



融合自组装双亲短肽对重组过氧化氢酶酶学性质的影响

庞焦, 姜梦彤, 刘羽欣, 李明玉, 王从纲*, 李宪臻

大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034

庞焦, 姜梦彤, 刘羽欣, 李明玉, 王从纲, 李宪臻. 融合自组装双亲短肽对重组过氧化氢酶酶学性质的影响. 微生物学报, 2022, 62(9): 3449–3463.

Pang Jiao, Jiang Mengtong, Liu Yuxin, Li Mingyu, Wang Conggang, Li Xianzhen. Effect of fusing a self-assembling amphipathic peptide on the enzymatic properties of recombinant catalase. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3449–3463.

摘要: 【目的】利用融合自组装双亲短肽策略对源自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的过氧化氢酶 KatA 进行改性, 以强化重组过氧化氢酶在工业中的应用适应性。【方法】将自组装双亲短肽 S1vw 通过连接肽 PT-linker 融合在 KatA 的 N 端, 构建重组质粒 pHT254-S1vw-PT-katA, 将其与携带天然酶基因的 pHT254-katA 分别转入枯草芽孢杆菌 WB800N 中进行分泌表达, 之后将分离纯化得到的纯酶进行酶学性质研究。【结果】成功构建出工程菌并将胞外粗酶液通过乙醇沉淀、DEAE 阴离子交换层析、疏水层析和凝胶过滤层析 4 步纯化, 最终获得电泳纯的重组酶蛋白。酶学性质研究结果显示, 融合酶 S1vw-PT-KatA 和天然酶 KatA 的最适反应温度均为 30 °C, 最适反应 pH 值均为 11.0。然而, 融合酶在 pH 12.0 下孵育 30 min 的相对酶活为 77.3%, 是相同处理条件下天然酶相对酶活的 14.9 倍, 在 65 °C 和 70 °C 下孵育 30 min 的相对酶活分别为 19.8% 和 17.5%, 是相同处理条件下天然酶相对酶活的 1.8 倍和 1.7 倍。此外, 融合酶在 4 °C 储存 14 d 后相对酶活为 88.6%, 而天然酶仅具有 44.3% 的相对酶活。同时, 融合酶的 k_{cat}/K_m 提高到天然酶的 2.3 倍。【结论】融合自组装双亲短肽 S1vw 提高了重组过氧化氢酶 KatA 的 pH 稳定性、温度稳定性、储存稳定性和催化效率, 不仅获得了催化效率和应用适应性改良的重组酶蛋白, 为针对过氧化氢酶的进一步分子改造提供了策略参考和实验依据, 而且促进了其在工业上的规模化制备和应用。

关键词: 过氧化氢酶; 融合表达; 自组装双亲短肽; 酶学性质

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(20180550668)

Supported by Natural Science Foundation of Liaoning Province (20180550668)

*Corresponding author. Tel: +86-411-86318692; E-mail: wangcg@dlpu.edu.cn

Received: 8 January 2022; Revised: 28 February 2022; Published online: 5 March 2022

Effect of fusing a self-assembling amphipathic peptide on the enzymatic properties of recombinant catalase

PANG Jiao, JIANG Mengtong, LIU Yuxin, LI Mingyu, WANG Conggang*, LI Xianzhen

School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

Abstract: [Objective] In this study, we fused a catalase KatA from *Bacillus subtilis* with a self-assembling amphipathic peptide to improve its adaptability in industrial production. [Methods] *S1vw-PT-katA* and *katA* were cloned into pHT254 to yield the constructs pHT254-*S1vw-PT-katA* and pHT254-*katA*, respectively, which were separately introduced into *B. subtilis* WB800N for expression. The recombinant enzymes were then purified and characterized. [Results] The purified enzymes were acquired from the extracellular crude extract of the engineering bacteria through a four-step procedure consisting of ethanol precipitation, DEAE anion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, and gel filtration chromatography. The fused enzyme S1vw-PT-KatA and natural enzyme KatA exhibited maximum activity at 30 °C and pH 11.0. However, the relative activity of the S1vw-PT-KatA incubated at pH 12.0 for 30 min was 77.3%, which was 14.9 times that of KatA under the same conditions. The relative activities of S1vw-PT-KatA incubated at 65 °C and 70 °C for 30 min were 19.8% and 17.5%, respectively, which were 1.8 and 1.7 times that of KatA. The relative activity of S1vw-PT-KatA stored at 4 °C for 14 days was 88.6%, while that was only 44.3% for KatA. Meanwhile, the k_{cat}/K_m value of S1vw-PT-KatA was 2.3 times that of KatA. [Conclusion] Fusing with a self-assembling amphipathic peptide S1vw can improve the pH stability, thermostability, storage stability, and catalytic efficiency of recombinant KatA. This finding provides a potential strategy for the modification, large-scale production, and application of catalase.

Keywords: catalase; fusion expression; self-assembling amphipathic peptide; enzymatic properties

过氧化氢酶(EC 1.11.1.6)是一种普遍存在于动植物和微生物细胞内的氧化还原酶,能高效催化过氧化氢分解为 O_2 和 H_2O ,阻止其转化为具有较强细胞毒性的羟基自由基($\cdot OH$),从而保护机体免受氧化损伤。同时,过氧化氢酶作为一种重要的工业酶制剂,在食品、医疗和纺织等领域具有重要的应用^[1-3],如在食品领域,过氧化氢酶可用于去除食品加工过程中残留的助剂过氧化氢,并且作为抗氧化剂去除啤酒和饮料中的活性氧,提高食品的保鲜效果,还可作为烘焙食品的疏松剂^[4-8];在医疗领域中,过氧化氢酶可用于分解医疗器械消毒过程中残留的 H_2O_2 ;在纺织工业中,经常在高于 50 °C 的

碱性环境下(pH>9.0)使用过氧化氢对纺织物进行漂白,残留的过氧化氢对后续纺织物的染色效果和下游废水处理都造成不利影响,传统的高温水洗法存在去除效率低、能耗高、可控性差等缺点,而基于过氧化氢酶的生物催化法能克服上述缺点,具有去除效率高、能耗低和环保安全等优势^[9-11]。由于目前食品、医药和纺织等行业对过氧化氢酶的需求量逐年增加^[12-13],而商品化的过氧化氢酶主要从牛肝中提取,因其稳定性差、催化效率不高,导致当前过氧化氢酶的生产和使用成本较高,严重阻碍其大规模应用。通过微生物重组表达过氧化氢酶有利于提高其产量,但过氧化氢酶经常需要在高温

和碱性条件下使用, 这对重组过氧化氢酶的应用适应性提出了更高的要求。因此, 对过氧化氢酶进行改性以提高其稳定性和催化效率, 并且利用生长周期短、容易放大生产的微生物进行重组表达, 可以有效降低其生产和使用成本, 具有良好的应用前景。

