

研究报告



拉达克轮丝菌 TGase 在大肠杆菌中的分子改造

王玉^{1,2} 付丽红^{1,2} 鞠建松^{*1} 王丽敏^{*2} 于波²

1 河北师范大学生命科学学院 河北 石家庄 050024

2 中国科学院微生物研究所 北京 100101

摘要:【背景】谷氨酰胺转氨酶是一种能够催化酰基转移反应的酶,催化各种蛋白质分子之间或之内发生交联反应,在食品、化妆品、医药等领域具有重要的潜在价值。【目的】克隆来自拉达克轮丝菌(*Streptovorticillium ladakanum*) B1 的谷氨酰胺转氨酶(TGase)基因并对其进行分子改造,使其在大肠杆菌中获得高效异源表达。【方法】分别克隆来自拉达克轮丝菌谷氨酰胺转氨酶的自身前导肽(pro)和除前导肽以外的成熟谷氨酰胺转氨酶(TGase)基因,以 pET-22b 为表达载体构建 pro、TGase 共表达和融合表达两种表达模式,在这两种表达模式的基础上进一步用定点突变的方法对成熟 TGase N 端前 4 个氨基酸进行改造,检测不同表达模式以及突变对酶活的影响。【结果】当采用前导肽与 TGase 共表达时,可以直接得到活性形式的 TGase,比酶活达到 37.71 U/mg。在融合表达的基础上,将 TGase N 端前 3 个氨基酸 DSD 突变为 AAA,比酶活达到 14.04 U/mg,相较于原始表达模式提高了 14.05%。【结论】前导肽与 TGase 共表达可以直接产生活性 TGase,对于融合表达模式,合适位点的突变有利于提高 TGase 酶活。

关键词: 谷氨酰胺转氨酶, 表达模式, 定点突变, 酶活

Molecule evolution of TGase from *Streptovorticillium ladakanum* in *Escherichia coli*WANG Yu^{1,2} FU Li-Hong^{1,2} JU Jian-Song^{*1} WANG Li-Min^{*2} YU Bo²

1 College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050024, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Background] Transglutaminase (TGase) is an enzyme that catalyzes the acyl transfer reaction, which can catalyze cross-linking reactions between or within various protein molecules, and has important potential value in the food, cosmetics, medicine and other fields. [Objective] Molecular engineering and site-directed mutagenesis were carried out by cloning glutamyl transferase from *Streptovorticillium*

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31670045); Natural Science Foundation of Hebei Province (C2016205130); Key Project of Science and Technology of Hebei Educational Committee (ZD2017047)

***Corresponding authors:** JU Jian-Song: Tel: 86-311-80787573; E-mail: jujiansong@126.com
WANG Li-Min: Tel: 86-10-64806132; E-mail: wanglimin@im.ac.cn

Received: 05-07-2018; **Accepted:** 29-10-2018; **Published online:** 13-12-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31670045); 河北省自然科学基金(C2016205130); 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZD2017047)

***通信作者:** 鞠建松: Tel: 0311-80787573; E-mail: jujiansong@126.com

王丽敏: Tel: 010-64806132; E-mail: wanglimin@im.ac.cn

收稿日期: 2018-07-05; **接受日期:** 2018-10-29; **网络首发日期:** 2018-12-13

ladakanum B1 to obtain efficient heterologous expression in *E. coli*. **[Methods]** The gene of pro and TG from *Streptovorticillium ladakanum* were cloned into pET-22b to generate co-expression and fusion expression, respectively. Based on these two expression patterns, the first four amino acids of the mature TGase N-terminal were modified by site-directed mutagenesis to detect the effect of different expression patterns and mutation on enzyme activity. **[Results]** When co-expression of the pro-peptide with TGase, the active form of TGase can be obtained directly, and the specific activity reaches 37.71 U/mg. Based on the fusion expression, the first three amino acid DSD of the N-terminal of TGase were mutated to AAA, and the specific enzyme activity reached 14.04 U/mg, which was 14.05% higher than the original expression pattern. **[Conclusion]** The co-expression of pro-peptide with TGase can directly produce the active form of TGase. For the fusion expression pattern, the mutation of the appropriate site is beneficial to increase the TGase activity.

