第 44 卷第 5 期　　河 北 科 技 大 学 学 报　　Vol. 44, No. 5
2023 年 10 月　　Journal of Hebei University of Science and Technology　　Oct. 2023

文章编号:1008-1542(2023)05-0485-08

嵌合信号肽提高 α-淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的分泌

张春晓,冉从国,徐志斌,王丽丽

(河北科技大学食品与生物学院,河北石家庄　050018)

摘　要:为提高 α-淀粉酶的分泌效率,将不同天然信号肽的 N,H 和 C 区进行组合,以期筛选出优于天然信号肽的嵌合信号肽。首先从天然信号肽库中筛选了适合解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)α-淀粉酶在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中分泌的天然信号肽,以其中 4 种天然信号肽(SPyvcE,SPyoqM,SPBglS 和 SPyobB)的 H 区替换信号肽 SPsacB 的 H 区,构建 4 种嵌合信号肽 RSP1—RSP4 指导 α-淀粉酶的基因工程菌株。结果表明,适合 α-淀粉酶的最适天然信号肽和嵌合信号肽分别为 SPyoqM 和 RSP1,且 RSP1 指导 α-淀粉酶在枯草芽孢杆菌的分泌效率较 SPyoqM 提高 27%,较具有相同 H 区的 SPyvcE 提高了 3.6 倍,较仅 H 区不同的 SPsacB 提高了 2.07 倍。嵌合信号肽构建策略是一种有效提高 α-淀粉酶分泌效率的方法,可为其他蛋白质的高效分泌提供参考。

关键词:基因工程;α-淀粉酶;枯草芽孢杆菌;信号肽;疏水区

中图分类号:Q789　　**文献标识码**:A　　**DOI**:10.7535/hbkd.2023yx05007

Improvement of α-amylase secretion in *Bacillus subtilis* by chimeric signal peptide

ZHANG Chunxiao, RAN Congguo, XU Zhibin, WANG Lili

(School of Food and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: The chimeric signal peptides superior to natural signal peptides were constructed based on the N, H and C regions of different natural signal peptides to improve the α-amylase secretion in *Bacillus subtilis*. Through screening the natural signal peptides library, several optimal natural signal peptides were selected for *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase secretion in *B. subtilis*. The H region of signal peptide SPsacB were replaced by H region of four natural signal peptides (SPyvcE, SPyoqM, SPBglS and SPyobB) to construct four different chimeric signal peptides (RSP1 to RSP4) applied in α-amylase genetic engineering strain. The results show that the most suitable natural and chimeric signal peptides for α-amylase were SPyoqM and RSP1, respectively. The α-amylase secretion efficiency guided by RSP1 was 27% higher than that by SPyoqM, 3.6 times higher than that by SPyvcE which has the same H region with RSP1, and 2.07 times higher than that by SPsacB

收稿日期:2023-08-01;修回日期:2023-09-03;责任编辑:卢　琼

基金项目:河北省重点研发计划项目(21372802D)

第一作者简介:张春晓(1971—),女,河北安国人,副教授,博士,主要从事酶工程及微生物代谢工程方面的研究。

通信作者:王丽丽教授。E-mail: 380392410@qq.com

张春晓,冉从国,徐志斌,等.嵌合信号肽提高 α-淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的分泌[J].河北科技大学学报,2023,44(5):485-492.

ZHANG Chunxiao, RAN Congguo, XU Zhibin, et al. Improvement of α-amylase secretion in *Bacillus subtilis* by chimeric signal peptide [J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2023, 44(5): 485-492.

which has the same N and C region but different in H region. The chimeric signal peptide construction strategy is effective for α-amylase secretion in *Bacillus subtilis*, which provides guidance for efficient secretion of other proteins.

Keywords: genetic engineering; α-amylase; *Bacillus subtilis*; signal peptide; hydrophobic region

重组蛋白对工业、医疗保健和可持续的生物经济发展具有重要意义,因此,建立高质、高量蛋白质高效生产平台很有必要[1]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*,或 *B. subtilis*)被认为是一种生物安全菌株,并且具有遗传稳定性高和蛋白分泌能力强等优点,常被用于细胞工厂生产工业、农业、医药等领域重组蛋白,如蛋白酶、淀粉酶和木聚糖酶等[2]。

