耐热赖氨酸氨肽酶菌株筛选、鉴定及基因克隆

吴延涛， 丁国伟， 席宏星， 田亚平*

（江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：从土壤中筛选得到一株氨肽酶产生菌，经生理生化和分子生物学鉴定被命名为铜绿假单胞杆菌 NJ-814（*Pseudomonas aeruginosa* NJ-814）。在已考察知其所产氨肽酶是一种耐热赖氨酸氨肽酶的基础上，运用 PCR 技术从基因组中克隆获得该氨肽酶基因（*kap*），构建其表达载体 pET-28a-*kap*，并最终实现在大肠杆菌 BL21(DE3)中部分融合表达。*kap* 基因全长 1 500 bp，编码 499 个氨基酸。氨基酸序列同源性分析发现，其与脱叶链霉菌和糖多孢红霉菌的同源性较高。通过生物信息学方法对其理化性质和功能分析以及 *kap* 在大肠杆菌中实现异源表达，将为进一步研究该氨肽酶的耐热机制及功能创造基础。

关键词：铜绿假单胞杆菌；耐热氨肽酶；筛选；基因克隆

中图分类号：Q 55　**文献标志码：**A　**文章编号：**1673—1689(2014)08—0821—06

Strain with Thermo-Stable Lysine Aminopeptidase: Isolation, Identification and Gene Cloning

WU Yantao, *DING Guowei*, *XI Hongxing*, *TIAN Yaping**

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The strain isolated from soil, producing an aminopeptidase, was identified by physiological, biochemical and molecular biological methods, named *Pseudomonas aeruginosa* NJ-814. Based on this enzyme which have been investigated a thermo-stable Lysine Aminopeptidase, the kap gene was cloned from the genomic DNA of *Pseudomonas aeruginosa* NJ-814 by PCR. The expression vector pET-28a-*kap* was constructed to partly express fusion protein in *E. coli* BL21 (DE3). The *kap* gene contains 1 500 nucleotides coding 499 amino acids. The deduced amino acids of *kap* had a high similarities with *Streptomyces exfoliates* and *Saccharopolyspora erythraea.* The physical and chemical properties was analyzed with the biological informatics method and the *kap* gene was successfully expressed in the *E. coli* BL21(DE3), which lay the foundation for further research of the thermo-stable mechanisms and functional characterization of the aminopeptidase.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, thermo-stable aminopeptidase, isolation, gene cloning

---

收稿日期：2013-11-10

基金项目：国家 863 计划项目(2011AA100905)。

* **通信作者：**田亚平(1964—)，女，江苏无锡人，工学博士，教授，硕士研究生导师，主要从事生物活性物质方面的研究。

E-mail: yapingtian@hotmail.com

氨肽酶(aminopeptidase,简称 AP)是可以从多肽链的 N 端顺序水解氨基酸、使氨基酸逐个游离出来的酶[1]。氨肽酶广泛分布于植物、动物和微生物中[2]。其可用于肉制品加工,乳品业等;可减少制品苦味,增加游离氨基酸,提高食品营养价值;还可用作蛋白序列测定的分子工具及重组蛋白或融合产物的固化剂等。大多数食品中蛋白原料经内切型商品蛋白酶类水解后,往往因为肽末端的疏水氨基酸存在比例较高,常常会出现苦味,脱苦问题是蛋白酶解产物在食品中扩展应用的主要障碍。赖氨酸氨肽酶(Lysine aminopeptidase,KAP)不仅偏好从 N-末端水解多肽链释放出赖氨酸,有利于提高必需氨基酸的含量,且对一些疏水性氨基酸末端水解能力相对较强,因此该类酶在食品加工和饲料添加剂方面有广泛的应用价值[3]。

耐热氨肽酶具有提高化学反应速率、简化工艺、降低成本、提高产品质量、活性稳定和耐贮藏等优点,因此具有更广阔的应用前景。国内外关于耐热氨肽酶的研究鲜见报道。已经发现产耐热氨肽酶的菌株有:*Bacillus stearothermophilus*[4],*Bacillus kaustophilus*[5],*Thermus aquaticus*[6],*Aquifex aeolicus*[7],*Pyrococcus horikoshii*[8]和 *Pseudomonas aeruginosa*[9],但是大多数研究内容仍主要集中在酶的分离纯化及酶学表征方面,尚较少有耐热氨肽酶的异源表达等方面的研究。

