

# 一株产谷氨酰胺转氨酶菌株的分离、鉴定及其 *tgl* 的克隆表达

张莹莹<sup>1</sup>, 石楠<sup>1,2</sup>, 杜萍萍<sup>1</sup>, 申培立<sup>1</sup>, 李志辉<sup>1</sup>, 于宏伟<sup>1</sup>, 卢海强<sup>1</sup>, 苏旭东<sup>1</sup>, 张伟<sup>1</sup>, 檀建新<sup>1,\*</sup>

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北省农产品加工工程技术中心, 河北保定 071001;

2. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002)

**摘要:**用稀释平板法从土壤样品中分离到 166 株细菌菌株, 通过凝胶法初筛和 Folk 比色法复筛, 得到一株产谷氨酰胺转氨酶 (transglutaminase, TGase) 的菌株, 通过形态学、生理生化特征和 16S rDNA 序列比对证明该菌株是枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 命名为 TGase1318。克隆了该菌株 TGase 的编码基因 *tgl*, 序列长 738bp, 编码由 245 个氨基酸组成的蛋白质; TGase 的氨基酸序列与 NCBI 公布的 *B.subtilis* 的 TGase 相似性达 94%~100%。用 *B.subtilis* 表达载体 pTZ 和 *E.coli* 表达载体 pET21b 分别构建了含 *tgl* 的重组质粒, 转化 *B.subtilis* WB800 和 *E.coli* BL21, *tgl* 基因表达产物在 70℃ 下可催化 BSA 交联, 表明 *tgl* 在 *B.subtilis* 和 *E.coli* 中获得了表达且表现出 TGase 活性, 这为其在食品工业上的开发利用打下基础。

**关键词:** 谷氨酰胺转氨酶, 枯草芽孢杆菌, 克隆和表达, 16S rDNA

## Isolation and identification of a transglutaminase producing strain and its *tgl* cloning and expression

ZHANG Ying-ying<sup>1</sup>, SHI Nan<sup>1,2</sup>, DU Ping-ping<sup>1</sup>, SHEN Pei-li<sup>1</sup>, LI Zhi-hui<sup>1</sup>, YU Hong-wei<sup>1</sup>,  
LU Hai-qiang<sup>1</sup>, SU Xu-dong<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, TAN Jian-xin<sup>1,\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Engineering Research Center of Hebei Province  
for Agricultural Products Processing, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

**Abstract:** By using the dilution plate method, 166 bacterial strains isolated from soil samples and one strain, TGase1318, which could produce transglutaminase, was obtained after screening with gel formation method and Folk's colorimetry method. The strain was identified as *Bacillus subtilis* according to the morphology, physiological and biochemical characters as well as 16S rDNA sequence homological analysis. The *tgl* gene, which was a 738 bp long nucleotide, was cloned from the strain and encoded a 245 residue long TGase. Homological analysis of TGase peptide sequence revealed that it shared 94%~100% conservation with TGase of other *B.subtilis* strains released by NCBI. The expression recombinant plasmids pTZ-tgl and pET21b-tgl were constructed and transformed into *B.subtilis* WB800 and *E.coli* BL21, respectively. The results of BSA crosslink at 70℃ indicated the *tgl* gene was expressed in both *B.subtilis* and *E.coli* with TGase activity. This study laid a foundation for the application of TGase from *B.subtilis* TGase1318 to food industry.

**Key words:** transglutaminase; *Bacillus subtilis*; cloning and expression; 16S rDNA

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)11-0141-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.11.020

谷氨酰胺转氨酶 (Transglutaminase, 简称 TGase, EC2.3.2.13) 是一种催化酰基转移反应的酶。它以肽链中谷氨酰胺残基的  $\gamma$ -羧酰胺基作为酰基供体, 酰基受体可以是多肽链中赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基、伯胺基或水。通过催化食品中的蛋白质的交联反应, 从

而改善其凝胶性、黏度、乳化性等物理性质, 在食品加工过程中有广泛应用<sup>[1]</sup>。谷氨酰胺转氨酶存在于动物、植物和微生物中, 相对于动、植物来源的 TGase 的分离、提取、纯化工艺复杂、回收率低、成本过高等缺点, 微生物源的 TGase 可通过发酵法制备, 具有产

