

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.02.016

# Barnase 及其突变体在乳酸乳球菌中的异源表达

艾雅倩<sup>1</sup>, 穆冬冬<sup>1</sup>, 李兴江<sup>1</sup>, 王 瑾<sup>2</sup>, 吴学风<sup>1</sup>

(1. 合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601; 2. 安徽曦强乳业集团有限公司, 安徽 淮北 235099)

**摘要:**为了得到纯化简便的核糖核酸酶, 文章将来自解淀粉芽孢杆菌 BH072 的核糖核酸酶 *Barnase* 基因克隆到携带信号肽 *Usp45* 的诱导性载体中, 然后将其导入乳酸乳球菌中进行表达。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证 *Barnase* 分子量大小为 14.64 kDa, 确认酶蛋白表达成功。为了进一步提高 *Barnase* 的表达量与活性, 将 *Barnase* 的第 58 位天冬酰胺突变成组氨酸, 并对表达时间和诱导剂质量浓度进行优化, 得出最佳条件为孵育时间 36 h、诱导剂质量浓度 3  $\mu\text{g/L}$ , 该条件下纯化突变体酶活性达到 3.7 kU/mL。

**关键词:** *Barstar* 基因; 聚合酶链式反应(PCR); 蛋白表达; 乳酸乳球菌

**中图分类号:** Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-5060(2025)02-0245-06

## Heterologous expression of *Barnase* and its mutants in *Lactococcus lactis*

AI Yaqian<sup>1</sup>, MU Dongdong<sup>1</sup>, LI Xingjiang<sup>1</sup>, WANG Jin<sup>2</sup>, WU Xuefeng<sup>1</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China; 2. Anhui Xiqiang Dairy Group Co., Ltd., Huaibei 235099, China)

**Abstract:** In order to obtain a simple purified ribonuclease, the ribonuclease gene (*Barnase*) from *Bacillus amyloliquefaciens* BH072 was cloned into an inducible vector carrying the signal peptide *Usp45* and then expressed in *Lactococcus lactis*. The molecular weight of *Barnase* was 14.64 kDa, which was verified by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and confirmed the successful expression of the enzyme protein. To further improve the expression and activity of *Barnase*, the asparagine at position 58 of *Barnase* was mutated to histidine, and the expression time and inducer concentration were optimized. The optimal conditions were as follows: incubation time of 36 h and inducer concentration of 3  $\mu\text{g/L}$ , and the purified mutant enzyme activity was up to 3.7 kU/mL under these conditions.

**Key words:** *Barstar* gene; polymerase chain reaction (PCR); protein expression; *Lactococcus lactis*

## 0 引 言

核糖核酸酶(RNase)是一种催化 RNA 中磷酸二酯键裂解的水解酶, 主要在鸟嘌呤残基后切割 RNA, 最终生成寡核苷酸, 因此可以利用它们来切割目标 RNA, 降低基因的表达, 目前已经应用于基因治疗、质粒纯化、植物病毒防治以及预防免疫等各方面的研究<sup>[1]</sup>。随着基因工程技术的创新和发展, 越来越多的人开始追求品质优、活性

高、可工业化生产的核糖核酸酶。

目前市面上的核糖核酸酶主要来源于牛核糖核酸酶, 其纯化过程复杂、产量较低, 且使用天然牛核糖核酸酶具有感染牛海绵状脑病的风险<sup>[2]</sup>, 因此, 安全的重组核糖核酸酶受到了关注。除此以外, 一些靶标结合位点的突变重组酶能有效、特异地降解细菌 RNA, 为疫苗制备、基因治疗或质粒 DNA 的构建提供了参考<sup>[3]</sup>。

文献[4]从解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus*

收稿日期: 2022-10-09; 修回日期: 2022-12-13

基金项目: 安徽省科技重大专项资助项目(201903a06020007); 安徽省自然科学基金资助项目(2108085MC123)

作者简介: 艾雅倩(1997—), 女, 安徽宣城人, 合肥工业大学硕士生;

