas</i> sp.130(Parent)	29.6
<i>E. coli</i> C600(Host)	0
Clones:	
MR1	0
MR2	0
MR3	0
MR4	0
MR5	37.3
MR6	5.9
MR7	38.6

析表明 pMR5 和 pMR6 的插入片段上均无 EcoRI 切点,但同样各有一个 Hpa I 切点

和两个Xho I 切点, 当以载体 pBR322 上的单一切点 EcoR I 为参照切点进行 Hpa I /EcoR I 或 Xho I /EcoR I 双酶切后, 酶切产物的凝胶电泳见图版 I -5, 根据酶切片段的泳动位置可以计算出 pMR5

和 pMR6 的总分子量分别为 11.2kb 和 10.1kb, 减除载体质粒 pBR322的分子量 (4.4kb)后, 推算出重组质粒 pMR5 中插入片段的分子量是 6.8kb, 而pMR6 中的插入片段则是5.7kb(表 3)。

表 3 重组质粒pMR5和pMR6的限制酶酶切片段分子量  
Table 3 Size of restriction fragments of plasmid pMR5 and pMR6

重组质粒 Recombinant plasmid	限制酶 Restriction endonucleases	酶切片段大小 Size of fragments(kb)	总分子量 Total MW (kb)	平均分子量 Average MW.(kb)	载体分子量 MW.of vector(kb)	插入片段分子量 MW.of insert (kb)
pMR5	EcoRI + HpaI	6.7; 4.5	11.2	11.2	4.4	6.8
	EcoRI + XhoI	5.8; 3.0; 2.4	11.2			
pMR6	EcoRI + HpaI	8.8; 1.4	10.2	10.1	4.4	5.7
	EcoRI + XhoI	4.5; 3.1; 2.4	10.0			

(七)不同的大肠杆菌宿主对酰化酶基因表达的影响

在基因工程的研究中, 业已证明不同宿主菌的遗传和生理背景会影响外源基因的表达, 合适的宿主菌可以提高重组质粒上所带目的基因的表达水平。我们以重组质粒 pMR5为材料比较了该质粒在大肠杆菌不同菌株中, GL-7-ACA 酰化酶基因的表达水平。将实验室收集保藏的 8 株大肠杆菌菌株, 按常规方法制备成感受态细胞, 然后分别用pMR5质粒 DNA 进行转化, 在含氨苄青霉素(50μg/ml)的肉汤平板上选择Amp<sup>r</sup> 转化子并测定转化子培养液的菌浓度及 GL-7-ACA 酰化酶产量, 并进一步计算出以单位菌浊度表示的比活力(表 4), 结果表明重组质粒pMR5 在被测试的菌株中表达水平并不相同, 其中 W3110和LE392的菌浊度最高, 即菌的生长量高, 但总的产酶活力并不高, 分别为每升 10 和 26 单位, 相应比活力较低。而 A56、YS1和HB101的每升培养液产酶量分别是43、58和63单位, 它们的比活相近。通过这一实验不仅证明来源于假单胞菌的 GL-7-ACA 酰化酶基因能在大肠杆

表 4 宿主细胞对质粒pMR5上GL-7-ACA酰化酶基因表达水平的影响  
Table 4 Effect of hosts on expression of GL-7-ACA acylase gene on plasmid pMR5

宿主 Host	培养液 菌浓度 (OD <sub>400nm</sub> )	酰化酶活力 Acylase activity (u/L)	比活 Specific activity (u/OD <sub>400nm</sub> )
<i>E.coli</i>			
A56 <sub>1</sub>	1.52	43	28.3
YS1	2.18	58	26.6
HB101	2.32	63	27.1
JM83	2.32	29	12.5
ED6054	2.56	41	16.0
K802	2.58	26	10.1
W3110	2.92	10	3.4
LE392	2.98	26	8.7

