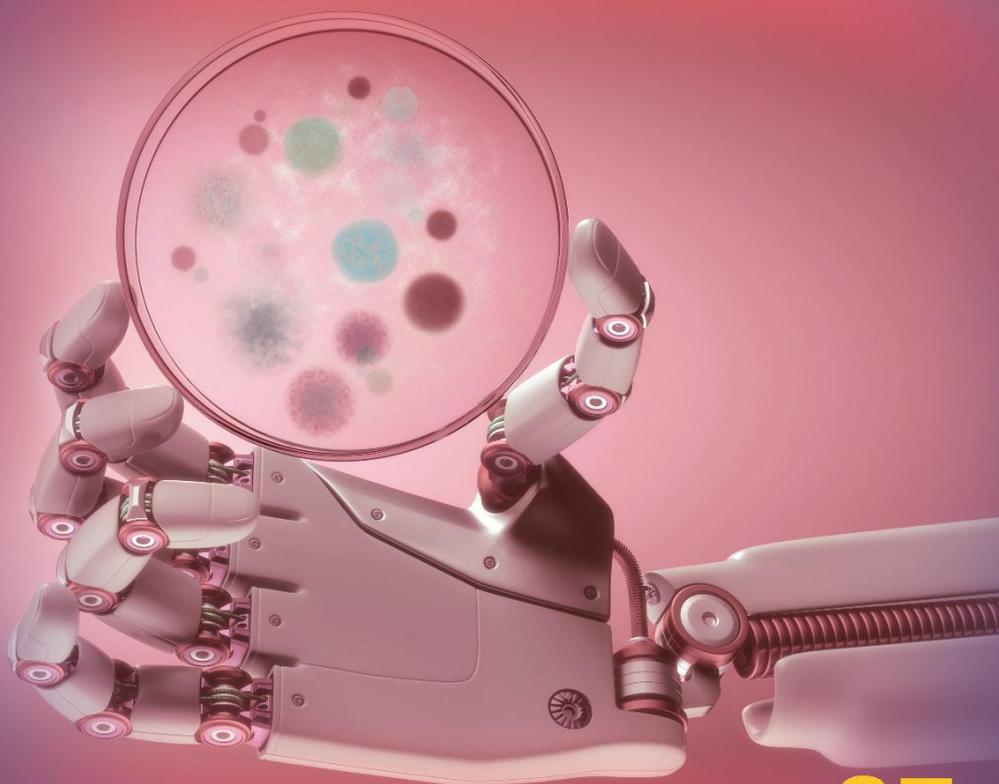


ISSN 1000-3061
CN 11-1998/Q
CODEN SGXUED

Chinese **生物工程学报** Journal of Biotechnology

主办 / 中国科学院微生物研究所 中国微生物学会 出版 / 科学出版社



05

2018 VOL.34



中文核心期刊 中国科技核心期刊 CSCD核心期刊

生物工程学报

《生物工程学报》·1985年创刊
月刊·每月25日出版

主管 / 中国科学院
主办 / 中国科学院微生物研究所 中国微生物学会
主编 / 邓子新
执行主编 / 张先恩
主任 / 陈宏宇
编辑 / 中国科学院微生物研究所 期刊联合编辑部
地址 / 北京朝阳区北辰西路1号院3号
中国科学院微生物研究所B401
邮编 / 100101

编辑部 / 电话: 010-64807509
E-mail: cjb@im.ac.cn

广告部 / 电话: 010-64806142
E-mail: gg@im.ac.cn

发行部 / 电话: 010-64806142
E-mail: bjb@im.ac.cn

传真 / 010-64807327

网址 / <http://journals.im.ac.cn/cjbcn>

出版 / 科学出版社

印刷 / 北京科信印刷有限公司

总发行 / 中国邮政集团公司北京市报刊发行局

订购处 / 全国各地邮局

国外总发行 / 中国国际图书贸易集团有限公司

国外代号 / M5608

广告经营许可证 / 京朝工商广登字20170187号

邮发代号 / 82-13

每期定价 / 78.00元

ISSN 1000-3061

CN 11-1998/Q

版权声明

我联合编辑部编辑出版有《生物工程学报》、《微生物学报》、《菌物学报》和《微生物学通报》四种期刊,凡向本编辑部投稿,均视为同意在本编辑部网站及CNKI等全文数据库出版,所付稿酬包含网络出版稿酬。本刊文责自负,版权所有,未经许可,不得转载使用。

目次



Shengwu Gongcheng Xuebao

第34卷第5期(总第233期)

2018年5月25日

综述

631 高等植物叶绿体表达重组蛋白研究进展

林优红 程霞英 杨东风 梁宗锁 杨宗岐

644 基于经血源性子宫内膜干细胞的中枢神经系统疾病治疗的研究进展

刘蒙蒙 成欣然 李凯凯 许鸣锐 吴永继 王梦丽
张倩如 闫文勇 罗畅 赵善廷

653 Spt蛋白与酿酒酵母压力抗性研究进展

芦志龙 陆琦 陈英 吴仁智 黄俊 陈小玲 陈东
黄日波

664 寡核苷酸药物及寡核苷酸制备技术研究进展

汪小龙 咸静女 陈刚 彭海波

动物及兽医生物技术

676 应用体积排阻色谱法测定口蹄疫灭活疫苗中的146S抗原含量

徐嫻 邹兴启 李翠 朱元源 何天慈 杨延丽 林旋
宋艳民 郑金来 张松平 赵启祖

685 单核细胞增多性李斯特菌氨基肽酶Lmo1711体外表达及其酶活分析

何展 王航 韩笑 马天天 杭奕 俞慧飞 卫芳芳
孙静 杨永春 程昌勇 宋厚辉

关于本刊

《生物工程学报》是由中国科协批准，中国科学院主管，中国科学院微生物研究所和中国微生物学会共同主办的综合性的学术刊物，系中国自然科学核心期刊。主要报道我国生命科学领域科学和技术的新进展和新成果，刊登的内容包括：基因工程、细胞工程、组织工程、酶工程、蛋白质工程、发酵工程、生物制药、生物反应器、基因芯片等各个方面，涉及工业、农业和医学等诸多领域。刊载的文章有70%以上是获“863”、“973”、国家自然科学基金资助或属“十二五”攻关及省部级重大项目的研究论文。本刊已被美国化学文摘 CA、美国医学索引IM/MEDLINE、俄罗斯文摘AJ、日本科学技术社数据库JST、波兰的哥白尼索引IC、荷兰Elsevier公司的Scopus文摘、荷兰医学文摘EMBASE、美国的乌利希期刊指南(网络版)(Ulrichsweb)等国际著名检索机构收录；国内则被中国知网CNKI、中国生物学文摘、中国生物医学文献数据库、中国科学引文数据库、中国科技期刊光盘版等几乎所有重要的检索机构收录。

