

· 农业生物技术 ·

角蛋白酶基因 *gm2886* 在密旋链霉菌 ACT12 中的表达及鉴定

马怡茗¹, 柯欣¹, 李晓霞¹, 舒伟学¹, 杨文翰¹, 刘亚勇², 颜霞¹, 贾良辉¹, 颜华¹

1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

马怡茗, 柯欣, 李晓霞, 等. 角蛋白酶基因 *gm2886* 在密旋链霉菌 ACT12 中的表达及鉴定. 生物工程学报, 2017, 33(12): 1968–1978.

Ma YM, Ke X, Li XX, et al. Expression and characterization of a keratinase encoding gene *gm2886* in *Streptomyces pactum* ACT12 strain. Chin J Biotech, 2017, 33(12): 1968–1978.

摘要: 通过生物信息学分析, 在本实验室分离得到的 1 株羽毛高效降解菌微白黄链霉菌 Fea-10 基因组中发现基因 *gm2886* (GenBank Accession Number: KY368946) 可能编码一新的角蛋白酶, 通过在该基因 5'端和 3'端分别连接红霉素抗性基因启动子 (*PermE*) 和组氨酸标签编码序列并构建在大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒 pSET152 上, 接合转入密旋链霉菌 *Streptomyces pactum* ACT12, 从而实现了异源表达, 蛋白纯化后对其酶学性质进行了研究。实验结果表明, 带有组氨酸标签编码序列的 *gm2886* 在密旋链霉菌 ACT12 中可以表达分泌得到 1 个大小说约为 36 kDa 的蛋白。多种底物检测表明异源表达得到的重组蛋白 GM2886-His6 具有蛋白酶活性, 可以降解水不溶性的天青角蛋白和羽毛粉; 其最适温度和 pH 分别为 50 °C 和 pH 10.0。PMSF 可抑制 GM2886-His6 的酶活, 而 EDTA 不能, 说明该酶为丝氨酸蛋白酶。本研究为从分子水平上解析羽毛高效降解菌 Fea-10 的活性机理, 从而进一步开发其应用潜力提供了基础, 同时可为该类蛋白酶的研究提供借鉴。

关键词: 角蛋白酶, 微白黄链霉菌 Fea-10, 密旋链霉菌, 异源表达, 重组酶

Received: March 1, 2017; **Accepted:** April 11, 2017

Supported by: Science Technology Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2015NY066), State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University (No. MMLKF14-09), Fundamental Research Funds for the Central Universities (Nos. Z109021426, Z109021432), National Natural Science Foundation of China (No. 31601700).

Corresponding authors: Hua Yan. Tel: +86-29-87092262; E-mail: yanh99@gmail.com

Lianghui Jia. Tel: +86-29-87092262; E-mail: jialianguihui@nwsuaf.edu.cn

陕西省农业科技创新与攻关 (No. 2015NY066), 上海交通大学微生物代谢国家重点实验室开放基金 (No. MMLKF14-09), 中央高校基本科研业务费 (Nos. Z109021426, Z109021432), 国家自然科学基金 (No. 31601700) 资助。

网络出版时间: 2017-04-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170418.1114.004.html>

Expression and characterization of a keratinase encoding gene *gm2886* in *Streptomyces pactum* ACT12 strain

Yiming Ma¹, Xin Ke¹, Xiaoxia Li¹, Weixue Shu¹, Wenhan Yang¹, Yayong Liu², Xia Yan¹, Lianghui Jia¹, and Hua Yan¹

¹ College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: By bioinformatics analysis, a putative keratinase gene *gm2886* (Accession number: KY368946) was discovered in the genome of a feather-degrading strain, *Streptomyces albidoflavus* Fea-10. *gm2886* was ligated into integrative *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vector pSET152 under the promoter *PermE* and added with C-terminal His-tag. The expression vector was transformed into *Streptomyces pactum* ACT12 by conjugal transfer and the recombinant protein GM2886-His6 was detected in fermentation broth. GM2886-His6 was purified and characterized. Its size was nearly 36 kDa. GM2886-His6 showed proteolytic activity towards a variety of substrates and could even degrade insoluble substrates, such as azure keratin and chicken feathers. The optimal pH and temperature of GM2886-His6 for proteolysis of casein was pH 10.0 and 50 °C, respectively. The enzyme activity was inhibited by PMSF, but not EDTA, indicating that GM2886-His6 was a serine proteinase. Our results laid the foundation for the research of the molecular biological mechanism on feather-degrading and for the further utilization of Fea-10.

