

枯草杆菌谷氨酰胺转胺酶的克隆及其在大肠杆菌中的融合表达

周建 董亚芳 吴自荣*

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要 利用 PCR 技术,从枯草杆菌 DB403 染色体上扩增出谷氨酰胺转胺酶基因,将其克隆到大肠杆菌载体 pET32a(+) 中,成功构建谷氨酰胺转胺酶表达载体 pET32-BTGase,并转化大肠杆菌 BL21(DE3)。重组克隆在 IPTG 诱导下,表达出硫氧还蛋白-谷氨酰胺转胺酶(Trx-BTGase)融合蛋白,表达量占细菌总蛋白量的 26%。利用金属螯合层析纯化菌体裂解上清中表达的融合蛋白,纯度超过 80%,再通过分子筛层析进一步纯化得到融合蛋白纯品。酶活性分析表明表达的 Trx-BTGase 融合蛋白具有交联蛋白的活性,并发现 Trx-BTGase 融合蛋白和经凝血酶酶切后得到的 BTGase 单体都能催化牛血清白蛋白的聚合反应。

关键词 谷氨酰胺转胺酶 枯草杆菌 融合表达

谷氨酰胺转胺酶(transglutaminase, TGase)是一类催化酰基转移的酶类,可催化蛋白质、多肽分子内和分子间 ϵ -(γ -glutaminy) lysine 共价键的形成^[1],广泛分布于各种真核生物^[2,3]和多种原核生物^[4,5]中。在真核生物体内, TGase 参与多种重要的生理活动,如血液凝固、细胞分化等^[6,7],但真核生物的 TGase 需依赖钙离子激活才能发挥其生物活性,且表达量极低,分离纯化非常困难,从而限制了 TGase 的研究和应用。近十几年来,人们将注意力转移到了原核生物,并首先在轮枝链霉菌中分离到了 TGase,发现这类 TGase 不需依赖钙离子就能发挥其催化酰基转移的功能^[4],故可广泛应用于食品、化妆品等领域中,而且,随着近年来蛋白质修饰化学的发展, TGase 由于可在蛋白质特定位点上形成 Glu-Lys(GL)键而备受重视^[8]。

枯草杆菌 TGase(BTGase)最早由 Kobayashi 等^[9]于 1996 年在枯草杆菌孢子中发现,并研究了其分子结构,发现 BTGase 没有信号肽,在枯草杆菌生长后期仅受 σ^k 因子控制转录、表达,交联孢子表面蛋白,使得孢子免受蛋白酶的降解^[10]。

目前,国外有许多研究人员致力于研究各种生物来源 TGase 的性质和功能,但在国内相关的报道

还较为少见,且报道的多是产 TGase 轮枝链霉菌的突变诱种、发酵以及轮枝链霉菌 TGase 的应用等^[11~13],研究枯草杆菌 TGase 和 TGase 基因克隆表达的均未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 大肠杆菌表达载体 pET-32a(+) (novagen); 枯草杆菌 DB403 为枯草芽孢杆菌标准菌 168 衍生而来,由王林发博士馈赠;大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21(DE3) (本实验室保存)。

1.1.2 培养基 细菌常规培养基为 LB,抗性培养基为 LB 添加终浓度为 100 μ g/ml 的氨苄青霉素。

1.1.3 主要试剂 pfu DNA 聚合酶、dNTP、氨苄青霉素、3S NTA Resin(上海申能博彩有限公司);各种限制性内切酶(MBI Fementas);T4 DNA 连接酶、碱性磷酸酶(CIAP);DNA Marker、DNA 片段纯化试剂盒(TaKaRa);其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 引物合成 由上海博亚公司合成。

