

基于信号肽策略提高外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达

苗华彪^{1, 2} 曹艳¹ 杨梦瀚¹ 黄遵锡^{1, 2}

(1. 云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500; 2. 生物能源持续开发利用教育部工程中心, 昆明 650500)

摘要: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 作为一种重要的原核表达宿主菌, 具有蛋白分泌能力强、遗传背景清晰、无密码子偏好性、生长迅速和非致病性等优点, 一直都是外源蛋白表达优选的模式菌株。信号肽 (signal peptide) 是一段存在于前体蛋白 N- 端的短肽链, 其功能在于引导和调节前体蛋白的折叠, 在蛋白转移和分泌过程中扮演着极其重要的角色。目前, 利用枯草芽孢杆菌信号肽, 针对不同外源蛋白的高效分泌暂无规律性可寻。为此, 从枯草芽孢杆菌信号肽的结构特点、分类、转运途径和应用方式等方面进行综述, 以期为进一步筛选外源蛋白在枯草芽孢杆菌表达系统中的最适信号肽提供一定的参考。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 信号肽; 分泌途径; 信号肽文库

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-1255

The Strategy for Enhancing Foreign Proteins Expression by Signal Peptide in *Bacillus subtilis*

MIAO Hua-biao^{1, 2} CAO Yan¹ YANG Meng-han¹ HUANG Zun-xi^{1, 2}

(1. College of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500; 2. Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming 650500)

Abstract: As an important prokaryotic expression host strain, *Bacillus subtilis* has always been regarded as preferred model strain for foreign protein expression, featuring strong protein secretion, clear genetic background, no codon preference, rapid growth and non-pathogenicity. Signal peptide is a short peptide chain located in the N-terminal of the precursor protein, with the function of guiding and regulating the folding of the precursor protein. Meanwhile, it plays a very important role in the process of protein transfer and secretion. At present, there is no regularity to find the efficient secretion of different foreign proteins by using the signal peptide of *B. subtilis*. For this reason, the structural characteristics, classification, transport pathway and application of signal peptides from *B. subtilis* are reviewed here, aiming to provide certain reference for further screening the optimal signal peptides of foreign proteins in *B. subtilis* expression system.

Key words: *Bacillus subtilis*; signal peptide; secretion pathway; signal peptide library

与大肠杆菌和酵母菌相比, 枯草芽孢杆菌表达系统研究起步较晚, 但因其具有: 安全、蛋白分泌能力强、易于高密度发酵、遗传背景清晰和被认为是安全菌株 (generally recognized as safe, GRAS) 等优势, 使其成为基因表达系统研究热点之一^[1-3]。枯草芽孢杆菌作为表达宿主菌可以将蛋白分泌到胞外培养基中, 这一过程由位于外源蛋白 N 末端的信

号肽来完成, 它可以正确的将外源蛋白导向分泌装置, 在蛋白分泌过程中起着不可替代的作用^[2, 4]。目前, 只有少数外源蛋白在枯草芽孢杆菌表达系统中实现了高效表达, 但还有大多数外源蛋白的分泌和表达效果不理想。其中枯草芽孢杆菌信号肽的氨基酸组成、类型和分泌途径均会对外源蛋白分泌的效率产生影响, 合适的信号肽是保证外源蛋白在枯

收稿日期: 2020-10-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31660304), 国家重点研发计划 (2017YFB0308401)

作者简介: 苗华彪, 男, 博士, 研究方向: 生物化学与分子生物学; E-mail: ynsfmhb@163.com

通讯作者: 黄遵锡, 男, 博士, 教授, 研究方向: 酶工程; E-mail: huangzunxi@163.com

草芽孢杆菌高效表达的关键因素之一。基于信号肽的策略提高外源蛋白的分泌量是切实可行的,并且往往会取得意想不到的效果^[5-6]。虽然科学家对枯草芽孢杆菌信号肽进行了坚持不懈的探究,但仍然存在许多尚未解决的问题。本文综述了枯草芽孢杆菌信号肽的最新研究进展,重点讨论了一般分泌途径(general secretion pathway, Sec)和双精氨酸分泌途径(twin-arginine translocation pathway, Tat)信号肽的结构特点、分类、分泌机制及其在提高外源蛋白表达方面的实际应用。同时总结了信号肽在枯草芽孢杆菌表达系统中应用的问题和展望,以期为通过信号肽的策略提高外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的高效表达提供一定的参考。

1 信号肽的概述

四十多年前蛋白质合成后的转移与定位是不为人知的,直到1975年Blobel等^[7]正式提出信号假说(signal hypothesis)后,才得以解决。其认为游离核糖体是开始合成分泌蛋白的场所,新合成的蛋白质有一个内源性的信号肽,可以与内质网膜识别并结合,紧随其后的新生肽链则不断延伸并通过内质网膜,合成完成后信号肽则被信号肽酶(signal peptidase, SPase)水解^[7],此后,信号识别颗粒(signal recognition protein, SRP)及其受体(SRP receptor, SR)的发现完善了该假说^[8-9]。随后大量的研究表明信号肽的作用机理普遍存在于动植物和微生物中,进而使其成为一个系统的理论, Blobel也因此获得了1999年的诺贝尔生理学或医学奖^[4]。信号肽的提出为研究蛋白质的空间属性这一新领域开辟了道路,也为研究蛋白质的结构和功能奠定了基础^[7-9]。

2 枯草芽孢杆菌信号肽分泌途径

由于枯草芽孢杆菌缺乏外膜结构,分泌蛋白会转运到胞外培养基中,保证分泌蛋白的正确定位和转移则由信号肽来完成^[2]。枯草芽孢杆菌可以将300多种蛋白分泌到胞外^[2-4],至少包含4种类型的蛋白分泌途径,分别为:Sec分泌途径、Tat分泌途径、假菌丝蛋白输出途径(Pseudophilin pathway, Com)和ATP结合盒转运子途径(ATP-binding cassette transporter, ABC)^[4]。其中Sec和Tat分泌途径的信号肽占整个枯草芽孢杆菌的90%以上,为此将重

点讨论这两种分泌途径的信号肽。

2.1 Sec分泌途径

2.1.1 Sec分泌途径信号肽的类型 Sec分泌途径是枯草芽孢杆菌最主要的分泌途径,主要转运未折叠的蛋白质。由于信号肽预测软件的算法不同,对信号肽的分类也会存在一定的差异。通常根据SPase切割底物特异性不同可分为两类:I型信号肽,是由I型信号肽酶(Lep)进行切割的信号肽^[4, 10-11], Tjalsma等^[10]总结了这种信号肽有166种, Brockmeier等^[12]总结了173种;II型信号肽,是由II型信号肽酶(LspA)进行切割的一类脂蛋白信号肽^[11, 13], 据Tjalsma等^[11]报道有114种。随着对枯草芽孢杆菌信号肽的不断研究,目前可在信号肽数据库(<http://www.signalpeptide.de/index.php>)中查询到的枯草芽孢杆菌来源的信号肽已有244种,在Tjalsma等^[11]报道的基础上新增了61种。