穆冬冬(1985—), 男, 安徽颍上人, 博士, 合肥工业大学讲师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: d.mu@hfut.edu.cn;

李兴江(1978—), 男, 安徽五河人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师。

*amyloliquefaciens*)中鉴定并纯化出第 1 个原核核糖核酸酶 Barnase,它是通过去除氨基末端信号肽而合成的一种活性酶原。Barnase 是一种小分子量蛋白,其功能表达不需要二硫键、二价金属或其他非肽成分。由于具有上述优势特性,Barnase 在各种细胞中表达都是活跃的。但在宿主菌株中引入 Barnase 基因会影响 mRNA 的表达,造成细胞死亡,因此需要引入 Barstar 作为 Barnase 的抑制剂<sup>[5]</sup>。Barstar 也是来源于解淀粉芽孢杆菌的小分子蛋白,可以与 Barnase 紧密结合,抑制 Barnase 在细胞内的活性,从而使得 Barnase 在宿主菌中正常表达<sup>[6]</sup>。文献[2]将 Barnase 引入大肠杆菌进行表达,以减少质粒提取过程中的 RNA 污染;文献[3]用大肠杆菌重组表达的巴氏酶代替牛的核糖核酸酶 A 进行药物纯化。然而,在上述研究中,Barnase 的产量并不高,而且只限于大肠杆菌,从而限制了其在食品行业中的应用。因此,本研究将 Barnase 在乳酸乳球菌 NZ9000 (*L. lactis* NZ9000)中进行异源表达。

*L. lactis* 是一种原核微生物,归属于硬壁菌门、杆菌纲、乳杆菌目、链球菌科、乳球菌属,被广泛应用于乳制品和植物产品,对人和动物无致病性,是公认安全的微生物,对于食品产业有着不可估量的价值<sup>[7]</sup>。此外,*L. lactis* 具有单一的外膜,便于重组蛋白的表达纯化<sup>[7-8]</sup>。因此,本研究将来源于解淀粉芽孢杆菌 BH072(*B. amyloliquefaciens* BH072)的 Barnase 基因加上组氨酸标签后在 *L. lactis* NZ9000 中异源表达,再将第 58 位的天冬酰胺(N)突变成组氨酸(H),导入 *L. lactis* NZ9000 中进行表达,并对表达条件进行优化。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 培养基与化学试剂

M17 肉汤购于青岛海宝生物技术有限公司;用于制备 LB 培养基的酵母提取物和胰蛋白酶购于北京 Oxoid 有限公司;酵母核糖核酸酶于 Sig-

ma-Aldrich;Pfu DNA 聚合酶、dNTPs、Ni-NTA 和核酸标准品(Marker)均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;其余试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 细菌菌株和生长条件

*B. amyloliquefaciens* BH072、*L. lactis* NZ9000 均来自本实验室的储藏。*B. amyloliquefaciens* BH072 在 LB 肉汤中生长,温度 37 °C,转速 200 r/min;*L. lactis* NZ9000 在 GM17 肉汤中生长,温度为 30 °C,静置培养。在 M17 中加入 0.5% 的葡萄糖以产生 GM17,必要时使用质量浓度为 5 μg/mL 的氯霉素。

来自 *B. amyloliquefaciens* BH072 的 Barnase 和 Barstar 氨基酸序列已存入 GenBank 数据库,登录号分别为 AJE80140.1 和 AJE80270.1。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 目的基因的扩增

本文所用引物见表 1 所列,引物设计均利用 Snapgene 软件进行。*L. lactis* 和 *B. amyloliquefaciens* 用平板划线法活化后取单菌落接入液体培养基,培养 18 h 后取 2 mL 菌液提取基因组(基因组提取试剂盒)。

