



特异腐质霉角质酶-OMP25 融合蛋白在大肠杆菌中的高效表达

晏婷婷^{1,2,3}, 刘展志^{1,2,3}, 李光耀^{1,2,3}, 吴敬^{1,2,3*}

- 1 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 2 江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 3 江南大学教育部食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122

晏婷婷, 刘展志, 李光耀, 吴敬. 特异腐质霉角质酶-OMP25 融合蛋白在大肠杆菌中的高效表达. 微生物学报, 2022, 62(12): 4918–4926.

Yan Tingting, Liu Zhanzhi, Li Guangyao, Wu Jing. High-efficiency expression of *Humicola insolens* cutinase-OMP25 fusion protein in *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4918–4926.

摘要:【目的】通过探究特异腐质霉角质酶-OMP25 融合蛋白(HiC-OMP25)在不同大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株中的表达情况、底物降解情况、热稳定性及宿主菌细胞膜通透性与细胞表面疏水性,揭示表达 HiC-OMP25 时不同宿主菌的差异性,并进一步提高 HiC-OMP25 在大肠杆菌中的表达量。【方法】分别在 *E. coli* BL21(DE3)及 *E. coli* C43(DE3)中表达 HiC-OMP25,并测定其对对硝基苯丁酸酯(4-nitrophenol butyrate, pNPB)、聚丙烯酸乙酯(polyethyl acrylate, PEA)的降解效果、50 °C 稳定性;测定表达 HiC-OMP25 时宿主菌的细胞膜通透性及细胞表面疏水性变化;共表达伴侣蛋白提高 HiC-OMP25 在 *E. coli* C43(DE3)中的表达量。【结果】HiC-OMP25 在 *E. coli* BL21(DE3)与 *E. coli* C43(DE3)中均成功表达并降解 pNPB,但前者对 PEA 的降解效果及 50 °C 稳定性均低于后者。同时,表达 HiC-OMP25 显著增强了 *E. coli* BL21(DE3)的细胞膜通透性及细胞表面疏水性。HiC-OMP25 与巯基氧化酶(Erv1p)、二硫键异构酶(DsbC)在 *E. coli* C43(DE3)中共表达时,其表达量为原始菌株的 2.14 倍,且对 pNPB 及 PEA 均有良好的降解效果。【结论】异源表

基金项目:国家重点研发计划(2019YFA0706900);江苏省科技厅政策引导类计划(国际科技合作/港澳台科技合作)——“一带一路”创新合作项目(BZ2020010)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0706900) and by the Jiangsu Provincial Science and Technology Department Policy Guidance Program-International Cooperation Projects-Innovation Cooperation Project of “Belt and Road” (BZ2020010)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85327802; Fax: +86-510-85326653; E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

Received: 29 March 2022; Revised: 6 May 2022; Published online: 17 June 2022

达时, HiC-OMP25 在 *E. coli* C43(DE3)中正确折叠, 而在 *E. coli* BL21(DE3)中未完全正确折叠; 通过共表达伴侣蛋白提高了 HiC-OMP25 在 *E. coli* C43(DE3)中的表达量, 为以后 HiC-OMP25 的工业化生产及应用奠定了基础。

关键词: HiC-OMP25; *Escherichia coli* BL21(DE3); *Escherichia coli* C43(DE3); 细胞膜通透性; 细胞表面疏水性; 伴侣蛋白

High-efficiency expression of *Humicola insolens* cutinase-OMP25 fusion protein in *Escherichia coli*

YAN Tingting^{1,2,3}, LIU Zhanzhi^{1,2,3}, LI Guangyao^{1,2,3}, WU Jing^{1,2,3*}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 International Joint Laboratory on Food Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To explore the expression, substrate degradation and thermal stability of *Humicola insolens* cutinase-OMP25 fusion protein (HiC-OMP25) in different *Escherichia coli* strains as well as the host cell membrane permeability and cell surface hydrophobicity, so as to reveal the differences in the expression of HiC-OMP25 by different host bacteria and further increase the expression of HiC-OMP25 in *E. coli*. **[Methods]** HiC-OMP25 was expressed in *E. coli* BL21(DE3) and *E. coli* C43(DE3), separately, and their degradation effect on 4-nitrophenol butyrate (*p*NPB) and polyethyl acrylate (PEA) and stability at 50°C were determined. In addition, the changes in the cell membrane permeability and cell surface hydrophobicity of host bacteria were detected in HiC-OMP25 expression, and the expression of HiC-OMP25 in *E. coli* C43(DE3) was explored by co-expressing chaperone proteins. **[Results]** HiC-OMP25 was expressed in *E. coli* BL21(DE3) and *E. coli* C43(DE3) and *p*NPB was degraded. However, the degradation effect of the former on PEA and its stability at 50 °C were both lower than those of the latter. Additionally, HiC-OMP25 significantly enhanced the cell membrane permeability and cell surface hydrophobicity of *E. coli* BL21(DE3). Co-expression of HiC-OMP25 with sulfhydryl oxidase (Erv1p) and disulfide isomerase (DsbC) in *E. coli* C43(DE3) finally increased the expression level of HiC-OMP25 by 2.14 times, well degraded *p*NPB and PEA. **[Conclusion]** When heterologously expressed, HiC-OMP25 folded correctly in *E. coli* C43(DE3), but not in *E. coli* BL21(DE3). Co-expression of chaperone proteins improved the expression of HiC-OMP25 in *E. coli* C43(DE3), which laid a foundation for the industrial production and application of HiC-OMP25 in the future.

