

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (2) :198 - 204; 4 February 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140016

利用非经典分泌蛋白质实现脂肪酶 A 的分泌表达

崔静^{1,2}, 王光强², 陈海琴^{1,2*}, 陈洁¹, 顾震南², 陈卫^{1,2}, 张灏²

¹江南大学食品科学与技术国家重点实验室, ²江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122

摘要:【目的】以枯草芽孢杆菌脂肪酶 A (LipaseA) 为报告蛋白, 尝试利用 4 种非经典分泌蛋白质及其前 50 个氨基酸作为分泌信号以实现其分泌表达。【方法】我们扩增了脂肪酶 A 的编码基因和非经典分泌蛋白质的编码序列, 构建了 8 种针对脂肪酶 A 的分泌表达载体, 并转化至枯草芽孢杆菌 WB800 菌株, 通过测定重组菌株的酶活、利用蛋白质电泳和免疫印迹等技术检测脂肪酶 A 的分泌情况【结果】以 PdhA 的氨基酸序列和 SodA、Eno 的前 50 氨基酸序列作为分泌信号的重组菌株较好的实现了脂肪酶 A 的分泌表达。【结论】部分非经典分泌蛋白质的编码基因或其前 50 个氨基酸序列能够引导脂肪酶 A 分泌至细胞外。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 非经典分泌蛋白质, 脂肪酶 A

中图分类号: Q933 文章编号: 0001-6209 (2015) 02-0198-07

蛋白质分泌 (protein secretion) 是指蛋白质从合成的位置—细胞质经细胞的膜结构转运到细胞外的过程。一般认为, 可分泌的蛋白质首先以含有信号肽的蛋白质前体形式存在, 因此信号肽是区分细胞质蛋白质和分泌蛋白质的一个重要指标^[1]。但是在 20 年前, 首次有文献报道了白细胞介素 1 β (interleukin 1 β) 和乳糖凝集素 1 (galectin-1) 能够在经典的 ER/Golgi 转运系统不存在的情况下被转运到细胞外, 而且这两种蛋白质中都不存在信号肽。通过 2D 电泳技术和质谱技术, 在枯草芽孢杆菌的发酵上清液中也发现了 17 种类似的蛋白质, 这些蛋白质在细胞内外的大小一致, 都能被有效的转运到细胞外, 而且这些蛋白质均不含有信号肽^[2]。进一步的实验证实这些蛋白质不是由于细胞裂解而被释放到细胞外的, 而是通过一些未知的分泌途径被转

运到细胞外^[3]。这些通过未知的分泌途径分泌到胞外的蛋白被称为非经典分泌蛋白质^[3]。一直以来, 人们对于此类蛋白质的分泌途径和分泌机理的研究甚少, 直到最近 Yang 等人在胞内表达羧酸酯酶 Est55 时发现细胞外也存在大量的 Est55, 而且胞外 Est55 的量比胞内多。作者推测, 非经典分泌蛋白质的分泌在原核生物中是一种常见的现象, 并且这些蛋白质的分泌并不是由细胞裂解引起的^[4]。*B. subtilis* 作为革兰氏阳性细菌的模式菌株, 在基因组学、蛋白质组学等领域中对它都有着较为深入的研究, 已先后在其中成功表达了近 200 种原核和真核生物来源的蛋白质。因此, 无论在理论研究还是实际生产方面, *B. subtilis* 均占有重要地位。其中, 以 *B. subtilis* 168 为应用研究最广泛的野生型菌株之一。1997 年, Kunst F^[5] 等人首次完成了其完整基因

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171636); 国家“863 计划” (2011AA100905)

* 通信作者。E-mail: haiqinchen@jiangnan.edu.cn

作者简介: 崔静 (1989 -), 女, 河北南和人, 硕士研究生。E-mail: cxj0124@gmail.com

收稿日期: 2014-01-17; 修回日期: 2014-10-01

组序列的测定, 并将结果发表在《Nature》杂志上。如今, *B. subtilis* 168 株基因组信息可以从 NCBI 上快速方便的搜索获得。因此, 本研究选取 *B. subtilis* 168 株作为所需基因的供体菌。