以 *B. amyloliquefaciens* 基因组为模板扩增 Barnase 基因,扩增体系为 10 μL 10 × fast pfu buffer,4 μL dNTPs,1 μL Pfu DNA 聚合酶,1 μL 模板,1 μL 引物 P1,1 μL 引物 P2、超纯水补充至 50 μL。该体系用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)仪的条件为:95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 1min,30 个循环;72 °C 延伸 7 min。同上用引物 P3 和 P4 扩增 Barstar 基因。以 *L. lactis* 基因组为模板扩增 *Usp45* 基因,使用引物 P5 和引物 P6,退火温度 57 °C,延伸 15 s,其余条件均同 Barnase 的扩增。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,并用试剂盒纯化和回收目的片段,4 °C 保存备用。

表 1 所用的引物

引物名称	序列(5'—3')	作用
P1	GCCCCGTTGTCAGGTGTTTACGCTGCCAAGACGGATACATCTTC	与 P6 重合/扩增 Barnase
P2	GCCTCCTTATAATTTATTTGTAGTTTAGTGATGGTGATGGTGATG	扩增 Barnase/与 P3 重合/引入 6His 残基
P3	CAAAATAAATTATAAGGAGGCACTACCATGAATAAAGCAGTTATTAACG	扩增 Barstar/与 P2 重合
P4	CGG <u>GGTACC</u> TTATGAAAGTATGATGGTGATGTCG	Kpn I 酶切位点/扩增 Barstar
P5	CAT <u>GCCATG</u> GCAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAA	扩增 <i>Usp45</i> /Nco I 酶切位点
P6	GTCAGGTGTTTACGCTGCCAAGACGGATACATCTTC	扩增 <i>Usp45</i> /与 P1 重合

注:“=”部分为限制性核酸内切酶序列;“-”部分为 6His-tag。

### 1.2.2 目的基因的融合与拼接

将上述得到的 *Barnase* 基因片段与 *Usp45* 基因片段通过融合 PCR 技术进行融合<sup>[9]</sup>。融合 PCR 反应体系为 10  $\mu$ L 10  $\times$  fast pfu buffer, 4  $\mu$ L dNTPs, 1  $\mu$ L Pfu DNA 聚合酶, 1  $\mu$ L *Barnase* 溶液, 1  $\mu$ L *Usp45*, 超纯水 32  $\mu$ L。该体系用 PCR 仪的条件为: 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64  $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 10 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将加入引物 P1 和引物 P4 各 1  $\mu$ L, 放入 PCR 仪 (95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min) 待冷却到室温, 取出样品并用琼脂糖凝胶电泳验证, 回收正确的目的片段于 4  $^{\circ}$ C 保存。同上将 *Usp45-Barnase* 基因片段与 *Barstar* 基因片段通过融合 PCR 技术进行拼接, *Barnase* 与 *Barstar* 之间含有核糖体结合位点 (RBS), 得到片段 *Usp45-Barnase-Barstar* (*Usp45-Ban-Bas*), 用琼脂糖凝胶电泳验证后回收。

### 1.2.3 重组表达载体的构建

*L. lactis* (含 pNZ8048 质粒) 平板划线法活化后挑单菌落接种于 5 mL 液体 GM17 培养基中, 30  $^{\circ}$ C 过夜培养后利用质粒提取试剂盒提取质粒 pNZ8048。将质粒 pNZ8048 和 *Usp45-Ban-Bas* 融合片段分别利用 *Nco* I 和 *Kpn* I 进行双酶切, 酶切产物用 PCR 快速回收试剂盒进行回收。然后将线性化的质粒和 *Usp45-Ban-Bas* 片段用 T4-DNA 连接酶过夜连接。连接产物通过电转化导入 *L. lactis* NZ9000 的感受态细胞中, 孵育 18 h 后进行菌落 PCR 验证, 挑取阳性克隆子, 提取质粒进行测序。

### 1.2.4 突变表达载体的构建

突变体的构建采用 PCR 定点突变技术, 利用引物 P5 和引物 P6 扩增质粒重组表达载体 pNZ8048-*Usp45-Ban-Bas*, 扩增产物用 PCR 快速回收试剂盒进行回收, 然后将线性质粒经 T4-DNA 连接酶过夜连接后电转化导入 *L. lactis* NZ9000 的感受态细胞中, 孵育 18 h 后进行菌落 PCR 验证, 阳性克隆子转接后提取质粒进行测序。

