前导肽对 *Aspergillus pseudoglaucus* 酸性蛋白酶 App 表达及功能的影响

刘海燕， 张荣珍*， 李利宏， 周丽仙， 徐 岩
（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：从 *Aspergillus pseudoglaucus* 基因组中克隆酸性蛋白酶 App 基因，分别将其自身前导肽基因 *pro*、来自 *Candida tropicalis* 的 candidapepsin 前导肽基因 *CP*、*Saccharomyces cerevisiae* 的 proteinase A 前导肽基因 *PP*、*Rhizomucor miehei* 的 proteinase 前导肽基因 *RP*、*Candida albicans* 的 aspartic proteinase 2 前导肽基因 *SP* 导入基因的 5′端，获得含不同前导肽的 App 基因片段，于 *Escherichia coli* 中表达。SDS-PAGE 结果显示，不加前导肽时，蛋白质不表达；酶活测定结果显示，加入自身前导肽时，蛋白质 proApp 在 55 ℃、pH 2.8 条件下有最大酶活质 903 U/mg。而其他前导肽能使蛋白质表达但蛋白质无酶活。圆二色谱结果显示，前导肽能够改变蛋白质二级结构组成，使其无法正确折叠。乳蛋白水解结果显示，在 55 ℃，pH 2.2 条件下，proApp 有最大水解活力 252 U/mg。该研究表明特定前导肽对蛋白酶异源表达与水解功能的重要性，同时为酸性蛋白酶水解乳蛋白提供了良好的研究基础。

关键词：酸性蛋白酶；前导肽；异源表达；蛋白质折叠；假灰绿曲霉
中图分类号：Q 78　　**文章编号**：1673-1689(2020)03-0032-09　　DOI：10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.005

Effects of Propeptide on the Expression and Enzyme Function of *Aspergillus pseudoglaucus* Aspartic Protease App

LIU Haiyan， *ZHANG Rongzhen**， *LI Lihong*， *ZHOU Lixian*， *XU Yan*
（School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：The gene coding aspartic protease App was cloned from the genome of *Aspergillus pseudoglaucus*. Its self propeptide gene *pro*，the propeptide gene *CP* from *Candida tropicalis* candidapepsin，the gene *PP* from *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A，the gene *RP* from *Rhizomucor miehei* proteinase，and the gene *SP* from *Candida albicans* aspartic proteinase 2 were cloned at the 5′-terminal of App gene. The different gene fragments including the different propeptides were obtained，and expressed in *Escherichia coli*. SDS-PAGE analysis showed that App could not expressed in *E. coli* without any propeptides at 5'-terminal App gene. When casein was

收稿日期：2018-02-13
基金项目：国家自然科学基金项目(31370100)；江苏省六大人才高峰高层次人才资助项目(2015-SWYY-010)；高等学校学科创新引智计划资助项目(111-2-06)。
* **通信作者**：张荣珍(1973—)，女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事生物催化和酶工程研究。E-mail：rzzhang@jiangnan.edu.cn

used as substate，proApp with its self propeptide showed the highest specific activity of 903 U/mg at 55 ℃ and pH 2.8. Although the App with propeptides of the other proteases were expressed at a high level in *E. coli*，they did not present enzyme activity towards casein. The results of circular dichroism showed that the different propeptides changed the constituents of the secondary structure of protease，and thus the protein were not correctly folded. With milk protein as the substrate，proApp showed the highest hyhrolytic activity at 55 ℃ and pH 2.2. This work shows the important of the specific propeptide on heterologous expression and hydrolytic function of protease，and provides a good research basis for aspartic protease catalyzing the hydrolysis of milk protein.

Keywords：aspartic protease，propeptide，heterologous expression，protein folding，*Aspergillus pseudoglaucus*

蛋白酶（Protease）是一类能够催化蛋白水解为小分子的多肽和氨基酸的水解酶类，其在动植物及微生物中广泛存在[1-2]。根据不同分类标准，蛋白酶有多种分类，其中根据其最适作用 pH 的不同可将其分为碱性蛋白酶、中性蛋白质酶和酸性蛋白质酶。酸性蛋白酶是能在酸性环境下水解蛋白的蛋白酶类，其最适作用 pH 在 2.0~5.0 之间。目前酸性蛋白酶已广泛应用于食品[3]、酿造[4]、皮革与皮毛[5]、医药[6]、饮料[7]等各个领域。Sun 等[8]将来源于 *Rhizomucor miehei* CAU432 的一种酸性蛋白酶（RmproA）作为嫩肉剂应用于猪肉，结果显示经过 RmproA 处理后的猪肉比木瓜蛋白酶处理后的猪肉显示更低的剪切力。Steven 等[9]发现来自 *Botrytis cinerea* 的酸性蛋白酶 BcAP8 能够有效除去白酒酿造过程中产生的蛋白浑浊。Swarna 等[10]将酸性蛋白酶应用于皮革染色工艺并进行对照实验，结果显示与对照相比，经过酸性蛋白酶处理后的皮革表现出更加丰富的颜色和色调。目前，国外对蛋白酶的研究主要集中在新品种的发掘、理想产生菌的选育以及酶学性质的改造等。而我国目前在这方面的研究尚存在许多不足，如微生物资源开发不足、酶制剂品种较为单一等[11]。因此进一步探索开发和研究新型酸性蛋白酶显得很有必要。