收稿日期: 2014-08-25

作者简介: 张莹莹 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物学。

\* 通讯作者: 檀建新 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物资源开发与利用。

基金项目: 多谷物主食冷冻面团的关键技术研究 (13227105D); 植物多酚类功能性物质对 A (形成的影响 (冀人社字 [2010] 195 号))。

量高、易回收、成本低、不受季节限制等优点,更适合工业化生产和应用<sup>[2]</sup>。

利用生物技术将编码 TGase 的基因克隆并在适当受体微生物中表达,是提高 TGase 产量的有效途径。目前,微生物谷氨酰胺转氨酶(Microbial transglutaminase, MTG)表达的研究主要集中在对放线菌的 *tgl* 基因的克隆与表达上<sup>[3-5]</sup>。Kikuchi<sup>[6]</sup>等人利用 *Corynebacterium glutamicum* 构建了分泌型表达质粒,可以直接表达具有酶活性的 TGase,通过优化发酵条件,使产量达到 142mg/mL。有关枯草芽孢杆菌 TGase 的报道不少,但主要集中于 TGase 在芽孢形成时促进胞衣蛋白之间的交联作用<sup>[7-8]</sup>,而对 *tgl* 基因克隆和表达则鲜有报道<sup>[9]</sup>。鉴于芽孢的抗热性,其 TGase 可能有较高的最适温度,较放线菌来源的 TGase 可能更适合高温条件下的食品加工。如果能够通过基因工程的手段获得高效表达源于 *Bacillus* 的 TGase 的重组菌株,则其将会在食品工业中起到重要的作用。

本研究从土壤中分离并筛选出产 TGase 的菌株,克隆了其 *tgl* 基因,导入了枯草芽孢杆菌和大肠杆菌进行表达,为提高 TGase 表达量提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

土壤样品 河北省保定地区,取地表 5~15cm 之间的土壤,装入无菌袋中 4℃ 保存; *E.coli* BL21 购自宝生物工程(大连)有限公司; *B. subtilis* WB800, pET21b 和 pTZ 表达载体 为本实验室保存;重组质粒 pET21b-*tgl*, pTZ-*tgl* 和 TGase 表达菌株 BL21-pET1b-*tgl*, WB800-pTZ-*tgl* 为本研究构建;试剂 CBZ-Gln-Gly、盐酸羟胺、还原性谷胱甘肽、L-谷氨酸- $\gamma$ -单羟肟酸 均购自 Sigma 公司,其余试剂均为国产分析纯试剂;质粒提取试剂盒,胶回收试剂盒, pMD19-T 载体和限制性内切酶等分子生物学试剂 购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR 试剂、100bp marker (2000、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100bp)、1kb marker(10、8、6、5、4、3、2、1kb) 购自北京康为世纪生物科技有限公司。

紫外分光光度仪 上海光谱仪器有限公司; JY96-IIIN 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技有限公司; DYY-8C 电泳仪 北京六一仪器厂; BINDA 2020D 凝胶成像系统 北京宾达英创科技有限公司。

### 1.2 培养基

Luria-Bertani (LB) 培养基:胰蛋白胨 10.0g/L、酵母粉 5.0g/L、NaCl 10.0g/L、琼脂粉 15.0g/L、蒸馏水 1000mL, pH8.0。

发酵培养基:蛋白胨 20.0g/L、可溶性淀粉 20.0g/L、酵母粉 2.0g/L、MgSO<sub>4</sub> 2.0g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0g/L、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0g/L、蒸馏水 1000mL, pH7.0

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 产酶菌株的分离与筛选

1.3.1.1 细菌的分离、纯化 利用稀释涂布平板法<sup>[10]</sup>在 LB 平板上分离土壤样品中的细菌,30℃ 下培养 2~3d,根据菌落形状、大小、颜色等特征进行初步归

类,每一类随机挑取单菌落划线纯化,并保存于 4℃ 冰箱中备用。

1.3.1.2 初筛 将分离的菌种分别于 LB 液体培养基中活化后,转接至含 5mL 发酵培养基的试管中,于 30℃、200r/min 培养 6d 后利用凝胶法初筛产酶菌株<sup>[11]</sup>。

1.3.1.3 复筛 对初筛选出的菌株用比色法进行复筛,测定上清液的谷氨酰胺转氨酶活力。谷氨酰胺转氨酶活力测定按照 Folk 的比色法<sup>[12]</sup>。终止反应后,12000r/min 离心,弃去沉淀,测上清液在 525nm 下的吸光度。一个 MTG 酶活单位(1U/mL)定义为 37℃ 下 1min 催化 1 $\mu$ mol 底物 CBZ-Gln-Gly 生成其单羟肟酸产物所需的酶量。

#### 1.3.2 菌株的鉴定

1.3.2.1 形态学观察和生理生化实验 菌株鉴定参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup>和《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[14]</sup>进行。