### 1.2.5 生长曲线的绘制

将 *L. lactis* NZ9000、*L. lactis* NZ9000 (pNZ8048)、*L. lactis* NZ9000 (pNZ8048-*Usp45-Ban-Bas*)、*L. lactis* NZ9000 (pNZ8048-*Usp45-Ban<sub>N58H</sub>-Bas*) 利用平板划线法活化后挑取单菌落接种于 5 mL GM17 中, 过夜培养后的菌液按 1 :

100 (体积比) 接入新鲜的 GM17 液体培养基中, 含有质粒的菌株在  $A_{600}$  达到 0.5 时加入乳酸链球菌素 (nisin), 之后每隔 1 h 取样, 离心洗涤, 用等体积的蒸馏水重悬后测定  $A_{600}$  值, 持续 18 h, 以蒸馏水作为空白对照。根据  $A_{600}$  值绘制菌株的生长曲线。

### 1.2.6 重组酶的表达及纯化

同上述方法操作, 将活化后的 *L. lactis* NZ9000 (pNZ8048-*Usp45-Ban-Bas*)、*L. lactis* NZ9000 (pNZ8048-*Usp45-Ban<sub>N58H</sub>-Bas*) 以 1 : 100 的体积比接种入新鲜的 GM17 培养基中, 3  $^{\circ}$ C 培养, 在  $A_{600}$  为 0.5 时加入 nisin 诱导重组酶表达。为了提高重组酶的表达量, 分别测定了不同诱导时间 (12、24、36、48、60 h) 和不同诱导剂质量浓度 (1、3、5、7、9  $\mu$ g/L) 条件下的酶表达量以探究最佳表达条件。

重组酶构建过程中加入 6His-tag, 可以与  $\text{Ni}^{2+}$  特异性结合。因此, 本实验将蛋白表达后的菌液进行离心, 取上清液与清洗过的  $\text{Ni}^{2+}$  通过转子平衡进行结合。与蛋白结合后的  $\text{Ni}^{2+}$  用 Wash buffer 进行洗涤, 去除残余细胞体及杂蛋白, 最后用 1.5 mL Elution buffer 洗脱重组酶<sup>[10]</sup>。利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 技术和 Image lab 软件分析重组酶的最佳表达条件。

### 1.2.7 重组酶的活性

重组酶活性的测定按文献<sup>[11]</sup>的方法进行, 通过测试酸溶性寡核苷酸的释放测量酵母 RNA 的水解率。将 5  $\mu$ L 酶溶液加入 135  $\mu$ L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中, 该溶液的 pH 值为 5.0。以 5  $\mu$ L 水作为对照, 加入 10  $\mu$ L (10 mg/mL) 酵母 RNA 溶液, 15 min 后在 50  $^{\circ}$ C 下加入 350  $\mu$ L 的 3.8%  $\text{HClO}_4$  结束反应。反应在 14 000 r/min 下离心 5 min, 并在 260 nm 下测量上清液的吸光度。1 个酶单位被定义为在 50  $^{\circ}$ C、pH 值 5.0 的特定条件下, 每分钟在 260 nm 处引起吸光度增加 1.0 单位的酶量。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因的扩增与拼接分析

基因扩增电泳结果如图 1 所示。图 1 中: M 表示 DNA Marker; 泳道 1 表示对照; 泳道 2 表示样品。

由图 1a 可知, 本实验扩增的 *Usp45* 基因是正确的, 通过 PCR 快速回收试剂盒回收的基因质

量浓度为 172.62 ng/ $\mu$ L。

NCBI 数据库公布的 *Barnase* 基因序列 (GenBank nucleotide ID: CP009938.1) 显示, *Barnase* 基因片段大小为 390 bp, 电泳结果如图 1b 所示。从图 1b 可以看出, *Barnase* 的扩增条带大小约为 400 bp, 考虑到引物设计过程中加入的保护碱基、RBS 以及融合片段所需要的重复片段, 理论片段大小应为 432 bp, 因此, 本实验扩增的 *Barnase* 基因是正确的。通过 PCR 快速回收试剂盒回收的基因质量浓度为 156.32 ng/ $\mu$ L。

