

枯草芽孢杆菌中人乳铁蛋白的表达与分泌

张予婷², 李洋², 武耀康^{1,2}, 刘延峰^{1,2}, 李江华^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 吕雪芹^{1,2}, 刘龙^{1,2*}

1 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122

张予婷, 李洋, 武耀康, 刘延峰, 李江华, 堵国成, 吕雪芹, 刘龙. 枯草芽孢杆菌中人乳铁蛋白的表达与分泌[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1895-1908.

ZHANG Yuting, LI Yang, WU Yaokang, LIU Yanfeng, LI Jianghua, DU Guocheng, LV Xueqin, LIU Long. The expression and secretion of human lactoferrin in *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1895-1908.

摘要: 人源乳铁蛋白(human lactoferrin, HLF)是母乳中重要的营养成分, 具有抗菌、消炎、提高机体免疫力等功能。本研究以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) G601 为宿主, 对比了 3 种组成型(P_{21} 、 P_{43} 和 P_{veg})和 3 种诱导型启动子($P_{grac100}$ 、 P_{xyIA} 和 P_{tet*})对 HLF 表达的影响, 摇瓶发酵结果显示, 启动子 P_{tet*} 驱动的 HLF 的表达量最高, 为 651.57 $\mu\text{g/L}$; 进一步对核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)和信号肽进行组合筛选, 获得的 RBS-信号肽组合 RBS6-SP_{ycp} 促使 HLF 的总表达量提升至 1 099.87 $\mu\text{g/L}$, 其中分泌至胞外的蛋白量为 498.68 $\mu\text{g/L}$; 为了提高蛋白的胞外分泌量, 敲除细胞壁表面离子相关基因 *dltD*, 菌株 HLF 分泌产量达到 637.28 $\mu\text{g/L}$ 。本研究通过表达元件筛选与优化等策略成功实现了 HLF 在 *B. subtilis* 的分泌表达, 为构建 *B. subtilis* 细胞工厂高效合成乳蛋白奠定了基础。

关键词: 乳铁蛋白; 枯草芽孢杆菌; 核糖体结合位点(RBS)-信号肽筛选; 分泌表达

资助项目: 国家自然科学基金(32270096, 32021005)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32270096, 32021005).

*Corresponding author. E-mail: longliu@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-11-15; Accepted: 2024-01-17; Published online: 2024-06-07

The expression and secretion of human lactoferrin in *Bacillus subtilis*

ZHANG Yuting², LI Yang², WU Yaokang^{1,2}, LIU Yanfeng^{1,2}, LI Jianghua^{1,2}, DU Guocheng^{1,2}, LV Xueqin^{1,2}, LIU Long^{1,2*}

1 Key Laboratory of Sugar Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Human lactoferrin (HLF), an essential nutrient found in breast milk, possesses antibacterial, anti-inflammatory, and immune-enhancing properties. In this study, the effects of three constitutive promoters (P_{21} , P_{43} , and P_{veg}) and three inducible promoters ($P_{grac100}$, P_{xylA} , and P_{tet*}) on the expression of HLF were compared using *Bacillus subtilis* G601 as the host strain. The results showed that the highest expression of HLF, reaching 651.57 $\mu\text{g/L}$, was achieved when regulated by the P_{tet*} promoter. Furthermore, the combinational optimization of ribosome binding site (RBS) and signal peptides was investigated, and the optimal combination of RBS6 and SP_{yycP} resulted in increased HLF expression to 1 099.87 $\mu\text{g/L}$, with 498.68 $\mu\text{g/L}$ being secreted extracellularly. To further enhance HLF secretion, the metal cations-related gene *dltD* was knocked out, leading to an extracellular HLF level of 637.28 $\mu\text{g/L}$. This study successfully demonstrated the secretory expression of HLF in *B. subtilis* through the selection and optimization of expression elements, laying the foundation for the development of efficient *B. subtilis* cell factories for lactoprotein synthesis.

Keywords: lactoferrin; *Bacillus subtilis*; ribosome binding site (RBS)-signal peptide screening; secretion expression

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是一种非血红素铁结合糖蛋白, 主要由哺乳动物(如人、山羊、牛和狗)的乳腺上皮细胞生产。在母乳中, 其含量最为丰富, 约占母乳总蛋白质含量的15%–20%^[1-2]。LF 具有抗菌、消炎及提高婴幼儿免疫力等功能, 可作为食品营养强化剂添加到婴幼儿配方食品和含乳饮料中, 在食品和保健品领域得到了广泛应用^[3]。目前, 市场上商业化的 LF 主要来自牛奶的分离提取, 但每 14 kg 的牛奶只能提取 1 g 的 LF, 成本高昂; 并且牛源 LF 与人乳铁蛋白(human lactoferrin, HLF)在结构和翻译后修饰等方面存在明显的差异性, 使用时易出现抗原反应。因此构建微生物细胞

工厂实现 HLF 的重组表达具有重要意义。

目前已有 HLF 重组表达的相关报道。例如, Jiang 等^[4]使用载体 pPIC9K 在毕赤酵母中表达了 HLF, 其采用甲醇/甘油混合培养物显著提高了高细胞密度发酵诱导阶段重组 HLF 的表达水平。但甲醇为有毒物质, 存在一定的安全隐患。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种食品安全级菌株, 具有遗传信息清晰、生长速度快、无内毒素等优良特性, 被广泛用于各种化学产品和重组蛋白的工业生产。在 *B. subtilis* 中表达异源蛋白的常见策略包括启动子、核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)、信号肽等表达元件的筛选和优化以及过表达伴侣蛋白增强蛋白

的折叠与分泌等^[5]。但文献表明 HLF 对 *B. subtilis* 具有明显的抑菌性^[6]，在 *B. subtilis* 中异源表达 HLF 会对细胞生长造成较大的影响。除此之外，HLF 在 *B. subtilis* 中很难实现分泌表达，目前研究者多集中在 HLF 部分片段分泌表达的研究，鲜有关于全长 HLF 在 *B. subtilis* 中分泌表达的报道。

课题组前期开发了基于 CRISPR/Cpf1 的多基因编辑与调控系统工具箱 CAMERS-B^[7]，利用该工具箱构建了胞外蛋白酶失活菌株 *B. subtilis* G600 和 G601^[8]。在此基础上，本研究首先选取了 3 种组成型启动子(P_{21} 、 P_{43} 和 P_{veg})和 3 种诱导型启动子($P_{grac100}$ 、 P_{xylA} 和 P_{tet^*})对 HLF 全长蛋白进行表达，并通过 Western blotting 和酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)进行定性与定量分析，结果显示，诱导型启动子可实现菌株生长与 HLF 表达解偶联，提高 HLF 的产量，其中 P_{tet^*} 效果最好，但 HLF 主要集中于胞内。采用 RBS-信号肽系统组合优化方法，成功获得了能分泌表达 HLF 的 RBS-信号肽组合 RBS6-SP_{ycp}；此外，本研究对 *csaA*、*hrcA*、*dltD* 等伴侣蛋白相关基因进行过表达或敲除，其中 *dltD* 基因的敲除大幅提高了菌株 HLF 的分泌产量。相关研究成果为高效表达乳蛋白的 *B. subtilis* 细胞工厂的构建提供了一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所涉及的菌株、质粒如表 1 所示。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): NaCl 10.00, 酵母提取物 5.00, 胰蛋白胨 10.00。

TB 培养基(g/L): 酵母提取物 24.00, 胰蛋白胨 12.00, 甘油 5.05, KH_2PO_4 2.31, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 12.54。