2.1.2 Sec分泌途径信号肽的结构 对Sec分泌途径的信号肽基本性质进行统计,发现I型信号肽长度在17-45 aa之间,平均长度接近28 aa;II型信号肽更短(13-38 aa),平均长度不足20 aa(图1-A)^[4-5, 11]。虽然信号肽的一级结构之间没有直接相关性,但其二级结构还是有一定的规律可循。利用SignalP 3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)和Phobius(<http://phobius.sbc.su.se/>)信号肽预测网站可将信号肽分为3段不同的结构域:(1)N端结构域,通常含有1-5个带正电的氨基酸残基(R/K),这可能与转运过程中膜脂质双层中带负电荷的磷脂相互作用有关^[11]。(2)H端结构域,是由7-15个疏水性氨基酸组成的螺旋结构,这种结构有利于信号肽插入膜中,有助于特定SPase的切割^[2-3, 11],而且H端结构域疏水性氨基酸占比高达80%左右,其中甘氨酸(G)、脯氨酸(P)、亮氨酸(L)和缬氨酸(V)出现频率最高^[4, 11]。(3)C端结构域位于信号肽的最末端,包含SPase切割位点,将信号肽从成熟蛋白上切割下来,成熟蛋白则可折叠成天然构象,信号肽则被移除和降解。通常, Lep信号肽的SPase识别位点是AXAA, LspA信号肽是LAAC,它与其他分泌型蛋白信号肽最大差异在于具有一个不变的半胱氨酸(C)残基,有助于脂蛋白的

切割和锚定^[4-5, 11, 14]。信号肽能够有效地被 SPase 识别并剪切的前提条件是 C 端必须具有一个 β 片状折叠延伸结构, 且 C 端 -2 位的氨基酸残基通常具有体积小且无电荷的特点^[4]。

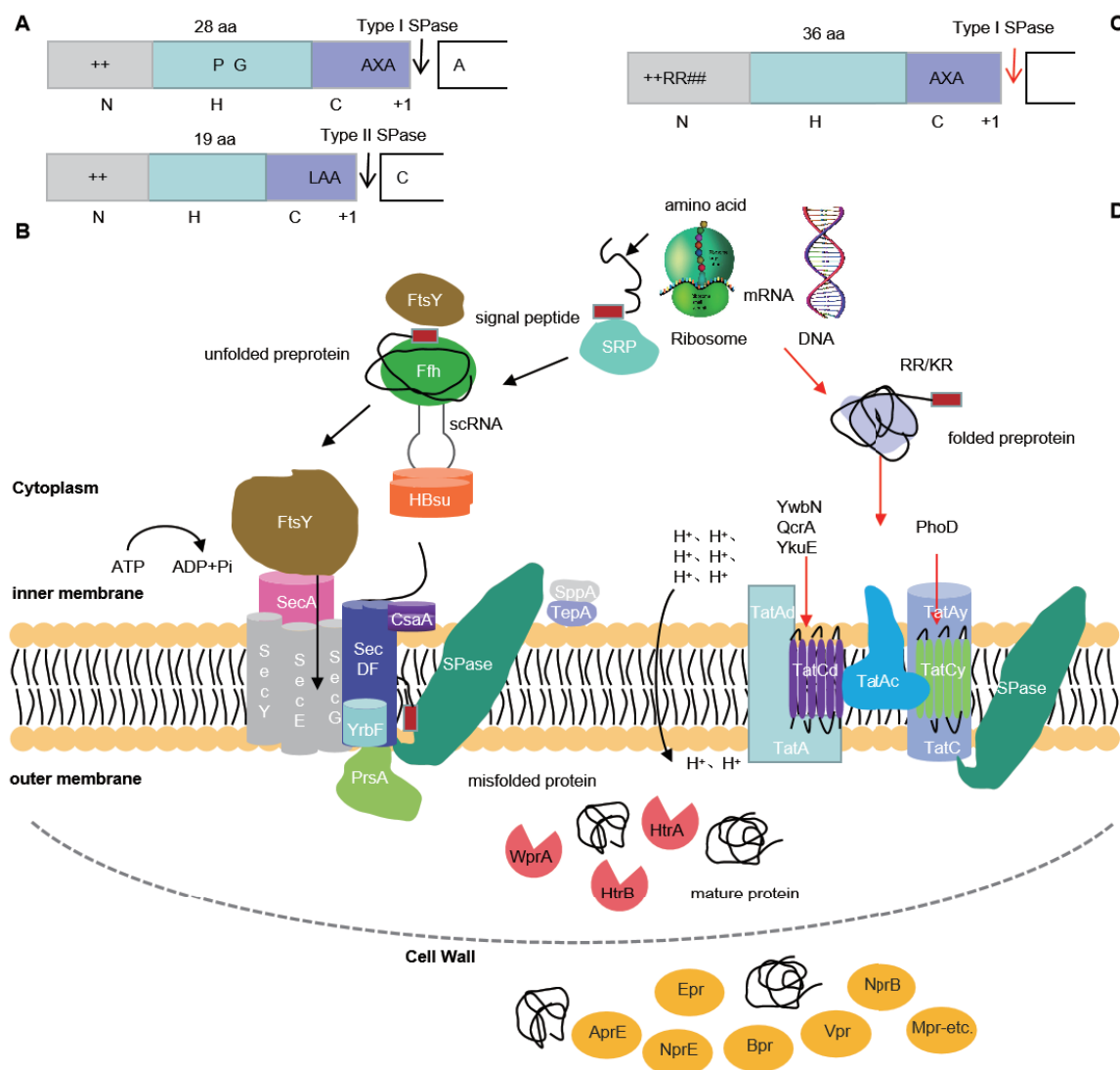
2.1.3 Sec 途径信号肽的分泌机制 Sec 分泌途径一般分为 4 步完成 (图 1-B): (1) 识别: 首先, 在核糖体上转录翻译后的基因, 生成一条 N 端带有一段信号肽的多肽链, 由 SRP 来完成对该多肽链的识别, 并被膜受体 (FtsY) 引导至转运子^[14]。其中, SRP 是一个高度保守的蛋白-核酸复合物, 它包括一个细胞质小 RNA (scRNA)^[15]、两个组蛋白类似物 (HBsu)^[16] 和一个独立蛋白 (Ffh) 组成^[11, 16]。(2) 易位: 前体蛋白主要通过 Sec 转运酶完成跨膜, 它由转运通道 (SecYEG)^[17]、马达蛋白 (SecA)^[17-18] 和辅助蛋白 (SecDF-YrbF) 3 部分组成^[19-20]。其中, SecYEG 蛋白是由 SecY、SecE 和 SecG 三个单体蛋白形成的膜结合异源三聚体, 在蛋白转移中起辅助通道作用, 只与蛋白分泌的效率有关^[17]。Sec 转运酶的能量来源是由马达组件 SecA 催化 ATP 的水解来提供, 多数情况下 SecA 是以单体的形式存在, 但 SecA 也存在其他的寡聚体结构形式来发挥同样的功能^[21-22]。此外, SecA 也可充当伴侣分子, 直接将底物从合成位点转运到转运酶上, 但这种仅由 SecA 构成的通道效率较低^[21-22]。SecDF 与同系物 YrbF 构成一个异源三聚体的辅助蛋白^[23], 作用是将前体蛋白从通道中提取出来^[2-3], 但某些前体蛋白 (PhoB 和 YvaY) 的分泌, 需要另外一个同型二聚体辅助蛋白 CsaA 的参与^[24]。(3) 切除: 前体蛋白跨膜转运后, 位于 N 末端的信号肽需要被切除, 否则, 可能会影响到其他蛋白的易位, 信号肽序列的切割是由膜结合蛋白 SPase 来完成, 切除下来的信号肽不会一直存在, 由 SppA 和 TepA 将其降解^[2-4]。枯草芽孢杆菌染色体上存在多种 SPase 基因, 多数情况下, 1-2 个基因的表达足以满足前体蛋白的加工和细胞活力^[2-4], 这种基因多样性保证了不同条件下蛋白分泌的灵活性。此外, SPase 不仅具有切割功能, 也参与枯草芽孢杆菌的产孢和贴壁生物膜的形成等生理反应^[11, 25]。(4) 加工后修饰: 转运蛋白的修饰、折叠和后续过程都会受到一些特定分子伴侣的影响。