《生物工程学报》2000年荣获中国科学院优秀期刊二等奖，2003、2005、2008年荣获中国科协优秀论文奖，2008年荣获“中国精品科技期刊”称号，2012和2013连续两年被评为“中国国际影响力优秀学术期刊”，2012年荣获“中国百种杰出学术期刊”称号，2014年入选300种“第3届中国精品科技期刊”，为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊，2015年获得中国科协精品科技期刊学术质量提升项目资助，2015-2017连续3年均荣获中国科学院科学出版基金科技期刊排行榜三等奖。

本刊虽然已连续数年在国内生物工程类期刊中排名第一，但成为最受欢迎、最具学术影响力的期刊是我们的目标。为此，我们将积极关注生物工程领域的最新研究动态，努力吸引更多优秀稿件。期待《生物工程学报》在大家的帮助下取得更大的进步。

694 牛乳源金黄色葡萄球菌EsxA蛋白的表达及免疫原性分析

易鸳鸯 赵亚南 马鹏睿 李斌 苏艳

工业生物技术

703 细胞膜合成途径模块化调控与形态改造提高大肠杆菌 β -胡萝卜素的积累与产量

武陶 张柏林 毕昌昊

712 利用游离型表达质粒强化毕赤酵母表达木聚糖酶

潘阳 吴丹 吴敬

722 大肠杆菌通过甲羟戊酸途径合成紫苏醇

秦泽华 张汝兵 郁建平

医学与免疫生物技术

731 靶向HER2的CAR-T细胞构建与抗肿瘤活性的体外分析

李永强 姚崧源 李延胜 徐明恺 张惠文 张成刚

743 自制抗人磷脂酶A2受体抗体ELISA试剂盒的临床应用评价

黄莉敏 张大准 王艳 张巧 梁伟 张永顶 熊祖应

752 FOXG1在结直肠癌侵袭及转移中的作用及机制

吴海霞 钱程 刘春刚 向俊宇 叶迪 张振芳 张献全

761 骨髓间充质干细胞移植对急性脊髓损伤脱髓鞘病变的保护作用

苟杨 刘丹彦 刘金凤 孙鸿然

生物技术与方法

777 HPLC法检测蛇足石杉内生真菌胶胞炭疽发酵液中石杉碱甲和石杉碱乙的含量

胡莉琴 康信聪 沈鹏原 陈田 张家银 刘东波

785 SELEX法筛选宫颈癌前病变核酸适配子

李文慧 石大林 贾茹涵 杨静 张艳艳 陈卫 韩跃武

生物育种与工艺优化

794 高产吡咯喹啉醌扭脱甲基杆菌的高通量选育

李红月 曾伟主 周景文

803 高产3-羟基丁酮解淀粉芽孢杆菌的选育及发酵优化

王诗卉 罗秋玲 刘佳 刘立明 陈修来

Chinese Journal of Biotechnology

Monthly • Started in 1985

Administration / Chinese Academy of Sciences

Sponsored by / Institute of Microbiology,

Chinese Academy of Sciences;

Chinese Society for Microbiology

Editor-in-Chief / Zixin Deng

Executive Editor-in-Chief / Xian-En Zhang

Director / Hongyu Chen

Edited by / United Editorial Office of the Journals
in the Institute of Microbiology, Chinese Academy of
Sciences

Address / B401, Institute of Microbiology,

Chinese Academy of Sciences,

No. 1 Beichen West Road, Chaoyang District, Beijing

100101, China

Tel: +86-10-64807509

Fax: +86-10-64807327

E-mail: cjb@im.ac.cn

<http://journals.im.ac.cn/cjbcn> (Chinese)

<http://www.sciencedirect.com/science/>

journal/18722075 (English)

Published by / Science Press

Add: 16 Donghuangchenggen North Street,

Beijing 100717, China

Tel: +86-10-64034563

E-mail: journal@mail.sciencep.com

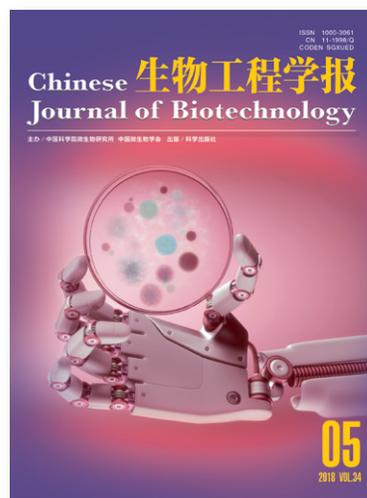
Printed by / Beijing Kexin Printing Co., LTD

Oversea distributed by / China International Book
Trading

Copyright

© 2018 by the Institute of Microbiology, the Chinese
Academy of Sciences and the Chinese Society
for Microbiology

CONTENTS



Shengwu Gongcheng Xuebao

Vol. 34 No. 5 May 2018
25 May 2018

Reviews

- 631** Advances in chloroplast expression of recombinant proteins in higher plants
Youhong Lin, Xiaying Cheng, Dongfeng Yang, Zongsuo Liang, and Zongqi Yang
- 644** Process in menstrual blood-derived mesenchymal stem cells for treatment of central nervous system diseases
Mengmeng Liu, Xinran Cheng, Kaikai Li, Mingrui Xu, Yongji Wu, Mengli Wang, Qianru Zhang, Wenyong Yan, Chang Luo, and Shanting Zhao
- 653** Advances in Spt proteins and stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae*
Zhilong Lu, Qi Lu, Ying Chen, Renzhi Wu, Jun Huang, Xiaoling Chen, Dong Chen, and Ribo Huang
- 664** Therapeutic oligonucleotides: a review
Xiaolong Wang, Jingnü Xian, Gang Chen, and Haibo Peng

Animal and Veterinary Biotechnology

- 676** Using size-exclusion chromatography to quantify the 146S antigen in inactivated foot-and-mouth disease vaccine
Yuan Xu, Xingqi Zou, Cui Li, Yuanyuan Zhu, Tianci He, Yanli Yang, Xuan Lin, Yanmin Song, Jinlai Zheng, Songping Zhang, and Qizu Zhao
- 685** Characterization of a recombinant aminopeptidase Lmo1711 from *Listeria monocytogenes*
Zhan He, Hang Wang, Xiao Han, Tiantian Ma, Yi Hang, Huifei Yu, Fangfang Wei, Jing Sun, Yongchun Yang, Changyong Cheng, and Houhui Song

About

Founded in 1985, Chinese Journal of Biotechnology is the official journal of the Institute of Microbiology, the Chinese Academy of Sciences and the Chinese Society for Microbiology. Chinese Journal of Biotechnology is an international, peer-reviewed journal that publishes original papers and reviews on all aspects of Biotechnology, such as genetic engineering, cell engineering, enzyme engineering, biochemical engineering, tissue engineering, biochips, bioinformatics, bioreactor, and so on. The journal is indexed/abstracted in various important citation resources such as Chemistry Abstracts, MEDLINE/PubMed, AJ of Viniti, JST, Scopus, Center for Agriculture and Bioscience International, EMBASE, Ulrichsweb, CNKI, Chinese Biological Digest, CBM, Chinese Scientific Quotation Database (Web amp; CD), Chinese Science and Technological Periodical (CD).