YN 培养基(g/L): 酵母提取物 7.00, 营养肉汤 18.00。

1.1.3 主要试剂

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 和 Rapid Taq Master Mix 购于宝生物工程(大连)有限公司，质粒提取、感受态制备试剂盒、HLF-ELISA 试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因序列和引物合成

HLF 基因(GenBank 登录号: NP_002334.2)以及所使用引物(表 2)均由苏州金唯智生物科技有限公司进行合成。

1.2.2 底盘菌株构建

本实验使用文献[7]所报道的基因编辑系统对菌株进行基因编辑，此编辑系统由 2 个质粒 pHT-XCR6 和 pcrF19NM2 组成。质粒 pHT-XCR6 为 Cpf1 表达载体；质粒 pcrF19NM2 为 crRNA 表达载体，并且可将同源修复模板插入其中，其同源模板插入区中含有 *mCherry* 基因，用于插入筛选，其在 *B. subtilis* 中为温敏型质粒，在 37 °C 以上培养时无法复制。

1.2.3 重组质粒构建

表达质粒构建：分别对质粒载体、基因片段以及启动子进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)得到线性化片段，之后采用碧云天一步克隆酶(上海碧云天生物技术股份有限公司)进行片段连接，得到的连接产物转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态，并涂布相应的抗性平板，次日将平板上的单菌落送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序，将测序正确的单菌落扩大培养，并提取重组质粒。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Descriptions	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Wild-type strain	Lab store
G601	<i>Bacillus subtilis</i> 168 derivate, $\Delta epr::XylR-P_{xylA}-comKS$, $\Delta trpC2::trpC0$, $\Delta gudB::gudB^+$, $aprE^0$, $nprE^0$, bpr^0 , mpr^0 , $nprB^0$	Lab store
pHT-XCR6	ColE1 Amp ^r , RepA Cm ^r , XylR- P_{xylA} -FnCpf1-NgAgo	Lab store
pcrF19NM2	ColE1, pE194ts Kan ^r , <i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i> shuttle carrier, crRNA and gene-edited or knockout frame vectors	Lab store
pHT01	Expression vector	Lab store
pHT-SP-sfGFP	pHT01 with signal peptide insertion site linked with sfGFP	Lab store
pHT- P_{21} -sfGFP	pHT01 with promoter P_{21} linked with sfGFP	Lab store
pHT- P_{43} -sfGFP	pHT01 with promoter P_{43} linked with sfGFP	Lab store
pHT- P_{veg} -sfGFP	pHT01 with promoter P_{veg} linked with sfGFP	Lab store
pHT- $P_{grac100}$ -sfGFP	pHT01 with promoter $P_{grac100}$ linked with sfGFP	Lab store
pHT- P_{tet^*} -sfGFP	pHT01 with promoter P_{tet^*} linked with sfGFP	Lab store
pHT- P_{xylA} -sfGFP	pHT01 with promoter P_{xylA} linked with sfGFP	Lab store
pHT- P_{21} -RBS-SP-HLF-sfGFP	pHT01 with promoter P_{21} linked with HLF-sfGFP, used for RBS-SP screening	Lab store
pHT- P_{21} -HLF	pHT01 with promoter P_{21} linked with HLF	This study
pHT- P_{43} -HLF	pHT01 with promoter P_{43} linked with HLF	This study
pHT- P_{veg} -HLF	pHT01 with promoter P_{veg} linked with HLF	This study
pHT- $P_{grac100}$ -HLF	pHT01 with promoter $P_{grac100}$ linked with HLF	This study
pHT- P_{tet^*} -HLF	pHT01 with promoter P_{tet^*} linked with HLF	This study
pHT- P_{xylA} -HLF	pHT01 with promoter P_{xylA} linked with HLF	This study
pHT- P_{21} -RBS1- SP_{spollQ} -HLF	pHT01 with promoter P_{21} , RBS1 and SP_{spollQ} linked with HLF	This study
pHT- P_{21} -RBS2- SP_{yxiT} -HLF	pHT01 with promoter P_{21} , RBS2 and SP_{yxiT} linked with HLF	This study
pHT- P_{21} -RBS3- SP_{yjuA} -HLF	pHT01 with promoter P_{21} , RBS3 and SP_{yjuA} linked with HLF	This study
pHT- P_{21} -RBS4- SP_{wprA} -HLF	pHT01 with promoter P_{21} , RBS4 and SP_{wprA} linked with HLF	This study
pHT- P_{21} -RBS5- SP_{yncM} -HLF	pHT01 with promoter P_{21} , RBS5 and SP_{yncM} linked with HLF	This study
pHT- P_{21} -RBS6- SP_{yycP} -HLF	pHT01 with promoter P_{21} , RBS6 and SP_{yycP} linked with HLF	This study
pHT- P_{tet^*} -RBS6- SP_{yycP} -HLF	pHT01 with promoter P_{tet^*} , RBS6 and SP_{yycP} linked with HLF	This study
pHT- P_{21} - SP_{mpr} -sfGFP	pHT01 with promoter P_{21} , SP_{mpr} linked with sfGFP	Lab store
pHT- P_{21} - SP_{bigC} -sfGFP	pHT01 with promoter P_{21} , SP_{bigC} linked with sfGFP	Lab store

RBS-信号肽重组质粒文库构建: 将 HLF 蛋白序列连接到筛选质粒得到模板质粒 pHT- P_{21} -RBS-SP-HLF-sfGFP, 该质粒主要由启动子 P_{21} 、2 个 *Eco31* I 酶切(GGTCTC)位点、HLF-sfGFP 融合蛋白基因、复制子和抗性基因(Amp^R, Cm^R)构成; 构建 RBS 文库, 以 RBS (AAGGAGATATACC) 为初始 RBS, 使用简并引物 RBS-F 与 RBS-R, 两端加上 *Eco31* I 酶切位点并获得 RBS 混合文库(MAGGMRGWATCAC), 该文库包含 16 个具有

