

Pyrococcus yayanosii L-天冬酰胺酶在枯草芽孢杆菌中分泌途径的鉴定及其分泌能力的提高

李 谔^{1,2}, 徐书琴^{1,2}, 张 显^{1,2}, 徐美娟^{1,2},
杨套伟^{1,2}, 张惠玲³, 方海田³, 饶志明^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 食品安全(GRAS)菌株枯草芽孢杆菌由于其具有良好的分泌表达能力及易于基因工程操作等特性被广泛用作外源蛋白质的表达菌株。枯草芽孢杆菌中蛋白质的分泌大多依赖于信号肽介导的 Sec 分泌途径 (General secretion pathway) 和 Tat 分泌途径 (Twin-arginine translocation pathway)。在本研究中, 通过信号肽预测、蛋白质 N 端测序等手段发现来自于 *Pyrococcus yayanosii* L-天冬酰胺酶在枯草芽孢杆菌中的分泌并不依赖信号肽, 该酶通过非经典蛋白质分泌途径(non-classical protein secretion pathway)进行分泌。通过信号肽筛选, 发现最适合该酶在枯草芽孢杆菌中表达的信号肽为 Tat 分泌途径信号肽 SP_{phoD}, 并通过共表达分子伴侣 PrsA 的方式将该 L-天冬酰胺酶的分泌量提高了 72.11%。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 分泌表达; L-天冬酰胺酶; 信号肽; 分子伴侣

中图分类号: Q 933 文章编号: 1673-1689(2020)11-0034-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.11.005

Secretion Pathway Identification of *Pyrococcus yayanosii* L-Asparaginase in *Bacillus subtilis* and the Secretion Level Improvement

LI Xu^{1,2}, XU Shuqin^{1,2}, ZHANG Xian^{1,2}, XU Meijuan^{1,2}, YANG Taowei^{1,2},
ZHANG Huiling³, FANG Haitian³, RAO Zhiming^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: *Bacillus subtilis*, generally recognized as safe (GRAS), was widely used as host strain to express heterologous proteins due to its good secretion ability and easy genetic manipulations. In *B. subtilis*, most of the signal peptide-mediated secretion was depended on Sec-pathway (General secretion pathway) or Tat-pathway (Twin-arginine translocation pathway). In this study, through

收稿日期: 2019-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500065); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题项目(LITE2018-06); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP51708A); 宁夏回族自治区科技创新团队项目(KJT2017001); 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2017BY069); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目; 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

* 通信作者: 饶志明(1975—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物与代谢工程方面的研究。E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

signal peptide prediction and protein N terminal sequencing, the secretion of *Pyrococcus yayanosii* L-asparaginase in *B. subtilis* was confirmed to depend on non-classical protein secretion pathway. By signal peptide screening, the Tat-pathway signal peptide SP_{phoD} was found to be beneficial for the L-asparaginase secretion in *B. subtilis*. With the co-expression of SP_{phoD} and molecular chaperone PrsA, the L-asparaginase secretion was increased by 72.11% compared with that of the original one.

Keywords: *Bacillus subtilis*, L-asparaginase, secretion, signal peptide, molecular chaperone

在利用微生物进行表达重组蛋白质的过程中,良好的分泌性能降低产品回收成本,是重组蛋白质能否进行工业生产的重要考量因素。为了满足工业生产的需求,科研工作者们通过基因工程手段建立了许多提高分泌的策略^[1-3]。其中,枯草芽孢杆菌由于缺少细胞外膜而具有良好的分泌能力^[4],是分泌生物制品的理想宿主。同时,枯草芽孢杆菌还具有食品安全性^[5]、基因信息清楚^[6]、良好的生产技术和发酵基础等特性,因此被广泛应用于蛋白质、食品添加剂、抗生素的生物发酵制备当中。