枯草芽孢杆菌具有细胞内和细胞外两种分子伴侣以单独或协同作用的方式加快蛋白质的折叠和组装, 可以协助转运蛋白的聚集和维持转运前体蛋白的构象^[21, 26-28]。如脂蛋白 (PrsA) 属于细胞外伴侣, 可促进成熟蛋白的折叠、稳定正确的蛋白构象^[25]。分泌到膜外的蛋白, 如果发生了错误折叠则由蛋白酶类进行降解。

2.2 Tat 分泌途径

2.2.1 Tat 分泌途径信号肽的类型和结构特点 Tat 类信号肽作为枯草芽孢杆菌第二大分泌途径, 数量少了很多^[4, 11, 32], 一般认为有 24 种这样的信号肽, 其中有 14 种能被 Lep 信号肽酶所识别^[11]。该类信号肽长度要明显大于 Sec 途径信号肽, N 端结构域的长度是 Sec 途径信号肽的两倍, 在 N 端和 H 端的连接处具有一个明显的保守序列 ++RR## (图 1-C)^[4-5, 11]; H 端相比于 Sec 途径信号肽长度更长且疏水性要低^[11]; C 端出现频率较高的氨基酸残基也和 Sec 途径信号肽不同^[4-5, 11]。

2.2.2 Tat 途径信号肽的分泌机制 Tat 分泌途径信号肽转运那些折叠迅速或已经在胞内折叠好的蛋白质^[29-31], 这些蛋白利用 Sec 分泌途径信号肽很难转运 (图 1-D)。与 Sec 分泌途径不同的是, 目前, 仅鉴定出 PhoD、YwnN、QcrA 和 YkuE 这 4 种底物蛋白是明确按照 Tat 途径进行分泌^[29-31, 33-36]。Tat 系统可以处理高达 150 kD 的前体蛋白, 但 Tat 途径中的各组件都比较小, 这意味着它们需要组装成较大的复合物, 以促进较大前体蛋白的跨膜通过^[29, 37]。与大肠杆菌相比, 枯草芽孢杆菌 Tat 分泌途径拥有两套相互独立的通道蛋白复合物: 由 *tatAdCd* 操作子所编码的 TatA (230 kD) 通道蛋白, 它由在膜上成“L 形”排列的 TatAd (7.4 kD) 蛋白和具有 6 个跨膜螺旋的 TatCd (28 kD) 蛋白复合组成; 及由 *tatAyCy* 操作子所编码的 TatC (200 kD) 通道蛋白, 它由 TatAy (6 kD) 和 TatCy (28.9 kD) 两种蛋白组成; 底物蛋白的易位, 还需要枯草芽孢杆菌 TatAc (6.7 kD) 蛋白的帮助^[37-38]。进行蛋白分泌时, 首先转运酶复合物通过两亲性双螺旋结构形成一个比 Sec 途径孔道要大的直径为 5-6 nm 的跨膜 Tat 孔空结构, 这也许是已折叠蛋白能够穿过该通道的一个重要原



图中 A 和 C 分别代表 Sec 和 Tat 型信号肽的主要特征，箭头代表信号肽酶裂解位点；灰色：N- 端结构；青色：H- 端结构；蓝色：C- 端结构；白色：表示成熟蛋白。B 和 D 分别代表 Sec 和 Tat 蛋白分泌途径的示意图。黑色箭头：Sec 分泌途径；红色箭头：Tat 分泌途径；红色矩形：信号肽；黑线：前体蛋白；参与分泌过程的蛋白质用不规则图形或不同颜色的圆柱体表示

A and C represent the main characteristics of Sec and Tat type signal peptides respectively, arrows represent signal peptidase cleavage sites; gray : N-terminal structure; cyan : H-terminal structure; blue : C-terminal structure; white : indicates mature protein. B and D represent schematic diagrams of Sec and Tat protein secretion pathways respectively. Black arrows : Sec secretion pathways; red arrows : Tat secretion pathways; red rectangles : signal peptides; black lines : precursor proteins; and proteins involved in the secretion process are represented by irregular graphics or cylinders of different colors

图 1 枯草芽孢杆菌 Sec 和 Tat 分泌途径信号肽的主要特征和机制示意图 (依据参考文献^[2, 5, 21, 27, 29-31]绘制)

Fig.1 Schematic diagram of the main characteristics and mechanism of the signal peptides about the secretory pathways of *Bacillus subtilis* Sec and Tat (Based on the references^[2, 5, 21, 27, 29-31])

因^[29-30]。之后，前体蛋白先与 TatA/TatC 相连的复合物相互作用，在跨膜 pH 梯度下，将折叠好的前体蛋白转移到 Tat 孔外^[31]，易位后，I 型 SPase 裂解信号肽，成熟的蛋白质分泌到培养基中^[29-31]。另外，

Walther 等^[39]基于电区域 (DCR) 和两亲性螺旋 (APH) 的互补性，也提出了 Tat 分泌途径一种可能机制：这种 Tat 分泌途径的蛋白质被 7 个盐桥“拉链”，形成了一个易于穿过脂质双层的发夹结构。Tat 途径已

成为一种日益流行的运输途径，因为它将目标蛋白全折叠分泌到培养基中，从而降低了纯化成本，在生物技术应用方面的研究也越来越受到重视。

3 信号肽在提高外源蛋白分泌表达中的应用

3.1 基于对信号肽的直接替换提高外源蛋白的表达

目前，对信号肽的应用仍然处于探索阶段，由于对分泌机制了解有限，准确预算出一个蛋白的最佳信号肽还较为困难。虽然研究人员开发了有助于信号肽选择的预测工具，但评分和蛋白实际分泌量似乎不相关^[12]。为了提高外源蛋白的表达量，学者们开始尝试直接在外源蛋白的N端添加或者替换原有信号肽，详见表1。虽然这种方式工作量较大，且存在一定的随机性，但近年来在提高外源蛋白表达量方面也取得了一定成果，实现了酰胺酶^[40]、氨肽酶^[41]、碱性丝氨酸蛋白酶^[42]、角蛋白

酶^[43]、L-天冬酰胺酶^[44]、β-甘露聚糖酶^[45]、碱性果胶酶^[46]、果聚糖蔗糖酶^[47]、普鲁兰酶^[48]、聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶^[49]、脂肪酶^[50]、β-半乳糖苷酶^[51]和淀粉酶^[52-56]胞外表达量的提高。通常借鉴被认为能够高效分泌外源蛋白的常用信号肽，如Sec分泌途径的AmyE^[40-42, 44, 47-49, 51-52, 55-56]、AprE^[42, 46, 51-52, 55]、NprE^[41-43, 45, 47-48, 51-54, 56]、NprB^[40, 42, 45, 50, 54]、SacB^[40-42, 47-49, 52, 54, 56]和Bpr^[41-42, 46-47, 49, 53-55]等外源蛋白的信号肽；Tat分泌途径的PhoD^[42, 45, 49, 51, 54, 56]、YwbN^[42-46, 49, 51, 53]、LipA^[40, 42-45, 50, 54, 56]、WapA^[42-44, 46-47, 52-53]等外源蛋白的信号肽，构建几个乃至几十个含有不同信号肽的异源表达载体，分别将其导入枯草芽孢杆菌中，并进行外源蛋白分泌量的比较，进而确定哪种信号肽适合外源蛋白的表达。这种方式筛选到的高表达信号肽，由于筛选范围的狭小，未必就是这种外源