枯草芽孢杆菌胞外蛋白分泌系统主要有一般分泌途径(Sec)、双精氨酸分泌途径(Tat)、ABC 转运系统和非经典途径等[3],其中大部分蛋白质以 Sec 途径进行分泌。生命领域中绝大多数分泌蛋白在其 N 端携带短肽,一般含 25～30 个氨基酸残基,称为信号肽,就像全球定位系统一样,导向靶蛋白到达最终目的地[4-6]。信号肽包含 N 区、H 区和 C 区 3 部分[1,3-4],带正电荷的 N 区,含有赖氨酸或精氨酸残基;疏水性 H 区,由一连串疏水残基组成,可能采用 α-螺旋构象,在这个疏水核心区的中间,经常会出现螺旋断裂的甘氨酸或脯氨酸残基,从而形成一个可以插入膜的发夹状结构;亲水性 C 区,具有Ⅰ型信号肽酶识别位点,含 Ala-x-Ala 共识基序[1,3]。信号肽除了被相应的蛋白转位酶靶向和膜易位所需要外,还对相应的靶蛋白的生物合成、折叠动力学和稳定性有额外的影响[7],信号肽的净电荷、疏水性或长度的改变都会改变靶蛋白的分泌效率[8],且同一信号肽指导不同蛋白质的分泌效率存在很大差异[9],目前尚未建立预测靶蛋白最适信号肽的相关软件,因此,通过信号肽库的构建和筛选仍是提高目的蛋白分泌量的一种有效措施[9-10]。

在分析了 N 区正电荷数量、氨基酸组成及密码子偏好性等方面的研究后,笔者得出,N 区不像信号肽的 H 区和 C 区保守、被研究得透彻,在信号肽优化中没有发挥主要作用[4]。信号肽 C 末端由形成 β-螺旋的氨基酸组成,在切除位点上游具有保守的(－3,－1)规则或 AXA 基序,提供信号肽酶结合位点,涉及信号肽的切除[4]。尽管信号肽长度、电荷及疏水性不同,但其切除位点比较保守[4]。H 区是信号肽研究的里程碑,其疏水性决定了:1)信号肽的构象及面向细胞膜的方向;2)信号肽的切除,影响蛋白质转位速率和效率;3)信号肽的蛋白质的分泌途径;4)蛋白质加工,如 N 连接的糖基化[4]。H 区疏水氨基酸残基的类型、顺序和数量在不同生物中偏好性不同[4]。尽管很多研究在提高异源蛋白表达方面均对天然信号肽库进行筛选,并获得了较好的适合目的蛋白的信号肽[11-12],但不一定是最佳信号肽。因此,本研究以 α-淀粉酶为例,将筛选得到的 4 种天然信号肽(SPyvcE,SPyoqM,SPBglS 和 SPyobB)的 H 区,替换 SPsacB 信号肽的 H 区,构建 4 种嵌合信号肽 RSP1—RSP4,以期筛选出优于天然信号肽的嵌合信号肽,实现 α-淀粉酶的更高效分泌。本研究有望为其他蛋白质的高效分泌提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料

本研究所用质粒包括 pWB-manBl(I91N/L211I)[13],构建的 pWB-amyL(SPsacB 信号肽指导的 α-淀粉酶表达载体)、pWB-SP*n*-amyL(天然信号肽指导的 α-淀粉酶表达载体,*n* 代表不同天然信号肽)和 pWB-RSP*x*-amyL(嵌合信号肽指导的 α-淀粉酶表达载体,*x* 代表 1,2,3,4)。所用菌株包括实验室保藏的解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*),*B. subtilis* DB104[14]及新构建的 α-淀粉酶表达菌株 *B. subtilis* (pWB-amyL),*B. subtilis* (pWB-SPn-amyL)和 *B. subtilis* (pWB-RSPx-amyL)。引物见表 1。

表 1 引物种类

Tab. 1 Primers

引 物	序 列	说 明
BFamy-5	AGCTTTTGCCGGAGGTGGAGGTTCTGTAAATGGCACGCTGATGCAGT	amyL 基因
BFamy-2	AGCCTTGCCCTTATTTCTGAACATAAATGGAGACG	
Vlinker-1	AGAACCTCCACCTCCGGCAAAAGCTTGAGTTGCGCCT	淀粉酶表达载体骨架片段
VBFamy-2	ATTTATGTTCAGAAATAAGGGCAAGGCTAGACGGGACTTAC	
P1	AGGAGGCATGAACGATGAGAAAGAGTTTAATTACA	SPyvcE
P2	AGAACCTCCACCTCCCGCCGATGCAGTTTTACTTGT	

