

张秀娟, 于海威, 刘栋琦, 等. SrtA 蛋白在大肠杆菌中的高效表达与活性鉴定 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 83–88. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020070281

ZHANG Xiujuan, YU Haiwei, LIU Dongqi, et al. High-efficiency Expression and Activity Identification of SrtA Protein in *Escherichia coli*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(10): 83–88. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020070281

· 生物工程 ·

SrtA 蛋白在大肠杆菌中的高效表达与活性鉴定

张秀娟¹, 于海威¹, 刘栋琦¹, 赵晋彤¹, 熊向华^{2,*}

(1. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150076;

2. 军事科学院军事医学研究院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要:按大肠杆菌偏好优化密码子并合成高活性突变型 *srtA* 基因, 构建 Trx 蛋白共表达载体 pTIG-*srtA*, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后低温诱导表达, 通过 Ni²⁺柱亲和和层析纯化 SrtA 蛋白, 连接 LH_N-LPETG 和 G-H_C 蛋白检测 SrtA 蛋白活性。菌液 PCR 鉴定和测定序列比对结果显示, 构建 pTIG-*srtA* 载体成功; SDS-PAGE 及 Western Blot 分析结果显示, 在大肠杆菌中实现了 SrtA 蛋白的可溶性高表达, Ni²⁺柱亲和和层析后得到纯度大于 95% 的 SrtA 蛋白, LH_N-LPETG 和 G-H_C 蛋白成功连接表明, 原核系统表达纯化的 SrtA 蛋白具有良好的转肽酶活性。

关键词:SrtA, 密码子优化, 酶连接法, A 型肉毒毒素

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2021)10-0083-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020070281

High-efficiency Expression and Activity Identification of SrtA Protein in *Escherichia coli*

ZHANG Xiujuan¹, YU Haiwei¹, LIU Dongqi¹, ZHAO Jintong¹, XIONG Xianghua^{2,*}

(1. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences,
Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: Optimize codons according to *E. coli* preference and synthesize highly active mutant *srtA* gene to construct the Trx protein co-expression vector pTIG-*srtA*. Then it was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and induced expression at low temperature, and the SrtA protein was purified by Ni²⁺ column affinity chromatography, and connected LH_N-LPETG and G-H_C protein to detect SrtA protein activity. The results of bacterial liquid PCR identification and determination of sequence comparison showed that the pTIG-*srtA* plasmid was successfully constructed. The results of SDS-PAGE and Western Blot analysis showed that high soluble expression of SrtA protein was achieved in *E. coli*, Ni²⁺ column affinity chromatography obtains SrtA protein with a purity greater than 95%. The successful connection of LH_N-LPETG and G-H_C protein indicated that the SrtA protein expressed and purified by the prokaryotic system had good transpeptidase activity.

Key words: Sortase A; codon optimization; enzyme ligation method; botulinum neurotoxin A

Sortase 酶是一组存在于革兰氏阳性细菌中介导表面蛋白与细胞壁共价结合的蛋白酶, 负责细胞表面蛋白的修饰和细菌鞭毛的构建, 在帮助病原细菌逃避

宿主免疫系统方面起重要作用^[1]。Sortase 酶根据识别表面蛋白序列的不同可以分为 A、B、C、D 等多种, 其中以在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

收稿日期: 2020-07-23

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2018X09J18105-003)。

作者简介: 张秀娟 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物生物活性研究, E-mail: zhangmu77@163.com。

* 通信作者: 熊向华 (1977-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 病原微生物, E-mail: xionghua@sina.com。

中发现的转肽酶 A (Sortase A, SrtA) 研究得最为广泛, 其结构、功能及催化机制均已阐明^[2-3]。Sortase A 酶具有一个典型的类似 II 型膜蛋白的 N 端跨膜区域和一个尾部富集正电荷的 C 端结构域, 可以特异性识别底物蛋白上的分选序列 LPXTG (X 为除半胱氨酸以外的任一氨基酸)^[4-5], 在苏氨酸 (Thr) 和甘氨酸 (Gly) 之间进行剪切^[6-7], 并将其与含有多甘氨酸接头 (GlyGlyGly-, G-) 的底物蛋白进行连接^[8-9]。SrtA 酶催化的连接反应具有反应条件温和、效率高、特异性强等优点^[10-11], 近年来已应用于蛋白质与蛋白质、肽、核酸类似物^[12-13]、糖等活性物质连接以及蛋白质固定化^[14-15], 展示出良好的应用前景。但是野生型 SrtA 酶催化的连接反应耗时长、产率低, 不同研究者开展了包括提高催化活性、改变底物识别特征等一系列改造, Chen 等报道 P94S、D160N、D165A 和 K196T 这 4 个位点的突变可将 SrtA 酶催化活性提高 140 多倍, 推测突变型 SrtA 酶更利于底物进入结合区域, 从而大大提升连接效率^[16-17]。

