

转谷氨酰胺酶基因在大肠杆菌中的克隆表达

王莉¹ 常忠义¹ 李平作^{2*}

(1 华东师范大学生命科学学院 上海 200062 2 上海伍佰豪生物工程研究发展有限公司 上海 200233)

摘要 从轮枝链霉菌 *Streptovorticillium mobaraense* 细胞中获得其基因组 DNA,用一对特异性的引物通过 PCR 的方法扩增出转谷氨酰胺酶 (transglutaminase, TGase) 全长基因,回收片段并将其连接到表达载体 pET30a 中,转化大肠杆菌 DH5。双向测序表明获得的转谷氨酰胺酶全长基因序列正确。纯化重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3),以 1mmol/L IPTG 诱导 5h 收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳分析,与阴性对照相比,明显多出了一条蛋白条带,紫外扫描显示此带约占总蛋白量的 17%,Western blotting 证实此带能够特异性地与兔抗 MTG(味之素公司)的抗体发生反应。测得纯化后得到的 TGase 蛋白的酶活可以达到 15.1U/mg 蛋白。

关键词 转谷氨酰胺酶 克隆表达 生物活性

转谷氨酰胺酶,又称谷氨酰胺转氨酶 (transglutaminase, EC 2. 3. 2. 13 全称 R-glutaminylopeptide: amine-⁻glutamyl-transferase 简称 TGase),即蛋白质-谷氨酸-谷氨酰胺转移酶。它广泛存在于哺乳动物、鱼类、植物、细菌、真菌和绿藻等生物中,不仅与血液凝固、伤口愈合、表皮角质化、红细胞膜硬化等生物现象有关,并参与调节细胞生长、分化、增生等,与一些腹腔疾病和老年痴呆症等有关。该酶催化蛋白质或多肽链中谷氨酰胺残基的 γ -酰胺基与一级氨基之间的酰胺基转移反应,从而可以将蛋白质进行分子之间的共价交联聚合,并由此能够直接改变蛋白质本身以及蛋白质所附着的细胞、组织、甚至器官的特性。

来源于微生物的转谷氨酰胺酶常简称为 MTG (microbial transglutaminase) 由于它的酶活不依赖于 Ca 离子,因此它的应用前景更为广泛,它可以改善肉制品的外观、质构及风味,延长储藏期;改善焙烤食品和豆腐、面条等植物蛋白食品的质地;提高奶酪的产量;提高食品的营养价值等等^[1~5]。

日本与 MTG 有关的食物销售额在 2000 年就已经达到 2000 亿日元,但到目前为止并没有在中国的食品工业中得到广泛的推广应用,主要原因一方面是因为其价格昂贵,另一方面也是因为国内迟

迟不能筛选到一株稳定的高产酶菌株。

要解决这一问题,有几个办法,其一,继续通过传统方法诱变育种,筛选高效表达的产酶菌;其二,优化发酵条件,选择适当培养基和培养参数,以期目前的菌株能最大程度地表达 MTG^[6];其三,突破传统育种方法,采用太空诱变育种^[7,8]或通过基因工程方法改造菌种,前一种方法为国内王璋教授等采用,取得了一定的进展,但尚未用于大规模发酵,后一种国内尚无,国外有人做过^[9~11],结果不尽如人意,但并不能排除使用其它的表达体系或表达载体得到可以高效表达的基因工程菌的可能性。本文通过基因工程方法成功构建了大肠杆菌表达载体 pET30a-TGase,并实现了 TGase 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的大量表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 轮枝链霉菌 *Streptovorticillium mobaraense*,大肠杆菌 (*E. coli*) DH5、BL21 (DE3) 系中国科学院上海生物工程研究中心保藏菌种;表达载体 pET30a 系本实验室保藏。

1.1.2 主要试剂与试剂盒 限制性内切酶 *EcoR*、*Not* 等为日本宝生物工程(大连)有限公司产品;T₄ 连接酶、DNA 聚合酶均为上海 Promega 公司产品;质粒抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒为杭州维特洁公司产品;酵母膏、胰化