1.2 方法

1.2.1 常规操作 按 Huang 等^[14]方法抽提枯草杆菌 DB403 的染色体;常规 DNA 操作方法见文献[15];DNA 片段的纯化按试剂盒操作。

1.2.2 重组融合蛋白的表达 采用 CaCl_2 法将表

达载体 pET32 BTGase 转化大肠杆菌 BL21(DE3)。挑取单菌落入 50 ml LB(100 μg/ml 氨苄青霉素和 2% 葡萄糖), 37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0. 6, 添加 IPTG 至终浓度为 0. 4 mmol/L, 30℃、150 r/min 诱导表达 4h, 离心取菌体备用。

1. 2. 3 重组融合蛋白的纯化 按 3S NTA Resin 说明裂解菌体, 离心取上清上 3S NTA Resin 层析柱。收集含有目的蛋白的组分, 经超滤浓缩后过 Superdex 75 层析柱进行精细纯化, 得到融合蛋白纯品。融合蛋白通过凝血酶酶切得到 BTGase 单体。

1. 2. 4 重组融合蛋白包含体的纯化及复性 按 3S NTA Resin 说明裂解菌体, 离心取沉淀, 用缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7. 9, 0. 5 mol/L NaCl, 10% 甘油) 洗沉淀 2~ 3 次, 即可获得较纯的包含体。用 6mol/L 盐酸胍溶解包含体, 室温作用 30min 后, 对 2 L 缓冲液透析 48h, 蛋白浓度不超过 50μg/ml, 复性蛋白通过金属螯合层析柱浓缩。

1. 2. 5 酶活的定性测定用 10 mmol/L Tris(pH 8. 0) 配制 1mg/ml BSA 溶液。1μg BTGase 和 2μg Trx-BTGase 融合蛋白分别催化交联 10μg BSA, 在 20 mmol/L DIT 作用下 37℃ 反应。

1. 2. 6 蛋白含量测定 参照 BAC 法测定蛋白浓度。

2 结 果

2. 1 表达载体的构建

参照 Kobayashi 等^[10] 提供的 BTGase 的基因序列设计一对引物, 在引物两端添加 BamH I 酶切位点, 如下:

P1: 5' TA GGATCC ATGATTATTGTATCAGGAC AATTGCTCCG 3'
P2: 5' GC GGATCC TTAGCGGACGATGCCGAAA AGAGACGGAACATCCAG 3'

PCR 扩增的 BTGase 基因经 BamH I 酶切后, 与载体 pET- 32a(+) 酶切后并去磷酸化的片段连接, 得到重组表达载体 pET32- BTGase。所构建的表达载体 pET32- BTGase 如图 1 所示。在 BTGase 基因内部有一个 EcoR I 位点, 通过 EcoR I 酶切重组质粒, 除了大片段外, 只能切下一个不到 100 bps 的小片段, 因此可用 EcoR I 酶切重组质粒来鉴定 BTGase 基因插入的方向。在硫氧还蛋白与谷氨酰胺转氨酶之间有一个凝血酶酶切位点, 通过凝血酶的作用

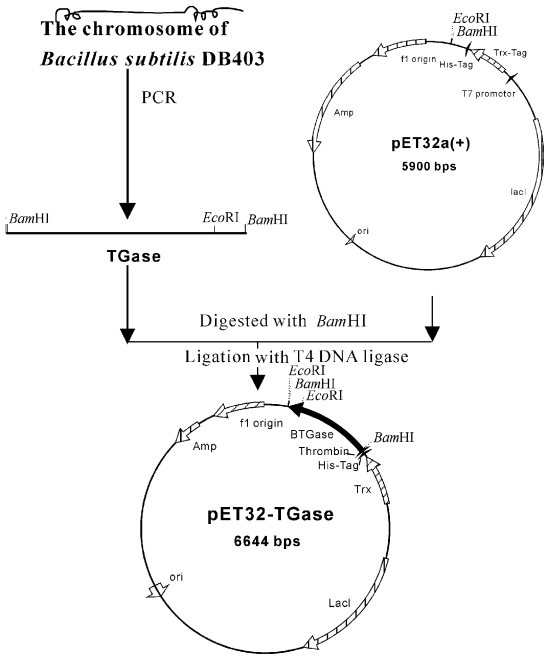


图 1 谷氨酰胺转氨酶表达载体 pET32 BTGase 的构建
Fig. 1 Construction of the expression vector pET32 BTGase

