



双碱性氨基酸内肽酶末端剪切修饰显著提高酶活及其高效水解大豆蛋白

彭爱凤, 张荣珍*, 徐岩

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

彭爱凤, 张荣珍, 徐岩. 双碱性氨基酸内肽酶末端剪切修饰显著提高酶活及其高效水解大豆蛋白[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3602-3615.

PENG Aifeng, ZHANG Rongzhen, XU Yan. Terminal truncation improves the activity and soybean protein hydrolysis efficiency of dibasic endopeptidase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3602-3615.

摘要: 【目的】将酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤亚库德里亚夫泽维(*Pichia kudriavzevii*)来源的双碱性氨基酸内肽酶基因 *sckex2* 和 *pkkex2* 克隆到大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 中, 实现双碱性氨基酸内肽酶的异源表达, 研究重组酶的酶学性质及其与碱性蛋白酶的协同高效水解大豆蛋白释放出小分子活性肽的作用。【方法】按照大肠杆菌的密码子偏好性, 对 *S. cerevisiae* 和 *P. kudriavzevii* 的 *kex2* 基因进行优化, 分析 KEX2 蛋白的非功能区域, 对其 C-末端、N-末端氨基酸进行剪切修饰获得 4 种突变酶基因 *sckex2Δ3*、*sckex2Δ4*、*pkkex2Δ3* 和 *pkkex2Δ4*, 构建在载体 pGEX-6P-1 上, 转入 *E. coli* BL21 感受态细胞中, 经 DNA 测序验证, 获得重组菌株 *E. coli* BL21/pGEX-ScKEX2Δ3、*E. coli* BL21/pGEX-ScKEX2Δ4、*E. coli* BL21/pGEX-PkKEX2Δ3 和 *E. coli* BL21/pGEX-PkKEX2Δ4。利用 GST 亲和层析柱和 PreScission 蛋白酶对重组酶进行分离纯化, 研究纯酶 pH 和温度稳定性等酶学性质。以碱性蛋白酶单独水解大豆分离蛋白为对照, 重组双碱性氨基酸内肽酶与碱性蛋白酶协同水解大豆蛋白, 测定水解产物中小分子活性肽组分。【结果】重组双碱性氨基酸内肽酶野生型和突变酶在 *E. coli* BL21 中可溶性表达, SDS-PAGE 分析表明纯化的重组酶显示单一条带, 在最适条件下, 野生型酶几乎没有酶活, 突变体最高比酶活达到 47.32 U/g, K_m 值为 23.61 $\mu\text{mol/L}$, k_{cat} 值为 50.18 s^{-1} , k_{cat}/K_m 值为 2 125.06 L/(mmol·s)。当重组酶在 pH 5.0 孵育 2 d

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0900302); 国家自然科学基金(31970045); 江苏省研究生科研与实践创新计划(1012050205205974); 国家轻工技术与工程一流学科(LITE2018-12); 高等学校学科创新引智计划(111-2-06)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900302), the National Natural Science Foundation of China (31970045), the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (1012050205205974), the National First-class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-12), and the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06).

*Corresponding author. Tel: +86-510-85197760, Fax: +86-510-85918201, E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-01-10; Accepted: 2023-03-27; Published online: 2023-04-04

后, 相对酶活力保留最高为 40%以上。在 35 °C 下孵育 1 h 后酶活力仍能保留 60%以上。重组双碱性氨基酸内肽酶与碱性蛋白酶协同水解大豆分离蛋白, 水解产物中超过 39%为分子量小于 500 Da 的活性肽, 且分子量小于 100 Da 的活性肽的含量比碱性蛋白酶单独水解时高 50%。【结论】通过末端剪切修饰, 获得在大肠杆菌中可溶性表达的双碱性氨基酸内肽酶截短突变体, 其重组酶催化效率高, 能够高效水解大豆蛋白获得活性小分子肽, 该研究为富含蛋白质生物资源的增值及高效水解奠定了坚实的研究基础。

关键词: 双碱性氨基酸内肽酶; 大肠杆菌; 酶学性质; 大豆蛋白; 活性肽

Terminal truncation improves the activity and soybean protein hydrolysis efficiency of dibasic endopeptidase

PENG Aifeng, ZHANG Rongzhen*, XU Yan

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

Abstract: [Objective] To realize the heterologous expression of dibasic endopeptidase genes *sckex2* and *pkkex2* from *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii* in *Escherichia coli* BL21 and then study the properties of the recombinant KEX2 enzymes and their efficiency of hydrolyzing soybean protein in collaboration with alkaline protease. [Methods] The *kex2* from *S. cerevisiae* and *P. kudriavzevii* was optimized according to the codon bias of *E. coli*. After analysis of non-functional region, we redesigned their C-terminal and N-terminal residues by truncation. Four truncated genes, *sckex2* Δ 3, *sckex2* Δ 4, *pkkex2* Δ 3, and *pkkex2* Δ 4, were respectively cloned into the vector pGEX-6P-1, and the recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21 competent cells. After confirmed by DNA sequencing, the four recombinant strains, *E. coli* BL21/pGEX-ScKEX2 Δ 3, *E. coli* BL21/pGEX-ScKEX2 Δ 4, *E. coli* BL21/pGEX-PkKEX2 Δ 3, and *E. coli* BL21/pGEX-PkKEX2 Δ 4, were constructed. The recombinant enzymes were purified by GST affinity chromatography and PreScission protease and then their pH stability and thermal stability were determined. With the soybean protein hydrolysis by alkaline protease alone as the control, the yield of small-molecule peptides from the hydrolysis with the recombinant KEX2 in collaboration with alkaline protease was determined. [Results] The recombinant KEX2 and the wild type showed soluble expression in *E. coli* BL21. SDS-PAGE showed that the purified recombinant enzymes produced single bands. Under the optimal conditions, the wild type showed no enzyme activity, while the mutants showed the maximum specific activity of 47.32 U/g, K_m of 23.61 μ mol/L, k_{cat} of 50.18 s^{-1} , and k_{cat}/K_m of 2 125.06 L/(mmol·s). After incubation at pH 5.0 for 2 d, the maximum relative activity of the recombinant enzymes was more than 40%. After incubation at 35 °C for 1 h, the relative activity was still over 60%. When the recombinant KEX2 and alkaline protease were used together to hydrolyze soybean protein, more than 39% of the hydrolysates were active

peptides with molecular weight less than 500 Da, and the content of active peptides with the molecular weight less than 100 Da was 50% higher than that from the hydrolysis with the alkaline protease alone. **[Conclusion]** Through terminal truncation, the soluble expression of truncated KEX2 mutants was realized in *E. coli*. The recombinant enzymes demonstrate high catalytic efficiency and can efficiently hydrolyze soybean protein to release active peptides. This work lays a solid foundation for the value addition and deep hydrolysis of protein-rich biological resources.

