# 结核分枝杆菌腺苷磷酰硫酸激酶的异源活性表达和酶学性质

胥睿睿[1]，王 阳[1]，史仲平[*1,2]，康 振[1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

**摘要**：PAPS是生物体内磺化反应的惟一活性磺酸基团供体。腺苷磷酰硫酸激酶是催化APS和ATP生成PAPS和ADP的一类酶。为实现PAPS的酶法合成，作者通过密码子优化来自结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis* AUSMDU00018547）的腺苷磷酰硫酸激酶编码基因与共表达硫氧还蛋白TrxB，实现了腺苷磷酰硫酸激酶在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21（DE3）中的异源高活性表达。采用His-Tag标签实现了对腺苷磷酰硫酸激酶的纯化，进一步酶学性质分析结果表明，重组腺苷磷酰硫酸激酶最适温度、最适pH以及比酶活分别为35 ℃、7.5和（1.26±0.08）U/mg。腺苷磷酰硫酸激酶的异源活性表达与酶学性质分析为未来实现酶法合成PAPS奠定了基础。

**关键词**：PAPS；腺苷磷酰硫酸激酶；结核分枝杆菌；活性表达；活性分析

**中图分类号**：Q 814　**文章编号**：1673-1689（2021）02-0049-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.02.007

# Heterologous Expression and Enzymatic Characterization of Adenylyl-Sulfate Kinase from *Mycobacterium tuberculosis*

*XU Ruirui*[1]，*WANG Yang*[1]，*SHI Zhongping*[*1,2]，*KANG Zhen*[1,2]

（1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

**Abstract**: PAPS is the only active sulfonic acid group donor for sulfation in living organisms. Adenylyl-sulfate kinase catalyzes the formation of PAPS and ADP from APS and ATP. In order to achieve the enzymatic synthesis of PAPS, the adenylyl-sulfate kinase encoding gene from *Mycobacterium tuberculosis* AUSMDU00018547 was codon-optimized and heterologously co-expressed with thioredoxin TrxB to achieve the active and high-level heterologous expression of adenosine phosphorylsulfate kinase (APK) in *Escherichia coli* BL21(DE3). His-tagged recombinant adenylyl-sulfate kinase was successfully purified. Further enzymatic property analysis results showed that the optimal temperature, pH and the specific enzyme activity of recombinant adenylyl-sulfate kinase were 35 ℃, pH 7.5 and (1.26 ±0.08) U/mg, respectively. Heterologous expression of

**收稿日期**：2020-02-09

**基金项目**：国家“十三五”重点研发计划项目（2018YFA0901401）；国家轻工技术与工程一流学科自主课题（LITE2018-16）。

* **通信作者**：史仲平（1962—），博士，教授，博士研究生导师，主要从事发酵工程及自动控制方面的研究。

E-mail：zpshi@jiangnan.edu.cn

adenylyl-sulfate kinase and enzymatic property analysis lay a foundation for the enzymatic synthesis of PAPS in the future.

**Keywords:** PAPS, adenylyl-sulfate kinase, *Mycobacterium tuberculosis*, active expression, activity analysis

肝素和硫酸软骨素都含有磺酸基团,在医药方面,肝素具有抗凝血等重要的生理学功能[1],硫酸软骨素在治疗关节炎等疾病有显著疗效[2]。目前,商品化肝素和硫酸软骨素依赖于动物组织提取,然而提取法获得的肝素和硫酸软骨素含有其他杂多糖,磺酸化程度难以控制[3]。酶法合成肝素和硫酸软骨素策略具有诸多优势,如可以获得结构明确的肝素和硫酸软骨素[4-5]。在酶法合成肝素和硫酸软骨素中,3′-磷酸腺苷-5′-磷酰硫酸(3′-phosphoadenosine-5′-phosphosulfate,PAPS)是惟一的磺酸基团供体[6]。此外,PAPS 还用于黄酮类[7]、胆碱类[8]和固醇类[9]化合物的合成,应用广泛。但 PAPS 价格昂贵,因此高效低成本合成 PAPS 有着重要的意义。

PAPS 是细胞体内活性硫酸物质,广泛存在于各类生物体内,是细胞内硫代谢环节重要的中间体[10]。目前,PAPS 的获得主要依靠化学法合成和酶法合成。酶法合成是将体内通用的 PAPS 合成途径基因通过微生物表达,以三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)为底物,经过 ATP 硫酸化酶合成中间体腺苷磷酰硫酸(adenosine phosphosulfate,APS),后又经 APS 激酶合成 PAPS[11],此方法能有效合成 PAPS,见图 1。