密码子 (codon) 是中心法则的重要组成部分, 同时也是生物遗传和变异的最基本单元, 对某物种基因组来说, 一些同义密码子会频繁出现, 称为优化密码子; 还有一些密码子则很少出现甚至不出现, 称为非优化密码子或稀有密码子, 这一现象称为密码子偏好性 (codon usage bias)^[18-19]。不同物种之间对密码子使用存在各自的偏好, 各同义密码子之间虽然不会改变氨基酸的序列, 但对于蛋白的表达水平具有一定程度的影响^[20-21]。基因合成是一项较为成熟的技术^[22-23], 常与密码子优化配合使用^[24-25], 本文选择了高活性突变型的 *srtA* 酶基因, 为解决 SrtA 酶在大肠杆菌表达系统中表达水平低、包涵体比例高的缺点, 按照大肠杆菌偏好性进行了密码子优化后合成了 *srtA* 基因并连入硫氧还蛋白 (Thioredoxin, Trx) 共表达载体 pTIG, 导入大肠杆菌 BL21(DE3) 后通过低温诱导实现了 SrtA 酶的可溶性高表达, 纯化的 SrtA 酶成功实现了 A 型肉毒毒素 (Botulinum toxins A, BoNT/A) 活性缺失突变体 LH_N-LPETG 结构域和 GH_C 结构域的连接。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

DH5 α 大肠杆菌感受态、BL21(DE3) 大肠杆菌感受态 北京擎科生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒 北京达科为生物技术有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒、限制性内切酶 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; BCA 法蛋白浓度测定试剂盒 康为世纪生物技术有限公司; 琼脂糖 索莱宝科技有限公司; T4 DNA 连接酶 NEB 有限公司; IPTG 北京经科宏达生物技术有限公司; pTIG-GH_C、pTIG-LH_N-LPETG、PUC57-*srtA* 质粒 (克隆载体) 军事医学科学院军事医学研究院生物工程研究所。

Ni²⁺亲和层析柱、强阴离子亲和层析柱、强阳离

子亲和层析柱 GE 公司; 3K-18 型低温冷冻离心机 Sigma; T-1 型 PCR 仪 Biometra; DY III 3A 型凝胶电泳仪 北京六一仪器厂; Gel-pro 2020D 凝胶成像仪 pHarmacia Biotech; MiniPROTEAN®3 Cell 蛋白电泳仪 Bio-RAD; AKTA UPC-900 蛋白质纯化仪 GE; PAC200 半干转膜仪 Bio-Rad 等。

1.2 实验方法

1.2.1 *srtA* 基因密码子优化 将高活性突变型 *srtA* 基因序列按大肠杆菌偏好性进行密码子优化, 交由北京擎科生物技术有限公司进行合成。

1.2.2 引物设计 利用 edit seq 软件设计引物, 引物序列如表 1。

表 1 引物设计
Table 1 Primer design

引物	引物序列 (5'-3')
F- pTIG- <i>srtA</i>	GGTAATGGCTAAACCTCAAATTCCGAAAG
R- pTIG- <i>srtA</i>	CCTTTGACTTCTGTAGCTACAAAGATTITAC

注: 下划线为酶切位点, GAATTC: EcoRI; CTCGAG: XhoI。

1.2.3 pTIG-*srtA* 质粒构建 根据优化后的 *srtA* 基因序列设计正、反向引物, 降落 PCR 扩增目的基因片段后进行琼脂糖凝胶电泳, 切胶分离目的片段后回收。将目的片段与 pTIG 表达载体经 EcoRI+XhoI 双酶切后再次电泳验证并回收, 二者于 16℃ 连接过夜后转化至 DH5 α 感受态, 将菌液涂布于 LB (Amp) 固体培养基, 倒置在 37℃ 培养过夜, 次日挑单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 阳性对照的 PCR 模板为 PUC57-*srtA*, 阴性对照的 PCR 模板为 pTIG 空载体。鉴定筛选后将阳性克隆送至公司测序。

