

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00378

· 论 著 ·

## 人源与鼠源神经生长因子信号肽引导β-内啡肽分泌表达的差异

徐学武,裴树俊,缪雪蓉,俞卫锋\*

第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科,上海 200438

**[摘要]** **目的:**考察人源神经生长因子信号肽序列是否具有介导β-内啡肽分泌性表达的作用,以及人源与鼠源神经生长因子信号肽的作用效率是否存在差异。**方法:**构建2个分别利用人或鼠的信号序列介导β-内啡肽分泌表达的真核表达载体 pcDNA3.1-hEP 和 pcDNA3.1-mEP;脂质体法转染 NIH3T3 细胞,转染 48 h 后分别收集细胞培养上清液、细胞,以及细胞呈单层生长的盖玻片。收集的上清液用 RIA 法测定β-内啡肽的浓度;收集的细胞提取总 RNA,一步法 RT-PCR 检测融合基因的 mRNA 的转录;长有细胞的盖玻片处理后进行细胞免疫荧光染色。**结果:**RT-PCR 的结果显示,所构建的融合基因在 NIH3T3 细胞内发生了表达,β-内啡肽主要分布在 NIH3T3 细胞的胞质内。pcDNA3.1-hEP 和 pcDNA3.1-mEP 分别转染 NIH3T3 细胞 48 h 后,细胞培养上清β-内啡肽的浓度分别是(280.33±24.16) pg/ml 和(191.04±7.96) pg/ml,有显著的统计学差异( $P < 0.05$ ),且与空白对照之间均有显著的统计学差异( $P < 0.01$ )。**结论:**人源神经生长因子信号肽序列能够介导β-内啡肽蛋白的分泌性表达,且作用效率要优于鼠源信号肽。

**[关键词]** 信号肽;神经生长因子;β-内啡肽;分泌性表达

**[中图分类号]** R 341 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)04-0378-05

### Signal peptide of human nerve growth factor is better than signal peptide of mouse nerve growth factor in mediating secretory expression of beta-endorphin

XU Xue-wu, PEI Shu-jun, MIAO Xue-rong, YU Wei-feng\*

Department of Anesthesia, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To clarify whether the signal peptide of human nerve growth factor can mediate secretory expression of beta-endorphin and whether there is difference between the efficiency of signal peptides from human and mouse nerve growth factor. **Methods:** Two kinds of eukaryotic vectors containing human or mouse signal sequence-mediated secretory expression of beta-endorphin were constructed. The culture supernatant and cells were collected 48 h after NIH3T3 cells were transfected by the two kinds of vectors, and the cover slips with single-layer cells was prepared. The concentration of beta-endorphin in the culture was determined by radio-immunoassay. The total RNA was extracted from cells and mRNA from fusion genes was assayed by RT-PCR. Cells on cover slips were subjected to immunofluorescence staining. **Results:** RT-PCR showed that the fusion genes were expressed in NIH3T3 cells; the expression of beta-endorphin was mainly in the cytoplasm of NIH3T3 cells. The concentrations of beta-endorphin in the supernatants 48 h after transfection with pcDNA3.1-hEP and pcDNA3.1-mEP were (280.33±24.16) pg/ml and (191.04±7.96) pg/ml ( $P < 0.05$ ), respectively, and they were significantly different from that of the blank control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The signal sequence of human nerve growth factor can mediate the secretory expression of protein and the efficacy of human signal peptide is higher than that of mouse signal peptide.

**[KEY WORDS]** signal peptide; nerve growth factor; beta-endorphin; secretory expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(4): 378-382]

蛋白质的表达包括分泌性表达和组成性表达。众所周知,信号肽对于蛋白质的分泌表达是一个非常重要的成分和关键的因子。信号肽已广泛地应用于基因工程和医药行业。蛋白质的分泌性表达这一

过程是非常复杂的。首先,细胞质内的信号肽识别蛋白(SRP)对信号肽进行识别<sup>[1]</sup>,形成信号肽-SRP复合物(signal peptide-SRP complex)。然后,信号肽-SRP复合物定位到内质网膜上,信号肽再从复合

**[收稿日期]** 2008-08-12 **[接受日期]** 2009-02-13

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30700788). Supported by National Natural Science Foundation of China(30700788).

