

高热稳定性己糖激酶在大肠杆菌中的表征和表达优化

李倩妮^{1,2}, 舒泉先³, 杨小雁³, 赵运英^{1,2*}, 周胜虎^{1,2}, 邓禹^{1,2*}

1 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122

3 山东渤海实业集团有限公司 山东省油脂油料精深加工技术重点实验室, 山东 滨州 256599

李倩妮, 舒泉先, 杨小雁, 赵运英, 周胜虎, 邓禹. 高热稳定性己糖激酶在大肠杆菌中的表征和表达优化[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3171-3188.

LI Qianni, SHU Quanxian, YANG Xiaoyan, ZHAO Yunying, ZHOU Shenghu, DENG Yu. Characterization and expression optimization of a highly thermostable hexokinase in *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3171-3188.

摘要: 己糖激酶是血糖检测中的重要诊断试剂, 因此对其酶活和热稳定性要求较高。目前国内己糖激酶主要依赖进口, 大多是酵母来源酶, 其价格昂贵且存在热稳定性较差等问题, 限制了国内血糖诊断试剂的开发。因此, 当前亟待实现高活性、高热稳定性己糖激酶的高效表达。本研究在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中异源表达了一种来源于嗜热菌的 ATP 依赖型己糖激酶(hexokinase, Glk), 发现其对葡萄糖特异性高、依赖 Mg^{2+} , 最适 pH 和温度分别为 8.5 和 80 °C, 在 30–37 °C 下保存 7 d 后酶活保留 90% 以上, 属于热稳定的偏碱性葡萄糖激酶。随后系统优化了 Glk 表达的培养基、诱导时机、诱导剂终浓度、诱导温度、诱导时长等因素, 优化后 Glk 表达量相比于优化前提高了 4.71 倍。Glk 纯化后, 比酶活达到 (43.05 ± 2.00) U/mg, 纯度达到 95% 以上。本研究开发的高热稳定己糖激酶的表达和纯化方法, 为突破血糖诊断试剂制备中的短板提供了更多可能性和发展空间。

关键词: 己糖激酶; 葡萄糖; 血糖检测; 表达优化; 热稳定性

资助项目: 江苏省杰出青年基金(BK20220089); 天津市合成生物技术创新能力提升行动 (TSBICIP-KJGG-015)

This work was supported by the Distinguished Young Scholars of Jiangsu Province (BK20220089) and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-015).

*Corresponding authors. E-mail: DENG Yu, dengyu@jiangnan.edu.cn; ZHAO Yunying, yunyingzhao@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-01-10; Accepted: 2024-03-25; Published online: 2024-03-28

Characterization and expression optimization of a highly thermostable hexokinase in *Escherichia coli*

LI Qianni^{1,2}, SHU Quanxian³, YANG Xiaoyan³, ZHAO Yunying^{1,2*}, ZHOU Shenghu^{1,2}, DENG Yu^{1,2*}

1 National Engineering Research Center of Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Bioactive Product Processing Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Shandong Provincial Key Laboratory of Fat & Oil Deep-processing, Shandong Bohi Industry Co., Ltd., Binzhou 256599, Shandong, China

Abstract: Hexokinase is a crucial diagnostic reagent in blood glucose testing, which has high requirements for the enzyme activity and thermal stability. The hexokinases in China mainly rely on imports and are primarily sourced from yeast, with high costs and poor thermal stability, which limit the development of blood glucose diagnostic reagents. Therefore, there is an urgent need for the efficient expression of highly active and thermally stable hexokinases. In this study, an ATP-dependent hexokinase (glucokinase, Glk) from a thermophilic bacterium Glk was heterologously expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). Glk exhibited high specificity for glucose, dependence on Mg^{2+} , and the highest activity at pH 8.5 and 80 °C. It retained over 90% activity after storage at 30–37 °C for 7 days, demonstrating thermal stability as an alkaline glucose kinase. Subsequently, the factors influencing Glk expression, including culture medium, OD_{600} , final concentration of the inducer, induction temperature, and induction duration, were systematically optimized. The optimization increased the Glk expression by 4.71 folds Glk compared with non-optimized conditions. After purification, Glk exhibited a specific activity of (43.05 ± 2.00) U/mg and the purity $\geq 98\%$. In conclusion, the developed expression and purification method for the highly thermostable hexokinase provides more possibilities for overcoming the shortcomings in the preparation of blood glucose diagnostic reagents in China.

Keywords: hexokinase; glucose; blood glucose testing; expression optimization; thermal stability

己糖激酶可催化葡萄糖磷酸化形成葡萄糖-6-磷酸, 与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶偶联可将 NAD^+ 还原为 $NADH^{[1-2]}$ 。通过检测 $NADH$ 在340 nm处的吸光值变化可对葡萄糖含量进行定量检测。因此, 在生化检测行业中己糖激酶常被用于血糖、尿糖等生化检测项目中的葡萄糖定量检测。目前, 国际上公认的血糖检测标准方法是己糖激酶(葡萄糖激酶)法^[3]。相比于葡萄糖氧化酶法, 己糖激酶法检测血糖其特异性更好^[4]、抗

干扰能力更强, 是临床诊断上更推荐的血糖检测方法^[5]。因此, 己糖激酶成为血糖检测中重要的试剂, 不仅能直接用于临床生化检测, 而且能作为原料用于葡萄糖或血糖试剂盒、血糖监测芯片、便携式血糖检测仪等产品的开发与设计^[6-10]。

随着生活水平的提高, 人们的饮食习惯也发生相应变化, 越来越多人趋向于高热量高糖饮食, 导致糖尿病患者数量日益增加^[5]。据世

卫生组织预测,全球糖尿病患者人数将在 2040 年达到 6.42 亿,而中国将成为全球糖尿病患者人数最多的国家,人数预计将达 1.51 亿^[11]。由于血糖检测是糖尿病患者治疗环节中不可或缺的一步,糖尿病患者剧增意味着对血糖检测的需求增加,己糖激酶的需求量也随之增加。但由于己糖激酶是酶制剂行业的小酶种,国内鲜有报道己糖激酶生产制备相关的研究成果,相关企业对其关注度不高,缺乏自主知识产权^[12],导致国内己糖激酶市场目前仍然以进口酶为主。进口酶主要是酵母源己糖激酶,价格昂贵,存在热稳定性较差的问题。由于目前关于其他来源己糖激酶的研究较少,缺乏相关工业化生产制备的理论支撑,市场上仍然以酵母源己糖激酶为主。因此,对其他来源己糖激酶的挖掘、表征和表达是目前获得更廉价且热稳定更好的己糖激酶的有效手段。

嗜热菌长期生存于高温环境,其相关蛋白及酶类热稳定性高,是热稳定己糖激酶挖掘筛选的优势来源^[13]。根据目前对嗜热菌来源己糖激酶的研究可以看出,挖掘并鉴定成功的热稳定性己糖激酶,在其最适反应温度下均具有极高酶活性,但不同嗜热菌菌株之间的己糖激酶的己糖底物谱大不相同,如已经鉴定成功的来源于敏捷气火菌(*Aeropyrum pernix*)^[14]、顽固热变形菌(*Thermoproteus tenax*)^[15]、东京理工学院硫化叶菌(*Sulfolobus tokodaii*)^[16-17]和热泉热棒菌(*Pyrobaculum calidifontis*)^[18]的己糖激酶均具有广泛的底物谱,能同时对葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖等进行反应。而源于强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*)的己糖激酶则对 D-葡萄糖有较高底物特异性^[19]。己糖激酶在血糖检测中应用要求对葡萄糖的特异性高,因此在筛选热稳定己糖激酶时首选对葡萄糖底物特异性强的己糖激酶,其次考虑其酶活性及热稳定性。

本研究筛选出了一种来源于嗜热细菌的己糖激酶(glucokinase, Glk),葡萄糖特异性强且热稳定性高,是一种 ATP 依赖型己糖激酶。随后在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中进行了酶学性质表征、表达水平优化和纯化条件优化研究。在最佳表达条件下,Glk 的表达量达到 298.91 mg/L,纯化后纯度达到 95%。本研究为目前热稳定己糖激酶生产制备提供了潜在的技术支撑,同时也为进一步理性改造强化 Glk 的酶学性质奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒

重组质粒 pET-28a(+)-Glk 的 Glk 基因序列由安升达(金唯智)公司合成并克隆至 pET-28a(+)载体。*E. coli* BL21(DE3)用于表达重组质粒 pET-28a(+)-Glk。

1.1.2 主要试剂

葡萄糖、无水氯化钙,购自国药集团化学试剂有限公司;异丙基硫代半乳糖苷(isopropylthiogalactoside, IPTG)、卡那霉素(kanamycin, Kan),购自生工生物工程(上海)股份有限公司;无水氯化镁、三磷酸腺苷(adenosine 5'-triphosphate, ATP),购自北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH),购自上海源叶生物科技有限公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺),购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.1.3 主要培养基

LB 培养基、TB 培养基和 SOB 培养基均参考“Molecular Cloning: a Laboratory Manual”^[20]进行配制,LBG 培养基、TBG 培养基、SOBG 培养基则是分别在 LB 培养基、TB 培养基和 SOB

培养基的基础上加入 5.0 g/L 葡萄糖进行配制, 115 °C 灭菌 30 min。培养基在使用时均添加终浓度 50.0 mg/L Kan。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养与 Glk 表达

将构建成功的 pET28a(+)-Glk 重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中, 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 于 37 °C、250 r/min 培养过夜得到种子液。将种子液按 4.0% (体积分数) 的比例转接于含 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 摇瓶中, 于 37 °C、250 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6 后添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 随后转至 30 °C、250 r/min 培养 10 h 表达 Glk。根据需求添加终浓度为 50 µg/mL 的 Kan 至培养基中。