Keywords: keratinase, *Streptomyces albidoflavus* Fea-10, *Streptomyces pactum*, heterologous expression, recombinant enzyme

角蛋白是一类在自然界中广泛存在的不可溶蛋白,是表皮、羽毛、羊毛、鱼鳞、头发、蹄以及指甲的主要组成部分。由于它紧密交联的氢键、疏水作用以及二硫键的存在,角蛋白相当稳定且难降解,也不易被大部分商品化的蛋白酶如木瓜蛋白酶、胶原酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶水解^[1-3]。以禽类加工中产生的废弃物羽毛(90%为角蛋白,富含丝氨酸、脯氨酸、赖氨酸、色氨酸、胱氨酸)为例,全世界每年产生约8 000 000 t 羽毛废弃物,这些羽毛废弃物常常被掩埋或焚烧,导致严重的环境污染问题,其资源化利用益发显得重要。

角蛋白酶(Keratinase)是一大类可以降解羽毛等不可溶底物和多种蛋白的蛋白水解酶,主要是丝氨酸蛋白酶或者金属蛋白酶类。由于

可以特异性分解角蛋白,所以在饲料工业、食品工业、皮革加工、洗涤剂行业、医药工业及环境治理等方面具有广阔的应用前景^[4-6],越来越引起研究者的关注。目前在细菌、真菌和放线菌^[7]中均已经发现了可以产生角蛋白酶从而降解角蛋白的菌株,其中又以芽孢杆菌属的细菌居多。放线菌可以产生丰富的次级代谢产物,同时,放线菌的生活史有基质菌丝和气生菌丝阶段,这样的特点非常有助于侵入羽毛等硬质角蛋白,从而有助于角蛋白的完全降解,所以角蛋白降解放线菌及其角蛋白酶的研究得到了关注。

我们从家禽养殖场的羽毛堆积废弃物中分离到1株能高效快速降解羽毛的放线菌 Fea-10,经16S rDNA 测序初步鉴定为微白黄链霉菌

Streptomyces albidoflavus。查阅文献发现 Verneuil 等曾报道微白黄链霉菌 K1-02 具有很强的角蛋白酶活性,他们纯化得到了角蛋白酶 SAKase,并对其 N 端的 31 个氨基酸进行了测序^[8],但该蛋白的完整编码基因一直未见报道。我们对 Fea-10 进行全基因组测序,利用 BioEdit 软件进行本地搜索,发现了极可能编码角蛋白酶的基因 *gm2886*,拟通过异源表达鉴定其表达产物并对表达出的蛋白进行功能研究。

以往角蛋白酶基因的异源表达研究中应用较多的表达宿主有大肠杆菌、枯草芽胞杆菌和毕赤酵母,链霉菌表达系统则较少有人关注。链霉菌 GC 含量高达 70% 以上,革兰氏染色阳性,与革兰氏阴性的大肠杆菌显著不同。因此,链霉菌来源的基因更易于在链霉菌宿主中表达。此外,链霉菌有着丰富的外分泌系统,外源基因分泌性表达,可以简化表达产物的分离和纯化过程。因此我们克隆了 *gm2886*,构建了链霉菌表达载体,实现了 *gm2886* 的表达纯化,得到重组蛋白 GM2886-His6,并对其酶学性质进行了研究。

1 材料

1.1 菌株、质粒、培养基和抗生素

菌株:微白黄链霉菌 *Streptomyces albidoflavus* Fea-10、密旋链霉菌 *Streptomyces pactum* ACT12、大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 和大肠杆菌 *Escherichia coli* S17-1 (均由本实验室保藏)。质粒:pMD18-T (TaKaRa 公司)、pET28a、pIJ8641 (含有红霉素抗性基因启动子 *PermE*)、pSET152 (本实验室保存)。培养基:LB 培养基、高氏一号培养基、改良 2CMY 培养基、2% 脱脂牛奶培养基和 TSBY 培养基。抗生素:Ampicillin (终

浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Kanamycin (终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Apramycin (在 LB 培养基中终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在高氏 1 号及改良 2CMY 终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 萘啶酮酸 (终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