研究表明，许多酶在细胞中产生时首先会以酶原形式出现，酶原主要包括 3 部分：信号肽、前导肽和成熟肽[12]，其中前导肽对酸性蛋白酶的表达及正确折叠有着重要的作用。前导肽能够作为分子内伴侣[13]或帮助蛋白质正确折叠[14-15]；与此同时，研究证明前导肽对蛋白质的功能活性也具有调节作用[12]。Wang 等[16]克隆了来源于 *Rhizomumor miehei* 的脂肪酶并在大肠杆菌中进行表达，发现如果不添加前导肽，目的蛋白则无法正常表达。Cai 等[17]发现若将来源于 *Thermomyces lanuginosus* 的脂肪酶的前导肽去除后于 *Pichia pastoris* 中异源表达，其酶活低于带有前导肽的重组脂肪酶。目前关于酸性蛋白酶的前导肽对酶蛋白在大肠杆菌中表达和功能影响的研究很少。

本研究对来源于 *Aspergillus pseudoglaucus* 的酸性蛋白酶 App 进行了重组表达，考察了包含其自身前导肽在内的共 5 种前导肽对酶蛋白的表达及酶学性质的影响。研究了重组酶的最适酶活条件，分析了不同前导肽对 App 蛋白的二级结构的影响，测定了 App 对乳蛋白的水解酶活，为 App 的进一步研究及工业应用提供了良好的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 本研究中使用的菌株和质粒如表 1 所示。

表 1 实验菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids in this work

菌株和质粒	功能描述	来源
Aspergillus pseudoglaucus	*App* 和基因来源	作者所在实验室保存
E. coli JM109/pET-*App*	*E. coli* JM109 含 pET-*App*	本研究构建

续表 1

菌株和质粒	功能描述	来源
E. coli BL21/pET–*App*	*E. coli* BL21 含 pET–*App*	本研究构建
E. coli JM109/pET–*proApp*	*E. coli* JM109 含 pET–*proApp*	本研究构建
E. coli BL21/pET–*proApp*	*E. coli* BL21 含 pET–*proApp*	本研究构建
E. coli JM109/pET–*CP–App*	*E. coli* JM109 含 pET–*CP–App*	本研究构建
E. coli BL21/pET–*CP–App*	*E. coli* BL21 含 pET–*CP–App*	本研究构建
E. coli JM109/pET–*PP–App*	*E. coli* JM 109 含 pET–*PP–App*	本研究构建
E. coli BL21/pET–*PP–App*	*E. coli* BL21 含 pET–*PP–App*	本研究构建
E. coli JM109/pET–*RP–App*	*E. coli* JM109 含 pET–*RP–App*	本研究构建
E. coli BL21/pET–*RP–App*	*E. coli* BL21 含 pET–*RP–App*	本研究构建
E. coli JM109/pET–*SP–App*	*E. coli* JM109 含 pET–*SP–App*	本研究构建
E. coli BL21/pET–*SP–App*	*E. coli* BL21 含 pET–*SP–App*	本研究构建
pMD19–T	(Amp^r), 2 692 bp	TaKaRa
pET–28a	(Kan^r), 5 369 bp	作者所在实验室保存
T–*App*	pMD19–T 含 1.0 kb *App* 基因, 3.7 kb	本研究构建
T–*proApp*	pMD19–T 含 1.1 kb *proApp* 基因, 3.8 kb	本研究构建
T–*CP–App*	pMD19–T 含 1.1 kb *CP–App* 基因, 3.8 kb	本研究构建
T–*PP–App*	pMD19–T 含 1.1 kb *PP–App* 基因, 3.8 kb	本研究构建
T–*RP–App*	pMD19–T 含 1.1 kb *RP–App* 基因, 3.8 kb	本研究构建
T–*SP–App*	pMD19–T 含 1.1 kb *SP–App* 基因, 3.8 kb	本研究构建
pET–*App*	pET–28a 含 1.0 kb *App* 基因, 6.3 kb	本研究构建
pET–*proApp*	pET–28a 含 1.1 kb *proApp* 基因, 6.4 kb	本研究构建
pET–*CP–App*	pET–28a 含 1.1 kb *CP–App* 基因, 6.4 kb	本研究构建
pET–*PP–App*	pET–28a 含 1.1 kb *PP–App* 基因, 6.4 kb	本研究构建
pET–*RP–App*	pET–28a 含 1.1 kb *RP–App* 基因, 6.4 kb	本研究构建
pET–*SP–App*	pET–28a 含 1.1 kb *SP–App* 基因, 6.4 kb	本研究构建