**[作者简介]** 徐学武,博士,主治医师. E-mail:decode555@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875231, E-mail:ywf808@sohu.com

物上转移到内质网上的一种整合的膜糖蛋白(the integral membrane glycoprotein),后者与易位子(translocon)邻近,是内质网上的信号肽受体,这也是进入分泌通路的第一个步骤<sup>[2]</sup>。在蛋白进行翻译的同时或翻译后处理过程中,与转位蛋白结合后,蛋白前体在转位蛋白的协助下进行定位<sup>[3]</sup>。在蛋白翻译及定位过程中,信号肽在特定信号肽酶的作用下从前体蛋白上被切下形成成熟的可分泌的蛋白,并释放进入内质网内腔<sup>[4-5]</sup>。信号肽都有一个经典的结构,N-端带正电荷的氨基酸残基序列(n区,1~5个氨基酸),中部的疏水核心(h区,7~15个氨基酸),以及C-端包含一个具有在1位和3位为非极性氨基酸的极化区段(n区,3~7个氨基酸)<sup>[6]</sup>。

虽然目前有大量的关于神经生长因子研究的文献报道,但是有关其表达序列中信号肽序列的报道很少见。体外研究及在体研究都已证实鼠源的神经生长因子信号肽能够介导 $\beta$ -内啡肽的分泌表达<sup>[7-8]</sup>。人类基因组内存在鼠源神经生长因子信号肽序列的对应物,但尚没有该人源对应序列的研究见诸报道,并且这两个对应序列在引导分泌表达时的工作效率未见比较研究。在本研究中,作者等首先从人类基因组获取人源神经生长因子信号肽序列,并在此基础上将人 $\beta$ -内啡肽的表达序列与之相连,同时在接点处添加了Furin水解酶的识别序列,从而形成了能够分泌表达人 $\beta$ -内啡肽的融合基因。研究结果发现,人源神经生长因子的信号肽序列能够在NIH3T3细胞内介导 $\beta$ -内啡肽的分泌表达,与鼠源信号肽作用效果一致,且人源信号肽的作用效率要高于鼠源信号肽。

## 1 材料和方法

1.1 菌株繁殖和细胞培养 *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ 菌株(Gibco BRL, UK)在LB培养基中进行培养传代,重组质粒载体转化培养的细菌用于实验。购自于ATCC(Manassas, VA, USA)的NIH3T3细胞在含有10%的胎牛血清(PAA, Germany)的DMEM(Gibco BRL, UK)中培养,实验中重组真核表达载体转染该细胞后进行相关检测。

1.2 PCR反应模板的制备 从1名志愿者的外周静脉取血,放入含EDTA的离心管内;取300  $\mu$ l静脉血转入新离心管内,加Tris-Cl(pH 7.6, 20 mmol/L)900  $\mu$ l,振荡混匀后室温孵育10 min,13 000  $\times$  g离心20 s;留20  $\mu$ l上清外余弃除,重悬收集的白细胞;加冰预冷的细胞裂解液600  $\mu$ l,混匀后加3  $\mu$ l蛋白酶K,55 $^{\circ}$ C消化至少3 h至过夜;冷却至室温,加3

$\mu$ l无RNase的DNase,37 $^{\circ}$ C孵育60 min;冷却至室温后加200  $\mu$ l醋酸钾,剧烈振荡混匀,于4 $^{\circ}$ C下13 000  $\times$  g离心3 min;上清转入含600  $\mu$ l异丙醇的新离心管内,混匀后室温13 000  $\times$  g离心1 min;弃上清,加70%乙醇600  $\mu$ l,颠倒数次,室温下13 000  $\times$  g离心1 min;弃上清,室温干燥DNA沉淀,用100  $\mu$ l TE (pH 7.6)溶解,储存备用。