在枯草芽孢杆菌中,根据分泌的蛋白质是否依赖信号肽,可以分为信号肽依赖的分泌途径和不依赖于信号肽的分泌途径。枯草芽孢杆菌中依赖信号肽分泌的途径又分为以下4种^[7]:Sec分泌途径(General secretion pathway),原核微生物中主要的蛋白质分泌途径,该类信号肽的最典型特征是C端氨基酸序列为Ala-X-Ala(X代表任何氨基酸),由I型信号肽酶切割;Tat分泌途径(Twin-arginine translocation pathway),其特征在N端含有双精氨酸(RR/KR)二级结构;ABC转运途径(ATP-binding cassette transporter),ABC转运途径仅用于细菌素等分子的输出^[8];假菌丝蛋白质输出途径(Pseudophilin pathway),假菌丝蛋白质输出途径参与枯草芽孢杆菌细胞感受态的形成^[9]。在枯草芽孢杆菌胞外蛋白质组中的113种被鉴定的蛋白质中,约有15%的蛋白质缺少信号肽但依然被分泌到胞外培养基中^[2]。这些不依赖于信号肽的蛋白质分泌途径研究相对较少,其分泌机理尚无法完全解析,并且与经典分泌途径有所不同,因此该分泌途径被称为非经典分泌途径(non-classical protein secretion pathway)^[10]。

L-天冬酰胺酶(L-Asparaginase, EC 3.5.1.1)能够通过水解L-天冬酰胺脱氨基形成L-天冬氨酸和氨^[11],其在医疗和食品行业中都具有重要的应用价值^[12]。在医疗行业中,L-天冬酰胺酶能降解癌细胞代谢循环所必须的L-天冬酰胺,从而杀死癌细胞^[13]。

在食品行业中,L-天冬酰胺酶能通过分解潜在致癌物质丙烯酰胺的前体天冬酰胺来降低高温、油炸食品中的丙烯酰胺含量^[14-15]。

在课题组此前的研究中^[16],我们已经在枯草芽孢杆菌中成功实现*Pyrococcus yayanosii* L-天冬酰胺酶的高产发酵,与此同时,我们发现部分该酶能被枯草芽孢杆菌分泌到胞外,基于此,作者分析鉴定了*Pyrococcus yayanosii* L-天冬酰胺酶在枯草芽孢杆菌中的分泌途径,并通过添加信号肽及其共表达分子伴侣的方式提高了其分泌水平。

1 材料与方法

1.1 实验材料

*E. coli*和*B. subtilis*穿梭质粒pMA5、克隆宿主*E. coli* JM109、表达宿主*B. subtilis* 168;由作者所在实验室保存;限制性核酸内切酶、PrimeSTAR[®] HS DNA聚合酶和T4 DNA连接酶;购买自TaKaRa生物公司(大连,中国);小型质粒快速分离试剂盒、DNA提取试剂盒和Mini DNA快速纯化试剂盒等;购自Sangon Biotech Co., Ltd(上海,中国);质粒同源重组试剂盒(ClonExpress[®] MultiS One-Step Cloning Kit);购自Vazyme Biotech Co.(南京,中国);其余试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒的构建 以作者所在实验室已构建含有*Pyrococcus yayanosii* L-天冬酰胺酶基因(*pyasnase*)的重组质粒pMA5-*pyasnase*为模板^[16],分别用引物F1&R1和F2&R2为模板分别克隆启动子P_{HpaI}和*pyasnase*,见表1。将获得的启动子P_{HpaI}和*pyasnase* PCR产物分别用EcoR I & EcoR V和EcoR V & Hind III限制性核酸内切酶进行双酶切,通过酶连的方式将启动子P_{HpaI}基因和*pyasnase*分别酶连于pMA5多克隆位点EcoR I & EcoR V和EcoR V & Hind III之间。以枯草芽孢杆菌168基因组为模板,分别用引物F3 & R3-F13 & R13分别扩

增信号肽基因 SP_{phoB} 、 SP_{LipA} 、 SP_{wapA} 、 SP_{ywbN} 、 SP_{YmaC} 、 SP_{pel} 、 SP_{yvhx} 、 SP_{lipB} 、 SP_{nprE} 。利用同源重组试剂盒将携带有启动子 P_{HpaII} 和 *pyasnase* 同源臂的信号肽基因连接到 P_{HpaII} 和 *pyasnase* 之间。嗜麦芽寡养单胞菌脂肪酶信号肽 SP_{lips} 基因由上海生工 Sangon Biotech Co., Ltd (上海, 中国) 合成并连接到 P_{HpaII} 和 *pyasnase* 之间。