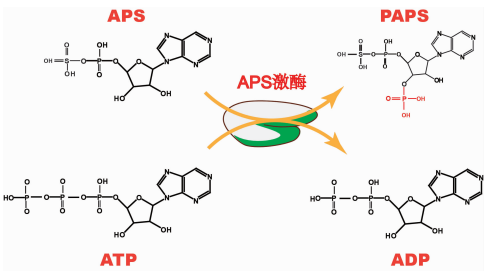



**图 1 PAPS 的合成途径**

**Fig. 1 Synthetic pathway of PAPS**

作者以大肠杆菌为表达宿主,pET28a(+)为表达载体,异源表达结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis* AUSMDU00018547)来源的 APS 激酶(EC 2.7.1.25),基因名称为 *cysC*,GenBank 登录号为 QGK78545.1。对其氨基酸序列和结构分析预测发现,第 549 和 556 位的半胱氨酸形成的二硫键是其在大肠杆菌中异源表达全部为包涵体的主要原因。由于大肠杆菌胞质环境呈还原性,不利于二硫键的正确形成[12-13]。有文献指出,硫氧还蛋白 TrxA、TrxB 可帮助重组蛋白二硫键正确折叠[14],二硫键异构酶 DsbA、DsbB 和 DsbC 对可影响二硫键的从头合成并促进二硫键的正确折叠[15-19]。将此 5 类促溶蛋白与目的蛋白质腺苷磷酰硫酸激酶共表达发现,其中 TrxB 能有效帮助重组蛋白质二硫键的形成,促进重组蛋白质的可溶表达。本研究实现了对腺苷酰磷硫酸激酶的异源高效活性表达,并利用 His-Tag 编码序列对重组酶实现了镍柱亲和层析纯化。此外,还研究了重组蛋白质的酶学性质,对体外酶法合成 PAPS 有着重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

*Escherichia coli* JM109、*E. coli* BL21 (DE3):分别作为克隆宿主和表达宿主,均为作者所在实验室保存菌株;质粒 pET-28a(+):美国 Novagen 公司;Taq DNA polymerase、DL 5 000 bp Marker、蛋白质电泳 Marker、蛋白质预制胶、4×loading Buffer、5×蛋白质上样缓冲液:购买于 Thermo Fisher 公司;*Nde* I、*Hind* III 和 *Xho* I 限制性内切酶、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒:购买于 Vazyme 生物技术有限公司;抗生素(硫酸卡那霉素):购自上海生工;PAPS、APS 和 ATP:购自 Sigma(USA);亲和层析 Ni 柱:购自 GE(USA);异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG):购买于上海生物生工;PCR 引物合成及测序:均由上海生物生工公司完成;考马斯亮蓝 R-250、咪唑、三羟甲基氨基甲烷、$KH_2PO_4$、$K_2HPO_4$、$MgSO_4$、NaCl、盐酸、乙腈:均购于国药集团;胰蛋白胨、酵母粉:购买于美国 Oxoid;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

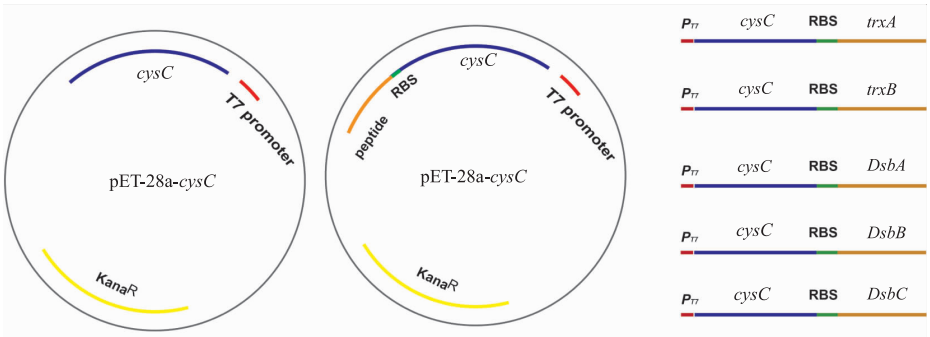
Agilent1260 高效液相色谱仪:美国安捷伦有限公司产品;polyamine II 柱:日本 YMC 科技有限公司产品;PCR 仪、凝胶成像仪:Bio-Rad 公司产品;UV1800 紫外可见分光光度计:岛津企业管理有限公司产品;蒸汽灭菌器:致微(厦门)公司产品;落地高速冷冻离心机:美国贝克曼 Beekman 公司产品;恒温水浴锅:常州中诚仪器公司产品;NanoDrop 超微量紫外可见分光光度计、蛋白质电泳仪:Thermo 公司产品;超净工作台:苏州净化设备有限公司产品;恒温培养摇床、生化培养箱:上海知楚公司产品;蛋白质纯化仪:美国 GE 公司产品;超声破碎仪:上海虔钧科学仪器有限公司产品。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 表达载体构建** 目的基因密码子优化与合成:从 NCBI 上查得结核分枝杆菌腺苷磷酰硫酸激酶基因 *cysC* 序列(GenBank:QGK78545.1),用在线软件(http://www.Entelechon.com),按照大肠杆菌密码子偏好性优化,优化后基因由上海生工全合成。合成后基因以酶切连接方式连接到 pET28a(+)质粒的 *Nde* I 和 *Hind* III 限制性酶切位点之间,构建质粒 pET28a-*cysC*,见图 2。