通过蛋白质工程对酶蛋白进行改造主要包括基于定点突变技术的理性设计和依赖随机突变结合高通量筛选的定向进化, 其中理性设计需要对酶蛋白的结构功能关系有深入理解, 而定向进化需要构建文库并且建立合适的高通量筛选方法, 往往在短时间内难以获得所需特性的突变体^[14-15]。融合标签技术是上述手段的有力补充, 能够在无需晶体结构信息的条件下快速获得酶学性质改良的酶蛋白, 具有较高的分子改造效率^[15-16]。目前, 已报道在微生物系统对重组过氧化氢酶的改造工作主要包括将源自短小芽孢杆菌 ML413 的过氧化氢酶通过引入二硫键得到了温度稳定性改善、催化效率提高 40% 的突变体, 以及利用基于 PoPMuSiC 算法的理性设计提高了过氧化氢酶的温度稳定性和催化效率^[17-18]。然而, 目前缺少利用融合标签技术对过氧化氢酶进行改造的研究工作。自组装双亲短肽(self-assembling amphipathic peptide, SAP)是一类由亲水和疏水氨基酸按一定规律分布, 能自组装成有序的纳米结构的短肽。近年研究发现, 通过融合 SAPs 能够改进一些工业酶的稳定性和催化活性, 如 Lu 等将 6 种 SAPs 分别融合到脂肪氧合酶的 N 末端, 使该酶的热稳定性提高了 2.3-3.6 倍, 催化效率提高了 1.0-2.8 倍^[19]; Liu 等通过将自组装双亲短肽 ELK16 和 EAK16 融合到脲水合酶的 N 末端提高了其在 50 °C 下的热稳定性^[20]; Yang 等将 6 种 SAPs 与碱性淀粉酶融合表达, 筛选出酶学性质改良的融合酶

AmyK-p1, 其比活力提高到天然酶的 4.1 倍, 60 °C 的热稳定性提高到天然酶的 2 倍^[21]。上述研究工作不仅表明 SAP 在工业酶的改性方面具有较好的应用潜力, 而且丰富了现有融合标签的种类, 并且扩展了融合标签技术在酶工程领域中的应用范围。

本研究采用近期文献报道的具有改进酶蛋白的稳定性和分离性能的自组装双亲短肽标签 S1vw (HNANARARHNANARARHNANARARHNARARAR)^[22], 以源自食品安全级微生物枯草芽孢杆菌的过氧化氢酶 KatA 为研究对象, 将 S1vw 通过连接肽 PT-linker (PTPPTTPTPPTTPTPTP)与 KatA 进行融合, 构建重组质粒转入枯草芽孢杆菌 WB800N 中进行表达, 通过对胞外粗酶液进行分离纯化得到纯酶, 进一步将 S1vw 融合酶与天然酶进行酶学性质研究和对比分析, 从而为针对过氧化氢酶分子改造的应用基础研究提供参考, 促进其在工业上的规模化应用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH10B、枯草芽孢杆菌 WB800N、质粒 pMDTM19 T (Simple)-katA 和质粒 pHT254 均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

氨苄青霉素、氯霉素、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、BCA 蛋白质定量检测试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。经枯草芽孢杆菌密码子优化后的 S1vw-PT-katA 短片段由苏州泓迅生物科技股份

有限公司合成。PrimeSTAR® HS DNA Polymerase、DNA 和蛋白质相对分子质量标准品均购自宝生物工程(大连)有限公司。DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析填料、Phenyl Sepharose™ CL-4B 疏水层析填料和 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤层析填料均购自 GE 公司。其他化学试剂购自天津市科密欧化学试剂有限公司。本研究所需引物合成和基因测序工作均由华大基因完成。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.2。LB 固体培养基为在 LB 液体培养基中加入 1.5%琼脂。枯草芽孢杆菌发酵培养基(g/L): 胰蛋白胨 16.0, 酵母粉 10.0, NaCl 5.0, 葡萄糖 20.0, NaNO₃ 10.0, MgSO₄·7H₂O 0.50, Na₂HPO₄ 9.52, KH₂PO₄ 0.60, FeSO₄·7H₂O 0.002 5, pH 7.25。枯草芽孢杆菌感受态细胞制备所需溶液包括生长培养基、电转培养基和复苏培养基。生长培养基(g/L): NaCl 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 山梨醇 90.0, pH 7.2。电转培养基(g/L): 山梨醇 90.83, 甘露醇 90.83, 甘油 10%。复苏培养基(g/L): 山梨醇 90, 甘露醇 69, NaCl 10, 胰蛋白胨 10, 酵母浸粉 5。缓冲液 A: 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠 50 mmol/L, pH 7.0; 缓冲液 B: 磷酸二氢钾-磷酸氢二钠 66.67 mmol/L, pH 8.34。

1.2 主要仪器

Milli-Q 超纯水过滤系统, Cogent μScale TFF System, Millipore 公司; HITACHI-CR21GIII 超速冷冻离心机, 日立(中国)有限公司; TGL-16 高速台式冷冻离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; 通用型垂直电泳仪, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Infinite F50 酶标仪, TECAN 公司; PCR 仪、电转仪, Eppendorf 公司; NanoVue

plus 超微量紫外分光光度计、ImageQuant LAS4000 凝胶成像分析系统, 通用电气(中国)有限公司; 紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司。

1.3 重组工程菌的构建

本研究所用引物序列如表 1 所示。利用 RF 克隆技术(restriction-free cloning)^[23]构建重组质粒 pHT254-*katA*, 首先以实验室前期构建的携带源自枯草芽孢杆菌 168 的 *katA* 基因的质粒 pMD™19 T (Simple)-*katA* 为模板, 利用引物 P1/P2 进行 PCR 扩增带有 pHT254 载体同源臂的 *katA* 基因片段。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测后利用胶回收试剂盒回收目的基因片段, 之后以 pHT254 载体为模板进行第二轮 PCR 反应, 反应结束后加入限制酶 *Dpn* I 分解模板质粒并利用电转化法将反应产物转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, 涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体平板上。挑取单菌落利用菌落 PCR 技术筛选阳性克隆后进一步培养, 提取质粒后进行基因测序。测序正确的重组质粒命名为 pHT254-*katA*。对于重组质粒 pHT254-*SIvw-PT-katA* 的构建, 首先由苏州泓讯生物科技股份有限公司合成一段长度为 276 bp 含有 *SIvw-PT* 基因序列(5'端带有部分 amyQ 信号肽序列, 3'端带有部分 *katA* 上游序列)的短片段, 利用引物 P3/P4 进行 PCR 扩增使其带有载体同源序列, 进一步以 pHT254-*katA* 质粒为模板进行第二轮 PCR 扩增, 反应结束后进行限制酶 *Dpn* II 消化反应后利用电转化法将消化产物转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, 涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体平板上。挑取单菌落利用引物 P5/P6 进行菌落 PCR 鉴定并将阳性单克隆继续培养, 提取质粒后进行测序, 测序正确的重组质粒命名为 pHT254-*SIvw-PT-katA*。

表 1 本文所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

| Primers | Primer sequences (5'→3') |
|---------|--|
| P1 | GCCGATTACAAAAACATCAGCCAGTTCAAATAAACTGACAAGTAGCTGG |
| P2 | GTGATGGTGATGAGCGACGTCTTAAGAATCTTTTTTAATCGGCAATCCAAGG |
| P3 | ATGATTCAAAAACGAAAGCGACAGTTTCGTTTCAGACTTG |
| P4 | GTCCGCGAGAACCGGCAGTCATTGAGTTTTGATTATCTCCAAC |
| P5 | TGATGACCTCGTTTCCACCG |
| P6 | CCGATATTAGCCTCGTATGTTTCA |