Keywords: Transglutaminase, Expression pattern, Site-directed mutagenesis, Enzyme activity

谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase, TGase)广泛存在于动植物以及微生物中,它能够催化酰基转移反应,通过胺的结合和交联修饰蛋白质^[1],由于它特殊的安全交联性质使其在食品、医药和纺织等领域得到广泛应用^[2-4]。谷氨酰胺转氨酶根据来源不同可以分为组织谷氨酰胺转氨酶(Tissue transglutaminase, tTG)和微生物谷氨酰胺转氨酶(Microbial transglutaminase, MTG)^[5]。其中 MTG 属于胞外酶,可直接分泌到体外,相较于 tTG 分离纯化较简单,且微生物发酵成本低、周期短,目前已成为商业化 TGase 的主要来源^[6]。

目前已发现多种微生物中含有 TGase 基因,例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[7]、拉达克轮丝菌(*Streptovorticillium ladakanum*)^[8]和茂原链轮丝菌(*S. mobaraense*)^[9]等,其中来自茂原链轮丝菌的 TGase 已被广泛研究^[9]。来自链霉菌的 TGase 以 pro-TGase 的形式合成初级酶原,通过切去 N 端的前导肽(pro)形成有活性的 TGase,有研究表明在大肠杆菌中单独表达 TGase 时仅以包涵体的形式存在^[10],将 pro-TGase 融合表达可以获得大量可溶性蛋白,通过后期处理切除前导肽获得活性的 TGase,这说明前导肽可以提高 TGase 在大肠杆菌中的溶解度^[11]。Liu 等发现前导肽可以帮助 TGase 在大肠杆菌中正确折叠,通过在大肠杆菌中共用 T7 启动子,以 pelB 信号肽按照 pro、TGase 的顺序共表达时,可以直接在胞内产生有活性的 TGase,其酶活达到 0.13 U/(mL·OD₆₀₀)^[12],这种表达策略方便了 TGase

的生产。

近年来,有许多研究者对谷氨酰胺转氨酶进行了分子改造,以期获得高酶活的 TGase,其中基因突变是较常见的一种研究方法。Shimba 等利用随机突变从突变库中筛到一株突变菌 M16T,其突变体酶活为野生型的 1.6 倍^[13]。Chen 等利用饱和突变将前导肽 α -螺旋的 37G-42S 替换为 3 个甘氨酸或 3 个丙氨酸,其酶活都有明显提高^[14]。Buettner 等分析了对 TGase 热稳定性有重要影响的氨基酸位点,分别选择 S2、S23 和 K269 进行饱和突变,其中突变体 S2M、S23V 和 K269 的热稳定性有明显提高^[15]。可见 TGase 的 N 端区域对其催化活性有着重要影响。

本研究室获得了一株含有高 TGase 酶活的拉达克轮丝菌(*S. ladakanum*) B1, 并以其总 DNA 为模板克隆了 pro-TGase 基因,以大肠杆菌为表达宿主菌构建了两种不同表达模式的载体,实现了 TGase 在大肠杆菌中的可溶性异源表达,并在此基础上利用全质粒 PCR 法对两种表达模式定点突变。其中共表达模式可以直接产生有活性的 TGase,在融合表达基础上将 TGase N 端前 3 个氨基酸 DSD 突变为 3 个丙氨酸,酶活有明显提高,这为后期对该酶的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

S. ladakanum B1 由中国科学院微生物研究所姜春波实验室提供; *Escherichia coli* TOP10、*E. coli*

BL21(DE3)购自天根生化科技(北京)有限公司;表达载体 pET-22b 为本实验室保存。

1.1.2 培养基和培养条件

用于构建重组质粒的 *E. coli* TOP10 接种于 LB 培养基^[16](含 100 mg/L 氨苄青霉素)中, 37 °C、200 r/min 摇床培养。含有重组质粒的 *E. coli* BL21(DE3)接种于 TB 培养基^[16](含 100 mg/L 氨苄青霉素)用于发酵培养, 培养条件为 37 °C、200 r/min。