共表达质粒的构建:通过文献调研及 NCBI 数据库搜索,共表达 TrxA(GeneID:948289)、TrxB(GeneID:949054)、DsbA(GeneID:948353)、DsbB(GeneID:946344)和 DsbC(GeneID:947363)基因。扩增后添加一段 RBS 序列(AAGGAGATATACAT)在 pET28a-cysC 质粒的 *Hind* III 和 *Xho* I 限制性酶切位点之间,实现共表达,见表 1。

**1.3.2 目的蛋白质的表达与纯化** LB 培养基:10 g




(a)原始质粒示意图 (b)共表达质粒示意图

**图 2 质粒构建示意图**

**Fig. 2 Schematic diagram of plasmid construction**

**表 1 PCR 扩增引物**

**Table 1 Primers for PCR amplification**

| 引物名称 | 序列(5′-3′) |
|---|---|
| cysC-F | GCCGCGCGGCAGCCATATGATGACGACGCTATTGCGGC |
| cysC-R | GGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGCTAAGACGATGACTCCAACAGGTCG |
| TrxA-F | GTCATCGTCTTAGAAGCTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACG |
| TrxA-R | GTGCTCGAGTGCGGCCGCTTACGCCAGGTTAGCGTCGAG |
| TrxB-F | GTCATCGTCTTAGAAGCTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCACGACCAAACACAGTAAAC |
| TrxB-R | GTGCTCGAGTGCGGCCGCTTATTTTGCGTCAGCTAAACCATCGAG |
| DsbA-F | GTCATCGTCTTAGAAGCTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTG |
| DsbA-R | GTGCTCGAGTGCGGCCGCTTATTTTTTCTCGGACAGATATTTCACTGTATCAGC |
| DsbB-F | GTCATCGTCTTAGAAGCTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTGCGATTTTTGAACCAATGTTCAC |
| DsbB-R | GTGCTCGAGTGCGGCCGCTTAGCGACCGAACAGATCACGTTTTTTC |
| DsbC-F | GTCATCGTCTTAGAAGCTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGAAAGGTTTTATGTTGTTTACTTTGTTAGCG |
| DsbC-R | GTGCTCGAGTGCGGCCGCTTATTTACCGCTGGTCATTTTTTGGTGTTCG |

注:红色为限制性酶切位点

NaCl,10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母粉,加去离子水至 1 L,分装后高压蒸汽灭菌;TB 培养基:$KH_2PO_4$ 2.31 g,$K_2HPO_4$ 12.54 g,胰蛋白胨 12 g,酵母粉 24 g,甘油 5 g,加去离子水至 1 L,调节 pH 至 7.0~7.2,分装后高压蒸汽灭菌。

目的蛋白质的表达:将重组质粒转入 *E. coli* BL21( DE3)菌株中,将验证正确的菌株在含有卡那霉素 50 μg/L 平板上划线并过夜培养。挑取单菌落接种于 LB 种子培养基中,置于弹簧摇床(37 ℃、220 r/min)培养 8~10 h;将种子液按 2%体积分数转接到 50 mL TB 发酵培养基中,培养至 OD 为 0.6~0.8 时,加入不同浓度的 IPTG(0.5、1 mmol/L)并在不同温度(30、37 ℃)下诱导培养 10 h 后离心收集菌体。将收集的细胞用 20 mmol/L、pH 7.5 Tris-HCl 洗涤两遍后,加入适量的缓冲液重悬细胞,超声破碎后用于纯化和分析。

目的蛋白质的纯化:将填充好的 Ni-NTA 层析柱用10 倍柱体积的上样缓冲液 Buffer A (NaCl 0.5 mol/L, 咪唑 20 mmol/L,Tris-HCl 20 mmol/L,pH 7.5)平衡。样品以低流量 1~2 mL/min 上样,上样后用Buffer A 平衡柱子,再依次利用不同浓度梯度洗脱液 Buffer B (NaCl 0.5 mol/L, 咪唑 500 mmol/L, Tris-HCl 20 mmol/L,pH 7.5) 洗脱杂蛋白质和目的蛋白质,咪唑的洗脱浓度分别为 50、100、150、200、250、300、500 mmol/L。纯化后蛋白质用 SDS-PAGE 分析,透析去除咪唑用于检测酶活。