收稿日期:2004-03-23 修回日期:2004-07-19

*通讯作者,电子信箱:pingzuoli@hotmail.com

蛋白胨为 Oxoid 公司产品;琼脂糖、溴化乙锭、EDTA、N,N-甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、Tris、BSA、DTT、TEMED、SDS 等均为生工进口分装;MTGase 样品来源于日本味之素公司,商品名为 TG 的转谷氨酰胺酶由浙江一鸣精细化工有限公司出品,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 *Streptovorticillium mobaraense* 菌株总 DNA 的提取 取 5ml 30 培养 2~3d 的菌液 5000r/min 离心 5min,菌泥中加 1ml 无菌水清洗,离心。沉淀重悬于 1ml 双蒸水,超声波破胞 2~4min 至菌液透明后,离心,沉淀中加入 576 μ l 的 TE 溶液,用枪头反复吹打使之重悬,再加入 30 μ l 10% 的 SDS 和 3 μ l 20mg/ml 的蛋白酶 K,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 温育 1h。溶液中加入 100 μ l 5mol/L NaCl,充分混匀,再加入 80 μ l CTAB/NaCl 溶液,混匀,于 65 $^{\circ}$ C 温育 10min。上清液用等体积氯仿/异戊醇、酚/氯仿/异戊醇依次抽提,异丙醇常温沉淀,沉淀用 70% 乙醇洗涤后真空干燥,溶于 50 μ l TE 中备用。

1.2.2 TGase 引物设计 以轮枝链霉菌 *Streptovorticillium mobaraense* 及 *Streptovorticillium S-8112* 的转谷氨酰胺酶基因为 PCR 引物设计的参考序列。引物序列如下:

P1:5'-GCGAATTCATGGACAATGCCCGGGGG-
AAGA-3'

P2:5'-CCCGCCCCCTCACGCCAGCCCTGCTT-
TA-3'

引物 P1 的 5 端加上了 *EcoR* 酶切位点(下划线标示),引物 P2 的 5 端终止密码子之后引入了 *Not* 酶切位点(下划线标示)。

1.2.3 TGase 基因的克隆及大肠杆菌重组表达载体的构建 主要根据分子克隆实验指南(第 2 版)进行。将用常规的 PCR 方法扩增得到的轮枝链霉菌的 TGase 基因在 *EcoR* 和 *Not* 酶切位点之间插入表达质粒 pET30a 上,然后转化大肠杆菌 DH5 $^+$,测序验证基因的正确性(由基康公司完成)。再将鉴定得到的 pET30a-TGase 重组质粒转化大肠杆菌 B121(DE3),挑取阳性克隆子,用于表达研究。

1.2.4 大肠杆菌重组子的培养与诱导表达 在 3ml 含卡那霉素的 LB 培养基中接种一重组大肠杆菌 pET30a-TGase/BL21(DE3)单菌落,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 10h,以 1% 体积接种于 50ml LB + Kan 抗性生长培养基中,37 $^{\circ}$ C、200r/min 培养至对数生长期,加入适

量的 IPTG 诱导,诱导后 3~5h 取样。处理菌液,分别将总蛋白、破胞上清及包涵体部分进行 SDS-PAGE 电泳,并用未诱导的重组菌和大肠杆菌 BL21(DE3)作为对照。

1.2.5 重组表达的 TGase 的纯化 包涵体的提取:取 200ml 过夜诱导的菌液,离心(4 $^{\circ}$ C, 5000g, 10min);细菌重溶于 50ml 重悬液(50mmol/L Tris-HCl, 0.1mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0);超声破胞 30min;再次离心(4 $^{\circ}$ C, 12000r/min, 30min);用 1% TritonX-100 洗涤沉淀 2 次,用双蒸水洗 1 次;离心(4 $^{\circ}$ C, 12000r/min, 30min),沉淀重悬于 50ml 变性溶液(8mol/L 尿素, 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5);重悬液于室温轻轻振荡 4h;离心(18 $^{\circ}$ C, 12000r/min, 30min),去除不溶物;将上清装入透析袋,在磷酸平衡液(20mmol/L Na₃PO₄, 0.5mol/L NaCl, pH7.4)中透析两次,保持 4 $^{\circ}$ C, 每次进行 12h。