Aimed at promoting the scientific exchanges between China and other parts of the world, Chinese Journal of Biotechnology has cooperated with Elsevier to publish online English edition from 2006 to 2008 ([http:// www. sciencedirect.com/science/journal/18722075](http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722075)). The online English edition, launched on the ScienceDirect, provides original English papers and some translated articles selected from the corresponding issue of Chinese edition.

We welcome submissions from all over the world. Please feel free to contact us (Tel: +86-10-64807509; E-mail: cjb@im.ac.cn).

扫描二维码，关注
《生物工程学报》微信
公众号，获得最新投
稿信息及阅读体验。



- 694 Expression and immunogenicity analysis of EsxA protein of *Staphylococcus aureus* isolated from cow milk

Yuan yang Yi, Ya'nan Zhao, Pengrui Ma, Bin Li, and Yan Su

Industrial Biotechnology

- 703 Improving β -carotene production in *Escherichia coli* by modularized regulation of the membrane synthetic pathway and morphology engineering

Tao Wu, Bolin Zhang, and Changhao Bi

- 712 Improving the expression of recombinant xylanase in *Pichia pastoris* with episomal expression plasmid

Yang Pan, Dan Wu, and Jing Wu

- 722 Perillyl alcohol production by engineered heterologous mevalonate pathway in *Escherichia coli*

Zehua Qin, Rubing Zhang, and Jianping Yu

Medicine and Immune Biological Technology

- 731 Construction of HER2-specific CAR-T cells and *in vitro* analysis of their activity to suppress tumor cell growth

Yongqiang Li, Songyuan Yao, Yansheng Li, Mingkai Xu, Huiwen Zhang, and Chenggang Zhang

- 743 Clinical application of homemade ELISA kit for anti-human phospholipase A2 receptor antibody

Limin Huang, Dazhun Zhang, Yan Wang, Qiao Zhang, Wei Liang, Yongding Zhang, and Zuying Xiong

- 752 Role and mechanism of FOXG1 in invasion and metastasis of colorectal cancer

Haixia Wu, Cheng Qian, Chungang Liu, Junyu Xiang, Di Ye, Zhenfang Zhang, and Xianquan Zhang

- 761 Protective effect of transplantation of bone mesenchymal stem cells on demyelination in spinal cord injury

Yang Gou, Danyan Liu, Jinfeng Liu, and Hongran Sun

Methods in Biotechnology

- 777 Detection of Huperzine A and Huperzine B in fermentation broth of endophytic fungus *Colletotrichum gloesporioides* from *Huperzia serrate* by HPLC

Liqin Hu, Xincong Kang, Pengyuan Shen, Tian Chen, Jiayin Zhang, and Dongbo Liu

- 785 Selection of DNA aptamers to cervical intraepithelial neoplasia by SELEX

Wenhui Li, Dalin Shi, Ruhan Jia, Jing Yang, Yanyan Zhang, Wei Chen, and Yuewu Han

Biotechnological Breeding and Process Optimization

- 794 High-throughput screening of *Methylobacterium extorquens* for high production of pyrroloquinoline quinone

Hongyue Li, Weizhu Zeng, and Jingwen Zhou

- 803 Mutation and fermentation optimization of *Bacillus amyloliquefaciens* for acetoin production

Shihui Wang, Qiuling Luo, Jia Liu, Liming Liu, and Xiulai Chen



生物工程学报
Chinese Journal of Biotechnology
ISSN 1000-3061, CN 11-1998/Q

《生物工程学报》网络首发论文

题目: 单核细胞增多性李斯特菌氨基肽酶 Lmo1711 体外表达及其酶活分析
作者: 何展, 王航, 韩笑, 马天天, 杭奕, 俞慧飞, 卫芳芳, 孙静, 杨永春, 程昌勇, 宋厚辉
DOI: 10.13345/j.cjb.170468
收稿日期: 2017-11-28
网络首发日期: 2018-03-28
引用格式: 何展, 王航, 韩笑, 马天天, 杭奕, 俞慧飞, 卫芳芳, 孙静, 杨永春, 程昌勇, 宋厚辉. 单核细胞增多性李斯特菌氨基肽酶 Lmo1711 体外表达及其酶活分析. 生物工程学报. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.170468>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

单核细胞增多性李斯特菌氨基肽酶 Lmo1711 体外表达及其酶活分析

何展*, 王航, 韩笑, 马天天, 杭奕, 俞慧飞, 卫芳芳, 孙静, 杨永春, 程昌勇, 宋厚辉

浙江农林大学动物科技学院, 浙江 临安 311300

何展, 王航, 韩笑, 等. 单核细胞增多性李斯特菌氨基肽酶 Lmo1711 体外表达及其酶活分析. 生物工程学报, 2018, 34(8):

He Z, Wang H, Han X, et al. Characterization of a recombinant aminopeptidase Lmo1711 from *Listeria monocytogenes*. Chin J Biotech, 2018, 34(8):

摘要: 对单核细胞增多性李斯特菌 (简称单增李斯特菌) *lmo1711* 基因编码的氨基肽酶进行克隆表达与纯化, 并研究该重组蛋白的体外酶学特性。首先通过生物信息学分析预测 Lmo1711 与氨基肽酶家族成员的亲缘关系及关键活性位点的保守性, 利用 SWISS-MODEL 模拟预测该蛋白的空间结构; 构建 Lmo1711 原核表达载体并转化入 *E. coli* Rosetta 中, 诱导表达重组目的蛋白, 并利用镍离子亲和层析方法纯化目的蛋白; 以氨基酸-对硝基苯胺偶联物为底物, Lmo1711 通过水解底物 N 端氨基酸残基产生游离对硝基苯胺单体, 405 nm 处检测吸光值对该产物进行检测从而分析 Lmo1711 的酶学特性, 在此基础上系统研究 Lmo1711 对不同氨基酸残基底物的催化特异性及不同金属离子对该酶活性的影响。经原核表达纯化获得 49.3 kDa 的重组 Lmo1711 蛋白, 与预测分子量一致; 生物信息学分析推测 Lmo1711 属于 M29 氨基肽酶家族, 且存在保守关键氨基酸活性位点 (Glu250、Glu316、His345、Tyr352、His378、Asp380); 酶活分析显示, Lmo1711 具有较强的氨基肽酶活性, 针对不同底物的结合和催化能力差异较大, 对亮氨酸残基的亲合程度最高; Lmo1711 氨基肽酶活性具有金属离子依赖性, Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 等多种金属离子均能显著增强其活性, 其中 Co^{2+} 的激活效应最显著。本试验首次发现并证实, 单增李斯特菌 Lmo1711 属于 M29 氨基肽酶家族成员, 具有较强的催化活性, 且对金属离子具有不同程度的依赖性。

关键词: 单核细胞增多性李斯特菌, M29 家族氨基肽酶, 酶学特性, 金属离子

Received: November 28, 2017; **Accepted:** January 22, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31770040, 31470179, 31402215), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (No. LY17C180001), ZAFU Student Research and Training Program (No. 2013200010 and 2013200009).