下可以获得谷氨酰胺转氨酶蛋白单体。图 2 显示重组载体 pET 32- BTGase 限制性内切酶鉴定结果, BamH I 酶切 pET 32- BTGase 载体产生一条略小于 750bp 的 DNA 片段, 与已报道 BTGase 基因片段大

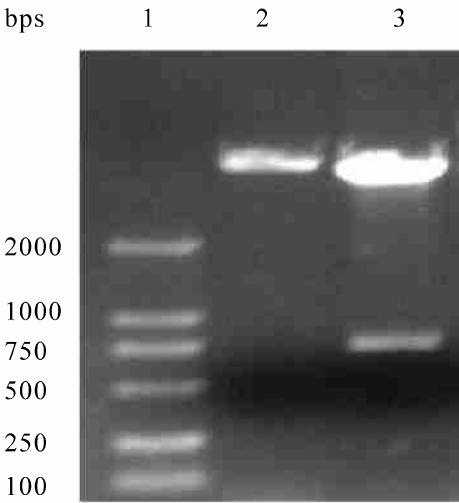


图 2 pET32- BTGase 表达载体酶切鉴定
Fig. 2 Restriction analysis of the plasmid pET32- BTGase
1: 低分子量 DNA Marker; 2: EcoRI 酶切质粒 pET 32 BTGase;
3: BamHI 酶切质粒 pET 32 BTGase
1: DNA molecular weight standard DL2000; 2: pET 32 BTGase digested with EcoRI ; 3: pET 32- BTGase digested with BamHI

小(735bp) 相符, *EcoR* I 酶切 pET32- BTGase 载体, 在电泳图上未显示出一条较小的条带, 说明插入方向是正确的。重组载体 pET32-BTGase 进一步通过测序鉴定, 表明获得了正确的 BTGase 重组表达菌株。

2.2 重组融合蛋白在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达

在 0. 4 mmol/L IPTG 诱导下, 重组 Trx-BTGase 融合蛋白在大肠杆菌中成功表达。如图 3 所示, 以 pET 32a(+) 克隆载体为对照, 重组载体 pET32-BTGase 在 43 000 Da 附近有一特异表达条带, 与预计的融合蛋白分子大小(45 000 Da) 相符, SDS- PAGE 扫描显示, 融合蛋白约占总蛋白的 26%。

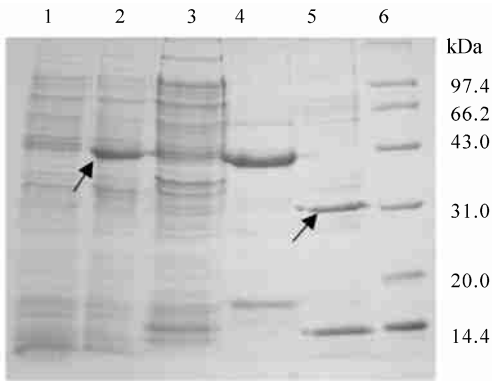


图 3 SDS PAGE 分析重组融合蛋白表达及纯化

Fig. 3 SDS PAGE analysis of the expression and purification of the fusion protein Trx BTGase

1: 未用 IPTG 诱导重组菌表达总蛋白; 2: IPTG 诱导重组菌表达总蛋白; 3: 3S NTA 金属螯合层析穿透的蛋白; 4: 3S NTA 金属螯合层析洗脱的蛋白; 5: 凝血酶酶切 Trx BTGase 融合蛋白; 6: 低分子质量蛋白 Marker

1: total proteins of *E. coli* BL21(DE3) carrying pET 32 BTGase without IPTG induction; 2: total proteins of *E. coli* BL21(DE3) carrying pET 32 BTGase with IPTG induction; 3: the flow through protein portion from 3S NTA resin; 4: the eluted protein portion from 3S NTA resin; 5: Trx BTGase cleaved with thrombin; 6: low molecular weight protein marker

