

重组谷氨酰胺转胺酶的表达、复性及纯化

邵坤彦 彭宝玉 叶程 刘威 何冬兰

中南民族大学生命科学院, 武汉 430074

摘要 以吸水链霉菌基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到谷氨酰胺转胺酶基因片段, 构建 pGEX-TGase 重组质粒, 并转化到大肠杆菌中得到重组菌 BL21/pGEX-TGase。重组菌经乳糖诱导产生融合蛋白, 并对诱导条件进行了优化。表达产物主要以包涵体形式存在, 采取稀释及尿素梯度液相色谱结合的方法, 成功地实现了包涵体蛋白的复性。通过 GST 亲和柱纯化目的蛋白, 得到酶活为 29 U/mg 的电泳纯目的蛋白。

关键词 谷氨酰胺转胺酶; 乳糖诱导; 包涵体蛋白; 纯化; 复性

中图分类号 Q 556 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)01-0014-05

谷氨酰胺转胺酶(transglutaminase, TGase)是一类催化酰基转移的酶, 它主要通过识别蛋白 C 末端氨基酸序列(GGGSLLQG), 使蛋白质中的谷氨酰胺与赖氨酸形成共价键, 产生稳定的网络结构, 引起蛋白功能性质的改变^[1-3]。TGase 在食品行业中具有广泛的应用前景, 近年来 TGase 在人造蛋白领域被视为有效的分子订书机^[4]。来源于动物与植物的谷氨酰胺转胺酶分离纯化工艺复杂, 价格昂贵, 不适合工业化生产。自 1989 年 Ando 等^[5]发现了来源于微生物的谷氨酰胺转胺酶(microbial transglutaminase, MTG)以来, 人们逐渐将注意力转移到利用链霉菌及其他菌种发酵产酶的研究。链霉菌自然状态下分泌的谷氨酰胺转胺酶产量低, 因此有必要借助基因工程手段来提高其产量。Yu 等^[6]、Sommer 等^[7]均通过基因工程手段获得了酶活高于野生型 1 倍以上的 TGase。基因克隆中最常使用的表达体系是 *Escherichia coli*, 而该体系易形成包涵体。对于包涵体形式的 TGase, 目前国内外研究的较少, 唐名山等^[8]对 TGase 进行稀释复性及镍亲和层析纯化, 获得的酶液活力大小为 10.3 U/mg; Liu 等^[9]利用离子交换树脂对 TGase 同时进行复性及纯化, 获得的酶活力大小为 21 U/mg。目前人们广泛使用有潜在毒性的异丙基- β -D-半乳糖苷(IPTG)^[10]作为诱导剂, 其价格昂贵且可能对终产物造成不利影响。为了提高 TGase 的表达水平, 降低生产

成本, 本研究选择乳糖作为诱导剂, 以吸水链霉菌基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到谷氨酰胺转胺酶基因片段, 构建 pGEX-TGase 重组质粒, 并转化到大肠杆菌中得到重组菌 BL21/pGEX-TGase; 对诱导培养基中乳糖的质量浓度进行优化, 并对获得的无活性的包涵体蛋白进行复性及 GST 亲和纯化试验, 最终获得有活性且为电泳纯状态的酶蛋白。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1) 菌株和质粒。链霉菌菌株 H197 菌株、*E. coli* DH5 α 菌株、*E. coli* BL21 (DE3)、菌株 pGEX-4T-1 质粒均由中南民族大学生命科学院生物工程实验室分离所得; 克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。

2) 主要试剂。限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I, 购自日本 TaKaRa 公司; GST 标签纯化树脂购自 Biomiga 公司; 肝素亲和树脂购自 GE 公司; CBZ-Gln-Gly 购自 Sigma 公司; 其余试剂为国产分析纯。

1.2 目的基因的提取及 PCR 扩增

提取培养 50 h 的 *S. ygroscopicu* H197 的 DNA, 根据已报道的谷氨酰胺转胺酶的基因序列设计引物如下, 并分别在 5' 端引入 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切位点。

