



高通量构建与筛选信号肽库提高枯草芽孢杆菌外源蛋白的表达分泌

李昊霓^{1,2}, 李颖^{1,2}, 于思礼², 涂然², 花尔并^{1*}, 刘扬^{2*}, 王猛²

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

李昊霓, 李颖, 于思礼, 涂然, 花尔并, 刘扬, 王猛. 高通量构建与筛选信号肽库提高枯草芽孢杆菌外源蛋白的表达分泌[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 3059-3072.

LI Haoni, LI Ying, YU Sili, TU Ran, HUA Erbing, LIU Yang, WANG Meng. High-throughput screening of signal peptides to improve the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 3059-3072.

摘要:【目的】基于信号肽在分泌表达系统中的重要作用, 利用自动化高通量设备, 搭建枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)酶蛋白信号肽库的高通量自动化构建与筛选平台, 探索枯草芽孢杆菌中不同信号肽对酶蛋白的表达分泌作用。【方法】首先以大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭载体 pHP13 以及 pMA5 为骨架, 将编码毒性蛋白的 *ccdB* 基因插入大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭载体的启动子和目标基因之间, 构建针对绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)以及普鲁兰酶(pullulanase, PulA)的信号肽筛选载体。以枯草芽孢杆菌 168 基因组为模板, 扩增 173 条信号肽序列, 基于高通量自动化设备搭建枯草芽孢杆菌外源蛋白表达及活性筛选平台, 构建含有不同信号肽的外源蛋白重组菌株, 筛选并考察不同信号肽对外源蛋白表达分泌的影响。【结果】RpmG、AspB、CitH、LytF 和 YkwD 这 5 个信号肽具有较强的引导 GFP 胞外蛋白分泌能力, 其中 RpmG 引导 GFP 胞外分泌能力最强, 其重组菌株与对照菌株相比胞外 GFP 的荧光值提高了 236%。针对 PulA 的信号肽筛选, 其中 41 个信号肽与 PulA 的适配性很低, 2 个信号肽 RpmG、AspB 引导 PulA 胞外分泌的能力较强。含 AspB 信号肽的 PulA 重组菌株分泌率可达到 74%, 与对照菌株相比分泌率提高了 68%; RpmG 信号肽引导的 PulA 酶活与其他信号肽相比最高, 总酶活可达 116 U/mL, 细胞外酶活为 52 U/mL。【结论】本研究建立了枯草芽孢杆菌酶蛋白信号肽库的高通量自动化构建与筛选平台, 分别获得

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100201); 国家自然科学基金(32100046)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100201) and the National Natural Science Foundation of China (32100046).

*Corresponding authors. E-mail: HUA Erbing, huarb@tust.edu.cn; LIU Yang, liuyang@tib.cas.cn

Received: 2024-01-17; Accepted: 2024-03-04; Published online: 2024-03-12

可以提高 GFP 和 PulA 表达分泌的信号肽。该自动化平台允许大量样品的并行处理，这简化了纯手工的重复性实验工作，并且我们发现高通量实验平台不论在时间和成本方面都优于手工操作。自动化高通量平台的优势将随着样本量的增加而更加显著。综上所述，我们建立的自动化高通量筛选平台不仅可以加速外源蛋白的信号肽筛选优化过程，也为其他高附加值蛋白酶的工业菌种改造提升和迭代提供新的技术支持。

关键词：枯草芽孢杆菌；信号肽；外源蛋白分泌；自动化高通量筛选

High-throughput screening of signal peptides to improve the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*

LI Haoni^{1,2}, LI Ying^{1,2}, YU Sili², TU Ran², HUA Erbing^{1*}, LIU Yang^{2*}, WANG Meng²

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: [Objective] Considering the important role of signal peptides in the secretory expression of heterologous proteins, we devised an automated high-throughput platform for the automatic screening of signal peptides, aiming to explore the effects of different signal peptides in *Bacillus subtilis* on the expression of heterologous proteins. **[Methods]** First, using the *Escherichia coli*-*B. subtilis* shuttle vectors pHP13 and pMA5 as the skeleton, we amplified the cell division B lethal gene (*ccdB*) and then ligated it to the middle of the promoter and the target gene to build the signal peptide screening vector. With the genomic DNA of *B. subtilis* 168 as the template, 173 signal peptides were amplified. An automated platform was established for the expression and screening of heterologous proteins in *B. subtilis*. Furthermore, the recombinant strains of heterologous proteins containing different signal peptides were constructed, and the effects of different signal peptides on the secretory expression of heterologous proteins were investigated. **[Results]** Five signal peptides (RpmG, AspB, CitH, LytF, and YkwD) showed strong abilities to induce the export of GFP from *B. subtilis*. Among them, RpmG had the strongest ability to induce the export of GFP, and the extracellular GFP fluorescence of the recombinant strain increased by 236% compared with that of the control strain. In addition, 41 signal peptides were not compatible with pullulanase (PulA), while the two signal peptides RpmG and AspB showed strong abilities to export PulA. The highest PulA activity of 116 U/mL was detected from the recombinant strain carrying the signal peptide RpmG, and the extracellular enzyme activity was 52 U/mL. The secretion rate of the PulA recombinant strain carrying the signal peptide AspB reached 74%, which was 68% higher than that of the control strain. **[Conclusion]** We developed an automated platform for high-throughput screening of the

heterologous protein signal peptides in *B. subtilis* and obtained the signal peptides capable of improving the secretory expression of GFP and Pula. This automated platform allowed the parallel processing of a considerable number of samples, which simplified the repetitive manual laboratory work. This platform outperformed manual operation in terms of both time consumption and cost. The advantage of the automated high-throughput platform will be more significant with the increase in sample size. In summary, the established automatic high-throughput screening platform not only accelerates the screening process of signal peptides of heterologous proteins, but also provides new technical support for the modification and iteration of industrial strains of other value-added proteases.

Keywords: *Bacillus subtilis*; signal peptide; heterologous protein secretion; automated high-throughput screening

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是革兰氏阳性模式微生物, 具有遗传背景清晰、无密码子偏好性、培养方式简单和无特殊营养需求等优点。另外, 由于枯草芽孢杆菌拥有高效的蛋白分泌系统, 其蛋白分泌能力强且多保持天然的构象和生物活性, 生物安全性等优势, 被认为是重要的分泌型酶蛋白的细胞工厂, 广泛应用于工业酶的生产^[1-5]。

近年来, 对枯草芽孢杆菌的表达分泌元件, 如不同类型的质粒、启动子、信号肽和调控因子的挖掘与表征, 极大地推动了枯草芽孢杆菌重组表达系统的发展^[6-10], 其中信号肽能够有效提高目的蛋白的产量, 受到了人们的广泛关注。目标蛋白通常以前体形式合成, 其氨基末端包含一段特异的信号肽, 引导其分泌表达, 其中的分泌途径主要有 Sec 途径和 Tat 途径, 信号肽在分泌过程中被信号肽酶识别并切除, 从而释放成熟的蛋白^[11-12]。由于信号肽除了被相应的蛋白转位酶定位和膜转运所必需外, 还对特定目的蛋白的生物合成、折叠动力学和稳定性有影响^[13]。随着研究的深入, 研究人员发现信号肽与目标蛋白两者之间存在适配性的问题, 同一目标蛋白在不同信号肽引导条件下, 其分泌效率差异显著。Wang 等^[14]在枯草芽孢杆菌中使用 5 个信号肽分别表