1.2.2 Glk 的粗酶液制备及纯化

Glk 表达完成后, 5 000 r/min、5 min 离心收集菌体, 随后用 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.8) 洗涤菌体 2 次并重悬。重悬菌液于高压匀浆机中进行破碎, 破碎条件为 6 °C、600 Pa、15 min。破碎后经过 10 000 r/min、15 min 离心分离上清和沉淀。将沉淀用 Tris-HCl (pH 7.8) 重悬, 并进行 10 倍浓缩。破碎上清液和沉淀重悬液可用于后续 SDS-PAGE 实验。根据 SDS-PAGE 结果可适当浓缩或稀释沉淀重悬液。破碎上清液于 65 °C 热沉降 12 h 后于 10 000 r/min 离心分离 15 min 获得上清即为粗酶液。利用亲和层析柱 (Ni-NTA

6FF, 生工生物工程(上海)股份有限公司) 和含有 30 mmol/L 咪唑的 Tris-HCl (pH 7.8) 洗脱杂蛋白, 使用含 50 mmol/L 咪唑的 Tris-HCl (pH 7.8) 洗脱 Glk, 获得 Glk 粗纯液。将 Glk 粗纯液利用阴离子层析柱 (HiTrap Canto Q ImpRes, 思拓凡生物科技(杭州)有限公司) 于 Tris-HCl (pH 7.8, 200 mmol/L NaCl) 条件下洗脱杂蛋白, Tris-HCl (pH 7.8, 500 mmol/L NaCl) 条件下洗脱 Glk, 获得 Glk 精纯液。Glk 蛋白精纯液利用超滤管 (10 kDa, 2 000×g) 置换缓冲液进行脱盐, 从而获得 Glk 纯酶。

1.2.3 Glk 酶活性分析及其基本性质

己糖激酶能偶联 G-6-PDH, 将 NAD^+ 还原为 NADH。因此, 通过检测 NADH 在 340 nm 处的吸光变化, 可间接检测己糖激酶的酶活。酶活定义为每分钟生成 1 µmol NADH 所需要的酶量。Glk 纯酶比酶活测定方法如下: (1) 根据表 1 准备样品和体系。(2) 配制体系 1 (试剂 A-E), 30 °C, 预热 5 min; 体系 2 (试剂 A-D), 80 °C, 预热 5 min。(3) 体系 1 加入 0.1 mL Glk, 混匀, 酶标仪 (提前预热至 30 °C) 检测 340 nm 下 NADH 吸光变化, 每 1 min 测定 1 次, 测 10 min。(4) 体系 2 加入 0.1 mL Glk, 混匀, 金属浴 80 °C 反应 5 min, 冰上停止反应后添加 0.01 mL 试剂 E, 混匀, 酶标仪 (提前预热至 25 °C) 检测 340 nm 下 NADH 吸光变化, 每 1 min 测定 1 次, 测 10 min。

表 1 测定 Glk 比酶活的试剂

Table 1 Reagents for determining Glk ratio enzyme activity

Reagents	Amount (mL)
A 50.00 mmol/L Tris/HCl pH 7.80 (13.30 mmol/L $MgCl_2$)	2.30
B 0.67 mol/L D-glucose (prepared with Reagent A)	0.50
C 16.50 mmol/L ATP (prepared with Reagent A)	0.10
D 6.80 mmol/L NAD^+ (prepared with Reagent A)	0.10
E 300.00 U/mL G-6-PDH (prepared with Reagent A)	0.01
F 50.00 mmol/L Tris/HCl (13.30 mmol/L $MgCl_2$), add 0.10% BSA (bovine serum albumin, ≥98%) pH 8.50	
Enzymes Glk was diluted to 10.00 µg/mL with Reagent F for 30.00 °C and 2.00–3.00 µg/mL for 80.00 °C	0.10

操作后得到的数据利用公式(1)和(2)进行计算分析。

$$U / \text{mL} = \frac{(OD_{\text{test}} - OD_{\text{blank}}) / \text{min} \times V_t \times Df}{\varepsilon \times d \times V_E} \quad (1)$$

$$U / \text{mg} = U / \text{mL} \times \frac{1}{C} \quad (2)$$

式中: V_t : 反应体系总体积; Df : 稀释倍数; ε : NADH 吸光摩尔系数, 6.22 mmol/(L·cm); d : 光路长度; V_E : 样品酶添加体积; C : 样品酶对应的蛋白浓度(mg/mL), 利用改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒测定。

通过检测不同条件下(表 2)的 Glk 的酶活性, 可确定其磷酸供体、己糖底物以及最适反应温度、pH。

1.2.4 Glk 诱导表达条件优化

以 1.2.1 的菌株培养和 Glk 表达条件为基

础, 根据表 3 的方案对 Glk 诱导表达条件进行优化。以诱导结束后 *E. coli* BL21(DE3)的最终 OD_{600} 、Glk 可溶性表达量、Glk 比酶活作为评价标准, 获得 Glk 的最适诱导表达条件。

1.2.5 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况

将表达结束后的重组 *E. coli* BL21(DE3)细胞的 OD_{600} 调节到 3.0, 根据 1.2.2 的方法制备破碎上清液和沉淀重悬液。取破碎上清液和沉淀重悬液各 40 μL 至两个不同的 EP 管, 分别添加上样缓冲液 6 μL , 混匀后煮沸 10 min。利用 12% SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达情况, 结束后使用考马斯亮蓝 G-250 染液染色。脱色后, 以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 纯度 $\geq 98\%$)作为标准蛋白, 利用 Image J 计算蛋白条带灰度值并计算 Glk 表达量(公式 3)。文中所

表 2 不同条件下 Glk 比酶活测定方案

Table 2 Determination of Glk specific enzyme activity under different conditions

No.	Phosphoric acid donor	Hexose substrate	Divalent metal ions	pH	Temperature (°C)
1	ATP, ADP	D-glucose	Mg^{2+}	7.80	30.00
2	ATP	D-glucose, D-fructose, D-galactose, D-mannose	Mg^{2+}	7.80	30.00
3	ATP	D-glucose	Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+}	7.80	30.00
4	ATP	D-glucose	Mg^{2+}	6.50–10.00	30.00
5	ATP	D-glucose	Mg^{2+}	8.50	25.00–100.00

表 3 Glk 表达优化单因素实验

Table 3 Single factor experiment of Glk expression optimization

No.	Culture medium	Induce OD_{600}	IPTG final concentration (mmol/L)	Induce temperature (°C)	Duration of induction (h)	Glycerol (mL/L)	Mg^{2+} (mmol/L)	Tryptone (g/L)
1	LB	0.60–1.60	0.50	30.00	10.00	0.00	0.00	10.00
2	LB	1.20–1.40	0.01–1.00	30.00	10.00	0.00	0.00	10.00
3	LB	1.20–1.40	0.01	25.00–37.00	10.00	0.00	0.00	10.00
4	LB	1.20–1.40	0.01	30.00	4.00–36.00	0.00	0.00	10.00
5	LB, TB, SOB, LBG, TBG, SOBG	1.20–1.40	0.50	30.00	10.00	0.00	0.00	10.00
6	LB	1.20–1.40	0.01	30.00	14.00	0.00–10.00	0.00	10.00
7	LB	1.20–1.40	0.01	30.00	14.00	2.00	0.00–20.00	10.00
8	LB	1.20–1.40	0.01	30.00	14.00	2.00	1.00	10.00–20.00

述 Glk 可溶性表达量为重组 *E. coli* BL21(DE3) 细胞 OD_{600} 为 3.0 时所对应的破碎上清液中 Glk 的浓度。

$$C_{\text{Glk}} = C_{\text{BSA}} \times \frac{V_{\text{BSA}}}{V_{\text{Glk}}} \times \frac{\text{IntDen}_{\text{Glk}}}{\text{IntDen}_{\text{BSA}}} \quad (3)$$

式中： C_{BSA} ：取 BSA (纯度 $\geq 98\%$) 标样溶解于 Tris/HCl (pH 7.8) 中所测定的蛋白浓度，mg/L； C_{Glk} ：Glk 的浓度，mg/L； V_{BSA} ：SDS-PAGE 时 BSA 的加样体积， μL ； V_{Glk} ：SDS-PAGE 时 Glk 的加样体积， μL ； $\text{IntDen}_{\text{Glk}}$ ：Glk 条带对应的积分灰度值； $\text{IntDen}_{\text{BSA}}$ ：BSA 条带对应的积分灰度值。

1.2.6 数据分析

利用 Graphpad Prism 9.0 对数据进行方差分析， $P < 0.05$ 表示存在统计学意义，ns 表示不存在显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 Glk 的表达与纯化