Corresponding author: Cheng Changyong. Tel/Fax: +86-571-63741392; E-mail: lamge@zafu.edu.cn

Song Houhui. Tel/Fax: +86-571-63741392; E-mail: songhh@zafu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31402215, 31770040, 31470179), 浙江省自然科学基金 (No. LY17C180001), 浙江农林大学学生科研训练项目 (No. 2013200010 and 2013200009) 资助。

网络出版时间:

网络出版地址:

Characterization of a recombinant aminopeptidase Lmo1711 from *Listeria monocytogenes*

Zhan He*, Hang Wang, Xiao Han, Tiantian Ma, Yi Hang, Huifei Yu, Fangfang Wei, Jing Sun, Yongchun Yang, Changyong Cheng, Houhui Song

College of Animal Science and Technology, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China

Abstract: We aimed to obtain the recombinant aminopeptidase encoded by *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) gene lmo1711, and characterized the enzyme. First, the amino acid sequences of Lmo1711 from *L. monocytogenes* EGD-e and its homologues in other microbial species were aligned and the putative active sites were analyzed. The putative model of Lmo1711 was constructed through the SWISS-MODEL Workspace. Then, the plasmid pET30a-Lmo1711 was constructed and transformed into *E. coli* for expression of the recombinant Lmo1711. The his-tagged soluble protein was purified using the nickel-chelated affinity column chromatography. With the amino acid-*p*-nitroaniline as the substrate, Lmo1711 hydrolyzed the substrate to free *p*-nitroaniline monomers, whose absorbance measured at 405 nm reflected the aminopeptidase activity. The specificity of Lmo1711 to substrates was then examined by changing various substrates, and the effect of metal ions on the catalytic efficiency of this enzyme was further determined. Based on the bioinformatics data, Lmo1711 is a member of the M29 family aminopeptidases, containing a highly conserved catalytic motif (Glu-Glu-His-Tyr-His-Asp) with typical structure arrangements of the peptidase family. The recombinant Lmo1711 with a size of about 49.3 kDa exhibited aminopeptidase activity and had a selectivity to the substrates, with the highest degree of affinity for leucine-*p*-nitroaniline. Interestingly, the enzymatic activity of Lmo1711 can be activated by Cd^{2+} , Zn^{2+} , and is strongly stimulated by Co^{2+} . We here, for the first time demonstrate that *L. monocytogenes* lmo1711 encodes a cobalt-activated aminopeptidase of M29 family.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, M29 aminopeptidase, Enzymatic characteristic, Metal ion

单增李斯特菌是一种人畜共患的食源性胞内寄生菌。在欧美西方国家爆发李斯特菌病的概率很高,并且每次都引起高死亡率^[1]。单增李斯特菌病在免疫力低下,孕妇及胎儿中多发,主要症状表现为败血症、脑膜炎、单核细胞增多和胎儿流产等^[2-3]。单增李斯特菌的感染过程都需要毒力因子的参与,其中关键步骤包括:宿主细胞粘附和侵袭,细胞内增殖和运动以及细胞间传播^[4]。在单增李斯特菌中 PrfA 是毒力因子,可维持细菌胞内环境的稳态;内化素(InlA 和 InlBv)介导细菌对宿主细胞的黏附、内化;溶血素(LLO)和磷脂酰肌醇磷脂酶(PlcA)裂解吞噬体膜;磷脂酶(PlcA 和 PlcB)参与细菌的逃逸过程^[5-7]。

氨基肽酶作为一种水解酶,可能参与单增李斯特菌毒力因子修饰,进而与细菌感染过程存在某种关联。氨基肽酶是针对寡肽、多肽和蛋白质释放 N-末端氨基残基的酶,不仅能够完全降解蛋白质和多肽,使得组分氨基酸被重新利用;而且用于蛋白质翻译后加工,使得蛋白质在到达正确的空间位置或处于必需的生理发育环境前无法被激活^[8]。多数氨基肽酶属于金属蛋白酶,其基因中存在 H-E-X-X-H (His-Glu-X-X-His) 活性位点序列对于催化和配位金属离子是必需的。金属蛋白酶活性由一个或两个二价离子(通常是锌)介导,这些离子激活水分子以进行底物肽键的亲核攻击,进而起到降解、加工、抑制等作用^[9]。金属蛋白酶对机体也具有多样性的功能,例如基质金属蛋白酶(MMPs)是参与细胞外基质降解的

酶，其生物学功能不仅仅是蛋白水解功能，还包括诱导复合信号传导以及诱导独立于蛋白水解活性的癌细胞迁移等^[10-11]。

单增李斯特菌中 *lmo1603* 和 *lmo1711* 被注释为编码氨基肽酶的基因。此前本实验室已证实 *Lmo1603* 具有氨基肽酶的性质，但 *Lmo1711* 是否具有氨基肽酶活性尚未知晓。在本研究中表达并纯化得到高纯度 *Lmo1711* 蛋白，以氨基酸-对硝基苯胺作为底物鉴别出 *Lmo1711* 具有氨基肽酶的活性和对于底物的选择性；而加入不同金属离子产生的酶活性差异表明这些金属离子对 *Lmo1711* 活性增强效果不同。以上试验证实了 *Lmo1711* 属于氨基肽酶 M29 家族成员，具有高度的金属离子依赖性，为进一步探讨 *lmo1711* 在单增李斯特菌体内发挥的作用和功能奠定前期试验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒以及引物

本试验中所用到的菌株及质粒包括：单增李斯特菌参考菌株 EGD-e、大肠杆菌 DH5 α 和 Rosetta、重组蛋白原核表达载体 pET30a(+), 以上菌株和质粒均为本实验室保存。单增李斯特菌培养于 BHI (Brain Heart Infusion, BHI) 培养基，DH5 α 和 Rosetta 菌株培养于 LB 培养基中。本试验所涉及菌株的培养条件均为 37 °C (静置或振荡) 培养，试验涉及引物为：*lmo1711*-fwd: 5'-CGG GGTACCATGACAGTATTTAGTGAAAAGTTAG AAAAGTATGC-3'；*lmo1711*-rev: 5'-CGCGGATCC TTAGAACGCCAGTCGCCTTA-3'。

1.1.2 试剂

BHI 培养基购自 Oxiod 公司；LB 培养基购自上海生工生物工程有限公司；KOD plus Neo PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司；PCR 产物纯化和回收试剂盒购自上海莱枫生物科技有限公司；限制性核酸内切酶购自 NEB 公司；质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司；镍柱亲和层析柱购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司；氨基酸-对硝基苯胺均购自 Sigma-Aldrich 公司。本试验所用化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 Lmo1711 蛋白生物信息学分析

根据 Uniprot 网站预测，单增李斯特菌 *Lmo1711* 全长 410 aa，分子量 45 kDa，无信号肽，属于 M29.002 家族。而 MEROPS 网站分析，M29 家族氨基肽酶典型特征是钴离子依赖性，并且保守位点是 Glu-Glu-His-Tyr-His-Asp。利用 CLC Sequence Viewer 6 软件将单增李斯特菌的 *Lmo1711* 氨基酸序列同其他细菌氨基肽酶序列进行比较，分析关键氨基酸位点或区域，同时构建系统进化树；在 Swiss Model Workspace 中以肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae* PepS 为模板，对 *Lmo1711* 的空间结构进行模拟比对。