续表1

引　物	序　列	说　明
P3	AGGAGGCATGAACGATGAAATTAAGAAAAGTATTG	SPyoqM
P4	AGAACCTCCACCTCCAGCGAATGCAGGAGAAGCAGA	
P5	AGGAGGCATGAACGATGAAACGCAAATTATTATCT	SPyuaB
P6	AGAACCTCCACCTCCCGCGAAAGAAGCTGTAGGTGC	
P7	AGGAGGCATGAACGATGAAAAAAGTGATGTTAGCT	SPpelA
P8	AGAACCTCCACCTCCTGCGTTCGCGCCAGCTGGAGT	
P9	AGGAGGCATGAACGATGAAACGACTTTGTTTATGG	SPpelB
P10	AGAACCTCCACCTCCACCTAATGCTTTTCCAGGCAA	
P11	AGGAGGCATGAACGATGAAAAAGATGTTGATGTTA	SPyoaW
P12	AGAACCTCCACCTCCGGCCGAAGCTTCCCCTACATG	
P13	AGGAGGCATGAACGATGTTTAAGAAATTACTTTTA	SPyqxI
P14	AGAACCTCCACCTCCAGCTTTGGCATGTCCATCCAA	
P15	AGGAGGCATGAACGATGAGCGGCTTTTGCTGACGGCTG	SPlipA
P16	AGAACCTCCACCTCCAGCGGCTTTTGCTGACGGCTG	
P17	AGGAGGCATGAACGATGAAAAAAGTACTTATGGCA	SPestB
P18	AGAACCTCCACCTCCAGCTTTTGCGCCAGACGGCGG	
P19	AGGAGGCATGAACGATGAAACGATTTATTTTAGTT	SPyoqH
P20	AGAACCTCCACCTCCGGCGTTTGTTTGAATGGGATA	
P21	AGGAGGCATGAACGATGAAACGAATGATAGTGAGA	SPybfO
P22	AGAACCTCCACCTCCAGCACGGGCTGAGGCTGAAAA	
P23	AGGAGGCATGAACGATGAAAAAATGGATATATGTT	SPybxI
P24	AGAACCTCCACCTCCTGCGTGGACGGAGAAGCCGCC	
P25	AGGAGGCATGAACGATGAACATCAAAAAGTTTGCA	SPsacB
P26	AGAACCTCCACCTCCCGCAAACGCTTGAGTTGCGCC	RSP1-4
P27	AGGAGGCATGAACGATGCCTTATCTGAAACGAGTG	SPBglS
P28	AGAACCTCCACCTCCAGCTGAGGCAGTAGCAGTGAC	
P29	AGGAGGCATGAACGATGAGAAAGAAAAGAGTTATT	SPyddT
P30	AGAACCTCCACCTCCTGCAGAAGCGTAACCTGCAGG	
P31	AGGAGGCATGAACGATGAAGATTAGGAAAATCTTA	SPyobB
P32	AGAACCTCCACCTCCAGCCAATGCGGGAACCGCGGA	
P33	AGGAGGCATGAACGATGAGAAGCAAAAAATTGTGG	SPaprE
P34	AGAACCTCCACCTCCAGCCTGCGCAGACATGTTGCT	
P35	AGGAGGCATGAACGATGCGCAACTTGACCAAGACATCT	SPnprB
P36	AGAACCTCCACCTCCAGCTGAGGCATGTGTTACAAA	
P37	AGGAGGCATGAACGATGAGGAAAAAAACGAAAAAC	SPbpr
P38	AGAACCTCCACCTCCTGCCCCGGCTGCTCCCGGAAA	
P39	AGGAGGCATGAACGATGAAATTAGTTCCAAGATTC	SPmpr
P40	AGAACCTCCACCTCCCGCTTTTGCCGGTACGCCAAA	
P41	AGGAGGCATGAACGATGAAAAACATGTCTTGCAAA	SPepr
P42	AGAACCTCCACCTCCCGCATGAGCGAGAGGGCCTAT	
P43	AGGAGGCATGAACGATGGGTTTAGGTAAGAAATTG	SPnprE
P44	AGAACCTCCACCTCCAGCCTGAACACCTGGCAGGCT	
P45	AGGAGGCATGAACGATGAAAAAGGGGATCATTCGC	SPvpr
P46	AGAACCTCCACCTCCTGCCTGAACGCCCGTAATGCC	
P47	AGGAGGCATGAACGATGAAACGCAGAAAATTCAGC	SPwprA
P48	AGAACCTCCACCTCCCGCTGCAGCTTTGGTTCCCGG	
P49	AGGAGGCATGAACGATGTTTGCAAAACGATTCAAA	SPamyE
P50	AGAACCTCCACCTCCAGCACTCGCAGCCGCCGGTCC	
Vsip-1	CATCGTTCATGCCTCCTTTTTTATGTACTGTGTTAGCG	α-淀粉酶信号肽库表达载体骨架片段
Vsip-2	GGAGGTGGAGGTCTGTAAATGGCAC	同 Vsip-1 引物