1.3.2.2 16S rDNA 序列系统进化树 按文献<sup>[15]</sup>提取菌株 TGase1318 基因组作为模板,用 16S rDNA 通用引物 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'扩增 16S rDNA。反应体系为:2 $\mu$ L 模板 DNA,上下游引物各 1 $\mu$ L, 2 $\times$  EsTaq MasterMix 10 $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 6 $\mu$ L。PCR 反应条件:94℃、预变性 10min, 94℃ 变性 45s、55℃ 退火 45s、72℃ 延伸 90s, 30 个循环, 72℃ 延伸 5min。PCR 产物经胶回收、连接、转化、质粒提取验证后由北京六合华大基因科技股份有限公司测序。将菌株 TGase1318 的 16S rDNA 序列经 GenBank 的 BLAST 检索进行系统发育分析,选取属内同源性较高的细菌的 16S rDNA 序列进行遗传距离计算,采用 MEGA 软件的 Neighbor-Joining 模型和 BioEdit 软件分析遗传距离并绘制系统发育树。

#### 1.3.3 *Tgl* 的克隆、测序和序列比对

1.3.3.1 *Tgl* 的 PCR 扩增和克隆 依据 NCBI 上已公布 *B. subtilis* 的 TGase 基因的起始序列,用 DNAMAN 设计引物,上游引物 *Tgl*-5: 5'-GCGGTCGACATGATTATTGTATCAGGAC-3'(下划线为 Sal I 酶切位点); *Tgl*-3: 5'-TAAAGCTTTTAGCGGACATGCGGAAAAG-3'(下划线为 Hind III 酶切位点)。扩增反应体系为 60 $\mu$ L: 基因组 DNA 2 $\mu$ L, 引物(10 $\mu$ mol/L)各 3 $\mu$ L, 2 $\times$  EsTaq MasterMix 30 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 22 $\mu$ L。PCR 反应条件:94℃、预变性 10min, 94℃ 变性 40s, 58℃ 退火 40s, 72℃ 延伸 1min, 25 个循环, 72℃ 终延伸 10min。将 PCR 产物克隆入 p-MD-19T 的 Sal I 和 Hind III 位点之间,测序。

1.3.3.2 蛋白序列分析 利用 NCBI BLAST、DNAMAN 软件分析 TGase1318 氨基酸序列。利用欧洲分子生物学开放软件包 EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite),在线调用 pepstats 后,输入 TGase1318 的 TGase 氨基酸序列,得到其一级结构和一些基本参数。用 AntheProt 软件分析蛋白的等电点和蛋白二级结构,分别预测其  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角、无规则卷曲的百分含量。利用

Phyre<sup>2</sup> 软件对该菌株 TGase 进行蛋白的保守域和三级结构预测。

1.3.3.3 重组质粒 pTZ-tgl 和 pET-21b-tgl 的构建 重组质粒 pTZ-tgl 和 pET21b-tgl 的构建步骤如图 1 所示,用 Sal I 和 Hind III 双酶切 1.3.3.1 中的 tgl PCR 产物和载体 pTZ、pET21b,经酶切胶回收后的 tgl 基因片段分别与载体 pTZ 和 pET21b 连接,转化 *E.coli* JM109。将验证正确的重组质粒命名为 pTZ-tgl 和 pET21b-tgl。

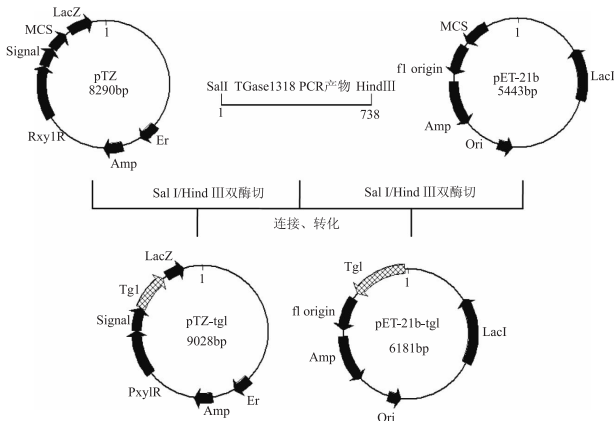


图1 表达载体 pTZ-tgl 和 pET-21b-tgl 的构建流程简图

Fig.1 Flow chart of the construction of expression vectors pET-21b-tgl and pTZ-tgl

1.3.3.4 重组质粒在 *E.coli* BL21 和 *B.subtilis* WB800 中的转化 取重组质粒 pTZ-tgl 加入已制备好的 *B.subtilis* WB800 的感受态细胞<sup>[16-17]</sup>中,至终浓度约 1 μg/mL,37℃ 静置 1h 后 200r/min 振荡培养 3h,转化液涂布在含有红霉素 (10 μg/mL) LB 平板上,培养过夜。挑取阳性转化子验证后命名为 WB800-pTZ-tgl。