**1.3.3** *酶活测定方法* 1 mL 催化体系:Tris-HCl 100 mmol/L(相应 pH),$MgSO_4$ 1 mmol/L,ATP 1 mmol/L,APS 1 mmol/L,30 ℃预热后加入 0.5 mg CysC 纯化蛋白质,在 30 ℃反应一定时间[20-23]。

不同温度下酶活的测定:Tris-HCl 100 mmol/L (pH 7.5),$MgSO_4$ 1 mmol/L,ATP 1 mmol/L,APS 1 mmol/L,30 ℃预热后加入 0.5 mg 腺苷磷酰硫酸激酶纯化蛋白质,分别在 25、30、35、40 ℃下进行反应。

不同 pH 下酶活的测定:Tris-HCl 100 mmol/L, $MgSO_4$ 1 mmol/L,ATP 1 mmol/L,APS 1 mmol/L,30 ℃预热后加入 0.5 mg 腺苷磷酰硫酸激酶纯化蛋白质,温度设置为 30 ℃,调节缓冲液 pH 进行反应。

酶的活力单位定义:在最适条件(一定温度和一定 pH) 下,1 h 内反应生成 1 μmol PAPS 所需要的酶量[20,23]。

PAPS 的检测:采用 Agilent 1600 HPLC 系统,polyamine II 柱(4.6 mm×250 mm,*D* 为 12 nm),流动相:50 mmol/L $KH_2PO_4$ 溶液,流量:0.6 mL/min,进样量:5 μL,检测时间 35 min,检测器:UV 254 nm[20]。

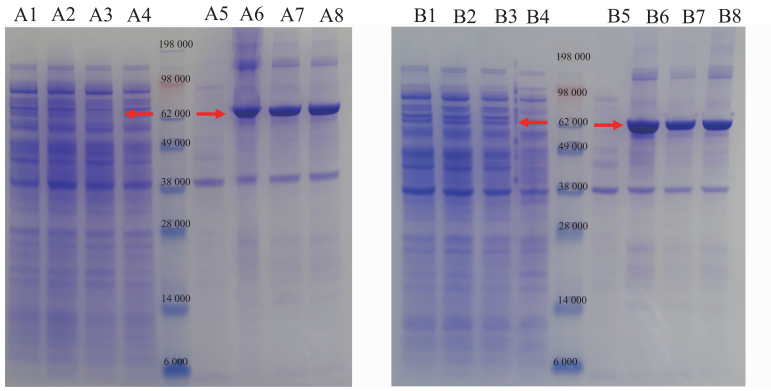
## 2 结果与讨论

### 2.1 腺苷磷酰硫酸激酶的表达优化与纯化

**2.1.1** *腺苷磷酰硫酸激酶的初步表达* 将成功构建的 pET28a-cysC 质粒转化 *E. coli* BL2(DE3)菌株中,挑取阳性克隆子分别在不同浓度的 IPTG 和不同温度下诱导表达,目的蛋白质共含有 615 个氨基酸,预测蛋白质相对分子质量为 67 800。腺苷磷酰硫酸激酶的表达结果见图 3。通过 SDS-PAGE 分析,重组大肠杆菌在不同浓度的诱导剂和不同诱导温度下表达均为包涵体,通过 IPTG 浓度和温度调控启动子强度不足以使腺苷磷酰硫酸激酶中二硫键正确折叠达到可溶表达的目的。

**2.1.2** *共表达二硫键促溶蛋白促进 pET28a-cysC 可溶表达* 将二硫键促溶蛋白构建到原始质粒上并利用一段 RBS 序列进行串联表达,将验证正确的克隆子划线过夜培养,挑取单菌落接入 LB 培养基中,37 ℃培养 8~10 h。以 2%接种体积分数转接至 TB 发酵培养基中,继续培养至 OD 为 0.6~0.8 时,对培养条件进行优化。分别以不同浓度的诱导剂 IPTG 和不同的诱导温度试验,确定最佳诱导条件为:诱导剂IPTG 终浓度 0.5 mmol/L,诱导温度 30 ℃。在此诱导条件下,有目的蛋白质可溶表达且共表达标签 TrxB、TrxA,DsbA,DsbB 均可见表达条带。培养 10 h 后收集菌体,经超声破碎后利用 SDS-PAGE 分析,结果见图4。从蛋白质表达情况可以看出,共表达 TrxB 可以有效促进腺苷磷酰硫酸激酶的可溶表达,而共表达 TrxA、DsbA、DsbB 或 DsbC 对腺苷磷酰硫酸激酶的可溶表达没有显著效果。