1.2.2 Lmo1711 重组原核蛋白表达质粒的构建

NCBI GenBank 数据库下载 *lmo1711* 基因序列 (NC_003210.1)，导入 Vector NTI 软件设计出针对 *lmo1711* 完整 ORF 引物，命名为 *lmo1711* fwd 和 *lmo1711* rev。*lmo1711* 与本实验室数据库中的

pET30a 模拟构建重组质粒。通过 PCR 对目的基因扩增,然后对载体和目的片段用 *Kpn* I 和 *Bam*HI 进行双酶切反应,酶切产物以 T4 DNA 连接酶过夜连接,最后将酶连产物热击转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。通过 PCR 筛选得到携带重组质粒(根据实验室命名规则,命名为 pSL350)的重组菌株,经测序验证正确后用于下一步的蛋白表达。

1.2.3 Lmo1711 重组蛋白的原核表达与纯化

将测序正确的重组表达质粒 pSL350 通过热击法转入大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞。取 5 mL Rosetta-pSL350 菌液转接至 500 ml LB (Kana),待 $OD_{600}=0.6-0.8$,加入 IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷,工作浓度 1 mmol/L) 低温诱导 12 h。离心收集菌体,50 mmol/L PBS 洗涤菌体 2 次后置于冰上超声破碎。超声破碎后离心取上清与 2.5 ml 镍柱 4 $^{\circ}$ C 翻转结合 6 h。用 30 mmol/L 至 300 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白并收集目标蛋白。收集到的目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析验证蛋白纯度与大小。目的蛋白浓度用 BCA 试剂盒进行测定。

1.2.4 Lmo1711 氨基肽酶活性分析

试剂准备:Lmo1711 蛋白 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4);100 mmol/L 氨基酸对硝基苯胺 aa-pNA,本试验中选用 3 种底物,分别是:Arg-pNA、Leu-pNA、Lys-pNA。将各反应成分混合后以 200 μ L 体积(Lmo1711 工作浓度 0.1 μ mol/L,aa-pNA 工作浓度 0.1-10 mmol/L)加入 96 孔板,震荡混匀后,立即放入酶标仪进行检测,游离的对硝基苯胺吸收峰值为 405 nm。反应温度 37 $^{\circ}$ C,

间隔时间 1 h,连续读数 12 h。

1.2.5 Lmo1711 氨基肽酶活性的金属离子依赖性分析

为了验证 Lmo1711 是否具有金属依赖性。本试验中选取 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 等氨基肽酶常见辅助金属离子,以相同工作浓度(0.5 mmol/L)加入反应体系,底物为 Leu-pNA,测定产物浓度。反应温度 37 $^{\circ}$ C,间隔时间 5 min,连续读数 60 min。

2 结果

2.1 单增李斯特菌 Lmo1711 属于氨基肽酶 M29 家族

单增李斯特菌 M29 家族的代表性成员有:氨基肽酶 T(AmpT)、氨基肽酶 II(AmpII)、PepS 氨基肽酶、氨基肽酶 S(AmpS),它们分别属于 001、002、004 和 005 亚族,其中 Lmo1603 就属于 AmpT。通过氨基酸序列比对,推测 Lmo1711 保守活性位点是 Glu250、Glu316、His345、Tyr352、His378、Asp380,如图 1A。进化树分析发现,Lmo1711 与之前报道的 AmpT Lmo1603 亲缘关系较远,而与来自嗜热菌中的氨基肽酶 II(AmpII M29.002) 进化关系最近,与 UniProt 网站预测结果一致(图 1B)。以 PepS (PDB:4ICQ) 为模板利用 SWISS-MODEL Workspace 对 Lmo1711 蛋白三级结构进行模拟发现两者的空间折叠结构高度相似,即 Lmo1711 的催化结构域亦是二聚体的非对称结构。此外,Lmo1711 与同属于 M29 家族的 AmpS (PDB:1ZJC)、AmpT (PDB:2AYI)、AmpII 等结构非常类似,所有保守活动区域均处于该结构域中(图 2)。根据以上生物信息学分析,推测单增李斯特菌 lmo1711 基因编码的蛋白质与 M29

家族其他的氨基肽酶可能存在相似的性质。

2.2 成功构建 Lmo1711 重组表达载体

利用 PCR 扩增出 EGD-e *lmo1711* 目的片段, 其理论大小为 1 347 bp, 而实际结果显示在 1 347 bp 处出现了明显条带 (图 3A)。PCR 产物与蛋白表达载体 pET30a(+)重组。转化后挑取若干单菌落接种于 LB Kana 培养基。以 EGD-e 为阳性对照, 利用菌液 PCR 验证得到符合目的条带大小的阳性质粒, 目的条带大小仍在 1 347 bp (图 3B)。将测序正确的重组质粒转入 *E. coli* Rosetta, 得到 Lmo1711 蛋白表达菌株。

2.3 成功表达与纯化 Lmo1711 重组蛋白

通过 UniProt 网站以及 Vector NTI 软件分析预测 Lmo1711 蛋白大小在 44.96 kDa, 与 His-tag 融合后的大小在 49.3 kDa。采用大肠杆菌表达系统诱导蛋白表达, 在蛋白纯化后用 SDS-PAGE 分析, 显示纯化出的蛋白有明显的单一条带, 大小在 49.3 kDa 处与预测值一致 (图 3C)。以上结果证实已成功获得重组 Lmo1711 蛋白, 可用于体外酶活试验。

2.4 Lmo1711 具有氨基肽酶的活性

Lmo1711 能够水解不同种类的氨基酸-对硝基苯, 而且对不同的底物水解强度也存在差异。Lmo1711 水解 Leu-pNA 的能力要强于水解 Arg-pNA 和 Lys-pNA (图 4A、B)。证实 Lmo1711 作为氨基肽酶对底物具有选择性, 且优先水解 Leu-pNA。

2.5 Lmo1711 具有金属离子依赖性

本试验中, 多种金属离子均能够增强 Lmo1711 的水解能力, 且对酶活的增强存在较大的差异。加入 Co^{2+} 后 Lmo1711 的活性极显著增强, 约 4 min 后就超出酶标仪测量量程 (图 4D); 加入其他金属离子 Lmo1711 的活性也得到不同程度的提升 (图 4C)。 Co^{2+} 在 0.5 mmol/L 基础上稀释 100 倍后加入反应体系, 仍可以显著增强 Lmo1711 的水解能力 (图 4E)。由此证实 Lmo1711 属于金属依赖性氨基肽酶, 其中 Co^{2+} 催化 Lmo1711 氨基肽酶的水解能力最强。