不同转录强度的 RBS; 构建信号肽组合文库, 在 Signal Peptide Website 中下载 *B. subtilis* 的 173 个 Sec 途径的信号肽, 设计引物在信号肽片段两端加上 *Eco31* I 酶切位点, 从基因组中将片段扩增出, 混合获得信号肽文库; 使用 Golden Gate 方法(表 3)将模板质粒 pHT- P_{21} -RBS-SP-HLF-sfGFP、RBS 文库和信号肽文库进行连接并转化 *E. coli* DH5 α 进行质粒文库的扩增, 之后从 *E. coli* DH5 α 中提取得到质粒文库。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
HLF-pHT-F	AAAGAAAGGAGGTTTATTTTATGAAACTGGTTTTCTGGTTCTG	44
HLF-pHT-R	TAATGATGGTGATGGTGATGTTTTCTCAGAAATTCGCATGCTTC	44
pHT-6HIS-LiF	CATCACCATCACCATCATTAACTGCAGGTCGACGTCCCC	39
pHT-6HIS-LiR	AAAATAAACCTCCTTTCTTTACTTACCC	29
pHT-GliF	AGTGATAGCGGTACCCTCG	19
pHT-GliR	ACTAGTATAAAAAACGCCGGC	22
pHT-sfGFP-liF	CTGCAGGTCGACGTCCCC	18
pHT-sfGFP-liR	AAAATAAACCTCCTTTCTTTACTTACCCTCTATTAACAAAATTATTTGTAGA	54
HLF-SP-F	TTCCACGTGGATCCGTCGATATGAAACTGGTTTTCTGGTTCTG	44
HLF-SP-R	CTGCCGCCACCGCCGCTCCATGATGGTGATGGTGATGTTTTTC	43
pHT-SGP-LiF	CTGCAGGTCGACGTCCCC	18
pHT-SGP-LiR	GCATAAAATCCCCTTTCATTCTAGAGC	27
pHT-SP-LiF	GGAAGCGGCGGTGGCGGC	18
pHT-SP-LiR	ATCGACGGATCCACGTGGAA	20
CR-hrcA-R	AATTTCTGTAAAGAAGGTGAATCCGTT	27
CR-hrcA-F	AGATAACGGATTCACCTTCTTTACAGA	27
hrcA-F	TGGCCAGTGCCTCTAGAGTCGCTTTTGACAAGTCCGAAGTCA	42
hrcA-R	GTTTCGTAACAGGTCGACTCTAGCTGATGGATATGATCAACCG	42
hrcA0-F	AGCTAACGTTATGTTTACATCATCACCTCTGTTAGCAC	41
hrcA0-R	TGATGTAAACATAACGTTAGCTGCTGATCCTTCAGGTTATAATCAAC	47
CR-csaA-F	AGATGAGATATACAATATTCTTTTAAC	27
CR-csaA-R	AATTGTTAAAAGAATATTGTATATCTC	27
csaA-DF	AAAGAAAGGAGGTTTATTTTATGGCAGTTATTGATGACTTTGAG	44
csaA-DR	GTTTCGTAACAGGTCGACTCTTATGTTTATCCAAATAATTAGATCTCTTTCTAGG	55
csaA-UF	TGGCCAGTGCCTCTAGAGTCTTCTTTATATGGAAAAATCGGCTTTTCG	48
csaA-UR	AAAATCCCCTTTTATTCTAGTCATTTTTTATCCGAATATAAGGTGTTTCGATA	53
CR-dltD-F	AGATTTCTATTTCGAGGCGCCATCGCA	27
CR-dltD-R	AATTTGCGATGGCGCCTGCGAATAGAA	27
dltD-F	TGGCCAGTGCCTCTAGAGTCGGTTTCTGTATAAATTTATTATCGGCTAC	50
dltD-R	GTTTCGTAACAGGTCGACTCTATGTGAAAATCGTTAGAACCGG	42
dltD0-F	CCAATTATTTGGCGTAAATTTAATTTCGAGGCGCCATC	39
dltD0-R	GATGGCGCCTGCGAATTAATTTACGCCAAAATAATTGGACCGAA	45

表 3 Golden Gate 程序

Table 3 Golden Gate procedure

Serial number	Temperature (°C)	Time (min)
1	37	3
2	16	5
3	37	60
4	50	5
5	80	5
6	4	30
Cycles×60 from 1 to 2		

1.2.4 感受态细胞制备和转化

E. coli 感受态制备：按照感受态细胞制备试剂盒进行感受态制备。

B. subtilis 感受态制备：新鲜划线的菌株，接种于 2 mL YN 培养基，过夜培养；取 500 μL 过夜培养菌液转接 2 mL YN 培养基，并加入 80 μL 500 g/L 的木糖，37 °C 培养 2 h，之后加入终浓度 10% 的甘油保藏。或者过夜后取 150 μL 接种

于 2 mL YN 之后再加木糖诱导 2 h, 制成感受态直接转化。

1.2.5 HLF 表达量测定

采用 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行定性分析。

1) SDS-PAGE

胞内蛋白样品制备: 取 1 mL 发酵液 12 000 r/min 离心 2 min, PBS 重悬细胞后, 12 000 r/min 离心 2 min, 重复 2 次, 用 1 mL PBS 重悬, 细胞破碎仪进行破碎, 程序为 20 min, 工作 4 s, 间隔 2 s。破碎完放于 -20 °C 备用。胞外蛋白样品制备: 取 1 mL, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清。取 60 μ L 制备好的样品, 加入 20 μ L 4 \times SDS 样品缓冲液并混合均匀, 之后将 8 连管于 99 °C 加热 10 min; 向预制胶(赛默飞世尔科技公司)中每孔加入 15 μ L 样品处理液, 接好电源, 将电压稳定在 120 V, 电泳 90 min; 取出凝胶放入孵育盒中, 加入适量的考马斯亮蓝染液, 并放在侧摆摇床中, 染色 30–60 min。之后将染液倒回瓶中, 加入清水脱色, 每隔 30 min 更换一次清水, 重复 2–3 次, 之后过夜脱色, 直至凝胶条带清晰可见。将凝胶放在照胶仪上, 观察染色结果。

2) Western blotting

按照文献[9]所述方法进行转膜。

1.2.6 sfGFP 荧光检测

将 sfGFP 重组表达菌株在 LB 培养基中培养 10 h, 以 1% 的比例接种于 200 μ L LB 的 96 孔板中。在孔板摇床上以 750 r/min、37 °C 孵育。在不同的时间点检测 sfGFP 荧光与 OD_{600} 。荧光检测条件(激发光 480 nm; 发射光 516 nm), 菌浓度 OD_{600} (600 nm 处吸光度值)。应用式(1)计算相对荧光强度, 排除培养基的背景 OD (OD_{bg}) 和没有荧光蛋白表达的菌株的背景荧光 (FP_{bg})。

$$\left(\frac{FP}{OD}\right)_{corrected} = \frac{FP - FP_{bg}}{OD - OD_{bg}} \quad (1)$$

1.2.7 数据分析方法

所有试验均重复至少 3 次, 数据以平均值 \pm 标准差的形式表示。采用 *t* 检验和单因素方差分析对统计学显著性差异进行评估。“*”表示 $P < 0.05$, “***”表示 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 全长 HLF 的重组表达和表达优化

为了实现全长 HLF 的重组表达, 首先将 HLF 的基因序列按照 *B. subtilis* 的密码子偏好性进行优化并在 C 端加上 6 \times His 标签。以 pHT01 为质粒骨架, 选择 *B. subtilis* 中常用的组成型强启动子 P_{21} 、 P_{43} 和 P_{veg} 构建 HLF 的表达质粒(图 1A), 获得重组表达质粒 pHT- P_{21} -HLF、pHT- P_{43} -HLF 和 pHT- P_{veg} -HLF, 将上述 3 个重组表达质粒和空载质粒 pHT01 分别转入 *B. subtilis* G601 中, 获得重组菌株 G601- P_{21} -HLF、G601- P_{43} -HLF、G601- P_{veg} -HLF 和 G601-pHT01。对这些菌株进行摇瓶发酵, 选取发酵时间为 24 h 的样品进行 Western blotting 验证。如图 1B 所示, 相比于对照菌株, 重组蛋白表达菌株在 70 kDa 左右均出现特异性条带, 其中菌株 G601- P_{21} -HLF 相比于其他两个菌株的表达量更高。对菌株 G601- P_{21} -HLF 不同时间的发酵样品进行 Western blotting 验证, 结果显示, 发酵 12 h 时, HLF 产量最高(图 1C)。为了明确 HLF 的表达量, 使用 HLF 的 ELISA 试剂盒进行定量分析, 在 12 h 时, 重组菌株 G601- P_{21} -HLF、G601- P_{43} -HLF 和 G601- P_{veg} -HLF 的 HLF 表达量分别为 52.09、15.30、15.10 μ g/L(图 1D)。