**2.1.3** *目的蛋白质的纯化* 重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a-cysC-TrxB 经诱导表达后,破壁离心后去除沉淀,利用载体自带组氨酸纯化标签,经镍柱亲和层析纯化后,利用 SDS-PAGE 分析,结果见图 5。纯化后的目的蛋白质条带较单一,目的条带相对分子质量在 62 000 以上,与预测蛋白质相对分子质量(67 300)大小一致,因此,结核分枝杆菌腺苷磷酰硫酸激酶基因在大肠杆菌中实现了高效可溶表达并可有效纯化。



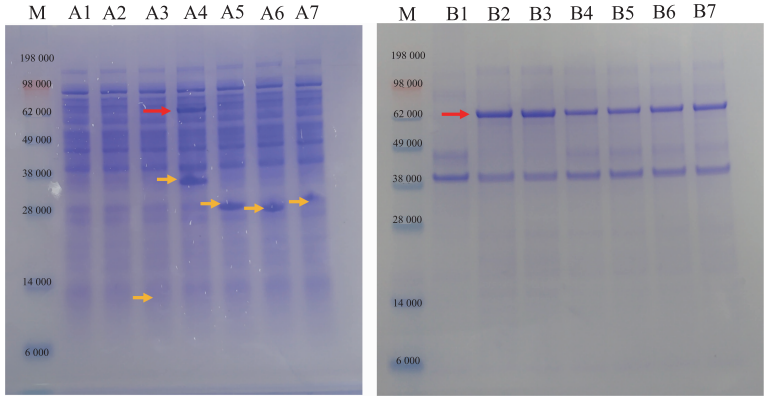

A1:25 ℃ 1 mmol/L IPTG CysC 上清液;A2:30 ℃ 1 mmol/L IPTG CysC 上清液;A3:37 ℃ 1 mmol/L IPTG CysC 上清液;A4:空白上清液;A5:空白沉淀;A6:37 ℃ 1 mmol/L IPTG CysC 沉淀;A7:30 ℃ 1 mmol/L IPTG CysC 沉淀;A8:37 ℃ 1 mmol/L IPTG CysC 上清液。

B1:25 ℃ 0.5 mmol/L IPTG CysC 上清液;B2:30 ℃ 0.5 mmol/L IPTG CysC 上清液;B3:37 ℃ 0.5 mmol/L IPTG CysC 上清液;B4:空白上清液;B5:空白沉淀;B6:37 ℃ 0.5 mmol/L IPTG CysC 沉淀;B7:30 ℃ 0.5 mmol/L IPTG CysC 沉淀;B8:37 ℃ 0.5 mmol/L IPTG CysC 上清液。

红色箭头所指为腺苷磷酰硫酸激酶所在位置。

**图 3 原始质粒 pET28a–*cysC* 的表达情况**

**Fig. 3 SDS–PAGE analysis of pET28a–*cysC* expression in *E.coli* BL21(DE3)**




红色条带所指为目的条带所在位置,黄色条带所指为二硫键促溶蛋白所在位置。

A1:空白上清液;A2:原始 CysC 上清液;A3:共表达 TrxA 与 CysC 上清液;A4:共表达 TrxB 与 CysC 上清液;A5:共表达 DsbA 与 CysC 上清液;A6:共表达 DsbB 与 CysC 上清液;A7:共表达 DsbC 与 CysC 上清液。

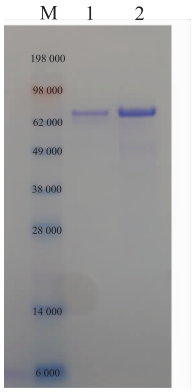
B1:空白沉淀;B2:原始 CysC 沉淀;B3:共表达 TrxA 与 CysC 沉淀;B4:共表达 TrxB 与 CysC 沉淀;B5:共表达 DsbA 与 CysC 沉淀;B6:共表达 DsbB 与CysC 沉淀;B7:共表达 DsbC 与 CysC 沉淀。