脂肪酶是一类能在油水界面催化水解甘油三酯酯键的酶, 可以催化短链、长链、饱和和不饱和酯, 在食品、医药、皮革和洗涤剂等行业应用广泛^[6]。其广泛存在于动植物和微生物中, 与动植物来源的脂肪酶相比, 微生物来源的脂肪酶种类多, 具有 pH 适应范围宽、反应温度范围广以及底物专一性强等特点^[7]。

本研究以枯草芽孢杆菌脂肪酶 A 为报告蛋白, 选取 4 种非经典分泌蛋白质烯醇酶 (Enolase; Eno)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GapA)、丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate dehydrogenase; PdhA)、过氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase; SodA), 以其氨基酸序列及其前 50 个氨基

酸序列作为分泌信号, 构建了 8 种针对脂肪酶 A 的分泌表达载体和分泌表达菌株, 并探讨这些非经典分泌蛋白质或者它们的前 50 个氨基酸序列作为分泌信号实现 EstA 分泌表达的可能性。结果表明部分非经典分泌蛋白质及其前 50 个氨基酸序列能有效的引导 EstA 至细胞外, 这为外源蛋白质的分泌表达提供了一种新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件: 实验室所用菌株与质粒及相关特性描述见表 1。培养基: LB (Luria-Bertani), 根据需要, 在培养基中加入氨苄青霉素 (Ampicillin, 简称 Amp) 至终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 或卡那霉素 (Kanamycin, 简称 Km) 至终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1. 菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Correlated characteristic	Origin
Strain		
<i>E. coli</i> TOP10	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80 lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu)	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> 168	7697 galU galK rpsL (Strr) endA1 nupG trpC2	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> WB800	nprE aprE epr bpr mpr::ble nprB::bsr vpr wprA::hyg	Laboratory stock
Plasmid		
pUCX05	Plac, ColE1, Amp ^r	Laboratory stock
pMA5 Δ MCS	an intermediate plasmid excised the original cloning site of pMA5 pMA5 Δ MCS carrying the estA r	Laboratory stock
pMA5-SP-estA	Encodes the estA fused with the native signal peptide	This study
pMA5-CP-estA	Encodes 4 non-classically secreted protein-estA fusions	This study
pMA5-CP50-estA	Encodes the first 50 amino acids of non-classical proteins fused with estA	This study

SP represents signal peptide of estA; CP represents signal peptide of Eno, GapA, PdhA, SodA respectively.

1.1.2 PCR 引物: 根据需要扩增的目的基因设计 PCR 引物, 其中上游引物包含 *NdeI* 酶切位点, 下游引物包含 *BamHI*、*EcoRI* 双酶切位点。如果基因序列中有上述酶切位点, 找同功酶, *EcoRI* 首先选 *MunI*, *BamHI* 首先选 *BglII*。引物名称中蛋白质名称代表对应要扩增的基因, B 代表 *BamHI* 酶切位点, M 代表与 *EcoRI* 的同工酶 *MfeI* 的酶切位点, E 代表 *EcoRI*, II 代表 *BamHI* 的同工酶 *BglII*, 50 代表前 50 个氨基酸。FC 和 FR 位于质粒 pMA5 Δ MCS 多克隆位点的上下游, 用于验证目的基因插入位置是否正确。

本实验所用 PCR 引物序列参见表 2。

1.1.3 工具酶与试剂: 各种限制性内切酶、T4 DNA

连接酶、Taq DNA 聚合酶、蛋白质分子量标准均购自 TaKaRa 公司; KOD plus 高保真 DNA 聚合酶购自 Toyobo 公司; 质粒抽提试剂盒购自天根生物公司; DNA 胶回收试剂盒购自 Fermentas 公司; PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工公司; 1 kb plus DNA ladder 相对质量标准购自中科泰瑞公司; 核酸染料 (Goldview) 购自赛百盛公司; 棕榈酸对硝基苯酯 (pNPP) 购自 Alfa Aesar 公司; 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 常规分子生物学操作