异源蛋白的大量表达可能会增加宿主细胞的代谢负担进而影响细胞的生长, 同时, HLF 对革兰氏阳性菌具有一定的抑菌作用^[6,10-13]。本

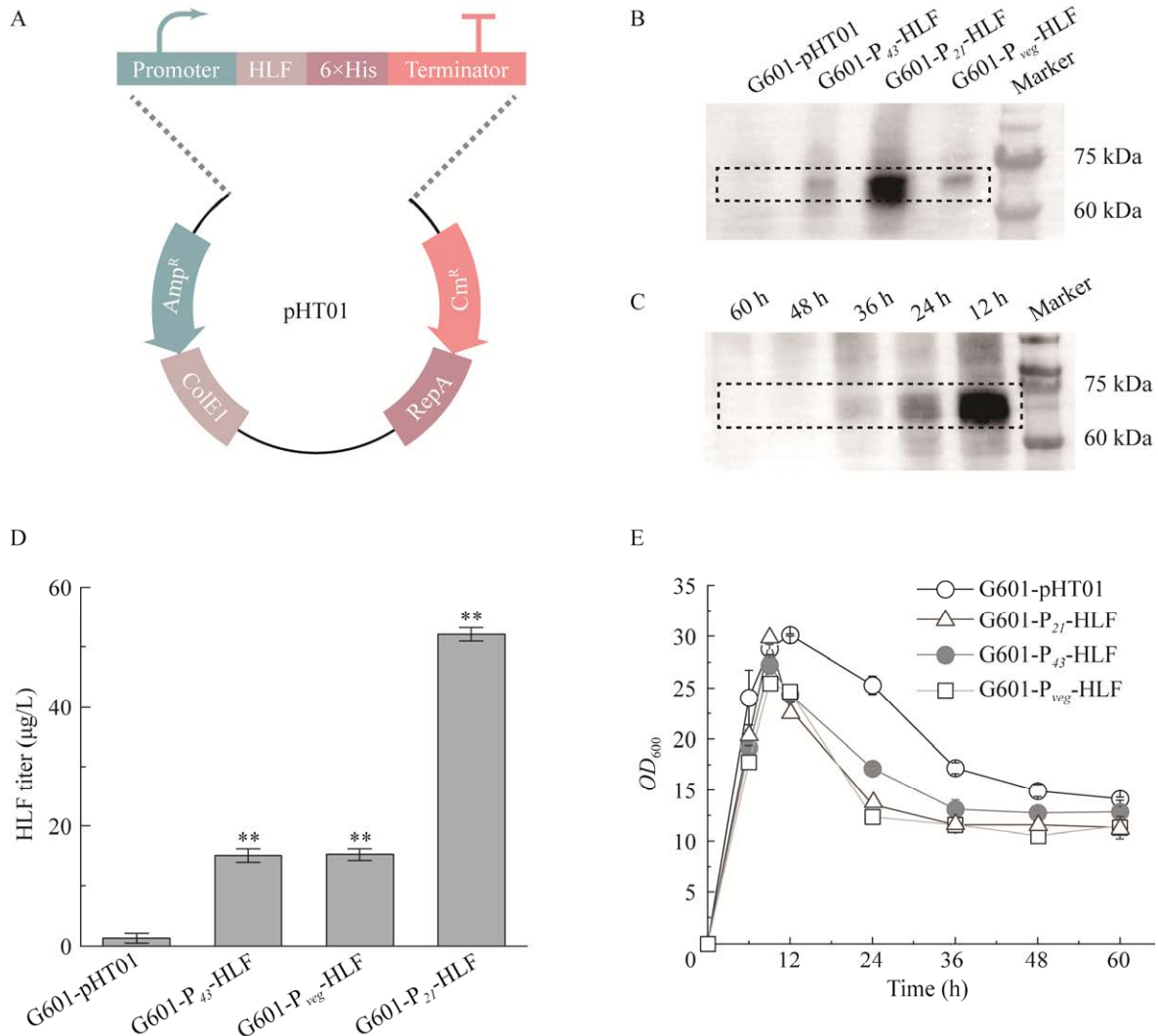


图 1 HLF 组成型表达 A: 重组质粒构建示意图. B 和 C: Western blotting 检测不同组成型启动子以及不同发酵时间对 HLF 表达的影响. D: ELISA 试剂盒检测不同组成型启动子对 HLF 产量的影响. E: HLF 表达对菌株生长的影响. **表示 $P < 0.01$

Figure 1 Constitutive expression of HLF. A: Schematic of the construction plasmid. B, C: Effects of different constitutive promoters and fermentation time on HLF production detected by Western blotting. D: Effects of different promoters on HLF production detected by ELISA kit. E: Effect of HLF expression using different promoters on cell growth. ** indicate $P < 0.01$.

研究通过菌体在 OD_{600} 的吸光值对菌株的生长情况进行测定。结果显示，相比于对照菌株，组成型表达 HLF 菌株 OD_{600} 值降低了 30%–50% (图 1E)，说明 HLF 异源表达对细胞的生长存在明显的抑制作用。为了减弱 HLF 表达对菌株生长

的影响，接下来选用诱导型启动子 $P_{grac100}$ 、 P_{xylA} 和 P_{tet} 进行 HLF 表达，其分别由异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、木糖和脱水四环素 (anhydrotetracycline, aTc) 进行诱导。以此构建了诱导型表达载体

pHT- $P_{grac100}$ -HLF、pHT- P_{xylA} -HLF 和 pHT- P_{tet^*} -HLF, 将这 3 个表达载体分别转化菌株 G601, 得到表达菌株 G601- $P_{grac100}$ -HLF、G601- P_{xylA} -HLF 和 G601- P_{tet^*} -HLF。对上述菌株进行发酵验证, 并在 6 h 时添加诱导剂, 每隔 12 h 对菌株生长状况进行检测, 如图 2A 所示, 相比于对照菌株, 重组菌株的生长并没有明显变化。进一步对发酵样品进行 ELISA 定量分析, G601- $P_{grac100}$ -HLF、G601- P_{xylA} -HLF 和 G601- P_{tet^*} -HLF 的 HLF 表达量分别为 245.62、446.12 和 651.57 $\mu\text{g/L}$, 相比于 G601- P_{21} -HLF 菌株分别提升了 4.72、8.56 和 12.51 倍(图 2B), 说明诱导型启动子的应用可以缓解 HLF 抑菌性对菌株生长的影响, 提高 HLF 产量, 其中 P_{tet^*} 驱动 HLF 表达的效果最好。

2.2 RBS-信号肽组合筛选实现 HLF 分泌表达

目前已经开发出了多种筛选信号肽和 RBS 的工具箱^[14-16]。Li 等^[8]设计了 RBS 和信号肽的系

统组合优化(systemic combinatorial optimization of ribosome binding site equipped with signal peptide, SCORES)方法对目标蛋白的最适 RBS 和信号肽进行组合筛选, 并构建了包含 2 768 种组合 RBS-信号肽混合文库。为了实现 HLF 的高效分泌表达, 首先选用了组成型启动子 P_{21} 来进行文库的筛选, 构建筛选质粒 pHT- P_{21} -RBS-SP-HLF-sfGFP, 将构建好的筛选文库使用流式细胞术进行初步筛选, 将筛选出来的菌株使用 96 孔板培养, 12 h 后使用酶标仪检测上清中荧光强度, 其荧光值均在 200–600 a.u.之间(图 3A)。从中选取 6 个荧光值较高的菌株, 提取质粒, 并通过测序得出融合蛋白表达质粒前的信号肽及 RBS 序列, 结果如表 4 所示, 其中 RBS6 和 SP_{yycP} 组合荧光值最高。