**图 4 共表达硫氧还蛋白和二硫键异构酶对腺苷磷酰硫酸表达的影响**

**Fig. 4 Effect of co–expression of thioredoxin and disulfide isomerase on adenylyl–sulfate kinase expression**

## 2.2 腺苷磷酰硫酸激酶的酶学性质分析

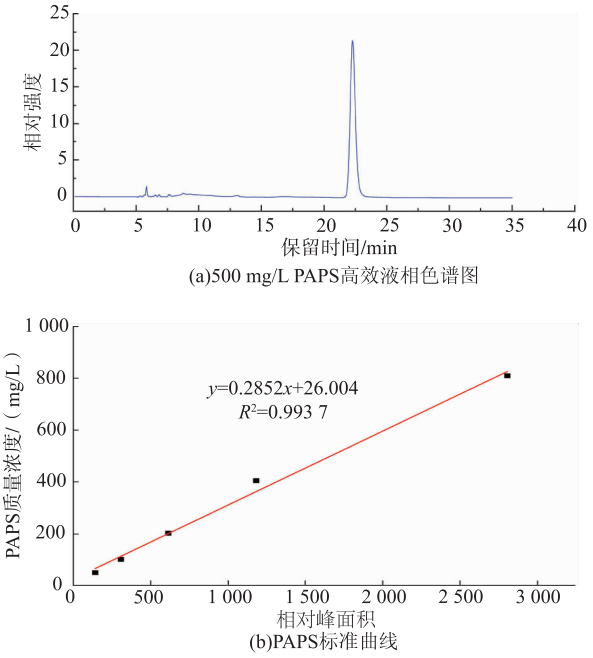
**2.2.1 PAPS 标准曲线的绘制** 配置不同质量浓度的 PAPS 水溶液,经 HPLC 测定分析绘制 PAPS 质量浓度与峰面积的点线图,通过拟合绘制标准曲线,结果见图 6。绘制所得 PAPS 质量浓度范围为 0~800 mg/L 时的标准曲线为 $y=0.282x+26.004$,$R^2=0.993\ 7$,线性良好,以此建立的 PAPS 的高效液相检测方法适合催化体系中 PAPS 的检测。




1:150 mmol/L 咪唑洗脱;2:200 mmol/L 咪唑洗脱。

**图 5 腺苷磷酰硫酸激酶纯化分析图**

**Fig. 5 Purification of SDS -PAGE electrophoresis by recombinant protein**




(a)500 mg/L PAPS高效液相色谱图

(b)PAPS标准曲线

**图 6 PAPS 高效液相色谱图**

**Fig. 6 HPLC analysis of PAPS content**

**2.2.2 重组蛋白质最适反应温度的确定** 控制催化体系 pH 为 7.0,测定温度为 25、30、35、40 ℃下腺苷磷酰硫酸激酶的酶活,结果见图 7。经测定,在 pH 为 7.0、温度为 35 ℃时,重组蛋白酶活力最高,即重组蛋白最适反应温度为 35 ℃,此时比酶活为(1.20±0.10) U/mg。

**2.2.3 重组蛋白质最适反应 pH 的确定** 控制催化体系的温度为 35 ℃,分别测定催化缓冲液 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 时腺苷磷酰硫酸激酶的酶活,

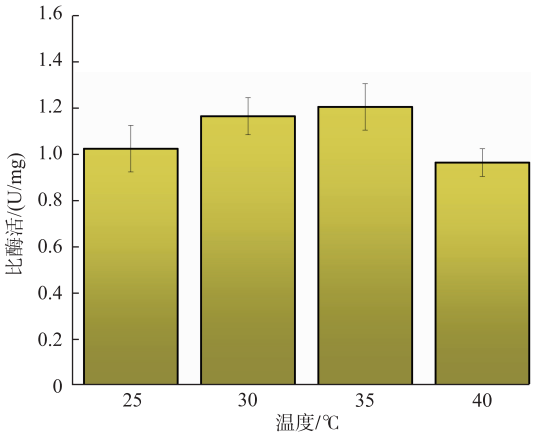



**图 7 不同温度下的酶活**

**Fig. 7 Enzyme activity at different temperature**

结果见图 8。经测定,在 35 ℃时,重组蛋白酶在 pH 为 7.5 时催化活力最高,即重组蛋白最适反应 pH 为 7.5,此时比酶活为(1.26±0.08) U/mg。

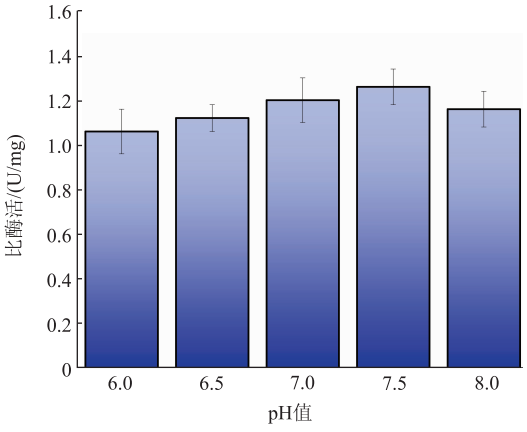



**图 8 不同 pH 值下的酶活**

**Fig. 8 Enzyme activity at different pH**

## 3 结 语

作者以大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)为宿主,以 pET-28a(+)为载体,表达结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis* AUSMDU00018547)来源的腺苷磷酰硫酸激酶,由于第 549 和 556 位的半胱氨酸形成的一对二硫键无法正确折叠,目的蛋白质全部以包涵体形式存在,降低诱导温度和诱导剂 IPTG 的浓度以控制启动子强度不能有效地实现目的蛋白质的可溶表达。通过共表达 5 种不同的二硫键促溶蛋白显示,硫氧还蛋白 TrxB 可以有效促进腺苷磷酰硫酸激酶的可溶表达。文献报道 TrxB 是