Keywords: *Humicola insolens* cutinase-OMP25 fusion protein (HiC-OMP25); *Escherichia coli* BL21(DE3); *Escherichia coli* C43(DE3); cell membrane permeability; cell surface hydrophobicity; chaperone protein

废纸作为一种可循环利用的纤维资源,是造纸工业的主要生产原料,拥有广阔的发展及应用前景^[1]。然而,在废纸循环利用过程中会引入大量的有机杂质,如压敏胶、粘结胶等胶黏物,胶黏物主要成分包括聚丙烯酸乙酯(polyethyl acrylate, PEA)、聚醋酸乙烯酯(polyvinyl acetate, PVAc)等化学物质,会随着废纸浆进入造纸水循环体系,损伤设备、降低纸张质量^[2-4]。

目前,胶黏物处理方法主要有物理控制法、化学控制法以及生物控制法。作为一种绿色环保的重要方法,生物控制法主要通过酶解胶黏物中的酯键降低其黏性,防止粒子聚集^[5]。角质酶是一种多功能水解酶,可水解短链或长链脂肪酸酯类、甘油三酯等。相较于普通的脂肪酶,角质酶缺少盖子结构,更易于降解聚酯,在农业、食品、纺织、造纸等方面具有广阔的应用前景^[6-8]。李光耀^[9]将锚定肽 OMP25 与特异腐质霉角质酶(*Humicola insolens* cutinase, HiC)进行融合,融合蛋白 HiC-OMP25 提高了对 PEA 的降解率。

异源表达量是工业酶应用的主要限制因素。很多重组蛋白在大肠杆菌表达系统中拥有更高的表达水平,如 *Humicola insolens*、*Thermobifida fusca* 来源的角质酶。大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达系统作为最常用的异源蛋白表达系统,具有遗传背景清晰、操作简便、生长周期短、易于表达等优点。根据不同需求,*E. coli* 表达系统衍生出多种菌株,选择合适的菌株宿主可以提高重组蛋白质的表达效率。大肠杆菌作为最为常用的表达菌株,*E. coli* BL21(DE3)利用 T7 RNA 聚合酶对外源基因进行高效转录表达,适合大部分蛋白的表达。*E. coli* C43(DE3)起源于 *E. coli* BL21(DE3),增强了对外源蛋白毒性作用的抗性,更适合表达

膜蛋白或疏水性蛋白^[10]。

本研究将 HiC-OMP25 分别在 *E. coli* BL21(DE3) 及 *E. coli* C43(DE3) 中进行异源表达,发现不同宿主中表达的 HiC-OMP25 具有差异性;随后通过细胞膜通透性及细胞表面疏水性测定,分析导致该差异性的原因;最终通过共表达伴侣蛋白,提高了 HiC-OMP25 在 *E. coli* C43(DE3) 中的表达量,为 HiC-OMP25 工业化生产奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

菌株 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* C43(DE3) 为本实验室前期保藏, pET-20b(+)、pET-20b(+)-*hic*、pET-20b(+)-*hic-omp25*、pET-24a(+)-*dsbc*、pCDFDuet-1-*erv1p-dsbc* 为本实验室前期构建并保藏。

1.2 材料与仪器

酵母粉、蛋白胨购自 Oxoid 公司;氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kana)、链霉素(Sm)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(2-nitrophenyl- β -D-galactoside, oNPG)、对硝基苯丁酸酯(4-nitrophenol butyrate, pNPB)、PEA 购自 Sigma-Aldrich 公司, PEA 的分子量在 17 000 Da 左右;其他国产分析纯试剂均购自国药集团。恒温振荡培养箱购于上海知楚仪器有限公司;紫外可见分光光度计购于 Shimadzu 公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 固体培养基另添加琼脂粉 15.0。

