

国家自然科学基金 (No. 31401638) 资助。

enzymes/proteins N-terminus through a PT-linker, the crude enzymatic activities of polygalacturonate lyase and lipoxygenase were enhanced 3.1- and 1.89-fold, respectively, compared to the wild-type proteins. The relative fluorescence intensity of the green fluorescent protein was enhanced 16.22-fold. All the three S1vw fusions could be purified by nickel column with high purities and acceptable recovery rates. Moreover, S1vw also induced the thermostabilities enhancement of the fusions, with polygalacturonate lyase and lipoxygenase fusions exhibiting 2.16- and 3.2-fold increase compared with the corresponding wild-type, respectively. In addition, S1vw could enhance the production yield of green fluorescent protein in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* while the production of GFP and its S1vw fusion changed slightly in *Pichia pastoris*. These results indicated that S1vw could be used as a multifunctional tag to benefit the production, thermal stability and purification of the fusion protein in prokaryotic expression system.

Keywords: self-assembling amphipathic peptides, fusion enzymes, production yield, thermal stability, purification, expression host

微生物发酵已逐渐应用于多种酶蛋白的工业化生产过程中。目前, 如何获得高产量、高稳定性及高催化效率的多功能酶蛋白是酶催化工业应用的主要瓶颈问题^[1]。虽然通过基因工程和蛋白质工程等手段可以对酶蛋白本身进行改造, 利用合适的表达宿主或优化培养条件可使得微生物对酶进行高效异源表达, 但实际生产中还是经常面临着蛋白低可溶表达、稳定性差、催化效率低和难分离纯化等诸多问题^[2]。利用分子生物学技术可以将不同酶分子融合表达成为符合工业需求的多功能酶, 可应用于多功能催化体系的研究中并显示出重要的理论和应用研究价值^[3]。此外, 末端融合功能肽的方法对酶蛋白的表达量及催化性质的改造已取得广泛显著成果^[4-6]。在无需酶蛋白的晶体结构信息的条件下进行末端融合, 可有效促进其异源表达产量及相关酶学性质^[7]。

由亲疏水氨基酸按照一定规律分布组成的自组装双亲短肽 (Self-assembling amphipathic peptides, SAPs) 被 Lu 等首次应用于脂肪氧合酶 (Lipoxygenase, LOX, EC 1.13.11.12) 的热稳定性及催化效率改造^[5]。其中, 来源于酵母 Zution 蛋白中的 SAP (S1, AEAEAKAKAEAEAKAK) 对环糊精转移酶^[8]、胍水合酶^[9]、碱性淀粉酶^[10]及碱性果胶酶^[11]的蛋白表达量、热稳定性及催化效率均有一定促进作用。基于此, 具有与 S1 类似氨基酸组成和排布方式的 SAP (S1v1, AEAEAHAAEAEAAH) 被开发并应用在多个酶蛋白的异源表

达过程中, 其融合蛋白在大肠杆菌中的表达量、稳定性及催化效率均有所提高, 且 S1v1 内的组氨酸可用于融合酶的镍柱亲和层析, 其纯化效率较 His-tag 纯化效率明显提高^[12]。S1 与 S1v1 之间的 4 个氨基酸残基的差异, 说明氨基酸组成对 SAPs 融合酶表达量有着重要影响。此外, 氨基酸的突变会引入相应密码子的改变, 诸多研究证明密码子对异源基因转录和翻译过程有重要影响^[13-14]。故根据前期研究结论, 对 SAPs 合理的改造和修饰可以进一步提高其多功能应用效果。

本研究提出一条全新的多功能 SAP(S1vw, HNNANARARHNNANARARHNNANARARHNNARARAR), 其可促进重组融合蛋白表达和稳定性, 同时可作为一种用于镍柱亲和层析的多功能蛋白标签。并将其应用到碱性果胶酶 (Alkaline polygalacturonate lyase, PGL)、脂肪氧合酶 (Lipoxygenase, LOX) 及绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 中验证其作用效果。此外以 GFP 为模式蛋白, 研究 S1vw 在不同表达体系 (大肠杆菌、枯草芽孢杆菌及毕赤酵母) 中的促表达功效。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 作为质粒的克隆宿主。酶/蛋白表达宿主 *E. coli* BL21(DE3)、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* W600 及毕赤酵母

Pichia pastoris GS115 由本实验室保存。

含有 PGL 表达基因的质粒 pET-22b(+)/*pgl*、含有 LOX 表达基因的 pET-22b(+)/*lox* 质粒及含有 GFP 表达基因的 pET-22b(+)/*gfp* 质粒由本实验室前期构建并保存 (图 1A)^[12]。S1 的 PGL 融合酶 (PGL-S1) 表达质粒 pET-22b(+)/*pgl-S1* 及 S1v1 的 PGL 融合酶 (PGL-S1v1) 表达质粒 pET-22b(+)/*pgl-S1v1* 由本实验室保存。pPIC9K 质粒及 pP43NMK 质粒购于 TaKaRa (大连) 公司。