收稿日期: 2012-03-12

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2010CDZ046)

邵坤彦, 硕士研究生, 研究方向: 分子微生物学及生化制药。E-mail: sky_quiqi@sohu.com

通讯作者: 何冬兰, 教授, 研究方向: 分子微生物及酶学。E-mail: ymhlh@yahoo.com.cn

CGAGGATCCATGCAAACGCCGAGATT, CGCCTCGAGTTACGGCCAGCCAGCCCTGCT, 下划线即为酶切位点。以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

1.3 目的基因的 TA 克隆及表达载体构建

回收 PCR 扩增产物,与 pMD19-T 连接后转化 *E. coli* DH5 α 的感受态细胞,用含氨苄青霉素的 LB 培养基进行筛选,提取重组质粒 DNA 酶切鉴定,并测序。重组质粒和 pGEX-4T-1 均用 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切,凝胶电泳纯化后,回收并连接,得重组表达载体 pGEX-TGase,酶切鉴定后转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,随后将菌液涂在含氨苄青霉素的 LB 平板上培养。

1.4 乳糖诱导表达及条件优化

将工程菌 BL21/pGEX-TGase 接种到含氨苄的 LB 培养基中,37 °C 活化过夜。再转接至 10 mL 含 100 μ g/mL 乳糖诱导培养基中,诱导培养 9 h。添加乳糖的终质量浓度分别为 0、0.4、1.2、2.0、2.8、3.6 g/L,诱导培养后取样进行 SDS-PAGE,并通过 Bradford 法^[11]测定蛋白质质量浓度。

1.5 表达产物分布的确定

收集 200 mL 菌液,离心保留菌体,用 50 mmol/L、pH 6.0 的 PBS 缓冲液洗涤,加入细菌裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 5 mmol/L DTT, pH 8.0), 37 °C 振摇 2 h,离心弃上清后加入超声缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, pH 7.4),冰浴超声裂解菌体后离心,上清液为可溶性蛋白,沉淀为包涵体蛋白。包涵体蛋白依次用含 1% TritonX-100、2 mol/L 尿素、20 mmol/L DTT 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤,接着用包涵体溶解液(50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 0.15 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, 5 mmol/L DTT, pH 7.5)搅拌溶解至无沉淀,离心取上清并通过 0.22 μ m 微孔滤膜。取以上每步的样品进行 SDS-PAGE。

1.6 包涵体蛋白的复性

经 SDS-PAGE,结果发现目的蛋白条带主要存在于包涵体中。将包涵体溶解液用 20 mmol/L 醋酸钠溶液稀释 80 倍,4 °C 孵育过夜^[12],再用 20 mmol/L、pH 6.0 的 PBS 缓冲液透析 1 d,离心弃去不溶物。用葡聚糖凝胶 G-75 柱做介质,采用尿素梯度进行柱复性。蛋白用溶液 A(20 mmol/L PBS,

0.2 mol/L NaCl, 0.3 mmol/L GSSG + 3 mmol/L GSH, 6 mol/L 尿素, pH 6.0)上柱,再用线性梯度液 100% 溶液 A \rightarrow 100% 溶液 B(20 mmol/L PBS, 0.2 mol/L NaCl, 0.3 mmol/L GSSG + 3 mmol/L GSH, 0.5 mol/L 尿素, pH 6.0)洗脱。将收集的蛋白峰用 20 mmol/L PBS(pH 6.0)溶液透析 24 h, 30 ku 滤膜超滤 10 min,可去除部分小分子并浓缩,取上清。以 0.3 mL/min 的流速上样与洗脱,分别以尿素梯度时间长度及 $c_{GSSG} : c_{GSH}$ 为变量,用 Gross-wicz 比色法^[13]测定酶活力并计算复性酶活收率,测定蛋白质量浓度并计算蛋白回收率。

