介导纳豆激酶分泌表达的信号肽比较

何孝天，刘中美，崔文璟，周哲敏

（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）

摘要：以纳豆芽孢杆菌（*Bacillus natto*）的基因组为模板，PCR 分别扩增编码信号肽、前导肽、成熟肽的前纳豆激酶原基因序列（*pre-pro-nk*），编码前导肽、成熟肽的纳豆激酶原基因（*pro-nk*），构建了含有三种不同信号肽的纳豆激酶重组质粒 pMA0911-*wapA-pro-nk*、pMA0911-*yncM-pro-nk*、pMA0911-*pre-pro-nk* (m)。通过 3 种信号肽介导的纳豆激酶的分泌表达、酶活性质分析等实验结果表明，*wapA* 信号肽介导的纳豆激酶的分泌效率以及纤溶酶活性最高。对 *wapA* 信号肽介导的纳豆激酶表达产物进行了纯化，纯化倍数及回收率分别为 2.15 和 21.5%。酶学性质分析结果表明重组纳豆激酶的最适温度、最适 pH 分别为 50 ℃和 pH 8.0，纳豆激酶在温度低于 60 ℃及 pH 5.0~11.0 比较稳定。本研究为纳豆激酶的基因工程改造以及进一步提高纳豆激酶在枯草芽孢杆菌中的表达量奠定了一定的基础。

关键词：纳豆激酶；信号肽；表达；酶学性质；纳豆芽孢杆菌

文章篇号：1673-9078(2014)5-62-68

Comparison of Signal Peptides for Nattokinase Secretory Expression

HE Xiao-tian, LIU Zhong-mei, CUI Wen-jing, ZHOU Zhe-min

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The gene *pre-pro-nk* (encoding signal peptide, propeptide and mature peptide) and *pro-nk* (encoding propeptide and mature peptide) were amplified from *Bacillus natto* chromosome by PCR. Three recombinant vectors (pMA0911-*wapA-pro-nk*, pMA0911-*yncM-pro-nk*, pMA0911-*pre-pro-nk* (m)) with different signal peptides were constructed. Overexpression of nattokinase with those different signal peptides were achieved in *B. subtilis* expression system. The recombinant nattokinase with *wapA* signal peptide was expressed at the highest level, and exhibited the strongest fibrinolytic activity. The recombinant nattokinase was purified, and the purification factor and activity recovery of the nattokinase were 2.15 and 21.5%, respectively. The enzymatic property was analyzed. The optimal pH and temperature were 8.0 and 50 ℃, respectively. And the recombinant nattokinase was stable at pH of 5.0~11.0 and temperature of less than 60 ℃. This study could be useful for genetic reconstruction of nattokinase and improvement of expression level of nattokinase in *B. subtilis*.

Key words: nattokinase ; signal peptide; expression; enzymatic properties; *Bacillus natto*

纳豆激酶是由日本传统发酵食品纳豆在发酵过程中由纳豆杆菌分泌的一种可溶解血栓的蛋白质[1]，它不仅能直接作用于纤维蛋白，而且还可以激活体内的 t-PA，从而表现出很强的溶血栓作用[2]。近年来，国内外掀起了纳豆激酶的研究和开发热潮。在国际市场上，纳豆激酶产品的最大生产国家是日本，日本有多家企业推出含有纳豆激酶为主要成分的产品如日研纳豆胶囊、金之纳纳豆胶囊等；在国内有燕京纳豆胶囊等保健品。纳豆及纳豆激酶作为保健食品有着广阔的发展前景。

Nakamura[3]等首次报道了包括调控序列在内共 1473 bp 的 NK 全长基因序列，其中 1143 bp 阅读框架编码 29 个氨基酸的信号肽（pre），77 个氨基酸的前肽（pro）以及 275 个氨基酸的成熟肽（NK）。在翻译后的加工过程中切除N端的信号肽和前导肽而形成的成熟肽，由 275 个氨基酸组成，其相对分子质量（Mr）为 27.7 kDa，等电点为 8.6±0.3。2010 年 Yanagisawa[4]等对纳豆激酶的三维空间结构进行了解析。近年来纳豆激酶的研究热点主要集中在优化纳豆枯草杆菌发酵条件，以及利用基因工程方法构建纳豆激酶的高效表达载体、优化表达系统提高纳豆激酶表达水平，改进纳豆激酶纯化工艺等方面。2013 年 Nguyen 等[5]采用基因工程方法克隆了来源于 *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01 的纳豆激酶基因并在缺陷型菌株 WB800 中进行了高效表达；国内的刘北域、黄磊等通过构建基因工程菌的方法也成功实现了纳豆激酶在枯