达聚对苯二甲酸乙二醇酯水解酶(polyethylene terephthalate hydrolase, PETase), 最终信号肽 SP_{amy} 联合启动子 P₄₃ 最大限度地分泌表达 PETase; Feng 等^[15]在枯草芽孢杆菌 WB600 中使用 P₄₃ 启动子, 联合信号肽 SP_{amyE} 表达 L-天冬酰胺酶, 是其他信号肽的 20 倍, L-天冬酰胺酶酶活可达到 374.9 U/mL; Fu 等^[16]基于 PCR 的克隆方法构建了一个包含 173 个枯草芽孢杆菌 Sec 型信号肽文库, 以 α -淀粉酶 AmyS 为报告基因, 鉴定出 15 个显著提高 AmyS 产量的信号肽, 最终 AmyS 的最高产量为 5 086 U/mL。

综上所述, 目前尚无有效的工具能够预测特定信号肽在引导目标蛋白分泌时的效率, 研究人员在寻找高效信号肽以引导感兴趣蛋白分泌的过程中, 仍然基于试错^[17-18]。目前, 信号肽文库的构建通常采用酶切连接的传统策略, 这种方法存在诸多局限性, 首先待筛选的信号肽序列数量多, 导致可用于构建的酶切位点选择受限^[19]; 其次信号肽酶识别位点处于信号肽的末端, 而在信号肽两端人为添加酶切位点, 可能会干扰信号肽酶对信号肽的识别, 进而导致信号肽切割过程受阻; 再则手动构建信号肽文库的方式通量低、耗时长、人力和物力成本高^[20]。针对上述问题, 本研究整合实验室现有的 Biomek i7 自动化工作

站、QPix 420 高通量微生物自动克隆筛选系统、KingFisher Flex 磁珠纯化仪、高通量振荡摇床等自动化设备,建立了枯草芽孢杆菌酶蛋白信号肽库的高通量自动化构建和筛选平台,加快了外源蛋白的信号肽优化过程,提高外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达分泌水平。本研究也为高附加值酶蛋白的工业菌种改造提升和迭代提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所用菌株和质粒由实验室储存和构建(表 1),所用引物由北京擎科生物科技股份有限公司和中国科学院天津工业生物技术研究所合成(表 2 和表 3)。

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in the study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources
Strains		
DH5 α	<i>Escherichia coli</i> , used for gene cloning	This lab
DB3.1	<i>E. coli</i> , <i>gyrA462 endA1</i> Δ (<i>sr1-RecA</i>) <i>mcrB mrr hsdS20 glnV44</i> (=supE44) <i>ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl-5 leuB6 mtl-1</i>	This lab
<i>B. subtilis</i> 168	<i>Bacillus subtilis</i> , wild type	This lab
<i>B. subtilis</i> SCK6	<i>B. subtilis</i> , wild type	This lab
Plasmids		
pHP13-P _{gapDH} -gfp	pHP13 carrying <i>gfp</i> gene under control of P _{gapDH}	[21]
pBAC9987	<i>B. subtilis-E. coli</i> shuttle vector for Cas9-based genome editing in <i>B. subtilis</i> , Amp ^R , Cm ^R , <i>rep</i> pE194 ^{ts} , expressing Cas9 and a <i>ccdB</i> cassette.	[22]
pHP13-P _{gapDH} -ccdB-gfp	pHP13 carrying <i>gfp</i> gene under control of P _{gapDH} , the <i>ccdB</i> gene was used to integrate the signal peptide fragment	This study
pHP13-P _{gapDH} -SPs-gfp	pHP13 carrying <i>gfp</i> gene under control of P _{gapDH} , contains different signal peptide fragments	This study
pMA0911-pulA	pMA0911 carrying <i>pulA</i> gene under control of P _{HapII}	This lab
pHP13-P _{gapDH} -pulA	pHP13 carrying <i>pulA</i> gene under control of P _{gapDH}	This study
pMA0911-ccdB-pulA	pMA0911 carrying <i>pulA</i> gene under control of P _{HapII} , the <i>ccdB</i> gene was used to integrate the signal peptide fragment	This study
pMA0911-SPs-pulA	pMA0911 carrying <i>pulA</i> gene under control of P _{HapII} , contains different signal peptide fragments	This study

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers name	Sequences (5'→3')
<i>gfp-ccdB</i> -F	CGGATCCACGCGTGGTCTCCATGGGATCCATGTCGAAGGG
pHP13-P _{gapDH} -ccdB-R	CTGGGGAATATAAGGTCTCGTAATATCGCCTCCTATTGTAAATTTAAATTTAATT
<i>ccdB</i> -F	CGAGACCTTATATCCCCAGAACAT
<i>ccdB</i> -R	GGAGACCACGCGTGGATCCG
pHP13-pulA-F	TACAATAGGAGGCGATATTAATGCCCCAAAACAACAGTC
pHP13-pulA-R	TAAAACGACGGCCAGTGAATTCAACATTGAATTAATACCCACGCACCA
<i>pulA-ccdB-Bbs</i> I-F	GGATCCACGCGTGAAGACGAATGCCCCAAAACAACAGTCG
<i>pulA-ccdB-Bbs</i> I-R	GGAATATAAGAAGACGACATATGTAAATCGCTCCTTTTGTAGGTGGC
<i>ccdB-Bbs</i> I-F	ATGTCGTCTTCTTATATCCCCAGAACATC
<i>ccdB-Bbs</i> I-R	TCGTCTTACGCGTGGATCC

表 3 构建含不同信号肽的 GFP 分泌载体所用引物(部分)

Table 3 Primers used to construct GFP secretion vectors containing different signal peptides (partial)

Primers name	Sequences (5'→3')
<i>aspB</i> -F	CCAGGTCTCAATTAATGAAACTGGCAAAAAGAGTATCCGC
<i>citH</i> -F	CCAGGTCTCAATTAATGGGAAATACTCGTAAAAAAGTTTCTGT
<i>lytF</i> -F	CCAGGTCTCAATTAATGAAAAAGAAATTAGCAGCAGGGC
<i>rpmG</i> -F	CCAGGTCTCAATTAATGAGAAAAAAGATTACGTTAGCATGCA
<i>ykwD</i> -F	CCAGGTCTCAATTAATGAAGAAAGCATTTATTTTATCTGCTGCC
<i>aspB</i> -R	CCAGGTCTCACCATCGCTTTCGCTGTGATTGC
<i>citH</i> -R	CCAGGTCTCACCATAACGTCTGCCAGCTCTTTTT
<i>lytF</i> -R	CCAGGTCTCACCATTGCTTCAGCTGGTGTCACTAC
<i>rpmG</i> -R	CCAGGTCTCACCATCGCTGATGCAGAGCTCTTCA
<i>ykwD</i> -R	CCAGGTCTCACCATCGCTGATGCTTGCTGTACG

1.1.2 主要试剂

Q5 High-Fidelity DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶均购自纽英伦生物技术(北京)有限公司; 2×ES Taq MasterMix (Dye)购自北京康为世纪生物科技有限公司; 质粒小量提取试剂盒(磁珠法)、普通 DNA 产物纯化试剂盒(磁珠法)购自杭州倍沃医学科技有限公司; 重组试剂盒 ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、卡那霉素(kanamycin, Kan)、壮观霉素(spectinomycin, Spe)购自北京索莱宝科技有限公司。

