

枯草芽孢杆菌谷氨酰胺转氨酶的异源表达

刘 凯, 刘逸寒, 张 艳, 田 耀, 路福平

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 以野生型枯草芽孢杆菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增获得带有 SD 序列及谷氨酸棒状杆菌信号肽 Δ S0949 的 BTG 基因. 将其与大肠杆菌-谷氨酸棒状杆菌穿梭表达载体 pXMJ19 连接, 构建重组质粒 pXMJ19-Sbtg 转化谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032. 经 IPTG 诱导后该重组菌发酵液具有交联酪蛋白的能力, 表明该重组菌能够实现分泌表达.

关键词: 谷氨酰胺转氨酶; 谷氨酸棒状杆菌; 信号肽; 分泌表达

中图分类号: Q814.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2012)03-0001-05

Heterogeneous Expression of *Bacillus subtilis* Transglutaminase

LIU Kai, LIU Yihan, ZHANG Yan, TIAN Yao, LU Fuping

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Gene *Sbtg* with SD sequence and signal peptide Δ S0949 *Corynebacterium glutamicum* was obtained from the genomic DNA of wild type *Bacillus subtilis* though PCR amplification. It was then inserted into an *E. coli*-*C. glutamicum* shuttle vector pXMJ19 to construct expression plasmid pXMJ19-Sbtg. The recombinant plasmid was then transformed into *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Induced by IPTG, the fermentation broth had a cross-linking ability. The result indicated that gene *Sbtg* was a secretion expression.

Key words: transglutaminase; *Corynebacterium glutamicum*; signal peptide; secretion expression

谷氨酰胺转氨酶 (transglutaminase, EC 2.3.2.13, 简称 TG 或 TGase) 是一种催化酰基转移反应的转移酶. TG 作为酰基受体与蛋白质中的赖氨酸残基的 ϵ -氨基作用, 形成 ϵ -(γ -谷氨酰)Lys 键, 催化蛋白质分子内和分子间发生交联、蛋白质和氨基酸之间的连接以及蛋白质分子内谷氨酰胺基的水解反应, 从而改善蛋白质功能性质, 提高蛋白质的营养价值, 在肉制品、鱼类制品、豆制品、面食和乳制品等食品加工工业以及纺织和生物制药等领域有着广泛的应用前景^[1-6].

目前, 食品工业中谷氨酰胺转氨酶的主要生产方法是通过茂源链霉菌 (*Streptomyces mobaraensis*) 直接发酵获得, 由于酶活收率较低 (仅为 37%)^[7] 使其价格居高不下. 虽然以日本的味之素公司科研人员为代表的中外学者对茂源链霉菌谷氨酰胺转氨酶 (*Streptomyces mobaraensis* transglutaminase, MTG) 进

行了大量研究, 发现使用谷氨酸棒状杆菌作为表达宿主, 将 MTG 的酶原区基因和激活该酶原的蛋白酶基因同时转入宿主细胞后能够大量表达 MTG^[8-9], 之后不断研究通过分子生物学技术改进酶的活力, 先后采用嵌合前肽替代自身前肽^[10]、亲水表面热区区域趋向突变 (WASH-ROM) 理性进化和随机突变的非理性分子进化技术^[11], 在提高酶的活力的同时, 对酶的突变体的构效关系以及底物特异性进行了详细的分析, 肯定了随机突变是提高酶比活力的有效手段, 确定了影响酶活力的关键氨基酸. 同时证明了 *C. ammoniagenes* ATCC6872 等棒状杆菌属微生物都是表达外源蛋白的良好宿主^[12], 但 MTG 一些特性 (诸如: pH 和温度等) 对一些加工底物和加工过程的需求不能很好满足^[13], 使得开发不同种类和特性的 TG 成为食品加工工业发展的一个必然趋势. 而枯草芽孢杆菌谷氨

收稿日期: 2011-12-16; 修回日期: 2012-01-22

基金项目: “863” “十二五” 农村领域国家科技计划课题资助 (2011AA100905-4); 国家自然科学基金资助项目 (21076159)

作者简介: 刘 凯 (1986—), 男, 山东泰安人, 硕士研究生; 通信作者: 路福平, 教授, lfp@tust.edu.cn.

