

茂原链轮丝菌转谷氨酰胺酶基因在大肠杆菌中高效表达 High Expression of Microbial Transglutaminase Gene from *Streptoverticillium Mobaraense* in *Escherichia coli*

徐斌^{1,2*}, 韩之波¹, 杨萍¹, 刘拥军^{1,2}, 李妍涵¹, 韩忠朝^{1,2}

XU Bin^{1,2*}, HAN Zhi-Bo¹, YANG Ping¹, LIU Yong-Jun^{1,2}, LI Yan-Han¹ and HAN Zhong-Chao^{1,2}

1. 中国医学科学院血液学研究所, 天津 300020

2. 泰达生命科学技术研究中心, 天津 300457

1. Institute of Hematology Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China

2. TEDA Life Science and Technology Research Center, Tianjin 300457, China

摘要 利用 PCR 方法从茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*) 基因组 DNA 扩增出微生物转谷氨酰胺酶 (Microbial Transglutaminase, MTG) 的基因片段, 并构建表达质粒 pET-MTG。后者在大肠杆菌 (*Escherichia coli* Rosetta DE3) 中得到高效表达, 但表达的 MTG 存在于包涵体中。经洗涤、变性和复性, 并以强阳离子交换层析纯化, 获得了 SDS-PAGE 纯的 MTG, 并具有与天然酶几乎相同的比活性。此项工作为工业化生产 MTG 打下了基础。

关键词 微生物转谷氨酰胺酶, 大肠杆菌, 表达, 包涵体

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)05-0794-05

Abstract The microbial transglutaminase (MTG) gene was amplified from the genomic DNA of *Streptoverticillium mobaraense* by using PCR and inserted into pET vector to construct the expression plasmid called pET-MTG. The pET-MTG was transfected into *E. coli* (Rosetta DE3) and the MTG protein was found to be highly expressed as inclusion bodies. The inclusion bodies were isolated and subjected to denaturation and re-naturation, followed by strong cation ion-exchange chromatography to purify the expressed MTG. The specific activity of purified MTG was close to that of native MTG. Taken together, this study might provide a base for the industrial production of microbial transglutaminase.

Key words microbial transglutaminase, *E. coli*, expression, inclusion body

微生物转谷氨酰胺酶 (MTG, E2.3.2.13) 是一种催化多肽链中谷氨酰胺的 γ -酰基转移至另一底物中氨基, 形成 γ -谷氨酰化化合物的转移酶。如底物为蛋白质, 它能催化两个蛋白质之间的交联反应。底物包括乳清蛋白、麦胚蛋白、大豆蛋白、牛肌球蛋白和家禽类肌动球蛋白等^[1]。通过催化蛋白质或多肽之间的交联反应, 提高蛋白质的水溶性、起泡性、可

搅拌性、热稳定性、乳化性等功能, 使蛋白质类食品在质构、外观和风味得到了改善, 从而提高蛋白质的营养价值。目前, MTG 已广泛应用于食品工业^[2]。转谷氨酰胺酶广泛存在于动物许多组织中, 但由于含量低、分离困难、热稳定性差、对钙离子的依赖性, 使之工业化生产十分困难。

Received: May 13, 2005; Accepted: June 17, 2005.

This work was supported by a grant from the Natural Sciences Foundation of Tianjin (No.0443607011).

* Corresponding author. Tel 86-22-66211428; E-mail xubin_td@sohu.com

天津市自然科学基金资助项目 (No.043607011).