大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 GFP 表达使用 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0。枯草芽孢杆菌 PulA 蛋白表达使用 2×SR 培养基(g/L): 蛋白胨 30.0, 酵母提取物 50.0, K₂HPO₄·3H₂O 6.0。各种抗性培养基中抗生素浓度: Spe 在大肠杆菌中为 100 μg/mL, 在枯草芽孢杆菌中为 250 μg/mL; Amp 在大肠杆菌中为 100 μg/mL, Kan 在枯草芽孢杆菌中为 25 μg/mL。

1.2 枯草芽孢杆菌的转化

将已活化的 *B. subtilis* SCK6 菌液按照 OD₆₀₀ 为 1.0 用 LB 液体无抗培养基稀释转接并加入

20%的木糖母液, 使得木糖的终浓度在 2%, 在 37 °C、220 r/min 条件下培养 2 h 制备成感受态。随即转入 2 μg 质粒到 100 μL 感受态细胞中, 在 37 °C、220 r/min 条件下孵育 3 h 涂布于含有抗性的 LB 固体培养基上, 37 °C 倒置培养过夜。

1.3 重组枯草芽孢杆菌 GFP 培养及荧光测定

重组菌株培养: 采用 Biomek i7 自动化工作站向 96 孔板中加入含抗性的 LB 液体培养基, 利用 QPix 420 高通量微生物自动克隆筛选系统将含有不同信号肽的绿色荧光蛋白重组菌株单克隆接种于 96 孔板中, 高通量振荡摇床 37 °C、800 r/min 培养 16 h, Biomek i7 自动化工作站转接 10 μL 种子液至含有新鲜培养基的 96 孔板中, 高通量振荡摇床 37 °C、800 r/min 培养 24 h。

荧光测定: Biomek i7 自动化工作站分别转移 100 μL 发酵液和发酵液离心后的上清液至酶标板中, 使用酶标仪测定重组菌株发酵后的绿色荧光强度以及菌株的 OD₆₀₀ 值(荧光激发波长为 488 nm, 吸收波长为 520 nm)。目的蛋白的分泌率(%)=上清液的荧光/总荧光×100。

1.4 生产 PulA 重组枯草芽孢杆菌的培养及其酶活测定

重组菌株培养: 含有不同信号肽的 PulA 重组菌株单克隆接种于带有抗性的 LB 液体培养基

中, 37 °C、220 r/min 条件下培养 16 h, 以起始 OD_{600} 为 0.1 转接至带有抗性的 2×SR 培养基中, 37 °C、220 r/min 下培养 48 h。

酶活测定: 采用 3,5-二硝基水杨酸 (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 定糖法^[23]。在相应的温度和 pH 条件下, 以 5% 的普鲁兰糖溶液和 pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液按体积比 1:8 混合作为底物, 加入 50 μ L 预热酶液, 混匀后 60 °C 反应 30 min, 加入 500 μ L DNS 液终止反应, 沸水浴 10 min, 测定 OD_{540} 下的光吸收值。以葡萄糖的 DNS 显色 OD_{540} 光吸收值, 绘制标准曲线进行标定。酶活定义: 每分钟生成 1 μ mol 葡萄糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。分别测定胞内和胞外的酶活, 并计算分泌率。目的蛋白的分泌率 (%) = 胞外酶活 / (胞外酶活 + 胞内酶活) × 100。

1.5 表达产物 SDS-PAGE 分析

收集发酵上清液与菌体沉淀, 菌体沉淀用等体积磷酸缓冲液悬浮, 超声破碎 10 min, 之后 12 000 r/min 离心 2 min 收集破碎上清与沉淀, 将待测样品与蛋白上样缓冲液混匀, 100 °C

金属浴加热 10 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清液点样进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果与分析

2.1 GFP 信号肽筛选载体的构建

以 pHP13- P_{gapDH} -*gfp* 质粒^[21]为模板使用引物对 *gfp-ccdB*-F/pHP13- P_{gapDH} -*ccdB*-R 进行 PCR 扩增骨架片段, 使用质粒 pBAC9987 为模板^[22], 用引物对 *ccdB*-F/*ccdB*-R 进行 PCR 扩增 *ccdB* 基因片段, 将 2 个片段同源重组连接转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DB3.1 中获得重组菌, 以 Spe 抗性筛选阳性克隆, 提取质粒, 使用限制性内切酶 *EcoR* V 和 *EcoR* I 进行酶切鉴定, 电泳结果显示重组质粒 pHP13- P_{gapDH} -*ccdB*-*gfp* 的酶切片段大小正确(图 1)。

2.2 高通量构建 GFP 表达分泌菌株

以 GFP 为报告基因, 建立枯草芽孢杆菌 GFP 高分泌载体, 并搭建酶蛋白信号肽库的高通量自动化构建和筛选平台。以枯草芽孢杆菌 168 基因组为模板分别使用不同的引物对 PCR 扩增 173 条信号肽片段(图 2), 使用 KingFisher Flex 磁珠纯化

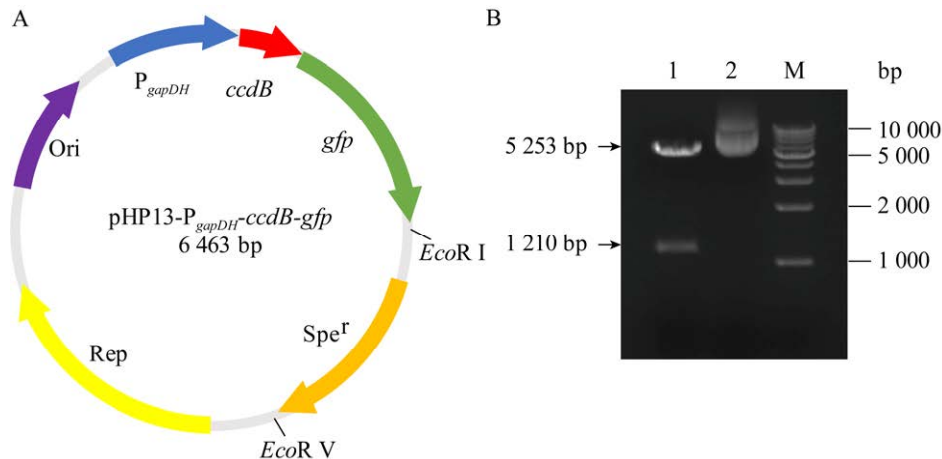


图 1 pHP13- P_{gapDH} -*ccdB*-*gfp* 质粒谱图及酶切验证图

Figure 1 Plasmid construction and confirmation for pHP13- P_{gapDH} -*ccdB*-*gfp*. A: Map of pHP13- P_{gapDH} -*ccdB*-*gfp*. B: Confirmation of pHP13- P_{gapDH} -*ccdB*-*gfp*. Lane M: DNA Molecular Weight Marker; Lane 1: pHP13- P_{gapDH} -*ccdB*-*gfp*/*EcoR* V+*EcoR* I; Lane 2: pHP13- P_{gapDH} -*ccdB*-*gfp* isolated from DB3.1/pHP13- P_{gapDH} -*ccdB*-*gfp*.