将构建正确的重组质粒 pHT254-*kata* 和 pHT254-*S1vw-PT-kata* 通过电转化法转入 WB800N 感受态细胞中。首先制备枯草芽孢杆菌 WB800N 感受态细胞^[24]: (1) 将枯草芽孢杆菌 WB800N 甘油菌划线于 LB 固体平板上, 37 °C 倒置培养 14 h; (2) 用接菌环挑取生长状态良好的单菌落接种至 5 mL LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 培养 14 h; (3) 取步骤(2)培养所得菌液 2 mL 加入 100 mL 生长培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 达到 0.5–0.8; (4) 将步骤(3)所得菌液冰浴 10 min 后, 于 4 °C、5 000 r/min 离心 8 min 收集菌体沉淀; (5) 用预冷的电转培养基重悬菌体, 于 4 °C、5 000 r/min 离心 8 min 收集菌体沉淀, 重复进行 4 次步骤(5)的实验操作; (6) 用 1 mL 电转培养基重悬菌体后, 每管分装 80 μ L 用于后续电转或 -80 °C 冷藏。之后将重组质粒利用电转化法转入枯草芽孢杆菌 WB800N 感受态细胞中, 电转化条件为: 取 1 μ g 重组质粒加入 80 μ L 枯草芽孢杆菌 WB800N 感受态细胞, 在电压 2 500 V, 5 ms 条件下进行电击转化, 之后迅速倒入复苏培养基并于 37 °C、200 r/min 培养 6 h, 涂布于含 5 μ g/mL 浓度氯霉素的 LB 固体平板上。挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定后得到阳性工程菌。

1.4 重组工程菌的诱导表达

挑取重组工程菌单菌落接种于 5 mL 含 5 μ g/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min

培养 14 h 得到种子液。将种子液以 3% (V/V) 比例转入含 5 μ g/mL 氯霉素的发酵培养基中进行扩大培养, 37 °C、200 r/min 培养至菌体 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 在 30 °C、200 r/min 条件下培养 40 h 进行诱导表达。

1.5 天然酶和融合酶的分离纯化

将诱导表达后分别含有天然酶和融合酶的发酵液在 10 000 r/min 下离心 10 min, 分别收集上清液进行超滤浓缩。将超滤浓缩后的样品在冰水混合物中充分预冷后, 缓慢加入预冷的乙醇至总体积的 80%, 在冰水混合物中静置 45 min 后于 10 000 r/min 离心 30 min 得到含有目的蛋白的沉淀组分。之后将含有天然酶 KatA 的乙醇沉淀组分利用缓冲液 A 复溶, 将含有融合酶的乙醇沉淀组分利用缓冲液 B 复溶, 将复溶后样品于 10 000 r/min 离心 30 min 去除未溶解的沉淀后, 将上清液上样于 DEAE 阴离子交换层析柱。对于 KatA 首先用 10 倍柱体积的缓冲液 A 充分清洗色谱柱以除去未结合的杂蛋白, 之后用含有 0–1 mol/L NaCl 的缓冲液 A 进行线性梯度洗脱; 对于 S1vw-PT-KatA 首先用 10 倍柱体积的缓冲液 B 充分清洗色谱柱以除去未结合的杂蛋白, 之后用含有 0–1 mol/L NaCl 的缓冲液 B 进行线性梯度洗脱。将洗脱样品中含有目的蛋白的组分收集合并后进行透析以去除 NaCl, 之后向含有天然酶和融合酶的样品中分别加入

等体积的含 2 mol/L $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 的缓冲液 A, 10 000 r/min 离心 40 min 去除不溶性沉淀, 之后上样于 Phenyl Sepharose™ CL-4B 疏水层析柱, 利用含 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 的缓冲液 A 清洗层析柱以除去未结合的杂蛋白, 之后利用含 0–1 mol/L $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 的缓冲液 A 进行线性梯度洗脱, 将含有目的蛋白的组分收集合并后进行透析和超滤浓缩, 之后上样于 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤层析柱, 利用缓冲液 A 缓冲液进行洗脱, 收集含目的蛋白的组分进行超滤浓缩, 之后利用 SDS-PAGE 电泳对样品进行检测分析。利用 BCA 蛋白质定量检测试剂盒对纯酶进行定量检测。

1.6 酶活力的测定

利用分光光度法检测重组过氧化氢酶的酶活力^[25], 将 0.1 mL 酶液加入 0.9 mL 含 10 mmol/L H_2O_2 的 50 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH 7.0)中, 在 37 °C 反应 2 min, 测定 240 nm 处吸光度的变化并计算酶活力。酶活力单位的定义为: 37 °C 下每分钟分解 1 μmol H_2O_2 所需的酶量为一个酶活力单位。

1.7 天然酶和融合酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性的测定

最适反应 pH 的测定: 将 0.1 mL 纯酶加入 0.9 mL 含 10 mmol/L H_2O_2 的不同 pH (pH 4.0–6.0 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液; pH 6.0–8.0 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠; pH 8.0–9.0 的 Tris-HCl; pH 9.0–10.0 碳酸钠-碳酸氢钠; pH 10.0–11.0 的碳酸氢钠-氢氧化钠; pH 11.0–12.0 磷酸氢二钠-氢氧化钠)缓冲液中, 于 37 °C 反应 2 min 后测定酶活力, 以最高酶活力值作为 100%。pH 稳定性的测定: 将纯酶在 pH 4.0–12.0 条件下于 30 °C 孵育 30 min 后在最适反应条件下检测酶活力, 以最高酶活力值作为 100%。

1.8 天然酶和融合酶的最适反应温度和温度稳定性的测定

最适反应温度的测定: 取 0.1 mL 酶液加入 0.9 mL 含 10 mmol/L H_2O_2 的 pH 11.0 磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液中, 分别在 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70 °C 下反应 2 min 后测定酶活力, 以最高酶活力值为 100%。温度稳定性的测定: 将纯酶分别在 25–70 °C 条件下孵育 30 min, 之后迅速冰浴冷却后于最适反应条件下测定酶活力, 以最高酶活力值作为 100%。

1.9 天然酶和融合酶的动力学参数测定

分别将天然酶和融合酶在最适反应条件下, 于不同浓度过氧化氢底物(2.5、4、5、8、10、20、30、40、50、60、70、80 mmol/L)中进行催化反应并计算反应初速度, 利用 GraphPad Prism5.0 基于 Michaelis-Menten 方程进行非线性拟合得到动力学参数 K_m 和 V_{max} , 计算得到 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 。

1.10 金属离子对天然酶和融合酶酶活力的影响

用去离子水配制含不同金属盐的浓缩液, 用 50 mmol/L pH 7.0 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液稀释后与纯酶混合, 使金属离子终浓度为 1 mmol/L, 于 30 °C 孵育 10 min 后测定酶活力。以未加入上述金属离子的酶液的酶活力作为 100%。

1.11 天然酶和融合酶的储存稳定性

将天然酶和融合酶纯酶在 50 mmol/L pH 7.0 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液中于 4 °C 储存。在不同时间点取样测定酶活力, 以初始酶活力作为 100%。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体的构建

SAPs 是一类由亲水和疏水性氨基酸按照一定规律组成的短肽, 能在特定条件下自组装成有序的纳米结构^[14,26], 文献报道末端融合

SAPs 能改进多种酶蛋白的稳定性^[20-22,27]。本研究选取自组装双亲短肽 S1vw 与过氧化氢酶融合表达, 文献已报道通过融合 S1vw 不仅改进了碱性果胶酶、脂肪氧合酶和 GFP 的稳定性, 而且能使上述蛋白通过镍柱进行纯化, 提高了目的蛋白的分离性能^[19,28-29]。因此本研究将 S1vw 通过连接肽 PT-linker 与过氧化氢酶基因进行融合, 将融合基因构建于携带严谨型强启动子 Pgrac100 和 amyQ 信号肽的 pHT254 表达载体中^[30](图 1), 之后转入枯草芽孢杆菌 WB800N 中构建相应工程菌。首先利用 RF 克隆技术构建重组表达载体 pHT254-katA, 通过