1.3 表达载体的构建 根据人源神经生长因子的信号肽序列,合成了2条引物:正向引物 I 5'-CCG AAG CTT TTC CAG GTG CAT AGC GTA ACC ATG TCC ATG TTG TTC TAC AC-3'和反向引物 I 5'-CGC TTG CTC TTG TGA GTC CTG TTG A-3'。取1  $\mu$ g人基因组DNA作为PCR反应的模板,PCR反应在Primer-STAR polymerase(TaKaRa)催化下进行,参数如下:95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 0.5 min,58 $^{\circ}$ C 0.5 min,72 $^{\circ}$ C 0.5 min,72 $^{\circ}$ C 3 min,共进行30个循环,产物进行电泳后用QIAquick gel extraction kit(Qiagen)回收392 bp大小的DNA片段。利用2条引物从模板质粒pTCNE<sup>[7]</sup>内获取人 $\beta$ -内啡肽的DNA序列:正向引物 II 5'-TCA ACA GGA CTC ACA AGA GCA AGC G-3'和反向引物 II 5'-CGC GAA TTC ATT ACT CGC CCT TCT TGT AGG C-3',PCR反应参数如下:95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 0.5 min,58 $^{\circ}$ C 0.5 min,72 $^{\circ}$ C 0.5 min,72 $^{\circ}$ C 3 min,共进行30个循环,产物进行电泳后用QIAquick gel extraction kit(Qiagen)回收132 bp大小的DNA片段。将前2个PCR反应的产物混合后作为第3个PCR反应的底物,引物为正向引物 I 和反向引物 II,反应的参数为:95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 0.5 min,58 $^{\circ}$ C 0.5 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 3 min,共进行30个循环,产物进行电泳后同样回收499 bp大小的DNA片段,后者经Hind III和EcoR I (NEB)消化酶切后插入到pcDNA-3.1(+)(Invitrogen)内产生由人源神经生长因子信号肽引导的表达人 $\beta$ -内啡肽的真核表达载体pcDNA-3.1-hEP。用正向引物 I 和反向引物 II从模板质粒pTCNE内获取由鼠源神经生长因子信号肽引导分泌表达的融合基因片段,PCR反应参数同前,产物经Hind III和EcoR I (NEB)消化酶切后同样插入到pcDNA-3.1(+)(Invitrogen)内形成由鼠源神经生长因子信号肽引导的表达人 $\beta$ -内啡肽的真核表达载体pcDNA-3.1-mEP。

菌液PCR挑选阳性克隆,DNA测序证实真核表达载体内插入的表达片段的正确性,随后pcDNA-3.1-hEP、pcDNA-3.1-mEP和pcDNA-3.1(+)(Invitrogen)3个载体进行大量扩增,并用Qiagen Plasmid Mini Kit

(Qiagen)抽提质粒用于后续细胞实验。

1.4 质粒载体的细胞转染 6孔板(Corning)内 NIH3T3(ATCC)用含10%胎牛血清的高糖DMEM于37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>环境下培养。根据 Lipofectamine2000 转染试剂(Invitrogen)产品说明,真核表达载体 pcDNA-3.1-hEP、pcDNA-3.1-mEP 和 pcDNA-3.1(+)(空白对照)分别转染 NIH3T3 细胞。转染前 1 d,6孔板各孔内接种 NIH3T3(2 × 10<sup>5</sup> cells/well)。由于 pcDNA-3.1-hEP 和 pcDNA-3.1-mEP 相对分子质量几乎相等,而 pcDNA-3.1(+ )的相对分子质量稍小,为确保每个孔内转染质粒的分子数一致,每孔内 pcDNA-3.1-hEP、pcDNA-3.1-mEP 质粒的平均转染量为 1.6 μg,而 pcDNA-3.1(+ )空白载体对照的转染量为 1.4 μg。用 Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) 250 μl 稀释载体 DNA,Lipofectamine 2000 转染试剂用同种同量溶液进行稀释,室温孵育 5 min;混合 2 个稀释液并混匀,再室温孵育 20 min;6孔板每孔加该混合液 500 μl,交叉晃动数次使转染试剂均匀分布,继续于 37℃ 的二氧化碳培养箱内培养 48 h。

1.5 逆转录 PCR 反应 转染后 48 h 收集质粒转染的 NIH3T3 细胞,利用 TRIzol 分离液(Invitrogen)抽提细胞总 RNA,并测定浓度,Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit(Invitrogen)逆转录合成 cDNAs。RT-PCR 反应引物为正向引物 I 和反向引物 II,逆转录合成的 cDNAs 作为反应底物,参数如下:95℃ 3 min,95℃ 0.5 min,58℃ 0.5 min,72℃ 1 min,72℃ 3 min,共进行 30 个循环,产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳。