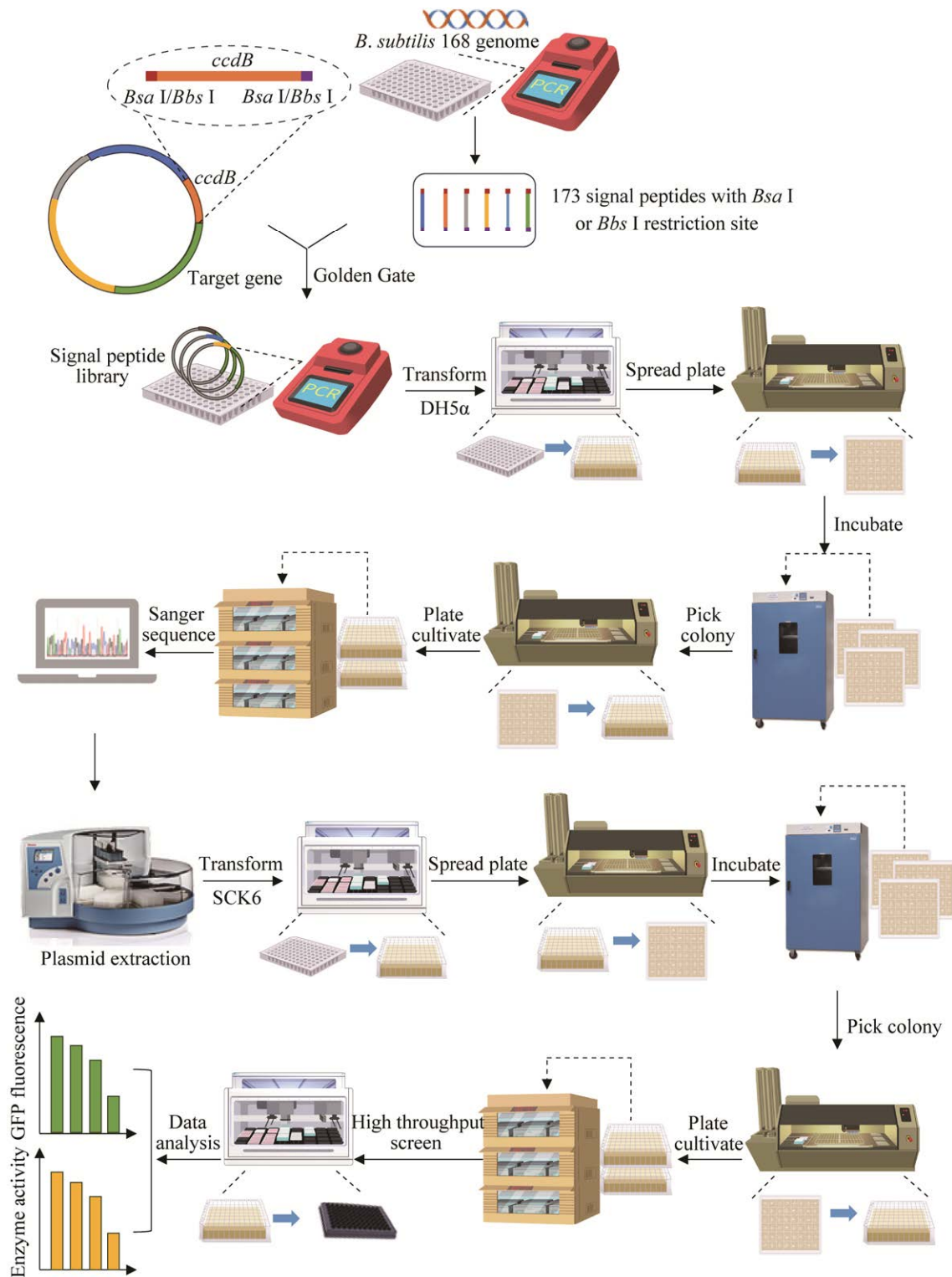


图 2 高通量自动化构建和筛选信号肽库流程图

Figure 2 Flowchart of high-throughput automated construction and screening of signal peptide libraries.

仪高通量纯化回收 173 条信号肽片段, 分别与 pHP13-P_{gapDH-ccdB-gfp} 质粒进行 Golden Gate 连接, 使用 Biomek i7 自动化工作站添加 *E. coli* DH5 α 感受态至连接产物中, PCR 仪 42 °C 热击, 高通量振荡摇床孵育 1 h, QPix 420 高通量微生物自动克隆筛选系统涂板, 37 °C 培养箱培养过夜。经单克隆测序验证, 成功构建 96 个重组菌株, 高通量振荡摇床培养后使用 KingFisher Flex 磁珠纯化仪提取 DNA 质粒, 使用 Biomek i7 自动化工作站添加 *B. subtilis* SCK6 感受态至 2 μ g 质粒中, 高通量振荡摇床 37 °C 孵育 3 h, QPix 420 高通量微生物自动克隆筛选系统涂板最终获得 91 株重组菌株(图 2)。

2.3 重组枯草芽孢杆菌中 GFP 的荧光测定

91 株含不同信号肽的重组菌株经孔板发酵 24 h 检测荧光, 结果显示含有不同信号肽重组菌株中 GFP 的表达分泌差异显著。其中 25 条信号肽(如 SP_{YkvV}、SP_{YobB}、SP_{YddT} 和 SP_{YnrB})与 GFP 适配性很低, 重组菌的荧光值与含有空质粒的 SCK6 菌株相比无明显差异。SP_{abnA}、SP_{ywtD}、SP_{ydbK} 和 SP_{ywmD} 等 61 个信号肽具有一定引导 GFP 表达和细胞外分泌的能力, 但 GFP 的表达较低。SP_{rpmG} (GenBank 登录号为 NP_387980.1)、SP_{aspB} (GenBank 登录号为 NP_390118.1)、SP_{citH} (GenBank 登录号为 NP_390790.1)、SP_{lytF} (GenBank 登录号为 NP_388818.2) 和 SP_{YkwD} (GenBank 登录号为 NP_389280.2) 5 个信号肽引导 GFP 胞外分泌的能力较强, 其中 SP_{rpmG} 为本次筛选得到的最优信号肽, 其重组菌株 SCK6/pHP13-P_{gapDH-SP_{rpmG}-gfp} 的总荧光值达 25 606 a.u., 与野生型 SCK6/pHP13-P_{gapDH-gfp} 相比 GFP 总表达量提高了 123%, 其细胞外 GFP 荧光值可达 22 854 a.u., 与野生型 SCK6/pHP13-P_{gapDH-gfp} 相比细胞外 GFP 表达量提高了 236%, 为所有重组菌株的最高水平(图 3)。在荧光显微镜下观察重组菌株

SCK6/pHP13-P_{gapDH-SP_{rpmG}-gfp} 与 SCK6 野生型菌株的 GFP 荧光强度(图 4), 重组菌株 SCK6/pHP13-P_{gapDH-SP_{rpmG}-gfp} 可以观察到明亮的绿色荧光。

2.4 普鲁兰酶表达载体的构建及其酶活测定

针对重要的工业酶普鲁兰酶构建了其信号肽表达载体重组质粒 pHP13-P_{gapDH-pulA}。以质粒 pHP13-P_{gapDH-gfp}^[21] 为模板, 使用引物对 pHP13-P_{gapDH-F}/pHP13-P_{gapDH-R} 进行 PCR 扩增骨架片段, 以枯草芽孢杆菌 SCK6/pMA0911-pulA 为模板, 使用引物对 pHP13-pulA-F/pHP13-pulA-R 进行 PCR 扩增, 回收 pulA 片段, 将 2 个片段同源重组连接转化 *E. coli* DH5 α 中获得重组菌, 以 Spe 抗性筛选阳性克隆, 提取质粒, 经测序验证, 质粒构建正确(图 5)。