将得到的信号肽和 RBS 组合应用于 HLF 的分泌表达并进行发酵, 发酵上清液以及细胞破碎液采用 ELISA 方法进行验证。结果如

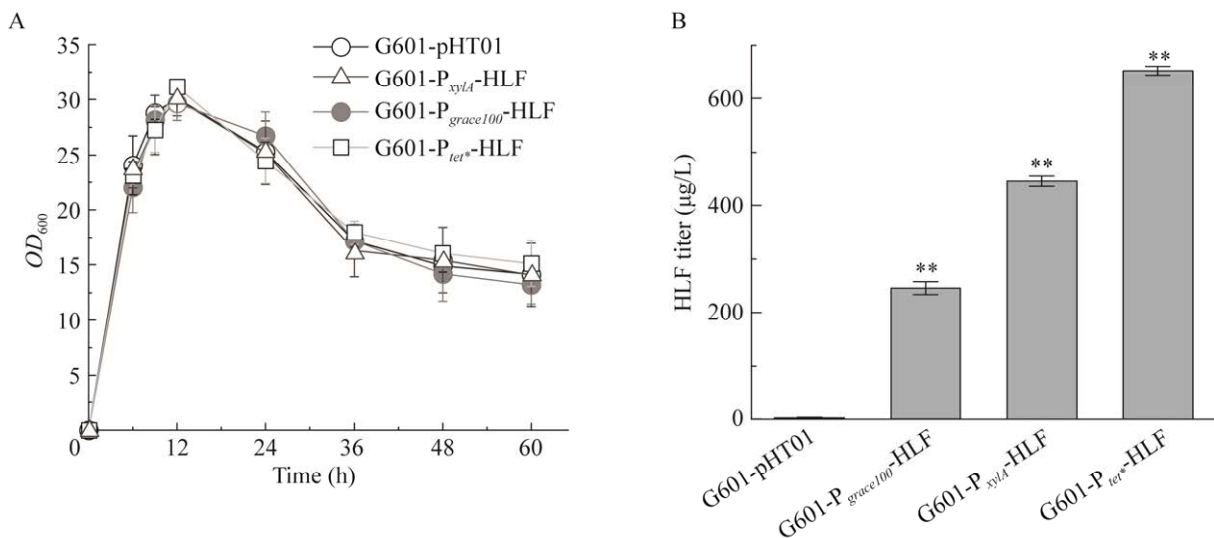


图 2 HLF 诱导型表达 A: 诱导型表达 HLF 对菌株生长的影响. B: ELISA 试剂盒检测不同诱导型启动子菌株 G601-pHT01、G601- $P_{grac100}$ -HLF、G601- P_{xylA} -HLF 和 G601- P_{tet^*} -HLF 的 HLF 产量. **表示 $P < 0.01$

Figure 2 Inducible expression of HLF. A: The growth cell of HLF expressing strains driven by different inducible promoters. B: The production of strains G601-pHT01, G601- $P_{grac100}$ -HLF, G601- P_{xylA} -HLF, and G601- P_{tet^*} -HLF detected by ELISA kit. ** indicate $P < 0.01$.

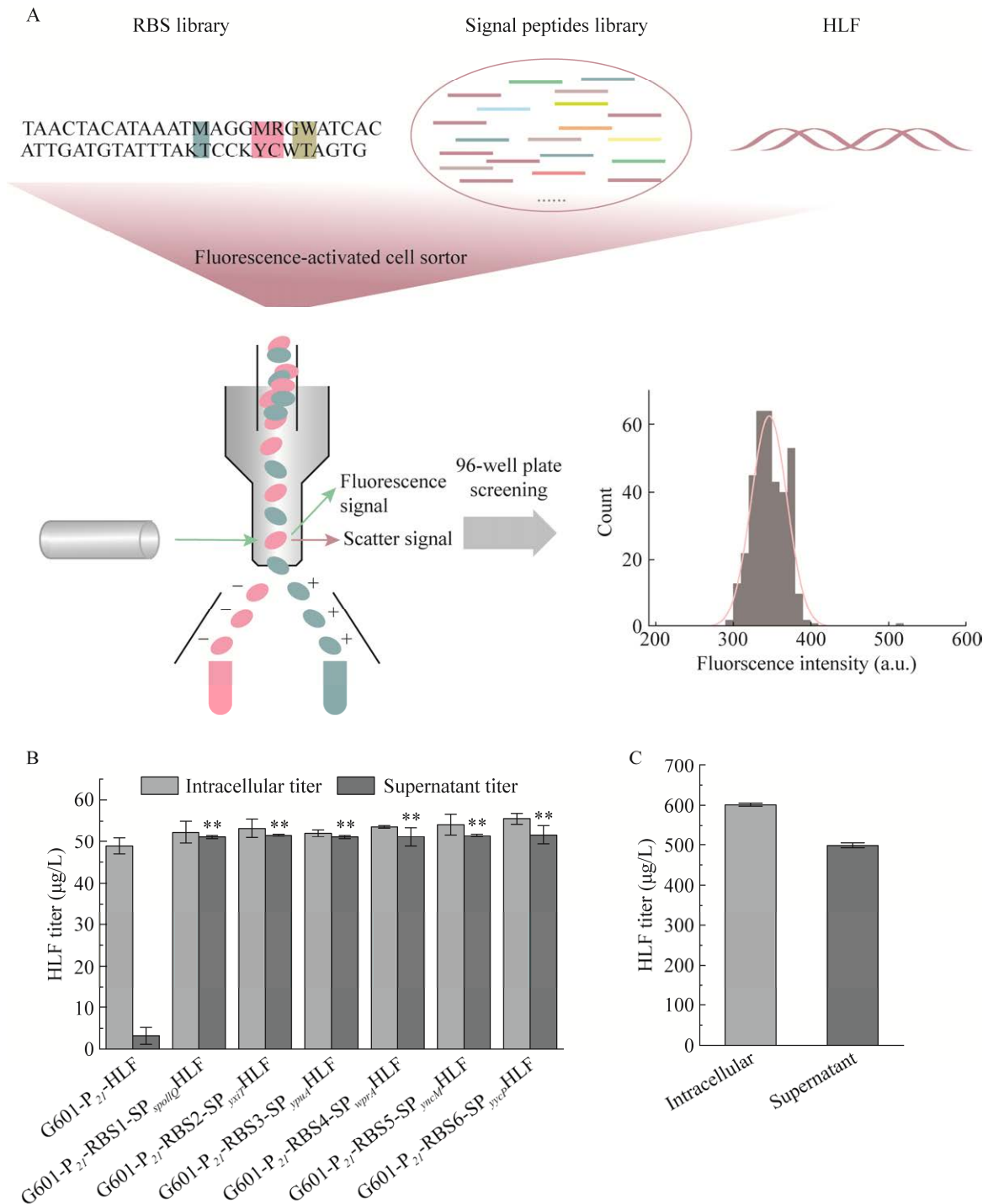


图 3 HLF RBS 和信号肽组合筛选 A: RBS-信号肽文库构建和筛选过程. B: 不同 RBS 和信号肽菌株 HLF 产量. C: 诱导型分泌菌株 G601-P_{tet*}-RBS6-SP_{yycP}-HLF 的 HLF 产量. **表示 $P < 0.01$

Figure 3 Combinational screening of RBS and signal peptides for HLF expression. A: Library construction and screening of RBS and signal peptide. B: The HLF titers of strains with different RBS and signal peptides. C: The HLF titer of strain G601-P_{tet*}-RBS6-SP_{yycP}-HLF. ** indicate $P < 0.01$.