1.6 细胞免疫荧光 消毒的盖玻片置于 6 孔板内,接种的 NIH3T3 细胞单层生长。取出长满细胞的盖玻片用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,随后用 4%多聚甲醛固定 15 min,再用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;用 1%BSA 孵育 30 min;用含 5%BSA 的 PBS 稀释的兔抗人 β-内啡肽的多克隆抗体(ABcam, ab43825),4℃过夜孵育;PBS 洗涤 3 × 5 min,Cy3 标记的羊抗兔 IgG(Sigma)室温避光孵育 1 h;PBS 洗涤 3 × 5 min,1 μg/ml 的 Hoechst 染色 1 min;PBS 洗涤 3 × 5 min,封片后在 Olympus IX70 倒置荧光显微镜下成像(10 × 20)。

1.7 放射免疫分析 质粒转染 48 h 后收集细胞培养上清,并离心 5 000 × g 5 min;离心后上清转移入新离心管。每毫升待测样品内加 200 U 的抑肽酶。样品内 β-内啡肽浓度采用购自于第二军医大学基础部

神经生物学教研室的 RIA 试剂盒进行测定,操作过程严格按照产品说明书进行,最后得到标准曲线和计算公式并计算出每个样品中 β-内啡肽的最终浓度。

## 2 结果

2.1 表达人 β-内啡肽的载体的构建 本研究中通过将分泌表达人 β-内啡肽融合基因的 DNA 片段插入到载体 pcDNA3.1(+ )内构建了分别由人源或鼠源神经生长因子信号肽介导分泌表达的真核表达载体 pcDNA 3.1-hEP 和 pcDNA 3.1-mEP,前者 pcDNA3.1-hEP 包含了人源神经生长因子信号肽,pcDNA3.1-mEP 中的融合基因的分泌表达是由鼠源神经生长因子信号肽介导的(图 1),两者的融合基因都是由 CMV 启动子启动表达的。由于 β-内啡肽的受体位于细胞膜上,故所表达的 β-内啡肽必须经过由信号肽介导的分泌表达过程转运到细胞外才能发挥作用。为了实现 2 个载体内人 β-内啡肽的分泌表达,作者把 2 个不同信号肽的序列分别与人 β-内啡肽相连接形成表达基因,并且为了保证 β-内啡肽能够从蛋白前体上顺利分离,作者等在信号肽与 β-内啡肽的序列之间加入了能够为蛋白水解酶 Furin 所识别的包含 4 个氨基酸的序列。

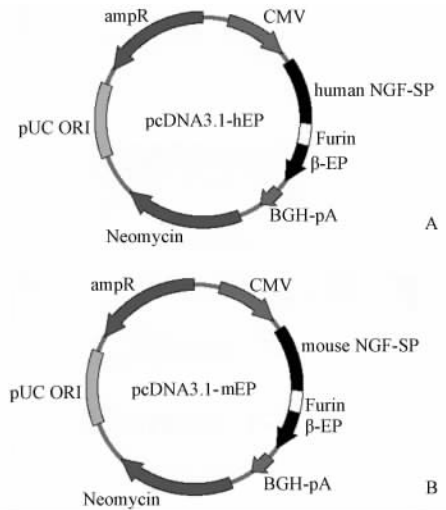


图 1 真核表达载体结构示意图

Fig 1 Schematic representation of construction of two eukaryotic expression vectors

A:pcDNA3.1-hEP. The signal peptide of human nerve growth factor (human NGF-SP) was inserted between a promoter and a fragment of polyA;B:pcDNA3.1-mEP. The signal peptide of mouse nerve growth factor (mouse NGF-SP) was included. Furin: the recognition sequence of furin hydrolytic enzyme. β-EP: human beta-endorphin sequence

2.2 NIH3T3 内 β-内啡肽 mRNA 检测 未经处理

的 NIH3T3 细胞内没有  $\beta$ -内啡肽的表达。RT-PCR 结果显示, 转染所构建的真核表达载体后 NIH3T3 细胞内出现了相应的  $\beta$ -内啡肽的 mRNA(图 2A),