经单克隆测序验证正确后的 pHP13-P_{gapDH-pulA} 质粒转入枯草芽孢杆菌 SCK6 后摇瓶发酵 48 h, 测定重组菌株中生产的普鲁兰酶的酶活(图 6A), 重组菌株 SCK6/pHP13-P_{gapDH-pulA} 表达 PulA 酶活仅为 16 U/mL, 说明此表达系统与普鲁兰酶的表达适配性低。因此, 更换 pMA0911 表达载体表达普鲁兰酶, 测试重组菌株 SCK6/pMA0911-pulA 表达 PulA 的酶活可达到 202 U/mL, 是重组菌株 SCK6/pHP13-P_{gapDH-pulA} 普鲁兰酶表达量的 12.6 倍(图 6A)。将发酵液 4 °C 离心, 取上述菌株的上清液以及胞内超声破碎的上清液, 采用 SDS-PAGE 方法进行分析。结果发现, 重组菌株 SCK6/pHP13-P_{gapDH-pulA} 和 SCK6/pMA0911-pulA 均有正确的蛋白表达条带, 与文献报道^[24]一致(图 6B), 说明普鲁兰酶基因在 2 种表达系统条件下均能成功地表达, 并且 SCK6/pMA0911-pulA 中普鲁兰酶的表达明显优于 SCK6/pHP13-P_{gapDH-pulA}。基于上述结果选择 pMA0911 载体用于下一步实验。

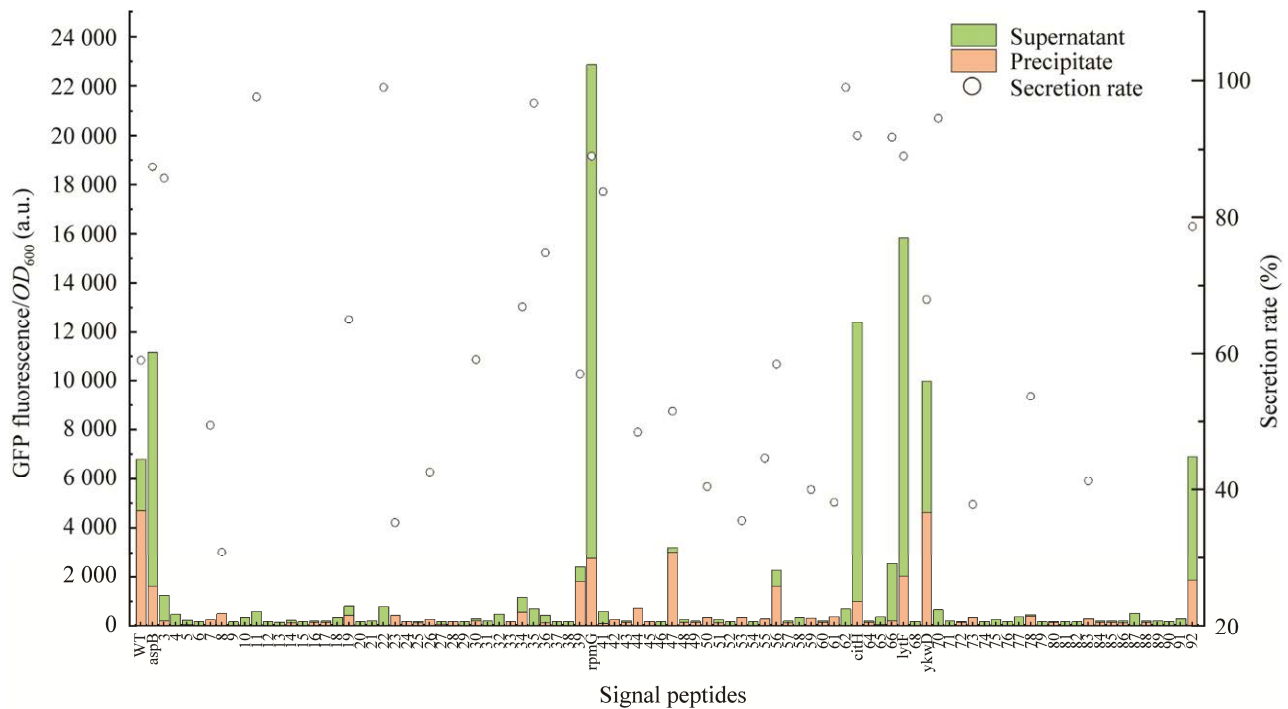


图3 含不同信号肽重组枯草芽孢杆菌 GFP 的表征

Figure 3 Characterization of recombinant *Bacillus subtilis* GFP containing different signal peptides. The ordinate secretion rate (%) is the GFP fluorescence in the supernatant/total GFP fluorescence. The fluorescence of LB medium for blank control was 300 a.u.; 3–39 were AmyX, LipB, LytC, PbpB, PhoA, PhrF, YbbR, YbbC, YbdN, YjfA, LytB, YlbL, WprA, NprE, YlxF, LytR, YwtD, LytR, XynA, AmyE, PbpX, YqxM, YwqC, YvbX, YpmB, YxaK, YwmB, YwfM, CotC, BglS, TyrA, YwmD, DacF, LytD, YbbE, GlpQ, TasA, respectively; 41–62 were YdjM, MotB, YlxW, YdbK, YnzA(TatAC), Pel, YobV, CccA, YoaW, MreC, YjcN, YocA, YlxY, YoqM, YhcR, YvgO, YxiT, YvpA, YpuD, YwjE, YwtF, Csn, respectively; 64–66 were YdjN, YhdC, PenP, respectively; 68 was YddT; 70–92 were WapA, SpoIIQ, Mpr, CwlD, YncM, YfkN, NprB, YbfO, YwqO, YngK, YhaK, YobB, YkvV, DltD, YvcE, YwoF, YusW, YrvJ, YqzG, YunB, YqzC, YqfZ, AbnA, respectively.

2.5 PulA 信号肽筛选载体的构建

以实验室保存的 pMA0911-*pulA* 质粒为模板使用引物对 *pulA-ccdB-Bbs* I-F/*pulA-ccdB-Bbs* I-R 进行 PCR 扩增骨架片段, 使用本实验室的质粒 pBAC9987^[22] 为模板, 用引物对 *ccdB-Bbs* I-F/*ccdB-Bbs* I-R 进行 PCR 扩增 *ccdB* 基因片段, 同源重组连接产物转化大肠杆菌 DB3.1 感受态细胞, 以 Amp 抗性筛选阳性克隆, 用限制性内切酶 *Bam*H I 进行酶切鉴定, 电泳结果显示重组质粒

pMA0911-*ccdB-pulA* 酶切的片段大小正确(图 7)。

2.6 高通量构建 PulA 表达分泌菌株

以枯草芽孢杆菌 168 基因组为模板分别使用不同的引物对 PCR 扩增, 获得 173 条信号肽片段。与高通量构建 GFP 分泌载体不同的是, Golden Gate 的酶切位点不同, 其余构建步骤一致。经单克隆测序验证, 成功构建 158 个重组菌株, 高通量振荡摇床培养后使用 KingFisher Flex 磁珠纯化仪提取 DNA 质粒, 使用 Biomek i7 自

动化工作站添加 *B. subtilis* SCK6 感受态至 2 μg 质粒中，高通量振荡摇床 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h，QPix