作者筛选得到一株产耐热赖氨酸氨肽酶的菌株,对该菌进行了鉴定。对其在 *E. coli* 中异源表达进行了探究,并对该产酶基因的特点进行了初步分析,为进一步探讨该类耐热氨肽酶的结构和功能的关系及最终实现其异源高效表达创造良好的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 氨肽酶产生菌分离样品 橡胶厂附近土样。

1.1.2 培养基 富集培养基和发酵培养基(组分 g/L):胰蛋白胨 10,酵母膏 5,NaCl 10,琼脂 20;pH 7.0。

初筛培养基 (脱脂牛奶琼脂平板)(组分 g/L):脱脂牛奶 15,琼脂 20;自然 pH。

1.1.3 菌株和质粒 *E. coil* JM109、质粒 pET-28a(+):宝生物工程(大连)有限公司;*E. coil* BL21(DE3):Novagen 公司产品。

1.1.4 主要试剂 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒:上海生物工程有限公司;所有底物:美国 Alfa 公司;限制性内切酶:宝生物工程(大连)有限公司;分子级的酵母粉、蛋白胨:英国 Oxoid 公司;其他试剂:国产分析纯。

1.2 氨肽酶产生菌的筛选

1.2.1 富集 将 10 g 土样加入 90 mL/250 mL 的无菌生理盐水中,玻璃珠振荡均匀。取 0.1 mL 悬浮液加入 50 mL/250 mL 富集培养基中,37 ℃、200 r/min 富集培养 24 h。

1.2.2 初筛 将经富集培养的菌液用无菌水适当稀释,取一定量涂布到脱脂牛奶琼脂平板中,37 ℃培养 24 h,将产生透明圈的菌株点种到另一个脱脂牛奶琼脂平板上,培养 48 h,测得 $\Phi_{透明圈}/\Phi_{菌落}\geq 2.5$ 的菌株作为待研究的出发菌株。

1.2.3 复筛 复筛利用 LNA 法[10],测定初筛所得菌株发酵液中氨肽酶的活性。首先加入 2 mL pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液和 1 mL 底物 (L-亮氨酸对硝基苯胺 L-leu-pNA),然后再加入稀释一定倍数的发酵液,在 50 ℃水浴反应 10 min 后,OD_{405} 比色测定酶活。

1.2.4 酶活定义 在 50 ℃,每分钟分解 L-leu-pNA 产生 1 μmoL 的对硝基苯胺所需酶量即为一个酶活单位。

1.3 氨肽酶产生菌的鉴定

1.3.1 形态及理化鉴定 参阅《伯杰氏细菌鉴定手册》[11]。

1.3.2 16S rDNA 的扩增及测序 使用通用引物 27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3′)和 1492R(5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)。经 PCR 扩增细菌的 16S rDNA。扩增条件为:预变性 95 ℃ 5 min,然后 94 ℃ 45 s,56 ℃ 90 s,72 ℃ 90 s 为一个循环,共进行 35 个循环,72 ℃后延伸 10 min。PCR 产物经纯化连接到 T-载体后送南京金斯瑞有限公司进行测序。菌株的测序结果通过 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 网站上的 Blast 程序与 Genbank 中核酸数据库进行对比分析。

1.4 氨肽酶基因的克隆表达

1.4.1 基因的克隆 按照细菌全基因提取试剂盒的说明书提取 *P. aeruginosa* NJ-814 的全基因组,根据已报道的铜绿假单胞杆菌氨肽酶基因设计引物,分别在正义链、反义链引入 *Bam*H I、*Hind* III 酶

切位点及保护碱基序列,引物序列如下(下划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶酶切位点):P1:5′-CGGGATCCATGGGCAAACCCAACCC-3′;P2:5′-CCCAAGCTTTTACTTGATGAAGTCGTGACCC-3′。PCR 反应条件:预变性 95 ℃ 5 min,95 ℃ 15 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s, 共 33 个循环;72 ℃ 5 min。

1.4.2 克隆质粒的构建与转化 双酶切并纯化的 PCR 产物和 pET-28a(+),16 ℃连接过夜,连接产物转化到 *E. coli* JM109 感受态细胞, 通过菌落 PCR、双酶切验证确定阳性转化子,并由上海生物工程有限公司完成测序。将连接产物转入 *E. coil* BL21(DE3)中,获得转化子。