第一轮 PCR 扩增出带有 pHT254 载体同源臂的 *katA* 基因, 利用琼脂糖凝胶电泳和胶回收试剂盒回收扩增片段, 结果如图 2A 所示, 扩增产物在约 1 500 bp 显示为单一条带, 与预期产物长度 1 492 bp 相一致。以其为长引物与模板 pHT254 载体进行第二轮 PCR 反应, 构建出重组表达载体 pHT254-*katA*。之后进行融合基因的构建: 利用全基因合成技术得到带有 S1vw-PT 序列(5'端带有部分 amyQ 信号肽序列, 3'端带有部分 KatA 上游序列)的短片段, 通过第一轮 PCR 扩增出带有载体同源臂的短片段, 利用琼脂糖凝胶电泳和胶回收试剂盒进行回收, 结果如图 2B

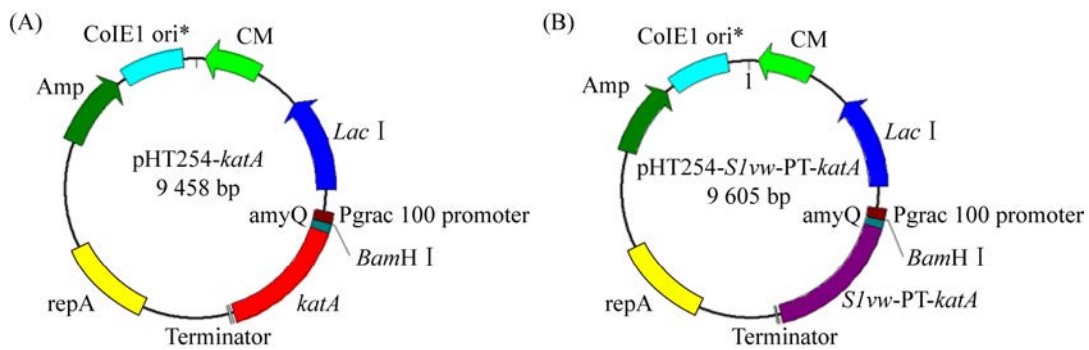


图 1 重组表达载体构建示意图

Figure 1 Schematic diagram of construction of the recombinant expression vector. A: pHT254-*katA*; B: pHT254-*S1vw-PT-katA*.

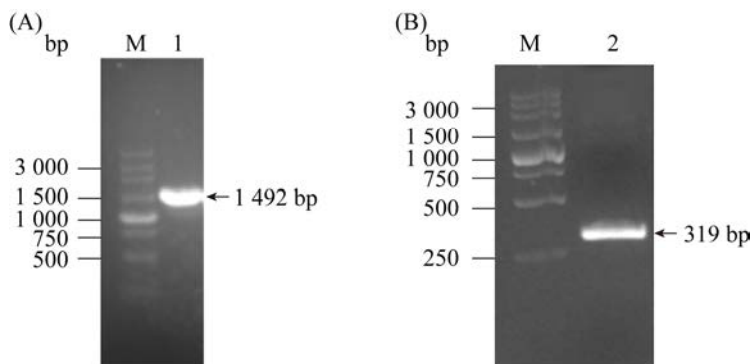


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Figure 2 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products. M: DNA marker; lane 1: *katA* gene; lane 2: partial gene fragment of *S1vw-PT-katA*.

所示, 扩增产物在 250–500 bp 之间显示为单一条带, 与预期产物长度 319 bp 相一致。将其作为第二轮 PCR 反应的长引物, 以 pHT254-*katA* 为模板进行第二轮 PCR 反应, 构建出重组表达载体 pHT254-*S1vw-PT-katA*。将上述重组表达载体转化大肠杆菌后利用 pHT254 载体的通用引物进行菌落 PCR 鉴定, 结果如图 3A、3B 所示, 分别在 1 500–2 250 bp 和约 2 000 bp 处扩增出单一条带, 分别与预期产物长度 1 860 bp 和 2 007 bp 大小一致。将菌落 PCR 鉴定正确的大肠杆菌培养后提取质粒进行基因测序, 测序正确的重组表达载体标记为 pHT254-*katA* 和 pHT254-*S1vw-PT-katA*。

2.2 天然酶和融合酶的诱导表达与分离纯化

分别将重组表达载体 pHT254-*katA* 和 pHT254-*S1vw-PT-katA* 通过电转化法转入枯草芽孢杆菌 WB800N 感受态细胞中并进行菌落 PCR 鉴定, 结果如图 4A、4B 所示, 成功构建了 WB800N/pHT254-*katA* 和 WB800N/pHT254-*S1vw-PT-katA* 工程菌。将重组工程菌进行摇瓶培养, 并且在 30 °C 以 1 mmol/L 终浓度的 IPTG 进行诱导表达。将 WB800N/pHT254-*katA* 工程菌诱导表达

后的胞外粗酶液依次利用乙醇沉淀、DEAE 离子交换层析、疏水层析和凝胶过滤层析进行分离, 纯化产物利用 SDS-PAGE 检测, 结果如图 5A 所示, 经过分离纯化在 54.66 kDa 处显示相应目的条带, 表明成功纯化到重组过氧化氢酶 KatA。由于文献报道 S1vw 与特定酶蛋白融合后能够利用镍柱进行分离纯化, 因此首先将 WB800N/pHT254-*S1vw-PT-katA* 工程菌的胞外粗酶液尝试利用镍柱进行纯化, 但发现目的蛋白与填料的结合效率不高, 因此采用乙醇沉淀、DEAE 离子交换层析、疏水层析和凝胶过滤层析进行纯化, 并且成功纯化到了目的蛋白 S1vw-PT-KatA (图 5B)。值得注意的是, 在 DEAE 阴离子交换层析过程中, 经过分析计算得出融合酶的理论等电点为 7.51, 而天然酶的理论等电点为 6.01, 因此针对含有融合酶的样品采用了更高 pH 的缓冲液进行上样, 同时发现需要更高浓度的 NaCl 才能将融合酶大量洗脱。重组 KatA 纯酶的比活力为 23 107 U/mg, S1vw-PT-KatA 纯酶的比活力为 19 717 U/mg, 表明融合 S1vw 和连接肽 PT-linker 导致融合酶的比活力有所下降。经蛋白定量和计算分析, 采用 1 L 培养基进行摇瓶发酵, 可以通过上述

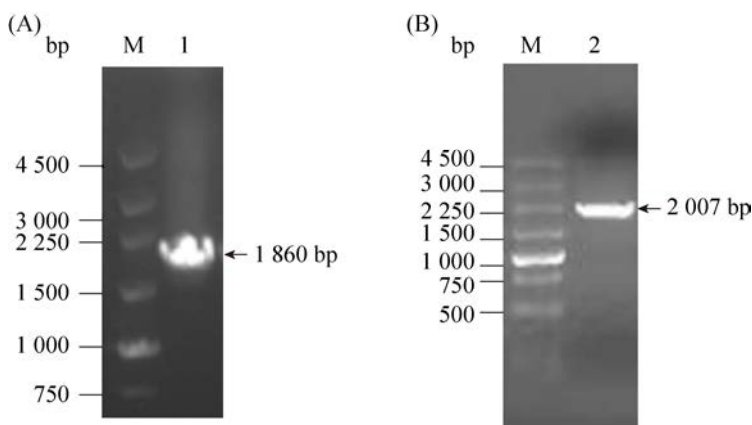


图 3 转化重组质粒工程菌 *E. coli* DH10B 的菌落 PCR 鉴定

Figure 3 Colony PCR identification of engineering strain *E. coli* DH10B transformed with recombinant plasmid. M: DNA marker; 1: pHT254-*katA*; 2: pHT254-*S1vw-PT-katA*.