420 高通量微生物自动克隆筛选系统涂板，最终获得 74 株正确的重组菌株(图 2)。

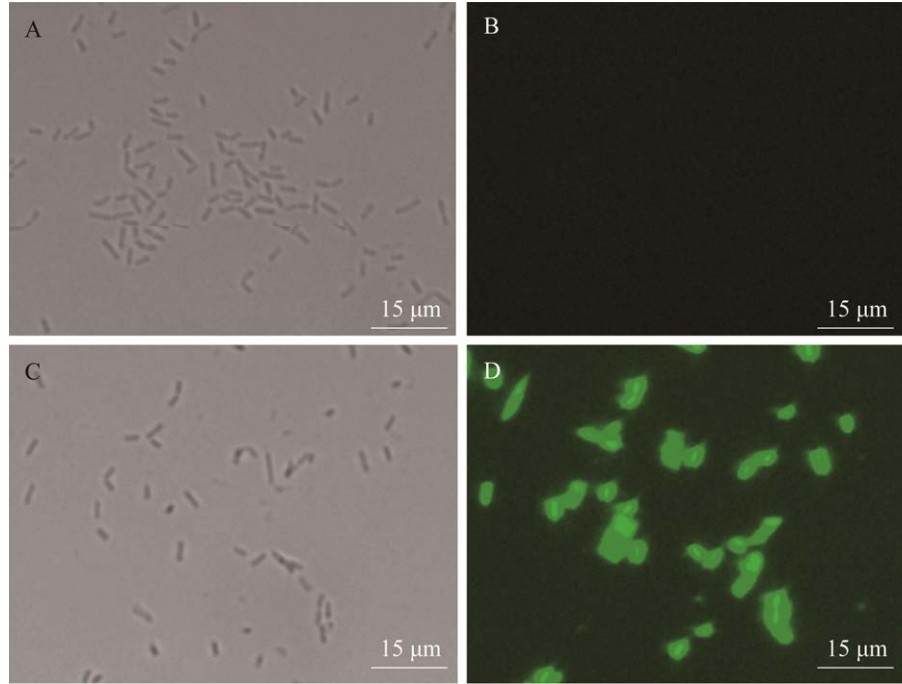


图 4 荧光显微镜观察不同菌株表达 GFP 的荧光

Figure 4 Fluorescent images of *Bacillus subtilis* SCK6 (A and B) and *Bacillus subtilis* SCK6/pHP13- P_{gapDH} - SP_{rpmG} - gfp (C and D). A and C: Bright field images. B and D: Fluorescence images. Cells were excited at 488 nm.

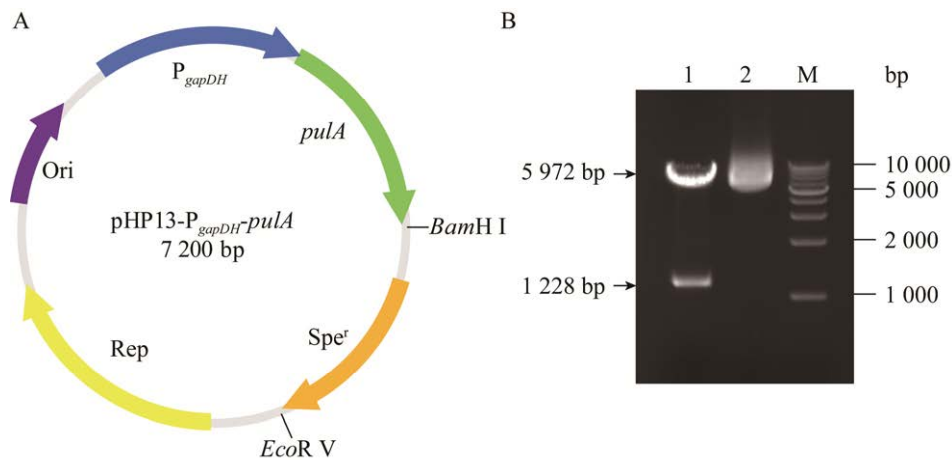


图 5 pHP13- P_{gapDH} - $pulA$ 质粒谱图及酶切验证图

Figure 5 Plasmid construction and confirmation for pHP13- P_{gapDH} - $pulA$. A: Map of pHP13- P_{gapDH} - $pulA$. B: Confirmation of pHP13- P_{gapDH} - $pulA$. Lane M: DNA Molecular Weight Marker; Lane 1: pHP13- P_{gapDH} - $pulA$ /EcoR V+BamH I; Lane 2: pHP13- P_{gapDH} - $pulA$ isolated from *E. coli* DH5 α /pHP13- P_{gapDH} - $pulA$.

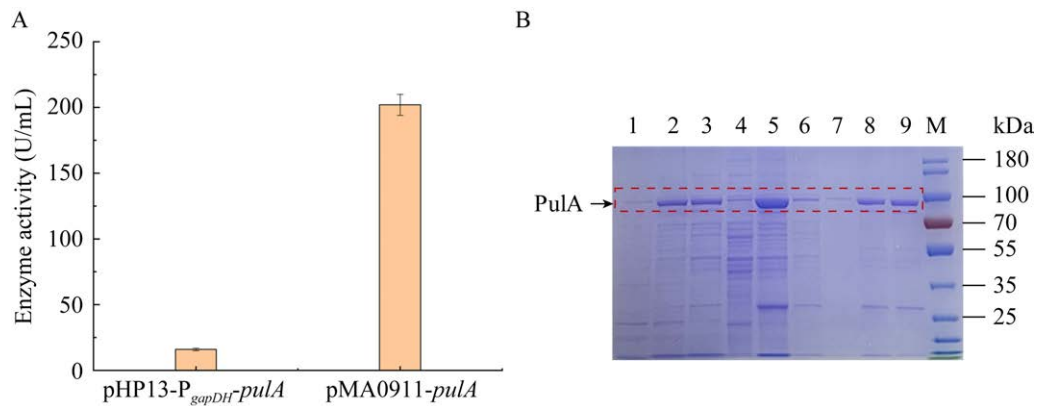


图 6 不同表达载体表达 *PulA* 酶活测定及 SDS-PAGE 分析

Figure 6 Enzyme activity and SDS-PAGE analysis of *PulA* expressed of different expression vectors. A: Enzyme activity of *PulA* expressed by different expression vectors. B: SDS-PAGE analysis. Lane M: Protein Molecular Weight Marker; Lane 1, 4, and 7 are the supernatant, intracellular, and inclusion bodies of pHP13-*P_{gapDH}-pulA* by shake flask fermentation, respectively; Lane 2, 5, and 8 are the supernatant, intracellular, and inclusion bodies of pMA0911-*pulA* by shake flask fermentation, respectively; Lane 3, 6, and 9 are the supernatant, intracellular, and inclusion bodies after fermentation of pMA0911-*pulA* in 96 well plates, respectively.

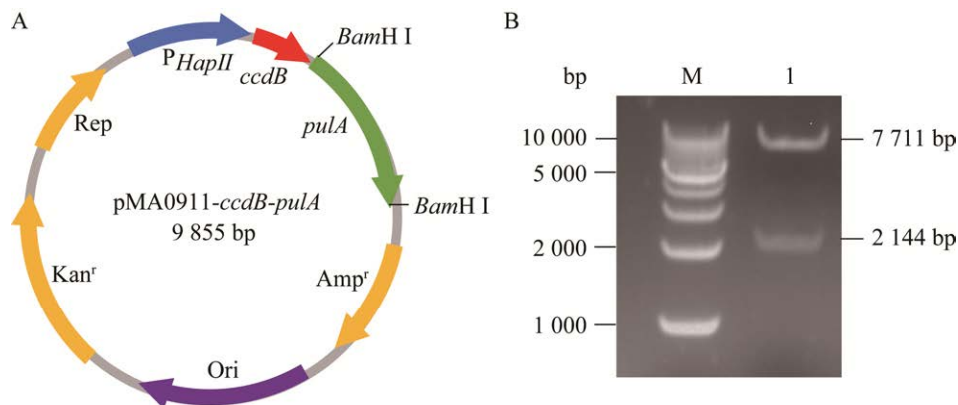


图 7 pMA0911-*ccdB-pulA* 质粒谱图及酶切验证图

Figure 7 Plasmid construction and confirmation for pMA0911-*ccdB-pulA*. A: Map of pMA0911-*ccdB-pulA*. B: Confirmation of pMA0911-*ccdB-pulA*. Lane M: DNA Molecular Weight Marker; Lane 1: pMA0911-*ccdB-pulA*/BamH I.