Keywords: dibasic endopeptidase (KEX2); *Escherichia coli*; enzymatic properties; soybean protein; active peptides

KEX2 蛋白酶(EC 3.4.21.61)是一种钙离子依赖型的丝氨酸蛋白酶,具有细菌枯草菌素样催化结构域,可以特异性识别 2 个连续的碱性氨基酸(Arg-Arg、Lys-Arg 或 Lys-Lys)并在第二个碱性氨基酸的羧基端肽键进行切割^[1-2]。kex2 基因来自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[3],由美国 Thorner 实验室发现并命名^[4],研究发现与枯草杆菌素家族的消化蛋白酶有远亲关系^[5]。

KEX2 蛋白酶属于前体加工酶的一种,与多种生物活性蛋白质的加工有关^[6]。内切蛋白酶 KEX2 从前蛋白中去除信号肽并释放分泌蛋白的成熟形式,因此在酵母分泌途径中起着关键作用^[7]。KEX2 在 Lys-Arg 位点的羧基侧切割 α 交配的信息素前体,即前 α 因子。KEX2 切割前 α 因子对于产生成熟的 α 因子至关重要^[8]。KEX2 切割前列腺抑素-II 产生成熟的 SRIF-28^[9]。KEX2 具有较高的位点特异性,体外已经表明,*S. cerevisia* 来源的 KEX2 可以成为用 poly His 标签切割重组融合蛋白的有用工具之一,用于在螯合金属离子柱上通过亲和色谱简单、快速地纯化表达的蛋白质^[10]。Bader 等^[11-12]报道了 *Candida glabrata* 的双碱性氨基酸内肽酶,比较了 4 种酵母来源的 KEX2 蛋白酶底物特异性,但对毕赤酵母双碱性氨基酸内肽酶的表达及酶学性质未进行研究。

Brenner 等对 ScKEX2 蛋白酶的结构性质及

作用机制进行了分析^[13-16]。天然双碱性氨基酸内肽酶由 814 个氨基酸残基组成,包括信号肽、前体肽、催化结构域、P 结构域、Thr/Ser 富集区、跨膜区和 C 端尾巴。在催化结构域有关键的催化三联体丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸^[17]。Sreenivas 等^[18]过表达删除 C 端 154 残基的 KEX2 蛋白酶增强重组甘精胰岛素双链生产。艾敏榕等的研究发现剪切 C 端 201 个残基以后 KEX2 仍可保留酶活性^[19]。通过删除跨膜结构域和 C 端尾区,可以分泌出 KEX2 蛋白酶,而不影响蛋白酶活性^[15-16]。

目前商用 KEX2 蛋白酶生产的宿主主要是毕赤酵母(*Pichia pastoris*),表达量较低且培养周期较长,这制约了 KEX2 蛋白酶的广泛应用。人们对于 *S. cerevisiae* 来源的 KEX2 酶进行了广泛研究^[20],但对其他来源的 KEX2 研究较少^[21],而 *P. kudriavzevii* 来源的 KEX2 目前尚未有相关报道。以这 2 种不同来源的 KEX2 酶学性质的测定结果做对比,为 KEX2 蛋白酶的应用及生产成本的降低奠定了基础。

本研究拟将 *S. cerevisiae* 和毕赤亚库德里亚夫泽维(*Pichia kudriavzevii*)的 KEX2 酶通过 C-末端、N-末端理性剪切后,克隆不同的末端修饰突变体基因到 *E. coli* BL21(DE3)宿主细胞中进行表达,重组蛋白经纯化后,研究其酶学性质,通过碱性蛋白酶和重组双碱性氨基酸内肽酶突

变体的协同水解大豆分离蛋白释放出小分子活性肽,为提高富含蛋白质资源的深度水解和利用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌株和质粒

菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 (DE3)、*E. coli* BL21(DE3)、质粒 pGEX-6P-1 和 PreScission 蛋白酶重组菌保藏于本实验室, *sckex2* (CAA96143.1)和 *pkkex2* (XP_029323542) 基因经密码子优化后,由生工生物工程(上海)股份有限公司化学合成。

1.1.2 主要试剂

Primerstar、DNA Maker 购自于宝生物工程(大连)有限公司;一步法克隆试剂盒、胶回收、DNA 纯化试剂盒、质粒 DNA 小提试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Boc-Gln-Arg-Arg-pNA 购自合肥博美生物科技有限责任公司;还原型谷胱甘肽及大豆分离蛋白购自上海麦克林生化科技有限公司;谷胱甘肽琼脂糖树脂购自嘉兴千纯生物科技股份有限公司; TureColor Pre-stained Protein Marker、氨苄青霉素钠、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;其余试剂与药品均为国产分析纯。

1.1.3 主要溶液和培养基

缓冲液 A: 140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 1.8 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.3。

缓冲液 B: 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 1 mmol/L DTT, pH 8.0。

缓冲液 C: 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, pH 7.5。

LB 培养基: 蛋白胨 1.0% (质量体积分数),

酵母提取物 0.5% (质量体积分数), 氯化钠 1.0% (质量体积分数)。

1.2 重组双碱性氨基酸内肽酶表达载体的构建

基于 *E. coli* 密码子偏好性合成 *sckex2* (CAA96143.1)和 *pkkex2* (XP_029323542)基因,在其 3'-端设计添加 8×His 标签,构建在表达载体 pGEX-6P-1 上,综合筛选 2 个酶 ScKEX2 和 PkKEX2 的主要截短片段,包括截去信号肽、跨膜结构域(*kex2Δ3*)和 C 端与截去信号肽、前体肽、跨膜结构域与 C 端(*kex2Δ4*)。根据截短的基因序列分别设计引物,同时保留双碱性氨基酸内肽酶 C 端的 8×His 标签。设计合成引物序列如表 1 所示。

PCR 扩增目的基因 *sckex2Δ3*、*sckex2Δ4*、*pkkex2Δ3* 和 *pkkex2Δ4* 与载体 pGEX-Sc 和 pGEX-Pk。PCR 扩增目的基因的反应条件: 98 °C 预变性 30 s;然后以下程序进行 30 个循环:98 °C 变性 30 s,55 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 40 s;72 °C 最后延伸 10 min, 16 °C 保温。PCR 扩增载体 pGEX-Sc 和 pGEX-Pk 的反应条件: 98 °C 预变性 30 s;然后以下程序进行 30 个循环: 98 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 90 s; 72 °C 最后延伸 10 min, 16 °C 保温。

利用单片段同源重组试剂盒将目的基因 *sckex2Δ3*、*sckex2Δ4*、*pkkex2Δ3* 和 *pkkex2Δ4* 与线性化载体 pGEX-Sc 和 pGEX-Pk 进行连接,构建表达载体 pGEX-ScKEX2Δ3、pGEX-ScKEX2Δ4、pGEX-PkKEX2Δ3 和 pGEX-PkKEX2Δ4,并将其转入 *E. coli* JM109 感受态细胞,经 DNA 测序验证,获得重组菌 *E. coli* BL21/pGEX-ScKEX2Δ3、*E. coli* BL21/pGEX-ScKEX2Δ4、*E. coli* BL21/pGEX-PkKEX2Δ3 和 *E. coli* BL21/pGEX-PkKEX2Δ4。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