TB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 12.0, 酵母提取物 24.0, 无水磷酸氢二钾 2.31, 无水磷酸二氢钾 12.54, 甘油 5.0。

1.4 重组表达

利用热激法将 pET-20b(+), pET-20b(+)-*hic*、pET-20b(+)-*hic-omp25* 分别转入 *E. coli* BL21(DE3) 与 *E. coli* C43(DE3) 中。将单个转化子接种至 LB 液体培养基中(100 μg/mL Amp), 装液量为 10 mL/50 mL, 然后 37 °C、200 r/min 恒温培养 8–10 h。以 5% (V/V) 的接种量将 LB 培养基中种子液转接至 TB 培养基(含 100 μg/mL Amp)中, 装液量为 50 mL/250 mL, 将摇瓶 37 °C、200 r/min 恒温培养 2 h, 随后在 25 °C、200 r/min 的培养条件下培养 36 h 进行表达。将得到的菌液 8 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为发酵上清; 菌体用缓冲液复溶, 利用超声破壁仪对菌体进行超声破碎, 随后离心, 上清液即为胞内上清。

1.5 角质酶的酶活测定

底物: 将 pNPB 与乙腈互溶, 配制成浓度为 50 mmol/L 的 pNPB 溶液, 封口, -20 °C 保存。

采用连续分光光度法测定角质酶活力。将 10 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液及底物提前于 37 °C 预热, 取 1.44 mL 缓冲液、30 μL 稀释一定倍数的粗酶液、30 μL 底物至 0.5 cm 石英比色皿中, 混匀后立即放入可见分光光度计中, 测定 405 nm 处反应体系的吸光值变化。

酶活定义: 37 °C 条件下, 每分钟催化 pNPB 水解生成 1 μmol 对硝基苯酚的酶量即为 1 个酶活力单位(U), 酶活力按公式 1 进行计算。

$$\text{酶活力(U/mL)} = \frac{(k-b) \times V_1}{a \times V_2 \times 1000} \times N \quad (1)$$

式中: k : 酶反应中所测吸光值(A_{405})与时间(min)线性函数的斜率; V_1 : 反应体积(mL); V_2 : 加酶量(mL); N : 稀释倍数。

其中 $a=0.0058$, $b=0.0097$ (由对硝基苯酚标准曲线得出)。

1.6 菌体细胞膜透性分析

参考文献[11]方法, 将 24 h 发酵液于 5 000 r/min

离心 3 min, 收集菌体用磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)洗涤 2 次并悬浮于上述缓冲液中, 使菌体浓度最终 OD_{600} 为 0.5, 加入终浓度为 100 μg/mL 的 oNPG, 采用分光光度计检测在 420 nm 波长处吸光值随时间的变化。

1.7 菌体细胞表面疏水性分析

参考文献[12]方法对菌体细胞表面疏水性进行分析, 将培养 24 h 后的发酵液于 5 000 r/min 离心 3 min, 收集菌体并用磷酸钠缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)洗涤 2 次, 随后悬浮于上述缓冲液中, 将所有菌株菌体浓度调为一致, 记为 $OD_{\text{对照}}$ 。取 2 mL 菌悬液, 加入 1 mL 正十六烷, 漩涡振荡 2 min 使各溶液充分混合, 于室温静置 10 min 后, 快速吸取水相中溶液置于 96 孔板中测定其 OD_{600} 数值, 记为 $OD_{\text{实验}}$ 。菌体细胞表面疏水性与其吸附率相关, 可用大肠杆菌吸附率反映菌体细胞表面疏水性的变化, 大肠杆菌吸附率按式(2)进行计算。

$$\text{大肠杆菌吸附率} = \frac{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{实验}}}{OD_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (2)$$

1.8 角质酶对 PEA 的降解

将 PEA 溶解在丙酮中, 配制成 1% 浓度的 PEA 溶液备用。将 9 mL 用 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0)稀释过的粗酶液和 1 mL PEA 溶液加入旋盖玻璃瓶中, 放入 50 °C、150 r/min 的水浴摇床中反应 6 h, 利用分光光度计测定波长 600 nm 处反应体系的浊度。

1.9 表达优化

利用热激法将 pET-20b(+)-*hic-omp25* 分别与 pET-24a(+)-*dsbc*、pCDFDuet-1-*erv1p-dsbc* 共转入 *E. coli* C43(DE3) 中, 分别均匀涂布于 LB 固体平板上(含 50 μg/mL Amp 及 15 μg/mL Kana、50 μg/mL Amp 及 25 μg/mL Sm), 随后挑选单个转化子进行重组表达。