1.2 工具酶和引物

工具酶:本实验使用的限制性内切酶、T4 DNA 连接酶以及 *Taq* 酶均购自 TaKaRa 公司, *Pfu* 高保真酶购自 Thermo 公司;PCR 引物的合成与测序均在生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2 方法

2.1 DNA 操作

常规的分子生物学操作参照《分子克隆指南》^[9],链霉菌基因组的提取参照《链霉菌操作手册》^[10]。

2.2 角蛋白酶基因的获取及序列分析

根据文献,结合微白黄链霉菌 Fea-10 的全基因组,利用软件 BioEdit 进行 local blast;序列比对在 NCBI 上进行,信号肽在 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 网站上进行预测,蛋白大小及等电点在 http://web.expasy.org/compute_pi/ 网站上进行分析。

2.3 *gm2866* 基因的克隆以及链霉菌表达载体的构建

设计引物 F1 (带有 *EcoR* I, 序列见表 1, 下同) 和 R1 (带有 *Xho* I), 以微白黄链霉菌 *Streptomyces albidoflavus* Fea-10 基因组 DNA 为模版,使用 *Pfu* 酶 PCR 扩增获得 *gm2886* 的完整基因,使用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后连入 pET28a 构建载体 pET28a-*gm2886* (提供 His Tag), 测序验证。使用 *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶

响。分别在 4 mL 的反应体系中加入 5 mmol 不同的金属离子 (Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+}) 或者不同的化学试剂 (5 mmol EDTA、5 mmol PMSF、1% DMSO、1% SDS、1% 异丙醇、1% DTT 以及 1% β -巯基乙醇), 按上述酪蛋白作为底物的试验方法进行酶活测定。以未加入任何金属离子和化学试剂时测定的酶活作为对照。每种反应测定 3 次重复, 取平均值。

2.8 不同底物对酶活影响的测定

分别以可溶的酪蛋白 (Casein)、偶氮酪蛋白 (Azo-casein)、牛血清白蛋白 (BSA)、血红蛋白 (Hemoglobin) 和不可溶的天青角蛋白 (Azure keratin)、羽毛粉 (Feather) 为底物测定重组蛋白对不同底物的酶活^[13-15]。可溶性底物首先用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9) 配置成 2% 的溶液。可溶性底物测定酶活的反应总体系为 2 mL, 体系中含有 100 μL 纯化的重组蛋白 (0.12 mg/mL), 1 mL 2% 可溶底物溶液, 900 μL pH 10.0 的 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min, 加入 2 mL 0.4 mol/L TCA 终止反应, 继续置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅保温 20 min。离心取上清 1 mL, 加入 1 mL 3% 茚三酮溶液和 1 mL 醋酸缓冲液 (pH 4.5), 摇匀, 置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅 10 min, 加入 3 mL 的 60% 乙醇, 摇匀测定 OD_{570} 。定义每释放出 1 μg 酪氨酸, 酶活升高 1 个单位。其中偶氮酪蛋白在加入 TCA 后直接测定上清的 OD_{440} 。定义 OD 每升高 0.01, 酶活增加 1 个单位。不可溶底物酶活测定的反应总体系为 4 mL, 其中含有 200 μL 纯化的 GM2886-His6 (0.12 mg/mL), 20 mg 不可溶底物, 10 mmol/L DTT, 补 50 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液至总体积为 4 mL。37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振摇 1 h, 天

青角蛋白直接测定 OD_{595} , 羽毛测定 OD_{280} 。定义 OD 每升高 0.01, 酶活增加 1 个单位。

3 结果与分析

3.1 *gm2886* 编码多肽的氨基酸序列分析及与已知链霉菌角蛋白酶同源性比较

利用 BioEdit 软件在 Fea-10 基因组内进行本地搜索, 遴选可能的角蛋白酶基因, 得到候选基因 *gm2886*。*gm2886* 基因全长 1 083 bp, GC 含量较高, 达 71%。编码 360 个氨基酸的多肽, 其中包括 34 个氨基酸的信号肽, 138 个氨基酸的 N-末端前肽以及一个 188 个氨基酸的成熟蛋白酶结构域。其成熟酶序列与 NCBI 上已知的角蛋白酶成熟酶序列同源性对比结果如图 1 所示。它和灰色链霉菌外泌角蛋白酶 SGPD^[16] 的序列相似度最高, 为 83%。