表 1 引物序列表

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'—3')
F1	CCGGAATTCTAAAAATTGGCAAGGGTTT
R1	GGTGGGATATCTAAATCGCTCCTTTTTAGGTG
F2	AGAGCTCGATATCATGAGACTGCTGATCCTGGG
R2	CCTTGCTCTCCAAGCTTTTACGCGGATTTCCTCAAT T
F3	AGCGATTTACATATGGATATCATGGCATACGAC AGTCGTTTT
R3	GATCAGCAGTCTCATGATATCGGCCCAACCGA CTGGGCAA
F4	AGCGATTTACATATGGATATCATGAAATTTGTA AAAAGAAGG
R4	GATCAGCAGTCTCATGATATCAGCGGCTTTTGC TGACGGCTG
F5	AGCGATTTACATATGGATATCATGAAAAAAGA AAGAGCGCA
R5	GATCAGCAGTCTCATGATATCGGCTGGCACTAA TGAAATCAT
F6	AGCGATTTACATATGGATATCATGAGCGATGAA CAAAAAAAG
R6	GATCAGCAGTCTCATGATATCCGCAACGGCTGC CCCCGCCAT
F7	AGCGATTTACATATGGATATCATGAGAAGATTT TTACTAAAT
R7	GATCAGCAGTCTCATGATATCTTCTGTTTCAAT GAGTAATG
F8	AGCGATTTACATATGGATATCATGAAAAAAGTG ATGTTAGCT
R8	GATCAGCAGTCTCATGATATCTGCGTTTCGCGCC AGCTGGAGT
F9	AGCGATTTACATATGGATATCATGAAAAAATGG CTGATCATA
R9	GATCAGCAGTCTCATGATATCTGCCTTCGCTTCT CCTTTTGT
F10	AGCGATTTACATATGGATATCGTAAAAAAGTA CTTATGGCA
R10	GATCAGCAGTCTCATGATATCAGCTTTTGCGCCA GACGGCGG
F11	AGCGATTTACATATGGATATCGTGGGTTTAGGT AAGAAATTG
R11	GATCAGCAGTCTCATGATATCAGCCTGAACACC TGCCAGGCT
F12	CGCGGATCCATGAAGAAAATCGCAATAGC
R12	CGACCGGTTTATTTAGAATTGCTTGAAGA
F13	CGCGGATCCATGAGTAAAGTTATCGGAA
R13	CGACCGGTTTATTTTGTGTTTGGTTCGT

以枯草芽孢杆菌基因组为模板, 分别用引物 F12 & R12 和 F13 & R13 扩增 *PrsA* 和 *DnaK*, 并用酶切酶连的方式连接到含有信号肽基因 $pMA5$ 的 *BamHI* & *MluI* 间。将所得连接产物用热激法转入大肠杆菌 *E. coli* JM109 感受态细胞, 挑选阳性转化子, 测序并检测是否构建成功, 抽提质粒, 将质粒转化入枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 感受态细胞中进行表达。

1.2.2 L-天冬酰胺酶的表达和纯化 将重组枯草芽孢杆菌接种至含有终质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素的 LB 培养基中 (NaCl 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母浸出物 5 g/L), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 12 h, 作为种子液。取 1 mL 该种子液接种在 100 mL 的新鲜发酵培养基 (蔗糖 35 g/L, 蛋白胨 15 g/L, 尿素 0.8 g/L, 玉米浆 12 g/L, K_2HPO_4 2.612 g/L, KH_2PO_4 2.041 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.845 g/L, NaCl 5 g/L, L-天冬酰胺 1 g/L) 中, 并在相同条件下培养 24 h, 将扩增后的重组枯草芽孢杆菌细胞于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为胞外粗酶液, 用于胞外 L-天冬酰胺酶酶活测定, 并用 Edman 水解法降解, 并用质谱进行蛋白质 N 端测序。取其细胞用裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0) 重复洗涤细胞 3 次后, 在细胞裂解缓冲液中加入 6 mg/mL 溶菌酶, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h, 再于 20 MHz、45% 功率下, 超声处理细胞 30 min。将所得细胞裂解物在 12 000 r/min 下离心 25 min, 收集上清液作为胞内粗酶液, 用于胞内 L-天冬酰胺酶酶活测定。

