

人工设计二硫键增强谷氨酰胺转胺酶热稳定性

刘中美, 杜坤, 周哲敏*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 对 *S. hygroscopicus* 来源的谷氨酰胺转胺酶(microbial transglutaminase, MTG) 进行分子改造, 在 MTG 的 N 端区域引入二硫键, 增强其热稳定性。通过序列比对与结构分析、运用 Disulfide by Design 软件, 构建含有二硫键的突变体 MTG(4-284)。在 55 °C 下处理 10 min, MTG(4-284) 可以保持 95% 的酶活, 而原始酶 MTG 仅剩 15% 的酶活。圆二色谱检测结果显示 MTG 和 MTG(4-284) 的 T_{50} 分别为 58 和 65 °C。以上结果对 MTG 的分子水平的深入研究提供了基础, 同时进一步满足其工业化应用的需求。

关键词: 谷氨酰胺转胺酶; 二硫键; 热稳定性

中图分类号: Q 55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)10—1057—05

Enhancement of the Thermostability of Transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* by Engineering a Disulfide Bond

LIU Zhongmei, DU Kun, ZHOU Zhemin*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, transglutaminase (MTG) from *S. hygroscopicus* was molecularly modified to improve the thermostability. Mutant MTG (4-284) containing a disulfide bond in the N-terminal region was constructed through sequence alignment, structure analysis and the software Disulfide by Design. After treatment at 55 °C for 10 min, MTG (4-284) remained 95% activity whereas MTG only retained 15% activity. The T_{50} values of MTG and MTG (4-284) were 58 and 65 °C, respectively. Results in this study could improve genetic reconstruction and promote the industry application of MTG.

Keywords: transglutaminase, disulfide bond, thermostability

谷氨酰胺转胺酶(Transglutaminase, TGase, EC 2.3.2.13)是一种能够催化酰基转移反应的酶。它可以催化谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基与各种酰基受

体发生反应, 实现蛋白质分子内、分子间交联, 从而极大地改变蛋白质的性质^[1]。TGase 广泛应用于食品行业、生物医药、组织工程、纺织和皮革处理等多个

收稿日期: 2014-09-17

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金(第 47 批); 江苏省博士集聚计划人才项目(2013)。

作者简介: 刘中美(1978—), 女, 山东蓬莱人, 理学博士, 副教授, 主要从事生物酶学与蛋白质工程研究。E-mail: zliu@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 周哲敏(1969—), 男, 河北石家庄人, 工学博士, 教授, 主要从事生物酶学与酶工程研究。E-mail: zhmzhou@jiangnan.edu.cn

领域^[2-3]。由于 TGase 的卓越催化功能而倍受越来越多的研究者的青睐,它被誉为“21 世纪超级粘合剂”。

对 TGase 的研究可以追溯到 50 年前,美国生物化学家 Heinrich Waelsch 在人脑和肝脏提取物中首次发现具有酰胺基转移催化功能的 TGase 酶^[3]。微生物来源的 TGases (Microbial TGase, MTG) 是 1989 年日本味之素公司首次发现的,由土壤中分离出的茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraense*)产生^[4]。与其它来源的 TGase 相比,MTG 具有非 Ca^{2+} 依赖性、温度和 pH 稳定性高等特点^[5-6]。此外,MTG 生产周期短、产量高、成本低,易于工业化生产。*S. mobaraense* 来源的 MTG 一级氨基酸序列于 1993 年被测定^[7],由 331 个氨基酸组成,与动物来源的 TGase 相比,二者序列相似度低。*S. mobaraense* MTG 的晶体结构于 2002 年被解析,二级结构属于 $\alpha+\beta$ 型,含 11 个 α -螺旋及 8 个 β -折叠;催化活性基团 Cys64、Asp255 和 His274 均位于分子裂缝底部^[8]。

目前,微生物来源的 MTG 已经实现了商品化 (ActivaTM),ActivaTM 中每克粉末中含有 100 个单位的酶活,但是其中只有体积分数 1% 的蛋白,体积分数 99% 的是麦芽糖糊精。麦芽糖糊精的作用是增强 MTG 的稳定性和使产品易于操作^[9],因为酶的热稳定性越好,在应用过程中可耐受的操作温度越高,反应速率越快,成本也就越低。德国马丁路德大学的 Pietzsch 研究组利用随机突变和饱和突变等技术,提高了 *S. mobaraense* 来源的 MTG 的热稳定性。研究表明,影响 MTG 热稳定性的突变点大都集中在 MTG 的 N 端区域^[10]。