| Primer | Sequence (5'→3') |
|-------------|--|
| 6P-Sc-C-F | CTGGTCGTTCTCATCATCATCATCATCATCATTAAGACTGACTGACGATCTGCCTC |
| 6P-Sc-C-R | GTATTTACGTACTTTCATGGGCCCCCTGGAACAGAAGT |
| Sc-C-F | TCTGTTCCAGGGGCCCATGAAAGTACGTAAATACATCACTTTATGTT |
| Sc-C-R | ATGATGATGATGAGAACGACCAGAAGATGGTGGAA |
| 6P-Pk-C-F | CGGAGCTGAATGAAGCCATAC |
| 6P-Pk-C-R | ATGATGATGATGAAGGATAGTACGTTTGTGTCGTTAA |
| Pk-C-F | TACTATCCTTCATCATCATCATCATCATCATTAAGACTGACTGACGATCTGCCTCG |
| Pk-C-R | GTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGT |
| 6P-S-R | CATGGGCCCCCTGGAACAGAAGTTC |
| 6P-S-F | CATCATCATCATCATTAAGACTGACTGACGATCTGCCTCGCG |
| 6P-P-F | CATCATCATCATCATTAAGACTGACTGACGATCTGCCTCG |
| 6P-P-R | GGATCCCAGGGGCCCTGGAACAG |
| ScKEXΔ3-C-F | TGTTCCAGGGGCCCATGTTAGTTAGCTCACAAACAATCCCACT |
| ScKEXΔ4-C-F | TGTTCCAGGGGCCCATGGCTCCACCAATGGATTCTTCTCTTTT |
| ScKEXΔ-C-R | GATCGTCAGTCAGTCTTAATGATGATGATGATGATGATGATGGTGCATAGCTTGACGAGGTG |
| PkKEXΔ3-C-F | GGGCCCCCTGGATCCATGTTAATCTTCTCTAACCCTATCAACGC |
| PkKEXΔ4-C-F | CCAGGGGCCCTGGATCCATGGTCAGCTACGGCAAAGATGTTT |
| PkKEXΔ-C-R | GTCAGTCAGTCTTAATGATGATGATGATGATGATGATGAATTACGTAGTGGTGTGTTGG |

1.3 重组双碱性氨基酸内肽酶的诱导表达与纯化

从转化平板上挑取单克隆,接种至含有氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养 8 h,种子液按 1%的接种量转接至 200 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养 1.5–2 h,待 OD_{600} 达到 0.6–0.8,向菌液中加入适量 IPTG 诱导,25 °C、200 r/min 培养 12–14 h。

离心菌体收集细胞,用缓冲液 A 将细胞洗涤 3 次。按照 1:20 (质量体积比)的比例,用缓冲液 A 将细胞悬浮,在冰浴条件下超声破碎细胞。破碎液于 4 °C、10 000×g 离心 30 min,分离上清液与沉淀物,上清液经 0.22 μm 水系滤膜过滤后,即可用于后续蛋白纯化。

蛋白纯化操作在低温条件下进行。GST 亲和层析柱保存于 20%乙醇中,用超纯水洗 5 个柱体积,用缓冲液 A 平衡 5 个柱体积。将处理好的细胞破碎液上样于 GST 亲和层析柱中,然

后用缓冲液 A 冲洗杂蛋白,接着将 PreScission 蛋白酶加入 GST 亲和层析柱中,并于 4 °C 放置过夜,然后使用缓冲液 C 洗脱并收集目的蛋白,通过 SDS-PAGE 验证。向 GST 亲和层析柱中加入 5 个柱体积以上的缓冲液 B,洗脱 GST 标签和 PreScission 蛋白酶。

1.4 重组双碱性氨基酸内肽酶的酶学性质测定

1.4.1 酶活测定方法

依据 KEX2 底物偏好性,选择 Boc-Gln-Arg-Arg-pNA (Boc-QRR-pNA)作为底物,KEX2 蛋白酶在 RR 位点 C 端切割后,释放的对硝基苯胺在 405 nm 处有吸光值,且吸光值大小与浓度成正比。

反应体系为:50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液,2 mmol/L Ca^{2+} ,100 μmol/L 底物 Boc-Gln-Arg-Arg-pNA (Boc-QRR-pNA)和适量的酶液,利用酶标仪连续测定 5 min 内吸光值,

每隔 10 s 测量一次, 保证每分钟的 OD_{405} 变化不超过 0.04。酶活定义为 25 °C 下每分钟催化底物生成 1 μmol 对硝基苯胺所需的酶量为一个酶活单位(U)。

1.4.2 重组双碱性氨基酸内肽酶的最适 pH 和 pH 稳定性

在不同 pH 条件下, 测定重组双碱性氨基酸内肽酶的酶活, 探究重组双碱性氨基酸内肽酶 ScKEX2 Δ 3、ScKEX2 Δ 4、PkKEX2 Δ 3 和 PkKEX2 Δ 4 的最适反应 pH。不同 pH 缓冲液为: 50 mmol/L 乙酸钠-乙酸缓冲液(pH 4.0 和 5.0), 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.0–8.0), 50 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 9.0)。

将纯酶溶解于不同 pH 的缓冲液中, 置于 4 °C, 48 h 后取样, 测定重组酶残余酶活力, 研究重组双碱性氨基酸内肽酶的 pH 稳定性。

1.4.3 重组双碱性氨基酸内肽酶的最适温度和温度稳定性

将 50 mmol/L 乙酸钠-乙酸缓冲液(pH 5.0), 100 μmol /L 底物 Boc-QRR-pNA 置于 25、30、35、40、45、50、55 °C 温育 5 min, 加入适量酶液, 测定不同温度条件下重组双碱性氨基酸内肽酶的酶活力, 研究重组双碱性氨基酸内肽酶的最适反应温度。

将等量酶液分别置于 25、30、35、40、45、50、55 °C 条件下温育 1 h, 然后加入其余反应物, 测定重组双碱性氨基酸内肽酶的残余酶活力, 研究其温度稳定性。

1.4.4 重组双碱性氨基酸内肽酶的动力学测定

在最适反应条件下, 测定重组双碱性氨基酸内肽酶的动力学参数。配制不同浓度(10–300 μmol /L)的底物 Boc-QRR-pNA, 将除酶以外组分在金属浴孵育 5 min, 加入适量纯酶, 测定重组酶的酶活, 用 origin 软件中的 Michaelis-Menten 方程拟合曲线, 计算重组酶的 K_m 、 k_{cat} 及 k_{cat}/K_m 值。

1.5 重组双碱性氨基酸内肽酶催化蛋白水解

利用重组双碱性氨基酸内肽酶组合或不组合碱性蛋白酶对大豆分离蛋白进行水解反应。

称 1 g 大豆分离蛋白于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)中, 沸水煮 5 min, 确保完全溶解, 使得反应体系终浓度为 1% (质量体积分数)。待蛋白溶液冷却至室温后, 在反应体系中加入 0.1 g/L 碱性蛋白酶于 35 °C、pH 8.0 水解 2 h 后, 调 pH 为 5.0, 并加入双碱性氨基酸内肽酶及 Ca^{2+} , 于 35 °C 继续反应 4 h 后终止反应。通过 10 000 \times g 离心 5 min, 分离出上清液, 用 0.22 μm 水系滤膜处理后, 采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析水解液中不同分子量的小分子活性肽分布。

2 结果与分析

2.1 双碱性氨基酸内肽酶结构域分析及非必需功能域截短

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中 获得 ScKEX2 和 PkKEX2 的氨基酸序列, 运用 I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>)预测分析 ScKEX2 和 PkKEX2 蛋白的三级结构(图 1A、1B)。KEX2 蛋白酶由 814 个氨基酸残基组成(图 1C), 整个分子包括信号肽(1–19 残基)、前体肽(20–113 残基)、催化结构域(114–410 残基)、P 结构域(411–624 残基)、Thr/Ser 富集区(625–678 残基)、跨膜域(679–699 残基)和 C 端尾巴(700–814 残基)。信号肽的主要功能是引导 KEX2 进入内质网膜; 前体肽的主要功能是扮演分子伴侣的角色, 协助 KEX2 的正确折叠; 催化结构域中包含着催化三联体 Asp₁₇₅、His₂₁₃、Ser₃₈₅ 及一个在催化过程中起着稳定酶分子氧负离子洞作用的 Asn₃₁₄ 关键残基^[14]; P 结构域的作用在于帮助酶分子的正确折叠并增强其稳定性; Thr/Ser 富集区是进行糖基化的主要场所; 跨膜区和 C