1.2.3 L-天冬酰胺酶酶活的测定 L-天冬酰胺酶酶活测定采用 Li 等人所述的奈斯勒试剂显色法进行, 通过测定酶促反应所生成氨的量来计算酶促反应速率^[16]。在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下对底物 (1 mL 的 25 mmol/L L-天冬酰胺和 50 mmol/L, pH 8.0 Tris-HCl 混合物) 进行预热后, 加入 100 μL 酶溶液, 反应进行 10 min 后加入 100 μL 15% 的三氯乙酸 (TCA) 终止反应。反应后的混合物体系以 20 000 r/min 离心 10 min, 取 200 μL 澄清上清液加入 4.8 mL 去离子水中, 并加入 200 μL 奈斯勒试剂反应, 用分光光度计在 450 nm 处测量吸光度来检测反应中释放的氨的量。对照组在酶促反应前加入 100 μL 的 15% 三氯乙酸提前终止反应, 以除去由于高温下 L-天冬酰胺自水解带来的误差。酶活力单位定义: 在酶的最适反应条件下, 每分钟内产生 1 μmol 氨所需的酶量定义为 1 个酶

活单位。

2 结果与讨论

2.1 *Pyrococcus yanosii* L-天冬酰胺酶分泌途径的鉴定

利用食品安全菌株枯草芽孢杆菌分泌 L-天冬酰胺酶具有良好的食品应用前景^[16]。*Pyrococcus yanosii* L-天冬酰胺酶具有良好的热稳定性,在 85℃下的半衰期达到 105 min,37℃储藏1个月仍能保持 90%以上的酶活,具有良好的应用潜能^[17]。在此前的研究中,发现该酶在枯草芽孢杆菌中具有一定的分泌能力,摇瓶发酵 24 h 后,胞外和胞内酶活分别为 23.31、65.72 U/mL,本研究对其分泌途径进行了分析鉴定。

SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线预测软件能准确的预测信号肽切割位点,进而对信号肽进行预测^[18]。我们通过 SignalP4.1 Server 对该酶信号肽进行了预测,见图 1。发现其整段氨基酸序列的切割位点值(C 值)均较低,最高为 0.213,未发现信号肽切割位点,说明该酶不具有典型的信号肽。同时,我们将胞外所得酶液体进行 N 端测序,发现分泌到胞外该酶 N 端序列(MRLLILGMG)与该酶蛋白 N 端初始氨基酸序列一致,说明该酶分泌过程中不存在信号肽的切割,再一次说明该酶的分泌不依赖于信号肽。

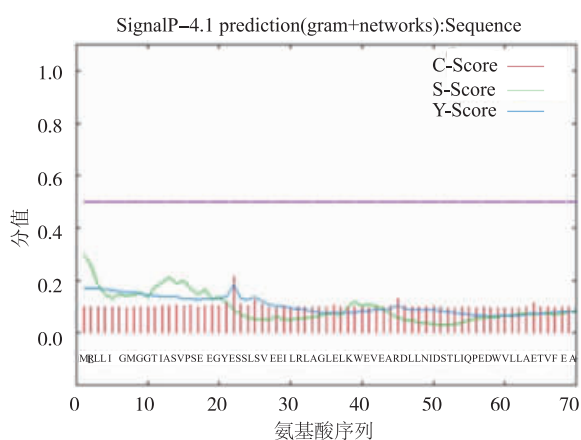
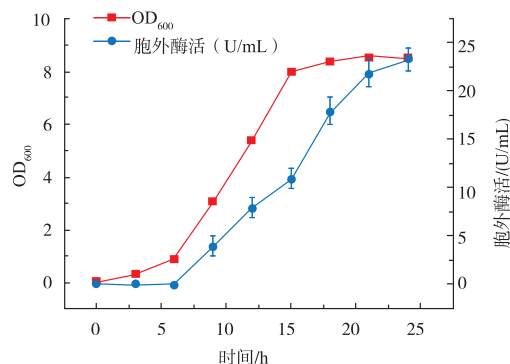


图 1 *P. yanosii* L-天冬酰胺酶信号肽预测

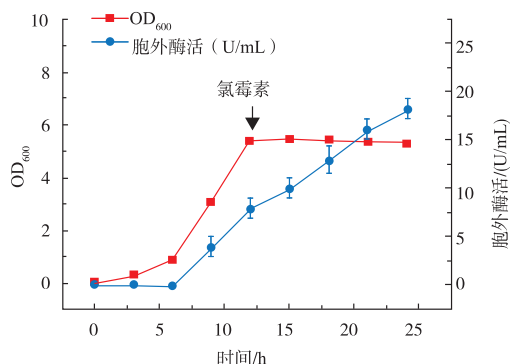
Fig. 1 Signal peptide prediction of *P. yanosii* L-asparaginase