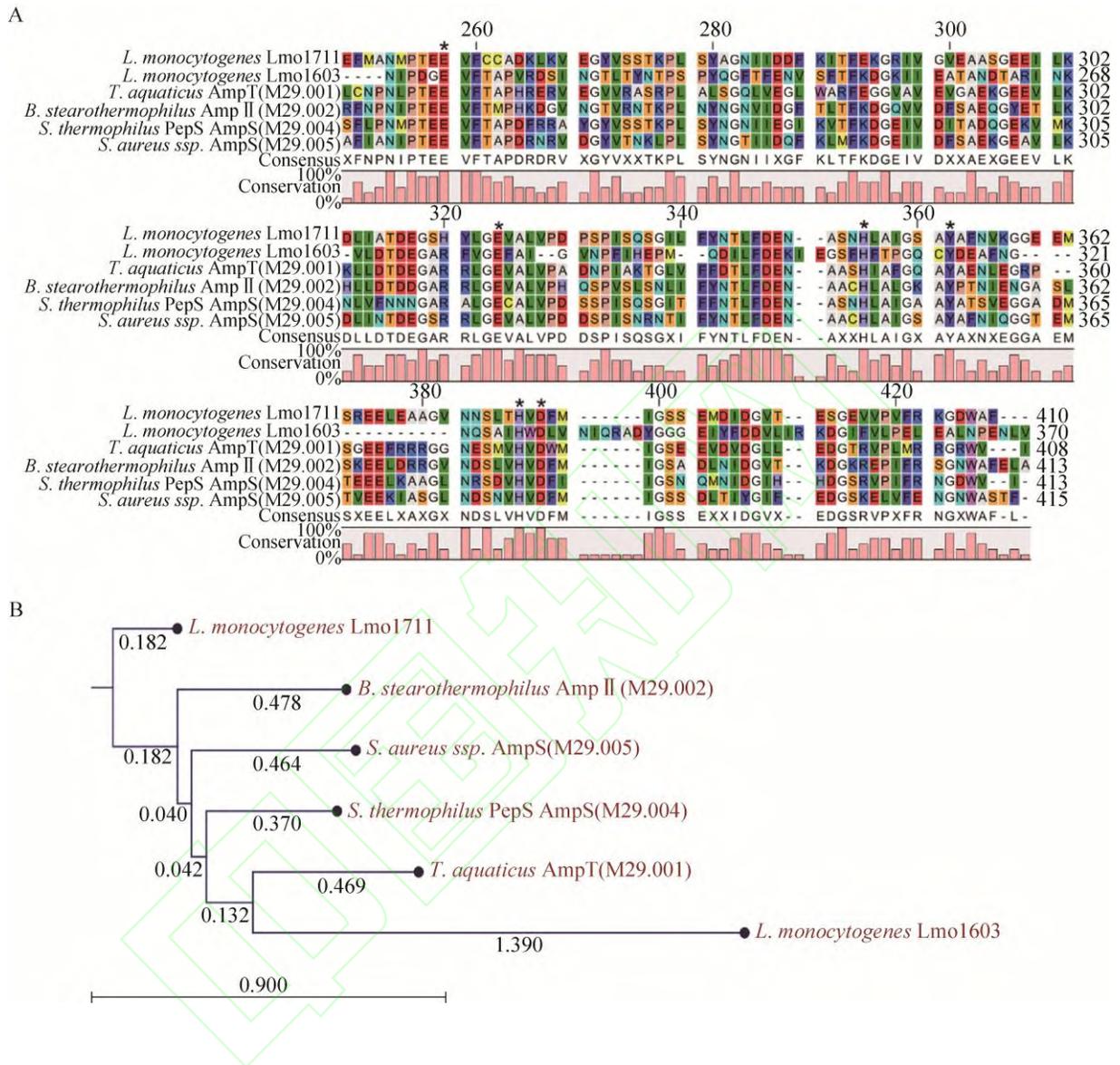


图1 M29家族部分氨基肽酶氨基酸序列比对(“*”为推测的活性位点)(A)和进化关系分析(B)

Fig. 1 Amino acid sequence alignment (A) and phylogenetic tree (B) of Lmo1711 and the members of the M29 aminopeptidase family.

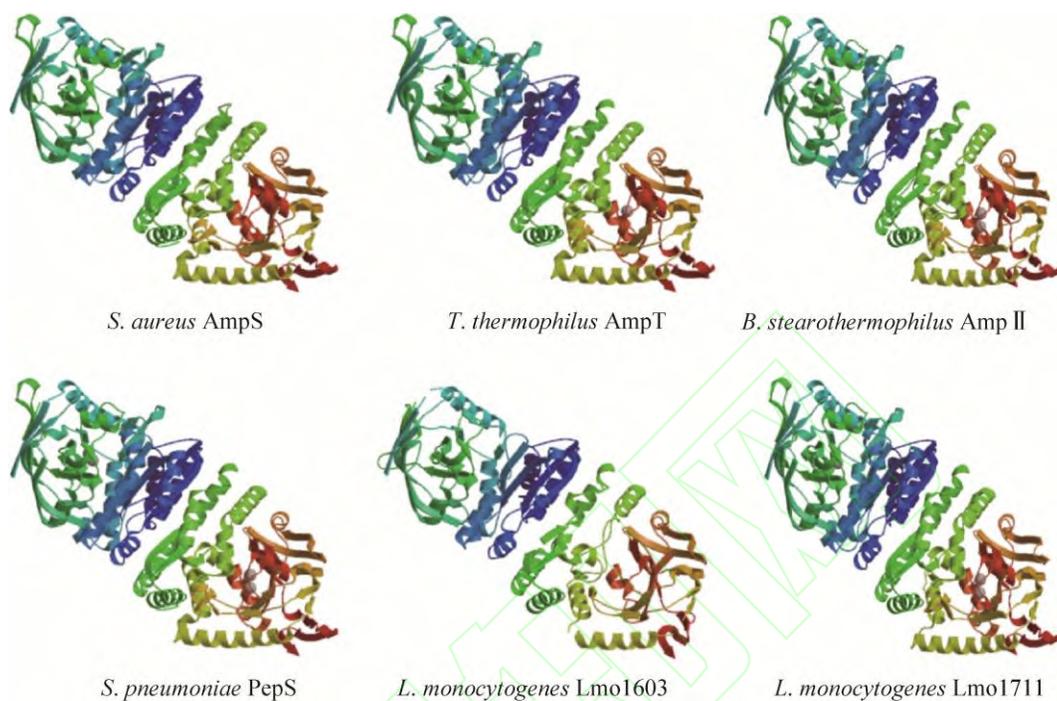


图 2 以 M29 家族多种氨基肽酶晶体结构预测模拟 Lmo1711 空间结构

Fig. 2 Predicted protein structure of Lmo1711 based on the templates with known crystal structures from the members of the M29 aminopeptidase.