收稿日期：2013-12-16

基金项目：新世纪优秀人才项目（NCET-10-0461）；教育部重大项目（311023）

作者简介：何孝天（1989-），男，硕士研究生，研究方向：发酵工程

通讯作者：周哲敏（1969-），男，教授，研究方向：生物酶学、发酵工程

草芽孢杆菌中的表达；明飞平等[6]采用单因素和正交实验确定了纳豆芽孢杆菌的最佳发酵培养基和发酵工艺条件获得了较高的生物量；谭颖嫦等[7]经过一步阳离子交换层析即获得了纯度较高的纳豆激酶纯化液并具有较高的纯化倍数和回收率。

枯草芽孢杆菌作为传统的工业生产菌，具有极强的蛋白质分泌能力，是研究蛋白质表达和分泌的良好系统。利用枯草芽孢杆菌信号肽引导外源蛋白质定位分泌到细胞特定区间，可提高外源蛋白质的可溶性，避免因包涵体复性带来的产物纯化等困难[8]。然而，同一种蛋白质在不同信号肽的作用下，分泌效率往往相差甚远，有的甚至不能实现分泌。本实验构建了含有三种不同信号肽的大肠-枯草杆菌穿梭表达载体，实现了纳豆激酶在枯草芽孢杆菌 WB600 中的分泌表达并比较了三种信号肽对纳豆激酶表达的影响，同时对表达产物进行了酶学性质分析。本研究为纳豆激酶基因改造等工作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

纳豆芽孢杆菌（*Bacillus natto*）、枯草芽孢杆菌 WB600、*Escherichia coli* JM109、质粒载体 pUC18、pMA0911[9]均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂与仪器

Pfu DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等，购自日本宝生物工程（大连）有限公司；基因组 DNA 提取试剂盒，购自 BBI 公司；质粒 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒，购自上海生物工程公司；凝血酶、牛纤维蛋白原、巴比妥钠，购自 Sigma 公司；其它试剂均为国产或进口分析纯。AKTAXPRESS 蛋白纯化系统，通用电气（中国）医疗器械集团；HiTrap SP HP (1 mL)，通用电气（中国）医疗器械集团；UV1100 紫外-可见分光光度计，上海美谱达仪器有限公司。

1.1.3 培养基

枯草芽孢杆菌表达培养基成分为：蛋白胨 12 g/L、酵母粉 24 g/L、甘油 4 mL/L、KH_2PO_4 2.3 g/L、$K_2HPO_4{\cdot}3H_2O$ 16.4 g/L、$CaCl_2$ 0.2 g/L。

1.2 方法

1.2.1 纳豆芽孢杆菌全基因组 DNA 的提取

将枯草芽孢杆菌在培养基中进行数次活化后接入摇瓶，37 ℃振荡培养 12 h，取适量菌液离心收集菌体后加溶菌酶 37 ℃水浴半小时，按照基因组 DNA 提取试剂盒 EZ-10 spin Column Genomic DNA Isolation Kit 说明书所示方法提取基因组 DNA。

1.2.2 pMA0911-*wapA-pro-nk* 、pMA0911-*yncM-pro-nk* 表达载体的构建

根据 Genbank 所提供的纳豆激酶基因序列（Genbank 登录号：S51909）设计引物（表 1）以纳豆芽孢杆菌（*Bacillus natto*）的基因组 DNA 为模板扩增 *pro-nk* 基因。将 PCR 扩增到的 *pro-nk* 基因产物用 *EcoR* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切后连接到用同样限制性内切酶酶切的大肠-枯草杆菌穿梭质粒 pMA0911-*wapA*、pMA0911-*yncM* 上并转化大肠杆菌 JM109 获得重组质粒 pMA0911-*wapA-pro-nk*、pMA0911-*yncM-pro-nk*。以上所有质粒均经过测序验证。

1.2.3 pMA0911-*pre-pro-nk (m)*表达载体的构建

根据 Genbank 所提供的纳豆激酶基因序列（Genbank 登录号：S51909）设计引物（表 1）以纳豆芽孢杆菌（*Bacillus natto*）的基因组 DNA 为模板扩增 *pre-pro-nk* 基因。将 PCR 扩增到的 *pre-pro-nk* 基因产物用 *EcoR* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切后连接到用同样限制性内切酶酶切的质粒载体 pUC18 上，得到重组质粒 pUC18-*pre-pro-nk*。

