

龚 丽,李云霞.一种新型 ATP-依赖型 ClpP 家族蛋白水解酶 *PlclpP* 基因的克隆、表达和酶学特性[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):47-50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.012

一种新型 ATP-依赖型 ClpP 家族蛋白水解酶 *PlclpP* 基因的克隆、表达和酶学特性

龚 丽,李云霞

(上海海洋大学食品科学与技术学院/农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估重点实验室,上海 201306)

摘要:运用基因克隆技术,以分离鉴定获得的蛋白水解酶高活性类芽孢杆菌(*Paenibacillus lautus*) CHN26 菌株的基因组 DNA 为模板,经克隆鉴定该菌株是一种新型 ATP-依赖型 ClpP 家族蛋白水解酶 *PlclpP* 基因,全长 585 bp,编码 194 个氨基酸,分子量约为 21 ku。采用大肠杆菌(*Escherichia coli*) pET 表达系统构建 *PlclpP* 基因表达质粒 pET-28-*PlclpP*,并在大肠杆菌 BL21 中实现了重组 PlClpP 蛋白的表达。利用组氨酸标签(His-tag)亲和纯化法获得 PlClpP 纯化蛋白,发现 PlClpP 可能与宿主菌未知伴侣分子形成蛋白复合物。PlClpP 复合物具有 ATP-依赖型酪蛋白水解酶活性,最适反应温度为 40 ℃、pH 值 7.0。表面活性剂强烈抑制 PlClpP 复合物的酶活性,而常规丝氨酸蛋白酶抑制剂对其活性没有抑制作用。本研究结果为蛋白酶新基因资源的开发、ClpP 家族蛋白酶的基础理论和应用研究奠定了基础。

关键词:ClpP 家族蛋白水解酶;类芽孢杆菌;基因;克隆;表达;酶学特性

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0047-04

蛋白水解酶约占全球酶制剂市场的 60%,被广泛应用于食品、医药、洗涤剂、农业等领域^[1]。微生物是水解酶的主要来源,探索并开发微生物新基因资源,对于解决目前商品化酶制剂种类及来源较少、底物单一、价格昂贵等问题具有重要意义。

ClpP(caseinolytic peptidase)家族 ATP-依赖型伴侣分子相连(chaperone-linked)的酪蛋白水解肽酶广泛存在于原核

生物及真核生物中^[2],其利用 ATP 驱动蛋白底物解折叠并转位进入蛋白水解腔(chamber)中降解成小分子肽^[3]。1988 年,ClpP 蛋白酶首次被发现于大肠杆菌(*Escherichia coli*)中^[4]。此后的大量研究表明,大肠杆菌中 ClpP 蛋白酶(EcClpP)由蛋白水解核心 ClpP、依赖 ATP 的伴侣分子 ClpA 或 ClpX 组成,其蛋白水解腔由催化位点序列形成的 2 个反向同型七聚体环构成^[2]。在国外,ClpP 蛋白酶已商品化,而目前国内尚无涉及 ClpP 家族蛋白酶的研究报道。此外,有关类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* spp.)中 *clpP* 基因功能的研究国内外均无报道。采用基因克隆技术,以笔者所在实验室分离鉴定获得的

收稿日期:2015-04-07

基金项目:上海市科学技术委员会项目(编号:09320503600)。

作者简介:龚 丽(1989—),女,上海人,硕士研究生,主要从事食品质量与安全研究。E-mail:emo_jun@163.com。

参考文献:

- [1] 詹启敏,陈 杰.细胞周期与肿瘤转化医学[J]. 中国肿瘤临床,2014,41(1):1-7.
- [2] Kirsch T, Nickel J, Sebald W. BMP-2 antagonists e-merge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor[J]. EMBO,2000,19(12):3314-3324.
- [3] Evans T, Rosenthal E T, Youngblom J, et al. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in seaurchin eggs that is destroyed at each cleavage division[J]. Cell,1983,33(2):389-396.
- [4] Lewin B. Driving the cell: M phase kinase, its partners, and substrates[J]. Cell,1990,61(5):743-752.
- [5] 韩世愈,王 娇.细胞周期蛋白在恶性肿瘤中的表达及其在肿瘤治疗中的作用[J]. 分子诊断与治疗杂志,2013,5(5):357-360.
- [6] Shigeo H, Masamitsu Y. Kinase independent activity of *Cdc2/CyclinA* prevents the S phase in the *Drosophila* cell cycle[J]. Genes Cells,1999,4:111-122.
- [7] 潘敏慧,洪开丽,陈向云,等. *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 是家蚕细胞周期进程所必需的[J]. 中国科学:生命科学,2013,43(3):240-246.
- [8] 刘丽华,沈卫德,李 兵,等. siRNA-CyclinE 对家蚕细胞增殖的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2013,41(4):21-25.
- [9] 范兰芬,钟杨生,林健荣. 家蚕细胞周期蛋白基因 *BmCcn1* 的克隆及表达分析[J]. 昆虫学报,2010,53(12):1325-1332.
- [10] 江 艳. *BmCycH* 基因及其在家蚕中表达特性的研究[D]. 杭州:浙江理工大学,2010.
- [11] 中国农业科学院蚕业研究所. 中国养蚕学[M]. 上海:上海科学出版社,1991:228-230.
- [12] Scheffe J H, Lehmann K E, Buschmann I R, et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C-T difference" formula[J]. Journal of Molecular Medicine - JMM,2006,84(11):901-910.
- [13] 向仲怀,黄君霆,夏建国. 蚕丝生物学[D]. 北京:中国林业出版社,2005:12-14.
- [14] 刘丽华,沈卫德,李 兵,等. 家蚕细胞周期蛋白家族基因在 5 龄幼虫组织中的表达谱分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(11):13-17.

蛋白水解酶高活性类芽孢杆菌(*P. laetus*) CHN26 菌株基因组 DNA 为模板,克隆鉴定了该菌株的一种新型 ATP-依赖型 ClpP 家族蛋白水解酶 *PlclpP* 基因,并在大肠杆菌 BL21 中实现了异源表达。本研究结果为 ClpP 家族蛋白酶的基础理论和应用研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Mini BEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、Premix Ex Taq Version 2.0、T₄ DNA ligase 均购自宝生物工程(大连)有限公司。限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 均购自 Promega(美国)公司, Luria-Bertani (LB) 培养基购自北京陆桥技术有限责任公司。卡那霉素、氨苄青霉素、聚丙烯酰胺和 *N,N'*-亚甲双丙烯酰胺等 SDS-PAGE 试剂、蛋白质定量检测试剂盒均购自生工生物工程(上海)有限公司。蛋白裂解试剂 BugBuster Protein Extraction、纯化试剂 Ni-NTA His-Bind[®] resin 均购自 Merck Millipore(德国)公司。 β -酪蛋白购自 Sigma-Aldrich(美国)公司。

大肠杆菌 TOP10、大肠杆菌 BL21、基因克隆载体 pGM-T (Amp^r) 均购自天根生物技术有限公司;基因表达载体 pET-28a(Km^r) 购自 Merck Millipore(德国)公司;类芽孢杆菌 CHN26 由笔者所在实验室分离鉴定并保存。

1.2 试验方法

1.2.1 分子生物学方法 采用 Primer 5.0 软件(<http://www.premierbiosoft.com/>)设计 *PlclpP* 基因 PCR 扩增上、下游引物 ClpP-P1f(5'-ATGGAGGATGAAACCATGAA-3')、ClpP-P1r(5'-TCACAGTTTGGTGACGATGT-3'),以及在 5' 端分别引入限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点(以下划线表示)的上、下游引物 ClpP-P2f(5'-CGGGATCCATGGAGGATGA-3')、ClpP-P2r(5'-CCCCAAGCTTCAGTTTGTGAC-3')。寡核苷酸引物合成、DNA 序列测定由生工生物工程(上海)有限公司完成,基因组和质粒 DNA 的提取参照试剂盒说明书完成。参考 Shi 等的方法^[5]进行 PCR 反应、产物纯化、酶切、DNA 片段连接与转化、菌落 PCR 检测等。采用 Clustal 2.1 软件(www.ebi.ac.uk/Tools/services)进行多序列比对分析。