1.1.2 试剂

Prime STAR (HS) DNA 高保真聚合酶、DNA 片段回收试剂盒、质粒提取试剂盒、限制性内切酶及大肠杆菌感受态制备试剂盒均购于 TaKaRa (大连) 公司。异丙基-β-D 硫代半乳糖苷 (IPTG)、氨苄青霉素、卡那霉素及遗传霉素 G418 均购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。NuPAGE® Novex® Bis-Tris 预制凝胶及所用标准蛋白 marker 购自 Life Technologies 公司。一步克隆反应 ClonExpress™ II 试剂盒购于南京诺唯赞公司。DNA 片段合成、引物合成及测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。所用相关底物等均购于 Sigma 公司, 其他常规试剂均为国产或进口分

析纯。

1.2 方法

1.2.1 S1vw 融合酶突变体的构建

自组装双亲短肽 S1vw (HNANARARHNANA RARHNANARARHNARARAR) 连同 PT-linker (PTPPTTPTPPTTPTP) 的编码基因由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成并插入至 pET-22b(+)/*pgl*、pET-22b(+)/*lox*、pET-22b(+)/*gfp* 的 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点之间, 分别获得 PGL-S1vw、LOX-S1vw 和 GFP-S1vw 融合酶的表达质粒 pET-22b(+)/*pgl-S1vw*、pET-22b(+)/*lox-S1vw* 和 pET-22b(+)/*gfp-S1vw* (图 1B)。并将 pET-22b(+)/*gfp-S1vw* 质粒作为模板, 以表 1 中所列对应引物进行聚合酶链式反应 (PCR) 获得融合酶的表达基因片段, 并用一步克隆酶融合至线性化的质粒 pP43NMK 及 pPIC9K 中, 获得在枯草芽孢杆菌及毕赤酵母中的 pP43NMK/*gfp-S1vw* 和 pPIC9K/*gfp-S1vw* 表达质粒 (图 1B)。并用引物对 DS-pP43-F/DS-pP43-R 和 DS-9K-F/DS-9K-R 分别将 S1vw 和 PT-linker 表达基因从 pP43NMK/*gfp-S1vw* 和 pPIC9K/*gfp-S1vw* 中缺失, 获得在枯草芽孢杆菌及毕赤酵母中表达的野生型 GFP (图 1A)。

表 1 本文所用引物序列表

Table 1 Oligonucleotides used for mutagenesis

Primer name	Sequence (5'-3')	Use
<i>gfp</i> -pP43-F	AATGTACACCATAACGCGAACGCTCGA	<i>gfp</i> fragment used to insert into pP43NMK
<i>gfp</i> -pP43-R	CTTTCATCATTATTTGTATAGTTCATC	
<i>gfp</i> -9K-F	TACGTAGAATTCATGCACAACGCGAACG	<i>gfp</i> fragment used to insert into pP43NMK
<i>gfp</i> -9K-R	TGCGGCCGCAAGCTTTTATTTGTATAGTTCATC	
pP43-F	GTGTACATTCCCTCTCTTACCTATAATG	pP43NMK linearized
pP43-R	TGATGAAAGCTTGCGGTAATC	
9K-F	CATGAATTCTACGTAAGCTTCAGCCTCTC	pPICK linearized
9K-R	AAGCTTGCGGCCGCACTCGAG	
DS-pP43-F	GTGTACATTCCCTCTCTTACCTATAAT	S1vw deletion
DS-pP43-R	GGTAAGGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAG	
DS-9K-F	CATGAATTCTACGTAAGCTTCAGCCTCTCT	S1vw deletion
DS-9K-R	GGTAAGGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAG	

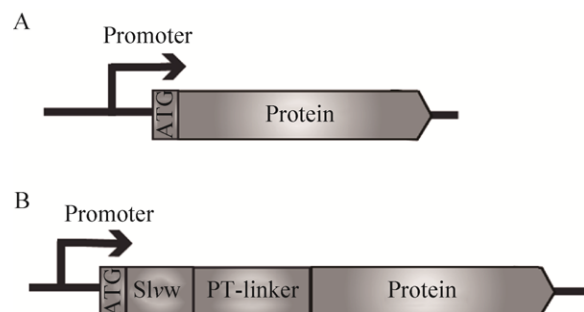


图1 重组质粒构建

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmids. (A) Wild-type enzyme/protein. (B) S1vw fusions.