1.2　试剂与仪器

Fastpfu，dNTP，DNA Marker、蛋白 Marker，分析纯，北京全式金生物技术有限公司提供；寡核苷酸引物，分析纯，英潍捷基（上海）贸易有限公司提供；玉米淀粉（生物试剂），沈阳雷仕淀粉有限公司提供；3，5-二硝基水杨酸（DNS，生物试剂）、D-葡萄糖（生物试剂）、刚果红染料（生物试剂）、琼脂粉（生物试剂），北京索莱宝科技有限公司提供；酵母粉、蛋白胨和胰蛋白胨、分析纯，OXOID 公司提供。

ZWY-2102C振荡摇床，上海智城分析仪器制造有限公司提供；Biometra Tone梯度PCR仪，德国耶拿公司提供；Quantity One凝胶成像系统，美国BioRad公司提供；BIFUGE STRATOS高速冷冻离心机，美国GE公司提供；SpectraMaxm i3x多功能酶标仪，美国Molecular Devices公司提供；恒温金属浴，杭州博日科技有限公司提供。

1.3 淀粉酶基因amyL扩增及其表达载体构建

以*B. amyloliquefaciens*基因组为模板，BFamy-5和BFamy-2为引物，扩增amyL基因，95 ℃ 2 min；95 ℃ 20 s，61 ℃ 20 s，72 ℃ 25 s；72 ℃ 5 min，32个循环。以Vlinker-1和VBFamy-2为引物，质粒pWB-manBl (I91N/L211I)为模板扩增载体片段，95 ℃ 2 min；95 ℃ 20 s，62 ℃ 20 s，72 ℃ 1 min，32个循环；72 ℃ 5 min；再将2个PCR片段采用POE-PCR方法进行扩增，95 ℃ 2 min；98 ℃ 15 s，60 ℃ 20 s，68 ℃ 6 min；68 ℃ 10 min，35个循环。将POE-PCR产物转化至*B. subtilis* DB104感受态细胞，获得淀粉酶表达菌株*B. subtilis*(pWB-amyL)。

1.4 天然信号肽库的构建及筛选

1.4.1 天然信号肽基因克隆

依据文献报道的嗜热脂肪芽胞杆菌(*B. stearothermophilus*)淀粉酶AmyS分泌效果较好的15种信号肽(SPyvcE，SPyoqM，yuaB，pelA，pelB，yoaW，yqxI，lipA，estB，yoqH，ybfO，SPsacB，SPBglS，yddT，SPyobB ybxI)[10]，本研究又增加了8种常用蛋白酶信号肽(aprE，nprB，bpr，mpr，epr，nprE，vpr，wprA)以及ybxI和amyE信号肽共25种天然信号肽进行克隆。以*B. subtilis* DB104基因组为模板，所用引物见表1。

1.4.2 载体扩增

以pWB-amyL质粒为模板，Vsip-1和Vsip-2为引物，扩增5.2 kb载体骨架片段用于扩增α-淀粉酶载体骨架，95 ℃ 2 min；95 ℃ 20 s，55 ℃ 20 s，72 ℃ 1 min 30 s，5个循环；95 ℃ 20 s，61 ℃ 20 s，72 ℃ 1 min 30 s；72 ℃ 5 min。

1.4.3 天然信号肽与载体片段融合

天然信号肽和载体片段纯化后，将天然信号肽按分子量大小分为6组，通过POE-PCR方法克隆信号肽-载体骨架多聚体[15]，95 ℃ 2 min；95 ℃ 20 s，56 ℃ 20 s，68 ℃ 6 min；35个循环，68 ℃ 10 min。将POE-PCR产物转入至*B. subtilis* DB104感受态细胞，获得淀粉酶天然信号肽库*B. subtilis* (pWB-SP*n*-amyL)。

1.4.4 天然信号肽库的筛选

将天然信号肽库转化产物平铺在刚果红筛选培养基上，于37 ℃恒温培养14 h进行初筛；从每组中挑取水解圈较大的10个克隆再次进行刚果红平板复筛，水解圈较大的进行24孔板培养并测定酶活力，并从每组中选取3个酶活力较高的克隆进行测序，鉴定信号肽种类。

1.5 嵌合信号肽库的构建

4种嵌合信号肽RSP1—RSP4序列由北京六合华大基因科技有限公司提供，PCR扩增程序同天然信号肽。嵌合信号肽克隆所用引物为P25和P26，采用1.4.2方法构建*B. subtilis* (pWB-RSPx-amyL)。

1.6 重组菌株发酵

挑取每种枯草芽孢杆菌工程菌株3个单克隆于种子培养基，37 ℃ 180 r/min培养12 h；按10%比例转接至发酵培养基，相同培养条件下继续培养5 d，每隔1 d进行取样测定酶活力。