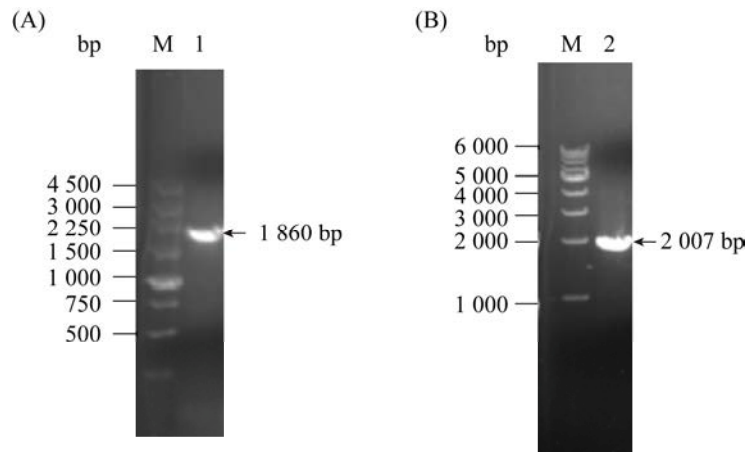


图 4 转化重组质粒工程菌枯草芽孢杆菌 WB800N 的菌落 PCR 鉴定

Figure 4 Colony PCR identification of engineering strain *B. subtilis* WB800N transformed with recombinant plasmid. M: DNA marker; 1: pHT254-*katA*; 2: pHT254-*S1vw-PT-katA*.

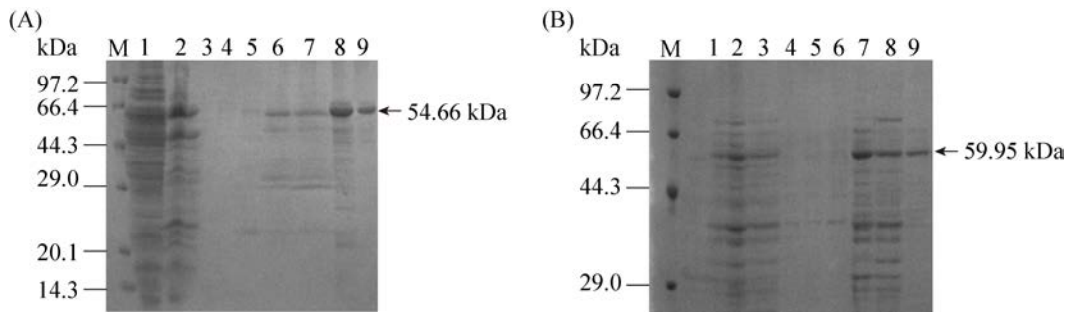


图 5 天然酶 KatA 和融合酶 S1vw-PT-KatA 分离纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 5 SDS-PAGE analysis of separation and purification of natural enzyme KatA and fusion enzyme S1vw-PT-KatA. A: SDS-PAGE analysis of natural enzyme KatA. M: protein marker; 1: fermentation broth; 2: samples after ethanol precipitation; 3–7: samples after DEAE-Sepharose anionic exchange chromatography (3: flow through; 4: 0–300 mmol/L NaCl fraction; 5: 300–400 mmol/L NaCl fraction; 6: 400–520 mmol/L NaCl fraction; 7: 520–550 mmol/L NaCl fraction); 8: samples after hydrophobic chromatography; 9: samples after gel filtration chromatography. B: SDS-PAGE analysis of fusion enzyme S1vw-PT-KatA. M: protein marker; 1: fermentation broth; 2: samples after ethanol precipitation; 3–7: samples after DEAE-Sepharose anionic exchange chromatography (3: flow through; 4: 0–670 mmol/L NaCl fraction; 5: 670–730 mmol/L NaCl fraction; 6: 730–780 mmol/L NaCl fraction; 7: 780–950 mmol/L NaCl fraction); 8: samples after hydrophobic chromatography; 9: samples after gel filtration chromatography.

纯化过程从胞外上清液中纯化得到 0.14 mg KatA 纯酶和 0.61 mg S1vw-PT-KatA 纯酶, 因此后续研究工作可以对培养条件进行优化或采用高密度发酵手段进一步提高纯酶的产量。

2.3 融合 S1vw 对过氧化氢酶最适反应 pH 和 pH 稳定性的影响

将天然酶和融合酶纯酶进行酶学性质表征,

首先在 pH 4.0–12.0 条件下检测二者的酶活力, 结果如图 6A 所示, 天然酶和融合酶在 pH 4.0–12.0 范围内均显示出酶活力, 并且均在 pH 11.0 具有最高酶活力。此外, pH 稳定性检测结果显示, 天然酶 KatA 在 pH 7.0–11.0 条件下孵育 30 min 后具有超过 93.3% 的酶活力, 在 pH 12.0 条件下孵育后酶活力仅剩 5.2%, 而融合酶在 pH 8.0–11.0 范围内经

过孵育后仍具有超过 99.1% 的酶活力，并且在 pH 12.0 条件下孵育后具有 77.3% 的酶活力，是相同处理条件下天然酶的 14.9 倍，显示出比天然酶在碱性条件下更好的稳定性。

2.4 融合 S1vw 对过氧化氢酶最适反应温度和温度稳定性的影响

为了研究融合 S1vw 对重组过氧化氢酶最适反应温度和温度稳定性的影响，选取 25–70 °C 范围进行检测，最适反应温度检测结

果如图 7A 所示，KatA 和 S1vw-PT-KatA 的最适反应温度均为 30 °C。温度稳定性检测结果如图 7B 所示，天然酶和融合酶在 25–55 °C 孵育 30 min 后均保留超过 90% 的酶活，但天然酶在 65 °C 和 70 °C 条件下孵育 30 min 后酶活仅剩 11.1% 和 10.2%，而融合酶在上述条件下的酶活为 19.8% 和 17.5%，分别是相同处理条件下天然酶的 1.8 倍和 1.7 倍，显示出较天然酶更好的温度稳定性。

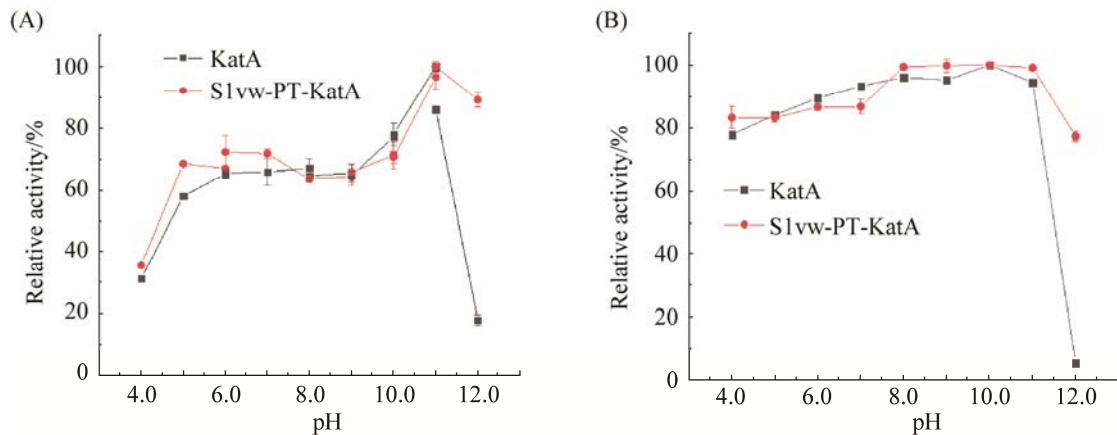


图 6 天然酶 KatA 与融合酶 S1vw-PT-KatA 的最适 pH (A) 及 pH 稳定性 (B)

Figure 6 Optimal pH (A) and pH stability (B) of the natural enzyme KatA and the fusion enzyme S1vw-PT-KatA. Data are presented as mean±SD ($n=3$).