质粒 DNA 的抽提、纯化、胶回收等参照相应试剂盒说明书, 酶切、连接、核酸凝胶电泳、蛋白质

SDS-PAGE 电泳、大肠杆菌感受态细胞的制备和转化等参照分子克隆^[8]。

枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备和转化采用电击法^[9]进行。

表 2. 引物序列

Table 2. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
EnoF	ATGAATTC <u>CATATGCCATACATTGTTGATGTTTATGC</u>
EnoBMR	GCATCAATTGGGATCCCTTGTTTAAGTTGTGAAAGAGTTG
Eno50EcoRIR	ACCGGAATTCCTCAACCGCTTCGTATTCACCTG
PdhANdeIF	GCGTGAATTCATATGGCTGCAAAAACGAAAAAAGCT
PdhAIER	GCGTGAATTCAGATCTCTTCGACTCCTTCTGTGTAT
pdhA50R	ACCGGAATTC ^{TTTTAATTGATCATCAGTTAAATC}
SodANdeIF	GCGTGAATTCATATGGCTTACGAACTCCAGAATTAC
SodAER	GCATGAATTCGGATCCTTTTGCTTCGCTGTATAGACGAG
SodA50R	ACCGGAATTCGGCAAGAGCAGTGTTCCTTC
GapF	GTGCACCTGCATATGGCAGTAAAAGTCGGTATTAAC
GapR	CAATGAATTC ^{AAGACCTTTTTTGGCGATGTAAG}
Gap50R	CAATGAATTC ^{TACAGAATCATATTGTA} AAAAGGTGAGC
FC	GGAAAGAGCGAAAATGCCTC
FR	CGAGGTGAATTCGACCTCT
estA50R	ATTGTTATAATTTGTGCCTGTC
estANdeIF	CGGGCCATATGAAATTTGTA AAAAGAAGG
estABamHIR	GTCTGGATCCATTCGATTCTGGCC
estAEcoRIF	GCCGCTGAATTCATCCAGTCGTTATG

Enzyme sites are underlined. F presents upstream primer, R presents downstream primer.

1.3 *estA* 基因的扩增及其带自身信号肽分泌表达载体的构建

以 *B. subtilis*168 基因组 DNA 为模板, *estABamHIR* 为上游引物、*estANdeIF* 为下游引物, PCR 扩增 *estA* 的基因序列, 该片段包含了其自身信号肽序列部分。将 PCR 产物和质粒 pMA5ΔMCS 分别用 *NdeI*, *BamHI* 双酶切后进行连接, 构建载体 pMA5-SP-*estA*, 作为阳性对照。

1.4 分泌信号基因的扩增及表达载体的构建

随机选取 4 种非经典分泌蛋白质及其前 50 个氨基酸作为分泌信号, 根据这 8 种目的基因序列设计 PCR 引物 (见表 2), 以 *B. subtilis* 168 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增, PCR 产物用 *EcoRI*、*NdeI* 双酶切, 连接到 pMA5-SP-*estA* 相应酶切位点处, 构建相应的分泌表达载体 (图 1)。

1.5 重组质粒的枯草芽孢杆菌转化与筛选

按照材料与方法中 1.2.2 的方法将构建好的分泌表达载体转化到枯草芽孢杆菌 WB800, 在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子, 提取质粒, 酶切电

泳鉴定。

1.6 脂肪酶活力的测定

脂肪酶活力测定参考 Winkler 等^[10]的方法进行。称取 30 mg 棕榈酸对硝基苯酯 (pNPP) 溶解于 10 mL 异丙醇中, 再与 90 mL 0.05 mol/L Sørensen phosphate buffer (pH 8.0) (添加有 207 mg 脱氧胆酸钠和 100 mg 阿拉伯胶) 混合均匀, 制备底物乳浊液, 该溶液使用前放置于 37 °C 预温 5 min 以上。将破壁后上清液取 5–20 μL 与 2.5 mL 底物乳浊液混和均匀, 迅速放置于 37 °C 温浴 15–30 min, 取出在分光光度计 410 nm 处比浊, 测定吸光度值。酶活的单位定义为: 在 pH 8.0, 37°C 条件下, 以 pNPP 为底物, 1 min 内水解产生 1 μmol 的 pNP 所需的脂肪酶量为一个酶活力单位 U。

