

重组蛋白融合信号肽在大肠杆菌周质空间表达的研究进展

王寅竹¹, 孙涛¹, 吴昊^{1,2}, 马江锋^{*1,2}

1 南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816

2 南京工业大学江苏先进生物与化学制造协同创新中心, 江苏 南京 211816

王寅竹, 孙涛, 吴昊, 马江锋. 重组蛋白融合信号肽在大肠杆菌周质空间表达的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 794-806

Wang Yinzhu, Sun Tao, Wu Hao, Ma Jiangfeng. Advances in expression of recombinant protein fusion signal peptide in *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 794-806

摘要: 重组蛋白在大肠杆菌中表达时, 往往面临着形成包涵体的问题, 而重组蛋白若是分泌至周质空间则基本解决了这一问题, 周质空间的周质蛋白不仅能帮助重组蛋白正确折叠还有利于二硫键的生成。信号肽是一段由 15–30 个氨基酸组成, 被融合在重组蛋白 N 端的短肽, 按照结构、功能的不同可以划分为 N 区、H 区和 C 区, 具有引导重组蛋白转运至细胞周质空间的作用。本文综述了信号肽的结构组成、作用机理和基本分泌途径, 讨论了信号肽的高效转运和筛选方法, 总结了在大肠杆菌中重组蛋白融合信号肽实现周质表达的新进展, 并对未来高效信号肽选择方面的研究进行了探讨。

关键词: 信号肽; 大肠杆菌; 周质空间; 分泌表达

基金项目: 国家自然科学基金(22178175); 江苏省生物质能源与材料重点实验室开放基金(JSBEM2016010)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (22178175); Open Fund of Biomass Energy and Materials Laboratory of Jiangsu Province (JSBEM2016010)

*Corresponding author: E-mail: majiangfeng@njtech.edu.cn

Received: 2021-03-31; Accepted: 2021-08-04; Published online: 2021-10-08

Advances in expression of recombinant protein fusion signal peptide in *Escherichia coli*

WANG Yin Zhu¹, SUN Tao¹, WU Hao^{1,2}, MA Jiangfeng^{*1,2}

1 State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

2 Jiangsu National Synergetic Innovation Center for Advanced Materials (SICAM), Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

Abstract: A signal peptide is a short peptide fused in the recombinant protein N-terminus, generally composed of 15–30 amino acids, guiding the transport of recombinant protein to the periplasmic space of the cell. It is divided into N region, H region and C according to the structure and function. Recombined protein expression in *Escherichia coli*, often faces with the problem of forming an inclusion body. If the recombined protein is secreted into the periplasmic space, the periplasmic protein can not only help the recombination protein fold into to correct structure but also facilitate the production of disulfide bonds. This paper summarizes the structure composition, action structure and basic secretion pathways of signal peptides; discusses the efficient transport and screening methods of signal peptides. This paper also summarizes the new progress of recombination protein fusion signal peptides in *E. coli* to achieve perennial expression, and visions the screening techniques of signal peptides in the future.

Keywords: signal peptide; *Escherichia coli*; periplasmic space; secretory expression

大肠杆菌是目前使用最为成熟的工程菌, 其具有清晰的遗传背景, 以及短周期、易培养、低成本的生长特点和高产量、易纯化的生产特点^[1-2], 因此在医药、食品和工业领域都广泛采用大肠杆菌生产重组蛋白。虽然大肠杆菌有诸多优点, 但是缺少真核细胞翻译后加工的能力^[3], 其分泌的重组蛋白往往易形成包涵体, 甚至被胞内存在的蛋白酶水解, 成为大肠杆菌在工业化生产过程中亟须解决的问题^[4-7]。

在大肠杆菌的周质空间中包含有大量的二硫键氧化还原酶和肽脯氨酰异构酶, 能帮助蛋白质正确折叠, 其中的氧化环境利于蛋白质二硫键的形成^[8], 而且, 与细胞质空间相比周质空间中蛋白的含量少、蛋白酶活性低, 既有利于重组蛋白的纯化收集, 又能避免在胞内降

解, 因此大肠杆菌的周质空间成为重组蛋白分泌的理想部位之一^[3]。

信号肽(signal peptide, SP)是一段位于新生蛋白 N 端, 能够引导蛋白转移到周质空间的短肽链^[9]。在大肠杆菌中存在一般分泌途径(general secretory pathway, Sec)、信号识别颗粒(signal-recognition particle, Srp)途径和双精氨酸转运(twin-arginine translocation, Tat)途径, 这 3 种转运途径分别有不同的转运元件、转运机制和信号肽, 信号肽通过与转运元件结合^[7], 再通过不同的转运方式将重组蛋白转运至周质空间。本文主要阐述了大肠杆菌周质分泌的途径, 介绍了信号肽的结构和功能, 讨论了信号肽的选择和修饰方法, 同时对未来如何更加高效地选择合适的信号肽提出了见解。

1 大肠杆菌周质分泌的途径

在大肠杆菌的生命活动过程中, 超过 1/3 的蛋白质会在细胞质核糖体上合成^[10], 而后被运输到周质空间和细胞外, 从而完成相应的生物功能。大肠杆菌中的蛋白质先转运至周质空间再分泌到胞外的过程称为两步分泌, 而 Sec、Tat 和 Srp 则是重组蛋白进行周质转运的主要途径^[7]。这 3 种途径在转运方式、元件组成及用途上都存在极大差异^[7], 3 种转运途径的机制如图 1 所示^[11]。信号肽是一段由 15–30 个氨基酸组成的短肽^[12], 位于新生蛋白质的 N 端, 在蛋白质转运过程中介导蛋白质与相应转运途径的识别元件结合, Sec、Srp 和 Tat 这 3 个途径的信号肽在结构和组成上有微小差异, 但均能分为 N 区、H 区和 C 区这 3 个部分^[13–14]。