2.7 重组枯草芽孢杆菌中 *PulA* 活性测定

74 株重组枯草芽孢杆菌发酵 48 h 后检测酶活, 结果显示含有不同信号肽重组菌株 *PulA* 酶活差异显著。含 *SP_{glpQ}*、*SP_{ywmC}*、*SP_{yrad}* 和 *SP_{pelB}* 等 41 个信号肽的重组菌株几乎检测不到普鲁兰酶酶活, 说明这些信号肽与普鲁兰酶的适配性很低。含 *SP_{rpmG}*、*SP_{aspB}*、*SP_{ylaE}*、*SP_{lytF}*、*SP_{ylxW}* 和 *SP_{yymB}* 等 33 个信号肽有一定的引导普鲁兰酶细胞外分泌的能力。其中 *SP_{rpmG}* 和 *SP_{aspB}* 为本次筛

选得到的最优信号肽, 重组菌株 SCK6/pMA0911-*SP_{rpmG}-pulA* 表达普鲁兰酶酶活为所有重组菌株中的最高水平, 可达 116 U/mL, 其表达普鲁兰酶的分泌率可达 45%, 与对照菌株 SCK6/pMA0911-*pulA* 相当。重组菌株 SCK6/pMA0911-*SP_{aspB}-pulA* 表达普鲁兰酶的分泌率达到 74%, 与对照菌株 SCK6/pMA0911-*pulA* 相比分泌率提高了 68%, 其总酶活为 84 U/mL, 细胞外酶活为 62 U/mL (图 8)。

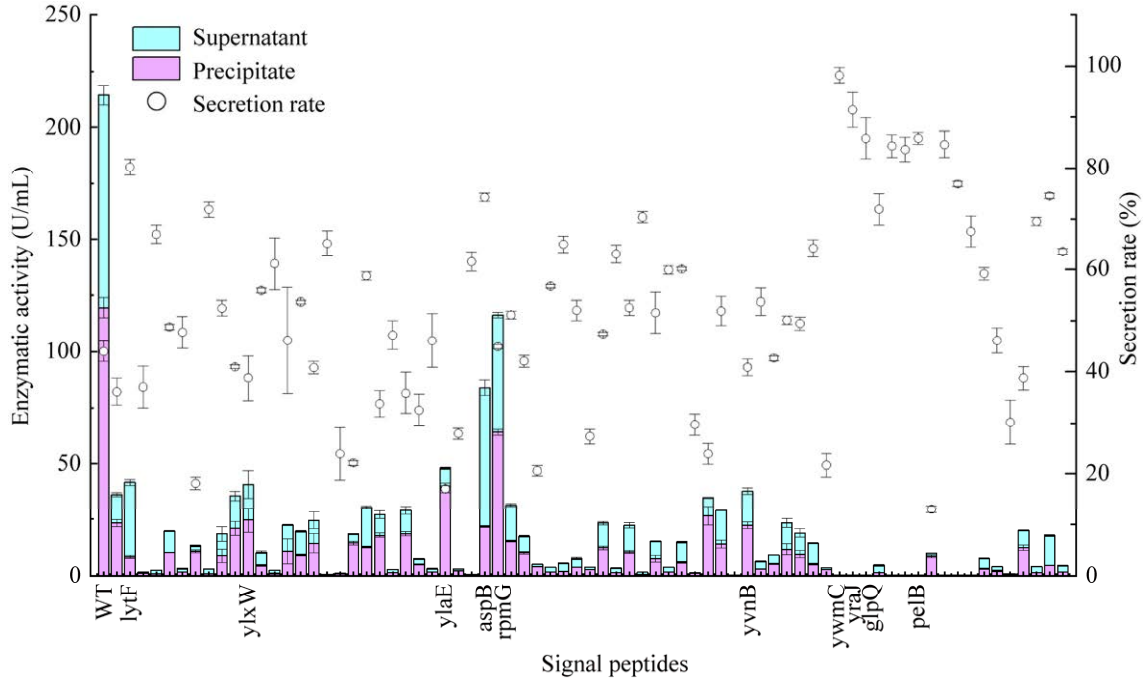


图 8 含不同信号肽重组枯草芽孢杆菌 *PulA* 的表征

Figure 8 Characterization of recombinant *Bacillus subtilis* *PulA* containing different signal peptides. Control is the SCK6/pMA0911-*pulA* recombinant strain; Error bars indicate the standard deviation of three biologically parallel samples.

3 讨论与结论

枯草芽孢杆菌是具有分泌表达外源蛋白的一类宿主。由于它具有遗传背景清晰、培养方法简单、蛋白分泌能力强和生物安全性等优点，成为工业酶表达的重要宿主之一。然而，目前除了少部分外源蛋白在枯草芽孢杆菌表达系统中实现了高效表达，大多数外源蛋白在枯草芽孢杆菌中的表达效果不理想。为了解决外源蛋白的表达分泌效果，获得更优性能的工业酶表达宿主，我们通过优化枯草芽孢杆菌中质粒构建和转化等使能技术，结合自动化实验装备，建立了枯草芽孢杆菌酶蛋白信号肽库的高通量自动化构建与筛选平台，高效筛选获得表达分泌增强的菌株以及与高表达分泌相关的元件工具，为提升枯草芽孢杆菌作为宿主底盘的表达分泌能力，解析它的

高表达分泌机制奠定基础。同时，建立自动化高通量筛选平台不仅加速了枯草芽孢杆菌中外源蛋白的信号肽筛选优化过程，提升酶蛋白制造的效率，也为其他高附加值酶蛋白的工业菌种改造提升和迭代提供新的思路。

本研究以 GFP 绿色荧光蛋白为报告蛋白，构建 91 株含不同信号肽的 GFP 重组菌株。通过测定重组枯草芽孢杆菌中 GFP 的荧光，筛选出 5 个具有较强引导 GFP 胞外分泌能力的信号肽 SP_{rpmG}、SP_{aspB}、SP_{citH}、SP_{lytF} 和 SP_{ykwD}。其中重组菌株 SCK6/pHP13-P_{gapDH}-SP_{rpmG}-*gfp* 引导 GFP 胞外分泌效果最佳，其细胞外分泌的 GFP 荧光与对照菌株相比提高了 236%。基于上述搭建的枯草芽孢杆菌中酶蛋白信号肽库的高通量自动化构建与筛选平台，我们进一步优化和筛选了枯草芽孢杆菌中针对普鲁兰酶分泌的信号肽，获得