设计突变引物（表 1）以重组质粒 pUC18-*pre-pro-nk* 为模板全质粒扩增将纳豆激酶前肽基因（*pro*）中 *Nde* Ⅰ酶切位点替换为其同义密码子，将所获得 PCR 产物用 *Dpn* Ⅰ消化甲基化模版 pUC18-*pre-pro-nk* 后，转化入 *E. coli* JM109 中，得到基因中不含 *Nde* Ⅰ酶切位点的重组质粒 pUC18-*pre-pro-nk* (m)。以此为模板设计引物（表 1）扩增 *pre-pro-nk* (m)基因，将 PCR 扩增到的 *pre-pro-nk* (m)基因产物用 *Nde* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切后连接到用同样限制性内切酶酶切的大肠-枯草杆菌穿梭质粒 pMA0911 并转化大肠杆菌 JM109 获得重组质粒 pMA0911-*pre-pro-nk* (m)，以上所有质粒均经过测序验证。

1.2.4 重组质粒在枯草杆菌表达系统中的表达

将测序正确的重组质粒转化枯草芽孢杆菌 WB600，获得纳豆激酶表达型重组枯草芽孢杆菌 WB600/pMA0911-*wapA-pro-nk*、WB600/pMA0911-*yncM-pro-nk*、WB600/pMA0911-*pre-pro-nk* (m)。分别挑取平板单菌落，接种于 5 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的表达培养基中，37 ℃、200 r/min 振荡过夜培养。将 0.5 mL 上述过夜培养物接种于 50 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的表达培养基中，37 ℃、200 r/min 振荡培养，每隔 12 h 取样用于酶活测定。收集发酵表达 48 h 的培养液

进行 SDS-PAGE 及纤溶活性分析。

表 1 PCR 扩增引物序列

Tabel 1 Sequence of PCR amplification primers

Name	Sequence
pro-nk	Forward:5'-CGGAATTCGCCGGAAAAAGCAGTACAG-3' *EcoR* Ⅰ site Reverse:5'-CGGGATCCTTATTGTGCAGCTGCTTGTACGTTGATTAA -3' *BamH* Ⅰ site
pre-pro-nk	Forward:5'-CGGAATTCGTGAGAAGCA AAAAATTGTGG-3' *EcoR* Ⅰ site Reverse:5'-CGGGATCCTTATTGTGCAGCTGCTTGTACGTTGATTAA -3' *BamH* Ⅰ site
pre-pro-nk (m)	Forward:5'-CGCATATGGTGAGAAGCA AAAAATTGTGG-3' *Nde* Ⅰ site Reverse:5'-CGGGATCCTTATTGTGCAGCTGCTTGTACGTTGATTAA -3' *BamH* Ⅰ site
pUC18-*pre-pro-nk* (m)	Forward:5'-GAAAAAAGATCCGAGCGTTGCGTACGTGGAAGAAGATC -3' Reverse:5'-CATGTGCAAT ATGATCTTCT TCCACGTACGCAACGCTCGG ATC-3'

注：限制性酶切位点及突变位点为下划线部分。

1.2.5 重组蛋白的纯化

挑取 WB600/pMA0911-*wapA-pro-nk* 平板单菌落，接种于 5 mL 含 100 μg/mL 卡那霉素的表达培养基中，37 ℃、200 r/min 振荡过夜培养。将 1 mL 上述过夜培养物接种于 100 mL 含 100 μg/mL 卡那霉素的表达培养基中，37 ℃、200 r/min 振荡培养至 48 h 左右，8000 r/min 离心后留取上清进行硫酸铵盐析，收集硫酸铵饱和度 40~60%下的蛋白沉淀于 Buffer A（20 mM 磷酸盐缓冲液；pH 6.0）过夜透析,经过阳离子交换层析柱 HiTrap SP HP 纯化目的蛋白，采用 Buffer B（含有 1 M NaCl 的 20 mM 磷酸盐缓冲液；pH 6.0）进行线性洗脱。按峰来收集样品，将收集的样品用 SDS-PAGE 分析鉴定。