将重组质粒 pET-21b-tgl 用热击法转化 *E.coli* BL21 感受态细胞,涂布于含 100 μg/mL 的氨苄青霉素 LB 平板上,经 37℃ 培养,挑取阳性转化子验证后命名为 BL21-pET21b-tgl。

1.3.4 Tgl 在 *E.coli* 和 *B.subtilis* 中的表达和 BSA 交联反应 将 WB800-pTZ-tgl 和 BL21-pET21b-tgl 分别转接至 20mL 含有红霉素 (10 μg/mL) 或氨苄青霉素 (100 μg/mL) 的 LB 液体培养基中,37℃、200r/min 震荡培养到 OD<sub>600</sub> 为 0.5 时,分别加入终浓度为 2% 的 D-Xylose 和 1mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG),诱导 24h 后收集菌体。

将诱导后的 WB800-pTZ-tgl 发酵液离心收集上清作为粗酶液,参照 1.3.1.3 方法测定谷氨酰胺转氨酶的活性;同时将 60 μL 粗酶液与 30 μL BSA (1mg/mL)<sup>[18]</sup>于 70℃ 保温不同时间,取 30 μL 进行 SDS-PAGE 电泳分析。

将培养的 BL21-pET21b-tgl 用 IPTG (1mmol/L) 诱导后收集菌体,重悬于 1mL Tris-HCl (20 μmol/L, pH8.0) 缓冲液中超声破碎制备成粗酶液,取 400 μL 粗酶液按 1.3.1.3 测定 TGase 的活性;取 20 μL 粗酶液进行 SDS-PAGE 电泳来判定表达产物的大小和多少;同时取 60 μL 粗酶液与 30 μL BSA (1mg/mL) 在

70℃ 保温不同时间,取 20 μL 进行 SDS-PAGE 电泳分析。以未经 IPTG 诱导的 BL21-pET21b-tgl 菌裂解液作为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 TGase1318 的分离和鉴定

2.1.1 产 TGase 的芽孢杆菌的分离 经稀释平板法从土样中分离到 166 株细菌,用酪蛋白凝胶反应初筛得到 55 株细菌。将这些菌株经摇瓶培养用比色法测定 TGase 的活性,筛选到一株酶活为 0.11 ± 0.04U/mL 的菌株,与其他菌株相比,其活性最高,命名为 TGase1318,以此为出发菌株作进一步鉴定和异源表达分析。

2.1.2 菌株 TGase1318 的 16S rDNA 扩增和系统发育树的构建 以产酶菌株 TGase1318 的基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA 得到长度约为 1.5kb 的 DNA 片段,1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。将 16S rDNA 扩增片段测序,证明该片段长 1487bp。将该序列与多个 NCBI 公布的芽孢杆菌属的菌株 16S rDNA 序列进行比对,用 MEGA 软件构建了基于 16S rDNA 序列的系统发育树 (图 2),由图可知其 16S rDNA 序列与枯草芽孢杆菌 (*B.subtilis*) 的同源性高达 99% 以上,证明菌株 TGase1318 为 *B.subtilis*。

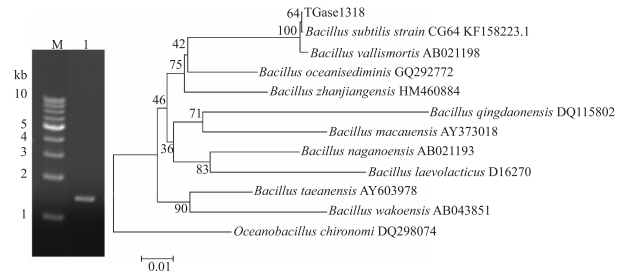


图2 菌株 TGase1318 的 16S rDNA 的 PCR 产物及其系统发育树

Fig.2 16S rDNA PCR product of the strain TGase1318 and its phylogenetic tree  
注:M:1kb Marker;1:16S rDNA PCR 产物。

2.1.3 菌株 TGase1318 的形态及生理生化特征 将菌株 TGase1318 在 LB 平板上培养,菌落呈圆形,乌白色,表面干燥,粗糙不透明,边缘不规则 (图 3)。挑取单个菌落镜检,该菌株为革兰氏阳性、直杆状细菌,在营养条件贫乏或生长条件不利的情况下形成芽孢 (图 3,箭头所指为芽孢)。将菌株 TGase 进行生理生化鉴定,结果见表 1。从菌落特征、个体形态和生理生化鉴定结果可知,该菌株为枯草芽孢杆菌,与 16S rDNA 结果一致,因此确定菌株 TGase1318 为 *B.subtilis*。

