

解淀粉芽孢杆菌 I 型信号肽酶与信号肽的相互作用

郭洁洁, 王伟红, 何杰民, 李登科, 刘业学, 路福平, 李玉*

天津科技大学 生物工程学院, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

郭洁洁, 王伟红, 何杰民, 李登科, 刘业学, 路福平, 李玉. 解淀粉芽孢杆菌 I 型信号肽酶与信号肽的相互作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 256-267.

GUO Jiejie, WANG Weihong, HE Jiemin, LI Dengke, LIU Yexue, LU Fuping, LI Yu. Interaction between type I signal peptidase and signal peptides in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 256-267.

摘要:【目的】基于 I 型信号肽酶在分泌系统中的重要作用, 探究信号肽酶与信号肽之间的作用关系, 指导氨肽酶在解淀粉芽孢杆菌中的分泌表达优化。【方法】对解淀粉芽孢杆菌 TCCC 19030 的内源性信号肽酶和信号肽进行筛选, 采用相对荧光强度、酶活力等表征手段进行分析, 同时采用分子对接技术探究信号肽酶和信号肽的相互作用关系。【结果】信号肽 Yo1C 融合氨肽酶的胞外酶活力最高, 达到 11 847.67 U/mL。过表达信号肽酶 SipW 后, 氨肽酶的酶活力提高到 16 261 U/mL。分子对接结果显示, 信号肽 Yo1C 与信号肽酶 SipW 结合自由能最低, 为 -4.4 kcal/mol。【结论】信号肽优化与信号肽酶过表达可有效提高氨肽酶的分泌表达, 其中信号肽酶与信号肽的结合能是影响目的蛋白分泌量的关键因素之一。

关键词: 信号肽酶; 信号肽; 分子对接技术

Interaction between type I signal peptidase and signal peptides in *Bacillus amyloliquefaciens*

GUO Jiejie, WANG Weihong, HE Jiemin, LI Dengke, LIU Yexue, LU Fuping, LI Yu*

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, School of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Objective] Based on the critical role of type I signal peptidase in the secretion system, this study explores the interaction between signal peptidase and signal peptides to guide the optimization of aminopeptidase secretion expression in *Bacillus amyloliquefaciens*.

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2104000)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2104000).

*Corresponding author. E-mail: liyu@tust.edu.cn

Received: 2024-08-15; Accepted: 2024-10-30; Published online: 2024-11-01

[Methods] The endogenous signal peptidase and signal peptide of *Bacillus amyloliquefaciens* TCCC 19030 were examined using relative fluorescence intensity and enzyme activity for analysis, and molecular docking to study their interaction. **[Results]** The signal peptide YolC fused with aminopeptidase exhibited the highest extracellular enzyme activity, reaching 11 847.67 U/mL. Overexpression of the signal peptidase SipW increased aminopeptidase activity to 16 261 U/mL. Molecular docking results also showed that YolC had the lowest binding free energy with SipW, at -4.4 kcal/mol. **[Conclusion]** Optimization of signal peptides and overexpression of signal peptidase can effectively enhance the secretion of aminopeptidase. The binding energy between signal peptidase and signal peptide is a key factor influencing the secretion levels of the target protein.

Keywords: signal peptidase; signal peptide; molecular docking

信号肽是一段连续的氨基酸序列, 可协助蛋白质从细胞内跨膜分泌到细胞外^[1-2]。在原核生物中, 蛋白的分泌几乎离不开信号肽, 近年来有不少学者通过优化信号肽进一步提高目标产物的产量, Khadye 等^[3]对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168 基因组的 173 个内源信号肽文库进行了高通量筛选, 使得耐热 β -葡萄糖苷酶分泌量比出发菌株提高了 16 倍。Shi 等^[4]通过建立信号肽 *pelB* 的突变文库, 使得 PET 水解酶的分泌量提高了 1.7 倍。然而, 当信号肽牵引前体蛋白完成跨膜转运后, 信号肽酶可以识别信号肽 C 端区域的最后 3 个氨基酸残基, 并将其切割, 使信号肽与成熟蛋白断开, 从而使成熟蛋白分泌至胞外^[5]。然而, 不同表达水平的信号肽酶显著影响外源蛋白的分泌水平, 优化信号肽酶同样是提高目的蛋白表达量的策略之一^[6]。王豪^[7]在地衣芽孢杆菌中, 通过构建信号肽酶基因 *sipV* 过表达菌株, 使得纳豆激酶酶活达到 35.6 FU/mL, 相对于对照菌株提高了 16%。Cai 等^[8]以纳豆激酶作为表征蛋白, 并敲除了地衣芽孢杆菌的 4 个 I 型信号肽酶基因 *sipS*、*sipT*、*sipW* 和 *sipV*, 其中 *sipV* 的缺失对纳豆激酶活性的影响最大, 另外过表达 *sipV* 后, 纳豆激酶活性比初始菌株提高了 4.68 倍。Owji

等^[9]研究指出, 信号肽酶的切割效率是蛋白分泌的限速步骤之一。因此, 研究信号肽酶与信号肽之间的相互作用, 对于提高外源蛋白的高效表达至关重要。尽管大部分细菌中的信号肽酶已经被鉴定^[7], 但是关于信号肽酶与信号肽之间的相互作用关系是如何影响外源蛋白分泌的报道相对较少。目前, 研究分子间的相互作用常用到分子对接模拟技术, Li 等^[10]通过分子对接和自由能计算, 直观地反映出信号肽酶与信号肽之间的结合程度, 随后将 *sipA* 整合到解淀粉芽孢杆菌基因组中过量表达, 使胞外 AprE 活性相对于原始菌株提高了 19.9%。因此利用对接结果分析信号肽酶与信号肽之间的相互作用, 可为提升底盘菌株的分泌效率提供一定的指导和帮助。

解淀粉芽孢杆菌作为重要的工业底盘菌株, 其分泌蛋白能力极强, 并且参与了多种酶制剂的生产^[11], 因此本研究以解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) TCCC 19030 为出发菌株, 以氨肽酶(YwaD)的酶活力为评价指标, 筛选出最优信号肽, 并以该信号肽为研究对象, 利用分子对接、实验验证等方法探究信号肽与信号肽酶之间的作用关系, 为进一步提升外源蛋白在解淀粉芽孢杆菌中的分泌表达效率提供参考和依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种和质粒