根据 NCBI 数据库公布的 *Barstar* 基因序列 (GenBank nucleotide ID: X15545.1) 显示, *Barstar* 基因片段大小为 314 bp, 电泳结果如图 1c 所示。从图 1c 可以看出, *Barstar* 的扩增条带大小约为 300 bp, 考虑到引物设计过程中加入的酶切位点、保护碱基、RBS 以及融合片段所需要的重复片段, 理论片段大小应该为 311 bp, 因此, 本实验扩增的 *Barstar* 基因是正确的。通过 PCR 快速回收试剂盒回收的基因质量浓度为 108.65 ng/ $\mu$ L。

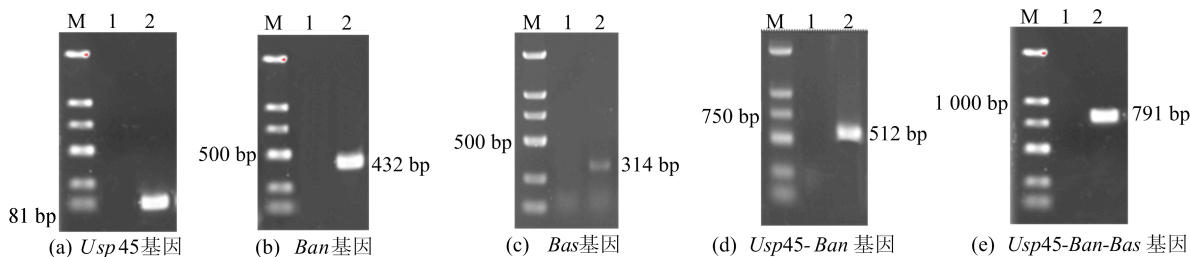


图 1 基因扩增电泳图

*Usp45-Ban* 融合片段的理论大小应为 512 bp, 其电泳图如图 1d 所示。由图 1d 可知, 条带处于 500 bp 附近且高于 500 bp, 因此认为本实验融合的 *Ban-Bas* 是正确的。

750 bp 附近的条带, 表明双酶切并没有将片段切碎; 泳道 3、泳道 4 分别含有 1 个约 400 bp 和 1 个约 500 bp 的条带, 表明双酶切成功。实际条带大小与理论值一致, 将双酶切的质粒和目的基因过夜连接后转入 *L. lactis*。

*Usp45-Ban-Bas* 的理论片段大小应为 791 bp, 其电泳图如图 1e 所示。由图 1e 可知, 条带处于 750 bp 附近且高于 750 bp, 因此认为本实验室融合的 *Usp45-Ban-Bas* 片段是正确的。正确融合的片段经 PCR 快速回收试剂盒回收后质量浓度为 325.83 ng/ $\mu$ L。

2.3 核糖核酸酶阳性克隆的筛选结果

2.2 重组质粒的构建结果

电转化后涂板, 挑取单菌落进行菌落 PCR 验证, 结果如图 3 所示。图 3 中: M 表示 DNA Marker; 泳道 1 表示空白对照; 泳道 2 表示菌落 PCR 条带。由图 3 可知, 泳道 2 处于 1 200 bp 附近, 与理论大小一致。泳道 2 所代表的菌株过夜培养后提取质粒测序, 结果如图 4 所示。

质粒 pNZ8048 和目的片段 *Usp45-Ban-Bas* 过夜酶切后进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 2 所示。图 2 中: M 表示 DNA Marker; 泳道 1、泳道 2 表示酶切后的 *Usp45-Ban-Bas*; 泳道 3、泳道 4 表示酶切后的 pNZ8048。