1.2.4 SrtA 蛋白表达鉴定 将表达载体 pTIG-*srtA* 转入 BL21(DE3) 感受态, 然后挑取转化子培养至对数生长期, 加入终浓度 0.5 mmol 的 IPTG 置于 16℃ 诱导过夜。次日取 1 mL 菌液离心后重悬于 500 μ L TE 裂解液, 经过超声破碎后, 取出 20 μ L 备用 (全菌), 其余裂解液离心, 吸取 20 μ L 上清待用, 去掉上清后沉淀部分用 480 μ L 裂解液重悬, 取 20 μ L 备用 (沉淀)。将全菌、上清、沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定, 并利用 Gelpro Analyzer 软件分析蛋白表达量。

1.2.5 SrtA 蛋白纯化 取 pTIG-*srtA*/BL21(DE3) 单菌落至摇瓶培养, 按 1.2.4 低温诱导表达, 超声裂解后利用 AKTA 纯化仪梯度洗脱纯化蛋白。经前期纯化条件摸索, *srtA* 蛋白需经过两步纯化, 第一步使用强阳离子柱进行纯化, 收集洗脱液后液通过 3 kDa 截留分子量的超滤管进行超滤换液脱盐, 将溶液置换为 Ni²⁺柱平衡液。第二步通过 Ni²⁺亲和层析柱进行二次纯化, 纯化后采用 3 kDa 截留分子量的超滤管进行超滤换液脱盐浓缩, 利用 SDS-PAGE 及 Gelpro Analyzer 软件分析纯化蛋白纯度, 同时使用抗 His 标签抗体为一抗进行 Western Blot 鉴定。纯化体系平衡液、洗脱液见表 2。

表 2 纯化平衡液、洗脱液
Table 2 loading buffer and elution buffer

名称	配方及pH
Ni ²⁺ 柱纯化平衡液	20 mmol/L PB, 200 mmol/L氯化钠, 20 mmol/L咪唑, 调整pH至7.4
Ni ²⁺ 柱纯化洗脱液	20 mmol/L PB, 200 mmol/L氯化钠, 500 mmol/L咪唑, 调整pH至7.4
LH _N 强阴离子柱纯化平衡液	20 mmol/L Tris-HCl, 调整pH至7.0
LH _N 强阴离子柱纯化洗脱液	20 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl调整pH至7.0
SrtA强阳离子柱纯化平衡液	20 mmol/L PB, 调整pH至7.5
SrtA强阳离子柱纯化洗脱液	20 mmol/L PB, 1 mol/L NaCl调整pH至7.5
G-H _C 强阳离子柱纯化平衡液	20 mmol/L PB, 调整 pH至8.0
G-H _C 强阳离子柱纯化洗脱液	20 mmol/L PB, 1 mol/L NaCl 调整pH至8.0

1.2.6 SrtA 蛋白活性鉴定 分别将 pTIG-G-H_C、pTIG-LH_N-LPETG 质粒转入 BL21(DE3)感受态细胞, 按照 1.2.4 及 1.2.5 进行表达鉴定及纯化, G-H_C 纯化步骤同 SrtA 纯化。LH_N-LPETG 蛋白需经过两步纯化, 第一步进行 Ni²⁺亲和和层析柱纯化, 利用 30 kDa 截留分子量的超滤管对收集的洗脱液进行超滤换液, 将溶液置换为强阴离子柱平衡液, 第二步利用强阴离子柱进行纯化, 纯化后两种蛋白利用抗 His 标签抗体进行 WesternBlot 鉴定。

将纯化后的 SrtA、G-H_C、LH_N-LPETG 蛋白按照摩尔比 1:1:1 混合后分装于 EP 管中, 每支 20 μL, 分别置于 37 和 30 ℃ 孵育 0.5、1、2、4 h 进行蛋白连接。孵育完成后进行 SDS-PAGE 鉴定及 Western Blot 鉴定, Western Blot 所用一抗为特异性针对 G-H_C 的抗体, 二抗为山羊抗人 IgG 抗体。

1.2.7 分子筛纯化 BoNT/A 失活突变体 利用 SuperdexG200 分子筛(平衡液为 20 mmol/L PBS、150 mmol/L NaCl)纯化连接体系中的 BoNT/A 失活突变体, 少量多次收取穿过液, 待完全收集穿过液后进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.3 数据处理