1.1 大肠杆菌 Sec 转运途径及其信号肽

Sec 是大肠杆菌使用最广泛的一种蛋白转运途径, 大肠杆菌中的胞外蛋白约有 90% 通过 Sec 途径转运^[10,15]。Sec 的转运方式是翻译后转运的形式, 多肽链完成翻译后缓慢折叠甚至不折叠, 在保持展开的状态下通过相关的转运蛋白穿过细胞质膜^[16]。Sec 途径的转运蛋白包括 SecA、SecB、SecD、SecF、SecY、SecE、SecG^[7], 另外还有触发因子辅助转运^[10], 整个转运过程如图 1 所示, 可以分为介导、转运和释放折叠 3 个步骤。转运蛋白 SecA 对新生信号肽进行识别并结合后开始向跨膜通道介导, 介导的过程中游离在细胞质中的 SecB 与新生肽链结合, SecB 和分子伴侣有相似的功能, 其与新生肽链的成熟结构域结合后可以帮助肽链维持展开状态和水溶状态^[7,16]。SecY、SecE 和 SecG 组成 SecYEG 跨膜通道嵌入在细胞质膜中, 前体蛋白在展开的状态下穿过 SecYEG 跨膜通道抵达周质空间^[11]。目前 SecD 与 SecF 组成的复合

体 SecDF 工作原理尚未研究清楚, 但研究人员发现 SecDF 与 SecYEG 结合提高了重组蛋白的转运速率, 认为 SecDF 提高了质子泵的效率从而提高了转运效率^[17–18]。通过 ATP 水解提供的能量, 质子泵推动重组蛋白进行跨膜转运, 跨膜运动完成后信号肽酶(signal peptidase, SPase)分解信号肽, 前体蛋白完成折叠, 成为成熟的蛋白质^[7]。

大肠杆菌 Sec 信号肽的 N 区通常由 3–5 个带正电的氨基酸组成, 负责与 SecB 的磷酸骨架结合^[19]; H 区由 7–15 个疏水性氨基酸组成, H 区可以通过疏水作用与 SecA 结合^[20]; C 区含有信号肽酶识别位点^[19], 重组蛋白分泌到周质空间后信号肽部分被 SPase 识别, C 区中的识别位点能够提高识别效率, 信号肽被切割下来后, 重组蛋白再进行折叠形成天然构象。

1.2 大肠杆菌 Srp 转运途径及其信号肽

Srp 转运途径与 Sec 转运途径共享 SecYEG 转运蛋白构成的转运通道^[21], 而且信号肽的氨基酸构成也类似, 因此将其合并到 Sec 途径, 但 Srp 的转运方式与 Sec 不同, 如图 1 所示。Srp 途径的转运元件包括信号识别颗粒(signal-recognition particle, SRP)、SRP 膜受体 FtsY 受体及 SecYEG 复合体^[16], 当含有 Srp 信号肽的新生肽链出现在核糖体的出口时, 便被处在通道附近的 SRP 及 FtsY 识别并结合, 形成核糖体-新生链-SRP 复合体, 再引导至 SecYEG 跨膜通道处完成转运, 因此蛋白质的翻译和转运同时进行, 这种转运方式被称为共翻译转运方式^[10]。大肠杆菌的 SRP 是由 4.5S RNA 和 Ffh 蛋白构成的核糖核蛋白。

1.3 大肠杆菌 Tat 转运途径及其信号肽

对于 Tat 转运途径而言, 其转运方式与 Sec 不同, 如图 1 所示, 当蛋白质在细胞质完成折叠之后才会开始转运工作, 即翻译后转运^[22]。

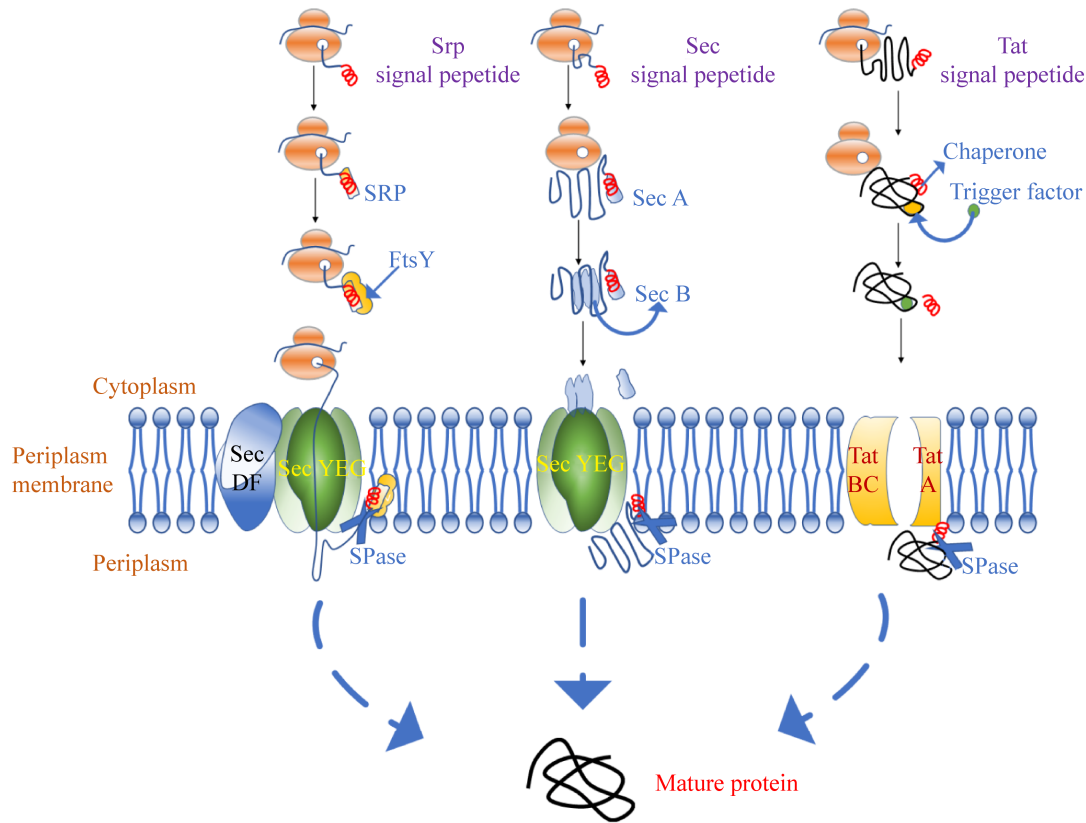


图 1 大肠杆菌 Srp、Sec 和 Tat 分泌途径^[11]

Figure 1 Secretion pathways of Srp, Sec and Tat in *Escherichia coli*^[11].