对诱导结束后的菌体进行破碎，收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析(图 1A)，结果显示

Glk 的蛋白分子量约为 31 kDa，主要存在于上清液中，证明该酶主要以可溶性形式表达。Glk 破碎上清液在 65 °C 条件下热沉降、亲和层析柱、阴离子层析柱进行纯化后得到 Glk 纯酶。SDS-PAGE 分析发现，相比于纯化前的 Glk，Ni 柱洗脱的 Glk 和 Ni-Q 柱洗脱的 Glk 中杂蛋白含量明显减少(图 1B)。根据公式(3)计算 Glk 浓度并计算 Glk 回收率及纯化倍数，由表 4 可知，Glk 破碎上清液经热沉降、Ni 柱纯化、Ni-Q 柱纯化后，Glk 的回收率均 $\geq 97\%$ ，纯化倍数均为正数，说明上述纯化步骤能有效纯化 Glk。且根据表 4 结果可知，Glk 破碎上清液经 Ni-Q 柱纯化后，相比于纯化前，纯化倍数为 3.68。Glk 实际纯度由 20.46% 提高至 95.82%，比酶活由 0.06 U/mg 提高至 43.05 U/mg。对 500 mmol/L NaCl 洗脱液进行脱盐，以排除洗脱液中高浓度盐对 Glk 活性的影响。比较脱盐前后比酶活，发现 500 mmol/L NaCl 对 Glk 酶活无显著性影响(图 1C)，但仅能说明 500 mmol/L NaCl 对纯化后即用的 Glk 影响小，无法确定 500 mmol/L NaCl 对长期保存 Glk 时的影响。因此，在后期酶的表

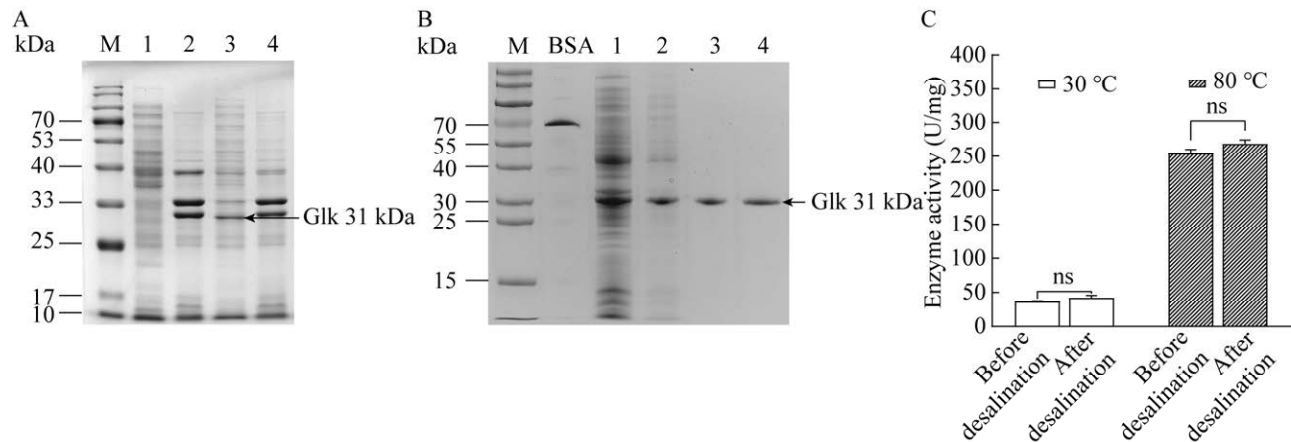


图 1 Glk 的克隆表达及纯化

Figure 1 Expression and purification of Glk. A: Expression of Glk. M: Protein marker; 1: Non-induced supernatant; 2: Non-induced group precipitate; 3: Induced group supernatant; 4: Induced group precipitation. B: SDS-PAGE for the Glk purification process. M: Protein marker; BSA: Bovine serum albumin ($\geq 98\%$); 1: Unpurified; 2: After thermal sedimentation; 3: Ni column chromatography purification; 4: Ni-Q column chromatography purification. C: Difference of specific enzyme activity of Glk before and after desalination. ns: No significant difference.

表 4 Glk 纯化效率

Table 4 Glk purification efficiency

Purification steps	Before purification	Thermal sedimentation	Ni column chromatography purification	Ni-Q column chromatography purification
Total protein concentration (mg/L)	494.74	293.06	105.49	99.99
Glk concentration (mg/L)	101.22	98.26	96.18	95.82
Actual purity (%)	20.46	33.53	91.60	95.82
Purification factor	—	0.64	3.48	3.68
Glk recovery rate (%)	—	97.08	97.88	99.63
Glk specific enzyme activity (U/mg)	0.06	0.11	38.20	43.05

—: No data.

达纯化过程中, 纯化后即用的 Glk 可选择不脱盐, 而长期保存需脱盐处理。

2.2 Glk 的酶学性质研究

不同的己糖激酶往往具有不同的底物偏好性、磷酸供体偏好性和金属离子偏好性。根据表 2 的条件设置, 利用纯酶测定 Glk 的酶学性质, 发现 Glk 仅对 D-葡萄糖有催化活性, 对其他 D-半乳糖、D-鼠李糖和 D-果糖 3 种己糖均没有活性, 说明 Glk 是一种葡萄糖特异的己糖激酶。此外, 当以 ADP 为磷酸供体时酶活较低, 仅为以 ATP 为磷酸供体时的 10% (图 2A)。己糖激酶磷酸化底物葡萄糖需要二价金属离子作为辅助因子来激活反应^[21]。因此, 测定了不使用金属离子作为磷酸化反应激活剂时 Glk 的酶活, 发现其是 Mg^{2+} 偏好型己糖激酶, Mg^{2+} 存在时酶活是 Mn^{2+} 的 10 倍, 而仅有 Co^{2+} 和 Ca^{2+} 存在时无酶活 (图 2A)。

温度、pH 是影响酶活的重要因素^[22], 因此对 Glk 酶活反应的最佳温度、pH 环境进行了探究。在 30 °C 时对不同 pH 环境下对 Glk 酶活进行检测, 图 2C 结果显示该酶在 pH 为 8.5–9.0 时比酶活比 pH 范围为 6.0–8.0 时高 2 倍, 且 pH 8.5 和 pH 9.0 时 Glk 的比酶活之间无显著性差异,

因此 Glk 是一种偏碱性的蛋白酶, 最佳反应 pH 为 8.5。pH 为 8.5 时对不同温度环境下 Glk 进行活性检测, 图 2D 的结果显示该酶在 30–55 °C 时 Glk 比酶活小于 100 U/mg, 在 60–90 °C 时 Glk 比酶活大于 200 U/mg, 80 °C 时比酶活达 280 U/mg, 为 30 °C 时比酶活的 8.5 倍, 该结果说明 Glk 最佳反应温度为 80 °C。

Glk 在高温下能保持活性, 但无法说明其在高温下保持稳定的时长, 因此对该酶在不同温度下的稳定性进行了试验。图 2B 结果显示该酶在 30 °C 和 37 °C 条件下保存 7 d 仍能够保留 ≥90% 的酶活, 80 °C 条件下保存 30 min 仍保留 84% 酶活, 120 min 后残存酶活仅剩 17%, 该结果说明 Glk 对热稳定。综上所述, Glk 是一种 ATP 依赖、 Mg^{2+} 偏好型的偏碱性己糖激酶, 其最适反应温度是 80 °C, 在 30 °C 和 37 °C 条件下保存 7 d 仍保留 ≥90% 酶活。后续可以尝试对酶的保存方法和保存试剂进行优化, 有望进一步突破该酶在常温条件中保存的时间极限。

2.3 Glk 表达条件优化

2.3.1 诱导时机对 Glk 可溶性表达的影响

选择合适的诱导时机即添加诱导剂时菌体对应的 OD_{600} 对 Glk 进行诱导表达, 可在实现高

生物量积累的同时保证 Glk 的表达量^[23]。因此,以 LB 作为培养基对不同诱导时机进行单因素实验(表3)。从图 3C 可以看出,不同诱导时机条件下重组 *E. coli* BL21(DE3) 最终 OD_{600} 之间无显著性区别。但在诱导时机为 OD_{600} 1.2–1.4 时,Glk 可溶性表达量大于其他诱导时机时的 Glk 可溶性表达量,表达量最高为 83.22 mg/L。该结果说明优化 Glk 可溶性表达的诱导时机并不能明显提高重组 *E. coli* BL21(DE3) 生物量,但能提高 Glk 的可溶性表达量。对诱导时机在 OD_{600} 1.2–1.4 时

的 Glk 可溶性表达量进行显著性差异分析,结果显示,Glk 可溶性表达量在诱导时机为 OD_{600} 1.2–1.4 之间时无显著性差异(图 3C)。对不同诱导时机条件下表达的 Glk 纯酶进行比酶活检测,由图 3D 可知,不同诱导时机条件下表达的 Glk 纯酶之间的比酶活无明显区别。因此可得出结论,优化 Glk 可溶性表达的诱导时机并不能明显提高重组 *E. coli* BL21(DE3) 生物量,但能提高 Glk 的可溶性表达量且不会影响其酶活性,Glk 可溶性表达最佳诱导时机为 OD_{600} 1.2–1.4。