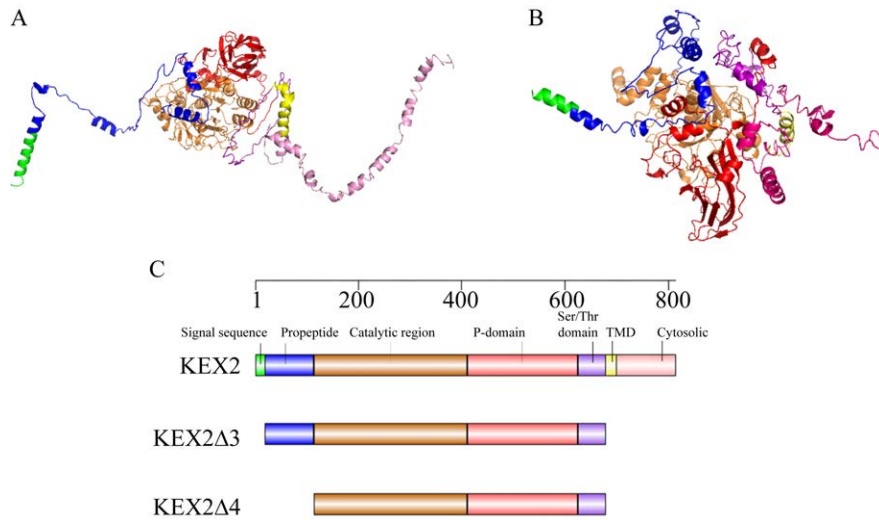


图 1 重组双碱性氨基酸内肽酶的结构分析

Figure 1 Structural analysis of recombinant dibasic endopeptidase. A: Three-dimensional structure of ScKEX2 protease. B: Three-dimensional structure of PkKEX2 protease. C: The structure of KEX2, KEX2 Δ 3 and KEX2 Δ 4.

端尾巴帮助 KEX2 分子锚定在细胞内的膜结构上,特别是 C 端尾巴有信号帮助 KEX2 在细胞内直接定位,并指导 KEX2 在各个亚细胞器间运输和分泌^[22]。而在大肠杆菌表达系统中没有细胞器,表达 KEX2 时可以考虑去除信号肽、前体肽、跨膜区和 C 端尾巴。

将 ScKEX2 和 PkKEX2 的氨基酸序列进行比对,发现两者同源率为 49.68% (图 2)。将 PkKEX2 的结构类比 ScKEX2, PkKEX2 由 869 个氨基酸残基组成,包括信号肽(1–12 残基)、前体肽(13–131 残基)、催化结构域(132–442 残基)、P 结构域(443–657 残基)、Thr/Ser 富集区(658–724 残基)、跨膜域(725–741 残基)和 C 端尾巴(742–869 残基)。

对 ScKEX2 和 PkKEX2 的序列分别进行截短处理,截短类型包括:截去信号肽、跨膜结构域(KEX2 Δ 3)和 C 端尾巴与截去信号肽、前体肽、跨膜结构域和 C 端尾巴(KEX2 Δ 4),获得 4 株突变株 ScKEX2 Δ 3、ScKEX2 Δ 4、PkKEX2 Δ 3 和 PkKEX2 Δ 4。

2.2 重组双碱性氨基酸内肽酶的表达、纯化及酶活测定

从 NCBI 数据库中获得 *sckex2* (CAA96143.1) 和 *pkkex2* (XP_029323542) 的全长序列,进行密码子优化后构建到载体 pGEX-6P-1 上,并于 3'-端添加 8 \times His 标签促进表达,构建重组质粒 pGEX-ScKEX2 和 pGEX-PkKEX2。将重组质粒转化到感受态细胞 *E. coli* BL21,经 DNA 测序验证,获得重组表达菌株 *E. coli* BL21/pGEX-ScKEX2 和 *E. coli* BL21/pGEX-PkKEX2。将重组菌经过 0.5 mmol/L IPTG 诱导培养,经超声破碎后离心获得细胞破碎液上清,即粗酶液。利用 GST 亲和层析柱对粗酶液进行分离纯化,PreScission 蛋白酶过夜酶切切去 N 端的 GST 标签,利用缓冲液 C 冲洗即可得到目标蛋白。SDS-PAGE 结果(图 3)显示纯化后的重组酶基本为单一条带,对应的分子量 ScKEX2 为 92 kDa 和 PkKEX2 为 98 kDa 左右。对纯化的蛋白按照 1.4.1 进行酶活力的测定,比活力均 < 1.0 U/g。考虑在蛋白的折叠过程中一些非必要残基的存在,可能会影响酶的正确