1.2.2 蛋白表达及纯化 参考 Li 等的方法^[6]进行 *PlclpP* 基因表达质粒的构建、蛋白的诱导表达、组氨酸标签(His-tag)亲和纯化、SDS-PAGE 等。

1.2.3 蛋白水解酶活性的检测 以 β -酪蛋白为底物,在 150 μ L 酶反应液[2.7 μ g β -casein, 5 μ L 0.1 mol/L ATP, 2 mmol/L ZnCl₂, 50 mmol/L Tris-HCl(pH 值为 7.3)]中加入 50 μ L 纯化酶进行反应。将 40 $^{\circ}$ C、pH 值 7.0 条件下,30 min 内水解 β -酪蛋白使 $D_{362\text{nm}}$ 值增加 0.01 的酶量定义为 1 个酶活性单位(U)^[7]。参考 Li 等的方法^[6]测定温度、pH 值,表明活性剂(SDS, Tween-20, Tween-80)和蛋白酶抑制剂(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)对 *PlclpP* 复合物酶活性的影响。

2 结果与分析

2.1 蛋白水解酶高活性菌株类芽孢杆菌 CHN26 的分离鉴定

基于酶功能的筛选方法^[6],笔者所在实验室从东海水产

养殖池塘底泥中分离获得 1 株蛋白水解酶高活性菌株,经 16S rRNA 基因序列测定(GenBank 登录号为 KF460030)分析及生理生化鉴定,发现其为厚壁菌门(Firmicutes)芽孢杆菌纲(Bacilli)芽孢杆菌目(Bacillales)类芽孢杆菌科(Paenibacillaceae)类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)的细菌,命名为类芽孢杆菌 CHN26^[6]。笔者所在实验室对该菌株的多种蛋白水解酶基因进行了研究,本次报道其中一种酪蛋白水解肽酶 *clpP* 基因的克隆和表达。

2.2 类芽孢杆菌 CHN26 的 *PlclpP* 基因分子克隆及序列分析

迄今为止,国内外涉及类芽孢杆菌中 *clpP* 基因功能的研究尚无文献报道。本研究利用目前 GenBank 数据库中类芽孢杆菌属 Y412MC10 菌株的全基因组信息(GenBank 登录号为 NC_013406.1),基于其 *clpP* 基因序列设计了 PCR 扩增引物 clpP-P1f/r。提取类芽孢杆菌 CHN26 基因组 DNA 并以其为模板进行 PCR 扩增,获得约 0.6 kb 的单一 PCR 扩增产物。PCR 产物经纯化后与克隆载体 pGM-T 连接,转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞。筛选并提取 Amp^r 阳性转化子重组质粒,经 DNA 序列测定发现,克隆所得类芽孢杆菌 CHN26 的 *clpP* 基因全长 585 bp,编码 194 个氨基酸,预测分子量约为 21 ku,将其命名为 *PlclpP*。

BLAST 序列比对分析结果显示, *PlclpP* 序列与 GenBank 数据库中类芽孢杆菌属的 ATP-依赖型 ClpP 蛋白酶水解亚单位氨基酸序列的相似性为 71%~98%,而与 *EcClpP* 的氨基酸序列相似性仅为 62%。然而 *clpP* 基因多序列比对分析结果显示, *PlclpP* 基因序列含有 S14_ClP 家族的特征性八肽结构域(KDIHMYIN,第 59 个至第 66 个氨基酸)(图 1),其中第 59 个的赖氨酸(Lys₅₈, K)、第 60 个的天冬氨酸(Asp₅₉, D)、第 64 个的催化亲核物质(catalytic nucleophile)酪氨酸(Tyr₆₃, Y)为高度保守的催化三分体残基(catalytic triad residues),在酪蛋白水解中发挥重要作用^[8]。此外, *PlclpP* 序列还含有丝氨酸蛋白水解酶高度保守的催化活性位点(Ser₉₉-His₁₂₄-Asp₁₇₃)(图 1)。