1.2.6 蛋白浓度的测定

蛋白质定量采用常规的 Bradford 法，采用牛血清蛋白为标准蛋白。

1.2.7 重组纳豆激酶的活性测定

纤维蛋白平板的制备参照文献[10]，分别取 pMA0911（空白对照）、pMA0911-*wapA-pro-nk*、pMA0911-*yncM-pro-nk*、pMA0911-*pre-pro-nk* (m)在枯草芽孢杆菌中的表达产物于纤维蛋白平板点样检测活性，每孔点样 20 μL, 37 ℃温育 5 h。紫外分光光度计法测定纳豆激酶活性按照日本纳豆激酶协会建立的方法（http://j-nattokinase.org/jnka_nk_english.html）并稍作改进。取 1.4 mL 50 mM Tris-HCl（pH 8.0）缓冲液与 0.4 mL 0.72%(*m/V*)的纤维蛋白原溶液混匀后 37 ℃放置 5 min，向上述溶液中加入 0.1 mL 凝血酶溶液（20 U/mL）充分混匀，37 ℃放置 10 min。再向上述反应体系中加入 0.1 mL 稀释的酶液充分混匀，于 37 ℃水浴中保温反应，分别在反应开始后的 20 min 和 40 min 时，分别混匀 10 s，在准确计时 60 min 后加入 2 mL 0.2 M 的三氯乙酸（TCA）终止反应并在 37 ℃水浴中再保温 20 min。上述反应液于 15000 r/min 下离心 10 min。测定离心上清液在 275 nm 处的吸光值。一个酶活力单位（FU）定义为在 37 ℃，pH 8.0 的条件下，每分钟在 275 nm 处吸光值变化 0.01 所需的酶量。

1.2.8 纳豆激酶的酶学性质研究

最适温度的测定：采用紫外分光光度计法测定纳豆激酶在 20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃下的酶活，并以纳豆激酶相对酶活的百分比对温度作图。

最适 pH 值的测定：采用紫外分光光度计法测定纳豆激酶在各个不同 pH 值缓冲液条件下的活性，并以纳豆激酶相对酶活的百分比对 pH 值作图。pH 3.0~pH 5.0 采用的缓冲溶液为 20 mM 柠檬酸缓冲液，pH 6.0~pH 8.0 采用的缓冲溶液为 20 mM 磷酸盐缓冲液，pH 9.0~pH 11.0 采用的缓冲溶液为 20 mM Na_2CO_3-$NaHCO_3$ 缓冲液。

热稳定性的测定：将纳豆激酶放置于 20 mM 磷酸盐缓冲液（pH 7.0）中，在一系列不同温度

（30~70 ℃）下孵育 30 min，采用紫外分光光度计法测定剩余的酶活并以相对酶活的百分比对温度作图。

pH 稳定性的测定：将纳豆激酶放置于一系列不同 pH 值的缓冲液（pH 3.0~pH 11.0）中，37 ℃下孵育 30 min，采用紫外分光光度计法测定剩余的酶活并以相对酶活的百分比对 pH 作图。

2 结果与分析

2.1 pMA0911-*wapA-pro-nk*、pMA0911-*yncM-pro-nk*、pMA0911-*pre-pro-nk (m)*表达载体的构建

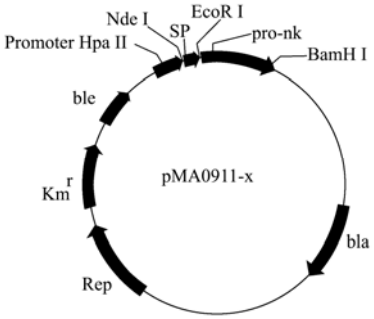


图 1 不同信号肽的枯草芽孢杆菌分泌表达质粒的构建

Fig.1 Construction of expression and secretion plasmids for *Bacillus subtilis* with different signal peptides

注: pMA0911-x 中的 x 分别代表 *wapA-pro-nk*，*pre-pro-nk*，*yncM-pro-nk*。

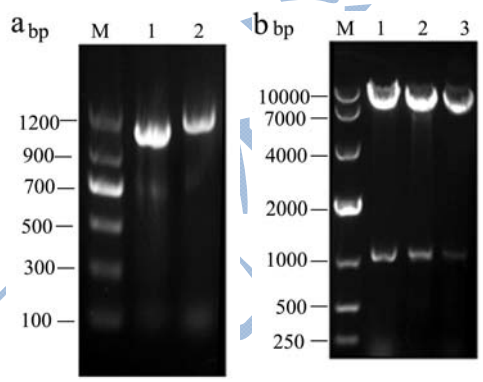


图 2 PCR 扩增产物和重组质粒酶切鉴定结果

Fig.2 PCR product of *pro-nk* , *pre-pro-nk* and identification of the recombinant plasmid by restriction enzyme digestion