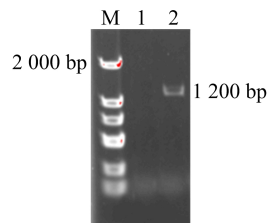


图 3 菌落 PCR 验证结果

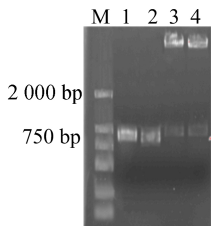


图 2 双酶切产物

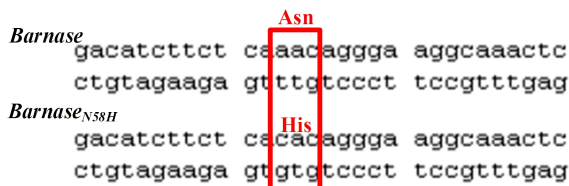


图 4 突变序列对比图

从图 2 可以看出: 泳道 1、泳道 2 仅含有 1 个

由图4可知,碱基序列与来源于数据库的序列完全一致。由此本实验成功构建了 *L. lactis* (pNZ8048-*Usp45-Ban-Bas*) 表达系统。

#### 2.4 突变表达体系的构建结果

为了提高 Barnase 的酶活性,提取构建成功的质粒载体 pNZ8048-*Usp45-Ban-Bas*, 利用 PCR 定点突变技术进行扩增,线性化质粒经 T4-DNA 连接酶连接后转入 *L. lactis* 挑取阳性克隆,结果如图5所示。图5中: M 表示 DNA Marker;泳道1表示阳性对照;泳道2表示空白对照;泳道3表示菌落 PCR 条带。由图5可知,泳道3条带与阳性对照条带均处于 1 200 bp 附近,与理论片段大小一致。同上进行测序,结果如图4所示,表明 Barnase 第 58 位的天冬酰胺成功突变成组氨酸。

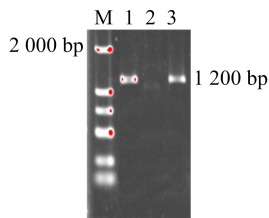


图5 突变体菌落 PCR 验证

#### 2.5 Barnase 的表达对菌株生长的影响

*L. lactis* NZ9000、*L. lactis* NZ9000 (pNZ8048)、*L. lactis* NZ9000 (pNZ8048-*Usp45-Ban-Bas*)、*L. lactis* NZ9000 (pNZ8048-*Usp45-Ban<sub>N58H</sub>-Bas*) 的生长曲线如图6所示。

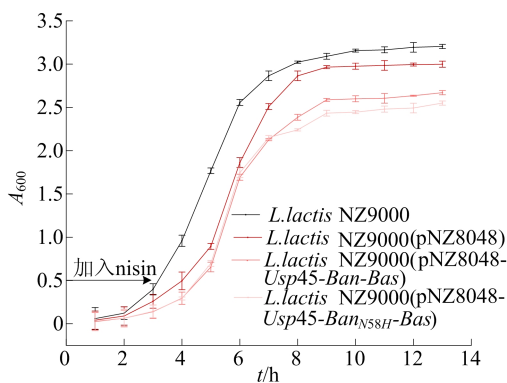


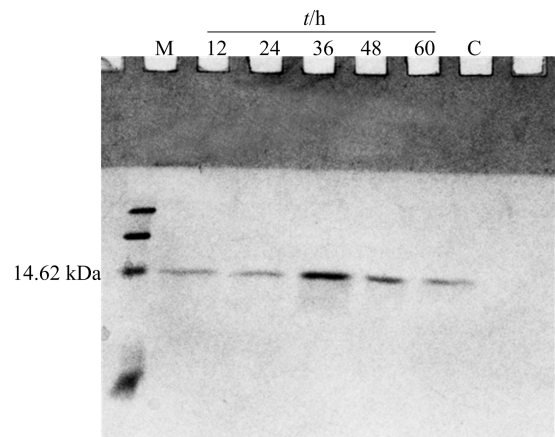
图6 生长曲线

空载体的菌株和载有 *Usp45-Ban-Bas* 或 *Usp45-Ban<sub>N58H</sub>-Bas* 的菌株有类似的生长行为,基本上所有菌株在静止期的  $A_{600}$  都稳定在 2.5~3.0 之间。然而,*L. lactis* NZ9000 表现出较快的生长速度,含有 *Usp45-Ban-Bas* 或 *Usp45-Ban<sub>N58H</sub>-Bas* 的菌株则相对稍慢,但生长趋势与