1.7 Western blot 蛋白印迹

Western blot 实验中选用 Anti-His Antibody 作为一抗, 羊抗鼠 IgG 作为二抗, 操作参见参考文献 [11]。

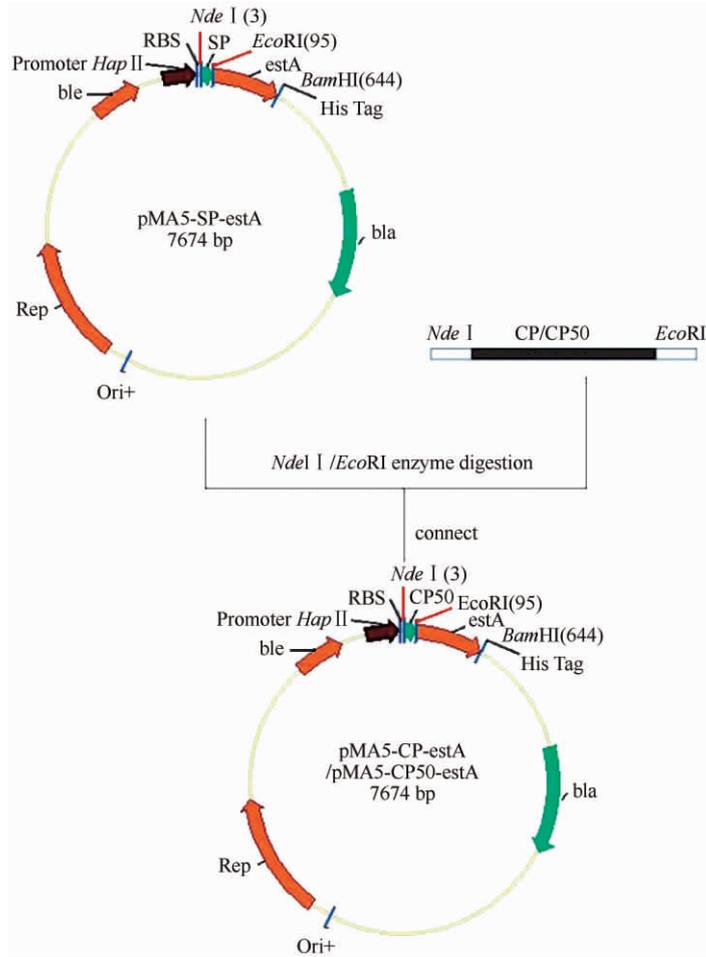


图 1. 不同分泌信号的枯草芽孢杆菌分泌表达载体的构建

Figure 1. Construction of expression and secretion plasmids for *Bacillus subtilis* with different Secretion signal.

2 结果和讨论

2.1 重组分泌表达载体的构建

以 *B. subtilis* 168 菌株基因组 DNA 为模板, 分别扩增 *estA* 的基因和 8 种分泌信号的基因, 并以此构建在枯草芽孢杆菌中的表达载体, 以引物 FC 和 *est50R* 来验证 *estA* 是否成功连接到质粒 pMA5 Δ MCS 上。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 大小正确, 经测序验证全部正确, 验证结果见图 2 和图 3。

2.2 重组菌株的脂肪酶活力测定

参照材料与方法 1.5, 质粒 pMA5-*Eno-estA* 经鉴定错误, 将鉴定正确的重组菌株划线培养在含有卡那霉素的 LB 抗性平板上, 次日挑取单菌落接种于添加卡那霉素的 LB 液体试管中 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培

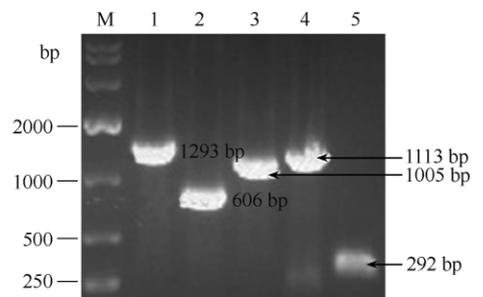


图 2. pMA5-SP-*estA* 和 pMA5-CP-*estA* 的 PCR 验证结果

Figure 2. pMA5-SP-*estA* and pMA5-CP-*estA* PCR verification results. M: 1 kb plus DNA ladder; lane 1: pMA5-*Eno-estA*; lane 2: pMA5-*SodA-estA*; lane 3: pMA5-*GapA-estA*; lane 4: pMA5-*PdhA-estA*; lane 5: pMA5-SP-*estA*.