2.3 重组融合蛋白的纯化和蛋白酶解

在 IPTG 诱导作用下, 重组融合蛋白有部分是可溶性的形式在菌体裂解上清中表达。而在融合蛋白内部有 6 个连续组氨酸, 所以可以用金属螯合层析捕获菌体裂解上清中表达的融合蛋白, 图 3 显示通过金属螯合层析一步就可将融合蛋白纯度提高到 80% 以上。再经过 Superdex 75 层析柱后, 可得到融合蛋白纯品, 图 4 SDS-PAGE 电泳结果显示 Superdex 75 纯化后为一条蛋白条带。

融合蛋白在凝血酶的作用下产生两条蛋白条

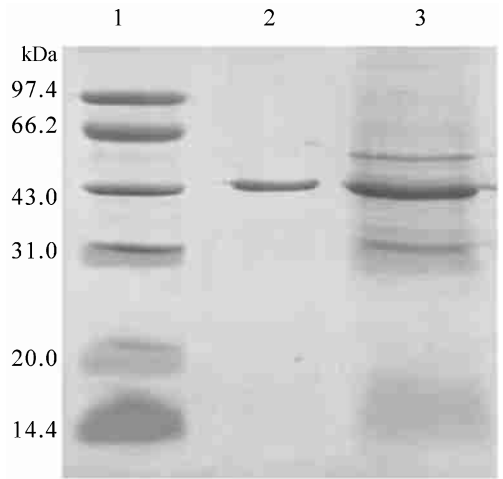


图 4 Superdex 75 纯化融合蛋白

Fig. 4 Further purification of Trx BTGase by Superdex 75

1: 低分子质量蛋白 Marker; 2: Superdex 75 纯化的重组蛋白; 3: 3S NTA 金属螯合层析纯化的重组蛋白
1: low molecular weight protein marker; 2: purified Trx BTGase with Superdex 75; 3: purified Trx BTGase with 3S NTA resin

带, 包括 14 kDa 的硫氧还蛋白和 31 kDa 的 BTGase (图 3)。

2.4 重组融合蛋白包含体的复性

重组融合蛋白包含体经盐酸胍变性、透析复性, 并通过金属螯合层析浓缩后, 通过交联 BSA 来检测复性蛋白的活性。如图 5, 复性后的蛋白能够催化 BSA 发生交联反应, 形成大分子的 BSA 聚合物, 12% 分离胶电泳时, 大分子聚合物不能进入分离胶, 而一直保留在上样孔和浓缩胶中。

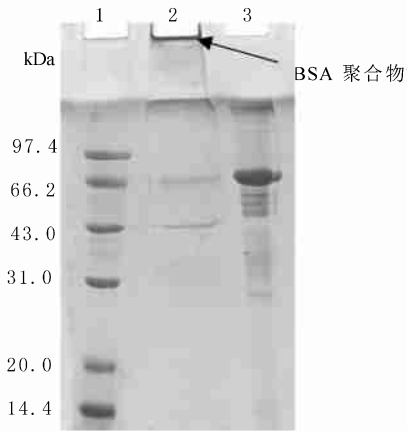


图 5 复性融合蛋白催化 BSA 的交联聚合

Fig. 5 BSA polymerization by renatured fusion protein Trx BTGase

1: 低分子质量蛋白 Marker; 2: 复性蛋白催化 BSA 交联; 3: BSA 对照
1: low molecular weight protein marker

2: BSA polymerization by renatured Trx BTGase; 3: BSA control

2.5 重组蛋白催化 BSA 的交联

37℃反应 12h 后, 12% 分离胶 SDS-PAGE 显示 BSA 被部分交联(图 6), 交联形成的蛋白分子很大, 不能进入分离胶, 而处在在上样孔和浓缩胶里。由图可见, 不管是 BTGase 单体还是 Trx BTGase 融合蛋白都能催化 BSA 发生交联反应, 两者没有明显的差别。