2 结果与分析

2.1 HiC-OMP25 在大肠杆菌中的表达

HiC 及 HiC-OMP25 基因来自于实验室前期合成^[9]。将 pET-20b(+), pET-20b(+)-*hic*、pET-20b(+)-*hic-omp25* 分别转入 *E. coli* BL21(DE3)/*E. coli* C43(DE3) 中, 重组菌株分别命名为 B1、B2、B3/C1、C2、C3。

分别测定各菌株不同诱导时间胞内胞外 pNPB 角质酶酶活。表达 pET-20b(+) 质粒的菌株均无 pNPB 角质酶酶活, 其余表达结果如图 1 所示, 酶活均随着发酵时间的延长而增加。发酵 36 h 时, B2、B3、C2、C3 胞外酶活分别为 443.23、207.89、31.75、43.13 U/mL; 胞内酶活分别为 253.03、62.32、61.12、39.28 U/mL。在大肠杆菌中表达时, HiC 的酶活高于 HiC-OMP25, HiC-OMP25 的比活为 1 450 U/mg, 高于 HiC 1 048 U/mg 的比活^[9], 证实 HiC 与 OMP25 融合降低了其在大肠杆菌中的表达。

PEA 是胶黏物的主要成分之一, 不溶于水, 加入水相体系由于 PEA 析出而导致体系浑浊。

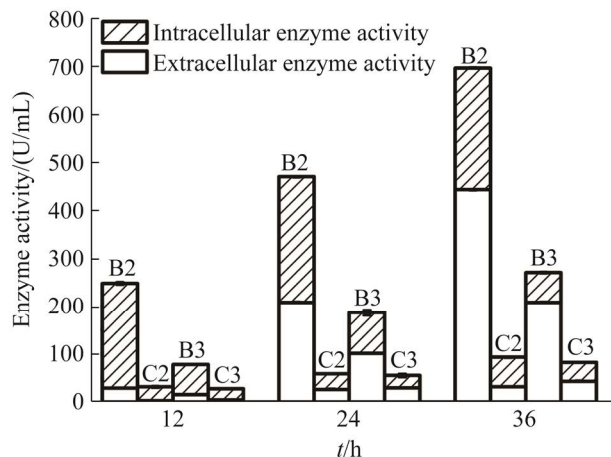


图 1 HiC、HiC-OMP25 在不同大肠杆菌中的酶活
Figure 1 Enzyme activity of HiC and HiC-OMP25 in different *E. coli*. Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation.

当角质酶将 PEA 的酯键降解后, 亲水性增强, 反应体系的浊度下降。因此浊度下降越明显说明角质酶对其降解效果越好。分别测定 B3 与 C3 胞外胞内 HiC-OMP25 对 PEA 的降解效果。如图 2 所示, B3 中胞外 HiC-OMP25 对 PEA 降解效果接近空白对照, 胞内 HiC-OMP25 降解 PEA 后相对浊度为 50% 左右, 而 C3 胞外及胞内 HiC-OMP25 对降解 PEA 的效果一致, 相对浊度均为 23% 左右。

上述实验结果表明, 在 *E. coli* C43(DE3) 中表达的 HiC-OMP25 对 2 种底物均有一定的降解效果, 但在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达的 HiC-OMP25 仅对小分子底物 pNPB 有降解作用, 对 PEA 降解效果较差。原因推测 pNPB 为水溶性小分子化合物, 均匀分布于溶液中, 易进入 HiC 的催化中心而被降解; 但 PEA 为不溶性聚合物, 因其具有少量未参与形成酯键的羧基、羟基而带有一定电负性, 通过表面静电与疏水作用与酶吸附, 其降解受蛋白结构影响较大^[13]。*E. coli*

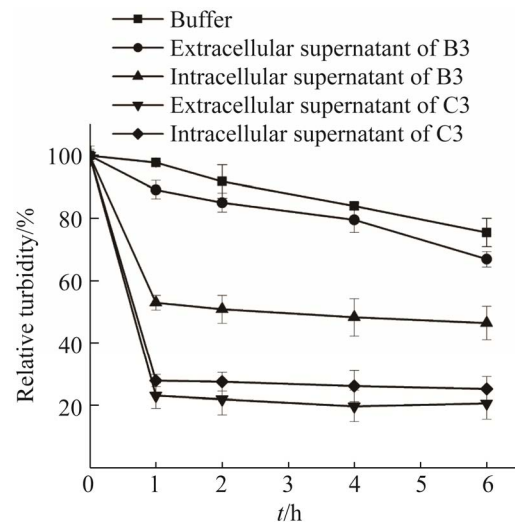


图 2 PEA 相对浊度变化

Figure 2 The change of relative turbidity of PEA. Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation.