1.1.2 *引物* 本研究中使用的引物如表 2 所示。

表 2 实验引物

Table 2 Primers in this work

基因	引物	序列 (5′→3′)
App	App_F	CGGAATTCATGGCTGCCACTGGCTCTGTAACTACTAATCC (*Eco*R I)
	App_R	CCGCTCGAGTTAATGATGGTGGTGGTGGTGCGCCTGCGCCGCAAAG (*Xho* I)
proApp	proApp_F	CGGAATTCATGGCTCCAACTGCTCCTCAAGTTAAAGG (*Eco*R I)
	proApp_R	CCGCTCGAGTTAATGATGGTGGTGGTGGTGCGCCTGCGCCGCAAAG (*Xho* I)
CP–App	CP–App_F_1	CGGGATCCCTGTTCGCTCAAGGTCTGACGATC (*Bam*H I)
	CP–App_f_1	CGGGATCCCTGTTCGCTCAAGGTCTG (*Bam*H I)
	CP–App_r_1	CAGTGGCAGCACGTTTCTGGATCAGACG
	CP–App_f_2	CCAGAAACGTGCTGCCACTGGCTCTGTAACTACTAATCC
	App_R_2	CCGCTCGAGCGCCTGCGCCGCAAA (*Xho* I)

续表 2

基因	引物	序列 (5′→3′)
PP-App	PP-App_F_1	CGGGATCCAAAGTCCACAAGGCTAAAATTTATAAACACGA (*Bam*H I)
	PP-App_f_1	CGGGATCCAAAGTCCACAAGGCTAAAATT (*Bam*H I)
	PP-App_r_1	GCCAGTGGCAGCTTCAGTGAAGAAAGGATGCT
	PP-App_f_2	CTTCACTGAAGCTGCCACTGGCTCTGTAACTACTAATCC
	App_R_2	CCGCTCGAGCGCCTGCGCCGCAAA (*Xho* I)
RP-App	RP-App_F_1	CGGGATCCCGTCCAGTCTCTAAGCAGTCTGAGTCTAAGG (*Bam*H I)
	RP-App_f_1	CGGGATCCCGTCCAGTCTCTAAGCAGTC (*Bam*H I)
	RP-App_r_1	CAGTGGCAGCCTCGGAGAATGGTTTCAGA
	RP-App_f_2	ATTCTCCGAGGCTGCCACTGGCTCTGTAACTACTAATCC
	App_R_2	CCGCTCGAGCGCCTGCGCCGCAAA (*Xho* I)
SP-App	SP-App_F_1	CGGGATCCACGCCTACGACTACTAAGCGTAGCG (*Bam*H I)
	SP-App_f_1	CGGGATCCACGCCTACGACTACTAAGC (*Bam*H I)
	SP-App_r_1	CAGTGGCAGCACGTTTAGACGTCTTACCCT
	SP-App_f_2	GTCTAAACGTGCTGCCACTGGCTCTGTAACTACTAATCC
	App_R_2	CCGCTCGAGCGCCTGCGCCGCAAA (*Xho* I)

注:下划线标注序列为限制性内切酶识别位点

1.1.3 基因 4 种酸性蛋白酶的基因分别是:来自 *Candida tropicalis* 的 candidapepsin 基因,来自 *Saccharomyces cerevisiae* S288c 的 proteinase A 基因,来自 *Rhizomucor miehei* 的 proteinase 的基因和来自 *Candida albicans* 的 aspartic proteinase 2 的基因,所有基因经密码子优化后由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.4 主要试剂 PrimeSTAR HS(Premix)、T4 DNA Ligase、DNA Marker、限制性内切酶、IPTG,购于 TaKaRa 生物有限公司;质粒提取、凝胶回收和 DNA 回收试剂盒,购于 OMEGA BIO-TEK。引物由上海生工生物工程有限公司合成。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌体培养 马铃薯培养基 (g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20;pH 7.0;添加 1.5 g/dL 琼脂粉即为马铃薯固体培养基。将 *A. pseudoglaucus* 菌种分别接种于装有 5 mL 马铃薯液体培养基的试管中,28 ℃、200 r/min 振荡培养 48 h。

1.2.2 基因组 DNA 将菌体于 10 000 r/min 离心 2 min 并收集细胞,用 1 mL 超纯水离心洗涤 2 次 (10 000 r/min,2 min)。依次加入 0.2 mL 无菌水、0.3 g 玻璃珠(0.4 mm)和 0.3 mL 的 PC(苯酚:氯仿体积比为 1:1 的混合物)混匀,使用细胞破碎仪破碎细胞 30 s 后加入 0.6 mL 超纯水,颠倒混匀。10 000 r/min 离心 10 min。取上清液 300~400 μL 加入 2 倍体积冰乙醇,4 ℃静置 4 h 后 10 000 r/min 离心 15 min。弃上清液,真空干燥至无乙醇,加入 50 μL 无菌水溶解基因组。

1.2.3 *ProApp* 和 *App* 基因的获得 以 *A. pseudoglaucus* 基因组为模板,通过 DNAMAN 软件设计引物如表 2 中所示 (下划线为限制性内切酶识别位点)。以 *A. pseudoglaucus* 基因组为模板,PCR 扩增 *App* 基因,条件为:98 ℃ 30 s;98 ℃ 10 s,68.5 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,30 次循环;72 ℃ 10 min。以 *A. pseudoglaucus* 基因组为模板,PCR 扩增 *proApp* 基因,条件为:98 ℃ 30 s;98 ℃ 10 s,68.5 ℃ 30 s,72 ℃ 69 s,30 次循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经柱纯化后,进行加 A 处理后连接至 pMD19-T 上,连接产物转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布于 LB 固体培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),获得阳性克隆后提取质粒,使用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I 分别对质粒 T-*App* 和质粒 T-*proApp* 进行双酶切验证后由上海生工生物工