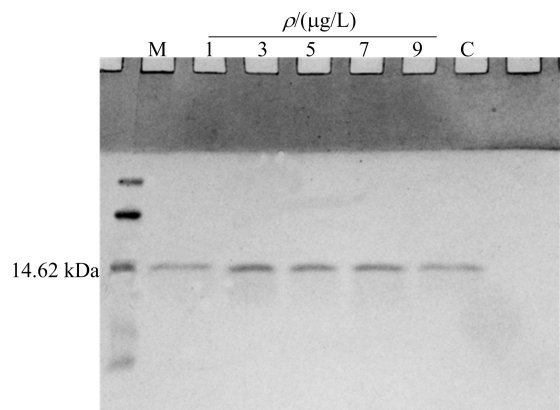
*L. lactis* NZ9000 (pNZ8048) 相同,由此可见, *Usp45-Ban-Bas* 或 *Usp45-Ban<sub>N58H</sub>-Bas* 的表达对菌株的生长影响不大,而轻微的影响可能是由于质粒复制和蛋白表达过程分走了菌株生长的部分能量。总的来说, *Usp45-Ban-Bas* 和 *Usp45-Ban<sub>N58H</sub>-Bas* 的表达对于 *L. lactis* 的生长并没有毒性作用,因此可以在 *L. lactis* 中正常表达。

#### 2.6 重组酶的纯化及最佳表达条件

将上述经不同表达时间和不同质量浓度诱导剂诱导的 Barnase 和 Barnase<sub>N58H</sub> 蛋白溶液进行纯化,纯化后的样品经 SDS-PAGE 电泳后的结果如图7所示。所有电泳图均在 15 kDa 附近出现蛋白条带,理论蛋白大小应为 14.62 kDa,因此本实验成功表达了 Barnase 和 Barnase<sub>N58H</sub>。图7中: M 表示蛋白 Marker;C 表示空白对照(*L. lactis* NZ9000(pNZ8048) 发酵液纯化的样品)。由图7a可知:Barnase 的最佳表达时间为 36 h,诱导剂质量浓度在 3  $\mu\text{g/L}$  时得到最大蛋白表达量;Barnase<sub>N58H</sub> 的最佳诱导时间和诱导剂质量浓度与 Barnase 的一致,这也进一步证明了 Barnase 的突变对蛋白表达没有影响。



(a) Barnase 表达时间优化



(b) Barnase 表达诱导剂质量浓度优化

图7 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

## 2.7 重组酶的活性检测结果

为了探究 Barnase 第 58 位天冬酰胺突变为组氨酸是否提高了其活性,本研究分别测定 Barnase 和 Barnase<sub>N58H</sub> 在温度为 50 °C 和 pH 值为 5 条件下的酶活,并进行比较。检测结果显示,Barnase 的酶活性为 3.5 kU/mL, Barnase<sub>N58H</sub> 的酶活性为 3.7 kU/mL,因此本实验的突变提高了 Barnase 的酶活力。

## 3 讨 论

核糖核酸酶的获得主要来源于对动物体组织的纯化,不仅操作复杂、价格昂贵,还在使用过程中易造成动物病毒感染<sup>[12]</sup>。为了解决该问题,本研究对解淀粉芽孢杆菌来源的 Barnase 在 *L. lactis* 中进行异源表达,同时,barstar 被用来抑制 Barnase 的细胞毒性。从生长曲线可以看出,Barnase 与 barstar 共表达后几乎没有细胞毒性,这与文献[4,13]研究结果一致。这可能是由于 barnase 本身对核酸的降解会对细胞产生毒性,barstar 可以在胞内与 Barnase 结合,以抑制其胞内活性,进而抑制毒性。