作者参考 Pietzsch 研究组的实验结果,采用理性设计手段,通过分子生物学技术、结构分析软件、分子模拟等手段对 *Streptomyces hygroscopicus* 来源的 MTG 进行分子改造。通过结构比对和序列分析,并借助二硫键预测软件 Disulfide by design,在 MTG 的 N 端区域引入二硫键,使 MTG 的热稳定性得到提高,进一步促进其工业化应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 质粒 pET22b-pro-MTG、*E. coli* BL21(DE3) 和 *E. coli* JM109 为本实验室保存。

1.1.2 试剂与仪器 N-carboxybenzoyl-L-

glutaminyl-glycine (N-CBZ-Gln-GLy)、L-谷氨酸- γ -单羟胺酸购自 Sigma 公司;中性蛋白酶 Dispase: 购自 Worthington 公司,PCR 引物:生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

紫外分光光度计(UV-1800):上海美谱达有限公司产品;HiTrap Q HP 和 HiTrap SP HP:GE 公司产品;AKTA avant:GE 公司产品;Millipore 超滤离心管 Ultra-15 3K,默克公司产品。

1.1.3 主要培养基 LB 培养基:10 g/L 蛋白胨,5 g/L 酵母提取物,10 g/L NaCl,pH 7.0。TB 培养基:12 g/L 蛋白胨,24 g/L 酵母提取物,体积分数 0.4% 甘油,17 mmol/L KH_2PO_4 ,72 mmol/L K_2HPO_4 ,pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 构建分泌表达载体 pET22b-pro-MTG (4-284) 以载体 pET22b-pro-MTG^[11] 为模板,D4C-up 和 D4C-down 为引物,进行全质粒 PCR,得到重组质粒 pET-pro-MTG (D4C)。以载体 pET-pro-MTG (D4C) 为模板,G284C-up 和 G284C-down 为引物,进行全质粒 PCR,获得重组质粒 pET-pro-MTG (4-284)。引物序列见表 1,质粒均经过测序验证。

表 1 研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequence
D4C-up	CCCGACGCTGCCTGCGAGAGGGTGACC
D4C-down	CTCGGCAGGAGGGCACACCCTCTC
G284C-up	GAAGAGCAGCGATGCAAGCTGTCC
G284C-down	GCCGTAGGACAGCTTGCATCGCTGCTCTTC

1.2.2 重组蛋白酶的诱导表达 将转化子接于含有 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 °C 过夜培养后转接至 TB 培养基中(含有 4 g/L 葡萄糖和 50 mg/L 氨苄青霉素),37 °C 条件下培养至 OD_{600} 为 0.5~0.6,加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,20 °C 条件下诱导 40 h。

1.2.3 酶原活化与蛋白质纯化 参照报道^[12],收集发酵液,并在发酵液中加入终质量浓度为 5 mg/L 的中性蛋白酶 Dispase,37 °C 保温 1 h,活化 pro-MTG 和 pro-MTG (4-284)。活化完成后,硫酸铵沉淀法(硫酸铵浓度 55%~75%)收集目标蛋白,复溶于 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0)。

将复溶液经过层析柱 HiTrap SP HP 分离纯化,用含 0.5 mmol/L NaCl 的磷酸钾缓冲液(pH 6.0)进

行线性洗脱。收集含有目标蛋白的峰,并将收集的样品于 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中透析过夜。将透析样品离心取上清,注入 HiTrap Q HP 离子柱,并用含有 0.5 mmol/L NaCl 的 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液进行线性洗脱,收集目标蛋白。用 SDS-PAGE 凝胶电泳来检测目标蛋白纯度, Bradford 法检测蛋白质浓度。

1.2.4 检测蛋白的二硫键含量 参照文献^[13],将蛋白 MTG 和 MTG(4-284),分别稀释在含有和不含有还原剂(10 mmol/L DTT)的溶液 A(80 mmol/L 磷酸钾缓冲液,质量分数 2% SDS,pH 8.0)中,在沸水中煮 10 min 使蛋白变性。用超滤离心管(Millipore Ultra-15 3K)浓缩蛋白,同时用溶液 A 洗去 DTT,然后取样测蛋白质浓度。测定各样品的吸光度值,计算各样品在有 DTT 和无 DTT 存在时,半胱氨酸含量的变化,进而算出二硫键的含量。