程有限公司进行测序。

1.2.4 不同前导肽 App 基因的获得 利用重叠延伸PCR 法,第 1 步:以合成的 4 种酸性蛋白酶基因为模板,分别以表 2 中相对应每组中 f_1 和 r_1 为引物,PCR 扩增前导肽基因,分别是来自 *C. tropicalis* 的 candidapepsin 的前导肽基因 *CP*,来自 *S. cerevisiae* S288c 的 proteinase A 的前导肽基因 *PP*,来自 *R. miehei* 的 proteinase 的前导肽基因 *RP* 和来自 *C. albicans* 的 aspartic proteinase 2 的前导肽基因 *SP*,条件为:98 ℃ 30 s;98 ℃ 10 s,T_m 30 s,72 ℃ 10 s,30 次循环;72 ℃ 10 min。其中变性温度 T_m 按 *CP*、*PP*、*RP*、*SP* 的顺序依次为 55、55、55.8、52.8 ℃。以 *proApp* 基因为模板,分别以表 2 中相对应每组中 f_2 和 R_2 为引物,PCR 扩增 *App* 基因,条件为:98 ℃ 30 s;98 ℃ 10 s,68 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,30 次循环;72 ℃ 10 min。将 PCR 扩增产物进行 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳,胶回收 PCR 产物。第 2 步:将第一步回收获得的前导肽基因和与之对应的 *App* 基因互为模板和引物,补齐其他扩增反应试剂,获得带有不同来源的前导肽 *App* 基因的 PCR 产物(*CP*–*App*、*PP*–*App*、*RP*–*App*、*SP*–*App*),条件为 98 ℃ 30 s;98 ℃ 10 s,66.9 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,10 次循环;72 ℃ 10 min。PCR 结束后分别在管中加入每组相对应的引物 F_1 和 R_2,继续进行 PCR 扩增,条件为 98 ℃ 30 s;98 ℃ 10 s,66.9 ℃ 30 s,72 ℃ 70 s,30 次循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经柱纯化后,进行加 A 处理后连接至 pMD19–T 上,连接产物转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布于 LB 固体培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),获得阳性克隆后提取质粒,使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 分别对质粒 T–*CP*–*App*、质粒 T–*PP*–*App*、质粒 T–*RP*–*App* 和质粒 T–*SP*–*App* 进行双酶切验证后由上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.5 表达载体的构建 使用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I 分别对载体 pET–28a、质粒 T–*App*、质粒 T–*proApp* 进行双酶切;使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 分别对载体 pET–28a、质粒 T–*CP*–*App*、质粒 T–*PP*–*App*、质粒 T–*RP*–*App* 和质粒 T–*SP*–*App* 进行双酶切。所有酶切产物回收 DNA 片段通过粘性末端连接获得重组表达质粒 pET–*App*、pET–*proApp*、pET–*CP*–*App*、pET–*PP*–*App*、pET–*RP*–*App* 和 pET–*SP*–*App*。连接产物转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布于 LB 固体培养基(含 50 μg/mL 卡那霉素),获得阳性克隆后提取质粒,使用限制性内切酶分别对重组表达质粒进行双酶切验证后由上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.6 重组菌株的构建 将重组表达质粒转化至感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3)菌株,从卡那霉素抗性平板上筛选出重组菌株 *E. coli* BL21/pET–*App*、*E. coli* BL21/pET–*proApp*、*E. coli* BL21/pET–*CP*–*App*、*E. coli* BL21/pET–*PP*–*App*、*E. coli* BL21/pET–*RP*–*App* 和 *E. coli* BL21/pET–*SP*–*App* 的阳性克隆。

1.2.7 蛋白纯化 从平板上挑取重组菌 *E. coli* BL21/pET–*App*、*E. coli* BL21/pET–*proApp*、*E. coli* BL21/pET–*CP*–*App*、*E. coli* BL21/pET–*PP*–*App*、*E. coli* BL21/pET–*RP*–*App* 和 *E. coli* BL21/pET–*SP*–*App* 的单菌落分别接种于含有 50 μg/mL 卡那霉素的 200 mL LB 液体培养基中,当菌体培养的 OD_{600} 值达到 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的诱导剂 IPTG,20 ℃诱导表达 10 h。将诱导表达后的菌液离心,收集菌体,使用生理盐水洗涤 3 次后重悬于 20 mmol/L Tris–HCl 缓冲液(pH 8.0),超声破碎。12 000 r/min,4 ℃离心收集上清液,经 0.22 μm 滤膜过滤后的滤液即为粗酶液。利用镍离子亲和层析柱。