1.2.2 大肠杆菌发酵培养条件

种子培养: 挑取单菌落接入种子培养基^[7]装液量为 25 mL 的三角瓶 (250 mL) 中, 培养温度 37 °C, 摇床转速 200 r/min, 培养 12 h。

发酵培养: 按 3% (V/V) 的接种量接入装液量为 25 mL 的三角瓶 (250 mL) 的发酵培养基中, 培养温度 37 °C, 当 OD_{600} 达到 0.6 时加入 IPTG 诱导, 并同时调整温度到该酶最适宜的诱导温度下培养。

培养条件: PGL: IPTG 0.04 mmol/L, 30 °C 下培养 48 h; LOX: IPTG 1 mmol/L, 20 °C 下培养 48 h; GFP: IPTG 0.05 mmol/L, 25 °C 下培养 24 h。

1.2.3 S1vw 的 GFP 融合酶在不同表达宿主中的培养条件

大肠杆菌培养参照文献[7]完成。枯草芽孢杆菌培养参照文献[15]完成。毕赤酵母菌培养参照文献[16]完成。

1.2.4 酶活及荧光检测方法

碱性果胶酶 (PGL)^[17]的酶活测定方法参照前期研究。

由于脂肪氧合酶 (LOX) 为胞内表达, 故取一定的菌体, 用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 清洗 2 次, 用相同体积的缓冲液悬浮 (使得 $OD_{600}=5$), 破壁后, 离心取上清液, 按照前期研

究方法测定 LOX 酶活^[18]。

绿色荧光蛋白 (GFP) 检测方法: 在避光条件下将荧光样品进行一定的稀释, 采用多功能酶标仪 (BioTek, Winooski, VT, USA) 进行荧光强度检测, 缓冲液 A (20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.5) 作为空白对照。

1.2.5 酶/蛋白的分离纯化

A 液: 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑。

B 液: 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑。

20 mmol/L 的 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液配制方法: 190 mL 20 mmol/L NaH_2PO_4 与 810 mL 20 mmol/L Na_2HPO_4 均匀混合。

野生型 PGL 和 PGL-S1^[17]、野生型 LOX^[18]的纯化分别参照前期研究方法进行操作。野生型 GFP 采用盐析方法进行初步富集和阴离子亲和层析进行纯化, 操作过程参照前期报道^[19]。

PGL-S1vw、PGL-S1v1、LOX-S1vw 及 GFP-S1vw 融合酶采用镍柱亲和层析。含有目的蛋白的胞外发酵液或胞内上清液经过 0.22 μm 滤膜过滤后作为待纯化样品。用缓冲液 A 以 1 mL/min 的流速平衡 HisTrap 5 mL FF 纯化柱。将含有重组融合酶样品以 1 mL/min 流速上样, 并用缓冲液 A 洗脱未结合蛋白, 平衡纯化柱。将结合在镍柱上的蛋白分别用 8% 的缓冲液 B、60% 的缓冲液 B 及 100% 的缓冲液 B 进行梯度洗脱并收集含有目的蛋白的组分。

所获得的目的蛋白溶液使用 5 mL HiTrap Desalting 纯化柱用缓冲液 A 以 5 mL/min 的流速进行脱盐处理, 所得蛋白样品于 4 °C 保存。

1.2.6 蛋白电泳分析及蛋白浓度测定

SDS-PAGE 分析, 使用 Life Technologies 公司预制胶 NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris, 操作步骤详见说明书。以 0.1% (W/V) 考马斯亮蓝 R-250 进行染色。

采用 Bradford 方法测定蛋白质浓度,以牛血清蛋白作为标准蛋白测定蛋白浓度标准曲线。具体操作参照试剂盒说明书。

1.2.7 酶的热稳定性测定方法

重组 PGL 及其突变体的热稳定性以 60 °C 下的半衰期 ($t_{1/2}$, min) 来表示。将纯化并除盐后的 PGL 用缓冲液 A 稀释至一定浓度,在 60 °C 下保温,每隔 3 min 测定残余酶活。

脂肪氧合酶热稳定性测定方法:将纯化后的酶用缓冲液 A 稀释到蛋白浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 并在 50 °C 保温,间隔测定残余酶活,计算 $t_{1/2}$ 。 $t_{1/2}$ 按照文献所述方式进行拟合计算^[20]。

2 结果与分析

2.1 多功能肽 S1vw 序列的设计

S1 类 SAPs 融合在酶蛋白 N 端时具有促进融合酶表达和稳定化的功能^[12]。前期研究结果表明^[21],蛋白质翻译过程中,新生肽链 N 端的正电荷氨基酸残基能与带负电的核糖体相结合,从而减缓蛋白质翻译速率,促进蛋白质表达产量。为强化 S1 类 SAPs 的促表达功能,提出 S1vw 短肽,在其中引入不带电的天冬酰胺残基 (N) 和带正电荷的精氨酸残基 (R),使其整体呈现净电荷为正。常用的组氨酸标签 His-tag (HHHHHH) 含有 6 个组氨酸,关于 S1v1 的研究结果显示^[12],4 个组氨酸残基即可实现良好的纯化效果,且组氨酸残基在蛋白质分子中均匀分布,可防止其被包埋^[22]。故在 S1vw 内部均匀插入 4 个组氨酸 (H),最终确定 S1vw 的氨基酸序列为 HNANARARHNANARA RHNANARARHNARARAR,以期融合在酶蛋白 N 端时,既可促进融合酶的表达量和稳定性,又可作为镍柱纯化的多功能蛋白标签。

