

文章编号:1673-1689(2005)02-0041-05

生物转化法生产茶氨酸的重组大肠杆菌的构建

郭亮^{1,2}, 沈微¹, 王正祥¹, 诸葛健¹

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036; 2. 南昌大学 中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘要: 为构建生物转化法生产茶氨酸的基因工程菌, 作者分析了影响大肠杆菌高效表达 γ -谷氨酰基转肽酶的几个主要因素. 将大肠杆菌 JM109 的 *ggt* 基因接入两种不同的质粒中后, 转化大肠杆菌 JM109, 并在一定的条件下进行表达. 通过对比 *E. coli* JM109 和转化子的 γ -谷氨酰基转肽酶表达活性的不同, 探讨了 *ggt* 基因的拷贝数、启动子的强弱等几个因素对 γ -谷氨酰基转肽酶高效表达的影响. 实验表明, 将含有自身信号肽和启动子的 *E. coli* JM109 的 *ggt* 基因接入高拷贝的质粒 pUC18 中, 仅提高 *ggt* 基因的拷贝数不能增加 γ -谷氨酰基转肽酶的表达量. 将含有自身信号肽但不含有自身启动子的 *E. coli* JM109 的 *ggt* 基因接入具有 *tac* 启动子的表达载体 pEtac 中, 发现在强启动子 *tac* 的控制下, γ -谷氨酰基转肽酶的表达量提高至出发菌株的 2.3 倍. 将构建的工程菌用于生物转化法生成茶氨酸, 底物转化率相应地提高至出发菌株的 1.7 倍.

关键词: γ -谷氨酰基转肽酶; 高效表达; 茶氨酸

中图分类号: Q 933

文献标识码: A

Construction of Recombinant *E. coli* for Producing Theanine

GUO Liang^{1,2}, SHEN Wei¹, WANG Zheng-xiang¹, ZHUGE Jian¹

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Several key factors supposed to affect the expression of γ -glutamyl transpeptidase in *Escherichia coli* was studied for construction of recombinant *E. coli* to product theanine. Recombined plasmid pUC18-ggt($s^+ p^+$) was generated by intergrating whole *ggt* gene of *E. coli* JM109 with its own promoter and signal sequence into plasmid pUC18. Recombined plasmid pEtac-ggt($s^+ p^-$) was generated by intergrating *ggt* gene of *E. coli* JM109 without its own promoter into plasmid pEtac. The recombinant *E. coli* JM109 harboring pUC18-ggt($s^+ p^+$) exhibits the same γ -glutamyl transpeptidase activity as *E. coli* JM109 in periplasm, while the recombinant *E. coli* JM109 harboring pEtac-ggt($s^+ p^-$) exhibits 2.3 times' γ -glutamyl transpeptidase activity of *E. coli* JM109 in periplasm. The same conversion rate of glutamine to theanine was determined when glutamine and ethylamine were converted into theanine by cell suspension of *E. coli* JM109 and recombinant *E. coli* JM109 harboring pUC18-ggt($s^+ p^+$) respectively, while the conversion rate of glutamine when converted by cell suspension of the recombinant *E. coli* JM109 harboring pEtac-ggt($s^+ p^-$) was about 1.7 times higher than that

收稿日期: 2004-03-08; 修回日期: 2004-04-16.

作者简介: 郭亮(1974-), 男, 江西南昌人, 助理研究员, 工学硕士.

万方数据

converted by cell suspension of *E. coli* JM109.

Key words: γ -glutamyl transpeptidase; overexpression; theanine

γ -谷氨酰基转肽酶(GGT)是谷胱甘肽代谢途径中的一个关键酶,广泛分布在活体组织中。它既可以催化 γ -谷氨酰基化合物上的 γ -谷氨酰基团转移至氨基酸、多肽等受体上,也可以催化 γ -谷氨酰基化合物的水解反应生成 γ -谷氨酸。在大肠杆菌中,此酶在自身信号肽的介导下被转运至周质空间中发挥其生理作用。目前,已有多种细菌中的 γ -谷氨酰基转肽酶被用作生物转化法合成目的化合物的生物催化剂^[1]。茶氨酸是天然茶叶中的一种具有保健功能的风味物质,有广泛的应用价值。谷氨酰胺和乙胺在细菌的 γ -谷氨酰基转肽酶的催化作用下可以发生转谷氨酰基反应得到茶氨酸^[2]。为了得到能用于生物转化法生产茶氨酸的微生物,必须提高微生物中 γ -谷氨酰基转肽酶的表达量。作者构建了高效表达 γ -谷氨酰基转肽酶的重组大肠杆菌,其转化生成茶氨酸的能力也相应地提高。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