74 株含不同信号肽的 *Pu1A* 重组菌株。测定重组菌株中普鲁兰酶的酶活, 获得了 2 个具有高效引导普鲁兰酶胞外分泌能力的信号肽 SP_{rpmG} 和 SP_{aspB} , 其中重组菌株 SCK6/pMA0911- SP_{rpmG} -*pula* 的普鲁兰酶的表达量与其他重组菌株相比最高, 胞外普鲁兰酶酶活为 52 U/mL, 总酶活可达 116 U/mL。重组菌株 SCK6/pMA0911- SP_{aspB} -*pula* 的普鲁兰酶分泌率可达到 74%, 与对照菌株 SCK6/pMA0911-*pula* 相比分泌率提高了 68%, 其胞外酶活为 62 U/mL, 总酶活为 84 U/mL。另外, 我们在研究过程中发现, 构建重组质粒时有的信号肽序列极易发生突变或缺失, 推测这与蛋白表达系统中所含有的强启动子有关; 同时发现有的含信号肽重组质粒转入枯草芽孢杆菌时转化效率低, 导致获得的重组菌株较少, 推测添加信号肽序列可能对重组菌株的生长产生影响。本实验仅研究了部分枯草芽孢杆菌信号肽引导外源蛋白胞外分泌的能力, 今后可以通过构建和筛选更多的含不同信号肽的重组菌株, 获得更加高效生产普鲁兰酶的枯草芽孢杆菌重组菌株。

另外, 通过对比不同外源蛋白 GFP 和 *Pu1A* 的信号肽库的筛选与优化结果, 发现信号肽 SP_{rpmG} 引导 GFP 和普鲁兰酶胞外分泌的能力都是最优的, 信号肽 SP_{aspB} 对 GFP 和普鲁兰酶都具有较强的引导胞外分泌的能力。可以通过进一步优化枯草芽孢杆菌中酶蛋白信号肽库的高通量自动化构建与筛选平台, 获得大量有关信号肽的分析数据, 采用生物信息学等方法, 对所获得的信号肽序列进行归纳分析, 探究信号肽与外源蛋白之间的匹配机制。

参考文献

- [1] SU Y, LIU C, FANG H, ZHANG DW. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 173.
- [2] TOLIBIA SEM, PACHECO AD, BALBUENA SYG, ROCHA J, LÓPEZ Y, LÓPEZ VE. Engineering of global transcription factors in *Bacillus*, a genetic tool for increasing product yields: a bioprocess overview[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 39(1): 12.
- [3] EJAZ S, KHAN H, SARWAR N, AQEEL SM, AL-ADEEB A, LIU S. A review on recent advancement in expression strategies used in *Bacillus subtilis*[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2022, 29(9): 733-743.
- [4] VOLK MJ, TRAN VG, TAN SI, MISHRA S, FATMA Z, BOOB A, LI HX, XUE P, MARTIN TA, ZHAO HM. Metabolic engineering: methodologies and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(9): 5521-5570.
- [5] STÜLKE J, GRÜPPEN A, BRAMKAMP M, PELZER S. *Bacillus subtilis*, a Swiss army knife in science and biotechnology[J]. *Journal of Bacteriology*, 2023, 205(5): e0010223.
- [6] LIU YF, LIU L, LI JH, DU GC, CHEN J. Synthetic biology toolbox and chassis development in *Bacillus subtilis*[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(5): 548-562.
- [7] 王杰, 王晨, 杜燕, 徐晶玉, 班睿. 枯草芽孢杆菌表达和分泌异源蛋白的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(8): 2815-2826.
WANG J, WANG C, DU Y, XU JY, BAN R. Advances in heterologous protein expression and secretion of *Bacillus subtilis*[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(8): 2815-2826 (in Chinese).
- [8] 吕雪芹, 武耀康, 林璐, 徐显皓, 于文文, 崔世修, 李江华, 堵国成, 刘龙. 枯草芽孢杆菌代谢工程改造的策略与工具[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(5): 1619-1636.
LÜ XQ, WU YK, LIN L, XU XH, YU WW, CUI SX, LI JH, DU GC, LIU L. Strategies and tools for metabolic engineering in *Bacillus subtilis*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(5): 1619-1636 (in Chinese).
- [9] 康倩, 向梦洁, 张大伟. 枯草芽孢杆菌在系统与合成生物技术中研究进展及工业应用[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 923-938.
KANG Q, XIANG MJ, ZHANG DW. Research progress and industrial application of *Bacillus subtilis* in systematic and synthetic biotechnology[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(3): 923-938 (in Chinese).

- [10] 徐善恒, 辛瑜, 刘建民, 石贵阳, 丁重阳, 顾正华, 李由然, 张梁. 优化 *Bacillus subtilis* 对异源 β -1,4-内切木聚糖酶分泌表达的研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(10): 3222-3234.
XU SH, XIN Y, LIU JM, SHI GY, DING CY, GU ZH, LI YR, ZHANG L. Optimization of secretion of heterologous endo- β -1,4-xylanase in *Bacillus subtilis*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(10): 3222-3234 (in Chinese).
- [11] GREEN ER, MECSAS J. Bacterial secretion systems: an overview[J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(1): 10.
- [12] PALMER T, BERKS BC. The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10: 483-496.
- [13] FREUDL R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems[J]. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 52.
- [14] WANG N, GUAN F, LV X, HAN D, ZHANG Y, WU N, XIA X, TIAN J. Enhancing secretion of polyethylene terephthalate hydrolase PETase in *Bacillus subtilis* WB600 mediated by the SPamy signal peptide[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2020, 71(3): 235-241.
- [15] FENG Y, LIU S, JIAO Y, WANG YL, WANG M, DU GC. Gene cloning and expression of the L-asparaginase from *Bacillus cereus* BDRD-ST26 in *Bacillus subtilis* WB600[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 127(4): 418-424.
- [16] FU G, LIU JL, LI JS, ZHU BW, ZHANG DW. Systematic screening of optimal signal peptides for secretory production of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(50): 13141-13151.
- [17] NIELSEN H, TSIRIGOS KD, BRUNAK S, von HEIJNE G. A brief history of protein sorting prediction[J]. *The Protein Journal*, 2019, 38(3): 200-216.
- [18] OWJI H, NEZAFAT N, NEGAHDARIPOUR M, HAJIEBRAHIMI A, GHASEMI Y. A comprehensive review of signal peptides: structure, roles, and applications[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2018, 97(6): 422-441.
- [19] 李川敏, 张玮祎, 张献, 刘红星, 徐大庆. 谷氨酸棒杆菌信号肽探测载体的构建及强信号肽筛选[J]. 河北农业大学学报, 2021, 44(4): 69-75.
LI CM, ZHANG WY, ZHANG X, LIU HX, XU DQ. Construction of a signal peptide-probe vector and screening of strong signal peptides in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2021, 44(4): 69-75 (in Chinese).
- [20] 胡哲辉, 徐娟, 卞光凯. 自动化高通量技术在天然产物生物合成中的应用[J]. 合成生物学, 2023, 4(5): 932-946.
HU ZH, XU J, BIAN GK. Application of automated high-throughput technology in natural product biosynthesis[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(5): 932-946 (in Chinese).
- [21] LIU Y, ZHENG H, ZHAN GH, QIN W, TIAN L, LI WL. Establishment of an efficient transformation protocol and its application in marine-derived *Bacillus* strain[J]. *Science China Life Sciences*, 2014, 57(6): 627-635.
- [22] LIU Y, CHENG HJ, LI HN, ZHANG YZ, WANG M. A programmable CRISPR/Cas9 toolkit improves lycopene production in *Bacillus subtilis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89(6): e0023023.
- [23] MILLER GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426-428.
- [24] 甄杰, 胡政, 李树芳, 徐健勇, 宋诤. 一个新型耐热普鲁兰酶的结构与功能[J]. 生物工程学报, 2014, 30(1): 119-128.
ZHEN J, HU Z, LI SF, XU JY, SONG H. Structure and function of a novel thermostable pullulanase[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2014, 30(1): 119-128 (in Chinese).