酰胺转氨酶 (*Bacillus subtilis* transglutaminase, 简称 BTG) 则能较好地弥补这些缺点. 1996 年日本的 Kobayashi 等^[14]最早在枯草芽孢杆菌中发现了 BTG, 同时克隆出 BTG 基因, 研究其分子结构, 发现 BTG 没有信号肽. 而 Suzuki 等通过对 BTG 进行分离和特性研究, 证明该酶相对分子质量约为 2.9×10^4 , 最适作用温度为 $60\text{ }^\circ\text{C}$, 最适 pH 8.2, 能分别催化酪素液及 BSA 蛋白分子的交联和凝胶化^[15]. 关于 BTG 的研究目前主要以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 为表达宿主, 主要存在表达量不高^[16], 产物极易形成包涵体等问题, 而关于该酶分泌表达的报道则极少.

谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 目前主要用于工业化生产谷氨酸和赖氨酸等各类氨基酸^[17]. 以谷氨酸棒状杆菌作为表达宿主有着极其明显的优势: 拥有一套高效的分泌信号肽及分子伴侣系统, 转录翻译机制、遗传背景较清楚, 从而能够高效分泌目的蛋白, 也简化了目的蛋白的分离纯化, 而且在多数情况下, 谷氨酸棒状杆菌分泌的重组异源蛋白具有天然构象和生物活性^[18]; 谷氨酸棒状杆菌分泌的蛋白酶极少, 几乎不会对表达的蛋白造成影响; 谷氨酸棒状杆菌严格好氧, 生长迅速, 培养条件简单, 使用安全, 无致病性, 作为表达宿主时间久, 人们积累了极其丰富的发酵经验. 这些都说明谷氨酸棒状杆菌是一种优良的食品用酶表达宿主.

本实验旨在通过构建谷氨酸棒状杆菌表达系统来实现 BTG 的分泌表达, 为未来 BTG 的广泛应用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM110、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCCA13032、野生型枯草芽孢杆菌 (wild type *Bacillus subtilis*)、质粒 pXMJ19 均为本实验室保存.

1.1.2 主要试剂和工具酶

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Hind* III 和 *Pst* I, Takala 公司; DNA 纯化回收和质粒快速提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 蛋白胨和酵母浸粉, Oxoid 公司; 其他试剂均为国产分析纯.

1.1.3 培养基

LB (Luria-Bertani) 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵

母浸出粉 5, NaCl 5, pH 7.0.

LA 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母浸出粉 5, NaCl 5, 琼脂粉 20, pH 7.0 ~ 7.2.

谷棒复苏培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母浸出粉 5, NaCl 5, 葡萄糖 5, pH 7.0 ~ 7.2.

1.1.4 引物合成

根据 GenBank 中枯草芽孢杆菌谷氨酰胺转氨酶基因序列 (登录号为: E13095), 参考谷氨酸棒状杆菌信号肽筛选的结果^[19], 设计一段含 SD 序列及全长信号肽序列 Δ S0949 的 BTG 基因, 该信号肽为 Keiro W 等在野生型谷氨酸棒状杆菌基因组中筛选出的具有高效分泌能力的信号肽 0949 的基础上, 通过优化切割位点的首个氨基酸, 将原始信号肽的首个氨基酸亮氨酸 (L) 改为谷氨酰胺 (Q) 得到的. 引物设计为: 上游引物 P1: 5'-TATCGGCGCTGCCAGCATGTTTATGCCAAAGGCCAACGCCAAGGAGCATCGAGATGATTATTGTATCAGGACAA-3', 上游引物 P2: 5'-CCCAAGCTTAAAGGAGGACACGCATGCAAATAAACC GCCGAGGCTTCTTAAAAGCCACCGCAGGACTTGCCACTATCGGCGCTGCCAG-3', 下游引物 P3: 5'-AAAACCTGCAGTTAGCGGACGATGCG-3'. 上游引物 P1 除互补序列外还含有信号肽序列 Δ S0949 的下游 49 个碱基序列, 上游引物 P2 的 5' 端引入了 *Hind* III 酶切位点 (AAGCTT), 含有信号肽序列 Δ S0949 的上游 50 个碱基序列及全长 SD 序列; 下游引物 P3 的 5' 端引入了 *Pst* I 酶切位点 (CTGCAG). 引物委托上海英俊生物工程有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 野生型枯草芽孢杆菌染色体 DNA 的提取