表 1 基于对信号肽的直接替换提高外源蛋白表达的研究

外源蛋白	信号肽类型	最适信号肽	分泌途径	胞外活性	参考文献
Foreign protein	Signal peptide type	Optimal signal peptide	Secretory pathway	Extracellular activity	Reference
酰胺酶 Amidase	20 个 Sec+1 个 Tat	Pac	Sec	+1.36 倍	[40]
氨肽酶 Aminopeptidase	19 个 Sec	YncM	Sec	+1.20 倍	[41]
碱性丝氨酸蛋白酶 Alkaline serine protease	73 个 Sec	DacB	Sec	953.00 U/mg	[42]
角蛋白酶 Keratinase	5 个 Sec+4 个 Tat	LipA	Tat	+2.00 倍	[43]
L-天冬酰胺酶 L-asparaginase	5 个 Sec+3 个 Tat	WapA	Tat	+1.72 倍	[44]
β-甘露聚糖酶 β-mannanase	3 个 Sec+3 个 Tat	LipA	Tat	+1.25 倍	[45]
碱性果胶酶 Alkaline polygalacturonate lyase	11 个 Sec+3 个 Tat	Bpr	Sec	313.70 U/g	[46]
果聚糖蔗糖酶 Encoding levansucrase	7 个 Sec+1 个 Tat	YncM	Sec	+2.61 倍	[47]
普鲁兰酶 Pullulanase	4 个 Sec	SacB	Sec	2.82 U/mL	[48]
聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶 PETase	3 个 Sec+3 个 Tat	SP _{PETase}	Tat	+3.80 倍	[49]
脂肪酶 Lipase	6 个 Sec+2 个 Tat	PhoD	Tat	+2.33 倍	[50]
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	3 个 Sec+2 个 Tat	PhoD	Tat	+10.10 倍	[51]
α-淀粉酶 α-Amylase	5 个 Sec+1 个 Tat	NprE	Sec	260.00 U/mL	[52]
碱性淀粉酶 Alkaline amylase	9 个 Sec+4 个 Tat	YwbN	Tat	364.5 U/mL	[53]
α-淀粉酶 α-Amylase	44 个 Sec+2 个 Tat	BglS	Sec	1393.30 U/mL	[54]
α-淀粉酶 α-Amylase	8 个 Sec+1 个 Tat	YfkN	Sec	+10.00 倍	[55]
α-淀粉酶 α-Amylase	6 个 Sec+2 个 Tat	NprE	Sec	242.00 U/mL	[56]

注：+：表示经替换信号肽后，外源蛋白的胞外活性增加的倍数。下同
Note：+ indicates a fold increase in the extracellular activity of the foreign protein compared to the original signal peptide. The same below

蛋白分泌最佳信号肽。有趣的是，我们无法确定哪种类型的信号肽比较适合外源蛋白的分泌表达，甚至，同一类外源蛋白（淀粉酶）由于基因和性质上的差异，导致所筛选的高效表达信号肽也不同^[52-56]。虽然 Tat 分泌途径的信号肽只有 24 种，但在提高外源蛋白表达方面，似乎概率性更高^[43-45, 49-51, 53]。

3.2 基于对信号肽的突变提高外源蛋白的表达

有报道显示枯草芽孢杆菌信号肽 N 端带正电荷氨基酸数量和 H 端疏水性强弱对外源蛋白的分泌有一定影响^[2-4]，通过对信号肽的突变也能提高外源蛋白的表达量，见表 2。一般采用 3 种方式改造信号肽的 N 端区域：将原有氨基酸突变成碱性氨基酸（K/R）^[50, 53, 57]；在 N 端直接插入碱性氨基酸（K/R）^[53]和将原有氨基酸进行饱和突变^[50, 58]。通过对信号肽的 N 端区域进行改造实现了脂肪酶^[50]、淀粉酶^[53, 55]、地衣聚糖酶^[57]和角质酶^[58]表达量的提高。此外，也会采用 N 端和 H 端相结合的方式提高信号肽的分泌能力，如 Fu 等^[57]和马樱芳等^[53]在增加 N 端正电荷数量基础上，进一步将 H 端的极性氨基酸突变成非极性氨基酸，从而降低 H 端的疏水性，实现了提高淀粉酶^[53]和地衣聚糖酶^[57]的胞

外酶活。此外，祝发明等^[59]针对信号肽 AmyX 三个区域的同时突变使 β- 半乳糖苷酶胞外酶活提高了 2.5 倍。研究也发现信号肽 N 端所含正电荷数量也不是越多越好，Fu 等^[57]在对信号肽 H1 进行突变时发现，当 N 端有 4 个正电荷的碱性氨基酸时，其分泌能力反而大幅度降低，这与周勇^[50]、袁林等^[55]和马樱芳等^[53]对信号肽 N 端区域突变时所得结论一致。Caspers 等^[58]在对信号肽（AmyE）N 端区域进行饱和突变时，突变体 F2D 和 F2E 虽然导致信号肽 N 端正电荷数量减少，但角质酶胞外酶活却提高了约 3 倍，也佐证了这一观点。综上，通过对信号肽 N 端和 H 端的氨基酸残基进行适当的突变和插入，改变信号肽 N 端区域的带正电数^[50, 53, 55, 57-58]和降低 H 端的疏水性^[50, 57]，进一步改变了信号肽二级结构和前体蛋白折叠方式，从而提高外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的分泌能力^[2-4, 58]。综合前人^[57-58]的研究结果可知信号肽 N 端的正电荷数量 +2 或 +3 比较合适，具体原因有待进一步探究。通过这种方式，较构建信号肽文库大大减少了工作量，相对于直接替换其他类型信号肽，也增加了准确性，作者认为这种方式将是未来对信号肽改造的一个热门趋势。

表 2 基于对信号肽的突变提高外源蛋白表达的研究

Table 2 Research on improving the expression of foreign protein based on mutation of signal peptide

外源蛋白 Foreign protein	信号肽 Signal peptide	分泌途径 Secretory pathway	信号肽突变点 Signal peptide mutation site	胞外活性 Extracellular activity	参考文献 Reference
脂肪酶 Lipase	PhoD	Tat	N3K、N3K/L4K、D25R、D25R/F29R	+1.12-1.31 倍	[50]
碱性淀粉酶 Alkaline amylase	YwbN	Tat	E4K/E9K、I16N/L17S/W19S	+1.08-1.58 倍	[53]
α- 淀粉酶 α-Amylase	YfkN	Sec	I3G/Q4R	+13.00 倍	[55]
地衣聚糖酶 Lichenase	H1	-	VNIAFMLF/RKIAGMAT	+4.60 倍	[57]
角质酶 Cutinase	AmyE	Sec	F2D、F2E、F6W、K4L	+2-3 倍	[58]
β- 半乳糖苷酶 β-galactosidase	AmyX	Tat	N4I/ Y8F/N17I	+2.50 倍	[59]

注：- 表示未统计

Note：- indicates that the article is not counted

3.3 基于构建信号肽文库提高外源蛋白的表达

为了构建优化异源蛋白分泌的有力策略，Brocmeier 等^[12]构建了一个信号肽库，结合高通量筛选的方法，可以筛选到分泌异源蛋白的最佳信号肽，这是目前应用最为广泛且成功的方式，见表 3。其步骤总结如下：首先，通过 PCR 的方式从 *B. subtilis* 168^[12, 60-65]或 *B. subtilis* 1A427^[63]基因组上扩增出