### 2.2 菌株 TGase1318 tgl 基因的克隆和表达

2.2.1 tgl 基因的克隆 通过已知 *B.subtilis* 的 tgl 序列设计引物,以 TGase1318 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,经过扩增后得到 DNA 条带大小约 740bp,PCR 产物回收后用 pMD-19 克隆 (图 4)。将 tgl 测序证明该基因编码区全长 738bp,与 GenBank 中已公布的 *B.subtilis* 的 tgl 基因序列比对,同源性在 93% ~ 99% 之间,该基因已在 GenBank 中注册 (Accession

表1 TGase1318的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain TGase1318

生理生化实验	产酸	产气	V·P实验	淀粉水解	马尿酸盐水解	明胶液化	葡萄糖利用	柠檬酸盐利用	乳糖利用	1% NaCl 利用	好氧生长	运动	水解酪素	精氨酸双水解酶	卵磷脂酶
结果	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

注: +:阳性;-:阴性。

number:1742195)。



图3 TGase1318在LB平板上的菌落形态、菌体及芽孢形态

Fig.3 The morphology of cell, spore and colony of the strain TGase1318 on LB plate The arrow point to the spore of TGase1318 strain

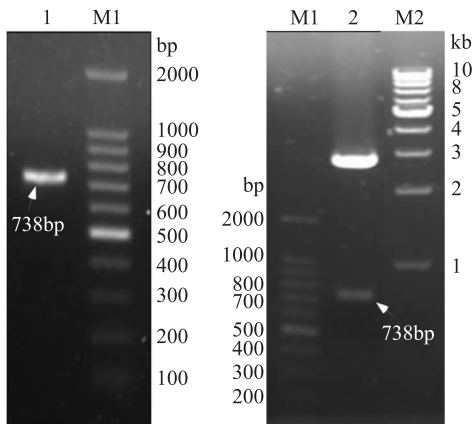


图4 菌株TGase1318的 tgl 基因的克隆

Fig.4 cloning of tgl gene from TGase1318 strain

注:1: tgl 基因 PCR 产物; 2: 经 Sal I/Hind III 酶切后的 pMD-19T-tgl; M1: 100bp Marker; M2: 1kb Marker。

2.2.2 tgl 编码蛋白质氨基酸序列及特性分析 由 tgl 基因序列推导出其编码的 TGase 由 245 个氨基酸残基组成, 包括了 20 种常见的氨基酸, 其中亮氨酸、异亮氨酸和丙氨酸含量最高, 分别占 11.43%、8.98%、7.76%。从氨基酸性质看, 该蛋白含 57.55% 的非极性氨基酸和 42.45% 的极性氨基酸, 其中极性氨基酸中碱性氨基酸占 13.47%, 酸性氨基酸占 11.43%。该蛋白分子量为 28.29ku, 预测的等电点为 pI 6.71, 为弱酸性蛋白。

根据氨基酸序列, 基于 GOR 法预测的蛋白质二级结构见图 5, 其中  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲分别占 44%、14%、21% 和 21%, 利用 Phyre<sup>2</sup> 软件预测的 TGase 三级结构见图 6, 它有四个  $\alpha$ -螺旋、两个  $\beta$ -折叠, 蛋白的保守区预测在蛋白质的中后段, 位于第 110~197 个氨基酸残基区域。将氨

基酸序列与 NCBI 公布的 TGase 进行 BLAST 比对, 表明该蛋白与现有 *B.subtilis* 的 TGase 同源性高达 94%~100%, 说明 *B.subtilis* 的 TGase 具有极强的保守性; 与其他芽孢杆菌属的 TGase 相比, 同源性多在 54%~75% 之间, 如与 *B.vallismortis*、*B.amyloliquefaciens*、*B.pumilus* 同源性分别为 91%、72% 和 54%。