BL21(DE3)中表达的 HiC-OMP25 不能降解 PEA, 原因推测可能是由于 HiC-OMP25 未完全正确折叠, 影响了其与 PEA 的结合。Hiraishi 等^[14]的研究结果与我们相似, 通过对 ϵ -聚-3-羟基丁酸酯解聚酶的底物结合域进行定点突变, 得到了 3 个突变体——L441H、Y443H 和 S445C, 突变体的二级结构和对水溶性底物 pNPB 的降解活性与野生型酶相同, 但对不溶性底物 PHB 的降解效果却表现出明显的差异。综上所述, 本研究在 *E. coli* BL21(DE3)表达的 HiC-OMP25 末端可能未完全折叠致使角质酶不能识别 PEA, 从而影响了其对 PEA 的结合能力。

此外, 我们进一步测定了在不同宿主中表达的 HiC-OMP25 的热稳定性, 结果如图 3 所示。在 50 °C 放置 12 h 后, *E. coli* C43(DE3)中表达的 HiC-OMP25 残留酶活为 116% (角质酶存在热激活现象^[15]), 与毕赤酵母中表达的 HiC-OMP25 具有相似的热稳定性^[9], 但 *E. coli* BL21(DE3)表达的 HiC-OMP25 残留酶活仅为 36%, 这表明 HiC-OMP25 在不同宿主中呈现出不同的热稳定性。同时, 有相关报道显示 *Fusarium oxysporum* 角质酶经不同宿主表达后其热稳定性也具有一定差异。Nikolaivits 等^[16]将 *F. oxysporum* 角质酶分别在 *E. coli* BL21(DE3)和 *E. coli* Origami 2 (DE3)中表达, 经 30 °C 处理 3 h, 其残留酶活分别为 30%与 80%。由于 PEA 降解实验的反应温度为 50 °C, 因此, 不同宿主表达 HiC-OMP25 的热稳定性差异也可能是导致对 PEA 降解差异的原因之一。

2.2 表达 HiC-OMP25 对菌体细胞膜通透性的影响

据报道显示, OMP25 是来自大肠杆菌外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)的一段 β 片段, 全长 24 个氨基酸, 包括 4 个负电荷氨基酸、1 个正电荷氨基酸、9 个疏水性氨基酸, C 端、N 端

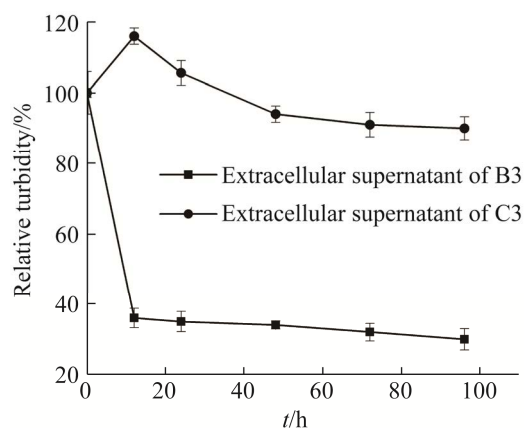


图 3 HiC-OMP25 50 °C 温度稳定性

Figure 3 Temperature stability of HiC-OMP25 at 50 °C. Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation.

均有带电氨基酸^[17]。该结构有利于多肽与细胞膜产生相互作用并结合在细胞膜上形成离子通道或孔洞^[18-20]。OMP 可改变细胞膜的通透性^[21]。宿玲恰^[22]的研究发现某些角质酶具有磷脂酶活性, 可增强细胞膜通透性导致其非特异性渗漏至胞外。通过测定 HiC-OMP25 对菌体的细胞膜通透性进一步探究 *E. coli* BL21(DE3)未能完全折叠 HiC-OMP25 的原因。

β -半乳糖苷酶是自然存在于细胞内部的大分子蛋白, 可将底物 oNPG 水解为半乳糖及黄色的邻硝基苯酚。若提高细胞膜的通透性, oNPG 容易进入细胞内部, 反应体系的吸光值会发生变化。因此, 可利用此方法检测 HiC-OMP25 对菌体细胞膜通透性的影响。如图 4 所示, 仅有 B2、B3 的 A_{420} 值迅速上升, 表明其细胞膜通透性增加, 而 B1、C1、C2、C3 的细胞膜通透性并未改变。B3 的 A_{420} 值上升快于 B2, 表明 HiC-OMP25 增强细胞膜透性的作用强于 HiC。结合 PEA 降解结果, 我们推测是由于 OMP25 与细胞膜产生相互作用, 从而促进了 HiC 对细胞膜的结合, 显著提升了 *E. coli* BL21(DE3)细胞膜通透性,