2.2 S1vw 融合酶表达质粒的构建

S1vw (HNANARARHNANARARHNANARA

RHNARARAR) 是根据 S1 及 S1v1 序列优化而来。为研究其对不同酶蛋白的表达量、稳定性等的影响,本研究构建 PGL、LOX 及 GFP 的 S1vw 融合酶突变体 (图 1),在大肠杆菌中进行异源表达。并将 GFP-S1vw 在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌及毕赤酵母中进行表达,比较其表达量差异。研究 S1vw 针对不同酶/蛋白和 S1vw 在不同表达系统的普适性应用效果。

2.3 S1vw 对不同酶/蛋白表达量的影响

在大肠杆菌表达系统中,PGL 胞外表达,而 LOX 和 GFP 胞内表达。分别测定 PGL 的胞外酶活、LOX 的胞内酶活和 GFP 表达菌的全细胞荧光强度。结果如图 2 所示,分别在 3 种酶/蛋白的 N 端融合 S1vw 后,融合酶/蛋白的表达量明显提高。PGL 的融合酶 (PGL-S1vw) 的胞外酶活提高至原野生型 PGL 的 3.1 倍,与 PGL-S1 和 PGL-S1v1 相比,分别提高了 1.2 倍和 0.95 倍,说明相较于 S1 和 S1v1, S1vw 促表达效果更佳。LOX 的融合酶 (LOX-S1vw) 的胞内酶活较野生型提高了 1.89 倍。在相同处理条件下,GFP-S1vw 的荧光强度 (荧光强度/菌浓 OD_{600}) 是 GFP 的 16.22 倍。SDS-PAGE 分析也表明融合 SAPs 后条带变粗,且蛋白分子量也发生一定变化,说明 N 端融合 S1vw 后,酶/蛋白表达量显著提高。

2.4 S1vw 对不同酶蛋白纯化效率的影响

野生型 PGL、LOX 及 GFP 不能直接用镍柱亲和和层析进行纯化,由于野生型表达过程中蛋白含量较低,往往需要进行一步硫酸铵或乙醇富集的工序,导致整个过程中蛋白质回收率较低。表 2 详细比较了野生型 PGL、LOX 及 GFP 与所对应的 S1vw 融合酶在不同纯化条件下的回收率。结果显示,在经过任何预处理的条件下, S1vw 的 3 种融合酶的回收率分别达到 55.43%、34.22% 和 64.35%。而所对应的野生型 PGL、LOX 及 GFP,

在相同条件下几乎不能被有效纯化, 经过硫酸铵和乙醇沉淀富集后用对应的方法进行纯化^[17-19], 回收率分别为 20.45%、26.22% 和 36.54%。

此外, 前期研究表明 S1v1 短肽也具有纯化功能^[12], 如表 2 所示, 相同条件下 PGL-S1v1 与 PGL-S1vw 的回收率相近, 说明 S1vw 保持了 S1v1 的纯化功能。纯化后蛋白电泳分析如图 3 所示。且需要说明的是, 前期研究已经证明 PGL 和 LOX 的 His-tag 融合酶在相同条件下不能用镍柱纯化, GFP 的 His-tag 融合酶在与 GFP-S1vw 相同的纯化条件下回收率仅有 8%^[12]。

2.5 S1vw 对不同酶蛋白稳定性的影响

为比较 S1vw 对不同酶的稳定性及催化活性的影响, 测定纯化后的野生型 PGL、LOX 及融合酶的比酶活及半衰期。结果显示(图 4 和图 5), PGL-S1vw 在 60 °C 下的半衰期由 5.2 min 提高至 16.43 min, 比酶活 279.14 U/mg 提高至 758.9 U/mg。LOX-S1vw 在 50 °C 下半衰期由 9.4 min 提高至 29.78 min, 比酶活由 32.5 U/mg 提高至 82.3 U/mg。此外, 与 PGL-S1 和 PGL-S1v1 相比^[12], S1vw 进一步促进了 PGL 的热稳定性和催化活性(图 4)。