利用 DNAMAN 软件比对分析阳性克隆序列是否正确; 使用 Gelpro Analyzer 软件分析纯化蛋白纯度。

2 结果与分析

2.1 pTIG-srtA 质粒构建

高活性突变型 *srtA* 基因序列按大肠杆菌表达系统密码子偏好性进行优化, 并送公司进行全基因合成。PCR 扩增后经 EcoRI+XhoI 双酶切连入 pTIG 质粒, 转化至 DH5α 感受态, 菌液 PCR 筛选阳性克隆, 结果如图 1 所示, PCR 扩增片段大小与 *srtA* 基因大小相符。阳性克隆测定序列经 DNAMAN 软件比对, 结果显示与预期序列一致, 表明成功构建 pTIG-*srtA* 基因表达载体。

2.2 SrtA 蛋白表达

将表达载体 pTIG-*srtA* 基因转化至 BL21(DE3)感受态, 挑单菌落至 LB(Amp)液体培养基中培养至对数期, 加入 IPTG, 诱导表达过夜, 收集菌体经超声

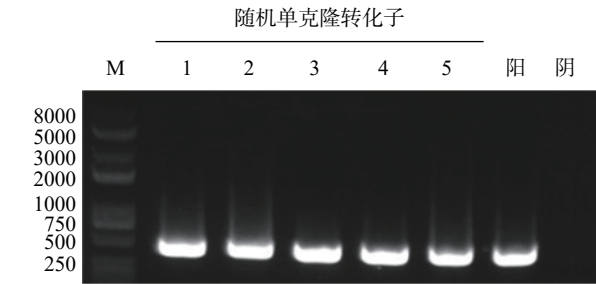


图 1 pTIG-SrtA/DH5α 菌落 PCR 鉴定
Fig.1 Colony PCR identification of recombinant plasmid pTIG-SrtA

注: M: DNA 相对分子质量标志物 Marker; 1~5: 随机 pTIG-*srtA*/DH5α 菌落 PCR 鉴定; 阳: 阳性对照; 阴: 阴性对照。

裂解后进行 SDS-PAGE 分析。结果如图 2 所示, 与阴性对照相比, 1~5 泳道都有特异性蛋白表达条带, 分子量为 20 kDa 左右, 与 SrtA 蛋白大小相符; 而且目的蛋白大部分在菌体裂解上清部分, 说明 SrtA 蛋白主要为可溶性表达。Gelpro Analyzer 软件分析 SrtA 蛋白表达量占全菌蛋白 55%。

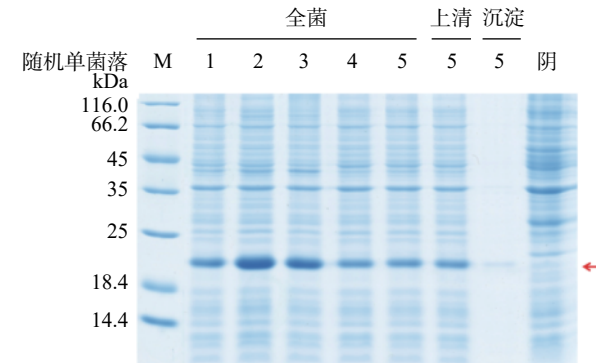


图 2 SrtA 蛋白表达的 SDS-PAGE 鉴定
Fig.2 SDS-PAGE identification of SrtA protein expression

注: M: 蛋白分子质量相对标志物; 阴: pTIG 空表达载体全菌裂解液; 全菌: 随机挑取的单克隆转化子诱导表达后的全菌裂解液; 上清: 全菌裂解液离心后上清部分; 沉淀: 全菌裂解液离心后沉淀部分。

2.3 SrtA 蛋白纯化

挑取新鲜 pTIG-*srtA*/BL21(DE3) 单菌落至 LB(Amp)液体培养基培养活化, 转接至 LB(Amp)液体培养基培养至对数生长期, 加入 IPTG 置于 16 ℃

诱导过夜。离心收集菌体并超声裂解,第一步使用强阳离子柱进行纯化,收集洗脱液后液通过 3 kDa 截留分子量的超滤管进行超滤换液,将溶液置换为 Ni^{2+} 柱平衡液。第二步通过 Ni^{2+} 亲和层析柱进行二次纯化,收集洗脱液 20%~40% 部分的洗脱峰(图 3)进行 SDS-PAGE 鉴定,各泳道为分段接取的洗脱液,于 20 kDa 附近可见清晰条带。采用 3 kDa 截留分子量的超滤管进行超滤换液脱盐,经 SDS-PAGE 分析纯化蛋白纯度, Gelpro Analyzer 软件分析纯化的结果表明 SrtA 蛋白纯度>95%(图 4)。Western Blot 分析表明纯化的 SrtA 蛋白能特异地与抗 His 标签抗体结合(图 5)。