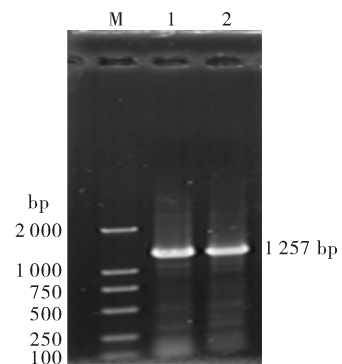
1.7 复性蛋白的 GST 纯化

将 GST 凝胶树脂装柱,用 10 倍体积的 20 mmol/L、pH 6.0 的 PBS 缓冲液洗涤,以 1 mL/min 的流速上样,用 PBS 缓冲液洗涤至基线水平,用含 10 mmol/L 谷胱甘肽的上样缓冲液进行洗脱,收集 280 nm 处的洗脱峰,进行 SDS-PAGE 检测。向洗脱溶液中加入 50 mg/mL 凝血酶,于 22 °C 环境下静置 16 h。用 20 mmol/L、pH 6.0 的 PBS 缓冲液平衡肝素亲和树脂,将样品液通过肝素亲和柱,直接收集流出液,进行 SDS-PAGE 检测,并测定酶活力大小。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 PCR 验证

以重组质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,得到大小为 1 257 bp 的条带(图 1),经测序后进行同源聚类分析,发现得到的片段同普拉特链霉菌(*Streptomyces platensis*, 登录号 AB451018)有 99% 的同源性,证实该片段为 TGase 序列。



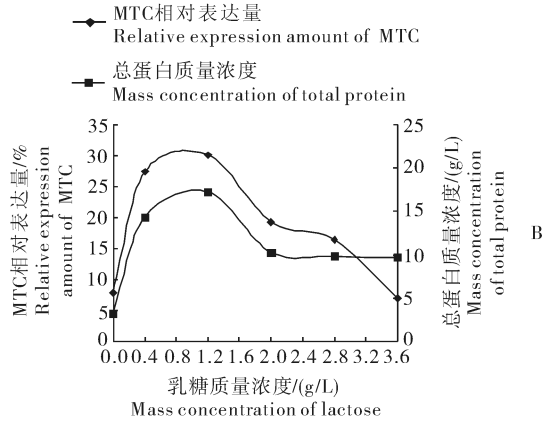
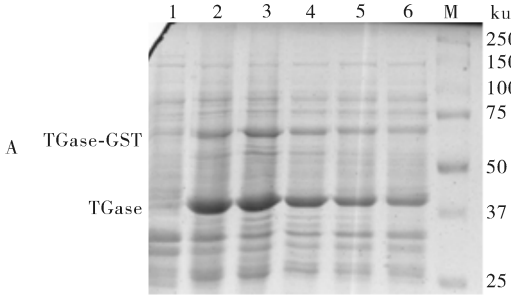
M: Marker; 1, 2: TGase 的 PCR 片段 PCR fragment of TGase gene.

图 1 重组质粒 PCR 产物电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of recombinant plasmids product by PCR

2.2 乳糖诱导表达条件的优化

重组菌 BL21/pGEX-TGase 经不同质量浓度的乳糖诱导培养后,取菌体总蛋白进行 SDS-PAGE 分析,在乳糖质量浓度为 1.2 g/L 时,目的蛋白表达量最大,经胶片处理软件分析最高 TGase 相对表达量

达 30.1%。在 47、72 ku 处分别出现了 TGase 和 TGase-GST 蛋白条带(图 2),证明目的基因在表达过程中,一部分直接以目的蛋白的形式表达,另一部分以融合了 GST 标签的融合蛋白形式表达。



A:不同质量浓度乳糖表达的电泳检测 Electrophoresis results at different lactose concentration; 1:未诱导样品 Uninduced sample; 2~6:0.4、1.2、2.0、2.8、3.6 g/L 乳糖分别诱导 9 h 后的结果 Results after induced for 9 h under 0.4、1.2、2.0、2.8、3.6 g/L lactose; M:Marker; B:表达量分析 Analysis of protein expression level.