1.4.3 生物信息学分析 将测序结果,经 DNASTAR 拼接, 利用 DNAMAN 初步分析。通过 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)进行蛋白序列的同源性分析。使用在线分析网站 ProtParam tool (http://www.expasy.ch/tools/protparam.html) 分析蛋白氨基酸基本成分;蛋白质二级结构分析用 Predict Protein(https://www.predictprotein.org/);蛋白质三级结构预测用 SWISS-MODEL 的蛋白质结构同源模型服务器 (http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html)。

1.4.4 重组氨肽酶的诱导 将转化子转接到终浓度 50 μg/mL 卡那霉素抗性 30 mL/250 mL 的 LB 液体培养基中,37 ℃振荡培养过夜,再以 3%的接种体积分数接到新鲜的含抗性的 LB 培养基中,200 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.6,加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,16 ℃诱导 14 h。8 000 r/min 离心 10 min,收集菌体用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0)漂洗两次。加入原体积 1/5 的上述缓冲溶液重悬菌体,超声波破碎至澄清离心收集上清液, 即细胞裂解液。以未经 IPTG 诱导的重组菌作对照。离心后分别收集上清液及沉淀用于 SDS-PAGE 电泳检测。

2 结果与讨论

2.1 氨肽酶产生菌株的筛选

氨肽酶是一种外切型蛋白酶,因此作者借鉴蛋白酶产生菌的筛选方法,初筛筛选产蛋白酶较强的菌株。由表 1 可知:符合 $\Phi_{透明圈}/\Phi_{菌落}\geq 2.5$ 的菌株,分别为 NJ03、NJ04、NJ05、NJ08、NJ09、NJ10、NJ11、NJ12、NJ13、NJ14 和 NJ15。以这 11 株菌为复筛出发菌株, 利用 LNA 法测定其发酵液中氨肽酶的活性。初步确定 NJ03 具有较高的酶活,为 0.61 U/mL。

表 1 菌株初筛结果

Table 1 Result of primary screening of these strains

菌株	$\Phi_{菌落}$/cm	$\Phi_{透明圈}$/cm	$\Phi_{透明圈}/\Phi_{菌落}$
NJ01	0.65	0.75	1.15
NJ02	2.24	3.25	1.45
NJ03	0.70	2.25	3.21
NJ04	0.82	2.40	2.92
NJ05	0.60	1.90	3.12
NJ06	1.25	2.40	1.92
NJ07	1.18	2.55	2.16
NJ08	0.65	2.15	3.30
NJ09	0.65	1.90	2.92
NJ10	0.80	2.35	2.93
NJ11	1.75	3.30	1.89
NJ12	1.85	3.05	1.65
NJ13	0.55	2.05	3.73
NJ14	0.72	2.25	3.13
NJ15	0.41	1.10	2.68

2.2 产氨肽酶菌株的鉴定

2.2.1 生理生化鉴定 参照细菌生理生化鉴定的基本方法和操作,对这株菌的部分生理生化特征进行实验观察,见表 2。

表 2 NJ03 菌株的生理生化特点

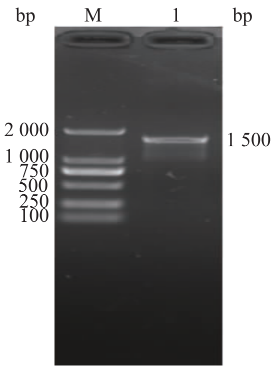
Table 2 Characteristics of the NJ03 strain

检测类型	结果	检测类型	结果
革兰氏反应	–	5%NaCl	+
过氧化氢酶	+	7%NaCl	–
V.P 反应	–	10%NaCl	–
V.P 反应的 pH	+	果糖产酸产气	+/–
柠檬酸盐利用	+	木糖产酸产气	+/–
明胶利用	+	乳糖产酸产气	–/–
淀粉水解	–	蔗糖产酸产气	–/+
		甘露醇产酸产气	+/+
		葡萄糖产酸产气	+/–

2.2.2 16S rDNA 分析 NJ03 的 16S rDNA 全长序列为 1 402 bp, 测序结果通过比对发现和铜绿假单胞杆菌 PAO1(*Pseudomonas aeruginosa* PAO1,基因登录号为NR074828.1) 的 16S rDNA 序列相似性达 100%。结合 NJ03 的生理生化鉴定以及 16S rDNA 分析结果,初步鉴定该菌为铜绿假单胞杆菌。命名为 *Pseudomonas aeruginosa* NJ-814。