RT-PCR 产物为 499 bp。此外, 转染空白对照载体 pcDNA3. 1(+ ) 的 NIH3T3 细胞内没有检测到相同的产物。

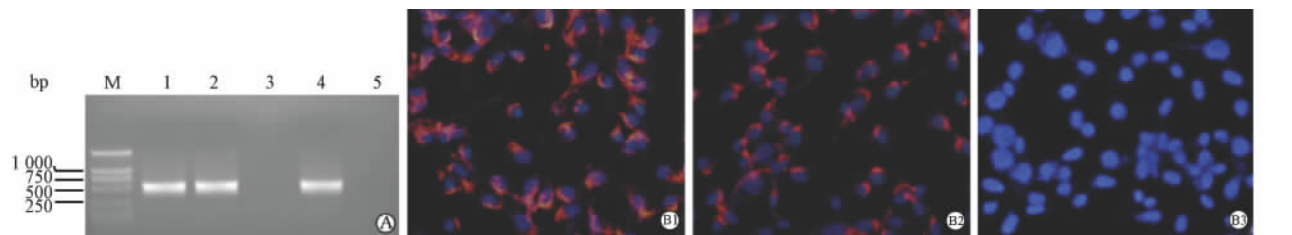


图 2  $\beta$ -内啡肽在 NIH3T3 细胞内的表达

Fig 2 Expression of beta-endorphin in cultured NIH3T3 cells

A: Detection of mRNA from fusion genes expressing beta-endorphin by RT-PCR. M; DNA marker DL2000; 1: mRNA from pcDNA3. 1-hEP; 2: mRNA from pcDNA3. 1-mEP; 3: mRNA from pcDNA3. 1(+); 4: Positive control; 5: Negative control. B: Immunofluorescence of beta-endorphin; Intracellular localization of beta-endorphin was detected by immunocytochemistry in NIH3T3. Nuclei were counter-stained with Hoechst33342. B1: pcDNA3. 1-hEP; B2: pcDNA3. 1-mEP. One representative staining out of several independent experiments is shown; B3: pcDNA3. 1(+), as the negative control. Original magnification:  $\times 200$

2.3  $\beta$ -内啡肽在 NIH3T3 细胞内的表达 为了验证新构建的融合基因能够发生表达, 我们利用免疫荧光染色方法分析了融合基因表达产物  $\beta$ -内啡肽在 NIH3T3 细胞中的表达。由于在未经处理的 NIH3T3 细胞中没有内源性  $\beta$ -内啡肽的表达, 可以认为在实验中所检测到的  $\beta$ -内啡肽是所构建的融合基因的表达产物。检测结果显示,  $\beta$ -内啡肽在真核表达载体转染的 NIH3T3 细胞质内有丰富的表达(图 2B), 而在转染空白对照质粒的细胞中并未检测到  $\beta$ -内啡肽的存在, 提示所构建的融合基因确实在 NIH3T3 细胞中发生了表达。

2.4 信号肽具有不同的工作效率 为明确融合基因所表达的  $\beta$ -内啡肽能否被转运到细胞外, pcDNA3. 1-hEP、pcDNA3. 1-mEP 和空白对照 pcDNA3. 1(+ ) 分别转染了 6 孔板培养的 NIH3T3 细胞。 $\beta$ -内啡肽首先以蛋白前体的形式合成, 其前体再发生剪切而形成有活性的  $\beta$ -内啡肽并被转运至细胞外, 所以细胞外的  $\beta$ -内啡肽是检测目标, 分析  $\beta$ -内啡肽在细胞培养上清中的浓度采用了放射免疫分析法。pcDNA3. 1-hEP 和 pcDNA3. 1-mEP 分别转染 NIH3T3 细胞 48 h 后, 收集细胞培养上清, RIA 法测定的  $\beta$ -内啡肽浓度分别是  $(280.33 \pm 24.16)$  pg/ml 和  $(191.04 \pm 7.96)$  pg/ml, 均高于空白载体对照组  $[(4.24 \pm 4.28)$  pg/ml,  $P < 0.01$ ], 而 pcDNA3. 1(+ ) 转染所产生的培养上清中仅检测到很微量的  $\beta$ -内啡肽, 提示 2 个融合基因在细胞内表达出了  $\beta$ -内啡肽, 且融合基因的表达产物在相应信号肽的作用下能够通过分泌通路完成转运。但同时可以发现在