3.2 *gm2886* 在密旋链霉菌 ACT12 中的表达、纯化

重组质粒 pSET152::*Perm::gm2886* 转化 S17-1 并通过接合转移转入密旋链霉菌 ACT12 后, 使用阿普霉素筛选出阳性接合子, 并用 2% 脱脂牛奶平板对接合子进行复筛, 以野生型密旋链霉菌 ACT12 作为对照, 出现降解圈即为有蛋白水解活性。结果如图 2 所示。

挑取阳性接合子, 使用 TSBY 培养基发酵 96 h 后, 离心取发酵液上清加入等体积的饱和硫酸铵溶液至 50%, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 10 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心收集沉淀, 将其溶解于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.9) 即为粗蛋白液。粗蛋白液过滤后使用镍柱亲和纯化。如图 3 所示, 发酵液上清中可以纯化到一个大小约为 36 kDa 的蛋白, 说明该蛋白是外泌表达蛋白。

GM2886_mat	IAGGDAIHG.DGGRCSLGFNVVKGGEPY	27
SFP2_mat	IAGGHAIIYAAGGGRCSLGFNVRRSSSGAT	28
SGPA_mat	IAGGHAITIT.GGSRCSLGFNVSVNGVAH	27
SGPB_mat	ISGGDAIYSST.GRCSLGFNVR..SGST	25
SGPD_mat	IAGGDAIWG.SGSRCSLGFNVVKGGEPY	27
Consensus	i g g a i r c s l g f n v	
GM2886_mat	FL.TAGHCTEGISSWSEISGGSE..IGIT	52
SFP2_mat	YA.LTAGHCTEIASTWYITNSGQTSLLGT	55
SGPA_mat	.A.LTAGHC.....TNISASWSIGT	45
SGPB_mat	YYFLTAGHCTIDGATTWWANSARTTVLGT	53
SGPD_mat	FL.TAGHCTESVTSWSDITQGGSE..IGA	52
Consensus	g	
GM2886_mat	TVESNFPGDDYGLVOYVIGSIEHPSEVNL	80
SFP2_mat	RAGTSFPGNDYGLIRHSNAAADGRVYL	83
SGPA_mat	RTGTSFPPNDYGIIRHSNPAADGRVYL	73
SGPB_mat	TSGSSFPNDYGVIRYNTNTTIHKDGTVG	81
SGPD_mat	NEGSSFPENDYGLVKYVTSDFAHPSVNL	80
Consensus	f p d y g	
GM2886_mat	YDGSITQAITGAGDAVVGQSVITRSGSTTQ	108
SFP2_mat	YNGSYRDIITGAGNAYVGGQVQRISGSTTG	111
SGPA_mat	YNGSYQDITTAGNAFVGGQAVORISGSTTG	101
SGPB_mat	GQ....DITSAANATVGMATVRRRISGSTTG	105
SGPD_mat	YDGSITQAITQAGDAVVGQAVTRSGSTTQ	108
Consensus	i t a a v g v r g s t t	
GM2886_mat	VSTGEVITALDAIVNYGGGDVVVEGLIQTT	136
SFP2_mat	LHSGRVTGLNATVNYGGGDIVSGLIQTN	139
SGPA_mat	LRSGSMVITGLNATVNYGSSGIVYGMIQTN	129
SGPB_mat	THSGSVTALNATVNYGGGDVVVYGMIRTN	133
SGPD_mat	VHDGEVITALDAIVNYGNGDIVNGLIQTT	136
Consensus	g v t l a t v n y g v g i t	
GM2886_mat	VCAEPGDSGGSLFDGISTALGLTSGGSGD	164
SFP2_mat	VCAEPGDSGGALFAGSTALGLTSGGSGN	167
SGPA_mat	VCAEPGDSGGSLFAGSTALGLTSGGSGN	157
SGPB_mat	VCAEPGDSGGHLYSITRATGISTSGGSGN	161
SGPD_mat	VCAEPGDSGGALFAGDITLGLTSGGSGD	164
Consensus	v c a e p g d s g g l g a g l t s g g s g	
GM2886_mat	CSSGGHTFFQPVPEALSAYGVEI	187
SFP2_mat	CRTGGTTFQPVTEALSAYGVSII	190
SGPA_mat	CRTGGTTFYQPVTEALSAYGATVI	180
SGPB_mat	CSSGGTTFQPVTEALSAYGVSIV	184
SGPD_mat	CSSGGTTFQPVPEALAAVGAEL	187
Consensus	c g g t f q p v e a l a y g	

图 1 GM2886 与几种已知的链霉菌来源角蛋白酶的成熟酶序列同源性分析

Fig. 1 Sequence alignment of mature protein sequence of GM2886 and several other known keratinases.

