

研究报告

信号肽及化学通透剂对环糊精葡萄糖基转移酶胞外分泌的影响

蔡海松¹ 林晓栩^{1,2} 郭永华¹ 陈龙军¹ 张慧¹ 邱宏端² 林新坚¹ 陈济琛^{1*}

(1. 福建省农业科学院土壤肥料研究所 福建 福州 350003)

(2. 福州大学生物科学与工程学院 福建 福州 350108)

摘要:【目的】研究不同的信号肽和化学通透剂对重组环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)胞外分泌的影响,提高CGTase的胞外分泌量。【方法】扩增地芽孢杆菌CHB1(*Geobacillus* sp. CHB1)的CGTase基因,构建带有地芽孢杆菌CHB1自身信号肽、OmpA、PelB信号肽和不带信号肽的4种重组质粒;比较4种重组质粒对重组CGTase胞外分泌的影响,筛选最优的信号肽;考察甘氨酸、Triton X-100、SDS和Tween 80四种化学通透剂对重组CGTase胞外分泌的影响,确定最佳的化学通透剂及其浓度。【结果】OmpA信号肽介导的分泌效果最好,胞外酶活达到7.44 U/mL,分别是PelB、CHB1信号肽的2.04倍和11.27倍,不带信号肽的重组质粒菌胞外检测不到酶活;携带OmpA信号肽的重组质粒菌发酵48 h,同时添加浓度为0.6%的甘氨酸和0.3%的Triton X-100,胞外酶活达最大到14.27 U/mL;SDS和Tween 80对该酶的胞外分泌具有明显的抑制作用。【结论】OmpA信号肽的介导效果最佳,同时添加浓度为0.6%和0.3%的甘氨酸和Triton X-100可以有效促进胞外分泌,为该重组酶的高效胞外分泌提供了一种有效的方法。

关键词: 环糊精葡萄糖基转移酶, 信号肽, 化学通透剂, 胞外分泌

Foundation item: Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2014J01105); Special Department of the Public Class Research (No. 2014R1022-3); Fujian Finance Social Commonweal Research (No. 2060302); National Nonprofit Agricultural Research (No. 201303094-05)

*Corresponding author: E-mail: chenjichen2001@163.com

Received: March 29, 2016; **Accepted:** August 05, 2016; **Published online** (www.cnki.net): September 07, 2016

基金项目: 福建省自然科学基金项目(No. 2014J01105); 科技厅公益类科研专项项目(No. 2014R1022-3); 福建财政社会公益研究项目(No. 2060302); 国家公益性农业科研专项项目(No. 201303094-05)

*通讯作者: E-mail: chenjichen2001@163.com

收稿日期: 2016-03-29; 接受日期: 2016-08-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-07

Effects of different signal peptides and chemical penetrators on extracellular production of recombinant cyclodextrin glycosyltransferase

CAI Hai-Song¹ LIN Xiao-Xu^{1,2} GUO Yong-Hua¹ CHEN Long-Jun¹
ZHANG Hui¹ QIU Hong-Duan² LIN Xin-Jian¹ CHEN Ji-Chen^{1*}

(1. Soil and Fertilizer Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

(2. College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: [Objective] Effects of signal peptides and chemical penetrators on extracellular secretion of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) in recombinant *Escherichia coli* strain BL21(DE3) was observed in this study in order to lay foundation for fermentation technology of CGTase. [Methods] The CGTase gene was cloned by PCR with genomic DNA of *Geobacillus* sp. CHB1 as template. Four recombinant plasmids were constructed which included the signal peptide of *Geobacillus* sp. CHB1, OmpA, PelB and no signal peptide. The recombinant plasmids were respectively transformed into *E. coli* BL21(DE3) and then induced to express. The extracellular enzyme activities of the target proteins were analyzed and measured to screen the best signal peptide. Chemical penetrators like glycine, SDS, Triton X-100 and Tween 80 were added into the culture to determine the effect of chemical additives on extracellular secretion of recombinant CGTase. [Results] The results showed that these four recombinant plasmids could successfully express CGTase in *E. coli* BL21(DE3) and OmpA was the optimal signal peptide. Extracellular enzyme activity induced by OmpA could reach 7.44 U/mL which were 2.04- and 11.27-folds of PelB and CHB1, respectively. No extracellular CGTase activity was detected in *E. coli* BL21(DE3) with the no signal peptide. Extracellular enzyme activities induced by OmpA were 9.27 U/mL and 9.75 U/mL by addition of 0.6% glycine and 0.3% Triton X-100, respectively, and it could reach 14.27 U/mL by synergistic action of glycine and Triton X-100 after 48 h. However, SDS and Tween 80 had obvious inhibition on extracellular CGTase activity. [Conclusion] The extracellular CGTase activity in *E. coli* BL21(DE3) induced by OmpA could reach the highest by addition of 0.6% glycine and 0.3% Triton X-100.