宿主菌 *Escherichia coli* JM109; *Escherichia coli* JM109 染色体 DNA; 表达载体 pUC18; 作者所在实验室保藏; 表达载体 pEtac; 作者所在实验室构建^[3]。

1.2 酶和试剂

TaqDNA 聚合酶、限制性内切酶、CIAP、T4 连接酶、核酸标准相对分子质量 Marker 等为宝生物工程(大连)有限公司产品。PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶中回收 DNA 片断的试剂盒; 上海华舜生物工程有限公司产品。

扩增 *E. coli* JM109 中 γ -谷氨酰基转肽酶基因的引物如下。引物 P1: 5'-ACCGGAAT-TCGTCTGACTGGAAGAATATCTACAGG-3'; P2: 5'-ACCGGAATTCGTCTGACCGTAAGAAT-CAGAAGTCG-3'; P3: 5'-ACCGGAATTCAT-GATAAAACCGACGTTT-3'。

其中 P1 与 γ -谷氨酰基转肽酶基因的下游序列互补。P2、P3 分别在不同部位与该基因的上游序列互补; P2 的互补序列位于 γ -谷氨酰基转肽酶基因自身启动子的上游; P3 的互补序列位于 γ -谷氨酰基转肽酶基因自身信号肽的上游,自身启动子的下游。引物 P1、P2 和 P3 的 5' 端分别引入了 *Sal*I、*Sal*I、

*Eco*RI 3 个限制性酶切位点。

1.3 PCR 扩增

以 P1、P2 为引物的 PCR 反应条件为: 以 *E. coli* JM109 染色体 DNA 为模板, 在 50 μ L PCR 反应混合液中含 10 倍缓冲液 5 μ L, dNTP(各 2.5 mmol/L) 4 μ L, 20 mmol/L 引物各 4 μ L, 模板 1.5 μ L, Taq 酶 1 μ L, 用无菌水调整至 50 μ L。95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 循环参数: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s; 52 $^{\circ}$ C 退火 90 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s; 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min 使产物延伸完全。

以 P1、P3 为引物的 PCR 反应条件在上述条件的基础上略加改变即可。

1.4 DNA 重组、转化及阳性转化子的筛选

1) 以 P1、P2 为引物的 PCR 反应产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化, *Sal*I 酶切后电泳分离回收约 2.0 kb 的 PCR 产物, 并与经相同酶切的载体 pUC18 连接后转化 *E. coli* JM109, 在含有 X-gal、IPTG 以及 200 μ g/mL 氨卞青霉素的 LB 平板上检出转化子, 提取质粒, 酶切电泳鉴定, 所获质粒是目的重组质粒 pUC18-ggt(s⁺p⁺)。

2) 以 P1、P3 为引物的 PCR 反应产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化, *Sal*I、*Eco*RI 酶切后电泳分离回收约 1.9 kb 的 PCR 产物, 并与经相同酶切的载体 pEtac 连接后转化 *E. coli* JM109, 在含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上检出转化子, 提取质粒, 酶切电泳鉴定, 所获质粒是目的重组质粒 pEtac-ggt(s⁺p⁻)。

1.5 重组质粒在大肠菌中的表达

1.5.1 携带 pUC18-ggt(s⁺p⁺) 的 *E. coli* JM109 转化子的培养条件 转化子纯化后接种含 200 μ g/mL 氨卞青霉素的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h 后按体积分数 2% 接种量接种至含 200 μ g/mL 氨卞青霉素的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h 后仍按体积分数 2% 接种量接种至含 200 μ g/mL 氨卞青霉素的 LB 液体培养基中, 20 $^{\circ}$ C 振荡培养 40 h 后测定 γ -谷氨酰基转肽酶酶活。