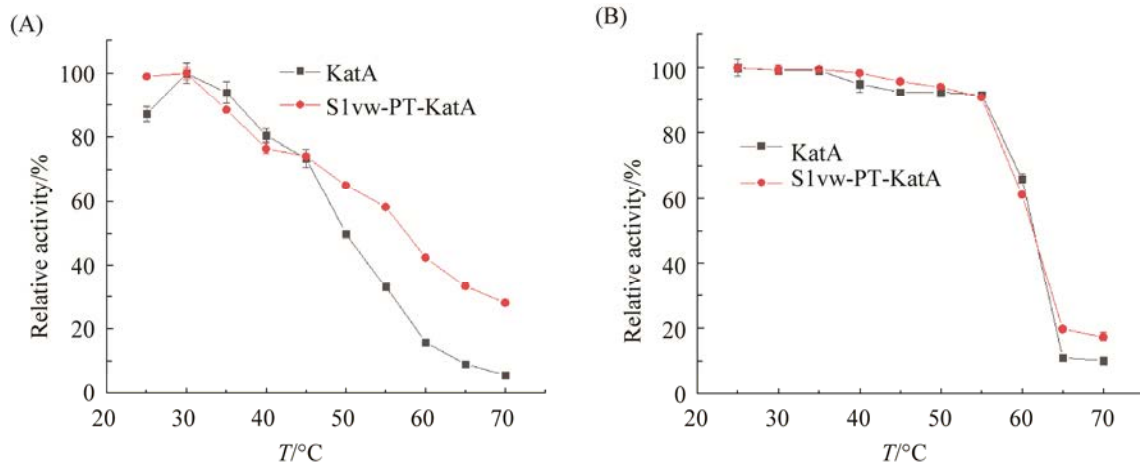


图 7 天然酶 KatA 与融合酶 S1vw-PT-KatA 的最适温度 (A) 及温度稳定性 (B)

Figure 7 Optimum temperature (A) and temperature stability (B) of the natural enzyme KatA and the fusion enzyme S1vw-PT-KatA. Data are presented as mean±SD ($n=3$).

2.5 天然酶和融合酶的动力学常数分析

在最适反应条件下分别测定天然酶与融合酶对不同浓度底物过氧化氢的催化反应初速度并进行拟合得到动力学常数, 结果如表 2 所示, 天然酶对底物过氧化氢的 K_m 为 18.98 ± 1.21 mmol/L、 V_{max} 为 $6\ 843.00 \pm 25.12$ $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 、 k_{cat} 为 $155\ 848.59 \pm 572.10$ s^{-1} , k_{cat}/K_m 为 $8\ 211.20 \pm 30.14$ L/(mmol·s), 而融合酶的 K_m 为 10.73 ± 0.22 mmol/L、 V_{max} 为 $9\ 057.00 \pm 106.02$ $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 、 k_{cat} 为 $201\ 105.78 \pm 2\ 354.20$ s^{-1} , k_{cat}/K_m 为 $18\ 742.38 \pm 219.40$ L/(mmol·s)。相比之下, 融合酶的 K_m 值较天然酶有所降低, 为天然酶的 56.5%, 同时, 融合酶的催化效率较天然酶有较大提高, 达到天然酶的 2.3 倍。

2.6 金属离子对天然酶和融合酶的影响

本文研究了 1 mmol/L 的不同金属盐(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+})对天然

酶和融合酶的影响。结果如图 8 所示, Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 略微提高了天然酶的酶活力, Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 导致天然酶的酶活力明显降低, 而 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 略微提高了融合酶的酶活力, Cu^{2+} 导致融合酶的酶活力明显降低。

2.7 天然酶和融合酶的储存稳定性

将天然酶和融合酶于 4 °C 放置 14 d, 在不同时间点取样检测酶活力从而确定二者的储存稳定性, 结果如图 9 所示, 天然酶放置 14 d 后剩余酶活为 44.3%, 而融合酶仍具有 88.6% 的酶活, 表现出较天然酶更好的储存稳定性。因此, 综合酶学性质表征结果可知, S1vw-PT-KatA 的 pH 稳定性、温度稳定性和储存稳定性较天然酶 KatA 均有改进, 并且具有更高的催化效率, 表明 S1vw-PT-KatA 不仅更适用于生产加工, 而且保存周期长, 显示出较好的工业应用潜力, 并且进一步表明自组装双亲短肽标签在对酶蛋白改性方面具有较好的应用效果。

表 2 天然酶 KatA 及融合酶 S1vw-PT-KatA 的动力学常数

Table 2 Kinetic parameters of natural enzyme KatA and the fusion enzyme S1vw-PT-KatA

| Sample | $K_m/(\text{mmol}/\text{L})$ | $V_{max}/[\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})]$ | k_{cat}/s^{-1} | $k_{cat}/K_m/[\text{L}/(\text{mmol} \cdot \text{s})]$ |
|--------------|------------------------------|---|-----------------------------|---|
| KatA | 18.98 ± 1.21 | $6\ 843.00 \pm 25.12$ | $155\ 848.59 \pm 572.10$ | $8\ 211.20 \pm 30.14$ |
| S1vw-PT-KatA | 10.73 ± 0.22 | $9\ 057.00 \pm 106.02$ | $201\ 105.78 \pm 2\ 354.20$ | $18\ 742.38 \pm 219.40$ |

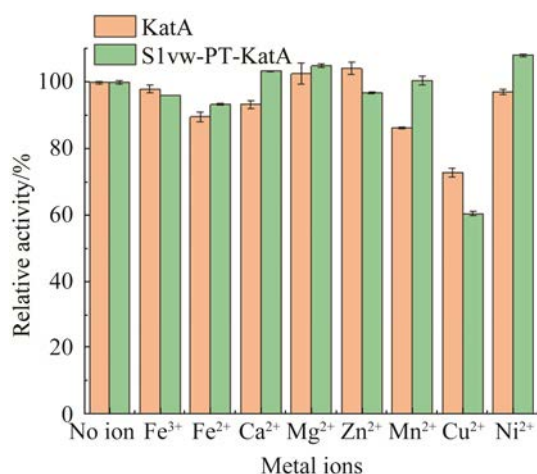


图 8 金属离子对天然酶 KatA 和融合酶 S1vw-PT-KatA 酶活的影响

Figure 8 The effect of metal ions on the enzymatic activity of the natural enzyme KatA and the fusion enzyme S1vw-PT-KatA. Data are presented as mean±SD ($n=3$).

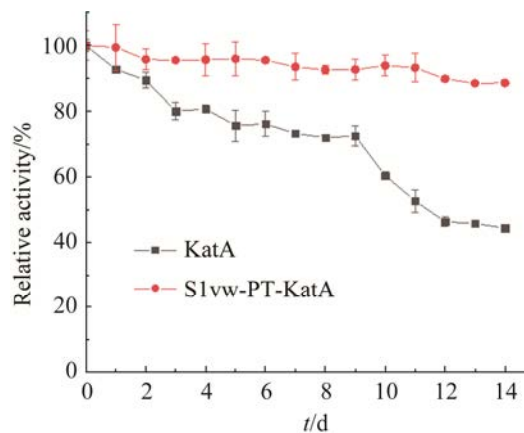


图 9 天然酶 KatA 与融合酶 S1vw-PT-KatA 的储存稳定性

Figure 9 Storage stability of the natural enzyme KatA and the fusion enzyme S1vw-PT-KatA. Data are presented as mean±SD ($n=3$).