解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) TCCC 19030 为本实验室保藏, 表达载体 pLY-3 为本实验室前期构建。本研究中使用的菌株、质粒详情信息见表 1, 所用引物详细信息见表 2,

引物由天津金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.2 酶和试剂

DNA 聚合酶、限制性内切核酸酶均购自 TaKaRa 公司; 无缝克隆酶购自北京全式金生物技术有限公司; 酶活试剂盒购自 Megazyme 公司; 质粒提取试剂盒、DNA 切胶回收试剂盒、DNA 抽提试剂盒均购自 Omega 公司; 卡那霉素、溶菌酶等均购自北京索莱宝科技有限公司。

表 1 本研究中所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in the study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources
Strains		
<i>B. amyloliquefaciens</i> TCCC 19030	<i>B. amyloliquefaciens</i> , used for initial expression host	This lab
<i>E. coli</i> JM109	Host for plasmid construction	This lab
<i>E. coli</i> EC135/pM.Bam	Host for plasmid-methylated modification	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences
BY-19030	<i>B. amyloliquefaciens</i> harboring pLY-3-YolC-YwaD plasmid	This study
19030-YwaD	<i>B. amyloliquefaciens</i> harboring pLY-3-YwaD plasmid	This study
19030-NC	<i>B. amyloliquefaciens</i> harboring pLY-3 plasmid	This study
19030-ΔW	<i>B. amyloliquefaciens</i> , Δ <i>sipW</i>	This study
19030-ΔA	<i>B. amyloliquefaciens</i> , Δ <i>sipA</i>	This study
19030-ΔS	<i>B. amyloliquefaciens</i> , Δ <i>sipS</i>	This study
19030-ΔV	<i>B. amyloliquefaciens</i> , Δ <i>sipV</i>	This study
BY-ΔA	19030-ΔA harboring pLY-3-YolC-YwaD plasmid	This study
BY-ΔV	19030-ΔV harboring pLY-3-YolC-YwaD plasmid	This study
BY-ΔS	19030-ΔS harboring pLY-3-YolC-YwaD plasmid	This study
BY-ΔW	19030-ΔW harboring pLY-3-YolC-YwaD plasmid	This study
19030-YwaD-SipW	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>sipW</i> gene overexpression	This study
19030-YwaD-SipA	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>sipA</i> gene overexpression	This study
19030-YwaD-SipS	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>sipS</i> gene overexpression	This study
19030-YwaD-SipV	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>sipV</i> gene overexpression	This study
Plasmids		
pWH-T2	Temperature-sensitive shuttle vector, Kana ^r	Hubei University
pLY-3	Shuttle expression vector, Cm ^r (<i>E. coli</i>) and Kana ^r (<i>Bacillus</i>), MCS	This lab
pLY-3-YolC-YwaD	Aminopeptidase expression vector, Kana ^r	This study
pWH-T2-SipW	Knockdown plasmid, <i>sipW</i> gene deletion, Kana ^r	This study
pWH-T2-SipA	Knockdown plasmid, <i>sipA</i> gene deletion, Kana ^r	This study
pWH-T2-SipS	Knockdown plasmid, <i>sipS</i> gene deletion, Kana ^r	This study
pWH-T2-SipV	Knockdown plasmid, <i>sipV</i> gene deletion, Kana ^r	This study
pWH-SipW-YwaD	<i>sipV</i> gene and <i>ywaD</i> gene expression vector, Kana ^r	This study

表 2 本研究中所用的引物序列

Table 2 Primers used in the study

Primers name	Sequences (5'→3')
For the construction of expression cassette of SipW	
<i>sipW</i> -Up-F	CCCTTAACGAATTCCTGCAGCCCCTGATACGTCAGGCACCGTG
<i>sipW</i> -Up-R	AATCAAGCTGAAGATTACGGCATAAC
<i>sipW</i> -Down-F	GTATGCCGTAATCTTCAGCTTGATTTCATGAGAGAAACGGGACCATGTC
<i>sipW</i> -Down-R	CACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGTCTTTACCGACTGTCAGAACCG
<i>sipW</i> -djh-F	CCGACTGCGCAAAGACATAATC
<i>sipW</i> -djh-R	CTGCCTGAGGCAGCATTAAAC
<i>sipW</i> -sjh-F	GTGGTGGCGAATACGAATGC
<i>sipW</i> -sjh-R	CTGCCTGAGGCAGCATTAAAC
<i>sipW</i> -F	ATGGGAGGAAATCACTTGAAATCAG
<i>sipW</i> -R	TTATTCGTCTTGCGAATTCATTAAACG
For amplification of signal peptides	
YolC-F	CGCTGCTTGATGTGATCATCCGCGGCATTATGTTTGAATTTCCGTTTAAAGAATGGGCTG
YolC-R	CGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGATGCTTCGATTAAGTAATACCTGACATAATCAAAGC
ywaD-F	TCAATGAGCTTACAGGATCCATGAAAAAGCTTTTACTGTCATGACG
ywaD-R	TTCTAATTACCCTCCCCGGGTATTTGATATCTTCAAAAATGTCAGATGCTTTCGC

1.1.3 培养基

种子培养基(LB 液体培养基): 酵母粉 5.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, 氯化钠 10.0 g/L, 溶于自来水中, 121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基: 豆饼粉 60.0 g, 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液溶于 1 L 去离子水中混匀, pH 12.0, 50 °C 下搅拌 2 h, 待温度冷却至室温之后, 加入磷酸直到 pH 7.3, 13 000 r/min 离心 10 min 后获得上清液, 加入 0.03% KH₂PO₄, 3% 糊精, 0.4% Na₂HPO₄ 混匀。

1.2 表达载体的构建

以 *B. subtilis* 168 基因组为模板克隆出目的基因 168AP, 并将其构建到 pLY-3 载体上获得表达载体 pLY-3-YwaD。将 pLY-3-YwaD 和原 pLY-3 载体分别电转化至 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030, 获得重组菌株 19030-YwaD 和对照菌株 19030-NC。