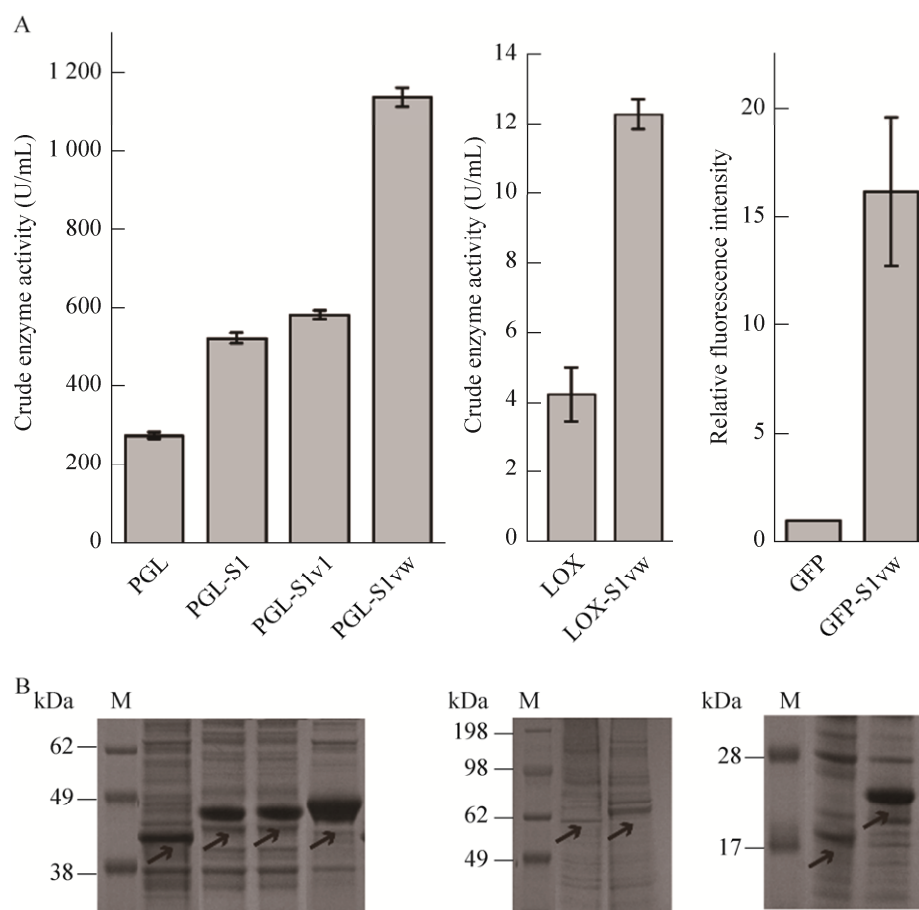


图 2 酶/蛋白及其对应的 SAPs 融合酶表达量分析

Fig. 2 The production yield analysis of the PGL, LOX and the corresponding fusion. M: molecular weight standard of protein. (A) The crude enzymatic activities of PGL, LOX and the corresponding fusion. (B) SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins.

表 2 酶/蛋白纯化收率表

Table 2 Purification yield of the recombinant enzymes/proteins

Enzymes	Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
PGL	Crude enzyme	60.26	3 325.32	55.24	100.00
	Ammonium sulfate precipitation	6.35	2 573.51	405.26	77.43
	Cation exchange chromatography	1.24	526.17	424.33	20.45
LOX	Crude enzyme	73.40	3 908.74	53.25	100.00
	Ethanol precipitation	6.78	3 126.40	461.12	80.29
	Anion exchange chromatography	2.33	812.76	348.82	26.22
GFP	Crude enzyme	38.60	20.64	1.87	100.00
	Ammonium sulfate precipitation	2.97	13.63	4.58	66.45
	Anion exchange chromatography	0.97	4.96	5.12	36.54
PGL-S1v1	Crude enzyme	58.47	4 212.47	72.04	100.00
	Nickel affinity chromatography	2.76	2 190.34	792.36	52.26
PGL-S1vw	Crude enzyme	60.32	4 474.58	74.18	100.00
	Nickel affinity chromatography	3.26	2 416.23	800.24	55.43
LOX-S1vw	Crude enzyme	36.94	65.75	1.78	100.00
	Nickel affinity chromatography	4.25	22.34	5.32	34.22
GFP-S1vw	Crude enzyme	26.77	57.20	2.14	100.00
	Nickel affinity chromatography	3.84	36.78	8.92	64.35