2.3 *PlclpP* 基因表达质粒 pET-28a-*PlclpP* 的构建与鉴定

基于本研究获得的 *PlclpP* 基因序列,设计了携带限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的引物 clpP-P2f/r,采用 PCR 方法扩增 *PlclpP* 基因,获得单一 PCR 产物。采用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 PCR 产物,回收纯化酶切产物。同时,提取表达载体 pET-28a 的质粒 DNA,经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切为线性的 DNA 片段,酶切产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定结果见图 2。

将上述纯化后的酶切片段经 T₄-DNA 连接酶连接后,转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,在含有 30 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂平板上,采用菌落 PCR 方法筛选获得阳性转化子克隆(图 2)。提取阳性转化子重组质粒 DNA,经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切验证为单一 DNA 片段插入,大小约 0.6 kb(图 2)。经 DNA 序列测定,验证插入片段为 *PlclpP* 基因。

2.4 *PlclpP* 基因的表达和纯化

采用 LB 液体培养基(含 30 μ g/mL 卡那霉素)于 20 $^{\circ}$ C 培养含有重组表达质粒的大肠杆菌 BL21(pET-28a-*PlclpP*),通过 0.6 mmol/L IPTG 诱导表达 18 h,获得含有组氨酸标签的重组 *PlclpP* 蛋白,分子量约为 21 ku,与预测的 ClpP 蛋白

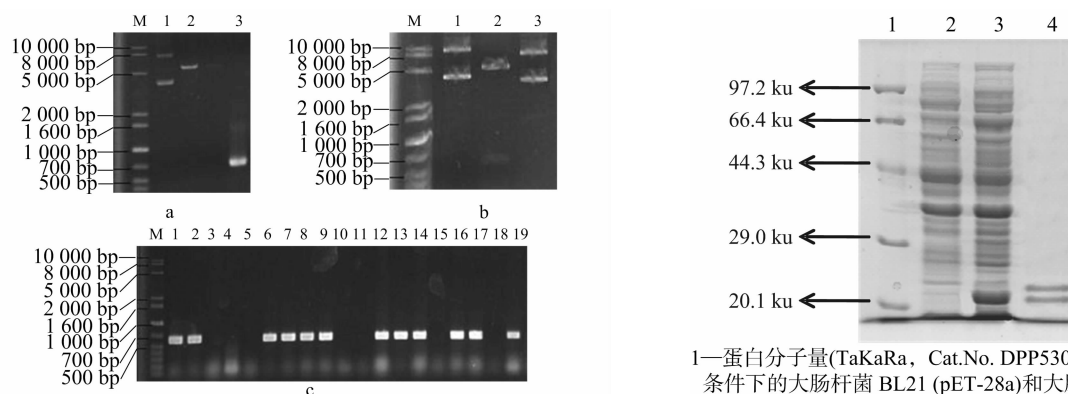
```

ACX66587.1 QLLFLAAEDPEKDIHMYINSPGGSVSAGFGIYDTMQIIKQVNTICTGFAASYGAILLLA 111
P1ClpP QLLFLAAEDPEKDIHMYINSPGGSVSAGFGIYDTMQIIKQVNTICTGFAASYGAILLLA 107
EHB68686.1 QLLFLAAEDPDRIHMYINSPGGSVSAGFGIYDTMQIIKQVNTICTGFAASYGAILLLA 106
AJE49643.1 QLLFLAAEDPEKDIHMYINSPGGSVSAGFAIYDTMQIYIKFEVHTICTGFAASYGAILLLA 107
EFU43338.1 QMLFLSAEDPEKDIHLYINSPGGSIITAGMAIFDTMQFIKFDVSTICVGMMAASMGAFLLNA 106
EII68935.1 QMLFLSAEDPEKDIYLYINSPGGVITAGMSIYDTMQFIKFDVSTICMGQAASMGAFLLTA 119
      * * * * *
ACX66587.1 GAKGKRLALPNSIIMIDPLGGVQQAATDIAITAKRIKLTREKLAHIISERTGQSVERVE 171
P1ClpP GAKGKRLALPNSIIMIDPLGGVQQAATDIAITAKRIKLTREKLAHIISERTGQSVERVE 167
EHB68686.1 GAKGKRLALPNSIIMIDPLGGVQQAASDIAITAKRIKLTREKLVQITAERTGQFAERVE 166
AJE49643.1 GAKGKRLALPNSIIMIDPLGGVQQAASDIAITAKRIKLTREKLVQITAERTGQFAERVE 167
EFU43338.1 GAKGKRYGLPNSIIMIDPLGGVQQAATDIEIRARRILKMRDKLNRLISDRTGQFPERIE 166
EII68935.1 GAKGKRCFLPNSRVMIIDPLGGVQQAATDIEIRAREILKVKGRMELMALHTGQSLEQIE 179
      * * * * *
ACX66587.1 KDMERDVFMSAEAAKEYGIIDIVTKL----- 198
P1ClpP KDMERDVFMSAEAAKEYGIIDIVTKL----- 194
EHB68686.1 RDMERDVFMTAEAALEYGIIDIVTKL----- 193
AJE49643.1 KDMERDVFMSAEAAKEYGVIDQVITSL----- 194
EFU43338.1 KDTDRDVFMTADEAKEYGLIDQVLENTFPQGL 198
EII68935.1 RDTERRFLSAFAEAVEYGLVDSILTHRN---- 207
      * * * * *