Keywords: Cyclodextrin glycosyltransferase, Signal peptide, Chemical penetrators, Extracellular secretion

环糊精葡萄糖基转移酶 (Cyclodextrin Glycosyltransferase, 简称 CGTase) 是 α -淀粉酶家族的一个重要成员^[1], 将淀粉及相关基质转化成环糊精 (CDs)^[2]。CDs 是一种环状结构的低聚糖^[3], 内疏水外亲水, 广泛应用于食品、医药和环保等领域^[4]。据报道嗜碱脂肪芽孢杆菌、浸麻芽孢杆菌属和软化芽孢杆菌等菌株能产 CGTase^[5]。地芽孢杆菌属是一个新属, 该属的菌株产 CGTase 的报道很少^[6], 本实验室筛选得到一株地芽孢杆菌 CHB1 能产耐高温的 CGTase, 但在大肠杆菌中表达时胞外分泌量较少^[7]。

信号肽可以实现外源重组蛋白在大肠杆菌中分泌表达^[8-9]。由于大肠杆菌细胞的特殊性, 重组蛋

白分泌到培养基中需要跨越内外两层细胞膜, 跨内膜的分泌需要借助信号肽的作用。信号肽利用其 N 端的正电荷和 H 域的疏水性以静电作用和疏水作用参与转运蛋白, 目的蛋白跨越内膜时信号肽被特定的信号肽酶切割而形成成熟的蛋白^[10]。然而到达周质空间的目的蛋白借助非特异性渗透或者化学通透剂跨越外膜释放到培养基中^[11-12]。因此, 运用信号肽和化学通透剂等方法提高地芽孢杆菌 CHB1 的重组 CGTase 胞外分泌量具有重要意义。

本研究利用分子生物学技术构建带有地芽孢杆菌 CHB1 自身信号肽、OmpA、PelB 信号肽和不带信号肽的 4 种重组质粒, 研究不同信号肽与通透剂对 CGTase 胞外分泌的影响, 提高 CGTase 的胞外

酶活, 并对信号肽和通透剂影响 CGTase 胞外分泌的机理进行分析, 为该酶的开发应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 地芽孢杆菌 CHB1、大肠杆菌 BL21(DE3)、大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存; 重组表达质粒 pEASY-E2-OmpA-*cgt* 由本实验室构建并保存; pET-22b(+)载体(提供 PelB 信号肽序列)、pLLp-OmpA 载体(提供 OmpA 信号肽序列)为实验室保存。

1.1.2 培养基: 地芽孢杆菌 CHB1 生长培养基(g/L): 大豆蛋白胨 10.0, 牛肉浸膏 3.0, 氯化钠 0.2, pH 7.0。LB 培养基按照参考文献[4]配置。乳糖自诱导培养基^[13](g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, Na₂HPO₄ 17.9, KH₂PO₄ 6.8, (NH₄)₂SO₄ 3.3, MgSO₄ 0.5, Trace metal 200 μ L, 甘油 5 mL, 葡萄糖 0.05%, 乳糖 0.2%, pH 7.0。

1.1.3 主要试剂和仪器: 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA marker 和 DL15000 DNA marker, 日本 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶, 加拿大 Fermentas 公司; 原核表达载体 pEASY-E2, 北京全式金生物公司; DNA 切胶回收试剂盒、PCR 引物、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、X-Gal、氨苄抗生素(Amp)及质粒快速提取试剂盒, 上海生工生物工程股份有限公司; 蛋白质分子量标准, 美国赛默飞世尔科技公司; 其余试剂均为国产或进口分析纯。TECAN Infinite F50 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; 蛋白电泳仪、凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 地芽孢杆菌 CHB1 基因组 DNA 和质粒的提取

地芽孢杆菌 CHB1 基因组 DNA 的提取参照 Zhou 等^[14]的方法进行; 质粒的提取参照上海生工生物工程股份有限公司质粒提取试剂盒说明书的方法进行。

1.3 环糊精葡萄糖基转移酶基因的克隆

根据地芽孢杆菌 CHB1 的 CGTase 基因序列, 分别设计 P1、P2 两对上下游引物, 如表 1 所示。

表 1 PCR 反应引物
Table 1 The primes of PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
CHB1- <i>cgt</i> -P1 5'-Primer	CGGGATCCGCAAAAGATGGCTTTC ATTGATT
CHB1- <i>cgt</i> -P1 3'-Primer	CCGCTCGAGGTTTTGCCAATCACT ATAAT
<i>cgt</i> -P2 5'-Primer	CGGGATCCGAAATCTTAATAAAGT AAATTTTAC
<i>cgt</i> -P2 3'-Primer	CCCTCGAGGGGTTTTGCCAATCA CTATAATTTTC

以地芽孢杆菌 CHB1 菌株基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 方法分别以 P1 引物和 P2 引物扩增带有地芽孢杆菌 CHB1 自身信号肽的 CHB1-*cgt* 基因和不带信号肽的 *cgt* 基因。PCR 反应体系(20 μ L): 基因组 DNA 2.0 μ L, 2 \times Taq Master Mix 10.0 μ L, 引物 F 和引物 R (10 μ mol/L)各 1.0 μ L, ddH₂O 6.0 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 胶回收纯化 PCR 产物, 回收样品与 pMD19-T 载体 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布平板进行蓝白斑筛选, 挑取白斑进行 PCR 和测序验证获取阳性克隆(pMD19-T-*cgt* 和 pMD19-T-CHB1-*cgt*)。