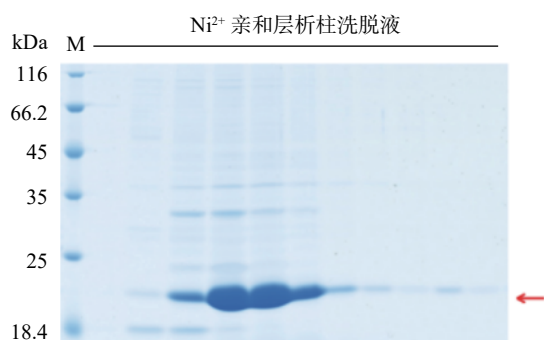


图 3 Ni^{2+} 亲和层析纯化 SrtA 蛋白 SDS-PAGE 鉴定 (20%~40% 部分洗脱液)

Fig.3 SDS-PAGE identification of SrtA protein purified by Ni^{2+} affinity chromatography column (20%~40% elution buffer)

注: M: 蛋白分子质量相对标志物; 其余泳道为分段接取的纯化洗脱液。

2.4 SrtA 蛋白活性鉴定

将表达载体 pTIG-G- H_C 、pTIG-LH $_N$ -LPETG 分别转化至 BL21(DE3)感受态中进行表达,利用 SDS-PAGE 鉴定蛋白表达方式, Gelpro Analyzer 软件分析蛋白表达量。如图 6(a)所示,各泳道为分段接取的洗脱液,在 50 kDa 附近有清晰条带,分子量大小与 G- H_C 蛋白相符,表达量占全菌蛋白 40%,且主要

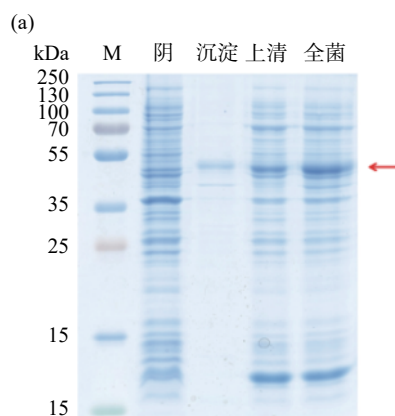


图 6 G- H_C 、LH $_N$ -LPETG 表达形式 SDS-PAGE 鉴定

Fig.6 SDS-PAGE identification of G- H_C 、LH $_N$ -LPETG expression

注: (a): G- H_C ; (b): LH $_N$ -LPETG. M: 蛋白分子质量相对标志物; 全菌: 随机挑取的单克隆转化子诱导表达后的全菌裂解液; 上清: 全菌裂解液离心后上清部分; 沉淀: 全菌裂解液离心后沉淀部分。

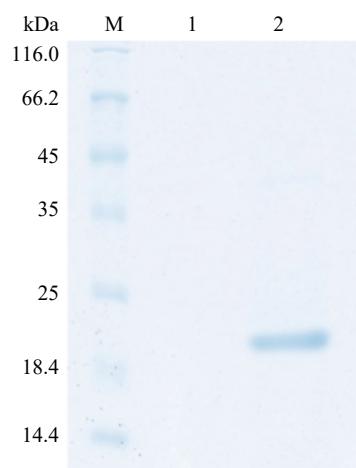


图 4 SrtA 蛋白超滤换液后 SDS-PAGE 鉴定

Fig.4 SDS-PAGE identification of SrtA protein after ultrafiltrate

注: M: 蛋白分子质量相对标志物; 1: 超滤换液后下层溶液; 2: 超滤换液后上层溶液。

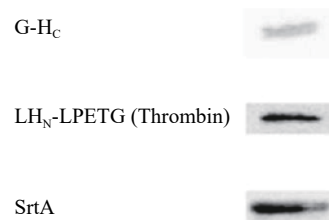
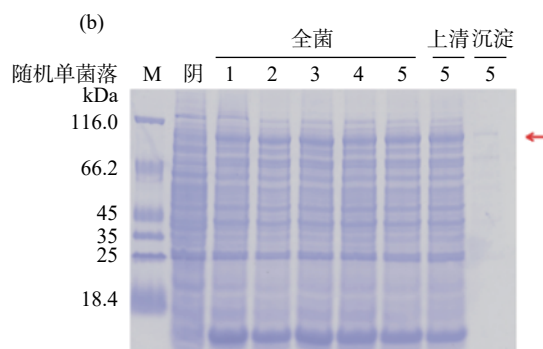