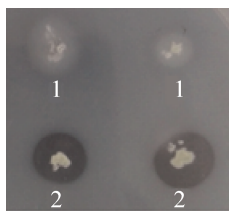


图 2 密旋链霉菌 ACT12/pSET152::Perm::gm2886 牛奶平板复筛

Fig. 2 Secondary screening of *Streptomyces pactum* ACT12/pSET152::Perm::gm2886 using milk-agar plate. 1: wild type ACT12; 2: ACT12/pSET152::Perm::gm2886.

使用酪蛋白为底物进行非变性蛋白电泳，在重组蛋白对应位置可以出现透明条带（图 4），表明该纯化到的蛋白具有蛋白水解活性。

3.3 重组蛋白 GM2886-His6 的产量与酶活

对纯化到的重组蛋白产量进行测定，得到重组蛋白 GM2886-His6 在密旋链霉菌 ACT12 中的异源表达产量为 1.108 mg/L。以酪蛋白为底物测得重组蛋白的最大酶活为 5.36 kU/mg。

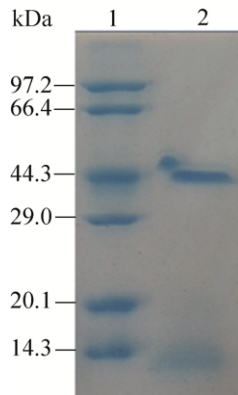


图3 纯化到的重组蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified GM2886-His6.
1: premixed protein marker; 2: purified GM2886-His6.

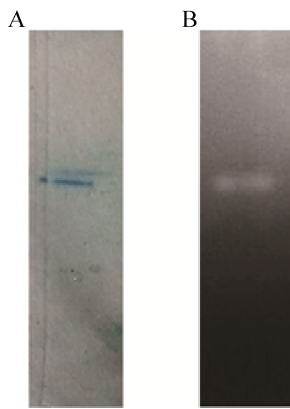


图4 以酪蛋白为底物的非变性蛋白电泳分析
Fig. 4 Zymogram analysis of proteases excreted by *S. pactum* ACT12/pSET152::Perm::gm2886. (A) GM2886-His6 stained with Coomassie G-250. (B) GM2886-His6 with casein.

3.4 重组蛋白 GM2886-His6 最适 pH、最适温度及温度稳定性分析

以酪蛋白为底物分别测定重组蛋白在不同反应温度下的酶活, 结果如图 5 所示, 在 30–70 °C 均有酶活, 且在 50 °C 时酶活最高, 所以 50 °C 是重组蛋白 GM2886-His6 的最适反应温度。分别以酪蛋白为底物测定重组蛋白在不同 pH 下的酶活, 结果如图 6 所示, 在 pH 4.0–11.0 时均有酶活, 在 pH 10.0 时酶活最大, 所以

pH 10.0 为重组蛋白 GM2886-His6 的最适 pH。将重组蛋白分别在 30–80 °C 下保温 30 min 后测定以酪蛋白为底物时的酶活, 结果如图 7, 在 30–40 °C 处理下仍有酶活。

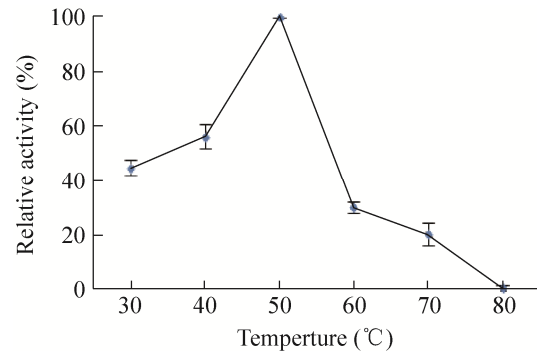


图5 反应温度对重组角蛋白酶酶活的影响
Fig. 5 Effect of temperature on recombinant keratinases.