1.4 携带不同信号肽的表达质粒的构建与验证

pEASY-E2-*cgt* 重组质粒(不含信号肽)的构建: 表达载体 pEASY-E2 与 *cgt* 基因连接。

pEASY-E2-CHB1-*cgt* 重组质粒(含有 CHB1 信号肽)的构建: 表达载体 pEASY-E2 与 CHB1-*cgt* 基因进行连接。

pEASY-E2-PelB-*cgt* 重组质粒(含 PelB 信号肽)的构建: 设计一对引物 F (5'-CATGCCATGGGAAA TCTTAATAAGGTAAATTTT-3', 下划线为 Nco I 限制性酶切位点)和 R (5'-CCGCTCGAGGTTTTGCCAAT TCACTATAAT-3', 下划线为 Xho I 限制性酶切位点)构建重组表达质粒 pET-22b(+)-*cgt*; 以重组表达质粒 pET-22b(+)-*cgt* 为模板, PCR 扩增带有 PelB 信号肽的 PelB-*cgt* 基因, 将 PelB-*cgt* 基因与表达载体

pEASY-E2 连接。

上述 3 种连接产物分别转化大肠杆菌 BL21(DE3), 氨苄青霉素抗性平板筛选阳性克隆。提取质粒, 进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切验证, 并且将阳性克隆子送上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 重组 CGTase 的诱导表达

种子培养: 将含有不同质粒的重组菌各接入装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C、180 r/min 培养 8 h。

发酵培养: 将种子液按 2% (体积比) 的接种量, 接种至装有 50 mL 乳糖自诱导培养基^[13]的 250 mL 三角瓶中进行培养, 25 °C、180 r/min 诱导 72 h。样品于 8 000 r/min 离心 2 min, 收集上清测定胞外酶活。

各培养基使用前均需添加 100 mg/L 氨苄青霉素。

1.6 重组 CGTase 胞内外表达分析

取 8 mL 发酵液, 8 000 r/min 离心 2 min, 分别收集上清和沉淀, 上清即为胞外可溶性重组 CGTase 组分; 沉淀部分加入 3 mL 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.0), 然后进行超声破碎, 超声破碎液 13 000 r/min 离心 5 min, 分别收集上清和沉淀, 此时的上清即为胞内可溶性重组 CGTase 组分, 沉淀即为胞内不可溶性重组 CGTase 组分(包涵体)。

1.7 重组 CGTase α -环化活力和蛋白含量测定

CGTase α -环化活性参照文献^[15]。一个酶活单位(U)定义为在上述条件下每分钟生成 1 μ mol 的环糊精所需的酶量。

蛋白含量的测定采用 Bradford 法^[16], 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

2 结果与分析

2.1 环糊精葡萄糖基转移酶基因的克隆

以地芽孢杆菌 CHB1 的基因组 DNA 为模板, 分别扩增带有地芽孢杆菌 CHB1 自身信号肽的 CHB1-*cgt* 基因和不带信号肽的 *cgt* 基因, 获得两条大小在 2 000 bp 附近的 DNA 片段(图 1); 另外, 基因测序结果显示序列没有发生突变。因此, PCR 扩增获得了大小和序列均正确的 CHB1-*cgt* 和 *cgt* 基因。

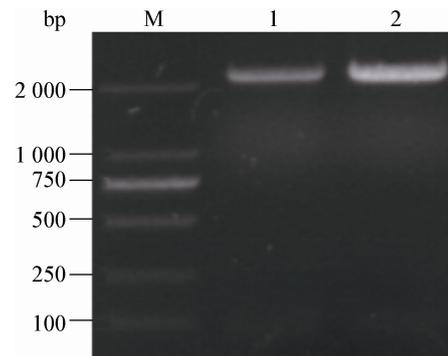


图 1 CHB1-*cgt* 和 *cgt* 基因 PCR 产物

Figure 1 The PCR product of CHB1-*cgt* and *cgt* gene

Note: M: DL2000 DNA marker; 1: *cgt* gene; 2: CHB1-*cgt*.

2.2 携带不同信号肽的重组 CGTase 表达质粒的构建与验证

将扩增产物(CHB1-*cgt* 和 *cgt*)用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切纯化后, 与同样进行双酶切的表达质粒 pEASY-E2、pET-22b(+)-PelB 进行连接得到重组质粒 pEASY-E2-CHB1-*cgt*、pET-22b(+)-PelB-*cgt*。经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切验证均得到大小在 2 000 bp 附近和 5 000 bp 附近的两条条带(图 2), 证明重组质粒 pEASY-E2-CHB1-*cgt*、pET-22b(+)-*cgt* 构建成功。

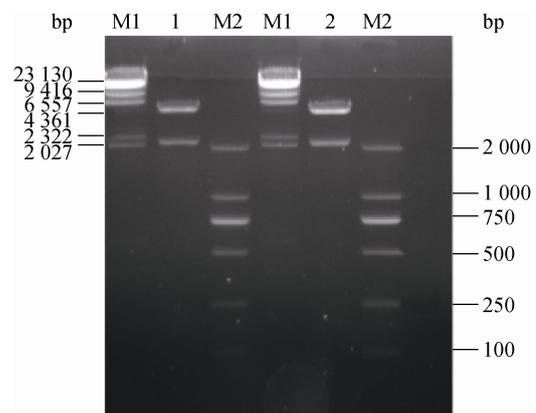


图 2 重组质粒 pEASY-E2-CHB1-*cgt*、pET-22b(+)-PelB-*cgt* 的双酶切验证

Figure 2 The restriction analysis of recombinant plasmid pEASY-E2-CHB1-*cgt* and pET-22b(+)-PelB-*cgt*

注: M1: λ Hind III DNA 标准分子量; 1: 质粒 pET-22b(+)-PelB-*cgt* 被 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切; 2: 质粒 pEASY-E2-CHB1-*cgt* 被 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切; M2: DNA 标准分子量。

Note: M1: λ Hind III marker; 1: The digestion of recombinant plasmid pET-22b(+)-PelB-*cgt* by *Bam*H I and *Xho* I; 2: The digestion of recombinant plasmid pEASY-E2-CHB1-*cgt* by *Bam*H I and *Xho* I; M2: DL2000 DNA marker.