菌中表达, 而且宿主菌的差异对目的基因的表达有很大的影响。

讨 论

一般以单一限制酶切点的“鸟枪法”来进行基因克隆时, 因载体 DNA 的自身环化, 使外源片段插入到载体中的频率较低, 如用双酶切作同样实验的话, 重组质粒的比例可大幅度提高。我们实验中虽利用pBR322上的单一BamHI 切点作为插入

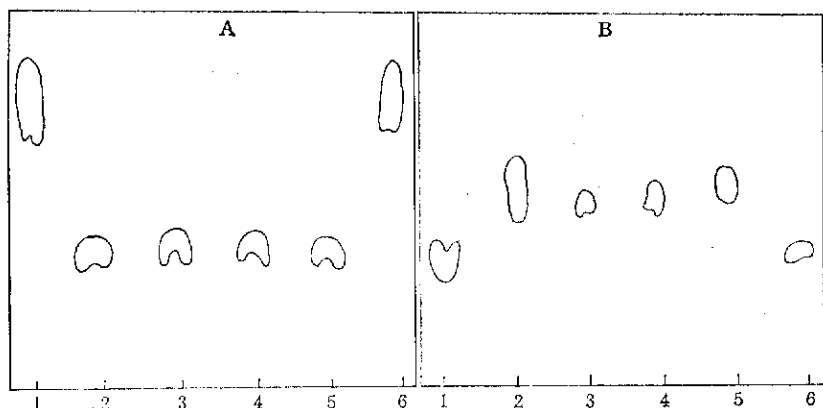


图 3 GL-7-ACA酰化酶活性的纸层析检测

Fig. 3 Detection of GL-7-ACA acylase activity with paper chromatography

A. 溶剂系统(Solvent system)

正丁醇:醋酸:水 = 4:1:1

n-butanol: acetic acid: water = 4:1:1

1. GL-7-ADCA; 2. 7-ADCA; 3. (1)+Ps.130; 4. (1)+MR5; 5. (1)+MR7;  
6. (1)+*E.coli* C600

B. 溶剂系统(Solvent system)

甲醇:氯仿:吡啶:水 = 9:8:1:3

Methanol: chloroform: pyrimidin: water = 9:8:1:3

1. GL-7-ACA; 2. 7-ACA; 3. (1)+Ps.130; 4. (1)+MR5; 5. (1)+MR7;  
6. (1)+*E.coli* C600

位点,但通过牛肠碱性磷酸脂酶对BamHI酶解的 pBR322 进行 5' 端脱磷处理,有效地减少了载体本身的环化,使重组频率上升到50%左右,经对3205个重组质粒的筛选得到 3 株带酰化酶基因的正克隆。Matssuda等<sup>[41]</sup>以Pst I 酶切和CIP处理的pBR325为载体,从Pst I 部分酶切的假单胞菌GK1的染色体 DNA 上克隆 GL-7-ACA酰化酶基因,结果从 2000 个转化子中得到一株带目的基因的片段,该片段的分子量是7.35kb。因此,当用“鸟枪法”从部分酶切的染色体片段克隆外源基因时,正克隆株的筛选频率与目的基因片段中酶切位点的多少以及部分酶切反应的程度有关。在我们筛选过程中,首先用 $\gamma$ -<sup>32</sup>P标记的寡核苷酸探针检测得到的 7 株阳性菌

落,并不都表达具有催化活性的 GL-7-ACA 酰化酶蛋白,其原因可能是得到的重组质粒中,有些插入片段并未包括目的基因表达所需的全部顺序,因此通过放射免疫反应, GL-7-ACA 酰化酶活力的化学测定以及酶反应产物的纸谱色层分析等方法对克隆株作进一步的鉴定。

宿主菌的遗传和生理背景对所克隆的目的基因的表达水平有一定影响<sup>[14]</sup>,我们的试验结果也证明这点。作为 GL-7-ACA 酰化酶基因的合适宿主菌,不仅考虑产酶水平,还需考虑它对重组质粒稳定性的影响。同时,还要符合 $\beta$ -内酰胺酶活力低这一要求,因为该酶会破坏作为底物的GL-7-ACA以及反应产物 7-ACA 分子中的 $\beta$ -内酰胺环。