在枯草芽孢杆菌胞外蛋白质组中的 113 种被鉴定的蛋白质中,约有 15%蛋白质缺少了典型的信号肽,但依旧被分泌到胞外^[19]。对于这些“分泌蛋

白”,一些学者们认为可能是由于细胞裂解所导致的^[20]。为了验证该 L-天冬酰胺酶的分泌是否由枯草芽孢杆菌裂解所致,我们监控了摇瓶发酵过程中胞外 L-天冬酰胺酶的酶活情况,发现该酶在对数生长期(发酵 9 h)开始分泌,在稳定期胞外酶活也有所增加(图 2(a))。稳定期间枯草芽孢杆菌生物量不变,胞外酶活的增加说明细胞持续分泌该 L-天冬酰胺酶,但也有可能是由于细胞裂解速率与生物量增加速率相一致导致的。为排除细胞裂解的影响,我们在细胞对数生长期的后半段(发酵 12 h)添加终质量浓度为 100 μg/mL 的氯霉素,抑制枯草芽孢杆菌的生长,此后 9 小时枯草芽孢杆菌的生物量未降低,说明细胞未出现裂解,而此段时间内,该 L-天冬酰胺酶在胞外酶活依旧持续增加,说明该 L-天冬酰胺酶在枯草芽孢杆菌中的分泌不是细胞裂解所引起的(图 2(b))。综上所述,该 L-天冬酰胺酶在枯草芽孢杆菌中的分泌是由于不依赖信号肽的非经典分泌途径(non-classical protein secretion pathway)进行分泌的。



(a) 不加入氯霉素情况下 *Pyrococcus yanosii* L-天冬酰胺酶在摇瓶发酵情况



(b) 加入氯霉素情况下 *Pyrococcus yanosii* L-天冬酰胺酶在摇瓶发酵情况

图 2 *Pyrococcus yanosii* L-天冬酰胺酶摇瓶发酵情况
Fig. 2 Shake flask fermentation of *Pyrococcus yanosii* L-asparaginase

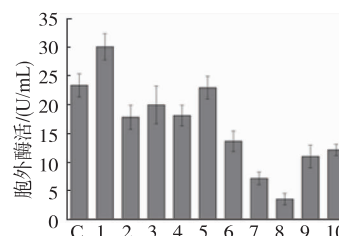
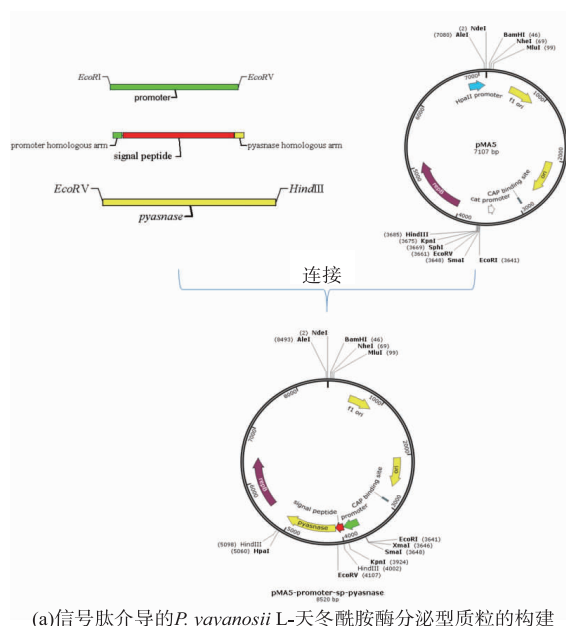
2.2 信号肽对 L-天冬酰胺酶分泌的影响

为了提高 *Pyrococcus yayanosii* L-天冬酰胺酶的分泌水平,我们研究了枯草芽孢杆菌来源的 5 种 Tat 途径的信号肽(SP_{phoD}、SP_{LipA}、SP_{wapA}、SP_{ywbN}、SP_{YmaC})和 4 种 Sec 途径信号肽 (SP_{pel}、SP_{yvbx}、SP_{lipB}、SP_{nprE}),以及 1 个嗜麦芽寡养单胞菌 Sec 途径信号肽 SP_{lips} 对该酶分泌的影响。