1.2.8 酶活力测定 蛋白酶水解酪蛋白产生酪氨酸,酪氨酸在碱性条件下使福林酚试剂还原生成钼蓝与钨蓝,在 680 nm 处有最大吸光度,其吸光值与酪氨酸含量成正比。因此可通过测定反应过程中 680 nm 处吸光度的变化来衡量蛋白酶的活力。酶活测定方法参照国标 GB/T 23527–2009,每个实验重复 3 次取平均值。蛋白质含量采用 Bradford 法测定[18],以 BSA 为标准蛋白质。定义 1 个酶活单位(U)为每分钟催化产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量。

1.2.9 乳蛋白水解活性测定 以乳蛋白为底物测定蛋白酶对其水解活力。每个实验重复 3 次取平均值。

1.2.10 圆二色谱分析 以 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)为溶剂将纯化蛋白稀释至 0.1 mg/mL,使用 Jasco J720 光谱仪在 25 ℃条件下进行二级结构的测定,光谱值范围为 190~250 nm,扫描速度 50 nm/min,带宽 2 nm,反应时间 1 s,读数 30 次,取信号平均值并基线校正,将所测定的 CD 值转换成摩尔椭圆度(molar ellipticity) θ (deg×cm^2×dmol^{-1}),用计算机专

用软件（J-700 for Windows Secondary Structure Estimaton, Version 1.10.00）分析各蛋白质二级结构组成[19]。

2 结果与讨论

2.1 重组质粒 pET-*App* 和 pET-*proApp* 的构建

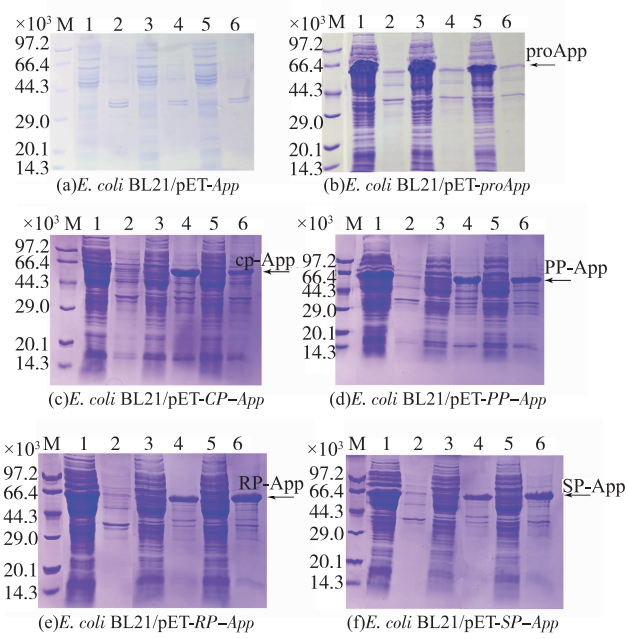
以 *A. pseudoglaucus* 基因组为模板，分别以 App_F 和 App_R、proApp_F 和 proApp_R 为引物，进行 PCR 扩增，获得目的基因 *App* 和 *proApp*，经过 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析其条带大小约为为 1.0 kb 和 1.1 kb。将 *App* 和 *proApp* 基因片段连入 pMD19-T，经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切后连入 pET-28a 载体。2 种重组质粒均经双酶切鉴定后转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中，挑取阳性克隆提取质粒并送去测序，测序结果显示 2 种基因均已克隆到相应表达载体上，获得重组质粒 pET-*App* 和 pET-*proApp*。测序正确的重组表达质粒转入 *E. coli* BL21（DE3）感受态细胞获得重组表达菌株。

2.2 不同前导肽 App 重组质粒的构建

分别以 *proApp* 基因和合成的 4 种酸性蛋白酶基因为模板，进行重叠延伸 PCR，获得目的基因 *CP-App*、*PP-App*、*RP-App* 和 *SP-App*，经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳其条带大小为 1.1 kb 左右。将基因片断连入 pMD19-T，经 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切后连入 pET-28a 载体。4 种重组质粒转入 *E. coli* JM109 感受态细胞中，挑取阳性克隆提取质粒，经双酶切鉴定后送去测序，测序结果显示 2 种基因均已克隆到相应表达载体上，获得重组质粒 pET-*CP-App*、pET-*PP-App*、pET-*RP-App* 和 pET-*SP-App*。测序正确的重组表达质粒转入 *E. coli* BL21（DE3）感受态细胞获得重组表达菌株。