1.1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、pMD19-T 载体、PrimeSTAR DNA 聚合酶等均购自北京六合通经贸有限公司;质粒小提试剂盒、纯化试剂盒购自 Omega 公司; Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。PCR 仪购自北京六合通经贸有限公司;紫外/可见分光光度计购自北京瑞利分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的克隆

根据基因组信息设计引物 PTG-F 和 PTG-R (表 1)以 *S. ladakanum* B1 基因组 DNA 为模板, 使用 PrimeSTAR DNA 聚合酶扩增含有前导肽区的 TGase (pro-TGase)的编码基因。PCR 反应体系(50 μL): 模板 50 ng, 2×PrimeSTAR 25 μL, 上、下游引物各 400 nmol/L, 添加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 50 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。将基因片段采用 1%的琼脂糖凝胶回收, 连接至 pMD19-T 载体, 得到的质粒 proTG-19T 由北京睿博公司测序。

1.2.2 不同表达模式质粒的构建

以 proTG-19T 为模板扩增 TGase 基因, pET-22b 为表达载体,构建两种表达模式 proTG-22b 和 pro-pelB-TG-22b。用 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')
PTG-F	GGCCATGGCCACCGGCAGTGGCAGTGG
PTG-R	GTGCTCGAGCGGCCAGCCCTGTGTACACCTT
pro-NcoI-F	TGGCCATGGCCACCGGCAGTGGCAGTG
pro-BamHI-R	TCGGATCCGGGGGCCCCGGAAGGACGGACCG
TG-NcoI-F	TGGCCATGGACTCCGACGAGCGGGTGACTC
TG-BamHI-R	TCGGATCCCCCGGCCAGCCCTGTGTACACCTTGTCG
gTG-F	GGTCCGTCCTTCCGGGCCCCCTAAGGATCCCTTGAAGGAGATATACATATGAAATACCTG
gTG-R	GTGGTGGTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTGGGCCAGCCCTGTGTACACCTTGTCGGGG
AAA-FO1	GTCCCTCCGGGCCCCCGCAGCAGCAGAGCGGGTGACTCCTCCCGC
AAA-RO1	GCGGGAGGAGTCACCCGCTCTGCTGCTGCGGGGGCCCCGGAAGGAC
DSD-FO1	GTCCGTCCTTCCGGGCCCCCGAGCGGGTGACTCCTCCCGC
DSD-RO1	GCGGGAGGAGTCACCCGCTCGGGGGCCCCGGAAGGACGGAC
ED-FO1	TTCCGGGCCCCCGACTCCGACGACCGGGTGACTCCT
ED-RO1	AGGAGTCACCCGGTCGTCGGAGTCGGGGGCCCCGGAA
AAA-2FO1	TGGCCATGGCAGCAGCAGAGCGGGTGACTCCTCCCGCCGA
AAA-2RO1	TCGGCGGGAGGAGTCACCCGCTCTGCTGCTGCCATGGCCA
DSD-2FO1	TGGCCATGGAGCGGGTGACTCCTCCCGCCGAGCCGCTCGA
DSD-2RO1	TCGAGCGGCTCGGCGGGAGGAGTCACCCGCTCCATGGCCA
ED-2FO1	TGGCCATGGACTCCGACGACCGGGTGACTCCTCCCGCCGA
ED-2RO1	TCGGCGGGAGGAGTCACCCGGTCGTCGGAGTCCATGGCCA

proTG-19T, 将切下的片段连接到 pET-22b, 构建得到第一种表达模式的质粒 proTG-22b; 使用引物 pro-NcoI-F 和 pro-BamHI-R 以 proTG-19T 为模板扩增片段 pro, 将片段 pro 连接到 pET22b, 构成质粒 pro-22b。同时以 proTG-19T 为模板, 使用引物 TG-NcoI-F 和 TG-BamHI-R 扩增 TGase, 连接 pET-22b, 得到的质粒命名为 TG-22b。再以 TG-22b 为模板, 用引物 gTG-F 和 gTG-R 扩增得到连着 pelB 信号肽的 TGase 片段, 使用 BamH I 和 Sac I 双酶切片段和质粒 pro-22b 后用 T4 DNA 连接酶连接, 构成第二种表达模式的质粒 pro-pelB-TG-22b。