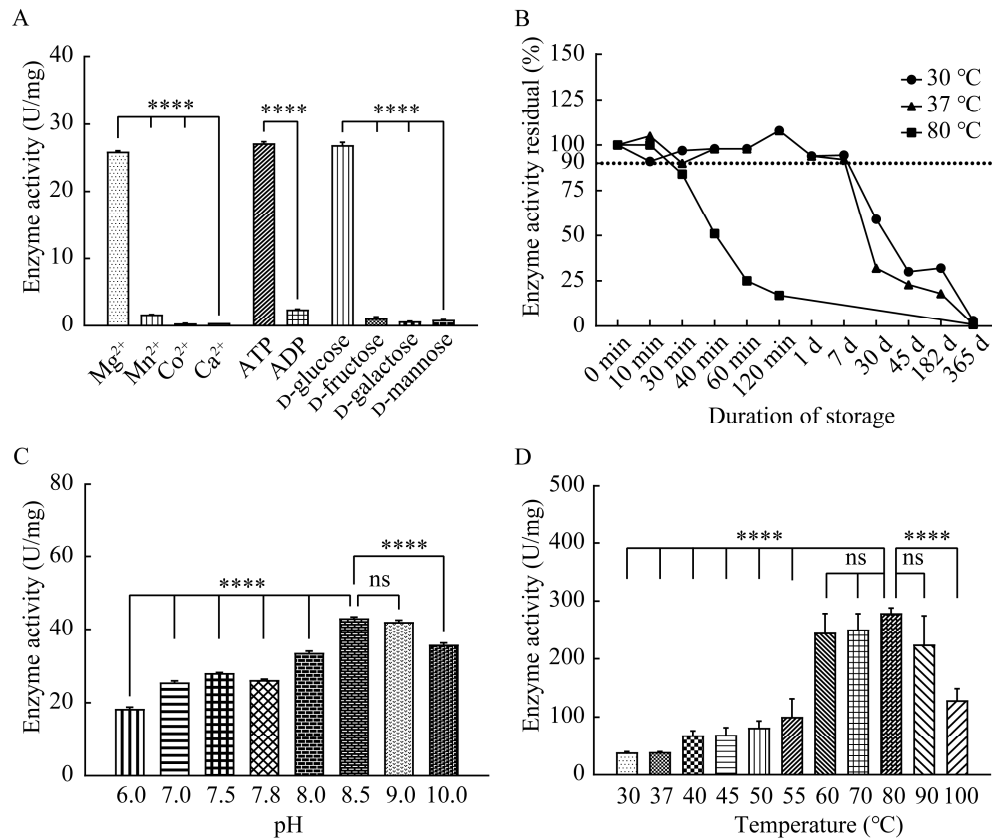


图 2 Glk 酶学基本性质

Figure 2 Basic properties of Glk. A: The difference of Glk specific enzyme activity under different metal ions, phosphate donor and hexose substrate. B: Thermal stability of Glk at different temperatures. C: The difference of Glk specific enzyme activity under different pH at 30 °C. D: The difference of Glk specific enzyme activity under different temperatures at pH 8.5. **** represents $P < 0.0001$; ns: No significant difference.

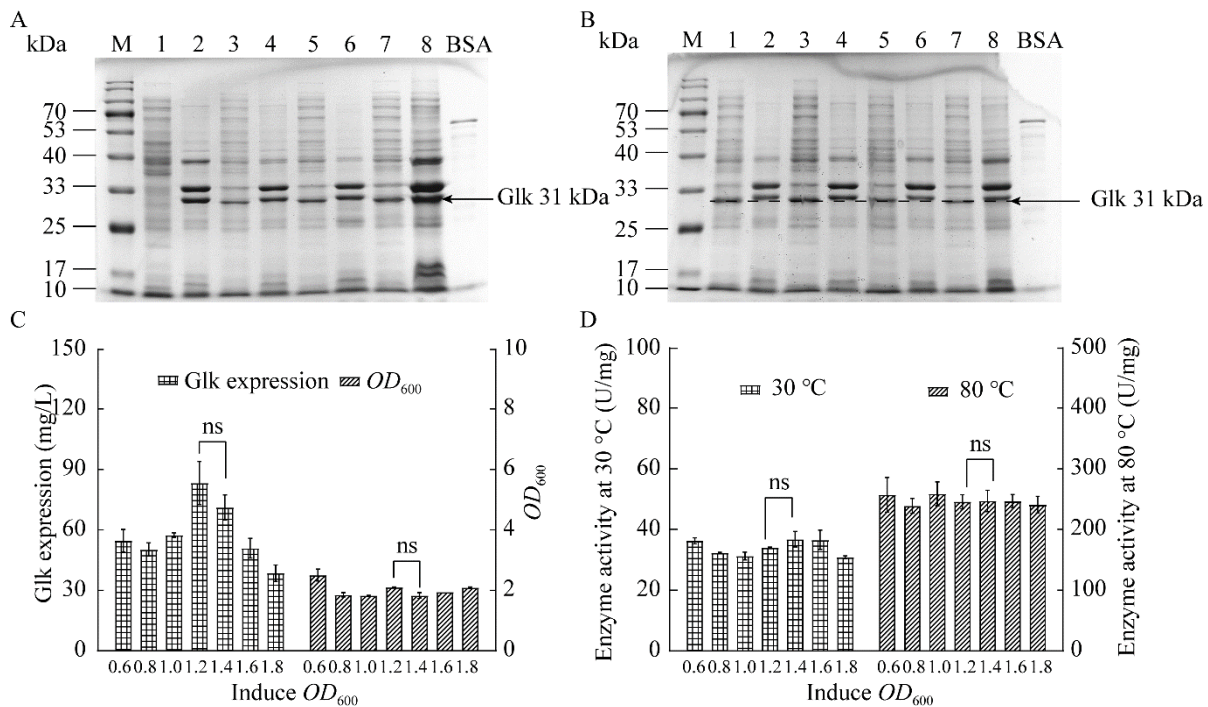


图3 诱导起始 OD_{600} 对 Glk 可溶性表达的影响

Figure 3 Effect of induce OD_{600} on the soluble expression of Glk. A: The difference of Glk expression by LB media under different induce OD_{600} . M: Protein marker; BSA: Bovine serum albumin ($\geq 98\%$); 1: Non-induced supernatant; 2: Non-induced group precipitate; 3, 5, 7: Supernatant of induce OD_{600} 0.6, 0.8, 1.0; 4, 6, 8: Precipitation of induce OD_{600} 0.6, 0.8, 1.0. B: The difference of Glk expression by LB media under different induce OD_{600} . 1, 3, 5, 7: Supernatant of induce OD_{600} 1.2, 1.4, 1.6, 1.8; 2, 4, 6, 8: Precipitation of induce OD_{600} 1.2, 1.4, 1.6, 1.8. C: Differences in soluble expression of Glk and OD_{600} in *E. coli* BL21(DE3) under different induced initiation OD_{600} at the end of induction. D: Specific enzymatic activity of Glk expressed in different induced initiation OD_{600} at 30 °C and 80 °C. ns: No significant difference.

2.3.2 诱导剂终浓度对 Glk 可溶性表达的影响

IPTG 不能被细胞代谢，一旦进入细胞便能产生持续长久的诱导效果，因此具有极强的诱导性。但也正因如此，IPTG 对细胞具有一定的毒性^[24-25]，高浓度 IPTG 甚至可杀死细胞；且 IPTG 浓度太高会导致蛋白合成速度过快形成大量包涵体，可溶性蛋白的量反而减少。因此，选择合适的 IPTG 诱导浓度对于 Glk 的可溶性表达至关重要。对 IPTG 终浓度进行优化，发现 IPTG 终浓度越高，菌体生物量积累越少(图 4B)。一方面原因可能是蛋白质表达占用物质资源对细胞产生抑制作用，从而影响细胞生长^[26]；另一方面原因可能是 IPTG 本

身对菌体具有一定的毒害作用。因此，在保证目的蛋白表达量的前提下，低浓度的 IPTG 更利于生物量的积累。由图 4B 可知，0.01 mmol/L IPTG 诱导 Glk 表达时其可溶性表达量达到 111.10 mg/L，0.2 mmol/L IPTG 诱导 Glk 表达时其可溶性表达量达到 103.75 mg/L。0.01 mmol/L 与 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达的 Glk 可溶性表达量之间无显著性差异，但 0.01 mmol/L IPTG 诱导时的最终 OD_{600} (2.35)高于 0.2 mmol/L IPTG 诱导时最终 OD_{600} (2.19)。检测不同 IPTG 终浓度诱导表达的 Glk 纯酶的比酶活，由图 4C 可知，不同 IPTG 终浓度诱导表达的 Glk 纯酶比酶活之间无显著性差异。因此，Glk 最适诱导剂终浓度

为 0.01 mmol/L。

2.3.3 诱导温度对 Glk 可溶性表达的影响

合适的诱导温度有利于 *E. coli* BL21(DE3) 生长并有助于 Glk 的正确折叠。因此, 设置不同温度条件对 Glk 进行表达并分析。SDS-PAGE 结果显示, 在 20 °C 和 30 °C 进行 Glk 表达时基本无包涵体形成, 37 °C 进行 Glk 表达时则有少量的包涵体存在, 可能是由于表达温度高, 蛋白合成速度快, 没有充分的时间给予次级键的形成与折叠或直接导致折叠错误而使得 Glk 在表达时产生部分包涵体^[25,27]。由图 5B 可以看

出, Glk 的可溶性表达量在 20、30、37 °C 的条件下分别为 121.36、140.94、129.32 mg/L。不同温度条件下诱导结束后重组 *E. coli* BL21(DE3) 的生物量之间无显著性差异, 但 30 °C 时 Glk 表达量高于 20 °C 和 37 °C 时 Glk 的表达量。检测不同温度条件下表达 Glk 的纯酶比酶活, 发现不同温度条件下表达的 Glk 纯酶比酶活之间无显著性差异(图 5C)。综上所述, 30 °C 表达 Glk 时, 其生物量及可溶性表达效果比 20 °C 和 37 °C 时更佳, 因此 30 °C 为 Glk 可溶性表达的最适诱导温度。