1.3 氨肽酶表达的 SDS-PAGE 分析

将菌株接种至装有 50 mL LB 的 250 mL 摇

瓶中, 于 37 °C、200 r/min 条件下培养 48 h, 取出发酵液于 13 000 r/min 离心 10 min 后获得上清液, 随后取出部分上清进行 SDS-PAGE 分析。浓缩胶浓度 5%, 电泳电压 80 V; 分离胶浓度 15%, 电泳电压 120 V。

1.4 融合信号肽表达载体的构建

通过 NCBI 数据库和 SignalP 系列软件筛选出 20 条 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030 来源的信号肽序列。随后以 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030 的基因组为模板(DNA 抽提参考试剂盒), 设计引物 PCR 扩增信号肽、氨肽酶和 pLY-3 线性载体的基因序列, 采用无缝克隆连接, 获得重组质粒, 随后将其转化至 *E. coli* JM109 感受态中, 再将经过甲基化修饰的质粒电转化至 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030, 获得重组菌株。

1.5 信号肽酶缺失菌株的构建

采用同源重组的方法敲除 4 个信号肽酶基因(*sipA*、*sipS*、*sipW* 和 *sipV*), 敲除过程以 *sipW* 基因为例。使用表 1 所示的引物 *sipW*-Up-F 和

sipW-Up-R, 以及 *sipW*-Down-F 和 *sipW*-Down-R 扩增 *sipW* 基因同源臂片段, 使用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切 pWH-T2 载体获得 pWH-T2 线性载体。采用无缝克隆技术将 *sipW* 基因同源臂片段与 pWH-T2 线性载体连接, 得到重组质粒 pWH-T2-SipW。将 pWH-T2-SipW 转化至 *E. coli* JM109 感受态中, 再将经过甲基化修饰的重组质粒电转化至 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030, 通过 Kana 抗性筛选出正确的转化子进行单、双交换, 双交换验证成功的转化子即为信号肽酶基因 *sipW* 敲除成功的菌株。

1.6 信号肽酶 *sipW* 过表达菌株的构建

以 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030 基因组为模板, 使用表 1 所示引物 sipW-F 和 sipW-R 扩增 *sipW* 基因片段, 使用引物 ywaD-F 和 ywaD-R 扩增 *ywaD* 基因片段。利用无缝克隆技术将 *sipW* 基因片段、*ywaD* 基因片段与 pWH-T2 线性载体连接, 获得重组质粒 pWH-SipW-YwaD 并转化至 *E. coli* JM109, 对转化子进行菌落 PCR 验证和测序验证, 将验证正确的重组质粒转化到 *E. coli* EC135/pM.Bam 中进行甲基化修饰, 随后电转化至 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030, 利用菌落 PCR 技术验证单、双交换转化子, 最终双交换验证成功的转化子即为信号肽酶 *sipW* 基因过表达成功的菌株。

1.7 信号肽酶缺失菌株生长曲线的测定

将活化后的菌株挑单菌落接种至 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养 12 h。以 2% 的接种量接种至 50 mL LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养 6 h 后, 每隔 2 h 取样, 使用酶标仪在 600 nm 波长下检测其吸光度值, 以时间为横坐标, 以 OD_{600} 值为纵坐标绘制生长曲线, 直至检测的 OD_{600} 值下降, 结束取样。

1.8 氨肽酶酶活测定方法

先配制终浓度为 40 μ g/mL 的对硝基苯胺

(*p*-nitroaniline, pNA) 标准溶液, 以其为母液进行稀释, 绘制标准曲线。随后对酶液进行稀释, 进行样品的制备和检测。

对照样品制备方法: 吸取 2.6 mL 的 Tris-HCl 缓冲液加入试管, 50 °C 预热 5 min, 随后加入 1 mL 40% 的乙酸, 反应 10 min, 再加入 0.05 mol/L L-亮氨酸-4-硝基苯胺(L-leucine-*p*-nitroaniline, LNA) 0.2 mL, 混匀后静置 10 min。实验样品的制备方法为, 吸取 0.2 mL 酶液, 加入含有 2.6 mL Tris-HCl 缓冲液的试管中, 50 °C 预热 5 min, 加 0.05 mol/L 的 LNA 0.2 mL 到试管中, 反应 10 min, 加入 1 mL 40% 的乙酸终止反应, 混匀后静置 10 min。最后将对照样品和实验样品在 405 nm 的条件下检测。

在 50 °C 和 pH 8.0 条件下, 每分钟水解亮氨酸对硝基苯胺生成 1 μ g pNA, 即定义为一个酶活单位, 以 U/mL 表示。酶活按照公式(1)计算。

$$\text{酶活力(U/mL)} = \frac{X \times n \times 4}{0.2} \times \frac{1}{10} \quad (1)$$

式中: X 为由标准曲线得出的样品最终稀释液的酶活力, n 为稀释倍数, 0.2 为加入反应体系的酶液体积, 10 为反应时间 10 min。

1.9 AutoDock 分子对接方法

使用 AutoDock 软件将信号肽末端 3 个氨基酸与信号肽酶蛋白分子进行模拟对接, 具体操作步骤如下。

首先准备受体和配体的.pdb 文件。之后用 AutoDockTools 打开 protein.pdb 和 ligand.pdb, 分别输出为 protein.pdbqt 和 ligand.pdbqt 形式。接下来对受体蛋白设置对接的盒子大小, 盒子要将活性位点完全包裹, 保存 protein_ligand.gpf 文件作为对接的文件。随后, 选择 protein.pdbqt 文件, 将受体蛋白质设置为刚性, 对接算法选择拉马克遗传算法, 保存成为 protein_ligand.dpf 文件。运行 AutoGrid 和 AutoDock 程序进行对接, 对接的结果文件保存为 protein_ligand.dlg