1.2.3 突变质粒的构建

以 proTG-22b 为模板, 采用全质粒 PCR 法引入突变位点。构建 3 种突变方式, 将 TGase N 端前 3 个氨基酸 DSD 突变为 AAA 或全部缺失, 将 N 端第 4 个氨基酸 E 突变为 D。使用引物对 AAA-FO1/AAA-RO1、DSD-FO1/DSD-RO1、ED-FO1/ED-RO1 进行全质粒 PCR, 对 PCR 产物进行 Dpn I 消化处理, 纯化后转化 *E. coli* BL21(DE3), 挑选单克隆测序验证, 得到突变质粒 AAA-proTG-22b、DSD-proTG-22b 和 ED-proTG-22b。以 pro-pelB-TG-22b 为模板, 使用引物对 AAA-2FO1/AAA-2RO1、DSD-2FO1/DSD-2RO1、ED-2FO1/ED-2RO1 采用全质粒 PCR 法引入与上述相同位点突变, 得到的突变质粒命名为 AAA-pelB-TG-22b、DSD-pelB-TG-22b 和 ED-pelB-TG-22b。

1.2.4 重组蛋白的表达和纯化

挑取一环含有重组质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 接种到装有 50 mL LB (含 100 mg/L 氨苄青霉素) 的 250 mL 三角瓶中。37 °C、200 r/min 振荡培养过夜。以 1% 接种到装有 100 mL TB 的 250 mL 三角瓶中。待 OD_{600} 达到 1.0–1.2 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 20 °C、200 r/min 振荡培养 48 h 后, 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。

用 20 mL 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.1 mol/L, pH 7.0) 悬浮菌体, 超声波破碎, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清用于胞内酶活测定和重组蛋白的纯化。由

于重组蛋白含有组氨酸标签 His-Tag, 因此使用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒纯化。纯化方法参照试剂盒手册进行。杂蛋白用洗脱液 I (pH 7.9 Tris-HCl 4 mmol/L, 咪唑 60 mmol/L, NaCl 0.1 mol/L) 进行洗脱, 目的蛋白用洗脱液 II (pH 7.9 Tris-HCl 4 mmol/L, 咪唑 300 mmol/L, NaCl 0.1 mol/L) 洗脱并通过超滤管脱盐、浓缩后于 -80 °C 保存。收集各阶段的洗脱液进行 SDS-PAGE (13% 分离胶, 4% 浓缩胶) 电泳和考马斯亮蓝(R-250)染色分析^[17]。

1.2.5 酶活力测定

按照比色法^[18]测定酶活, TGase 酶活定义为: 37 °C 反应条件下, 1 min 生成 1 μ mol 氧肟酸所需要的酶量。发酵液上清用于测量蛋白的胞外酶活, 粗酶液用于测量胞内酶活。纯化后的蛋白用于计算比酶活, 采用 Bradford 方法计算蛋白浓度。对于前导肽和 TGase 共表达的蛋白要加入终浓度为 0.08 g/L 的分散酶 37 °C 处理 20 min, 再用于酶活的测量。

2 结果与分析

2.1 proTGase 的克隆

根据链霉菌基因组 DNA 设计引物 PTG-F 和 PTG-R。以 *S. ladakanum* B1 基因组 DNA 为模板, 扩增得到大小与目的基因基本一致的片段。片段大小在 1 200–2 000 bp 之间, 经测序验证该片段为 proTGase 的序列, 将其连到 pMD19-T 载体上构建得到质粒 proTG-19T, 保存质粒。

2.2 重组质粒的构建

通过使用表达载体 pET-22b 的 T7 启动子和 pelB 信号肽构建了两种表达模式(图 1), proTG-22b 以 T7 启动子和 pelB 信号肽融合表达 proTGase。pro-pelB-TG-22b 以 T7 启动子按 pro-TGase 的顺序共表达。

2.3 SDS-PAGE 检测目的蛋白

将不同表达模式的重组质粒以及突变质粒分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 进行诱导表达。用 Ni-Agarose