Tat 虽然不像 Sec 一样是大肠杆菌输出蛋白的主要途径, 但其却是大肠杆菌生命活动不可或缺的转运途径, 参与呼吸和有机磷代谢等生命活动^[23]。大肠杆菌 Tat 转运系统由 TatA、TatC 和 TatB 组成^[7,22], 其中 TatB 先和 TatC 组成一个膜复合物, 再与 TatA 组成完整的跨膜通道^[24]。

Tat 信号肽在 N 区末端和 H 区前端交界处有一段保守序列 S/T-R-R-X-F-L-K, 双精氨酸的存在也是 Tat 名字的由来, 转运开始时, TatB 先和 TatC 组合成复合体 TatBC, 当 TatBC 复合物靠近重组蛋白, Tat 信号肽的双精氨酸序列被 TatC 识别, 信号肽和重组蛋白接近 TatB 并结合, 成为重组蛋白 TatBC 复合体后便开始招募游离在细胞质内的 TatA, 进一步聚合成为转位复合体 TatABC, 重组蛋白通过复合体 TatABC

完成跨膜转运。最后, 当多肽链被转运到足够远的位置后, TatA 从 TatABC 上分离重新成为游离体, TatBC 开始转运新的蛋白, 而信号肽则被信号肽酶水解^[25]。

1.4 转运途径的差异和功能

Sec、Srp 与 Tat 是大肠杆菌转运和分泌蛋白质的主要途径, 但它们的输出方式却存在着巨大的差异^[26]。Sec 是 3 个转运途径中最高效的系统, 其转运能力强、能量消耗少, 同时在转运过程中原蛋白和细胞内蛋白酶的接触概率较小, 不易被分解失活, 因此 Sec 途径是这 3 个途径中最主要的途径^[10]。然而 Sec 途径最常面临的问题是运力不足, 当新生蛋白的转运速度慢于新生蛋白的合成速度时, 多肽链无法正确折叠, 容易在细胞内聚集形成包涵体^[10,27], 大

大降低了活性蛋白的得率。例如, GFP 通过 Sec 途径转运到达周质空间后无法进行正确折叠^[28]。与 Sec 共用 SecYEG 复合体的 Srp 途径则是转运与翻译同时进行, 当信号肽和成熟多肽链从核糖体中出现时, 迅速被位于核糖体出口的 SRP 识别, 在翻译进行的同时将多肽链运输到 SecYEG 开始跨膜转运^[7]。因此, 新生蛋白聚集在细胞质的几率显著降低, 转运的速率大大提高, 改善了 Sec 途径包涵体聚集的问题^[27]。由于 Srp 和 Sec 共用 SecYEG 转运复合体, 而 Sec 又占有 SecYEG 复合体的主要蛋白, 因此当分泌蛋白过量时, Srp 转运的需求上升, 过多的能量消耗在蛋白转运上, 造成细胞生长缺陷^[29]。与 Sec 和 Srp 完全不同的 Tat 途径则可以有效解决这类问题, 它们既利用与 Sec 完全不同的转运元件, 也有比 Srp 更强的转运能力, 同时 Tat 途径翻译后转运的形式更能够满足某些重组蛋白无法通过 Sec、Srp 完成转运的需求^[30], 但是 Tat 也存在缺陷, 对于分子量过大的蛋白则难以通过 TatABC 通道。正因不同转运途径功能上的差异, 选择何种转运途径、何种信号肽介导转运成为大肠杆菌周质分泌研究的重点。

2 大肠杆菌信号肽

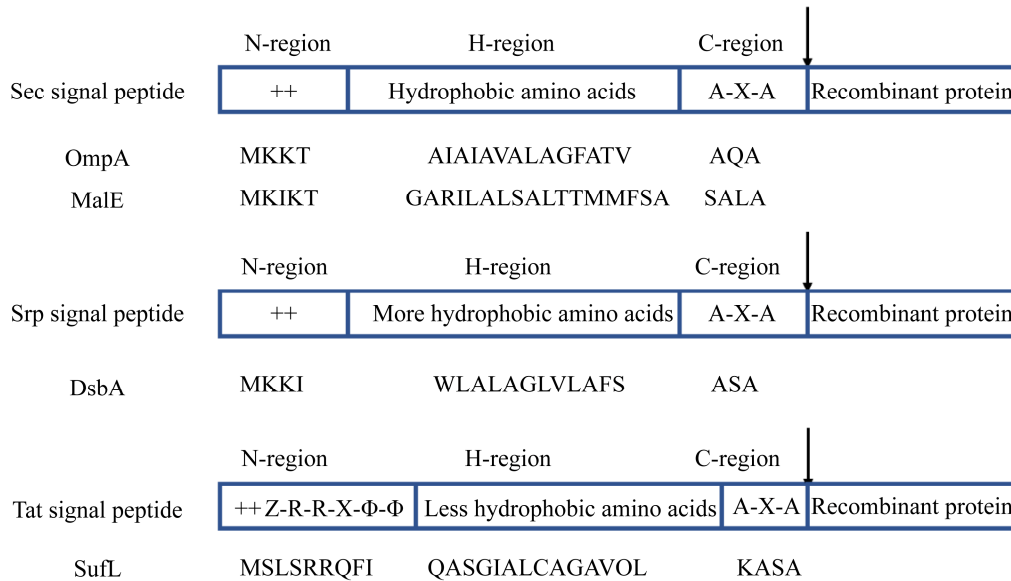
大肠杆菌信号肽来源广泛, 可以介导各种转运途径。信号肽在功能上既有来源于大肠杆菌自身的蛋白如外膜蛋白(outer membrane protein, OmpA)^[31-32]、存在于周质空间的二硫化物氧化还原酶(thiol disulfide oxidoreductase, DsbA)^[33]、大肠杆菌代谢调控转运的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, PhoA)^[7], 也有源于其他菌种分泌的胞外蛋白; 例如来自胡萝卜软腐欧文氏菌的果胶裂解酶(pectate lysate from *Erwinia carotovora*, PelB)^[9]。

2.1 信号肽的结构和功能

信号肽的 N 区由 3-5 个带正电的氨基酸组成, 正电氨基酸与磷脂双分子层的磷酸基团相互作用完成重组蛋白的跨膜转运^[12]。H 区长度在 9-12 个氨基酸之间, 以疏水氨基酸为主, 疏水性的强弱会影响前体蛋白加工和转运的速率。一方面信号肽通过疏水作用与转运蛋白 SecA、SRP 和触发因子结合, 因此疏水性的强弱决定了结合的稳定性, 从而影响了前体蛋白转运速率^[22]; 另一方面高疏水性的氨基酸有利于 α -螺旋的形成, 而该结构又利于信号肽通过磷脂双分子层提高转运速率^[34-37]。另外已有研究表明信号肽的疏水性还能维持前体蛋白的运输能力^[34]。不同转运途径信号肽 H 区的疏水性存在明显差异, 其中 Srp 途径信号肽的疏水性最强, 其次则是 Sec 途径信号肽, 最弱的是 Tat 途径信号肽^[35]。信号肽的 C 区含有 SPase 识别位点, 当蛋白质被转运出细胞质膜后, 信号肽即被切除^[19]。大多数原核生物信号肽尾部的 1 和 3 处是 SPase 识别的关键位置, 因此也叫(-3,-1)规则^[24,36], 为便于 SPase 识别, C 区多以极性氨基酸构成, 极性氨基酸构成的 β -构象有利于 SPase 和信号肽的结合。