2.3 重组蛋白酶的表达及纯化

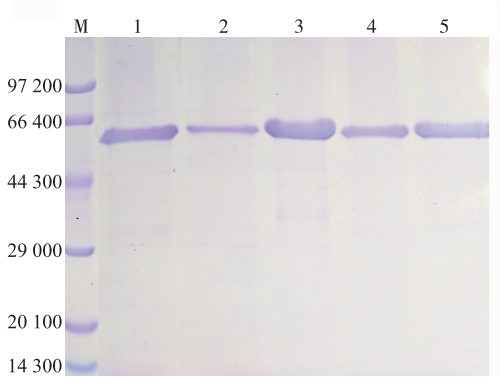
挑取 *E. coli* BL21/pET-*App*、*E. coli* BL21/pET-*proApp*、*E. coli* BL21/pET-*CP-App*、*E. coli* BL21/pET-*PP-App*、*E. coli* BL21/pET-*RP-App* 和 *E. coli* BL21/pET-*SP-App* 的单菌落至含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中培养，分别在 20、25 ℃和 30 ℃条件下，经 IPTG 诱导后收集菌体，洗涤后重悬于 Tris-HCl 缓冲液中，超声破碎、离心、过膜得到粗酶液。取上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳，如图1 所示。结果显示 *E. coli* BL21/pET-*App* 在 3 种温度下的破碎上清液和沉淀均未见目的蛋白质条带，其他蛋白酶重组菌株均在 20 ℃条件下实现可溶性表达，破碎上清液中存在目的蛋白条带。由此说明前导肽有助于 App 蛋白酶在大肠杆菌中表达。然后将粗酶液使用 Ni 柱进行分离纯化，经 SDS-PAGE 电泳分析，重组蛋白纯化后获得目的蛋白条带均一，约为 5.5×10⁴，与理论相对分子质量大小一致（图 2）。纯化蛋白于-80 ℃保存，用于后续研究。



M：蛋白质相对分子质量标准；1、3、5：重组菌分别在 20、25 ℃和 30 ℃条件下诱导后破碎上清液；2、4、6：重组菌分别在 20、25 ℃和 30 ℃条件下诱导后破碎沉淀

图 1 重组蛋白酶的表达

Fig. 1 Expression of *E. coli* BL21/pET-*App*, *E. coli* BL21/pET-*proApp*, *E. coli* BL21/pET-*CP-App*, *E. coli* BL21/pET-*PP-App*, *E. coli* BL21/pET-*RP-App* and *E. coli* BL21/pET-*SP-App*



M：蛋白质相对分子质量标准；1：proApp；2：CP-App；3：PP-App；4：RP-App；5：SP-App

图 2 重组蛋白酶的纯化

Fig. 2 Purification of the recombinant proteases

2.4 重组蛋白酶酶活的测定

在 pH 3.0 条件下,以酪蛋白为底物,在不同温度下测定了重组酶的酶活。结果显示除了 proApp 具有较高的酶活外,其他重组蛋白酶均未检测到酶活。在 55 ℃时 proApp 的酶活力达到最高,为 826 U/mg(图 3(a))。在 55 ℃条件下,不同 pH 时,proApp 的蛋白酶活进行了测定,但由于酪蛋白的等电点在 4.5 左右,在 pH 3.5~5.5 范围内酪蛋白不溶或溶解度很小,因此测定最适 pH 时 pH 的范围在 2.2~3.2。结果显示除了 proApp 具有酶活外,其他重组蛋白酶均无酶活。当 pH 为 2.8 时 proApp 达到最大酶活,为 903 U/mg(图 3(b))。上述结果表明不同来源的前导肽虽然能够使 App 在大肠杆菌中成功可溶性表达,但不能促使蛋白质正确折叠,导致蛋白酶没有酶活。为了探索不同前导肽对 App 酶活影响的原因,后续试验对所有重组蛋白酶二级结构进行了分析。

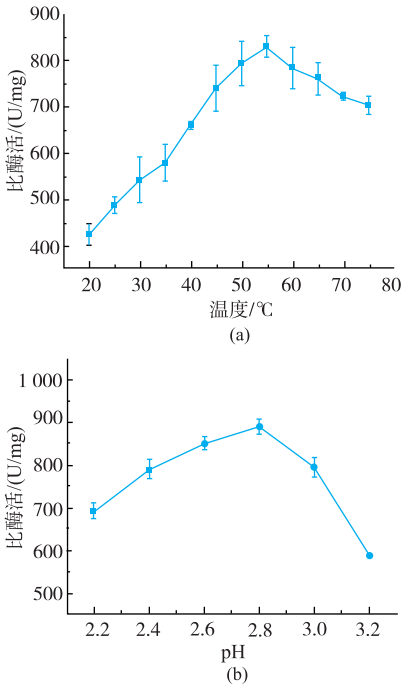


图 3 不同温度下和不同 pH 下 proApp 的酶活

Fig. 3 Protease activities of proApp at different temperature and different pH

2.5 重组蛋白酶二级结构分析

从图 4 可以看出,随着波长的变化,CP-App、PP-App、RP-App、SP-App 与 proApp 的摩尔椭圆度显示出完全不同的变化趋势,说明 proApp 的二级结构与其他 4 种具有不同前导肽蛋白酶的二级结构存在很大差异,CP、PP、RP 和 SP 这 4 个前导肽改变了 App 蛋白的二级结构,使其未能正确折叠。二级结构结果证实了 4 种其他来源的前导肽虽然能够使 App 蛋白在大肠杆菌中可溶性表达,但无法促使其正确折叠,因而表现为没有酶活。