2.3 *P. aeruginosa* NJ-814 氨肽酶基因的克隆

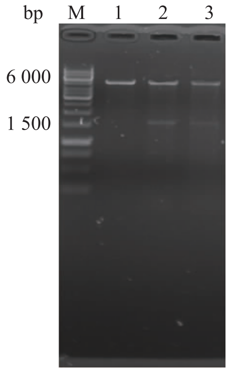
2.3.1 氨肽酶基因克隆及表达载体的构建 根据 *P. aeruginosa* PAO1 中氨肽酶基因序列设计引物，以 *P. aeruginosa* NJ-814 提取的全基因组作为模板，扩增出长度约为 1 500 bp 的基因片段，见图 1。目的片段和 pET-28a(+)载体经 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切回收后，经 T4 连接酶连接，构建了原核表达载体 pET28a-*kap*。将连接产物转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞，通过 Kan 抗性筛选，提取质粒双酶切验证，切出约 1 500 bp 大小的目的条带，见图 2，结果表明已成功将该基因连接到 pET-28a(+)载体上。



M：Marker；1：PCR 产物

图 1 氨肽酶基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 Amplification of aminopeptidase gene by PCR



M：Marker；1：空载；2，3：重组质粒

图 2 重组质粒酶切验证

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid by *Bam*H Ⅰ and *Hind* Ⅲ

2.3.2 DNA 序列分析 对鉴定的重组质粒进行正反向测序，经 DNASTAR 拼接后，得到的基因长度为 1 500 bp。编码 499 个氨基酸，见图 3。测序结果经 NCBI 中 BLAST 检索数据库发现与其它物种中的氨肽酶基因的核苷酸序列具有较高同源性，尤其与脱叶链霉菌和糖多孢红霉菌高达 75%和 73%。

```
1    ATGGGCAAACCCAACCCGTCGATCTGCAAATCGCCGTTGCTGGTCAGCACCCCGCTTGGC
      M  G  K  P  N  P  S  I  C  K  S  P  L  L  V  S  T  P  L  G
61   CTGCCGCGCTGCCTGCAAGCCAGCAACGTGGTCAAGCGCCTGCAGAAGCTGGAGGACATC
      L  P  R  C  L  Q  A  S  N  V  V  K  R  L  Q  K  L  E  D  I
121  GCCAGTCTCAACGACGGCAACCGCGCCGCCGCCACGCCGGGCTACCAGGCCTCCGTCGAC
      A  S  L  N  D  G  N  R  A  A  A  T  P  G  Y  Q  A  S  V  D
181  TACGTGAAGCAGACCCTGCAGAAAGCCGGCTACAAGGTCAGCGTGCAGCCCTTCCCGTTC
      Y  V  K  Q  T  L  Q  K  A  G  Y  K  V  S  V  Q  P  F  P  F
241  ACCGCCTACTACCCGAAAGGCCCGGGTAGCCTGAGCGCCACCGTGCCGCAGCCGGTCACC
      T  A  Y  Y  P  K  G  P  G  S  L  S  A  T  V  P  Q  P  V  T
301  TACGAATGGGAGAAGGACTTCACCTACCTGTCGCAGACCGAGGCAGGCGACGTCACCGCC
      Y  E  W  E  K  D  F  T  Y  L  S  Q  T  E  A  G  D  V  T  A
361  AAGGTGGTCCCGGTGGACCTGTCCCTCGGCGCCGGCAACACCTCCACCAGCGGTTGCGAG
      K  V  V  P  V  D  L  S  L  G  A  G  N  T  S  T  S  G  C  E
421  GCGGAAGACTTCGCCAACTTCCCGGCCGGCTCGATCGCGCTGATCCAGCGCGGCACCTGC
      A  E  D  F  A  N  F  P  A  G  S  I  A  L  I  Q  R  G  T  C
481  AACTTCGAGCAGAAGGCCGAGAACGCCGCGGCCGCCGGCGCCGCCGGGGTGATCATCTTC
      N  F  E  Q  K  A  E  N  A  A  A  A  G  A  A  G  V  I  I  F
541  AACCAGGGCAACACCGACGACCGCAAGGGCCTGGAGAACGTCACCGTGGGCGAGTCCTAC