图 2 乳糖诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE of induction under lactose

2.3 表达产物的分布

对表达产物的 SDS-PAGE 分析(图 3)显示,菌体总蛋白中的目的蛋白条带(图 3-4)与包涵体溶解液中的目的蛋白条带(图 3-5)差异不大;而可溶性上清中的目的蛋白条带(图 3-6)与杂蛋白条带的区分并不明显,其表达的目的蛋白质量浓度明显低于包涵体蛋白。结果表明:工程菌中的目的蛋白主要以包涵体蛋白的形式存在,要获得有活性的目的蛋白还需要对包涵体蛋白进行复性。

2.4 尿素梯度、GSSG-GSH 比例对复性的影响

在梯度柱层析复性过程中, TGase 脱除变性剂的速度由尿素的梯度长度决定,当流速为 0.3 mL/min、尿素梯度长度为 180 min 时,蛋白活性回收率最高,为上柱前蛋白活性的 61.5%(图 4)。

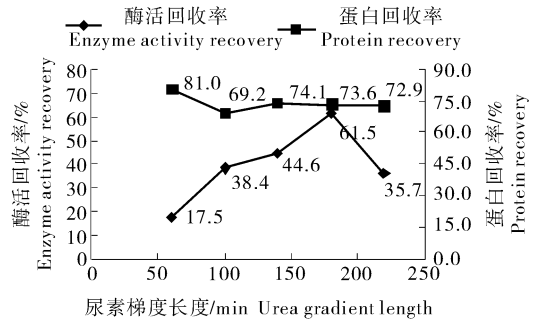
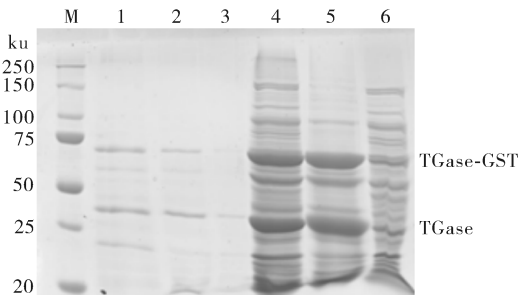


图 4 尿素梯度长度对 TGase 复性的影响

Fig. 4 Effect of the urea gradient length on renaturation of Tgase

M:Marker; 1~3:第 1、2、3 次洗涤包涵体的溶液 The 1st, 2nd, 3rd washing liquid inclusion bodies; 4:菌株总蛋白 Total bacterial protein; 5:包涵体蛋白 Inclusion body protein; 6:可溶性蛋白 Soluble protein.

图 3 表达产物的分布

Fig. 3 The distribution of expression products

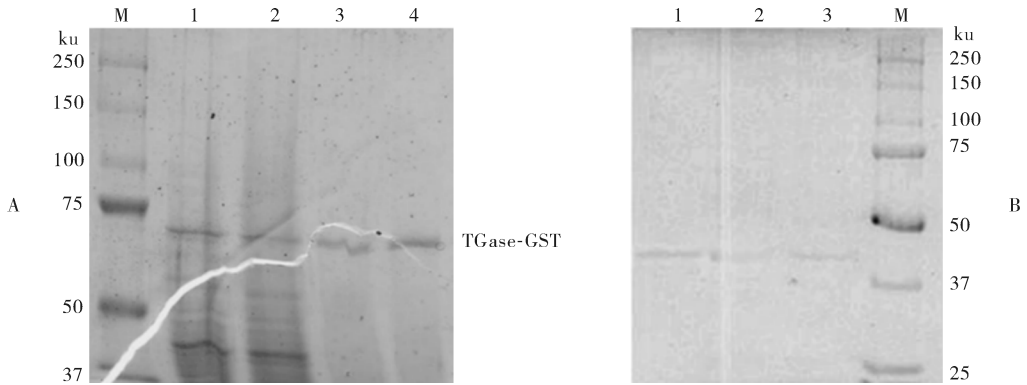
GSSG、GSH 的添加有助于包涵体复性,他们分别具有氧化型和还原型的巯基,能促进蛋白形成正确的二硫键。从表 1 中可以看出,当 $C_{GSSG} : C_{GSH} = 1 : 10$ 时,酶活回收率最高,为 67%。