将启动子 P_{HpaII} 和 L-天冬酰胺酶基因 *pyasnase* 分别连接到 pMA5 的 *EcoR* I & *EcoR* V 和 *EcoR* V & *Hind* III 酶切位点中,并利用同源重组将各信号肽基因连接到启动子和 *pyasnase* 之间,构建新的重组质粒(图 3(a))。对胞外粗酶液进行酶活测定(图 3(b)),并进行 SDS-PAGE 分析(图 3(c)),发现 Sec 途径的信号肽对 L-天冬酰胺酶的分泌都具有一定的抑制作用,Tat 途径的信号肽对 L-天冬酰胺酶的影响相对较小,其中 SP_{phoD} 对该酶的分泌有一定促进作用,使该酶的分泌量从 23.31 U/mL 提高到 30.03 U/mL,见表 2。Sec 途径分泌途径和 Tat 分泌途径的一个重要差异在于 Sec 途径分泌时先进行蛋白质分泌后再进行蛋白质折叠,而 Tat 途径分泌时蛋白质先折叠形成正确构象后再通过信号肽分泌到胞外^[21]。可能由于该 L-天冬酰胺酶在枯草芽孢杆菌中迅速折叠,而 Sec 分泌途径的信号肽无法正确介导已折叠好的蛋白质进行分泌,反而由于在该 L-天冬酰胺酶的 N 端加入一段短肽抑制了其自身的分泌特性从而降低了该酶的分泌能力。同时从表 2 可看出,在提高胞外酶活的同时并未造成胞内酶活的降低,这可能该酶在枯草芽孢杆菌细胞内有一个“阈值”,当该酶的量达到此“阈值”时,该酶难以再在细胞内积累,因此将酶分泌到胞外对提高该酶在枯草芽孢杆菌中的表达也具有重要的研究意义。

2.3 共表达分子伴侣提高 L-天冬酰胺酶分泌水平

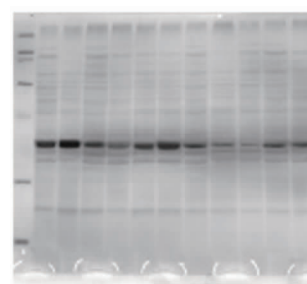
分子伴侣(molecular chaperones)在细胞中能识别并结合到不完整折叠或装配的蛋白质,帮助这些蛋白质进行折叠、分泌。在枯草芽孢杆菌中,PrsA 是一种能结合到胞质外侧的脂蛋白分子伴侣,在蛋白质分泌的过程中,它能协助蛋白质穿过细胞膜,因此与细胞的分泌水平紧密相关,提高 PrsA 的水平能使淀粉酶的分泌量提高 6 倍^[22]。DnaK 是一种胞内分子伴侣,它具有协调蛋白质折叠、减少蛋白质聚集、保护蛋白质前体转移的功能,该蛋白质的缺失会限制异源蛋白质分泌水平^[23]。将 PrsA 和 DnaK 基因分



C: 不含信号肽的分泌情况; 1~10: 分别在SP_{phoD}、SP_{LipA}、SP_{wapA}、SP_{ywbN}、SP_{YmaC}、SP_{pel}、SP_{yvbx}、SP_{lipB}、SP_{nprE}、SP_{lips}介导下的分泌情况。

(b)信号肽对胞外酶活的影响

M C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



M: 蛋白质Marker (premixed protein marker (broad range)); C: 不含信号肽的分泌情况; 1~10: 分别在SP_{phoD}、SP_{LipA}、SP_{wapA}、SP_{ywbN}、SP_{YmaC}、SP_{pel}、SP_{yvbx}、SP_{lipB}、SP_{nprE}、SP_{lips}介导下的分泌情况。

(c)SDS-PAGE对胞外粗酶液分析

图 3 信号肽介导的 *P. yayanosii* L-天冬酰胺酶分泌型质粒的构建及其对酶分泌的影响

Fig. 3 Construction of secretion plasmid with signal peptide and effect to the secretion of *P. yayanosii* L-asparaginase