1.2.5 酶学性质与热稳定性测定 将重组 MTG 和 MTG(4-284)分别在 37、45、50、55、65 °C 下处理 10 min,然后在冰上冷却 30 min。以 N-CBZ-Gln-GLy (30 mmol/L)为底物,用比色法测定 MTG 酶活^[14]。一个单位谷氨酰胺转氨酶酶活的定义为:37 °C 时每分钟催化形成 1 μmol L⁻¹谷氨酸-γ-单羟基肟酸的酶量。

1.2.6 圆二色谱 用 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液稀释至蛋白质质量浓度为 0.2 mg/mL,通过 MOS-450/AF-CD 分光偏振计分别测定重组 MTG 和 MTG(4-284)的 T_{50} 值。吸收池宽 10 mm,检测波长为 222 nm,温度范围为 40~80 °C。

1.2.7 抗胰蛋白酶降解测试 将纯化后的蛋白样品稀释至 0.5 mg/mL 并分别加入终浓度为 0.1 U/mL 的胰蛋白酶。37 °C 保温 3 h,每隔 0.5 h 取样一次,用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白的降解程度。

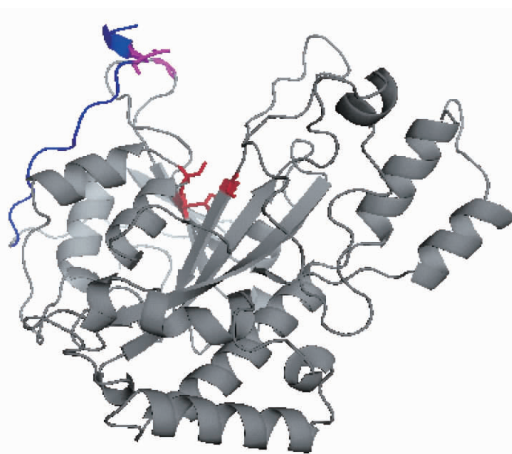
1.2.8 同源建模 通过 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>)对来源于 *S. hygroscopicus* 的 MTG 进行同源建模,具体方法参见网站上的说明。模板为来源于 *Streptomyces mobaranesis* 的 MTG (1IU4),两者之间的氨基酸序列同源性为 79.2%。利用 PROCHECK (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>)对模型空间结构的准确性进行评估,结果显示所有的氨基酸都是在合理的位置,表明构建的模型准确性较高。

2 结果与讨论

2.1 MTG 上二硫键位置的选取及质粒构建

S. mobaraense 来源的 MTG 的 N 端区域对于 MTG 的热稳定性起着很关键的作用^[10]。*S. hygroscopicus* 和 *S. mobaraense* 来源的 MTG 的序列同源性高达 79.2%,因此推断 *S. hygroscopicus* 来源的 MTG 的 N 端区域对其热稳定性同样重要,在该区域设计二硫键预期可以提高其稳定性。

通过同源建模获得 *S. hygroscopicus* 来源的 MTG 的三维结构图(图 1)。选定 N 端的 Loop 区作为改造的目标,利用 Disulfide by Design 软件在目标区域预测二硫键的氨基酸位点,结果显示在 D4 和 G284 之间可能形成二硫键。构建突变体质粒 pET-pro-MTG(4-284),以检测二硫键对 MTG 热稳定性的影响。



■为 N 端 Loop 区域;■为二硫键预测位点 D4、G284;■为催化活性基团 C64、D255、H274。

图 1 三维结构图

Fig. 1 3D structure comparison of MTG

2.2 MTG 和 MTG(4-284)的表达、活化与纯化

MTG 和 MTG(4-284)进行胞外表达,经过中性蛋白酶 Dispase 活化、硫酸铵分级沉淀(质量分数 55%~75%)、阳离子层析和阴离子层析后,获得了纯度较高的 MTG 和 MTG(4-284),SDS-PAGE 结果如图 2 所示。

2.3 MTG 和 MTG(4-284)的二硫键数量测定

二硫键的数量是通过对比 MTG 和 MTG(4-284)在还原性环境(经 DTT 处理)和非还原性环境(未经 DTT 处理)下的巯基含量来确定的^[13]。结果如

表 2 所示,MTG 在经 DTT 处理前后,其巯基含量基本没有变化。每个 MTG 内只含有 1 个巯基,这和已知的蛋白序列只含一个半胱氨酸相一致。MTG(4-284)在经 DTT 处理后,检测到的巯基含量约是 DTT 处理前的 3 倍,这说明经 DTT 处理后,一个二硫键被打开了,进而释放出了两个巯基。实验结果表明 MTG(4-284)内形成了一个二硫键。