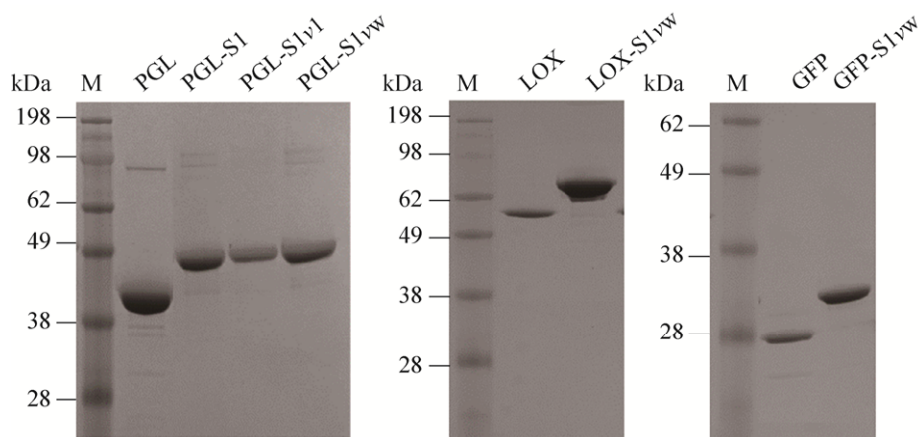


图 3 酶/蛋白纯化后的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified enzymes/proteins. M: molecular weight standard of protein.

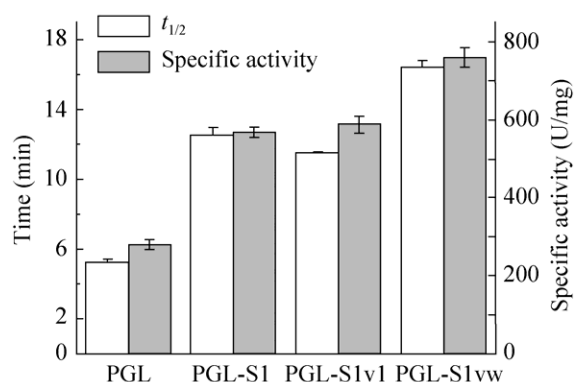


图4 PGL 及其 SAPs 融合酶的半衰期与比酶活测定
Fig. 4 The thermal stabilities and specific activities analysis of PGL and its SAPs fusions.

2.6 S1vw 在不同表达宿主中对融合酶表达量的影响

由于不同表达系统中异源蛋白的表达机制存在差异,故本研究以 GFP 为模式蛋白,比较 S1vw 在不同宿主中(大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和毕赤酵母)对 GFP 的表达量的影响。如图 6 所示,在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中,融合 S1vw 后荧光强度显著提高,但在毕赤酵母表达系统中, GFP 和 GFP-S1vw 的荧光强度相近,说明 S1vw 在原核表达体系中对融合酶的表达量有促进作用,但对真核表达系统酶/蛋白异源表达的产量没有明显影响。

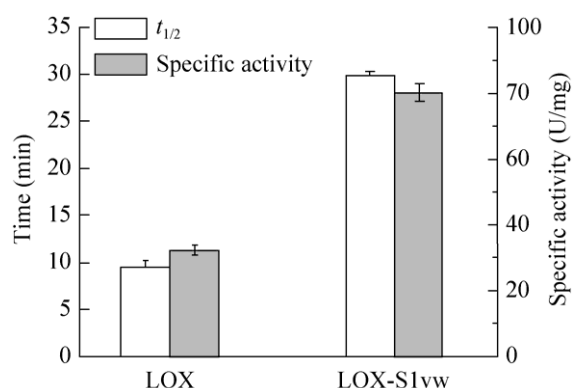


图5 LOX 及其 SAPs 融合酶的半衰期与比酶活测定
Fig. 5 The thermal stabilities and specific activities analysis of LOX and LOX-S1vw.

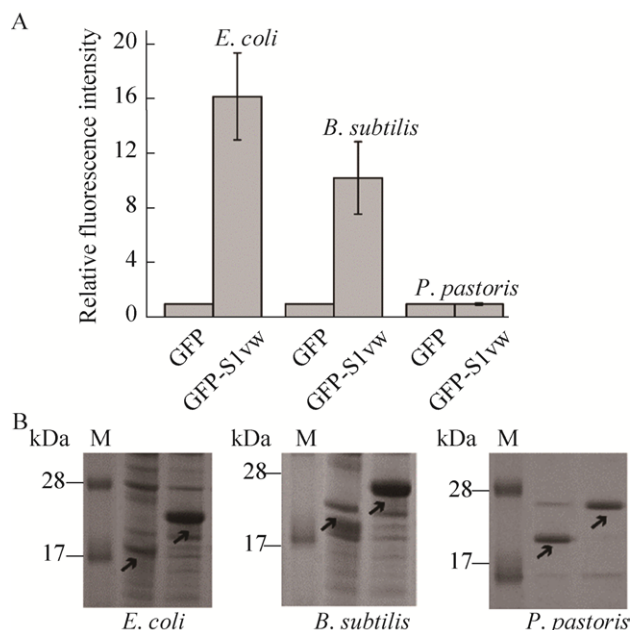


图6 GFP 和 GFP-S1vw 在不同表达宿主中的表达量
Fig. 6 The production yield of GFP and GFP-S1vw in different expression hosts. M: molecular weight standard of protein. (A) The relative fluorescence intensity of GFP and GFP-S1vw in different expression system. (B) SDS-PAGE analysis of the recombinant proteins.