173 种 Sec 信号肽目的片段，混合成一个信号肽杂合文库，即使商业化的文库^[60, 63-64]也是采用这种方式获得；同时，构建一个包含外源蛋白的表达载体骨架，研究表明，信号肽和外源蛋白之间多余的氨基酸（酶切位点），似乎并不影响外源蛋白的分泌^[12, 60, 66]，也可采用融合 PCR 的方式避免这一问题^[65]。其次，通过酶切或 PCR 的方式将包含外源

表 3 基于构建信号肽文库提高外源蛋白表达的研究

外源蛋白	信号肽类型	分泌途径	最适信号肽	胞外活性	参考文献
Foreign protein	Signal peptide type	Secretory pathway	Optimal signal peptide	Extracellular activity	Reference
角质酶 Cutinase	173 个 Sec	Sec	Epr	4.67 U/mL	[12]
细胞质酯酶 Cytoplasmatic esterase	173 个 Sec	Sec	YwmC	1.50 U/mL	[12]
α - 麦芽淀粉酶 Maltogenic α -amylase	173 个 Sec	Sec	YvcE	250.70 U/mL	[60]
蛋白酶 Protease	173 个 Sec	Sec	YbdN	+7.00 倍	[61]
纳豆植酸酶 Natto phytase	173 个 Sec	Sec	Php	+2.00 倍	[62]
α - 淀粉酶 α -Amylase	173 个 Sec	Sec	YomL	113.25 U/mL	[63]
α - 淀粉酶 α -Amylase	173 个 Sec	Sec	YojL	+3.5 倍	[64]
α - 淀粉酶 α -Amylase	173 个 Sec	Sec	PeI	+1.68 倍	[65]
木聚糖酶 Xylanase	114 个 Sec+24 个 Tat	Sec	PhoB	327.20 U/mL	[66]

蛋白的载体骨架线性化，借助于无缝克隆^[62-66]进行信号肽文库的构建，这就需要在 PCR 扩增信号肽片段时在两端预留 20 bp 用于与载体重组的序列。由于枯草芽孢杆菌的转化效率不如大肠杆菌，构建好的信号肽文库质粒导入枯草芽孢杆菌之前，通常会选择一个大肠杆菌亚文库来介导^[12, 60, 66]，这就要求表达载体必然是一个穿梭质粒，至今，只有 Fu 等^[65]实现了将构建好的信号肽文库质粒直接导入枯草芽孢杆菌中。对于信号肽混合质粒导入枯草芽孢杆菌的方式有 spizizen 法^[12, 60, 62, 64-65]、原生质体法^[61]和电转化法^[63, 66]。最后，信号肽文库的筛选，通常结合高通量筛选技术^[12, 60-61, 63, 65]或与透明圈^[61, 65]一起进行筛选。Tsuji 等^[62]也报道了直接采用透明圈的方式进行筛选；Zhang 等^[66]则利用针对每一个信号肽，从构建到筛选均是一一对应，直接比较每一个胞外木聚糖酶活性的方式进行筛选。目前已完成了角质酶^[12]、细胞质酯酶^[12]、 α -麦芽淀粉酶^[60]、蛋白酶^[61]、植酸酶^[62]、 α -淀粉酶^[63-65]和木聚糖酶^[66]的最佳信号肽的筛选。本课题组也对来自解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶最佳信号肽进行了筛选，使其胞外淀粉酶活力提高了 3.8 倍^[63]。由于每一种外源蛋白在枯草芽孢杆菌的分泌方式均不同，构建多种混合信号肽文库的方法虽然复杂且工作量和筛选任务繁重，但能够获得一个真实的外源蛋白分泌最佳信号肽。此外，也有学者报道了利用枯草芽孢杆菌信号肽文库在 *Escherichia coli*^[67-69]、*Corynebacterium glutamicum*^[70]和 *Bacillus*

lincheniformis^[61]宿主菌中实现提高外源蛋白表达量的应用。

3.4 基于信号肽中稀有密码子提高外源蛋白的表达

目前关于外源蛋白基因密码子偏好性的研究主要集中在大肠杆菌和酿酒酵母 5' 端信号肽区域^[71]。研究表明，大肠杆菌中信号肽的第二个氨基酸更偏好能保证高起始翻译的赖氨酸（L）密码子是 AAA 而不是 AAG^[72-73]；革兰氏阳性菌 *Streptomyces coelicolor*^[74]同样也发现稀有密码子在信号肽序列中的高频率使用，甚至信号肽区域使用稀有密码子获得的蛋白质产物是使用普通密码子的数倍^[75-76]。通过分析其蛋白质产物二级结构发现信号肽使用不同密码子得到的蛋白质二级结构有显著的差异，可能是由于使用通用密码子时蛋白质翻译速度过快，信号肽序列区域的构象和正常情况不同，导致后续成熟蛋白的折叠也出现错误而被降解^[77]。信号肽区域的稀有密码子对保证正确的共翻译折叠具有重要作用^[71]。因此，可在分泌蛋白基因 5' 端信号肽区域使用 tRNA 适应指数（tRNA adaptation index, tAI）值低的密码子减慢翻译速度以帮助蛋白质的跨膜、加工成熟和折叠^[78]。此外，在 SRP 结合位点下游大约 35-40 个密码子的区域内存在较多的稀有密码子，通过减缓翻译速度，帮助信号肽序列与 SRP 的结合^[79]。但至今，在枯草芽孢杆菌表达系统中没有报道过改变外源蛋白信号肽中的稀有密码子的方式来提高分泌量的研究。

3.5 基于信号肽分泌系统中相关蛋白的改造提高外源蛋白的表达

枯草芽孢杆菌将外源蛋白分泌到胞外培养基中,除了必须有信号肽引导外,还需要一系列相关蛋白的参与,包括靶向因子、转运酶、信号肽酶、分子伴侣和胞外蛋白酶,通过改造这些相关蛋白也可以提高外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达^[80]。(1)靶向因子是将待分泌蛋白从细胞质内转移至转运酶上的辅助蛋白,在枯草芽孢杆菌表达系统中有 FtsY 和 CsaA 这两种辅助蛋白靶向因子^[80]。研究表明过表达 FtsY 和 CsaA 蛋白,可以提高目标蛋白在枯草芽孢杆菌中的分泌量(US 6410262),相反,抑制了这两种蛋白的表达,目标蛋白在枯草芽孢杆菌中的分泌量也会相应的降低^[80-82]。(2)分泌外源蛋白时跨膜是在转运酶复合体帮助下完成的, Kakeshtia 等^[83]删除了 SecA 的 C 末端区域,成功的提高了碱性纤维素酶和干扰素在枯草芽孢杆菌中的胞外分泌量;另外,对 SecA 的 C 末端区的点突变也可以提高 PhoB 蛋白的分泌量(EP 1633873)。过表达转运酶组分中的相关蛋白也是提高外源蛋白分泌量的有效措施之一,如 Mulder 等^[84]首次人工构建了 SecYEG 操纵子,并最终增加了枯草芽孢杆菌分泌淀粉酶的产量。Genecor 公司通过 SecA、SecDF 和 SecG 的过表达,发现可以增强某些异源蛋白在枯草芽孢杆菌中的分泌(EP 1003872、US 7807808、US 6258563)。(3)信号肽酶的不足可能会导致信号肽切割效率的下降,研究发现, ClpXP 蛋白酶的缺失可以提高 sipS、sipT 和 sipV 信号肽酶基因的转录水平,从而提高了信号肽的加工过程并增加了蛋白分泌速率^[4],同时还发现,当敲除 sipS 基因后, AmyQ 信号肽的切割效率则有明显提高;另一方面,过表达信号肽酶 sipI 也增强了宿主切割 AmyQ 信号肽的能力^[85]。所以对信号肽酶进行过表达,或者解除某些信号肽酶相互之间的抑制有望增加某些异源分泌蛋白在枯草芽孢杆菌中的分泌表达量^[80]。(4)分子伴侣能够降低待分泌蛋白错误折叠的概率,增加被靶向因子的识别。Wu 等^[86]失活 HrcA 导致胞内分子伴侣组成型表达,使得 scFV 的分泌量增加了 60%,另外,过表达胞外分子伴侣 prsA 也导致了 scFV 总量增加,进一步共表达胞内和胞外伴侣则导致了 scFV 分泌量更加明