注：a：M，DNA marker C；1，*pro-nk* 的 PCR 产物；2，*pre-pro-nk* 的 PCR 产物。b：M，DNA marker DL10000；1，质粒 pMA0911-*wapA-pro-nk* 酶切验证；2，质粒 pMA0911-*pre-pro-nk* (m)酶切验证；3，pMA0911-*yncM-pro-nk* (m)酶切验证。

重组质粒的物理图谱如图 1 所示。通过 PCR 方法，从纳豆芽孢杆菌基因组中扩增得到约 1100 bp 的 *pro-nk* 基因片段和约 1200 bp 的 *pre-pro-nk* 的基因片段，大小与预期的相符合（图 2a）。该基因经测序验证，确定为纳豆芽孢杆菌的 *pro-nk* 和 *pre-pro-nk* 基因。重组质粒 pMA0911-*wapA-pro-nk*、pMA0911-*yncM-pro-nk* 经 *EcoR* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切得到 1100 bp 左右的目的条带 *pro-nk*（如图 2b）。经测序验证不含有 *Nde* Ⅰ酶切位点的的 *pre-pro-nk* (m)基因与载体 pMA0911 连接构建的重组质粒 pMA0911-*pre-pro-nk* (m)经 *Nde* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切后得到约 1200 bp 的目的条带 *pre-pro-nk* (m)（如图 2b），表明外源基因已经成功连接到表达载体上。

2.2 pMA0911-*wapA-pro-nk*、pMA0911-*yncM-pro-nk*、pMA0911-*pre-pro-nk (m)*在枯草杆菌中的表达

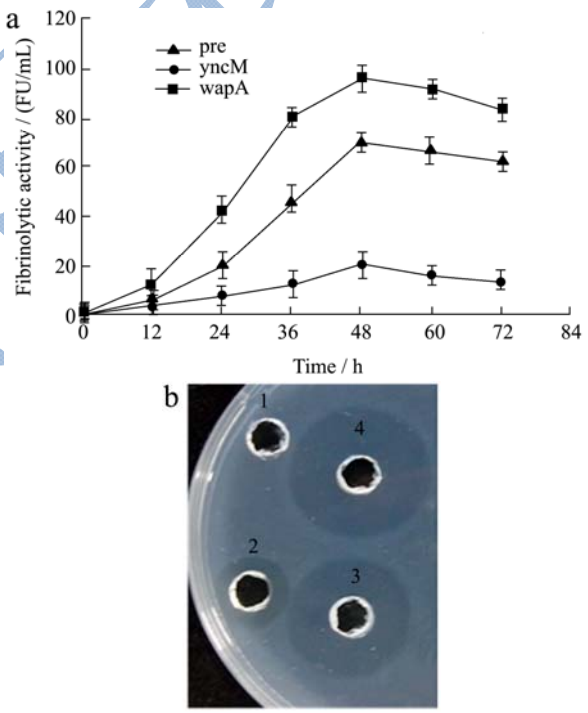


图 3 重组质粒表达产物的纤溶活性分析

Fig.3 Fibrinolytic activity of recombinant nattokinase

注：A：标记（▲），（●），（◆）依次代表重组菌株 WB600/pMA0911-*pre-pro-nk* (m)，WB600/pMA0911-*yncM-pro-nk*，WB600/pMA0911-*wapA-pro-nk* 发酵上清液的酶活曲线。B：1，WB600/pMA0911 空白对照；2，WB600/pMA0911-*yncM-pro-nk* 表达产物；3，WB600/pMA0911-*pre-pro-nk* (m)表达产物；4，WB600/pMA0911-*wapA-pro-nk* 表达产物。

通过测定不同时间下发酵上清液纳豆激酶的活性（图 3a），结果表明，在 *wapA*、*yncM*、*pre* 三种信号肽的引导下，纳豆激酶的分泌表达水平相差较大。发

酵培养 48 h 后，各重组菌发酵上清液纳豆激酶活性达到最高，其中在 *wapA* 信号肽引导下的纳豆激酶的纤溶活性明显高于其它两者。该实验结果与纤维蛋白平板检测酶活结果一致（图 3b）。以不含目的基因的空质粒的枯草芽孢杆菌为对照，SDS-PAGE 鉴定结果表明，重组菌株 WB600/pMA0911-*wapA-pro-nk*、WB600/pMA0911-*pre-pro-nk* (m)的培养上清液在 29 kD 下方有一表达条带（图 4），表达产物以分泌形式存在，*wapA* 信号肽引导的纳豆激酶的分泌表达量较高。上述结果表明，在三种纳豆激酶枯草表达体系中 *wapA* 信号肽的性质明显优于其它两种信号肽。