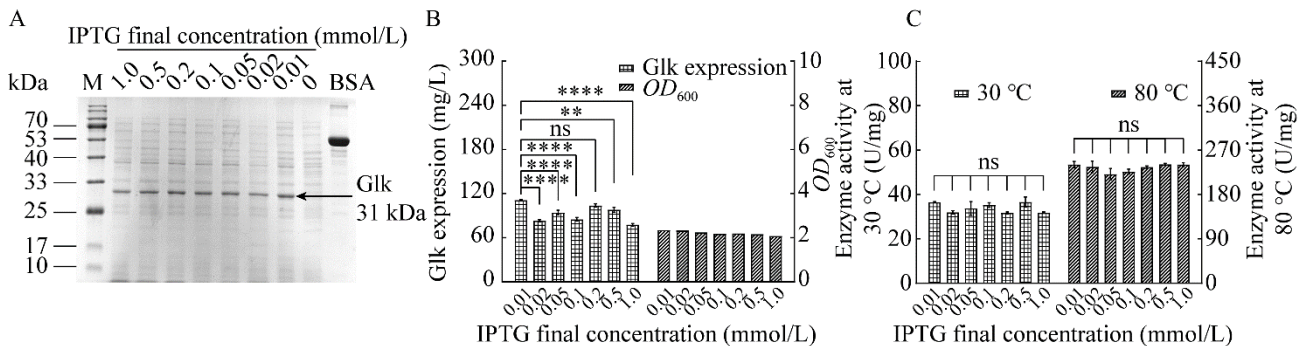


图 4 诱导剂 IPTG 终浓度对 Glk 可溶性表达的影响

Figure 4 Effect of IPTG final concentration on the soluble expression of Glk. A: The difference of Glk expression by LB media under different IPTG final concentration. M: Protein marker; BSA: Bovine serum albumin ($\geq 98\%$). B: Differences in the OD_{600} of *E. coli* BL21(DE3) and the soluble expression of Glk at the end of induction under different final IPTG final concentrations. C: The specific enzymatic activity of Glk expressed under different final IPTG concentrations at 30 °C and 80 °C. **** represents $P < 0.0001$; ** represents $P < 0.01$; ns: No significant difference.

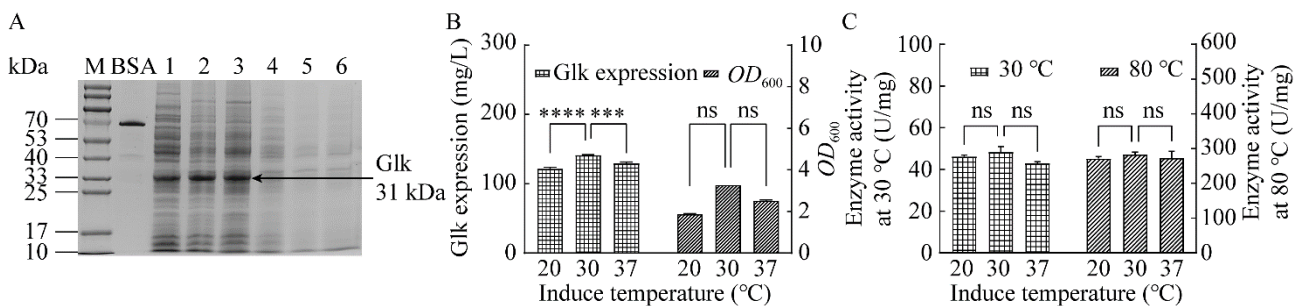


图 5 诱导温度对 Glk 可溶性表达的影响

Figure 5 Effect of induced temperature on the soluble expression of Glk. A: The difference of Glk expression in LB media under different induced temperature. M: Protein marker; BSA: Bovine serum albumin ($\geq 98\%$); 1, 2, 3: Supernatant after induction at 20, 30, 37 °C; 4, 5, 6: Precipitation after induction at 20, 30, 37 °C. B: Differences in the OD_{600} of *E. coli* BL21(DE3) and the soluble expression of Glk at the end of induction under different induce temperature. C: The specific enzymatic activity of Glk expressed under different induce temperature at 30 °C and 80 °C. **** represents $P < 0.0001$; *** represents $P < 0.001$; ns: No significant difference.

2.3.4 诱导时长对 Glk 可溶性表达的影响

合适的诱导时长有利于 *E. coli* BL21(DE3) 菌体生长并表达 Glk。设置不同诱导时长(4–36 h)对诱导 Glk 可溶性表达进行单因素实验(表 3), 结果显示(图 6B), 诱导时间越长, 重组 *E. coli* BL21(DE3)生物量越多。当培养时间超过 16 h 时, 菌体生物量开始下降, 可能是重组 *E. coli* BL21(DE3)在生长时产生的代谢产物对菌体生长产生抑制作用, 生长进入衰亡期从而导致 OD_{600} 下降。诱导时间不足 12 h 或超过 18 h 时, Glk 表达量均低于 160 mg/L, 而诱导 14 h 和 16 h 时的可溶性表达量分别达到 236.46 mg/L 和 244.45 mg/L (图 6B、6C), 且不同诱导时长下 Glk 的比酶活之间并无显著性差异。因此, 14–16 h 为表达 Glk 的最适诱导时长。

2.3.5 Glk 表达的培养基成分优化

大肠杆菌异源表达蛋白时, 合适的培养基成分不仅能够提高菌体生物量的积累还能够增加异源蛋白的可溶性表达。因此, 对重组 *E. coli* BL21(DE3)表达 Glk 的培养基成分进行优化有可能提高菌体生物量积累及 Glk 可溶性表达量。目前 LB、TB、SOB 这 3 种培养基是大肠杆菌表达蛋白常用的基础培养基, 在 3 种培养基基础上分别添加 5 g/L 葡萄糖并将培养基命名为 LBG、TBG、SOBG。对 LB、TB、SOB、LBG、TBG、SOBG 共 6 种不同的培养基进行诱导表达 Glk。图 7A、7B 显示, 在 LB 培养基中表达 Glk 时其可溶性表达量达到 238.9 mg/L, 高于 TB、SOB、LBG、TBG 和 SOBG 培养基中表达 Glk 时其可溶性表达量。对 LB、TB、SOB、LBG、TBG、SOBG 共 6 种不同的培养基进行诱导表达 Glk 进行纯化并检测比酶活(图 7C), 发现使用不同的培养基进行诱导表达的 Glk 纯酶的比酶活之间并未表现出显著差异。因此, LB 培养基更适用于重组 *E. coli* BL21(DE3)表达 Glk。

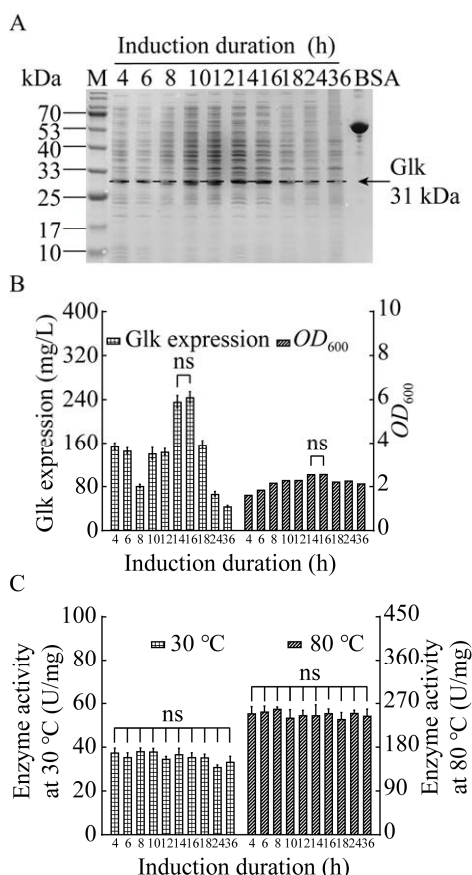


图 6 诱导时长对 Glk 可溶性表达的影响

Figure 6 Effect of induction duration on the soluble expression of Glk. A: The difference of Glk expression in LB media under different induction duration. M: Protein marker; BSA: Bovine serum albumin ($\geq 98\%$). B: Differences in the OD_{600} of *E. coli* BL21(DE3) and the soluble expression of Glk at the end of induction under different induction duration. C: The specific enzymatic activity of Glk expressed under different induction duration at 30 °C and 80 °C. ns: No significant difference.

葡萄糖的添加有助于菌株生长, 但是会降低 Glk 的可溶性表达量(图 7A、7B), 图 7B 结果显示, 在添加甘油的 TB 和 TBG 培养基中, 重组 *E. coli* BL21(DE3)生物量高于未添加甘油的 LB、SOB、LBG 和 SOBG 培养基, 甘油作为三碳化合物可充当培养基中的碳源供菌体摄取利用, 因此推测甘油的添加能够促进菌体生长。为了积累更多菌体并提高 Glk 的可溶性表达量, 选择使用甘

油代替葡萄糖作为碳源优化 Glk 的可溶性表达。适量的碳源对菌体的生长的积累起到积极作用, 过量则可能会导致菌株生长和蛋白表达的不平衡, 降低可溶性表达效果。为了获得最优的甘油终浓度, 在 LB 培养基中添加不同浓度的甘油 (0–10 mL/L) 表达 Glk。未添加甘油进行表达时重组 *E. coli* BL21(DE3) 最终 OD_{600} 为 2.02, 添加甘油后表达的 OD_{600} 均大于 3.1, 说明甘油的添加对 *E. coli* BL21(DE3) 生物量的积累起促进作用。其中添加 2.5 mL/L 甘油时, 重组 *E. coli* BL21(DE3) 的最终 OD_{600} 最高 (3.77), Glk 可溶性表达量为 184.36 mg/L (图 8B)。但 Glk 可溶性表达量在添加 2.0 mL/L 甘

油时最高, 达到 219.43 mg/L, 且不同甘油终浓度条件下诱导表达的 Glk 比酶活之间不存在显著性差异 (图 8C)。因此, 在 LB 培养基中添加 2.0 mL/L 甘油能积累更多生物量并能提高 Glk 的可溶性表达量。