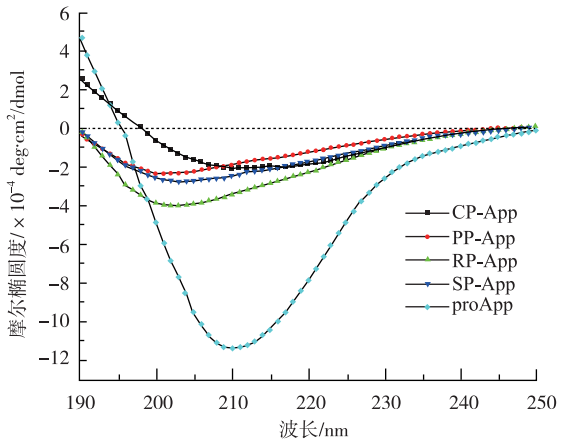


图 4 proApp、CP-App、PP-App、RP-App 和 SP-App 的圆二色谱分析

Fig. 4 Circular dichroism analysis of secondary structures for proApp、CP-App、PP-App、RP-App and SP-App

2.6 ProApp 乳蛋白水解活性的测定

以乳蛋白为底物,检测不同条件下 proApp 对乳蛋白的水解活力,结果如图 5 所示。在 pH 3.0 条件下,在不同温度条件下对 proApp 水解乳蛋白活性的活性进行了检测。可以发现在 55 ℃条件下,proApp 对乳蛋白的水解活性达到最大为 160 U/mg。在 55 ℃条件下,在不同 pH 条件下,对 proApp 水解乳蛋白的活性进行了检测。可以发现在 pH 2.2 时,proApp 对乳蛋白的水解活性达到最大值,为 252 U/mg。以上结果表明 proApp 对乳蛋白具有较好的水解活力。

3 结 语

酸性蛋白酶是能够在酸性环境下具有水解活性的蛋白酶类,近年来随着人们对其研究越来越深入,其应用也越来越广泛[20]。近年来国外对蛋白酶的研究主要在新品种的发掘、理想蛋白酶产生菌的选育和酶的改造以适应工业需求。而我国目前在这方面的研究尚存在许多问题如微生物资源开发不足、酶制剂品种较为单一等。因此进一步探索开发和研究新型酸性蛋白酶显得很有必要。本研究从基因工程和蛋白质工程角度出发,对来源于 *A. pseudoglaucus*

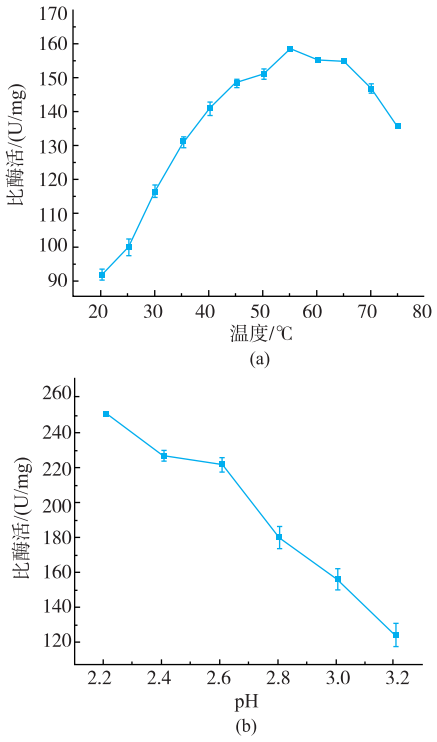


图 5　不同温度和不同 pH 下 proApp 对乳蛋白的水解活性

Fig. 5　Hydrolytic activities of proApp towards milk protein at different temperature and different pH

的酸性蛋白酶 App 进行了重组表达并对其酶学性质进行了分析。通常情况下，酸性蛋白酶在细胞中首先是以酶原形式出现的，酶原主要包括 3 部分：信号肽、前导肽和成熟肽。其中前导肽对蛋白质的表达和折叠有着重要意义[21-22]。此外也有研究表明前导肽对蛋白质的功能活性具有修饰和调节作用。我们分别构建了 2 种重组 App 蛋白酶表达菌株即加前导肽的重组菌株 *E. coli* BL21/pET-*proApp* 和不加前导肽的重组菌株 *E. coli* BL21/pET-*App*。通过诱导表达，我们发现若不加前导肽 App 不能在大肠杆菌中表达。为了进一步探索前导肽对 App 的表达和酶功能的影响，选取了 4 个不同来源的前导肽，通过重叠延伸 PCR 技术将前导肽基因加到 App 基因 5′端，构建了 4 株重组酸性蛋白酶表达菌株 *E. coli* BL21/pET-*CP-App*、*E. coli* BL21/pET-*PP-App*、*E. coli* BL21/pET-*RP-App* 和 *E. coli* BL21/pET-*SP-App*。分别进行诱导表达并进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳分析，发现 4 种重组蛋白酶均成功可溶性表达。然而对 5 种具有不同前导肽的 App 蛋白酶的酶活检测结果显示，除 proApp 具有酶活外，最大酶活为 903 U/mg，其他含有其他来源前导肽的 4 种重组蛋白酶均无酶活。对 5 种含有前导肽的蛋白酶的二级结构进行了检测，发现 CP-App、PP-App、RP-App 和 SP-App 的二级结构与 proApp 的二级结构有很大差异，说明前导肽可以改变蛋白质的折叠，从而影响蛋白质的功能。最后我们对 proApp 的乳蛋白水解活性进行了研究，发现 proApp 对乳蛋白在酸性条件下具有较好的水解能力，水解活性最大可达 252 U/mg。本研究探索了前导肽对 App 重组酶的表达和酶活的影响，表明前导肽的种类对 App 的表达和结构具有决定性的影响，为进一步探索 App 对蛋白质的水解工业应用提供了较好的研究基础。

参考文献：

[1] OZTURKOGLU-BUDAK S，WIEBENGA A，BRON P A，et al. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese[J]. **International Journal of Food Microbiology**，2016，237：17-27.