1.7 α-淀粉酶活力测定

采用DNS法测定α-淀粉酶活力[16]。不同工程菌粗酶液制备：取发酵液样品，调至相同OD_{600}，12 000 r/min离心10 min，取上清液作为粗酶液。将玉米淀粉溶于pH 7.0的磷酸缓冲液，配制20 g/L的底物，在1.5 mL离心管中加入底物270 μL，再加入30 μL适当稀释的粗酶液，混合均匀后放入60 ℃恒温水浴锅，反应10 min，取出后迅速加入600 μL的DNS试剂，混合均匀后放入100 ℃沸水浴5 min，迅速取出进行冷水浴，测定样品540 nm吸光值。配制不同浓度的葡萄糖，与DNS试剂混匀，沸水浴5 min，测定OD_{540}值并制备标准曲线。

1.8 信号肽结构预测

通过SigP 6.0进行信号肽N，H和C区的分析[17]。

1.9 数据处理

实验重复3次，采用SPSS软件进行显著性分析，$p<0.05$%差异性显著，$p<0.01$%差异性极显著。应用Origin 2021软件绘图。

2　结果与讨论

2.1　α-淀粉酶基因分析

α-淀粉酶基因扩增结果如图 1 所示，泳道 1 所示目的条带位置与期望的 1 545 bp α-淀粉酶基因大小一致，通过 POE-PCR 构建载体 pWB-amyL 后，进行测序，结果表明与 *B. amyloliquefaciens* α-淀粉酶基因（CP054415.1）一致性 100%。该基因编码 514 个氨基酸。经 SigP 6.0 软件预测，前 31 个氨基酸为信号肽序列。

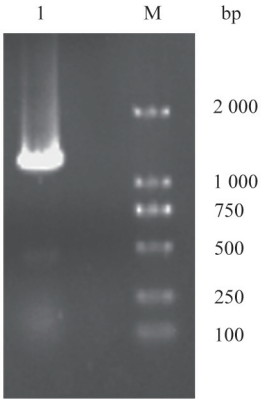


图 1　α-淀粉酶基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1　PCR results of α-amylase

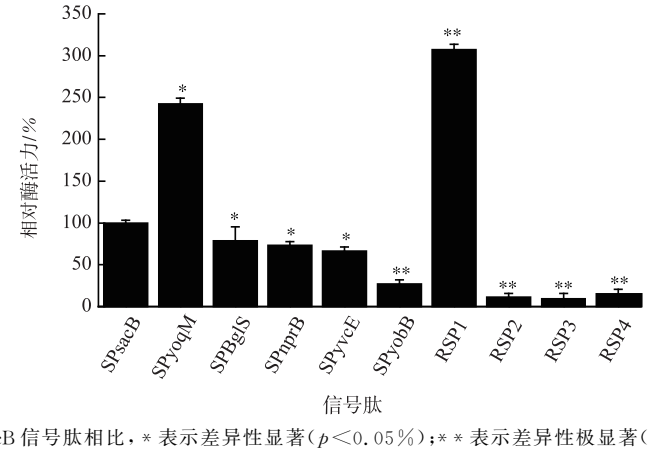
2.2　α-淀粉酶天然信号肽库的筛选

从每组转化平板中挑取透明圈较大的 10 个单克隆进行复筛，结果如图 2 所示，每个克隆所产透明圈有明显差异，每组挑取水解圈直径（*D*）与菌落直径（*d*）比值较大的 3 个菌落，进行液体培养，测定 α-淀粉酶活力，共挑取 10 个酶活力较高的菌株进行测序，测序结果表明，筛选得到的对 α-淀粉酶分泌效率较高的天然信号肽是 SPyoqM，SPyobB，SPBglS，SPsacB，nprB 和 SPyvcE 等 6 种信号肽。