图 3B 和表 5 所示, 与未加信号肽的菌株相比, 加了不同信号肽和 RBS 组合的 HLF 表达菌株胞内 HLF 的表达无明显差异, 但 HLF 的总表达量提高至原来的 1.98–2.06 倍, 其中菌株 G601-P₂₁-RBS6-SP_{yycP}HLF 的 HLF 产量最高, 为 107.17 μg/L, 其中分泌产量为 51.63 μg/L。上述结果表明, SCORES 方法可促进 HLF 的分泌表达。

将 RBS6-SP_{yycP} 组合连接至诱导表达载体, 获得质粒 pHT-P_{tet*}-RBS6-SP_{yycP}HLF, 转入 G601 后

表 4 筛选出的 RBS 和信号肽

Table 4 Screened signal peptides and RBS sequences by flow cytometry

Serial number	Fluorescence value (a.u.)	RBS	The name of signal peptides
1	326	CAGGAAGAATCAC	<i>spollQ</i>
2	336	AAGGAGGTATCAC	<i>yxjT</i>
3	348	AAGGAGGAATCAC	<i>ypuA</i>
4	375	AAGGAGGAATCAC	<i>wprA</i>
5	407	CAGGAGGAATCAC	<i>yncM</i>
6	515	AAGGAGGAATCAC	<i>yycP</i>

表 5 含有不同信号肽菌株的 HLF 产量

Table 5 HLF titers of strains containing different signal peptides

Sample name	Intracellular HLF titer (μg/L)	Supernatant HLF titer (μg/L)	Total HLF titer (μg/L)
G601-P ₂₁ -HLF	48.90	3.17	52.09
G601-P ₂₁ -RBS1-SP _{spollQ} HLF	52.26	51.06	103.32
G601-P ₂₁ -RBS2-SP _{yxjT} HLF	53.21	51.53	104.74
G601-P ₂₁ -RBS3-SP _{ypuA} HLF	52.03	51.05	103.08
G601-P ₂₁ -RBS4-SP _{wprA} HLF	53.65	51.11	104.76
G601-P ₂₁ -RBS5-SP _{yncM} HLF	54.09	51.49	105.58
G601-P ₂₁ -RBS6-SP _{yycP} HLF	55.54	51.63	107.17
G601-P _{tet*} -RBS6-SP _{yycP} HLF	601.19	498.68	1 099.87

获得菌株 G601-P_{tet*}-RBS6-SP_{yycP}HLF。摇瓶发酵结果显示, 该菌株 HLF 的分泌产量为 498.68 μg/L, 总产量为 1 099.87 μg/L (图 3C 和表 5)。

2.3 蛋白折叠相关基因改造促进 HLF 分泌表达

分子伴侣可以在蛋白分泌过程中辅助其折叠和装配, 避免其因未折叠完全被蛋白酶降解。因此, *B. subtilis* 中分子伴侣的表达量和活性是影响异源蛋白产量的关键因素^[17]。为了进一步促进 HLF 的分泌表达, 对胞内的伴侣蛋白表达进行调控。

csaA 是 *B. subtilis* 的一个必需基因, 其可以促进蛋白正确折叠与分泌^[17-19]。本研究首先将 *csaA* 基因的启动子替换为强启动子 P₂₁ (图 4A), 对 *csaA* 基因进行过表达, 得到菌株 G6csaA, 以带有不同信号肽的 sfGFP (P₂₁-SP_{bigC}/SP_{mpr}-sfGFP) 为表征, 将带有不同信号肽的表达质粒 pHT-P₂₁-SP_{bigC}-sfGFP 和 pHT-P₂₁-SP_{mpr}-sfGFP, 以及不带信号肽的表达质粒 pHT-P₂₁-sfGFP 分别转入 G6csaA 和 G601 中, 取不同发酵时间点的样品, 对其发酵液上清的荧光值进行检测。结果如图 4B 所示, 相比于对照菌株, 过表达 *csaA* 对不同信号肽引导的绿色荧光蛋白的促进分泌效果并不相同, 对于 SP_{mpr}, 过表达 *csaA* 使其蛋白分泌量提升了 55.9%。但对于 SP_{bigC}, 过表达 *csaA* 基因反而使其蛋白分泌产量降低了 7.0%。

之后, 对 *hrcA* 基因进行无义突变得到菌株 G6hrcA0 (图 4A), HrcA 蛋白负责调控 *groESL* 操纵子和 *dnaK* 操纵子, 而 *groESL* 操纵子和 *dnaK* 操纵子负责编码胞内分子伴侣 GroES/GroEL 和 DnaK/DnaJ, 当 *hrcA* 基因缺陷时, 2 个操纵子所编码的分子伴侣则可获得组成型表达^[17-19]。以带有不同信号肽的 sfGFP (P₂₁-SP_{bigC}/SP_{mpr}-sfGFP) 为表征, 以 G601 菌株为对照, 结果显示, 无义突变 *hrcA* 使得 sfGFP 几乎不表达 (图 4B)。