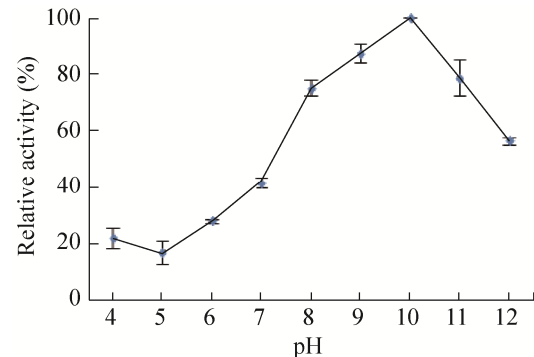


图6 pH 对重组角蛋白酶酶活的影响
Fig. 6 Effect of pH on recombinant keratinases.

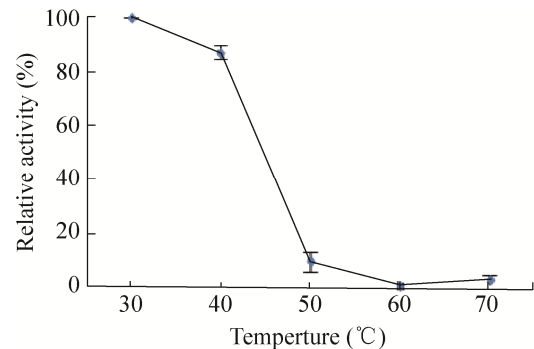


图7 重组角蛋白酶的温度稳定性
Fig. 7 Temperature stability of recombinant keratinases.

3.5 金属离子和化学试剂对重组蛋白 GM2886-His6 酶活影响分析

Ca²⁺、K⁺和 Mg²⁺对重组蛋白酶活具有抑制作用。DMSO、SDS 对重组蛋白酶活具有较弱的抑制作用, EDTA、异丙醇对重组蛋白酶活没有影响, PMSF 明显抑制重组蛋白的酶活, 说明该重组蛋白为丝氨酸蛋白酶。β-巯基乙醇和 DTT 使酶活数据极大提高。结果见表 2。

3.6 重组蛋白 GM2886-His6 的底物特异性分析

分别测定纯化的 GM2886-His6 对不同底物的酶活, 结果见表 3。重组蛋白可与大部分可溶底物反应, 其中酪蛋白为底物时酶活最高。重组蛋白水解天青角蛋白和羽毛, 证明该重组蛋白具有角蛋白酶活性。

表 2 金属离子与化学试剂对重组角蛋白酶活的影响
Table 2 Effect of metal ions and chemicals on recombinant keratinases

Metals	Concentrations (mmol)	Relative activity (%)
Control		100
Ca ²⁺	5	64
Mg ²⁺	5	32
K ⁺	5	55
Chemicals	Concentrations	Relative activity (%)
PMSF	5 mmol	66
EDTA	5 mmol	100
DMSO	1% (V/V)	93
SDS	1% (V/V)	91
Isopropanol	1% (V/V)	100
β-Mercaptoethanol	1% (V/V)	3 477
DTT	1% (V/V)	1 266

表 3 不同底物对重组角蛋白酶活的影响

Table 3 Effect of portein substrates on recombinant keratinase

Protein substrate	Specific activity (U)	Relative activity (%)
Casein	36.87±0.080	100
BSA	12.64±0.072	34.28
Azo-casein	16.1±0.174	43.67
Hemoglobin	17.52±0.131	47.52
Feather	11.8±0.464	32.00
Azure keratin	20.5±0.954	55.60

4 讨论

角蛋白酶由于可以特异性地降解角蛋白, 在多个领域具有很大的应用前景, 近来被人们广泛关注。目前关于角蛋白酶的研究主要集中在角蛋白酶生产菌的筛选与鉴定^[17]、角蛋白酶的纯化与表征^[18-19]以及角蛋白酶基因的异源表达^[14,20-21]等方面, 其中针对地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis*^[22-21] 和绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*^[14-15]来源的角蛋白酶的研究较多, 链霉菌来源的角蛋白酶研究较少, 主要是弗氏链霉菌 *Streptomyces fradiae* sfp2^[11-23-24]等。角蛋白酶异源表达常用宿主为大肠杆菌 *E. coli*^[22-21]、芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 等^[14-20]以及毕赤酵母 *Pichia pastoris*^[15-20], 使用链霉菌作为表达宿主的并不常见。