接 1 环枯草芽孢杆菌单菌落于 5 mL LB 液体培养基, 180 r/min 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养过夜; 取 1 mL 菌液于 1.5 mL 的 EP 管中, 离心去上清液, 用 500 μL 去离子水重悬菌体, 加溶菌酶至终质量浓度 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 30 min; 加 10% SDS 100 μL , 混匀, 放置 10 min 左右直至黏稠; 然后加入 5 mol/L NaCl 100 μL , 充分混匀, 放置 10 min; 再加入体积比为 1:1 的苯酚与氯仿混合溶液 700 μL , 剧烈振荡, 离心 10 min; 直至两界面澄清. 用 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 弃上清液, 充分晾干; 然后加 50 μL 去离子水溶解 DNA, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用.

1.2.2 含 SD 序列及信号肽 Δ S0949 的 *btg* 基因扩增

以野生型枯草芽孢杆菌染色体为模板, 首先用引物 P1、P3 扩增目的基因, 然后以该扩增产物为模板, 以 P2、P3 为引物扩增出含 SD 序列及全长信号肽序

列 Δ S0949 的 BTG 基因;扩增循环条件:95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环。

1.2.3 重组质粒的构建

PCR 产物纯化回收后用 *Hind* III 和 *Pst* I 双切后与同样经过 *Hind* III 和 *Pst* I 双切的质粒 pXMJ19 连接,转化 *E. coli* JM110, 涂布含氯霉素质量浓度为 50 μ g/mL 的平板,挑取转化子,提取质粒,酶切验证,实验流程如图 1 所示。

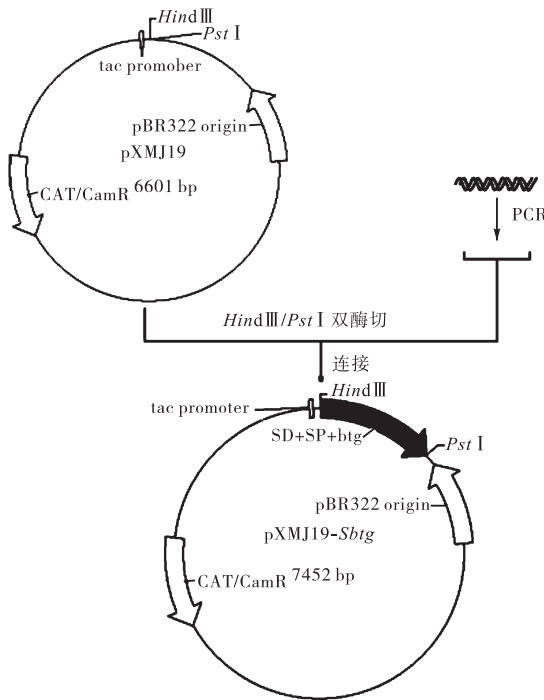


图 1 重组质粒 pXMJ19-Sbtg 构建流程图

Fig. 1 Construction of pXMJ19-Sbtg

1.2.4 谷氨酸棒状杆菌的电转化

接种新鲜的对数期菌液至含 0.1%吐温 80 和 3% 甘氨酸的 LB 液体培养基中,培养至 A_{600} 约为 0.9 时取出摇瓶,冰浴 15 min, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min. 用预冷的 10%甘油洗涤菌体 4 次,最后用 10%甘油重悬菌体,分装保存. 取 50 μ L 感受态细胞和 2 μ L 构建好的重组质粒混匀,迅速加入预冷的电转杯中电击. 电击条件为电压 2.5 kV,电阻 400 Ω ,电容 200 μ F. 电击结束后迅速取出电转杯,加入 LB 培养基 1 mL, 46 °C 热击 6 min, 30 °C 振荡培养 1 h, 取 200 μ L 涂布于含 10 μ g/mL 氯霉素的 LB 抗性平板. 挑取转化子酶切验证。