pcDNA3. 1-hEP 和 pcDNA3. 1-mEP 转染的 NIH3T3 细胞培养上清中  $\beta$ -内啡肽的水平间存在显著的差异 ( $P < 0.05$ ), 且转染 pcDNA3. 1-hEP 时产物浓度明显高于 pcDNA3. 1-mEP 转染时的产物浓度, 进一步提示人源神经生长因子信号肽的作用效率优于鼠源信号肽。

### 3 讨论

信号肽在蛋白质的分泌表达中起着非常重要的作用。在信号肽 h/c 交界处以及成熟蛋白 +1 位的氨基酸残基的性质对信号肽的定位和剪切存在一定的影响。此外, 信号肽也会影响基因表达的调控<sup>[9-10]</sup>, 对蛋白产物的分泌<sup>[11-12]</sup>和活性<sup>[13-14]</sup>也存在影响。在真核细胞中, 分泌性蛋白和膜蛋白的前体中都包含一段对蛋白定位至内质网所必需的信号序列, 该信号序列对于表达的蛋白产物进入分泌通路是必需的。研究中所检测的  $\beta$ -内啡肽基因是人为设计的分泌性基因, 其在本研究中的作用是为了方便分析信号肽的作用效率。包含信号肽的前体蛋白首先进入分泌通路, 并在进入蛋白转运通道后, 信号肽在信号肽酶的作用下从前体蛋白上剪切下来,  $\beta$ -内啡肽成为有活性的蛋白。

虽然所有包含信号肽的蛋白通常情况下都会穿越质膜, 但前体随后的命运由于其中是否存在信号肽酶的特异酶切位点而不同。I 型信号肽有一个信号肽(引导肽)酶的切点, 其成熟的多肽可从膜上释放, 而 II 型信号肽是硫基甘油二酯共价修饰的底物, 本研究所选择的信号肽属于 I 型信号肽。在培养的

哺乳动物细胞中,不仅蛋白的合成和分泌较强烈地依赖于所选择的信号肽<sup>[12, 15]</sup>,而且信号肽的优化也可以增加异种蛋白的表达水平<sup>[16-17]</sup>。很明显,只有在将信号肽从“整体蛋白”(信号肽段及内啡肽)上剪切下来,本研究中所表达的 $\beta$ -内啡肽才能成为具有活性的成熟蛋白。细胞培养基内的 $\beta$ -内啡肽的水平与所采用的信号肽的作用效率高度相关。据报道,将小鼠的神经生长因子信号肽序列连接至 $\beta$ -内啡肽序列前形成融合基因后,体外实验和在体实验中均证实其神经生长因子信号肽能够介导 $\beta$ -内啡肽的分泌表达<sup>[7-8]</sup>。同时,作者注意到在人类基因组存在着一个鼠源神经生长因子信号肽序列的对应物,但没有有关该信号肽序列作用的报道。

本研究中,首先根据人基因组中的鼠源神经生长因子信号肽相应的DNA序列设计合成了2对引物,以人基因组DNA为模板通过3次PCR反应得到了由人源神经生长因子信号肽引导的人 $\beta$ -内啡肽的表达基因。随后作者等构建了2个真核表达载体pcDNA3.1-hEP和pcDNA3.1-mEP以明确人源神经生长因子信号肽序列是否可以如鼠源信号肽一样介导 $\beta$ -内啡肽的分泌,并且评价比较了人源信号肽和鼠源信号肽序列的工作效率。pcDNA3.1-hEP包含了人源神经生长因子信号肽,pcDNA3.1-mEP包含鼠源神经生长因子信号肽。比较所应用的2个信号肽的DNA序列及其所翻译出的多肽氨基酸序列后,发现2个序列的DNA碱基序列的相似性高达83%,蛋白氨基酸序列的相似性也达到了80%,但2个信号肽的作用效率经检测存在显著差异,这可能与序列中不同的部分造成,对这部分序列进行深入的研究有助于明确信号肽的作用特点。