为了使巴氏酶能更高的表达,本研究对重组酶的最佳表达时间进行了优化,并在 36 h 得到了最大的酶表达量,这可能是由于一开始随着时间的延长,细菌不断繁殖,酶的表达量不断增加,而随着时间的继续延长,培养基中营养成分降低,细菌繁殖速度降低,酶的表达量增速降低,同时,随着时间不断延长,酶开始发生部分降解。

为了提高 Barnase 的活性,本研究将其第 58 位的天冬酰胺突变成了组氨酸,结果显示突变后的 Barnase<sub>N58H</sub> 酶活性提高了 6%,这可能是由于 Barnase 的底物是核酸,而 His 是碱性氨基酸,有利于与底物反应,使酶活性增加<sup>[14-15]</sup>,且突变体酶的催化特性不变,这为获得产量高、活性好、生产价格低廉且安全的核糖核酸酶提供了理论基础。

## [参 考 文 献]

[1] LARSEN J, JOERGENSEN L. Reduction of rna and DNA in methylococcus capsulatus by endogenous nucleases[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1996, 45 (1/2): 137-140.

[2] SHANKAR R, SCHÄFFER N, SCHMEER M, et al. Re-

combinant expression of barnase in *Escherichia coli* and its application in Plasmid purification[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1):171.

- [3] VOSS C, LINDAU D, FLASCHEL E. Production of recombinant rnaase ba and its application in downstream processing of plasmid DNA for pharmaceutical use[J]. Biotechnol Prog, 2006, 22(3):737-744.
- [4] HARTLEY R W. Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together[J]. Trends Biochem Sci, 1989, 14 (11): 450-454.
- [5] ULYANOVA V, VERSHININA V, ILINSKAYA O. Barnase and binase: twins with distinct fates[J]. The FEBS Journal, 2011, 278(19):3633-3643.
- [6] OKOROKOV A L, HARTLEY R W, PANOV K I. An improved system for ribonuclease ba expression[J]. Protein Expr Purif, 1994, 5(6):547-552.
- [7] LEROY F, DE VUYST L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry [J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15(2):67-78.
- [8] KUIPERS O P, DE JONG A, BAERENDS R J, et al. Transcriptome analysis and related databases of *Lactococcus lactis* [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 82 (1/2/3/4): 113-122.
- [9] BAO S, LI X, WU X, et al. Secretion of bacillus amyloliquefaciens levansucrase and its mutants from *L. Lactis* nz9000 and their applications in the synthesis of levan [J]. ACS Food Science & Technology, 2022, 2(4):655-666.
- [10] SPRIESTERSBACH A, KUBICEK J, SCHAFFER F, et al. Purification of his-tagged proteins [J]. Methods Enzymol, 2015, 559:1-15.
- [11] RUSHIZKY G W, GRECO A E, HARTLEY R W, et al. Studies on the characterization ribonucleases [J]. Journal of Biological Chemistry, 1964, 239(6):2165-2169.
- [12] SEZONOV G, JOSELEAU-PETIT D, D'ARI R. *Escherichia coli* physiology in luria-bertani broth [J]. J Bacteriol, 2007, 189(23): 8746-8749.
- [13] HAHNEN E, ZNAMENSKAYA L, KOCZAN D, et al. A novel secreted ribonuclease from bacillus intermedius: gene structure and regulatory control [J]. Mol Gen Genet, 2000, 263(4):571-580.
- [14] GUILLET V, LAPTHORN A, HARTLEY R W, et al. Recognition between a bacterial ribonuclease, barnase, and its natural inhibitor, barstar [J]. Structure, 1993, 1 (3): 165-176.
- [15] PADDON C J, HARTLEY R W. Expression of bacillus amyloliquefaciens extracellular ribonuclease (barnase) in *Escherichia coli* following an inactivating mutation [J]. Gene, 1987, 53(1):11-19.

(责任编辑 闫杏丽)