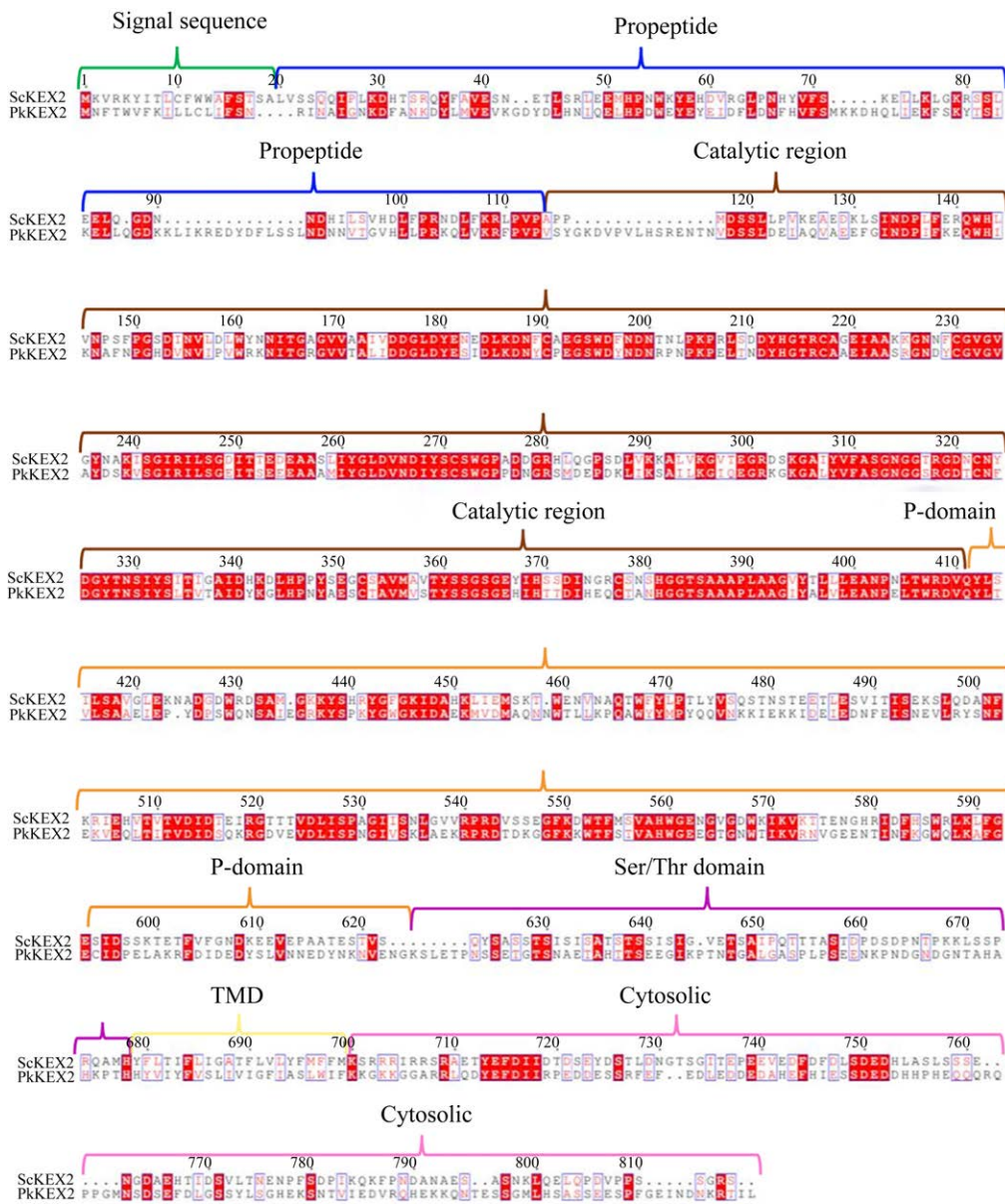


图 2 ScKEX2 和 PkKEX2 的氨基酸序列比对图

Figure 2 Alignment of amino acid sequences for the ScKEX2 and PkKEX2.

折叠及功能发挥, 后续对 ScKEX2 和 PkKEX2 进行不同非功能区域的截短突变并进行表达。

2.3 重组双碱性氨基酸内肽酶突变体的表达与纯化

以 pGEX-ScKEX2 和 pGEX-PkKEX2 为模板, PCR 扩增双碱性氨基酸内肽酶基因

sckex2Δ3、*sckex2Δ4*、*pkkex2Δ3* 和 *pkkex2Δ4*, 理论分子大小分别为 1 728、2 045、1 839、2 192 bp。PCR 扩增载体 pGEX-6P-1 片段后, 利用同源重组法与目的基因相连接, 构建重组质粒 pGEX-ScKEX2Δ3、pGEX-ScKEX2Δ4、pGEX-PkKEX2Δ3 和 pGEX-PkKEX2Δ4。将重组质粒转化入 *E. coli*

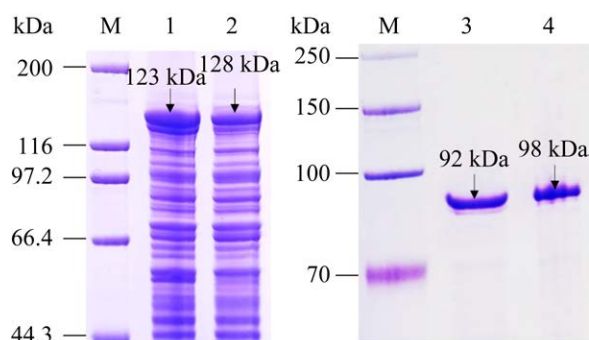


图 3 野生型重组双碱性氨基酸内肽酶的表达纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 SDS-PAGE analysis of expression and purification of wild-type KEX2 in *Escherichia coli* BL21/pGEX-KEX2. M: Marker; Lane 1: The cell-free extracts of ScKEX2; Lane 2: The cell-free extracts of PcKEX2; Lane 3: The purified ScKEX2; Lane 4: The purified PcKEX2.

BL21, 得到重组表达菌株 *E. coli* BL21/pGEX-ScKEX2 Δ 3、*E. coli* BL21/pGEX-ScKEX2 Δ 4、*E. coli* BL21/pGEX-PcKEX2 Δ 3 和 *E. coli* BL21/pGEX-PcKEX2 Δ 4。

将重组菌经过 0.3 mmol/L IPTG 诱导培养, 收集菌体破碎液上清经 SDS-PAGE 结果(图 4)显示纯化后的重组酶基本为单一条带, 对应的分子量 ScKEX2 Δ 3 为 73 kDa、ScKEX2 Δ 4 为 62 kDa、PcKEX2 Δ 3 为 80 kDa 和 PcKEX2 Δ 4 为 66 kDa 左右。

2.4 pH 和温度对重组双碱性氨基酸内肽酶突变体活力的影响

如图 5 所示, ScKEX2 Δ 3、ScKEX2 Δ 4、PcKEX2 Δ 3 和 PcKEX2 Δ 4 的最适 pH 为 5.0, 即重组双碱性氨基酸内肽酶突变体的最适 pH 偏低。

将纯酶溶液在 4 °C 条件下, 于 pH 4.0、pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0 和 pH 8.0 的缓冲液中孵育 48 h, 测定不同 pH 下的残余酶活力, 结果如图 5 所示。这 4 个酶的活性变化的趋势是一致的。在不同 pH 放置 48 h 后, 在 pH 4.0–5.0 时残留酶

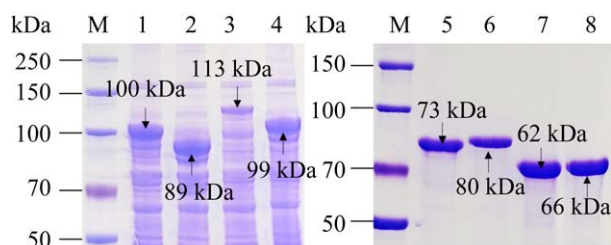


图 4 重组双碱性氨基酸内肽酶截短突变体的表达纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of expression and purification of truncation mutant KEX2. M: Marker; Lane 1: The cell-free extracts of ScKEX2 Δ 3; Lane 2: The cell-free extracts of ScKEX2 Δ 4; Lane 3: The cell-free extracts of PcKEX2 Δ 3; Lane 4: The cell-free extracts of PcKEX2 Δ 4; Lane 5: The purified ScKEX2 Δ 3; Lane 6: The purified PcKEX2 Δ 3; Lane 7: The purified ScKEX2 Δ 4; Lane 8: The purified PcKEX2 Δ 4.

活力逐渐升高, 在 pH 5.0 条件下的残留酶活力达到最高, 在 pH>6.0 时, 双碱性氨基酸内肽酶的残留酶活力开始逐渐下降。

ScKEX2 Δ 3、PcKEX2 Δ 3 和 PcKEX2 Δ 4 的最适温度为 40 °C, ScKEX2 Δ 4 的最适温度为 50 °C, 表明重组双碱性氨基酸内肽酶突变体在 40–50 °C 的范围内相对酶活力较高。将不同的双碱性氨基酸内肽酶至于不同的温度下温浴 1 h 后, 测定重组酶的温度稳定性, 结果如图 6 所示。ScKEX2 Δ 3 在低于 35 °C 的条件下温浴 1 h 后, 酶活力仍能保持在 60% 以上, 而当温度高于 35 °C 时酶活力逐渐丧失。ScKEX2 Δ 4 和 PcKEX2 Δ 3 的酶活力随着温度的升高, 活性逐渐丧失, 当温度超过 30 °C 以后, 酶活力降低为 40% 以下。PcKEX2 Δ 4 在 30 °C 时酶活力残余最高, 随着温度的升高酶的活性逐渐丧失。