图 5 Western Blot 鉴定 G- H_C 、LH $_N$ -LPETG、SrtA 蛋白

Fig.5 Western Blot identification protein of G- H_C 、LH $_N$ -LPETG、SrtA

为可溶性表达。如图 6(b)所示,各泳道为分段接取的洗脱液,在 100 kDa 附近有特异表达条带,分子量大小与 LH $_N$ -LPETG 蛋白相符,表达量占全菌蛋白 25%,且主要为可溶性表达。

SDS-PAGE 鉴定结果表明,G- H_C 及 LH $_N$ -LPETG 表达蛋白经纯化后得到较高纯度目的蛋白(图 7); Western Blot 分析表明纯化的 G- H_C 及 LH $_N$ -LPETG



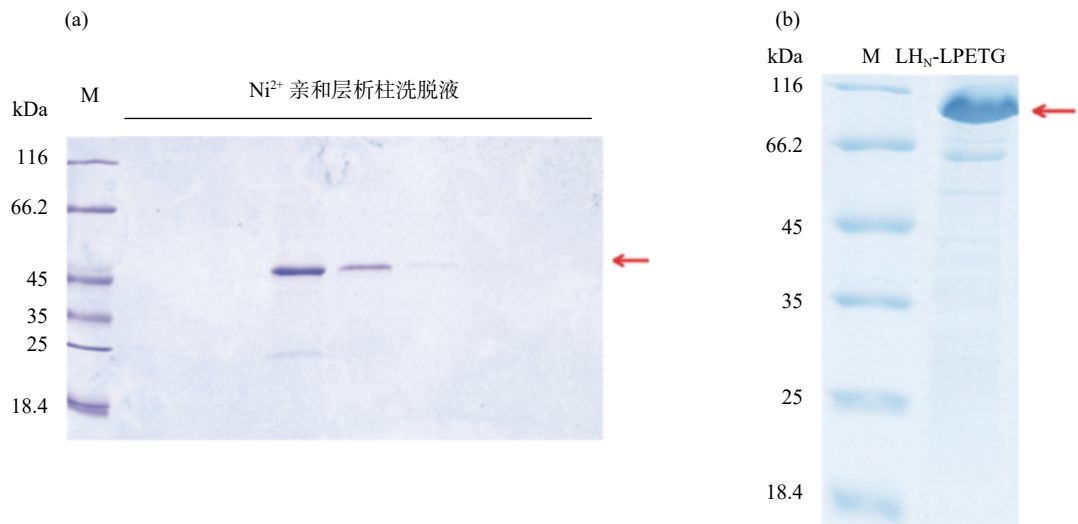


图 7 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化后的 G-H_C 、 LH_N -LPETG 蛋白 SDS-PAGE 鉴定

Fig.7 SDS-PAGE identification of protein purified by Ni^{2+} affinity chromatography column

注: (a): G-H_C ; M: 蛋白分子质量相对标志物, 其余泳道为分段接取的纯化洗脱液;

(b): LH_N -LPETG, M: 蛋白分子质量相对标志物。

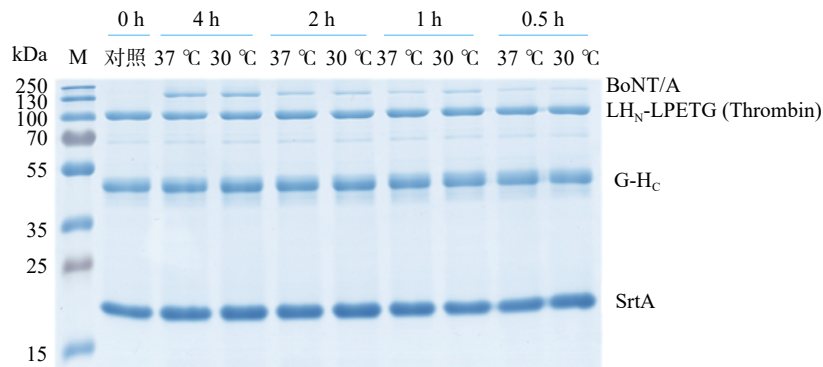


图 8 SDS-PAGE 鉴定不同孵育时间下连接生成的 BoNT/A 失活突变体

Fig.8 SDS-PAGE identification of inactivated BoNT/A generated by connection at different incubation times