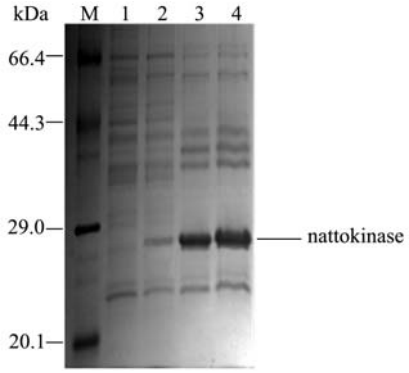


图 4 重组质粒表达产物的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE analysis of recombinant vectors expression products

注：M，蛋白质分子质量标准；1，WB600/pMA0911 的发酵上清；2，WB600/pMA0911-*yncM-pro-nk* 的发酵上清；3，WB600/pMA0911-*pre-pro-nk* (m) 的发酵上清；4，WB600/pMA0911-*wapA-pro-nk* 的发酵上清。

2.3 纳豆激酶的分离纯化

对由 pMA0911-*wapA-pro-nk* 重组质粒分泌表达的纳豆激酶经硫酸铵盐析和 HiTrap SP HP 纯化的 SDS-PAGE 电泳分析结果如图 5 所示，结果表明经过一步纯化获得了较纯的目的蛋白。各步的纯化效率如表 2 所示，结果显示纯化后的纳豆激酶比酶活达到 1052 FU/mg，纯化倍数为 2.15 倍，纯化回收率为 21.5%。

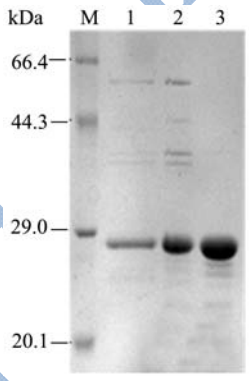


图 5 重组纳豆激酶纯化过程的 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE of purified recombinant nattokinase

注：M，蛋白质分子质量标准；1，发酵上清；2，经硫酸铵沉淀样品；3，经 HiTrap SP HP 柱子纯化样品。

表 2 纳豆激酶的纯化总表

Table 2 summary of purification of nattokinase from WB600/pMA0911-*wapA-pro-nk*

Purification step	Total activity/FU	Total protein/mg	Specific activity/(FU/mg)	Purification fold	Yield/ %
Culture supernatant	9300	19.0	489.47	1	100
$(NH_4)_2SO_4$ ppt	3650	6.60	553.03	1.13	39.25
HiTrap SP HP	2000	1.90	1052.63	2.15	21.51