2.2 不同分泌系统信号肽的结构差异

不同分泌途径的信号肽虽然都划分出相同的 3 个区域, 但不同信号肽在组成上却存在一定的差异, 这些差异造就了它们不同的分泌途径和转运效率。以 Sec 途径信号肽为基础进行对比(图 2), Tat 信号肽 N 区的前几个氨基酸一般包含碱性氨基酸, 而 Sec、Srp 信号肽 N 区前端则很少含有碱性氨基酸, 这一差异决定了 Tat 信号肽的分泌途径。N 区和 H 区的交界区域会有一段 S/T-R-R-X-F-L-K 的氨基酸序列组合是 Tat 途径信号肽的一个明显特征^[22,37], 随着后续实验的研究, 该组合被进一步简化为 Z-R-R-X- Φ - Φ ^[7], 其

图2 SEC、SRP和TAT信号肽的组成^[21]Figure 2 The constituents of Sec, Srp and Tat signal peptide^[21].

中连续的R-R双精氨酸序列高度保守，X一般为极性氨基酸，Φ代表疏水氨基酸。双精氨酸的序列组合是Tat途径的关键部分，有实验表明对R-R进行突变后，会抑制蛋白质的转运速率^[23]。

与Tat信号肽相比，Srp和Sec信号肽没有特征性的序列，但Srp和Sec信号肽H区的疏水性存在较大差异。SRP的Ffh蛋白含有较多的甲硫氨酸，其信号肽疏水性强于Sec信号肽，当新生肽链从核糖体出口出现时，可以与H区疏水氨基酸进行结合，从而引导重组蛋白进入SecYEG复合体完成转运^[16]。Tat信号肽的疏水性最弱，其弱疏水性为避免Tat信号肽被SRP识别提供了帮助^[38]。研究发现当信号肽H区疏水性介于Sec和Tat信号肽之间时，可以同时利用2个途径完成蛋白转运，如Fhud^[38-39]、YfhG^[38]。

C区存在的A-X-A序列是切割位点中最常见的一种，A-X-B则是另一类，其中B可以是丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)和丝氨酸(Ser)，而A

除了丙氨酸外，还可以替换为亮氨酸(Leu)、缬氨酸(Val)和苏氨酸(Thr)^[12]，例如Sec途径的OmpT的切除位点序列是S-F-A。此外，Tat途径信号肽的C区含有碱性氨基酸，导致Tat信号肽的疏水性进一步弱于Sec信号肽，而这些碱性氨基酸几乎不会出现在Sec的信号肽中。因此，碱性氨基酸的存在可以防止Tat信号肽被Sec途径的SecA识别，具有“Sec逃避”信号的作用^[38]。不同途径的信号肽除了在结构上存在差异外，在长度上Tat的信号肽比Sec和Srp信号肽平均多14个氨基酸，增加的部分主要集中于N区。

3 信号肽的选择与修饰

3.1 利用生物信息学分析信号肽

信号肽能够介导蛋白质完成转运、平衡蛋白质的翻译速度和转运速度^[15]。信号肽的数量极其庞大，合适的信号肽既能最大限度地利用细胞质的空间，同时又不影响细胞的正常生长和

代谢;恰当的转运速率使细胞质中既保持一定量的前体蛋白,但又不累积成为包涵体^[40]。研究发现,即使是同一信号肽,对不同异源蛋白的分泌效率也有很大差异^[41],因此目前并不存在通用的信号肽,所选择的信号肽都需要进行实验才能确定其转运能力。

随着生物信息学的发展及对信号肽研究的深入,已经建立一个信号肽数据库 signal peptide website (<http://www.signalpeptide.de/>)用于收集信号肽,研究者已经通过计算机软件筛选出合适的信号肽^[6,14,42-45],其中使用最广泛的是 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。该工具可以预测序列中是否含有信号肽,以及信号肽的切除位点,对于预测结果会给予 5 个分值, *S*、*C*、*Y*、*s-means* 及 *D* 值,其中 *D* 值是最关键的指标,当重组蛋白与某个信号肽融合后的 *D* 值低于 0.5,就认为该信号肽无法完成重组蛋白的转运工作^[43,45-46]。SignalP 可以对绝大多数信号肽进行评分和预测,除了 SignalP 以外,还有专门预测 Tat 信号肽的工具 TatP (<https://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>)。生物信息学分析筛选信号肽的流程如图 3 所示,首先使用 SignalP 对信号肽进行评分,之后再使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protpara>)分析蛋白质的理化性质及疏水性和亲水性,再使用 ProtComp (<http://linux1.softberry.com/>

[berry.phtml](http://linux1.softberry.com/berry.phtml))预测蛋白质的亚细胞定位^[44-45,47]。通过以上这些工具,针对不同重组蛋白进行信号肽评估,极大地提高了信号肽选择的效率并降低了实验成本和时间。

生物信息学的发展极大地简化了信号肽筛选的过程, Yari 等^[44]先使用 NCBI 数据库获取信号肽信息,然后利用 SignalP 筛选出高分信号肽,再利用 GRAVY 和 ProtParam 分析这些信号肽的亲水性和理化性质,最后符合要求的信号肽用于实验。通过以上流程成功筛选 PeIB 为合适信号肽,在大肠杆菌中实现了欧文氏菌的天门冬酰胺酶(*Erwinia asparaginase*)的高效分泌。已有研究发现,利用软件评估信号肽的转运能力还存在偏差, Fu 等^[48]通过实验完成信号肽的筛选,在对最佳信号肽进行分析评估时发现最佳信号肽的 *D* 值与酶活无关。此外,当异源蛋白以大肠杆菌为宿主进行表达时,软件难以对其自身的天然信号肽进行正确地识别和评估。