文件。最后利用 PyMOL 进行配体与受体的可视化对接。

2 结果与分析

2.1 氨肽酶的分泌表达

将重组菌 19030-YwaD 和对照菌 19030-NC 分别以 1% 接种量接种至装 50 mL LB 的 250 mL 摇瓶中, 于 37 °C、200 r/min 条件下培养 48 h。发酵液 13 000 r/min 离心 10 min 后取上清液进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 1 所示。与对照相比, 在约 49.00 kDa 大小的位置出现了一条蛋白条带, 与氨肽酶相对分子量理论值 49.45 kDa 大小一致。此外, 观察到对照组在 49.50 kDa 左右也存在略浅条带, 这是因为 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030 胞外蛋白组中的蛋白种类众多, 不排除存在与氨肽酶分子量大小相似的条带。随后, 取发酵上清液进行氨肽酶酶活检测, 结果表明重组菌 19030-YwaD 氨肽酶酶活为 6 056 U/mL,

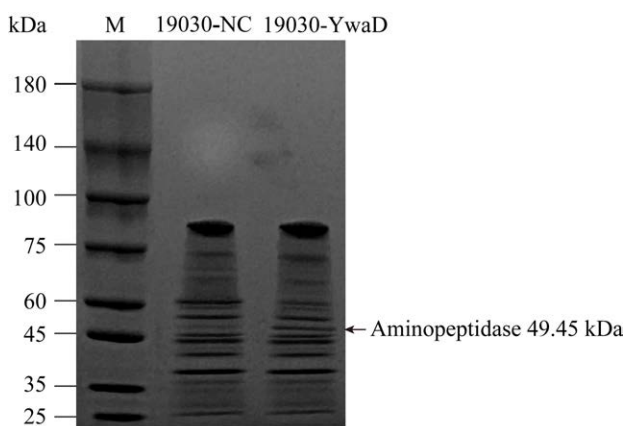


图 1 胞外蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 1 SDS-PAGE analysis of the extracellular proteins. 15% SDS-PAGE analysis of the fermentation supernatant after concentrated by ultrafiltration. Lane M: Protein Molecular Weight Marker; Lane 19030-YwaD: *Bacillus amyloliquefaciens* harboring pLY-3-YwaD plasmid; Lane 19030-NC: *Bacillus amyloliquefaciens* harboring pLY-3 plasmid.

而对照菌 19030-NC 未检测到酶活。通过检测酶活以及 SDS-PAGE 条带深浅的双重分析, 可以证明枯草芽孢杆菌来源的氨肽酶在 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030 成功分泌表达。

2.2 信号肽的筛选

通过基因组数据和 SignalP 系列软件分析并鉴定出 20 条 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030 来源的信号肽序列, 选用氨肽酶的酶活力作为信号肽评价指标。将 20 个重组菌株分别以 1% 接种量接种至 250 mL 摇瓶中, 每个摇瓶装 50 mL LB 培养基, 于 37 °C、220 r/min 条件下培养 48 h, 每个重组菌株设置 3 个平行, 发酵结果如图 2 所示。酶活相对较高的 5 个分别是氨肽酶融合了 YolC、YdbK、YqzG、BglC 和 Lytb 信号肽, 相比于对照菌株分别提高了 34.19%、25.01%、27.07%、25.42% 和 25.17%, 其中信号肽 YolC 融合氨肽酶时, 氨肽酶酶活最高, 达到 11 847.67 U/mL, 最终选取最优信号肽 YolC 进行后续实验。

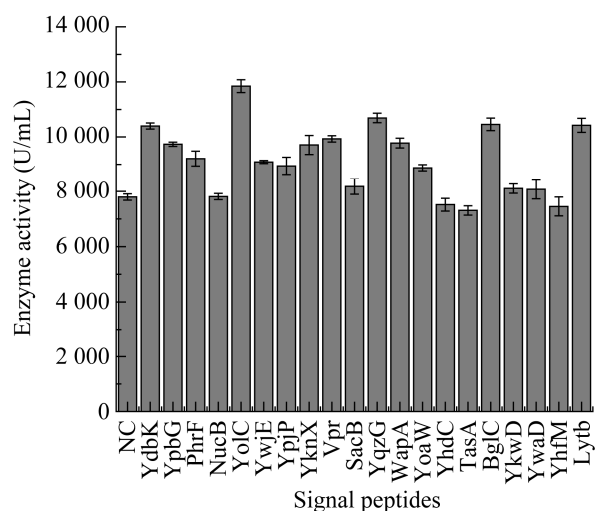


图 2 不同信号肽融合氨肽酶的酶活力

Figure 2 Enzyme activity of aminopeptidase guided by different signal peptides.

2.3 信号肽酶基因缺失菌株的构建及其对菌体生长的影响

不同信号肽酶的表达影响外源蛋白的分泌水平。利用生物信息学工具对 *B. amyloliquefaciens* TCCC 19030 基因组进行了系统的比对分析, 最终确定基因组上存在这 4 种 I 型信号肽酶, 分别是信号肽酶 SipA、SipS、SipW 和 SipV, 其在基因组上的相对位置如图 3 所示, 大小分别为 581、557、584 和 515 bp。采用同源重组法缺失 4 个 I 型信号肽酶基因 *sipA*、*sipS*、*sipW* 和 *sipV*, 4 个信号肽酶基因缺失成功的菌株分别命名为 19030- Δ A、19030- Δ S、19030- Δ W 和 19030- Δ V, 接下来探究这 4 种 I 型信号肽酶缺失对相关信号肽以及外源蛋白分泌的影响。

据报道, 信号肽酶的缺失不仅影响蛋白质的分泌, 一定程度上也影响细胞的生长^[12-13]。因此, 对 4 株敲除菌株 19030- Δ A、19030- Δ V、19030- Δ S 和 19030- Δ W 进行生长曲线测定, 结果如图 4 所示, 进入对数生长期后, 19030- Δ W 菌株的 OD_{600} 值略高于对照菌株 TCCC 19030, 但差异不显著。其余 3 株敲除菌株与对照菌株 TCCC 19030 相比生长曲线无明显差异, 表明 I 型信号肽酶的缺失对菌株的生长不会造成显著影响。Cai 等^[8]缺失了地衣芽孢杆菌的 4 个信号肽基因 *sipS*、*sipT*、*sipV* 和 *sipW* 后并未导致细菌生长停滞, 本研究结果与该报道一致。

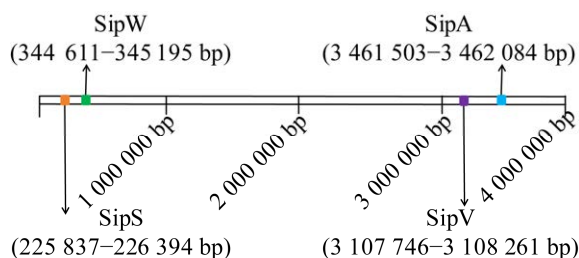


图 3 I 型信号肽酶在 *Bacillus amyloliquefaciens* TCCC 19030 基因组上的相对位置

Figure 3 Relative position of type I signal peptidase on the *Bacillus amyloliquefaciens* TCCC 19030 genome.