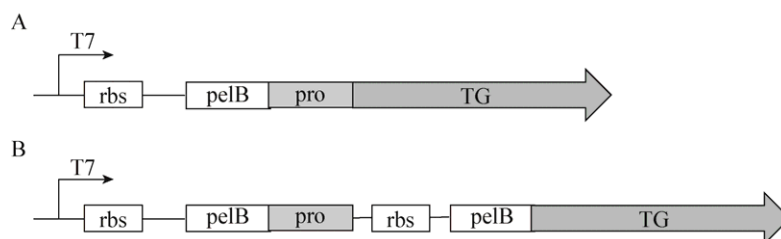


图1 TGase 的两种表达模式

Figure 1 Two expressions of TGase

Note: A: proTG-22b; B: pro-pelB-TG-22b.

His 标签蛋白纯化试剂盒进行蛋白纯化。利用 SDS-PAGE 检测纯化后的蛋白。根据基因信息, 前导肽和 TGase 共表达的蛋白以及在共表达基础上构建的 3 种突变体蛋白大小为 42.3 kD 左右, 前导肽和 TGase 融合表达的蛋白以及在融合表达基础上构建的 3 种突变体蛋白大小为 46.3 kD 左右。由图 2 可以看出目的蛋白均大小正确, 收集纯化后的蛋白用于后期酶活测定。

2.4 两种表达模式对 TGase 活性的影响

研究表明前导肽可以使 TGase 正确折叠, 但是前导肽的存在抑制了 TGase 和底物的结合, 因此必须切掉前导肽才能使 TGase 发挥功能。根据 Liu 等的研究结果构建了两种表达模式 proTG-22b 和 pro-pelB-TG-22b^[12]。第 1 种表达方式中, 前导肽和 TGase 融合表达, 被信号肽输送到周质空间, 再通过周质渗透分泌到胞外; 在第 2 种表达方式中, 前导肽和 TGase 分别被信号肽输送到周质空间, 在周质空间中前导肽帮助 TGase 正确折叠使 TGase 形成活性形式。分别检测这两种表达模式在胞内外的酶活(表 2), 发现前导肽和 TGase 共表达的形式(pro-pelB-TG-22b)在胞内表现出较高的酶活, 比酶活达到 37.71 U/mg, 是第 1 种表达方式的 3.06 倍。

表 2 不同表达方式对 TGase 酶活的影响

Table 2 Effects of different expression patterns on activity of TGase

表达质粒 Expression plasmids	胞外酶活 Extracellular enzymatic activity of TGase (U/mL)	胞内酶活 Intracellular enzymatic activity of TGase (U/mL)	比酶活 Specific activity (U/mg)
proTG-22b	1.07±0.60	1.34±1.20	12.31±0.30
pro-pelB-TG-22b	0.42±0.40	2.27±0.80	37.71±0.90

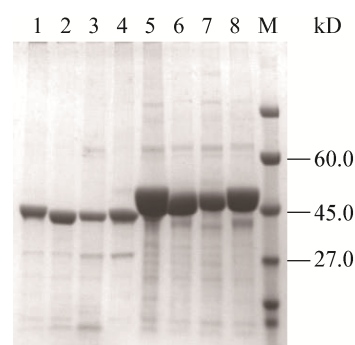


图2 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 2 Analysis of purified proteins by SDS-PAGE

Note: M: Protein marker; 1: pro-pelB-TG-22b; 2: AAA-pelB-TG-22b; 3: DSD-pelB-TG-22b; 4: ED-pelB-TG-22b; 5: proTG-22b; 6: AAA-proTG-22b; 7: DSD-proTG-22b; 8: ED-proTG-22b.

这种表达方式的优点是 TGase 直接表现为活性形式, 且不需要后期切除 N 端前导肽, 这也为工业化生产提供了便利。

2.5 突变对融合表达酶活的影响

虽然采用前导肽和 TGase 共表达的形式(pro-pelB-TG-22b)可以直接得到有活性的 TGase, 但大部分积累在胞内。Chen 等对来自吸水链霉菌 TGase 的 N 端区域的前 4 个氨基酸 DAAD 进行缺失突变, 同时将第 5 位氨基酸 E 突变为 D, 得到的突变体 Del1-4/E62D 比酶活为野生酶的 1.8 倍^[16]。因此我