养 20 h。取 2 mL 菌液于 11.6 \times g 离心 10 min 后回收上清, 菌体用 1 mL 去离子水重悬洗涤 1 次, 然后用 2 mL 去离子水重悬后在冰浴中用超声波破碎仪

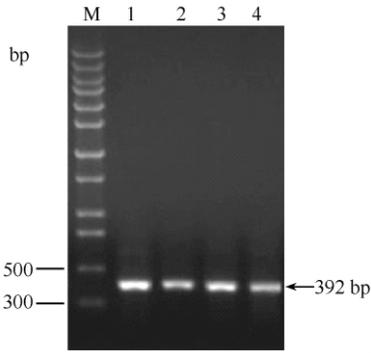


图 3. pMA5-CP50-estA 的 PCR 验证结果

Figure 3. pMA5-CP50-estA PCR verification results. M: 1kb plus DNA ladder; lane 1: pMA5-Eno50-estA; lane 2: pMA5-PdhA50-estA; lane 3: pMA5-GapA50-estA; lane 4: pMA5-SodA50-estA.

破碎菌体。然后参照 1.6 测定重组菌株上清和菌体的脂肪酶活力,结果如图 4。

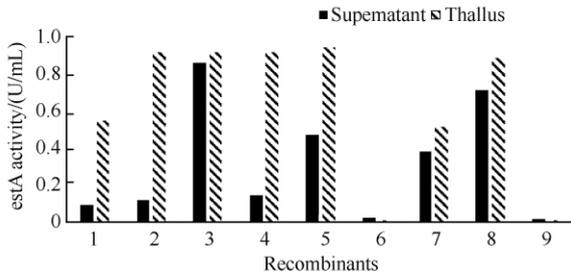


图 4. 重组菌株的脂肪酶活力测定

Figure 4. Detection of estA activity secreted by recombinants. 1: WB800 (pMA5-GapA-estA); 2: WB800 (pMA5-GapA50-estA); 3: WB800 (pMA5-PdhA-estA); 4: WB800 (pMA5-PdhA50-estA); 5: WB800 (pMA5-SodA50-estA); 6: WB800 (pMA5-SodA-estA); 7: WB800 (pMA5-Eno50-estA); 8: WB800 (pMA5-SP-estA); 9: WB800.

如图可以看出出发菌株 WB800 上清和菌体酶活分别是 0.02、0.01 U/mL。而本文所构建的重组菌株 WB800 (pMA5-SP-estA) 上清和菌体的酶活分别是 0.71、0.88 U/mL, 远远高于出发菌株, 可以作为阳性对照。曾伶俐^[12]等人曾利用不同的信号肽更换其原有信号肽去分泌脂肪酶 A, 但总体分泌量很低, 最低值仅为 0.18 U/mL, 分泌效率很低。当我们利用非经典分泌蛋白质更换其原有的信号肽后, 结果各异, 由于我们采用的是蛋白质的氨基酸序列作为分泌信号替换信号肽, 与信号肽有本质上的区别, 并且各个蛋白质的氨基酸序列相差较大, 所以脂肪酶 A 的分泌表达水平相差也很大, 其中 WB800 (pMA5-SodA-estA) 的上清和菌体酶活分别为 0.03 U/mL、0.01 U/mL, 没有实现脂肪酶 A 的表达; 除此之外, WB800 (pMA5-GapA-estA) 的上清和菌体酶活最低 (分别为 0.10、0.54 U/mL), 分泌率也很低, 仅为 15%, 考虑到本底问题, 可以认为 WB800 (pMA5-GapA-estA) 没有分泌 EstA。WB800 (pMA5-PdhA-estA) 的上清和菌体酶活最高, 分别为 0.86、0.92 U/mL, 分泌率为 48%, 与阳性对照 WB800 (pMA5-SP-estA) 基本一致, 但是分泌量比阳性对照高, 考虑到分泌出的蛋白质为 pdhA 跟 estA 的融合蛋白, pdhA 对 estA 的酶活力有一定的协同作用。