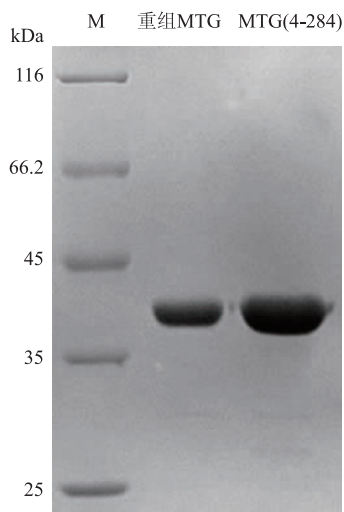


图 2 纯化蛋白电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified proteins

表 2 MTG 和 MTG(4-284)的二硫键数量

Table 2 Disulfide numbers of MTG and MTG(4-284)

样品	DTT 处理前 [SH]/MTG / (mol/mol)	DTT 处理后 [SH]/MTG / (mol/mol)	二硫键数量
MTG	0.87	0.85	0
MTG(4-284)	2.89	0.81	1

2.4 MTG 和 MTG(4-284)的热稳定性比较

将 MTG 和 MTG(4-284)在 37、45、50、55、60 °C 分别下处理 10 min,再冰浴 30 min,进行酶活检测。如图 3 所示,MTG 和 MTG(4-284)在 45 °C 处理 10 min 后,酶活基本没有降低,表明在该温度下 MTG 的热稳定性较好。MTG 在 50~60 °C 的环境下酶活随着温度的升高而迅速降低,而 MTG(4-284)在 55 °C 下处理 10 min 后,仍然保留 95% 的酶活,表明 MTG(4-284)的热稳性有了很大的提高。

圆二色谱技术测定 MTG 和 MTG(4-284)的 T_{50} 分别为 58 和 65 °C (图 4),表明 MTG(4-284)的蛋白质在变性和解折叠过程中所需的温度均有所提高,

反映出其热稳定性提高了。这与热处理后检测酶活的结果一致。以上结果表明在 *S. hygroscopicus* 来源的 MTG 的 N 端区域引入二硫键可以提高其热稳定性。

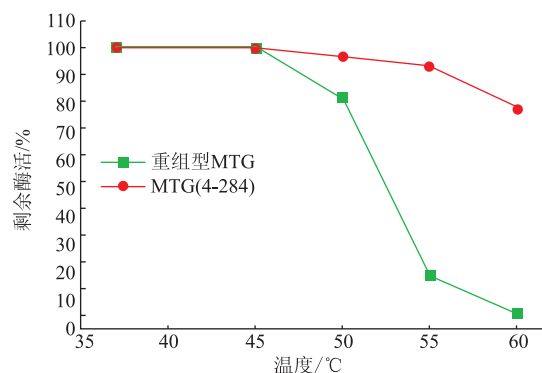


图 3 MTG 和 MTG(4-284)的热稳定性

Fig. 3 Thermostability of MTG and MTG (4-284) at different temperature

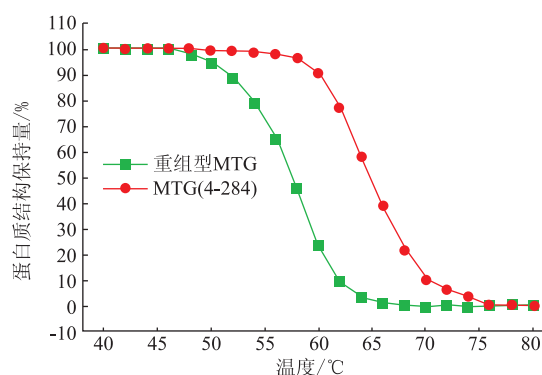


图 4 MTG 和 MTG(4-284)的 T_{50}

Fig. 4 The T_{50} of MTG and MTG(4-284)

2.5 MTG 和 MTG(4-284)的抗胰蛋白酶降解能力比较

胰蛋白酶经常被用来检测蛋白酶的抗降解能力。从图 5 中可以看出,MTG 在经过 3 h 的胰蛋白酶处理后,目标条带基本消失,在 27 000 左右出现一个明显条带。而 MTG(4-284)在处理 3 h 后,依然有着比较明显的条带,下方也没有出现降解的蛋白条带。以上结果显示 MTG(4-284)抗胰蛋白酶降解的能力明显增强。