上世纪 80 年代末, Ando 等^[3]发现茂原链轮丝菌、肉桂链轮丝菌和灰肉链轮丝菌等能分泌 MTG, 这类 MTG 具有热稳定、不需要钙离子、产物交联程度高等特点。但由于表达量较低, 生产成本仍然较高, 限制了它的进一步应用。大肠杆菌已广泛地应用酶制剂和生物制药工业^[4], 生产重组蛋白。2002 年 Kashiwagi 小组^[5]在大肠杆菌 BL21(DE3) PLYS 中表达了 MTG, 但带有该质粒的菌体表达 T7 溶菌酶, 所产生的 T7 溶菌酶与 T7RNA 聚合酶结合, 抑制转录, 能明显降低本底表达, 对外源目的蛋白的高效表达产生了不利影响^[6]。MTG 的编码基因含有大肠杆菌稀有密码子, 特别是位于 N-端第 5 和 15 位的 Arg 密码子均为 AGG, 不利于高效表达^[7]。为此, 本实验选择表达稀有密码子的大肠杆菌 Rosetta(DE3) 作为宿主菌, 改善稀有密码子对表达的限制, 利用 pET 系统高效表达 MTG, 建立了高密度发酵工艺和简便有效的 MTG 包涵体复性方法, 并对其表达产物进行了纯化和活性测定。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3) 由本室保存; 大肠杆菌 BL21(DE3) PLYS、Rosetta(DE3) 和质粒 pET-22b 购自 Novagen; 限制酶 *Nde* I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶为大连 TaKaRa 产品, 高保真 Pfu 聚合酶为上海生工产品; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜; PCR 引物由上海博亚合成; DNA 测序由上海博亚公司完成; 茂原链轮丝菌基因组 DNA 由杨小平博士惠送; 天然 MTG 由 Pasternack 博士惠送; SP-Sepharose 购自 Amersham; 蛋白分子量标准为 Gibco 产品。IPTG、尿素、EDTA 等为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 MTG 基因:以 1 μ g 茂原链轮丝菌基因组 DNA 为 PCR 反应模板, 正向引物为 5'-TAAAAACATATGGACTCCGACGACAGGTCAC-3', 反向引物为 5'-TAAAAACTCGAGTTACGGCCAGCCCTGCTTTACC-3'。PCR 反应在 50 μ L 总体积中进行, 反应条件为在 94 $^{\circ}$ C 变性 5min 后开始循环, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 50s, 58 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 共 30 个循环后, 再于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.2.2 MTG 表达质粒的构建:凝胶回收的 PCR 产物和 pET-22b 载体分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 并通过凝胶回收试剂盒回收, 然后进行连接(16 $^{\circ}$ C,

16h) 转化 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆, 提取质粒后进行双酶切分析验证, 并进行 DNA 测序鉴定。构建的表达质粒被称为 pET-MTG。

1.2.3 MTG 在 *E. coli* 中的表达、包涵体的复性和 MTG 的纯化:以测序验证的 pET-MTG 表达质粒分别转化 BL21(DE3), BL21(DE3) PLYS 和 Rosetta(DE3) 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 接种于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 后二种 *E. coli* 的培养基中含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素和 30 μ g/mL 氯霉素, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.6 ~ 0.8 时, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导 3h。接种上述转化后的 Rosetta(DE3) 于 1000mL LB 培养基, 待 OD_{600} 值约达 2.0 时, 诱导与上述相同。离心收集菌体, 以 50mmol/L, pH 8.0 Tris-HCl(含 1mmol/L EDTA) 悬浮, 在冰浴中以超声波破碎菌体, 离心后分别收集上清和沉淀, 其中沉淀部分(包涵体) 以 50mmol Tris-HCl (pH8.0, 含 100mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100) 重悬, 并经超声处理洗涤 3 次, 然后再以不含 Triton X-100 的同一缓冲液洗涤 3 次, 得到纯化的包涵体。MTG 的复性参照 Kashiwagi 等方法^[5] 并进行了改进。包涵体(20mL, 蛋白浓度约为 20mg/mL) 溶于 20mmol/L, pH8.0 Tris-HCl(含 8mol/L 尿素, 20mmol/L DTT 和 1mmol/L EDTA), 室温搅拌 2h, 离心去除沉淀后, 用 HCl 调 pH 至 4.0, 再次离心去除沉淀, 用 20mmol/L, pH4.0 的乙酸缓冲液(含 0.05% 的 Triton) 稀释 50 倍, 4 $^{\circ}$ C 搅拌过夜, 次日用 0.5mol/L NaOH 调 pH 至 6.0。离心去除沉淀后, 用 10 倍 20mmol/L, pH6.0 磷酸缓冲液(PB) 透析 2 次。复性产物上 SP-Sepharose 柱, 用 PB(含 20mmol/L NaCl) 洗去未结合的成分, 再用含 0.5mol/L NaCl 洗脱, 洗脱液透析后进行超滤浓缩, 得到 MTG 145mg。所有样品以 SDS-PAGE 进行分析, 以 Lowry 法测定蛋白浓度。