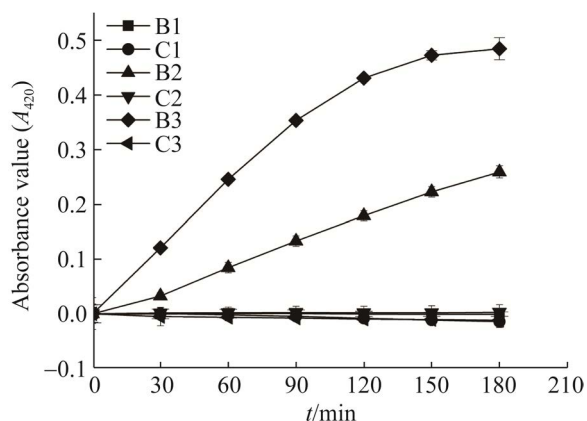


图 4 携带不同质粒的大肠杆菌细胞膜通透性
Figure 4 Cell membrane permeability of *E. coli* carrying different plasmids. Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation.

导致 HiC-OMP25 未完全折叠便分泌至胞外,从而降低了其对 PEA 的降解效果。而由于 *E. coli* C43(DE3)降低了外源蛋白的表达强度,并对膜蛋白以及疏水蛋白的毒性具有一定抗性,因此 C3 表达的 HiC-OMP25 能够在宿主细胞内完全折叠,从而对 PEA 的降解效果优于在 *E. coli* BL21(DE3)中表达。

2.3 表达 HiC-OMP25 对菌体细胞表面疏水性的影响

角质酶具有较强的疏水性,其与细胞膜结合会增强菌体表面疏水性,我们可以利用 BATH (bacterial adhesion to hydrocarbons)方法^[12]检测菌体细胞表面疏水性的变化,验证 OMP25 与细胞膜的相互作用模式。正十六烷与水不互溶,当与菌液混合时,拥有较强疏水性的菌株留在正十六烷中使菌液吸光值下降。菌液吸光值前后差值可表示疏水性变化,差值越大,则菌体细胞表面疏水性越强。如图 5 所示, B1 的吸附率(2.27%)高于 C1 (0.48%),证明 *E. coli* BL21(DE3)菌株细胞表面疏水性高于 *E. coli* C43(DE3)。B2 的吸附率(13.90%)高于 B1 (2.27%),证明表达

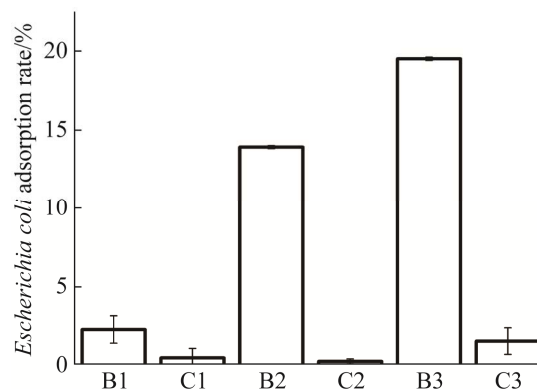


图 5 菌株的疏水率

Figure 5 Hydrophobicity of strains. Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation.

HiC 时提高了 *E. coli* BL21(DE3)菌株细胞表面疏水性。B3 的吸附率(19.49%)比 B2 (13.90%)高,证明表达 HiC-OMP25 可进一步提高菌株细胞表面疏水性。而表达 HiC 及 HiC-OMP25 时均未造成 *E. coli* C43(DE3)的细胞疏水性上升,证明 *E. coli* C43(DE3)的细胞膜不易被插入。综上所述,推测可能由于 HiC-OMP25 聚集或者直接插入细胞膜表面,提高了菌体细胞表面疏水性;而 HiC-OMP25 不能聚集或直接插入细胞膜表面,而使融合蛋白正确折叠后分泌至胞外。

2.4 表达优化

由于 HiC-OMP25 在 *E. coli* BL21(DE3)中产生的融合蛋白未能正确折叠,所以不适合后续研究。实验表明 HiC-OMP25 在 *E. coli* C43(DE3)中表达稳定,但亟需提升其表达量以满足工业化需求。因 HiC 结构中具有 2 对二硫键,而二硫键在蛋白结构中主要提高角质酶的稳定性,故选取共表达二硫键异构酶(DsbC)及巯基氧化酶(Erv1p)对 *E. coli* C43(DE3)中表达 HiC-OMP25 进行优化。DsbC 是一种氧化还原酶,能够增强蛋白质在其细胞质及周质区表达时的氧化折叠^[23]。Erv1p 可以利用分子氧以 FAD 依赖性方式催化