## 参 考 文 献

- [1] 杨胜利等: 生物工程学报, 1(1):29, 1985.
- [2] 吴汝平等: 生物工程学报, 1(3):12, 1985.
- [3] Shibuya, Y. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 45:1661, 1980.
- [4] Matsuda, A. et al.: *J. Bacteriol.*, 163:1222, 1985.
- [5] Matsuda, A. et al.: *J. Bacteriol.*, 169: 5815, 1987.
- [6] Mazzero, P. et al.: *J. Chem. Soc., Perkin 1*, 20:2532, 1972.
- [7] Gilbert, D.A. et al.: British patent: 1272769, 1968.
- [8] Szwajcer, E. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 7: 1, 1985.
- [9] 任克勤, 焦瑞身: 生物工程学报, 1(1):51, 1985.
- [10] 任克勤等: 微生物学报, 26(3):242, 1986.
- [11] 李维泉, 焦瑞身: 微生物学报, 31(3):251—253, 1991.
- [12] Appleyard, R.K. et al.: *Genetics*, 39:440, 1954.
- [13] Boyer, H.W.: *J. Mol. Biol.*, 41:459, 1968.
- [14] 姜增莲等: 生物工程学报, 4(3):166, 1988.
- [15] Wood, W.B.: *J. Mol. Biol.*, 16:118, 1966.
- [16] Bachmann, D.J.: *Bacteriol. Rev.*, 36:525, 1972.
- [17] Murray, N.E.: *Mol. Gen. Genet.*, 150:53, 1972.
- [18] Vieira, J. et al.: *Gene*, 19:259, 1982.
- [19] Bolivar, F. et al.: *Gene*, 2:95, 1977.
- [20] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, 3:208, 1961.
- [21] Birnboim, H.C. et al.: *Nucl. Acid Res.*, 7:1513, 1979.
- [22] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. 1982.
- [23] Ausabel, F.M.: *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1987.
- [24] 关颖谦等: 生物工程学报, 4(1):11, 1988.
- [25] 关颖谦等: 生物工程学报, 5(1):30, 1989.
- [26] Alexander, D.C. et al.: *Gene*, 31:79, 1984.