2.4 重组纳豆激酶的酶学性质

2.4.1 纳豆激酶的最适温度

重组纳豆激酶在不同的温度下的酶活如图 6 所示。可见该酶的最适温度为 50 ℃。当温度大于 50 ℃，纳豆激酶的活力开始逐渐下降。

2.4.2 纳豆激酶的最适 pH

重组纳豆激酶酶在不同的 pH 条件下的酶活如图 7 所示，表明该酶的最适 pH 值为 8.0 左右。当 pH 为 4.0 时，纳豆激酶活性基本丧失。

2.4.3 纳豆激酶的热稳定性研究

重组纳豆激酶在不同温度下孵育 30 min 后其酶活百分比变化如图 8 所示。该酶在温度低于 60 ℃时比较稳定，温度高于 60 ℃，迅速失活。

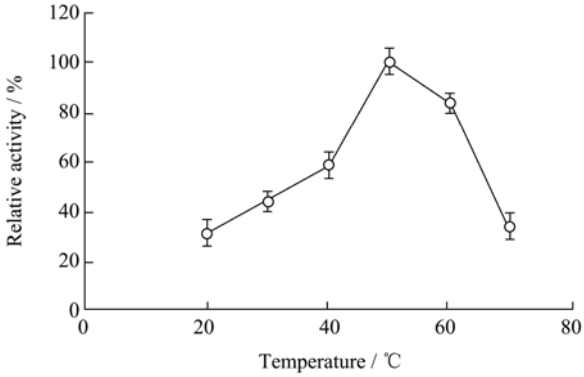


图 6 纳豆激酶酶的最适温度

Fig.6 Effect of temperature on the purified nattokinase

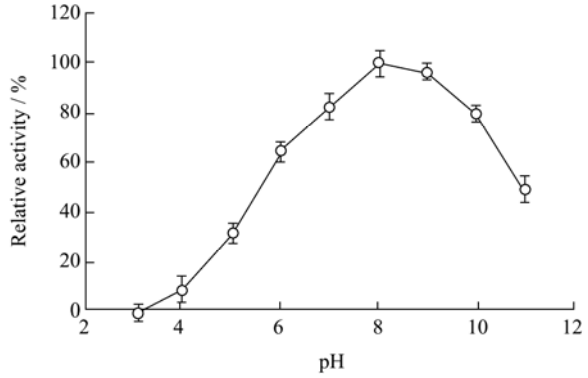


图 7 纳豆激酶的最适 pH

Fig.7 Effect of pH on the purified nattokinase

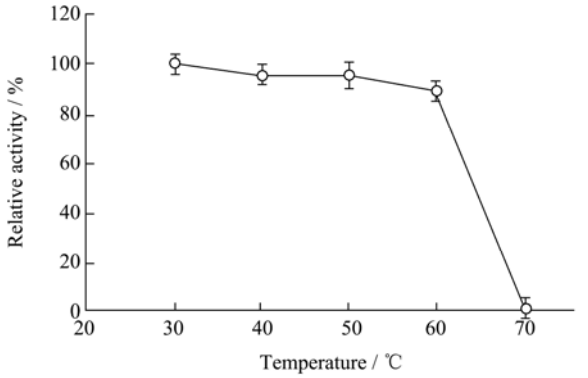


图 8 纳豆激酶的热稳定性

Fig.8 Effect of temperature on stability of the purified nattokinase

2.4.4 纳豆激酶的 pH 稳定性研究

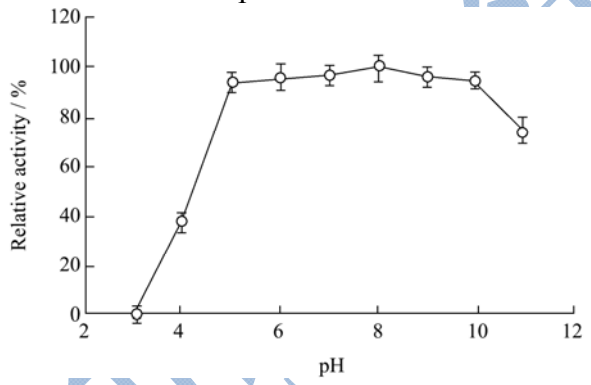


图 9 纳豆激酶的 pH 稳定性

Fig.9 Effect of pH on stability of the purified nattokinase

重组纳豆激酶在不同 pH 值缓冲液条件下，孵育 30 min 后其酶活百分比变化如图 9 所示。该酶在 pH5.0~11.0 时比较稳定，在 pH 低于 5.0 时迅速失活。

3 讨论

本研究成功建构了含有三种不同信号肽的纳豆激酶重组质粒 pMA0911-*wapA-pro-nk*、pMA0911-*yncM-pro-nk*、pMA0911-*pre-pro-nk* (m)，实现了纳豆激酶在枯草芽孢杆菌中的分泌表达。表达产物为 28 kD 左右（图 4），与成熟肽大小一致，表明纳豆激酶前导肽在枯草芽孢杆菌中表达后通过自身加工切除 *pro* 序列而形成有活性的纳豆激酶。黄磊等[11]报道在枯草芽孢杆菌中表达不含有 *pro* 序列的纳豆激酶成熟肽基因，表达产物仍为纳豆激酶且具有纤溶活性，而我们在大肠杆菌中表达只编码纳豆激酶成熟肽基因，表达产物形成无活性的包涵体（数据未列出），表明 *pro* 序列对于纳豆激酶在枯草芽孢杆菌中的表达可能不必要，但是对于在大肠杆菌中实现活性表达是必须的。本研究选用的质粒 pMA0911 是 pMA5 的衍生质粒，含有组成型的强启动子 PHpa Ⅱ，具有较高的启动强度，拷贝数较高，为 30~50，有利于目的蛋白的大量表达。本研究中纳豆激酶的表达量约为 190 mg/L，接近于 Chen 等[12]报道的经优化后的纳豆激酶表达量（260 mg/L），相信通过发酵条件优化等方式表达量可以得到进一步提高。本研究比较了三种不同信号肽对纳豆激酶分泌表达的影响，由实验结果可以看出 *wapA* 信号肽引导纳豆激酶分泌表达效率最高，并且具有较高纤溶活性。根据 Wang 等[13]研究报道，增加信号肽 N 端的正电荷数有利于提高信号肽的加工效率，而 *wapA* 信号肽与其它两种信号肽相比 N-端含有较多的正电荷，据此推测 *wapA* 信号肽引导纳豆激酶的分泌表达水平较高可能与其 N-端含有较多的正电荷有一定关系。本研究又对表达产物进行了纯化及酶学性质的分析，由实验结果可以得出由纳豆激酶的最适 pH 和最适温度分别为 pH 8.0、50 ℃，与 Yin 等[14]的研究接近。重组纳豆激酶在温度低于 60 ℃和 pH 5.0~11.0 较为稳定，与 Yin 等[14]报道纳豆激酶在 10~40 ℃和 pH 5.0~11.0 条件下比较稳定的研究结果相比，酶学性质较为优越。本研究为纳豆激酶基因工程改造及进一步提高纳豆激酶在枯草芽孢杆菌中的表达水平大奠定了一定的基础。