1.5.2 携带 pEtac-ggt(s⁺p⁻) 的 *E. coli* JM109 转化子的培养条件 转化子纯化后接种至含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 $A_{600\text{nm}}$ 约为 0.4 时, 加入 IPTG 至终质量浓度为 0.5 mg/mL, 诱导 4 h 后测定 γ -谷氨酰基转肽酶酶活^[3]。

1.6 *E. coli* JM109 的培养条件

E. coli JM109 纯化后接种至 LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养 12 h 后按体积分数 2% 接种至 LB 液体培养基, 30 °C 振荡培养 12 h 后仍按体积分数 2% 接种至 LB 液体培养基, 20 °C 振荡培养 40 h 后测定 γ -谷氨酰基转肽酶活性^[4].

1.7 周质蛋白分离方法

渗透压法^[5].

1.8 酶活测定方法

参照文献^[4].

1.9 生物转化生成茶氨酸的反应条件

将培养好的发酵液用 4 000 r/min 离心 15 min, 用去离子水洗涤一次, 再离心 15 min, 弃去上清液, 按一定比例用缓冲液悬浮沉淀, 制备菌体悬浮液. 1 mL 转化反应体系中, 含湿菌体 1 mg, 谷氨酰胺 20 mmol/L, 乙胺 150 mmol/L, pH 10, 37 °C 孵育 24 h^[2].

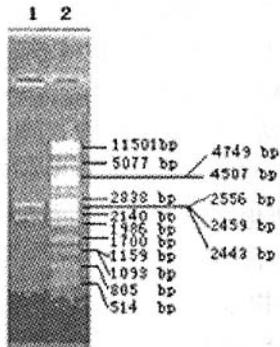
1.10 茶氨酸检测条件

参照文献^[6].

2 结 果

2.1 重组质粒 pUC18-ggt(s⁺p⁺) 的构建及其转化子培养物的 γ -谷氨酰基转肽酶酶活

以 *E. coli* JM109 染色体 DNA 为模板, 用 P1、P2 作为引物进行 PCR 扩增, 电泳表明, PCR 产物在约 2.0 kb 处形成一明亮的条带, 没有杂带. 将扩增产物酶切纯化后与 pUC18 连接得到重组质粒 pUC18-ggt(s⁺p⁺). 用 *Sal*I 酶切重组质粒 pUC18-ggt(s⁺p⁺), 酶切产物用琼脂糖凝胶电泳分析, 结果见图 1. 图谱分析表明, 酶切产物含有大小约为 2.7 kb 和 2.0 kb 的两种片段, 符合 pUC18-ggt(s⁺p⁺) 应有的特征, 重组质粒构建成功.



1. pUC18-ggt(s⁺p⁺)/*Sal*I; 2. DNA marker λ -DNA/*ps*tI.

图 1 重组质粒 pUC18-ggt(s⁺p⁺) 的酶切鉴定

Fig. 1 Analysis of the recombined plasmid pUC18-ggt(s⁺p⁺) 芯片数据

按照 1.6 的方法培养 *E. coli* JM109, 按照 1.5.1 中的方法培养携带有 pUC18 的 *E. coli* JM109 转化子以及携带有 pUC18-ggt(s⁺p⁺) 的 *E. coli* JM109 转化子, 分别测定培养液和细胞周质内的 γ -谷氨酰基转肽酶活性, 见表 1. 结果表明, 上述各种培养物的培养基中检测不到 GGT 活性. 用 *t*-检验评估不同菌株培养物周质内的比酶活之间差异的显著性, 结果 $P > 0.05$, 表明 *E. coli* JM109、携带有 pUC18 的 *E. coli* JM109 转化子和携带有 pUC18-ggt(s⁺p⁺) 的 *E. coli* JM109 转化子的周质内的比酶活几乎相同.