通过 MCA 金属螯合层析纯化 TGase:用小柱进行纯化,装柱后,用 5 个柱体积的双蒸水洗柱;加入 0.5 个柱体积的 0.1mol/L NiSO₄;用 5 个柱体积的双蒸水洗柱;用 10 个柱体积的磷酸平衡液(20mmol/L Na₃PO₄, 0.5mol/L NaCl, pH7.4)平衡;缓慢上样 5ml,收集穿过液;用 10 个柱体积的平衡液洗柱,收集洗出液;分别用 5ml 含不同浓度咪唑(10mmol/L、100mmol/L、500mmol/L)的磷酸平衡液洗脱,分部收集洗脱液(1ml/管);用 10 个柱体积的平衡液洗柱,收集最初的 5ml 洗脱液。

样品处理后作蛋白质 SDS-PAGE 电泳,检测穿液、洗出液及每一管洗脱液中的蛋白含量,上层胶(浓缩胶)5%,下层胶(分离胶)18%。

1.2.6 重组表达的 TGase 的活性鉴定 测定转谷氨酰胺酶酶活:用羟胺法^[12]测定 TGase 活性。一个单位的转谷氨酰胺酶的酶活定义为:在 37 $^{\circ}$ C, pH6.0 的条件下,每分钟催化产生 1 μ mol CBZ-Gu-单氧肟酸的酶量。以 Gu-MHA 作标准曲线。

免疫学方法鉴定:1) Dot Blotting 实验流程:点样于 NC 膜上(1~2 μ l),并风干,用 15ml 3%BSA 封闭液于室温封闭 30min,用 PBS 洗膜 3 次,每次 20s,用 5ml 一抗(500 μ g/ml, 1:100 用 PBS 稀释)孵育 1h,用 PBS 洗膜 3 次,用 5ml 羊抗兔二抗(1:1000 用 PBS 稀释)孵育 30min,用 PBS 洗膜 3 次,转入 DAB 底物显色液中显色,用清水对膜稍加漂洗,风干膜,照相并保存。2) Western blotting 实验流程:先进行

SDS-PAGE 电泳,采用半干法转 NC 膜,1.2mA/cm² 转膜 1h,其余步骤同 Dot Blotting 实验流程。

2 结果

2.1 轮枝链霉菌 TGase 基因克隆

2.1.1 轮枝链霉菌 TGase 基因的扩增 以 P1、P2 为引物,以 *Streptovorticillium mobaraense* 的基因组 DNA 为模板,扩增出约 1.1 kb 的不带原信号肽编码序列的转谷氨酰胺酶基因 TGase,见图 1。

2.1.2 重组表达载体 pET30a-TGase 质粒的构建 重组表达载体 pET30a-TGase 构建的过程见图 2:



图 1 PCR 扩增的琼脂糖电泳

Fig. 1 Agarose electrophoresis of PCR products

1 ~ 3: PCR product; 4: Marker DL2000

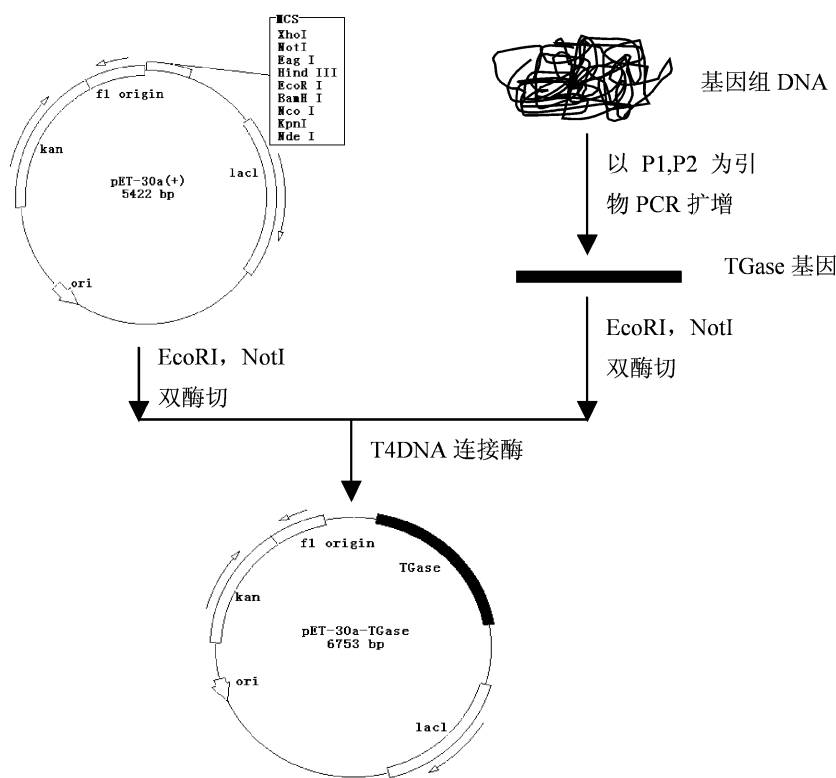


图 2 pET30a-TGase 重组质粒的构建图

Fig. 2 Structure of recombinant plasmid pET30a-TGase

通过利用 *EcoR* 和 *Not* 双酶切及 PCR 鉴定,所得到的质粒正是重组质粒 pET30a-TGase。序列测定表明它与报道的 *Streptovorticillium mobaraense* 的 MTGase 序列完全一致。

2.2 TGase 基因的表达与纯化

按“1.2.3”的方法发酵和诱导表达并处理菌体,同时电泳检测其表达量和可溶性。根据测定,可知蛋白的表达量可以达到蛋白总量的 10% 以

上,电泳结果见图 3。

从图 3 可以看出,用 pET30a 载体构建并转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 得到的重组表达菌株 PET30a-MTG/BL21 (DE3) 明显表达了除其自身蛋白以外的外源蛋白,可以得到明显表达条带。通过凝胶成像系统对蛋白条带分析发现,表达条带最多可以达到总蛋白的 17%。对细胞内外不同部分的蛋白进行电泳发现,表达的蛋白大部分都以包涵体的形式存