## Cloning of GL-7-ACA Acylase Gene from *Pseudomonas* sp.130 and Its Expression in *Escherichia coli*

Yang Yunliu Yun Dinfang Guan Yingqian Peng Huilin

Chen Jianmin He Yunsheng Jiao Ruishen

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

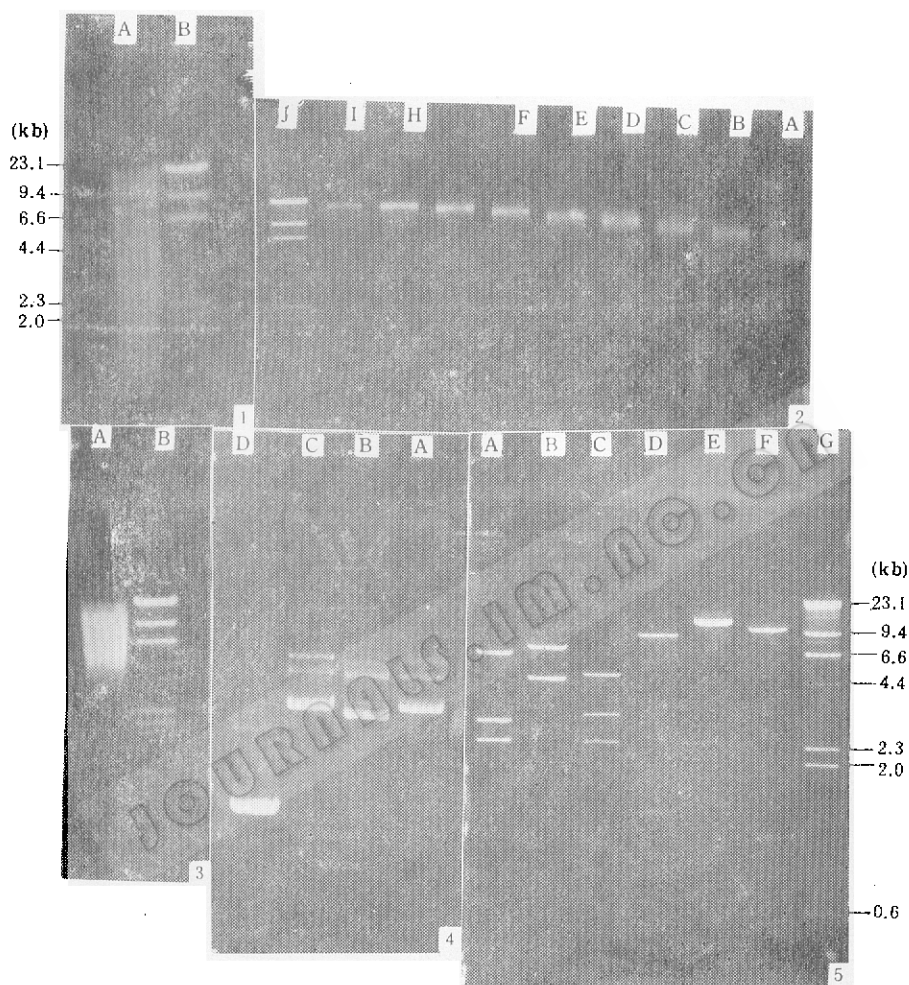
Using BamHI digested and dephosphorylated pBR322 as vector, a GL-7-ACA acylase gene from *Pseudomonas* sp.130 chromosomal DNA was cloned and expressed in *E. coli* C600. Seven positive clones were detected from 3205 recombinant plasmids with  $^{32}\text{P}$ -labeled oligonucleotide *in situ* hybridization. Out of them, three clones which produce active GL-7-ACA acylase were identified by radio-immunological assay, chemical test and chromatographic analysis of reaction mixture. The plasmid DNA of recombinant pMR5, pMR6 and pMR7 were extracted. Analysis of gel electrophoresis indicated that pMR5 and pMR7 contained the



same 6.8kb fragment and the size of the insert in pMR6 was 5.7kb. The effect of various *E. coli* hosts on the expression of cloned GL-7-ACA acylase gene is also reported.

### Key words

Gene cloning; GL-7-ACA acylase; 7-ACA



1. Pattern of 0.7% agarose gel electrophoresis  
 Sau 3A partial digested Ps.130 chromosomal DNA  
 A. Ps.130 DNA + Sau 3A; B.  $\lambda$ DNA + Hind III (MW.Marker)
2. Fractionation of Sau 3A digested Ps.130 DNA by centrifugation in 10—40% sucrose gradient  
 A to I. Fractions collected; J.  $\lambda$ DNA + Hind III (MW.marker)
3. DNA from pooled fractions containing fragments larger than 4kb in size  
 A. Pooled DNA; B.  $\lambda$ DNA + Hind III (MW.marker)
4. Agarose gel (0.7%) electrophoresis of recombinant plasmid DNA  
 A. Recombinant plasmid pMR5 DNA; B. pMR6; C. pMR7; D. Vector plasmid pBR322 DNA
5. Agarose gel analysis of cloned GL-7-ACA acylase<sub>7</sub> gene fragment  
 A. pMR5 DNA + (EcoRI + XhoI); B. pMR5 DNA + (EcoRI + HpaI); C. pMR6 DNA + (EcoRI + XhoI); D. pMR6 DNA + (EcoRI + HpaI); E. pMR5 DNA + EcoRI;  
 F. pMR6 DNA + EcoRI; G.  $\lambda$ DNA + Hind III