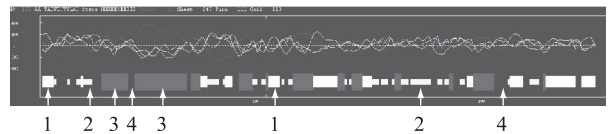


图5 tgl 编码蛋白 TGase 的二级结构预测图

Fig.5 The secondary structure prediction of TGase encoded by tgl gene

注: 1:  $\beta$ -折叠; 2:  $\beta$ -转角; 3:  $\alpha$ -螺旋; 4: 无规则卷曲。

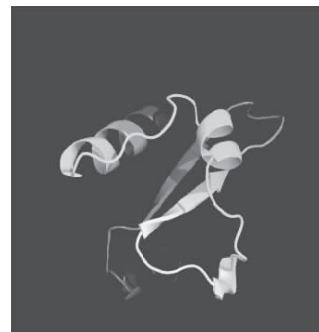


图6 tgl 编码蛋白 TGase 的三级结构预测图

Fig.6 The tertiary structure prediction of TGase1318 encoded by tgl gene

2.2.3 含 tgl 基因的表达载体 pTZ-tgl 和 pET21b-tgl 的构建 克隆的 tgl 基因和分泌型穿梭表达载体 pTZ、表达载体 pET21b 分别经 Sal I 和 Hind III 双酶切, 回收后的 tgl 和载体连接后分别构建重组质粒 pTZ-tgl 和 pET21b-tgl (图 1), 酶切分析结果证明两个重组质粒含有 tgl 基因(738bp) 和 pTZ(约 8300bp) (或 pET21b, 约 5440bp) 载体, 表明重组质粒构建成功(图 7)。

## 2.3 表达载体 pTZ-tgl 和 pET21b-tgl 在 *B.subtilis* WB800 和 *E.coli* BL21 中的诱导表达

将含分泌型表达载体 pTZ-tgl 的阳性菌株 WB800-pTZ-tgl 在含有红霉素(10 $\mu$ g/mL)的 LB 培养基中培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.5 时, 加入木糖诱导 24h 后离心收集上清, 测定谷氨酰胺转氨酶的活性。结果表明 TGase 酶活较低仅为 0.16  $\pm$  0.04U/mL, 与出发菌株相似, 但是粗酶液与 BSA 反应不同时间后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 可以看出表达的 TGase 能使

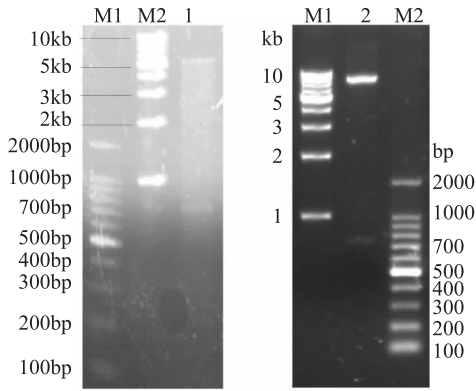


图7 含 *tgl* 基因表达载体的构建

Fig.7 Construction of expression vectors

(pET21b-*tgl* and pTZ-*tgl*) containing *tgl* gene

注: M1: 100bp Marker; M2: 1kb Marker

1: 经 Sal I/Hind II 酶切后的 pET21b-*tgl*;

2: 经 Sal I/Hind III 酶切后的 pTZ-*tgl*。

BSA 交联,并随时间延长交联程度增大(图8),说明该菌株表达且将 TGase 分泌到了培养基中。但是 SDS-PAGE 电泳分析发酵液,未发现明显的 TGase 条带,表明表达量较低。

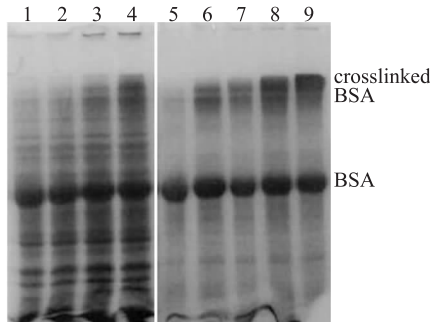


图8 TGase 对 BSA 的交联作用

Fig.8 The crosslink of BSA catalyzed by TGase

注: 1~4: BL21-pET21b-*tgl* 与 BSA 混合温育 0, 1, 3 and 6h;

5~9: WB800-pTZ-*tgl* 与 BSA 混合温育 0, 1, 3, 6 and 12h。

有鉴于此,我们进而将 *tgl* 基因在大肠杆菌中进行了表达,将含 pET21b-*tgl* 的阳性菌株 BL21-pET21b-*tgl* 在 LB 培养基中培养至 OD<sub>600</sub> 0.5 左右,加 IPTG 诱导,24h 后收集菌体并破碎,测定酶活为 0.45 ± 0.06U/mL,表明 TGase 在大肠杆菌中表达后活性得到很大提高。周建<sup>[19]</sup>、刘凯<sup>[20]</sup>等人将枯草芽孢杆菌转入大肠杆菌中诱导表达 TGase 后用 Folk 比色法难以测得 TGase 活性,本实验通过比色法在 WB800-pTZ-*tgl* 发酵液中测到了较低的活性,而大肠杆菌表达后活性显著增大,说明所构建的重组菌株 TGase 得到高效表达。将样品进行 SDS-PAGE 电泳,结果表明,与对照相比,诱导后 BL21-pET21b-*tgl* 在 28ku 处有一明显表达条带(图9),与 TGase 推测出的分子量相符,也与相关报道一致<sup>[21]</sup>,证明 *tgl* 在 BL21 中得到了很好的表达。将样品与 BSA 反应不同时间后进行 SDS-PAGE 电泳,结果表明随着反应时间延长,BSA 发生交联,分子量增大,不但在浓缩胶和分离胶之间形成明显的大分子量蛋白质交联