2.5 重组双碱性氨基酸内肽酶突变体的动力学参数

通过测定不同浓度(10–300 μ mol/g)的底物

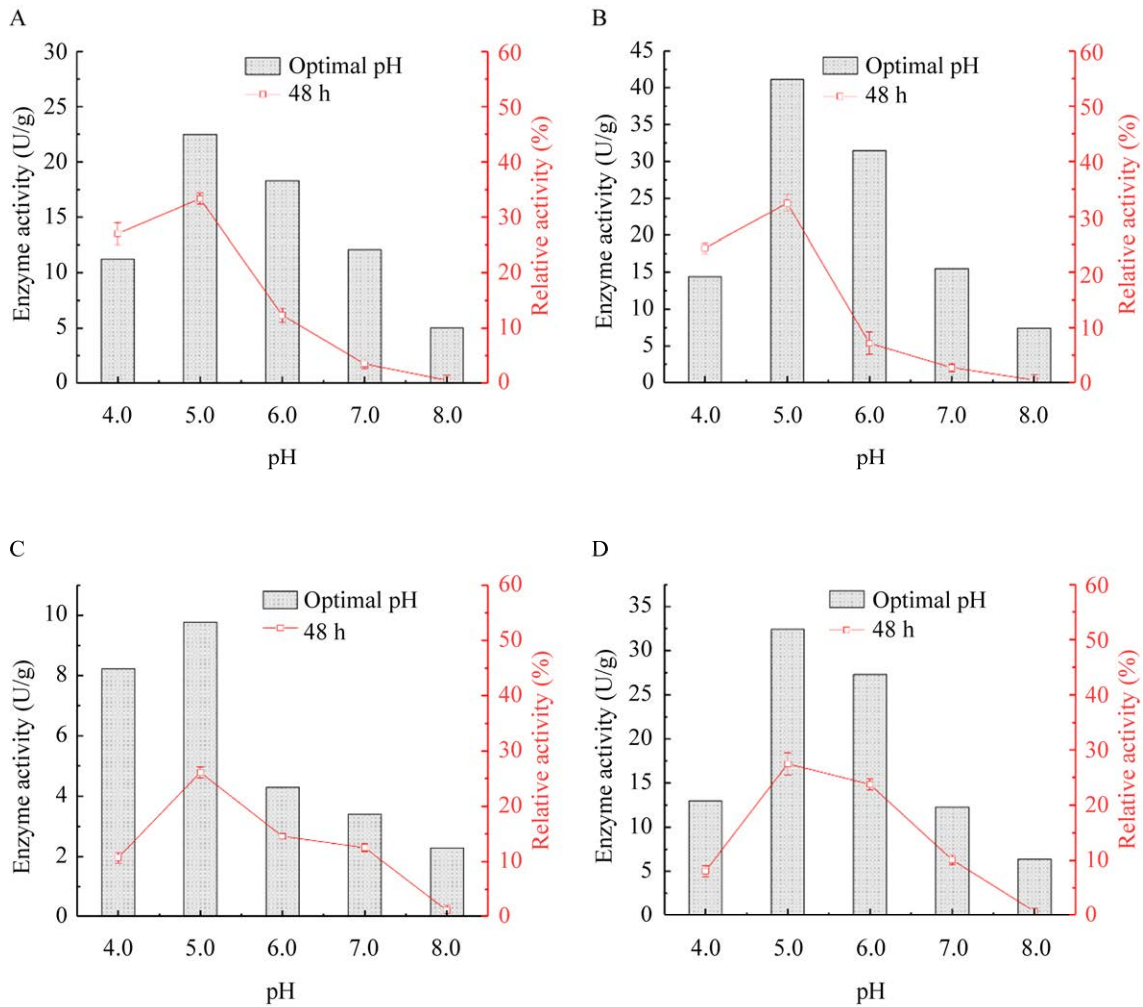


图 5 pH 对重组双碱性氨基酸内肽酶酶截短突变体酶活和稳定性的影响

Figure 5 Effects of pH on activity and stability of truncation mutant of KEX2. A: ScKEX2Δ3. B: ScKEX2Δ4. C: PkKEX2Δ3. D: PkKEX2Δ4.

Boc-QRR-pNA 条件下,不同重组酶的比活变化,使用 origin 软件处理初始比活数据,通过 Michaelis-Menten 方程拟合非线性回归曲线,计算酶的动力学参数。如表 2 所示,4 个突变株的 K_m 相差不大,表明突变酶对于底物 Boc-QRR-pNA 的亲和力近乎相等。ScKEX2Δ4 和 PkKEX2Δ4 的 k_{cat} 比 ScKEX2Δ3 和 PkKEX2Δ3 分别提高了 10.8%和 16.6%。与 ScKEX2Δ3 相比 ScKEX2Δ4 的 k_{cat}/K_m 值提高了 9.9%,与 PkKEX2Δ3 相比

PkKEX2Δ4 的 k_{cat}/K_m 值提高了 16.9%。这些结果表明在截短 C-末端的同时,截去信号肽与前体肽比只截去信号肽更能提高 k_{cat} 值,最终显著提高了酶的催化效率。PkKEX2Δ3 的 k_{cat}/K_m 值最小,其催化效率最低,这与之前测得的比酶活数据相吻合。ScKEX2Δ4 与 PkKEX2Δ4 两者的 k_{cat}/K_m 值相近,表明在大肠杆菌体系中,这 2 种不同来源的 KEX2 酶截短处理以后,其催化效率无明显差别。