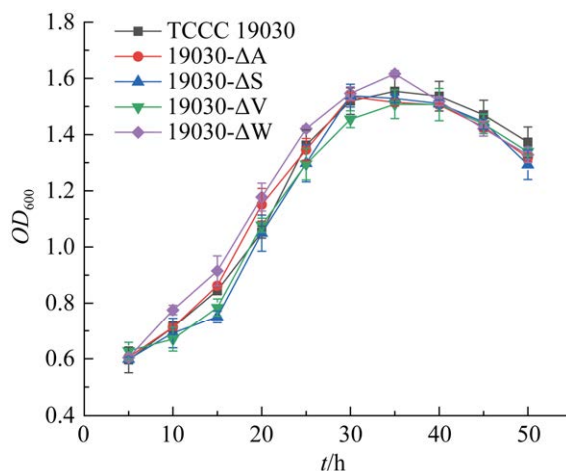


图 4 I 型信号肽酶缺失菌株生长曲线

Figure 4 Growth curves of type I signal peptidase deletion strains.

2.4 I 型信号肽酶的缺失对氨肽酶分泌的影响

将 pLY-3-YolC-YwaD 分别电转化至 4 种 I 型信号肽酶敲除菌株和原始菌株中, 分别命名为 BY- Δ A、BY- Δ V、BY- Δ S、BY- Δ W 和 BY-19030。上述电转化成功的 5 个重组菌株分别以 1% 接种量接种至装 50 mL LB 的 250 mL 摇瓶中, 于 37 °C、220 r/min 条件下培养 48 h, 每个重组菌株设置 3 个平行, 发酵结果如图 5 所示。信号肽酶缺失菌株的氨肽酶酶活均低于对照菌株, 其中信号肽酶基因 *sipW* 缺失的菌株 BY- Δ W, 氨肽酶酶活力最低, 在 48 h 的酶活力仅为对照菌株 BY-19030 的 67.36%, 说明在解淀粉芽孢杆菌中信号肽酶 SipW 对氨肽酶的分泌表达影响最大。信号肽酶基因 *sipA*、*sipS*、*sipV* 的缺失对氨肽酶分泌表达的影响较小。后续实验对 4 种信号肽酶进行过表达验证, 以确定关键信号肽酶的功能。

2.5 I 型信号肽酶过表达对氨肽酶分泌的影响

为进一步探究 4 种 I 型信号肽酶对氨肽酶分泌的影响。利用基因组整合的方法将信号肽

酶基因 *sipA*、*sipS*、*sipW* 和 *sipV* 进行过表达, 并将质粒 pLY-3-YolC-YwaD 分别电转化至 4 种 I 型信号肽酶过表达菌株中, 重组菌株分别命名为 19030-YwaD-SipA、19030-YwaD-SipS、19030-YwaD-SipW、19030-YwaD-SipV。以 BY-19030 为对照菌株, 将 4 种重组菌株和 BY-19030 分别以 1% 接种量接种至装 50 mL LB 的 250 mL 摇瓶中, 于 37 °C、220 r/min 条件下培养 48 h, 每个重组菌株设置 3 个平行, 发酵结果如图 6 所示。

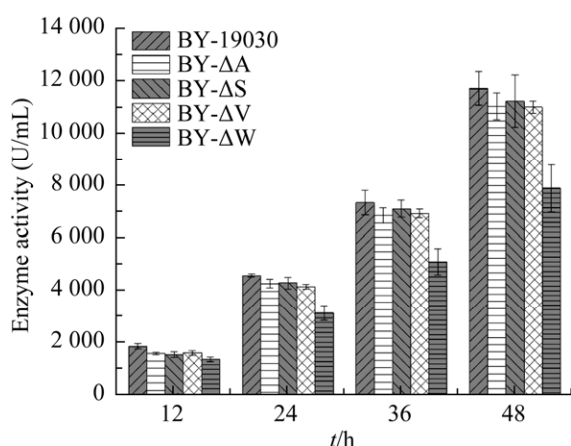


图 5 氨基酶在信号肽酶缺失菌株中的酶活力
Figure 5 Enzyme activity of aminopeptidase in signal peptidase-deficient strains.

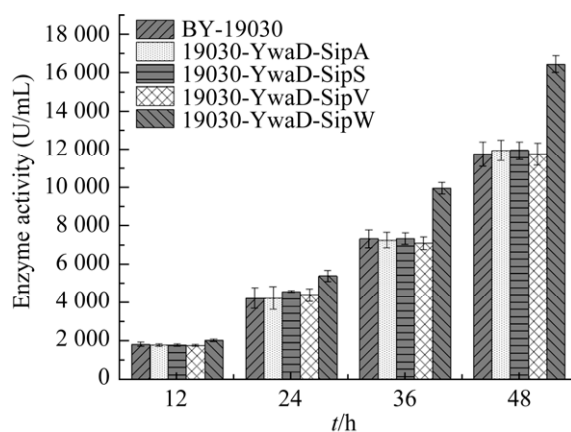


图 6 信号肽酶基因过表达的氨基酶酶活力
Figure 6 Aminopeptidase activity of signal peptidase genes overexpressed.