1.2.5 目的基因在谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中的表达

接 1 环重组菌单菌落于装有 50 mL LB 培养基

的 250 mL 三角瓶中,30 °C、200 r/min 振荡培养过夜,以 1%的接种量转接于装有 100 mL LB 培养基的 500 mL 三角瓶中,30 °C、200 r/min 振荡培养 8 h,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导目的蛋白的表达,继续培养 48 h. 发酵液于 12 000 r/min 离心 5 min,取 1 mL 上清液,向其中加入 100%TCA 130 μ L, -20 °C 放置 30 min, 4 °C 沉淀 12 h, 12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加 1 mL 丙酮洗涤,待丙酮挥发完全后向沉淀中加入 30 μ L 电泳上样缓冲液,沸水浴 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 酪蛋白交联实验

用 0.1 mol/L Tris·Cl (pH 7.5) 配制 1 mg/mL 酪蛋白溶液. 将酪蛋白溶液与粗酶液按一定比例混合,再加入 DTT 至终浓度为 5 mmol/L,于 37 °C 反应过夜. 反应产物进行 SDS-PAGE 检测。

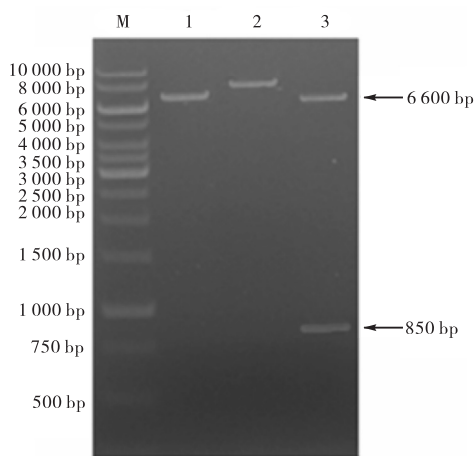
2 结果与分析

2.1 重组表达载体的构建

以野生型枯草芽孢杆菌染色体为模板,分别用引物 P1、P3 和 P2、P3 扩增目的基因 *Sbtg*. 由于在引物合成过程中,在 *btg* 的上游外源添加了一段 SD 序列和谷氨酸棒状杆菌的高效分泌信号肽序列 Δ S0949,使得 *btg* 具有了在谷氨酸棒状杆菌中能够分泌表达的潜力. PCR 产物纯化回收后用 *Hind* III 和 *Pst* I 双切,后与同样经过 *Hind* III 和 *Pst* I 双切的质粒 pXMJ19 连接,转化 *E. coli* JM110,涂布含氯霉素质量浓度为 50 μ g/mL 的平板,挑取转化子,提取质粒,酶切验证(图 2). 经 *Hind* III 和 *Pst* I 双切,重组质粒产生 6 600 bp 和 850 bp 的两条带,与预计大小相符,表明重组质粒构建成功。

2.2 谷氨酸棒状杆菌的电转化及鉴定

鉴于谷氨酸棒状杆菌具有非常强的限制系统,能有效降解来自不同菌种的异源 DNA 或被异源甲基化修饰的 DNA,使得在普通大肠杆菌中构建的重组 DNA 对谷氨酸棒状杆菌的电转化效率不高,因此,首先在甲基化修饰缺陷系统的大肠杆菌菌株 JM110 中构建好重组质粒 pXMJ19-Sbtg,利用该质粒的大肠杆菌-谷氨酸棒状杆菌穿梭特性转化谷氨酸棒状杆菌,可提高其转化效率. 提取 JM110 中构建好的质粒,转化 ATCC13032 感受态细胞,涂布于含氯霉素 10 μ g/mL 的 LA 抗性平板. 挑取转化子酶切验证。