别连接到含有 *pyasnase* 及 SP_{phoD} 基因的 pMA5 质粒上的 *Bam*HI & *Mlu* I 间(图 4(a)),并将该重组质粒

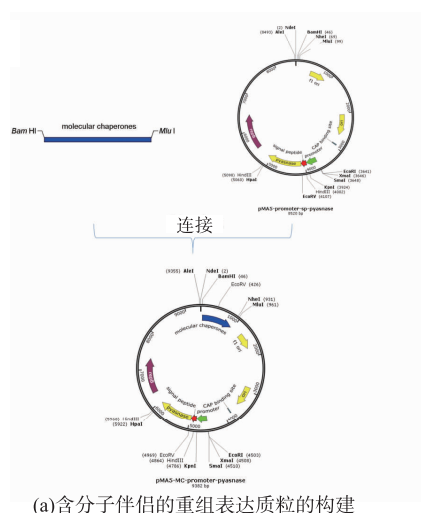
转入 *B. subtilis* 168 中实现分子伴侣和该 L-天冬酰胺酶的共表达,用以提高该酶的分泌水平。

表 2 信号肽对 L-天冬酰胺酶在枯草芽孢杆菌中分泌的影响

Table 2 Effect of signal peptides on L-asparaginase secretion with *B. subtilis*

信号肽	分泌途径	胞外酶活/(U/mL)	胞内酶活/(U/mL)	胞外酶活占比/%
无	—	23.31	65.72	26.18
SP _{phoD}	Tat 途径	30.03	66.12	31.23
SP _{LipA}	Tat 途径	17.76	51.12	25.78
SP _{wspA}	Tat 途径	19.90	67.77	22.70
SP _{ywhN}	Tat 途径	18.05	66.51	21.34
SP _{YmaC}	Tat 途径	22.91	64.51	26.20
SP _{pel}	Sec 途径	13.58	60.12	18.42
SP _{yvhx}	Sec 途径	7.10	57.41	11.01
SP _{lipB}	Sec 途径	3.50	54.33	6.05
SP _{qprE}	Sec 途径	10.91	64.32	14.50
SP _{lips}	Sec 途径	12.06	59.88	16.76

取胞外粗酶液进行 SDS-PAGE 分析(图 4(b)) 并进行酶活测定,发现该酶的分泌量在与 DnaK 共表达后并未出现明显变化(胞外酶活仅从 30.03 U/mL 变为 30.15 U/mL,总酶活从 96.15 U/mL 变为 96.25 U/mL),而与 PrsA 共表达后,成功的将胞外酶活从 30.03 U/mL 提高到 40.12 U/mL,并且将蛋白质总的表达量从 96.15 U/mL 提高到 105.4 U/mL。综合考虑不同途径信号肽及分子伴侣对该酶的影响,出现该结果可能是由于该酶的折叠较快,且不需要 DnaK 的协助或枯草芽孢杆菌中 DnaK 已足够满足该酶的折叠及转运的需求,同时由于其折叠较快且折叠好的分子相对较大,将蛋白质转出细胞膜成为限制该蛋白质分泌的重要因素,此时过表达 PrsA,有利于该蛋白质的转出细胞膜,从而提高了该酶的分泌水平。



M: 蛋白质Marker; 1: 信号肽SP_{phoD}介导下胞外粗酶液; 2: PrsA和信号肽SP_{phoD}介导下粗酶液; 3: DnaK和信号肽SP_{phoD}介导下粗酶液。

(b) SDS-PAGE对胞外粗酶液分析

图 4 分子伴侣共表达表达质粒的构建及其对 *P.yanosii* L-天冬酰胺酶分泌的影响

Fig. 4 Co-expression plasmid construction of molecular chaperone and effect on the secretion of *P.yanosii* L-asparaginase

总体来说,通过添加 Tat 途径信号肽,并在此基础上共表达分子伴侣 PrsA,使 L-天冬酰胺酶分泌量从 23.31 U/mL 提高到 40.12 U/mL,分泌量提高了 72.11%。