3 讨论

酶的高表达、高稳定性、高效纯化工工艺和循环利用技术是目前酶工程领域的主要研究方向。融合功能标签技术作为一种便捷、高效的酶蛋白改造策略也已经在该领域取得一定实效成果^[23]。本研究在 SAPs 的前期研究的基础上^[7, 12, 24],提出一种可促进在原核表达宿主中酶蛋白表达产量、提高融合酶稳定性并可用于镍柱纯化的多功能标签 S1vw。分别将 S1vw 以 PT-linker 融合在 PGL、LOX 和 GFP 的 N 端,在大肠杆菌中培养发酵,与对应的野生型相比,粗酶活或荧光强度分别提高了 3.1、1.89 和 16.22 倍,且用镍柱进行亲和层析纯化达到了可观的回收率。PGL 和 LOX 的融合酶在对应热处理条件下的半衰期分别提高了 2.16 倍和 3.2 倍。将 GFP-S1vw 在枯草芽孢杆菌及毕赤酵母表达系统中表达,发现在枯草芽孢杆

菌中融合酶表达量提高明显,但在毕赤酵母中表达量几乎没有改变。说明在原核表达体系中 S1vw 可作为一种新型的促表达、稳定化和纯化的多功能标签。

S1 类 SAPs 融合在酶蛋白 N 端时具有促进融合酶表达和稳定化的功能。为优化 S1 类 SAPs 的促表达特性,在 S1vw 中引入不带电的天冬酰胺残基和带正电荷的精氨酸残基,并插入正电荷的组氨酸以便用于镍柱纯化,结果表明,优化之后的 S1vw 促表达效果更加明显,这很有可能是 S1vw 整体呈现净电荷为正的结果。但由于真核原核表达系统的差异,S1vw 在真核毕赤酵母中没有促表达的功能,这也为后续 SAPs 的促表达研究提供一定的研究方向。

尽管 S1vw 整体带电情况发生改变,但其亲疏水性交替分布的形式仍然与 S1 和 S1v1 类似,并且保持了 S1 类 SAPs 的稳定化效果。SAPs 内的疏水氨基酸残基对其融合酶形态至关重要,强疏水性的 SAPs 可直接导致活性包涵体的产生^[24]。相比于 S1 和 S1v1, S1vw 引入更多的疏水丙氨酸残基,故其稳定化功效进一步提高。

生物活性酶在工业生产中具有广泛的应用,酶的分离纯化是工业酶成本计算的重点考量指标之一。在所有酶的分离纯化方法中^[25],亲和层析是相对简单和节约成本的方法,其中最常用的就是组氨酸标签亲和层析方法。在 S1vw 中引入 4 个组氨酸,且均匀分布在 S1vw 中,可提高组氨酸残基与镍柱的结合效率。此外, S1vw 融合酶的热稳定性较高,其在纯化过程中活性损失较小,有利于提高目的蛋白的回收率^[26]。

多功能标签的融合可以在融合单一蛋白或短肽的同时实现多个酶/蛋白质性质的优化,另一个明显的优势是可以减少由外来融合标签带来的空间组织(结构域)之间的相互影响,保持酶/蛋白原有催化或功能特性。因此,基于 SAPs 的多功能肽

的开发将为酶或功能蛋白的改造研究提供新的技术手段和研究方向。

REFERENCES

- [1] Yu K, Liu CC, Kim BG, et al. Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(1): 155–164.
- [2] Kaur J, Kumar A, Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements. *Int J Biol Macromol*, 2018, 106: 803–822.
- [3] Zhang Q, Wu XY, Jiang XK, et al. Trend of hybrid enzyme design in the big data era. *Chin J Biotech*, 2018, 34(7): 1033–1045 (in Chinese).
张群, 吴秀芸, 蒋绪恺, 等. 大数据时代杂合酶的设计及其新趋势. *生物工程学报*, 2018, 34(7): 1033–1045.
- [4] Takano K, Okamoto T, Okada J, et al. Stabilization by fusion to the C-terminus of hyperthermophile *Sulfolobus tokodaii* RNase HI: a possibility of protein stabilization tag. *PLoS ONE*, 2011, 6(1): e16226.
- [5] Lu XY, Liu S, Zhang DX, et al. Enhanced thermal stability and specific activity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxigenase by fusing with self-assembling amphipathic peptides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(21): 9419–9427.
- [6] Zhao Q, Xu WH, Xing L, et al. Recombinant production of medium-to large-sized peptides in *Escherichia coli* using a cleavable self-aggregating tag. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 136.
- [7] Zhao WX, Liu S, Liu LM, et al. Analysis of the factors influencing the expression of enzymes fused with self-assembling amphipathic peptides. *Food Ferment Ind*, 2017, 43(12): 1–6 (in Chinese).
赵伟欣, 刘松, 刘立明, 等. 自组装双亲短肽氨基酸组成及连接肽对其融合酶表达量的影响. *食品与发酵工业*, 2017, 43(12): 1–6.
- [8] Han RZ, Li JH, Shin HD, et al. Fusion of self-assembling amphipathic oligopeptides with cyclodextrin glycosyltransferase improves 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid synthesis with soluble starch as the glycosyl donor. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(15): 4717–4724.