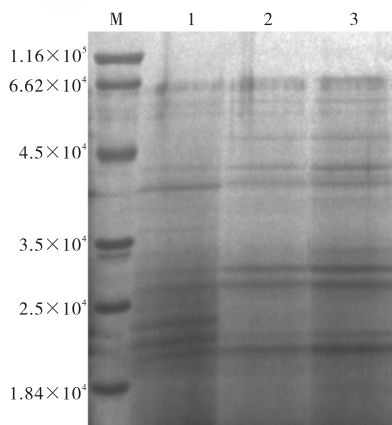
M. DNA Marker; 1. pXMJ19/Hind III; 2. pXMJ19-Sbtg/Hind III; 3. pXMJ19-Sbtg/Hind III-Pst I

图2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant vector by digestion with Hind III and Pst I

2.3 重组菌 pXMJ19-Sbtg/13032 的诱导表达

将未诱导及诱导 48 h 后的重组菌株和对照菌株 pXMJ19/13032 发酵液进行 SDS-PAGE (图 3). 通过测序结果推测, 目的蛋白的相对分子质量应该为 2.7×10^4 , 但电泳结果显示, 重组菌株 pXMJ19-Sbtg/13032 及对照菌株 pXMJ19/13032 均未见明显的目的条带出现, 推测原因: 活性形式的 BTG 由于其交联作用会对菌体产生毒害作用, 导致该蛋白的表达量不高.



M. Protein Marker; 1. pXMJ19/13032 发酵液; 2. pXMJ19-Sbtg/13032 未诱导发酵液; 3. pXMJ19-Sbtg/13032 诱导发酵液

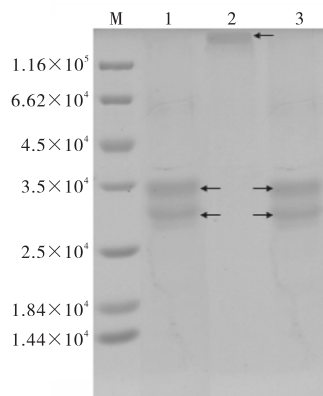
图3 重组蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein

2.4 酪蛋白交联实验

分别将诱导前后重组菌及对照菌 pXMJ19/13032

发酵液过滤除菌后与配制的酪蛋白溶液混合, 37°C 反应过夜后可见重组菌发酵液变浑浊, 有白色絮状沉淀产生, 而对照菌发酵液则依然为澄清状态. 取反应液 SDS-PAGE 分析 (图 4), 结果表明与重组菌发酵液混合的酪蛋白经过 BTG 的交联作用产生相对分子质量极大的聚合物, 该聚合物无法进入浓缩胶内, 而对照菌则未发生交联反应. 这表明重组菌经诱导后 BTG 得到了表达.



M. Protein Marker; 1. 对照菌 pXMJ19/13032 诱导后发酵液交联结果; 2. 重组菌 pXMJ19-Sbtg/13032 诱导后发酵液交联结果; 3. 重组菌 pXMJ19-Sbtg/13032 未诱导发酵液交联结果

图4 酪蛋白交联产物 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of cross-linked polymer

3 结 语

枯草芽孢杆菌谷氨酰胺转氨酶 (BTG) 作为谷氨酰胺转氨酶家族中较为特殊的一种, 由于其相对分子质量较小 (约 2.8×10^4) 及比活力较高, 从而具有巨大的潜在应用价值. 大肠杆菌由于产内毒素和易形成包涵体等局限, 无法达到食品级用酶严格的生产要求, 而谷氨酸棒状杆菌则无此局限, 是生产该酶潜在的优良宿主. 由于天然存在的 BTG 是胞内酶, 不含信号肽序列, 无法得到分泌表达, 故参阅相关文献, 利用一段适于谷氨酸棒状杆菌高效分泌表达的信号肽序列 ΔS0949 , 将其与 BTG 基因连接, 得到了能分泌表达 BTG 的重组谷氨酸棒状杆菌. 目前还没有关于特异性测定 BTG 酶活的方法, 而氧氨酸比色法^[20] 是测定茂源链霉菌谷氨酰胺转氨酶酶活的特异方法, 但无法使用该方法测出 BTG 的酶活, 推测可能原因为不同来源的谷氨酰胺转氨酶的底物要求不同造成的, 寻找特异性底物对 BTG 的表达量进行定量分析成为下一步工作的重点.