以 pET-22b(+)-PelB-*cgt* 重组载体为模板, PCR 扩增带有 PelB 信号肽的 PelB-*cgt* 基因(图 3)。将目的片段 PelB-*cgt* 双酶切后与同样进行双酶切的表达载体 pEASY-E2 进行连接, 得到重组质粒 pEASY-E2-PelB-*cgt*。提取质粒进行双酶切验证, 经双酶切验证得到大小在 2 000 bp 和 5 000 bp 附近的两条条带(图 3), 条带大小分别与载体片段及目的基因片段大小相符, 表明重组质粒 pEASY-E2-PelB-*cgt* 构建成功。

2.3 携带不同质粒重组菌的诱导表达

将重组质粒 pEASY-E2-OmpA-*cgt*、pEASY-E2-PelB-*cgt*、pEASY-E2-CHB1-*cgt*、pEASY-E2-*cgt* 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中, 挑取阳性克隆子进行诱导表达。不同信号肽对重组 CGTase 胞内外表达的影响情况见图 4, 携带不同质粒的 4 种重组菌均能诱导表达 CGTase, 在 70 kD 左右出现目标条带, 这与预期的 CGTase 的相对分子质量一致。

通过比较发现, 不同信号肽对菌诱导表达、分泌 CGTase 有着明显的差异, 其中重组质粒

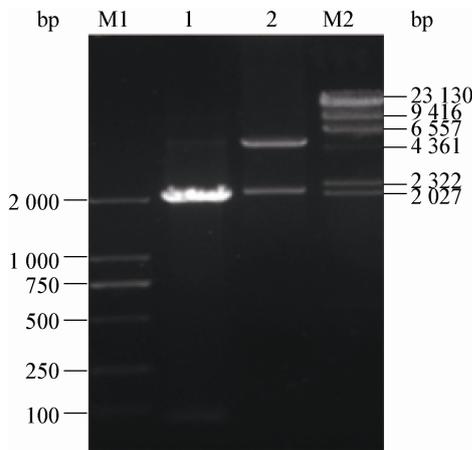


图 3 PCR 扩增产物的电泳分析及重组质粒 pEASY-E2-PelB-*cgt* 双酶切验证

Figure 3 The map of recombinant plasmid pEASY-E2-PelB-*cgt* and the restriction analysis of recombinant plasmid pEASY-E2-PelB-*cgt*

Note: M1: DL2000 DNA marker; 1: PelB-*cgt*; 2: The digestion of recombinant plasmid pEASY-E2-PelB-*cgt* by *Nco* I and *Xho* I; M2: λ /*Hind* III marker.

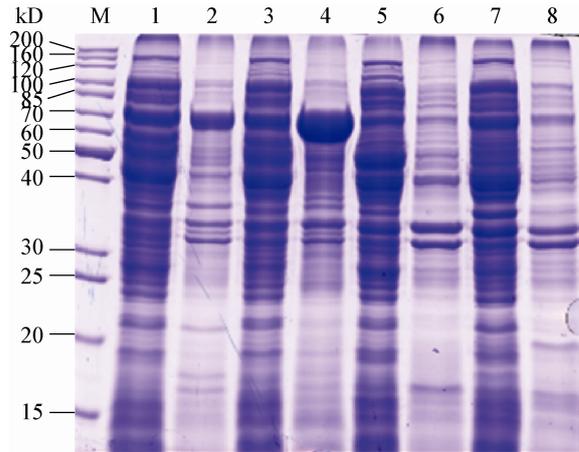


图 4 重组菌诱导表达 CGTase SDS-PAGE 电泳

Figure 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant CGTase
注: M: 蛋白标准; 1: 重组质粒 pEASY-E2-OmpA-*cgt* 的可溶性部分; 2: 重组质粒 pEASY-E2-OmpA-*cgt* 的不可溶性部分; 3: 重组质粒 pEASY-E2-*cgt* 的可溶性部分; 4: 重组质粒 pEASY-E2-*cgt* 的不可溶性部分; 5: 重组质粒 pEASY-E2-CHB1-*cgt* 的可溶性部分; 6: 重组质粒 pEASY-E2-CHB1-*cgt* 的不可溶性部分; 7: 重组质粒 pEASY-E2-PelB-*cgt* 的可溶性部分; 8: 重组质粒 pEASY-E2-PelB-*cgt* 的不可溶性部分。

Note: M: Protein marker; 1: The soluble cellular fraction of recombinant plasmid pEASY-E2-OmpA-*cgt*; 2: The insoluble cellular fraction of recombinant plasmid pEASY-E2-OmpA-*cgt*; 3: The soluble cellular fraction of recombinant plasmid pEASY-E2-*cgt*; 4: The insoluble cellular fraction of recombinant plasmid pEASY-E2-*cgt*; 5: The soluble cellular fraction of recombinant plasmid pEASY-E2-CHB1-*cgt*; 6: The insoluble cellular fraction of recombinant plasmid pEASY-E2-CHB1-*cgt*; 7: The soluble cellular fraction of recombinant plasmid pEASY-E2-PelB-*cgt*; 8: The insoluble cellular fraction of recombinant plasmid pEASY-E2-PelB-*cgt*.