实验室前期分离得到一株短时间内即可降解完整羽毛的微白黄链霉菌菌株 Fea-10, 在对其进行全基因组测序后通过生物信息学方法筛选到了可能的角蛋白酶编码基因 *gm2886*。我们曾经尝试在大肠杆菌表达系统中表达 *gm2886*, 可能由于其序列 GC 含量比较高、大肠杆菌和链霉

菌密码子偏好性以及对角蛋白酶的加工处理机制不同等原因而没能得到重组蛋白,因此我们选取了角蛋白酶酶活较弱的密旋链霉菌 ACT12 作为异源表达的宿主。另外,鉴于角蛋白酶多属于诱导酶,其自身的启动子需要在羽毛等角蛋白的诱导下起始基因的转录,这样限制了培养基的成分和营养,因此本实验使用组成型的红霉素启动子替代 *gm2886* 原始启动子,使其不需要通过羽毛的诱导就能进行高效表达,可以使用营养更为丰富的培养基进行发酵,从而增加菌体生长速度和角蛋白酶产量。经过多方改进,最终我们得到了一个大小约为 36 kDa 的重组蛋白,活性检测表明其具有蛋白酶活性,在还原剂存在的情况下可以高效地降解水不溶性底物天青角蛋白和羽毛粉,说明 *gm2886* 确实为角蛋白酶基因,其成熟酶序列和已报道的角蛋白酶的成熟酶序列具有同源性,最高为 83%,有一定的研究价值。

gm2886 基因的序列分析表明它具有信号肽、前肽和成熟酶 3 个结构域。前肽是胞外蛋白酶的一个典型结构,被认为参与帮助成熟酶的正确折叠^[25-26]。大多数的研究表明,直接表达酶原编码基因,所产生的具有正常生物学活性的表达产物多为经过切除前肽后的成熟酶,如地衣芽胞杆菌 *kerA*^[22] 和弗氏链霉菌的 *sfp2*^[23-24]。*gm2886* 编码的成熟蛋白的理论分子量约为 20 kDa (加上组氨酸标签),在 ACT12 中纯化得到的重组蛋白约为 36 kDa,表明重组蛋白的前肽可能并没有被前肽酶切割,但在实验室条件下却仍然表现出蛋白酶活性,这值得我们后续对其进一步研究。

在底物特异性实验中,我们发现重组蛋白 GM2886-His6 需要在还原剂 DTT 的存在下才可以水解不可溶底物天青角蛋白和羽毛。一般认为,角

蛋白水解主要有两个过程,第一步是在还原剂的参与下裂解二硫键,第二步是肽链的水解^[27]。许多微生物如高温放线菌 CDF^[28]、*Thermoactinomyces candidus*^[29]和 *Bacillus species*^[5-30]等,均需在活细胞的存在下才可以完全降解羽毛,表明活细胞自身提供必要的还原剂来高效水解二硫键。本实验底物特异性实验的结果验证了在水解角蛋白时,二硫键的裂解是必要的,且需要有还原剂的存在。

综上所述,本实验通过生物信息学分析获得了角蛋白酶编码基因 *gm2886*,实现了其在密旋链霉菌 ACT12 中的异源表达,纯化得到了具有羽毛粉降解活性的重组蛋白,并对其酶学性质进行了研究。本研究为解析羽毛高效降解菌 Fea-10 降解角蛋白的分子机理,从而进一步开发其应用潜力提供了基础;并为同类蛋白的研究提供了借鉴。

REFERENCES

- [1] Kublanov IV, Perevalova AA, Slobodkina GB, et al. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera, Kamchatka (Russia). *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(1): 286-291.
- [2] Son HJ, Park HC, Kim HS, et al. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(3): 461-465.
- [3] Suzuki Y, Tsujimoto Y, Matsui H, et al. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J Biosci Bioeng*, 2006, 102(2): 73-81.
- [4] Gupta R, Rajput R, Sharma R, et al. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(23): 9931-9940.
- [5] Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and