```

ClpP多序列比对中序列的GenBank登录号如下: ACX66587.1, 类芽孢杆菌属 Y412MC10; EHB68686.1, *Paenibacillus lactis*, 154; AJE49643.1, 多粘类芽孢杆菌; EFU43338.1, *P. vortex* V453; EII68935.1, 大肠杆菌 2.4168; P1ClpP, 类芽孢杆菌 CHN26。ClpP家族特征性八肽结构域、丝氨酸蛋白酶保守的催化活性位点以黑色方框标记

图1 ClpP 多序列比对分析结果



M—10 kb DNA Marker; a.1~3—pET-28a 质粒 DNA 及其 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切产物、*PlcPp* 基因 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切产物; b.1~3—pET-28a-*PlcPp* 重组质粒DNA及其双酶切产物、pET-28a 质粒 DNA; c.1~2、6~9、12~14、16~17、19—菌落PCR检测为阳性的转化子克隆, 含有大小约为 0.6 kb 的插入片段

图2 类芽孢杆菌 CHN26 的 *PlcPp* 基因表达质粒 pET-28a-*PlcPp* 的构建与鉴定

分子量大小相一致, SDS - PAGE 分析结果见图 3。利用 Ni - NTA - His · Bind resin 纯化法纯化大肠杆菌 BL21 菌体裂解后的无细胞提取液, 经 SDS - PAGE 分析洗脱液各组分, 获得了纯化的目标蛋白 PIClpP。在大肠杆菌 BL21 中异源表达的 PIClpP 蛋白在 SDS - PAGE 图谱上呈现 2 个条带, 分子量分别约为 21、25 ku (图 3)。鉴于大肠杆菌 EcClpP 蛋白酶伴侣分子 ClpA、ClpX 的分子量分别为 80、46 ku^[9-10], 推测 PIClpP 可能与大肠杆菌 BL21 中未知伴侣分子形成复合物, 未知伴侣分子的序列和功能有待进一步研究。采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测 PIClpP 的表达量, 结果显示, 1 g 细胞湿质量可以产生纯化的重组 PIClpP 蛋白复合物约 0.54 mg, 约占细胞总蛋白的 5.25%。

2.5 PIClpP 复合物的蛋白水解酶活

本研究以非折叠态模式底物 β - 酪蛋白为底物, 在含有 2.5 mmol/L ATP 的反应液中分析纯化 PIClpP 复合物在不同温度下的蛋白水解酶活性, PIClpP 复合物的最适反应温度为 40 °C (图 4), 明显高于类芽孢杆菌 CHN26 和大肠杆菌 BL21 的最适生长温度 37 °C。同时分析了该复合物在不同温度下的稳定性, 结果显示, PIClpP 复合物在 10 ~ 40 °C 下处理 3 h