显的增加。这与 Kontinen 等^[87]报道的过表达 prsA 后,淀粉酶和蛋白酶在枯草芽孢杆菌中的分泌量分别提高了 6 倍和 2 倍是一致的。因此,促进外源蛋白在细胞膜外进行快速折叠的手段,有望增加某些分泌蛋白的胞外分泌量。(5)敲除枯草芽孢杆菌宿主菌中的蛋白酶基因也能有效提高外源蛋白的分泌量^[2-4, 26]。目前商业化的 WB800 就是敲除了 8 个胞外蛋白酶基因,但敲除过多的蛋白酶基因会带来菌株生长活力下降的问题。

4 总结与展望

近年来,枯草芽孢杆菌表达系统因其在蛋白表达纯化和分泌活性蛋白等方面要明显优于大肠杆菌,已成为比较热门的表达体系之一。学者们经过多年的不懈努力,如今虽建立了一套有效的外源蛋白枯草表达系统,并且在外源蛋白表达方面也取得了很大的进展,但相比大肠杆菌表达系统,还是远远滞后的。外源蛋白在枯草芽孢杆菌中能否实现高效表达,信号肽是关键元件之一,适配的信号肽甚至能够提高外源蛋白表达量高达数十倍。目前,国内外学者主要针对枯草芽孢杆菌信号肽的 Sec 和 Tat 分泌途径进行研究,基于信号肽的简单替换、突变、构建高通量文库和改造分泌途径中相关蛋白的方式来提高外源蛋白的表达量,虽取得了一定的进展,但仍有上升空间。作者认为未来的研究方向应该集中以下方面:(1)增加枯草芽孢杆菌信号肽的基础研究与应用,证明这种潜在的工业细菌将通过不断优化可成为超级分泌细胞工厂。在信号肽分泌途径研究方面,尤其是 Sec 和 Tat 途径,仍然需要进一步研究了解每个信号肽和分泌途径的功能及其相互作用,特别是 Tat 途径信号肽,虽然在数量上较少,但似乎更能提高外源蛋白分泌量,这可能与转运途径中参与蛋白有关。(2)可以基于生物信息学,针对信号肽的结构, N 端所带正电荷数为 +2 或 +3,降低 H 端的疏水性,模拟其在分泌途径中的可行性,在一定理论上,建立一套实用性的预测平台,降低工作量的同时确保提高外源蛋白分泌效率的准确性。(3)基于信号肽分泌途径中相关蛋白的单个或多种基因的组合过表达,提高其在外源蛋白转运途径中的工作效率,使得外源蛋白的转运、加

工、折叠和分泌更加高效,胞外分泌量也会相应提高。

(4) 结合其他蛋白表达优化方法:如启动子、稀有密码子、代谢工程技术、转录组学、蛋白组学和基因编辑等技术,通过整体策略提高外源蛋白的分泌表达。总之,从本质上研究分泌途径的机制、信号肽优选方式和影响因素是至关重要的,为未来进一步扩大枯草芽孢杆菌的高效工业应用的范围提供理论和实验依据。

参考文献

- [1] Lee NK, Kim WS, Paik HD. *Bacillus* strains as human probiotics : characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier [J] . Food Science and Biotechnology, 2019, 28 (5) : 1297-1305.
- [2] Cui WJ, Han LH, Suo FY, et al. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond [J] . World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2018, 34 (10) : 145-164.
- [3] Gu Y, Xu XH, Wu YK, et al. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories : from rational design to industrial applications [J] . Metabolic Engineering, 2018, 50 : 109-121.
- [4] Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, et al. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis* : separating the “secrets” of the secretome [J] . Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68 (2) : 207-233.
- [5] Song Y, Nikoloff JM, Zhang D. Improving protein production on the level of regulation of both expression and secretion pathways in *Bacillus subtilis* [J] . World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2015, 25 (7) : 963-977.
- [6] 熊海涛, 韦宇拓. 枯草芽孢杆菌表达系统及其启动子的研究进展 [J] . 广西科学, 2018, 25 (3) : 233-241.
Xiong HT, Wei YT. Research progress of *Bacillus subtilis* expression on system and its promoter regulatory elements [J] . Guangxi Sciences, 2018, 25 (3) : 233-241.
- [7] Blobel G. Transfer of proteins across membranes I. presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma [J] . J Cell Biol, 1975, 67 (3) : 835-851.
- [8] Walter P, Blobel G. Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum [J] . Proceedings of the National Academy of Sciences, 1980, 77 (12) : 7112-7116.
- [9] Gilmore R, Walter P, Blobel G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum II. isolation and characterization of the signal recognition particle receptor [J] . The Journal of Cell Biology, 1982, 95 (2) : 470-477.
- [10] Tjalsma H, Noback MA, Bron S, et al. *Bacillus subtilis* contains four closely related type I signal peptidases with overlapping substrate specificities : constitutive and temporally controlled expression of different sip genes [J] . Journal of Biological Chemistry, 1997, 272 (41) : 25983-25992.
- [11] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, et al. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis* : a genome-based survey of the secretome [J] . Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64 (3) : 515-547.
- [12] Brockmeier U, Caspers M, Freudl R, et al. Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis* : a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria [J] . J Mol Biol, 2006, 362 (3) : 393-402.
- [13] Tjalsma H, Zanen G, Venema G, et al. The potential active site of the lipoprotein-specific (type II) signal peptidase of *Bacillus subtilis* [J] . Journal of Biological Chemistry, 1999, 274 (40) : 28191-28197.
- [14] Georg K, Klemens W, Irmgard S. Structure of the complete bacterial SRP Alu domain [J] . Nucleic Acids Research, 2014, 42 (19) : 12284-12294.
- [15] Struck JCR, Hartmann RK, Toschka HY, et al. Transcription and processing of *Bacillus subtilis* small cytoplasmic RNA [J] . Molecular & General Genetics, 1989, 215 (3) : 478-482.
- [16] Carabetta VJ, Greco TM, Cristea IM, et al. YfmK is an N ϵ -lysine acetyltransferase that directly acetylates the histone-like protein HBsu in *Bacillus subtilis* [J] . Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019, 116 (9) : 1-6.
- [17] Tomas F, Daniel W, Peter O, et al. Dynamic action of the Sec machinery during initiation, protein translocation and termination [J] . eLife, 2018, 7 : 35112-3538.
- [18] Adachi S, Murakawa Y, Hiraga S. Dynamic nature of SecA and its associated proteins in *Escherichia coli* [J] . Frontiers in Microbiology, 2015, 75 (6) : 75-87.
- [19] Voros A, Simm R, Slamti L, et al. SecDF as part of the Sec-translocase facilitates efficient secretion of *Bacillus cereus* toxins