们根据 Chen 等的研究在第 1 种表达模式的基础上构建了 3 种突变体, 将 TGase N 端前 3 个氨基酸 DSD 突变为 3 个丙氨酸(AAA-proTG-22b)或全部缺失(DSD-proTG-22b), 将 N 端第 4 个氨基酸 E 突变为 D (ED-proTG-22b)。通过比较胞内外的酶活(表 3), 发现突变体 AAA-proTG-22b 胞内外酶活都明显提高, 相较于原始表达方式比酶活提高了 14.05%。而其他两种突变体比酶活显著降低, 但胞外酶活并未受到影响, 这可能是由于突变增加了 TGase 蛋白的分泌量, 具体机制还需要后期的研究。

2.6 突变对共表达酶活的影响

在融合表达基础上构建的突变体 AAA-proTG-22b 比酶活相较于原始表达方式提高了 14.05%, 但是依然远低于共表达模式。为了得到更高的酶活, 在共表达的基础上做了与融合表达相同位点的突变, 测定 TGase 酶活(表 4)。与融合表达突变不同的是, 将 TGase N 端前 3 个氨基酸 DSD 突变为 AAA 得到的突变体(AAA-pelB-TG-22b), 比酶活不仅没有提高, 反而仅为原始共表达模式的 56.4%。根据 Liu 等^[12]的研究, 在共表达模式中前导肽和 TGase 分别被 pelB 信号肽输送到大肠杆菌的周质空间, 在

周质空间中前导肽帮助 TGase 正确折叠, 使其具有活性。猜测这种突变形式可能不利于前导肽帮助 TGase 在周质空间中正确折叠, 以至于活性降低。

3 讨论与结论

谷氨酰胺转氨酶作为一种重要的酶制剂, 自 1993 年投放食品工业市场以来, 市场需求量也越来越高。微生物来源的谷氨酰胺转氨酶是 TGase 获取的主要渠道, 近年来许多研究者致力于提高该酶的产酶水平, 主要方法有诱变育种筛选高产菌株及利用基因工程技术表达 TGase。然而诱变育种获得的菌株不够稳定, 传代培养后容易发生退变^[5], 利用基因工程技术则可以解决这一问题, 但是目前我国构建的基因工程菌产酶量尚未达到商业化水平, 因此在基因工程技术上提高产酶量依然是我们研究的重点。

本研究成功克隆了拉达克轮丝菌(*S. ladakanum*) B1 的谷氨酰胺转氨酶基因, 构建了融合表达和共表达两种表达模式, 均可实现其在大肠杆菌中的可溶性表达。在融合表达模式中, TGase 以 proTGase 的形式在大肠杆菌中可溶性表达, 但是前导肽的存

表 3 突变对融合表达 TGase 酶活的影响

Table 3 Effects of mutation on enzymatic activity of fusion expression of TGase

表达质粒 Expression plasmids	胞外酶活 Extracellular enzymatic activity of TGase (U/mL)	胞内酶活 Intracellular enzymatic activity of TGase (U/mL)	比酶活 Specific activity (U/mg)
proTG-22b	1.07±0.60	1.34±1.20	12.31±0.30
AAA-proTG-22b	1.14±0.80	2.08±0.70	14.04±0.90
DSD-proTG-22b	1.01±1.20	0.83±0.60	10.63±0.50
ED-proTG-22b	1.07±0.50	0.77±1.30	10.83±0.80

表 4 突变对共表达 TGase 酶活的影响

Table 4 Effects of mutation on enzymatic activity of co-expressing TGase

表达质粒 Expression plasmids	胞外酶活 Extracellular enzymatic activity of TGase (U/mL)	胞内酶活 Intracellular enzymatic activity of TGase (U/mL)	比酶活 Specific activity (U/mg)
pro-pelB-TG-22b	0.42±0.40	2.27±0.80	37.71±0.90
AAA-pelB-TG-22b	0.25±0.80	1.09±0.90	19.91±0.50
DSD-pelB-TG -22b	0.42±1.20	2.01±0.60	36.54±0.80
ED-pelB-TG -22b	0.30±0.60	1.98±1.30	36.32±0.80