3 讨论与结论

融合标签技术能够在无需晶体结构信息的条件下快速获得酶学性质改良的酶蛋白,是酶工程领域中理性设计和定向进化策略的有力补充,目前已经成功用于多种酶蛋白的改造。由亲水和疏水氨基酸按照一定规律组成能够自组装成有序纳米结构的自组装双亲短肽 SAP 作为一种新型融合标签,近年来已被成功用于多种工业酶的稳定性和催化活性的改造,显示出较大的应用潜力。本研究采用近期文献报道的不仅有利于提高重组酶稳定性和催化活性,而且有望提高酶蛋白分离性能的自组装双亲短肽 S1vw,用于重组过氧化氢酶 KatA 的改性,将纯化的天然酶 KatA 和融合酶 S1vw-PT-KatA 进行酶学性质比较,发现融合酶在碱性条件 pH 12.0 下和高温条件 65 °C、70 °C 下的稳定性均有所提高,并且融合酶的 k_{cat}/K_m 提高到天然酶的 2.3 倍,显示出更高的催化效率。

文献报道由于 S1vw 中含有均匀分布的 4 个组氨酸残基,将其与绿色荧光蛋白、脂肪氧合酶、碱性果胶酶进行融合表达,融合酶可以用金属离子螯合层析进行分离纯化^[22]。然而,本研究发现 S1vw-PT-KatA 与镍柱的结合效率不高,其可能原因是 KatA 作为一种四聚体酶具有复杂的空间结构,S1vw 即使在引入连接臂的情况下仍然存在部分序列与 KatA 分子内相互作用,导致 S1vw 无法与镍离子充分结合,因此影响了融合酶与镍柱的结合效果。近期研究报道了通过串联融合多个标签实现不同标签的功能互补^[31],后续工作可以尝试利用串联融合的方法,将 S1vw 与其他纯化标签融合以提高融合酶的分离性能,或对 S1vw 进一步设计优化以扩展其用于提高酶蛋白分离性能的普适性。

过氧化氢酶在工业中经常需要在碱性和高温条件下使用,如纺织工业的漂白工艺普遍在 pH > 9.0 和温度高于 50 °C 条件下进行,因此提高重组过氧化氢酶在碱性和高温条件下的稳定性对于其在工业上的大规模应用具有重要意义。本研究以源自食品安全级微生物枯草芽孢杆菌的过氧化氢酶 KatA 为研究对象,结果发现纯化的天然酶 KatA 与文献报道在大肠杆菌中异源表达和纯化的 KatA 纯酶具有类似的 pH 稳定性^[25],而通过融合 S1vw 标签进一步提高了融合酶在强碱性 pH 下的稳定性,从而为针对重组过氧化氢酶 pH 稳定性的改造工作提供了新的策略。目前对于过氧化氢酶的热稳定性改造主要采用理性设计策略,已报道文献主要通过引入二硫键,将源自 *Bacillus pumilus* ML413 的过氧化氢酶 KatX2 在 60 °C 下的半衰期提高了 48 min,而通过基于 PoPMusiC 算法指导的理性设计鉴定出 Lys114 位点并获得了一系列热稳定性提高的突变体^[17-18]。由于过氧化氢酶 KatA 是一种四聚体酶,缺少精细的晶体结构信息,导致针对其稳定性改造的理性设计难度较大,因此融合标签技术可以作为有力补充用于过氧化氢酶的改性。目前已有多项研究工作表明,不同氨基酸组成和长度的 SAPs 可用于提高酶蛋白的热稳定性,如 Lu 等将 6 种 SAPs 与脂肪氧合酶融合表达,发现不同类型的 SAPs 能将该酶的热稳定性提高 2.3-3.6 倍^[19]; Liu 等通过融合 SAPs 提高了脲水合酶在 50 °C 下的热稳定性^[20];刘松等将 6 种具有不同疏水性和柔性的 SAP 融合至芽孢杆菌 WSHB04-02 碱性果胶酶的 N 端,使得融合酶在 55 °C 的半衰期比天然酶提高了 9.69-72.03 倍^[28],其可能原因涉及对酶蛋白在溶液中聚集态的影响。而本研究通过融合 S1vw 标签提高了重组过氧化氢酶的热稳定性,进一步表明 SAP 融合标签技术的广

泛适用性, 并且由于其改造无需酶结构信息和大量突变体的筛选, 因此可以作为理性设计和定向进化手段的有力补充^[15-16]。本研究采用融合标签技术对 KatA 进行改性, 通过在 KatA 的 N 端融合自组装双亲短肽 S1vw 获得了在高温下具有更好稳定性的融合酶, 从而为针对重组过氧化氢酶热稳定性改造的研究提供了新策略。此外, 文献报道与不同类型的 SAP 融合后可以分别导致酶蛋白的催化效率提高或降低^[29], 而本文获得了催化效率显著提高的融合酶, 进一步表明自组装双亲短肽在酶改性中具有多功能性, 但需要进一步通过晶体结构研究等工作解析其影响酶催化效率的作用机制。

综上所述, 本文在对源自枯草芽孢杆菌的过氧化氢酶 KatA 的重组表达和改性研究中, 得到了较天然酶具有更好 pH 稳定性、温度稳定性、储存稳定性和催化效率的融合酶 S1vw-PT-KatA, 其具有较好的工业生产和应用潜力。同时, 本研究为针对过氧化氢酶的改造工作提供了新思路, 后续研究可以通过晶体解析在分子水平揭示融合自组装双亲短肽对过氧化氢酶以及其他酶蛋白结构和功能的影响机制, 不仅能够促进相关酶制剂的优化改造, 同时有望得到优化的自组装双亲短肽标签, 促进其在酶工程领域的广泛应用。

参考文献

- [1] Jyoti K, Seema M, Gursharan S, Arun R, Shailendra KA. Catalase enzyme: application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018, 16: 192–199.
- [2] Usui S, Komeima K, Lee SY, Jo YJ, Ueno S, Rogers BS, Wu ZH, Shen JK, Lu LL, Oveson BC, Rabinovitch PS, Campochiaro PA. Increased expression of catalase and superoxide dismutase 2 reduces cone cell death in retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy*, 2009, 17(5): 778–786.
- [3] Alaçam A, Tulunoglu O, Oygür T, Bilici S. Effects of topical catalase application on dental pulp tissue: a histopathological evaluation. *Journal of Dentistry*, 2000, 28(5): 333–339.
- [4] 方芳, 李寅, 堵国成, 张娟, 陈坚. 一株嗜热子囊菌产生的碱性耐热过氧化氢酶及其应用潜力. *生物工程学报*, 2004, 20(3): 423–428.
Fang F, Li Y, Du GC, Zhang J, Chen J. Thermo-alkali-stable catalase from *Thermoascus aurantiacus* and its potential use in textile bleaching process. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, 20(3): 423–428. (in Chinese)
- [5] Chu HD, Leeder JG, Gilbert SG. Immobilized catalase reactor for use in peroxide sterilization of dairy products. *Journal of Food Science*, 2006, 40(3): 641–643.
- [6] 刘灵芝, 钟广蓉, 熊莲, 常雁红, 肖宝清, 罗晖. 过氧化氢酶的研究与应用新进展. *化学与生物工程*, 2009, 26(3): 15–18.
Liu LZ, Zhong GR, Xiong L, Chang YH, Xiao BQ, Luo H. Research and application progress of catalase. *Chemistry & Bioengineering*, 2009, 26(3): 15–18. (in Chinese)
- [7] 张坤生, 田荟琳. 过氧化氢酶的功能及研究. *食品科技*, 2007, 32(1): 8–11.
Zhang KS, Tian HL. Research and function of catalase in organism. *Food Science and Technology*, 2007, 32(1): 8–11. (in Chinese)
- [8] 周利伟, 张艳丽, 左冬阳, 张伟, 张宇宏. 阴沟肠杆菌过氧化氢酶基因的重组表达及酶学性质研究. *生物技术进展*, 2013, 3(3): 211–217.
Zhou LW, Zhang YL, Zuo DY, Zhang W, Zhang YH. Recombinant expression and characterization of a catalase from *Enterobacter cloacae*. *Current Biotechnology*, 2013, 3(3): 211–217. (in Chinese)
- [9] Gudelj M, Fruhwirth G, Paar A, Lottspeich F, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz G. A catalase-peroxidase from a newly isolated thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. with potential for the treatment of textile bleaching effluents. *Extremophiles*, 2001, 5(6): 423–429.
- [10] 王凡强, 王正祥, 邵蔚蓝, 刘吉泉, 徐成勇, 诸葛健. 热稳定性过氧化氢酶工程菌株发酵条件的研究. *食品与发酵工业*, 2002, 28(2): 11–14.
Wang FQ, Wang ZX, Shao WL, Liu JQ, Xu CY, Zhuge