重组蛋白通过 Sephadex G-75 柱复性后,经酶活力检测, TGase 主要集中在紫外检测图的第 1 峰。

表 1 GSSG-GSH 比例对 TGase 复性的影响

Table 1 Effect of GSSG-GSH rate on renaturation of TGase

项目 Item	1:1	1:5	1:10	1:15	1:20
酶活回收率/% Enzyme activity recovery	24.6	30.8	67.0	47.6	45.2
蛋白回收率/% Protein recovery	70.1	75.5	77.6	79.8	74.5



A: 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE analysis of the purified protein; M: Marker; 1~2: 洗涤峰中的 BL21/pGEX-TGase BL21/pGEX-TGase in washing peak; 3~4: 纯化蛋白 Purified protein. B: 除去 GST 标签后目的蛋白的 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE analysis of the target protein after GST label removed; 1~3: 纯化的 TGase Purified TGase; M: Marker.

图 5 纯化后目的蛋白的检测

Fig. 5 Detection of target protein after be purified

3 讨论

由于谷氨酰胺转胺酶生产菌株在自然状态下分泌的酶产量低、周期长,现阶段研究者为了降低生产成本,获得高水平产酶菌株,纷纷选择利用基因工程技术进行该酶的表达。肖明兵等^[14]将 Glypican 3 N 端基因片段成功插入载体 pGEX-4T-1,表达了分子质量为 64 ku 的 GST-GPC3 N 端融合蛋白。覃晓琳等^[15]将小鼠 PD-1 胞外段进行克隆表达时亦得到 GST-ePD-1 融合蛋白。带有 GST 标签的蛋白极大地方便了后续的亲和纯化工作。本研究成功克隆了谷氨酰胺转胺酶基因,并构建了 pGEX-TGase 融合表达载体,实现了该融合蛋白的高效表达,并对诱导条件做了优化,确定了最佳的诱导条件。

自基因改造后的蛋白在大肠杆菌中表达后,人们逐渐发现一旦外源蛋白基因过量表达就易形成包涵体^[16-18]。包涵体复性过程主要是除去溶解状态下包涵体中的变性剂,使目的蛋白重折叠,实现复性。除去变性剂的方法一般包括透析、稀释、超滤、凝胶过滤层析、添加促进剂、反胶束、双水相等。笔者曾尝试采用透析复性法,试验过程中多次出现沉淀现

2.5 复性蛋白的纯化

将目的蛋白进行 GST 柱亲和纯化,从 170 min 时开始收集峰高为 0.74($D_{280\text{nm}}$)的单一洗脱峰,再进行 SDS-PAGE 检测,在 72 ku 处出现了 TGase-GST 的单一一条带,证明纯化效果已达到电泳纯。经肝素亲和柱除去 GST 标签后的样品的 SDS-PAGE 分析(图 5),结果证实已获得纯化的 TGase,测得酶活力约为 29 U/mg。

象,推测在此过程中,蛋白之间产生了低分子量的多聚物。本研究结合稀释、梯度液相色谱、凝胶过滤层析、添加氧化还原剂的方法,实现了包涵体蛋白的复性,复性前的包涵体几乎没有活性,复性后的目的蛋白酶活力为 29 U/mg。黄柯等^[19]在构建重组菌 pGEX-6p-1-MTG/*E. coli* BL21 (DE3) 后获得了可溶性 TGase,纯化后的酶活力为 0.85 U/mL,本研究中包涵体形式的目的蛋白酶复性后的酶活力为国内一般水平;为防止酶液浓缩后目的蛋白的再次变性,并没对终酶液进行浓缩,因此为获得更高酶活力的目的蛋白,可从复性的方法上进行深入研究。唐名山等^[8]发现 pH 值的大小对蛋白质的复性有一定的影响,所以在过柱复性中采取尿素梯度及 pH 梯度结合的双梯度复性法尚有待进一步探索。