[2] WANG Jilian，LI Mingyuan，CHEN Yun. Progress in cloning and expression of protease genes[J]. **Food Science**，2015，36(23)：377-381.（in Chinese）

[3] YIN C M，ZHENG L S，CHEN L G，et al. Cloning，expression，and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (Po-Asp) from pleurotus ostreatus[J]. **Applied Biochemistry Biotechnology**，2014，172(4)：2119-2131.

[4] LI Shusen. Application of acid protease in ethanol production[J]. **Liquor Making**，2013，41(3)：84-86.（in Chinese）

[5] JIAN Xiaoyun，ZHANG Jinwei，CHEN Lijian，et al. Bating of vegetable tanned leather with acid protease[J]. **China Leather**，2015，44(15)：1-4.（in Chinese）

[6] CHANALIA P，GANDHI D，JODHA D，et al. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry：an overview[J]. **Reviews in Medical Microbiology**，2011，22(4)：96-101.

[7] THERON L W，DIVOL B. Microbial aspartic proteases：current and potential applications in industry[J]. **Applied Microbiology**

and Biotechnology, 2014, 98(21): 8853-8868.

[8] SUN Q, CHEN F S, GENG F, et al. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides[J]. **Food Chemistry**, 2018, 245: 570-577.

[9] VAN SLUYTER S C, WARNOCK N I, SCHMIDT S, et al. Aspartic acid protease from *Botrytis cinerea* removes haze-forming proteins during white winemaking[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013, 61(40): 9705-9711.

[10] KANTH S V, VENBA R, JAYAKUMAR G C, et al. Kinetics of leather dyeing pretreated with enzymes: role of acid protease[J]. **Bioresource Technology**, 2009, 100(8): 2430-2435.

[11] 孙倩. 三种不同来源(植物、细菌和臭菌)蛋白酶的纯化、性质及应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.

[12] DEMIDYUK I V, SHUBIN A V, GASANOV E V, et al. Propeptides as modulators of functional activity of proteases [J]. **Biomolecular Concepts**, 2010, 1(3-4): 305-322.

[13] INOUYE M. Intramolecular chaperone-the role of the pro-peptide in protein folding[J]. **Enzyme**, 1991, 45(5-6): 314-321.

[14] EDER J, FERSHT A R. Pro-sequence assisted protein folding[J]. **Molecular Microbiology**, 1995, 16(4): 609-614.

[15] LI Q, Yi L, MAREK P, et al. Commercial proteases: present and future[J]. **FEBS Letter**, 2013, 587(8): 1155-1163.

[16] WANG J, WANG D, WANG B, et al. Enhanced activity of Rhizomucor miehei lipase by directed evolution with simultaneous evolution of the propeptide[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, 96(2): 443-450.

[17] CAI H Y, ZHAO M J, LI Y, et al. Pentapeptide prosequence enhances expression and structure folding of recombinant *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris*[J]. **Protein & Peptide Letter**, 2017, 24(7): 676-681.

[18] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analysis Biochemistry**, 1976, 72: 248-254.

[19] LI K P, ZHANG R Z, XU Y, et al. Sortase a-mediated crosslinked short-chain dehydrogenases/reductases as novel biocatalysts with improved thermostability and catalytic efficiency[J]. **Science Report**, 2017, 7(1): 1-11.

[20] JUNTUNEN K, MAKINEN S, ISONIEMI S, et al. A new subtilase-like protease deriving from *Fusarium equiseti* with high potential for industrial applications[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2015, 177(2): 407-430.

[21] GUO Jiping, MA Guang, MA Ying. Effect of pro-peptide sequence on expression of *Aspergillus oryzae* alkaline protease gene in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Shanghai University** (**Agricultural Science**), 2008, 26(3): 237-241. (in Chinese)

[22] CHEN Liming, TANG Jianguo. Intramolecular chaperone-the role of Pro peptide in protein folding[J]. **Chinese Bulletin of Life Sciences**, 2002, 14(1): 35-39. (in Chinese)

会　议　消　息

会议名称：中国化学会第九届“天然产物全合成—青年学术研讨会”

会议时间：2020 年 8 月 16–19 日

会议地点：陕西省西安市

主 办 方：中国化学会有机化学学科委员会

共同主办：陕西师范大学

承 办 方：陕西师范大学化学化工学院

会议主题：天然产物与人类健康

大会主席：高子伟

预计规模：150 人

联 系 人：赵玉明

电子邮箱：ymzhao@snnu.edu.cn

电　　话：13679112496

会议内容：就天然产物分离、合成、化学生物学及相关药物研发开展广泛和深入研讨。