3 结 语

在本研究中,针对前期工作发现 *P. yanosii* L-天冬酰胺酶在枯草芽孢杆菌中表达时具有一定分泌性的现象进行了研究。通过信号肽预测、N 端测

序等手段鉴定出 *P. yanosii* L-天冬酰胺酶的分泌依赖非经典蛋白质分泌途径,并且发现 Tat 途径的信号肽 SP_{phoD} 能提高该酶分泌水平,同时共表达分子伴侣 PrsA 有利于该酶的分泌,通过以上策略,将该 L-天冬酰胺酶的分泌量提高了 72.11%,并且对该酶的分泌过程进行了分析,为进一步研究和探讨该 L-天冬酰胺酶的分泌过程及提高分泌能力提供了一定参考价值。

参考文献:

- [1] CHEN J, ZHAO L, FU G, et al. A novel strategy for protein production using non-classical secretion pathway in *Bacillus subtilis* [J]. **Microbial Cell Factories**, 2016, 15: 1-16.
- [2] WANG G, XIA Y, GU Z, et al. A new potential secretion pathway for recombinant proteins in *Bacillus subtilis* [J]. **Microbial Cell Factories**, 2015, 14(1): 179.
- [3] LE L Y, GRUSS A, EHRLICH S D, et al. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis* [J]. **Journal of Bacteriology**, 1998, 180(7): 1895-1903.
- [4] HARWOOD C R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses [J]. **Trends in Biotechnology**, 1992, 10(7): 247-256.
- [5] OGGIONI M R, POZZI G, VALENSIN P E, et al. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis* [J]. **Journal of Clinical Microbiology**, 1998, 36(1): 325-326.
- [6] KUNST F, OGASAWARA N, MOSZER I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* [J]. **Nature**, 1997, 390(6657): 249-256.
- [7] TJALSMA H, ANTELMANN H, JONGBLOED J D, et al. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome [J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, 2004, 68(2): 207-333.
- [8] BANERJEE S, HANSEN J N. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1988, 263(19): 9508-9514.
- [9] CHUNG Y S, BREIDT F, DUBNAU D. Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis* [J]. **Molecular Microbiology**, 1998, 29(3): 905-913.
- [10] BENDTSEN J D, KIEMER L, FAUSBOLL A, et al. Non-classical protein secretion in bacteria [J]. **BMC Microbiology**, 2005, 5: 58.
- [11] ZUO S, ZHANG T, JIANG B, et al. Recent research progress on microbial L-asparaginases [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015, 99(3): 1069-1079.
- [12] VIDYA J, SAJITHA S, USHASREE M V, et al. Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: an overview [J]. **Bioresource Technology**, 2017: 1775-1781.
- [13] COVINI D, TARDITO S, BUSSOLATI O, et al. Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase [J]. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, 2012, 7(1): 4-13.
- [14] JIA M M, XU M J, HE B B, et al. Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06 [J]. **J Agr Food Chem**, 2013, 61(39): 9428-9434.
- [15] SHI R, LIU Y, MU Q, et al. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Paenibacillus barengoltzii* being suitable for acrylamide reduction in potato chips and mooncakes [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017, 96: 93-99.
- [16] 张显, 龙水清, 饶志明, 等. 定点突变提高枯草芽孢杆菌 L-天冬酰胺酶的活力及稳定性 [J]. **食品与生物技术学报**, 2015, 34(11): 1128-1134.
- [17] LI X, ZHANG X, XU S, et al. Simultaneous cell disruption and semi-quantitative activity assays for high-throughput screening of thermostable L-asparaginases [J]. **Scientific Reports**, 2018, 8(1): 7915.
- [18] PETERSEN T N, BRUNAK S, VON HEIJNE G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. **Nature Methods**, 2011, 8(10): 785-786.
- [19] ANTELMANN H, TJALSMA H, VOIGT B, et al. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions [J]. **Genome Research**, 2001, 11(9): 1484-1502.
- [20] STEPHENSON K, HARWOOD C, S. Cellular lysis in *Bacillus subtilis*; the affect of multiple extracellular protease deficiencies [J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2010, 29(2): 141-145.
- [21] BENDTSEN J D, NIELSEN H, WIDDICK D, et al. Prediction of twin-arginine signal peptides [J]. **BMC Bioinformatics**, 2005, 6(1): 167.
- [22] KONTINEN V P, SARVAS M, . The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion [J]. **Molecular Microbiology**, 2010, 8(4): 727-737.
- [23] CHEN J, FU G, GAI Y, et al. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression [J]. **Microbial Cell Factories**, 2015, 14: 92.