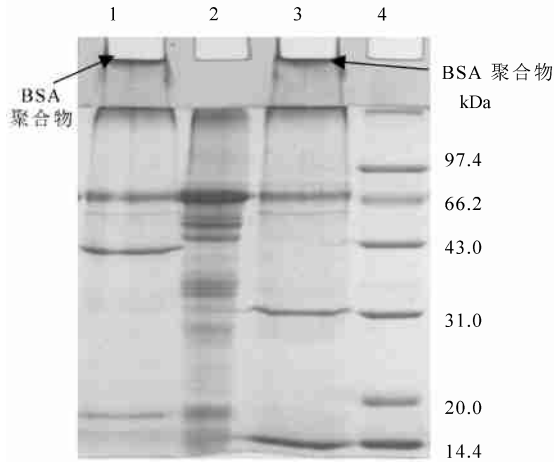


图 6 BSA 的交联聚合

Fig. 6 BSA polymerization

- 1: Trx BTGase 融合蛋白催化 BSA 交联; 2: BSA 对照;
3: BTGase 单体催化 BSA 交联; 4: 低分子质量蛋白 Marker
1: BSA polymerization by Trx BTGase fusion protein;
2: BSA control; 3: BSA polymerization by BTGase monomer
4: low molecular weight protein marker

3 讨 论

自微生物 TGase 发现以来, 由于放线菌生长周期长、难以大规模培养等原因, 很多研究人员尝试在其它菌体中重组表达 TGase, 用以适应生产、降低成本, 但都没获得较好的结果, 主要是因为 TGase 具有交联蛋白性质, 不能在菌体内大量表达。Kobayashi 等^[10] 虽然也在大肠杆菌中表达了 BTGase, 但所表达的 BTGase 活性也很低。作者曾将 BTGase 基因转到枯草杆菌和毕赤酵母菌中外分泌表达, 但表达量非常少(数据未显示), 而本文中, 通过融合蛋白表达的形式在大肠杆菌中表达了 Trx BTGase 融合蛋白, 经凝血酶切去 Trx 以后得到 BTGase 单体, 具有交联蛋白的性质; 同时发现此融合蛋白也具有交联蛋白的活性, Trx 本身是一种无毒副作用的蛋白, 所以在以后的工农业和食品加工应用中可以直接添加融合蛋白, 较大幅度降低了生

产成本。

本研究选用原核细胞的融合表达载体表达 BTGase 蛋白, 表达的蛋白产量高, 融合蛋白内部有 6 个组氨酸, 易于通过金属螯合层析纯化。大肠杆菌载体 pET32a(+) 采用的是高效的 T7 启动子, 通过重组大肠杆菌表达 BTGase 蛋白, 蛋白表达量大, 会形成部分包含体, 本文中对形成的包含体进行了变复性研究, 复性后的融合蛋白具有生物活性。BTGase 具有交联蛋白的性质, 因此在复性过程中, 蛋白浓度不能太高, 以免 BTGase 发生自身交联, 降低得率。

以往 TGase 的研究中, 对 TGase 测活都没有一种通用的方法, 不同来源的 TGase 都必须按照作用机理采用不同灵敏度的方法来测活。这主要是由于不同来源的 TGase 底物要求不同, 本文中用简单的轮丝链霉菌 TGase 测活方法^[4] 测不出枯草杆菌 TGase 的活性, 作者也尝试用其他的方法测 TGase 的活性, 但结果不尽人意。日本科学家是用同位素方法测得枯草杆菌中提取的 TGase 的活性^[9], 同位素法不能完全定量, 测得的也是一个相对计数值。而在本文中则利用 BSA 这种容易获得的无害物质对枯草杆菌 TGase 进行研究, 就可以避免使用同位素的污染。