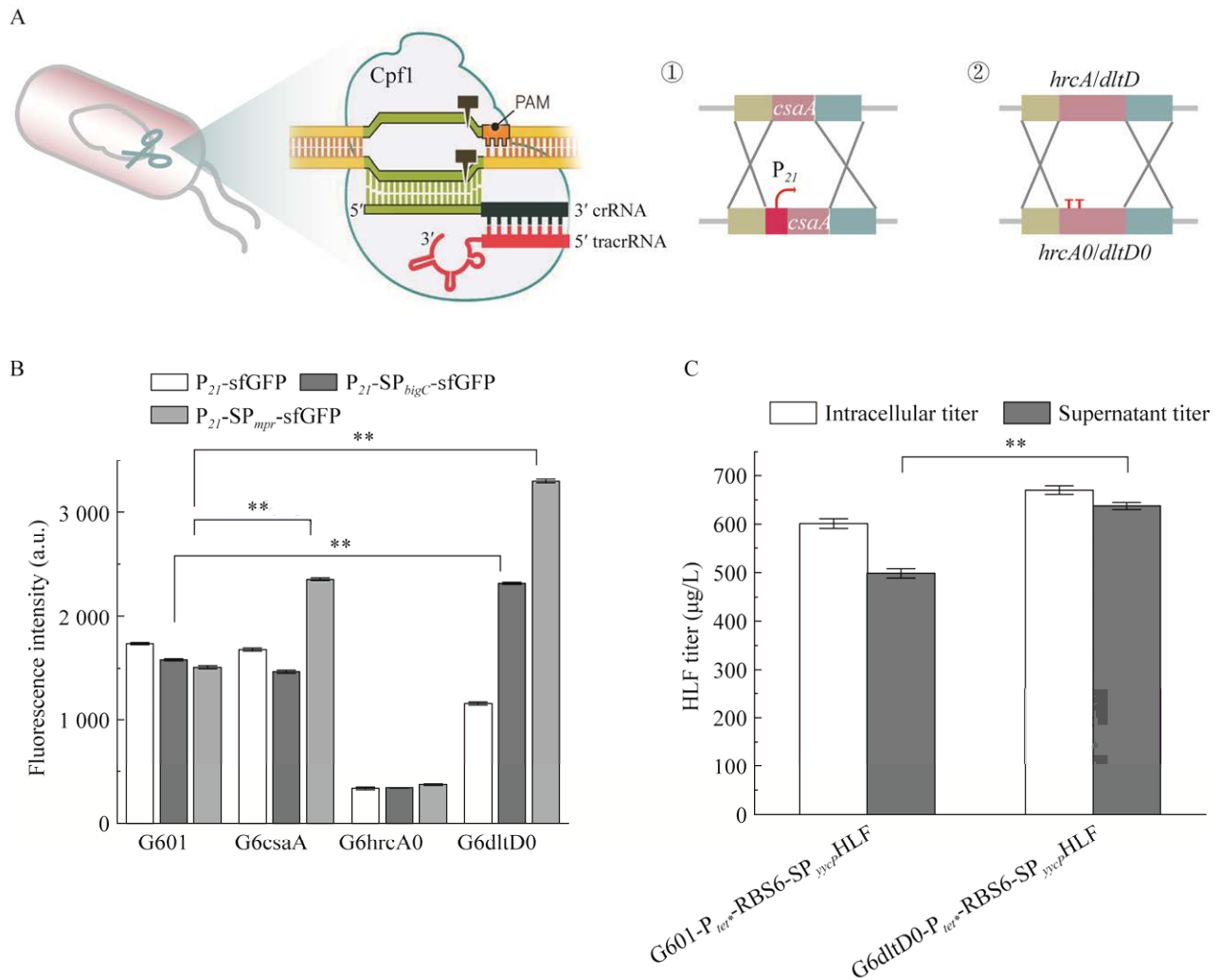


图 4 底盘菌株改造促进 HLF 表达 A: 基因编辑方法示意图. B: 底盘改造菌株对不同信号肽引导绿色荧光蛋白分泌产量的影响. C: G601-P_{tet}*-RBS6-SP_{yyeP}HLF 和 G6dltD0-P_{tet}*-RBS6-SP_{yyeP}HLF 菌株 HLF 产量对比. **表示 $P < 0.01$.

Figure 4 Promoting HLF expression through chassis strain modification. A: Schematic of gene editing methods. B: Impacts of chassis strain modification on the expression of sfGFP guided by different signal peptides. C: The production of strains G601-P_{tet}*-RBS6-SP_{yyeP}HLF and G6dltD0-P_{tet}*-RBS6-SP_{yyeP}HLF detected by ELISA kit. ** indicate $P < 0.01$.

dltD 为细胞膜表面金属离子相关基因^[17-19], 其可以影响阳离子折叠因子与细胞壁表面的结合。我们对 *dltD* 进行无义突变(图 4A), 得到菌株 G6dltD0, 以带有不同信号肽的 sfGFP (P₂₁-SP_{bigC}/SP_{mpr}.sfGFP)为表征, 以 G601 菌株为对照, 结果显示, *dltD* 无义突变菌株 G6dltD0 对

于 SP_{bigC} 和 SP_{mpr} 引导的绿色荧光蛋白都有促进分泌的效果, 蛋白分泌量分别提升了 46.5%和 118.5% (图 4B)。从结果来看, 无义突变 *dltD* 基因促进分泌的效果更优, 普适性更好。

将 2.3 中的质粒 pHT-P_{tet}*-RBS6-SP_{yyeP}HLF 转入菌株 G601、G6dltD0, 得到菌株 G601-P_{tet}*-

RBS6-SP_{yycP}HLF 和 G6dltD0-P_{ter*}-RBS6-SP_{yycP}HLF, 进行发酵验证,并在 6 h 加入 4 μmol/L aTc 对诱导型启动子进行诱导。结果如图 4C 所示,相比于 G601-P_{ter*}-RBS6-SP_{yycP}HLF 菌株, G6dltD0-P_{ter*}-RBS6-SP_{yycP}HLF 分泌产量达到 637.28 μg/L,提升了 27.80%,总蛋白表达量达到 1 307.21 μg/L,提升了 18.90%。

3 讨论与结论

B. subtilis 作为一种微生物工程平台,被广泛应用于异源蛋白的生产。目前利用 *B. subtilis* 表达 HLF 的相关报道多为分段表达,很少有全长 HLF 在 *B. subtilis* 中异源表达的相关报道。如 Jin 等^[20]在 *B. subtilis* 中分别对牛 LF 的 N 叶和 C 叶进行异源表达,其中牛 LF-N 叶在 10 L 发酵罐上产量为 2.35 mg/L。本研究选择胞外蛋白酶失活菌株 G601,选择 aTc 诱导型启动子 P_{ter*},实现了 HLF 表达与细胞生长解耦联。

B. subtilis 分泌大量的蛋白酶到胞外,因此,其自身具有多种分泌途径,包括经典途径(Sec 分泌途径、Tat 双精氨酸途径、ABC 转运蛋白分泌途径和假菌丝蛋白输出途径,其中 90%的蛋白通过 Sec 途径分泌到胞外)和非经典途径^[21-23],但是目前重组人源蛋白在 *B. subtilis* 中分泌表达产量普遍较低,如人白细胞介素 3 在 *B. subtilis* 中分泌产量仅有 100 μg/L^[24]。本研究采用 SCORE 方法对 16 种 RBS 和 173 种 Sec 型信号肽进行组合筛选,得到能分泌表达 HLF 的 RBS-信号肽组合 RBS6-SP_{yycP},成功实现了 HLF 的分泌表达,胞外 HLF 的产量达到 498.68 μg/L。但是实验过程中发现现有的 Sec 分泌途径并不能很好地适配 HLF 的分泌表达,后续可以对已有的信号肽进行理性或非理性改造。有相关研究报道,非经典分泌途径对一些难分泌的异源蛋白有较好的引导分泌效果,如 Wang 等^[21]利用非

经典分泌途径成功使碱性磷酸化酶 PhoA 和耐热乳糖酶 BgaB 分泌到胞外。因此,后续可尝试采用非经典途径进行 HLF 的分泌表达。

此外,蛋白质错误折叠也是限制异源蛋白分泌表达的一个关键问题。细胞内伴侣蛋白在蛋白质正确折叠和分泌中发挥着关键作用。*B. subtilis* 伴侣蛋白包括胞内分子伴侣(GroES/GroEL, DnaK/DnaJ)、胞外分子伴侣(PrsA)^[25]、分泌相关蛋白 CsaA 以及金属离子相关基因 *dltA-dltE* 等^[18]。*dlt* 操纵子(*dltA-dltE*)介导磷壁酸和脂磷壁酸的酯化反应,可以修饰细胞表面电荷,从而降低细胞壁和周质空间的负电荷。*dlt* 操纵子中任何一个基因的缺陷都会降低其 D-丙氨酸酰化程度,导致细胞壁负电荷程度增加。随着负电荷程度的增加,细胞壁可以结合更多的阳离子折叠因子,从而作为折叠效应因子,改善输出蛋白的易位后折叠^[19]。本研究对 *dltD* 基因进行敲除后,得到菌株 G6dltD0,其 HLF 分泌产量明显提升。然而,在对 *hrcA* 基因无义突变后,我们观察到外源蛋白的基因表达量大幅降低,与预期结果不符。据文献报道,HrcA 可响应外界的应激条件,调控分子伴侣的表达,从而修复被错误折叠的蛋白质,使细胞能够更好地适应外界条件变化^[26-27],因而我们推测完全失活 *hrcA* 基因,一方面可导致细胞应激过度,降低细胞的适应性,另一方面可能导致细胞分泌压力过大,从而影响目的蛋白的分泌。因此,抑制 *hrcA* 基因的表达有助于促进目的蛋白的有效分泌。