Mg^{2+} 是转录翻译、氨基酸合成过程中 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、氨酰-tRNA 合成酶的激活剂, 同时还是核糖体结构的一部分, 能稳定核糖体亚单位构型保证蛋白质合成, 对蛋白质的合成具有重要作用^[28-29]。因此, 在 LB 培养基中添加适量的 Mg^{2+} 可能对 Glk 的可溶性表达有积极影响。设置不同终浓度 (0–20 mmol/L) Mg^{2+} ,

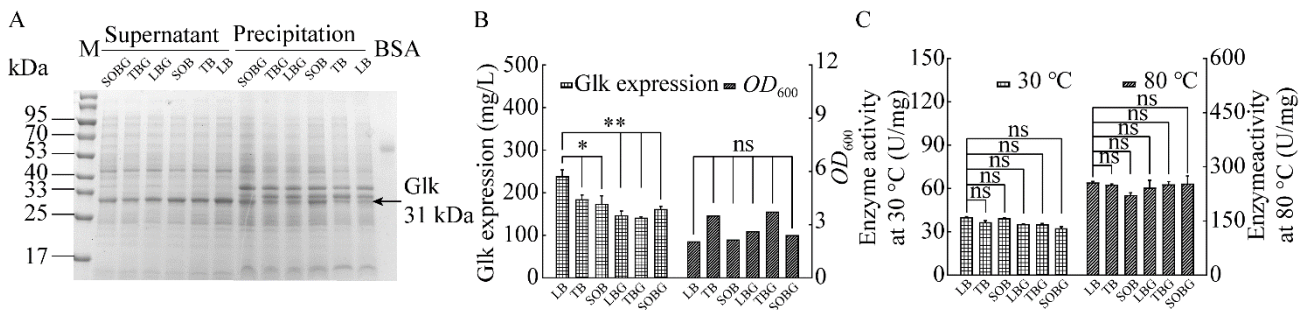


图 7 培养基种类对 Glk 可溶性表达的影响

Figure 7 Effects of diverse media on the soluble expression of Glk. A: The difference of Glk expression induced by diverse media. M: Protein marker; BSA: Bovine serum albumin ($\geq 98\%$). B: Differences in the OD_{600} of *E. coli* BL21(DE3) and the soluble expression of Glk at the end of induction under different media. C: The specific enzymatic activity of Glk expressed under different media at 30 °C and 80 °C. ** represents $P < 0.01$; * represents $P < 0.05$; ns: No significant difference.

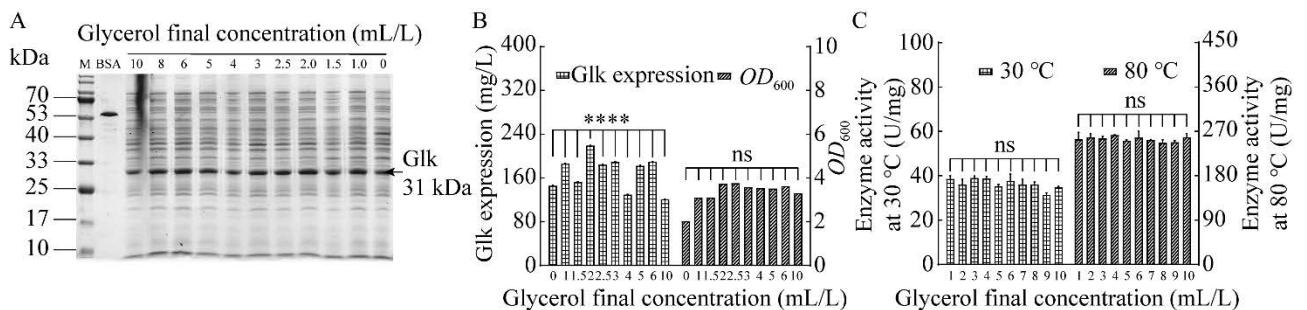


图 8 甘油对 Glk 可溶性表达的影响

Figure 8 Effect of glycerol final concentration on the soluble expression of Glk. A: The difference of Glk expression in LB media under different glycerol final concentration. M: Protein marker; BSA: Bovine serum albumin ($\geq 98\%$). B: Differences in the OD_{600} of *E. coli* BL21(DE3) and the soluble expression of Glk at the end of induction under different Glycerol final concentrations. C: The specific enzymatic activity of Glk expressed under different glycerol final concentrations at 30 °C and 80 °C. **** represents $P < 0.0001$; ns: No significant difference.

探究其对 Glk 的可溶性表达的影响, 由图 9A 和图 9B 可知, Mg^{2+} 的添加并不会显著增加重组 *E. coli* BL21(DE3) 的生物量的积累。但在添加 1.0–15.0 mmol/L Mg^{2+} 时 Glk 的可溶性表达量大于无 Mg^{2+} 添加或 Mg^{2+} 添加量为 20 mmol/L 时 Glk 的可溶性表达量, 说明 Mg^{2+} 的添加能提高 Glk 可溶性表达。纯化在含不同 Mg^{2+} 浓度的 LB 中表达获得的 Glk 并检测比酶活, 发现在不同 Mg^{2+} 浓度的 LB 中表达后的 Glk 纯酶的比酶活之间无显著性区别, 说明 LB 培养基中 Mg^{2+} 表达 Glk 并不会影响 Glk 纯酶的比酶活。由此可见,

LB 培养基中添加 1.0 mmol/L Mg^{2+} 不能显著提高重组 *E. coli* BL21(DE3) 生物量, 但能提高 Glk 可溶性表达量且不会影响 Glk 纯酶的比酶活。由图 9B 可知 Glk 的可溶性表达量在添加 1.0 mmol/L Mg^{2+} 时最高, 可达 221.51 mg/L。因此, 在 LB 培养基中表达 Glk 时 Mg^{2+} 添加的终浓度为 1.0 mmol/L。

氮源是蛋白质合成过程中的重要因素, 对 LB 培养基成分中胰蛋白胨的添加量进行优化 (10–20 g/L), 探究其对 Glk 的可溶性表达是否有积极影响。由图 10A 和图 10B 可知, 重组 *E. coli*

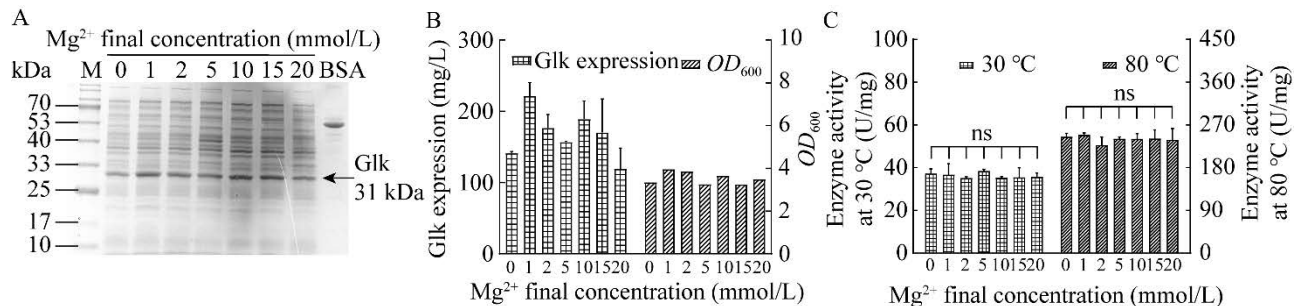


图 9 Mg^{2+} 对 Glk 可溶性表达的影响

Figure 9 Effect of Mg^{2+} final concentration on the soluble expression of Glk. A: The difference of Glk expression in LB media under different Mg^{2+} final concentration. M: Protein marker; BSA: Bovine serum albumin ($\geq 98\%$). B: Differences in the OD_{600} of *E. coli* BL21(DE3) and the soluble expression of Glk at the end of induction under different Mg^{2+} final concentrations. C: The specific enzymatic activity of Glk expressed under different Mg^{2+} final concentrations at 30 °C and 80 °C. ns: No significant difference.

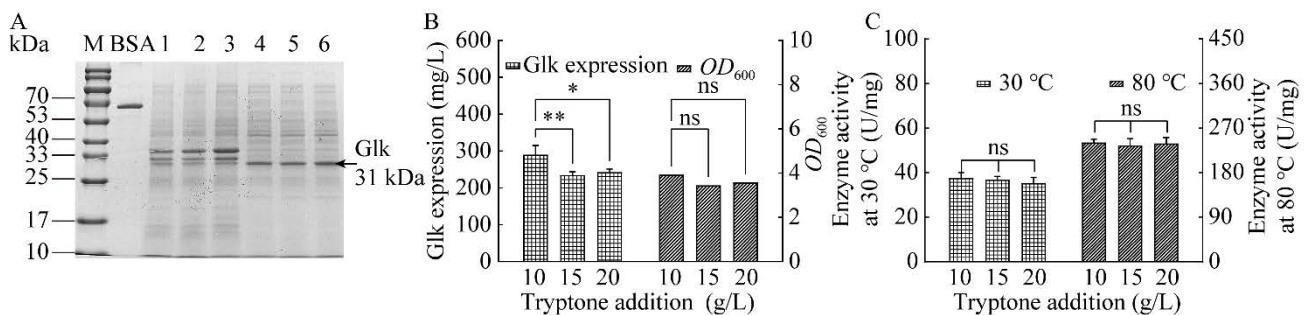


图 10 胰蛋白胨添加量对 Glk 可溶性表达的影响

Figure 10 Effect of tryptone addition on the soluble expression of Glk. A: The difference of Glk expression in LB media under different tryptone addition. M: Protein marker; BSA: Bovine serum albumin ($\geq 98\%$). 1, 3, 5: Precipitation after induction by 10, 15, and 20 g/L tryptone; 2, 4, 6: Supernatant after induction by 10, 15, and 20 g/L tryptone. B: Differences in the OD_{600} of *E. coli* BL21(DE3) and the soluble expression of Glk at the end of induction under different tryptone addition. C: The specific enzymatic activity of Glk expressed under different tryptone addition at 30 °C and 80 °C. ** represents $P < 0.01$; * represents $P < 0.05$; ns: No significant difference.