1.2.4 高密度发酵:15L 发酵罐发酵(工作体积为 10L) 接种量为 100mL。发酵时间、pH、温度和搅拌速度分别为 7.0、37 $^{\circ}$ C 和 600r/min。发酵初始时培养基为: 蛋白胨 40g、酵母提取物 25g、12mmol/L Na₂HPO₄、15mmol/L KH₂PO₄、14mmol/L NaCl、40mmol/L (NH₄)₂SO₄、20mmol/L 葡萄糖、12mmol/L MgSO₄ 和适量的微量元素。补料为 20% 的葡萄糖(含有 2mmol/L Na₂HPO₄ 及 3mmol/L KH₂PO₄), 待菌体密度的 OD_{600} 值达 60 ~ 65 时, 补糖结束。待溶氧上升超过 30% 后, 加入 IPTG 进行诱导表达, IPTG 的

终浓度为 1mmol/L, 溶氧保持在 30% ~ 50%, 补料为 40% 水解酪蛋白, 诱导 4h 后放罐, 并在 1、2、3h 分别留样。

1.2.5 MTG 的活性测定: 比色法测定 MTG 活性^[8]。25 μ L 含酶样品加入到 350 μ L 酶反应体系中 (200mmol/L, pH6.0 Tris-乙酸缓冲液, 含 30mmol/L CBZ-Gln-Gly, 10mmol/L Hydroxylamine 和 10mmol/L GST)。充分混合后, 37 $^{\circ}$ C 保温 5min。然后加入 375 μ L FeCl₃ (1mol/L, 溶解在 5% 的三氯乙酸), 混合后离心去除沉淀后, 在 525nm 波长下测定光密度值。对照组为不含 MTG 的样品缓冲液。一个 MTG 的酶活力单位为: 37 $^{\circ}$ C 时, 1min 催化底物 CBZ-Gln-Gly 生成 1 μ mol L-谷氨酰 γ -单异羟基脲酸 (L-Glutamic acid γ -monohydroxamate)。

2 结果

2.1 PCR 扩增 MTG 基因片段的鉴定

根据 Kikuchi 报道的 MTG 基因编码序列 (GenBank :AF531437), 设计引物, 以茂原链轮丝菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增出一条与预计大小 (993bp) 相符的 DNA 片段 (图 1)。

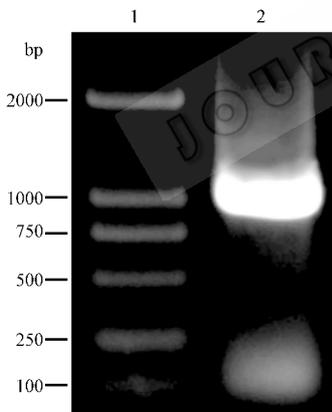


图 1 以 PCR 方法扩增 MTG 基因

Fig.1 Amplification of MTG gene (993bp) by PCR

1 :DNA marker ; 2 :PCR product.

2.2 MTG 表达质粒的鉴定

凝胶回收的 PCR 产物经双酶切后, 与凝胶回收的 pET-22b 连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 并抽提质粒, 经双酶切方法鉴定重组质粒含有外源 993bp 片段 (图 2)。重组 pET 被命名为 pET-MTG。然后测定其中一个重组质粒的插入序列, 测序结果显示插入 DNA 片段序列与 GenBank 登记的 MTG 基因序列完全相同。

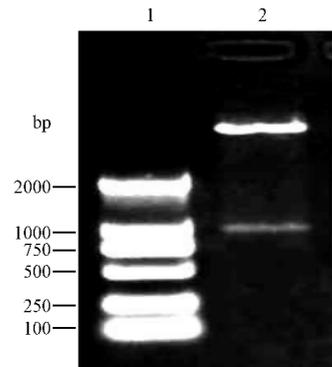


图 2 双酶切方法鉴定重组质粒

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid pET-MTG by double restrictive enzyme digestion

1 :DNA marker ; 2 :pET-MTG/*Nde* I + *Xho* I .