- [9] Liu Y, Cui WJ, Liu ZM, et al. Enhancement of thermo-stability and product tolerance of *Pseudomonas putida* nitrile hydratase by fusing with self-assembling peptide. *J Biosci Bioeng*, 2014, 118(3): 249–252.
- [10] Yang HQ, Lu XY, Liu L, et al. Fusion of an oligopeptide to the N terminus of an alkaline α -amylase from *Alkalimonas amylolytica* simultaneously improves the enzyme's catalytic efficiency, thermal stability, and resistance to oxidation. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(9): 3049–3058.
- [11] Liu S, Wang MX, Du GC, et al. Improvement of thermal stability of alkaline polygalacturonate lyase by fusing with self-assembling amphipathic peptides. *Food Ferment Ind*, 2015, 41(11): 1–6 (in Chinese).
刘松, 汪明星, 堵国成, 等. 融合自组装双亲短肽提高碱性果胶酶热稳定性. *食品与发酵工业*, 2015, 41(11): 1–6.
- [12] Zhao WX, Liu LM, Du GC, et al. A multifunctional tag with the ability to benefit the expression, purification, thermostability and activity of recombinant proteins. *J Biotechnol*, 2018, 283: 1–10.
- [13] Goodman DB, Church GM, Kosuri S. Causes and effects of N-Terminal codon bias in bacterial genes. *Science*, 2013, 342(6157): 475–479.
- [14] Zhong C, Wei P, Zhang YHP. Enhancing functional expression of codon-optimized heterologous enzymes in *Escherichia coli* BL21(DE3) by selective introduction of synonymous rare codons. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(5): 1054–1064.
- [15] Chen X. Study on the expression and fermentation optimization of L-asparaginase in *Bacillus subtilis* WB600[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015 (in Chinese).
陈璇. L-天冬酰胺酶在 *Bacillus subtilis* WB600 中的表达与发酵过程优化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [16] Ren CH, Zhang J, Du GC, et al. Enhancing thermal stability of glucose oxidase by fusing amphiphilic short peptide. *Chin J Biotech*, 2018, 34(7): 1106–1116 (in Chinese).
任春慧, 张娟, 堵国成, 等. 基于融合双亲短肽提高葡萄糖氧化酶的热稳定性. *生物工程学报*, 2018, 34(7): 1106–1116.
- [17] Wang MX, Liu S, Liu L, et al. Fusions of amphipathic peptide to the alkaline polygalacturonate lyase from *Bacillus* sp. WSHB04-02 improves the production. *J Food Sci Biotechnol*, 2016, 35(5): 504–509 (in Chinese).
汪明星, 刘松, 刘龙, 等. 融合短肽促进碱性果胶酶的高效表达. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(5): 504–509.
- [18] Qiu FF. Study on the high-level expression and thermal stability of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017 (in Chinese).
邱芳芳. 重组脂肪氧合酶的高效表达和热稳定性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [19] Lu XY, Zhang J, Liu S, et al. Overproduction, purification, and characterization of extracellular lipoxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(13): 5793–5800.
- [20] O'Fágáin C. Enzyme stabilization-recent experimental progress. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 33(2/3): 137–149.
- [21] Charneski CA, Hurst LD. Positively charged residues are the major determinants of ribosomal velocity. *PLoS Biol*, 2013, 11(3): e1001508.
- [22] Mei YZ, Chen YR, Zhai RY, et al. Cloning, purification and biochemical properties of a thermostable pectinase from *Bacillus halodurans* M29. *J Mol Catal B: Enzymat*, 2013, 94: 77–81.
- [23] Kosobokova EN, Skrypnik KA, Kosorukov VS. Overview of fusion tags for recombinant proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, 81(3): 187–200.
- [24] Lin ZL, Zhou BH, Wu W, et al. Self-assembling amphipathic alpha-helical peptides induce the formation of active protein aggregates *in vivo*. *Faraday Dis*, 2013, 166: 243–256.
- [25] Becker K, Van Alstine J, Bülow L. Multipurpose peptide tags for protein isolation. *J Chromatogr A*, 2008, 1202(1): 40–46.
- [26] Farchaus JW, Ribot WJ, Jendrek S, et al. Fermentation, purification, and characterization of protective antigen from a recombinant, avirulent strain of *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(3): 982–991.

(本文责编 陈宏宇)