3.2 信号肽的选择方法

目前常选用的信号肽多是一些天然胞外蛋白的信号肽,表 1 总结了近年利用常见的天然信号肽实现高效分泌的产物。PeIB 和革兰氏阴性菌特有的外膜蛋白(outer membrane protein, Omp)等信号肽具有良好的普适性^[49],能够实现许多重组蛋白的周质表达。最初, Barthelemy 等^[61]利用 OmpA 成功将人体白细胞介素 6 (human

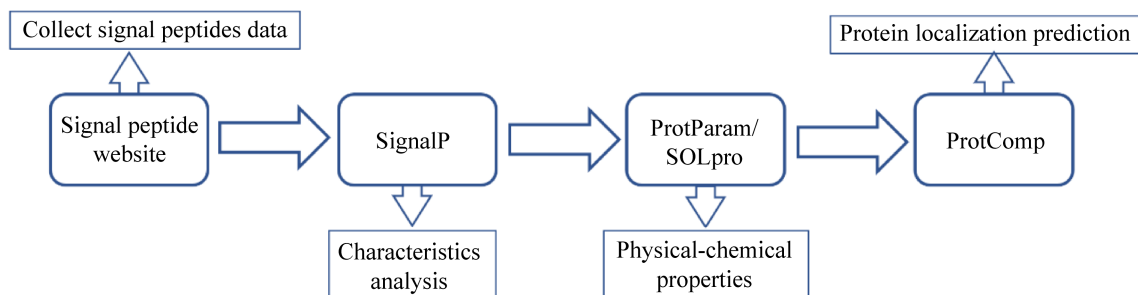


图 3 利用电脑分析筛选信号肽^[47]
Figure 3 Screening signal peptides *in silico*^[47].

interleukin-6, hIL-6)分泌到培养基中, 随后 Luciferase 等^[62]利用 PelB 成功实现胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)的分泌。此方法对比建立信号肽文库的烦琐工作来说, 可以快速筛选出一批信号肽, 但缺点则是该信号肽可能并非最佳信号肽, 其产量不高, 还需要后续进一步开发, 例如使用 T7 启动子和 PelB 时难以实现抗原结合片段 (antigen-binding fragment, Fab) 的高效分泌, Luo 等^[63]开发了一种新型分泌系统, 利用 PhoA 启动子和耐热肠毒素 II (heat-stable enterotoxin type II, STII) 信号肽, 实现了 5 种 Fab 的高效分泌, 其中 α -血管内皮生长因子 (α -vascular endothelial growth factor, α VEGF) 的产量从 192 pmol/L 提升到 2.4 nmol/L。

另一种方法则是通过异源信号肽来提高重组蛋白的分泌, Falahati-Pour 等^[64]利用来源于黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 的有机磷水解酶 (organophosphorus hydrolase) 自身信号肽实现了有机磷水解酶的高效分泌表达。Cui 等^[65]将放线

菌的信号肽与木聚糖酶融合表达, 将原先的酶活力由 2.4 U/mL 提高到 30.6 U/mL, 同时其胞外检测到 9.6 U/mL 酶活力。

寻找重组蛋白高效分泌的信号肽是一个烦琐的工作, 因此如何高效、快速地遴选出合适的信号肽是目前研究的重点。Selas Castiñeiras 等^[40]开发出一种高通量筛选方法, 以 β -内酰胺酶为报告基因融合于目的蛋白单链抗体片段 C 端, 培养于不同浓度的氨苄青霉素平板上, 利用头孢硝噻吩的显色功能, 通过检测 β -内酰胺酶的分泌效果, 实现对信号肽库的构建及筛选^[9]。

3.3 信号肽修饰

获得合适的信号肽后, 往往还会对信号肽的氨基酸进行修改, 以进一步优化、提高分泌蛋白的能力。虽然信号肽自身结构、引导的转运途径存在差异, 但是只要对信号肽的 N 区、H 区和 C 区这 3 个部分的关键氨基酸进行替换就会影响信号肽的转运能力^[32]。Sec 和 Srp 信号肽 N 区的正电氨基酸是信号肽与 SecA 和 SecB 作用的关

表 1 融合信号肽在大肠杆菌中实现分泌表达实例

Table 1 Examples of fusion signal peptide to realize secretion expression in *Escherichia coli*

Production	Yield	Signal peptide	Pathway	References
Cyclodextrin glucanotransferases	445.40 U/mL	DacD	Sec	[9]
IgG	0.40 g/L	DsbA	Srp	[29]
Chitosanase	18.50 mg/L	OmpA	Sec	[49]
Recombinant human endostatin	0.83 mg/L	PelB	Sec	[50]
Xylanase	436.50 U/mL	PelB	Sec	[51]
Penicillin G acylase	4.90 mg/mL	MalE	Sec	[52]
Thermostable lipases	265.41 U/mL	DsbA	Srp	[53]
Poly ethylene terephthalate PETase	6.20 mg/L	LamB	Sec	[54]
Pullulanase	654.00 U/mL	PelB	Sec	[55]
Dodecanoic acid methyl ester	2.60 mmol/L	FadL	Sec	[56]
Rat aryl sulfotransferases IV	21.35 U/mL	PelB	Sec	[57]
Phospholipase D	10.50 U/mL	PelB	Sec	[58]
Thermo stable xylanase	1 746.00 U/mg	FhuD	Sec+Tat	[59]
Endoinulinase	75.22 U/mg	PelB	Sec	[60]

键因素^[66], 改变 N 区正电性强弱时重组蛋白的分泌会受到影响, 而 Tat 途径不同, 仅改变其正电氨基酸和负电氨基酸的分布就会影响分泌效果^[67], 另外双精氨酸作为 Tat 信号肽的关键部分, 一旦更换将极大地降低甚至失去转运能力^[20]。H 区是信号肽序列最关键的部分^[19], 该区域的疏水性强弱是影响转运速率的关键因素。由于 H 区的疏水性是区分不同途径信号肽的关键部位, 因此改变 H 区的长度及疏水性能产生较大的影响^[68], 例如改变 H 区的疏水氨基酸会产生不同效果, 一般来说, 使用疏水性更强的氨基酸代替原本的疏水氨基酸表达效果会增强, 但同时当疏水氨基酸过多时反而会降低表达量^[20], 另外, 疏水氨基酸的更替可能会使信号肽选择的转运途径也发生改变。Jeiranikhameneh 等^[35]利用亮氨酸填充于 H 区与 C 区交界区域, H 区和 C 区的分隔让重组蛋白能够更灵活地进行跨膜运动^[35]。C 区是信号肽酶作用的关键部位, 以 A-X-A 识别位点为例, 如果将 2 个位置的丙氨酸进行替换则会对信号肽的切割效率产生影响。