BL21(DE3)最终 OD_{600} 在添加 10 g/L 胰蛋白胍时为 3.93, 在添加大于 10 g/L 胰蛋白胍时小于 3.93。Glk 的可溶性表达量在添加 10 g/L 胰蛋白胍时达 290.18 mg/L, 大于 10 g/L 胰蛋白胍时显著降低。以上结果说明 LB 培养基成分中胰蛋白胍的添加量大于 10 g/L 并不能提高重组 *E. coli* BL21(DE3)生物量和 Glk 可溶性表达量。对不同胰蛋白胍添加量下表达的 Glk 进行纯化并检测比酶活, 由图 10C 可知, 不同胰蛋白胍添加量下表达的 Glk 纯酶比酶活之间无显著性区别。因此, LB 中添加 10 g/L 胰蛋白胍更适用于 Glk 的可溶性表达。

2.4 Glk 最佳表达条件

E. coli BL21(DE3)表达异源 Glk 的最优条件

见表 5, 对优化前和优化后的表达条件(表 5)进行发酵并比较。图 11B 结果显示 *E. coli* BL21(DE3)表达 Glk 优化前 *E. coli* BL21(DE3)最终 OD_{600} 为 1.88, 优化后 *E. coli* BL21(DE3) OD_{600} 为 3.91, 比优化前的 OD_{600} 提高了 2.08 倍。优化前 Glk 的可溶性表达量为 63.49 mg/L, 优化后提高到 298.91 mg/L, 较优化前共提高了 4.71 倍。对表达优化前后的 Glk 纯酶进行酶活检测, 图 11C 的结果显示, 表达优化前后 Glk 酶的比酶活之间未表现出明显差异。因此, 优化 *E. coli* BL21(DE3)表达 Glk 的诱导时机、IPTG 终浓度、诱导温度、诱导时长以及培养基条件, 一定程度上能够提高重组 *E. coli* BL21(DE3)的生物量并提高 Glk 可溶性表达水平。

表 5 优化前后 Glk 的表达条件

Table 5 Expression conditions of Glk before and after optimization

Items	Culture medium	Induce OD_{600}	Final IPTG concentration (mmol/L)	Induce temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Duration of induction (h)	Glycerol (mL/L)	Mg^{2+} (mmol/L)	Tryptone (g/L)
After optimization	LB	1.20–1.40	0.01	30.00	14.00	2.00	1.00	10.00
Before optimization	LB	0.60–0.80	0.05	30.00	10.00	0.00	0.00	10.00

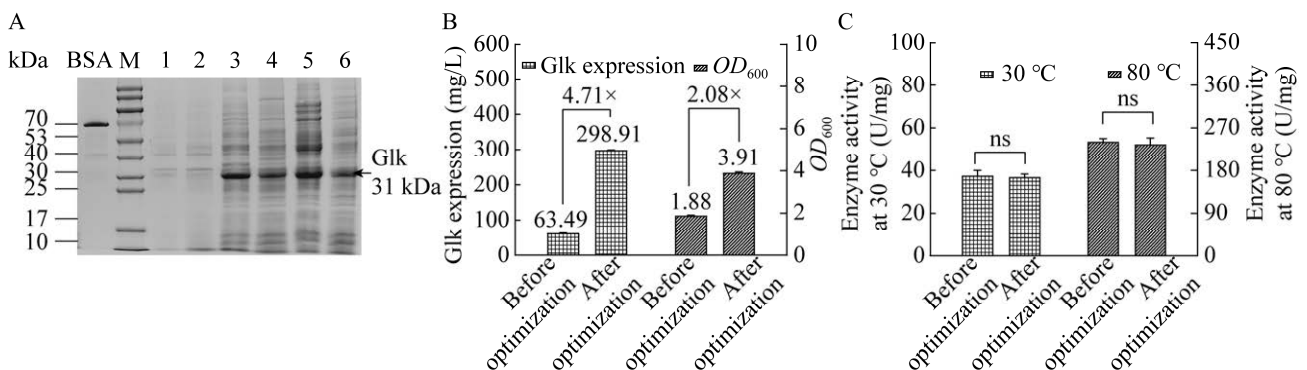


图 11 Glk 可溶性表达优化前后对比

Figure 11 Comparison of soluble expression of Glk before and after optimization. A: SDS-PAGE analysis of Glk before and after optimization. M: Protein marker; BSA: Bovine serum albumin ($\geq 98\%$); 1, 3, 5: Precipitation, supernatant, and cell after optimization; 2, 4, 6: Precipitation, supernatant, and cell before optimization. B: Differences in soluble expression of Glk before and after optimization. C: Specific enzymatic activity of Glk before and after optimization at 30 $^{\circ}\text{C}$ and 80 $^{\circ}\text{C}$. ns: No significant difference.

3 结论与展望

目前市场上己糖激酶产品主要来源于酵母,其热稳定性差,导致在生产、运输、贮藏等过程中的成本高且使用环境受限。因此,当前期望通过筛选或改造获得比酶活较高的热稳定性己糖激酶。嗜热菌长期在高温环境中生长繁殖,其相关蛋白和酶类对热稳定,是筛选热稳定性己糖激酶的极佳研究对象。Fujita 等^[30]在1999年申请了嗜热酵母己糖激酶的相关专利,该己糖激酶在37℃下贮藏7d后仍然能保留80%的酶活性,热稳定性好,但发酵酶活很低(37℃下小于10 U/mg),在实际生产应用中存在局限。本研究中,嗜热菌来源己糖激酶 Glk 在37℃下贮藏7d后仍然能保留大于90%的酶活性,具有更好的热稳定性。与日本旭化成公司2022年上市的两来源于嗜热菌的ADP依赖型的热稳定性己糖激酶(ADP-HKT II, ADP-HKP II)相比^[31-32],在常用温度30℃条件下,本文 Glk 的比酶活(30-40 U/mg)高于ADP-HKP II的25 U/mg和ADP-HKT II的30 U/mg,具有显著的市场应用价值。

国内外研究显示,己糖激酶的表达更偏向于使用大肠杆菌表达系统(表6)。而大肠杆菌是极为成熟的原核生物表达系统,具有遗传背景清晰、繁殖快、培养方法简单、操作简便和遗传稳定等优势。因此,本研究以 *E. coli* BL21(DE3)作为表达系统,表达嗜热菌来源己糖激酶 Glk,并对其基本性质进行研究,优化 *E. coli* BL21(DE3)表达 Glk 的条件。发现在 *E. coli* BL21(DE3)表达 Glk 时改变诱导时机、IPTG 终浓度、诱导温度、诱导时长时并不能明显提高生物量,但 Glk 的可溶性表达量明显提高且不影响 Glk 在30℃和80℃下的比酶活。因此,推测己糖激酶的表达会抑制菌株生长。随后,本研究为了提高生物量,在LB培养基中优化了甘油、Mg²⁺和胰蛋白酶的添加量,结果显示优化后的培养基能够促进重组 *E. coli* BL21(DE3)的生长并提高 Glk 的表达。除培养基成分优化外,通过合成生物技术改造底盘菌株、酶工程改造己糖激酶或将己糖激酶分泌到细胞外表达也都可能同时提高 Glk 的表达和菌体生物量的积累。目前尚未见通过这些方法提高热稳定己糖激酶表达和催化性能的相关研究报道。因此,在保证热

表6 比较不同来源己糖激酶的重组表达

Table 6 Comparing the recombinant expressing of hexokinases from different sources

Sources	Expression host	Optimal enzyme activity assay temperature (°C)	Enzyme activity (U/mg)	References
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	30	13.81	[33]
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	80	43.30	[34]
<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	90	367.00	[18]
<i>Helianthus annuus</i> L.	<i>E. coli</i> XL-Blue	22	19.30	[35]
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>E. coli</i>	-	60.00±14.00	[36]
<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>E. coli</i> XL1-blue	25	19.44	[37]
Human brain	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	37	67.80±5.20	[38]
<i>Nosema bombycis</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	37	130.00	[39]
<i>Thermoproteus tenax</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	30	43.05±2.00	This study

-: This data is not available in the cited references.