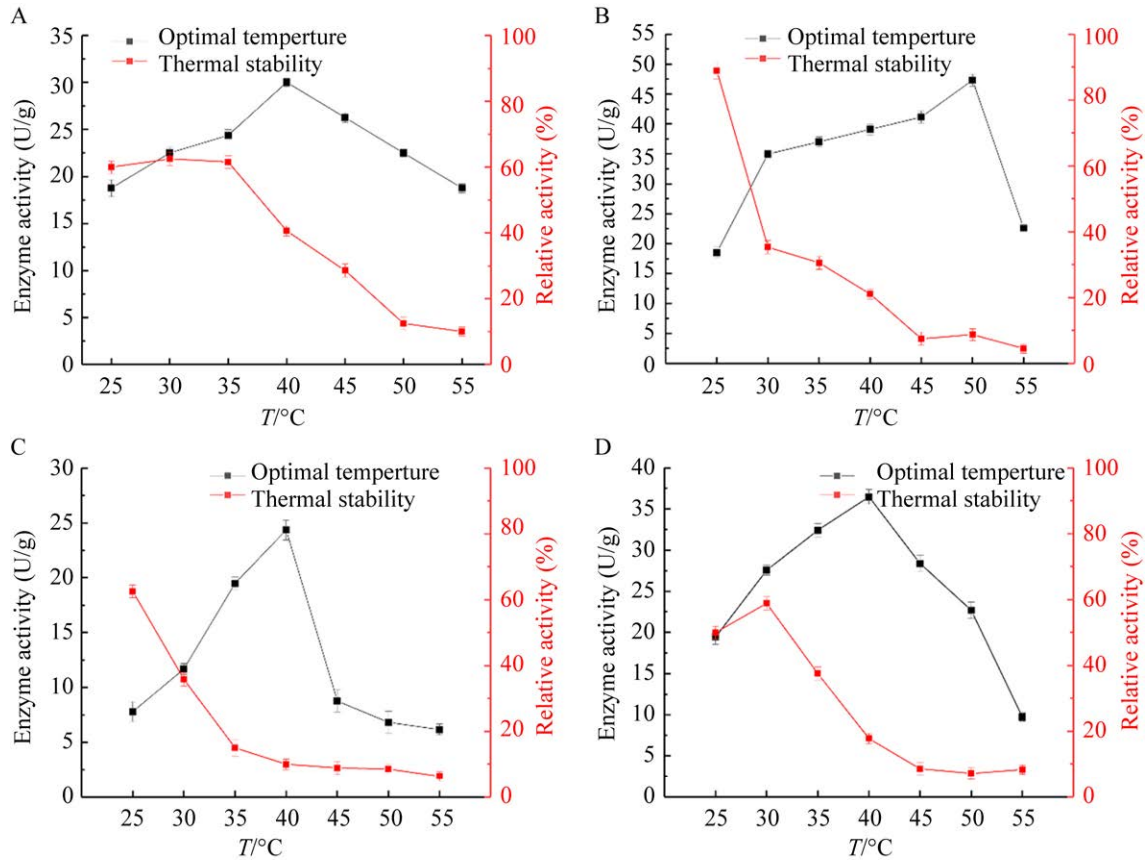


图 6 温度对重组双碱性氨基酸内肽酶酶截短突变体酶活和稳定性的影响

Figure 6 Effects of temperature on activity and stability of truncation mutant of KEX2. A: ScKEX2 Δ 3. B: ScKEX2 Δ 4. C: PkKEX2 Δ 3. D: PkKEX2 Δ 4.

表 2 重组双碱性氨基酸内肽酶突变体对底物 Boc-QRR-pNA 的动力学参数

Table 2 Kinetics of KEX2 mutant towards Boc-QRR-pNA

| Proteases | K_m ($\mu\text{mol/L}$) | k_{cat} (s^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$) |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| ScKEX2 Δ 3 | 23.4 | 45.3 | 1 933.9 |
| ScKEX2 Δ 4 | 23.6 | 50.2 | 2 125.1 |
| PkKEX2 Δ 3 | 23.8 | 41.1 | 1 726.8 |
| PkKEX2 Δ 4 | 23.3 | 50.0 | 2 145.0 |

2.6 重组双碱性氨基酸内肽酶突变体在蛋白质水解中的应用

以大豆分离蛋白作为底物,当碱性蛋白酶单独作用时,在不同的时间段取样,通过 SDS-PAGE 简单表征水解情况(图 7),发现在 2 h 后碱性蛋白酶的水解情况基本保持不变。大豆蛋白

水解液中的多肽分子量分布主要集中在>5 000 Da (13%)、2 000–5 000 Da (16%)、1 000–2 000 Da (19%)、500–1 000 Da (21%)、100–500 Da (24%) 以及<100 Da (7%) (图 8)。其中,绝大部分多肽集中在 100–1 000 Da 范围内,占比为 45%。当碱性蛋白酶协同重组双碱性氨基酸内肽酶水解时,大豆蛋白水解液中的多肽分子量分布则主要集中在>5 000 Da (7%–10%)、2 000–5 000 Da (14%)、1 000–2 000 Da (19%)、500–1 000 Da (20%)、100–500 Da (24%–25%)以及<100 Da (11%–14%) (图 8)。其中,小于 100 Da 的多肽分子量占比相对提高 50%。因此,重组双碱性氨基酸内肽酶协同碱性蛋白酶可以将大豆分离蛋白降解成比单独碱性蛋白酶更小的肽。

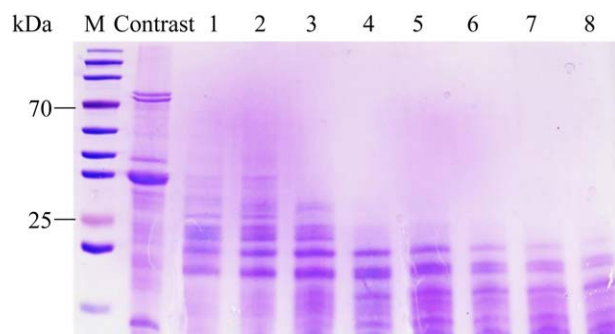


图7 碱性蛋白酶在不同时间下水解大豆分离蛋白
Figure 7 Alkaline protease hydrolyzes soybean protein at different time. M: Marker; Contrast: Soybean protein; Lane 1: 15 min; Lane 2: 30 min; Lane 3: 1 h; Lane 4: 1.5 h; Lane 5: 2 h; Lane 6: 3 h; Lane 7: 4 h; Lane 8: 5 h.

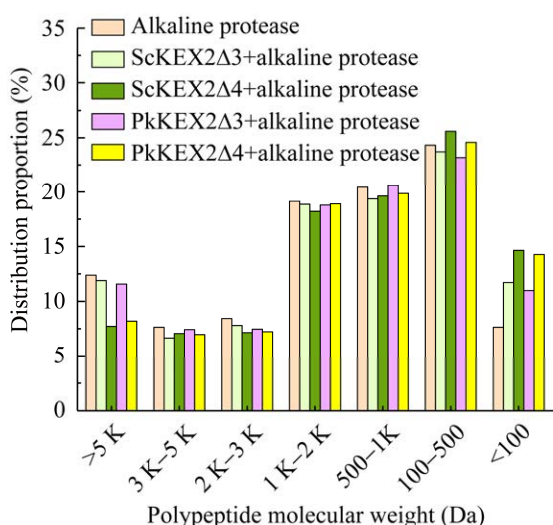


图8 大豆分离蛋白水解液多肽分子量分布
Figure 8 The distribution of polypeptide molecular weight in soybean protein hydrolysates.

3 讨论与结论

大肠杆菌表达系统是一种应用广泛的蛋白表达系统,其具有操作难度低、成本低廉、制备周期短等优点^[23]。实验室前期尝试了 *pkkex2* 与 *sckex2* 全长序列完成密码子优化后在大肠杆菌内表达,成功表达后对其酶活性进行测定发现几乎没有酶活。通过比较 PkKEX2 与 ScKEX2 的

氨基酸序列及二级结构,发现两者均由信号肽、前导肽、催化结构域、P 结构域、Thr/Ser 富集区、跨膜区和 C 端尾巴构成,但有一些结构域在大肠杆菌表达系统中是不需要发挥功能的。通过对其结构进行分析,对非必须功能的结构域进行截短,在大肠杆菌中成功表达及纯化,发现截短突变可以有效提高酶的表达水平和比酶活。相似的研究,艾敏榕等^[19]切除 ScKEX2 的 C-末端 201 个氨基酸残基后,在甲醇酵母发酵上清中检测到了酶活力,但酶活力较低;刘颖颖等^[15]通过截短其 C-末端 215 位氨基酸残基后,其表达水平和酶活力均有提高,表明末端截短手段确实可以影响甚至提升该酶的活力。