氧化还原反应中的氢供体，伴随着电子和质子的转移，从而调节胞质的氧化还原状态[24-25]，使二硫键能够正确折叠。本研究中共表达 TrxB 有效地促进腺苷磷酰硫酸激酶的可溶表达，其原因可能与蛋白质二硫键的正确折叠相关。经镍柱纯化后对重组蛋白质酶学性质进行测定，发现目的蛋白质最适反应温度为 35 ℃，最适 pH 为 7.5，最大比酶活为（1.26±0.08）U/mg。腺苷磷酰硫酸激酶的研究主要分为两个方向：一是通过提取纯化微生物自身的腺苷磷酰硫酸激酶用于研究其酶学性质，虽然提取的腺苷磷酰硫酸激酶的比酶活最高能达到 7 560 U/mg[26]，但该方式步骤繁琐，蛋白质得率低，不适合应用；二是异源过表达腺苷磷酰硫酸激酶实现 PAPS 的合成。在相关研究中异源表达的腺苷磷酰硫酸激酶只是作为一锅法合成 PAPS 的途径酶之一，没有单独对酶活或产量有具体的报道[20,22]。本研究是国内外首次异源表达结核分枝杆菌来源的腺苷磷酰硫酸激酶，因此提高结核分枝杆菌来源的腺苷磷酰硫酸激酶的酶活和增加可溶表达量都有很大的提升空间。用大肠杆菌作为表达宿主，表达效率和表达量高，操作方便。腺苷磷酰硫酸激酶作为 PAPS 合成途径中最后一步酶，该酶的活性表达及纯化对于体外酶法合成 PAPS 有着重要的意义。

## 参考文献：

[1] LIU J，LINHARDT R J. Chemoenzymatic synthesis of heparan sulfate and heparin[J]. **Natural Product Reports**，2014，31（12）：1676-1685.
[2] CLEGG D O，REDA D J，HARRIS C L，et al. Glucosamine，chondroitin sulfate，and the two in combination for painful knee osteoarthritis[J]. **The New England Journal of Medicine**，2006，354（8）：795-808.
[3] LIU H，ZHANG Z，LINHARDT R J. Lessons learned from the contamination of heparin[J]. **Natural Product Reports**，2009，26（3）：313-321.
[4] KANG Z，ZHOU Z，WANG Y，et al. Bio-based strategies for producing glycosaminoglycans and their oligosaccharides[J]. **Trends in Biotechnology**，2018，36（8）：806-818.
[5] ZHOU Z，LI Q，HUANG H，et al. A microbial-enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans[J]. **Biotechnology and Bioengineering**，2018，115（6）：1561-1570.
[6] XU Y，MASUKO S，TAKIEDDIN M，et al. Chemoenzymatic synthesis of homogeneous ultralow molecular weight heparins[J]. **Science**，2011，334（6055）：498-501.
[7] CHU L L，DHAKAL D，SHIN H J，et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of naringenin 7-sulfate and its biological activities[J]. **Frontiers in Microbiology**，2018，9：1671.
[8] RIVOAL J，HANSON A D. Choline-O-sulfate biosynthesis in plants （identification and partial characterization of a salinity-inducible choline sulfotransferase from species of limonium （*Plumbaginaceae*）[J]. **Plant Physiology**，1994，106（3）：1187-1193.
[9] FOSTER P A，MUELLER J W. Sulfation pathways：insights into steroid sulfation and desulfation pathways[J]. **Journal of Molecular Endocrinology**，2018，61（2）：T271-T283.
[10] KLAASSEN C D，BOLES J W. Sulfation and sulfotransferases 5：the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate（PAPS）in the regulation of sulfation [J]. **FASEB Journal：Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**，1997，11（6）：404-418.
[11] MUELLER J W，SHAFQAT N. Adenosine-5'-phosphosulfate--a multifaceted modulator of bifunctional 3'-phospho-adenosine-5'-phosphosulfate synthases and related enzymes[J]. **The FEBS Journal**，2013，280（13）：3050-3057.
[12] LEE S F，DAVEY L. Disulfide bonds：a key modification in bacterial extracytoplasmic proteins[J]. **Journal of Dental Research**，2017，96（13）：1465-1473.
[13] SAEZ N J，CRISTOFORI-ARMSTRONG B，ANANGI R，et al. A strategy for production of correctly folded disulfide-rich peptides in the periplasm of *E. coli*[J]. **Methods in Molecular Biology**，2017，1586：155-180.
[14] CHEN X，SHI J，CHEN R，et al. Molecular chaperones （TrxA，SUMO，Intein，and GST）mediating expression，purification，and antimicrobial activity assays of plectasin in *Escherichia coli*[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**，2015，62（5）：606-614.