按照 1.9 的方法转化谷氨酰胺和乙胺生成茶氨酸, 按照 1.10 的方法检测条件测定茶氨酸. 将生成的茶氨酸的量除以反应体系中初始的谷氨酰胺的量得到谷氨酰胺的转化率, 见表 1. 用 *t*-检验评估不同菌株培养物的转化率之间差异的显著性, 结果 $P > 0.05$, 表明携带有 pUC18-ggt(s⁺p⁺) 的 *E. coli* JM109 转化子转化生成茶氨酸的能力与出发菌株 *E. coli* JM109 相比没有显著性地改变.

表 1 各菌株培养物的 γ -谷氨酰基转肽酶活性分析

Tab. 1 Detection of γ -glutamyl transpeptidase expressed by

E. coli JM109 and recombinant

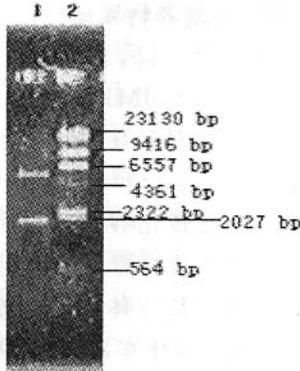
<i>E. coli</i> JM109 携带的质粒	培养基中比酶活/(U/mg)	周质中比酶活/(U/mg)	谷氨酰胺转化率/%
无	0	0.464 ± 0.033	1.78 ± 0.13
pUC18	0	0.447 ± 0.026	1.71 ± 0.12
pUC18-ggt(s ⁺ p ⁺)	0	0.450 ± 0.031	1.73 ± 0.15

2.2 重组质粒 pEtag-ggt(s⁺p⁻) 的构建及其转化子培养物的 γ -谷氨酰基转肽酶酶活

以 *E. coli* JM109 染色体 DNA 为模板, 用 P1、P3 作为引物进行 PCR 扩增, 电泳表明, PCR 产物在 1.9 kb 处形成一明亮的条带, 没有杂带. 将扩增产物酶切纯化后与 pEtag 连接得到重组质粒 pEtag-ggt(s⁺p⁻). 用 *Sal*I、*Eco*RI 酶切重组质粒 pEtag-ggt(s⁺p⁻), 酶切产物用琼脂糖凝胶电泳分析, 结果见图 2. 图谱分析表明, 酶切产物含有大小约为 4.5 kb 和 1.9 kb 的两种片段, 符合 pEtag-ggt(s⁺p⁻) 应有的特征, 重组质粒构建成功.

按照 1.6 的方法培养 *E. coli* JM109, 按照 1.5.2 的方法培养携带有 pEtag 的 *E. coli* JM109 转化子以及携带有 pEtag-ggt(s⁺p⁻) 的 *E. coli* JM109 转化子, 分别测定培养液和细胞周质内的 γ -谷氨酰基转肽酶活性, 见表 2. 结果表明, 上述各种培养物的培养基中均检测不到 GGT 活性. 用 *t*-检

验评估不同菌株培养物周质内的比酶活之间差异的显著性,结果 $P > 0.05$, 表明 *E. coli* JM109、携带有 pEtac 的 *E. coli* JM109 转化子的周质内的比酶活几乎相同. 而携带有 pEtac-ggt($s^+ p^-$) 的 *E. coli* JM109 转化子的周质内的比酶活约为前两者的 2.3 倍.



1. pEtac-ggt($s^+ p^-$)/*Sa*I + *Eco*RI; 2. DNA marker λ -DNA/*Hind*III

图2 重组质粒 pEtac-ggt($s^+ p^-$) 的酶切鉴定

Fig. 2 Analysis of the recombinated plasmid pEtac-ggt($s^+ p^-$)

按照 1.9 的方法转化谷氨酰胺和乙胺生成茶氨酸,按照 1.10 的检测条件测定茶氨酸. 将生成的茶氨酸的量除以反应体系中初始的谷氨酰胺的量得到谷氨酰胺的转化率,见表 2. 结果表明,携带有 pEtac-ggt($s^+ p^-$) 的 *E. coli* JM109 转化子转化生成茶氨酸的能力是出发菌株的 1.7 倍.