2.3 MTG 中表达、包涵体复性和纯化

将构建的 pET-MTG 质粒分别转化 BL21(DE3)、BL21(DE3)PLysS 和 Rosetta(DE3), 得到含重组质粒的基因工程菌。SDS-PAGE 分析 IPTG 诱导前后的全菌蛋白, 只有转化后并经 IPTG 诱导的 Rosetta(DE3) 出现分子量为 36kD 的外源蛋白表达带, 而转化的 BL21(DE3) 和 BL21(DE3)PLysS 以及未经 IPTG 诱导的三个菌株均未出现表达带 (图 3)。经光密度扫描测定, 表达带占菌体蛋白的 41%。筛选的表达菌株使用 LB 培养基培养 (1000mL), IPTG 诱导 3h 后, 离

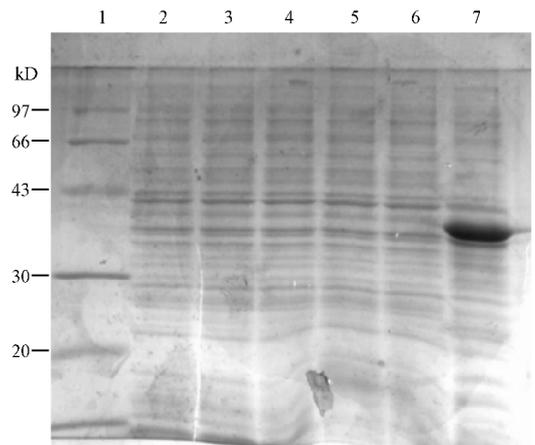


图 3 IPTG 诱导前后 MTG 蛋白的表达

Fig.3 SDS-PAGE analysis of MTG expression in *E. coli* before and after IPTG induction

1 :molecular weight marker (kD); 2~4 : before IPTG induction ;
2 :*E. coli* BL 21(DE3); 3 :*E. coli* BL 21(DE3)PLysS ;
4 :*E. coli* Rosetta(DE3); 5~7 : after IPTG induction
5 :*E. coli* BL21(DE3); 6 :*E. coli* BL21(DE3)PLysS ;
7 :*E. coli* Rosetta(DE3).

心后收集菌体,经破碎后分为上清和沉淀,沉淀部分用含 0.5% Triton X-100 的菌体悬浮缓冲液充分洗涤得包涵体(图 5),上清无表达带(结果未显示)。包涵体经尿素溶解变性和透析复性后,以 SP-Sepharose 强阳离子交换柱层析纯化(图 4,5),结合在柱上的 MTG 用含有 500mmol/L NaCl 的 PB 洗脱,洗脱液透析后进行超滤浓缩,共获得 MTG 蛋白 145mg。复性前酶蛋白量约为 400mg,以此计算,复性率约为 36.3%。

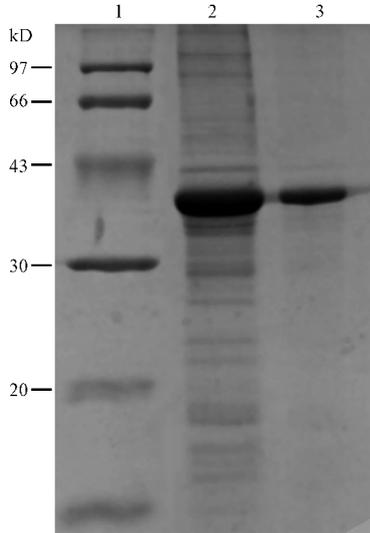


图 4 包涵体中和离子交换柱层析纯化后 MTG 蛋白的鉴定

Fig.4 SDS-PAGE analysis of MTG protein in inclusion body and after purification by ion-exchange chromatography

1: marker; 2: isolated inclusion body; 3: purified MTG.

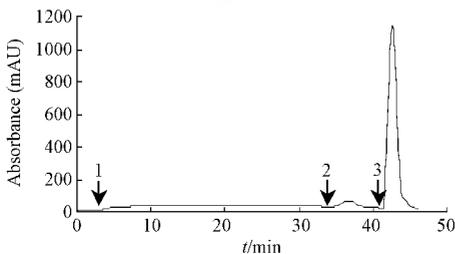


图 5 SP-Sepharose FF 离子交换层析纯化复性后的 MTG

Fig.5 Purification of Refolded MTG by SP-Sepharose FF
Sample(1): refolded MTG in PB; Eluent(A(2)): PB + 20mmol/L NaCl;
R Eluent(B(3)): PB + 500mmol/L NaCl.