在 12、24、36 和 48 h 测得的菌株 19030-YwaD-SipW 酶活力均高于对照菌株, 发酵培养 48 h, 氨基酶酶活达到最高, 为 16 261 U/mL, 比对照菌株高 27.75%。然而在信号肽酶基因 *sipA*、*sipS* 和 *sipV* 过表达的菌株中, 氨基酶酶活却无明显差异。

随后将 4 种信号肽酶基因过表达菌株的发酵上清液进行 SDS-PAGE, 结果如图 7 所示, 信号肽酶基因 *sipW* 的过表达对氨基酶在解淀粉芽胞杆菌中的分泌表达影响最大, 而信号肽酶基因 *sipA*、*sipS* 和 *sipV* 过表达对氨基酶的分泌无显著性影响, SDS-PAGE 结果与酶活测定结果一致, 表明信号肽酶基因 *sipW* 的过表达可以通过提高氨基酶的分泌表达量, 进而提高酶活。

2.6 信号肽与信号肽酶之间的作用分析

研究表明, 在 4 种信号肽酶中只有信号肽酶 SipW 对氨基酶的分泌有明显的促进作用。为了探究造成这种差异的原因, 采用分子对接技术模拟 4 种信号肽酶与信号肽 YolC 之间的相互作用。选取信号肽 YolC 末端的 3 个氨基酸(脯氨

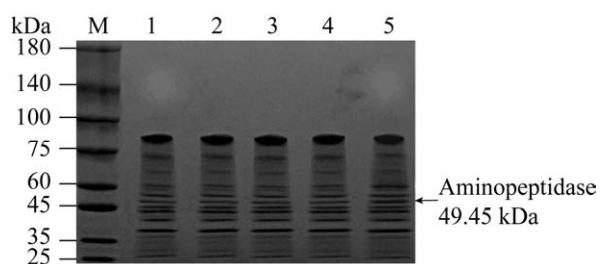


图 7 过表达信号肽酶基因对氨基酶影响的 SDS-PAGE 分析

Figure 7 SDS-PAGE analysis of extracellular proteins from 19030-YwaD-SipA, 19030-YwaD-SipS, 19030-YwaD-SipW, 19030-YwaD-SipV, and BY-19030. Lane M: Protein Molecular Weight Marker; Lane 1: BY-19030; Lane 2: 19030-YwaD-SipA; Lane 3: 19030-YwaD-SipS; Lane 4: 19030-YwaD-SipV; Lane 5: 19030-YwaD-SipW.

酸-天冬酰胺-赖氨酸, P-N-K)作为配体, 采用 PyMOL 软件建立三肽模型。此外, 利用网站 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测了信号肽酶 SipA、SipS、SipW 和 SipV 的结构作为受体(图 8)。

使用 AutoDock 软件将信号肽 YolC 与上述 4 种信号肽酶进行分子对接^[14], 对接得到的 4 个模型如图 9 所示。通过观察配体与受体相互作用的结构示意图, 能够清晰地看到配体在受体结合口袋中的空间位置和相互作用情况, 在分子半柔性对接的最优构象中, YolC 末端的 3 个氨基酸建立

合口袋中。此外, 在结构示意图中可以明显看到配体与受体的特定氨基酸残基之间存在相互作用力, 这使得配体稳定存在于结合口袋中, 因此对接结果以结合自由能为最终评价, 结合自由能越低, 构象趋于稳定, 表明对接的结果越好^[15]。如图 10 所示, 信号肽 YolC 与信号肽酶 SipA、SipS、SipV 和 SipW 的对接结合自由能分别为-2.8、-3.5、-3.5 和-4.4 kcal/mol。其中信号肽 YolC 与 SipW 的结合自由能最低, 说明信号肽酶 SipW 与信号肽 YolC 的结合能力最强, 信号肽酶 SipW 行使切割功能的可能性越大, 越有利于外源蛋白的分泌^[13], 这与氨肽酶酶活测定结果一致。

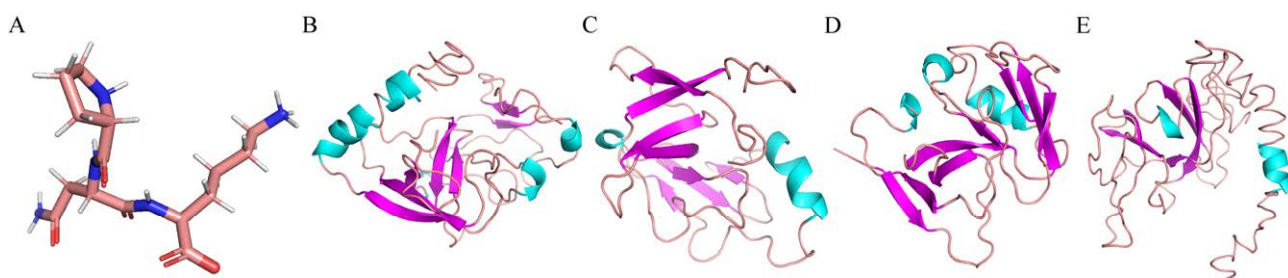


图 8 信号肽 YolC 末端的三肽模型与信号肽酶的结构模型。A: 脯氨酸-天冬酰胺-赖氨酸三肽的模型; B: SipA 预测模型; C: SipS 预测模型; D: SipV 预测模型; E: SipW 预测模型。

Figure 8 Model of signal peptide YolC and models of signal peptidases. A: Model of proline-asparagine-lysine; B: SipA prediction model; C: SipS prediction model; D: SipV prediction model; E: SipW prediction model.

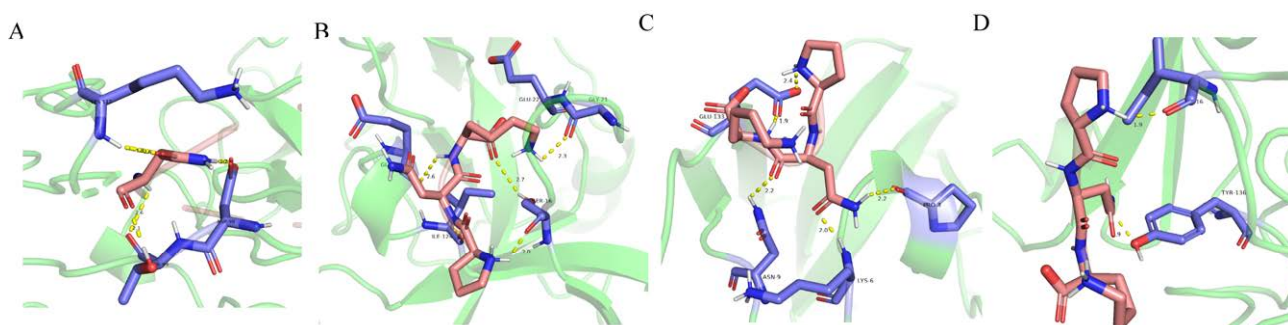


图 9 P-N-K 与信号肽酶的对接模型。A: P-N-K 和 SipA 的对接模型; B: P-N-K 和 SipS 的对接模型; C: P-N-K 和 SipV 的对接模型; D: P-N-K 和 SipW 的对接模型。

Figure 9 The docking models of P-N-K and signal peptidases. A: The docking model of P-N-K and SipA; B: The docking model of P-N-K and SipS; C: The docking model of P-N-K and SipV; D: The docking model of P-N-K and SipW.