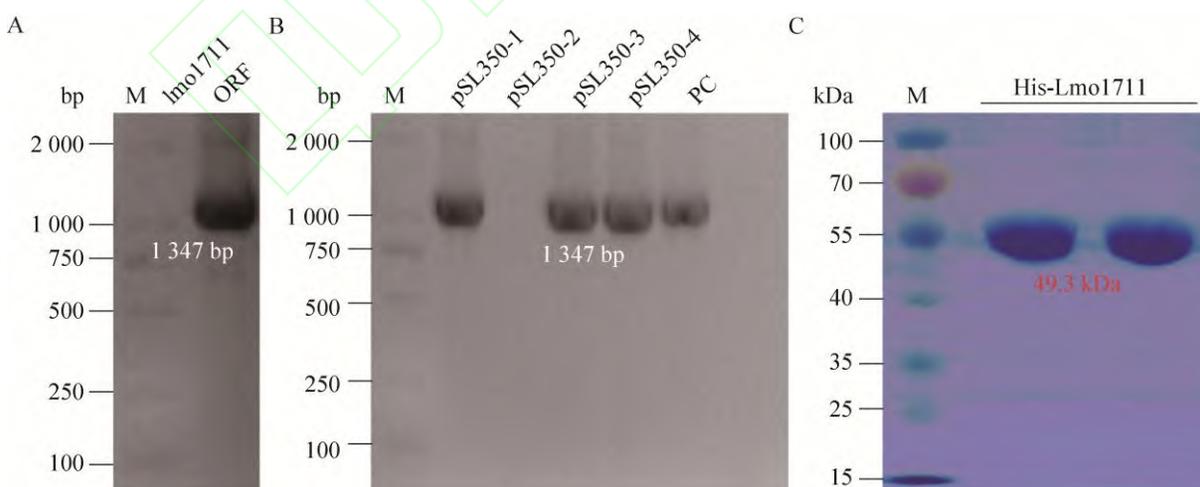


图 3 PCR 扩增 *lmo1711* 全基因序列 (A) 并对 *lmo1711* 重组表达质粒进行阳性克隆验证 (B); 利用镍柱亲和层析纯化重组 Lmo1711 蛋白 (C)

Fig. 3 Verification of the recombinant Lmo1711 expression clones using PCR method (A-B) and purification of recombinant Lmo1711 protein using SDS-PAGE analysis (C).

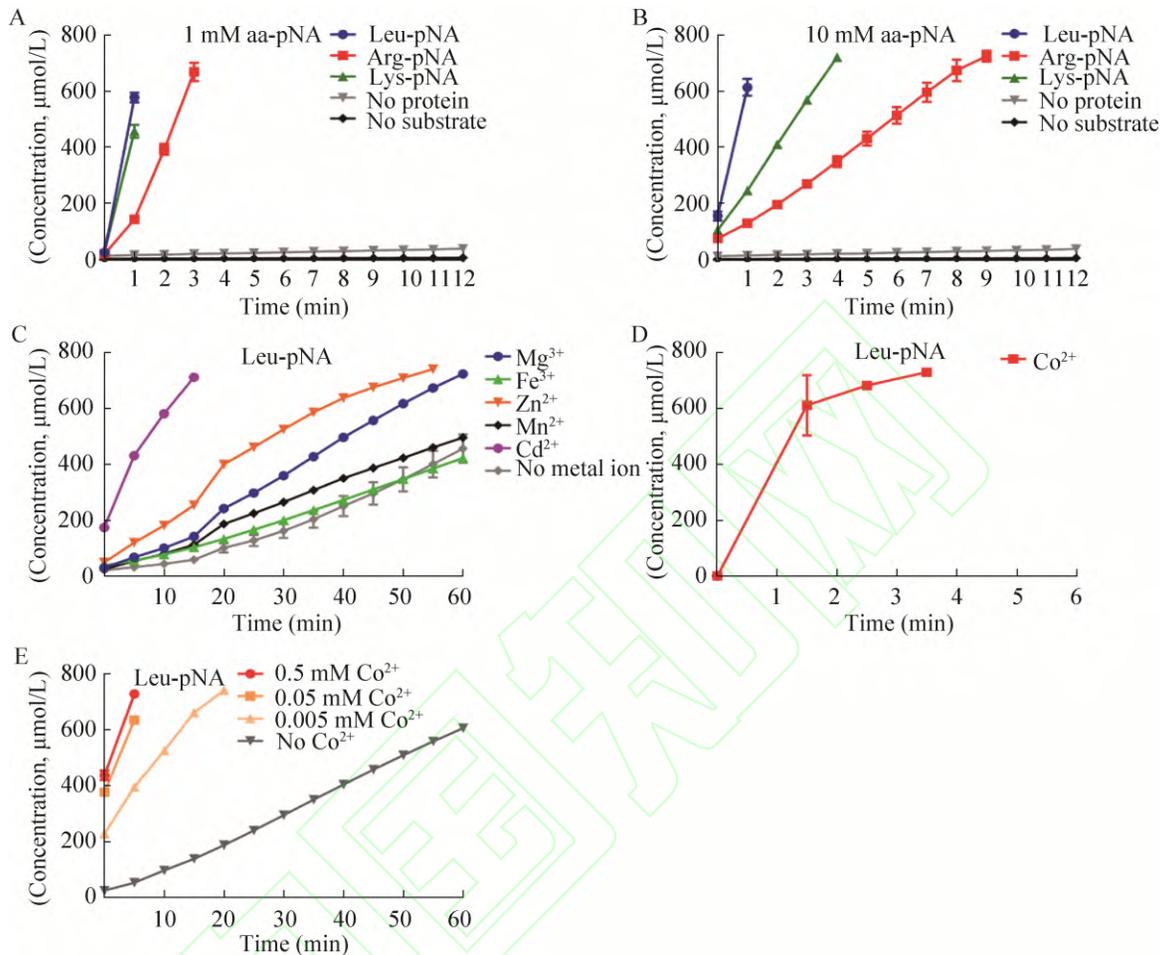


图 4 比较底物浓度在 1 mmol/L (A)、10 mmol/L (B) 条件下, Lmo1711 对不同底物的水解效果; (C) 以亮氨酸-对硝基苯胺为底物, 比较不同金属离子对 Lmo1711 活性的增强作用; (D) 以亮氨酸-对硝基苯胺为底物, 观察 Co^{2+} 离子对 Lmo1711 活性的增强作用; (E) 比较不同浓度 Co^{2+} 对 Lmo1711 活性增强效果

Fig. 4 (A-B) Kinetic aminopeptidase activity of recombinant Lmo1711 using 1 mmol/L or 10 mmol/L Leu-pNA, Arg-Pna or Lys-pNA as the substrate in 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5). (C-D) Effects of metal ions (Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} , each of 1 mmol/L) on enzymatic activity of Lmo1711. (E) Activated effects of various concentrations of Co^{2+} on enzymatic activity of Lmo1711.