参考文献

[1] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, et al. Microbial transglutaminase: a review of its production and application in food processing. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 44: 277~ 282
[2] Aeschlimann D, Paulsson M. Transglutaminase: Protein cross linking enzymes in tissues and body fluids. Thrombosis and Haemostasis, 1994, 71(4): 402~ 415
[3] Yasueda H, Kumazawa Y, Motoki M. Purification and characterization of a tissue type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Biosci Biotechnol Biochem, 1994, 58(11): 2041~ 2045
[4] Ando H, Adachi M, Umeda K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. Agric Biol Chem, 1989, 53(10): 2613~ 2617
[5] Duran R, Junqua M, Schmitter J M, et al. Purification, characterization, and gene cloning of transglutaminase from *Streptococcus thermophilus* CBS 683. 68. Biochimie, 1998, 80: 313~ 319
[6] Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminase: multifunctional cross linking enzymes that stabilize tissues. FASEB J, 1991, 5: 3071~ 3077
[7] Friedrich P, Aszodi A. Calcium dependent proteolysis and isopeptide bond formation: calpains and transglutaminases. Pure Appl Chem, 1992, 64: 1093~ 1097
[8] Hanuya S, Eiko H, Naoyuki Y, et al. Further studies on the site specific protein modification by microbial transglutaminase. Bioconjugate Chem, 2001, 12: 701~ 710

- [9] Kobayashi K, Kumazawa Y, Miwa K, et al. ϵ -(γ -Glutamyl) lysine cross links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Letters, 1996, 144: 157~ 160
- [10] Kobayashi K, Hashiguchi K, Yokozeki K, et al. Molecular cloning of the Transglutaminase gene from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*, Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62 (6): 1109~ 1114
- [11] 王灼维, 王璋. 土壤分离转谷氨酰胺酶生产菌株. 食品与发酵工业, 2003, 29(4): 5~ 10
- [12] 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. 食品与发酵工业, 2003, 29(1): 6~ 12
- [13] 王璋, 王灼维. 微生物谷氨酰胺转氨酶高产菌株的诱变选育. 食品科学, 2003, 24(5): 62~ 67
- [14] Huang Jing, Fang Wei jun, Peng Xir xia, et al. Biochemical characterization and *in vivo* testing of a recombinant fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. N18. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 2002, 10(2): 79~ 87
- [15] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 26~ 96

Cloning of the Transglutaminase Gene from *Bacillus subtilis* and Fusion Expression in *Escherichia coli*

ZHOU Jian DONG Ya-fang WU Zi rong

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

Abstract The gene of transglutaminase was amplified from the chromosome of *Bacillus subtilis* DB403 by PCR and translationally fused with thioredoxin gene (*trx A*) in the plasmid pET32a(+) to achieve the expression vector pET32-BTGase. The fusion protein Trx-BTGase could be expressed in *E. coli* BL21 (DE3) after IPTG induction, with a level up to 26 percent of the total bacterial proteins. Trx-BTGase was initially purified from the supernatant of the bacterial lysate by metal-chelating chromatography with a purity of over 80 percent, and finally purified with Superdex 75. Enzyme activity assay demonstrated that the Trx-BTGase expressed in *E. coli* could be functional in polymerizing other proteins, and no influence on the biological activities of BTGase to polymerize BSA (bovine serum albumin) was found in case of the thrombin cleavage of this fusion protein.

Key words Transglutaminase *Bacillus subtilis* Fusion expression

《英语科技论文撰写与投稿》

本书全方位地分析和展示了英语科技写作的技巧与诀窍,介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求,从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作,通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则——Accuracy、Brevity 和 Clarity,分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写,举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项,总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题,结合实例举证,从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达,较为详尽地总结了英文标点符号的使用,从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系,综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富。为方便读者进一步追溯和研读相关资料,书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次)。

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物,可作为理工科研究生的教学用书或自学教材,也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

本书由国家自然科学基金委员会科学基金杂志社任胜利博士编著,科学出版社出版。关于本书的详细信息请游览网站: www.lifescience.com.cn/newbk_usl.htm, 购书者请与国家自然科学基金委员会科学基金杂志社联系,地址:北京市海淀区双清路 83 号(100085),联系人:刘俐、程宇,电话:010 62327204,传真:010 62326921。