注: M: 蛋白分子质量相对标志物; 图 9~图 10 同。

蛋白蛋白能特异性地与抗 His 标签抗体结合(图 5)。

将纯化后的 SrtA、 G-H_C 、 LH_N -LPETG 蛋白按照摩尔比 1:1:1 混合后分装于 EP 管中, 于 37 和 30 °C 连接 0.5、1、2、4 h, 结果如图 8 所示。随着连接时间的增加, 在 150 kDa 附近逐渐出现条带, 大小与 BoNT/A 失活突变体全长蛋白相符。如图 9 所示, Western Blot 鉴定结果表明, 连接蛋白可以与抗 G-H_C 抗体结合, 进一步表明 150 kDa 处连接蛋白为 BoNT/A 失活突变体全长蛋白。

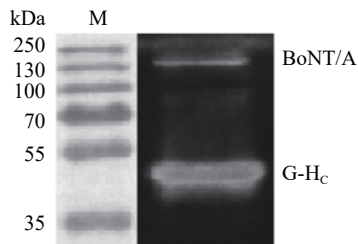


图 9 Western Blot 鉴定连接生成的 BoNT/A 失活突变体

Fig.9 Western Blot identification of mutant of BoNT/A generated by connection

连接体系经分子筛纯化后收集目的蛋白洗脱峰, SDS-PAGE 电泳结果显示在 150 kDa 附近可见条带, 表明纯化得到全长 BoNT/A 活性突变体蛋白(图 10)。

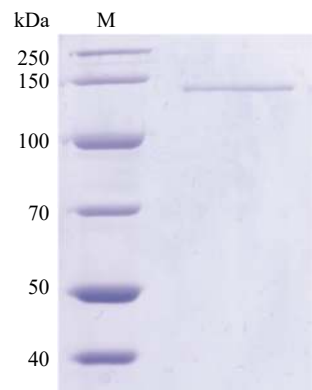


图 10 SDS-PAGE 鉴定 SuperdexG200 分子筛纯化的 BoNT/A 失活突变体

Fig.10 SDS-PAGE identification of purified mutant of BoNT/A by Superdex G200 molecular sieve

3 结论

大肠杆菌表达系统是一种应用广泛的蛋白制备技术,其具有操作难度低、成本低廉、制备周期短等优点^[26-27],实验室前期尝试在大肠杆菌原核表达系统中表达未经密码子优化的 *srtA* 基因,但与文献报道结果一致,原始 SrtA 蛋白表达水平低而且主要为包涵体^[11],后续纯化难度较大且需要复性^[28],其原因可能是在原核细胞表达系统中,由于蛋白合成速度过快,导致目的蛋白存在来不及正确折叠及组装的情况,会形成无生物活性的蛋白聚集物即包涵体^[29-30]。本研究将 *srtA* 基因按大肠杆菌表达系统偏好性进行密码子优化,并克隆入 pTIG 表达载体与硫氧还蛋白 (Trx) 进行共表达,结果表明在大肠杆菌 BL21(DE3) 中经 16℃ 低温诱导过夜实现了 SrtA 蛋白的可溶性高表达,表达量占全菌蛋白的 50% 以上。进一步亲和层析纯化得到了纯度>95% 的 SrtA 蛋白。纯化的 SrtA 蛋白能够完成带有特征识别序列的 BoNT/A 失活突变体的两部分片段 LH_N-LPETG 和 G-H_C 的酶法连接,得到全长的 BoNT/A 失活突变体蛋白,这充分说明在大肠杆菌中表达纯化的 SrtA 蛋白具有转肽酶活性。