二硫醇氧化为二硫化物, 和 DsbC 在 *E. coli* 的细胞质中可以辅助折叠具有二硫键的蛋白, 增加其表达量^[24]。将 pET-20b(+)-*hic-omp25* 与 pET-24a(+)-*dsbc* 共转入 *E. coli* C43(DE3) 中, 培养 36 h 时取样测定胞内胞外酶活变化。如图 6 所示, 与 DsbC 共表达时, HiC-OMP25 的胞外表达量无提升, 但胞内表达量提高了 2.18 倍。随后, 将 Erv1p、DsbC、HiC-OMP25 在 *E. coli* C43(DE3) 中进行共表达, 在发酵培养 36 h 时, 其 HiC-OMP25 主要集中在胞外, 胞外酶活比 HiC-OMP25 单独表达时提高了 2.14 倍。测定共表达菌株的胞内胞外 HiC-OMP25 对 PEA 的降解, 6 h 后相对浊度均为 23% 左右, 说明共表达菌株分泌的 HiC-OMP25 为正确折叠的蛋白, 适用于后续研究。因此, 研究表明 DsbC 与 Erv1p 与 HiC-OMP25 在 *E. coli* C43(DE3) 中表达时增强了胞外 HiC-OMP25 的表达。

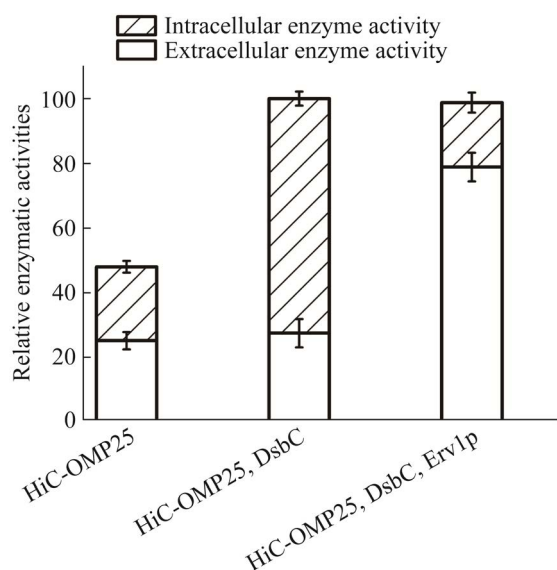


图 6 HiC-OMP25 与不同伴侣蛋白共表达的相对酶活

Figure 6 Relative enzymatic activities of HiC-OMP25 co-expressed with different chaperones. Data represent the means of three biological replicates, and error bars represent the standard deviation.

3 讨论与结论

角质酶在胶黏物控制中的应用越来越受到国内外造纸行业的关注。HiC-OMP25 对胶黏物有较强的降解效果, 是一种具有较强发展前景的工业用酶。本研究将 HiC-OMP25 进行异源表达, 通过 pNPB、PEA 降解实验及 50 °C 的热稳定性分析, 发现 *E. coli* C43(DE3) 中表达的 HiC-OMP25 正确折叠, 而在 *E. coli* BL21(DE3) 中没有正确折叠。在 *E. coli* BL21(DE3) 表达 HiC-OMP25 时检测出菌体细胞膜通透性及细胞表面疏水性较其他菌株显著增强, 推测 HiC-OMP25 在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达时, 由于 OMP25 插入或聚集于细胞膜表面, 增强了 HiC 对细胞膜的非特异性水解, 引起细胞膜的通透性及疏水性增加, 最终导致 HiC-OMP25 未能完全折叠便渗漏至胞外。*E. coli* C43(DE3) 相比于 *E. coli* BL21(DE3) 表达外源蛋白强度有所降低, 表达不同质粒时菌株细胞膜通透性及细胞表面疏水性均无明显变化, 因此 *E. coli* C43(DE3) 适合 HiC-OMP25 的正确表达。伴侣蛋白 Erv1p、DsbC 与 HiC-OMP25 在 *E. coli* C43(DE3) 中共表达时, 胞外 HiC-OMP25 酶活提高了 2.14 倍, 比毕赤酵母中 HiC-OMP25 的表达提高了 1.1 倍。本研究提高了 HiC-OMP25 在 *E. coli* C43(DE3) 中的表达量, 为将来的工业化生产奠定了基础。

参考文献

- [1] 房桂干, 沈葵忠, 李晓亮, 史君齐. 限塑和禁止固废进口政策下中国造纸工业纤维原料的供应策略. 中国造纸, 2021, 40(7): 1-7.
Fang GG, Shen KZ, Li XL, Shi JQ. Supply strategy of fiber sources for China's paper industry under policies of restriction usage of plastic and banning solid wastes importation. *China Pulp & Paper*, 2021, 40(7): 1-7. (in Chinese)
- [2] Ackermann C, Putz HJ, Goettsching L. Improved sticky determination method as a useful tool for the