- and cell wall-associated proteins [J]. *PLoS One*, 2014, 8 (9) : e103326.
- [20] Chiba S, Ito K. MifM monitors total YidC activities of *Bacillus subtilis*, including that of YidC₂, the target of regulation [J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197 (1) : 99-107.
- [21] Kudva R, Denks K, Kuhn P, et al. Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria : the Sec and Tat dependent protein transport pathways [J]. *Research in Microbiology*, 2013, 164 (6) : 505-534.
- [22] Wang H, Ma Y, Hsieh YH, et al. SecAAA trimer is fully functional as SecAA dimer in the membrane : existence of higher oligomers? [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 447 (2) : 250-254.
- [23] Ma RJ, Wang YH, Liu L, et al. Production enhancement of the extracellular lipase LipA in *Bacillus subtilis* : effects of expression system and Sec pathway components [J]. *Protein Expression and Purification*, 2018, 142 : 81-87.
- [24] Shapova YA, Paetzel M. Crystallographic analysis of *Bacillus subtilis* CsaA [J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2007, 63 (4) : 478-485.
- [25] Terra R, Stanley-Wall NR, Cao G, et al. Identification of *Bacillus subtilis* SipW as a bifunctional signal peptidase that controls surface-adhered biofilm formation [J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (11) : 2781-2790.
- [26] Motojima F, Fujii K, Yoshida M. Chaperonin facilitates protein folding by avoiding initial polypeptide collapse [J]. *Journal of Biochemistry*, 2018, 164 (5) : 369-379.
- [27] Kang Z, Yang S, Du G, et al. Molecular engineering of secretory machinery components for high-level secretion of proteins in *Bacillus* species [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41 (11) : 1599-1607.
- [28] Seydlová G, Halada P, Fiser R, et al. DnaK and GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress [J]. *J Appl Microbiol*, 2012, 112 (4) : 765-742.
- [29] Anne J, Economou A, Bernaerts K. Protein secretion in Gram-positive bacteria : from multiple pathways to biotechnology [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 404 : 267-308.
- [30] Frain KM, Dijl JMV, Robinson C. The Twin-Arginine Pathway for Protein Secretion [M] // *Protein Secretion in Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, 2019.
- [31] Frain KM, Robinson C, Dijl JMV. Transport of folded proteins by the Tat system [J]. *Protein J*, 2019, 38 (4) : 377-388.
- [32] Freudl R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems [J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17 (1) : 52-62.
- [33] Vivianne J, Goosens CG, Dijl JMV, et al. The Tat system of Gram-positive bacteria [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2014, 1843 (8) : 1698-1706.
- [34] Van DPR, Mader U, Homuth G, et al. Environmental salinity determines the specificity and need for Tat-dependent secretion of the YwbN protein in *Bacillus subtilis* [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (3) : e18140.
- [35] Monteferrante CG, Miethke M, Vand PR, et al. Specific targeting of the metallophosphoesterase YkuE to the *Bacillus* cell wall requires the Twin-arginine translocation system [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287 (35) : 29789-29800.
- [36] Palmer T, Stansfeld PJ. Targeting of proteins to the twin-arginine translocation pathway [J]. *Mol Microbiol*, 2020, 113 (5) : 861-871.
- [37] Goosens VJ, Van DJM. Twin-arginine protein translocation [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 404 : 69-94.
- [38] Goosens VJ, De-San-Eustaquio-Campillo A, Carballido-López R, et al. A Tat ménage à trois-the role of *Bacillus subtilis* TatAc in twin-arginine protein translocation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2015, 1853 (10) : 2425-2753.
- [39] Walther TH, Gottselig C, Grage SL, et al. Folding and self-assembly of the TatA translocation pore based on a charge zipper mechanism [J]. *Cell*, 2013, 152 (1-2) : 316-326.
- [40] Kang XM, Cai X, Huang ZX, et al. Construction of highly active secretory expression system in *Bacillus subtilis* of a recombinant amidase by promoter and signal peptide engineering [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143 : 833-841.
- [41] Guan CR, Cui WJ, Cheng JT, et al. Construction of highly active secretory expression system via an engineered dual promoter and a highly efficient signal peptide in *Bacillus subtilis* [J]. *New Biotechnology*, 2016, 33 (3) : 372-379.
- [42] Li YH, Shi CS, Li DK, et al. Engineering a highly efficient expression system to produce BcaPRO protease in *Bacillus subtilis* by an optimized promoter and signal peptide [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138 : 903-911.

- [43] Tian JW, Long X, Tian YQ, et al. Enhanced extracellular recombinant keratinase activity in *Bacillus subtilis* SCK6 through signal peptide optimization and site-directed mutagenesis [J]. RSC Advances, 2019, 9 (57) : 33337-33344.
- [44] Feng X, Liu S, Jiao Y, et al. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2017, 101 (4) : 1509-1520.
- [45] Song YF, Fu G, Dong HN, et al. High-efficiency Secretion of β -mannanase in *Bacillus subtilis* through protein synthesis and secretion optimization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65 (12) : 2540-2548.
- [46] Zhang JJ, Kang Z, Lin ZM, et al. High-level extracellular production of alkaline polygalacturonate lyase in *Bacillus subtilis* with optimized regulatory elements [J]. Bioresource Technology, 2013, 146 : 543-548.
- [47] Gu YY, Zheng JY, Feng J, et al. Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2017, 101 (10) : 4163-4142.
- [48] Wang YP, Liu YH, Wang ZX, et al. Influence of promoter and signal peptide on the expression of pullulanase in *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36 (9) : 1783-1789.
- [49] Huang X, Cao LC, Qin ZM, et al. Tat-independent secretion of polyethylene terephthalate hydrolase PETase in *Bacillus subtilis* 168 mediated by its native signal peptide [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66 (50) : 13217-13227.
- [50] 周勇. 嗜麦芽糖寡养单胞菌脂肪酶 LipS 在枯草芽孢杆菌中的高效分泌表达 [D]. 杭州：浙江大学, 2015.
- Zhou Y. High level secretion expression of a lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* in *Bacillus subtilis* [J]. Hangzhou : Zhejiang University, 2015.
- [51] Ren GH, Cao LC, Kong W, et al. Efficient secretion of the β -galactosidase Bgal1-3 via both Tat-dependent and Tat-independent pathways in *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64 (28) : 5708-5726.
- [52] Chen JQ, Gai YM, Fu G, et al. Enhanced extracellular production of α -amylase in *Bacillus subtilis* by optimization of regulatory elements and over-expression of PrsA lipoprotein [J]. Biotechnology Letters, 2015, 37 (4) : 899-906.
- [53] 马樱芳. 基于 ARTP 诱变、表达元件定向改造及发酵优化提高枯草芽孢杆菌生产重组碱性淀粉酶的水平 [D]. 无锡：江南大学, 2016.
- Ma YF. Improving the yield of recombinant alkaline amylase in *Bacillus subtilis* by ARTP mutagenesis, directed modification of expression elements and fermentation optimization [J]. Wuxi : Jiangnan University, 2016.
- [54] 刘金岚, 付刚, 董会娜, 等. 通过信号肽筛选优化耐高温 α -淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的分泌 [J]. 工业微生物, 2017, 47(1) : 17-23.
- Liu JL, Fu G, Dong HN, et al. Optimization of thermostable α -amylase secretion by screening of optimal signal peptide in *Bacillus subtilis* [J]. Industrial Microbiology, 2017, 47 (1) : 17-23.
- [55] 袁林, 曾静, 郭建军, 等. 极端嗜热酸性 α -淀粉酶 PFA 在枯草芽孢杆菌中的高效分泌表达 [J]. 食品科学, 2018, 39(18) : 100-108.
- Yuan L, Zeng J, Guo JJ, et al. Efficient secretory expression of hyperthermoacidophilic α -Amylase PFA in *Bacillus subtilis* WB600 [J]. Food Science, 2018, 39 (18) : 100-108.
- [56] 张士彬, 陈景奇, 崔艳艳, 等. 中温 α -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的高效表达及其发酵条件优化 [J]. 食品与发酵工业, 2016, 42 (4) : 50-56.
- Zhang SB, Chen JQ, Cui YY, et al. High level expression of medium α -amylase in *Bacillus subtilis* and optimization of fermentation conditions [J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42 (4) : 50-56.
- [57] Fu LL, Xu ZR, Shuai JB, et al. High-level secretion of a chimeric thermostable lichenase from *Bacillus subtilis* by screening of site-mutated signal peptides with structural alterations [J]. Current Microbiology, 2008, 56 (3) : 287-292.
- [58] Caspers M, Brockmeier U, Degering C, et al. 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 & Biotechnology, 2010, 86 (6) : 1877-1885.
- [59] 祝发明, 刘辉, 曹要玲, 等. 枯草芽孢杆菌 AmyX 基因信号肽性能优化研究 [J]. 西北农林科技大学学报：自然科学版, 2006, 36 (9) : 11-16.
- Zhu FM, Liu H, Cao YL, et al. Studies on optimizing the signal pep-