在会抑制 TGase 的活性, 经过后期分散酶处理将前导肽切除, 使 TGase 获得活性。在融合表达基础上构建的突变体 AAA-proTG-22b 比酶活达到 14.04 U/mg, 相较于原始融合表达模式提高了 14.05%。在前导肽和 TGase 共表达模式中, 前导肽和 TGase 依次被分泌到周质空间中, TGase 在前导肽的帮助下获得活性构型, 纯化后的比酶活达到 37.71 U/mg。而在共表达基础上的突变体酶活均未提高, 这可能是由于 TGase N 端的突变影响了后期前导肽对 TGase 的加工, 从而使酶活降低。本研究构建的两种表达模式均实现了 TGase 的可溶性表达, 同时利用基因工程技术提高了 TGase 酶活, 为以后的研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Folk JE. Transglutaminases[J]. Annual Review of Biochemistry, 1980, 49: 517-531
- [2] Li QZ, Gui P, Huang Z, et al. Effect of transglutaminase on quality and gel properties of pork and fish mince mixtures[J]. Journal of Texture Studies, 2018, 49(1): 56-64
- [3] Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, et al. Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis[J]. Journal of Experimental Medicine, 2002, 195(6): 747-757
- [4] Han X, Yu YY, Wang Q, et al. Facilitation of pretreatment for TGase catalyzing ϵ -PLL grafted wool fabrics[J]. New Chemical Materials, 2015, 43(3): 92-95 (in Chinese)
韩雪, 余圆圆, 王强, 等. 预处理对 TGase 催化羊毛接枝 ϵ -PLL 的促进作用[J]. 化工新型材料, 2015, 43(3): 92-95
- [5] Zhao HM, Wang MX, Mou ZC, et al. Study on transglutiminase in food industry[J]. Food Science and Technology, 2008, 33(9): 137-141 (in Chinese)
赵华梅, 王曼霞, 牟志春, 等. 食品工业中的谷氨酰胺转氨酶及其酶制剂[J]. 食品科技, 2008, 33(9): 137-141
- [6] Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. Properties and applications of microbial transglutaminase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(4): 447-454
- [7] Kobayashi K, Hashiguchi K, Yokozeki K, et al. Molecular cloning of the transglutaminase gene from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1998, 62(6): 1109-1114
- [8] Lin YS, Chao ML, Liu CH, et al. Cloning and expression of the transglutaminase gene from *Streptovorticillium ladakanum*, in *Streptomyces lividans*[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(5): 591-598
- [9] Ando H, Adachi M, Umeda K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 2006, 53(10): 2613-2617
- [10] Kawai M, Takehana S, Takagi H. High-level expression of the chemically synthesized gene for microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* in *Escherichia coli*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 61(5): 830-835
- [11] Yu YJ, Wu SC, Chan HH, et al. Overproduction of soluble recombinant transglutaminase from *Streptomyces netropsis* in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(3): 523-532
- [12] Liu S, Zhang DX, Wang M, et al. The order of expression is a key factor in the production of active transglutaminase in *Escherichia coli* by co-expression with its pro-peptide[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(1): 112
- [13] Shimba N, Shinohara M, Yokoyama KI, et al. Enhancement of transglutaminase activity by NMR identification of its flexible residues affecting the active site[J]. FEBS Letters, 2002, 517(1/3): 175-179
- [14] Chen KK, Liu S, Ma JL, et al. Deletion combined with saturation mutagenesis of N-terminal residues in transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* results in enhanced activity and thermostability[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 2329-2334
- [15] Buettner K, Hertel TC, Pietzsch M. Increased thermostability of microbial transglutaminase by combination of several hot spots evolved by random and saturation mutagenesis[J]. Amino Acids, 2012, 42(2/3): 987-996
- [16] Chen KK. The study on the molecular modification of *Streptomyces hygroscopicus* transglutaminase for enhanced catalytic properties[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)
陈康康. 分子改造强化 *Streptomyces hygroscopicus* 谷氨酰胺转氨酶催化性能研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2013
- [17] Bradford MM. 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(1/2): 248-254
- [18] Grossowicz N, Wainfan E, Borek E, et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine[J]. Journal of Biological Chemistry, 1950, 187(1): 111-125