MTG(4-284)热稳性和抗蛋白酶降解的能力都有所提高,进一步表明在 N 端引入二硫键有效的提高了 MTG(4-284)的稳定性。

3.6 MTG 和 MTG(4-284)的酶学性质比较

MTG(4-284)的比酶活略低于 MTG; K_m 和 k_{cat}

的结果显示,引入的二硫键使得 k_{cat} 变化略大, K_m 值变化很小,表明二硫键的引入基本没有影响酶与底物的结合,而是底物进入活性中心后,酶分子完成催化所需的时间受到了一定的影响;MTG(4-284)在热稳定性提高的同时,最适反应温度也有所提高。

3 结 语

作者通过在 MTG 的 N 端区域人工设计并引入二硫键,有效提高了其稳定性。圆二色谱检测结果表明二硫键的引入使得其 T_{50} 由 58 提高至 65 °C;酶活力检测结果表明二硫键的引入导致比酶活略有下降,由 13.3 U/mg 下降为 12.5 U/mg;酶动力学参数表明二硫键的引入没有影响酶与底物的结合过程,而是影响了底物进入活性中心后的催化过程。作者研究结果表明 *S. hygroscopicus* 来源的 MTG 的 N 端区域对于其稳定性重要影响,而该区域相对远离活性中心,也比较适合进行分子改造。

参考文献:

- [1] Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. Properties and applications of microbial transglutaminase [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2004, 64(4): 447-454.
- [2] Santos M, Torne J M. Recent patents on transglutaminase production and applications; a brief review[J]. **Recent Pat Biotechnol**, 2009, 3(3): 166-174.
- [3] Beninati S, Bergamini C M, Piacentini M. An overview of the first 50 years of transglutaminase research [J]. **Amino Acids**, 2009, 36(4): 591-598.
- [4] Ando H, Adachi M, Umeda K, et al. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms[J]. **Agric Biol Chem**, 1989, 53(10): 2613-2617.
- [5] 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]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2010, 87(6): 2087-2096.
- [6] Heck T, Faccio G, Richter M, et al. Enzyme-catalyzed protein crosslinking [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2013, 97(2): 461-475.
- [7] Kanaji T, Ozaki H, Takao T, et al. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain s-8112 [J]. **J Biol Chem**, 1993, 268(16): 11565-11572.
- [8] Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K, et al. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense* [J]. **J Biol Chem**, 2002, 277(46): 44252-44260.
- [9] Sommer C, Hertel T C, Schmelzer C E, et al. Investigations on the activation of recombinant microbial pro-transglutaminase; in contrast to proteinase K, dispase removes the histidine-tag[J]. **Amino Acids**, 2012, 42(2-3): 997-1006.
- [10] Mark C K, Hertel T C, Pietzsch M. Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat-sensitive variants[J]. **J Biotechnol**, 2008, 136(3-4): 156-162.
- [11] 杜坤, 周丽, 堵国成, 等. 内含肽介导谷氨酰胺转氨酶酶原的活化[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 90-94.
DU Kun, ZHOU Li, DU Guocheng, et al. Intein-mediated activation of transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* [J]. **Food Science**, 2013, 34(9): 90-94. (in Chinese)
- [12] LIU S, ZHANG D, WANG M, et al. The pro-region of *Streptomyces hygroscopicus* transglutaminase affects its secretion by *Escherichia coli*[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2011, 324(2): 98-105.
- [13] Jeong M Y, Kim S, Yun C W, et al. Engineering a de novo internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236[J]. **J Biotechnol**, 2007, 127(2): 300-309.

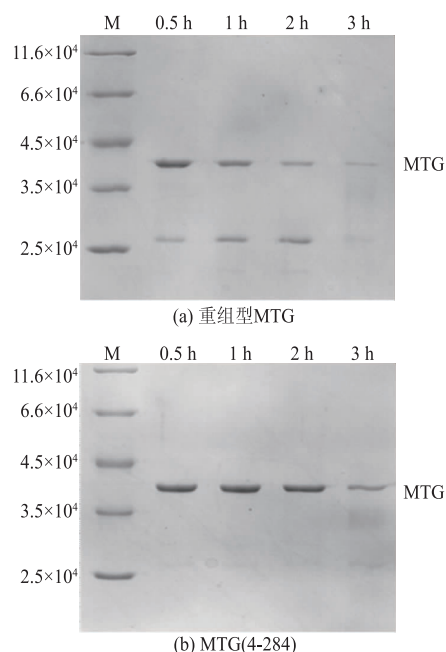


图 5 MTG(a)和 MTG(4-284)(b)抗胰蛋白酶降解比较
Fig. 5 Trypsin-resistance of MTG(a) and MTG(4-284)(b)