      N  Q  G  N  T  D  D  R  K  G  L  E  N  V  T  V  G  E  S  Y
601  GAGGGCGGCATCCCGGTGATCTTCGCCACCTACGACAACGGCGTGGCCTGGTCGCAGACC
      E  G  G  I  P  V  I  F  A  T  Y  D  N  G  V  A  W  S  Q  T
661  CCGGACCTGCAGTTGCACCTGGTGGTCGACGTGGTACGCAAGAAGACCGAGACCTACAAC
      P  D  L  Q  L  H  L  V  V  D  V  V  R  K  K  T  E  T  Y  N
721  GTGGTCGCCGAGACCCGTCGCGGCAACCCGAACAACGTGGTGATGGTCGGCGCGCACCTC
      V  V  A  E  T  R  R  G  N  P  N  N  V  V  M  V  G  A  H  L
781  GACTCGGTGTTCGAAGGCCCCGGTATCAACGACAACGGTTCGGGCAGCGCCGCCCAACTG
      D  S  V  F  E  G  P  G  I  N  D  N  G  S  G  S  A  A  Q  L
841  GAGATGGCCGTGCTGCTGGCCAAGGCGCTGCCGGTCAACAAGGTGCGCTTCGCCTGGTGG
      E  M  A  V  L  L  A  K  A  L  P  V  N  K  V  R  F  A  W  W
901  GGCGCCGAGGAAGCCGGCCTGGTGGGCTCGACCCACTACGTGCAGAACCTCGCCCCGGAA
      G  A  E  E  A  G  L  V  G  S  T  H  Y  V  Q  N  L  A  P  E
961  GAGAAGAAGAAGATCAAGGCCTACCTGAACTTCGACATGATCGGCTCGCCGAACTTCGGC
      E  K  K  K  I  K  A  Y  L  N  F  D  M  I  G  S  P  N  F  G
1021 AACTTCATCTATGACGGCGACGGTTCCGACTTCGGCCTCCAGGGTCCGCCCGGCTCGGCC
      N  F  I  Y  D  G  D  G  S  D  F  G  L  Q  G  P  P  G  S  A
1081 GCCATCGAGCGCCTGTTCGAAGCCTACTTCCGCCTGCGCGGCCAGCAATCGGAAGGCACC
      A  I  E  R  L  F  E  A  Y  F  R  L  R  G  Q  Q  S  E  G  T
1141 GAGATCGACTTCCGCTCCGACTACGCCGAGTTCTTCAACAGCGGCATCGCCTTCGGCGGC
      E  I  D  F  R  S  D  Y  A  E  F  F  N  S  G  I  A  F  G  G
1201 CTGTTCACCGGCGCCGAGGGCCTGAAGACCGAAGAGCAGGCGCAGAAGTACGGCGGCACC
      L  F  T  G  A  E  G  L  K  T  E  E  Q  A  Q  K  Y  G  G  T
1261 GCCGGCAAGGCCTACGACGAGTGCTACCACAGCAAGTGCGACGGCATCGCCAACATCAAC
```

图 3 *P. aeruginosa* NJ-814 氨肽酶成熟肽编码序列和推测的氨基酸序列

Fig. 3 Coding sequence of mature peptide of aminopeptidase from *P. aeruginosa* NJ-814 and its amino acid

2.3.3 *P. aeruginosa* 中编码氨肽酶基因所对应氨基酸的一般理化性质 利用 ExPASy 服务器在线软件，分析 *P. aeruginosa* 中编码氨肽酶基因的理化性质，见表 3。

表 3 *P. aeruginosa* NJ-814 中编码氨肽酶基因的理化性质

Table 3 Physical and chemical properties of aminopeptidase gene from *P. aeruginosa* NJ-814

一级结构特征	预测结果
相对分子质量	53 500
等电点	5.00
负电荷残基(Asp + Glu)/个	58
正电荷残基(Arg + Lys)/个	43
分子式	C2376H3667N6410746S12
不稳定系数	36.09
平均疏水性(GRAVY)	-0.29
脂肪指数	75.66