除了对信号肽 N 区、H 区和 C 区的氨基酸进行更换外, 还可以从信号肽的编码序列着手, 目前的实验已经发现, 如果将密码子的序列变成稀有密码子, 产物的得率反而会上升^[10], 这是由于使用稀有密码子后蛋白质的翻译和折叠速度下降, 信号肽及转运途径有更充分的时间完成蛋白质的转运^[69], 因此产物的得率上升。Yu 等^[70]发现使用稀有密码子能抑制翻译速度, 避免快速折叠导致的错误折叠, 从而提高蛋白的产量^[10]。由于 Tat 途径是翻译后转运, 因此提高其翻译速度能提升蛋白表达, Falahati-Pour 等^[53]删除了 Tat 途径的稀有密码子从而提高了有机磷水解酶的产量。mRNA 的二级结构主要通过调节核糖体在序列上的移动速率来调控

翻译过程, 而信号肽的氨基酸序列则影响翻译起始区(translation initiation region, TIR), Zhu 等^[71]通过研究金属蛋白酶(metalloprotease)融合不同信号肽后的重组蛋白发现相较于原始信号肽, PelB、OmpA 这类常见信号肽 TIR 的自由能较高, 起始密码子 AUG 的位置也暴露在外, 这些特点提高了蛋白的分泌表达, Jeiranikhameneh 等^[35]、Yari 等^[44]均有相似研究结果。

随着生物信息学的发展及信号肽研究的深入, 可以根据信号肽的构造进行人工设计信号肽^[72-73]。Zandsalimi 等^[73]利用计算机对盐生盐杆菌(*Halobacterium salinarum*)、嗜盐古菌(*Haloferax volcanii*)及 *E. coli* 的 Tat 途径不同信号肽进行比对, 将出现频率较高、相一致的氨基酸挑选出来, 最终设计出一种新信号肽(new designed signal peptide, NDSP)。该信号肽利用 Tat 途径转运人激活素 A (human activin A), 通过 SDS-PAGE 比对发现利用 NDSP 作为信号肽有 69%的人激活素 A 被分泌到周质空间, 而通过 Sec 途径分泌的量只有 55%^[72]。

4 展望

随着生物信息学与高通量筛选的结合, 越来越多重组蛋白利用信号肽实现了周质表达, 同时, 对信号肽结构和作用机理的深入研究, 通过改造信号肽实现了重组蛋白的高效分泌。然而目前存在许多问题需要进一步的研究, 将来的发展可以在以下几个方面展开:

(1) 开发一套筛选重组蛋白信号肽的方法。由于信号肽的使用缺少普适性, 在信号肽的筛选方面往往面临耗时长、效果弱的问题, 严重限制了信号肽的应用, 因此可以利用高通量筛选技术, 在配合重组蛋白自身的检测方法, 建立一套快速的检测方法进行大规模筛选。

(2) 加深信号肽与翻译速率关系的研究。

鉴于优秀信号肽能够平衡转运速率和翻译速率, 因此转运速率与翻译速率之间的关系应该是未来研究的重点, 目前的研究已经揭示了信号肽的工作原理及 N、H、C 各区的组成与功能, 若能进一步揭示其组成结构与转运速率、翻译速率间的规律, 利用数学的方法对其相关功能进行量化, 那么即使不存在通用的信号肽, 也能利用这些理论筛选出契合的信号肽。

(3) 加快人工设计信号肽的研究。目前已经有许多设计的新信号肽实现了重组蛋白的高效分泌^[35,71-72], 随着生物信息学的发展, 已经可以参考天然信号肽的结构组成对信号肽进行修饰或重新设计, 下一步则可以根据生物信息学的大数据, 按照信号肽的氨基酸排列设计出一种本不存在的全新的信号肽。

随着对信号肽研究的深入, 利用信号肽实现重组蛋白的分泌表达一定会有更加广泛的应用, 各种重组蛋白的产业化前景也会更加广阔。

REFERENCES

- [1] 韩建福, 富敏霞, 祝铃钰, 贡军贤. L-苯丙氨酸制备的研究进展[J]. 生物加工过程, 2019, 17(2): 117-124
Han JF, Fu MX, Zhu LY, Yun JX. Advances in L-phenylalanine preparation[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(2): 117-124 (in Chinese)
- [2] 庄倩倩. 大肠杆菌利用合成生物学策略生产聚羟基脂肪酸酯的研究进展[J]. 生物加工过程, 2017, 15(6): 38-43
Zhuang QQ. Progress in synthetic biology of *Escherichia coli* to produce polyhydroxyalkanoates[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2017, 15(6): 38-43 (in Chinese)
- [3] Tsai WC, Wu TC, Chiang BL, Wen HW. Cloning, expression, and purification of recombinant major mango allergen Man i 1 in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2017, 130: 35-43
- [4] He XY, Li Y, Tao YH, Qi XL, Ma RQ, Jia HH, Yan M, Chen KQ, Hao N. Discovering and efficiently promoting the extracellular secretory expression of *Thermobacillus* sp. ZCTH02-B1 sucrose phosphorylase in *Escherichia coli*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 173: 532-540
- [5] Xu ZS, Wang T, Zhang SS. Extracellular secretion of feruloyl esterase derived from *Lactobacillus crispatus* in *Escherichia coli* and its application for ferulic acid production[J]. Bioresource Technology, 2019, 288: 121526
- [6] Yarabbi H, Mortazavi SA, Yavarmanesh M, Javadmanesh A. *In silico* study of different signal peptides to express recombinant glutamate decarboxylase in the outer membrane of *Escherichia coli*[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2020, 26(4): 1879-1891
- [7] Kleiner-Grote GRM, Risse JM, Friehs K. Secretion of recombinant proteins from *E. coli*[J]. Engineering in Life Sciences, 2018, 18(8): 532-550
- [8] Qiu ZL, Wang MZ, She MQ, Chen QM, Li QQ, Zhu JB, Yang XR, Cai XS. Efficient production of human zona *Pellucida*-3 in a prokaryotic expression system[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(11): 1-7
- [9] Sonnendecker C, Wei R, Kurze E, Wang JP, Oeser T, Zimmermann W. Efficient extracellular recombinant production and purification of a *Bacillus* cyclodextrin glucanotransferase in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 87
- [10] Tsirigotaki A, De Geyter J, Šoštarić N, Economou A, Karamanou S. Protein export through the bacterial Sec pathway[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(1): 21-36
- [11] Smets D, Loos MS, Karamanou S, Economou A. Protein transport across the bacterial plasma membrane by the sec pathway[J]. The Protein Journal, 2019, 38(3): 262-273
- [12] Owji H, Nezafat N, Negahdaripour M, Hajiebrahimi A, Ghasemi Y. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications[J]. European Journal of Cell Biology, 2018, 97(6): 422-441
- [13] Zhou YL, Lu ZH, Wang X, Selvaraj JN, Zhang GM. Genetic engineering modification and fermentation optimization for extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(4): 1545-1556
- [14] Mohammadi S, Mostafavi-Pour Z, Ghasemi Y, Barazesh M, Kavousi Pour S, Ata A, Mokarram P, Morowvat MH. *In silico* analysis of different signal peptides for the