体,而且在点样孔中也发现了明显的蛋白沉积,且远多余 WB800-pTZ-*tgl* 发酵液与 BSA 反应的样品,表明 *tgl* 在大肠杆菌中较芽孢杆菌中表达效果更好,且活性明显。与周建<sup>[19]</sup>等人用重组 TGase 蛋白催化 BSA 交联的现象一致,并且本实验证明 TGase 在 70℃ 下具有高活性,与相关文章表述的该酶具有的高温活性相符<sup>[21-22]</sup>。

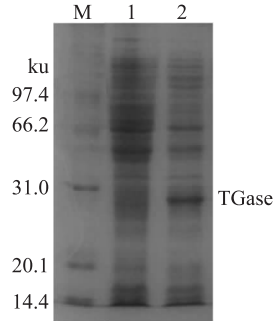


图9 *tgl* 基因在 *E. coli* BL21 中的表达

Fig.9 Expression of *tgl* in *E. coli* BL21

注: M: 低分子量蛋白 Marker; 1: 未经 IPTG 诱导的

BL21-pET21b-*tgl*; 2: 经 IPTG 诱导的 BL21-pET21b-*tgl*。

### 3 结论与讨论

通过凝胶法初筛及 Folk 比色法复筛,从土样中分离得到的 166 株细菌中筛选到一株产谷氨酰胺转氨酶的芽孢杆菌,命名为 TGase1318。通过 16S rDNA 序列比对、生理生化实验和形态学特征分析,鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌 (*B.subtilis*)。

用 PCR 法克隆了该菌株的 *tgl* 基因,该基因长 738bp,编码的 TGase 由 245 个氨基酸组成,分子量为 28.29ku, pI 6.71,与来自 *B.subtilis* 其他菌株的 TGase 相比有 94%~100% 的同源性。

构建了重组质粒 pTZ-*tgl* 和 pET-21b-*tgl*,并分别在 *B.subtilis* WB800 和 *E.coli* BL21 中成功地表达了 TGase, WB800-pTZ-*tgl* 发酵液和 BL21-pET21b-*tgl* 菌液都能在 70℃ 下催化 BSA 发生交联反应,大肠杆菌中活性达到 0.45 ± 0.06U/mL。

本研究对源于枯草芽孢杆菌的 *tgl* 基因成功地进行了异源表达,表达的 TGase 活性高于已有报道<sup>[19-20]</sup>,并且在 70℃ 下仍表现出明显的对 BSA 的交联作用,这一特性对高温下的食品加工有潜在的利用价值。但 *tgl* 在枯草芽孢杆菌中表达量较低,还有待进一步改善。

### 参考文献

- [1] Seguro K, Nio N, Motoki M. Some characteristics of a microbial protein cross-linking enzyme: Transglutaminase in macromolecular interaction in food technology [J]. American Chemical Society Symp Ser, 1996, 650: 271-280.
- [2] 邵虎,陶红军,黄亚东,等.谷氨酰胺转氨酶的研究进展 [J]. 中国酿造, 2010(6): 9-12.
- [3] Lin Y, Chao M, Liu C, et al. Cloning and expression of the transglutaminase gene from *Streptovorticillium ladakanum* in *Streptomyces lividans* [J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 591-598.