总之,本研究利用免疫荧光方法检测了 $\beta$ -内啡肽多肽在小鼠原代成纤维细胞NIH3T3细胞中的表达,该多肽主要位于细胞质内,而不是位于细胞核内。随后用RIA法检测了细胞培养上清液中分泌表达的 $\beta$ -内啡肽的水平,发现在空白对照与两个实验组间都存在显著差异。此外,在2个实验组的 $\beta$ -内啡肽的水平之间也存在显著差异,说明在介导 $\beta$ -内啡肽的分泌表达中人源信号肽的作用效率要高于鼠源信号肽。

## [参考文献]

- [1] Keenan R J, Freymann D M, Stroud R M, Walter P. The signal recognition particle[J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 755-775.
- [2] Schwartz T, Blobel G. Structural basis for the function of the  $\beta$  subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor [J]. *Cell*, 2003, 112: 793-803.
- [3] de Keyzer J, van der Does C, Driessen A J. The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60: 2034-2052.
- [4] Paetzel M, Karla A, Strynadka N C, Dalbey R E. Signal peptidases[J]. *Chem Rev*, 2002, 102: 4549-4580.
- [5] Lemberg M K, Martoglio B. On the mechanism of SPP-catalysed intramembrane proteolysis; conformational control of peptide bond hydrolysis in the plane of the membrane[J]. *FEBS Lett*, 2004, 564: 213-218.
- [6] Tuteja R. Type I signal peptidase: an overview[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 441: 107-111.
- [7] 徐学武, 俞卫锋, 王星华, 李泉, 董刚, 吴飞翔. 含人 $\beta$ -内啡肽融合基因的腺病毒/腺相关杂合病毒载体的构建与鉴定[J]. *生物技术*, 2005, 15: 6-8.
- [8] 尤圣武, 俞卫锋, 于布为, 钱其军, 王星华, 苏长青, 等. 重组小鼠神经生长因子前导肽和人 $\beta$ -内啡肽融合基因非增殖型腺病毒的构建和鉴定[J]. *中华麻醉学杂志*, 2004, 24: 896-900.
- [9] Serruto D, Galeotti C L. The signal peptide sequence of a lytic transglycosylase of *Neisseria meningitidis* is involved in regulation of gene expression[J]. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 5): 1427-1437.
- [10] Lee S J, Han Y H, Nam B H, Kim Y O, Reeves P R. A novel expression system for recombinant marine mussel adhesive protein Mefp1 using a truncated OmpA signal peptide[J]. *Mol Cells*, 2008, 26: 34-40.
- [11] Holden P, Keene D R, Lunstrum G P, Bächinger H P, Horton W A. Secretion of cartilage oligomeric matrix protein is affected by the signal peptide[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 17172-17179.
- [12] Knappskog S, Ravneberg H, Gjerdrum C, Trösse C, Stern B, Pryme I F. The level of synthesis and secretion of Gaussia princeps luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide[J]. *J Biotechnol*, 2007, 128: 705-715.
- [13] Lo H F, Chou W M, Chen P J, Lin L L. Influence of signal-peptide truncations on the functional expression of *Escherichia coli* gamma-glutamyltranspeptidase [J]. *J Basic Microbiol*, 2008, 48: 260-268.
- [14] Martín M, Gutiérrez J, Criado R, Herranz C, Cintas L M, Hernández P E. Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis* [J]. *J Food Prot*, 2007, 70: 2792-2798.
- [15] Kato T, Park E Y. Specific expression of GFP<sub>uv</sub>- $\beta$ 1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 fusion protein in fat body of *Bombyx mori* silkworm larvae using signal peptide[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359: 543-548.
- [16] Ravn P, Arnau J, Madsen S M, Vrang A, Israelsen H. Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis* [J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 8): 2193-2201.
- [17] Chang H T, Kao Y L, Wu C M, Fan T C, Lai Y K, Huang K L, et al. Signal peptide of eosinophil cationic protein upregulates transforming growth factor- $\alpha$  expression in human cells[J]. *J Cell Biochem*, 2007, 100: 1266-1275.