[15] LANDETA C, BOYD D, BECKWITH J. Disulfide bond formation in prokaryotes[J]. **Nature Microbiology**, 2018, 3(3): 270- 280.
[16] REGEIMBAL J, BARDWELL J C. DsbB catalyzes disulfide bond formation de novo[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002, 277(36): 32706-32713.
[17] JOLY J C, SWARTZ J R. In vitro and in vivo redox states of the *Escherichia coli* periplasmic oxidoreductases DsbA and DsbC[J]. **Biochemistry**, 1997, 36(33): 10067-10072.
[18] PAN J L, SLISKOVIC I, BARDWELL J C. Mutants in DsbB that appear to redirect oxidation through the disulfide isomerization pathway[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2008, 377(5): 1433-1442.
[19] ZAPUN A, MISSIAKAS D, RAINA S, et al. Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*[J]. **Biochemistry**, 1995, 34(15): 5075-5089.
[20] AN C, ZHAO L, WEI Z, et al. Chemoenzymatic synthesis of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate coupling with an ATP regeneration system[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2017, 101(20): 7535-7544.
[21] YU Z, LANSDON E B, SEGEL I H, et al. Crystal structure of the bifunctional ATP sulfurylase-APS kinase from the chemolithotrophic thermophile *Aquifex aeolicus*[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2007, 365(3): 732-743.
[22] ZHOU X, CHANDARAJOTI K, PHAM T Q, et al. Expression of heparan sulfate sulfotransferases in *Kluyveromyces lactis* and preparation of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate[J]. **Glycobiology**, 2011, 21(6): 771-780.
[23] WONG K P. A simple sensitive fluorimetric assay of APS-kinase activity[J]. **Biochemical Pharmacology**, 1990, 39(1): 173-179.
[24] BALLAL A, MANNA A C. Control of thioredoxin reductase gene (trxB) transcription by SarA in *Staphylococcus aureus*[J]. **Journal of Bacteriology**, 2010, 192(1): 336-345.
[25] PROBA K, GE L, PLUCKTHUN A. Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB)[J]. **Gene**, 1995, 159(2): 203-207.
[26] SATISHCHANDRAN C, MARKHAM G D. Adenosine-5'-phosphosulfate kinase from *Escherichia coli* K12 purification, characterization, and identification of a phosphorylated enzyme intermediate[J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 1989, 264(25): 15012-15021.

## 科　技　信　息

**食品领域顶级期刊在线发表了肉品加工与品质调控团队综述文章“肉品质生物标志物最新研究进展及发展趋势”**

肉品质生物标志物能够阐明畜禽宰后肌肉转化为肉过程中发生一系列复杂的生理生化变化，涉及能量代谢、钙信号传导和细胞凋亡等数十种途径，决定肉品质。生物标志物是众多生化反应的物质基础和关键靶标，筛选和确证肉品质生物标志物是国际肉品科技研究的最新前沿，但一直未明确目标研究对象。近年来，肉品加工与品质调控创新团队聚焦能量代谢与靶标蛋白质(酶)翻译后修饰关联调控肉品质的新机制，筛选了肉品质特征蛋白质(酶)，解析了多条代谢途径，发表论文 50 余篇。基于团队已有基础，该团队对肉品质生物标志物最新研究进展进行了系统梳理和科学分析，筛选和聚焦到 79 种表征肉类品质的潜在生物标志物，其中 GAPDH、TPI1、HSPB1、HSPA1B、PARK7、ACTA1 和 TTN 可同时表征肉嫩度、色泽和持水力，这些标志物可从糖酵解、热应激、蛋白质氧化与水解、细胞凋亡等途径调控肉品质。本综述为从分子层面解析和调控肉品质提供了靶标，为构建肉品质精准评价体系和快速在线监测方法提供了方向。

该成果在线发表在食品领域顶尖期刊 *Trend in Food Science and Technology*(一区，IF：11.077)上，得到了中国农业科学院科技创新工程和“十三五”国家重点研发计划项目资助。

［信息来源］中国农业科学院农产品加工研究所. 食品领域顶级期刊在线发表了肉品加工与品质调控团队综述文章“肉品质生物标志物最新研究进展及发展趋势”[EB/OL]. (2020-10-9). http://ifst.caas.cn/xwzx/kyjz/260341.htm