参考文献

- [1] Paterson G K, Mitchell T J. The biology of Gram-positive sortase enzymes[J]. *Trend Microbiol*, 2004, 12(2): 89-95.
- [2] Otto M. *Staphylococcus epidermidis*-the accidental pathogen[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(8): 555-567.
- [3] 谭超, 邹黎黎, 王君. 以转肽酶 A 为靶点的表皮葡萄球菌感染干预机制初探[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(12): 1406-1409.
- [4] Huang X, Aulabaugh A, Ding W, et al. Kinetic mechanism of *Staphylococcus aureus* sortase SrtA[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(38): 11307-11315.
- [5] Davies J R, Svensäter G, Herzberg M C. Identification of novel LPXTG-linked surface proteins from *Streptococcus gordonii*[J]. *Microbiology* (13500872), 2009, 2(1): 7-8.
- [6] 朱芳, 邓思, 罗立新. 分选酶 A 在 pET32a(+) 原核表达载体中的表达和鉴定[J]. 生物技术通报, 2011(6): 218-222.
- [7] Navarre W W, Schneewind O. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria[J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 14(1): 115-121.
- [8] Wu Z, Hong H, Zhao X, et al. Efficient expression of sortase A from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* and its enzymatic characterizations[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2017, 4(1): 63-65.
- [9] Lu C, Zhu J, Wang Y, et al. *Staphylococcus aureus* sortase A exists as a dimeric protein *in vitro*[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(32): 9346-9354.
- [10] 邓思, 罗立新. 分选酶 A(SrtA) 的 GST 融合表达、纯化及活性测定[J]. 生物技术通报, 2012(5): 121-125.
- [11] 胡义芳, 杨朝博, 秦松, 等. 金黄色葡萄球菌 SortaseA 原核表达纯化方法的研究进展[J]. *海南医学*, 2016, 27(10): 1640-1643.
- [12] Zhao X, Hong H, Wu Z. Efficient extracellular expression of transpeptidase sortase A in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression & Purification*, 2017, 133: 132-138.
- [13] Z Wu, X Guo, Z Guo. Sortase a-catalyzed peptide cyclization for the synthesis of macrocyclic peptides and glycopeptides[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(32): 9218-9220.
- [14] Guo X, Wang Q, Swarts B M, et al. Sortase-catalyzed peptide-glycosylphosphatidylinositol analogue ligation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(29): 9878.
- [15] Levary D A, Ranganath P, Boder E T, et al. Protein-protein fusion catalyzed by sortase A[J]. *Plos One*, 2011, 6(4): e18342.
- [16] 李健, 王鹏举, 崔云凤, 等. 检测 SortaseA 酶催化蛋白质连接效率的新型报道系统[J]. 生物工程学报, 2014, 30(2): 284-293.
- [17] Chen I, Dorr B M, Liu D R. A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(28): 11399-11404.
- [18] 任桂萍, 董璵莹, 党云琨. 密码子中的密码: 密码子偏好性与基因表达的精细调控[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(7): 839-847.
- [19] Ruth, Hershberg, Dmitri A, et al. Selection on codon bias[J]. *Annual review of genetics*, 2008, 42: 287-299.
- [20] 朱沛煌, 陈好, 朱灵芝, 等. 马尾松转录组密码子使用偏好性及其影响因素[J]. *林业科学*, 2020, 56(4): 74-81.
- [21] 刘慧, 王梦醒, 岳文杰, 等. 糜子叶绿体基因组密码子使用偏性的分析[J]. *植物科学学报*, 2017, 35(3): 362-371.
- [22] 冯森, 王璐, 田敬东. 基因合成技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2013, 29(8): 1075-1085.
- [23] 李雷, 姜卫红, 覃重军, 等. 合成生物学使能技术的研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(10): 950-968.
- [24] 周栋, 成子强, 刘建柱, 等. 猪附红细胞体 ORF2 的全基因合成、表达与鉴定[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(8): 1184-1188.
- [25] 杨鼎, 吴江鸿, 祁云霞, 等. 牛肌酸激酶同功酶 CK-BB 的全基因合成及其原核表达[J]. *畜牧与饲料科学*, 2016, 37(2): 29-33.
- [26] 刘爽, 胡宝成. 原核系统可溶性表达策略[J]. *生物技术通讯*, 2005(2): 172-175.
- [27] Mittraki A, Fane B, Haase-Pettingell C, et al. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation[J]. *Science*, 1991, 253(5015): 54-58.
- [28] 朱翔宇, 蔡熙姮, 史宁, 等. 水貂细小病毒 VP2 基因的可溶性表达优化及包涵体蛋白复性研究[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(6): 1-6.
- [29] 邓春梅, 葛玉强, 刘丽, 等. 外源基因表达系统的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(19): 3744-3746.
- [30] Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*[J]. *Postepy Biochem*, 2006, 52(4): 448-456.