参考文献:

- [1] Cofrades S , López-López I , Ruiz-Capillas C , et al. Quality characteristics of low-salt restructured poultry with microbial transglutaminase and seaweed [J]. Meat Science, 2011, 87(4) : 373–380.
- [2] Yeoh S Y , Alkarkhi A F , Ramli S B , et al. Effect of cooking on physical and sensory properties of fresh yellow alkaline noodles prepared by partial substitution of wheat flour with soy protein isolate and treated with cross-linking agents[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2011, 62(4) : 410–417.
- [3] Benjakul S , Phatcharat S , Tammattinna A , et al. Improvement of gelling properties of lizardfish mince as influenced by microbial transglutaminase and fish freshness[J]. Journal of Food Science , 2008, 73(6) : 239–246.
- [4] Agyare K K , Damodaran S. pH-stability and thermal properties of microbial transglutaminase-treated whey protein isolate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(3) : 1946–1953.
- [5] Zhu Y , Rinzema A , Tramper J. Microbial transglutaminase: A review of its production and application in food processing[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 44(3/4) : 277–282.
- [6] Seguro K , Nio N , Motoki M. Some characteristics of a microbial protein cross-linking enzyme : Transglutaminase[J]. ACS Symposium Series, 1996, 650: 271–280.
- [7] 周楠迪, 田亚平, 华子安, 等. 微生物转谷氨酰胺酶的纯化方法和酶学性质研究[J]. 工业微生物, 2004, 34(3) : 20–23.
- [8] Kikuchi Y , Date M , Yokoyama K , et al. Secretion of active-form *Streptoverticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: Processing of the pro-domain by a co-secreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(1) : 358–366.
- [9] Date M , Yokoyama K , Umezawa Y , et al. Production of native-type *Streptoverticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(5) : 3011–3014.
- [10] Date M , Yokoyama K , Umezawa K , et al. High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamomeus* transglutaminase[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 110(3) : 219–226.
- [11] Yokoyama K , Utsumi H , Nakamura T , et al. Screening for improved activity of a transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* created by a novel rational mutagenesis and random mutagenesis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(6) : 2087–2096.
- [12] Itaya H , Kikuchi Y. Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase by *coryneform* bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(4) : 621–625.
- [13] Bernard B K , Tsubuku S , Shioya S. Acute toxicity and genotoxicity studies of a microbial transglutaminase[J]. International Journal of Toxicology, 1998, 17(6) : 703–721.
- [14] Kobayashi K , Kumazawa Y , Miwa K , et al. ϵ -(γ -Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiology Letter, 1996, 144(2/3) : 157–160.
- [15] Suzuki S , Izawa Y , Kobayashi K , et al. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64(11) : 2344–2351.
- [16] 周建, 董亚芳, 吴自荣. 枯草杆菌谷氨酰胺转氨酶的克隆及其在大肠杆菌中的融合表达[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(8) : 77–81.
- [17] Krämer R. Secretion of amino acids by bacteria : Physiology and mechanism[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 13(1) : 75–93.
- [18] Lothar E , Michael B. Handbook of *Corynebacterium glutamicum* [M]. Boca Raton London New York Singapore: CRC Press, 2005.
- [19] Watanabe K , Tsuchida Y , Okibe N , et al. Scanning the *Corynebacterium glutamicum* R genome for high-efficiency secretion signal sequences[J]. Microbiology, 2009, 155(3) : 741–750.
- [20] Grossowicz N , Wainfan E , Borek E , et al. The enzyme formation of hydroxamic acids from glutamine[J]. Journal of Biological Chemistry, 1950, 187: 111–125.

责任编辑: 郎婧