表2 各菌株培养物的 γ -谷氨酰基转肽酶活性分析

Tab. 2 Detection of γ -glutamyl transpeptidase expressed by *E. coli* JM109 and recombinant

<i>E. coli</i> JM109 携带的质粒	培养基中比酶活/(U/mg)	周质中比酶活/(U/mg)	谷氨酰胺转化率/%
无	0	0.464 ± 0.033	1.78 ± 0.13
pEtac	0	0.441 ± 0.050	1.67 ± 0.17
pEtac-ggt($s^+ p^-$)	0	1.065 ± 0.034	2.98 ± 0.11

3 讨论

构建具有经济价值的基因工程菌,通常需要建立基因的高效表达系统. 影响基因高效表达的因素非常复杂,大致可以从转录、翻译以及翻译后的处理 3 个水平对活性蛋白质的表达进行调控. 大肠杆菌中的 γ -谷氨酰基转肽酶是一种以溶解状态存在于周质空间中的非糖基化酶,由大小两个亚基组成,相对分子质量分别约为 39 000 和 20 000. 这两个亚基由共同的 γ -谷氨酰基转肽酶前体经过翻译

后的加工形成^[7]. 因此,GGT 的高活性表达与转录的强弱、信号肽的强弱及翻译后的加工均密切相关.

3.1 γ -谷氨酰基转肽酶基因的拷贝数对 γ -谷氨酰基转肽酶表达量的影响

pUC18 是一种高拷贝的质粒,将含有自身启动子及信号肽编码序列的 γ -谷氨酰基转肽酶的完整基因接入 pUC18 后,携带有 pUC18-ggt($s^+ p^+$) 的 *E. coli* JM109 转化子中 *ggt* 基因的拷贝数得以大量提高,但是并不改变该酶原有的转录调控元件和介导翻译产物进入周质空间的信号肽. 因此通过比较 pUC18-ggt($s^+ p^+$) 的 *E. coli* JM109 转化子和 *E. coli* JM109 量的 GGT 表达量可以判断基因的拷贝数对 γ -谷氨酰基转肽酶表达量的影响. 结果表明,在原有的调控序列的作用下,仅仅提高 *ggt* 基因的拷贝数不能使细胞的 GGT 活性发生显著性的改变,转化子转化生成茶氨酸的能力没有改变. 可能的原因是 *ggt* 基因剂量的增加并不能导致其转录或翻译水平的提高.

3.2 强启动子对 γ -谷氨酰基转肽酶表达量的影响

表达载体 pEtac 同时含有 *tac* 启动子和 *lacI* 基因,因此它可以产生更高浓度的阻遏蛋白,降低载体上 *tac* 启动子下游基因的本底表达,从而避免因酶过量表达产生的毒性影响细胞生长. 而在用 IPTG 诱导后可以使目的基因在强启动子 *tac* 的作用下高表达,目前该载体已成功用于 α -淀粉酶基因和 1,3-丙二醇氧化还原酶基因在 *E. coli* JM109 中的高表达^[3]. 将含有自身信号肽编码序列,但不含自身启动子的 γ -谷氨酰基转肽酶基因接入 pEtac 的 *tac* 启动子下游的适当位置得到重组质粒 pEtac-ggt($s^+ p^-$). 携带有 pEtac-ggt($s^+ p^-$) 的 *E. coli* JM109 转化子中 *ggt* 基因可以在强启动子 *tac* 的作用下大幅度提高转录水平. 通过比较携带有 pEtac-ggt($s^+ p^-$) 的 *E. coli* JM109 转化子和 *E. coli* JM109 的 GGT 表达活性可以判断强启动子 *tac* 对 γ -谷氨酰基转肽酶表达活性的影响. 结果表明,在 *tac* 启动子的作用下转化子的周质内的比酶活较出发菌株有明显增加,其转化生成茶氨酸的能力也相应地明显提高. 由此可知,GGT 表达在转录水平受到调控,通过提高 *ggt* 结构基因上游启动子的效率可以使细胞产 GGT 的能力明显提高. 而高产 γ -谷氨酰基转肽酶的重组菌转化生成茶氨酸的能力也相应地增强. 相信通过改进产酶条件和生物转化条件,基因工程菌的转化生成茶氨酸的能力应该可以进一步得到提高. 因此通过提高 *ggt* 结构基因上游启动子