参考文献

[1] Sumi H, Hamada H,Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soy-bean food in the Japanese diet [J]. Experimentia, 1987, 43(10): 1110-1111

[2] Fujita M S, Nomura K C, Hong K G, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan [J]. Biochem. Biophy. Res. Commun., 1993, 197(3): 1340-1347

[3] Nakamura T K, Yamagata Y H, Ichishima E J. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, aprN, of *Bacillus subtilis (natto)* [J]. Biosci. Biotech. Biochem., 1992, 56(11): 1869-1871

[4] Yanagisawa Y, Chatake T, Chiba-Kamoshida, et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction experiment of nattokinase from *Bacillus subtilis natto* [J]. Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun., 2010, 66(12): 1670-1673

[5] Nguyen T T, Quyen T D, Le H T. Cloning and enhancing production of a detergent-and organic-solvent-resistant nattokinase from Bacillus subtilis VTCC-DVN-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient Bacillus subtilis WB800 [J]. Microb. Cell Fact, 2013, 12: 79

[6] 明飞平,赵培静,廖春芳,等.纳豆芽孢杆菌液体发酵条件优化研究[J].现代食品科技,2009,25(6):625-629
MING Fei-ping, ZHAO Pei-jing, LIAO Chun Fang, et al. Optimization of liquid fermentation of *Bacillus natto* [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(6): 625-629

[7] 谭颖嫦,彭中键,夏枫耿,等.纳豆激酶分离纯化的工艺研究[J].现代食品科技, 2011,8(27):985-987
TAN Ying-chang, PENG Zhong-jie, XIA Feng-geng, et al. Separation and purification of nattokinase [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 8(27): 985-987

[8] 曾伶俐.不同信号肽对脂肪酶A在枯草芽孢杆菌中分泌表达的影响[D].无锡:江南大学,2009
ZENG Ling-li. Effects of different signal peptides on the secretion of lipase a in Bacillus subtilis [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009

[9] Gong Zifeng, Xia Yu. A signa peptide library for Bacillus subtilis and its application for secretion of a thermostable β-galactosidase [OL]. (2011) [2014]. http://www.paper. edu.cn/en_releasepaper/content/4453161

[10] Weng M, Zheng Z, Bao W, et al. Enhancement of oxidative stability of the subtilisin nattokinase by site-directed mutagenesis expressed in Escherichia coli [J]. Biochim. Biophys. Acta., 2009, 1794(11): 1566-72

[11] 黄磊,谢玉娟,李申,等.纳豆激酶基因的克隆及其在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的表达[J].食品科学,2007,28(5):199-202
HUANG Lei, XIE Yu-juan, LI Shen, et al. Molecular clone and expression of nattokinae gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. Food Science, 2007, 28(5): 199-202

[12] Chen P T, Y-P Chao. Enhanced production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* by the elimination of limiting factors [J]. Biotechnol. Lett., 2006, 28(19): 1595-1600

[13] Wang L, Miller A, Kendall D A. Signal peptide determinants of SecA binding and stimulation of ATPase activity [J]. Biol. Chem., 2000, 275(14): 10154-10159

[14] Yin L J, H H Lin, S T Jiang. Bioproperties of potent nattokinase from *Bacillus subtilis* YJ1 [J]. J. Agric. Food Chem., 2010, 58(9): 5737-5742

现代食品科技