- J. Study on culture conditions of engineered strain of thermostable catalase. *Food and Fermentation Industries*, 2002, 28(2): 11–14. (in Chinese)
- [11] 冷晒祥, 钱国砥, 华兆哲, 堵国成, 陈坚. 过氧化氢酶的棉针织物漂染工艺研究. *印染*, 2006, 32(19): 1–3.
Leng SX, Qian GD, Hua ZZ, Du GC, Chen J. Catalase for H₂O₂ removal after cotton knits bleaching. *Dyeing and Finishing*, 2006, 32(19): 1–3. (in Chinese)
- [12] 钱军民, 李旭祥. 纤维素固定化葡萄糖氧化酶的研究. *西安交通大学学报*, 2001, 35(4): 416–420.
Qian JM, Li XX. Study on immobilization of glucose oxidase on cotton cellulose. *Journal of Xi'an Jiaotong University*, 2001, 35(4): 416–420. (in Chinese)
- [13] 周丽萍, 张东旭, 李江华, 堵国成, 陈坚. 过氧化氢酶基因在大肠杆菌中的克隆表达及发酵优化. *工业微生物*, 2011, 41(3): 66–70.
Zhou LP, Zhang DX, Li JH, Du GC, Chen J. Cloning, expression and fermentation optimization of a catalase gene in *E. coli*. *Industrial Microbiology*, 2011, 41(3): 66–70. (in Chinese)
- [14] 任春慧, 张娟, 堵国成, 陈坚. 基于融合双亲短肽提高葡萄糖氧化酶的热稳定性. *生物工程学报*, 2018, 34(7): 1106–1116.
Ren CH, Zhang J, Du GC, Chen J. Enhancing thermal stability of glucose oxidase by fusing amphiphilic short peptide. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(7): 1106–1116. (in Chinese)
- [15] 赵伟欣, 刘松, 刘立明, 陈坚, 堵国成. 自组装双亲短肽氨基酸组成及连接肽对其融合酶表达量的影响. *食品与发酵工业*, 2017, 43(12): 1–6.
Zhao WX, Liu S, Liu LM, Chen J, Du GC. Analysis of the factors influencing the expression of enzymes fused with self-assembling amphipathic peptides. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(12): 1–6. (in Chinese)
- [16] Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 2012, 7(5): 620–634.
- [17] Samson M, Yang TW, Omar M, Xu MJ, Zhang X, Alphonse U, Rao ZM. Improved thermostability and catalytic efficiency of overexpressed catalase from *B. pumilus* ML 413 (KatX2) by introducing disulfide bond C286–C289. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 119: 10–16.
- [18] Cao W, Kang Z, Liu S, Liu L, Du G, Chen J. Improved catalytic efficiency of catalase from *Bacillus subtilis* by rational mutation of Lys114. *Process Biochemistry*, 2014, 49(9): 1497–1502.
- [19] Lu XY, Liu S, Zhang DX, Zhou XM, Wang M, Liu Y, Wu J, Du GC, Chen J. Enhanced thermal stability and specific activity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxigenase by fusing with self-assembling amphipathic peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(21): 9419–9427.
- [20] Liu Y, Cui WJ, Liu ZM, Cui YT, Xia YY, Kobayashi M, Zhou ZM. Enhancement of thermo-stability and product tolerance of *Pseudomonas putida* nitrile hydratase by fusing with self-assembling peptide. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(3): 249–252.
- [21] Yang HQ, Lu XY, Liu L, Li JH, Shin HD, Chen RR, Du GC, Chen J. Fusion of an oligopeptide to the N terminus of an alkaline α -amylase from *Alkalimonas amylolytica* simultaneously improves the enzyme's catalytic efficiency, thermal stability, and resistance to oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(9): 3049–3058.
- [22] 赵伟欣, 刘松, 刘立明, 陈坚, 堵国成. 一种可促进重组蛋白表达量和稳定性的多功能纯化标签的开发与利用. *生物工程学报*, 2019, 35(4): 626–635.
Zhao WX, Liu S, Liu LM, Chen J, Du GC. Development of a purification tag to produce thermostable fused protein. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(4): 626–635. (in Chinese)
- [23] Van Den Ent F, Löwe J. RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2006, 67(1): 67–74.
- [24] Xue GP, Johnson JS, Dalrymple BP. High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 34(3): 183–191.
- [25] Yu ZX, Zheng HC, Zhao XY, Li SF, Xu JY, Song H. High level extracellular production of a recombinant alkaline catalase in *E. coli* BL21 under ethanol stress and its application in hydrogen peroxide removal after cotton fabrics bleaching. *Bioresource Technology*, 2016,

- 214: 303–310.
- [26] Yang H, Fung SY, Pritzker M, Chen P. Modification of hydrophilic and hydrophobic surfaces using an ionic-complementary peptide. *PLoS One*, 2007, 2(12): e1325.
- [27] Han RZ, Li JH, Shin HD, Chen RR, Liu L, Du GC, Chen J. Fusion of self-assembling amphipathic oligopeptides with cyclodextrin glycosyltransferase improves 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid synthesis with soluble starch as the glycosyl donor. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(15): 4717–4724.
- [28] 刘松, 汪明星, 堵国成, 陈坚. 融合自组装双亲短肽提高碱性果胶酶热稳定性. *食品与发酵工业*, 2015, 41(11): 1–6.
- Liu S, Wang MX, Du GC, Chen J. Improvement of thermal stability of alkaline polygalacturonate lyase by fusing with self-assembling amphipathic peptides. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(11): 1–6. (in Chinese)
- [29] Zhao WX, Liu LM, Du GC, Liu S. A multifunctional tag with the ability to benefit the expression, purification, thermostability and activity of recombinant proteins. *Journal of Biotechnology*, 2018, 283: 1–10.
- [30] Phan TTP, Tran LT, Schumann W, Nguyen HD. Development of Pgrac100-based expression vectors allowing high protein production levels in *Bacillus subtilis* and relatively low basal expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 72.
- [31] Bernier SC, Cantin L, Salesse C. Systematic analysis of the expression, solubility and purification of a passenger protein in fusion with different tags. *Protein Expression and Purification*, 2018, 152: 92–106.