的效率可以构建得到用于生物转化法生产茶氨酸的工程菌。

虽然构建的重组菌产 γ -谷氨酰基转肽酶的能力有明显提高,但是与其它利用 pEtac 构建的重组菌中目的蛋白表达量的提高倍数相比,GGT 活性的提高倍数较低。GGT 是周质蛋白,因此它的翻译后的加工过程,如信号肽的切除、大小亚基的形成、蛋白质的折叠等均发生在周质空间中。如果 GGT 前体不能顺利到达周质空间,可能造成 GGT 在胞内的积累,反馈抑制 GGT 的合成。即使在强启动子的作用下大量提高了 GGT 前体的生成量,也会因

为 GGT 前体不能顺利转运而大部分以未切去信号肽的前体分子形式聚集在胞内或结合在内膜内侧形成包涵体。因此翻译后的转运和加工过程也是提高大肠杆菌中 GGT 表达活性的影响因素,很可能是 GGT 前体转运效率的偏低限制了强启动子提高细胞 GGT 活性的能力。为考察转运过程对提高 GGT 表达活性的影响,可以将既不含有自身信号肽编码序列,也不含自身启动子的 γ -谷氨酰基转肽酶基因接入同时具有强启动子和强信号肽序列的载体来表达 *ggt* 基因,以观察在强启动子和强信号肽协同作用下 γ -谷氨酰基转肽酶的表达活性。

参考文献:

- [1] Hiromichi M. Salt-tolerant γ -Glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2003, 32: 431—438.
- [2] Suzuki H. Enzyme production of theanine, an umami component of tea, from glutamine and ethylamine with bacterial γ -Glutamyltranspeptidase[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002, 31: 884—889.
- [3] 沈微,王正祥,唐雪明,等. 古细菌 *Pyrococcus furiosus* 嗜热 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中的分泌表达[J]. **中国酿造**, 2003, 124: 12—14.
- [4] Suzuki H, Kumagai H, Tochikura T. γ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12 purification and properties[J]. **J Bacteriol**, 1986, 168: 1325—1331.
- [5] Novagen Inc. pET System Manual[M]. Wisconsin: Novagen Inc, 2000.
- [6] Varuzhan H Abelian. A novel method of production of theanine by immobilized *pseudomonas nitroreducens* cells[J]. **Biosci Biotech Biochem**, 1993, 57(3): 481—483.
- [7] Suzuki H, Kumagai H. Autocatalytic processing of γ -Glutamyl transpeptidase[J]. **J Biol Chem**, 2002, 277: 43536—43543.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 40 页)

参考文献:

- [1] 庄毅. 中国药用真菌概况[J]. **中国食用菌**, 2001, 20(2): 3—5.
- [2] 李师鹏,安利国. 真菌多糖免疫活性的研究进展[J]. **菌物系统**, 2001, 20(4): 581—587.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国药典[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995.
- [4] 李平作. 灵芝深层发酵生产生物活性物质的研究[D]. 无锡:无锡轻工大学, 1997.
- [5] 何国亮. 灵芝饮品中灵芝肽多糖含量的测定[J]. **营养学报**, 1998, 20(1): 102—104.
- [6] Anello J D, Baugher J E, Paul E, *et al.* Direct and indirect methods for molar-mass analysis of fragments of the capsular polysaccharide of haemophilus influenzae type[J]. **Analytical Biochemistry**, 1997, 250: 280.
- [7] 张惟杰. 复合多糖生化技术(第二版)[M]. 杭州:浙江大学出版社, 1999.
- [8] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用[M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [9] 李雁群. 中药的灵芝发酵及其产物抗乙肝活性的研究 [D]. 无锡:江南大学, 2004.

(责任编辑:李春丽)