- excretory production of recombinant NS₃-GP96 fusion protein in *Escherichia coli*[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2019, 25(4): 1279-1290
- [15] Low KO, Muhammad Mahadi N, Md Illias R. Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 3811-3826
- [16] Baumgarten T, Ytterberg AJ, Zubarev RA, De Gier JW. Optimizing recombinant protein production in the *Escherichia coli* periplasm alleviates stress[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(12): e00270-18
- [17] Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai SY, Tanaka T, Perederina A, Vassilyev DG, Kohno T, Maturana AD, et al. Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export[J]. Nature, 2011, 474(7350): 235-238
- [18] Schulze RJ, Komar J, Botte M, Allen WJ, Whitehouse S, Gold VAM, Lycklama A Nijeholt JA, Huard K, Berger I, Schaffitzel C, et al. Membrane protein insertion and proton-motive-force-dependent secretion through the bacterial holo-translocon SecYEG-SecDF-YajC-YidC[J]. PNAS, 2014, 111(13): 4844-4849
- [19] Fekkes P, Driessen AJ. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63(1): 161-173
- [20] Palmer T, Berks BC. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(7): 483-496
- [21] Beckwith J. The Sec-dependent pathway[J]. Research in Microbiology, 2013, 164(6): 497-504
- [22] Frain KM, Robinson C, Van Dijl JM. Transport of folded proteins by the tat system[J]. The Protein Journal, 2019, 38(4): 377-388
- [23] Natale P, Brüser T, Driessen AJM. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Biomembranes, 2008, 1778(9): 1735-1756
- [24] Robinson C, Bolhuis A. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001, 2(5): 350-356
- [25] Goosens VJ, Van Dijl JM. Twin-arginine protein translocation[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2017, 404: 69-94
- [26] Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, Waksman G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and mechanistic insights[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(6): 343-359
- [27] Lee YJ, Jeong KJ. Enhanced production of antibody fragment via SRP pathway engineering in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2013, 18(4): 751-758
- [28] Gao JH, Qian HM, Guo XQ, Mi Y, Guo JP, Zhao JL, Xu C, Zheng T, Duan M, Tang ZW, et al. The signal peptide of CryIIa can improve the expression of eGFP or mCherry in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and enhance the host's fluorescent intensity[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 112
- [29] Lee YJ, Lee R, Lee SH, Yim SS, Jeong KJ. Enhanced secretion of recombinant proteins via signal recognition particle (SRP)-dependent secretion pathway by deletion of *rrsE* in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 113(11): 2453-2461
- [30] Palmer T, Stansfeld PJ. Targeting of proteins to the twin-arginine translocation pathway[J]. Molecular Microbiology, 2020, 113(5): 861-871
- [31] Kim JH, Lee J, Park J, Ghoo YS. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2015, 40: 97-104
- [32] Huang L, Wang QH, Jiang SJ, Zhou YL, Zhang GM, Ma YH. Improved extracellular expression and high-cell-density fed-batch fermentation of chitosanase from *Aspergillus Fumigatus* in *Escherichia coli*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2016, 39(11): 1679-1687
- [33] Zhou YZ, Liu P, Gan YT, Sandoval W, Katakam AK, Reichelt M, Rangell L, Reilly D. Enhancing full-length antibody production by signal peptide engineering[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 1-11
- [34] IZARD JW, DOUGHTY MB, KENDALL DA. Physical and conformational properties of synthetic idealized signal sequences parallel their biological function[J]. Biochemistry, 1995, 34(31): 9904-9912
- [35] Jeiranikhameneh M, Moshiri F, Keyhan Falasafi S, Zomorodipour A. Designing signal peptides for efficient periplasmic expression of human growth hormone in *Escherichia coli*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(11): 1999-2009
- [36] Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(5): 625-635