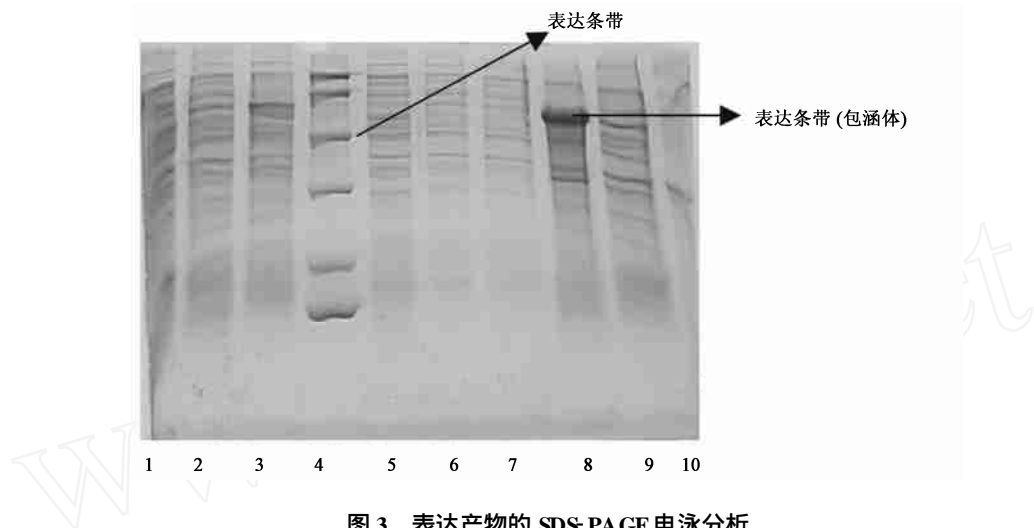


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression products

1: Total protein of BL21 ;2: Total protein of pET30a-TGase/BL21 (uninducted) ;3: Total protein of pET30a-TGase/BL21 (inducted) ;4: Protein standards ;5: suspension of B L21 ;6: suspension of pET30a-TGase/BL21 (uninducted) ;7: suspension of pET30a-TGase/BL21 (inducted) ;8: pET30a-TGase/BL21 inclusions (inducted) ;9: pET30a-TGase/BL21 inclusions (uninducted) ;10: BL21 inclusions

在于细胞中。

2.3 酶活测定

经试验证实可以从 1L 培养液中得到至少 2.1g 包涵体,经 Ni 离子亲和层析纯化回收后约可以得到 13.1mg/L 蛋白,应用“1.2.6”中的酶活测定方法测得酶活约为 15.1U/mg 蛋白。比 *sp s*-8112 的酶活 22.6U/mg 蛋白低了很多,但是却比国内筛选的其他产 TGase 菌株的产酶量高。

2.4 Dot blotting 免疫鉴定

用日本味之素公司的 MTG 样品和浙江一鸣精细化工有限公司的 TG 作为阳性对照,装载了 pET30a 的 BL21 (DE3) 作为阴性对照,可以发现重组菌表达的 TGase 是有较强免疫活性的。

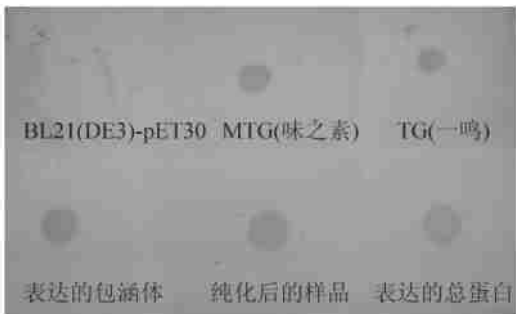


图 4 Dot blotting 鉴定图

Fig. 4 Dot blotting analysis of expression products

图 5 箭头所指的蛋白条带就是表达条带。这也证明泳道 2 所示的目的蛋白条带就是表达的重

组 TGase。

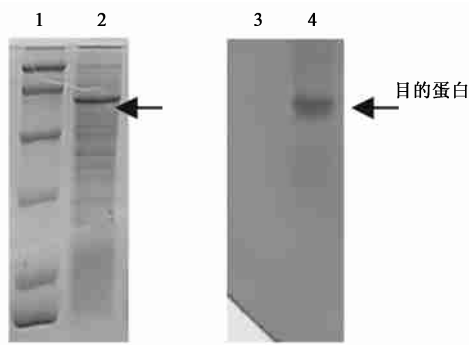


图 5 Western blotting 图

Fig. 5 Western blotting analysis of expression products

1: Protein standards ;2: Total protein of pET30a-TGase/BL21 ;3: Total protein of pET30a /BL21 ;4: Total protein of pET30a-TGase/BL21

3 讨 论

本文成功地构建了一种可以高效表达 TGase 的表达载体 pET30a-TGase,表达出了有活性的 TGase。

虽然日本的轮枝链霉菌 *s*-8112 已应用于工业生产 MTGase,但该酶价格高昂,国内的食品企业现阶段根本用不起,因此也就有了使用有毒的甲醇等来提高面制品的韧性的黑心厂家。我们期望通过基因工程手段构建的一种高效表达载体的生长周期,发酵条件,产酶量都将优于轮枝链霉菌。本人

还将通用酵母菌表达系统来表达 MTGase, 希望能将其大量用于食品工业, 以进一步提高 MTGase 的应用, 改善人们的生活品质。本文截稿之日从食品配料博览会上喜闻国内浙江一鸣精细化工有限公司的商品名为 TG 的转谷氨酰胺酶业已上市, 此乃一大进步, 虽然价格还是比较昂贵, 但是总算有了零的突破, 更能激发众多研究者继续研究它的生产和应用。