图 2　α-淀粉酶天然信号肽库复筛结果

Fig. 2　2nd round screening for natural signal peptide library of α-amylase

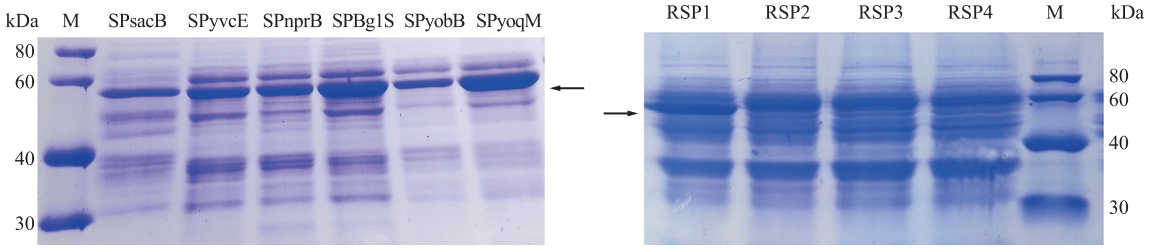
对发酵 4 d 的 6 种天然信号肽工程菌 *B. subtilis*（pWB-SPyoqM-amyL），*B. subtilis*（pWB-SPyobB-amyL），*B. subtilis*（pWB-SPBglS-amyL），*B. subtilis*（pWB-SPsacB-amyL），*B. subtilis*（pWB-nprB-amyL）和 *B. subtilis*（pWB-SPyvcE-amyL）测定胞外 α-淀粉酶活力。结果表明上述 6 种不同天然信号肽中，SPyoqM 指导的 α-淀粉酶分泌效率最高，酶活力在第 4 d 时达 763.6 U/mL，是所筛选得到的 α-淀粉酶的最适天然信号肽，分泌效率为 SPsacB 信号肽的 2.42 倍，其他天然信号肽指导 α-淀粉酶分泌效率由高到低分别是 SPsacB，SPBglS，nprB，SPyvcE 及 SPyobB 信号（见图 3）。同时对上述 6 种天然信号肽工程菌株第 4 d 粗酶液样品进行 SDS-PAGE 电泳，可以看到 6 种工程菌在 55.4 kDa 位置都有目的蛋白（见图 4 a），黑色箭头所示，与 α-淀粉酶预期分子量大小一致，但蛋白表达量明显有差异，即 SPyoqM 信号肽指导的 α-淀粉酶分泌量最高，信号肽 SPyobB 指导的 α-淀粉酶分泌量最低。来源于 *B. stearothermophilus* 的 α-淀粉酶最适天然信号肽为 SP(pel)，其摇瓶发酵 48 h 酶活力达 1 487.85 U/mL[10]，高于本研究 SPyoqM 信号肽指导的 *B. amyloliquefaciens* α-淀粉酶活力，这可能是 2 种 α-淀粉酶比酶活力本身存在差异，也可能是所用菌株和质粒不同，导致酶产量存在差异。



注：与 SPsacB 信号肽相比，* 表示差异性显著（$p<0.05\%$）；** 表示差异性极显著（$p<0.01\%$）。

图 3　不同信号肽指导的 α-淀粉酶相对酶活力

Fig. 3　Relative enzyme activity of α-amylase enzyme by different signal peptides



a）天然信号肽　　b）嵌合信号肽

图 4　不同信号肽工程菌胞外蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 4　Exa-cellular protein SDS-PAGE analysis of engineering strains with different signal peptides

2.3　嵌合信号肽对 α-淀粉酶分泌的影响

由于 SPsacB 是 *B. subtilis* 常用的信号肽，SigP 6.0 预测结果表明其 N 区、H 区和 C 区分别由 MNIKKFAKQ，ATVLTFTTALL 和 AGGATQAFA 短肽组成。本文以该信号肽为基础，将 α-淀粉酶筛选得到的胞外酶活力较高的 4 种天然信号肽 SPyvcE，SPyoqM，SPBglS 和 SPyobB 的 H 区分别替换 SPsacB 的 H 区，构建嵌合信号肽 RSP1，RSP2，RSP3 和 RSP4（如表 2 所示），以期通过 α-淀粉酶信号肽 N 区、H 区和 C 区的强强组合，实现 α-淀粉酶更加高效分泌。

表 2　嵌合信号肽 H 区组成

Tab. 2　Hydrophobic region of chimeric signal peptides

名称	来源	序　列	残基数目	疏水残基数目
SPsacB	—	ATVLTFTTALL	11	7
RSP1	SPyvcE	ITLGLASVIGTSSFLI	16	9
RSP2	SPyoqM	VLTGSVLSLGLL	12	7
RSP3	SPBglS	VLLLLVTGLFMS	12	9
RSP4	SPyobB	ILLSSALSFGM	11	7