- [37] Rabbani M, Bagherinejad M, Sadeghi HM, Abedi D, Moazen F. Effect of Twine-arginine Translocation-signaling fusion system and chaperones Co-expression on secretory expression of somatropin[J]. *Advanced Biomedical Research*, 2018, 7(1): 17
- [38] Tullman-Ercek D, DeLisa MP, Kawarasaki Y, Iranpour P, Ribnicky B, Palmer T, Georgiou G. Export pathway selectivity of *Escherichia coli* twin arginine translocation signal peptides[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(11): 8309-8316
- [39] Ize B, Porcelli I, Lucchini S, Hinton JC, Berks BC, Palmer T. Novel phenotypes of *Escherichia coli* tat mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(46): 47543-47554
- [40] Selas Castiñeiras T, Williams SG, Hitchcock A, Cole JA, Smith DC, Overton TW. Development of a generic β -lactamase screening system for improved signal peptides for periplasmic targeting of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1-18
- [41] Mirzadeh K, Shilling PJ, Elfageih R, Cumming AJ, Cui HL, Rennig M, Nørholm MHH, Daley DO. Increased production of periplasmic proteins in *Escherichia coli* by directed evolution of the translation initiation region[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 85
- [42] Jahandar MH, Forouharmehr A. Optimization of human serum albumin periplasmic localization in *Escherichia coli* using *in silico* evaluation of different signal peptides[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2019, 25(2): 635-643
- [43] Juibari AD, Ramezani S, Rezadoust MH. Bioinformatics analysis of various signal peptides for periplasmic expression of parathyroid hormone in *E. coli*[J]. *Journal of Medicine and Life*, 2019, 12(2): 184-191
- [44] Yari M, Ghoshoon MB, Nezafat N, Ghasemi Y. Experimental evaluation of *in silico* selected signal peptides for secretory expression of *Erwinia* asparaginase in *Escherichia coli*[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2020, 26(3): 1583-1591
- [45] Roshanak S, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Javadmanesh A, Movaffagh J. Comparison of different signal sequences to use for periplasmic over-expression of buforin I in *Escherichia coli*: an *in silico* study[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2020, 26(4): 2495-2504
- [46] Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 785-786
- [47] Nazifi N, Tahmoorespur M, Sekhavati MH, Haghparast A, Behroozikhah MA. Assessment of signal peptides to optimize interleukin 2 (IL-2) folding and expression[J]. *Current Proteomics*, 2019, 16(3): 188-198
- [48] Fu G, Liu JL, Li JS, Zhu BW, Zhang DW. Systematic screening of optimal signal peptides for secretory production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(50): 13141-13151
- [49] Pechsrichuang P, Songsiririthigul C, Haltrich D, Roytrakul S, Namvijtr P, Bonaparte N, Yamabhai M. OmpA signal peptide leads to heterogenous secretion of *B. subtilis* chitosanase enzyme from *E. coli* expression system[J]. *SpringerPlus*, 2016, 5(1): 1-10
- [50] Mohajeri A, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Pourhassan-Moghaddam M, Abdolalizadeh J, Karimi P, Zarghami N. Cloning and expression of recombinant human endostatin in periplasm of *Escherichia coli* expression system[J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 6(2): 187-194
- [51] Chang SY, Guo YL, Wu B, He BF. Extracellular expression of alkali tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E. coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 96: 249-256
- [52] Pan X, Yu Q, Chu JL, Jiang TY, He BF. Fitting replacement of signal peptide for highly efficient expression of three penicillin G acylases in *E. coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(17): 7455-7464
- [53] Zhang WQ, Lu J, Zhang SW, Liu L, Pang XY, Lv J. Development an effective system to expression recombinant protein in *E. coli* via comparison and optimization of signal peptides: expression of *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 thermostable lipase as case study[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 50
- [54] Seo H, Kim S, Son HF, Sagong HY, Joo S, Kim KJ. Production of extracellular PETase from *Ideonella sakaiensis* using sec-dependent signal peptides in *E. coli*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(1): 250-255
- [55] Wang XY, Chen YQ, Nie Y, Xu Y. Improvement of extracellular secretion efficiency of *Bacillus naganensis* pullulanase from recombinant *Escherichia coli*: peptide fusion and cell wall modification[J]. *Protein Expression*

- and Purification, 2019, 155: 72-77
- [56] Yoo HW, Kim J, Patil MD, Park BG, Joo SY, Yun H, Kim BG. Production of 12-hydroxy dodecanoic acid methyl ester using a signal peptide sequence-optimized transporter AlkL and a novel monooxygenase[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 291: 121812
- [57] Zhou ZX, Li Q, Xu RR, Wang BB, Du GC, Kang Z. Secretary expression of the rat aryl sulfotransferases IV with improved catalytic efficiency by molecular engineering[J]. *3 Biotech*, 2019, 9(6): 1-7
- [58] Wang J, Xu S, Pang Y, Wang X, Chen KQ, Ouyang PK. Highly efficient extracellular production of recombinant *Streptomyces* PMF phospholipase D in *Escherichia coli*[J]. *Catalysts*, 2020, 10(9): 1057
- [59] Zhang FY, He HH, Deng T, Ge HR, Yu C, Feng L, Huang FH, Yi L. N-terminal fused signal peptide prompted extracellular production of a *Bacillus*-derived alkaline and thermo stable xylanase in *E. coli* through cell autolysis[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 192(2): 339-352
- [60] Wang PP, Ma JF, Zhang Y, Zhang M, Wu MK, Dai ZX, Jiang M. Efficient secretory overexpression of endoinulinase in *Escherichia coli* and the production of inulooligosaccharides[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 179(5): 880-894
- [61] Barthelemy I, González De Buitrago G, Carreiro C, Roncal F, Pérez-Aranda A, Márquez G, Barbero JL. Production and secretion of human interleukin 6 into the periplasm of *Escherichia coli*: efficient processing of N-terminal variants of hIL6 by the *E. coli* signal peptidase[J]. *Journal of Biotechnology*, 1993, 27(3): 307-316
- [62] Lucic MR, Forbes BE, Grosvenor SE, Carr JM, Wallace JC, Forsberg G. Secretion in *Escherichia coli* and phage-display of recombinant insulin-like growth factor binding protein-2[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 61(2): 95-108
- [63] Luo MY, Zhao MQ, Cagliero C, Jiang H, Xie YQ, Zhu JW, Yang H, Zhang MX, Zheng Y, Yuan YS, et al. A general platform for efficient extracellular expression and purification of Fab from *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(8): 3341-3353
- [64] Falahati-Pour SK, Lotfi AS, Ahmadian G, Baghizadeh A, Behroozi R, Haghghi F. High-level extracellular secretion of organophosphorous hydrolase of *Flavobacterium* sp. in *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2016, 63(6): 870-876
- [65] Cui YB, Meng YW, Zhang J, Cheng B, Yin HJ, Gao C, Xu P, Yang CY. Efficient secretory expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* with a novel actinomycete signal peptide[J]. *Protein Expression and Purification*, 2017, 129: 69-74
- [66] Caspers M, Brockmeier U, Degering C, Eggert T, Freudl R. Improvement of Sec-dependent secretion of a heterologous model protein in *Bacillus subtilis* by saturation mutagenesis of the N-domain of the AmyE signal peptide[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(6): 1877-1885
- [67] Braun V, Hantke K. Novel tat-dependent protein secretion[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(9): e00058-20
- [68] Freudl R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 1-10
- [69] Zalucki YM, Beacham IR, Jennings MP. Biased *Codon* usage in signal peptides: a role in protein export[J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(4): 146-150
- [70] Yu TH, Yi YC, Shih IT, Ng IS. Enhanced 5-aminolevulinic acid production by co-expression of *Codon*-optimized hemaA gene with chaperone in genetic engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191(1): 299-312
- [71] Zhu FC, Liu F, Wu B, He BF. Efficient extracellular expression of metalloprotease for Z-aspartame synthesis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(51): 9631-9638
- [72] Gao CF, Wang S, Tian FW, Zhu P, Chen W. An artificial design technique to optimize signal peptide[J]. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 13(3): 114-122
- [73] Zandsalimi F, Hajihassan Z, Hamidi R. Denovo designing: a novel signal peptide for tat translocation pathway to transport activin A to the periplasmic space of *E. coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(1): 45-55