pEASY-E2-OmpA-*cgt* 与 pEASY-E2-*cgt* 的 CGTase 表达量大于其余两种重组质粒, pEASY-E2-OmpA-*cgt* 的蛋白可溶性部分(胞外分泌)较多(图 4), 而且形成的包涵体明显比较少(图 4)。由于信号肽作用, 分泌型重组表达载体 pEASY-E2-OmpA-*cgt* 能将 CGTase 分泌到胞外, 这为后期的优化及大规模提取奠定了基础。然而重组质粒 pEASY-E2-PelB-*cgt*、pEASY-E2-CHB1-*cgt* 的 CGTase 表达量、胞外分泌量较小(图 4), 说明不同信号肽对目的蛋白的表达、胞外分泌影响不同。

2.4 不同信号肽对重组 CGTase 胞外分泌的影响

将携带不同质粒的 4 种重组菌进行发酵培养, 3 次平行实验测定胞内外分泌情况如图 5 所示。带

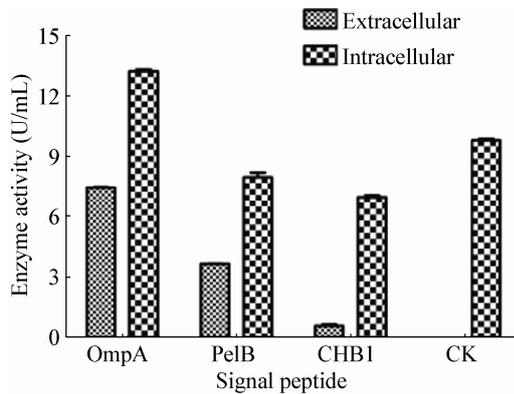


图 5 不同信号肽对重组大肠杆菌胞内外生产 CGTase 的影响

Figure 5 The influence of different signal peptide on the extracellular and intracellular CGTase production by *E. coli*

有 OmpA 信号肽的重组菌的胞外和胞内酶活均高于其他 3 个重组菌,在相同的发酵条件下发酵 72 h,胞外酶活达到 7.44 U/mL,分别是 PelB 信号肽和 CHB1 自身信号肽的 2.04 倍和 11.27 倍,而不带信号肽的重组菌胞外检测不到酶活。通过对图 4 和

图 5 的分析表明,OmpA 信号肽更利于重组 CGTase 的表达和胞外分泌。4 种重组菌的胞内酶活都比胞外高,因此在后续的研究中,如何提高细胞外膜的通透性以促进 CGTase 从胞内、周质空间向胞外释放及缩短发酵周期成为研究重点。

2.5 不同通透剂对重组 CGTase 胞外分泌的影响

以重组质粒 pEASY-E2-OmpA-cgt 作为研究对象,诱导时分别加入了甘氨酸、Triton X-100、SDS 和 Tween 80 四种化学通透剂,3 次平行实验测定比较这 4 种化学通透剂对重组 CGTase 胞外分泌的影响,结果如图 6 所示。从图 6 可知,甘氨酸、Triton X-100 均能促进重组 CGTase 的胞外分泌,随着甘氨酸、Triton X-100 添加量的依次增加,胞外酶活也依次增加,当甘氨酸和 Triton X-100 的添加量分别为 0.6%和 0.3%时,甘氨酸和 Triton X-100 导致大肠杆菌细胞膜透性的明显增加^[17],胞外酶活分别达到最大为 9.27 U/mL 和 9.75 U/mL,但添加量过大胞外酶活性反而下降。