结果表明，筛选得到的适合 α-淀粉酶的嵌合信号肽为 RSP1，其指导的胞外 α-淀粉酶活力达 968.5 U/mL（见图 3），较筛选的 α-淀粉酶最适天然信号肽 SPyoqM 分泌效率提高 27%；而其他嵌合信号肽 RSP2，RSP3 和 RSP4 指导的 α-淀粉酶胞外酶活力约为 SPsacB 信号肽的 10%左右。RSP1 与 SPsacB 的 N 区和 C 区相同，仅 H 区不同，但 RSP1 指导 α-淀粉酶的分泌效率是 SPsacB 的 3.07 倍；此外，尽管 RSP1 与 SPyvcE 信号肽 H 区相同，但 RSP1 指导 α-淀粉酶的分泌效率为 SPyvcE 信号肽的 4.6 倍；SPyoqM 与 RSP2 相比，信号肽的 H 区相同但 N 区和 C 区不同，SPyoqM 对 α-淀粉酶的分泌效率是 RSP2 的 21.9 倍。SPsacB 与 4 种嵌合信号肽对 α-淀粉酶的分泌效率都达到极显著水平（$p<0.01\%$）。图 4 b）为发酵 4 d 的粗酶液电泳结果，只有嵌合信号肽 RSP1 指导的 α-淀粉酶有明显的 55.4 kDa 的目的条带（图中黑色箭头所示），其他嵌合信号肽无明显的 α-淀粉酶目的条带，与酶活力测定结果一致。应用嵌合信号肽指导外源蛋白的高效分泌报道较少，仅见对修饰的信号肽 SPdsbA 和 SPpelB 特定区域进行交换，在大肠杆菌（*Escherichia coli*）中提高金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）Alpha $toxin_{H35L}$ 的分泌[18]，未见应用嵌合信号肽指导 α-淀粉酶分泌的报道。

2.4　信号肽组成对蛋白分泌效率的影响

重组蛋白的产量，不仅与表达水平相关，也与转位效率相关，而分泌机器和信号肽，决定了蛋白的分泌效率[4]。同源或异源信号肽筛选、信号肽突变等策略，是提高靶蛋白产量的有效措施[10,19-20]。YANG 等[21]应用信号肽工程包括信号肽优化、对信号肽 SPywbN′删除 29—45 位肽段、在第 4 和第 5 位插入精氨酸 R、降低 H 区疏水性等多项措施，并结合启动子工程及高密度发酵，使碱性 α-淀粉酶产量提高 250.6 倍。信号肽的变化改变了易位效率、裂解位点，甚至裂解后过程[4]。

4 种嵌合信号肽 RSP1—RSP4 的 N 区和 C 区均来自 SPsacB，仅 H 区不同，其氨基酸组成见表 2。首先，从疏水性氨基酸残基数目来看，RSP1 和 RSP3 疏水性残基均为 9，而 RSP2，RSP4 和 SPsacB 的疏水性残基个数为 7，但 RSP1 指导 α-淀粉酶的分泌效率远高于其他信号肽，说明疏水性氨基酸残基数目较多，分泌效率较高，这与 H 区疏水性降低、蛋白质的加工和转运将变慢或完全停止结论一致[4,22]。但不是疏水性残基越高越好，如果疏水性增加过多，大量具有非天然构象的未成熟蛋白会堵塞在转座酶后面，不仅会减少蛋白质的分泌，还会威胁细胞的生存能力[4]。其次，从疏水性氨基酸残基的分布来看，疏水性残基之间插入螺旋阻断(helix-breaker)残基，使疏水残基分布较均匀，优于集中分布。RSP1 和 RSP3 的疏水性残基数目相同，但 RSP1 疏水性残基被螺旋阻断氨基酸 G 或 S 分割为 4 个区域，分布较均匀，而 RSP3 的疏水性残基集中分布在 H 区的两端，中间仅被 1 个 G 阻断，说明信号肽分泌效率不仅与疏水性残基数目多少有关，还与疏水性残基的分布相关。HAN 等[18]认为高效信号肽在 H 区中间或 C 区附近具有疏水残基，如果疏水残基在 N 区附近则会降低分泌效率。DALBEY 等[23]则指出，H 区螺旋阻断残基 G，P 和 S 在 H 区中间的插入使信号肽形成发夹状结构，使信号肽更容易插入膜中并被 SPase 切割。再次，尽管 H 区在蛋白分泌过程中起着举足轻重的作用，但仅 H 区不能决定蛋白分泌效率。RSP1 与 SPyvcE 的 H 区完全相同，但 N 区和 C 区不同，RSP1 指导 α-淀粉酶的分泌效率是 SPyvcE 的 4.6 倍；α-淀粉酶的最适天然信号肽 SPyoqM 与 RSP2 相比，信号肽的 H 区相同但 N 区和 C 区不同，使得 SPyoqM 是 RSP2 的 21.9 倍。HAN 等[18]也认为 H 区疏水残基与另外 2 个区域之间存在相互作用。总之，信号肽 N，H 和 C 区甚至目的蛋白之间与分泌机器共同作用，最终决定了靶蛋白的分泌效率。