预测结果表明，该基因所编码的氨肽酶等电点为 5.00，属于酸性类型，相对分子质量约为 53 500；编码该基因的氨基酸的不稳定系数为 36.09，表明该蛋白质属于较稳定蛋白质；其总平均疏水指数

(GRAVY)为-0.29，预测为亲水性蛋白质。该蛋白质由20种基本氨基酸组成，其中Ala和Gly的含量最高分别为10.8%和10.0%，Cys、His、Trp和Met含量最少，均为1.2%，见表4。预测其二级结构，发现α-螺旋占26.25%，β-转角占17.03%，无规卷曲占56.71%。利用SWISS-MODEL[12]对其三级结构进行预测，对提交的目标氨基酸序列进行模板识别，选择相似度最高的*Aneurinibacillus* sp. AM-1的氨肽酶蛋白(PDB code:2ek8)为模板进行同源建模，在比对过程中发现该氨肽酶基因具有PA结构域、Zn-肽链端解酶、M28族金属酶相关序列，结果见图4。

表4 氨基酸组成分析

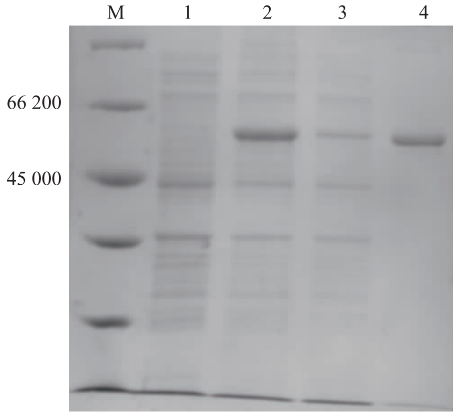
Table 4 Composition of amino acid

氨基酸	含量/%	氨基酸	含量/%
Ala(A)	10.9	Met(M)	1.0
Cys(C)	1.2	Asn(N)	5.2
Asp(D)	5.4	Pro(P)	4.6
Glu(E)	6.2	Gln(Q)	5.2
Phe(F)	4.6	Arg(R)	3.0
Gly(G)	10.1	Ser(S)	7.0
His(H)	1.2	Thr(T)	5.2
Ile(I)	4.2	Val(V)	7.2
Lys(K)	5.6	Trp(W)	1.2
Leu(L)	7.0	Tyr(Y)	3.6

图4 蛋白3D模拟结果

Fig. 4 Three-dimensional structure of protein

2.3.4 基因的诱导表达 以融合蛋白的含量作为指标，分别从诱导剂浓度、诱导时间、诱导温度等方面优化诱导条件，选择最佳诱导条件：0.4 mmol/L IPTG，16 ℃诱导14 h。但大部分仍是包涵体。经IPTG诱导后，含有重组质粒的*E. coil* BL21(DE3)菌株破壁上清液在约53 000处出现特异蛋白质条带，见图5。利用LAN法测定酶活，检测到活性较低，当向反应体系中加入终浓度50 mmol/L的Co^{2+}，测定比酶活为7.2 U/mg。可能的原因为：1)有些酶发挥作用需要辅助因子，有可能是该重组菌所产的氨肽酶在测酶活时需要额外添加辅因子Co^{2+}；2)该重组蛋白并未正确折叠，Co^{2+}对该氨肽酶结构具有积极的作用。如有研究表明，在许多天然和设计的金属蛋白中，配位作用能改变金属结合部位周围的肽链构象，从而产生成熟酶[13]；3)没有在更适合表达的载体或宿主中进行分泌。比如外源基因在大肠杆菌中表达存在密码子偏爱性，偏爱性不好导致表达量低，同时还可能会因为其它各种原因而不表达。



M：Marker；1：对照全细胞；2：IPTG诱导全细胞；3：破碎液上清；4：破碎液沉淀。

图5 氨肽酶表达的SDS-PAGE分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the expression of aminopeptidase

3 结语

作者从土壤中筛选得到一株产氨肽酶的菌株，通过生理生化鉴定和16S rDNA分析，鉴定该菌为铜绿假单胞杆菌，并命名为*P. aeruginosa* NJ-814。对*P. aeruginosa* NJ-814所产氨肽酶纯化后的酶学性质进行考察，其最适反应温度80 ℃，80 ℃半衰期为119 min；底物特异性考察发现其对Lys-pNA的分解能力最强，对Leu-pNA及一些疏水氨基酸末端也有较好水解能力。表明*P. aeruginosa* NJ-814是一株产耐热赖氨酸氨肽酶的菌株，其优良的酶学性质使得该酶有广阔的工业应用前景。利用生物信息学方法对*P. aeruginosa* NJ-814中氨肽酶基因的理化性质分析、结构预测以及在*E. coil* BL21(DE3)表达的探究，为其基因功能的进一步研究提供线索，对实现该基因的异源高效表达以及对该酶的耐热机制研究提供参考。

参考文献：

[1] Sanderink G J, Artur Y, Siest G. Human aminopeptidases: a review of the literature [J]. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, 1988, 26(12): 795-808.