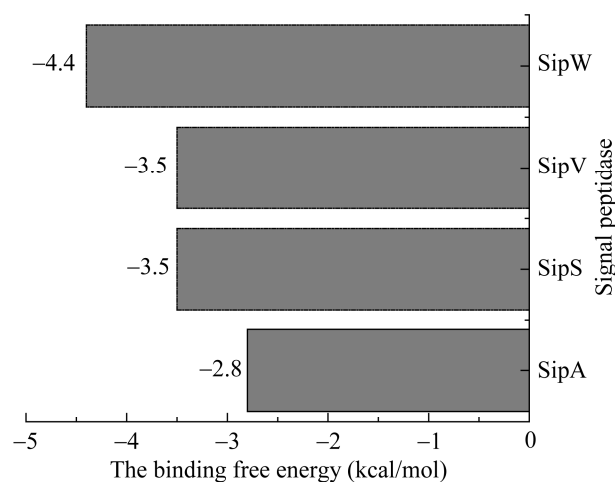


图 10 信号肽 YoIC 与不同信号肽酶模拟对接的结合自由能

Figure 10 The binding free energies of signal peptide YoIC and different signal peptidases analog docking.

3 讨论与结论

解淀粉芽孢杆菌在洗涤、皮革、食品和医药等行业中应用广泛，是原核表达系统中分泌表达外源蛋白的理想宿主。很多研究在解淀粉芽孢杆菌菌株的改造、表达元件以及发酵条件优化等方面都做了大量的工作以提升目标产物的产量。Zhang 等^[16]通过串联缺失肽聚糖水解酶 *lytD*、*lytE* 和 *sigD* 基因，使耐酸 α -淀粉酶酶活力提升了 48.4%。张莹等^[17]通过生物信息学手段预测及筛选启动子，获得新型启动子，提高了解淀粉芽孢杆菌碱性果胶酶的表达量。邝嘉华等^[18]通过单因素试验和响应面试验对解淀粉芽孢杆菌 BSK532 的发酵条件进行了优化，使得其胞外多糖产量达到 171.31 mg/L，较原始条件提高 155.7%。然而，由于解淀粉芽孢杆菌分泌系统的复杂性^[19]，提高分泌蛋白的产量仍然是一个挑战。大多数研究人员也通过优化信号肽以及信号肽酶来提升目的蛋白的产量，王茂军等^[20]通过对 5 种信号肽进行筛选和组合，重组菌株的果聚糖蔗糖酶酶活力达到 125.76 U/mL，

较原始酶活力提高了 100.49%。蒋蕊^[21]筛选出引导 α -淀粉酶高效分泌的信号肽 *yoml*，使得酶活达到 113.25 U/mL。

本研究以解淀粉芽孢杆菌 TCCC 19030 为出发菌株，构建分泌表达载体，筛选出氨肽酶分泌的最优信号肽 YoIC，相比于对照菌株，氨肽酶酶活提高了 34.19%。然而效果好的信号肽只能将更多的前体蛋白引导到膜上，必须经过信号肽酶的切割才能促进蛋白质的成熟。在此基础上，本研究进一步考察了信号肽酶对氨肽酶分泌的影响，4 种信号肽酶 SipA、SipS、SipV 和 SipW 都会对氨肽酶的分泌产生影响，其中信号肽酶 SipW 对氨肽酶分泌的影响最大。然而通过过表达关键信号肽酶 SipW 使氨肽酶酶活提高了 27.75%。此外，Malten 等^[6]通过在巨大芽孢杆菌中过表达 SPase I 型基因 *sipM*，使葡聚糖蔗糖酶的产量提高了 3.7 倍。

然而，如何快速、合理地筛选信号肽，确定关键的信号肽酶，以及研究两者之间的相互作用关系，对于提高分泌效率至关重要。随着计算工具的迅猛发展，分子模拟对接技术日趋成熟。任绍东^[22]从信号肽引导分泌功能的角度出发，基于信号肽的三维结构，利用分子对接的方法设计了信号肽的共通 H 区氨基酸序列，获得了能够与原始信号肽分泌能力相媲美的信号肽。吴怡^[23]通过分子对接、体内外活性等一系列筛选实验，最终获得 3 个具有 *P. aeruginosa* 群体感应系统抑制作用的噁唑烷酮类化合物：MM11、MM16 及 MM22。其中 MM11 浓度在 200 μ mol/L 时，可减少约 30%胞外蛋白酶分泌。本研究利用生物信息学软件 AutoDock、PyMOL 和 SWISS-MODEL，将信号肽 YoIC 与 4 种 I 型信号肽酶进行模拟对接，其中信号肽酶 SipW 与信号肽 YoIC 的结合自由能最低，说明信号肽酶 SipW 与信号肽 YoIC 的结合能力最强，行使切

割功能的可能性最大,有利于外源蛋白的分泌。证实了将关键信号肽酶 SipW 进行过表达是提高目的蛋白分泌效率的有效手段之一,本研究为其他芽孢杆菌分泌系统的优化提供了参考。