2.4 高密度发酵及表达

菌体生长的 OD 值曲线表明(图 6): OD 值在接种 2h 开始上升,3h 后上升速度加快,26h 后上升速度减慢,此时的 OD 值为 56。溶氧曲线显示:接种 4h 后溶氧开始下降,6h 后直线下降。8h 后溶氧下降到 28%,同时碱泵间歇运转,表明细菌在产酸,约

在 10h,溶氧开始上升,说明发酵罐里养料逐渐消耗,在 15h 时开始补料。待菌体密度的 OD 值达 60~65 时,停止补料半小时,让葡萄糖充分耗尽。IPTG 诱导后 MTG 表达逐渐增高,在 3h 达到最高,4h 后表达量下降(图 7)。在诱导 3h 时,表达带与它相近的一条带已融合起来,无法判断 MTG 占全菌蛋白的百分含量。在随后的高密度发酵中,确定诱导时间为 3h,离心得湿菌体 105g/L 培养基。按上述方法分离纯化包涵体,并进行复性纯化,共获得 MTG 蛋白 1.85g。

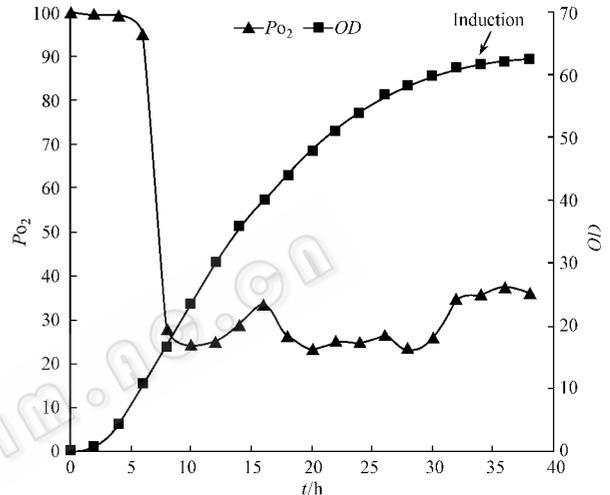


图 6 高密度发酵菌体生长曲线

Fig.6 Growth profile of bacteria in the high density fermentation

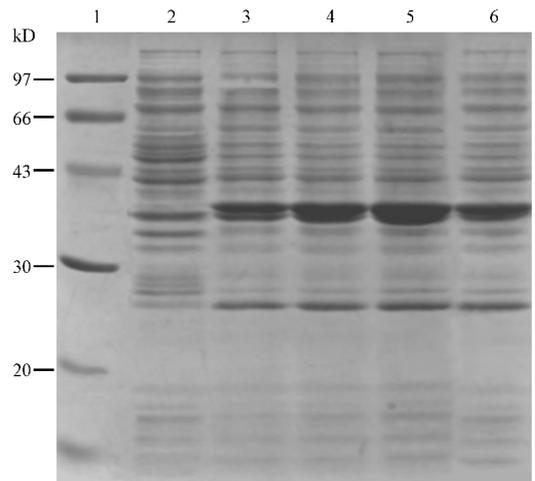


图 7 MTG 在 LB 培养基及高密度发酵中的表达

Fig.7 SDS-PAGE analysis of MTG expression in high density fermentation

1: marker; 2: before IPTG induction; 3~6: after IPTG induction 1h 2h 3h and 4h

2.5 MTG 的活性测定

MTG 作用于底物后生成 L-谷氨酰 γ -单异羟基肟酸,后者在波长 525nm 处有吸收峰。根据蛋白测定及酶的活性测定,重组 MTG 的比活为 21.5u/mg,天然 MTG 的比活为 23u/mg。