1—蛋白分子量 (TaKaRa, Cat.No. DPP530S); 2~4—相同诱导条件下的大肠杆菌 BL21 (pET-28a) 和大肠杆菌 BL21 (pET-28a-*PlcPp*) 细胞可溶性蛋白、纯化的 PIClpP 蛋白及其复合物

图3 SDS-PAGE 检测 PIClpP 的表达及其纯化

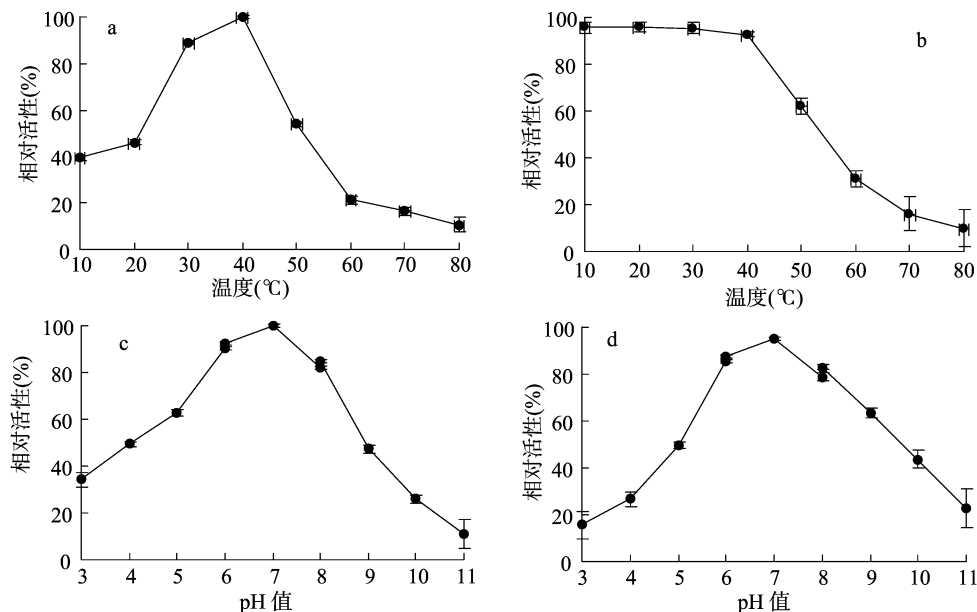
后相对酶活性仍高于 90%, 进一步证明了 PIClpP 复合物的嗜中温反应特性 (图 4)。此外还分析了 pH 值对 PIClpP 复合物蛋白水解酶活性的影响, 结果显示, 该复合物的最适反应 pH 值为 7.0。在强酸 (pH 值 ≤ 6.0)、强碱 (pH 值 ≥ 7.0) 条件下于 4 °C 处理 12 h 后, 相对酶活性迅速减弱, 而在 pH 值 6.0 ~ 7.0 条件下相对酶活性强于 87%, 证明 PIClpP 复合物的中性 pH 值反应特性。

2.6 表面活性剂和蛋白酶抑制剂对 PIClpP 复合物酶活性的影响

分别采用 SDS、Tween - 20、Tween - 80 表面活性剂于 40 °C 条件下处理纯化的 PIClpP 复合物 1 h, 并在最适温度和 pH 值条件下测定残余酶活。结果显示, 终浓度为 0.5% 的表面活性剂强烈抑制 PIClpP 性复合物的酶活性 50% ~ 60%; PIClpP 复合物对常规丝氨酸蛋白酶抑制剂具有较强的抗性, 10 mmol/L PMSF 处理 PIClpP 复合物 1 h 对其酶活性无明显影响, 表明 PIClpP 属于一类非常规的丝氨酸蛋白酶。