纯化后得到的 TGase 蛋白的酶活可以达到 15.1U/mg 蛋白, 虽然比 *sp s-8112* 的酶活 22.6U/mg 蛋白低了很多, 但是却比国内筛选的其他产 TGase 菌株的产酶量及酶活都高。如果改善发酵条件, 使用发酵罐进行高密度发酵, 改进纯化方法, 那么 TGase 的产量和酶活必定能得到进一步的提高, 比起发酵轮枝链霉菌来说不仅省时省力, 并且会大量节省成本。

参考文献

- [1] 叶丹英, 彭志英, 赵谋明. 转谷氨酰胺酶及其在食品加工中的应用. 郑州粮食学院学报, 2000, 21(2): 46~49
- [2] 王森, 吴小平. 转谷氨酰胺酶在肉制品中的应用. 食品与机械, 2001, 83: 33~35
- [3] 张红城, 彭志英, 赵谋明, 等. 转谷氨酰胺酶在食品中的应用. 食品与发酵工业, 24(3): 73~76
- [4] 杨晓泉, 赵谋明, 陈中, 等. 转谷氨酰胺酶催化大豆蛋白和乳清蛋白合成耐热性聚合蛋白. 中国粮油学报, 2001, 16(2): 217~227
- [5] 赵学兵, 岳振峰, 徐建祥, 等. 转谷氨酰胺酶的功能特性及其在乳品中的应用. 中国乳品工业, 2000, 28(6): 42~46
- [6] 常忠义, 江波, 王璋. 碳源对轮枝链霉菌 SK2 产谷氨酰胺酶的影响. 生物技术, 2000, 10(5): 20~22
- [7] 王璋, 王灼维, 袁辉, 等. 微生物转谷氨酰胺酶生产菌的“神舟四号”飞船搭载育种研究——搭载前地面育种试验. 食品与发酵工业, 2003, 29(1): 6~12
- [8] 王璋, 贺雷雨, 李新华. “神舟”4 号飞船搭载选育的微生物转谷氨酰胺酶在肉肠食品加工应用效果评价. 中国食品学报, 2003, 增刊: 1~5
- [9] Wong D W, Batt C A, Kinsella J E. Expression of the transglutaminase gene in *Escherichia coli*. Int J Biochem, 1991, 23(9): 947~953
- [10] Duran R, Junqua M, Schmitter J M, et al. Purification, characterization, and gene cloning of transglutaminase from *Streptovorticillium cinnamomeum* CBS 683. 68. Biochimie, 1998, 80(4): 313~319
- [11] Kawai M, Takehana S, Takagi H. High-level expression of the chemically synthesized gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* in *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61(5): 830~835
- [12] Folk J E, Tablr H, Tabor C W. Methods in enzymology transglutaminase. New York: Academic Press, 1970. 17: 889~894

Cloning and Expression of Transglutaminase Gene in *Escherichia coli*

WANG Li¹ CHANG Zhong-yi¹ LI Ping-zuo²

(1 Life Science College of East China Normal University Shanghai 200062, China)

2 Shanghai Wubaihao Biotechnology Research and Development Ltd. Shanghai 200233, China)

Abstract TGase (Transglutaminase) gene from *Streptovorticillium mobaraense* was cloned into expression vector pET30a. The result of sequencing analysis indicated that the TGase whole length gene was obtained. Then TGase gene was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Its expression was induced by 1mmol/L IPTG. The result of SDS-PAGE analysis showed that there is a new protein band which is of 17 % in total bacterial protein. Dolt blotting and Western blotting analysis proved that the inducible band could be specifically recognized by immol/Lune serum come from habit, which have been injected with TGase. Then the recombinant protein was purified and its biological activity of amine-glutamyl-transferase was characterized, which can reach 15.1U/mg protein.

Key words Transglutaminase Gene clone Protein expression and purification Biological activity