参 考 文 献

- [1] KASHIWAGI T, YOKOYAMA K, ISHIKAWA K, et al. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillum mobaraense*[J]. Biol Chem, 2002, 277: 44252-44260.
- [2] TANAKA Y, TSURUDA Y, NISHI M, et al. Exploring enzymatic

- catalysis at a solid surface; a case study with transglutaminase-mediated protein immobilization[J]. *Org Biomol Chem*, 2007, 5: 1764-1770.
- [3] SMIDDY M A, MARTIN J, KELLY A L. Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase[J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89: 1906-1914.
- [4] ABE H, GOTO M, KAMIYA N. Protein lipidation catalyzed by microbial transglutaminase[J]. *Chemistry*, 2011, 17: 140004-140008.
- [5] ANDO H, ADADI M, UMEDA K, et al. Purification and characterization of a novel transglutaminase derived from microorganism[J]. *Biol Chem*, 1989, 53: 2613-2617.
- [6] YU J Y, WU S C, HUNG H C, et al. Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from *Streptomyces netropsis* in *Escherichia coli* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81: 523-532.
- [7] SOMMER C, VOLK N, PIETZSCH M. Model based optimization of the fed-batch production of a highly active transglutaminase variant in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2011, 77(1): 9-19.
- [8] 唐名山, 王树英, 陈坚, 等. *Streptoverticillium mobaraense* 谷氨酰胺转氨酶的表达纯化和复性[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(4): 17-21.
- [9] LIU X Q, YANG X Q, XIE F H, et al. On-column refolding and purification of transglutaminase from *Streptomyces fradiae* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 51: 179-186.
- [10] DONOVAN R S, ROBINSON C W, GLICK B R. Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter[J]. *Journal of India Microbiology*, 1996, 16: 145-154.
- [11] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [12] YOKOYAMA K, KUNIO O, OHTSUKA T, et al. *In vitro* refolding process of urea-denatured microbial transglutaminase without pro-peptide sequence[J]. *Protein Expression and Purification*, 2002, 26: 329-335.
- [13] GROSSOWICZ N, WAINFAN E, BOREK E, et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagines [J]. *Biol Chem*, 1950, 187: 111-125.
- [14] 肖明兵, 赵敏星, 倪润洲, 等. GST-Glypican 3 N 端融合蛋白表达载体构建及表达纯化[J]. *临床检验杂志*, 2010, 28(3): 212-214.
- [15] 覃晓琳, 刘朝奇, 李斌, 等. 小鼠 PD-1 胞外段的克隆, 原核表达及活性分析[J]. *免疫学杂志*, 2010(5): 403-407.
- [16] DE-BEMARDEZ-CLARK E, SCHWARZ E, RUDOLPH R. Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding[J]. *Methods Enzymol*, 1999, 309: 217-236.
- [17] EJIMA D, WATANABE M, SATO Y, et al. High yield refolding and purification process for recombinant human interleukin-6 expressed in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 62(3): 301-310.
- [18] 代广中, 袁兆栋, 苟洪兰, 等. 百脉根离子通道蛋白 Pollux 与翻译延伸因子 EF1A 的相互作用[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(1): 34-38.
- [19] 黄柯, 金志华, 金庆超, 等. 谷氨酰胺转氨酶基因的融合表达[J]. *广州化工*, 2010, 8(6): 97-100.

Expression, renaturation and purification of recombinant transglutaminase

SHAO Kun-yan PENG Bao-yu YE Cheng LIU Wei HE Dong-lan

College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract Using the genomic DNA of *Streptomyces hygroscopicus* as a template, transglutaminase gene segments were obtained by PCR amplification. The recombinant plasmid pGEX-TGase was transformed into *E. coli* to get the recombinant strain BL21/pGEX-TGase. The recombinant strain produced fusion protein induced by lactose and the conditions of induction were optimized. Expression products existed mainly in the form of inclusion bodies. Dilution and urea gradient liquid chromatography was used to refold the inclusion bodies successfully. The target proteins with electrophoretical purity and activity of 29 U/mg were purified by GST affinity column.

Key words transglutaminase; lactose-induction; inclusion body protein; purification; renaturation