- their prospective applications: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(1): 21–33.
- [6] Macedo AJ, da Silva WO, Gava R, et al. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(1): 594–596.
- [7] Verma A, Singh H, Anwar S, et al. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. *Crit Rev Biotechnol*, 2017, 37(4): 476–491.
- [8] Bressollier P, Letourneau F, Urdaci M, et al. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(6): 2570–2576.
- [9] Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- [10] Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Colney, Norwich: John Innes Foundation, 2000.
- [11] Li JX, Chen DD, Yu ZQ, et al. Improvement of expression level of keratinase Sfp2 from *Streptomyces fradiae* by site-directed mutagenesis of its *N*-terminal pro-sequence. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(5): 743–749.
- [12] Liu BH, Zhang J, Li B, et al. Expression and characterization of extreme alkaline, oxidation-resistant keratinase from *Bacillus licheniformis* in recombinant *Bacillus subtilis* WB600 expression system and its application in wool fiber processing. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29(5): 825–832.
- [13] Lin HH, Yin LJ, Jiang ST. Cloning, expression, and purification of *Pseudomonas aeruginosa* keratinase in *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS expression system. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(9): 3506–3511.
- [14] Lin HH, Yin LJ, Jiang ST. Expression and purification of *Pseudomonas aeruginosa* keratinase in *Bacillus subtilis* DB104 expression system. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(17): 7779–7784.
- [15] Lin HH, Yin LJ, Jiang ST. Functional expression and characterization of keratinase from *Pseudomonas aeruginosa* in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(12): 5321–5325.
- [16] Sidhu SS, Kalmar GB, Willis LG, et al. Protease evolution in *Streptomyces griseus* discovery of a novel dimeric enzyme. *J Biol Chem*, 1995, 270(13): 7594–7600.
- [17] Yusuf I, Ahmad SA, Phang LY, et al. Keratinase production and biodegradation of polluted secondary chicken feather wastes by a newly isolated multi heavy metal tolerant bacterium-*Alcaligenes* sp. AQ05-001. *J Environ Manage*, 2016, 183: 182–195.
- [18] Elhouli MB, Jaouadi NZ, Rekik H, et al. Biochemical and molecular characterization of new keratinolytic protease from *Actinomadura viridilutea* DZ50. *Int J Biol Macromol*, 2016, 92: 299–315.
- [19] Bouacem K, Bouanane-Darenfed A, Jaouadi N Z, et al. Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86: 321–328.
- [20] Radha S, Gunasekaran P. Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains. *Prot Exp Purif*, 2009, 64(1): 24–31.
- [21] Tiwary E, Gupta R. Extracellular expression of keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15 in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(14): 8380–8385.
- [22] Hu H, He J, Yu B, et al. Expression of a keratinase (*kerA*) gene from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzymes. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(2): 239–244.
- [23] Li J, Shi PJ, Han XY, et al. Functional expression of the keratinolytic serine protease gene *sfp2* from *Streptomyces fradiae* var. k11 in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Purif*, 2007, 54(1): 79–86.
- [24] Li J, Shi PJ, Zhang WZ, et al. Gene cloning and expression of serine protease SFP2 from

- Streptomyces fradiae* var. k11. Chin J Biotech, 2005, 21(5): 782–788 (in Chinese).
李江, 石鹏君, 张王照, 等. 弗氏链霉菌丝氨酸蛋白酶基因的克隆及表达. 生物工程学报, 2005, 21(5): 782–788.
- [25] Baardsnes J, Sidhu S, MacLeod A, et al. *Streptomyces griseus* protease B: secretion correlates with the length of the propeptide. J Bacteriol, 1998, 180(12): 3241–3244.
- [26] Baker D, Silen JL, Agard DA. Protease pro region required for folding is a potent inhibitor of the mature enzyme. Proteins, 1992, 12(4): 339–344.
- [27] Brandelli A, Daroit DJ, Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85(6): 1735–1750.
- [28] Wang LY, Cheng GY, Ren YX, et al. Degradation of intact chicken feathers by *Thermoactinomyces* sp. CDF and characterization of its keratinolytic protease. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(9): 3949–3959.
- [29] Ignatova Z, Gousterova A, Spassov G, et al. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. Can J Microbiol, 1999, 45(3): 217–222.
- [30] Ramnani P, Singh R, Gupta R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. Can J Microbiol, 2005, 51(3): 191–196.

(本文责编 陈宏宇)