作者贡献声明

郭洁洁: 论文撰写和修改、研究构思和设计、数据收集和处理; 王伟红: 协助实验操作、数据收集和处理; 何杰民: 软件处理、数据可视化展示; 李登科: 方法设计; 刘业学: 论文讨论和技术支持; 路福平: 项目管理、调查研究; 李玉: 监督指导、项目管理、资金获取。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] CUI WJ, HAN LC, SUO FY, LIU ZM, ZHOU L, ZHOU ZM. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(10): 145.
- [2] GU Y, XU XH, WU YK, NIU TF, LIU YF, LI JH, DU GC, LIU L. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 50: 109-121.
- [3] KHADYE VS, SAWANT S, SHAIKH K, SRIVASTAVA R, CHANDRAYAN S, ODANETH AA. Optimal secretion of thermostable beta-glucosidase in *Bacillus subtilis* by signal peptide optimization[J]. *Protein Expression and Purification*, 2021, 182: 105843.
- [4] SHI LX, LIU HF, GAO SF, WENG YX, ZHU LL. Enhanced extracellular production of is PETase in *Escherichia coli* via engineering of the pelB signal peptide[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(7): 2245-2252.
- [5] van ROOSMALEN ML, GEUKENS N, JONGBLOED JDH, TJALSMA H, DUBOIS JY F, BRON S, van DIJL JM, ANNÉ J. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1694(1/2/3): 279-297.
- [6] MALTEN M, NAHRSTEDT H, MEINHARDT F, JAHN D. Coexpression of the type I signal peptidase gene sipM increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 91(5): 616-621.
- [7] 王豪. 高效表达外源蛋白的地衣芽孢杆菌信号肽酶、信号肽酶及启动子[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2018.
WANG H. *Bacillus licheniformis* signal peptidase, signal peptidase and promoter for efficiently expressing foreign protein[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei University, 2018 (in Chinese).
- [8] CAI D, WEI X, QIU Y, CHEN Y, CHEN J, WEN Z, CHEN S. High-level expression of nattokinase in *Bacillus licheniformis* by manipulating signal peptide and signal peptidase[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(3): 704-712.
- [9] OWJI H, NEZAFAT N, NEGAHDARIPOUR M, HAJIEBRAHIMI A, GHASEMI Y. A comprehensive review of signal peptides: structure, roles, and applications[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2018, 97(6): 422-441.
- [10] LI DK, CAI YA, GUO JJ, LIU YH, LU FP, LI QG, LIU YX, LI Y. Screening signal peptidase based on split-GFP assembly technology to promote the secretion of alkaline protease AprE in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 269: 132166.
- [11] 陈雪佳. 解淀粉芽孢杆菌胞外酶缺失对外源碱性蛋白酶表达的影响[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2021.
CHEN XJ. Effect of extracellular enzyme deletion of *Bacillus amyloliquefaciens* on the expression of exogenous alkaline protease[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2021 (in Chinese).
- [12] TERRA R, STANLEY-WALL NR, CAO GQ, LAZAZZERA BA. Identification of *Bacillus subtilis* SipW as a bifunctional signal peptidase that controls surface-adhered biofilm formation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(11): 2781-2790.
- [13] PAETZEL M. Structure and mechanism of *Escherichia coli* type I signal peptidase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1843(8): 1497-1508.
- [14] MORRIS GM, HUEY R, LINDSTROM W, SANNER MF, BELEW RK, GOODSSELL DS, OLSON AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30(16): 2785-2791.
- [15] WLODAWER A. Rational approach to AIDS drug design through structural biology[J]. *Annual Review of Medicine*, 2002, 53: 595-614.
- [16] ZHANG JF, XU XJ, LI XY, CHEN XJ, ZHOU CX, LIU YH, LI Y, LU FP. Reducing the cell lysis to enhance yield of acid-stable alpha amylase by deletion of multiple peptidoglycan hydrolase-related genes in

- Bacillus amyloliquefaciens*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167: 777-786.
- [17] 张莹, 韩晓静, 蔡逸安, 李登科, 李庆刚, 路福平, 李玉. 解淀粉芽孢杆菌内源启动子的筛选及表达碱性果胶酶的应用研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1575-1586.
ZHANG Y, HAN XJ, CAI YA, LI DK, LI QG, LU FP, LI Y. Screening of endogenous promoters of *Bacillus amyloliquefaciens* and application of them in the expression of alkaline pectinase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1575-1586 (in Chinese).
- [18] 邝嘉华, 黄燕燕, 胡金双, 余佳佳, 周钦育, 赵珊, 刘冬梅. 解淀粉芽孢杆菌 DMBA-K4 高产胞外多糖的发酵条件优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(22): 28-35.
KUANG JH, HUANG YY, HU JS, YU JJ, ZHOU QY, ZHAO S, LIU DM. Optimization of fermentation conditions and anti-oxidation of exopolysaccharide produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DMBA-K4[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(22): 28-35 (in Chinese).
- [19] ZHANG JF, ZHU BY, LI XY, XU XJ, LI DK, ZENG F, ZHOU CX, LIU YH, LI Y, LU FP. Multiple modular engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* cell factories for enhanced production of alkaline proteases from *B. clausii*[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 866066.
- [20] 王茂军, 色依德·斯马依, 蔡逸安, 李庆刚, 路福平. 不同信号肽及其组合对果聚糖蔗糖酶异源表达的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(5): 37-44.
WANG MJ, SIMAYI SYD, CAI YA, LI QG, LU FP. Effects of different signal peptides and their combinations on heterologous expression of levansucrase[J]. China Biotechnology, 2023, 43(5): 37-44 (in Chinese).
- [21] 蒋蕊. α -淀粉酶共表达系统的研究及在枯草芽孢杆菌中最优信号肽的筛选[D]. 昆明: 云南师范大学硕士学位论文, 2019.
JIANG R. Study on α -amylase co-expression system and screening of optimal signal peptide in *Bacillus subtilis*[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan Normal University, 2019 (in Chinese).
- [22] 任绍东. 解淀粉芽孢杆菌分泌重组蛋白的信号肽设计[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2022.
REN SD. Design of signal peptide of recombinant protein secreted by *Bacillus amyloliquefaciens*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2022 (in Chinese).
- [23] 吴怡. 以细菌群体感应系统为靶向的噁唑烷酮类抗毒力药物筛选与功效研究[D]. 成都: 成都大学硕士学位论文, 2024.
WU Y. Screening and efficacy study of oxazolidinone anti-virulence drugs targeting bacterial quorum sensing systems[D]. Chengdu: Master's Thesis of Chengdu University, 2024 (in Chinese).