2.3 重组菌株分泌表达 estA 的 SDS-PAGE 检测和免疫印迹检查。

重组菌株分泌表达 estA 的蛋白质电泳结果如图 5。图中箭头标注的位置有一条特异蛋白质条带, 且以 WB800 (pMA5-SP-estA) 菌株发酵上清的条

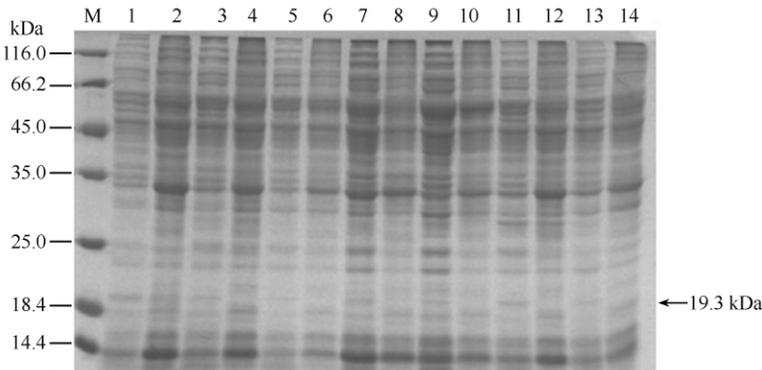


图 5. 重组菌株 estA 的 SDS-PAGE 分析

Figure 5. SDS-PAGE analysis of recombinant expressed estA. M: Protein molecular Marker. Lane 1: pMA5-SP-estA (S); lane 2: pMA5-SP-estA (T); lane 3: pMA5-GapA50-estA (S); lane 4: pMA5-GapA50-estA (T); lane 5: pMA5-GapA-estA (S); lane 6: pMA5-GapA-estA (T); lane 7: pMA5-Eno50-estA (S); lane 8: pMA5-Eno50-estA (T); lane 9: pMA5-PdhA-estA (S); lane 10: pMA5-PdhA-estA (T); lane 11: pMA5-SodA50-estA (S); lane 12: pMA5-SodA50-estA (T); lane 13: pMA5-SodA-estA (S); lane 14: pMA5-SodA-estA (T).

带最为明显,与文献报道 EstA 蛋白质分子质量 19.3 kDa 相符^[13]。由图中可以看出在 pdhA、sodA50、eno50 的引导下,在上清液中将测到 EstA,其余几乎看不到特异性蛋白质条带。由此,可以初步确定重组菌株中,pdhA 的氨基酸序列和 sodA、eno 的前 50 氨基酸序列对于脂肪酶 A 分泌到细胞外有一定引导作用。

重组菌株分泌表达 estA 的 Western blot 结果如图 6。在菌体内检测到大量融合蛋白 PdhA50-estA,而上清中几乎检测不到;但是在上清中检测到的融合蛋白质有 Eno50-estA, sodA50-estA 和 PdhA-estA,说明这些蛋白质可以被分泌到细胞外,与酶活结果基本一致。由此确定 pdhA 的编码基因和 sodA、eno 的前 50 氨基酸序列对脂肪酶 A 分泌到细胞外有一定的引导作用。

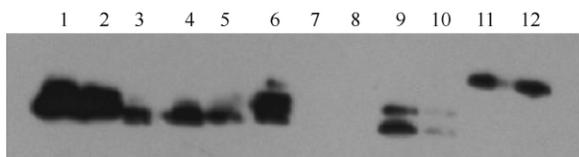


图 6. 重组菌株表达 estA 的 Western-blot 分析

Figure 6. Western-blot analysis of recombinant expressed estA. Lane 1: pMA5-SP-estA (S); lane 2: pMA5-SP-estA (T); lane 3: pMA5-Eno50-estA (S); lane 4: pMA5-Eno50-estA (T); lane 5: pMA5-SodA50-estA (S); lane 6: pMA5-SodA50-estA (T); lane 7: pMA5-SodA-estA (S); lane 8: pMA5-SodA-estA (T); lane 9: pMA5-PdhA50-estA (T); lane 10: pMA5-PdhA50-estA (S); lane 11: pMA5-PdhA-estA (T); lane 12: pMA5-PdhA-estA (S).

3 结论

构建了 8 种枯草芽孢杆菌脂肪酶 A 的分泌表达载体,并实现了枯草芽孢杆菌 168 菌株中的分泌表达,结果表明无信号肽细胞质蛋白质 PdhA 的氨基酸序列和 SodA、Eno 的前 50 氨基酸序列可以作为分泌信号引导脂肪酶 A 分泌到细胞外。由此可见部分非经典蛋白质及其前 50 个氨基酸序列能有有效的引导 EstA 至细胞外,这为外源蛋白质的分泌表达提供了一种新的途径。

参考文献

[1] Blobel, Günter, Bernhard Dobberstein. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically

processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *The Journal of Cell Biology*, 1975, 67 (3) : 835-851.