综上所述,本研究首先从转录水平入手,选择了 3 种组成型(P₂₁、P₄₃ 和 P_{veg})和 3 种诱导型启动子(P_{grac100}、P_{xyIA} 和 P_{ter*}),通过对比其对 HLF 表达的影响,选出效果最佳的启动子 P_{ter*},在此基础上,通过 RBS 和信号肽组合筛选的方法,对 HLF 翻译和分泌进行优化,得到能有效分

泌表达 HLF 的菌株 G601-P_{ter^s}-RBS6-SP_{ycp}HLF。进一步对胞内伴侣蛋白表达进行调控, 得到 *dltD* 基因敲除菌株 G6dltD0, 使得 HLF 分泌产量提高至 637.28 μg/L。整个蛋白表达与优化流程具有普适性, 可为构建 *B. subtilis* 细胞工厂高效表达异源蛋白提供一定的参考。

REFERENCES

- [1] 张皓, 童欣. 人乳中的生物活性蛋白及其功能特性[J]. 中外食品工业(下半月), 2014(9): 61-61, 63.
ZHANG H, TONG X. Bioactive proteins in human milk and their functional properties[J]. Sino-foreign Food Industry (the second half of the month), 2014(9): 61-61, 63 (in Chinese).
- [2] KELL DB, HEYDEN EL, PRETORIUS E. The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1221.
- [3] GONZÁLEZ-CHÁVEZ SA, ARÉVALO-GALLEGOS S, RASCÓN-CRUZ Q. Lactoferrin: structure, function and applications[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 33(4): 301.e1-301.e8.
- [4] JIANG TM, CHEN LJ, JIA SQ, CHEN LS, MA Y. High-level expression and production of human lactoferrin in *Pichia pastoris*[J]. *Dairy Science & Technology*, 2008, 88(2): 173-181.
- [5] YANG HQ, QU JF, ZOU W, SHEN W, CHEN XZ. An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(18): 6607-6626.
- [6] SIENKIEWICZ M, JAŚKIEWICZ A, TARASIUK A, FICHNA J. Lactoferrin: an overview of its main functions, immunomodulatory and antimicrobial role, and clinical significance[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(22): 6016-6033.
- [7] WU YK, LIU YF, LV XQ, LI JH, DU GC, LIU L. CAMERS-B: CRISPR/Cpf1 assisted multiple-genes editing and regulation system for *Bacillus subtilis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(6): 1817-1825.
- [8] LI Y, WU YK, LIU YF, LI JH, DU GC, LV XQ, LIU L. A genetic toolkit for efficient production of secretory protein in *Bacillus subtilis*[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 1127885.
- [9] BURNETTE WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio iodinated protein A[J]. *Analytical Biochemistry*, 1981, 112(2): 195-203.
- [10] BERLUTTI F, PANTANELLA F, NATALIZI T, FRIONI A, PAESANO R, POLIMENI A, VALENTI P. Antiviral properties of lactoferrin-a natural immunity molecule[J]. *Molecules*, 2011, 16(8): 6992-7018.
- [11] LIZZI AR, CARNICELLI V, CLARKSON MM, NAZZICONE C, SEGATORE B, CELENZA G, ASCHI M, DOLO V, STROM R, AMICOSANTE G. Bovine lactoferrin and its tryptic peptides: antibacterial activity against different species[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2016, 52(4): 435-440.
- [12] ELLISON III RT, GIEHL TJ, LAFORCE FM. Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin[J]. *Infection and Immunity*, 1988, 56(11): 2774-2781.
- [13] BAKER EN, BAKER HM, KIDD RD. Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework[J]. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire*, 2002, 80(1): 27-34.
- [14] KRÜGER A, WELSCH N, DÜRWARD A, BRUNDIEK H, WARDENGA R, PIASCHECK H, MENGERS HG, KRABBE J, BEYER S, KABISCH JF, POPPER L, HÜBEL T, ANTRANIKIAN G, SCHWEDER T. A host-vector toolbox for improved secretory protein overproduction in *Bacillus subtilis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(13): 5137-5151.
- [15] LU J, ZHAO Y, CHENG Y, HU R, FANG YW, LYU MS, WANG SJ, LU ZX. Optimal secretory expression of acetaldehyde dehydrogenase from *Issatchenkia terricola* in *Bacillus subtilis* through a combined strategy[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 747.
- [16] LI WF, ZHOU XX, LU P. Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Research in Microbiology*, 2004, 155(8): 605-610.
- [17] 王杰, 王晨, 杜燕, 徐晶玉, 班睿. 枯草芽孢杆菌表达和分泌异源蛋白的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(8): 2815-2826.
WANG J, WANG C, DU Y, XU JY, BAN R. Advances in heterologous protein expression and secretion of *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(8): 2815-2826 (in Chinese).

- [18] FU G, YUE J, LI DD, LI YX, LEE SY, ZHANG DW. An operator-based expression toolkit for *Bacillus subtilis* enables fine-tuning of gene expression and biosynthetic pathway regulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(11): e2119980119.
- [19] ZHANG K, SU LQ, WU J. Recent advances in recombinant protein production by *Bacillus subtilis*[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2020, 11: 295-318.
- [20] JIN L, LI LH, ZHOU LX, ZHANG RZ, XU Y, LI JM. Improving expression of bovine lactoferrin N-lobe by promoter optimization and codon engineering in *Bacillus subtilis* and its antibacterial activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(35): 9749-9756.
- [21] WANG GQ, CHEN HQ, ZHANG H, SONG YD, CHEN W. The secretion of an intrinsically disordered protein with different secretion signals in *Bacillus subtilis*[J]. Current Microbiology, 2013, 66(6): 566-572.
- [22] DUAN XG, LUAN SY. Efficient secreted expression of natural intracellular β -galactosidase from *Bacillus aryabhatai* via non-classical protein secretion pathway in *Bacillus subtilis*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 248: 125758.
- [23] FRAN KM, ROBINSON C, van DIJL JM. Transport of folded proteins by the Tat system[J]. The Protein Journal, 2019, 38(4): 377-388.
- [24] WESTERS L, DIJKSTRA DS, WESTERS H, van DIJL JM, QUAX WJ. Secretion of functional human interleukin-3 from *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 123(2): 211-224.
- [25] GEISSLER AS, POULSEN LD, DONCHEVA NT, ANTHON C, SEEMANN SE, GONZÁLEZ-TORTUERO E, BREÜNER A, JENSEN LJ, HJORT C, VINTHER J, GORODKIN J. The impact of PrsA over-expression on the *Bacillus subtilis* transcriptome during fed-batch fermentation of alpha-amylase production[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 909493.
- [26] ÖKTEM A, NÚÑEZ-NEPOMUCENO D, FERRERO-BORDERA B, WALGRAEVE J, SEEFRIED M, GESELL SALAZAR M, STEIL L, MICHALIK S, MAAB S, BECHER D, MÄDER U, VÖLKER U, van DIJL JM. Enhancing bacterial fitness and recombinant enzyme yield by engineering the quality control protease HtrA of *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(6): e0177823.
- [27] DRILLER K, CORNEJO FA, TURGAY K. (p)ppGpp-an important player during heat shock response[J]. microLife, 2023, 4: uqad017.

(本文责编 陈宏宇)