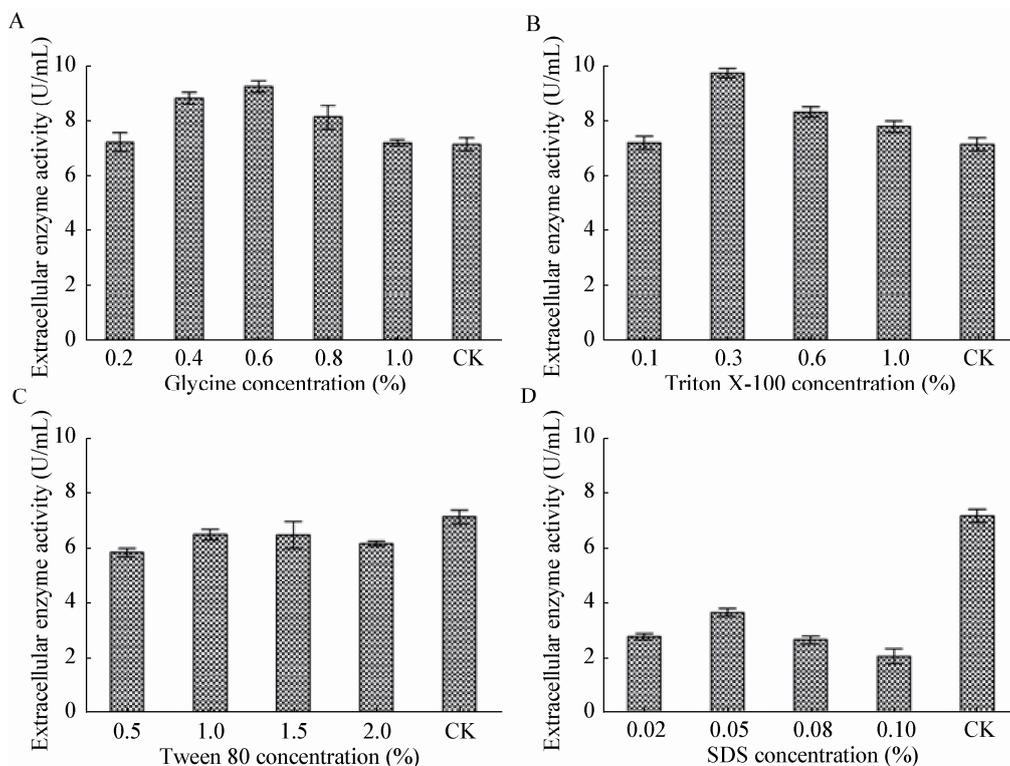


图 6 不同化学通透剂对重组 CGTase 胞外分泌的影响

Figure 6 The influence of different chemical additives on extracellular secretion of recombinant CGTase

如图 7 所示, 4 种化学通透剂对大肠杆菌细胞生长有不同程度的负面影响, 与对照组相比, 4 个实验组单位体积中的细胞总数有不同的下降, 这限制了重组酶胞外分泌量和生产强度的进一步增加。其中, SDS 和 Tween 80 对菌体生长的抑制作用比较明显, 发酵至 72 h, 添加 0.1% SDS 的菌体 OD_{600} 仅为 9.6, 添加 2% Tween 80 的菌体 OD_{600} 仅为 9.9, 而对照组为 18.7, 结果 Tween 80 和 SDS 的添加反而使胞外酶活低于空白对照; 甘氨酸和 Triton X-100 对菌体抑制作用较弱, 与对照相比, 添加 0.6% SDS 的菌体 OD_{600} 仅下降 11.7%, 但随着通透剂浓度增大, 对菌体生长的抑制作用也增大。因此, 在发酵过程中, 添加适当浓度的甘氨酸和 Triton X-100 能够提高重组酶的胞外产量。

2.6 不同时间添加通透剂对重组 CGTase 胞外分泌的影响

如图 6 所示, 随着甘氨酸量的增加, 胞外重组 CGTase 产量提高幅度下降。为了进一步提高重组 CGTase 的胞外分泌, 因此选择添加浓度为 0.6% 的甘氨酸

酸, 分别在发酵的不同时间点(15、24、36、48、72 h) 添加, 考察发酵上清液中重组 CGTase 的酶活情况。

如图 8 所示, 在不同诱导时间加入 0.6% 的甘氨酸, 对重组 CGTase 的胞外分泌产生不同影响, 过早或过晚添加甘氨酸都不利于菌体的生长和 CGTase 的胞外分泌。当重组菌诱导至 48 h 时, 菌体生长情况比较接近对照组, 添加甘氨酸促进重组 CGTase 胞外分泌的效果最好, 发酵至 96 h, OD_{600} 为 16.2, 胞外酶活最高可达 12.51 U/mL; 而发酵 72 h 添加甘氨酸, 菌体 OD_{600} 达到最大 17.3。其原因一方面可能是因为过早添加通透剂, 由于菌量较少, 并且通透剂对菌体生长具有抑制作用, 因此菌体生长受阻, 不利于重组蛋白的形成, 从而影响胞外表达; 太迟加入通透剂, 由于菌体生长已经进入衰亡期, 大量对目的蛋白具有降解作用的次级代谢产物已经形成, 通透剂裂解菌体细胞则加速目的蛋白的降解, 抑制胞外分泌。综合 OD_{600} 和胞外酶活情况, 甘氨酸的最佳添加浓度和时间为在发酵 48 h 后添加 0.6%。

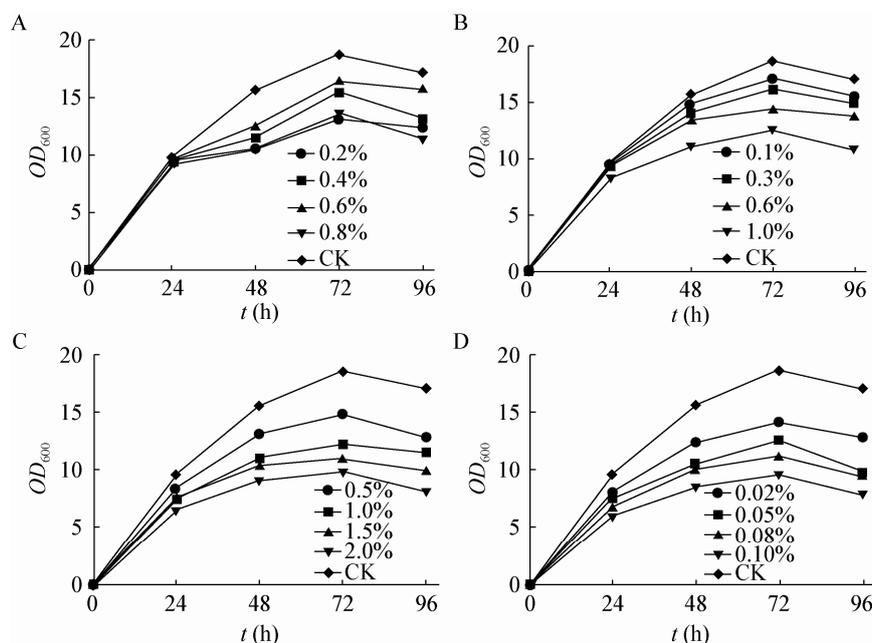


图 7 不同化学通透剂对重组大肠杆菌生长的影响

Figure 7 The influence of different chemical penetrators on growth of recombinant *E. coli*

Note: A: Glycine; B: Triton X-100; C: Tween 80; D: SDS.