- [4] Lin Y, Chao M, Liu C, et al. Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans* [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 519-524.
- [5] Christian K M, Thomas C H, Markus P. Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 1543-1550.
- [6] Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K, et al. Secretion of active-form streptoverlicillium mobaraense transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albobovis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 358-366.
- [7] Monroe A, Setlow P. Localization of the transglutaminase cross-linking sites in the *Bacillus subtilis* spore coat protein GerG [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(21): 7609-16.
- [8] de Souza CF, de Matos GS, Flóres SH, et al. Environmental effects on transglutaminase production and cell sporulation in submerged cultivation of *Bacillus circulans* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 158(2): 302-12.
- [9] 李秀星, 戚薇, 王建玲. 枯草芽孢杆菌谷氨酰胺转氨酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. *食品研究与开发*, 2008, 29(6): 53-57.
- [10] 王陆玲, 金明晓, 宋阳成. 产谷氨酰胺转氨酶菌种的筛选鉴定[J]. *现代食品科技*, 2010, 26(12): 1297-1298.
- [11] 邱秀宝, 高东, 王颖达. 短小芽孢杆菌碱性蛋白酶 BP 的纯化和性质[J]. *微生物学报*, 1994, 34(4): 293-300.
- [12] Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline proteases: A review [J]. *Bioresource Technology*, 1998, 64: 175-183.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 354-385.
- [14] Buchanan R E, N E Gibbons. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. 8<sup>th</sup> edition. 1986: The Williams & Wilkins Company.
- [15] 闫丽娟, 赵春雷, 谢振荣, 等. 脂肪酶产生菌 *Aspergillus niger* NJY-1 的选育及鉴定 [J]. *生物技术*, 2009, 19(6): 17-20.
- [16] 李瑞芳, 薛雯雯, 黄亮, 等. 枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备及质粒转化方法研究 [J]. *生物技术通报*, 2011, 5: 227-230.
- [17] 陆雁, 王青艳, 朱绮霞, 等. 枯草芽孢杆菌高效转化及其转化子验证方法 [J]. *广西科学院学报*, 2012, 28(2): 117-119.
- [18] Plácido D, Fernandes C G, Isidro A, et al. Auto-induction and purification of a *Bacillus subtilis* transglutaminase (Tgl) and its preliminary crystallographic characterization [J]. *Protein expression and purification*, 2008, 59(1): 1-8.
- [19] 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.
- [20] 刘凯, 刘逸寒, 张艳, 等. 枯草芽孢杆菌谷氨酰胺转氨酶的异源表达 [J]. *天津科技大学学报*, 2012, 27(3): 1-5.
- [21] Eto Y, Hashiguchi K, Kobayashi K, et al. *Bacillus*-derived transglutaminase: U.S. Patent 5,731,183 [P]. 1998: 3-24.
- [22] 于小娜. 产谷氨酰胺转氨酶 (TGase) 菌株的分离、鉴定及 TGase 基因的克隆表达 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 1-76.
- (上接第 135 页)
- food engineering, 2007, 82(4): 418-426.
- [4] 朱俊晨, 翟迪升. 速冻饺子品质改良工艺的研究 [J]. *食品科学*, 2004, 25(3): 208-210.
- [5] 梁一楨. 馒头冷却工艺的研究与设计 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2012.
- [6] 吕莹果, 王励铭, 陈洁, 等. 冷冻面条的品质改良研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2012(5): 107-111.
- [7] 赵学伟, 秦潭洋. 微波-蒸汽联合加热过程中冻结馒头温度和水分变化 [J]. *粮食与油脂*, 2009(6): 23-25.
- [8] Huang S R, Yang J I, Lee Y C. Interactions of heat and mass transfer in steam reheating of starchy foods [J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 114(2): 174-182.
- [9] 林婉玲, 芮汉明, 曾庆孝. 莲蓉包热扩散特性的研究 [J]. *食品科学*, 2007, 27(12): 191-194.
- [10] 关志强. 食品冷冻冷藏原理与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [11] Hamdami N, Monteau J Y, Le Bail A. Heat and mass transfer in par-baked bread during freezing [J]. *Food research international*, 2004, 37(5): 477-488.
- [12] 孙丽丽, 董银卯, 李丽, 等. 红豆生物活性成分及其制备工艺研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(4): 390-392.
- [13] 郑宝东, 郑金贵, 曾绍. 我国主要莲子品种营养成分的分
- 析 [J]. *营养学报*, 2003, 25(2): 153-156.
- [14] Datta A K. Porous media approaches to studying simultaneous heat and mass transfer in food processes. II: Property data and representative results [J]. *Journal of food engineering*, 2007, 80(1): 96-110.
- [15] 王欢欢. 热历史对馒头品质的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [16] Murthy C T, Rao P N. Thermal diffusivity of idli batter [J]. *Journal of food engineering*, 1997, 33(3): 299-304.
- [17] Magee T R A, Bransburg T. Measurement of thermal diffusivity of potato, malt bread and wheat flour [J]. *Journal of Food Engineering*, 1995, 25(2): 223-232.
- [18] Kostaropoulos A E, Saravacos G D. Thermal diffusivity of granular and porous foods at low moisture content [J]. *Journal of Food Engineering*, 1997, 33(1): 101-109.
- [19] 韩文芳, 王欢欢, 李江涛, 等. 复热方式对冷冻馒头质构和消化特性的影响 [J]. *中国粮油学报*, 2013, 28(4): 93-96.
- [20] 林向阳, 何承云, 阮榕生, 等. MRI 研究冷冻馒头微波复热过程水分的迁移变化 [J]. *食品科学*, 2005, 26(8): 82-86.
- [21] Bárcenas M E, Rosell C M. Effect of frozen storage time on the bread crumb and aging of par-baked bread [J]. *Food Chemistry*, 2006, 95(3): 438-445.