3　结　语

本文提出将不同来源的天然信号肽 N，H 和 C 区进行组合构建嵌合信号肽的理念，且嵌合信号肽 RSP1 指导的 α-淀粉酶分泌效率较最适天然信号肽 SPyoqM 提高了 27%，表明嵌合信号肽是有效提高 α-淀粉酶产量的一种方法。本研究对其他蛋白的高效分泌具有指导意义。枯草芽孢杆菌中蛋白分泌过程涉及多个环节和多种蛋白质，其中信号肽对目的蛋白分泌有着重要影响，但是，目前尚没有一种确定的信号肽能够指导任意靶蛋白的高效分泌，因此，需要对更多信号肽与靶蛋白分泌效率的数据进行分析，建立信号肽结构/序列与靶蛋白结构/序列之间的关联，开发靶蛋白分泌效率的信号肽预测软件，提高分泌效率和蛋白产量。

参考文献/References：

[1] NEEF J，VAN DIJL J M，BUIST G. Recombinant protein secretion by *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*：Pathways，applications，and innovation potential[J]. Essays in Biochemistry，2021，65(2)：187-195.

[2] SU Yuan，LIU Chuan，FANG Huan，et al. *Bacillus subtilis*：A universal cell factory for industry，agriculture，biomaterials and medicine [J]. Microbial Cell Factories，2020，19(1)：173.

[3] TJALSMA H，ANTELMANN H，JONGBLOED J D H，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.

[4] OWJI H，NEZAFAT N，NEGAHDARIPOUR M，et al. A comprehensive review of signal peptides：Structure，roles，and applications[J]. European Journal of Cell Biology，2018，97(6)：422-441.

[5] LOW K O，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.

[6] TJALSMA H，BOLHUIS A，JONGBLOED J D，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.

[7] FREUDL R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems[J]. Microbial Cell Factories，2018，17(1)：52. DOI：10.1186/s12934-018-0901-3.

[8] BORCHERT T V，NAGARAJAN V. Effect of signal sequence alterations on export of levansucrase in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology，1991，173(1)：276-282.

[9] 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]. Journal of Molecular Biology，2006，362(3)：393-402.

[10] FU Gang,LIU Jinlan,LI Jinshan,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.

[11] YAO Dongbang,SU Lingqia,LI Na,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. DOI:10.1186/s12934-019-1119-8.

[12] ZHANG Peng,GONG Jinsong,XIE Zhihao,et al. Efficient secretory expression of phospholipase D for the high-yield production of phosphatidylserine and phospholipid derivates from soybean lecithin[J]. Synthetic and Systems Biotechnology,2023,8(2):273-280.

[13] 陈赟,高伟强,梁琪,等.高酶活性 β-甘露聚糖酶定向进化及其用于制备甘露寡糖[J/OL]. 精细化工:1-12[2023-02-18]. https://doi.org/10.13550/j.jxhg.20221182.

[14] KAWAMURA F,DOI R H. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases[J]. Journal of Bacteriology,1984,160(1):442-444.

[15] YOU Chun,ZHANG Y H P. Simple cloning and DNA assembly in *Escherichia coli* by prolonged overlap extension PCR[J]. Methods in Molecular Biology,2014,1116:183-192.

[16] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry,1959,31(3):426-428.

[17] NIELSEN H,TSIRIGOS K D,BRUNAK S,et al. A brief history of protein sorting prediction[J]. The Protein Journal,2019,38(3):200-216.

[18] HAN S J,MACHHI S,BERGE M,et al. Novel signal peptides improve the secretion of recombinant *Staphylococcus aureus* Alpha toxin$_{H35L}$ in *Escherichia coli*[J]. AMB Express,2017,7(1):93. DOI:10.1186/s13568-017-0394-1.

[19] 檀瑞婷,张康,吴敬.嗜热古菌超高温 α-淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达[J]. 基因组学与应用生物学,2021,40(Z1):2109-2117.
TAN Ruiting,ZHANG Kang,WU Jing. Secretion and expression of thermophilic archaea α-amylase in *Bacillus subtilis*[J]. Genomics and Applied Biology,2021,40(Z1):2109-2117.

[20] 苗华彪,曹艳,杨梦瀚,等.基于信号肽策略提高外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达[J]. 生物技术通报,2021,37(6):259-271.
MIAO Huabiao,CAO Yan,YANG Menghan,et al. The strategy for enhancing foreign proteins expression by signal peptide in *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Bulletin,2021,37(6):259-271.

[21] YANG Haiquan,MA Yingfang,ZHAO Yuan,et al. Systematic engineering of transport and transcription to boost alkaline α-amylase production in *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2020,104(7):2973-2985.

[22] ZHOU Yizhou,LIU P,GAN Yutian,et al. Enhancing full-length antibody production by signal peptide engineering[J]. Microbial Cell Factories,2016,15:47.

[23] DALBEY R E,LIVELY M O,BRON S,et al. The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases[J]. Protein Science,1997,6(6):1129-1138.