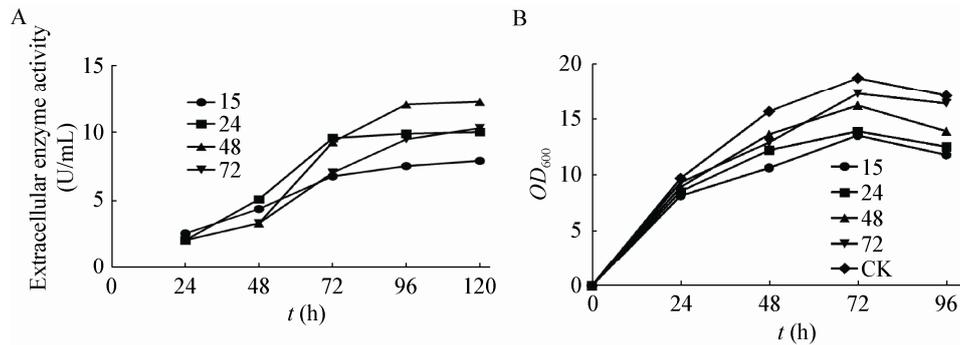


图8 不同时间添加甘氨酸对重组大肠杆菌发酵产CGTase的影响

Figure 8 The effects of different addition time of glycine on CGTase by recombinant *E. coli*

注: A: 胞外酶活性图; B: 重组大肠杆菌生长曲线图。

Note: A: CGTase activity; B: Growth curve of the strain.

2.7 甘氨酸和 Triton X-100 协同作用对胞外分泌的影响

甘氨酸和 Triton X-100 对重组蛋白的胞外分泌具有促进作用, 因此对于重组 CGTase 胞外分泌所需的甘氨酸和 Triton X-100 的添加浓度进行优化。根据单因素实验结果, 选择甘氨酸和 Triton X-100 作为正交实验的具体因素(表 2), 每个因素选择 4 个浓度水平, 以发酵 72 h 胞外酶活作为考察指标, 确定最优的添加浓度。

如表 3 所示, 根据极差分析结果, 发现甘氨酸和 Triton X-100 协同作用时, 0.6%的甘氨酸和 0.3% Triton X-100 对重组 CGTase 胞外分泌的促进效果最明显, 胞外酶活为 14.27 U/mL, 是不加任何化学通透剂对照组的 2 倍左右。

3 讨论

信号肽一般位于重组蛋白的 N 端, 其长度根据融合位置的不同有一定差异, 长度一般为 18–30 个

氨基酸。信号肽在一级结构上具有高度的可变性, 但均具有相同的功能域, 包括带正电荷的 N 端、疏水性的 H 区域和极性的 C 区域^[9]。本研究采用信号肽预测在线分析工具 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0> 分析三大信号肽的氨基酸序列

表 3 不同浓度的甘氨酸和 Triton X-100 正交实验设计

Table 3 Orthogonal array of design experiments of different glycine and Triton X-100 concentration

编号 Number	甘氨酸 Glycine (%)	Triton X-100 (%)	胞外酶活 Extracellular activity (U/mL)
1	1	1	9.36
2	1	2	9.12
3	1	3	10.04
4	1	4	8.33
5	2	1	9.19
6	2	2	9.28
7	2	3	10.55
8	2	4	8.92
9	3	1	10.37
10	3	2	14.27
11	3	3	12.55
12	3	4	11.50
13	4	1	8.23
14	4	2	8.92
15	4	3	9.37
16	4	4	8.10
R	12.07	4.74	

表 2 影响因素及水平分布

Table 2 Selected factors and assigned levels for glycine and Triton X-100 concentration

因素 Factor	甘氨酸 Glycine (%)	Triton X-100 (%)
1	0.2	0.1
2	0.4	0.3
3	0.6	0.6
4	0.8	1.0

与性质,见表4(黑体加粗部分是信号肽的N端序列,加下划线的是C区域,斜体部分是H区域)。根据 ExPasy Proteomics Server 在线分析软件 <http://web.expasy.org/protparam>,其信号肽特性如表5所示,由于OmpA信号肽是大肠杆菌外膜蛋白A的信号肽,与表达宿主的亲缘关系比PelB和CHB1自身信号肽近,而地芽孢杆菌CHB1自身信号肽对于促进CGTase的胞外表达效果相对较差,可能是由于地芽孢杆菌CHB1的信号肽不适合介导CGTase在大肠杆菌中分泌表达,H域疏水性也是决定信号肽分泌效果的重要因素,由于OmpA信号肽的H域疏水性大于其他两个信号肽,跨膜时形成的疏水作用较强,因此对目的蛋白的分泌效率较强。

Triton X-100作为一种非离子性表面活性剂,不易受强电解质的影响,并且能与生物膜中的脂类结合形成可溶性复合物,因此能改变生物膜的渗透性^[18],甘氨酸可与合成肽聚糖所必需的D-丙氨酸竞争,并取代它们,形成更加松弛交联的肽聚糖,从而破坏细胞壁肽聚糖的结构,导致大肠杆菌细胞膜透性的明显增加^[19]。甘氨酸和Triton X-100对于促进重组酶在大肠杆菌的胞外表达具有协同作用^[18],两种或多种化学通透剂同时使用可以使分泌效果