- tide of AmyX protein from *B. subtilis* [J]. Journal of Northwest A&F University : Social Science Edition, 2006, 36 (9) : 11-16.
- [60] Yao DB, Su LQ, Li N, et al. Enhanced extracellular expression of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase in *Bacillus subtilis* through signal peptide optimization, chaperone overexpression and α -amylase mutant selection [J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18 (1) : 69-81.
- [61] Degering C, Eggert T, Puls M, et al. Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by screening of homologous and heterologous signal peptides [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76 (19) : 6370-6376.
- [62] Tsuji S, Tanaka K, Takenaka S, et al. Enhanced secretion of natto phytase by *Bacillus subtilis* [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2015, 79 (11) : 1906-1914.
- [63] 蒋蕊. α -淀粉酶共表达系统的研究及在枯草芽孢杆菌中最优信号肽的筛选 [D]. 昆明 : 云南师范大学, 2019.
- Jiang R. Research on co-expression of α -amylase and screening of optimal signal in *Bacillus subtilis* [J]. Kunming : Yunnan Normal University, 2019.
- [64] 李雨桐. 嗜热脂肪芽孢杆菌麦芽糖淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的重组表达及发酵优化 [D]. 无锡 : 江南大学, 2018.
- Li YT. Recombinant expression and fermentation optimization of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase in *Bacillus subtilis* [J]. Wuxi : Jiangnan University, 2018.
- [65] Fu G, Liu JL, Li JS, et al. 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.
- [66] Zhang WW, Yang MM, Yang YD, et al. Optimal secretion of alkali-tolerant xylanase in *Bacillus subtilis* by signal peptide screening [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100 (20) : 8425-8756.
- [67] Albiniak AM, Matos CFRO, Branston SD, et al. High-level secretion of a recombinant protein to the culture medium with a *Bacillus subtilis* twin-arginine translocation system in *Escherichia coli* [J]. FEBS Journal, 2013, 280 (16) : 3810-3821.
- [68] 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 Bugs, 2012, 3 (6) : 334-338.
- [69] Zhang FY, He HH, Deng T, et al. 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 : 339-352.
- [70] Hemmerich J, Rohe P, Kleine B, et al. Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15 (1) : 208-219.
- [71] 刘慧玲. 分泌蛋白基因编码区 5' 端密码子使用偏好性研究 [D]. 杨凌 : 西北农林科技大学, 2016.
- Liu HL. Codon usage bias in 5' terminal of coding sequences reveals a distinct enrichment of gene functions [J]. Yangling : Northwest A&F University, 2016.
- [72] Zalucki YM, Power PM, Jennings MP. Selection for efficient translation initiation biases codon usage at second amino acid position in secretory proteins [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35 (17) : 5748-5754.
- [73] Power PM, Jones RA, Beacham IR, et al. Whole genome analysis reveals a high incidence of non-optimal codons in secretory signal sequences of *Escherichia coli* [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2004, 322 (3) : 1038-1044.
- [74] Li YD, Li YQ, Chen JS, et al. Whole genome analysis of non-optimal codon usage in secretory signal sequences of *Streptomyces coelicolor* [J]. Biosystems, 2006, 85 (3) : 225-230.
- [75] Zalucki YM, Jennings MP. Experimental confirmation of a key role for non-optimal codons in protein export [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 355 (1) : 143-148.
- [76] Zalucki YM, Gittins KL, Jennings MP. Secretory signal sequence non-optimal codons are required for expression and export of β -lactamase [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2008, 366 (1) : 135-141.
- [77] Zalucki YM, Jones CE, Ng PSK, et al. Signal sequence non-optimal codons are required for the correct folding of mature maltose binding protein [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2010, 1798 (6) : 1244-1249.
- [78] Mahlab S, Linial M, Pilpel Y. Speed controls in translating secretory proteins in Eukaryotes-an evolutionary perspective [J]. Plos Computational Biology, 2014, 10 (1) : e1003294.
- [79] Pechmann S, Chartron JW, Frydman J. Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain

- recognition by SRP in vivo [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21 (12): 1100-1105.
- [80] 陈景奇. α -淀粉酶的异源表达、调控元件优化和分泌瓶颈鉴定 [D]. 天津 : 天津大学, 2015.
- Chen JQ. The heterologous expression of α -amylase regulatory element optimization and identification of secretion bottleneck [J]. Tianjin : Tianjin University, 2015.
- [81] Muller JP, Bron S, Venema G, et al. Chaperone-like activities of the CsaA protein of *Bacillus subtilis* [J]. *Microbiology*, 2000, 146 (1): 77-88.
- [82] Muller JP, Ozegowski J, Vettermann S, et al. Interaction of *Bacillus subtilis* CsaA with SecA and precursor proteins [J]. *Biochemical Journal*, 2000, 348 (2): 367-373.
- [83] Kakeshita H, Kageyama Y, Ara K, et al. Enhanced extracellular production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis* by deleting the C-terminal region of the SecA secretory machinery [J]. *Molecular Biotechnology*, 2010, 46 (3): 250-257.
- [84] Mulder KCL, Bandola J, Schumann W. Construction of an artificial secYEG operon allowing high level secretion of α -amylase [J]. *Protein Expression & Purification*, 2013, 89 (1): 92-96.
- [85] Vitikainen M, Pummi T, Airaksinen U, et al. Quantitation of the capacity of the secretion apparatus and requirement for PrsA in growth and secretion of α -amylase in *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (6): 1881-1890.
- [86] Wu SC, Ye R, Wu XC, et al. Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (11): 2830-2835.
- [87] Kontinen VP, Sarvas M. The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion [J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 8 (4): 727-737.

(责任编辑 朱琳峰)