- evaluation of the macro sticky forming potential of printed products. *Pulp and Paper Canada*, 2003(2): 1663–1668.
- [3] 曾细玲, 付时雨, 俞霁川, 李坤, 詹怀宇, 李小红. 生物酶降解纸浆中胶黏物的研究, *中国造纸*, 2009, 28(6): 1–4.
Zeng XL, Fu SY, Yu JC, Li K, Zhan HY, Li XH. Study on rapid prediction of stickies content in pulp by NIR spectroscopy. *China Pulp and Paper*, 2009, 28(6): 1–4. (in Chinese)
- [4] Leroux R, Pruszyński PE, Armstrong JR, Lin JF, Angelac AP. Control of stickies contaminants in newsprint applications—review, mechanisms and novel approach. *Pulp and Paper Canada*, 1997, 98(9): 54–58.
- [5] Patrick K. Enzyme technology improves efficiency, cost, safety of stickies removal program. *Paper Age*, 2004, 120(6): 22–25.
- [6] Wei Y, Swenson L, Castro C, Derewenda U, Minor W, Arai H, Aoki J, Inoue K, Servin-Gonzalez L, Derewenda ZS. Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution. *Structure: London, England*, 1998, 6(4): 511–519.
- [7] Chen S, Su L, Chen J, Wu J. Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1754–1767.
- [8] Bloomer S, Adlercreutz P, Mattiasson B. Triglyceride interesterification by lipases. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1990, 67(8): 519–524.
- [9] 李光耀. *Humicola insolens* 角质酶的功能优化、高效表达及在处理废纸胶黏物中的应用. 江南大学硕士学位论文, 2021.
- [10] Kwon SK, Kim SK, Lee DH, Kim JF. Comparative genomics and experimental evolution of *Escherichia coli* BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16076.
- [11] Li ZF, Gu ZB, Wang M, Du GC, Wu J, Chen J. Delayed supplementation of glycine enhances extracellular secretion of the recombinant α -cyclodextrin glycosyltransferase in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(3): 553–561.
- [12] Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 262(2): 129–134.
- [13] Zhu B, Wang D, Wei N. Enzyme discovery and engineering for sustainable plastic recycling. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(1): 22–37.
- [14] Hiraishi T, Komiya N, Matsumoto N, Abe H, Fujita M, Maeda M. Degradation and adsorption characteristics of PHB depolymerase as revealed by kinetics of mutant enzymes with amino acid substitution in substrate-binding domain. *Biomacromolecules*, 2010, 11(1): 113–119.
- [15] 陈晟. 嗜热单孢菌角质酶的基因鉴定、高效表达及分子改造. 江南大学博士学位论文, 2009.
- [16] Nikolaivits E, Kokkinou A, Karpus M, Topakas E. Microbial host selection and periplasmic folding in *Escherichia coli* affect the biochemical characteristics of a cutinase from *Fusarium oxysporum*. *Protein Expression and Purification*, 2016, 127: 1–7.
- [17] Kumada Y, Murata S, Ishikawa Y, Nakatsuka K, Kishimoto M. Screening of PC and PMMA-binding peptides for site-specific immobilization of proteins. *Journal of Biotechnology*, 2012, 160(3/4): 222–228.
- [18] Harris F, Dennison SR, Phoenix DA. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein & Peptide Science*, 2009, 10(6): 585–606.
- [19] Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1462(1/2): 55–70.
- [20] Steffen H, Rieg S, Wiedemann I, Kalbacher H, Deeg M, Sahl HG, Peschel A, Götz F, Garbe C, Schitteck B. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(8): 2608–2620.
- [21] Lee J, Song WJ. Folding of circularly permuted and split outer membrane protein F via electrostatic interactions with terminal residues. *Biochemistry*, 2021, 60(23): 1787–1796.
- [22] 宿玲恰. 重组 *Thermobifida fusca* 角质酶的高效胞外表达及其分子机制. 江南大学博士学位论文, 2013.
- [23] Maskos K, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R. DsbA and DsbC-catalyzed oxidative folding of proteins with complex disulfide bridge patterns *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 325(3): 495–513.
- [24] Nguyen VD, Hatahet F, Salo KE, Enlund E, Zhang C, Ruddock LW. Pre-expression of a sulfhydryl oxidase significantly increases the yields of eukaryotic disulfide bond containing proteins expressed in the cytoplasm of *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10: 1.