更佳。以带有OmpA信号肽的重组质粒pEASY-E2-OmpA-cgt作为研究对象,在单因素实验中,优化了甘氨酸和Triton X-100的最适添加浓度,分别为0.6%和0.3%,最适添加时间为48 h。正交实验结果表明甘氨酸和Triton X-100共同作用时的最适浓度分别为0.6%和0.3%,胞外酶活为14.27 U/mL,是不加任何化学通透剂组的2倍左右,是pEASY-E2-cgt重组菌的22.54倍。

综上所述,携带OmpA信号肽的重组质粒pEASY-E2-OmpA-cgt可以增加CGTase的可溶性表达及胞外分泌。在诱导表达时,加入适宜浓度的化学通透剂甘氨酸和Triton X-100能够有效促进CGTase的胞外分泌。

参考文献

- [1] Han RZ, Li JH, Shin HD, et al. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 415-428
- [2] Li ZF, Li B, Gu ZB, et al. Extracellular expression and biochemical characterization of α -cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*[J]. *Carbohydrate Research*, 2010, 345(7): 886-892
- [3] Leemhuis H, Kelly RM, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4): 823-835
- [4] Li ZF. Expression of α -Cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans* in *Escherichia coli* and analysis of its product specificity[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2009 (in Chinese)
李兆丰. 软化类芽孢杆菌 α -环糊精葡萄糖基转移酶在大肠杆菌中的表达及其产物特异性分析[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2009
- [5] Amiri A, Mohamad R, Rahim RA, et al. Cyclodextrin glycosyltransferase biosynthesis improvement by recombinant *Lactococcus lactis* NZ: NSP: CGT: medium formulation and culture condition optimization[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29(3): 555-563
- [6] Zhou WM, Yang SZ, Nazina TN, et al. Progress in *Geobacillus* study[J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(3): 46-49 (in Chinese)
周卫民, 杨世忠, Nazina TN, 等. *Geobacillus* 研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2005, 25(3): 46-49
- [7] Guo YH, Chen JC, Jia XB, et al. Effects of chaperone co-expression on heterologous solubility expression of thermophilic cyclodextrin glucosyltransferase[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(3): 518-526 (in Chinese)
郭永华, 陈济琛, 贾宪波, 等. 分子伴侣共表达对嗜热环糊精葡萄糖基转移酶异源可溶性表达的影响[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(3): 518-526
- [8] Xiao XH, Huang L, Huang N, et al. Cloning and expression analysis of *ScBAK1* gene and its alternative spliceosome in sugarcane[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(5): 872-881 (in Chinese)

表4 不同信号肽的氨基酸序列与性质

Table 4 The amino acid sequence of different signal peptides

信号肽	氨基酸序列
Signal peptide	The amino acid sequence
OmpA	MKKTAIAIAV <u>ALAGFATVAQA</u>
PelB	MKYLLPTAAAG <u>LLLLAAQPAMA</u>
CHB1	MKRWLSLIFS <u>MSLVFSAMFMS</u> <u>SDTQKVT</u> <u>VAAA</u>

表5 信号肽特性

Table 5 The properties of signal peptides

信号肽	氨基酸数目	H区疏水性	N端带电量
Signal peptide	The amino acid number	H hydrophobicity	N electrified capacity
OmpA	21	2.531	2
PelB	22	1.707	1
CHB1	32	1.067	3

- 肖新换, 黄珑, 黄宁, 等. 甘蔗 *ScBAKI* 基因及其可变剪接体的克隆与表达分析[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(5): 872-881
- [9] Mergulhão FJM, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(3): 177-202
- [10] Gelis I, Bonvin AMJJ, Keramisanou D, et al. Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR[J]. Cell, 2007, 131(4): 756-769
- [11] Low KO, Jonet MA, Ismail NF, et al. Optimization of a *Bacillus* sp. signal peptide for improved recombinant protein secretion and cell viability in *Escherichia coli*[J]. Bioengineered, 2012, 3(6): 334-338
- [12] Jonet MA, Mahadi NM, Murad AMA, et al. Optimization of a heterologous signal peptide by site-directed mutagenesis for improved secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2012, 22(1): 48-58
- [13] Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 41(1): 207-234
- [14] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322
- [15] Chen FJ, Xie T, Yue Y, et al. Molecular dynamic analysis of mutant Y195I α -cyclodextrin glycosyltransferase with switched product specificity from α -cyclodextrin to γ -cyclodextrin[J]. Journal of Molecular Modeling, 2015, 21(8): 208
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [17] Ding RR, Li ZF, Chen S, et al. Enhanced secretion of recombinant α -cyclodextrin glucosyltransferase from *E. coli* by medium additives[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(6): 880-886
- [18] Tang JB, Yang HM, Zhang YJ, et al. Effect of glycine and Triton X-100 on the secretion of ZZ-EGFP fusion protein[J]. Chinese Medicinal Biotechnology, 2007, 2(4): 266-269 (in Chinese)
唐金宝, 杨洪鸣, 张义军, 等. 甘氨酸和 Triton X-100 对 ZZ-EGFP 融合蛋白分泌表达影响的初步研究[J]. 中国医药生物技术, 2007, 2(4): 266-269
- [19] Hammes W, Schleifer KH, Kandler O. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan[J]. Journal of Bacteriology, 1973, 116(2): 1029-1053

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。