3 结论

运用基因克隆技术, 以分离鉴定获得的蛋白水解酶高活性类芽孢杆菌 CHN26 基因组 DNA 为模板, 经克隆鉴定该菌株为一种新型蛋白水解酶基因 *PlcPp*, 编码 194 个氨基酸, 分子量约为 21 ku。PIClpP 氨基酸序列含有保守的 ClpP 家族特征性八肽结构域 (KDIHMYIN, 第 59 个至第 66 个氨基酸), 以



a—PIClpP 复合物在 10~80 °C、pH 值 7.0 反应条件下的蛋白水解酶活性；b—分别于 10~80 °C 处理 3 h 后，PIClpP 复合物的残余酶活性；c—PIClpP 复合物在 pH 值 3.0~11.0 反应条件下的蛋白水解酶活性；d—分别于 pH 值 3.0~11.0、4 °C 处理 12 h 后，PIClpP 复合物的残余酶活性； β -酪蛋白为反应底物

图4 温度和 pH 值对 PIClpP 复合物蛋白水解酶活性的影响

及丝氨酸蛋白水解酶保守的催化活性位点 (Ser₉₉ - His₁₂₄ - Asp₁₇₃)。采用大肠杆菌的 pET 表达系统构建了 *PlclpP* 基因表达质粒 pET - 28 - *PlclpP*，在大肠杆菌 BL21 中实现了重组 PIClpP 蛋白的表达。利用组氨酸标签 (His - tag) 亲和纯化法获得了 PIClpP 纯化蛋白，发现 PIClpP 可能与宿主菌未知伴侣分子形成蛋白复合物。PIClpP 复合物具有 ATP - 依赖型酪蛋白水解酶活性，最适反应温度为 40 °C、pH 值 7.0。终浓度为 0.5% 的表面活性剂 SDS、Tween - 20、Tween - 80 均强烈抑制 PIClpP 复合物的酶活性，而常规丝氨酸蛋白酶抑制剂 (PMSF) 对其活性无抑制作用。本研究填补了我国 ClpP 家族蛋白水解酶研究领域的空白，为开发蛋白酶新基因资源、ClpP 家族蛋白酶的基础理论和应用研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Krik O, Borchert T V, Fuglsang C C. Industrial enzyme applications [J]. Current Opinion Biotechnology, 2002, 13 (4) : 345 - 435.
- [2] Kress W, Maglica Z, Weber - Ban E. Clp chaperoneproteases: structure and function [J]. Research in Microbiology, 2009, 160: 618 - 628.
- [3] Schmitz K R, Carney D W, Sello J K, et al. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* ClpPIP2 suggests a model for peptidaseactivation by AAA⁺ partner binding and substrate delivery [J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2014, 111 (43) : E4587 - E4595.
- [4] Hwang B J, Woo K M, Goldberg A L, et al. Protease T1, a new ATP - dependent protease in *Escherichia coli*, contains protein - activated ATPase and proteolytic functions in distinct subunits [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263 (18) : 8727 - 8734.
- [5] Shi Y P, Pan Y J, Li B L, et al. Molecular cloning of a novel *bioH* gene from an environmental metagenome encoding a carboxylesterase with exceptional tolerance to organic solvents [J]. BMC Biotechnology, 2013, 13: 13.
- [6] Li Y X, Pan Y J, She Q X, et al. A novel carboxyl - terminal protease derived from *Paenibacillus lautus* CHN26 exhibiting high activities at multiple sites of substrates [J]. BMC Biotechnology, 2013, 13: 89.
- [7] Kasana R C, Yadav S K. Isolation of a psychrotrophic *Exiguobacterium* sp. SKPB5 (MTCC 7803) and characterization of its alkaline protease [J]. Current Microbiology, 2007, 54 (3) : 224 - 229.
- [8] Bewley M C, Graziano V, Griffin K, et al. Turned on for degradation: ATPase - independent degradation by ClpP [J]. Journal of Structural Biology, 2009, 165 (2) : 118 - 125.
- [9] Grimaud R, Kessel M, Beuron F, et al. Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP - dependent proteases, ClpXP and ClpAP [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273 (20) : 12476 - 12481.
- [10] Wojtkowiak D G C, Characterization of C. A new ATP - dependent specificity component of the Clp protease of *Escherichia coli* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268 (30) : 22609 - 22617.