稳定性的前提下通过分子改造提高 Glk 的酶学性质和表达水平, 增加其实际应用场景, 仍然需要更多更深入的研究。本研究后续也将对 Glk 的改造进行研究, 为国内热稳定己糖激酶的生产提供更多技术支撑, 为解决国内己糖激酶的迫切需求提供更多可能。

REFERENCES

- [1] GUO C, LUDVIK AE, ARLOTTO ME, HAYES MG, ARMSTRONG LL, SCHOLTENS DM, BROWN CD, NEWGARD CB, BECKER TC, LAYDEN BT, LOWE WL, REDDY TE. Coordinated regulatory variation associated with gestational hyperglycaemia regulates expression of the novel hexokinase HKDC1[J]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 6069.
- [2] YADAV S, BHARTI S, MATHUR P. GlucoKinaseDB: a comprehensive, curated resource of glucokinase modulators for clinical and molecular research[J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2023, 103: 107818.
- [3] 薛建, 徐俊, 黄辉. 己糖激酶法与酶电极法测定葡萄糖的方法学比较[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(A4): 223-224.
XUE J, XU J, HUANG H. Methodological comparison between hexokinase method and enzyme electrode method for the determination of glucose[J]. *World Latest Medicine Information*, 2016, 16(A4): 223-224 (in Chinese).
- [4] JIA KK, ZHANG J. Evaluation of five routine glucose methods on an Olympus AU5400 analyzer using the CDC hexokinase reference method[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2010, 48(3): 361-364.
- [5] 赵丽. 血糖测定方法的进展[J]. *安徽卫生职业技术学院学报*, 2016, 15(1): 141-143.
ZHAO L. Research advances in blood glucose measurement methods[J]. *Journal of Anhui Health Vocational & Technical College*, 2016, 15(1): 141-143 (in Chinese).
- [6] SCHUCHERT-SHI A, KUBÁN P, HAUSER PC. Monitoring of enzymatic reactions using conventional and on-chip capillary electrophoresis with contactless conductivity detection[J]. *Electrophoresis*, 2007, 28(24): 4690-4696.
- [7] HUSSAIN F, BIRCH DJS, PICKUP JC. Glucose sensing based on the intrinsic fluorescence of sol-gel immobilized yeast hexokinase[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 339(1): 137-143.
- [8] DICKSON LM, BUCHMANN EJ, JANSE van RENSBURG C, NORRIS SA. The impact of differences in plasma glucose between glucose oxidase and hexokinase methods on estimated gestational diabetes mellitus prevalence[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 7238.
- [9] GACHOKI JM. Comparative analysis of random blood glucose levels in serum, plasma and whole blood using glucose oxidase and hexokinase methods under spectrophotometric and electrochemical techniques[D]. Nairobi: Doctoral dissertation of Kenyatta University, 2020.
- [10] LIN Q, HUANG JQ, ZHANG YL, CHEN MM, XU YZ, ZOU XY, LIU SY, DAI Z. A smartphone-assisted "all-in-one" paper chip for one-pot noninvasive detection of salivary glucose level[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 468: 143608.
- [11] 张帅, 程晓磊, 刘曦, 李琼, 白董慧, 于广利, 郝杰杰. 葡萄糖激酶的异源表达及葡萄糖激酶激动剂筛选体系的建立[J]. *中国海洋药物*, 2020, 39(5): 1-8.
ZHANG S, CHENG XL, LIU X, LI Q, BAI DH, YU GL, HAO JJ. Heterologous expression of glucokinase and establishment of a glucokinase agonist screening system[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2020, 39(5): 1-8 (in Chinese).
- [12] 刘春卯, 罗同阳, 胡美荣, 吴芳彤, 曹倩荣, 郑翔. 诊断试剂用己糖激酶的制备工艺研究[J]. *河北农业大学学报*, 2017, 40(1): 66-70, 86.
LIU CM, LUO TY, HU MR, WU FT, CAO QR, ZHENG X. Preparation of hexokinase for diagnostic reagents[J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2017, 40(1): 66-70, 86 (in Chinese).
- [13] ATALAH J, CÁCERES-MORENO P, ESPINA G,

- BLAMEY JM. Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 280: 478-488.
- [14] SAKURABA H, MITANI Y, GODA S, KAWARABAYASI Y, OHSHIMA T. Cloning, expression, and characterization of the first archaeal ATP-dependent glucokinase from aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2003, 133(2): 219-224.
- [15] QIAN Z, ZHAO JJ, BAI X, TONG W, CHEN Z, WEI HF, WANG QH, LIU SQ. Thermal stability of glucokinases in *Thermoanaerobacter tengcongensis*[J]. *BioMed Research International*, 2013, 2013: 646539.
- [16] MIYAZONO KI, Tabei N, MORITA S, OHNISHI Y, HORINOUCI S, TANOKURA M. Substrate recognition mechanism and substrate-dependent conformational changes of an ROK family glucokinase from *Streptomyces griseus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(3): 607-616.
- [17] NISHIMASU H, FUSHINOBU S, SHOUN H, WAKAGI T. Crystal structures of an ATP-dependent hexokinase with broad substrate specificity from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(13): 9923-9931.
- [18] SHAKIR NA, ASLAM M, BIBI T, FALAK S, RASHID N. Functional analyses of a highly thermostable hexokinase from *Pyrobaculum calidifontis*[J]. *Carbohydrate Research*, 2023, 523: 108711.
- [19] VERHEES CH, KOOT DGM, ETTEMA TJG, DIJKEMA C, de VOS WM, van der OOST J. Biochemical adaptations of two sugar kinases from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*[J]. *The Biochemical Journal*, 2002, 366(Pt 1): 121-127.
- [20] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20-25.
- [21] 刘金香. 人体中镁离子的生理生化功能[J]. *江西教育学院学报(自然科学)*, 2001, (6): 44-46.
- LIU JX. Physiological and biochemical function of magnesium ion on human body[J]. *Journal of Jiangxi Institute of Education (Natural Sciences)*, 2001, (6): 44-46 (in Chinese).
- [22] KIDO T, TABATA M, TOTANI M, MURACHI T. Enzymatic method for the determination of magnesium in urine using hexokinase or glucokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase[J]. *Japanese Journal of Clinical Chemistry*, 1986, 15: 146-151.
- [23] BISSWANGER H. Enzyme assays[J]. *Perspectives in Science*, 2014, 1(1/2/3/4/5/6): 41-55.
- [24] TAYLOR T, DENSON J-P, ESPOSITO D. Optimizing expression and solubility of proteins in *E. coli* using modified media and induction parameters[J]. *Heterologous Gene Expression in E. coli: Methods and Protocols*, 2017: 65-82.
- [25] 陈亮, 任随周, 许玫英, 孙国萍. 乳糖替代 IPTG 诱导脱色酶 TpmD 基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(4): 551-556.
- CHEN L, REN SZ, XU MY, SUN GP. Over-expression of highly active triphenylmethane dyes decolorization enzyme (TpmD) induced by lactose instead of IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. *Microbiology*, 2009, 36(4): 551-556 (in Chinese).
- [26] OVERTON TW. Recombinant protein production in bacterial hosts[J]. *Drug Discovery Today*, 2014, 19(5): 590-601.
- [27] KURLAND CG, DONG H. Bacterial growth inhibition by overproduction of protein[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(1): 1-4.
- [28] LEBENDIKER M, DANIELI T. Production of prone-to-aggregate proteins[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(2): 236-246.
- [29] WOLFE SM, WEISBERGER AS. Protein synthesis by reticulocyte ribosomes, II. The effects of magnesium ion and chloramphenicol on induced protein synthesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1965, 53(5): 991-998.
- [30] FUJITA T, MATSUKAWA H. Hexokinase obtained from thermophilic yeast *Kluyveromyces fragilis*

- 0879659[P/OL]. (1999-07-09) [2024-01-01].
<https://www.freepatentsonline.com/5948665.html>.
- [31] SOHEI I, SHINYA F, ISSEI Y, etc. Structural Basis for the ADP-Specificity of a Novel Glucokinase from a Hyperthermophilic Archaeon [J]. *Structure*, 2001, 9(3): 205-214.
- [32] SHINJI K, ISSEI Y, HARUHIKO S, etc. Biochemical Characterization, Cloning, and Sequencing of ADP-Dependent (AMP-Forming) Glucokinase from Two Hyperthermophilic Archaea, *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*[J]. *The Japanese Biochemical Society*, 2000, 128(6): 1079-1085.
- [33] 孔董俊, 李玉, 张俊环, 贾红红, 路福平, 杜连祥. 乳糖代替 IPTG 诱导己糖激酶在大肠杆菌中的表达[J]. *工业微生物*, 2011, 41(1): 15-20.
KONG DJ, LI Y, ZHANG JH, JIA HH, LU FP, DU LX. Expression of GLK in recombinant strain *Escherichia coli* BL21(DE3) induced by lactose instead of IPTG[J]. *Industrial Microbiology*, 2011, 41(1): 15-20 (in Chinese).
- [34] 钱忠, 王敬强, 周传奇, 马延和, 刘斯奇. 嗜热厌氧菌葡萄糖激酶在不同温度下的表达和催化活性[J]. *微生物学报*, 2006, 46(2): 243-248.
QIAN Z, WANG JQ, ZHOU CQ, MA YH, LIU SQ. Expression and catalysis of glucokinase of *Thermoanaerobacter tengcongensis* at different temperatures[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(2): 243-248 (in Chinese).
- [35] TRONCOSO-PONCE MA, RIVOAL J, DORION S, MOISAN MC, GARCÉS R, MARTÍNEZ-FORCE E. Cloning, biochemical characterization and expression of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) hexokinase associated with seed storage compounds accumulation[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(4): 299-308.
- [36] ARMSTRONG R L, WILSON J E, SHOEMAKER C B. Purification and characterization of the hexokinase from *Schistosoma mansoni*, expressed in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 1996, 8(3): 374-380.
- [37] CÁCERES AJ, PORTILLO R, ACOSTA H, ROSALES D, QUIÑONES W, AVILAN L, SALAZAR L, DUBOURDIEU M, MICHELS PAM, CONCEPCIÓN JL. Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2003, 126(2): 251-262.
- [38] PALMA F, LONGHI S, AGOSTINI D, STOCCHI V. One-step purification of a fully active hexahistidine-tagged human hexokinase type I overexpressed in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2001, 22(1): 38-44.
- [39] MAGNANI PM. Expression, purification, and characterization of a recombinant erythroid-specific hexokinase isozyme[J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 1998, 24(4): 401-411.

(本文责编 郝丽芳)