本研究从 NCBI 数据中查找的 2 种来源的 *kex2* 基因出发,通过序列优化、分子克隆、同源重组和转化等手段,实现重组双碱性氨基酸内肽酶在大肠杆菌细胞中的可溶性表达。利用 GST 亲和层析柱及 PreScission 蛋白酶纯化目标蛋白,测定了经纯化后的 KEX2 蛋白酶的酶学性质。比较几种重组酶的酶学性质发现,重组酶 ScKEX2Δ3 在 pH 5.0、40 °C 条件下达到最大比酶活,为 30.02 U/g。重组酶 ScKEX2Δ4 在 pH 5.0、50 °C 条件下达到最大比酶活,为 47.32 U/g。重组酶 PkKEX2Δ3 在 pH 5.0、40 °C 条件下达到最大比酶活,为 24.35 U/g。重组酶 PkKEX2Δ4 在 pH 5.0、40 °C 条件下达到最大比酶活,为 36.47 U/g,经过比较发现同时切除信号肽与前体肽的菌株比只切除信号肽的菌株活力要高。而且在大肠杆菌体系中,KEX2 蛋白酶在较低 pH 条件下酶稳定性较好、酶活力较高,但是热稳定性较差。虽然最适温度在 40–50 °C,但是温浴 1 h 后,酶活力几乎消失。在大肠杆菌中表达的重组双碱性氨基酸内肽酶的最适 pH 为 4.0–5.0,在 pH 5.0 时稳定性较好,刘颖颖等^[15-16]在毕赤酵母中表达的 KEX2 酶在 pH 5.0 以下,蛋白酶基本丧失活性。

重组双碱性氨基酸内肽酶与碱性蛋白酶的组合使用,能够提高蛋白质的水解程度,并更加促进活性小分子多肽的释放。在大豆分离蛋白水解液中,以碱性蛋白酶单独水解底物为对照,分子量<100 Da 的只有 7%,而碱性蛋白酶协同重组双碱性氨基酸内肽酶作用的水解液中分子量<100 Da 的最多占 15%,相对提高了约 50%。因为重组双碱性氨基酸内肽酶可以特异的切割双碱性氨基酸的 C 末端肽键,其较高的水解能力可以将分子量较大的多肽水解为更小的多肽,因此较碱性蛋白酶的单独水解,协同水解更能促进小分子肽的释放。

目前关于双碱性氨基酸内肽酶在酵母体系中的研究较多,但存在表达量低且发酵周期长等问题,表达量较高且成本低。本研究成功地实现了其在大肠杆菌体系中的表达及功能鉴定,为以后继续在大肠杆菌表达体系内进行深入研究奠定了基础。后续可以对其进行分析及改造,以提高其酶活力及 pH 范围及稳定性等。

参考文献

- [1] FULLER RS, BRAKE AJ, THORNER J. Yeast prohormone processing enzyme (*KEX2* gene product) is a Ca^{2+} -dependent serine protease[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(5): 1434-1438.
- [2] FULLER RS, BRAKE AJ, THORNER J. Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease[J]. *Science*, 1989, 246(4929): 482-486.
- [3] THOMAS G, THORNE BA, THOMAS L, ALLEN RG, HRUBY DE, FULLER R, THORNER J. Yeast *KEX2* endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells[J]. *Science*, 1988, 241(4862): 226-230.
- [4] JULIUS D, BRAKE AJ, BLAIR L, KUNISAWA R, THORNER J. Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor[J]. *Cell*, 1984, 37(3): 1075-1089.
- [5] MANFREDI MA, ANTUNES AA, JESUS LO, JULIANO MA, JULIANO L, JUDICE WA. Specificity characterization of the α -mating factor hormone by *Kex2* protease[J]. *Biochimie*, 2016, 131: 149-158.
- [6] JAAKS P, BERNASCONI M. The proprotein convertase furin in tumour progression[J]. *International Journal of Cancer*, 2017, 141(4): 654-663.
- [7] AGGARWAL S, MISHRA S. Modifications in the *Kex2* P1' cleavage site in the α -MAT secretion signal lead to higher production of human granulocyte colony-stimulating factor in *Pichia pastoris*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(11): 197.
- [8] HUANG YD, LONG YY, LI SH, LIN T, WU JW, ZHANG YF, LIN Y. Investigation on the processing and improving the cleavage efficiency of furin cleavage sites in *Pichia pastoris*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 172.
- [9] WERTEN MWT, EGGINK G, COHEN STUART MA, de WOLF FA. Production of protein-based polymers in *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(5): 642-666.
- [10] GHOSH S, LOWENSTEIN JM. A multifunctional vector system for heterologous expression of proteins in *Escherichia coli* expression of native and hexahistidyl fusion proteins, rapid purification of the fusion proteins, and removal of fusion peptide by *Kex2* protease[J]. *Gene*, 1996, 176(1/2): 249-255.
- [11] BADER O, SCHALLER M, KLEIN S, KUKULA J, HAACK K, MÜHLSCHLEGEL F, KORTING HC, SCHÄFER W, HUBE B. The *KEX2* gene of *Candida glabrata* is required for cell surface integrity[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 41(6): 1431-1444.
- [12] BADER O, KRAUKE Y, HUBE B. Processing of predicted substrates of fungal *Kex2* proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*[J]. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 116.
- [13] BRENNER C, FULLER RS. Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone-processing enzyme: secreted, soluble *Kex2* protease[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(3): 922-926.
- [14] HOLYOAK T, WILSON MA, FENN TD, KETTNER CA, PETSKO GA, FULLER RS, RINGE D. A resolution crystal structure of the prototypical hormone-processing protease *Kex2* in complex with an Ala-Lys-Arg boronic acid inhibitor[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(22): 6709-6718.

- [15] 刘颖颖, 王之可, 李素霞. Kex2蛋白酶在毕赤酵母中的表达、纯化和性质研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 37-39, 42.
LIU YY, WANG ZK, LI SX. Expression, purification and properties of recombinant Kex2 in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biochemical and Pharmaceuticals, 2015, 35(1): 37-39, 42 (in Chinese).
- [16] YANG F, LIU L, LIU YY, LI SX. Effect of K225 residue to the catalytic efficiency of Kex2 protease[J]. Protein Expression and Purification, 2020, 176: 105725.
- [17] ANTUNES AA, JESUS LOP, MANFREDI MA, de SOUZA AA, MACHADO MFM, E SILVA PM, LCIMOTO MY, JULIANO MA, JULIANO L, JUDICE WAS. Thermodynamic analysis of Kex2 activity: the acylation and deacylation steps are potassium- and substrate-dependent[J]. Biophysical Chemistry, 2018, 235: 29-39.
- [18] SREENIVAS S, KRISHNAIAH SM, GOVINDAPPA N, BASAVARAJU Y, KANOJIA K, MALLIKARJUN N, NATARAJAN J, CHATTERJEE A, SASTRY KN. Enhancement in production of recombinant two-chain insulin glargine by over-expression of Kex2 protease in *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(1): 327-336.
- [19] 艾敏榕, 杨曜中. Kex2p 在甲醇酵母中的分泌表达[J]. 华东理工大学学报, 2002, 28(2): 161-163, 215.
AI MR, YANG YZ. Expression of Kex2p in *Pichia pastoris*[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2002, 28(2): 161-163, 215 (in Chinese).
- [20] de M, ABAZEED ME, FULLER RS. Direct binding of the Kex2p cytosolic tail to the VHS domain of yeast Gga2p facilitates TGN to prevacuolar compartment transport and is regulated by phosphorylation[J]. Molecular Biology of the Cell, 2013, 24(4): 495-509.
- [21] KIM MJ, SUNG BH, KIM HJ, SOHN JH, BAE JH. Production of autolysis-proof Kex2 protease from *Candida albicans* in *Saccharomyces cerevisiae* for *in vitro* processing of fusion proteins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(21): 7063-7072.
- [22] BRENNER C, BEVAN A, FULLER RS. Biochemical and genetic methods for analyzing specificity and activity of a precursor-processing enzyme: yeast Kex2 protease, kexin[J]. Methods in Enzymology, 1994, 244: 152-167.
- [23] SAHDEV S, KHATTAR SK, SAINI KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2008, 307(1/2): 249-264.