3 讨论

本试验证实 Lmo1711 在体外所具有的氨基肽酶活性和金属依赖性, 而 M29 家族中众多嗜热菌来源的氨基肽酶也具有类似的性质。例如: 氨基肽酶 T 具有广泛的底物特异性, 但会优先水解释放 Leu、Val、Phe 或 Tyr, 受到 EDTA 或 1,10-邻菲咯啉抑制剂抑制时, 通过添加外源 Co^{2+} 可恢

复其活性。嗜热脂肪芽孢杆菌氨基肽酶 II 同样显示出对亮氨酸对硝基苯胺 (Leu-pNA) 的显著偏好^[12-13], 而 PepS 氨基肽酶 (M29.004)^[14] 与氨基肽酶 S (M29.005) 同样也存在与 Lmo1711 性质相似^[15]。迄今为止, 除了细菌外, 还在古生菌 (Archaeobacteria) 和植物中鉴定出编码 M29 氨基肽酶的基因, 然而只有来自水生栖热菌、嗜热栖

热菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和嗜热链球菌的氨基肽酶才被认为是该家族真正的成员^[16]。基于进化树分析, Lmo1711 与氨基肽酶 S、氨基肽酶 II、氨基肽酶 T 和 PepS 氨基肽酶同属 M29 家族, 其中与嗜热菌中的氨基肽酶 II (AmpII M29.002) 进化关系最为密切, 推测 Lmo1711 属于 M29.002 家族。氨基肽酶通常具有一些保守氨基酸位点, 在结合和催化底物过程中起关键作用, 如金黄色葡萄菌 AmpS 的活性位点会通过溶剂分子 (可能是氢氧根离子) 和 Glu319 桥连后先结合两个金属离子, 再借助 Glu253 和 His348 的协助结合第三个金属离子, 进而暴露酶的活性中心^[15]。根据氨基酸序列分析, Lmo1711 具有 6 个保守氨基酸位点, 分别为 Glu250、Glu316、His345、Tyr352、His378、Asp380, 这些位点可能决定了 Lmo1711 的酶活特性。

分泌型的细菌氨基肽酶都是单体, 而胞内酶则是单体或多聚体^[17]。除了金属蛋白酶 TAP_{Bb} 外, 目前尚未发现 M29 家族的其他六聚体氨基肽酶, 如水生栖热菌和嗜热脂肪芽孢杆菌的氨基肽酶 T 是二聚体, 嗜热链球菌的 PepS 是单体^[16]。根据 Biozentrum 网站预测, Lmo1711 为同源二聚体, 三级结构为细长状, 其 N 端结构域包括至少 7 个 α -螺旋片段围绕中心结构, 同时存在平行 β -折叠片段, C 端有 2 个 β -折叠片段。TAP_{Bb} 是致病微生物中最早发现的 M29 家族氨基肽酶, 其六聚体结构是发挥该酶活性的基础^[18]。另外, 二硫键不参与 TAP_{Bb} 的低聚组装, 因为其单体化不依赖于还原剂的存在, 这与 M29 家族的部分成员以及其他氨基肽酶 (例如牛的亮氨酸氨基肽酶晶状体和

氨基肽酶 A) 的结构一致^[18]。

本研究首次研究并证实单增李斯特菌 Lmo1711 能够特异性水解 N-末端具有芳香族化合物的多肽, 且对 Leu-pNA、Arg-pNA、Lys-pNA 等底物具有不同亲和力。在金属离子催化下 Lmo1711 活性得到显著增强, 尤其以 Co^{2+} 的激活效果最明显。Lmo1711 的 6 个保守位点对其催化或底物结合是否起到关键作用以及该蛋白在细菌体内是否参与修饰毒力因子或相关蛋白的合成、加工及成熟尚不得知, 因此我们下一步将针对 Lmo1711 在李斯特菌感染宿主过程中发挥的生物学功能及分子机制开展深入研究。

REFERENCES

- [1] VOETSCH A C, ANGULO F J, JONES T F, et al. Reduction in the incidence of invasive listeriosis in foodborne diseases active surveillance network sites, 1996-2003. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(4): 513-520.
- [2] PAGLIANO P, ARSLAN F, ASCIONE T. Epidemiology and treatment of the commo/Lonest form of listeriosis: meningitis and bacteraemia. *Infez Med*, 2017, 25(3): 210-216.
- [3] JACKSON K A, IWAMOTO M, SWERDLOW D. Pregnancy-associated listeriosis. *Epidemiol Infect*, 2010, 138(10): 1503-1509.
- [4] DAVID D J V, COSSART P. Recent advances in understanding *Listeria monocytogenes* infection: the importance of subcellular and physiological context. *F1000Res*, 2017, 6(F1000 Faculty Rev):1126.
- [5] COSSART P, TOLEDO-ARANA A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview [J]. *Microbes Infect*, 2008, 10(9): 1041-1050.
- [6] PAMER E G. Immol/Lune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immol/Lunol*, 2004, 4(10): 812-823.
- [7] LIN P L, CHENG Y M, WU D W, et al. A combination of anti-PD-L1 mAb plus Lm-LLO-E6

- vaccine efficiently suppresses tumor growth and metastasis in HPV-infected cancers. *Cancer Med*, 2017, 6(9): 2052–2062.
- [8] RAWLINGS N D. Identification and prioritization of novel uncharacterized peptidases for biochemical characterization. 2013, 2013: bat022.
- [9] Hecht KA, Wytiaz VA, Ast T, et al. Characterization of an M28 metalloprotease family member residing in the yeast vacuole. *FEMS Yeast Res*, 2013, 13(5): 471–484.
- [10] Alford VM, Kamath A, Ren XD, et al. Targeting the hemopexin-like domain of latent matrix metalloproteinase-9 (proMMOL/LP-9) with a small molecule inhibitor prevents the formation of focal adhesion junctions. *ACS Chem Biol*, 2017, 12(11): 2788–2803.
- [11] Bedrosian LD, Ferguson KK, Cantonwine DE, et al. Urinary phthalate metabolite concentrations in relation to levels of circulating matrix metalloproteinases in pregnant women. *Sci Total Environ*, 2017, 613–614: 1349–1352.
- [12] Myrin PÂ, Hofsten BV. Purification and metal ion activation of an aminopeptidase (aminopeptidase II) from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim Biophys Acta-Enzymol*, 1974, 350(1): 13–25.
- [13] Wang TF, Lin MG, Lo HF, et al. Biophysical characterization of a recombinant aminopeptidase II from the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Phys*, 2014, 40(1): 25–40.
- [14] Ta HM, Bae S, Han S, et al. Structure-based elucidation of the regulatory mechanism for aminopeptidase activity. *Acta Crystallogr D*, 2013, 69: 1738–1747.
- [15] Odintsov SG, Sabała I, Bourenkov G, et al. *Staphylococcus aureus* aminopeptidase S is a founding member of a new peptidase clan. *J Biol Chem*, 2005, 280(30): 27792–27799.
- [16] Fernandez-Espla M D, Rul F. PepS from *Streptococcus thermophilus*. A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. *Eur J Biochem*, 1999, 263(2): 502–510.
- [17] Gonzales T, Robert-Baudouy J. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol Rev*, 1996, 18(4): 319–344.
- [18] Bertin PB, Lozzi SP, Howell JK, et al. The thermophilic, homohexameric aminopeptidase of *Borrelia burgdorferi* is a member of the M29 family of metallopeptidases. *Infect Immunol/Lun*, 2005, 73(4): 2253–2261.

(本文责编 郝丽芳)