[2] Zhang L, Cai Q F, Wu G P, et al. Arginine aminopeptidase from white shrimp (Litopenaeus vannamei) muscle: purification and characterization[J]. **European Food Research and Technology**, 2013, 236: 759-769.

[3] Marui J, Matsushita-Morita M, Tada S, et al. Comparison of expression and enzymatic properties of *Aspergillus oryzae* lysine amino peptidases ApsA and ApsB[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2012, 28(8): 2643-2650.

[4] Wang T F, Lin M G, Lo H F, et al. Biophysical characterization of a recombinant aminopeptidase II from the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus*[J]. **Journal of Biological Physics**, 2013: 1-16.

[5] Lin L L, Hsu W H, Wu C P, et al. A thermostable leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223[J]. **Extremophiles**, 2004, 8(1): 79-87.

[6] Minagawa E, Kaminogawa S, Matsuzawa H, et al. Isolation and characterization of a thermostable aminopeptidase (aminopeptidase T) from *Thermus aquaticus* YT-1, an extremely thermophilic bacterium (biological chemistry)[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1988, 52(7): 1755-1763.

[7] Khan A R, Nirasawa S, Kaneko S, et al. Characterization of a solvent resistant and thermostable aminopeptidase from the hyperthermophillic bacterium, *Aquifex aeolicus*[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2000, 27(1): 83-88.

[8] Ando S, Ishikawa K, Ishida H, et al. Thermostable aminopeptidase from *Pyrococcus horikoshii* [J]. **FEBS Letters**, 1999, 447(1): 25-28.

[9] Gaur R, Grover T, Sharma R, et al. Purification and characterization of a solvent stable aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*: Cloning and analysis of aminopeptidase gene conferring solvent stability [J]. **Process Biochemistry**, 2010, 45(5): 757-764.

[10] 张静，田亚平. 丁二酸酐修饰对枯草芽孢杆菌氨肽酶结构及酶学特性的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32 (6): 622-627.
ZHANG Jing, TIAN Yaping. Chemical modification of the *Bacillus subtilis* aminopeptidase by succinic anhydride and its enzyme properties[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(6): 622-627. (in Chinese)

[11] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组译. 北京：科学出版社, 1984: 278-279.

[12] Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models [J]. **Bioinformatics**, 2011, 27(3): 343-350.

[13] Firbank S J, Rogers M S, Wilmot C M, et al. Crystal structure of the precursor of galactose oxidase: an unusual self-processing enzyme[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2001, 98(23): 12932-12937.

会　议　信　息

会议名称(中文)：第七届中国饲料营养学术研讨会

所属学科：畜牧学,动物食品科学

开始日期：2014-10-01　　所在城市：北京市东城区

主办单位：中国畜牧兽医学会动物营养学分会

联系电话：010-62731297　　E-MAIL：dwyyxfh@163.com

会议网站：http://www.ananutri.com/zhaoyaotongzhi/201306/155.html

会议背景介绍：根据中国畜牧兽医学会动物营养学分会第九届理事会第一届理事长工作会议精神以及“第九届理事会第一届秘书长和专题组主任”工作会议的要求，由中国畜牧兽医学会动物营养学分会饲料营养专题组委员会主办的“第七届中国饲料营养学术研讨会”计划于 2014 年 10 月举行

大会内容主要有：邀请国内外专家就当前饲料科学与动物营养领域的热点问题作专题报告、讲座；围绕“质量-生态-健康”主题开展饲料科学与动物营养学术交流与研讨；重点开展饲料原料及饲料添加剂产业前沿科研成果介绍和创新产品展示与信息交流；同时召开中国畜牧兽医学会动物营养学分会第九届二次全体理事会、《动物营养学报》编委会会议。