3 讨论

pET22b 为分泌型表达载体,含有 pelB 信号肽的编码序列,本实验使用 *Nde* I 酶切去除该序列,因此表达产物不含信号肽。重组质粒 pET-MTG 插入的 DNA 片段序列与 Kikuchi 等报道的完全相同,其中 G+C 占 66.66%。当外源目的基因在大肠杆菌表达时,由于密码子的偏爱性不同,会因为缺乏某种和几种 tRNA,直接导致翻译中止或错误。编码精氨酸密码子 AGA、AGG、甘氨酸密码子 GGA 和脯氨酸 CCC 很少被使用^[9]。在所有大肠杆菌含稀有密码子的 tRNA 中, tRNA^{arg}(AGG/AGA)含量最少。MTG 编码基因分析显示:含有大肠杆菌稀有密码子 AGA、AGG、CCC、GGA,其中 AGA 和 AGG 最多,占编码精氨酸密码子中的 37.8%(11/29)。位于 MTG N-端第 5 和 15 位的 Arg,密码子均为 AGG,更不利于 MTG 的表达。Ivanov 等报道^[7],当 mRNA 5'端含有稀有密码子时,该基因在大肠杆菌表达明显受到抑制。本研究结果表明:在使用 *E. coli* BL-21(DE3)和 BL-21(DE3) P_{Lys}S 作为宿主菌时, IPTG 诱导后未看到表达带,这可能是这两株宿主菌中含稀有密码子的 tRNA^{arg}(AGG/AGA)含量不足所致。Rosetta(DE3)是经过修饰,专用于带有大肠杆菌稀有密码子的外源蛋白表达的菌株,故使 MTG 实现了高效表达。

Kashiwagi 等^[4]报道利用 BL21(DE3)P_{Lys}S 成功地表达 MTG,这与本文的结果不同,该文中未显示其表达量及 MTG 基因表达电泳分析。P_{Lys}S 菌体表达的 T7 溶菌酶抑制 T7 RNA 聚合酶^[10],降低本底表达,对带有毒性基因载体的耐受性有所提高,但对外源基因高效表达可产生不利的影响。Mierendorf^[11]等曾观察到:当采用 T7 lac 启动子时, P_{Lys}S 宿主菌的表达水平比非 P_{Lys}S 宿主菌相对较低。高密度发酵时间长,同时伴有高速机械搅拌,不可避免有少量菌体破碎,破碎的 P_{Lys}S 菌体释放的溶菌酶可损伤其它生长的菌体,不利于高密度发酵。

在包涵体复性过程中,本研究使用了稀释复性,该技术简单且容易放大,适合工业化生产。参照 Kashiwagi 提供的复性方法,在复性液中添加 0.05%

的 Triton,使复性率提高了 40%(结果未列出)。使用高密度发酵方法,每升培养基获得 105g 湿菌体,获得了近 1.85g 的纯酶,远高于目前报道的最高的表达水平^[12](132mg/L 培养基)。活性试验表明:与文献报道天然酶活性^[12]相比,重组 MTG 的比活几乎相同(重组 MTG 的比活为 21.5u/mg,天然酶的比活为 23u/mg)。

总之,本研究实现了 MTG 的原核高效表达,并建立了高密度发酵工艺和简便有效的包涵体复性方法,为进一步建立利用大肠杆菌工业化生产更廉价的微生物转谷氨酰胺酶打下了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J. Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995 **44**: 277–282
- [2] Ye DY(叶丹英), Peng ZY(彭志英), Zhao MM(赵谋明). Transglutaminase and its application in food processing. *Journal of Zhongzhou Grain College(郑州粮食学院学报)*, 2000, **21**(2): 46–49
- [3] Ando H, Adachi M, Umeda K *et al.* Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganism. *Agric Biol Chem*, 1989, **53**: 2613–2617
- [4] Francois Baneyx. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**: 411–421
- [5] Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K *et al.* Crystal structure of microbial transglutaminase from streptococcus mobaraense. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**: 44252–44260
- [6] Huang J, Villemain J, Padilla R *et al.* Mechanisms by which T7 lysozyme specifically regulates T7 RNA polymerase during different phases of transcription. *J Mol Biol*, 1999, **293**(3): 457–475
- [7] Ivanov I, Alexandrova R, Dragulev B *et al.* Effect of tandemlyrepeated AGG triplets on the translation of CAT-mRNA in *E. coli*. *FEBS Lett*, 1992, **28**(307): 173–176
- [8] Pasternack R, Dorsch S, Otterbach J *et al.* Bacterial pro-transglutaminase from *Streptococcus mobaraense*. Purification, characterization and sequence of the zymogen. *Eur J Biochem*, 1998, **257**: 570–576
- [9] Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, **6**: 494–500
- [10] Zhang X, Studier FW. Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme. *J Mol Biol*, 1997, **269**: 10–27
- [11] pET System Manual. 10th edition. 10–11
- [12] Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K *et al.* Secretion of active-form *Streptococcus mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 358–366