- [2] Bendtsen JD, Kiemer L, Fausbøll A, & Brunak S. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology*, 2005, 5 (1) : 58.
- [3] Zhang DJ, Cui CP, Wu ZZ. Advances in research on nonclassical secretory protein. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2007, 31 (5) : 484-486. (in Chinese)
- 张达矜, 崔春萍, 吴祖泽. 非经典分泌蛋白研究进展. 军事医学科学院院刊, 2007, 31 (5) : 484-486.
- [4] Yang, CK, Ewis, HE, Zhang X, Lu CD, Hu HJ, Pan Y, Tai, PC. Nonclassical protein secretion by *Bacillus subtilis* in the stationary phase is not due to cell lysis. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (20) : 5607-5615.
- [5] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni, GO, Azevedo V, Haga K. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, 390 (6657) : 249-256.
- [6] Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13 (4) : 390-397.
- [7] Xia Y, Cheng YL, Li DQ, Lv YL. Construction of Secretory Expression Vectors for *Bacillus subtilis* and Secretion of Lipase A. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2011, 39 (30) : 18435-18437. (in Chinese)
- 夏雨, 成玉梁, 李达倩, 吕源玲. 枯草芽孢杆菌分泌载体构建及对脂肪酶 A 的分泌表达. 安徽农业科学, 2011, 39 (30) : 18435-18437.
- [8] J Sambrook, DW Russell. 分子克隆实验指南. 第三版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] Wang PP, Guo QG, Li ShZ, Lu XY, Li BQ, Zhang LP, Ma P, Dong JG. High-efficiency Electro-transformation of *Bacillus subtilis* Strain NCD-2. *Chinese Journal of Biological Control*, 2011, 27 (3) : 368-372. (in Chinese)
- 王培培, 郭庆港, 李社增, 鹿秀云, 李宝庆, 张莉萍, 马平, 董金皋. 枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株的高效电击转化. 中国生物防治学报, 2011, 27 (3) : 368-372.
- [10] Winkler UK, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 1979, 138 (3) : 663-670.
- [11] Wang GQ, Chen HQ, Zhang H, Song YD, Chen W. The secretion of an intrinsically disordered protein with different secretion signals in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology*, 2013, 66 : 566-572.

[12] Lingli Zeng, Yu Xia, Fengwei Tian, Haiqin Chen, Jianxin Zhao, Wei Chen, Hao Zhang. Effects of different signal peptides on the secretion of lipase A in *Bacillus subtilis*. *Science Paperonline*, 2009. (in Chinese)
曾伶俐, 夏雨, 田丰伟, 陈海琴, 赵建新, 陈卫, 张灏. 不同信号肽对脂肪酶 A 在枯草芽孢杆菌中分泌表达的

影响. 中国科技论文在线, 2009.

[13] Ma JS, Zhang ZM, Wang BJ, Kong XJ, Wang YG, Cao SG, Feng Y. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification*, 2006, 45: 22-29.

Effect of non-classical secreted proteins on LipaseA secretion

Jing Cui^{1,2}, Guangqiang Wang², Haiqin Chen^{1,2*}, Jie Chen¹, Zhennan Gu², Wei Chen^{1,2}, Hao Zhang²

¹State Key of Food Science and Technology, ²School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We used 50-amino acid-long peptides from the N-terminus of 4 different non-classically secreted proteins to study the secretion efficiency of *Bacillus subtilis* LipaseA via non-classical secretion pathway. [Methods] We amplified the coding sequences (CDs) of LipaseA and N-terminus of non-classically secreted proteins, constructed 8 fusion protein expression vectors containing both LipaseA CD and different secretion signal peptide and transformed them into *B. subtilis* WB800. Secretion efficiency of these fusion proteins was analyzed by enzyme activity, SDS-PAGE and Western-Blot. [Results] Recombinant LipaseA containing coding sequences of PdhA or N-terminus of SodA and Eno as secretion signals was efficiently secreted. [Conclusion] Parts of non-classically secreted proteins or N-terminus (50 amino acids) could guide LipaseA protein secretion.

Keywords: *Bacillus subtilis*, non-classical secreted proteins, LipaseA

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171636) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA100905)

* Corresponding author. +86-510-85197239; E-mail: haiqinchen@jiangnan.edu.cn

Received: 7 January 2014/Revised: 1 October 2014